

公告本

843162

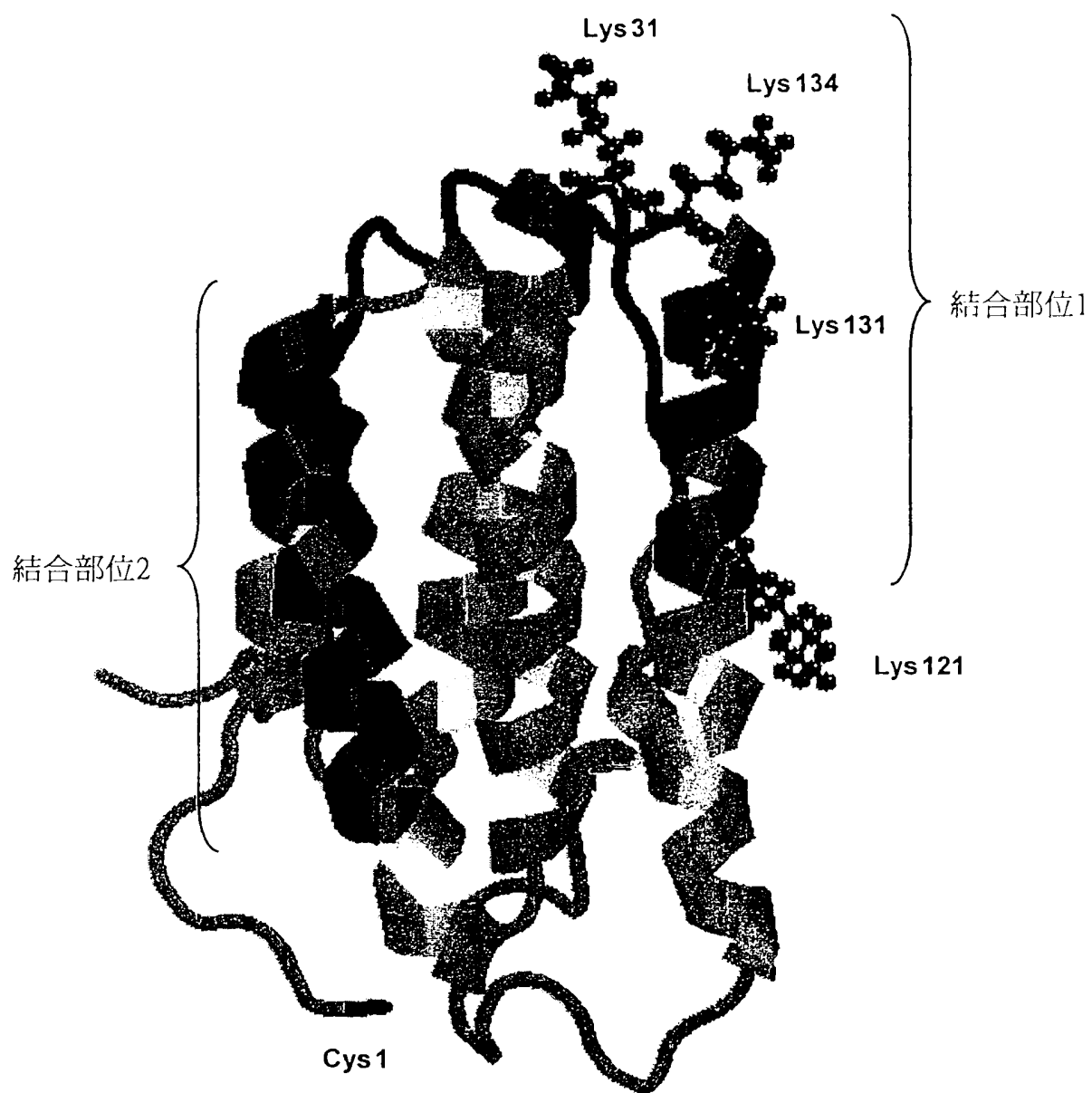
干擾素- α -2a

圖 1a

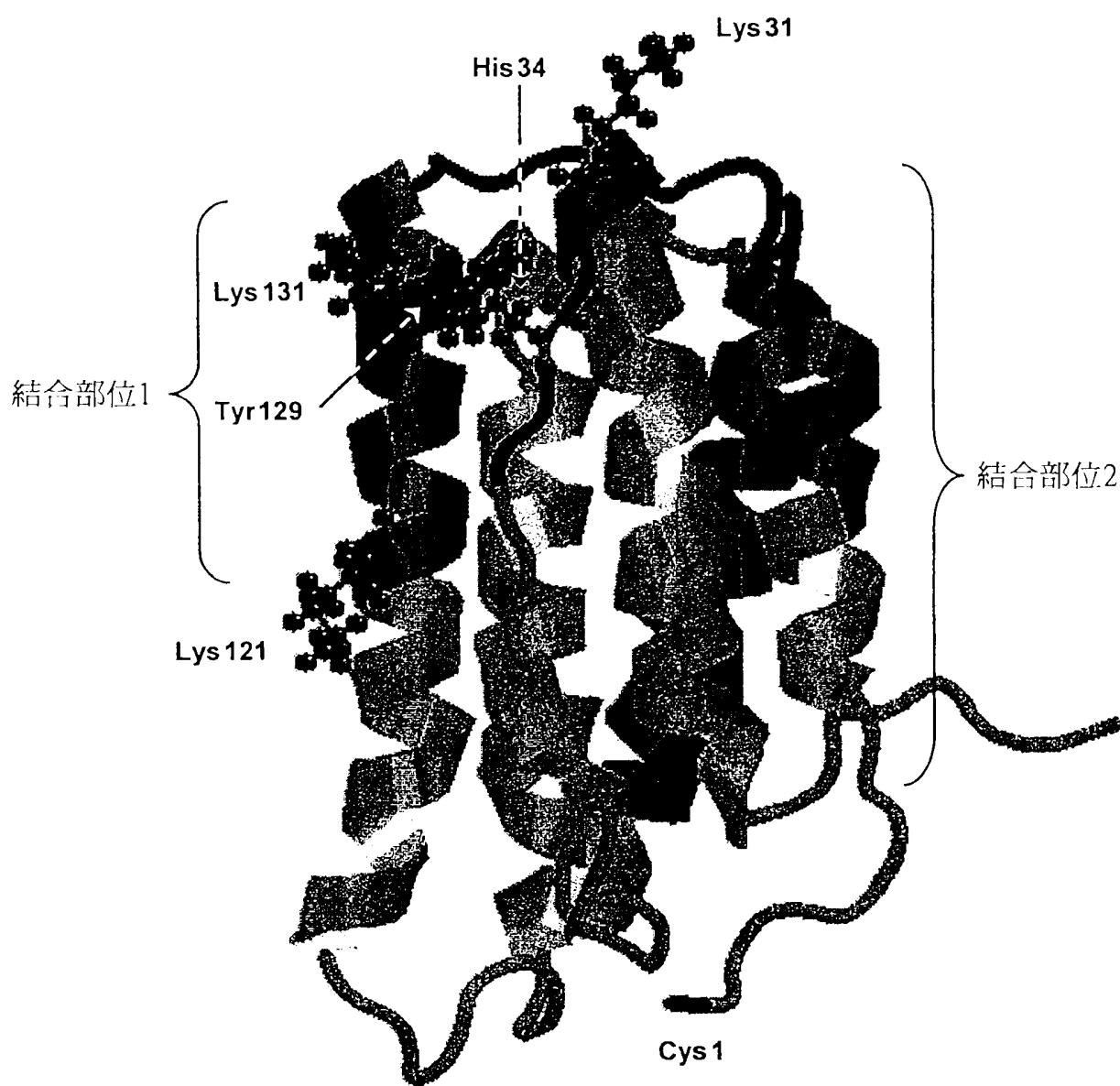
干擾素- α -2b

圖 1b

干擾素- α -2b

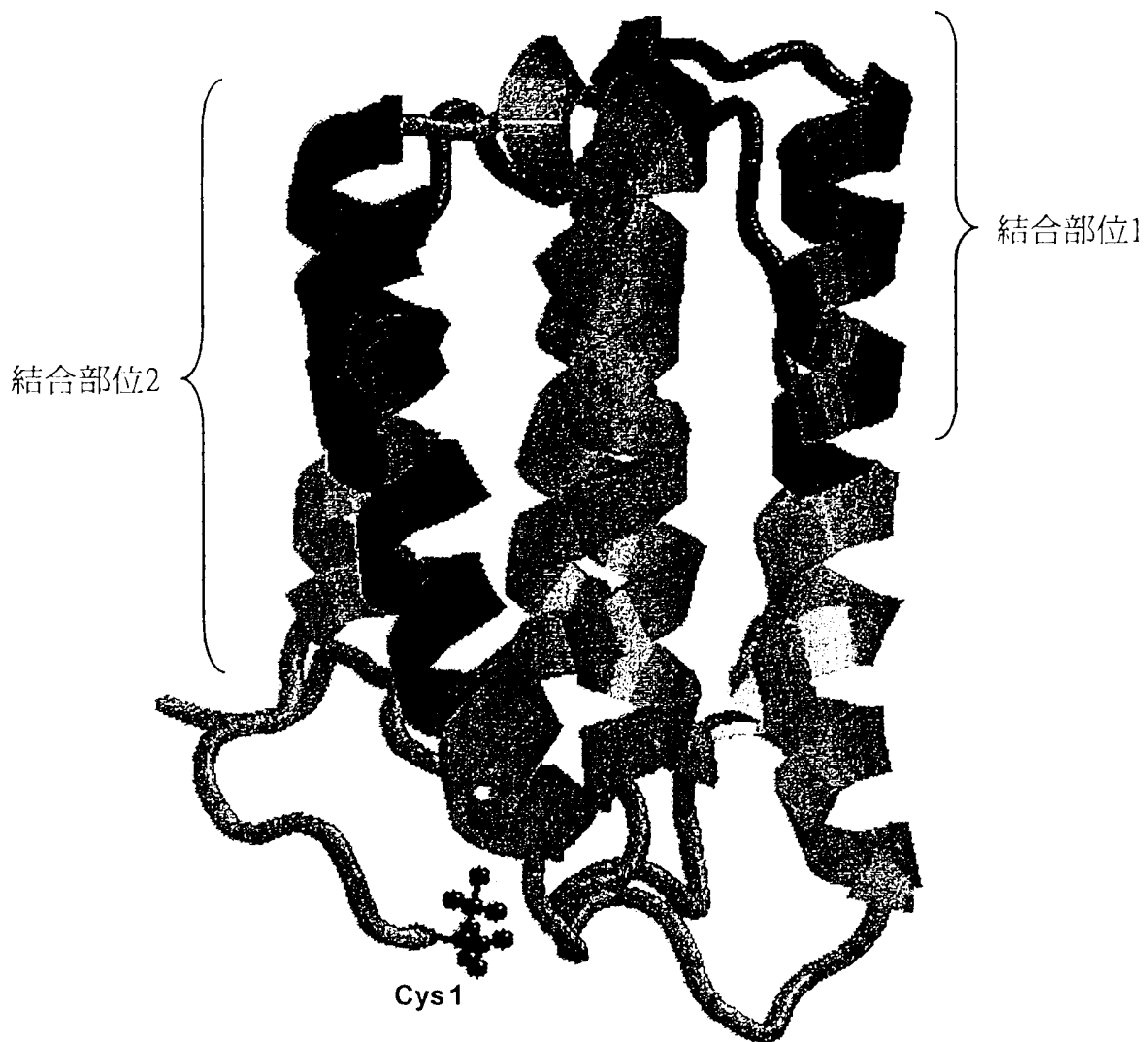


圖1c

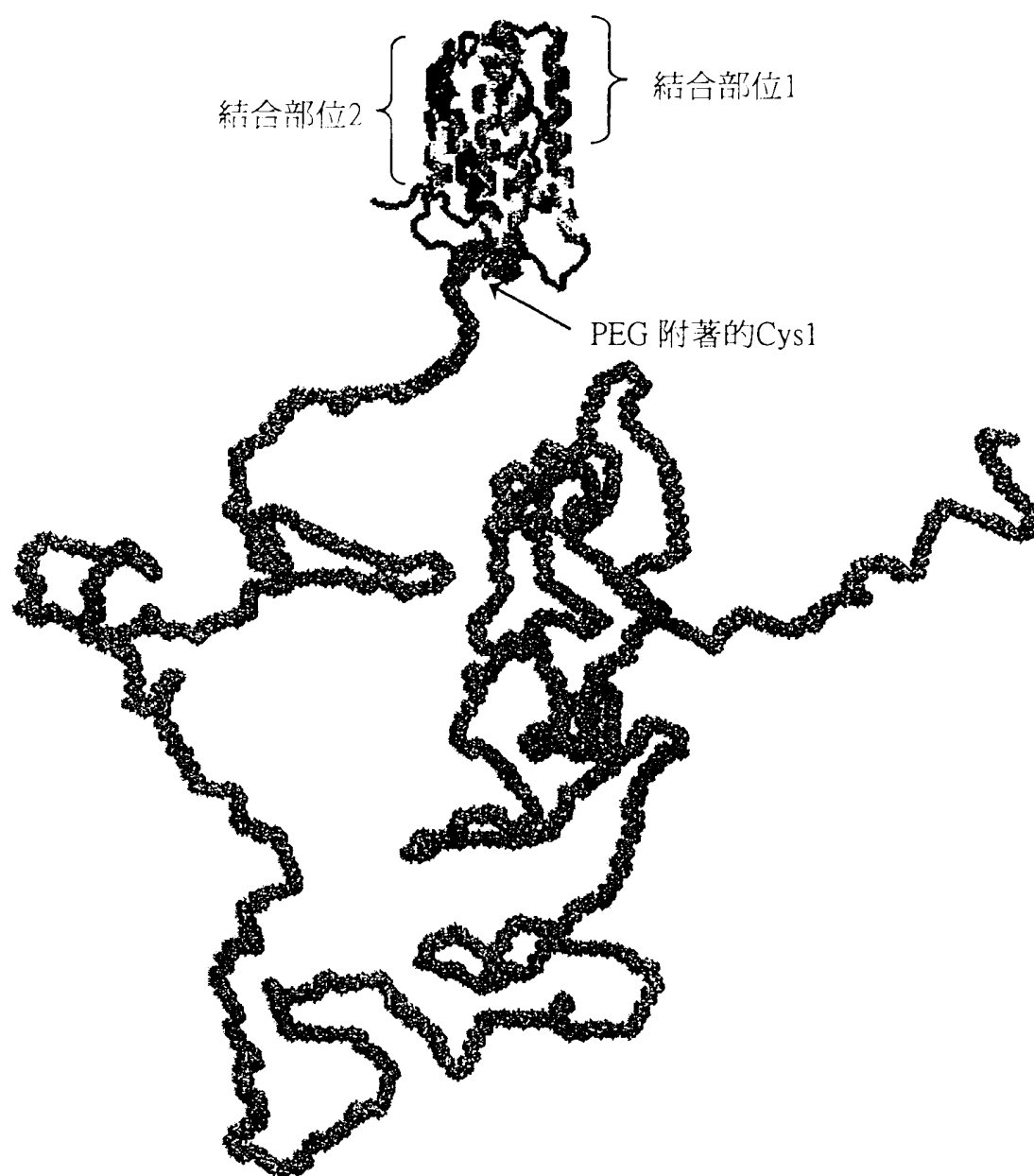
20-kDa PEG-干擾素- α -2b

圖 1d

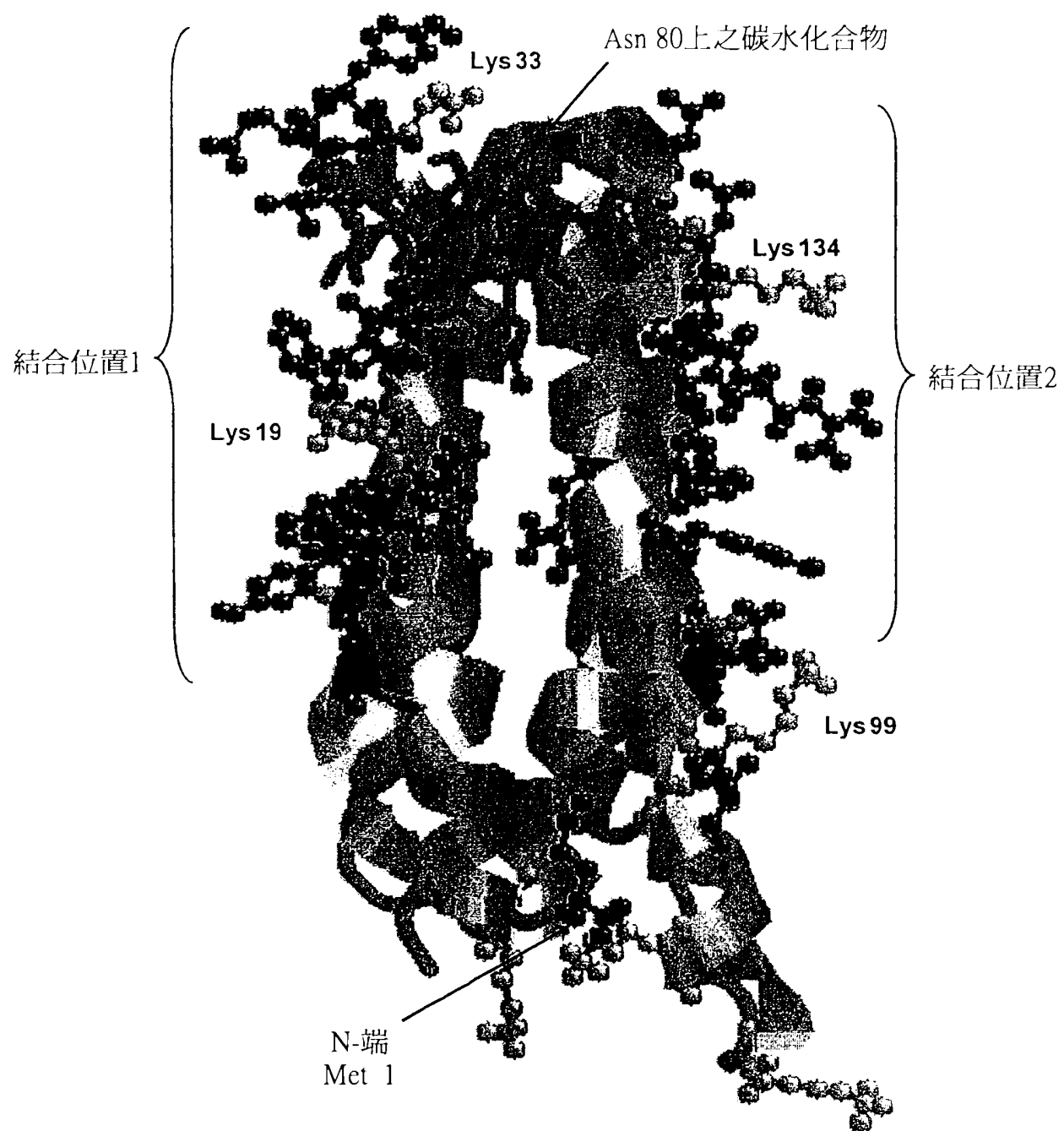
干擾素- β -1a

圖2

粒細胞-巨噬細胞菌落-刺激因子

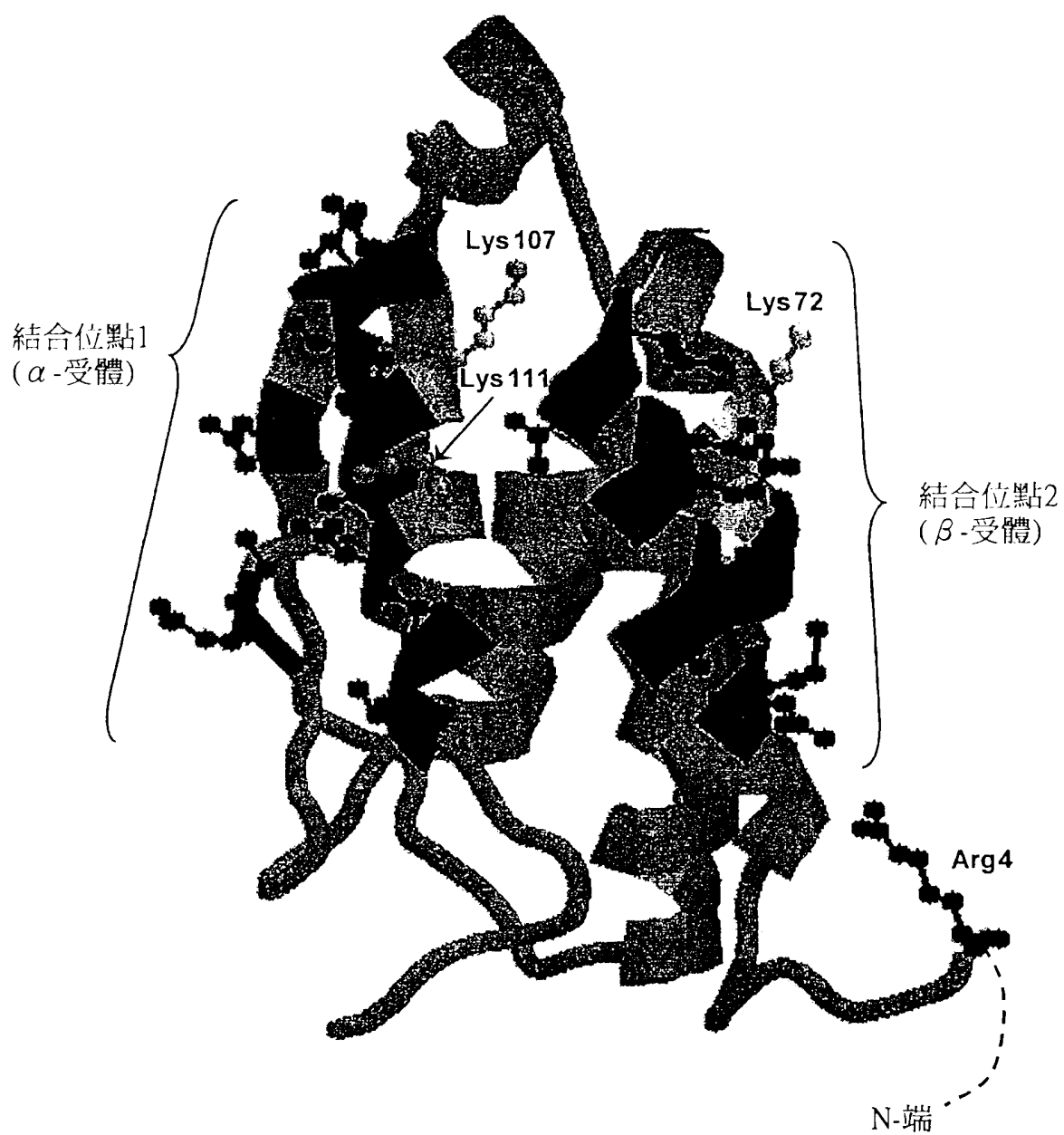


圖 3

第二型白細胞介素

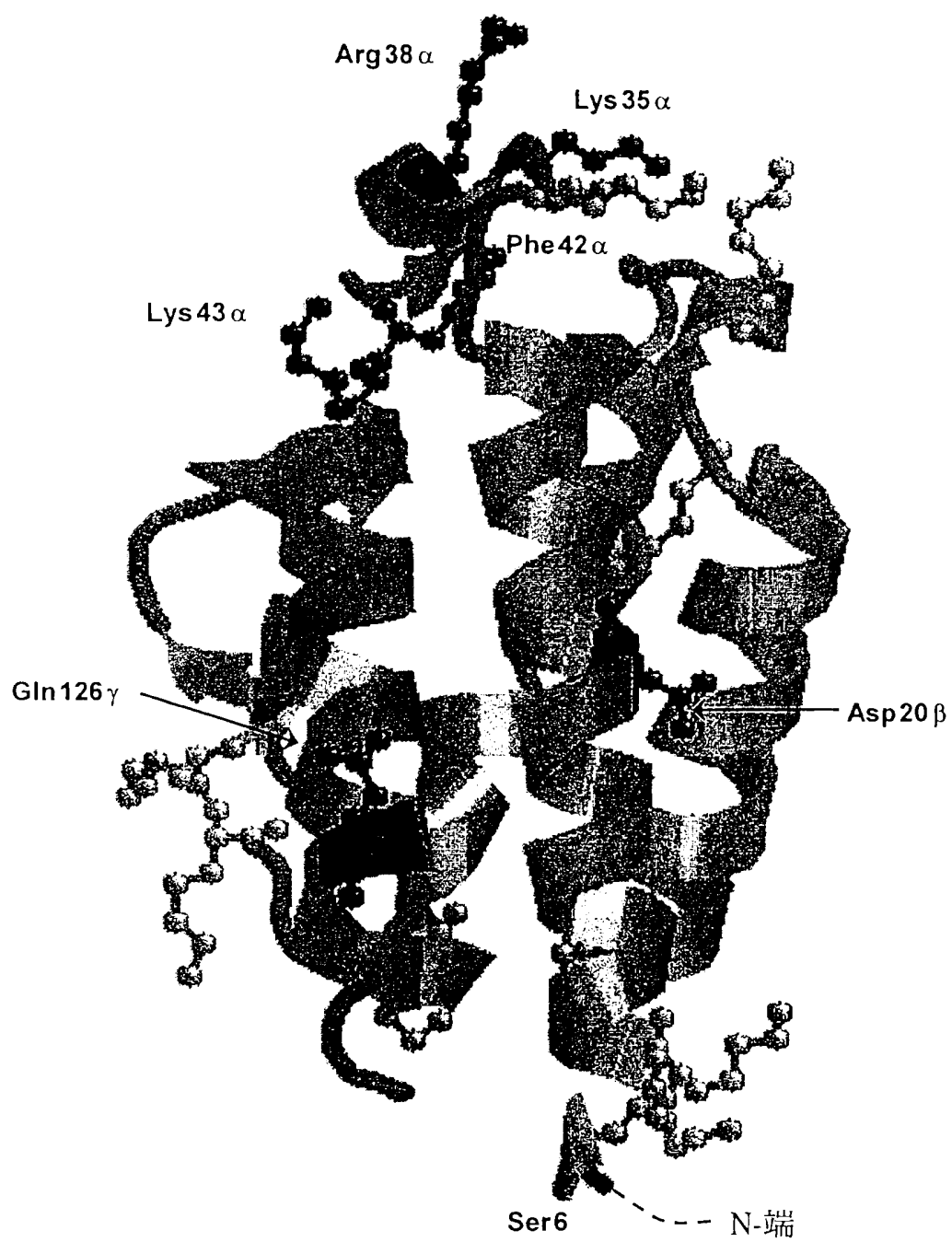


圖4

表皮生長因子



圖 5

基本成纖維細胞生長因子

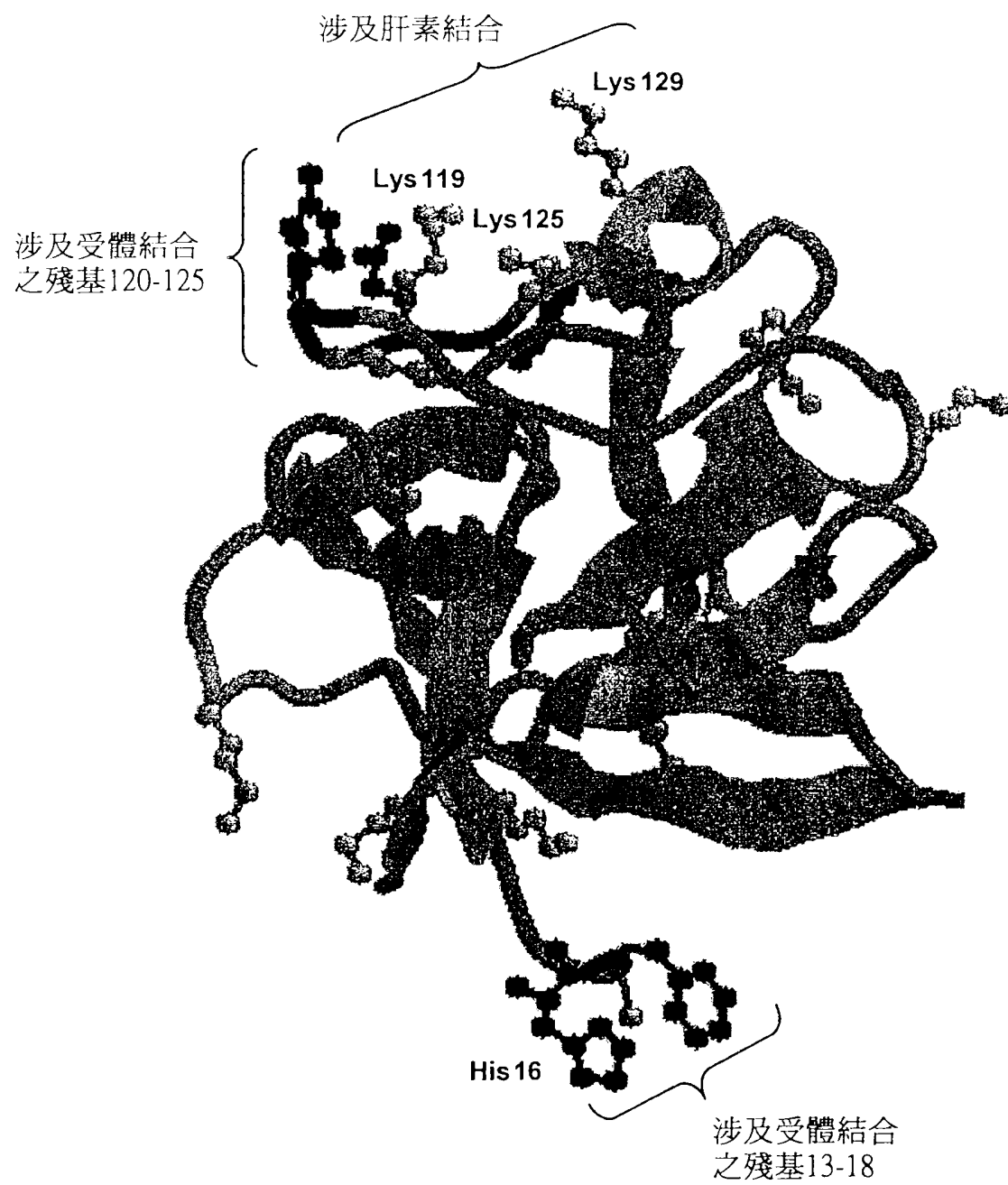


圖 6

類胰島素生長因子-1

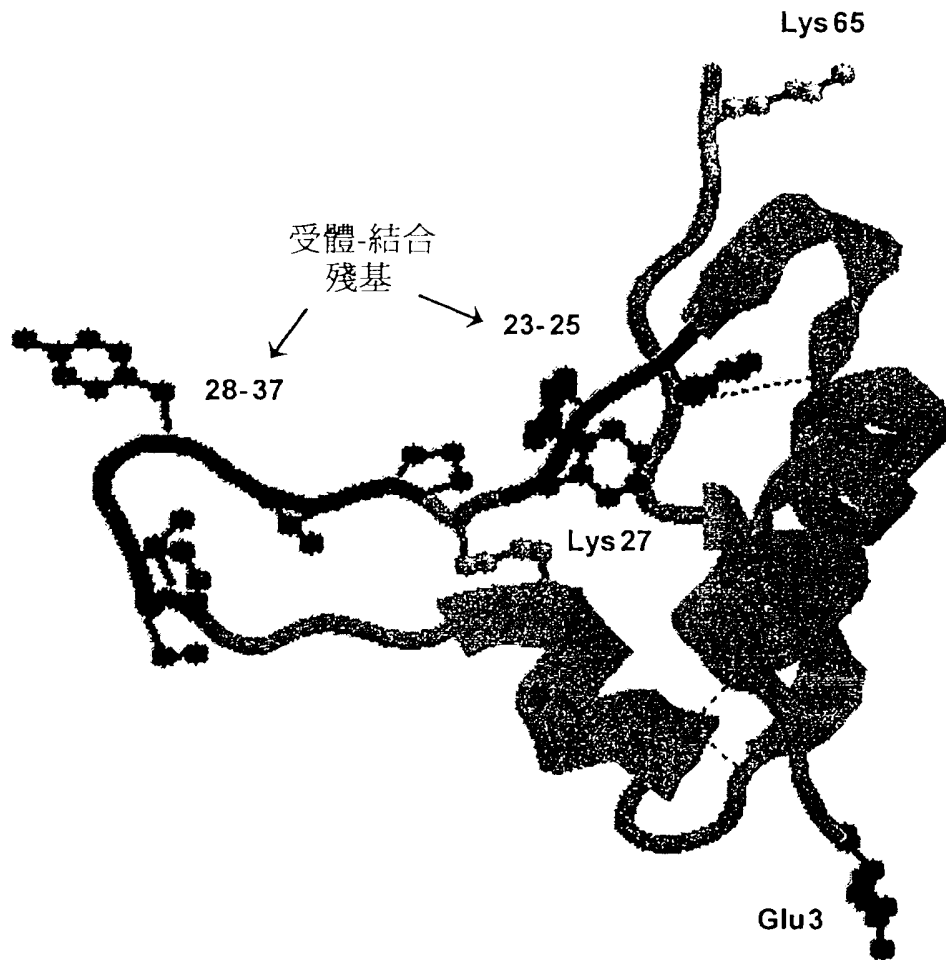


圖 7

干擾素- γ 同源二聚體

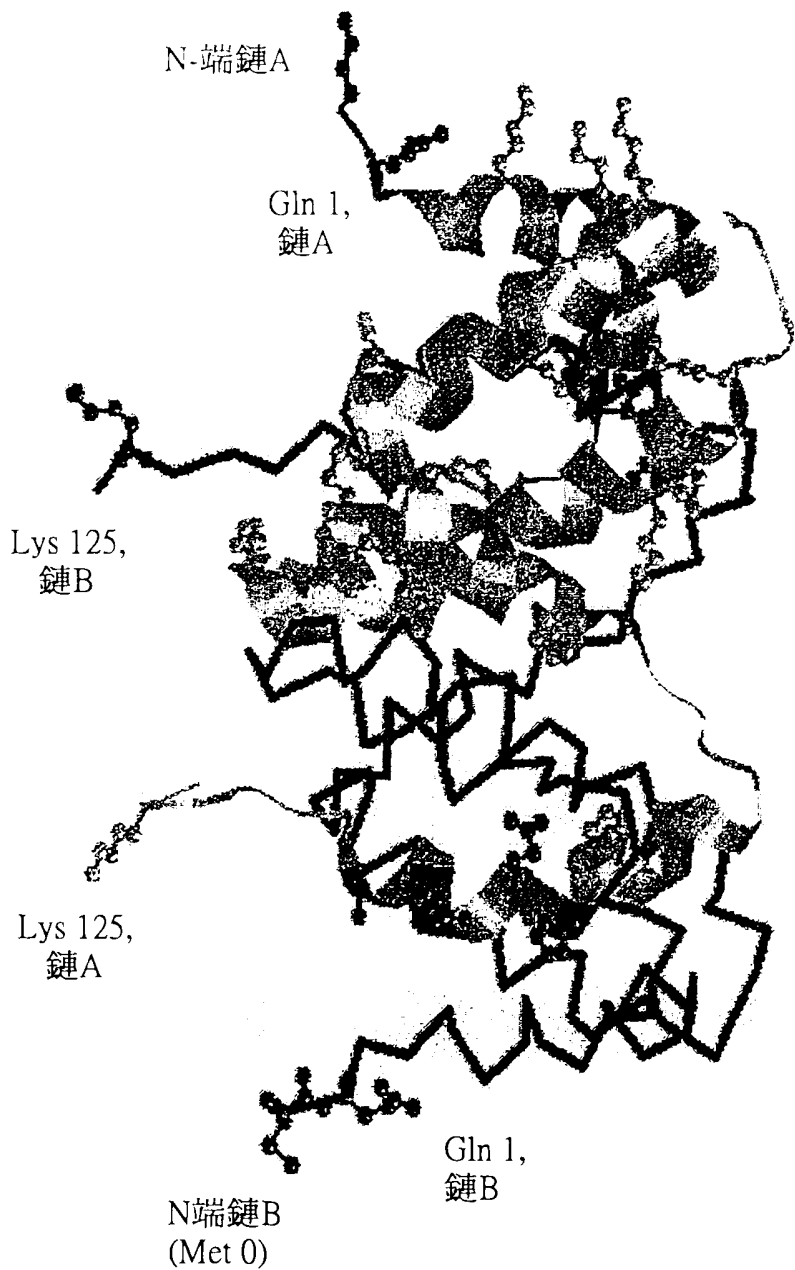


圖 8

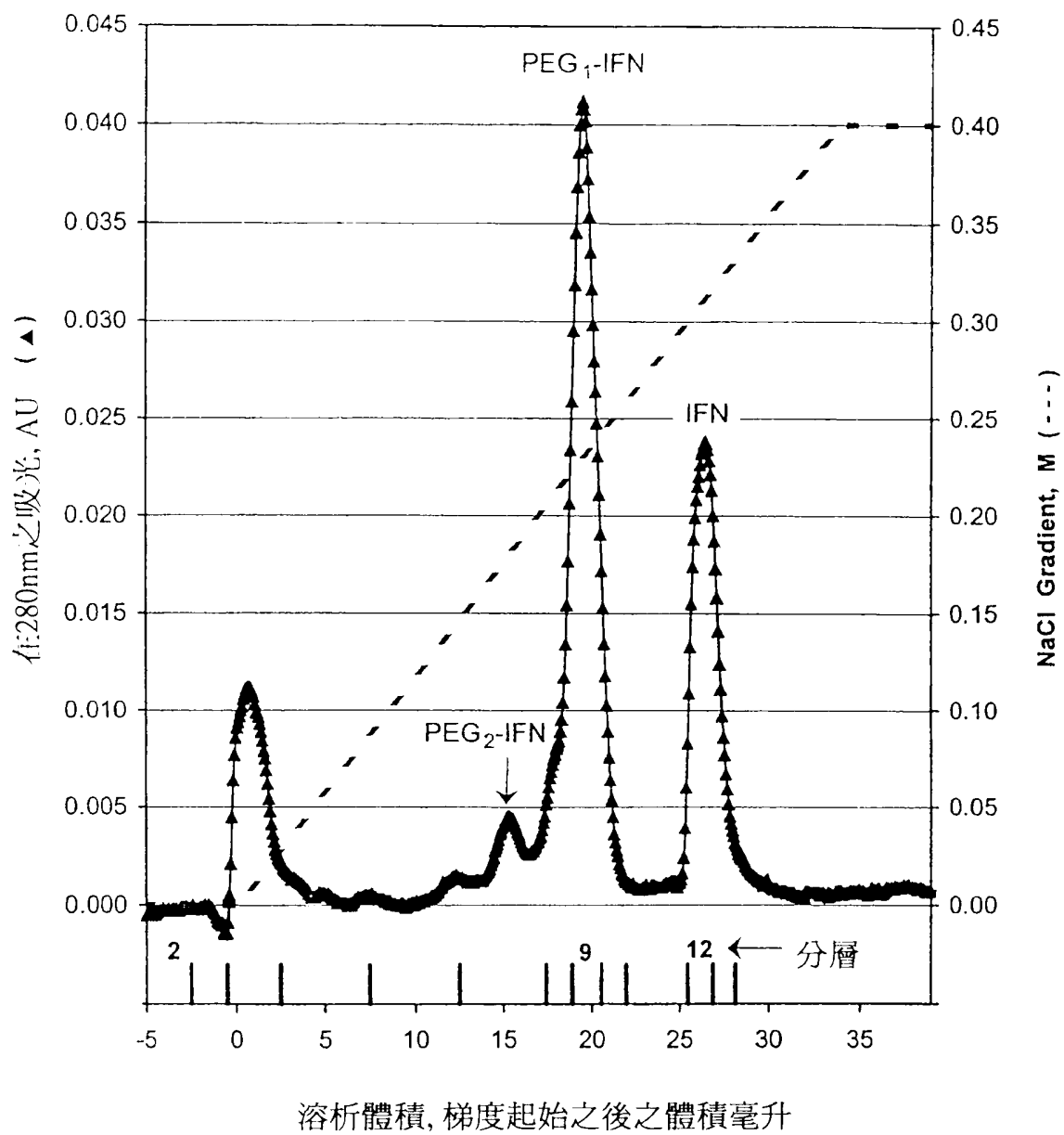
PEG-干擾素- α -2b反應混合物之陽離子交換層析

圖9

PEG-干擾素- α -2b反應混合物和陽離子-交換色層
