

公告本

發明專利說明書

(本說明書格式、順序及粗體字，請勿任意更動，※記號部分請勿填寫)

※ 申請案號：9312364²

※ 申請日期：93.8.6

※IPC 分類：

C08B 31/12 (2006.01)

C07K 17/10 (2006.01)

A61K 47/48 (2006.01)

一、發明名稱：(中文/英文)

製造羥基烷基澱粉衍生物之方法

METHOD OF PRODUCING HYDROXYALKYL STARCH
DERIVATIVES

二、申請人：(共 1 人)

姓名或名稱：(中文/英文)

費森尤斯卡比德意志有限公司

FRESENIUS KABI DEUTSCHLAND GMBH

代表人：(中文/英文)

1. 麥伯德博士/DR. MATHIEU, BERND

2. 史畢其/STAUDE, BIRGIT

住居所或營業所地址：(中文/英文)

德國貝伯格城艾斯街 1 號

Else-Kröner-Straße 1, 61352 Bad Homburg v. d. H., Germany

國 籍：(中文/英文)

德國/Germany

三、發明人：(共 2 人)

姓 名：(中文/英文)

1. 法蘭克/FRANK, RONALD

2. 查得爾/ZANDER, NORBERT

國 籍：(中文/英文)

1.~2.均為德國

四、聲明事項：

公告本

發明專利說明書

(本說明書格式、順序及粗體字，請勿任意更動，※記號部分請勿填寫)

※ 申請案號：9312364²

※ 申請日期：93.8.6

※IPC 分類：

C08B 31/12 (2006.01)

C07K 17/10 (2006.01)

A61K 47/48 (2006.01)

一、發明名稱：(中文/英文)

製造羥基烷基澱粉衍生物之方法

METHOD OF PRODUCING HYDROXYALKYL STARCH
DERIVATIVES

二、申請人：(共 1 人)

姓名或名稱：(中文/英文)

費森尤斯卡比德意志有限公司

FRESENIUS KABI DEUTSCHLAND GMBH

代表人：(中文/英文)

1. 麥伯德博士/DR. MATHIEU, BERND

2. 史畢其/STAUDE, BIRGIT

住居所或營業所地址：(中文/英文)

德國貝伯格城艾斯街 1 號

Else-Kröner-Straße 1, 61352 Bad Homburg v. d. H., Germany

國 籍：(中文/英文)

德國/Germany

三、發明人：(共 2 人)

姓 名：(中文/英文)

1. 法蘭克/FRANK, RONALD

2. 查得爾/ZANDER, NORBERT

國 籍：(中文/英文)

1.~2.均為德國

四、聲明事項：

主張專利法第二十二條第二項 第一款或 第二款規定之事實，其事實發生日期為： 年 月 日。

申請前已向下列國家（地區）申請專利：

【格式請依：受理國家（地區）、申請日、申請案號 順序註記】

有主張專利法第二十七條第一項國際優先權：

1. 世界智慧財產權組織 WO; 西元 2003 年 8 月 08 日; PCT/EP03/08829
2. 世界智慧財產權組織 WO; 西元 2003 年 8 月 08 日; PCT/EP03/08858
3. 歐洲專利局 EPO; 西元 2003 年 9 月 11 日; 03020424.2

無主張專利法第二十七條第一項國際優先權：

主張專利法第二十九條第一項國內優先權：

【格式請依：申請日、申請案號 順序註記】

主張專利法第三十條生物材料：

須寄存生物材料者：

國內生物材料 【格式請依：寄存機構、日期、號碼 順序註記】

國外生物材料 【格式請依：寄存國家、機構、日期、號碼 順序註記】

不須寄存生物材料者：

所屬技術領域中具有通常知識者易於獲得時，不須寄存。

五、發明說明 (73)

化合物(M)是多肽。

再者，本發明係關於如所述羥基烷基澱粉衍生物在治療貧血症或造血功能不全或其相關疾病之藥劑製備方面的用途。

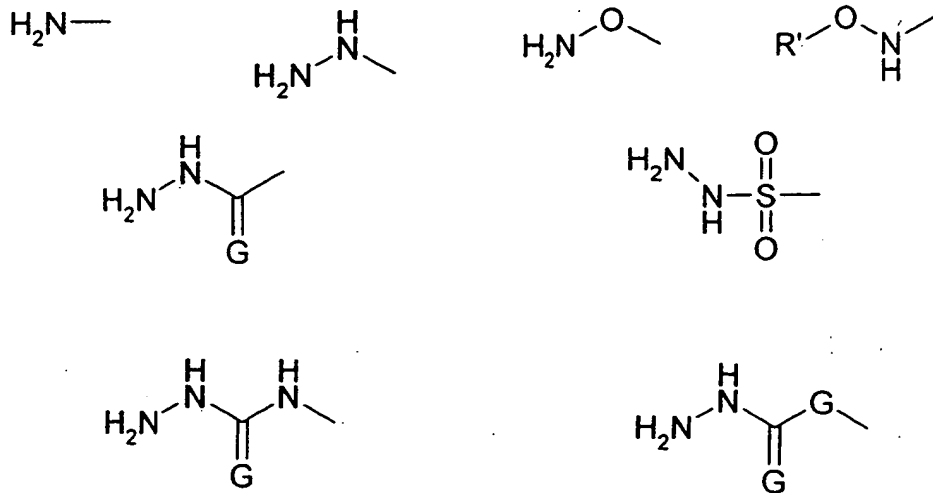
根據一較佳具體實施例，本發明係關於一種如上所述之醫藥組合物，其中該多肽是一抗凝血酶(AT)，較佳係 AT III(Levy JH, Weisinger A, Ziomek CA, Echelard Y, 重組體抗凝血酶：製造及在心血管疾病方面的角色，血栓及止血方面之演講 27, 4 (2001) 405-416；Edmunds T, Van Patten SM, Pollock J, Hanson E, Bernasconi R, Higgins E, Manavalan P, Ziomek C, Meade H, McPherson J, Cole ES, 以基因轉殖方式製得之人類抗凝血酶：與衍生自人類血漿之抗凝血酶之結構及功能比較，血液 91, 12 (1998) 4661-4671；Minnema MC, Chang ACK, Jansen PM, Lubbers YTP, Pratt BM, Whittaker BG, Taylor FB, Hack CE, Friedman B, 重組人抗凝血酶 III 改善受大腸桿菌致命攻擊之狒狒的存活率並降低炎症反應，血液 95, 4 (2000) 1117-1123；Van Patten SM, Hanson EH, Bernasconi R, Zhang K, Manavaln P, Cole ES, McPherson JM, Edmunds T, 甲硫胺酸殘基在抗凝血酶中之氧化作用，生物化學期刊 274, 15 (1999) 10268-10276)。

五、發明說明 (74)

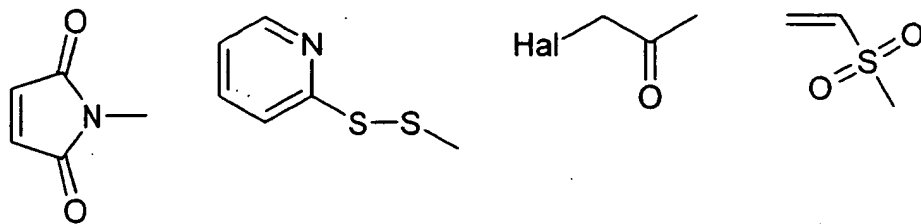
根據其他較佳具體實施例，本發明係關於多肽為 G-CSF 或 IFN- β 之醫藥組合物。

根據一特佳具體實施例，本發明係關於一種如上所述之醫藥組合物，其中該多肽為紅血球生成素。

根據另一具體實施例，本發明係關於一種如上所述之醫藥組合物，其中該官能基 Y 為 -SH 且化合物(L)為一通式 Z₁-L'-X 之化合物，其中官能基 Z₁ 係選自下列基團組成之群



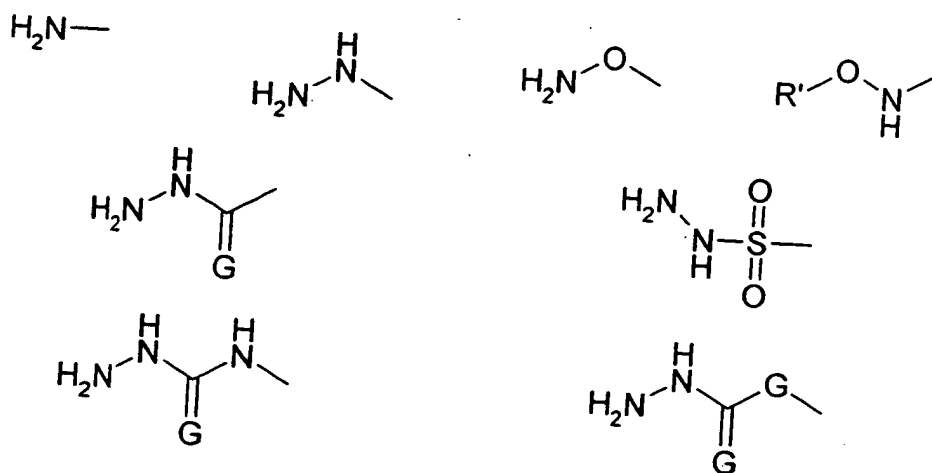
其中 G 為 O 或 S，且若出現兩次，其係獨立地為 O 或 S，且 R' 為甲基，而且其中官能基 X 係選自下列基團組成之群



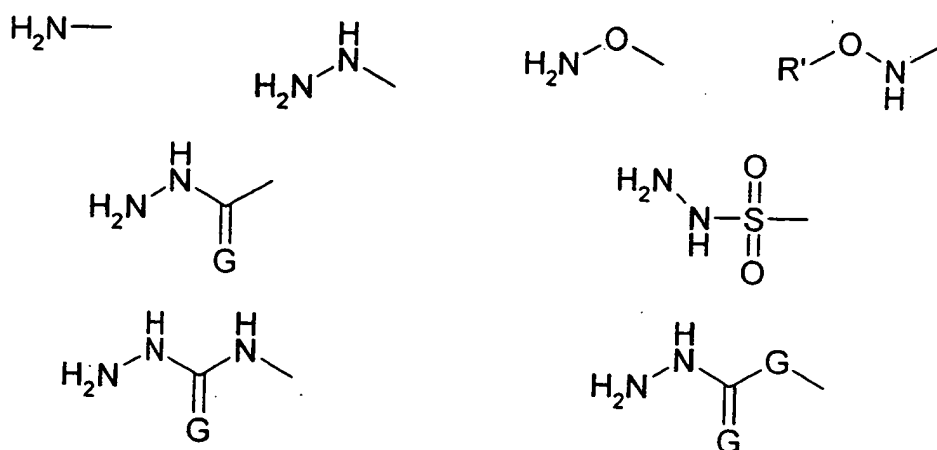
五、發明說明 (75)

其中 Hal 為 Cl、Br 或 I，而且其中 L' 為一橋接 Z₁ 與 X 之有機鏈或 L' 不存在。

根據一較佳具體實施例，本發明係關於一種如上所述之醫藥組合物，其中該官能基 Y 係選自醛基、酮基、半縮醛及縮醛基組成之群，而且化合物(L)為一通式 Z₁-L'-X 之化合物，其中官能基 Z₁ 係選自下列基團組成之群



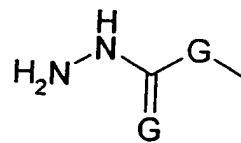
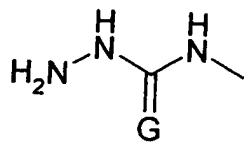
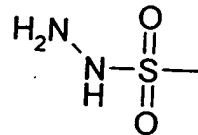
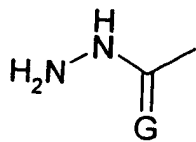
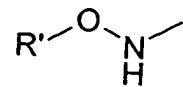
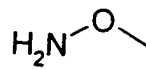
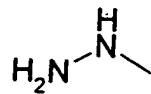
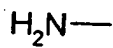
其中 G 為 O 或 S，且若出現兩次，其係獨立地為 O 或 S，且 R' 為甲基，而且其中官能基 X 係選自下列基團組成之群



五、發明說明 (76)

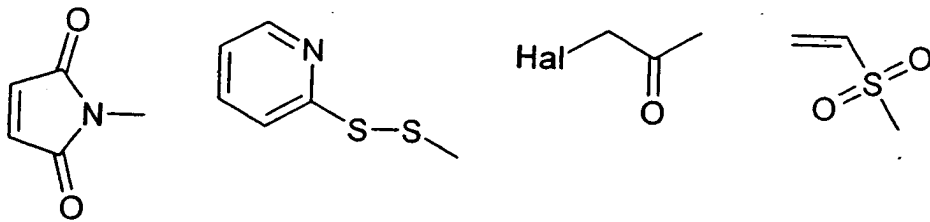
其中 G 為 O 或 S，且若出現兩次，其係獨立地為 O 或 S，且 R' 為甲基，而且其中 L' 為一橋接 Z₁ 與 X 之有機鏈或 L' 不存在。

根據另一具體實施例，本發明係關於一種如上所述之醫藥組合物，其中該官能基 Y 是 -SH，化合物(D)為一通式 Z₁-D'-W 之化合物，而且化合物(L)為一通式 Z₂-L'-X 之化合物，其中官能基 Z₁ 係選自下列基團組成之群

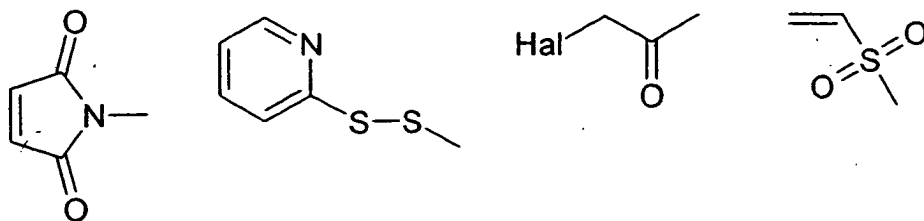


五、發明說明 (77)

其中 G 為 O 或 S，且若出現兩次，其係獨立地為 O 或 S，且 R' 為甲基，其中官能基 X 係選自下列基團組成之群

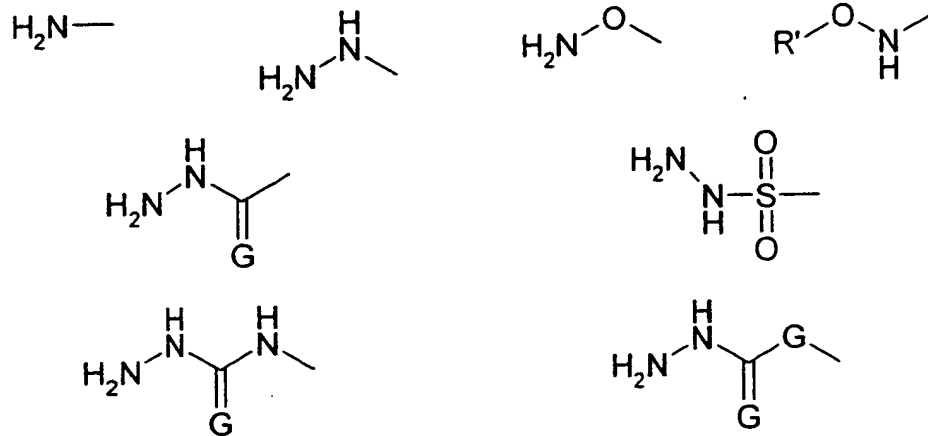


其中 Hal 為 Cl、Br 或 I，其中官能基 W 或官能基 Z₂ 為 -SH，而且官能基 Z₂ 或官能基 W 係選自下列基團組成之群



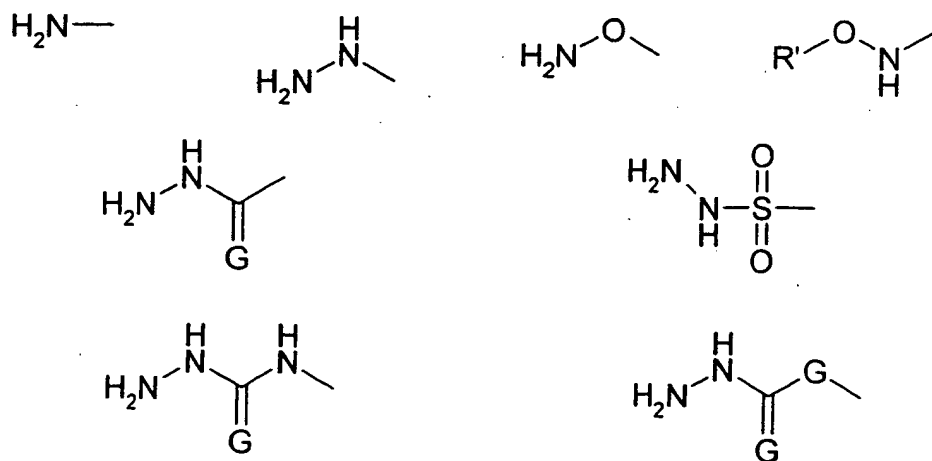
其中 Hal 為 Cl、Br 或 I，或其中官能基 W 或官能基 Z₂ 係選自上述活性酯或視情況可轉化成活性酯之羧基組成之群，而且官能基 Z₂ 或官能基 W 係選自下列基團組成之群

五、發明說明 (78)



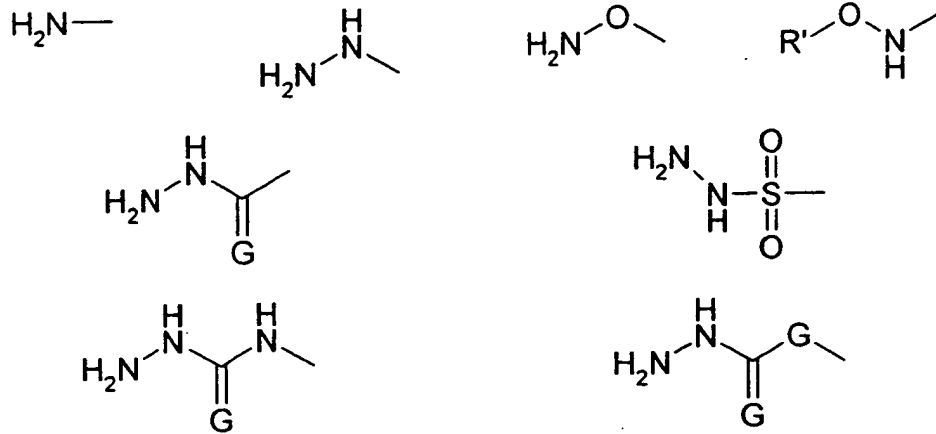
其中 G 為 O 或 S，且若出現兩次，其係獨立地為 O 或 S，且 R' 為甲基，而且其中 D' 為一橋接 Z₁ 與 W 之有機鏈或 D' 不存在，L' 為一橋接 Z₁ 與 X 之有機鏈或 L' 不存在。

根據另一具體實施例，本發明係關於一種如上所述之醫藥組合物，其中該官能基 Y 係選自醛基、酮基、半縮醛基及縮醛基組成之群，化合物(D)為一通式 Z₁-D'-W 之化合物，而且化合物(L)為一通式 Z₂-L'-X 之化合物，其中官能基 Z₁ 係選自下列基團組成之群

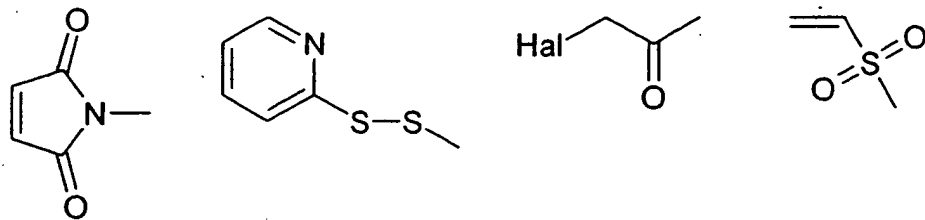


五、發明說明 (79)

其中 G 為 O 或 S，且若出現兩次，其係獨立地為 O 或 S，
且 R' 為甲基，其中官能基 X 係選自下列基團組成之群

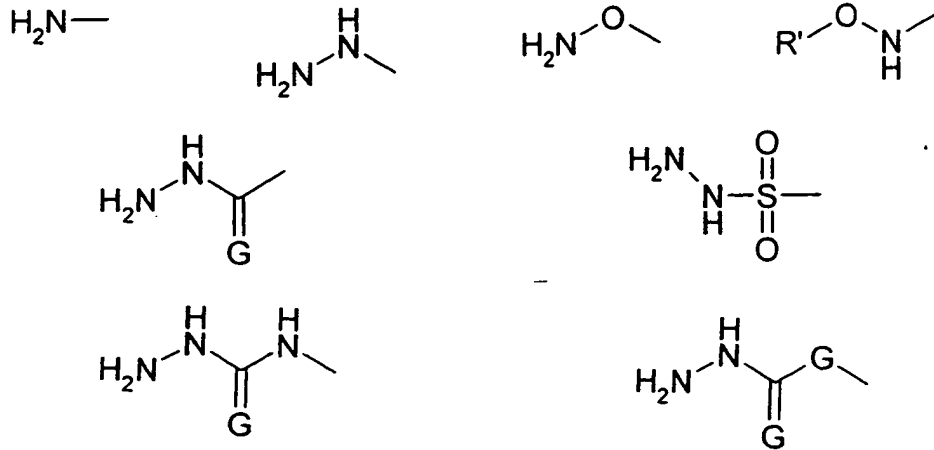


其中 G 為 O 或 S，且若出現兩次，其係獨立地為 O 或 S，
且 R' 為甲基，該官能基 W 或官能基 Z₂ 為 -SH，而且官能
基 Z₂ 或官能基 W 係選自下列基團組成之群



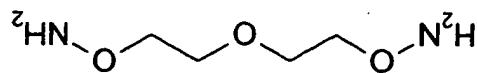
其中 Hal 為 Cl、Br 或 I，或其中官能基 W 或官能基 Z₂ 係
選自上述活性酯或視情況可轉化成活性酯之羧基組成之
群，而且官能基 Z₂ 或官能基 W 係選自下列基團組成之群

五、發明說明 (80)



其中 G 為 O 或 S，且若出現兩次，其係獨立地為 O 或 S，且 R' 為甲基，而且其中 D' 為一橋接 Z_1 與 W 之有機鏈或 D' 不存在，而且 L' 為一橋接 Z_1 與 X 之有機鏈或 L' 不存在。

根據一特佳具體實施例，本發明係關於一種如上所述之醫藥組合物，其中該羥基烷基澱粉係在一水性媒介中與一根據下式之化合物反應



而且該反應產物係與紅血球生成素反應。

根據一極佳具體實施例，本發明係關於該上述醫藥組合物，其中該紅血球生成素在反應前係經過碘酸鈉氧化。

五、發明說明 (81)

根據另一較佳具體實施例，本發明係關於如上所述般之醫藥組合物，其中該紅血球生成素在反應前係經部分去涎酸化，而且接著以過碘酸鈉氧化之。

根據本發明另一較佳具體實施例，排除包含一以根據實例 6 已完全還原之硫-EPO 為基質所製得之羥基烷基澱粉衍生物的醫藥組合物。

上述醫藥組合物係特別適合用於治療貧血症或造血功能不全症或其相關疾病。

本文所用之術語“治療上有效量”係指可提供一既定病況及給藥攝食法治療作用之量。服用紅血球生成素異構重組物最好係經由非經口路徑進行。所選特定路徑係視欲治療之病況而定。服用紅血球生成素異構重組物最好係以作為劑型一部分的方式完成，其中該劑型包含適合載劑(如人類血清蛋白)、適合稀釋劑(如經緩衝之鹽水溶液)及/或適合佐劑。所需劑量將是足以提高病患之血溶比的量，而且將隨欲治療病況之嚴重性、所用給藥方法及類似因素而變。

利用本發明醫藥組合物治療的目的最好是血液中血紅素值的增加量超過 6.8 毫莫耳/公升。對於此，該醫藥組合物可以每週血紅素值的增加量在 0.6 毫莫耳/公升與 1.6 毫莫耳/

五、發明說明 (82)

公升之間的方式服用。若血紅素值超過 8.7 毫莫耳/公升，最好應中斷治療，直到血紅素值低於 8.1 毫莫耳/公升。

本發明組合物最好以一適合用於皮下或靜脈或非經腸注射之劑型使用之。對於此，適合的賦形藥及載劑是，如硫酸二氫鈉、硫酸氫二鈉、氯化鈉、聚山梨醇酯 80、HAS 及注射用水。一週可服用該組合物三次，較佳係一週兩次，更佳係一週一次，最佳係每兩週一次。

較佳係該醫藥組合物的服用量為 0.01-10 微克/公斤病患體重，較佳係 0.1 至 5 微克/公斤、0.1 至 1 微克/公斤或 0.2-0.9 微克/公斤，最佳係 0.3-0.7 微克/公斤且最佳係 0.4-0.6 微克/公斤體積。

一般，最好每一次劑量係服用 10 微克至 200 微克，較佳係服用 15 微克至 100 微克。

本發明另外關於一種根據本發明可用於人體或動物體治療方法中之 HAS-多肽。

本發明另外關於本發明 HAS-EPO 偶合物在治療貧血症或造血功能不全症或其相關疾病之藥劑製備方面的用途。

若根據本發明所用之化合物(L)係包含一或多個掌性中心，

五、發明說明 (83)

關於各掌性中心，化合物(II)可以 R 構型或以 S 構型或以消旋化合物型態存在。

若本發明視情況所用之化合物(D)包含一或多個掌性中心，關於各掌性中心，化合物(D)可以 R 構型或以 S 構型或以消旋化合物型態存在。

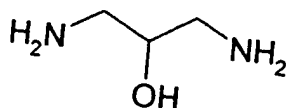
進一步以下列實例、表格及圖式說明本發明，其中該等實例、表格及圖式不欲以任何方式限制本發明範圍。

實施方法

實例

實例 1 : 藉由還原胺化未氧化之還原端形成羥基乙基澱粉

實例 1.1 : 羥基乙基澱粉與 1,3-二胺基-2-羥基丙烷之反應



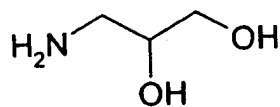
a) 在 200 毫克羥基乙基澱粉(HES18/0.4(MW=18,000D, DS=0.4))溶於 5 毫升水之溶液中，加入 0.83 毫莫耳

五、發明說明 (84)

1,3-二胺基-2-羥基丙烷(Sigma Aldrich, Taufkirchen, D) 及 50 毫克氰硼氫化鈉 NaCNBH_3 。所得混合物在 80°C 下培養 17 小時。將反應混合物加入 160 毫升丙酮與乙醇之 1:1 冷混合物(體積/體積)中。藉離心收集沉澱物並以水透析 4 天(SnakeSkin 透析管, 3.5 KD 移除, Perbio Science Deutschland GmbH, Bonn, D)並冷凍乾燥之。

- b) 由 0.83 毫莫耳 1,3-二胺基-2-羥基丙烷及 50 毫克氰硼氫化鈉 NaCNBH_3 加入 200 毫克羥基乙基澱粉溶液所形成之混合物的培養是可行的並可在 25°C 下進行 3 天。

實例 1.2 : 羥基乙基澱粉與 1,2-二羥基-3-胺基丙烷之反應



- a) 在 200 毫克羥基乙基澱粉(HES18/0.4 (MW=18,000D, DS=0.4))溶於 5 毫升水之溶液中, 加入 0.83 毫莫耳 1,2-二羥基-3-胺基丙烷(Sigma Aldrich, Taufkirchen, D) 及 50 毫克氰硼氫化鈉 NaCNBH_3 。所得混合物在 80°C 下培養 17 小時。將反應混合物加入 160 毫升丙酮與乙醇之 1:1 冷混合物(體積/體積)中。藉離心收集

五、發明說明 (85)

沉澱物並以水進行 4 天(SnakeSkin 透析管, 3.5 KD 移除, Perbio Science Deutschland GmbH, Bonn, D)並冷凍乾燥之。

b) 由 0.83 毫莫耳 1,2-二羥基-2-胺基丙烷及 50 毫克氰硼氫化鈉 NaCNBH_3 加入 200 毫克羥基乙基澱粉溶液所形成混合物之培養是可行的並可在 25°C 下進行 3 天。

1,2-二羥基-2-胺基丙烷與 HES 之反應係藉由甲醛之定量測量間接獲得確認，其中該甲醛係如 G. Avigad Anal. Biochem. 134 (1983) 449-504 所描述般，藉由過碘酸鹽氧化分解反應產物中之 1,2-二醇所形成。

實例 1.3 : 羥基乙基澱粉與 1,4-二胺基丁烷之反應



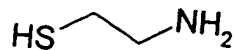
a) 在 200 毫克羥基乙基澱粉(HES18/0.4 (MW=18,000D, DS=0.4))溶於 5 毫升水之溶液中，加入 0.83 毫莫耳 1,4-二胺基丁烷 (Sigma Aldrich, Taufkirchen, D)及 50 毫克氰硼氫化鈉 NaCNBH_3 。所得混合物在 80°C 下培養 17 小時。將反應混合物加入 160 毫升丙酮與乙醇之 1:1 冷混合物(體積/體積)中。藉離心收集沉澱物

五、發明說明 (86)

並以水透析 4 天(SnakeSkin 透析管, 3.5 KD 移除, Perbio Science Deutschland GmbH, Bonn, D)並冷凍乾燥之。

- b) 由 0.83 毫莫耳 1,4-二胺基丁烷及 50 毫克氰硼氫化鈉 NaCNBH_3 加入 200 毫克羥基乙基澱粉溶液所形成之混合物的培養是可行的並可在 25°C 下進行 3 天。

實例 1.4 : 羥基乙基澱粉與 1-氫硫基-2-胺基乙烷之反應



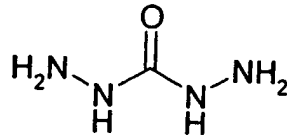
- a) 在 200 毫克羥基乙基澱粉(HES18/0.4 (MW=18,000D, DS=0.4))溶於 5 毫升水之溶液中, 加入 0.83 毫莫耳 1-氫硫基-2-胺基乙烷(Sigma Aldrich, Taufkirchen, D) 及 50 毫克氰硼氫化鈉 NaCNBH_3 。所得混合物在 80 °C 下培養 17 小時。將反應混合物加入 160 毫升丙酮與乙醇之 1:1 冷混合物(體積/體積)中。藉離心收集沉澱物並以水透析 4 天(SnakeSkin 透析管, 3.5 KD 移除, Perbio Science Deutschland GmbH, Bonn, D)並冷凍乾燥之。
- b) 由 0.83 毫莫耳 1-氫硫基-2-胺基乙烷及 50 毫克氰硼氫化鈉 NaCNBH_3 加入 200 毫克羥基乙基澱粉溶液所

五、發明說明 (87)

形成之混合物的培養是可行的並可在 25°C 下進行 3 天。

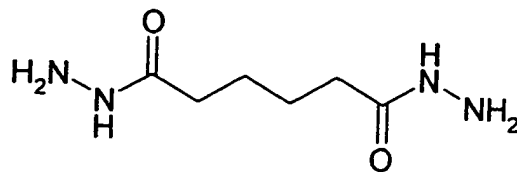
實例 2 : 藉與未氧化之還原端偶合作用形成羥基乙基澱粉衍生物

實例 2.1 : 羥基乙基澱粉與碳醯肼之反應



將 0.96 克 HES18/0.4 (MW=18,000D, DS=0.4) 溶於 8 毫升水性 0.1M 乙酸鈉緩衝液 (pH 5.2) 中並加入 8 毫莫耳碳醯肼 (Sigma Aldrich, Taufkirchen, D)。在 25°C 下攪拌 18 小時後，將反應混合物加入 160 毫升丙酮與乙醇之 1:1 冷混合物 (體積/體積) 中。藉離心收集沉澱產物，再將其溶解於 40 毫升水中並以水透析 3 天 (SnakeSkin 透析管, 3.5 KD 移除, Perbio Science Deutschland GmbH, Bonn, D) 並冷凍乾燥之。

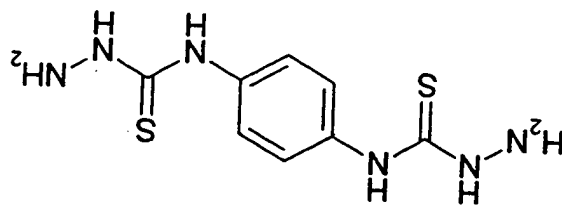
實例 2.2 : 羥基乙基澱粉與己二酸二醯肼之反應



五、發明說明 (88)

將 0.96 克 HES18/0.4 (MW=18,000D, DS=0.4) 溶於 8 毫升水性 0.1M 乙酸钠緩衝液 (pH 5.2) 中並加入 8 毫莫耳己二酸二醯肼 (Lancaster Synthesis, Frankfurt/Main, D)。在 25°C 下攪拌 18 小時後，將反應混合物加入 160 毫升丙酮與乙醇之 1:1 冷混合物 (體積/體積) 中。藉離心收集沉澱產物，再將其溶解於 40 毫升水中並以水透析 3 天 (SnakeSkin 透析管, 3.5 KD 移除, Perbio Science Deutschland GmbH, Bonn, D) 並冷凍乾燥之。

實例 2.3 : 羧基乙基澱粉與 1,4-伸苯基-雙-3-氨基硫脲之反應

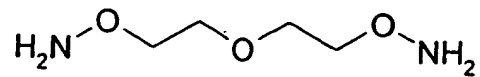


將 0.96 克 HES18/0.4 (MW=18,000D, DS=0.4) 溶於 8 毫升水性 0.1M 乙酸钠緩衝液 (pH 5.2) 中並加入 8 毫莫耳 1,4-伸苯基-雙-3-氨基硫脲 (Lancaster Synthesis, Frankfurt/Main, D)。在 25°C 下攪拌 18 小時後，將 8 毫升水加入反應混合物中並將懸浮液以 4,500rpm 離心 15 分鐘。傾析上澄液，接著將其加入 160 毫升丙酮與乙醇之 1:1 冷混合物 (體積/體積) 中。藉離心收集沉澱產物，再將其溶解於 40 毫升水中並以 4,500rpm 離心 15

五、發明說明 (89)

分鐘。上澄液以水透析 3 天(SnakeSkin 透析管, 3.5 KD 移除, Perbio Science Deutschland GmbH, Bonn, D)並冷凍乾燥之。

實例 2.4 : 羥基乙基澱粉與 O-[2-(2-胺氧基-乙氧基)-乙基]-羥基胺之反應



O-[2-(2-胺氧基-乙氧基)-乙基]-羥基胺可如 Boturyn 等人, Tetrahedron 53(1997), 5485-5492 頁中所描述般以 2 步驟由市售材料合成得到。

將 0.96 克 HES18/0.4 (MW=18,000D, DS=0.4)溶於 8 毫升水性 0.1M 乙酸钠緩衝液(pH 5.2)中並加入 8 毫莫耳 O-[2-(2-胺氧基-乙氧基)-乙基]-羥基胺。在 25°C 下攪拌 18 小時後, 將反應混合物加入 160 毫升丙酮與乙醇之 1:1 冷混合物(體積/體積)中。藉離心收集沉澱產物, 再將其溶解於 40 毫升水中並以水透析 3 天(SnakeSkin 透析管, 3.5 KD 移除, Perbio Science Deutschland GmbH, Bonn, D)並冷凍乾燥之。

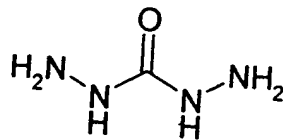
實例 2.4(a) : 羥基乙基澱粉與 O-[2-(2-胺氧基-乙氧基)-乙基]-羥基胺之反應

五、發明說明 (90)

如 DE 196 28 705 A1 中所述般製備已氧化 HES。200 毫克已氧化 HES18/0.4 (MW=18000D, DS=0.4) 在真空中 80 °C 下加熱 17 小時並溶於 2 毫升乾 DMSO 中 (Fluka, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, D)。在該溶液中，加入 2 毫莫耳 O-[2-(2-胺氧基-乙氧基)-乙基]-羥基胺。在 65°C 下培養 5 天後，將反應混合物加入 20 毫升冰-冷 2-丙醇中並在 -20°C 下培養 1 小時。在 4°C 下藉離心收集沉澱產物，以 42 毫升冰-冷 2-丙醇清洗之，再將其溶解於 10 毫升水中並以水透析 27 小時 (SnakeSkin 透析管, 3.5 KD 移除, Perbio Sciences Deutschland GmbH, Bonn, D) 並冷凍乾燥之。

實例 3 : 藉由與已氧化之還原端反應形成羥基乙基澱粉衍生物

實例 3.1 : 羥基乙基澱粉與碳醯肼之反應

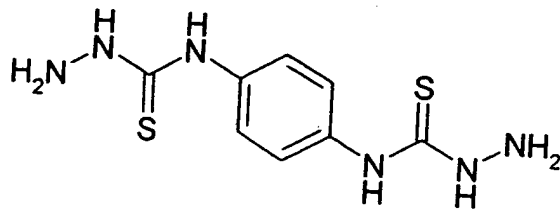


將 0.12 毫莫耳 Oxo-HES 10/0.4 (MW=10,000D, DS=0.4, 根據 DE 196 28 705 A1 所製得) 溶於 3 毫升絕對二甲基亞砷 (DMSO) 中並在氮氣下逐滴加入 15 毫莫耳碳

五、發明說明 (91)

醯肼(Sigma Aldrich, Taufkirchen, D)溶於 15 毫升 DMSO 之混合物中。在 65°C 下攪拌 88 小時後，將反應混合物加入 160 毫升丙酮與乙醇之 1:1 冷混合物(體積/體積)中。藉離心收集沉澱物並以水透析 4 天(SnakeSkin 透析管, 3.5 KD 移除, Perbio Science Deutschland GmbH, Bonn, D)並冷凍乾燥之。

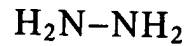
實例 3.2 : 羥基乙基澱粉與 1,4-伸苯基-雙-3-氨基硫脲之反應



將 0.12 毫莫耳 Oxo-HES 10/0.4 (MW=10,000D, DS=0.4, 根據 DE 196 28 705 A1 所製得)溶於 3 毫升絕對二甲基亞砷(DMSO)中並在氮氣下逐滴加入 15 毫莫耳 1,4-伸苯基-雙-3-氨基硫脲(Lancaster Synthesis, Frankfurt/Main, D)溶於 15 毫升 DMSO 之混合物中。在 65°C 下攪拌 88 小時後，將反應混合物加入 160 毫升丙酮與乙醇之 1:1 冷混合物(體積/體積)中。藉離心收集沉澱物並以水透析 4 天(SnakeSkin 透析管, 3.5 KD 移除, Perbio Science Deutschland GmbH, Bonn, D)並冷凍乾燥之。

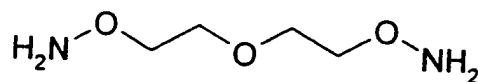
五、發明說明 (92)

實例 3.3 : 羥基乙基澱粉與胼之反應



將 1.44 克 (0.12 毫莫耳) 之 Oxo-HES 10/0.4 (MW=10,000D, DS=0.4, 根據 DE 196 28 705 A1 所製得) 溶於 3 毫升絕對二甲基亞砜(DMSO)中並在氮氣下逐滴加入 0.47 毫升(15 毫莫耳)胼溶於 15 毫升 DMSO 之混合物中。在 40°C 下攪拌 19 小時後, 將反應混合物加入 160 毫升乙醇與丙酮之 1:1 混合物(體積/體積)中。藉離心收集沉澱產物, 再將其溶解於 40 毫升的水中並以 0.5%(體積/體積)三乙基胺之水溶液透析 2 天並以水透析 2 天(SnakeSkin 透析管, 3.5 KD 移除, Perbio Science Deutschland GmbH, Bonn, 德國)並冷凍乾燥之。

實例 3.4 : 羥基乙基澱粉與羥基胺之反應

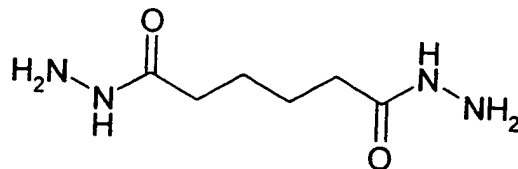


O-[2-(2-胺氧基-乙氧基)-乙基]-羥基胺可如 Boturyn 等人所描述般以 2 步驟由市售材料合成得到 (Boturyn, Boudali, Constant, Defrancq, Lhomme, 1997, *Tetrahedron*, 53, 5485)

五、發明說明 (93)

將 1.44 克(0.12 毫莫耳)Oxo-HES 10/0.4 (MW=10,000D, DS=0.4, 根據 DE 196 28 705 A1 所製得)溶於 3 毫升絕對二甲基亞砜(DMSO)中並在氮氣下逐滴加入 2.04 克(15 毫莫耳)O-[2-(2-胺氧基-乙氧基)-乙基]-羥基胺溶於 15 毫升 DMSO 之混合物中。在 65°C 下攪拌 48 小時後, 將反應混合物加入 160 毫升乙醇與丙酮之 1:1 混合物(體積/體積)中。藉離心收集沉澱產物, 再將其溶解於 40 毫升的水中並以水透析 4 天(SnakeSkin 透析管, 3.5 KD 移除, Perbio Science Deutschland GmbH, Bonn, D)並冷凍乾燥之。

實例 3.5 : 羥基乙基澱粉與己二酸二醯肼之反應

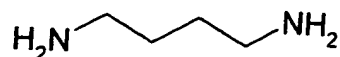


在 65°C 下將 1.74 克(15 毫莫耳)己二酸二醯肼(Lancaster Synthesis, Frankfurt/Main, D)溶於 20 毫升絕對二甲基亞砜(DMSO)中並在氮氣下逐滴加入 1.44 克(0.12 毫莫耳)溶於 3 毫升絕對 DMSO 之 Oxo-HES 10/0.4 (MW=10,000D, DS=0.4, 根據 DE 196 28 705 A1 所製得)。在 60°C 下攪拌 68 小時後, 將反應混合物加入 200 毫升水中。含有反應產物之溶液以 0.5%(體積/體積)三乙基胺之水溶液透析 2 天並以水透析 2 天(SnakeSkin 透析管, 3.5 KD 移

五、發明說明 (94)

除, Perbio Science Deutschland GmbH, Bonn, 德國)並冷凍乾燥之。

實例 3.6 : 羥基乙基澱粉與 1,4-二胺基丁烷之反應



將 1.44 克(0.12 毫莫耳)Oxo-HES 10/0.4 (MW=10,000D, DS=0.4, 根據 DE 196 28 705 A1 所製得)溶於 3 毫升乾二甲基亞砜(DMSO)中並在氮氣下逐滴加入 1.51 毫升(15 毫莫耳)1,4-二胺基丁烷 (Sigma Aldrich, Taufkirchen, D)溶於 15 毫升 DMSO 之混合物中。在 40°C 下攪拌 19 小時後, 將反應混合物加入 160 毫升乙醇與丙酮之 1:1 混合物(體積/體積)中。藉離心收集沉澱物胺基-HES10KD/0.4, 再將其溶解於 40 毫升的水中並以水透析 4 天 (SnakeSkin 透析管, 3.5 KD 移除, Perbio Science Deutschland GmbH, Bonn, 德國)並冷凍乾燥之。

實例 4 : 紅血球生長素之氧化作用

已氧化紅血球生長素係如實例 8 所述般製得。使用如實例 8.11(c)所述之 EPO-GT-1-A(未經酸水解但經溫和過碘酸鹽氧化處理之 EPO-GT-1)作為已氧化紅血球生長素。

裝 訂 線

五、發明說明 (95)

實例 5 : 羥基乙基澱粉衍生物與實例 4 之已氧化紅血球生長素之偶合作用

實例 5.1 : 已氧化紅血球生長素與實例 2.1 之反應產物的反應

以 5 M 乙酸钠緩衝液(pH 5.2)將溶於 20 mM PBS 緩衝液之已氧化 EPO(1.055 微克/微升)調整至 pH 5.3。在 19 微升之 EPO 溶液中，加入 18 微升根據實例 2.1 所製得之 HES 衍生物溶液(MW 18kD；18.7 微克/毫升溶於 0.1 M 乙酸钠緩衝液(pH 5.2)中)，而且混合物在 25°C 下培養 16 小時。冷凍乾燥後，如 Invitrogen 所提供之使用說明書所述般，藉由 SDS-Page 以 NuPAGE 10%Bis-Tris 凝膠/MOPS 緩衝液(Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)分析粗產物。以 Roti-Blue Coomassie 染色劑(Roth, Karlsruhe, D)隔夜將該凝膠染色。

實驗結果係表示於圖 1 中。藉由蛋白質帶遷移至較高分子量指示偶合作用成功。所增加的帶寬係歸因於所用 HES 衍生物之分子量分布及連接至該蛋白質之 HES 衍生物的數目之故。

實例 5.2 : 已氧化紅血球生長素與實例 2.3 之反應產物的反應

五、發明說明 (96)

以 5 M 乙酸钠緩衝液(pH 5.2)將溶於 20 mM PBS 緩衝液之已氧化 EPO(1.055 微克/微升)調整至 pH 5.3。在 19 微升之 EPO 溶液中，加入 18 微升根據實例 2.3 所製得的 HES 衍生物溶液(MW 18kD；18.7 微克/毫升溶於 0.1 M 乙酸钠緩衝液(pH 5.2)中)，而且混合物在 25°C 下培養 16 小時。冷凍乾燥後，如 Invitrogen 所提供之使用說明書所述般，藉由 SDS-Page 利用 NuPAGE 10%Bis-Tris 凝膠/MOPS 緩衝液(Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)分析粗產物。

實例 5.3 : 已氧化紅血球生長素與實例 2.4 之反應產物的反應

以 5 M 乙酸钠緩衝液(pH 5.2)將溶於 20 mM PBS 緩衝液之已氧化 EPO(1.055 微克/微升)調整至 pH 5.3。在 19 微升 EPO 溶液中，加入 18 微升根據實例 2.4 所製得的 HES 衍生物溶液(MW 18kD；18.7 微克/毫升溶於 0.1 M 乙酸钠緩衝液(pH 5.2)中)，而且混合物在 25°C 下培養 16 小時。冷凍乾燥後，如 Invitrogen 所提供之使用說明書所述般，藉由 SDS-Page 利用 NuPAGE 10%Bis-Tris 凝膠/MOPS 緩衝液(Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)分析粗產物。以 Roti-Blue Coomassie 染色劑(Roth, Karlsruhe, D)隔夜將該凝膠染色。

五、發明說明 (97)

實驗結果係表示於圖 2 中。藉由蛋白質帶遷移至較高分子量指示偶合作用成功。所增加的帶寬係歸因於所用 HES 衍生物之分子量分布及連接至該蛋白質之 HES 衍生物的數目。

實例 5.4 : 已氧化紅血球生長素與實例 3.1 之反應產物的反應

以 5 M 乙酸鈉緩衝液(pH 5.2)將溶於 20 mM PBS 緩衝液之已氧化 EPO(1.055 微克/微升)調整至 pH 5.3。在 19 微升之 EPO 溶液中，加入 18 微升根據實例 3.1 所製得的 HES 衍生物溶液(MW 10kD；18.7 微克/毫升溶於 0.1 M 乙酸鈉緩衝液(pH 5.2)中)，而且混合物在 25°C 下培養 16 小時。冷凍乾燥後，如 Invitrogen 所提供之使用說明書所述般，藉由 SDS-Page 利用 NuPAGE 10%Bis-Tris 凝膠/MOPS 緩衝液(Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)分析粗產物。以 Roti-Blue Coomassie 染色劑(Roth, Karlsruhe, D)隔夜將該凝膠染色。

實驗結果係表示於圖 3 中。藉由蛋白質帶遷移至較高分子量指示偶合作用成功。所增加的帶寬係歸因於所用 HES 衍生物之分子量分布及連接至該蛋白質之 HES 衍生物的數目。

五、發明說明 (98)

實例 5.5 : 已氧化紅血球生長素與實例 3.2 之反應產物的反應

以 5 M 乙酸鈉緩衝液(pH 5.2)將溶於 20 mM PBS 緩衝液之已氧化 EPO(1.055 微克/微升)調整至 pH 5.3。在 19 微升之 EPO 溶液中，加入 18 微升根據實例 3.2 所製得的 HES 衍生物溶液(MW 10kD; 18.7 微克/毫升溶於 0.1 M 乙酸鈉緩衝液(pH 5.2)中)，而且混合物在 25°C 下培養 16 小時。冷凍乾燥後，如 Invitrogen 所提供之使用說明書所述般，藉由 SDS-Page 利用 NuPAGE 10%Bis-Tris 凝膠/MOPS 緩衝液(Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)分析粗產物。以 Roti-Blue Coomassie 染色劑(Roth, Karlsruhe, D)隔夜將該凝膠染色。

實驗結果係表示於圖 3 中。藉由蛋白質帶遷移至較高分子量指示偶合作用成功。所增加的帶寬係歸因於所用 HES 衍生物之分子量分布及連接至該蛋白質之 HES 衍生物的數目。

實例 6 : 藉由紅血球生長素之還原作用形成硫-EPO

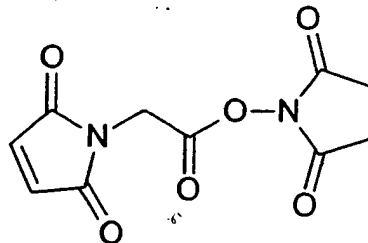
241.5 微克溶於 500 微升 pH8.3 之 0.1M 硼酸鈉緩衝液、5mM EDTA、10mM DTT(Lancaster, Morcambe, UK)

五、發明說明 (99)

的紅血球生長素(EPO-GT-1, 參見實例 8)在 37°C 下培養 1 小時。利用 VIVASPIN 0.5 毫升濃縮機, 10KD MWCO (VIVASCIENCE, Hannover, D)以 13,000rpm 離心過濾方式移除 DTT, 接著以硼酸鹽緩衝液清洗 3 次並以磷酸鹽緩衝液(0.1M, 9.15M NaCl, 50mM EDTA, pH 7.2)清洗兩次。以 Roti-Blue Coomassie 染色劑(Roth, Karlsruhe, D)隔夜將凝膠染色。

實例 7 : 利用交聯化合物進行羧基乙基澱粉衍生物與巖基-紅血球生長素之偶合作用

在下列各實例中, 使用 N-(α -馬來醯亞胺乙醯氧基)琥珀醯亞胺酯(AMAS)作為交聯化合物。



實例 7.1 : 巖基-紅血球生長素與實例 2.1 和交聯化合物之反應產物的反應

在根據實例 2.1 所製得並溶於 200 微升 0.1M 磷酸鈉緩衝液(0.1M, 9.15M NaCl, 50mM EDTA, pH 7.2)之 50nmol HES 衍生物中, 加入 10 微升 2.5 微莫耳 AMAS (Sigma

五、發明說明 (100)

Aldrich, Taufkirchen, D)溶於 DMSO 之溶液。該澄清液在 25 下培養 80 分鐘並在 40°C 下培養 20 分鐘。利用 VIVASPIN 0.5 毫升濃縮機，5KD MWCO (VIVASCIENCE, Hannover, D)以 13,000rpm 離心過濾的方式移除剩餘 AMAS，以磷酸鹽緩衝液清洗 4 次達 30 分鐘。

在剩餘溶液中，加入 15 微克根據實例 5 所製得之硫基 EPO(1 微克/微升溶於磷酸鹽緩衝液中)，而且混合物在 25°C 下培養 16 小時。冷凍乾燥後，如 Invitrogen 所提供之使用說明書所述般，藉由 SDS-Page 利用 NuPAGE 10%Bis-Tris 凝膠/MOPS 緩衝液 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)分析粗產物。以 Roti-Blue Coomassie 染色劑 (Roth, Karlsruhe, D)隔夜將凝膠染色。

實驗結果係表示於圖 4 中。藉由蛋白質帶遷移至較高分子量指示偶合作用成功。所增加的帶寬係歸因於所用 HES 衍生物之分子量分布及連接至該蛋白質之 HES 衍生物數目。

