



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(51) Int. Cl.

C07K 14/435 (2006.01)*C07K 14/505* (2006.01)

(11) 공개번호

10-2006-0124656

(43) 공개일자

2006년12월05일

(21) 출원번호 10-2006-7012656

(22) 출원일자 2006년06월23일

심사청구일자 없음

번역문 제출일자 2006년06월23일

(86) 국제출원번호 PCT/EP2004/014608

(87) 국제공개번호

WO 2005/063808

국제출원일자 2004년12월22일

국제공개일자

2005년07월14일

(30) 우선권주장 60/533,858 2003년12월31일 미국(US)

(71) 출원인
메르크 파텐트 계엠베하
독일 64293 다툼스타트 프랑크푸르터 스트라세 250(72) 발명자
길리즈 스티븐 디
미국 01741 매사추세츠주 칼리슬 스완슨 레인 47
로더 스코트
미국 01719 매사추세츠주 박스보로 쿨릿지 팜 로드 44
크레쓰 도로테
독일 64291 다툼슈타트 인 텐 빙어텐 29
뮐러 로베르트
독일 64665 알스바흐-헨라인 알테 베르크슈트라쎄 54
말러 한스-크리스티안
독일 65205 비스바덴 부싱슈트라쎄 54

(74) 대리인 특허법인코리아나

전체 청구항 수 : 총 25 항

(54) 개선된 약물동태를 가지는 Fc-에리스로포이에틴 용합단백질

(57) 요약

본 발명은 바람직하게는 EPO 부분 뿐만아니라 Fc- 부분에 한쌍의 변형을 포함하고 개선된 약물동태를 가지는 고도로 시알릴화된 신규한 Fc-EPO 용합 단백질을 제공한다. 구체적으로는, 상기 Fc-EPO 용합 단백질은 연장된 혈청 반감기 및 증가된 생체내 효능을 가진다. BHK 세포에서 합성된 Fc-EPO 용합 단백질은, 예를 들어 NS/O와 같은 기타의 세포 주에서 제조된 상응하는 Fc-EPO 용합 단백질에 비해 극적으로 연장된 혈청 반감기 및 증가된 생체내 효능을 가진다.

대표도

도 1A

특허청구의 범위

청구항 1.

정제된 이량체 융합 단백질로서, 힌지(hinge) 영역, CH2 및 CH3 도메인을 포함하는 인간 IgG 분자의 이량체 Fc 부분, 및 인간 에리스로포이에틴(EPO)으로 필수적으로 이루어지며, 상기 이량체 Fc 부분의 각 사슬은 직접적으로 그것의 C-말단을 통해 또는 링커 웹티드를 통해 EPO 분자의 N-말단에 연결되며, 상기 융합 단백질이 하기의 특성을 가지는 것인 이량체 융합 단백질:

- (i) 상기 분자는 15-28개의 시알산 잔기를 포함하여 고도로 시알릴화되며;
- (ii) 상기 CH2 도메인은 인간 IgG2로부터 유래되고, 상기 CH2 도메인의 Gln-Phe-Asn-Ser 서열 트랙 내의 아미노산 잔기 Phe 및 Asn를 Ala 및 Asn으로 대체하여, 상기 CH2 도메인 내에 Gln-Ala-Gln-Ser을 형성하는 것에 의해 변형되며;
- (iii) 상기 CH3 도메인의 C-말단 부근의 Leu-Ser-Leu-Ser 아미노산 서열 트랙이 Ala-Thr-Ala-Thr로 대체됨.

청구항 2.

제 1 항에 있어서, 추가적으로 상기 CH3 도메인의 Lys 잔기가 Ala으로 대체되는 이량체 Fc-EPO 융합 단백질.

청구항 3.

제 1 항 또는 제 2 항에 있어서, 상기 힌지 영역이 인간 IgG1으로부터 유래되는 것인 이량체 Fc-EPO 융합 단백질.

청구항 4.

제 3 항에 있어서, 상기 힌지 영역의 Pro-Lys-Ser-Cys-Asp-Lys 서열 트랙 내의 아미노산 잔기 Cys를 Ser 잔기로 대체하여, 힌지 영역 내의 서열 Pro-Lys-Ser-Ser-Asp-Lys를 형성함으로써, 상기 IgG1 힌지 영역이 변형되는, 이량체 Fc-EPO 융합 단백질.

청구항 5.

제 1 항 내지 제 4 항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 에리스로포이에틴 부분이 하나 이상의 하기 치환을 포함하는 것인 이량체 Fc-EPO 융합 단백질:

- (i) EPO 분자의 29 위치에 시스테인 이외의 잔기,
- (ii) EPO 분자의 33 위치에 시스테인 이외의 잔기,
- (iii) EPO 분자의 88 위치에 시스테인 잔기, 및
- (iv) EPO 분자의 139 위치에 시스테인 잔기.

청구항 6.

제 5 항에 있어서, 본래의 Cys 잔기 대신에 Cys 이외의 아미노산 잔기가 상기 EPO 분자의 33 위치에 있고, 본래의 Trp 잔기 대신에 Cys 잔기가 상기 EPO 분자의 88 위치에 있어, 이에 따라 상기 융합 단백질 내의 EPO 부분이 Cys₂₉-Cys₈₈ 이 황화 결합을 형성하는, 이량체 Fc-EPO 융합 단백질.

청구항 7.

제 6 항에 있어서, 상기 33 위치에서의 Cys 이외의 아미노산 잔기가 Pro인 이량체 Fc-EPO 융합 단백질.

청구항 8.

제 1 항 내지 제 7 항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 EPO 부분이 하기의 군으로부터 선택되는 하나 이상의 돌연변이를 포함하는 것인 이량체 Fc-EPO 융합 단백질:

(i) Arg₁₃₁→Glu₁₃₁

(ii) Arg₁₃₉→Glu₁₃₉

(iii) His₃₂→Gly₃₂

(iv) Ser34→Arg34

(v) Pro₉₀→Ala₉₀.

청구항 9.

제 1 항 내지 제 8 항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 링커 펩티드가 당화 부위를 포함하는 것인 이량체 Fc-EPO 융합 단백질.

청구항 10.

제 9 항에 있어서, 상기 당화 부위가 Asn-Ala-Thr 아미노산 서열을 포함하는 것인 이량체 Fc-EPO 융합 단백질.

청구항 11.

제 1 항 내지 제 10 항 중 어느 한 항에 있어서, 완성된 IgG 분자가 IgG2로부터 유래하고 상기 헌지 영역이 IgG1으로부터 유래하는 것인 이량체 Fc-EPO 융합 단백질.

청구항 12.

제 1 항 내지 제 11 항 중 어느 한 항에 있어서, 추가적으로 CH1 도메인을 포함하는 이량체 Fc-EPO 융합 단백질.

청구항 13.

제 1 항 내지 제 12 항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 융합 단백질이 20-22개의 시알산 잔기를 가지는 것인 이량체 Fc-EPO 융합 단백질.

청구항 14.

하기의 서열을 포함하는 이량체 Fc-EPO 융합 단백질:

EPKSSDKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWY
VDGVEVHNNAKTKPREEQAQSTFRVSVLTVVHQLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTK

GQPREPQVTLPSSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPMLDSGD
SFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSATATPGAAPPRLICDSRVLERYL
EAKAEAENITTGCAEHCSLNENITVPDTKVNFYAWKRMEVGQQAVEVWQGLALLSEAVLRGQA
LLVNSSQPWEPLQLHVVDKAVSGLRSLLRALGAQKEAISPPDAASAAPLRTITADTFRKL
FRVYSNFLRGKLKLYTGEACRTGDR (SEQ ID NO:14).

청구항 15.

하기의 서열을 포함하는 이량체 Fc-EPO 융합 단백질:

EPKSSDKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWY
VDGVEVHNNAKTKPREEQAQSTFRVSVLTVVHQLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTK
GQPREPQVTLPSSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPMLDSGD
SFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSATATPGAAPPRLICDSRVLERYL
EAKAEAENITTGCAEGPSLNENITVPDTKVNFYAWKRMEVGQQAVEVWQGLALLSEAVLRGQA
LLVNSSQPCEALQLHVVDKAVSGLRSLLRALGAQKEAISPPDAASAAPLRTITADTFRKL
FRVYSNFLRGKLKLYTGEACRTGDR (SEQ ID NO:15).

청구항 16.

제 1 항 내지 제 15 항 중 어느 한 항의 융합 단백질을 코딩하는 DNA 문자.

청구항 17.

제 1 항 내지 제 15 항 중 어느 한 항에서 구체화된 Fc-EPO 융합 단백질의 유효량을, 약학적으로 허용 가능한 담체, 희석제 또는 부형제와 함께 포함할 수 있는, 포유동물에서의 조혈성 장애 또는 결핍의 치료에 적합한 약학적 조성물.

청구항 18.

포유동물에 특여하기 적합한 고도로 시알릴화된 정제 Fc-EPO 융합 단백질 집단으로서, 상기 Fc-EPO 융합 단백질이 Fc-EPO의 N-말단 방향의 Fc 부분 및 상기 Fc-EPO 융합 단백질의 C-말단 방향의 에리스로포이에틴 부분을 포함하며, 상기 융합 단백질 집단은 정제 Fc-EPO 융합 단백질 당 평균 15-28개의 시알산 잔기를 가지며 각각의 Fc-EPO 융합 단백질을

코딩하는 DNA 분자를 BHK 세포에 도입하고, 상응하는 Fc-EPO 융합 단백질 집단을 발현시키고, 단리시키고 정제함으로써 수득될 수 있으며, 상기 집단은 NS/O, PerC6, 또는 293 세포에서 합성된 상응하는 Fc-EPO 융합 단백질 집단에 비해 더욱 긴 혈청 반감기를 가지는 것인, 정제 Fc-EPO 융합 단백질 집단.

청구항 19.

제 18 항에 있어서, 상기 융합 단백질 집단이 정제 Fc-EPO 융합 단백질 당 평균 20-22개의 시알산 잔기를 가지는 것인, 정제 Fc-EPO 융합 단백질 집단.

청구항 20.

제 18 항 또는 제 19 항에 있어서, 상기 BHK 세포가 단백질이 없는 배지 또는 혼탁액에서 성장하도록 한 정제 Fc-EPO 융합 단백질 집단.

청구항 21.

Fc-EPO 융합 단백질의 N-말단 방향의 Fc 부분 및 Fc-EPO 융합 단백질의 C-말단 방향의 에리스로포이에틴 부분을 포함하는 고도로 시알릴화된 정제 재조합 Fc-EPO 융합 단백질 집단의 제조 방법으로서, 하기 단계를 포함하는 방법:

- (i) Fc-EPO 융합 단백질을 코딩하는 DNA 분자를 제조하고,
- (ii) 단백질이 없는 배지 또는 혼탁액에서, BHK 세포를 상기 DNA 분자를 사용하여 변형시키고,
- (iii) 상기 DNA 분자에 의해 코딩된 Fc-EPO 융합 단백질 집단을 발현시키고,
- (iv) 상기 Fc-EPO 융합 단백질 집단을 수득하고, 단리하고 정제함.

청구항 22.

제 21 항에 있어서, 상기 합성된 융합 단백질 집단이 정제 Fc-EPO 융합 단백질 당 평균 15-28개의 시알산 잔기를 가지는 것인 방법.

청구항 23.

제 22 항에 있어서, 상기 합성된 융합 단백질 집단이 정제 Fc-EPO 융합 단백질 당 평균 20-22개의 시알산 잔기를 가지는 것인 방법.

청구항 24.

Fc 부분 및 에리스로포이에틴 부분을 포함하는 Fc-EPO 융합 단백질을 코딩하는 핵산 서열을 안정적으로 유지하는 BHK 세포를 선별하는 방법으로서, 하기 단계를 포함하는 방법: (a) 히그로마이신 B(hygromycin B)를 코딩하는 핵산 서열 및 상기 Fc-EPO 융합 단백질을 코딩하는 핵산 서열을 BHK 세포로 도입하고; (b) 히그로마이신 B 존재 하에서 BHK 세포를 배양함.

청구항 25.

제 24 항에 있어서, 상기 히그로마이신 B를 코딩하는 핵산 서열 및 상기 Fc-EPO 융합 단백질을 코딩하는 핵산 서열이 단일 DNA 분자에 존재하는 것인 방법.

명세서

기술분야

본 발명은 개선된 약물동태를 가지는, 일반적으로 고도로 시알릴화된(sialylated) Fc-EPO 신규한 융합 단백질을 제공한다. 구체적으로는, Fc-EPO 단백질은 연장된 혈청 반감기 및 증가된 생체내 효능률을 가진다. BHK 세포에서 합성된 Fc-융합 단백질은, 예를 들어 NS/O 세포와 같은 다른 세포 주에서 제조된 상응하는 Fc-EPO 융합 단백질과 비교했을 때, 극적으로 연장된 혈청 반감기 및 증가된 생체내 효능률을 가진다. 본 발명은 또한, 추가적으로 개선된 특성을 가지는 각각의 분자를 수득하기 위하여, EPO 부분뿐만 아니라 Fc-부분에서 두 개의 변형이 수행된 Fc-EPO에 관한 것이다.

배경기술

에리스로포이에틴(erythropoietin)은 적혈구 전구 세포를 적혈구로 성숙시키기 위해 필요한 당단백질 호르몬이다. 이것은 신장에서 생성되고, 순환계 내의 적혈구의 수준을 조절하는데 필수적이다. 낮은 수준의 조직 산소 신호로 표시되는 조건이 에리스로포이에틴의 생성을 증가시키고, 이것이 차례로 적혈구 생성을 자극한다. 순환계 내의 에리스로포이에틴 수준은 엄격하게 조절되어, 적혈구가 단지 장기간의 산소 결핍에 반응하여서만 생성되도록 보장한다. 70%의 에리스로포이에틴은 수용체-매개 세포내이입에 의해 제거된다. 에리스로포이에틴이 그것의 수용체에 결합될 때, 상기 복합체는 세포내이입되고 분해되어, 신호의 과급을 제한한다. 에리스로포이에틴의 잔여물은 신장 여과를 통하여 소변으로 배출된다. 결과적으로, 에리스로포이에틴은 상대적으로 짧은 혈청 반감기를 가진다.

자연 발생적 인간 에리스로포이에틴 또는 포유동물의 세포에서 제조되는 재조합 에리스로포이에틴은 3개의 N-결합형 및 1개의 O-결합형 올리고사카라이드 사슬을 함유한다. N-결합형 당화(glycosylation)는 24, 38 및 83에 위치한 아스파라긴 잔기에서 일어나는 반면, O-결합형 당화는 126에 위치한 세린 잔기에서 일어난다[Lai 등, (1986) *J. Biol. Chem.* 261: 3116; Broudy 등, (1988) *Arch. Biochem.Biophys.* 265: 329]. 올리고사카라이드 사슬은 말단의 시알산 잔기로 변형되어 나타내어진다. N-결합형 사슬은 전형적으로 사슬 당 4개 이하의 시알산을 가지고, O-결합형 사슬은 2개 이하의 시알산을 가진다. 따라서 에리스로포이에틴 폴리펩티드는 총 14개 이하의 시알산을 가질 수 있다. 세포로부터 에리스로포이에틴의 분비를 위하여, 에리스로포이에틴의 용해성을 증가시키기 위하여, 및 에리스로포이에틴의 생체내 생물학적 활성을 위하여, 탄수화물이 요구된다고 나타난다[Dube 등, (1988) *J. Biol. Chem.* 263: 17516; DeLorme 등, (1992) *Biochemistry* 31: 9871-9876].

재조합 인간 에리스로포이에틴의 투여는 신부전, HIV 감염, 혈액 손실 및 만성 질환과 관련된 것을 포함하는, 예를 들어 상이한 형태의 빈혈과 같은 조혈성 장애 또는 결핍의 치료에 효과적이다. 에리스로포이에틴은 전형적으로 정맥 주사로 투여된다. 에리스로포이에틴은 상대적으로 짧은 혈청 반감기를 가지므로, 순환 내 에리스로포이에틴의 치료학적 유효 수준을 유지하기 위해 빈번한 정맥 주사가 요구된다. 자연 발생적 또는 재조합 인간 에리스로포이에틴을 함유하는 약학적 조성물은 전형적으로 일주일에 3번, 약 25-100 단위/kg의 용량으로 투여된다. 상기 형태의 에리스로포이에틴 치료법은 매우 효과적이지만, 매우 고가이고 정맥 투여는 종종 의사 또는 병원을 방문할 것을 요하므로 불편하다. 최근에, 과당화된(hyperglycosylated) 재조합 인간 에리스로포이에틴 유사체인, 신규한 적혈구 생성 자극 단백질(NESP)이 빈혈 치료용으로 상표명 Aranesp®(Amgen Inc., Thousand Oaks, California)하에 시판된다. Aranesp®는 동일한 생물학적 반응을 수득하기 위해, 통상의 에리스로포이에틴 보다 덜 빈번하게 투여될 수 있다.

대안적인 투여 경로는 피하 주사이다. 상기 형태의 투여는 환자에 의해 가정에서 투여될 수 있고, 투여 지점으로부터 더 느린 흡수를 제공하는 서방 제형으로 더욱 적합하다. 그러나, 피하 주사에 의해 현저하게 낮은 순환 수준에 도달되고, 따라서 목적하는 치료학적 효과를 달성하기 위하여 빈번한 주사가 요구된다. 더욱이, 감염에 대한 주요 장벽인 피부는 수지상 세포가 풍부하고 찰과상 및 외부 물질을 확인하고 이에 반응하기 위한 민감한 메커니즘을 가진 면역 기관이기 때문에, 단백질 약물의 피하 투여는 일반적으로 정맥 투여 보다 더욱 면역원성이다. Casadevall 등은 최근에 피하로 에리스로포이에틴을 주입받은 환자에서 항-에리스로포이에틴 항체가 발생한다고 보고하였다[Casadevall 등 (2002) *N Engl. J. Med.* 346 (7): 469-75].

따라서, 덜 빈번한 투여가 요구되는 더욱 효과적인 에리스로포이에틴 치료법에 대한 요구가 있다.

발명의 개요

본 발명은, 다양한 구현예에서, 야생형(wild-type) 또는 자연 발생적 에리스로포이에틴, 재조합 에리스로포이에틴, 또는 과 당화된 에리스로포이에틴 유사체 NESP(PCT 공개 WO 00/24893)에 비해 개선된 약물동태를 가지는, 에리스로포이에틴 융합 단백질을 제공한다. 따라서, 에리스로포이에틴 치료법을 단순화하고, 조혈성 장애 또는 결핍 또는 기타 에리스로포이에틴 투여에 대한 적응증을 가진 인간 및 기타 포유동물을 치료하는데 관련된 비용을 감소시키는 것이 본 발명의 목적이다.

구체적으로는, 본 발명은 연장된 혈청 반감기 및 증가된 생체내 효능을 가진 생물학적으로 활성된 Fc-에리스로포이에틴 (Fc-EPO) 융합 단백질을 제공한다.

본원에서 사용되는 "Fc-EPO 융합 단백질"은 Fc 부분 및 에리스로포이에틴 부분을 가진 폴리펩티드를 포함하는 단백질을 지칭한다. 본원에서 사용되는 "Fc 부분"은 불변 영역의 단편, 유사체, 변이, 돌연변이 또는 유도체를 포함하는, 면역글로불린, 바람직하게는 인간 면역글로불린의 불변 영역으로부터 유래된 도메인을 포함한다. 본원에서 사용되는 "에리스로포이에틴 부분"은 생물학적으로 활성된 에리스로포이에틴의 단편, 유사체, 변이, 돌연변이 또는 유도체를 포함하는, 인간 및 기타의 종으로부터의 야생형 또는 자연 발생적 에리스로포이에틴, 재조합 에리스로포이에틴, 과 당화된 에리스로포이에틴 유사체를 포함한다.

한 측면에서, 본 발명은 BHK 세포에서 합성된 Fc-EPO 단백질을 제공한다. BHK 세포에서 합성된 본 발명의 Fc-EPO 융합 단백질은, 예를 들어 NS/0, PerC6 또는 293 세포와 같은 다른 세포 주에서 제조된 상응하는 Fc-EPO 융합 단백질에 비해, 극적으로 연장된 혈청 반감기 및 증가된 생체내 효능을 증명한다. 본 발명은 또한 포유동물에 투여하기 적당한, 고도로 시알릴화된 Fc-EPO 융합 단백질 집단을 제공한다. 상기 고도로 시알릴화된 Fc-EPO 융합 단백질은, 다양한 구현예에서, 야생형 또는 자연 발생적 에리스로포이에틴, 재조합 에리스로포이에틴, 과 당화된 에리스로포이에틴 유사체 NESP, 또는 NS/0, PerC6 또는 293 세포에서 합성된 동일한 아미노산 서열의 Fc-EPO 융합 단백질에 비해 더 긴 혈청 반감기 및 증가된 생체내 효능을 가진다. 본 발명에 따르면, Fc-EPO 융합 단백질은 일반적으로 Fc 융합 단백질의 혈청 반감기를 연장시키는, Fc 부분에서의 아미노산 변형을 함유할 수 있다. 예를 들어, 상기 아미노산 변형은, Fc 수용체 결합 또는 보체 결합 활성을 실질적으로 감소시키거나 제거하는 돌연변이를 포함한다. 또한, Fc-EPO 융합 단백질은 또한 EPO 수용체-매개 세포내이입을 감소시키거나 에리스로포이에틴의 생물학적 활성을 증가시키는 에리스로포이에틴 부분에서의 아미노산 변형을 함유할 수 있다. 다양한 구현예에서, 본 발명은 면역글로불린 융합 단백질, Fc 및 에리스로포이에틴 부분의 아미노산 변형, 및 BHK 세포에서의 제조(예를 들어, 고 수준의 시알릴화)로부터 제공된 이점들을 조합한다. 상기 조합된 이점들은 부가적 또는 상승적 효과를 가져 놀랍도록 연장된 혈청 반감기 및 증가된 생체내 효능을 가진 Fc-EPO 융합 단백질을 생성시킨다.

따라서, 한 측면에서의 본 발명은 Fc-EPO 융합 단백질을 코딩하는 핵산 서열을 함유하는 BHK 세포에 관한 것이다. 한 구현예에서, 본 발명의 BHK 세포가 단백질이 없는 배지에서 성장하도록 한다. 또 다른 구현예에서, BHK 세포가 혼탁액에서 성장하도록 한다. 또 다른 구현예에서, BHK 세포가 단백질이 없는 배지 및 혼탁액에서 성장하도록 한다. 단백질이 없는 배지에서 성장한 BHK 세포로부터 제조된 Fc-EPO 융합 단백질은, 기타의 배지에서 성장한 BHK 세포로부터 제조된 Fc-EPO 융합 단백질에 비해, 놀랍도록 증가되고 더욱 균질한 시알릴화를 나타낸다. 바람직한 구현예에서, 핵산은 BHK 세포에서 안정적으로 유지된다. 본원에서 사용되는 "안정적으로 유지되는 핵산"은 항생제에 기초한 선택과 같은 선택압(selective pressure)의 부재하에서, 모세포로부터 딸세포로의 손실율이 3% 미만이어서 핵산이 유지되는 임의의 핵산을 지칭한다. 따라서, 핵산을 안정적으로 유지하는 세포가 분열되는 경우, 생성 세포의 97% 이상(및, 더욱 바람직하게는 98% 초과, 99% 초과, 또는 99.5% 초과)이 상기 핵산을 함유한다. 핵산을 함유하는 생성 세포가 분열되는 경우, (제 2) 분열로부터 생성되는 세포의 97% 이상이 상기 핵산을 함유할 것이다. 또한, 핵산의 세포 당 핵산의 복제의 수는 반복되는 세포 분열에 의해 실질적으로 감소되지 않는다. 바람직한 구현예에서, 안정적으로 유지되는 핵산 서열은 BHK 세포의 염색체에서 통합된다.

핵산 서열은 임의의 다양한 배열로 Fc-EPO 융합 단백질을 코딩할 수 있다. 바람직한 구현예에서, 핵산 서열은 Fc-EPO 융합 단백질의 N-말단 방향의 Fc 부분 및 Fc-EPO 융합 단백질의 C-말단 방향의 에리스로포이에틴 부분을 포함하는 Fc-EPO 융합 단백질을 코딩한다. Fc 부분은 불변 영역의 단편, 유사체, 변이, 돌연변이 또는 유도체를 포함하는, 면역글로불린의 불변 영역으로부터 유래된 영역을 일반적으로 포함한다. 바람직한 구현예에서, Fc 부분은 인간 면역글로불린 중쇄(heavy chain), 예를 들어 IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, 또는 기타 클래스로부터 유래된다. 일부 구현예에서, Fc 부분은 CH2 도메인을 포함한다. 또 다른 구현예에서, Fc 부분은 CH2 및 CH3 도메인을 포함한다.

바람직한 구현예에서, Fc 부분은 Fc 수용체에 대한 친화력을 감소시키거나 Fc 효과기 기능을 감소시키는 돌연변이를 함유한다. 예를 들어, Fc 부분은 IgG 중쇄의 Fc 부분 내의 당화 부위를 제거하는 돌연변이를 함유할 수 있다. 일부 구현예에서, Fc 부분은 IgG1의 Leu234, Leu235, Gly236, Gly237, Asn297, 또는 Pro331(아미노산은 EU 명명법에 따라 번호가 붙여진다)에 해당하는 아미노산 위치에서의 돌연변이, 결손, 삽입을 함유한다. 바람직한 구현예에서, Fc 부분은 IgG1의 Asn297에 해당하는 아미노산 위치에서의 돌연변이를 함유한다. 대안적인 구현예에서, Fc 부분은 IgG1의 Leu281, Leu282, Gly283, Gly284, Asn344, 또는 Pro378에 해당하는 아미노산 위치에서의 돌연변이, 결손 또는 삽입을 함유한다.

일부 구현예에서, Fc 부분은 인간의 IgG2 또는 IgG4 중쇄로부터 유래된 CH2 도메인을 함유한다. 바람직하게는, CH2 도메인은 CH2 도메인 내의 당화 부위를 제거하는 돌연변이를 함유한다. 한 구현예에서, 돌연변이는 IgG2 또는 IgG4 중쇄의 CH2 도메인 내의 Gln-Phe-Asn-Ser 아미노산 서열 내의 아스파라긴을 변경시킨다. 바람직하게는 상기 돌연변이는 아스파라긴을 글루타민으로 변경시킨다. 대안적으로, 돌연변이는 Gln-Phe-Asn-Ser 아미노산 서열 내의 페닐알라닌 및 아스파라긴 모두를 변경시킨다. 한 구현예에서, 상기 Gln-Phe-Asn-Ser 아미노산 서열은 Gln-Ala-Gln-Ser 아미노산 서열로 대체된다.

Gln-Phe-Asn-Ser 아미노산 서열 내의 아스파라긴은 IgG1의 Asn297에 상응한다. IgG2 또는 IgG4의 Gln-Phe-Asn-Ser 아미노산 서열 내의 아스파라긴(즉, IgG1의 Asn297에 상응함)의 돌연변이는 또한 EPO 수용체에 대한 Fc-EPO 융합 단백질의 결합을 놀랍도록 감소시킨다. 이론에 의해 제한되기를 바라지는 않으나, IgG2 또는 IgG4의 Gln-Phe-Asn-Ser 아미노산 서열 내의 아스파라긴(즉, IgG1의 Asn297에 상응함)의 돌연변이는 Fc-EPO 융합 단백질의 전반적인 입체형태의 변화를 유도할 수 있고, 이는 극적으로 개선된 약물동력학적 특성을 갖게 한다.

또 다른 구현예에서, Fc 부분은 CH2 도메인 및 적어도 힌지(hinge) 영역의 부분을 포함한다. 힌지 영역은 면역글로불린의 중쇄, 예를 들어 IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, 또는 기타 클래스로부터 유래될 수 있다. 바람직하게는, 상기 힌지 영역은 인간 IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, 또는 기타 적당한 클래스로부터 유래된다. 더욱 바람직하게는, 상기 힌지 영역은 인간 IgG1 중쇄로부터 유래된다. 한 구현예에서, IgG1 힌지 영역의 Pro-Lys-Ser-Cys-Asp-Lys 아미노산 서열에서의 시스테인이 변경된다. 바람직한 구현예에서, Pro-Lys-Ser-Cys-Asp-Lys 아미노산 서열은 Pro-Lys-Ser-Ser-Asp-Lys 아미노산 서열로 대체된다. 한 구현예에서, Fc 부분은 제 1 항체 동형으로부터 유래된 CH2 도메인 및 제 2 항체 동형으로부터 유래된 힌지 영역을 포함한다. 구체적인 구현예에서, CH2 도메인은 인간 IgG2 또는 IgG4 중쇄로부터 유래되는 반면, 힌지 영역은 변경된 인간 IgG1 중쇄로부터 유래된다.

바람직한 구현예에서, Fc 부분은 불변 영역의 C-말단 부근의 Leu-Ser-Leu-Ser 아미노산 서열이 변경되어 잠재적인 접합부 T-세포 에피토프를 제거하는 IgG 서열로부터 유래된다. 예를 들어, 한 구현예에서, Leu-Ser-Leu-Ser 아미노산 서열은 Ala-Thr-Ala-Thr 아미노산 서열로 대체된다. 또 다른 구현예에서, Fc 부분은 C-말단의 리신 잔기가 대체된 IgG 서열로부터 유래된다. 바람직하게는, IgG 서열의 C-말단의 리신이 리신 이외의 아미노산, 예컨대 알라닌으로 대체되어 Fc 융합 단백질의 혈청 반감기를 추가적으로 증가시킨다.

본 발명에 따르면, Fc 부분은 본원에서 기술되는 하나 이상의 돌연변이를 함유할 수 있다. Fc 부분에서의 돌연변이의 조합은 Fc-EPO 융합 단백질의 연장된 혈청 반감기 및 증가된 생체내 효능에 대해 일반적으로 부가적 또는 상승적 효과를 미친다. 따라서, 한 대표적인 구현예에서, Fc 부분은 (i) Lys-Ser-Lys-Ser 아미노산 서열이 Ala-Thr-Ala-Thr 아미노산 서열로 대체된 IgG 서열로부터 유래된 영역; (ii) 리신 대신에 C-말단의 알라닌 잔기; (iii) 상이한 항체 동형으로부터 유래된 CH2 도메인 및 힌지 영역, 예를 들어 IgG2 CH2 도메인 및 변경된 IgG1 힌지 영역; (iv) IgG2-유래의 CH2 도메인 내의 당화 부위를 제거하는 돌연변이, 예를 들어 IgG2-유래의 CH2 도메인 내의 Gln-Phe-Asn-Ser 아미노산 서열 대신에 Gln-Ala-Gln-Ser 아미노산 서열을 함유할 수 있다.

Fc-EPO 융합 단백질의 에리스로포이에틴 부분은 전체 길이의 야생형 또는 자연 발생적 에리스로포이에틴, 재조합 에리스로포이에틴, 또는 에리스로포이에틴-유사 분자, 예컨대 생물학적으로 활성된 에리스로포이에틴 단편, 유사체, 변이, 돌연변이 또는 에리스로포이에틴의 유도체일 수 있다. 바람직하게는, 에리스로포이에틴 부분은 인간 에리스로포이에틴으로부터 유래된다. 일부 구현예에서, 에리스로포이에틴 부분은 에리스로포이에틴의 EPO 수용체에 대한 결합 친화력을 감소시키거나 에리스로포이에틴의 생물학적 활성을 증가시키는 아미노산 변형을 함유할 수 있다. 일부 구현예에서, 에리스로포이에틴 부분은 하나 이상의 하기 돌연변이를 함유한다: Arg131→Glu 및 Arg139→Glu(성숙한 인간 에리스로포이에틴 서열에 기초한 아미노산 번호 표기). 다른 구현예들에서, 에리스로포이에틴 부분은 하나 이상의 하기 돌연변이를 함유한다: His₃₂→Gly, Ser₃₄→Arg, 및 Pro₉₀→Ala. 또 다른 구현예에서, 에리스로포이에틴 부분은 인간 에리스로포이에틴과 구별

되는 이황화 결합 패턴을 가진다. 예를 들어, 에리스로포이에틴 부분은 하나 이상의 하기 아미노산 치환을 함유할 수 있다: 29 위치에서 시스테인 이외의 잔기, 33 위치에서 시스테인 이외의 잔기, 88 위치에서 시스테인 잔기, 및 139 위치에서 시스테인 잔기. 한 구현예에서, 에리스로포이에틴 부분은 7, 29, 88, 및 161 위치에서 시스테인 잔기를 함유한다. 또 다른 구현예에서, 에리스로포이에틴 부분은 하나 이상의 하기 치환을 추가적으로 함유한다: His₃₂→Gly, Cys₃₃→Pro, 및 Pro₉₀→Ala. 본 발명에 따르면, 에리스로포이에틴 부분은 본원에서 기술되는 임의의 돌연변이 조합을 함유할 수 있다.

