



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2009-0057370
(43) 공개일자 2009년06월05일

(51) Int. Cl.

A61K 47/48 (2006.01) A61K 38/28 (2006.01)

A61P 3/10 (2006.01) A61K 47/10 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2009-7003805

(22) 출원일자 2009년02월24일

심사청구일자 없음

번역문제출일자 2009년02월24일

(86) 국제출원번호 PCT/GB2007/002821

국제출원일자 2007년07월25일

(87) 국제공개번호 WO 2008/012528

국제공개일자 2008년01월31일

(30) 우선권주장

06117830.7 2006년07월25일

유럽특허청(EPO)(EP)

(71) 출원인

리폭센 테크놀로지즈 리미티드

영국 런던 엔더블유1 0엔에이치 2 로얄 컬리지 스트리트 런던 바이오사이언스 이노베이션 센터

(72) 발명자

자인, 산자이

영국 런던 엔더블유1 0엔에이치 2 로얄 컬리지 스트리트 런던 생명과학 혁신 센터

장, 룡생

영국 런던 엔더블유1 0엔에이치 2 로얄 컬리지 스트리트 런던 생명과학 혁신 센터

(74) 대리인

김윤배, 강철중, 조영신

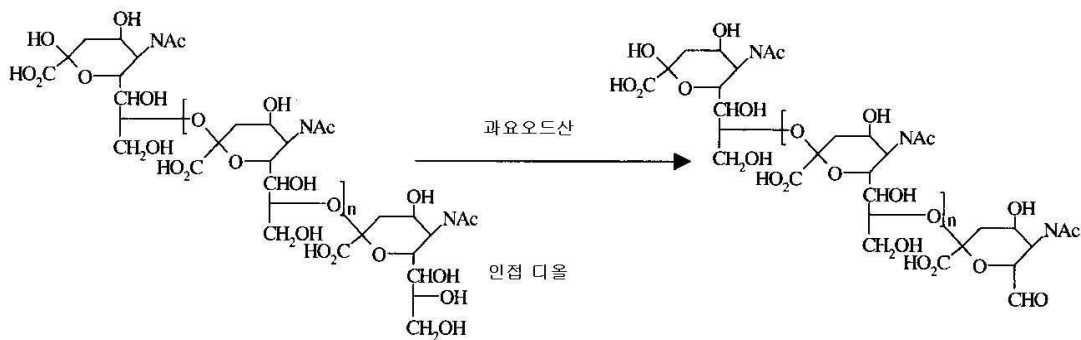
전체 청구항 수 : 총 28 항

(54) N-말단 폴리시알화

(57) 요약

본 발명은 단백질의 폴리사카라이드 유도체 집단을 포함하는 조성물에 관한 것이고, 상기 단백질은 인슐린 또는 인슐린-유사 단백질이고, 폴리사카라이드는 음이온성이며 2 내지 125개의 사카라이드 단위를 포함하고, 그리고 상기 집단은 실질적으로 단백질의 N-말단 유도체로만 이루어진다. 통상적으로 폴리사카라이드는 PSA이다. 본 발명은 또한 신규한 화합물을 포함하는 약제학적 조성물, 및 신규한 화합물의 제조 방법에 관한 것이다.

대표도



특허청구의 범위

청구항 1

단백질의 폴리사카라이드 유도체 집단을 포함하는 조성물로서, 상기 단백질은 인슐린 또는 인슐린-유사 단백질이고, 폴리사카라이드는 음이온성이며 2 내지 125개의 사카라이드 단위를 포함하고, 그리고 상기 집단은 실질적으로 단백질의 N-말단 유도체로만 이루어지는 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 폴리사카라이드가 폴리시알산, 헤파린, 히알루론산 또는 콘드로이틴 황산으로부터 선택되는 조성물.

청구항 3

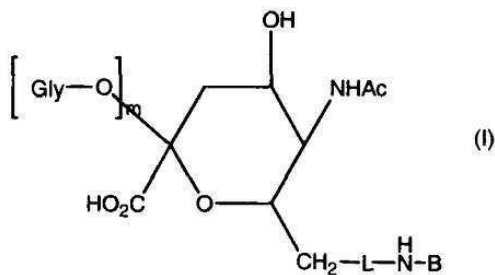
제2항에 있어서, 상기 폴리사카라이드가 바람직하기는 실질적으로 시알산 단위로만 이루어지는, 폴리시알산인 조성물.

청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 인슐린 또는 인슐린-유사 단백질은 폴리사카라이드의 환원성 말단 단위에서 폴리사카라이드에 의해 유도되는 조성물.

청구항 5

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 폴리사카라이드 유도체가 일반식 (I)을 갖는 것인 조성물:



여기서, m은 일 이상이고;

HNB는 N-말단 인슐린 또는 인슐린-유사 단백질인 B-NH₂로부터 유도되고;

L은 결합, 연결기이며, 또는 폴리펩티드 또는 합성 다이오머를 포함하고;

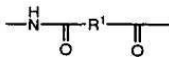
GlyO은 음이온성 사카라이드 단위이고;

여기서, 연결기가 존재하는 경우 일반식 -Y-C(O)-R¹-C(O)-을 가지는 것이고;

여기서, Y는 NR² 또는 NR²-NR²이고, R¹은 카보닐, 에스테르, 설피드, 에테르, 아마이드 및/또는 아민 연결에 의해 치환되거나 그리고/또는 방해될 수 있는, 알칸디일, 아릴렌, 알카릴렌, 헤테로아릴렌 및 알킬헤테로아릴렌으로 이루어진 군으로부터 선택되는 이관능성 유기 라디칼이고; 그리고

R²는 H 또는 C₁₋₆ 알킬이다.

청구항 6

제5항에 있어서, 상기 L이 결합이거나  기인 조성물.

청구항 7

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 폴리사카라이드는 10-80의 시알산 단위, 더 바람직하기는 20-60 시알산 단위, 가장 바람직하기는 40-50 시알산 단위를 포함하는 조성물.

청구항 8

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 음이온성 폴리사카라이드의 다분산성이 1.3 미만, 바람직하기는 1.2 미만, 가장 바람직하기는 1.1 미만인 조성물.

청구항 9

제1항 내지 제8항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 조성물이 약제학적 조성물이고 하나 이상의 약제학적으로 허용 가능한 부형물을 포함하는 조성물.

청구항 10

제1항 내지 제8항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 조성물은 치료시 사용하기 위한 조성물.

청구항 11

인슐린 또는 인슐린-유사 단백질의 폴리사카라이드 유도체의 제조방법으로서, 2-125 사카라이드 단위를 포함하는 음이온성 폴리사카라이드는 실질적으로 인슐린 또는 인슐린-유사 단백질의 N-말단 아민에서만 화학 반응하는 제조방법.

청구항 12

제11항에 있어서, 상기 음이온성 폴리사카라이드는 인슐린 또는 인슐린-유사 단백질과 반응하는 반응성 알데히드기를 가지고, 유도체화 반응은 환원 조건에서 수행되는 제조방법.

청구항 13

제12항에 있어서, 상기 반응성 알데히드기가 폴리사카라이드의 비-환원성 말단에 있는 제조방법.

청구항 14

제12항에 있어서, 상기 반응성 알데히드가 폴리사카라이드의 환원성 말단에 있고, 비-환원성 말단은 그것이 인슐린 또는 인슐린-유사 단백질과 반응하지 않도록 무반응화되는 제조방법.

청구항 15

제11항 내지 제14항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 폴리사카라이드는 인슐린 또는 인슐린-유사 단백질의 아민기와 반응하는 제조방법.

청구항 16

제15항에 있어서, 상기 아민이 말단 아민기인 제조방법.

청구항 17

제15항에 있어서, 상기 아민이 인슐린 또는 인슐린-유사 단백질의 리신 아미노산으로부터 유도되는 제조방법.

청구항 18

제11항에 있어서, 상기 음이온성 폴리사카라이드는 예비 반응 단계에서 아민으로 전환한 후, N-말레이미드, 비닐술폰, N-요오드아세트아미드 또는 오르토포리딜기 또는 N-히드록시숙신이미드로부터 선택된 하나 이상의 관능기를 포함하는 이관능성 시약과 반응하여 반응 중간체(여기서, 반응 중간체는 인슐린 또는 인슐린-유사 단백질과 반응한다)를 형성하는 반응성 알데히드기를 가지는 제조방법.

청구항 19

제11항 내지 제18항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 음이온성 폴리사카라이드 또는 반응 중간체는 산성 pH의 제1 수용액에서 인슐린 또는 인슐린-유사 단백질의 말단 아민기와 반응하고; 그리고 생성된 폴리사카라이드 유도체는 제1수용액 보다 높은 pH의 제2수용액에서 정제되는 제조방법.

청구항 20

제19항에 있어서, 상기 제1수용액의 pH는 4.0-6.0 범위이고, 제2수용액의 pH는 6.5-8.5인 제조방법.

청구항 21

제11항 내지 제20항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제조방법은 제형 첨가물의 존재하에 수행되는 제조방법.

청구항 22

제21항에 있어서, 상기 제형 첨가물이 하나 이상의 완충제, 안정화제, 계면활성제, 염, 중합체, 금속 이온, 당, 폴리올 또는 아미노산으로부터 선택되는 제조방법.

청구항 23

제22항에 있어서, 상기 제형 첨가물이 솔비톨, 트레할로스 또는 수크로즈인 제조방법.

청구항 24

제22항에 있어서, 상기 제형 첨가물이 비-이온성 계면활성제인 제조방법.

청구항 25

제22항에 있어서, 상기 제형 첨가물이 PSA, PEG 또는 히드록시-베타-시클로덱스트린으로부터 선택되는 중합체인 제조방법.

청구항 26

제22항에 있어서, 상기 제형 첨가물이 2가 금속 이온, 바람직하기는 Zn^{2+} , Ni^{2+} , Co^{2+} , Sr^{2+} , Fe^{2+} , Ca^{2+} 또는 Mg^{2+} 인 제조방법.

청구항 27

제22항에 있어서, 상기 제형 첨가물은 완충제이고, 완충제는 인산 나트륨인 제조방법.

청구항 28

제11항 내지 제27항 중 어느 한 항에 따른 제조방법에 의해 얻을 수 있는 인슐린 또는 인슐린-유사 단백질의 폴리사카라이드 유도체.

명세서

기술분야

<1> 본 발명은 인슐린의 신규한 폴리사카라이드 유도체 및 상기 유도체의 제조 방법에 관한 것이다. 유도체는 인슐린의 안정성, 약물동태학 및 약물동역학을 개선시키는데 유용하다.

배경기술

<2> 당뇨병은 탄수화물 대사 장애로서 인슐린의 불충분한 생산 또는 인슐린에 대한 감소된 감수성에 의한 것이다. 인슐린은 췌장에 있는 랑게르한스섬의 베타 세포에서 합성되고 인체내 대부분의 세포에 의한 포도당의 정상적 이용에 필요하다. 당뇨병에 걸리 사람의 경우, 포도당의 정상적 사용 능력이 억제됨으로써, 혈당 수치가 증가한다(고혈당).

<3> 당뇨병에는 두가지 종류가 있다. 타입I은 인슐린-의존성 당뇨병 또는 IDDM이다. IDDM는 이전에 소아 당뇨병이라 불리었다. IDDM의 경우, 인슐린은 췌장에 의해 분비되지 않고 외부원으로부터 제공받아야 한다. 타입II 성인 당

노병은 보통 식이요법에 의해 조절될 수 있으나, 몇몇 특수한 사례의 경우 인슐린이 요구된다.

- <4> 1920년 인슐린을 단리하기 전에, 대부분의 환자는 질병의 개시 이후 짧은 시간 내에 사망하였다. 치료되지 않은 당뇨병은 혈중 케논(지방 분해 산물)을 축적하는, 케톤증을 초래한다; 이것은 메스꺼움과 구토를 동반한 산증(혈중 산의 축적)을 수반한다. 탄수화물 및 지방 대사 장애의 독성 산물이 계속 축적되면, 환자는 당뇨병 혼수 상태가 된다.
- <5> 당뇨병의 치료는 통상적으로 인슐린의 정기적인 주입을 요구한다. 이것은 극적인, 생명-구조 임상적 개선을 초래한다. 그러나, 인슐린 주입이 불편하기 때문에, 인슐린의 투여 및 생체동화를 개선시키기 위한 엄청난 노력에 초점을 맞추어 왔다.
- <6> 인슐린 분자는 이황화 결합으로 연결된 아미노산의 두 사슬로 이루어진다(mw 5804). 췌장 소도(islet)의 [베타]-세포는 프로인슐린으로 알려진, 인슐린의 외사슬 전구체를 분비한다. 프로인슐린의 단백질 가수분해는 4개의 염기성 아미노산(프로인슐린 사슬의 번호 31, 32, 64 및 65: 각각 Arg, Arg, Lys, Arg) 및 연결("C") 폴리펩티드의 제거를 초래한다. 생성된 2-사슬 인슐린 분자의 경우, A 사슬은 아미노 말단에 글리신을 가지며, B 사슬은 아미노 말단에 페닐알라닌을 가진다.
- <7> 인슐린은 단량체, 2량체 또는 2량체 3개로 형성된 6량체로 존재할 수 있다. 6량체는 Zn^{2+} 원자와 배위결합한다. 생물학적 활성은 단량체에 있다. 최근까지, 소와 돼지 인슐린이 인간의 당뇨병을 치료하는데 거의 독점적으로 사용되었지만, 중간 인슐린의 수많은 변이가 알려져 있다. 돼지 인슐린은 B-사슬의 C-말단에 트레오닌 잔기 대신에 알라닌을 가진다는 점만 다를 뿐, 인간 인슐린과 거의 유사하다. 이러한 차이에도 불구하고, 대부분의 포유류 인슐린은 동등한 특이적 활성을 가진다. 최근까지, 동물 추출물은 질병의 치료를 위해 사용된 모든 인슐린에 제공되었다. 재조합 기술의 발전은 인간 인슐린의 상업적 규모의 제조를 가능하게 한다(예를 들면, 휴물린(humulin, TM), Eli Lilly 및 Company, Indianapolis, Ind. 제품).
- <8> 인슐린의 약물동태학적 특성을 개선하기 위하여, 인슐린을 유도하기 위한 시도가 이루어져 왔다. 시판중인 제품, PEG-인슐린(Nektar Therapeutics)이 있다. PEG는 수많은 반복 단위의 에틸렌 옥사이드를 포함하는 중성의, 수용성 비독성 중합체이다. PEG화(PEGylation)는 활성 분자의 크기를 증가시켜, 궁극적으로 약물동태학을 최적화하고, 생체이용율을 증가시키고, 면역원성을 감소시키고 자주 투여함으로써 약물 효율을 개선시키기 위하여 고안되었다. PEG-인슐린의 고안 및 개발은 WO2004091494에 추가로 기재되어 있다.
- <9> PEG화된 인슐린 유도체의 다양한 제조 방법이 공지되어 있다. Davis 등 (미국 특허 제4,179,337호)은 PEG와 단백질 사이의 연결체로서 트리클로로-s-트리아진 (시아누릭 클로라이드)를 사용하여 구성된 PEG-인슐린의 합성을 개시하였다. 그들은 시아누릭 클로라이드 활성화된 PEG(2000Da)의 다량의 과량(50X)을 2시간 동안 봉산염 완충제(pH 9.2)에서 인슐린과 반응시키는 합성 도식에 따른다. 발명자들은 비-면역원성 및 비-항원성인, 부분 활성(약 50%) PEG-인슐린 컨쥬게이트(conjugate)를 제조할 수 있었다. Obermeier 등 (캐나다 특허 제1,156,217호)은 상기 참고된 Davis 특허에 따른 PEG-인슐린 컨쥬게이트 체제가 약 50% 트리-PEG 인슐린을 함유하는 불-균일 컨쥬게이트 혼합물을 제조하고, 다른 가능한 PEG-인슐린 유도체 조합(모노- 및 디-PEG-인슐린)이 잔기 PheB1에서 치환되지 않는다는 것을 발견하였다.
- <10> Obermeier 등 (캐나다 특허 제1,156,217호)은 잔기 PheB1에서 특이적으로 변형된 PEG-인슐린 컨쥬게이션의 합성을 개시한다. 상기 발명의 원리는 알칼리 조건하에 유기 용매(예를 들면, DMF, DMSO, 피리딘 등)에서, tert-부틸옥시카보닐(t-boc) 또는 메틸술포닐에틸옥시카보닐(Msc)기로 잔기 GlyA1 및 LysB29에 있는 반응성 아민을 보호하는 것을 포함한다. 보호된 인슐린의 복합 혼합물(모노-, 디- 및 트리-)로부터, N.sup..알파.A1, N.sup..입실론.B29-bis-보호-인슐린 중은 통상적 크로마토그래피 기술에 의해 단리된다. 단리 이후에, 순수한 N.sup..알파.A1, N.sup..입실론.B29-bis-보호-인슐린은 펩티드 화학에 공통된 기술을 사용하여 보호기의 사후 제거로 활성(예를 들면, 산 클로라이드 또는 이소시아네이트) PEG 유도체와 반응하였다. 발명자들은 GlyA1와 LysB29의 아미노기가 알칼리 반응 조건하에서 PheB1의 아미노기 보다 더 반응성이 있다는 것을 관찰하였다. 그것들은 그들의 부위-특이적 mPEG(1500)-B1-인슐린 컨쥬게이트가 토끼의 혈당 수치 감소에 영향을 미치는 100% 인슐린 효과(몰을 기준으로 계산)를 가진다고 추정되었다.
- <11> Geiger 등 (1980) 및 Ehrat 등 (1983)은 Obermeier 등, Geiger 등 및 Ehrat 등에 의해 개시된 다중-단계 방법과 유사한 보호/컨쥬게이션/탈보호를 이용하여 제조된 잔기 PheB1에서 특이적으로 변형된 PEG-인슐린 부가물을 개시하고, PEG(1500)-B1-인슐린 컨쥬게이트가 천연 인슐린 보다 (간 효소에)훨씬 덜 항원성이 있고 더 안정하다는 것을 관찰하였다. 다른 PEG-인슐린 제제 (Caliceti 등, 1999; Uchio 등, 1999; Hinds 등, 2002)는 1) 상기

