



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2021년04월12일

(11) 등록번호 10-2238317

(24) 등록일자 2021년04월05일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 47/50 (2017.01) **A61K 31/40** (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01) **A61K 9/08** (2006.01)
- (52) CPC특허분류
A61K 47/50 (2017.08)
A61K 31/40 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2020-7018040(분할)
- (22) 출원일자(국제) 2013년03월14일
 심사청구일자 2020년07월21일
- (85) 번역문제출일자 2020년06월22일
- (65) 공개번호 10-2020-0077616
- (43) 공개일자 2020년06월30일
- (62) 원출원 특허 10-2014-7035387
 원출원일자(국제) 2013년03월14일
 심사청구일자 2018년03월13일
- (86) 국제출원번호 PCT/US2013/031788
- (87) 국제공개번호 WO 2013/172967
 국제공개일자 2013년11월21일
- (30) 우선권주장
 61/648,516 2012년05월17일 미국(US)
 (뒷면에 계속)
- (56) 선행기술조사문헌
 US20020136731 A1
 US19935232836 A1
- (73) 특허권자
 익스텐드 바이오사이언시즈, 인크.
 미국 02458 매사추세츠주 뉴턴 브리지 스트리트
 90 스위트 100
- (72) 발명자
 솔리맨 데이릭 엠.
 미국 02140 매사추세츠주 캠브리지 피오 박스
 400927
 헤일즈 라우라 엠.
 미국 02140 매사추세츠주 캠브리지 피오 박스
 400927
 (뒷면에 계속)
- (74) 대리인
 김진희, 김태홍

전체 청구항 수 : 총 18 항

심사관 : 이재정

(54) 발명의 명칭 개선된 약물 전달용 캐리어

(57) 요약

본 발명은 치료 화합물의 흡수, 반감기 또는 생체이용률을 증강시키는 캐리어를 제공한다. 캐리어는 비타민 D 결합 단백질(DBP)에 결합하는 표적화기, 상기 표적화기를 치료 화합물에 커플링시키기 위한 접합기 및 임의로 스캐폴딩 모이어티를 포함한다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

A61K 39/395 (2013.01)

A61K 9/08 (2013.01)

Y10S 514/886 (2013.01)

(72) 발명자

사드 호워드 피.

미국 01801 매사추세츠주 워번 살렘 스트리트 240

어메르 무칸티

미국 01801 매사추세츠주 워번 살렘 스트리트 240

(30) 우선권주장

61/673,874 2012년07월20일 미국(US)

61/780,346 2013년03월13일 미국(US)

명세서

청구범위

청구항 1

- (a) 서열번호 5와 90% 이상의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 그렐린 활성을 갖는 단백질,
 - (b) 상기 단백질에 접합된 폴리(에틸렌 글리콜) 스캐폴드 (PEG),
 - (c) 상기 PEG에 안정적으로 접합된 세코스테로이드 비타민 D, 및
 - (d) 약제학적으로 허용되는 부형제
- 를 포함하는 조성물로서,

상기 비타민 D는 환자의 혈청 내 비타민 D 결합 단백질(DBP)에 결합하고, 상기 결합은 상기 환자의 순환 혈청 내에서 상기 그렐린 단백질의 흡수, 생체이용률 또는 반감기를, 비접합된 그렐린 단백질에 비해 증가시키는 것인 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 PEG가 약 500 Da. 내지 5,000 Da.인 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 단백질이 서열번호 5의 서열을 갖는 것인 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 비타민 D가 티올 결합, 아마이드 결합, 옥심 결합, 하이드라존 결합 및 티아졸리디논 결합으로 이루어진 그룹 중에서 선택되는 결합에 의해 상기 그렐린 단백질에 연결되는 것인 조성물.

청구항 5

- (a) 서열번호 2와 90% 이상의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 섬유아세포 성장 인자 21(FGF21) 활성을 갖는 단백질,
 - (b) 상기 단백질에 접합된 폴리(에틸렌 글리콜) 스캐폴드 (PEG),
 - (c) 상기 PEG에 안정적으로 접합된 세코스테로이드 비타민 D, 및
 - (d) 약제학적으로 허용되는 부형제
- 를 포함하는 조성물로서,

상기 비타민 D는 환자의 혈청 내 비타민 D 결합 단백질(DBP)에 결합하고, 상기 결합은 상기 환자의 순환 혈청 내에서 상기 FGF21 단백질의 흡수, 생체이용률 또는 반감기를, 비접합된 FGF21 단백질에 비해 증가시키는 것인 조성물.

청구항 6

제5항에 있어서, 상기 PEG가 약 500 Da. 내지 5,000 Da.인 조성물.

청구항 7

제5항에 있어서, 상기 FGF21 단백질이 서열번호 2의 서열을 갖는 것인 조성물.

청구항 8

제5항에 있어서, 상기 비타민 D가 티올 결합, 아마이드 결합, 옥심 결합, 하이드라존 결합 및 티아졸리디논 결합으로 이루어진 그룹 중에서 선택되는 결합에 의해 상기 FGF21 단백질에 연결되는 것인 조성물.

청구항 9

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 환자에서 식욕을 자극하거나 또는 성장 호르몬의 방출을 유발하기 위한 것인 조성물.

청구항 10

제5항 내지 제8항 중 어느 한 항에 있어서, 환자에서 지방세포에 의한 글루코즈 흡수를 촉진하기 위한 것인 조성물.

청구항 11

제1항 내지 제8항 중 어느 한 항에 있어서, 경피, 경구, 비경구, 피하, 피내, 정맥내, 근육내, 관절내, 활막내, 흉골내, 경막내, 병변내, 두개내 주사, 주입, 흡입, 눈, 국소, 직장, 코, 볼, 설하, 질 또는 이식 저장기 모드에 의해 환자에게 전달하기 위한 것인 조성물.

청구항 12

제1항 내지 제8항 중 어느 한 항에 있어서, 의약이 필요한 환자의 치료용 의약의 제조를 위한 것인 조성물.

청구항 13

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항의 조성물을 제조하는 방법으로서, 상기 PEG 상의 반응성 커플링기를 사용하여 상기 비타민 D를 상기 그렐린 단백질에 접합시키는 단계를 포함하는 방법.

청구항 14

제13항에 있어서, 상기 커플링기는 아민-반응기, 티올-반응기, 말레이미드기, 티올기, 알데하이드기, N-하이드록시숙신이미드(NHS)-에스테르기, 할로아세틸기, 요오도아세틸기, 브로모아세틸기, 숙신이미딜 4-(N-말레이미도메틸)시클로헥산-1-카르복실레이트(SMCC)기, 설폰 SMCC기, 카보디이미드기, 이작용성 가교-링커, NHS-말레이미도 및 이의 조합으로 이루어진 그룹 중에서 선택되는 것인 방법.

청구항 15

제13항에 있어서, 상기 접합 단계는 고리 첨가 반응에 의해 달성되는 것인 방법.

청구항 16

제5항 내지 제8항 중 어느 한 항의 조성물을 제조하는 방법으로서, 상기 PEG 상의 반응성 커플링기를 사용하여 상기 비타민 D를 상기 FGF21 단백질에 접합시키는 단계를 포함하는 방법.

청구항 17

제16항에 있어서, 상기 커플링기는 아민-반응기, 티올-반응기, 말레이미드기, 티올기, 알데하이드기, N-하이드록시숙신이미드(NHS)-에스테르기, 할로아세틸기, 요오도아세틸기, 브로모아세틸기, 숙신이미딜 4-(N-말레이미도메틸)시클로헥산-1-카르복실레이트(SMCC)기, 설폰 SMCC기, 카보디이미드기, 이작용성 가교-링커, NHS-말레이미도 및 이의 조합으로 이루어진 그룹 중에서 선택되는 것인 방법.

청구항 18

제16항에 있어서, 상기 접합 단계는 고리 첨가 반응에 의해 달성되는 것인 방법.

청구항 19

삭제

청구항 20

삭제

청구항 21

삭제

청구항 22

삭제

청구항 23

삭제

청구항 24

삭제

청구항 25

삭제

청구항 26

삭제

청구항 27

삭제

청구항 28

삭제

청구항 29

삭제

청구항 30

삭제

청구항 31

삭제

청구항 32

삭제

청구항 33

삭제

청구항 34

삭제

청구항 35

삭제

청구항 36

삭제

청구항 37

삭제

청구항 38

삭제

청구항 39

삭제

청구항 40

삭제

청구항 41

삭제

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명의 분야는 생체내에서의 약동학적 특성을 개선함으로써 치료 화합물의 효능, 흡수, 생체이용률 또는 순환 반감기를 증가시키기 위한 치료 화합물의 조성물 및 캐리어, 접합체, 융합물 또는 제형의 일반적 용도를 제공한다.

배경 기술

[0002] 본 발명은 치료 화합물의 효능, 흡수 또는 약동학적 특성을 개선하는 것에 관한 것이다. 폴리(에틸렌 글리콜) 또는(PEG)의 첨가는, 신장 청소(kidney clearance)를 감소시키고, 응집을 감소시키며, 잠재적으로 바람직하지 않은 면역 인식을 감소시킴으로써 일부 화합물의 반감기를 증가시키는 공지된 방법이다[Jain, *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.* 25:403-447(2008)]. PEG는 전형적으로 순환시 반감기를 극대화시키기 위해 상당히 큰 크기(20 내지 40 kDa)로 사용된다. 이는 화합물에 부착되는 단일한 큰 PEG 또는 다수의 보다 작은 PEG를 사용하여 달성될 수 있다[Clark 등 *J. Biol. Chem.* 271:21969-21977(1996); Fishburn, *J. Pharm. Sci.* 97:4167-4183(2008)].

[0003] 약물은 임의의 의약 효과가 일어날 수 있기 전에 흡수되어야 하기 때문에 약물 개발 및 의약 화학에서는 흡수가 제1 주안점이다. 약물의 약동학 프로파일은 많은 요인들에 의해 영향을 받을 수 있다. 또한, 치료 화합물의 흡수 특성은 화합물마다 상당히 다양하다. 일부 치료 화합물은 경구 또는 피부 투여 후 저조하게 흡수된다. 다른 치료 화합물, 예를 들어, 대부분의 펩타이드- 및 단백질-기반 치료제들은 경구로 투여될 수 없다. 다른 투여 경로, 예를 들어, 정맥내, 피하 또는 근육내 주사가 일부 화합물에 대해 일상적으로 이용된다; 그러나, 이들 경로들은 종종 흡수를 더디게 하며 치료 화합물들을 이들을 분해시킬 수 있는 효소에 노출시킴으로써 효능 달성에 훨씬 더 높은 용량이 필요해진다.

[0004] 다수의 펩타이드가 치료적으로 유망한 것으로 확인되었다. 펩타이드 및 단백질의 화학적 및 생물학적 특성은 이들을 치료 화합물로서 사용하기 위한 매력적인 후보물이 되도록 한다. 펩타이드 및 단백질은 아미노산으로 이루어진 천연 발생 분자이며 다수의 생리학적 과정에 관여한다. 펩타이드 및 단백질은 높은 선택도 및 효능을 나타내며, 잠재적으로 유해한 약물-약물 상호작용 또는 다른 부정적 부작용을 겪지 않을 수 있다. 따라서, 펩타이드 및 단백질은 매우 다양하고 매우 효과적이며 매우 선택적인 부류의 저독성 치료 화합물로서 매우 유망하다. 그러나, 펩타이드 및 단백질은 짧은 생체내 반감기를 가질 수 있다. 이러한 펩타이드의 경우, 반감기는 단지 수 분일 수 있다. 이는 이들을 일반적으로 치료 투여를 위해 천연 형태로 사용할 수 없게 할 수 있다. 또한, 펩타이드는 짧은 작용 기간 또는 저조한 생체이용률을 가질 수 있다.

[0005] 섬유아세포 성장 인자 21(서열번호 2)은 혈청 내에서 순환하는 단백질이다. *FGF21* 유전자에 의해 암호화되는 경우, 이는 FGF19 및 FGF23을 포함하는 비전형적 섬유아세포 성장 인자(FGF) 패밀리 구성원이다. 이는 통상의 FGF 헤파린-결합 도메인이 없다. FGF 패밀리 구성원은 광범위한 분열촉진 및 세포 생존 활성을 가지며 배아 발

달, 세포 성장, 형태형성, 조직 복구, 종양 성장 및 침습을 포함한 다양한 생물학적 과정에 관여한다. FGF21은 HMGS2 활성화에 의해 특이적으로 유도된다. FGF21은 지방세포에서는 글루코즈 흡수를 자극하나 다른 세포 유형에서는 그렇지 않다. 이러한 효과는 인슐린 활성화에 대해 부가적인 것이다.

[0006] 시험관내 연구는 FGF21이 다른 FGFR 이소타입을 포함하는 것보다 FGFR1c/b-Klotho 수용체 복합체에 더 잘 결합한다는 것을 나타낸다[Kliwer and Mangelsdorf, *Am. J. Clin. Nutr.* 91:254S-257S(2010)]. FGF21은 시험관내에서 지방세포에 의한 글루코즈 흡수를 촉진한다. 당뇨병 동물에 대한 FGF21의 투여는 순환하는 글루코즈 수준을 낮추지만, 과량의 FGF21은 과량의 인슐린 투여에서 보여지는 바와 같은 저혈당을 유발하지는 않는다[Kharitonov and Shanafelt, *Curr. Opin. Investig. Drugs* 10:359-364(2009)]. 따라서, FGF21은 당뇨병 치료에 대해 유망한 치료 단백질이다. 그러나, FGF21은 동물 모델에서 치료 이점을 조사하기 위해 자주 투여되었다[Kharitonov 등, *J. Clin. Invest.* 115:1627-1635(2005)]. 천연 상태의 FGF21은 혈청 내에서 매우 짧은 반감기(1.1시간)를 가지므로 천연 상태의 FGF21의 외래적 첨가를 치료로서 임상적으로 실현가능하지 않게 한다[W003/011213 참조]. 또한, FGF21은 피하 주사시 저조한 생체이용률을 나타낸다. 비교 약동학 연구에서, 1 mg/kg의 FGF21을 정맥내(IV) 또는 피하(SC) 주사하였으며, FGF21의 농도를 시간 경과에 따라 분석하였다. 그 결과, 피하 투여 경로를 이용한 생체이용률(Cmax 73 nM)은 정맥내 경로(Cmax 1890 nM)와 비교하여 상당한 감소를 나타내었다(문헌[Xu J 등, 2009. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 297: E1105 E1114]의 표 1 참조). 상기 참조 문들은 이들의 전문이 참조로 본원에 포함된다.

[0007] 그렐린 펩타이드(서열번호 5)는 포유동물의 위로부터 천연적으로 분비되어 순환되며 식욕 및 성장 호르몬 방출을 자극한다. 그렐린은 세포 수용체 GHS-R을 통해 뇌하수체로부터 성장 호르몬(GH)의 방출을 자극하며 에너지 항상성에 중요한 역할을 한다. 또한, 그렐린은 중추 신경계에 직접적으로 작용하여 교감 신경 활성을 감소시킨다. 그렐린 수용체(GHS-R)는 시상하부-뇌하수체 단위에 농축된다. GHS-R은 심장, 폐, 간, 신장, 췌장, 위, 소장, 대장, 지방 및 면역 세포를 포함한 말초 조직에 분포된다.

[0008] 그렐린은 암과 같은 만성 질환으로부터 초래된 악액질 또는 불수의 체중 손실을 겪는 환자에서 체중 및 마른 체중을 늘리기 위해 치료학적으로 사용되어 왔다[Hiura 등, *Cancer* Jan 26, 2012, <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/cncr.27430/abstract>]. 그러나, 그렐린은 사람에서 천연적으로 11분의 짧은 반감기를 가지므로[Akamizu 등, *Eur J Endocrinol* 150:447-55(2004)], 치료 효과를 나타내기 위해서는 자주 투여되어야 한다.

[0009] 인플릭시마브[Remicade, Janssen Biotech Inc., U.S. Pat. Nos. US 5,919,452 및 US 2002/0141996, 이들의 전문이 참조로 본원에 포함됨]는 자가면역 질환을 치료하는데 사용되는 종양 괴사 인자 알파(TNF- α , 서열번호 10)에 결합하는 모노클로날 항체이다. 인플릭시마브는 건선, 크론 질환, 강직성 척추염, 건선 관절염, 류마티스 관절염 및 궤양성 결장염의 치료를 위해 미국 식약청(FDA)에 의해 승인되었다. TNF- α 는 화학적 매신저(사이토킨)이고 자가면역 반응의 중요한 요소이다. 인플릭시마브는 의료 전문가에 의해 정맥내 투여되며 피하 투여는 승인되지 않는다.

발명의 내용

해결하려는 과제

과제의 해결 수단

[0010] 본 발명은 치료 화합물의 흡수, 안정성, 반감기, 효과 지속, 효능 또는 생체이용률을 증진시키는 캐리어를 제공한다. 캐리어는 비타민 D 결합 단백질(DBP)에 결합하는 표적화기, 표적화기를 치료 화합물에 커플링시키기 위한 접합기 및 임의의 스캐폴딩 모이어티를 포함한다.

[0011] 본 발명의 실시형태에서, 표적화기는 비타민 D, 비타민 D 유사체, 비타민 D-관련 대사물, 비타민 D-관련 대사물의 유사체, DBP에 결합하는 펩타이드, 항-DBP 항체, 항-DBP 항체 유도체, DBP에 결합하는 뉴클레오타이드 압타머 또는 DBP에 결합하는 탄소-기반 소분자이다.

[0012] 또 다른 실시형태에서, 커플링기는 아민-반응기, 티올-반응기, 말레이미드기, 티올기, 알데하이드기, NHS-에스테르기, 4-니트로페닐 에스테르, 아실이미다졸, 할로아세틸기, 요오도아세틸기, 브로모아세틸기, SMCC기, 설포 SMCC기, 카보디이미드기 및 이작용성 가교-링커, 예를 들어, NHS-말레이미드, 또는 이의 조합이다. 본 발명의

커플링기는 캐리어 또는 표적화기를 치료 화합물에 커플링시키기 위해 티올 결합, 아미드 결합, 옥심 결합, 하이드라존 결합, 티아졸리디논 결합을 촉진하거나 고리 첨가 반응(예: 클릭 화학)을 사용할 수 있다.

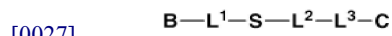
- [0013] 또 다른 실시형태에서, 약제학적 캐리어는 폴리(에틸렌 글리콜), 폴리리신, 폴리에틸렌이민, 폴리(프로필렌글리콜), 펩타이드, 혈청 알부민, 티오레독신, 면역글로불린, 아미노산, 핵산, 글리칸, 반응성 링커를 포함하는 변형기, 수용성 중합체, 작은 탄소쇄 링커 또는 추가의 치료 모이어티를 포함하는 스캐폴드 모이어티를 더 포함한다.
- [0014] 또 다른 실시형태에서, 스캐폴드 모이어티는 약 100 Da 내지 200,000 Da이다. 바람직한 실시형태에서, 스캐폴드 모이어티는 약 100 Da 내지 20,000 Da, 200 Da 내지 15,000 Da, 300 Da 내지 10,000 Da, 400 Da 내지 9,000 Da, 500 Da 내지 5,000 Da, 600 Da 내지 2,000 Da, 1000 Da 내지 200,000 Da, 5000 Da 내지 100,000 Da, 10,000 Da 내지 80,000 Da, 20,000 Da 내지 60,000 Da 또는 20,000 Da 내지 40,000 Da이다.
- [0015] 본 발명은 캐리어에 접합되거나 캐리어에 융합되거나 캐리어와 함께 제형화된 치료 화합물을 포함하는 약제학적 조성물을 제공한다. 캐리어는 DBP에 결합하고 순환되는 치료 화합물의 흡수, 생체이용률 또는 반감기를 증가시키는 표적화기를 포함한다. 본 발명의 약제학적 조성물은 단일 캐리어에 접합된 2개 이상의 치료 화합물을 포함할 수 있다. 본 발명의 약제학적 조성물은 치료 화합물에 접합된 2개 이상의 캐리어를 포함할 수 있다.
- [0016] 하나의 실시형태에서, 약제학적 조성물 중의 표적화기는 비타민 D, 비타민 D 유사체, 비타민 D-관련 대사물, 비타민 D-관련 대사물의 유사체, DBP에 결합하는 펩타이드, 항-DBP 항체, 항-DBP 항체 유도체, DBP에 결합하는 뉴클레오타이드 압타머 또는 DBP에 결합하는 탄소-기반 소분자이다.
- [0017] 또 다른 실시형태에서, 약제학적 조성물은 스캐폴드 모이어티를 더 포함한다. 바람직한 실시형태에서, 스캐폴드 모이어티는 폴리(에틸렌 글리콜), 폴리리신, 폴리에틸렌이민, 폴리(프로필렌글리콜), 펩타이드, 혈청 알부민, 티오레독신, 면역글로불린, 아미노산, 핵산, 글리칸, 반응성 링커를 포함하는 변형기, 수용성 중합체, 작은 탄소쇄 링커 또는 추가의 치료 화합물이다.
- [0018] 본 발명의 약제학적 조성물은 소분자, 화학 물질(chemical entity), 핵산, 핵산 유도체, 펩타이드, 펩타이드 유도체, 천연 발생 단백질, 비-천연 발생 단백질, 펩타이드-핵산(PNA), 스테이플식(stapled) 펩타이드, 모폴리노, 포스포로디아미데이트 모폴리노, 안티센스 약물, RNA-기반 사일런싱 약물, 압타머, 당단백질, 효소, 호르몬, 사이토킨, 인터페론, 성장 인자, 혈액 응고 인자, 항체, 항체 단편, 항체 유도체, 독소-접합된 항체, 대사 효능제(effector), 진통제, 해열제, 소염제, 항생제, 항미생물제, 항바이러스제, 항진균제, 근골격 약물, 심혈관 약물, 신장 약물, 폐 약물, 소화 질환 약물, 혈액 약물, 비노기 약물, 대사 약물, 간 약물, 신경 약물, 항당뇨 약물, 항암 약물, 위 병태 치료 약물, 결장 병태 치료 약물, 피부 병태 치료 약물 또는 림프 병태 치료 약물을 포함할 수 있다.
- [0019] 바람직한 실시형태에서, 약제학적 조성물은 서열번호 2와 90% 이상의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 FGF21 활성을 갖는 단백질을 포함한다. 또 다른 바람직한 실시형태에서, 표적화기는 비타민 D이다. 또 다른 바람직한 실시형태에서, 스캐폴드 모이어티는 폴리(에틸렌 글리콜)이다.
- [0020] 가장 바람직한 실시형태에서, 본 발명은 서열번호 2와 90% 이상의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 FGF21 활성을 갖는 단백질, 폴리(에틸렌 글리콜)인 스캐폴드 모이어티 및 비타민 D인 표적화기를 포함하는 약제학적 조성물을 고려한다. 이러한 실시형태에서, 표적화기는 순환되는 치료 화합물의 흡수, 생체이용률 또는 반감기를 증가시킨다. 또 다른 가장 바람직한 실시형태에서, 본 발명은 FGF21 활성 및 서열번호 2의 아미노산 서열을 갖는 단백질을 포함하는 약제학적 조성물을 고려한다.
- [0021] 바람직한 실시형태에서, 약제학적 조성물은 서열번호 5와 90% 이상의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 그렐린 활성을 갖는 단백질을 포함한다. 또 다른 바람직한 실시형태에서, 표적화기는 비타민 D이다. 또 다른 바람직한 실시형태에서, 스캐폴드 모이어티는 폴리(에틸렌 글리콜)이다.
- [0022] 가장 바람직한 실시형태에서, 본 발명은 서열번호 5와 90% 이상의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 그렐린 활성을 갖는 단백질, 폴리(에틸렌 글리콜)인 스캐폴드 모이어티 및 비타민 D인 표적화기를 포함하는 약제학적 조성물을 고려한다. 이러한 실시형태에서, 표적화기는 순환되는 치료 화합물의 흡수, 생체이용률 또는 반감기를 증가시킨다. 또 다른 가장 바람직한 실시형태에서, 본 발명은 그렐린 활성 및 서열번호 5의 아미노산 서열을 갖는 단백질을 포함하는 약제학적 조성물을 고려한다.
- [0023] 하나의 실시형태에서, 약제학적 조성물은 항체를 포함한다. 바람직한 실시형태에서, 항체는 서열번호 10과 90%

이상의 서열 동일성의 아미노산 서열을 갖는 단백질에 특이적으로 결합하는 항-TNF- α 항체이다. 더욱 바람직한 실시형태에서, 항-TNF- α 항체는 서열번호 10의 아미노산 서열을 갖는 단백질에 특이적으로 결합한다. 또 다른 바람직한 실시형태에서, 표적화기는 비타민 D이다. 또 다른 바람직한 실시형태에서, 스캐폴드 모이어티는 폴리(에틸렌 글리콜)이다.

[0024] 가장 바람직한 실시형태에서, 본 발명은 서열번호 10과 90% 이상의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 갖는 단백질에 특이적으로 결합하는 항-TNF- α 항체, 폴리(에틸렌 글리콜)인 스캐폴드 모이어티 및 비타민 D인 표적화기를 포함한다. 이러한 실시형태에서, 표적화기는 순환되는 치료 화합물의 흡수, 생체이용률 또는 반감기를 증가시킨다.

[0025] 특정 실시형태에서, 본 발명은 화학식 I의 캐리어를 포함하는 캐리어를 제공한다:

[0026] 화학식 I



[0028] 상기 식에서,

[0029] B는 비타민 D, 비타민 D 유사체, 비타민 D-관련 대사물, 비타민 D-관련 대사물의 유사체, DBP에 결합하는 펩타이드, 항-DBP 항체, 항-DBP 항체 유도체, DBP에 결합하는 뉴클레오타이드 압타머 또는 DBP에 결합하는 탄소-기반 소분자 중에서 선택되는 표적화기이고;

[0030] S는 폴리(에틸렌 글리콜), 폴리리신, 폴리에틸렌이민, 폴리(프로필렌글리콜), 펩타이드, 혈청 알부민, 티오레독신, 면역글로불린, 아미노산, 핵산, 글리칸, 반응성 링커를 포함하는 변형기, 폴리락트산, 수용성 중합체, 작은 탄소쇄 링커 또는 추가의 치료 모이어티를 포함하는 스캐폴드 모이어티이고;

[0031] C는 아민-반응기, 티올-반응기, 말레이미드기, 티올기, 디설파이드기, 알데하이드기, NHS-에스테르기, 4-니트로페닐 에스테르, 아실이미다졸, 할로아세틸기, 요오도아세틸기, 브로모아세틸기, SMCC기, 설포 SMCC기, 카보디이미드기 및 이작용성 가교-링커, 예를 들어, NHS-말레이미도, 또는 이의 조합이고;

[0032] L^1 및 L^2 는 $-(CH_2)_n-$, $-C(O)NH-$, $-HNC(O)-$, $-C(O)O-$, $-OC(O)-$, $-O-$, $-S-S-$, $-S-$, $-S(O)-$, $-S(O)_2-$ 및 $-NH-$ 중에서 독립적으로 선택되는 링커이고;

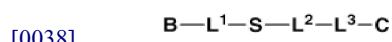
[0033] L^3 은 $-(CH_2)_o-$ 이고;

[0034] n은 0 내지 3의 정수이고;

[0035] o는 0 내지 3의 정수이다.

[0036] 특정 실시형태에서, 본 발명은 화학식 Ia의 화합물을 아미드 커플링제의 존재 하에서 화학식 Ib의 화합물과 반응시키는 단계를 포함하는, 화학식 I의 캐리어를 제조하는 방법을 제공한다:

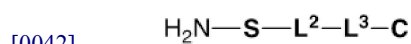
[0037] 화학식 I



[0039] 화학식 Ia



[0041] 화학식 Ib



[0043] 상기 식에서, B, S, C, L^2 및 L^3 은 상기 정의된 바와 같고, L^1 은 $-C(O)NH-$ 이다.