일부 구현예에서, Fc-EPO 융합 단백질은 Fc 부분과 에리스로포이에틴 부분 사이의 링커(linker)를 포함한다. 포함되는 경우, 상기 링커는 일반적으로 1 내지 25개의 아미노산을 함유하고, 바람직하게는 프로테아제 절단 부위를 가지지 않는다. 상기 링커는 단백질 분해를 저지할 수 있는 N-결합형 또는 O-결합형 당화 부위를 함유할 수 있다. 예를 들어, 한 구현예에서, 상기 링커는 Asn-Ala-Thr 아미노산 서열을 함유한다.

본 발명은 또한 Fc-EPO 융합 단백질을 제조하는 방법에 관한 것이다. 상기 방법은 코딩되는 Fc-EPO 융합 단백질의 발현에 적합한 조건 하에서 Fc-EPO 융합 단백질을 코딩하는 핵산 서열을 함유하는 BHK 세포를 유지하고, 발현된 Fc-EPO 융합 단백질을 회수하는 것을 포함한다. 한 구현예에서, BHK 세포는 단백질이 없는 배지에서 배양된다. 또 다른 구현예에서, BHK 세포는 혼탁액에서 배양된다. 또 다른 구현예에서, BHK 세포는 단백질이 없는 배지 및 혼탁액에서 배양된다. 일부 구현예에서, 핵산은 BHK 세포에서 안정적으로 유지된다. 일반적으로, BHK 세포에서 제조된 Fc-EPO 융합 단백질이, 예를 들어 NS/0, PerC6, 또는 293 세포와 같은 기타 세포 주에서 제조된 상응하는 Fc-EPO 융합 단백질보다 더 긴 혈청 반감기를 가진다.

본 발명은 BHK 세포에서 제조된 Fc-EPO 융합 단백질을 함유하는 약학적 조성물을 제공한다. 바람직한 구현예에서, 약학적 조성물에 사용되는 Fc-EPO 융합 단백질은 시알산 잔기를 제거하도록 처리되지 않는다. 상기 약학적 조성물은 약학적으로 허용 가능한 담체를 또한 포함한다. 본 발명은 또한 약학적 조성물을 포유동물에 투여하는 것에 의해 포유동물을 치료하는 방법을 제공한다. 일부 구현예에서, 치료되는 포유동물은 조혈성 장애 또는 결핍을 가진다. 본 발명의 Fc-EPO 융합 단백질은 증가된 생체내 효능 및 연장된 혈청 반감기를 가지므로, Fc-EPO 융합 단백질을 함유하는 약학적 조성물은, 자연 발생적 또는 재조합 에리스로포이에틴 또는 다른 세포에서 제조된 상응하는 Fc-EPO 융합 단백질을 함유하는 약학적 조성물에 비해, 일반적으로 덜 빈번한 투여를 요한다. 바람직한 구현예에서, 약학적 조성물은 일주일에 3회 미만으로 투여된다(즉, 주 2회, 주 1회 또는 10일에 한번 이하, 예컨대 2주에 한번, 한 달에 한번 또는 두 달에 한번).

또 다른 측면에서, 본 발명은 Fc 부분 및 에리스로포이에틴 부분을 포함하는 융합 단백질을 코딩하는 핵산을 안정적으로 유지하는 BHK 세포를 선별하는 방법을 제공한다. 상기 방법은 히그로마이신 B(hygromycin B)를 코딩하는 핵산 서열 및 융합 단백질을 코딩하는 핵산 서열을 BHK 세포로 도입하는 것; 및 히그로마이신 B 존재하에서 BHK 세포를 배양하는 것을 포함한다. 한 구현예에서, 히그로마이신 B를 코딩하는 핵산 서열 및 융합 단백질을 코딩하는 핵산 서열이 하나의 핵산에 존재한다. 또 다른 구현예에서, 히그로마이신 B를 코딩하는 핵산 서열 및 융합 단백질을 코딩하는 핵산 서열이 두 개의 분리된 핵산에 존재한다.

또 다른 측면에서, 본 발명은 포유동물에 투여하기에 적합한 정제된 Fc-EPO 융합 단백질 집단을 제공한다. 바람직한 구현예에서, Fc-EPO 융합 단백질은 Fc-EPO 융합 단백질의 N-말단 방향의 Fc 부분 및 Fc-EPO 융합 단백질의 C-말단 방향의 에리스로포이에틴 부분을 포함한다. 더욱 바람직하게는, 정제된 Fc-EPO 융합 단백질 집단은 고도로 시알릴화되며, 즉 정제된 Fc-EPO 융합 단백질 당 평균 11-28개의 시알산 잔기를 가진다. 바람직한 고도로 시알릴화된 Fc-EPO 융합 단백질 집단은 정제된 Fc-EPO 융합 단백질 당 평균 13-28개, 15-28개, 17-28개, 19-28개, 또는 21-28개의 시알산 잔기를 가진다. 예를 들어, 한 바람직한 고도로 시알릴화된 Fc-EPO 융합 단백질은 정제된 Fc-EPO 융합 단백질 당 평균 20 내지 22개의 시알산 잔기를 가진다. 바람직한 구현예에서, 정제된 Fc-EPO 융합 단백질은 BHK 세포에서 합성된다. 한 구현예에서, BHK 세포를 혼탁액에서 성장하도록 한다. 또 다른 구현예에서, BHK 세포를 단백질이 없는 배지에서 성장하도록 한다. 또 다른 구현예에서, BHK 세포를 단백질이 없는 배지 및 혼탁액에서 성장하도록 한다. 본 발명에 의해 제공되는 고도로 시알릴화된 정제 Fc-EPO 융합 단백질 집단은, 예를 들어 NS/0, PerC6, 또는 293 세포와 같은 세포에서 제조되는 상응하는 Fc-EPO 융합 단백질 집단에 비해, 더 긴 혈청 반감기를 가진다. 본 발명에 따르면, 정제 Fc-EPO 융합 단백질의 Fc 부분 및 에리스로포이에틴 부분은 본원에서 기술되는 하나 이상의 돌연변이 또는 변형을 함유할 수 있으며, 이는 향상된 시알릴화로, 연장된 혈청 반감기 및 증가된 생체내 효능에 부가적 또는 상승적 효과를 부여한다.

본 발명은 또한 본원에서 기술되는 고도로 시알릴화된 정제 Fc-EPO 융합 단백질 집단을 함유하는 약학적 조성물을 제공한다. 바람직한 약학적 조성물은 약학적으로 허용 가능한 담체를 추가적으로 포함한다. 본 발명은 고도로 시알릴화된 정제

Fc-EPO 융합 단백질 집단을 함유하는 약학적 조성물을 포유동물에 투여하는 것을 포함하는 포유동물의 치료 방법을 추가적으로 제공한다. 바람직한 구현예에서, 상기 약학적 조성물은 일주일에 3회 미만으로 투여된다(즉, 주 2회, 주 1회 또는 10일에 한번 이하, 예컨대 2주에 한번, 한 달에 한번 또는 두 달에 한번).

- 요약하면, 본 발명은 하기의 쟁점에 관한 것이다:

정제된 이량체 융합 단백질, 헌지 영역, CH2 및 CH3 도메인을 포함하는 인간 IgG 분자의 이량체 Fc 부분, 및 인간 에리스로포이에틴(EPO)으로 필수적으로 이루어진 정제된 이량체 융합 단백질로서, 여기서 이량체 Fc 부분의 각 사슬은, 그것의 C-말단을 통해 직접적으로 또는 링커 팝티드를 통해, EPO 분자의 N-말단에 연결되며, 상기 융합 단백질은 하기의 특성을 가진다: (i) 상기 분자는 15-28개의 시알산 잔기를 포함하여 고도로 시알릴화된다; (ii) CH2 도메인은 인간 IgG2로부터 유래되고, CH2 도메인의 Gln-Phe-Asn-Ser 서열 트랙 내의 아미노산 잔기 Phe 및 Asn를 Ala 및 Asn으로 대체하여, CH2 도메인 내의 Gln-Ala-Gln-Ser을 형성하는 것에 의해 변형된다; (iii) CH3 도메인의 C-말단 부근의 Leu-Ser-Leu-Ser 아미노산 서열 트랙이 Ala-Thr-Ala-Thr로 대체된다.

- 추가적으로, CH3 도메인의 C-말단의 Lys 잔기가 Ala로 대체된, 각각의 이량체 Fc-EPO 융합 단백질.
- 헌지 영역이 인간 IgG1으로부터 유래된, 각각의 이량체 Fc-EPO 융합 단백질.
- 상기 IgG1 헌지 영역이 헌지 영역의 Pro-Lys-Ser-Cys-Asp-Lys 서열 트랙 내의 아미노산 잔기 Cys를 Ser 잔기로 대체하여, 헌지 영역 내에 Pro-Lys-Ser-Ser-Asp-Lys를 형성함으로써 변형된, 각각의 이량체 Fc-EPO 융합 단백질.
- 에리스로포이에틴 부분이 하기의 아미노산 치환 중 하나 이상을 포함하는, 각각의 이량체 Fc-EPO 융합 단백질:
 - (i) EPO 분자의 29 위치에 시스테인 이외의 잔기,
 - (ii) EPO 분자의 33 위치에 시스테인 이외의 잔기,
 - (iii) EPO 분자의 88 위치에 시스테인 잔기, 및
 - (iv) EPO 분자의 139 위치에 시스테인 잔기.
- EPO 분자의 33 위치에 본래의 Cys 잔기 대신 Cys 이외의 아미노산 잔기가 있고, EPO 분자의 88 위치에 본래의 Trp 잔기 대신 Cys 잔기가 있어, 융합 단백질 내의 EPO 부분이 Cys₂₉-Cys₈₈ 이황화 결합을 형성할 수 있게 하는 각각의 이량체 Fc-EPO 융합 단백질.
- 33 위치의 Cys 이외의 아미노산 잔기가 Pro인 각각의 이량체 Fc-EPO 융합 단백질.
- EPO 부분이 하기의 군으로부터 선택되는 하나 이상의 돌연변이를 포함하는 각각의 이량체 Fc-EPO 융합 단백질:
 - (i) Arg₁₃₁→Glu₁₃₁
 - (ii) Arg₁₃₉→Glu₁₃₉
 - (iii) His₃₂→Gly₃₂
 - (iv) Ser₃₄→Arg₃₄
 - (v) Pro₉₀→Ala₉₀.
- 링커 팝티드가 당화 부위를 포함하는, 각각의 이량체 Fc-EPO 융합 단백질.

- 당화 부위가 Asn-Ala-Thr 아미노산 서열을 포함하는, 각각의 이량체 Fc-EPO 융합 단백질.
- 부가적으로 CH1 도메인을 포함하는, 각각의 이량체 Fc-EPO 융합 단백질.
- CH2, CH3 및 임의로 CH1을 포함하는 전체 IgG 분자가 IgG2로부터 유래되고 헌지 영역이 IgG1으로부터 유래되는, 각각의 Fc-EPO 융합 단백질.
- CH2, CH3 및 헌지 영역, 및 임의로 CH1을 포함하는 전체 IgG 분자가 IgG1으로부터 유래되는, 각각의 Fc-EPO 융합 단백질.
- 융합 단백질이 18-24개, 바람직하게는 20-22개의 시알산 잔기를 가지는, 각각의 이량체 Fc-EPO 융합 단백질.
- 하기의 서열을 포함하는이량체 Fc-EPO 융합 단백질:

EPKSSDKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWY
VDGVEVHNAKTKPREEQAQSTFRVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTK
GQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPMULDSDG
SFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSATATPGAAPRLLCDSRVLERYL
EAKAEAENITTGCAEHCSLNENITVPDTKVNFYAWKRMEVGQQAVEVWQGLALLSEAVLRGQA
LLVNSSQPWEPLQLHVVDKAVSGLRSLLRALGAQKEAISPPDAASAAPLRTITADTFRKL
FRVYSNFLRGKLKLYTGEACRTGDR (SEQ ID NO:14).

- 하기의 서열을 포함하는 이량체 Fc-EPO 융합 단백질:

EPKSSDKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWY
VDGVEVHNAKTKPREEQAQSTFRVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTK
GQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPMULDSDG
SFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSATATPGAAPRLLCDSRVLERYL
EAKAEAENITTGCAEGPSLNENITVPDTKVNFYAWKRMEVGQQAVEVWQGLALLSEAVLRGQA
LLVNSSQPCEALQLHVVDKAVSGLRSLLRALGAQKEAISPPDAASAAPLRTITADTFRKL
FRVYSNFLRGKLKLYTGEACRTGDR (SEQ ID NO:15).

- 상기에서 구체화된 융합 단백질을 코딩하는 DNA 분자.
- 상기에서 또는 청구 범위에서 구체화되는 Fc-EPO 융합 단백질의 유효량을, 임의로 약학적으로 허용 가능한 담체, 희석제 또는 부형제와 함께 포함하는, 포유동물의 조혈성 장애 또는 결핍의 치료에 적합한 약학적 조성물.
- Fc-EPO 융합 단백질이 Fc-EPO 융합 단백질의 N-말단 방향의 Fc 부분 및 Fc-EPO 융합 단백질의 C-말단 방향의 에리스로포이에틴 부분을 포함하고, 융합 단백질 집단은 정제 Fc-EPO 융합 단백질 당 평균 15-28개의 시알산 잔기를 가지며, 각각의 Fc-EPO 융합 단백질을 코딩하는 DNA 분자를 BHK 세포에 도입하고, 상응하는 Fc-EPO 융합 단백질 집단을 발현시키고 단리하고 정제함으로써 수득 가능하고, 상기 집단이 NS/O, PerC6, 또는 293 세포에서 합성된 상응하는 Fc-EPO 융합 단백질 집단에 비해 더 긴 혈청 반감기를 가지는, 포유동물에 투여하기 적합한 고도로 시알릴화된 정제 Fc-EPO 융합 단백질 집단.
- 상기 융합 단백질 집단이 정제 Fc-EPO 융합 단백질 당 평균 20-22개의 시알산 잔기를 가지는, 상응하는 정제 Fc-EPO 융합 단백질 집단.
- BHK 세포가 단백질이 없는 배지 또는 혼탁액에서 성장하도록 한, 상응하는 정제 Fc-EPO 융합 단백질 집단.

- Fc-EPO 융합 단백질의 N-말단 방향의 Fc 부분 및 Fc-EPO 융합 단백질의 C-말단 방향의 에리스로포이에틴 부분을 포함하는, 고도로 시알릴화된 정제 재조합 정제 Fc-EPO 융합 단백질 집단의 제조 방법으로서, 상기 방법은 하기 단계를 포함한다:

- (i) Fc-EPO 융합 단백질을 코딩하는 DNA 분자를 만든다;
- (ii) 상기 DNA 분자를 가진 BHK 세포를 단백질이 없는 배지 또는 혼탁액에서 형질전환시킨다,
- (iii) 상기 DNA 분자에 의해 코딩된 Fc-융합 단백질 집단을 발현시킨다,
- (iv) 상기 Fc-EPO 융합 단백질 집단을 수득하고, 단리하고 정제한다.

- 상기 합성된 융합 단백질 집단이, 정제 Fc-EPO 융합 단백질 당 평균 15-28개, 바람직하게는 15-25개, 더욱 바람직하게는 20-22개의 시알산 잔기를 가지는, 상응하는 방법.
- Fc 부분 및 에리스로포이에틴 부분을 포함하는 Fc-EPO 융합 단백질을 코딩하는 핵산 서열을 안정적으로 유지하는 BHK 세포를 선별하는 방법으로서, 상기 방법은 하기 단계를 포함한다: (a) 히그로마이신 B를 코딩하는 핵산 서열 및 Fc-EPO 융합 단백질을 코딩하는 핵산 서열을 BHK 세포에 도입하고; (b) 히그로마이신 B의 존재하에 BHK 세포를 배양한다.
- 히그로마이신 B를 코딩하는 핵산 서열 및 Fc-EPO 융합 단백질을 코딩하는 핵산 서열이 하나의 DNA 분자에 존재하는, 상응하는 방법.

발명의 상세한 설명

본 발명은 개선된 약물동태를 가지는 Fc-EPO 융합 단백질을 제공한다. 구체적으로는, 본 발명에 의해 제공되는 Fc-EPO 단백질은 연장된 혈청 반감기 및 증가된 생체내 효능을 가진다. 한 측면에서, 본 발명은 BHK 세포에서 합성된 Fc-EPO 융합 단백질을 제공한다. BHK 세포에서 합성된 Fc-EPO 융합 단백질은, 예를 들어 NS/O, PerC6 또는 293 세포와 같은 다른 세포 주에서 제조된 상응하는 Fc-EPO 융합 단백질에 비해, 극적으로 연장된 혈청 반감기 및 증가된 생체내 효능을 증명한다. 또 다른 측면에서, 본 발명은 고도로 시알릴화된 Fc-EPO 융합 단백질 집단을 제공한다. 상기 고도로 시알릴화된 Fc-EPO 융합 단백질은, 낮은 수준으로 시알릴화된 상응하는 Fc-EPO 융합 단백질 집단에 비해 더 긴 혈청 반감기를 가진다. 본 발명에 따르면, Fc-EPO 융합 단백질은, Fc 수용체 결합 활성을 실질적으로 감소시키거나 제거시킴으로써, Fc 융합 단백질의 혈청 반감기를 연장시키는 Fc 부분에서의 아미노산 변형, 또는 보체 결합 활성을 감소시키는 변형을 함유할 수 있다. 또한, Fc-EPO 융합 단백질은 EPO 수용체-매개 세포내이입을 감소시키거나 에리스로포이에틴의 생물학적 활성을 증가시키는 에리스로포이에틴에서의 변형을 또한 함유할 수 있다.

Fc-EPO 융합 단백질

본원에서 사용되는 "Fc-EPO 융합 단백질"은 두 개 이상의 부분, 즉 일반적으로는 동일한 폴리펩티드에 존재하지 않는, Fc 부분 및 에리스로포이에틴 부분을 가진 폴리펩티드를 포함하는 단백질을 지칭한다. 본 발명의 바람직한 구현예에서, Fc 부분 및 에리스로포이에틴 부분을 가진 폴리펩티드는 동종이량체(homodimer)를 형성한다; 따라서, Fc-EPO 융합 단백질은 일반적으로, 하나 이상의 이황화 결합에 의해 결합되고, 각 폴리펩티드 사슬이 Fc 부분과 에리스로포이에틴 부분을 함유하는 이량체 단백질이다. 그러나, 본 발명의 Fc-EPO 융합 단백질은, 에리스로포이에틴 활성을 유지하면서 에리스로포이에틴 부분이 Fc 부분과 안정적으로 연결되도록 하는 임의의 입체 형상을 가질 수 있다. 예를 들어, 상기 입체 형상은 두 개의 Fc 부분 및 두 개의 에리스로포이에틴 부분을 함유하는 하나의 폴리펩티드, 두 개의 Fc 부분 및 한 개의 에리스로포이에틴 부분을 함유하는 하나의 폴리펩티드, Fc 부분 및 에리스로포이에틴 부분을 함유하는 하나의 폴리펩티드 및 Fc 부분을 함유하는 또 다른 폴리펩티드를 포함하는 이종이량체(heterodimer) 단백질, 및 기타 적합한 입체 형상을 비제한적으로 포함한다.

에리스로포이에틴 부분은 다양한 입체 형상으로 Fc에 직접 또는 간접적으로 연결될 수 있다. 한 구현예에서, 상기 에리스로포이에틴 부분은 공유 결합을 통해 Fc 부분에 직접적으로 연결된다. 예를 들어, 상기 에리스로포이에틴 부분은 그것의 C-말단 또는 N-말단을 통해 Fc 부분에 직접적으로 융합될 수 있다. 한 구현예에서, Fc 부분의 C-말단은 에리스로포이에틴 부분의 N-말단에 융합되며, 즉 $N_{term}-Fc-C_{term}-N_{term}-EPO-C_{term}$ 이다. 상기 입체 형상에서, Fc 부분이 Fc-EPO 융합

단백질의 N-말단 방향이고, 에리스로포이에틴 부분이 C-말단 방향이다. 또 다른 구현예에서, 에리스로포이에틴의 C-말단은 Fc 부분의 N-말단에 융합되며, 즉 $N_{term}-EPO-C_{term}-N_{term}-Fc-C_{term}$ 이다. 상기 입체형상에서, 에리스로포이에틴 부분이 Fc-EPO 융합 단백질의 N-말단 방향이고, Fc 부분이 C-말단 방향이다.

다른 구현예들에서, 에리스로포이에틴 부분은 Fc 부분에 간접적으로 연결된다. 예를 들어, Fc-EPO 융합 단백질은 Fc 부분과 에리스로포이에틴 부분 사이의 링커(L)를 포함할 수 있다. 직접적인 융합과 유사하게, 에리스로포이에틴 부분은 링커를 통해 Fc 부분의 C-말단에 바람직하게 융합되며, 즉 $N_{term}-Fc-C_{term}-L-N_{term}-EPO-C_{term}$ 이다. 따라서, Fc 부분은 Fc-EPO 융합 단백질의 N-말단 방향이고, 링커에 의해 C-말단 방향의 에리스로포이에틴 부분으로부터 분리된다. 대안적으로, 에리스로포이에틴 부분은 링커를 통해 Fc 부분의 N-말단에 융합될 수 있으며, 즉 $N_{term}-EPO-C_{term}-L-N_{term}-Fc-C_{term}$ 이다.

Fc 부분

본원에서 사용되는 바와 같이, "Fc 부분"은 면역글로불린, 바람직하게는 인간 면역글로불린의 불변 영역으로부터 유래되는 도메인을 포함하며, 불변 영역의 단편, 유사체, 변이, 돌연변이 또는 유도체를 포함한다. 적합한 면역글로불린은 IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 및 기타의 클래스를 포함한다. 면역글로불린의 불변 영역은 면역글로불린 C-말단 영역에 해당되는 자연 발생적 또는 합성으로 제조된 폴리펩티드로서 정의되며, CH1 도메인, 힌지, CH2 도메인, CH3 도메인, 또는 CH4 도메인을, 분리 또는 조합으로 포함한다. 인간 IgG1, IgG2 및 IgG4의 불변 영역의 서열 정렬이 도 1A 및 1B에 나타난다. Paul, (1999) Fundamental Immunology 4판, Lippincott-Raven에 의하면, CH1 도메인은 아미노산 118-215를 포함하고; 힌지 영역은 아미노산 216-230을 포함하고; CH2 도메인은 아미노산 231-340을 포함하고; CH3 도메인은 아미노산 341-447을 포함한다(아미노산 위치는 IgG1 서열에 기초한다). 힌지 영역은 CH1 도메인을 CH2 및 CH3 도메인으로 연결시킨다.

본 발명에서, Fc 부분은 전형적으로 적어도 CH2 도메인을 포함한다. 예를 들어, Fc 부분은 힌지-CH2-CH3를 포함할 수 있다. 대안적으로, Fc 부분은 힌지 영역, CH2 도메인 및/또는 CH3 도메인의 전체 또는 부분을 포함할 수 있다.

면역글로불린의 불변 영역은, Fc 수용체(FcR) 결합 및 보체 결합을 포함하는 많은 중요한 항체 기능에 영향을 미친다. IgA, IgG, IgD, IgE, IgM으로 분류되는 중쇄 불변 영역의 5개 주요 클래스가 있으며, 각각은 동형에 의해 지정되는 특징적인 효과기 기능을 갖는다. 예를 들어, IgG는 4개의 하위 클래스: γ1, γ2, γ3 및 γ4로 구분되며, 또한 각각 IgG1, IgG2, IgG3, 및 IgG4로도 공지되어 있다.

IgG 분자는, 항체의 IgG 클래스에 특이적인 3개 클래스의 Fcγ 수용체(FcγR), 즉 Fcγ I, Fcγ II, 및 Fcγ III를 포함하는 다수의 세포 수용체 클래스와 상호작용한다. IgG가 FcγR 수용체에 결합하기 위한 중요한 서열은 CH2 및 CH3 도메인에 위치하고 있다고 보고되어 있다. 항체의 혈청 반감기는 항체가 Fc 수용체(FcR)에 결합하는 능력에 의해 영향을 받는다. 유사하게, 면역글로불린 융합 단백질의 혈청 반감기 또한 상기 수용체에 결합하는 능력에 의해 영향을 받는다[Gillies SD 등, (1999) Cancer Res. 59: 2159-66]. IgG1의 것들에 비하여, IgG2 및 IgG4의 CH2 및 CH3 도메인은, Fc 수용체에 대해 생화학적으로 탐지될 수 없거나 감소된 결합 친화력을 가진다. IgG2 또는 IgG4의 CH2 및 CH3 도메인을 함유하는 면역글로불린 융합 단백질이, IgG1의 CH2 및 CH3를 함유하는 상응하는 융합 단백질에 비해 더 긴 혈청 반감기를 가진다고 보고되어 있다[미국 특허 제 5,541,087; Lo 등, (1998) Protein Engineering, 11: 495-500]. 따라서, 본 발명을 위한 바람직한 CH2 및 CH3 도메인은 감소된 수용체 결합 친화력 및 효능기 작용을 가진 항체 동형, 예를 들어 IgG2 또는 IgG4로부터 유래된다. 더욱 바람직한 CH2 및 CH3 도메인은 IgG2로부터 유래된다.

힌지 영역은 일반적으로 중쇄 불변 영역의 CH1 도메인의 C-말단에 위치한다. IgG 동형에서, 이황화 결합은 전형적으로 상기 힌지 영역 내에서 발생하여, 최종적인 사량체 분자를 형성하게 한다. 상기 영역은 프롤린, 세린 및 트레오닌에 의해 지배된다. 본 발명에 포함되는 경우, 힌지 영역은 전형적으로 적어도, 두 개의 Fc 부분을 연결하는 이황화 결합을 형성하는 시스테인 잔기를 포함하는 자연 발생적 면역글로불린 영역에 해당한다. 인간 및 마우스 면역글로불린에서의 힌지 영역의 대표적인 서열은 Borrebaeck, C. A. K., ed., (1992) ANTIBODY ENGINEERING. A PRACTICAL GUIDE, W. H. Freeman and Co.에서 발견할 수 있다. 본 발명에 적합한 힌지 영역은 IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, 및 기타 면역글로불린 클래스로부터 유래될 수 있다. IgG1 힌지 영역은 3개의 시스테인을 가지며, 이 중 두 개는 면역글로불린의 두 개의 중쇄 사이의 이황화 결합에 수반된다. 상기 동일한 시스테인은 Fc 부분 사이의 효율적이고 일정한 이황화 결합을 형성하게 한다. 그러므로, 본 발명의 바람직한 힌지 영역은 IgG1으로부터 유래되고, 더욱 바람직하게는 인간 IgG1으로부터 유래된다. 일부 구현예에서, 인간 IgG1 힌지 영역 내의 제 1 시스테인이 다른 아미노산, 바람직하게는 세린으로 돌연변이 된다. IgG2 동형

힌지 영역은 올리고머화를 촉진시키는 경향이 있는 4개의 이황화 결합을 가지며, 재조합 시스템 내에서 분비 동안 부정확한 이황화 결합을 형성하는 것이 가능하다. 적합한 힌지 영역은 IgG2 힌지로부터 유래될 수 있다; 첫번째 두 개의 시스테인은 각각 바람직하게 다른 아미노산으로 돌연변이된다. IgG4의 힌지 영역은 비효율적으로 내부 사슬 이황화 결합을 형성하는 것으로 공지되어 있다. 그러나, 본 발명에 대한 적합한 힌지 영역은 IgG4 힌지 영역으로부터 유래될 수 있고, 바람직하게는 중쇄-유래 부분들 사이의 이황화 결합의 정확한 형성을 향상시키는 돌연변이를 포함한다[Angal S 등, (1993) *Mol. Immunol.*, 30: 105-8].

본 발명에 따르면, Fc 부분은 상이한 항체 동형으로부터 유래된 CH2 및/또는 CH3 도메인 및 힌지 영역을 함유할 수 있으며, 즉 하이브리드 Fc 부분이다. 예를 들어, 한 구현예에서, Fc 부분은 IgG2 또는 IgG4로부터 유래된 CH2 및/또는 CH3 도메인 및 IgG1으로부터 유래된 돌연변이 힌지 영역을 함유한다. 대안적으로, 또 다른 IgG 하위 클래스로부터의 돌연변이 힌지 영역이 하이브리드 Fc 부분에 사용된다. 예를 들어, 두 개의 중쇄 사이의 효율적인 이황화 결합을 이루도록 하는 IgG4 힌지의 돌연변이 형태가 사용될 수 있다. 돌연변이 힌지는 또한 첫번째 두 개의 시스테인이 각각 다른 아미노산으로 돌연변이 된 IgG2 힌지로부터 유래될 수 있다. 상기 하이브리드 Fc 부분은 고 수준의 발현을 촉진시키고 Fc-EPO 융합 단백질의 정확한 조립을 증진시킨다. 상기 하이브리드 Fc 부분의 조립은 미국특허 공개공보 제20030044423 [즉, 미국 특허출원 제10/093,958]에 기술되어 있고, 상기의 개시는 이하에서 참고로서 도입된다.

일부 구현예에서, Fc 부분은, 일반적으로 Fc 융합 단백질의 혈청 반감기를 연장시키는 아미노산 변형을 함유한다. 상기 아미노산 변형은 Fc 수용체의 결합 또는 보체 결합 활성을 실질적으로 감소시키거나 제거하는 돌연변이를 포함한다. 예를 들어, 면역글로불린 중쇄의 Fc 부분 내의 당화 부위가 제거될 수 있다. IgG1에서, 당화 부위는 Asn297이다. 다른 면역글로불린 동형에서, 당화 부위는 IgG1의 Asn297에 상응한다. 예를 들어, IgG2 및 IgG4에서, 당화 부위는 아미노산 서열 Gln-Phe-Asn-Ser 내의 아스파라긴이다. 따라서, IgG1의 Asn297의 돌연변이는 IgG1으로부터 유래된 Fc 부분의 당화 부위를 제거한다. 한 구현예에서, Asn297은 Gln으로 대체된다. 유사하게, IgG2 또는 IgG4에서 아미노산 서열 Gln-Phe-Asn-Ser 내의 아스파라긴의 돌연변이는 IgG2 또는 IgG4 중쇄로부터 유래된 Fc 부분의 당화 부위를 제거한다. 한 구현예에서, 아스파라긴은 글루타민으로 대체된다. 다른 구현예에서, 아미노산 서열 Gln-Phe-Asn-Ser 내의 페닐알라닌이 추가적으로 돌연변이 되어, 아스파라긴 돌연변이로부터 생성되는 잠재적인 비자기(non-self) T-세포 에피토프를 제거한다. 예를 들어, IgG2 또는 IgG4 중쇄 내의 아미노산 서열 Gln-Phe-Asn-Ser이 Gln-Ala-Gln-Ser 아미노산 서열로 대체될 수 있다.