實例 7.2 : 硫基-紅血球生長素與實例 2.2 和交聯化合物之反應產物的反應

在根據實例 2.2 所製得並溶於 200 微升 0.1M 磷酸鈉緩

五、發明說明 (101)

衝液(0.1M, 9.15M NaCl, 50mM EDTA, pH 7.2)之 50nmol HES 衍生物中，加入 10 微升 2.5 微莫耳 AMAS (Sigma Aldrich, Taufkirchen, D)溶於 DMSO 之溶液。該澄清液在 25°C 下培養 80 分鐘並在 40°C 下培養 20 分鐘。利用 VIVASPIN 0.5 毫升濃縮機，5KD MWCO (VIVASCIENCE, Hannover, D)以 13,000rpm 離心過濾的方式移除剩餘的 AMAS，以磷酸鹽緩衝液清洗 4 次達 30 分鐘。

在剩餘溶液中，加入 15 微克根據實例 5 所製得之硫基 EPO(1 微克/微升溶於磷酸鹽緩衝液中)，而且混合物在 25°C 下培養 16 小時。冷凍乾燥後，如 Invitrogen 所提供之使用說明書所述般，藉由 SDS-Page 利用 NuPAGE 10%Bis-Tris 凝膠/MOPS 緩衝液 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)分析粗產物。以 Roti-Blue Coomassie 染色劑 (Roth, Karlsruhe, D)隔夜將凝膠染色。

實驗結果係表示於圖 5 中。藉由蛋白質帶遷移至較高分子量指示偶合作用成功。所增加的帶寬係歸因於所用 HES 衍生物之分子量分布及連接至該蛋白質之 HES 衍生物的數目。

實例 7.3 : 硫基-紅血球生長素與實例 2.3 和交聯化合物之反應產物的反應

五、發明說明 (102)

在根據實例 2.3 所製得並溶於 200 微升 0.1M 磷酸鈉緩衝液(0.1M, 9.15M NaCl, 50mM EDTA, pH 7.2)之 50nmol HES 衍生物中，加入 10 微升 2.5 微莫耳 AMAS (Sigma Aldrich, Taufkirchen, D)溶於 DMSO 之溶液。該澄清液在 25°C 下培養 80 分鐘並在 40°C 下培養 20 分鐘。利用 VIVASPIN 0.5 毫升濃縮機，5KD MWCO (VIVASCIENCE, Hannover, D)以 13,000rpm 離心過濾的方式移除剩餘的 AMAS，以磷酸鹽緩衝液清洗 4 次達 30 分鐘。

在剩餘溶液中，加入 15 微克根據實例 5 所製得之硫基 EPO(1 微克/微升溶於磷酸鹽緩衝液中)，而且混合物在 25°C 下培養 16 小時。冷凍乾燥後，如 Invitrogen 所提供之使用說明書所述般，藉由 SDS-Page 利用 NuPAGE 10%Bis-Tris 凝膠/MOPS 緩衝液(Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)分析粗產物。以 Roti-Blue Coomassie 染色劑 (Roth, Karlsruhe, D)隔夜將凝膠染色。

實驗結果係表示於圖 5 中。藉由蛋白質帶遷移至較高分子量指示偶合作用成功。所增加的帶寬係歸因於所用 HES 衍生物之分子量分布及連接至該蛋白質之 HES 衍生物的數目。

五、發明說明 (103)

實例 7.4 : 巯基-紅血球生長素與實例 2.4 和交聯化合物之反應產物的反應

在根據實例 2.4 所製得並溶於 200 微升 0.1M 磷酸鈉緩衝液(0.1M, 9.15M NaCl, 50mM EDTA, pH 7.2)之 50nmol HES 衍生物中，加入 10 微升 2.5 微莫耳 AMAS (Sigma Aldrich, Taufkirchen, D)溶於 DMSO 之溶液。該澄清液在 25°C 下培養 80 分鐘並在 40°C 下培養 20 分鐘。利用 VIVASPIN 0.5 毫升濃縮機，5KD MWCO (VIVASCIENCE, Hannover, D)以 13,000rpm 離心過濾的方式移除剩餘的 AMAS，以磷酸鹽緩衝液清洗 4 次達 30 分鐘。

在剩餘溶液中，加入 15 微克根據實例 5 所製得之巯基 EPO(1 微克/微升溶於磷酸鹽緩衝液中)，而且混合物在 25°C 下培養 16 小時。冷凍乾燥後，如 Invitrogen 所提供之使用說明書所述般，藉由 SDS-Page 利用 NuPAGE 10%Bis-Tris 凝膠/MOPS 緩衝液 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)分析粗產物。以 Roti-Blue Coomassie 染色劑 (Roth, Karlsruhe, D)隔夜將凝膠染色。

實驗結果係表示於圖 4 中。藉由蛋白質帶遷移至較高分子量指示偶合作用成功。所增加的帶寬係歸因於所用 HES 衍生物之分子量分布及連接至該蛋白質之 HES 衍

五、發明說明 (104)

生物的數目。

實例 7.5 : 硫基-紅血球生長素與實例 1.1 和交聯化合物之反應產物的反應

於根據實例 1.1，在 80°C 下 17 小時以及在 25°C 下 3 天之培養條件下所製得並溶於 200 微升 0.1M 磷酸鈉緩衝液(0.1M, 9.15M NaCl, 50mM EDTA, pH 7.2)之 50nmol HES 衍生物中，加入 10 微升 2.5 微莫耳 AMAS(Sigma Aldrich, Taufkirchen, D)溶於 DMSO 之溶液。該澄清液在 25°C 下培養 80 分鐘並在 40°C 下培養 20 分鐘。剩餘的 AMAS 可藉 VIVASPIN 0.5 毫升濃縮機，5KD MWCO (VIVASCIENCE, Hannover, D)以 13,000rpm 離心過濾而移除，以磷酸鹽緩衝液清洗 4 次達 30 分鐘。

在剩餘溶液中，加入 15 微克根據實例 5 所製得之硫基 EPO(1 微克/微升溶於磷酸鹽緩衝液中)，而且混合物在 25°C 下培養 16 小時。冷凍乾燥後，如 Invitrogen 所提供之使用說明書所述般，藉由 SDS-Page 利用 NuPAGE 10%Bis-Tris 凝膠/MOPS 緩衝液(Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)分析粗產物。以 Roti-Blue Coomassie 染色劑(Roth, Karlsruhe, D)隔夜將凝膠染色。

實驗結果係表示於圖 5 中。藉由蛋白質帶遷移至較高分

五、發明說明 (105)

子量指示偶合作用成功。所增加的帶寬係歸因於所用 HES 衍生物之分子量分布及連接至該蛋白質之 HES 衍生物的數目。

實例 7.6 : 硫基-紅血球生長素與實例 1.3 和交聯化合物之反應產物的反應

於根據實例 1.3 在 80°C 下 17 小時以及在 25°C 下 3 天之培養條件下所製得並溶於 200 微升 0.1M 磷酸鈉緩衝液 (0.1M, 9.15M NaCl, 50mM EDTA, pH 7.2) 之 50nmol HES 衍生物中，加入 10 微升 2.5 微莫耳 AMAS (Sigma Aldrich, Taufkirchen, D) 溶於 DMSO 之溶液。該澄清液在 25°C 下培養 80 分鐘並在 40°C 下培養 20 分鐘。剩餘的 AMAS 可藉 VIVASPIN 0.5 毫升濃縮機，5KD MWCO (VIVASCIENCE, Hannover, D) 以 13,000rpm 離心過濾而移除，以磷酸鹽緩衝液清洗 4 次達 30 分鐘。

在剩餘溶液中，加入 15 微克根據實例 5 所製得之硫基 EPO (1 微克/微升溶於磷酸鹽緩衝液中)，而且混合物在 25°C 下培養 16 小時。冷凍乾燥後，如 Invitrogen 所提供之使用說明書所述般，藉由 SDS-Page 利用 NuPAGE 10%Bis-Tris 凝膠/MOPS 緩衝液 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) 分析粗產物。以 Roti-Blue Coomassie 染色劑 (Roth, Karlsruhe, D) 隔夜將凝膠染色。

五、發明說明 (106)

實驗結果係表示於圖 5 中。藉由蛋白質帶遷移至較高分子量指示偶合作用成功。所增加的帶寬係歸因於所用 HES 衍生物之分子量分布及連接至該蛋白質之 HES 衍生物的數目。

實例 7.7 : 硫基-紅血球生長素與實例 3.1 和交聯化合物之反應產物的反應

於根據實例 3.1 所製得並溶於 200 微升磷酸鹽緩衝液 (0.1M, 9.15M NaCl, 50mM EDTA, pH 7.2) 之 50nmol HES 衍生物中，加入 10 微升 2.5 微莫耳 AMAS (Sigma Aldrich, Taufkirchen, D) 溶於 DMSO 之溶液，而且該澄清液在 25°C 下培養 80 分鐘並在 40°C 下培養 20 分鐘。該 AMAS 可藉 VIVASPIN 0.5 毫升濃縮機，5KD MWCO (VIVASCIENCE, Hannover, 德國) 以 13,000rpm 離心過濾而移除並以磷酸鹽緩衝液清洗 4 次達 30 分鐘。

在剩餘溶液中，加入 15 微克硫基-EPO(1 微克/微升溶於磷酸鹽緩衝液中)，而且混合物在 25°C 下培養 16 小時。冷凍乾燥後，如 Invitrogen 所提供之使用說明書所述般，藉由 SDS-Page 利用 NuPAGE 10%Bis-Tris 凝膠/MOPS 緩衝液 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) 分析粗產物。以 Roti-Blue Coomassie 染色劑 (Roth, Karlsruhe, D)

五、發明說明 (107)

隔夜將凝膠染色。

實驗結果係表示於圖 6 中。藉由蛋白質帶遷移至較高分子量指示偶合作用成功。所增加的帶寬係歸因於所用 HES 衍生物之分子量分布及連接至該蛋白質之 HES 衍生物的數目。

實例 7.8 : 巖基-紅血球生長素與實例 3.2 和交聯化合物之反應產物的反應

於根據實例 3.2 所製得並溶於 200 微升磷酸鹽緩衝液 (0.1M, 9.15M NaCl, 50mM EDTA, pH 7.2) 之 50nmol HES 衍生物中, 加入 10 微升 2.5 微莫耳 AMAS (Sigma Aldrich, Taufkirchen, D) 溶於 DMSO 之溶液, 而且該澄清液在 25°C 下培養 80 分鐘並在 40°C 下培養 20 分鐘。該 AMAS 可藉 VIVASPIN 0.5 毫升濃縮機, 5KD MWCO (VIVASCIENCE, Hannover, 德國) 以 13,000rpm 離心過濾而移除並以磷酸鹽緩衝液清洗 4 次達 30 分鐘。

在剩餘溶液中, 加入 15 微克巖基-EPO(1 微克/微升溶於磷酸鹽緩衝液中), 而且混合物在 25°C 下培養 16 小時。冷凍乾燥後, 如 Invitrogen 所提供之使用說明書所述般, 藉由 SDS-Page 利用 NuPAGE 10%Bis-Tris 凝膠/MOPS 緩衝液 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) 分析粗產

五、發明說明 (108)

物。以 Roti-Blue Coomassie 染色劑(Roth, Karlsruhe, D) 隔夜將凝膠染色。

實驗結果係表示於圖 6 中。藉由蛋白質帶遷移至較高分子量指示偶合作用成功。所增加的帶寬係歸因於所用 HES 衍生物之分子量分布及連接至該蛋白質之 HES 衍生物的數目。

實例 7.9 : 硫基-紅血球生長素與實例 3.3 和交聯化合物之反應產物的反應

於根據實例 3.3 所製得並溶於 200 微升磷酸鹽緩衝液 (0.1M, 9.15M NaCl, 50mM EDTA, pH 7.2)之 50nmol HES 衍生物中，加入 10 微升 2.5 微莫耳 AMAS(Sigma Aldrich, Taufkirchen, D)溶於 DMSO 之溶液，而且該澄清液在 25°C 下培養 80 分鐘並在 40°C 下培養 20 分鐘。該 AMAS 可藉 VIVASPIN 0.5 毫升濃縮機，5KD MWCO (VIVASCIENCE, Hannover, 德國)以 13,000rpm 離心過濾而移除並以磷酸鹽緩衝液清洗 4 次達 30 分鐘。

在剩餘溶液中，加入 15 微克硫基-EPO(1 微克/微升溶於磷酸鹽緩衝液中)，而且混合物在 25°C 下培養 16 小時。冷凍乾燥後，如 Invitrogen 所提供之使用說明書所述般，藉由 SDS-Page 利用 NuPAGE 10%Bis-Tris 凝膠

五、發明說明 (109)

/MOPS 緩衝液(Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)分析粗產物。以 Roti-Blue Coomassie 染色劑(Roth, Karlsruhe, D)隔夜將凝膠染色。

實驗結果係表示於圖 6 中。藉由蛋白質帶遷移至較高分子量指示偶合作用成功。所增加的帶寬係歸因於所用 HES 衍生物之分子量分布及連接至該蛋白質之 HES 衍生物的數目。

實例 7.10 : 硫基-紅血球生長素與實例 3.4 和交聯化合物之反應產物的反應

於根據實例 3.4 所製得並溶於 200 微升磷酸鹽緩衝液 (0.1M, 9.15M NaCl, 50mM EDTA, pH 7.2)之 50nmol HES 衍生物中，加入 10 微升 2.5 微莫耳 AMAS (Sigma Aldrich, Taufkirchen, D)溶於 DMSO 之溶液，而且該澄清液在 25°C 下培養 80 分鐘並在 40°C 下培養 20 分鐘。該 AMAS 可藉 VIVASPIN 0.5 毫升濃縮機，5KD MWCO (VIVASCIENCE, Hannover, 德國)以 13,000rpm 離心過濾而移除並以磷酸鹽緩衝液清洗 4 次達 30 分鐘。

在剩餘溶液中，加入 15 微克硫基-EPO(1 微克/微升溶於磷酸鹽緩衝液中)，而且混合物在 25°C 下培養 16 小時。冷凍乾燥後，如 Invitrogen 所提供之使用說明書所述

五、發明說明 (110)

般，藉由 SDS-Page 利用 NuPAGE 10%Bis-Tris 凝膠/MOPS 緩衝液(Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)分析粗產物。以 Roti-Blue Coomassie 染色劑(Roth, Karlsruhe, D)隔夜將凝膠染色。

實驗結果係表示於圖 6 中。藉由蛋白質帶遷移至較高分子量指示偶合作用成功。所增加的帶寬係歸因於所用 HES 衍生物之分子量分布及連接至該蛋白質之 HES 衍生物的數目。

實例 7.11 : 硫基-紅血球生長素與實例 3.5 和交聯化合物之反應產物的反應

於根據實例 3.5 所製得並溶於 200 微升磷酸鹽緩衝液 (0.1M, 9.15M NaCl, 50mM EDTA, pH 7.2)之 50nmol HES 衍生物中，加入 10 微升 2.5 微莫耳 AMAS (Sigma Aldrich, Taufkirchen, D)溶於 DMSO 之溶液，而且該澄清液在 25°C 下培養 80 分鐘並在 40°C 下培養 20 分鐘。該 AMAS 可藉 VIVASPIN 0.5 毫升濃縮機，5KD MWCO (VIVASCIENCE, Hannover, D)以 13,000rpm 離心過濾而移除並以磷酸鹽緩衝液清洗 4 次達 30 分鐘。

在剩餘溶液中，加入 15 微克硫基-EPO(1 微克/微升溶於磷酸鹽緩衝液中)，而且混合物在 25°C 下培養 16 小時。

五、發明說明 (111)

冷凍乾燥後，如 Invitrogen 所提供之使用說明書所述般，藉由 SDS-Page 利用 NuPAGE 10%Bis-Tris 凝膠/MOPS 緩衝液(Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)分析粗產物。以 Roti-Blue Coomassie 染色劑(Roth, Karlsruhe, D)隔夜將凝膠染色。

實驗結果係表示於圖 6 中。藉由蛋白質帶遷移至較高分子量指示偶合作用成功。所增加的帶寬係歸因於所用 HES 衍生物之分子量分布及連接至該蛋白質之 HES 衍生物的數目。

實例 7.12 : 巰基-紅血球生長素與實例 3.6 和交聯化合物之反應產物的反應

於根據實例 3.6 所製得並溶於 200 微升磷酸鹽緩衝液 (0.1M, 9.15M NaCl, 50mM EDTA, pH 7.2)之 50nmol HES 衍生物中，加入 10 微升 2.5 微莫耳 AMAS (Sigma Aldrich, Taufkirchen, D)溶於 DMSO 之溶液，而且該澄清液在 25°C 下培養 80 分鐘並在 40°C 下培養 20 分鐘。該 AMAS 可藉 VIVASPIN 0.5 毫升濃縮機，5KD MWCO (VIVASCIENCE, Hannover, 德國)以 13,000rpm 離心過濾而移除並以磷酸鹽緩衝液清洗 4 次達 30 分鐘。

在剩餘溶液中，加入 15 微克巰基-EPO(1 微克/微升溶於

五、發明說明 (112)

磷酸鹽緩衝液中)，而且混合物在 25°C 下培養 16 小時。冷凍乾燥後，如 Invitrogen 所提供之使用說明書所述般，藉由 SDS-Page 利用 NuPAGE 10%Bis-Tris 凝膠/MOPS 緩衝液 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) 分析粗產物。以 Roti-Blue Coomassie 染色劑 (Roth, Karlsruhe, D) 隔夜將凝膠染色。

實驗結果係表示於圖 6 中。藉由蛋白質帶遷移至較高分子量指示偶合作用成功。所增加的帶寬係歸因於所用 HES 衍生物之分子量分布及連接至該蛋白質之 HES 衍生物的數目。

實例 8 : 預備製造 HES-EPO 偶合物

摘要

HES-EPO 偶合物係藉 HES 衍生物 (平均 mw 為 18,000 道耳吞；羥基乙基取代度為 0.4) 偶合至重組人 EPO 之寡醣鏈上已部分 (溫和過碘酸鹽) 氧化之涎酸殘基合成得到。基於碳氫化合物結構分析，所引入之改質不影響核心寡醣鏈的結構完整性，因為經溫和酸處理及 HES 改質之聚醣的 MALDI/TOF-MS 顯露出無法與未改質 EPO 產物中所見區分之完好無缺的中性 N-乙醯基乳糖胺類型鏈。所得結果指示在 EPO 製劑進行改質而無事先移

五、發明說明 (113)

除部分涎酸的情況下，每個 EPO 分子黏結至少 3 個已改質 HES-殘基。缺少約 50% 先前蛋白質之涎酸殘基的 EPO 變體在 SDS-PAGE 中顯示一類似視高分子量遷移率(60-110KDa，相對於 BRP EPO 標準品之 40KDa)。經 HES 改質之 EPO 在標準離子交換色層分析條件下室溫及 pH 3-10 中是安定的。

以利用獲自歐洲藥典及以 BRP EPO 標準製劑為背景已校正過之 RP-HPLC EPO 蛋白質測定方法之 UV 吸收值的蛋白質測定值為基礎，相較於國際 BRP EPO 參考標準品時，紅血球正常小鼠系統之 EPO-生物分析指示經 HES-改質之 EPO 在此分析中具有 2.5-3.0 倍高之特異活性(IU/毫克)。

實例 8.1 : 材料及方法

(a) 藉由 N-糖苷酶消化釋出 N-連接寡糖

樣品與 25 單位(根據製造商的規格，Roche Diagnostics，德國)之重組體 PNGase F 在 37°C 下進行隔夜培養。完全消化可藉 SDS-PAGE 中蛋白質之特異遷移率變動進行監測。藉添加 3 倍體積之冷 100%乙醇及在 -20°C 下培養至少 2 小時可自該多肽中分離出所釋出的 N-聚糖(Schroeter S 等人，1999)。藉由在 4°C 下以 13000rpm

五、發明說明 (114)

離心 10 分鐘的方式移除所沉澱的蛋白質。然後另外以 500 微升冰-冷 75%乙醇清洗該圓球 2 次。所集中上澄液中的寡糖在真空離心機(Speed Vac 濃縮機, Savant 儀器公司, 美國)中乾燥。使用前如下利用 Hypercarb 管匣(25 毫克或 100 毫克之 HyperCarb)使該聚醣樣品脫鹽: 以 3 x 500 微升 80%溶於 0.1%TFA 之乙腈(體積/體積)清洗管柱, 接著以 3 x 500 微升的水清洗之。樣品在裝入該管匣之前, 先以水將其稀釋至最終體積為 300 微升-600 微升, 然後以水徹底清洗該管匣。以 1.2 毫升(25 毫克管匣; 至於 100 毫克管匣, 則以 1.8 毫升)25%溶於水的乙腈溶離出寡糖, 其中該水包含 0.1%三氟乙酸(體積/體積)。以 2M NH₄OH 中和溶離出的寡糖並在 Speed Vac 濃縮機中乾燥。在某些例子中, 藉由<100 微克總(糖)蛋白質之樣品的消化混合物吸附在 100 毫克 HyperCarb 管匣上, 使經 N-糖苷酶所釋出之寡糖進行脫鹽。

(b) 藉由基質輔助雷射脫附離子化/飛行時間質譜儀 (MALDI/ TOF-MS)分析寡糖

使用一 Bruker ULTRAFLEX 飛行時間(TOF/TOF)儀器: 在正離子模式以及負離子模式中利用 2,5-二羥基苯甲酸作為 UV 吸收材料分析天然已去涎酸化寡糖, 其中兩個模式皆利用反射器。對於 Ms-MS 分析, 令所選母離子進行雷射誘導解離(LID)並藉該儀器之第二 TOF 階段(LIFT)分離所得片段離子。1 微升且近似濃度為 1-

五、發明說明 (115)

10pmol/微升之樣品溶液係與各個基質等量混合。將此混合物點在一不銹鋼靶上並於分析前在室溫下乾燥之。

實例 8.2 重組人 EPO(EPO-GT-1)之製備及特徵化

如所述(Muelle PP 等人, 1999, Dorner AJ 等人, 1984)由重組體 CHO 細胞表現 EPO 並根據歐洲藥典(歐洲藥典 4, *Monography 01/2002 : 1316 : 紅血球生成素濃縮溶液*)中所述方法特徵化製法。最終產物的涎酸含量為 12nMol (+/-1.5nMol)/nMol 蛋白質。如所述般(Nimtz 等人, 1999, Grabenhorst, 1999), 藉由 HPAEC-PAD 及藉由 MALDI/TOF-MS 測定 N-連接寡糖的結構。所獲得之 EPO 製劑包含二-、三-及四涎酸化寡糖(分別為 2-12%、15-28%及 60-80%, 硫酸化及五涎酸化鏈係以少量存在)。EPO 製劑之整體糖基化特徵係類似於國際 BRP EPO 標準製劑。

重組體 EPO 之等電聚焦圖案係類似於顯示對應異構重組物之國際 BRP 參考 EPO 標準製劑。25%EPO 蛋白質在多肽鏈之 Ser₁₂₆ 處無 O-糖基化作用。

實例 8.3 已部分去涎酸化之 EPO 型的製備

在 20mM 磷酸鈉緩衝液(pH 7.0)中將 EPO GT-1 蛋白質

五、發明說明 (116)

(2.84 毫克/毫升)加熱至 80°C，然後每 1 毫升 EPO 溶液加入 100 微升 1N H₂SO₄；分別持續培養 5 分鐘、10 分鐘及 60 分鐘，產生不同涎酸化程度之 EPO 製劑。具有 0-4 個涎酸之寡糖的定量測量可在以多肽 N-糖苷酶釋出寡糖後進行，而且 N-連接鏈的分離可利用 Hypercarb 管匣 (25 毫克 HyperSep Hypercarb；ThermoHypersil-Keystone，英國)脫鹽的方式進行。藉加入 1N NaOH 中和 EPO 製劑並在液態 N₂ 下冷凍之，並儲存在 -20°C 下直到進一步使用之。

實例 8.4 已涎酸化 EPO 型之過碘酸鹽氧化作用

在溶於 3.5 毫升 20mM 磷酸鈉緩衝液(pH 7.0)的 10 毫克未經處理或經溫和酸處理 EPO 中，加入 1.5 毫升 0.1M 乙酸钠緩衝液(pH5.5)，並且在冰浴中將混合物冷卻至 0°C；加入 500 微升 10mM 過碘酸鈉並將反應混合物保持在暗處 0°C 下達 60 分鐘。然後加入 10 微升甘油並另外在暗處持續培養 10 分鐘。根據製造商的建議利用 VIVASPIN 濃縮機 (10,000 MWCO，PES Vivascience AG, Hannover, 德國)以 3000rpm 在裝有固定角轉子之實驗室離心機中脫鹽以分離出試劑中已部分氧化之 EPO 型。在液態氮中冷凍後，將 EPO 製劑以 4 毫升之最終體積儲存於 -20°C 下。

五、發明說明 (117)

令數份 10 微克已部分氧化 EPO 製劑進行 N-糖苷酶處理並如所述利用 Hypercarb 管匣分離寡糖。寡糖係藉由溫和酸處理去涎酸化並利用 HPAEC-PAD 分析之，而且如所述 (Nimtz 等人, 1990 及 1993)，其滯留時間係類似這些可靠標準寡糖的滯留時間。

實例 8.5 以二硫蘇糖醇還原 EPO 二硫化物

5 毫克 EPO-GT-1 在 37°C 及 30mM 二硫蘇糖醇 (DTT) 的存在下 5 毫升 0.1M Tris/HCl 緩衝液 (pH 8.1) 中培養 60 分鐘；利用 Vivaspin 濃縮機在 4°C 下以 4 個緩衝液交換循環完成 DTT 之移除。最終已還原 EPO 製劑在液態氮中冷凍並儲存在 -20°C 下 50mM 乙酸鈉緩衝液 (pH5.5) 中。

實例 8.6 EPO 蛋白質測定

EPO 蛋白質之定量測定係根據歐洲藥典 (歐洲藥典 4, Monography 01/2002 : 1316 : 紅血球生成素濃縮溶液) 在光徑為 1 厘米之比色管中藉由測量 280 毫微米之 UV 吸收的方式進行。而且，EPO 可藉 RP-HPLC 方法之應用利用 RP-C4 管柱 (Vydac 蛋白質 C4, 目錄編號 214TP5410, Grace Vydac, CA, USA) 定量之；HPLC 方法係利用紅血球生成素 BRP 1 參考標準品進行校正 (歐洲

五、發明說明 (118)

藥典, Conseil de l'Europe B.P. 907-F67029, Strasbourg Cedex 1)。

實例 8.7 半乳糖氧化酶氧化已去涎酸化 EPO

4.485 毫克已完全去涎酸化之 EPO 在 16 微升過氧化氫分解酶 (6214 單位/200 毫升)及 80 微升半乳糖氧化酶 (2250 單位/毫升, 獲自 *Dactylium dendroides* (Sigma-Aldrich, Steinheim, 德國))的存在下 20mM 磷酸鈉緩衝液 (pH 6.8) 中培養; 在 37°C 下隔夜培養; 分別於開始培養 4 小時後及 8 小時後各加入 20 微升半乳糖氧化酶。

實例 8.8 製備 EPO 樣品以供生物分析用

由活性 HES 培養已經過碘酸鹽或半乳糖氧化酶氧化之 EPO 蛋白質製劑之 EPO 的純化

EPO 樣品的純化(未反應 HES 衍生物之移除)係在室溫下進行。EPO 培養混合物 (近 5 毫克 EPO 蛋白質)係利用緩衝液 A(20mM 溶於二次蒸餾水之 N-嗎福啉丙烷磺酸 [MOPS/NaOH], pH8.0)以 1:10 的比例進行稀釋並塗佈在一含有 3 毫升 Q-瓊脂糖凝膠 HP(藥典代碼 17-1014-03, 批號 220211)之管柱上, 其中該管柱係利用 0.5 毫升/分鐘之流率以 10 倍管柱體積(CV)之緩衝液 A 達平

五、發明說明 (119)

衡。以 6-8CV 之緩衝液 A (流率=0.8 毫升/分鐘)清洗管柱並利用緩衝液 B (溶於二次蒸餾水之 20mM 嗎福啉乙烷磺酸[MES/NaOH], 0.5M NaCl, pH6.5)以 0.5 毫升/分鐘的流率進行溶離。藉由 280 毫微米之 UV 吸收偵測 EPO 並以約 6 毫升溶離之。利用 3 CV 之緩衝液 C (溶於已調整至 pH 6.5 之二次蒸餾水之 20mM MES, 1.5M NaCl)再生管柱並再度利用 10CV 之緩衝液 A (流率=0.7 毫升/分鐘)平衡之。

自 Q-瓊脂糖凝膠步驟所獲得的 EPO 溶離液係利用 Vivaspin 濃縮機及經磷酸鹽緩衝之鹽水(PBS)以每個樣品各 3 個離心循環的方式進行緩衝液交換；以 PBS 將樣品調整至 2 毫升並儲存在 -20°C 下。

由 Q-瓊脂糖凝膠溶離液只獲得 <25% 進行 HES 改質之已部分去涎酸化並接著經溫和過碘酸鹽氧化 EPO 型，因為在所用條件下，基本 EPO 型無法與 Q-瓊脂糖凝膠鍵結並可在流過物中與未反應 HES 衍生物一起被發現。

實例 8.9 具有脈衝電流偵測器之高 pH 陰離子交換色層分析法(HPAEC-PAD)

藉由高 pH 陰離子交換(HPAE)色層分析法利用裝有 CarboPac PA1 管柱(0.4x25 厘米)結合一脈衝電流偵測器

五、發明說明 (120)

(PAD)之 Dionex BioLC 系統(Dionex, USA)分析已純化天然及已去涎酸化寡糖(SChröter 等人, 1999; Nimtze 等人, 1999)。偵測器的電位(E)及脈寬(T)為：E1：+50 毫伏特，T1：480 毫秒；E2：+500 毫伏特，T2：120 毫秒；E3：-500 毫伏特，T3：60 毫秒，而且輸出範圍為 500-1500nA。然後將寡糖注射在經 100%溶劑 A 平衡之 CarboPac PA1 管柱上。對於已去涎酸化寡糖，藉應用在 40 分鐘內，線性梯度(0-20%)增加溶劑 B，接著以 5 分鐘由 20%-100%線性增加溶劑 B 的方式進行溶離(流率：1 毫升/分鐘)。溶劑 A 為 0.2M 溶於二次蒸餾水之 NaOH，溶劑 B 係由 0.6M NaOAc 溶於溶劑 A 所組成。對於天然寡糖，管柱係經 100%溶劑 C(0.1M 溶於二次蒸餾水之 NaOH)平衡，並藉應用在 48 分鐘內，線性梯度(0-35%)增加溶劑 D，接著以 10 分鐘由 35%-100%線性增加溶劑 D 的方式進行溶離(流率：1 毫升/分鐘)。溶劑 D 係由 0.6M NaOAc 溶於溶劑 C 所組成。

實例 8.10 藉由 GC-MS 進行 N-聚糖、經 HES 改質 N-聚糖及 EPO 蛋白質之單糖組成分析

在甲醇分解、N-再乙醯化及三甲基矽烷化後，藉由 GC/MS 分析單糖之對應甲基糖苷[Chaplin, M.F. (1982) 一種分析碳氫化合物之快速且靈敏的方法，*Anal. Biochem.* 123, 336-341]。該等分析係在裝有 30 米 DB5

五、發明說明 (121)

毛細管柱以正離子 EI 模式運作之 Finnigan GCQ 離子阱質譜儀(Finnigan MAT 公司, San Jose, CA)上進行。溫度程式：在 80°C 下等溫進行 2 分鐘，然後以 10°C/分鐘增加至 300°C。

單醣係以其滯留時間及特徵片段圖案進行確認。未經修正之電子波峰積分結果係用於定性分析。由於呔喃型化合物及吡喃型化合物之端基異構性及/或存在性而產生超過一個波峰之單醣係可藉加入所有主峰的方式進行測量。利用 0.5 微克肌醇作為內部標準化合物。

實例 8.11 結果

實例 8.11(a) 經溫和酸處理(部分去涎酸化)EPO-GT-1 之 N-聚醣的特徵化作用

如圖 7 中所示，藉以 N-糖苷酶培養而釋出 N-連接寡醣之前及之後，利用 SDS-PAGE 分析已經溫和酸處理 5、10 或 60 分鐘之 EPO-GT-1 製劑。令 N-連接寡醣進行 HPAEC-PAD 寡醣圖譜鑑定(圖 8)。未經處理 EPO-GT-1 包含 >90% 具有 3 或 4 個涎酸殘基之 N-連接寡醣，然而在溫和酸的存在下培養 5 分鐘後，<40% 碳氫化合物鏈具有 3 或 4 個涎酸殘基。已去涎酸化 N-聚醣之 HPAEC-PAD 顯露由未經處理 EPO-GT-1 所偵測得到且仍在已進行酸處理

五、發明說明 (122)

5、10 或 60 分鐘之製劑中保持安定之中性寡糖的比例。已去涎酸化聚糖之 MALDI/TOF-MS 顯露 <90% 近側岩藻糖在溫和酸處理蛋白質後仍存在。

實例 8.11(b) 經過碘酸鹽處理之 EPO-GT-1 的特徵化作用

圖 10 係比較已事先進行 5 及 10 分鐘酸處理或未經處理之已經溫和過碘酸鹽處理 EPO 型之 SDS-PAGE 遷移率。用於過碘酸鹽氧化涎酸之條件不會改變 EPO 製劑的 SDS-PAGE 圖案(相較於圖 7)。涎酸之氧化作用在 HPAEC-PAD 分析中造成寡糖移至較早溶離時間(比較圖 8 及 11)

實例 8.11(c) 經 HES 改質 EPO 衍生物之特徵化作用

(aa) 以根據實例 2.4 所製得經羥基胺改質之 HES 衍生物 X 進行 EPO-GT-1-A 之 HES 改質的時程

將 400 微克經羥基胺改質之 HES 衍生物 X 加入溶於 20 微升 0.5M NaOAc 緩衝液(pH 5.5)之 20 微克 EPO-GT-1(經溫和過碘酸鹽氧化 EPO, 其在溫和過碘酸鹽氧化作用前係未經酸水解的)中並分別在 30 分鐘、2、4 及 17 小時後藉在液態氮中冷凍樣品以停止反應。接著將樣品

五、發明說明 (123)

儲存在 -20°C 下，直到進一步分析之。

加入 SDS-PAGE 樣品緩衝液並將樣品加熱至 90°C 和塗佈在 SDS-凝膠上。如圖 12 所示般，增加培養時間造成朝較高蛋白質分子量的移位增加。在經羥基胺改質之 HES 衍生物 X 的存在下培養 17 小時後，以分子量標準品的位置為基準(參見圖 12 左側部分)，偵測到一擴散 Coomassie 染色的蛋白質帶遷移至 60 與 11KDa 之間的區域。在以 N-糖苷酶處理後，大部分蛋白質朝去-N-糖基化 EPO 的位置移動(參見圖 12，右側凝膠；箭頭 A 指示 N-糖苷酶的遷移位置，箭頭 B 指示去-N-糖基化 EPO 的遷移位置)；推測在 28KDa 與 36KDa 分子量標準品間的區域見到之擴散蛋白質帶代表已被 HES 改質之 EPO 型及該分子的 O-糖基化位置。鑑於 N-糖苷酶的特異性，吾人由此結果推得下列事實：HES 改質發生在 EPO 蛋白質之聚醣中經過碘酸鹽氧化的涎酸殘基上。

(bb) HES-EPO 偶合物之特徵化作用

如上所述般合成 HES-EPO 偶合物 I (源自溫和過碘酸鹽氧化作用後之 EPO-GT-1，即源自 EPO-GT-1-A)、II (源自進行 5 分鐘酸水解及溫和過碘酸鹽氧化作用之 EPO-GT-1)、III (源自進行 10 分鐘酸水解及溫和過碘酸鹽氧化作用之 EPO-GT-1)。包括一控制培養物(K)，其包含

五、發明說明 (124)

在相同緩衝條件下加入等量未經改質 HES 之未經改質 EPO-GT-1。令該等培養混合物進行進一步純化以接著進行 HES-EPO 衍生物之生物化學分析。

如“材料及方法”(實例 8.8)所述般，令培養物 HES-EPO 偶合物 I、II 及 III 以及控制培養物 K 進行 Q-瓊脂糖凝膠純化步驟以除去離子交換管柱之流過物中所預期之過量未反應 HES-試劑。由於經事先酸處理樣品 II 及 III 中所含之高量基本 EPO 型，吾人預期流過物中包含大量源自這些培育物之已改質 EPO。如圖 13 中所示般，幾乎所有樣品 I 之 EPO 物質皆滯留在 Q-瓊脂糖凝膠管柱中，而只有近 20-30%之樣品 II 及 III 可在含高鹽濃度之溶離餾份中被回收。與控制 EPO 比較時，在流過物及含高鹽之溶離餾份中所有源自含 HES 衍生物 X 之培養物的蛋白質物質在 SDS-PAGE 中具有明顯較高之分子量。

為了更詳細地特徵化，經 HES 改質 EPO 樣品 A 及 K(參見圖 11)係與經過碘酸鹽氧化型 EPO-GT-1-A 比較。令樣品進行 N-糖苷酶處理並如圖 14a 及 14b 所描繪般釋放出 N-聚醣，而在標準 EPO 製劑之 O-己糖基化及未糖基化 EPO 型的位置產生兩個低分子量帶。至於樣品 A，偵測到另一帶遷移至 28KDa mw 標準品位置，其建議 HES 改質係在此 EPO 變體之 O-聚醣處(參考實例 8.11(c)(aa))。此帶

五、發明說明 (125)

(以及經 HES 嚴重改質高 mw 型之 N-糖基化 EPO, 參見圖 14a 及 14b) 在令樣品進行溫和水解後消失, 其係與在紅血球生成素之經過碘酸鹽氧化的涎酸殘基上完成 HES 改質所見一致。

數份 N-糖苷酶培養混合物係利用可完全移除寡糖之涎酸殘基(以及涎酸連接 HES 衍生物)的條件水解; 中和後, 然後混合物吸附在小 Hypercarb 管柱上以使其脫鹽。經水徹底清洗該管柱, 接著以溶於包含 0.1% 三氟乙酸之水的 40% 乙腈溶離鍵結的中性寡糖。令所得寡糖進行 MALDI/TOF-MS。對於偶合物類型之寡糖, 樣品 A、EPO-GT-1-A 及樣品 K 之去涎酸化寡糖餾份的光譜於下顯示相同質量: $m/z=1810\text{Da}$ (雙觸角), $2175=$ 三觸角、 $2540=$ 四觸角, $2906=$ 四觸角加 1 個 N-乙醯基乳糖胺重複基及 $3271=$ 四觸角加 2 個 N-乙醯基乳糖胺重複基; 偵測到對應於缺少岩藻糖(-146)及半乳糖(-162)之小信號, 其可歸因於用於移除涎酸之酸水解條件(參見圖 17、18 及 19 之 MALDI)。

在一平行實驗中, N-糖苷酶消化混合物係吸附在 1 毫升 RP-C18 管匣上(無事先酸水解寡糖)並以溶於包含 0.1% TFA 之水的 5% 乙腈進行溶離; 在這些條件下, EPO 蛋白質完全滯留在 RP-材料上, 以溶於包含 0.1% TFA 之水的 5% 乙腈洗出管柱中的寡糖。以溶於包含 0.1% TFA 之水的 70% 乙腈溶離出去-N-糖基化 EPO 蛋白質。中和獲自經 N-糖苷

五、發明說明 (126)

酶處理之樣品 A、EPO-GT-1-A 及樣品 K 之 RP-C18 步驟的寡糖餾份，接著利用已描述過之 Hypercarb 管匣進行脫鹽。在可定量移除聚糖之涎酸的條件下進行溫和酸處理之前(參見圖 15)及之後(參見圖 16)，令分離出來的寡糖進行 HPAEC-PAD 圖譜鑑定。

獲自經 HES 改質樣品 A 之天然物質的 HPAEC-PAD 分佈圖只顯示可忽略之寡糖信號，而衍生自 EPO-GT-1-A 的寡糖呈現出與圖 11(稱為溫和過碘酸鹽處理後之 EPO-GT-1 的樣品)所示相同之聚糖分佈圖。獲自控制 EPO 樣品(K)之寡糖的溶離分佈圖產生預期圖案(相較於圖 8 之分佈圖)。為了比較，包含國際 BRP-EPO 標準品之天然寡糖分佈圖以供比較並做為參考標準。

溫和酸水解之後，所有寡糖製劑顯示一與如 EPO 製備方法部分所描述用於目前研究中作為起始物之二-、三-及四觸角偶合物類型的碳氫化合物鏈所預期之定性及定量組成相同的天然寡糖結構溶離分佈圖(參見圖 16)。此結果證明 EPO 樣品之 HES 改質作用形成 HES 衍生物共價連接，而該 HES 衍生物可藉 N-糖苷酶與 EPO 蛋白質解離而且是酸不安定的，因為利用已知去涎酸化碳氫化合物之溫和酸處理條件可將其自 N-聚糖中移除(參見圖 14a+b)。

(cc) 藉由 GC-MS 進行 HES-EPO 及 HES-EPO N-聚糖

五、發明說明 (127)

之單醣組成分析

為了進一步確認 EPO 之 HES 改質係發生在該分子之 N-聚醣，以 N-糖苷酶消化 EPO 樣品並使 EPO 蛋白質吸附在 RP-C18 管匣上，而如上述般洗出寡醣物質。如表 2 所示般，只在半胱氨酸殘基進行 HES 改質之 EPO 蛋白質及 EPO 樣品 A2 之寡醣餉份中偵測到葡萄糖及羥基乙基化葡萄糖衍生物。

實例 8.11(d) 活體內分析經 HES 改質 EPO 之生物活性

在紅血球正常之小鼠系統中，EPO-生物分析係根據歐洲藥典所述程序進行；進行 EPO 分析之實驗室係利用國際 BRP EPO 參考標準製劑。對於經 HES 改質之 EPO A2 製劑，測得一 294,600 單位/毫克蛋白質之 EPO 之特異活性平均值，相較於用於進行活性分析之樣品中所含的國際 BRP EPO 參考標準製劑，其指示一近 3 倍高之特異活性。

研究結果係概述於表 3 中。

實例 1 至 8 之參考文獻：

五、發明說明 (128)

Nimtz M, Noll G, Paques EP, Conradt HS

以重組體中國倉鼠卵巢細胞表現之人類組織纖維蛋白溶酶原活化物之碳氫化合物結構。

FEBS Lett. 1990 Oct. 1 ; 271 (1-2) : 14-8

Dorner AJ, Wasley LC, Kaufman RJ.

增加分泌性蛋白質之合成誘導經葡萄糖調節之蛋白質在經丁酸鹽處理過之中國倉鼠卵巢細胞中的表現

J. Biol Chem. 1989 Dec 5 ; 264 (34) : 20602-7

Mueller PP, Schlenke P, Nimtz M, Conradt HS, Hauser H

增生受控制之 BHK-21 細胞中重組體糖蛋白的品質

Biotechnol Bioeng. 1999 Dec 5 ; 65(5) : 529-36

Nimtz M, Martin W, Wray V, Kloppel KD, Augustin J, Conradt HS

以重組體 BHK-21 細胞表現之人類紅血球生成素之涎酸化寡糖的結構

Eur J Biochem. 1993 Apr. 1 ; 213(1) : 39-56

Hermentin P, Witzel R, Vliegenthart JF, Kamerling JP, Nimtz M, Conradt HS

藉具有脈衝電流偵測器之高 pH 陰離子交換色層分析法進行 N-聚糖之圖譜鑑定的方法

五、發明說明 (129)

Anal Biochem. 1992 June ; 203(2) : 281-9

Schroter S, Derr P, Conradt HS, Nimtz M, Hale G, Kirchhoff C.

人類 CD52 之雄性特異改質。

J Biol Chem. 1999 Oct. 15 ; 274(42) : 29862-73

實例 9

重組體 EPO 之製造

A) 在哺乳動物細胞中製造

重組體 EPO 在 CHO 細胞中的製造如下：

將人類 EPO cDNA 之質體載體選殖入真核表現載體中 (pCR3 及後文所稱之 pCREPO)。利用所述標準程序進行定點突變 (Grabenhorst, Nimtz, Costa 等人, 1999, 在生物合成路易士寡糖及涎酸化路易士寡糖基序中人類 $\alpha 1,3/4$ -岩藻糖基轉移酶 III-VII 對偶合物類型 N-聚糖之活體內特異性-由 BHK-21 細胞與人類 β 微量蛋白質一起進行同時表現研究, J. Biol. Chem., 273(47), 30985-30994)。

安定地表現人類 EPO 或其胺基酸變體 (如 Cys-

五、發明說明 (130)

29→Ser/Ala 或 Cys-33→Ser/Ala、Ser-126→Ala 等)之 CHO 細胞係利用磷酸鈣沉澱法產生並如所述 (Grabenhorst 等人)以 G418-硫酸鹽進行選擇。轉染三天後，細胞以 1:5 移植並選殖在含有 10%FBS 及 1.5 克/公升 G418 硫酸鹽之 DMEM 中。

利用此選擇程序，通常 100-500 株存活並另外於該處選擇培養基中繁殖 2-3 週的時間。然後藉由西方(Western)墨點分析法及藉由 IEF/西方墨點分析法分析融合生長單層之細胞培養上澄液的 EPO 表現程度。

EPO 係在攪拌式燒瓶或在 21 灌注反應器中由安定次株所製得。不同醣型之具有不同 NeuAc 含量(如 2-8 個、4-10 個、8-12 個 NeuAc 殘基)的 EPO 係根據所發表的實驗程序利用如下所述多種色層分析程序之組合方法分離出來。

文獻：

Grabenhorst, Conradt, 1999, 醣基轉移酶之細胞質、跨膜及幹荖區域指定其在高基氏體中之活體內功能性低局部化及安定性, J. Biol Chem., 274(51), 36107-16; Grabenhorst, Schlenke, Pohl, Nimtz, Conradt, 1999, 重組體醣蛋白之基因工程及在哺乳動物主細胞中的糖基化途徑, Glycoconj J., 16(2), 81-97; Mueller, Schlenke, Nimtz, Conradt,

五、發明說明 (131)

Hauser, 1999, 重組體醣蛋白產物在增生受控制之 BHK-21 細胞中的品質, 生物技術及生物工程, 65(5), 529-536; Schlenke, Grabenhorst, Nimtz, Conradt, 1999, 具有人類類型涎酸化特徵之經安定轉染 BHK-21 的構造及特徵, 細胞檢查法, 30(1-3), 17-25。

B) 在昆蟲細胞中製造

如文獻中所述般, 在多角體蛋白啟動子的控制下以含有人類 EPO cDNA 之重組體桿狀病毒載體感染細胞後, 由昆蟲細胞株 SF9 及 SF21 製得。

以 2×10^6 或 2×10^7 個細胞/毫升之細胞密度感染在無血清培養基中所生長的細胞並每天測定細胞培養上澄液中的 EPO 滴定度。藉由藍色瓊脂糖凝膠色層分析法、在 Q-瓊脂糖凝膠上進行之離子交換色層分析法及最後在 C4-相上進行之 RP-HPLC 純化 EPO。

產物之純度可藉 SDS-PAGE 及 N-端定序檢視。詳細的碳氫化合物結構分析(N-及 O-糖基化)係根據所發表之程序進行。

文獻：

五、發明說明 (132)

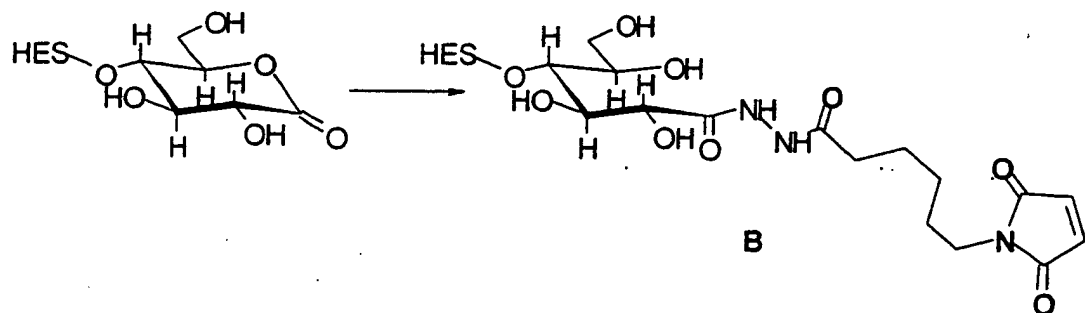
Grabenhorst, Hofer, Nimtz, Jager, Conradt, 1993, 自受桿狀病毒感染的 Sf21 細胞生物合成及分泌人類介白素 2 醣蛋白變體。多肽之特徵化作用及後轉譯改質作用, Eur J Biochem., 215(1), 189-97 ; Quelle, Caslake, Burkert, Wojchowski, 1989, 利用桿狀病毒載體所製得之重組人紅血球生成素的高度表現及純化作用, 血液, 74(2), 652-7。

實例 10

反應性 HES 衍生物之形成

1. SH-反應性 HES

1.1 EMCH 與 Oxo-HES12KD 反應以形成 SH-反應性 HES12KD B



將 0.144 克(0.012 毫莫耳)Oxo-HES12KD(Fresenius 德國專利 DE 196 28 705 A1)溶於 0.3 毫升絕對二甲基亞砜(DMSO)

五、發明說明 (133)

並在氮氣下逐滴加入 34 毫克(0.15 毫莫耳)EMCH(Perbio Science, Deutschland GmbH, Bonn, 德國)溶於 1.5 毫升 DMSO 之混合物中。在 60°C 下攪拌 19 小時後，將反應混合物加入 16 毫升乙醇與丙酮之 1:1 混合物中。藉由離心收集沉澱物，再溶於 3 毫升 DMSO 中並如所述般再度使其沉澱。藉由離心獲得 SH-反應性-HES12KD B 並在真空中乾燥。與巖基-EPO 之偶合反應係描述於實例 1.1, 2.2 中。

替代方法：

在此反應中，可使用所有可呈現以間隔基分開之醯肼官能基及馬來醯亞胺官能基之交聯劑。該類分子之其他實例係表示於表 1 中；標記為“A”，其可由德國 Bonn 市之 Perbio Science Deutschland GmbH 購得。此外，也可使用另一類呈現活性二硫官能基以取代馬來醯亞胺官能基之交聯劑。

1.2 HES 醯基胺之鹵素乙醯胺衍生物

- a) 醯基胺之形成 ¹(¹Manger, Wong, Rademacher, Dwek, 1992, Biochemistry, 31, 10733-10740; Manger, Rademacher, Dwek, 1992, Biochemistry, 31, 10724-10732)

五、發明說明 (134)

將 1 毫克 HES12KD 樣品溶於 3 毫升飽和碳酸氫銨。然後在 30°C 下培養 120 小時期間，加入額外固體碳酸氫銨以保持溶液的飽和度。藉直接冷凍乾燥反應混合物使胺基-HES12KD C 脫鹽。

b) 以氯乙酸酐醯化糖基胺 C

將 1 毫克胺基-HES12KD C 樣品溶於 1 毫升 1M 碳酸氫鈉並在冰上冷卻。對此加入固體氯乙酸酐 (~5 毫克) 晶體並令反應混合物溫熱至室溫。監測 pH，若 pH 下降至 7.0，加入額外的鹼。在室溫下 2 小時後，加入第二份鹼及酸酐。6 小時後，藉通過一混合物床 Amberlite MB-3(H)(OH) 離子交換樹脂使產物氯乙醯胺-HES D1(X=Cl) 脫鹽。

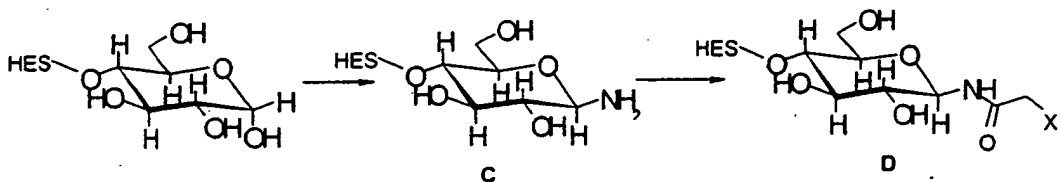
c) 以溴乙酸酐醯化糖基胺 ²(²Black, Kiss, Tull, Withers, 1993, *Carbohydr. Res.*, 250, 195)

