



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2018년10월26일
(11) 등록번호 10-1912335
(24) 등록일자 2018년10월22일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 38/36 (2006.01) A61K 31/70 (2006.01)
A61K 47/50 (2017.01)
(52) CPC특허분류
A61K 38/36 (2013.01)
A61K 31/70 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2017-7019368(분할)
(22) 출원일자(국제) 2010년07월26일
심사청구일자 2017년07월12일
(85) 번역문제출일자 2017년07월12일
(65) 공개번호 10-2017-0085606
(43) 공개일자 2017년07월24일
(62) 원출원 특허 10-2012-7003344
원출원일자(국제) 2010년07월26일
심사청구일자 2015년06월15일
(86) 국제출원번호 PCT/GB2010/001422
(87) 국제공개번호 WO 2011/012850
국제공개일자 2011년02월03일
(30) 우선권주장
61/228,828 2009년07월27일 미국(US)
61/347,136 2010년05월21일 미국(US)
(56) 선행기술조사문헌
EP00605963 A2*
(뒷면에 계속)
전체 청구항 수 : 총 11 항

(73) 특허권자
리폭센 테크놀로지스 리미티드
영국, 런던 에스더블유1에이 2디디, 화이트홀,
15, 5플로어
박스알타 인코퍼레이티드
미국, 일리노이즈 60015, 배녹번, 1200 레이크사
이드 드라이브
박스알타 게엠베하
스위스 6300 추크 제호러백 4
(72) 발명자
자인, 산자이
영국 런던 엔더블유1 0엔에이치1 로얄 컬리지 스
트리트2 런던 바이오사이언스 이노베이션 센터
그레고리아디스, 그레고리
영국 런던 엔더블유1 0엔에이치1 로얄 컬리지 스
트리트2 런던 바이오사이언스 이노베이션 센터
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
김순웅

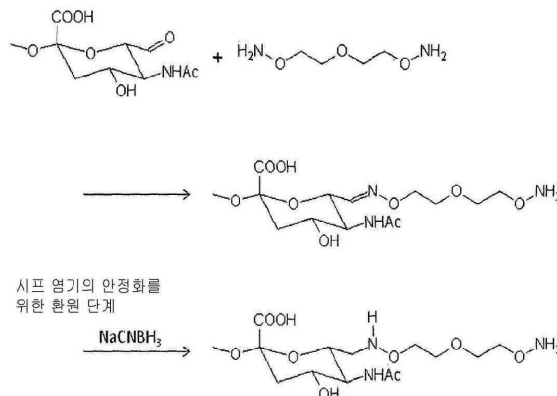
심사관 : 조경주

(54) 발명의 명칭 비혈액 응고 단백질의 글리코폴리시알화

(57) 요약

수용성 중합체, 특히 특정 폴리시알산(PSA) 또는 변형된 PSA(mPSA)는 혈액 응고 단백질이 아닌 당단백질의 산화된 탄수화물 부분을 수용성 중합체와 접촉시킴으로서 당단백질의 산화된 탄수화물 부분, 또는 강글리오시드(ganglioside) 또는 약물 전달 시스템에 접합되되, 상기 수용성 중합체는 아미노옥시기를 함유하고, 산화된 탄수 (뒷면에 계속)

대표도 - 도2



화물 부분과 수용성 중합체 상의 아미노옥시기 사이에 옥심 결합(oxime linkage)이 형성되거나, 상기 수용성 중합체는 히드라지드기를 함유하고, 산화된 탄수화물 부분과 수용성 중합체 상의 히드라지드기 사이에 히드라존 결합(hydrazone linkage)이 형성된다. 따라서 PSA 및 mPSA와 같은 아미노옥시- 또는 히드라지드-수용성 중합체의 접합체가 수득되며, 이때 PSA 또는 mPSA는 탄수화물 부분을 통해 부착된다.

(52) CPC특허분류

A61K 47/60 (2017.08)

A61K 47/61 (2017.08)

(72) 발명자

드워베디, 아치아나

영국 런던 엔더블유1 0엔에이치1 로얄 컬리지 스트리트 2 런던 바이오사이언스 이노베이션 센터

나쓰, 스리즈잇

영국 런던 엔더블유1 0엔에이치1 로얄 컬리지 스트리트2 런던 바이오사이언스 이노베이션 센터

시크만, 위르겐

오스트리아, 에이-1210 비엔나, 게라스도르프 스트라쎬 153/209

하이더, 스테판

오스트리아, 에이-3385 프린저스도르퍼, 모짜르트 스트라쎬 2

로텐스테인너, 한스피터

오스트리아, 에이-1020 비엔나, 하이드가쎬10/17

투레썩, 피터

오스트리아, 에이-3400 클로스터노이부르크, 하우스트스트라쎬 59, 웨이들링

(56) 선행기술조사문헌

US20090076237 A1*

KR100254650 B1*

Nature Method, vol. 6, no. 3, pp. 207-209(2009.03.)*

W02005014035 A2*

W02008151258 A2

*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

명세서

청구범위

청구항 1

히드라지드 링커로 DNase의 산화된 탄수화물 부분에 히드라지드 기를 포함하는 폴리시알산(PSA) 또는 변형된 PSA(mPSA)를 접합하는 방법에 있어서, 상기 방법은

- a) 수용성 중합체인 PSA 또는 mPSA를 산화시켜 알데히드기를 형성하는 단계;
 - b) 히드라지드 링커와 상기 산화된 PSA 또는 mPSA가 반응하는 단계;
 - c) DNase가 산화되면서 알데히드기를 형성하는 단계; 및
 - d) b) 단계에서 합성된 화합물이 c) 단계의 산화된 DNase와 반응하여 DNase의 산화된 탄수화물 부분의 알데히드 부분과 b) 단계에서 합성된 화합물의 히드라지드 기 사이에 히드라존 결합을 형성하는 단계;를 포함하고,
- 상기 mPSA는 산화 또는 환원에 의하여 말단 N-아세틸뉴라민산 부분으로부터 유래된 부분을 포함하는 PSA인, 방법.