分析的分層之大小排除HPLC

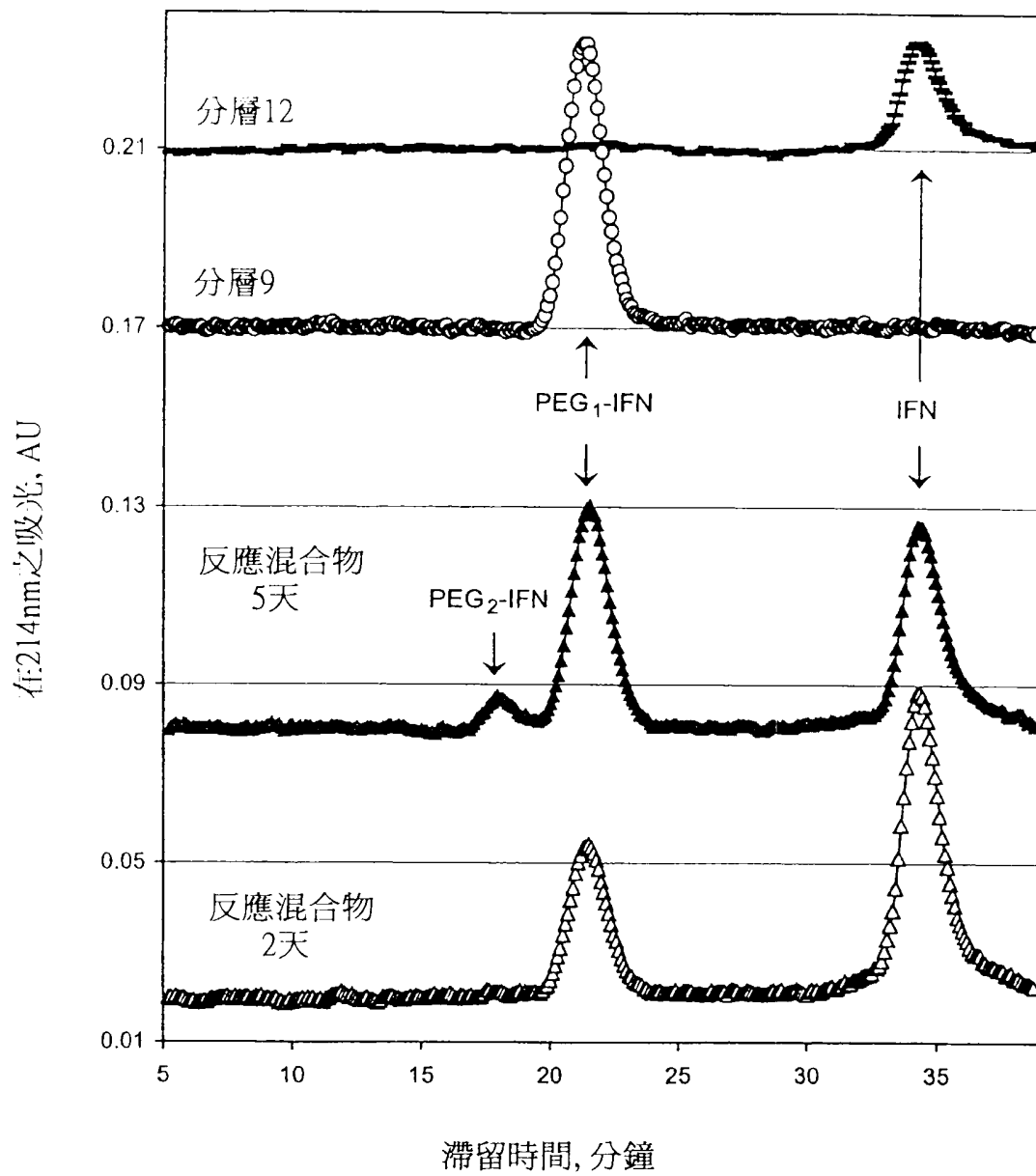


圖10

PEG-白細胞介素2反應混合物之陽離子交換層析法

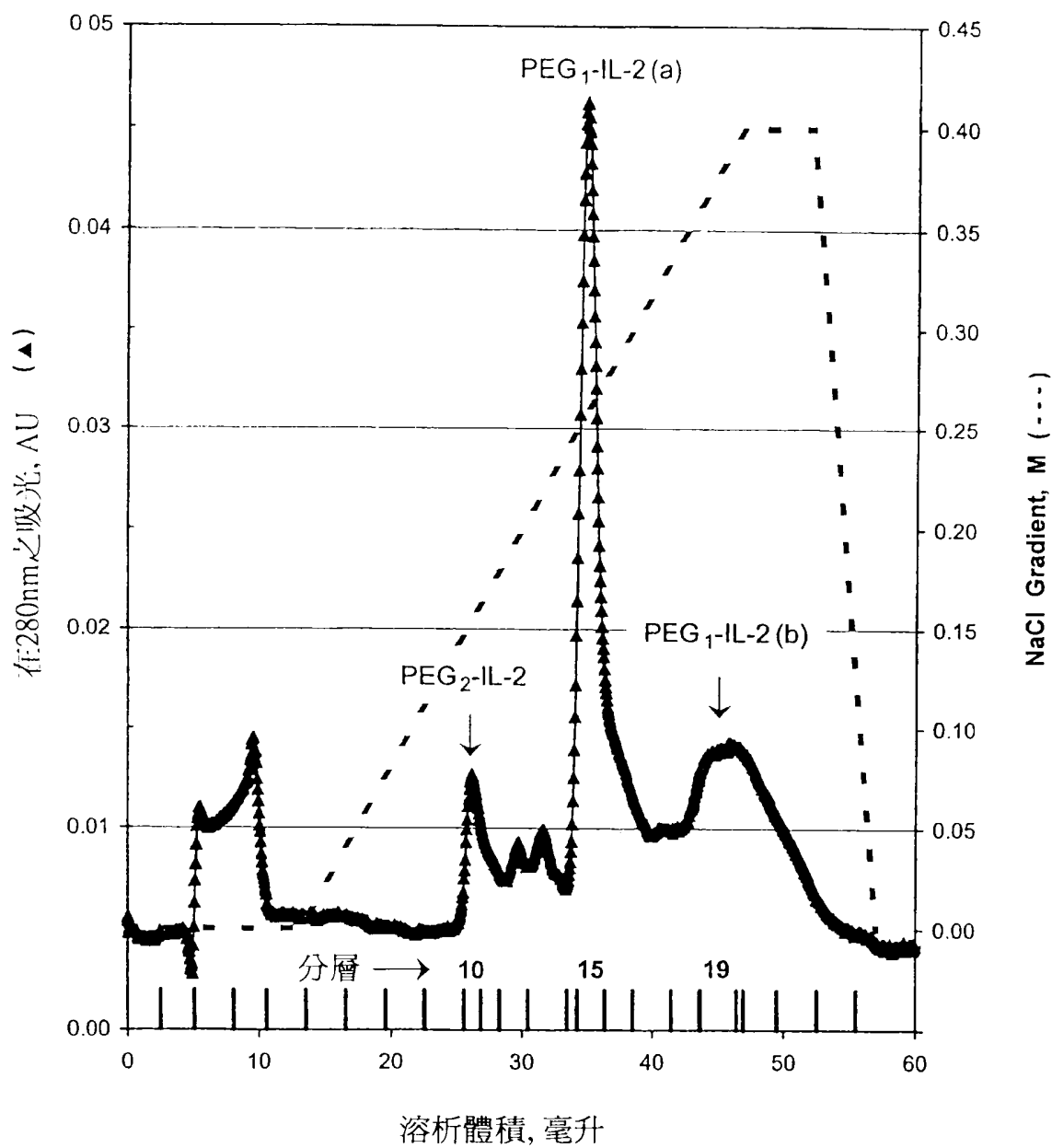


圖 11

PEG-第二型白細胞介素反應混合物和陽離子-交換色層
分析的分層之大小排除HPLC

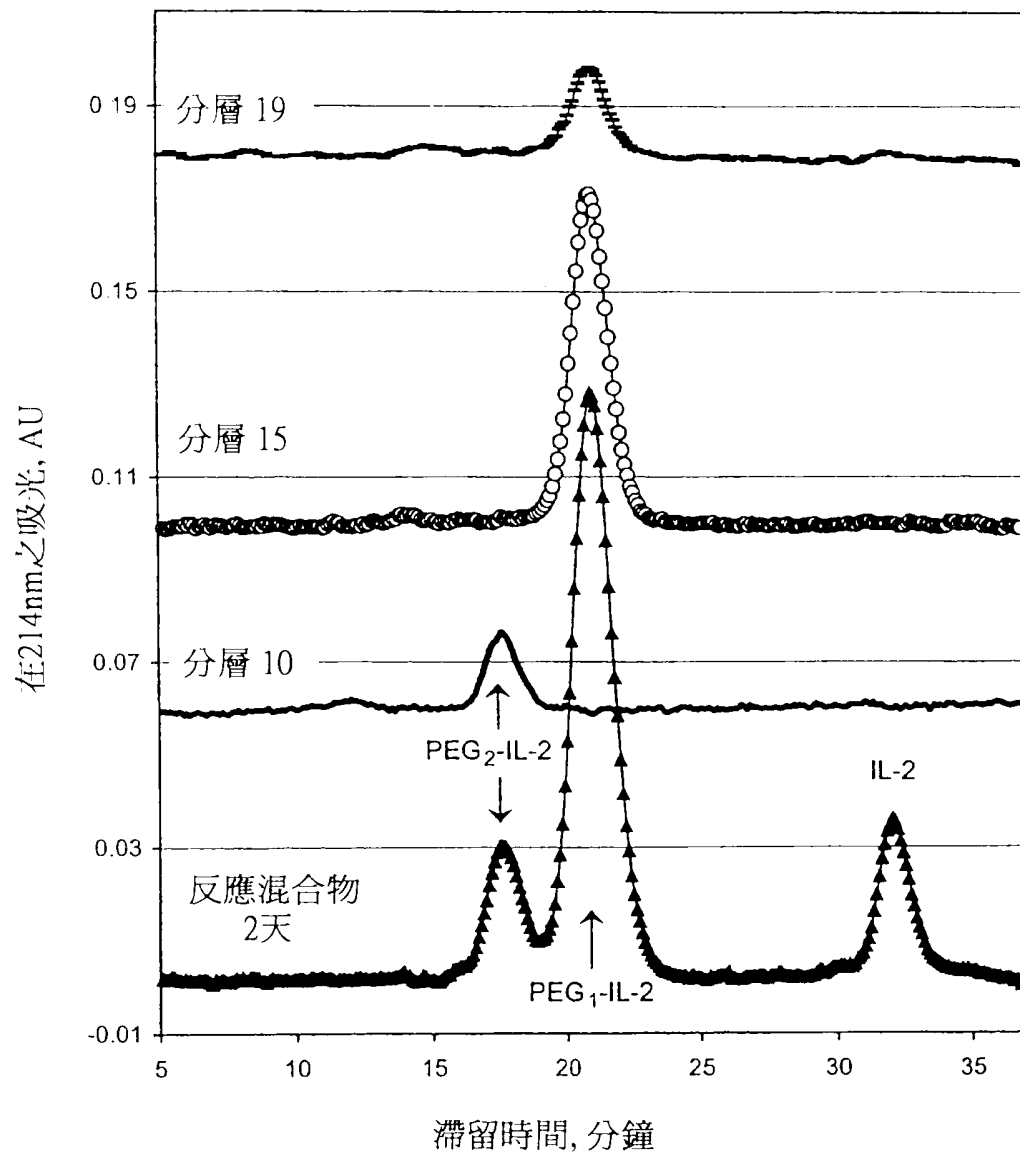


圖12

PEG-第二型白細胞介素反應混合物和純化的
單聚乙二醇化的共軛體之電泳分析

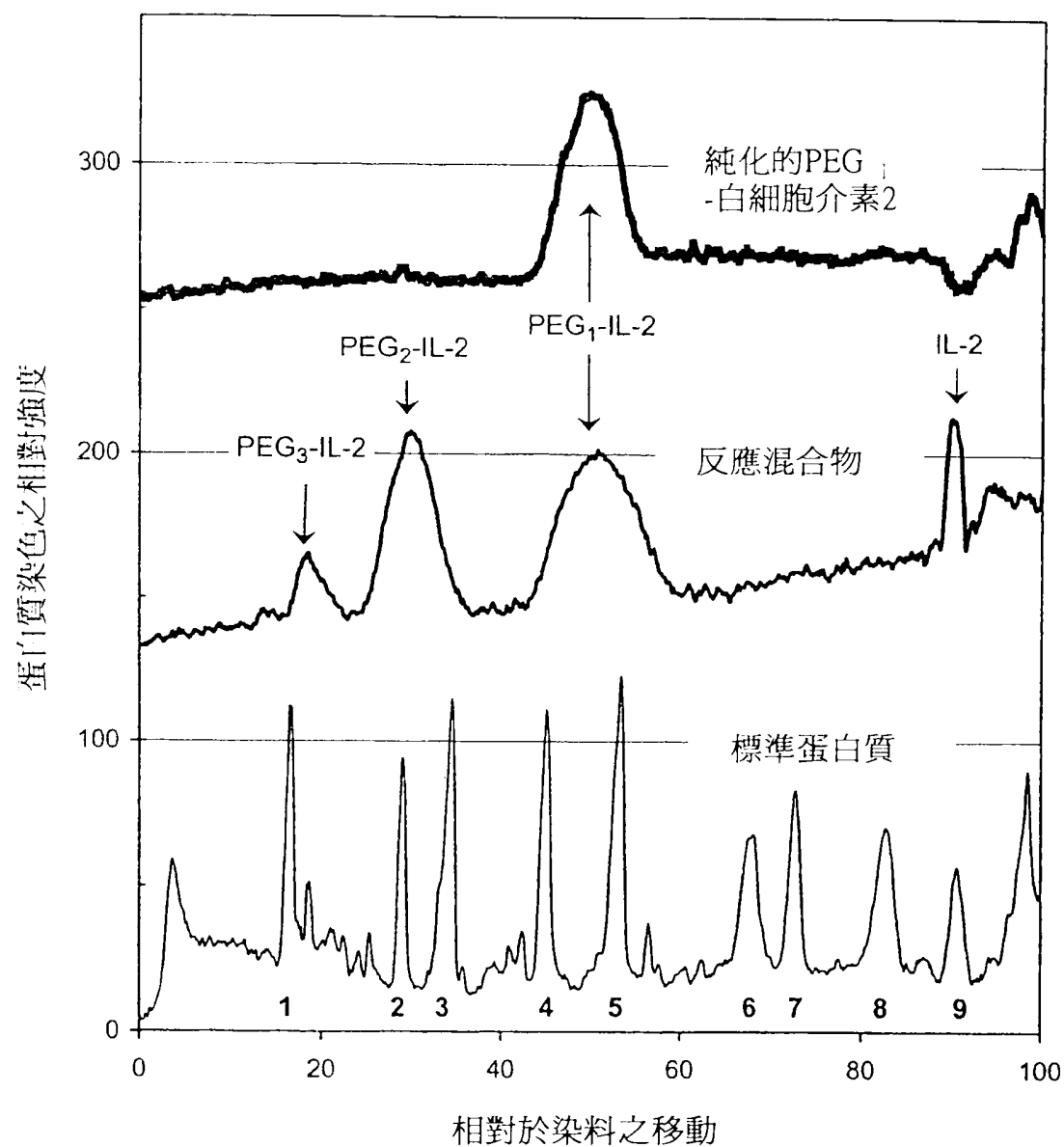


圖13

干擾素-β-1b以及20-kDa PEG共軛體之大小排除HPLC

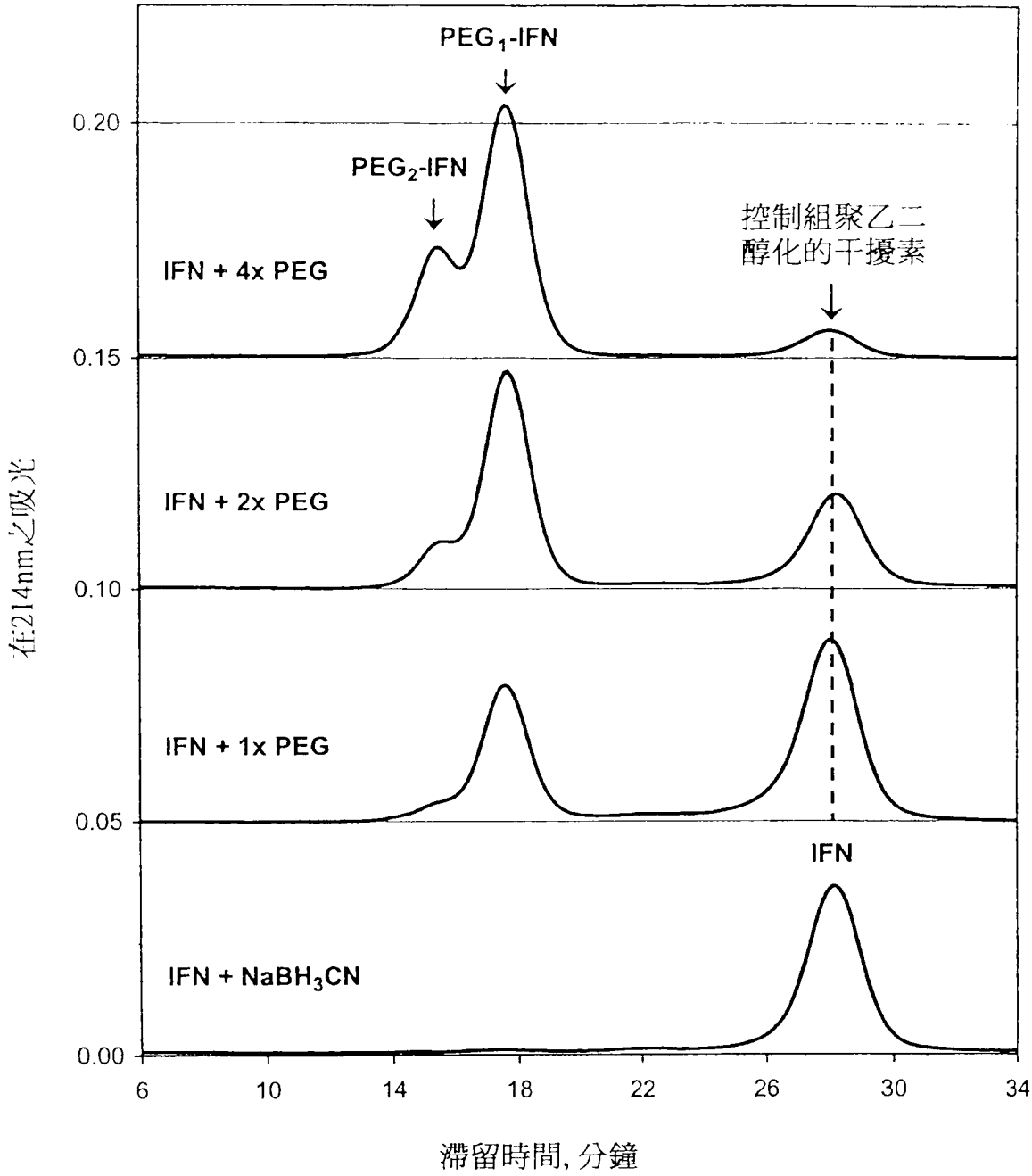


圖 14

酸鹼度6.4+/- SDS或NaCl, 3毫莫耳濃度NaIO₄ 氧化分裂之前及之後合成PEG₁-干擾素-β-1b之大小排除HPLC

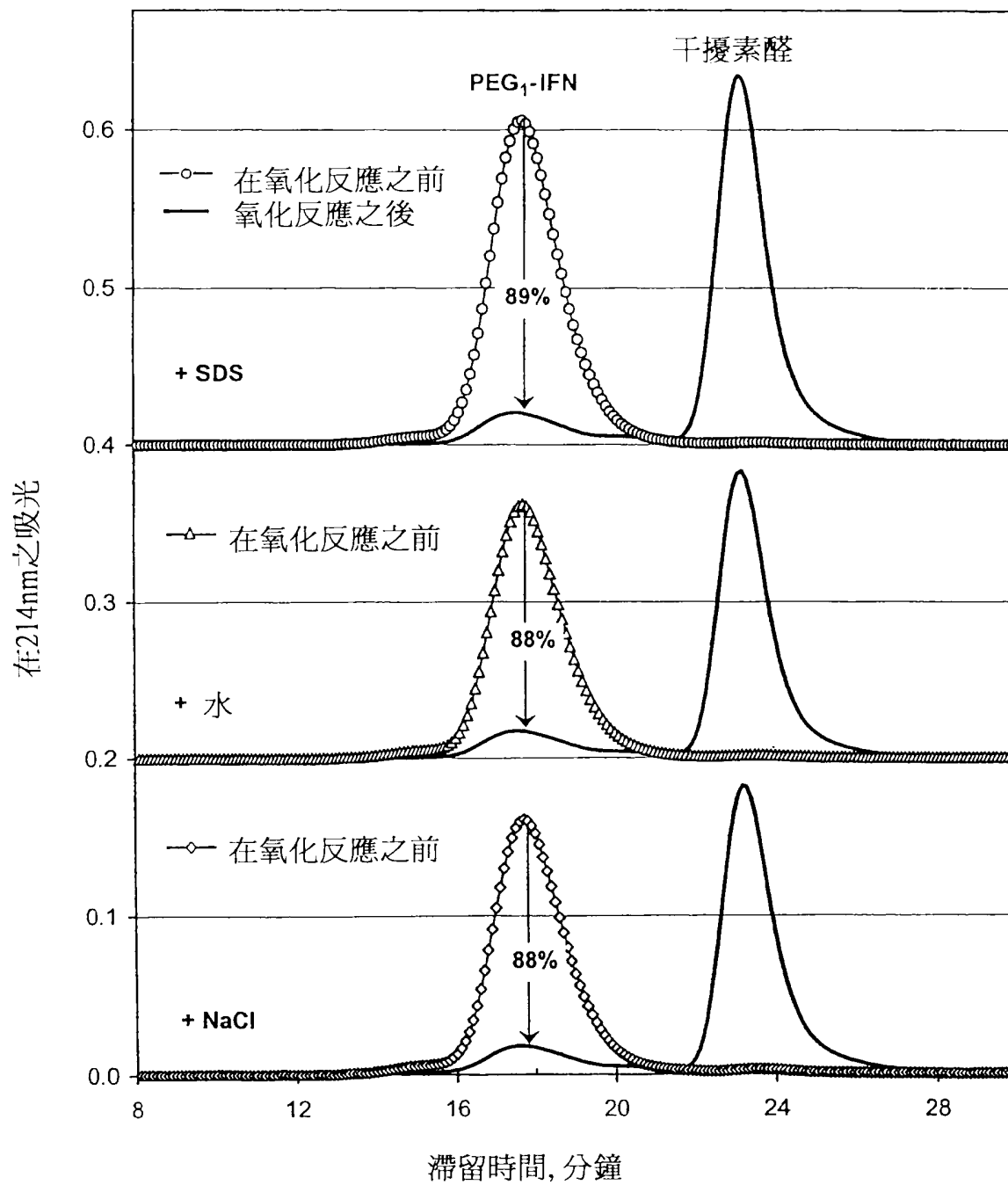


圖 15

從未結合的PEG以及SDS用逆相色譜法分離
聚乙二醇化的干擾素- β -1

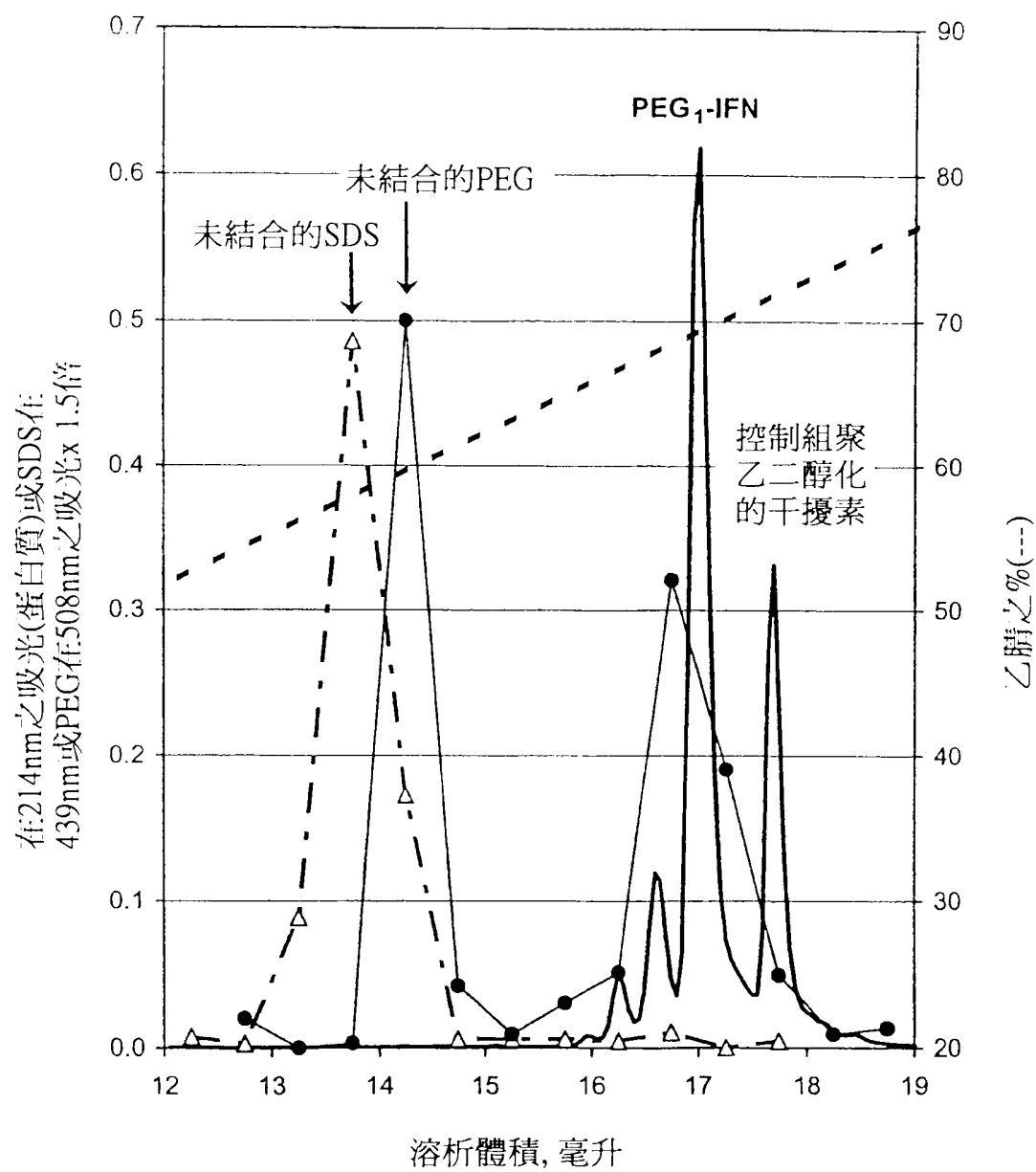


圖16

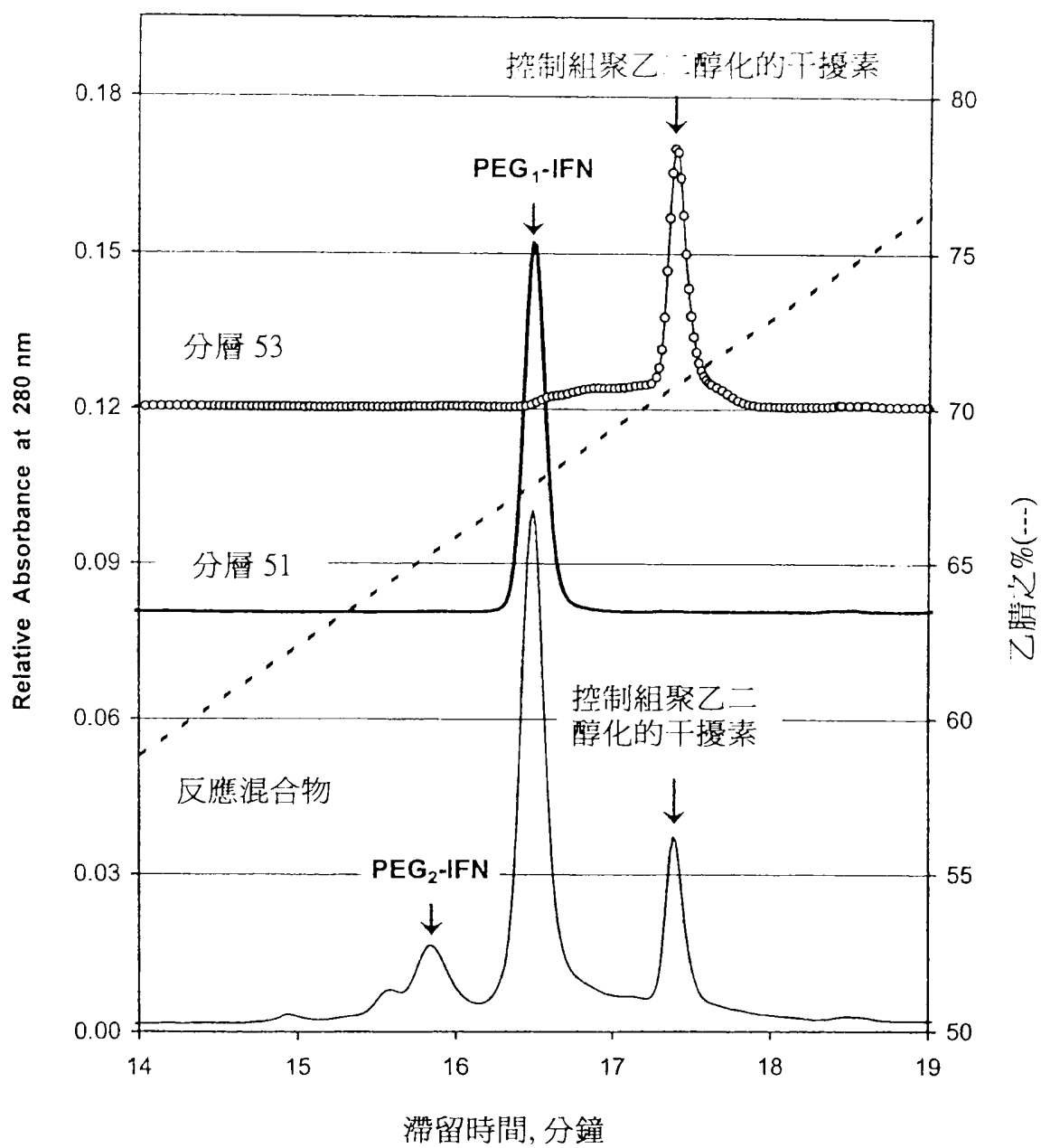
逆相HPLC用純化單聚乙二醇化的干擾素- β -1b

圖 17

聚乙二醇化的干擾素- β -1b以及逆相色譜法分層
之SDS-PAGE分析(蛋白質染色)