Fc 부분과 비-Fc 부분의 접합부 부근의 아미노산의 변경이 Fc 융합 단백질의 혈청 반감기를 극적으로 증가시킬 수 있다는 것이 또한 관찰된다(PCT 공개 WO 01/58957, 상기의 개시는 이하에서 참고로서 도입됨). 따라서, 본 발명의 Fc-EPO 융합 단백질의 접합부 부위는, 면역글로불린 중쇄 및 에리스로포이에틴의 자연 발생적 서열과 비교하여, 바람직하게는 접합부 지점의 10 이내의 아미노산의 변경을 함유할 수 있다. 상기 아미노산 변화는, 예를 들어 Fc 부분의 C-말단 리신이 알라닌 또는 류신과 같은 소수성 아미노산으로 변화하는 것에 의해, 소수성의 증가를 초래할 수 있다.

다른 구현예에서, Fc 부분은 면역글로불린 중쇄의 Fc 부분의 C-말단 부근의 Leu-Ser-Leu-Ser 부분의 아미노산 변경을 포함한다. Leu-Ser-Leu-Ser 부분의 아미노산 치환은 잠재적인 접합 T-세포 에피토프를 제거한다. 한 구현예에서, Fc 부분의 C-말단 부근의 Leu-Ser-Leu-Ser 아미노산 서열은 Ala-Thr-Ala-Thr 아미노산 서열로 대체된다. 다른 구현예에서, Leu-Ser-Leu-Ser 부분 내의 아미노산은 글리신 또는 프롤린과 같은 다른 아미노산으로 대체된다. IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, 또는 기타 면역글로불린 클래스 분자의 C-말단 부근의 Leu-Ser-Leu-Ser 부분의 아미노산 치환을 생성하는 상세한 방법이 미국 특허 공개공보 제 20030166877 (즉, 미국 특허 출원 10/112,582)에 기술되어 있으며, 상기 개시는 이하에서 참고로서 도입된다.

에리스로포이에틴 부분

본원에서 사용되는 "에리스로포이에틴 부분"은 인간 및 기타의 종으로부터의 야생형 또는 자연 발생적 에리스로포이에틴, 재조합 에리스로포이에틴, 및 생물학적으로 활성인 에리스로포이에틴 단편, 유사체, 변이, 돌연변이 또는 에리스로포이에틴의 유도체를 포함하는 에리스로포이에틴 유사 분자를 포함한다.

야생형 또는 자연 발생적 에리스로포이에틴은 에리스로포이에틴 전구 세포로부터 적혈구의 성장 및 발달을 자극하는 34 KD 당단백질 호르몬이다. 야생형 또는 자연 발생적 에리스로포이에틴은 저산소증(예를 들어, 빈혈로 인한 적혈구 손실)에 대한 반응으로 신장에서 제조되고, 동족의 세포 수용체와의 상호작용을 통해 적혈수 세포의 성장 및 분화를 조절한다. 야생형 또는 자연 발생적 에리스로포이에틴은 혈액[Miyake T. 등, (1977) *J. Biol. Chem.*, 252: 5558-5564], 또는 혈장(Goldwasser, E. 등, (1971) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 68: 697-698], 또는 소변으로부터 단리되고 정제될 수 있다.

재조합 또는 화학적으로 합성된 에리스로포이에틴은 당업자에게 널리 공지된 기술은 사용하여 제조될 수 있다. 두 가지 형태의 재조합 인간 에리스로포이에틴(rHuEPO)이 시판되고 있다: Amgen 사의 EPOGEN® 및 Johnson & Johnson 사의 PROCRIT®.

본원에서 사용되는, 에리스로포이에틴의 생물학적 활성은 에리스로포이에틴 수용체와의 상호작용을 통한 세포 증식을 자극하는 능력으로서 정의된다. 에리스로포이에틴의 기능 평가는 시험관 내 또는 생체 내에서 수행될 수 있다. 예를 들어, 에리스로포이에틴의 시험관 내 활성은 세포 기재의 평가에서 테스트될 수 있다. 구체적으로, 에리스로포이에틴 활성은 TF-1 세포 증식 평가에 기초하여 확인될 수 있다. TF-1 세포는 EPO 수용체를 발현한다. 삼중수소화 티미딘의 도입에 의해 확인되는, TF-1 세포의 증식은 에리스로포이에틴 활성의 함수이다[Hammerling 등, (1996) *J. Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 14: 1455; Kitamura 등, (1989) *J. Cellular Physiol*, 140: 323]. 시험관 내 세포 기재의 평가는 실시예 6에서 보다 상세하게 기술된다. 생체 내 평가는 전형적으로 동물 모델, 예를 들어 마우스 및 래트에서 수행된다. 생체 내 평가의 실시에는 적혈구용적률(HCT) 평가 및 망상적혈구 평가를 비제한적으로 포함한다. HCT 평가는 에리스로포이에틴 처리된 동물로부터 채취한 혈액 샘플로부터 적혈구의 부피를 측정하고, 모세 시험관에서 혈액을 원심분리시키고, 침전된 적혈구가 차지하는 총 부피 중의 분획을 측정함으로써 수행된다. 생체 내 HCT 평가는 실시예 8에서 보다 상세하게 기술된다. 망상적혈구 평가는, 전구 세포로부터 최근에 분화되어 여전히 전구 세포에 특징적인 핵산 잔유물을 가진, 망상적혈구라고도 공지되어 있는 신규한 적혈구를 측정한다. 망상적혈구는, 아크리딘 오렌지 또는 티아졸 오렌지와 같은 핵산-염색약으로 염색한 후 유동 세포 측정기(flow cytometer)에서 적혈구를 분류하고, 양성으로 염색된 망상적혈구 분획을 계산함으로써 측정된다.

생물학적으로 활성된 또는 기능적으로 활성된 에리스로포이에틴 유사 분자는 야생형 또는 자연 발생적 에리스로포이에틴의 상응하는 서열과 실질적인 아미노산 서열 유사성 또는 동일성을 전형적으로 공유하고(예를 들어, 약 55%, 약 65%, 약 75% 이상의 동일성, 전형적으로는 약 80% 이상이고 가장 전형적으로는 약 90-95%의 동일성), 상기 야생형 에리스로포이에틴의 하나 이상의 기능을 가진다.

따라서, 본 발명의 에리스로포이에틴은 구체적으로 야생형 에리스로포이에틴의 서열과 유사한 아미노산 서열을 가진 에리스로포이에틴 폴리펩티드를 포함한다고 이해된다. 상기 단백질은 본원에서 에리스로포이에틴 유사체라고 정의된다. 본원에서 정의되는 "유사체"는 상기 단백질의 생물학적 활성을 가진 야생형 에리스로포이에틴의 아미노산 서열과 충분한 유사성을 가진 아미노산 서열을 의미한다. 예를 들어, 에리스로포이에틴의 유사체는 야생형 에리스로포이에틴의 아미노산 서열에서 하나 이상의 아미노산 변화를 함유할 수 있고, 예를 들어 적혈구 생산 및 성숙을 자극하는 능력을 가질 수 있다. 상기 아미노산 변화의 예는 아미노산 잔기의 침가, 결실 또는 치환을 포함한다. 본 발명의 에리스로포이에틴은, 미국 특히 제5,614,184에 기술된 바와 같이, 야생형 에리스로포이에틴 보다 더 증가되거나 감소된 생물학적 활성을 나타내는 돌연변이 단백질을 또한 포함한다.

본 발명의 에리스로포이에틴은 에리스로포이에틴의 생물학적으로 활성된 단편을 또한 포함한다. 상기 단편은 에리스로포이에틴의 전체 길이 아미노산 서열의 단지 부분만을 포함하지만, 생물학적 활성을 가질 수 있다. 본원에서 사용되는 "생물학적으로 활성된 단편"은 전체 길이 단백질과 유사한 생물학적 효과를 발휘할 수 있는 단편을 의미한다. 상기 단편은 내부의 결실 뿐만 아니라 아미노- 및 카르복시- 말단의 결실에 의해 제조될 수 있다. 이는 또한 에리스로포이에틴의 말단이 절단된(truncated) 및 하이브리드 형태를 포함한다. "말단이 절단된" 형태는, 예를 들어 아미노 말단 또는 카르복시 말단 잔기가 제거된, 에리스로포이에틴의 더 짧은 버전이다.

에리스로포이에틴 서열의 변이

아미노산 변형이 본 발명의 에리스로포이에틴 부분에 도입되어 EPO 수용체에 대한 결합 친화력을 감소시키고; 단백질 안정성을 향상시키고; 정확한, 활성 입체형상의 채택을 향상시키고; 약물동력학적 특성을 향상시키고; 합성을 향상시키거나; 기타의 이로운 특징을 제공할 수 있다. 예를 들어, EPO 수용체-매개의 세포내이입은 에리스로포이에틴과 EPO 수용체 사이의 결합 친화력에 의해 결정된다. 인간 에리스로포이에틴 및 EPO 수용체의 복합체의 3차원적 구조는, 에리스로포이에틴이 수용체에 결합하는 것이 에리스로포이에틴 표면상의 양전하 및 EPO 수용체 상의 음전하에 의해 지배된다는 것을 증명한다. Syed 등, (1998) *Nature*, 395: 511. 결합 비율을 감소시키기 위하여, 돌연변이를 도입하여 에리스로포이에틴-EPO 수용체 접촉 표면 부근에 있는 양전하를 뛴 아미노산을 대체한다. 예를 들어, 한 구현예에서, 인간 에리스로포이에틴의 Arg131 및 Arg139 중 하나 또는 두 개가 대체될 수 있다(EPO 서열의 아미노산 번호 표기는 성숙한 인간 EPO에 기초한다). 바람직하게는, Arg131 및 Arg139가 글루탐산 및 아스파르트산, 또는 기타의 양전하를 띠지 않은 아미노산으로 대

체된다. 돌연변이가 다른 종의 에리스로포이에틴에 도입되어, 인간 에리스로포이에틴의 Arg131 및 Arg139에 상응하는 아미노산을 대체할 수 있다. 그러나, EPO의 생물학적 활성을 보존하기 위하여, EPO 아미노산 서열에서 변경이 일어나는 경우, EPO-EPO 수용체 상호작용의 중심에 있는 잔기들은 피하여야 한다.

대안적으로, 알라닌 주사(scanning) 돌연변이 유발에 의한 아미노산 치환을 허용하는 영역 또는 위치를 실험적으로 결정 할 수 있다(Cunningham 등, (1989) Science, 244, 1081-1085). 상기 방법에서, 생물학적 활성에 대한 효과를 확인하기 위하여, 선택된 아미노산 잔기들은 각각 중성 아미노산(예를 들어, 알라닌)으로 치환된다.

한 구현예에서, 에리스로포이에틴 부분은 하나 이상의 하기의 돌연변이를 함유한다: His32→Gly 및/또는 Ser34→Arg, 및 Pro90→Ala. 다른 구현예에서, 시스테인 치환이 에리스로포이에틴에 도입되어 시스테인-시스테인 이황화 결합의 패턴을 변경하여, 그 결과 신규한 이황화 결합을 형성한다("NDS 돌연변이"). 포유동물의 에리스로포이에틴 중 특이하다고 여겨지는 자연 발생적 인간 에리스로포이에틴은 7, 29, 33, 및 161 위치에 정확히 4개의 시스테인을 가지고 있어 두 개의 이황화 결합을 형성한다. 에리스로포이에틴 부분의 상기 시스테인 잔기 중 하나 이상이 변경될 수 있다. 변경된 이황화 결합을 생성하기 위하여, 시스테인 잔기 하나가, 알라닌 또는 세린과 같이 구조적으로 호환가능한 아미노산으로 돌연변이 되고, 3차원적 구조에서 가까이 있는 두번째 아미노산이 시스테인으로 돌연변이 된다. 예를 들어, 아미노산 Gln₈₆, Pro₈₇, Trp₈₈, Glu₈₉, 및 Leu₉₁ 중 하나는 Cys으로 대체될 수 있다. Trp₈₈이 Cys에 의해 대체되고 Cys₃₃이 또 다른 아미노산을 대체되면, 에리스로포이에틴 부분은 인간 EPO에서는 발견되지 않는 Cys₂₉-Cys₈₈ 이황화 결합을 형성할 것이다. 상기 결합은 전형적인 Cys₂₉-Cys₃₃ 이황화 결합을 가진 융합 단백질보다 더 큰 활성을 가진 융합 단백질을 생성한다. 더욱이, Cys₂₉-Cys₈₈ 융합 단백질은, 융합 단백질의 에리스로포이에틴 부분에서의 다른 돌연변이 존재하에서, Cys₂₉-Cys₃₃ 융합 단백질에 비하여, 활성의 뚜렷한 증가를 나타낸다. 따라서, 본 발명의 한 구현예에서, 에리스로포이에틴 부분은 하기 아미노산 치환 중 하나 이상을 포함한다: 29 위치에서 시스테인 이외의 잔기, 33 위치에서 시스테인 이외의 잔기, 88 위치에서 시스테인 잔기 및 139 위치에서 시스테인 잔기. 한 구현예에서, 에리스로포이에틴 부분은 7, 29, 88, 및 161 위치에서 시스테인을 함유한다. 또 다른 구현예에서, 에리스로포이에틴 부분은 하기의 치환 중 하나 이상을 추가적으로 함유한다: His₃₂→Gly, Cys₃₃→Pro, 및 Pro₉₀→Ala. 대안적 구현예에서, 두 개의 아미노산이 시스테인으로 돌연변이 되어 전체적으로 신규한 이황화 결합이 단백질에 부가된다. 바람직한 Cys 처리된 본 발명의 구현예에서, Cys 돌연변이가 초래할 수 있는 가능한 구조의 변형을 상쇄하기 위하여, 에리스로포이에틴은 상기 잠재적인 변형을 완화시키도록 고안된 돌연변이를 추가적으로 함유한다.

시스테인 치환에 관련된 추가적인 구현예가 PCT 공개공보 WO 01/36489(즉, 미국 특허출원 제 09/708,506)에 기술되어 있으며, 상기의 개시는 이하에서 참고로서 도입된다.

에리스로포이에틴에 돌연변이를 도입하는 방법은 당업계에 널리 공지되어 있다. 예를 들어, 돌연변이는 위치-지정 돌연변이 유발 기술에 의해 도입될 수 있다. 매우 다양한 위치-지정 돌연변이 유발 기술이 이용 가능하고 유사한 결과를 달성하기 위한 대안으로서 사용될 수 있음에 주목하는 것이 중요하다. 기타의 기술은 무작위 및 반-무작위(semi-random) 돌연변이 유발을 비제한적으로 포함한다.

링커

본 발명에 따른 Fc-EPO 융합 단백질은, Fc 부분과 에리스로포이에틴 사이의 링커 분자, 바람직하게는 웹티드 링커를 포함할 수 있다. 링커를 가진 융합 단백질은 증가된 생물학적 활성과 같은 개선된 특성을 가질 수 있다. 링커는 일반적으로 1 내지 25개의 아미노산을 함유한다(예를 들어, 5 내지 25 또는 10 내지 20개의 아미노산). 링커는 프로테아제 절단 부위를 포함하지 않도록 고안될 수 있다. 또한, 링커는 단백질 분해를 입체적으로 억제하는 N-결합형 또는 O-결합형 당화 부위를 함유할 수 있다. 따라서, 한 구현예에서, 링커는 Asn-Ala-Thr 아미노산 서열을 함유한다.

그 외의 적합한 링커가 Robinson 등, (1998), Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 95, 5929; 및 미국 출원 제09/708,506에 개시되어 있다.

당화

자연 발생적 인간 에리스로포이에틴 및 포유동물의 세포에서 발현된 재조합 에리스로포이에틴은 세 개의 N-결합형 및 한 개의 O-결합형 올리고사카라이드 사슬을 함유한다. N-결합형 당화는 24, 38 및 83 위치에 있는 아스파라긴 잔기에서 발생하는 반면, O-결합형 당화는 126 위치에 있는 세린 잔기에서 발생한다[Lai 등, (1986) J. Biol. Chem., 261: 3116;

Broudy 등, (1988) *Arch. Biochem. Biophys.*, 265: 329]. 올리고사카라이드 사슬은 말단의 시알산 잔기로 변형되어 나타난다. N-결합형 사슬은 전형적으로 사슬 당 4개 이하의 시알산을 가지고, O-결합형 사슬은 2개 이하의 시알산을 가진다. 따라서 에리스로포이에틴 폴리펩티드는 총 14개 이하의 시알산을 가질 수 있다.

시알산은 N-결합형 또는 O-결합형 올리고사카라이드 상의 말단의 당이다. 시알릴화의 정도는 부위별, 단백질별로 다양하고, 사용되는 세포 배양 조건, 세포 유형 및 특정 세포 클론에 의존할 수 있다. BHK 세포에서 합성되는 본 발명의 Fc-EPO 융합 단백질은 고도로 시알릴화된다는 것이 발견되었다. Fc-EPO 융합 단백질의 시알릴화 정도는, 단백질이 없는 배지, 혼탁액, 또는 단백질이 없는 배지 및 혼탁액에서 BHK 세포가 성장하도록 함으로써 추가적으로 향상될 수 있다. NS/0, PerC6, 또는 293 세포와 같은 통상적으로 사용되는 특정한 기타 세포 주는, 표준 조건 하에서 고도로 시알릴화된 Fc-EPO 융합 단백질을 제조하지 못한다. 상이한 세포 주로부터 제조된 Fc-EPO 융합 단백질의 시알릴화 정도는 고도로 음전하를 띠는 시알산 잔기에 의한 등전 포커싱(isoelectric focusing; IEF) 겔 전기이동에 의해 확인될 수 있다; IEF 겔 전기이동의 상세사항은 실시예 5B에 기술된다. 상이한 세포 주에서 제조되는 Fc-EPO 융합 단백질의 시알릴화 정도는 또한 당업자에게 익숙한 방법을 사용하는 렉틴-결합 연구에 의해 정성적으로 확인될 수 있다. 렉틴-결합 평가의 예는 실시예 5B에서 기술된다.

전형적으로, 본 발명의 고도로 시알릴화된 정제 Fc-EPO 융합 단백질 집단은 정제 Fc-EPO 융합 단백질 당 평균 11-28개의 시알산을 가진다. 바람직하게는 고도로 시알릴화된 Fc-EPO 융합 단백질 집단은 정제 Fc-EPO 융합 단백질 당 평균 13-28개, 15-28개, 17-28개, 19-28개, 또는 21-28개의 시알산 잔기를 가진다. 예를 들어, 하나의 바람직한 고도로 시알릴화된 Fc-EPO 융합 단백질 집단은 정제 Fc-EPO 융합 단백질 당 평균 20 내지 22개의 시알산 잔기를 가진다. 또 다른 바람직한 Fc-EPO 융합 단백질 집단은 정제 Fc-EPO 융합 단백질 당 평균 23-28개의 시알산 잔기를 가진다.

시알릴화된 Fc-EPO 융합 단백질의 약물동태

적혈구 생성 촉진제의 생체 내 생물학적 활성을 결정하는 가장 중요한 요소 중 하나는, 단백질의 혈청 농도가 적혈구 생성에 필요한 역치를 초과하여 유지되는 시간의 길이이며, 이는 적혈구 생성 촉진제의 약물동태에 의해 결정된다. 고도로 시알릴화된 Fc-EPO 융합 단백질의 약물동력학적 프로필은 자연 발생적 또는 재조합 에리스로포이에틴의 그것과 구별된다. 주요한 차이점은 고도로 시알릴화된 Fc-EPO 융합 단백질이 훨씬 긴 혈청 반감기 및 느린 배설을 가지고 있어서, 생체 내 생물학적 효능을 증가시킨다는 것이다. 이론에 의해 제한되기를 바라지는 않으나, 시알산 잔기는 에리스로포이에틴 분자 상의 음전하를 증가시켜, 결과적으로 음전하를 띤 EPO 수용체 대한 결합 비율을 감소시키고 EPO 수용체 매개 세포내이입을 감소시켜, 혈청 반감기를 연장시킨다고 여겨진다. 더욱이, 시알산은 또한 에리스로포이에틴 단백질이, 노출된 갈락토스 잔기가 있는 당단백질을 결합시키는 아시알로당단백질(asialoglycoprotein) 수용체에 의해 세포내이입되는 것을 방지한다.

일반적으로, 에리스로포이에틴과 같은 치료학적 분자의 대부분의 약물동력학적 프로필은 혈청 농도가 개시시 하락을 나타내고(알파 상), 이어서 투여 후에 더욱 점진적인 감소(베타 상)를 나타낸다.

알파 상에 영향을 주는 요소들

작은 분자 약물동력학 이론에 따르면, 알파 상은 분자 부분이 얼마나 혈액 외의 구획으로 들어가는지를 기술하는 분포 용적을 정의한다. 알파 상에서 관찰되는 하강은 상이한 세포 주에서 합성된 상이한 Fc-융합 단백질에 대해 매우 다양하다. 이론 상, 상기 차이점은 분포 용적의 변이에 기인하거나, 내부 구획 트래피킹(trafficking)의 변이에 기인한다. 그러나, 시알릴화의 정도와 쥐에서의 Fc-EPO 단백질의 약물동력학적 거동 사이의 상관관계가 있는 것으로 관찰되었다. 예를 들어, BHK 세포에서 합성된 Fc-EPO 융합 단백질은 고도로 시알릴화되어 최상의 약물동력학적 프로필을 나타낸다. NS/0 세포에서 합성된 Fc-EPO 융합 단백질은 약간 시알릴화되어 중간 정도의 약물동력학적 프로필을 가진다. 293 및 PerC6 세포에서 합성된 Fc-EPO 융합 단백질은 거의 시알릴화되지 않거나 시알릴화되지 않아서 최초 30분 내에 혈청 농도가 약 100 배 하락하는 것을 특징으로하는 나쁜 약물학적 프로필을 가진다. 그러므로, 특정 Fc-EPO 융합 단백질의 알파 상에 영향을 미치는 주요 요소는 당화 종류의 분포 및 시알릴화의 수준이다. 시알릴화 되지 않은 Fc-EPO 융합 단백질은 신속하게 소멸한다.

또한, 도 2에 나타낸 바와 같이, 알파 상 동안 Fc-EPO 혈청 농도의 하강 정도는 용량에 따라 변화하며, 이는 상기 거동이 포화 가능하고 수용체 매개일 것임을 나타낸다. 알파 상 하강을 매개하는 수용체는 EPO 수용체도 Fc 수용체도 아닌, 아시알로당단백질 수용체와 같은 또 다른 수용체 일 수 있다. Aranesp®는 부가적인 N-결합형 당화 부위의 결과로서 증가된 음전하를 가지므로, Aranesp®은 보통의 인간 에리스로포이에틴에 비해, EPO 수용체에 대한 감소된 결합 친화력을 가진

다. 그러나, Aranesp[®] 및 보통의 인간 에리스로포이에틴은 알파 상 동안 유사한 하강을 나타낸다. 또한, 일반적으로 적혈구 전구 세포의 세포 표면 상의 EPO 수용체의 수는 단지 약 200개이고, 상기 수용체는 도 2에서 사용된 것보다 훨씬 더 저 용량으로 완전히 포화된다. 당화 부위를 제거하는 돌연변이, 예를 들어 IgG1의 Asn297에 상응하는 아미노산의 돌연변이를 가진 Fc-EPO 융합 단백질은 여전히 알파 상에서 가파른 하강을 나타낼 수 있기 때문에, Fc 수용체는 아마도 알파 상에서 극적인 하강을 매개하지는 않을 것이다. 또한, 응집하지 않는 경우, 비록 IgG2 CH2 영역이 일반적으로 Fc 수용체에 결합하지 않더라도, IgG2 CH2 영역을 함유하는 Fc-EPO 단백질은 알파 상 동안 여전히 현저한 하강을 나타낸다.

이론에 의해 제한되기를 바라지는 않으나, 알파 상 동안 Fc-EPO 융합 단백질의 혈청 농도의 하강은 아시알로당단백질-수용체-매개 세포내이입을 통해 아시알로당단백질에 의해 매개될 수 있다. 시알릴화 되지 않은 Fc-EPO 융합 단백질은 아시알로당단백질 수용체에 의해 결합되어 아시알로당단백질-수용체-매개 세포내이입을 생성하는 노출된 갈락토스를 함유한다. 결과적으로, 시알릴화되지 않은 Fc-EPO 융합 단백질은 신속하게 소멸될 수 있다.

베타 상에 영향을 주는 요소들

베타 상에서 Fc-EPO 융합 단백질의 혈청 농도의 하강은 알파 상의 하강에 비해 덜 가파르다. 예를 들어, 마우스에서, 투여 후 8 내지 24 시간에, Fc-EPO 융합 단백질의 혈청 농도가 2배 내지 3배 하강하는 것이 관찰된다. 상이한 세포 주에서 합성된 상이한 Fc-EPO 단백질 사이의 베타 상 동안의 하강의 차이 또한 덜 급격하다. 그러나, 알파 상에서와 같이, 시알릴화의 정도는 베타 상에서의 약물동력학적 거동과 상관관계가 있다. 예를 들어, BHK 세포에서 합성된 Fc-EPO 융합 단백질은 NS/0 세포에서 합성된 다른 동일한 Fc-EPO 단백질에 비해, 현저히 개선된 베타상을 가진다. EPO 수용체-매개 세포내이입은 베타 상 동안 Fc-EPO 융합 단백질의 혈청 농도의 하강에 적어도 부분적으로 영향을 준다. 보통의 인간 에리스로포이에틴에 비해, EPO 수용체에 대해 감소된 결합 친화력을 가진 Aranesp[®]은, 유사한 알파 상 프로필에도 불구하고, 보통의 인간 에리스로포이에틴에 비해 현저히 개선된 베타상을 가진다.

본 발명의 Fc-EPO 융합 단백질은 일반적으로, 자연 발생적 또는 재조합 에리스로포이에틴에 비해 개선된 베타상을 나타내며, 이는 Fc 부분의 부가가 베타 상 동안의 혈청 농도의 감소를 현저하게 늦춘다는 것을 나타낸다. Fc 부분 또는 에리스로포이에틴 부분의 특정 아미노산 변형이 베타상을 현저하게 개선할 수 있다는 것이 또한 관찰되었다. 예를 들어, Fc 부분의 당화 부위를 제거하는 돌연변이가 Fc-EPO 융합 단백질의 베타상을 개선한다. 에리스로포이에틴 부분의 안정성을 증가시키는 돌연변이, 예를 들어 에리스로포이에틴 부분의 이황화 결합을 형성하는 돌연변이(예를 들어 NDS 돌연변이)는 Fc-EPO 융합 단백질의 베타상을 현저하게 개선한다. 일반적으로, 개선된 베타상은 Fc-EPO 융합 단백질의 말기 혈청 반감기를 연장시킨다.

Fc-EPO 융합 단백질의 제거 경로

몸으로부터 에리스로포이에틴 단백질 분자의 제거는 몇 가지 가능한 경로가 있다. 야생형 또는 자연 발생적 에리스로포이에틴 분자는 신장 여과 및 수용체-매개 세포내이입에 의해 몸으로부터 제거될 수 있다. 세포내이입된 에리스로포이에틴은 효율적으로 분해된다. 도 3에 도시된 바와 같이, 에리스로포이에틴 부분에 Fc 부분을 부가하는 것은 신장을 통한 Fc-EPO 융합 단백질의 배설을 본질적으로 차단할 것이라고 예상된다. 결과적으로, 수용체-매개 세포내이입이 Fc-EPO 융합 단백질 제거의 주요 경로이다. 또한, 에리스로포이에틴 부분에 Fc 부분을 부가하는 것은 내부 이행 후의 분해를 감소시킬 것으로 또한 예상되는데, 이는 FcRn 엔도솜 수용체가 융합 세포를 다시 셀 밖으로 재순환시킬 것으로 예상되기 때문이다.

원칙적으로, 세 유형 이상의 수용체, 즉 Fc-수용체, EPO 수용체, 및 아시알로당단백질 수용체가 Fc-EPO 융합 단백질의 제거를 매개할 수 있다. Fc 수용체를 통한 Fc-EPO 융합 단백질의 제거는 Fc 부분의 IgG1-유래의 CH2 대신 IgG2-유래의 CH2 도메인을 사용함으로써 현저하게 감소된다. IgG2-유래의 CH2 도메인은, IgG들에 대해 가장 높은 친화력을 가진 Fc γ RI에 대해, IgG1-유래의 CH2 도메인에 비해 약 100배 낮은 친화력을 가진다. IgG2-유래의 CH2와 Fc γ RI 사이의 상호작용은 대부분의 결합 평가에서 탐지될 수 없다. 그러나, CH2 도메인의 당화 부위를 제거하는 아스파라긴 돌연변이는 추가적으로 Fc-수용체의 결합을 감소시키고 Fc-EPO 융합 단백질의 약물동태를 개선하기 때문에, IgG2-유래의 CH2 도메인의 나머지 Fc γ R-결합 활성은 Fc-EPO 융합 단백질의 제거에서 여전히 역할을 수행할 수 있다.

NDS 돌연변이는 에리스로포이에틴 구조를 안정화시키는 효과가 있고, 그 결과 내부 이행 후 Fc-EPO 융합 단백질의 분해를 감소시킬 것으로 예상된다. NDS 돌연변이를 포함하는 Fc-EPO 융합 단백질은 개선된 약물동력학적 특성 및 증가된 혈청 반감기를 가진다.

시알릴화는 Fc-EPO 융합 단백질의 음전하를 증가시키고, 이는 EPO 수용체에 대한 Fc-EPO 융합 단백질의 결합 친화력을 감소시킨다. 시알릴화는 또한 Fc-EPO 융합 단백질 상의 노출된 갈락토스 잔기의 수를 감소시키고, 이는 아시알로당단백질 수용체에 대한 Fc-EPO 융합 단백질의 결합 친화력을 감소시킨다. 따라서, 도 3에 도시된 바와 같이, 시알릴화는 EPO 수용체-매개 세포내이입 및 아시알로당단백질 수용체-매개 세포내이입 모두를 감소시킨다. 그러므로, 고도로 시알릴화된 Fc-EPO 융합 단백질은 극적으로 늦춰진 제거 속도를 가지고, 그 결과 현저하게 증가된 혈청 반감기 가진다.

Fc 부분의 부가, Fc 및 에리스로포이에틴 부분의 변경, 및 시알릴화는 각각 Fc-EPO 융합 단백질의 제거를 감소시킨다. 제거 및 혈청 반감기에 대한 조합된 효과는 더해지거나 곱해진다.

Fc-EPO 융합 단백질의 시험관 내 활성 및 생체 내 효능

Fc-EPO 단백질의 시험관 내 활성은 세포-기재의 평가에서 테스트 될 수 있다.

구체적으로, Fc-EPO와 EPO 수용체 사이의 상호작용은 TF-1 세포 증식 평가에 기초하여 확인될 수 있다. TF-1 세포는 EPO 수용체를 발현시키고, 따라서 삼중수소화 티미딘의 도입에 의해 확인되는 TF-1 세포의 증식은 에리스로포이에틴 활성의 함수이다[Hammerling 등, (1996) *J. Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 14: 1455; Kitamura 등, (1989) *J. Cellular Physio.*, 140: 323]. 본 발명에서, TF-1 세포의 증식은 에리스로포이에틴 부분과 EPO 수용체 사이의 상호작용의 함수이다. 구체적으로, Fc-EPO 융합 단백질의 에리스로포이에틴 부분이 EPO 수용체에 대해 감소된 결합 비율을 가지면, Fc-EPO 단백질은 일반적으로 세포-기재 평가에서 감소된 활성을 가진다(증가된 ED50 값으로 표시됨).

상대적으로 수득하기 용이한, 세포-기재의 평가로부터의 데이터는, 일반적으로 Fc-EPO 단백질의 약물동태 및 생체 내 효능과 상관관계가 있다. EPO 수용체에 대한 감소된 결합 비율을 나타내는 시험관 내 활성의 감소는, 일반적으로 개선된 약물동력학적 특성 및 향상된 생체 내 효능과 상관관계가 있다. 반면, EPO 수용체에 대한 향상된 결합 비율을 나타내는 시험관 내 활성의 증가(감소된 ED50 값으로 표시됨)는, 일반적으로 나쁜 약물동력학적 특성 및 감소된 생체 내 효능과 상관관계가 있다.

