

本案已向

國(地區)申請專利

美國 US

申請日期

1997/12/19 08/994, 622

案號

主張優先權

有

有關微生物已寄存於

寄存日期

寄存號碼

無



五、發明說明 (1)

發明之背景

1. 發明之領域

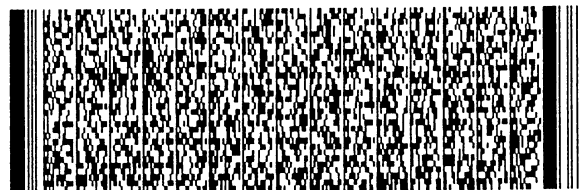
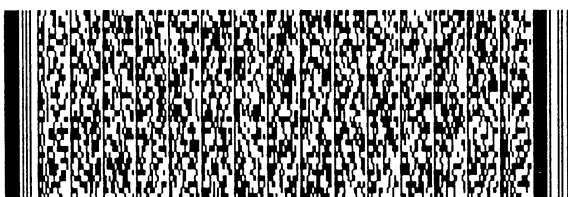
本發明係關於干擾素聚合物共軛物。特定言之，本發明係關於具有新穎干擾素-聚合物連接外形之共軛物。

2. 相關技藝之說明

已建議將生物活性蛋白質共軛聚合物以活體改良循環壽命，水溶解度或抗原性之一或更多種性質。例如，一些起初之對聚乙二醇(PEG)與類似之水溶性聚合物偶合肽或多肽之概念揭示於美國專利4,179,337，此揭示在此併入作為參考。

胰島素與血紅素為第一批共軛之治療劑。這些相當大之多肽含許多自由離胺酸 ϵ -胺基連接位置。許多聚合物可連接而無生物活性之重大損失。

然而，對於許多生物活性物質，共軛方法並非無併發症。必須小心以限制因共軛反應造成之生物活性之損失。例如，如果太多之活化聚合物連接目標蛋白質或多肽，生物活性可嚴重地降低或損失。此外，如果接合聚合物與蛋白質使用錯誤鍵聯劑或不足量之聚合物連接至目標，生成共軛物之治療價值相當受限。經常，此共軛物並未證明足夠之循環壽命增加以補償生物活性之損失。在治療部份之活性位置(即，發現具生物活性之處)如聚合物連接之結果而阻塞時亦生成問題。此問題難以避免，因為聚合物與蛋白質一般在溶液為主之反應中結合。已建議以如吡哆醛磷酸鹽之物質預先阻塞活性位置，但是結果不一致。問題隨



五、發明說明 (2)

低分子量蛋白質與肽而特別尖銳。這些生物活性物質經常具有極少之未具生物活性之連接位置。

干擾素，以下亦稱為IFN，為可由改良之聚合物共軛技術受益之蛋白質之特定實例。例如，參見美國專利4,766,106與4,917,888，其特別敘述與活化聚合物共軛之 β 干擾素，其包括mPEG-2,4,6-三氯-S-三吡啶，mPEG-N-戊二酸琥珀醯亞胺酯或mPEG-N-琥珀酸琥珀醯亞胺酯。專利人揭示蛋白質之共價改性在5至9之pH完成，而且在蛋白質經其離胺酸殘基反應時，蛋白質之共價改性在8至9之pH完成。亦使用相當高莫耳過量(10、20與50-倍)之活化聚合物。

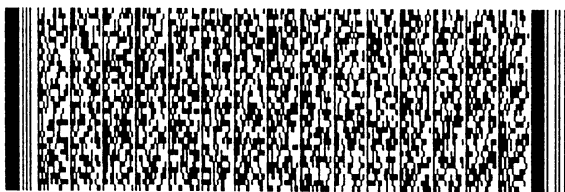
公告號碼0 236 987之歐洲專利申請案敘述在較佳為包括約7至9之pH之條件下，以高莫耳過量之烷基醯亞胺酯-活化聚乙二醇反應 α 與 γ 干擾素。公告號碼0 510 356之歐洲專利申請案敘述在7至9之pH共軛 α 干擾素及吡啶羰基與硫羰基活化之PEG。在這些揭示中並未提及離胺酸以外之胺基酸涉及共軛或對其為有利的。

儘管上述之揭示，大部份之干擾素-聚合物共軛物已因某種原因而被視為不可接受的。

本發明解決這些缺點。

發明之概要

在一種狀態，本發明包括含單-聚合物束 α 干擾素共軛物之混合物之藥學組合物。在混合物中，個別之單-聚合物-IFN共軛物定義為位置異構物，其視何種胺基酸殘基共



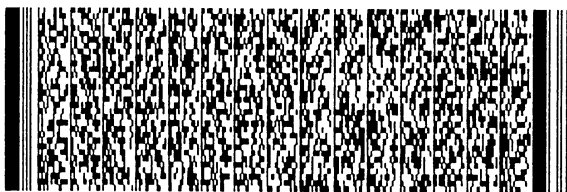
五、發明說明 (3)

價地連接聚合物而定。在此混合物內為在 α 干擾素上在組胺酸殘基與聚合物共價地共軛 α 干擾素之異構物。組合物部份由於至少約15%，而且較佳為至少約30%之干擾素共軛物，其包括作為組合物之部份，具有共價地連接 α 干擾素之組胺酸之聚合物之事實，而與先行產物有所區別。然而，較佳為共軛物或位置異構物為每個 α 干擾素含約一種聚合物束，不論聚合物在何處連接。

本發明之進一步狀態包括製備 α -干擾素共軛物之方法及此方法製備之組合物。IFN-聚合物共軛物藉由在足以進行聚合物對干擾素之共價連接之條件下，其至少部份對如His34之 α 干擾素之His殘基，以足量之氧基羰基-N-二羰醯亞胺-活化聚合物，如碳酸琥珀醯亞胺酯活化之PEG，反應含 α 干擾素之溶液而製備。部份之這些條件包括在足以利於干擾素分子之至少一部份聚合物束對組胺酸殘基胺基之共價連接之pH範圍內進行共軛反應。

適當之 α -干擾素包括自哺乳動物隔離之重組與非重組 α -干擾素。共軛物之聚合物部份較佳為聚氧化伸烷基(PAO)，如單乙氧基聚乙二醇(mPEG)。在替代具體實施例中，亦可使用其他之實質上非抗原性聚合物。聚合物較佳為具有約200至約35,000之分子量。

進行共軛之條件包括以相對 α -干擾素為約等莫耳對約相當少莫耳過量之活化聚合物進行連接反應。此條件進一步包括在小於約7之pH而且較佳為約4.5至約6.8之pH進行反應。



五、發明說明 (4)

本發明亦包括在哺乳動物容許條件處理 α -干擾素之方法。在此狀態中，處理包括將有效量之含在此所述IFN共軛物之組合物對需要此治療之哺乳動物投藥。

如同本發明之結果，已出乎意料地發現，干擾素-聚合物互軛組合物之額外改良為可能的。例如，藉由修改共軛條件，現在可得到含相當高活性單-聚合物IFN共軛物之組合物，其中一部份之 α 干擾素在獨特位置連接聚合物。此外，已發現在比一般用於共軛更酸之pH程度，以碳酸琥珀醯亞胺酯及一些相關之氧基羰基-N-二羰醯亞胺型活化聚合物，如SC-PEG，進行共軛反應，造成聚合物不僅在預期之IFN分子上之離胺酸位置，亦選擇性地在 α 干擾素上之組胺酸位置連接，如較佳之His34胺基酸。

為了本發明之較佳了解，參考以下之說明及圖式。

圖式之簡要說明

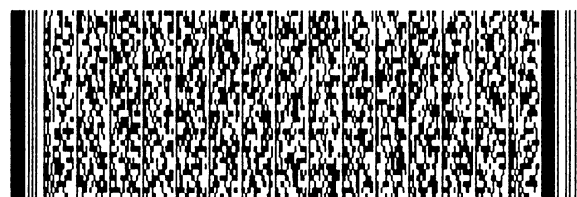
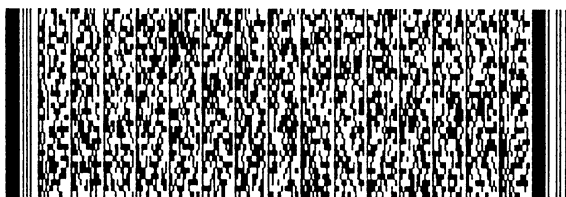
圖1為一系列參考實例11之層析圖。

圖2為一系列參考實例13之層析圖。

發明之詳細說明

1. 干擾素

聚合物共軛物之干擾素(IFN)部份可由許多來源製備或得到，其包括如使用E. coli中表現之合成基因之重組技術。亦參見Pestka在人類細胞分裂之"干擾素 α "，Blackwell科學刊物1-16(1992)，此揭示在此併入作為參考。此外，IFN亦可為哺乳動物來源萃取物，如人類，反芻或牛科 α IFN。一種特佳之IFN為IFN α -2b，紐澤西州

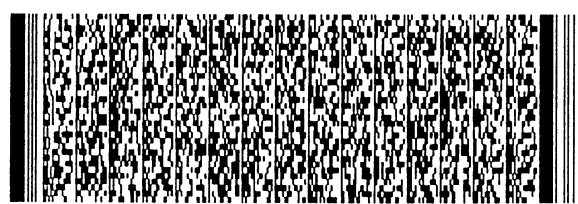
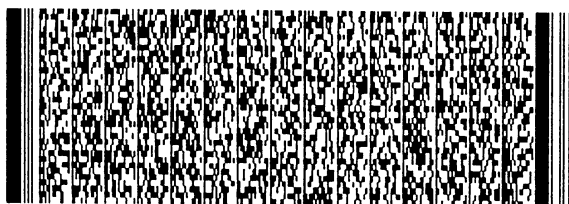


五、發明說明 (5)