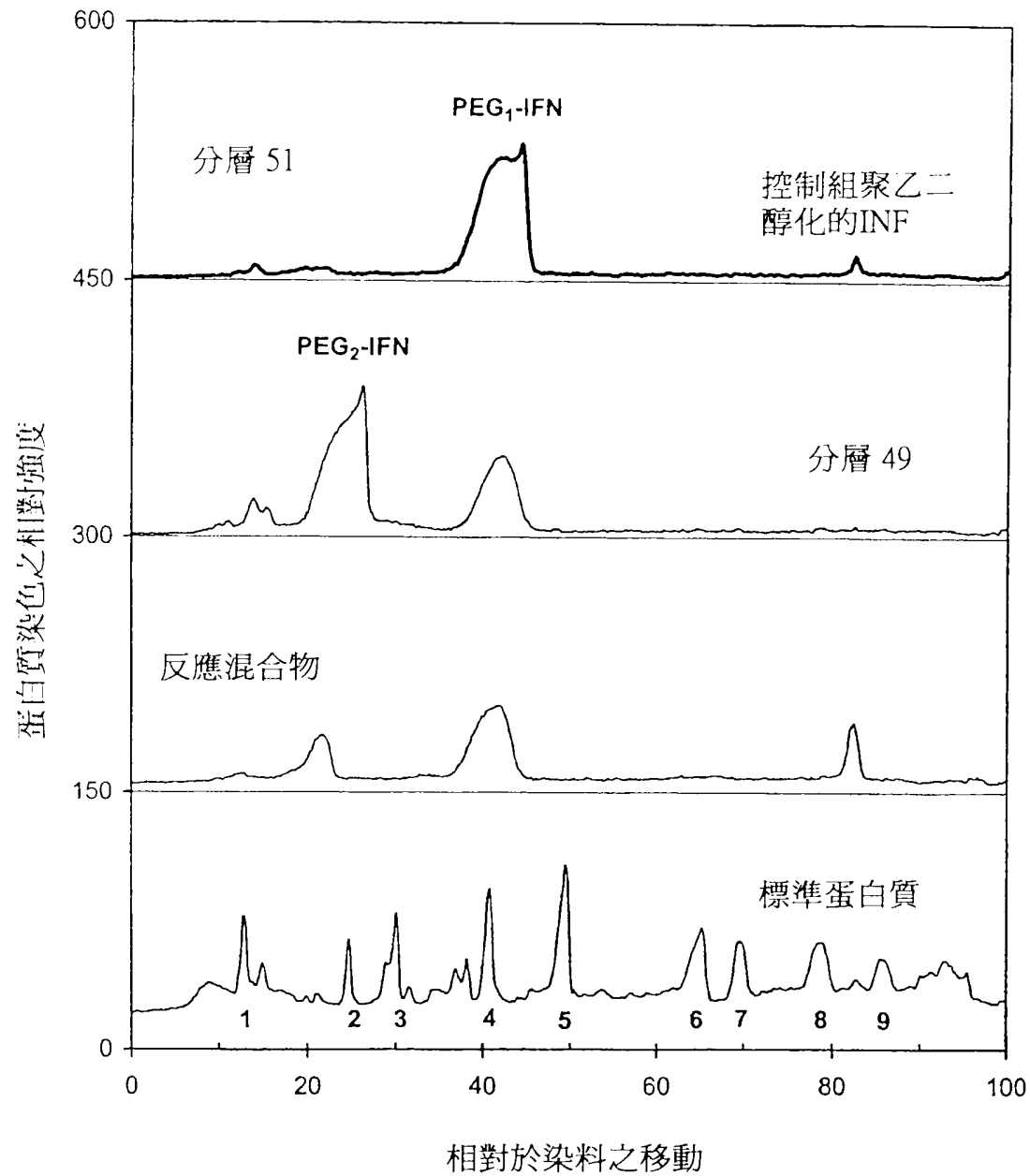


圖 18

聚乙二醇化的干擾素- β -1b以及逆相色譜法分層
之SDS-PAGE分析(PEG染色)

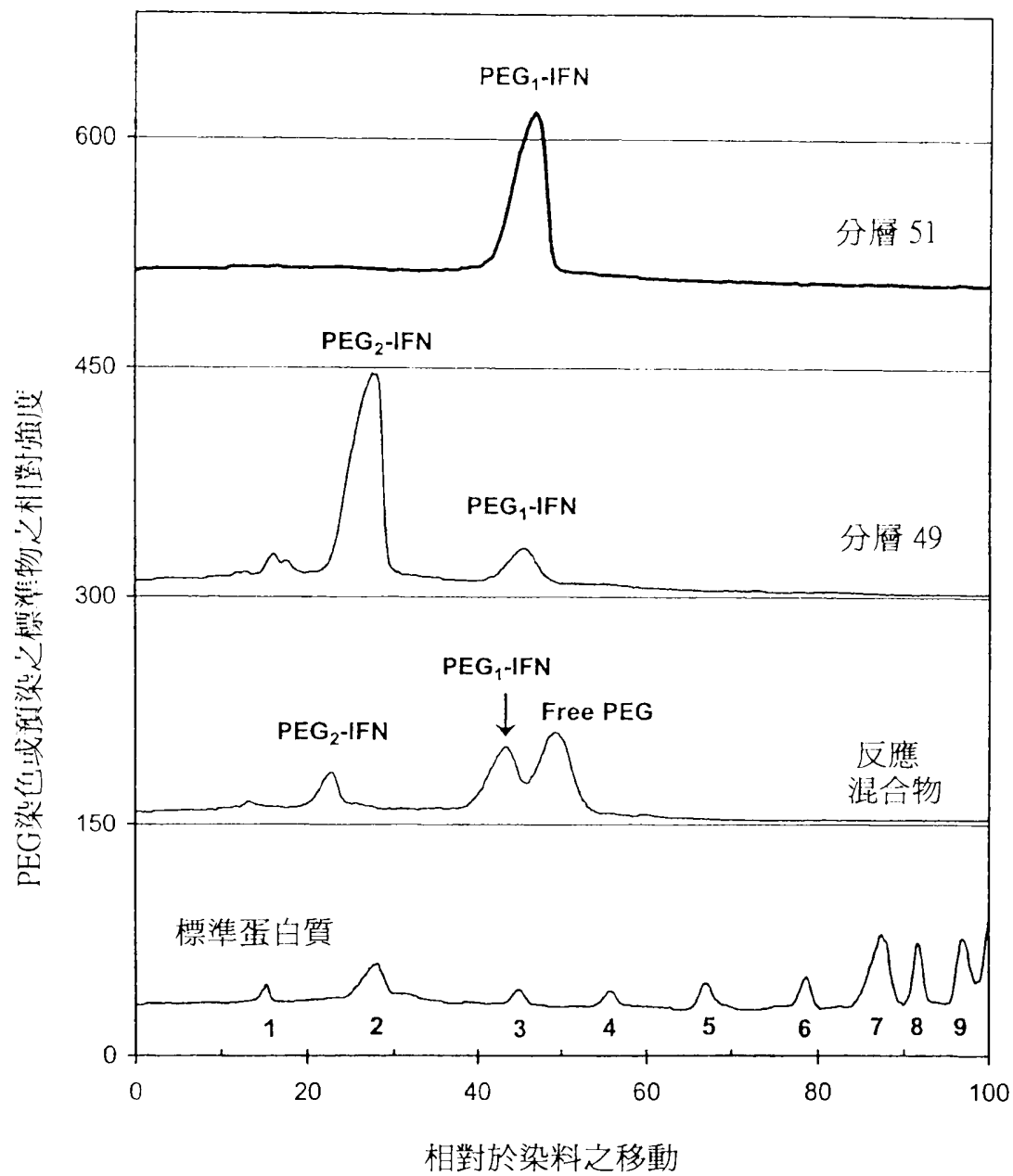


圖 19

在和PEG-肼基甲酸酯反應之前干擾素- α -1b氧化之
時間進程, 大小排除HPLC展示

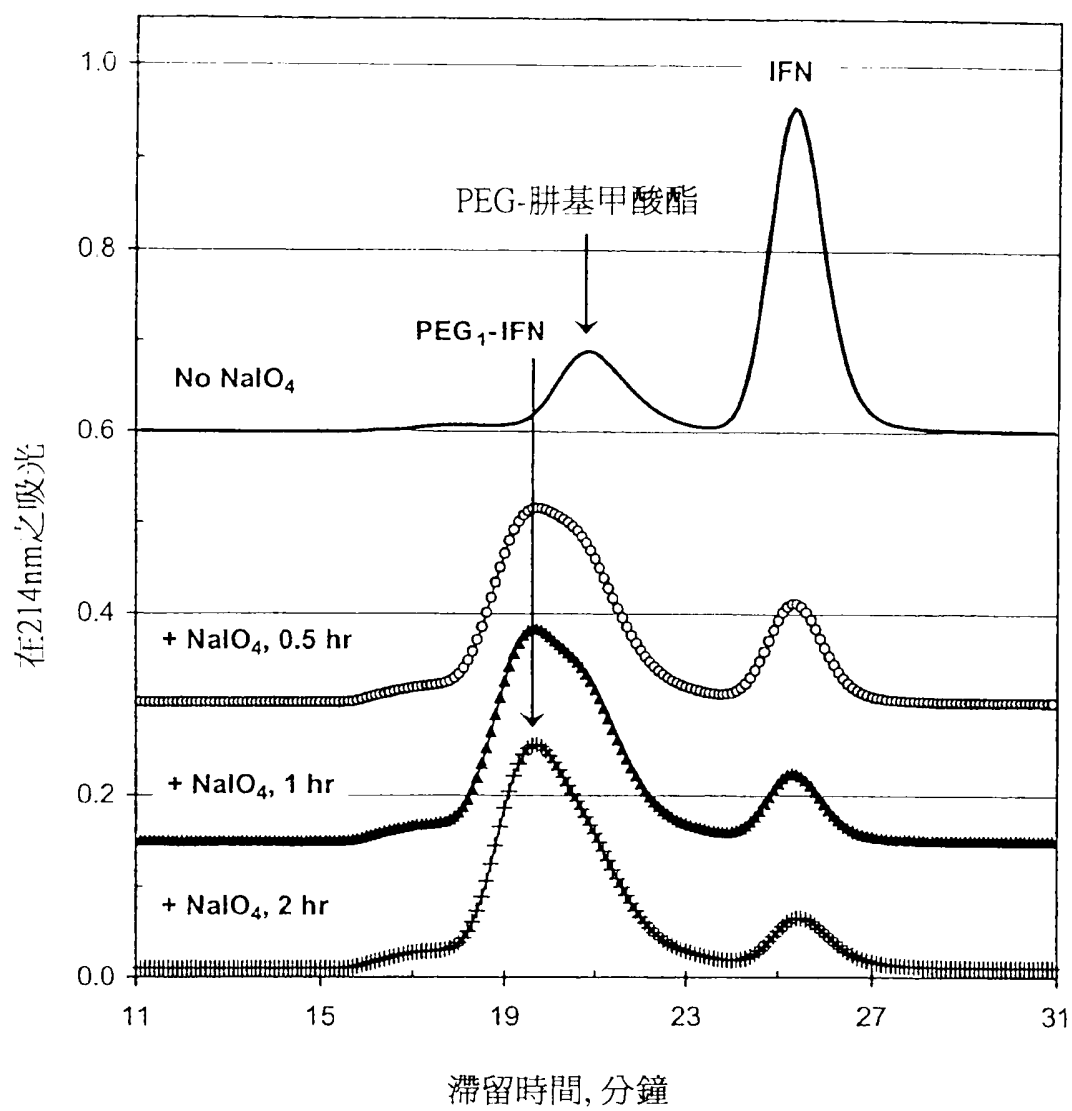


圖 21

未處理的干擾素- β -1b以及內含控制組聚乙二醇化的或單聚乙二醇化的干擾素- β -1b知逆相HPLC分層對Daudi細胞生長之抑制

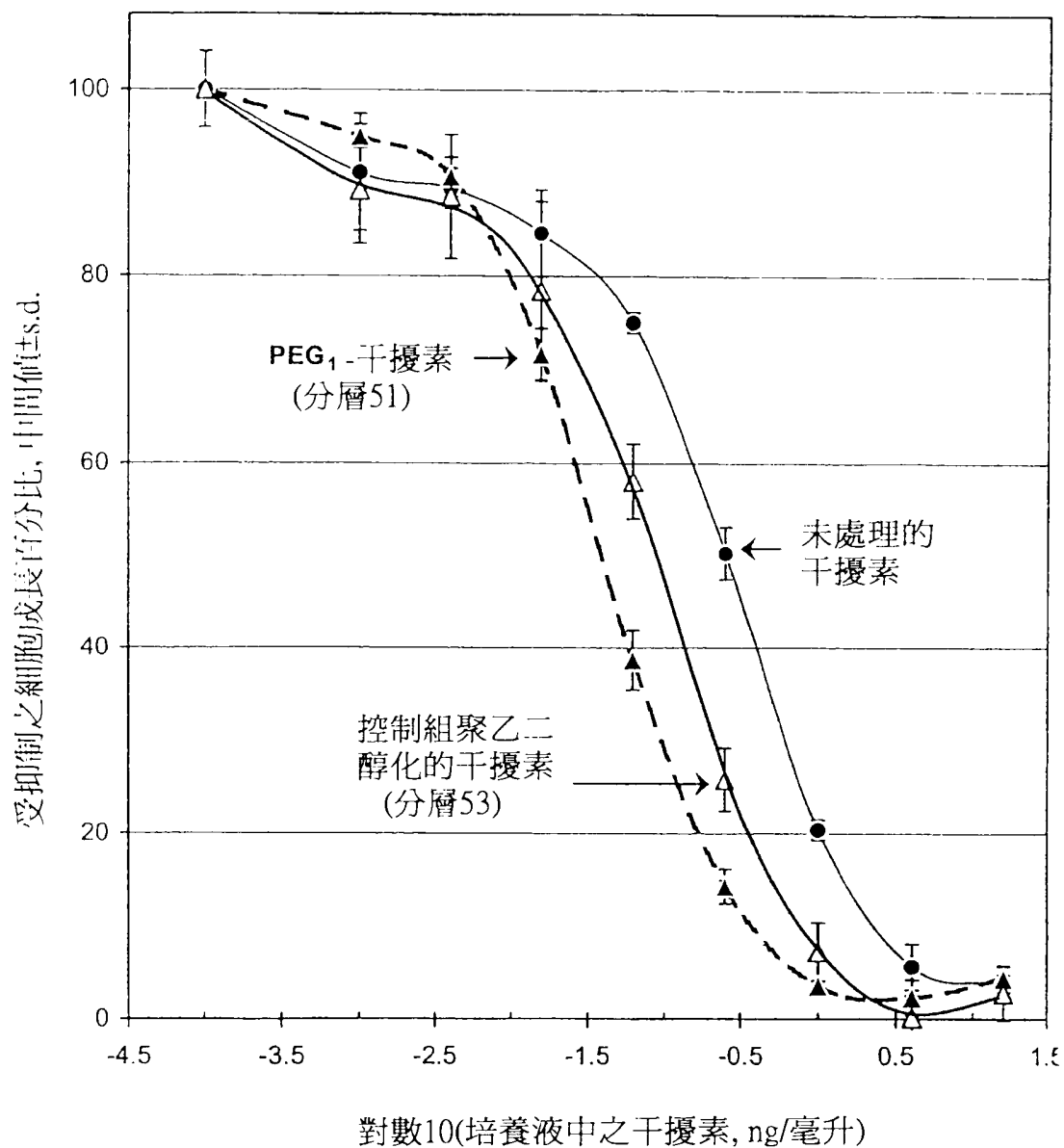


圖22

發明專利說明書

99年3月27日修正本

(本申請書格式、順序及粗體字，請勿任意更動，※記號部分請勿填寫)

公告本

※申請案號：92136583

※申請日期：92 年 12 月 23 日

※IPC 分類：

一、發明名稱：

(中) 生物效力增進的 β 干擾素聚合物共軛體

(英) Polymer conjugates of interferon-beta with enhanced biological potency

二、申請人：(共 1 人)

1. 姓 名：(中) 山景製藥股份有限公司

(英) MOUNTAIN VIEW PHARMACEUTICALS, INC.

代表人：(中) 1. 梅瑞 歇爾曼

(英) 1. SHERMAN, MERRY R.

地 址：(中) 美國加州曼洛公園艾迪生路三四七五號

(英) 3475 Edison Way, Suite S, Menlo Park, CA 94025, U. S. A.

國籍：(中英) 美國 U.S.A.

三、發明人：(共 4 人)

1. 姓 名：(中) 馬克 塞佛

(英) SAIFER, MARK G.P.

國 籍：(中) 美國

(英) U.S.A.

2. 姓 名：(中) 艾雷沙 馬丁納

(英) MARTINEZ, ALEXA L.

國 籍：(中)

(英)

3. 姓 名：(中) 艾爾 威廉斯

(英) WILLIAMS, L. DAVID

國 籍：(中) 美國

(英) U.S.A.

4. 姓 名：(中) 梅瑞 歇爾曼

(英) SHERMAN, MERRY R.
國 籍：(中) 美國
(英) U.S.A.

四、聲明事項：

◎本案申請前已向下列國家（地區）申請專利 ☐ 主張國際優先權：

【格式請依：受理國家（地區）；申請日；申請案號數 順序註記】

- | | | |
|-------|---------------------------|--|
| 1. 美國 | ； 2002/12/26 ； 60/436,020 | ☒ 有主張優先權 |
| 2. 美國 | ； 2003/06/20 ； 60/479,913 | ☒ 有主張優先權 |
| 3. 美國 | ； 2003/06/20 ； 60/479,914 | ☒ 有主張優先權 |

(英) SHERMAN, MERRY R.
國 籍：(中) 美國
(英) U.S.A.

四、聲明事項：

◎本案申請前已向下列國家（地區）申請專利 ☐ 主張國際優先權：

【格式請依：受理國家（地區）；申請日；申請案號數 順序註記】

- | | | |
|-------|---------------------------|--|
| 1. 美國 | ； 2002/12/26 ； 60/436,020 | ☒ 有主張優先權 |
| 2. 美國 | ； 2003/06/20 ； 60/479,913 | ☒ 有主張優先權 |
| 3. 美國 | ； 2003/06/20 ； 60/479,914 | ☒ 有主張優先權 |

玖、發明說明

【發明所屬之技術領域】

本發明屬於蛋白質生化學及藥學和醫學領域。特定言之，本發明提供一種由水溶性聚合物（例如聚（乙二醇）及其衍生物）聯結細胞激動素（例如 β 干擾素）產生共軛體的方法，相較於以標準合成方法合成之相同細胞激動素的聚合物共軛體，該共軛體之效能增加。本發明亦提供依該方法製作之共軛體，包含該共軛體之組成物，包含該共軛體以及組成物之組套以及使用該共軛體和組成物預防、診斷以及治療各種醫學和獸醫症狀之方法。本發明亦提供在某些條件下還原烷化決定此聚合物附著位點之方法。

【先前技術】

下列相關技藝的描述包括解釋本案不屬於先前技藝之部份。細胞激動素是一種調控分泌的蛋白質，其以內分泌、旁分泌或自分泌之方式控制細胞之生存、生長、分化、及 / 或 啟動之功能（參見 Nicola, N.A. (1994) in: Guidebook to Cytokines and Their Receptors, Nicola, N.A., ed., pp.1-7, Oxford University Press, New York）。由於細胞激動素之效能、特異性、分子小以及較易以重組生物體產生，因此具有許多潛在的治療劑用途。

此細胞激動素及重組蛋白質作為治療劑在發展上有二個重大阻礙：其在循環系統中之半生期短及潛在的抗原性和免疫產生性。在本文及在此技藝中，本文術語之"抗原

性"意指分子結合於已存在的抗體之能力，而本文術語之"產生免疫性"意指分子在活體內喚起免疫反應之能力，不論該反應是否包含形成抗體（"體液的反應"）或刺激細胞的免疫反應。

投用重組型治療性蛋白質時，爲了達到最高循環活性及減少生物效性和降解方面的問題，經常採取靜脈內（i.v.）投用。然而，以 i.v.投用後，小蛋白質之半生期通常極短（參閱實施例 Mordenti, J., et al., (1991) Pharm Res 8:1351-1359; Kuwabara, T., et al., (1995) Pharm Res 12:1466-1469）。一般而言，健康的腎臟可吸收血液中水動力半徑大於血清白蛋白（即 Stokes 半徑 0.36 Å 以及分子量 66,000 道耳吞，66 kDa）之蛋白質。然而，較小型的蛋白質，包括細胞激動素例如：粒細胞集落刺激因子（"G-CSF"）、第二型白細胞介素（"白細胞介素 2"）、干擾素- α （"干擾素- α "）以及干擾素- γ （"干擾素- γ "），則經腎臟絲球體的過濾快速地從血流中消除（Brenner, B.M., et al., (1978) Am JPhysiol 234:F455-F460; Venkatachalam, M.A. et al., (1978) Circ Res 43:337-347; Wilson, G., (1979) JGen Physiol 74:495-509; Knauf, M.J., et al., (1988) J Biol Chem 263:15064-15070; Kita, Y., et al., (1990) Drug Des Deliv 6:157-167; Rostaing, L., et al., (1998), JAm Soc Nephrol 9:2344-2348）。結果，不易在投用後使循環中保有適當治療濃度的重組型小蛋白質。因此，一般必須投用較高濃

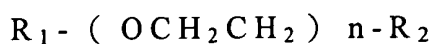
度的蛋白質且注射次數更頻繁。該方式產生的療程使治療成本提高，降低病人的順服性並增加副作用的危機，例如免疫反應。細胞以及體液免疫反應會使在循環系統中重組蛋白質的注射濃度減低，以致於妨礙投用有效劑量，或導致影響治療成效之情形，包括清除加速、降低功效及過敏性反應（Ragnhammar, P., et al.,(1994) *Blood* 84:4078-4087; Wadhwa, M., et al.,(1999) *Clin Cancer Res* 5:1353-1361; Hjelm Skog, A.-L., et al.,(2001) *Clin Cancer Res* 7:1163-1170; Li, J., et al.,(2001) *Blood* 98:3241-3248; Bassar, R.L., et al.,(2002) *Blood* 99:2599-2602; Schellekens, H.,(2002) *Clin Ther* 24:1720-1740）。

目前已有許多研究著力於藉由聚（乙二醇）（"PEG"）之共價鍵附著來修飾重組蛋白質以改善上述缺點（評估於 Sherman, M.R., et al.,(1997) in:Poly(ethylene glycol):Chemistry and Biological Applications, Harris, J.M., et al., eds., pp.155-169, American Chemical Society, Washington, D.C.; Roberts, M.J., et al., (2002) *Adv Drug Deliv Rev* 54:459-476）。在活體內將 PEG 附著在蛋白質上已顯示能穩定蛋白質，改良其生物效性及/或減低其免疫產生性。（PEG 共價附著至蛋白質或其它本文之反應受質，在本文中以及技藝上稱為"PEG 化作用"。）此外，PEG 化作用可顯著的增加蛋白質的水動力半徑。當小蛋白質，例如細胞激動素偶聯至 PEG 的單一長股（例如，其分子量至少約 18 kDa），所產生的共軛體之水動

力半徑大於血清白蛋白，其經由腎絲球體自循環系統中清除會顯著減緩。PEG 化的總合效應：蛋白質水解降低、免疫辨視性降低以及腎清除速率降低，均賦予 PEG 化蛋白質在作為治療劑之實質優點。

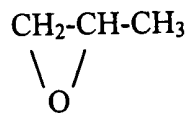
自 1970 年代以來即已嘗試使用共價附著的聚合物來改良各式醫藥用蛋白質之安全性和功效（參閱，例如 Davis, F.F., et al., U.S. Patent No. 4,179,337）。一些實施例包括：將 PEG 或聚（環氧乙烷）（"PEO"）偶聯至腺苷脫胺酶（EC 3.5.4.4）以治療重症聯合免疫缺陷（Davis, S., et al., (1981) Clin Exp Immunol 46:649-652; Hershfield, M.S., et al., (1987) N Engl J Med 316:589-596）；偶聯至超氧化物歧化酶（EC 1.15.1.1）以治療發炎病症（Saifer, M., et al., 美國專利第 5,006,333 以及 5,080,891 號）以及偶聯至尿酸鹽氧化酶（EC 1.7.3.3）以從血液和尿液中去除過量的尿酸（Kelly, S.J., et al., (2001) J Am Soc Nephrol 12:1001-1009; Williams, L.D., et al., PCT 公告第 WO 00/07629 A3 號以及美國專利第 6,576,235 號；Sherman, M.R., et al., PCT 公告第 WO 01/59078 A2 號）。

PEOs 以及 PEGs 是一種由共價聯結的環氧乙烷單位所組成的聚合物。此類聚合物有下列的一般構造：



其中 R_2 可為羥基（或其反應性的派生物），而 R_1 可為氫（如二羥基 EG（"PEG diol"））、甲基（如單甲氧

基 PEG ("mPEG"))、或另一較低碳數烷基團，例如異丙氧基 PEG 或第三丁氧基 PEG。PEG 通式的參數 n 為聚合物環氧乙烷單位之數目，在本文及在此技藝中係指"聚合度"。相同通式的聚合物，其中 R_1 為 C_{1-7} 烷基團，亦稱為環氧乙烷衍生物 (Yasukohchi, T., et al., 美國專利第 6,455,639 號)。PEGs 以及 PEOs 可為線性、分支 (Fuke, I., et al. (1994) JControl Release 30: 27-34) 或星形狀 (Merrill, E.W. (1993) JBiomater Sci Polym Ed 5: 1-11)。PEGs 以及 PEOs 是兩性化合物，即彼可溶解於水和某些有機溶劑中，且彼可黏附至內含脂質之材料，包括病毒被膜及動物和細菌細胞的細胞膜。某些環氧乙烷 (OCH_2CH_2) 以及帶有下列構造環氧丙烷之隨機或嵌段或交替共聚物，



其性質與 PEG 很相似，此類共聚物在某些用途上可作為 PEG 適當的代替物 (參閱例如，Hiratani, H., 美國專利第 4,609,546 號以及 Saifer, M., et al., 美國專利第 5,283,317 號)。本文術語之"聚伸烷基氧化物"及縮寫"PAOs"意指此類共聚物、PEG 或 PEO 及聚(氧基伸乙基-氧基亞甲基)共聚物 (Pitt, C.G., et al., 美國專利第 5,476,653 號)。本文術語之"聚伸烷基乙二醇類"及縮寫"PAGs"一般係指適用於本發明結合體之聚合物，尤其是指 PEGs，更明確的說是指內含單一的反應性基團的 PEGs

("單官能性活化的 PEGs") 。

PEG 或其它聚伸烷基氧化物係共價附著至蛋白質，需要轉化聚合物中至少一個終端基團成具反應性的官能基。此方法通常稱為"活化"，此產物則被稱為"活化的 PEG"或活化的聚環氧烷類。最常用的單甲氧基 PEGs 是在其中一個終端上之氧係蓋上不具反應性的、化性穩定的甲基（產生"甲氧基"），且在另一終端則有對蛋白質分子胺基具反應性的官能基。較少使用所謂的"分支" mPEGs，其在單一活化的官能基的遠端含有兩個或多個甲氧基。分支 PEG 的實施例是二-mPEG-離胺酸，其中 PEG 係偶聯至兩個胺基，而離胺酸之羧基團大部份則是用 N-羥基琥珀醯亞胺的酯化作用活化（ Martinez, A., et al., 美國專利第 5,643,575 號； Greenwald, R.B., et al., 美國專利第 5,919,455 號； Harris, J.M., et al., 美國專利第 5,932,462 號）。

通常活化的聚合物可和具有親核官能基（作為附著位點）之生物活性化合物反應。通常作為附著位點的一個親核官能基是離胺酸殘基之 ϵ 胺基。溶劑-易接近的 α -胺基、羧酸基團、胍基團、咪唑基團、適當地活化之羰基、氧化的醣類部份和硫醇基亦可作為附著位點。

在附著至蛋白質之前，PEG 之羥基已用三聚氰酸氯化物活化（ Abuchowski, A., et al., (1977) JBiol Chem 252:3582-3586; Abuchowski, A., et al., (1981) Cancer Treat Rep 65:1077-1081 ） 。不過，使用此方法卻有缺點

，例如三聚氰酸氯化物之毒性以及它對於具有非胺類官能基之蛋白質（例如對其功能很重要的一些易受溶劑影響的半胱胺酸或酪胺酸殘基）的非專一反應性。爲了克服此類以及其它缺點，可引入另外活化的 PEGs，例如 PEG 之琥珀醯亞胺基琥珀酸鹽衍生物（"SS-PEG"）（Abuchowski, A., et al., (1984) *Cancer Biochem Biophys* 7:175-186）、PAG 之琥珀醯亞胺基碳酸鹽衍生物（"SC-PAG"）（Saifer, M., et al., 美國專利第 5,006,333 號）以及 PEG 之醛衍生物（Royer, G.P., 美國專利第 4,002,531 號）。

通常，數股（例如 5 至 10）之一個或多個 PAGs，例如一個或多個 PEG（分子量約 5 kDa 至約 10 kDa）可經由一級胺基（離胺酸殘基之 ϵ 胺基以及 N-端胺基酸之 α 胺基）偶聯至目標蛋白質。最近，已合成內含較高分子量（例如，12 kDa, 20 kDa 或 30 kDa）之單股 mPEG 的共軛體。共軛體血漿之半生期與增加分子量及 / 或增加偶聯 PEG 的股數之間有直接的相關（Knauf, M.J., et al., *supra*; Katre, N.V. (1990) *J Immunol* 144:209-213; Clark, R., et al., (1996) *JBiol Chem* 271:21969-21977; Bowen, S., et al., (1999) *Exp Hematol* 27:425-432; Leong, S.R., et al., (2001) *Cytokine* 16:106-119）。另一方面，增加 PEG 偶聯至各蛋白質分子之股數目，修飾蛋白質（尤其是受體-結合蛋白質）必需區域的胺基以及因此損害蛋白質的生物學功能之或然率將會增加。對於含有許多胺基之較大型蛋白質，以及對低分子量受質之酵素

而言，增加反應時間而減低比活性是可接受的，因為彼可使內含 PEG 之共軛體在活體內之生物生產活性淨增加。然而對於一些與細胞-表面受體交互作用產生功能的較小型蛋白質（例如細胞激動素）而言，則已有研究報導指出，較高取代程度會減少功能活性，甚至於其使血液半生期加長之優點亦不足以補償（Clark, R., et al., supra）。

因此，爲了延長治療性蛋白質（例如酵素）的生物活性及降低治免疫反應性，聚合物共軛技藝是已爲大家接受（參閱例如，美國的暫時申請案第 60/436,020 號，申請日期 2002 年 12 月 26 日，以及美國的暫時申請案第 60/479,913 以及 60/479,914 號，兩者的申請日期爲 2003 年 6 月 20 日，該揭示全文在此併入參考文獻）。治療性蛋白質之分類將有益於尤其是減低 β 干擾素，尤其是 β 干擾素-1b（"干擾素- β -1b；序列確認號碼：1）之免疫反應性（The IFNB Multiple Sclerosis Study Group (1996) Neurology 47:889-894）。然而，聚合物與藉由細胞-表面受體之專一性結合而作用的調控蛋白質進行共軛通常會：

（1）干擾該結合作用；（2）顯著地縮小細胞激動素促效劑訊息傳遞之劑效；以及（3）顯著地縮小細胞激動素拮抗劑之競爭性效劑。該受體-結合活性降低的共軛體已發表的實施例包含粒細胞集落刺激因子（"G-CSF"）聚合物共軛體（Kinstler, O., et al., PCT 公告第 WO 96/11953 號；Bowen, S., et al., supra）；人類生長激素（"hGH"）（Clark, R., et al., supra）；hGH 拮抗劑（Ross, R.J.M., et

al., (2001) J Clin Endocrinol Metab 86:1716-1723; 以及干擾素- α (Bailon, P., et al., (2001) Bioconjug Chem 12:195-202; Wylie, D.C., et al., (2001) Pharm Res 18:1354-1360; and Wang, Y.-S., et al., (2002) Adv Drug Deliv Rev 54:547-570) 等。極端的案例中，聚合物與第一型白細胞介素 5 ("IL-15") 偶聯可將類白細胞介素-2-生長因子轉換成細胞增殖抑制劑 (Pettit, D.K., et al., (1997) J Biol Chem 272:2312-2318)。不受限於理論，此 PEG 化的不佳效應之機制可能涉及在受體交互作用中因大體積的 PEG 基團造成之空間障礙、電荷中和，或以上兩者。

因此，需要產生內含 PAG (例如內含 PEG 及/或 PEO) 共軛體之方法，尤其是水溶性聚合物以及受體-結合蛋白質之共軛體，並保存實質上生物活性 (例如至少約 40%)，幾乎完全的生物活性 (例如至少約 80%) 或本質上完全的生物活性 (例如至少約 90%)。相較於習見的聚合物共軛體，在預防性、治療性或臨床檢驗的目的下對動物引入結合體，該結合體將可在活體內提供增加溶解度、穩定性以及生物效性之有益聚合物成分，並大大地提高效能或功用。

【發明內容】

本發明能滿足以上之需要，並提供方法製備水溶性聚合物，例如：聚(乙二醇)、以及其衍生物，與生物活性

成份，尤其是受體-綁蛋白質，尤其是治療的或臨床檢驗生物活性成份，例如細胞激動素包括 β 干擾素，最明確的說是 β 干擾素-1b 之共軛體。本發明亦提供由該方法產生之共軛體。相較於對應的非共軛結合的生物活性成份，本發明共軛體可增加穩定性（即較長的庫存壽限以及在活體內較長的半生期）。此外，相較於具相同生物活性成份且聚合物隨機附著在多肽鏈主鏈上溶劑-易接近的位點所製備的共軛體，本發明共軛體可增加受體-結合活性，其可在體外測量或使用，並增加效能，其可在體外或在活體內測量。此外，本發明亦提供包含該結合體的組成物、內含該結合體及組成物之組套以及在各種治療的以及臨床療程中使用此結合體及組成物之方法。

具體實施例之一中，本發明提供提高細胞激動素效能之方法。依據本發明此特色之某些方法包含，例如：選擇地偶聯一個或多個合成的水溶性聚合物至細胞激動素之胺基端胺基酸，其中胺基端胺基酸是位於細胞激動素之一個或多個受體-結合功能部位的遠端。本發明提供用以提高細胞激動素之效能的相關方法，包含：例如在位於或接近一個或多個細胞激動素糖基化作用位點上選擇性地偶聯一個或多個合成的水溶性聚合物，其中一個或多個糖基化作用位點是位於細胞激動素之一個或多個受體-結合功能部位的遠端。

應用於本發明此類方法的適當聚合物包括（但非限於）：一種或多種聚伸烷基乙二醇類（包括，但非限於：一

種或多種聚（乙二醇）、一種或多種單甲氧基-聚（乙二醇）以及一種或多種單羥基聚（乙二醇）、一種或多種聚伸烷基氧化物、一種或多種聚環氧乙烷、一種或多種聚烯烴醇類，例如：聚乙烯醇、一種或多種聚羧酸酯、一種或多種聚（乙烯基吡咯烷酮）、一種或多種聚（氧基伸乙基-氧基亞甲基）、一種或多種聚（胺基酸）、一種或多種聚丙烯醯基-嗎福啉、一種或多種由一種或多種醯胺以及一種或多種伸烷基氧化物組成之共聚物、一種或多種聚葡萄糖以及一種或多種玻尿酸。適用於應用於本發明方法之聚合物典型地包含的分子量介於約 1 kDa 至約 100 kDa 之間，或更明確的說是包含的分子量介於約 8 kDa 至約 14 kDa 之間；包含的分子量介於約 10 kDa 至約 30 kDa 之間；包含的分子量介於約 18 kDa 至約 22 kDa 之間；或約 20 kDa 或約 30 kDa。