Fc-EPO 융합 단백질의 생체 내 생물학적 활성은, 예를 들어 마우스 및 래트와 같은 동물 모델에서 수행되는 평가에 의해 측정될 수 있다. 생체 내 평가의 예는 적혈구용적률(HCT) 평가 및 망상적혈구 평가를 비제한적으로 포함한다. HCT 평가는 적혈구(RBCs)가 차지하는 혈액의 부피를 측정하며, 모세 튜브 내의 혈액을 단순히 원심분리시키고, 총 부피 중 침전된 RBCs가 차지하는 분획을 측정함으로써 수행된다. 망상적혈구는 전구 세포로부터 최근에 분화된 신규한 RBCs이고 전구 세포로부터의 핵산 잔류물을 함유하는 것을 특징으로 한다. 망상적혈구는 예를 들어 아크리딘 오렌지 또는 티아졸 오렌지와 같은 핵산-염색약으로 염색한 후 유동 세포 측정기에서 적혈구를 분류하고, 염색된 분획을 계산함으로써 측정된다. 전형적으로, 적혈구용적률 및 망상적혈구는 일주일에 2회 측정된다.

망상적혈구 데이터는, 어떤 의미에서는, 적혈구용적률 데이터의 일차 미분이다. 망상적혈구 수는 적혈구의 생성 비율의 측정인 반면, 적혈구용적률은 총 적혈구를 측정한다. 전형적인 실험에서, Fc-EPO 융합 단백질이 투여된 동물의 적혈구용적률이 증가하고 이어서 기준선으로 회귀할 것이다. 적혈구용적률이 높고 투여된 Fc-EPO 단백질이 동물의 순환계에서 소멸 시, 적혈구 생성이 억제되기 때문에, 망상적혈구 수는 기준선 미만으로 된다.

망상적혈구는 보통 전구 세포가 적혈구로 된 4일 후에 골수로부터 방출된다. 그러나, 에리스로포이에틴의 고 수준의 존재 하에서, 망상적혈구는 종종 투여 후 1-3일 후에 골수로부터 이탈할 것이다.

Fc-EPO 단백질의 주입에 대한 반응으로, 동물에서의 적혈구용적률이 증가하고, 일정 수준이 유지되며, 이어서 기준선으로 회귀한다. 상기 적혈구용적률 반응의 실시예가 도 4-6에 나타내어진다. 최대 감소율은, 마우스에서의 RBC 수명 약 45일에 상응하는 마우스에서 주 당 혈액 부피의 약 7% 및 래트에서의 RBC 수명 약 65일에 상응하는 래트에서 주 당 혈액 부피의 약 5%이다. 최대 감소율은 아마도 신규한 합성의 부재하에 RBCs의 파괴를 나타낸다. 생물학적으로 활성된 Fc-EPO 단백질이 적혈구 생성을 위한 역치 초과의 농도로 시스템 내에 남아 있다면, 생물학적으로 활성된 Fc-EPO의 수준이 약물동력학적 실험에서 탐지되지 않더라도, 적혈구용적률은 높게 유지되고 떨어지지 않을 것이다.

Fc-EPO 단백질의 약물동력학적 특성은 단백질의 생체 내 효능과 상관관계가 있음이 밝혀졌다. 상기 논의된, Fc-EPO 융합 단백질의 약물동태를 향상시키는 본 발명의 모든 특징은 또한 동물 실험에서의 생체 내 효능을 향상시킨다. 표 1에 나

타난 바와 같이, 상기 특징은 예를 들어, Fc 부분의 부가, Fc 부분 내의 당화 부위의 제거(예를 들어, IgG1의 Asn279에 해당하는 위치에서 N→Q 치환), 에리스로포이에틴 부분에 NDS 돌연변이의 도입, 및 BHK 세포에서 Fc-EPO 단백질 합성에 의한 고 수준의 시알릴화를 포함한다.

[표 1]

Fc-EPO의 약물동태 및 생물학적 활성을 주는 요소들

특징	시험판 내 효능에 대한 효과	약물동태에 대한 효과	생체 내 활성에 대한 효과
BHK 세포에서의 합성 (vs. NS/0 세포)	감소	향상	향상
Fc의 부가	약간 향상	향상	향상
NDS 돌연변이	없음	향상	향상
N→Q	없음	향상	향상
g2h (vs. g4h)	향상	향상	향상

에리스로포이에틴 부분마다, BHK 세포로부터 만들어진 Fcg2h(FN→AQ)-Epo 및 Fcg2h-EPO(NDS)가 가장 우수한 약물동태 및 가장 강력한 생체 내 생물학적 활성을 나타낸다. Fcg2h(FN→AQ)-Epo 및 Fcg2h-EPO(NDS) 각각은 에리스로포이에틴 부분마다 Aranesp® 보다 더 긴 혈청 반감기 및 더 강력한 생체 내 활성을 가진다.

Fc-EPO 융합 단백질의 합성

본 발명의 Fc-EPO 융합 단백질은 인간 또는 기타 포유동물의 세포 주와 같은 적합한 세포 또는 세포 주에서 제조될 수 있다. 적합한 세포 주는 새끼 햄스터 신장(BHK) 세포, 중국 햄스터 난소(CHO) 세포(디히드로플레이트 환원효소(DHFR)-결핍 세포), 및 COS 세포를 비제한적으로 포함한다. 바람직한 구현 예에서, BHK 세포가 사용된다.

적합한 숙주 세포(예를 들어, BHK 세포)에서 Fc-EPO 융합 단백질을 발현시키기 위하여, 당업자에게 익숙한 표준 재조합 분자 기술을 사용하여, 우선 Fc-EPO 융합 단백질을 코딩하는 핵산 서열을 발현 벡터에 도입한다. 바람직하게는 고 수준의 발현을 위해, 에리스로포이에틴 부분을 코딩하는 서열이 코돈-최적화된다. 코돈-최적화된 인간 에리스로포이에틴이 PCT 공개공보 WO 01/36489(즉, 미국 출원 제09/708,506)에 기술되어 있으며, 상기 개시는 이하에서 참고로서 도입된다. 에리스로포이에틴 부분을 코딩하는 대표적인 핵산 서열이 SEQ ID NO:1에 제공된다:

```

CCCCACCACGCCCTCATCTGTGACAGCCGAGTGCTGGAGAGGTACCTCTGGAGGCCAAGGAGGC
CGAGAATATCACGACCGGCTGTGCTGAACACTGCAGCTTGAATGAGAACATCACCGTGCCTGACA
CCAAAGTGAATTCTATGCCTGGAAGAGGGATGGAGGTTGCCAGCAGGCCGTAGAACGTGTGGCAG
GGCCTGGCCCTGCTGTCGGAAGCTGTCCTGCCAGGCCCTGTTGGTCAACTCTTCCCAGCC
GTGGGAGCCCCTGCAACTGCATGTGGATAAAGCCGTGAGTGGCCTTCGCAGCCTCACCACTCTGC
TTCGGGCTCTGGGAGCCCAGAAGGAAGCCATCTCCCTCCAGATGCAGGCCCTCAGCTGCTCCCCCTC
CCGACAATCACTGCTGACACTTCCGCAAATCTTCCGAGTCTACTCCAATTCCCTGGGGAAA
GCTGAAGCTGTACACAGGGAGGCCTGCCGGACAGGGGACAGATGA (SEQ ID NO:1)

```

바람직한 Fc 부분, 예를 들어 IgG2로부터 유래된 CH2 도메인 및 IgG1으로부터 유래된 힌지 영역을 포함하는 Fc 부분을 코딩하는 대표적인 핵산 서열이 미국 특허 공개공보 제20030044423(즉, U.S. 출원 제10/093,958)에 기술되어 있으며, 상기 개시는 이하에서 참고로서 도입된다.

일반적으로, Fc-EPO 융합 단백질을 코딩하는 핵산 서열은 시그널 웹티드를 코딩하는 핵산 서열(선도 서열)을 포함한다. 선도 서열은 분비 과정 동안 분할된다. 선도 서열 없이 성숙한 Fc-EPO 단백질을 코딩하는 대표적인 핵산 서열(SEQ ID NO:2)이 도 7에 나타난다.

적합한 벡터는 포유동물의 숙주 세포에서 발현되기에 적합한 것을 포함한다. 벡터는 예를 들어, 플라스미드 또는 바이러스일 수 있다. 벡터는 전형적으로 하기의 요소를 포함한다: 프로모터 및 기타 "업스트림(upstream)" 조절 요소, 복제 기점, 리보솜 결합 부위, 전사 종결 부위, 폴리링커 부위, 및 포유동물의 숙주 세포에서의 사용과 양립 가능한 선별 마커. 벡터는 또한 원핵 생물의 숙주 세포에서도 증식 및 유지가 되는 요소를 함유할 수 있다. 본 발명에 대한 적합한 벡터는 pdCs-Fc-X 및 이로부터 유래된 벡터, 및 phClO-Fc-X 및 이로부터 유래된 벡터를 비제한적으로 포함한다.

Fc-EPO 단백질을 코딩하는 벡터는, 형질 감염 및 바이러스 기술을 포함하는 표준 세포 생물학 기술에 의해 숙주 세포로 도입된다. 형질 감염은 단리된 DNA, RNA, 또는 합성 뉴클레오티드 중합체를 사용하여 세포에 유전 정보를 전달하는 것을 의미한다. 적합한 형질 감염 방법은, 몇 가지 예를 들면, 칼슘 포스페이트-매개 공-침전[Sambrook 등, (1989) Molecular Cloning: ALaboratory Manual, 제 2 판, Cold Spring Harbor Laboratory Press], 리포펙션(lipofection)[예를 들어, Lipofectamine Plus from Life Technologies of Rockville, Maryland], DEAE-덱스트란-매개 형질 감염 기술, 리소자 임 융합 또는 적혈구 융합, 스크래핑, 직접 흡수, 삼투압 또는 수크로스 쇼크, 직접 미세주입, 적혈구-매개 기술과 같은 간접 미세주입, 원형질체 융합, 또는 숙주 세포에 전류를 가하는 것(예를 들어, 전기천공)을 비제한적으로 포함한다. 유전 정보를 세포에 도입하기 위한 다른 과정이 반드시 개발될 것이므로, 상기 형질 감염 방법의 열거는 완전한 것으로 고려되지는 않는다.

Fc-EPO 융합 단백질을 코딩하는 핵산을 함유하는 숙주 세포의 선별을 촉진하기 위하여, Fc-EPO 융합 단백질을 코딩하는 핵산이 선별 마커로 전형적으로 도입된다. 상기 선별 마커는 Fc-EPO 융합 단백질을 코딩하는 동일한 발현 벡터 상에 존재하는 핵산 서열에 의해 코딩될 수 있다. 대안적으로, 상기 선별 마커는 상이한 벡터 상에 존재하는 핵산 서열에 의해 코딩될 수 있다. 후자의 경우, 공 형질 감염 또는 공 형질 도입에 의해 두 개의 벡터가 숙주 세포에 함께 도입될 수 있다. 적합한 선별 마커는 예를 들어, 히그로마이신 B(Hyg B) 및 디히드로폴레이트 환원효소(DHFR)를 포함한다.

일시적 발현은 작은 크기의 단백질 제조 및 Fc-EPO 융합 단백질의 신속한 분석에 유용하다. Fc-EPO 융합 단백질을 코딩하는 핵산 서열을 함유하는 숙주 세포는 코딩되는 Fc-EPO 융합 단백질의 발현에 적합한 조건하에서 유지된다. Fc-EP 융합 단백질을 발현하는 숙주 세포를 유지하기 위해, 표준 세포 배양 방법, 조건 및 배지가 사용될 수 있다.

안정적으로 형질 감염된 세포는 종종 대규모의 제조, 고 수준의 발현 및 기타의 목적을 위해 바람직하다. 안정적으로 유지되는 핵산은 숙주 세포내에서 임의의 다양한 형태로 존재할 수 있다. 예를 들어, 한 구현예에서, 안정적으로 유지되는 핵산 서열은 숙주 세포의 염색체에 통합된다. 다른 구현예에서, 안정적으로 유지되는 핵산 서열은 염색체 외 배열로서, 인공적 염색체로서, 또는 다른 적합한 형태로 존재할 수 있다.

한 구현예에서, BHK 세포는 Fc-EPO 융합 단백질을 합성하기 위해 사용된다. 안정적으로 형질 감염된 BHK 세포를 수득하기 위해, 융합 단백질을 코딩하는 핵산 서열 및 선별 마커를 코딩하는 핵산 서열이 BHK 세포로 도입되고, 바람직하게는 전기천공, 원형질체 융합 또는 리포펙션 방법에 의해서이다. 융합 단백질을 코딩하는 핵산 서열 및 선별 마커를 코딩하는 핵산 서열이 동일한 발현 벡터 상에 존재할 수 있다. 대안적으로, 융합 단백질을 코딩하는 핵산 서열 및 선별 마커를 코딩하는 핵산 서열이 분리된 벡터 상에 존재할 수 있다. 안정한 BHK 세포를 만들기 위한 바람직한 선별 마커는 Hyg B이다. DHFR와 같은 다른 선별 마커 또한 사용될 수 있다. 안정적으로 형질 감염된 클론이 단리되고, 적합한 농도(예를 들어, 200, 250 또는 300 마이크로그램/ml)의 Hyg B 존재하에, 예를 들어 Life Technologies 사로부터 입수 가능한 MEM+ FBS, DMEM/F-12 배지, 또는 VP-SFM와 같은 표준 조직 배양 배지, 및 다른 적합한 배지에서의 이들의 성장에 의해 증식된다. Fc-융합 단백질의 발현 수준은 상청액 및 배양 배지로부터의 샘플에 대하여, 예를 들어 ELISA 테스트, 웨스턴 블롯(Western Blot), 도트 블롯(dot blot), 또는 기타 적합한 평가와 같은 표준 단백질-검출 평가에 의해 관측될 수 있다. 고 발현 클론이 선택되고 대규모로 증식된다.

전형적으로, BHK 세포는 부착성 세포 주이고, 통상적으로 MEM + 10% 열-불활성화된 소 태아 혈청(FBS)과 같은 혈청-함유 배지에서 성장된다. 그러나, BHK 세포는 혼탁액 및 예를 들어, VP-SFM(Invitrogen Corp., cat # 11681-020) 또는 Opti-Pro SFM (Invitrogen Corp., cat # 12309)와 같은 혈청이 없는 배지에서 성장하도록 할 수 있다. 대표적인 적응 과정이 실시예 3에 기술되어 있다. 혈청이 없는 배지에서 성장하도록 한 BHK 세포는 예를 들어, DMEM/F-12 (Invitrogen Corp., cat # 11039-021)와 같은 단백질이 없는 배지에서 추가적으로 성장하도록 할 수 있다. 한 대표적인 적응 과정인 실시예 3에 기술되어 있다. 바람직하게는, DMEM/F-12는 적합한 아미노산 및 예를 들어 글루타민, HyPep 4601(Quest International, cat # 5Z10419) 및 HyPep 1510(Quest International, cat # 5X59053)와 같은 단백질 가수분해물, 에탄올아민(Sigma, cat # E0135), 및 트로폴론(Sigma, cat # T7387)과 같은 다른 성분으로 보충된다. 각 보충물의 적합한 농도는 당업자에 의한 통상적인 실험으로 결정될 수 있다.

단백질이 없는 배지에서 성장한 BHK 세포에서 합성된 Fc-EPO 융합 단백질은, 혈청-함유 배지(예를 들어, MEM + FBS) 또는 혈청은 없으나 단백질이 존재하는 배지(예를 들어, VP-SFM)에서 성장한 세포에서 합성된 상응하는 단백질보다 더 고도로 시알릴화 되고 더욱 균질한 시알릴화를 나타낸다. 또한, 상기 수득된 Fc-EPO 단백질은 실질적으로 응집되지 않으며, 즉 총 수득량의 약 98%가 응집되지 않는다. 단백질이 없는 배지에서 성장한 BHK 세포로부터의 단백질 수득량은 혈청-함유 배지에서 성장한 BHK 세포로부터의 수득량과 유사하며, 즉 10 마이크로그램/밀리리터(mcg/ml) 초파이다. 따라서, 혼탁액에서 및/또는 단백질이 없는 배지에서의 성장은, 1) 증가된 시알릴화의 결과로 Fc-EPO 융합 단백질의 약물동태를 증진시키고; 2) 혼탁액 모드 및 단백질이 없는 배지에서 성장한 세포로부터 단백질을 정제할 수 있기 때문에, 다운스트림 정제 공정을 촉진시키는 것을 포함하는 수많은 이점을 제공한다.

정제

Fc-EPO의 정제는 당업자에게 공지된 표준 GMP 과정에 따라 행해진다. 단백질은 일반적으로 균질하거나 거의 균질하도록 정제된다. 컬럼 크로마토그래피를 수반하는 것과 같은 크로마토그래피 정제가 일반적으로 바람직하다. 일반적으로, Fc-EPO 융합 단백질에 대한 정제 방법은 초기의 단백질 포획 단계; 바이러스 불활성화 단계; 하나 이상의 폴리싱 단계; 바이러스 제거 단계; 및 단백질 농축 및/또는 제형 단계를 비제한적으로 포함할 수 있다. 예를 들어, 융합 단백질의 Fc 부분에 결합하는 크로마토그래피 수지 물질이 Fc-EPO 단백질을 포획하기 위해 사용될 수 있다. 적합한 수지 물질은 단백질 A와 결합하는 수지를 비제한적으로 포함한다. 폴리싱 단계는 오염 성분을 제거하기 위해 포함될 수 있다. 예를 들어, 히드록시 아파타이트 크로마토그래피, 세파로즈(Sepharose) Q 크로마토그래피, 크기 배재 크로마토그래피, 소수성 상호작용 크로마토그래피가 오염물을 제거하기 위해 사용될 수 있다. Fc 부분에 결합하여 Fc-EPO 융합 단백질을 정제하는 단백질 A-기재 컬럼 크로마토그래피를 사용하는 한 정제 방법이 실시에 12에 기술되며, 바이러스 불활성화 및 제거를 위한 임의의 방법 또한 기술된다. 정제된 단백질은, 일반적으로 한외여과를 사용하여 목적하는 농도로 농축되고; 적합한 제형 완충제 내로 여과되고; 필터가 멸균되고; 바이알에 분산된다.

투여

약학적 조성물 및 투여 경로

본 발명은 또한 본 발명에 따라 제조된 Fc-EPO 단백질을 함유하는 약학적 조성물을 제공한다. 상기 약학적 조성물은 적혈구 생산을 자극하고 빈혈을 예방하고 치료하기 위해 사용될 수 있다. 본 발명에 의해 치료 가능한 상태는 신장 기능의 감소 또는 손실(만성 신부전)과 관련된 빈혈, 화학요법 또는 항 바이러스 약물(예컨대 AZT)와 같은 골수억제성 치료와 관련된 빈혈, 비-골수암의 증식과 관련된 빈혈, 바이러스 감염(예컨대 HIV)과 관련된 빈혈, 및 만성 질환 빈혈을 포함한다. 또한 수술 중 예상되는 혈액의 손실과 같은 건강하지 않은 개인에서 빈혈에 이를 수 있는 상태가 치료 가능하다. 일반적으로, rHuEpo로 치료 가능한 임의의 상태 또한 본 발명의 Fc-EPO 융합 단백질로 치료될 수 있다.

Fc-EPO 단백질을 함유하는 제형

일반적으로, 제형은 Fc-EPO 단백질, 완충제 및 액체 또는 고체 형태의 계면활성제를 함유한다. 고체 제형은 또한 동결 건조, 스프레이 동결 건조 또는 스프레이 건조 제형을 비제한적으로 포함한다. 액체 제형은 바람직하게는 물 기재이나, 몇 가지 예로 에탄올, 프로판올, 프로판디올 또는 글리세롤과 같은 다른 성분을 함유 할 수 있다.

Fc-EPO 단백질은 당업자에게 공지된 표준 GMP 과정에 따라 수용액에서 제형화된다. 일반적으로, 제형은 적합한 농도에서 적합한 성분을 포함하는 일정한 부피의 수용액을 혼합함으로써 생성된다. 예를 들어, 제형은 전형적으로 Fc-EPO 단백질을 0.1 내지 200 mg/ml, 바람직하게는 0.2 내지 10 mg/ml, 더욱 바람직하게는 0.5 내지 6 mg/ml의 농도로 함유한다.

완충 성분은, 예를 들어 시트레이트 염, 아세테이트 염, 히스티딘 염, 숙시네이트 염, 말레이트 염, 포스페이트 염, 락테이트 염, 이를 각각의 산 또는 염기 또는 이들의 혼합물과 같은 pH를 조절할 수 있는, 생리학적으로 양립할 수 있는 물질을 포함한다. 통상적으로 사용되는 완충 성분은 시트레이트 염 및/또는 이들의 유리산이다. 제형은 전형적으로 10 내지 100 mmol/l, 바람직하게는 2 내지 20 mmol/l, 더욱 바람직하게는 10 mmol/l의 농도로 완충 성분을 함유한다.

Fc-EPO 제형에 대한 계면활성제는 약학적 조성물 내의 계면활성제로 사용되는 임의의 부형제일 수 있고, 바람직하게는 폴리옥시에틸렌(20)-소르비탄모노라우레이트, 폴리옥시에틸렌(20)-소르비탄모노팔미테이트 및 폴리옥시에틸렌(20)-소

르비탄모노스테아레이트와 같은 폴리에틸렌-소르비탄-에스테르(Tweens[®]), 및 폴리옥시에틸렌-폴리옥시프로필렌-공중합체이다. 제형은 전형적으로 0.001 내지 1.0 % w/v, 바람직하게는 0.005 내지 0.1% w/v, 더욱 바람직하게는 0.01 내지 0.5% w/v의 농도로 계면활성제를 함유한다.

제형은 또한 하나 이상의 아미노산을 함유할 수 있다. 적합한 아미노산은 아르기닌, 히스티딘, 오르니틴, 리신, 글리신, 메티오닌, 이소류신, 류신, 알라닌, 페닐알라닌, 타이로신 및 트립토판을 비제한적으로 포함한다. 한 구현예에서, Fc-EPO의 제형은 글리신을 함유한다. 바람직하게는, 아미노산은 염의 형태, 예를 들어, 염산 염으로 사용된다. 적용 가능한 아미노산 농도는 2 내지 200 mmol/L, 또는 50 내지 150 mmol/L의 범위이다.

부가적으로, 제형은 수크로스, 트레할로스, 소르비톨과 같은 당; 아스코르브산 또는 글루타티온과 같은 항산화제; 페놀, m-크레솔, 메틸- 또는 프로필파라벤과 같은 방부제; 클로르부탄올; 티오메르살; 벤잘코늄클로라이드; 폴리에틸렌글리콜; 시클로덱스트린 및 기타 적합한 성분을 함유할 수 있다.

Fc-EPO 제형은 등장성인 것이 바람직하다. 예를 들어, 제형의 삼투압은 150 내지 450 mOsmol/kg의 범위일 수 있다. 약학적 조성물은 목적하는 저장 온도, 예컨대 2-8°C 또는 실온에서, 목적하는 보관기간 동안 안정하여야 한다. Fc-EPO 단백질을 함유하는 유용한 제형은 생리학적으로 잘 용인되고 제조하기 용이하며, 정확하게 투약될 수 있고, 2°C-8°C 또는 25°C에서 저장 동안, 다수의 냉동-해동 주기 및 기계적 스트레스, 뿐만 아니라 40°C에서 3개월 이상 동안의 저장과 같은 기타의 스트레스에 안정하다. Fc-EPO 제형의 안정성은 스트레스 테스트에서 검사될 수 있다. 대표적인 스트레스 테스트가 실시에 13에 기술되어 있다.

투여

본 발명에 따라 제조되는 Fc-EPO 융합 단백질을 함유하는 치료학적 조성물은 임의의 경로에 의해 포유동물 숙주에 투여될 수 있다. 따라서, 적절하게는, 경구적 투여 또는 정맥 및 복강 내 투여 경로를 포함하는 비경구적 투여(예를 들어, i.v., i.a., s.c., i.m.)일 수 있다. 또한, 투여는 치료제의 정기적인 일시 주사이거나, 외부의 저장소(예를 들어, i.v 백)로부터의 정맥 또는 복강 내 투여에 의해 보다 연속적일 수 있다. 특정 구현예에서, 본 발명의 치료제는 약학적-등급일 수 있다. 즉, 특정 구현예는 인간에 투여되기 위해 요구되는 순도 및 품질 관리의 표준에 적합하다. 수의학적 적용 또한 본원에서 의도된 의미 내에 있다.

수의학적 및 인간의 의학적 용도를 위한, 본 발명에 따른 치료제의 제형은 전형적으로 약학적으로 허용 가능한 담체 및 임의로 기타 성분(들)과 함께 상기의 치료제를 포함한다. 담체(들)는 제형의 다른 성분들과 양립 가능하고 이들의 수용자에게 유해하지 않다는 의미로 "허용 가능한" 일 수 있다. 이와 관련하여, 약학적으로 허용 가능한 담체는 약학적 투여에 적합한 임의의 모든 용매, 분산 매질, 코팅제, 항균 및 항진균제, 등장성 및 흡수 지연제 등을 포함하는 것으로 의도된다. 약학적으로 활성화된 물질을 위한 상기 매질 및 시약의 사용은 당업계에 공지되어 있다. 임의의 통상적인 매질 또는 시약이 활성화합물과 융합되지 않는 경우를 제외하고는, 조성물 내에서 이들의 사용이 고려된다. 보충적인 활성화합물 또한 조성물 내에 도입될 수 있다. 상기 제형은 통상적으로 투여 단위 형태로 존재할 수 있으며, 약학/미생물학의 당업계에 널리 공지된 임의의 방법에 의해 제조될 수 있다. 일반적으로, 일부 제형은 상기 치료제를 액체 담체 또는 미세하게 분할된 고체 담체 또는 이들 양자와 함께 넣고, 필요하다면 이어서 목적하는 제형으로 생성물의 모양을 만들어서 제조할 수 있다.

본 발명의 약학적 조성물은 그것의 의도된 투여 경로에 적합하게 제형화될 수 있다. 투여 경로의 예는 경구적 또는 비경구적, 예를 들어 정맥, 피부내, 흡입(예를 들어, 분무 후), 경피(국소), 경점막, 비강, 협측, 직장 투여를 포함한다. 비경구, 피부내, 또는 피하 적용에 사용되는 용액 또는 혼탁액은 하기의 성분을 포함할 수 있다: 주사용 물과 같은 멸균 희석제, 식염수 용액, 고정유, 폴리에틸렌 글리콜, 글리세린, 프로필렌 글리콜 또는 기타 합성 용매; 벤질 알콜 또는 메틸 파라벤과 같은 항균제; 아스코르브산 또는 아황산 수소 나트륨과 같은 항산화제; 에틸렌디아민테트라아세트산과 같은 킬레이트제; 아세테이트, 시트레이트 또는 포스페이트와 같은 완충제 및 염화나트륨 또는 텍스트로스와 같은 삼투압 조절제. pH는 염산 또는 수산화 나트륨과 같은 산 또는 염기로 조절될 수 있다.

본 발명의 Fc-EPO 단백질 생성물의 바람직한 투여 방법은 비경구(예를 들어, IV, IM, SC, 또는 IP) 경로에 의한 것이고, 투여되는 조성물은 허용 가능한 희석제, 담체 및/또는 보조제와 조합한 생성물의 치료학적 유효량을 통상적으로 포함한다. 유효 용량은 치료되는 조건에 따라 실질적으로 변화할 것으로 예상되나, 치료학적 용량은 활성 물질 0.2 내지 2 mcg/체중 kg의 범위일 것으로 현재 예상된다. 인간 혈청 알부민과 같은 표준 희석제가 본 발명의 약학적 조성물에 대해 고려되며, 식염수와 같은 표준 담체도 마찬가지이다. 본 발명의 조성물에 사용되기에 적합한 보조 물질은 테스토스테론, 전구 세포 자극제, 인슐린-유사 성장 인자, 프로스타글란дин, 세로토닌, 사이클릭 AMP, 프로락틴 및 트리요오도티로닌과 같은 독립

적으로 적혈구 생성 촉진 효과가 알려진 화합물, 뿐만 아니라 메테놀렌, 스타노졸를 및 난드롤론과 같은 재생불량성 빈혈의 치료에 일반적으로 사용되는 약물을 포함한다. 예를 들어, Resegotti 등, (1981), *Panminerva Medics*, 23, 243-248; McGonigle 등, (1984) *Kidney Int.*, 25 (2), 437-444 ; Pavlovic-Kantera 등, (1980) *Expt. Hemato.*, 8(Supp. 8), 283-291; 및 Kurtz, (1982) *FEBS Letters*, 14a(1), 105-108을 참조하라.

또한 보조제로서, "간 적혈구 생성 인자"[Naughton 등, (1983) *Acta Haemat.*, 69, 171-179 참조] 및 Congote 등, in Abstract 364, *Proceedings 7th International Congress of Endocrinology*, Quebec City, Quebec, Jul. 1-7, 1984 ; Congote (1983), *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 115(2), 447-483; 및 Congote, (1984), *Anal. Biochem.*, 140, 428-433에 의해 기술되는 "에리스로트로핀" 및 Rothman 등, (1982), *J. Surg.Oncol.*, 20, 105-108에서 기술되는 "에리스로제닌"으로 표시되는 화합물의 클래스뿐만 아니라 아드레날린 작용제, 티로이드 호르몬, 안드로겐 및 BPA와 같이, Fc-EPO의 효과를 향상시키거나, Fc-EPO와 함께 상승작용을 일으키는 것으로 보고된 물질이 고려된다.

경구적 또는 비경구적 투여를 위한 유용한 용액은, 예를 들어 Remington's Pharmaceutical Sciences, (Gennaro, A.,ed.) , Mack Pub., 1990에 기술된, 약업계에 널리 공지된 임의의 방법에 의해 제조될 수 있다. 비경구 투여용 제형은 협측 투여를 위한 글리코콜레이트, 직장 투여를 위한 메톡시살리실레이트, 또는 질 투여를 위한 시트르산을 또한 포함할 수 있다. 비경구 제제는 앰플, 일회용 주사기 또는 유리 또는 플라스틱으로 만든 다중 용량 바이알에 담을 수 있다. 직장 투여를 위한 좌제는 코코아 버터, 기타 글리세리드, 또는 실온에서 고체이고 체온에서 액체인 기타의 조성물과 같은 비-자극성 부형제와 약물을 혼합함으로써 또한 제조될 수 있다. 제형은 또한 예를 들어, 폴리에틸렌 글리콜과 같은 폴리알킬렌 글리콜, 식물성 오일, 수소화 나프탈렌 등을 포함할 수 있다. 직접 투여를 위한 제형은 글리세롤 및 고점도의 기타 조성물을 포함할 수 있다. 상기 치료제를 위한 기타의 잠정적으로 유용한 비경구용 담체는 에틸렌-비닐 아세테이트 공중합체 입자, 삼투압 펌프, 삽입성 주입 시스템, 및 리포솜을 포함한다. 흡입 투여용 제형은, 부형제로서 예를 들어 락토스를 함유할 수 있거나, 예를 들어 폴리옥시에틸렌-9-라우릴 에테르, 글리코콜레이트 및 데옥시콜레이트를 함유하는 수용액이거나, 점비 형태로 또는 코안에 적용되는 젤로서 투여하기 위한 오일성 용액일 수 있다. 정체 관장이 또한 직장 전달을 위해 사용될 수 있다.

