

(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(51) Int. Cl. ⁷ C07K 14/505	(11) 공개번호 (43) 공개일자	특2001-0049676 2001년06월 15일
(21) 출원번호	10-2000-0036976	
(22) 출원일자	2000년06월30일	
(30) 우선권주장	60/142,254 1999년07월02일 미국(US) 60/150,225 1999년08월23일 미국(US) 60/151,548 1999년08월31일 미국(US) 60/166,151 1999년11월17일 미국(US)	
(71) 출원인	에프. 호프만-라 로슈 아게 프리돌린 클라우스너, 룰란드 비. 보레르 스위스 체하-4070 바젤 그렌짜체스트라체 124	
(72) 발명자	바일론파스칼세바스티안 미국뉴저지주07932플로렘파크우드바인로드21	
(74) 대리인	김창세	

심사청구 : 있음

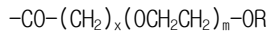
(54) 에리트로포이에틴 컨쥬게이트

요약

본 발명은 하나 이상의 자유 아미노기를 갖고, 골수 세포가 더 많은 양의 망상적혈구 및 적혈구 세포를 생산하도록 하는 생체내 생물학적 활성을 가지며, 인간의 에리트로포이에틴, 및 1 내지 6개의 포도당화 부위가 첨가되거나 또는 하나 이상의 포도당화 부위가 재배치됨으로써 개질된 인간의 에리트로포이에틴의 서열을 갖는 그의 유사체로 이루어진 군으로부터 선택되는 에리트로포이에틴 당단백질을 포함하며, 이 때

상기 당단백질이, 상기 아미노기중 하나와 아미드 결합을 형성하는 각 폴리(에틸렌 글리콜)기의 카보닐기에 의해 하기 화학식 1의 폴리(에틸렌 글리콜)기 "n"개에 공유 결합되어 있는, 폴리(에틸렌 글리콜)과 에리트로포이에틴의 컨쥬게이트 (conjugate)에 관한 것이다:

화학식 1



상기 식에서,
R은 저급 알킬이고;
x는 2 또는 3이고;
m은 약 450 내지 약 900이며;
n은 1 내지 3이고;
n 및 m은 컨쥬게이트에서 에리트로포이에틴 당단백질을 제외한 분자량이 20킬로달톤 내지 100킬로달톤이 되도록 선택된다.

명세서

발명의 상세한 설명

발명의 목적

발명이 속하는 기술 및 그 분야의 종래기술

본 발명은 에리트로포이에틴 당단백질과 폴리(에틸렌 글리콜)의 컨쥬게이트(conjugate) 및 이를 포함하는 조성물에 관한 것이다.

적혈구신생(erythropoiesis)은 적혈구 세포의 파괴를 상쇄시키기 위하여 발생하는 적혈구 세포의 생성이다. 적혈구신생은 충분한 적혈구 세포가 적절한 조직 산소화에 이용될 수 있도록 하는 조절되는 생리학적 기작이다. 천연적으로 발생하는 인간의 에리트로포이에틴(hEPO)은 신장에서 생성되며, 적혈구 세포 생성을 자극하는 인간의 혈장 요소이다[카넛(Carnot, P) 및 디플랑드르(Deflandre, C) (1906) C.R.

Acad. Sci. 143:432; 에르슬레프(Erslev, AJ) (1953) Blood 8:349; 라이스만(Reissmann, KR) (1950) Blood 5:372; 제이콥슨(Jacobson, LO), 골드워서(Goldwasser, E), 프라이드(Freid, W) 및 플작(Pizak, LF) (1957) Nature 179:6331-4]. 천연적으로 발생하는 EPO는 골수내의 제후된 적혈구계 프로제니터(committed erythroid progenitor)의 분할 및 분화를 자극하고, 적혈구계 선구물질상의 수용체에 결합함으로써 생물학적 활성을 나타낸다[크란츠(Krantz, BS), (1991), Blood 77:419].

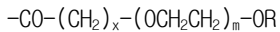
에리트로포이에틴은 재조합 DNA 기법을 이용하여 생합성 제조되어 왔으며[에그리(Egrie, JC), 스트리클랜드(Strickland, TW), 레인(Lane, J) 등 (1986) Immunobiol. 72:213-224], 차이니스 햄스터의 난소 세포(CHO 세포)내로 삽입되어 발현된 클로닝된 인간의 EPO 유전자의 산물이다. hEPO의 우세하고 완전히 가공된 형태의 주요 구조는 SEQ ID NO:1에 기재되어 있다. Cys⁷-Cys¹⁶¹ 및 Cys²⁹-Cys³³ 사이에 2개의 디설파이드 가교가 있다. 당 잔기 없는 EPO의 폴리펩티드 체의 분자량은 18,236Da이다. 완전한 EPO 분자에서, 분자량의 약 40%는 단백질상의 포도당화 부위에서 단백질을 포도당화시키는 탄수화물 기에 해당한다.

인간의 에리트로포이에틴은 적혈구 세포 형성에 필수적이기 때문에, 이 호르몬은 적혈구 세포 생성이 적거나 결핍됨을 특징으로 하는 혈액 질환의 치료에 유용하다. 임상적으로, EPO는 만성 신부전증 환자(CRF)[에쉬바흐(Eschbach, JW), 에그리, 다우닝(Downing, MR) 등 (1987) NEJM 316:73-78; 에쉬바흐, 압둘하디(Abdulhadi, MH), 브라우니(Browne, JK) 등 (1989) Ann. Intern. Med. 111:992; 에그리, 에쉬바흐, 맥과이어(McGuire, T), 아담슨(Adamson, JW) (1988) Kidney Intl. 33:262; 림(Lim, VS), 데고윈(Degowin, RL), 자발라(Zavala, D) 등 (1989) Ann. Intern. Med. 110:108-114], 화학요법이 진행 중인 AIDS 및 암 환자[다나(Danna, RP), 루드닉(Rudnick, SA), 아벨스(Abels, RI In: MB), 가닉(Garnick) 편집, Erythropoietin in Clinical Applications-An International Perspective. New York, NY: Marcel Dekker; 1990: p. 301-324]에서의 빈혈을 치료하는데 사용된다. 그러나, EPO 같은 시판 중인 단백질 치료제의 생체내이용효율은 그들의 짧은 혈장내 반감기 및 프로테아제 분해에 대한 감수성으로 인해 제한된다. 이러한 단점으로 인해 이들은 최대 임상 효능을 달성하지 못한다.

발명이 이루고자하는 기술적 과제

본 발명은 하나 이상의 자유 아미노기를 갖고, 골수 세포가 더 많은 양의 망상적혈구 및 적혈구 세포를 생산하도록 하는 생체내 생물학적 활성을 가지며, 인간의 에리트로포이에틴, 및 1 내지 6개의 포도당화 부위를 첨가하거나 또는 하나 이상의 포도당화 부위를 재배치함으로써 개질된 인간의 에리트로포이에틴의 서열을 갖는 그의 유사체로 이루어진 군으로부터 선택되는 에리트로포이에틴 당단백질을 포함하며, 이 때 상기 당단백질이 상기 아미노기중 하나와 아미드 결합을 형성하는 각 폴리(에틸렌 글리콜) 기의 -CO(즉, 카보닐)에 의해 하기 화학식 1의 폴리(에틸렌 글리콜) 기 "n"개에 공유 결합되어 있는 에리트로포이에틴 컨쥬게이트를 제공한다:

화학식 1



상기 식에서,

R은 저급 알킬이고,

x는 2 또는 3이고,

m은 약 450 내지 약 900이고,

n은 1 내지 3이고,

n 및 m은 컨쥬게이트로부터 에리트로포이에틴 당단백질을 제외한 분자량이 20 내지 100킬로달톤이 되도록 선택된다.

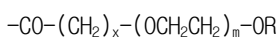
본 발명은 또한 상기 기술한 컨쥬게이트를 포함하되 n이 1인 컨쥬게이트의 조성물중 백분율이 90% 이상인 조성물을 제공한다.

개질되지 않은 EPO(즉, PEG가 부착되지 않은 EPO) 및 종래의 PEG-EPO 컨쥬게이트와 비교하여, 본 발명의 컨쥬게이트는 증가된 순환 반감기 및 혈장내 체류시간, 감소된 제거율(clearance), 및 증가된 생체내 임상 활성을 갖는다. 본 발명의 컨쥬게이트는 EPO와 동일한 용도를 갖는다. 특히, 본 발명의 컨쥬게이트는 환자를 치료하는데 EPO를 사용하는 것과 동일한 방식으로 골수내의 제후된 적혈구계 프로제니터의 분할 및 분화를 자극함으로써 환자를 치료하는데 유용하다.

