

公告本

發明專利說明書

(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)

※申請案號：92136592

※申請日期：92年12月23日

※IPC分類：

A61K38/16(2006.01)

A61K47/48(2006.01)

壹、發明名稱：

(中) 具有保留之受體結合活性的細胞活素、趨化激素、生長因子、多肽激素及其拮抗劑之聚合物共軛物(外) Polymer conjugates of cytokines, chemokines, growth factors, polypeptide hormones and antagonists thereof with preserved receptor-binding activity

貳、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.

參、發明人：(共4人)

1. 姓名：(中) 謝姆 巴斯卡倫(英) BHASKARAN, SHYAM S.地址：(中) 美國加州聖布魯諾伊斯頓大道九五三號(英) 953 Easton Avenue, San Bruno, CA 94066, U.S.A.2. 姓名：(中) 梅瑞 歇爾曼(英) SHERMAN, MERRY R.地址：(中) 美國加州聖卡洛斯羅伊路一一一四號(英) 1114 Royal Lane, San Carlos, CA 94070, U.S.A.3. 姓名：(中) 馬克 塞佛(英) SAIFER, MARK G.P.地址：(中) 美國加州聖卡洛斯羅伊路一一一四號(英) 1114 Royal Lane, San Carlos, CA 94070, U.S.A.

4. 姓名：(中) 艾爾 威廉斯
 (英) WILLIAMS, L. DAVID
 地址：(中) 美國加州費蒙特亞蘭廣場三七七〇九號
 (英) 37709 Arlene Court, Fremont, CA 94536, U.S.A.

肆、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 ; 60/479,914 有主張優先權

4. 姓名：(中) 艾爾 威廉斯
 (英) WILLIAMS, L. DAVID
 地址：(中) 美國加州費蒙特亞蘭廣場三七七〇九號
 (英) 37709 Arlene Court, Fremont, CA 94536, U.S.A.

肆、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 ; 60/479,914 有主張優先權

(1)

玖、發明說明**【發明所屬之技術領域】**

本發明係在蛋白質生物化學及藥學和醫學領域中。尤其是，本發明提供用於製造介於水溶性聚合物（如：聚（乙二醇）及其衍生物）和某些生物活性成分間之共軛物的方法，此種共軛物與標準之聚合物 - 生物活性成分共軛物相較下，具有增加之受體 - 結合活性。更具體地說，本發明提供用於製造具有異於尋常高之受體 - 結合活性的某些受體 - 結合蛋白質之聚合物共軛物的方法。本發明亦提供由這類方法所製造之共軛物、含這類共軛物之組成物、含這類共軛物和組成物之套組和組成物，以及利用該共軛物和組成物來預防、診斷和處理多種醫學和獸醫疾病的方法。

【先前技術】

下列相關技藝之描述包括不在先前技藝中之本發明者本身的解釋。細胞活素為以內分泌、旁分泌或自動分泌方式來控制細胞之生存、生長、分化及/或作用器功能的分泌出的調節性蛋白質（回顧：Nicola, N.A. (1994) 於：Guidebook to Cytokines and Their Receptors, Nicola, N.A., ed., pp. 1-7, Oxford University Press, New York）。趨化激素為一族構造上相關，具有效之白血球活化及/或趨化活性的醣蛋白（回顧：Oppenheim, J.J., et al., (1997) Clin Cancer Res 3:2682-2686）。就像其密切相關物質，

(2)

多肽激素和生長因子、細胞活素及趨化激素藉由結合至其靶的細胞表面上之特殊受體蛋白質來啓動其調節功能（回顧：Kossiakoff, A.A., et al., (1998) *Adv Protein Chem* 52:67-108; Onuffer, J.J., et al., (2002) *Trends Pharmacol Sci* 23:459-467）。由於其效力、特異性、小尺寸，且容易在重組有機體中製造，因此，細胞活素、趨化激素、生長因子和多肽激素在作為治療劑上有多種可能之用途。

一般而言，二種關鍵因素阻礙細胞活素，尤其是，重組蛋白質在作為治療劑上之發展-----其在循環中普遍較短之半生期，及其潛在之抗原性和致免疫性。此處及本技藝中一般所使用之"抗原性"一詞係指分子連接預先存在之抗體的能力，而"致免疫性"一詞係指分子在活體內激發免疫反應之能力，不論該反應是否涉及形成抗體（"體液反應"）或刺激細胞免疫反應。

在重組之治療性蛋白質的給藥方面，靜脈內（i.v.）給藥通常較適宜用來取得最高之循環活性，並可將生物可利用性及降解問題降至最低。然而，在 i.v. 給藥後小分子蛋白質的半生期通常非常短（是下列文獻中之實施例：Mordenti, J., et al., (1991) *Pharm Res* 8: 1351-1359; Kuwabara, T., et al., (1995) *Pharm Res* 12: 1466-1469）。流體動力學半徑超過血清白蛋白之蛋白質（其具有約 36Å 之史托克氏（Stokes）半徑和約 66,000 道耳頓（66kDa）之分子量）通常可由健康腎臟保留在血流中。

(3)

然而，較小之蛋白質，包括：細胞活素，如：顆粒性白血球群落-刺激因子（"G-CSF"）、間白素-2（"IL-2"）、干擾素- α （"IFN- α "）和干擾素- γ （"IFN- γ "）將經由腎小球過濾作用快速地從血流中清除（Brenner, B.M., et al., (1978) *Am J Physiol* 234: F455-F460; Venkatachalam, M.A. et al., (1978) *Circ Res* 43: 337-347; Wilson, G., (1979) *J Gen 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), *J Am Soc Nephrol* 9: 2344-2348)。結果，注射後，在循環中維持治療上有用濃度之小分子重組蛋白質是有疑問的。因此，通常必須給予較高濃度之這類蛋白質和更頻繁的注射。所產生之劑量給藥法會增加治療成本，降低患者適應的可能，並增加不良後果的風險，如：免疫反應。細胞和體液免疫反應二者均會降低注入之重組蛋白質的循環濃度直到可能妨礙有效劑量之給予，或可能導致治療-限制之後果，包括：加速清除，藥力失效和過敏性反應（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; Basser, R.L., et al., (2002) *Blood* 99: 2599-2602; Schellekens, H., (2002) *Clin Ther* 24: 1720-1740)。

(4)

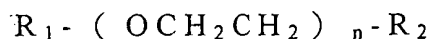
經由共價連接聚（乙二醇）（"PEG"）來改良重組蛋白質的方法已被廣泛研究，以用來作為對付上述缺點的工 具（回顧見：Sherman, M.R., et al., (1997) in: Poly (ethylene glycol) : Chemistry and Biological Applications, Harris, J.M., et al., eds., pp. 155-169, American Chemical Society, Washington, D.C.; Roberts, M.J., et al., (2002) Adv Drug Deliv Rev 54: 459-476)。將 PEG 附著至蛋白質顯示出可穩定蛋白質，改良其在活體內之生物可利用性及/或降低其致免疫性。（在本文中和本技藝中將 PEG 共價連接至蛋白質或其它受質上係稱為"聚乙二醇化"）。另外，聚乙二醇化可顯著增加蛋白質之流體動力半徑。當小分子蛋白質，如：細胞活素、趨化激素、生長因子或多肽激素偶合至 PEG（如：所具之分子量至少約 18kDa）之單一長股時，所產生之共軛物的流體動力學半徑超過血清白蛋白所具者，且其經由腎小球從循環中清除之速率顯著減緩。聚乙二醇化之聯合效果-降低蛋白質水解、降低免疫辨識及降低腎臟清除速率-賦予作為治療劑之聚乙二醇化的蛋白質多種優點。

自 1970 年代起，已有許多人努力利用共價連接聚合物來改良用於藥學用途之不同蛋白質的安全性和有效性（見，如，Davis, F.F., et al., U.S. Patent No. 4,179,337）。一些實施例包括：將 PEG 或聚（乙烯化氧）（"PEO"）偶合至腺苷脫胺酶（EC3.5.4.4），以用來治療嚴重之合併的免疫缺乏症（Davis, S., et al., (1981)

(5)

Clin Exp Immunol 46: 649-652; Hershfield, M.S., et al., (1987) N Engl J Med 316: 589-596), 將其偶合至過氧化物歧化酶 (EC1.15.1.1), 以用來治療發炎狀態 (Saifer, M., et al., U.S.專利 5,006,333 號和 5,080,891 號), 及將其偶合至尿酸化物氧化酶 (EC1.7.3.3), 以用來從血液和尿液中排除過量的尿酸 (Kelly, S.J., et al., (2001) J Am Soc Nephrol 12: 1001-1009; Williams, L.D., et al., PCT Publication No. WO 00/007629 A2 和 A3 及 U.S.專利 6,576,235 號; Sherman, M.R., et al., PCT 刊物 WO 01/59078 A2 號)。

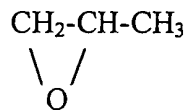
PEOs 和 PEGs 為由共價連接之乙烯化氧單位所組成之聚合物。這些聚合物具下列一般構造：



其中 R_2 可為一羥基團 (或其反應性衍生物), 而 R_1 可為氫 (如在二羥基 PEG ("PEG 二醇") 中)、甲基團 (如在一甲氧基 PEG ("mPEG") 中)、或其它較低烷基團 (如在異丙氧基 PEG 或第三-丁氧基 PEG 中)。在 PEG 之一般構造中的變數 n 表示在聚合物中之乙烯化氧單位的數量, 且此處和本技藝中係指"聚合化程度"。具相同之一般構造的聚合物 (其中 R_1 為 C_{1-7} 烷基團) 亦曾稱為環氧乙烷衍生物 (Yasukohchi, T., et al., U.S.專利 6,455,639 號)。PEGs and PEOs can be linear, branched

(6)

(Fuke, I., et al., (1994) J Control Release 30: 27-34) or star-shaped (Merrill, E.W., (1993) J. Biomater Sci Polym Ed 5: 1-11) 。 PEGs 和 PEOs 為兩歧性分子，也就是其可溶於水和某些有機溶劑中，且其可黏附至含脂質之物質上，包括：有外套之病毒，及動物之細胞膜和細菌細胞。某些具下列構造之乙烯化氧 (OCH₂CH₂) 和丙烯化氧：



的大小不一的、或大塊的或替換的共聚物具有相當類似於 PEG 所具之性質，在某些應用中，這些共聚物被認為是 PEG 之合適的替代物（見，如：Hiratani, H., U.S.專利 4,609,546 號和 Saifer, M., et al., U.S.專利 5,283,317 號）。此處所使用之"聚伸烷基氧化物"和縮寫"PAOs"一詞係指這類共聚物，以及 PEGs 或 PEOs，和聚（氧化乙烯-氧化甲烷）共聚物（Pitt, C.G., et al., U.S.專利 5,476,653 號）。此處所使用之"聚伸烷基二醇"和縮寫"PAGs"一般係指適合用於本發明共軛物中之聚合物，尤其是 PEGs，更特別是含單一反應基團的 PEGs（"經單官能化方式活化的 PEGs"）。

將 PEG 或其它聚伸烷基氧化物共價附著至蛋白質需要將至少一個該聚合物之端基團轉化成反應性官能基。此過程常稱為"活化"，且該產物係稱為"活化之 PEG"或活化

(7)

之聚伸烷基氧化物。這類方法最使常用一甲氧基 PEGs (其中在一端之氧被一未反應的、化學上穩定的甲基團蓋住(以產生"甲氧基")，而另一端具有一對蛋白質分子上之胺基團具反應性的官能基)。稱為"側鏈型" mPEGs (其含有二或多個在經單一活化之官能基遠端的甲氧基)者較不常被使用。二-mPEG-賴胺酸為側鏈型 PEG 的實施例，其中 PEG 偶合至二個胺基，而賴胺酸之羧基最常藉 N-羥基琥珀醯亞胺進行酯化反應來活化 (Martinez, A., et al., U.S. 專利第 5,643,575; Greenwald, R.B., et al., U.S. 專利第 5,919,455 號; Harris, J.M., et al., U.S. 專利 5,932,462 號)。

通常，活化之聚合物與具有親核性官能基(作為附著部位)之生物活性化合物反應。一種常作為附著部位之親核性官能基為賴胺酸殘質之 ϵ 胺基。溶劑-易近之 α -胺基、羧酸基團、胍基團、咪唑基團、經適當活化之羰基團、氧化之醣部分和硫醇基團亦曾作為附著部位。

PEG 之羥基在連接蛋白質前已藉氰尿酸醯氨活化 (Abuchowski, A., et al., (1977) J Biol Chem 252: 3582-3586; Abuchowski, A., et al., (1981) Cancer Treat Rep 65: 1077-1081)。然而，本方法在使用上有缺點，如：氰尿酸醯氨有毒性，且其對具有除了胺類外之官能基(如：對官能而言為必要之溶劑-易近的半胱胺酸或酪胺酸殘質)的蛋白質具非-特異性反應性。為了克服這些及其它缺點，此方法已引入替換之活化的 PEGs，如：PEG

(8)

之琥珀醯亞胺基琥珀酸酯衍生物 ("SS-PEG") (Abuchowski, A., et al., (1984) *Cancer Biochem Biophys* 7: 175-186), PAG 之琥珀醯亞胺基碳酸酯衍生物 ("SC-PAG") (Saifer, M., et al., U.S. 專利 5,006,333 號) 和 PEG 之醛衍生物 (Royer, G.P., U.S. 專利 4,002,531 號)。

通常，分子量為約 5kDa 至約 10kDa 之一或多個 PAGs (如：一或多個 PEGs) 的數個股 (如：5-10) 係經由一級胺基團 (賴胺酸殘質之 ϵ 胺基酸，以及可能有，胺基-端 ("N-端") 胺基酸之 α 胺基團) 來偶合至靶的蛋白質。最近，已合成含有具較高分子量 (如：12kDa、20kDa 或 30kDa) 之 m PEG 的單股的共軛物。共軛物之血漿半生期與增加之分子量及/或增加之偶合的 PEG 股數間的直接相關性已被證實 (Knauf, M.J., et al., *supra*; Katre, N.V. (1990) *J Immunol* 144: 209-213; Clark, R., et al., (1996) *J Biol Chem* 271: 21969-21977; Leong, S.R., et al., (2001) *Cytokine* 16: 106-119)。另一方面，偶合至蛋白質各分子之 PEG 股數增加時，在蛋白質之必要區中的胺基團被改良的機率也增加，這暗示該蛋白質之生物功能將減弱，尤其是當其一種受體-結合蛋白質時。對含有許多胺基團之較大蛋白質，及其受質具低分子量之酶而言，由於在活體中之含 PEG 的共軛物的生物活性淨增加，因此在增加之作用期與降低之特異活性間的交易是可接受的。然而，在那些經由與細胞-表面受體之交互作用

(9)

來發生作用的較小蛋白質（如：細胞活素、趨化激素、生長因子和多肽激素）方面，已有報告表示：其相當高度之取代反應會將官能活性降低到甚至抹滅掉其在血流中之半生期被延長的優點（Clark, R., et al., supra）。

因此，聚合物共軛作用係一種建立完善之用於延長治療性蛋白質（如：酶）的生物活性和降低其免疫活性的技術（見，如：2002年12月26日提出之U.S.暫時性申請案60/436,020號和2003年6月20日提出之U.S.暫時性申請案60/479,913號和60/479,914號，其揭示內容全部併為本文之參考資料）。然而，聚合物共軛結合至經由特異連接細胞-表面受體來作用之受體-結合蛋白質上的反應通常會：1）干擾這類連接；2）明顯削減細胞活素、趨化激素、生長因子及多肽激素激動劑之訊號轉導效力；及3）明顯削減細胞活素、趨化激素、生長因子及多肽激素拮抗劑之競爭效力。已發表之這類具削減的受體-結合活性的共軛物的實例包括：人類生長激素（"hGH"）（Clark, R., et al., supra），尤其是hGH拮抗劑（Ross, R.J.M., et al., (2001) J Clin Endocrinol Metab 86: 1716-1723; IFN-alpha (Bailon, P., et al., (2001) Bioconjug Chem 12: 195-202; Wylie, D.C., et al., (2001) Pharm Res 18: 1354-1360; Wang, Y.-S., et al., (2002) Adv Drug Deliv Rev 54: 547-570)及尤其是，G-CSF（Kinstler, O., et al., PCT申請案WO 96 /11953號；Bowen, S., et al., (1999) Exp Hematol 27: 425-432）。在一特殊案例

(10)

中，將聚合物偶合至間白素-15 ("IL-15") 可將此似 IL-2 生長因子轉化成一種細胞增殖抑制劑 (Pettit, D.K., et al., (1997) J Biol Chem 272: 2312-2318)。不欲受限於理論，這類不利之聚乙二醇化效果的機制可能涉及龐大之 PEG 基團、電荷中和，或此二者對受體交互作用所造成的空間阻礙。

因此，對於製造保留大致之生物活性（如：至少約 40%）、接近完整之生物活性（如：至少約 80%）或實質上完整之生物活性（如：至少約 90%）之含 PAG（如：含 PEG 及 / 或含 PEO）的共軛物（尤其是介於這類水溶性聚合物和受體-結合蛋白質之間的共軛物）的方法是有需要的。這類共軛物可取得由聚合物成分所提供之增加溶解度、穩定性、活體內之半生期及生物可利用性的益處，且與習知之聚合物共軛物相較下，其在引入該共軛物，以用於預防、治療或診斷目的之動物體內將顯現出實質增加之效力或用途。

[發明之簡單摘述]

本發明提出上述確定之需要，並提供用於製備水溶性聚合物（如：聚（乙二醇），及其衍生物）與生物活性成分，尤其是受體-結合蛋白質，特別是治療性或診斷用之生物活性成分（如：細胞活素、趨化激素、多肽激素及多肽生長因子）之共軛物的方法。本發明亦提供由這類方法製備之共軛物。與相對應之未共軛的生物活性成分相比

(11)

下，本發明之共軛物具有增加之穩定性（也就是在活體內保存較久，半生期較長）。另外，與那些由相同之生物活性成分和任意附著在多肽鏈上之溶劑-易近位置上的聚合物鏈製備出的共軛物相較下，本發明之共軛物具有增加之受體-結合活性（其可在試管中測量或使用），及增加之活體內效力。本發明亦提供這類改良之共軛物來用於工業細胞培養中。再者，本發明提供含有這類共軛物之組成物、含有這類共軛物和組成物之套組，及該共軛物和組成物在多種預防、診斷及治療養生法中的使用方法。

在一種實施態樣中，本發明提供用於保存細胞活素、趨化激素、生長因子或多肽激素之受體-結合效力的方法，其包含將一或多種合成之水溶性聚合物選擇性地偶合至細胞活素、趨化激素、生長因子或多肽激素，或其拮抗劑之胺基-端胺基酸，其中該胺基-端胺基酸位在遠離細胞活素、趨化激素、生長因子或多肽激素，或其拮抗劑之一或多個受體-結合功能區塊的位置處。在一種相關的實施態樣中，本發明提供用於保存細胞活素、趨化激素、生長因子及多肽激素或其拮抗劑之受體-結合效力的方法，其包含將一或多種合成之水溶性聚合物選擇性地偶合至在或接近細胞活素、趨化激素、生長因子或多肽激素，或其拮抗劑之一或多個醯化位置處，其中該一或多個醯化位置係位在遠離細胞活素、趨化激素、生長因子或多肽激素之一或多個受體-結合功能區塊的位置處。

適合用於本發明這些方法中之聚合物包括但不限於：

(12)

一或多種聚伸烷基二醇（包括但不限於：一或多種聚（乙二醇）、一或多種一甲氧基聚（乙二醇）及一或多種一羥基聚（乙二醇））、一或多種聚伸烷基氧化物一或多種聚環氧乙烷、一或多種聚烯醇類（如：聚乙烯醇）、一或多種聚羧酸酯、一或多種聚（乙烯基吡咯酮）、一或多種聚（氧化乙烯-氧化甲烯）、一或多種聚（胺基酸）、一或多種聚丙稀醯嗎啉、一或多種醯胺類和一或多種烯化氧之一或多種共聚物、一或多種葡聚糖及一或多種玻璃酸類。適合用於本發明方法中之聚合物之分子量通常介於約 1kDa 和約 100kDa（包含在內）之間，或更特別的為介於約 1kDa 和約 5kDa（包含在內）之間；介於約 10kDa 和約 20kDa（包含在內）之間；介於約 18kDa 和約 60kDa（包含在內）之間；介於約 12kDa 和約 30kDa（包含在內）之間；或約 10kDa、約 20kDa 或約 30kDa。

多種細胞活素、趨化激素、生長因子和多肽激素（以及可模擬（也就是激動）或拮抗相對應之細胞活素、趨化激素、生長因子或多肽激素的生物作用（此係經由其特異性細胞-表面受體傳介）的同系物）均適合用來製備本發明之共軛物。這些包括具有四個螺旋束構造之細胞活素、趨化激素、生長因子或多肽激素（包括但不限於：顆粒性白血球群落-刺激因子（G-CSF）、巨噬細胞群落-刺激因子（M-CSF）、顆粒性白血球-巨噬細胞群落-刺激因子（GM-CSF）、白血球抑制因子（LIF）、紅血球生成素（EPO）、血小板生成素（Tpo）、幹細胞因子（SCF）、

(13)

Flt3 配位體、抑制瘤素 M (OSM)、間白素-2 (IL-2)、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-9、IL-10、IL-11、IL-12 (p35 次單位)、IL-13、IL-15、IL-17、干擾素 α (IFN- α)、干擾素 β (IFN- β) (包括 IFN- β -1b)、同感干擾素、催乳激素和生長激素及其突變蛋白、變異體、同系物和衍生物);具有 β -長帶或 β -圓筒構造之細胞活素、趨化激素、生長因子或多肽激素 (包括但不限於:腫瘤壞死因子- α (TNF- α)、IL-1 α 、IL-1 β 、IL-12 (p40 次單位)、IL-16、表皮生長因子 (EGF)、似胰島素生長因子 1 (IGF-1)、鹼性纖維母細胞生長因子 (bFGF)、酸性 FGF、FGF-4 及角質細胞生長因子 (KGF;FGF-7), 及其突變蛋白、變異體、同系物和衍生物);具有混合之 α/β 構造的細胞活素、趨化激素、生長因子或多肽激素 (包括但不限於:嗜中性白血球活化肽-2 (NAP-2)、基質細胞-衍生之因子-1 α (SDF-1 α)、IL-8、單核細胞化學誘質蛋白質-1 (MCP-1)、MCP-2、MCP-3、嗜伊紅趨化素-1、嗜伊紅趨化素-2、嗜伊紅趨化素-3、RANTES、骨髓祖代抑制因子-1 (MPLIF-1)、神經趨化素、巨噬細胞移動抑制因子 (MIF) 和 GRO/黑色瘤生長刺激活性 (GRO- α /MGSA), 及其突變蛋白、變異體、同系物和衍生物)。適合用於本發明中之多肽激素包括但不限於: 胰島素和可模擬或拮抗由胰島素受體傳介之胰島素的生物作用的胰島素同系物;催乳激素和可模擬或拮抗由催乳激素受體傳介之催乳激素的生物作用的催乳激

(14)

素同系物；及生長激素（尤其是人類生長激素）和可模擬或拮抗由生長激素受體傳介之生長激素的生物作用的生長激素同系物。

特別適合用於本發明之較佳的細胞活素、趨化激素、生長因子及多肽激素包括：IL-2;IL-10; IFN- α ;IFN- β （包括 IFN- β -1b）;TNF- α ;IGF-1;EGF;bEGF;hGH;催乳激素和胰島素。特別合適者還有前述細胞活素、趨化激素、生長因子及多肽激素之競爭性拮抗劑，如：TNF- α 、hGH 或催乳激素，及這些細胞活素、趨化激素、生長因子和多肽激素的突變蛋白、變異體和衍生物的拮抗劑。

在某些實施態樣中，該一或多種聚合物係經共價偶合（尤其是經由仲胺之鍵結）至細胞活素、趨化激素、生長因子或多肽激素之胺基端的胺基酸的 α 胺基團。在其它實施態樣中，該一或多種聚合物係經共價偶合至細胞活素、趨化激素、生長因子或多肽激素之胺基端胺基酸的化學活性側鏈基團（如：羥基團、氫硫基團、胍基團、咪唑基團、胺基團、羧基團或醛衍生物）。在額外之實施態樣中，聚合物在胺基端胺基酸，或者是，在或接近一或多個醯化位置處偶合至細胞活素、趨化激素、生長因子或多肽激素可模擬細胞活素、趨化激素、生長因子或多肽激素醯化的有利效果。在相關實施態樣中，聚合物在或接近細胞活素、趨化激素、生長因子或多肽激素上之一或多個醯化位置偶合至細胞活素、趨化激素、生長因子或多肽激素可模擬細胞活素、趨化激素、生長因子或多肽激素過醯化的

(15)

有利效果，其中"過醣化"表示除了那些存在於天然構造中者外，共價連接之單純或複合的碳水化合物部分。

本發明亦提供由本發明方法所製備之共軛物。本發明之共軛物含有偶合至一或多種合成之水溶性聚合物（如上述者）的選出之細胞活素、選出之趨化激素、選出之生長因子、選出之多肽激素或選出之其拮抗劑（如上述者），其中該一或多種聚合物係偶合至細胞活素、趨化激素、生長因子或多肽激素之胺基-端胺基酸上，且其中該胺基-端胺基酸係位在遠離該選出的細胞活素、趨化激素、生長因子或多肽激素之一或多個受體-結合功能區塊的位置處。另外，本發明之共軛物含有偶合至一或多種合成之水溶性聚合物（如上述者）的選出之細胞活素、選出之趨化激素、選出之生長因子、選出之多肽激素或選出之其拮抗劑（如上述者），其中該一或多種聚合物係偶合至細胞活素、趨化激素、生長因子或多肽激素，或其拮抗劑之一或多個醣化位置處，且其中該一或多個醣化位置係位在遠離該細胞活素、趨化激素、生長因子或多肽激素，或其拮抗劑之一或多個受體-結合功能區塊的位置處。在本發明之激動劑的聚合物共軛物方面，較合適的為：聚合物附著之位置遠離所有受體-結合功能區塊。在本發明之某些拮抗劑的聚合物共軛物方面，較合適的為：聚合物結合位置係遠離某些對發生結合而言為必要之受體-結合功能區塊，但不必遠離所有對由激動劑轉導訊號之作用而言為必要之受體-結合功能區塊。本發明亦提供含有一或多種本發明

(16)

之共軛物，及一或多種其它成分（如：一或多種藥學上可接受之稀釋劑、賦形劑或載體）的組成物，尤其是藥學組成物。本發明亦提供含有一或多種本發明之共軛物、組成物及/或藥學組成物之套組。

本發明亦提供預防、診斷，或治療受身體疾病所苦或易罹患身體疾病之動物（如：哺乳動物，如：人類）的身體疾病的方法。這類方法可包含，如：給予該動物一有效量之一或多種本發明的共軛物、組成物及/或藥學組成物。適合根據本發明這類方法治療或預防的身體疾病，包括但不限於：癌症（如：乳癌、子宮癌、卵巢癌、攝護腺癌、睪丸癌、肺癌、血癌、淋巴癌、大腸癌、胃腸癌、胰臟癌、膀胱癌、腎癌、骨癌、神經癌、頭頸癌、皮膚癌、肉瘤、腺癌、惡性瘤及骨髓瘤）；傳染病（如：細菌病、黴菌病、寄生蟲病和病毒病（如：病毒性肝炎，由心臟部位病毒引起之疾病；HIV/AIDS；等））；及遺傳病（如：貧血、嗜中性白血球減少症、血小板減少症、血友病、侏儒病及嚴重之合併免疫缺乏症（"SCID"）；自體免疫症（如：牛皮癬、系統性紅斑性狼瘡和類風濕性關節炎）和神經退化症（如：不同型式和階段之多發性硬化症、庫賈氏症、阿茲海默氏症，等）。