주사 가능한 용도에 적합한 약학적 조성물은 멸균 수용액(수용성인 경우) 또는 분산액, 및 멸균 주사 가능 용액 또는 분산액의 즉석 제조를 위한 멸균 분말을 포함한다. 정맥 투여를 위한 적합한 담체는 생리학적 식염수, 정균수, 크레모포르 (Cremophor) ELM (BASF, Parsippany, NJ) 또는 인산염 완충 식염수(PBS)를 포함한다. 모든 경우에, 상기 조성물은 멸균될 수 있고, 용이한 주사 가능성이 존재할 수 있을 정도로 유동적일 수 있다. 이는 제조 및 저장의 조건하에서 안정적일 수 있고, 박테리아 및 곰팡이와 같은 미생물의 오염 작용으로부터 보존될 수 있다. 상기 담체는 예를 들어 물, 에탄올, 폴리올(예를 들어, 글리세롤, 프로필렌 글리콜, 및 액체 폴리프로필렌 글리콜 등), 및 이들의 적합한 혼합물을 함유하는 용매 또는 분산 매질일 수 있다. 예를 들어, 레시틴과 같은 코팅의 사용에 의해, 분산액의 경우 요구되는 입자 크기의 유지에 의해, 계면활성제의 사용에 의해, 적당한 유동성이 유지될 수 있다. 미생물의 작용의 예방은, 다양한 항균 및 항진균제, 예를 들어 파라벤, 클로로부탄올, 폐놀, 아스코르브산, 티메로살 등에 의해 달성될 수 있다. 많은 경우에 있어서, 조성물 내에, 등장제, 예를 들어 당, 만니톨, 소르비톨과 같은 폴리알콜 및 염화 나트륨을 포함하는 것이 바람직할 것이다. 조성물 내에 흡수를 지연시키는 물질, 예를 들어 알루미늄 모노스테아레이트 및 젤라틴을 포함함으로써, 주사 가능한 조성물의 연장된 흡수가 발생될 수 있다.

멸균 주사 가능 용액은 활성 화합물의 요구량을, 요구되는 상기 열거된 성분 하나 또는 조합인 적합한 용액에 도입하고, 이어서 여과 멸균함으로써 제조될 수 있다. 일반적으로, 분산액은 활성 성분을 기본 분산 매질 및 상기 열거된 기타 요구 성분을 함유하는 멸균 매개체에 도입함으로써 제조된다. 멸균 주사 가능 용액의 제조를 위한 멸균 분말의 경우, 제조 방법은 이들의 사전에 멸균-여과된 용액으로부터 임의의 부가적인 목적 성분과 더해진 활성 성분의 분말을 수득하는, 진공 건조 및 동결 건조를 포함한다.

한 구현예에서, 상기 치료제는, 삽입 및 미세캡슐화된 전달 시스템을 포함하는 방출 제어 제형과 같은 몸으로부터 신속한 제거를 방지하는 담체와 함께 제조된다. 에틸렌 비닐 아세테이트, 폴리무수물, 폴리글리콜산, 콜라겐, 폴리오르소에스테르, 및 폴리락트산과 같은 생분해성, 생체 적합성 중합체가 사용될 수 있다. 상기 제형의 제조 방법은 당업자에게 명백할 것이다. 상기 물질 또한 Alza Corporation 및 Nova Pharmaceuticals, Inc로부터 상업적으로 수득될 수 있다. 리포솜 혼탁액 또한 약학적으로 허용 가능한 담체로서 사용될 수 있다. 상기는 예를 들어 미국 특허 제4,522,811에 기술되어 있는 바와 같이 당업자에게 공지된 방법에 의해 제조될 수 있다. 마이크로솜 및 미립자 또한 사용될 수 있다.

경구 또는 비경구 조성물은 투여의 용이성 및 용량의 균일성을 위한 투여 단위 형태로 제형화될 수 있다. 투여 단위 형태는 처리되는 대상에 대한 단일 용량으로서 적합한, 물리적으로 구별된 단위를 지칭하며; 각 단위는 요구되는 약학적 담체와

관련하여 목적하는 치료학적 효과를 나타내도록 계산된 활성 화합물의 미리 정해진 양을 함유한다. 본 발명의 투여 단위 형태에 대한 상세사항은 활성 화합물의 독특한 특성 및 달성하고자 하는 특정한 치료학적 효과, 및 개인의 치료를 위한 상기의 활성 화합물을 혼합하는 기술에 있어 고유한 한정에 의해 지시되고 직접적으로 이에 의존한다.

Fc-EPO의 치료학적 유효량 및 투여 빈도의 결정

일반적으로, 본 발명에 따라 제조된 Fc-EPO 융합 단백질을 함유하는 치료제는, 예를 들어 치료학적 유효량, 즉 목적하는 효과를 유발하기에 충분한 시간 동안 표적 조직에 약물의 적합한 농도를 제공하는 양으로 인간 또는 다른 포유동물에 비경구 또는 경구 투여하기 위해 제형화될 수 있다. 더욱 구체적으로, 본원에서 사용되는 용어 "치료학적 유효량"은 목표 적혈구용적률 또는 목표 적혈구용적률 범위 이내에서 환자에게 이익을 제공하거나, 대안적으로 환자를 유지시키는, 목표 적혈구용적률 또는 목표 적혈구용적률 범위까지 적혈구용적률 증가시키는 Fc-EPO 융합 단백질의 양을 지칭한다. 상기 양은 개인에 따라 변화하고, 환자의 전반적인 신체적 상태, 각 환자에 대한 심각성 및 잠재적인 번혈의 원인 및 궁극적인 목표 적혈구용적률을 포함하는 수많은 요소에 의존할 것이다. 목표 적혈구용적률은 전형적으로 약 30% 이상 또는 30%-38%의 범위, 바람직하게는 38% 초과이고 더욱 바람직하게는 40%-45%이다. rHuEpo에 대한 목표 적혈구용적률에 관한 일반적인 가이드라인은 96년 12월 23일자에 삽입된 EUPOGEN® 패키지에서 또한 발견되며 30%-36%, 또는 대안적으로, 거기서 언급된 바와 같이 32%-38%이다. 상기 목표는 개인에 따라 변화하므로, 임의의 주어진 환자에 대한 실제의 목표 적혈구용적률을 결정하는데 있어서 의사의 분별이 적절할 수 있다. 그럼에도 불구하고, 목표 적혈구용적률을 결정하는 것은 당업계의 수준 이내이다.

Fc-EPO 단백질의 치료학적 유효량은 당업자가 쉽게 확인할 수 있다. 실시예 15는 1주일에 한번 또는 2주일에 한번, 및 한 달에 한번 투여시, Fc-EPO의 치료학적 유효량을 결정하는 한 목적을 가지는 임상적 프로토콜을 설명한다. 예를 들어, 일주일에 한번 또는 이주일에 한번 투여하기 위한 용량 범위는 투여 당 약 0.075 내지 약 4.5 mcg Fc-EPO/kg이다. 한달에 한번 투여하기 위한 용량 범위는 투여 당 0.45 내지 4.5 mcg Fc-EPO/kg이다.

치료학적 조성물 내에 들어가는 본 발명의 Fc-EPO 융합 단백질의 유효 농도는, 투여되는 약물의 최종의 목적하는 용량 및 투여 경로를 포함하는 수많은 요소에 따라 변화할 것이다. 투여되는 바람직한 용량은 또한 치료되는 질환 또는 적응증의 유형 및 정도, 특정 환자의 전반적인 건강 상태, 전달되는 치료제의 상대적인 생물학적 효능(예를 들어, 시알릴화 수준), 치료제의 제형, 제형 내 부형제의 존재 및 유형, 및 투여 경로와 같은 변수에 의존할 수 있다. 일부 구현예에서, 인간 외의 영장류 및 설치류를 사용하는 포유동물 연구로부터 추론된 전형적인 용량 단위를 사용하는 개인에게, 본 발명의 치료제가 제공될 수 있다. 상기 기술된 바와 같이, 투여 단위는 환자에 투여될 수 있는 단위 용량을 지칭하고, 이는 용이하게 취급되고 포장될 수 있으며, 상기 치료제 또는 이와 고체 또는 액체의 약학적 희석제 또는 담체와의 혼합물을 포함하는 물리적 및 생물학적으로 안정한 단위 용량으로 남아 있다.

Fc-EPO 융합 단백질을 함유하는 치료제의 투여 빈도는 치료받는 상태 및 목표 적혈구용적률에 따라 변화하나, 일반적으로 일주일에 3회 미만일 것이다. 투여 빈도는 일주일에 약 1회 또는 2회일 수 있다. 투여 빈도는 약 일주일에 한번 미만, 예를 들어 약 이주일에 한번(약 14일에 한번), 한달에 한번 또는 두달에 한번일 수도 있다. 실제로 사용되는 투여 빈도는, 상이한 개인에 의한 에리스로포이에틴 및 그 유사체에 대한 상이한 개인에 의한 반응의 변이에 기인하여, 본원에서 개시되는 빈도와 다소 다를 수 있다; 용어 "약"은 상기 변이를 반영하고자 하는 것이다.

본 발명은 또한 치료 동안 증가된 에리스로포이에틴을 유지하기 위해, 치료학적 유효량의 철의 투여를 제공한다. 제공되는 양은 rHuEpo 요법에 기초가 있는 당업자에 의해 용이하게 결정될 수 있다. 또한, 본 발명의 치료제는 단독으로 또는 관심 있는 특정 질환 또는 적응증에 이익이 되는 효과를 가진 것으로 알려진 다른 분자와 조합하여 투여될 수 있다. 단지 예로서, 유용한 보조 인자는, 방부제, 항생제, 항바이러스제 및 항진균제 및 진통제 및 마취제를 포함하는 증상-완화 보조인자를 포함한다.

프로드럭

본 발명의 치료제는 또한 "프로드럭" 유도체를 포함한다. 용어 프로드럭은 기관 내에서 활성 성분을 방출하거나 활성화되기 위해, 자발적인 또는 효소적인 생체내변환이 필요한, 모 분자의 약학적 불활성(또는 부분적으로 불활성) 유도체를 지칭한다. 프로드럭은 대사 조건 하에서 절단될 수 있는 기를 가진, 본 발명의 치료제의 변이 또는 유도체이다. 프로드럭은, 생리학적 조건 하에서 가용매분해를 거치거나 효소적 분해를 거치는 경우, 생체 내에서 약학적으로 활성인 본 발명의 치료제가 된다. 본 발명의 프로드럭은, 기관 내에서 활성 약물 성분을 방출하거나 활성화하는데 요구되는 생체내변환 단계의 수에 따라, 일중, 이중, 삼중 등으로 칭해질 수 있고, 이는 전구체-유형 형태에 존재하는 작용기의 수를 나타낸다. 프로드럭

형태는 종종 용해도의 이점, 조직 적합성, 또는 포유동물 기관에서의 방출의 지연[Bundgaard, (1985) Design of Prodrugs, pp. 7-9, 21-24, Elsevier, Amsterdam; Silverman, (1992) The Organic Chemistry of Drug Design and Drug Action, pp. 352-401, Academic Press, San Diego, Calif. 참조]을 제공한다. 또한, 본 발명에 따른 프로드럭 유도체는 생체이용율을 향상시키기 위해 다른 것들과 조합될 수 있다.

생체내 발현

본 발명의 Fc-EPO 융합 단백질은 생체내 발현 방법에 의해 제공될 수 있다. 예를 들어, 조혈성 장애 또는 결핍으로 고통받는 환자에게 직접 Fc-EPO 융합 단백질을 코딩하는 핵산이 유리하게 제공되거나, 생체 외 세포에 제공된 후 이어서 환자에게 생존 세포가 투여될 수 있다. 당업계에 공지된 생체내 유전자 요법은 (예를 들어, 플라스미드 내의) 정제 DNA를 제공하거나, 바이러스 벡터 내의 DNA를 제공하거나, 리포솜 또는 기타 소포체 내의 DNA를 제공하는 것을 포함한다[예를 들어, 유전자 요법에 사용하기 위한 지질 담체를 개시하는 미국 특허 제5,827,703, 및 유전자 요법에 유용한 아데노바이러스 벡터를 제공하는 미국 특허 제6,281,010 참조].

제조합 단백질을 발현하도록 변형된 세포를 이식하여 질환을 치료하는 방법이 또한 공지되어 있다. 예를 들어, 인간에 도입하기 위한 일차 인간 세포에 핵산을 도입하는 방법을 개시하는 미국 특허 제5,399,346을 참조하라.

생체내 발현 방법은, 정제 없이 단백질을 표적 조직 또는 세포 구획에 직접 전달하기에 특히 유용하다. 본 발명에서, Fc-EPO를 코딩하는 서열을 사용하는 유전자 요법은 빈혈을 포함하는 다양한 혈액 불규칙성 질환 상태, 장애 및 상태, 특히 만성 신부전과 관련된 유형의 빈혈의 교정 등에의 용도를 발견할 수 있다. Fc-EPO 융합 단백질을 코딩하는 핵산 서열이 적합한 전사 또는 발현 카세트에 삽입되고, DNA 단독 또는 적합한 담체와 복합체를 이루어 숙주 포유동물에 도입될 수 있다. 활성 Fc-EPO 단백질 제조의 관찰은 핵산 하이브리드 형성, ELISA, 웨스턴 하이브리드 형성, 및 당업자에게 공지된 기타의 적합한 방법에 의해 수행될 수 있다.

전이 유전자의 전신 투여 후에, 복수의 조직이 형질전환 될 수 있음이 발견되었다. 양이온성 지질 담체/외인성 DNA 복합체를 포유동물 숙주에 정맥 주사한 후, T 림프구, 세망내피계, 심장 내피 세포, 폐 세포, 골수 세포, 예를 들어, 골수 유래의 조혈 세포를 포함하는 다수의 조직에서 외인성 DNA의 발현이 나타났다.

미국 특허 제6,627,615에 기술된 생체내 유전자 요법 전달 기술은 동물에서 비독성이고, 전이 유전자 발현은 일회 투여 후 60일 이상 지속된다고 나타났다. 전이 유전자는 서던 분석(Southern analysis)에 의해 측정된 바와 같이, 생체내에서 탐지될 수 있는 수준으로 숙주 세포 DNA에 통합되는 것으로 보이지는 않으며, 이는 유전자 요법에 대한 상기 기술이 암-유발 발암유전자를 활성화하는 정상 세포 유전자의 발현을 변경하거나, 암-예방 종양 억제 유전자를 차단하는 것에 의해, 숙주 포유동물에 대해 문제를 초래하지 않을 것임을 제시한다.

실시예

실시예 1. Fc-EPO 융합 단백질을 코딩하는 구성

정상 에리스로포이에틴 부분을 포함하는 Fc-EPO 융합 단백질을 코딩하는 플라스미드 pHC10-Fcgh(FN→AQ)-M1-EPO 및 NDS 돌연변이가 있는 Fc-EPO 융합 단백질을 코딩하는 pHC10-Fcg2h(FN→AQ)-M1-EPO(NDS)를 하기와 같이 구성하였다.

인간 에리스로포이에틴을 코딩하는 핵산 서열을 포유동물 세포에서의 고 발현을 위해 코돈-최적화하였다. 예를 들어, SEQ ID NO:3은 번역을 최적화하기 위한 변형 코돈을 가진 성숙한 인간 에리스로포이에틴의 코딩 서열의 예를 나타낸다. 5' 말단의 서열 또한 변형되어 서브클로닝을 촉진시키는 Sma I 부위를 포함하였다.

SEQ ID NO:3

CCCGGGGtGCCACCACGCCATCTGTGACAGCCGAGTgCTGGAGAGGTACCTCTGGAGGCCA
 AGGAGGCCGAGAATATCACGACcGGCTGTGCTGAACACTGCAGCTGAATGAGAACATCACcGTg
 CCTGACACCAAAGTgAATTCTATGCCTGAAAGAGGATGGAGGTtGGcCAGCAGGCCGTAGAAGT
 gTGGCAGGGCCTGGCCCTGCTGTCCGAAGCTGTCCCTGCGGGGCCAGGCCCTGTTGGTCAACTCTT
 CCCAGCCGTGGGAGCCCTGCAaCTGCATGTGGATAAAGCCGtgAGTGGCCTCGCAGCCTCACC
 ACTCTGCTTCGGGCTCTGgGAGCCCAGAAGGAAGCCATCTCCCTCCAGATGCAGCCTCAGCTGC
 TCCcCTCCGcACAATCACTGCTGACACTTCCGAAACTCTCCGAGTCTACTCCAATTCCCTCC
 GGGGAAAGCTGAAGCTGTACACAGGGGAGGCCTgcCGGACAGGGGACAGATGActcgag

(소문자는 야생형 인간 에리스로포이에틴 코딩 서열과의 염기 차이를 나타낸다. 상기 변화로 포유동물 세포에서의 발현 수준은 증가하지만 발현된 단백질 서열은 변화하지 않을 것으로 예상된다.)

그 개시가 이하에서 참고로서 도입되는 PCT 공개 WO 01/36489에 기술된 바와 같이, 부위-지정 돌연변이유발에 의해 NDS 돌연변이가 에리스로포이에틴 부분에 도입되었다. 예를 들어, WO 01/36489에 개시된 바와 같이, 아미노산 치환 His32Gly, Cys33Pro, Trp88Cys, 및 Pro90Ala를 생성하는 돌연변이를 가진 인간 에리스로포이에틴 코딩 서열의 형태를 포함하는 Xma I-Xho I DNA 단편을 사용하였다. 상기 상응하는 단백질 서열을 SEQ ID NO:4에 나타내었다.

SEQ ID NO:4

APPRLICDSRVLERYLLEAKEAENITGCAEGPSLNENITVPDTKVNFYAWKRMEVGQQAVEVWQ
 GLALLSEAVLRGQALLVNSSQPCEGLQLHVDKAVSGLRSLLRALGAQKEAISPPDAASAAPL
 RTITADTFRKLFRVYSNFLRGKLKLYTGEACRTGDR (SEQ ID NO:4)

IgG2-유래의 CH2 도메인 및 IgG1-유래의 힌지 부위를 포함하는 하이브리드 Fc 부분은 미국 특허 공개 제20020147311 및, 예를 들어 WO 01/058957에 기술된 바와 같이 구성하였다.

에리스로포이에틴의 형성을 코딩하는 Xma I-Xho I DNA 단편을 플라스미드 벡터, 예를 들어, pdCs-Fc-X에 삽입하여, CH3 C-말단 영역에서 아미노산 치환을 생성하는 두 세트의 돌연변이(본원에서 M1 세트 돌연변이라고 지칭한다)가 있는 것을 제외한, IgG1으로부터의 변경된 힌지 영역 및 IgG2로부터의 CH2 및 CH3 영역을 코딩하였고, 상기 CH3 C-말단과 EPO N-말단의 접합부에서의 서열은 하기와 같다:

....TQKSATATPGA-APPRLI....(SEQ ID NO:5)

IgG2 CH3 영역의 서열 KSLSLSPG (SEQ ID NO:6)을 KSATATPG (SEQ ID NO:7)로 변화시키는 제 1 세트 돌연변이가 WO 02/079232에 개시되어 있다. Leu-Ser-Leu-Ser(SEQ ID NO:6의 3 위치 내지 6 위치)을 Ala-Thr-Ala-Thr(SEQ ID NO:7의 3 위치 내지 6 위치)로 치환하는 것의 효과는, 인간 Fc 와 인간 에리스로포이에틴 사이의 접합부가 비-자기 웨 펩 티드 서열을 포함하기 때문에 일어날 수 있는 잠재적인 인간 비-자기 T-세포 에피토프를 제거하는 것이다. CH3 영역의 C-말단 아미노산에서 K에서 A로의 단일 아미노산 치환으로 이루어진 제 2 세트 돌연변이가 WO 01/58957에 개시되어 있다.

Fc 융합 단백질의 발현을 위한 발현 벡터 pdCs-Fc-X가 Lo 등, (1998) *Protein Engineering* 11: 495에 의해 기술되었다. 플라스미드 phCLO-Fc-X는, 메토트렉세이트에 저항성을 부여하는 디히드로폴레이트 환원 효소(DHFR) 유전자의 코딩 영역을 히그로마이신 B에 저항성을 부여하는 유전자로 대체함으로써 구성하였다. Nhe I/Nsi I 히그로마이신 B DNA 단편은 프라이머 5'-GCTAGCTTGGTGCCCTCATGAAAAAGCCTGAACTC-3'(SEQ ID NO:8) 및 5'-ATGCATTCAGTTAGCCTCCCCATC-3' (SEQ ID NO:9)를 사용하여, 주형 플라스미드 pCEP4 (Invitrogen)로부터 히그로마이신 B의 PCR 증폭에 의해 수득하였다. PCR 단편을 TA 클로닝 벡터 pCR2.1 (Invitrogen)로 클로닝하였고, 그 서열을 확정하였다.

플라스미드 pdCs-Fcg2h-M1-EPO(NDS) 및 Nhe I/Nse I 히그로마이신 B 단편으로부터 Nhe I/Afl I 및 Afl II/Nsi I DNA 단편을 삼중 결합시켜, 플라스미드 phC10-Fcg2h-M1-EPO(NDS)를 생성하였다.

또한, 잠재적인 T-세포 에피토프 및 Fc 부분에서의 N-결합형 당화를 제거하는, IgG2 중쇄의 CH2 도메인 내의 Gln-Phe-Asn-Ser 아미노산 서열 내의, 이중 아미노산 치환, "FN > AQ"을 생성하는 돌연변이를 PCR 돌연변이 유발에 의해 도입하였다. 돌연변이 유발 프라이머 5'-AGCAGGCCAGAGCACGTTCCGTGGT-3'(SEQ ID NO:10) 및 5'-GAACGTGCTCTGGGCCTGCTCCTCCGT-3'(SEQ ID NO:11)는 각각 Sac II 부위 5'-CCCCCGCGGGTCCCACCTTGG-3'(SEQ ID NO:12)를 포함하는 다운스트림 프라이머 및 Pvu II 부위 5'-CCCAGCTGGGTGCTGACACGT-3'(SEQ ID NO:13)를 포함하는 업스트림 프라이머와 쌍을 이루고, 두개의 오버랩된 DNA 단편이 주형 DNA pdC10-Fcg2h-MI-EPO(NDS)로부터 증폭되었다. 제 2 증폭 순환에서, 제 1 증폭 순환에서의 PCR 생성물로부터의 업스트림 프라이머(SEQ ID NO:13) 및 다운스트림 프라이머(SEQ ID NO:12)를 사용하여 돌연변이(FN→AQ)를 함유하는 Pvu II/Sac II 단편을 증폭하였다. Pvu II/Sac II 단편을 TA 벡터 pCR2.1(Invitrogen)에 클로닝하고, 그 서열을 확인하였다. pdC10-Fcg2h(FN→AQ)-M1-EPO(NDS) 구성이 pdC10-Fcg2h-MI-EPO으로부터의 PvuII/Sac II 단편, Xho I/Sac II 단편, 및 pdC10-Fcg2h-MI-EPO(NDS)로부터의 Xho I/Pvu II 단편의 삼중 연결로부터 생성되었다.

FN>AQ 돌연변이를 플라스미드 phC10-Fcg2h-MI-EPO에 도입하기 위해서, phC10-Fcg2h-MI-EPO로부터 및 pdC10-Fcg2h(FN→AQ)-M1-EPO로부터의 적합한 DNA 절편을 조합하였다. phC10-Fcg2h-MI-EPO 및 pdC10-Fcg2h(FN→AQ)-M1-EPO 구성 모두 Xho I 및 Xba I와 응화되었고, 5.7 kb Xho I/Xba I phC10-Fcg2h-MI-EPO(NDS) 절편이 1.9 kb pdC10-Fcg2h(FN→AQ)-M1-EPO 절편과 연결되어 phC10-Fcg2h(FN→AQ)-M1-EPO를 생성하였다.

FN→AQ 돌연변이를 플라스미드 phC10-Fcg2h-MI-EPO(NDS)에 도입하기 위해서, phC10-Fcg2h-MI-EPO(NDS)로부터 및 phC10-Fcg2h(FN→AQ)-M1-EPO로부터의 2개의 적합한 Xho I/Sma I 융합 단편을 연결하여, phC10-Fcg2h(FN→AQ)-M1-EPO(NDS)를 생성하였다.

pdC10-huFcg2h(FN→AQ)-MI-EPO에 의해 코딩된 Fc-EPO의 아미노산 서열을 SEQ ID NO:14에 나타내었다.

EPKSSDKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDG
VEVHNAKTKPREEQAOQSTFRVSVLTvvHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREP
QVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQOPENNYKTPPMULDSDGSFFLYSKLT
VDKSRWQQGNVFSCSVHEALHNHYTQKSATATPGAAPPRLLCDSRVLERYLLEAKEAENITTGC
AEHCSLNENITVPDTKVNFYAWKRMEVGQQAVEVWQGLALLSEAVLRGQALLVNSSQPWEPLQLH
VDKAVSGLRSLLRALGAQEAISSPPDAASAAPLRTITADTFRKLFRVYSNFLRGKLKLYTGE
ACRTGDR (SEQ ID NO:14)

pdC10-huFcg2h(FN→AQ)-MI-EPO(NDS)에 의해 코딩되는 Fc-EPO(NDS)의 아미노산 서열을 SEQ ID NO:15에 나타내었다.

EPKSSDKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDG
VEVHNAKTKPREEQAOQSTFRVSVLTvvHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREP
QVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQOPENNYKTPPMULDSDGSFFLYSKLT
VDKSRWQQGNVFSCSVHEALHNHYTQKSATATPGAAPPRLLCDSRVLERYLLEAKEAENITTGC
AEGPSLNENITVPDTKVNFYAWKRMEVGQQAVEVWQGLALLSEAVLRGQALLVNSSQPCEALQLH
VDKAVSGLRSLLRALGAQEAISSPPDAASAAPLRTITADTFRKLFRVYSNFLRGKLKLYTGE
ACRTGDR (SEQ ID NO:15)

밀줄 친 서열 트랙은 EPO 부분을 나타내고, 이중으로 밀줄 친 서열은 IgG1 헌지를 나타내고, 밀줄치지 않은 서열은 변형된 IgG 사슬의 CH2 및 CH3 도메인을 나타내며, 이 중 이탈릭 체로 쓰여진 서열은 CH3 도메인을 나타낸다.

실시예 2. 다양한 세포 주에서의 Fc-EPO의 발현

융합 단백질의 신속한 분석을 위해서, 예를 들어, 칼슘 포스페이트-매개 DNA 공-침전[Sambrook 등, (1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 제 2판, Cold Spring Harbor Laboratory Press], 또는 제조자의 프로토콜에 따라

Lipofectamine Plus(Life Technologies)를 사용하는 리포펙션과 같은 표준의 일시적일 형질 감염 방법에 의해, 플라스미드인 phC10-Fcg2h(FN→AQ)-MI-EPO(NDS) 또는 phC10-Fcg2h(FN→AQ)-MI-EPO를 적합한 조직 배양 세포에 도입하였다.

안정적으로 형질 감염된 BHK-21 세포를 수득하기 위해서, 전기천공에 의해 플라스미드인 phC10-Fcg2h(FN→AQ)-MI-EPO(NDS) 또는 phC10-Fcg2h(FN→AQ)-MI-EPO를 BHK-21 세포에 도입하였다. 고-효율 전기천공을 위하여, MEM 배지(American Type Culture Collection (ATCC)이 추천한 바와 같이 비-필수 아미노산 및 소듐 피루베이트로 보충됨)에서 성장한 BHK-21 세포를 PBS로 1회 세척하고; 약 5×10^6 의 세포를 0.5 ml의 PBS에 재현탁시키고, 10 μg 의 선형화된 플라스미드 DNA와 함께 얼음 상에서 10분 동안 0.4 cm의 전극 간격을 가진 Gene Pulser™ Cuvette에서 인큐베이션 시켰다. 전기천공은 0.25 V 및 500 μF 에서 세팅한 GenePulser™(BioRad, Hercules, CA)을 사용하여 수행하였다. 세포를 얼음에서 10분 동안 회복하도록 하고, 성장 배지에 재현탁하고, 2개의 96 웰 플레이트에 두었다. 히그로마이신 B(Hyg B)를 300 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도로 형질 감염 2일 후에 성장 배지에 첨가하였다. 상기 세포를 3일 마다 2 내지 3회 이상 영양 공급하였고, Hyg B 저항성 안정한 클론이 2주 내지 3주내에 나타났다.

고 수준의 Fc-EPO 융합 단백질을 제조하는 안정한 클론을 확인하기 위하여, 클론으로부터의 상청액을 항-Fc 항체를 사용하는 ELISA에 의해 평가하였다. 고-제조 클론을 단리하고 300 $\mu\text{g}/\text{Hyg B ml}$ 를 함유하는 성장 배지에서 증식시켰다. 단백질 제조 목적을 위해, BHK-21 세포는 보충된 DMEM/F-12 배지 또는 VP-SFM(Life Technologies)와 같은 다른 적합한 배지에서 통상적으로 성장시켰다. Fc-EPO 융합 단백질을 표준 정상-흐름 여과에 의해 조건화된 배지로부터 수득하고, 추가적인 정제가 있을 때까지 정화된 물질을 섭씨 4도에서 저장하였다. 전형적으로, 롤러 보틀 제조 방식에서, 수득량 6-12 mcg/ml의 Fc-EPO 단백질을 BHK-21 세포로부터 수득하였다.

Fc-EPO 융합 단백질을 또한 NS/0 세포에서 발현시키고 NS/0 세포로부터 회소하였다. 그 전체적인 개시가 이하에서 참고로서 도입되는 PCT 공개 WO 01/36489에 이전에 기술된 방법에 의해, 플라스미드 pdC10-Fcg2h(FN→AQ)-MI-EPO 또는 pdC10-Fcg2h(FN→AQ)-MI-EPO(NDS)를 안정적으로 유지하는 NS/0 클론을 확립하였다. 전형적으로, 수득량 50-100 mcg/ml의 Fc-EPO 단백질을 NS/0 세포로부터 수득하였다.

실시예 3. 혼탁액 및/또는 단백질이 없는 배지에서의 성장을 위한 BHK 세포의 적용

BHK는 예를 들어, MEM + 10% 열-불활성화 소 태아 혈청(FBS)과 같은 혈청-함유 배지에서 통상적으로 성장된 부착성 세포 주이다. BHK 세포를 유지하고 증식시키기 위해, 전형적으로 트립신-EDTA 용액의 작용에 의해 이들을 정기적으로 (예를 들어, 4일 간격으로) 그 기질로부터 박리시키고, 새로운 배지에서 회석시키고 적합한 용기에서 재접종하였다. 그러나, BHK 세포는 하기의 절차에 의해 혼탁액 및 혈청이 없고/없거나 단백질이 없는 배지에서 성장하도록 할 수 있다.

전형적인 적용 과정에서, 우선 BHK 세포를 지수 단계가 될 때까지 MEM+FBS의 혼합물:표적 배지 75:25(v/v)에서 배양하고, 이어서 50:50(v/v), 25:75(v/v)로, 최종적으로 원래의 배지:표적 배지 0:100(v/v)로 적합한 세포 밀도에서 계대배양 하였다. 적용과정 동안, BHK 세포의 성장을 외관 검사에 의해 관측하였다. 하기의 혈청이 없는 배지를 적용을 위해 시험하였다: 293 SFM II(Invitrogen Corp., cat# 11686-929), CHO-S-SFM II(Invitrogen Corp., cat# 12052-098), VP-SFM (Invitrogen Corp., cat# 11681-020), Opti-Pro SFM (Invitrogen Corp., cat# 12309), CD Hybridoma(Invitrogen Corp., cat# 11279- 023), 및 H-SFM(Invitrogen Corp., cat# 12045-076).

적용 과정 동안 BHK 세포를 부착성 세포 주에서 혼탁 세포 주로 바꾸기 위해, 배양 혼합물을 각 계대 전에 방치하고, 상위 25%의 세포 혼탁액을 제거하고, 새로운 배지에 넣어 회석하였다. 응집하는 세포는 단일 또는 이중 세포보다 더욱 신속하게 배양 용기의 바닥에 가라앉기 때문에, 상위 25%의 세포 혼탁액은 일반적으로 최소의 응집량을 나타내는 세포를 함유한다. 따라서, 각 계대는 응집하는 경향이 적은 BHK 세포를 증식시키고 풍부하게 하며, Fc-EPO 단백질을 발현시키는 BHK 세포 클론의 혼탁 세포 주가 상기 방법에 의해 확립되었다.

Fc-EPO 단백질을 발현하는 BHK 세포가 VP-SFM 또는 Opti-PRO SFM 혈청 없는 배지 및 혼탁액 배양에서 성장하도록 할 수 있음이 발견되었다. Fc-EPO 융합 단백질을 발현하는 BHK 세포는 하기의 혈청이 없는 배지에서는 성장할 수 없었다: 93 SFM II, CHO-S-SFM II, CD 하이브리도마, 및 H-SFM.