Kenilworth之Schering公司之重組地製造之產物。

在此使用之名詞"干擾素"或"IFN"表示抑制濾過性病毒複製及細胞分裂增殖及調節免疫反應之高度同質物種-特定蛋白質族。人類干擾素基於其細胞源與抗原性歸類成三種： α -干擾素(白血球)、 β -干擾素(纖維母細胞)與 γ -干擾素(B細胞)。已發展各組之重組形式及為商業可得。各組之次型基於抗原性/結構特徵。至少24種具有獨特胺基酸序列之干擾素 α (歸類成次型A至H)已藉由隔離及將這些肽序列DNA編碼而證驗。亦參見Viscomi之1996生物治療10:59-86,其內容在此併入作為參考。在本申請案中交換地使用名詞" α -干擾素"、" α 干擾素"、"干擾素 α "及"人類白血球干擾素"以敘述此組之成員。天然發生與重組 α -干擾素可用於本發明之實務,其包括如敘述於美國專利4,897,471之共同干擾素,其內容在此併入作為參考。

干擾素 α 由自全血之緩衝塗料部份之人類白血球之純化敘述於美國專利4,503,035。以此方式製備之人類白血球干擾素含具有不同胺基酸序列之人類白血球干擾素之混合物。經純化之天然人類 α -干擾素及其可用於本發明之實務之混合物包括但不限於得自日本住友公司之Sumiferon干擾素 α -n1,得自英國倫敦之Glaxo-Wellcome有限公司之Wellferon 干擾素 α -n1(Ins),及得自康乃狄克州Norwalk之Purdue Frederick公司之Alferon 干擾素 α -n3。

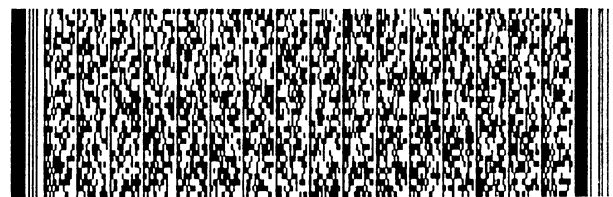
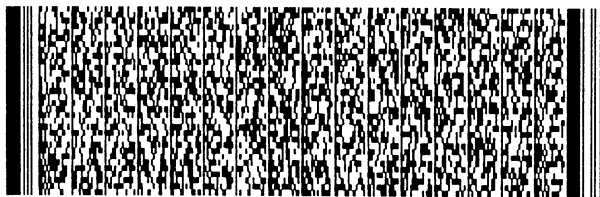


五、發明說明 (6)

應用於干擾素製造之重組DNA技術之來臨使得成功地合成許多人類干擾素，因而造成各種干擾素對同質之大規模激動，製造，隔離，及純化。重組地製造之干擾素保留其試管與活體抗濾過性病毒及免疫調節活性。亦應了解重組技術亦包括重組地衍生之多肽之碳水化合物部份加成之苷化位置。

重組DNA質體之構成，其含序列編碼至少部份之人體白血球干擾素與E. coli中表現之具有人體白血球干擾素之免疫或生物活性之多肽，揭示於美國專利4,530,901與歐洲專利EP 0 032 134。含不同次型序列之組合(例如，A與D，A與B，A與F)之混成 α -干擾素基因之構成，揭示於美國專利4,414,150、4,456,748與4,678,751。可用於本發明實務之典型之適當重組 α -干擾素包括但不限於干擾素 α -2b，如得自紐澤西州Kenilworth之Schering公司之Intron A，干擾素 α -2a，得自紐澤西州Nutley之Hoffmann-La Roche公司之Roferon A，及得自加州Thousand Oaks公司之Infergen。

如果需要，亦可使用其中外 α IFN未完全自身化之替代具體實施例。然而，關鍵為非自身化 α IFN在目標哺乳動物中具有足夠之生物活性或 α IFN效應，如抗濾過性病毒活性。包括 α IFN部份或原多肽之其他物質亦可包括於本發明之共軛物中。在此使用之"哺乳動物中之 α -IFN效應"表示對應以 α IFN觀察到之活體活性。這些物質藉由使用熟悉此技藝者已知之技術製備，如組織培育，自動物來源



五、發明說明 (7)

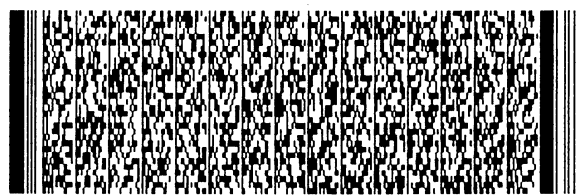
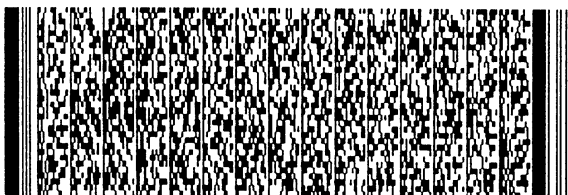
萃取或藉重組DNA方法。亦意圖 α IFN與相關部份之基因轉移來源。此物質得自基因轉移動物，即，老鼠，豬，牛等，其中 α IFN蛋白質表現於乳汁、血液、或其他組織中。製備 α IFN以用於本發明之共軛物之方法不限於在此所述者。為了本發明之目的， α IFN因為其生化與血清性質而較佳。特別地， α IFN已證明抗濾過性病毒性質及其他干擾素更有效地擴散至血統中。

2. 非抗原性聚合物

為了將IFN共軛至如聚(氧化伸烷基)之聚合物，聚合物羥基端基之一轉化成可共軛之反應性官能基。此方法經常稱為"活化"及產物稱為"活化"聚合物或活化聚(氧化伸烷基)。其他實質上非抗原性聚合物類似地"活化"或官能化。

活化之聚合物與 α IFN反應，使得連接發生在離胺酸之 ϵ -胺基，N-終端半胱胺酸胺基，及如下所述，在組胺酸之胺基。如果需要，自由羧基，適當地活化之羧基，氧化碳酸化合物部份，及如果在IFN上可得之硫醇部份，亦可作為補充連接位置。

在本發明之較佳狀態中，在 α IFN胺基酸胺基(即，離胺酸，組胺酸，N-終端)與活化之聚合物之間，形成胺甲酸乙酯(胺甲酸酯)鍵聯。較佳為，胺甲酸乙酯鍵聯使用終端氧基羧基-氧基-N-二羧醯亞胺基形成，如碳酸琥珀醯亞胺酯基。替代之活化基包括N-琥珀醯亞胺，N-酞醯亞胺，N-戊二醯亞胺，N-四氫酞醯亞胺與N-甲苄-2,3-二羧化物。



五、發明說明 (8)

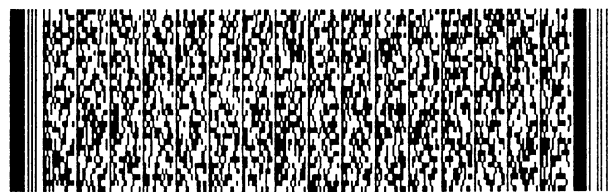
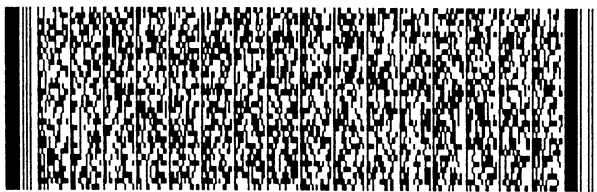
這些胺甲酸乙酯形成基敘述於共有之美國專利5,122,614，此揭示在此併入作為參考。此專利亦揭示包括亦可與離胺酸胺基目標形成胺甲酸乙酯鍵聯之聚乙二醇聚之氧化伸烷基之碳酸N-琥珀鹽亞胺酯衍生物。

其中實質上非抗原性聚合物，單活化，烷氧基終止聚氧化伸烷基(PAO)較佳，如單甲氧基-終止聚乙二醇(mPEG)。為了交聯 α IFN或提供連接其他部份之方法，如瞄準試劑以將聚合物- α IFN共軛物局限於特定區域，例如，肝，亦意圖雙-活化聚氧化伸烷基(二醇)。

適當聚合物實質上以重量比改變。為了本發明之目的，通常選擇具有範圍為約200至約35,000之分子數量平均分子量之聚合物。約1,000至約15,000之分子量較佳而且2,000至約12,500特佳。

包括之聚合物質在室溫為水溶性亦較佳。此聚合物之非限制性表列包括聚氧化伸烷基均聚物，如聚乙二醇(PEG)或聚丙二醇，聚氧化乙烯多元醇，其共聚物及其嵌段共聚物，其條件為維持嵌段共聚物之水溶性。除了mPEG，亦可使用C₁₋₄烷基終止聚合物。

至於PAO-衍生聚合物之替代，可使用有效非抗原性物質，如糊精，聚乙烷基吡咯啉酮，如HPMA-甲基丙烯酸羥基丙酯之聚丙烯鹽胺，聚乙醇醇，碳水化合物為主之聚合物，以上之共聚物等。熟悉此技藝者應了解，以上表列僅為描述性及意圖具有在此所述品質之所有聚合物物質。為了本發明之目的，"實質上或有效非抗原性"表示此技藝所



五、發明說明 (9)

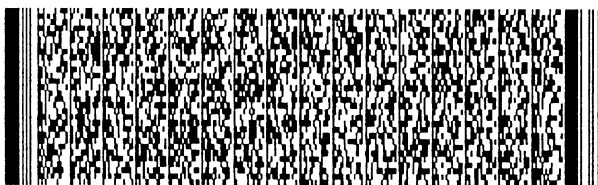
了解在哺乳動物中為非毒性及未誘出明顯免疫反應之所有物質。

3. 反應條件

共軛反應，有時稱為PEG化反應，經常在溶液中進行而無關聚合物在何處連接蛋白質。此技術亦通常在微鹼性進行以將 α IFN共軛，即，pH7+至約9。然而，本發明之關鍵為，如果聚合物連接至組胺酸，較佳為IFN α 2b上之His34，保留之IFN生物活性為最大。熟悉此技藝者應了解，雖然 α IFN之各種物質在胺基酸34可或不必具有組胺酸，干擾素共軛物較佳為包括至少一些含在可得組胺酸連接之聚合物之位置異構物。

本發明之方法因此包括在足以利於個別干擾素分子之至少一部份聚合物束，對如IFN α 2b之His34之組胺酸之共價連接之pH，以定量之氧基羰基-氧基-N-二羰醯亞胺-活化聚合物，如碳酸琥珀醯亞胺酯-活化mPEG，反應含 α 干擾素之溶液。特別地，pH較佳為微酸性，即，小於約7.0；更佳為，小於約6.8而且最佳為在約4.5至約6.8之範圍。