설명된 기본 3-단계 보호/퀀주게이션/탈보호 도식을 중심으로, 2) 인슐린 분자의 비-특이적 변형을 초래하거나 또는 3) 가장 유효한 퀀주게이트 즉, PEG-B1-인슐린을 제조하지 않는다.

<12> Liu 등 (미국 특허 제6,323,311 B1호)는 PEG-B1-퀀주게이트의 합성에 유용한 방법을 개시한다. 상기 방법은 Obermeier 3-단계 보호/퀀주게이션/탈보호 도식의 연장이지만, 단계 사이에 반응 중간체의 단리를 요구하지 않는다(즉, 단일 합성). 따라서, 인슐린은 잔기 GlyA1 및 LysB29에서 보호되고, 즉시 PEG와 반응한 후, 어느 종을 단리하기 전에 탈보호된다. 상기 발명자들은 그들의 단일 반응이 다음의 유도화에서 재사용될 수 있는 정확한 위치의 이성질체(즉, PEG-B1-인슐린)의 50%와 미반응된 인슐린의 30%까지 제조할 수 있다고 주장한다. 상기 구성체의 제조가 신속하게 수행된다고 가정하면, 완성까지는 최소한 5일이 걸릴것이다. 게다가, 만족스러운 결과를 달성하기 위하여, 상기 발명은 많은 과량의 PEG 시약을 요구한다. 상기 발명의 생산물이 유효할 수는 있지만, 그들의 제제는 여전히 연장된 기간 동안 단백질-유해 환경(고 및 저 pH)에서 단백질을 3개의 반응 단계에 제공하는 것을 요구한다.

<13> US2007083006 발명은 인슐린의 B-사슬(PheB1)의 N-말단에서 특이적으로 PEG화된 고순도 인슐린 유도체를 단순하게 제조하기 위한 방법을 한 단계로 제공함으로써 인슐린을 PEG화 하기 위한 종래 방법의 단점을 설명한다. PheB1에서 PEG화가 최소한의 가능한 반응 생산물이라는 것을 나타내는 종래 경험(예를 들면, 상기 Caliceti 등, 1999)과 달리, 본 방법은 PEG화의 우세한 부위가 되는 곳에서의 PheB1 아미노 말단의 상대적 반응성을 증가시키기 위하여, 특정 조건의 pH 조절, 금속 이온 킬레이터의 사용 및 유기 용매의 첨가를 사용한다. 잔기 PheB1에서 부위-특이적 PEG화를 통해 인슐린에 부여된 많은 유리한 특성(예를 들면, 면역원성/항원성 감소; 단백질 분해, 화학적 및 물리적 안정성 증가; 순환 반감기 증가; 수성/유기 가용성 증가; 충분한 생물학적 활성)을 고려하면, 이 결과를 달성하기 위하여, 단순하고, 비용-효율적이고 용이하게 측정할 수 있는 공정이 당업계에서 발전할 것이다.

<14> 종래 기술을 고려하면, 인간과 동물 치료에 유용하고 최적 안정성, 반감기 및 낮은 독성을 가질 수 있는 개선된 인슐린 유도체를 제공하는 것이 요구된다. 본 발명자들은 인슐린에 PSA를 결합하면 상기 특성이 부여되는 것을 발견하였다.

발명의 상세한 설명

<15> 폴리시알산(PSA)은 특정 세균성 균주와 포유동물의 특정 세포로 제조된 천연적으로 발생하는 시알산의 비분지된 중합체이다. 그들은 제한된 산 가수분해에 의해 또는 뉴라미니다아제에 의한 소화에 의해, 또는 천연적으로, 세균적으로 유도된 형태의 중합체의 분획화에 의해 n = 약 80 이상의 시알산 잔기에서부터 n = 2까지의 다양한 중합도로 제조될 수 있다.

<16> 최근, 시알산의 생물학적 특성, 특히 알파-2,8-연결된 호모중합성 폴리시알산의 생물학적 특성들이 단백질 및 저분자량 약물 분자들의 약물동태학적 특성을 변경하기 위해 개발되어왔다. 폴리시알산 유도화는 카탈라아제와 아스파라기나아제를 포함하는 수많은 치료학적 단백질의 순환 반감기에 극적인 개선을 가져왔고, 또한 상기 단백질이 치료학적 단백질에 노출되기 전에 원하지 않는(그리고 때때로 필연적인) 결과로서 발생하는 선-존재 항체에도 불구하고 사용되도록 한다[Fernandes 및 Gregoriadis, 1996, 1997]. 알파-2,8 연결된 폴리시알산은 PEG에 대한 매력적인 대체물을 제공하고, 인체의 천연 일부인 면역학적으로 눈에 띄지 않는 생분해성 중합체이며, 이것은 조직 뉴라미니다아제를 거쳐, 시알산, 비-독성 사카라이드로 분해된다.

<17> 본 출원인은 단백질과 같은 치료제에 폴리사카라이드(특히, PSA)를 부착하는 방법을 이전에 개시하였다[US-A-5846,951; WO-A-0187922]. 몇몇 상기 방법은 1차 아미노산에 반응하는 단백질-반응성 알데히드 모이어티를 제조하기 위한 중합체의 '비-환원성' 말단의 화학적 유도화에 의존한다. 비-환원성 시알산 말단 단위는, 그것이 근접한 디올을 함유하므로, 쉽게(그리고 선택적으로) 과요오드산염과 산화되어 모노-알데히드 형태를 제조하여, 단백질에 대해 훨씬 반응성이고, 환원성 아민화와 다른 화학적 성질을 통한 단백질의 결합에 적합한 반응성 구성요소를 포함한다. 반응은 도 1 및 도 2에서 설명되고, 여기서

<18> 도 1은 비-환원성 말단에서 단백질-반응성 알데히드를 형성하기 위한 과요오드산 나트륨을 사용한 콜로민산(E. coli로부터 알파-2,8-연결된 폴리시알산)의 산화를 나타내고; 그리고

<19> 도 2는 단백질 아미노기와 안정한 비가역 공유결합을 형성하기 위한 시프염기를 사용한 소듐 시아노보로하이드리드의 선택적 환원반응을 나타낸다.

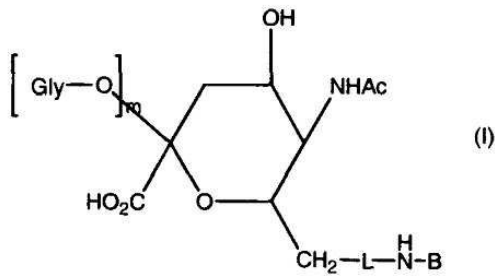
<20> 본 발명자들은 폴리시알화된 인슐린의 합성을 이전의 출판물, 예를 들면, Biochimica et Biophysica Acta

(2003)에서 개시하였다. 이것을 참고하면, 22kDa 및 39kDa 콜로민산은 산화되고 재조합 인간 인슐린의 아미노기와 반응한다. 사용된 CA의 다분산성은 1.33 및 1.40로, 치료학적 용도에는 꽤 컸다.

- <21> 본 출원인들은 또한 인슐린-콜로민산 컨주게이트의 합성을 WO 2005/016974로 발행된, 이전의 특허 출원에서 개시하였다. 그러나, 본 출원의 경우, 컨주게이트는 전부 특이적인 N-말단이 아니고, 다양한 컨주게이트가 제조된다.
- <22> 의도하지 않는 부산물이 예를 들면, 아미노산의 축쇄와 콜로민산의 반응에 의해 상기 기술된 종래 컨주게이션 반응시 발생할 수 있다. 그들은 인간과 동물에서 치료학적 사용을 위한 규정 당국에 의해 요구되는 화학적으로 정의된 컨주게이트의 제조시 충분히 문제가 될 수 있다.
- <23> 대부분의 반응 생산물의 물리화학적 특징이 유사하기 때문에, 여러 의도되지 않은 생산물이 없는 의도된 반응 생산물(예를 들면, 모노폴리시알화 생산물)을 정제하는 것이 수월하지 않다. 이것은 이온-교환 크로마토그래피 및 겔-투과성 크로마토그래피(각각 전하 및 크기를 기초로 하여 분리)와 같은 기술이 열악한 정제 프로파일을 제조한다는 것을 의미한다.
- <24> 본 발명의 첫번째 관점에 따르면, 단백질의 폴리사카라이드 유도체 집단을 포함하는 조성물이 제공되고, 상기 단백질은 인슐린 또는 인슐린-유사 단백질이고 폴리사카라이드는 음이온성이며 2 내지 125 사카라이드 단위를 포함하고, 그리고 상기 집단은 실질적으로 단백질의 N-말단 유도체로만 이루어진다.
- <25> 이하, 용어 인슐린을 사용하는 경우, 본 출원인은 또한 인슐린-유사 단백질 포함하기 위한 의도이다. 인슐린-유사 단백질이란 인슐린의 활성과 동등한 활성을 가지는 단백질을 의미한다. 인슐린은 통상적으로 혈당 농도를 감소시킨다. 그것은 또한 모노사카라이드, 아미노산 및 지방산의 세포 투과성을 증가시키고, 간에서의 해당작용, 펜토스 인산 순환 및 글리코겐 합성을 촉진시킨다. 바람직하기는, 인슐린-유사 단백질은 Swissprot 기탁 번호 P01308로부터 유도된 인간 인슐린 활성의 35% 이상, 더 바람직하기는 50% 이상을 가진다.
- <26> 상기 설명한 바와 같이, 필요한 활성을 가진 인슐린 변이체가 또한 사용될 수 있다. "인슐린-유사" 단백질은 또한 "인슐린-유사체"로 언급될 수 있다. 두 염기서열이 상동성이든 아니든, 당업계에서 잘 알려진 용어인, 백분율 유사성 또는 동종성을 사용하여 관례대로 계산하였다. 염기서열은 인간 인슐린의 비가공 전구체인 SEQ ID. No. 1과 유사하여야 한다. 잔기 25-54는 인슐린 B 사슬에 해당하고 잔기 90-110는 인슐린 A 사슬에 해당한다. 유사체 염기서열은 또한 인간 인슐린의 활성형태와 유사할 수 있다.
- <27> 유사체는 바람직하기는 핵산 또는 아미노산 수준에서 50% 이상의 유사성 또는 동등성, 더 바람직하기는 60%, 70%, 80% 이상, 핵산 또는 아미노산 수준에서 95% 또는 99% 동등성 또는 유사성과 같이, 더 바람직하기는 90% 이상을 가진다. 많은 프로그램이 유사성 또는 동일성을 계산하기 위해 사용될 수 있다; 바람직한 프로그램으로는 www.ncbi.nlm.nih.gov에서 구입가능한, 기본 매개변수(default parameter)로 작동하는 BLASTn, BLASTp 및 BLASTx 프로그램이 있다. 예를 들면, 2 아미노산 염기서열은 BLASTn 프로그램을 기본 매개변수(점수 = 100, 단어 길이 = 11, 기대치 = 11, 저 복잡도 필터링 = 켜짐)를 사용하여 비교될 수 있다. 상기의 상동성 수준은 이러한 기본 매개변수를 사용하여 계산된다.
- <28> 인슐린은 천연 즉, 인간 또는 동물로부터 유도된 것이거나 또는 합성, 예를 들면, 재조합 방법에 의해 만들어지는 것일 수 있다.
- <29> 당업계에서 잘 알려진 바와 같이, 인슐린은 두 펩티드 사슬을 포함한다. 바람직하기는, 본 발명에서, 인슐린은 그의 B 사슬 N-말단에 폴리사카라이드를 가지고 유도된다.
- <30> "집단"이란 조성물내 하나 이상의 폴리사카라이드 유도체가 있는 것을 의미한다. 유도체는 동일하거나 상이한 수의 사카라이드 단위를 포함할 수 있다. 바람직하기는, 조성물내 폴리사카라이드의 다분산성(polydispersity)은 1.3 미만, 더 바람직하기는 1.1 미만이다.
- <31> 집단에서, 실질적으로 모든 단백질은 N-말단에서만 유도된다. 인슐린에는 두개의 펩티드 사슬이 있기 때문에, 두개의 N 말단 단위가 존재한다. 집단내 B 사슬의 바람직하기는 85% 이상, 더 바람직하기는 90% 이상, 가장 바람직하기는 95% 이상이 음이온성 폴리사카라이드로 N-말단에서 유도된다. A 사슬의 N-말단은 유도될 필요가 없다.
- <32> N-말단에서의 유도화도는 펩티드 맵핑(peptide mapping)과 Edman Degradation와 같은 당업계의 표준 기술을 사용하여 측정될 수 있다.