[0044] 특정한 다른 실시형태에서, 본 발명은 화학식 Ia의 화합물을 아미드 커플링제의 존재 하에서 화학식 Ic의 화합물과 반응시키는 단계, 에스테르를 카복실산으로 가수분해하는 단계 및 카복실산을 활성 에스테르로 전환시키는 단계를 포함하는, 화학식 I의 캐리어를 제조하는 방법을 제공한다:

- [0045] 화학식 I
- [0046] $B-L^1-S-L^2-L^3-C$
- [0047] 화학식 Ia
- [0048] $B-COOH$
- [0049] 화학식 Ic
- [0050] $H_2N-S-L^2-L^3-COOR^1$
- [0051] 상기 식에서, B, S, L^2 , L^3 , n 및 o는 상기 정의된 바와 같고, L^1 은 $-C(O)NH-$ 이고, R^1 은 C_1-C_6 알킬이다.
- [0052] 본 발명은 본원에서 기술되는 약제학적 조성물 중 하나 이상의 유효량을 투여하는 단계를 포함하는, 치료 화합물이 필요한 환자를 치료하는 방법을 제공한다. 예시적 치료 화합물은 소분자, 화학 물질, 핵산, 핵산 유도체, 펩타이드, 펩타이드 유도체, 천연 발생 단백질, 비-천연 발생 단백질, 펩타이드-핵산(PNA), 스테이플식 펩타이드, 모폴리노, 포스포로디아미데이트 모폴리노, 안티센스 약물, RNA-기반 사일런싱 약물, 압타머, 당단백질, 효소, 호르몬, 사이토킨, 인터페론, 성장 인자, 혈액 응고 인자, 항체, 항체 단편, 항체 유도체, 독소-접합된 항체, 대사 효능제, 진통제, 해열제, 소염제, 항생제, 항미생물제, 항바이러스제, 항진균제, 근골격 약물, 심혈관 약물, 신장 약물, 폐 약물, 소화 질환 약물, 혈액 약물, 비뇨기 약물, 대사 약물, 간 약물, 신경 약물, 항당뇨 약물, 항암 약물, 위 병태 치료 약물, 결장 병태 치료 약물, 피부 병태 치료 약물 및 림프 병태 치료 약물을 포함한다.
- [0053] 바람직한 방법에서, 치료 화합물은 서열번호 2와 90% 이상의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 FGF21 활성을 갖는 단백질이다. 또 다른 바람직한 방법에서, 치료 화합물은 서열번호 5와 90% 이상의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 그렐린 활성을 갖는 단백질이다. 다른 바람직한 방법에서, 치료 화합물은 서열번호 10과 90% 이상의 서열 동일성을 갖는 단백질에 특이적으로 결합하는 항-TNF- α 항체이다. 다른 바람직한 방법에서, 표적화기는 비타민 D이거나, 스캐폴드는 폴리(에틸렌 글리콜)이다.
- [0054] 다른 실시형태 및 방법에서, 본 발명의 약제학적 조성물은 약제학적으로 허용되는 제형으로 존재한다. 약제학적 조성물은 경피, 경구, 비경구, 피하, 피내, 정맥내, 근육내, 관절내, 활막내, 흉골내, 격막내, 병변내, 두개내 주사, 주입, 흡입, 눈, 국소, 직장, 코, 볼, 설하, 질 또는 이식 저장기 모드에 의해 환자에게 전달될 수 있다.
- [0055] 본 발명은 의약이 필요한 환자 치료용 의약의 제조를 위한 본원에 기술된 약제학적 조성물의 용도를 제공한다.
- [0056] 본 발명은 표적화기 및 약물을 커플링기를 이용하여 캐리어-약물 화합물로 접합시키는 단계를 포함하는, 본원에서 기술되는 약제학적 조성물을 제조하는 방법을 제공한다. 커플링기는 아민-반응성 커플링기, 말레이미드 커플링기, 시스테인 커플링기, 알데하이드 커플링기 또는 티올-반응성 커플링기일 수 있다. 말레이미드는, 예를 들어, 목적하는 위치의 펩타이드 또는 단백질로 위치-특이적으로 조작될 수 있는 유리 시스테인 잔기 상의 설피하이드릴기에 대한 커플링시 사용하기에 유용한 커플링기다. 다른 커플링기, 예를 들어, 치료 화합물의 N-말단에 위치 특이적으로 부착하는데 사용될 수 있는 아민기 또는 알데하이드를 표적화하는 NHS-가 당업자에게 널리 알려져 있다. 다른 더욱 특수화된 커플링기들이 당업자에 의해 고려되고 대체될 수 있다.
- [0057] 일부 방법에서, 표적화기는 비타민 D, 비타민 D 유사체, 비타민 D-관련 대사물, 비타민 D-관련 대사물의 유사체, DBP에 결합하는 펩타이드, 항-DBP 항체, 항-DBP 항체 유도체, DBP에 결합하는 뉴클레오타이드 압타머 또는 DBP에 결합하는 탄소-기반 소분자이다.
- [0058] 다른 실시형태에서, 약제학적 조성물을 제조하는 방법은 스캐폴드 모이어티를 표적화기 또는 약물에 접합시키는 단계를 더 포함한다. 스캐폴드 모이어티는 폴리(에틸렌 글리콜), 폴리리신, 폴리(에틸렌이민), 폴리(프로필렌글리콜), 펩타이드, 혈청 알부민, 티오레독신, 면역글로불린, 아미노산, 핵산, 글리칸, 반응성 링커를 포함하는 변형기, 수용성 중합체, 작은 탄소쇄 링커 또는 추가의 치료 화합물일 수 있다.
- 도면의 간단한 설명**
- [0059] 도 1: 약물에 커플링된 캐리어의 일반적 구조를 도시하는 개략도. 캐리어는 표적화기, 스캐폴드 및 임의로 커플링기를 포함한다.

도 2: 캐리어인 비타민 D₃-PEG-말레이미드 부가물을 생성하는데 사용되는 화학 구조 및 합성을 나타내는 반응 도식. 캐리어는 1) 비타민 D 유사체(표적화기), 2) PEG 스캐폴드 및 3) 말레이미드 커플링기를 접합시킴으로써 생성되었다.

도 3: FGF21-캐리어 접합체의 생체이용률 및 약동학. FGF21단독(서열번호 3) 또는 비타민 D₃-PEG-말레이미드 캐리어에 접합된 FGF21을 0.1 mg/kg으로 스프라그 돌리 래트에 피하 주사하였다. 혈장 샘플을 FGF21 농도에 대해 ELISA를 이용하여 이중으로 분석하였으며, 시점당 평균 3 내지 5마리의 동물을 반-로그 플롯 그래프 상에 플로팅하였다.

도 4: 그렐린-캐리어 접합체의 약동학. 그렐린 단독(서열번호 6) 또는 비타민 D₃-PEG-말레이미드 캐리어에 접합된 그렐린을 0.1 mg/kg으로 스프라그 돌리 래트에 정맥내 주사하였다. 혈장 샘플을 그렐린 농도에 대해 ELISA를 이용하여 이중으로 분석하였으며, 시점당 평균 3 내지 5마리의 동물을 반-로그 플롯 그래프 상에 플로팅하였다.

도 5: 또 다른 캐리어인 비타민 D₃-PEG-NHS 부가물을 생성하는데 사용되는 화학 구조 및 합성을 나타내는 반응 도식. 캐리어는 1) 비타민 D 유사체(표적화기), 2) PEG 스캐폴드 및 3) NHS 커플링기를 접합시킴으로써 생성되었다.

도 6: 인플릭시마브-캐리어 접합체의 생체이용률 및 약동학. 인플릭시마브 단독 또는 비타민 D₃-PEG-NHS 캐리어에 접합된 인플릭시마브를 1 mg/kg으로 스프라그 돌리 래트에 피하 주사하였다. 혈장 샘플을 인플릭시마브 농도에 대해 인플릭시마브-특이적 ELISA를 이용하여 분석하였으며, 시점당 평균 3마리의 동물을 선형 플롯 그래프 상에 플로팅하였다

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0060] 본 발명은 치료 화합물의 효능, 흡수, 생체이용률, 순환 반감기 또는 약동학적 특성을 개선하기 위해 치료 단백질, 펩타이드, 핵산 또는 소분자에 공유적으로 부착되거나 이에 융합되거나 이와 함께 제형화되는 캐리어 분자를 제공한다. 특정 실시형태에서, 캐리어는 표적화기, 스캐폴드 및 커플링기를 포함한다. 다른 실시형태에서, 캐리어는 특히 표적화기와 치료 화합물 사이의 "스페이스"로서 작용하는 스캐폴드가 없다.
- [0061] 캐리어는 사람 및 동물에서 사용하기에 적합하도록 고안된다. 캐리어는 이에 커플링되거나 이에 접합되거나 이에 융합되거나 이와 함께 제형화되는 생물 또는 화학 물질의 약동학 특성을 개선하는데 기여한다. 이는 표적화기와 비타민 D 결합 단백질(DBP)의 상호작용을 통해 일어나며, 투여 부위로부터 순환 혈장으로 빠르고 효과적으로 분자를 적극적으로 전달하므로 약물의 분해 효소에 대한 노출을 감소시킬 수 있다. 또한, 캐리어는 DBP에 결합함으로써 약물의 순환 반감기를 개선하며, 따라서 신장 여과를 방지함으로써 약물의 효능 및 치료 효능을 증가시킨다. 본원에서 기술되는 캐리어의 치료 화합물에 대한 접합 방법은 당업자에게 알려져 있다. 예시로서, 본 발명의 커플링기를 사용하는 접합은 문헌[W093/012145(Atassi 등) 및 7,803,777(Defrees 등)], 이들 각각은 이들의 전문이 본원에 참조로 포함됨]에 기술된 조성물 및 방법을 이용하여 수행될 수 있다.
- [0062] 본 발명의 하나 이상의 실시형태를 기술하고 청구함에 있어서, 하기 용어가 후술되는 정의에 따라 사용될 것이다.
- [0063] 용어 "흡수"는 약물의 혈류로의 이동이다. 약물은 일부 투여 경로(예: 경구, 국소 또는 피부)를 통하거나 정제, 캡슐제 또는 액제와 같은 특정 투여 형태로 도입될 필요가 있다. 정맥내 요법, 근육내 주사 및 경장 영양법(enteral nutrition)은 흡수시 더 적은 가변성을 제공하며 생체이용률은 종종 거의 100%이다. 가장 빠른 흡수 경로는 흡입이다.
- [0064] "길항제"는, 리간드의 경우 하나 이상의 수용체에 대한 결합 또는 수용체의 경우 하나 이상의 리간드에 대한 결합을 포함하여, 특정 또는 구체화된 단백질의 활성을 중화, 차단, 억제, 제거, 감소 또는 방해할 수 있는 분자를 지칭한다. 길항제는 항체 및 이의 항원-결합 단편, 단백질, 펩타이드, 당단백질, 당펩타이드, 당지질, 다당류, 올리고당류, 핵산, 생물유기 분자, 펩타이드 모사체(peptidomimetics), 약리학적 제제 및 이들의 대사물, 전사 및 번역 조절 서열 등을 포함한다. 길항제는 또한 단백질, 호르몬 또는 다른 생체활성 분자에 대한 소분자 억제제를 포함한다. 길항제는 단백질, 호르몬 또는 다른 생체활성 분자에 특이적으로 결합하여 이의 표적물에 대한 결합을 방해하는 융합 단백질, 수용체 분자, 안티센스 분자, 압타머, 리보자임 또는 유도체일 수 있다.
- [0065] "항체"(Ab) 및 "면역글로불린"(Ig)은 유사한 구조적 특성을 갖는 당단백질을 지칭한다. 항체는 특정 항원에 결

합 특이성을 나타내는 한편, 면역글로불린은 항체 및 일반적으로 항원 특이성이 없는 다른 항체-유사 분자 둘다를 포함한다. 후자의 종류의 폴리펩타이드는, 예를 들어, 림프구에 의해서는 낮은 수준으로 생성되고 골수종에 의해서는 증가된 수준으로 생성된다.

[0066] "압타머"는 특정 표적물에 결합하기 위해 선택되었던 핵산-기반 화합물이다. 압타머-기반 치료 화합물의 예는 W007/035922(전문이 본원에 참조로 포함됨)에서 찾을 수 있다.

[0067] 용어 "생체이용률"은 전신 순환에 도달하는 비변화된 약물의 투여량 부분을 지칭하며 약물의 주요한 약동학적 특성 중 하나이다. 의약이 정맥내로 투여되는 경우, 이의 생체이용률은 100%이다. 의약이 다른 경로(예: 경구)로 투여되는 경우, 이의 생체이용률은(불완전한 흡수 및 제1-통과 대사 때문에) 일반적으로 감소되거나 환자마다 상이할 수 있다. 생체이용률은 비-정맥내 투여 경로를 위한 용량을 계산하는 경우 고려되는 약동학에 있어서 중요한 변수이다.

[0068] "캐리어"는 약물의 흡수, 반감기, 생체이용률, 약동학 또는 약력학 특성을 개선하기 위해 치료 화합물에 접합되거나 융합되거나 커플링되거나 이와 함께 제형화될 수 있는 화합물이다. 이들은 표적화기, 커플링기 및 임의로 스캐폴드 모이어티를 포함한다.

[0069] "유효량"은 투약시 필요한 기간 동안 목적하는 치료 또는 예방 결과를 달성하는데 효과적인 치료 화합물의 양을 지칭한다. 치료 화합물의 "치료학적 유효량"은 개체의 질환 상태, 연령, 성별 및 체중, 및 개체에서 목적하는 반응을 유도하는 항체의 능력과 같은 요인에 따라 다양할 수 있다. 치료학적 유효량은, 예를 들어, 개선된 생존율, 보다 신속한 회복, 또는 증상의 경감, 개선 또는 제거, 또는 다른 허용가능한 바이오마커 또는 대용 마커에 의해 측정될 수 있다. 치료학적 유효량은 또한 치료 화합물의 임의의 독성 또는 악영향보다 치료학적으로 유리한 효과가 우세한 것이다. "예방학적 유효량"은 투약시 필요한 기간 동안 목적하는 예방 결과를 달성하는데 효과적인 치료 화합물의 양을 지칭한다. 전형적으로, 반드시 아니지만, 예방 용량은 질환 전 또는 초기 단계에서 피험자에게 사용되기 때문에, 예방학적 유효량은 치료학적 유효량보다 적을 것이다.

[0070] "반감기"는 시험 분자의 1/2량이 더 이상 검출되지 않을 때의 경과된 시간의 양을 지칭하는 당해 분야에 알려진 과학적 용어이다. 생체내 반감기는 사람 또는 동물의 순환 혈청 또는 조직에서 시험 분자의 1/2이 더 이상 검출 가능하지 않을 때의 경과된 시간을 지칭한다.

[0071] "호르몬"은 하나의 세포(또는 세포의 그룹)로부터 신호 능력을 갖는 또 다른 세포까지의 생물학적 또는 화학적 메신저이다. 본원에서 기술되는 바와 같이, 본 발명에서 사용하기 위한 호르몬은 펩타이드, 스테로이드, 페로몬, 인터루킨, 림포카인, 사이토킨 또는 당해 분야에 알려진 다른 호르몬 부류의 구성원일 수 있다.

[0072] "상동체"는 참조 분자와 뉴클레오타이드 서열, 펩타이드 서열, 기능 또는 구조 수준에서 유사한 생체활성 분자이다. 상동체는 참조 서열과 특정한 백분율의 동일성을 공유하는 서열 유도체를 포함할 수 있다. 따라서, 하나의 실시형태에서, 상동 또는 유도체 서열은 적어도 70% 서열 동일성을 갖는다. 바람직한 실시형태에서, 상동 또는 유도체 서열은 적어도 80 또는 85% 서열 동일성을 갖는다. 더욱 바람직한 실시형태에서, 상동 또는 유도체 서열은 적어도 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 또는 99% 서열 동일성을 갖는다. 상동 또는 유도체 핵산 서열은 또한 매우 엄격한 하이브리드화 조건 하에서 참조 핵산 서열에 결합된 상태로 있는 이들의 능력에 의해 정의될 수 있다. 참조 분자에 대해 구조적 또는 기능적 유사성을 갖는 상동체는 참조 분자의 화학적 유도체일 수 있다. 구조적 및 기능적 상동체 및 유도체를 검출, 생성 및 스크리닝하는 방법은 당해 분야에 알려져 있다.

[0073] "하이브리드화"는 일반적으로 상보성 가닥이 이들의 융점 이하의 환경에 있을 때 다시 어닐링하는 변성된 DNA의 능력에 의존한다. 프로브와 하이브리드화 가능한 서열 간에 목적하는 상동성의 정도가 높을수록, 사용될 수 있는 상대적 온도가 더 높다. 그 결과, 당연히 보다 높은 상대적 온도는 반응 조건을 보다 엄격하게 하고 낮은 온도는 덜 엄격하게 하는 경향이 있다. 하이브리드화 반응의 엄격성에 대한 추가의 상세 및 설명을 위해 문헌 [Ausubel 등, Current Protocols in Molecular Biology, Wiley Interscience Publishers, (1995)]을 참조한다.

[0074] "개체", "피험자" 또는 "환자"는 척추동물이다. 특정 실시형태에서, 척추동물은 포유동물이다. 포유동물은 영장류(사람 및 비-사람 영장류 포함) 및 설치류(예: 마우스, 햄스터, 기니아 피그 및 래트)를 포함하고 이로 제한되지 않는다. 특정 실시형태에서, 포유동물은 사람이다. "대조군 피험자"는 개체, 피험자 또는 환자에서 확인되었던 질환, 기능이상 또는 병태를 갖는 것으로 진단되지 않은 건강한 피험자를 지칭한다. 대조군 피험자는 질환, 기능이상 또는 병태와 연관된 임의의 징후 또는 증상을 겪지 않는다.

- [0075] "의약"은 질환, 장애 또는 병태를 치료하기 위해 제조된 활성 약물이다.
- [0076] "모폴리노"는 포스포로디아미데이트 결합을 이용하는 천연 핵산의 비-천연 변이체인 합성 분자이며, 미국 특허 번호 8,076,476(이의 전문이 본원에 참조로 포함됨)에 기술되어 있다.
- [0077] "핵산"은 세포 기능을 지시할 수 있는 유전 정보를 운반하는 일 그룹의 거대 분자(DNA, RNA 또는 이의 변이체) 중 임의의 것이다. 핵산은 효소-유사 활성을 갖거나(예: 리보자임) 피험자에서 유전자 발현을 억제하는데 사용될 수 있다(예: RNAi). 본원에서 기술되는 본 발명에서 사용되는 핵산은 단일-가닥, 이중-가닥, 선형 또는환형 일 수 있다. 본 발명은 또한 압타머, PNA, 모폴리노 또는 핵산의 다른 비천연 변이체를 포함하고 이로 제한되지 않는 핵산 변이체의 사용을 포함한다. 예시로서, 본 발명에 유용한 핵산은 미국 특허 번호 8,076,476(이의 전문이 본원에 참조로 포함됨)에 기술되어 있다.
- [0078] "환자 반응" 또는 "반응"은, 제한없이, (1) 감속 및 완전한 저지를 포함하여 질환 진행을 어느 정도까지 억제; (2) 질환의 에피소드 및/또는 증상의 수를 감소; (3) 인접 말초 기관 및/또는 조직으로의 질환 세포 침윤 억제(즉, 감소, 감속 또는 완전한 정지); (4) 질환 확산의 억제(즉, 감소, 감속 또는 완전한 정지); (5) 자가면역 병태의 감소; (6) 장애와 연관된 바이오마커 발현에서의 유리한 변화; (7) 장애와 연관된 하나 이상의 증상의 어느 정도까지의 완화; (8) 치료 후 무질환 제시 기간의 증가; 또는 (9) 치료 후 소정의 시점에서 사망률의 감소를 포함하는 환자에 대한 이점을 나타내는 임의의 중점을 사용하여 평가될 수 있다.
- [0079] 본원에서 사용되는 용어 "펩타이드"는 2개 이상의 아미노산을 포함하는 임의의 펩타이드이다. 용어 펩타이드는 짧은 펩타이드(예: 2 내지 14개의 아미노산을 포함하는 펩타이드), 중간 길이 펩타이드(15개 내지 50개) 또는 장쇄 펩타이드(예: 단백질)를 포함한다. 용어 펩타이드, 중간 길이 펩타이드 및 단백질은 본원에서 상호교환적으로 사용될 수 있다. 본원에서 사용되는 용어 "펩타이드"는 펩타이드 결합을 통해 연결된 아미노산 잔기, 관련된 천연 발생 구조적 변이체, 및 이의 합성적 비-천연 발생 유사체로 구성된 중합체, 관련된 천연 발생 구조적 변이체, 및 이의 합성적 비-천연 발생 유사체를 의미하는 것으로 해석된다. 합성적 펩타이드는, 예를 들어, 자동화된 펩타이드 합성기를 사용하여 합성될 수 있다. 펩타이드는 또한, 예를 들어, 세포, 세균, 효모 또는 다른 살아있는 유기체 등의 다른 수단에 의해 합성될 수도 있다. 펩타이드는 20개의 유전자-암호화된 아미노산 이외의 다른 아미노산을 포함할 수 있다. 펩타이드는 천연 과정, 예를 들어, 프로세싱 및 다른 번역후 변형에 의하거나 화학적 변형 기법에 의해 변형된 것들을 포함한다. 이러한 변형은 기본 교체 및 보다 상세한 전공 논문에서 잘 기술되어 있으며, 당업자에게 잘 알려져 있다. 변형은 펩타이드 골격, 아미노산 측쇄 및 아미노 또는 카복실 말단을 포함하여 펩타이드 내 어디에서든지 일어난다.
- [0080] 본원에서 사용되는 "약제학적으로 허용되는 캐리어" 또는 "치료학적으로 효과적인 캐리어"는 수성 또는 비수성 (고체), 예를 들어, 알콜 또는 유성, 또는 이의 혼합물이며, 계면활성제, 완화제, 윤활제, 안정화제, 염료, 향료, 보존제, pH 조절용 산 또는 염기, 용매, 유화제, 겔화제, 보습제, 안정화제, 습윤제, 지속 방출제, 보수제, 또는 약제학적 조성물의 특정 형태에 일반적으로 포함되는 다른 성분을 포함할 수 있다. 약제학적으로 허용되는 캐리어는 당해 분야에 잘 알려져 있으며, 예를 들어, 수용액, 예를 들어, 물 또는 생리학적 완충 염수 또는 다른 용매 또는 비히클, 예를 들어, 글리콜, 글리세롤, 및 오일, 예를 들어, 올리브 오일 또는 주사가능한 유기 에스테르를 포함한다. 약제학적으로 허용되는 캐리어는, 예를 들어, 특정 억제제를 안정화시키거나 이의 흡수를 증가시키도록 작용하는 생리학적으로 허용되는 화합물, 예를 들어, 탄수화물, 예를 들어, 글루코즈, 슈크로즈 또는 덱스트란, 항산화제, 예를 들어, 아스코르브산 또는 글루타티온, 킬레이트화제, 저분자량 단백질 또는 다른 안정화제 또는 부형제를 포함할 수 있다.
- [0081] 용어 "약동학"은 현재 치료 화합물의 흡수, 분포, 대사 및 배출에 대한 시간 과정으로 정의된다. 개선된 "약동학적 특성"은 특정한 치료 화합물에 대해 필요한 약동학적 특성 중 하나 이상을 개선하는 것으로 정의된다. 예를 들어, 대사 또는 분비를 통한 제거 감소, 약물 흡수 증가, 반감기 증가 및/또는 생체이용률 증가를 포함하고 이로 제한되지 않는다.
- [0082] "PNA"는 DNA 또는 RNA와 유사한 화학적 구조를 갖는 펩타이드 핵산을 지칭한다. 펩타이드 결합은 뉴클레오타이드 또는 뉴클레오사이드를 함께 연결하는데 사용된다.
- [0083] "스캐폴드"는 다른 분자가 이에 대해 공유적으로 또는 비-공유적으로 부착되거나 제형화될 수 있는 분자이다. 본 발명의 스캐폴드는 표적화기와 약물 사이의 "스페이서" 또는 "링커"로 작용할 수 있다. 스캐폴드는 또한 반응성 링커를 포함할 수 있거나 약물에 추가하여 유리한 치료 특성을 가질 수 있다. 따라서, 본 발명의 스캐폴드는, 예를 들어, PEG, 혈청 알부민, 티오레독신, 면역글로불린, 반응성 링커를 포함하는 변형기, 수용성 중합체

또는 치료 화합물일 수 있다.

- [0084] 하이브리드화 반응의 "엄격함"은 당업자에 의해 쉽게 측정가능하며, 일반적으로 프로브 길이, 세척 온도 및 염 농도에 따른 경험적 계산이다. 일반적으로, 보다 긴 프로브는 적합한 어닐링을 위해 보다 높은 온도를 필요로 하고, 보다 짧은 프로브는 보다 낮은 온도를 필요로 한다.
- [0085] 본원에서 정의되는 "엄격한 조건" 또는 "매우 엄격한 조건"은(1) 세척에 대해 낮은 이온 세기 및 높은 온도, 예를 들어, 50℃에서 0.015 M 염화나트륨/0.0015 M 나트륨 시트레이트/0.1% 나트륨 도데실 설페이트를 사용하거나;(2) 하이브리드화 동안 변성제, 예를 들어, 포름아미드, 예를 들어, 0.1% 소혈청 알부민/0.1% 피콜/0.1% 폴리비닐피롤리돈/50 mM 인산나트륨 완충액(pH 6.5)을 갖는 50%(v/v) 포름아미드를 42℃에서 750 mM 염화나트륨, 75 mM 나트륨 시트레이트와 함께 사용하거나;(3) 0.2 x SSC(염화나트륨/나트륨 시트레이트) 중 42℃에서 10분 세척 후 55℃에서 EDTA를 포함하는 0.1 x SSC로 이루어진 10분의 고도-엄격 세척과 함께, 42℃에서 50% 포름아미드, 5 x SSC(0.75 M NaCl, 0.075 M 나트륨 시트레이트), 50 mM 인산나트륨(pH 6.8), 0.1 % 피로인산나트륨, 5 x 덴하르트 용액(Denhardt's solution), 초음파처리된 연어 정자 DNA(50 μ l/ml), 0.1% SDS 및 10% 텍스트란 설페이트를 사용하는 용액 중에서 밤새 하이브리드화 하는 것에 의해 확인될 수 있다.
- [0086] 본원에 개시된 "치료학적 화합물"은 질환 또는 기능이상을 치료하거나 달리 개체의 건강에 영향을 끼치기 위해 피험자에게 투여되는 소분자, 화학 물질, 핵산, 핵산 유도체, 펩타이드, 펩타이드 유도체, 천연 발생 단백질, 비-천연 발생 단백질, 당단백질 및 스테로이드를 지칭한다. 치료 화합물의 비제한적 예는 폴리펩타이드, 예를 들어, 효소, 호르몬, 사이토킨, 항체 또는 항체 단편, 항체 유도체, 대사 기능에 영향을 끼치는 약물, 유기 화합물, 예를 들어, 진통제, 해열제, 소염제, 항생제, 항바이러스 화합물, 항진균 화합물, 심혈관 약물, 신장 기능에 영향을 끼치는 약물, 전해질 대사물, 중추 신경계에 작용하는 약물, 화학요법 화합물, 수용체 작용제 및 수용체 길항제를 포함한다. 치료 화합물은, 예를 들어, 세포외 분자, 예를 들어, 혈청 알부민, 면역글로불린, 아포지단백질 또는 트랜스페린과 같은 혈장 단백질 또는 적혈구 또는 림프구의 표면에서 발견되는 단백질을 포함하고 이로 제한되지 않는 혈청 인자들을 포함한다. 따라서, 예시적인 치료 화합물은 소분자, 화학 물질, 핵산, 핵산 유도체, 펩타이드, 펩타이드 유도체, 천연 발생 단백질, 비-천연 발생 단백질, 펩타이드-핵산(PNA), 스테이플식 펩타이드, 포스포로디아미데이트 모폴리노, 안티센스 약물, RNA-기반 사일런싱 약물, 압타머, 당단백질, 효소, 호르몬, 사이토킨, 인터페론, 성장 인자, 혈액 응고 인자, 항체, 항체 단편, 항체 유도체, 독소-접합된 항체, 대사 효능제, 진통제, 해열제, 소염제, 항생제, 항미생물제, 항바이러스제, 항진균제, 근골격 약물, 심혈관 약물, 신장 약물, 폐 약물, 소화 질환 약물, 혈액 약물, 비뇨기 약물, 대사 약물, 간 약물, 신경 약물, 항당뇨 약물, 항암 약물, 위 병태 치료 약물, 결장 병태 치료 약물, 피부 병태 치료 약물 및 림프 병태 치료 약물을 포함한다. 본원에서 사용되는 용어 "치료 화합물"은 용어 "약물" 또는 "치료제"와 본질적으로 동일한 의미를 갖는다.
- [0087] 본원에서 사용되는 "치료"는 치료되는 개체 또는 세포의 자연스런 과정을 변화시키려는 임상적 개입을 지칭하며, 임상적 병리의 과정 전 또는 도중에 수행될 수 있다. 치료의 바람직한 효과는 질환 또는 병태 또는 이의 증상의 발생 또는 재발 방지, 질환의 병태 또는 증상 완화, 질환의 임의의 직접적 또는 간접적 병리 결과 감소, 질환 진행률 감소, 질환 상태의 개선 또는 완화 및 차도 또는 개선된 예후 달성을 포함한다. 일부 실시형태에서, 본 발명의 방법 및 조성물은 질환 또는 장애의 발병을 지연시키는데 유용하다.
- [0088] "비타민"은 당해 분야에서 인식되는 용어이며, 신체의 정상적 성장 및 활동을 위해 소량으로 필수적인 지용성 또는 수용성 유기 물질로서 정의되며, 식물 및 동물 식품 또는 보충물로부터 천연적으로 취득된다.
- [0089] "비타민 D"는 일 그룹의 지용성 세코스테로이드이다. 비타민 D에 대한 수개의 형태(비타민)가 존재한다. 2개의 주요한 형태는 비타민 D₂ 또는 에르고칼시페롤, 및 비타민 D₃ 또는 콜레칼시페롤이다. 아래 첨자가 없는 비타민 D는 D₂ 또는 D₃ 또는 둘다를 지칭한다. 사람에서, 비타민 D는 콜레칼시페롤(비타민 D₃) 또는 에르고칼시페롤(비타민 D₂)로서 소화될 수 있다. 또한, 사람은 태양 노출이 적당한 경우 콜레스테롤로부터 이를 합성할 수 있다.
- [0090] "비타민 D 결합 단백질" 또는 "DBP"는 다른 여러 활성들 중에서도 특히, 비타민이 이의 활성 형태로 변형되는 경우 비타민 D 및 이의 유사체에 결합하고 간 및 신장에 있는 부위에 전달할 수 있는 모든 포유동물에서 발견되는 천연 순환 혈청 단백질이며, 순환시 사람에서 평균 30일 동안 다양한 형태의 비타민 D를 보유한다. DBP 단백질 서열은 서열번호 7에 기술되며, DPB 단백질 서열을 암호화하는 예시적인 핵산 서열은 서열번호 8에 기술된다. DBP는 다수의 천연 발생 이소형태를 갖는다. 예시적인 이소형태는 공개된 서열 데이터베이스(예: 수납 번호 NM_001204306.1, NM_001204307.1, NM_000583.3, BC036003.1, M12654.1, X03178.1, AK223458,

P_001191235.1, NP_000574.2, AAA61704.1, AAD13872.1, NP_001191236.1, AAA19662.2, I54269, P02774.1, EAX05645.1, AAH57228.1, AAA52173.1, AAB29423.1, AAD14249.1, AAD14250.1 및 BAD97178.1)에서 이용가능하다.