청구항 2

제 1 항에 있어서,
상기 PSA 또는 mPSA는 콜로민산 또는 변형된 콜로민산인, 방법.

청구항 3

제 1 항에 있어서,
상기 PSA 또는 mPSA는 2 내지 500개의 시알산 단위를 포함하는, 방법.

청구항 4

제 1 항에 있어서,
상기 c) 단계의 탄수화물 부분을 산화시키는 단계는 과요오드산나트륨(sodium periodate, NaIO_4)과 함께 DNase를 배양하는 것을 포함하는, 방법

청구항 5

제 1 항에 있어서,
상기 a) 단계는 PSA 또는 mPSA의 말단 단위 상에 알데히드기를 형성하도록 PSA 또는 mPSA를 산화시키는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 6

제 5 항에 있어서,
 NaIO_4 를 이용하여 상기 PSA 또는 mPSA를 산화시키는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 7

제 1 항에 있어서,
아닐린 및 아닐린 유도체로부터 선택된 친핵성 촉매를 포함하는 완충액에서 PSA 또는 mPSA와 상기 산화된 탄수화물 부분을 접촉시키는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 8

제 1 항에 있어서,

상기 히드라지드 기는 산화된 PSA 또는 mPSA를 아디프산 디히드라지드 또는 히드라진 중에서 선택된 히드라지드 링커와 반응시킴으로써 형성되는 것인, 방법.

청구항 9

제 1 항에 있어서,

환원성 화합물의 존재 하에 배양함으로써 상기 접합된 DNase 내 히드라존 결합을 환원시키는 단계를 더 포함하는, 방법.

청구항 10

제 9 항에 있어서,

상기 환원성 화합물은 나트륨 시아노보로보로하이드리드(sodium cyanoborohydride, NaCNBH₃) 또는 아스코르브산(비타민 C)인, 방법.

청구항 11

다음을 포함하는 접합된 DNase:

(a) DNase; 및

(b) DNase에 결합된 적어도 하나의 히드라지드-폴리시알산(PSA) 또는 히드라지드 변형된 폴리시알산(mPSA)을 포함하고, 상기 히드라지드-PSA 또는 히드라지드 mPSA는 하나 이상의 탄수화물 부분을 통해 상기 DNase에 부착되고,

상기 mPSA는 산화 또는 환원에 의하여 말단 N-아세틸뉴라민산 부분으로부터 유래된 부분을 포함하는 PSA임.

청구항 12

삭제

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 수용성 중합체, 특히 폴리시알산을 접합시키기 위한 물질 및 방법, 탄수화물 함유 화합물, 특히 혈액 응고 단백질이 아닌 당단백질, 및 수득된 접합체에 관한 것이다.

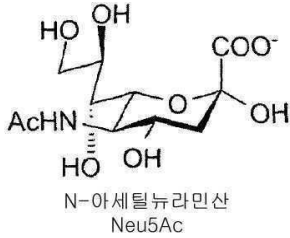
배경 기술

[0002] 폐길화(PEGylation) 또는 폴리시알화(polysialylation)에 의해서와 같은 폴리펩티드 약물의 접합은 혈액 순환에서의 분해로부터 이들 약물을 보호하고, 따라서 이들의 약물 역학적(pharmacodynamic) 및 약물 동력학적(pharmacokinetic) 프로파일을 향상시킨다(Harris and Chess, Nat Rev Drug Discov. 2003; 2: 214-21; S. Jain, D. Hreczuk-Hirst, P. Laing and G. Gregoriadis, Drug Deliver Systems and Sciences, 4(No 1): 3-9, 2004). 폐길화 공정에 의해 에틸렌글리콜(폴리에틸렌글리콜, PEG)의 반복 단위가 폴리펩티드 약물에 부착된다. PEG 분자는 수력학적 부피가 크며(구상 단백질 크기의 5 내지 10배), 고도로 수용성이고, 수화되어 있으며, 비독성이면서 비-면역원성며, 인체로부터 신속하게 제거된다. 분자의 폐길화는 효소적 분해에 대한 약물의 저항성의 증가, 생체 내 반감기의 증가, 투여 빈도의 감소, 면역원성의 감소, 물리적 및 열적 안정성의 증가, 용해성의 증가, 액체 안정성의 증가 및 집합체 형성의 감소를 초래할 수 있다. 최초로 폐길화된 약물은 1990년 대 초반에 FDA에 의해 승인되었다. 그때 이후로, FDA는 경구 투여, 주사용 투여 및 국부 투여용으로 몇몇 폐길화된 약물을 승인했다.

[0003] 시알산(N-아세틸뉴라민산으로도 지칭됨) 및 폴리시알산은 동물 조직에서 광범위하게 분포하고, 식물 및 진균류 내지 효모 및 박테리아에 이르는 기타 종에서 다소 낮은 정도로 분포하며, 주로 당단백질 및 강글리오시드(ganglioside)에 분포하는 것으로 알려져 있다.

[0004] 본원에서 사용된 "PSA"란 약어는 "폴리시알산"이란 용어를 지칭한다. 마찬가지로, 본원에서 사용된 "mPSA"란 용어는 "변형된 폴리시알산"이란 용어를 지칭한다.

[0005] PSA는 N-아세틸뉴라민산의 중합체(일반적으로 단일 중합체)로 이루어져 있다. 2차 아미노기는 정상적으로는 아세틸기를 갖지만, 이는 대신에 글리코실기를 가질 수 있다. 히드록실기 상의 가능한 치환기로는 아세틸기, 락틸기, 에틸기, 설페이트기 및 포스페이트기를 들 수 있다.