如 Thomas³(³Thomas, 1977, *Methodes Enzymol.*, 46, 362) 描述般製備溴乙酸酐。將 1 毫克胺基-HES12KD C 樣品溶於 0.1 毫升乾 DMF 中並在冰上冷卻，然後加入 5 毫克溴乙酸酐。令反應混合物緩慢地溫熱至室溫並攪拌溶液 3 小時。將反應混合物加入 1 毫升 -20°C 之乙醇與丙酮的 1:1 混

五、發明說明 (135)

合物中。藉由離心收集沉澱物，再將其溶解於 0.1 毫升 DMF 並如所述般再度沉澱之。藉由離心獲得溴乙醯胺-HES D2(X=Br)並在真空中乾燥之。與硫基-EPO 之偶合反應係如實例 11, 1.2 所述般。

- d) 如對 D2 所描述般合成對應碘-衍生物 D3 (X=I)。
使用 N-琥珀醯亞胺基碘乙酸酯取代溴乙酸酐



並所有步驟皆在暗處中進行。

替代方法：

可用其他活性型態之鹵素乙酸以醯化胺基，如

- -溴化物或-氯化物
- 酯，如 N-羥基琥珀醯亞胺酯、具有經取代酚之酯(對-硝基酚、五氟酚、三氯酚等)

此外，可使用所有具有以間隔基分開之胺基反應性基及鹵素乙醯官能基的交聯劑。其實例為 SBAP。此分子及其他分子可由德國 Bonn 市之 Perbio Science Deutschland GmbH 購得。其在表 1 中係以 "D" 為標記。對於用作連接

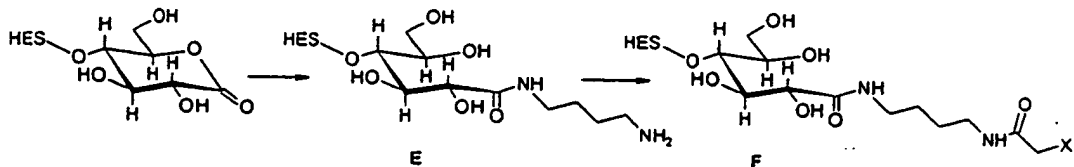
五、發明說明 (136)

胺基-HES 與 硫基-EPO，而無分離鹵素乙醯胺-HES 衍生物的交聯劑，參見實例 11, 1.2 的註解。

1.3 胺基-HES E¹ 之鹵素乙醯胺衍生物

- a) 1,4-二胺基丁烷與 Oxo-HES12KD 反應以形成胺基 -HES12KD E⁴(⁴S. Frie, Diplomarbeit, Fachhochschule Hamburg, 1998)

將 1.44 克(0.12 毫莫耳)Oxo-HES12KD 溶於 3 毫升乾二甲基亞砜(DMSO)並在氮氣下逐滴加入 1.51 毫升(15 毫莫耳)1,4-二胺基丁烷溶於 15 毫升 DMSO 之混合物中。在 40°C 下攪拌 19 小時後，將反應混合物加入 160 毫升乙醇與丙酮之 1:1 混合物中。藉由離心收集沉澱物胺基-HES12KD E，再將其溶解於 40 毫升的水中並以水透析 4 天 (SnakeSkin 透析管, 3.5 KD 移除, Perbio Science Deutschland GmbH, Bonn, 德國)並冷凍乾燥之。



- b) 如上 1.3 對氯乙醯胺-HES12KD D1 所作的描述，

五、發明說明 (137)

製備氯乙醯胺-HES12KD F1。

c) 如上 1.3 對溴乙醯胺-HES12KD D2 所作的描述，製備溴乙醯胺-HES12KD F2(X=Br)。與硫基-EPO 之偶合反應係描述於實例 11, 1.2 中。

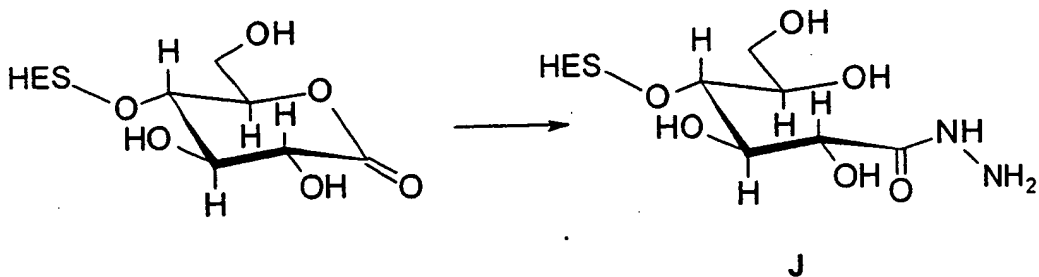
d) 對應碘-衍生物 F3(X=I)在與硫基-EPO 反應之前未將其分離出來。實驗係描述於實例 11, 1.1 中。

替代方法：

見上 1.2。

2. CHO-反應性 HES

2.1 醯肼-HES

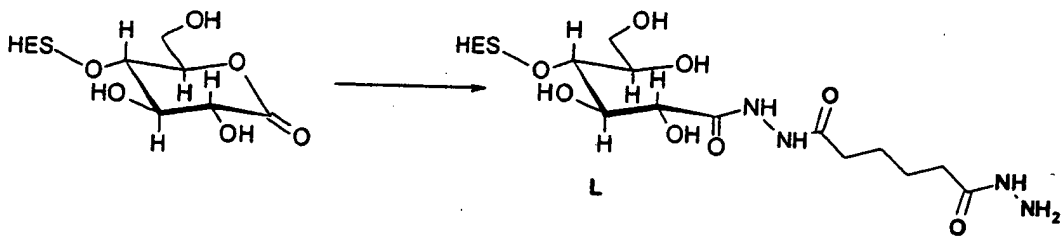


a) 醯肼與 Oxo-HES12KD 之反應

將 1.44 克(0.12 毫莫耳)Oxo-HES12KD 溶於 3 毫升絕對二甲基亞砒(DMSO)並在氮氣下逐滴加入 0.47 毫

五、發明說明 (138)

升(15 毫莫耳)醯肼溶於 15 毫升 DMSO 之混合物中。在 40°C 下攪拌 19 小時後，將反應混合物加入 160 毫升乙醇與丙酮之 1:1 混合物中。藉由離心收集沉澱產物 J，再將其溶解於 40 毫升水中並以 0.5%(體積/體積)三乙基胺之水溶液透析 2 天並以水透析 2 天(SnakeSkin 透析管, 3.5 KD 移除, Perbio Science Deutschland GmbH, Bonn, 德國)並冷凍乾燥之。與已氧化 Glyco-EPO 之偶合反應係描述於實例 12, 2.2 中。



b) 己二酸二醯肼與 Oxo-HES12KD 之反應

在 65°C 下將 1.74 克(15 毫莫耳)己二酸二醯肼溶於 20 毫升絕對二甲基亞砷(DMSO)並在氮氣下逐滴加入 1.44 克(0.12 毫莫耳)溶於 3 毫升絕對 DMSO 之 Oxo-HES12KD。在 60°C 下攪拌 68 小時後，將反應混合物加入 200 毫升水中。包含 L 之溶液以 0.5%(體積/體積)三乙基胺之水溶液透析 2 天並以水透析 2 天(SnakeSkin 透析管, 3.5 KD 移除, Perbio Science Deutschland GmbH, Bonn, 德國)並冷凍乾燥之。與已氧化 Glyco-EPO 之偶合反應係描述於實例 12, 2.2

五、發明說明 (139)

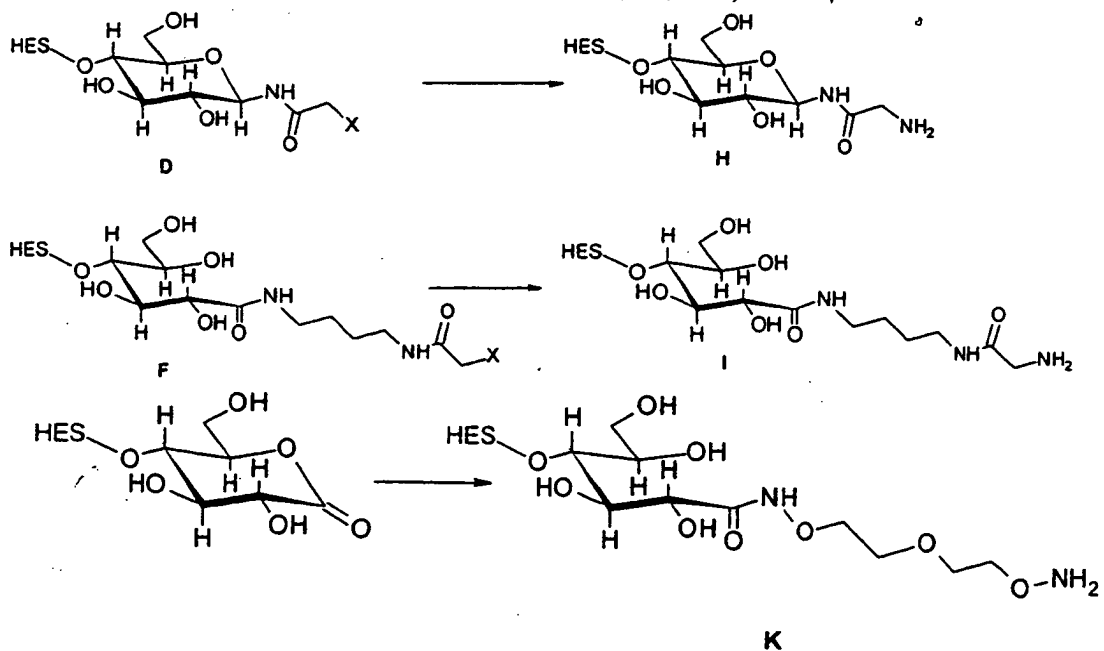
中。

替代方法：

此外，可使用兩個醯肼基被任何間隔基分開之衍生物。

3. 其他胺基-HES12KD 衍生物 I 及 H¹

D 或 F 之氨解作用係分別藉溶解 1 毫克各鹵素乙醯胺樣品於 0.1 毫升飽和碳酸銨的方式進行。然後在 30°C 下培養 120 小時期間，加入額外的固體碳酸銨以保持溶液的飽和度。將反應混合物加入 1 毫升 -20°C 之乙醇與丙酮的 1:1 混合物中。藉由離心收集沉澱物，再將其溶解於 0.05 毫升水中並如所述般再度沉澱之。藉由離心獲得產物胺基-HES H 或 I 並在真空中乾燥之。與已氧化 Glyco-EPO 之偶合反應係描述於實例 12, 4.1 中。



五、發明說明 (140)

4. 經羥基胺基改質之 HES12KD K

O-[2-(2-胺氧基-乙氧基)-乙基]-羥基胺可如 Boturyn 等人所描述般以 2 步驟由市售材料合成得到⁵(⁵Boturyn, Boudali, Constant, Defrancq, Lhomme, 1997, *Tetrahedron*, 53, 5485)。將 1.44 克(0.12 毫莫耳)Oxo-HES12KD 溶於 3 毫升絕對二甲基亞砒(DMSO)並在氮氣下逐滴加入 2.04 克(15 毫莫耳)O-[2-(2-胺氧基-乙氧基)-乙基]-羥基胺溶於 15 毫升 DMSO 之混合物中。在 65°C 下攪拌 48 小時後，將反應混合物加入 160 毫升乙醇與丙酮之 1:1 混合物中。藉由離心收集沉澱產物 K，再將其溶解於 40 毫升水中並以水透析 4 天 (SnakeSkin 透析管, 3.5 KD 移除, Perbio Science Deutschland GmbH, Bonn, 德國)並冷凍乾燥之。與已氧化 Glyco-EPO 之偶合反應係描述於實例 12, 3.1 中。

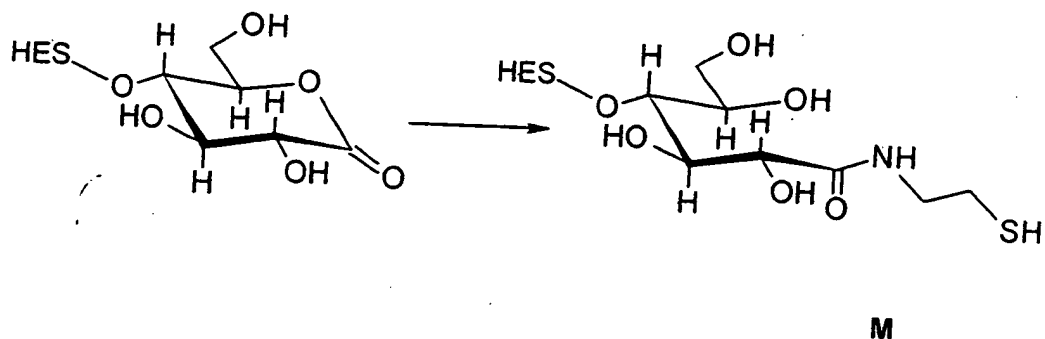
替代方法：

五、發明說明 (141)

此外，可使用兩個羥基胺基被任何間隔基分開之衍生物。

5. 硫基-HES12KD

5.1 加成至 Oxo-HES12KD



將 1.44 克(0.12 毫莫耳)Oxo-HES12KD 溶於 3 毫升絕對二甲基亞砜(DMSO)並在氮氣下逐滴加入 1.16 克(15 毫莫耳)半胱胺溶於 15 毫升 DMSO 之混合物中。在 40°C 下攪拌 24 小時後，將反應混合物加入 160 毫升乙醇與丙酮之 1:1 混合物中。藉由離心收集沉澱產物 M，再將其溶解於 40 毫升水中並以 0.5%(體積/體積)三乙基胺之水溶液透析 2 天並以水透析 2 天(SnakeSkin 透析管, 3.5 KD 移除, Perbio Science Deutschland GmbH, Bonn, 德國)並冷凍乾燥之。與已氧化 Glyco-EPO 之偶合反應係描述於實例 12, 2.1 中。

替代方法：

五、發明說明 (156)

試劑監測餾份中的蛋白質含量，集中所有包含蛋白質偶合物的餾份並在以水進行隔夜透析後，藉由冷凍乾燥獲得偶合物。

程序注意事項：

脘加成物在極端 pH 下有些不穩定。對於可能包含低 pH 處理之應用，吾人藉由溶於 PBS 緩衝液之 30mM 氰硼氫化鈉的處理可將脘還原成脘。對於大部分應用而言，此額外步驟是不需要的。

2.2 實例實驗程序 8

將已氧化 Glyco-EPO 直接偶合至醯脘-HES12KD L 中。

材料

- A. 獲自 6.1.1 之已氧化 Glyco-EPO 溶液：5 毫克/毫升之 Glyco-EPO 溶於乙酸鹽緩衝液中。
- B. 醯脘-HES12KD L 或 J：10 毫克/毫升溶於乙酸鹽緩衝液中。
- C. 乙酸鹽緩衝液：0.1M 乙酸鈉溶液，pH 5.5
- D. 凝膠過濾管柱：例如，Sephadex®G-200(1.5 x 45 厘米)。
- E. Coomassie® 蛋白質分析試劑 (Perbio Science

五、發明說明 (157)

Deutschland GmbH, Bonn, 德國)

F. PBS, 經磷酸鹽緩衝之鹽水: 10mM 磷酸鈉, 150mM NaCl, pH 7.4。

方法

結合 1 毫升醯肼-HES12KD L 溶液及 1 毫升已氧化 Glyco-EPO 溶液並反應混合物在室溫下隨著攪拌反應 16 小時。將反應混合物塗佈在經 PBS 平衡過之 Sephadex®G-200(1.5 x 45 厘米)中並收集 1 毫升餾份。利用 Coomassie 蛋白質分析試劑監測餾份中的蛋白質含量, 集中所有包含蛋白質偶合物的餾份並在以水進行隔夜透析後, 藉由冷凍乾燥獲得偶合物。偶合作用的結果係表示於圖 24 中。所觀察到的分子量變動證明偶合作用是成功的。此黏稠物係因 HES 之不均一性所造成。圖 25 證明 HES 係偶合至碳氫化合物側鏈之碳氫化合物部分。

程序注意事項:

脘加成物在極端 pH 下是有些不穩定。對於可能包含低 pH 處理之應用, 吾人可藉由溶於 PBS 緩衝液之 30mM 氰硼氫化鈉的處理將脘還原成肼。對於大部分應用而言, 此額外步驟是不需要的。

五、發明說明 (158)

3. 與羥基胺-衍生物偶合⁸(⁸Rose, 1994, *Am. Chem. Soc.*, 116, 30)

3.1 實例實驗程序 9

已氧化 Glyco-EPO 偶合至羥基胺-HES12KD K。

材料

- A. 獲自 6.1.1 之已氧化 Glyco-EPO 溶液：5 毫克/毫升 Glyco-EPO 溶於乙酸鹽緩衝液。
- B. 羥基胺-HES12KD K：10 毫克/毫升溶於乙酸鹽緩衝液中。
- C. 乙酸鹽緩衝液：0.1M 乙酸钠溶液，pH 5.5
- D. 凝膠過濾管柱：例如，Sephadex®G-200(1.5x45 厘米)。
- E. Coomassie® 蛋白質分析試劑 (Perbio Science Deutschland GmbH, Bonn, 德國)
- F. PBS，經磷酸鹽緩衝之鹽水：10mM 磷酸鈉，150mM NaCl，pH 7.4。

方法

結合 1 毫升羥基胺-HES12KD K 溶液及 1 毫升已氧

五、發明說明 (159)

化 Glyco-EPO 溶液並令反應混合物在室溫下隨著攪拌反應 16 小時。將反應混合物塗佈在經 PBS 平衡之 Sephadex®G-200(1.5x45 厘米)中並收集 1 毫升餾份。利用 Coomassie 蛋白質分析試劑監測餾份中的蛋白質含量，集中所有包含蛋白質偶合物的餾份並相對於水隔夜透析後，藉由冷凍乾燥獲得偶合物。所得偶合物係表示於圖 24 中。在膠道 2 中所觀察到的分子量變動證明偶合作用是成功的。此黏稠物係因 HES 之不均一性所造成。圖 25 證明 HES 係偶合至碳氫化合物側鏈之碳氫化合物部分。

實例 13

已經半乳糖氧化酶處理之 EPO N-聚糖的特徵化

重組體 EPO 或已部分去涎酸化 EPO 型(藉由有限溫和酸水解所產生)係於過氧化氫分解酶的存在下 0.05M 磷酸鈉緩衝液 pH 7.0 中與半乳糖氧化酶於 37°C 下培養 30 分鐘-4 小時。藉移除 50 微克 EPO 部分，接著以多肽 N-葡聚糖酶處理蛋白質。

在除去涎酸之前及之後，如所述般(Grabenhorst 等人, 1999, Nimitz 等人, 1993/1994; Schlenke 等人, 1999)令所釋出的 N-連接寡糖(藉由 SDS-PAGE 偵測去-N-糖基化多肽的方式

五、發明說明 (160)

監測)進行 HPAEC-PAD 圖譜鑑定。

藉由 HPAEC-PAD 所觀察到的典型變動可進行各 EPO 寡糖中已氧化半乳糖殘基量之測量並且也可藉由寡糖混合物之 MALDI/TOD MS 證實。

實例 14

已經 HAS 改質之 EPO 的特徵化

已經 HAS 改質之 EPO 型與未反應 EPO 或 HAS-前驅物分子之分離可利用如，Ultrogel AcA 44/54 或類似凝膠過濾介質藉由凝膠過濾達到。或者，在 4 毫升管柱上藉由免疫親和力分離 EPO 以移除未反應 HAS，接著藉由凝膠過濾分離 (如利用可分離相對分子量介於 20kDa 與 200kDa 間之球狀蛋白質的基質)，其中該管柱包含偶合至 Affigel(BioRad)之單株抗體。

經 HAS 改質 HPO 係藉由 SDS-PAGE 分析(利用 12.5 或 10%丙烯醯胺凝膠)以 Coomassie 亮藍將凝膠染色後經由其相較於未經處理 EPO 較高分子量的偵測進行識別。經 HAS 改質 HPO 多肽之較高分子量也可利用對抗重組人 EPO 所產生的多株抗體藉由西方墨點分析樣品進行識別。

五、發明說明 (161)

EPO 型之 N-聚醣改質可藉以多肽 N-聚醣酶成功地將其自 EPO 蛋白質移除(獲自德國 Roch 之重組體 N-糖苷酶，其使用 25 單位/毫克 EPO 蛋白質在 37°C 16 小時)獲得證明；SDS-PAGE 分析產生 EPO 蛋白質典型變動至近 20KDa 之已經 N-糖苷酶處理未經改質 EPO 的遷移率位置。

單已去涎酸化並經半乳糖氧化酶處理過 EPO O-聚醣在 Ser126 之改質可藉偵測其相較於未經處理去-N-糖基化 EPO 之遷移率位置由去-N-糖基化產物的 SDS-PAGE 遷移率可獲得證明。必要時，經改質 EPO 可在 SDS-PAGE 分析前於 C8-相上藉由 RP-HPLC 進行分餾。EPO 之 HAS O-聚醣改質也可藉 β -消去 O-聚醣並偵測在利用對抗重組人 EPO 所產生的多株抗體之西方墨點中 EPO 之去-O-糖基化型進行分析。

實例 15

定量測定 EPO 及經改質 EPO 型

EPO 型係如歐洲藥典(2000, Erythropoietini Solutio concentrate, 1316, 780-785)所述般藉由 UV 測量進行定量並與國際 BRP 參考 EPO 標準品比較。或者，藉由 RP-

五、發明說明 (162)

HPLC 分析利用 RP-C4-管柱及 254 毫微米之吸收測定 EPO 的濃度，其校正係使用 20、40、80 及 120 微克 BRP 標準 EPO 參考製劑。

實例 16

經 HES 改質重組人 EPO 之活體內生物活性

如 Krystal[Krystal, 1984, Exp. Heamatol., 11, 649-660]所述利用紅血球生成素生物活性分析測試已純化經 HES 改質 EPO。

在 NMRI 小鼠中藉由苯基胍鹽酸之處理引發貧血並收集脾臟細胞並如[Fibi 等人, 1991, 血液, 77, 1203 及其後數頁]所述般使用之。在 96 井微量滴定盤中以 3×10^5 個細胞/井培養 EPO 稀釋液。在在濕大氣(5%CO₂)中 37°C 下 24 小時後，細胞以每井 1 μ Ci 之 ³H-胸腺嘧啶核苷進行標記達 4 小時。所摻入的放射性係利用液相閃爍計數進行測定。國際參考 EPO 標準品(BRP-標準品)係用於對照。

或者，EPO 生物活性可利用對 EPO 敏感的細胞線 TF-1 進行活體內分析而量得(Kitamura 等人, J. cell Phys., 140, 323-334)。清洗呈指數生長細胞使其不含生長因子並另外在一系列 EPO 稀釋液的存在下培養 48 小時。如 Mosmann 所述

五、發明說明 (163)

[Mosman, 1983, J. Immuno, Methods, 65, 55-63]利用 MTT 減少分析法分析細胞之增生。

實例 17

EPO 及經 HAS 改質 EPO 型之活體內活性測定

活體內活性測定係在紅血球正常小鼠中藉由動物接受預知劑量之 EPO 或經改質 EPO 型後之 4 天後測量網狀紅血球增加的方式進行。分析係利用 BRP EPO 標準品進行，其中該 BRP EPO 標準品係相對於紅血球增多小鼠分析中的 WHO EPO 標準品做校正。EPO 樣品係以經磷酸鹽緩衝之鹽水稀釋，其中該鹽水含有 1 毫克/毫升之牛血清蛋白 (Sigma)。

每隻動物經由皮下受到 0.5 毫升溶於 Dulbecco 之緩衝鹽水的 EPO 試驗溶液(對應於 100、80、40 或 20IU/毫升 BRP 標準 EPO 之 EPO 蛋白質當量)感染。感染 4 天後採集血樣並以吡啶橘將網狀紅血球染色：網狀紅血球之定量測量係藉由流式細胞儀在採集血樣後 5 小時內共計算 30,000 個血液細胞方式進行(參見 Ph. Eur, 2000, Erythropoietini Solutio concentrate, 1316, 780-785 及歐洲藥典(1996/2000, 附錄 2002))。

五、發明說明 (164)

實例 18

活體內半衰期測定

以特定量未經改質或經 HAS 改質 EPO 型靜脈注射兔子。在特定時間獲得血樣並製備血清。血清紅血球生成素量係藉活體內生物分析或藉 EPO-特異市售 ELISA 測得。

實例 19

活體內藥物動力學

在小鼠中：各動物經皮下接受 300IU EPO/公斤。後處理 7 天後，測定各動物的血容比。在所有經已改質 EPO 處理之動物皆觀察到血容比明顯增加，鑑於未經處理 EPO 之相當短的半衰期，其為預期結果。已改質 EPO 經處理族群之血容筆的平均變化係明顯不同於未經處理 EPO 族群及控制族群。

在兔子中：以單劑量之未經改質或經 HAS 改質 EPO 處理兔子，其中該劑量係對應於 200 或高達 800ng/公斤體重。利用市售 EPO-特異 ELISA 分析 2、6、16、24 及 48 小時後之血樣以測定血漿濃度。測得平均血漿 EPO 濃度並如所述：(Zettlmissl 等人, 1989, J. Biol. 264,

五、發明說明 (165)

21153-21159)由 ELISA 值計算平均初半衰期(α -相)及末相半衰期(β -相)。

文獻：

Sytkowski, Lunn, Risinger 及 Davis, 1999, 包含相同重複結構域呈現較高生物性質之紅血球生成素融合蛋白質, J. Biol. Chem., 274, 24773-24778。

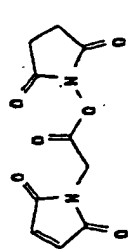
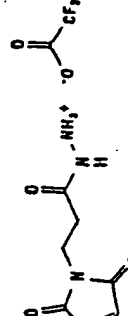
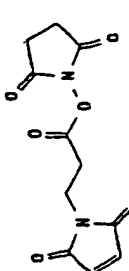
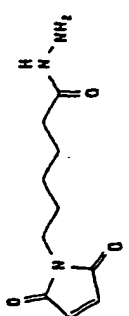
實例 20


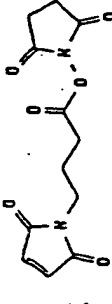

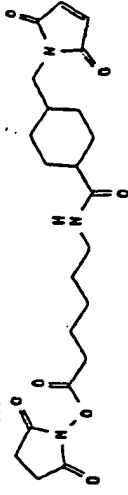
經 HES 改質重組人 IL-2 之活體內生物活性的評估

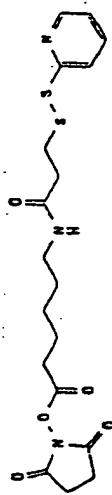
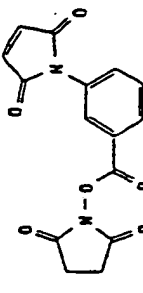

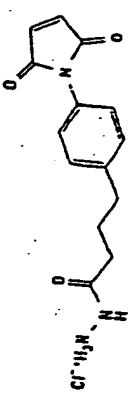
經改質 IL2 係藉凝膠過濾在 Ultrogel AcA 54 上回收。對應餾份部分係經滅菌過濾並利用 IL2 相依鼠 CTLL-2 細胞株測定 IL2 生物活性[Gillis, Ferm, On 及 Smith, 1978, J. Immunol., 120, 2027-2032]。活性係關於國際參考 IL2 標準製劑。

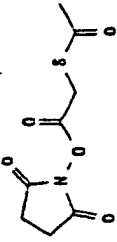
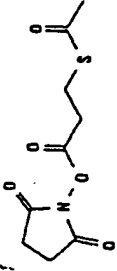
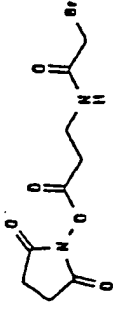
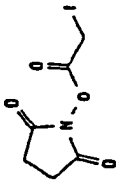
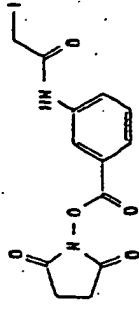
裝
訂
線

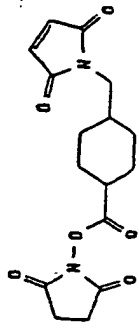
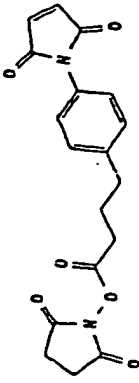
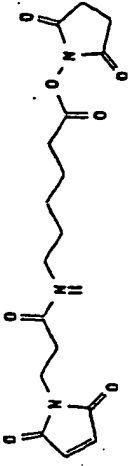
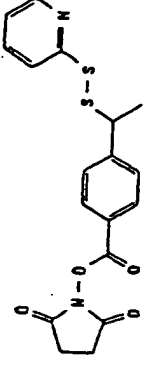
表 1

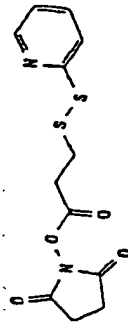

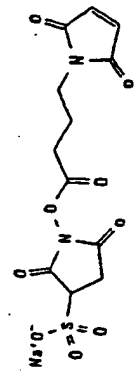
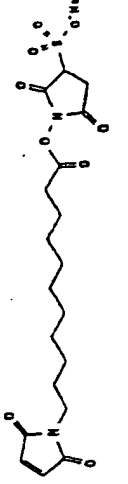
簡寫	化學名稱	類型	
AMAS	N-(α -馬來醯亞胺乙醯氧基)琥珀醯亞胺酯	E	
BMPH	N-(β -馬來醯亞胺丙酸)醯肼·TFA	A	
BMPS	N-(β -馬來醯亞胺丙氧基)琥珀醯亞胺酯	E	
EMCH	N-(ϵ -馬來醯亞胺己酸)醯肼	A	

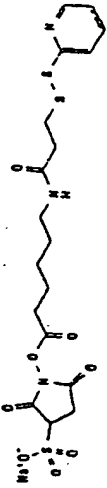
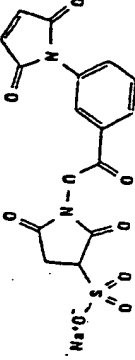
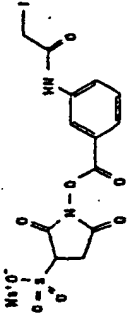
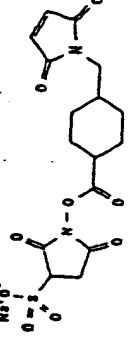
簡寫	化學名稱	類型	
EMCS	N-(ε-馬來醯亞胺己醯氧基)琥珀醯亞胺 酯	E	
GMBS	N-γ-馬來醯亞胺丁醯氧基-琥珀醯亞胺 酯	E	
KMUH	N-(κ-馬來醯亞胺十一酸)醯肼	A	
LC-SMCC	琥珀醯亞胺基 4-(N-馬來醯亞胺甲基) 環己烷-1-羧基-(6-醯胺基-己酸酯)	E	

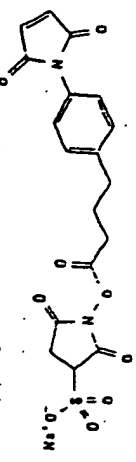
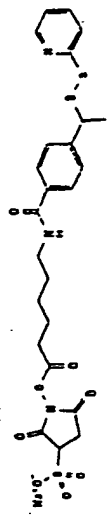
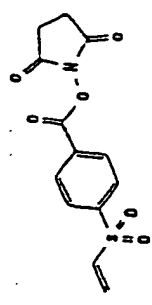
簡寫	化學名稱	類型	
LC-SPDP	琥珀醯亞胺 6-(3'-[2-吡啶基-二硫基]丙醯胺基)己酸酯	F	
MBS	間-馬來醯亞胺苯甲醯基-N-羥基琥珀醯亞胺酯	E	
M ₂ C ₂ H	4-(N-馬來醯亞胺甲基)-環己烷-1-羧基-醯肼·HCl·1/2 二噁烷	A	
MPBH	4-(4-N-馬來醯亞胺苯基)-丁酸醯肼·HCl	A	

簡寫	化學名稱	類型	
SATA	N-琥珀醯亞胺基 S-乙醯硫基-乙酸酯	H	
SATP	N-琥珀醯亞胺基 S-乙醯硫基-丙酸酯	H	
SBAP	琥珀醯亞胺基 3-(溴乙醯胺基)丙酸酯	D	
SIA	N-琥珀醯亞胺基碘乙酸酯	C	
SIAB	N-琥珀醯亞胺基(4-碘乙醯基)胺基苯甲酸酯	C	

簡寫	化學名稱	類型	
SMCC	琥珀醯亞胺基 4-(N-馬來醯亞胺甲基) 環己烷-1-羧酸酯	E	
SMPB	琥珀醯亞胺基 4-(對-馬來醯亞胺苯基) 丁酸酯	E	
SMPH	琥珀醯亞胺基-6-(β-馬來醯亞胺丙醯胺 基)己酸酯	E	
SMPT	4-琥珀醯亞胺氧基-羰基-甲基-α-(2-吡 啶二硫基)甲苯	F	

簡寫	化學名稱	類型	
SPDP	N-琥珀醯亞胺基 3-(2-吡啶二硫基)丙酸酯	F	
磺酸基-EMCS	N-(ε-馬來醯亞胺己醯氧基)磺酸基琥珀醯亞胺酯	E	
磺酸基-GMBS	N-γ-馬來醯亞胺丁醯氧基-磺酸基琥珀醯亞胺酯	E	
磺酸基-KMUS	N-(κ-馬來醯亞胺十一醯氧基)-磺酸基琥珀醯亞胺酯	E	

簡寫	化學名稱	類型	
<p>磺酸基 -LC-SPDP</p>	<p>磺酸基琥珀亞胺基 6-(3'-[2-吡啶基-二硫基]丙基)己酸酯</p>	<p>F</p>	
<p>磺酸基-MBS</p>	<p>間-馬來亞胺基甲磺基-N-羥基磺酸基琥珀亞胺酯</p>	<p>E</p>	
<p>磺酸基-SIAB</p>	<p>磺酸基琥珀亞胺基(4-碘乙基)胺基甲酸酯</p>	<p>C</p>	
<p>磺酸基-SMCC</p>	<p>磺酸基琥珀亞胺基 4-(N-馬來亞胺基)甲(基)環己烷-1-羧酸酯</p>	<p>E</p>	

簡寫	化學名稱	類型	
磺酸基-SMPB	磺酸基琥珀醯亞胺基 4-(對-馬來醯亞胺苯基)丁酸酯	E	
磺酸基-LC-SMPT	磺酸基琥珀醯亞胺基 6-(α -甲基- α -[2-吡啶基二硫基]-甲苯醯胺)己酸酯	F	
SVSB	N-琥珀醯亞胺基-(4-乙烯基磺醯基)苯甲酸酯	G	

五、發明說明 (166)

表 2

獲自經 HES 改質 EPO 及控制樣品之聚醣的單醣組成分析

**單醣	I. 獲自 A2 之 聚醣	II. 獲自 EPO- GT-1A 之聚 醣	III. 獲自 K2 之 聚醣	III. 獲自 A2 之 聚醣	IV. 獲自 EPO- GT-1A 之聚 醣	V. 獲自 K2 之 聚醣	VI. 經半 胱胺 酸改 質之 EPO 蛋白 質*
岩藻糖	1,935	3,924	2,602	2,246	4,461	2,601	2,181
甘露糖	6,028	11,020	9,198	6,379	11,668	6,117	6,260
半乳糖	8,886	19,935	14,427	10,570	16,911	11,555	10,386
葡萄糖	17,968	---	---	21,193	微量	微量	33,021
GlcNAc	7,839	21,310	14,440	11,360	15,953	10,503	10,498
GlcHe1	5,583	---	---	5,926	---	---	14,857
GlcHe2	1,380	---	---	1,552	---	---	3,775
NeuNAc	5,461	822	4,504	3,895	4,871	13,562	13,003
肌醇	1,230	2,310	1,620	2,050	1,320	1,134	1,087
<p>*令該當量之經 Cys-HEs 改質 EPO 蛋白質係進行組成分析：EPO 蛋白質係藉由色層分析法如上述般在 Q-Q-瓊脂糖凝膠管住上自 HES 培養混合物中分離出來並藉由離心利用 Vivaspin 5 分離裝置使其脫鹽。</p> <p>**單醣測定係由過三甲基矽烷基化甲基醣苷之單次 GC 操作完成；所列</p>							

五、發明說明 (167)

波峰之電子積分值係尚未對衍生程序期間的損失及各化合物的回收量進行修正。

表 3

樣品編號	樣品描述	所算得 EPO 樣品之特異活性 (以 A280nm 及 RP-HPLC 測定為基礎)
850247	1.經 HES 改質 EPO A2	344,000 U/毫克
850248	2.EPO-GT-1-A	82,268 U/毫克
850249	3.控制 EPO K2	121,410 U/毫克
850250	4.BRP EPO 標準品	86,702 U/毫克
850251	1.經 4 倍體積之 PBS 稀釋	309,129 U/毫克
850252	2.經 4 倍體積之 PBS 稀釋	94,500 U/毫克
850253	3.經 4 倍體積之 PBS 稀釋	114,100 U/毫克
850254	4.經 4 倍體積之 PBS 稀釋	81,200 U/毫克
850255	5.經 4 倍體積之 PBS 稀釋	230,720 U/毫克

圖式簡單說明

圖 1

圖 1 顯示根據實例 5.1 所製得之 HES-EPO 偶合物的 SDSPage 分析。

膠道 A：蛋白質標記 Roti®-Mark PRESTAINED(Carl

五、發明說明 (168)

Roth GmbH+Co, Karlsruhe, D)；從頂端至底部，蛋白質標記之分子量(以 kD 表示)：245、123、77、42、30、25.4 及 17。

膠道 B：根據實例 5.1 偶合後之粗產物。

膠道 C：EPO 起始物。

圖 2

圖 2 顯示根據實例 5.3 所製得之 HES-EPO 偶合物的 SDSPage 分析。

膠道 A：根據實例 5.3 偶合後之粗產物。

膠道 B：EPO 起始物。

膠道 C：蛋白質標記 Roti®-Mark PRESTAINED(Carl Roth GmbH+Co, Karlsruhe, D)；從頂端至底部，蛋白質標記的分子量(以 kD 表示)：245、123、77、42、30、25.4 及 17。

圖 3

圖 3 顯示根據實例 5.4 及 5.5 所製得之 HES-EPO 偶合物的 SDSPage 分析。

膠道 A：蛋白質標記 Roti®-Mark PRESTAINED(Carl Roth GmbH+Co, Karlsruhe, D)；從頂端至底部，蛋白質標記的分子量(以 kD 表示)：

五、發明說明 (169)

245、123、77、42、30、25.4 及 17。

膠道 B：根據實例 5.4 偶合後之粗產物。

膠道 C：根據實例 5.5 偶合後之粗產物。

膠道 D：EPO 起始物。

圖 4

圖 4 顯示根據實例 7.1 及 7.4 所製得之 HES-EPO 偶合物的 SDSPage 分析。

膠道 A：蛋白質標記 Roti®-Mark PRESTAINED(Carl Roth GmbH+Co, Karlsruhe, D)；從頂端至底部，蛋白質標記的分子量(以 kD 表示)：
245、123、77、42、30、25.4 及 17。

膠道 B：根據實例 7.4 偶合後之粗產物。

膠道 C：根據實例 7.1 偶合後之粗產物。

膠道 D：EPO 起始物。

圖 5

圖 5 顯示根據實例 7.2、7.3、7.5 及 7.6 所製得之 HES-EPO 偶合物的 SDSPage 分析。

膠道 A：蛋白質標記 Roti®-Mark PRESTAINED(Carl Roth GmbH+Co, Karlsruhe, D)；從頂端至底部，蛋白質標記的分子量(以 kD 表示)：

五、發明說明 (170)

245、123、77、42、30、25.4 及 17。

膠道 B：以實例 1.3 b) 為基質，根據實例 7.6 偶合後之粗產物。

膠道 C：以實例 1.1 b) 為基質，根據實例 7.5 偶合後之粗產物。

膠道 D：以實例 1.3 a) 為基質，根據實例 7.6 偶合後之粗產物。

膠道 E：以實例 1.1 a) 為基質，根據實例 7.5 偶合後之粗產物。

膠道 F：根據實例 7.2 偶合後之粗產物。

膠道 G：根據實例 7.3 偶合後之粗產物。

膠道 K：EPO 起始物。

圖 6

圖 6 顯示根據實例 7.7、7.8、7.9、7.10、7.11 及 7.12 所製得之 HES-EPO 偶合物的 SDSPage 分析。

膠道 A：蛋白質標記 Roti®-Mark PRESTAINED(Carl Roth GmbH+Co, Karlsruhe, D)；從頂端至底部，蛋白質標記的分子量(以 kD 表示)：

245、123、77、42、30、25.4 及 17。

膠道 B：根據實例 7.11 偶合後之粗產物。

膠道 C：根據實例 7.10 偶合後之粗產物。

膠道 D：根據實例 7.7 偶合後之粗產物。

五、發明說明 (171)

膠道 E：根據實例 7.8 偶合後之粗產物。

膠道 F：根據實例 7.12 偶合後之粗產物。

膠道 G：EPO 起始物。

膠道 K：根據實例 7.9 偶合後之粗產物。

圖 7

已進行溫和酸處理 5 分鐘之 EPO-GT-1 的 SDS-PAGE 分析物=膠道 2；進行溫和酸處理 10 分鐘=膠道 3；進行溫和酸處理 60 分鐘=膠道 4 及未經處理 EPO=膠道 1；顯示移除 N-聚糖後，EPO 之遷移率變動(+PNGASE)。

圖 8

自未經處理 EPO 及自在溫和酸水解條件下培養 5 分鐘、10 分鐘及 60 分鐘之 EPO 分離出來的寡糖之 HPAEC-PAD 圖案。羅馬數字 I-V 指示 I 之溶離位置=去涎酸化雙觸角結構；II=三涎酸化三觸角結構(兩個異構物)；III=四涎酸化四觸角結構+2 個 N-乙醯基乳糖胺重複基；IV=四涎酸化四觸角結構+1 個 N-乙醯基乳糖胺重複基；V=四涎酸化四觸角結構+無 N-乙醯基乳糖胺重複基。不具或具有 1-4 個涎酸之寡糖結構的溶離區係以括號表示。

圖 9

去涎酸化後，N-連接寡糖的 HPAEC-PAD；顯示 N-乙醯

五、發明說明 (172)

基神經氨酸之溶離位置；數字 1-9 指示標準寡糖之溶離位置；1=雙觸角；2=三觸角(2-4 個異構物)；3=三觸角(2-6 個異構物)；4=四觸角；5=三觸角加 1 個重複基；6=四觸角加 1 個重複基；7=三觸角加 2 個重複基；8=四觸角加 2 個重複基及 9=四觸角加 3 個重複基。

圖 10

已進行涎酸殘基之過碘酸鹽氧化作用之經溫和處理和未經處理 EPO 的 SDS-PAGE 分析。1=經過碘酸鹽氧化但未經酸處理；2=經過碘酸鹽氧化及酸處理 5 分鐘；3=經過碘酸鹽氧化及酸處理 10 分鐘；4=經過碘酸鹽氧化但未經酸處理；5=未經過碘酸鹽且未經酸處理之 BRP EPO 標準品。

圖 11

自未經處理 EPO 及自在溫和酸水解條件下培養 5 分鐘及 10 分鐘並接著進行過碘酸鹽處理之 EPO 分離出來的天然寡糖的 HPAEC-PAD 圖案。不具或具有 1-4 個涎酸之寡糖結構的溶離區係以括號 1-5 表示。

圖 12

HES 改質 EPO-GT-1-A 之時間過程中的 SDS-PAG 分析：數份 20 微克之 EPO-GT-1-A 與經羥基胺改質之 HES 衍生物 X 反應 30 分鐘、2、4 及 17 小時。膠道

五、發明說明 (173)

1=30 分鐘反應時間；膠道 2=2 小時反應時間；膠道 3=4 小時反應時間；膠道 4=17 小時反應時間；膠道 5=未經 HES 改質之 EPO-GT-1-A。左圖顯示在經羥基胺改質之 HES 衍生物 X 的存在下，EPO-GT-1-A 之遷移率隨培養時間漸增加而變動(流率：1 毫升/分鐘)；膠道 1=30 分鐘反應時間；膠道 2=2 小時反應時間；膠道 3=4 小時反應時間；膠道 4=17 小時反應時間；膠道 5=經 HES 改質之 EPO-GT-1-A。右圖顯示相同樣品在經 N-糖苷酶處理後之分析。

圖 13

HES-EPO 偶合物之 Q-瓊脂糖凝膠餾份的 SDS-PAG 分析。各 1% 流通部分及 1% 以高鹽濃度溶離之餾份在 Speed Vac 濃縮機中濃縮並將其裝在樣品緩衝液中凝膠上。以 Coomassie 藍將 EPO 蛋白質染色。A=樣品 I；B=樣品 II；C=樣品 III；K=控制 EPO-GT-1；A1、B1、C1 及 K1 指示流通餾份；A2、B2、C2 及 K2 指示以高鹽濃度溶離之餾份。

圖 14a

經 HES 改質 EPO 樣品 A2(參見圖 13)、控制 EPO 樣品 K2 及 EPO-GT-1-A 之 SDS-PAG 分析，其中該等 EPO 製劑係在 N-糖苷酶的存在下消化以除去 N-連接寡糖。所有 EPO 樣品顯示遷移率朝缺乏或包含 O-聚糖之低分子量

五、發明說明 (174)

型態變動。去-N-糖基化後，由經 HES 改質之 EPO 樣品 A2 可觀察到較低比例之 O-已糖基化及未糖基化蛋白質帶，並且在 30 kDa 周圍偵測到擴散蛋白質帶，推測表示 HES 改質發生在 O-聚醣殘基之涎酸上(參見打上星號之箭頭)。

圖 14b

經 HES 改質之 EPO 樣品 A2(參見圖 13)、控制 EPO 樣品 K2 及 EPO-GT-1-A 在溫和水解後之 SDS-PAG 分析，其中該等樣品係未經處理或已在 N-醣苷酶的存在下消化以除去 N-連接寡醣(參見圖 14a)。N-醣苷酶處理前之 A2 及處理後之 A 的高分子量型態(參見有或無箭頭之括號)在酸處理樣品後皆消失。比較用之 BRP EPO 標準品係未進行溫和酸處理。

圖 15

自經未經改質 HES(K)培養之經 HES 改質樣品 A、EPO-GT-1-A 及控制 EPO 樣品所釋出之 N-連接寡醣物質的 HPAEC-PAD 分析。羅馬數字 I-V 指示 I 之溶離位置=二涎酸化雙觸角結構；II=三涎酸化三觸角結構(兩個異構物)；III=四涎酸化四觸角結構+2 個 N-乙醯基乳糖胺重複基；IV=四涎酸化四觸角結構+1 個 N-乙醯基乳糖胺重複基；V=四涎酸化四觸角結構+無 N-乙醯基乳糖胺重複基；如圖 8 及 11 之說明中所揭示，括號指示經雙涎酸化-、三

五、發明說明 (175)

涎酸化-及四涎酸化 N-聚醣之溶離區。

圖 16

自經未經改質 HES 培養之經 HES 改質的樣品 A、EPO-GT-1-A 及控制 EPO 樣品(K)所釋出之 N-連接寡醣物質的 HPAEC-PAD 分析。顯示標準寡醣混合物之滯留時間：數字 1-9 指示標準寡醣之溶離位置：1=雙觸角；2=三觸角(2-4 個異構物)；3=三觸角(2-6 個異構物)；4=四觸角；5=三觸角加 1 個重複基；6=四觸角加 1 個重複基；7=三觸角加 2 個重複基；8=四觸角加 2 個重複基及 9=四觸角加 3 個重複基。

圖 17 至 23

圖 17 至 23 代表自經 HES-改質 EPO 及控制 EPO 製劑所分離出經酵素釋出並已化學去涎酸化之 N-聚醣的 MALDI/TOF 質譜圖。在 m/z 1809.7、2174.8、2539.9、2905.0 及 3270.1 之主要信號係對應於不具或具有一或兩個 N-乙醯基乳糖胺重複基之二-至四觸角偶合類型 N-聚醣結構，其因失去岩藻醣或半乳糖而伴隨微弱信號，其中岩藻醣或半乳糖的失去係因去涎酸化樣品以供 MS 分析之酸水解條件之故。

圖 17

MALDI/TOF 光譜圖：經 HES-改質 EPO A2 之已去涎酸

五、發明說明 (176)

化寡糖。

圖 18

MALDI/TOF 光譜圖：EPO GT-1-A 之已去涎酸化寡糖。

圖 19

MALDI/TOF 光譜圖：EPO K2 之已去涎酸化寡糖。

圖 20

MALDI/TOF 光譜圖：EPO-GT-1 之已去涎酸化寡糖。

圖 21

MALDI/TOF 光譜圖：已進行酸水解達 5 分鐘之 EPO GT-1 的已去涎酸化寡糖。

圖 22

MALDI/TOF 光譜圖：已進行酸水解達 10 分鐘之 EPO GT-1 的已去涎酸化寡糖。

圖 23

MALDI/TOF 光譜圖：已進行酸水解達 60 分鐘之 EPO GT-1 的已去涎酸化寡糖。

圖 24

五、發明說明 (177)

圖 24 顯示兩個 HES-EPO 偶合物之 SDSPage 分析

mw : 標記

膠道 1 : 根據實例實驗程序 8 所製得的 HES-EPO :
EPO 係偶合至醯肼-HES 12KD L

膠道 2 : 根據實例實驗程序 9 所製得的 HES-EPO :
EPO 係偶合至羥基胺基-HES 12KD K

C : 控制(未偶合 EPO); 上方帶代表 EPO 二聚物

圖 25

圖 25 係藉顯示經多肽 N-醣苷酶消化之經 HAS 改質的 EPO 型證明 HES 係偶合至碳氫化合物側鏈之碳氫化合物部分

膠道 1 : 以 N-醣苷酶消化後根據實例實驗程序 8 所製得之 HES-EPO

膠道 2 : 以 N-醣苷酶消化後根據實例實驗程序 9 製得之 HES-EPO

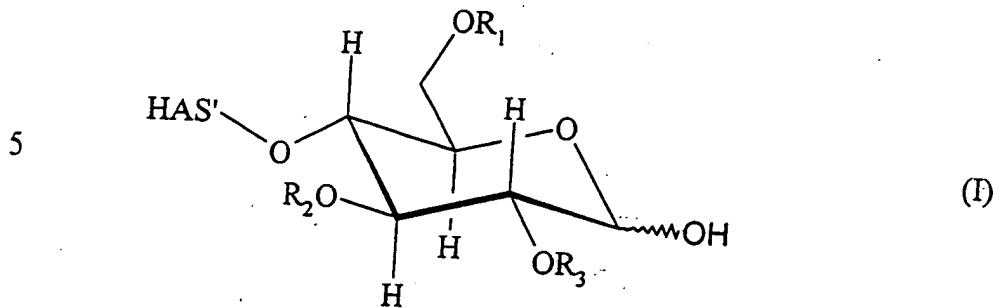
膠道 3 : BRP EPO 標準品

膠道 4 : 以 N-醣苷酶消化後之 BRP EPO 標準品

mw : 標記(Bio-Rad SDS-PAGE 標準品低範圍目錄
編號 161-0305, Bio-Rad Laboratories,
Hercules, CA, USA)

四、中文發明摘要 (發明之名稱：製造羥基烷基澱粉衍生物之方法)

本發明係關於一種製造一羥基烷基澱粉衍生物之方法，該羥基烷基澱粉具有一根據式(I)之結構



其包括

- 10 - 式(I)羥基烷基澱粉中視情況已氧化之還原端或
 - 一羥基烷基澱粉衍生物，其係藉由式(I)羥基烷基澱粉中視情況已氧化之還原端與一化合物(D)反應所獲得，該化合物(D)包含
- 15 -- 至少一個可與該羥基烷基澱粉中視情況已氧化之還原端反應的官能基 Z_1 及
 -- 至少一個官能基 W，

與一包含下列基團之化合物(L)反應，

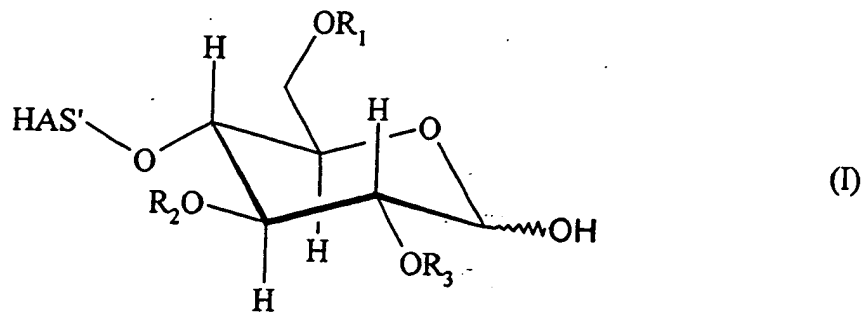
- 20 - 至少一個可與該羥基烷基澱粉反應之官能基 Z_1 或至少一個可與該羥基烷基澱粉衍生物中所含之官能基 W 反應的官能基 Z_2 ，及
 - 至少一個可與另一化合物(M)之官能基 Y 反應的官能基 X，

其中該官能基 Y 係選自醛基、酮基、半縮醛基、縮醛基及硫基組成之群。本發明另外關於羥基烷基澱粉衍生物本身

25 及一種包含該羥基烷基澱粉衍生物之醫藥組合物。

四、英文發明摘要 (發明之名稱: Method of producing hydroxyalkyl starch derivatives)

The present invention relates to a method of producing a hydroxyalkyl starch derivative, said hydroxyalkyl starch having a structure according to formula (I)



Comprising reacting

- hydroxyalkyl starch of formula (I) at its optionally oxidized reducing end or
 - a hydroxyalkyl starch derivative, obtainable by reacting hydroxyalkyl starch of formula (I) at its optionally oxidized reducing end with a compound (D), said compound (D) comprising
 - at least one functional group Z_1 capable of being reacted with the optionally oxidized reducing end of the hydroxyalkyl starch, and
 - at least one functional group W,
- with a compound (L) comprising
- at least one functional group Z_1 capable of being reacted with said hydroxyalkyl starch, or at least one functional group Z_2 capable of being reacted with functional group W comprised in said hydroxyalkyl starch derivative, and

四、英文發明摘要（發明之名稱： Method of producing hydroxyalkyl starch derivatives)

- at least one functional group X capable of being reacted with a functional group Y of a further compound (M), wherein said functional group Y is selected from the group consisting of an aldehyde group, a keto group, a hemiacetal group, an acetal group, and a thio group. The present invention further relates to the hydroxyalkyl starch derivatives as such and a pharmaceutical composition comprising the hydroxyalkyl starch derivatives.