進行共軛之反應條件進一步包括以相對 α -干擾素為約等莫耳至約相當少量莫耳過量之活化聚合物進行連接反應。關於此點，此方法可使用約1-8倍莫耳過量；較佳為約1.5-7倍莫耳過量而且最佳為約1.75-5倍莫耳過量進行。共軛反應可在大約室溫20-25°C進行。亦較佳為可在驟冷之前進行偶合反應相當短之時間，即，1-2小時。實務上，此反應條件提供聚合物-IFN位置異構物之混合物。



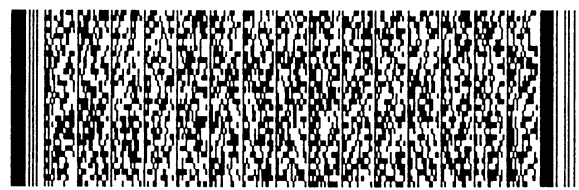
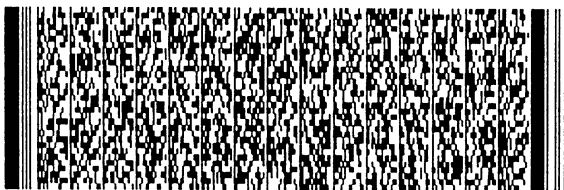
五、發明說明 (10)

較佳為，各異構物含經胺基酸殘基連接干擾素之單一聚合物束。在替代具體實施例中，可有超過一束之聚合物連接，如同此方法之結果。含這些共軛物之溶液亦可如此使用或進一步處理以基於分子量分離共軛物。

較佳聚合物束-IFN共軛物(異構物)經陽離子交換層析成為分離尖峰之特徵化顯示，聚合物可在IFN $\alpha 2b$ 分子上連接達約八個不同位置。這些表示個別位置異構物之位置為Cys1、Lys31、His34、Lys49、Lys83、Lys121、Lys131、Lys134。在一些較佳具體實施例中，含單-聚合物-IFN共軛物之反應池可含相當高比例之His位置異構物，即，約30-60%，約7-20%之Cys1位置異構物，及約7-15%之Lys121位置異構物，其餘為包含其餘之位置異構物。應了解替代之IFN提供位置異構物之替代性分布，其視起始物質之胺基酸序列而定。

由於溶液為主之共軛反應之本性，組合物為含在干擾素分子上不同位置之連接之聚合物束之物種之異質混合物。在含共軛物之任何溶液中，較易存在至少約3種，較佳為約6種而且更佳為約8種位置異構物之混合物。例如，在使用IFN $\alpha 2b$ 時，溶液含聚合物連接在干擾素之Cys1、Lys31、His34、Lys49、Lys83、Lys121、Lys131、與Lys134之一或更多之共軛異構物。在IFN $\alpha 2b$ 之情形及在此所述活化聚合物之較佳形式中，3個最顯著之連接位置為His34(55%)，Cys1(15%)與Lys121(15%)。

本發明之較佳組合物為IFN-聚合物異構物之混合物，其



五、發明說明 (11)

由至少約15%之His-聚合物取代-IFN組成。即，至少約15%之共軛物包含 α 干擾素對His之實質上非抗原性聚合物之共價連接。在本發明之更佳狀態中，至少約30%，而且在最佳狀態中，至少約40%之共軛物包含His34共價聚合物連接。在使用IFN α 2b或相關IFN時，組胺酸連接位置較佳為His34。

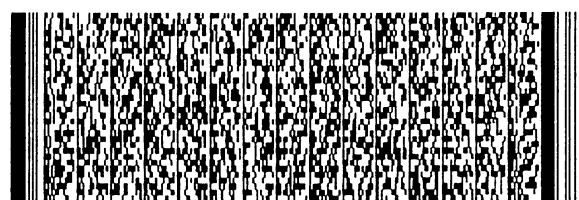
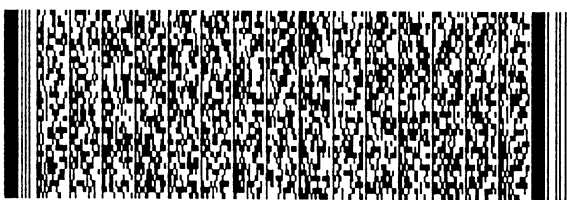
4. 反應pH對PEG-IFN位置異構物分布之影響

本發明之方法利用聚合物在 α 干擾素上連接之位置大受反應系統之pH影響之發現。隨著反應溶液之pH改變，朝向各種官能基，如 α -胺，咪唑與 ϵ 胺，之特定形式活化聚合物之反應性改變。一般而言，聚合物共軛反應在鹼性pH進行以使在離胺酸 ϵ 胺基之連接最大。例如，Zalipsky等人之生物技術與應用生化，第15卷，第100-114頁；

(1992)，評估用於PEG化之SC-PEG試劑，及報告最適反應性為在約pH 9.3。然而，本發明之方法包括在較低之pH進行反應，以使一部份之活化聚合物束連接組胺酸胺基及去顯著，但非排除離胺酸位置之連接。此外，亦已發現各種聚合物共軛物位置異構物之生物活性出乎意料地不同，即使在各位置異構物具有相同之聚合物取代程度時。

在此所述之方法提供新穎之聚合物連接，如PEG對IFN分子中之特定離胺酸殘基。在較佳具體實施例中，共軛反應生成大量之共軛物，即，至少約30%，在如IFN α 2b上之His34之IFN組胺酸位置鍵聯。

亦已出乎意料地決定位置異構物之相對分布大為視進行



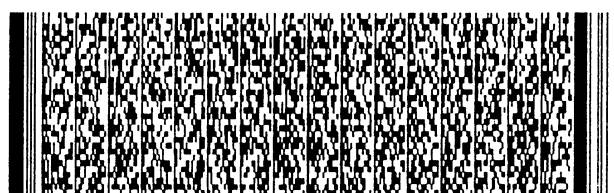
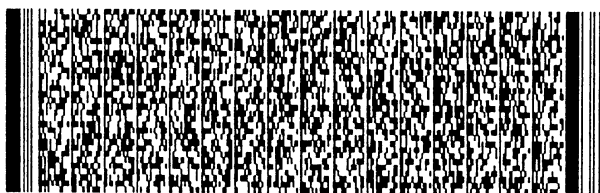
五、發明說明 (12)

共軛反應之pH而定。將pH由鹼性轉移至微酸性pH(5.5-6.5)，有利於在IFN α 2b上之His34，及較低程度之N-末端(Cys1)鍵聯之共軛物之形成。另一方面，在共軛反應時使用pH(8-10)，有利於離胺酸相關連接位置之形成，其經陽離子交換層析術證實。在未包括IFN α 2b之狀況中，His34位置當然並非總是存在。反應條件允許活化聚合物對His之共價連接。因此，申請人已證明反應系統之pH影響一些型式之活化聚合物對蛋白質表面之配置，特別是關於不同之胺基酸殘基(即，離胺酸相對N-末端胺相對組胺酸)。

5. 共軛物之分段

雖然本方法製造大量具有單一聚合物束之共軛物，亦產生具有不同聚氧化伸烷基取代程度之共軛物。亦可存在殘餘之未共軛PAO及 α IFN。此混合物一般為含一或更多種磷酸鹽、氯化物與碳酸氫鹽陰離子之反應緩衝液。PAO， α IFN與共軛物混合物較佳為在含約1-10毫克/毫升PAO- α IFN共軛物之緩衝溶液中分段。適當之分段溶液具有約7.0至約9.0，而且較佳為約7.5至約8.5之pH。溶液較佳為含一或更多種選自KCl、NaCl、 K_2HPO_4 、 KH_2PO_4 、 Na_2HPO_4 、 $Na_2H_2PO_4$ 、 $NaHCO_3$ 、 $NaBO_4$ 、 $(NH_4)_2CO_3$ 與甘胺酸NaOH之緩衝鹽。磷酸鈉緩衝液較佳。

視反應緩衝液而定，含 α IFN-聚合物共軛物之溶液可以首先進行緩衝液交換/超過濾。例如， α IFN共軛物溶液可經低分子量切斷(10,000至30,000道耳吞)薄膜過濾，其亦

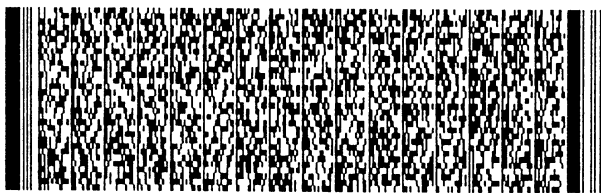


五、發明說明 (13)

去除大部份如果存在之界面活性劑。

共軛物成為所需物種之分段較佳為使用陰離子交換介質進行。此介質可選擇性地結合具有1-4個聚合物束之 α IFN-聚合物共軛物，過量聚合物與未改性 α IFN。此分段因為各種取代程度之 α IFN分子具有以稍可預測方式改變之等電點而發生。例如， α IFN之等電點由蛋白質表面上可得之可得胺基之數量決定。這些胺基亦作為聚氧化伸烷基共軛物之連接點。因此，隨聚氧化伸烷基之取代程度增加，等電點降低，且共軛物結合陰離子交換樹脂之能力減弱。

強極性陰離子交換樹脂之使用對本發明之方法特佳。因此，使用塗覆第四胺之陰離子交換樹脂。第四胺樹脂可塗覆在聚合或矽石基質上；然而，聚合基質較佳。許多塗覆在支撐基質上之四甲胺，或第四甲胺陰離子交換樹脂為商業可得的。其中適用於本發明之商業可得第四陰離子交換樹脂包括得自Bio-Septra公司之Q-HD；法國Garenne之IBF公司為麻州Marlborough之Sepracor公司製造之QA TRISACRYL 與QMA-SPHEROSIL，其為塗覆在聚合物基質上之第四胺樹脂；紐澤西州Gibbstown之EM-分離器公司製造之TMAE650M，其為塗覆在聚合物基質上之四甲胺基乙基樹脂；QAE550C 與SUPERQC，其各為塗覆在聚合物基質上之第四胺樹脂及由賓州Montgomeryville之TosoHaas公司製造。亦可使用麻州Millford之Millipore公司製造之QMA Accell，及紐澤西州Phillipsburg之JT Baker公司製造之PEI樹脂。