一般技術人士在參考本發明之下列圖形和說明，以及申請專利範圍後將可清楚明白本發明之其它較佳實施態樣。

(17)

【發明內容】

除非另外定義，否則此處使用之所有技術和科學名詞與本發明之技藝領域中一般技術人員平常所了解者具相同意義。雖然任何類似或同等於此處所描述者的方法和物質均可用來執行或測試本發明，但較佳之方法和物質描述於下。

定義

約：當本文中用來指任何數值時，"約"一詞係指所陳述之數值 $\pm 10\%$ 的值（如："約 50°C "係包含從 45°C 至 50°C （包含在內）之溫度範圍；類似地，"約 100mM "係包含從 90mM 至 110mM （包含在內）之濃度範圍。

胺基酸殘質：此處所使用之"胺基酸殘質"一詞係指一種特殊胺基酸，其通常因牽涉到二個肽鍵、牽涉到多肽骨架或側鏈而脫水，但當胺基酸牽涉到在線性多肽鏈各端所產生的一個肽鍵時亦有相同情形。胺基酸殘質係藉本技藝中常用之三-字母密碼或單-字母密碼來表示。

拮抗劑：此處所使用之"拮抗劑"一詞係指一種化合物、分子、部分或複合物，其可透過一指定之細胞活素、趨化激素、生長因子或多肽激素之受體的傳介來實質上降低或完全抑制該指定之細胞活素、趨化激素、生長因子或多肽激素在細胞、組織、或有機體上的生物及/或生理效果。拮抗劑可以多種方式行使此類效果，包括但不限於：與激動劑競爭在細胞表面上之結合位置或受體；以可降

(18)

低、實質上降低或抑制激動劑連接細胞表面受體之能力的方式來與激動劑交互作用；連接細胞表面受體並誘發其中之結構變化，以使受體呈現一種激動劑無法再連接（或僅能以減低或實質上減低之親和力及/或效力連接）的構造；在細胞、組織或有機體中誘發一種生理學變化（如：增加胞內傳訊複合物；增加轉錄抑制劑；降低細胞表面配位體受體之表現；等），以使激動劑在結合至細胞時，其結合力或由激動劑誘導之生理訊號降低、實質上降低或完全抑制；及其它本技藝中一般技術人士所熟知之讓拮抗劑實現其活性的機制。如本技藝中一般技術人士所知：拮抗劑可能與其所拮抗之配位體具類似構造（如：該拮抗劑可能為激動劑之突變蛋白、變異體、片段和衍生物），或可能完全無關。

生物活性成分：此處所使用之"生物活性成分"一詞係指一種在活體內、試管中或活體外，在細胞、組織、或有機體上具特殊生物活性，且可連接一或多種聚伸烷基二醇，以形成本發明之共軛物的化合物、分子、部分或複合物。較佳之生物活性成分包括但不限於：蛋白質和多肽類，如：本文中所描述者。

結合：此處所使用之"結合"一詞係指可為共價（如：以化學方式偶合），或非-共價（如：離子性交互作用、疏水性交互作用、氫鍵，等）之連接或附著。共價鍵可為，如：酯、醚、磷酸酯、硫酯、硫醚、氨脲、醯胺、胺、肽、醯亞胺、腓、醯肼、碳-硫鍵、碳-磷鍵，等。"結合"

(19)

一詞較"偶合"、"共軛"和"附著"等詞更廣義，且包含這些名詞之意義。

共軛物/共軛作用：此處所使用之"共軛物"一詞係指聚合物（如：PEG或PEO）共價連接一生物活性成分（如：蛋白質或醣蛋白）的產物。"共軛作用"係指形成如前句所定義之共軛物的反應。任何聚合物共軛作用之技藝中的技術熟習人士所常用的生物活性物質均可用於本發明中。

偶合的：此處所使用之"偶合的"一詞係指藉由共價鍵或強非-共價交互作用之連接，典型且較佳之情況為經由共價鍵連接。任何常由生物活性物質偶合之技藝中的技術熟習人士所使用的方法均可用於本發明中。

細胞活素/趨化激素：此處所使用之"細胞活素"一詞的定義為可控制細胞之存活、生長、分化及/或效應子功能，而以內分泌、旁分泌或自動分泌方式分泌出之調節性蛋白質（回顧：Nicola, N.A., 如上述；Kossiakoff, A.A., et al., 如上述）。類似地，此處所使用之"趨化激素"一詞的定義為一群構造上相關、具有效之白血球活化及/或趨化活性的醣蛋白中的一員（回顧：Oppenheim, J.J., et al., 如上述）。根據這些定義，細胞活素和趨化激素包括間白素、群落-刺激因子、生長因子及其它由不同細胞所製造之肽因子，包括但不限於此處所具體揭示或示範者。如同其相近之類似物，多肽激素和生長因子，細胞活素和趨化激素經由結合至在其靶的細胞表面上之特殊受體蛋白質來起動其調節功能。

(20)

疾病、失調、情況：此處所使用之"疾病"或"失調"一詞係指上述任何人類或動物之不良情況，包括：腫瘤、癌症、過敏、成癮、自體免疫、感染、中毒或理想之心靈或身體功能損傷。此處所使用之"情況"一詞包括疾病和失調，但亦指生理狀態，如：生育力為一種生理狀態而非疾病或失調。因此，適合經由降低生育力來預防懷孕之本發明組成物可被描述成處理一種狀況（生育力），而非治療失調或疾病。其它狀況為本技藝中一般技術人士所知。

有效量：此處所使用之"有效量"一詞係指為了實現所需之生物效果所需或足夠之指定共軛物或組成物的量。本發明之指定共軛物或組成物的有效量為可達到此選擇之結果的量，且這類量可由本技藝中技術熟習人士利用本技藝中已知及/或此處所描述之分析例行測定，不需作過多之實驗。例如：用於治療免疫系統缺陷之有效量可為在暴露至抗原時能引起免疫系統活化，以發展出抗原-特異性免疫反應的需要量。此名詞亦與"足夠量"同義。用於任何特殊應用之有效量可根據下列因素而有不同：處理之疾病或狀況、給予之特殊組成物、給藥途徑、個體之尺寸，及/或疾病或狀況之嚴重性。本技藝中一般技術人士可根據經驗來測定本發明之特殊共軛物或組成物的有效量，不需作過多之實驗。

一（one、a 或 an）：除非另外指出，本揭示內容中所使用之"一"詞係指"至少一"或"一或多"。

PEG：此處所使用之"PEG"包括所有乙烯化氧之聚合

(21)

物，不論其為直鏈型、或側鏈型、或多-臂型，且不論其為終端-加蓋型或羥基終結型。在本技藝中所使用之關於乙烯化氧之聚合物的其它名字中，"PEG"包括那些本技藝中已知之稱為聚(乙二醇)、甲氧基聚(乙二醇)、或mPEG、或聚(乙二醇)-一甲醚、烷氧基聚(乙二醇)、聚(乙烯化氧)、或PEO、 α -甲基- ω -羥基-聚(氧基-乙二基)和聚環氧乙烷的聚合物。

聚乙二醇化作用、經聚乙二醇化的及經莫克(Mock)聚乙二醇化的：此處所使用之"聚乙二醇化作用"一詞係指任何用來將PEG共價偶合至生物活性靶的分子，尤其是受體-結合蛋白質的過程。由此產生之共軛物稱為"經聚乙二醇化的"。此處所使用之"經莫克聚乙二醇化的"一詞係指在聚乙二醇化反應混合物中，無PEG已共價連接之蛋白質部分或其它生物活性成分。然而，經莫克聚乙二醇化之產物可能在反應或接下去之純化步驟中被改變，如：在藉還原性烷基化作用進行聚乙二醇化的期間，因暴露在還原劑中所造成之結果，及/或在處理及/或純化步驟時去除一或多種抑制劑、化合物，等所造成之結果。

多肽：此處所使用之"多肽"一詞係指藉由醯胺鍵(亦稱為肽鍵)以線性方式連接之單體(胺基酸)所組成的分子。其係指一種胺基酸的分子鏈，而非指特殊長度之產物。因此，肽類、二肽類、三肽類、寡肽類和蛋白質均包括在多肽之定義內。此名詞亦指多肽之表現改良後的產物，如：醯化、過醯化、乙醯基化、磷酸化作用，等。多

(22)

肽可從天然來源衍生，或藉重組技術產生，但不一定是從指定之核酸序列轉譯而來。其可以任何方式產生，包括藉由化學合成產生。

蛋白質和醣蛋白：此處所使用之蛋白質一詞通常係指其大小大於約 10 或更多個胺基酸，20 或更多個胺基酸，25 或更多個胺基酸，50 或更多個胺基酸，75 或更多個胺基酸，100 或更多個胺基酸，200 或更多個胺基酸，500 或更多個胺基酸，1000 或更多個胺基酸，或 2000 或更多個胺基酸的多肽。蛋白質一般具有有限定之三-次元構造，但並不一定具有此種構造，且與肽類和多肽類相反（其通常不會擁有限定之三-次元構造，而是採取大量不同構型，並稱為未摺疊的構造），蛋白質之構造通常稱為摺疊構造。然而，肽類亦可有限定之三-次元構造。此處所使用之"醣蛋白"一詞係指與至少一碳水化合物部分偶合之蛋白質，該碳水化合物部分經由胺基酸殘質（如：絲胺酸殘質或天門冬醯胺殘質）之含氧或含氮側鏈附著至蛋白質。

遠離：此處所使用之"遠離"（如在"遠離 N-端胺基酸"或"遠離醣化位置"中者）一詞係指一種構造，經由分子造型評估，其中在蛋白質上之一或多種聚合物之一或多個附著位置係位在該蛋白質之一或多個受體-結合區或功能區塊的遠端，或與其有空間上之相隔。聚合物在這類遠端附著部位（通常為 N-端胺基酸（在稱為"遠離 N-端"或"RN"受體-結合蛋白質之受體-結合蛋白質方面），或在醣蛋白上之一或多個碳水化合物部分或醣化位置（在稱為"遠端

(23)

醴化"或"RG"受體-結合蛋白質的受體-結合蛋白質方面))之共軛作用不會對其受體造成蛋白質結合的實質空間遮蔽。因此,當一水溶性聚合物分別共軛(如:共價連接)至胺基-端胺基酸或醴化位置不會實質上干擾細胞活素、趨化激素、生長因子或多肽激素連接其受體,尤其是連接細胞表面受體的能力時,在細胞活素、趨化激素、生長因子或多肽激素上之胺基-端胺基酸或醴化位置可說是"位於遠離細胞活素、趨化激素、生長因子或多肽激素的一或多個受體-結合功能區塊"。當然,指定之細胞活素、趨化激素、生長因子或多肽激素可含有超過一個受體-結合功能區塊是吾人所認知的。在此種情況中,細胞活素、趨化激素、生長因子或多肽激素的胺基-端胺基酸或醴化位置可位在遠離一個這類功能區塊,或遠離超過一個這類功能區塊的位置上,而仍被視為"位於遠離一或多個受體-結合功能區塊的位置上",只要該胺基-端胺基酸或醴化位置之共軛作用不會實質上干擾細胞活素、趨化激素、生長因子或多肽激素經由一或多個受體-結合功能區塊連接其受體。共軛作用是否會實質上干擾蛋白質結合其受體之能力可很容易地利用一般技術人士所熟知之本技藝中已知的配位體-受體-結合分析來測定。

評估配位體-受體-結合之方法包括但不限於:競爭性結合分析、放射受體-結合分析、以細胞為基礎之分析、表面胞質基因共振測量、動態光散射及超離。

如本說明書之第 1d 圖中所示,相對於具類似分子量

(24)

之蛋白質，PEG 為一種在溶液中佔據大量體積，且具高度延展性及彈性之聚合物。雖然 PEG 所附著之胺基酸殘質可能遠離一或多個受體-結合位置，但聚合物之部分可某種程度地干擾受體-結合。這類干擾之可能性隨著分子量增加造成聚合物在溶液中所佔據之體積的增加而增為口。最後，遠離受體-結合區之聚乙二醇化作用較任意之聚乙二醇化作用對受體-結合的干擾較少。

實質上地、實質的：如此處所使用，若經共軛之蛋白質結合至受體的速度及/或量不低於約 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%或更多之相對應的未共軛的細胞活素、趨化激素、生長因子或多肽激素的結合速度及/或量時，則可說蛋白質之共軛作用不會"實質上"干擾蛋白質結合至其受體的能力。

處置：此處所使用之"處置" (treatment、treat、treated 或 treating) 係指預防及/或治療。例如：當用在感染疾病方面時，此名詞可指增加個體對病原感染之抵抗力的預防性處置 (或者，換言之，降低個體受病原感染，或顯出因感染而生病之徵兆的可能性)，以及在個體受病原感染後之處置，以對抗感染，如：降低或排除感染，或預防變得更嚴重。

綜述

(25)

本發明提供用於合成受體-結合蛋白質之聚合物共軛物的方法，相對於其中有一或多個聚合物係任意連接之相同受體-結合蛋白質的聚合物共軛物，本發明方法所合成者可保留出乎意料之高的受體-結合活性。利用 X-光結晶學和以核磁共振為基礎之構造分析、突變分析和分子造型軟體，本發明者已鑑定出細胞活素、趨化激素、生長因子和多肽激素聚乙二醇化的靶的位置（包括涉及或不涉及連接其受體者）。包括這些細胞活素、趨化激素、生長因子及多肽激素之激動劑和拮抗劑的這類蛋白質在本文中稱為受體-結合蛋白質。經由選擇可將聚合物之連接瞄準那些不涉及受體交互作用之受體-結合蛋白質區的合成策略，可避免某些不利之空間遮蔽，而所產生之聚合物共軛物可保留非常高之效力。那些具有遠離一或多個其受體-結合區或功能區塊之胺基-端殘質的受體-結合蛋白質在本文中被定義為"遠離 N-端"或"RN"受體-結合蛋白質；其包括所有那些其胺基-端胺基酸係位在遠離蛋白質之受體-結合位置處的細胞活素、趨化激素、生長因子和多肽激素，或其拮抗劑。

本發明另一實施態樣中係製備含有一或多種經共價偶合至如下述之細胞活素、趨化激素、生長因子或多肽激素的合成聚合物（如：一或多種聚（乙二醇））的共軛物：這些細胞活素、趨化激素、生長因子或多肽激素具有遠離一或多個其受體-結合區或功能區塊之天然醮化位置。根據本發明此觀點，當合成之聚合物在醮化位置之區域中偶

(26)

合時，共軛物之生物活性成分（如：蛋白質）將顯示出保存良好之受體-結合活性。此受體-結合蛋白質次組在本文中稱爲"RG"受體-結合蛋白質。當親水性或兩歧性聚合物選擇性地在或接近這類"遠端醮化"位置處偶合時，尤其是當靶的蛋白質爲一種被天然醮化之蛋白質的非-醮化型式時，該聚合物可模擬天然碳水化合物類之有利效果，如：對聚集、穩定性及/或溶解度的作用，因此，其附著作用在此稱爲"假醮化作用"。因此，本發明提供用來合成共軛物的方法，且在此共軛物中，合成聚合物之位置-選擇性偶合作用可有效取代天然之碳水化合物部分。與蛋白質之其它非醮化型式相較下，所產生之假醮化可改良溶解度、減少聚集，並從血液中延遲清除。因此，本方法特別適合用來製備經由在原核宿主細胞（如：細菌，如大腸桿菌）中，以重組 DNA 技術產生之蛋白質的共軛物和組成物，因爲原核有機體通常不會將其表現之蛋白質醮化。類似地，將醮蛋白之碳水化合物部分進行選擇性聚乙二醇化可造成醮蛋白之"假性過醮化"。本方法描述於，如：C. Bona et al., PCT 刊物第 WO 96/40731 號中，其揭示內容全部併爲本文之參考資料。因此，本方法特別適合用來製備經由在真核宿主細胞（如：在酵母菌、植物細胞和動物細胞（包括哺乳動物和昆蟲細胞））中，藉重組 DNA 技術產生之蛋白質的共軛物和組成物，因爲若那些蛋白質包含天然產生之醮化訊號或藉重組 DNA 技術引入之醮化訊號時，真核有機體通常會將其表現之蛋白質醮化。這類經假

(27)

性醱化及假性過醱化之 RG 受體-結合蛋白質係在本發明之範圍內。

因此，本發明亦包含實質上、幾乎完全或實質上完全保留受體-結合活性之 "RN" 受體-結合蛋白質的聚合物共軛物，和實質上、幾乎完全或實質上完全保留受體-結合活性之假性醱化或假性過醱化之 "RG" 受體-結合蛋白質。當細胞活素、趨化激素、生長因子或多肽激素與根據本發明之一或多種水溶性聚合物共軛時，若該細胞活素、趨化激素、生長因子或多肽激素之共軛作用不會實質上干擾蛋白質結合其受體的能力，也就是若共軛之蛋白質與其相對應之受體結合的速度及/或量不低於約 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% 或更多之未共軛型式的相對應蛋白質的結合速度及/或量時，則可說細胞活素、趨化激素、生長因子或多肽激素"保留實質的、幾乎全部的、實質上全部之受體-結合活性"。那些被同時歸類為 "RN" 和 "RG" 受體-結合蛋白質之受體-結合蛋白質的聚合物共軛物亦包含在本發明之範圍內。干擾素 β (尤其是干擾素- β -1b) 及 IL-2 為後項蛋白質之二種實例。

在額外之實施態樣中，本發明提供用於合成受體-結合蛋白質之聚合物共軛物的方法，這些聚合物共軛物與其中有一或多個聚合物係任意附著之相同受體-結合蛋白質的聚合物共軛物相比下，其可保留出乎意料之高的受體-

(28)

結合活性。本發明亦提供由這類方法製造之共軛物，含有一或多種本發明這些共軛物之組成物，這些組成物還可另外包含一或多種其它成分或試劑，如：一或多種緩衝鹽類、一或多種碳水化合物賦形劑、一或多種載體蛋白質、一或多種酶、一或多種清潔劑、一或多種核酸分子、一或多種聚合物（如：未共軛之 PEG 或聚伸烷基二醇，等）。本發明亦提供含本發明之共軛物和組成物的套組。

本發明亦提供含本發明之共軛物及至少一種藥學或獸醫用途上可接受之賦形劑或載體的藥學或獸醫組成物。本發明亦提供利用這類組成物來治療或預防多種身體失調的方法，其包含給予為身體失調或狀況所苦，或容易患病之動物一或多種有效量之本發明的共軛物或組成物。

再者，本發明提供穩定之受體-結合蛋白質及用於在工業細胞培養中的製造彼之方法，藉由實質上保留生物活性和增加在工業用途中之作用期的合併效果，可取得出乎意料之高的效力。本發明之共軛物的不尋常高之效力可反映在不尋常高之生物團產量、不尋常高之重組蛋白質表現水準及其它生物處理效率之改良。

方法

本發明者已發現將聚合物瞄準 "RN" 受體-結合蛋白質之胺基-端胺基酸，或瞄準 "RG" 受體-結合蛋白質之醯化位置的近處可確保聚合物附著在遠離該蛋白質之一或多個受體-結合區或功能區塊的位置上，以藉由該附著之聚合物

(29)

分子將受體交互作用之立體遮蔽情況降至最少。因此，與那些聚合物係附著在分子中涉及受體-結合之部分內或近端處的情況相較下，根據本發明之方法可藉由共軛蛋白質來保留較高百分比之受體-結合活性。此原則（其可保留出乎意料高之受體-結合活性）可用來證明從如下群體選出之受體-結合蛋白質：鹼性纖維母細胞生長因子（"bFCF"或"FGF-2"）、表皮生長因子（EGF）、似胰島素生長因子-1（"IGF-1"）、干擾素- α （"IFN- α "）、干擾素- β （"IFN- β "（包括 IFN- β -1b））、顆粒性白血球-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 配位體、幹細胞因子（"SCF"）、間白素 2、3、4、6、10、12、13 和 15，腫瘤壞死因子- α （"TNF- α "）、腫瘤壞死因子- β （"TNF- β "）、轉形生長因子- α （"TGF- α "）、轉形生長因子- β （"TGF- β "）、角質細胞生長因子（"KGF"）、人類生長激素（"hGH"）、催乳激素、胎盤生乳激素、纖毛神經營養因子（"CNTF"）、瘦體素（leptin）及模擬這些蛋白質之作用的這些受體-結合蛋白質之構造同系物，或其受體-結合拮抗劑。相反的，大聚合物選擇性地附著 IFN- γ 之胺基端並不被預期可保留此細胞活素之大部分活性，因為這類偶合被認為會干擾活性二聚體連接其受體（根據 Walter, M.R., et al., (1995) Nature 376: 230-235 和 Thiel, D.J., et al., 之資料）。

在本發明之相關的這類實施態樣中，聚合物係偶合至

(30)

受體-結合蛋白質之突變蛋白的胺基-端殘質上，該突變蛋白係經由連接一或多種相同受體，但不啓動訊號轉導來作為該天然蛋白質之競爭性拮抗劑。可作為實例的有：含有單點突變 G120R 之 hGH 拮抗劑的聚合物共軛物（Sundström, M., et al., (1996) J Biol Chem 271: 32197-32203）和含有單點突變 G129R 之催乳激素的拮抗劑（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 刊物 WO 99/58142 A1 號）。其它受體-結合蛋白質的拮抗劑可藉由選擇性單點突變、截斷或缺失來製造（見如：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）。

在本發明之另一種實施態樣中，在"RG"受體-結合蛋白質方面，本發明之方法使一或多種合成之聚合物附著在鄰近那些受體-結合蛋白質（為醣蛋白者）之碳水化合物部分的天然附著位置處。這將造成這些受體-結合蛋白質之"假醣化作用"（例如：當其經由重組 DNA 技術表現在大腸桿菌或其它不會執行後-轉譯醣化作用之原核細胞中時），或造成其醣蛋白型式之"假過醣化作用"（例如：對天然產生之醣蛋白或由會執行後-轉譯醣化作用之真核

(31)

宿主細胞（如：酵母菌、植物細胞和動物細胞（包括哺乳動物和昆蟲細胞））所產生之醣蛋白而言）。實施例有：干擾素 α 和 β ，以及紅血球生成素（"EPO"）和間白素-2 之聚合物共軛物。將合成聚合物附著在或接近天然醣化位置處的反應可藉任何本技藝中之已知方法來執行，包括 R.J. Goodson 等人（(1990) *Biotechnology* 8: 343-346）之突變方法和涉及碳水化合物之先行氧化的 R.S. Larson 等人（(2001) *Bioconjug Chem* 12: 861-869）的方法，其揭示內容全部併為此處之參考資料。

一些蛋白質之胺基-端修改方法已在之前揭示過（見如：Dixon, H.B.F., (1984) *J Protein Chem* 3: 99-108）。例如，已有人報告：修改蛋白質之 N-端胺基可穩定某些蛋白質來對抗胺基肽酶之作用（Guerra, P.I., et al., (1998) *Pharm Res* 15: 1822-1827），改良蛋白質之溶解度（Hinds, K., et al., (2000) *Bioconjug Chem* 11: 195-201），降低 N-端胺基團上之電荷，或者，尤其是改良所產生之共軛物的同質性（Kinstler, O., et al., 歐洲專利刊物第 EP 0 822 199 A2 號；Kinstler, O., et al., (2002) *Adv Drug Deliv Rev* 54: 477-485）。另一種經由本技藝中已知之"天然化學連接"程序來將聚合物偶合至 N-端半胱胺酸或組胺酸殘質之 α 胺基團的替換方法已揭示於（Roberts, M.J., et al., PCT 刊物第 WO 03/031581 A2 號和 U.S. 專利申請刊物第 2003/0105224 號）中。然而，先前報導並未認知或說明有受體-結合蛋白質之 "RN" 和 "RG"

(32)

次類的存在，用於選擇這些類型之成員的一般方法，及用來製備及使用這類受體-結合蛋白質之聚合物共軛物，次保留"RN"受體-結合蛋白質之令人意外高的官能活性的方法。

因此，測定一指定之細胞活素、趨化激素、生長因子或多肽激素是否具有遠離配位體之受體-結合位置的 N-端及/或醯化位置是有益處的。在將配位體與聚合物共軛前先預測指定之細胞活素、趨化激素、生長因子或多肽是否為"RN"或"RG"配位體的能力可實質上減少製造聚合物-配位體共軛物（如：與聚合物，如：PEG，共軛之細胞活素、趨化激素、生長因子、多肽激素或其拮抗劑）時所需的實驗，其中該共軛物之抗原性和致免疫性相對於未共軛之配位體的抗原性和致免疫性而言已降低，而該共軛之配位體的受體-結合和生理活性並未減低。

因此，在其它實施態樣中，本發明提供用於鑑定和選擇具有遠離蛋白質配位體之受體-結合位置的 N-端及/或醯化位置的受體-結合蛋白質配位體（如：細胞活素、趨化激素、生長因子、多肽激素及其拮抗劑）的方法（也就是用於鑑定和選擇"RN"或"RG"蛋白質的方法）。在某些這類本發明之實施態樣中，用於一或多種聚合物（如：一或多種 PEGs）之共軛結合的理想位置可利用分子造型來測定，如：利用分子造型軟體來審視蛋白質（細胞活素、趨化激素、生長因子、多肽激素或其拮抗劑）之三次元構造，以預測該可讓一或多種聚合物附著至蛋白質，且不會

(33)

實質損失蛋白質之生物或受體連接活性的位置（亦見 Schein, C.H., 如上述）。例如：已證明出一種用於將 PEG 共軛結合至 G-CSF，以改良其對蛋白質水解之分解作用的抗性的類似方法（見已出版之 T.D.Osslund 的 U.S. 申請案第 2001/0016191 A1 號，其全部揭示內容併為此處之參考資料）。適合用於本發明中之分子造型軟體，如：RASMOL（Sayle, R.A., et al., 如上述）及其它用來產生存放在蛋白質資料庫（Protein Data Bank）（PDB; 見 Laskowski, R.A., 如上述）中之巨分子的構造資料庫的程式為本技藝中所熟知，且為本技藝所熟知，並為本技藝中之一般技術人士所熟悉。利用這類分子造型軟體可根據配位體及其受體之結晶學分析可靠地預測或測定多肽，如：細胞活素、趨化激素、生長因子、多肽激素或其拮抗劑的三次元構造。以此方式，一般技術人士可以很容易地測定那一配位體為適合用於本發明之 "RN" 或 "RG" 配位體。

為了實行本發明，一種用來將水溶性聚合物共價偶合至蛋白質之 N-端胺基酸殘質的 α -胺基團的較方便途徑為經由希夫氏（Schiff's）鹼之還原性烷基化反應來進行，該希夫氏鹼係以帶有單一醛基之聚合物形成，如：G.P.Royer 所申請之專利（U.S. 專利案第 4,002,531 號），但非 J.M.Harris 等人所申請之專利（U.S. 專利案第 5,252,714 號），因後面這位發明者僅申請在二端帶有醛基團之衍生的聚合物的專利，而此物質為交聯劑，其並不適合用來合成可保留實質之受體-結合活性的長效受體-

(34)

結合蛋白質)。

指導 PEG-一醛之希夫氏鹼朝向受體-結合蛋白質之 N-端胺基酸的 α 胺基團，而遠離其賴胺酸殘質之 ϵ 胺基團進行還原性烷基化的反應可根據下列揭示內容，藉由多種方法完成：J.T. Edsall *Proteins, Amino Acids and Peptides as Ions and Dipolar Ions* ((1943)之第 4 章和第 5 章, pp. 75-115 和 pp. 116-139, Reinhold Publishing Corporation, New York)，其揭示內容全部併為此處之參考資料。多肽之 N-端胺基酸的 α 胺基團的酸性解離常數 ("pK_a") 被預期為低於 7.6，然而多肽中之賴胺酸殘質的 ϵ 胺基團的酸性解離常數 ("pK_a") 被預期為約 9.5。Edsall (1943，如上述) 清楚地陳述醛類與胺基酸之胺基團 "僅在其等電點之鹼側" 合併。