- [0091] 본 발명은 DBP 활성을 실질적으로 보유하는 보존적 또는 비-보존적 아미노산 치환을 포함하는 DBP 변이체 및 상동체의 사용을 고려한다. DBP 결합 분자 또는 기능성 DBP 변이체는 공지된 기법을 이용하여 확인되고 공지된 방법을 이용하여 특성화될 수 있다[Bouillon 등, *J Bone Miner Res.* 6(10):1051-7(1991), Teegarden 등, *Anal. Biochemistry* 199(2):293-299(1991), McLeod 등, *J Biol Chem.* 264(2):1260-7(1989), Revelle 등, *J. Steroid Biochem.* 22:469-474(1985)]. 상기 참조문들은 이들의 전문이 참조로 본원에 포함된다.
- [0092] 용어 "수용성"은 물 중에서 얼마간의 검출가능한 정도의 용해도를 갖는 모이어티를 지칭한다. 수용해도를 검출 및/또는 정량하는 방법은 당해 분야에 널리 알려져 있다. 예시적인 수용성 중합체는 펩타이드, 당류, 폴리(에테르), 폴리(아민), 폴리(카복실산) 등을 포함한다.
- [0093] 본 발명은 단백질, 펩타이드, 다른 생물체, 핵산 및 소분자 약물을 투여하기 위한 효과적인 경로를 제공한다. 본 발명은 또한 경피, 경구, 비경구, 피하, 피내, 정맥내, 근육내, 관절내, 활막내, 흉골내, 격막내, 병변내, 두개내 주사, 주입, 흡입, 눈, 국소, 직장, 코, 볼, 설하, 질 또는 이식 저장기 모드를 통한 효과적인 약물 투여 경로를 제공한다.
- [0094] 또한, 본원에서 기술되는 본 발명은 치료 화합물에 대한 표적물 결합 활성, 즉 약력학(PD)을 유지하기 위한 조성물 및 방법을 제공한다. 본 발명은 또한 본원에서 기술되는 치료 화합물의 약동학(PK) 프로필을 개선하기 위한 조성물 및 방법을 제공한다. 본 발명은 또한 본원에서 기술되는 본 발명물 없이 동일한 투여 경로 또는 상이한 투여 경로를 이용하는 약물에 대한 약물 흡수 프로필과 비교하여 개선된 약물 흡수 프로필을 위한 조성물 및 방법을 제공한다. 본 발명은 또한 본원에서 기술되는 본 발명물 없이 동일한 투여 경로 또는 상이한 투여 경로를 이용하는 약물에 대한 약물 생체이용률 프로필과 비교하여 개선된 약물 생체이용률 프로필을 위한 조성물 및 방법을 제공한다. 본 발명은 또한 본원에서 기술되는 본 발명물 없이 동일한 투여 경로 또는 상이한 투여 경로를 이용하는 약물에 대한 약물 반감기 프로필과 비교하여 개선된 약물 반감기 프로필을 위한 조성물 및 방법을 제공한다.
- [0095] 본 발명은 또한 본원에서 기술되는 본 발명물이 없는 약물과 비교하여 환자에게 보다 비용-효과적이고 유리한 대체적인 약물 투여 경로를 제공한다.
- [0096] 본 발명은 약물의 흡수, 반감기, 생체이용률 또는 약동학적 특성을 개선하기 위해 활성 치료 화합물에 접합되거나 이에 융합되거나 이와 함께 제형화될 수 있는 캐리어로서 작용하는 분자를 사용하기 위한 조성물 및 방법을 제공한다. 캐리어는 신체의 천연 DBP에 결합하는 특성을 갖는다. 본 발명의 하나의 양태는 투여 부위로부터 순환 혈청까지 캐리어-약물 복합체를 수송하기 위한 천연 DBP의 용도를 제공한다. 본 발명의 또 다른 양태는 연장된 기간 동안 순환되는 약물을 보유하기 위한 천연 DBP의 용도이다. 본 발명은 보다 지속적인 치료 효과를 달성하도록 신체로부터 이의 배출을 방지하고 신체에서 치료 화합물의 노출을 증가시킬 수 있다. 본 발명의 또 다른 양태에서, 비접합되거나 비융합되거나 비제형화된 약물과 비교하여 캐리어에 접합되거나 융합되거나 이와 함께 제형화되는 경우 보다 적은 약물 용량이 필요하다. 본 발명의 또 다른 양태는 치료 화합물에 커플링되는 경우 보다 큰 PEG 화합물의 기능을 대체하기 위한 캐리어의 용도이다. 본 발명은 접합되거나 융합되거나 제형화된 화합물의 약동학적 프로필 및 효능을 개선할 수 있다.
- [0097] 본 발명은 바람직하게는 하나 이상의 부분들 또는 성분들로 구성된 캐리어 분자를 제공한다. 하나의 실시형태에서, 캐리어는 표적화기 및 표적화기를 치료 화합물에 부착시키기 위한 커플링기를 포함한다. 또 다른 실시형태에서, 캐리어는 표적화기 및 치료 화합물에 연결된 스캐폴드 모이어티를 포함한다. 표적화기는 비타민 D, 비타민 D 유사체, 비타민 D-관련 대사물, 비타민 D-관련 대사물의 유사체, 비타민 D 결합 단백질(DBP)에 결합하거나 이와 상호작용할 수 있는 또 다른 분자이다. 하나의 실시형태에서, 표적화기는 항체 또는 항체 유도체, DBP 또는 이의 단편에 결합하도록 고안된 펩타이드, DBP 또는 이의 단편에 대해 선택되는 파아지 디스플레이 또는 다른 펩타이드 라이브러리로부터 유도되는 펩타이드, DBP에 결합하는 뉴클레오타이드 압타머, DBP에 결합하도록 고안되거나 DBP 또는 이의 단편에 대해 선택되는 화학적 라이브러리로부터 유도되는 소분자이다.
- [0098] 본 발명의 치료 화합물 캐리어 접합체는 전형적으로 치료 화합물에 개별적으로 부착되는 약 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10개의 표적화기를 갖는다. 하나의 실시형태에서, 본 발명의 캐리어 접합체는 치료 화합물에 개별적으로 부착되는 약 4개의 표적화기, 치료 화합물에 개별적으로 부착되는 약 3개의 표적화기, 치료 화합물에 개

별적으로 부착되는 약 2개의 표적화기, 또는 치료 화합물에 부착되는 약 1개의 표적화기를 포함할 것이다. 치료 화합물에 부착되는 표적화기 각각의 구조는 동일하거나 상이할 수 있다. 바람직한 실시형태에서, 하나 이상의 표적화기는 치료 단백질의 N-말단에서 치료 화합물에 안정적으로 부착된다. 바람직한 실시형태에서, 하나 이상의 표적화기는 치료 단백질의 C-말단에서 치료 단백질에 안정적으로 부착된다. 다른 바람직한 양태에서, 하나 이상의 표적화기는 치료 단백질의 다른 부위에 안정적으로 부착될 수 있다. 예를 들어, 치료 화합물 캐리어 접합체는 N-말단에 부착되는 표적화기 및 추가로 리신 잔기에 부착되는 표적화기를 포함할 수 있다. 또 다른 실시형태에서, 치료 화합물 캐리어 접합체는 글리코실화 부위의 일부로서의 슈가 잔기와 같은 변형물을 통해 치료 단백질에 부착되거나 펩타이드의 아실화 부위에 부착되거나 인산화 부위 또는 당업자에게 친숙한 다른 천연 또는 비-천연 변형물에 부착되는 표적화기를 갖는다. 또한, 상술된 부위의 조합을 이용하는 부착 부위도 고려된다. 본 발명의 하나의 바람직한 실시형태는 치료 화합물 상의 하나의 특정 부위에서 치료 화합물에 부착되는 표적화기를 포함한다. 또 다른 바람직한 실시형태에서, 단백질 상의 부착 부위는 시스테인, 리신, N-말단 또는 C-말단일 수 있다.

[0099] 또 다른 실시형태에서, 스캐폴드는 약제학적으로 허용되는 캐리어이다. 바람직한 실시형태에서, 스캐폴드는 폴리(에틸렌 글리콜), 폴리로신, 폴리에틸렌이민, 폴리(프로필렌글리콜), 펩타이드, 혈청 알부민, 티오레독신, 면역글로불린, 아미노산, 핵산, 글리칸, 반응성 링커를 포함하는 변형기, 수용성 중합체, 작은 탄소쇄 링커 또는 추가의 치료 모이어티이다.

[0100] 하나의 실시형태에서, 수용성 스캐폴드 모이어티는 물 중에서 얼마간의 검출가능한 정도의 용해도를 갖는다. 수용해도를 검출 및/또는 정량하는 방법은 당해 분야에 널리 알려져 있다. 예시적인 수용성 중합체는 펩타이드, 당류, 폴리(에테르), 폴리(아민), 폴리(카복실산) 등을 포함한다.

[0101] 펩타이드는 혼합된 서열을 갖거나 단일 아미노산(예: 폴리(리신))으로 구성될 수 있다. 예시적인 다당류는 폴리(시알산)이다. 예시적인 폴리(에테르)는 폴리(에틸렌 글리콜), 예를 들어, m-PEG이다. 폴리(에틸렌이민)은 예시적인 폴리아민이며, 폴리(아크릴)산은 대표적인 폴리(카복실산)이다. 수용성 중합체의 중합체 골격은 폴리(에틸렌 글리콜)(즉, PEG)일 수 있다. 그러나, 다른 관련 중합체들도 본 발명의 실시예 사용하기에 적합하며 이 점에 있어서 용어 PEG 또는 폴리(에틸렌 글리콜)의 사용은 포괄적인 것이지 배타적인 것이 아니라는 것을 알아야 한다. 용어 PEG는 알콕시 PEG, 이작용성 PEG, 다수-아암 PEG, 포크형 PEG, 분지된 PEG, 펜던트 PEG(즉, 중합체 골격에 달린 하나 이상의 작용기를 갖는 PEG 또는 관련 중합체) 또는 내부에 분해가능한 결합을 갖는 PEG를 포함하는 임의의 형태의 폴리(에틸렌 글리콜)을 포함한다. 중합체 골격은 선형이거나 분지될 수 있다.

[0102] 분지된 중합체 골격은 일반적으로 당해 분야에 알려져 있다. 전형적으로, 분지된 중합체는 중심 브랜치 코어 모이어티 및 중심 브랜치 코어에 연결된 복수의 선형 중합체 쇄를 갖는다. PEG는 일반적으로 다양한 폴리올, 예를 들어, 글리세롤, 펜타에리트리톨 및 소르비톨에 에틸렌 옥사이드를 첨가함으로써 제조될 수 있는 분지된 형태로 사용된다. 중심 브랜치 모이어티는 수개의 아미노산, 예를 들어, 리신으로부터 유도될 수도 있다. 분지된 폴리(에틸렌 글리콜)은 $R(-PEG-OH)_m$ 여기서, R은 코어 모이어티, 예를 들어, 글리세롤 또는 펜타에리트리톨을 나타내고, m은 아암의 수를 나타낸다와 같은 일반적 형태로 나타내어질 수 있다. 다수-아암 PEG 분자, 예를 들어, 미국 특허 번호 5,932,462(이의 전문이 본원에 참조로 포함됨)에 기술되어 있는 것들이 또한 중합체 골격으로 사용될 수 있다.

[0103] 많은 다른 중합체가 또한 본 발명에 적합하다. 2 내지 약 300개 말단을 갖는 비-펩타이드성의 수용성 중합체 골격이 본 발명에 특히 유용하다. 적합한 중합체의 예는, 다른 폴리(알킬렌 글리콜), 예를 들어, 폴리(프로필렌 글리콜)("PPG"), 에틸렌 글리콜과 프로필렌 글리콜의 공중합체 등, 폴리(옥시에틸화된 폴리올), 폴리(올레핀성 알콜), 폴리비닐피롤리돈, 폴리로신, 폴리에틸렌이민, 폴리(하이드록시프로필메타크릴아미드), 폴리(α -하이드록시산), 폴리(비닐 알콜), 폴리포스파젠, 폴리옥사졸린, 폴리(N-아크릴로일모폴린), 예를 들어, 미국 특허 번호 5,629,384(이의 전문이 본원에 참조로 포함됨)에 기술된 것들, 및 이의 공중합체, 터폴리머 및 혼합물을 포함하고 이로 제한되지 않는다. 중합체 골격의 각각의 쇄의 분자량은 다양할 수 있지만, 전형적으로 약 100 Da 내지 약 100,000 Da의 범위 내에 있다.

[0104] 다른 실시형태에서, 스캐폴드 모이어티는 펩타이드, 혈청 알부민, 티오레독신, 면역글로불린, 아미노산, 핵산, 글리칸, 반응성 링커를 포함하는 변형기, 수용성 중합체, 작은 탄소쇄 링커 또는 추가의 치료 화합물일 수 있다. 하나의 실시형태에서, 스캐폴드 모이어티는 사람 및 동물에게 무독성이다. 또 다른 실시형태에서, 스캐폴드는 내인성 혈청 단백질이다. 또 다른 실시형태에서, 스캐폴드 모이어티는 수용성 중합체이다. 또 다른 실시형태에서, 스캐폴드는 비-천연 발생 중합체이다. 또 다른 실시형태에서, 스캐폴드는 추가의 모이어티(예: PEG, 폴

리(프로필렌 글리콜), 폴리(아스파테이트), 생체분자, 치료 모이어티 또는 진단 모이어티)에 대한 공유적 부착으로 변형되는 천연 발생 모이어티이다.

[0105] 친수성 중합체, 예를 들어, PEG의 접합은 당해 분야에 알려져 있다. 가장 일반적인 형태에서, PEG는 각각의 말단이 하이드록실기로 종결되는 선형 중합체이다: $\text{HOCH}_2\text{CH}_2\text{O}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$ (여기서, n 은 전형적으로 약 3 내지 약 4000의 범위이다). 바람직한 실시형태에서, PEG는 본질적으로 단일분산된 분자량 분포를 갖는다. 또 다른 바람직한 실시형태에서, PEG는 선형 중합체이다. 또 다른 바람직한 실시형태에서, PEG는 분지된 중합체이다.

[0106] 많은 말단-작용화되거나 분지된 유도체 및 다양한 크기가 당해 분야에 알려져 있으며 시판된다. 예로써, PEG 또는 PEO의 접합은 본원 및 미국 특허 번호 7,803,777(Defrees 등) 및 4,179,337(Davis 등)(이들 각각은 이들의 전문이 본원에 참조로 포함됨)에서 기술되는 조성물 및 방법을 이용하여 수행될 수 있다.

[0107] 일부 실시형태에서, 보다 작은 치료 화합물은 보다 작은 스캐폴드 모이어티와 짝을 이루고, 보다 큰 치료 화합물은 보다 큰 스캐폴드 모이어티와 짝을 이룬다. 그러나, 보다 작은 치료 화합물은 보다 큰 스캐폴드 모이어티와 짝을 이룰 수 있으며 반대의 경우도 마찬가지로 고려된다. 보다 작은 치료 화합물은 1 Da 내지 10 kDa의 분자량을 갖는 것으로 정의된다. 보다 큰 치료 화합물은 10 kDa 내지 1000 kDa의 분자량을 갖는 것으로 정의된다.

[0108] 본 발명의 스캐폴드는 예를 들어 100 달톤(Da.), 500 Da., 1000 Da., 2000 Da., 5000 Da., 10,000 Da., 15,000 Da., 20,000 Da., 30,000 Da., 40,000 Da. 또는 60,000 Da.의 분자량을 가질 수 있다. 본 발명의 하나의 실시형태에서, "작은" 스캐폴드 모이어티는 약 100 Da. 내지 약 20,000 Da.일 수 있다. 또 다른 실시형태에서, "큰" 스캐폴드 모이어티는 약 20,000 Da. 내지 약 200,000 Da. 초과일 수 있다. 바람직한 실시형태에서, 스캐폴드 모이어티는 약 100 Da. 내지 200,000 Da.이다. 더욱 바람직한 실시형태에서, 스캐폴드 모이어티는 약 100 Da. 내지 20,000 Da., 200 Da. 내지 15,000 Da., 300 Da. 내지 10,000 Da., 400 Da. 내지 9,000 Da., 500 Da. 내지 5,000 Da., 600 Da. 내지 2,000 Da., 1000 Da. 내지 200,000 Da., 20,00 Da. 내지 200,000 Da., 100,000 내지 200,000 Da., 5000 Da. 내지 100,000 Da., 10,000 Da. 내지 80,000 Da., 20,000 Da. 내지 60,000 Da., 또는 20,000 Da. 내지 40,000 Da.이다.

[0109] 캐리어 분자의 또 다른 성분은 바람직하게는 약물을 스캐폴드 또는 캐리어에 공유적으로 부착시키는데 사용되는 커플링기를 포함한다. 본 발명의 커플링기는 아민-반응기, 티올-반응기, 말레이미드기, 티올기, 알데하이드기, NHS-에스테르기, 할로아세틸기, 요오도아세틸기, 브로모아세틸기, SMCC기, 설폰 SMCC기, 카보다이미드기 및 이 작용성 가교-링커, 예를 들어, NHS-말레이미드 또는 이의 조합, 또는 당업자에게 친숙한 다른 커플링기를 포함한다. 본 발명의 커플링기는 티올 결합, 아미드 결합, 옥심 결합, 하이드라존 결합, 티아졸리딘 결합을 촉진할 수 있으며 또는 캐리어를 치료 화합물에 커플링시키기 위해 클릭 화학이라고도 불리는 고리 첨가 반응을 사용한다. 또 다른 실시형태에서, 조성물은 바람직하게는 스캐폴드 분자의 커플링기에 부착된 하나 이상의 치료 화합물의 조합을 포함한다.

[0110] NHS기는 부착 부위에서 조작하지 않아도 천연 펩타이드 및 단백질에 커플링하는데 유용한 것으로 당업자에게 알려져 있다. NHS기는 리신 잔기와 같은 아민기를 갖는 아미노산을 포함하는 대부분의 단백질 및 펩타이드에 대한 부착을 가능하게 한다. 단백질 구조 및 반응 시간이 치료 화합물에 접합되는 캐리어 분자의 부착 부위 및 수에 영향을 끼칠 수 있기 때문에 NHS기의 활용은 캐리어 접합 부위에서 유연성을 제공한다. 예로써, 치료 화합물에 대한 NHS-캐리어의 물비를 조절함으로써, 당업자는 치료 화합물에 부착되는 캐리어 분자의 수를 얼마간 조절할 수 있으므로, 필요한 경우, 하나 초과와 캐리어가 소정의 치료 화합물에 접합되게 한다.

[0111] 캐리어의 치료 화합물에 대한 접합은 적합한 용액, 완충액 또는 용매를 사용하여 특정 물비로 분자들의 용액을 함께 혼합함으로써 달성된다. 예를 들어, 1:1, 2:1, 4:1, 5:1, 10:1, 20:1, 25:1, 50:1, 100:1, 1000:1, 또는 1:2, 1:4, 1:5, 1:10, 1:20 1:25, 1:50, 1:100 또는 1:1000의 캐리어:치료 화합물의 물비가 사용될 수 있다. 특정한 실시형태에서, 1:1, 2:1, 4:1, 5:1, 10:1, 20:1, 25:1 또는 1:2, 1:4, 1:5, 1:10, 1:20 1:25, 1:50의 캐리어:치료 화합물의 물비가 사용될 수 있다. 바람직한 실시형태에서, 1:1, 2:1, 4:1, 5:1, 10:1 또는 1:2, 1:4, 1:5, 1:10의 캐리어:치료 화합물의 물비가 사용될 수 있다. 비율을 변화시킴으로써 치료 화합물에 부착되는 각각의 캐리어의 수를 달리하거나 특정 부착 부위의 선택을 도울 수 있다. 캐리어의 부착은 또한 pH, 완충액, 염 및 온도에 의존적이며, 특히 이들 변수들을 변화시킴으로써 부착 부위, 부착되는 캐리어의 수 및 반응 속도에 영향을 끼칠 수 있다. 예를 들어, pH 6 이하에서의 반응을 위한 pH를 선택함으로써 캐리어의 알데하이드 버전을 치료 단백질 또는 펩타이드의 N-말단에 선택적으로 접합시키는 것을 도울 수 있다.

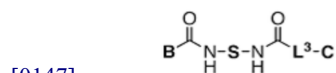
[0112] 특정 실시형태에서, 본 발명은 화학식 I의 캐리어들을 포함하는 캐리어들을 제공한다:

- [0113] 화학식 I
- [0114] $B-L^1-S-L^2-L^3-C$
- [0115] 상기 식에서,
- [0116] B는 비타민 D, 비타민 D 유사체, 비타민 D-관련 대사물, 비타민 D-관련 대사물의 유사체, DBP에 결합하는 펩타이드, 항-DBP 항체, 항-DBP 항체 유도체, DBP에 결합하는 뉴클레오타이드 압타머 또는 DBP에 결합하는 탄소-기반 소분자 중에서 선택되는 표적화기이고;
- [0117] S는 폴리(에틸렌 글리콜), 폴리에틸렌, 폴리에틸렌이민, 폴리(프로필렌글리콜), 펩타이드, 혈청 알부민, 티오레독신, 면역글로불린, 아미노산, 핵산, 글리칸, 반응성 링커를 포함하는 변형기, 폴리락트산, 수용성 중합체, 작은 탄소쇄 링커 또는 추가의 치료 화합물을 포함하는 스캐폴드 모이어티이고;
- [0118] C는 아민-반응기, 티올-반응기, 말레이미드기, 티올기, 디설파이드기, 알데하이드기, NHS-에스테르기, 4-니트로페닐 에스테르, 아크릴아미다졸, 할로아세틸기, 요오도아세틸기, 브로모아세틸기, SMCC기, 설포 SMCC기, 카보디이미드기 및 이작용성 가교-링커, 예를 들어, NHS-말레이미드 또는 이의 조합이고;
- [0119] L^1 및 L^2 는 $-(CH_2)_n-$, $-C(O)NH-$, $-HNC(O)-$, $-C(O)O-$, $-OC(O)-$, $-O-$, $-S-S-$, $-S-$, $-S(O)-$, $-S(O)_2-$ 및 $-NH-$ 중에서 독립적으로 선택되는 링커이고;
- [0120] L^3 은 $-(CH_2)_o-$ 이고;
- [0121] n은 0 내지 3의 정수이고;
- [0122] o는 0 내지 3의 정수이다.
- [0123] 바람직한 실시형태에서, 본 발명은 화학식 I의 캐리어들을 포함하는 캐리어들을 제공한다:
- [0124] 화학식 I
- [0125] $B-L^1-S-L^2-L^3-C$
- [0126] 상기 식에서,
- [0127] B는 비타민 D, 비타민 D 유사체, 비타민 D-관련 대사물, 비타민 D-관련 대사물의 유사체 또는 DBP에 결합하는 탄소-기반 소분자 중에서 선택되는 표적화기이고;
- [0128] S는 폴리(에틸렌 글리콜), 폴리에틸렌, 폴리(프로필렌글리콜), 펩타이드, 혈청 알부민, 아미노산, 핵산, 글리칸, 폴리락트산, 수용성 중합체 또는 작은 탄소쇄 링커를 포함하는 스캐폴드 모이어티이고;
- [0129] C는 말레이미드기, 티올기, 디설파이드기, 알데하이드기, NHS-에스테르기, 요오도아세틸기 또는 브로모아세틸기이고;
- [0130] L^1 및 L^2 는 $-(CH_2)_n-$, $-C(O)NH-$, $-HNC(O)-$, $-C(O)O-$, $-OC(O)-$, $-O-$, $-S-$ 및 $-NH-$ 중에서 독립적으로 선택되는 링커이고;
- [0131] L^3 은 $-(CH_2)_o-$ 이고;
- [0132] n은 0 내지 3의 정수이고;
- [0133] o는 0 내지 3의 정수이다.
- [0134] 더욱 바람직한 실시형태에서, 본 발명은 화학식 I의 캐리어들을 포함하는 캐리어들을 제공한다:
- [0135] 화학식 I
- [0136] $B-L^1-S-L^2-L^3-C$
- [0137] 상기 식에서,

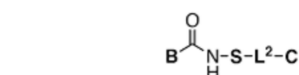
- [0138] B는 비타민 D, 비타민 D 유사체 또는 비타민 D-관련 대사물 중에서 선택되는 표적화기이고;
- [0139] S는 폴리(에틸렌 글리콜), 폴리에리신 또는 폴리(프로필렌글리콜)을 포함하는 스캐폴드 모이어티이고;
- [0140] C는 말레이미드기, 디설파이드기, 알데하이드기, NHS-에스테르기 또는 요오도아세틸기이고;
- [0141] L^1 및 L^2 는 $-(CH_2)_n-$, $-C(O)NH-$, $-HNC(O)-$, $-C(O)O-$ 및 $-OC(O)-$ 중에서 독립적으로 선택되는 링커이고;
- [0142] L^3 은 $-(CH_2)_o-$ 이고;
- [0143] n은 0 내지 3의 정수이고;
- [0144] o는 0 내지 3의 정수이다.

[0145] 가장 바람직한 실시형태에서, 본 발명은 화학식 IIa 및 IIb의 캐리어들을 포함하는 캐리어들을 제공한다:

[0146] 화학식 IIa



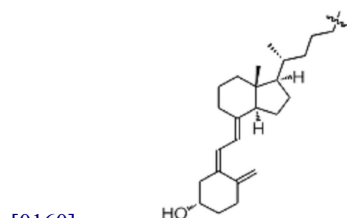
[0148] 화학식 IIb



[0150] 상기 식에서,

- [0151] B는 비타민 D, 비타민 D 유사체 또는 비타민 D-관련 대사물 중에서 선택되는 표적화기이고;
- [0152] S는 폴리(에틸렌 글리콜) 또는 폴리(프로필렌글리콜)을 포함하는 스캐폴드 모이어티이고;
- [0153] C는 말레이미드기, 디설파이드기, 알데하이드기, NHS-에스테르기 또는 요오도아세틸기이고;
- [0154] L^2 은 $-(CH_2)_n-$ 이고;
- [0155] L^3 은 $-(CH_2)_o-$ 이고;
- [0156] n은 1이고;
- [0157] o는 2이다.
- [0158] 화학식 IIa의 특정한 가장 바람직한 실시형태에서, B는 화학식 III로 나타내어지고, S는 폴리(에틸렌 글리콜)이고, L^3-C 는 화학식 IVa로 나타내어진다:

[0159] 화학식 III



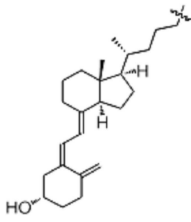
[0161] 화학식 IVa



[0163] 화학식 IIb의 특정한 가장 바람직한 실시형태에서, B는 화학식 III로 나타내어지고, S는 폴리(에틸렌 글리콜)이

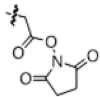
고, L^2 -C는 화학식 IVb로 나타내어진다:

[0164] 화학식 III



[0165]

[0166] 화학식 IVb

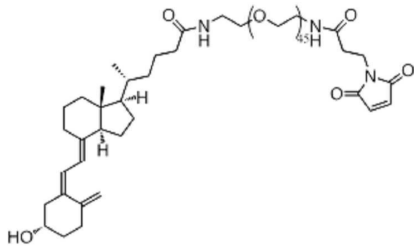


[0167]

[0168] 특정한 가장 바람직한 실시형태에서, S는 약 100 Da. 내지 200,000 Da.이다. 다른 가장 바람직한 실시형태에서, 스캐폴드 모이어티는 약 100 Da. 내지 20,000 Da., 200 Da. 내지 15,000 Da., 300 Da. 내지 10,000 Da., 400 Da. 내지 9,000 Da., 500 Da. 내지 5,000 Da., 600 Da. 내지 2,000 Da., 1000 Da. 내지 200,000 Da., 5000 Da. 내지 100,000 Da., 10,000 Da. 내지 80,000 Da., 20,000 Da. 내지 60,000 Da. 또는 20,000 Da. 내지 40,000 Da.이다.