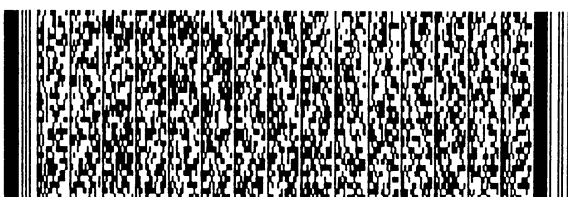
五、發明說明 (14)

陰離子交換樹脂充填於管柱中及以習知方法平衡。使用具有如共軛 α IFN 溶液之相同 pH 及滲透壓之緩衝液。含共軛物溶液然後吸附在管柱上。在裝載完成時，具有增加鹽濃度之溶析緩衝液之梯度流動應用於管柱以溶析聚氧化伸烷基-共軛 α IFN 之所需部份。此部份具有本質上均勻之分子量及取代程度。

較佳之 IFN 共軛部份每個 α IFN 分子具有 1-4 個聚合物束。較佳為，此部份每個 α IFN 分子含約 1-2 個，而且最佳為約 1 個聚合物束。溶析緩衝液較佳為含一或更多種選自 KCl 、 NaCl 、 K_2HPO_4 、 KH_2PO_4 、 Na_2HPO_4 、 NaH_2PO_4 、 NaHCO_3 、 NaBO_4 與 $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ 之鹽。這些部份實質上無其他共軛物。任何共軛物種然後藉習知技術由管柱反洗。

亦可使用利用增加濃度之多重等位階段之技術。增加濃度之多重等位溶析階段生成 α IFN-聚合物共軛物之循序溶析。各部份內之聚合物共軛程度為實質上均勻的。然而，各部份之聚合物共軛程度隨溶析時間降低。共軛物之離子交換純化亦可使用，例如，得自 Sepracor 公司之 Q-HD 管柱，及以稀磷酸鈉溶液 (10 mM NaPO_4 離子) 進行。樣品以 10 mM NaPO_4 清洗以去除任何未反應之 PAO 然後使用 NaCl 之階段梯度溶析。使用 10 mM NaCl 之溶析回收含每個 IFN 具有大於 3 個聚合物束 PAO 之共軛物之部份；使用 50 mM NaCl 之溶析回收含 1-2 個束之共軛物；使用 150 mM NaCl 回收未改性之 IFN。

溶析之溫度範圍為約 4°C 至約 25°C 。較佳為，溶析在約



五、發明說明 (15)

6 °C 至約 22 °C 之溫度進行。PAO- α IFN 部份藉由在 254 nm 之 UV 吸收偵檢。部份之收集可經簡單時間溶析外形完成。較佳之部份亦可存放在溶析緩衝液中。

6. 界面活性劑

在另一個較佳具體實施例中，反應條件包括界面活性劑之存在。用於本發明方法之界面活性劑為離子型試劑。一種特佳之試劑為十二基硫酸鈉(SDS)。亦可使用其他之離子性界面活性劑，如十二基硫酸鋰，第四銨化合物，牛膽酸，辛酸，癸烷磺酸等。亦可使用非離子性界面活性劑。例如，可使用如聚氧化乙烯葡萄糖醇(Tweens)，聚氧化乙烯醚(Tritons)之物質。亦參見清潔劑在生物與生化之性質與用途之導引(1992)，Calbiochem 公司。對用於本發明方法之界面活性劑之唯一限制為，其不造成 IFN 之大量變性及不完全抑制聚合物共軛。界面活性劑以約

0.01-0.5%；較佳為 0.05-0.5%；而且最佳為約 0.075-0.25% 之量存在於反應混合物中。亦意圖界面活性劑之混合物。

7. 藥學熱力學參數

如以上所指出，本發明之組合物含聚合物-IFN 物種之異質混合物，其中聚合物束在干擾素分子上之不同位置連接。儘管共軛物之異質本性，組合物具有使干擾素之治療效果為最大之可預測活體藥學熱力學外形。含 IFN α 之本發明組合物較佳為包括至少約 15% 之聚合物-His 共聚物，更佳為至少約 30% 而且最佳為至少約 40% 之聚合物-His 共聚



五、發明說明 (16)

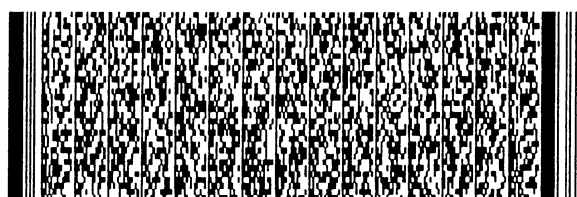
物。雖然申請人不受理論所束縛，據信包括於本發明組合物中之His-位置異構物之鍵聯比起Lys-位置異構物為相當不穩定的。結果，在生理pH，組合物證明在投藥後相當順利之開始及延長之效用期間。此外形使熟悉此技藝者以比未改性IFN較少之劑量將組合物投藥。

8. 治療之方法

本發明之另一種狀態提供各種在哺乳動物，較佳為人類之醫療病況之治療方法。此方法包括將有效量之含已知在此所述而製備之組合物之 α IFN-聚合物共軛物依此治療之需要對哺乳動物投藥。共軛物可用於對干擾素為主之治療陽性地或有利地反應之治療干擾素容許病況，如這些名詞在醫療技藝所已知。

依照本發明可治療之病況通常為容許使用干擾素 α 之治療者。例如，容許之病況包括對干擾素為主之治療陽性地或有利地反應之病況，如這些名詞在醫療技藝所已知。為了本發明之目的，可使用干擾素 α 治療之病況包括其中使用干擾素 α 之治療顯示一些效果，但是其可能無法使用干擾素 α 治療，因為負面副作用超過治療之益處之病況。例如，伴隨 α 治療之副作用已實際上排除使用干擾素 α 之Epstein Barr病毒治療。比較習知之干擾素 α 治療，本發明之實務生成實質上降低或排除副作用。

可使用干擾素治療之例示病況包括但不限於細胞分裂增殖失常，特別是癌症(例如，多毛細胞白血病，卡波季氏肉瘤，慢性骨髓白血病，多重骨髓瘤，根細胞瘤與惡性黑



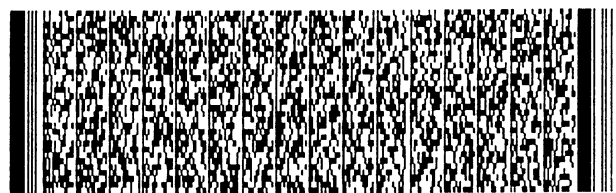
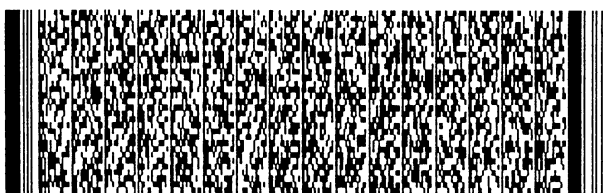
五、發明說明 (17)

素瘤，卵巢癌，皮膚T細胞淋巴腺瘤)，及濾過性病毒感染。使用干擾素之治療可用以治療由抑制對干擾素敏感之病毒之複製受益之病況而無限制。可依照本發明治療之濾過性病毒感染包括A型肝炎，B型肝炎，C型肝炎，其他非-A/非-B型肝炎，疱疹病毒，Epstein-Barr病毒(EBV)，細胞巨化病毒(CMV)，單純疱疹，人類疱疹病毒第6型(HHV-6)，乳狀瘤，痘病毒，細小核糖核酸病毒，腺病毒，鼻病毒，人類T型淋巴組織病毒-第1與2型(HTLV-1/-2)，人類轉病毒，狂犬病，反轉病毒，其包括人類免疫缺乏病毒(HIV)，腦炎與呼吸病毒感染。本發明之方法亦可用以修改各種免疫反應。

干擾素 α 之變體目前在美國及其他國家許可以用於多毛細胞白血病，靜脈瘤，卡波季氏肉瘤，及慢性非-A/非-B型肝炎之治療；以商標名INTRON[®] A上市(紐澤西州Kenilworth之Schering公司)之干擾素 α -2b，與以商標名Roferon[®] A上市(紐澤西州Nutley之Hoffmann-La Roche公司)之干擾素 α -2a，及以商標名Infergen[™]上市(加州Thousand Oaks之Amgen公司)之共同干擾素。由於所有之干擾素中，干擾素 α -2b在全世界具有最廣泛之許可以用於慢性C型肝炎感染，其依照本發明之實務用於慢性C型肝炎之治療最佳。

所述劑量之投藥可為每隔一天，但是較佳為一週一次或兩次。藥劑通常為藉注射投藥超過至少24週期間。

藥劑之投藥可為靜脈內，皮下，肌肉內，或任何其他可

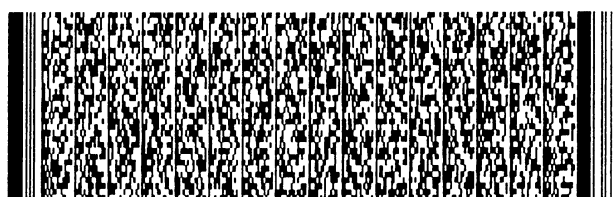
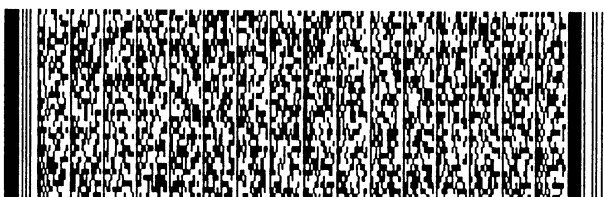


五、發明說明 (18)

接受之全身方法。基於照料之臨床醫師之判斷，投藥之藥量及治療方法當然視被治療病人之年齡、性別與醫療歷史，嗜中性計數(例如，中性粒細胞減少之嚴重性)，特定疾病病況之嚴重性及病人對治療之容忍度，如由局部毒性與全身副作用所證明。劑量與頻率可在嗜中性計數之起初篩選時決定。