발명의 구성 및 작용

본 발명은 하나 이상의 자유 아미노기를 갖고, 골수 세포가 더 많은 양의 망상적혈구 및 적혈구 세포를 생산하도록 하는 생체내 생물학적 활성을 가지며, 인간의 에리트로포이에틴, 및 1 내지 6개의 포도당화 부위를 첨가하거나 또는 하나 이상의 포도당화 부위를 재배치함으로써 개질된 인간의 에리트로포이에틴의 서열을 갖는 그의 유사체로 이루어진 군으로부터 선택되는 에리트로포이에틴 당단백질을 포함하며, 이 때 상기 당단백질이 상기 아미노기중 하나와 아미드 결합을 형성하는 각 폴리(에틸렌 글리콜) 기의 -CO(즉, 카보닐)에 의해 하기 화학식 1의 폴리(에틸렌 글리콜) 기 "n"개에 공유 결합되어 있는 에리트로포이에틴 컨쥬게이트를 제공한다:

화학식 1



상기 식에서,

R은 저급 알킬이고,

x는 2 또는 3이고,

m은 약 450 내지 약 900이고,

n은 1 내지 3이고,

n 및 m은 컨쥬게이트로부터 에리트로포이에틴 당단백질을 제외한 분자량이 20 내지 100킬로돌턴이 되도록 선택된다.

본 발명의 컨쥬게이트는 개질되지 않은 EPO와 동일한 방식으로 사용될 수 있는 것으로 밝혀졌다. 그러나, 본 발명의 컨쥬게이트는 증가된 순환 반감기 및 혈장내 체류시간, 감소된 제거율 및 증가된 생체내 임상 활성을 갖는다. 이러한 개선된 특성으로 인해, 본 발명의 컨쥬게이트는 개질되지 않는 EPO가 1주일에 3회 투여되는데 비해 1주일에 1회만 투여될 수 있다. 투여빈도가 줄어들어 따라 환자가 치료에 더욱 순응하게 되어 치료 효과가 개선될 뿐만 아니라 환자의 삶의 질도 개선된다. 폴리(에틸렌 글리콜)에 결합된 종래의 EPO 컨쥬게이트와 비교하여, 본 발명의 컨쥬게이트의 분자량 및 결합 구조를 갖는 컨쥬게이트가 효능, 안정성, AUC, 순환 반감기 및 사용 프로파일 비용 면에서 개선된 것으로 밝혀졌다.

본 발명에 따른 컨쥬게이트는 EPO가 투여되는 것과 동일한 방식으로 환자에게 치료-효과량으로 투여될 수 있다. 치료-효과량은 골수 세포가 더 많은 양의 망상적혈구 및 적혈구 세포를 생산하도록 하는 생체내 생물학적 활성에 필요한 컨쥬게이트의 양이다. 컨쥬게이트의 정확한 양은 치료될 질환의 정확한 유형, 치료될 환자의 상태 및 조성물중의 다른 성분 같은 인자의 문제이다. 예를 들면, 체중 1kg당 0.01 내지 10 μ g, 바람직하게는 체중 1kg당 0.1 내지 1 μ g을 예컨대 1주일에 1회 투여할 수 있다.

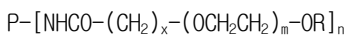
컨쥬게이트를 함유하는 약학 조성물은 적혈구 세포의 생산이 적거나 결핍됨을 특징으로 하는 혈액 질환을 앓고 있는 인간 환자에게 다양한 수단으로 투여하기에 효과적인 강도로 제형화될 수 있다. 컨쥬게이트의 평균적인 치료-효과량은 변할 수 있으며, 특히 자질있는 전문의의 권유 및 처방에 따라야 한다.

본 발명에 따라 제조된 에리트로포이에틴 당단백질 생성물은 당해 분야에 공지된 방법에 의해 약학적으로 허용가능한 담체 또는 비히글과 함께 주사에 적합한 약학 조성물로 제조될 수 있다. 예를 들어, 적절한 조성물은 WO 97/09996 호, WO 97/40850 호, WO 98/58660 호 및 WO 99/07401 호에 기재되어 있다. 본 발명의 생성물을 제형화시키기에 바람직한 약학적으로 허용가능한 담체중에는 인간 혈청 알부민, 인간 혈장 단백질 등이 있다. 본 발명의 화합물은 긴장제(tonicity agent), 예컨대 132mM 염화나트륨을 함유하는 pH 7의 10mM 인산나트륨/칼륨 완충액중에서 제형화될 수 있다. 임의적으로는 약학 조성물은 보존제를 함유할 수 있다. 약학 조성물은 상이한 양, 예컨대 10 내지 1000 μ g/ml, 예를 들어 50 μ g 또는 400 μ g의 에리트로포이에틴을 함유할 수 있다.

"에리트로포이에틴" 또는 "EPO"라는 용어는 SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2에 기재된 아미노산 서열 또는 이와 실질적으로 상동인 아미노산 서열을 가지며, 생물학적 특성이 적혈구 세포 생산의 자극 및 골수내의 제후된 적혈구계 프로제니터의 분할 및 분화의 자극에 관련된 당단백질이다. 본원에 사용된 바와 같은 이들 용어는 예컨대 부위 유도된 변이유발(mutagenesis)에 의해 의도적으로 또는 돌연변이(mutation)를 통해 예기치않게 개질된 상기 단백질을 포함한다. 이들 용어는 또한 1 내지 6개의 추가적인 포도당화 부위를 갖는 유사체, 당단백질의 카복시 말단에 하나 이상의 추가적인 아미노산을 갖는 유사체(이때, 상기 추가적인 아미노산은 하나 이상의 포도당화 부위를 포함한다) 및 하나 이상의 포도당화 부위의 재배치를 포함하는 아미노산 서열을 갖는 유사체도 포함한다. 이들 용어는 천연적인 인간의 에리트로포이에틴 및 재조합법에 의해 생산된 인간의 에리트로포이에틴을 포함한다.

본 발명의 에리트로포이에틴 컨쥬게이트는 하기 화학식 2로 표시될 수 있다:

화학식 2



상기 식에서,

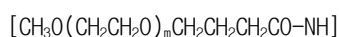
x, m, n 및 R은 전술한 바와 같고,

P는 골수 세포가 더 많은 양의 망상적혈구 및 적혈구 세포를 생산하도록 하는 생체내 생물학적 활성을 갖는, 본원에 기술된 에리트로포이에틴 당단백질의 잔기(즉, 화학식 1에 나타난 카보닐과 아미드 결합을 형성하는 아미노기(들)가 없음)이다.

본 발명의 바람직한 태양에서, R은 메틸이다. 바람직하게는, m은 약 650 내지 약 750이고, n은 바람직하게는 1이다.

본 발명의 가장 바람직한 태양에서, R은 메틸이고, m은 약 650 내지 약 750이고, n은 1인데, 이는 하기 화학식 3의 전술한 컨쥬게이트이다:

화학식 3



$_n$ -P

상기 식에서, m은 650 내지 750이고, n은 1이고, P는 전술한 바와 같다.

바람직하게는 M은 약 680의 평균치를 갖는다.

바람직하게는, 전술한 컨주계이트종의 당단백질은 인간의 에리트로포이에틴이다. 인간의 에리트로포이에틴 및 상기 정의된 유사 단백질은 내인성 유전자 활성화에 의해 발현될 수 있다. 바람직한 인간의 에리트로포이에틴 당단백질은 SEQ ID NO:1 및 SEQ ID NO:2인 것이고, 가장 바람직하게는 SEQ ID NO:1인 것이다.

또한, P는 인간의 에리트로포이에틴 및 1 내지 6개의 추가적인 포도당화 부위를 갖는 그의 유사체의 잔기로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있다. 아래에 자세히 기술하는 바와 같이, EPO의 제조 및 정제는 당해 분야에 널리 공지되어 있다. EPO는 천연 또는 재조합 단백질, 바람직하게는 조직, 단백질 합성, 천연 또는 재조합 세포를 사용한 세포 배양 같은 임의의 통상적인 공급원으로부터 수득되는 인간의 EPO이다. 유데인 또는 달리 개질된 단백질 같은 EPO의 활성을 갖는 임의의 단백질이 포함된다. 재조합 EPO는 재조합 DNA 기법에 의해 또는 내인성 유전자 활성화에 의해 CHO-, BHK- 또는 HeLa 세포주에서 발현시킴으로써 제조될 수 있다. 내인성 유전자 활성화를 통해 EPO를 비롯한 단백질을 발현시키는 것은 당해 분야에 잘 공지되어 있고, 예컨대 미국 특허 제 5,733,761 호, 제 5,641,670 호 및 제 5,733,746 호, 및 국제 특허 공개 WO 93/09222 호, WO 94/12650 호, WO 95/31560 호, WO 90/11354 호, WO 91/06667 호 및 WO 91/09955 호에 개시되어 있으며, 이들 각각의 내용은 본원에 참고로 인용되어 있다. 에리트로포이에틴 당단백질 생성물을 제조하기 위한 바람직한 EPO류는 인간의 EPO류이다. 더욱 바람직하게는, EPO류는 SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2에 기재된 아미노산 서열, 더욱 바람직하게는 아미노산 서열 SEQ ID NO:1을 갖는 인간의 EPO이다.