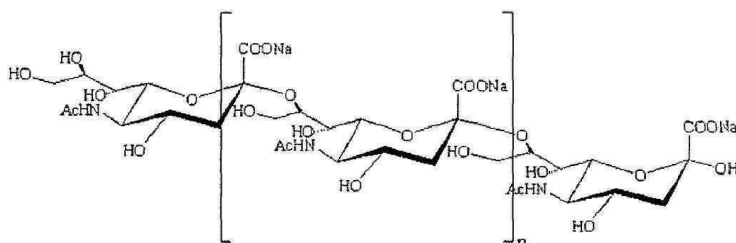
[0006] 시알산(N-아세틸뉴라민산)의 구조

[0007] PSA 및 mPSA는 일반적으로 2,8- 또는 2,9-글리코시드 결합 또는 이들의 조합(예를 들어, 교호적 2,8- 및 2,9-결합)에 의해 연결된 N-아세틸뉴라민산 부분으로 본질적으로 이루어진 선형 중합체를 포함한다. 특히 바람직한 PSA 및 mPSA에서, 글리코시드 결합은 α-2,8이다. 이 같은 PSA 및 mPSA는 편리하게도 콜로민산으로부터 유도되고, 본원에서 "CA" 및 "mCA"로서 지칭된다. 전형적인 PSA 및 mPSA는 적어도 2개, 바람직하게는 적어도 5개, 더욱 바람직하게는 적어도 10개, 및 가장 바람직하게는 적어도 20개의 N-아세틸뉴라민산 부분을 포함한다. 따라서 이들은 5 내지 500개의 N-아세틸뉴라민산 부분, 바람직하게는 10 내지 300개의 N-아세틸뉴라민산 부분을 포함할 수 있다. PSA 및 CA는 상이한 당 부분을 포함하는 중합체일 수 있다. 이들은 공중합체일 수 있다. PSA 및 CA에는 바람직하게는 본질적으로 N-아세틸뉴라민산이 아닌 당 부분이 없다. PSA 및 CA는 바람직하게는 적어도 90%, 더욱 바람직하게는 적어도 95%, 및 가장 바람직하게는 적어도 98%의 N-아세틸뉴라민산 부분을 포함한다.

[0008] PSA 및 CA가 N-아세틸뉴라민산이 아닌 부분(예를 들어, mPSA 및 mCA에서와 같음)을 포함하는 경우, 이들은 바람직하게는 중합체 쇄의 일 말단 또는 양 말단에 위치한다. 이 같은 "기타" 부분은, 예를 들어 산화 또는 환원에 의해 말단 N-아세틸뉴라민산 부분으로부터 유래될 수 있다.

[0009] 예를 들어, WO-A-0187922 호에는 이 같은 mPSA 및 mCA가 개시되어 있으며, 여기서 비-환원성의 말단 N-아세틸뉴라민산 단위는 과요오드산나트륨과의 반응에 의해 알데히드기로 전환된다. 또한, WO 2005/016974 호에는 이 같은 mPSA 및 mCA가 개시되어 있으며, 여기서 환원성의 말단 N-아세틸뉴라민산 단위는 환원반응에 적용되어 상환원성의 말단 N-아세틸뉴라민산 단위에서 환원적으로 개환되며, 그 결과 인접한 디올기가 형성된 후, 산화에 의해 인접한 디올기는 알데히드기로 전환된다.

[0010] 시알산 풍부 당단백질은 인간 및 기타 유기체에서 셀렉틴(selectin)을 결합시킨다. 이들은 인간 인플루엔자 감염에 중요한 역할을 한다. 예를 들어, 시알산은 숙주 세포 또는 박테리아의 표면 상의 만노스 항원을 만노스 결합 렉틴으로부터 숨길 수 있다. 이는 보체(complement)의 활성화를 방지한다. 또한 시알산은 끝에서 두 번째에 위치한 갈락토스(galactose) 잔기를 숨겨서, 간 실질세포(hepatic parenchymal cell) 상의 갈락토스 수용체에 의한 당단백질의 신속한 제거를 예방한다.



[0011] 콜로민산(N-아세틸뉴라민산의 단일 중합체)의 구조

[0012] CA는, 그 중에서도, K1 항원을 갖고 있는 대장균(*Escherichia coli*)의 특정 균주에 의해 생산된다. CA는 많은 생리학적 기능을 갖는다. 이들은 약물 및 화장품용 원료로서 중요하다.

[0013] 폴리시알화되지만 변형되지 않은 아스파라기나제(asparaginase)에 대한 생체 내 비교 연구에 따르면, 폴리시알화는 효소의 반감기를 증가시키는 것으로 나타났다(Fernandes and Gregoriadis, *Biochimica Biophysica Acta*)

1341: 26-34, 1997).

- [0014] 수용성 중합체와 치료용 단백질 사이의 공유 결합의 형성에 의한 접합체의 제조는 다양한 화학적 방법을 이용하여 수행될 수 있다. PSA를 치료용 단백질에 결합시키기 위한 하나의 접근법은 단백질의 탄수화물 부분을 통한 중합체의 접합이다. 단백질 중의 탄수화물의 인접한 하이드록실(OH)기는 과요오드산나트륨(NaIO_4)으로 용이하게 산화되어 활성 알데히드기를 형성할 수 있다(Rothfus and Smith, J Biol Chem 1963; 238: 1402-10; van Lenten and Ashwell, J Biol Chem 1971; 246: 1889-94). 후속적으로, 중합체는, 예를 들어 활성 히드라지드기를 함유하는 시약의 사용에 의해 탄수화물의 알데히드기에 결합될 수 있다(Wilchek M and Bayer EA, Methods Enzymol 1987; 138: 429-42). 더욱 최근의 기술은 옥심 결합을 형성하기 위해 알데히드와 반응하는 아미노옥시기를 함유하는 시약의 사용이다(WO 96/40662, WO2008/025856).
- [0015] 치료용 단백질에 대한 PSA의 접합을 개시한 또 다른 예는 히드라지드 화학적 성질을 이용한 rFVIII의 산화 및 PSA 및 기타 수용성 중합체(예를 들어, PEG, HES, 텍스트란)에 대한 후속적인 결합을 교시하고 있는 미국 공개 공보 제 2009/0076237 호; 상이한 응고 인자, 예를 들어, rFIX, FVIII 및 FVIIa의 산화 및 중합체, 예를 들어, PEG에 대한 후속적인 결합을 교시하고 있는 WO 2008/025856 호에 개시되어 있다.
- [0016] 최근, 알데히드를 생성하기 위해 시알산의 온건한 과요오드산염 산화 이후에 촉매량의 아닐린의 존재 하에 아미노옥시기 함유 시약과 반응하는 단계를 포함하는 개선된 방법이 개시되어 있다(Dirksen A and Dawson PE, Bioconjugate Chem. 2008; 19, 2543-8; 및 Zeng Y et al., Nature Methods 2009; 6: 207-9). 아닐린 촉매작용은 옥심 라이제이션(oxime ligation)을 현저하게 가속화하여, 매우 낮은 농도의 시약을 사용하는 것을 가능케 한다.
- [0017] 수용성 중합체를 치료용 단백질에 접합하는데 이용 가능한 방법에도 불구하고, 다양한 시약과 관련된 비용을 최소화하면서, 수용성 중합체를 화합물의 약물 역학적 및/또는 약물 동력학적 특성을 향상시키는, 혈액 응고 단백질이 아닌 탄수화물 함유 화합물에 접합시키기 위한 물질 및 방법의 개발에 대한 요구가 여전히 존재한다.