[0169] 특정한 실시형태에서, 본 발명은 화학식 V로 나타내어지는 캐리어를 제공한다:

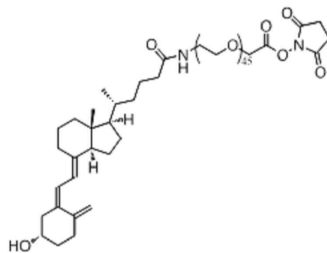
[0170] 화학식 V



[0171]

[0172] 또 다른 특정한 실시형태에서, 본 발명은 화학식 VI로 나타내어지는 캐리어를 제공한다:

[0173] 화학식 VI



[0174]

[0175] 특정 실시형태에서, 본 발명은 화학식 Ia의 화합물을 아미드 커플링제의 존재 하에서 화학식 Ib의 화합물과 반응시키는 단계를 포함하는, 화학식 I의 캐리어를 제조하는 방법을 제공한다:

[0176] 화학식 I

[0177] $B-L^1-S-L^2-L^3-C$

[0178] 화학식 Ia

[0179] $B-COOH$

- [0180] 화학식 Ib
- [0181]
$$\text{H}_2\text{N}-\text{S}-\text{L}^2-\text{L}^3-\text{C}$$
- [0182] 상기 식에서, B, S, C 및 L^2 는 상기 정의된 바와 같고, L^1 은 $-\text{C}(\text{O})\text{NH}-$ 이다.
- [0183] 당업자는 화학식 Ib의 화합물이 유리 염기 또는 적합한 염 형태로 사용될 수 있다는 것을 알 수 있을 것이다. 적합한 염 형태는 TFA, HCl, HBr, MsOH, TfOH 및 AcOH를 포함하고 이로 제한되지 않는다.
- [0184] 임의의 적합한 아미드 커플링제를 화학식 I의 화합물을 형성하는데 사용할 수 있다. 적합한 아미드 커플링제는 2-클로로메틸피리디늄 요오다이드, BOP, PyBOP, HBTU, HATU, DCC, EDCI, TBTU 및 T3P를 포함하고 이로 제한되지 않는다. 특정 실시형태에서, 아미드 커플링제는 단독으로 사용된다. 특정 실시형태에서, 아미드 커플링제는 HOBT 또는 DMAP와 같은 공동-시약과 함께 사용된다. 특정 실시형태에서, 아미드 커플링제는 트리에틸아민 또는 디이소프로필에틸아민과 같은 염기와 함께 사용된다. 특정 실시형태에서, 아미드 커플링제는 HOBT 또는 DMAP와 같은 공동-시약 및 트리에틸아민 또는 디이소프로필에틸아민과 같은 염기 둘다와 함께 사용된다. 당업자는 HOBT 또는 DMAP 이외의 다른 공동-시약도 사용될 수 있다는 것을 알 수 있을 것이다. 또한, 당업자는 트리에틸아민 또는 디이소프로필에틸아민 이외의 다른 염기도 사용될 수 있다는 것을 알 수 있을 것이다.
- [0185] 특정 실시형태에서, 화학식 Ia의 카복실산 성분은 화학식 Id의 에스테르를 가수분해제로 처리함으로써 생성된다:
- [0186] 화학식 Id
- [0187]
$$\text{B}-\text{COOR}$$
- [0188] 상기 식에서, B는 상기 정의된 바와 같고, R은 $\text{C}_1\text{-C}_6$ 분지 또는 비분지 알킬기이다.
- [0189] 임의의 적합한 가수분해제를 화학식 Id의 화합물로부터 화학식 Ia의 화합물을 제조하는데 사용할 수 있다.
- [0190] 특정한 다른 실시형태에서, 본 발명은 화학식 Ia의 화합물을 아미드 커플링제의 존재 하에서 화학식 Ic의 화합물과 반응시켜 화학식 Ie의 화합물을 형성하는 단계; 화학식 Ie의 에스테르를 화학식 If의 카복실산으로 가수분해하는 단계; 및 화학식 If의 카복실산을 화학식 I의 활성 에스테르로 전환시키는 단계를 포함하는, 화학식 Ig의 캐리어를 생성하는 방법을 제공한다:
- [0191] 화학식 Ig
- [0192]
$$\text{B}-\overset{\text{O}}{\parallel}\text{N}-\text{S}-\text{L}^2-\text{L}^3-\text{C}$$
- [0193] 화학식 Ia
- [0194]
$$\text{B}-\text{COOH}$$
- [0195] 화학식 Ic
- [0196]
$$\text{H}_2\text{N}-\text{S}-\text{L}^2-\text{L}^3-\text{COOR}^1$$
- [0197]
$$\begin{array}{ccc} \text{B}-\overset{\text{O}}{\parallel}\text{N}-\text{S}-\text{L}^2-\text{L}^3-\text{COOR}^1 & \longrightarrow & \text{B}-\overset{\text{O}}{\parallel}\text{N}-\text{S}-\text{L}^2-\text{L}^3-\text{COOH} \\ \text{화학식 Ie} & & \text{화학식 If} \end{array}$$
- [0198]
$$\begin{array}{ccc} \text{B}-\overset{\text{O}}{\parallel}\text{N}-\text{S}-\text{L}^2-\text{L}^3-\text{COOH} & \longrightarrow & \text{B}-\text{L}^1-\text{S}-\text{L}^2-\text{L}^3-\text{C} \\ \text{화학식 If} & & \text{화학식 I} \end{array}$$
- [0199] 상기 식에서, B, S, C, R^1 , L^2 , L^3 , n 및 o는 상기 정의된 바와 같고, L^1 은 $-\text{C}(\text{O})\text{NH}-$ 이다.
- [0200] 당업자는 화학식 Ic의 화합물이 유리 염기 또는 적합한 염 형태로 사용될 수 있다는 것을 알 수 있을 것이다. 적합한 염 형태는 TFA, HCl, HBr, MsOH, TfOH 및 AcOH를 포함하고 이로 제한되지 않는다.
- [0201] 임의의 적합한 아미드 커플링제를 화학식 Ie의 화합물을 형성하는데 사용할 수 있다. 적합한 아미드 커플링제는

2-클로로메틸피리디늄 요오다이드, BOP, PyBOP, HBTU, HATU, DCC, EDCI, TBTU 및 T3P를 포함하고 이로 제한되지 않는다. 특정 실시형태에서, 아미드 커플링제는 단독으로 사용된다. 특정 실시형태에서, 아미드 커플링제는 HOBT 또는 DMAP와 같은 공동-시약과 함께 사용된다. 특정 실시형태에서, 아미드 커플링제는 트리에틸아민 또는 디이소프로필에틸아민과 같은 염기와 함께 사용된다. 특정 실시형태에서, 아미드 커플링제는 HOBT 또는 DMAP와 같은 공동-시약 및 트리에틸아민 또는 디이소프로필에틸아민과 같은 염기 둘다와 함께 사용된다. 당업자는 HOBT 또는 DMAP 이외의 다른 공동-시약도 사용될 수 있다는 것을 알 수 있을 것이다. 또한, 당업자는 트리에틸아민 또는 디이소프로필에틸아민 이외의 다른 염기도 사용될 수 있다는 것을 알 수 있을 것이다.

[0202] 특정 실시형태에서, 화학식 Ia의 카복실산 성분은 화학식 Id의 에스테르를 가수분해제로 처리함으로써 생성된다:

[0203] 화학식 Id

[0204] $B-COOR$

[0205] 상기 식에서, B는 상기 정의된 바와 같고, R은 C₁-C₆ 분지 또는 비분지 알킬기이다.

[0206] 임의의 적합한 가수분해제를 화학식 Id의 화합물로부터 화학식 Ia의 화합물을 제조하는데 사용할 수 있다. 적합한 가수분해제는 수산화리튬, 수산화나트륨 및 수산화칼륨을 포함하고 이로 제한되지 않는다.

[0207] 임의의 적합한 가수분해제를 화학식 Id의 화합물로부터 화학식 If의 화합물을 제조하는데 사용할 수 있다. 적합한 가수분해제는 수산화리튬, 수산화나트륨 및 수산화칼륨을 포함하고 이로 제한되지 않는다.

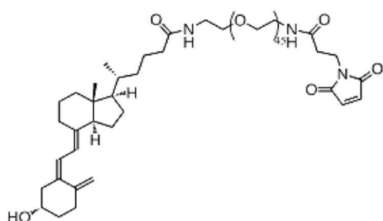
[0208] 임의의 적합한 이탈기를 적합한 커플링제의 존재 하에서 화학식 If의 카복실산과 커플링시켜 화학식 I의 활성 에스테르를 형성할 수 있다. 적합한 이탈기는 이미다졸, HOBT, NHS 및 4-니트로페놀을 포함하고 이로 제한되지 않는다. 적합한 커플링제는 2-클로로메틸피리디늄 요오다이드, BOP, PyBOP, HBTU, HATU, DCC, EDCI, TBTU 및 T3P를 포함하고 이로 제한되지 않는다.

[0209] 일부 실시형태에서, 화학식 I의 활성 에스테르는 적합한 이탈기와 커플링제의 조합을 사용하여 화학식 If의 카복실산으로부터 형성된다.

[0210] 일부 실시형태에서, 화학식 I의 활성 에스테르는 이탈기를 생성하고 또한 커플링 반응을 일으키는 단일 시약을 사용하여 화학식 If의 카복실산으로부터 형성된다. 이러한 시약은 1,1-카보닐디이미다졸, N,N'-디숙신이미딜 카보네이트, 4-니트로페닐 트리플루오로아세테이트 및 HBTU를 포함하고 이로 제한되지 않는다. 일부 실시형태에서, 단일 시약은 단독으로 사용된다. 다른 실시형태에서, 단일 시약은 아실 전달 촉매와 함께 사용된다. 이러한 아실 전달 촉매는 DMAP 및 피리딘을 포함하고 이로 제한되지 않는다. 당업자는 추가의 아실 전달 촉매가 사용될 수 있다는 것을 알 수 있을 것이다.

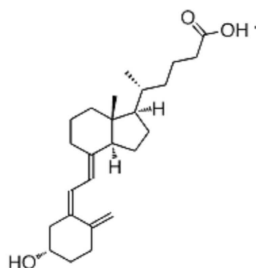
[0211] 특정한 실시형태에서, 본 발명은 화학식 Va의 화합물을 아미드 커플링제의 존재 하에서 화학식 Vb의 화합물과 반응시키는 단계를 포함하는, 화학식 V로 나타내어지는 캐리어를 생성하는 방법을 제공한다:

[0212] 화학식 V



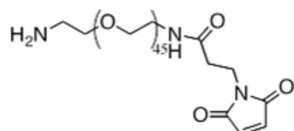
[0213]

[0214] 화학식 Va



[0215]

[0216] 화학식 Vb



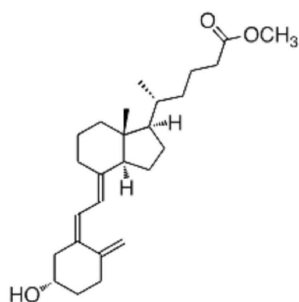
[0217]

[0218] 당업자는 화학식 Vb의 화합물이 유리 염기 또는 적합한 염 형태로 사용될 수 있다는 것을 알 수 있을 것이다. 적합한 염 형태는 TFA, HCl, HBr, MsOH, TfOH 및 AcOH를 포함하고 이로 제한되지 않는다.

[0219] 임의의 적합한 아미드 커플링제를 화학식 V의 화합물을 형성하는데 사용할 수 있다. 적합한 아미드 커플링제는 2-클로로메틸피리디늄 요오다이드, BOP, PyBOP, HBTU, HATU, DCC, EDCI, TBTU 및 T3P를 포함하고 이로 제한되지 않는다. 특정 실시형태에서, 아미드 커플링제는 단독으로 사용된다. 특정 실시형태에서, 아미드 커플링제는 HOBT 또는 DMAP와 같은 공동-시약과 함께 사용된다. 특정 실시형태에서, 아미드 커플링제는 triethylamine 또는 diisopropylethylamine과 같은 염기와 함께 사용된다. 특정 실시형태에서, 아미드 커플링제는 HOBT 또는 DMAP와 같은 공동-시약 및 triethylamine 또는 diisopropylethylamine과 같은 염기 둘다와 함께 사용된다. 당업자는 HOBT 또는 DMAP 이외의 다른 공동-시약도 사용될 수 있다는 것을 알 수 있을 것이다. 또한, 당업자는 triethylamine 또는 diisopropylethylamine 이외의 다른 염기도 사용될 수 있다는 것을 알 수 있을 것이다.

[0220] 특정 실시형태에서, 화학식 Va의 카복실산 성분은 화학식 Vc의 메틸 에스테르를 가수분해제로 처리함으로써 생성된다:

[0221] 화학식 Vc

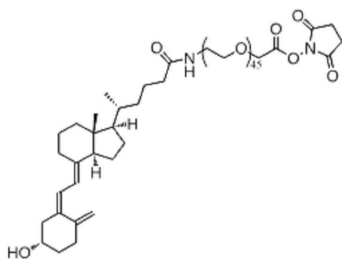


[0222]

[0223] 임의의 적합한 가수분해제를 화학식 Vc의 화합물로부터 화학식 Va의 화합물을 제조하는데 사용할 수 있다. 적합한 가수분해제는 수산화리튬, 수산화나트륨 및 수산화칼륨을 포함하고 이로 제한되지 않는다.

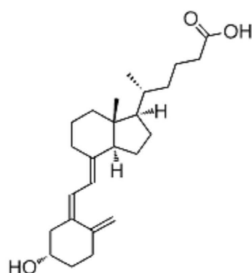
[0224] 또 다른 구체적 실시형태에서, 본 발명은 화학식 Va의 화합물을 아미드 커플링제의 존재 하에서 화학식 VIa의 화합물과 반응시켜 화학식 VIb의 화합물을 형성하는 단계; 화학식 VIb의 에스테르를 화학식 VIc의 카복실산으로 가수분해하는 단계; 및 화학식 VIc의 카복실산을 화학식 VI의 활성 에스테르로 전환시키는 단계를 포함하는, 화학식 VI으로 나타내어지는 캐리어를 생성하는 방법을 제공한다:

[0225] 화학식 VI



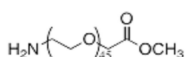
[0226]

[0227] 화학식 Va

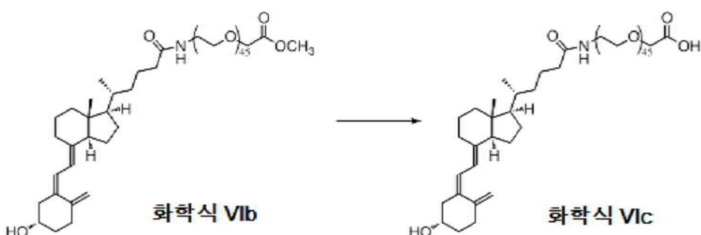


[0228]

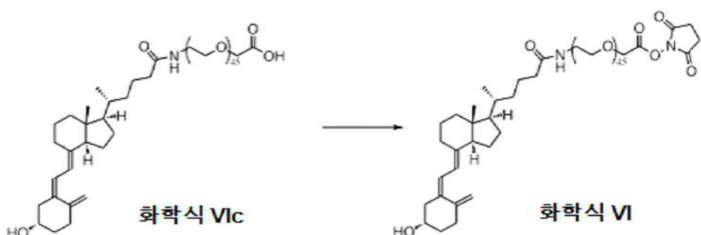
[0229] 화학식 VIa



[0230]



[0231]



[0232]

[0233] 당업자는 화학식 VIa의 화합물이 유리 염기 또는 적합한 염 형태로 사용될 수 있다는 것을 알 수 있을 것이다. 적합한 염 형태는 TFA, HCl, HBr, MsOH, TfOH 및 AcOH를 포함하고 이로 제한되지 않는다.

[0234] 임의의 적합한 아미드 커플링제를 화학식 VIb의 화합물을 형성하는데 사용할 수 있다. 적합한 아미드 커플링제는 2-클로로메틸피리디늄 요오다이드, BOP, PyBOP, HBTU, HATU, DCC, EDCI, TBTU 및 T3P를 포함하고 이로 제한되지 않는다. 특정 실시형태에서, 아미드 커플링제는 단독으로 사용된다. 특정 실시형태에서, 아미드 커플링제는 HOBT 또는 DMAP와 같은 공동-시약과 함께 사용된다. 특정 실시형태에서, 아미드 커플링제는 트리에틸아민 또는 디이소프로필에틸아민과 같은 염기와 함께 사용된다. 특정 실시형태에서, 아미드 커플링제는 HOBT 또는 DMAP와 같은 공동-시약 및 트리에틸아민 또는 디이소프로필에틸아민과 같은 염기 둘다와 함께 사용된다. 당업자는 HOBT 또는 DMAP 이외의 다른 공동-시약도 사용될 수 있다는 것을 알 수 있을 것이다. 또한, 당업자는 트리에틸아민 또는 디이소프로필에틸아민 이외의 다른 염기도 사용될 수 있다는 것을 알 수 있을 것이다.

[0235] 임의의 적합한 가수분해제를 화학식 VIb의 화합물로부터 화학식 VIc의 화합물을 제조하는데 사용할 수 있다. 적합한 가수분해제는 수산화리튬, 수산화나트륨 및 수산화칼륨을 포함하고 이로 제한되지 않는다.

[0236] NHS를 적합한 커플링제의 존재 하에서 화학식 VIc의 카복실산과 커플링시켜 화학식 VI의 활성 에스테르를 형성

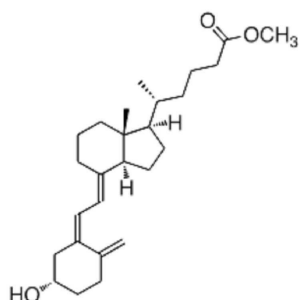
할 수 있다. 적합한 커플링제는 2-클로로메틸피리디늄 요오다이드, BOP, PyBOP, HBTU, HATU, DCC, EDCI, TBTU 및 T3P를 포함하고 이로 제한되지 않는다.

[0237] 일부 실시형태에서, 화학식 VI의 활성 에스테르는 NHS와 커플링제의 조합을 사용하여 화학식 VIc의 카복실산으로부터 형성된다.

[0238] 일부 실시형태에서, 화학식 VI의 활성 에스테르는 이탈기를 생성하고 또한 커플링 반응을 일으키는 단일 시약을 사용하여 화학식 VIc의 카복실산으로부터 형성된다. 이러한 시약은 N,N'-디숙신이미딜 카보네이트를 포함하고 이로 제한되지 않는다. 일부 실시형태에서, 단일 시약은 단독으로 사용된다. 다른 실시형태에서, 단일 시약은 아실 전달 촉매와 함께 사용된다. 이러한 아실 전달 촉매는 DMAP 및 피리딘을 포함하고 이로 제한되지 않는다. 당업자는 추가의 아실 전달 촉매가 사용될 수 있다는 것을 알 수 있을 것이다.

[0239] 특정 실시형태에서, 화학식 Va의 카복실산 성분은 화학식 Vc의 메틸 에스테르를 가수분해제로 처리함으로써 생성된다:

[0240] 화학식 Vc



[0241]

[0242] 임의의 적합한 가수분해제를 화학식 Vc의 화합물로부터 화학식 Va의 화합물을 제조하는데 사용할 수 있다. 적합한 가수분해제는 수산화리튬, 수산화나트륨 및 수산화칼륨을 포함하고 이로 제한되지 않는다.

[0243] 필요한 경우, 상이한 분자량을 갖는 치료 화합물 캐리어 접합체는 겔 여과 크로마토그래피 및/또는 이온 교환 크로마토그래피를 이용하여 분리될 수 있다. 겔 여과 크로마토그래피는 상이한 치료 화합물 캐리어 접합체(예: 단량체, 이량체, 삼량체 등, 여기서 "단량체"는 치료 화합물당 1개의 표적화기 분자를 나타내고, "이량체"는 치료 화합물에 부착된 2개의 표적화기를 나타내며, 그 밖의 것도 같은 양태이다)를 이들의 상이한 분자량(여기서 분자량 차이는 본질적으로 표적화기의 평균 분자량에 상응한다)에 기초하여 분획화하는데 사용될 수 있다.

[0244] 이러한 유형의 분리를 수행하는데 적합한 겔 여과 컬럼은 아머삼 바이오사이언시즈(Amersham Biosciences, Piscataway, N.J.)로부터 입수가 가능한 수퍼덱스(Superdex) 및 세파덱스(Sephadex) 컬럼을 포함한다. 특정 컬럼의 선택은 목적하는 분획화 범위에 따라 것이다. 용출은 일반적으로 적합한 완충액, 예를 들어, 포스페이트, 아세테이트 등을 사용하여 수행된다. 수집된 분획물은 다수의 상이한 방법, 예를 들어, (i) 단백질 함량에 대한 280 nm에서의 흡광도(OD), (ii) 소혈청 알부민(BSA) 단백질 분석 및 (iii) 나트륨 도데실 설페이트 폴리아크릴아미드 겔 전기영동(SDS PAGE)에 의해 분석될 수 있다.

[0245] 치료 화합물 캐리어 접합체의 분리는 또한 역상-고성능 액체 크로마토그래피(RP-HPLC) C18 컬럼(아머삼 바이오사이언시즈 또는 Vydac)을 사용하는 역상 크로마토그래피 또는 아머삼 바이오사이언시즈로부터 구입가능한 이온 교환 컬럼, 예를 들어, DEAE- 또는 CM-세파로즈 이온 교환 컬럼을 사용하는 이온 교환 크로마토그래피에 의해 수행될 수 있다. 생성된 정제된 조성물은 바람직하게는 비-표적화기-접합된 치료 화합물이 실질적으로 없다. 또한, 조성물은 바람직하게는 모든 다른 비-공유적으로 부착된 표적화기가 실질적으로 없다.

[0246] 본 발명은 비타민 D 또는 다른 DBP 결합 분자를 사용하여 약물의 약동학적 특성을 개선시킴으로써 약물을 더욱 효과 있게 하는 조성물 및 방법을 제공한다. 자외선에 노출시 피부에서의 비타민 D의 형성에 대한 자연 경로는, UV 활성화된 비타민 D를 순환되게 하여 세포 과정에 사용될 수 있도록 하는 DBP와의 상호작용에 의존한다[Lips, *Prog. Biophys. Molec. Biol.* 92:4-8(2006); DeLuca, *Nutr. Rev.* 66(suppl. 2):S73-S78(2008)]. DBP는 비타민 D를 빠르고 효과적으로 순환되게 한다. DBP는 또한 활성 비타민 D를 평균 30일 동안 순환되게 한다[Cooke, N.E., and J.G. Haddad. 1989. *Endocr. Rev.* 10:294-307; Haddad, J.G. 등 1993. *J. Clin. Invest.* 91:2552-2555; Haddad, J.G. 1995. *J. Steroid Biochem. Molec. Biol.* 53:579-582]. 본 발명은 치료 화합물을 신체에 보다 효과적으로 전달하기 위해 DBP를 사용하는 것을 처음으로 제공한다. 하나의 실시형태에서, 치료 화합물은

캐리어에 공유적으로 결합되거나 융합된다. 또 다른 실시형태에서, 치료 화합물은 캐리어와 함께 제형화되지만 공유적으로 결합되지 않는다. 하나의 실시형태에서, 캐리어는 약물을 투여 부위로부터 보다 효과적으로 신체에 운반하기 위해 DBP와 상호작용한다. 또 다른 실시형태에서, 캐리어는 약물을 연장된 기간 동안 순환되게 유지시킨다.

[0247] 하나의 실시형태에서, 캐리어는 표적화기 및 표적화기를 치료 화합물에 부착시키기 위한 커플링기를 포함한다. 또 다른 실시형태에서, 캐리어는 표적화기 및 치료 화합물에 연결된 스캐폴드 모이어티를 포함한다. 표적화기는 비타민 D, 비타민 D 유사체, 비타민 D-관련 대사물, 비타민 D-관련 대사물 유사체 또는 비타민 D 결합 단백질(DBP)에 결합하거나 상호작용할 수 있는 또 다른 분자이다. 하나의 실시형태에서, 표적화기는 항체 또는 항체 유도체, DBP 또는 이의 단편에 결합하도록 고안된 펩타이드, DBP 또는 이의 단편에 대해 선택되는 파아지 디스플레이 또는 다른 펩타이드 라이브러리로부터 유도되는 펩타이드, DBP에 결합하는 뉴클레오타이드 압타머, DBP에 결합하도록 고안되거나 DBP 또는 이의 단편에 대해 선택되는 화학적 라이브러리로부터 유도되는 소분자 또는 본원에서 개시되는 바와 같이 DBP에 결합할 수 있는 모이어티이다. 또 다른 실시형태에서, 캐리어는 DBP 자체 또는 DBP의 유도체를 포함한다.

[0248] 비타민 D는 일 그룹의 지용성 세코스테로이드이다. 비타민 D에 대한 수개의 형태(비타민)가 존재한다. 2개의 주요한 형태는 비타민 D₂ 또는 에르고칼시페롤, 및 비타민 D₃ 또는 콜레칼시페롤이고, 아래 첨자가 없는 비타민 D는 D₂ 또는 D₃ 또는 둘다를 지칭한다. 사람에서, 비타민 D는 콜레칼시페롤(비타민 D₃) 또는 에르고칼시페롤(비타민 D₂)로서 소화될 수 있다. 또한, 사람은 태양 노출이 적당한 경우 콜레스테롤로부터 이를 합성할 수 있다.

[0249] 비타민 D는 다양한 기관에서 발견되는 효소에 의해 또한 DBP에 결합할 수 있는 일 부류의 "비타민 D 대사물"로 추가로 변형된다. 예를 들어, 비타민 D는 간에서 칼시디올(25OH 하이드록시-비타민 D)로 전환된다. 칼시디올의 일부는 신장에 의해 칼시트리올(1, 25(OH)₂ 디하이드록시-비타민 D)로 전환된다. 칼시디올은 또한 다른 목적으로 신장의 바깥에서 칼시트리올로 전환된다. 또한, 24, 25(OH)₂ 디하이드록시-비타민 D는 신체에서 발견된다. 따라서, 하나의 실시형태에서, 표적화기는 비타민 D 대사물이다.

[0250] 또 다른 실시형태에서, 표적화기는 "비타민 D 유사체"이다. 이들 화합물들은 비타민 D 구조에 기초하고, 비타민 D의 일부 기능을 보유한다. 이들은 비록 친화도는 다양하나 비타민 D와 동일한 단백질 일부(예: DBP 및 비타민 D 수용체)와 상호작용한다. 예시적 유사체는 하기를 포함한다: OCT(측쇄의 22번 위치에 산소 원자를 갖는 1,25(OH)₂D₃의 화학적 합성 유사체)[Abe *et.al.*, *FEBS Lett.* 226:58-62(1987)]; 저미니(Gemini) 비타민 D 유사체(1 α .25-디하이드록시-20R-21(3-하이드록시-3-듀테로메틸-4,4,4-트리듀테로부틸)-23-인-26,27-헥사플루오로-콜레칼시페롤(BXL0124))[So 등, *Mol Pharmacol.* 79(3):360-7(2011)]; 파리칼시톨(모든 천연 비타민 D 대사물에서 발견되는 탄소-19 메틸렌기가 결여된 비타민 D₂ 유도된 스테롤)[Slatopolsky 등, *Am J. Kidney Dis.* 26: 852(1995)]; 독세르칼시페롤(1 α -하이드록시비타민 D₂)(간에서 1 α .25(OH)₂D₂로 하이드록실화되는 프로드럭인 알파칼시톨(1 α -하이드록시비타민 D₃)과 유사, 알파칼시톨과 달리 독세르칼시페롤은 또한 24-하이드록실화되어 1 α .24(S)-(OH)₂D₂를 생성)[Knutson 등, *Biochem Pharmacol* 53: 829(1997)]; 디하이드로타키스테롤₂(DHT₂)(생체 내에서 25(OH)DHT₂ 및 1,25(OH)₂DHT₂로 하이드록실화됨)[McIntyre 등, *Kidney Int.* 55: 500(1999)](또한, 문헌 [Erben and Musculoskel, Neuron Interact. 2(1):59-69(2001); Steddon 등 *Nephrol. Dial. Transplant.* 16(10): 1965-1967(2001)] 참조). 상기 참조문들은 이들의 전문이 참조로 본원에 포함된다.

[0251] 또 다른 실시형태에서, 캐리어는 추가로 표적화기 및 치료 화합물에 공유적으로 부착되는 약제학적으로 허용되는 스캐폴드 모이어티를 포함한다. 본 발명의 캐리어의 스캐폴드 모이어티는 반드시 참여하는 것은 아니나 치료 화합물의 기능에 기여하거나 이의 약동학적 특성을 개선할 수 있다. 본 발명의 스캐폴드는 표적화기가 DBP에 결합하는 것을 실질적으로 방해하지 않는다. 마찬가지로, 본 발명의 스캐폴드는 치료 화합물의 구조 또는 기능을 실질적으로 방해하지 않는다. 스캐폴드 모이어티의 길이는 표적화기 및 치료 화합물의 특징에 의존적이다. 당업자는 원자의 다양한 조합이 다양한 결합 사이의 공지된 거리에 기초하여 다양한 길이의 분자를 제공한다는 것을 인식할 것이다[Morrison, and Boyd, *Organic Chemistry, 3rd Ed*, Allyn and Bacon, Inc., Boston, Mass.(1977), 참조로 본원에 포함됨]. 본 발명에 의해 고려되는 다른 스캐폴드는 펩타이드 링커, 단백질 링커, 예를 들어, 사람 혈청 알부민, 항체 또는 이의 단편, 헥산 링커, 작은 탄소쇄 링커, 산소 또는 질소가 사이에 끼인 탄소 링커를 포함하고, 또한 이들 예들의 조합도 고려된다.