裝
訂
線

圖 1

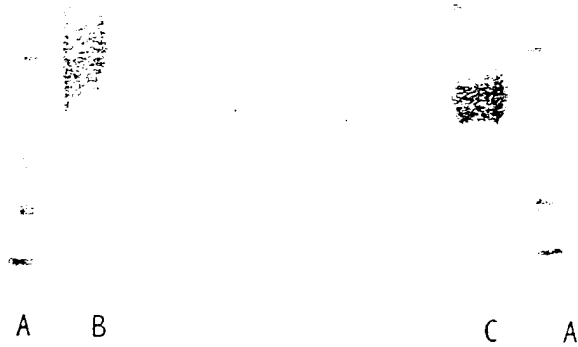


圖 2

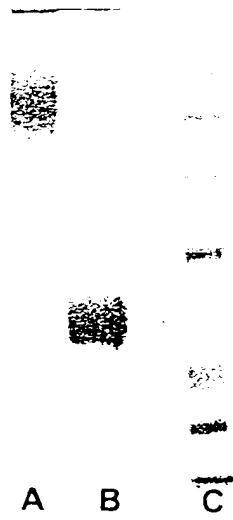


圖 3

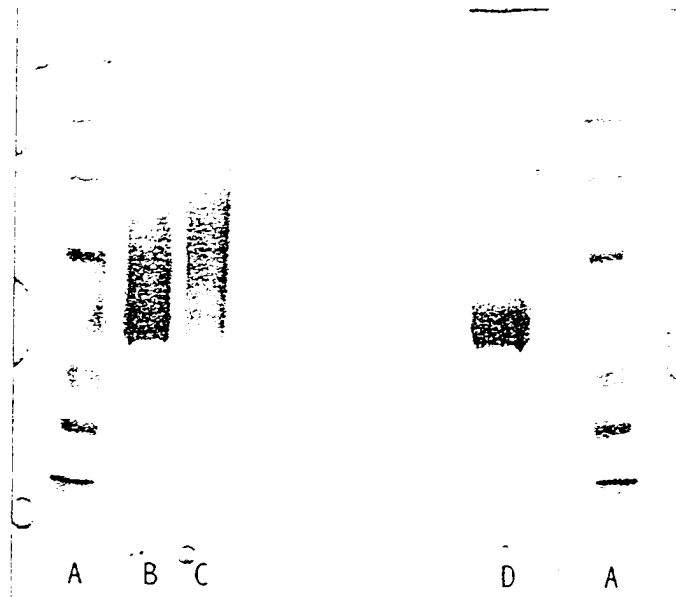


圖 4

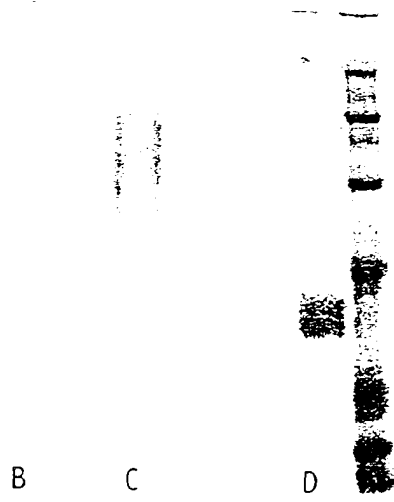


圖 5

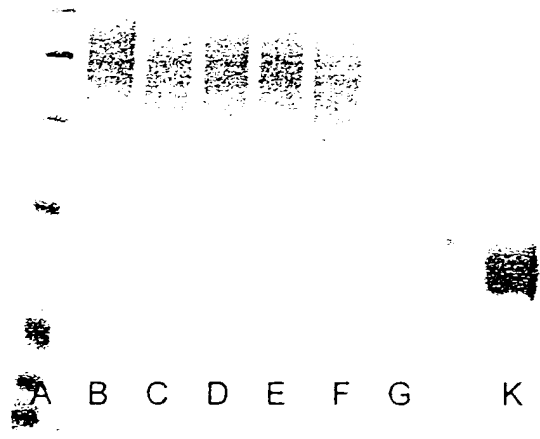
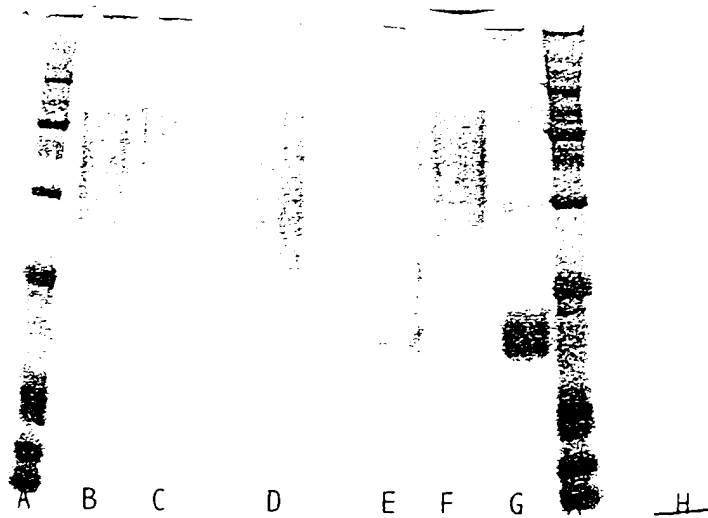


圖 6



7

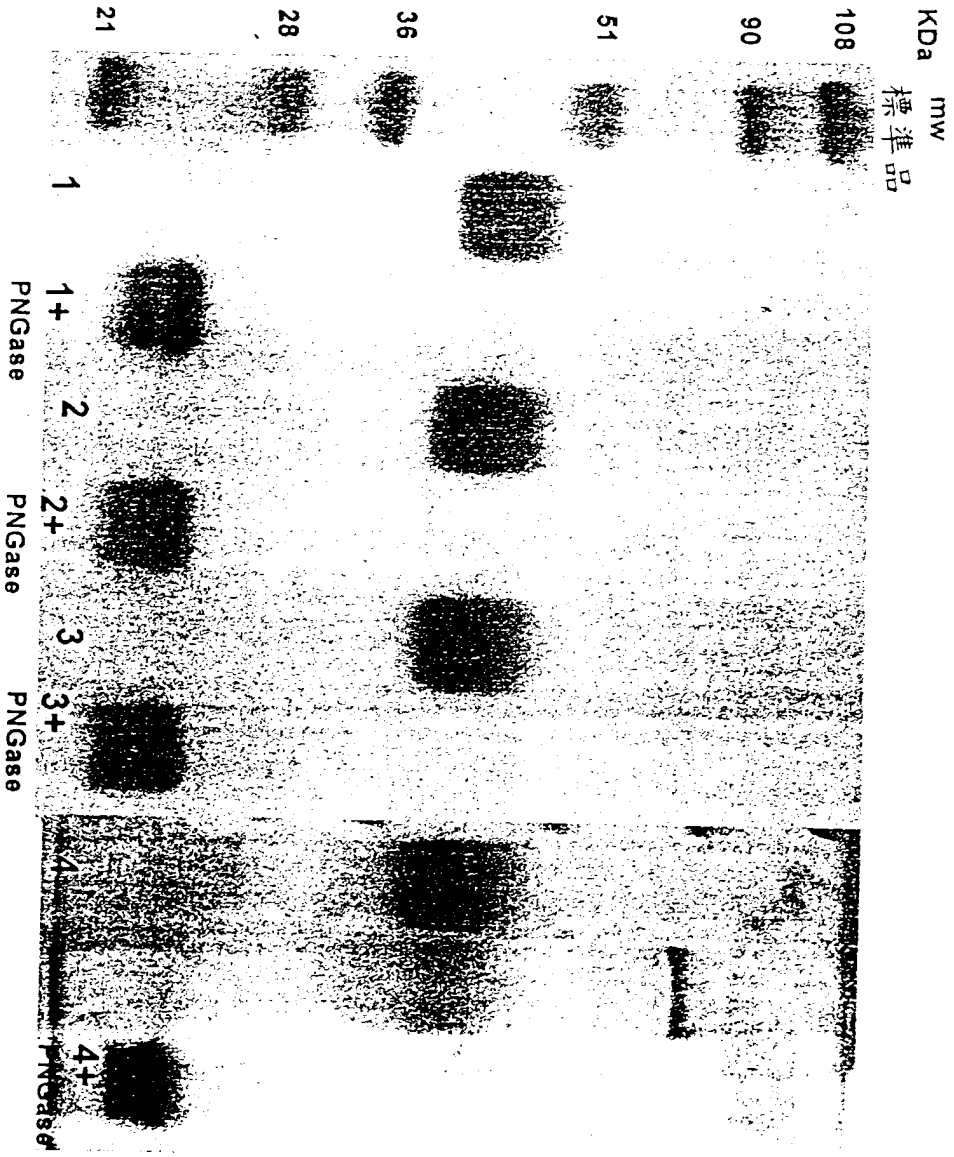
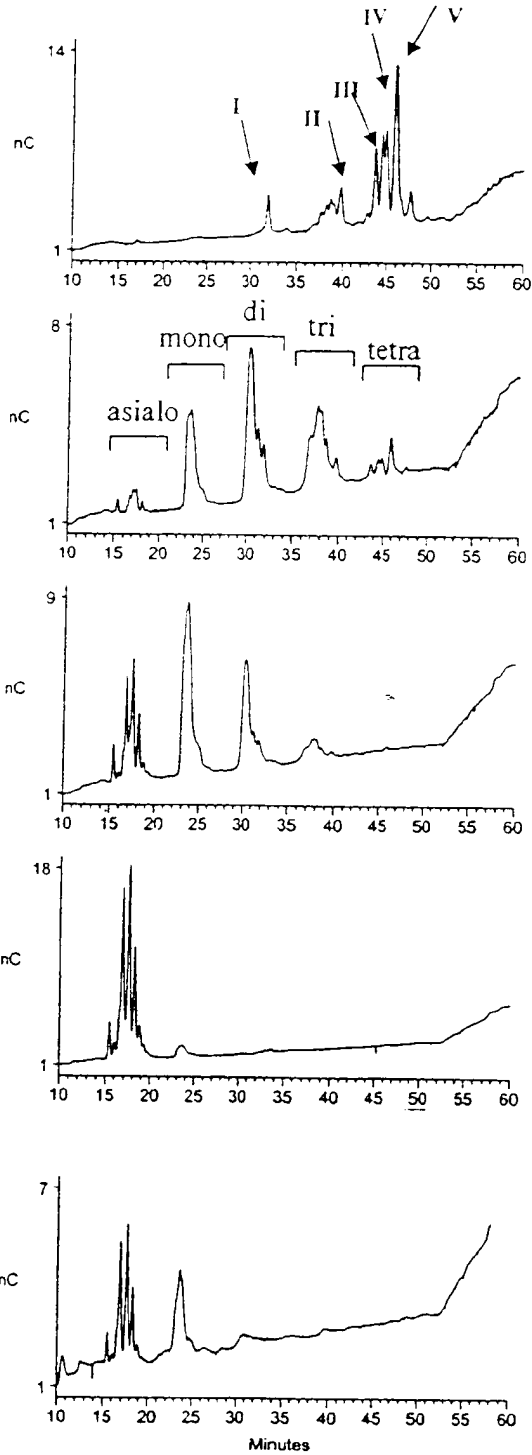


圖 8



EPO GT-1
未處理

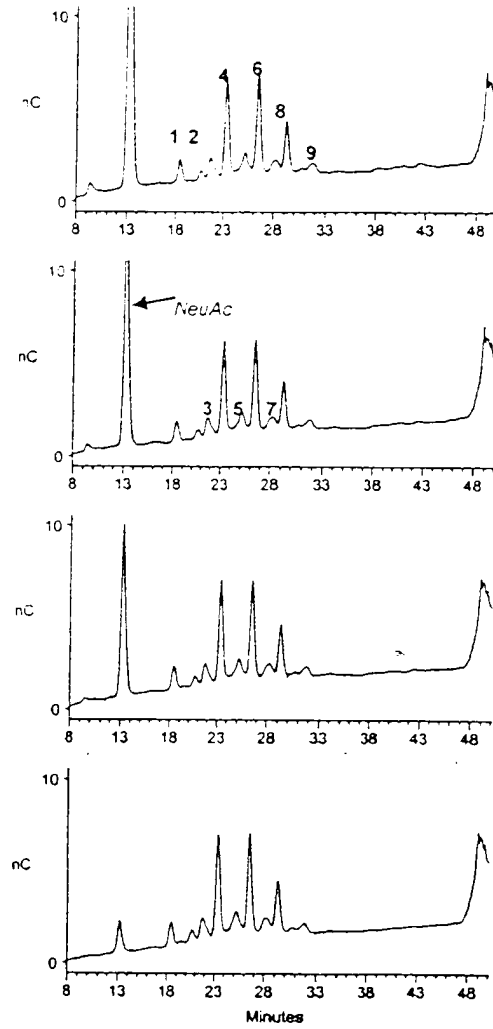
EPO GT-1
5 分鐘 H⁺

EPO GT-1
10 分鐘 H⁺

EPO GT-1
60 分鐘 H⁺

EPO GT-1
60 分鐘 H⁺
+ 半乳糖氧化酶

圖 9



EPO GT-1
未處理

EPO GT-1
5 分鐘 H⁺

EPO GT-1
10 分鐘 H⁺

EPO GT-1
60 分鐘 H⁺

圖 10

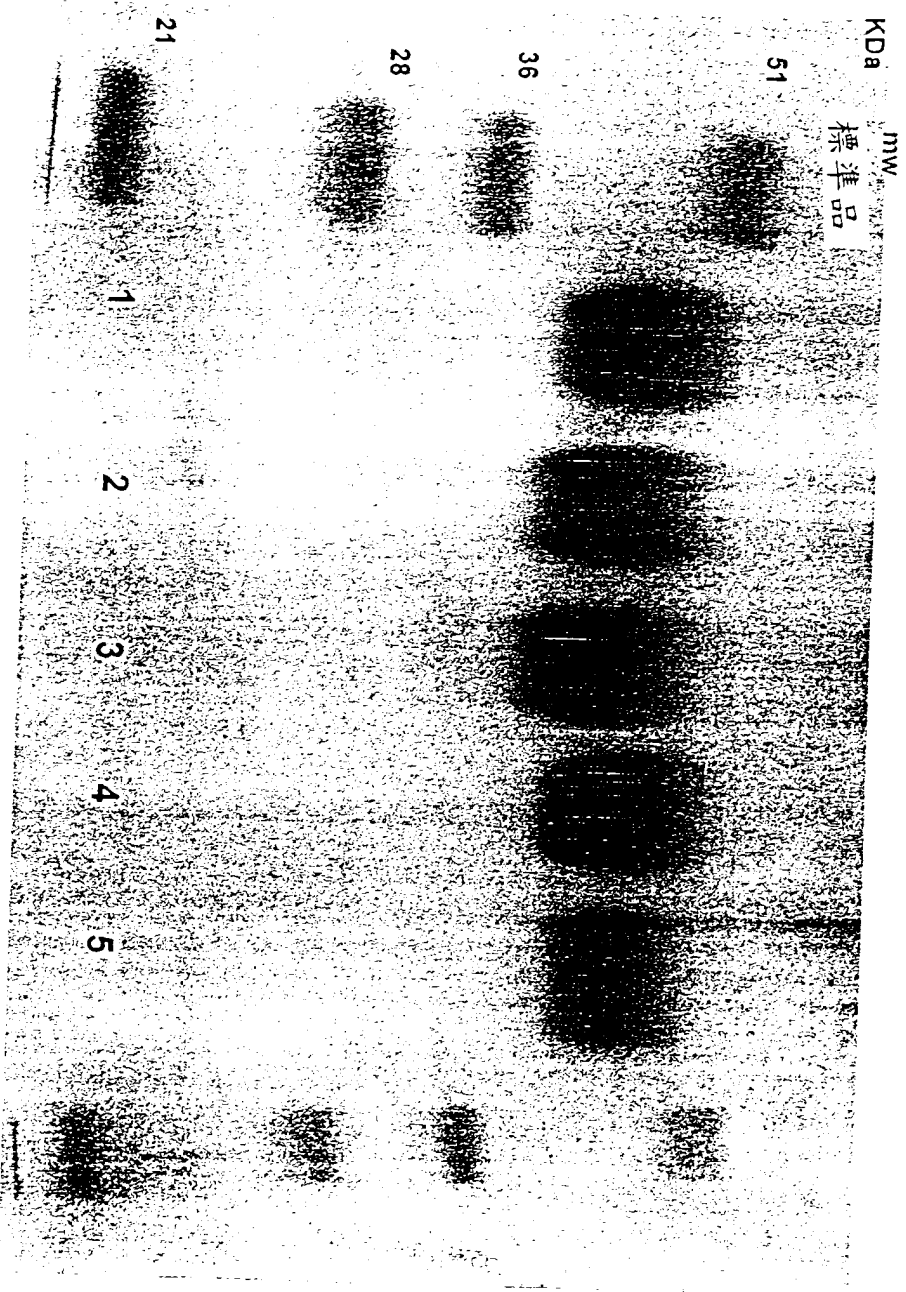
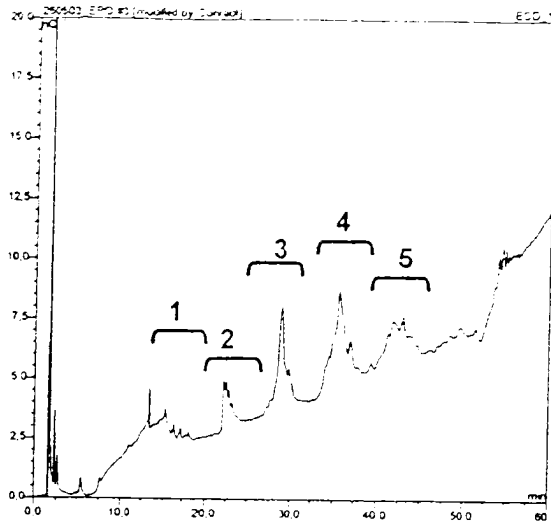
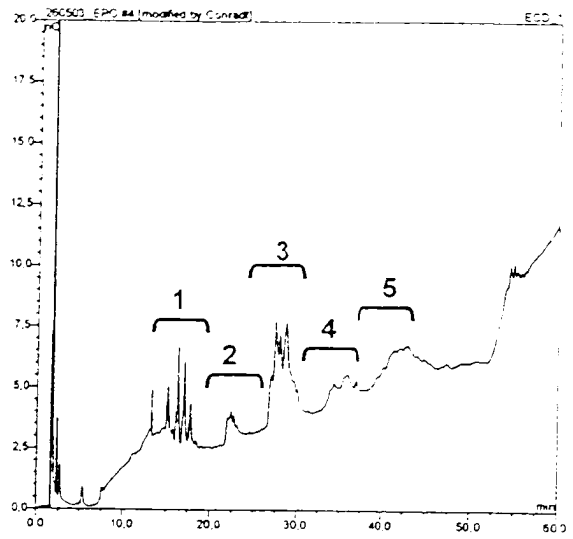


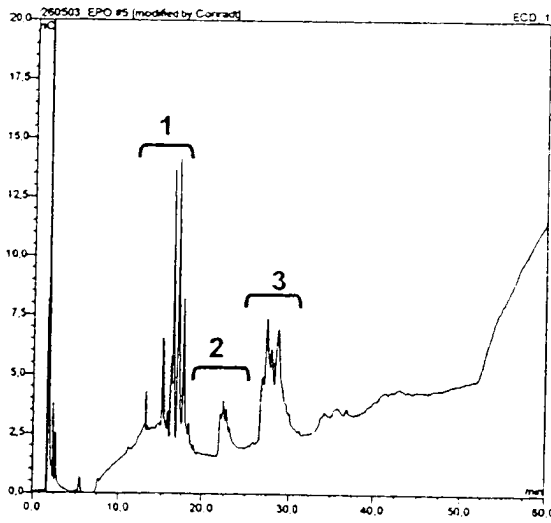
圖 11



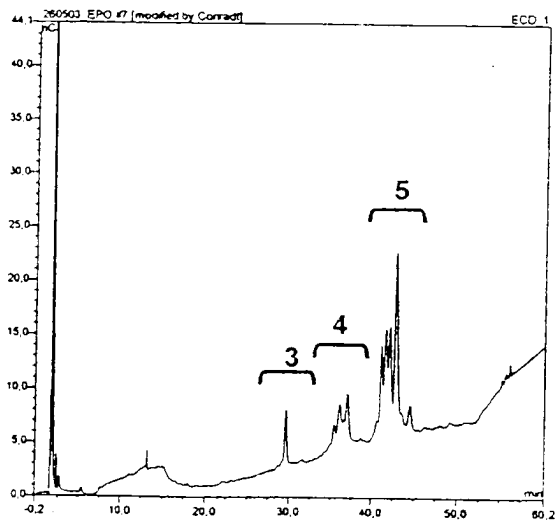
EPO GT-1 無酸處理
+溫和過碘酸鹽氧化



EPO GT-1 15 分鐘 H⁺ 及
溫和過碘酸鹽氧化



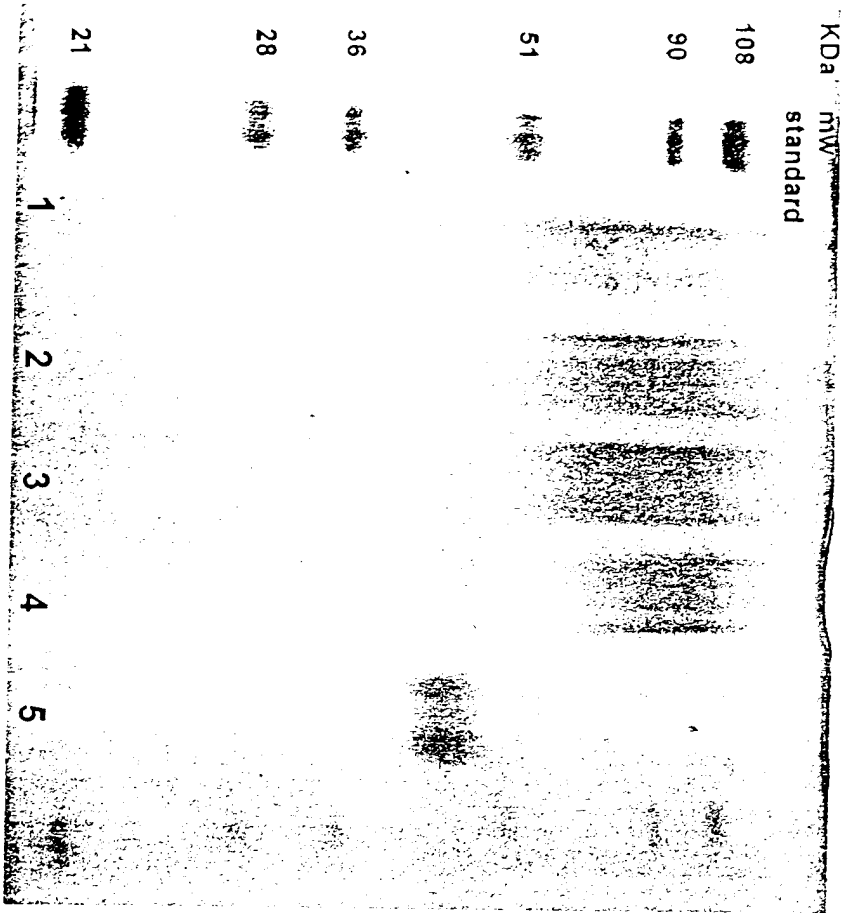
EPO GT-1 10 分鐘 H⁺ 及
溫和過碘酸鹽氧化



EPO GT-1 無酸且
無過碘酸鹽處理

12

以 N-糖苷酶處理前



以 N-糖苷酶處理後

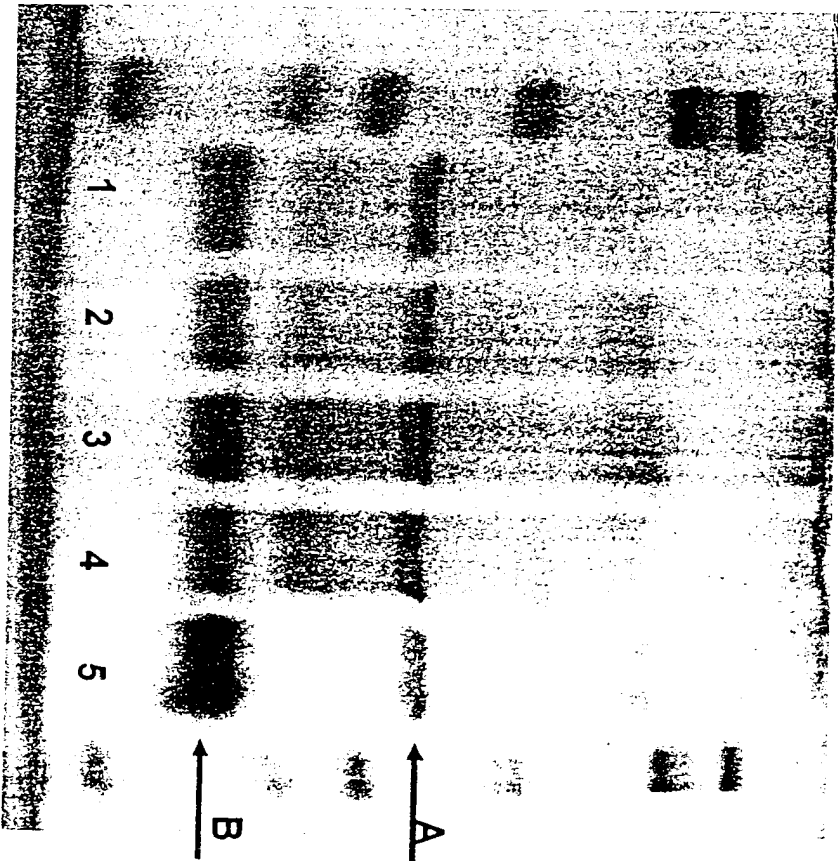


圖 13

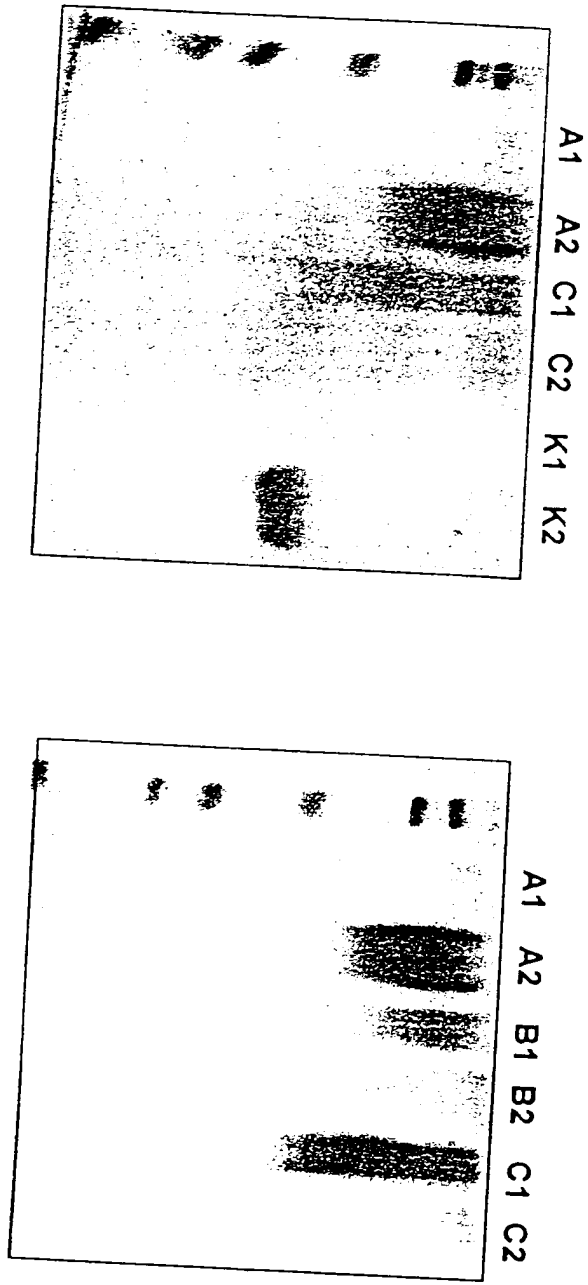
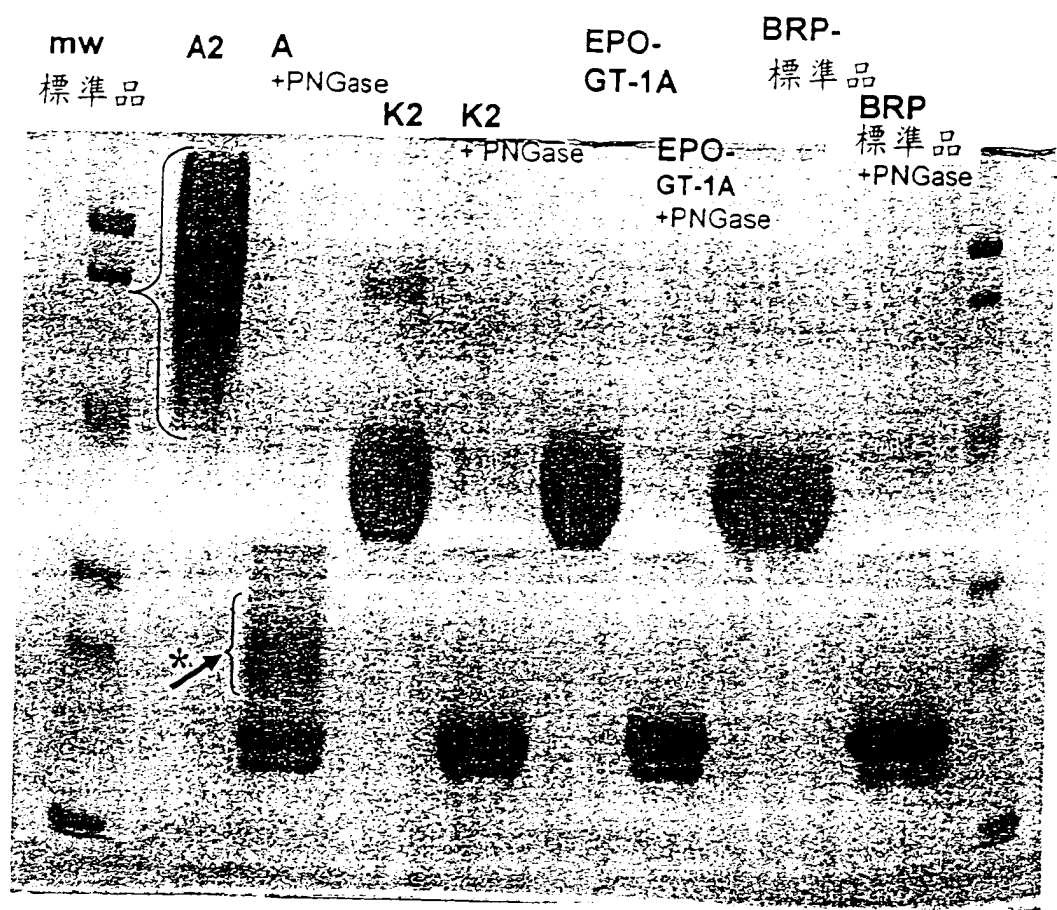


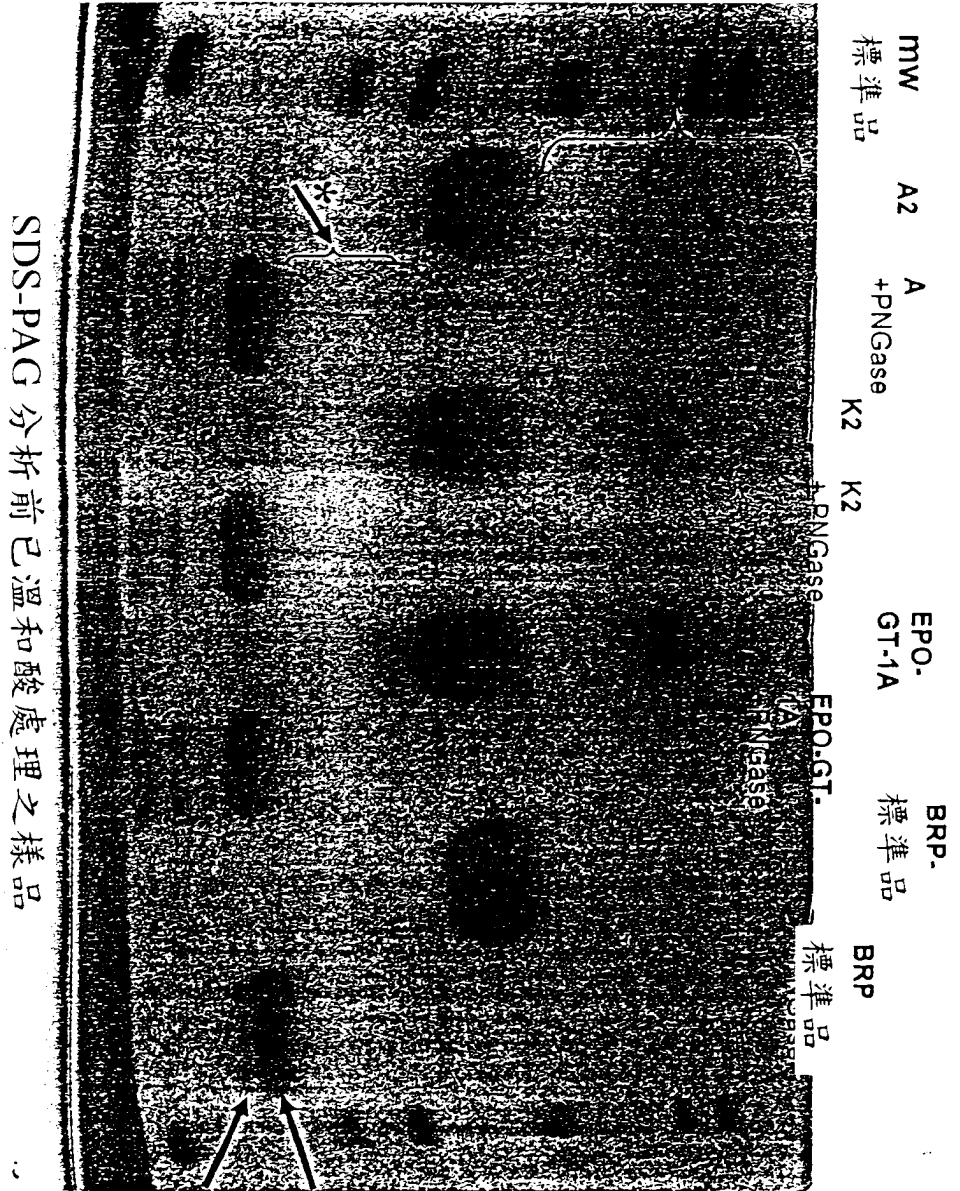
圖 14a



O-已糖基化 EPO
 未糖基化 EPO

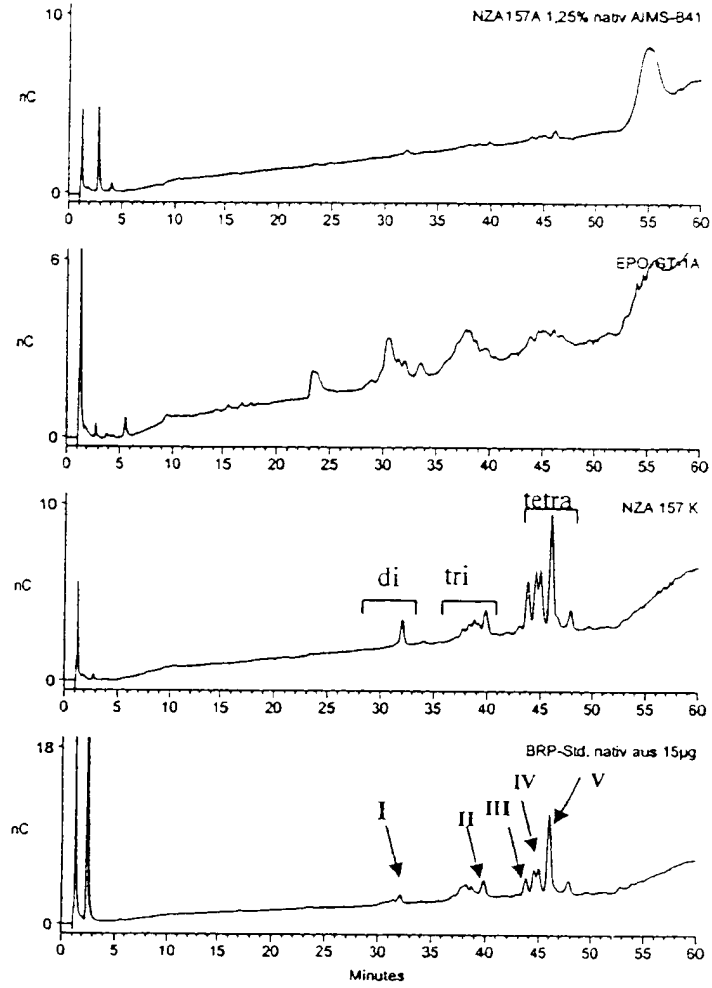
以 N-糖苷酶消化前與消化後之樣品

14b



O-已糖基化 EPO
 未糖基化 EPO

圖 15



A

EPO-
GT-1A

K

自 BRP EPO 標準品
分離出來的寡糖

圖 16

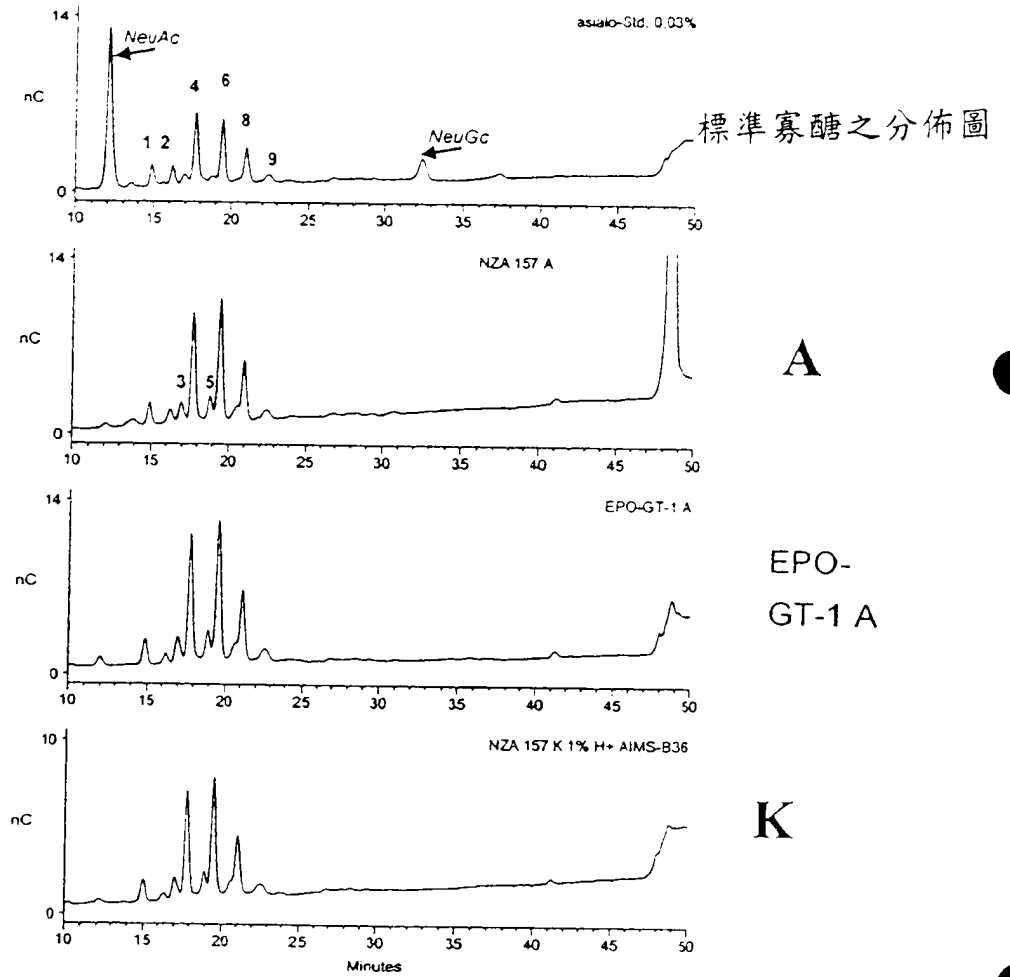
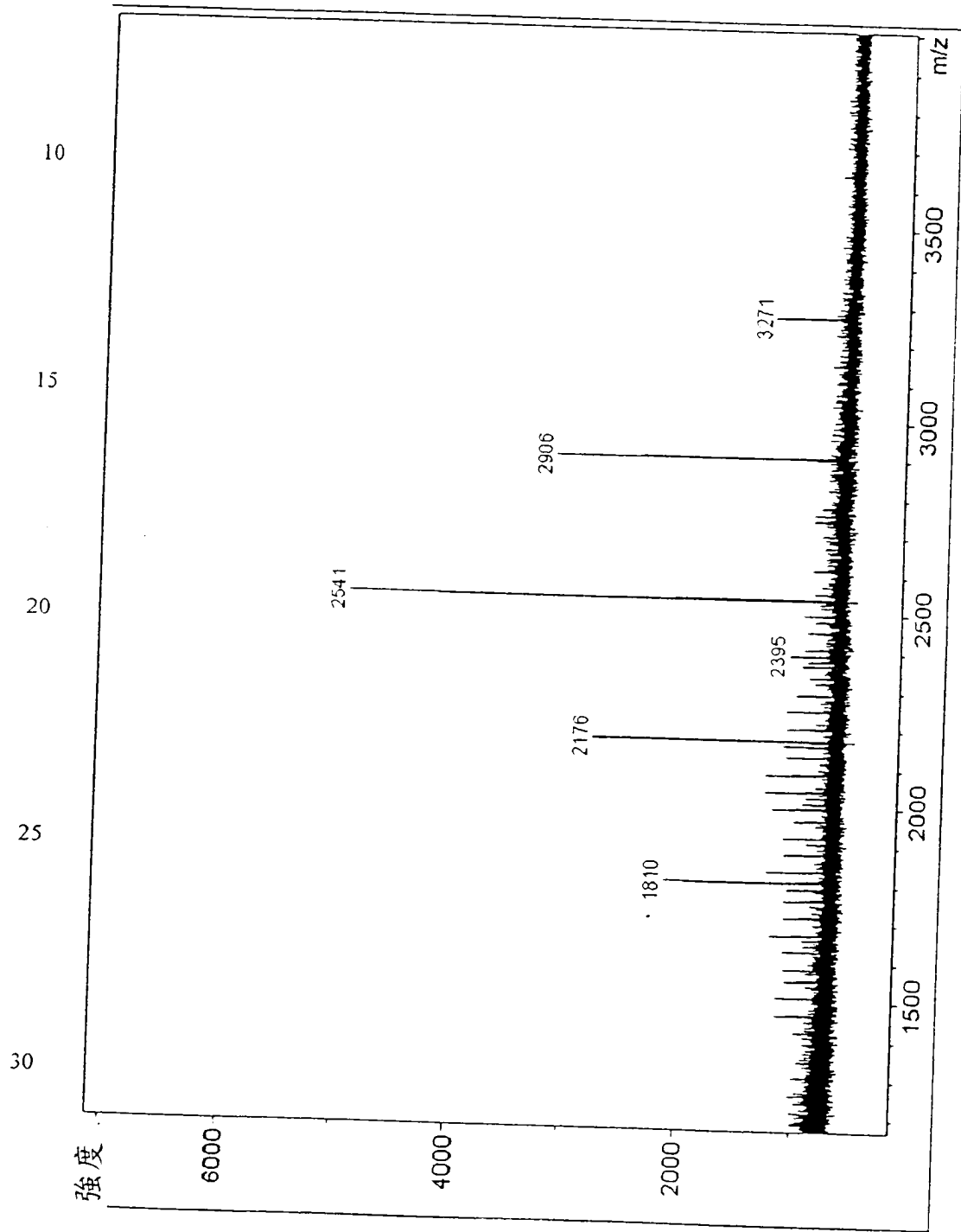