因此，根據本揭示內容及本技藝中可很容易取得之資料，本技藝中之一般技術人士可認知到：(1) 醛與蛋白質之 α 胺基團的選擇性反應較傾向在 pH 低於 9.5 之範圍內進行 (約蛋白質中之 ϵ 胺基團的 pK_a)；(2) 當反應之 pH 向 7.6 降低 (約蛋白質中之 α 胺基團的 pK_a) 時，醛與 ϵ 胺基團的反應速率將減慢；(3) 當反應之 pH 向 7.6 降低時，醛與 α 胺基團的反應速率降低的情形小於醛與 ϵ 胺基團之反應速率降低的情形；(4) 醛與 α 胺基團之反應的選擇性可藉由將 pH 向 6.6 降低而稍微改良。由於後項數值約低於 α 胺基團之 pK_a 一個 pH 單位及低於 ϵ 胺基團之 pK_a 三個 pH 單位，因此，約有 10% 之 α 胺基團和約

(35)

0.1%之 ϵ 胺基團將處於其反應性、未質子化的狀態。如此，在 pH6.6 時，未質子化之 α 胺基團的部分較未質子化之 ϵ 胺基團的部分高 100 倍。因此，經由將反應之 pH 值進一步降低至如：5.6（其中，理論上，1%之 α 胺基團和約 0.01%之 ϵ 胺基團將處於其反應性、未質子化的狀態）只能使選擇性再增加一點。因此，在本發明之某些實施態樣中，蛋白質配位體（尤其是 "RN" 或 "RG" 配位體，包括細胞活素、趨化激素、生長因子、多肽激素和其拮抗劑）與一或多種聚合物之共軛結合係經由在約 5.6 至約 7.6 之 pH 值下；在約 5.6 至約 7.0 之 pH 值下；在約 6.0 至約 7.0 之 pH 值下；在約 6.5 至約 7.0 之 pH 值下；在約 6.6 至約 7.6 之 pH 值下；在約 6.6 至約 7.0 之 pH 值下；或在約 6.6 之 pH 值下，形成配位體和該一或多種聚合物間之混合物來進行。因此，本方法與本技藝中已知之方法顯著不同，其中將聚合物偶合至配位體之 N-端胺基酸殘質上的 α 胺基團的反應係在 pH 值約為 5 下進行（Kinstler, O., et al., (2002) Adv Drug Deliv Rev 54: 477-485; 歐洲專利刊物第 EP 0 822 199 A2; U.S. 專利案第 5,824,784 號和 5,985,265 號; Roberts, M.J., et al., (2002) 如上述; Delgado, C., et al., U.S. 申請刊物第 2002/0127244 A1 號），而將聚合物偶合至配位體多肽骨架中之賴胺酸殘質的 ϵ 胺基團的反應係在 pH 值約為 8.0 下進行（Kinstler, O., et al., EP 0 822 199 A2; U.S. 專利案第 5,824,784 和 5,985,265 號）。以相同方式，本發明方法亦與利用轉麩醯胺酶，將聚（乙二

(36)

醇)之烷基胺衍生物偶合至某些蛋白質上的酶方法(此反應係在 pH 值為 7.5 下進行)顯著不同(Sato, H., (2002), *Adv Drug Deliv Rev* 54: 487-504)。

以溫和之還原劑,如:氰基氫硼化鈉或吡啶甲硼烷(Cabacungan, J.C., et al., (1982) *Anal Biochem* 124: 272-278)將所產生之希夫氏鹼還原可形成在生理 pH 值下可保留蛋白質之 N-端 α 胺基團的正電荷的仲胺鍵。這類保留與天然蛋白質相同電荷之鍵比中和電荷之替換鍵結化學(如:經由形成醯胺鍵(Burg, J., et al., PCT 刊物第 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.B.; et al., (1996) *Pharm Res*, 13: 996-1002; Kita, Y., et al., 如上述),或氨脲鍵(Gilbert, C.W., et al., U.S. 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)更可能保留其生物活性。

用來將聚合物選擇性偶合至 N-端胺基酸殘質之替換方法為本技藝中之技術熟習人士所已知。這些方法包括將醯肼、肼、胺基尿或其它含胺之聚合物偶合至已被過碘酸氧化物氧化分裂成醛類之 N-端絲胺酸或蘇胺酸殘質上的方法(Dixon, H.B.F., 如上述; Geoghegan, K.F., U.S. 專利 5,362,852 號; Gaertner, H.F., et al., (1996) *Bioconjug Chem* 7: 38-44; Drummond, R.J., et al., U.S. 專利 6,423,685)。

(37)

合適之聚合物

在某些本發明之實施態樣中，最好將在反應（其中聚合物偶合至生物活性成分上，以製造本發明共軛物）中，由聚合物（如：PEG）形成分子內和分子間之交叉結合的情形降至最少。此點可經由使用下列群體之聚合物來達成：僅在一端被活化之聚合物（此處稱為"經單官能性活化之 PEGs"或"經單官能性活化之 PAGs"），或其中經二官能性活化（在直鏈型 PEG 中稱為"雙-活化之 PEG 二醇"）或經多官能性活化之聚合物的比例少於約 30%（以少於約 10%更佳，而以少於約 2%（重量/重量）最佳）的聚合物製品。使用全部或幾乎全部單官能性之活化的聚合物可將下列各項之形成全部減至最少：在個別蛋白質分子內之分子內交叉結合，"啞鈴"構造（其中聚合物之一股連接二個蛋白質分子）及較大之集合體或膠化體。

適合用於本發明之方法和組成物中的活化型式之聚合物可包括任何本技藝中所已知之直鏈型或側鏈型，單官能活化型之聚合物。例如：包含在內的有分子量在約 1kDa 至約 100kDa 範圍內者（不包括活化基團之質量）。合適之分子量範圍包括，但不限於：約 5kDa 至約 30kDa；約 10kDa 至約 20kDa；約 18kDa 至約 60kDa；約 12kDa 至約 30kDa；約 5kDa、約 10kDa、約 20kDa 或約 30kDa。在直鏈型聚合物的情況中，約 10kDa、約 20kDa 或約 30kDa 之分子量分別相當於約 230、約 450 或約 680 個乙烯化氧

(38)

單體單位的聚合度。在活體內之用途方面，合適之活化聚合物的分子量範圍包括約 1kDa 至約 5kDa。需注意的是：早在辨識出有 "RN" 和 "RG" 群之受體-結合蛋白質存在之前已先觀察到將治療性蛋白質偶合至具相當高分子量（也就是超過約 20-30kDa）之聚合物的益處（Saifer, M., et al., PCT 刊物第 WO 89/01033 A1 號，1989 年 2 月 9 日出版，其內容全部併為此處之參考資料）。

在本發明之其它實施態樣中，可用於試管中（如：在細胞培養中），具異常高比例之保留之生物活性的受體-結合蛋白質的共軛物可根據本發明之方法，經由偶合經單官能性活化之約 1kDa、約 2kDa 或約 5kDa 的聚合物來製備。在這類試管中之應用方面，以具較低範圍之分子量者較佳。

隨意地，直鏈型聚合物可在一端或二端具有一反應性基團，以藉此創造 "反應性聚合物"。在本發明某些實施態樣中，使用 PEG 之一丙酸衍生物的 N-羥基琥珀醯亞胺酯（如 J.M.Harris et al., U.S. 專利第 5,672,662 號中所揭示者，其內容全部併為此處之參考資料）或其它 N-羥基琥珀醯亞胺-活化之 PEG-一羧酸可令人滿意。在某些其它實施態樣中，使用 PEG 之一琥珀醯亞胺基碳酸酯衍生物（"SC-PEG"）（如 M.Saifer et al., U.S. 專利第 5,006,333; 5,080,891; 5,283,317 和 5,468,478 號中所揭示者），或 PEG 之一對-硝苯基碳酸酯衍生物（如下列文獻中所揭示者：S.J. Kelly et al., 如上述；in L.D. Williams et

(39)

al., PCT 刊物第 WO 00/07629 A2 和 A3 號; L.D. Williams et al., U.S. 專利第 6,576,235 號和 M.R. Sherman et al., PCT 刊物第 WO 01/59078 A2 號) 可令人滿意。再者, 可使用其它類型之反應性基團來合成蛋白質之聚合物共軛物。這些衍生物包括, 但不限於: PEGs 之單醛衍生物 (Royer, G.P., U.S. 專利第 4,002,531 號; Harris, J.M. et al., U.S. 專利第 5,252,714 號), PEGs 之一胺、一-三溴苯基碳酸酯、一羰基-咪唑、一-三氯苯基碳酸酯、一-三氟苯基碳酸酯、一醯肼、一胺基尿、一肼基甲酸酯、一硫基卡巴脲、一碘基乙醯胺、一馬來醯亞胺、一-鄰吡啶基二硫化物、一-氧肟、一-苯基乙二醛、一-噻唑烷-2-硫酮、一硫酯、一硫醇、一三吡和一乙烯磺衍生物。在其它實施態樣中, 細胞活素、趨化激素、生長因子、多肽激素及其拮抗劑可依共同擁有之審查中的 U.S. 專利申請案第 10/669,597 號 (其揭示內容全部併為此處之參考資料) 中所描述者, 偶合至一或多種聚合物。

生物活性成分

如上述指出, 本發明之共軛物含有共價附著至一或多種生物活性成分的 PAG 或 PAO, 尤其是 PEG 之一股。本文中, 共價連接著一或多種聚合物 (或其股) 之生物活性成分係使用與 "共軛之生物活性成分" 或 "修改之生物活性成分" 不同但相等的名稱。這些名稱需與那些用來指稱尚未有聚合物共價附著於其上之生物活性成分的名稱: "未

(40)

共軛之生物活性成分"、"初始之生物活性成分"或"未修改之生物活性成分"區分。然而，當與野生型或天然分子相比較時，"未共軛的"、"未修改的"或"初始的"生物活性成分可含有其它非聚合物之共軛結合或修改，且根據本發明，其仍將被視為"未共軛的"、"未修改的"或"初始的"生物活性成分，因為就聚合物之附著而言，該生物活性成分仍為"未共軛的"、"未修改的"或"初始的"，就如在此處稱為"經莫克聚乙二醇化的"生物活性成分的情況。

"穩定"生物活性成分（或"穩定之方法"，或"穩定之生物活性成分"）一詞係指已根據本發明之方法穩定化的生物活性成分（也就是已根據本發明之方法共價連接一聚合物的生物活性成分）。當與未穩定化之生物活性成分（也就是未共價連接一聚合物的生物活性成分）比較時，這類穩定化之生物活性成分將展現出某些改變之生物化學和生物物理的特徵。尤其是在受體-結合蛋白質方面，這類改變之生物化學和生物物理變數中可包括：對蛋白質水解性降解作用的感受性降低，尤其是，在某些惡劣之環境或實驗條件下培養的期間，受體-結合蛋白質活性之維持。在本發明之某些實施態樣中，改變之生物化學和生物物理變數可包括，如：在活體內之循環中的半生期增加、生物可利用性延長、在試管中之作用期增加，等。

任何受體-結合蛋白質（通常為細胞活素、趨化激素、生長因子或多肽激素）具有與遠離其胺基-端，或天然-產生或經突變引入之醣化位置之分子部分相關的生物

(41)

(也就是生理的、生化的或藥物的)活性時，其可適合作為本發明之起始成分。這類生物活性成分包括但不限於：肽類、多肽類、蛋白質，等。生物活性成分亦包括這類肽、多肽、蛋白質，等之片段、突變蛋白和衍生物，尤其是具生物(也就是生理的、生化的或藥物的)活性之這類片段、突變蛋白和衍生物。

可用來作為本發明中之生物活性成分的合適肽類、多肽類和蛋白質、醣蛋白，等係包括任何具有一個或超過一個遠離該生物活性成分之受體-結合區的可用的胺基團、硫基團或其它基團，且聚合物可選擇性地連接至其上的肽、多肽、蛋白質，等。這類肽類、多肽類、蛋白質、醣蛋白，等包括細胞活素、趨化激素、生長因子和多肽激素，其可具有多種構造中之任一種(Nicola, N.A., 如上述; Schein, C.H., 如上述)。

例如：具有意義之合適肽類、多肽類和蛋白質包括但不限於具有包含四個 α -螺旋束(包括長鏈和短鏈二種次類)之構造的細胞活素類(回顧，見：Schein, C.H., 如上述)。適合用於本發明之這類包含四個 α -螺旋束的蛋白質有多種，包括但不限於：間白素，如：IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-9、IL-10、IL-11、IL-12(p35次單位)、IL-13、IL-15和IL-17；群落-刺激因子，如：巨噬細胞群落-刺激因子(M-CSF)和顆粒性白血球-巨噬細胞群落-刺激因子(GM-CSF; Rozwarski, D.A., et al., (1996) Proteins 26: 304-313)；干擾素，如：IFN- α 、

(42)

IFN- β (包括 IFN- β -1b) 和同感 IFN; 血癌抑制因子 (LIF)、紅血球生成素 (EPO)、血小板生成素 (Tpo)、巨核細胞生長和發展因子 (MGDF); 幹細胞因子 (SCF), 其在本技藝中亦稱為史提爾 (Steel) 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); 抑制瘤素 M (OSM); 磷脂酶-活化蛋白質 (PLAP); 神經營養因子; 及其肽擬態物。雖然催乳激素和生長激素為可在體內廣範圍循環之傳統激素, 不像細胞活素通常係在接近其靶的細胞處產生, 但催乳激素和生長激素因具四個 α -螺旋束, 而與細胞活素屬於相同之構造類, (Nicola, N.A., 如上述; Goffin, V., et al., 如上述), 且其同樣適合作為用於聚合物偶合之靶的, 且適合用來根據本發明製備本發明之共軛物。這些肽類、多肽類和蛋白質之同系物、突變蛋白、拮抗劑、變異體和衍生物亦適合用於本發明中, 且因此係包含在本發明中。

長鏈 β -長帶或 β -圓筒構造類之受體-結合蛋白質 (回顧, 見 Schein, C.H., 如上述) 亦適合用來製備本發明之共軛物和組成物。這些包括但不限於: 細胞活素之腫瘤壞死因子一族, 如: TNF- α 、TNF- β 和 Fas 配位體, 其顯示 β -膠狀滾筒構造; IL-1 (包括 IL-1 α 和 IL-1 β) 和 FGF (包括鹼性纖維母細胞生長因子 (bFGF)、酸性 FGF、FGF-4 及角質細胞生長因子 (KGF; FGF-7) 族類, 其顯示 β -三葉形摺疊 (Schein, C.H., et al., 如上述); IL-

(43)

12、IL-16;表皮生長因子 (EGF;Lu, H.-S., et al., 如上述);和由血小板衍生之生長因子 (PDGFs)、轉形生長因子 (包括轉形生長因子- α 和轉形生長因子- β (TGF- β))和神經生長因子,其採用胱胺酸-結構。這些肽類、多肽類和蛋白質之同系物、突變蛋白、拮抗劑、變異體和衍生物亦適合用於本發明中,因此係包含在本發明中。

可方便地用在本發明之共軛物和組成物中之另一構造類的蛋白質為富含二硫化物之混合的 α/β 細胞活素、趨化激素和生長因子(回顧見Schein, C.H.,如上述),包括但不限於:EGF一族,其具有 β -彎曲構造;IL-8;RANTES;嗜中性白血球活化肽-2 (NAP-2);基質細胞-衍生之因子-1 α (SDF-1 α);單核細胞化學誘質蛋白質 (MCP-1、MCP-2和MCP-3);嗜伊紅趨化素(如:嗜伊紅趨化素-1、嗜伊紅趨化素-2和嗜伊紅趨化素-3);骨髓祖代抑制因子-1 (MPLIF-1);神經趨化素、巨噬細胞移動抑制因子 (MIF);生長-相關之致癌基因/黑色素瘤生長刺激活性 (GRO- α /MGSA);軀體介質;和胰島素及似胰島素生長因子(如:IGF-1和IGF-2)。用於本發明之共軛物和組成物中之相關的蛋白質構造類為具嵌鑲構造之細胞活素,其包括如IL-12和肝細胞生長因子之類的生長因子(Nicola, N.A.,如上述)。這些肽類、多肽類和蛋白質之同系物、突變蛋白、拮抗劑、變異體和衍生物亦適合用於本發明中,因此係包含在本發明中。

(44)

其它有意義之蛋白質包括，但不限於：生長激素（尤其是人類生長激素（hGH；見 Tchelet, A., 等，如上述））及其拮抗劑（見，如：Sundström, M., et al., 如上述）、催乳激素及其拮抗劑、絨毛膜促性腺素、濾泡-刺激激素、甲狀腺-刺激激素、色素激素、角質細胞生長因子、丘腦下釋出因子、抗利尿激素和所有上述構造類之細胞活素、趨化激素、生長因子和多肽激素之受體-結合拮抗劑。許多這類蛋白質係以醣化及非-醣化二種型式存在。非-醣化型式可利用在原核細胞中進行之重組 DNA 技術製造產生，或利用化學合成。這類非-醣化產品係在作為本發明之合適生物活性成分的肽類和蛋白質中。最後，雖然某些抗體可作為受體-結合激動劑或拮抗劑（見，如：Morris, J.C., et al., (2000) Ann Rheum Dis 59 (Suppl 1): i109-i-114），但這類免疫球蛋白並非本發明範圍內用於 N-端聚合物偶合作用之合適候選者，也就是其非 RN 受體-結合蛋白質，因為該輕和重鏈二者之胺基-端區參與了抗原辨識。

可特別用來製備本發明之聚合物共軛物的生物活性成分有：干擾素- α 、干擾素 β （包括 IFN- β -1b）、IL-2、IL-4、IL-10、TNF- α 、hGH、催乳激素、胰島素、IGF-1、EGF、bFGF 和紅血球生成素（EPO）。這類生物活性成分的突變蛋白和片段亦具有特別用途，尤其是那些能結合至相對應之野生型或完整多肽之受體者，不論此種結合是否能誘出生物或生理效果。在某些這類實施態樣中，生

(45)

物活性成分之突變蛋白和片段可作為相對應之配位體的拮抗劑，其可減少、實質上減少或完全抑制配位體連接其受體，及/或配位體在其靶的細胞、組織及/或有機體上之活性。該有意義之配位體的其它拮抗劑（其可能是或不是構造同系物），突變蛋白、變異體或衍生物亦適合根據本發明製備共軛物。實際上，指定之突變蛋白、片段、變異體、衍生物或拮抗劑是否拮抗指定之配位體的生物及/或生理作用均可利用用於配位體本身的生物及/或生理作用分析來測定，其中多項為本技藝中所熟知及/或此處所描述者，不需做過多的實驗。

可根據本發明來方便地使用的這些和其它有意義的多肽類之構造（一級、二級、三級及當合適時，四級）為本技藝所熟知，且亦為一般技術人士所熟悉，尤其是在參考過本文及本文所列舉之參考資料（其內容全部併為此處之參考資料）中所提出的構造後。

共軛物

本發明提供用於多種應用中之生物活性成分（尤其是細胞活素、趨化激素、生長因子和多肽激素）的穩定共軛物。如下列所示之與本技藝中已知之共軛物的非限制性及示範性比較顯示，這類本發明之共軛物較本技藝中先前已知者多出許多優點。

H. Hiratani (European 專利第 EP 0 098 110 號和 U.S. 專利第 4,609,546 號) 揭示乙烯化氧和丙烯化氧之共

(46)

聚合物 ("PEG-PPG", PAGs 之一般類型中的一員) 與蛋白質 (包括: 干擾素和間白素) 的共軛物, 其中並未揭示避開涉及受體-結合之蛋白質區為較佳之情況。在這些參考資料中, 干擾素 α 、 β 和 γ 被認為是與 PAG 偶合之同等靶的, 不像在本發明中, 干擾素- γ 並不被認為是用於 N-端偶合之合適靶的, 因為胺基端係在此細胞活素之受體-結合區內。另外, Hiratani 揭示僅以 1kDa 至 10kDa 之 PAG 合成的共軛物, 然而, 本發明之方法較偏好偶合水溶性、分子量超過 10kDa 之合成聚合物, 以用於醫療用途。類似地, N.V. Katre ((1990) J Immunol 144: 209-213) 揭示將 5-kDa mPEG 之較多股偶合至人類之重組間白素-2 可增加所產生之共軛物在小鼠和兔子血流中的保存時間。然而, 此參考資料並未揭示或認知到本發明所提供之將較少量的 PEG 較長股, 或高分子量 PEG 之單股偶合至 IL-2 之胺基端的優點。

G. Shaw (U.S. 專利第 4,904,584 號和 PCT 刊物第 WO 89/05824 A2 號) 揭示藉由引入、取代或刪除靶的蛋白質 (尤其是 EPO、G-CSF 和 IL-2) 中之賴胺酸殘質來誘發胺-反應性聚合物之位置-選擇性連接的方法。然而, 不像本發明中所揭示者, 這些參考資料並未揭示胺-反應性聚合物可與靶的蛋白質中, 除了賴胺酸殘質之 ϵ 胺基團外的任何胺反應, 這與本發明之揭示內容清楚地區隔。

D.E. Nitecki 等人 (U.S. 專利第 4,902,502 號) 揭示從傾向與賴胺酸殘質之 ϵ 胺基團反應之不同的 PEG 氮甲

(47)

酸酯衍生物所製得之經多重聚乙二醇化的 IL-2 共軛物。然而，與本發明之方法相反，此參考資料未揭示避免將 IL-2 蛋白質區中之賴胺酸殘質（涉及受體-結合者）聚乙二醇化的方法，也不知道任何避開這類位置的優點。

N. Katre 等人（U.S. 專利第 5,206,344 號）揭示 PEG-IL-2 共軛物，其中 PEG 係偶合至賴胺酸殘質之 ϵ 胺基團、偶合至在位置 125（從胺基端開始數）之天然半胱胺酸殘質的未配對氫硫基團，或偶合至已藉突變方式引至從 IL-2 之胺基端開始的第 1 和第 20 個殘質間位置處的半胱胺酸殘質的氫硫基團上。在 '344 專利中所揭示之突變蛋白中包括 "*des-ala-1*"IL-2，也就是，其中該胺基-端胺基丙酸已被刪除，且未聚乙二醇化之突變蛋白。然而，與本發明之揭示內容相反的，'344 專利中並未揭示任何可避免將 PEG 偶合至涉及連接受體之胺基酸殘質的方法，也不知道此種方法的優點。與此觀念一致，但與本發明相反的，'344 專利中所提出之廣範圍的連接點並未建議將 PEG 偶合至 IL-2 之胺基-端特別有利。

在 S.P. Monkarsh et al., (1997) Anal Biochem 247: 434-440 和 S.P. Monkarsh et al., (1997) in Harris, J.M., et al., eds., Poly(ethylene glycol): Chemistry and Biological Applications, pp. 207-216, American Chemical Society, Washington, D.C., 中揭示將干擾素- α -2a 與三倍莫耳過量之分子量為 5300 道耳頓的活化 PEG 反應可產生 11 種一 PEG-干擾素之位置異構物，相當於 11 種在干擾

(48)

素 - α - 2a 中之賴胺酸殘質。沒有報導描述到其中 PEG 係偶合至干擾素之胺基端的 α 胺基團的 PEG-干擾素。這些參考資料中所報導的 11 種位置異構物在細胞培養中所顯示出的抗病毒活性為未修改之干擾素的活性的 6% 至 40%，而在細胞培養中所顯示出的抗增殖活性為未修改之干擾素的 9% 至 29%。這類結果清楚地證明：與本發明方法所製備之共軛物相反的，由這些檢查者所執行之賴胺酸殘質的任意聚乙二醇化作用會干擾由干擾素 - α - 2a 受體所傳介之干擾素 - α - 2a 的功能。另外，不像本發明之共軛物，在這些參考資料中所報導之共軛物中並無 N-端聚乙二醇化之干擾素。

O. Nishimura 等人（美國專利法發明登記第 H1662 號）揭示經由在 pH7.0（對干擾素共軛物而言）或 pH7.15（對 IL-2 共軛物而言）下，以氰基氫硼化鈉將活化之“聚乙二醇甲醚醛類”進行還原性烷基化來製備之干擾素 - α 、干擾素 - γ 和 IL-2 的共軛物。然而，報導表示：藉由這類方法所製備之共軛物損失至多為未修改之蛋白質的生物活性的 95%，這顯然是因為有多處聚合物附著位置存在，這些位置均被描述為在賴胺酸殘質之 ϵ 胺基團上（參考本發明之第 1 和第 4 圖）。

D.K.Pettit 等人（如上述）揭示間白素 - 15（“IL-15”）之聚合物共軛物。然而，本參考資料中所報導之共軛的 IL-15 不只因為聚合物係偶合至在涉及受體-結合之蛋白質區中的賴胺酸殘質而損失其似 -IL-2 生長-促進能

(49)

力，且亦顯示出其拮抗性超過激動性。這些作者總結出：選擇性地抑制 IL-15 連接數種細胞表面受體之一可為一種聚合物共軛作用的結果，而這類抑制作用不僅可減少受體結合，亦可逆轉蛋白質之生物學效果。經由避免將聚合物偶合至涉及與受體-結合蛋白質之受體交互作用的受體-結合蛋白質部分，本發明可避免此種聚合物偶合作用的不利結果。

J. Hakimi 等人 (U.S. 專利第 5,792,834 號和 5,834,594 號) 揭示蛋白質之氨脲-連接的 PEG 共軛物，包括干擾素- α ，IL-2、間白素-1 ("IL-1") 和 IL-1-受體之拮抗劑，其製備目的係為了降低個別蛋白質之致免疫性、增加溶解度並增加生物半生期。在這些參考資料中，PEG 係偶合至 "不同的游離胺基"，並無 N-端聚乙二醇化之參考資料，亦未揭示 N-端 α 胺基可或應被聚乙二醇化。這些專利亦陳述其中所揭示之共軛物 "具有至少一部分" 起始蛋白質之原始生物活性，這表示可能損失大致之生物活性。此結果與其中所揭示之使用未經瞄準之聚乙二醇化方法一致。與本發明相反的，這些專利未揭示任何欲經由改變其中所揭示之聚乙二醇化方法的選擇性來改良其共軛物之生物活性保持力的嘗試。

O.B.Kinstler 等人 (歐洲專利刊物第 EP 0 822 199 A2 號) 揭示用於將聚 (乙二醇) 與在多肽 (尤其是同感干擾素和 G-CSF，此為由 Amgen 公司 (本專利申請案之讓受人) 製造之二種蛋白質) 之胺基-端的胺基酸的 α 胺基團

(50)

進行反應的方法。此刊物指出"足夠酸至可選擇性地活化 α 胺基團的 pH"為所揭示之方法的必要特性。相反的，本發明已發現經由降低 pH 值可降低胺基團與 PEG 醛類之反應性，且 α 胺基團未被質子化（也就是在高於其 pK_a 之 pH 值下）時更具反應性。因此，本發明者發現沒有任何 pH 值是"足夠酸至可選擇性地活化任何本發明之 RN 細胞活素的 α 胺基團"。由 J.T. Edsall（如上述）和由 R.S.Larsen 等人（(2001) *Bioconjug Chem* 12: 861-869）所提出之 N-端 α 胺基團與醛類之反應性對 pH 值之倚賴性的解釋與本發明者之經驗較相符。再者，Kinstler 等人報導利用多肽之 N-端聚乙二醇化反應來增加所產生之共軛物的同質性，並保護胺基-端不被蛋白酶降解，但其並未揭示 N-端聚乙二醇化作用可使某些受體-結合蛋白質保留較多部分的受體-結合活性（見，如：PCT 刊物第 WO 96 /11953 號；歐洲專利第 EP 0 733 067 號，和 U.S.專利第 5,770,577 號、5,824,784 號和 5,985,265 號，全部為 Kinstler, O.B., et al.所有）。