- <33> 폴리사카라이드는 바람직하기는 2 이상, 더 바람직하기는 5 이상, 가장 바람직하기는 10 이상, 예를 들면, 50 이상의 사카라이드 단위를 가진다.
- <34> 음이온성 폴리아사카라이드는 폴리시알산, 헤파린, 히알루론산 및 콘드로이틴 황산으로부터 선택되는 것이 바람직하다. 바람직하기는, 폴리아사카라이드는 폴리시알산이고, 실질적으로 시알산 단위로만 이루어진다. 그러나, 폴리아사카라이드는 분자내 시알산 이외의 단위를 가질 수 있다. 예를 들면, 시알산 단위는 다른 사카라이드 단위와 치환될 수 있다. 그러나, 폴리아사카라이드는 실질적으로 시알산 단위로 이루어지는 것이 바람직하다.
- <35> 폴리아사카라이드는 말단 시알산기를 가지는 것이 바람직하며, 상기 설명한 바와 같이, 폴리시알산이 더 바람직한 바, 그것은 α -2-8 또는 α -2-9 연결을 통해 서로 결합된 2개 이상의 시알산 단위를 포함하는 폴리아사카라이드이다. 적합한 폴리시알산은 2 내지 100kDa 범위, 바람직하기는 1 내지 35kDa 범위의 질량 평균 분자량을 가진다. 가장 바람직한 폴리시알산은 10-20kDa 범위, 통상적으로는 약 14kDa의 분자량을 가진다. 가장 바람직하기는, 폴리시알산은 세균원, 예를 들면, *E. coli* K1, *N. meningitidis*, *Maraxella liquefaciens* 또는 *Pasteurella aeruginosa*의 폴리아사카라이드 B, 또는 *E. coli* K92 균주의 K92 폴리아사카라이드로부터 유도된다. *E. coli* K1으로부터 유도된 콜로민산이 가장 바람직하다.
- <36> 음이온성 폴리아사카라이드, 바람직하기는 폴리시알산은 염 또는 유리산 형태일 수 있다. 분자량이 세균원으로부터 회수됨에 따라 감소되는, 가수분해된 형태일 수 있다. 폴리아사카라이드, 바람직하기는 폴리시알산은 1.3 보다 큰 다분산성, 예를 들면, 2 보다 큰 다분산성을 가지는 바와 같이, 넓은 범위의 분자량을 가지는 물질일 수 있다. 바람직하기는, 분자량의 다분산성은 1.3 또는 1.2 미만, 바람직하기는 1.1 미만, 예를 들면, 1.01 미만이다.
- <37> 통상적으로, 본 발명의 화합물은 인슐린의 폴리시알산 유도체이고, 2-125 개의 시알산 단위를 포함한다. 더 통상적으로, 화합물은 10-80 시알산 단위, 바람직하기는 20-60 시알산 단위, 가장 바람직하기는 40-50 시알산 단위를 포함한다.
- <38> 본 발명의 첫번째 관점에서, 폴리아사카라이드 유도체는 인슐린의 N-말단과 음이온성 폴리아사카라이드 사이에서 공유-결합된 컨주게이트일 수 있다. 폴리아사카라이드와 인슐린 사이의 다른 결합 방법은 정전 흡착을 포함한다. 그러나, 공유 결합이 바람직하다. 공유 연결은 카르복실기와 아민기 사이의 아마이드 연결일 수 있다. 인슐린이 폴리아사카라이드에 공유 결합할 수 있는 다른 연결은 시프 염기(Schiff base)에 의하는 것이다. 아민에 컨주게이트하기에 적합한 기는 WO 2006/016168에 추가로 기재되어 있다.
- <39> 본 발명에서, 폴리아사카라이드는 천연적으로 발생하는 폴리아사카라이드 또는 천연적으로 발생하는 폴리아사카라이드의 유도체, 예를 들면, 사카라이드 잔기에서 하나 이상의 활성기 반응에 의해 유도되는, 또는 폴리아사카라이드 사슬 말단에서 유도되는 기와 공유결합하는 폴리아사카라이드일 수 있다.
- <40> 폴리아사카라이드는 인슐린의 환원성 또는 비-환원성 말단 단위를 통해 인슐린에 결합될 수 있다.
- <41> 폴리아사카라이드를 단백질에 결합시키는 방법은 당업계에 잘 알려져 있고, WO 92/22331 및 WO-A-0187922에 상세히 기재되어 있다. 본 발명에서 바람직한 방법은 하기에 더 상세히 기재되어 있다. 방법은 또한 본 명세서의 도 1 및 2에 기재되어 있다.
- <42> 폴리아사카라이드는 인슐린의 환원성 및 비-환원성 말단 단위를 통해 인슐린에 연결될 수 있다. 이것은 한 폴리아사카라이드 사슬이 두 인슐린 단백질, 즉 환원성 뿐 아니라 비-환원성 말단에서 유도된 인슐린 단백질에 연결될 수 있다.
- <43> 폴리아사카라이드는 즉, 도 1 및 도2에 나타낸 바와 같이 인슐린 펩티드에 직접 또는 연결체를 통해 연결될 수 있다. 적합한 연결체는 N-말레이미드, 비닐술폰, N-요오드아세트아미드 또는 오르토포리딜 또는 N-히드록시숙신이미드-함유 시약으로부터 유도될 수 있다. 연결체는 또한 생체안정성 또는 생분해성이고, 예를 들면, 폴리펩티드 또는 합성 올리고머를 포함한다. 연결체는 WO 2005/016973에 추가 기재된 바와 같이, 이관능성 모이어티로부터 유도될 수 있다. 적합한 이관능성 시약은 예를 들면, Bis-NHS이다. 시약은 일반식 Z-R¹-Z를 가질 수 있고 여기서, 각 Z는 관능기이며 동일하거나 상이할 수 있고, R¹은 이관능성 유기 라디칼이다. R¹은 카보닐, 에스테르, 실 피드, 에테르, 아마이드 및/또는 아민 연결에 의해 치환되거나 그리고/또는 방해될 수 있는, 알칸디일, 아릴렌, 알카릴렌, 헤테로아릴렌 및 알킬헤테로아릴렌으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것이 바람직하다. C₃-C₆ 알칸디일이 특히 바람직하다. 가장 바람직하기는, R¹은 적합한 이관능성 시약의 적절한 부위에 해당한다.

<44> 일반식 (I)의 폴리사카라이드 유도체가 바람직하다.



- <45>
- <46> 여기서, m은 일 이상이고;
- <47> HNB은 인슐린 또는 인슐린-유사 펩티드의 N-말단인, B-NH₂로부터 유도되고;
- <48> L은 결합, 연결기이며, 또는 폴리펩티드 또는 합성 올리고머를 포함하고;
- <49> GlyO은 음이온성 사카라이드 단위이고;
- <50> 여기서, 연결기가 존재하는 경우 일반식 -Y-C(O)-R¹-C(O)-에 대한 것이고;

<51> 여기서, Y는 NR² 또는 NR²-NR²이고, R¹은 상기 정의된 바와 같이 이관능성 유기 라디칼이고; 그리고 R²는 H 또는 C₁₋₆ 알킬이다.

<52> 본 발명의 이 관점에서, 인슐린은 폴리사카라이드의 비-환원성 말단에 연결된다. 말단 폴리사카라이드 단위는 시알산 단위이다. 폴리사카라이드내 다른 사카라이드 단위는 GlyO에 의해 나타내어지고 동일하거나 상이할 수 있다. 적합한 사카라이드 단위는 헤파린, 히알루론산 또는 콘드로이틴 황산을 포함한다.

<53> 인슐린이 폴리사카라이드에 직접 결합하는 경우, L기는 결합이다. 그러나, L기는 선택적으로 N-말레이미드, 비닐술폰, N-아이오도아세트아미드, 오르토포리달 또는 N-히드록시숙신아미드 함유 시약으로부터 유도될 수 있다.

시약은 상기 정의된 바와 같이 일반식 Z-R¹-Z를 가질 수 있다. 이 구체예에서, L은 통상적으로

기일 수 있다.

- <54> 본 발명의 다른 관점은 약제학적 조성물인 상기 정의된 바와 같은 조성물이고 추가적으로 하나 이상의 약제학적으로 허용가능한 부형제를 포함한다.
- <55> 약제학적 조성물은 수성 현탁액 형태일 수 있다. 수성 현탁액은 수성 현탁액의 제조에 적합한 부형제와 혼합된 신규한 화합물을 함유한다. 약제학적 조성물은 멸균 주사용 수성 또는 균질 현탁액 형태일 수 있다. 이 현탁액은 적합한 분산제 또는 습윤제 및 현탁제를 사용하는 공지된 기술에 따라 제형화될 수 있다.
- <56> 약제학적 조성물은 인간 또는 수의학적 용도로 경구, 정맥, 복막내, 근육내, 피하내, 비강내, 피부내, 국소적 또는 기관내에 투여될 수 있다.
- <57> 조성물은 제형 첨가물을 추가적으로 포함할 수 있다. 제형 첨가물의 경우, Wang 등 (1999)에 기재된 바와 같이, 내부적으로 또는 외부적으로 인슐린을 안정화시킬 수 있는 부형제를 의미한다. 부형제는 안정화제, 가용화제 또는 금속 이온일 수 있다. 제형 첨가물의 적합한 예는 하나 이상의 완충제, 안정화제, 계면활성제, 염, 중합체, 금속 이온, 당, 폴리올 또는 아미노산을 포함한다. 이들은 단독 또는 함께 사용될 수 있다.
- <58> 안정화제는 통상적으로 단백질을 풀기 위하여 증가된 경우 깎스 자유 에너지(Gibbs free energy) 변화를 초래하는, 단백질의 변성 상태의 비안정화에 의해 작용한다. 안정화제는 당 또는 폴리올, 예를 들면, 수크로오스, 솔비톨, 트레할로스, 글리세롤, 만니톨, 락토즈 및 에틸렌 글리콜이 바람직하다. 안정화 완충제는 소듐 포스페이트이다.
- <59> 안정화제는 바람직하기는 계면활성제, 바람직하기는 비-이온성 계면 활성제이다. 적합한 예는 Tween 80, Tween 20, Tween 40, Pluoronic F68, Brij 35 및 Triton X 100를 포함한다.

- <60> 금속 이온은 2가가 바람직하다. 적합한 금속 이온은 Zn^{2+} , Ni^{2+} , Co^{2+} , Sr^{2+} , Cu^{2+} , Ca^{2+} , Mg^{2+} 및 Fe^{2+} 를 포함한다.
- <61> 제형 첨가물은 또한 PSA, PEG 또는 히드록시-베타-시클로덱스크린으로부터 선택된 중합체일 수 있다.
- <62> m-Cresol과 같은 보존제가 또한 사용될 수 있다.
- <63> 제형 첨가물로서 사용되기에 적합한 아미노산 및 아미노산 유도체는 히스티딘, 글리신, 다른 유사 아미노산 및 소듐 아스팔테이트를 포함한다.
- <64> 본 발명의 다른 관점은 치료시 사용하기 위한 상기 기재한 바와 같은 화합물이다.
- <65> 본 발명의 다른 관점에 따르면, 본 출원인은 인슐린 또는 인슐린-유사 단백질의 폴리사카라이드 유도체를 제조하는 방법을 제공하고 여기서, 2-125개의 사카라이드 단위를 포함하는 음이온성 폴리사카라이드는 실질적으로 인슐린 또는 인슐린-유사 단백질의 N-말단 아민에서만 화학 반응한다.
- <66> 용어 "실질적으로 N-말단 아민에서만 화학 반응함"이란 단백질의 85% 이상, 더 바람직하기는 90% 이상, 가장 바람직하기는 95% 이상의 유도체 집단이 그것의 N-말단 아민에서만 유도된다는 것을 의미한다.
- <67> 본 방법과 하기 설명된 바와 같이 바람직한 구체에 중 하나에 의해 얻어질 수 있는 폴리사카라이드 유도체는 또한 본 발명의 일부를 형성한다.
- <68> 본 출원인은 폴리사카라이드를 단백질에 컨쥬게이션하는 새로운 방법을 개발함으로써, 단백질 N-말단의 높은 반응성을 이용하여, 과요오드산 산화된 천연 콜로민산을 갖는 단백질의 환원성 아민화에 대한 확립된 방법(도 1 및 도2)를 사용하여 얻어진 생산물 복합체를 피할 수 있었다.
- <69> 폴리사카라이드는 또한 인슐린의 변형된 형태와 반응할 수 있다. 예를 들면, 인슐린상의 하나 이상의 기는 예를 들면, 환원 또는 산화와 같은 화학적 변형을 겪을 수 있다. 환원성 카보닐은 예를 들면, 산화 조건을 사용하여 인슐린의 말단 아미노기 위치에서 발생될 수 있다.
- <70> 본 발명의 방법에 사용하기에 적합한 폴리사카라이드는 신규한 조성물에 상기 기재된 바와 같다.
- <71> 본 발명의 화합물은 종래 기술에서 기재된 적합한 방법 중 어느 것에 의하여 제조될 수 있다. 예를 들면, 통상적인 방법은 본 출원인의 이전 특허 출원 WO 92/22331에 기재되어 있다.
- <72> 통상적으로, 음이온성 폴리사카라이드는 인슐린으로 유도되기 전에 활성화된다. 그것은 예를 들면, 반응성 알데히드기를 가질 수 있고 유도화 반응은 환원 조건하에 수행될 수 있다. 반응성 알데히드기는 폴리사카라이드의 히드록실기의 산화를 조절함으로써 제조될 수 있다. 이 반응성 알데히드는 수용액에서 폴리사카라이드가 조절된 산화 조건하에, 예를 들면, 과요오드산 나트륨을 사용하여 반응하는, 이전 단계에 발생하는 것이 가장 바람직하다. 산화는 화학적 산화가 바람직하지만, 이 단계를 수행할 수 있는 효소가 또한 사용될 수 있다. 반응성 알데히드기는 폴리사카라이드의 비-환원 말단 또는 환원 말단에 있을 수 있다. 환원성 인슐린의 N-말단 유도체를 제조하는 부가물을 제조하기 위하여, 인슐린, 통상적으로 N-말단은 그 다음 반응성 알데히드기와 반응할 수 있다.
- <73> 폴리사카라이드의 활성화는 바람직하기는 실질적으로 분자량 감소가 없는, 폴리사카라이드 백본(backbone)의 중간-사슬 분열이 실질적으로 존재하지 않는 조건 하에서 수행되어야 한다. 산화제는 perhuthenate가 적합하고, 과요오드산이 바람직하다. 산화는 1mM 내지 1M 범위의 농도, 3 내지 10 범위의 pH, 0 내지 60°C 범위의 온도, 1 내지 48시간 범위의 시간에서 과요오드산으로 수행될 수 있다.
- <74> 유도화 반응에 적합한 환원 조건은 촉매 또는 바람직하기는 보로하이드리드와 같은 하이드리드와 수소를 사용할 수 있다. 이들은 Amberlite (상표명)-담지된 보로하이드리드와 같이 부동태화될 수 있다. 소듐 보로하이드리드와 같은 알칼리 금속 하이드리드는 1 μ m 내지 0.1 M 범위의 농도, 4 내지 10 범위의 pH, 0 내지 60°C 범위의 온도 및 1분 내지 72시간의 기간에서 환원제로서 사용되는 것이 바람직하다. 반응 조건은 출발 물질상의 펜던트(pendant) 카복실기가 환원되지 않는 것이 선택된다. 다른 적합한 환원제는 산성 조건, 예를 들면, 중합체 지지된 시아노보로하이드리드 또는 알칼리 금속 시아노보로하이드리드, L-아스코르빈산, 소듐 메타비설피트, L-실렉트린드, 트리아세톡시보로하이드리드 등과 같은 시아노보로하이드리드이다.
- <75> 폴리사카라이드의 다른 활성화된 유도체가 본 발명에서 이용될 수 있고, 본 출원인의 이전 특허 출원 WO 06/00540에 기재된 바와 같이, NHS와 같은 펜던트 관능기를 갖는 것들을 포함한다.
- <76> 한 구체예에서, 반응성 알데히드는 폴리사카라이드의 환원성 말단에 있고, 비-환원성 말단은 인슐린의 펜던트기

와 반응하지 않게 무반응화되어 있다.