순차적으로 BHK 세포를 75:25(v/v), 50:50 (v/v), 25:75 (v/v), 및 최종적으로 0:100 (v/v)의 VP-SFM:DMEM/F-12 혼합물로, 적합한 세포 밀도에서 배양하여, 혈청이 없는 배지인 VP-SFM에 적용된 BHK 세포를 단백질이 없는 배지, 예를 들어 DMEM/F-12 (Invitrogen Corp., cat# 11039-021)에서 성장하도록 추가적으로 적용시켰다. 단백질이 없는 배지

DMEM/F-12를 글루타민(최종 6 mM), 2g/l의 HyPep 4601(Quest International, Chicago, IL, cat# 5Z10419,), 2g/l의 HyPep 1510 (Quest International, Chicago, IL, cat# 5X59053,), 10 μ l/l(v/v)의 에탄올아민(Sigma, cat# E0135), 및 5 μ M의 트로폴론(Sigma, cat# T7387)으로 보충하였다. 보충된 DMEM/F-12에서 성장할 수 있는 Fc-EPO 융합 단백질을 안정적으로 발현하는 BHK 세포 주를 상기 방법에 의해 수득하였고, 높은 세포 생존율을 유지하였다.

실시예 4. 정제 및 단백질 응집 상태의 평가

분석을 위하여, 단백질 A에 대한 Fc 부분의 친화력에 기초한 단백질 A 크로마토그래피를 통해 Fc-EPO 융합 단백질을 세포-배양 상청액으로부터 정제하였다. Fc-EPO 단백질을 발현하는 세포로부터의 조건화된 상청액을 예비-평형시킨 빠른-흐름 단백질 A 세파로즈 컬럼에 로딩하였다. 상기 컬럼을 인산 나트륨 완충액(150 mM 인산 나트륨, 중성 pH에서 100 mM의 NaCl)으로 광범위하게 세척하였다. 결합된 단백질은 낮은 pH (pH 2.5-3)의 인산 나트륨 완충액(상기의 조성)에 의해 용리되었고, 그 용리된 분획을 즉시 중화하였다.

상이한 세포 주에서 제조된 Fc-EPO 융합 단백질의 응집 상태를 평가하기 위하여, 단백질 A 정제 샘플을 분석적 크기-배재 크로마토그래피(SEC)에 의해 분석하였다. HPLC-SEC(예를 들어, Super 3000 SW, TosoHaas, Montgomeryville, PA)에 의해 유속 0.35 ml/분으로 15분 작동시켜, 상기 샘플을 분획하였다. BHK 세포로부터 제조된 Fc-EPO 단백질의 실질적인 부분(예를 들어, 총 수율 90% 내지 100%에 이른)은 응집되지 않았다. 또한, 환원하는 SDS-PAGE (프리캐스트 NuPAGE 4%-12% gel, NuPAGE, Novex)에 의해 분석된 Fc-EPO 융합 단백질의 샘플은 실질적으로 단일의 벤드임이 밝혀졌고, 이는 생성물이 표준 작동 절차하에서 분해에 저항성이라는 것을 나타냈다.

현탁액, 혈청이 없는 배지, 및/또는 단백질이 없는 배지에서 성장한 BHK 세포로부터 정제된 Fc-EPO 융합 단백질은 또한 SDS-PAGE 및 상기 기술된 SEC에 의해 평가된다. 상기 단백질은, 혈청을 함유하는 배지에서 성장한 BHK 세포에서 합성된 단백질과 같이, 실질적으로 응집되지 않고 분해되지 않음이 발견되었다.

실시예 5A. 당화 패턴의 평가

인간 에리스로포이에틴의 세린126은 O-당화에 적합한 서열내에 있고, 모든 포유동물의 에리스로포이에틴 단백질에서 보존된다. 그러나, 세린126은 단백질의 나머지에 대해 단단하게 묶여있지 않은 "플로피 루프(floppy loop)"에 있다. O-당화의 부재에서, 에리스로포이에틴의 상기 영역은 특히 단백질 분해에 민감하다.

상이한 세포 주에서 제조된 Fc-EPO 단백질에서의 Ser126에서의 O-당화 상태를 역상 HPLC에 의해 시험하였다. 샘플을 변성시키고 환원하고, 0.1%의 트리플루오로아세트산(TFA)으로 희석시키고, 역상 HPLC 컬럼(예를 들어, Vydac C4 컬럼, Grace Vydac)에 주입하였다. 아세토니트릴 중의 TFA 0.085%까지의 기울기가 적용되었고, 단백질 샘플의 머무름 시간을 기록하였다. BHK-21 세포에서 합성된 Fc-EPO 및 Fc-g2h(FN \rightarrow AQ)-EPO가 두개의 부분적으로 오버랩된 주요 피크(피크#1 및 피크#2)를 생성함이 밝혀졌다. 상기 피크의 분획을 웨비드 맵핑에 의해 추가적으로 분석하였다. 피크#1은, 시그너처 웨비드(웨비드#36)의 부재에 의해서 나타나는 바와 같이, Ser126에서 당화된 Fc-EPO의 형태에 상응하고, 반면, 피크#2는, 시그너처 웨비드(웨비드#36)의 존재에 의해 나타나는 바와 같이, Ser126에서 당화되지 않은 Fc-EPO 형태에 상응한다. BHK 세포로부터 제조된 Fc-EPO 분자의 약 60%에서 Ser126이 O-당화에 의해 변형되었음이 밝혀졌으며, 이는 자연 발생적 EPO에 대해 보고되었던 것과 일치한다. 또한, 보충된, 단백질이 없는 DMEM/F-12 배지에서의 BHK 세포의 성장은 O-당화의 빈도에 긍정적인 효과를 미친다.

실시예 5B. 시알릴화 패턴의 평가

NS/O, BHK, 293, 및 PerC6에서 합성된 Fc-EPO 융합 단백질의 시알릴화의 정도를 등전압 포커싱(IEF) 겔 전기영동에 의해 비교하였다. 간단히, 샘플을, 필요하다면 2 mg/ml로 농축하고 제염하여, 동등한 부피의 IEF 샘플 완충액 pH 3-7에 첨가하고, 처음 한시간은 100V, 두번째 한시간은 200V 및 마지막 30분은 500V로, 2.5 시간 동안 수직 프리캐스트 Novex pH 3-7 IEF 겔(Novex, cat# EC6655B/B2)에서 작동시켰다. 이어서 상기 겔을 고정시키고, 염색하고 염색을 제거하였다.

한 특정 실험에서, 하기의 샘플을 비교하였다(샘플은 혈청-함유 배지에서 성장한 세포로부터 유래하였다):

1. NS/O로부터의 Fcg2h-EPO(NDS)

2. BHK-21로부터의 Fcg2h-EPO(NDS)

3. BHK-21로부터의 Fcg2h-EPO

4. BHK-21로부터의 Fcg2h("Delta Lys")-EPO

5. BHK-21로부터의 Fcg4h(FN→AQ "Delta Lys")-EPO

6. BHK-21로부터의 Fcg4h("Delta Lys")-EPO

상기 군에서, "Delta Lys"는 Fc 도메인의 C-말단에서의 리신의 결손을 지칭한다(샘플 4-6). 샘플 1-3은 상기 C-말단의 리신에서 알라닌으로의 돌연변이를 가진다. 따라서 상기 C-말단의 리신은 모든 샘플에 부재하고, 샘플 사이에 생성된 전혀 차이가 없다. 모든 세포는 혈청-함유 배지에서 부착성 세포로서 성장하였다.

샘플을 pH 3-7의 IEF 젤 상에 로딩하고, pH 3.5, 4.2, 4.5, 5.2, 5.3, 6.0, 및 6.9에 맞추어 표준과 비교하였다(Serva 전기 영동, 독일). 제 1 샘플인 NS/O로부터의 Fcg2h-EPO(NDS)는 약 pH 5.3 내지 6.5에서 등전압점을 갖는 밴드의 분포로서 이동하였고; 가장 강한 밴드는 pH 6.0-6.1에 존재하였다. 제 2 샘플인 BHK-21로부터의 Fcg2h-EPO(NDS)은 약 pH 4.6 내지 pH 5.0에서 등전압점을 갖는 강한 밴드 분포가 있고, pH 5.0 내지 약 pH 6.0에서 더 흐린 밴드를 가지고; 가장 강한 밴드는 pH 4.8-4.9에 존재하였다. 제 3 및 제 4 샘플인 BHK-21로부터의 Fcg2h-EPO 및 BHK-21로부터의 Fcg2h ("Delta Lys")-EPO는 각각, 약 pH 5.3에서 가장 강한 밴드를 가진, 약 pH 4.7 내지 6.0에서 밴드 분포를 가진다. 제 5 내지 제 6 샘플인 BHK-21로부터의 Fcg4h(FN→AQ "Delta Lys")-EPO 및 BHK-21로부터의 Fcg4h("Delta Lys")-EPO는 각각, 제 2 샘플과 유사한 포커싱 패턴을 가지며, 즉 약 pH 4.6 내지 pH 5.0에서 등전압점을 갖는 강한 밴드 분포가 있고, pH 5.0 내지 약 pH 6.0에서 더 흐린 밴드를 가진다. 상기 결과는 BHK 세포에서 Fc-EPO 융합 단백질의 합성이 일반적으로 NS/O 세포에서 합성된 동일한 또는 유사한 생성물보다 현저하게 더 산성인 생성물을 나타낸다.

다른 실험에서, BHK 세포로부터의 Fcg2h-MI-EPO(NDS)의 샘플을, 올리고사카라이드로부터 시알산을 제거하는 뉴라미니다제로 처리하였다. 상기 생성된 뉴라미니다제로 처리된 샘플을 IEF 젤에 두고, pH 6.9 이상에서 몇몇 밴드로서 집중되는 것을 발견하였다. 뉴라미니다제 처리를 하거나 하지 않은 BHK 세포로부터의 샘플 및 NS/O 세포로부터의 샘플의 밴드 패턴을 비교하는 경우, 약 27개의 명백한 시알릴화된 종이 확인되었다. 상기 27개의 종은 동종이량체의 입체 형상에서 Fc-EPO 융합 단백질의 다양한 정도의 시알릴화로부터 생성될 수 있는 예상되는 28개의 상이한 종과 잘 상응한다. 상기 분석에 따르면, 4-5개의 시알릴산 잔기를 가진 Fcg2h-EPO는 pH 6.9 마커와 함께 포커싱되고, 11-12개의 시알릴산 잔기를 가진 Fcg2h-EPO는 pH 6.0 마커와 함께 포커싱되었다. BHK 세포에서 합성된 Fcg2h-EPO 단백질 집단은 단백질 분자 당 평균 21개의 시알릴산 잔기를 가지는 것으로 밝혀졌다. 반면, NS/O 세포에서 합성된 Fc(g2h)-EPO 단백질 집단은 단백질 분자 당 평균 약 10개의 시알릴산 잔기를 가질 것이다.

후속 실험에서, Fc-EPO 단백질을 발현하는 BHK 세포를 혈청이 없는 성장 조건 및 대규모 제조에 적합한 조건, 예를 들어 혼탁 조건으로 적응시켰다. 혈청이 없는 배지 및 혼탁액에서 성장한 BHK 세포로부터 제조된 Fc-EPO 단백질을 상기 기술된 IEF 젤 전기영동으로 분석하였다. 성장 조건에서의 상기 변경은 가장 강한 밴드의 등전점을 단지 0.1 내지 0.3 pH 단위 이동시켰다.

보충된 DMEM/F-12 단백질 없는 배지에서 합성된 Fc-EPO 융합 단백질의 샘플을 IEF 젤 전기영동에 의해 유사하게 평가하였다. 상기 단백질 생성물은, VP-SFM과 같은 혈청이 없는 배지에서 성장한 세포로부터 수득한 상응하는 생성물보다, 시알릴화 정도가 더 컸고 더욱 균질한 시알릴화를 나타내었다.

상이한 세포 중에서 제조된 Fc-EPO 단백질의 시알릴화 정도를 또한 렉틴-결합 연구에 의해 정성적으로 확인하였다. 예를 들어, 우선 Fc-EPO 융합 단백질을 표준 SDS 젤 전기영동으로 분리하고, 블롯하고, 이어서 특유의 탄수화물 부분을 인지하는 변형된 렉틴(예를 들어, Roche Applied Science, Indianapolis, IN으로부터 시판됨)으로 탐지하였고, 결합된 렉틴을 시각화할 수 있었다. 적합한 렉틴은 특정 연결이 있는 시알릴산을 인지하는 Sambucus nigra 응집소(SNA) 또는 Maackia amurensis 응집소(MAA), 및 O-글리칸 코어과 같은 탄수화물 부분의 다른 부위를 인지하는 Datura stramonium 응집소(DAA), Peanut 응집소(PNA) 및 자칼린을 비제한적으로 포함한다. 레시틴-결합 평가에 기초하여, 상이한 세포 제조된 Fc-EPO 융합 단백질의 시알릴화 수준을 확인할 수 있었다.

실시예 6. Fc-EPO 변이의 시험관내 생물학적 활성

상이한 Fc-EPO 단백질의 시험관내 활성을 세포-기재의 평가에서 시험하였다. TF-1 세포 주는 EPO 수용체를 발현하고, 따라서, 적합한 배양 조건 하에서, 삼중수소화 티미딘의 도입은 EPO 또는 EPO-유사 단백질 활성의 함수이다 [Hammerling 등, (1996) *J. Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 14: 1455 ; Kitamura 등, (1989) *J. Cellular Physiol.*, 140: 323]. 구체적으로는, 활성 로그 상의 TF-1 세포 주를 EPO가 없는 배지에서 2회 세척하고, 미량 역가판 (microtiter plates)에 약 10^4 세포/웰로 평판 배양하였다. 이어서 상기 세포를, Fc-EPO 변이의 적정된 희석 시리즈에서 48 시간 동안 인큐베이션시켰다. 세포 증식을 평가하기 10 시간 전에 $0.3 \mu\text{Ci}$ 의 ^3H -티미딘을 웰에 첨가하였다. 대조군으로서, TF-1 세포를 재조합 인간 EPO, 및 과 당화된 EPO 유사체 Aranesp[®]의 존재하에서 또한 인큐베이션시켰다. 방사성 티미딘의 도입을 총 TCA-침전 가능한 수로서 측정하였다. 표 2에 나타난 바와 같이, Fcg2h-M1-EPO 분자의 활성은 재조합 인간 EPO활성에 필적할 만하다.

상기 데이터로부터 일부 일반적인 결론을 도출할 수 있다. 이전에 보고된 결과와 일치하듯이, CHO 세포로부터 제조된 EPO는 약 0.7 ng/ml의 ED50을 가지고; 이는 NIBSC EPO 표준, R&D 시스템으로부터의 EPO, 및 시판되는 Proscrit[®]을 포함한다. Aranesp[®]는 시험관내에서 현저하게 활성이 낮았고, 이는 아마도 그의 증가된 음전하에 기인한 감소된 결합 속도를 반영한다. 유사하게, BHK 세포로부터 제조된 Fc-EPO는 NS/O 세포로부터 제조된 Fc-EPO보다 활성이 낮고, 이는 BHK 세포로부터 제조된 Fc-EPO 단백질이 고 수준으로 시알릴화되어 단백질 상에 증가된 음전하를 생성한다는 관찰과 일치한다.

[표 2]

단백질	ED50 (ng/ml)	S.D.	N
EPO (NIBSC)	0.77	0.35	22
EPO (R&D Systems)	0.6	0.26	26
EPO (Procrit [®])	0.68	0.15	6
EPO (Aranesp [®])	2.4	0.96	10
Fcg2h-M1-EPO (NS/0)	0.35	0.15	14
Fcg2h-M1-EPO (BHK)	0.94	0.34	5

실시예 7. Fc-EPO 변이의 약물동력학적 분석

다양한 세포 주에서 합성된 상이한 Fc-EPO 단백질의 약물동력학적 프로필을 하기의 생체내 실험에 기초하여 평가하였다. 한 실험예에서, 도 8에 나타난 바와 같이, NS/O 세포 및 BHK 세포에서 합성된 Fcg2h (N > Q)-EPO 단백질 약 14 mcg을 Swiss-Webster 마우스에 정맥내 투여하였다. 투여 후 다양한 시간 지점(예를 들어, 투여 후 T=0, 1/2, 1, 2, 4, 8, 및 24 시간)에서, 혈액 샘플을 수집하고, 원심분리에 의해 혈청을 준비하였다. Fc-EPO의 혈청 농도를 항-Fc 항체를 사용하여 ELISA에 의해 확인하였다. 도 8에 나타난 바와 같이, 투여 후 24 시간에서, BHK 유래의 Fc-EPO의 초기 혈청 농도의 10% 이상이 혈청에 남아 있었던 반면, NS/O-유래의 Fc-EPO의 초기 혈청 농도의 0.1% 미만이 혈청에 남아있었다.

NS/O 세포 및 BHK 세포에서 합성된 Fcg2h-EPO(NDS) 단백질로 유사한 실험을 행하였다. NS/O 세포 및 BHK 세포에서 합성된 Fcg2h-EPO(NDS) 약 14 mcg을 Swiss-Webster 마우스에 정맥 내로 투여하였다. T=0, 1/2, 1, 2, 4, 8, 24, 및 36 시간에서 혈액 샘플을 수집하고, 혈청 내의 Fcg2h-EPO(NDS)의 농도를 항-Fc ELISA에 의해 측정하였다. 도 9에 나타난 바와 같이, 투여 후 24 시간에서, BHK 유래의 Fcg2h-EPO(NDS)의 초기 혈청 농도의 10% 이상이 혈청에 남아 있었던 반면, NS/O 유래의 Fcg2h-EPO(NDS)의 초기 혈청 농도의 0.1% 미만이 혈청에 남아있었다.

BHK-21 세포, PERC6 세포, 및 293 세포에서 제조된 Fcg2h-EPO(NDS)의 약물동력학적 프로필을 또한 비교하였다. 구체적으로는, Fcg2h-Epo(NDS)를 발현하는 플라스미드를 일시적으로 BHK, 293, 및 PERC6 세포로 형질 감염시켰다. 상기 발현된 Fcg2h-Epo(NDS) 용합 단백질을 상이한 세포 주로부터 정제하고 Swiss-Webster 마우스에 마우스 당 1.7 mcg의 농도로 마우스에 정맥 주사하였다. 혈액 샘플을 T=0, 1/2, 1, 2, 4, 8, 24, 48, 및 72 시간에서 수집하였고, 혈청 내

의 Fcg2h-Epo(NDS) 농도를 항-Fc ELISA로 측정하였다. 도 10에 나타난 바와 같이, 투여 후 24 시간에서, BHK 유래의 Fcg2h-EPO(NDS)의 초기 혈청 농도의 10% 이상이 혈청에 남아 있었던 반면, 293 세포 유래의 Fcg2h-EPO(NDS)의 초기 혈청 농도의 0.1% 미만이 혈청에 남아있었고, PerC6 세포 유래의 Fcg2h-EPO(NDS)는 혈청에서 거의 발견되지 않았다. 유사한 결과가 BHK, PerC6 및 293 세포에서 제조된 Fcg2h(N→Q)-EPO 단백질에서 수득되었다.

Fcg2h(N→Q)-EPO, Fcg2h-EPO(NDS), Fcg2h-EPO, 및 Aranesp[®](즉, NESP)의 약물동력학적 프로필을 비교하기 위하여, 유사한 실험을 마우스에서 수행하였다. 본원에서 사용된 Fc-EPO 변이는 BHK 세포로부터 합성되었다. 투여 후 48 시간에서, Aranesp[®]의 초기 혈청 농도의 10% 미만이 혈청에 남아 있고, 한편 Fcg2h(N→Q)-EPO 및 Fcg2h-EPO(NDS) 양자의 초기 혈청 농도의 10% 이상이 혈청에 남아 있는 것으로 관찰되었다. 상기 결과는 BHK-21 세포로부터 제조된 Fcg2h(N→Q)-EPO 및 Fcg2h-EPO(NDS)가 Aranesp[®]의 그것보다 훨씬 더 긴 반감기를 가짐을 나타낸다.

실시예 8. Fc-EPO 변이의 생체내 효능

상이한 Fc-EPO 변이의 생체내 생물학적 활성을, 마우스 및 래트에서의 적혈구용적률(HCT) 평가 및 망상적혈구 평가에 의해 측정하였다.

한 HCT 실험에서, BHK 세포에서 합성된 Fcg2h(FN→AQ)-EPO 단백질을 20 mcg/kg 및 10 mcg/kg 용량으로 CD1 마우스에 복강내 주사하였다. 4, 7, 11 및 14 일에 마우스로부터 혈액 샘플을 채취하고, 모세 튜브에서 원심분리하였다. 침전된 RBC의 양을 총 부피에 대한 분획으로서 측정하였다. 도 4에 도시된 바와 같이, Fcg2h(FN>AQ)-EPO 단백질의 주사에 대한 반응으로, 적혈구용적률은 처음에 극적으로 증가하고, 이어서 항정을 유지하다가, 최종적으로 감소하였다.

다른 실험에서, Sprague-Dawley 래트에 BHK 세포에서 합성된 하기의 단백질을 복강내 주사하였다. 모든 동물에 대해 42.5 mcg/kg으로 투여하였다.

1. Fcg2h-EPO
2. Fcg2h-EPO(NDS)
3. Fcg4h-EPO
4. Fcg4h(N>Q)-EPO

HCT 평가는 상기 기술된 바와 같이 주사된 마우스로부터 채취한 혈액 샘플로 수행하였다. 도 5에 나타난 바와 같이, Fcg2h-EPO(NDS) 및 Fcg2h-EPO에 대한 반응으로, 주사된 래트에서의 적혈구용적률의 양은 연장된 기간 동안 항정으로 남아있고, 이는 Fcg2h-EPO(NDS) 및 Fcg2h-EPO 단백질 양자 모두 연장된 혈청 반감기 및 강력한 생체내 생물학적 활성을 가짐을 나타낸다. 도 5에서 나타난 바와 같이 Fcg4h-EPO 및 Fcg4h(N→Q)-EPO는 Fcg2h-EPO(NDS) 및 Fcg2h-EPO 단백질에 비하여 더 짧은 항정 기간 및 혈청 농도의 더 신속한 감소를 나타낸다는 것이 밝혀졌다.

다른 실험에서, CD1 마우스에 하기의 샘플을 복강내 투여하였다.

1. 85 mcg/kg, 42.5 mcg/kg, 및 21.25 mcg/kg 용량의 BHK 세포로부터의 Fcg2h-EPO(NDS)
2. 85 mcg/kg, 42.5 mcg/kg, 및 21.25 mcg/kg 용량의 NS/0 세포로부터의 Fcg2h-EPO(NDS)
3. 50 mcg/kg, 25 mcg/kg, 및 12.5 mcg/kg 용량의 Aranesp[®](즉, NESP)

탄수화물이 없는 단백질 분자량에 기초하여 단백질 양을 계산하였다. 상기 실험에서, Fcg2h-EPO(NDS)의 분자량은 단량체 폴리펩티드에 기초한다. 따라서, Fcg2h-EPO(NDS) 대 NESP의 분자량의 비는 약 1.71 대 1이다. 그러므로, 상기 실험에서의 각 단백질에 대한 용량 범위는 대략 동등하였다.

도 6에서 나타나는 바와 같이, BHK 세포에서 합성된 Fcg2h-EPO(NDS) 단백질은 효능 및 효과의 지속시간 면에서 최상의 적혈구용적률 프로필을 나타내었고, 이는 BHK 세포로부터의 Fcg2h-EPO(NDS) 단백질이 NS/O 세포로부터의 Fcg2h-EPO(NDS) 및 NESP 양자에 비해 더욱 긴 혈청 반감기 및 더욱 강력한 생체내 활성을 가짐을 나타내었다. NS/O 세포로부터의 Fcg2h-EPO (NDS) 및 NESP의 적혈구용적률 프로필은 유사하다.

실시예 9. IgG2와 IgG4로부터 유래된 CH2-CH3 도메인을 가진 Fc-EPO 단백질의 비교

다양한 Fc-EPO 단백질의 세포-기재 에리스로포이에틴의 활성 비교는 IgG4로부터 유래된 CH2 및 CH3 도메인을 가진 융합 단백질이 일반적으로 IgG2로부터 유래된 CH2 및 CH3 도메인을 가진 상응하는 단백질보다 더 낮은 활성을 가진다고 밝혀졌다. 상기 결론은 3 유형 이상의 Fc-EPO 단백질, 즉 에리스로포이에틴 부분에서 NDS 돌연변이 가지고 NS/O 세포에서 합성된 단백질(표 3), BHK 세포에서 합성된 NDS 돌연변이를 가진 단백질(표 4), 및 BHK 세포에서 합성된 정상 에리스로포이에틴을 가진 단백질(표 5)에 적용된다.

하기 표 3 내지 5에서 비교된 모든 단백질은 IgG1으로부터 유래된 변형된 헌지 및 Fc 부분의 C-말단에서 M1 세트의 돌연변이를 가진다. 실시예 6에서 기술된 표준 절차에 따라 단백질에 의해 자극된, TF-1 세포에 삼중수소화된 티미딘의 도입을 측정함으로써 상기 단백질의 활성을 확인하였다. 활성은 에리스로포이에틴 부분의 ng/ml로 ED50으로서 나타낸다.

[표 3]

NDS 돌연변이를 가지고 NS/O 세포에서 합성된 Fc-EPO 융합 단백질의 세포-기재 활성

Fc-EPO 단백질	ED50 (EPO의 ng/ml)	S.D	No. 실험
Fcg2h-M1-EPO(NDS) NS0 제제 1	0.60	0.17	5
Fcg2h-M1-EPO(NDS) NS0 제제 2	0.57	0.33	13
Fcg2h-M1-EPO(NDS) NS0 제제 3	0.54	0.34	8
Fcg2h-M1-EPO(NDS) NS0 제제 4	0.36	0.11	5
Fcg4h-M1-EPO(NDS) NS0 제제 1	0.96	0.21	4

[표 4]

NDS 돌연변이를 가지고 BHK 세포에서 합성된 Fc-EPO 융합 단백질의 세포-기재 활성

Fc-EPO 단백질	ED50 (ng of EPO/ml)	S.D.	No. 실험
Fcg2h-M1-EPO(NDS) BHK 제제 1	0.81	0.23	11
Fcg2h-M1-EPO(NDS) BHK 제제 2	2.17	1.23	6
Fcg2h-M1-EPO(NDS) BHK 제제 3	1.16	0.28	5
Fcg2h-M1-EPO(NDS) BHK 제제 4	0.89	0.44	4
Fcg2h-M1-EPO(NDS) BHK 제제 5	1.09	0.41	4
Fcg4h-M1-EPO(NDS) BHK 제제 1	6.24	2.34	6

[표 5]

야생형 EPO를 가지고 BHK 세포에서 합성된 Fc-EPO 융합 단백질의 세포-기재 활성

Fc-EPO 단백질	ED50 (EPO의 ng/ml)	S.D.	No. 실험
Fcg2h-M1-EPO BHK 제제 1	0.84	0.28	4
Fcg2h-M1-EPO BHK 제제 2	0.95	0.32	7
Fcg2h-M1-EPO BHK 제제 3	0.72	0.27	3
Fcg2h-M1-EPO BHK 제제 4	0.95	0.17	3
Fcg2h-M1-EPO BHK 제제 5	0.43	0.18	2
Fcg4h-M1-EPO BHK 제제 1	1.09	0.31	7
Fcg4h-M1-EPO BHK 제제 2	1.53	0.35	6

시험관내 세포-기재 평가로부터의 활성 데이터는 일반적으로 에리스로포이에틴-함유 단백질의 약물동력학적 프로필 및 생체내 효능을 제시할 수 있다. 일반적으로, 세포-기재 평가에서의 감소된 시험관내 활성은 EPO 수용체에 대한 감소된 결합 속도를 나타내며, 이는 증가된 약물동력학적 특성(예를 들어, 연장된 반감기) 및 향상된 생체내 활성과 상관관계가 있다. 그러나, IgG4-유래의 CH2 및 CH3 도메인을 가진 Fc-EPO 융합 단백질의 감소된 시험관내 활성은 증가된 약물 동태 및 향상된 생체내 생물학적 활성과 상관관계가 없다. IgG4-유래의 CH2 및 CH3 도메인을 가진 Fc-EPO 융합 단백질의 약물동력학적 프로필은 일반적으로 IgG2-유래의 CH2 및 CH3 도메인을 가진 상응하는 단백질과 구별할 수 없다는 것이 밝혀졌다. IgG4-유래의 CH2 및 CH3 도메인을 가진 Fc-EPO 융합 단백질은 IgG2-유래의 CH2 및 CH3 도메인을 가진 상응하는 단백질에 비해 일반적으로 낮은 활성을 가진다는 것이 또한 밝혀졌다(도 5 참조).

실시예 10. Fc 부분의 당화 부위 제거의 효과

Fc 부분의 당화 부위의 제거가 시험관내 활성, 약물동태, 및 생체내 효능에 미치는 효과를 테스트하기 위해 실험을 수행하였다. 특히, IgG2 유래의 CH2 및 CH3 도메인 또는 IgG4-유래의 CH2 및 CH3 도메인을 함유하는 Fc-EPO 융합 단백질을 테스트하였다. IgG1의 Asn297에 상응하는 IgG2 또는 IgG4의 Gln-Phe-Asn-Ser 아미노산 서열 내의 아스파라긴을 글루타민으로 대체하였다. 대부분의 실험에서, Gln-Phe-Asn-Ser 아미노산 서열 내의 페닐알라닌을 알라닌으로 대체하여, 아스파라긴의 돌연변이로부터 생성될 수 있는 가능한 비-자기 T-세포를 제거하였다. 표 6에서 나타난 바와 같이, 세포-기재의 시험관내 평가에서, Fc 부분의 N-결합형 당화 부위를 제거하는 FN > AQ 돌연변이를 가진 Fc-EPO 단백질의 ED50 값은 일반적으로 돌연변이가 없는 Fc-EPO 단백질의 그것보다 약 5 배가 낮으며, 이는 N-결합형 당화 부위의 제거가 세포-기재 평가에서 감소된 시험관내 활성을 초래함을 나타낸다.

N-결합형 당화의 제거가 약물동태 및 생체내 효능에 미치는 효과를 테스트하기 위해 또한 실험을 수행하였다. CD1 마우스를 BHK 세포에서 합성된 Fcg2h-M1-EPO, Fcg2h-M1-EPO(NDS), 및 Fcg2h(N>Q)-M1-EPO 단백질 각각 42 mcg/kg로 처리하였다. Fcg2h(N>Q)-M1-EPO 단백질이 N→Q 돌연변이가 없는 상응하는 단백질보다 더욱 우수한 약물동력학적 프로필을 나타냄을 관찰하였다. 그러므로, IgG2-유래의 Fc 부분에서의 N-결합형 당화를 제거하는 N > Q 돌연변이는 증가된 약물동태(예를 들어, 연장된 혈청 반감기)를 초래하였다. IgG2-유래의 CH2 및 CH3 도메인은 이미 필수적으로 감지될 수 없는 Fc-수용체 결합을 가지므로, 상기 연장된 혈청 반감기를 Fc 수용체에의 결합에 대한 효과에 의해 설명할 수 없다.