하나의 실시태양에서, P는 1 내지 6개의 추가적인 포도당화 부위를 갖는 당단백질 유사체의 잔기일 수 있다. 하나 이상의 올리고사카라이드 기에 의한 단백질의 포도당화는 폴리펩티드 주쇄를 따라 특정 위치에서 일어나고, 단백질 안정성, 분비, 세포내 위치 및 생물학적 활성 같은 단백질의 물리적 특성에 큰 영향을 끼친다. 포도당화는 통상 2가지 유형이 있다. 0-결합된 올리고사카라이드는 세린 또는 트레오닌 잔기에 부착되고, N-결합된 올리고사카라이드는 아스파라긴 잔기에 부착된다. N-결합된 올리고사카라이드 및 0-결합된 올리고사카라이드 둘 다에서 발견되는 올리고사카라이드의 한 유형은 N-아세틸뉴라민산(시알산)이며, 이는 9개 이상의 탄소 원자를 함유하는 아미노 당의 일원이다. 시알산은 통상 N-결합된 올리고사카라이드 및 0-결합된 올리고사카라이드상의 말단 잔기이며, 이는 시알산이 음전하를 가져 당단백질에 산성 특성을 부여하기 때문이다. 165개의 아미노산을 갖는 인간의 에리트로포이에틴은 당단백질의 전체 분자량의 약 40%를 차지하는 3개의 N-결합된 올리고사카라이드 쇠 및 한 개의 0-결합된 올리고사카라이드 쇠를 함유한다. N-결합된 포도당화는 24, 38 및 83 위치에 위치하는 아스파라긴 잔기에서 일어나고, 0-결합된 포도당화는 126 위치에 존재하는 세린 잔기에서 발생한다. 올리고사카라이드 쇠는 말단 시알산 잔기로 개질된다. 포도당화된 에리트로포이에틴으로부터 모든 시알산을 효소에 의해 제거하면 생체내 활성은 손실되지만 시험관내 활성은 손실되지 않는데, 에리트로포이에틴의 시알화는 간의 결합 단백질에 의한 그의 결합 및 후속되는 제거를 방해하기 때문이다.

본 발명의 당단백질은 인간의 에리트로포이에틴의 아미노산 서열에서 하나 이상이 변화된(이로 인해 시알산 부착 부위의 수가 증가하게 된다) 인간의 에리트로포이에틴의 유사체를 포함한다. 이들 당단백질 유사체는 포도당화에 이용가능한 부위를 증가시키거나 변화시키는 아미노산 잔기의 첨가, 결실 또는 치환을 갖는 부위-유도된 변이유발에 의해 생성될 수 있다. 인간의 에리트로포이에틴에서 발견되는 것보다 더 큰 시알산 함량을 갖는 당단백질 유사체는 생물학적 활성에 필요한 2차 또는 3차 구조를 교란시키지 않는 포도당화 부위를 첨가함으로써 생성된다. 본 발명의 당단백질은 또한 N-결합 부위 또는 0-결합 부위에 인접한 하나 이상의 아미노산의 치환을 통상적으로 포함하는 포도당화 부위에서의 탄수화물 부착의 수준이 증가된 유사체도 포함한다. 본 발명의 당단백질은 또한 에리트로포이에틴의 카복시 말단으로부터 연장된 하나 이상의 아미노산을 갖고 하나 이상의 추가적인 탄수화물 부위를 제공하는 유사체도 포함한다. 본 발명의 당단백질은 또한 하나 이상의 포도당화 부위의 재배치를 포함하는 아미노산 서열을 갖는 유사체도 포함한다. 이러한 포도당화 부위의 재배치는 인간의 에리트로포이에틴에서 하나 이상의 포도당화 부위를 결실시키고 하나 이상의 비-천연 발생 포도당화 부위를 첨가함을 포함한다. 에리트로포이에틴상의 탄수화물 쇠의 수의 증가 및 이에 따른 에리트로포이에틴 분자당 시알산의 수의 증가는 증가된 가용성, 단백질 가수분해에 대한 보다 큰 저항성, 감소된 면역원성, 증가된 혈청내 반감기 및 증가된 생물학적 활성 같은 유리한 특성을 부여할 수 있다. 추가적인 포도당화 부위를 갖는 에리트로포이에틴 유사체는 1995년 3월 1일자로 공개된 유럽 특허원 제 640 619 호(엘리엇(Elliott))에 더욱 자세하게 개시되어 있다.

바람직한 실시태양에서, 본 발명의 당단백질은 하기로부터 선택된 개질에 의해 개질된 인간의 에리트로포이에틴의 서열을 포함하는 에리트로포이에틴을 포함하지만 이로 한정되지는 않는 하나 이상의 추가적

인 포도당화 부위를 포함하는 아미노산 서열을 포함한다:

- Asn³⁰Thr³²;
- Asn⁵¹Thr⁵³;
- Asn⁵⁷Thr⁵⁹;
- Asn⁶⁹;
- Asn⁶⁹Thr⁷¹;
- Ser⁶⁸Asn⁶⁹Thr⁷¹;
- Val⁸⁷Asn⁸⁸Thr⁹⁰;
- Ser⁸⁷Asn⁸⁸Thr⁹⁰;
- Ser⁸⁷Asn⁸⁸Gly⁸⁹Thr⁹⁰;
- Ser⁸⁷Asn⁸⁸Thr⁹⁰Thr⁹²;
- Ser⁸⁷Asn⁸⁸Thr⁹⁰Ala¹⁶²;
- Asn⁶⁹Thr⁷¹Ser⁸⁷Asn⁸⁸Thr⁹⁰;
- Asn³⁰Thr³²Val⁸⁷Asn⁸⁸Thr⁹⁰;
- Asn⁸⁹Ile⁹⁰Thr⁹¹;
- Ser⁸⁷Asn⁸⁹Ile⁹⁰Thr⁹¹;
- Asn¹³⁶Thr¹³⁸;
- Asn¹³⁸Thr¹⁴⁰;
- Thr¹²⁵; and
- Pro¹²⁴Thr¹²⁵.

아미노산 서열의 개질에 대한 본원의 표시는 윗첨자 숫자(들)로 표시된 상응하는 개질되지 않은 단백질(예컨대, SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 hEPO)의 위치(들)가 개별적인 윗첨자 숫자(들) 바로 앞의 아미노산(들)으로 변화됨을 의미한다.

당단백질은 또한 당단백질의 카복시 말단에 하나 이상의 추가적인 아미노산을 갖는 유사체도 포함할 수 있으며, 이 때 추가적인 아미노산은 하나 이상의 글리코실화 부위를 포함한다. 즉, 상기 정의된 컨쥬게이트는 당단백질이 인간의 에리트로포이에틴의 서열 및 인간의 에리트로포이에틴 서열의 카복시 말단에서의 제 2 서열을 포함하는 서열을 갖는 화합물도 지칭하며, 이 때 제 2 서열은 하나 이상의 포도당화 부위를 함유한다. 추가적인 아미노산은 인간의 융모성 성선자극호르몬의 카복시 말단으로부터 유도된 펩티드 단편을 포함할 수 있다. 바람직하게는, 당단백질은 (a) 카복시 말단으로부터 연장되는 아미노산 서열 Ser Ser Ser Ser Lys Ala Pro Pro Pro Ser Leu Pro Ser Pro Ser Arg Leu Pro Gly Pro Ser Asp Thr Pro Ile Leu Pro Gln(SEQ ID NO:3)을 갖는 인간의 에리트로포이에틴, (b) Ser⁸⁷Asn⁸⁸Thr⁹⁰ EPO를 추가로 포함하는 (a)의 유사체, 및 (c) Asn³⁰Thr³²Val⁸⁷Asn⁸⁸Thr⁹⁰ EPO를 추가로 포함하는 (a)의 유사체로 이루어진 군으로부터 선택되는 유사체이다.

당단백질은 또한 하나 이상의 포도당화 부위의 재배치를 포함하는 아미노산 서열을 갖는 유사체일 수도 있다. 재배치는 인간의 에리트로포이에틴의 N-결합된 탄수화물 부위중 임의의 것을 결실시키는 것과 인간의 에리트로포이에틴의 아미노산 서열의 88 위치에 N-결합된 탄수화물 부위를 첨가하는 것을 포함한다. 바람직하게는, 당단백질은 Gln²⁴Ser⁸⁷Asn⁸⁸Thr⁹⁰ EPO; Gln³⁸Ser⁸⁷Asn⁸⁸Thr⁹⁰ EPO, 및 Gln⁸³Ser⁸⁷Asn⁸⁸Thr⁹⁰ EPO로 이루어진 군으로부터 선택된 유사체이다.

본원에서 사용된 "저급 알킬"은 1 내지 6개의 탄소원자를 갖는 선형 또는 분지된 알킬기이다. 저급 알킬기의 예는 메틸, 에틸 및 이소프로필을 포함한다. 본 발명에 따라, R은 임의의 저급 알킬이다. R이 메틸인 컨쥬게이트가 바람직하다.