발명의 내용

해결하려는 과제

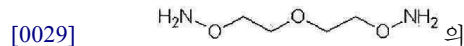
- [0018] 본 발명은, 다양한 시약과 관련된 비용을 최소화하면서, 수용성 중합체를 화합물의 약물 역학적 및/또는 약물 동력학적 특성을 향상시키는, 혈액 응고 단백질이 아닌 탄수화물 함유 화합물에 접합시키기 위한 물질 및 방법을 제공한다.

과제의 해결 수단

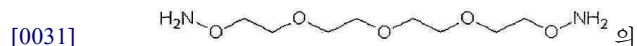
- [0019] 본 발명의 일 실시형태에서, 수용성 중합체를 혈액 응고 단백질이 아닌 탄수화물 함유 화합물의 산화된 탄수화물 부분에 접합시키기 위한 방법이 제공되며, 상기 방법은 접합을 허용하는 조건 하에서 산화된 탄수화물 부분을 수용성 중합체와 접촉시키는 단계를 포함하며, 이때 상기 수용성 중합체는 아미노옥시기를 함유하고, 산화된 탄수화물 부분과 수용성 중합체 중의 아미노옥시기 사이에는 옥심 결합이 형성되거나, 상기 수용성 중합체는 히드라지드기를 함유하고, 산화된 탄수화물 부분과 수용성 중합체 중의 아미노옥시기 사이에는 히드라존 결합이 형성된다. 상기 화합물은 (1) 혈액 응고 단백질이 아닌 당단백질, (2) 강글리오시드, 또는 (3) 탄수화물 기를 포함하는 약물 전달 시스템일 수 있다.
- [0020] 탄수화물 부분은 당 특이적 산화 효소(예를 들어, 갈락토스 또는 글루코스 옥시다제(oxidase))를 이용하여 산화되거나, 과요오드산나트륨(NaIO_4), 테트라아세트산납($\text{Pb}(\text{OAc})_4$) 및 칼륨페르루트헨염(potassium perruthenate, KRuO_4)으로부터 선택된 산화제를 포함하는 완충액과 배양함으로써 산화될 수 있다.
- [0021] 탄수화물 부분은 시알산, 만노스, 갈락토스 또는 글루코스 잔기에서 산화될 수 있다.
- [0022] 본 발명에서 사용된 수용성 중합체는 폴리에틸렌글리콜(PEG), 분지형 PEG, PEG 유도체, PSA, mPSA, CA, mCA, 하이드록시에틸 셀룰로스(HEC), 텍스트린, 폴리옥사졸린, 탄수화물, 다당류, 풀룰란(pullulane), 키토산, 히아룰론산, 콘드로이틴 설페이트, 더마탄 황산(dermatan sulfate), 전분, 텍스트란, 카복시메틸-텍스트란, 폴리알킬렌 옥사이드(PAO), 폴리알킬렌 글리콜(PAG), 폴리프로필렌 글리콜(PPG), 폴리옥사졸린, 폴리아크릴로일모폴린, 폴리비닐 알코올(PVA), 폴리카복실레이트, 폴리비닐피롤리돈, 폴리포스파젠, 폴리옥사졸린, 폴리에틸렌-공-말레산 무수물, 폴리스티렌-공-말레산 무수물, 폴리(1-하이드록시메틸에틸렌 하이드록시메틸포르말)(PHF), 또는 2-

메타크릴로일옥시-2'-에틸트리메틸암모늄포스페이트(MPC)일 수 있지만, 이에 한정되지 않는다.

- [0023] 하기 실시예에 예시된 본 발명의 특정 실시형태에서, 수용성 중합체는 PEG 또는 분지형 PEG이다.
- [0024] 하기 실시예에 예시된 본 발명의 또 다른 특정 실시형태에서, 수용성 중합체는 폴리시알산(PSA) 또는 변형된 PSA(mPSA)이다. PSA 또는 mPSA는 350 Da 내지 120,000 Da, 500 Da 내지 100,000 Da, 1000 Da 내지 80,000 Da, 1500 Da 내지 60,000 Da, 2,000 Da 내지 45,000 Da, 또는 3,000 Da 내지 35,000 Da의 분자량 범위를 가질 수 있다.
- [0025] PSA 또는 mPSA는 콜로민산 또는 변형된 콜로민산일 수 있다.
- [0026] 본 발명의 다른 실시형태에서, PSA 또는 mPSA는 약 2 내지 500개 또는 10 내지 300개의 시알산 단위로 구성된다. 또 다른 실시형태에서, 산화제가 과요오드산나트륨(NaIO₄)인 상술한 방법이 제공된다.
- [0027] 본 발명의 방법은 수용성 중합체를 산화시켜 수용성 중합체의 말단 시알산 단위 상에 알데히드기를 형성하는 단계, 및 산화된 수용성 중합체를 아미노옥시 링커(aminooxy linker)와 반응시키는 단계를 포함할 수 있다.
- [0028] 본 발명의 또 다른 실시형태에서, 활성화된 아미노옥시 링커를 산화된 수용성 중합체와 반응시킴으로써 수용성 중합체가 제조되는 방법이 제공되며, 여기서 상기 링커는 단일 이작용성(homobifunctional) 또는 이중 이작용성(heterobifunctional) 링커이다. 단일 이작용성 링커는 일반식 NH₂[OCH₂CH₂]_nNH₂를 가질 수 있으며, 여기서 n은 1 내지 50, 바람직하게는 1 내지 11, 더욱 바람직하게는 1 내지 6이다. 상기 링커는 특히 화학식:



[0030] 3-옥사-펜탄-1,5-디옥시아민 링커, 및 화학식:



- [0032] 3,6,9-트리옥사-운데칸-1,11-디옥시아민 링커로부터 선택될 수 있다. PSA 또는 mPSA는 PSA의 비-환원성 말단에 말단 알데히드기를 형성하기 위해 산화제와 함께 배양함으로써 산화될 수 있다.
- [0033] 상기 방법은 수용성 중합체를 산화시켜 수용성 중합체의 말단 단위, 예를 들어 PSA 또는 mPSA의 말단 시알산 단위 상에 알데히드를 형성하는 단계, 및 산화된 수용성 중합체를 아미노옥시 링커와 반응시키는 단계를 포함할 수 있다. 또 다른 실시형태에서, 아미노옥시 링커가 3-옥사-펜탄-1,5-디옥시아민인 상술한 방법이 제공된다. 관련된 실시형태에서, 산화제는 NaIO₄이다.
- [0034] 본 발명의 다른 실시형태에서, 아닐린 및 아닐린 유도체로 이루어진 군으로부터 선택된 친핵성 촉매를 포함하는 완충액에서 활성화된 수용성 중합체와 산화된 탄수화물 부분의 접촉이 일어나는 상술한 방법이 제공된다.
- [0035] 산화된 수용성 중합체를 히드라지드 링커와 반응시킴으로써 히드라지드기가 수용성 중합체 상에 형성될 수 있다. 히드라지드 링커는 적절하게는 아디프산 디히드라지드 또는 히드라진일 수 있다.
- [0036] 본 발명의 또 다른 실시형태에서, 예를 들어 나트륨 시아노보로하이드리드 (sodium cyanoborohydride, NaCNBH₃) 및 아스코르브산(비타민 C)로 이루어진 군으로부터 선택된 환원성 화합물을 포함하는 완충액에서 접합된 단백질을 배양함으로써 상기 접합된 단백질 중의 옥심 또는 히드라존 결합을 환원시키는 단계를 더 포함하는 상술한 방법이 제공된다. 관련된 실시형태에서, 환원성 화합물은 나트륨 시아노보로하이드리드(sodium cyanoborohydride, NaCNBH₃)이다.
- [0037] 본 발명의 다른 실시형태에서, 임의의 상술한 방법에 의해 생성된 접합된 당단백질이 제공된다. 본 발명의 또 다른 실시형태에서, 혈액 응고 단백질이 아닌 접합된 당단백질, 강글리오시드 또는 약물 전달 시스템은 (a) 상기 당단백질, 강글리오시드 또는 약물 전달 시스템; 및 (b) 상기 (a)의 당단백질에 결합된 적어도 하나의 아미노옥시 수용성 중합체를 포함하되, 상기 아미노옥시 수용성 중합체는 하나 이상의 탄수화물 부분을 통해 당단백질, 강글리오시드 또는 약물 전달 시스템에 부착된다. 본 발명 또 다른 실시형태에서, 혈액 응고 단백질이 아닌 접합된 당단백질, 강글리오시드 또는 약물 전달 시스템은 (a) 상기 당단백질, 강글리오시드 또는 약물 전달 시스템; 및 (b) 상기 (a)의 당단백질에 결합된 적어도 하나의 히드라지드 수용성 중합체를 포함하되, 상기 히드라지드 수용성 중합체는 하나 이상의 탄수화물 부분을 통해 당단백질 강글리오시드 또는 약물 전달 시스템에 부착된다.

도면의 간단한 설명

- [0038] 도 1은 수용성 디아미노옥시 링커인 3-옥사-펜탄-1,5-디옥시아민 및 3,6,9-트리옥사-운데칸-1,11-디옥시아민의 합성을 나타낸다.
- 도 2는 아미노옥시-PSA의 제조를 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0039] 혈액 응고 단백질이 아닌 당단백질과 같은 탄수화물 함유 화합물의 약리학적 및 면역학적 특성은 화학적 변형 및 수용성 중합체, 특히 PEG 또는 PSA 또는 mPSA와의 접합에 의해 향상될 수 있다. 얻어진 접합체의 특성은 일반적으로 상기 중합체에 크게 의존한다. 따라서 한정되고 좁은 크기 분포를 갖는 중합체가 일반적으로 바람직하다. 특정 실시예에서 사용된 PSA 및 mPSA는 좁은 크기 분포를 갖는 최종 PSA 제제를 생성하는 방식으로 정제될 수 있다.