圖 17

5



18

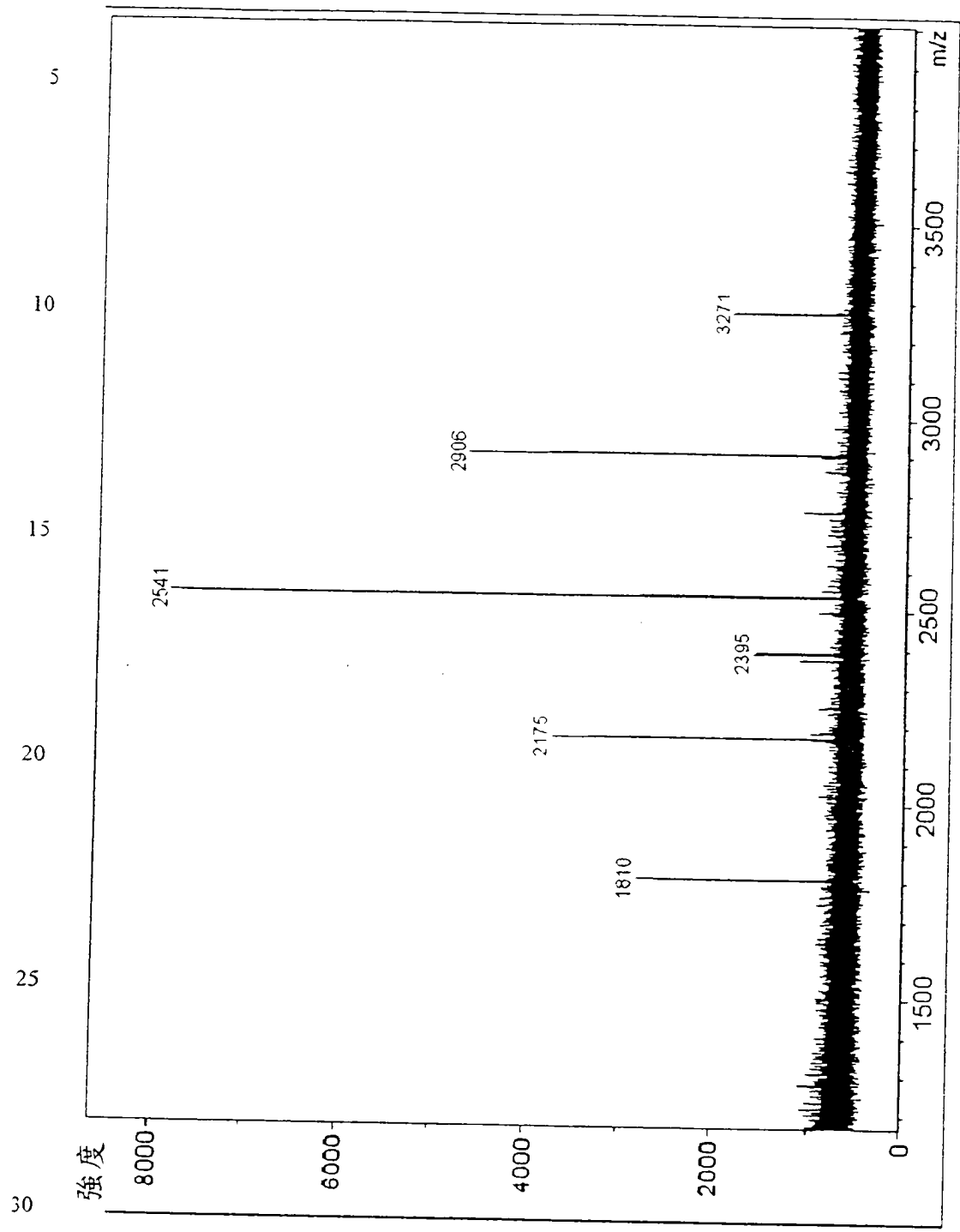


圖 19

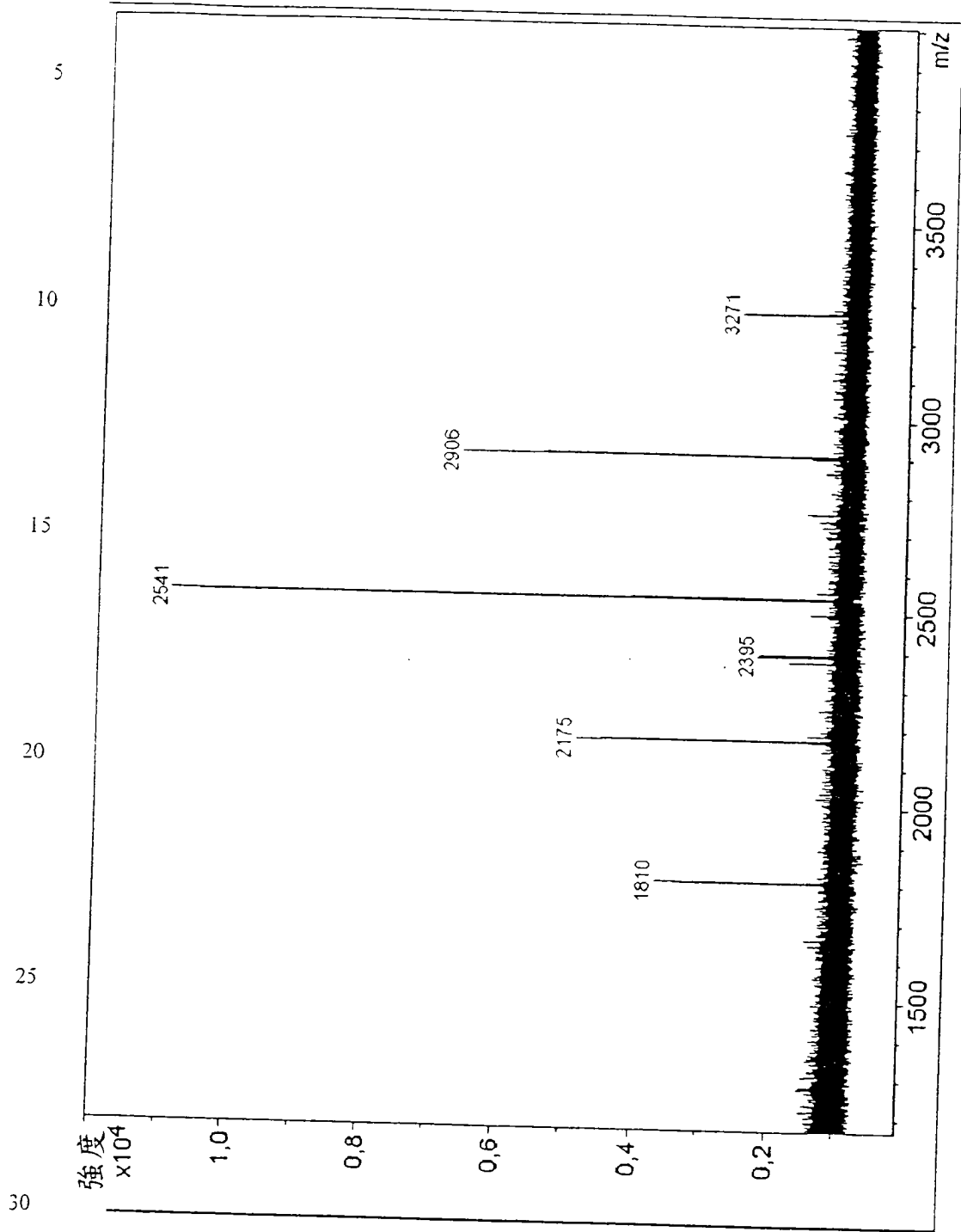


圖 20

5

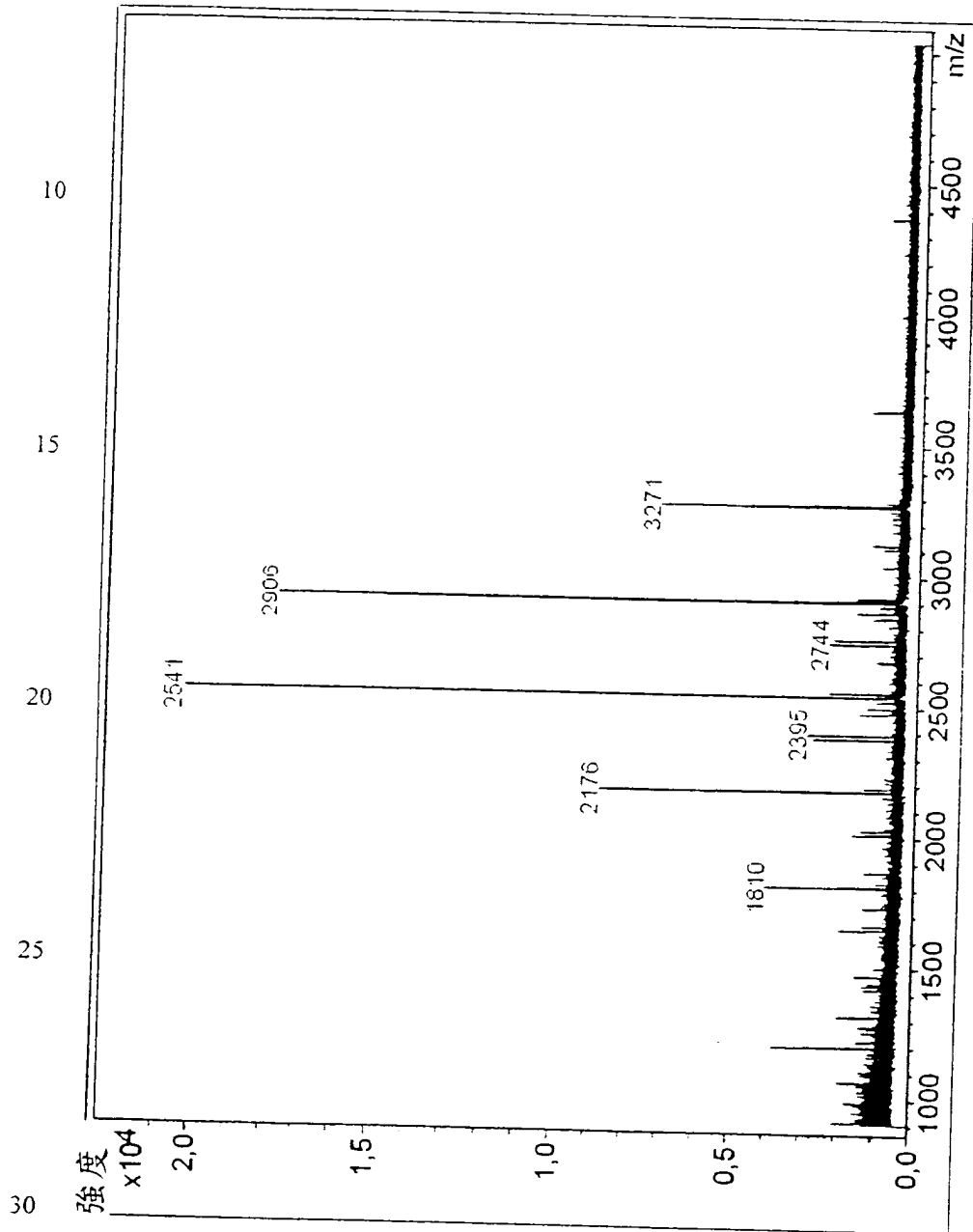


圖 21

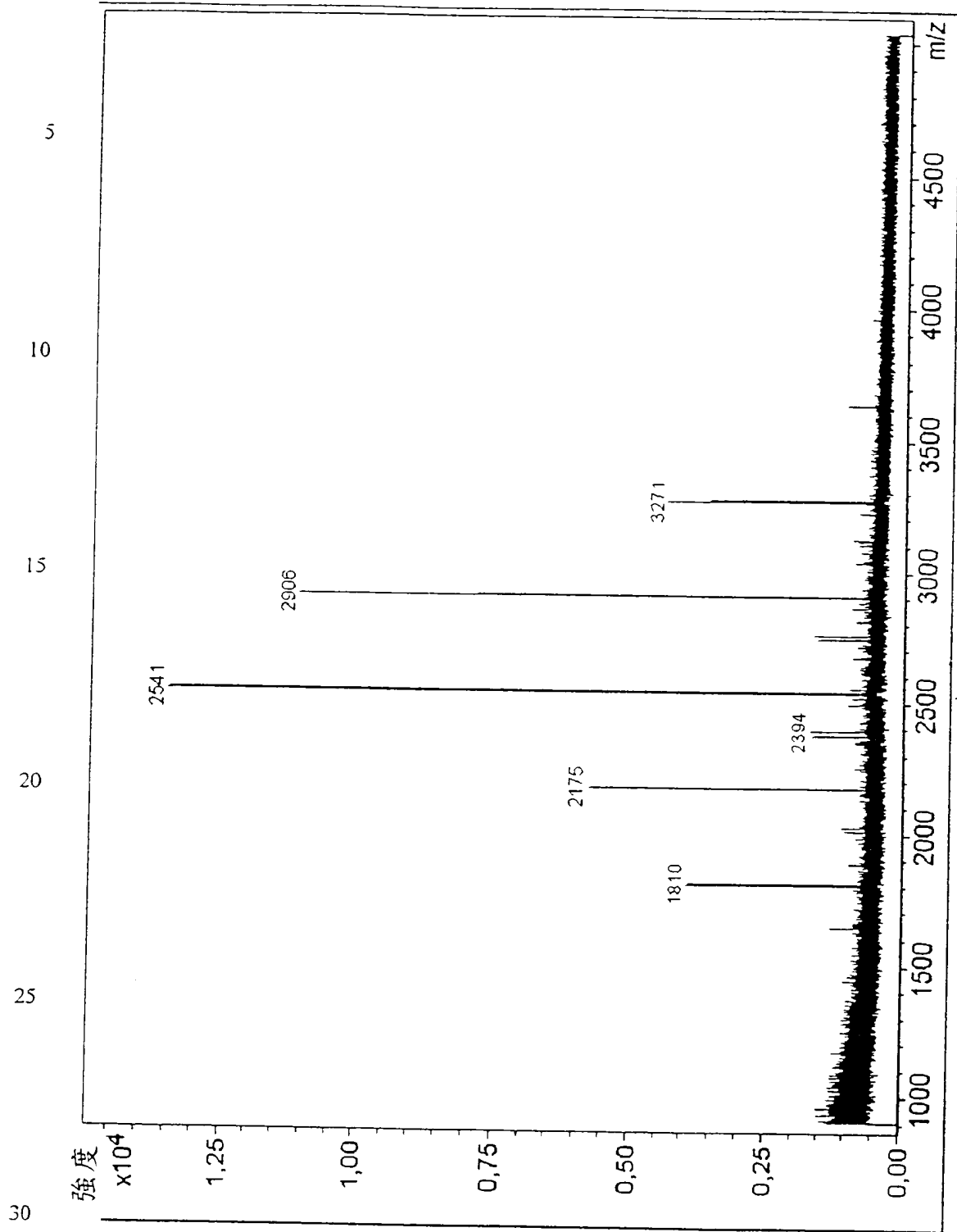
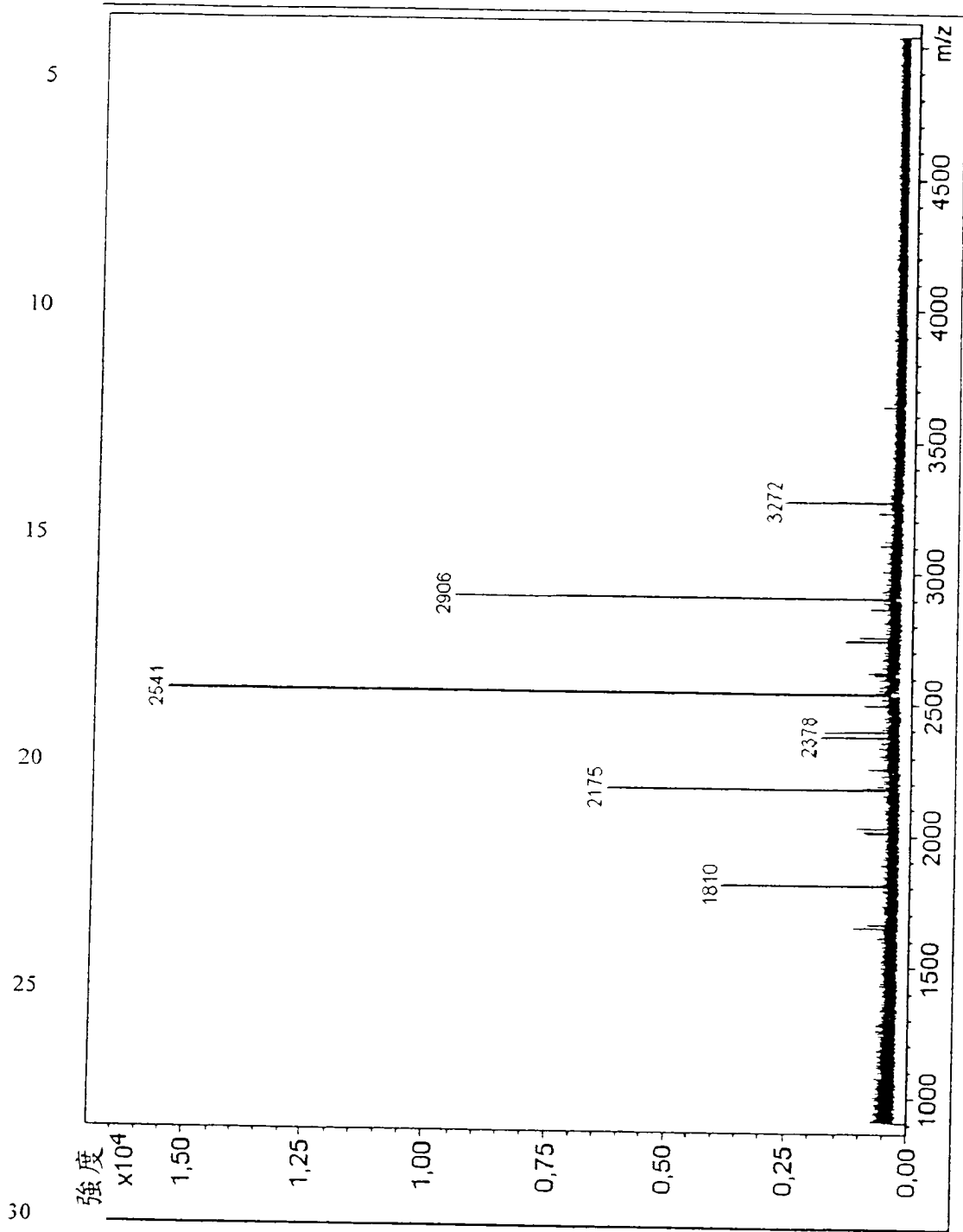


圖 22



(



圖 23

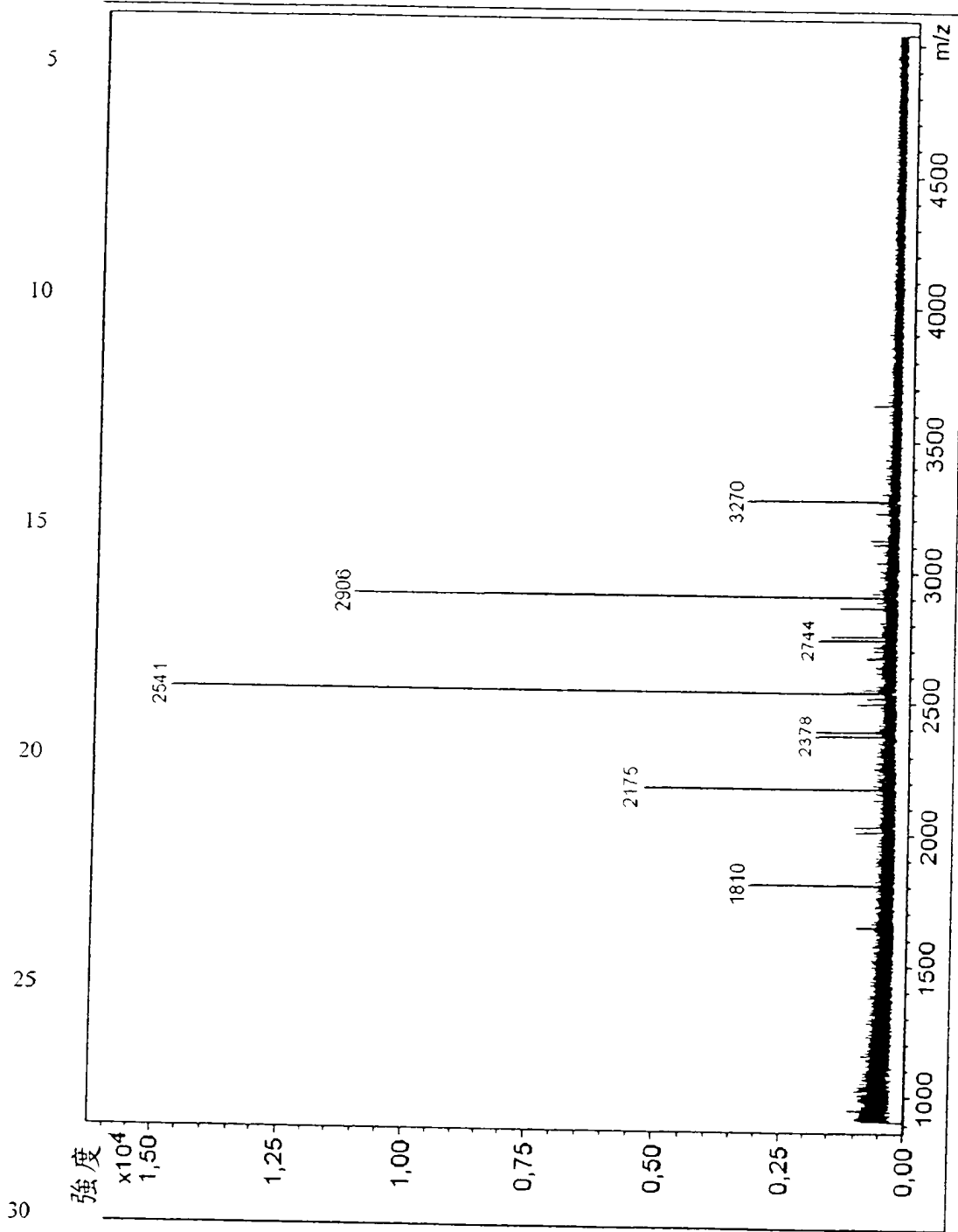
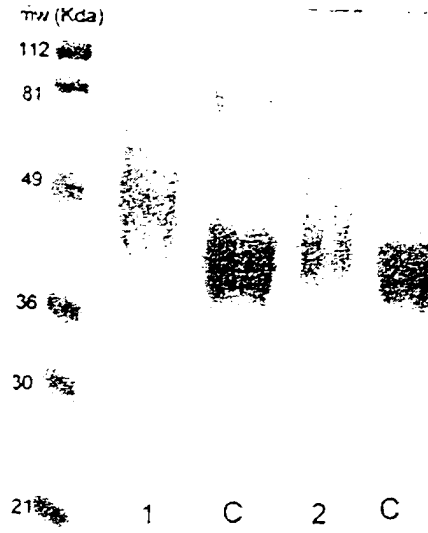


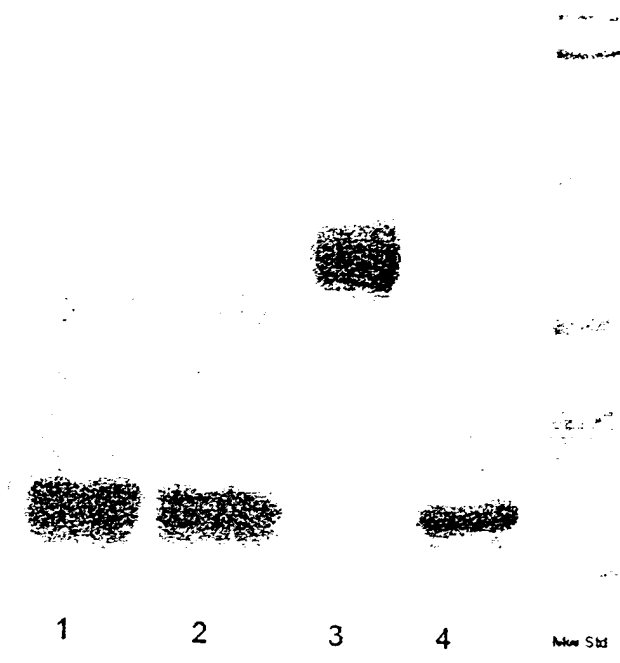
圖 24



5

10

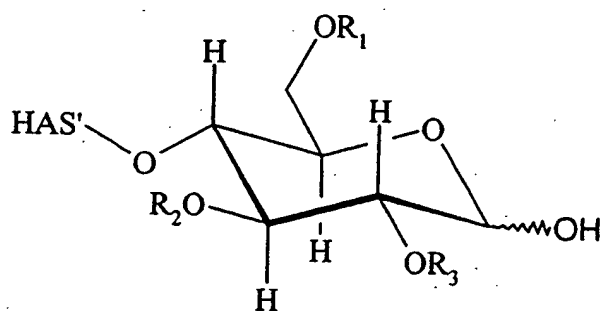
圖 25



(一)本案指定代表圖為：第()圖

(二)本代表圖之元件代表符號簡單說明：

本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式



(1)

P. 3~74,
144~157

五、發明說明 (1)

發明所屬之技術領域

本發明係關於羥基烷基澱粉衍生物，特別是藉由一種方法所獲得之羥基烷基澱粉衍生物，在該方法中羥基烷基澱粉係與交聯化合物之一級或二級胺基或與兩種交聯化合物反應，其中所得羥基烷基澱粉衍生物具有至少一個可與一另外化合物之官能基 Y 反應的官能基 X，而且其中此基團為醛基、酮基、半縮醛基、縮醛基或硫醇基。根據一特佳具體實施例，本發明係關於藉由一種方法所獲得之羥基烷基澱粉衍生物，根據該方法，羥基烷基澱粉係與一交聯化合物之一級或二級胺基反應，所得反應產物視情況係進一步與第二交聯化合物反應，其中所得羥基烷基澱粉衍生物具有至少一個可與一另外化合物之官能基 Y 反應的官能基 X，而且其中此基團 Y 為醛基、酮基、半縮醛基、縮醛基或硫醇基，而且所得反應產物係與一多肽，較佳係與如 AT III、IFN-β 或紅血球生成素等多肽，特佳係與紅血球生成素反應，其中該等多肽包含這些官能基 Y 中至少一個。特佳羥基烷基澱粉為羥基乙基澱粉。根據本發明，羥基烷基澱粉，較佳係羥基乙基澱粉係與交聯劑化合物之還原端反應，其中該還原端視情況在該反應前已被氧化。

先前技術

羥基乙基澱粉(HES)是天然形成澱粉膠的衍生物並會被體內α-澱粉酶降解。HES 是碳氫化合物聚合物澱粉膠之經取代衍生物，其存在於玉米澱粉中的濃度係高達 95 重量

五、發明說明(2)

%。HES 呈現有利的生物性質並且可用作血容量更新劑及用於臨床之血液稀釋治療法中(Sommermeier 等人,1987, krankenhaushauspharmazie, 8(8), 271-278 ; 及 Weidler 等人, 1991, Arzneim-Forschung/Drug Res., 41, 494-498)。

澱粉膠係由葡萄糖部分組成的，其中在主鏈中存在著 α -1,4-糖苷鍵並且在支鏈位置可找到 α -1,6-糖苷鍵。此分子的物理化學性質主要係藉由糖苷鍵的類型決定。由於缺口 α -1,4-糖苷鍵，產生每轉約 6 個葡萄糖單體之螺旋結構。該聚合物之物理化學及生物化學性質可經由取代改質。羥基乙基的引入可經由鹼性羥基乙基化達到。藉由調整反應條件，可充分利用未經取代葡萄糖單體中各羥基有關羥基乙基化之不同反應性。由於此事實，熟諳此技者可影響取代模式的程度有限。

技術上曾描述一些製造羥基乙基澱粉衍生物的方法。

DE 26 16 086 描述血紅素對羥基乙基澱粉之偶合作用，其中第一個步驟係將交聯劑，如溴化氰鍵結至羥基乙基澱粉，接著將血紅素連接至該中間產物。

一個使用 HES 之重要領域為安定化多肽，其係被應用在，如循環系統中以獲得一特定生理作用。這些多肽之一特定實例為血紅球生成素，一種近 34,000kD 之酸醣蛋

五、發明說明(3)

白，其在循環中調整紅血球細胞含量方面是不可或缺的。

一個有關多肽及酵素應用方面之熟知問題為這些蛋白質經常呈現無法令人滿意的安定性。特別是血紅球生成素具有相當短的血漿半衰期(Spivak 及 Hogans, 1989, 血液 73, 90; McMahon 等人, 1990, 血液 76, 1718)。這意味治療用血漿量係快速流失，而且必須重複進行靜脈注射給藥。而且，在特定狀況下，觀察到對多肽之免疫反應。

當多肽與聚合物分子偶合時，可改善多肽的安定性並降低對這些多肽之免疫反應是普遍可接受的。WO 94/28024 揭示經聚乙二醇(PEG)改質之多肽的生理活性呈現較低的免疫原性及抗原性，而且血液中的循環明顯較未偶合蛋白質長，即具有較長清除率。但是，PEG-藥物偶合物呈現數項缺點，如其無法呈現可為活體內降解途徑之元素所認可的天然結構。因此，除了 PEG-偶合物外，也已製造其他偶合物及蛋白質聚合物。文獻中曾描述過許多用於交聯不同蛋白質及巨分子如聚合酶的方法(參見如 Wong, 蛋白質偶合及交聯化學, 1993, CRCS 公司)。

簡言之，對具有較佳安定性及生物活性之經進一步改質的多肽仍有需求。這特別適用於必須從具有低量涎酸之異構重組物中純化出具有高量涎酸並因此具有高活性之異構重組物的紅血球生成素(參見 EP 0 428 267 B1)。因此，若製

五、發明說明(4)

造方法係可提供高活性多肽而不需要全面純化，則係極有助益的。不幸地，在細菌或昆蟲細胞中製造多肽經常是困難的，因為多肽經常無法製造經適當摺疊之天然構型並缺乏適當糖基化作用。

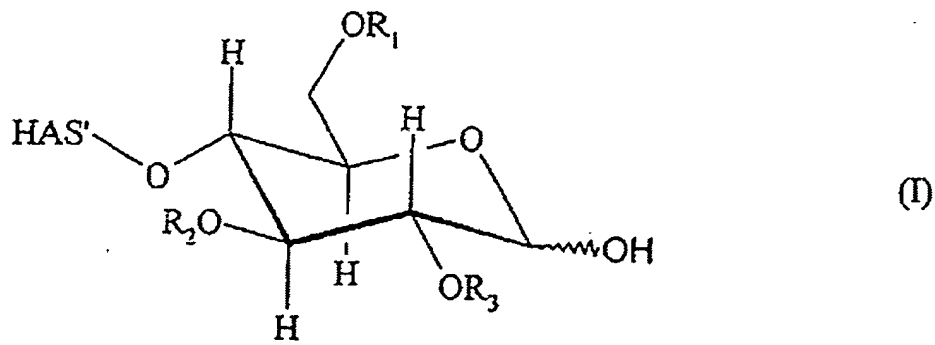
WO 02/08079 A2 揭示包含活性劑與羥基烷基澱粉之偶合物的化合物，其中活性劑與羥基烷基澱粉係直接連接或經由連接劑化合物連接。就直接連接而言，活性劑與羥基烷基澱粉之反應係在一水性媒介中進行，其中該水性媒介係包含至少 10 重量%的水。無法提供任何有關羥基烷基澱粉連接至該活性劑所含之羰基，而非醛基或酮基，亦非酸醛基或半縮醛基的實例。

因此，本發明目的係提供可與一另外化合物，如多肽形成化學連接之羥基烷基澱粉衍生物，其中該化合物包含硫醇基或醛基、酮基、半縮醛基或縮醛基作為官能基。較佳係醛基、酮基、半縮醛基或縮醛基被包含在該另外化合物之碳氫化合物部分中。

發明內容

因此，本發明係關於一種製造羥基烷基澱粉衍生物之方法，該羥基烷基澱粉具有一根據式(I)之結構

五、發明說明(5)



包含

- 式(I)羥基烷基澱粉中視情況已氧化之還原端或
- 一羥基烷基澱粉衍生物，其係藉由式(I)羥基烷基澱粉中視情況已氧化之還原端與一化合物(D)反應所獲得，該化合物(D)包含

- 至少一個可與該羥基烷基澱粉中視情況已氧化之還原端反應的官能基 Z₁ 及
- 至少一個官能基 W，

與一包含下列基團之化合物(L)反應，

- 至少一個可與該羥基烷基澱粉反應之官能基 Z₁ 或至少一個可與該羥基烷基澱粉衍生物中所含之官能基 W 反應之官能基 Z₂，及
- 至少一個可與一另外化合物(M)之官能基 Y 反應的官能基 X，

其中該官能基 Y 係選自醛基、酮基、半縮醛基、縮醛基及硫醇基組成之群。

在本發明內文中，術語“羥基烷基澱粉”(HAS)係指已被至少一個羥基烷基取代之澱粉衍生物。因此，為達簡潔目的，本發明所用之術語羥基烷基澱粉係不限於末端碳氫化

五、發明說明 (6)

合物部分包含如式(I)所述之羥基烷基 R_1 、 R_2 及/或 R_3 的化合物，而且亦指存在於任何處，如存在於澱粉分子 HAS' 之末端碳氫化合物部分及/或剩餘部分之至少一個羥基係被羥基烷基 R_1 、 R_2 或 R_3 取代的化合物。

在此文中，烷基可為可經適當取代之直鏈或分支鏈烷基。較佳係該羥基烷基包含 1 至 10 個碳原子，更佳係 1 至 6 個碳原子，更佳係 1 至 4 個碳原子，極佳係 2-4 個碳原子。"羥基烷基澱粉"因此最好包含羥基乙基澱粉、羥基丙基澱粉及羥基丁基澱粉，其中以羥基乙基澱粉及羥基丙基澱粉為特佳。

本發明亦包含含有兩或多個不同羥基烷基之羥基烷基澱粉。

HAS 中所含至少一個羥基烷基可包含兩或多個羥基。根據一較佳具體實施例，HAS 所含之至少一個羥基烷基包含一個羥基。

語詞"羥基烷基澱粉"亦包括烷基係經單或多取代之衍生物。在此文中，較佳為烷基係經鹵素，特別是氟或經芳基取代，前提是 HAS 仍可溶於水。而且，羥基烷基之末端羥基係經過酯化或醚化的。

五、發明說明(7)

此外，可使用直鏈或分支鏈經取代或未經取代烯基取代烷基。

羥基烷基澱粉為澱粉之醚衍生物。除了該醚衍生物外，其他澱粉衍生物亦可用於本發明內文中。例如，包含已酯化羥基之衍生物是有用的。這些衍生物可為，如具有 2-12 個碳原子之未經取代單或二羧酸的衍生物或其經取代衍生物。特別有用的是具有 2-6 個碳原子之未經取代單羧酸衍生物，特別是乙酸衍生物。在此文中，以乙醯基澱粉、丁基澱粉及丙基澱粉為佳。

此外，以具有 2-6 個碳原子之未經取代二羧酸衍生物為佳。

至於二羧酸衍生物，二羧酸之第二個羧基也被酯化是有助益的。而且，二羧酸單烷基酯之衍生物亦適合用於本發明內文中。

對於經取代單羧酸或二羧酸，取代基最好係與上述經取代烷基殘基之取代基相同。

澱粉之酯化技術係為已知技術(參見，如 Klemm. D 等人，綜合纖維素化學，第二卷，1998，Wiley-VCH, Weinheim, New York，特別是第 4.4 章，纖維素之酯化作用(ISBN 3-

五、發明說明(8)

527-29489-9))。

對於所有本發明具體實施例而言，最佳係羥基乙基澱粉(HES)。

因此，本發明亦關於一種如上所述之方法，其中該羥基烷基澱粉為羥基乙基澱粉。

HES 的主要特徵在於分子量分布及取代度。取代度有下列兩種可能描述方式：

1. 取代度可被描述成與所有葡萄糖部分(DS)相關經取代葡萄糖單體部分成比例。
2. 取代度可被描述成"莫耳取代"(MS)，其中描述每個葡萄糖部分之羥基乙基數目。

HES 溶液係以多分散組合物形式存在，其中各分子在相關聚合度、分支位置的數目及類型及取代類型方面彼此各不相同。HES 因此是不同分子量之化合物的混合物。因此，特定 HES 溶液係藉由統計構件的幫助由平均分子量決定。在此文中， M_n 被算成視分子數目而定之算術平均值。或者，重量平均值 M_w 代表一視 HES 質量而定的單位。

在本發明內文中，羥基乙基澱粉的平均分子量(重量平均)

五、發明說明(9)

係從 1 至 300kDa，其中以從 5 至 100kDa 之平均分子量為更佳。羥基乙基澱粉另外呈現從 0.1 至 0.8 之莫耳取代度而且相對於羥基乙基， $C_2 : C_6$ 取代間之比例係在 2 至 20 範圍內。

對根據式(I)之殘基 R_1 、 R_2 及 R_3 無任何特殊限制，只要化合物(I)仍可與化合物(D)或化合物(L)反應。根據一較佳具體實施例， R_1 、 R_2 及 R_3 係獨立地為氫或具有 1 至 10 個碳原子之羥基烷基、羥基芳基、羥基芳烷基或羥基烷芳基。較佳為氫及具有 1 至 6 個碳原子之羥基烷基。該烷基、芳基、芳烷基及/或烷芳基可為直鏈或分支鏈並可經適當取代。

因此，本發明也關於一種如上所述之方法，其中 R_1 、 R_2 及 R_3 獨立地為氫或具有 1 至 6 個碳原子之直鏈或分支鏈羥基烷基。

因此， R_1 、 R_2 及 R_3 可能是羥基己基、羥基戊基、羥基丁基、羥基丙基如 1-羥基丙基、2-羥基丙基、3-羥基丙基、1-羥基異丙基、2-羥基異丙基、羥基乙基如 1-羥基乙基、2-羥基乙基或羥基甲基。較佳係氫及羥基乙基，特佳係氫及 2-羥基乙基。

因此，本發明也關於一種如上所述之方法，其中 R_1 、 R_2

五、發明說明(10)

及 R_3 獨立地為氫或 2-羥基乙基。

根據本發明，化合物(D)或化合物(L)與羥基烷基澱粉之還原端係經由官能基 Z_1 與該還原端反應進行反應，其中基團 Z_1 係包含在化合物(D)或化合物(L)中。

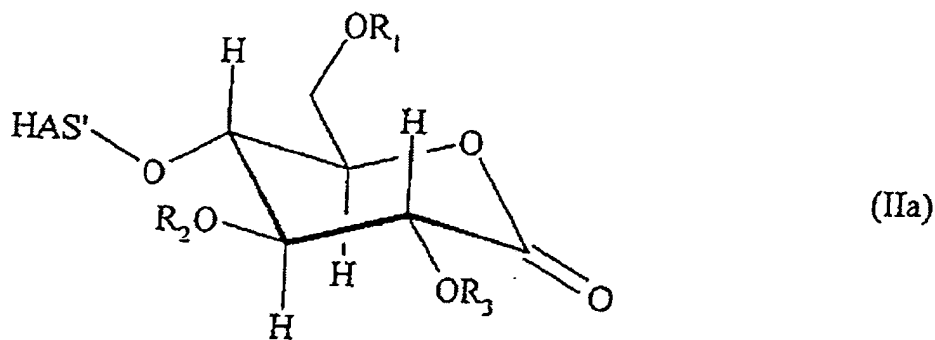
根據本發明第一具體實施例，化合物(D)或化合物(L)係與該羥基烷基澱粉之還原端反應，其中該還原端在反應前已經過氧化。

此還原端之氧化作用產生末端碳氫化合物基團包含內酯基或視化學反應條件及/或氧化劑而定，末端碳氫化合物基團具有一包含羧基之非環狀結構的羥基烷基澱粉。

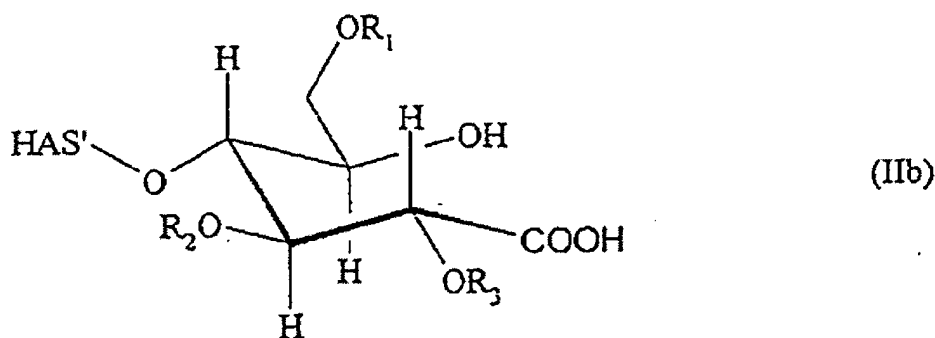
根據本發明一具體實施例，還原端已氧化之羥基烷基澱粉係以含有內酯基之化合物與含有羧基之化合物的混合物形式存在。在此混合物中，各個化合物可以任何可想到的比例存在。

因此，本發明也關於一種如上所述之方法，其中該羥基烷基澱粉之還原端在與化合物(D)或化合物(L)反應前已經過氧化，該羥基烷基澱粉因此具有一根據式(IIa)之結構

五、發明說明 (11)



及/或根據式(IIb)之結構。



該羥基烷基澱粉之還原端的氧化作用可根據各形成具有上述結構(IIa)及/或(IIb)之化合物的方法或組合方法進行。

雖然氧化作用可根據所有適合形成羥基烷基澱粉之已氧化還原端之一或多種方法進行，但較佳係如，例如 196 28 705 A1 中所述利用一鹼金屬碘溶液進行。

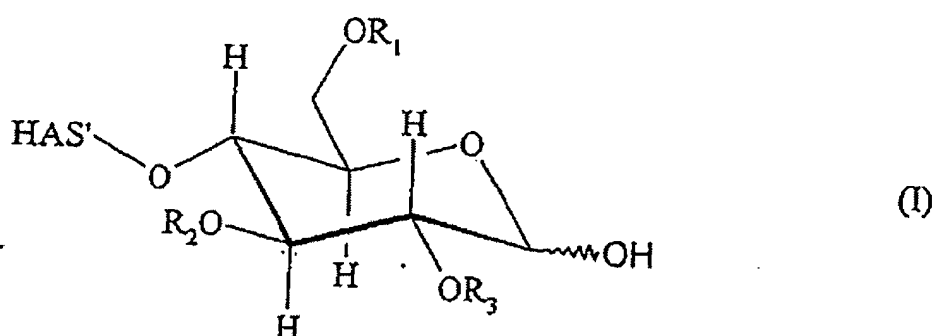
因此，本發明也關於一種如上所述之方法，其中該還原端係被一鹼金屬碘溶液氧化。

根據本發明之第二較佳具體實施例，化合物(D)或化合物

五、發明說明 (12)

(L)係與該羥基烷基澱粉之還原端反應，其中該還原端在反應前尚未被氧化。

因此，本發明也關於一種如上所述之方法，其中該羥基烷基澱粉之還原端在與化合物(D)或化合物(L)反應前尚未被氧化，該羥基烷基澱粉因此具有一根據式(I)之結構。



化合物(L)與羥基烷基澱粉或化合物(D)與羥基烷基澱粉間形成化學連接係可藉官能基 Z_1 與該羥基烷基澱粉中視情況已氧化之還原端反應而達到。

可使用各可與該羥基烷基澱粉中視情況已氧化之還原端形成化學連接之官能基作為官能基 Z_1 。

根據本發明一較佳具體實施例，官能基 Z_1 包含化學結構-NH-。

因此，本發明也關於一種如上所述之方法，其中官能基 Z_1 包含化學結構-NH-。

五、發明說明 (13)

根據本發明一較佳具體實施例，官能基 Z_1 為一具有結構 $R'-NH-$ 之基團，其中 R' 是氫或烷基、環烷基、芳基、芳烷基、芳環烷基、烷芳基或環烷芳基殘基，其中環烷基、芳基、芳烷基、芳環烷基、烷芳基或環烷芳基殘基可直接連接在 NH 基上，或根據另一具體實施例，可藉由一氧橋接至 NH 基上。該等烷基、環烷基、芳基、芳烷基、芳環烷基、烷芳基或環烷芳基殘基可經適當取代。作為較佳取代基，可能提及鹵素如 F 、 Cl 或 Br 。特佳殘基 R' 為氫、烷基及烷氧基，極佳係氫及未經取代烷基及烷氧基。

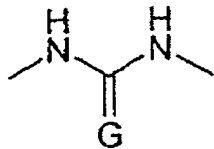
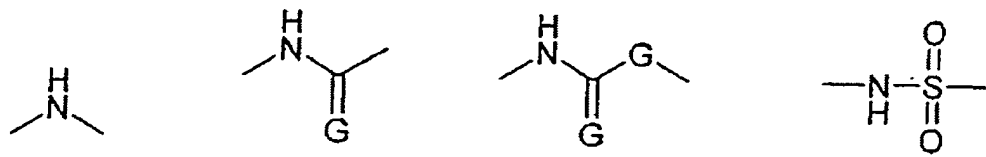
在烷基及烷氧基中，較佳係具有 1、2、3、4、5 或 6 個 C 原子之基團。更佳係甲基、乙基、丙基、異丙基、甲氧基、乙氧基、丙氧基及異丙氧基。特佳係甲基、乙基、甲氧基、乙氧基，並特別偏好使用甲基或甲氧基。

因此，本發明也關於一種如上所述之方法，其中 R' 是氫或甲基或甲氧基。

根據本發明另一較佳具體實施例，官能基 Z_1 具有結構 $R'-NH-R''-$ ，其中 R'' 最好包含結構單位 $-NH-$ 及/或結構單位 $-(C=G)-$ (其中 G 是 O 或 S) 及/或結構單位 $-SO_2-$ 。根據更多佳具體實施例，官能基 R'' 係選自下列基團組成之群

A7
B 100. 8. 22
年 月 日 (更正) 正替換

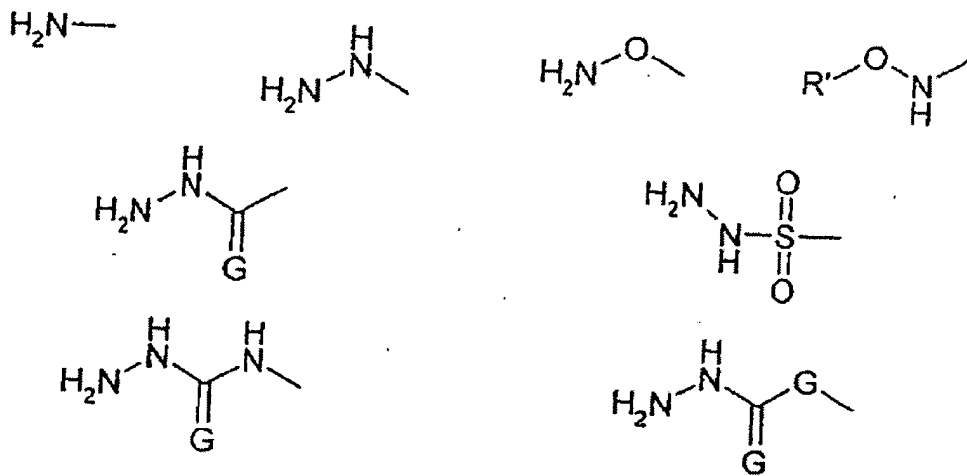
五、發明說明 (14)



及

其中若 G 出現兩次，其係獨立地為 O 或 S。

因此，本發明也關於一種如上所述之方法，其中官能基 Z₁ 係選自下列基團組成之群



其中 G 為 O 或 S，且若出現兩次，其係獨立地為 O 或 S，且 R' 為甲基。

本發明目的係提供一種羥基烷基澱粉衍生物，其包含一可

裝 訂 線

五、發明說明 (15)

與一另外化合物(M)之官能基 Y 反應以獲得羥基烷基澱粉衍生物作為反應產物的官能基 X，其中該羥基烷基澱粉衍生物包含羥基烷基澱粉、化合物(L)、視情況選用化合物(D)及另外化合物。

對於官能基 X 無任何特殊限制，前提是其可與另外化合物(M)中所含的官能基 Y 形成化學連接。

若官能基 Y 係選自醛基、酮基、半縮醛及縮醛基組成之群，官能基 X 最好包含化學結構-NH-。

因此，本發明也關於一種如上所述之方法，其中官能基 Y 係選自醛基、酮基、半縮醛及縮醛基組成之群，而且官能基 X 包含結構-NH-。

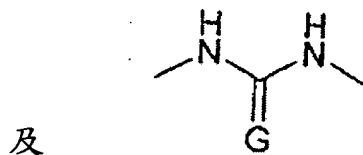
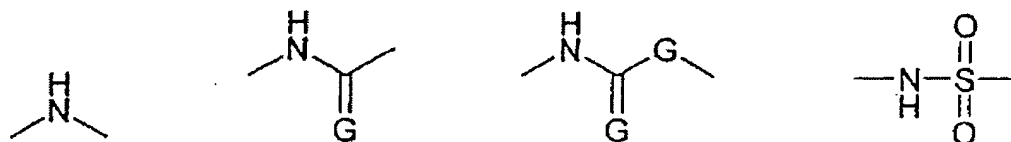
根據本發明一較佳具體實施例，官能基 X 為一具有結構 R'-NH-之基團，其中 R' 為氫或烷基、環烷基、芳基、芳烷基、芳環烷基、烷芳基或環烷芳基殘基，其中該環烷基、芳基、芳烷基、芳環烷基、烷芳基或環烷芳基殘基可直接連接在 NH 基上，或根據另一具體實施例，可藉由一氧橋接至 NH 基上。該等烷基、環烷基、芳基、芳烷基、芳環烷基、烷芳基或環烷芳基殘基可經適當取代。作為較佳取代基，可能提及鹵素如 F、Cl 或 Br。特佳殘基 R' 為氫、烷基及烷氧基，極佳係氫及未經取代烷基及烷氧基。

五、發明說明 (16)

在烷基及烷氧基中，較佳係具有 1、2、3、4、5 或 6 個 C 原子之基團。更佳係甲基、乙基、丙基、異丙基、甲氧基、乙氧基、丙氧基及異丙氧基。特佳係甲基、乙基、甲氧基、乙氧基，並特別偏好使用甲基或甲氧基。

因此，本發明也關於一種如上所述之方法，其中 R' 是氫或甲基或甲氧基。

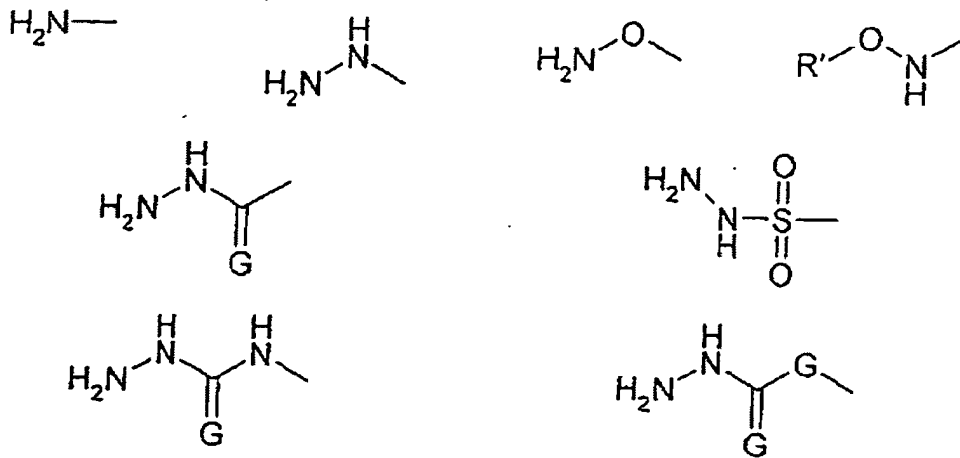
根據本發明另一較佳具體實施例，官能基 X 具有結構 R'-NH-R''-，其中 R'' 最好包含結構單位-NH-及/或結構單位-(C=G)- (其中 G 是 O 或 S) 及/或結構單位-SO₂-。根據更佳具體實施例，官能基 R'' 係選自下列基團組成之群



其中若 G 出現兩次，其係獨立地為 O 或 S。

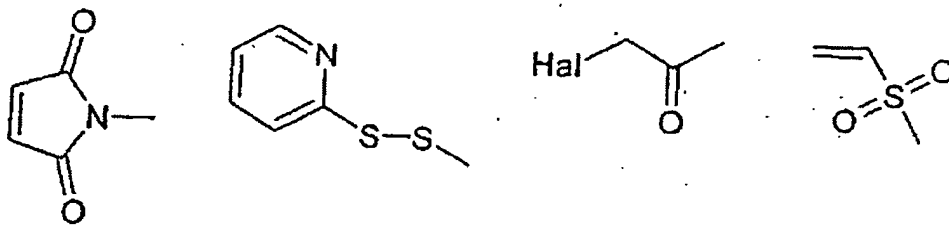
因此，本發明也關於一種如上所述之方法，其中官能基 X 係選自下列基團組成之群

五、發明說明 (17)



其中 G 為 O 或 S，且若出現兩次，其係獨立地為 O 或 S，且 R' 為甲基。

若官能基 Y 為硫醇基，官能基 X 最好係選自下列基團組成之群

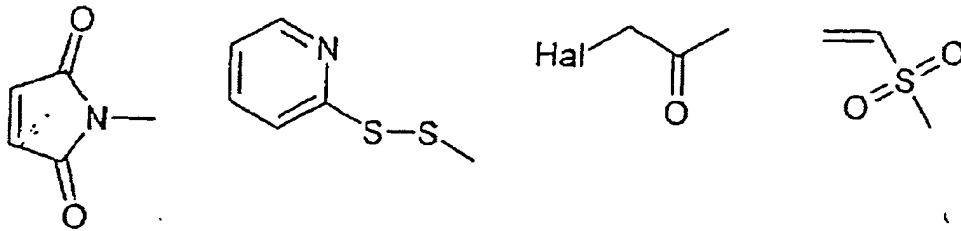


其中 Hal 為 Cl、Br 或 I，較佳係 Br 或 I。

因此，本發明也關於一種如上所述之方法，其中官能基 Y 為 -SH 且官能基 X 係選自下列基團組成之群

五、發明說明 (18)

年 月 日修(更)正替換頁



其中 Hal 為 Cl、Br 或 I。

根據本發明一具體實施例，羥基烷基澱粉係與化合物(D)反應，而且所得反應產物係進一步與化合物(L)反應，其中化合物(L)與反應產物間之化學連接係藉由化合物(L)中所含官能基 Z_2 與屬反應產物一部分之化合物(D)中所含官能基 W 反應所形成。

一般對官能基 Z_2 及 W 無任何限制，前提是其可形成所需化學連接。

作為可用的官能基 W 或 Z_2 ，其中可能提及下列官能基：

- C-C 雙鍵或 C-C 叁鍵或芳族 C-C 鍵；
- 硫醇基或羥基；
- 烷基磺酸醯肼、芳基磺酸醯肼；
- 1,2-二醇；
- 1,2-胺基醇；
- 胺基-NH₂-或包含結構單位-NH-之胺基衍生物如胺基烷基、胺基芳基、胺基芳烷基或烷芳基胺基；
- 羥基胺基-O-NH₂-或包含結構單位-O-NH-之羥基胺基

五、發明說明 (19)

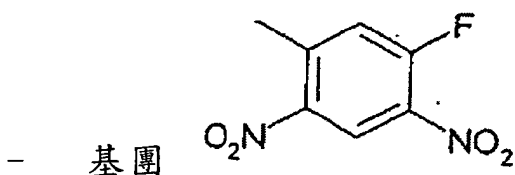
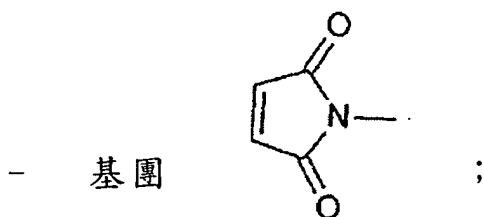
衍生物，如羥基烷基胺基、羥基芳基胺基、羥基芳烷基胺基或羥基烷芳基胺基；