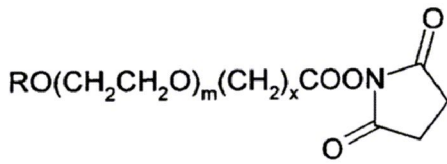
기호 "m"은 폴리(에틸렌 옥사이드)기중 에틸렌 옥사이드 잔기(OCH₂CH₂)의 수를 나타낸다. 에틸렌 옥사이드의 단일 PEG 서브단위는 약 44돌턴의 분자량을 갖는다. 따라서, (EPO의 분자량을 제외한) 컨쥬게이트의 분자량은 숫자 "m"에 따라 달라진다. 본 발명의 컨쥬게이트에서 "m"은 약 450 내지 약 900(약 20 내지 약 40kDa의 분자량에 상응함), 바람직하게는 약 650 내지 약 750(약 30kDa의 분자량에 상응함)이다. 숫자 m은 본 발명의 컨쥬게이트가 개질되지 않은 EPO에 필적할만한 생리학적 활성을 갖도록 선택되는데, 상기 활성은 개질되지 않은 EPO의 상응하는 활성과 동일하거나, 그 활성 이상이거나, 또는 그 활성의 일부일 수 있다. "약" 어떤 수의 분자량은 이것이 통상적인 분석 기법에 의해 결정된 숫자의 적절한 범위 내에 있음을 의미한다. 숫자 "m"은 에리트로포이에틴 당단백질에 공유 결합된 각 폴리(에틸렌 글리콜)기의 분자량이 약 20 내지 약 40kDa, 바람직하게는 약 30kDa이 되도록 선택된다.

본 발명의 컨쥬게이트에서, "n"이란 수는 에리트로포이에틴 단백질의 자유 아미노기(라이신 아미노산의 ε-아미노기 및/또는 아미노-말단 아미노기를 포함함)에 아미드 결합(들)을 통해 공유 결합된 폴리에틸

렌 글리콜기의 수이다. 본 발명의 컨주게이트는 EP0의 분자당 1, 2 또는 3개의 PEG기를 가질 수 있다. "n"은 1 내지 3의 정수이고, 바람직하게는 1 또는 2이고, 보다 바람직하게는 1이다.

화학식 1의 화합물은 하기 화학식 4의 공지된 중합체 물질을 에리트로포이에틴 당단백질과 축합반응시킴으로써 화학식 4의 화합물로부터 제조될 수 있다:

화학식 4



상기 식에서,

R 및 m은 상기 정의된 바와 같다.

x가 3인 화학식 4의 화합물은 폴리(에틸렌 글리콜)의 α-저급 알콕시, 부티르산 숙신이미딜 에스테르(저급 알콕시-PEG-SBA)이다. x가 2인 화학식 4의 화합물은 폴리(에틸렌 글리콜)의 α-저급 알콕시, 프로피온산 숙신이미딜 에스테르(저급 알콕시-PEG-SPA)이다. 활성화된 에스테르를 아민과 반응시켜 아마이드를 형성하는 임의의 공지된 방법이 사용될 수 있다. 상술된 반응에서, 예시된 숙신이미딜 에스테르는 아마이드 형성을 일으키는 이탈기이다. 단백질과 함께 컨주게이트를 제조하기 위한 숙신이미딜 에스테르, 예컨대 화학식 4의 화합물의 사용은 해리스(Harris) 등에게 1997년 9월 30일자로 허여된 미국 특허 제 5,672,662호에 개시되어 있다.

인간 EP0는 9개의 자유 아미노기, 즉 하나의 아미노-말단 아미노기 및 8개의 라이신 잔기의 ε-아미노기를 함유한다. 폴리에틸렌 글리콜화(pegylation) 시약을 화학식 4의 SBA 화합물과 배합할 경우, pH 7.5에서의 단백질 대 PEG 비는 1:30이고, 반응 온도는 20 내지 25°C이며, 모노-폴리에틸렌 글리콜화류, 디-폴리에틸렌 글리콜화류 및 미량의 트리-폴리에틸렌 글리콜화류의 혼합물이 생성되었다. 폴리에틸렌 글리콜화 시약이 화학식 4의 SPA 화합물일 경우, 단백질 대 PEG의 비가 1:2임을 제외하고는 동일한 조건에서 주로 모노-폴리에틸렌 글리콜화류가 생성된다. 폴리에틸렌 글리콜화된 EP0는 혼합물로서, 또는 양이온 교환 크로마토그래피에 의해 분리된 상이한 폴리에틸렌 글리콜화류로서 투여될 수 있다. 반응 조건(예를 들면, 시약의 비, pH, 온도, 단백질 농도, 반응 시간 등)을 조작함으로써, 상이한 폴리에틸렌 글리콜화류의 상대량이 달라질 수 있다.

인간 에리트로포이에틴(EP0)은 적혈구의 생성을 자극하는 인간 당단백질이다. 이의 제법 및 치료 용도는 예를 들면 미국 특허 제 5,547,933호 및 제 5,621,080호, EP-B 0 148 605호, 후양(Huang, S.L.)의 문헌[Proc. Natl. Acad. Sci. USA(1984), 2708-2712], EP-B 0 205 564호, EP-B 0 209 539호 및 EP-B 0 411 678호 뿐만 아니라 라이(Lai, P.H.) 등의 문헌[J. Biol. Chem. 261(1986), 3116-3121], 사사키(Sasaki, H.) 등의 문헌[J. Biol. Chem. 262(1987), 12059-12076]에 기재되어 있다. 치료용의 에리트로포이에틴은 재조합 수단에 의해 제조될 수 있다(EP-B 0 148 605호, EP-B 0 209 539호 및 에그리에(Egrie, J.C.), 스트릭랜드(Strickland, T.W.), 라인(Lane, J.) 등의 문헌 [Immunobiol.(1986) 72:213-224]).

무혈청 배지에서 에리트로포이에틴을 발현시키고 제조하기 위한 방법은 1996년 11월 14일자로 공개된 버그(Burg)의 국제특허공개공보 W0 96/35718호, 및 1992년 6월 12일자로 공개된 코흐(Koch)의 유럽특허공개공보 513 738호에 기재되어 있다. 상술된 공개공보 뿐만 아니라, EP0 유전자를 함유하는 재조합 CHO 세포의 무혈청 발효가 수행될 수 있다고 알려져 있다. 이러한 방법은 EP-A 0 513 738호, EP-A 0 267 678호 및 가와모토(Kawamoto, T.) 등의 문헌[Analytical Biochem. 130(1983) 445-453], EP-A 0 248 656호, 코와르(Kowar, J.) 및 프라넥(Franek, F.)의 문헌[Methods in Enzymology 421 (1986) 277-292], 바비스터(Bavister, B.)의 문헌[Expcology 271 (1981) 45-51], EP-A 0 481 791호, EP-A 0 307 247호, EP-A 0 343 635호, 국제특허공개공보 W0 88/00967호에 기재되어 있다.

EP-A 0 267 678호에는, S-세파로스상에서의 이온 교환 크로마토그래피, C₈상에서의 제조용 역상 HPLC 및 겔 여과 크로마토그래피가 투석 이후에 무혈청 배양시 생성되는 EP0의 정제를 위해 기재되어 있다. 상기와 관련하여, 겔 여과 크로마토그래피 단계는 S-세파로스상에서의 이온 교환 크로마토그래피에 의해 신속히 대체될 수 있다. 또한, 블루 트리사크릴(Blue Trisacryl) 칼럼상의 염료 크로마토그래피가 이온 교환 크로마토그래피 이전에 수행될 수 있다고 제안된다.

재조합 EP0의 정제 방법은 노부오(Nobuo, I) 등의 문헌[J. Biochem. 107 (1990) 352-359]에 기재되어 있다. 상기 방법에서 EP0는 정제 단계 이전에 트윈(Tween, 등록상표) 20, 페닐메틸설포닐 플루오라이드, 에틸말레이미드, 펙스타틴 A, 황화구리 및 옥삼산의 용액으로 처리된다. 1996년 11월 14일자로 공개된 버그(Burg)의 국제특허공개공보 W0 96/35718호를 비롯한 문헌에는 무혈청 발효 공정에서 에리트로포이에틴(EP0sf)을 제조하는 방법이 개시되어 있다.

본 발명에 따른 EP0 또는 EP0 컨주게이트의 특이적 활성은 당 분야에 공지된 다양한 검정에 의해 결정될 수 있다. 본 발명의 정제된 EP0 단백질의 생물학적 활성은, 인간 환자에게 EP0 단백질을 주사하여 투여한 결과 주사되지 않은 대상 또는 대조군의 대상과 비교하여 골수 세포가 망상적혈구 및 적혈 세포의 생산을 증가시키도록 하는 것이다. 본 발명에 따라 수득되고 정제된 EP0 단백질 또는 이의 단편의 생물학적 활성은 아나블(Annable) 등의 문헌[Bull. Wild. Hlth. Org. (1972) 47:99-112] 및 문헌[Pharm. Europa Spec. Issue Erythropoietin BRP Bio 1997(2)]에 따른 방법에 의해 시험될 수 있다. EP0 단백질의 활

성을 측정하기 위한 또다른 생물학적 검정, 즉 정상적혈구의 마우스 검정이 실시예 4에 기재되어 있다.