在使用本發明之共軛物組合物時亦可製備習知藥學配方。此配方包含治療有效量之干擾素-聚合物共軛物組合物與藥學上可接受載體。例如，如果需要，佐藥，稀釋劑，防腐劑及/或安定劑可用於本發明之實務中。包括本發明之干擾素之藥學組合物可包括各種緩衝液之稀釋劑(例如，Tris-HCl，乙酸鹽，磷酸鹽)，其具有一定範圍之pH及離子強度，載體(例如，人類血清蛋白)，安定劑(例如，非離子活性劑，聚花楸酸鹽)，及防腐劑(例如，硫柳汞醇， β -醇)。例如，參見美國專利4,496,537。

投藥以治療上述病況之 α -IFN聚合物共軛物之量為基於聚合共軛物之IFN活性。其為足以進行正面診斷反應之量。雖然診斷劑量在一些病人造成一些程度之副作用，對於包括人類之哺乳動物之最大劑量為不造成無法控制之診斷上重要副作用之最高劑量。為了本發明之目的，此診斷上重要之副作用為由於嚴重之流行性感冒症狀，中樞神經系統衰弱，嚴重之腸胃失常，禿頭，嚴重之癬癢症或發疹而需要中止治療者。大量白及/或紅血球細胞及/或肝酵素異常或貧血狀病況亦應限制劑量。



五、發明說明 (19)

自然地，各種 α IFN 組合物之劑量視 α IFN 部份與所選擇聚合物而稍微不同。然而，通常共軛物以基於哺乳動物病況，範圍為每日約 100,000 至約數百萬 IU/平方米之量投藥。上述之範圍為描述性且熟悉此技藝者可基於診斷經驗與治療指示決定所選擇共軛物之最適劑量。

藥學組合物可為依照此技藝已知之方法製備之溶液，懸浮液，藥錠，膠囊，凍乾粉末等之形式。亦意圖此組合物之投藥主要為非腸道路徑，雖然視熟悉此技藝者之需要而亦可使用口服或吸入路徑。

實例

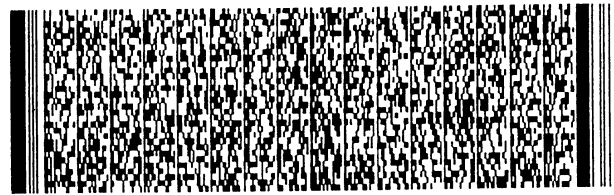
以下實例用以提供本發明之進一步瞭解，但在任何方面均不表示限制本發明之有效範圍。

實例 1

$r \alpha$ IFN-PEG_{5,000} 在 SDS(0.1%) 之存在下之製備

在此實例中，重組 α IFN-2b($r \alpha$ IFN)，紐澤西州 Kenilworth 之 Schering-Plough 公司之產品，與如美國專利 5,122,614 所述之活化聚乙二醇-N-碳酸琥珀醯亞胺酯 (SC-PEG) 共軛。聚合物具有約 5,000 之分子量。

36 毫克之 $r \alpha$ IFN 使用 Centricon-10 (麻州 Beverly 之 Amicon 公司之產品) 滲析至 pH 7.5 之 0.1 莫耳磷酸鈉中。 $r \alpha$ IFN 之最終濃度為約 3 毫克/毫升。0.1 毫升之 10% SDS 加入 $r \alpha$ IFN 及在室溫培育 10 分鐘。然後，42 毫克之 SC-PEG_{5,000} 加入蛋白質-SDS 溶液及在室溫攪拌兩小時然後以甘油驟冷。其次，反應混合物使用 Centricon-30 滲析至



五、發明說明 (20)

pH 8 之 10 mM 磷酸鈉以將 PEG 化 IFN 分段。

實例 2

r α IFN-PEG_{12,000} 在 SDS (0.1%) 之存在下製備

在此實例中，重複實例 1 之步驟，除了聚乙二醇具有約 12,000 之分子量。反應步驟確實地相同以提供 PEG_{12,000} 共軛物。

實例 3

2PEG_{5,000} r α IFN 之分段

在此實例中，依照實例 1 製備之共軛物分段而得到所需之 2-PEG_{5,000} 部份。磷酸鈉緩衝液中之 PEG- α IFN 裝在 QHD 陰離子交換管柱上。2-PEG 部份以 0 至 400 mM 氯化鈉於 pH 8 之 10 mM 磷酸鹽之梯度溶析。2-PEG 部份使用大小排除層析術與 SDS-PAGE 證驗。

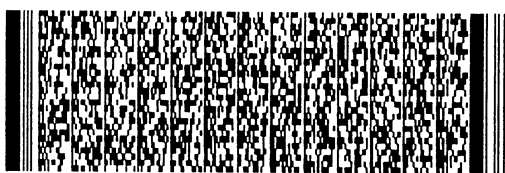
實例 4

2PEG_{12,000} r α IFN 之分段

實例 2 之聚合物共軛物以實例 3 所述之方法分段及以相同之方法證驗。

實例 5-8

在這些實例中，如前所述製備額外之 PEG_{12,000}-r α IFN 製品，除了未使用界面活性劑。共軛反應後，試驗樣品之保留活性與 PEG 數量。結果提供於下表。



五、發明說明 (21)

表 1

IFN-PEG _{12,000} 製備	對照之活性(CPE)%	PEG#
實例 6	26	1.2
實例 7	26	1.3
實例 8	24	1.0

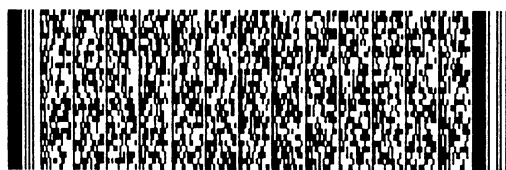
實例 9

比較數據

在此實例中，試驗實例 3 之產物(SDS-2-PEG_{5,000} r α IFN)，無界面活性劑而製造之 2-PEG_{5,000} r α IFN 及未共軛之 r α IFN。使用 CPE 檢驗以 EMC 病毒挑戰 A549 人類肺癌細胞而測定活性。使用由接受 1 百萬單位之組之 3 隻老鼠得到之平均值測定循環壽命，時間點取為超過 7 日。

表 2

	活性(%)	濾過性病毒保護檢驗 IC ₅₀ (pg/ml)	循環半生期 α 相 (HRS.)
A. IFN-SDS 2-PEG _{5,000}	69	2.2	5.8
B. IFN-PEG _{5,000}	30	4.0	6.8
C. IFN	100	1.5	0.17



五、發明說明 (22)

此數據明確地顯示本方法之優點。保留活性超過使用標準技術得到之兩倍。

實例10

在此實例中，使用依照上述方法製備之2PEG-r α IFN 共軛物產生各種藥學熱力學數據。這些樣品比較依照表4所述協定之未改性IFN。以SDS製備樣品B。

表3
保留活性

樣品	PEG 分子量	CPE 活性(對照%)
A	5,000	35
B	5,000	69
C	12,000	26
D	12,000	26

例如：

表4

藥學熱力學協定

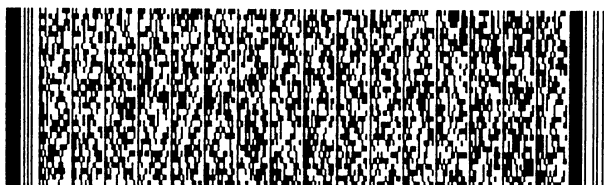
動物：Sprague Dawley(3隻老鼠/時間點)

劑量： 10×10^6 UN IFN/鼠

路徑：皮下(S.C.)

藥物：2-PEG-IFN α 之5,000與12,000莫耳重量PEG

時間點：藥物投藥後0分鐘，5分鐘，15分鐘，30分鐘，1小時，2小時，4小時，8小時，24小時，48小時，5日，及7日。



五、發明說明 (23)

檢驗：在EMC病毒與A549人類肺癌使用血清樣品之CPE檢驗。

AUC=曲線下面積， $C_{\max}$ ， $T_{1/2\alpha}$ ， $T_{1/2\beta}$ -均具有熟悉此技藝者一般所認為之意義。

表 5 與 6

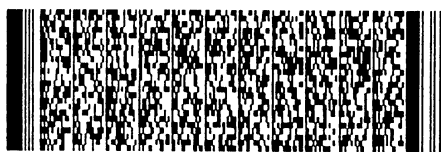
PEG-干擾素之藥學熱力學數據之概要

表 5

樣品	IC ₅₀ (pg/ml)	活性%	AUC	Cmax (IU/ml)
原生 IFN α	1.52 pg/ml (N=6)	100%	145,720	60,000
A	4.0 pg/ml (N=3)	35%	348,920	24,433
B	2.2 $\pm$ 0.5 pg/ml (N=3)	69%	351,037	-
C	5.8 $\pm$ 2.2 pg/ml (N=3)	26%	1,574,682	62,750

表 6

樣品	T _{max} (hr)	T _{1/2} α 相(hr)	T _{1/2} β 相(HR)
原生 IFN α	1	0.17	-
A	4	6.8	48
B	2-3	5.8	-
C	8	12.1	33



五、發明說明 (24)

以上之數據提供以下之結論：

以5,000與12,000分子量製備之2-PEG-r α IFN共軛物在哺乳動物具有優於未改性干擾素之獨特優點。在皮下投藥組合物之情形， $T_{\max}$ 因蛋白質與約2PEG之共軛而實質上增加。對於慢性病況，希望較長之 $T_{\max}$ 及使臨床醫師由於效用期間之加長而放大重複投藥。然而，甚至更出乎意料的為2-PEG_{12,000}共軛物可出乎意料地增加AUC超過10倍之事實。此曲線下面積之戲劇性增加並未與額外聚合物重量成比例。顯然治療優點因此出乎意料之增加而實現。

實例11

pH對PEG化之影響

為了探測此影響，在四個不同之pH，5.4，6.5，8.0與10.0，使用mPEG_{12,000}（無界面活性劑）重複實例5-8之聚合物共軛（PEG化）反應。在pH 5.4，6.5與8.0，2.6克之SC-PEG_{12,000}對1克之IFN之比例（莫耳比例3.9：1）用於反應，及在pH 10使用2.1克之SC-PEG_{12,000}對1克之IFN之比例（莫耳比例3.2：1）。反應結束時，加入甘油以驟冷任何殘餘之PEG化試劑。得自各反應之產物然後在pH 8使用Q-hyper D樹脂以鹽溶析純化以去除未反應之成份。