各種細胞激動素以及摹仿或對抗經專一性細胞-表面受體調節的對應的細胞激動素生物學效應之類似物均適用於製備本共軛體。此類化合物包含具有四個螺旋束構造之細胞激動素（包括，但非限於：粒細胞集落刺激因子（G-CSF）、巨噬細胞菌落-刺激因子（M-CSF）、粒細胞-巨噬細胞菌落-刺激因子（GM-CSF）、白血病抑制性因子（LIF）、紅細胞生成素（Epo）、促血小板生成素（Tpo）、幹細胞激動素（SCF）、Flt3 配體、制癌蛋白 M（OSM）、第二型白細胞介素（白細胞介素 2）、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-9、IL-10、IL-11、IL-12（p35

次單體)、IL-13、IL-15、IL-17、干擾素- α (干擾素- α)、干擾素 β (干擾素- β)(尤其是干擾素- β -1b)、干擾素以及突變蛋白共有序列、其變異體、類似物以及衍生物)以及具有 β -平版或 β -桶狀構造之細胞激動素(包括,但非限於:腫瘤壞死因子 α (TNF- α)、IL-1 α 、IL-1 β 、IL-12(p40次單體)、IL-16、表皮生長因子(EGF)、胰島素樣生長因子-1(IGF-1)、基本成纖維細胞生長因子(bFGF)、酸性的FGF、FGF-4以及角質細胞生長因子(KGF; FGF-7)、以及突變蛋白、其變異體、類似物以及衍生物)。

適用於依據本發明使用之尤佳的細胞激動素包含白細胞介素2;干擾素- α ;干擾素- β ;IGF-1;EGF以及bFGF。亦尤其適用於使用者是前述的細胞激動素與此類細胞激動素之突變蛋白、變異體以及衍生物之競爭性拮抗劑。

在某些具體實施例中,此一個或多個聚合物是共價鍵地偶聯(尤其是經由二級胺聯結)至細胞激動素胺基端胺基酸之 α 胺基。在其它具體實施例中,一個或多個聚合物是共價鍵地偶聯至細胞激動素上胺基端胺基酸之化學反應性的側鏈基團(例如:羥基、氫硫基、胍基、咪唑基、胺基、羧基或醛派生物)。在其它具體實施例中,聚合物在細胞激動素之胺基端胺基酸或在或接近一個或多個模仿糖基化作用有利效應的糖基化作用位點上偶聯至細胞激動素。在相關的具體實施例中,聚合物在細胞激動素之或接近一個或多個模仿糖基化作用有利效應的糖基化作用位點上

偶聯至細胞激動素，其中"過糖基化作用"意指共價附著上除了那些天然存在的構造以外之簡單或複合的糖類部份。

本發明亦提供本發明方法產生之共軛體。本發明共軛體包含一種選擇的細胞激動素或其選擇的拮抗劑（例如說明如上），偶聯至一個或多個）成的水溶性聚合物（例如說明如上），其中一個或多個聚合物是偶聯至細胞激動素之胺基端胺基酸以及其中胺基端胺基酸是位於選擇的細胞激動素之一個或多個受體-結合功能部位的遠端。此外，本發明共軛體包含一種選擇的細胞激動素或其選擇的拮抗劑（例如說明如上），偶聯至一個或多個合成的水溶性聚合物（例如說明如上），其中一個或多個聚合物係偶聯至選擇的細胞激動素之一個或多個糖基化作用位點以及其中一個或多個糖基化作用位點是位於細胞激動素之一個或多個受體-結合功能部位的遠端。聚合物共軛結合本發明促效劑時宜使聚合物附著位點位於所有受體-結合功能部位的遠端。聚合物共軛結合本發明某結合功能部位的遠端，但不一定是促效劑重要的訊息傳遞之所有受體-結合功能部位的遠端。本發明亦提供組成物，尤其是藥學組成物：包含一種或多種本發明共軛體以及一種或多種其它成份，例如一種或多種醫藥學上可接受的稀釋劑、賦形劑或載體。本發明亦提供包含一種或多種本發明之共軛體、組成物、及/或藥學組成物之組套。

本發明亦提供預防、診斷、或治療患有或有身體病症傾向之動物（例如哺乳動物，例如人類）其身體病症的方

法。該方法包含，例如：對動物投用有效量之一種或多種本發明共軛體、組成物或藥學組成物。依據本發明方法可適當地治療或預防的身體病症包括，但非限於：癌症（例如：乳癌、宮癌、卵巢癌、前列腺癌、睪丸癌、肺癌、白血病、淋巴瘤、結腸癌、胃腸的癌症、胰腺癌、膀胱癌、腎癌、骨癌、神經癌症、頭部以及頸癌症、皮膚癌、肉瘤、癌、腺瘤以及骨髓癌）；傳染性疾病（例如：細菌的疾病、黴菌疾病、寄生蟲病以及病毒疾病（例如：病毒性肝炎、心臟增生病毒引起的疾病、人類免疫不全病毒/愛滋病、及其類似者）；以及遺傳疾病（例如：貧血、中性血細胞減少症、血小板減少症、血友病、侏儒症以及重症聯合免疫缺陷（"SCID"）；自體免疫病症（例如：牛皮癬、全身性紅斑狼瘡以及類風濕性關節炎）以及神經變性疾病病症（例如：各式各樣不同形式以及階段的多發性硬化（"MS"），例如：復發性-緩解型 MS、初級進行性的 MS 以及二級進行性的 MS；克雅二氏病；阿爾茨海默病；及其類似者）。

相關的具體實施例中，本發明亦提供決定聚合物用量之方法，其係經還原烷化附著至具有 N-端絲胺酸殘基蛋白質之胺基末端，合成聚合物-蛋白質結合體。依據本發明特色之方法包含，例如：（a）將共軛體與充分的量氧化劑反應充分的時間以從聚合物分解蛋白質之絲胺酸殘基；以及（b）測量製劑中非共軛結合蛋白質增加之比例。依據該方法適用之蛋白質包括，但非限於：細胞激動素（

包括 β 干擾素（尤其是 β 干擾素-1b，較佳者具有序列確認號碼：1 之胺基酸序列）以及巨核細胞生長以及發生因子）。用於某些本發明方法之氧化劑為高碘酸鹽包括，但非限於：偏高碘酸鈉、偏高碘酸鉀、偏高碘酸鋰、高碘酸鈣、高碘酸鋇以及高碘酸。測量製劑中非共軛結合蛋白質比例增加的適當方法包含任何蛋白質和肽分析在技藝已知的方法，包括例如：大小排阻層析、逆相色譜法、膠體電泳、毛細管電泳、超高速離心、超濾法、光散射以及質譜儀法。

相關的具體實施例之外，本發明提供方法選擇性的氧化分裂生物活性的蛋白質 N-端絲胺酸殘基而未氧化該生物活性的蛋白質功能必需之胺基酸殘基。某些本發明方法包含，例如：（a）調整生物活性的蛋白質溶液之氫離子濃度至酸鹼度約 5 至約 10，更佳者調整酸鹼度至約 7 至約 8；（b）每生物活性的蛋白質溶液與高碘酸鹽（約 0.1 莫耳至約 10 莫耳，或更佳者約 0.5 莫耳至約 5 莫耳）攪拌；以及（c）反應該混合物至少一個小時，較佳者反應溫度介於約 2°C 至約 40°C 之間。依據該方法適用之蛋白質包括，但非限於：細胞激動素（包括 β 干擾素（尤其是 β 干擾素-1b，較佳者具有序列確認號碼：1 之胺基酸序列））。

在其他具體實施例中，本發明提供增加 β 干擾素之製劑，尤其是 β 干擾素-1b 之製劑之生物效力的方法，該方法包含去除 β 干擾素（或 β 干擾素-1b）製劑之一種或多

種抑制性成份。依據本發明此方面，可從製劑經各種技藝上已知的蛋白質和肽加工、純化及/或分析方法移除一種或多種抑制性成份，該方法包括（但非限於）一種或多種層析法，例如大小-排阻層析、逆相層析法、疏水性交互作用層析法以及親和層析法。測定給定的 β 干擾素製劑其生物效力（即相對於 β 干擾素儲備溶液，效力是否增加、減低或不受影響），可用熟悉技藝的專業人士熟知的任何在體外或在活體內之方法測定加以完成。例如，可利用對 β 干擾素有反應的細胞培養分析法測定 β 干擾素製劑之生物效力。適當的該細胞培養分析法之非限制的實施例包含抗增殖的分析、抗病毒的分析、訊息傳遞分析以及基因活化分析，該等實施例為熟悉此技藝的專業人士習知的方法。

一般熟悉此技藝的專業人士在參見下列圖示以及本發明之描述以及申請專利範圍後，即能了解本發明其它的較佳具體實施例。

【實施方式】

除非另行定義，本文中所有技藝的及科學的術語與熟悉此技藝的專業人士常用之術語有相同的意義。雖然與本發明相似或當量的任何方法及材料均可用於本發明之進行或測試，較佳的方法以及材料將描述如下。

定義

約：用於在本文中之任何數值時，本文術語之"約"意指陳述之數值之 $\pm 10\%$ （例如，"約 50°C "則包含 45°C 至 55°C 之溫度範圍；同樣地"約 100 毫莫耳濃度則"包含 90 毫莫耳濃度至 110 毫莫耳濃度之濃度範圍）。

胺基酸殘基：本文術語之"胺基酸殘基"意指專一性胺基酸，通常是涉及二個肽鍵之脫水的胺基酸，位於多肽主鏈或側鏈，當此胺基酸只涉及一個肽鍵時則位於直線的多肽鏈端點。在此技藝中胺基酸殘基係使用三字碼或單字碼表示。

拮抗劑：本文術語之"拮抗劑"意指一種化合物、分子、部分或複合物，其可實質上降低或完全地抑制給定的經由受體調節的細胞激動素對細胞、組織或生物體的生物及/或生理的效應。拮抗劑可用各種方法進行該效應，包括（但非限於）和促效劑競爭細胞表面上之結合部位或受體；以實質上減低促效劑之方法和促效劑交互作用；減少或完全地抑制促效劑結合至細胞表面受體之能力；結合並誘導細胞表面受體構像改變，始該受體改變構造而不再結合促效劑（或僅可以降低的或實質上降低親和力及/或效率之方式結合）；誘導結合促效劑之細胞、組織或生物體的生理改變（例如增加細胞內信息複合物；增加轉錄的抑制劑；減少細胞表面配體受體表現；等），使促效劑結合至細胞上誘發的生理的信號降低、實質上降低或完全地抑制；以及熟悉技藝的專業人士熟知的拮抗劑進行其活性之其它機制。熟悉技藝的專業人士將瞭解，拮抗劑可帶有與其

拮抗之配體相似的構造（例如：拮抗劑可為突變蛋白、變異體、片段或促效劑衍生物），或可帶有完全不相關的構造。

生物活性成份：本文術語之"生物活性成份"意指一種化合物、分子、部分或複合物，彼在活體內、在體外或在細胞、組織、器官或生物體體外具有特定的生物活性，且能結合一個或多個聚伸烷基乙二醇類以形成本發明共軛體。較佳的生物活性成份包括（但非限於）：蛋白質以及多胜肽，例如在此描述者。

結合：本文術語之"結合的"意指共價鍵的結合或附著，例如化學地偶聯，或非共價鍵的結合，例如：離子相互作用、忌水性交互作用、氫鍵等。共價鍵可為，例如：酯、醚、磷酸酯、硫酯、硫醚、胺基甲酸酯、醯胺、胺、肽、醯亞胺、腙、醯肼、碳-硫鍵結、碳-磷鍵結等。本文術語之"結合的"是廣義的，以及包括例如"偶聯的"、"共軛結合的"以及"附著的"。

共軛體/共軛作用：本文之"共軛體"意指共價附著聚合物，例如：PEG 或 PEO 至生物活性成份，例如：蛋白質或糖蛋白質之產物。"共軛作用"意指形成上一句子定義之結合。任何熟悉此技藝的專業人士常用之偶聯聚合物與生物活性材料之方法均可用於本發明。

偶聯的：本文術語之"偶聯的"意指經共價鍵或強的非共價鍵的交互作用加以附著，典型且較佳者是經共價鍵附著。任何熟悉此技藝的專業人士常用之偶聯生物活性材料

之方法均可用於本發明。

細胞激動素：本文術語之"細胞激動素"定義為分泌的調控蛋白質，其可以內分泌、旁分泌或自分泌之方式控制細胞之倖存、生長、分化、及/或啟動效應之功能（參見 Nicola, N.A., *supra*; Kossiakoff, A.A., et al., (1999) *Adv Protein Chem* 52:67-108）。依據此定義，細胞激動素包含介白素：菌落-刺激因子、生長因子、以及各種細胞製作之其它肽因子，包括（但非限於）本文特別揭示或舉例者。與其細胞激動素近親相似，多肽荷爾蒙以及生長因子可經結合至標的細胞表面之專一性受體蛋白啟動其調控的功能。

疾病、病症、症狀：本文術語之"疾病"或"病症"意指任何人類或動物之不良症狀，包括：腫瘤、癌症、過敏、成癮、自體免疫性、感染、中毒或最佳的精神或生體功能受損。"症狀"用於此包括疾病以及病症，且亦指生理的狀態。例如，能育性是生理的狀態但不是疾病或病症。本發明組成物經降低能育性適用於預防懷孕，因此描述為治療症狀（能育性），但不是治療病症或疾病。其他疾病是為平常的熟悉此技藝的專業人士所瞭解。

有效量：本文術語之"有效量"意指給定的共軛體或組成，其為必需的或足以產生所要求的生物效應的量。有效量之給定的本發明共軛體或組成，其用量可達成選擇的結果，以及該量可用熟悉此技藝的專業人士熟知的常規方法測定，可使用技藝上已知的及/或在此描述之方法測定

，而不須要過度的實驗。例如，治療免疫系統缺乏之有效量必需可導至免疫系統活化，造成抗原這暴露下發生抗原-專一性免疫反應。此術語亦和"充分的量"同義。任何特定用途的有效量可取決於其處理的疾病或症狀、投用的特定組成、投用的路線、病患大小、及/或疾病或症狀嚴重性等因子變化。平常的熟悉此技藝的專業人士可實驗的測定本發明特定的共軛體或組成之有效量，而不必過度的實驗。

一、a、或 an：本文術語之"一"、"a"或"an"，除非特別說明意指"至少一個"或"一個或多個"。

PEG：用於此之"PEG"包括所有環氧乙烷聚合物，包括直線的或分支的或多臂的以及蓋上端點帽或以羥基終止的聚合物。"PEG"包括技藝上已知的聚合物：聚（乙二醇）、甲氧基聚（乙二醇）或 mPEG 或聚（乙二醇）-單甲醚、烷氧基聚（乙二醇）、聚（環氧乙烷）或 PEO、 α -甲基-共羥基-聚（氧基-1,2-乙烷二基）以及聚環氧乙烷，以及其他用於在此技藝中之環氧乙烷聚合物。

PEG 化、聚乙二醇化以及控制組聚乙二醇化：用於此"PEG 化"意指任何共價偶聯 PEG 與生物活性的目標分子（尤其是受體-結合蛋白質）之方法。結合產物係稱為"聚乙二醇化的"產物。用於此"控制組聚乙二醇化"意指，PEG 化反應混合物中未曾經共價附著 PEG 之蛋白質部分。然而，控制組聚乙二醇化的產物可於反應期間或以後的純化步驟發生改變，例如 PEG 化期間由於曝露至還原劑的緣

故被還原烷化及 / 或於加工及 / 或純化步驟期間移除一個或多個抑制性藥劑、化合物等。

多肽：本文術語之 "多肽" 意指單體 (胺基酸) 經醯胺鍵結 (亦為習知的肽鍵) 線性的聯結組成的分子。意指胺基酸的分子鏈以及不是指產物特定之長度。因此，在此定義內之多肽包含肽類、二肽、三肽類、寡肽以及蛋白質。此術語亦意指此多肽後-表現修飾之產物，例如糖化作用、過糖基化作用、乙醯化、磷酸化等。多肽可源自天然的生物的來源或經重組脫氧核糖核酸科技製作，但不一定是轉譯自指定之核酸序列。可以任何方式包括化學合成產生。

蛋白質和糖蛋白質：本文術語之蛋白質意指多肽，一般而言其大小約 10 個或更多、20 個或更多、25 個或更多、50 個或更多、75 個或更多、100 個或更多、200 個或更多、500 個或更多、1,000 個或更多、或 2,000 個或更多胺基酸。一般而言蛋白質有明確的三維結構，其雖並不全然具有此種結構，而被認為有折疊構造，肽類以及多胜肽則相反，通常不擁有明確的三維結構，但卻具有大量不同構像，稱為展開構造。然而肽類亦可有明確的三維結構。本文術語之糖蛋白質意指經由含氧或含氮胺基酸殘基（例如絲胺酸殘基或天門冬醯胺酸殘基）之側鏈偶聯至至少一個醣類部分之蛋白質。

遠距：本文術語之 "遠距"（"遠距的 N-末端胺基酸" 或 "遠距的糖基化作用位點"）意指位於一個或多個蛋白質聚合物之一個或多個附著位點遠端或空間的遠離蛋白質一個

或多個受體-結合區域或功能部位（以分子模型評估）之構造。聚合物在遠距的附著位點偶聯（通常為 N-末端胺基酸），因此受體-結合蛋白質稱為"遠距的 N-端"或"RN"受體-結合蛋白質）或糖蛋白質之一個或多個醣類部份或糖基化作用位點（因此受體-結合蛋白質稱為"遠距的糖基化作用"或"RG"受體-結合蛋白質）偶聯不會導至實質上蛋白質之它的受體結合之位阻。因此，細胞激動素之胺基-末端胺基酸或糖基化作用位點為"位於一個或多個受體-結合功能部位的遠距"，當細胞激動素分別偶聯（例如共價附著）水溶性聚合物至胺基-末端胺基酸或糖基化作用位點，不會實質上干擾細胞激動素結合至它的受體，尤其是細胞-表面受體之能力。經確認給定的細胞激動素可含有一個以上之受體-結合功能部位。此情況下細胞激動素之胺基-末端胺基酸或糖基化作用位點可位於該功能部位或從一個以上之該功能部位的遠距，只要偶聯胺基-末端胺基酸或糖基化作用位點不實質干擾上細胞激動素一個或多個受體-結合功能部位與它的受體之結合，仍考慮為"位於一個或多個受體-結合功能部位之遠距"。無論偶聯是否實質上干擾蛋白質結合至它的受體之能力，其可使用熟悉技藝的專業人士習知的測定配體-受體結合之技藝立即測定。

如展示於本文之圖 1d，PEG 為高度延伸且有彈性的聚合物，相對於分子量相似的蛋白質，其在溶液中占有較大體積。雖然 PEG 附著的胺基酸殘基可距離一個或多個

受體 - 結合部位非常遙遠，然而聚合物部份在某種程度上可干擾受體結合。該干擾之或然率隨分子量以及溶液中聚合物佔有之體積而增加。任何案例中 PEG 定向的附著至一個或多個距離受體 - 結合區域遙遠的位點，將比隨機 PEG 化較少的干擾細胞激動素功能。

評估配體 - 受體結合之方法包括（而未限制）：競爭性結合測定、放射性的受體結合測定、以細胞為基礎之測定、表面胞質基因組共振測定、動態的光散射、超高速離心以及超濾法。

實質上、實質上：用於在此中，若共軛結合蛋白質結合至受體知速率及/或結合量不少於約 40%、約 50%、約 60%、約 65%、約 70%、約 75%、約 80%、約 85%、約 90%、約 91%、約 92%、約 93%、約 94%、約 95%、約 96%、約 97%、約 98%、約 99%或約 100%或更多，該對應的未共軛結合的細胞激動素之結合速率及/或結合量，則蛋白質之聯結"實質上"不干擾蛋白質結合至它的受體之能力。

治療：本文術語之"治療"、"治療"、"治療的"或"治療"意指預防及/或治療。當例如關於傳染病時，本文術語可意指預防性的治療以增加宿主對對抗病源菌感染之抗性，換言之減低宿主將來感染的以及顯示病源菌感染疾病的症候之可能性，與宿主感染之後的治療使宿主可對抗感染，例如：減低或滅絕感染或預防惡化。

概述

本發明提供合成受體結合蛋白質聚合物共軛體之方法，相對於其中一個或多個聚合物是隨機附著的相同之受體-結合蛋白質聚合物共軛體，其可未料到地保持高受體-結合活性。經由使用 X-光/結晶學/以及核磁共振的構造分析、突變的分析以及分子模式化軟體，本案發明人確認了涉及或是不涉及結合至其受體之細胞激動素 PEG 化位點。依蛋白質分類，此類細胞激動素是受體結合蛋白質。選擇目標聚合物附著至受體結合蛋白質不涉及受體交互作用之區域的合成策略，可避免某些討人厭的位阻以及產生的聚合物共軛體可保持獨特的高效能。受體結合蛋白質之胺基端殘基距離一個或多個受體-結合區域或功能部位非常遙遠者，在此定義成 "遠距的 N-端" 或 "RN" 受體結合蛋白質；彼包含胺基端胺基酸位於蛋白質受體-結合部位或位點遙遠的所有細胞激動素或拮抗劑。

本發明其它具體實施例中，製作共軛體包含將一個或多個合成聚合物（例如一個或多個聚乙二醇）共價鍵地偶聯至天然的糖基化作用位點遠離一個或多個受體-結合區域或功能部位之細胞激動素。依據本發明此特色，當合成聚合物是偶聯至糖基化作用位點區域，共軛體之生物活性成份（例如細胞激動素）將顯示有保存良好的受體-結合活性。此受體結合蛋白質稱為 "RG" 受體結合蛋白質。當親水性的或兩性的聚合物選擇地偶聯於或接近該 "遠距離的糖基化作用" 位點，尤其是當目標蛋白質是天然地糖基

化的非糖基化的蛋白質形式，則聚合物可摹仿天然碳水化合物優良的效應，例如凝集、穩定性及/或溶解度。因此於或接近糖基化作用位點附著聚合物在此稱為"假糖基化作用"。因此，本發明提供合成共軛體之方法，其中位點-選擇性偶聯之合成聚合物係有效地代替天然醣類部份。相較於其它未糖基化的蛋白質形式，假糖基化作用之結果可改良溶解度、減低凝集以及延緩從血流之清除。由於原核的生物體一般而言不糖基化彼表現之蛋白質，此解決方式因此尤其是可有利的製備共軛體以及蛋白質組成物，該蛋白質係為重組脫氧核糖核酸科技於原核的宿主細胞（例如細菌，例如大腸桿菌）製作之蛋白質。

類似的，糖蛋白質醣類部分選擇的 PEG 化可產生"假過糖基化作用"之糖蛋白質。此方法描述於例如 C. Bona et al.之 PCT 公告第 WO 96/40731 號，該揭示全文在此併入參考文獻。若蛋白質包含天然糖基化作用訊息或由重組脫氧核糖核酸科技製作之糖基化作用訊息，則真核的生物體一般而言會糖基化彼表現之蛋白質，因此該解決方式可尤其是有利的製備共軛體以及蛋白質組成物，該蛋白質係為重組脫氧核糖核酸科技於真核的宿主細胞（例如酵母菌、植物細胞以及動物細胞，包括哺乳動物的以及昆蟲細胞）製作之蛋白質。該假糖基化的以及假過糖基化的 RG 受體結合蛋白質屬於本發明範圍之內。

如此本發明亦包含實質上保持、幾乎完全的或本質上完全的受體-結合活性之"RAT"受體結合蛋白質聚合物共軛

體以及保持實質上、幾乎完全的或本質上完全的受體-結合活性之假氧糖基化的或假過糖基化的"RG"受體結合蛋白質。本文中"保持實質上、幾乎完全的或本質上完全的受體-結合活性"之細胞激動素，共軛結合一個或多個依據本發明水溶性聚合物時，共軛結合之細胞激動素實質上不干擾蛋白質結合至它的受體之能力，即蛋白質共軛結合至它的對應受體的速率及/或結合量不少於對應的蛋白質非共軛結合的形式之約 40%、約 50%、約 60%、約 65%、約 70%、約 75%、約 80%、約 85%、約 90%、約 91%、約 92%、約 93%、約 94%、約 95%、約 96%、約 97%、約 98%、約 99%或約 100%或更多。本發明範圍亦包括分類成"RN"以及"RG"之受體結合蛋白質的受體結合蛋白質聚合物共軛體。後一蛋白質之二個實施例是干擾素 β （尤其是 β 干擾素-Ib）以及白細胞介素 2。

其它具體實施例中，本發明提供合成受體結合蛋白質聚合物共軛體之方法，相對於其中一個或多個聚合物是隨機附著的相同之受體-結合蛋白質聚合物共軛體，其可未料到地保持高受體-結合活性。本發明亦提供該方法製作之共軛體，以及包含一個或多個本發明此類共軛體之組成物，其可進一步的包含一個或多個附加的成份或試劑，例如一個或多個緩衝劑鹽類，一個或多個醣類賦形劑，一個或多個運載蛋白，一個或多個酵素，一個或多個兩性介面活性劑，一個或多個核酸分子，一個或多個聚合物例如非共軛結合的 PEG 或聚伸烷基乙二醇等。本發明亦提供包

含本發明之結合體及/或組成物之組套。

本發明亦提供醫藥學的或獸醫組成物，其係包含本發明共軛體以及至少一個醫藥學的或獸醫學可接受的賦形劑或載體。本發明亦提供使用該組成物治療或預防各種身體病症的方法，該方法包含對患有或有身體病症或症狀之傾向的動物投用有效量之一種或多種本發明共軛體或組成物。

此外，本發明提供穩定受體結合蛋白質以及於工業之細胞培養產生彼之方法，因此未料到地得實質上既保留生物活性以及在工業用途上增加持續作用期間之合併效應的到高效率產品。此獨特的本發明之高效能共軛體可反映出獨特的高生物生產量、獨特的高重組蛋白質表現之含量以及增進其它生物工藝之效率。

於其它具體實施例中，本發明提供增加 β 干擾素製劑（尤其是 β 干擾素-1b 製劑）生物效力的替代方法。依據本發明此方面之方法可包含，例如從 β 干擾素（或 β 干擾素-1b）製劑去除一種或多種抑制性成份。依據本發明此方面，可從製劑經各種技藝上已知的蛋白質和肽加工、純化及/或分析方法移除該一種或多種抑制性成份，該方法包括（但非限於）一種或多種層析法，例如大小-排阻層析、逆相層析法、疏水性交互作用層析法以及親和層析法。實際尚，測定給定的 β 干擾素製劑其生物效力（即相對於細胞激動素如 β 干擾素的儲備溶液，生物效力是否增加、減低或不受影響），可用熟悉技藝的專業人士熟知的任

何在體外或在活體內之方法測定加以完成。例如，可利用對 β 干擾素有反應的細胞培養分析法測定 β 干擾素製劑之生物效力。適當的該細胞培養分析法之非限制的實施例包含抗增殖的分析、抗病毒的分析、訊息傳遞分析以及基因活化分析，該等實施例為平常的熟悉此技藝的專業人士習知的方法。

相關的具體實施例中，本發明亦提供決定經還原烷化合成之聚合物-蛋白質結合體附著至具有 N-端絲胺酸殘基蛋白質之胺基末端之聚合物含量之方法。依據本發明特色之方法包含，例如：（a）將共軛體與充分的量氧化劑反應充分的時間以從聚合物分解蛋白質之絲胺酸殘基；以及（b）測量製劑中非共軛結合蛋白質增加之比例。依據該方法適用之蛋白質包括，但非限於：細胞激動素（包括 β 干擾素（尤其是 β 干擾素-1b，較佳者具有序列確認號碼：1 之胺基酸序列）以及巨核細胞生長以及發生因子（Guerra, P.I., et al., (1998) Pharm Res 15:1822-1827，全文在此併入參考文獻）。用於某些本發明方法之氧化劑為高碘酸鹽包括，但非限於：偏高碘酸鈉、偏高碘酸鉀、偏高碘酸鋰、高碘酸鈣、高碘酸鋇以及高碘酸。測量製劑中非共軛結合蛋白質比例增加的適當方法包含任何蛋白質和肽分析在技藝已知的方法，包括例如：大小排阻層析、逆相色譜法、膠體電泳、毛細管電泳、超高速離心、超濾法、光散射以及質譜儀法。

相關的具體實施例之外，本發明提供方法選擇性的氧

化分裂生物活性的蛋白質 N-端絲胺酸殘基而未氧化該生物活性的蛋白質功能必需之胺基酸殘基。某些本發明方法包含，例如：（a）調整生物活性的蛋白質溶液之氫離子濃度至酸鹼度約 5 至約 10，更佳者調整酸鹼度至約 7 至約 8；（b）每生物活性的蛋白質溶液與約 0.1 莫耳至約 10 莫耳，或更佳者約 0.5 莫耳至約 5 莫耳，之高碘酸鹽攪拌；以及（c）反應該混合物至少一個小時，較佳者反應溫度介於約 2℃ 至約 40℃ 之間。依據該方法適用之蛋白質包括，但非限於：細胞激動素（包括 β 干擾素（尤其是 β 干擾素-1b，較佳者具有序列確認號碼：1 之胺基酸序列））。

方法

本案發明人發現聚合物鎖定 "RN" 受體-結合蛋白質胺基端胺基酸或 "RG" 受體-結合蛋白質糖基化作用位點鄰近範圍，可確保聚合物附著至一個或多個蛋白質受體-結合區域或功能部位之遙遠的位點，從而最小化附著的聚合物分子與受體交互作用之位阻。因此，依據本發明方法聯接蛋白質比起聚合物附著在涉及結合至它受體的部分或鄰近的部分，可保存較高百分比的受體-結合活性。此原理，可導致未料到地高度保留受體結合活性，可說明之受體結合蛋白質，其係選自：鹼性成纖維細胞生長因子（"bFGF" 或 "FGF-2"）、表皮生長因子（"EGF"）、胰島素樣生長因子-1（"IGF-1"）、干擾素- α （"干擾素- α "）、 β 干擾素

("β 干擾素" 包括但非限於 β 干擾素 -1 b) 、 粒細胞 - 巨噬細胞 - 群落刺激因子 ("GM-CSF") 、 單核細胞群落刺激因子 ("M-CSF") 、 Flt3 配體、幹細胞激動素 ("SCF") 、 介白素 2、3、4、6、10、12、13 以及 15、轉形生長因子 -β ("TGF-β") 、 人類生長激素 ("hGH") 、 促乳素、胎盤激乳素荷爾蒙、睫狀神經營養因子 ("CNTF") 、 瘦素以及摹擬此類蛋白質或其受體 - 結合拮抗劑之受體 - 結合 - 蛋白質構造的類似物。相反的，大的聚合物選擇的附著至干擾素 -γ 胺基末端則不預期可保存大部份的細胞激動素活性，由於該偶聯預期可干涉活性的二聚物與它的受體之結合 (基於 Walter, M.R., et al., (1995) Nature 376:230-235 之數據) 。

本發明相關的具體實施例中，聚合物是偶聯至受體結合蛋白質突變蛋白 (其功能是結合至一個或多個相同受體而未引發訊息傳遞之天然的蛋白質競爭性拮抗劑) 之胺基端殘基。實施例是含有點突變 G120R (Sundstrom, M., et al., (1996) J Biol Chem 271:32197-32203) 之 hGH 拮抗劑之聚合物共軛體以及含有點突變 G129R (Goffin, V., et al., (1997) J Mammary Gland Biol Neoplasia 2:7-17; Chen, W.Y., et al., (1999) Clin Cancer Res 5:3583-3593; Chen, W.Y., PCT Publication No. WO 99/58142 A1) 之促乳素拮抗劑。選擇的點突變、截斷或刪除可製作其它受體結合蛋白質拮抗劑 (參閱例如 Tchelet, A., et al., (1997) Mol Cell Endocrinol 130:141-152; Peterson,

F.C., (1998) Identification of Motifs Associated with the Lactogenic and Somatotropic Actions of Human Growth Hormone, Ph.D. Dissertation, Ohio State University, UMI # 9822357) 。

本發明 "RG" 受體結合蛋白質其它具體實施例中，本發明方法使一個或多個合成聚合物附著至醣蛋白受體結合蛋白質附著醣類部份天然位點的近端。導致此類受體結合蛋白質 "假溶氧糖基化作用" (例如當彼經重組脫氧核糖核酸科技於大腸桿菌或其它不進行後-轉譯的糖基化作用的原核細胞中表現) 或導致其糖蛋白質形式 "假過糖基化作用" (例如天然製作之醣蛋白或真核的宿主細胞 (例如酵母菌、植物細胞以及動物細胞包括哺乳動物的以及昆蟲細胞) 製作之進行後-轉譯的糖基化作用之醣蛋白) 。實施例是干擾素 α 以及 β 、紅細胞生成素 ("Epo") 以及第二型白細胞介素之聚合物共軛體。合成聚合物附著於或接近天然的糖基化作用位點可用技藝上已知的任何方法進行，包括 R.J. Goodson, et al. ((1990) Biotechnology 8:343-346) 的突變方法以及 R.S. Larson, et al. ((2001) Bioconjug Chem 12:861-869) 的方法，此類參考文獻之揭示全文在此併入參考文獻。

某些蛋白質胺基端之修改已揭示於先前的文獻 (參閱例如 Dixon, H.B.F., (1984) JProtein Chem 3:99-108) 。例如 N-端修改之蛋白質已報導可穩定某些蛋白質對抗胺肽酶之作用 (Guerra, P.I., et al., supra) ，可改良蛋白

質之溶解度 (Hinds, K., et al., (2000) Bioconjug Chem 11:195-201), 可減少 N-末端胺基電價, 或改良產生的共軛體之均一性 (Kinstler, O., et al. European Patent Application No. EP 0 822 199 A2; Kinstler, O., et al., (2002) Adv Drug Deliv Rev 54:477-485) 等。技偶聯聚合物與 N-端半胱胺酸或組胺酸殘基 α 胺基之備用方法 (技藝上已知的 "天然的化學品接合反應" 之改良步驟) 已揭示於 (Roberts, M.J., et al., PCT 公告第 WO 03/031581 A2 號以及美國專利申請案公布號碼第 2003/0105224 A1 號, 全文在此併入參考文獻)。然而, 存在之受體結合蛋白質 "RN" 以及 "RG" 亞類, 一般而言使採用的方法可選擇分類成員, 以及製劑以及使用該受體結合蛋白質聚合物共軛體作為方法保存先前未確認或描述之未料到地高功能的活性之 "RN" 受體結合蛋白質。

因此, 決定給定的細胞激動素是否有距離配之體受體-結合部位遙遠的 N-端及/或糖基化作用位點是有其優點。在配體和聚合物偶聯之前, 預測給定的細胞激動素是 "RN" 或 "RG" 配體之能力, 實質上可減低產生聚合物-配體共軛體之實驗上的須要 (例如細胞激動素或拮抗劑共軛結合聚合物例如, PEGs), 其中相對於非共軛結合的配體, 該共軛體之抗原性和產生免疫性降低, 而不實質上降低共軛結合的配體之受體-結合以及生理的活性。

據此, 其它的具體實施例中, 本發明提供方法確認以及選擇受體-結合蛋白質配體 (例如細胞激動素以及其拮

抗劑)，其係具有蛋白質配體受體-結合部位遠距離的 N-端及/或糖基化作用位點（即確認以及選擇 "RN" 或 "RG" 蛋白質之方法）。某些本發明具體實施例中，偶聯一個或多個聚合物（例如一個或多個 PEGs）之最適量位置可使用分子模式測定，例如使用分子模式化軟體觀看蛋白質（細胞激動素或其拮抗劑）之三維構造，預測一個或多個聚合物可附著至蛋白質而未實質上流失蛋白質生物的或受體-結合活性之位置（亦可參閱 Schein, C.H., *supra*）。類似的解決方式已被說明，例如偶聯 PEG 與 G-CSF 以試圖改良它對蛋白質水解的抗性（參閱發表的美國申請案第 2001/0016191 A1 號，頒給 T.D. Osslund，全文在此并入參考文獻）。應用於本發明的適當分子模式化軟體，例如觀看生物分子 3D 微觀立體結構的 RASMOL 軟體（Sayle et al., *supra*）以及其它用於產生寄存於蛋白質資料之庫匯編語言分子結構資料庫之程式（PDB；參閱 Laskowski, R.A., *supra*），為技藝上已知的軟體以及為平常的熟悉此技藝的專業人士所熟知。使用分子模式化軟體，可基於配體及其受體之結晶學分析預測高可信度測定多肽，例如細胞激動素或其拮抗劑之三維結構。以此方法，平常的熟悉此技藝的專業人士可立即測定適用於依據本發明之配體是 "RN" 或 "RG" 配體。