- 烷氧基胺基、芳氧基胺基、芳烷氧基胺基或烷芳氧基胺基，其各包含結構單位-NH-O-；
 - 具有羰基-Q-C(=G)-M 之殘基，其中 G 為 O 或 S，而且 M 為，例如
 - -OH 或-SH；
 - 烷氧基、芳氧基、芳烷氧基或烷芳氧基；
 - 烷硫醇基、芳硫醇基、芳烷硫醇基或烷芳硫醇基；
 - 烷基羰氧基、芳基羰氧基、芳烷基羰氧基、烷芳基羰氧基；
 - 活性酯如具有醯亞胺結構如 N-羥基琥珀醯亞胺或具有結構單位 O-N 之羥基胺的酯類，其中 N 係屬於雜芳基化合物的一部分或當 G=O 且 Q 不存在時，如具有經取代芳基殘基如五氟苯基、對硝基苯基或三氯苯基之芳氧基化合物；
- 其中 Q 是不存在或為 NH 或為雜原子如 S 或 O；
- -NH-NH₂ 或-NH-NH-；
 - -NO₂；
 - 氨基；
 - 羰基如醛基或酮基；
 - 羧基；
 - -N=C=O 基或-N=C=S 基；
 - 乙烯基鹵化物基團如乙烯基碘化物或乙烯基溴化物基

五、發明說明 (20)

年 片 日 () 正 替 換 頁

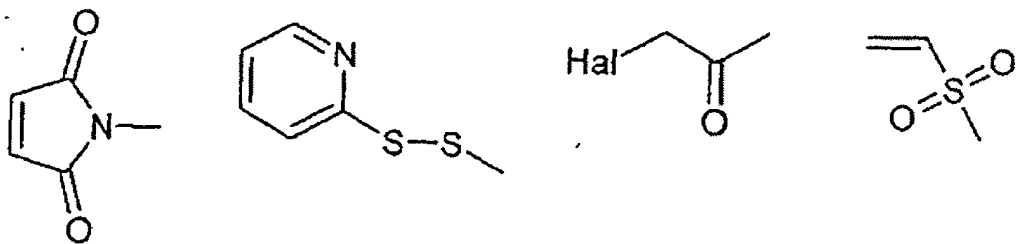
- 或三氟甲基磺酸鹽；
- $-C\equiv C-H$ ；
 - $-(C=NH_2Cl)-O$ 烷基；
 - 基團 $-(C=O)-CH_2-Hal$ ，其中 Hal 是 Cl、Br 或 I；
 - $-CH=CH-SO_2-$ ；
 - 包含結構 $-S-S-$ 之二硫基；



其中 Z_2 及 W 分別為可與上述基團之一形成化學連接之基團。

根據本發明較佳具體實施例， W 及 Z_2 皆為選自上列基團名單之基團。

根據本發明之第一特佳具體實施例， Z_2 或 W 為硫醇基。
在此特定例中，官能基 W 最好係選自下列基團組成之群

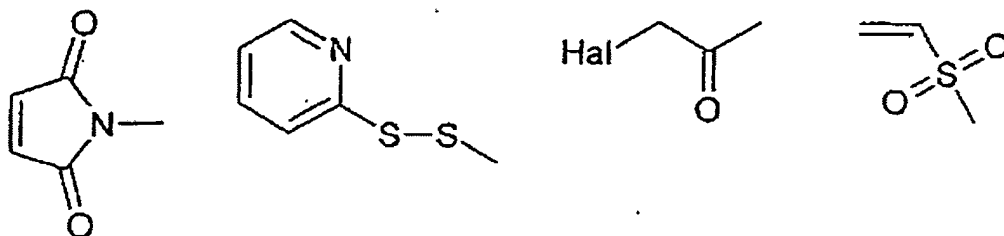


五、發明說明 (21)

年 月 日 (更) 正 替 換 頁

其中 Hal 為 Cl、Br 或 I，較佳係 Br 或 I。

因此，本發明也關於一種如上所述之方法，其中官能基 W 或官能基 Z₂ 為 -SH，而且官能基 Z₂ 或官能基 W 係選自下列基團組成之群



其中 Hal 為 Cl、Br 或 I。

根據本發明之第二特佳具體實施例，Z₂ 或 W 係選自上述活性酯或視情況可轉化成活性酯之羧基組成之群。在此特定例中，官能基 W 或 Z₂ 分別包含化學結構 -NH-。

因此，本發明也關於一種如上所述之方法，其中 Z₂ 或 W 係選自上述活性酯或視情況可轉化成活性酯之羧基組成之群，而且官能基 W 或 Z₂ 分別包含化學結構 -NH-。

根據本發明一較佳具體實施例，包含結構 -NH- 之官能基 W 或 Z₂ 為一具有結構 R'-NH- 之基團，其中 R' 是氫或烷基、

五、發明說明 (22)

年 月 日 (正) 正替換頁

環烷基、芳基、芳烷基、芳環烷基、烷芳基或環烷芳基殘基，其中環烷基、芳基、芳烷基、芳環烷基、烷芳基或環烷芳基殘基可直接連接在 NH 基上，或根據另一具體實施例，可藉由一氧橋接至 NH 基上。該等烷基、環烷基、芳基、芳烷基、芳環烷基、烷芳基或環烷芳基殘基可經適當取代。作為較佳取代基，可能提及鹵素如 F、Cl 或 Br。特佳殘基 R' 為氫、烷基及烷氧基，極佳係氫及未經取代烷基及烷氧基。

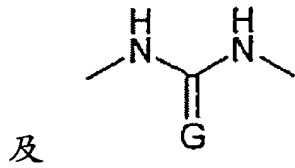
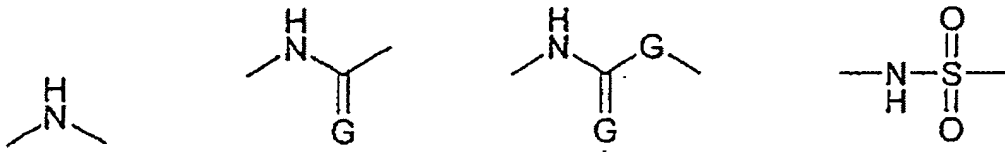
在烷基及烷氧基中，較佳係具有 1、2、3、4、5 或 6 個 C 原子之基團。更佳係甲基、乙基、丙基、異丙基、甲氧基、乙氧基、丙氧基及異丙氧基。特佳係甲基、乙基、甲氧基、乙氧基，並特別偏好使用甲基或甲氧基。

因此，本發明也關於一種如上所述之方法，其中 W 或 Z₂ 係選自上述活性酯或視情況可轉化成活性酯之羧基組成之群，而且官能基 W 或 Z₂ 分別為 R'-NH-，其中 R' 為氫或甲基或甲氧基。

根據本發明另一較佳具體實施例，官能基 W 或 Z₂ 具有結構 R'-NH-R''-，其中 R'' 最好包含結構單位-NH-及/或結構單位-(C=G)-(其中 G 是 O 或 S)及/或結構單位-SO₂-。根據更多較佳具體實施例，官能基 R'' 係選自下列基團組成之群

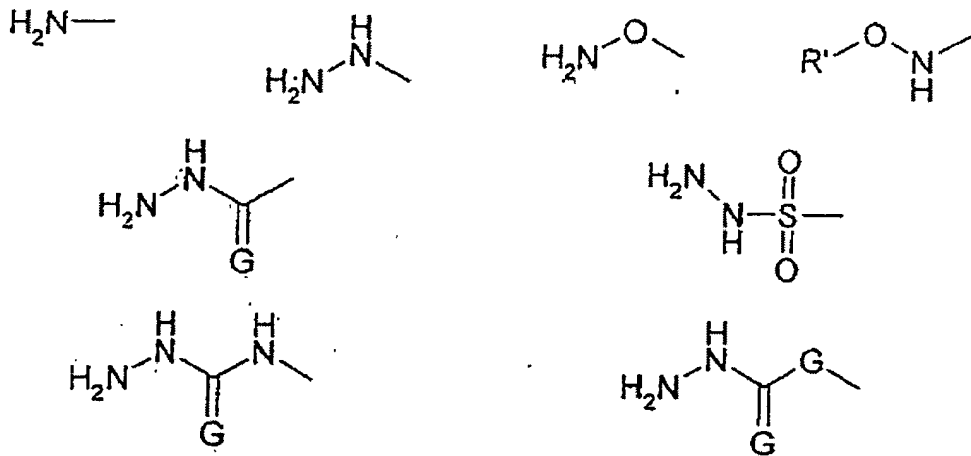
五、發明說明 (23)

100-8-22
年 月 日 (免)正替換頁



其中若 G 出現兩次，其係獨立地為 O 或 S。

因此，本發明也關於一種如上所述之方法，其中官能基 W 或 Z₂ 係選自下列基團組成之群



其中 G 為 O 或 S，且若出現兩次，其係獨立地為 O 或 S，且 R' 為甲基。

裝
訂
線

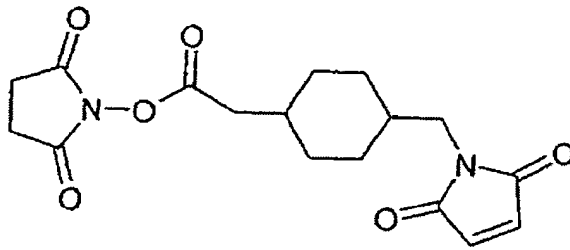
五、發明說明 (24)

100 22
年 月 日 (2) 正替換頁

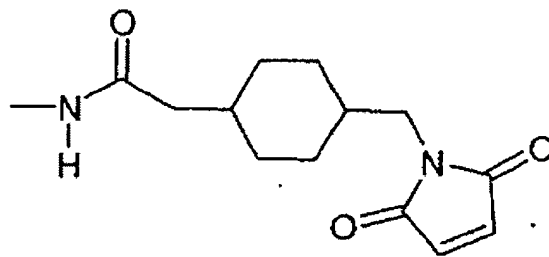
根據本發明另一項特點，至少一個官能基 X、Z₂ 及/或 W 可能是一無法與既定一另外化合物直接反應，但可經化學改質以可依所需方式反應之基團。

作為在與一另外化合物反應前欲改質之官能基實例，可能提及 1,2-胺基醇或 1,2-二醇，其例如，可藉氧化作用改質以形成醛基或酮基。

另一個在與一另外化合物反應前欲改質之官能基實例為-NH₂ 基，其可藉由與，例如根據下式之化合物反應



以獲得下式結構而改質，



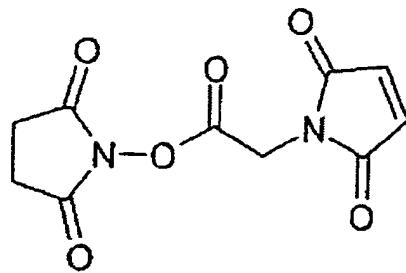
其中該結構係，例如可與硫醇基反應。

另一個在與一另外化合物反應前欲改質之官能基實例為-NH₂ 基，其可藉由與，例如根據下式之化合物反應

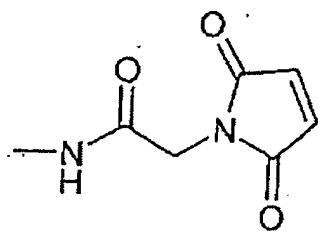
五、發明說明 (25)

100-8.22

年 .. : 第()正替換頁



以獲得下式結構而改質。



其中該結構係，例如可與硫醇基反應。

另一個在與一另外化合物反應前欲改質之官能基實例為可與溴乙酸酐或 N-琥珀醯亞胺碘基乙酸酯反應之胺基。

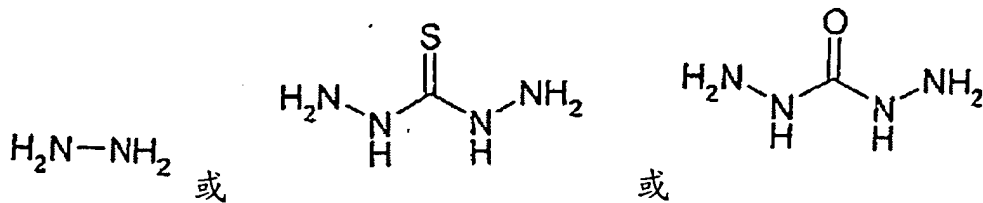
根據本發明一較佳具體實施例，化合物(L)具有結構 $Z_1-L'-X$ 或 $Z_2-L'-X$ ， L' 為一分離該等官能基之有機殘基並視情況是不存在的，該結構係視化合物(D)是否與羥基烷基澱粉反應而定。

根據第一較佳具體實施例，化合物(D)無參與，而且 Y 係選自醛基、酮基、半縮醛基及縮醛基組成之群。

五、發明說明 (26)

100. 8. 25
 年 月 日 修(更)正 替換頁

在此特例中，其中較佳係以下列化合物作為具有結構 Z₁-L'-X 之化合物(L)，其中 L'是不存在的：

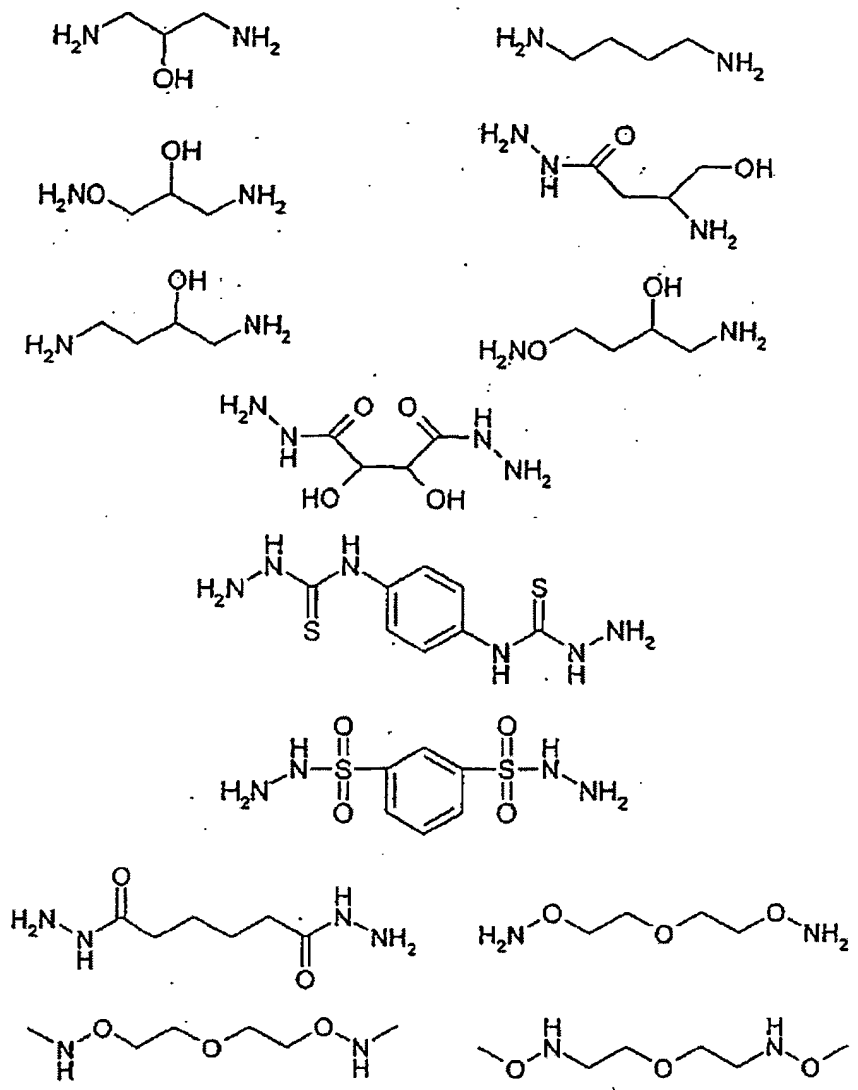


在此特例中，若 L'是存在的，L'可為直鏈或分支鏈烷基或環烷基或芳基或芳烷基或芳環烷基或烷芳基或環烷芳基，其中 L'可包含至少一個雜原子如 N、O、S，而且其中 L'可經適當取代。基團 L'的尺寸可經調整以符合特定需要。一般，分離基 L'一般具有 1 至 60 個，較佳係 1 至 40 個，更佳係 1 至 20 個，更佳係 1 至 10 個，更佳係 1 至 6 個，特佳係 1 至 4 個碳原子。若雜原子是存在的，該分離基一般包含 1 至 20 個，較佳係 1 至 8 個，特佳係 1 至 4 個雜原子。根據本發明特佳具體實施例，分離基 L'包含 1 至 4 個氧原子。分離基 L'可包含一具有，如 5 至 7 個碳原子之視情況分支的烷基鏈或芳基或環烷基，或是烷基部分可能是直鏈及/或環狀烷基之芳烷基、烷芳基。根據一極佳具體實施例，該分離基為具有 1 至 20 個，較佳係 1 至 8 個，更佳係 1 至 6 個，更佳係 1 至 4 個，特佳係 2 至 4 個碳原子之烷鏈。在出現雜原子的情況下，特佳係包含 1 至 4 個氧原子之鏈。

五、發明說明 (27)

10. 8. 22
年 月 日 (更正) 頁

關於此 Y 係選自醛基、酮基、半縮醛基及縮醛基組成之群的特例，其中較佳係以下列化合物作為具有結構 Z₁-L'-X 之化合物(L)，其中 L'是存在的：



根據第二較佳具體實施例，化合物(D)有參與。

根據本發明另一較佳具體實施例，化合物(D)具有結構 Z₁-D'-W，D'係一分離該等官能基之有機殘基並視情況是不存在的。

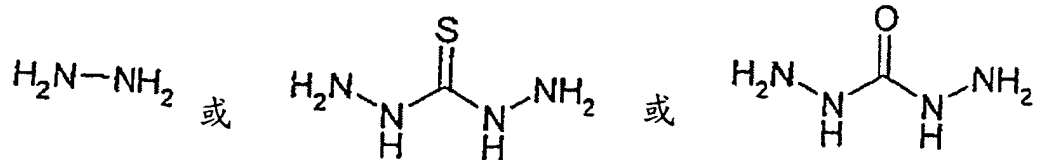
經濟部智慧財產局員工消費合作社印製

裝 訂 線

1990年8月22日(更正)替換頁

五、發明說明 (28)

在此特例中，其中較佳係以下列化合物作為具有 $Z_1-D'-W$ 之化合物(D)，其中 D' 是不存在的：



D' 是不存在的化合物 D 特定實例為 NH_3 。

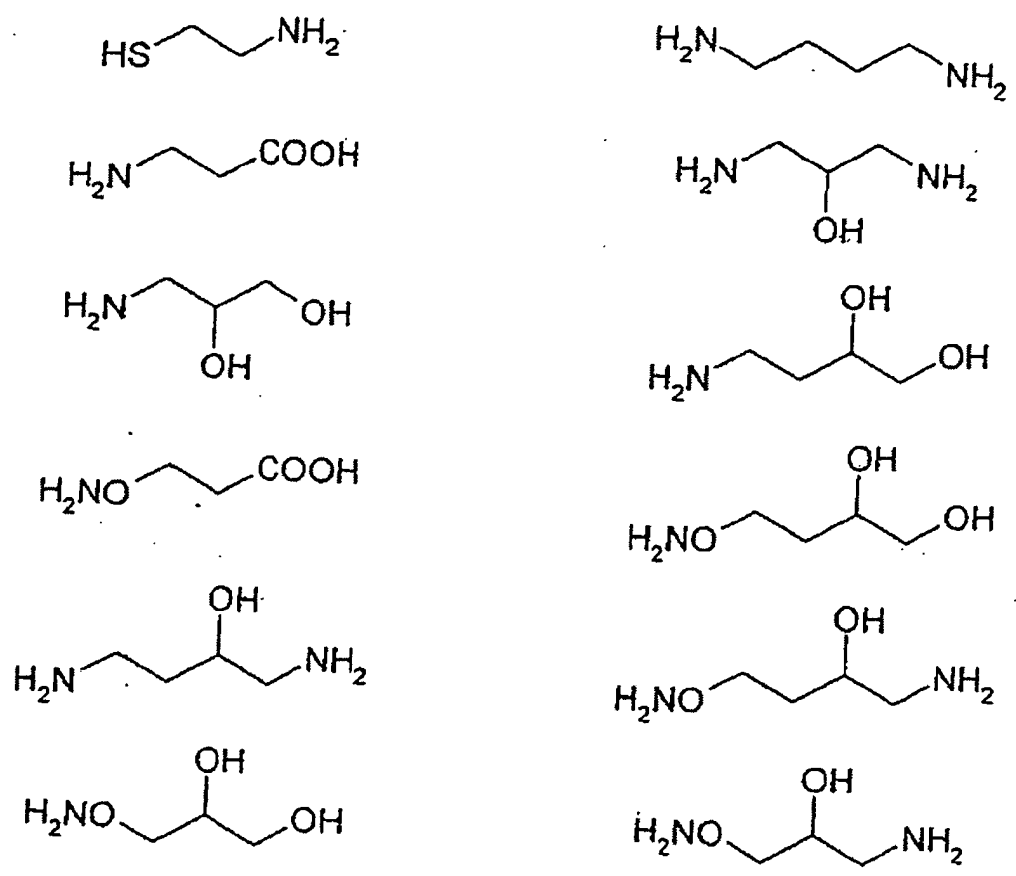
在此特例中，若 D' 是存在的，D' 可為直鏈或分支鏈烷基或環烷基或芳基或芳烷基或芳環烷基或烷芳基或環烷芳基，其中 D' 可包含至少一個雜原子如 N、O、S，而且其中 D' 可經適當取代。基團 D' 的尺寸可經調整以符合特定需要。一般，分離基 D' 一般具有 1 至 60 個，較佳係 1 至 40 個，更佳係 1 至 20 個，更佳係 1 至 10 個，更佳係 1 至 6 個，特佳係 1 至 4 個碳原子。若雜原子是存在的，該分離基一般包含 1 至 20 個，較佳係 1 至 8 個，特佳係 1 至 4 個雜原子。根據本發明特佳具體實施例，分離基 D' 包含 1 至 4 個氧原子。分離基 D' 可包含一具有，如 5 至 7 個碳原子之視情況經分支烷基鏈或芳基或環烷基，或是烷基部分可能是直鏈及/或環狀烷基之芳烷基、烷芳基。根據一極佳具體實施例，該分離基為具有 1 至 20 個，較佳係 1 至 8 個，更佳係 1 至 6 個，更佳係 1 至 4 個，特佳係 2 至 4 個碳原子之烷鏈。在出現雜原子的情況下，特佳係包含 1 至

五、發明說明 (29)

10. 8. 22
年 月 日修(更)正替換頁

4 個氧原子之鏈。

關於此特例，具有 Z₁-D'-W 且 D'是存在的較佳化合物(D)
為：

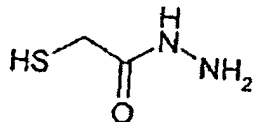
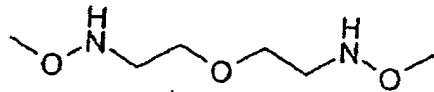
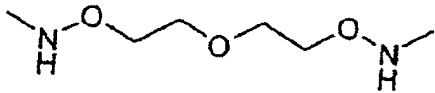
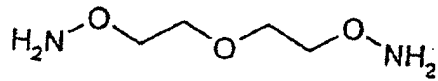
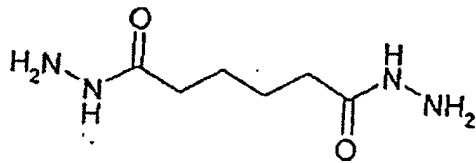
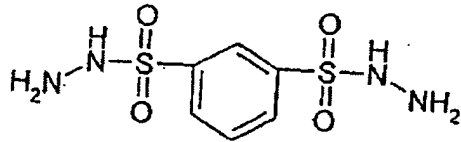
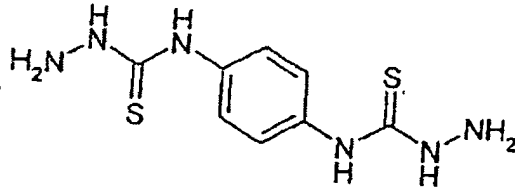
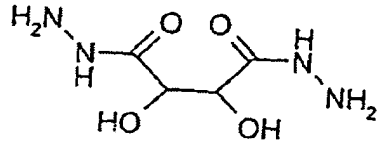
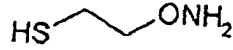
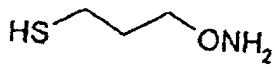
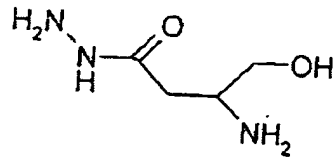
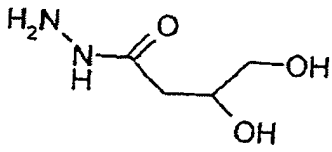
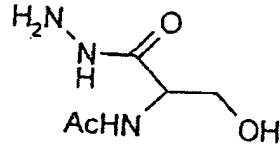
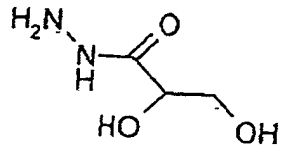
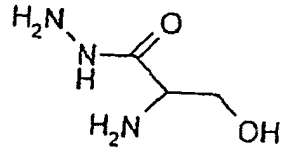
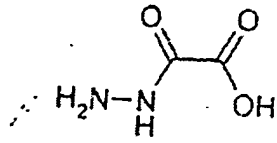


經濟部智慧財產局員工消費合作社印製

裝 訂 線

五、發明說明 (30)

100. 8. 22
年 月 日 (更) 正 替 換 頁



經濟部智慧財產局員工消費合作社印製

裝 訂 線

87
100 8.22
年 月 日 涉(更)正 替換頁

五、發明說明 (31)

視化合物(D)中所含官能基 W 的化學性質及官能基 Y 而定，可根據特定需求使用特定化合物(L)。

如上詳細說明般，若，例如官能基 Y 為一硫醇基且官能基 W 包含結構-NH-，其中係以下列類型之化合物(L)為佳：

化合物(L)類型	官能基 X	官能基 Z ₂
C	碘烷基	N-琥珀醯亞胺酯
D	溴烷基	N-琥珀醯亞胺酯
E	馬來醯亞胺	N-琥珀醯亞胺酯
F	吡啶二硫基	N-琥珀醯亞胺酯
G	乙烯基磺	N-琥珀醯亞胺酯

若，如官能基 Y 係選自醛基、酮基、半縮醛基及縮醛基組成之群，而且官能基 W 為硫醇基，其中以下列類型之化合物(L)為佳：

化合物(L)類型	官能基 X	官能基 Z ₂
A	醯肼	馬來醯亞胺
B	醯肼	吡啶二硫基

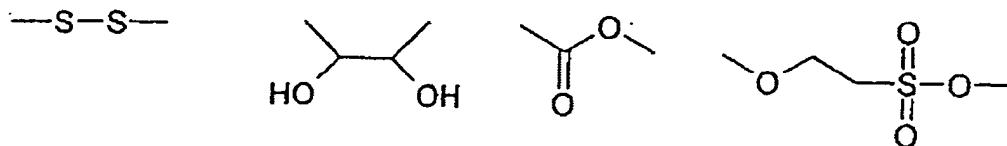
在結束本發明描述之表 1 中，列出一些根據上列類型之較佳化合物(L)實例。

分離基 L'及/或 D'可經適當取代。較佳取代基為，如鹵化物如 F、Cl、Br 或 I。

五、發明說明 (32)

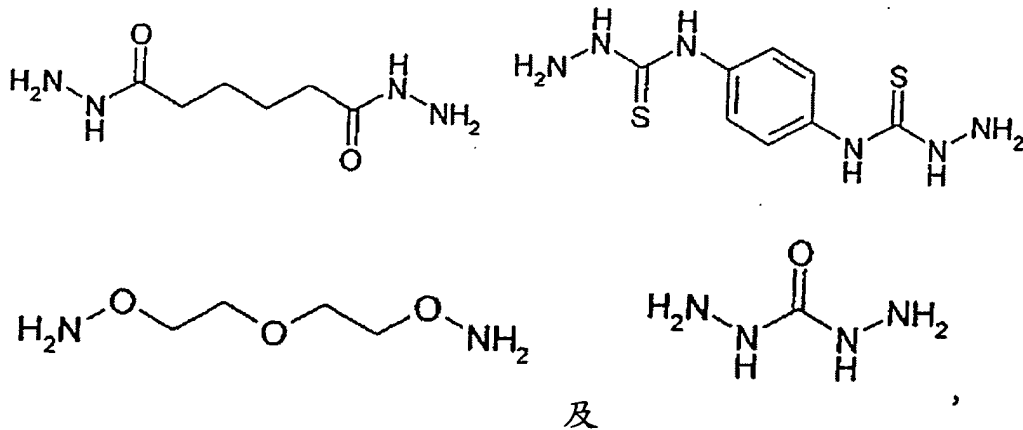
1998年8月22日修正(更)正替換頁

分離基 L' 及/或 D' 可包含一或多個分解位置如

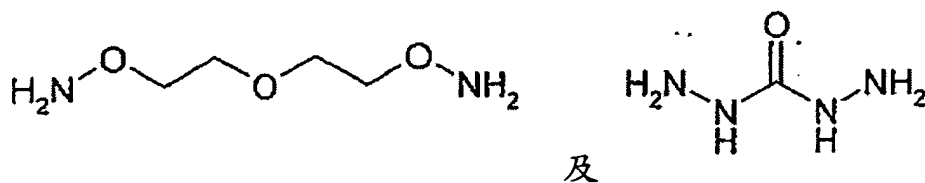


其中該等位置可在預定位置容易地分解所得化合物。

可連接至羥基烷基澱粉之化合物(L)的特佳實例為



特佳係化合物(L)



其中所得羥基烷基澱粉衍生物包含可與一另外化合物(M)所含官能基 Y 反應之官能基 X，而且其中該官能基 Y 係選自醛基、酮基、半縮醛基、縮醛基組成之群。

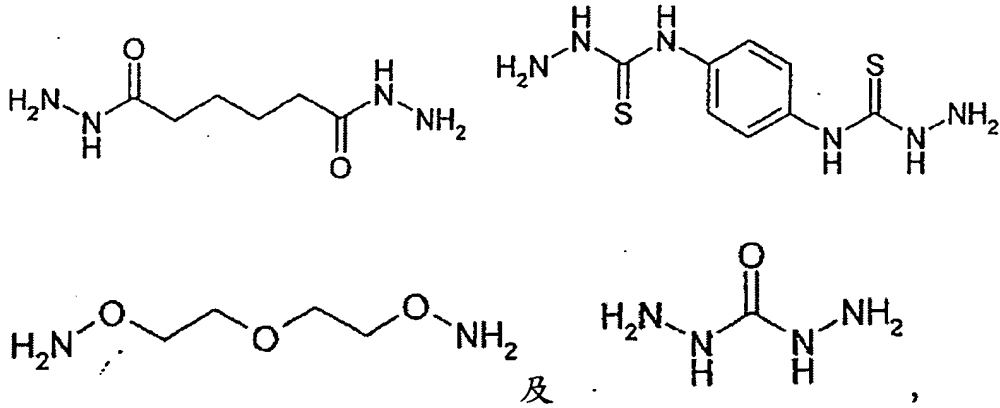
經濟部智慧財產局員工消費合作社印製

裝訂線

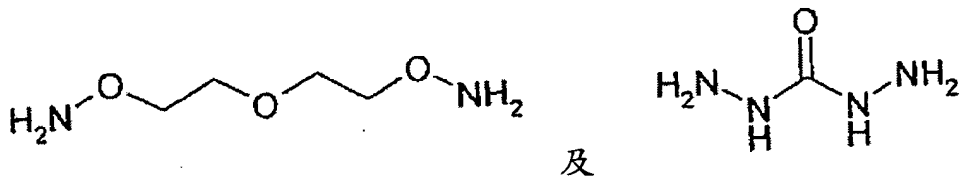
8. 22
年 月 日 第(更)正 替换頁

五、發明說明 (33)

可連接至羥基烷基澱粉之化合物(D)的特佳實例為

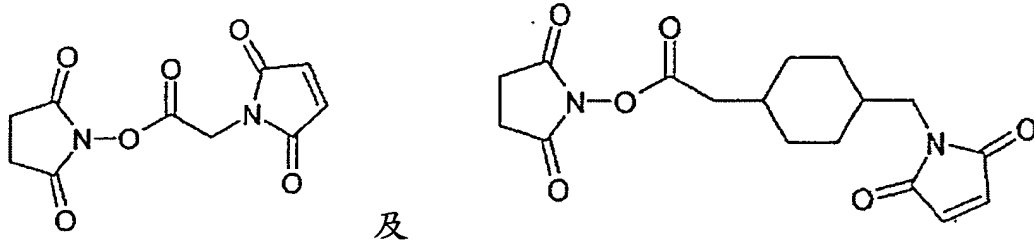


特佳係化合物(D)



其中所得羥基烷基澱粉衍生物包含可與化合物(L)所含官能基 Z₂ 反應之官能基 W，其中包含羥基烷基澱粉、化合物(D)及化合物(L)之所得羥基烷基澱粉衍生物係可與一另外化合物(M)所含官能基 Y 反應，而且其中該官能基 Y 為硫醇基。

較佳係以下列化合物(L)



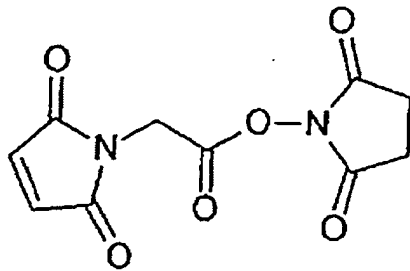
特佳係以化合物(L)

經濟部智慧財產局員工消費合作社印製

裝
訂
線

1988. 2. 22
 年 月 日修(更)正替換頁

五、發明說明 (34)



與上述較佳化合物(D)一起使用。

根據本發明第一較佳具體實施例，化合物(D)或化合物(L)係與該羥基烷基澱粉中未氧化之還原端反應。

視反應條件如所用溶劑或溶劑混合物、反應混合物之溫度、壓力或 pH 而定，化合物(D)或化合物(L)與該羥基烷基澱粉中未氧化之還原端反應的反應產物可具有不同組成份。

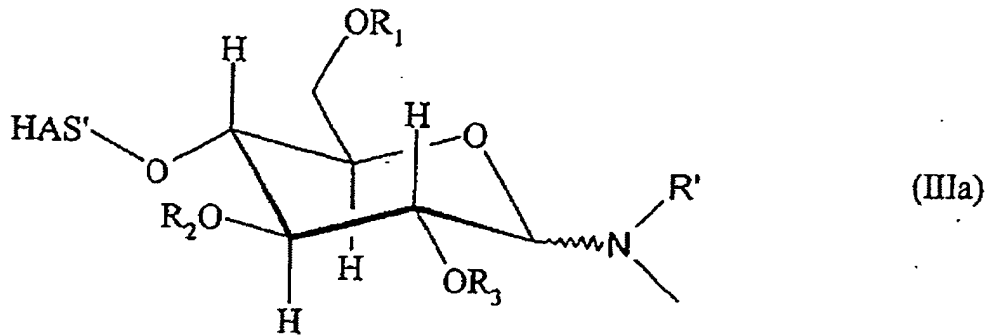
根據本發明一較佳具體實施例，此反應係在一水性系統中進行。

本發明內文中所用之術語”水性系統”係指一溶劑或溶劑混合物，其中該溶劑或溶劑混合物以所含溶劑之重量計包含範圍從至少 10 重量%，較佳係至少 50 重量%，更佳係至少 80 重量%，極佳係至少 90 重量%或高達 100 重量%之水。作為附加溶劑，可能提及如 DMSO、DMF、乙醇或甲醇等溶劑。

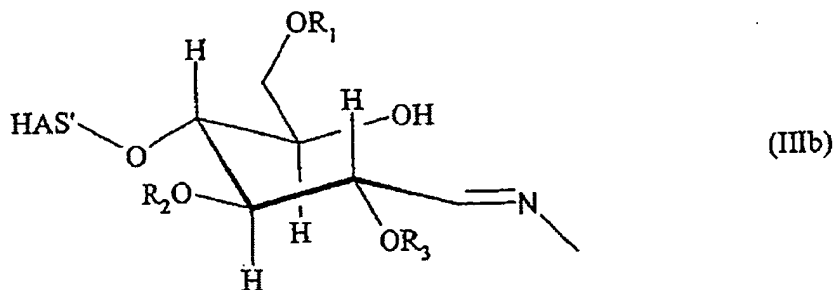
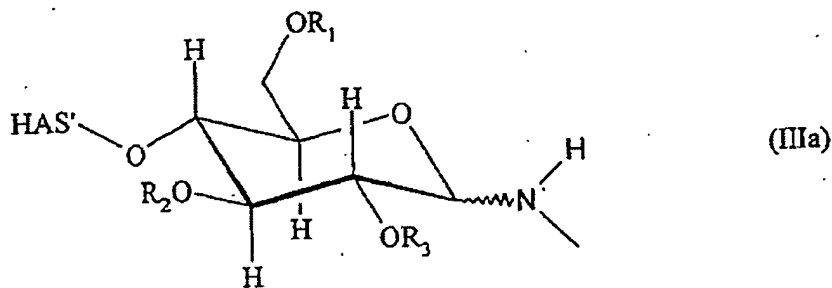
五、發明說明 (35)

1990. 8. 22
年 月 日 (更) 正 替 換 頁

若該反應係在一水性系統中進行，而且官能基 Z_1 為基團 $R'-NH-$ ，如上述般，該羥基烷基澱粉衍生物具有一根據式 (IIIa) 之組成份



若該反應係在一水性系統中進行，而且官能基 Z_1 為基團 $R'-NH-$ 且 $R'=H$ ，如上述般，該羥基烷基澱粉衍生物可具有一根據式 (IIIa) 或式 (IIIb) 之組成份，或為一根據式 (IIIa) 及 (IIIb) 之化合物的混合物



視反應條件及/或該反應所用之化合物(L)或化合物(D)的化學性質而定，根據式 (IIIa) 之化合物可以 N 原子為於赤道

五、發明說明 (36)

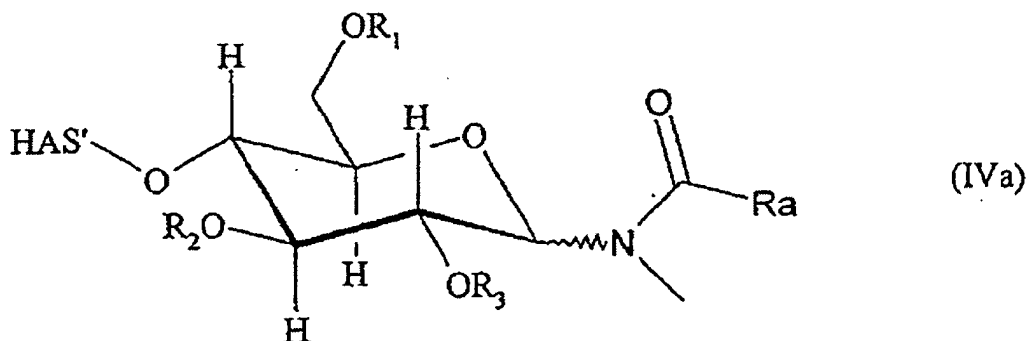
第 0. 22
年 月 日 (更正) 替換頁

或軸向位置之型態存在，其也可以具有特定平衡分布之兩型態混合物存在。

視反應條件及/或該反應所用之化合物(L)或(D)的化學性質而定，根據式(IIIb)之化合物可以 C-N 雙鍵呈 E 或 Z 構型的型態存在，其也可以具有特定平衡分布之兩型態混合物存在。

因此，本發明也關於一種上述具有根據式(IIIa)或根據式(IIIb)或根據式(IIIa)及(IIIb)之組成份的羥基烷基澱粉衍生物。

在某些例子中，可能希望安定根據式(IIIa)之化合物。這特別係在根據式(IIIa)之化合物係在水性溶液中製得或使用的情况。特佳係以根據式(IIIa)之化合物的醯化作用作為安定化方法，特別係在 R' 為氫的情况下。可使用所有適合產生根據式(IVa)之所需羥基烷基澱粉衍生物的試劑以作為醯化劑。



五、發明說明 (37)

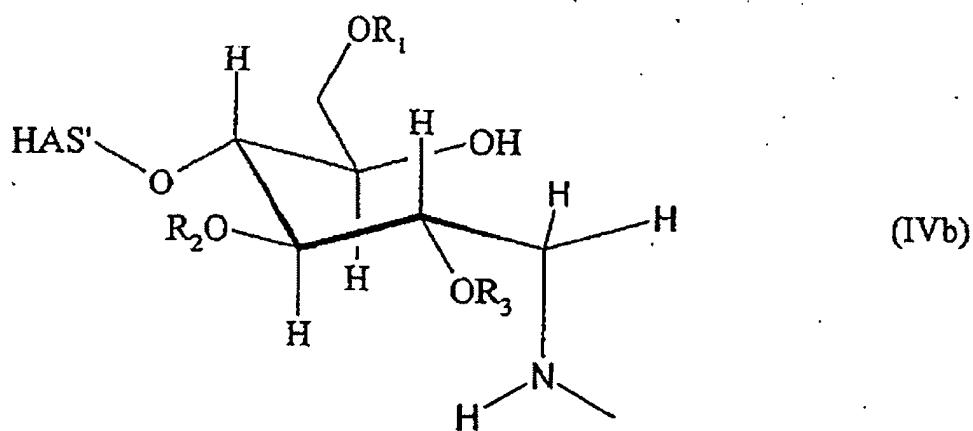
第 3, 22
年 月 日修訂(正)替換頁

根據本發明特佳具體實施例，屬於醃化劑一部分之殘基 Ra 為甲基。較佳係使用羧酸酐、羧酸鹵化物及羧酸活性酯作為醃化劑。

該醃化作用係在 0 至 30°C 之溫度範圍內，較佳係在 2 至 20°C 之溫度範圍內，特佳係在 4 至 10°C 之溫度範圍內進行。

因此，本發明也關於一種藉由上述方法所獲得之羥基烷基澱粉衍生物，其中該衍生物具有一根據式(IVa)之組成份。

在其他例子中，可能希望安定根據式(IIIb)之化合物。這特別係在根據式(IIIb)之化合物係在水性溶液中製造或使用的情况下。特佳係以根據式(IIIb)之化合物的還原作用作為安定化方法，特別係在 R' 為氫的情况下。可使用所有適合產生根據式(IVb)之所需羥基烷基澱粉衍生物的試劑作為還原劑。



年 月 日 (更) 正 替 換 頁

五、發明說明 (38)

根據本發明特佳具體實施例，可使用硼氫化物如 NaCNBH_3 或 NaBH_4 作為還原劑。

該還原作用係在 4 至 100°C 之溫度範圍內，較佳係在 10 至 90°C 之溫度範圍內，特佳係在 25 至 80°C 之溫度範圍內進行。

因此，本發明也關於一種藉由上述方法所獲得之羥基烷基澱粉衍生物，其中該衍生物具有一根據式(IVb)之組成份。

本發明另外關於具有根據式(IIIa)及(IIIb)、(IVa)及(IVb)、(IIIa)及(IVa)、(IIIa)及(IVb)、(IIIb)及(IVa)、(IIIb)及(IVb)、(IIIa)及(IIIb)及(IVa)、(IIIa)及(IIIb)及(IVb)、(IVa)及(IVb)及(IIIa)和(IVa)及(IVb)及(IIIa)之組成份的化合物混合物，其中(IIIa)及/或(IVa)可獨立地以 N 原子位於赤道或軸向位置之構型存在及/或其中(IIIb)可以 C-N 雙鍵呈 E 或 Z 構型存在。

根據本發明第二較佳具體實施例，化合物(D)或化合物(L)係與該羥基烷基澱粉之已氧化還原端反應。

在此例中，較佳係使用極性非質子溶劑，其也可包含特定量之水，如高達 10 重量%之水。其中較佳非質子溶劑為 DMSO 或 DMF。較佳反應溫度範圍之實例係從室溫 20 至

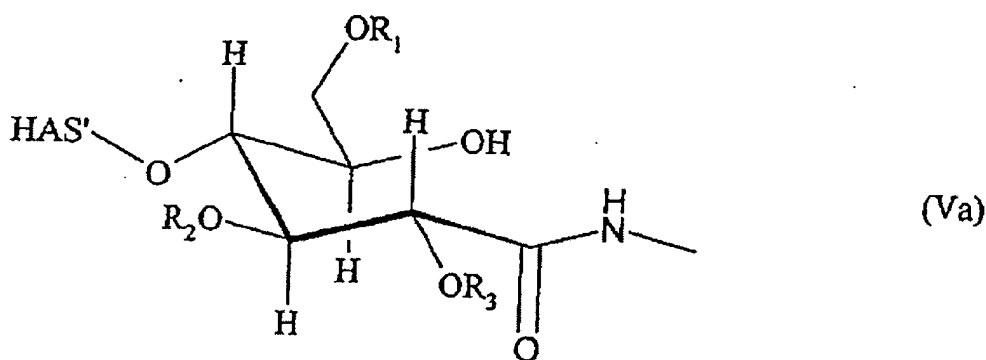
100. 8. 22

年 月 日 (管) 正 替 換 頁

五、發明說明 (39)

65°C，視與該羥基烷基澱粉之已氧化還原端反應之官能基的化學性質和其他反應條件而定，反應時間一般係在 1 分鐘至數小時範圍內並可高達數天。

在此例中，若官能基 Z_1 係如上述般為基團 $R'-NH-$ ，羥基烷基澱粉衍生物可具有一根據式(Va)之組成份



因此，本發明也關於一種藉由上述方法所獲得之羥基烷基澱粉衍生物，其中該衍生物具有一根據式(Va)之組成份。

就羥基烷基澱粉與化合物(D)及/或化合物(L)以及化合物(M)之反應而言，本發明包含所有可能順序。

本發明一較佳具體實施例係關於一種如上所述之方法，其中羥基烷基澱粉係經由官能基 Z_1 與羥基烷基澱粉中視情況已氧化之還原端的反應與化合物(L)反應，而且所得反應產物係經由化合物(L)所含之官能基 X 與一另外化合物(M)所含之官能基 Y 的反應與化合物(M)反應。

五、發明說明 (40)

本發明另一個具體實施例係關於一種如上所述之方法，其中羥基烷基澱粉係經由官能基 Z_1 與羥基烷基澱粉中視情況已氧化之還原端的反應與化合物(L)反應，其中在與該羥基烷基澱粉反應前，化合物(L)係經由化合物(L)所含之官能基 X 與一另外化合物(M)所含之官能基 Y 的反應與化合物(M)反應。

本發明另一個具體實施例係關於一種如上所述之方法，其中羥基烷基澱粉係經由化合物(D)所含之官能基 Z_1 與羥基烷基澱粉中視情況已氧化之還原端的反應與化合物(D)反應以獲得第一羥基烷基澱粉衍生物，而且該第一羥基烷基澱粉衍生物係經由化合物(L)所含之官能基 Z_2 與化合物(D)所含之官能基 W 的反應與化合物(L)反應以獲得第二羥基烷基澱粉衍生物。

本發明另一具體實施例係關於最後一種方法，其中第二羥基烷基澱粉衍生物係經由化合物(L)所含之官能基 X 與化合物(M)所含之官能基 Y 的反應與一另外化合物(M)反應。

本發明另一具體實施例係關於一種如上所述之方法，其中羥基烷基澱粉係經由化合物(D)所含之官能基 Z_1 與羥基烷基澱粉視情況已氧化還原端的反應與化合物(D)反應以獲得第一羥基烷基澱粉衍生物，而且該第一羥基烷基澱粉衍生物係經由化合物(D)所含之官能基 W 與化合物(L)所含之

五、發明說明 (41)

圖 8. 年 月 日 () 正替換頁

官能基 Z_2 的反應與化合物(L)反應，其中化合物(L)在與第一羥基烷基澱粉衍生物反應前係經由化合物(L)所含之官能基 X 與一另外化合物(M)所含之官能基 Y 的反應與化合物(M)反應。

就各上述反應步驟之反應條件而言，所有參數如溫度、壓力、pH 或溶劑或溶劑混合物可經過調整以符合特定需要及欲反應之化合物的化學性質。

根據本發明一特佳具體實施例，水係單獨或與至少一種其他溶劑組合用作溶劑。作為至少一種其他溶劑，可能提及 DMSO、DMF、甲醇及乙醇。不同於水之較佳溶劑為 DMSO、DMF、甲醇及乙醇。在此具體實施例中，羥基烷基澱粉最好係經由未氧化之還原端反應。

若羥基烷基澱粉係在一水性媒介中與化合物(D)或化合物(L)反應，而且化合物(D)或化合物(L)為一羥基胺或醯肼，該反應溫度最好係在 5 至 45°C 之範圍內，較佳係在 10 至 30°C 之範圍內，特佳係在 15 至 25°C 之範圍內。

若羥基烷基澱粉係在一水性媒介中與化合物(D)或化合物(L)反應而且該反應是一還原胺化作用，該溫度最好係在範圍高達 100°C，較佳係在 70 至 90°C 之範圍內，特佳係在 75 至 85°C 之範圍內。

五、發明說明 (42)

在反應過程期間，溫度最好在上列範圍內變化或本質上保持固定。

羥基烷基澱粉與化合物(D)或化合物(L)之反應的反應時間可經過調整以符合特定需要，而且一般係在 1 小時至 7 天範圍內。

在化合物(D)或化合物(L)為羥基胺或醯肼的情況下，反應時間最好係在 1 小時至 3 天範圍內，較佳係從 2 小時至 48 小時。

在羥基烷基澱粉與化合物(D)或化合物(L)之反應為一還原胺化作用的情況下，反應時間最好係在 2 小時至 7 天範圍內。

羥基烷基澱粉與化合物(D)或化合物(L)之反應的 pH 值可經過調整以符合特定需要如反應物之化學性質。

在化合物(D)或化合物(L)為羥基胺或醯肼的情況下，pH 值最好係在 4.5 至 6.5 之範圍內。

在羥基烷基澱粉與化合物(D)或化合物(L)之反應為一還原胺化作用的情況下，pH 值最好係在 8 至 12 之範圍內。

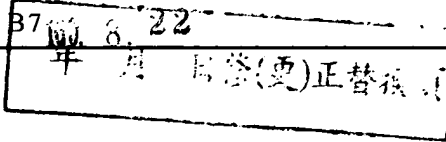
五、發明說明 (43)

可藉加入至少一種適合緩衝液調整各反應步驟中適合反應混合物之 pH 值。在較佳緩衝液中，可能提及乙酸鈉緩衝液、磷酸鹽或硼酸鹽緩衝液。

必要時，在羥基烷基澱粉與化合物(L)反應前或化合物(D)與化合物(L)反應前或在化合物(L)與羥基烷基澱粉和化合物(D)反應的反應產物反應前，至少一個官能基 X 可經至少一個適合保護基保護。在此方面，所有可想到可防止受保護化合物(L)經由至少一個官能基 X 反應的保護基皆可用。因此，保護基可視欲保護之官能基 X 的化學性質，如進行反應之溶劑或反應混合物之 pH 做選擇。其中較佳保護基為苯甲氧基羰基、第三丁氧基羰基、甲氧基苯基、2,4-二甲氧基苯基、三芳基甲基、三苯甲基、單甲氧基三苯甲基、二甲氧基三苯甲基、單甲基三苯甲基、二甲基三苯甲基、三氟乙醯基、酞亞胺(phthalimin)化合物、2-(三烷基矽烷基)乙氧基羰基化合物、甲酸芴甲酯(Fmoc)、第三丁基或三烷基矽烷基。

若化合物(L)中存在兩或多種不同官能基 X，至少一個基團可經過保護，而至少一個其他基團可保持未受保護。

在化合物(L)之反應後，至少一個保護基可留在反應產物中或藉適合方法如熟諳此技者已知之慣用方法除去。若兩種



五、發明說明 (44)

不同官能基 X 係經適合保護基保護，可除去至少一個保護基以使至少一個官能基 X 可用於與至少一另外化合物(M)進一步反應並留下至少一個其他已受保護之官能基，直到包含化合物(L)之反應產物與一另外化合物(M)反應。之後，可除去仍受保護之官能基的保護基使剩餘官能基 X 可用於與一另外化合物(M)反應。