Kinstler 等人之歐洲申請案（EP 0 822 199 A2）亦歸納出 N-端聚乙二醇化作用對所有多肽的益處，本發明者未曾有此經驗。具體而言，如 R.S.Larsen 等人（如上述）所揭示者，與賴胺酸殘質之任意聚乙二醇化相較下，由於抗體分子之胺基-端係在抗體蛋白質之抗原-合併區近端（Chapman, A.P. (2002) *Adv Drug Deliv Rev* 54: 531-545），因此，抗體之 N-端聚乙二醇化作用對生物活性具

(51)

有意料之外的傷害。類似地，吾人預期將非 "RN" 受體 - 結合蛋白質（如：干擾素- γ ）（見第 8 圖）之受體 - 結合蛋白質進行 N-端聚乙二醇化作用比將這類受體 - 結合蛋白質之賴胺酸殘質進行任意之聚乙二醇化更會抑制與受體的交互作用。

因此，如上述，本發明之方法與此處所列舉之由 Kinstler 等人所著之刊物中所揭示的方法的區別在於本發明之共軛物係經由將一或多種選出之作爲 RN 受體 - 結合蛋白質的細胞活素、趨化激素、生長因子、多肽激素或其拮抗劑與一或多種聚合物在下列 pH 值下共軛結合來製備，而此係藉著形成配位體和該一或多種聚合物間之混合物來進行：在約 5.6 至約 7.6 之 pH 值下；在約 5.6 至約 7.0 之 pH 值下；在約 6.0 至約 7.0 之 pH 值下；在約 6.5 至約 7.0 之 pH 值下；在約 6.6 至約 7.6 之 pH 值下；在約 6.6 至約 7.0 之 pH 值下；或在約 6.6 之 pH 值下。相反的，Kinstler 等人之方法係倚賴配位體在 pH 低於 5.5 以下之共軛作用，而本發明者發現該 pH 範圍對於製備配位體在遠離 N-端胺基酸及 / 或在遠離醯化位置處選擇性地與聚合物共軛結合的製品而言較不理想或較差。

R.B. Pepinsky 等人（PCT 刊物第 WO 00/23114 號和 U.S. 專利申請刊物第 2003/0021765 A1 號）揭示在抗病毒分析中較未醯化之干擾素- β -1b 更具活性之醯化的干擾素- β -1a 的聚合物共軛物。此參考資料亦揭示聚伸烷基二醇可經由在不同位置處（包括醯化蛋白質之胺基端、羧

(52)

基端和碳水化合物部分)之不同偶合基團偶合至干擾素- β -1a。然而,本刊物中並未揭示所描述之方法可推廣至其它蛋白質:"這些研究指出,不論干擾素- β -1a和干擾素- β -1b間之序列中的保留度如何,其生化本質不同,因此,關於干擾素- β -1b之已知部分大多無法適用於干擾素- β -1a,反之亦然"。相反地,本發明揭示包括在如此處所定義之"RN"和"RG"受體-結合蛋白質中的共通特性。根據本發明,干擾素- β -1a和干擾素- β -1b皆為"RN"受體-結合蛋白質。另外,干擾素- β -1b為一種"RG"受體-結合蛋白質。因此,與WO 00/23114之方法相反,本發明之方法可用來製備干擾素- β -1b和干擾素- β -1a二者之穩定、生物活性的共軛物。

Z. Wei等人(U.S.專利第6,077,939號)揭示用於將水溶性聚合物(尤其是PEG)偶合至多肽(尤其是紅血球生成素)之N-端 α 碳原子的方法,其中在N-端胺基酸之 α 碳處的胺係先經胺基轉移成 α 羰基團,然後再與PEG衍生物反應,以形成脲或脞鍵。由於此參考資料之揭示目的為發展一種可應用於一般蛋白質之方法,因此,並未考量可由選擇胺基端作為某些受體-結合蛋白質之聚乙二醇化位置來保留受體-結合活性。因此,與Wei等人所揭示之內容相反,本發明不需要移除N-端 α 胺基團,相反的,可在中性pH下,透過形成蛋白質和聚合物間之仲胺鍵合來保存N-端 α 胺基團的電荷。

C.W. Gilbert等人(U.S.專利第6,042,822號;歐洲

(53)

專利第 EP 1 039 922 號) 揭示 PEG-干擾素- α -2b 位置異構物之混合物的優點，其中特別有利之異構物具有偶合至干擾素- α -2b 之組胺酸殘質(尤其是組胺酸-34)的 PEG，並證明 PEG 連接組胺酸-34 之鍵合並不穩定。由於組胺酸-34 位在干擾素- α -2b 表面上之一個必須與干擾素受體密切接觸才能引起訊號轉導(見本專利說明書之第 1b 圖)的區內，因此，在這些參考資料中所揭示之 PEG 和組胺酸-34 間之鍵合的不穩定性顯示出其對這些參考資料中所揭示之 PEG-干擾素共軛物的功能具關鍵性。S. Lee 等人之 U.S. 專利第 5,985,263 號中揭示實質上純化之經組胺酸連結的蛋白質的聚合物共軛物。相反的，本發明證明較佳之共軛物為 PEG-干擾素共軛物，其中該 PEG 穩定連接在一遠離干擾素成分之受體-結合功能區塊的位置處。

P. Bailon 等人((2001) *Bioconjug Chem* 12: 195-202) 揭示每分子干擾素以一分子之 40-kDa 二-mPEG-賴胺酸聚乙二醇化的 干擾素- α -2a，其包含四種主要的位置異構物。此參考資料揭示幾乎所有 PEG 均經由醯胺鍵附著至賴胺酸 31、121、131 或 134，而其各在干擾素- α -2a 之受體-結合功能區塊內或鄰接著此區(根據 Bailon，等，殘質 29-35 和 123-140; 見本專利申請書之第 1a 圖)。Bailon 等人並未報導 N-端聚乙二醇化作用。分離出之 PEG-干擾素的位置異構物混合物對抗馬汀-達比(Madin-Darby)牛腎細胞之口炎病毒感染的試管中測試活性為未共軛之干擾素- α -2a 活性的 7%。這些不包含 N-

(54)

端聚乙二醇化之干擾素的干擾素共軛物中可觀察到實質損失生物活性的現象，由此，可清楚地區分 Bailon 等人之共軛物和本發明之共軛物。

R.B.Pepinsky 等人 ((2001) J Pharmacol Exp Ther 297: 1059-1066) 揭示從 (1) 具 N-端甲硫胺酸殘質之醯化的干擾素 - α -1a 和 (2) 20-kDa PEG-醛來合成共軛物的方法。此共軛物 (該參考資料中提及其係在 N-端甲硫胺酸處被單聚乙二醇化) 在抗病毒分析中被認為可保留全部生物活性，然而，與具較高分子量之 PEG 偶合時會降低或排除抗病毒活性。雖然這些作者揭示其選擇在 N-端位置將醯化之干擾素 - β -1b 聚乙二醇化是由於受制於位置-選擇性聚乙二醇化試劑之可利用性和分子造型，但他們承認 "某些效果為產品特異的"。再者，與本發明相反的，其中所報導之觀察內容並不能概括包含此處定義為 "RN" 受體-結合蛋白質之受體-結合蛋白質類別。

J. Burg 等人 (PCT 刊物第 WO 01/02017 A2 號) 揭示製造紅血球生成素醯蛋白之烷氧基 PEG 共軛物的方法，其中係將一至三股之甲氧基 PEG 與氫硫基團 (此係經由改良醯蛋白表面上之賴胺酸殘質的 ϵ 基團，以化學方式引入) 進行反應。然而，與本發明相反的，此參考資料並未揭示任何嘗試將 PEG 偶合至紅血球生成素之 N-端胺基酸的游離 α 胺基上，或避免修改在紅血球生成素醯蛋白之區域 (其對於與紅血球生成素受體之交互作用而言為必要的) 中的賴胺酸殘質的努力。

(55)

J. Burg 等人 (PCT 刊物第 WO 02/49673 A2 號) 揭示經由使用可選擇性分裂 N-端肽伸展物之方法來合成天然紅血球生成素醯蛋白和其突變蛋白之 N-端醯胺-連接 PEG 共軛物的方法，該 N-端肽伸展物係在所有醯蛋白之賴胺酸殘質的 ϵ 胺基團被聚乙二醇化之前和可逆轉之檸檬基化反應後被分裂。此參考資料中所揭示之用於多步驟方法的基本原理為選擇 N-端胺基酸之游離 α 胺基團進行聚乙二醇化，以產生同質性之經單聚乙二醇化的共軛物，而藉此避免需要從經多重聚乙二醇化之衍生物中分離出經單聚乙二醇化的共軛物。此方法在多項重要著眼點上與本發明不同，包括但不限於：(1) Burg 等人之方法限於那些烷氧基 PEG 係經由醯胺鍵連結之紅血球生成素醯蛋白，而本發明可應用在利用多種合成之聚合物共軛結合的多種生物活性成分上；(2) 本發明可應用在醯化和非醯化之 "RN" 和 "RG" 二種受體-結合蛋白質上，而 Burg 等人僅揭示醯蛋白之共軛作用；(3) 本發明同時包含烷氧基 PEGs (如：mPEG)，和經單官能性活化之羥基 PEGs，然而 Burg 等人僅揭示烷氧基 PEGs 之用途；(4) 本發明中，介於聚合物和蛋白質間之仲胺鍵合較 Burg 等人所使用之醯胺鍵合為佳，因為前者較穩定，且保留胺基團上之正電荷。在相同團體之類似工作中，Burg 等人 (U.S. 專利第 6,340,724 號) 揭示製造紅血球生成素醯蛋白之醯胺-連結共軛物的方法，在此種共軛物中烷氧基 PEG 之一至三股係連結至蛋白質之一至三個胺基團上。然而，與本發明

(56)

相反的，此參考資料並未報導選擇 N-端胺基酸之 α 胺基，或不在涉及與受體交互作用之區域中的胺基團的較優處。

C. Delgado 等人 (U.S. 專利第 6,384,195 號) 揭示利用反應性聚合物 (以崔氏基 (tresyl) 一甲氧基 PEG 作為代表，在該參考資料中係稱為 "TMPEG") 製備之顆粒性白血球-巨噬細胞群落-刺激因子的共軛物。此參考資料指出當將 TMPEG 與重組之人類 GM-CSF 接觸時，"該修改之物質含有不具活性之物種，及活性較未修改之物質來得高的物種"。本技藝中之一般技術人士可很容易地認知到：在聚合物-生物活性成分共軛物之混合物中，不具活性之物種較不利，尤其是在含有這類共軛物之用於治療的組成物中，因為其將造成將該共軛物給予需要這類給藥之患者的風險，且無法提供有利的效果。如此處所指出，本發明經由避免在涉及蛋白質受體-結合活性的蛋白質位置上修改 GM-CSF 和其它受體-結合蛋白質，來藉此減少或排除合成不具活性之物種，以至少克服部分這類限制。本發明亦提供用於分級分離和純化具不同大小、不同電荷及/或蛋白質上之電荷被聚合物遮蔽的程度不同的共軛物的方法。(見第 9-12 圖)。

值得注意的是：U.S. 專利第 6,384,195 號並未提到 GM-CSF 之 N-端聚乙二醇化作用，因此並未辨識出本發明方法的優點。最後，U.S. 專利第 6,384,195 號指出其中有超過一 PEG 偶合至 GM-CSF 之各分子的共軛物為較佳者，

(57)

而完全沒有考慮那些 PEG 分子係附著在 GM-CSF 分子上之何處（除了偶合賴胺酸殘質者外）。藉由聲明每一 GM-CSF 上有至多六個 PEG 的共軛物的較佳處，該參考資料藉此表明優先選擇其中 PEG 可連接至所有可能之賴胺酸殘質的共軛物，以確保 PEG 將連接在可空間阻隔蛋白質，使蛋白質不要太接近其細胞-表面受體的位置上（見本專利說明書第 3 圖）。相反的，本發明指出將 PEG 偶合至賴胺酸殘質的不利處，除非那些賴胺酸殘質位在遠離那些對與受體之交互作用而言為必要，以藉此轉導訊號（在激動劑之情況中）或競爭性地抑制轉導訊號（在拮抗劑之情況中）的受體-結合蛋白質的功能區塊中。

T. Nakamura 等人（PCT 刊物第 WO 02/32957 A1 號）揭示增加偶合至在紅血球生成素醣蛋白之位置 52 處的賴胺酸殘質的 ϵ 胺基團上的 PEG 分子量時，可增加共軛物在活體內之紅血球生成效果，並降低共軛物對紅血球生成素受體的親和力。然而，與本發明相反的，本參考資料並未揭示 PEG 在胺基-端或接近醣化位置處之偶合反應，亦未辨識出如此做的任何優點。

因此，本發明提供具有較先前揭示者優良之構造和功能上之優點的共軛物，及用於合成這些偶合至合成聚合物的生物活性成分之共軛物的方法。

組成物

本發明提供含有一或多種偶合至一或多種穩定之聚合

(58)

物（如：一或多種 PEGs）的生物活性成分（適合為一或多種細胞活素、趨化激素、生長因子或多肽激素）的共軛物或複合物。通常，這類共軛物係經由此處所描述之本發明方法來製造；然而，具有除了此處所描述者之外的構造和活性的共軛物若係藉本發明方法製造，則亦被視為同等物，因此，亦包含在本發明內。在相關觀點中，本發明亦提供含有一或多種這類共軛物或複合物之組成物。根據本發明此觀點之組成物將含有一或多種（如：一、二、三、四、五、十，等）本發明上述之共軛物或複合物。在某些這類觀點中，組成物可含有一或多種額外成分，如：一或多種緩衝鹽類、一或多種趨混（chaotropic）試劑、一或多種清潔劑、一或多種蛋白質（如：白蛋白或一或多種酶）、一或多種未鍵結之聚合物、一或多種滲透活性劑，等。本發明此觀點之組成物可為任何型式，包括固體（如：乾燥粉末）或溶液（尤其為含有一或多種本發明之共軛物的生理上相容的緩衝鹽溶液型式）。

A. 藥學組成物

本發明之某些組成物特別調配成可作為用於預防、診斷或治療用途中之藥學組成物。這類組成物通常含有一或多種本發明之共軛物、複合物或組成物，及一或多種藥學上可接受之載體或賦形劑。此處所使用之“藥學上可接受之載體或賦形劑”一詞係指可被引入該藥學組成物之受領動物（包括人類或其它哺乳動物）所耐受之任何型式的非

(59)

毒性固體、半固體或液體充填劑、稀釋劑、裝填膠囊物質或配方佐劑，其加入後不會對組成物產生不良作用。

本發明之藥學組成物可經由任何合適之給予模式給予受領者，如：經由口服、直腸、胃腸道外、系統內、陰道、腹膜內、局部（如：經由粉末、油膏、滴劑或穿皮貼布）、口頰途徑，以口服或鼻噴霧或吸入型式來給予。此處所使用之“腸胃道外”一詞係指給予模式，包括：靜脈內、動脈內、肌肉內、腹膜內、腦池內、皮下和關節內注射和注入。

本發明所提供之用於腸胃道外注射的藥學組成物可含有藥學上可接受之無菌水性的或非水性的溶液、分散液、懸浮液或乳劑，以及在使用前才加入注射溶液或分散液中進行重構成之無菌粉末。合適之水性和非水性載體、稀釋劑、溶劑或載劑的實施例包括：水、乙醇、多元醇（如：甘醇，等，丙二醇、聚（乙二醇））、羧甲基纖維素及其合適之混合物、蔬菜油（如：橄欖油）和可注射之有機酯類（如：油酸乙酯）。維持正確之流動性的方法有，如：在分散液的情況中，使用塗覆物質（如：卵磷脂）來維持所需之顆粒大小，及使用界面活性劑來維持。

這類本發明之藥學組成物亦可含有佐劑，如：防腐劑、濕潤劑、乳化劑和分散劑。預防微生物之作用可經由包含不同抗菌和抗黴菌劑，如：對羥基過苯甲酸酯、苄基醇、氫丁醇、苯酚、山梨酸，等來確定。在其中加入滲透劑，如：糖類、氯化鈉，等亦可令人滿意。可注射之藥型

(60)

可經由包含延遲吸收劑，如：一硬脂酸鋁、水凝膠和明膠來延長吸收。

在某些情況中，爲了延長藥物之效果，最好減慢從皮下或肌肉內注射吸收之速度。此可經由使用在水溶性體液中具不良溶解度之結晶型或無定型物質的液態懸浮液來達成。此時，藥物之吸收速率係倚賴其溶解速率，而此項可能係由其物理型式決定。或者，經腸胃道外途徑給予之藥物型式可經由將藥物溶解或懸浮在油載劑中來達到延遲吸收。

可注射之積儲型式係經由形成在可生物分解之聚合物（如：聚乳酸-聚甘醇酸）中的藥物顯微包囊基質來製備。根據藥物對載體聚合物之比例和所使用之特殊載體聚合物的性質可控制藥物釋出的速度。其它可生物分解之聚合物的實施例包括可生物相容之聚（原酸酯）和聚（酞）。可注射之儲積配方亦可經由將藥物截留在可與身體組織相容之脂粒或微粒乳劑內來製備。

可注射之配方可經由在使用前先將其通過細菌-保留濾器，或加入可溶解或分散在無菌水或其它無菌可注射介質中而爲無菌固體組成物型式之消毒劑來消毒。

用於口服給藥之固體劑型包括膠囊、錠劑、藥丸、粉末及顆粒。在這類固體劑型中，活性化合物與至少一種藥學上可接受之賦形劑或載體（如：檸檬酸鈉或磷酸二鈣），及/或如下群體混合：a) 填充劑或增量劑，如：澱粉、乳糖、蔗糖、葡萄糖、甘露醇及矽酸，b) 黏合劑，

(61)

如：羧甲基纖維素、藻酸鹽、明膠、聚乙烯吡咯酮、蔗糖和金合歡膠，c) 致濕劑，如：甘醇，d) 崩解劑，如：瓊脂、碳酸鈣、馬鈴薯或樹薯粉、藻酸、某些矽酸鹽，及碳酸鈉，e) 溶液阻滯劑，如：石蠟，f) 吸收加速劑，如：季銨化合物，g) 濕潤劑，如：鯨蠟醇和甘醇一硬脂酸酯，h) 吸附劑，如：高嶺土和皂土，及 i) 潤滑劑，如：滑石粉、硬脂酸鈣、硬脂酸鎂、固體 PEG、月桂基硫酸鈉，及其混合物。在膠囊、錠劑和藥丸的情況中，劑型中亦可含有緩衝劑。

類似類型之固體組成物亦可作為使用如乳糖（牛奶糖）及高分子量 PEGs，等賦形劑之軟和硬-填充膠囊中的填充劑。

錠劑、糖衣錠、膠囊、藥丸和顆粒之固體劑型可使用包衣和外殼，如：腸溶衣或時間調節包衣及其它藥學製劑領域中所熟知之包衣來製備。其可隨意地含有不透明劑，且亦可為僅釋出活性成分之類的組成物，或者，較佳的為：隨意地以延遲的方式，在胃腸道中的某一部分釋出。可使用之包埋組成物的實施例包括聚合之物質及蠟。若合適時，亦可以一或多種上述賦形劑將活性化合物製成顯微包囊的型式。

用於口服給藥之液體劑型可包括藥學上可接受之乳劑、溶液、懸浮液、糖漿和弛劑。除了活性化合物外，該液體劑型可含有本技藝中常用之惰性稀釋劑，如：水或其它溶劑、助溶劑和乳化劑，如：乙醇、異丙醇、碳酸乙

(62)

酯、醋酸乙酯、苧基醇、苯甲酸苧酯、丙二醇、1,3-丁二醇、二甲基甲醯胺、油類（尤其是棉籽、落花生、玉米、胚芽、橄欖、蓖麻油和芝麻油）、甘醇、四氫糠醇、聚（乙二醇）和山梨糖醇酐之脂肪酸酯，及其混合物。

除了惰性稀釋劑外，口服組成物亦可包含佐劑，如：濕潤劑、乳化劑和懸浮劑、甜味劑、調味劑和香味劑。

除了活性化合物外，懸浮液可含有懸浮劑，如：乙氧基化之異硬脂醯醇、聚氧化乙烯山梨糖醇和山梨糖醇酐酯類、微晶型纖維素、間位氫氧化鋁、皂土、瓊脂、西黃蓍膠，及其混合物。

局部給藥包括給予皮膚或黏膜，包括肺和眼的表面。用於局部給藥之組成物（包括那些用於吸入者）可製備成乾燥粉末型式，這些乾燥粉末可為經過加壓，或非-加壓的。在非-加壓之粉末組成物中，為精細分割型式之活性成分可與較大尺寸之藥學上可接受的惰性載體（包含之顆粒的直徑最大可為 100 微米）一起混合使用。合適之惰性載體包括糖類，如：乳糖和蔗糖。令人滿意的情況為，至少有 95 重量%之活性成分的顆粒具有大小在 0.01 至 10 微米範圍內之有效顆粒。

或者，藥學組成物可經過加壓並含有壓縮之氣體，如：氮或液態氣體推進劑。更確切地，液態推進劑介質及全部組成物的較佳情況為：活性成分不會大量溶解於其中。經過加壓之組成物亦可包含表面活性劑。表面活性劑可為液態或固態非-離子性表面活性劑，或可為固態陰離

(63)

子性表面活性劑。較合適的為使用鈉鹽型式之固態陰離子性表面活性劑。

另一種局部給藥之型式為眼睛給藥。在此種給藥模式中，本發明之共軛物或聚合物係在藥學上可接受之眼科載劑中遞送，如此，活性化合物可維持與眼球表面接觸一段足夠的時間，以使化合物滲透入眼睛之結膜或角膜，以及內部區域，如：前室、後室、玻璃體、水液、玻璃液、角膜、瞳孔/睫毛、晶狀體、脈絡膜/網膜和鞏膜。藥學上可接受之眼科載劑可為，如：油膏、蔬菜油或包囊物質。

用於直腸或陰道給藥之組成物宜為栓劑，其可經由將本發明之共軛物或組成物與合適之非-刺激性賦形劑或載體混合來製備，這些賦形劑或載體有，如：椰子油、PEG或栓劑蠟，其在室溫時為固體，但在體溫時為液體，因此，可在直腸或陰道腔中熔化並釋出藥物。

本治療方法中所使用之藥學組成物亦可以脂粒型式給予。如本技藝中所已知，脂粒通常係從磷脂質或其它脂質性物質衍生。脂粒係由一-或多-層分散在水溶性介質中之水化的液態結晶所形成。任何能形成脂粒之非毒性、生理上可接受並可代謝的脂質均可使用。除了本發明之一或多種共軛物或組成物外，本脂粒型式之藥學組成物亦可含有一或多種安定劑、防腐劑、賦形劑，等。較佳之脂質為磷脂質和磷醯胆鹼（卵磷脂），包括天然及合成者。用於形成脂粒之方法為本技藝中所已知（見，如：Zalipsky, S., et al., U.S.專利第 5,395,619 號）。含有共軛結合至 PEG

(64)

之磷脂質的脂粒（最普遍的為偶合至一甲氧基-PEG之磷醯乙醇胺）具有益之性質，包括在哺乳動物之血液循環中有延長之壽命（Fisher, D., U.S.專利第 6,132,763 號）。

B. 用途

如本文中他處所述，本發明之方法、共軛物和組成物適合用於可用來維持生物活性成分之生物可利用性，而不干擾生物成分連接其受體之能力的方法中。某些本發明這類方法可能需要將一或多種共軛物和組成物遞送至細胞、組織、器官或有機體。尤其是，本發明提供以經過控制之方式來將一或多種複合物或組合物之成分遞送至細胞、組織、器官或有機體的方法，以讓使用者能暫時性及場所性地調節可釋放出來而作用在細胞、組織、器官或有機體上之特殊成分的量。

一般而言，本發明這類方法涉及一或多種活性。例如：一種本發明這類方法包含：（a）製備一或多種如本文中所詳述之本發明的共軛物或組成物；及（b）將一或多種細胞、組織、器官或有機體與一或多種共軛物或組成物在偏向讓該一或多種本發明之共軛物或組成物與細胞、組織、器官或有機體結合的條件下接觸。一旦本發明之共軛物及/或組成物的生物活性成分已被細胞、組織、器官或有機體結合（或者，在某些情況中為內化）時，這些成分繼續進行其所欲進行之生物功能。例如：肽成分可結合至在細胞、組織、器官或有機體上或其內之受體或其它成

(65)

分；參與細胞、組織、器官或有機體內之代謝反應；在細胞、組織、器官或有機體進行、正調節或活化，或逆向調節或抑制一或多種酶之活性；提供細胞、組織、器官或有機體一種失去之構造成分；提供細胞、組織、器官或有機體一或多種營養需要；抑制、治療、逆轉或加速一種疾病或身體失調之一或多種過程或症狀；等。

在其它實施態樣中，由於本發明之共軛物的生物活性成分具有出人意料高之效能，因此可將該共軛物和組成物用於工業細胞培養中，而該共軛物之高效能係由於其生物活性被實質保留及作用期增加（即使是在工業用途之嚴苛條件下）的合併效果造成的。這些本發明共軛物之出人意料高的效能可產生不尋常高之生物團產量，不尋常高之重組蛋白質表現水準，並改良其它生物處理之有效性。

C. 劑量養生法

本發明之共軛物、複合物或組成物可經試管中、活體外、或活體內途徑給予細胞、組織、器官或有機體，以將一或多種生物活性成分（也就是一或多種細胞活素、趨化激素、生長因子或多肽激素或其拮抗劑）遞送至該處。本技藝中之一般技術人士可察知指定之活性化合物、共軛物、複合物或組成物之有效量可靠實驗測定，且可以純化型式使用，或當有藥學上可接受之配方或先驅藥物型式存在時，可以該型式使用。本發明之化合物、共軛物、複合物或組成物可以獸醫或藥學組成物加上一或多種藥學上可

(66)

接受之賦形劑的型式給予需要彼之動物（包括哺乳動物，如：人類）患者。用於任何特殊患者之治療上有效劑量水準可根據多種因素決定，包括：欲取得之細胞反應的類型和程度；所使用之特殊化合物、共軛物、複合物或組成物的特性及/或活性；患者之年齡、體重或表面積、一般健康情況、性別和飲食；給藥時間、給藥途徑、及活性化合物之分泌速度；治療期；與該特殊化合物、共軛物、複合物或組成物組合或同時使用之其它藥物；藥學和醫學領域中之一般技術人士所熟知的其它類似因子。例如：指定之化合物、共軛物、複合物或組成物的開始劑量需較欲取得所需療效的需要劑量低，再逐漸增加劑量直到取得所需療效的知識係在本技藝之技術範圍內。

劑量養生法亦可以患者-特異方式安排，以提供血中指定之活性化合物的預定濃度，該預定濃度可藉本技藝中之可接受和例行的技術測定，如：大小-排除法、離子交換法或逆相高效能液態色層分析法（"HPLC"）、生物分析或免疫分析。因此，患者之劑量養生法可經過調整，以取得相當固定之血中濃度（根據醫學、製藥及/或藥學技藝中之一般技術人士所熟知的方法，如：藉 HPLC 或免疫分析測量得知）。

D. 診斷和治療用途

本發明之共軛物的診斷用途可用來找出動物（尤其是人類）體內對細胞活素、趨化激素、生長因子或肽激素具

(67)