施行本發明時，共價鍵地偶聯水溶性聚合物與蛋白質 N-端胺基酸殘基之 α 胺基的一個合宜路線是還原烷化帶有單一的醛基團聚合物形成之席夫鹼，例如參見 G.P. Royer

(美國專利第 4,002,531 號)，但不是 J.M. Harris, et al. (美國專利第 5,252,714 號)，由於後一發明者僅申請兩端和醛基團衍生的聚合物，其為交聯劑因此不適用於合成保持實質上受體-結合活性的長效性受體結合蛋白質。

直接還原烷化 PEG-單醛類之席夫鹼與受體-結合蛋白質 N-端胺基酸 α 胺基以及遠離它的離胺酸殘基之 ϵ 胺基，可用各種方法完成，基於揭示於 J.T. Edsall 之第 4 以及 5 章 Proteins Amino Acids and Peptides as Ions and Dipolar Ions ((1943) , Reinhold Publishing Corporation, New York)，全文在此併入參考文獻。多肽 N-端胺基酸 α 胺基的酸性離解常數 ("pKa") 預期低於 7.6；而多胜肽離胺酸殘基之 ϵ 胺基的 pKa 值預期為大約 9.5。Edsall ((1943, supra) 明顯地說明僅在它的等電點為鹼性時醛類才會與胺基酸之胺基結合。

因此，基於本揭示以及在此技藝中可立即提供的資料，熟悉技藝的專業人士將認知 (1) 醛類和蛋白質 α 胺基選擇的反應偏愛之酸鹼度範圍低於 9.5 (大約是蛋白質 ϵ 胺基之 pKa)；(2) 若反應酸鹼度比 7.6 (大約蛋白質 α 胺基之 pKa) 少則醛類和 ϵ 胺基之反應速率將降低；(3) 若反應酸鹼度比 7.6 小，則醛類和 α 胺基之反應速率將比 ϵ 胺基慢，以及 (4) 酸鹼度 6.6 以下醛和 α 胺基反應之選擇性將可改良。由於後者數值大約比 α 胺基之 pKa 低一個酸鹼度單位以及比 ϵ 胺基 pKa 低三個酸鹼度單位，大約為反應性的、未質子化狀態的 α 胺基之 10% 以及大約

為 ϵ 胺基之 0.1%。如此於酸鹼度 6.6 時，未質子化的 α 胺基部分是未質子化的 ϵ 胺基的 100 倍。因此，進一步的降低酸鹼度，例如降低至 5.6，得到之選擇性增加非常小，理論上 1%之 α 胺基以及 0.01%之 ϵ 胺基將處於反應性的、未質子化的狀態。因此，在本發明某些具體實施例中，蛋白質配體（尤其是 "RN" 或 "RG" 配體，包括細胞激動素以及其拮抗劑）是於酸鹼度約 5.6 至約 7.6；酸鹼度約 5.6 至約 7.0；酸鹼度約 6.0 至約 7.0；酸鹼度約 6.5 至約 7.0；酸鹼度約 6.6 至約 7.6；酸鹼度約 6.6 至約 7.0；或酸鹼度約 6.6 下經形成配體以及一個或多個反應性的聚合物混合物之共軛結合一個或多個聚合物。如此本發明方法與已知的技藝顯著的不同，其中在配體 N-末端胺基酸殘基上進行偶聯聚合物與 α 胺基之酸鹼度約 5 (Kinstler, O., et al., (2002) *supra* ; EP 0 822 199 A2 ; 美國專利第 5,824,784 以及 5,985,265 號 ; Roberts, M. J., et al., (2002), *spura* ; Delgado, C., et al., 美國申請第公布號碼 2002/0127244 A1 號)，而進行偶聯聚合物至配體多肽鏈離胺基酸殘基 ϵ 胺基之酸鹼度為 8.0 (Kinstler, O., et al., EP 0 822 199 A2 ; 美國專利第 5,824,784 及 5,985,265 號)。

於相同方法中，本發明方法亦與酸鹼度 7.5 下使用轉麩胺醯酶進行偶聯聚（乙二醇）烷基胺衍生物至某些蛋白質的酵素方法有顯著的不同 (Sato, H., (2002) *Adv Drug Deliv Rev* 54:487-504)。

用輕微的還原劑，例如氰基硼氫化鈉或吡啶硼烷（

Cabacungan, J.C., et al., (1982) Anal Biochem 124:272-278) 還原 Schiff 鹼可形成在生理的酸鹼度下保存蛋白質 N-端 α 胺基正電荷之二級胺鍵結。保持與天然的蛋白質相同電荷之該鍵結，更能比備用聯結化學中和電荷，例如形成醯胺鍵結 (Burg, J., et al., PCT 公告第 WO 02/49673 A2 號; Kinstler, O., et al., 歐洲專利申請案第 EP 0 822 199 A2 號; Kinstler, O., et al., (1996) Pharm Res, 13:996-1002; Kita, Y., et al., supra) 或胺基甲酸酯鍵結 (Gilbert, C.W., et al., 美國專利第 6,042,822 號; Grace, M., et al., (2001) J Interferon Cytokine Res 21:1103-1115; Youngster, S., et al., (2002) Curr Pharm Des 8:2139-2157) 保存它的生物活性。

選擇的偶聯 N-末胺基酸殘基聚合物之備用方法是熟悉此技藝的專業人士所習知。包括偶聯醯肼、肼、半卡肼或其它內含聚合物胺至氧化地分解成醛類和高碘酸鹽之 N-端絲胺酸或蘇胺酸殘基之方法 (Dixon, H.B.F., supra; Geoghegan, K.F., U.S. Patent No. 5,362,852; Gaertner, H.F., et al., (1996) Bioconjug Chem 7:38-44; Drummond, R.J., et al., U.S. Patent No. 6,423,685) 。

適當的聚合物

在本發明某些具體實施例中，須要極小化聚合物例如 PEG 在反應期間分子內以及分子間此形成之交聯，其中此聚合物可偶聯至生物活性成份產生本發明共軛體。此可使

用僅一終端（"單官能基活化的 PEGs"或"單官能基活化的 PAGs"）活化的聚合物或雙官能基活化的百分比（以直線的 PEGs 為例是"雙-活化的 PEG 二元醇"）少於約 30%或多功能地活化的聚合物少於約 30%或更佳者少於約 10%或最佳者少於約 2%（w/w）之聚合物製劑加以完成。使用完全地或幾乎完全地單官能基活化的聚合物可極小化下列之形成：個別蛋白質分子內之分子內交聯、一股聚合物連接二蛋白質分子之"啞鈴"構造，以及較大的聚集物或凝膠。

適用於應用於本發明方法以及組成物的聚合物活化形式可包含技藝上已知的任何直線的或分支的、單官能基活化形式聚的合體。例如包括之分子量（排除活化基團質量）介於約 1 kDa 至約 100 kDa。適當的分子量範圍包含但非限於約 5 kDa 至約 30 kDa；約 8 kDa 至約 14 kDa；約 10 kDa 至約 20 kDa；約 18 kDa 至約 60 kDa；約 18 kDa 至約 22 kDa；約 12 kDa 至約 30 kDa,約 5 kDa,約 10 kDa,約 20 kDa 或約 30 kDa。以直線的 PEGs 為例，分子量約 10 kDa、約 20 kDa 或約 30 kDa，分別地相當於；聚合度（n）約 230、約 450 或約 680 環氧乙烷單體單位。值得一提的是在確認受體結合蛋白質"RN"以及"RG"分類存在之前，先揭示偶聯治療性蛋白質與相對地高分子量（即 >20-30 kDa）聚合物之優點（Saifer, M., et al., PCT 公告第 WO 89/01033 A1 號發表於 Feb. 9, 1989，全文在此併入參考文獻）。

本發明其它具體實施例中，獨特的保持高生物活性百分比之受體結合蛋白質共軛體可依據本發明方法經偶聯約 1 kDa、約 2 kDa 或約 5 kDa 之單官能基活化的聚合物在體外製備，例如細胞培養。爲了在體外製備，較低的分子量範圍爲較佳。

視需要，線型聚合物可於一終端或兩端具有反應性的基團，從而創造"反應性的聚合物"。在某些本發明具體實施例中，可令人滿意的使用 PEG 之單丙酸 N-羥基琥珀醯亞胺基酯衍生物，揭示於 J.M. Harris, et al., 美國專利第 5,672,662 號，全文在此併入參考文獻，或其它 N-羥基琥珀醯亞胺-活化的 PEG-單羧酸。某些其它具體實施例中，可令人滿意的使用 PEG 之單琥珀醯亞胺基碳酸酯衍生物（"SC-PEG"），描述於 M. Saifer, et al. 美國專利第 5,006,333；5,080,891；5,283,317 以及 5,468,478 號，或 PEG 之單-對硝基苯碳酸酯衍生物，揭示於 S.J. Kelly, et al., supra；L.D. Williams, et al. PCT 公告第 WO 00/07629 A2 號、L.D. Williams, et al., 美國專利第 6,576,235 號以及 M.R. Sherman, et al., PCT 公告第 WO 01/59078 A2 號。此外，其它反應性基團的型態可用以合成蛋白質聚合物共軛體。此類衍生物包括（但非限於）：PEG 之單醛衍生物（Royer, G.P., 美國專利第 4,002,531 號；Harris, J.M., et al., 美國專利第 5,252,714 號），PEG 之單胺、單-三溴苯基碳酸酯、單羰基-咪唑、單-三氯苯基碳酸酯、單-三氟苯基碳酸酯、單醯肼、單肼、單半卡

肼、單肼基甲酸酯、單硫半卡肼、單碘乙醯胺、單馬來醯亞胺、單-正吡啶基二硫化物、單-肟、單-苯基乙二醛、單-噻唑烷-2-甘肽、單硫酯、單硫醇、單三嗪以及單乙烯基磺衍生物。其它具體實施例中，細胞激動素、化學激素、生長因子、多肽荷爾蒙以及其拮抗劑可偶聯至一個或多個聚合物，描述於申請中的美國專利申請案第 10/669,597 號，全文在此併入參考文獻。

生物活性成份

如上述，本發明共軛體包含一個 PAG 或 PAO，以及尤其是一股 PEG 共價附著至一個或多個生物活性成份。一個或多個聚合物（或其股）以共價附著的生物活性成份在此稱為"共軛結合的生物活性成份"或"經修飾之生物活性成份"。此類術語與"非共軛結合的生物活性成份"、"起始生物活性成份"或"未經修飾之生物活性成份"不同，其係意指未共價附著聚合物之生物活性成份。據然而瞭解，"非共軛結合的"、"未經修飾之"或"起始"生物活性成份當相較於野生型或天然的分子可含有其它之非聚合物共軛作用或修飾，由於此生物活性成份將"非共軛結合的"、"未經修飾之"或"起始的"附著聚合物，所及依據本發明仍將考慮為"非共軛結合的"、"未經修飾之"或"起始"，該生物活性成份稱為"控制組聚乙二醇化的"生物活性成份。

本文術語之"安定"生物活性成份（或"穩定方法"或"穩定生物活性成份"）顯示生物活性成份已本發明依據方

法加以穩定（即生物活性成份已依據本發明方法共價附著至聚合物）。當相較於未經穩定之生物活性成份（即非共價附著生物活性成份的聚合物），該穩定之生物活性成份將展示某些改變的生化以及生物物理的特性。該改變的生化以及生物物理的參數，尤其是受體結合蛋白質，包括減低蛋白質水解降解之靈敏度以及尤其是在某些嚴厲的環境或實驗的條件下保存受體-結合蛋白質之活性。在本發明某些具體實施例中，改變的生化以及生物物理的參數可包括，例如，增加在活體循環內之半生期，增加生物效性，增加在體外作用之持續期間等。

任何具有生物（即生理的、生化的或醫藥學的）活性的受體-結合蛋白質（典型地細胞激動素）結合分子的胺基末端或天然或突變的-引入糖基化作用位點的遙遠部份，可適當地作為本發明之起始元件。該生物活性成份包括（但非限於）：肽類、多胜肽、蛋白質等。生物活性成份亦包含該肽類、多胜肽、蛋白質及其類似者之片段、突變蛋白以及衍生物，尤其是具有生物（即生理的、生化的或醫藥學的）活性的片段、突變蛋白以及其衍生物。

適用於本發明生物活性成份之適當的肽類、多胜肽以及蛋白質、醣蛋白及其類似者包含任何肽、多肽或蛋白質等，其具有一個或多個可供利用的胺基、硫醇基或其它基團，其係位於受體-結合區域或生物活性成份區域選擇地附著聚合物的遠端。該肽類、多胜肽、蛋白質、醣蛋白及其類似者包含細胞激動素，其可帶有任何之各種構造（

Nicola, N.A., *supra*; Schein, C.H., *supra*) 。

例如，適當的肽類、多胜肽以及重要的蛋白質包括（但非限於）包含分類上具有四個 α -螺旋束構造之細胞激動素（均為長鏈以及短鏈亞類）（參閱 Schein, C.H., *supra*）。適用於應用於本發明之各種含四個-螺旋束之蛋白質包括（但非限於）：介白素，例如：白細胞介素 2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-9、IL-10、IL-11、IL-12（p35 次單體）、IL-13、IL-15 以及 IL-17；菌落-刺激因子，例如：巨噬細胞菌落-刺激因子（M-CSF）以及粒細胞-巨噬細胞菌落-刺激因子（GM-CSF；Rozwarski, D.A., et al., (1996) *Proteins* 26:304-313）；干擾素，例如：干擾素- α 、干擾素- β （包括但非限於干擾素- β -1b）以及干擾素共有序列；白血病抑制性因子（LIF）；紅細胞生成素（Epo）；促血小板生成素（Tpo）；巨核細胞生長以及發生因子（MGDF）；幹細胞激動素（SCF），亦為技藝上已知的青灰因子（Morrissey, P.J., et al., (1994) *Cell Immunol* 157:118-131; McNiece, I.K., et al., (1995) *J Leukoc Biol* 58:14-22）；制瘤素 M（OSM）；磷脂酶-活化蛋白質（PLAP）；神經營養因子；以及其模仿肽。雖然促乳素以及生長激素是古典的荷爾蒙，廣泛的循環於身體，但與細胞激動素不同，其製作點通常接近其標的細胞，促乳素，以及生長激素與具有四個 α -螺旋束之細胞激動素屬於相同構造的分類（Nicola, N.A., *supra*; Goffin, V., et al., *supra*）以及同樣地彼是聚合物

偶聯以及產生依據本發明共軛體之適當的目標物。

長鏈 β -平板或 β -桶構造分類的受體結合蛋白質（參閱 Schein, C.H., *supra*）亦適用於應用於製備本發明共軛體以及組成物。此類包括（但非限於）：細胞激動素之腫瘤壞死因子家族，例如：TNF- α 、TNF- β 以及 Fas 配體，其係顯示 β -膠狀滾動構造； IL-1（包括 IL-1 α 以及 IL-1 β ）以及 FGF（包括鹼性成纖維細胞生長因子（bFGF）、酸性的 FGF、FGF-4 以及角質細胞生長因子（KGF；FGF-7））家族，其係顯示 β -三葉草折疊（Schein, C.H., *supra*; Schlessinger, J., *et al.*, *supra*）； IL-12； IL-16；表皮生長因子（EGF；Lu, H.-S., *et al.*, *supra*）；以及血小板衍生型生長因子（PDGFs）、轉形生長因子（包括轉形生長因子- α 以及轉形生長因子- β （TGF- β ））以及神經生長因子，其係顯示胱胺酸-網結構造。

有利地用於本發明共軛體以及組成物之蛋白質其它構造分類為富含二硫化物的混合的 α/β 細胞激動素以及生長因子（參閱 Schein, C.H., *supra*），包括但非限於：EGF 家族，其帶有 β -蜿蜒構造； IL-8； RANTES；嗜中性白血球活化肽-2（NAP-2）；基質細胞起源自因子-1 α （SDF-1 α ）；單核細胞化學趨化蛋白質（MCP-1、MCP-2 以及 MCP-3）；嗜酸性粒細胞趨化蛋白（例如嗜酸性粒細胞趨化蛋白-1、嗜酸性粒細胞趨化蛋白-2 以及嗜酸性粒細胞趨化蛋白-3）；骨髓的先驅抑制性因子-1（MIP-1）；神經元趨化蛋白、巨噬細胞移動抑制性因子（MIF）；生長-

相關的癌基因/黑素瘤生長刺激活性 (GRO- α /MGSA) ; 生長調節素 ; 以及胰島素以及胰島素樣生長因子 (例如 IGF-1 以及 IGF-2) 。應用於本發明共軛體以及組成物蛋白質相關的構造分類是細胞激動素和鑲嵌型結構, 包括生長因子例如 IL-12 以及肝細胞生長因子 (Nicola, N.A., *supra*) 。

其它重要的蛋白質包括 (但非限於) : 生長激素 (尤其是人類生長激素 (hGH; 參閱 Tchelet, A., et al., (1997) Mol Cell Endocrinol 130:141-152) 以及其拮抗劑 (參閱例如 Sundstrom, M., et al., (1996) J Biol Chem 271:32197-32203) 、促乳素以及其拮抗劑、絨毛 (膜) 性促素、濾泡刺激荷爾蒙、甲促素、色素荷爾蒙、下室丘的釋放因子、抗利尿素以及細胞激動素受體-結合拮抗劑以及所有上述構造分類的生長因子。許多該蛋白質存在糖基化的以及非糖基化的形式。非糖基化的形式是在原核生物中使用重組脫氧核糖核酸技藝或使用化學品合成產生之形式。肽類以及蛋白質之中該非糖基化的產物是本發明適當的生物活性成份。最後, 雖然一些抗體功能為受體-結合促效劑或拮抗劑 (參閱例如 Morris, J.C., et al., (2000) Ann Rheum Dis 59 (Suppl) :i109-i114) , 該免疫球蛋白不是本發明範圍內 N-端聚合物偶聯的適當候選物, 由於輕及重鏈胺基端區域參與抗原識別所以不是 RN 受體結合蛋白質。

應用於製備本發明聚合物共軛體特定的生物活性成份

是干擾素- α 、 β 干擾素、白細胞介素 2、IL-4、IL-10、hGH、促乳素、胰島素、IGF-1、EGF、bFGF 以及紅細胞生成素 (Epo)。使用之生物活性成份尤其是突變蛋白以及片段，尤其是那些能結合至受體對應至野生型或完整的多肽，無論結合是否會誘發生物的或生理的效應。某些具體實施例中，生物活性成份之突變蛋白以及片段可作為對應配體的拮抗劑，其可降低、實質上減低或完全地抑制配體結合至其受體及/或配體在標的細胞、組織及/或生物體上之活性。其它拮抗劑可為或不可為構造的類似物、突變蛋白、變異體或重要配體的衍生物，亦適用於製備依據本發明共軛體。實質上，給定的突變蛋白、片段、變異體、衍生物或拮抗劑無論是否拮抗給定配體的生物及/或生理效應，其可使用測定配體本身生物的/生理的效應之已知的及/或在此描述之各種技藝，未經過度的實驗加以測定。

有利地用於依據本發明之此類以及其它重要的多肽之構造（一級、二級、三級、和四級）在技藝上是已知的以及為平常熟知此技藝的專業人士所熟知，尤其是考慮到在此提供之構造以及引用之參考文獻，該文獻全文在此併入參考文獻。

共軛體

本發明提供穩定之生物活性成份共軛體，尤其是細胞激動素，應用於各種用途。本發明共軛體比起之前已知的

技藝有許多優點，其係展示於下列非限制的以及可仿效的技藝上已知的共軛體。

H. Hiratani (歐洲專利第 EP 0 098 110 B1 號以及美國專利第 4,609,546 號) 揭示環氧乙烷以及環氧丙烷共聚物 ("PEG-PPG" , 普通 PAGs 的成員) 和蛋白質 (包括干擾素以及介白素) 之共軛體，其中揭示並無避開涉及蛋白質受體結合的區域。此類參考文獻中干擾素 α 、 β 以及 γ 是偶聯 PAG 的等值目標，本發明不同的是干擾素- γ 不是 N-端偶聯適當的目標，因為胺基末端在細胞激動素受體-結合區域之內。此外，Hiratani 揭示僅用 1 kDa 至 10 kDa PAGs 合成之共軛體，而本發明方法比較喜歡偶聯水溶性、分子量超過 10 kDa 之合成聚合物用於治療的用途。類似的，N.V. Katre ((1990) *supra*) 揭示偶聯較大數目股之 5-kDa mPEG 至人類重組第二型白細胞介素以增加共軛體在小鼠以及兔子血流中之生命期。然而該參考文獻未揭示或認出本發明提供之偶聯較小的數目較長股之 PEG 或偶聯單一股的高分子量 PEG 至白細胞介素 2 胺基末端的優點。

Shaw (美國專利第 4,904,584 號以及 PCT 公告第 WO 89/05824 A2 號) 揭示引入、取代或刪除目標蛋白質 (尤其是 Epo、G-CSF 以及白細胞介素 2) 離胺酸殘基誘導位點-選擇的附著胺-反應性的聚合物之方法。然而與本發明的揭示不同，此類參考文獻未揭示胺-反應性的聚合物可與任何目標蛋白質離胺酸殘基 ϵ 胺基之外的胺反應，明顯

地與本發明揭示有所區別。

D.E. Nitecki et al., (美國專利第 4,902,502 號) 揭示從各式不同的 PEG 氯甲酸酯衍生物製備之多重聚乙二醇化的白細胞介素 2 共軛體，預期可與離胺酸殘基之 ϵ 胺基反應。然而與本發明方法相反，參考文獻未揭示避免 PEG 化白細胞介素 2 之蛋白質涉足受體結合之離胺酸殘基的方法，也未認知避免該位點的優點。

N. Katre, et al., (美國專利第 5,206,344 號) 揭示 PEG 偶聯至離胺酸殘基 ϵ 胺基之 PEG-白細胞介素 2 偶聯至天然半胱胺酸殘基位置 125 (從胺基末端計數) 不成對的氫硫基或從白細胞介素 2 胺基末端第一至第二十殘基之間突變的引入半胱胺酸殘基之氫硫基。包括之突變蛋白為已揭示於 '344 專利之 "des-ala-1" 白細胞介素 2，即刪除胺基端丙胺酸以及不可聚乙二醇化的突變蛋白。然而與本揭示相反，'344 專利未揭示任何避免偶聯 PEG 至涉及結合至受體胺基酸殘基之方法，也未認知該解決方式的任何優點。與該概念一致，以及與本發明相反，'344 專利提出的附著點之寬廣範圍不建議偶聯 PEG 至白細胞介素 2 之胺基末端將會尤其的有利。

S.P. Monkarsh, et al., (1997) Anal Biochem 247:434-440 以及 Harris, J.M., et al., eds., Poly (ethylene glycol): Chemistry and Biological Applications, pp.207-216, American Chemical Society, Washington, D.C., 揭示反應干擾素- α -2a 和三倍莫耳過量的活化的

PEG (分子量 5,300 道耳吞) 產生十一個單 PEG-干擾素之位置同分異構物，對應至干擾素- α -2a 之十一個離胺酸殘基。無 PEG 偶聯至干擾素胺基末端 α 胺基之 PEG-干擾素產生。此類參考文獻報導之十一個位置同分異構物顯示培養細胞中抗病毒的活性其範圍是未經修飾之干擾素的 6% 至 40% 以及培養細胞中抗增殖的活性其範圍是未經修飾之干擾素的 9% 至 29%。與本發明方法製備的共軛體相反，該結果明顯地顯示由此類研究者隨機 PEG 化離胺酸殘基，干擾了干擾素- α -2a 經由它的受體的調節功能。此外，與本發明共軛體不同，此類參考文獻並無報導共軛體中是否含有 N-端聚乙二醇化的干擾素。

O Nishimura et al., (美國專利法定發明註冊專利第 H1662 號) 揭示在酸鹼度 7.0 (干擾素共軛體) 或酸鹼度 7.15 (白細胞介素 2 共軛體) 下還原烷化活化的 "聚乙二醇甲醚醛類" 和氰基硼氫化鈉製備的干擾素- α 、干擾素- γ 以及白細胞介素 2 共軛體。然而該方法製備的共軛體失去的多至 95% 之未經修飾之蛋白質的生物活性，明顯係由於存在著聚合物附著至離胺酸殘基 ϵ 胺基之多重位點 (參見本發明圖 1 以及 4)。

D.K. Pettit, et al., (1997) J Biol Chem 272:2312-2318 揭示第 15 型白細胞介素 5 ("IL-15") 聚合物共軛體。然而該參考文獻報導之共軛結合的 IL-15，不僅失去它的類白細胞介素 2 生長-促進容量 (由於偶聯聚合物至蛋白質涉及受體結合之離胺酸殘基)，且亦顯示拮抗作用而

不是促效作用。此類作者推斷選擇的抑制 IL-15 結合至許多細胞表面受體中的一個，可造成聚合物偶聯而且該抑制不僅減少受體結合，且可逆轉蛋白質之生物學效應。避免偶聯聚合物至受體-結合蛋白質涉及受體交互作用之部份，本發明可避開聚合物偶聯造成之討人厭的結果。

J. Hakimi, et al., (美國專利第 5,792,834 以及 5,834,594 號) 揭示胺基甲酸酯-聯結的 PEG 共軛體之蛋白質，包括：干擾素- α 、白細胞介素 2、第一型白細胞介素 ("IL-1") 以及 IL-1-受體拮抗劑，據報導其製備分別地可減少產生免疫性、增加溶解度以及增加蛋白質之外生物半衰期。此類參考文獻中 PEG 是偶聯至"各式不同的自由胺基"，參考文獻未揭示 N-端 PEG 化以及未揭示 N-端 α 胺基可或應能聚乙二醇化。此類專利亦陳述揭示於此之共軛體，其中"有至少部分"之原本起始蛋白質的生物活性，如此顯示可能的流失大量的生物活性。此結果與本揭示之未標定的 PEG 化方法一致。與本發明相反，此類專利未揭示改變 PEG 化方法之選擇性以改進保留共軛體生物活性（揭示於此）之任何嘗試。

O.B. Kinstler, et al., (歐洲專利申請案第 EP 0 822 199 A2 號) 揭示聚(乙二醇)與多肽(尤其是本專利申請案受讓之干擾素以及 G-CSF 共有區，其為 Amgen, Inc. 製作的二種蛋白質)胺基末端胺基酸 α 胺基反應之方法。本文顯示"酸到足以選擇地活化 α 胺基之酸鹼度"為本揭示方法必需的特色。相反的，本發明發現降低酸鹼度值，減

少胺基和 PEG 醛類之反應性，而且 α 胺基未質子化（即酸鹼度大於它的 pK_a ）時更具反應性。因此，本案發明人發現沒有酸鹼度"足夠酸到可選擇地活化本發明之任何 RN 細胞激動素共軛體的 α 胺基"。J.T. Edsall (*supra*) 以及 R.S. Larsen et al., ((2001) *Bioconjug Chem* 12:861-869) 中說明酸鹼度依存之 N-端 α 胺基和醛類之反應性，與本案發明人之經歷更相容。此外，Kinstler et al. 報告使用 N-端 PEG 化之多胜肽以增加產生的共軛體之均一性以及保護胺基末端免於蛋白酶降解，但未揭示 N-端 PEG 化可保存某些受體結合蛋白質大部分之受體-結合活性（參閱例如 PCT 公告第 WO 96/11953 號；歐洲專利第 EP 0 733 067 BI 號，以及美國專利第 5,770,577, 5,824,784 以及 5,985,265 號，以上專利均屬於 Kinstler, O.B., et al.）。

Kinstler et al. 之歐洲申請案 (EP 0 822 199 A2) 亦歸納 N-端 PEG 化至所有多胜肽之優點，但與本案發明人之經歷不同。特別地，由於抗體分子胺基端鄰近抗體蛋白之抗原結合區域 (Chapman, A.P. (2002) *Adv Drug Deliv Rev* 54:531-545)，相較於隨機 PEG 化之離胺酸殘基，N-端 PEG 化之抗體未料到地對生物活性有害，如揭示於 Larsen, R.S., et al., *supra*。同樣地，非 "RN" 受體結合蛋白質之 N-端 PEG 化之受體結合蛋白質，例如干擾素- γ (參閱圖 8)，預期比隨機 PEG 化離胺酸殘之受體結合蛋白質基更具受體交互作用抑制性。

因此，如以上所述，本發明方法與揭示於 Kinstler et al.者不同，本發明共軛體之製備係在酸鹼度約 5.6 至約 7.6；酸鹼度約 5.6 至約 7.0；酸鹼度約 6.0 至約 7.0；酸鹼度約 6.5 至約 7.0；酸鹼度約 6.6 至約 7.6；酸鹼度約 6.6 至約 7.0；或酸鹼度約 6.6 之下聯接一個或多個細胞激動素或其拮抗劑（選擇的 RN 受體結合蛋白質）和一個或多個聚合物（形成配體間之混合物）以及一個或多個聚合物。相反的，Kinstler et al.方法是在酸鹼度 5.5 以下聯結配體，本案發明人發現該酸鹼度範圍為製備選擇地和遠距離的 N-末端胺基酸及/或遠距離的糖基化作用位點共軛結合之配體製劑的聚合物次佳的或較差的酸鹼度。

Pepinsky, B., et al. (PCT 公告第 WO 00/23114 號以及美國專利申請案公布號碼第 2003/0021765 A1 號) 揭示比非糖基化的 β 干擾素-1b 更具抗病毒分析活性的糖基化的 β 干擾素-1a 聚合物共軛體。當 Pepinsky et al.經還原烷化偶聯 5-kDa 或 20-kDa mPEG 至干擾素- β -1 胺基末端，觀察到 PEG 化在抗病毒的效能上並無效應，而偶聯較高的分子量之 PEGs 可減低或消除此效能。此參考文獻亦揭示聚伸烷基二醇可經由各式不同的位點（包括胺基末端、羧基末端以及糖基化的蛋白質醣類部分）偶聯基團偶聯至 β 干擾素-1a。然而此揭示方法不具一般性："此類研究指出，除了 β 干擾素-1a 以及 β 干擾素-1 b 序列之間的守恆之外，彼是不同的生化實體，因此 β 干擾素-1b 的知識不能施用至 β 干擾素-1a，反之亦然"。相反的，本發明揭示

一般共同的特色：定義在此之 "RN" 以及 "RG" 受體結合蛋白質。依據本發明， β 干擾素-1a 以及 β 干擾素-1b 是 "RN" 受體結合蛋白質。此外， β 干擾素-1b 是 "RG" 受體-結合蛋白質。據此，與 WO 00/23114 的方法相反，本發明方法是用於製備穩定的、生物活性的 β 干擾素-1b 以及 β 干擾素-1a 共軛體。

Z. Wei, et al., (美國專利第 6,077,939 號) 揭示偶聯水溶性聚合物 (尤其是 PEG) 至多肽 (尤其是紅細胞生成素) N-端 α -碳原子之方法，其中 N-末端胺基酸 α 碳之胺先轉胺化成 α 羰基，然後和 PEG 衍生物反應形成脒或脞鍵結。由於該參考文獻揭示之目標是關於發展用於蛋白質之一般方法，並未考慮到保存受體-結合活性 (在選擇一些胺基末端作為某些受體結合蛋白質 PEG 化之位點所產生的結果)。因此，與 Wei, et al. 的揭示相反，本發明不需要去除 N-端 α 胺基，相反的在中性的酸鹼度下經由形成蛋白質和聚合物間之二級胺聯結可保存 N-端 α 胺基電荷。

C.W. Gilbert et al., (美國專利第 6,042,822 號；歐洲專利第 EP 1 039 922 131 號) 揭示 PEG-干擾素- α -2b 位置同分異構物混合物之必要性，其中尤其是令人滿意的異構體具有偶聯至干擾素- α -2b 組胺酸殘基 (尤其是組胺酸-34) 之 PEG，以及顯示 PEG 聯結至組胺酸-34 不穩定。由於組胺酸-34 位於干擾素- α -2b 之表面，必須和干擾素受體緊密接觸以啟動訊息傳遞之區域 (參閱本說明書之圖 1 b

），揭示於此類參考文獻中 PEG 以及組胺酸-34 之間不穩定之聯結顯然是揭示於此之 PEG-干擾素共軛體其功能的關鍵。相當純之組胺酸-聯結的蛋白質聚合物共軛體描述 S. Lee et al., 美國專利第 5,985,263 號。相反的，本發明顯示一個較佳的共軛體，PEG-干擾素共軛體，其中 PEG 係穩定聯結在干擾素成分受體-結合功能部位遠距離的位置點。

P. Bailon, et al., ((2001) Bioconjug Chem 12:195-202)，揭示每分子干擾素聚乙二醇化一分子 40-kDa 之二-mPEG-離胺酸之干擾素- α -2a 包含四種主要的位置同分異構物。此參考文獻揭示幾乎所有之 PEG 是經醯胺鍵結附著至離胺酸 31、121、131 或 134，各離胺酸在干擾素- α -2a 受體-結合功能部位之內或鄰近（殘基 29-35 以及 123-140，依據 Bailon et al; 參閱本文之圖 1 a）。Bailon et al 並未報導 N-端 PEG 化。經測試 PEG-干擾素位置同分異構物分離的混合物在體外對抗水泡性口炎病毒感染 of Madin-Darby 牛腎細胞之抗病毒活性是非共軛結合的干擾素- α -2a 的 7%。N-端聚乙二醇化的干擾素並未觀察到此類 PEG-干擾素共軛體實質上生物活性之流失，如此可明顯地區別 Bailon et al. 共軛體與本發明。

R.B. Pepinsky et al., ((2001) J Pharmacol Exp Ther 297:1059-1066) 揭示以 (1) 具有 N-端甲硫胺酸殘基糖基化的 β 干擾素-1a 以及 (2) 20-kDa PEG-醛合成共軛體。此共軛體係於 N-端甲硫胺酸單聚乙二醇化，於抗

病毒試驗仍保持完整的生物活性。而該作者揭示選擇 N-端位點 PEG 化糖基化的 β 干擾素-1a 是取決於位點-選擇的 PEG 化試劑之利用性質以及分子的模式化，彼承認 "一些效應是產物特有的"。此外，與本發明相反，其觀察報導不是整理性的包含定義於此之 "RN" 受體結合蛋白質中的受體結合蛋白質。

J. Burg, et al., (PCT 公告第 WO 0 1/02017 A2 號) 揭示生產烷氧基 PEG 紅細胞生成素醣蛋白共軛體，其中一至三股之甲氧基 PEG 是和經修飾糖蛋白質表面之離胺酸殘基 ϵ 胺基化學引入之氫硫基反應。然而與本發明相反，該參考文獻未揭示任何試圖連接 PEG 與紅細胞生成素 N-末端胺基酸自由 α 胺基之嘗試或避免改變紅細胞生成素糖蛋白質和紅細胞生成素受體交互作用的重要區域之離胺酸殘基。

J. Burg, et al., (PCT 公告第 WO 02/49673 A2 號) 揭示經由使用選擇地可分解的 N-端肽延伸物在 PEG 化之前以及可逆的檸檬醯化糖蛋白質所有離胺酸殘基 ϵ 胺基之後分解合成天然的以及突變蛋白紅細胞生成素醣蛋白 N-端醯胺-聯結的 PEG 共軛體。該文中揭示選擇 N-末端胺基酸自由 α 胺基產生均勻的單聚乙二醇化的共軛體製造 PEG 化方法之多重步驟，從而避免須要從多數聚乙二醇化的衍生物分開單聚乙二醇化的共軛體。此方法與本發明有許多重要的不同，包括但非限於：(1) Burg et al. 方式只限於紅細胞生成素醣蛋白，其烷氧基 PEG 係經由醯胺鍵結