- <77> 비록 단백질 표적 쪽은 약하지만, 콜로민산의 환원성 말단의 반응성은 화학적으로 정의된 컨쥬게이트의 제조시 곤란하게 되기에 충분하다.
- <78> 폴리사카라이드의 환원성 말단에 반응성 알데히드를 갖는 폴리사카라이드의 제조에 적합한 화학은 본 출원인의 이전 출원 WO 05/016974에 기재되어 있다. 공정은 환원성 말단과 무반응화된 비-환원성 말단에 알데히드를 갖는 화합물을 제조하기 위하여 환원시킨 후 다시 추가 산화시키는 예비 선택적 산화 단계를 포함한다.
- <79> WO 2005/016973는 단백질에 컨쥬게이션하기에 유용한 폴리시알산 유도체 특히, 유리 설프히드릴 약물을 가지는 것들을 기재하고 있다. 폴리시알산 화합물은 헤테로이관능성 시약과 반응하여 설프히드릴기에 부위-특이적 컨쥬게이션을 위한 팬던트 관능기를 도입한다. 본 발명에서 사용된 음이온성 폴리사카라이드는 또한 상기 방법의 헤테로이관능성 시약으로 유도될 수 있다.
- <80> 폴리사카라이드는 인슐린과 반응하기 전에 유도될 수 있다. 예를 들면, 폴리사카라이드는 이관능성 시약과 반응할 수 있다.
- <81> 폴리사카라이드는 예비 반응 단계에 제공될 수 있으며, 상기 1차 아미노기, 2차 아미노기 및 히드라진으로부터 선택된 기는 말단 사카라이드상에 형성되며, 시알산이 바람직하고, 그 다음 반응 단계는 WO 2006/016168에 추가로 기재된 바와 같이 이관능성 시약과 반응하여 반응-중간체를 형성한다. 그 다음, 중간체는 인슐린 또는 인슐린-유사 펩티드와 반응할 수 있다. 이관능성 시약은 상기 정의된 바와 같이 일반식 $Z-R^1-Z$ 를 가질 수 있다.
- <82> 본 출원인은 특정 반응 조건이 인슐린의 N-말단에서의 선택적 유도화를 향상시킨다는 것을 발견하였다. N-말단에서의 선택적 반응을 향상시키기 위하여, 유도화 반응은 산성 pH 제1수용액에서 수행되어야 하고, 그 다음 생성된 폴리사카라이드 유도체는 제1수용액 보다 높은 pH를 갖는 제2수용액에서 정제되어야 한다. 산성 pH의 경우, 본 출원인은 7 이하의 pH를 의미한다. 통상적으로 제1수용액의 pH는 4.0-6.5, 바람직하기는 4.0-6.0 범위이고, 제2수용액의 pH는 6.5-9.0, 바람직하기는 6.5-8.5 또는 6.5-8.0 범위이다. 유도화 반응의 낮은 pH는 어느 중간-사슬 위치보다는 단백질의 N-말단에서 선택적 유도화를 향상시킨다.
- <83> 또한, 본 출원인은 특정 제형 첨가물의 사용이 선택적, 안정한, 폴리사카라이드 인슐린-유도체의 형성을 향상시킨다는 것을 발견하였다. 제형 첨가물은 하나 이상의 완충제, 안정화제, 계면활성제, 염, 중합체, 금속 이온, 당, 폴리올 또는 아미노산으로부터 선택될 수 있다. 이들은 반응 배지에 첨가되거나, 선택적으로 안정제로서 최종 제품 조성물에 첨가될 수 있다.
- <84> 본 발명의 한 구체예에서, 제형 첨가물은 솔비톨, 트레할로스 또는 수크로즈이다. 다른 구체예에서, 제형 첨가물은 비-이온성 계면활성제이다. 제형 첨가물은 선택적으로 PSA, PEG 또는 히드록시-베타-시클로덱스트린으로부터 선택된 중합체일 수 있다. 다른 구체예에서, 제형 첨가물은 2가 금속 이온이다. 바람직한 2가 금속 이온은 Zn^{2+} , Ni^{2+} , Co^{2+} , Sr^{2+} 또는 Fe^{2+} 를 포함한다.
- <85> 제형 첨가물은 완충제일 수 있다. 제형 첨가물이 완충제인 경우, 인산 나트륨 또는 아세트산 나트륨이 바람직하다
- <86> 본 발명의 방법에 따르면, 폴리사카라이드 유도체의 정제는 당업계에 공지된 다양한 방법을 사용하여 수행될 수 있다. 적합한 정제 방법의 예는 HIC (소수성 상호작용 크로마토그래피), SEC (크기 배제 크로마토그래피), HPLC (고 성능 액체크로마토그래피) 및 IEC (이온 교환 크로마토그래피)를 포함한다.
- <87> 넓은 분자량 분포를 갖는 폴리시알산 집단은 낮은 다분산성을 갖는 분획물 즉, 평균 분자량을 다르게 가지는 분획물로 분획될 수 있다. 분획화는 본 출원인의 이전 특허 출원 WO 2005/016794 및 WO 2005/03149에 기재된 바와 같이, 적합한 염기 완충제를 용출하기 위해 사용하는, 음이온 교환 크로마토그래피에 의해 수행되는 것이 바람직하다. 분획화는 폴리사카라이드 출발 물질뿐 아니라 유도체에도 적합하다. 또한, 기술은 본 발명의 필수 공정 단계 전에 또는 후에 적용될 수 있다. 생성된 인슐린의 폴리사카라이드 유도체는 1.1 이하의 다분산성을 가지는 것이 바람직하다.
- <88> 본 발명에 따르면, 인슐린의 유도화는 반감기를 증가시키고, 안정성을 개선시키며, 면역원성을 감소시키고 및/또는 용해성을 조절하여, 인슐린의 용해성 및 생체이용성 및 약물동태학을 조절한다. 신규한 방법은 모노폴리시알산화-인슐린 컨쥬게이트의 특정 제조 수처에 대한 것이다.

<89> 본 발명은 실시예 1 내지 6과 하기의 도면을 참고로 하여 설명된다.

실시예

1. 단백질 및 콜로민산 측정

<105> 레조르시놀 시약을 사용하여 폴리시알산(시알산)의 정량적 측정을 다른 문헌에 기재된 바와 같이[Gregoriadis 등, 1993; Fernandes and Gregoriadis, 1996, 1997] 레조르시놀법으로 수행하였다[Svennerholm 1957]. 단백질을 BCA 열량분석법 또는 280nm에서 UV 흡광도로 측정하였다.

2. 콜로민산의 활성

<106> 새롭게 제조된 0.2M 메타과요오드산염(NaIO₄) 용액(8배 몰 과량)을 20℃에서 CA로 혼합하고 반응 혼합물을 암실에서 15분 동안 자기적으로 교반하였다. 그 다음, 2-배 부피의 에틸렌 글리콜을 반응 혼합물에 첨가하여 과량의 NaIO₄로 확장하고 혼합물을 추가 13분 동안 20℃에서 교반하였다. 산화된 콜로민산(CAO)을 4℃에서 0.01% 압모늄 카보네이트 완충제(pH 7.4)에 대해 광범위하게 삼투시켰다(3.5KDa 분자량 컷 오프 삼투튜브). 삼투 튜브에서 CAO 용액을 농축시키기 위하여 외여과법(과분자량 컷 오프 3.5kDa)을 사용하였다. 필요한 부피로 농축시킨 후, 여과물을 냉동건조시키고 추가 사용시까지 -40℃에서 보관하였다. 선택적으로, CAO를 에탄올로 침전시켜(2회) 반응 혼합물에서 회수하였다.

3. CA와 유도체들의 산화상태의 측정

<107> 콜로민산 산화 정도의 정량적 평가를 2,4-디니트로페닐히드라진(2,4-DNPH)로 수행하여, 카보닐 화합물과의 상호작용으로 난용성(sparingly soluble) 2,4-디니트로페닐-히드라존을 생성하였다. 비-산화(CA)/산화(CAO)를 2,4-DNPH 시약(1.0ml)에 첨가하고, 용액을 흔들고 난 후, 결정성 침전물이 관찰될 때까지 37℃에서 방치하였다 [Shriner 등, 1980]. CA 산화의 정도(정량적)를 알칼리 용액에서 페리시아나이드 이온의 페릭 페로시아나이드로의 환원을 기초로 하는 방법[Park and Johnson, 1949]으로 측정한 후, 630nm에서 측정하였다. 이경우, 글루코스를 표준으로 사용하였다.

4. 겔 투과성 크로마토그래피

<108> 콜로민산 샘플(CA 및 CAO)을 NaNO₃(0.2M), CH₃CN(10%; 5mg/ml)에 용해시키고, 2x GMPWXL 컬럼에서 굴절률을 측정하여 색층분석하였다(GPC 시스템: VE1121 GPC 용매 펌프, VE3580 RI 검출기 및 Trisec 3 software (Viscotex Europe Ltd)에 의한 대조). 샘플(5mg/ml)을 0.45μm 나일론 막상에 여과하고, 이동상으로서 0.2M NaNO₃ 및 CH₃CN(10%)으로 0.7cm/min에서 작동시켰다.

5. 콜로민산 안정성

<109> PEG화의 화학 법칙은 상기 분자들의 물리화학적 특성에서의 차이로 인하여 폴리시알화에 적용될 수 없다. PSA는 산에 의해 분해가능한 물질이고 중성 pH 근처에서 수주일 동안 안정하다(도 3). 도 3의 결과는 pH 6.0 및 7.4 CAO가 천천히 분해하는 pH 5.0(48시간 후 초기 MW의 92%) 및 천천히 분해하는 pH 4.0(48시간 후 초기 MW의 70%)에서 8일 동안 안정하다는 것을 나타낸다. 폴리시알산은 고 친수성을 가지나, PEG는 자연에서 양쪽친화성 분자이다. 폴리시알화를 PEG화에 사용된 조건을 사용하여 수행하는 경우, 단백질의 응집 및 침전이 많이 나타난다.

6. 제형 첨가물로 N-말단 단백질-CA 컨쥬게이트의 제조

6.1 인슐린-CA 컨쥬게이트의 제조(N-말단 방법)

<110> 인슐린 (5804 Da)은 백색 고체가 제공되었다. 인슐린을 최소량의 100mM HCl로 용해시킨 후, 필요한 pH로 조절하고 얼음상에 넣었다. 컨쥬게이션시 첨가될 CAO의 양은 하기의 공식을 기준으로 계산되었다:

$$\text{단백질의 양 (g)} \\ \text{CAO의 종량} = \frac{\text{단백질의 양 (g)}}{\text{(단백질의 MW)}} \times (\text{CAO의 MW}) \times (\text{CAO의 몰 과량})$$

<111> 필요한 CAO의 양을 달았다. CAO를 10mM NaOAc, pH 6.0에서 용해시키고, CAO가 모두 용해될 때까지 혼합물을 살짝 볼텍스한 후, 새로운 용기에 여과시켜 모든 응집/침전 물질을 제거하였다. 필요한 양의 인슐린 단백질 용액

을 CAO 용액에 첨가하여 CAO의 7.5 몰 과량 (소규모) 및 5 (대규모)를 제공하고, 4±1℃에서 반응 혼합물을 온화한 교반기상에 놓고 살짝 혼합하였다. 최종 반응 혼합물내 8mg/ml를 갖기 위하여, 100mg/ml NaCNBH3 용액을 첨가하여 살짝 혼합하고, 최종 반응 혼합물의 pH를 확인하고, 필요한 경우 4±1℃에서 0.5M NaOH/HCl으로 6.0까지 pH를 조절하였다. 마지막으로, 10mM NaOAc, pH 6.0를 사용하여 반응의 부피를 조절하여 반응 혼합물내 1mg/ml의 단백질 농도를 제공하였다. 튜브를 밀봉하고 24시간 동안 원하는 온도(4±1℃)에서 교반하였다. 적절한 방법(tris(히드록시메틸)아미노메탄 완충제 pH 7.4 등)으로 반응을 정지시키고, 샘플을 꺼내어 SDS-PAGE (18% Tris 글리신 겔 사용), SE-HPLC (수퍼로즈 12 컬럼)하여 반응 혼합물의 pH를 확인하였다. 반응 혼합물의 어느 침전물을 제거하기 위하여 SE-HPLC 분석 및 정제를 시행하기 전에 5분 동안 13000rpm에서 원심분리하였고, SE-HPLC에 바람직한 완충제는 0.1M Na 포스페이트 (pH 6.9)였다.

6.2 최적화

<121> 환원성 아민화는 N-말단 및 임의의 유도화를 위해 인슐린 상에 CAO (10-30kda) 분자량 범위로 수행되었다. 공정 변수의 범위를 컨쥬게이션 반응을 위해 연구하였다: CAO 10-20 (소규모) 및 5-10 (대규모) 몰 과량; 시약 = 50-100mM NaCNBH3 반응 완충제 = 10mM NaOAc pH 5.5-6.5, 온도 = 4±1℃, 시간 = 16-24 시간 등.

<122> 최적화 반응 조건이 하기와 같이 될 때 발견되었다: CAO = 7.5 (소규모) 및 5 (대규모) 몰 과량, 시약 = 50mM NaCNBH3, 반응 완충제 = 10mM NaOAc pH 5.5, 온도 = 4±1℃, 시간 = 24 시간.

6.3 인슐린-CA 컨쥬게이트의 정제 및 특징화 (N-말단 방법)

<124> 혼합물에서 유리 CAO를 제거하기 위하여, HIC (HiTrap Butyl FF)를 사용하였다. 최소 부피를 갖는 인슐린 반응 혼합물을 농축된 (NH₄)₂SO₄ (예를 들면, 3 M), 20mM Na₂HPO₄ (pH 7.4)를 사용하여 희석시켜 적재 용액을 제조하여 적재 용액에 0.8M (NH₄)₂SO₄ 농도를 제공하였다. pH의 확인은 7.4에서 하거나 또는 0.5M HCl/NaOH로 조절되어야 하고, 적재 용액은 0.2μm 막 필터로 여과될 필요가 있다.