不尋常高之結合能力的細胞或組織（如：癌症）的位置，此係經由將本發明之共軛物或組成物給予動物來進行，其中該共軛物（或一或多種成分，也就是生物活性成分及/或合成之聚合物）係標上或含有一或多種可偵測到之標示，以使共軛物可被偵測到，如：根據本技藝中之已知方法，經由光學、放射線測定、螢光或共振偵測。例如：大部分之非-小細胞肺癌會表現出異常高濃度之表皮生長因子的受體（Bunn, P.A., et al., (2002) *Semin Oncol* 29 (Suppl 14): 38-44）。因此，在本發明之另一觀點中，本發明之共軛物和組成物可用於診斷或治療方法中，例如：用於診斷、治療或預防易罹患或受苦於多種身體失調之動物，尤其是哺乳動物，如：人類體內的這類失調。在這類方法中，治療目標係延遲或預防失調之發展，及/或治癒失調、誘導或維持失調緩和，及/或減少其它治療養生法之副作用，或使其減至最少。

因此，本發明之共軛物、複合物和組成物可用來保護、壓抑或治療身體失調，如：感染或疾病。此處所使用之"保護"隔開身體失調一詞包含"預防"、"壓抑"和"治療"。"保護"涉及在誘出疾病或身體失調之前先給予本發明之複合物或組成物，而"壓抑"涉及在疾病之臨床表現出來之前先給予本發明之複合物或組成物；因此，身體失調之"預防"和"壓抑"通常係在易罹患疾病或對其具感受性，但仍未受苦於此之動物體內進行。然而，"治療"身體失調涉及在疾病之臨床表現出來後給予本發明之治療性複合物或

(68)

組成物。吾人可理解，在人類和獸醫學中，並非總能分辨出"預防"和"壓抑"身體失調。在許多情況中，最終之誘導項可能為未知或潛伏的，且患者和醫療人員可能需直到誘導項完全發生後才知道。因此，常使用"預防疾病的"一詞來區別"治療"，以包含此處所定義之"預防"和"壓抑"。因此，根據本發明之方法所使用的"保護"一詞係包括"預防疾病的"。根據本發明此觀點之方法可含有一或多種步驟，以使臨床醫師能達成上述治療目標。本發明這類方法之一包含，如：(a) 鑑定受苦於或易罹患一種身體失調之動物（宜為哺乳動物，如：人類）；及(b) 給予該動物一或多種有效量之如此處所描述的本發明共軛物、複合物或組成物，如此，該給予之共軛物、複合物或組成物可預防、延遲或診斷動物體內之身體失調的發展，或治癒失調，誘使身體失調緩和或維持緩和。

本文中，"易罹患"一種身體失調之動物係定義為一種動物並未顯示出多種明顯之失調的身體症狀，但遺傳上、生理上或其它方面卻處於發展出失調的風險。在本方法中，鑑定動物（如：哺乳動物，包括人類）是否易罹患，處於罹病風險中或受苦於一種指定之身體失調的工作可根據本技藝中一般技術的臨床醫生所熟悉之標準已知方法完成，包括，如：放射分析、生化分析（如：分析從動物取得之樣本中的特殊肽、蛋白質、電解質，等之相關水準）、手術方法、遺傳篩選、家族史、身體觸診法、病理或組織學試驗（如：組織或體液樣本或抹片之顯微鏡評

(69)

估、免疫分析，等）、體液之測試（如：血液、血清、血漿、腦脊髓液、尿液、唾液、精液，等），想像（如：放射學、螢光、光學、共振（如：利用核磁共振（"NMR"）或電磁共振（"ESR"）），等。一旦已藉由一或多種這類方法鑑定出動物後，可將動物積極及/或準備進行治療，以預防、壓抑、延遲或治癒該身體失調。

可以本發明之共軛物、複合物、組成物和方法來預防、診斷或治療之身體失調包括任何可在預防、診斷或治療中使用共軛物或組成物之生物活性成分（典型上為細胞活素、趨化激素、生長因子或多肽激素或其拮抗劑）的身體失調。這類失調包括，但不限於：多種癌症（如：乳癌、子宮癌、卵巢癌、攝護腺癌、睪丸癌、血癌、淋巴瘤、肺癌、神經癌、皮膚癌、頭頸癌、骨癌、大腸癌和其它胃腸道癌、胰臟癌、膀胱癌、腎癌和其它惡性腫瘤、肉瘤、腺癌及骨髓瘤）；醫師疏失引起的疾病；傳染病（如：細菌病、黴菌病、病毒病（包括：肝炎，由心臟部位之病毒引起的疾病；HIV/AIDS，等）、寄生蟲病，等）；遺傳病（如：纖維囊腫、肌萎縮側肢硬化、肌肉失養症、高歇氏病、波普氏病、嚴重之合併的免疫缺乏症（"SCID"）、侏儒病，等）、貧血、嗜中性白血球減少症、血小板減少症、血友病及其它血液病；神經退化症（如：多發性硬化症、庫賈氏症、阿茲海默氏症，等）；酶性疾病（如：痛風、尿毒症、血膽固醇過多症，等）；不確定或多病灶病原之失調（如：心血管病、高血壓、發炎腸病，等）；自

(70)

體免疫失調（如：系統性紅斑性狼瘡、類風濕性關節炎、牛皮癬，等）和一般技術人士可容易熟悉之醫學上重要的疾病。本發明之共軛物、複合物、組成物和方法亦可用於預防疾病之進展，如：用於預防惡化前病灶進展為惡化病灶之化學預防法中。

因此，本發明之治療方法係使用本發明之一或多種共軛物、複合物或組成物，或本發明之一或多種藥學組成物，這些物質可以口服或鼻噴霧或吸入型式經由多種途徑給予需要彼之動物，這些途徑包括：經由口服、直腸、胃腸道外（包括靜脈內、動脈內、肌肉內、腹膜內、腦池內、皮下和關節內注射和注入）、系統內、陰道、腹膜內、局部（如：經由粉末、油膏、滴劑或穿皮貼布）、口頰途徑，以口服或鼻噴霧型式，或經由吸入來給藥。藉由本發明，可將有效量之共軛物、複合物或組成物在試管內、活體外或活體內給予細胞，或受苦於或易罹患一種特殊失調之動物，以藉此預防、延遲、診斷或治療動物體內之失調。此處所使用之"有效量之共軛物（或複合物或組成物）"係指能讓共軛物（或複合物或組成物）實行該共軛物、複合物或組成物之生物活性成分（也就是細胞活素、趨化激素、生長因子、多肽激素或其拮抗劑）之生物活性，以藉此預防、延遲、診斷、治療或治癒該接受本發明之共軛物、複合物或組成物的動物體內之失調。一般技術人士將可察知本發明之共軛物、複合物或組成物之有效量可根據藥學和醫學技藝中一般技術人士所熟知之標準方

(71)

法，以實驗方式測定；見，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., editor (2000) Basic and Clinical Pharmacology, 8th edition, Lange Medical Books/McGraw-Hill, New York; 這些參考資料及其中所列舉之參考資料內容全部併為本文之參考。

吾人可了解，當給予人類患者時，本發明之共軛物、複合物和組成物的總每日、每週或每月劑量將由主治醫師在合理的醫療判斷範圍內決定。例如：滿意的結果係經由根據所使用之特殊生物活性化合物，給予一些合適劑量之本發明的共軛物、複合物或組成物來取得，這些劑量對本技藝中之一般技術人士而言很容易知悉，或可很容易地僅利用例行實驗，以實驗方法測定。根據本發明此觀點，該共軛物、複合物或組成物可一次給完，或以分開之劑量給予，如：每天一次或二次，或每週一次或二次，或每月一次或二次，等。用於不同給藥模式（如：腸胃道外、皮下、肌肉內、眼內、鼻內，等）之合適的劑量養生法亦可根據共軛物、複合物或組成物的生物活性成分（也就是，

(72)

細胞活素、趨化激素、生長因子、多肽激素或其拮抗劑) 僅利用例行實驗以實驗方式測定，或可很容易地由本技藝中之一般技術人士知悉。

在其它應用中，本發明之共軛物、複合物或組成物可用來將診斷或治療劑特異瞄準那些表現出可結合、併入或攝入共軛物、複合物或組成物之生物活性成分（也就是細胞活素、趨化激素、生長因子、多肽激素或其拮抗劑）的細胞、組織、器官或有機體。根據本發明此觀點之方法可包含，如：將一或多種本發明之共軛物、複合物或組成物（其額外含有一或多種診斷或治療劑）與細胞、組織、器官或有機體接觸，以使共軛物、複合物或組成物可被細胞、組織、器官或有機體結合或攝入，以藉此將診斷或治療劑遞送至細胞、組織、器官或有機體。根據本發明此觀點所使用之診斷或治療劑可為，但不限於至少一種選自如下群體之試劑：核酸、有機化合物、蛋白質或肽、抗體、酶、醣蛋白、脂蛋白、一種元素、脂質、碳水化合物、同位素、碳水化合物、成像劑、可偵測之探針，或其任何組合，其可依本文之描述加上標示來偵測。本發明此觀點中所使用之治療劑可對靶的細胞（或組織、器官或有機體）具治療效果，此效果係選自下列群體，但不限於此：修正有缺陷之基因或蛋白質、藥物作用、毒性作用、生長刺激作用、生長抑制作用、代謝作用、催化作用、合成代謝作用、抗病毒作用、抗黴菌作用、抗細菌作用、激素作用、神經液性作用、細胞分化刺激作用、細胞分化抑制作用、

(73)

神經調節作用、抗-惡性作用、抗腫瘤作用、胰島素刺激或抑制作用、骨髓刺激作用、多重作用之幹細胞刺激作用、免疫系統刺激作用及任何其它已知可經由根據本發明此觀點之遞送系統遞送至細胞（或組織、器官或有機體）的治療劑的療效。

這類額外之治療劑可選自，但不限於：已知和新穎之化合物及組成物，包括：抗生素、膽固醇、細胞毒性劑、血管作用藥物、抗體和其它治療劑。這類試劑之非限制性實例包括：抗生素及其它用於治療細菌性休克之藥物，如：正大黴素、妥布黴素、蔡夫西林、非經腸胃道之頭孢子菌素，等；腎上腺皮質類固醇及其同系物，如：戴索美松（dexamethasone），其可緩和由內毒素所引起之細胞損傷；血管作用藥物，如： α 腎上腺素激導性受體阻斷劑（如：苯氧基苯材明）、 β 腎上腺素激導性受體激動劑（如：二羥基苄基醇），及多巴胺。

本發明之共軛物、複合物和組成物亦可用於診斷疾病和偵察治療反應。在某些這類方法中，本發明之共軛物、複合物或組成物可含有一或多種可偵測標示（如本文中它處所描述者）。在這類特殊方法中，這些可偵測之經標示的本發明共軛物、複合物或組成物可用來偵測可表現出用來攝入共軛物、複合物或組成物之生物活性成分（也就是細胞活素、趨化激素、生長因子、多肽激素或其拮抗劑）的細胞、組織、器官或有機體。在一種這類方法之實例中係將細胞、組織、器官或有機體與一或多種本發明之共軛

(74)

物、複合物或組成物在偏向可讓細胞、組織、器官或有機體結合或攝入共軛物的條件下接觸（如：經由將共軛物結合至細胞表面受體，或讓共軛物經由胞飲作用或擴散作用進入細胞），然後利用特異於所使用之標示的偵測方法（如：用於經螢光標示之共軛物的螢光偵測法；用於經磁性標示之共軛物的磁共振成像法；用於經放射標示之共軛物的放射成像法）來偵測結合至或併入細胞之共軛物。這類可偵測之經標示的共軛物的其它用途包括，如：經由給予有效量之一或多種本發明共軛物的標示型式，並測量與細胞、組織、器官或有機體（或動物）結合之可偵測的輻射來將細胞、組織、器官或有機體或動物（包括人類）之內部構造成像。偵測不同型態之標示的方法，及其於診斷和治療成像中的用途為本技藝中之一般技術人士所熟知，並描述於本文它處。

在另一種觀點中，本發明之共軛物和組成物可用來調節位在細胞表面上之共軛物生物活性成分的特殊受體的濃度或活性。"調節"指定之受體的活性一詞係指當共軛物結合至受體時，其可透過受體之傳介來活化或抑制生理活性（如：胞內傳訊串聯反應）。不欲受限於任何對本發明之共軛物之調節活性的特殊機制的解釋，這類共軛物可經由共軛物之生物活性成分結合至受體來拮抗細胞受體之生理活性，而藉此阻斷天然激動劑（如：未共軛之生物活性成分）之連接，並預防受體被天然激動劑活化，但不會誘發受體本身之生理活性的實質活性。根據本發明此觀點之方

(75)

法可含有一或多種步驟（其可在試管中、活體外或活體內進行），如：將細胞與一或多種本發明之共軛物在能讓共軛物（也就是共軛物之生物活性成分）連接細胞表面上之生物活性成分的受體，但不會實質活化受體的條件下接觸。本技藝中之一般技術人士可很容易地察知這類方法可用於多種診斷及治療應用中。

套組

本發明亦提供含有本發明之共軛物及/或組成物的套組。這類套組通常含有一種載體，如：盒子、紙盒、管子，等，其中有一或多個在密閉限制中的容器，如：玻璃瓶、試管、小玻璃瓶、瓶子、針筒，等，其中第一個容器內含有一或多種本發明之共軛物及/或組成物。本發明此觀點所包含之套組還另外包含一或多種執行本發明之共軛物和組成物的一或多種特殊應用時所需要的其它成分（如：試劑和化合物），如：一或多種用於診斷、治療或預防特殊疾病或身體失調的成分（如：一或多種額外之治療性化合物或組成物，一或多種診斷試劑，一或多種載體或賦形劑，等），一或多種本發明之其它共軛物或組成物，等。

相關技藝中之一般技術人士可很容易地察知其它可用來修改和適應本文中所描述之方法和應用的合適方法，且不背離本發明之範圍或其任何實施態樣。現在對本發明做詳細描述，本發明之內容在參考下列實施例後將更容易了

(76)

解，這些實施例僅用來說明，而非用來限制本發明。

【實施方式】

實施例 1：PEG-干擾素- α 共軛物

干擾素- α 為一種可購得之重要醫療蛋白質，2001 年時全世界的市場超過美金 2 億，其主要係用來治療感染 C 型肝炎病毒 ("HCV") 之患者。在美國，有 3 至 4 百萬人感染慢性 C 型肝炎病毒，且每年約有 10000 人之死因與 HCV 有關 (Chander, G., et al., (2002) *Hepatology* 36: 5135-5144)。在改良干擾素- α 之用處的努力中，負責干擾素- α 之發展和銷售的二個主要公司 (先靈-普洛 (Schering-Plough) 公司和霍夫曼-保麗公司 (F. Hoffmann-La Roche)) 已發展出帶有一甲氧基聚 (乙二醇) 或 "mPEG" 之干擾素- α 的共軛物，並將其投入商品中。在各個情況中，mPEG 僅在一附著點上連接著干擾素- α 之各分子。在各情況中，含有位置異構物之混合物的產物與未修改之干擾素相較下，其受體-結合活性顯著降低。在各情況中，經由測量每週注射一次共軛物所得之改良的臨床效力來與每週注射三次未改良之蛋白質，以治療 HCV 之慢性感染進行比較，結果得知共軛物在活體內所增加之生物可利用性和作用期可超過對在試管中因 PEG 共軛作用所減少之生物活性的補償 (Manns, M.P., et al., (2001) *Lancet* 358: 958-965)。

在霍夫曼-保麗公司之 PEG-干擾素- α -2a 共軛物，

(77)

PEGASYS®中，20-kDa mPEG 之二股係偶合至單一賴胺酸聯結子上，該聯結子主要連接至 Lys31、Lys121、Lys131 或 Lys134 的其中之一（其全部在干擾素- α -2a 之受體-結合功能區塊（見第 1a 圖中之結合位置 1 和 SEQ ID NO:1）內或鄰接著此區）（Bailon, P., et al., 如上述）。

在先靈-普洛公司之 PEG-干擾素- α -2b 共軛物中，一 12-kDa mPEG 之單股主要偶合至位置 34 之組胺酸殘質（His 34; Wylie, D.C., et al., 如上述; Gilbert, C.W., et al., U.S.專利第 6,042,822 號; Wang, Y.-S., et al., 如上述），其係位在對結合受體而言為重要之區內（見第 1b 圖）。其它在先靈-普洛公司之 PEG-INTRON 產物中之 PEG 連接位置（Lys121、Tyr129 和 Lys131）亦可在或接近結合位置 1 中見到（見第 1b 圖和 SEQ ID NO:2）。

相對於此二種商品，本發明之共軛物具有連接 N-端胺基酸殘質之水溶性、合成之聚合物（宜為 PEG 或 mPEG）的單股，該 N-端胺基酸殘質位在遠離蛋白質之受體-結合區（見第 1c 和 1d 圖中 Cys-1 和結合位置間之空間關係），這證明干擾素- α 為一種 "RN" 細胞活素。第 9 和 10 圖分別顯示本發明之示範性 PEG-干擾素- α 共軛物的陽離子-交換和大小-排除色層分析圖。反應混合物中含有干擾素- α -2b（其中一額外之甲硫胺酸殘質存在於胺基端，位在 Cys-1 之前，而 Cys-1 為天然序列之第一個殘質。反應性 PEG 為 20-kDa 之 PEG-醛，其存在濃度為

(78)

0.2mM。還原劑為氰基氫硼化鈉，其最終濃度為 14mM。反應之進展係在培養於 4°C 下之期間內，定期藉由大小-排除色層分析法進行偵察。如：C. W. Gilbert 等人關於 IFN- α 之描述（U. S. 專利第 5,711,944 號）和 R. B. Greenwald 等人關於 IFN- β 之描述（U. S. 專利第 5,738,846 號），雖然 IFN- α 可充分溶解，而在所描述之條件下被聚乙二醇化，但其它細胞活素，如：IFN- β 則較不易溶，且可能需要有表面活性劑存在才能被聚乙二醇化。

用於第 9 圖中所顯示之分級分離反應的陽離子-交換管柱為 ToyoPearl MD-G SP（1x6.8 公分；Tosoh Biosep, 賓州蒙哥馬利市），其係以流速 0.5 毫升/分，在 20mM 醋酸鈉緩衝液中之 0-0.4M NaCl 線性梯度（pH4.6）來發展。用來取得第 10 圖中之資料的大小-排除管柱為 Superdex®200（HR10/30；艾默森生物科學公司（Amersham Biosciences），紐澤西州匹茲凱特威），其係以 0.5 毫升/分之速度，在 20mM 醋酸鈉緩衝液中之 150mM NaCl（pH4.6）進行洗提。其它合適之離子-交換和大小-排除色層分析介質及分級分離條件為本技藝中之技術熟習人士所已知。將本發明之純化的一 PEG-IFN- α -2b 經由自動化艾德曼（Edman）降解來分析胺基-端胺基酸，並證明共有超過 90% 之 PEG 係附著在 N-端殘質上。此分析係由共同資源生物技術（Commonwealth Biotechnologies）公司（維吉尼亞州理奇蒙市）執行。

(79)

實施例 2：PEG-間白素-2 共軛物

間白素-2 ("IL-2") 為一種對某些癌症 (包括腎細胞癌和惡性黑色素瘤) 顯示出免疫調節活性之細胞活素。然而, 臨床效率不良, 僅有小部分患者經歷部分或完全的反應 (Weinreich, D.M., et al., (2002) *J Immunother* 25: 185-187)。IL-2 在血液中之半生期短, 這使得其誘導癌症患者病症緩解的速度慢。目前經由將賴胺酸殘質任意聚乙二醇化來使 IL-2 變得更有用的嘗試仍不理想 (Chen, S.A., et al., (2000) *J Pharmacol Exp Ther* 293: 248-259)。將 PEG 選擇性地附著至 IL-2 之醯化位置的嘗試 (Goodson, R.J., et al., 如上述), 或附著至含有半胱胺酸 (在殘質 1 和 20 間) 之 IL-2 的非-必須半胱胺酸 (Cys125) 或突變蛋白的嘗試 (Katre, N., et al., U.S. 專利第 5,206,344 號) 仍未取得可用於臨床上的產品。

第 4 圖示為賴胺酸殘質相關於 IL-2 之受體-結合區的分佈, 其顯示出許多表面-易近之賴胺酸殘質係在涉及受體-結合之區域內。事實上, Lys-35 和 Lys-43 已被鑑定為 IL-2 與 α -受體交互作用所須有的, 這使人聯想到經由將賴胺酸殘質聚乙二醇化來將 IL-2 去活化的機制 (見 SEQ ID NO:6)。第 4 圖亦顯示出 IL-2 之 N-端區遠離蛋白質之受體-結合區, 此證明 IL-2 具 "RN" 細胞活素之構造。我們的結論: IL-2 為一種 "RN" 細胞活素, 此與 H.Sato, 等人 ((2000) *Bioconjug Chem* 11: 502-509) 的觀察相符合, H.Sato, 等人係使用酶性轉麩醯胺作用來將 10-kDa

(80)

mPEG 之一或二股偶合至序列 AQQIVM 中之一或二個麩醯胺殘質 ("Q") (作者們引入一 IL-2 突變蛋白作為 N-端之延伸)。Sato 等人報導:藉由突變蛋白之轉麩醯胺作用,而在接近 N-端處被聚乙二醇化的共軛物可較該種經由將 IL-2 突變蛋白中之賴胺酸任意聚乙二醇化所製備之共軛物保留更多的生物活性。回顧可用來將其它蛋白質聚乙二醇化的類似方法可參考 Sato, H., (2002), 如上述。如第 4 圖中所示,根據 IL-2 之胺基端與蛋白質之受體-結合區間的空間相隔,吾人可知殘質 Thr-3 (未顯示)之醯化位置使 IL-2 成為如本文中所述之 "RG" 受體-結合蛋白質。因此,IL-2 同時為 "RN" 細胞活素和 "RG" 細胞活素。

第 11 和 12 圖示分別為本發明之示範性 PEG-IL-2 共軛物的陽離子-交換和大小-排除色層分析圖,該 PEG-IL-2 係經由如實施例 1 中之 N-端選擇性、還原性烷基化反應而被聚乙二醇化。分級分離所使用之條件與第 9 和 10 圖中所分別描述者相同。第 13 圖示為相同共軛物在經由離子-交換色層分析法進行純化之前和之後(如第 11 圖中所示),於十二烷基硫酸鈉之存在下的聚丙烯醯胺凝膠電泳分析("SDS-PAGE")。該凝膠含有在 Bis-Tris 緩衝液中之 4-12% 總丙烯醯胺梯度(目錄 #NP0335, 因維特金公司(Invitrogen), 加州卡斯班市)。分析前,將樣本(各含約 1-2 微克蛋白質)在 90°C 加熱 10 分鐘。讓凝膠在 117-120 之固定伏特數下移行約 135 分鐘,並一邊冷卻。

(81)

以 Sypro®Ruby 蛋白質凝膠染色 (分子探針公司, 勒岡州尤金市) 將一部分凝膠染色, 其它部分則採用 C. E. Childs (1975) *Microchem J* 20: 190-192) 和 B.Skoog (1979) *Vox Sang* 37: 345-349) 之方法將 PEG 染色。將第 11 圖中在二個波峯中之純化的一 PEG-IL-2 經由自動化之艾德曼降解, 以分析胺基-端胺基酸, 結果證明有超過 90% 之 PEG 係附著在 N-端殘質上。此分析係由共同資源生物技術公司 (維吉尼亞州理奇蒙市) 執行。

實施例 3: 經 N-端聚乙二醇化之 EGF 和 IGF-1 的合成方法和分析

分別根據第 5 和 7 圖中之分子模型 (其顯示 EGF 和 IGF-1 為 RN 生長因子), 選擇表皮生長因子 ("EGF"; SEQ ID NO:7) 和似-胰島素生長因子-1 ("IGF-1"; SEQ ID NO:9) 來進行 N-端聚乙二醇化。將 5-kDa PEG-丙醛 (NOF 公司, 東京) 溶解於 1mM HCl 中, 使最終濃度成爲 15 毫克/毫升, 以製備 5-kDa PEG-醛之 3mM 溶液。將 35 微升 (mcL) 之 8M 甲硼烷-吡啶 (歐德里奇 (Aldrich)) 在 0.3 毫升乙腈加 0.15 毫升水中稀釋, 使最終濃度成爲 0.58M, 以製備甲硼烷-吡啶。製備含有各爲 0.2M 之磷酸鈉和醋酸鈉 (pH6.3) 之緩衝液且將其通過 0.1 微米孔之無菌濾器過濾。將來自因維特金公司 (加州卡斯班市) 之重組的人類 EFG 溶解在水中, 濃度爲 1 毫克/毫升。在 0.6 毫升此溶液中加入 70 微升 3mM PEG-醛

(82)

溶液、35 微升磷酸鹽-醋酸鹽緩衝液和 30 微升之 0.58M 甲硼烷-吡啶溶液，並將混合物冷藏。在 4-8°C 培養四天後，在含有 100mMNaCl 之碳酸鈉緩衝液 (pH10.1) 中的 Superdex 75 HR 10/30 管柱上，藉由大小-排除 HPLC 來分析一份份之反應液，並藉 280nm 處之吸收和折射指數來偵察洗提液。在注入 0.65 毫升已培養 5 天之反應混合物後，從 280nm 之吸收主波峯的中心收集分液。經由加入醋酸來將此累積液之 pH 值降至約 5.5。經由大小-排除 HPLC 再次分析此累積產物後指出：有 100% 之蛋白質在相當於 PEG1-EGF ("—-PEG-EGF") 之位置處，而此累積物之蛋白質濃度為約 0.32 毫克/毫升。藉 SDS-PAGE 分析確定所有蛋白質係由 EGF 之一-PEG 共軛物所組成。在進行以細胞為基礎之生物分析的測試 (如實施例 4 之描述) 前，先將產物累積液通過 0.2 微米孔之康寧針筒濾器進行無菌過濾。以類似方法合成、純化和分析 EGF 之 10-kDa PEG 共軛物，但以來自 NOF 公司之 10-kDa PEG-丙醛取代 5-kDa PEG-醛。10-kDa PEG 共軛物之最終蛋白質產物濃度為約 0.36 毫克/毫升。

經由所描述之用於相對應之 EGF 共軛物的方法，將來自因維特金公司之重組的人類似-胰島素生長因子-1 ("IGF-1") 的樣本偶合至 5-kDa 或 10-kDa PEG-醛上。將 5-kDa PEG-醛與 IGF-1 偶合後，再依關於 PEG-EGF 之描述來將共軛物純化，所產生之產物約為 99% 之純一-PEG-IGF-1 共軛物，且最終之蛋白質產物濃度為約 0.20

(83)

毫克/毫升。SDS-PAGE 分析可確定該蛋白質主要為一-PEG 共軛物。電泳分析亦透露當裝載在凝膠上之量多時，有微量二-PEG 共軛物存在。將 10-kDa PEG-醛偶合至 IGF-1 之產物進行大小-排除 HPLC 分析後指出：此產物係由 95%之一-PEG 共軛物和約 5%之二-PEG 共軛物所組成，而總蛋白質濃度為約 0.23 毫克/毫升。

實施例 4：經 N-端聚乙二醇化之 EGF 和 IGF-1 的生物分析

評估 EGF 和 IGF-1 之 N-端聚乙二醇化作用是否會降低個別生長因子之受體-結合能力係經由細胞培養分析來進行。在 PEG-EGF 之分析方面，依先前關於 EGF 之描述，使用 3T3 纖維母細胞 (Crouch, M.F., et al., (2001) *J Cell Biol* 152: 263-273)。在 PEG-IGF-1 之分析方面，依先前關於 IGF-1 之描述，使用中國大頰鼠卵巢 ("CHO") 細胞 (Amoui, M., et al., (2001) *J Endocrinol* 171: 153-162; Morris, A.E., et al., (2000) *Biotechnol Prog* 16: 693-697)。將依實施例 3 之描述所製備之 PEG-EGF 和 PEG-IGF-1 的產品累積物透過 0.2 微米孔康寧針筒濾器進行無菌過濾，然後在以細胞為基礎之生物分析中進行測試。將經無菌過濾之 EGF 和以 5-kDa 和 10-kDa PEG 合成之一-PEG 共軛物的系列稀釋液加入在介質 (其含有之血清百分比低於理想生長所需者) 中之 3T3 細胞的培養中。將細胞在標準條件 (37°C, 5%CO₂/空氣) 下培養，