[0040] 당단백질

[0041] 본원에 개시된 바와 같이, 인터류킨, 알파-, 베타- 및 감마-인터페론과 같은 사이토카인, 과립구 콜로니 자극 인자를 포함한 콜로니 자극 인자, 섬유아세포 성장 인자, 혈소판 유래 성장 인자, 포스포리파제 활성화 단백질 (PUP), 인슐린, 렉틴s 및 리신과 같은 식물 단백질, 종양 괴사 인자(tumor necrosis factor) 및 관련된 대립 유전자, 종양 괴사 인자 수용체의 용해성 형태, 인터류킨 수용체 및 인터류킨 수용체의 용해성 형태, 성장 인자, 조직 성장 인자, TGF α 또는 TGF β 와 같은 형질전환 성장 인자 및 상피세포 성장 인자, 호르몬, 소마토메딘(somatomedin), 색소분비 호르몬, 시상하부 방출 인자, 항이노 호르몬, 프로락틴(prolactin), 융모성 고나도트로핀(chorionic gonadotropin), 여포 자극 호르몬, 갑상선 자극 호르몬, 조직 플라스미노겐 활성화인자(tissue plasminogen activator), 및 IgG, IgE, IgM, IgA 및 IgD와 같은 면역 글로블린, 단일 클론성 항체, 에리스로포이에틴(EPO), 혈액 응고 단백질이 아닌 혈액 인자, 갈락토시다제(galactosidase), α -갈락토시다제, β -갈락토시다제, DNase, 페투인(fetuin), 이들의 단편, 및 임의의 상술한 단백질 또는 이의 단편을 치료용 당단백질과 함께 포함하는 임의의 융합 단백질을 들 수 있지만 이에 제한되지 않는, 혈액 응고 단백질이 아닌 당단백질이 본 발명에 의해 일반적으로 고려된다. 일 실시형태에서, 당단백질은 EPO이다. 다른 실시형태에서, 당단백질은 갈락토시다제이다. 또 다른 실시형태에서, 당단백질은 DNase이다. 또 다른 실시형태에서, 당단백질은 페투인이다. 마지막으로, 여전히 또 다른 실시형태에서, 당단백질은 과립구 콜로니 자극 인자이다.

[0042] 본원에서 사용된 바와 같이, "생물학적으로 활성인 유도체" 또는 "생물학적으로 활성인 변이체"는 상기 분자의 실질적으로 동일한 기능적 및/또는 생물학적 특성, 예를 들어 결합 특성 및/또는 펩티드 골격 또는 염기성 중합체 단위와 같은 동일한 구조적 기반을 갖는 분자의 임의의 유도체 또는 변이체를 포함한다.

[0043] "유사체", "변이체" 또는 "유도체"는 구조가 실질적으로 유사하고 특정한 경우에 자연적으로 발생하는 분자에 대해 비록 정도가 상이하지만 동일한 생물학적 활성을 갖는 화합물이다. 예를 들어, 폴리펩티드 변이체는 실질적으로 유사한 구조를 공유하고 기준 폴리펩티드와 동일한 생물학적 활성을 갖는 폴리펩티드를 지칭한다. 변이체 또는 유사체는 하나 이상의 돌연변이에 기초하여 상기 유사체가 유래되는 자연적으로 발생하는 폴리펩티드에 비해 이들의 아미노산 서열의 조성이 다르며, 이때 상기 하나 이상의 돌연변이는 (i) 상기 폴리펩티드의 하나 이상의 말단 및/또는 자연적으로 발생하는 폴리펩티드 서열의 하나 이상의 내부 영역(예를 들어, 단편)에서 하나 이상의 아미노산 잔기의 결실(deletion), (ii) 상기 폴리펩티드의 하나 이상의 말단(전형적으로 "부가" 또는 "융합") 및/또는 자연적으로 발생하는 폴리펩티드 서열의 하나 이상의 내부 영역(전형적으로, "삽입")에서 하나 이상의 아미노산의 삽입 또는 부가, 또는 (iii) 자연적으로 발생하는 폴리펩티드 서열 중 기타 아미노산에 대한 하나 이상의 아미노산의 치환을 포함한다. 일례로서, "유도체"는, 예를 들어 화학적으로 변형되었던 기준 폴리펩티드와 동일하거나 실질적으로 유사한 구조를 공유하는 폴리펩티드를 지칭한다.

[0044] 변이체 또는 유사체 폴리펩티드는 삽입 변이체를 포함하며, 여기서 하나 이상의 아미노산 잔기가 본 발명의 단백질 아미노산 서열에 부가된다. 삽입은 단백질의 일 말단 또는 양 말단에 위치할 수 있고, 및/또는 단백질 아미노산 서열의 내부 영역 내에 위치할 수 있다. 일 말단 또는 양 말단에 또 다른 잔기를 갖는 삽입 변이체는, 예를 들어 융합 단백질, 및 아미노산 태그(tag) 또는 기타 아미노산 라벨(label)을 포함하는 단백질을 포함한다. 일 양태에서, 특히 분자가 대장균과 같은 박테리아 세포에서 재조합적으로 발현되는 경우에 단백질 분자는 임의적으로 N-말단 Met를 함유한다.

[0045] 결실 변이체(deletion variant)에서, 본원에 개시된 바와 같은 단백질 또는 폴리펩티드 중의 하나 이상의 아미

노산 잔기는 제거된다. 결실은 단백질 또는 폴리펩티드의 일 말단 또는 양 말단에서 이루어질 수 있고, 및/또는 단백질 아미노산 서열 내부의 하나 이상의 잔기의 제거에 의해 이루어질 수 있다. 따라서 결실 변이체는 단백질 또는 폴리펩티드 서열의 단편을 포함한다.

[0046] 치환 변이체(substitution variant)에서, 단백질 또는 폴리펩티드의 하나 이상의 아미노산 잔기가 제거되고, 대안적인 잔기로 교체된다. 일 양태에서, 치환은 특성상 보존적이며, 이러한 유형의 보존적인 치환은 선행 기술분야에 널리 공지되어 있다. 대안적으로는, 본 발명은 또한 비-보존적인 치환을 포함한다. 예시적인 보존적인 치환이 레닝거(Lehninger)의 문헌[Biochemistry, 2nd Edition; Worth Publishers, Inc., New York (1975), pp.71-77]에 기술되어 있으며, 하기에서 바로 개시되어 있다.

표 1

[0047]

보존적인 치환	
측쇄 특징	아미노산
비극성(소수성):	
A. 지방족	A L I V P
B. 방향족	F W
C. 황 함유	M
D. 경계선	G
하전되지 않은 극성:	
A. 하이드록실	S T Y
B. 아미드	N Q
C. 설프하이드릴	C
D. 경계선	G
양으로 하전(염기성)	K R H
음으로 하전(산성)	D E

[0048] 대안적으로, 예시적인 보존적인 치환은 하기에서 바로 개시되어 있다.