본 발명은 상술된 바와 같은 컨쥬게이트로 이루어진 조성물을 제공한다. 90% 이상의 모노-PEG 컨쥬게이트, 즉 n이 1인 컨쥬게이트를 함유하는 조성물은 실시예 5에 제시된 바와 같이 제조될 수 있다. 일반적으로 에리트로포이에틴 당단백질의 모노-PEG 컨쥬게이트는 이들이 디-PEG 컨쥬게이트 보다 높은 활성을 갖는 경향이 있으므로 바람직하다. 모노- 및 디-PEG 컨쥬게이트의 비 뿐만 아니라 모노-PEG 컨쥬게이트의 백분율은, 조성물중 보다 넓은 분획을 용출 피크 주위로 풀링(pooling)하여 모노-PEG의 백분율을 감소시키거나 조성물중 보다 좁은 분획을 풀링하여 모노-PEG의 백분율을 증가시킴으로써 조절될 수 있다. 약 90%의 모노-PEG 컨쥬게이트는 수율 및 활성의 양호한 균형을 이룬다. 때때로, 예를 들면 90% 이상 또는 96% 이상의 컨쥬게이트가 모노-PEG류 (n=1)인 조성물이 바람직할 수 있다. 본 발명의 한 양태에서, n이 1인 컨쥬게이트의 백분율은 90% 내지 96%이다.

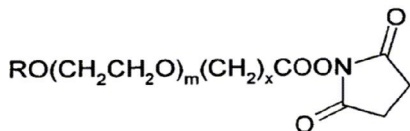
본 발명은 또한 컨쥬게이트 또는 상술된 바와 같은 조성물 및 약학적으로 허용가능한 부형제를 포함하는 상응하는 약학 조성물에 관한 것이다.

본 발명의 컨쥬게이트 및 조성물은 만성 신부전증 환자(CRF), 화학요법이 진행중인 AIDS 및 암 환자에서의 빈혈과 관련된 질환을 예방하고 치료하기 위한 약제의 제조를 위해 특히 유용하다.

본 발명의 추가의 양태는 환자에게 상술된 바와 같은 조성물을 투여하는 단계를 포함하는, 만성 신부전증 환자(CRF), 화학요법이 진행중인 AIDS 및 암 환자에서의 빈혈과 관련된 질환을 예방하고/하거나 치료하기 위한 방법에 관한 것이다.

추가로, 본 발명은 하기 화학식 4의 화합물과 에리트로포이에틴 당단백질을 축합시킴을 포함하는, 상기 기술된 바와 같은 화합물의 제조 방법에 관한 것이다:

화학식 4



상기 식에서,

R, m 및 x는 상기 정의된 바와 같다.

본 발명은 또한 만성 신부전증 환자(CRF), 화학요법이 진행중인 AIDS 및 암 환자에서의 빈혈과 관련된 질환을 치료하기 위한 상술된 바와 같은 화합물에 관한 것이다.

본 발명은, 본원에 기술된 발명을 예시하지만 한정하는 것은 아닌 하기 실시예를 참조하여 보다 잘 이해될 것이다.

실시예

실시예 1: 인간 EPO의 발효 및 정제

a) 접종물의 제조 및 발효

EPO-생성 CHO 세포주(EP 411 678호(Genetics Institute)에 개시된 ATCC CRL8695이 사용될 수 있다)로부터 기원한 1바이알(vial)의 워킹 셀 뱅크(Working Cell Bank)를 액체 질소 저장 탱크의 기체상으로부터 취한다. 세포를 유리 스피너(spinner) 플라스크에 도입하고 가습된 CO₂ 인큐베이터에서 탄화수소-완충된 배지중에 배양시켰다. 접종물 제조 및 발효를 위해 사용되는 전형적인 무혈청 배지는 1992년 6월 12일자로 공개된 코흐의 유럽특허출원 제 513 738호, 또는 1996년 11월 14일자로 공개된 버그의 WO 96/35718호에 개시되어 있고, 예를 들면 배지로서 DMEM/F12(예컨대, JRH Biosciences/Hazleton Hiologics, Denver, US, order No. 57-736) 및 추가로 탄화수소나트륨, 나글루타민, D+글루코즈, 재조합 인슐린, 소듐 셀레나이트, 디아미노부탄, 하이드로코르티손, 황산제일철, 아스파라긴, 아스파르트산, 세린 및 포유동물 세포용 안정화제, 예를 들면 폴리비닐 알코올, 메틸 셀룰로스, 폴리덱스트란, 폴리에틸렌 글리콜, 플루로닉(Pluronic) F68, 혈장 팽창제 폴리켈린(HEMACCEL; 등록상표) 또는 폴리비닐 피롤리돈(WO 96/35718호)를 함유한다.

오염된 미생물이 없는지에 대해 배양물을 현미경으로 확인하고, 세포 밀도를 측정한다. 이 시험은 각각 분리된 단계로 수행한다.

초기 성장 기간 후, 세포 배양물을 출발 세포 밀도가 되도록 새로운 배지로 희석하고 또다른 성장 주기를 진행시킨다. 이 절차는 유리 스피너 플라스크당 약 21배의 배양 부피가 수득될 때까지 반복한다. 약 12배로한 후, 상기 배양액의 1 내지 5ℓ가 이용될 수 있고, 이를 10ℓ 접종 발효기에 대한 접종물로서 사용한다.

3 내지 5일 후, 10ℓ 발효기중의 배양액을 100ℓ 접종 발효기에 대한 접종물로서 사용할 수 있다.

추가로 3 내지 5일 배양한 후, 100ℓ 발효기중의 배양액을 1000ℓ 생산 발효기에 대한 접종물로서 사용할 수 있다.

b) 수거 및 세포 현탁

회분식 재공급 공정이 사용되는데, 즉 원하는 세포 밀도에 도달하면, 약 80%의 배양물을 수거한다. 남은 배양물에 새로운 배양 배지를 다시 공급하고 다음 수거까지 배양한다. 1회 생산 과정은 최대 10회의 일련의 수거, 즉 9회의 부분적인 수거 및 배양 종결시의 1회의 완전한 수거로 이루어진다. 수거는 3 내

지 4일 마다 수행한다.

측정된 부피의 수거물을 냉각 용기내로 옮긴다. 세포를 원심분리나 여과에 의해 제거한 후 버린다. 원심분리 단계에서 EPO를 함유한 상청액을 인-라인(in-line)으로 여과하고, 제 2 냉각 용기에 수집한다. 각각의 수거물을 정제 동안에 별도로 가공한다.

EPO 단백질을 정제하기 위한 전형적인 방법은 1996년 11월 14일자로 공개된 버그의 국제특허공개공보 WO 96/35718호에 개시되어 있다. 정제 단계는 하기에 설명되어 있다:

a) 블루 세파로즈 크로마토그래피

블루 세파로즈[파마샤(Pharmacia) 제품]는 표면에 시바크론(Cibacron) 블루 염료가 공유 결합되어 있는 세파로즈 비드(bead)로 이루어져 있다. EPO는 대부분의 비-단백질성 오염물, 몇몇 단백질성 불순물 및 PVA에 비해 블루 세파로즈에 보다 강하게 결합되므로, EPO는 이 단계에서 농축될 수 있다. 블루 세파로즈 칼럼의 용출은 pH 뿐만 아니라 염 농도를 증가시킴으로써 수행된다.

칼럼에 80 내지 100 l의 블루 세파로즈를 충전시키고, NaOH로 재생시키고, 평형화 완충액(염화나트륨/염화칼슘 및 아세트산나트륨)으로 평형화시킨다. 산성화되고 여과된 발효기 상청액을 적재한다. 적재를 완료한 후, 염화나트륨을 보다 고농도로 함유한, 평형화 완충액과 유사한 완충액으로 우선 칼럼을 세척하고, 이어 트리스-염기 완충액으로 세척한다. 생성물은 트리스-염기 완충액으로 용출시키고, 주 용출 프로파일(master elution profile)에 따라 단일 분획물로 수집한다.

b) 부틸 토요펄(Toyopearl) 크로마토그래피

부틸 토요펄 650C[토소 하스(Toso Haas) 제품]는 지방족 부틸 잔기가 공유 결합된 폴리스티렌 기제 매트릭스이다. EPO는 대부분의 불순물 및 PVA에 비해 상기 겔에 보다 강하게 결합하므로, 이소프로판올을 함유한 완충액으로 용출되어야 한다.

칼럼에 30 내지 40 l의 부틸 토요펄 650C를 충전시키고, NaOH로 재생시키고, 트리스-염기 완충액으로 세척하고, 이소프로판올을 함유하는 트리스-염기 완충액으로 평형화시킨다.

블루 세파로즈 용출물을 칼럼 평형화 완충액중의 이소프로판올의 농도로 조정하고 칼럼상에 적재한다. 이어, 이소프로판올의 농도를 증가시키면서 칼럼을 평형화 완충액으로 세척한다. 생성물을 용출 완충액(이소프로판올 함량이 높은 트리스-염기 완충액)으로 용출시키고, 주 용출 프로파일에 따라 단일 분획물로 수집한다.

c) 하이드록시아파타이트 울트로겔(Hydroxyapatite Ultrogel) 크로마토그래피

하이드록시아파타이트 울트로겔[비오세프라(Biosepra) 제품]은 아가로스 매트릭스내에 혼입되어 기계적 성질이 개선된 하이드록시아파타이트로 이루어져 있다. EPO는 하이드록시아파타이트에 대해 낮은 친화성을 가지므로, 단백질 불순물에 비해 낮은 포스페이트 농도에서 용출될 수 있다.