(84)

並在一週中之數個間隔時間點以庫特 (Coulter) 細胞計數器 (Z1 型, 佛羅里達州, 邁阿密市) 計算細胞。相對於未加入生長因子時所觀察到之細胞數, 本發明之一-PEG 共軛物所增加之細胞數百分比至少與未修改之 EGF 所增加者相同。類似地, 將經無菌過濾之 IGF-1 之一-PEG 共軛物和未修改之 IGF-1 的系列稀釋液加入在介質 (其含有之血清百分比低於理想生長所需者) 中之 CHO 細胞的培養中, 並依上述關於 EGF 測試培養的描述來培養和計算細胞。如在 EGF 及其 N-端一-PEG 共軛物之試驗中所觀察到者, 數天後觀察細胞數時, 由 IGF-1 之一-PEG 共軛物所增加之細胞數百分比至少與未修改之生長因子所增加者相同。因此, EGF 和 IGF-1 二者均證明其在 N-端被聚乙二醇化後仍具完全之功能, 如同吾人對於那些具有附著在遠離受體-結合區之胺基酸殘質上的 PEG 的蛋白質之預期。

實施例 5: "RN"受體-結合蛋白質之類群的成員和非-成員

第 2、3 和 5-8 圖顯示受體-結合蛋白質干擾素- β 、顆粒性白血球-巨噬細胞群落-刺激因子 ("GM-CSF")、表皮生長因子 (EGF)、鹼性纖維母細胞生長因子 ("bFCF", 本技藝中亦稱為 "FGF-2")、似胰島素生長因子-1 ("IGF-1") 和干擾素- γ ("IFN- γ ") 之賴胺酸殘質相對於其受體-結合區的表面分佈, 並顯示出這些蛋白質何者為 "RN"細胞活素和生長因子。另外, 第 2 圖顯示干擾

(85)

素- β 為一種 "RG" 細胞活素。

第 2 圖顯示賴胺酸殘質分佈在整個干擾素- β 之結合位置 1 和結合位置 2 的區中，而多肽鏈之胺基-端則遠離蛋白質之受體-結合區，這證明 IFN- β 為一種 "RN" 細胞活素（見 SEQ ID NO:3）。

第 3 圖顯示賴胺酸殘質分佈在整個結合位置 1（其連接 GM-CSF 之 α 受體）和結合位置 2（其連接 GM-CSF 之 β 受體）的區內，然而，多肽鏈之胺基-端則遠離蛋白質之受體-結合區，這證明 GM-CSF 為一種 "RN" 細胞活素（見 SEQ ID NO:5）。

第 5 圖顯示賴胺酸殘質沿著表皮生長因子（"EGF"）之多肽鏈分佈，包括那些在或接近蛋白質之受體-結合區內的賴胺酸殘質，然而多肽鏈之胺基-端則更遠離蛋白質之受體-結合區（見 SEQ ID NO:7）。

第 6 圖顯示鹼性纖維母細胞生長因子（"bFCF"）之數個賴胺酸殘質牽涉到連接受體或連接肝素，此二者對 bFCF 轉導訊號為必要（Schlessinger, J., et al., 如上述）。bFCF 之胺基-端遠離 bFCF 之肝素-結合區，且足夠遠離受體-結合位置，而使 bFCF 成爲一種 RN 生長因子（見 SEQ ID NO:8）。

第 7 圖顯示數個似胰島素生長因子-1（"IGF-1"）之賴胺酸殘質係在多肽之受體-結合區內或鄰接此區，而 IGF-1 之胺基-端則遠離受體-結合功能區塊，證明 IGF-1 爲一種 "RN" 生長因子（見 SEQ ID NO:9）。

(86)

第 8 圖顯示干擾素- γ ("IFN- γ ") 係以同質二聚體之型式存在，其中該二種多肽鏈有大量之交互作用。各多肽之數個賴胺酸殘質係鄰接著涉及連接受體之 IFN- γ 的胺基酸殘質，或在二聚體化作用之界面中。胺基酸殘質 Gln-1 之 "球-和-棒" 版式係用來反應出此 N-端殘質之官能重要性的證據。此圖所根據之結晶構造包括一不存在於天然蛋白質中之額外的甲硫胺酸殘質 (標示著 "Met0") (見 SEQ ID NO:4)。由於 IFN- γ 之 N-端殘質係遠離二聚體化作用之界面，因此，N-端之聚乙二醇化可避免賴胺酸聚乙二醇化對 IFN- γ 之同質二聚體化反應的抑制作用。另一方面，二聚體與其受體之交互作用似乎可藉由將聚合物偶合至胺基-端而受到抑制，尤其是當附著聚合物之長股時。

IFN- γ 、IL-10 和幹細胞因子為以同質二聚體型式作用之細胞活素的實例 (Walter, M.R., et al., 如上述; Josephson, K., et al., (2000) *J Biol Chem* 275: 13552-13557; Thiel, D.J., et al., 如上述; McNiece, I.K., et al., 如上述)。受體-結合蛋白質之二聚體化作用造成對於那些 N-端一-聚乙二醇化之共軛物的特性描述之爭議，因為不同之可能的分子構造均可出現在具類似或相等大小及形狀之共軛物的製品中。例如：由一個二-聚乙二醇化單體及一個未聚乙二醇化之單體所組成的二聚體 (PEG₂-蛋白質₁+蛋白質₁) 可能很難或不可能藉由大部分之以大小為基礎的二聚體性共軛物的分析 (如：大小-排除層析法或沈澱係數、光散射或擴散係數之評估) 來與該種由二個 N-端聚

(87)

乙二醇化之單體所組成的二聚體 (PEG₁-蛋白質₁)₂ 區分，而這二種共軛物 (各共軛物包含每一蛋白質單體一個 PEG 之平均值) 之受體-結合效能可能相當不同。

在形成同質三聚體之長鏈 β-長帶受體-結合蛋白質 (如：腫瘤壞死因子 α ("TNF-α")) 方面，PEG₃-蛋白質₃ 三聚體之異構物的數目甚至比在溶液中產生之同質二聚體型式的受體-結合蛋白質還多。由於在 TNF 接近胺基-端進行化學修改顯示出可將此細胞活素去活化 (Utsumi, T., et al., (1992) Mol Immunol 29: 77-81)，因此，當在某些選擇 N-端殘質之條件下，以試劑將 TNF-α 聚乙二醇化時，TNF-α 可能無法保留大致之活性。然而，TNF-α 之拮抗劑 (如：Apo2L/TRAIL) (Hymowitz, S.G. et al. (2000), Biochemistry 39: 633-640) 適合利用本發明進行聚乙二醇化。

測定那些以寡聚物型式作用之細胞活素的共軛物之特徵時，需要數種分析方法之組合。胺基-端序列分析可偵察是否有具游離 N-端 α 胺基團之單體存在，而解離之單體的電泳分析 (如：SDS-PAGE 或毛細電泳法) 可透露出是否有受體-結合蛋白質之未聚乙二醇化和多重-聚乙二醇化的單體存在。沒有這類證據時，無法清楚證明這類同質二聚體-和同質三聚體-形成蛋白質之一-聚乙二醇化共軛物的合成。

這些實施例，尤其是該藉第 1 至 8 圖以圖解說明者，提供令人容易設想之基礎，使人了解蛋白質-受體交互作

(88)

用之立體遮蔽效果的可能角色，此遮蔽效果係由受體-結合蛋白質在，或鄰近這些生物活性成分之受體-結合功能區塊內的聚乙二醇化作用產生。若 PEG 係在單體間之交互作用所需要的區域中偶合，則由可高度延展及有彈性之 PEG 股（見第 1d 圖）所佔據之大體積亦會在空間上阻隔某些受體-結合蛋白質之單體聯結成官能性之同質二聚體或同質三聚體。因此，將聚乙二醇化作用瞄準遠離受體-結合蛋白質之受體-結合區的位置可減少聚乙二醇化作用干擾分子間之交互作用（對其官能而言為必要者）的可能性。根據本發明之方法進行受體-結合蛋白質的聚乙二醇化反應時可獲得較預期中者多之益處。所產生之共軛物組合了所預期之改良溶解度、增加生物可利用性、較大之穩定性和減低之致免疫性與保留出乎意料高之生物活性的益處。

本發明參考某些實施態樣及其某些實施例來做說明。本發明之方法可類似地應用至除了細胞活素、趨化激素、生長因子和多肽激素或其拮抗劑外之受體-結合肽和蛋白質，及其它共軛試劑上。因此，本發明之範圍不限於所描述之體系，而僅受限於申請專利之範圍。本技藝之工作人員和一般技術人員可很容易地察知其它可實行之體系，而不背離本發明之範圍。所有這類變化均被視為本發明之部分。

所有本專利申請書中所提及之刊物、專利和專利申請書為本發明所屬技藝中技術熟習人士之技術水準的指示，

(89)

且其併為本文之參考資料，如同各個別之刊物、專利或專利申請書被具體且個別指出併作本文之參考資料。

【圖式簡單說明】

第 1 至 8 圖顯示以 RasMol 軟體 (Sayle, R.A., et al., (1995) Trends Biochem Sci 20: 374-376)，根據結晶學資料所創造出之不同細胞活素和生長因子的分子模型。除了某些特別有意義之殘質外 (其係以 "球 - 和 - 棒" 版式表示)，各模型係以 "絲帶狀" 或 "草圖 (cartoon format)" 版式來表現。這些版式係利用 RasMol 軟體選出之選項。帶狀物之暗色部分代表細胞活素和生長因子中被描述為涉及連接其受體之的功能區塊。圖中指出各構造在蛋白質資料庫 ("PDB") 中的同意密碼 (見 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)。

第 1a 圖示為干擾素- α -2a (SEQ ID NO:1) 之模型，其中該四個被描述為係羅氏 (Roche's) PEG-干擾素產物，PEGASYS®中之主要聚乙二醇化位置處的賴胺酸殘質 (Lys31、Lys121、Lys131 和 Lys134) 係以 "球 - 和 - 棒" 版式顯示 (根據上述 Bailon, P., et al.之資料)。涉及連接其受體之區域 ("結合位置 1 和 2") 已被鑑定出。該四個被描述為在 PEGASYS 中被聚乙二醇化的賴胺酸殘質均在結合位置 1 之區域中 (PDB 密碼 1ITF)。

(90)

第 1b 圖示為干擾素- α -2b (SEQ ID NO:2) 之模型，其中被描述為係先靈-普洛 (Schering-Plough) 之 PEG-INTRON® 中之主要聚乙二醇化位置的殘質 (His34、Lys31、Lys121、Tyr129 和 Lys131) 係以 "球-和-棒" 版式顯示 (根據上述 Wylie, D.C., et al. 之資料)。這些胺基酸殘質均在結合位置 1 之區域中。

第 1c 圖示為干擾素- α -2b 之模型，其中該胺基端半胱胺酸殘質 ("Cys1") (其為根據本發明之聚乙二醇化作用的靶的) 係以 "球-和-棒" 版式顯示。Cys1 係遠離結合位置 1 和 2。

第 1d 圖示為與第 1c 圖中所顯示之干擾素- α -2b 相同的模型，在 N-端半胱胺酸殘質 ("Cys1") 上已連接一 20-kDa PEG 的單股。PEG 之構造係應用 Lee, L.S., 等 ((1999) Bioconjug Chem 10: 973-981) 所描述之程式產生，並使其與蛋白質具相同大小。

第 2 圖示為人類干擾素- β -1a (SEQ ID NO:3) 之分子模型，其中指出數個在受體-結合功能區塊內或與其相鄰之賴胺酸殘質 (Lys19、Lys33、Lys99 和 Lys134)。另外，醯化位置 (Asn80) 和 N-端甲硫胺酸殘質 ("Met 1") 係以 "球-和-棒" 版式顯示 (根據 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 之資料)。Met 1 係遠離結合位置 1 和 2，但數個賴

(91)

胺酸殘質均位在受體 - 結合功能區塊內。(PDB 密碼 1AUI)。干擾素- β -1b 與干擾素- β -1a 之構造的不同處在於其缺少 N-端甲硫胺酸殘質及碳水化合物部分，以及具有一取代未成對之半胱胺酸殘質 (Cys17) 的絲胺酸殘質。

第 3 圖示為人類顆粒性白血球-巨噬細胞群落-刺激因子 ("G-CSF;" SEQ ID NO:5) 之分子模型，其中三個在受體 - 結合功能區塊之賴胺酸殘質 (Lys72、Lys107 和 Lys111) 以及可在結晶構造中看到之接近胺基-端的第一個胺基酸殘質 ("Arg 4") 係以 "球-和-棒" 版式顯示 (根據 Rozwarski, D.A., et al. (1996) Proteins 26: 304-313 之資料)。GM-CSF 之胺基-端區係遠離結合位置 1 和 2。(PDB 密碼 2GMF)。

第 4 圖示為人類間白素-2 ("IL-2;" SEQ ID NO:6) 之分子模型，其中被描述為牽涉到所有三種受體 (α 、 β 和 γ) 的胺基酸殘質係以 "球-和-棒" 版式顯示，如在受體 - 結合功能區塊或接近此功能區塊之數個賴胺酸殘質。可在結晶構造中看到之最接近胺基-端的胺基酸殘質為遠離受體 - 結合功能區塊之絲胺酸 6 ("Ser6")，(根據 Bamborough, P., et al., (1994) Structure 2: 839-851; Pettit, D.K., et al., 如上述之資料)。(PDB 密碼 3INK)。

第 5 圖示為以 "草圖" 版式來表現之人類表皮生長因子 ("EGF;" SEQ ID NO:7) 的分子模型，但涉及受體 - 結

(92)

合之殘質，及鄰接受體-結合區之二個賴胺酸 (Lys28 和 Lys48) 除外。該鏈內之二硫化物鍵係以虛線顯示。根據此模型，可在此結晶構造中看到之最接近胺基-端的胺基酸殘質為半胱胺酸 6 ("Cys 6") (根據 Carpenter, G., et al., (1990) J Biol Chem 265: 7709-7712; Lu, H.-S., et al., (2001) J Biol Chem 276: 34913-34917 之資料)。在此結晶構造中看不到之 EGF 胺基端的彈性部分 (殘質 1-5) 並未顯示出係在受體-結合區內 (PDB 密碼 1JL9)。

第 6 圖示為以 "草圖" 版式來表現之鹼性纖維母細胞生長因子 ("bFGF;" SEQ ID NO:8) 的分子模型，其中該涉及連接受體及連接肝素之殘質係以 "球-和-棒" 版式呈現來確認 (根據 Schlessinger, J., et al., (2000) Mol Cell 6: 743-750 之資料)。從胺基-端開始的前 12 個胺基酸殘質並未牽涉到受體-結合 (PDB 密碼 1FQ9)。

第 7 圖示為以 "草圖" 版式來表現之似胰島素生長因子-1 ("IGF-1"; SEQ ID NO:9) 的分子模型，但涉及受體-結合之殘質 (23-25 和 28-37)，及麩胺酸殘質 3 ("Glu3") (其係在此結晶構造中可看到之最接近胺基-端的胺基酸殘質) 除外。可確認二個賴胺酸殘質，其中之一 (Lys27) 係鄰接受體-結合功能區塊，另一則遠離受體-結合功能區塊 (根據 Brzozowski, A.M., et al., (2002) Biochemistry 41: 9389-9397 之資料)。IGF-1 之胺基端係遠離受體-結合功能區塊。(PDB 密碼 1GZR)。

第 8 圖示為干擾素 γ ("IFN- γ ;" SEQ ID NO:4) 的分

(93)

子模型，其為同質二聚體。為了澄清二種多肽鏈間之交互作用，單體之一（"鏈 A"）係以"絲帶狀"版式顯示，另一（"鏈 B"）則以"骨架"版式顯示。賴胺酸殘質（以亮"球和棒"版式顯示）係沿著多肽鏈（包括牽涉到單體間之界面的區域，或鄰接著涉及受體 - 結合之胺基酸殘質的區）產生。IFN- γ 之胺基-端區遠離二聚體化界面，但麩醯胺 1（Gln 1）已涉及受體 - 結合（Thiel D.J., et al., (2000) Structure 8: 927-936;PDB 密碼 1FG9）。

第 9 圖示為未聚乙二醇化之干擾素 - α -2b（"IFN"）、一聚乙二醇化之干擾素 - α -2b（"PEG₁-IFN"）和二聚乙二醇化之干擾素 - α -2b（"PEG₂-IFN"）的分級分離結果，其係經由將含 IFN，20kDa mPEG-醛和還原劑之反應混合物進行陽離子-交換色層分析取得。

第 10 圖示為如第 9 圖中所示之分級分離反應混合物，及從離子交換管柱收集之選擇分液（其結果顯示於第 9 圖中）的大小-排除色層分析結果。

第 11 圖示為將含人類 IL-2，20-kDa mPEG-醛和還原劑之反應混合物進行陽離子-交換色層分析的分級分離結果。在指示之洗提條件下，不像第 9 圖中所示之干擾素 - α -2b 的結果，殘餘之未聚乙二醇化的 IL-2 並未從管柱洗提出。

第 12 圖示為如第 11 圖中所示之分級分離反應混合物，及所選擇之從管柱洗提出的分液的大小-排除色層分析結果。

(94)

第 13 圖示為聚乙二醇化之干擾素-2 (" PEG-IL-2") 和從陽離子交換管柱收集之分液 (其色層分析圖顯示於第 11 圖中) 的反應混合物的電泳分析。

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

<210> 4
 <211> 143
 <212> PRT
 <213> 現代人

<400> 4
 Gln Asp Pro Tyr Val Lys Glu Ala Glu Asn Leu Lys Lys Tyr Phe Asn
 1 5 10 15
 Ala Gly His Ser Asp Val Ala Asp Asn Gly Thr Leu Phe Leu Gly Ile
 20 25 30
 Leu Lys Asn Trp Lys Glu Glu Ser Asp Arg Lys Ile Met Gln Ser Gln
 35 40 45
 Ile Val Ser Phe Tyr Phe Lys Leu Phe Lys Asn Phe Lys Asp Asp Gln
 50 55 60
 Ser Ile Gln Lys Ser Val Glu Thr Ile Lys Glu Asp Met Asn Val Lys
 65 70 75 80
 Phe Phe Asn Ser Asn Lys Lys Lys Arg Asp Asp Phe Glu Lys Leu Thr
 85 90 95
 Asn Tyr Ser Val Thr Asp Leu Asn Val Gln Arg Lys Ala Ile His Glu
 100 105 110

Leu Ile Gln Val Met Ala Glu Leu Ser Pro Ala Ala Lys Thr Gly Lys
 115 120 125
 Arg Lys Arg Ser Gln Met Leu Phe Arg Gly Arg Arg Ala Ser Gln
 130 135 140

<210> 5
 <211> 127
 <212> PRT
 <213> 現代人

<400> 5

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

<210> 6
 <211> 133
 <212> PRT
 <213> 現代人

<400> 6

Ala Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu His
 1 5 10 15
 Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile Asn Asn Tyr Lys
 20 25 30
 Asn Pro Lys Leu Thr Arg Met Leu Thr Phe Lys Phe Tyr Met Pro Lys
 35 40 45

Pro His Ile Lys Leu Gln Leu Gln Ala Glu Glu Arg Gly Val Val Ser
 50 55 60
 Ile Lys Gly Val Cys Ala Asn Arg Tyr Leu Ala Met Lys Glu Asp Gly
 65 70 75 80
 Arg Leu Leu Ala Ser Lys Cys Val Thr Asp Glu Cys Phe Phe Phe Glu
 85 90 95
 Arg Leu Glu Ser Asn Asn Tyr Asn Thr Tyr Arg Ser Arg Lys Tyr Thr
 100 105 110
 Ser Trp Tyr Val Ala Leu Lys Arg Thr Gly Gln Tyr Lys Leu Gly Ser
 115 120 125
 Lys Thr Gly Pro Gly Gln Lys Ala Ile Leu Phe Leu Pro Met Ser Ala
 130 135 140
 Lys Ser
 145

<210> 9
 <211> 70
 <212> PRT
 <213> 現代人

<400> 9
 Gly Pro Glu Thr Leu Cys Gly Ala Glu Leu Val Asp Ala Leu Gln Phe
 1 5 10 15
 Val Cys Gly Asp Arg Gly Phe Tyr Phe Asn Lys Pro Thr Gly Tyr Gly
 20 25 30
 Ser Ser Ser Arg Arg Ala Pro Gln Thr Gly Ile Val Asp Glu Cys Cys
 35 40 45
 Phe Arg Ser Cys Asp Leu Arg Arg Leu Glu Met Tyr Cys Ala Pro Leu
 50 55 60
 Lys Pro Ala Lys Ser Ala
 65 70

伍、中文發明摘要

發明之名稱：具有保留之受體結合活性的細胞活素、趨化激素、生長因子、多肽激素及其拮抗劑之聚合物共軛物

提供用於合成細胞活素、趨化激素、生長因子、多肽激素及其受體-結合拮抗劑之聚合物共軛物的方法，此共軛物通常保有高受體-結合活性。根據本發明之方法來製備聚合物共軛物可減少或避免因聚合物附著在細胞活素、趨化激素、生長因子和多肽激素，以及其激動和拮抗同系物時所常產生之對受體-配位體交互作用的立體抑制作用。本發明亦提供由這類方法所製造之共軛物和組成物。本發明之共軛物保有較那些藉習知聚合物偶合方法(其未將避開細胞活素、趨化激素、生長因子和多肽激素之受體-結合功能區塊作為目標)所製造之共軛物來得高的受體-結合活性。與未共軛之細胞活素、趨化激素、生長因子和多肽激素相較下，本發明之共軛物在活體內和試管中亦展現出延長之半生期。本發明亦提供含有這類共軛物和/或組成物的套組，以及將這類共軛物和組成物應用於不同之診斷、預防、治療和生物加工之用途中的方法。

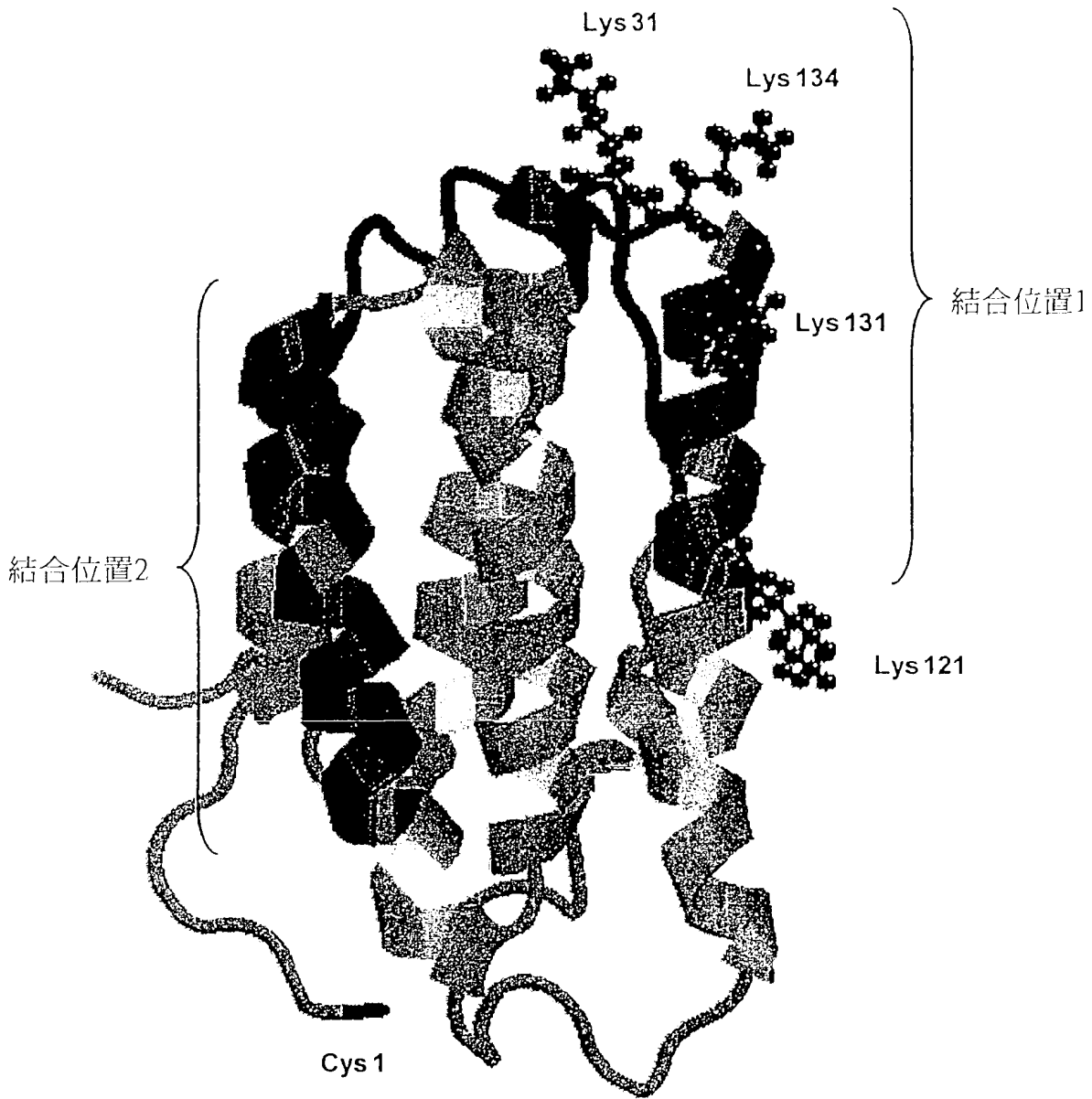
陸、英文發明摘要

發明之名稱：

Polymer Conjugates of Cytokines, Chemokines, Growth Factors, Polypeptide Hormones and Antagonists Thereof with Preserved Receptor-Binding Activity

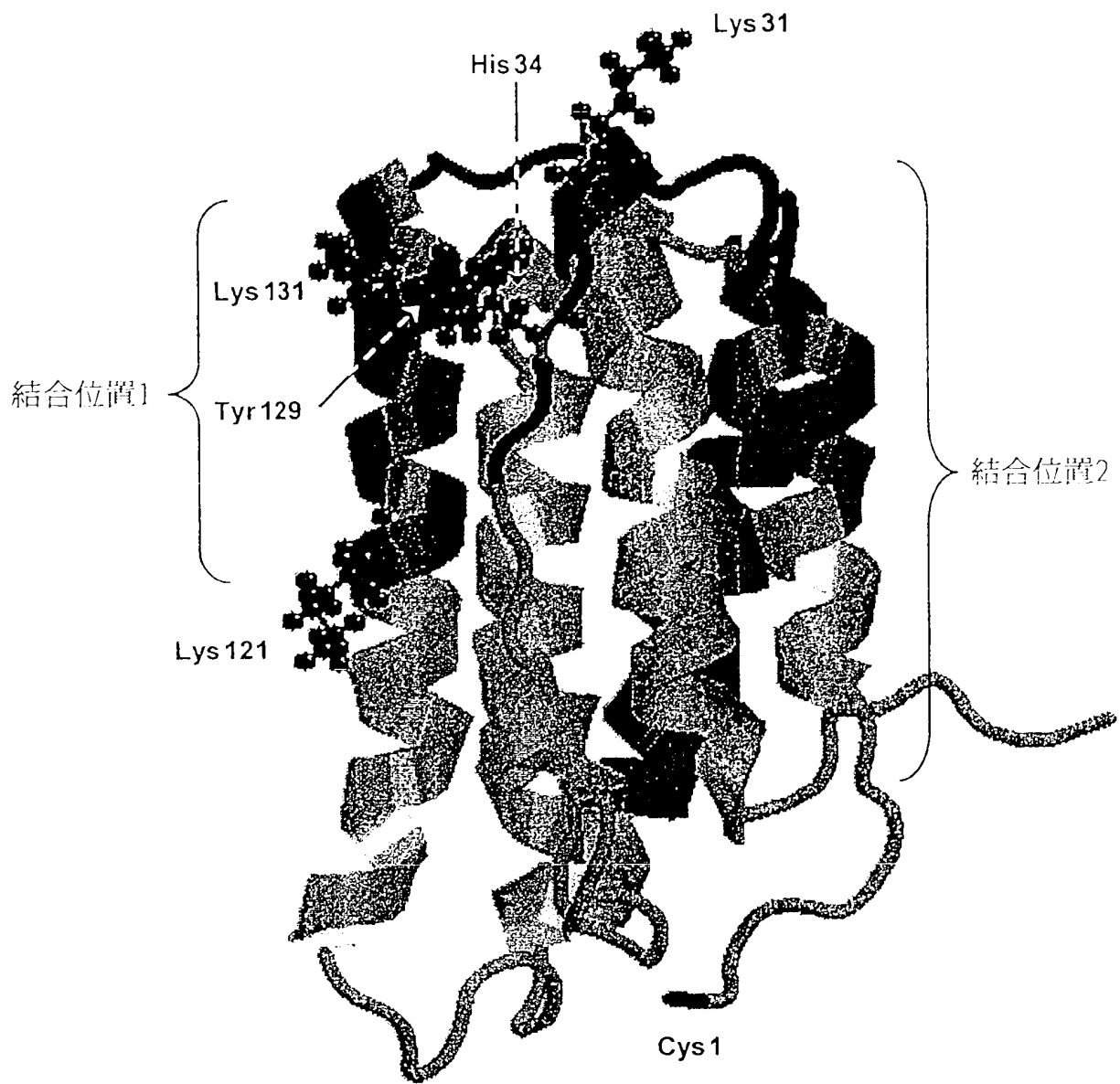
Methods are provided for the synthesis of polymer conjugates of cytokines, chemokines, growth factors, polypeptide hormones and receptor-binding antagonists thereof, which conjugates retain unusually high receptor-binding activity. Preparation of polymer conjugates according to the methods of the present invention diminishes or avoids steric inhibition of receptor-ligand interactions that commonly results from the attachment of polymers to receptor-binding regions of cytokines, chemokines, growth factors and polypeptide hormones, 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 higher level of receptor-binding activity than those produced by traditional polymer coupling methods that are not targeted to avoid receptor-binding domains of cytokines, chemokines, growth factors and polypeptide hormones. The conjugates of the present invention also exhibit an extended half-life *in vivo* and *in vitro* compared to unconjugated cytokines, chemokines, growth factors and polypeptide hormones. 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, therapeutic and bioprocessing applications.