聯結，本發明採用各種合成聚合物共軛結合各種生物活性成份；（2）本發明可應用於糖基化的以及非糖基化的"RN"以及"RG"受體結合蛋白質，而 Burg et al.僅揭示醣蛋白之結合；（3）本發明包含烷氧基 PEGs（例如 mPEG）以及單功能地-活化的羥基 PEG，而 Burg et al.僅揭示使用烷氧基 PEGs；以及（4）本發明聚合物和蛋白質之間使用二級胺聯結比 Burg et al.之醯胺鍵合好，由於前者更穩定以及保留胺基之正電荷。相同集團 J. Burg, et al.,（美國專利第 6,340,742 號）類似的成果揭示產生紅細胞生成素醣蛋白醯胺-聯結的共軛體，其中一至三股之烷氧基 PEG 是聯結至蛋白質之一至三個胺基。然而與本發明相反，此文獻無 N-端胺基酸之 α 胺基或不涉及受體交互作用區域之胺基的優先權。

C. Delgado et al.,（美國專利第 6,384,195 號）揭示使用反應性的聚合物 tresyl 單甲氧基 PEG（"TMPEG"）製備的粒細胞-巨噬細胞菌落-刺激因子共軛體。此文獻顯示當 TMPEG 和重組人類 GM-CSF 接觸，經修飾之材料含有比起未經修飾之材料無活性以及較高活性的物質。一般熟悉技藝之專業人士將立即認知聚合物-生物活性成份共軛體（尤其是包含該共軛體之治療的組成物）之混合物中無活性的物質是討人厭的，因為對須要的病人投用結合治療無有利的效應反而可促成危險性。本發明克服（至少部份地）此技藝中之限制，避免修飾 GM-CSF 以及其它受體結合蛋白質在蛋白質上涉及受體-結合活性之位點，從而

降低或排除無活性物質之合成。本發明亦提供分層作用以及純化有不同大小、不同電價及/或在聚合物蛋白質上不同程度電價屏蔽之共軛體的方法（參閱圖 9-12）。

值得注意的是美國專利第 6,384,195 號未描述 N-端 PEG 化之 GM-CSF，因此未顯出本發明方法之優點。最後美國專利第 6,384,195 號指出大於一個以上之 PEG 偶聯至各 GM-CSF 分子之共軛體的優先權，而未考慮附著 PEG 分子的 GM-CSF 分子（除了偶聯至離胺酸殘基以外）。陳述較佳之每個 GM-CSF 上多至六個 PEG 分子之共軛體，該文獻陳述 PEG 可能附著至所有可能的離胺酸殘基之較佳共軛體，從而確保 PEG 將附著於接近空間上阻礙蛋白質與它的細胞-表面受體作用知位置（參閱本說明書之圖 3）。相反的，本發明指出偶聯 PEG 至離胺酸殘基是不必要的，除非當離胺酸殘基距離和受體的交互作用以及因此傳遞訊息（促效劑）或為競爭性地抑制訊息傳遞（拮抗劑）之受體-結合蛋白質功能部位非常遙遠。

T. Nakamura, et al. (PCT 公告第 WO 02/32957 A1 號) 揭示增加偶聯至紅細胞生成素糖蛋白質位置 52 離胺酸殘基 ϵ 胺基之 PEG 分子量可在生物體內增加共軛體之促紅細胞生成的效應而降低共軛體對紅細胞生成素受體之親和力。然而與本發明相反該參考文獻未揭示於胺基末端或接近糖基化作用位點偶聯 PEG，也未認出其任何優點。

因此，本發明提供比之前揭示者有顯著的構造以及功能的優點之生物活性成份偶聯至合成聚合物之共軛體。

組成物

本發明提供共軛體或複合物，包含一個或多個生物活性成份（適當地為一個或多個細胞激動素）偶聯至一個或多個穩定的聚合物例如一個或多個 PEGs。典型地，該共軛體是以本發明在此描述之方法製作；然而具有在此描述之構造以及活性之共軛體，不論用於產生該共軛體之方法，均考慮等值於本發明方法之製作品及是因此包含於本發明之內。相關的特色中本發明亦提供包含一個或多個共軛體或複合物之組成物。依據本發明特色之組成物將包含一個或多個（例如：一、二、三、四、五、十個等）上述的本發明共軛體或複合物。於某些特色之中，組成物可包含一個或多個其它成份，例如一種或多種緩衝劑鹽類、一種或多種離液劑、一種或多種兩性介面活性劑、一種或多種蛋白質（例如白蛋白或一種或多種酵素）、一種或多種未結合的聚合物、一種或多種滲透活性劑等。本發明特色之組成物可為任何形式，包括固態（例如乾燥粉劑）或溶液（尤其是以生理上相容的緩衝鹽溶形式包含一個或多個本發明共軛體）。

A. 藥學組成物

某些本發明組成物，尤其是可調製成應用於預防性的、臨床檢驗或治療的用途之藥學組成物。該組成物典型地包含一種或多種本發明共軛體、複合物或組成物以及一種

或多種醫藥學上可接受的載體或賦形劑。本文術語之"醫藥學上可接受的載體或賦形劑"意指受體動物，包括人類或其它哺乳動物可耐受的無毒的固體、半固態或液體填料、稀釋劑、包膠材料或任何類型之輔助調配物，引入該藥學組成物不會有起因於它的加入而產生之負面效應。

本發明藥學組成物可經由任何適當的模式投用至受體動物，例如：口服地、直腸地、非經腸地、全身地、陰道地、腹腔內地、局部地（粉末、油膏、點滴）或經皮的貼片）、口頰地、口服的或鼻噴液或吸入劑等投用模式。本文術語之"不經腸道的"意指包含靜脈內的、動脈內的、肌肉內的、腹腔內的、腦池內的、皮下和關節內的注射以及輸液等投用模式。

本發明提供之不經腸道的藥學組成物可包含醫藥學上可接受的無菌的水溶液或非水溶液、分散液、懸浮液或乳狀液，以及在使用之前重新調製成無菌的注射溶液或分散液無菌的菌粉末。適當的水溶性以及非水溶性的載體、稀釋劑、溶劑或載劑之實施例包含：水、乙醇、多元醇（例如甘油及其類似者、丙二醇、聚（乙二醇））、羧甲基纖維素以及其適當的混合物、植物油（例如橄欖油）、以及可注射之有機酯類例如乙基油酸酯。使用塗敷劑例如卵磷脂，當分散時可維持須要之粒度以及使用表面活性劑可維持適當的流動性。

本發明藥學組成物亦可含有佐劑，例如：防腐劑、溼化劑、乳化劑以及分散劑。預防微生物之作用可各種抗菌

性以及抗真菌的藥劑加以達成，例如：對氧苯甲酸、苯甲醇、氯丁醇、酚、山梨酸等。亦可令人滿意的包含滲透的藥劑例如糖、氯化鈉等。內含延遲吸收之藥劑例如單硬脂酸鋁；水凝膠以及明膠可使注射醫藥學的形式長期的吸收。

在一些案例中，爲了延長藥物效應，可令人滿意的緩慢從皮下或肌內注射之吸收。此可使用體液中溶解度差之結晶或非晶態懸浮液完成。然後藥物之吸收速率視它的溶解速率而定，取決於它的物理形式。此外，藥物溶解或懸浮於油類載劑可完成非經腸投用藥物延發吸收的形式。

以生物降解性高分子例如聚丙內酯-聚糖內酯形成藥物微封包的基質可製造注射的儲存形式。取決於藥物與載體聚合之體比例和特定的載體聚合物之本質，可控制藥物釋出速率。其它生物降解性高分子之實施例包含生物相容的聚（正酯類）以及聚（酐）。以體組織相容之脂球體或微乳狀液誘捕藥物亦可製備的儲存注射調配物。

此注射調配物可滅菌，例如經由濾過細菌之濾器過濾，或并入消毒劑以無菌的固態組成物的形式在使用之前溶解或分散於滅菌水或其它無菌的注射液。

口服的固體劑量形式包含膠囊、藥片、藥丸、粉末以及顆粒。該固體劑量形式中，活性化合物是混合和至少一個醫藥學上可接受的賦形劑或載體，例如：檸檬酸鈉或磷酸二鈣及/或 a) 填充劑或增量劑，例如：澱粉、乳糖、蔗糖、葡萄糖、甘露糖醇、以及矽酸，b) 結合劑例如：羧

甲基纖維素、褐藻酸鹽、明膠、聚乙炔基吡咯烷酮、蔗糖、以及阿拉伯膠，c) 保濕劑例如甘油，d) 崩解的藥劑例如：瓊脂、碳酸鈣、馬鈴薯或木薯澱粉、藻酸、某些矽酸鹽、以及碳酸鈉，e) 溶液遲滯劑例如石蠟，f) 吸收加速劑例如四級銨化合物，g) 溼化劑例如：十六烷基醇以及甘油單硬脂酸鹽，h) 吸附劑例如高嶺土以及膨潤土，以及 i) 潤滑劑例如：滑石粉、硬脂酸鈣、硬脂酸鎂、固態 PEG、硫酸月桂酯鈉、及以上之混合物。膠囊、藥片以及藥丸等劑型亦可包含緩衝劑。

相似類型的固態組成物於柔軟-以及硬明膠膠囊亦可使賦形劑如乳糖與高分子量 PEG 等作為填充劑。

藥片、糖衣藥丸、膠囊、藥丸以及顆粒之固體劑量形式可用塗層以及外殼製備例如腸內的或慢性調控塗層以及其它醫藥學的調製技藝熟知的塗層。彼可視需要含有不透明化藥劑以及僅（或優先）於胃腸道之某些部份釋放出此有效成份之組成物，可視需要為延釋的方式。包埋組成物之實施例可包含聚合的物質以及蠟。活性化合物亦可為微封包的形式，視須要具有一種或多種上述的賦形劑。

口服的液體劑量形式可包含醫藥學上可接受的乳狀液、溶液、懸浮液、糖漿以及酏劑。除了活性化合物之外，液體劑量形式可含有此技藝中常用的惰性稀釋劑，例如：水或其它溶劑、溶解劑以及乳化劑，例如：乙醇、異丙醇、碳酸乙酯、乙酸乙酯、苯甲醇、苯甲酸苄酯、丙二醇、1,3-伸丁基二醇、二甲基甲醯胺、油類（特定言之，棉籽

、落花生、玉米、胚芽、橄欖油、麻油、以及芝麻油）、甘油、四氫糠醇、PEGs 以及山梨糖醇酐脂肪酸酯、及以上之混合物。

除了惰性稀釋劑，口服的組成物亦可包含佐劑例如：溼化劑、乳化劑以及懸浮劑、增甜劑、矯味劑以及香味劑。

除了活性化合物之外懸浮液可含有懸浮劑例如：乙氧基化異十八烷基醇、聚氧乙烯山梨糖醇以及山梨糖醇酐酯類、微晶粒纖維素、偏氫氧化鋁、膨潤土、瓊脂、特拉加康斯膠樹、及以上之混合物。

局部的投用包括投用至皮膚或粘膜，包括肺以及眼睛表面。局部投用的組成物，包括吸入劑，可使用乾燥粉劑加壓的或非加壓的製備。非加壓的粉劑組成物中細分的有效成分可混合較大的醫藥學上可接受的惰性載體，包含顆粒大小例如直徑多至 100 微米。適當的惰性載體包含糖例如乳糖和蔗糖。適當者至少 95% 以重量計之有效成份顆粒其有效的粒度介於 0.01 至 10 微米。

此外，藥學組成物可加壓的以及含有壓縮氣體，例如氮或液態氣體推進劑。較佳者有效成分於任何實質上程度不溶於液化的推進劑。加壓的成分亦可含有表面-活性劑。表面活性劑可為液體或固態非離子表面活性劑或可為固態陰離子性的表面-活性劑。宜以鈉鹽的形式使用固態陰離子性的表面活性劑。

局部投用的其它形式是眼部投用形式。此投用形式中

本發明共軛體或組成物是用醫藥學上可接受的眼的載劑運送，活性化合物與眼表面維持接觸充分的時間以允許化合物穿透眼睛結膜或角膜以及內部的區域，例如前室、後室、玻璃體、水樣液、玻璃液、角膜、虹膜/纖毛、晶狀體、脈絡膜/視網膜以及鞏膜。醫藥學上可接受的眼的載劑例如為油膏、植物油或包膠材料。

直腸或陰道投用的組成物較佳者為栓劑，其製備上可攪拌本發明共軛體或組成物與適當的非刺激性賦形劑或載體例如可可油、PEG或栓劑蠟，其在室溫下為固態但在直腸或陰道的溫度下熔化成液體並釋放出藥物。

本治療方法的藥學組成物亦可以脂球體的形式投用。技藝上已知脂球體一般而言是源自磷脂或其它脂肪物質。脂球體由單-或多層的水合液態晶體形成分散於水介質。任何無毒的、生理上可接受的以及可代謝的脂肪可用於形成脂球體。除了一種或多種本發明共軛體或組成物，脂質體形式之藥學組成物亦可含有一種或多種穩定劑、防腐劑、賦形劑等。較佳的脂質是磷脂及磷脂鹽基膽鹼（卵磷脂），天然的及合成的均可。形成脂球體之方法是技藝上已知的（參閱例如 Zalipsky, S., et al., U.S. Patent No. 5,395,619）。包含磷脂之脂球體可聯結至 PEG，最常見的是磷脂鹽乙醇胺偶聯至單甲氧基-PEG，有利的性質包括哺乳動物血液循環中長期的生命期（Fisher, D., 美國專利第 6,132,763 號）。

B. 用途

本發明方法、共軛體以及組成物可有利地用於維持或提高生物成份的生物活性而不干擾生物成份結合至其受體之能力。某些本發明該方法可運送一種或多種共軛體及組成物至細胞、組織、器官或生物體。特定言之，本發明提供控制傳送一種或多種共軛體、複合物或組成物成份至細胞、組織、器官或生物體，從而提供使用者能在時間以及空間上，調整釋出特定成分的活性量至細胞、組織、器官或生物體。

一般而言本發明方法參與一種或多種活性。例如本發明方法之一包含：（a）製備一種或多種本發明共軛體或組成物；以及（b）於結合一種或多種本發明共軛體或組成物至細胞、組織、器官或生物體之條件下接觸一種或多種細胞、組織、器官或生物體與一種或多種共軛體或組成物。一旦本發明共軛體及/或組成物之生物活性成份已結合（或在一些案例中攝入）細胞、組織、器官或生物體，此成份可繼續進行其預期的生物學功能。例如肽成份可結合至受體或其它在細胞、組織、器官或生物體上或內之內成份以參與細胞、組織、器官或生物體之內代謝的反應以執行、向上調控或使活化，或向下調控或抑制細胞、組織、器官或生物體之內一種或多種酵素的活性，提供細胞、組織、器官或生物體喪失的結構成份；提供一種或多種細胞、組織、器官或生物體須要的營養；抑制、治療、逆轉或改善一種或多種疾病或身體的病症進展或症狀等。

由於共軛體之生物活性成份具有實質上保留其生物活性以及甚至在工業用途之條件下增加持續作用期間的合併效應，因此具有出奇高的效能，故於其它具體實施例中本發明共軛體以及組成物可用於工業細胞培養。本共軛體此類出奇的高效能可導致高生物量產，獨特的高重組蛋白質表現量，以及增進其它生物工藝之效率。

C. 劑量療程

本發明共軛體、複合物或組成物可在體外、體外或在活體內投用至細胞、組織、器官或生物體以傳送一種或多種生物活性成份（即一種或多種細胞激動素或其拮抗劑）。一般熟悉技藝的專業人士將能認知給定的活性化合物、共軛體、複合物或組成之成分有效量可用實驗測定以及可使用純形成或（該形式存在的話）醫藥學上可接受的調配物或前藥物形式。本發明化合物、共軛體、複合物或組成物可以獸醫或藥學組成物結合一種或多種醫藥學上可接受的賦形劑投用至須要彼的動物（包括哺乳動物，例如人類）。任何特定的病人其治療上之有效劑量將取決於各種因子，包括：達成細胞反應之類型以及程度；專一性化合物、共軛體、複合物、或組成之特性及/或活性；年齡、體重或表面積、一般的健康、性別以及患者膳食；投用時間、投用路線、以及活性化合物之排泄速率；治療持續期間；專一性化合物、共軛體、複合物或組成結合之其它藥品；以及一般熟悉醫藥學以及醫學技藝的專業人士熟知的其

他因子。例如一般熟悉此技藝的專業人士可從比達成所要求的治療效果較低劑量之本發明給定的化合物、共軛體、複雜物或組成開始，緩慢增加劑量直到達成所要求的效應。

劑量療程亦可安排成病人專一性之方式以在血液中提供給定的活性化合物預定的濃度，其可以此技藝中可接受的以及常規地技藝測定，例如大小-排除法、離子-交換或逆相高效能液相色譜法（"HPLC"）、生物測定法或免疫測定等。因此，病人劑量療程可依據一般熟悉醫藥學以及醫學技藝的專業人士熟知的常規地和熟悉的方法調至達成相對固定的血液之含量（HPLC或免疫測定）。

D. 臨床檢驗和治療的用途

本發明共軛體於臨床檢驗之用途可在動物（尤其是人類）體內經由投用本發明共軛體或組成標定對細胞激動素具有高結合容量之細胞或組織，例如癌症，其中共軛體（或一種或多種成份，即生物活性成份及/或合成聚合物）係標記或包含一種或多種可偵測的標記，以便依據技藝上已知的方法進行檢測，例如光學、放射線偵測、螢光或聲音共鳴的檢測。例如，主要的非小細胞肺癌表現獨特的高表皮生長因子受體濃度（Bunn, P.A., et al., (2002) *Semin Oncol* 29 (Suppl 14):38-44）。因此，在本發明另一特色中本發明共軛體以及組成物可用於臨床檢驗或治療的方法，例如診斷、治療或預防各種動物（尤其是哺乳動

物例如人類)身體的病症、有該病症之傾向或該病症。該方法中,治療之目標是延遲或防止病之發展,及/或治癒、誘發病症緩和或保持緩和,及/或減少或極小化其它治療療程的副作用。

因此,本發明共軛體、複合物以及組成物可用於保護、抑制或治療身體的病症,例如感染或疾病。本文術語之"保護",包含"預防"、"抑制"和"治療"。"預防"包含於誘導疾病或身體的病症之前投用本發明複合物或組成,而"抑制"包含於疾病臨床的外觀出現之前投用共軛體或組成,"預防"以及"抑制"身體的病症一般是針對具有疾病傾向或易感病症但尚未經歷疾病之動物。然而"治療"身體的病症,包含疾病外觀出現之後投用本發明治療的共軛體或組成。據瞭解人類以及獸醫醫學中不是很容易的能分辨"預防"以及"抑制"身體的病症。許多案例中,最後的誘導情形或情形可能未知或潛伏的情形,而在它出現之前病人或醫師不能注意到此誘導情形。因此,一般本文術語之"預防"與"治療"不同包含定義於此之"預防"以及"抑制"。依據本發明方法本文術語之"保護"包含"預防"。依據本發明此特色之方法可包含一個或多個允許臨床醫生達成上述治療目標的步驟。本發明該方法之一可包含,例如:(a)確認患有或有身體的病症之傾向的動物(較佳者哺乳動物,例如人類);以及(b)對此動物投用有效量之一種或多種本發明在此描述之共軛體、複合物或組成物,投用該共軛體、複合物或組成,防止、遲延或診斷動物身體病症的

發展、或治癒或誘發緩和動物的身體病症。

本文之"有身體病症傾向"之動物其定義是不展示多數公開的身體症狀之動物，但在基因上、生理上或處於發展此病症之危險。本發明方法中辨別有身體病症之傾向的動物、處於病症危險中、或患有給定的身體病症的動物（例如哺乳動物，包括人類）可熟練的臨床醫生依據已知標準技藝的方法完成包括，例如：放射性的測定、生化檢定（例如，測定動物樣品中特定的肽類、蛋白質、電解質等相對的含量）、外科的方法、遺傳篩選、家族史、身體的觸診、病理的或組織學的測試（例如微觀的評估組織或體液樣品或塗片、免疫的測定等）、測試體液（例如：血、血清、血漿、腦脊髓液、尿、唾液、精液及其類似者）、影像（例如無線電、螢光、光學、聲音共鳴（例如使用核磁共振（"NMR"）或電子自旋共振（"ESR"））等。一旦動物經一種或多種方法確認，該動物可積極的及/或預先有效的治療以預防、抑制、延遲或治癒此身體的病症。

可用本發明共軛體、複合物、組成物以及方法預防、診斷或治療的身體病症包含可使用共軛體或組成物生物活性成份（典型地是細胞激動素其或拮抗劑）預防、診斷或治療之任何身體的病症。該病症包括（但非限於）：各種癌症（例如：乳癌、子宮癌、卵巢癌、前列腺癌、睪丸癌、白血病、淋巴瘤、肺癌、神經癌症、皮膚癌、頭部以及頸癌症、骨癌、大腸和其它胃腸的癌症、胰腺癌、膀胱癌、腎癌以及其它癌症、肉瘤、腺腫瘤以及骨髓癌）；醫原

性疾病；傳染性疾病（例如：細菌的疾病、黴菌疾病、病毒疾病（包括肝炎、心臟性病毒、人類免疫不全病毒/愛滋病、及其類似者引起的疾病）、寄生蟲病、及其類似者）；遺傳疾病（例如：囊性纖維化、側索硬化性肌肉萎縮症、肌肉萎縮症、高雪氏病、糖原貯積病、嚴重的合併之免疫不全病症、侏儒症及其類似者）、貧血、中性血細胞減少症、血小板減少症、血友病以及其它血液病症；神經變性疾病病症（例如：多發性硬化（"MS"包括，但非限於，復發性-緩解型 MS、一級進行性的 MS、二級進行性的 MS、及其類似者）、克雅二氏病、阿爾茨海默病、及其類似者）；酵素的病症（例如痛風、尿毒症、高膽固醇血症、及其類似者）；不明或多病灶的病原學病症（例如：心血管疾病、高血壓、炎性腸病、及其類似者）；自體免疫病症（例如：全身性紅斑狼瘡、類風濕性關節炎、牛皮癬、及其類似者）以及其它熟悉技藝的專業人士熟知的重要醫學病症。本發明共軛體、複合物、組成物以及方法亦可用於預防疾病進展，例如化學地預防前惡性的傷害至惡性傷害的進展。

如此使用一種或多種本發明共軛體、複合物或組成物，或一種或多種本發明藥學組成物之本發明治療的方法可經各種路徑投用至需要彼之動物，包括：口服地、直腸地、非經腸地（包括：靜脈內地、動脈內的、肌肉內的、腹腔內的、腦池內的、皮下的以及關節內的注射以及輸注）、全身內的、陰道的、腹腔內的、局部（粉末、油膏、點

滴或經皮的貼片)、口頰的、口服的或鼻噴液或吸入劑投用。本發明中，有效量之共軛體、複合物或組成物可在體外、體外或在活體內投用至細胞或患有或有特定病症之傾向的動物，從而預防、延緩、診斷或治療動物之病症。本文中"有效量之共軛體(或複合物或組成)"意指本發明投用之共軛體(或複合物或組成)其攜帶之生物活性成份(即細胞激動素或其拮抗劑)的生物活性量，可預防、延緩、診斷、治療或治癒動物身體的病症。熟悉技藝的專業人士將能認知本發明共軛體、複合物或組成物之有效量，其可依據醫藥學以及醫學技藝習知的標準方法實驗測定；參閱例如 Beers, M.H., et al., eds. (1999) Merck Manual of Diagnosis & Therapy, 17th edition, Merck and Co., Rahway, NJ; Hardman, J.G., et al., eds. (2001) Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics, 10th edition, McGraw-Hill Medical Publishing Division, New York; Speight, T.M., et al., eds. (1997) Avery's Drug Treatment, 4th edition, Adis International, Auckland, New Zealand; Katzung, B.G. (2000) Basic & Clinical Pharmacology, 8th edition, Lange Medical Books/McGraw-Hill, New York;; 該參考文獻以及引用之參考文獻全文在此併入參考文獻。

據瞭解當投用至人類病人，本發明共軛體、複合物以及組成物每日、每週的或每月的總劑量將由醫師在醫學的判斷範圍之內確定。例如，投用某些本發明共軛體、複合

物或組成物得到令人滿意的結果的適當劑量取決於使用之專一性生物活性化合物，其劑量將可立即由熟悉技藝的專業人士或僅使用常規地實驗立即測定。依據本發明此特色，共軛體、複合物或組成物可一次投用，分劑量投用，例如：每天一次或兩次、或每週一次或兩次、或每月一次或兩次等。各式各樣的不同投用模式的適當劑量療程（例如不經腸道的、皮下的、肌肉內的、眼睛內的、鼻腔內的、等）亦可僅使用常規地實驗立即測定，或由熟悉技藝的專業人士取決於共軛體、複合物或組成生物活性成份（即細胞激動素或其拮抗劑）之特性立即決定。

其它應用中，本發明共軛體、複合物以及組成物可使臨床檢驗或治療劑特別地標定表現受體之細胞、組織、器官或生物體，以結合、併入或攝入共軛體、複合物以及組成物之生物活性成份（即細胞激動素或其拮抗劑）。依據本發明特色之方法可包含，例如：接觸細胞、組織、器官或生物體與額外地包含一種或多種臨床檢驗劑或治療劑之一種或多種本發明共軛體、複合物或組成物，該共軛體、複合物或組成可結合至或溶於細胞、組織、器官或生物體，從而運送臨床檢驗劑或治療劑至細胞、組織、器官或生物體。依據本發明此特色之臨床檢驗劑或治療劑可為（但並非限制於）至少一個試劑，其係選自核酸、有機化合物、蛋白質或肽、抗體、酵素、糖蛋白質、脂蛋白、化學元素、脂質、糖、同位素、碳水化合物、影像劑、可偵測的探針、或任何其可偵測地標記之組合。本發明此特色之治

療劑可在標的細胞（或組織、器官或生物體）上帶有治療效果，該效應其係選自（但非限於）：矯正缺陷的基因或蛋白質、藥物作用、毒性作用、生長刺激效應、生長抑制效應、代謝的效應、異化作用的效應、同化作用的效應、抗病毒的效應、抗真菌的效應、抗菌性效應、荷爾蒙的效應、神經液性的效應、細胞分化刺激效應、細胞分化抑制性效應、神經調質效應、抗-腫瘤的效應、抗-腫瘤效應、胰島素刺激或抑制效應、骨髓刺激效應、多潛能型幹細胞刺激效應、免疫系統刺激效應、以及任何其它經由依據本發明此特色之傳送系統運送至治療劑細胞（或組織、器官或生物體）提供之習知的治療效果。

該其它治療劑，其係選自（但非限於）習知的以及新化合物以及組成物，包括抗生素、類固醇、細胞毒的藥劑、血管生物活性藥物、抗體以及其它治療劑。此藥劑非限制的實施例包含抗生素以及其它用於治療細菌性休的克藥品，例如：慶大黴素、妥布黴素、蔡夫西林、不經腸道的頭芽孢菌素等；腎上腺皮質類固醇以及其類似物，例如：地塞米松，減輕內毒素引起的細胞的受傷；血管生物活性藥物，例如 α 腎上腺素能受體封閉劑（例如酚苄明）、 β 腎上腺素受體促效劑（例如異丙腎上腺素）以及多巴。

本發明共軛體、複合物以及組成物亦可診斷疾病以及監視治療的反應。某些方法中本發明共軛體、複合物以及組成物可包含一種或多種可偵測的標記（例如描述於本文別處者）。該方法中此類可偵測地標記的本發明共軛體、

複合物以及組成物可用以偵測表現受體之細胞、組織、器官或生物體，或不然的話攝入共軛體、複合物或組成物之生物活性成份（即細胞激動素或其拮抗劑）。該方法之一個實施例中將細胞、組織、器官或生物體在有利於細胞、組織或生物體結合或攝取之條件下（例如結合共軛體與細胞-表面受體或胞飲作用或擴散共軛體至細胞）接觸一種或多種本發明共軛體、複合物以及組成物，以及然後使用標記專一性之偵檢方法偵測共軛體結合至或併入細胞（例如：螢光檢測法，觀察螢光標記的共軛體；核磁共振影像觀察磁性標記的共軛體；放射線影像觀察放射性標記之共軛體等）。該可偵測標記的共軛體之其它用途可包括，例如投用一種或多種共有效量之本發明軛體標記的形式影像化細胞、組織、器官或生物體、或動物（包括人類）內部的構造，以及測量相關於細胞、組織、器官或生物體（或動物）可偵測的放射線。偵測各式各樣的不同的標記型態之方法以及其於臨床檢驗和治療影像方面的用途是熟悉技藝的專業人士所熟知，以及是描述本文它處。

在另一特色中，本發明共軛體以及組成物可用於調控生物活性成份結合至表現該受體細胞之表面的濃度或專一性受體活性之方法。"調控"給定的受體之活性意指共軛體結合至受體時可經由受體調節的活化或抑制生理的活性（例如細胞內信息瀑布）。雖然不結合特定的機制以解釋本發明共軛體調控的活性，但該共軛經由偶聯生物活性成份結合至受體可拮抗細胞受體的生理活，從而阻斷天然的促

效劑（例如非共軛結合的生物活性成份）之結合以及預防受體經天然的促效劑活化，而不誘導實質上受體本身生理活性的活化。依據本發明此特色之方法可包含一種或多種步驟，例如在共軛體（即共軛體之生物活性成份部分）結合至生物活性成份在細胞表面上之受體但不實質上活化受體之條件下接觸細胞（在體外或在活體內）與一種或多種本發明共軛體。該方法將用於熟悉技藝的專業人士將認知的各種診斷、以及治療的用途。

組套

本發明亦提供包含本發明之結合體及/或組成物之組套。該組套典型地包含載體，例如紙盒、紙板盒、管子等，其具有封閉限的一或更多之容器，例如管形瓶、管、安瓿、瓶子、注射器及其類似者，其中第一容器含有一種或多種本發明共軛體及/或組成物。本發明此特色之組套可進一步的包含進行一種或多種本發明共軛體以及組成物明確的用途所必須的一種或多種其它成份（例如試劑以及化合物），例如一種或多種用於診斷、治療或預防特定的疾病或身體病症的成份（例如一種或多種其它治療的化合物或組成物、一種或多種診斷試劑、一種或多種載體或賦形劑、及其類似者）、一種或多種其它本發明共軛體或組成物等。

一般熟悉技藝之專業人士將認知在此描述之方法以及用途可適當的修飾以及適應而未脫離本發明或任其何具體

實施例之範圍。目前已詳細地描述本發明，參考下列實施例後本發明將更明顯，據此該實施例是爲了說明而不是限制本發明。

實施例

實施例 1: PEG-干擾素- α 共軛體

干擾素- α 是市售地重要的藥用蛋白質，2001 年世界市場超過美金二十億，主要是治療 C 型肝炎病毒 ("HCV") 感染之病人。在美國有三至四百萬人感染的和慢性丙型肝炎以及每年約發生 10,000 件 HCV-相關的死亡 (Chander, G., et al., (2002) *Hepatology* 36:5135-5144)。有兩個主要負責發展以及行銷的公司在改良有用的干擾素- α (Schering-Plough Corp.以及 F. Hoffmann-La Roche AG) 已發展以及市售干擾素- α 和單甲氧基聚(乙二醇)或 "mPEG." 之共軛體。各案例中，mPEG 係僅於一附著點聯結至干擾素- α 之各分子。於各案例中，相較於未經修飾之干擾素，產物含有顯著降低受體-結合活性之位置性同分異構物之混合物。於各案例中，共軛體在活體內增加生物效性以及作用持續期間可補償 PEG 共軛作用結果在體外減低之生物活性，較於未經修飾之蛋白質每週注射三次劑，可改良至每週一次注射的臨床療效，以治療 HCV 之慢性感染 (Manns, M.P., et al., (2001) *Lancet* 358:958-965)。

於 F. Hoffmann-La Roche 之 PEG-干擾素- α -2a 共軛體

中，二股 20-kDa mPEG 是偶聯至單一的離胺酸連結子（所謂的"分支的 PEG"），該連結子主要係聯結至一個 Lys 31、Lys 121、Lys 131 或 Lys 134（Bailon, P., et al., supra），所有以上之 Lys 係位於干擾素- α -2a 受體-結合功能部位之內或與之毗連（參閱圖 1a 之結合部位 1）。

於 Schering-Plough Corp.之 PEG-干擾素- α -2b 共軛體中，單股 12-kDa mPEG 主要係偶聯至位置 34 之組胺酸殘基（His 34; Wylie, D.C., et al., supra; Gilbert, C.W., et al., U.S. Patent No. 6,042,822; Wang, Y.-S., et al., supra），該區域是結合至受體重要的區域（參閱圖 1b）。其它 Schering-Plough 產物之 PEG 附著位點（Lys 121、Tyr 129 以及 Lys 131）亦位於或接近結合部位 1（圖 1b）。

與此二種商品產物相反，本發明共軛體具有單股的水溶性、合成聚合物，較佳者為 PEG 或 mPEG，聯結至 N-末端胺基酸殘基，其係距離蛋白質受體-結合區域遙遠（參閱 Cys-1 以及結合部位的立體關係，圖 1c 以及 1d），展現干擾素- α 是 "RN" 細胞激動素。圖 9 以及 10 分別地顯示本發明 PEG-干擾素- α 共軛體範例之陽離子-交換以及大小排除色譜。反應混合物內含之干擾素- α -2b 中，胺基末端有其它甲硫胺酸殘基，位於天然的序列第一個殘基 Cys-1 之前。反應性的 PEG 是 20-kDa PEG-醛，其濃度是 0.2 毫莫耳濃度。還原劑是氰基硼氫化鈉，最終濃度是 14 毫莫耳濃度。4°C 下之反應進展週期性地以大小-排阻層析監測。雖然在描述之條件下干擾素- α 可充分的溶解以聚

乙二醇化，其它細胞激動素例如 β 干擾素，則溶解度較小以及需要表面活性劑存在以聚乙二醇化，C.W. Gilbert et al., (美國專利第 5,711,944 號) 之干擾素- α 亦是如此以及 R.B. Greenwald, et al., (美國專利第 5,738,846 號) 之干擾素 α 以及 β 亦是如此。

分層作用之陽離子-交換管柱 (展示於圖 9) 是 ToyoPearl MD-G SP (1 x 6.8 公分; Tosoh Biosep, Montgomery-ville, PA)，以 0-0.4 莫耳濃度 NaCl 之 20 毫莫耳濃度乙酸鈉緩衝液，酸鹼度 4.6 直線的梯度展開，流量 0.5 毫升/分鐘。數據圖 10 之大小-排除管柱是 SUPERDEX®200 (HR 10/30; Amersham Biosciences, Piscataway, NJ)，以 0.5 毫升/分鐘之內含 150 毫莫耳濃度 NaCl 的 20 毫莫耳濃度乙酸鈉緩衝液，酸鹼度 4.6 溶析。其它適當的離子-交換以及大小排除色層分析液以及分層作用條件是熟悉此技藝的專業人士所習知。本發明純化的單 PEG-干擾素- α -2b 經自動化的 Edman 降解法之胺基-末端胺基酸分析顯示 >90% 之 PEG 是附著至 N-端殘基。此分析是由 Commonwealth Biotechnologies, Inc. (Richmond, VA) 進行。