<125> 그 다음, 상기 용액을 HIC 완충제 B (20mM 인산 나트륨 + 0.8M (NH₄)₂SO₄, pH 7.4)로 평형시키기 전에, HIC 컬럼 (비율 = 0.5ml/min)상에 적재하였다. 적재 분획물을 수거하고 (각 분획물 1.5 컬럼 부피) 컬럼을 HIC 완충제 B (5 컬럼 부피 이상; 비율 = 0.5 ml/min; 1.5 컬럼 부피 분획물)으로 세정한 다음 라벨 (L1-Lx)을 수거하여 라벨하였다(W1-Wx). HIC 완충제 A (10mM 인산 나트륨 완충제, pH 7.4) (비율 = 5 ml/min)을 갖는 생산물을 용출하고 분획물 (1 컬럼 부피 분획물; 6 컬럼 부피) 및 라벨 (E1-Ex)을 수거하였다. 두개의 연속 분획물이 단백질 내용물(UV280 nm)에 없는 경우, 다음 단계를 수행하였다, 샘플을 정제하는 동안 얼음상에 두었다. 단백질을 UV (280nm) (1mg/ml의 인슐린 흡광 계수는 280nm에서 약 1.043이었다). 샘플을 꺼내어 SDS-PAGE 및 SE-HPLC를 수행하였다.

<126> 단백질을 분획물을 함유하는 HIC 분획물을 IEC 완충제 A (20mM 포스페이트 완충제, pH 7.4)로 세정하였다. 암모늄 설페이트가 있으면 Vivaspin 20(MW: 5 Kd)에서 제거하였다. pH를 확인하고 필요한 경우 pH 7.4로 조절하였다. IEC 완충제 A로 평형시키기 전에 IEC 컬럼에 적재하였다. 경사도 시스템을 하기의 방법으로 적용하였다.

<127> 적재: IEC 완충제 A내 0.25ml/min의 주입된 샘플, 3CV 세정

<128> 세정: 경사도 시스템: IEC 완충제 A: 90%, AEX 완충제 B (20mM 포스페이트 완충제 + 1M NaCl, pH 7.4): 10%, 5CV 경사도 & 3CV 세정, 유속: 0.25ml/min

<129> IEC 완충제 A: 68%, IEC 완충제 B: 32%, 5 CV 경사도 & 3 CV 세정, 유속: 0.25ml/min

<130> IEC 완충제 A: 35%, IEC 완충제 B: 65%, 5CV 경사도 & 3CV 세정, 유속: 0.25ml/min

<131> IEC 완충제 A: 0%, IEC 완충제 B: 100%, 5CV 경사도 & 3CV1 세정, 유속: 0.25ml/min

<132> 정제된 컨쥬게이트를 함유하는 IEC 분획물을 모으고, 세정하여 PBS 완충제로 완충제를 바꾸어 염을 제거하였다. 염을 제거한 후 pH를 7.4로 조절하였다. 그 다음, 용액을 4±1℃에서 농축시키고 단백질을 UV 분광법 (280nm)으로 분석하였다. 컨쥬게이트를 멸균 여과하고 샘플을 꺼내어 SDS-PAGE 및 SE-HPLC로 활성 분석 및 특징화하였다. 필요에 따라, 단백질을 분석 및 CA 분석을 위해 분취물을 제거하였다. 잔여물을 추가 사용시까지 4±1℃에서 저장하고 SE-HPLC로 물리적 안정성을 검토하였다.

<133> 용액내 인슐린의 안정성에 영향을 미치는 다양한 공정의 효과와 유도화도를 검토하였다.

6.4 인슐린-14kDaCA 컨쥬게이트의 제조 (단분산)

<135> 인슐린 (5808Da)을 백색 고체로 공급하였다. 인슐린을 최소량의 100mM HCl을 첨가시키면서 용해한 후, 필요한 pH로 조절하고 얼음에 넣었다. 컨쥬게이션시 첨가될 14kDa CA의 양은 하기의 공식을 기초로 계산하였다:

단백질의 양 (g)

14 kDa CAO의 중량 = ----- x (CAO의 MW) x (CAO의 몰 과량)

<136>

<137> 필요한 14kDa CAO의 양을 달았다. 14kDa CAO를 10mM 포스페이트 완충제, pH 6.0 (최종 반응 부피의 20% 부피가 본 반응에서 사용되었다)에 용해시키고, 14kDa CAO가 모두 용해될 때까지 약하게 볼텍스한 후, 새로운 용기로 여과하여 모든 응집/침전 물질을 제거하였다. 인슐린 단백질 용액의 필요한 양을 14kDa CAO 용액에 첨가하여 14kDa CAO의 7.5 몰 과량 (소규모) 및 5 (대규모)를 제공하고 4±1°C에서 반응 혼합물을 온화한 교반기에 넣고 약하게 혼합하였다. 최종 반응 혼합물내 63.5mM 또는 4mg/ml를 갖기 위하여, 100mg/ml NaCNBH₃ 용액을 첨가하여 살짝 혼합하고, 최종 반응 혼합물의 pH를 확인하고, 필요에 따라, 4±1°C에서 0.5M NaOH/HCl으로 pH를 6.0까지 조절하였다. 마지막으로, 반응의 부피를 10mM NaOAc, pH 6.0를 사용하여 조절하고 반응 혼합물내 1mg/ml의 단백질 농도를 제공하였다. 튜브를 밀봉하고 24시간 동안 원하는 온도(4±1°C)에서 교반하였다. 적절한 방법으로 반응을 정지시키고, 샘플을 꺼내어 SDS-PAGE (18% Tris 글리신 겔 사용), SE-HPLC (수퍼로즈 12 컬럼)하여 반응 혼합물의 pH를 확인하였다. 모든 침전물을 제거하기 위하여 반응 혼합물을 SE-HPLC 분석 및 정제를 시행하기 전에 5분 동안 13000rpm에서 원심분리 하고, SE-HPLC에 바람직한 완충제는 0.1M Na 포스페이트 (pH 6.9)였다.

<138> **6.5 최적화**

<139> 환원성 아민화를 N-말단 및 임의의 유도화를 위한 인슐린에 CA (10-30kda) 분자량 범위로 수행하였다. 공정 변수의 범위를 컨쥬게이션 반응을 위해 연구하였다: CAO 10-20 (소규모) 및 5-10 (대규모) 몰 과량; 시약 = 50-100mM NaCNBH₃ 반응 완충제 = 10mM 포스페이트 완충제, pH = 5-7.4, 온도 = 4 -37±1°C, 시간 = 16-24 시간.

<140> 최적화 반응 조건이 하기와 같이 될 때 발견되었다: CAO = 7.5 (소규모) 및 5 (대규모) 몰 과량, 시약 = 63.5 mM NaCNBH₃, 반응 완충제 = 10mM NaOAc pH 6.0, 온도 = 4±1°C, 시간 = 24 시간.

<141> **6.6 인슐린-CA 컨쥬게이트의 정제 및 특징화 (N-말단 방법)**

<142> 혼합물에서 유리 CAO를 제거하기 위하여, HIC를 사용하였다. 최소 부피를 갖는 인슐린 반응 혼합물을 농축된 (NH₄)₂SO₄ (예를 들면, 3 M), 20mM Na₂HPO₄ (pH 7.4)를 사용하여 희석시켜 적재 용액을 제조하여 적재 용액에 0.8M (NH₄)₂SO₄ 농도를 제공하였다. pH의 확인은 7.4에서 하거나 또는 0.5M HCl/NaOH로 조절되어야 하고, 적재 용액은 0.2mm 막 필터로 여과될 필요가 있다.

<143> 그 다음, 상기 용액을 HIC 완충제 B (20mM 인산 나트륨 + 0.8M (NH₄)₂SO₄, pH 7.4)로 평형시키기 전에, HIC 컬럼 (비율 = 0.5ml/min)상에 적재하였다. 적재 분획물(각 분획물 1.5 컬럼 부피) 및 라벨 (L1-Lx)을 수거하였다. 컬럼을 HIC 완충제 B (5 컬럼 부피 이상; 비율 = 0.5 ml/min; 1.5 컬럼 부피 분획물)로 세정한 분획물과 라벨 (W1-Wx) 수거하였다. HIC 완충제 A (10mM 인산 나트륨 완충제, pH 7.4) (비율 = 5ml/min)로 생산물을 용출하고; 분획물 (1 컬럼 부피 분획물; 6 컬럼 부피) 및 라벨 (E1-Ex)을 수거하였다. 두개의 연속 분획물이 단백질 내용물(UV280 nm)에 없는 경우, 다음 단계를 수행하였다, 정제하는 동안 샘플을 얼음에 두었다. 단백질 농도를 UV (280nm) (1mg/ml의 인슐린 흡광 계수는 280nm에서 약 1.043이었다)로 분석하였다. 샘플을 꺼내어 SDS-PAGE 및 SE-HPLC를 수행하였다.

<144> 단백질 분획물을 함유하는 HIC 분획물을 IEC 완충제 A (20mM 포스페이트 완충제, pH 7.4)로 세정하였다. 암모늄 셀레이트가 존재하는 경우 Vivaspin 20(MW: 5 Kd)에서 제거하였다. pH를 확인하고 필요한 경우 pH 7.4로 조절하였다. IEC 완충제 A로 평형시키기 전에 IEC 컬럼에 적재하였다. 경사도 시스템을 하기의 방법으로 적용하였다:

<145> 적재: IEC 완충제 A내 0.25ml/min의 주입 샘플, 3CV 세정

<146> 세정: 경사도 시스템: IEC 완충제 A: 90%, AEX 완충제 B (20mM 포스페이트 완충제 + 1M NaCl, pH 7.4): 10%, 5CV 경사도 & 3CV 세정, 유속: 0.25ml/min IEC

<147> 완충제 A: 68%, IEC 완충제 B: 32%, 5CV 경사도 & 3CV 세정, 유속: 0.25ml/min

<148> IEC 완충제 A: 35%, IEC 완충제 B: 65%, 5CV 경사도 & 3CV 세정, 유속: 0.25ml/min

<149> IEC 완충제 A: 0%, IEC 완충제 B: 100%, 5CV 경사도 & 3CV 세정, 유속: 0.25ml/min

- <150> 정제된 컨주게이트를 함유하는 IEC 분획물을 모으고, 세정하여 PBS 완충제로 완충제를 바꾸어 염을 제거하였다. 염을 제거한 후 pH를 7.4로 조절하였다. 그 다음, 용액을 4±1℃에서 농축시키고 단백질 농도를 UV 분광법(280nm)으로 분석하였다. 컨주게이트를 멸균 여과하고 샘플을 꺼내어 SDS-PAGE 및 SE-HPLC로 활성 분석 및 특징화하였다. 필요에 따라, 단백질 분석 및 CA 분석을 위해 분취물을 제거하였다. 잔여물을 추가 사용시까지 4±1℃에서 저장하고 SE-HPLC로 물리적 안정성을 연구하였다.
- <151> 용액내 인슐린의 안정성에 영향을 미치는 다양한 공정의 효과와 유도화도를 연구하였다.
- <152> **6.7 인슐린 제형의 SE-HPLC**
- <153> Jasco, AS-2057와 4℃에서 냉각되는 자동샘플러, 및 Jasco UV-975 UV/VIS 검출기를 갖춘 액체 크로마토그래피(JASCO)상에 HPLC를 수행하였다. 데이터는 IBM/PC상의 EZchrom Elite 소프트웨어로 기록되었다. SEC 샘플을 Superose 12 컬럼상에 0.1M Na 포스페이트, pH 6.9의 등용매조성(isocratic)인 이동상으로 분석하였다(도 8). 도 8은 인슐린의 속성인, RT = 75.408에서의 한 피크만을 나타낸다.
- <154> **6.8 SDS 폴리아실아미드 겔 전기영동 & 웨스턴 블롯팅**
- <155> SDS-PAGE을 18% 트리글리신 겔을 사용하여 수행하였다. 샘플을 환원성 또는 비 환원성 완충제로 희석하고, 5.0ug의 단백질을 각 웰에 적재하였다. 겔을 트리글리세린 완충제 시스템에 작동시키고 Coomassie Blue로 착색하였다(도 5 & 7). 웨스턴 블롯팅을 항 PSA 항체를 사용하여 수행하였다. 도 4는 인슐린 제형의 SDS-PAGE를 나타낸다(부위-특이성; N-말단).
- <156> **6.9 27 및 13kDa CAO-인슐린의 등전점 전기영동 (IEF) 겔**
- <157> Novex[®] IEF 겔을 사용하여 인슐린과 CAO-인슐린 컨주게이트 등전점에서의 차이를 측정하였다. 샘플을 0.5mg/ml 농도에 용해하였다. 5ul 샘플을 5ul Novex IEF 샘플 완충제 pH 3-10를 사용하여 희석한 후, 겔상에 단백질 샘플을 적재하였다.
- <158> **6.10 안정성 검토**
- <159> 멸균 인슐린 컨주게이트를 6주 동안 4℃에서 PBS 완충제에 저장하였다. 시료의 천연-PAGE를 매주 수행하였다
- <160> **6.11 인슐린 제형의 생체내 효율성**
- <161> 인슐린 제형의 생체내 효율성을 7-8주령의 암컷 마우스 CD-1로 연구하였고, 0.3IU의 단백질 투여량(동일 활성)을 마우스로 피하내 주사하였다. 동물을 4마리씩 7군으로 나누었다. 인슐린 제형을 하기의 방법으로 각 군의 각 동물에게 제공하였다; 인슐린 (0.3IU/마우스), Lantus (Aventis) 인슐린-PSA 컨주게이트 (14kDa), PBS. 혈액 한 방울을 각 동물에서 채취하고 ACCU-CHEK Active (Roche Diagnostics)로 혈당을 측정하였다.
- <162> **결과**
- <163> **CA의 활성 및 산화도의 측정**
- <164> 콜로민산(CA)은 N-아세틸뉴라민산(Neu5Ac)의 선형 알파-2,8-연결된 호모폴리머이고, 잔기를 사용하였다. 산화에 콜로민산의 노출은 실온에서 20mM 과요오드산을 사용하여 1분 동안 수행되었다. 과요오드산을 처리한 후에 내부 알파-2,8-연결된 Neu5Ac의 완전성을 겔 투과성 크로마토그래피로 분석하고, 산화된(CAO) 물질의 크로마토그래피를 천연 CA 물질의 크로마토그래피와 비교하였다. 산화된 및 천연 CA는 거의 동일한 용출 프로파일을 나타내고, 연속적 산화 단계가 중합체 사슬의 상당한 분획화를 발생시킨다는 증거가 없다는 것을 발견하였다.
- <165> CA 산화의 정량적 측정을 글루코스를 표준으로 사용하여, 알칼리 용액에서 페리시아나이드 이온을 페릭 페로시아나이드로(Prussian Blue) 환원시켜 수행하였다[Park and Johnson, 1949]. 그것은 산화된 콜로민산이 환원제의 화학양론적 양(>100%)보다 큰, 즉 환원 말단 헤미케탈과 (다른 말단에)도입된 알데히드의 결합된 환원력을 포함하는 외관 알데히드 함량의 112 몰%을 가진다는 것을 나타낸다.
- <166> **폴리시알화 반응의 최적화**
- <167> 폴리시알화 조건은 다양한 온도 및 반응물 몰 비, 및 사슬 길이하에서 CAO를 갖는 1mg rh-인슐린을 사용하여 최적화되었다. 결과를 도 5-12에 나타내었다. 4℃는 반응시 CAO와 인슐린 안정성에 대한 최적 온도로 나타내었다. 그러나, 고온에서, 인슐린이 더 유효하도록, 더 많은 컨주게이션이 CAO와 인슐린의 7.5:1의 몰비로 달성되었다.