使用至少一個保護基可能對防止反應而產生包含已與兩或多個羥基烷基澱粉分子反應之化合物(L)或化合物(D)，即經多個 HAS 取代之化合物(L)或(D)的羥基烷基澱粉衍生物是重要的。但是，相同結果可藉羥基烷基澱粉與過量化合物(L)或(D)反應而達到。若本發明方法係使用過量之化合物(L)或(D)，化合物(L)或(D)相對於羥基烷基澱粉之莫耳比最好係在 2 至 100 之範圍內。

一旦形成上述各反應步驟之反應產物，其可藉由至少一適合方法自反應混合物中分離出來。必要時，可在利用至少一種適合方法分離之前，使反應產物沉澱。

若反應產物先沉澱，如反應混合物可能在適合溫度下與至少一種異於反應混合物中所存在之溶劑或溶劑混合物的溶劑或溶劑混合物接觸。

該產物可藉一溶劑或溶劑混合物的添加而沉澱，其中該產

五、發明說明 (45)

年 月 日 修(更)正 替換頁

物是不溶的或具有低溶解度。適合用於沉澱產物之溶劑係視產物性質而定。在一個具體實施例中，產物係藉由醇，較佳係 2-丙醇或乙醇的添加而沉澱，並且在通常為-60 至 20°C，較佳係-20 至 20°C 之溫度下培養。在另一個具體實施例中，產物係藉由醇與低沸點極性有機溶劑，例如丙酮之混合物使其沉澱。適合的溶劑混合物為乙醇及丙酮，例如乙醇與丙酮之 1:1 混合物，指等體積之該等溶劑並通常在-60 至 20°C，較佳係-20 至 20°C 之溫度下培養。沉澱產物例如，可藉由一般從 0 至 20°C，較佳係 0°C 之低溫下離心收集，在通常為-60 至 20°C，較佳係-20 至 20°C 之溫度下，較佳係利用用於沉澱之溶劑或溶劑混合物，更佳係以醇使其重新懸浮，並且通常在相同溫度下培養一般約 0.5 至 20 小時，較佳係 1 至 3 小時。

根據本發明一使用水性系統作為溶劑之特佳具體實施例，反應混合物係與乙醇及丙酮之混合物，較佳係指示等體積之該等溶劑的 1:1 混合物在一溫度下，較佳係在-20 至 +50°C 之溫度範圍內，特佳係在 0 至 25°C 之溫度範圍內接觸。

反應產物之分離可藉一可包括一或多個步驟之適合方法進行。根據本發明一較佳具體實施例，先藉由一適合方法如離心或過濾，將反應產物自反應混合物或反應混合物與，如乙醇-丙酮混合物之混合物中分離出來。在第二個步驟

五、發明說明 (46)

2008.22
年 月 日 修(更)正 替換頁

中，令分離出來之反應產物進行進一步處理如後處理，像透析、離心過濾或加壓過濾、離子交換色層分析法、HPLC、MPLC、凝膠過濾及/或冷凍乾燥法。根據一極佳具體實施例，先透析分離出來的反應產物，較佳係以水透析，然後冷凍乾燥之，直到根據產物所需規格，反應產物之溶劑含量係十分低的。冷凍乾燥可在 20 至 35°C，較佳係從 25 至 30°C 之溫度下進行。

根據本發明之較佳具體實施例，包含羥基烷基澱粉及化合物(L)或包含羥基烷基澱粉、化合物(D)及化合物(L)之羥基烷基澱粉衍生物係進一步與包含至少一個官能基 Y 之一另外化合物(M)反應。

一般，對化合物(M)無任何限制。於本發明內文中，較佳係使用多肽作為化合物(M)。但是，也可使用其他化合物(M)，不論是聚合物或寡聚物或單分子化合物或其兩或多種之混合物。

本發明內文中所用之術語“多肽”係指一包含至少 2 個胺基酸之化合物，其中該等胺基酸係經由肽鍵，即具有結構-(C=O)-NH-之鍵連接。多肽可為一天然形成的化合物或非天然形成的多肽，後者包含天然形成的胺基酸及/或至少一個非天然形成的胺基酸。多肽的主幹，多肽鏈可進一步被至少一個適合的取代基取代，因此具有至少一個側鏈。

五、發明說明 (47)

100 年 8 月 2 日
年 月 日 修(更)正替換

至少一個官能基 Y 可屬於多肽主幹一部分或屬於該主幹中至少一個取代基之一部分，其中具體實施例可能包含至少一個屬於多肽主幹一部分的官能基及至少一個屬於多肽主幹中至少一個取代基之一部分的官能基。

就多肽而言，無任何限制存在，前提是該多肽包含至少一個官能基 Y。該官能基 Y 可直接連接在多肽主幹上或主幹之側鏈一部分上。側鏈或官能基 Y 或兩者可為天然形成多肽的一部分或在與官能基 X 反應之前，被引入天然形成多肽中或引入至少部分非天然形成的多肽中。

此外，多肽可為，至少部分屬於任何人類或動物來源。在一較佳具體實施例中，多肽係屬於人類來源。

多肽可為細胞介素，特別是紅血球生成素、抗凝血酶(AT)如 AT III、介白素，特別是介白素-2、IFN- β 、IFN- α 、G-CSF、CSF、介白素-6 及治療用抗體。

根據一較佳具體實施例，多肽是一抗凝血酶(AT)，較佳係 AT III (Levy JH, Weisinger A, Ziomek CA, Echelard Y, 重組抗凝血酶：製造及在心血管疾病方面的角色，血栓及止血方面之演講 27,4 (2001) 405-416；Edmunds T, Van Patten SM, Pollock J, Hanson E, Bernasconi R, Higgins E, Manavalan P, Ziomek C, Meade H, McPherson J, Cole ES,

五、發明說明 (48)

100年6月28日發(更)正替換頁

基因轉殖方式製得之人類抗凝血酶：與衍生自人類血漿之抗凝血酶之結構及功能比較，Bood 91, 12 (1998) 4661-4671；Minnema Mc, Chang ACK, Jansen PM, Lubbers YTP, Pratt BM, Whittaker BG, Taylor FB, Hack CE, Friedman B, 重組人抗凝血酶 III 改善受大腸桿菌致命攻擊之狒狒的存活率並降低炎症反應，Bood 95, 4 (2000) 1117-1123；Van Patten SM, Hanson EH, Bernasconi R, Zhang K, Manavaln P, Cole ES, McPherson JM, Edmunds T, 甲硫胺酸殘基在抗凝血酶中之氧化作用，生物化學期刊 274, 15 (1999) 10268-10276)。

根據另一較佳具體實施例，多肽是人類 IFN- β ，特別是 IFN- α 1a(參考 Avonex®、REBIF®)及 IFN- β 1b(參考 BETASERON®)。

另一種偏好使用的多肽是人類 G-CSF(粒細胞集落刺激因數)。參見，如 Nagata 等人，人類粒細胞集落刺激因數之染色體基因結構及兩個 mRNAs, EMBO J. 5 : 575-581, 1986；Souza 等人，重組人粒細胞集落刺激因數：對正常及白血病骨髓細胞的作用，Science 232 (1986) 61-65；及 Herman 等人，Neupogen®(惠爾血添(Filgrastim))，一種重組人粒細胞集落刺激因數在：蛋白質藥物之劑型、特徵及安定性方面的劑型、特徵及安定性，Rodney Pearlman 及 Y. John Wang 著，Plenum 出版社，紐約，1996, 303-328。

五、發明說明 (49)

若使用至少兩種不同多肽之混合物，該等至少兩種多肽，如在分子質量、胺基酸的數目及/或序列、取代基的數目及/或化學性質或藉由適合化學鍵如二硫橋連接之多肽的數目方面可有不同。

根據本發明一較佳具體實施例，較佳係根據至少一種上述方法分離出羥基烷基澱粉與化合物(L)之反應產物或進一步與化合物(L)反應之羥基烷基澱粉與化合物(D)的反應產物，然後與具有至少一個官能基 Y 之多肽反應。根據本發明一較佳具體實施例，官能基 Y 係被包含在多肽的碳氫化合物部分內。

當與多肽偶合所用的羥基烷基澱粉衍生物已利用一醇，較佳係 2-丙醇或乙醇使其沉澱而分離時，在該偶合反應中羥基烷基澱粉衍生物與多肽之莫耳比通常是 1-50 : 1，較佳係 1-30 : 1，更佳係 1-20 : 1，極佳係 1-15 : 1，最佳係 1-5 : 1。

在本發明內文中，術語“碳氫化合物部分”係指羥基醛或羥基酮並指其化學改質物(參見 Römpp Chemielexikon, Thieme Verlag Stuttgart, 德國，第 9 版，1990，第 9 卷，2281-2285 頁及其中所引用之文獻)。此外，其亦指天然形成碳氫化合物部分之衍生物，像葡萄糖、半乳糖、甘露

五、發明說明 (50)

糖、澱酸及類似物。該術語亦包括經化學氧化、天然形成的碳氫化合物部分。已氧化碳氫化合物部分的結構可為環狀或直鏈。

碳氫化合物部分可直接連接在多肽主幹上。較佳係碳氫化合物部分係屬於碳氫化合物側鏈的一部分。更佳係碳氫化合物部分係屬於碳氫化合物側鏈的末端部分。

在一極佳具體實施例中，碳氫化合物部分是碳氫化合物側鏈之半乳糖殘基，較佳係碳氫化合物側鏈之末端半乳糖殘基。如下文所描述般，藉移除末端澱酸，接著進行氧化作用可使此半乳糖殘基可用於與官能基 X 反應，其中官能基 X 係被包含在羥基烷基澱粉與化合物(L)之反應產物或進一步與化合物(L)反應之羥基烷基澱粉與化合物(D)的反應產物中。

在另一較佳具體實施例中，羥基烷基澱粉與化合物(L)之反應產物或進一步與化合物(L)反應之羥基烷基澱粉與化合物(D)的反應產物係連接至碳氫化合物側鏈之澱酸殘基，較佳係連接在碳氫化合物側鏈之末端澱酸殘基上。

末端碳氫化合物部分之氧化作用可以化學方式或以酵素方式進行。

五、發明說明(51)

化學氧化多肽之碳氫化合物部分的方法為已知技術並包括利用過碘酸鹽處理(Chamow 等人, 1992, J. Biol. Chem., 267, 15916-15922)。

藉由化學方式氧化, 主要可氧化任何碳氫化合物部分, 不論其是否位於末端。但是, 藉由選擇溫和的條件(1mM 過碘酸鹽, 0°C, 相較於嚴酷條件: 在室溫下 10 mM 過碘酸鹽中 1 小時), 最好可氧化碳氫化合物側鏈之末端涎酸。

或者, 碳氫化合物部分可以酵素方式氧化。用於氧化各碳氫化合物部分之酵素為技術上已知的, 例如對於半乳糖, 該酵素為半乳糖氧化酶。若希望氧化末端半乳糖部分, 當多肽已在可將涎酸連接至碳氫化合物鏈之細胞中, 如在哺乳動物細胞或在已基因改質成可將涎酸連接至碳氫化合物鏈之細胞中製得時, 最後必須(部分或完全)將末端涎酸移除。用於移除涎酸之化學或酵素方法為已知技術(Chaplin 及 Kennedy (著), 1996, 碳氫化合物分析: 一種實施方法, 特別是第 5 章 Montreuil, 醣蛋白, 175-177 頁; IRL 出版社實施方法系列(ISBN 0-947946-44-3))。

根據本發明另一較佳具體實施例, 多肽之官能基是硫醇基。因此, 羥基烷基澱粉與化合物(L)之反應產物或進一步與化合物(L)反應之羥基烷基澱粉與化合物(D)的反應產物可經由硫醚基連接至多肽上, 其中 S 原子可衍生自多肽中

五、發明說明(52)

所含之任何硫醇基。

在此具體實施例之內文中，特佳係多肽與進一步和化合物(L)反應之羥基烷基澱粉與化合物(D)的反應產物反應。

因此，本發明也關於一種如上所述之方法，其中進一步和化合物(L)反應之羥基烷基澱粉與化合物(D)的反應產物係經由多肽中所含之硫醇基與多肽反應。

因此，本發明也關於一種如上所述之方法，其中進一步和化合物(L)反應之羥基烷基澱粉與化合物(D)的反應產物係經由多肽中所含之已氧化碳氫化合物部分及硫醇基與多肽反應。

硫醇基本身可存在於多肽中。而且，可根據一適合方法將硫醇基引入多肽中。尤其可能提及化學方法。若多肽中有二硫橋存在，可還原-S-S-結構以獲得硫醇基。亦可藉多肽經由胺基酸與一化合物反應而將多肽中所存在之胺基轉化成SH基，其中該化合物具有至少兩個不同官能基，其中之一可與胺基反應，另一個為SH基或SH基之前驅物。此胺基之改質作用可被視為蛋白質先與化合物(L)反應，然後所得反應產物與，如包含HAS之HAS衍生物及化合物(D)反應之實例，其中該化合物(L)具有至少兩個不同官能基，其中之一可與胺基反應，另一個為SH基，該HAS衍

五、發明說明 (53)

生物包含一可與 SH 基反應之官能基。亦可藉由多肽突變如藉將半胱胺酸或適合的 SH 官能基胺基酸引入多肽中，或如自多肽中移除半胱胺酸以使多肽中另一個半胱胺酸無法形成二硫橋的方式引入 SH 基。

可使用紅血球生成素(EPO)作為特佳多肽。

因此，本發明也關於一種如上所述之方法，其中該多肽為紅血球生成素。

EPO 可屬於任何人類的 EPO(參見，如 Inoue, Wada, Takeuchi, 1994, 一種以高活體內活性自貧血患者的尿液中純化人類紅血球生成素之較佳方法, Biol. Pharm. Bull. 17(2), 180-4; Miyake, Kung, Gold-wasser, 1977, 人類紅血球生成素之純化, J. Biol. Chem., 252(15), 5558-64)或其他哺乳動物來源並可藉由天然形成來源像人類腎臟、人類胚胎肝臟或動物，較佳係猴子的腎臟純化獲得。而且，語句”紅血球生成素”或”EPO”亦涵蓋一或多個胺基酸(如 1 至 25 個，較佳係 1 至 10 個，更佳係 1 至 5 個，最佳係 1 或 2 個)已被其他胺基酸交換並呈現紅血球生成素活性之 EPO 變體(參見，如 EP 640 619 B1)。紅血球生成素活性之測量係描述於技術中(對於活體外活性之測量參見，如 Fibi 等人, 1991, 血液, 77, 1203ff; Kitamura 等人, 1989, J. Cell. Phys., 140, 323-334; 對於活體內 EPO 活性之測量參見 Ph.

五、發明說明 (54)

年 月 日 (修正) 正替換頁

Eur. 2001, 911-917 ; Ph. Eur. 2000, 1316 Erythropoietini solutio concentrata, 780-785 ; 歐洲藥典(1996/2000) ; 歐洲藥典, 1996, 紅血球生成素濃溶液, 藥典, 8, 371-377 ; Fibi, Hermentin, Pauly, Lauffer, Zettlmeissl., 1995, 由 BHK-21 細胞所分泌之重組人紅血球生成素的 N-及 O-醣苷糖基化突變形成蛋白質, 血液, 85(5), 1229-36 ; (在第一天、第二天及第三天將 EPO 及經改質 EPO 型注入雌性 NMRI 小鼠中(等量蛋白質 50ng/隻小鼠), 於第四天採集血樣並測定網狀紅血球))。其他用於測量 EPO 活性之試驗的發表刊物為 Barbone, Aparicio, Anderson, Natarajan, Ritchie, 1994, 以網狀紅血球測量作為紅血球生成素之一項生物分析, J. Pharm. Biomed. Anal., 12(4), 515-22 ; Bowen, Culligan, Beguin, Kendall, Villis, 1994, 以自動化網狀紅血球參數估計利用血清轉鐵蛋白受體及紅血球生成素濃縮物之骨格發育不良的有效性及總紅血球細胞分化, Leukemi, 8(1), 151-5 ; Delorme, Lorenzini, Giffin, Martin, Jacobsen, Boone, Elliott, 1992, 糖基化作用在紅血球生成素之分泌及生物活性上的角色, 生物化學, 31(41), 9871-6 ; Higuchi, Oheda, Kuboniwa, Tomonoh, Shimonaka, Ochi, 1992 ; 糖鏈在表現人類紅血球生成素之生物活性表現上的角色, J. Biol. Chem., 267(11), 7703-9 ; Yamaguchi, Akai, Kawanishi, Ueda, Masuda, Sasaki, 1991, 人類紅血球生成素中 N-糖基化位置之定點移除對其製造及生物性質的作用, J. Biol. Chem., 266(30), 20434-9 ; Takeuchi, Inoue, Strickland, Kubota,

五、發明說明 (55)

Wada, Shimizu, Hoshi, Kozutsumi, Takasaki, Kobata, 1989, 中國倉鼠卵巢細胞中所製得重組人紅血球生成素之糖鏈結構與生物活性間的關係, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85(20), 7819-22; Kurtz, Eckardt, 1989, 紅血球生成素之分析方法, Nephron., 51(1), 11-4 (德國); Zucali, Sulkowski, 1985, 人類尿紅血球生成素在可控微孔玻璃珠及矽酸上之純化作用, Exp. Hematol., 13(3), 833-7; Krystal, 1983, 紅血球母細胞增強因數(EEF), 一種血清中不同於紅血球生成素之後期作用紅血球生成素刺激物的物理及生物特徵化作用, Exp. Hematol., 11(1), 18-31。

較佳為 EPO 係重組產生的。這包括在真核或原核細胞, 較佳係哺乳動物、昆蟲、酵母、細菌細胞或任何其他方便重組體製造 EPO 之細胞類型中製造。此外, EPO 可以基因轉殖動物(如體液, 像牛奶、血液等)、以基因轉殖鳥, 特別是家禽類, 較佳係雞的蛋, 或以基因轉移植物表現。

重組製造多肽為已知技術。一般, 這包括以一適當表現載體轉染宿主細胞, 在可製造多肽的條件下培養宿主細胞並自該宿主細胞純化多肽。對於細節資料參見, 如 Krystal, Pankratz, Farber, Smart, 1986, 藉由一 5 步驟之快速程序純化人類紅血球生成素至均一性, 血液, 67(1), 71-9; Quelle, Caslake, Burkert, Wojchowski, 1989, 利用一桿狀病毒載體所製得之重組人紅血球生成素的高度表現及純化, 血液,

五、發明說明 (56)

74(2), 652-7; EP 640 619 B1 及 EP 668 351 B1。

在一較佳具體實施例中，EPO 具有人類 EPO 之胺基酸序列(參見 EP 148 605 B2)。

EPO 可包含一或多個碳氫化合物側鏈，較佳係 1 至 12 個，更佳係 1 至 9 個，極佳係 1 至 6 個，特別是 1 至 4 個，特佳係 4 個碳氫化合物側鏈，其係經由 N-及/或 O-連接糖基化作用黏接在 EPO 上，即 EPO 被糖基化。通常，當於真核細胞中製得 EPO 時，多肽係經後轉譯糖基化。因此，碳氫化合物側鏈在哺乳動物中，特別係在人類、昆蟲或酵素細胞中生物合成期間可能已黏接在 EPO 上。技術上曾深入研究已糖基化 EPO 的結構及性質(參見 EP 428 267 B1; EP 640 619 B1; Rush, Derby, Smith, Merry, Rogers, Rohde, Katta, 1995, 紅血球生成素碳氫化合物結構之微不均一性, Anal. Chem., 67(8), 1442-52; Takeuchi, Kobara, 1991, 人類紅血球生成素中糖鏈之結構及功能角色, 糖生物學, 1(4), 337-46(回顧))。

因此，根據本發明之羥基烷基澱粉衍生物中每個 EPO 分子係包含至少一個，較佳係 1 至 12 個，更佳係 1 至 9 個，極佳係 1 至 6 個，特佳係 1 至 4 個 HAS 分子。每個 EPO 分子之 HAS 分子數目可在產物水解及所得單糖衍生化後利用 GC-MS 進行定量碳氫化合物組成分析測得(參見

五、發明說明(57)

Chaplin 及 Kennedy(著), 1986, 碳氫化合物分析：一種實施方法, IRL 出版實施方法系列(ISBN 0-947946-44-3), 特別是第 1 章, 單醣, 1-6 頁; 第 2 章, 寡醣, 37-53 頁; 第 3 章, 天然聚醣, 55-96 頁)。

根據本發明一特佳具體實施例, 連接至 EPO 之碳氫化合物部分係屬於碳氫化合物側鏈的一部分。更佳為碳氫化合物部分為碳氫化合物側鏈之末端部分。在一極佳具體實施例, 碳氫化合物部分是一碳氫化合物側鏈之半乳糖殘基, 較佳係碳氫化合物側鏈之末端半乳糖殘基。如下文所描述般, 可藉移除末端涎酸, 接著進行氧化使此半乳糖殘基可用於與化合物(I)和化合物(II)之反應產物反應。在另一較佳具體實施例中, 化合物(I)與(II)之反應產物係連接在碳氫化合物側鏈之涎酸殘基上, 較佳係連接至碳氫化合物側鏈之末端涎酸殘基上。如下文所描述般, 該涎酸係被氧化。

特佳係藉由移除末端涎酸, 接著進行氧化使此半乳糖殘基可經由官能基 X 與羥基烷基澱粉和化合物(L)之反應產物或進一步與化合物(L)反應之羥基烷基澱粉和化合物(D)的反應產物反應。

更佳係藉由氧化使此半乳糖殘基可經由官能基 X 與羥基烷基澱粉和化合物(L)之反應產物或進一步與化合物(L)反應

五、發明說明 (58)

之羥基烷基澱粉和化合物(D)的反應產物反應，其中末端澱酸未被移除。

如上述般，羥基烷基澱粉與化合物(L)之反應產物或進一步與化合物(L)反應之羥基烷基澱粉和化合物(D)的反應產物係與 EPO 所含的硫醇基反應。

羥基烷基澱粉與化合物(L)之反應產物或進一步與化合物(L)反應之羥基烷基澱粉和化合物(D)的反應產物亦可與硫醇基以及與碳氫化合物部分反應，其中硫醇基及碳氫化合物部分各包含在至少一另外化合物中，較佳係多肽，更佳係紅血球生成素中。

根據一較佳具體實施例，如，藉由利用羥基胺衍生物，如 2-(胺氧基)乙基硫醇鹽酸(Bauer L. 等人, 1965, J. Org. Chem., 30, 949)或利用醯肼衍生物，如乙硫醇酸醯肼(Whitesides 等人, 1977, J. Org. Chem., 42, 332)可將此 SH 基連接至一最好已氧化之碳氫化合物部分。

根據另一較佳具體實施例，最好將硫醇基引入 EPO 之已氧化碳氫化合物部分中，較佳係引入一已氧化碳氫化合物部分中，其中該已氧化碳氫化合物部分係屬於 EPO 之碳氫化合物側鏈的一部分。

五、發明說明 (59)

年 月 日修(更)正替換頁

較佳為該硫醇基係衍生自一天然形成的半胱胺酸或衍生自一附加半胱胺酸。更佳係 EPO 具有人類 EPO 之胺基酸序列，而且天然形成的半胱胺酸是半胱胺酸 29 及/或 33。在一更佳具體實施例中，羥基烷基澱粉與化合物(L)之反應產物或進一步與化合物(L)反應之羥基烷基澱粉和化合物(D)的反應產物係與半胱胺酸 29 反應，而半胱胺酸 33 係被另一個胺基酸取代。或者，羥基烷基澱粉與化合物(L)之反應產物或進一步與化合物(L)反應之羥基烷基澱粉和化合物(D)的反應產物係與半胱胺酸 33 反應，而半胱胺酸 29 係被另一個胺基酸取代。

在本發明內文中，術語"附加半胱胺酸"係指多肽，較佳係 EPO 包含一不存在於野生型多肽之半胱胺酸殘基。

在本發明此項特點之內文中，半胱胺酸可為 EPO 之 N-或 C-末端所加的額外胺基酸。

此外，該附加半胱胺酸已藉半胱胺酸或經適合取代之半胱胺酸取代一天然形成胺基酸的方式加入。在本發明此項特點之內文中，EPO 最好是人類 EPO 且被取代的胺基酸殘基是絲胺酸 126。

對於羥基烷基澱粉與化合物(L)之反應產物，視情況與化合物(D)，與一另外化合物(M)之反應的反應條件，無特別限

五、發明說明 (60)

制存在，而且該反應條件可針對特定需要作調整。根據本發明一特佳具體實施例，水可單獨或與至少一種其他溶劑組合以用作溶劑。作為至少一種其他溶劑，可能提及 DMSO、DMF、甲醇及乙醇。不同於水之較佳溶劑為甲醇及乙醇。根據其他較佳具體實施例，可使用 DMSO 或 DMF 或甲醇或乙醇或其兩或多種之混合物作為溶劑。

若，如羥基烷基澱粉係在一水性系統中與化合物(L)反應，依此情況，例如當羥基烷基澱粉係經由該澱粉之未氧化還原端之反應與羥基胺如 O-[2-(2-胺氧基-乙氧基)-乙基]-羥基胺反應，而且該反應產物係經由醛基、酮基、縮醛基或半縮醛基進一步與多肽，較佳係紅血球生成素反應時，反應溫度最好係在 4 至 37°C 範圍內，較佳係在 10 至 30°C 之範圍內，特佳係在 15 至 25°C 之範圍內。

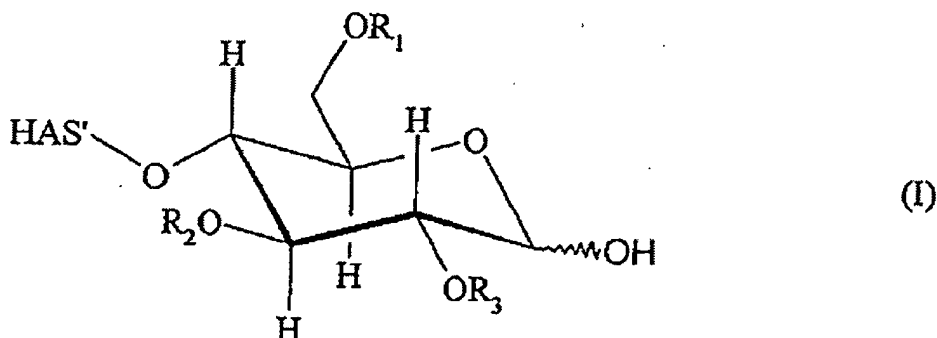
分離包含一另外化合物(M)，較佳為多肽，特佳為紅血球生成素之反應產物係可利用已知純化天然及重組體 EPO 之程序(如尺寸排除色層分析法、離子交換色層分析法、RP-HPLC、羥基磷灰石色層分析法、疏水交互作用色層分析法或其組合方法)進行。反應產物之分離可藉一適合程序進行，其中該程序包含一或多個步驟。根據本發明一較佳具體實施例，先藉由一適合方法如離心或過濾，將反應產物自反應混合物或反應混合物與，如乙醇-丙酮混合物之混合物中分離出來。在第二個步驟中，令分離出來的反

五、發明說明 (61)

應產物進行進一步處理如後處理，像透析、離心過濾或加壓過濾、離子交換色層分析法如，例如藉由一包含 Q-瓊脂糖凝膠之管柱進行之離子交換色層分析法、HPLC、MPLC、凝膠過濾及/或冷凍乾燥法。根據一較佳具體實施例，先透析分離出來的反應產物，較佳係以水透析之，然後冷凍乾燥之，直到反應產物之溶劑含量根據產物之所需規格而言係十分低的。冷凍乾燥可在 20 至 35°C，較佳係從 25 至 30°C 之溫度下進行。根據另一較佳具體實施例，將包含反應產物之反應混合物塗佈在一包含 Q-瓊脂糖凝膠之管柱上以獲得一溶離液，其可藉由離心過濾濃縮。

本發明另一項目的係提供藉由一或多種上述方法所製得之羥基烷基澱粉衍生物。

因此，本發明係關於一種藉由一種製造羥基烷基澱粉衍生物之方法所獲得的羥基烷基澱粉衍生物，該羥基烷基澱粉具有一根據式(I)之結構



其包括

- 式(I)羥基烷基澱粉中視情況已氧化之還原端或

五、發明說明 (62)

- 一羥基烷基澱粉衍生物，其係藉由式(I)羥基烷基澱粉中視情況已氧化之還原端與一化合物(D)反應所獲得，該化合物(D)包含
 - 至少一個可與該羥基烷基澱粉中視情況已氧化之還原端反應的官能基 Z_1 及
 - 至少一個官能基 W，與一包含下列基團之化合物反應，
- 至少一個可與該羥基烷基澱粉反應之官能基 Z_1 或至少一個可與該羥基烷基澱粉衍生物所含之官能基 W 反應之官能基 Z_2 ，及
- 至少一個可與一另外化合物(M)之官能基 Y 反應的官能基 X，

其中該官能基 Y 係選自醛基、酮基、半縮醛基、縮醛基及硫醇基組成之群。

根據一較佳具體實施例，本發明係關於一種如上所述般之羥基烷基澱粉衍生物，其中 R_1 、 R_2 及 R_3 係獨立地為氫或直鏈或分支羥基烷基。

根據一極佳具體實施例，本發明係關於一種如上所述般之羥基烷基澱粉衍生物，其中 R_1 、 R_2 及 R_3 係獨立地為氫或 2-羥基烷基。

根據另一較佳具體實施例，本發明係關於一種如上所述般之羥基烷基澱粉衍生物，其中該羥基烷基澱粉為羥基乙基

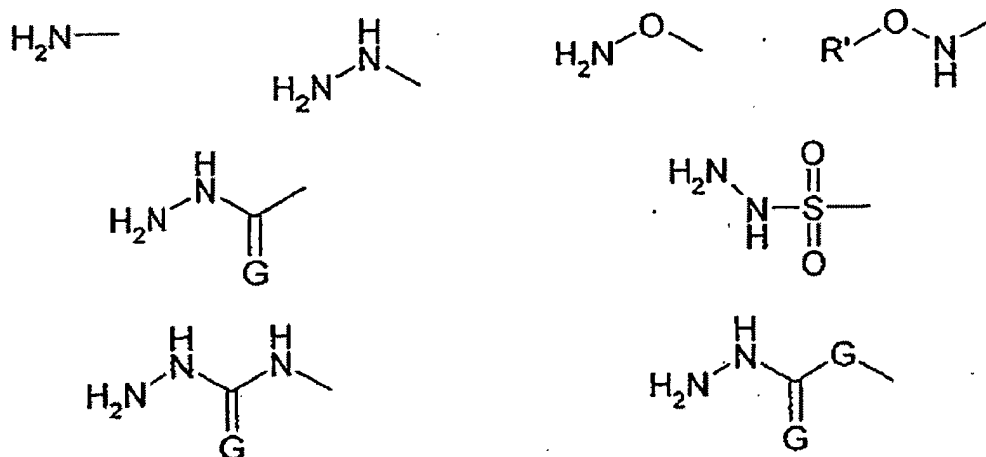
五、發明說明 (63)

100.3.22
年 月 日修(更)正替換頁

澱粉。

根據另一較佳具體實施例，本發明係關於一種如上所述般之羥基烷基澱粉衍生物，其中官能基 Z_1 包含結構-NH-。

根據一特佳具體實施例，本發明係關於一種如上所述般之羥基烷基澱粉衍生物，其中 Z_1 係選自下列基團組成之群



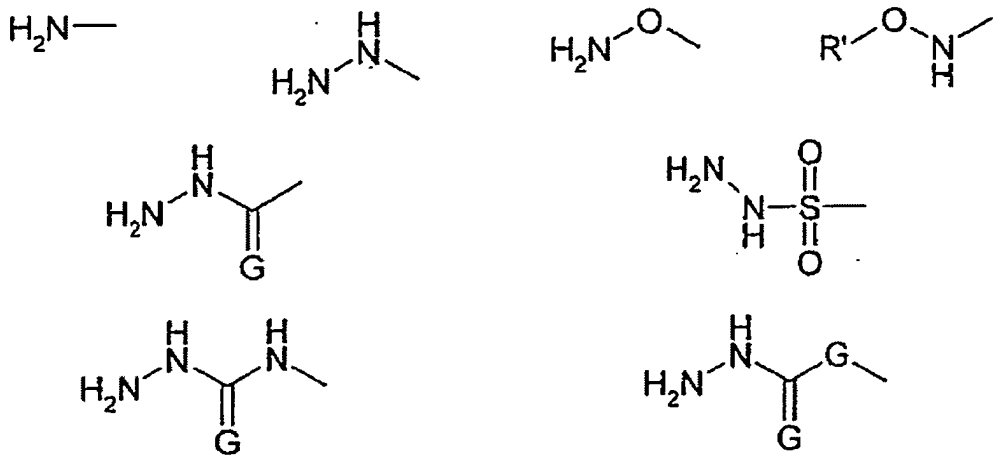
其中 G 為 O 或 S，且若出現兩次，其係獨立地為 O 或 S，且 R' 為甲基。

根據另一較佳具體實施例，本發明係關於一種如上所述般之羥基烷基澱粉衍生物，其中官能基 Y 係選自醛基、酮基、半縮醛基及縮醛基組成之群，而且官能基 X 包含結構-NH-。

五、發明說明 (64)

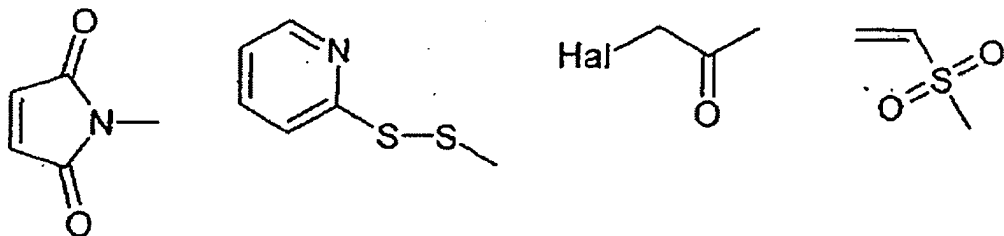
1983. 22
年 月 日修(更)正替換頁

根據一特佳具體實施例，本發明係關於一種如上所述般之羥基烷基澱粉衍生物，其中 X 係選自下列基團組成之群



其中 G 為 O 或 S，且若出現兩次，其係獨立地為 O 或 S，且 R' 為甲基。

根據另一較佳具體實施例，本發明係關於一種如上所述般之羥基烷基澱粉衍生物，其中官能基 Y 是 SH，而且官能基 X 係選自下列基團組成之群



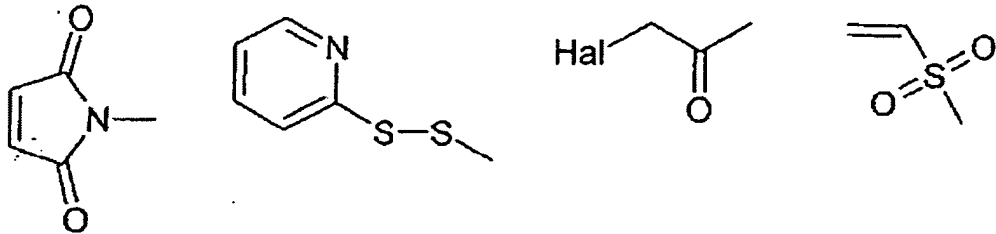
其中 Hal 是 Cl、Br 或 I。

根據另一較佳具體實施例，本發明係關於一種如上所述般

五、發明說明 (65)

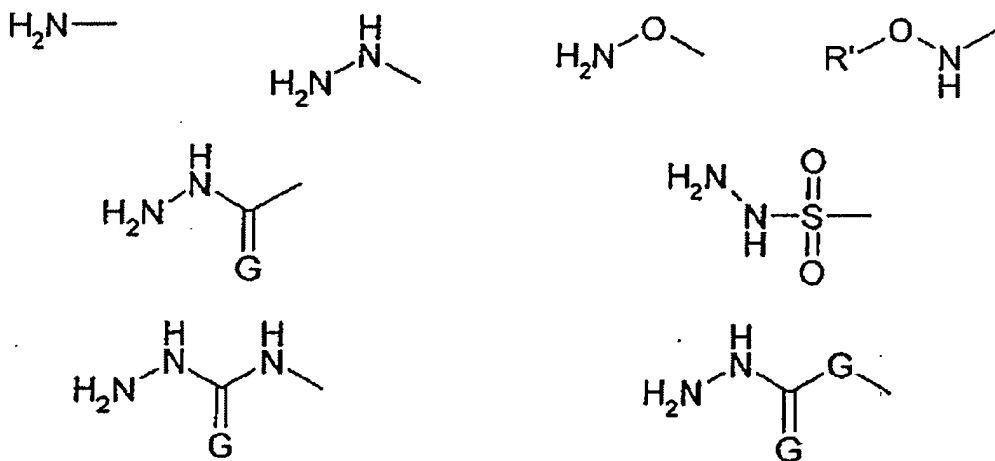
102 22
 年 月 日修(更)正替換頁

之羥基烷基澱粉衍生物，其中官能基 W 或官能基 Z₂ 是 -SH，而且官能基 Z₂ 或官能基 W 係選自下列基團組成之群



其中 Hal 是 Cl、Br 或 I。

根據另一較佳具體實施例，本發明係關於一種如上所述般之羥基烷基澱粉衍生物，其中官能基 W 或官能基 Z₂ 係選自上述活性酯或視情況可轉化成活性酯之羧基組成之群，而且官能基 Z₂ 或官能基 W 係選自下列基團組成之群

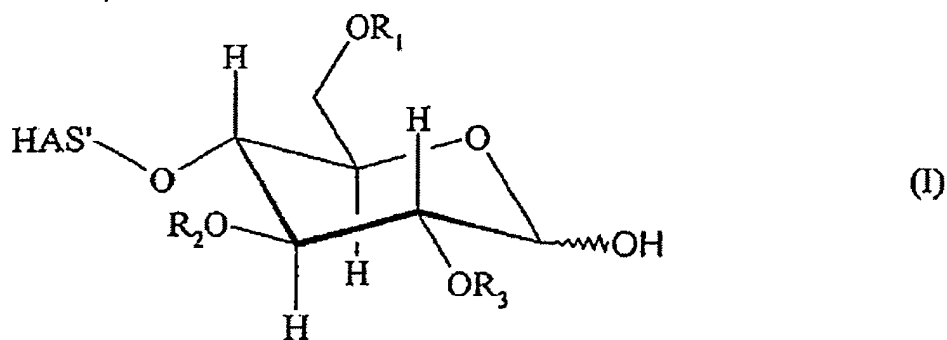


其中 G 為 O 或 S，且若出現兩次，其係獨立地為 O 或 S，

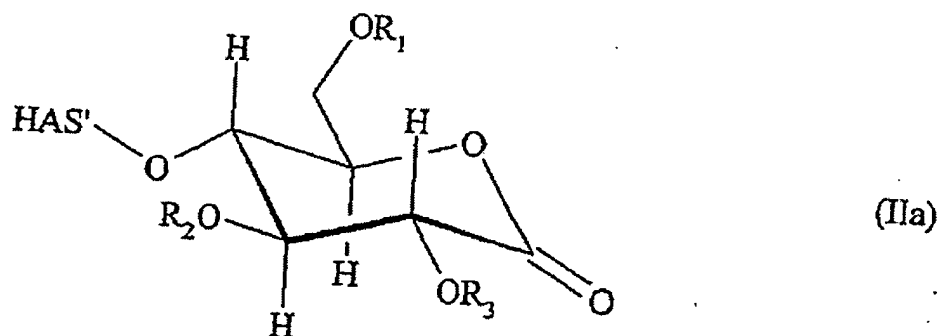
五、發明說明 (66) 100. 3. 22
年 月 日修(更)正替換頁

且 R' 為甲基。

根據一特佳具體實施例，本發明係關於一種如上所述般之羥基烷基澱粉衍生物，其中該羥基烷基澱粉之還原端在與化合物(D)或化合物(L)反應之前係未氧化的，該羥基烷基澱粉因此具有一根據式(I)之結構

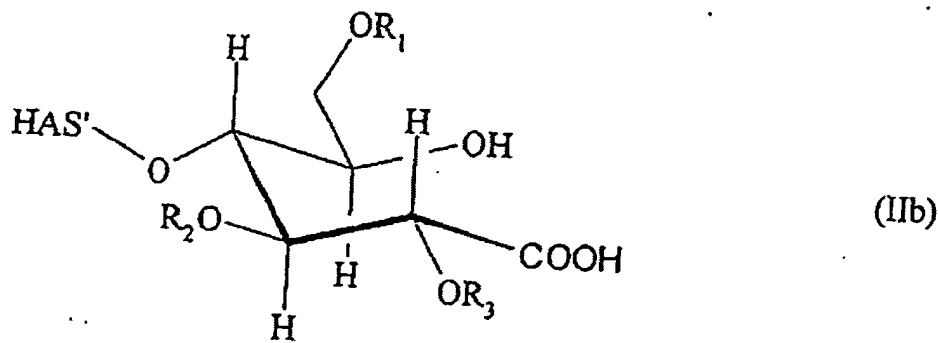


根據另一特佳具體實施例，本發明係關於一種如上所述般之羥基烷基澱粉衍生物，其中該羥基烷基澱粉之還原端在與化合物(D)或化合物(L)反應之前已經過氧化，該羥基烷基澱粉因此具有一根據式(IIa)之結構



及/或根據式(IIb)之結構。

五、發明說明 (67)



根據另一較佳具體實施例，本發明係關於一種如上所述般之羥基烷基澱粉衍生物，其中該還原劑係被一鹼金屬碘溶液氧化。

根據另一較佳具體實施例，本發明係關於一種如上所述般之羥基烷基澱粉衍生物，其中羥基烷基澱粉係經由官能基 Z_1 與羥基烷基澱粉中視情況已氧化之還原端的反應與化合物(L)反應，而且所得反應產物係經由化合物(L)所含之官能基 X 與一另外化合物(M)所含之官能基 Y 的反應與化合物(M)反應。

根據另一較佳具體實施例，本發明係關於一種如上所述般之羥基烷基澱粉衍生物，其中羥基烷基澱粉係經由官能基 Z_1 與羥基烷基澱粉中視情況已氧化之還原端的反應與化合物(L)反應，其中在與羥基烷基澱粉反應前，化合物(L)係經由化合物(L)所含之官能基 X 與一另外化合物(M)所含之官能基 Y 的反應與化合物(M)反應。

五、發明說明 (68)

根據另一較佳具體實施例，本發明係關於一種如上所述般之羥基烷基澱粉衍生物，其中羥基烷基澱粉係經由化合物(D)所含之官能基 Z_1 與羥基烷基澱粉中視情況已氧化之還原端的反應與化合物(D)反應以獲得第一羥基烷基澱粉衍生物，而且該第一羥基烷基澱粉衍生物係經由化合物(L)所含之官能基 Z_2 與化合物(D)所含之官能基 W 的反應與化合物(L)反應以獲得第二羥基烷基澱粉衍生物。

根據一特佳具體實施例，本發明係關於上述羥基烷基澱粉衍生物，其中第二羥基烷基澱粉衍生物係經由化合物(L)所含之官能基 X 與一另外化合物(M)所含之官能基 Y 的反應與化合物(M)反應。

根據另一較佳具體實施例，本發明係關於一種如上所述般之羥基烷基澱粉衍生物，其中羥基烷基澱粉係經由化合物(D)所含之官能基 Z_1 與羥基烷基澱粉中視情況已氧化之還原端的反應與化合物(D)反應以獲得第一羥基烷基澱粉衍生物，而且該第一羥基烷基澱粉衍生物係經由化合物(D)所含之官能基 W 與化合物(L)所含之官能基 Z_2 的反應與化合物(L)反應，其中化合物(L)在與第一羥基烷基澱粉衍生物反應前係經由化合物(L)所含之官能基 X 與一另外化合物(M)所含之官能基 Y 的反應與化合物(M)反應。

五、發明說明 (69)

根據一特佳具體實施例，本發明係關於一種如上所述般之羥基烷基澱粉衍生物，其中至少一另外化合物(M)是多肽。

根據一特佳具體實施例，本發明係關於一種如上所述般之羥基烷基澱粉衍生物，其中該多肽為紅血球生成素。

與偶合前之紅血球生成素相比較時，於下被稱為 HAS-EPO 偶合物，而且係藉由羥基烷基澱粉與化合物(L)及視情況選用的化合物(D)和紅血球生成素之反應所形成的羥基烷基澱粉衍生物具有呈現較佳生物安定性之優點。此外，其呈現一比標準 BRP EPO 更高之生物活性。這主要係鑑於下列事實：此羥基烷基澱粉衍生物較不或甚至無法被肝臟及腎臟之移除系統認出並因此可滯留在循環系統一段較長的時間。此外，自 HAS 黏接特定位置，因 HAS 偶合至 EPO 而破壞 EPO 之活體內生物活性的危險可減至最低。

本發明 HAS-EPO 偶合物本質上可呈現與重組體天然 EPO 相同之活體外生物活性，因為活體外生物活性只測量對 EPO 受體之結合親和力。測定活體內生物活性之方法為已知技術。

此外，HAS-EPO 呈現比用作偶合起始物之 EPO(未偶合

五、發明說明 (70)

EPO)更大之活體內活性。測定活體內生物活性之方法為已知技術。

若未偶合 EPO 的活體內活性係設定為 100%，則 HAS-EPO 偶合物呈現一從 110%至 500%，較佳係從 300%至 400%或較佳係從 110%至 300%，更佳係從 110%至 200%，更佳係從 110%至 180%或從 110%至 150%，最佳係從 110%至 140%之活體內活性。

相較於 Amgen 之高度涎酸化 EPO(參見 EP 428 267 B1)，若高度涎酸化 EPO 之活體內活性係設定為 100%，HAS-EPO 呈現至少 50%，較佳係至少 70%，極佳係至少 85%或至少 95%，至少 150%，至少 200%或至少 300%之高度涎酸化 EPO 的活體內活性。最佳係其呈現至少 95%之高度涎酸化 EPO 的活體內活性。

本發明 HAS-EPO 偶合物之高活體內生物活性主要源自下列事實：因為肝臟的移除系統較無法認出 HAS-EPO 偶合物並且因為腎臟清除率因較高分子量而降低，使其在循環中的滯留時間比未偶合 EPO 長。用於測定 EPO 在循環中之活體內半衰期的方法為已知技術(Sytkowski, Lunn, Davis, Feldman, Siekman, 1998, 具有顯著較高之活體內活性的人類紅血球生成素二聚物, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 95(3), 1184-8)。

五、發明說明 (71)

因此，本發明之極大優點係提供一種給藥頻率比目前市售 EPO 製劑低之 HAS-EPO 偶合物。當至少每 3 天必須服用標準 EPO 製劑時，本發明 HAS-EPO 偶合物更好地一週服用兩次，較佳係一週一次。

此外，本發明具有可以較低成本製得有效 EPO 衍生物之優點，因為該方法不含任何造成低最終產率之花錢耗時的純化步驟，例如其不必清掉已知呈現低或無活體內生物活性之澱酸化不足的 EPO 型。特別是實例 8.11(d)證明以極少改質步驟製得之 HAS-EPO 係呈現超過標準 BRP EPO 3 倍之活性。

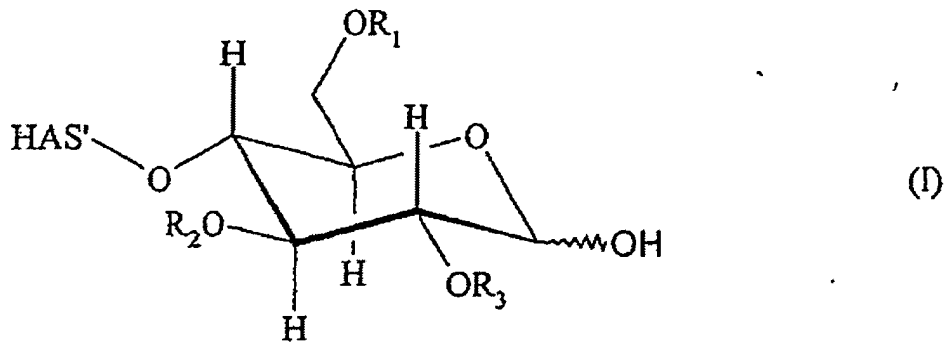
本發明另一個目的係提供一種包含治療上有效量之本發明 HES-EPO 偶合物的醫藥組合物。

此外，本發明係關於一種包含治療上有效量之 HAS-多肽偶合物，較佳係 HAS-EPO 偶合物，更佳係 HAS-EPO 偶合物，更佳係本發明 HES-EPO 偶合物之醫藥組合物。在一個具體實施例中，該醫藥組合物另外包含至少一種可用於紅血球生成素治療之醫藥上可接受稀釋劑、佐劑及/或載劑。

因此，本發明也關於一種包含治療上有效量之藉由一種製

五、發明說明 (72)

造羥基烷基澱粉衍生物之方法所獲得的羥基烷基澱粉衍生物的醫藥組合物，該羥基烷基澱粉具有一根據式(I)之結構



其包含

- 式(I)羥基烷基澱粉中視情況已氧化之還原端或
- 一羥基烷基澱粉衍生物，其係藉由式(I)羥基烷基澱粉中視情況已氧化之還原端與一化合物(D)反應所獲得，該化合物(D)包含

- 至少一個可與該羥基烷基澱粉中視情況已氧化之還原端反應的官能基 Z_1 及
- 至少一個官能基 W，

與一包含下列基團之化合物(L)反應，

- 至少一個可與該羥基烷基澱粉反應之官能基 Z_1 或至少一個可與該羥基烷基澱粉衍生物所含之官能基 W 反應之官能基 Z_2 ，及
- 至少一個可與一另外化合物(M)之官能基 Y 反應的官能基 X，

其中該官能基 Y 係選自醛基、酮基、半縮醛基、縮醛基及硫醇基組成之群，該製造一羥基烷基澱粉衍生物之方法另外包括包含羥基烷基澱粉、化合物(L)及視情況選用的化合物(D)之反應產物與一另外化合物(M)反應，其中至少一另外

五、發明說明 (142)

No. 8. 22

年 月 日修(更)正替換頁

可使用衍生物，其中胺基及硫醇基官能基可以任何間隔基分開。此外，衍生物中的胺基可被胍、醯胍或羥基胺取代。可以，如二硫化物或三苯甲基衍生物的型態保護該硫醇基官能基。但是，在此例中，必須在偶合前另外進行去保護步驟，釋放出類似 M 之組份。

5.2 胺基-HES12KD E、H 或 I 之改質

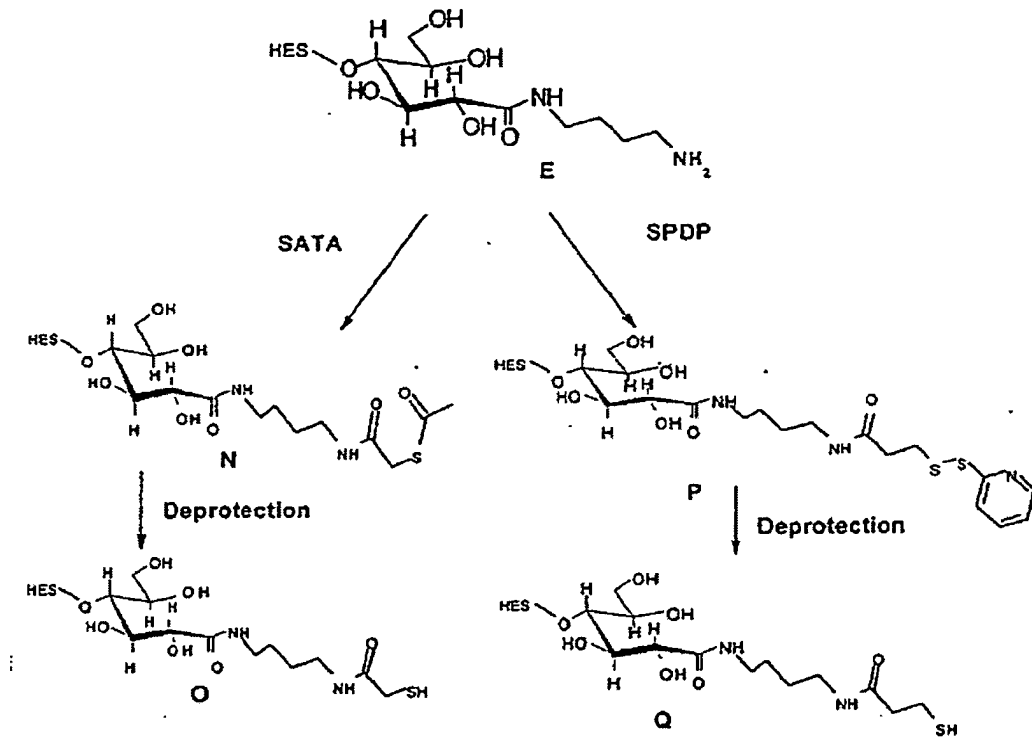
a) 以 SATA/SATP 改質

將 1.44 克(0.12 毫莫耳)胺基-HES12KD E、H 或 I 溶於 3 毫升絕對二甲基亞砜(DMSO)中並在氮氣下逐滴加入 139 毫克(0.6 毫莫耳)SATA 溶於 5 毫升 DMSO 之混合物中。在室溫下攪拌 24 小時後，將反應混合物加入 160 毫升乙醇與丙酮之 1:1 混合物中。藉由離心收集沉澱產物 N，再將其溶解於 40 毫升水中並以水透析 2 天(SnakeSkin 透析管，3.5 KD 移除，Perbio Science Deutschland GmbH, Bonn, 德國)並冷凍乾燥之。