實施例 2: PEG-第二型白細胞介素共軛體

第二型白細胞介素 ("白細胞介素 2") 是具有免疫調節活性對抗某些癌症，包括腎臟細胞的癌症以及惡性黑素瘤的細胞激動素。然而，臨床療效差，僅小部分病人局部

的或完全有效 (Weinreich, D.M., et al., (2002) *J Immunother* 25:185-187)。白細胞介素 2 於血流中半生期短，於癌症病患中誘導緩和速率低。經隨機 PEG 化離胺酸殘基嘗試使白細胞介素 2 更適用並未達成最佳化 (Chen, S.A., et al., (2000) *J Pharmacol Exp Ther* 293:248-259)。嘗試選擇地在白細胞介素 2 的糖基化作用位點貼上 PEG (Goodson, R.J., et al., *supra*) 或在非必需的半胱胺酸 (Cys 125) 或在白細胞介素 2 突變蛋白殘基 1 至 20 內含之半胱胺酸貼上 PEG (Katre, N., et al., 美國專利第 5,206,344 號)，沒有產生適用的臨床產物。

圖 4 顯示白細胞介素 2 受體-結合區域離胺酸殘基之分佈，顯示許多表面-易接近的離胺酸殘基涉及受體結合。其實實際上 Lys-35 以及 Lys-43 已確認是 α -受體與白細胞介素 2 交互作用所必須，暗示 PEG 化離胺酸殘基去活化白細胞介素 2 之機制。圖 4 亦顯示白細胞介素 2 N-端區域距離蛋白質受體-結合區域遙遠，展現白細胞介素 2 有 "RN" 細胞激動素構造。我們的結論是白細胞介素 2 是 "RN" 細胞激動素能和 H. Sato, et al., ((2000) *Bioconjug Chem* 11:502-509) 之觀察結果相容，彼使用酵素轉麩胺酸的反應連接一或二股 10-kDa mPEG 至該作者引入白細胞介素 2 突變蛋白 N-端突出之序列 AQQIVM 上之一或二個麩胺酸殘基 ("Q")。Sato et al. 報導其結合是突變蛋白經轉麩胺酸的反應聚乙二醇化接近胺基末端可比隨機 PEG 白細胞介素 2 突變蛋白化離胺酸製備的共

軛體保持更多的生物活性。類似的方法 PEG 化其它蛋白質可參閱 Sato, H., (2002) *supra*。基於這空間的分離白細胞介素 2 胺基末端與蛋白質之受體-結合區域，如展示於圖 4，可瞭解糖基化作用位點殘基 Thr-3 (未顯示) 造成白細胞介素 2 是本文定義之 "RG" 受體-結合蛋白質。因此，白細胞介素 2 是 RN 細胞激動素以及 RG 細胞激動素。

圖 11 以及 12 分別顯示本發明 PEG-白細胞介素 2 共軛體之陽離子-交換及大小排除色譜，彼係選擇的於 N-端聚乙二醇化 (還原烷化)，如實施例 1。分層作用之條件與圖 9 以及 10 之描述一致。圖 13 顯示離子交換層析法純化前後，相同共軛體十二基硫酸鈉 ("SDS-PAGE") 存在下之聚丙烯醯胺凝膠電泳分析，如展示於圖 11。凝膠內含 4-12% 梯度總聚丙烯醯胺之雙-三羥甲基胺基甲烷緩衝液 (目錄 # NP0335, Invitrogen, Carlsbad, CA)。樣品各含約 1-2 微克蛋白質，於分析之前在 90°C 下加熱 10 分鐘。凝膠於冷卻下操作於固定的電壓 117-120 約 135 分鐘。一部分之凝膠用 Sypro® Ruby 蛋白質凝膠染料 (Molecular Probes, Eugene, OR) 染色以及其他部分用改良的 C.E. Childs ((1975) *Microchem J* 20:190-192) 以及 B. Skoog ((1979) *Vox Sang* 37:345-349) 方法對 PEG 染色。本發明純化的單 PEG-白細胞介素之二吸收峰 (圖 11) 經自動化的 Edman 降解法之胺基-末端胺基酸分析顯示 >90% 之 PEG 是附著至 N-端殘基。此分析是由

Commonwealth Biotechnologies, Inc. (Richmond, VA) 進行。

實施例 3: "RN"受體結合蛋白質家族之成員以及非成員

圖 2、3 以及 5-8 顯示受體結合蛋白質 β 干擾素、粒細胞-巨噬細胞菌落-刺激因子 ("GM-CSF")、表皮生長因子 ("EGF")、基本成纖維細胞生長因子 ("bFGF"，亦為技藝上已知的 "FGF-2")、胰島素樣生長因子-1 ("IGF-1") 以及干擾素- γ ("干擾素- γ ") 表面分佈之離胺酸殘基相對於其受體-結合區域，並顯示此類蛋白質是 "RN"細胞激動素以及生長因子。此外，圖 2 顯示 β 干擾素是 "RG"細胞激動素。

圖 2 顯示 β 干擾素之結合部位 1 以及結合部位 2 區域之離胺酸殘基分佈，而多胜鍵胺基末端距離蛋白質受體-結合區域遙遠，展現 β 干擾素是 RN 細胞激動素。

圖 3 顯示 GM-CSF 結合部位 1 (結合 α 受體)，以及結合部位 2 (結合 β 受體) 區域離胺酸殘基分佈，而而多胜鍵胺基末端距離蛋白質受體-結合區域遙遠，展現 GM-CSF 是 RN 細胞激動素。

圖 5 顯示沿著表皮生長因子 ("EGF") 多胜鍵離胺酸殘基的分佈，包括位於或接近蛋白質受體-結合區域之離胺酸殘基，而多胜鍵胺基末端距離蛋白質受體-結合區域遙遠。

圖 6 顯示數個基本成纖維細胞生長因子 ("bFGF") 涉

及結合至受體或肝素（兩者均為 bFGF 訊息傳遞所必須）之離胺酸殘基（Schlessinger, J., et al., supra）。bFGF 胺基末端距離 bFGF 肝素-結合區域遙遠以及距離受體結合部位夠遠足以使 bFGF 成為 RN 生長因子。

圖 7 顯示數個胰島素樣生長因子-1 ("IGF-1") 之離胺酸殘基是位在或毗連多肽之受體-結合區域內，而 IGF-1 胺基末端距離受體-結合功能部位遙遠，展現 IGF-1 是 RN 生長因子。

圖 8 顯示干擾素- γ ("干擾素- γ ") 是同源二聚體，其中二多胜鍵有廣泛的交互作用。各多肽上數個離胺酸殘基是與干擾素- γ 上涉及結合至受體或是二聚作用之胺基酸殘基毗連。胺基酸殘基 Gln-1 之"球-和-棒"的版式反映出 N-端殘基功能上之重要性的證據。（此圖之晶體結構基本上包括其它甲硫胺酸殘基（標記成 "Met 0"），不存在於天然的蛋白質。）由於干擾素- γ N-端殘基遠距二聚作用介面遙遠，N-端 PEG 化可避免離胺酸 PEG 化對干擾素- γ 同二聚作用之抑制性效應。另一方面，偶聯聚合物至胺基末端可抑制二聚物和它的受體之交互作用，尤其是當附著的是長股之聚合物。

干擾素- γ ，IL-10 以及幹細胞激動素是同源二聚體細胞激動素之實施例（Walter, M.R., et al., supra; Josephson, K., et al., (2000) J Biol Chem 275:13552-13557; McNiece, I.K., et al., supra）。受體結合蛋白質二聚化是鑑定 N-端單聚乙二醇化的共軛體特別的主題，由

於不同可能的分子結構可存在於相似或同一的大小以及形狀的共軛體製劑中。例如，一個二聚乙二醇化的單體以及一個未聚乙二醇化的單體（ PEG_2 -蛋白質₁+蛋白質₁）組成之二聚物將難以或不可能以基於二聚的共軛體大小之分析（例如大小-排阻層析或沈降係數、光散射或擴散係數評估）辨別由二 N-端聚乙二醇化的單體（ PEG_1 -蛋白質₁）₂組成的二聚物，迄今此類每蛋白質單體平均內含一個 PEG 之二種共軛體其受體-結合能力可能相當不同。

長鏈 β -平板受體結合蛋白質形成同源三聚體時，例如腫瘤壞死因子 α （"TNF- α "）， PEG_3 -蛋白質₃三聚體之同分異構物數目甚至大於溶液中同源二聚體受體結合蛋白質之同分異構物數目。由於 TNF 之化學修飾接近胺基末端已展示使細胞激動素失活（Utsumi, T., et al., (1992) · Mol Immunol 29:77-81），當用試劑選擇的聚乙二醇化 N-端殘基，TNF- α 不可能保持實質上之活性。

爲了鑑定寡聚體功能之細胞激動素共軛體，須要組合的分析方法。胺基端序列分析可偵測存在自由 N-端 α 胺基之單體以及電泳分析離解之單體（例如 SDS-page 或毛细管電泳）可透露受體結合蛋白質中未聚乙二醇化的以及多重-聚乙二醇化的單體之存在。無該證據，不能明確的說明該形成同源二聚體以及同源三聚體之蛋白質係合成單聚乙二醇化的共軛體。

此類實施例，尤其是圖 1-8 圖式化地說明，在此類生物活性成份受體-結合功能部位之內或與毗連的區域，

PEG 化受體結合蛋白質對蛋白質-受體交互作用之位阻提供基本了解。若 PEG 是偶聯至單體交互作用的須要的區域，則高度延伸以及有彈性的 PEG 股（參閱圖 1d）佔有的大體積亦將在空間上妨礙某些受體結合蛋白質單體聯結成功能性的同源二聚體或同源三聚體。因此，標定 PEG 化至距離受體結合蛋白質受體-結合區域遙遠的位點可減低 PEG 化對其功能所須要之分子間交互作用的干涉。進行依據本發明方法，預期 PEG 化受體結合蛋白質更為有利。產生的共軛體結合預期之改良溶解度、增加生物效性、增大穩定性以及減低產生免疫性等利益，可未料到保留高生物活性。

實施例 4：還原烷化 PEG 化干擾素- β -1b

一系列之具體實施例中，合成干擾素- β -1b（"干擾素- β -1b；序列確認號碼：1）和單甲氧基 PEG（"mPEG"）共軛體是用硼烷-吡啶複合體作還原劑還原烷 20-kDa 或 30-kDa mPEG-醛（Cabacungan, J.C., et al., supra）。不含運載蛋白之干擾素- β -1b 以及濃度約 1.9 毫克/毫升之溶液，其中內含大約 3 毫克/毫升 SDS，係得自（Chiron Corporation（Emeryville, CA）。這個蛋白質稱為 "BETASERON®" 以調配物之型式售自 Berlex Laboratories（Schering AG 之美國子公司）以及 "BIFERON®" 以調配物之型式售自 Schering。硼烷-吡啶複合體（Aldrich 17,975-2, Milwaukee, WI）是稀釋成 450 毫莫耳濃度硼烷之 60%

(v/v) 乙腈水溶液。20-kDa mPEG 正丙醛 ("PEG-醛" ; NOF Corporation, Tokyo) 是溶於 1 毫莫耳濃度 HCl, 濃度為 30 毫克/毫升。溶解之後將 0.1 毫升 PEG-醛溶液加入 0.7 毫升干擾素- β -1b 溶液中以及混合。添加 0.05 毫升 100 毫莫耳濃度乙酸鹽緩衝液酸鹼度 4.6, 使反應混合物之最終酸鹼度為 5。另一內含 0.1 毫升 PEG-醛溶液以及 0.7 毫升干擾素- β -1b 溶液之反應混合物中, 加入 0.05 毫升 200 毫莫耳濃度乙酸、200 毫莫耳濃度 Na_2HPO_4 以及 68 毫莫耳濃度 NaOH 之混合物使最終酸鹼度為 6.4。三個 0.85-毫升等量樣本之混合物中各加入 0.1 毫升之水、1.5 毫莫耳濃度 NaCl 或 10 毫克/毫升 SDS。然後將稀釋之硼烷-吡啶複合物加入各反應混合物中以生成最終濃度 23 毫莫耳濃度之硼烷。將產生之各反應混合物分成二管於 4℃ 或室溫下反應 2 天。等量樣本之反應混合物以 10 毫莫耳濃度三羥甲基胺基甲烷、150 毫莫耳濃度 NaCl (酸鹼度 8.3), 其中內含 0.3 毫克/毫升 SDS, 流量 0.5 毫升/分鐘之 Superose™ 12 管柱 (Amersham Biosciences HR 10/30; Piscataway, NJ) 用大小排除 HPLC 分析。溶析物之吸光度用 214 毫微米監測。輸入比例大約為 2 莫耳 PEG/莫耳之蛋白質, 主要的產物是單聚乙二醇化的干擾素- β -1b (PEG₁-干擾素- β -1b)。在所有測試條件下 (酸鹼度 5 或酸鹼度 6.4; 4℃ 或室溫; NaCl 或其它 SDS 存在與否) PEG₁-干擾素- β -1b 之產率介於 65%至 72%之間。

其它實驗中使用 NaBH_3CN 作還原劑以及樣品分析是

用大小排除 HPLC 之 Superdex 200 HR 30/10 管柱 (Amersham Biosciences)，10 毫莫耳濃度乙酸鹽、150 毫莫耳濃度 NaCl (酸鹼度 4.6)，內含 1 毫克/毫升 SDS 溶析，流量 0.5 毫升/分鐘。該實驗之結果展示於圖 14。20-kDa mPEG 輸入濃度大約是 0.1 毫莫耳濃度、0.2 毫莫耳濃度以及 0.4 毫莫耳濃度 (圖 14 中分別地稱為 "1x"、"2x" 以及 "4x") 以及反應混合物是在室溫下反應 3 天。對照試樣 (底部示蹤) 是僅和還原劑反應。當相同樣品除了溶析緩衝液中刪除 SDS 之外在相同條件下進行色層分析，溶析物中未偵測到未聚乙二醇化的干擾素- β -1b。實施例 4 之方法中以 30-kDa mPEG 正丙醛取代 20-kDa mPEG 正丙醛時亦得到相似的結果。以 10-kDa mPEG 正丙醛取代 20-kDa mPEG 正丙醛時亦得到相似的結果。此外可使用 mPEG-乙醛或丁醛。此實施例方法選擇的 N-端 PEG 化 β 干擾素可產生增進生物活性的共軛體，不論 N-末端胺基酸是否是絲胺酸 (干擾素- β -1b)、甲硫胺酸 (干擾素- β -1a) 或另一胺基酸。

實施例 5: 氧化分裂作用測定 N-端 PEG 化之程度

PEG 偶聯至蛋白質 N-端絲胺酸殘基 α 胺基，而不是易接近的離胺酸殘基 ϵ 胺基的比率，可用包括烷基化絲胺酸殘基之氧化分裂作用之新穎的方法評估。PEG₁-干擾素- β -1b 是主要物種 (大約是總蛋白質之 70%) 之反應混合物可用 1 毫克/毫升 SDS 之乙酸鹽緩衝液 (酸鹼度 4.6) 透

析。然後添加 10 毫莫耳濃度 Na_3PO_4 將酸鹼度調至 7.4。此部份之溶液在 4°C 缺少過碘酸鈉下或最終濃度 0.1 至 10 毫莫耳濃度 NaIO_4 下反應多至 20 小時。反應後反應混合物以 SuperoseTM 6 管柱進行色層分析，10 毫莫耳濃度乙酸鹽緩衝液、150 毫莫耳濃度 NaCl （酸鹼度 4.6），內含 1 毫克/毫升 SDS 溶析。用 Superose 12 管柱關於單聚乙二醇化的干擾素- β -1b 回收率得到相似的結果，Superose 12 管柱之優點是允許從"鹽吸收峰"中解析未經修飾之干擾素- β -1b。214 毫微米吸光度吸收峰下對應至 PEG₁-干擾素- β -1b 之區域相對於高碘酸鹽濃度顯示至約 1 毫莫耳高碘酸鹽濃度下此區域劇烈減少以及 1 毫莫耳濃度至 10 毫莫耳高碘酸鹽濃度下殘留 PEG₁-干擾素- β -1b 幾乎維持固定的水準。以 ≥ 3 毫莫耳濃度高碘酸鹽處理 0.2、2 或 7 小時之後的相似分析指出絲胺酸-聯結 PEG 的氧化分裂作用實質上在 2 小時之內完成。殘留 PEG 共軛體僅內含離胺酸-聯結的 PEG，多至 10 毫莫耳濃度高碘酸鹽處理下聯結仍穩定。和高碘酸鹽氧化反應後存在之共軛體的比率相似於以 Edman 降解法估計的除胺基末端之外的聚乙二醇化位點的比率。用各種分析的方法，包括（但非限於）：逆相色譜法、毛細管電泳、膠體電泳、超高速離心、質譜檢查、光散射或超濾法評估氧化的方法下穩定或不穩定共軛體的分佈得到相似的結果。

干擾素- β -1b 是用硼烷-吡啶複合物作還原劑在各種描述於實施例 4 的不同條件下偶聯至 20-kDa PEG-醛。單聚

乙二醇化的干擾素- β -1b 是用 Superose 12 管柱色譜法純化，20 毫莫耳濃度磷酸鈉緩衝液、150 毫莫耳濃度 NaCl（酸鹼度 7.4），其中內含 0.3 毫克/毫升 SDS 溶析，流量為 0.5 毫升/分鐘。純化的 PEG₁-干擾素- β -1b 共軛體在室溫下 3 毫莫耳濃度過碘酸鈉不存在或存在下反應 2 小時。圖 15 顯示未處理的以及 PEG₁-干擾素- β -1b 氧化分解樣品之 Superose 12 管柱色譜，其係以 10 毫莫耳濃度三羥甲基胺基甲烷、150 毫莫耳濃度 NaCl（酸鹼度 8.3），內含 0.3 毫克/毫升 SDS 溶析，流速 0.5 毫升/分鐘。此類數據指出 PEG₁-干擾素- β -1b 中大約 90%PEG 在酸鹼度 6.4 下合成偶聯至 N-端絲胺酸。反應混合物中添加 150 毫莫耳濃度 NaCl（下面的曲線）或 1 毫克/毫升 SDS（上面的曲線）或在酸鹼度 5 下進行偶聯反應（結果未顯示）不會顯著的改變此結果。當單羥基 PEG 正丙醛用 mPEG 正丙醛或 PEG 醛取代時亦得到相似的結果。同樣地，本實施例方法可度量干擾素- β -1b 之外其他蛋白質（其中該蛋白質有 N-端絲胺酸或蘇胺酸殘基）N-端還原烷基化之程度。同樣地，還原烷基化 N-端絲胺酸或蘇胺酸殘基之聚合物聯結的氧化分裂作用可使用過碘酸鈉之外之高碘酸鹽達成，包括（但非限於）：偏高碘酸鈉（本文中以及技藝上亦稱為過碘酸鈉）、偏高碘酸鉀、偏高碘酸鋰、高碘酸鈣、高碘酸鋇以及高碘酸。

實施例 5 之方法還原烷基化其它細胞激動素合成聚合物共軛體可應用到第一型白細胞介素- α （Geoghegan, K.F.,

et al., supra) 以及巨核細胞生長以及發生因子 (Guerra, P.I., et al., supra)。

實施例 6: 逆相色譜法純化共軛體以及去除自由 PEG 和 SDS

使用 S. Hershenson et al. (美國專利第 4,894,330 號) 之逆相 ("RP") 色譜法純化細菌的細胞培養表現的干擾素- β -1b。本案發明人使用 Hershenson et al. 之方法分離從未經修飾之蛋白質依描述於實施例 4 合成之個別的聚乙二醇化物。此步驟亦可從蛋白質吸收峰解析自由 PEG 以及大部份的 SDS。圖 16 顯示 Jupiter™ C4 300A 管柱 (15 公分 x 4.6 毫米; Phenomenex; Torrance, CA) 分析的色譜, 以 20% 乙腈加上 0.04% 三氟乙酸至 80% 乙腈加上 0.1% 三氟乙酸梯度溶析。負荷十分之一毫升反應混合物以及收集 0.5 毫升分層, 流量 1 毫升/分鐘。吸光度 280 毫微米下 (固態曲線) 偵測到曝露至 PEG 化試劑下顯然為未經修飾干擾素- β -1b 之吸收峰 ("控制組聚乙二醇化") 以及每分子蛋白質內含一個或多股 PEG 之 PEG 共軛體吸收峰。此實驗中, 管柱是維持於 40°C。在室溫下之色譜法得到不同滯留時間但相似的定性結果。

收集分層測定 SDS 之結果以空心三角型展示。SDS 分析反應劑之儲備溶液內含 1 毫克/毫升之碳青色素染料 Stains-All (Sigma, # E-9379; 3,3'-二乙基-9-甲基-4,5,4',5'-二苯并噻碳青色素)、50% (v/v) 異丙醇水溶液

(Rusconi, F., et al., (2001) Anal Biochem 295:31-37) 。使用之前攪拌 2 毫升儲備溶液加上 2 毫升 N,N-二甲基甲醯胺以及 41 毫升水製備此工作反應劑。反應劑中添加 SDS 引起專一性 SDS 光譜的改變以及結果減少 510-515 毫微米之吸收峰以及在 439 毫微米出現吸收峰。將來自 RP 色層柱之各 2 mcL 分層添加至 96 孔微量滴定盤中之 250 mcL 工作反應劑，439 毫微米吸光度之改變是用 SpectraMax 250 平板計讀器監測 (Molecular Devices, Sunnyvale, CA) 。

分析收集分層 PEG 之結果展示於圖 16 之實新圓型。在使用之前攪拌 1 倍體積 20% (w/v) 氯化鋇之 1 當量 HCl 和 4 倍體積 4 毫克/毫升碘之 1% (w/v) 碘化鉀製備 PEG 分析反應劑。於內含 90 mcL 水之 96 孔微量滴定盤中加入 10 mcL 各 RP 色層柱分層 (以及 PEG 標準液) ，接著加入 100 mcL 之 PEG 分析試劑。樣品以及反應劑混合之後在室溫下反應 15 分鐘，以 SpectraMax 平板計讀器測量 508 毫微米之吸光度。圖 16 顯示 RP 色譜法從內含一個或多股 20-kDa PEG 共軛體中分離控制組聚乙二醇化的蛋白質之圖式，並從共軛體中解析未結合的 PEG 以及 SDS。從內含其它分子量 PEG (例如 10-kDa 或 30-kDa PEG) 以及 PEG 與干擾素- β -1b 之間其它酸-穩定聯結之共軛體亦得到相似的結果。

實施例 7: 從製備的逆相 HPLC 純化的分層進行色層分析

的以及電泳分析

逆相色譜法之條件下與描述於實施例 6 者相似，是將 PEG 化反應混合物較大的樣品（0.3 或 0.5 毫升）用相同的 Jupiter C4 管柱及經修飾之梯度進行分析。當負荷較大的樣品，各式各樣的干擾素（控制組聚乙二醇化物、PEG₁-干擾素-β-1b 或大於一股 PEG 之共軛體）之解析度不如圖 16 清楚。然而，得到之高度地富含控制組聚乙二醇化物或單聚乙二醇化的蛋白質分層，是以相同 RP 管柱局部純化分層的小量樣本再層析並展示（圖 17）。色譜分析是使用 EZChrom Elite 軟體（Scientific Software, Inc., Pleasanton, CA）。從此分析，展示於上方曲線之製備物（製備的 RP 管柱之分層 53）內含約 70-80%控制組聚乙二醇化的干擾素-β-1b，而展示於中間曲線之製備物（分層 51）內含約 99%PEG₁-干擾素-β-1b。圖 17 之底部曲線顯示源自此分層反應混合物之色譜，其中約 19%之吸光度是和控制組聚乙二醇化的蛋白質相關，約 61%和 PEG₁-干擾素吸收峰相關，約 12%和標記的 PEG₂-干擾素吸收峰相關，以及 5-6%之溶析比 PEG₂-干擾素快。從其它廠牌的逆相管柱得到相似的定性結果。

相同反應混合物（RP 色譜法分析，圖 17）以及二個 RP 色譜法純化的 PEG-干擾素分層是用聚丙烯醯胺凝膠電泳在 SDS 存在下分析（"SDS-PAGE"）。此結果展示於圖 18 以及 19。重複樣品和還原劑（Invitrogen, # NP0004; Carlsbad, CA）或無還原劑在周圍溫度下或 102℃ 下反應

10 分鐘以及在 4-12% 雙 - 三 羥 甲 基 胺 基 甲 烷 凝 膠 (Invitrogen, # NP0321B)、120 V 下電泳 140 分鐘。展示於圖 18 以及 19 蹤跡之樣品是既未還原也未加熱。蛋白質凝膠是用 SYPRO® Ruby Stain (Molecular Probes # S-12000, Eugene, OR) 染色, 302 毫微米照明以及使用橙色的 / 紅色可見光濾器 (Molecular Probes, # S-6655) 拍照 (圖 18)。數位成像是使用柯達 (Rochester, NY) 之 1D 影像分析軟體分析。水平軸代表相對於染料之位移 (100 單位), 垂直軸代表螢光蛋白質染色之相對強度。各行之基線值已垂直地位移以闡明呈現之結果。底部蹤跡代表標準蛋白質之混合物 (Mark12™, # LC5677, Invitrogen), 其中吸收峰 1 至 9 確認為其具有下列分子量之蛋白質 (以 kDa 表示): 200、116、97.1、66.3、55.4、36.5、31.0、21.5 以及 14.4。底部算起第二個蹤跡顯示電泳分析之反應混合物。此混合物中相對於各干擾素- β -1b 型式蛋白質染色之百分比是: 14% 控制組聚乙二醇化物; 64% PEG₁-干擾素; 20% PEG₂-干擾素以及約 2% 大於 PEG₂-干擾素之形式。底部算起第三個蹤跡顯示內含 $33 \pm 1\%$ PEG₁-干擾素 RP 層析柱分層; $64 \pm 1\%$ PEG₂-干擾素以及約 6% 大於 PEG₂-干擾素之形式。頂部曲線顯示內含 $95 \pm 1\%$ PEG₁-干擾素分層, 約 2% 控制組聚乙二醇化的干擾素以及約 2% 大於 PEG₂-干擾素之形式。以上百分比是各樣本四重複分析結果之平均值以及標準差。10 kDa 以及 30 kDa PEG 得到相似的定性結果。

圖 19 顯示 SDS-PAGE 分析結果，除了凝膠是使用 20% (w/v) BaCl₂ 之 1 當量 HCl 合併 4 體積 4 毫克/毫升 12 之 1% (w/v) KI 染色 PEG 之外如描述於圖 18。底部蹤跡代表代表預先染色的標準蛋白質之混合物（參閱 Blue Plus2™, Invitrogen # LC5625），其中吸收峰 1 至 9 之蛋白質的表觀分子量如下（以 kDa 表示）：204、111、68.8、51.5、40.2、28.9、20.7、14.9 以及 0.6。PEG-染色凝膠的定量分析顯示從 RP 管柱分層 51 之 PEG 約 99% 和 PEG₁-干擾素相聯（頂端曲線），而富含 diPEG 結合體之分層（從頂端算起第二個曲線）除了約 71% 之 PEG₂-干擾素之外內含 25 ± 1% 之 PEG₁-干擾素以及約 3% 大於 PEG₂-干擾素之形式。爲了估計各不同形式的干擾素-β-1b 經 PEG 染色的相對量，將 PEG₂-干擾素吸收峰以下之區域除以 2。反應混合物（從底部算起第二個曲線）中，約 50% 之 PEG 染色是和未結合的 PEG，約 35% 和 PEG₁-干擾素，約 14% 和 PEG₂-干擾素以及約 1% 和大於 PEG₂-干擾素之形式相結合。

實施例 8：干擾素-β-1b 選擇的 N-端氧化反應偶聯至低分子量胍基甲酸酯

使用備用之方法偶聯 mPEG 至干擾素-β-1b 胺基末端可明顯的將附著位點之選擇性從還原烷化（描述於實施例 4 以及 5）之約 90% 增加至約 100%。此 PEG 化方法之第一步驟是基於描述於實施例 5 氧化分裂作用還原烷基化

PEG-干擾素- β -1b 相似的原理。這個解決方式利用高碘酸鹽可將 N-端絲胺酸或蘇胺酸殘基分解至醛特有的敏感性之優點，如報導於 H.B.F. Dixon (supra) and by K.F. Geoghegan et al., ((1992) Bioconjug Chem 3:138-146; Geoghegan, K.F., U.S. Patent No. 5,362,852; Drummond, R.J., et al., 美國專利第 6,423,685 號。當干擾素- β -1b N-端絲胺酸殘基氧化程度是最大時，例如 3 毫莫耳濃度 NaIO_4 室溫下處理 2 小時之後，Superose 6 管柱大小-排阻層析產生的蛋白質吸光度吸收峰變寬。Superose 12 管柱後續的分析，10 毫莫耳濃度乙酸鹽、150 毫莫耳濃度 NaCl (酸鹼度 4.6)，內含 0.3 毫克/毫升 SDS 溶析，明顯將氧化的蛋白質解析成二種推論為蛋白質單體和二聚體之形式。此二吸收峰的性質是經 SDS-PAGE 証實，如描述於實施例 7。

逆相色譜法分析進一步的發現至少一個必需的甲硫胺酸殘基可有利的達成 N-端絲胺酸氧化最小的氧化反應。L.S. Lin et al., ((1996) Pharm Biotechnol 9:275-301) 以及 L. Lin ((1998) Dev Biol Stand 96:97-104) 顯示 RP 色譜法可解析干擾素- β -1b 的製劑中主要的成分 ("吸收峰 B") 以及較早溶析之次要成份 ("吸收峰 A")。Lin ((1998) supra) 進一步的說明吸收峰 A 內含干擾素- β -1b，其中功能性活性的甲硫胺酸 (BETASERON 之 Met 61) 是氧化成亞砷。本案發明人發現在此條件下可達成幾乎完全的氧化 N-端絲胺酸和最小 Met 61 的氧化反應

，並反射在 RP 色譜之吸收峰 A 的百分比。RP 色譜法測定之 Met 61 氧化可作為干擾素- β -1b 其他甲硫胺酸殘基（BETASERON 之 Met 35 以及 Met 116）氧化之替代標記。

研究酸鹼度以及反應（0.25 毫莫耳濃度 NaIO_4 ，4℃）時間與 Met 61 氧化之程度總結於表 1。

表 1：酸鹼度以及高碘酸鹽曝露時間對甲硫胺酸氧化程度之效應，逆相色譜法之後測定吸收峰 A 之區域。

暴露於 0.25m MNaIO_4 的時間	pH6.9 下吸收峰 A 之百分比	pH7.7 下吸收峰 A 之百分比
0	4.9	4.8
2 小時	5.1	5.2
6 小時	5.6	5.0
18 小時	7.3	5.4
9 天	21.2	15.7

干擾素- β -1b 之 N-端氧化反應形成之醛可促進比連接至 9-芴基甲基胍基甲酸酯（"Fmoc-胍基甲酸酯"，亦為技藝上已知的 "Fmoc-醯胍"）（Fluka 46917; Zhang, R.-E., et al., (1991) Anal Biochem 195:160-167）。干擾素- β -1b 之 Fmoc-胍基甲酸酯加合物獨特的吸光度光譜可判別蛋白質對應的非共軛結合的形式而不必使用螢光檢測器。各式不同濃度的 NaIO_4 酸鹼度 7.8 處理不同的時間（在室溫下 0.5 至 2 小時，或在冷卻下多至數天）可使干擾素- β -1b 氧化。此實驗展示於圖 20，此蛋白質是在室溫、0.5 毫莫耳濃度 NaIO_4 下反應 1 小時。添加甘油終止反應。在室溫下 30 分鐘之後，添加醋酸至最終濃度 19 毫莫耳濃度以降

低酸鹼度。各毫升產生之混合物，添加入 182 μL 之 15 毫莫耳濃度 Fmoc-胍基甲酸酯的甲醇，使 Fmoc-胍基甲酸酯之最終濃度為 2.3 毫莫耳濃度。逆相色譜法分析之前，將此反應混合物在 4-8 $^{\circ}\text{C}$ 下反應過夜。

圖 20 闡明干擾素- β -1b 和 0.5 毫莫耳濃度 NaIO_4 在室溫反應 1 小時，偶聯氧化產物與 Fmoc-胍基甲酸酯對 RP 色層分析性質的效應。比較對照樣本（上端曲線）和氧化的樣本（中間的曲線，空心圓型）之結果顯示主要的成分以及吸收峰 A（反映出存在約 5% 干擾素- β -1b 和氧化的甲硫胺酸殘基）氧化反應後之滯留時間是從 0.2 增加至 0.3 分鐘。測定吸收峰 A 之百分比（相較於吸收峰 A'）偵測到在此類條件下與 NaIO_4 反應氧化之甲硫胺酸少於 1%。

描述於實施例 11 之生物測定法的結果提供其它證據，用 0.1 至 0.3 毫莫耳濃度高碘酸鹽控氧化作用（例如在冷卻夏多至 2 小時）可保存蛋白質重要的生物活性胺基酸殘基之完整。

如展示於圖 20 較低的曲線實心三角型，主要的成分以及吸收峰 A'（吸收峰衍生的 N-端醛）位移至較長滯留時間，提供形成 Fmoc 加合物之證據。此外，278 毫微米與 214 毫微米（位移的吸收峰）吸光度之比例增加 50%。此二形式之蛋白質，增加滯留時間是由於形成對應的 N-端醛類（0.2-0.3 分鐘）遠小於形成對應的 Fmoc 衍生物（1.0-1.2 分鐘）增加之滯留時間。

實施例 9：合成 N-端氧化的干擾素- β -1b 之 PEG-胍基甲酸酯加合物

胺基末端選擇地氧化（描述於實施例 8）之干擾素- β -1b 亦可偶聯至胍基甲酸酯衍生的 PEG，其係使用描述於 R.J. Drummond et al. (PCT 公告第 WO 99/45026 號；美國專利第 6,423,685 號) 以及 S. Zalipsky et al., (PCT 公告第 WO 92/16555 A1 號以及 Harris, J.M, et al., eds., (1997) Chemistry and Biological Applications of Poly (ethylene glycol) , pp.318-341, Washington, D.C., American Chemical Society) 之方法。PEG-胍基甲酸酯是胍與對硝基苯碳酸鹽衍生的 20-kDa PEG ("NPC-PEG", NOF Corporation) 反應合成之產物。蛋白質在室溫、缺少高碘酸鹽或 0.125 毫莫耳濃度 NaIO_4 存在下反應 0.5、1 或 2 小時之後，樣品用 4 倍體積 20-kDa PEG-胍基甲酸酯之 10 毫莫耳濃度乙酸鹽緩衝液，150 毫莫耳濃度 NaCl (酸鹼度 4.6)，內含 1 毫克/毫升 SDS 稀釋，以及在室溫下反應 1 天。樣品用 Superose 12 管柱大小-排阻層析分析，10 毫莫耳濃度三羥甲基胺基甲烷，150 毫莫耳濃度 NaCl (酸鹼度 8.3)，內含 0.3 毫克/毫升 SDS 溶析。如展示於圖 21，與 PEG-胍基甲酸酯反應之前蛋白質先氧化多至 2 小時，結果可持續性的減少未經修飾之蛋白質（溶析的滯留時間約 25 分鐘）之濃度以及持續性的增加聯結 PEG_1 -干擾素- β -1b 共軛體（溶析的滯留時間約 20 分鐘）吸光度之比例。此方法產生之 PEG_1 -干擾素- β -1 b 超過

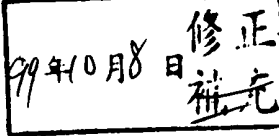
80%。使用單胍基甲酸酯衍生物 10-kDa 或 30-kDa PEG 可得到相似的結果。