칼럼을 30 내지 40 l의 하이드록시아파타이트 울트로겔로 충전시키고, 인산칼륨/염화칼슘 완충액 및 NaOH로, 이어 트리스-염기 완충액으로 재생시킨다. 이어서, 이소프로판올 및 염화나트륨을 적은 양으로 함유하는 트리스-염기 완충액으로 칼럼을 평형화시킨다.

부틸 토요펄 크로마토그래피의 EPO 함유 용출물을 칼럼에 적재한다. 그런 다음, 칼럼을 평형화 완충액, 및 이소프로판올과 염화나트륨을 함유하지 않은 트리스-염기 완충액으로 세척한다. 생성물을 인산칼륨을 저농도로 함유하는 트리스-염기 완충액과 함께 용출시키고, 주 용출 프로파일에 따라 단일 분획물로 수집한다.

d) 비닥(Vydac) C4상의 역상 HPLC

RP-HPLC 물질 비닥 C4[비닥(Vydac) 제품]는 표면에 C₄ 알킬 쇄를 갖는 실리카 겔 입자로 이루어져 있다. 단백질성 불순물로부터의 EPO의 분리는 소수성 상호작용의 강도에 차이를 근거로 한다. 희석된 트리플루오로아세트산중의 아세토니트릴 구배에 의해 용출시킨다.

제조용 HPLC는 스테인레스 스틸 칼럼(이는, 2.8 내지 3.2 l의 비닥 C4 실리카 겔로 충전됨)을 사용하여 수행한다. 트리플루오로아세트산을 첨가하여 하이드록시아파타이트 울트로겔 용출물을 산성화시키고, 비닥 C4 칼럼상에 적재한다. 세척 및 용출을 위해, 희석된 트리플루오로아세트산중의 아세토니트릴 구배를 사용한다. 분획물을 수집하고, 즉시 포스페이트 완충액으로 중화시킨다. IPC 제한범위내에 있는 EPO 분획물을 푸울링한다.

e) DEAE 세파로즈 크로마토그래피

DEAE 세파로즈(파마샤 제품) 물질은 세파로즈 비드의 표면에 공유 결합된 디메틸아미노에틸(DEAE)-기로 이루어져 있다. DEAE 기로의 EPO의 결합은 이온 상호작용에 의해 조정된다. 아세토니트릴 및 트리플루오로아세트산을 보유시키지 않고 칼럼을 통해 통과시킨다. 이들 물질이 세척되어 나간 후, 낮은 pH에서 아세테이트 완충액으로 칼럼을 세척하여 미량의 불순물을 제거한다. 이어, 칼럼을 중성 포스페이트 완충액으로 세척하고, EPO를 증가된 이온 강도의 완충액으로 용출시킨다.

칼럼에 DEAE 세파로즈를 신속한 흐름으로 충전시킨다. 칼럼 부피를 조정하여 겔 1ml당 3 내지 10mg의 EPO의 범위로 EPO를 적재하도록 한다. 칼럼을 물 및 평형화 완충액(인산나트륨/칼륨)으로 세척한다. HPLC 용출물의 푸울링된 분획물을 적재하고, 칼럼을 평형화 완충액으로 세척한다. 이어, 칼럼을 세척 완충액(아세트산나트륨 완충액)으로 세척한 후, 평형화 완충액으로 세척한다. 그런 다음, EPO를 용출 완충액(염화나트륨, 인산나트륨/칼륨)으로 칼럼으로부터 용출시키고, 주 용출 프로파일에 따라 단일 분획물로 수집한다.

DEAE 세파로즈 칼럼의 용출물을 규정된 전도도로 조정한다. 생성된 약제 물질을 테플론(Teflon) 병내로 멸균 여과시키고, -70℃에서 저장한다.

실시예 2: mPEG-SBA에 의한 EPO의 폴리에틸렌 글리콜화

실시예 1의 무혈청 과정에 따라 정제된 EPO(EPOsf)는 분석 방법에 의해 측정된 결과 균질하였고, 8개의 아이소폼(isoform)으로 이루어진 전형적인 아이소폼 패턴을 나타내었다. 이는 정상적혈구 마우스 검정에 의해 측정된 결과 190,000IU/mg의 특이적인 생물학적 비활성을 가졌다. 사용된 폴리에틸렌 글리콜화 시약은 메톡시-PEG-SBA이고, 이는 ROI 메틸이고, x가 30이며, m이 650 내지 750(평균 약 680, 약 30kDa의 평균 분자량에 상응함)인 화학식 4의 화합물이다.

폴리에틸렌 글리콜화 반응

EPOsf(10.3mg/ml EPOsf 스탁 9.71ml, 5.48마이크로몰) 100g에, 30kDa의 메톡시PEG-SBA(16.5마이크로몰)[알라바마주 헌트스빌 소재의 쉬어워터 폴리머스, 인코포레이티드(Shearwater Polymers, Inc.) 제품] 506mg을 포함하는 0.1M 인산칼륨 완충액 10ml(pH 7.5)을 첨가하고, 2시간 동안 실온(20 내지 23℃)에서 혼합하였다. 최종 단백질 농도는 5mg/ml이었고, 단백질 대 PEG 시약의 비는 1:30이었다. 2시간 후, 빙 초산으로 pH를 4.5로 조정함으로써 반응을 중단시킨 후, 정제할 준비가 될때까지 -20℃에서 저장하였다.

정제

1. 컨쥬게이트 혼합물: SP-세파로즈 FF(설폰-프로필 양이온 교환 수지) 약 28ml를 아미콘(AMICON) 유리 칼럼(2.2×7.5cm)내에 충전시키고 pH 4.5의 20mM 아세테이트 완충액으로 150ml/h의 유속으로 평형화시켰다. 단백질 30mg을 함유하는 반응 혼합물 6ml를 평형화 완충액으로 5배 희석시키고 칼럼상에 적용하였다. 흡착되지 않은 물질을 완충액으로 세척하여 제거하고, 흡착된 PEG 컨쥬게이트 혼합물을 평형화 완충액중 0.175M NaCl로 칼럼으로부터 용출시켰다. 아직 칼럼상에 남아있는 개질되지 않은 EPOsf는 750mM NaCl로 용출시켰다. 칼럼을 출발 완충액으로 재평형화시켰다. 샘플을 SDS-PAGE로 분석하고, 폴리에틸렌 글리콜화 정도를 측정하였다. 0.175M NaCl 용출물은 모노-폴리에틸렌 글리콜화류 뿐만 아니라 디-폴리에틸렌 글리콜화류 및 미량의 트리-폴리에틸렌 글리콜화류를 함유하고, 750mM NaCl 용출물은 개질되지 않은 EPOsf를 함유함이 밝혀졌다.

2. 디-PEG 및 모노-EPOsf: 이전 단계에서 칼럼으로부터 용출된 정제된 컨쥬게이트 혼합물을 완충액으로 4배 희석하고, 칼럼에 다시 적용하고, 상술된 바와 같이 세척하였다. 디-PEG-EPOsf 및 모노-PEG-EPOsf를 각각 0.1M NaCl 및 0.175M NaCl로 칼럼으로부터 별도로 용출시켰다. 또한 750mM NaCl로 용출을 수행하여 남아있는 개질되지 않은 EPOsf를 용출시켰다.

다르게는, 반응 혼합물을 아세테이트 완충액으로 5배 희석하고, SP-세파로즈 칼럼(약 0.5mg 단백질/ml 겔)상에 적용하였다. 칼럼을 세척하고, 흡착된 모노-PEG-EPOsf, 디-PEG-EPOsf 및 개질되지 않은 EPOsf를 상기 섹션에 기술된 바와 같이 용출시켰다.

결과

수평균 분자량이 30kDa인 선형 PEG 분자를 화학적으로 컨쥬게이팅시킴으로써 PEG-EPOsf를 합성하였다. EPOsf의 1차 아미노기와 30kDa의 PEG-부티르산의 숙신이미딜 에스테르 유도체 간의 반응에 의한 아미드 결합으로부터 PEG-EPOsf를 유도하였다.

결과를 표 1에 요약하였다. 정제된 컨쥬게이트 혼합물은, SDS-PAGE 분석으로 측정된 결과, 모노-PEG-EPOsf 및 디-PEG-EPOsf로 이루어지고, 개질되지 않은 EPOsf를 함유하지 않았다. 컨쥬게이트 혼합물은 23.4mg 또는 78%의 출발 물질이 차지한다. 모노-PEG-EPOsf 및 디-PEG-EPOsf를 양이온 교환 크로마토그래피로 분리한 결과, 컨쥬게이트 혼합물중 모노-PEG 대 디-PEG의 비는 대략 1:10이었다. 반응의 완료 후에, 모노-PEG 대 디-PEG 대 개질되지 않은 PEG의 개개 성분의 비는 40:38:20(%)였다. 전체 수율은 거의 정량적이었다.