評估在不同之pH得到之純化共軛物之生物活性，羥基胺敏感性及位置異構物之比例。生物活性由特定活性（MTT-CPE檢驗）測定。

進行羥基胺活性以測定多少百分比之共軛物在組胺酸位置PEG化，其包括IFN-His34。羥基胺為已發現選擇性地將

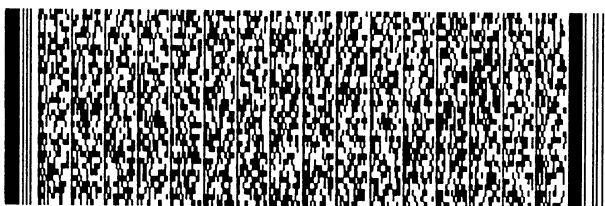
五、發明說明 (25)

PEG自IFN組胺酸分離之已知試劑。一等份量之各樣品(50 μ l)以pH 7.0之0.45毫升10 mM磷酸鈉稀釋。一等份量之此蛋白質溶液(150 μ l)以150 μ l之0.5M羥基胺處理及在室溫培育60分鐘。然後，75 μ l之體積裝在Mini-S管柱上(Pharmacia生物技術)以用於陽離子交換層析術。移動相A包括pH 5.3之10 mM乙酸鈉緩衝液及25%之2-丙醇。移動相B含500 mM之氯化鈉溶於移動相A。流速設為0.5毫升/分鐘及在214 nm偵檢溶析之蛋白質。個別之PEG-IFN溶液以pH 5.3之10 mM乙醇鈉溶液稀釋至1毫克/毫升蛋白質濃度，其含2-丙醇(5%)。注射體積範圍為10至30 μ l，其視蛋白質濃度而定。使用線性梯度。結果敘述於以下之表7及圖1。

圖1顯示得自不同pH反應產物之Mono-S陽離子交換層析術管柱之層析圖之重疊。各位置異構物之聚合物共軛之位置藉得自陽離子交換層析術之個別尖峰使用蛋白解酵素(胰蛋白酶，V8-蛋白酶，胰凝乳蛋白酶或枯草溶菌素)之消化，PEG化碎片之隔離，及N-終端序列之分析與質譜而測定。

如在圖中所見到，位置異構物之分佈隨反應pH之改變而重大地改變。pH越高，製造之His34-鍵聯之PEG-IFN越少，及Cys1-鍵聯之PEG-IFN產物戲劇性地越少。

表7歸納使用用於IFN之MTT-CPE生物檢驗測定之特定生物活性，及在25℃對不同之共軛物產物以0.5M羥基胺處理時釋放之IFN之量。這些發現證實在圖1中見到之差異亦有關產物之不同生物特徵。在共軛在較高之pH(即，8或10)



五、發明說明 (26)

進行時，形成之產物較不生物活性及較抗羥基胺，其因此表示在較高之pH，較少之聚合物在His34上。

表 7

在不同之 pH 產生之 PEG-IFN 之生物活性與羥基敏感性

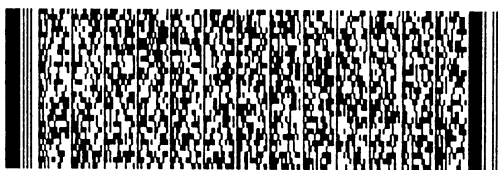
反應 pH	特定活性(CPE 檢驗) MIU/mg	藉羥基胺轉化成 IFN 之共軛物%
5.4	61.8	56%
6.5	74.5	47%
8.0	33.3	8%
10.0	27.8	<1%

以上之結果包括pH為共軛反應之主要變數，及位置異構物之相對分布隨pH戲劇性地改變。出乎意料地，位置異構物之生成PEG-IFN混合物之生物活性亦受影響。

實例12

胺甲酸乙酯鍵聯形成活化聚合物之比較

在此實例中，使用不同型式之胺甲酸乙酯鍵聯劑比較pH對反應條件之影響，以看看活性基在測定聚合物連接位置與生物活性是否具有任何角色。特別地，用於前例之甲氧基聚(乙二醇)-碳酸琥珀醯亞胺酯MW 12,000 (SC-PEG_{12,000})比較美國專利5,382,657揭示之甲氧基聚(乙二醇)-碳酸琥珀醯亞胺酯MW 12,000 (PC-PEG_{12,000})，作為用於干擾素 α -2b(IFN)之活化聚合物試劑。在pH 6.5與



五、發明說明 (27)

10.0，對各試劑SC-PEG_{12,000}與PC-PEG_{12,000}進行共軛反應。

用以產生用於分析之4個單位PEG化IFN樣品之條件為

1)SC-PEG_{12,000} @ pH 6.5；2)PC-PEG_{12,000} @ pH 6.5；

3)SC-PEG_{12,000} @ pH 10.0；4)PC-PEG_{12,000} @ pH 10.0。在

各pH 6.5之情形，使用3.9至1莫耳比例之PEG：IFN。在各pH 10.0之情形，使用3.2至1莫耳比例之PEG：IFN。選擇這些條件以評估反應pH與鍵聯劑對最終產物之組合物之影響。

回收得自各反應條件之共軛物質及試驗生物活性(CPE檢驗)及使用層析術檢驗試驗位置異構物之分佈。

在pH 6.5以PC-PEG_{12,000}反應IFN產生之PEG-IFN具有比以SC-PEG_{12,000}完成為低之生物活性，儘管兩種試劑均形成胺甲酸乙酯鍵。因此，其顯示儘管鍵聯劑間之類似，SC-PEG，氧基羰基-氧基-N-二羰醯亞胺-活化聚合物，更佳地連接至His34。然而，令人感興趣地，藉由在pH 10以PC-PEG_{12,000}與SC-PEG_{12,000}進行反應產生之PEG-IFN產物均具有類似之生物活性。然而，在兩者之情形，活性均比SC-PEG_{12,000}在pH6.5得到為低。

Mini-S層析術檢驗顯示組胺酸-34-鍵聯之PEG-IFN為在pH 6.5使用SC-PEG_{12,000}時存在之主要位置異構物。離胺酸-12-鍵聯之PEG-IFN為在pH 6.5使用PC-PEG_{12,000}時存在之主要位置異構物。在pH 10，離胺酸-121-鍵聯之PEG-IFN為使用各試劑之主要產物。參見表8。

因此，酸性pH及氧基羰基-氧基-N-二羰醯亞胺-活化聚



五、發明說明 (28)

合物，即，SC-PEG，製造其為獨特產物之共軛物，其無法藉由以SC-PEG_{12,000}取代如PC-PEG_{12,000}之另一種胺甲酸乙酯鍵形成活化聚合物而再現。

以上之物質含總共少於5%之二-PEG及多-PEG-IFN，如大小排除HPLC檢驗所示。

表 8
MiniS 檢驗結果之概要
尖峰號碼-(面積百分比)

樣品	1	2	3	4	5	6	7	8
SC-PEG; pH6.5	2.1	6.3	ND	0.7	11.8	5.6	3.4	13.3
PC-PEG; pH6.5	ND	4.8	9	9.6	33.8	13	3.8	25.9
SC-PEG; pH10	ND	ND	14.8	11.2	57.6	9.5	3.1	3.8
PC-PEG; pH10	ND	ND	9.6	13.8	51.7	13.7	3.5	7.8

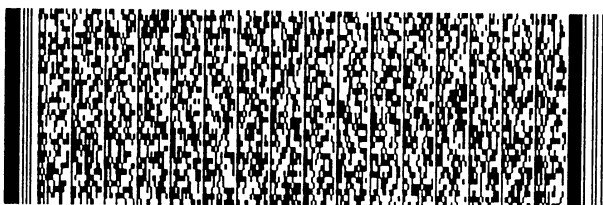
ND：未偵檢

尖峰指定：尖峰2：His-34鍵聯之PEG-IFN；尖峰4：Lys-31鍵聯之PEG-IFN；尖峰5：Lys-121鍵聯之PEG-IFN；尖峰6：Lys-49鍵聯之PEG-IFN；尖峰7：Lys-83鍵聯之PEG-IFN；尖峰8：N-終端(半胱胺酸)鍵聯之PEG-IFN。

實例13

陽離子交換層析術特徵

在此實例中，使用陽離子交換層析術進行使用實例11之步驟(pH 6.5)製造之許多PEG-IFN產物之批料之分析分離，以測定聚合物連接位置及證驗個別之位置異構物。陽



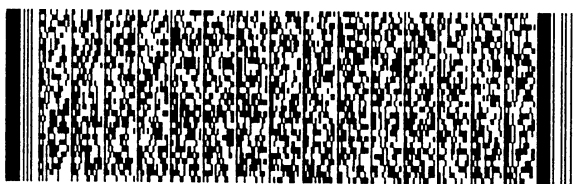
五、發明說明 (29)

離子交換裝置為Mini-S管柱(Pharmacia生物技術公司)。移動相A包括pH 5.3之10 mM 乙酸鈉緩衝液及25%2-丙醇。移動相B含500 mM之氯化鈉溶於移動相A。流速設為0.5毫升/分鐘及在214 nm偵檢溶析之蛋白質。個別之PEG-IFN溶液以pH 5.3之10 mM 乙醇鈉溶液稀釋至1毫克/毫升蛋白質濃度，其含2-丙醇(5%)。注射體積範圍為10至30 μ l，其視蛋白質濃度而定。

使用以下之線性梯度：

時間(min)	A(%)	B(%)
0	100	0
5	93	7
50	83	17
60	0	100
65	0	100
66	100	0
75	100	0

結果提供於以下表9及圖形地描述於圖2。



五、發明說明 (30)

表 9

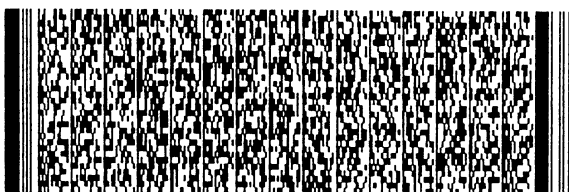
陽離子交換層析術之 PEG-IFN 批料之面積百分比定量

尖峰 1	尖峰 2	尖峰 3/4	尖峰 5	尖峰 6	尖峰 7a	尖峰 7b	尖峰 8
1	2.6	53.2	5.3	14.2	6.5	3.4	17.2
2	1.5	54.7	3.3	12.6	6.1	3.2	18.6
3	1.6	55.3	2.4	11.9	5.5	3.2	20.1
4	1.7	55.1	2.6	11.6	5.3	3.1	20.5
5	1.7	54.3	2.7	11.8	5.6	3.2	20.7
6	1.7	54.5	2.6	11.8	5.3	2.9	21.1
7	1.9	54.2	2.3	11.6	5.2	3.2	21.5