去保護係在室溫下包含 25mM EDTA 及 0.5M 羥基胺之 50mM 磷酸鈉緩衝液(pH 7.5)中進行 2 小時，而且產物 O 係以包含 1mM EDTA 之 0.1M 乙酸鈉緩衝液(pH 5.5)透析的方式純化。去保護反

五、發明說明 (143)

應係在實例 12, 2.1 所述之偶合反應前立即進行。



b) 以 SPDP 改質

將 1.44 克 (0.12 毫莫耳) 胺基-HES12KD E、H 或 I 溶於 3 毫升絕對二甲基亞砷(DMSO)中並在氮氣下逐滴加入 187 毫克 (0.6 毫莫耳) SPDP 溶於 5 毫升 DMSO 之混合物中。在室溫下攪拌 24 小時後，將反應混合物加入 160 毫升乙醇與丙酮之 1:1 混合物中。藉由離心收集沉澱產物 P，再將其溶

五、發明說明 (144)

解於 40 毫升水中並以水透析 2 天(SnakeSkin 透析管, 3.5 KD 移除, Perbio Science Deutschland GmbH, Bonn, 德國)並冷凍乾燥之。

去保護係在室溫及 pH 4.5 下 12 毫克二硫蘇糖醇(DTT)溶於 0.5 毫升包含 100mM 氯化鈉之 100mM 乙酸鈉緩衝液的溶液中進行 30 分鐘, 而且產物 Q 係藉以包含 1mM EDTA 之 0.1M 乙酸鈉緩衝液(pH 5.5)透析的方式純化。去保護反應係在實例 12, 2.1 所述之偶合反應前立即進行。

替代方法：

為了將胺基-轉化成硫基, 不論係以游離型態或受保護型態, 數種試劑是可用的。改質後, 可分離出產物。或者, 如使用交聯劑是可接受的, 可將其直接用於偶合反應中, 較佳係用於純化步驟後。為了分離及儲存硫基-HES 衍生物, 可使用受保護型態之硫基-HES 衍生物的合成法。對於此, 可使用所有類似 SATA 之衍生物, 其具有可以任何間隔基分開之活性酯官能基及硫酯官能基。另一個屬於此類之成員, SATP 可在表 1 中找到, 其係以"H"為標記。類似於 SPDP 之衍生物可具有以任何間隔基分開之活性酯官能基及二硫官能基。這些類之其他成員可在表 1 中找到, 其係以"F"為標記。其他類似衍生物可具有以任

五、發明說明 (145)

何間隔基分開之活性酯官能基及被保護成三苯甲基衍生物之硫醇官能基。

實例 11

與硫基-EPO 之偶合反應

1. 硫基-EPO 與經鹵素乙醯胺改質 SH-反應性 HES 之反應

1.1 實例實驗程序 1

以包含 NHS-活性酯及碘乙醯胺基之交聯劑，如 SIA⁶(⁶Cumber, Forrester, Foxwell, Ross, Thorpe, 1985, *Methods Enzymol.*, 112, 207)將硫基-EPO 偶合至胺基-HES12KD(E、H 或 I)。

材料

- A. 硼酸鹽緩衝液。組成為 50mM 硼酸鈉，pH 8.3，5mM EDTA。
- B. PBS，經磷酸鹽緩衝之鹽水：10mM 磷酸鈉，150mM NaCl，pH 7.4。
- C. 胺基 HES12KD E、H 或 I。以 1 毫克/毫升溶於硼酸鹽緩衝液中製得。

五、發明說明 (146)

D. 交聯劑儲備溶液：14 毫克 SIA 溶於 1 毫升 DMSO 中。

E. D-Salt™ 聚葡萄糖脫鹽管柱，2 x 5 毫升床體積 (Perbio Science Deutschland GmbH, Bonn, 德國)

F. Coomassie® 蛋白質分析試劑 (Perbio Science Deutschland GmbH, Bonn, 德國)

G. 巯基 EPO 溶液：5 毫克/毫升之巯基 EPO 1 溶於硼酸鹽緩衝液中。

H. 微濃縮機：Microcon YM-3 (Amicon, Milipore GmbH, Eschborn, 德國)。

方法

將 100 微升 SIA 溶液加入 400 微升胺基 HES12KD E 溶液中並令其在室溫下隨著攪拌反應 0.5 小時。利用微濃縮機以 14000 x g 離心樣品 60 分鐘以移除過量的交聯劑。離心後，以硼酸鹽緩衝液將樣品稀釋至其原體積並再重複此程序 2 次。將剩餘溶液加入 1 毫升巯基 EPO 溶液中並使反應混合物在室溫下培養 16 小時。在培養期結束時藉加入半胱胺酸至最終濃度為 10mM 以終止過量碘乙醯胺的反應性。將反應混合物塗佈在經 PBS 緩衝液平衡過之脫鹽管柱中並利用 Coomassie 蛋白質分析試劑監測餾份的蛋白質含量。集中所有包含蛋白質偶合物的餾份並在以

五、發明說明 (147)

水進行隔夜透析後藉由冷凍乾燥獲得偶合物。

替代方法：

在此反應中，可使用所有具有以間隔基分開之琥珀醯亞胺-或磺酸基琥珀醯亞胺官能基及碘乙醯胺官能基的交聯劑。其他實例可在表 1 中找到。其係以”C”為標記，而且可由德國 Bonn 市之 Perbio Science Deutschland GmbH 購得。

1.2 實例實驗程序 2

將巖基-EPO1 偶合至 SH 反應性 HES12KD 溴乙醯胺 D2、F2 或碘乙醯胺 D3⁷(⁷de Valasco, Merkus, Anderton, Verheul, Lizzio, Van der Zee, van Eden, Hoffmann, Verhoef, Snippe, 1995, *Infect. Immun.*, 63, 961)。

材料

- A. 磷酸鹽緩衝液。組成為 100mM 磷酸鈉，pH 6.1，5mM EDTA。
- B. PBS，經磷酸鹽緩衝之鹽水：10mM 磷酸鈉，150mM NaCl，pH 7.4。
- C. SH 反應性 HES12KD 碘乙醯胺 D2。以 10 毫克/毫升溶於磷酸鹽緩衝液而製得。

五、發明說明 (148)

D. D-Salt™ 聚葡萄糖脫鹽管柱，2 x 5 毫升床體積 (Perbio Science Deutschland GmbH, Bonn, 德國)

E. Coomassie® 蛋白質分析試劑 (Perbio Science Deutschland GmbH, Bonn, 德國)

F. 巰基 EPO 溶液：5 毫克/毫升之巰基 EPO 1 溶於磷酸鹽緩衝液中。

方法

結合 1 毫升 SH 反應性 HES12KD 溴乙醯胺 **D2** 溶液與 1 毫升巰基 EPO 溶液並令反應混合物在室溫下培養 48 小時。在培養期結束時藉加入半胱胺酸至最終濃度為 10mM 以終止過量溴乙醯胺的反應性。將反應混合物塗佈在一經 PBS 緩衝液平衡過之脫鹽管柱中。利用 Coomassie 蛋白質分析試劑監測餾份的蛋白質含量。集中所有包含蛋白質偶合物的餾份並在以水進行隔夜透析後藉由冷凍乾燥獲得偶合物。

替代方法：

取代分離出 SH 反應性 HES12KD-溴乙醯胺 **D2**，胺基 HES12KD(**E**、**H**、**I**)可經由琥珀醯亞胺-及溴乙醯胺官能基與交聯劑連接(見上 1.1)。SBAP 係屬此類交聯劑之一員並可在表 1 中找到，其係以”D”為標記。

五、發明說明 (149)

2. 巯基-EPO 與經馬來醯亞胺改質 SH-反應性 HES 之反應

2.1 實例實驗程序 4

將巯基-EPO 偶合至馬來醯亞胺基-HES12KD B。

材料

- A. 馬來醯亞胺基-HES12KD B：10 毫克/毫升溶於 0.1M 乙酸鈉緩衝液，pH 5.5 中。
- B. 巯基 EPO 溶液：5 毫克/毫升之巯基 EPO 溶於磷酸鹽/NaCl 緩衝液中。
- C. 磷酸鹽/NaCl：0.1M 磷酸鈉，50mM NaCl，pH 7.0。
- D. 凝膠過濾管柱：例如，Sephadex®G-200(1.5 x 45 厘米)。
- E. Coomassie® 蛋白質分析試劑 (Perbio Science Deutschland GmbH, Bonn, 德國)
- F. PBS，經磷酸鹽緩衝之鹽水：10mM 磷酸鈉，150mM NaCl，pH 7.4。

方法

五、發明說明 (150)

結合 1 毫升 SH 反應性 HES12KD B 溶液與 1 毫升硫基 EPO 1 溶液並令反應混合物在室溫下培養 2 小時。在培養期結束時藉加入半胱胺酸至最終濃度為 10mM 以終止過量馬來醯亞胺的反應性。將反應混合物塗佈在一經 PBS 緩衝液平衡過之 Sephadex®G-200 (1.5 x 45 厘米) 中並收集 1 毫升餾份。利用 Coomassie 蛋白質分析試劑監測餾份的蛋白質含量。集中所有包含蛋白質偶合物的餾份並在以水進行隔夜透析後，藉由冷凍乾燥獲得偶合物。

2.2 實例實驗程序 5

以包含 NHS-活性酯及馬來醯亞胺基之交聯劑，如 SMCC 將硫基-EPO 偶合至胺基-HES12KD(E、H 或 I)。

材料

- A. 微濃縮機：Microcon YM-10(amicon, Milipore GmbH, Eschborn, 德國)。
- B. PBS，經磷酸鹽緩衝之鹽水：10mM 磷酸鈉，150mM NaCl，pH 7.4。
- C. 胺基 HES12KD E、H 或 I。以 10 毫克/毫升溶於 PBS 緩衝液中製得。
- D. SMCC 溶液：1 毫克 SMCC 係溶於 50 微升 DMSO

五、發明說明 (151)

中

E. D-Salt™ 聚葡萄糖脫鹽管柱，2 x 5 毫升床體積 (Perbio Science Deutschland GmbH, Bonn, 德國)

F. Coomassie® 蛋白質分析試劑 (Perbio Science Deutschland GmbH, Bonn, 德國)

G. 硫基 EPO 1 溶液：5 毫克/毫升之硫基 EPO 1 溶於 PBS 緩衝液中。

方法

在 50 微升 SMCC 溶液中，加入 400 微升胺基 HES12KD E 溶液並令反應混合物在室溫下隨著攪拌反應 80 分鐘及在 46°C 下反應 10 分鐘。經由微濃縮機以 14000 x g 離心反應混合物 60 分鐘以移除過量的交聯劑。以 PBS 緩衝液將體積稀釋至 450 微升並再重複此程序 2 次。最後一次離心後，以 PBS 將剩餘溶液稀釋至 450 微升並將其加入 1 毫升硫基 EPO 溶液中並使反應混合物在室溫下培養 16 小時。在培養期結束時藉加入半胱胺酸至最終濃度為 10mM 以終止過量馬來醯亞胺的反應性。將反應混合物塗佈在經 PBS 緩衝液平衡過之脫鹽管柱中。利用 Coomassie 蛋白質分析試劑監測餾份的蛋白質含量，集中所有包含蛋白質偶合物的餾份並以水進行隔夜透析後，藉由冷凍乾燥獲得偶合物。

五、發明說明 (152)

替代方法：

在此反應中，可使用所有具有以間隔基分開之琥珀醯亞胺-或磺酸基琥珀醯亞胺官能基及馬來醯亞胺官能基之交聯劑。此類分子之其他實例可在表 1 中找到，其係以”E”為標記而且可由德國 Bonn 市之 Perbio Science Deutschland GmbH 購得。存在另一類以活性二硫官能基取代馬來醯亞胺官能基之交聯劑。這些交聯劑也可用於偶合。但是，偶合物的二硫鍵可在還原條件下斷裂。此類成員在表 1 係以”F”為標記。第三類交聯劑係利用乙烯基磺官能基取代馬來醯亞胺官能基作為 SH-反應性基。此類成員”SVSB”在表 1 係以”G”為標記。

實例 12

與已氧化 EPO 之偶合反應

1. Glyco-EPO 之氧化作用

1.1 Glyco-EPO 與偏過碘酸鈉之氧化作用：實例實驗程序

5

材料

五、發明說明 (153)

- A. Glyco-EPO 溶液：10 毫克/毫升之 Glyco-EPO 溶於乙酸鹽緩衝液中。
- B. 偏過碘酸鈉溶液：新鮮製造溶於乙酸鹽緩衝液之 10mM 或 100mM 偏過碘酸鈉。保存於暗處。利用這些溶液，偏過碘酸鈉在氧化混合物中的最終濃度分別為 1mM 或 10mM。
- C. 乙酸鹽緩衝液：0.1M 乙酸鈉緩衝液，pH5.5。
- D. 甘油
- E. 微濃縮機：Microcon YM-3(amicon, Milipore GmbH, Eschborn, 德國)。

方法

所有步驟皆在暗處中進行。

在 1 毫升冷 Glyco-EPO 溶液中，加入 0.1 毫升冷偏過碘酸鈉溶液並令氧化作用在暗處進行 1 小時。若欲氧化之 Glyco-EPO 包含涎酸殘基，然後氧化條件為 1mM 過碘酸鈉，0°C。否則使用在室溫下 10mM 過碘酸鈉中。為停止氧化作用，加入甘油使最終濃度為 15mM 並在 0°C 下培養 5 分鐘。利用微濃縮機以 14000 x g 離心產物 60 分鐘以移除過量試劑及副產物。離心後，以下個改質步驟所用的緩衝液，如以乙酸鹽緩衝液，將樣品稀釋至其原體積。另外重

五、發明說明 (154)

複此程序 2 次。

1.2 Glyco-EPO 之酵素氧化作用：實例實驗程序 6

EPO 之酵素氧化作用係另外描述(Chamow 等人, 1992, J. Biol. Chem., 267, 15916-15922)。

2. 與胍/醯胍衍生物之偶合作用

2.1 實例實驗程序 7

以包含醯胍及馬來醯亞胺官能基之交聯劑，如 M_2C_2H (Perbio Science, Deutschland GmbH, Bonn, 德國)將已氧化 Glyco-EPO 偶合至硫基-HES12KD M、O 或 Q。

材料

- A. M_2C_2H 儲備液：10 毫克/毫升 M_2C_2H 溶於 DMSO 中，新鮮製備。
- B. 獲自 6.1.1 之已氧化 Glyco-EPO 溶液：5 毫克/毫升之 Glyco-EPO 溶於乙酸鹽緩衝液中。
- C. 硫基-HES12KD M、O 或 Q：以 10 毫克/毫升溶於磷酸鹽/NaCl 緩衝液中。
- D. 乙酸鹽緩衝液：0.1M 乙酸钠緩衝液，pH 5.5

五、發明說明 (155)

E. 磷酸鹽/NaCl : 0.1M 磷酸鈉 , 50mM NaCl , pH 7.0

F. 微濃縮機 : Microcon YM-3(amicon, Milipore GmbH, Eschborn, 德國)。

G. 凝膠過濾管柱 : 例如 , Sephadex®G-200(1.5 x 45 厘米)。

H. Coomassie® 蛋白質分析試劑 (Perbio Science Deutschland GmbH, Bonn, 德國)

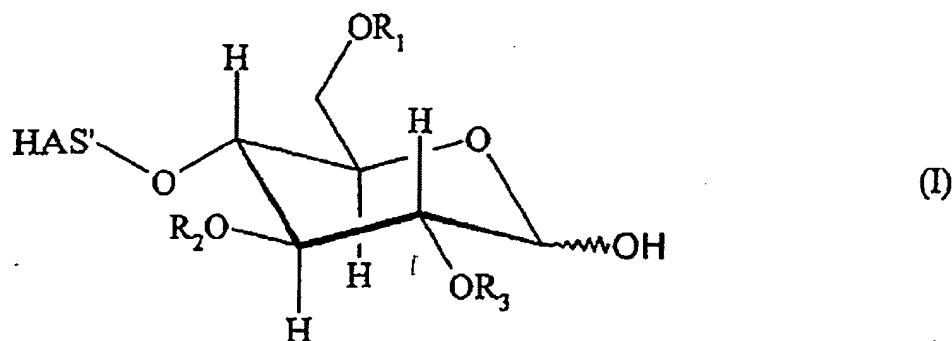
I. PBS , 經磷酸鹽緩衝之鹽水 : 10mM 磷酸鈉 , 150mM NaCl , pH 7.4 。

方法

將 M_2C_2H 儲備液加入 1 毫升已氧化 Glyco-EPO 溶液使最終濃度為 1mM 並令其在室溫下隨著攪拌反應 2 小時。利用微濃縮機以 14000 x g 離心樣品 60 分鐘以移除過量的交聯劑。離心後 , 以磷酸鹽/NaCl 緩衝液將樣品稀釋至其原體積並再重複此程序 2 次。在此經 M_2C_2H 改質之 Glyco-EPO 中 , 加入 1 毫升巖基-HES12KD M、O 或 Q 溶液並使反應混合物在室溫下培養 16 小時。在培養期結束時藉加入半胱胺酸終止過量馬來醯亞胺的反應性。將反應混合物塗佈在經 PBS 平衡過之 Sephadex®G-200(1.5 x 45 厘米) 中並收集 1 毫升餾份。利用 Coomassie 蛋白質分析

六、申請專利範圍

1. 一種製造一包含另外化合物(M)的羥基烷基澱粉衍生物之方法，該羥基烷基澱粉具有一根據式(I)之結構



其中 R_1 、 R_2 及 R_3 係獨立地為氫或一直鏈或分支鏈羥基烷基，該方法包括

(a) 將

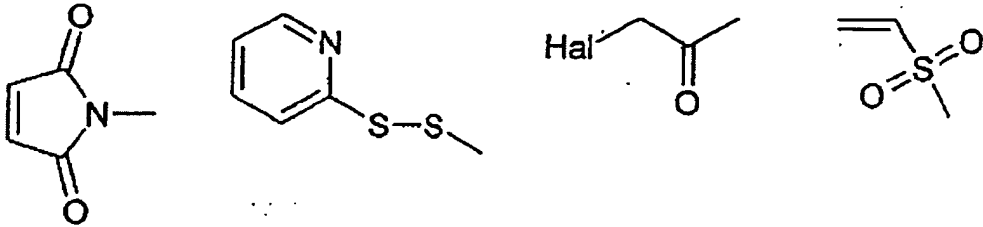
- 式(I)羥基烷基澱粉在其非氧化之還原端與通式 $Z_1-L'-X$ 之化合物(L)反應，其中 L' 為一橋接 Z_1 與 X 之有機鏈或其中缺少 L' ，以及其中 Z_1 係與羥基烷基澱粉之非氧化之還原端反應，

或

- 一可藉由式(I)羥基烷基澱粉在其非氧化之還原端與一通式 $Z_1-D'-W$ 之化合物(D)反應獲得之羥基烷基澱粉衍生物，與通式 $Z_2-L'-X$ 之化合物(L)反應，其中官能基 Z_2 係與包含在該羥基烷基澱粉中之官能基 W 反應，其中 D' 為一橋接 Z_1 與 W 之有機鏈或其中缺少 D' ，以及其中 Z_1 係與羥基烷基澱粉之非氧化之還原端反應，以及其中 L' 為一橋接 Z_2 與 X 之有機鏈或其中缺少 L' ，

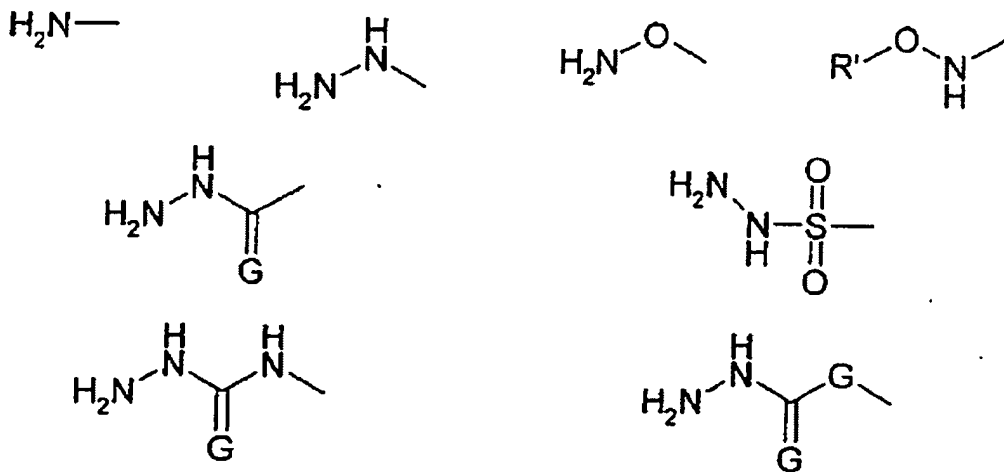
六、申請專利範圍

- (i) 其中該官能基 W 或官能基 Z₂ 為 -SH，而且官能基 Z₂ 或官能基 W 係選自下列組成之群



其中 Hal 為 Cl、Br 或 I，
或

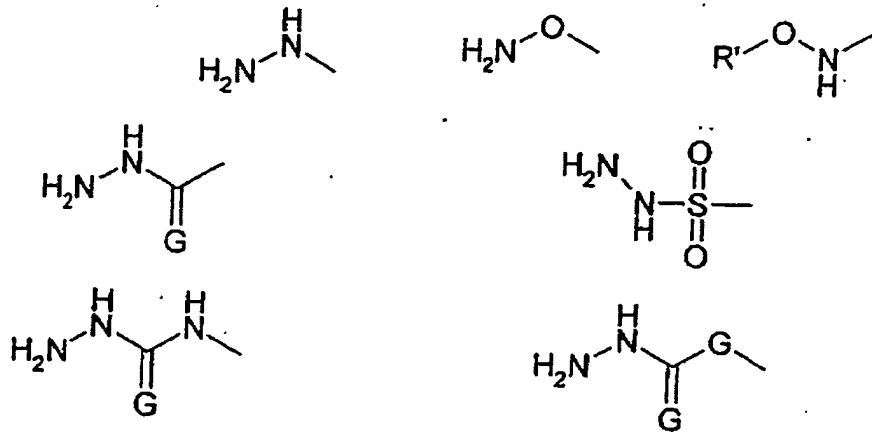
- (ii) 其中該官能基 W 或該官能基 Z₂ 係選自由活性酯或視情況可轉化成活性酯之羧基組成之群，而且該官能基 Z₂ 或該官能基 W 係選自由下列組成之群



其中 G 為 O 或 S，且若出現兩次，其係獨立地為 O 或 S，且 R' 為甲基，

六、申請專利範圍

以獲得一包含官能基 X 之羥基烷基澱粉衍生物，其中 Z_1 係選自由下列組成之群

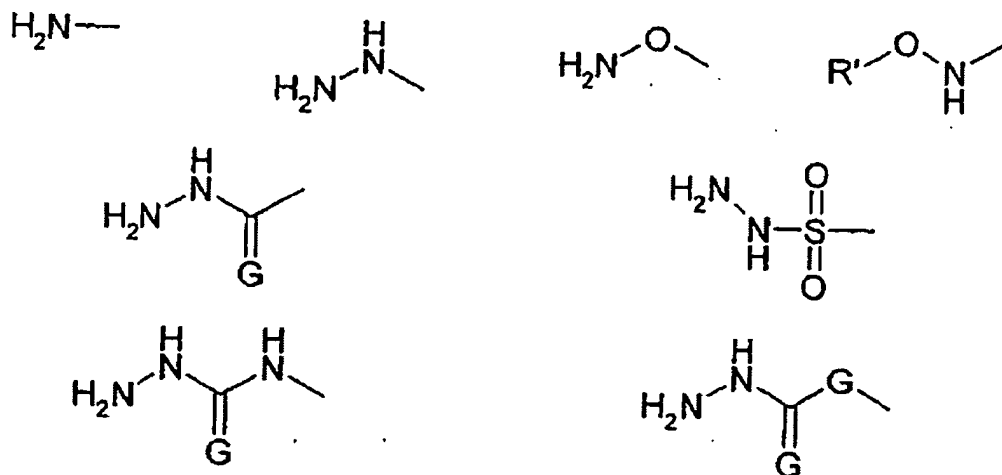


其中 G 為 O 或 S，且若出現兩次，其係獨立地為 O 或 S，且 R' 為甲基，

(b) 該方法另外包含將官能基 X 與該另外化合物(M)之官能基 Y 反應，

-- 其中該官能基 Y 係選自由醛基、酮基、半縮醛基及縮醛基組成之群，

以及其中官能基 X 係選自由下列組成之群



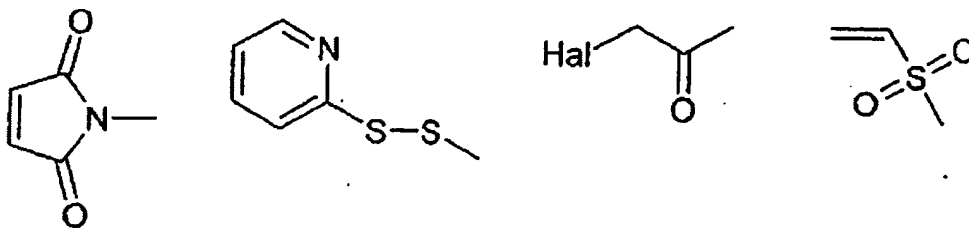
其中 G 為 O 或 S，且若出現兩次，其係獨立地

六、申請專利範圍

為 O 或 S，且 R' 為甲基，

或

-- 其中該官能基 Y 為硫醇基且官能基 X 係選自由下列組成之群



其中 Hal 為 Cl、Br 或 I，

以及其中該另外化合物(M)為多肽。

2. 如申請專利範圍第 1 項之方法，其中 R₁、R₂ 及 R₃ 係獨立地為氫或 2-羥基乙基。
3. 如申請專利範圍第 1 或 2 項之方法，其中該羥基烷基澱粉是羥基乙基澱粉。
4. 如申請專利範圍第 1 或 2 項之方法，其中羥基烷基澱粉係經由官能基 Z₁ 與該羥基烷基澱粉之還原端的反應與該化合物(L)反應，而且該所得反應產物係經由化合物(L)所含之官能基 X 與該另外化合物(M)所含之官能基 Y 的反應與化合物(M)反應。
5. 如申請專利範圍第 1 或 2 項之方法，其中羥基烷基澱

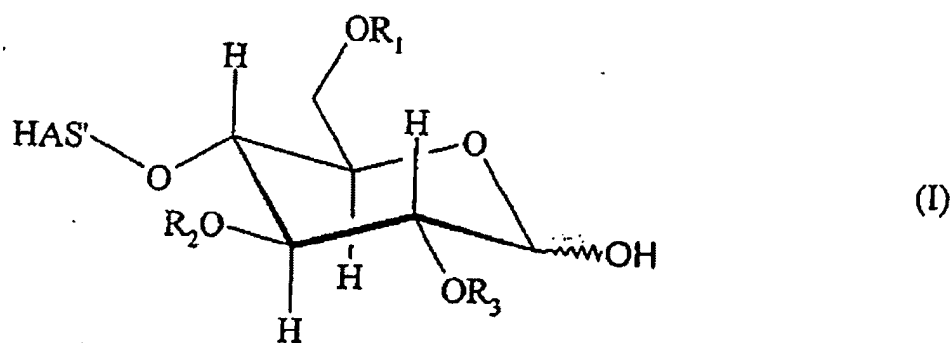
六、申請專利範圍

粉係經由官能基 Z_1 與該羥基烷基澱粉之還原端的反應與該化合物(L)反應，其中化合物(L)在與羥基烷基澱粉反應前係經由化合物(L)所含之官能基 X 與該另外化合物(M)所含之官能基 Y 的反應與化合物(M)反應。

6. 如申請專利範圍第 1 或 2 項之方法，其中羥基烷基澱粉係經由該化合物(D)所含之官能基 Z_1 與該羥基烷基澱粉之還原端的反應與化合物(D)反應以獲得第一羥基烷基澱粉衍生物，而且其中第一羥基烷基澱粉衍生物係經由該化合物(L)所含之官能基 Z_2 與化合物(D)所含之官能基 W 的反應與化合物(L)反應以獲得第二羥基烷基澱粉衍生物，以及其中第二羥基烷基澱粉衍生物係經由化合物(L)所含之官能基 X 與該另外化合物(M)所含之官能基 Y 的反應與化合物(M)反應。
7. 如申請專利範圍第 1 或 2 項之方法，其中羥基烷基澱粉係經由該化合物(D)所含之官能基 Z_1 與該羥基烷基澱粉之還原端的反應與化合物(D)反應以獲得第一羥基烷基澱粉衍生物，而且第一羥基烷基澱粉衍生物係經由化合物(D)所含之官能基 W 與化合物(L)所含之官能基 Z_2 的反應與化合物(L)反應，其中化合物(L)在與第一羥基烷基澱粉衍生物反應前係經由化合物(L)所含之官能基 X 與該另外化合物(M)所含之官能基 Y 的反應與化合物(M)反應。

六、申請專利範圍

8. 如申請專利範圍第 1 或 2 項之方法，其中該多肽為紅血球生成素。
9. 一種包含另外化合物(M)的羥基烷基澱粉衍生物，其係可藉由一種製造羥基烷基澱粉衍生物之方法所獲得，該羥基烷基澱粉具有一根據式(I)之結構



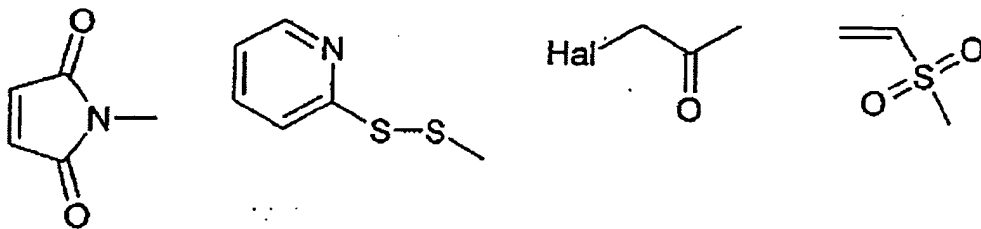
其中 R_1 、 R_2 及 R_3 係獨立地為氫或一直鏈或分支鏈羥基烷基，該方法包括

- (a) 將
- 式(I)羥基烷基澱粉在其非氧化之還原端與通式 $Z_1-L'-X$ 之化合物(L)反應，
其中 L' 為一橋接 Z_1 與 X 之有機鏈或其中缺少 L' ，以及其中 Z_1 係與羥基烷基澱粉之非氧化之還原端反應，
或
 - 一可藉由式(I)羥基烷基澱粉在其非氧化之還原端與一通式 $Z_1-D'-W$ 之化合物(D)反應獲得之羥基烷基澱粉衍生物，與通式 $Z_2-L'-X$ 之化合物(L)反

六、申請專利範圍

應，其中官能基 Z_2 係與包含在該羥基烷基澱粉中之官能基 W 反應，其中 D' 為一橋接 Z_1 與 W 之有機鏈或其中缺少 D'，以及其中 Z_1 係與羥基烷基澱粉之非氧化之還原端反應，以及其中 L' 為一橋接 Z_2 與 X 之有機鏈或其中缺少 L'，

- (i) 其中該官能基 W 或官能基 Z_2 為 -SH，而且官能基 Z_2 或官能基 W 係選自下列組成之群

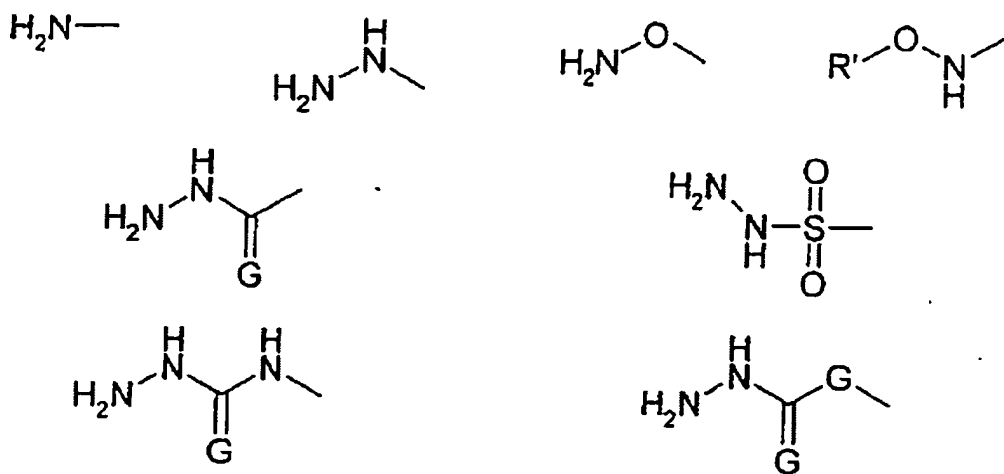


其中 Hal 為 Cl、Br 或 I，

或

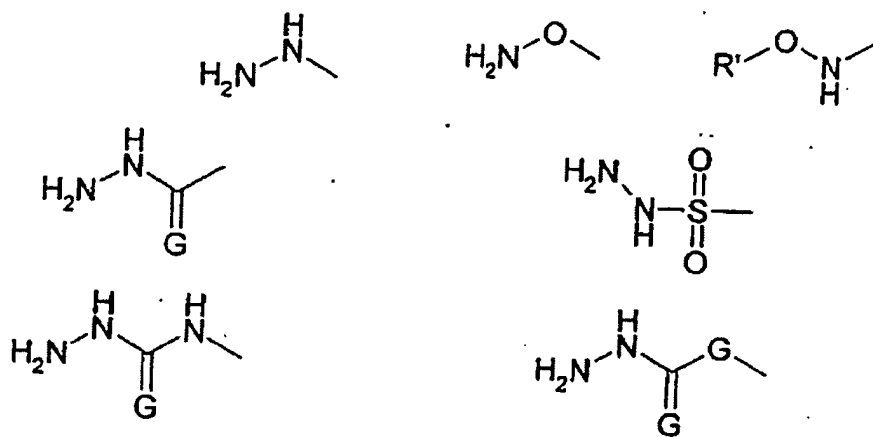
- (ii) 其中該官能基 W 或該官能基 Z_2 係選自由活性酯或視情況可轉化成活性酯之羧基組成之群，而且該官能基 Z_2 或該官能基 W 係選自由下列組成之群

六、申請專利範圍



其中 G 為 O 或 S，且若出現兩次，其係獨立地為 O 或 S，且 R' 為甲基，

以獲得一包含官能基 X 之羥基烷基澱粉衍生物，其中 Z₁ 係選自由下列組成之群



其中 G 為 O 或 S，且若出現兩次，其係獨立地為 O 或 S，且 R' 為甲基，

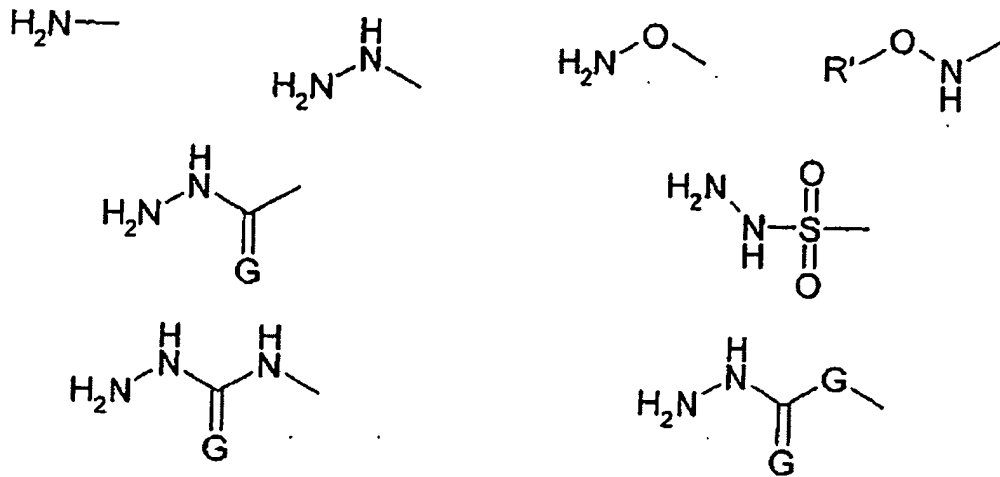
(b) 該方法另外包含將官能基 X 與該另外化合物(M)之官能基 Y 反應，

-- 其中該官能基 Y 係選自由醛基、酮基、半縮醛

六、申請專利範圍

基及縮醛基組成之群，

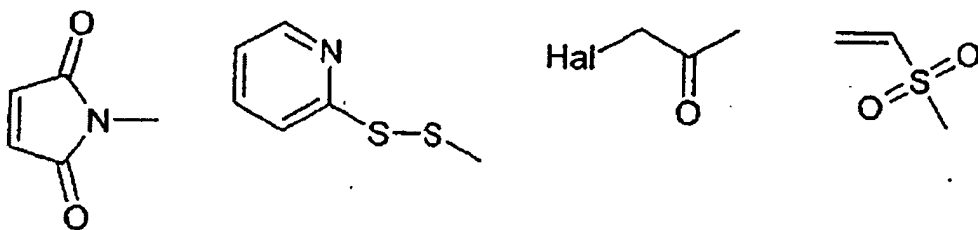
以及其中官能基 X 係選自由下列組成之群



其中 G 為 O 或 S，且若出現兩次，其係獨立地
為 O 或 S，且 R' 為甲基，

或

-- 其中該官能基 Y 為硫醇基且官能基 X 係選自由
下列組成之群



其中 Hal 為 Cl、Br 或 I，

以及其中該另外化合物(M)為多肽。

10. 如申請專利範圍第 9 項之羥基烷基澱粉衍生物，其中
R₁、R₂ 及 R₃ 係獨立地為氫或 2-羥基乙基。

六、申請專利範圍

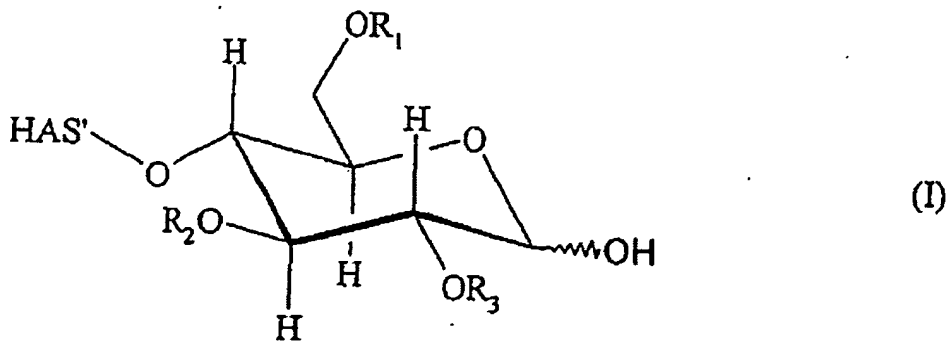
11. 如申請專利範圍第 9 或 10 項之羥基烷基澱粉衍生物，其中該羥基烷基澱粉是羥基乙基澱粉。
12. 如申請專利範圍第 9 或 10 項之羥基烷基澱粉衍生物，其中羥基烷基澱粉係經由官能基 Z_1 與羥基烷基澱粉之還原端的反應與該化合物(L)反應，而且該所得反應產物係經由化合物(L)所含之官能基 X 與該另外化合物(M)所含之官能基 Y 的反應與化合物(M)反應。
13. 如申請專利範圍第 9 或 10 項之羥基烷基澱粉衍生物，其中羥基烷基澱粉係經由官能基 Z_1 與該羥基烷基澱粉之還原端的反應與該化合物(L)反應，其中化合物(L)在與羥基烷基澱粉反應前係經由化合物(L)所含之官能基 X 與該另外化合物(M)所含之官能基 Y 的反應與化合物(M)反應。
14. 如申請專利範圍第 9 或 10 項之羥基烷基澱粉衍生物，其中羥基烷基澱粉係經由該化合物(D)所含之官能基 Z_1 與該羥基烷基澱粉之還原端的反應與化合物(D)反應以獲得第一羥基烷基澱粉衍生物，而且第一羥基烷基澱粉衍生物係經由該化合物(L)所含之官能基 Z_2 與化合物(D)所含之官能基 W 的反應與化合物(L)反應以獲得第二羥基烷基澱粉衍生物，以及其中第二羥

六、申請專利範圍

基烷基澱粉衍生物係經由化合物(L)所含之官能基 X 與該另外化合物(M)所含之官能基 Y 的反應與化合物(M)反應。

15. 如申請專利範圍第 9 或 10 項之羥基烷基澱粉衍生物，其中羥基烷基澱粉係經由該化合物(D)所含之官能基 Z_1 與該羥基烷基澱粉之還原端的反應與化合物(D)反應以獲得第一羥基烷基澱粉衍生物，而且該第一羥基烷基澱粉衍生物係經由化合物(D)所含之官能基 W 與化合物(L)所含之官能基 Z_2 的反應與化合物(L)反應，其中化合物(L)在與第一羥基烷基澱粉衍生物反應前係經由化合物(L)所含之官能基 X 與該另外化合物(M)所含之官能基 Y 的反應與化合物(M)反應。
16. 如申請專利範圍第 9 或 10 項之羥基烷基澱粉衍生物，其中該多肽為紅血球生成素。
17. 一種醫藥組合物，其包含治療上有效量之可藉由一種製造羥基烷基澱粉衍生物之方法獲得的包含一另外化合物(M)之羥基烷基澱粉衍生物，該羥基烷基澱粉具有一根據式(I)之結構

六、申請專利範圍



其中 R₁、R₂ 及 R₃ 係獨立地為氫或一直鏈或分支鏈羥基烷基，該方法包括

(a) 將

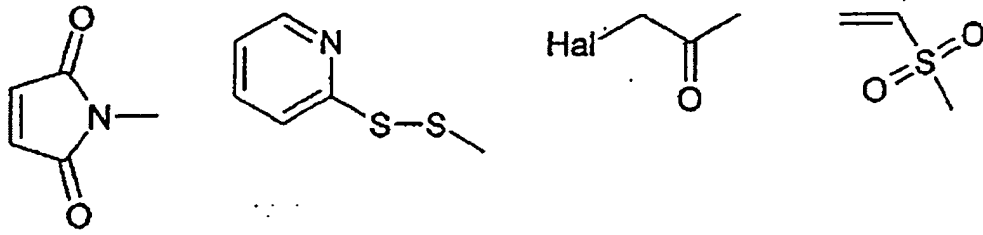
- 式(I)羥基烷基澱粉在其非氧化之還原端與通式 Z₁-L'-X 之化合物(L)反應，其中 L' 為一橋接 Z₁ 與 X 之有機鏈或其中缺少 L'，以及其中 Z₁ 係與羥基烷基澱粉之非氧化之還原端反應，

或

- 一可藉由式(I)羥基烷基澱粉在其非氧化之還原端與一通式 Z₁-D'-W 之化合物(D)反應獲得之羥基烷基澱粉衍生物，與通式 Z₂-L'-X 之化合物(L)反應，其中官能基 Z₂ 係與包含在該羥基烷基澱粉中之官能基 W 反應，其中 D' 為一橋接 Z₁ 與 W 之有機鏈或其中缺少 D'，以及其中 Z₁ 係與羥基烷基澱粉之非氧化之還原端反應，以及其中 L' 為一橋接 Z₂ 與 X 之有機鏈或其中缺少 L'，

(i) 其中該官能基 W 或官能基 Z₂ 為-SH，而且官能基 Z₂ 或官能基 W 係選自下列組成之群

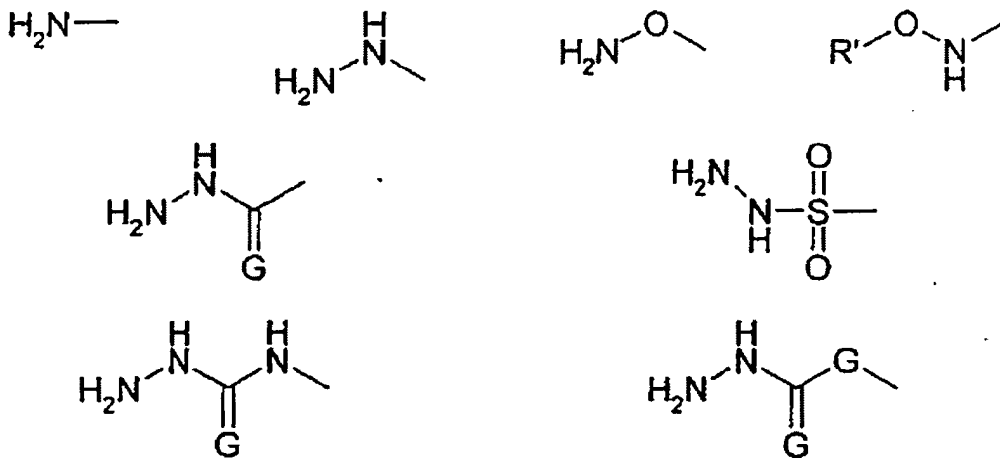
六、申請專利範圍



其中 Hal 為 Cl、Br 或 I，

或

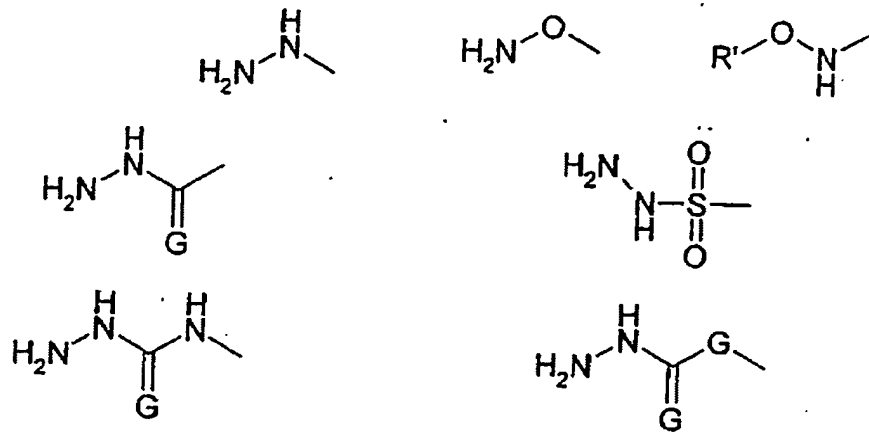
- (ii) 其中該官能基 W 或該官能基 Z₂ 係選自由活性酯或視情況可轉化成活性酯之羧基組成之群，而且該官能基 Z₂ 或該官能基 W 係選自由下列組成之群



其中 G 為 O 或 S，且若出現兩次，其係獨立地為 O 或 S，且 R' 為甲基，

以獲得一包含官能基 X 之羥基烷基澱粉衍生物，其中 Z₁ 係選自由下列組成之群

六、申請專利範圍

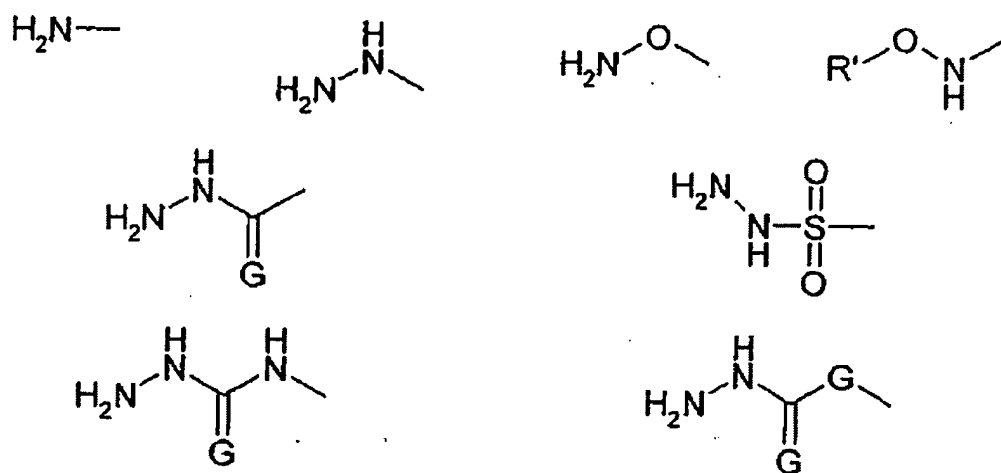


其中 G 為 O 或 S，且若出現兩次，其係獨立地為 O 或 S，且 R' 為甲基，

(b) 該方法另外包含將官能基 X 與該另外化合物 (M) 之官能基 Y 反應，

-- 其中該官能基 Y 係選自由醛基、酮基、半縮醛基及縮醛基組成之群，

以及其中官能基 X 係選自由下列組成之群

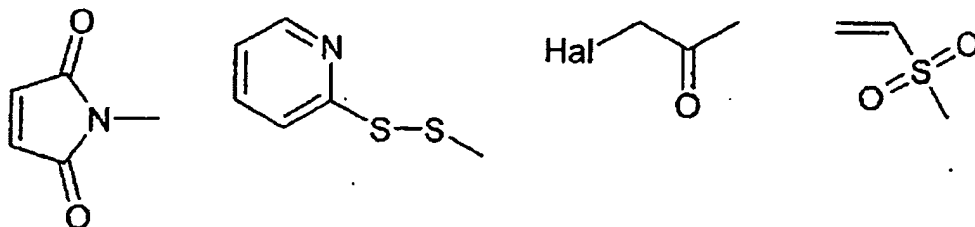


其中 G 為 O 或 S，且若出現兩次，其係獨立地為 O 或 S，且 R' 為甲基，

或

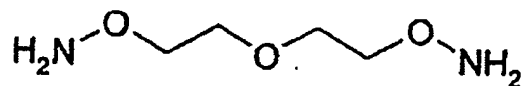
六、申請專利範圍

-- 其中該官能基 Y 為硫醇基且官能基 X 係選自由下列組成之群



其中 Hal 為 Cl、Br 或 I，
以及其中該另外化合物(M)為多肽。

18. 如申請專利範圍第 17 項之醫藥組合物，其中該多肽是抗凝血酶第 III 型(AT III)。
19. 如申請專利範圍第 17 項之醫藥組合物，其中該多肽是紅血球生成素。
20. 如申請專利範圍第 17 項之醫藥組合物，其中羥基烷基澱粉係在一水性媒介中與一根據下式之化合物(L)反應



而且該反應產物係與化合物(M)反應，其中(M)為紅血球生成素。

六、申請專利範圍

21. 如申請專利範圍第 20 項之醫藥組合物，其中該紅血球生成素在該反應前係經過碘酸鈉氧化。
22. 如申請專利範圍第 20 項之醫藥組合物，其中該該紅血球生成素在該反應前係經部分去涎酸化，而且接著被過碘酸鈉氧化。