<168> 표 1: 물 비가 폴리시알화에 미치는 효과

웰 번호	1	3	5	7	8	11	12
물 비	1 : 1	1 : 2	1 : 4	Ma	인슐린	1 : 7.5	1 : 10
CAO MW	100 CHO% 를 갖는 27 kDa CAO						
인슐린 (mg)	1	1	1			1	1
CAO (mg)	4.49	8.98	17.96			33.675	44.9
최종 NaCNBH ₃	4 mg/ml						
반응	4						
pH	6						

<169>

<170> PBS 조절의 영향 하에, 21.5 kd CAO-인슐린은 표 9에서 사용된 컨쥬게이트 중 마우스에서 혈당을 감소시키는 가장 중요한 효과를 가진다.

<171> 표 2: 다른 사슬 CAO-인슐린 컨쥬게이트 생체내 효율성의 T-시험(통계 분석, 대응-시험)

시간 (분)	0.0	32.0	64.5	99.4	170.8	230.2	303.3	358.0	1354.9
13 kDa CAO-인슐린		**	***	***					
21kDa CAO-인슐린			***	***		*			
27 kDa CAO-인슐린		**	***	**		**			**
32kDa CAO-인슐린		***	***	***					*
인슐린		***	***	***					

<172>

<173> 별표들은 Tris 완충제에 대한 그룹간의 차이의 가능성 정도를 나타낸다: *P < 0.05, **P< 0.01 , ***P < 0.001.

	Lantus	15 KDa CAO-인슐린 (시그마)
0		
30	***	**
60	***	***
90	**	***
120	*	**
150		*
210		
270		
330		

<174>

<175> 별표들은 PBS 완충제에 대한 그룹 사이의 차이의 가능성 수준을 나타낸다: *P < 0.05, **P< 0.01, ***P < 0.001.

<176> 15kDa CAO-인슐린의 생체내 효율성에 미치는 pH의 효과는 또한 pH 6.0이 7.4보다 더 우수하다는 것을 나타낸다. 따라서, 하기의 실험을 pH 6.0에서 수행하였다. 펩티드 맵핑 및 Edman 분해의 데이터는 pH 6.0 폴리시알화 조건에서의 컨쥬게이션이 인슐린의 B 사슬에서 N-말단부를 특이적으로 방해된다는 것을 추가로 확인하였다.

<177> 인슐린 컨쥬게이트의 제조, 정제 및 특징화

- <178> 단백질 CAO-인슐린을 연속적으로 컨쥬게이트 고 순도 컨쥬게이트를 스케일-업 HIC 및 IEC로 정제하였다. 정제 효율성을 도 10에 나타낸 바와 같이 분취용 HPLC로 설정된 IEC와 HIC 조합으로 개선하였다.
- <179> 감소된 pH (pH 6.0)와 $4 \pm 1^\circ\text{C}$ 에서 반응을 수행하여 N-말단 선택적 방법으로 인슐린의 콜로민산(CA) 컨쥬게이트를 제조하고 정제하는 과정은 상기에 설명되었다. 이것은 소듐 시아노보로하이드리드가 존재하는 컨쥬게이션을 포함하고, 소수성 상호작용 크로마토그래피(HIC)를 사용하여 정제된 후 유리 CA(도 11)를 제거하여 이온-교환 크로마토그래피(IEC)로 인슐린을 제거한다. 인슐린의 B-사슬(PheB1)의 N-말단에서 선택적 유도화를 용이하게 하고, 또한 반응시 인슐린의 응집을 최소화하기 위하여 낮은 pH가 사용된다. 최종 반응 완충제의 조성물은 pH 6.0에서 10mM NaOAc 중 1mg/ml 인슐린, 8mg/ml NaCNBH3 및 5 몰 과량 CAO이다.
- <180> 도 13의 13kDa 및 27kDa CAO-인슐린 컨쥬게이트에 대한 등전점 전기영동(IEF) 겔은 폴리시알화된 인슐린의 컨쥬게이트가 일정한 등전점(pI)을 가지지 않는다는 것을 나타낸다.
- <181> 인슐린-CA 컨쥬게이트의 형성 및 안정성을 SE-HPLC (인슐린에 비해 인슐린-PSA의 보유 시간 변화; 또한 두 모이 어티의 동시-용출); 이온 교환 크로마토그래피 (IEC 컬럼상에 컨쥬게이트의 결합) 및 폴리아크릴아미드 겔 전기영동 (고 m.w. 중을 갖는 밴드의 이동)로 확인하였다.
- <182> 생체내 효율성에 사용된 인슐린 컨쥬게이트 (CD-1 마우스, 평균 25g)은 인슐린에 비해 우수한 생체내 효율성 (증가) 및 블린트(프로파일보다 낮은 피크)를 나타내었다. 컨쥬게이트의 혈당 환원력의 증가는 도 14에 나타낸 바와 같이 제형에 사용된 중합체의 사슬 길이에 비례하였다.
- <183> 27kDa CAO-인슐린 컨쥬게이트의 안정성 연구는 천연-PAGE에서 관찰을 기초로 4°C 에서 40일 간의 저장 동안 어느 분해도 없었다는 것을 나타낸다.
- <184> **스케일-업 제조 및 정제로부터 14kDa -인슐린 컨쥬게이트의 특성화**
- <185> 700mg 출발 반응물로서 인슐린의 예에서, 230mg 14kDa CAO-인슐린 (단백질 질량 무게)을 스케일 업 컬럼 정제를 사용하여 생산하였다.
- <186> 크로마토그래피와 비교하면, 도 15에서 이마노산 양의 변화는 N-말단으로부터 아미노산을 나타낸다. PBS내 수성 샘플 1mg/mL pH 7.4를 물로 100배 희석하였다. $2\mu\text{l}$ 의 상기 희석액을 꺼내어 분석하였다. 결론적으로, 염기서열 G-I-V-E는 인슐린의 A 사슬과 동일하다. 아미노산 Phe/Val/Asn/Gln의 부재는 인슐린 B 사슬이 N-말단 차단되었다는 것을 나타낸다.
- <187> PSA 컨쥬게이트는 실험실 활성 분석에서 활성이 발견되었다. 생체내 활성 연구는 PSA-인슐린 컨쥬게이트가 인슐린보다 많이 우수하다는 것을 나타낸다.

<188> 참고문헌

- Geiger et al. (in D. Branderburg, and A. Wollmer (eds.), 1980, Insulin: Chemistry, Structure, and Function of Insulin and Related Hormones, Walter de Gruyter & Co., New York, P409-415,
- Ehrat M., Luisi P.L., 1983, Synthesis and spectroscopic characterization of insulin derivatives containing one or two poly(ethylene oxide) chains at specific positions, Biopolymers, 22: P 569-573,
- Caliceti P, (1999) mprovement of the physicochemical and biopharmaceutical properties of insulin by poly(ethyleneglycol) conjugation, STP Pharma Sciences 9: P 107-113
- Uchio, T., Baudys, M., Liu, F., Song, S.C., Kim, S.W., (1999) Site-specific insulin conjugates with enhanced stability and extended action profile., Advanced Drug Delivery Reviews, 35, P289-306
- Hinds K., Koh J.J, Joss L., Liu F., Baudys M. Kim, S.W., (2000)."Synthesis and Characterization of Poly(ethylene glycol)-Insulin Conjugates," Bioconjugate Chem., 11, 195-201
- Hinds K.D.; Kim S.W. (2002), Advanced Drug Delivery Reviews, 54: 505-530,
- Fernandes, A.I., Gregoriadis, G., Synthesis, characterization and properties of polysialylated catalase, Biochimica et Biophysica Acta, 1293 (1996) 92-96
- Fernandes, A.I., Gregoriadis, G., Polysialylated asparaginase: preparation, activity and pharmacokinetics, Biochimica et Biophysica Acta, 1341 (1997) 26-34.
- Jain, S. et al Polysialylated insulin: synthesis, characteristaion and biological activity in vivo, Biochimica et Biophysica Acta, 1662(2003) 42-49;
- Gregoriadis, G., McCormack, B., Wang, Z., Lively, R., Polysialic acids: potential in drug delivery, FEBS Letters, 315 (1993) 271-276.
- Park, J.T., Johnson, M.J., A submicrodetermination of glucose, Journal of Biological Chemistry, 181 (1949) 149-151.
- Shriner, R. L., Fuson, R.D.C., Curtin, D.Y., Morill, T.C., The Systematic Identification of Organic Compounds, 6th ed., Wiley, New York, 1980.
- Svennerholm, L., Quantitative estimation of sialic acid II: A colorimetric resorcinol-hydrochloric acid method, Biochimca et Biophysica Acta, 24 (1957) 604-611.

<189>

Wang, W., Instability, stabilization, and formulation of liquid protein pharmaceuticals, International Journal of Pharmaceutics, 185(1999) 129-188.

<190>

도면의 간단한 설명

<90>

도 1은 과요오드산 나트륨을 사용한 콜로민산(E. coli로부터 유도한 알파-2,8 결합 폴리시알산)의 산화를 나타낸다;

<91>

도 2는 단백질 아미노기로 안정한 비가역적 공유결합을 형성하기 위하여 소듐 시아노보로하이드리드를 사용한 시프 염기의 선택적 환원을 나타낸다;

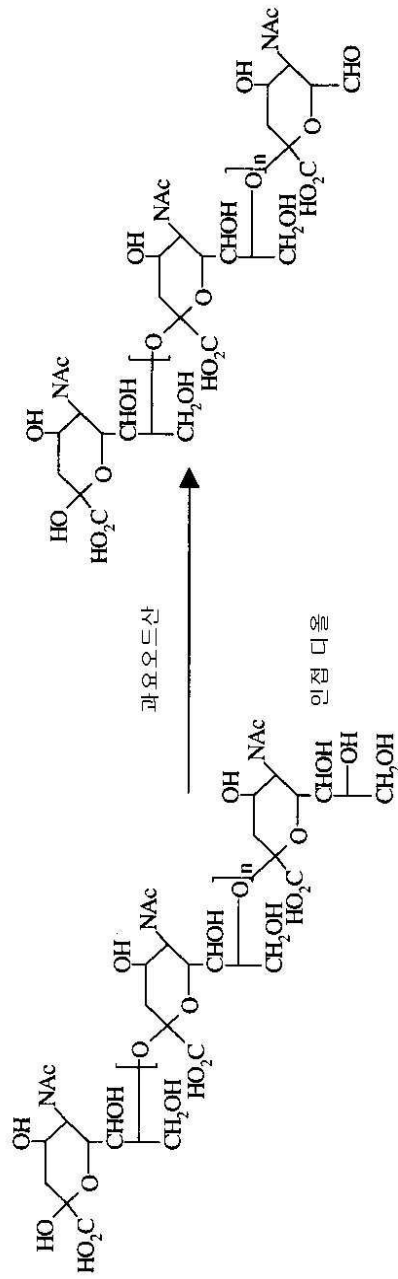
<92>

도 3은 다른 온도에서 22kDa CA0-rh-인슐린 컨쥬게이트의 SDS-PAGE이다;

- <93> 도 4는 유도화도에 미치는 온도의 효과를 나타낸다;
- <94> 도 5는 다른 몰 비에서 27kDa CAO-rh-인슐린 컨주게이트의 SDS-PAGE이다;
- <95> 도 6은 유도화도에 미치는 몰 비의 효과를 나타낸다;
- <96> 도 7은 8 및 11kDa CAO-rh-인슐린 컨주게이트의 SDS-PAGE이다;
- <97> 도 8은 8kDa CAO-rh-인슐린 제형 및 인슐린의 SE-HPLC이다;
- <98> 도 9는 10, 15 및 21.5kDa CAO-인슐린 제형의 체내 효능을 나타낸다;
- <99> 도 10은 컨주게이트를 정제하기 위한 IEC 또는 HIC를 갖는 분취용 HPLC의 실험 설정을 나타낸다;
- <100> 도 11은 HiTrap Butyl FF 칼럼 상의 소수성 상호작용 크로마토그래피에 의한 CAO-인슐린 컨주게이트의 정제를 나타낸다;
- <101> 도 12는 Hitrap Q FF 칼럼상의 음이온 교환 크로마토그래피에 의한, 예를 들면, 13kDa CAO를 갖는, HIC 피크 2로부터 CAO-인슐린 컨주게이트의 정제를 나타낸다;
- <102> 도 13은 13kDa 및 27kDa CAO-인슐린 컨주게이트의 등전 포커싱(isoelectric focusing) 겔이다;
- <103> 도 14는 마우스의 생체내 CAO-인슐린 컨주게이트를 나타낸다;
- <104> 도 15는 Edman 아미노산 분해 결과를 나타낸다.