[표 6]

Fc 부분의 당화 부위의 제거가 Fc-EPO 융합 단백질의 시험관내 세포-기재 활성을 감소시킴

Fc-EPO 융합 단백질	ED50 (EP의 ng/ml)	S.D.	No.	실험
Fcg2h-EPO BHK 제제 1	0.84	0.28	4	
Fcg2h-EPO BHK 제제 2	0.95	0.32	7	
Fcg2h-EPO BHK 제제 3	0.72	0.27	3	
Fcg2h-EPO BHK 제제 4	0.95	0.17	3	
Fcg2h-EPO BHK 제제 5	0.43	0.18	2	

Fcg2h(FN>AQ)-EPO BHK 제제 1	6.75	2.57	9	
Fcg2h(FN>AQ)-EPO BHK 제제 2	7.38	1.48	4	
Fcg2h(FN>AQ)-EPO BHK 제제 3	7.01	4.64	9	
Fcg2h(FN>AQ)-EPO BHK 제제 4	3.02	0.88	5	
Fcg2h(FN>AQ)-EPO BHK 제제 5	2.77	1.75	5	
Fcg2h(FN>AQ)-EPO BHK 제제 6	5.07	1.64	4	
Fcg2h(FN>AQ)-EPO BHK 제제 7	2.53	0.53	5	
Fcg2h(FN>AQ)-EPO BHK 제제 8	2.92	0.52	5	
Fcg2h(FN>AQ)-EPO BHK 제제 9	1.55	0.66	5	
Fcg2h(FN>AQ)-EPO BHK 제제 10	2.37	1.78	8	

Fcg4h-M1-EPO BHK 제제 1	1.09	0.31	7	
Fcg4h-M1-EPO BHK 제제 2	1.53	0.35	6	

Fcg4h(FN>AQ)-M1-EPO BHK 제제 1	17.16		1	
Fcg4h(FN>AQ)-M1-EPO BHK 제제 2	5.87	2.71	7	
Fcg4h(FN>AQ)-M1-EPO BHK 제제 3	3.79	0.93	5	
Fcg4h(FN>AQ)-M1-EPO BHK 제제 4	4.78	3.42	8	

IgG2 및 IgG4 유래의 Fc 부분에서의 N-결합형 당화의 제거에 의해 초래된 상기 효과는 에리스로포이에틴 수용체에 대한 감소된 결합 속도와 대부분 일치하기 때문에, 뜻밖이고 놀라웠다. 이론에 의해 제한되기를 바라지는 않으나, IgG2 및 IgG4 유래의 Fc 부분에서의 N-결합형 당화의 제거는 Fc-EPO 융합 단백질의 전반적인 입체형상의 변화를 초래할 수 있다.

실시예 11. BHK 세포에서 합성된 Fc-EPO 융합 단백질의 비글 개에 대한 처리

적혈구용적률, 망상적혈구 수, 및 기타의 혈액 파라미터에 대한 효과를 테스트하기 위하여, Fc-EPO 융합 단백질을 비글 개에 투여하였다. 구체적으로는, Fcg2h(FN→AQ)-EPO 단백질은 2개의 독립적으로 안정하게 형질 감염된 BHK 세로 주, 클론 65 및 클론 187로부터 정제하고, 비글 개에 정맥 투여하였다. 한마리의 수컷 및 한마리의 암컷 비글 개에 하기 일정에 따라 각 제제를 주사하였다:

0 일: 3 mcg/kg

16 일: 10 mcg/kg

23 일: 100 mcg/kg

각 투여 후 다양한 시간 지점에서, 약 2 ml의 혈액을 수집하고, 적혈구용적률, 망상적혈구 수, 및 기타 혈액 파라미터와 같은 혈액 파라미터를 측정하였다.

하기 처리 후의 적혈구용적률 반응을 도 11에 나타내었다. 3 mcg/kg의 Fc-EPO 융합 단백질 투여 후, 혈액 파라미터는 정상 범위로부터 증가하지 않았다. 10 mcg/kg 투여 후 1 주일 내에, 4 마리 동물 중 3 마리에서 망상적혈구 수가 총 부피의 3% 초과 증가하였고, 한마리에서는 적혈구용적률이 51까지 증가하였다. 기타 혈액 파라미터는 정상 범위로부터 증가하지 않았다. 100 mcg/kg 투여 후, 적혈구용적률 수는 신속하게 증가하여 57 내지 62의 피크 수준에 도달하였고, 5 내지 6 주 동안 정상 범위를 초과하여 유지되었다. 망상적혈구 수는 2 내지 3 주 동안 증가되어 유지되었다.

각 동물에 대해, 데시리터 당 그램으로 측정된, 혈액 및 해모글로빈의 마이크로리터 당 적혈구의 수는 적혈구용적률에 비례하였다. 상기 결과는 Fc-EPO 단백질이 정상 해모글로빈 용량을 갖는 정상 크기의 적혈구의 제조를 자극함을 나타내었다.

실시예 12. 임상적 용도를 위한 Fc-EPO 단백질의 정제

당업자에게 공지된 표준 GMP 절차에 따라 Fc-EPO 단백질을 정제한다. 백크트 제조 클론으로부터의 BHK-21 세포를, 부가적인 2.5 mM의 L-글루타민(Invitrogen), 각각 2 g/l의 HyPep 1501 및 HyPep 4601 (Quest International, Chicago, IL), 10 μ l/1의 에탄올아민(Sigma), 및 5 μ M의 트로폴론(Sigma)으로 보충된 DMEM/F-12 배지(Invitrogen)에서, 높은 세포 생존율(예를 들어, 80% 초과)을 유지하면서 배치 배양으로, 7-10일 동안 배양한다. 상기 조건화된 배지를 수확하고 정상-흐름-여과에 의해 정화하고, Fc 부분에 대한 단백질 A의 친화력에 기초하여 융합 단백질을 포획하는 예비-평형시킨 단백질 A 세파로즈 빠른 흐름 컬럼(Pharmacia)에 로딩한다. 상기 컬럼을 중성 pH에서 150 mM의 인산 나트륨 및 100 mM의 NaCl를 함유하는, 컬럼 부피 15 배의, 인산 나트륨 완충액으로 광범위하게 세척하였다. 결합된 단백질을, 150 mM의 인산 나트륨 및 100 mM의 NaCl를 또한 함유하는, 컬럼 부피의 15 배의 pH 2.5-3의 추가적인 산성 인산 나트륨 완충액으로 낮은 pH에서 용리시킨다.

바이러스 불활성화를 위하여, 혼주(pooled) 피크 분획을 pH 3.8로 조정하고, 실온에서 추가로 30분 동안 인큐베이션시킨다. 30 분의 인큐베이션 후, 혼주 분획을 중화하고 멸균 여과하고, 이어서 광범위한 시알릴화의 결과인 Fc-EPO 단백질의 산성 pI를 빼앗아 Fc-EPO 단백질과 함께 용리되는 잠재적인 오염물을 제거하는 Q-세파로즈 빠른 흐름 음이온 교환 컬럼(Pharmacia)에 적용시킨다. 구체적으로, 중성화된 분획을 pH 5.0에서 Q-세파로즈 빠른 흐름 음이온 교환 컬럼(Pharmacia) 상에 로딩하고 NaCl 용액의 기울기로 용리한다. 이어서 후속의 분석 및 추가적인 정제 과정을 위해 Fc-EPO 분획을 수집하고 풀(pool)한다. 예를 들어, Q-세파로즈 컬럼으로부터의 고 염 스트립(strip)을 역상 크로마토그래피 컬럼에 적용시켜 과량의 NaCl을 제거하였다. 역상 컬럼으로부터의 희석 용리액을 제 2 Q-세파로즈 빠른 흐름(Pharmacia, 3 cm × 9 cm) 컬럼에 추가적으로 적용시킨다.

이어서 잠재적인 바이러스 입자를 나노여과(예를 들어, Millipore에 의한 Viresolve)에 의한 풀로부터 제거한다. 임의로, 히드록시아파타이트 컬럼 또는 페닐-보로네이트 컬럼(시스-디올을 결합한다)과 같은 추가적인 정제 단계를 사용할 수 있다. 최종적으로, 한의 여과를 사용하여 상기 정제된 단백질을 목적하는 용도로 농축하고, 이어서 적합한 제형의 완충제로 정용 여과(diafilter) 한다. 상기 물질을 최종적으로 멸균 여과하고, 바이알에 분산시켜, 사전에 정해진 부피로 하였다.

실시예 13. Fc-EPO 단백질 제형의 안정성을 확인하기 위한 스트레스 테스트

실시예의 샘플 Fc-EPO 제형 또는 참조 Fc-EPO 제형을 함유하는 바이알을 40°C 및 75%의 상대 대기 습도에서 및 한정된 저장 시간 동안(예를 들어, 0주, 4주, 8주 등) 저장한다. 특정의 저장 후에 각 바이알로부터 부분 표본을 채취하여 분석한다. 흐름에 대한 냉광원으로의 직접적인 조명하에서 상기 샘플들을 시각적으로 평가하였다. 상기 흐름은 350nm 및 550 nm에서의 흡광도를 측정함으로써 추가적으로 확인한다. 또한, 샘플에서의 Fc-EPO 단백질의 조건 및 단백질 분해 생성물의 존재를 분석적 크기 배제 크로마토그래피(HPLC-SEC)에 의해 분석한다. 0.5 mg/ml의 Fc-EPO, 10 mM의 시트레이트 pH 6.2, 100 mM의 글리세린, 100 mM의 NaCl, 0.01% w/v의 폴리소르베이트 20을 함유하는 제형이 참조 용액에 비해 현저하게 증가된 안정성을 가짐을 발견하였다.

실시예 14. 인간에서의 Fcg2h(FN > AQ)-M1-EPO 융합 단백질의 I 상 연구

인간에서 Fcg2h(FN > AQ)-M1-EPO 융합 단백질의 I 상 임상 시험을 하기와 같이 수행하였다. 약물동력학적 파라미터는 필수적으로 MacDougall 등, (1999) *J. Am. Soc. Nephrol.* 10: 2392-2395에 의한 Aranesp®에 대해 기술된 바과 같이 결정하고, 그 지시는 이하에서 참고로서 도입된다. 인간에서 정맥 투여된 Fcg2h(FN→AQ)-M1-EPO 융합 단백질(1 mcg/kg로 투여됨)의 말기 혈청 반감기는 20 내지 30 시간임이 밝혀졌다. 따라서, 1 mcg/kg, 또는 성인 빈혈 환자에 약 70 mcg의 투여에 의해 초기 혈청 농도 약 10 ng/ml가 된다. 정상 인간 에리스로포이에틴 농도는 약 0.04 내지 0.25 ng/ml [Cazzola 등, (1998) *Blood* 91: 2139-2145]이므로, 약리학적으로 활성된 수준의 Fc-EPO 단백질이 5-10일 이상 동안 환자의 시스템에 남아있다.

실시예 15. Fcg2h(FN→AQ)-M1-EPO 융합 단백질의 II 상 용량의 발견 및 투여 일정의 연구

투석을 받는 만성 신부전(CRF) 환자에 피하 또는 정맥 주사 투여하는 경우, Fcg2h(FN>AQ)-M1-EPO 융합 단백질에 대한 최적 용량 및 투여 일정을 조사하게 위해, 다기관, 무작위, 순차적 용량-증가 연구를 개시한다.

임상적 실습에서, 하기의 가이드라인에 따라 Fcg2h(FN < AQ)-M1-EPO 융합 단백질을 개개의 빈혈 환자에게 투여하는 것을 맞추는 것이 일반적으로 적당하다. 초기 용량을 투여하고, 적혈구용적률, 혼모글로빈, 망상적혈구 수 및 혈소판 수와 같은 혈액 파라미터를 모니터한다. 상기 초기 농도는 전형적으로 약 0.3 내지 3 mcg/kg이다. 적당한 초기 농도는 1 mcg/kg이다. 8주 치료 후 적혈구용적률의 증가가 혈액 부피의 5 내지 6% 미만이면, 용량을 증가시켜야 한다. 2주 기간내에 적혈구용적률의 증가가 4% 이상이거나, 적혈구용적률이 36%에 도달하면, 용량을 감소시켜야 한다.

대표적인 투여 일정은 하기와 같다

1주일에 한번 투여: 0.075, 0.225, 0.45, 0.75, 1.5 및 4.5 mcg/kg/투여

2주일에 한번 투여: 0.075, 0.225, 0.45, 0.75, 1.5 및 4.5 mcg/kg/투여

한달에 한번 투여: 0.45, 0.75, 1.5 및 4.5 mcg/kg/투여

상기 연구는 두 부분으로 수행하였다. 제 1 부분은 4 주에 걸쳐 최적의 속도로 혼모글로빈을 증가시키는(1 g/dL 이상 3 g/dL 미만), 각각 1주일에 한번, 2주일에 한번, 또는 한달에 한번 주어지는 Fcg2h(FN→AQ)-M1-EPO 융합 단백질의 용량을 평가하기 위해 고안된 용량-증가 연구이다. 각 연구의 제 2 부분은, 치료학적 목표로 적혈구용적률을 유지하기 위해 요구되는 용량(1주일에 한번, 2주일에 한번, 한 달에 한번 각각 정맥 또는 피하 경로로 투여되는 경우)을 결정하기 위해 고안된다.

도면의 간단한 설명

도 1A 및 1B는 인간 IgG1, IgG2 및 IgG4의 불변 영역의 아미노산 서열의 정렬을 도시한다.

도 2는 Fc-EPO 용량과 알파 페이스 동안 Fc-EPO 혈청 농도의 감소량 사이의 상관관계를 나타내는 쥐에서의 약물동력학 실험을 도시한다. 상기 실험에서, NS/0 세포에서 합성된 시알릴화되지 않은 Fc-EPO 변이가 사용되었다.

도 3은 Fc-EPO 융합 단백질의 잠재적인 제거 결로 및 잠재적으로 이들 경로를 조절하는 융합 단백질로의 변형을 도시한다.

도 4는 Fcg2h(FN>AQ)-EPO의 투여 후 마우스에서의 대표적인 적혈구용적률 반응을 도시한다.

도 5는 BHK 세포로부터 제조된 Fcg2h-EPO, Fcg2h-EPO(NDS), Fcg4h-EPO, 및 Fcg4h(N>Q)-EPO 단백질의 투여 후, 래트에서의 대표적인 적혈구용적률 반응을 도시한다.

도 6은 BHK 세포로부터 제조된 Fcg2h-EPO(NDS), NS/0 세포로부터 제조된 Fcg2h-EPO(NDS), 및 NESP(즉, Aranesp®)의 투여 후, 마우스에서의 대표적인 적혈구용적률 반응을 도시한다.

도 7은 성숙한 Fc-EPO 단백질을 코딩하는 대표적인 핵산 서열을 도시한다.

도 8은 BHK 세포로부터 제조되는 Fcg2h(N>Q)-EPO 및 NS/0 세포로부터 제조되는 Fcg2h(N>Q)-EPO의 마우스에서의 약물동력학적 프로필을 도시한다.

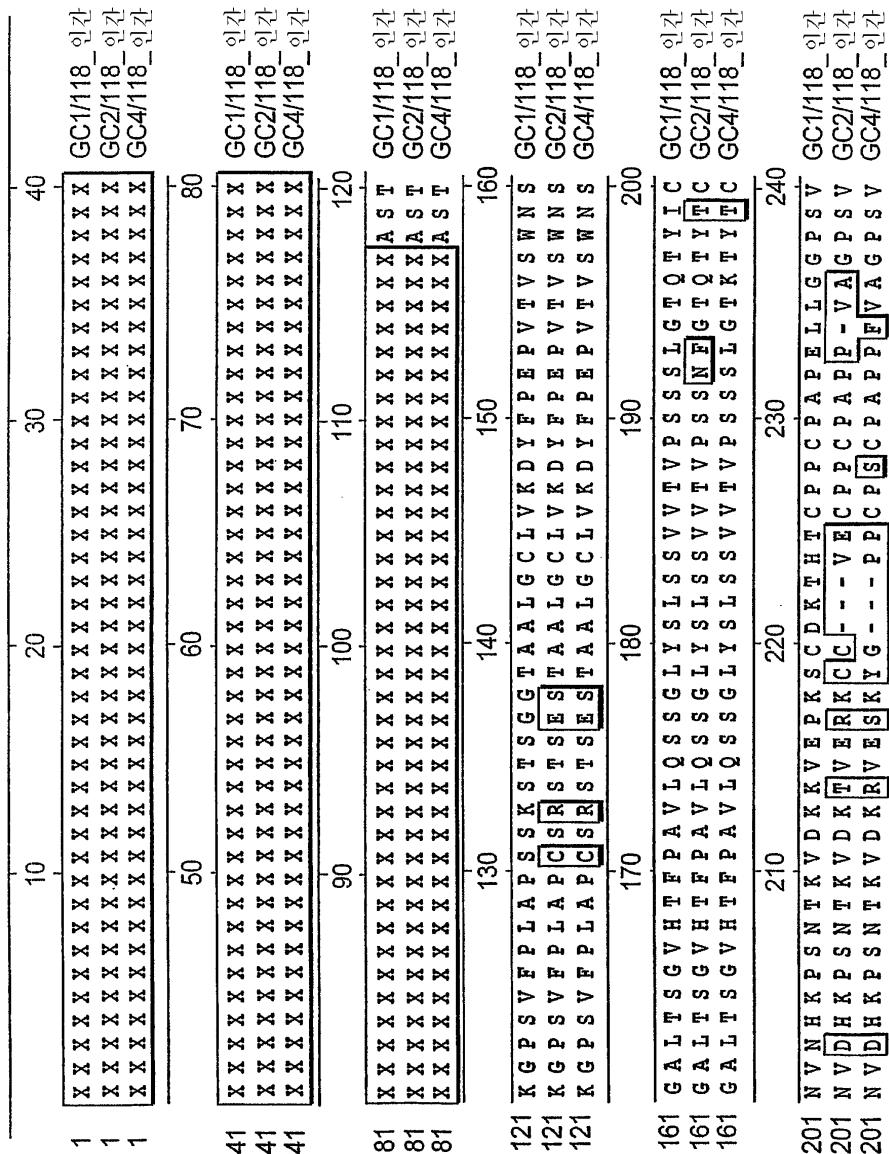
도 9는 BHK 세포로부터 제조되는 Fcg2h-EPO(NDS) 및 NS/0 세포로부터 제조되는 Fcg2h-EPO(NDS)의 마우스에서의 약물동력학적 프로필을 도시한다.

도 10은 BHK-21 세포, PERC6 세포, 및 293 세포에서 제조되는 Fcg2h-EPO(NDS) 단백질의 마우스에서의 약물동력학적 프로필을 도시한다.

도 11은 BHK 세포에서 합성되는 Fcg2h(FN→AQ)-EPO 단백질로 처리한 후의 비글 개에서의 적혈구용적률 반응을 도시한다.

도면

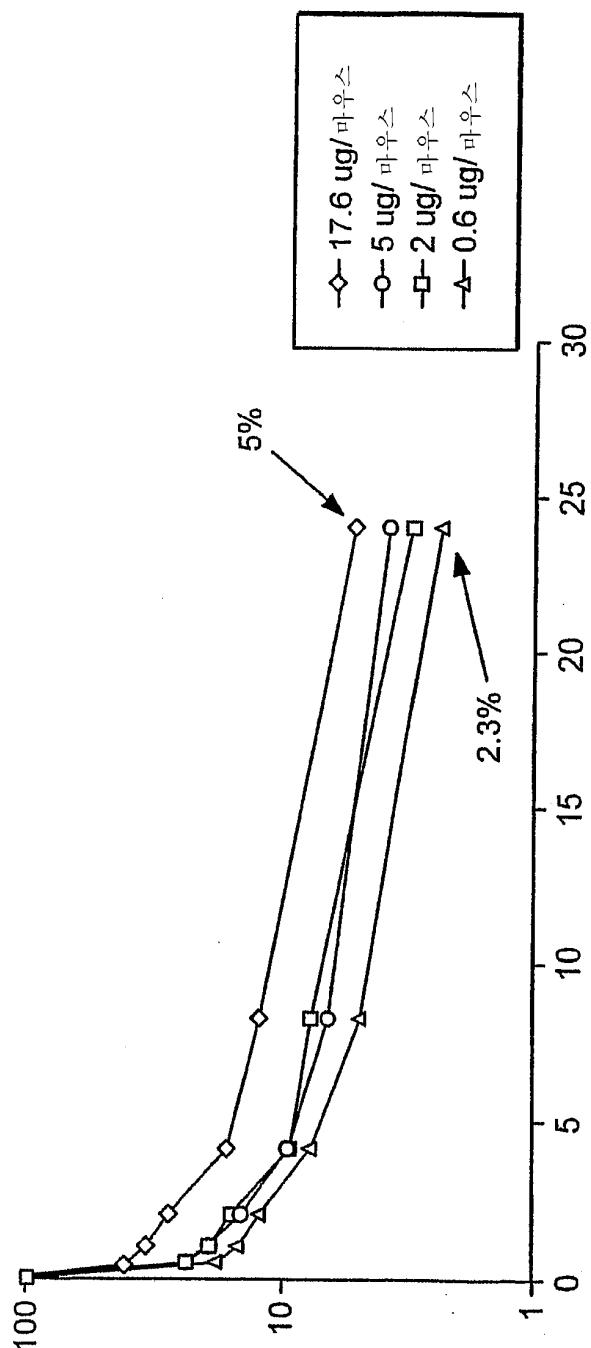
도면1A



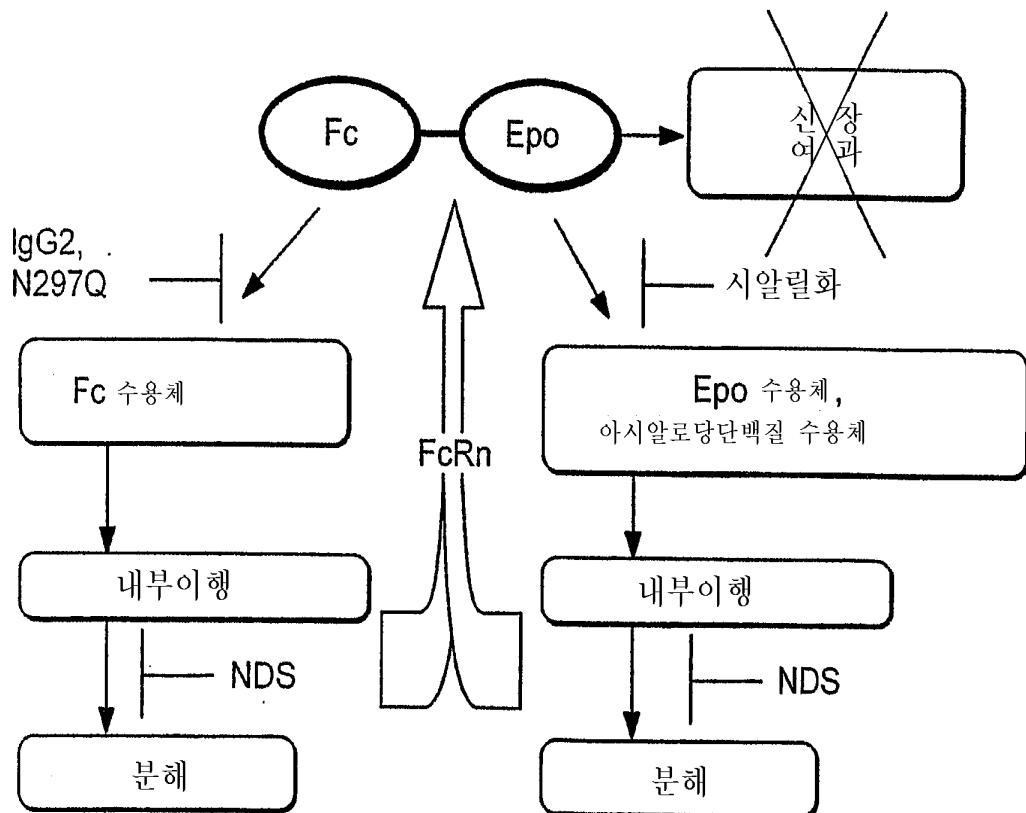
도면 1B

250	260	270	280	
241 FLEPPPKPDKTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDEPVKEFWYVD 237 FLEPPPKPDKTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDEPVQENWYVD 238 FLEPPPKPDKTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDEDPEVQENWYVD				GC1/118_인간 GC2/118_인간 GC4/118_인간
290 GVEVHNNAKTTKPREEQYNSTYRvvvsvlTvLHQDWLNKEYK 277 GVEVHNNAKTTKPREEQFNSTYRvvvsvlTvVHQDWLNKEYK 278 GVEVHNNAKTTKPREEQFNSTYRvvvsvlTvLHQDWLNKEYK	300	310	320	GC1/118_인간 GC2/118_인간 GC4/118_인간
330 CKVSNKA[LPAPIERTISSAKGQPREPQVYTLPSSRDELT 3317 CKVSNKG[LPAPIERTISSAKT[GQPREPQVYTLPSSREMT 3318 CKVSNKG[PSSIEKTTISAKT[GQPREPQVYTLPSSQEEMT	340	350	360	GC1/118_인간 GC2/118_인간 GC4/118_인간
370 NOVSSLTCLVKGFIYPSDIAVEWESENQOPENNYKTTPPVLD 357 NOVSSLTCLVKGFIYPSDIAVEWESENQOPENNYKTTPPVLD 358 NOVSSLTCLVKGFIYPSDIAVEWESENQOPENNYKTTPPVLD	380	390	400	GC1/118_인간 GC2/118_인간 GC4/118_인간
401 DGSEFLYSSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTOKS 397 DGSEFLYSSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTOKS 398 DGSEFLYSSR[LTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTOKS	370	380	390	GC1/118_인간 GC2/118_인간 GC4/118_인간
				441 LSLSPPGK 437 LSLSPPGK 438 LSLSPPGK