主要尖峰指定：尖峰 2：His-134 鍵聯之 PEG-IFN；尖峰 3/4：His-34 鍵聯之 PEG-IFN；尖峰 6：Lys-121 鍵聯之 PEG-IFN 與 Lys-131 鍵聯之 PEG-IFN；尖峰 8：Cys-1 鍵聯之 PEG-IFN。

結果描述大部份之共軛物發現於尖峰 3 與 4 (His-34 鍵聯之 PEG-IFN)。結果亦顯示相對於所預期，大部份之共軛物為藉由將聚合物連接至組胺酸而非離胺酸胺基之一而形成。

由在此所揭示之本說明書或本發明之實務之考量，本發明之其他具體實施例對熟悉此技藝者為明顯的。意圖使說明書與實例僅視為例示，本發明之真正範圍及精神由以下申請專利範圍指示。

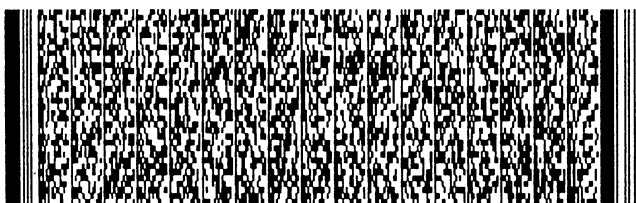


四、中文發明摘要 (發明之名稱：經改良之干擾素聚合物共軛物)

茲揭示與實質上非抗原性聚合物共軛之含 α 干擾素組合物，其中至少約30%之共軛物包括 α 干擾素對在組胺酸之實質上非抗原性聚合物之共價連接。亦揭示一種方法以製備共軛物。此方法包括在足以利於在 α 干擾素之組胺酸之聚合物之共價連接之pH，以碳酸琥珀鹽亞胺酯活化之實質上非抗原性聚合物接觸 α 干擾素。

英文發明摘要 (發明之名稱：IMPROVED INTERFERON POLYMER CONJUGATES)

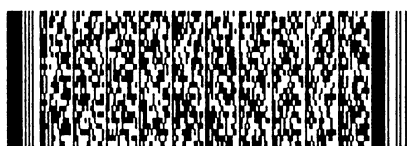
Compositions containing alpha interferon conjugated to a substantially non-antigenic polymer are disclosed in which at least about 30% of the conjugates include covalent attachment of the alpha interferon to the substantially non-antigenic polymer at a histidine. Also disclosed is a process for preparing the conjugates. The process includes contacting an alpha interferon with a succinimidyl carbonate-activated substantially non-antigenic



四、中文發明摘要 (發明之名稱：經改良之干擾素聚合物共軛物)

英文發明摘要 (發明之名稱：IMPROVED INTERFERON POLYMER CONJUGATES)

polymer at a pH which is sufficient to facilitate covalent attachment of the polymer on a histidine of the alpha interferon.



3.212.16

圖式

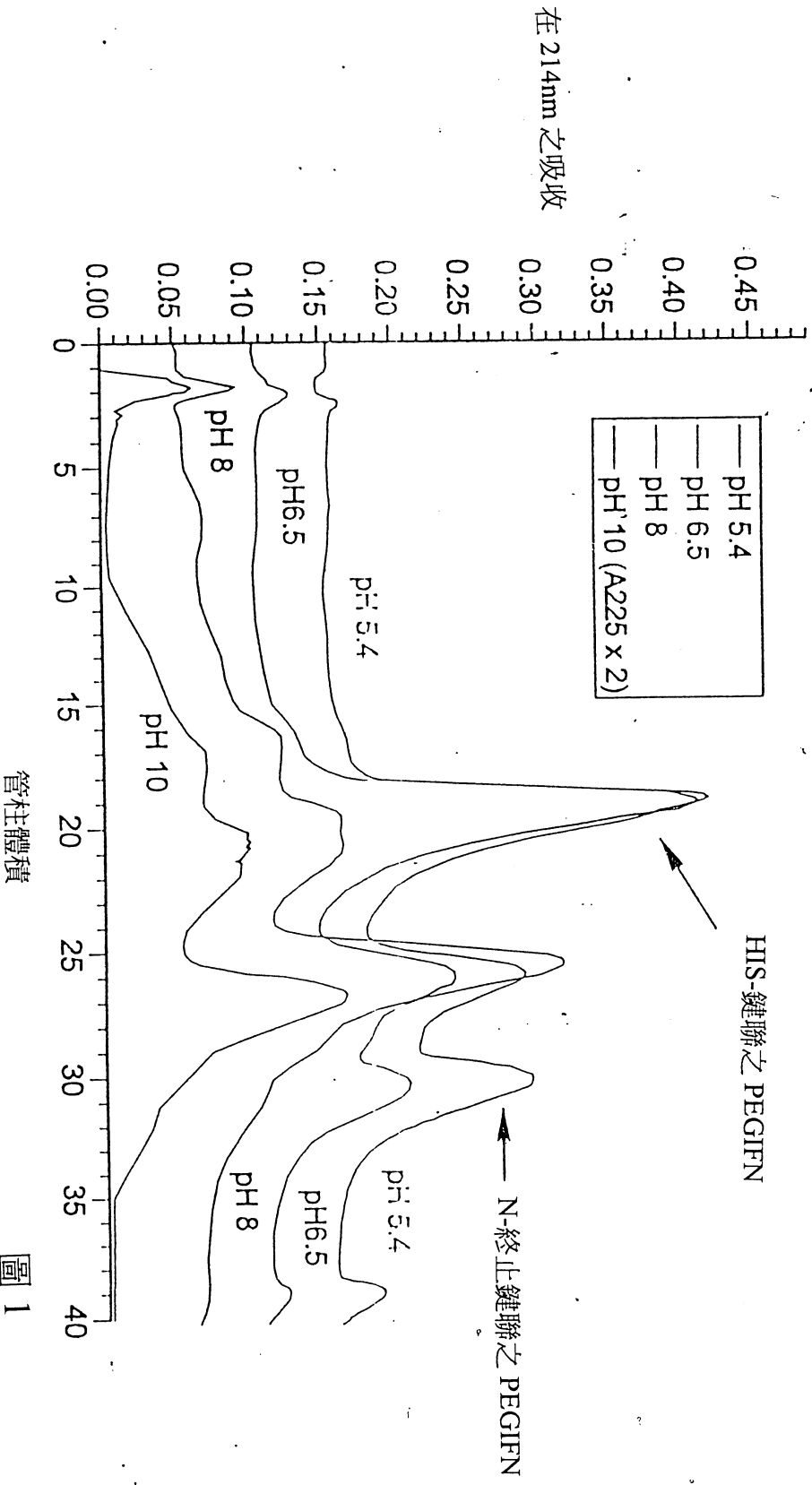
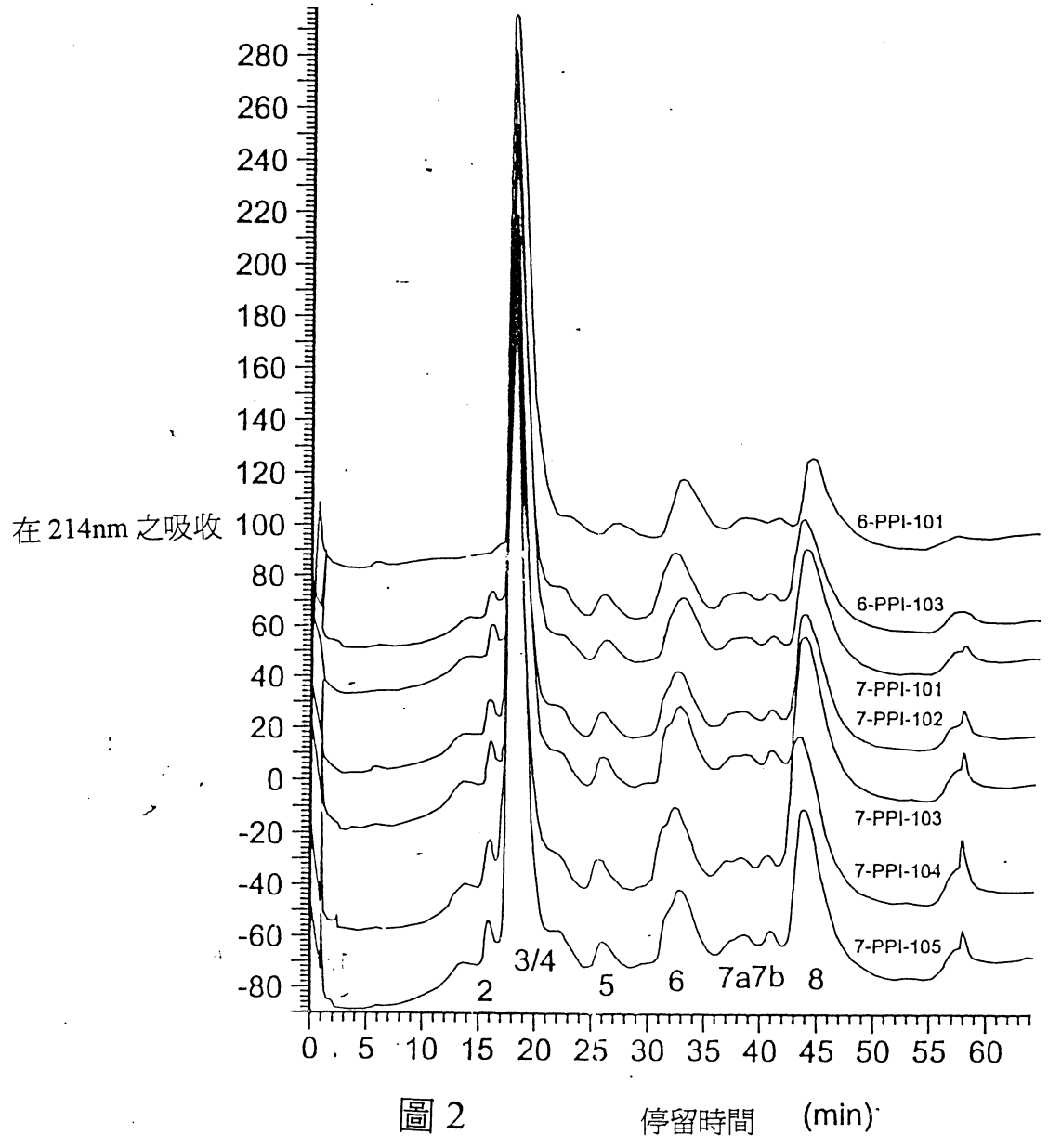