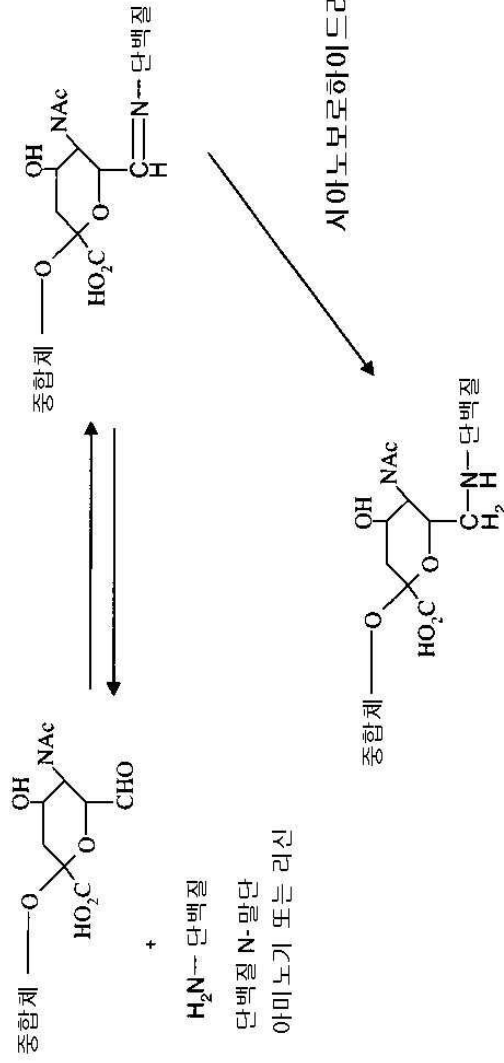
도면

도면1

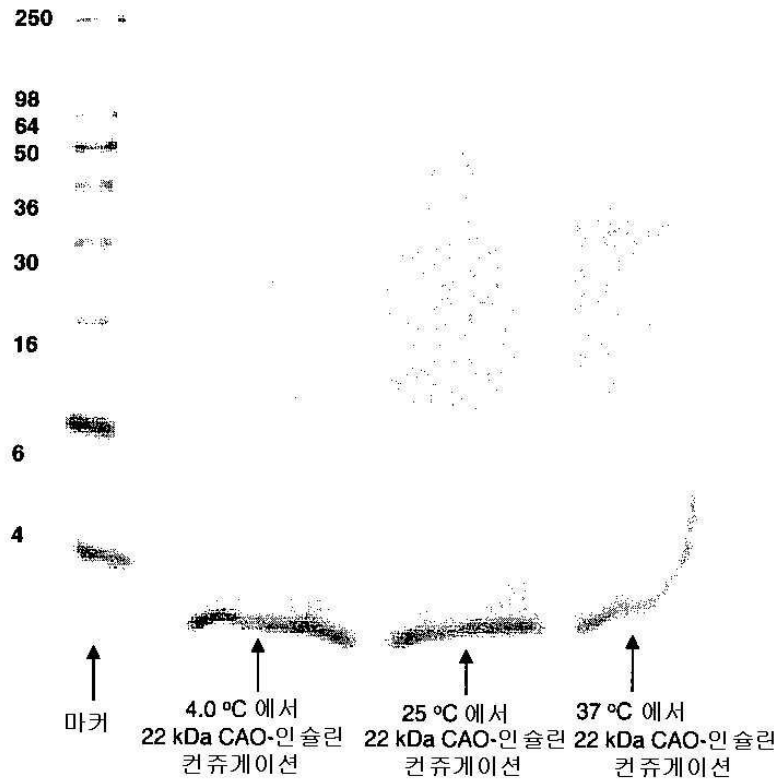


도면2

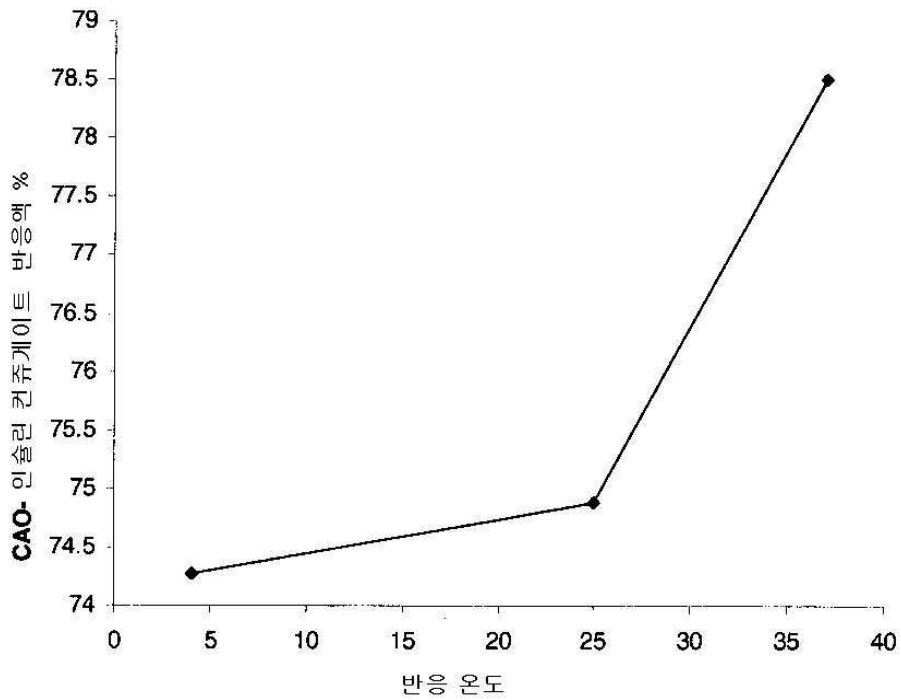
산화된 PSA



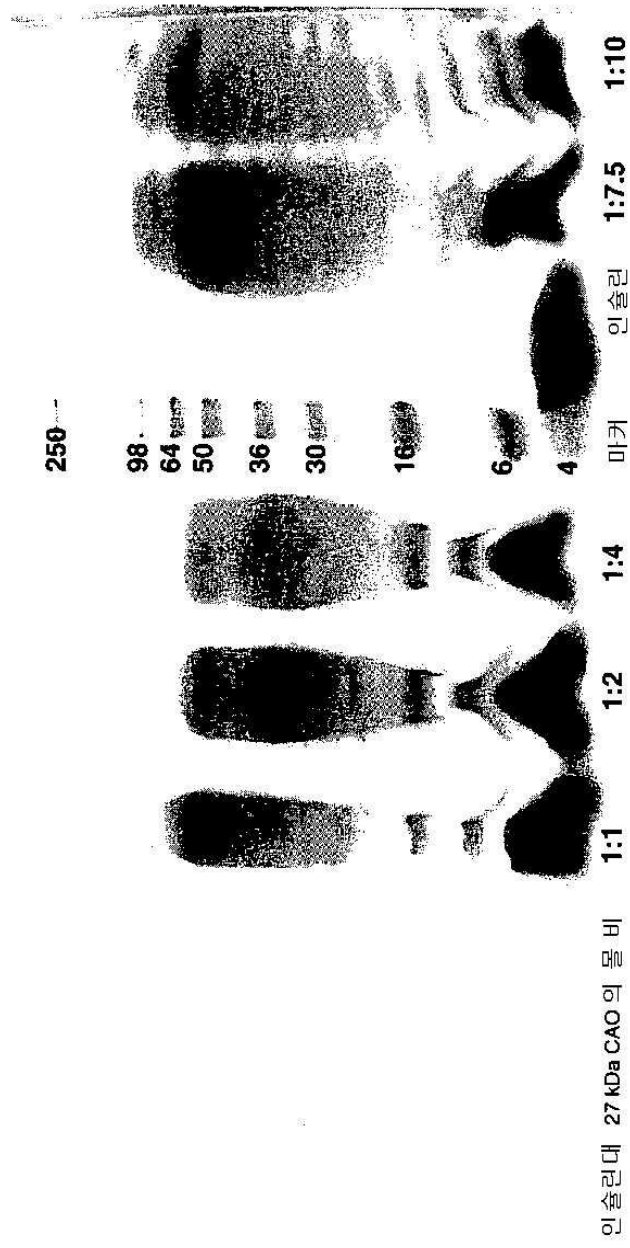
도면3



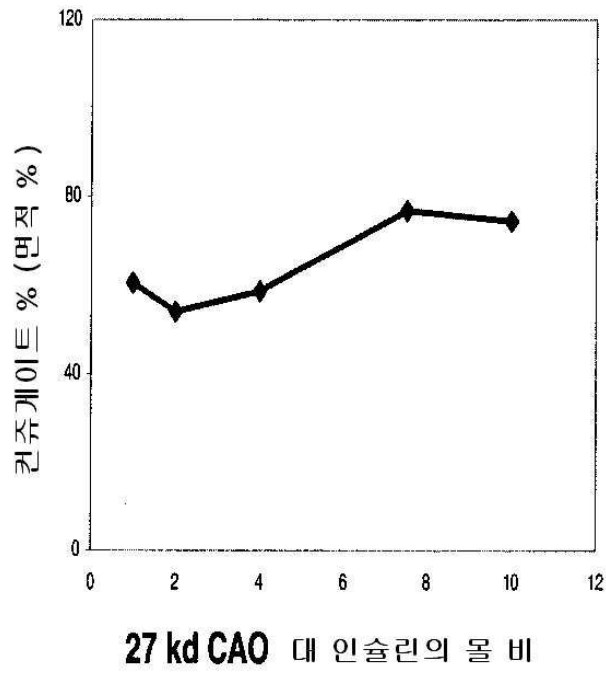
도면4



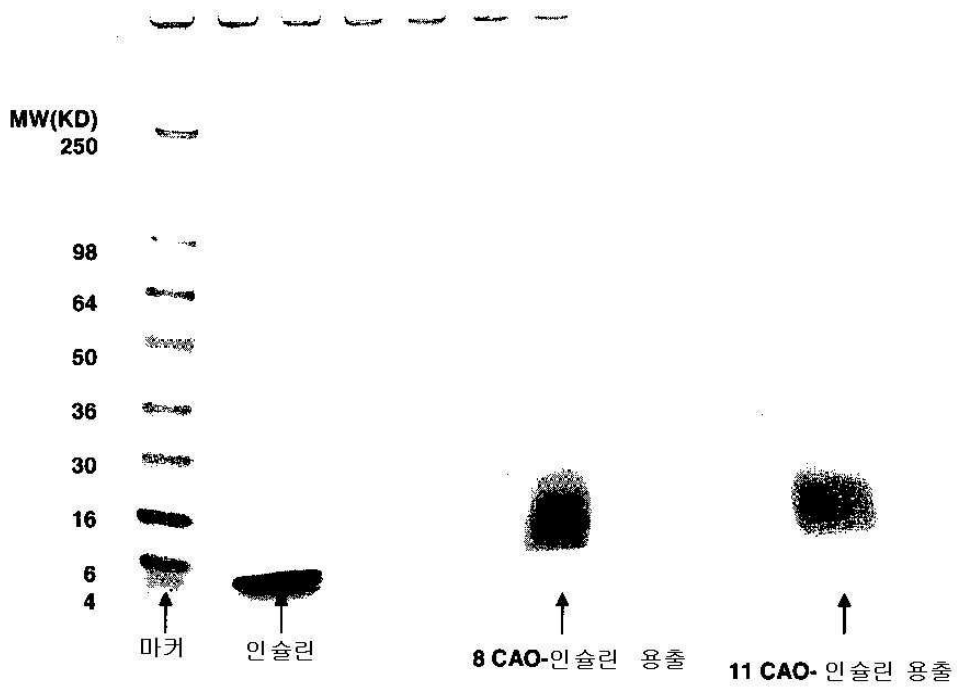
도면5



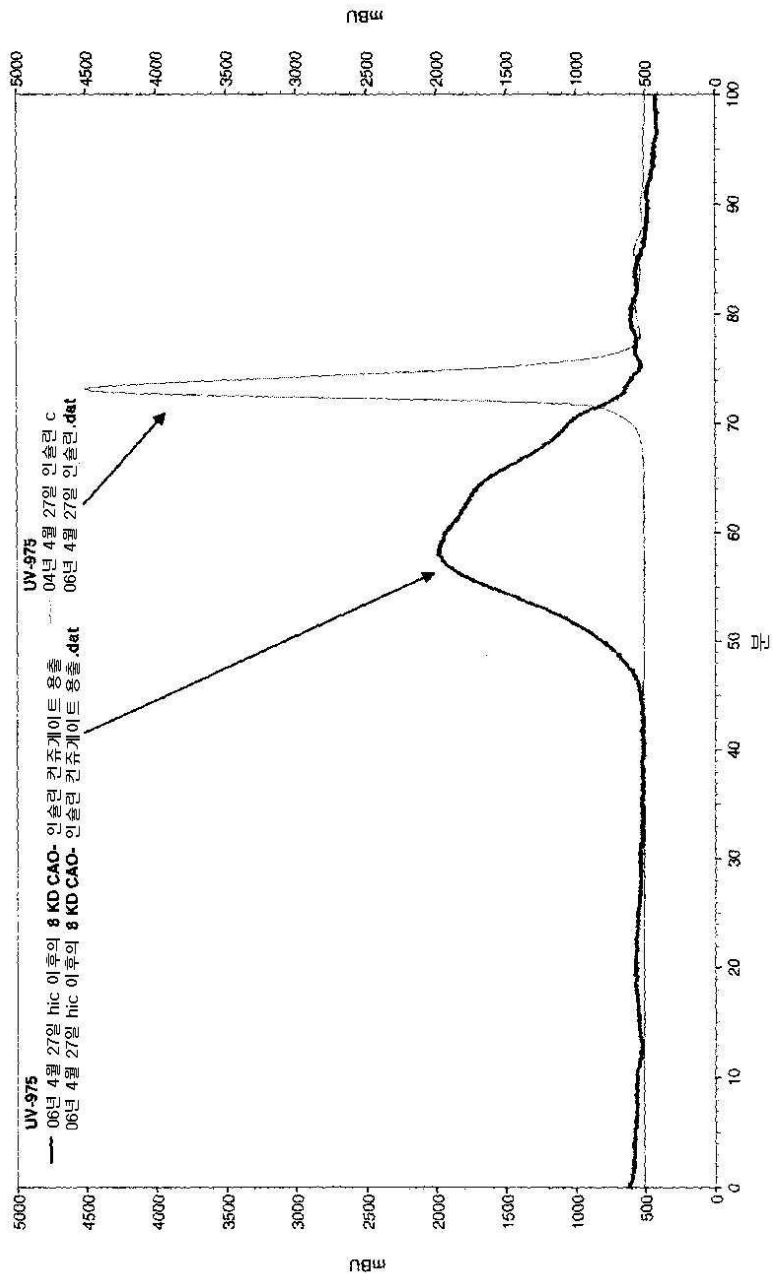
도면6



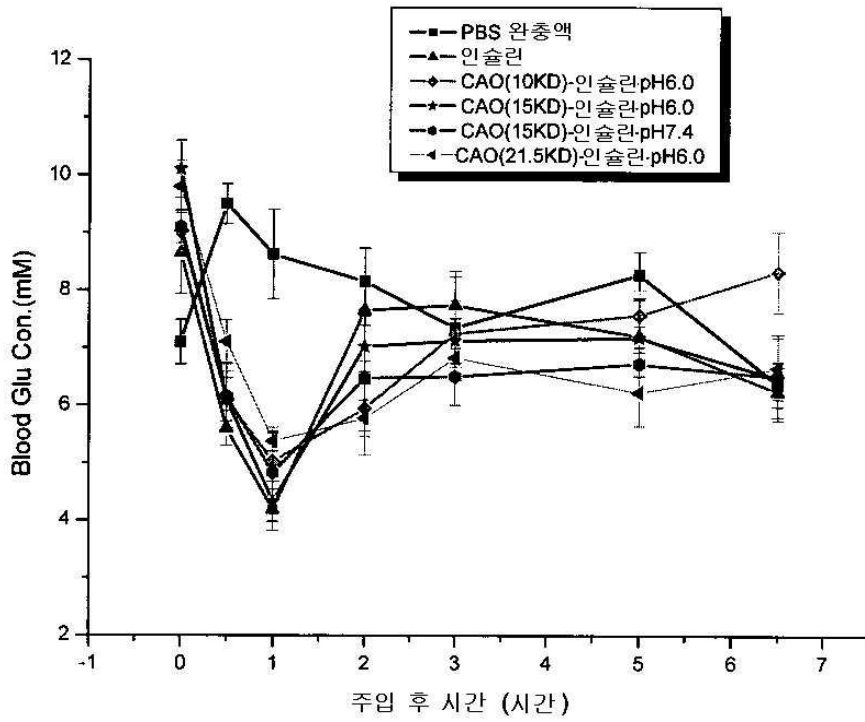
도면7



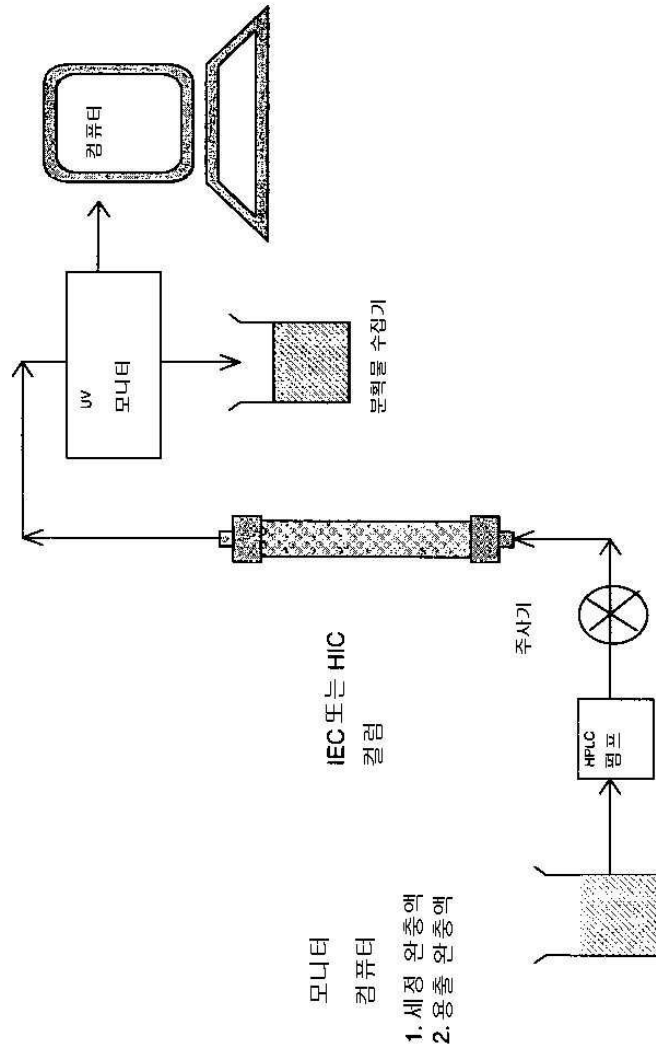
도면8



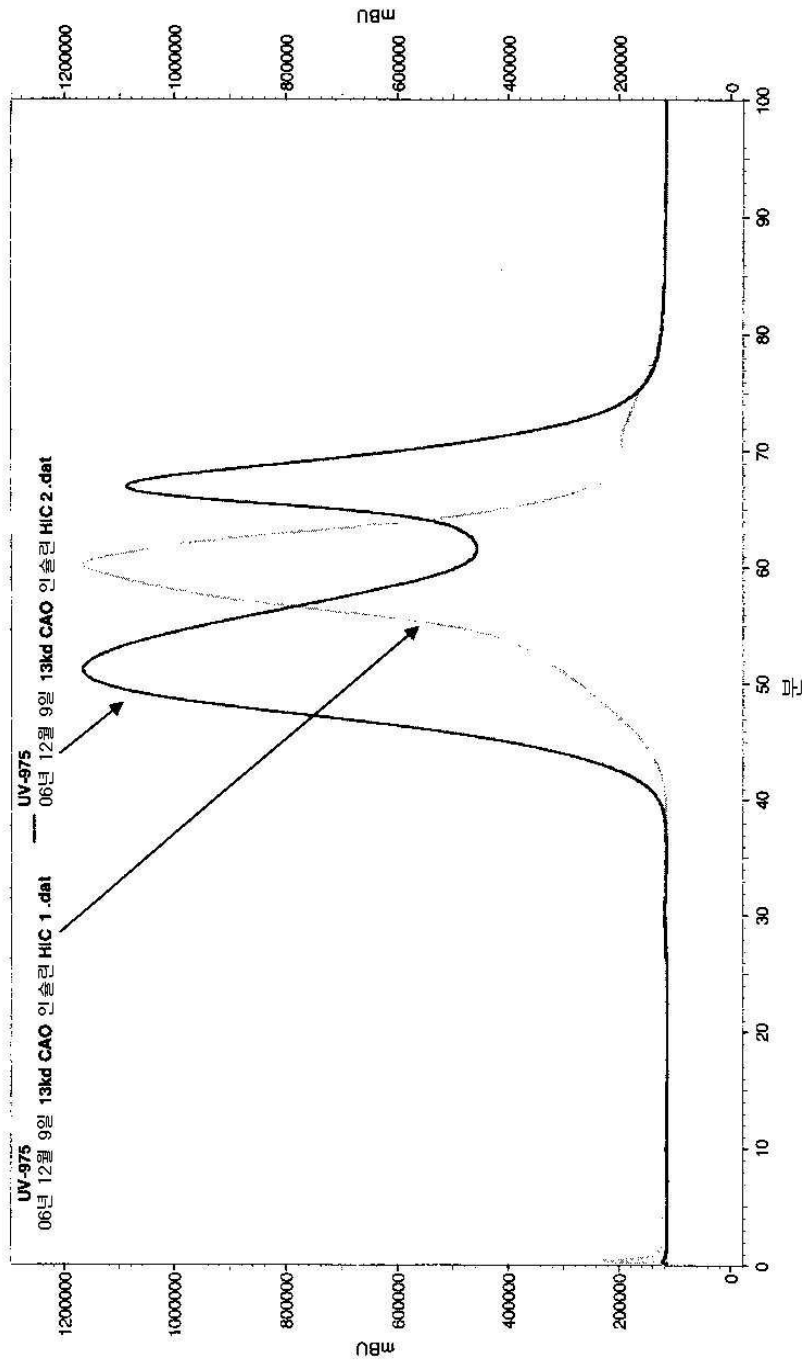
도면9



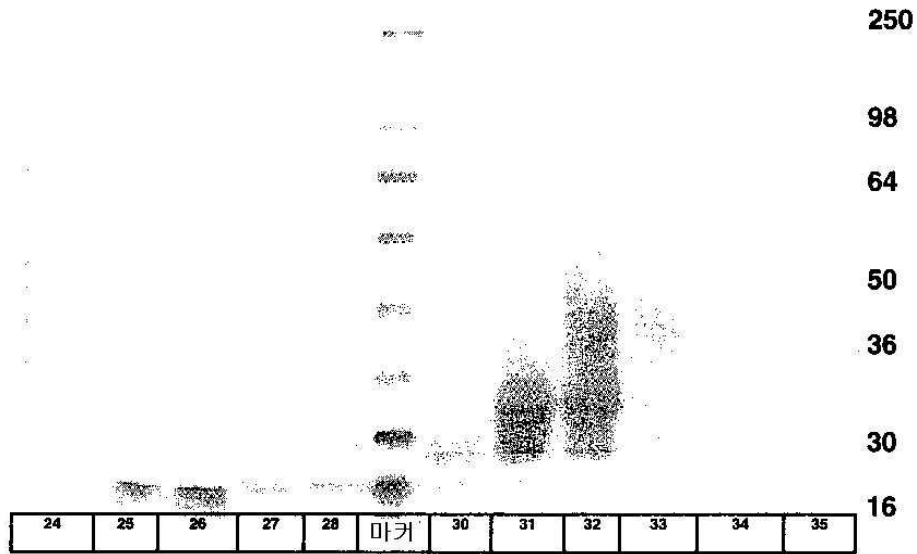
도면10



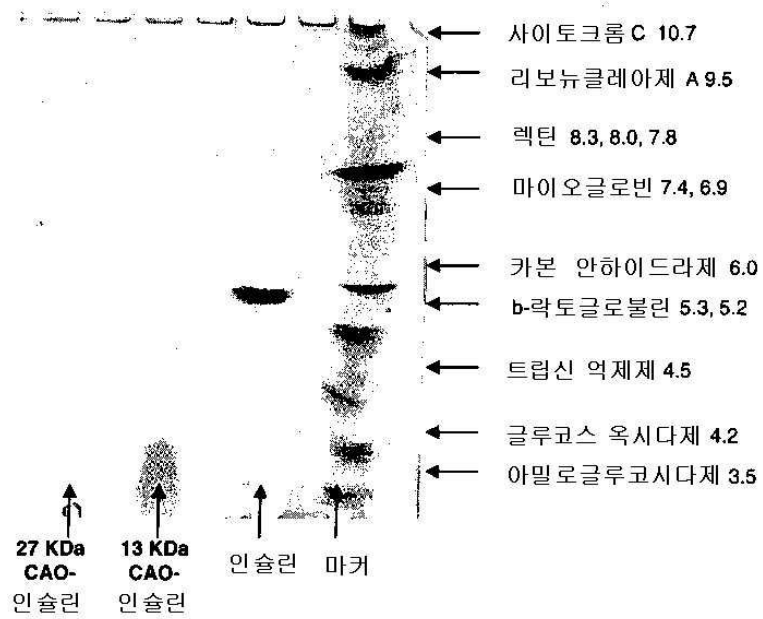
도면11



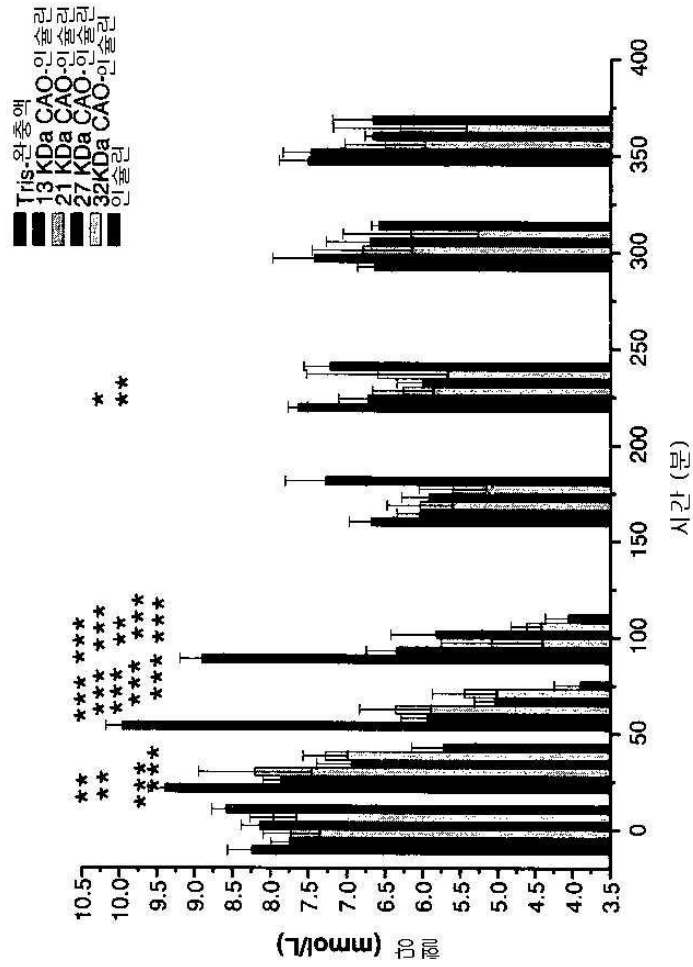
도면12



도면13



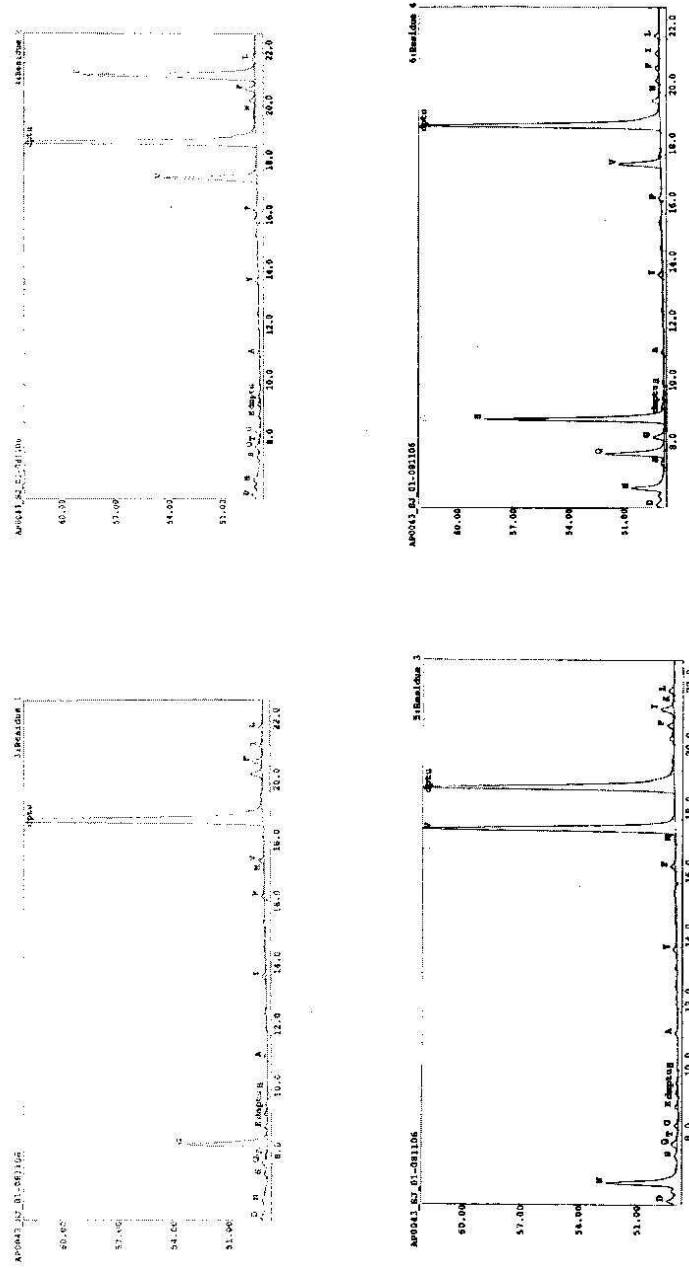
도면14



v v

+

도면15



서열목록

SEQUENCE LISTING

<110> Lipoxen Technologies Ltd

<120> N-TERMINAL POLYSIALYLATION

<130> HMJ04374W0

<150> EP06117830.7

<151> 2007-07-25

<160> 1

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 110

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Met Ala Leu Trp Met Arg Leu Leu Pro Leu Leu Ala Leu Leu Ala Leu
1 5 10 15

Trp Gly Pro Asp Pro Ala Ala Ala Phe Val Asn Gln His Leu Cys Gly
20 25 30

Ser His Leu Val Glu Ala Leu Tyr Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly Phe
35 40 45

Phe Tyr Thr Pro Lys Thr Arg Arg Glu Ala Glu Asp Leu Gln Val Gly
50 55 60

Gln Val Glu Leu Gly Gly Gly Pro Gly Ala Gly Ser Leu Gln Pro Leu
65 70 75 80

Ala Leu Glu Gly Ser Leu Gln Lys Arg Gly Ile Val Glu Gln Cys Cys
85 90 95

Thr Ser Ile Cys Ser Leu Tyr Gln Leu Glu Asn Tyr Cys Asn
100 105 110