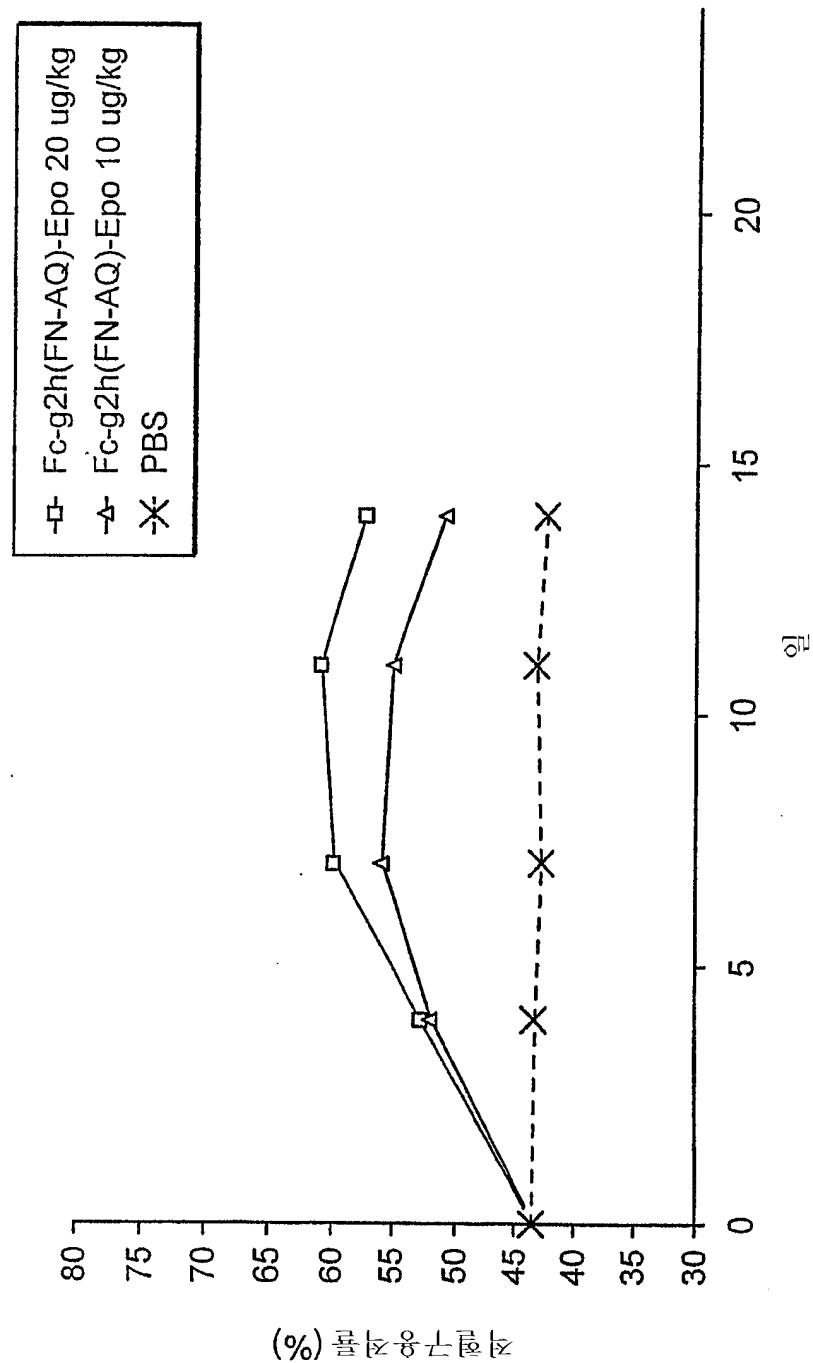
도면2



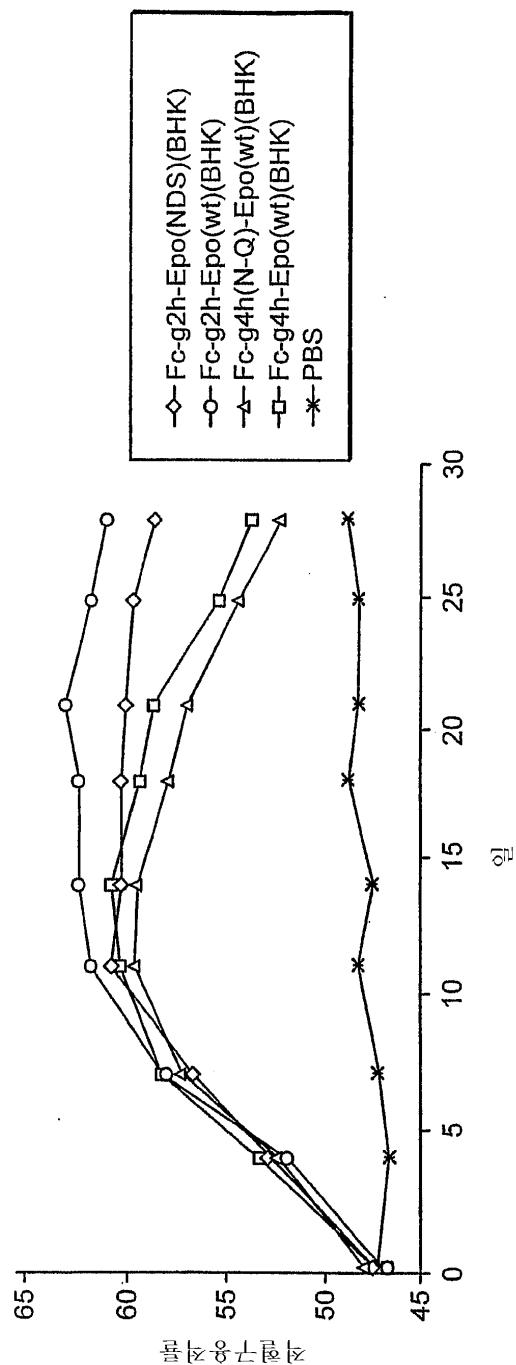
도면3



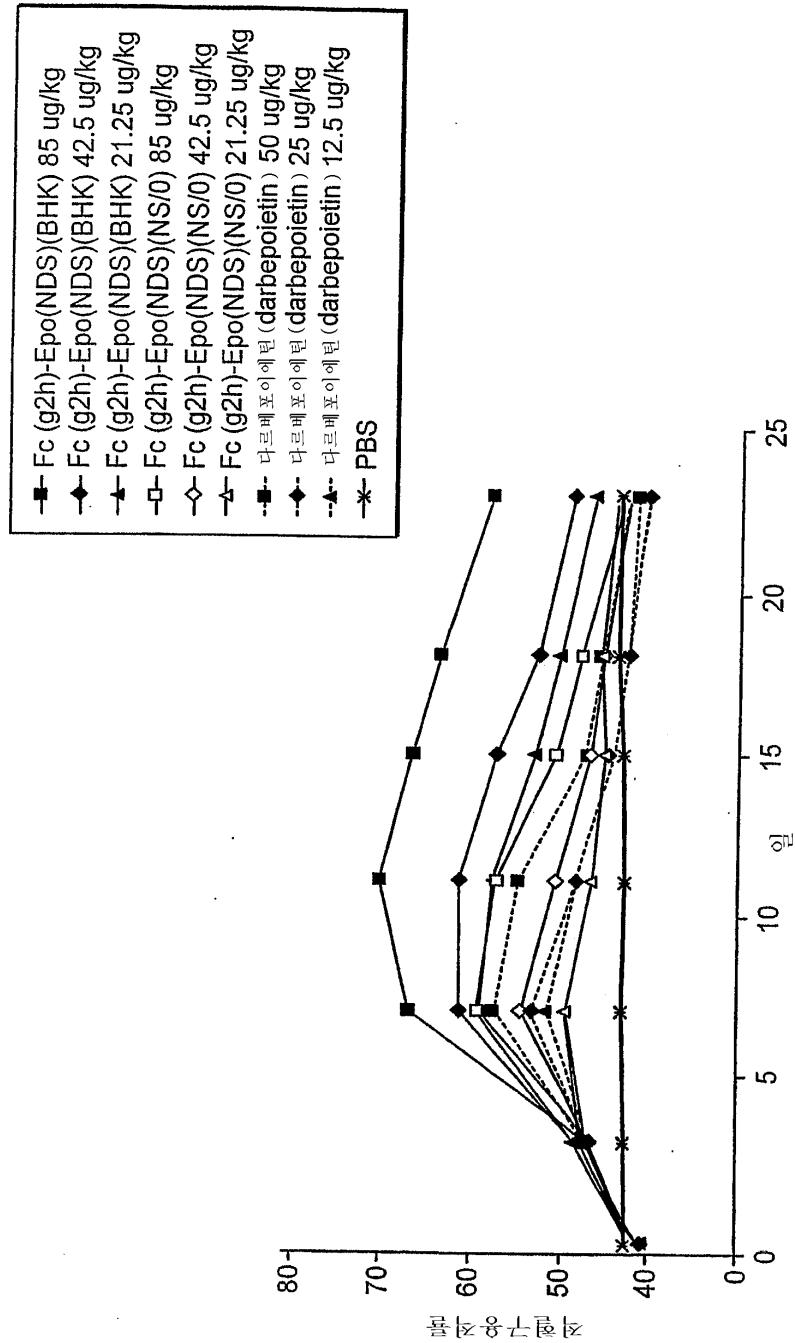
도면4



도면5



도면6

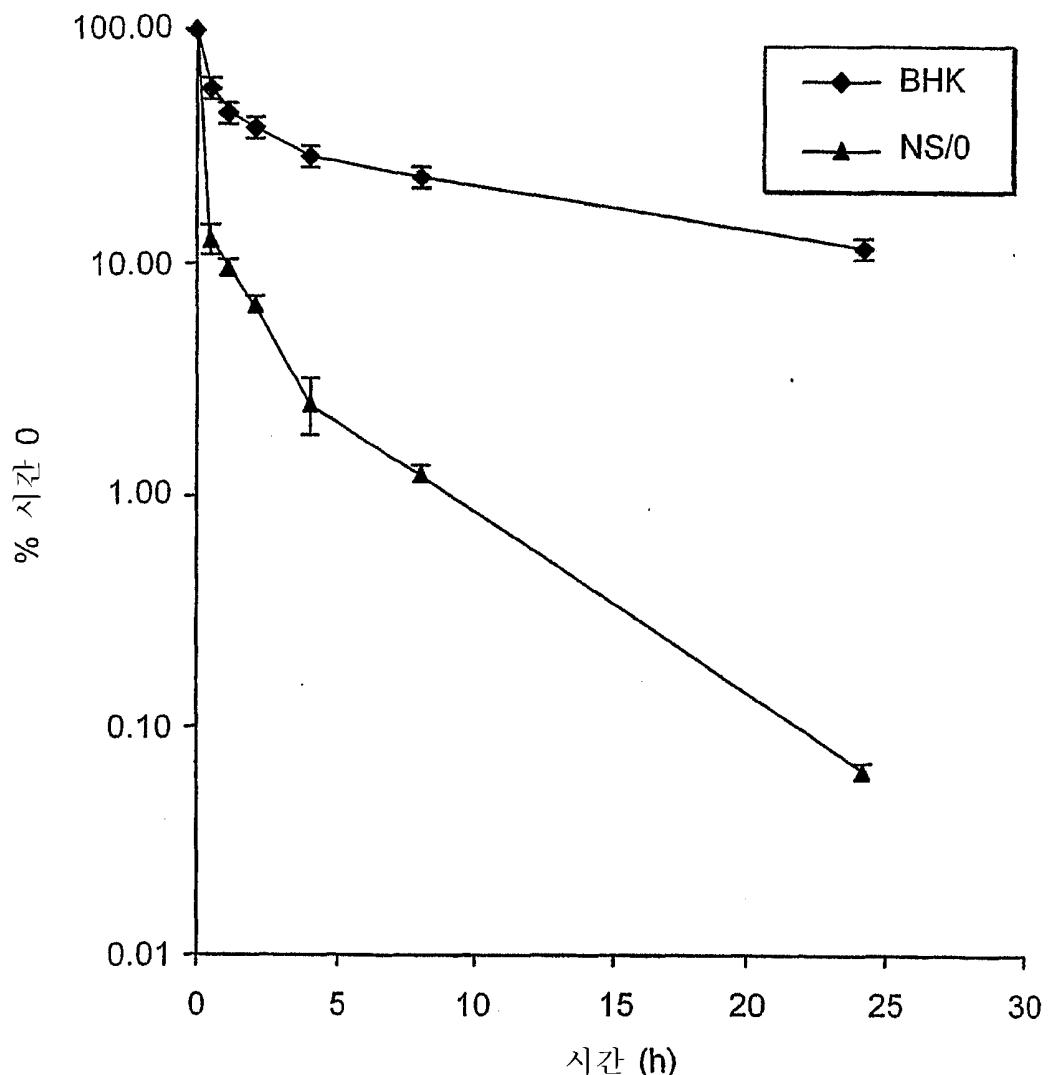


도면7

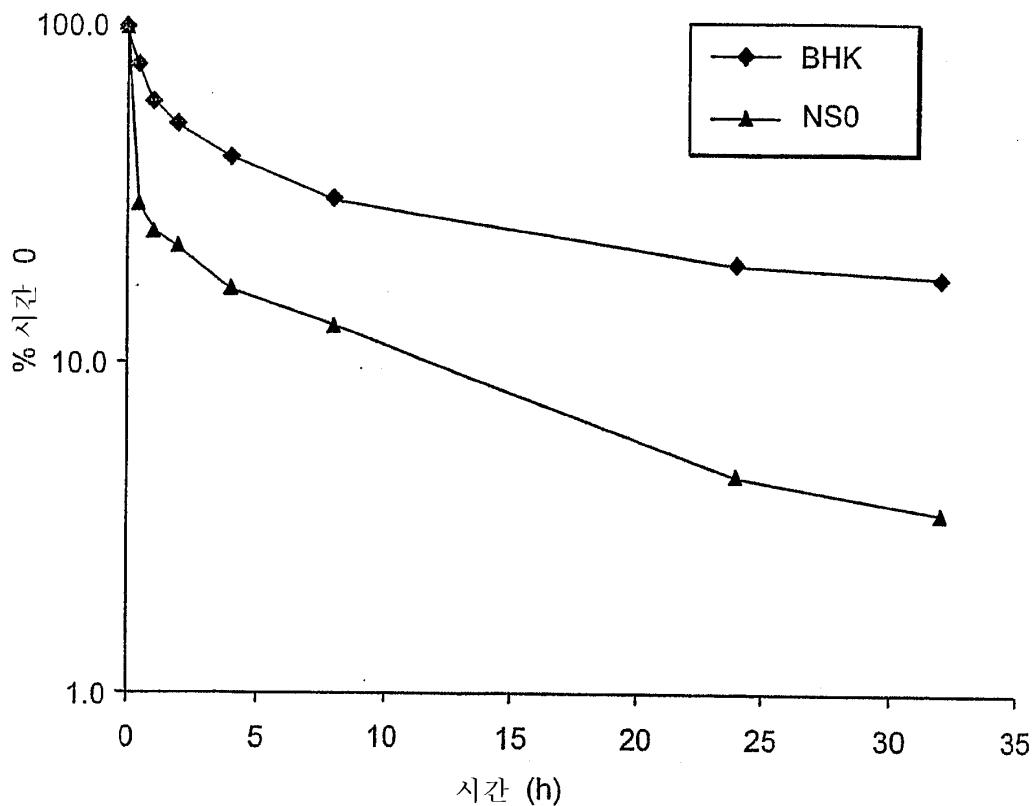
성숙한 huFc-EPO를 코딩하는 혼선 서열:
huFc-EPO(FN > AQ)-M1-EPO

GAGCCCCAAATCTTCTGACAAAACCTCACACATGCCAACCGTAGGTTAGGGCCCTAGGTCAGGTGGCTCATCAGGGACAGGCCAGCTGCCCTC
 CAGCTCAAGGGGGGAGCAGGGCCCTAGGATAGCCTGCATCCAGGGACGGCCAGCTGGCTGCTGACACG
 TCCACCTCCATCTTCTCAGCACCACTGTGGCAGGACGGTCAAGTCTTCCCCAANACCAA
 GGACACCCCTCATGATCTCCGGAACCCCTGAGGTCAAGTGGCTGAGGGTGCATTAATGCCAAGACAAAGCCACGGGAGGCAG
 AGGTCAGTTCAACTGGTACGGTGGAGGTGCATTAATGCCAAGACAAAGCCACGGGAGGCAG
 GCCCAGAGCACGGTCCGGTCAAGGTGGCTCACCGTTCAACGGTGGCTGACCCAGGACTGGCTGAAAGGAGTA
 CAAGTGCAGGGTCTCCAACAAAGGCCACATGGACAGGGCCGGCTGGCCACCCCTCTGGGAGTGACGGCTGT
 CCCGGGGATATGAGGGCCACATGGACAGGGCCGGCTGGCCACCCCTGACACGGTGTACACGGTGGCTGT
 GCCAACCTCTGTCCCTACAGGGAGCCCCGAGAACACACAGGTGACACCTGGCTGGGACTCAGGGGAGGA
 TGACCAAGAACCCAGGTAGCCTGACCTGGCTGGTCAAAAGGCTTCTACCCCAAGGACATCGCCGTGGAGTGG
 GAGAGCAATGGGAGCCCCGGAGAACAAACTACAAGAACACACCTCCCATTGGACTCCGACGGCTCCCTCT
 CCTCTACAGCPAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGAGGGAAAGCTCCATGCTCCGTGATGC
 ATGAGGCTCTGCACAACCAACTACACGGAGAAGGGTACCTCTGGAGGGCCAAAGGGCCGAGAATATCACGACGGGCTG
 ATCTGTGACAGCCGAGTGGTGGAGGGTAACTCACCGTGCCTGACACCAAGTGAATTCTATGCTGGAAAGA
 TGCTGAACACTGCAGCTGAATGAGAACATCACCGTGCCTGACACCAAGTGAATTCTATGCTGGAAAGA
 ATGAGGCTGGCAGGGCGTAGAAGTGTGGCAGGGCTGGCCCTGGAGGGCCGAGAATATCACGACGGGCTG
 GGATGGGGTTGGCTGGCCCTGGTGGTCAACTCTCCAGCCCTGGAGGGCTGGCAACTGCAATGTGGATAAGCCGTGAG
 GGCCAGGGCCCTGTTGGTCAACTCTCCAGCCCTGGAGGGCTGGCAACTGCAATGTGGATAAGCCGTGAG
 TGGCCTCGAGGCTCACCACTCTGGAGGGCTGGAGGGCCAGAAGGAAGGCCATCTCCCCCTCCAGATG
 CGGCCTCAGGCTGGCTCCGCAAAACTGACTGCTGACACTTCCGCAAAACTCTGGAGGGACAGGGACAGATGA
 TTCCTCGGGAAAAGCTGAAGGCTGTACACAGGGAGGGCTGGGGACAGGGACAGATGA

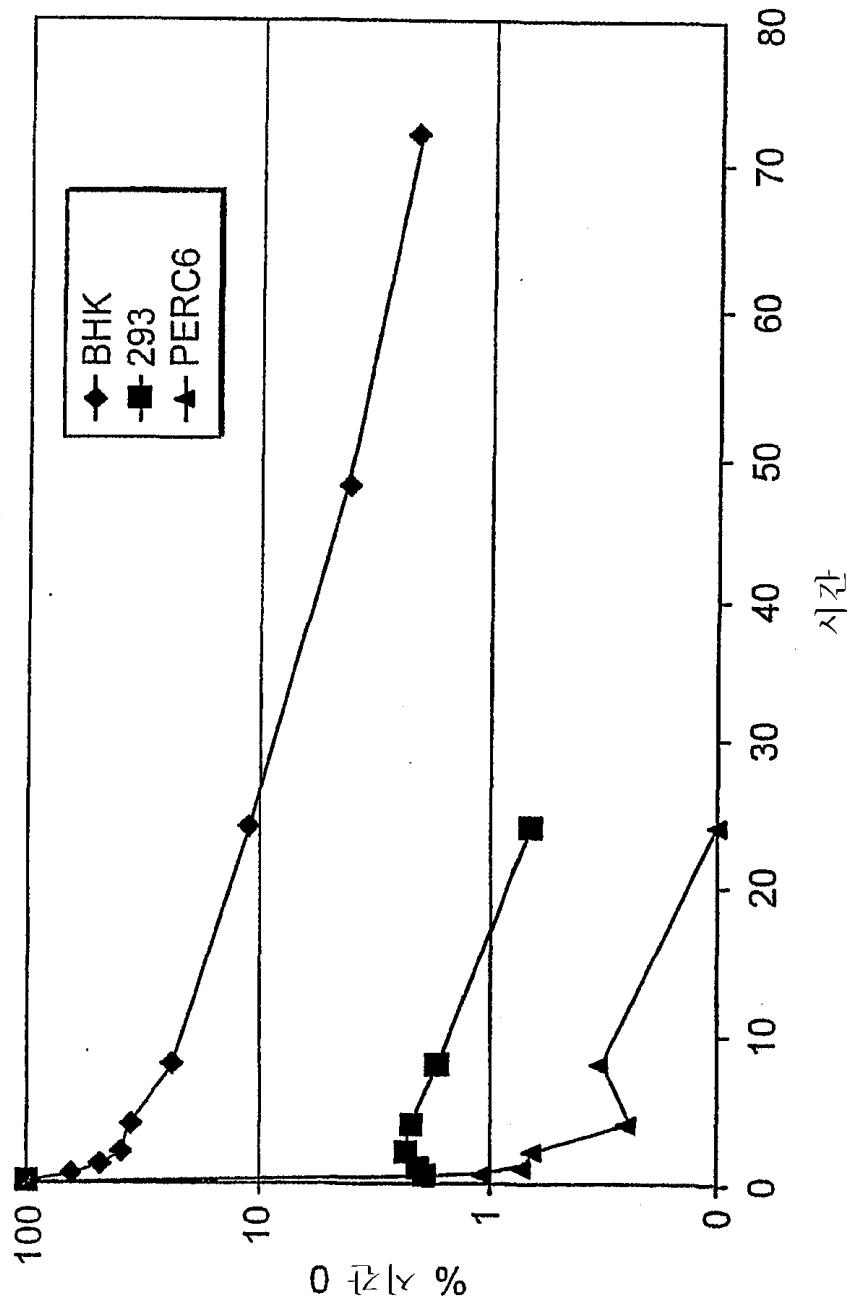
도면8



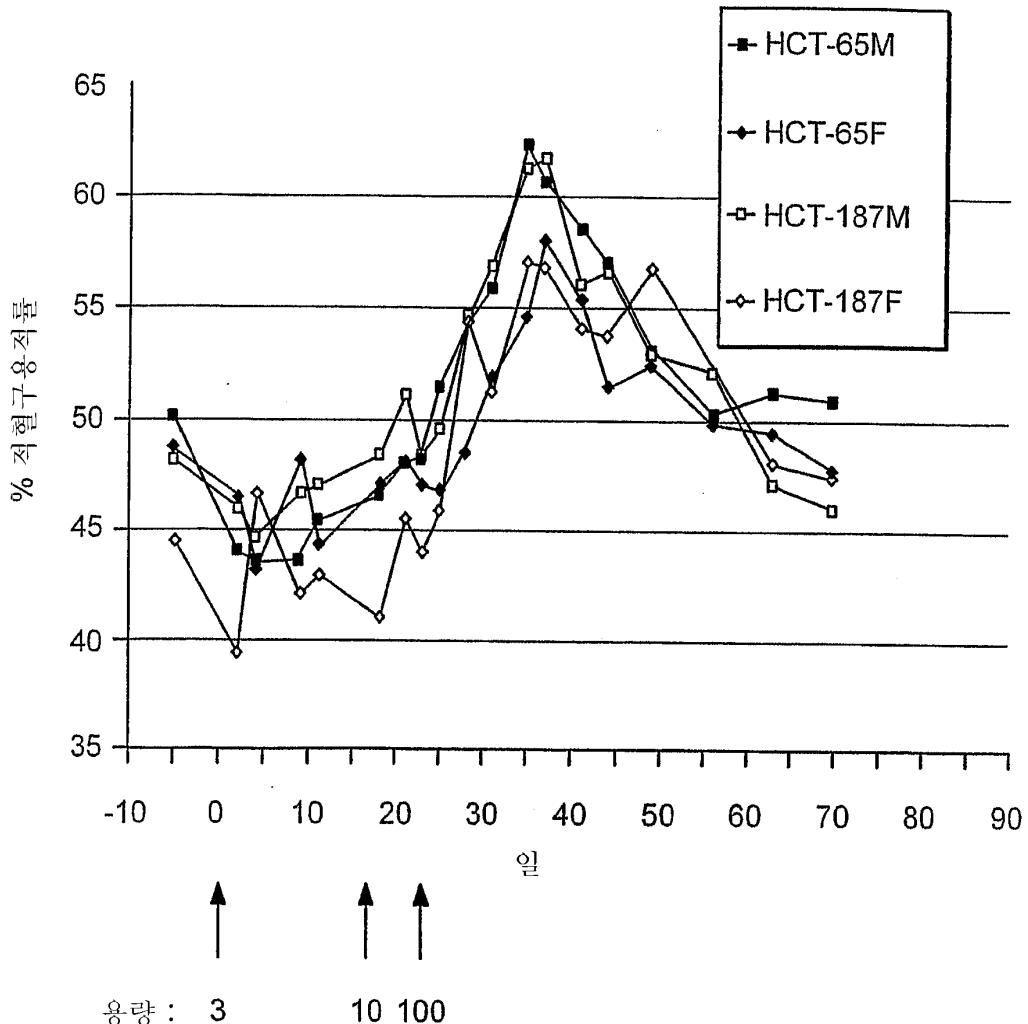
도면9



도면10



도면11



서열목록

- <110> Gillies, Stephen D.
Lauder, Scott
- <120> Fc-ERYTHROPOIETIN FUSION PROTEIN WITH IMPROVED PHARMACOKINETICS
- <130> LEX-027
- <150> US 60/533,858
<151> 2003-12-31
- <160> 24
- <170> PatentIn version 3.3
- <210> 1
<211> 501
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>

<223> An exemplary codon-optimized nucleic acid sequence encoding an erythropoietin portion.

<400> 1

gccccaccac gcctcatctg tgacagccga gtgctggaga ggtaccttt ggaggccaag	60
gaggccgaga atatcacgac cggctgtgct gaacactgca gcttgaatga gaacatcacc	120
gtgcctgaca ccaaagtcaa tttctatgcc tggaagagga tggaggttgg ccagcaggcc	180
gtagaagtgt ggcagggcct ggccctgctg tcggaagctg tcctgcgggg ccaggccctg	240
ttggtaact cttcccagcc gtgggagccc ctgcaactgc atgtggataa agccgtgagt	300
ggccttcgca gcctcaccac tctgcttcgg gctctggag cccagaagga agccatctcc	360
cctccagatg cggcctcagc tgctccctc cgacaaatca ctgctgacac tttccgcaaa	420
ctcttccgag tctactccaa ttccctccgg ggaaagctga agctgtacac aggggaggcc	480
tgccggacag gggacagatg a	501

<210> 2

<211> 1409

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> An exemplary nucleic acid sequence encoding a mature Fc-EPO protein without a leader sequence.

<400> 2

gagccaaat cttctgacaa aactcacaca tgcccaccgt gcccaggtaa gccagcccg	60
gcctcgccct ccagctcaag gcgggacagg tgcccttagag tagcctgcat ccagggacag	120
gccccagctg ggtgctgaca cgtccaccc catctttcc tcagcaccac ctgtggcagg	180
accgtcagtc ttccctttcc cccaaaacc caaggacacc ctcatgatct cccggacccc	240
tgaggtcacg tgcgtgggg tggacgtgag ccacgaagac cccgaggtcc agttcaactg	300
gtacgtggac ggcgtggagg tgcataatgc caagacaaag ccacgggagg agcaggccca	360
gagcacgttc cgtgtggta gcgtcctcac cggtgtgcac caggactggc tgaacggcaa	420
ggagtacaag tgcaaggct ccaacaaagg cctccagcc cccatcgaga aaaccatctc	480

caaaaacaaa	ggtgggaccc	gcgggtatg	agggccacat	ggacagaggg	cggctcgccc	540
caccctctgc	cctgggagtg	accgctgtgc	caacctctgt	ccctacaggg	cagccccgag	600
aaccacaggt	gtacaccctg	cccccatcac	gggaggagat	gaccaagaac	caggtcagcc	660
tgacctgcct	ggtcaaaggc	ttctaccca	gcgacatcgc	cgtggagtgg	gagagcaatg	720
ggcagccgga	gaacaactac	aagaccacac	ctcccatgct	ggactccgac	ggctccttct	780
tcctctacag	caagctcacc	gtggacaaga	gcaggtggca	gcagggaaac	gtttctcat	840
gctccgtat	gcatgaggct	ctgcacaacc	actacacgca	gaagagcgcc	accgcgaccc	900
ccccgcggc	cccaccacgc	ctcatctgtg	acagccgagt	gctggagagg	tacctttgg	960
aggccaagga	ggccgagaat	atcacgaccg	gctgtgctga	acactgcagc	ttgaatgaga	1020
acatcaccgt	gcctgacacc	aaagtgaatt	tctatgcctg	gaagaggatg	gaggttggcc	1080
agcaggccgt	agaagtgtgg	cagggcctgg	ccctgctgtc	ggaagctgtc	ctgcggggcc	1140
aggccctgtt	ggtcaactct	tcccagccgt	gggagccct	gcaactgcat	gtggataaag	1200
ccgtgagtg	ccttcgcagc	ctcaccactc	tgcttcgggc	tctggagcc	cagaaggaag	1260
ccatctcccc	tccagatgcg	gcctcagctg	ctccctccg	cacaatcact	gctgacactt	1320
tccgcaaact	cttccgagtc	tactccaatt	tcctccgggg	aaagctgaag	ctgtacacag	1380
gggaggcctg	ccggacaggg	gacagatga				1409

<210> 3
<211> 514
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> An example of coding sequences of mature human erythropoietin with modified codons to optimize translation.

<400> 3	cccgggtgcc	ccaccacgac	tcatctgtga	cagccgagtg	ctggagaggt	acctttggaa	60
ggccaaggag	gccgagaata	tcacgaccgg	ctgtgctgaa	cactgcagct	tgaatgagaa		120
catcaccgtg	cctgacacca	aagtgaattt	ctatgcctgg	aagaggatgg	aggttggcca		180
gcaggccgta	gaagtgtggc	agggcctggc	cctgctgtcg	gaagctgtcc	tgccggggcca		240

ggccctgttg gtcaactctt cccagccgtg ggagccccctg caactgcattg tggataaaagc 300
 cgtgagtggc cttcgcagcc tcaccactct gcttcgggct ctgggagccc agaaggaagc 360
 catctccctt ccagatgcgg cctcagctgc tcccctccgc acaatcactg ctgacacttt 420
 ccgcaaactc ttccgagtct actccaattt cctccgggaa aagctgaagc tgtacacagg 480
 ggaggcctgc cggacagggg acagatgact cgag 514

<210> 4
 <211> 166
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Human erythropoietin protein sequence with substitutions
 His32Gly, Cys33Pro, Trp88Cys, and Pro90Ala.

<400> 4
 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 Gly
 20 25 30
 Pro 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 Cys Glu Gly 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> 5
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> An exemplary sequence at the junction of the CH3 C-terminus and the EPO N-terminus.

<400> 5
Thr Gln Lys Ser Ala Thr Ala Thr Pro Gly Ala Ala Pro Pro Arg Leu
1 5 10 15

Ile

<210> 6
<211> 8
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 6
Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5

<210> 7
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> An altered IgG2 CH3 region.

<400> 7
Lys Ser Ala Thr Ala Thr Pro Gly
1 5

<210> 8
<211> 35
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> A primer suitable for amplifying Hygromycin B gene.

<400> 8
gctagttgg tgccctcatg aaaaaggctg aactc 35

<210> 9
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> A primer for amplifying Hygromycin B gene.

<400> 9
atgcatttcag ttagcctccc ccata 25

<210> 10
<211> 28
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> A mutagenic primer leading to a double amino acid substitution,
"FN>AQ", within the Gln-Phe-Asn-Ser amino acid sequence within
the CH2 domain of the IgG2 heavy chain.

<400> 10
agcaggccca gagcacgttc cgttggt 28

<210> 11
<211> 28
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> A mutagenic primer leading to a double amino acid substitution,
"FN>AQ", within the Gln-Phe-Asn-Ser amino acid sequence within
the CH2 domain of the IgG2 heavy chain.

<400> 11
gaaacgtgctc tggggctgct cctcccggt 28

<210> 12
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>

<223> A downstream primer containing a Sac II site.

<400> 12

ccccgcgggt cccaccttg g

21

<210> 13

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> An upstream primer containing a Pvu II site.

<400> 13

cccagctggg tgctgacacg t

21

<210> 14

<211> 397

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> An amino acid sequence of Fc-EPO containing FN>AQ mutations.

<400> 14

Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala

1

5

10

15

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

Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg
 115 120 125
 Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys
 130 135 140
 Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
 145 150 155 160
 Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
 165 170 175
 Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
 180 185 190
 Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser
 195 200 205
 Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
 210 215 220
 Ala Thr Ala Thr Pro Gly Ala Ala Pro Pro Arg Leu Ile Cys Asp Ser
 225 230 235 240
 Arg Val Leu Glu Arg Tyr Leu Leu Glu Ala Lys Glu Ala Glu Asn Ile
 245 250 255
 Thr Thr Gly Cys Ala Glu His Cys Ser Leu Asn Glu Asn Ile Thr Val
 260 265 270
 Pro Asp Thr Lys Val Asn Phe Tyr Ala Trp Lys Arg Met Glu Val Gly
 275 280 285
 Gln Gln Ala Val Glu Val Trp Gln Gly Leu Ala Leu Leu Ser Glu Ala
 290 295 300
 Val Leu Arg Gly Gln Ala Leu Leu Val Asn Ser Ser Gln Pro Trp Glu
 305 310 315 320
 Pro Leu Gln Leu His Val Asp Lys Ala Val Ser Gly Leu Arg Ser Leu
 325 330 335
 Thr Thr Leu Leu Arg Ala Leu Gly Ala Gln Lys Glu Ala Ile Ser Pro
 340 345 350
 Pro Asp Ala Ala Ser Ala Ala Pro Leu Arg Thr Ile Thr Ala Asp Thr
 355 360 365
 Phe Arg Lys Leu Phe Arg Val Tyr Ser Asn Phe Leu Arg Gly Lys Leu
 370 375 380
 Lys Leu Tyr Thr Gly Glu Ala Cys Arg Thr Gly Asp Arg
 385 390 395

<210> 15
<211> 397
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> The amino acid sequence of Fc-EPO(NDS) encoded by
pdC10-huFcg2h(FN>AQ)-M1-EPO.

<400> 15
Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala
1 5 10 15
Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
20 25 30
Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
35 40 45
Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp
50 55 60
Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Ala
65 70 75 80
Gln Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Val His Gln Asp
85 90 95
Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu
100 105 110
Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg
115 120 125
Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys
130 135 140
Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
145 150 155 160
Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
165 170 175
Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
180 185 190
Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser
195 200 205
Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser

210	215	220
Ala Thr Ala Thr Pro Gly Ala Ala Pro Pro Arg Leu Ile Cys Asp Ser		
225	230	235 240
Arg Val Leu Glu Arg Tyr Leu Leu Glu Ala Lys Glu Ala Glu Asn Ile		
245	250	255
Thr Thr Gly Cys Ala Glu Gly Pro Ser Leu Asn Glu Asn Ile Thr Val		
260	265	270
Pro Asp Thr Lys Val Asn Phe Tyr Ala Trp Lys Arg Met Glu Val Gly		
275	280	285
Gln Gln Ala Val Glu Val Trp Gln Gly Leu Ala Leu Leu Ser Glu Ala		
290	295	300
Val Leu Arg Gly Gln Ala Leu Leu Val Asn Ser Ser Gln Pro Cys Glu		
305	310	315 320
Ala Leu Gln Leu His Val Asp Lys Ala Val Ser Gly Leu Arg Ser Leu		
325	330	335
Thr Thr Leu Leu Arg Ala Leu Gly Ala Gln Lys Glu Ala Ile Ser Pro		
340	345	350
Pro Asp Ala Ala Ser Ala Ala Pro Leu Arg Thr Ile Thr Ala Asp Thr		
355	360	365
Phe Arg Lys Leu Phe Arg Val Tyr Ser Asn Phe Leu Arg Gly Lys Leu		
370	375	380
Lys Leu Tyr Thr Gly Glu Ala Cys Arg Thr Gly Asp Arg		
385	390	395

<210> 16
<211> 4
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 16
Gln Phe Asn Ser
1

<210> 17
<211> 4
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> An CH2 domain derived from a human IgG2 or IgG4 heavy chain.

<400> 17
Gln Ala Gln Ser
1

<210> 18
<211> 6
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 18
Pro Lys Ser Cys Asp Lys
1 5

<210> 19
<211> 6
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> An altered IgG1 hinge region.

<400> 19
Pro Lys Ser Ser Asp Lys
1 5

<210> 20
<211> 4
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 20
Leu Ser Leu Ser
1

<210> 21
<211> 4
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> An altered IgG sequence

<400> 21
Ala Thr Ala Thr
1

<210> 22
<211> 330
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 22
Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
1 5 10 15
Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
20 25 30
Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
35 40 45
Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
50 55 60
Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
65 70 75 80
Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
85 90 95
Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
100 105 110
Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
115 120 125
Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
130 135 140
Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
145 150 155 160
Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
165 170 175
Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
180 185 190
His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
195 200 205
Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
210 215 220
Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu
225 230 235 240

Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
 245 250 255

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
 260 265 270

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
 275 280 285

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
 290 295 300

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
 305 310 315 320

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 325 330

<210> 23

<211> 326

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 23

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg
 1 5 10 15

Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
 20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
 35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
 50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Asn Phe Gly Thr Gln Thr
 65 70 75 80

Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
 85 90 95

Thr Val Glu Arg Lys Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
 100 105 110

Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp
 115 120 125

Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp
 130 135 140

Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly
145 150 155 160

Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn
165 170 175

Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp
180 185 190

Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro
195 200 205

Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu
210 215 220

Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn
225 230 235 240

Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile
245 250 255

Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr
260 265 270

Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys
275 280 285

Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys
290 295 300

Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu
305 310 315 320

Ser Leu Ser Pro Gly Lys
325

<210> 24

<211> 327

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 24

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg
1 5 10 15

Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
 50 55 60
 Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr
 65 70 75 80
 Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
 85 90 95
 Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Ser Cys Pro Ala Pro
 100 105 110
 Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
 115 120 125
 Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
 130 135 140
 Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp
 145 150 155 160
 Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe
 165 170 175
 Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
 180 185 190
 Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu
 195 200 205
 Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
 210 215 220
 Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys
 225 230 235 240
 Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
 245 250 255
 Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
 260 265 270
 Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
 275 280 285
 Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser
 290 295 300
 Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
 305 310 315 320
 Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
 325