[표 1]

EPOsf 폴리에틸렌 글리콜화의 결과 요약

샘플	단백질(mg)	수율(%)
Rxn. 혼합물	30	100
모노-PEG	12.0	40
디-PEG	11.4	38
개질되지 않은 PEG	6.0	20
컨쥬게이트 혼합물	23.4	78

실시예 3: mPEG-SPA에 의한 EPO의 폴리에틸렌 글리콜화

실시예 2에서 사용된 EPOsf의 상이한 분량을 30kDa의 메톡시-PEG-SPA(알라바마주 헌트스빌 소재의 쉬어워터 폴리머스 인코포레이티드 제품)와 반응시켰다. 반응을 1:2의 단백질 대 시약의 비로 수행하였고, 정제 기법은 실시예 2에 상응하였다. 주로 모노-폴리에틸렌 글리콜화류가 생성되었다.

실시예 4: 정상적혈구 마우스 검정에 의해 측정된 폴리에틸렌 글리콜화된 EPO의 생체내 활성

정상적혈구 마우스 검정은 당 분야(Pharm. Europa Spec. Issue Erythropoietin BRP Bio 1997(2))에 공지되어 있고, 에리트로포이에틴에 대한 단행문(Ph. Eur. BRP.)에 나타난 방법이다. 샘플을 BSA-PBS로 희

석하였다. 7 내지 15주 자란 건강한 정상적인 마우스에 폴리에틸렌 글리콜화되지 않은 EPO 또는 실시예 2 또는 3으로부터의 트리-, 디- 또는 모노-폴리에틸렌 글리콜화된 EPO를 함유한 EPO-분획물 0.2ml를 피하 주사하였다. 6일만에 걸쳐, 꼬리 정맥을 천자시켜 혈액을 채취하고, 혈액 1 μ l가 0.15마이크로몰의 아크리딘 오렌지 염색액 1ml에 존재하도록 희석하였다. 염색 시간은 3 내지 10분이었다. 적색 형광 히스토그램(red fluorescence histogram)의 분석에 의해 유동 혈구계산기에서 망상적혈구를 미세형광분석적으로 계수하였다. 망상적혈구는 독립적인 형태(분석된 30,000개의 혈 세포당)에 대해서 계수된다. 제시된 데이터에 있어서, 각각의 군은 일일당 5마리의 마우스로 이루어지고, 마우스는 단지 1회 혈액을 채취당한다.

별도의 실험으로, 개질되지 않은 EPO의 단일 용량(EPO의 25ng), 실시예 2로부터의 PEG(SBA)-EPO 혼합물(컨쥬게이트 10ng), 실시예 2로부터의 모노- 및 디-폴리에틸렌 글리콜화된 EPO (컨쥬게이트 10ng), 실시예 3으로부터의 PEG(SPA)-EPO(컨쥬게이트 10ng) 및 완충액을 마우스에 투여하였다. 결과를 표 2에 나타내었다. 이 결과는, 상당히 증가된 양의 망상적혈구 및 망상적혈구 계수 최대치의 변동에 의해, 변형되지 않은 EPO의 경우 25ng의 용량과 비교하여, 마우스 당 동일한 용량(10ng)을 사용한 폴리에틸렌 글리콜화된 EPO류의 우수한 활성 및 연장된 반감기를 보여준다.

[표 2]

	EPO(개질되지 않음)	30kDa의 SPA PEG	모노 30KSBA	디 30KSBA	PEG-EPO SBA 컨쥬게이트 혼합물	대조용 완충액
72시간	1000	1393	1411	994	1328	857
96시간	500	1406	1501	926	1338	697
120시간	약 200	1100	1182	791	944	701
144시간	약 0	535	607	665	660	708

실시예 5: 모노-PEG-EPO의 우세적인 제조법

폴리에틸렌 글리콜화 반응

실시예 1에 따라 제조된 pH 7.5의 100mM 인산칼륨 완충액중 EPOsf 100mg(5.48밀리몰)로 출발하여, 1mM HCl 3ml에 용해된 30kDa의 PEG-SBA 시약 329mg(10.96마이크로몰)을 첨가하였다. 반응 혼합물의 부피를 20ml로 만들기 위해 pH 7.5의 100mM 인산칼륨 완충액의 총분량을 첨가하였다. 최종 단백질 농도는 5mg/ml였고, 단백질 대 PEG 시약의 비는 1:2였다. 반응 혼합물을 2시간 동안 주위 온도(20 내지 22°C)에서 혼합하였다. 2시간 후, 빙초산을 사용하여 pH를 4.5로 조정함으로써 반응을 중단시키고, 정제 준비가 될 때까지 -20°C에서 동결 저장하였다.

정제

이전 단계로부터의 반응 혼합물을 pH 4.5의 10mM 아세트산나트륨으로 1:5로 희석시키고, 4.2×19cm 칼럼에 충전된 300ml의 SP-세파로즈 FF(셀포프릴 양이온 교환 수지)에 적용하였다. 칼럼은 그 전에 동일한 완충액으로 평형화시켜 놓았다. 칼럼 용출물을 280nm에서 길슨(Gilson) UV 모니터로 모니터링하고, 킵 앤 조넨(Kipp and Zonen) 기록기로 기록하였다. 칼럼을 평형화 완충액 300ml 또는 1상(1st bed) 부피로 세척하여 과량의 시약, 반응 부산물 및 올리고머성 PEG-EPO를 제거하였다. 이후, 100mM NaCl의 2상 부피로 세척하여 디-PEG-EPO를 제거하였다. 이어, 200mM NaCl에 의해 모노-PEG-EPO를 용출시켰다. 모노-PEG-EPO의 용출 동안에, 단백질 피크의 최초 50ml를 버리고, 모노-PEG-EPO를 150ml의 분획물로 수집하였다. 칼럼상에 남은 개질되지 않은 EPOsf를 750mM NaCl로 용출시켰다. 모든 용출 완충액을 평형화 완충액으로 제조하였다. 모든 용출된 샘플을 SDS-PAGE 및 고성능 크기 배재 크로마토그래피(SEC)로 분석하였다. 이어, 150ml로부터 수득된 모노-PEG-EPO 푸울(이는 개질되지 않은 EPOsf를 함유하지 않았다)을 약 4.5 내지 7.5mg/ml로 농축시키고, 저장 완충액, 즉 10mM 인산칼륨, 100mM NaCl(pH 7.5)로 여과해내었다. 농축/여과는 주위 온도에서 50kDa의 분자를 거르는 밀리포어 펠리콘 XL 바이오맥스 50 멤브레인(Millipore Pellicon XL Biomax 50 membrane)이 구비된 밀리포어 랩스케일(Millipore LabScale; 등록상표) TFF 시스템으로 수행하였다. 농축된 모노-PEG-EPO를 멸균 여과하고, -20°C에서 동결 저장하였다.

약 75%의 EPOsf가 폴리에틸렌 글리콜화되었다. 정제후에, 총 수율은 모노-PEG-EPO가 약 30%이고, 비개질된 EPOsf는 검출되지 않았으며, 디-PEG-EPO는 약 25%였다. 올리고머, 및 폴리에틸렌 글리콜화되지 않은 EPOsf는 나머지 단백질을 이룬다. 150ml의 분획물로부터 수득된 모노-PEG-EPO 푸울은 약 90%의 모노-PEG-EPO 및 약 10%의 디-PEG-EPO를 함유하였다.

발명의 효과

본 발명에 따라, 종래의 에리트로포이에틴에 비해 증가된 반감기, 혈장내 체류시간, 감소된 제거율 및 증가된 생체내 임상 활성을 갖는 개선된 신규 에리트로포이에틴 컨쥬게이트가 제공되었다.

- <110> F.Hoffmann-La Roche AG
- <120> ERYTHROPOIETIN CONJUGATES
- <150> US 60/142,254
- <151> 1999-07-02

- <150> US 60/150,225
- <151> 1999-08-23
- <150> US 60/151,548
- <151> 1999-08-31
- <150> US 60/166,151
- <151> 1999-11-17
- <160> 3
- <170> KOPATIN 1.5
- <210> 1
- <211> 165
- <212> PRT
- <213> Homo sapiens
- <400> 1

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

- <210> 2
- <211> 166
- <212> PRT
- <213> Homo sapiens
- <400> 2

Ala Pro Pro Arg Leu Ile Cys Asp Ser Arg Val Leu Glu Arg Tyr Leu
 1 5 10 15
 Leu Glu Ala Lys Glu Ala Glu Asn Ile Thr Thr Gly Cys Ala Glu His
 20 25 30

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

- <210> 3
- <211> 28
- <212> PRT
- <213> Homo sapiens
- <400> 3

Ser Ser Ser Ser Lys Ala Pro Pro Pro Ser Leu Pro Ser Pro Ser Arg
 1 5 10 15
 Leu Pro Gly Pro Ser Asp Thr Pro Ile Leu Pro Gln
 20 25

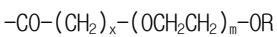
(57) 청구의 범위

청구항 1

하나 이상의 자유 아미노기를 갖고, 골수 세포가 더 많은 양의 망상적혈구 및 적혈구 세포를 생산하도록 하는 생체내 생물학적 활성을 가지며, 인간의 에리트로포이에틴 및 1 내지 6개의 포도당화 부위의 첨가 또는 하나 이상의 포도당화 부위의 재배치에 의해 개질된 인간 에리트로포이에틴의 서열을 갖는 그의 유사체로 이루어진 군으로부터 선택되는 에리트로포이에틴 당단백질을 포함하며, 이 때

상기 당단백질이, 상기 아미노기중 하나와 아미드 결합을 형성하는 각 폴리(에틸렌 글리콜)기의 -CO에 의해 하기 화학식 1의 폴리(에틸렌 글리콜)기 "n"개에 공유 결합되어 있는 컨쥬게이트(conjugate):

화학식 1



상기 식에서,

R은 저급 알킬이고,

x는 2 또는 3이고,

m은 약 450 내지 약 900이며,

n은 1 내지 3이며,

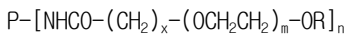
n 및 m은 컨쥬게이트에서 에리트로포이에틴 당단백질을 제외한 분자량이 20kDa 내지 100kDa가 되도록 선택된다.