干擾素- α -2a



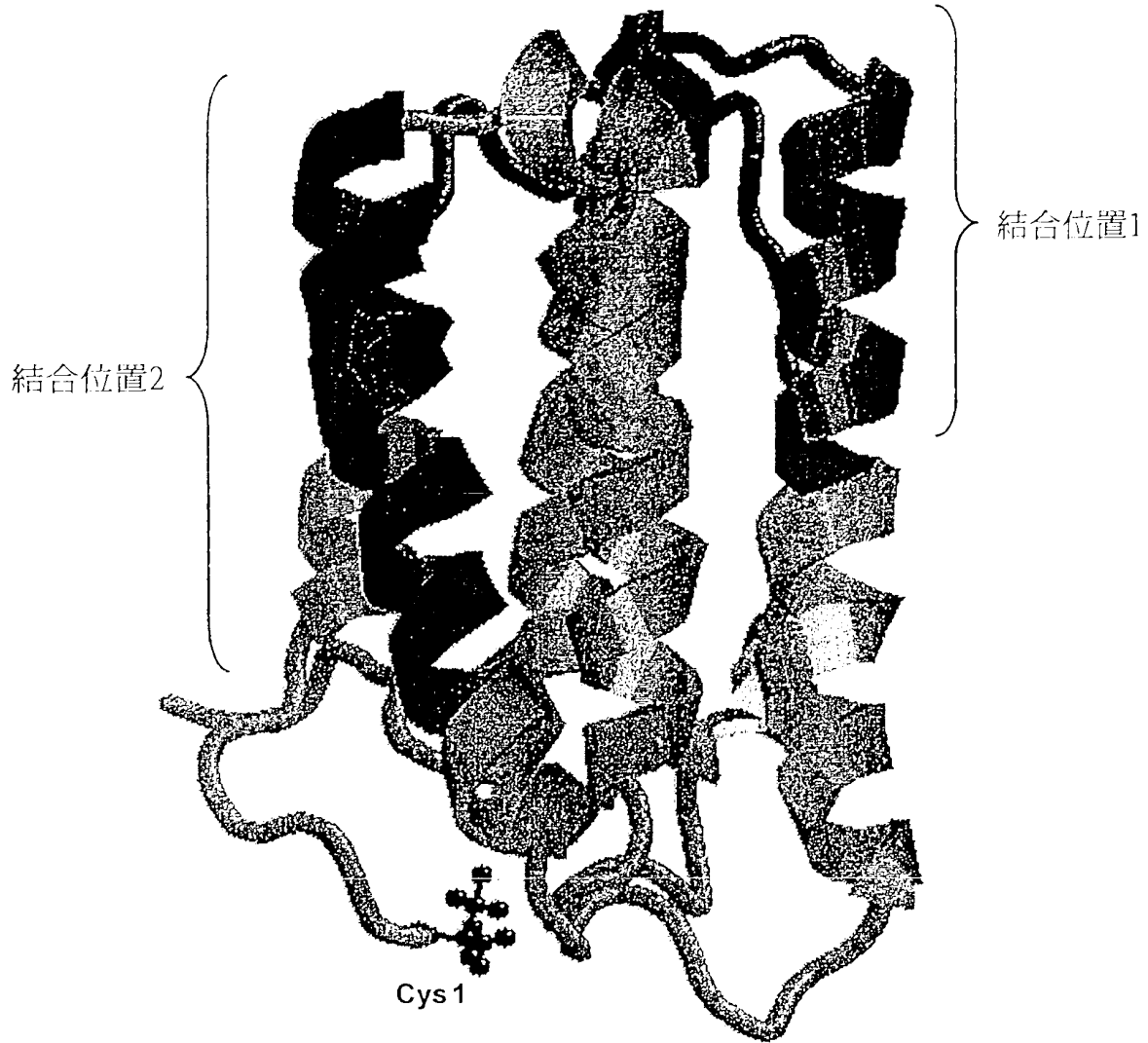
第1a圖

干擾素- α -2b



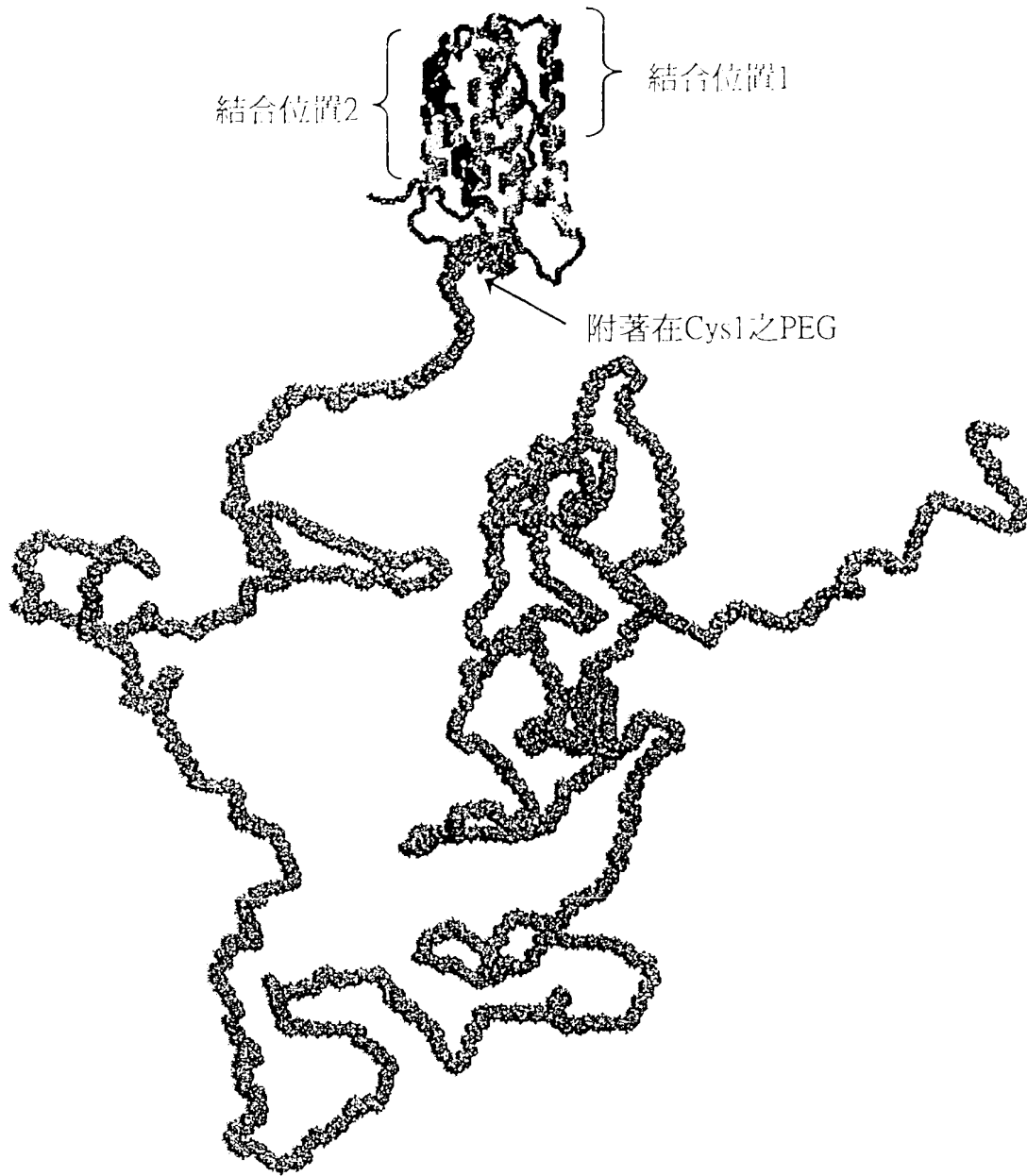
第1b圖

干擾素- α -2b



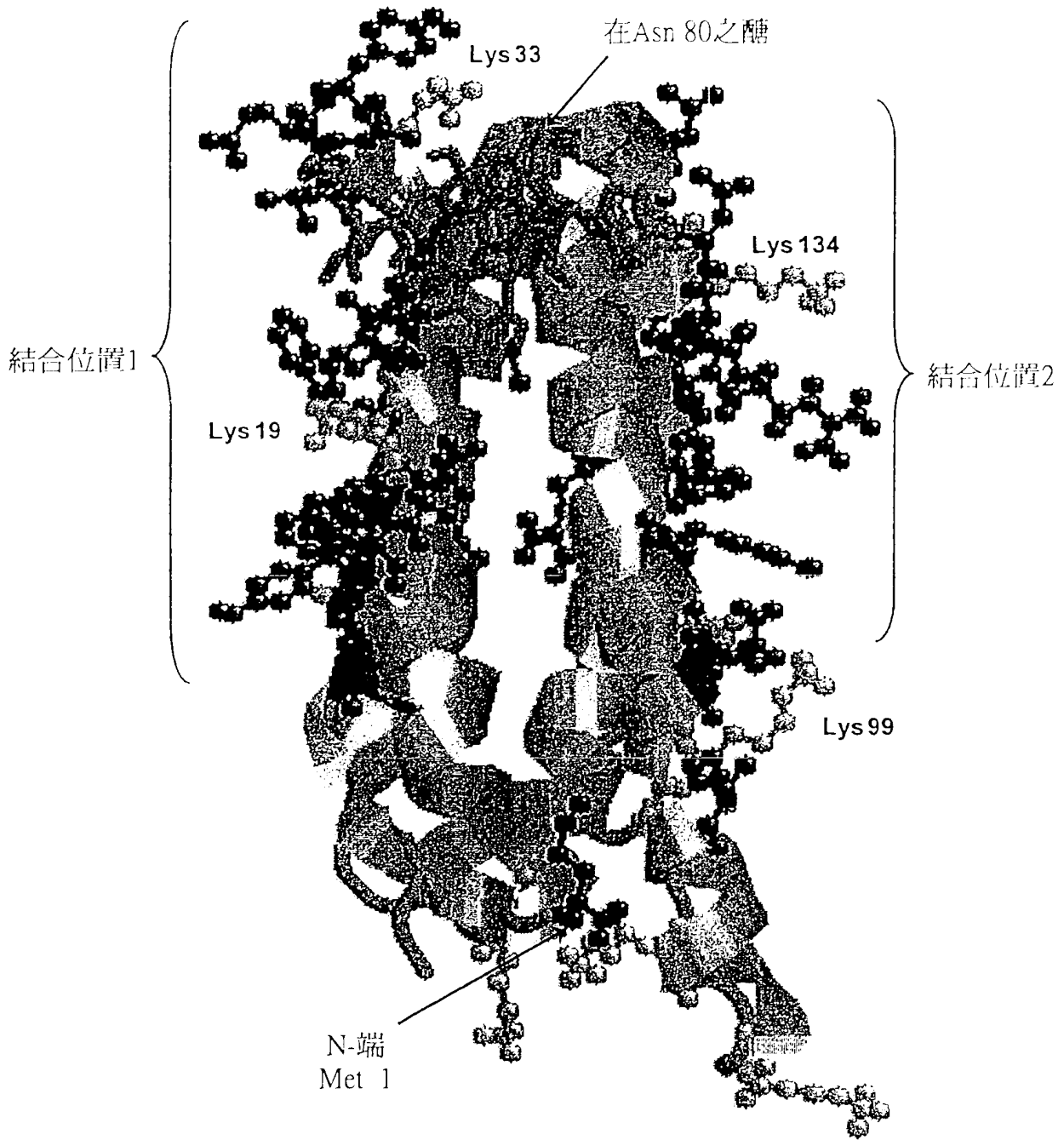
第1c圖

20-kDa PEG-干擾素- α -2b



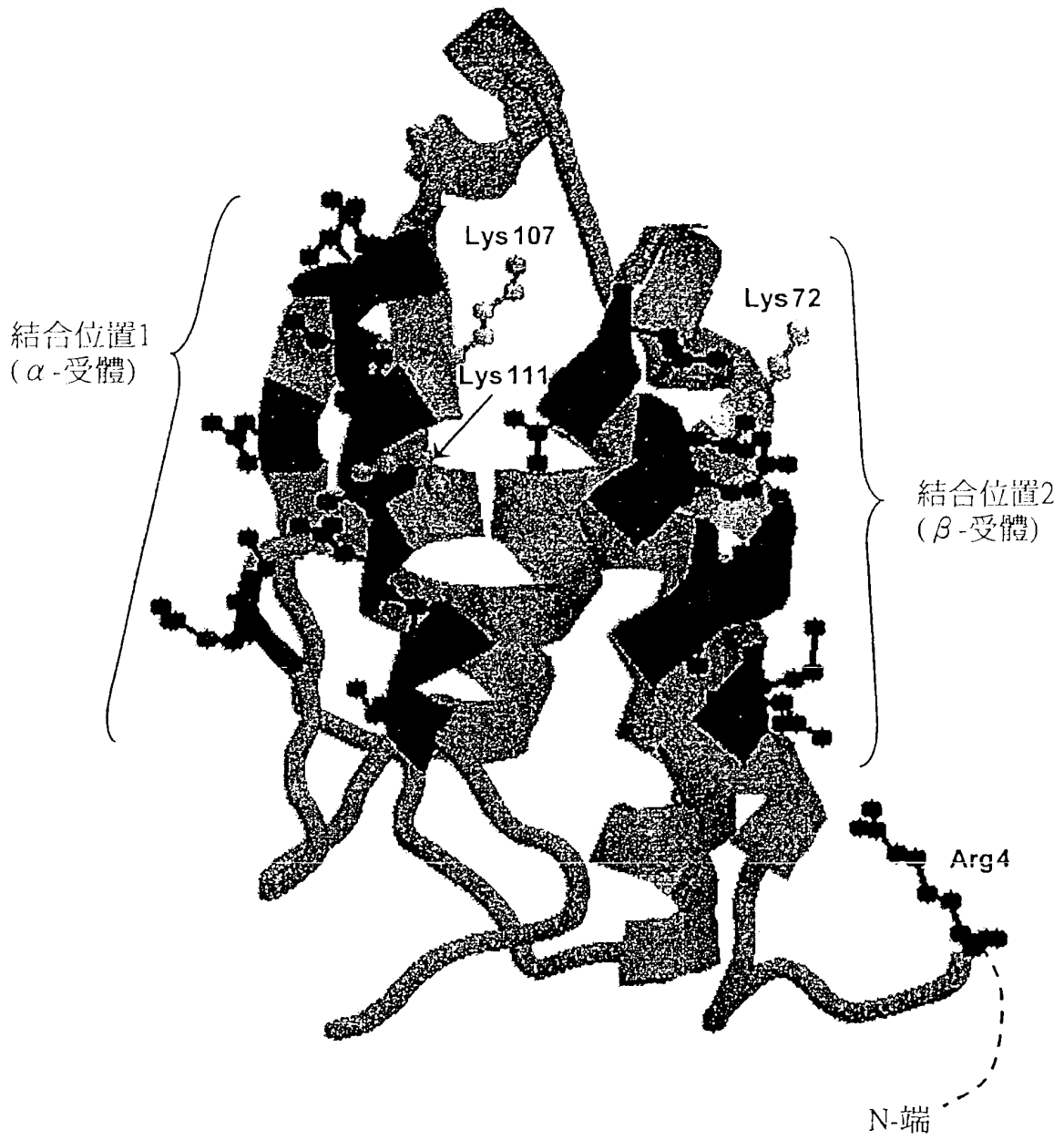
第1d圖

干擾素- β -1a



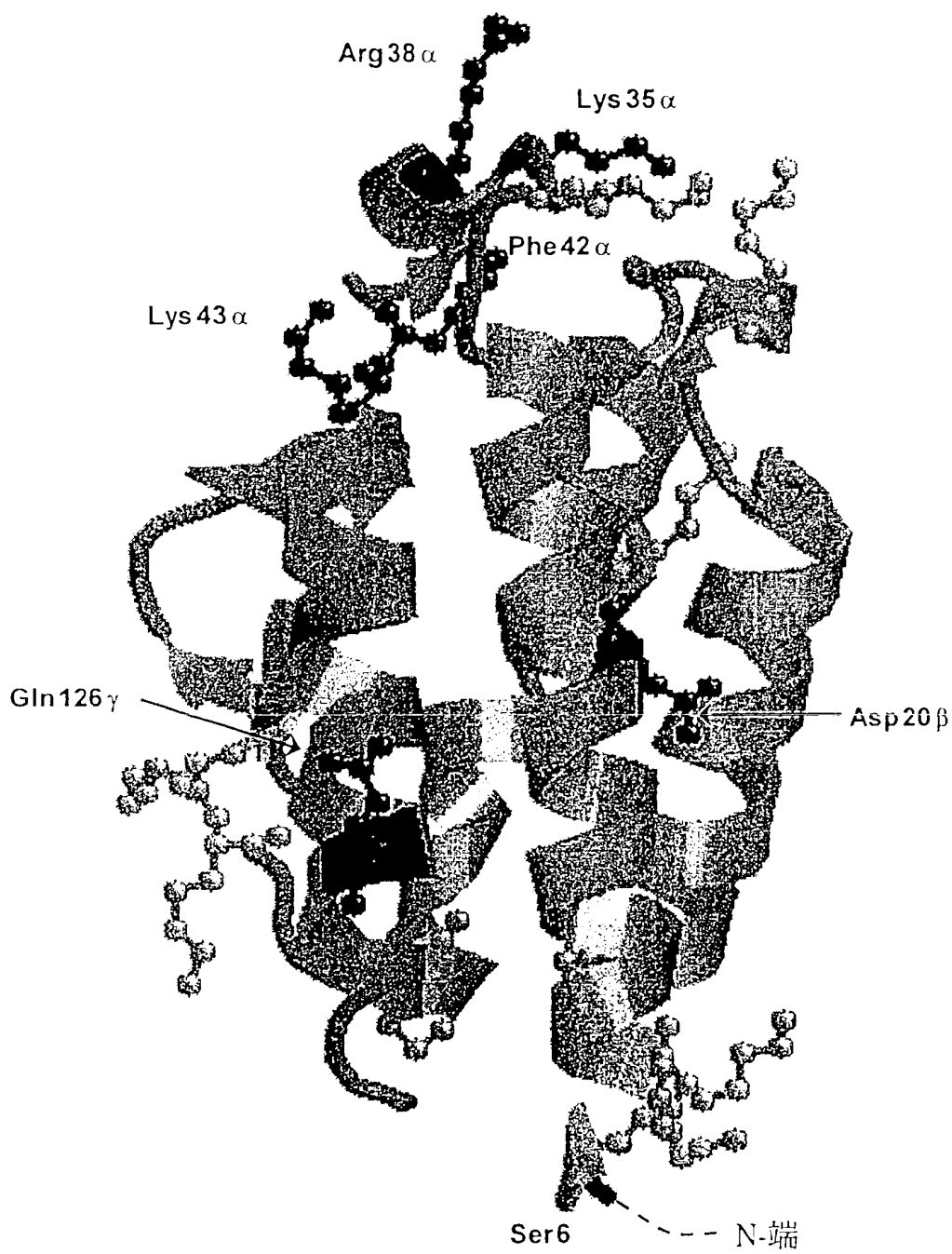
第2圖

顆粒細胞-巨噬細胞群落-刺激因子



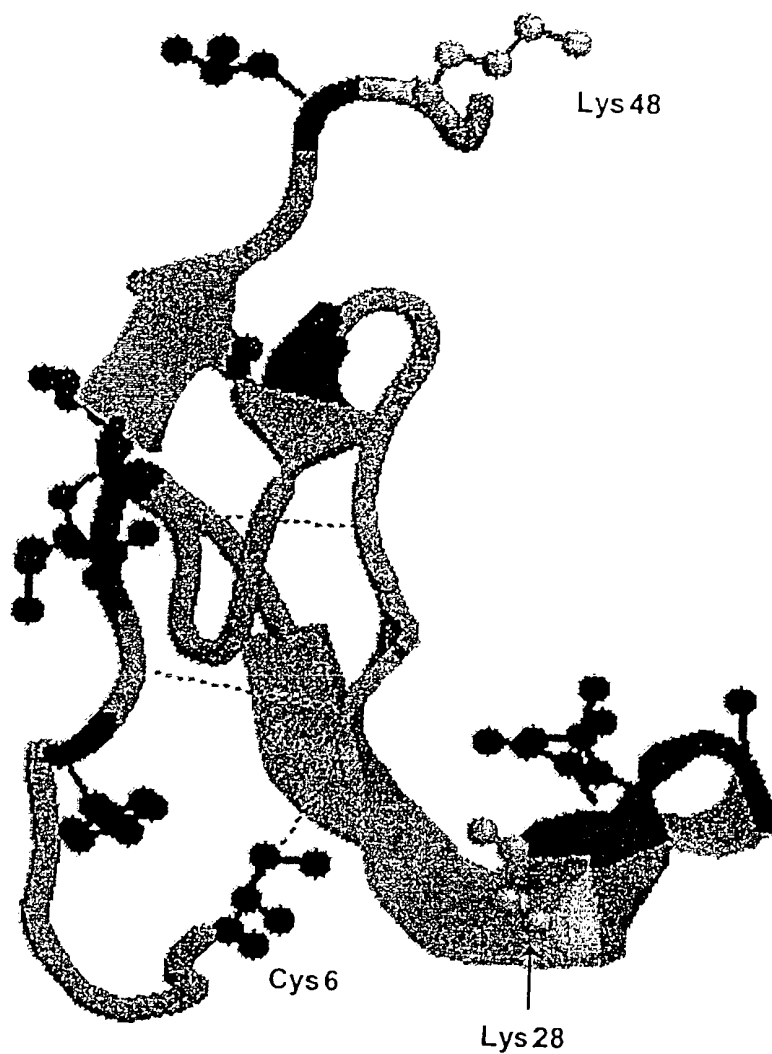
第3圖

間白素-2



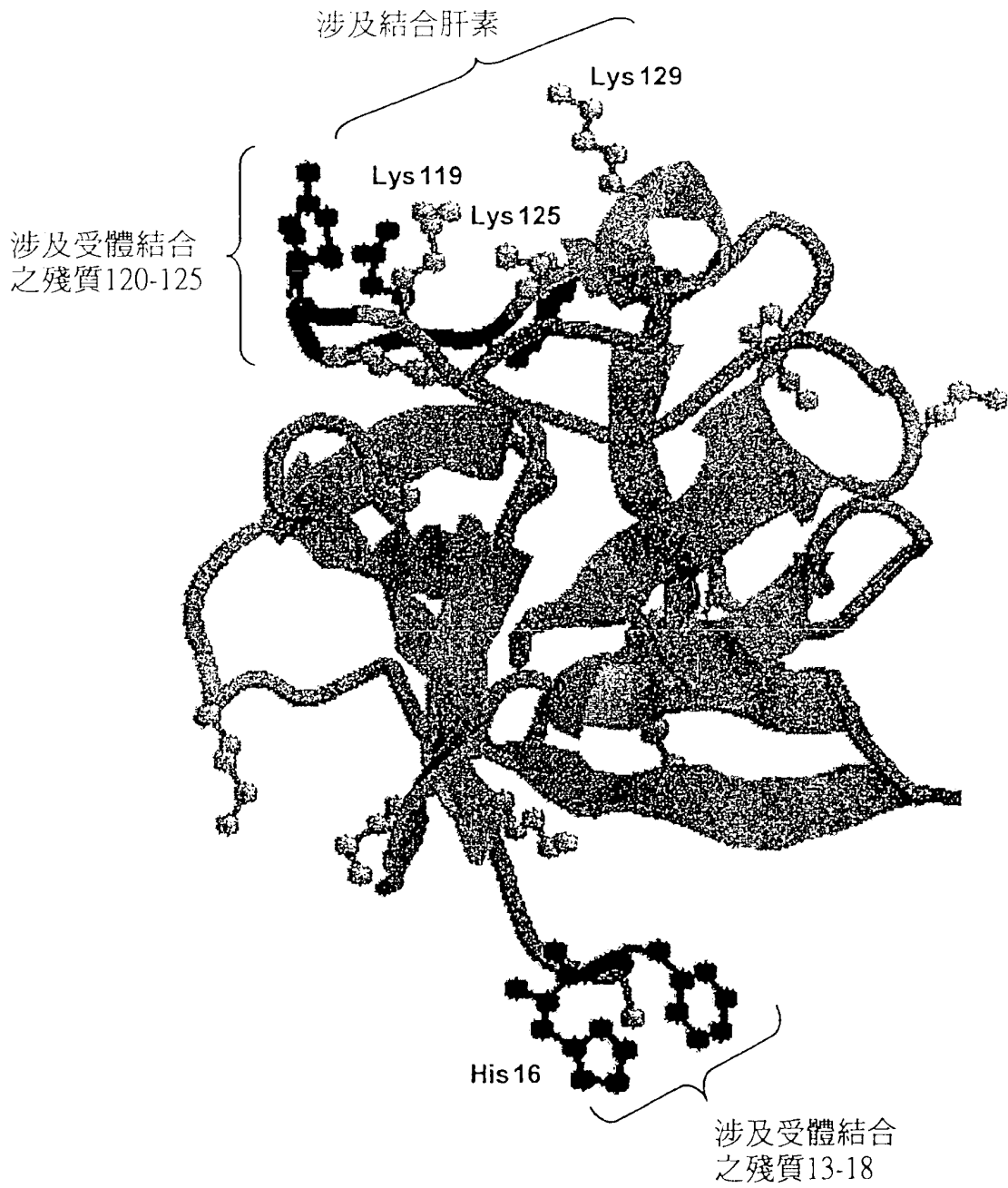
第4圖

表皮生長因子



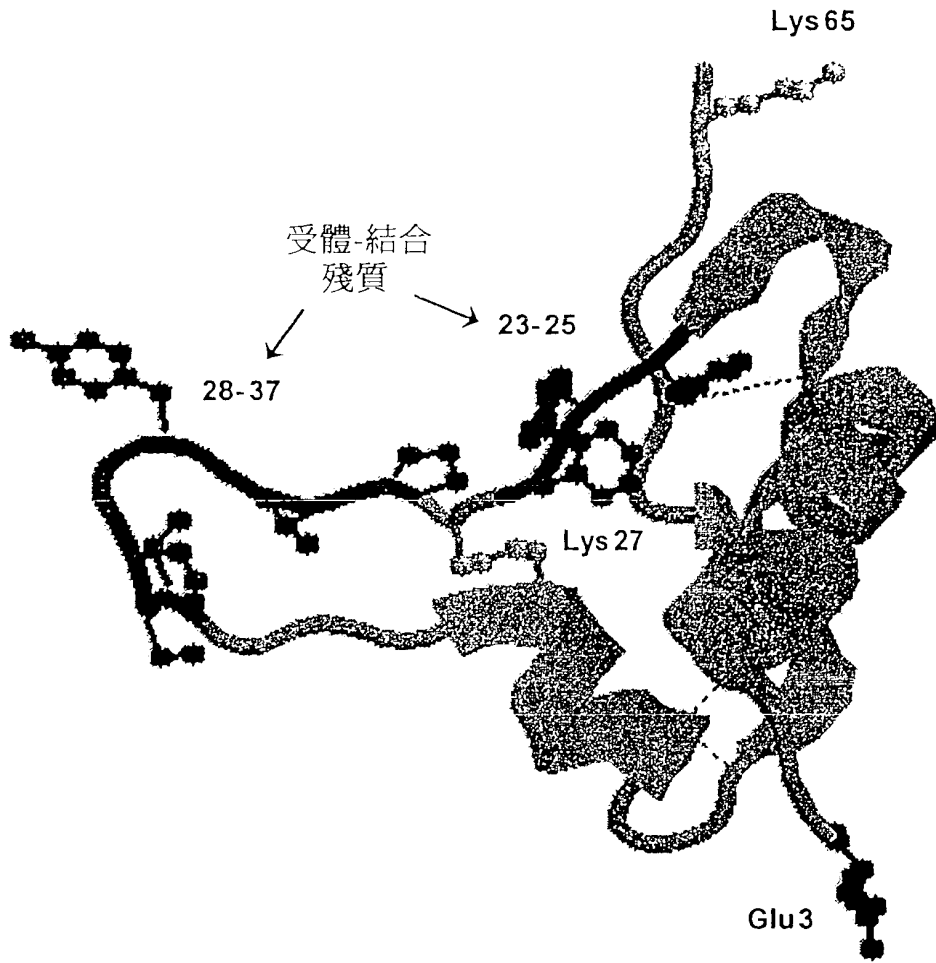
第5圖

鹼性纖維母細胞生長因子



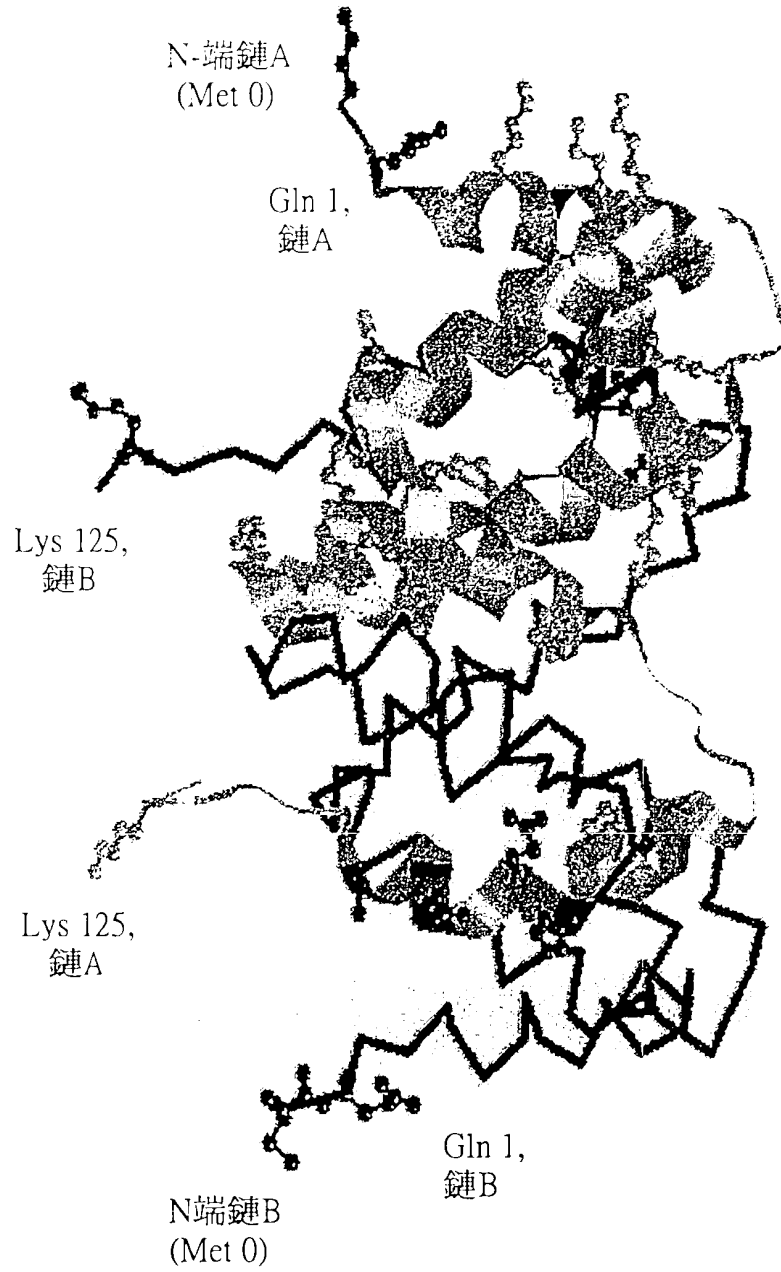
第6圖

似胰島素生長因子-1

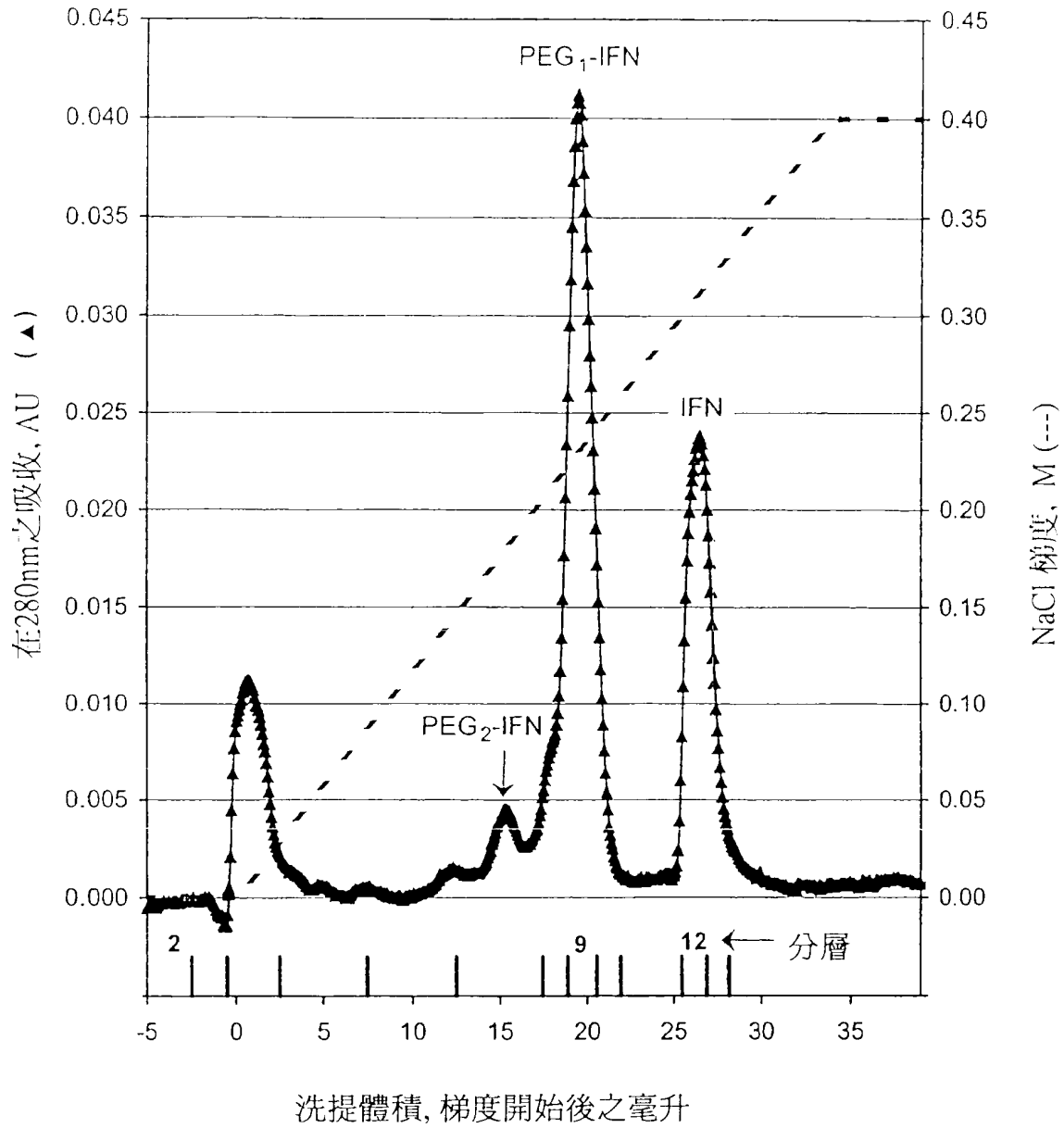


第7圖

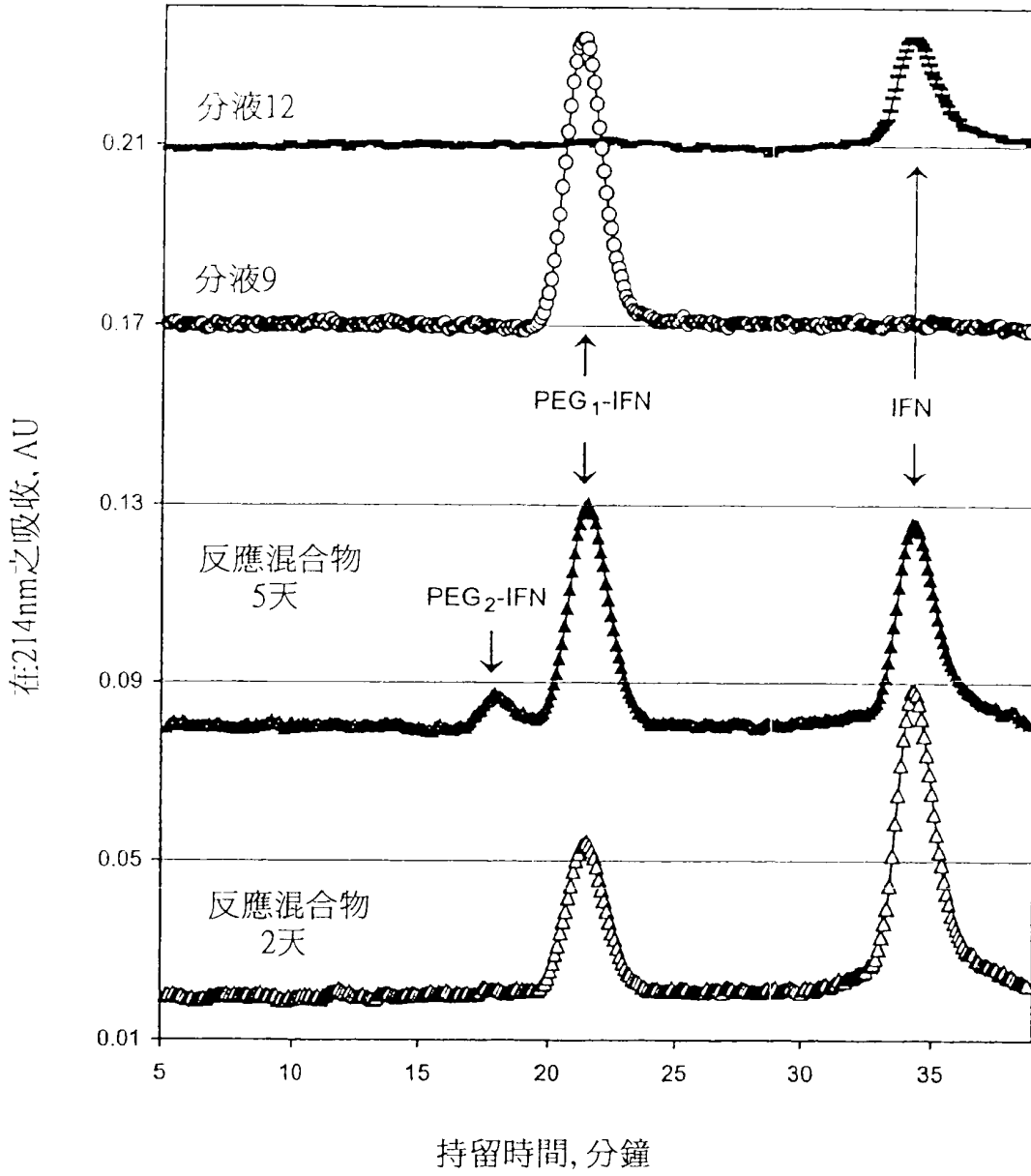
干擾素- γ 同質二聚體



第8圖

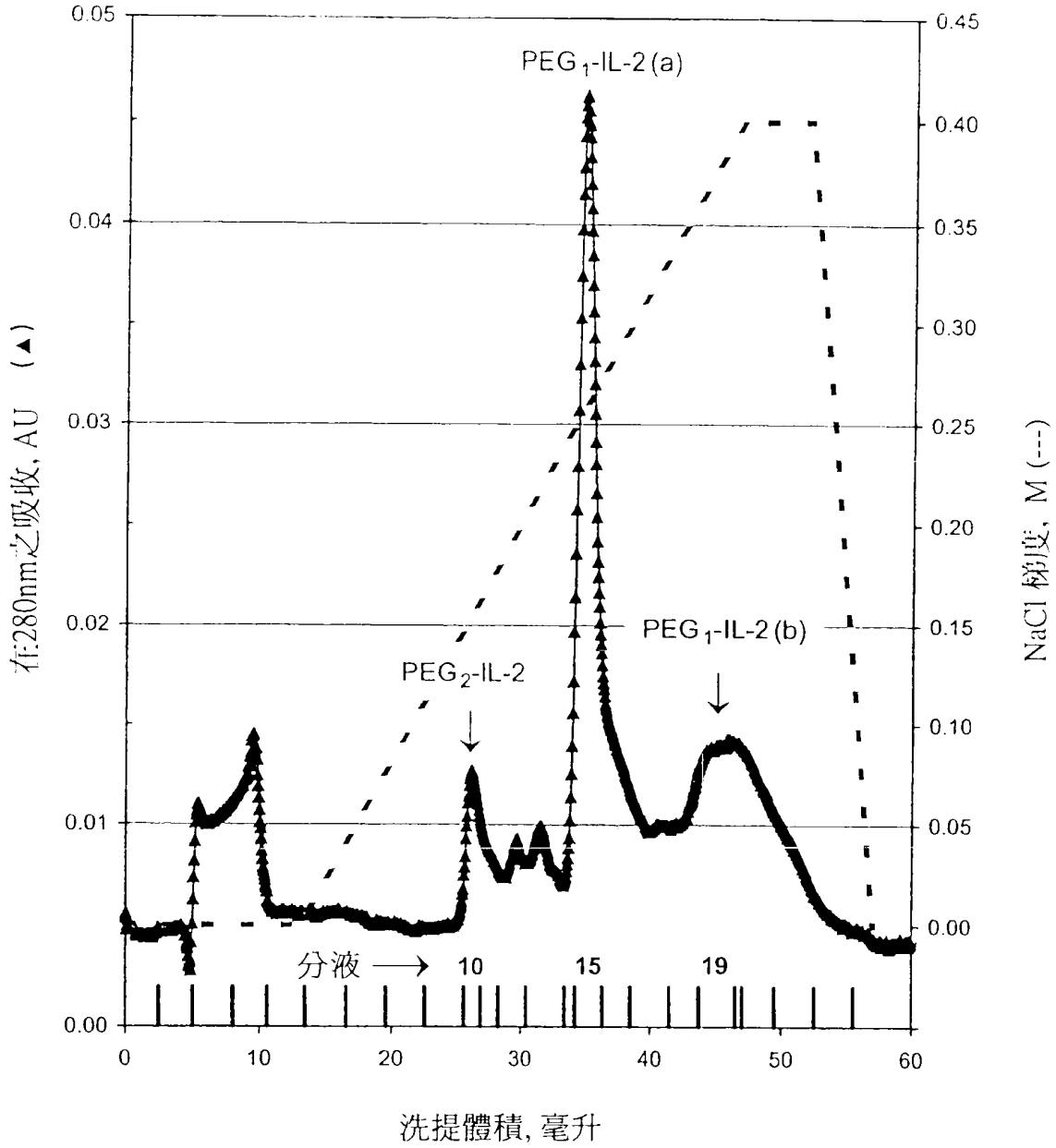
PEG-干擾素- α -2b反應混合物之陽離子-交換層析法

第9圖

PEG-干擾素- α -2b反應混合物之大小-排除HPLC
和陽離子-交換層析分液

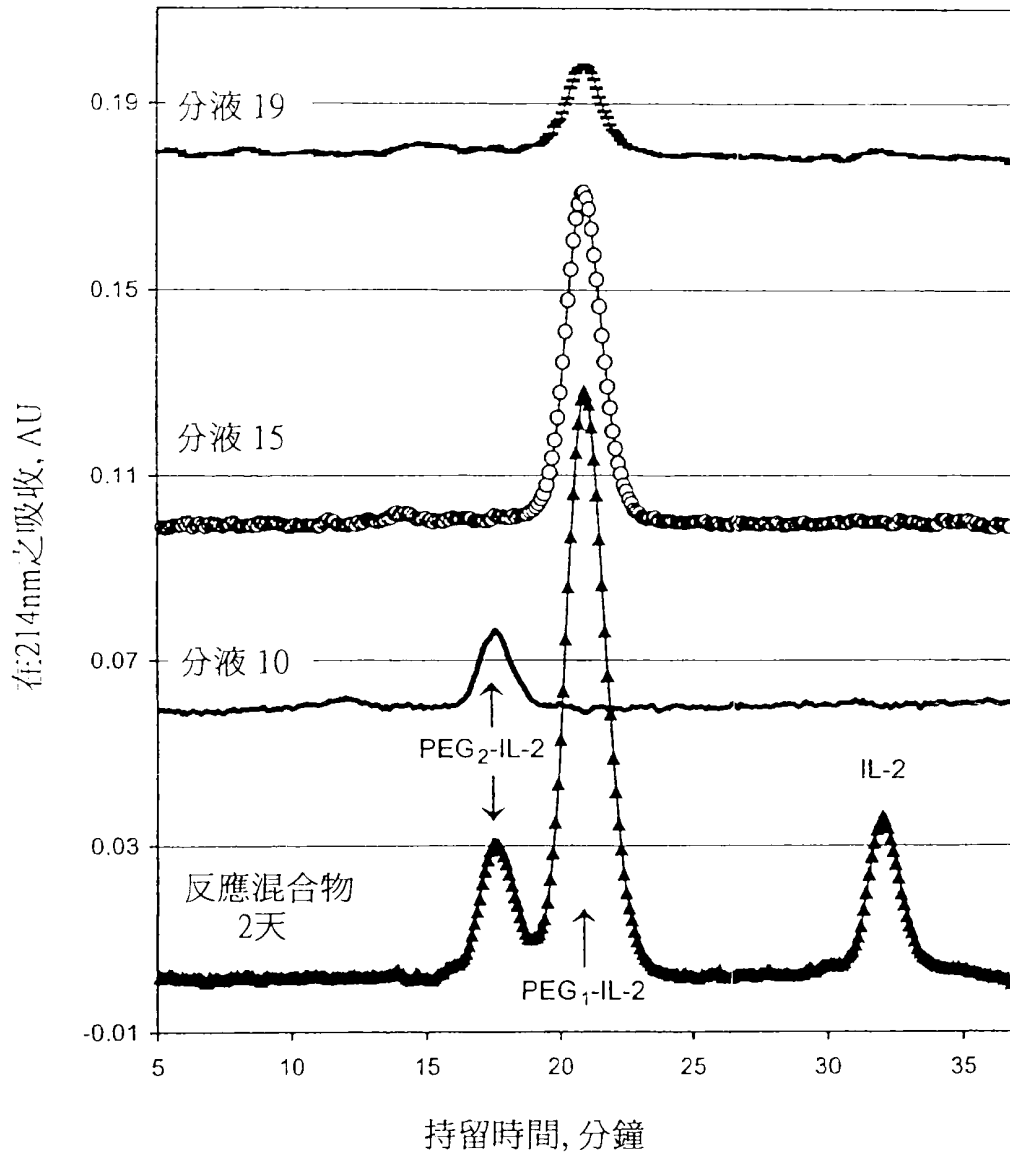
第10圖