圖 1

圖式



90年12月28日

修正

申請日期：87.12.18

案號：87121219

類別：

A61K 38/21, C07K 1/13, 14/56

90年12月28日

修正
補充

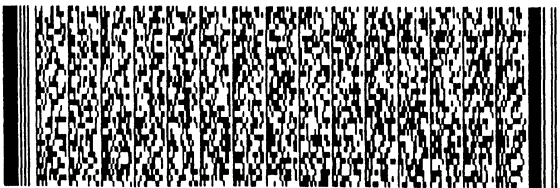
公告本

(以上各欄由本局填註)

發明專利說明書

570802

一、 發明名稱	中文	經改良之干擾素聚合物共軛物
	英文	IMPROVED INTERFERON POLYMER CONJUGATES
二、 發明人	姓名 (中文)	1. 卡爾 威 吉伯特 2. 蒙克 派克喬
	姓名 (英文)	1. CARL W. GILBERT 2. MYUNG-OK PARK-CHO
	國籍	1. 美國 2. 韓國
	住、居所	1. 美國喬治亞州包德史普林市歐克來斯曼諾路4655號 2. 韓國土邦古區誠東市A大廈東基路1-207號
三、 申請人	姓名 (名稱) (中文)	1. 美國先靈大藥廠
	姓名 (名稱) (英文)	1. SCHERING CORPORATION
	國籍	1. 美國
	住、居所 (事務所)	1. 美國新澤西州凱利佛市格羅賓希爾路2000號
	代表人 姓名 (中文)	1. 艾德華·梅哲
	代表人 姓名 (英文)	1. EDWARD H. MAZER



六、申請專利範圍

1. 一種用於治療哺乳動物受 α 干擾素影響病況之醫藥組合物，其包含 α 干擾素聚合物共軛物位置異構物之混合物，其中該位置異構物中之一包含以組胺酸殘基與實質上非抗原性聚合物共價共軛之 α 干擾素；其中該實質上非抗原性聚合物具約200至約35,000之分子量；且

其中該非抗原性聚合物包含聚氧化伸烷基。

2. 根據申請專利範圍第1項之醫藥組合物，其中該 α 干擾素係為干擾素 $\alpha 2b$ 。

3. 根據申請專利範圍第2項之醫藥組合物，其中該組胺酸殘基係為His34。

4. 根據申請專利範圍第1項之醫藥組合物，其中該 α 干擾素位置異構物之混合物包含至少約3個位置異構物。

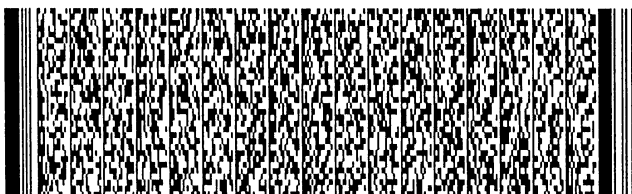
5. 根據申請專利範圍第4項之醫藥組合物，其中該 α 干擾素位置異構物之混合物包含至少約6個位置異構物。

6. 根據申請專利範圍第5項之醫藥組合物，其中該 α 干擾素位置異構物之混合物包含至少約8個位置異構物。

7. 根據申請專利範圍第6項之醫藥組合物，其中該干擾素係為 α 干擾素2b，且該位置異構物係選自由Cys1、Lys31、His34、Lys49、Lys83、Lys121、Lys131及Lys134所組成之群。

8. 根據申請專利範圍第1至7項中任一項之醫藥組合物，其中該非抗原性聚合物係為烷氧基終端之聚氧化伸烷基。

9. 根據申請專利範圍第8項中之醫藥組合物，其中該聚



六、申請專利範圍

氧化伸烷基係為聚乙二醇。

10. 根據申請專利範圍第8項中之醫藥組合物，其中該聚氧化伸烷基係為單甲氧基-聚乙二醇(mPEG)。

11. 根據申請專利範圍第1項中之醫藥組合物，其中該實質上非抗原性聚合物具約1,000至約15,000之分子量。

12. 根據申請專利範圍第11項中之醫藥組合物，其中該實質上非抗原性聚合物具約2,000至約12,500之分子量。

13. 一種用於製備用於治療哺乳動物受 α 干擾素影響病況之醫藥組合物之 α 干擾素-含有組合物，其包含多種 α 干擾素聚合物共軛物，其中至少約15%之該共軛物包括實質上非抗原性聚合物與 α 干擾素之組胺酸殘基共價連結；其中該實質上非抗原性聚合物具約200至約35,000之分子量；且

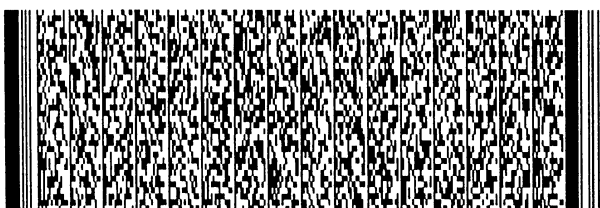
其中該非抗原性聚合物包含聚氧化伸烷基。

14. 根據申請專利範圍第13項之組合物，其中該組合物之 α 干擾素部分係為 α 干擾素2b，且該組胺酸係為His34。

15. 根據申請專利範圍第13項之組合物，其中至少約30%之該共軛物包括實質上非抗原性聚合物與 α 干擾素之組胺酸-34共價連結。

16. 根據申請專利範圍第15項之組合物，其中至少約40%之該共軛物包括實質上非抗原性聚合物與 α 干擾素之組胺酸-34共價連結。

17. 一種用於治療哺乳動物受 α 干擾素影響病況之醫藥組合物，其包含 α 干擾素2b-聚合物位置異構物之混合



六、申請專利範圍

物，其中約30%至約60%之該位置異構物包括實質上非抗原性聚合物共軛至 α 干擾素之His34，約7%至約20%之該位置異構物包括實質上非抗原性聚合物共軛至 α 干擾素之Cys1，及約7%至約15%之該位置異構物包括實質上非抗原性聚合物共軛至 α 干擾素之Lys121；

其中該實質上非抗原性聚合物具約200至約35,000之分子量；且

其中該非抗原性聚合物包含聚氧化伸烷基。

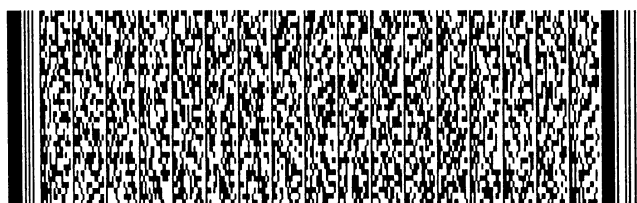
18. 根據申請專利範圍第17項之醫藥組合物，其中約55%之該位置異構物包括實質上非抗原性聚合物共軛至 α 干擾素之His34，約15%之該位置異構物包括實質上非抗原性聚合物共軛至 α 干擾素之Cys1，及約15%之該位置異構物包括實質上非抗原性聚合物共軛至 α 干擾素之Lys121。

19. 一種製備 α 干擾素聚合物共軛物位置異構物之方法，其包含於pH小於7.0下，將 α 干擾素與氧基羰基-氧基-N-二羧醯亞胺-活化之非抗原性聚合物接觸；其中該經活化之非抗原性聚合物存在之莫耳濃度多於該 α 干擾素者；且其中該實質上非抗原性聚合物具約200至約35,000之分子量；

其中該非抗原性聚合物包含聚氧化伸烷基；且

其中至少約15%之該製備之位置異構物包含以組胺酸殘基與非抗原性聚合物共價共軛之 α 干擾素。

20. 根據申請專利範圍第19項之方法，其中該氧基羰基-氧基-N-二羧醯亞胺係為碳酸琥珀醯亞胺酯。



六、申請專利範圍

21. 根據申請專利範圍第20項之方法，其中該接觸係於pH小於約6.8下進行。

22. 根據申請專利範圍第21項之方法，其中該接觸係於pH約4.5至約6.8下進行。

23. 根據申請專利範圍第19項之方法，其中該莫耳濃度係指多於約1至8倍。

24. 根據申請專利範圍第23項之方法，其中該莫耳濃度係指多於約1.5至7倍。

25. 根據申請專利範圍第24項之方法，其中該莫耳濃度係指多於約1.75至5倍。

26. 根據申請專利範圍第19項之方法，其中該實質上非抗原性聚合物係為烷氧基終端之聚氧化伸烷基。

27. 根據申請專利範圍第26項之方法，其中該聚氧化伸烷基係為聚乙二醇。

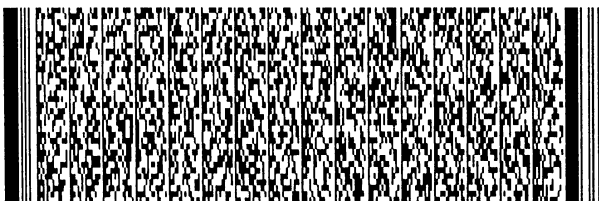
28. 根據申請專利範圍第19項之方法，其中該實質上非抗原性聚合物具約1,000至約15,000之分子量。

29. 根據申請專利範圍第28項之方法，其中該實質上非抗原性聚合物具約2,000至約12,500之分子量。

30. 根據申請專利範圍第19至29項中任一項之方法，其中該 α 干擾素係為干擾素 $\alpha 2b$ 。

31. 一種用於治療哺乳動物受干擾素影響病況之醫藥組合物，其包含根據申請專利範圍第13至18項之組合物。

32. 根據申請專利範圍第1至12項中任一項之醫藥組合物，其中至少約15%之該位置異構物包含以組胺酸殘基與



六、申請專利範圍

實質上非抗原性聚合物共價共軛之 α 干擾素。