實施例 10：逆相 HPLC 純化的單聚乙二醇化的干擾素- β -1b 之生物測定法

使用人類 Daudi Burkitt's 淋巴瘤細胞 (ATCC #CCL-23 1, Manassas, VA) 進行干擾素- β -1a 以及各種突變蛋白抗增殖的測定，描述於 L. Runkel et al. ((2000) Biochemistry 39:2538-2551)。圖 22 描述未處理的干擾素- β -1b 以及 RP 色譜法局部純化的 N-端單聚乙二醇化的共軛體 Daudi 細胞抗增殖活性測定的結果。此細胞是生長於補充之 RPMI 1640 之培養液 (Gibco #11875-093, Grand Island, NY) 內含 10% (v/v) 胎牛血清 (Irvine Scientific #3000, Santa Ana, CA)。將十萬個細胞接種到 48-測試盤各孔含 250 μ L 培養液以及容許在 37°C 和 5%CO₂ 下生長 4 小時，之後混合相等體積預先加熱之培養液或培養液稀釋之干擾素- β -1b 或 PEG 共軛體。於 3 天期間，以電子菌落計數器 (Model ZI, Miami, FL) 計算細胞，僅用培養液稀釋之細胞其數目增加至零時間之 590 $\pm$ 24% (s.d.)。干擾素- β -1b 或它的 PEG 共軛體最大的生長抑制之條件下，細胞之數目增加至零時間之 283 $\pm$ 8%。如此本實驗觀察到最大的生長抑制百分比是 48%。圖 22 各種不同的濃度之二種干擾素- β -1b 製劑之數據是用抑制細胞生長的百分比表現。

圖 22 顯示使用干擾素- β -1b 儲備溶液稀釋液以及製備的逆相色層分析的實驗（描述於實施例 7）內含幾乎純單 PEG 共軛體之分層（如展示於圖 17-19 分層 51），或幾乎純控制組聚乙二醇化的干擾素- β -1b（圖 17 管柱展示之分層 53）的結果。三重覆樣品用 1 微克/毫升補充胎牛血清以及經由 0.2-微米濾器過濾滅菌之培養液稀釋。從各起始稀釋液，製備 32 ng/毫升以及後續之系列稀釋液。從圖 22 之數據，計算各製劑抑制 50%細胞生長之濃度（"IC₅₀"）。結果顯示單-聚乙二醇化的干擾素- β -1b（IC₅₀ = 0.40 pg/毫升）大約是未經修飾之干擾素- β -1b（IC₅₀ = 0.250 pg/毫升）的 6 倍。一系列實驗測試之各種大小 PEG 之共軛體抗增殖的效力平均增加值，和展示於圖 22 者相似，範圍約 2.5-倍（10 kDa PEG）至約 5-倍（30 kDa PEG）。

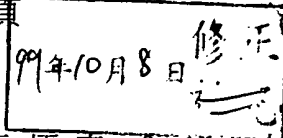
出人意外地，控制組聚乙二醇化的製劑展示於圖 22 其 IC₅₀ 約 80 pg/毫升，介於干擾素- β -1b 儲備溶液以及單聚乙二醇化的製劑中間。不結合理論或任何特定的機制說明，似合理的反映增進控制組聚乙二醇化的製劑抗增殖的能力代表逆相色譜法去除一些存在於干擾素- β -1b 溶液中之抑制性材料。此解釋和 Superose 6 管柱大小-排阻層析（溶析緩衝劑中內含 SDS，描述於實施例 4）之結果一致，大小-排阻層析揭露 214 毫微米以及 280 毫微米吸光度吸收峰可於干擾素- β -1b 以及"鹽吸收峰"溶析位置之間溶析出。相似於圖 22 展示的實驗之生物測定法是用 RP



管柱之分層 49 進行，彼內含 PEG₂-以及 PEG₁-干擾素- β -1b 之混合物（參閱圖 18 以及 19）。如同控制組聚乙二醇化的樣本，多數聚乙二醇化的樣本有抗增殖的能力，其係大於干擾素- β -1b 儲備溶液，但少於單聚乙二醇化的共軛體。其它實驗中觀察到單聚乙二醇化的干擾素- β -1 b 增加六-倍至十倍之效能。使用 PEG10、20 以及 30 kDa 之胍基甲酸酯加合物（描述於實施例 9）觀察到相似的增加效能。

可將本發明共軛體得到之 Daudi 細胞抗增殖的能力和已被報導的三種醫藥學形式干擾素- β 在抗病毒分析中測得的專一性活性比較。依據個別的包裝仿單，Berlex's BETASERON® (IFN- β -1b) 之活性是 32×10^6 IU/毫克、AVONEX® (Biogen's IFN- β -1a 調配物) 之活性是 200×10^6 IU/毫克以及 REBIF® (Serono's IFN- β -1a 調配物) 之活性是 270×10^6 IU/毫克。據此，圖 22 所示單聚乙二醇化的 BETASERON 在抗增殖分析之效能增加至少六倍表示以本發明方法將 BETASERON N-端 PEG 化已使其效能提高到市售糖基化製劑 AVONEX 以及 REBIF 的預期範圍。

先前提過，使用酸性的溶液 (Hanisch, W.H. et al., 美國專利第 4,462,940 號) 或添加 SDS (Thomson, J.W., 美國專利第 4,816,440 號) 可增進未糖基化的干擾素- β (表現於大腸桿菌) 之溶解度。不結合理論，PEG 化可增加干擾素- β -1b 在體外的抗增殖功效之機制是降低它在培養液中自我結合的傾向。據此，觀察到富含 PEG₂-干擾素- β -1b



之樣本的效力比 PEG₁-干擾素- β -1b 少，意指減低凝集之正性效應可克服多餘 PEG 化在細胞激動素結合至它受體的能力及/或以引發抗增殖活性訊息傳遞之負性效應。

實施例 11: 選擇地氧化的干擾素- β -1b 之生物測定

測定干擾素- β -1b 氧化至各種程度對 Daudi 細胞之抗增殖活性如描述於實施例 10。測試樣品包括干擾素- β -1b 儲備溶液以及 4°C 下 0.1、0.3 或 3 毫莫耳濃度高碘酸鹽處理數天之樣品。樣品如描述於實施例 10 稀釋以及於種辱細胞 4 小時之後混合相等體積之 Daudi 細胞懸浮液。細胞是於 37°C、5%CO₂ 下生長 2 天然後用 Coulter 計數器計數。在測試條件下 0.075-0.5 毫莫耳濃度 NaIO₄ 處理，干擾素- β -1b 抗增殖活性是不受影響或是增加。3 天之抗增殖的測定得到相似的結果，如描述於實施例 10。連結選擇地氧化的干擾素- β -1b 和 PEG-肼基甲酸酯可進一步的增進抗增殖的能力，如描述於實施例 9。選擇地氧化的干擾素- β -1b 與 PEG-醯肼連結 PEG-肼基甲酸酯之產物可得到相似的結果。相反的，干擾素- β -1b 用較高的濃度高碘酸鹽（例如 1-3 毫莫耳濃度）處理可抑制或徹底破壞 Daudi 細胞抗增殖的效應。此類高濃度 NaIO₄ 誘發蛋白質的二聚作用，可用 Superose 12 管柱大小排除 HPLC 偵測（描述於實施例 5），以及甲硫胺酸氧化反應，可用逆相色譜法偵測（描述於實施例 6）（結果未顯示）。

[S]

本發明共軛體之生物活性可用已知的抗增殖的技藝測

定以及基於各種細胞系或一級培養（其中細胞帶有 β 干擾素細胞-表面受體）之抗病毒技藝測定。此外，監視 β 干擾素反應包含誘導新蝶呤（Pepinsky, R.B., et al., supra）、R2-微球蛋白（Pepinsky, R.B., et al., supra）、或 2'-5'-寡腺苷酸鹽合成酶（Bruchelt, G., et al., (1992) Eur J. Clin Chem Clin Biochem 30:521-528）或操作聯結 β 干擾素可誘發的蛋白質啟動子至報導基因蛋白質。測定 β 干擾素聚合物共軛體生物活性之其它方法包含訊息傳遞測定以及基因活化測定（例如 Pungor, E., et al., (1998) J Interferon Cytokine Res 18:1025-1030）。

本發明是參照某些具體實施例以及某些實施例加以描述。本發明方法同樣地可用於除細胞激動素或其拮抗劑之外的某些受體-結合肽類以及蛋白質以及使用其它聯結試劑。因此本發明範圍並非受限制於描述之具體實施例，但僅受限制於申請專利範圍之範圍。平常的熟悉此技藝的專業人士可立即認知其它具體實施例可實際施行，而未脫離本發明範圍。所有該變異均考慮為本發明之部份。

本說明書提及之所有出版物、專利以及專利申請案係用以對熟悉此技藝的專業人士說明本發明，以及全文在此併入參考文獻。

【圖式簡單說明】

圖 1 至 8 顯示基於晶體學資料以 RasMol 軟體創造之各式不同的細胞激動素及生長因子之分子模式（Sayle,

R.A., et al., (1995) Trends Biochem Sci 20:374-376)。
 除某些特定的殘基(用"球-和棒"版式表示)之外,各模式是以"帶"或"卡通"版式表示。此類版式是用 RasMol 軟體選擇。微黑的條帶部分代表細胞激動素以及生長因子之功能部位,據報導該功能部位與其受體之結合相關。於各構造中,指出蛋白質資料庫("PDB")之編碼(參閱 Laskowski, R.A., (2001) Nucleic Acids Res 29:221-222; Peitsch, M.C., (2002) Bioinformatics 18:934-938; Schein, C.H., (2002) Curr Pharm Des 8:2113-2129)。

圖 1a 顯示干擾素- α -2a 之模型,其中四個離胺酸殘基(Lys 31、Lys 121、Lys 131 以及 Lys 134)報導為 Roche's PEG-干擾素產物 PEGASYS®之 PEG 化主要位點,展示於"球-和-棒"的版式(基於 Bailon, P., et al., supra 之數據)。涉及結合至受體("結合部位 1 以及 2")之區域亦經確認。Pegasys 聚乙二醇化的所有四個離胺酸殘基均位於結合部位 1 之區域。(PDB 編碼 1ITF)

圖 1a 顯示干擾素- α -2b 之模型,其中 Schering-Plough's PEG-INTRON®之 PEG 化主要位點之殘基(His 34、Lys 31、Lys 121、Tyr 129 以及 Lys 131),展示於"球-和-棒"的版式(基於 Wylie, D.C., et al., supra 之數據)。此類胺基酸殘基是位於結合部位 1 之區域。

圖 1c 顯示干擾素- α -2b 之模型,其中胺基端之半胱胺酸殘基("Cys V"),依據本發明是 PEG 化之目標,展示於"球-和-棒"的版式。Cys 1 距離結合部位 1 以及 2 很遙

遠。

圖 1d 顯示相同於圖 1c 之干擾素- α -2b 之模型，其中單股的 20-kDa PEG 附著至 N-端半胱胺酸殘基 ("Cys 1")。PEG 構造是使用 Lee, L.S., et al., (1999) *Bioconjug Chem* 10:973-981 中描述之程式經修改後產生以及與蛋白質有相同之比例。

圖 2 顯示人類 β 干擾素-1a (參閱序列確認號碼：2) 之分子模型，其中亦指出數個離胺酸殘基 (Lys 19、Lys 33、Lys 99 以及 Lys 134) 是位於受體-結合功能部位之內或與受體-結合功能部位毗連。此外，糖基化作用位點 (Asn 80) 以及這 N-端甲硫胺酸殘基 ("Met 1") 展示於 "球-和-棒" 的版式 (基於 Karpusas, M., et al., (1997) *Proc Natl Acad Sci USA* 94:11813-11818; Karpusas, M., et al., (1998) *Cell Mol Life Sci* 54:1203-1216; Runkel, L., et al., (2000) *Biochemistry* 39:2538-2551 的數據)。Met 1 距離結合部位 1 以及 2 遙遠，而數個離胺酸殘基是位於受體-結合功能部位之內。(PDB 之編號為 1AUI) 干擾素 β -1b (參閱序列確認號碼：1) 之構造與干擾素 β -1a 不同，缺少 N-端甲硫胺酸殘基以及醣類部分，但其具有經不成對的半胱胺酸殘基取代的絲胺酸殘基 (序列確認號碼：2 之 Cys 17)。

圖 3 顯示人類粒細胞-巨噬細胞菌落-刺激因子 ("GM-CSF") 之分子模型，其中位於受體-結合功能部位內之三個離胺酸殘基 (Lys 72、Lys 107 以及 Lys 111)，以及晶

體結構中可目視之接近胺基末端的第一個胺基酸殘基 ("Arg 4")，展示於"球-和-棒"的版式（基於 Rozwarski, D.A., et al., (1996) *Proteins* 26:304-313 之數據）。.GM-CSF 之胺基端區域位於結合部位 1 以及 2 的遠方。（PDB 編碼 2GMF）

圖 4 顯示人類第二型白細胞介素之分子模型，其中涉及各三個受體（ α 、 β 以及 γ ）之胺基酸殘基用"球-和-棒"的版式表示，為受體-結合功能部位內或接近受體-結合功能部位之數個離胺酸殘基。晶體結構中可目視之胺基末端最接近的胺基酸殘基是絲胺酸 6 ("Ser 6")，其位於受體-結合功能部位遠方（基於 Bamborough, P., et al., (1994) *Structure* 2:839-851; Pettit, D.K., et al., *supra* 之數據）。（PDB 編號 3INK）

圖 5 顯示涉及受體結合殘基以及受體-結合區域毗連的二個離胺酸殘基（Lys 28 以及 Lys 48）之人類表皮生長因子 ("EGF") 分子模型的"卡通"版式。鏈內之二硫化物鍵結用虛線展示。基於模型，晶體結構內可目視的最接近胺基末端的胺基酸殘基是半胱胺酸 6 ("Cys 6")（基於 Carpenter, G., et al., (1990) *J Biol Chem* 265:7709-7712; Lu, H.-S., et al., (2001) *JBiol Chem* 276:34913-34917 之數據）。晶體結構內不可目視的 EGF 胺基末端有彈性的部分（殘基 1-5）不是受體-結合區域。（PDB 編號 1JL9）

圖 6 顯示鹼性成纖維細胞生長因子 ("bFGF") 分子模

型之 "卡通" 版式，其中 涉及結合至受體以及肝素之殘基係以 "球 - 和 - 棒" 的版式呈現（基於 Schlessinger, J., et al., (2000) Mol Cell 6:743-750 之數據）。從胺基末端起算前 12 個胺基酸殘基不涉及受體結合。（PDB 編號 1FQ9）

圖 7 顯示胰島素樣生長因子-1 ("IGF-1") 分子模型之 "卡通" 版式，其為涉及受體結合之殘基（23-25 以及 28-37），以及麩胺酸殘基 3 ("Glu 3")，其為晶體結構中可目視之最接近胺基末端的胺基酸殘基。二個離胺酸殘基已被確認，其一毗連受體-結合功能部位 (Lys 27)，另一則遠離受體-結合功能部位（基於 Brzozowski, A.M., et al., (2002) Biochemistry 41:9389-939 之數據）。IGF-1 胺基末端位於受體-結合功能部位遠端。（PDB 編號 1GZR）

圖 8 顯示干擾素- γ ("干擾素- γ ") 之分子模型，其為同源二聚體。為了闡明二多胜鍵之交互作用，一個單體 ("鏈 A") 用 "條帶" 的版式展示以及另一個用 ("鏈 B") "骨架" 的版式展示。沿著多胜鍵之離胺酸殘基（展示淡 "球以及棒" 的版式），係散佈於涉及單體之間交互作用之介面區域或是毗連涉及受體結合的胺基酸殘基。干擾素- γ 之胺基端區域則遠離二聚作用之介面，但麩胺醯胺酸 1 (Gln 1) 則涉及受體結合。（Thiel, D.J., et al., (2000) Structure 8:927-936; PDB 編碼 IFG9）

圖 9 為內含干擾素、20-kDa mPEG-醛以及還原劑之

反應混合物經陽離子交換層析法顯示之未聚乙二醇化的干擾素- α -2b ("干擾素")、單聚乙二醇化的干擾素- α -2b ("PEG 1-干擾素")以及二聚乙二醇化的干擾素 α -2b ("PEG2-干擾素")分層。

圖 10 為展示於圖 9 份化之反應混合物以及收集自展示於圖 9 之離子-交換管柱選擇的分層之大小排除色層分析。

圖 11 顯示內含人類白細胞介素 2、20-kDa mPEG-醛以及還原劑之反應混合物的陽離子交換層析法分層作用在指定的溶析條件下，未聚乙二醇化的白細胞介素 2 殘留物不會自管柱溶析出，此結果與展示於圖 9 之干擾素- α -2b 不同。

圖 12 顯示如展示於圖 11 份化之反應混合物以及經該管柱溶析的選擇分層之大小排除色層分析。

圖 13 顯示聚乙二醇化的第二型白細胞介素 ("PEG-白細胞介素 2") 反應混合物以及展示於圖 11 陽離子-交換管柱層析分層之電泳分析。

圖 14 描述以各式各樣濃度 ("1x"、"2x"或"4x") 的 20 kDa mPEG 醛以氰基硼氫化鈉 (NaBH_3CN) 作為還原劑還原烷化形成的共軛體經大小排除 HPLC 解析之干擾素- β -1b ("干擾素")。共軛體中內含一股 PEG ("PEG₁-干擾素")或二股 ("PEG₂-干擾素")可解析自在此類條件下未偶聯 PEG 的干擾素 ("控制組聚乙二醇化的干擾素")。

圖 15 顯示過碘酸鈉氧化分裂約 90%之在各種不同條

件下還原烷化合成的 PEG 1-干擾素- β 。十二基硫酸鈉 ("SDS") 存在下以大小排除 HPLC 從切割產物 (包括甲醛以及 N-端 絲胺酸分解成醛之干擾素 ("干擾素醛")) 解析殘留的 PEG 1-干擾素- β 。

圖 16 描述從控制組聚乙二醇化的干擾素- β 、未結合的 PEG、未結合的 SDS 以及反應混合物次要成份以逆相色譜法解析 PEG₁-干擾素- β 。

圖 17 描述 PEG 化反應混合物分析性逆相 ("RP") 色譜法之結果以及製備性 RP 管柱之濃化的 PEG₁-干擾素- β (分層 51) 或控制組聚乙二醇化的干擾素- β (分層 53) 分層。

圖 18 描述 PEG 化反應混合物以及製備的 RP 管柱分層之濃化的 PEG₁-干擾素- β (分層 51) 或內含一股以上 PEG 共軛體 (分層 49) 之電泳分析的結果。凝膠用螢光染料對蛋白質染色以及在紫外線照明下拍照。染色強度用柯達 1D 影像軟體測量。

圖 19 描述圖 18 樣品電泳分析的結果，凝膠用內含 BaCl₂、I₂ 以及 KI 之試劑對 PEG 進行染色。如圖 18 測量凝膠照片之染色強度。反應混合物中可偵測到無殘留之 20-kDa PEG 的吸收峰。

圖 20 描述干擾素- β -1b 樣品之逆相色譜，樣品為未經處理 (頂端曲線) 或經 0.5 毫莫耳濃度 NaIO₄ 反應，其係分解主要以及次要成份的 N-端絲胺酸殘基產生醛衍生物 (中間的曲線)、或和 NaIO₄ 氧化並和 9-萘基甲基肼基甲

酸酯 ("Fmoc-胍基甲酸酯") 反應。次要成份 ("吸收峰 A") 含有氧化的甲硫胺酸殘基。相似的增加吸收峰 A 以及主要的成分氧化裂解 N-端絲胺酸殘基後各吸收峰相對於醛之滯留時間。在此類條件下與 NaIO_4 反應之後沒有偵測到吸收峰 A 百分比之增加。和 Fmoc-胍基甲酸酯反應之後增加滯留時間及吸光度，指出從氧化形式的吸收峰 A 以及主要的成分形成 Fmoc 共軛體。

圖 21 顯示 20-kDa PEG-胍基甲酸酯和干擾素- β 衍生物反應合成之 PEG 1-干擾素- β 。蛋白質和 0.125 毫莫耳濃度 NaIO_4 在室溫下反應 0.5、1 或 2 小時之後偵測共軛體之增加比例，顯示在此類條件下需要 1 小時以上將 N-端絲胺酸完全的轉變成醛。PEG₁-干擾素- β 無法在大小-排除管柱中完全與 20-kDa PEG-胍基甲酸酯解析。

圖 22 顯示稀釋之 PEG₁-干擾素- β (逆相色譜法純化的分層 51，其特徵在於圖 17-19) 比稀釋的干擾素- β 儲備溶液對人類 Burkitt's 淋巴瘤細胞 (Daudi 細胞) 有較大的抗增殖能力。純化的 PEG₁-干擾素- β 抑制 50% 此類細胞的生長須要之濃度是約 40 微微克/毫升，約是干擾素- β 儲備溶液的六分之一。純化的控制組聚乙二醇化的干擾素- β (展示於圖 17 之逆相色譜的分層 53) 抑制 50% 此類細胞的生長須要之濃度是約 80 微微克/毫升，約是干擾素- β 儲備溶液的三分之一。

序列表

<110> 山景製藥股份有限公司

美國加州曼洛公園艾迪生路三四七五號

<120> 生物效力增進的 β 干擾素聚合物共軛體

<130> 2057.012TW01/JAG/BJD

<140> (將被指定)

<141> (據此)

<150> US 60/479,914

<151> 2003-06-20

<150> US 60/479,913

<151> 2003-06-20

<150> US 60/436,020

<151> 2002-12-26

<160> 2

<170> FastSEQ視窗版本4.0

<210> 1

<211> 165

<212> PRT

<213> 人類

<400> 1

```

Ser Tyr Asn Leu Leu Gly Phe Leu Gln Arg Ser Ser Asn Phe Gln Ser
1           5           10           15
Gln Lys Leu Leu Trp Gln Leu Asn Gly Arg Leu Glu Tyr Cys Leu Lys
          20           25           30
Asp Arg Met Asn Phe Asp Ile Pro Glu Glu Ile Lys Gln Leu Gln Gln
          35           40           45
Phe Gln Lys Glu Asp Ala Ala Leu Thr Ile Tyr Glu Met Leu Gln Asn
          50           55           60
Ile Phe Ala Ile Phe Arg Gln Asp Ser Ser Ser Thr Gly Trp Asn Glu
65           70           75           80
Thr Ile Val Glu Asn Leu Leu Ala Asn Val Tyr His Gln Ile Asn His
          85           90           95
Leu Lys Thr Val Leu Glu Glu Lys Leu Glu Lys Glu Asp Phe Thr Arg
          100          105          110
Gly Lys Leu Met Ser Ser Leu His Leu Lys Arg Tyr Tyr Gly Arg Ile
          115          120          125
Leu His Tyr Leu Lys Ala Lys Glu Tyr Ser His Cys Ala Trp Thr Ile
          130          135          140

```

Val Arg Val Glu Ile Leu Arg Asn Phe Tyr Phe Ile Asn Arg Leu Thr
 145 150 155 160

Gly Tyr Leu Arg Asn
 165

<210> 2
 <211> 166
 <212> PRT
 <213> 人類

<400> 2
 Met Ser Tyr Asn Leu Leu Gly Phe Leu Gln Arg Ser Ser Asn Phe Gln
 1 5 10 15
 Cys Gln Lys Leu Leu Trp Gln Leu Asn Gly Arg Leu Glu Tyr Cys Leu
 20 25 30
 Lys Asp Arg Met Asn Phe Asp Ile Pro Glu Glu Ile Lys Gln Leu Gln
 35 40 45
 Gln Phe Gln Lys Glu Asp Ala Ala Leu Thr Ile Tyr Glu Met Leu Gln
 50 55 60
 Asn Ile Phe Ala Ile Phe Arg Gln Asp Ser Ser Ser Thr Gly Trp Asn
 65 70 75 80
 Glu Thr Ile Val Glu Asn Leu Leu Ala Asn Val Tyr His Gln Ile Asn
 85 90 95
 His Leu Lys Thr Val Leu Glu Glu Lys Leu Glu Lys Glu Asp Phe Thr
 100 105 110
 Arg Gly Lys Leu Met Ser Ser Leu His Leu Lys Arg Tyr Tyr Gly Arg
 115 120 125
 Ile Leu His Tyr Leu Lys Ala Lys Glu Tyr Ser His Cys Ala Trp Thr
 130 135 140
 Ile Val Arg Val Glu Ile Leu Arg Asn Phe Tyr Phe Ile Asn Arg Leu
 145 150 155 160
 Thr Gly Tyr Leu Arg Asn
 165

伍、中文發明摘要

發明之名稱：生物效力增進的 β 干擾素聚合物共軛體

本發明提供合成細胞激動素，尤其是非糖基化的 β 干擾素，以及其受體-結合拮抗劑聚合物共軛體之方法，該共軛體可保持獨特的高生物效力。依據本發明方法製備聚合物共軛體可縮小或避免由於聚合物附著在細胞激動素及其促效劑和拮抗類似物之受體-結合區域而造成對受體-配體交互作用的空間抑制。本發明亦提供依該方法製作之共軛體及組成物。相較於那些非著重於避開細胞激動素受體-結合結構區之傳統的聚合物偶聯方法製作之共軛體，本發明之共軛體能保持高水準之生物效力。在體外測定時，本發明的非糖基化 β 干擾素共軛體之生物效力實質上高於非共軛結合的 β 干擾素且類似於糖基化的 β 干擾素-1a。本發明之共軛體在活體內之半生期亦比對應的非共軛結合細胞激動素長。本發明亦提供包含該共軛體及/或組成物之組套，以及該共軛體以及組成物在各種診斷性的、預防性及治療用途之使用方法，包括多發性硬化治療。

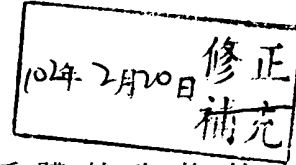
陸、英文發明摘要

發明之名稱：

Polymer conjugates of interferon-beta with enhanced biological potency

Methods are provided for the synthesis of polymer conjugates of cytokines and receptor-binding antagonists thereof, especially a non-glycosylated interferon-*beta*, which conjugates retain unusually high biological potency. Preparation of polymer conjugates according to the methods of the present invention diminishes or avoids steric inhibition of receptor-ligand interactions that commonly results from the attachment of polymers to receptor-binding regions of cytokines, as well as to agonistic and antagonistic analogs thereof. The invention also provides conjugates and compositions produced by such methods. The conjugates of the present invention retain a high level of biological potency compared to those produced by traditional polymer coupling methods that are not targeted to avoid receptor-binding domains of cytokines. In assays *in vitro*, the biological potency of the conjugates of non-glycosylated interferon-*beta* of the present invention is substantially higher than that of unconjugated interferon-*beta* and is similar to that of interferon-*beta*-1a that is glycosylated. The conjugates of the present invention also exhibit an extended half-life *in vivo* compared to the corresponding unconjugated cytokine. The present invention also provides kits comprising such conjugates and/or compositions, and methods of use of such conjugates and compositions in a variety of diagnostic, prophylactic and therapeutic applications, including treatment of multiple sclerosis.

拾、申請專利範圍



1. 一種增加非糖基化 β 干擾素的活體外生物效力之方法，包含在界面活性劑存在下選擇性地偶聯一種或多種合成的水溶性聚合物至該 β 干擾素的胺基-末端胺基酸，其中該胺基-末端胺基酸距離該 β 干擾素受體-結合功能部位是遠距的，且其中

(i) 該水溶性聚合物帶有單一醛基，且該偶聯包括在該水溶性聚合物與該 β 干擾素之間形成席夫鹼及以溫和的還原劑將該席夫鹼還原，或

(ii) 該偶聯包括將醯肼(hydrazide)、肼(hydrazine)、半卡肼(semicarbazide)或其他含胺之水溶性聚合物偶聯至已以高碘酸鹽氧化分裂為醛之該 β -干擾素的 N-末端絲胺酸或蘇胺酸殘基，

其中該水溶性聚合物為選自聚(乙二醇)、單甲氧基聚(乙二醇)、及單羥基聚(乙二醇)之聚伸烷基二醇，且

其中該活體外生物效力係於對 β -干擾素有反應之以細胞為基礎之分析中測量。

2. 如申請專利範圍第 1 項之方法，其中(i)包括形成 pH 在 5.6 至 7.6 之該 β -干擾素與該水溶性聚合物的混合物。

3. 如申請專利範圍第 1 或 2 項之方法，其中於(i)中該溫和的還原劑包含氰硼氫化鈉。

4. 如申請專利範圍第 1 項之方法，其中該 β 干擾素

具有序列確認號碼：1 所指定之干擾素- β -1b 的胺基酸序列。

5. 如申請專利範圍第 1 項之方法，其中該聚合物係以共價方式偶聯至該胺基-末端胺基酸之 α 胺基。

6. 如申請專利範圍第 5 項之方法，其中該共價偶聯該聚合物至該 α 胺基係經由二級胺聯結。

7. 如申請專利範圍第 1 項之方法，其中該聚伸烷基二醇是單甲氧基聚（乙二醇）。

8. 如申請專利範圍第 1 項之方法，其中該聚伸烷基二醇是單羥基聚（乙二醇）。

9. 如申請專利範圍第 1 項之方法，其中該聚伸烷基二醇具有之分子量介於約 1 kDa（含）至約 100 kDa（含）之間。

10. 如申請專利範圍第 9 項之方法，其中該聚伸烷基二醇具有之分子量介於約 8 kDa（含）至約 14 kDa（含）之間。

11. 如申請專利範圍第 9 項之方法，其中該聚伸烷基二醇具有之分子量介於約 10 kDa（含）至約 30 kDa（含）之間。

12. 如申請專利範圍第 11 項之方法，其中該聚伸烷基二醇具有之分子量介於約 18 kDa（含）至約 22 kDa（含）之間。

13. 如申請專利範圍第 12 項之方法，其中該聚伸烷基二醇具有之分子量約 20 kDa。

14. 如申請專利範圍第 9 項之方法，其中該聚伸烷基二醇具有之分子量約 30 kDa。

15. 如申請專利範圍第 1 項之方法，其中偶聯該聚合物至該 β 干擾素於該胺基-末端胺基酸係模仿該 β 干擾素糖基化作用或過糖基化作用的有益效應。

16. 一種共軛體，係由申請專利範圍第 1 或 2 項之方法製成的。

17. 一種共軛體，係由申請專利範圍第 3 項之方法製成的。

18. 一種共軛體，係由申請專利範圍第 4 至 15 項中任一項之方法製成的。

19. 如申請專利範圍第 16 項之共軛體，包含非糖基化 β 干擾素於其胺基-末端胺基酸共價方式偶聯至一種或多種合成的水溶性聚合物，其中該 β 干擾素共軛體相較於有一或多種相同的合成水溶性聚合物隨機地偶聯至溶劑易接近的離胺酸殘基的相同 β 干擾素之活體外生物效力有所增加，其中該活體外生物效力是在對 β 干擾素有反應之以細胞為基礎的分析中測量，且其中該水溶性聚合物為選自聚（乙二醇）、單甲氧基聚（乙二醇）、及單羥基聚（乙二醇）之聚伸烷基二醇。

20. 如申請專利範圍第 19 項之共軛體，其中該 β 干擾素具有序列確認號碼：1 中所指定之干擾素- β -1b 的胺基酸序列。

21. 如申請專利範圍第 20 項之共軛體，其中該干擾

素- β -1b 之活體外生物效力增加至大約為具有序列確認號碼：2 指定的胺基酸序列且於天門冬醯胺酸殘基 80 糖基化的干擾素- β -1a 之活體外效力。

22. 如申請專利範圍第 19 項之共軛體，其中該 β 干擾素反應性的細胞培養分析係選自：抗增殖的分析、抗病毒的分析、訊息傳遞分析以及基因活化分析。

23. 一種藥學組成物，包含如申請專利範圍第 16 項之共軛體以及藥學上可接受的載體或賦形劑。

24. 一種組套，包含如申請專利範圍第 16 項之共軛體。

25. 一種組套，包含如申請專利範圍第 23 項之藥學組成物。

26. 如申請專利範圍第 16 項之共軛體，係用於對患有 β 干擾素反應性的身體病症或有該身體病症之傾向的動物進行預防、診斷、或治療該身體病症。

27. 如申請專利範圍第 23 項之藥學組成物，係用於對患有 β 干擾素反應性的身體病症或有該身體病症之傾向的動物進行預防、診斷、或治療該身體病症。

28. 如申請專利範圍第 26 項之共軛體，其中該動物是哺乳動物。

29. 如申請專利範圍第 27 項之藥學組成物，其中該動物是哺乳動物。

30. 如申請專利範圍第 28 項之共軛體或第 29 項之藥學組成物，其中該哺乳動物是人類。

31. 如申請專利範圍第 26 項之共軛體，其中該 β 干擾素反應性的身體病症係選自：癌症、傳染病、神經變性病症、自體免疫病症以及遺傳疾病。

32. 如申請專利範圍第 31 項之共軛體，其中該癌症係選自：乳癌、子宮癌、卵巢癌、前列腺癌、睪丸癌、肺癌、白血病、淋巴瘤、結腸癌、胃腸的癌症、胰腺癌、膀胱癌、腎癌、骨癌、神經癌症、頭部以及頸部癌症、皮膚癌、癌、肉瘤、腺瘤以及骨髓癌。

33. 如申請專利範圍第 31 項之共軛體，其中該 β 干擾素反應性的傳染病係選自：病毒性肝炎、心臟病毒引起的疾病以及人類免疫不全病毒/愛滋病。

34. 如申請專利範圍第 31 項之共軛體，其中該 β 干擾素反應性的神經變性疾病是多發性硬化。

35. 如申請專利範圍第 34 項之共軛體，其中該多發性硬化係選自：復發性-緩解型、一級進行性的以及二級進行性的多發性硬化。

36. 如申請專利範圍第 27 項之藥學組成物，其中該 β 干擾素反應性的身體病症係選自：癌症、傳染病、神經變性病症、自體免疫病症以及遺傳疾病。

37. 如申請專利範圍第 36 項之藥學組成物，其中該癌症係選自：乳癌、子宮癌、卵巢癌、前列腺癌、睪丸癌、肺癌、白血病、淋巴瘤、結腸癌、胃腸的癌症、胰腺癌、膀胱癌、腎癌、骨癌、神經癌症、頭部以及頸部癌症、皮膚癌、癌、肉瘤、腺瘤以及骨髓癌。

38. 如申請專利範圍第 36 項之藥學組成物，其中該 β 干擾素反應性的傳染病係選自：病毒性肝炎、心臟病毒引起的疾病以及人類免疫不全病毒/愛滋病。

39. 如申請專利範圍第 36 項之藥學組成物，其中該 β 干擾素反應性的神經變性病症是多發性硬化。

40. 如申請專利範圍第 39 項之藥學組成物，其中該多發性硬化係選自：復發性-緩解型、一級進行性的以及二級進行性的多發性硬化。

41. 一種用以選擇性氧化分裂生物活性蛋白質 N-端絲胺酸或蘇胺酸殘基、而不氧化該生物活性蛋白質之功能必需胺基酸殘基的方法，包含：

a) 調整該生物活性蛋白質溶液之氫離子濃度至酸鹼值介於約 7 至約 8 之間；

b) 將該生物活性蛋白質溶液以每莫耳生物活性蛋白質對約 0.5 至約 5 莫耳高碘酸鹽之比例與高碘酸鹽混合；
以及

c) 令該混合物在溫度介於約 2°C 至約 40°C 之間溫育至少一個小時。

42. 如申請專利範圍第 41 項之方法，其中該生物活性蛋白質是 β 干擾素。

43. 如申請專利範圍第 42 項之方法，其中該 β 干擾素為具有序列確認號碼：1 所指定胺基酸序列之干擾素- β -1b。

44. 如申請專利範圍第 1 或 2 項之方法，其中於(i)中

該溫和的還原劑包含吡啶硼烷。

45. 如申請專利範圍第 1 或 2 項之方法，經進行此方法以使該 β 干擾素上至少一個必須甲硫胺酸殘基的氧化最小化。

46. 如申請專利範圍第 1 項之方法，其中該 β 干擾素具有序列確認號碼：1 之實質胺基酸序列。

柒、指定代表圖：

(一)、本案指定代表圖為：無

(二)、本代表圖之元件代表符號簡單說明：無

捌、本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式：無