PEG-IL-2反應混合物之陽離子交換層析法



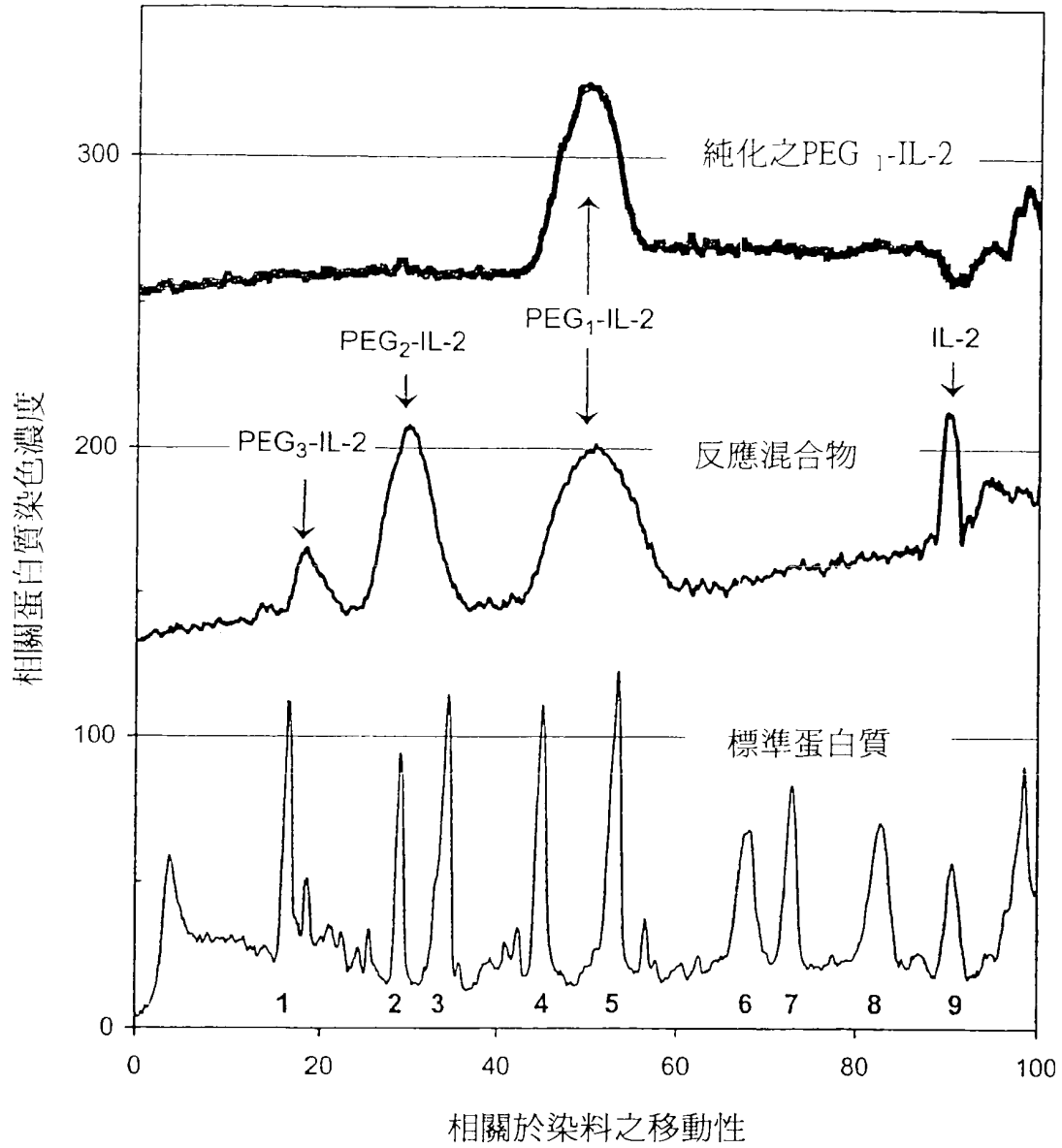
第11圖

PEG-間白素-2反應混合物之大小-排時HPLC
和陽離子-交換層析分液



第12圖

PEG-間白素-2反應混合物和純化之
一聚乙二醇化的共軛體的電泳分析



第13圖

柒、指定代表圖：

(一)、本案指定代表圖為：第 1d 圖

(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：

公告本

附件 3A：第 092136592 號申請專利範圍修正本

民國 100 年 11 月 30 日修正

拾、申請專利範圍

100. 11. 30 補充

1. 一種用於合成聚乙二醇(PEG)或單甲氧基聚乙二醇(mPEG)與肽或多肽之醫藥共軛物之方法，其包含令該 PEG 或 mPEG 與該肽或多肽之胺基端胺基酸的 α 胺基共價偶合，其中該 α 胺基經該 PEG 或 mPEG 修飾不會引起該肽或多肽與彼之受體結合之實質立體阻礙，且該經修飾之肽或多肽比任意經 PEG 或 mPEG 偶合者較能保有該肽或多肽之受體結合藥物動力效能，且其中該肽或多肽選自干擾素- α 、干擾素- β 、似胰島素生長因子、間白素或表皮生長因子。

2. 如申請專利範圍第 1 項之方法，其中該間白素係間白素-2。

3. 如申請專利範圍第 1 項之方法，其中該似胰島素生長因子係似胰島素生長因子-1。

4. 如申請專利範圍第 1 項之方法，其中該 PEG 或 mPEG 與該 α 胺基之共價偶合係經由二級胺鍵合。

5. 如申請專利範圍第 1 項之方法，其中該 PEG 或 mPEG 之分子量係介於 5 至 30 kDa。

6. 一種醫藥共軛物，其係經由如申請專利範圍第 1 至 5 項中任一項之方法所產製。

7. 如申請專利範圍第 6 項之醫藥共軛物，其於活體內和活體外顯現延長之半生期。