- [0252] 또 다른 실시형태에서, 펩타이드가 DBP에 결합하는 표적화기로 선택되었다. DBP 결합 펩타이드를 위한 펩타이드 또는 단백질 라이브러리 스크리닝 방법은 당해 분야에 공지되어 있다. 바람직한 실시형태에서, DBP 결합 펩타이드를 확인하는 2-하이브리드 방법이 이용된다. 또 다른 바람직한 실시형태에서, DBP 결합을 위한 시험관내 스크린이 이용된다. 이어서, 이러한 표적 펩타이드는 약물에 공유적으로 부착되거나 대안적으로는 이와 함께 제형화될 수 있다. 바람직한 실시형태에서, 스캐폴드 모이어티가 사용된다. 또 다른 실시형태에서, 표적화기는 DBP에 결합하기 때문에 선택되는 압타머이다. 이어서, 상기 압타머는 스캐폴드를 통해 약물에 공유적으로 부착되거나 이와 함께 제형화되거나 약물에 직접적으로 융합될 수 있다.
- [0253] 하나의 실시형태에서, 약물은 DNA 분자, RNA 분자, 압타머(단일 가닥 또는 이중 가닥), DNA 또는 RNA 올리고뉴클레오타이드, 선형 또는 환형인 큰 DNA 분자, RNA 간섭을 위해 사용되는 올리고뉴클레오타이드(RNAi), DNA의 변형물, 예를 들어, DNA/RNA 하이브리드 분자의 대체물, 합성 DNA-유사 분자, 예를 들어, PNA 또는 다른 핵산 유도체 분자이다[참조: WO07/035922, 이의 전문이 본원에 참조로 포함됨]. 또 다른 실시형태에서, 치료 화합물은 뉴클레아제-내성 DNA 또는 RNA 올리고뉴클레오타이드로 구성된다. 바람직한 실시형태에서, 뉴클레아제-내성 DNA 올리고뉴클레오타이드는 모폴리노(즉, 서열-특이적 방식으로 핵산에 결합하는 핵산의 포스포로디아미테이트 유사체, AVI BioPharma, Bothell, WA)이다.
- [0254] 또 다른 실시형태에서, 약물은 소분자 또는 화학 물질이다. 또 다른 실시형태에서, 약물은 펩타이드 또는 펩타이드의 유도체, 예를 들어, PNA이다. 또 다른 실시형태에서, 약물은, 전체 길이 또는 단편 또는 절두된 버전이거나, 폐길화(PEGylated), 당화되거나, 그렇지 않으면 공유적으로 또는 비공유적으로 변형되거나 비변형된, 폴리펩타이드의 전부 또는 일부로 구성된 단백질이다.
- [0255] 치료 화합물은 단백질, 펩타이드, 당단백질, 당펩타이드, 당지질, 다당류, 올리고당류, 핵산 등을 포함한다. 예시적 폴리펩타이드는 성장 인자, 예를 들어, 간세포 성장 인자(HGF), 신경 성장 인자(NGF), 표피 성장 인자(EGF), FGF21을 포함하는 섬유아세포 성장 인자, 혈액 응고 인자, 호르몬, 예를 들어, 성장 호르몬, 여포 자극 호르몬(FSH), 사이토킨, 인터페론, 종양 괴사 인자, 효소, 골 형태형성 단백질, 뉴로트로핀 및 성장 분화 인자를 포함한다. 본 발명의 조성물 및 방법은 또한 상술된 단백질, 당단백질, 소분자, 호르몬, 성장 인자 및 환자 또는 피험자에서 발견되는 다른 분자의 접합된 작용제, 길항제 또는 다른 효능제를 포함한다.
- [0256] 또한, 치료 펩타이드도 본 발명의 범위에 속한다. 용어 펩타이드는 여러 개의 아미노산을 포함하는 것을 의미한다. 본 발명의 펩타이드 내의 아미노산은 천연 발생 또는 비-천연 발생일 수 있다. 본 발명의 펩타이드는 화학적으로 또는 생물학적으로 합성될 수 있으며, 시스테인-농축 펩타이드, 환형 펩타이드, 스테이플식 펩타이드, D- 또는 L-아미노산 및 이의 혼합물을 포함하는 펩타이드, 펩타이드 모사체, 펩타이드-핵산(PNA) 및 이의 조합을 포함할 수 있다. 예시적 실시형태는 AIDS 백신, 알러지 백신, 소염 펩타이드, 항-인테그린 펩타이드, 항-TCR 백신, 항-알러지 펩타이드, 항암 펩타이드, 항진균 펩타이드, 항세균 펩타이드, 항류마티스 펩타이드, 항-트롬빈 펩타이드, 항바이러스 펩타이드, G 단백질-커플링된 수용체(GPCR) 리간드 및 관련 펩타이드(예: 세크레틴 패밀리), CGRP 유사체, GPCR 길항제, CMV 펩타이드, 칼파인 억제제, 콜라게나제 억제제, DAP 억제제, 디펜신, 투석 올리고펩타이드, 인헨신, 엔도르핀, 엔도텔린 길항제, 피브로넥틴 억제제, 가스트린 길항제, 그렐린, 글루카곤 길항제, 고나도렐린 유사체, 성장 인자 펩타이드, 시상하부 호르몬, 뇌하수체 호르몬, 장 기능 및 식욕을 조절하는 펩타이드, 프로염증성 지방 조직 생성물, 줄기 세포 증식 자극 펩타이드, 프로염증성 펩타이드, 천연 생성물, 단순 포진 백신, 헤파린 결합 펩타이드, B형 간염 백신, 면역조절 펩타이드, 인플루엔자 백신, LHRH 길항제, 오피오이드 펩타이드 유도체, MMP 억제제, MUC-1 백신, 말라리아 백신, 흑색종 백신, 수막염 백신, 뉴로펩타이드, 오피오이드 펩타이드, 골형성 성장 펩타이드, 골다공증 펩타이드, 유두종바이러스 백신, 전립선암 백신, RGD 펩타이드, RSV 백신, T 세포 수용체 펩타이드 등을 포함한다. 본 발명은 본원에서 기술되는 방법에 의해 추가의 변형을 통해 임상 생성물로 개선될 이의 합성 유사체를 고려한다. 당업자는 증가된 반감기, 작용 지속, 흡수 및/또는 생체이용률을 제공하기 위해 본원에서 기술되는 변형을 따를 수 있는 많은 추가의 상업적으로 중요한 펩타이드를 인식할 것이다.
- [0257] 또한, 분지를 갖거나 갖지 않는 분지형 또는 환형 펩타이드도 본원에서 기술되는 실시형태의 범위 내에서 고려된다. 환형, 분지형 및 분지된 환형 펩타이드는 번역후 자연 과정으로부터 생성되며, 또한 적합한 합성 방법에 의해서도 생성된다. 일부 실시형태에서, 본원에서 기술되는 임의의 펩타이드 생성물은 이어서 알킬-글리코사이드 표면활성제 모이어티에 공유적으로 부착되는 상술된 펩타이드 유사체를 포함한다.
- [0258] 또한, 본원에서 청구되는 유사체의 변형에 의해 적합한 위치에서 치환되는 펩타이드쇄도 본원에서 제시되는 실시형태의 범위 내에서 고려된다. 예를 들어, 링커 아미노산 상에서, 예를 들어, 리신의 ϵ -위치에서 지방산, 예

를 들어, 옥탄산, 데칸산, 도데칸산, 테트라데칸산, 헥사데칸산, 옥타데칸산, 3-페닐프로피온산 등으로 또는 포화되거나 불포화된 알킬쇄에 의해 아실화된다[Zhang, L. and Bulaj, G. (2012) Curr Med Chem 19: 1602-1618, 이의 전문이 참조로 본원에 포함됨].

[0259] 또한, 천연 및 비천연 아미노산 또는 천연 아미노산의 유사체로 구성된 펩타이드 쇠도 본원에서 제시되는 실시형태의 범위 내에서 고려된다. 본원에서 사용되는 펩타이드 및/또는 단백질 "유사체"는 파라-치환된 타이로신, 오르토-치환된 타이로신 및 메타-치환된 타이로신을 포함하는 타이로신 유사체와 같은 천연 아미노산에 기초한 비천연 아미노산을 포함하며, 타이로신 상의 치환기는 아세틸기, 벤조일기, 아미노기, 하이드라진, 하이드록시아민, 티올기, 카복시기, 메틸기, 이소프로필기, C2-C20 직쇄 또는 분지된 탄화수소, 포화 또는 불포화 탄화수소, O-메틸기, 폴리에테르기, 할로젠, 니트로기 등을 포함한다. Tyr 유사체의 예는 2,4-디메틸-타이로신(Dmt), 2,4-디에틸-타이로신, O-4-알릴-타이로신, 4-프로필-타이로신, Ca-메틸-타이로신 등을 포함한다. 리신 유사체의 예는 오르니틴(Orn), 호모-리신, Ca-메틸 리신(CMeLys) 등을 포함한다. 페닐알라닌 유사체의 예는 메타-치환된 페닐알라닌을 포함하고 이로 제한되지 않으며, 치환기는 메톡시기, C1-C20 알킬기, 예를 들어, 메틸기, 알릴기, 아세틸기 등을 포함한다. 구체적인 예는 2,4,6-트리메틸-L-페닐알라닌(Tmp), O-메틸-타이로신, 3-(2-나프틸)알라닌(Nal(2)), 3-(1-나프틸)알라닌(Nal(1)), 3-메틸-페닐알라닌, 1,2,3,4-테트라하이드로이소퀴놀린-3-카복실산(Tic), 플루오로화된 페닐알라닌, 이소프로필-페닐알라닌, p-아지도-페닐알라닌, p-아실-페닐알라닌, p-벤조일-페닐알라닌, p-요오도-페닐알라닌, p-브로모페닐알라닌, p-아미노-페닐알라닌 및 이소프로필-페닐알라닌 등을 포함하고 이로 제한되지 않는다.

[0260] 또한, 당해 분야에 공지된 비표준 또는 비천연 아미노산, 예를 들어, C-알파-이치환된 아미노산, 예를 들어, Aib, Ca-디에틸글리신(Deg), 아미노사이클로펜탄-1-카복실산(Ac4c), 아미노사이클로펜탄-1-카복실산(Ac5c) 등을 포함하는 펩타이드 쇠가 본원에서 제시되는 실시형태의 범위 내에서 고려된다. 이러한 아미노산은 빈번히 통제된 구조로 이어지고, 종종 알파 나선형 구조로 편향된다[Kaul, R. and Balaram, P.(1999) Bioorg Med Chem 7: 105-117, 이의 전문이 참조로 본원에 포함됨]. 유사체 고안에 유용한 이러한 비천연 아미노산의 추가의 예는 호모-아르기닌(Har) 등이다. 특정 예에서의 환원된 아미드 결합의 치환은 효소적 파괴로부터 개선된 보호를 제공하거나 수용체 결합을 변화시킨다. 예를 들어, 잔기들 사이에 환원된 아미드 결합을 갖는 Tic-Phe 디펩타이드 유니트(Tic-F[CH₂-NH][~]-Phe로 표시됨)의 삽입은 효소 분해를 감소시킨다.

[0261] 또한, 임의로 본 발명의 펩타이드 또는 단백질로 도입될 수 있는 아미노 또는 카복실 말단에서의 변형도 본원에서 제시되는 실시형태의 범위 내에서 고려된다[Nestor, J.J., Jr.(2009) Current Medicinal Chemistry 16: 4399 - 4418]. 예를 들어, 본 발명의 펩타이드 또는 단백질은 N-말단에서 절두되거나 아실화될 수 있다[Gourlet, P., 등(1998) Eur J Pharmacol 354: 105-111, Gozes, I. and Furman, S.(2003) Curr Pharm Des 9: 483-494, 이의 내용이 본원에 참조로 포함됨]. 펩타이드 또는 단백질의 N-말단에 대한 다른 변형, 예를 들어, D-Phe와 같은 D-아미노산의 결실 또는 삽입도 또한 본원에서 기술되는 변형물, 예를 들어, 장쇄 알킬 글리코사이드로 치환되는 경우 강력하고 장기 지속적인 작용제 또는 길항제를 제공할 수 있다. 이러한 작용제 및 길항제도 또한 상업적 유용성을 가지며, 본원에서 기술되는 고려된 실시형태의 범위에 속한다. 상기 참조문들은 이들의 전문이 본원에 포함된다.

[0262] 또한, 치료 화합물 유사체에 공유적으로 부착되거나 이에 융합되거나 이와 함께 제형화되는 캐리어도 본원에서 기술되는 실시형태의 범위 내에서 고려되며, 천연 치료 화합물은 아세틸화, 아실화, 페닐화, ADP-리보실화, 아미드화, 지질 또는 지질 유도체의 공유적 부착, 포스포티딜이노시톨의 공유적 부착, 가교결합, 고리화, 디설파이드 결합 형성, 탈메틸화, 시스테인의 공유적 가교결합 형성물의 형성, 피로글루타메이트의 형성, 포르밀화, 감마-카복실화, 당화, GPI 앵커 형성, 하이드록실화, 요오드화, 메틸화, 미리스토일화, 산화, 단백질 분해 프로세스, 인산화, 프레닐화, 라세미화, 당화, 지질 부착, 황화, 글루탐산 잔기의 감마-카복실화, 하이드록실화 및 ADP-리보실화, 셀레노일화, 황화, 아미노산의 단백질로의 전달-RNA 매개된 부가, 예를 들어, 아르기닐화 및 유비퀴틴화에 의해 변형된다. 예를 들어, 문헌[Nestor, J.J., Jr.(2007) Comprehensive Medicinal Chemistry II 2: 573-601, Nestor, J.J., Jr.(2009) Current Medicinal Chemistry 16: 4399 - 4418, Creighton, T.E.(1993, Wold, F.(1983) Posttranslational Covalent Modification of Proteins 1-12, Seifter, S. and England, S.(1990) Methods Enzymol 182: 626-646, Rattan, S.I., 등(1992) Ann N Y Acad Sci 663: 48-62]을 참조한다. 상기 참조문들은 이들의 전문이 참조로 포함된다.

[0263] 당화된 치료 펩타이드는, 예를 들어, 수지 상에서 통상의 Fmoc 화학 및 고체상 펩타이드 합성 기법을 이용하여 제조될 수 있으며, 목적하는 보호된 글리코아미노산은 펩타이드 합성 전에 제조된 후 펩타이드 합성 동안 목적하는 위치에서 펩타이드 쇠에 도입된다. 따라서, 치료 펩타이드 중합체 접합체는 시험관내에서 접합될 수 있다.

당화는 탈보호 전에 일어날 수 있다. 아미노산 글리코사이드의 제조는 문헌[U.S. Pat. No. 5,767,254, WO 2005/097158, 및 Doores, K., 등, Chem. Commun., 1401-1403, 2006, 이들의 전문이 참조로 본원에 포함됨]에 기술되어 있다. 예를 들어, 세린 및 트레오닌 잔기의 알파 및 베타 선택적 당화는 쾨니그스-노르(Koenigs-Knorr) 반응 및 레믹스(Lemieux) 제자리 아노머화 방법을 이용하고 쉬프(Schiff) 염기 중간체를 사용하여 수행된다. 이어서, 쉬프 염기 글리코사이드의 탈보호가 약한 산성 조건 또는 가수소분해를 이용하여 수행된다. 당화된 치료 펩타이드 접합체를 포함하는 조성물은 성장하는 펩타이드 쇄를 보호된 아미노산(보호된 아미노산 중 하나 이상은 당화된다)과 단계적으로 접촉시킨 후 수용성 중합체 접합을 수행하는 것을 포함하는 단계적 고체상 펩타이드 합성법에 의해 제조된다. 이러한 조성물은 당화되고 접합된 치료 펩타이드의 단일 종에 대해 적어도 95%, 적어도 97% 또는 적어도 98%의 순도를 가질 수 있다.

[0264] 본원에서 정의되고/되거나 기술되는 치료 펩타이드의 하나 이상의 아미노산 잔기에서의 도입에 사용될 수 있는 단당류는 글루코즈(덱스트로즈), 프럭토즈, 갈락토즈 및 리보스를 포함한다. 사용에 적합한 추가의 단당류는 글리세르알데하이드, 디하이드록시아세톤, 에리트로즈, 트레오즈, 에리트리톨로즈, 아라비노즈, 릭소즈, 크실로즈, 리불로즈, 크실룰로즈, 알로즈, 알트로즈, 만노즈, N-아세틸글루타민산, 푸코즈, N-아세틸갈락토사민 및 N-아세틸글루코사민 등을 포함한다. 본원에서 정의되고/되거나 기술되는 치료 펩타이드, 치료 펩타이드의 하나 이상의 아미노산 잔기를 변형시키는데 사용하기 위한 글리코사이드, 예를 들어, 단당류, 이당류 및 삼당류는 특히 수크로즈, 락토즈, 말토즈, 트레할로즈, 멜리비오즈 및 셀로비오즈를 포함한다. 삼당류는 아카르보즈, 라피노즈 및 멜레지토즈를 포함한다.

[0265] 본 발명의 추가의 실시형태에서, 본원에서 정의되고/되거나 기술되는 치료 화합물은 바이오틴에 화학적으로 커플링될 수 있다. 이어서, 바이오틴/치료 화합물은 아비딘에 결합될 수 있다.

[0266] 또한, 항체인 폴리펩타이드도 본 발명의 범위에 속한다. 용어 항체는 모노클로날 항체, 폴리클로날 항체, 독소-접합된 항체, 사람화된 항체, 항체 단편(예: Fc 도메인), Fab 단편, 단일쇄 항체, 이특이적 또는 다중특이적 항체, Llama 항체, 나노-바디, 디아바디, Fv, Fab, F(ab')₂, Fab', scFv, scFv-Fc 등을 포함하는 것이다. 또한, 이 용어에는 항체-융합 단백질, 예를 들어, Ig 키메라가 포함된다. 바람직한 항체는 사람화된 또는 완전 사람 모노클로날 항체 또는 이의 단편을 포함한다.

[0267] 용어 "항체" 및 "면역글로불린"은 광의로 상호교환적으로 사용되며, 모노클로날 항체(예: 전체 길이 또는 온전한 모노클로날 항체), 폴리클로날 항체, 일가 항체, 다가 항체, 다중특이적 항체(예: 목적하는 생물학적 활성을 나타내는 한 이특이적 항체)를 포함하고, 또한(본원에서 더욱 상세히 기술되는 바와 같은) 특정 항체 단편을 포함할 수 있다. 항체는 키메라, 사람, 사람화된 및/또는 친화도 성숙된 항체일 수 있다.

[0268] 용어 "전체 길이 항체", "온전한 항체" 및 "전체 항체"는 실질적으로 온전한 형태로서 하기에서 정의되는 바와 같은 항체 단편이 아닌 항체를 지칭하고자 본원에서 상호교환적으로 사용된다. 상기 용어는 특히 Fc 영역을 포함하는 중쇄를 갖는 항체를 지칭한다. "항체 단편"은 바람직하게는 항원 결합 영역을 포함하는 온전한 항체의 일부분을 포함한다. 항체 단편의 예는 Fab, Fab', F(ab')₂ 및 Fv 단편; 디아바디; 선형 항체; 단일쇄 항체 분자; 및 항체 단편으로부터 형성되는 다중특이적 항체를 포함한다. 본원에서 사용되는 용어 "모노클로날 항체"는 실질적으로 균질한 항체군으로부터 수득되는 항체를 지칭하며, 즉, 항체군을 포함하는 개별 항체는 소량으로 존재할 수 있는 가능한 변이, 예를 들어, 천연 발생 변이를 제외하고는 동일하다. 따라서, 변형체인 "모노클로날"은 개별 항체들의 혼합물이 아닌 항체의 특성을 나타낸다.

[0269] 특정 실시형태에서, 이러한 모노클로날 항체는 전형적으로 표적물에 결합하는 폴리펩타이드 서열을 포함하는 항체를 포함하며, 표적물-결합 폴리펩타이드 서열은 다수의 폴리펩타이드 서열로부터 단일 표적물 결합 폴리펩타이드 서열의 선별을 포함하는 과정에 의해 수득되었다. 예를 들어, 선별 과정은 복수의 클론, 예를 들어, 하이브리도마 클론, 파아지 클론 또는 재조합 DNA 클론의 풀로부터 특유한 클론의 선택일 수 있다. 선택된 표적물 결합 서열은, 예를 들어, 표적물에 대한 친화성 개선, 표적물 결합 서열 사람화, 세포 배양물 중 이의 생성 개선, 생체내에서 이의 면역원성 감소, 다중특이적 항체 생성 등을 위해서 더욱 변화될 수 있으며, 변화된 표적물 결합 서열을 포함하는 항체도 또한 본 발명의 모노클로날 항체라는 것을 알아야 한다. 전형적으로 상이한 결정자(에피토프)에 대해 지시되는 상이한 항체들을 포함하는 폴리클로날 항체 제제와는 대조적으로, 모노클로날 항체 제제의 각각의 모노클로날 항체는 항원 상의 단일 결정자에 대해 지시된다. 모노클로날 항체 제제는, 이의 특이성에 추가하여, 보통 다른 면역글로불린에 의해 오염되지 않는다는 점에서 유리하다.

[0270] 항원에 특이적으로 결합하는 항체는 항원에 대해 고친화성을 갖는다. 항체 친화도는 해리 상수(K_d)에 의해 측정될 수 있다. 특정 실시형태에서, 본원에서 제공되는 항체는 =100 nM, =10 nM, =1 nM, =0.1 nM, =0.01 nM, 또는

=0.001 nM(예: 10^{-8} M 이하, 예를 들어, 10^{-8} M 내지 10^{-13} M, 예를 들어, 10^{-9} M 내지 10^{-13} M)의 해리 상수(Kd)를 갖는다.

[0271] 하나의 실시형태에서, Kd는 하기 검정에서 기술되는 바와 같이 관심 항체의 Fab 버전 및 이의 항원을 사용하여 수행되는 방사선표지된 항원 결합 검정(RIA)에 의해 측정된다. 항원에 대한 Fab의 용액 결합 친화도는 Fab를 비표지된 항원의 적정 시리즈의 존재 하에서 최소 농도의(125 I)-표지된 항원과 함께 평형화한 후, 결합된 항원을 항-Fab 항체-코팅된 플레이트로 포획함으로써 측정된다(예를 들어, 문헌[Chen 등, J. Mol. Biol. 293:865-881(1999)] 참조). 검정 조건을 확립하기 위해서, MICROTITER® 다수-웰 플레이트(Thermo Scientific)를 50 mM 중탄산나트륨(pH 9.6) 중의 5 μ g/ml의 포획 항-Fab 항체(Cappel Labs)를 사용하여 밤새 코팅한 후, 실온(약 23°C)에서 2 내지 5시간 동안 PBS 중의 2%(w/v) 소혈청 알부민으로 차단한다. 비-흡착 플레이트(Nunc #269620)에서, 100 μ M 또는 26 μ M [125 I]-항원을 관심 Fab의 일련의 희석물과 함께 혼합한다(예를 들어, 문헌[Presta 등, Cancer Res. 57:4593-4599(1997)]에서의 항-VEGF 항체인 Fab-12의 평가와 일치함). 이어서, 관심 Fab는 밤새 항온처리된다; 그러나, 항온처리는 평형에 도달하는 것을 확실하게 하기 위해서 보다 긴 기간(예: 약 65시간) 동안 계속될 수 있다. 이후, 혼합물을 실온에서(예를 들어, 1시간 동안) 항원처리하기 위해 포획 플레이트로 옮긴다. 이어서, 용액을 제거하고, 플레이트를 PBS 중의 0.1% 폴리소르베이트 20(TWEEN-20®)으로 8회 세척한다. 플레이트가 건조되면, 150 μ l/웰의 섬광물(MICROSCINT-20™; Packard)을 첨가하고, 플레이트를 10분 동안 TOPCOUNT™ 감마 계수기(Packard)에서 계수한다. 최대 결합의 20% 이하를 제공하는 각각의 Fab의 농도를 경쟁적 결합 검정에 사용하기 위해 선택한다.

[0272] 또 다른 실시형태에 따라, Kd는 약 10 반응 단위(RU)의, 예를 들어, 고정된 항원 CM5 칩과 함께 25°C에서 BIACORE®-2000 또는 BIACORE®-3000(BIAcore, Inc., Piscataway, N.J.)을 사용하는 표면 플라즈몬 공명 검정을 이용하여 측정된다. 간단히 설명하면, 카복시메틸화된 텍스트란 바이오센서 칩(CM5, BIACORE, Inc.)을 공급자의 지침에 따라 N-에틸-N'-(3-디메틸아미노프로필)-카보디이미드 하이드로클로라이드(EDC) 및 N-하이드록시수신이미드(NHS)를 사용하여 활성화시킨다. 항원을 10 mM 나트륨 아세테이트 pH 4.8을 사용하여 5 μ g/ml(약 0.2 μ M)로 희석시키고, 5 μ l/분의 유속으로 주입하여 약 10 반응 단위(RU)의 커플링된 단백질을 수득한다. 항원 주입 후, 1 M 에탄올아민을 주입하여 비반응된기를 차단한다. 동역학 측정을 위해, Fab의 2배 연속 희석물(0.78 nM 내지 500 nM)을 PBS 중에서 약 25 μ l/분의 유속으로 25°C에서 0.05% 폴리소르베이트 20(TWEEN-20™) 표면활성제(PBST)와 함께 주입한다. 결합 속도(kon) 및 해리 속도(koff)를 단순 1대1 랭뮤어(Langmuir) 결합 모델(BIACORE® 평가 소프트웨어 버전3.2)을 사용하고 동시에 결합 및 해리 센소그램을 피팅하면서 계산한다. 평형 해리 상수(Kd)는 koff/kon의 비로 계산된다. 예를 들어, 문헌[Chen 등, J. Mol. Biol. 293:865-881(1999)]을 참조한다. 결합 속도(on-rate)가 상기한 표면 플라즈몬 공명 검정으로 $10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ 을 초과하는 경우, 결합 속도는, 분광기, 예를 들어, 정지-유동 장착된 분광광도기(Aviv Instruments) 또는 교반 큐벳을 갖는 8000-시리즈 SLM-AMINCO™ 분광광도기(ThermoSpectronic)에서 측정시, 증가 농도의 항원의 존재 하에서 PBS(pH 7.2) 중의 20 nM 항-항원 항체(Fab 형태)의 25°C에서의 형광 방출 강도(여기 = 295 nm; 방사 = 340 nm, 16 nm 밴드-통과)의 증가 또는 감소를 측정하는 형광 퀀칭 기법을 이용하여 측정될 수 있다. 또한, 당업자가 알 수 있는 바와 같이, 상술된 아민 커플링 방법(CM5 칩) 대신, 칩 표면에 대한 표적 항원을 위한 다른 커플링 화학(예: 스트렙타비딘/바이오틴, 소수성 상호작용 또는 디설파이드 화학)도 쉽게 이용가능하다.

[0273] 변형체인 "모노클로날"은 실질적으로 균질한 항체군으로부터 수득되는 항체의 특성을 나타내며, 임의의 특정한 방법에 의해 항체를 생성하는 것이 필요한 것으로 이해되지 말아야 한다. 예를 들어, 본 발명에 따라 사용될 모노클로날 항체는, 예를 들어, 하이브리도마 방법(예를 들어, 문헌[Kohler 등, Nature, 256: 495(1975); Harlow 등, Antibodies: A Laboratory Manual, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2nd ed. 1988); Hammerling 등, in: Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas 563-681(Elsevier, N.Y., 1981)]), 재조합 DNA 방법(예를 들어, 문헌[U.S. Patent No. 4,816,567] 참조), 파아지 디스플레이 기법(예를 들어, 문헌[Claackson 등, Nature, 352: 624-628(1991); Marks 등, J. Mol. Biol. 222: 581-597(1992); Sidhu 등, J. Mol. Biol. 338(2): 299-310(2004); Lee 등, J. Mol. Biol. 340(5): 1073-1093(2004); Fellouse, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 101(34): 12467-12472(2004); 및 Lee 등, J. Immunol. Methods 284(1-2): 119-132(2004)] 참조), 및 사람 면역글로불린 서열을 암호화하는 사람 면역글로불린 유전자자리 또는 유전자의 일부 또는 전부를 갖는 동물에서 사람 또는 사람-유사 항체를 생성하기 위한 기법(예를 들어, 문헌[W098/24893; W096/34096; W096/33735; W091/10741; Jakobovits 등, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 2551(1993); Jakobovits 등, Nature 362: 255-

258(1993); Bruggemann 등, Year in Immunol. 7:33(1993); U.S. Patent Nos. 5,545,807; 5,545,806; 5,569,825; 5,625,126; 5,633,425; 5,661,016; Marks 등, Bio. Technology 10: 779-783(1992); Lonberg 등, Nature 368: 856-859(1994); Morrison, Nature 368: 812-813(1994); Fishwild 등, Nature Biotechnol. 14: 845-851(1996); Neuberger, Nature Biotechnol. 14: 826(1996) 및 Lonberg and Huszar, Intern. Rev. Immunol. 13: 65-93(1995)] 참조)을 포함하는 다양한 기법으로 제조될 수 있다. 상기 특허, 공개문 및 참조문들은 이들의 전문이 참조로 포함된다.

[0274] 비-사람(예: 쥐과) 항체의 "사람화된" 형태는 비-사람 면역글로불린으로부터 유도되는 최소 서열을 포함하는 키메라 항체이다. 하나의 실시형태에서, 사람화된 항체는 수용체의 추가 변 영역으로부터의 잔기가 비-사람 종(공여자 항체), 예를 들어, 마우스, 래트, 래빗 또는 목적하는 특이성, 친화성 및/또는 능력을 갖는 비-사람 영향류의 추가 변 영역으로부터의 잔기에 의해 대체되는 사람 면역글로불린(수용체 항체)이다. 일부 예에서, 사람 면역글로불린의 프레임워크 영역(FR) 잔기가 상응하는 비-사람 잔기에 의해 대체된다. 또한, 사람화된 항체는 수용체 항체 또는 공여자 항체에서 발견되지 않는 잔기를 포함할 수 있다. 이들 변형들은 항체 성능을 더욱 개선하기 위해 수행될 수 있다. 일반적으로, 사람화된 항체는 적어도 1개, 전형적으로 2개의 가변 도메인을 실질적으로 전부 포함할 것이며, 이 경우 추가 변 루프의 전부 또는 실질적으로 전부는 비-사람 면역글로불린의 것에 상응하며, FR의 전부 또는 실질적으로 전부는 사람 면역글로불린 서열의 것이다. 임의로, 사람화된 항체는 또한 면역글로불린 불변 영역(Fc), 전형적으로 사람 면역글로불린의 Fc의 적어도 일부를 포함할 것이다. 보다 구체적인 것을 위해, 문헌[Jones 등, Nature 321 :522-525(1986); Riechmann 등, Nature 332:323-329(1988); 및 Presta, Curr. Op. Struct. Biol. 2:593-596(1992)]을 참조한다. 또한 하기 리뷰 논문 및 이에 인용된 참조문을 참조한다: Vaswani and Hamilton, Ann. Allergy, Asthma & Immunol. 1:105-115(1998); Harris, Biochem. Soc. Transactions 23: 1035-1038(1995); Hurlle and Gross, Curr. Op. Biotech. 5:428-433(1994). 상기 참조문들은 이들의 전문이 참조로 포함된다.

[0275] "사람 항체"는 사람에 의해 생성되는 항체의 아미노산 서열에 상응하는 아미노산 서열을 포함하는 항체이며/이거나 본원에서 기술되는 바와 같은 사람 항체를 제조하기 위한 기법 중 임의의 것을 이용하여 제조되었다. 이러한 기법은 사람-유도된 조합적 라이브러리, 예를 들어, 파아지 디스플레이 라이브러리를 스크리닝하는 것(예를 들어, 문헌[Marks 등, J. Mol. Biol., 222: 581-597(1991) 및 Hoogenboom 등, Nucl. Acids Res., 19: 4133-4137(1991)] 참조); 사람 모노클로날 항체의 생성을 위해 사람 골수종 및 마우스-사람 이종골수종 세포주를 사용하는 것(예를 들어, 문헌[Kozbor, J. Immunol., 133: 3001(1984); Brodeur 등, Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, pp. 55-93(Marcel Dekker, Inc., New York, 1987); 및 Boerner 등, J. Immunol., 147: 86(1991)] 참조); 및 내인성 면역글로불린 생성 부재 하에 사람 항체의 전체 레퍼토리를 생성할 수 있는 유전자식 동물(예: 마우스)에서 모노클로날 항체를 생성하는 것(예를 들어, 문헌[Jakobovits 등, Proc. Natl. Acad. Sci USA, 90: 2551(1993); Jakobovits 등, Nature, 362: 255(1993); Bruggermann 등, Year in Immunol., 7: 33(1993)] 참조)을 포함한다. 사람 항체에 대한 이러한 정의는 특별히 비-사람 동물로부터의 항원-결합 잔기를 포함하는 사람화된 항체를 배제시킨다.