표 2

[0049]

보존적인 치환 II	
원래의 잔기	예시적인 치환
Ala(A)	Val, Leu, Ile
Arg(R)	Lys, Gln, Asn
Asn(N)	Gln, His, Lys, Arg
Asp(D)	Glu
Cys(C)	Ser
Gln(Q)	Asn
Glu(E)	Asp
His(H)	Asn, Gln, Lys, Arg
Ile(I)	Leu, Val, Met, Ala, Phe
Leu(L)	Ile, Val, Met, Ala, Phe
Lys(K)	Arg, Gln, Asn
Met(M)	Leu, Phe, Ile
Phe(F)	Leu, Val, Ile, Ala
Pro(P)	Gly
Ser(S)	Thr
Thr(T)	Ser
Trp(W)	Tyr
Tyr(Y)	Trp, Phe, Thr, Ser
Val(V)	Ile, Leu, Met, Phe, Ala

[0050] **강글리오시드**

[0051] 본 발명의 실시형태에서, 강글리오시드는 수용성 중합체, 예를 들어 PEG, 또는 PSA 또는 mPSA에 접합된다. 강글리오시드는 세포성 인식(cellular recognition) 및 세포 대 세포 통신(cell-to-cell communication)에서 작용

할 수 있는 특징적인 표면 마커(surface marker)를 갖는 세포를 제공하는 것으로 공지되어 있다. 이들은 치료제로서 유용하다.

[0052] 본 발명의 접합체는 강글리오시드 및 수용성 중합체를 포함할 수 있으며, 이때 상기 글리오시드는 당쇄(sugar chain) 상에 연결된 하나 이상의 시알산을 갖는 글리코스핑고리피드(glycosphingolipid)(세라미드(ceramide) 및 올리고당)을 포함한다. 강글리오시드는 얼마나 많은 시알산 단위가 상기 분자 상에 존재하는지의 여부에 따라 분류될 수 있다. 강글리오시드의 예로는 GM1, GM2 및 GM3(모노시알로-강글리오시드), GD1a, GD1b, GD2 및 GD3(디시알로-강글리오시드), GT1b(트리시알로-강글리오시드) 및 GQ1(테트라시알로-강글리오시드)가 있다.

[0053] 본 발명에서 사용하기 위해, 바람직한 강글리오시드는 글루코스에 연결된 세라미드를 포함하며, 여기서 상기 글루코스는 제 1 갈락토스에 연결되고, 상기 제 1 갈락토스는 N-아세틸갈락토사민에 연결되고, 상기 N-아세틸갈락토사민은 제 2 갈락토스에 연결된다. 이러한 제 2 갈락토스는 하나의 시알산에 연결될 수 있다. 제 1 갈락토스는 1, 2, 3, 또는 4개의 시알산에 연결될 수 있다. 시알산은 단량체(각 갈락토스 분자 당 하나) 또는 올리고시알산(2 내지 4개의 시알산)로서 제 1 갈락토스에 연결될 수 있다.

[0054] 치료용 강글리오시드가 투여되는 경우에 장기간 동안 혈류에서 순환할 필요가 있다. 따라서 표적 조직에 대한 이들의 작용이 더욱 효과적이라도 강글리오시드는, 예를 들어 본 발명의 방법에 의해 폴리시알화될 수 있다.

[0055] **약물 전달 시스템**

[0056] 본 발명의 다른 실시형태에서, 약물 전달 시스템은 수용성 중합체, 예를 들어 PEG, 또는 PSA 또는 mPSA에 접합된다. 일반적으로, 약물 전달 시스템(drug delivery system, DDS)은 임의의 분자 또는 미립자 실체이며, 이는 상기 실체와 연관된 약물의 결정론(fate) 및 효과를 제어할 수 있다. 약물 전달 시스템은 2개의 일반적인 유형으로 분리될 수 있다. 제 1 유형은 폴리(하이드록시프로필메타크릴아미드), 폴리리신 및 중합된 알킬 시아노아크릴레이트와 같은 합성 중합체뿐만 아니라 거대 분자 약물 전달 시스템(micromolecule drug delivery system, MDDS), 예를 들어 항체, 네오글리코프로틴(neoglycoprotein)을 포함한다. 목적하는 부위에 약물을 표적화(targeting)하기 위해 단일 클론성 항체를 포함한 다양한 유형의 거대 분자 담체와 약물의 조합이, 예를 들어 문헌[Gregoriadis in Nature 265, 407-411 (1977)]에 개시되어 있다. 제 2 유형은 미립자 약물 전달 시스템(particulate drug delivery system, PDDS)이며, 이는, 예를 들어 나노 구형체(nanosphere) 또는 마이크로 구형체(microsphere)를 포함하고, 이들 구형체는 알부민과 같은 생분해성 물질, 또는 텍스트란 및 알킬시아노아크릴레이트 중합체와 같은 반-생분해성 물질을 포함하거나, 비이온성 계면활성제 또는 리피좀(liposome)과 같은 비히클(vesicle)을 포함하며, 이들의 세부사항에 대해서는, 예를 들어 문헌[Gregoriadis in NIPS, 4, 146-151 (1989)]을 참고한다.

[0057] 약물은 DDS에 공유 결합될 수 있거나, DDS 내로 수동적으로 포집(entrapment)될 수 있다. 예를 들어, 계면활성제 비히클 또는 리피좀을 포함하는 PDDS는 계면활성제 또는 지질 분자의 층들의 적절한 조합물로 형성됨으로써 친수성 또는 소수성의 약학적 활성 화합물을 포집할 수 있다. 약학적 활성 화합물은 일반적으로 MDDS에 공유 결합되며, 상기 결합에 의해 인체 내에서 상기 활성 화합물은, 예를 들어 자살의 기능을 수행하기 전후에 용해되거나 용해되지 않을 수 있다.

[0058] 다수의 MDDS는 표적 세포 또는 조직의 표면 상의 수용체를 통해 표적 세포 또는 조직에 의해 인식되는 고유(예를 들어, 항체) 또는 획득(예를 들어, 네오글리코프로틴) 능력을 갖는다. 일반적으로, 이 같은 DDS는 주사 시에 표적에 의해 특이적으로 흡수된다. 그러한 특성의 흡수는 기타 (치료요법에 대해) 무관한 조직에 의해 흡수되는 DDS의 부피에 의해 제한된다. 이에 대한 이유는, 항체 및 기타 DDS 단백질(표적에 대한 이들의 특이성과는 무관함)은 기타 단백질과 같이 이들의 생물학적 수명이 끝날 무렵에 이화(catabolisation)되어야 한다.