청구항 2

제 1 항에 있어서,

하기 화학식 2의 컨쥬게이트:

화학식 2



상기 식에서,

x, m, n 및 R은 제 1 항에서 정의된 바와 같고,

P는 폴리(에틸렌 글리콜)기(들)와 아미드 결합(들)을 형성하는 n개의 아미노기(들)가 없는 당단백질의 잔기이다.

청구항 3

제 1 항 또는 제 2 항에 있어서,

R이 메틸인 컨쥬게이트.

청구항 4

제 1 항 또는 제 2 항에 있어서,

m이 약 650 내지 약 750인 컨쥬게이트.

청구항 5

제 1 항 또는 제 2 항에 있어서,

n인 1인 컨쥬게이트.

청구항 6

제 1 항 또는 제 2 항에 있어서,

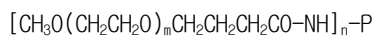
R이 메틸이고, m이 약 650 내지 약 750이며, n이 1인 컨쥬게이트.

청구항 7

제 1 항 또는 제 2 항에 있어서,

하기 화학식 3의 컨쥬게이트:

화학식 3



상기 식에서, m 은 650 내지 750이고, n은 10이며, P는 제 1 항에서 정의된 바와 같다.

청구항 8

제 1 항 또는 제 2 항에 있어서,

당단백질이 인간의 에리트로포이에틴인 컨쥬게이트.

청구항 9

제 1 항 또는 제 2 항에 있어서,

인간의 에리트로포이에틴이 내인성 유전자 활성화에 의해 발현되는 컨쥬게이트.

청구항 10

제 1 항 또는 제 2 항에 있어서,

당단백질이 SEQ ID NO:1의 서열을 갖는 컨쥬게이트.

청구항 11

제 1 항 또는 제 2 항에 있어서,

당단백질이 1 내지 6개의 포도당화 부위를 첨가함으로써 개질된 인간의 에리트로포이에틴의 서열을 갖는 컨쥬게이트.

청구항 12

제 1 항 또는 제 2 항에 있어서,

당단백질이 하기 군으로부터 선택되는 개질에 의해 개질된 인간의 에리트로포이에틴의 서열을 갖는 컨쥬

게이트:

Asn³⁰Thr³²;
 Asn⁵¹Thr⁵³;
 Asn⁵⁷Thr⁵⁹;
 Asn⁶⁹;
 Asn⁶⁹Thr⁷¹;
 Ser⁶⁸Asn⁶⁹Thr⁷¹;
 Val⁸⁷Asn⁸⁸Thr⁹⁰;
 Ser⁸⁷Asn⁸⁸Thr⁹⁰;
 Ser⁸⁷Asn⁸⁸Gly⁸⁹Thr⁹⁰;
 Ser⁸⁷Asn⁸⁸Thr⁹⁰Thr⁹²;
 Ser⁸⁷Asn⁸⁸Thr⁹⁰Ala¹⁶²;
 Asn⁶⁹Thr⁷¹Ser⁸⁷Asn⁸⁸Thr⁹⁰;
 Asn³⁰Thr³²Val⁸⁷Asn⁸⁸Thr⁹⁰;
 Asn⁸⁹Ile⁹⁰Thr⁹¹;
 Ser⁸⁷Asn⁸⁹Ile⁹⁰Thr⁹¹;
 Asn¹³⁶Thr¹³⁸;
 Asn¹³⁸Thr¹⁴⁰;
 Thr¹²⁵; and
 Pro¹²⁴Thr¹²⁵.

청구항 13

제 1 항 또는 제 2 항에 있어서,

당단백질이 인간의 에리트로포이에틴의 서열, 및 인간의 에리트로포이에틴 서열의 카복시 말단에 하나 이상의 포도당화 부위를 함유하는 제 2 서열을 포함하는 컨쥬게이트.

청구항 14

제 13 항에 있어서,

제 2 서열이 인간의 융모성 성선자극호르몬의 카복시 말단 서열로부터 유도된 서열을 포함하는 컨쥬게이트.

청구항 15

제 13 항에 있어서,

당단백질이

(a) 인간의 에리트로포이에틴의 서열 및 인간의 에리트로포이에틴 서열의 카복시 말단에 존재하는 SEQ ID NO:3의 서열,

(b) Ser⁸⁷Asn⁸⁸Thr⁹⁰에 의해 개질된 (a) 서열, 및

(c) Asn³⁰Thr³²Val⁸⁷Asn⁸⁸Thr⁹⁰에 의해 개질된 (a) 서열

로 이루어진 군으로부터 선택되는 서열을 갖는 컨쥬게이트.

청구항 16

제 1 항 또는 제 2 항에 있어서,

당단백질이 하나 이상의 포도당화 부위의 재배치에 의해 개질된 인간의 에리트로포이에틴의 서열을 갖는 컨쥬게이트.

청구항 17

제 16 항에 있어서,

상기 재배치가 인간의 에리트로포이에틴의 N-결합된 포도당화 부위중 임의의 것의 결실 및 인간의 에리트로포이에틴의 서열중 88 위치에서의 N-결합된 포도당화 부위의 첨가를 포함하는 컨쥬게이트.

청구항 18

제 17 항에 있어서,

당단백질이 Gln²⁴Ser⁸⁷Asn⁸⁸Thr⁹⁰; Gln³⁸Ser⁸⁷Asn⁸⁸Thr⁹⁰; 및 Gln⁸³Ser⁸⁷Asn⁸⁸Thr⁹⁰으로 이루어진 군으

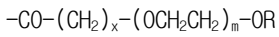
로부터 선택된 개질에 의해 개질된 인간의 에리트로포이에틴의 서열을 갖는 컨쥬게이트.

청구항 19

하나 이상의 자유 아미노기를 갖고, 골수 세포가 더 많은 양의 망상적혈구 및 적혈구 세포를 생산하도록 하는 생체내 생물학적 활성을 가지며, 인간의 에리트로포이에틴 및 1 내지 6개의 포도당화 부위의 첨가 또는 하나 이상의 포도당화 부위의 재배치에 의해 개질된 인간 에리트로포이에틴의 서열을 갖는 그의 유사체로 이루어진 군으로부터 선택되는 에리트로포이에틴 당단백질을 포함하며, 이 때 상기 당단백질이, 상기 아미노기중 하나와 아미드 결합을 형성하는 각 폴리(에틸렌 글리콜)기의 -CO에 의해 하기 화학식 1의 폴리(에틸렌 글리콜)기 "n"개에 공유 결합되어 있는 컨쥬게이트 및 약학적으로 허용가능한 부형제를 포함하되, n이 1인 컨쥬게이트의 백분율이 90% 이상인,

만성 신부전증 환자(CRF), 화학요법이 진행중인 AIDS 및 암 환자에서의 빈혈과 관련된 질환의 예방 및 치료에 유용한 조성물:

화학식 1



상기 식에서,

R은 저급 알킬이고,

x는 2 또는 3이고,

m은 약 450 내지 약 900이며,

n은 1 내지 3이며,

n 및 m은 컨쥬게이트에서 에리트로포이에틴 당단백질을 제외한 분자량이 20킬로돌턴 내지 100킬로돌턴이 되도록 선택된다.

청구항 20

제 19 항에 있어서,

n이 1인 컨쥬게이트의 백분율이 92% 이상인 조성물.

청구항 21

제 20 항에 있어서,

n이 1인 컨쥬게이트의 백분율이 96% 이상인 조성물.

청구항 22

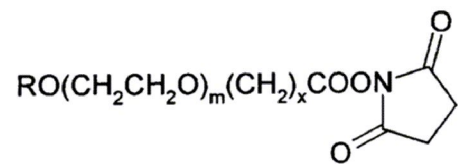
제 19 항에 있어서,

n이 1인 컨쥬게이트의 백분율이 90% 내지 96%인 조성물.

청구항 23

하기 화학식 4의 화합물을 에리트로포이에틴 당단백질과 축합시킴을 포함하는, 제 1 항 또는 제 2 항에 따른 컨쥬게이트의 제조방법:

화학식 4



상기 식에서, R, m 및 x는 제 1 항 또는 제 2 항에 정의된 바와 같다.

청구항 24

제 1 항 또는 제 2 항에 있어서,

제 23 항의 방법에 의해 제조된 컨쥬게이트.

청구항 25

제 1 항 또는 제 2 항에 있어서,

만성 신부전증 환자(CRF), 화학요법이 진행중인 AIDS 및 암 환자에서의 빈혈과 관련된 질환을 치료하기 위한 컨쥬게이트.