[0276] 이러한 항체에 대한 모든 공지된 유형이 본 발명의 범위에 속한다. 예시적 항체는 성장 인자, 사이토킨, 림포카인, 세포 표면 수용체, 효소, 혈관 내피 성장 인자, 섬유아세포 성장 인자 및 이들 각각의 수용체에 대한 항체에 결합하는 것들을 포함한다. 다른 예시적 항체는 수용체-IgG Fc 융합 단백질 및 당단백질에 대해 지시되는 모노클로날 항체를 포함한다. 상기 열거된 폴리펩타이드 중 임의의 것에 대한 임의의 변형된(예: 돌연변이된) 버전도 또한 본 발명의 범위에 속한다. 본 발명에서 사용될 치료 화합물은 당해 분야에 알려져 있으며, 예를 들어, 미국 특허 번호 7,608,681(이의 전문이 참조로 본원에 포함됨)에 기술되어 있다. 또한, 본 발명은 자가면역 질환 또는 바람직하지 못한 염증 상태를 일으키는 피험자에서의 천연 발생 또는 비-천연 발생 항체에 대한 억제제 또는 길항제의 접합체를 고려한다.

[0277] 캐리어의 어셈블리에 대한 일부 양태는 당해 분야에 널리 공지된 화학적 방법을 이용한다. 예를 들어, 비타민 E-PEG 는 이스트만 케미칼(Eastman Chemical)에 의해 제조되고, 바이오틴-PEG는 많은 PEG 제조자, 예를 들어, 엔존(Enzon), 넥타르(Nektar) 및 NOF 코포레이션에 의해 제조된다. 일부 비타민 및 이에 연결된 다른 치료 화합물을 갖는 PEG 분자를 제조하는 방법은 이들 화학적 방법 및 당해 분야에 공지된 다른 화학적 방법을 따른다. PEG의 올리고뉴클레오타이드 또는 관련 분자의 부착은, 예를 들어, PEG2-N-하이드록시숙신이미드 에스테르가 5' 아민 모이어티를 통해 올리고뉴클레오타이드에 커플링될 때 일어난다. 수개의 커플링 방법들이 고려되며, 예를 들어, 아민기, 예를 들어, 펩타이드 상의 리신 잔기에 대한 NHS 커플링, 예를 들어, 시스테인 잔기 상의 설프하이드릴기에 대한 말레이미드 커플링, 설프하이드릴기에 대한 요오도아세틸 커플링, 설프하이드릴기에 대한

피리딜디티올 커플링, 탄화수소기에 커플링하기 위한 하이드라지드, N-말단에 커플링하기 위한 알데하이드 또는 1급 또는 2급 아민과 반응하는 것으로 알려진 테트라플루오로페닐 에스테르 커플링을 포함한다. 다른 가능한 화학적 커플링 방법이 당업자에게 알려져 있으며, 대체될 수 있다. 예로써, 본 발명의 커플링기를 사용하는 접합은 문헌[W093/012145(Atassi 등) 및 7,803,777(Defrees 등), 이들의 전문이 본원에 참조로 포함됨]에서 기술되는 조성물 및 방법을 이용하여 수행될 수 있다.

[0278] 하나의 실시형태에서, 캐리어 화합물은 약물에 공유적으로 또는 비공유적으로 부착될 수 있다. 또 다른 실시형태에서, 캐리어 화합물은 약물에서 분리되나 기능 단위로 제형화되도록 개별 농도로 함께 혼합된다. 본 발명의 예시적 약물 제형은 수성 용액, 유기 용액, 분말 제형, 고체 제형 및 혼합상 제형을 포함한다.

[0279] 본 발명의 약제학적 조성물은 본 발명의 화합물 중 임의의 화합물 및 이의 약제학적으로 허용되는 염을 임의의 약제학적으로 허용되는 캐리어, 보조제 또는 비히클과 함께 포함한다. 본 발명의 약제학적 조성물에 사용될 수 있는 약제학적으로 허용되는 캐리어, 보조제 및 비히클은 이온 교환기, 알루미늄, 알루미늄 스테아레이트, 레시틴, 혈청 단백질, 예를 들어, 사람 혈청 알부민, 완충 물질, 예를 들어, 인산염, 글리신, 소르브산, 칼륨 소르베이트, 포화된 식물성 지방의 부분적 글리세라이드 혼합물, 물, 염 또는 전해질, 예를 들어, 프로타민 설페이트, 인산수소이나트륨, 인산수소칼륨, 염화나트륨, 아연 염, 콜로이드성 실리카, 마그네슘 트리실리케이트, 폴리비닐 피롤리돈, 셀룰로즈-기반 물질, 폴리에틸렌 글리콜, 나트륨 카복시메틸셀룰로즈, 폴리아크릴레이트, 왁스, 폴리에틸렌-폴리프로필렌-블록 중합체, 폴리에틸렌 글리콜 및 양모지를 포함하고 이로 제한되지 않는다.

[0280] 약제학적으로 허용되는 염은 독성 부작용 없이 치료 조성물의 목적하는 생물학적 활성을 유지한다. 이러한 염의 예는(a) 무기산, 예를 들어, 염산, 브롬산, 황산, 인산, 질산 등으로부터 형성되는 산부가염 및 유기산, 예를 들어, 아세트산, 트리플루오로아세트산, 타르타르산, 숙신산, 말레산, 푸마르산, 글루콘산, 시트르산, 말산, 아스코르브산, 벤조산, 타닌산, 파모산, 알긴산, 폴리글루탐산, 나프탈렌설포산, 나프탈렌 디설포산, 폴리갈락투론산 등으로부터 형성되는 염;(b) 염기부가염 또는 다가 금속 양이온, 예를 들어, 아연, 칼슘, 비스무트, 바륨, 마그네슘, 알루미늄, 구리, 코발트, 니켈, 카드뮴 등과 함께 형성되는 복합체; 또는 N,N'-디벤질에틸렌디아민 또는 에틸렌디아민으로부터 형성되는 유기 양이온과 함께 형성되는 복합체; 또는(c)(a) 및(b)의 조합, 예를 들어, 아연 탄나이트 염 등이다.

[0281] 본 발명의 약제학적 조성물은 경피, 경구, 비경구, 흡입, 눈, 국소, 직장, 코, 볼(설하 포함), 질 또는 이식 저장기 모드에 의해 투여될 수 있다. 본 발명의 약제학적 조성물은 임의의 통상의 무독성의 약제학적으로 허용되는 캐리어, 보조제 또는 비히클을 포함할 수 있다. 본원에서 사용되는 용어 비경구는 피하, 피내, 정맥내, 근육내, 관절내, 활막내, 흉골내, 격막내, 병변내, 두개내 주사 또는 주입 기법을 포함한다.

[0282] 또한, 일부 실시형태에서, 활성 성분으로서, 약제학적으로 허용되는 무독성 성분과 혼합된, 본원에서 기술되는 치료학적 화합물 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염을 포함하는 약제학적 조성물이 고려된다. 상술된 바와 같이, 이러한 조성물은 비경구 투여를 위해, 특히 액상 용액 또는 현탁액의 형태로; 경구 또는 볼 투여를 위해, 특히 정제 또는 캡슐의 형태로; 비내 투여를 위해, 특히 산제, 점비제, 증발 용액 또는 에어로졸의 형태로; 흡입을 위해, 특히 광범위하게 정의되는 부형제와 함께 액상 용액 또는 건조 산제의 형태로; 경피 투여를 위해, 특히 피부 패치 또는 마이크로니들 패치의 형태로; 및 직장 또는 질 투여를 위해 특히 좌제의 형태로 제조될 수 있다.

[0283] 조성물은 편리하게는 단위 투약 형태로 투여될 수 있으며, 약제학 분야에서 널리 공지된 방법 중 임의의 방법에 의해, 예를 들어, 문헌[Remington's Pharmaceutical Sciences, 17th ed., Mack Publishing Co., Easton, PA(1985), 이의 전문이 참조로 본원에 포함됨]에 기술되어 있는 바와 같이, 제조될 수 있다. 비경구 투여를 위한 제형은 부형제로서 멸균수 또는 염수 알킬렌 글리콜, 예를 들어, 프로필렌 글리콜, 폴리알킬렌 글리콜, 예를 들어, 폴리에틸렌 글리콜, 당류, 식물성 오일, 수소첨가 나프탈렌, 혈청 알부민 또는 다른 나노입자(AbraxaneTM American Pharmaceutical Partners, Inc. Schaumburg, IL)에서 사용되는 바와 같은 나노입자) 등을 포함할 수 있다. 경구 투여를 위해, 제형은 담즙산염 또는 아실카르니틴의 첨가에 의해 증진될 수 있다. 코 투여를 위한 제형은 증발 용매, 예를 들어, 하이드로플루오로카본 중의 고체 또는 용액일 수 있으며, 안정화를 위한 부형제, 예를 들어, 당류, 표면활성제, 서브마이크론 무수 알파-락토즈 또는 텍스트란을 포함할 수 있거나, 점비제 또는 계량 스프레이의 형태로 사용하기 위한 수성 또는 유성 용액일 수 있다. 볼 투여를 위한 전형적 부형제는 슈가, 칼슘 스테아레이트, 마그네슘 스테아레이트, 프리젤라틴화된 전분 등을 포함한다.

[0284] 장기간에 걸쳐, 예를 들어, 1주 내지 1년의 기간 동안 피험자에게 본원에서 기술되는 변형된 치료 화합물을 전

달하는 것은 목적하는 방출 기간 동안 충분한 활성 성분을 포함하는 조절된 방출 시스템을 단일 투여함으로써 달성될 수 있다. 다양한 조절된 방출 시스템, 예를 들어, 모놀리식(monolithic) 또는 저장기-유형 마이크로캡슐, 데포(depot) 이식물, 중합체성 하이드로겔, 삼투 펌프, 소포, 마이셀, 리보솜, 경피 패치, 이온영동(iontophoretic) 디바이스 및 다른 주사가 가능한 투약 형태가 이러한 목적에 사용될 수 있다. 활성 성분의 전달이 요구되는 부위에서의 국소화는 특정 장애의 치료시 유리한 것으로 입증될 수 있는 일부 조절 방출 디바이스의 부가적인 특징이다.

[0285] 경피 투여를 위한 특정 실시형태에서, 피부의 장애물을 통한 전달은 전극(예: 이온영동), 전기천공 또는 피부에 짧은 고전압 전기 자극의 적용, 고주파, 초음파(예: 초음파영동(sonophoresis)), 마이크로프로젝션(예: 마이크로니들), 제트 주입기, 열적 절제, 자기영동(magnetophoresis), 레이저, 속도 또는 광역학적 파장을 사용함으로써 증진될 것이다. 약물은 단층의 접착제 내 약물(drug-in-adhesive), 다층의 접착제 내 약물, 저장기, 매트릭스 또는 증기 스타일 패치에 포함될 수 있거나 패치리스(patchless) 기법을 이용할 수 있다. 피부 장애물을 통한 전달은 또한 캡슐화, 피부 지질 플루이다이저 또는 유공 또는 고체 마이크로구조 경피 시스템(MTS, 예를 들어, 3M에 의해 제조되는 것), 제트 주입기를 사용함으로써 증진될 수 있다. 피부를 통한 치료 화합물의 통과를 돕기 위한 제형에 대한 첨가제는 프로드럭, 화합물질, 표면활성제, 세포 투과 펩타이드, 투과 증진제, 캡슐화 기술, 효소, 효소 억제제, 겔, 나노입자 및 펩타이드 또는 단백질 사페론을 포함한다.

[0286] 조절-방출 제형의 하나의 형태는, 본원에 참조로 포함되는 켄트(Kent) 등의 미국 특허 번호 4,675,189의 선구적 작업에 기술되어 있는 바와 같이, 코폴리(락트산/글리콜산)와 같은 서서히 분해되는 무독성 비-항원성 중합체에 분산되거나 캡슐화되는 치료 화합물 또는 이의 염을 포함한다. 화합물 또는 이의 염은 또한 콜레스테롤 또는 다른 지질 매트릭스 펠릿 또는 실라스토머 매트릭스 이식물에 제형화될 수 있다. 추가의 지연 방출, 데포 이식물 또는 주사가 가능한 제형은 당업자에게 명백할 것이다. 예를 들어, 문헌[Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems, JR Robinson ed., Marcel Dekker Inc., New York, 1978; 및 Controlled Release of Biologically Active Agents, RW Baker, John Wiley & Sons, New York, 1987]을 참조한다. 상기 참조문들은 이들의 전문이 참조로 포함된다.

[0287] 조절-방출 제형의 추가의 형태는 생분해성 중합체, 예를 들어, 코폴리(락트산/글리콜산) 또는 락트산과 PEG의 블록 공중합체의 용액을 포함하거나, 데포 제형이 되도록 피하 또는 근육내 주사되는 생체허용성(bioacceptable) 용매이다. 본원에서 기술되는 치료 화합물과의 이러한 중합체 제형의 혼합은 작용 제형의 매우 긴 지속 시간을 달성하는데 적합하다.

[0288] 코 투여를 위해 제형화되는 경우, 코 점막을 통한 흡수는 약 0.1 내지 15중량%, 약 0.5 내지 4중량% 또는 약 2 중량% 범위의 양의 계면활성제, 예를 들어, 글리코콜산, 콜산, 타우로콜산, 에토콜산, 데옥시콜산, 체노데옥시콜산, 디하이드로콜산, 글리코데옥시콜산, 사이클텍스트린 등에 의해 더욱 증진될 수 있다. 감소된 자극과 함께 보다 높은 효능을 나타내는 것으로 보고된 흡수 증진제의 추가의 부류는 알킬 말토사이드의 부류, 예를 들어, 테트라데실말토사이드이다[Arnold, JJ 등, 2004, J Pharm Sci 93: 2205-13; Ahsan, F 등, 2001, Pharm Res 18:1742046, 및 이의 참조문헌들, 이들 모두 참조로 본원에 포함됨].

[0289] 약제학적 조성물은 멸균 주사가 가능한 제제, 예를 들어, 멸균 주사가 가능한 수성 또는 유성 현탁액의 형태일 수 있다. 이러한 현탁액은 적합한 분산제 또는 습윤제(예를 들어, 트윈 80) 및 현탁제를 사용하여 당해 분야에 공지된 기법에 따라 제형화될 수 있다. 멸균 주사가 가능한 제제는 또한 무독성의 비경구적으로 허용가능한 희석제 또는 용매 중의 멸균 주사가 가능 용액 또는 현탁액, 예를 들어, 1,3-부탄디올 중의 용액일 수 있다. 사용될 수 있는 허용가능한 비히클 및 용매 중에는 만니톨, 물, 링거 용액 및 등장성 염화나트륨 용액이 있다. 또한, 멸균된 비휘발성 오일이 용매 또는 현탁 매질로서 통상적으로 사용된다. 이러한 목적 상, 합성적 모노- 또는 디글리세라이드를 포함하는 임의의 블랜드 비휘발성 오일이 사용될 수 있다. 지방산, 예를 들어, 올레산 및 이의 글리세라이드 유도체가 주사제의 제조에 유용하며, 천연의 약제학적으로 허용되는 오일, 예를 들어, 올리브 오일 또는 피마자유, 특히 이들의 폴리옥시에틸화된 버전이 유용하다. 이들 오일 용액 또는 현탁액은 또한 장쇄 알콜 희석제 또는 분산제, 예를 들어, Ph. Helv 또는 유사한 알콜을 포함할 수 있다.

[0290] 본 발명의 약제학적 조성물은 캡슐, 정제 및 수성 현탁액 및 용액을 포함하고 이로 제한되지 않는 경구적으로 허용되는 투약 형태로 경구 투여될 수 있다. 경구용 정제의 경우, 일반적으로 사용되는 캐리어는 락토즈 및 옥수수 전분을 포함한다. 윤활제, 예를 들어, 마그네슘 스테아레이트가 또한 전형적으로 첨가된다. 캡슐 형태로 경구 투여하는데 유용한 희석제는 락토즈 및 무수 옥수수 전분을 포함한다. 수성 현탁액이 경구 투여되는 경우, 활성 성분은 유화제 및 현탁제와 배합된다. 필요한 경우, 특정한 감미제 및/또는 향미제 및/또는 착색제가 첨가

될 수 있다.

- [0291] 본 발명의 약제학적 조성물은 또한 직장 투여를 위한 좌제의 형태로 투여될 수 있다. 이들 조성물은 본 발명의 화합물을 실온에서는 고체이나 직장 온도에서는 액체이므로 직장에서 용융되어 활성 성분을 방출시킬 적합한 비-자극 부형제와 함께 혼합함으로써 제조될 수 있다. 이러한 물질은 코코아 버터, 밀랍 및 폴리에틸렌 글리콜을 포함하고 이로 제한되지 않는다.
- [0292] 본 발명의 약제학적 조성물의 국소 투여는, 특히 목적하는 치료가 국소 적용에 의해 쉽게 접근가능한 부위 또는 기관을 수반하는 경우 특히 유용하다. 피부에 국소적으로 적용하기 위해, 약제학적 조성물은 캐리어에 현탁되거나 용해된 활성 성분을 포함하는 적합한 연고로 제형화되어야 한다. 본 발명의 화합물의 국소 투여를 위한 캐리어는 광유, 액상 석유, 백색 석유, 프로필렌 글리콜, 폴리옥시에틸렌 폴리프로필렌 화합물, 유화용 왁스 및 물을 포함하고 이로 제한되지 않는다. 대안적으로, 약제학적 조성물은 캐리어 중에 현탁되거나 용해된 활성 화합물을 포함하는 적합한 로션 또는 크림과 함께 제형화될 수 있다. 적합한 캐리어는 광유, 소르비탄 모노스테아레이트, 폴리소르베이트 60, 세틸 에스테르 왁스, 세테아릴 알콜, 2-옥틸도데칸올, 벤질 알콜 및 물을 포함하고 이로 제한되지 않는다. 본 발명의 약제학적 조성물은 또한 직장용 좌제 제형에 의해 또는 적합한 관장 제형으로 하부 장관에 국소적으로 적용될 수 있다. 국소 경피 패치도 또한 본 발명에 속한다.
- [0293] 본 발명의 약제학적 조성물은 코 에어로졸 또는 흡입에 의해 투여될 수 있다. 이러한 조성물은 약제학적 제형 분야에 널리 알려진 기법으로 제조되거나 벤질 알콜 또는 다른 적합한 보존제, 생체이용률을 증진시키기 위한 흡수 촉진제, 플루오로카본 및/또는 당해 분야에 알려진 다른 가용화제 또는 분산제를 사용하여 염수 중의 용액으로 제조될 수 있다.
- [0294] 흡입에 의한 전달을 위해 제형화되는 경우, 다수의 제형들이 이점을 제공한다. 치료 화합물의 쉽게 분산되는 고체, 예를 들어, 디케토피페라진(예를 들어, 테크노스피어(Technosphere) 입자[Pfutzner, A and Forst, T, 2005, Expert Opin Drug Deliv 2:1097-1106]) 또는 유사한 구조물에서의 흡착은 치료 화합물의 초기 흡수를 빠르게 하는 제형을 제공한다. 치료 화합물 및 부형제를 포함하는 동결건조된 분말, 특히 유리질 입자는 우수한 생체이용률로 폐에 전달하는데 유용하며, 예를 들어, Exubera®(화이자 및 아벤티스 파마슈티칼스 인크(Pfizer and Aventis Pharmaceuticals Inc.)에 의한 흡입 인슐린)을 참조한다.
- [0295] 약 0.01 내지 약 100 mg/체중 kg/일, 바람직하게는 0.5 내지 약 50 mg/체중 kg/일의 활성 성분 화합물 투약 수준이 질환을 예방 및 치료하는데 유용하다. 전형적으로, 본 발명의 약제학적 조성물은 약 1 내지 약 5회/일 또는 대안적으로는 연속 주입으로 투여될 것이다. 이러한 투여는 장기간 또는 단기간 요법으로 사용될 수 있다. 단일 투약 형태를 생성하기 위해 캐리어 물질과 함께 배합될 수 있는 활성 성분의 양은 치료되는 호스트 및 특정 투여 방식에 따라 다양할 것이다. 전형적 제제는 약 5% 내지 약 95%의 활성 화합물(w/w)을 포함할 것이다. 바람직하게는, 이러한 제제는 약 20% 내지 약 80%의 활성 화합물을 포함한다.
- [0296] 필요한 경우, 환자의 병태의 개선시, 본 발명의 화합물, 조성물 또는 배합물의 유지 용량이 투여될 수 있다. 이어서, 투여 용량 또는 횟수 또는 이들 모두는, 증상에 따라, 개선된 증상이 보유되는 수준으로 감소될 수 있으며, 증상이 목적하는 수준으로 완화되었을 때 치료가 중단되어야 한다. 그러나, 환자는 질환의 증상이 재발되면 장기간에 걸친 간헐적 치료를 필요로 할 수 있다.
- [0297] 당업자라면 알 수 있는 바와 같이, 상기 인용된 용량보다 적거나 많은 용량이 요구될 수 있다. 임의의 특정 환자에 대한 특정 용량 및 치료 요법은 사용되는 특정 화합물의 활성, 연령, 체중, 일반적 건강 상태, 성별, 식이, 투여 시간, 배설율, 약물 배합, 감염의 중증도 및 경과, 감염에 대한 환자의 소인 및 치료하는 의사의 판단을 포함한 다양한 요소에 따를 것이다.
- [0298] 캐리어-약물 접합체, 용합물 또는 제형은 비접합, 비용합 또는 비제형화된 약물에 비해 약물 제조자 및 환자에게 이점을 제공한다. 구체적으로, 캐리어-약물 접합체 또는 제형은 비접합, 비용합 또는 비제형화된 약물에 비해 보다 적고 덜 빈번한 투약을 필요로 하는 보다 강력하고 보다 긴 지속성 약물일 것이다. 이는 의료 비용을 낮추고 환자에 대한 약물 투여 스케줄을 보다 편리하게 한다. 캐리어-약물 접합체 또는 제형은 또한 일반적으로 정맥내 주사로 주입되는 약물의 주사 경로에 영향을 끼쳐 피하 주사를 통해 또는 경피 전달 시스템으로 투여될 수 있다. 피하 주사 또는 경피 전달을 통한 투여 경로는 집에서 환자가 스스로 투여할 수 있기 때문에 가장 선호된다. 이는 환자의 순응을 개선할 수 있다.
- [0299] 본 발명의 또 다른 양태에서, DBP의 수준은 캐리어-약물 요법의 일부로서 증가될 수 있다. 에스트로겐이 DBP 수준을 증가시킬 수 있다고 보고되었다[Speckaert 등, Clinica Chimica Acta 371:33]. 본원에서는 DBP의 수준이

캐리어-약물 접합체의 보다 효과적인 전달을 위해 에스트로겐 투여에 의해 증가될 수 있다는 것이 고려된다.

[0300] 본 발명의 또 다른 양태에서, 캐리어가 약물을 경피적으로 전달하는데 사용될 수 있다는 것이 고려된다. DBP는 일반적으로 피부 표면에 가까운 위치에서 UV 활성화된 비타민 D를 수송하므로, 캐리어를 갖는 경피 전달 시스템의 사용이 가능해진다.

[0301] 본원에서 기술되는 본 발명을 보다 충분히 이해할 수 있도록 하기 위해, 하기 실시예가 기술된다. 이들 실시예들은 단지 본 발명을 설명하기 위한 것이지 어떠한 방식으로든 본 발명을 제한하려는 것이 아니라는 것을 알아야 한다.

[0303] 실시예

[0304] 실시예 1: 말레이미드 반응기를 갖는 비타민 D₃-PEG로 구성된 예시적 티올-반응성 캐리어의 제조

[0305] 본 실시예에서 캐리어 상의 말레이미드는 실시예 2 및 3에서의 단백질 또는 펩타이드 상의 유리 시스테인에 접합시키는데 사용되었다. 본 발명의 스케폴드의 PEG 크기는 약 0.1 kDa 내지 100 kDa인 것이 고려된다. 따라서, 2kDa PEG가 본 실시예를 위한 스케폴드로서 선택되었다. 본 실시예에서 사용되는 출발 물질은 하기 공급처로부터 구입하였다: 비타민 D 유사체(화합물 1, 토론토 리썬치 케미칼스 카탈로그 번호 B691610) 및 2kDa mPEG-말레이미드(화합물 4, 크리에이티브 PEG웍스 카탈로그 번호 PHB-940).

[0306] 도 2에 따라, (R)-메틸5-((1R,3aS,7aR,E)-4-((Z)-2-((S)-5-((3급-부틸디메틸실릴)옥시)-2-메틸렌사이클로헥실리덴)에틸리덴)-7a-메틸옥타하이드로-1H-인덴-1-일)헥사노에이트(화합물 1, 7.5 mg, 0.0145 mmol, 1 당량, 구입처: 토론토 리썬치 케미칼스)를 무수 테트라하이드로퓨란(0.4 mL) 중에 용해시키고, 질소로 플러싱하였다. 테트라부틸암모늄 플루오라이드(22.7 mg, 0.087 mmol, 6 당량)를 첨가하고, 반응물을 박층 크로마토그래피(TLC, 실리카 겔, 헥산 중 30% 에틸 아세테이트, UV 검출, 포스포몰리브드산 염색)으로 모니터링하면서 3시간 동안 실온에서 교반하였다. 화합물 2를 포함하는 생성 혼합물에 수산화리튬 일수화물(4.2 mg, 0.1015 mmol, 7 당량), 테트라하이드로퓨란(0.3 mL) 및 물(0.15 mL)을 첨가하였다. 반응물을 질소로 플러싱하고, 18시간 동안 실온에서 교반하였다. TLC 및 질량 분광법(MS)으로 평가시 예상된 화합물 3의 존재와 함께 완전한 반응을 나타내었다. 반응 혼합물을 에테르(2 x 15 mL)로 희석하고, 10% 수성 시트르산(30 mL), 물(30 mL) 및 염수(30 mL)로 세척하였다. 유기층을 무수 황산나트륨 상에서 건조시키고, 20℃ 미만의 온도를 유지시키면서 농축시켰다. 샘플을 질소 스트림 하에서 더욱 건조시켜((R)-5-((1R,3aS,7aR,E)-4-((Z)-2-((S)-5-하이드록시-2-메틸렌사이클로헥실리덴)에틸리덴)-7a-메틸옥타하이드로-1H-인덴-1-일)헥산산)(화합물 3, 5.3 mg, 95% 수율)을 무색 점으로서 수득하였다. R_f 0.2(실리카겔, 헥산 중 40% EtOAc). NMR 분석은 약 1.14%의 THF 및 약 0.14%의 에테르의 존재를 나타내었다.

[0307] 화합물 3(5.3 mg, 0.0137 mmol, 1 당량), 화합물 4(MAL-PEG-아민 TFA 염, 21.9 mg, 0.0109 mmol, 0.8 당량, 구입처: 크리에이티브 페그웍스) 및 2-클로로-1-메틸피리딘 요오다이드(8.7 mg, 0.0342 mmol, 2.5 당량)를 무수 디클로로메탄(0.5 mL) 중에 용해시켰다. 트리에틸아민(7.6 , 0.0548 mmol, 4 당량)을 첨가하고, 반응 혼합물을 질소 하에 실온에서 3시간 동안 교반하였다. 이어서, 반응물을 디클로로메탄(30 mL)으로 희석하고, 10% 수성 시트르산(40 mL), 포화된 수성 중탄산나트륨(30 mL) 및 염수(30 mL)로 세척하였다. 유기층을 무수 황산나트륨 상에서 건조시키고, 여과시킨 후, 20℃ 이하의 온도를 유지시키면서 농축시켰다. 샘플을 질소 스트림 하에서 더 건조시켜 표적 화합물을 갈색 점으로서 수득하였다. R_f 0.6(실리카겔, 디클로로메탄 중 20% 메탄올). 분리된 생성물의 TLC 분석(닌하이드린 염색)은 화합물 4의 부재를 나타내었다. 분리된 물질의 ¹H NMR 분석은 이의 정체 및 순도를 입증하였다. NMR 분석은 감지할 수 있는 양의 메틸렌 클로라이드 또는 다른 용매를 나타내지 않았다.

[0309] 실시예 2: 변형된 FGF21 단백질-캐리어 접합체의 제조 및 특성화

[0310] 변형된 FGF21을 실시예 1에서 기술되는 비타민 D₃-PEG-말레이미드 캐리어에 접합시켰다. 하기에서 보여지는 바와 같이, FGF21-캐리어 조성물은 천연 발생 FGF21과 비교하여 상당히 개선된 약동학적 특성을 제공함으로써 캐리어-접합된 분자를 당뇨병 치료를 위한 중요한 치료 화합물이 되게한다.

[0311] FGF21은 대장균(*E.coli*)에서 발현되었으며, 정제 후, 하기와 같이 캐리어에 접합되었다. 변형된 FGF21은 단백질의 캐리어에 대한 부위-특이적인 커플링이 가능하도록 FGF21의 아미노-말단 근처에 유리 시스테인 잔기를 삽입하고 정제의 편의를 위해 첨가되는 His₆ 태그를 삽입하도록 고안되었다. 변형된 FGF21 암호화 서열(서열번호 4)은 컴퓨터로 대장균에서의 발현에 최적화시켰으며, 유전자는 위탁 연구 전문기관(DNA2.0 Menlo Park, CA)에 의해 화학적으로 합성되었으며, T5 프로모터 및 카나마이신 내성 유전자를 포함하는 발현 벡터 pJexpress401에

클로닝되었다. 플라스미드는 대장균 오리가미2(*E. coli*Origami2) 세포(EMD Biosciences Inc.)로 형질전환되었다. 오리가미 균주에서 pJexpress401 벡터로부터의 FGF21의 발현은 하기와 같이 수행되었다. 루리아 브로쓰 + 1% 글루코스에 밤새 배양물을 1:100 희석비로 접종하고, OD600이 0.6인 대수기로 성장시켰다. 이어서, 배양 온도를 37℃로부터 18℃로 낮추고, 배양물을 0.2 mM IPTG를 사용하여 유도한 후, 180rpm에서 진탕시키면서 18℃에서 밤새 성장시켰다. 세포를 수거하고, 용해한 후, 상등액을 수집하였다. 단백질을 고정된 금속 친화성 크로마토그래피(IMAC) 수지를 사용하여 친화성 정제를 수행하고, 이온 교환 크로마토그래피로 처리하였다.

[0312] 이어서, 정제된 FGF21 단백질을 10 mM Tris pH 8.0, 50 mM NaCl, 1 mM EDTA로 완충액 교환하였다. DMSO 중에 10 mg/mL로 용해된 티올-반응성 캐리어를 0.5 mg/mL의 유리 시스테인을 포함하는 FGF21 단백질(서열번호 3)과 2:1의 캐리어:단백질의 몰비로 혼합함으로써 비타민 D₃-PEG-말레이미드 캐리어 분자(실시예 1)에 대한 접합을 달성하였다. 접합된 단백질을 이온 교환 크로마토그래피에 의해 비반응된 성분들로부터 분리하였다. 접합 및 순도는 SDS-PAGE에 의해 확인되었다. 이어서, FGF21 단독 및 FGF21-캐리어 접합체를 PBS에 대해 완충액 교환하고, 동물 연구에 사용하기 위해 0.22 마이크론 필터를 사용하여 멸균하였다.

[0313] FGF21(서열번호 3) 또는 FGF21-캐리어 접합체의 약동학을 스프라그 돌리 래트에서 연구하였다. 간단히 설명하면, 0.1 mg/kg 의 각각의 분자를 SC 주사에 의해 래트에 개별적으로 주사하였다. 혈장 샘플을 30분, 60분, 120분, 240분, 360분, 24시간 및 48시간에 수집하였다. 샘플을 FGF21에 대해 허가된 시판되는 ELISA 키트(Millipore, Cat. #EZHFGF21-19K)를 사용하여 분석하였다. 그 결과, SC 투여 후, 30, 60, 120 및 240분의 시점에서 FGF21과 FGF21-캐리어 접합체 간에 상당한 흡수 차이를 나타내었으며, 상기 시점 이후 FGF21 수준은 감소하기 시작하였다(도 3). 이들 자료는 FGF21에 대한 캐리어의 접합이 SC 주사 후 FGF21의 생체이용률을 상당히 증가시켰다는 것을 나타낸다(380배 증가, FGF21-캐리어 접합체의 평균 C_{max}인 143526 pg/mL를 FGF21의 평균 C_{max}인 376 pg/mL로 나누어 계산함). 곡선 아래 면적(AUC)는 또한 FGF21-캐리어 접합체에 대해 1047980 h*pg/mL로 계산되고 FGF21 단독에 대해 1551 h*pg/mL로 계산되었다. 따라서, 약물 노출은 FGF21-캐리어 접합체의 평균 AUC를 FGF21의 평균 AUC로 나누는 경우 675배 증가하였다. 따라서, 상기 자료는 생체이용률을 증가시키는데 있어서 캐리어 분자의 유용성을 입증하며, 접합된 FGF21이 천연 FGF21에 비해 상당한 약동학적 이점을 갖는다는 것을 나타낸다.

[0315] 실시예 3: 그렐린 펩타이드-캐리어 접합체의 제조 및 특성화

[0316] 본 실시예에서, 실시예 1에서 생성된 비타민 D₃-PEG-말레이미드 캐리어의 그렐린에 대한 접합은 그렐린에 대해 상당한 긴 반감기를 제공함으로써, 접합된 분자를 노인들의 약액질, 식욕부진 및/또는 허약을 치료하기 위한 잠재적으로 유용한 치료제가 되게 하였다.

[0317] 첨가된 C-말단 시스테인을 갖는 합성 래트 그렐린 펩타이드는 인노바젠(Innovagen, Lund, Sweden)(스웨덴 룬드, 서열번호 6)으로부터 구입하였다. 실시예 1에서 기술되는 바와 같은 비타민 D₃-PEG-말레이미드 캐리어는 접합이 생물활성에 유의하게 영향을 끼치지 않도록 크기상 2 내지 3 kDa 펩타이드와 균형이 잡히도록 선택하였다. 캐리어와의 접합은 DMSO중에 10 mg/mL로 용해된 티올 반응성 캐리어(실시예 1)를 15 mM MES pH 6.0, 1mM EDTA 중 1 mg/mL 농도의 유리 시스테인이 포함된 그렐린 펩타이드와 2:1의 캐리어:펩타이드의 몰비로 혼합함으로써 달성하였다. 접합된 펩타이드를 이온 교환 크로마토그래피에 의해 비반응된 성분들로부터 분리하였다. 접합 및 순도는 SDS-PAGE에 의해 확인되었다. 이어서, 래트 그렐린(rGhrelin) 펩타이드 및 rGhrelin-캐리어 접합체를 PBS에 대해 완충액 교환하고, 동물 연구에 사용하기 위해 0.22 마이크론 필터를 사용하여 멸균하였다.

[0318] rGhrelin(서열번호 6) 또는 rGhrelin-캐리어 접합체의 약동학을 스프라그 돌리 래트에서 연구하였다. 간단히 설명하면, 0.1 mg/kg 의 각각의 분자를 정맥내(IV) 주사에 의해 래트에 개별적으로 주사하였다. 혈장 샘플을 30분, 60분, 120분, 240분, 360분, 24시간 및 48시간에 수집하였다. 샘플을 래트 혈장으로부터의 rGhrelin 분석에 대해 허가된 시판되는 ELISA 키트(Millipore, Cat. #EZRGR-91K)를 사용하여 분석하였다. 그 결과, rGhrelin과 rGhrelin-캐리어 접합체의 약동학 프로파일에서 상당한 차이를 나타내었다(도 4). 윈논린(WinNonLin)을 사용한 반감기 계산은 rGhrelin에 대해 0.37시간의 반감기 및 rGhrelin-캐리어 접합체에 대해 8시간의 반감기를 나타내었으며, 이는 22배의 개선으로 계산된다. 상기 자료는 반감기 증가에 있어 캐리어 분자의 유용성에 대한 제2의 실례를 보여준다. 따라서, 접합된 형태의 그렐린은 고령층의 약액질, 식욕부진 및 허약과 같은 그렐린-반응성 질환을 치료하기 위한 유용한 치료제이다.

[0320] 실시예 4: 그렐린 펩타이드-캐리어의 수용체 결합 활성 평가

[0321] 그렐린 펩타이드의 활성은 캐리어에 접합시 스캐폴드 및 표적화기의 존재에 의해 약영향을 받지 않았다. 이를

증명하기 위해, 그렐린(서열번호 5) 및 실시예 3으로부터의 비타민 D₃-PEG-말레이미드 캐리어-접합된 그렐린을 후술하는 바와 같이 세포-기반 수용체 작용제(agonist) 검정을 이용하여 그렐린 수용체에 대한 수용체 결합 및 활성화(작용제 활성)에 대해 비교하였다.

[0322] 시험 화합물을 GHS-R-발현 CHO-K1 세포 배양물에 첨가하였다. 그렐린은 GHS-R 수용체에 결합하고 이를 활성화시키며, 세포내 칼슘 반응은 작용제 활성의 지표로서 평가되었다. 활성화는 FLIPR™ 형광 영상화 플레이트 판독기) 고처리 용량 세포 스크리닝 기구용의 겐스크립트 USA 인크.(GenScript USA Inc.)에 의해 개발된 칼슘 플릭스-기반 검정으로 측정하였다.

[0323] GHS-R을 발현하는 CHO-K1 세포를 10% 우태 혈청, 500mg/mL G418로 보충된 햄의 F12(Ham's F12)에서 배양하고, 최적 세포 건강을 유지하기 위해 계대하였다. 세포를 검정을 수행하기 18시간 전 20 μL의 성장 배지 중에 웰당 20,000개의 세포 밀도로 384-웰 블랙-웰 투명-바닥 플레이트에 씨딩하고, 37℃/5% CO₂에서 유지하였다. 검정 개시시, 20 μL의 칼슘-4 로딩 완충액을 웰에 첨가하였다. 플레이트를 60분 동안 37℃에 이어 15분 동안 실온에서 어둠 속에서 항온처리하였다. 그렐린 및 그렐린-접합된 시험 물품의 초기 농도는 DMSO 중 1 mM이었다. 시험 물품을 시험 플레이트에 첨가하기 전 20 mM HEPES 완충액 pH 7.4를 갖는 헵크의 완충된 식염 용액(Hank's Buffered Saline Solution: HBSS)에 10배 연속 희석하였다. 각각의 시험 물품의 최종 농도는 세포에 첨가하기 전 농도의 5배였다. 세포 중의 세포내 칼슘 수준은 시험 물품을 첨가하기 전 FLIPR™ 기구를 사용하여 20초 동안 측정하였다. 10 μL의 각각의 희석된 시험 물품을 플레이트에 첨가하여 최종 용적이 50 μL가 되게 하였다. 세포내 칼슘 수준의 변화는 추가의 100초(21~120초) 동안 측정하였다.

[0324] 20초 판독(1~20초) 평균값은 기선 판독치로 계산되었으며, 상대적 형광 단위(ΔRFU) 세기값은 기선 판독치의 평균값을 뺀 최대 형광 단위(21~120초)로 계산하였다. 자료 입수 및 분석은 ScreenWorks®(버전 3.1)을 사용하여 수행하였으며 엑셀로 내보냈다.

[0325] 화합물의 활성화율(%)은 하기 수학적식으로 계산되었다:

[0326]
$$\text{활성화율}(\%) = \frac{(\Delta\text{RFU}_{\text{화합물}} - \Delta\text{RFU}_{\text{배경}})}{(\Delta\text{RFU}_{\text{작용제 대조군}} - \Delta\text{RFU}_{\text{배경}})} \times 100\%$$

[0327] 이어서, 활성화율을 화합물의 누적 용량의 대수값에 대한 함수로서 플로팅하였다. 자료는 이중 측정치의 평균을 나타낸다. EC50은 겐스크립트(GenScript)에 의해 작성된 자료 분석 위자드를 사용하여 측정하였다.

[0328] 캐리어가 없는 그렐린의 EC50 값은 88.5 nM이었다. 대조적으로, 캐리어-접합된 그렐린은 85 nM의 EC50 값을 가졌으며, 이는 대조군 펩타이드와 거의 동일하다. 따라서, 펩타이드의 작용제 활성화는 캐리어를 그렐린 펩타이드에 접합한 후 보존되었다. 검정은 DBP를 포함하는 10% 혈청의 존재 하에서 수행되었다는 것에 주목한다. 캐리어-접합된 펩타이드에 대해 수용체 결합 및 활성화에 어떠한 방해도 관측되지 않았다.

[0330] **실시예 5: NHS-반응기를 갖는 비타민 D₃-PEG로 구성된 예시적 아민-반응성 캐리어의 제조**

[0331] 캐리어 상의 NHS-반응기는 단백질 상의 아민기에 대한 접합을 위해 생성되었다. 2kDa PEG가 본 실시예를 위한 스캐폴드로서 선택되었다. 본 실시예에서 사용되는 출발 물질인 비타민 D 유사체(화합물 1)는 토론토 리써치 케미칼스에서 구입하고 2kDa mPEG-아미노산(화합물 5)은 크리에이티브 페그워크스로부터 구입하였다.

[0332] 도 5(단계 1 및 2)에 따라, (R)-메틸5-((1R,3aS,7aR,E)-4-((Z)-2-((S)-5-((3급-부틸디메틸실릴)옥시)-2-메틸렌사이클로헥실리덴)에틸리덴)-7a-메틸옥타하이드로-1H-인덴-1-일)헥사노에이트(화합물 1, 8.2 mg, 0.0159 mmol, 1 당량)를 무수 테트라하이드로푸란(THF, 0.4 mL) 중에 용해시키고, 혼합물을 질소로 플라싱하였다. 테트라부틸암모늄 플루오라이드 용액(25 mg, 0.096 mmol, 6 당량)를 첨가하고, 반응 혼합물을 박층 크로마토그래피(TLC, 실리카 겔, 헥산 중 30% 에틸 아세테이트, UV 검출, 포스포몰리브드산 염색)로 모니터링하면서 3시간 동안 실온에서 교반하였다. 화합물 2를 포함하는 생성 혼합물에 수산화리튬 일수화물(4.6 mg, 0.109 mmol, 7 당량), THF(0.3 mL) 및 물(0.16 mL)을 첨가하였다. 반응 혼합물을 질소로 플라싱하고, 18시간 동안 실온에서 교반하였다. TLC 및 질량 분광법(MS)으로 평가시 예상된 화합물 3의 존재와 함께 완전한 반응을 나타내었다. 반응 혼합물을 에테르(10 mL)로 희석하고, 10% 수성 시트르산(10 mL), 물(10 mL) 및 염수(10 mL)로 세척하였다. 유기층을 무수 황산나트륨 상에서 건조시키고, 20℃ 미만의 온도를 유지시키면서 농축시켰다. 샘플을 질소 스트림 하에서 더욱 건조시켜((R)-5-((1R,3aS,7aR,E)-4-((Z)-2-((S)-5-하이드록시-2-메틸렌사이클로헥실리덴)에틸리덴)-7a-메틸옥타하이드로-1H-인덴-1-일)헥사노산)(화합물 3, 6.1 mg, 99% 수율)을 무색 검으로부터 수득하였다. R_f 0.2(실리카겔, 헥산 중 40% 에틸 아세테이트(EtOAc)). 핵자기공명분광(NMR) 분석은 약 7%의 에테르의 존재를 나타내었

다.

[0333] 도 5(단계 3)에 따라, 무수 메탄올 중의 PEG-아미노산 4(18.5 mg, 0.0092 mmol, 구입처: 크리에이티브 페그워크스)의 용액에 디옥산 중의 HCl(4 M, 1.5 mL)을 첨가하고, 반응 혼합물을 20시간 동안 밀봉관에서 70°C에서 가열하였다. 반응물을 TLC(닌하이드린 염색)으로 모니터링하고, 반응이 완결된 후, 로타랩(rotavap) 상에서 농축시켰다. 잔사를 디클로로메탄(3 x 5 mL) 및 에테르(3 x 5 mL)를 사용하여 담황색 포움으로 공동-증발시키고, 에테르(5 mL) 중에 현탁시켰다. 액체를 경사분리시키고, 수득된 고체를 건조시켜 목적하는 생성물 5(14 mg, 75%)을 담황색 고체로서 분리하였다. Rf 0.2(실리카겔, 20% 메탄올(MeOH) / DCM / 0.2 % NH₄OH). NMR 분석은 감지할 수 있는 양의 메틸렌 클로라이드 또는 에테르를 나타내지 않았다.

[0334] 도 5(단계 4)에 따라, 화합물 3(3.4 mg, 0.009 mmol, 1 당량), 화합물 6(메틸 에스테르 PEG-아민 HCl 염, 14 mg, 0.007 mmol, 0.8 당량) 및 2-클로로-1-메틸피리디늄 요오다이드(5.6 mg, 0.022 mmol, 2.5 당량)를 무수 디클로로메탄(0.6 mL) 중에 용해시켰다. 트리에틸아민(5 µL, 0.0356 mmol, 4 당량)을 첨가하고, 반응 혼합물을 질소 하에 실온에서 3시간 동안 교반하였다. 반응이 이 시점에서는 불완전하였으므로, 추가량의 화합물 3(1.7 mg, 0.0045 mmol)을 첨가하고, 추가의 3시간 동안 계속 반응시킨 후, 디클로로메탄(10 mL)으로 희석하고, 10% 수성 시트르산(10 mL), 포화된 수성 중탄산나트륨(10 mL) 및 염수(10 mL)로 세척하였다. 유기층을 무수 황산나트륨 상에서 건조시키고, 여과시킨 후, 20°C 미만의 온도를 유지시키면서 농축시켰다. 샘플을 실리카 겔(2 g) 플래쉬 크로마토그래피로 정제하였다. 컬럼을 먼저 에틸 아세테이트로 용출시켜 비반응된 화합물 3을 제거한 후, 1 내지 10 % MeOH/디클로로메탄(각각 20 mL)으로 용출시켰다. 순수한 생성물을 포함하는 분획물을 함께 합하고, 20°C 미만의 온도를 유지시키면서 로타랩 상에서 증발시켰다. 샘플을 질소 스트림 하에서 건조시켜 화합물 7을 갈색 검(10 mg, 60%)으로서 수득하였다. Rf 0.3(실리카겔, 디클로메탄 중 5% MeOH). 분리된 생성물의 TLC 분석(닌하이드린 염색)은 화합물 6의 부재를 나타내었다. 분리된 물질의 ¹H NMR 분석은 이의 정제 및 순도를 입증하였다. NMR 분석은 1.1% 메틸렌 클로라이드의 존재를 나타내었다.

[0335] 도 5(단계 5)에 따라, 화합물 7(10 mg, 0.0042 mmol)을 THF(0.2 mL)와 한 방울의 메탄올의 혼합물 중에 용해시켰다. 이 용액에 수산화리튬 일수화물 용액(0.1 mL의 물 중 0.9 mg, 0.021 mmol, 5 당량)을 첨가하였다. 반응 혼합물을 질소로 플러싱하고, 18시간 동안 실온에서 교반하였다. TLC로 평가시 화합물 8의 존재와 함께 완전한 반응을 나타내었다. 반응 혼합물을 디클로로메탄(10 mL)으로 희석하고, 10% 수성 시트르산(10 mL) 및 염수(10 mL)로 세척하였다. 유기층을 무수 황산나트륨 상에서 건조시키고 20°C 미만의 온도를 유지시키면서 농축시켰다. 샘플을 질소 스트림 하에 더욱 건조시켜 목적하는 비타민-D₃-PEG-산(화합물 8, 7 mg, 71% 수율)을 갈색 검으로서 수득하였다. Rf 0.2(실리카겔, 10% MeOH/디클로로메탄). NMR 분석은 약 2%의 디클로로메탄의 존재를 나타내었다.

[0336] 스톱 용액을 제조하였다: 1 mL의 무수 디메틸포름아미드(DMF) 중의 34 g의 N-하이드록시숙신이미드 및 1 mL의 무수 디클로로메탄 중의 61 mg의 디사이클로헥실카보디이미드(DCC).

[0337] 도 5(단계 6)에 따라, 디클로로메탄(0.3 mL) 중의 화합물 8(7 mg, 0.003 mmol, 1 당량)의 용액에 DMF 중의 N-하이드록시숙신이미드의 용액(10 µL, 0.34 mg, 0.003 mmol) 및 이어서 디클로로메탄 중의 DCC의 용액(10 µL, 0.61 mg, 0.003 mmol)을 첨가하고, 반응 혼합물을 질소로 플러싱하고, 20시간 동안 교반하였다. 반응이 TLC로 나타내어지는 바와 같이 불완전하였으므로, DMF 중의 N-하이드록시숙신이미드(25 µL, 0.85 mg, 0.0075 mmol) 및 디클로로메탄 중의 DCC(25 µL, 1.53 mg, 0.0075 mmol)의 추가량을 첨가하고, 반응을 또 다른 20시간 동안 계속하였다. 클로로포름(10 mL)를 반응 혼합물에 첨가하고, 이를 물(10 mL)로 세척하였다. 유기상을 황산나트륨 상에서 건조시키고, 용매를 제거하여 목적하는 표적 화합물인 비타민 D₃ - PEG - NHS(7.0 mg, 미정제)을 수득하였다. 이 물질의 ¹H NMR 및 TLC(R_f: 0.3, 10% MeOH/클로로포름)은 목적하는 물질의 존재를 나타내었다. 이어서, 비타민 D₃ - PEG - NHS 캐리어를 실시예 6에서 사용하였다.

[0339] 실시예 6: 항체-캐리어 접합체의 제조 및 특성화

[0340] 인플릭시마브-캐리어 접합체는 인플릭시마브 단독과 비교하여 래트에서 증가된 혈청 농도 및 생체이용률을 나타내었다.

[0341] 적합한 염과 함께 동결건조된 분말로서 판매되는 인플릭시마브(Hannah Pharmaceuticals)를 물을 사용하여 10 mg/mL의 농도로 재현탁시켰다. 비타민 D₃ - PEG - NHS 캐리어를 DMSO 중에 10 mg/mL의 농도로 재현탁시켰다. 이

어서, 비타민 D₃ - PEG - NHS 캐리어 및 인플릭시마브를 5:1 및 10:1의 캐리어:인플릭시마브의 몰비로 혼합하였다. 본 발명의 치료 화합물 캐리어 접합체는 전형적으로 치료 화합물에 개별적으로 부착된 1개 이상의 캐리어 분자를 가지며, 1 내지 10개의 캐리어 분자일 수 있다. 캐리어의 NHS 버전을 사용함으로써, 하나 초과와 캐리어가 치료 단백질에 부착될 수 있으며, 이는 반응물 중의 표적 치료제에 대한 캐리어의 몰비를 변화시킴으로써 실험적으로 조절될 수 있다. 본 실시예에서는, 2 내지 4개의 캐리어의 표적물 분포가 바람직한 변수로 설정되었다. 2개의 상이한 몰비를 시험하고 생성된 접합체를 질량 분광분석으로 조사함으로써 실제 비율을 측정하였다.

[0342] 인플릭시마브 및 인플릭시마브 NHS-캐리어 접합체를 40 kDa의 컷오프를 갖는 탈염 컬럼(Zeba Spin, Thermo Scientific)을 사용하여 비접합된 캐리어로부터 분리시켰다. 질량 분광분석을 이용하여 반응물 중의 인플릭시마브의 온전한 질량을 계산하였다. 그 결과, 비변형된 인플릭시마브는 주로 149 kDa의 질량을 갖는 것으로 나타났다. 캐리어-접합된 인플릭시마브의 질량은 항체당 2 내지 4개의 캐리어인 평균 3 kDa 캐리어의 부착과 함께 증가되는 비율의 질량을 가졌다.

[0343] 이어서, 정제된 5:1 반응 생성물을 피하(SC) 투여된 인플릭시마브 대 인플릭시마브-캐리어 접합체를 비교하는 래트 약동학 연구에 사용하였다. 용량은 모든 시험 그룹(그룹 당 3마리의 래트)에서 1 mg/kg이었다. 혈청 샘플을 투여 전 및 투여 후 5분부터 48시간까지 다양한 시간에 수집하였다. 이어서, 혈청 샘플을 혈청 중의 인플릭시마브의 수준을 측정하는데 특이적인 ELISA 키트(PromonitorTM, ProgenikaTM)를 사용하여 ELISA로 분석하였다. 약동학 변수는 윈론린을 사용하여 결정하였다. 도 6에 도시된 결과는, 항체를 비타민 D₃ - PEG - NHS 캐리어에 접합시키는 경우, 비접합된 항체와 비교하여, 혈청 농도 및 곡선 아래 면적(AUC)이 1.5배 개선된다는 것을 입증한다. 보다 구체적으로, 인플릭시마브에 대해, 24시간 및 48시간에 2100 ng/mL 및 4800 ng/mL의 농도가 관찰되었다. 이와는 대조적으로, 캐리어 접합된-인플릭시마브에 대해서는, 24시간 및 48시간에 3200 ng/mL 및 7000 ng/mL의 농도가 관찰되었다. 이는 생체이용률이 50% 개선되는 것으로 해석된다. AUC 계산은 50% 개선을 나타내었다(도 6). 따라서, 본 실시예는 비접합된 항체와 비교하여 인플릭시마브의 혈청 농도 및 생체이용률 개선에 있어 캐리어의 유용성을 증명한다.

[0345] **예시적 서열**

[0346] 서열번호 1

[0347] 사람 FGF21 단백질 서열

[0348] MDSDETFEHSGLWVSVLAGLLLGACQAHPIPDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQTEAHLEIREDTVGGAADQSPESLLQLKALKPGVIQILGVKTSRFLCQRPDGLYGLSLHFDPEACSFRELLLEDGYNVYQSEAHGLPLHLPGNKSPHRDPAPRGPAPRFLPLPGLPPALPEPPGILAPQPPDVGSSDPLSMVGPSQGRSPSYAS

[0350] 서열번호 2

[0351] 성숙한 사람 FGF21 단백질 서열

[0352] HPIDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQTEAHLEIREDTVGGAADQSPESLLQLKALKPGVIQILGVKTSRFLCQRPDGLYGLSLHFDPEACSFRELLLEDGYNVYQSEAHGLPLHLPGNKSPHRDPAPRGPAPRFLPLPGLPPALPEPPGILAPQPPDVGSSDPLSMVGPSQGRSPSYAS

[0354] 서열번호 3

[0355] 변형된 성숙한 사람 FGF21 단백질 서열(N-말단 6-his 태그, tev 절단 부위, C 말단에 추가의 182P 및 성숙한 사람 FGF21 서열의 번호 매김을 사용하여 하기 잔기로 변형: I3C 및 G170E)

[0356] MGSHHHHHSSGENLYFQGHPCPDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQTEAHLEIREDTVGGAADQSPESLLQLKALKPGVIQILGVKTSRFLCQRPDGLYGLSLHFDPEACSFRELLLEDGYNVYQSEAHGLPLHLPGNKSPHRDPAPRGPAPRFLPLPGLPPALPEPPGILAPQPPDVGSSDPLSMVEPSQGRSPSYASP

[0358] 서열번호 4

[0359] 대장균에서 FGF21 발현을 위한 최적화된 암호화 서열(서열번호 3의 아미노산 참조)

[0360] ATGGGCTCACATCATCACCACCATCATAGCAGCGGAGAGAACTTGATTTTCAGGGACATCCGTGCCCTGACAGCAGCCCGCTGCTGCAGTTCGGTGGTCAA GTCCGTCAGCGTTACCTGTACTGACGACGCGCAACAGACCGAGGCGCACCTGGAAATTCGCGAAGATGGTACGGTGGGTGGCGAGCGGACCAAGCCCG GAGTCCCTGTGCAGCTGAAGCCCTGAAGCCGGGTGTCATCCAATCTGGCGTTAAACCAGCCGTTTCTGTGCCAACGTCGGATGGTGCCTGTAC GGTTCCTGCACTTCGACCCAGAGGCATGTAGCTTTCGTGAAGTCTGCTGGAAGATGGCTATAATGTGTACCAGTCTGAGGCGCACGGTCTGCCGTTGCAC

TTGCCGGGTAACAAAAGCCCGCACCCGACCCAGCACCCGCTGGTCCGGCTCGCTTCTGCCGCTGCCGGGTCTGCCTCCGGCGCTGCCGGAGCCGCCAGGC
ATTCTGGCTCCGCAACCGCCGGATGTTGGCAGCAGCGATCCGCTGAGCATGGTTGAACCGTCGCAGGGCCGAGCCCGTCTTATGCCAGCCCGTAA

[0362] 서열번호 5

[0363] 사람 그렐린 FGF21 단백질 서열

[0364] GS(n-옥타노일-S)FLSPEHQRVQQRKESKKPPAKLQPR

[0366] 서열번호 6

[0367] 첨가된 C-말단 cys를 갖는 래트 그렐린

[0368] GS(n-옥타노일-S)FLSPEHQKAQQRKESKKPPAKLQPRC

[0370] 서열번호 7

[0371] DBP 단백질 서열

[0372] MKRVLVLLLAVALFGHALERGRDYENKVKCFESHLGKEDFTSLSLVLSRKFPSTGEQVSQLVKEVVSLEACCAEGADPDCTRTSALSASCSNSPF
PVHPGTAECCTKEGLERKLCMAALKHQPFQFTYVEPTNDEICEAFRKDPKEYANQFMWEYSTNYGQAPLSLLVSYTKSYLSMVGSCCTSASPTVCFLKERL
QLKHLSTLTLNVRVCSQYAYGEKKSRSLNLIKLAQKVPTADLEDVLPLAEDITNLSKCCESASEDCMAKELPEHTVKLCDNLSTKNSKFEDCCQEKTAM
DVFVCTYFMPAAQLPELDPVELPTNKDVCDPNGTKVMDKYFELSRRLHLEPFLSKVLEPTLKSLECCDVEDSTTCFNAKGPLLKKELSSFIDKGQELCA
DYSENTFTEYKKLAERLKAKLPDAPTTELAKLVNKHSDFASNCCSINSPLYCDSEIDAELEKNIL

[0374] 서열번호 8

[0375] DBP 뉴클레오타이드 서열

[0376] AAAGAATTCTAAGTTTGAAGACTGTTGTCAAGAAAAACAGCCATGGACGTTTTTGTGTGCACTTACTTCATGCCAGCTGCCCAACTCCCCGAGCTTCCAGA
TGTTAGAGTTGCCACAAACAAAGATGTGTGTGATCCAGGAACACCAAGTCATGGATAAGTATACATTTGAACCTAAGCAGAAAGGACTCATCTTCCGGAAGT
ATTCTCAGTAAGTACTTGAGCCAACCCATAAAAGCCTTGGTGAATGCTGTGATGTTGAAGACTCAACTACCTGTTTAAATGCTAAGGGCCCTCTACTAAA
GAAGGAATATCTTCTTTTATTGACAAGGGACAAGAACTATGTGCAGATTATTCAGAAAAATACATTTACTGAGTACAAGAAAAACTGGCAGAGCGACTAAA
AGCAAAATTGCCTGATGCCACACCCACGGAAGTGGCAAAGCTGGTTAACAAGCACTCAGACTTTGCCTCCAATGCTGTTCCATAAACTCACTCCTCTTTA
CTGTGATTACAGAGATTGATGCTGAATTGAAGAATATCCTGTAGTCTGAAGCATGTTTATTAACCTTGACCAGAGTTGGAGCCACCCAGGGGAATGATCTCT
GATGACCTAACCTAAGCAAAACCACTGAGCTTCTGGGAAGACAAGTAGGATACTTTCTACTTTTTCTAGCTACAATATCTTCATACAATGACAAGTATGATG
ATTTGCTATCAAAATAAATTGAAATATAATGCAACCATAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

[0378] 서열번호 9

[0379] 종양 괴사 인자-알파(TNF- α)

[0380] ATGAGCACTGAAAGCATGATCCGGGACGTGGAGCTGGCCGAGGAGGCGCTCCCCAAGAGACAGGGGGGCCCCAGGGCTCCAGGCGGTGCTTGTTCCTCAGC
CTCTTCTCCTTCTGATCGTGGCAGGCGCCACCACGCTCTTCTGCCTGCTGCACTTTGGGGTGATCGGCCCCAGAGGAAGAGTTCCCCAGGGACCTCTCT
CTAATCAGCCCTCTGGCCAGGCAGTCAGATCATCTTCTCGAACCCGAGTGACAAGCCTGTAGCCCATGTTGTAGCAAAACCTCAAGCTGAGGGGCGAGCTC
CAGTGCGTGAACCCGCGGCCAATGCCCTCCTGGCCAATGGCGTGGAGCTGAGAGATAACCAGTTGGTGGTGCCATCAGAGGGCCTGTACCTCATCTACTCC
CAGGTCTCTTCAAGGGCAAGGCTGCCCTCCACCCATGTGCTCTCACCCACACCATCAGCCGCATCGCCGTCTCTACCAGACCAAGGTCAACCTCCTC
TCTGCCATCAAGAGCCCTGCCAGAGGAGACCCAGAGGGGGTGAGGCCAAGCCCTGGTATGAGCCCATCTATCTGGGAGGGGTCTTCCAGCTGGAGAAG
GGTGACCGACTCAGCGCTGAGATCAATCGGCCCAGCTATCTCGACTTT GCCGAGTCTGGCAGGTCTACTTTGGGATCATTGCCCTGTGA

[0382] 서열번호 10

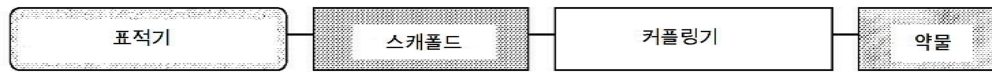
[0383] 종양 괴사 인자-알파(TNF- α)

[0384] MSTESMIRDVELAEALPKKTGGPQGSRRCLFLSLFSFLIVAGATTLFCLLHFVGIVGPQREEFPRDLSLSPLAQAVRSSRTPSDKPVAVHVVANPQAEQQL
QWLNRRANALLANGVELRDNLVVPSEGLYL IYSQVLFKQGCPSTHVLTHTSRIAVSYQTKVNLLSAIKSPCQRETPEGAEAKPWYEP IYLGGVFQLEK
GDRLSAEINRPDYLDFAESGQVYFGI IAL

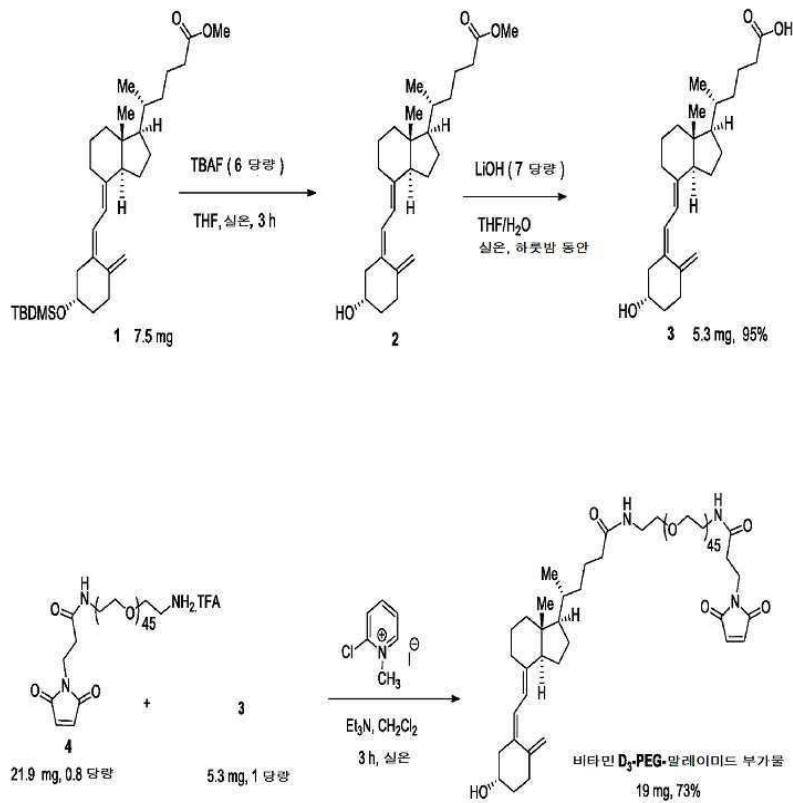
[0386] 본원에서 기술되거나 언급되는 모든 공개문 및 특허 문헌은 이의 전문이 참고로 포함된다. 상기의 기술은 단지 예시 및 설명을 위해 제시되었다. 이러한 기술은 본 발명을 개시된 형태로만 제한하고자 하는 것이 아니다. 본 발명의 범위는 본원에 첨부된 특허청구범위에 의해 정의하고자 한다.

도면

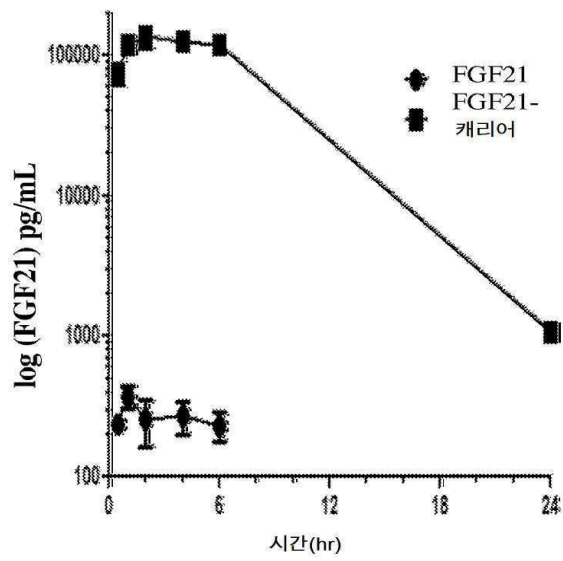
도면1



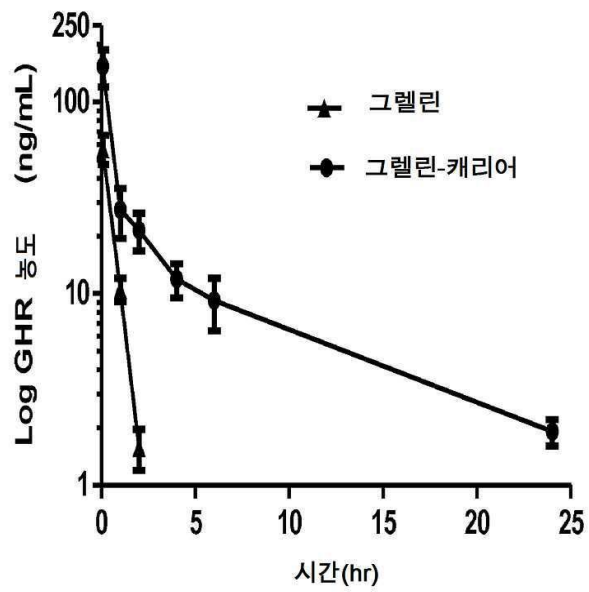
도면2



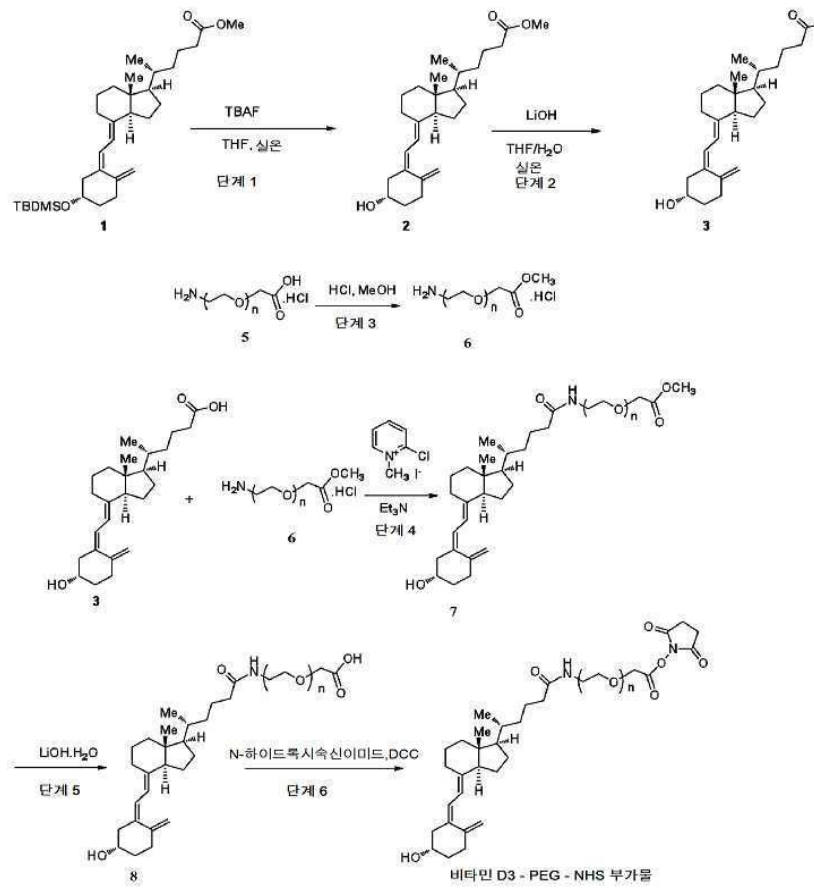
도면3



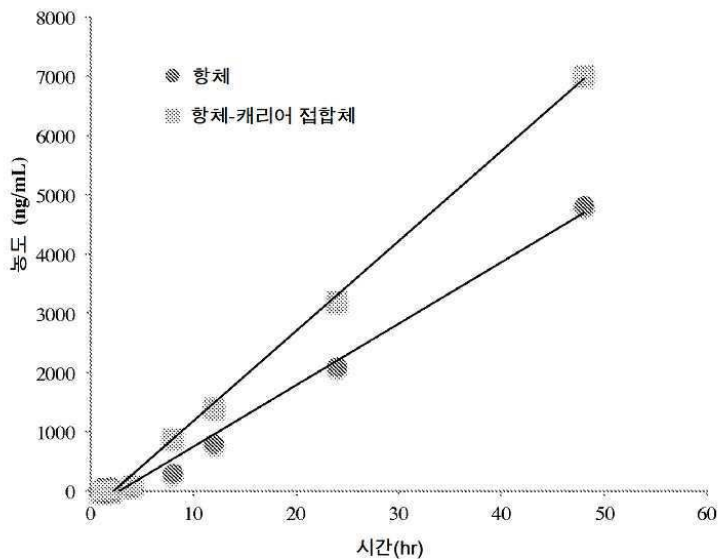
도면4



도면5



도면6



	항체	항체-캐리어 접합체
총 AUC (h*ng/mL)	103525	157375

서열 목록

SEQUENCE LISTING

<110> SOLIMAN, TARIK M.

HALES, LAURA M.

SARD, HOWARD P.

AMERE, MUKKANTI

<120> CARRIERS FOR IMPROVED DRUG DELIVERY

<130> XTND002US1

<140><141><150> PCT/US2013/031788

<151> 2013-03-14

<150> 61/780,346

<151> 2013-03-13

<150> 61/673,874

<151> 2012-07-20

<150> 61/648,516

<151> 2012-05-17

<160> 10

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 209

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Met Asp Ser Asp Glu Thr Gly Phe Glu His Ser Gly Leu Trp Val Ser

1 5 10 15

Val Leu Ala Gly Leu Leu Leu Gly Ala Cys Gln Ala His Pro Ile Pro

20 25 30

Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly Gly Gln Val Arg Gln Arg Tyr

35 40 45

Leu Tyr Thr Asp Asp Ala Gln Gln Thr Glu Ala His Leu Glu Ile Arg

50 55 60

Glu Asp Gly Thr Val Gly Gly Ala Ala Asp Gln Ser Pro Glu Ser Leu

65					70				75				80			
Leu	Gln	Leu	Lys	Ala	Leu	Lys	Pro	Gly	Val	Ile	Gln	Ile	Leu	Gly	Val	
				85				90				95				
Lys	Thr	Ser	Arg	Phe	Leu	Cys	Gln	Arg	Pro	Asp	Gly	Ala	Leu	Tyr	Gly	
				100				105				110				
Ser	Leu	His	Phe	Asp	Pro	Glu	Ala	Cys	Ser	Phe	Arg	Glu	Leu	Leu	Leu	
				115				120				125				
Glu	Asp	Gly	Tyr	Asn	Val	Tyr	Gln	Ser	Glu	Ala	His	Gly	Leu	Pro	Leu	
				130				135				140				
His	Leu	Pro	Gly	Asn	Lys	Ser	Pro	His	Arg	Asp	Pro	Ala	Pro	Arg	Gly	
145				150				155				160				
Pro	Ala	Arg	Phe	Leu	Pro	Leu	Pro	Gly	Leu	Pro	Pro	Ala	Leu	Pro	Glu	
				165				170				175				
Pro	Pro	Gly	Ile	Leu	Ala	Pro	Gln	Pro	Pro	Asp	Val	Gly	Ser	Ser	Asp	
				180				185				190				
Pro	Leu	Ser	Met	Val	Gly	Pro	Ser	Gln	Gly	Arg	Ser	Pro	Ser	Tyr	Ala	

195 200 205

Ser

 $\langle 210 \rangle$ 2

<211> 181

<212> PRT

<213> Homo sapiens

 $\langle 400 \rangle$ 2

His	Pro	Ile	Pro	Asp	Ser	Ser	Pro	Leu	Leu	Gln	Phe	Gly	Gly	Gln	Val
1				5					10					15	
Arg	Gln	Arg	Tyr	Leu	Tyr	Thr	Asp	Asp	Ala	Gln	Gln	Thr	Glu	Ala	His
			20					25					30		
Leu	Glu	Ile	Arg	Glu	Asp	Gly	Thr	Val	Gly	Gly	Ala	Ala	Asp	Gln	Ser
		35					40					45			

Pro Glu Ser Leu Leu Gln Leu Lys Ala Leu Lys Pro Gly Val Ile Gln
50 55 60

Ile Leu Gly Val Lys Thr Ser Arg Phe Leu Cys Gln Arg Pro Asp Gly
65 70 75 80
Ala Leu Tyr Gly Ser Leu His Phe Asp Pro Glu Ala Cys Ser Phe Arg
85 90 95
Glu Leu Leu Leu Glu Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser Glu Ala His
100 105 110

Gly	Leu	Pro	Leu	His	Leu	Pro	Gly	Asn	Lys	Ser	Pro	His	Arg	Asp	Pro		
115						120						125					
Ala	Pro	Arg	Gly	Pro	Ala	Arg	Phe	Leu	Pro	Leu	Pro	Gly	Leu	Pro	Pro		
130						135						140					
Ala	Leu	Pro	Glu	Pro	Pro	Gly	Ile	Leu	Ala	Pro	Gln	Pro	Pro	Asp	Val		
145						150						155			160		
Gly	Ser	Ser	Asp	Pro	Leu	Ser	Met	Val	Gly	Pro	Ser	Gln	Gly	Arg	Ser		
			165						170						175		

Pro Ser Tyr Ala Ser
180

<210> 3

<211> 201

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide

<220><223> Modified mature human FGF21: N-terminal 6-his tag,
 tev cleavage site, additional 182P, and modified I3C
 and G170E using mature FGF21 numbering

 $\langle 400 \rangle$ 3

Met Gly Ser His His His His His Ser Ser Gly Glu Asn Leu Tyr
1 5 10 15
Phe Gln Gly His Pro Cys Pro Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly
20 25 30
Gly Gln Val Arg Gln Arg Tyr Leu Tyr Thr Asp Asp Ala Gln Gln Thr
35 40 45

Glu Ala His Leu Glu Ile Arg Glu Asp Gly Thr Val Gly Gly Ala Ala
50 55 60
Asp Gln Ser Pro Glu Ser Leu Leu Gln Leu Lys Ala Leu Lys Pro Gly
65 70 75 80
Val Ile Gln Ile Leu Gly Val Lys Thr Ser Arg Phe Leu Cys Gln Arg
85 90 95
Pro Asp Gly Ala Leu Tyr Gly Ser Leu His Phe Asp Pro Glu Ala Cys
100 105 110
Ser Phe Arg Glu Leu Leu Leu Glu Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser
115 120 125
Glu Ala His Gly Leu Pro Leu His Leu Pro Gly Asn Lys Ser Pro His
130 135 140
Arg Asp Pro Ala Pro Arg Gly Pro Ala Arg Phe Leu Pro Leu Pro Gly

145 150 155 160
Leu Pro Pro Ala Leu Pro Glu Pro Pro Gly Ile Leu Ala Pro Gln Pro
165 170 175
Pro Asp Val Gly Ser Ser Asp Pro Leu Ser Met Val Glu Pro Ser Gln
180 185 190
Gly Arg Ser Pro Ser Tyr Ala Ser Pro
195 200

<210> 4

<211> 606

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

polynucleotide

<220><223> Optimized FGF21 nucleotide sequence for E. coli

expression

<400> 4

atgggctcac atcatcacca ccatcatagc agcggagaga acttgatatt tcaggacat	60
ccgtgcctg acagcagccc gctgctgcag ttcggtggc aagtcgtca gcgttacctg	120
tacactgacg acgcgaaca gaccgaggcg cacctggaaa ttcgcgaaga tggtaggtg	180

ggtggcgag cggaccaaag cccggagtcc ctgttgagc tgaaggcct gaagccgggt 240
gtcatccaaa tcctgggcgt taaaaccagc cgttttctgt gccaacgtcc ggatggtgcg 300
ctgtacggtt cctgcactt cgaccagag gcatgtagct ttcgtgaact gctgctgaa 360

gatggctata atgtgtacca gtctgaggcg cacggtctgc cgttgactt gccgggtaac 420
aaaagccgc accgcgacc agcaccgct ggtccgctc gcttctgcc gctgccgggt 480
ctgcctccgg cgctgccga gccgccaggc attctggctc cgcaaccgcc ggatgttggc 540
agcagcgatc cgctgagcat ggttgaaccg tcgcagggcc gcagcccgtc ttatgccagc 600
ccgtaa 606

<210> 5

<211> 28

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 5

Gly Ser Ser Phe Leu Ser Pro Glu His Gln Arg Val Gln Gln Arg Lys

1 5 10 15

Glu Ser Lys Lys Pro Pro Ala Lys Leu Gln Pro Arg

20 25

<210> 6

<211> 29

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<220><223> Rat Ghrelin with added C-term cysteine, serine at

position 3 is (n-octanoyl-S)

<400> 6

Gly Ser Ser Phe Leu Ser Pro Glu His Gln Lys Ala Gln Gln Arg Lys

1 5 10 15

Glu Ser Lys Lys Pro Pro Ala Lys Leu Gln Pro Arg Cys

20 25

<210> 7

<211> 474

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 7

Met Lys Arg Val Leu Val Leu Leu Leu Ala Val Ala Phe Gly His Ala

1 5 10 15

Leu Glu Arg Gly Arg Asp Tyr Glu Lys Asn Lys Val Cys Lys Glu Phe

20 25 30

Ser His Leu Gly Lys Glu Asp Phe Thr Ser Leu Ser Leu Val Leu Tyr

35 40 45

Ser Arg Lys Phe Pro Ser Gly Thr Phe Glu Gln Val Ser Gln Leu Val

50 55 60

Lys Glu Val Val Ser Leu Thr Glu Ala Cys Cys Ala Glu Gly Ala Asp

65 70 75 80

Pro Asp Cys Tyr Asp Thr Arg Thr Ser Ala Leu Ser Ala Lys Ser Cys

85 90 95

Glu Ser Asn Ser Pro Phe Pro Val His Pro Gly Thr Ala Glu Cys Cys

100 105 110

Thr Lys Glu Gly Leu Glu Arg Lys Leu Cys Met Ala Ala Leu Lys His

115 120 125

Gln Pro Gln Glu Phe Pro Thr Tyr Val Glu Pro Thr Asn Asp Glu Ile

130 135 140

Cys Glu Ala Phe Arg Lys Asp Pro Lys Glu Tyr Ala Asn Gln Phe Met

145 150 155 160

Trp Glu Tyr Ser Thr Asn Tyr Gly Gln Ala Pro Leu Ser Leu Leu Val

165 170 175

Ser Tyr Thr Lys Ser Tyr Leu Ser Met Val Gly Ser Cys Cys Thr Ser

180 185 190

Ala Ser Pro Thr Val Cys Phe Leu Lys Glu Arg Leu Gln Leu Lys His

195 200 205

Leu Ser Leu Leu Thr Thr Leu Ser Asn Arg Val Cys Ser Gln Tyr Ala

210 215 220

Ala Tyr Gly Glu Lys Lys Ser Arg Leu Ser Asn Leu Ile Lys Leu Ala

225 230 235 240

 Gln Lys Val Pro Thr Ala Asp Leu Glu Asp Val Leu Pro Leu Ala Glu
 245 250 255
 Asp Ile Thr Asn Ile Leu Ser Lys Cys Cys Glu Ser Ala Ser Glu Asp
 260 265 270
 Cys Met Ala Lys Glu Leu Pro Glu His Thr Val Lys Leu Cys Asp Asn
 275 280 285
 Leu Ser Thr Lys Asn Ser Lys Phe Glu Asp Cys Cys Gln Glu Lys Thr
 290 295 300

 Ala Met Asp Val Phe Val Cys Thr Tyr Phe Met Pro Ala Ala Gln Leu
 305 310 315 320
 Pro Glu Leu Pro Asp Val Glu Leu Pro Thr Asn Lys Asp Val Cys Asp
 325 330 335
 Pro Gly Asn Thr Lys Val Met Asp Lys Tyr Thr Phe Glu Leu Ser Arg
 340 345 350
 Arg Thr His Leu Pro Glu Val Phe Leu Ser Lys Val Leu Glu Pro Thr
 355 360 365

 Leu Lys Ser Leu Gly Glu Cys Cys Asp Val Glu Asp Ser Thr Thr Cys
 370 375 380
 Phe Asn Ala Lys Gly Pro Leu Leu Lys Lys Glu Leu Ser Ser Phe Ile
 385 390 395 400
 Asp Lys Gly Gln Glu Leu Cys Ala Asp Tyr Ser Glu Asn Thr Phe Thr
 405 410 415
 Glu Tyr Lys Lys Lys Leu Ala Glu Arg Leu Lys Ala Lys Leu Pro Asp
 420 425 430

 Ala Thr Pro Thr Glu Leu Ala Lys Leu Val Asn Lys His Ser Asp Phe
 435 440 445
 Ala Ser Asn Cys Cys Ser Ile Asn Ser Pro Pro Leu Tyr Cys Asp Ser
 450 455 460
 Glu Ile Asp Ala Glu Leu Lys Asn Ile Leu
 465 470

<210> 8

<211> 1800

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 8

ttaataata attctgtgtt gcttctgaga ttaataattg attaattcat agtcaggaat	60
ctttgtaaaa aggaaaccaa ttacttttgg ctaccacttt tacatggtca cctacaggag	120
agaggagggtg ctgcaagact ctctggtaga aaaatgaaga gggtcctggt actactgctt	180
gctgtggcat ttggacatgc tttagagaga ggccgggatt atgaaaagaa taaagtctgc	240
aaggaattct cccatctggg aaaggaggac ttcacatctc tgtcactagt cctgtacagt	300
agaaaatttc ccagtggcac gtttgaacag gtcagccaac ttgtgaagga agttgtctcc	360
ttgaccgaag cctgctgtgc ggaaggggct gacctgact gctatgacac caggacctca	420
gcactgtctg ccaagtctg tgaaagtaat tctccattcc ccgttcaccc aggcactgct	480
gagtgtctgca ccaaagaggg cctggaacga aagctctgca tggtctgctt gaaacaccag	540
ccacaggaat tccctaccta cgtggaaccc acaaatgatg aaatctgtga ggcgttcagg	600
aaagatccaa aggaatatgc taatcaattt atgtgggaat attccactaa ttacggacaa	660
gtcctctgt cacttttagt cagttacacc aagagttatc tttctatggt agggctctgc	720
tgtacctctg caagcccaac tgtatgcttt ttgaaagaga gactccagct taaacattta	780
tcacttctca ccactctgtc aaatagagtc tgctcacaat atgctgctta tggggagaag	840
aaatcaaggc tcagcaatct cataaagtta gcccaaaaag tgcctactgc tgatctggag	900
gatgttttgc cactagctga agatattact aacatcctct ccaaatgctg tgagtctgcc	960
tctgaagatt gcatggccaa agagctgcct gaacacacag taaaactctg tgacaattta	1020
tccacaaaga attctaagtt tgaagactgt tgtaagaaa aaacagccat ggacgttttt	1080
gtgtgcactt atttcatgcc agctgcccaa ctccccgagc ttccagatgt agagttgccc	1140
acaaacaaag atgtgtgtga tccaggaaac accaaagtca tggataagta tacatttgaa	1200
ctaagcagaa ggactcatct tccggaagta ttctcagta ggtacttgag ccaaccctaa	1260
aaagccttgg tgaatgctgt gatgttgaag actcaactac ctgttttaat gctaagggcc	1320
ctctactaaa gaaggaacta tcttctttca ttgacaaggg acaagaacta tgtgcagatt	1380
attcagaaaa tacatttact gagtacaaga aaaaactggc agagcgacta aaagcaaaat	1440
tgctgatgc cacaccacg gaactggcaa agctgggtta caagcactca gactttgcct	1500
ccaactgctg ttccataaac tcacctctc ttactgtga ttcagagatt gatgtgaat	1560

tgaagaatat cctgtagtcc tgaagcatgt ttattaaactt tgaccagagt tggagccacc 1620
caggggaatg atctctgatg acctaacctt agcaaaacca ctgagcttct gggaagacaa 1680
ctaggatact ttctactttt tctagctaca atatcttcat acaatgacaa gtatgatgat 1740
ttgctatcaa aataaattga aatataatgc aaaccataaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 1800

<210> 9

<211> 702

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 9

atgagcactg aaagcatgat ccgggacgtg gagctggccg aggaggcgct cccaagaag 60
acaggggggc cccagggttc caggcggtgc ttgttctca gcctcttctc ctctctgatc 120
gtggcaggcg ccaccacgct ctctgcctg ctgcactttg gggatgatcg ccccagagg 180
gaagagtcc caggggacct ctctctaata agccctctgg cccaggcagt cagatcatct 240
tctcgaacct cgagtacaa gcctgtagcc catgtttag caaacctca agctgagggg 300
cagctccagt ggctgaaccg ccgggccaat gcctctctgg ccaatggcgt ggagctgaga 360

gataaccagt tgggtgtgcc atcagagggc ctgtacctca tctactccca ggtctcttc 420
aaggccaag gctgccctc caccatgtg ctctcacc acaccatcag ccgcatgcc 480
gtctctacc agaccaagg caacctctc tctgcatca agagccctg ccagagggag 540
acccagagg gggctgagc caagccctg tatgagcca tctatctggg aggggtcttc 600
cagctggaga agggtagcc actcagcgt gagatcaat gcccgacta tctgacttt 660
gccgagtctg ggcaggtcta ctttgggac attgcctgt ga 702

<210> 10

<211> 233

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 10

Met Ser Thr Glu Ser Met Ile Arg Asp Val Glu Leu Ala Glu Glu Ala
1 5 10 15
Leu Pro Lys Lys Thr Gly Gly Pro Gln Gly Ser Arg Arg Cys Leu Phe
20 25 30
Leu Ser Leu Phe Ser Phe Leu Ile Val Ala Gly Ala Thr Thr Leu Phe
35 40 45

Cys Leu Leu His Phe Gly Val Ile Gly Pro Gln Arg Glu Glu Phe Pro
50 55 60

Arg Asp Leu Ser Leu Ile Ser Pro Leu Ala Gln Ala Val Arg Ser Ser
65 70 75 80

Ser Arg Thr Pro Ser Asp Lys Pro Val Ala His Val Val Ala Asn Pro
85 90 95

Gln Ala Glu Gly Gln Leu Gln Trp Leu Asn Arg Arg Ala Asn Ala Leu
100 105 110

Leu Ala Asn Gly Val Glu Leu Arg Asp Asn Gln Leu Val Val Pro Ser
115 120 125

Glu Gly Leu Tyr Leu Ile Tyr Ser Gln Val Leu Phe Lys Gly Gln Gly
130 135 140

Cys Pro Ser Thr His Val Leu Leu Thr His Thr Ile Ser Arg Ile Ala
145 150 155 160

Val Ser Tyr Gln Thr Lys Val Asn Leu Leu Ser Ala Ile Lys Ser Pro
165 170 175

Cys Gln Arg Glu Thr Pro Glu Gly Ala Glu Ala Lys Pro Trp Tyr Glu
180 185 190

Pro Ile Tyr Leu Gly Gly Val Phe Gln Leu Glu Lys Gly Asp Arg Leu
195 200 205

Ser Ala Glu Ile Asn Arg Pro Asp Tyr Leu Asp Phe Ala Glu Ser Gly
210 215 220

Gln Val Tyr Phe Gly Ile Ile Ala Leu
225 230