[0059] 거대 분자 유형의 DDS(MDDS)에서 사용되는 합성 중합체는, 예를 들어 폴리(하이드록시프로필메타크릴아미드) 폴리리신 및 중합된 알킬 시아노아크릴레이트이다. 이들은 세망내피계(reticuloendothelial system, RES) 또는 기타 조직에서 적절한 리보솜 효소에 의해 이화(catabolized)될 수 있다. 몇몇 수단에 의해, 예를 들어 RES 또는 기타 조직에 의한 DDS의 흡수를 감소시키거나, RES에 의해 일단 흡수된 리보솜 효소에 의한 분해를 감소시킴으로써 이 같은 생분해성 거대 분자 유형의 DDS의 이화작용 속도를 줄이는 것이 바람직할 수 있다.

[0060] 미립자 DDS(PDDS)는 일반적으로 RES에 의한 순환으로부터 제거된다. RES에 대한 이들의 경향으로 인해, PDDS는 종종 이들 조직으로의 약물의 전달을 위해 사용된다. 그러나 PDDS가 RES의 조직이 아닌 조직으로 향하게 되는 것이 종종 바람직할 수 있다. 이러한 목적을 달성하기 위해, 당업자는 RES에 의한 PDDS의 차단을 억제하거나 지연시켜야 한다.

- [0061] 본 발명에 사용하기 위한 DDS는 초기에는 글리콘(글리코리포좀)을 함유하지 않을 수 있다. 하나의 대안은 그렇지 않는 경우에 글리콘을 DDS 구조에 첨가하거나 도입하는 것이다. 이 같은 경우의 예로는 만노실화(mannosylation)되거나 갈락토실화(galatosylation)된 지질을 혼입하고 있는 리피좀이 있다. 이들 글리코리포좀은 만노스 또는 갈락토스 수용체를 각각 발현하는 조직으로 활성을 표적화하는 것이다.
- [0062] DDS가, 예를 들어 표적 조직에 의한 흡수가 더욱 효과적일도록 장기간 동안 혈액에서 순환할 필요가 있는 경우(간 실질세포의 경우), 이들은 유리하게도 본 발명의 방법에 의해 폴리시알화된다.
- [0063] **투여**
- [0064] 일 실시형태에서, 본 발명의 접합된 화합물은 정맥 내, 근육 내, 또는 복막 내 주사와 같은 주사에 의해 투여될 수 있다. 조성물은 치료제, 진단제 및/또는 유사한 약제로서 유용할 수 있다.
- [0065] 본 발명의 접합된 화합물을 포함하는 조성물을 인간 또는 시험 동물에 투여하기 위해, 일 양태에서 상기 조성물은 하나 이상의 약학적으로 허용 가능한 담체를 포함한다. "약학적으로" 또는 "약리학적으로 허용 가능한"이란 용어는, 후술된 바와 같이 당해 기술분야에 널리 공지된 경로를 이용하여 투여되는 경우에 안정하고, 집합 및 분해 산물과 같은 단백질 분해를 억제하고, 또한 알레르기성 또는 기타 이상 반응을 야기하지 않는 분자 실체 및 조성물을 지칭한다. "약학적으로 허용 가능한 담체"는 상술한 약제를 비롯하여 임의의 모든 임상적으로 유용한 용매, 분산 배지, 코팅물, 항-박테리아제 및 항-진균제, 등장제 및 흡수 지연제 등을 포함한다.
- [0066] 본원에서 사용된 바와 같이, "유효량"은 임상적으로 정의된 질병을 갖는 포유동물을 치료하기에 적합한 투여량을 포함한다.
- [0067] 상기 조성물은 경구적으로, 국부적으로, 경피적으로, 비경구적으로, 흡입 스프레이에 의해, 질 내, 직장 내, 또는 두개골 내 주사에 의해 투여될 수 있다. 본원에서 사용된 바와 같은 "비경구적"이란 용어는 피하 주사, 정맥 내, 근육 내, 뇌수조 내 주사, 또는 주입 기법을 포함한다. 정맥 내, 피 내, 근육 내, 유선 내, 복막 내, 포낭 내, 후구(retrobulbar), 폐 내 주사에 의한 투여, 및/또는 특정 부위에 외과적 이식(surgical implantation)에 의한 투여가 또한 고려된다. 일반적으로, 조성물에는 본질적으로 수용자에 해로울 수 있는 기타 분출물뿐만 아니라 발열물질(pyrogen)이 없다.
- [0068] 상기 조성물의 단일 또는 다중 투여는 임상적에 의해 선택되는 투여 수준 및 패턴에 의해 수행될 수 있다. 질환의 예방 또는 치료를 위해, 적절한 투여는 상술한 바와 같이 치료될 질환의 유형, 질환의 중증도 및 진행과정, 약물이 예방 또는 치료 목적으로 투여되는지의 여부, 이전의 치료요법, 약물에 대한 환자의 이상적 이력 및 반응, 및 외래 의사의 판단에 의존한 것이다.
- [0070] 또한 본 발명은 본원에서 정의된 바와 같은 접합된 화합물 또는 단백질을 유효량으로 포함하는 약학 조성물에 관한 것이다. 약학 조성물은 약학적으로 허용 가능한 담체, 희석제, 염, 완충액, 또는 부형제를 더 포함할 수 있다. 약학 조성물은 임상적으로 정의된 질병을 치료하기 위해 사용될 수 있다. 본 발명의 약학 조성물은 용액 또는 동결 건조된 생성물일 수 있다. 약학 조성물의 용액은 임의의 적합한 동결 건조 공정에 적용될 수 있다.
- [0071] 또 다른 양태로서, 본 발명은 개체에 투여하기 위해 이의 사용을 조장하는 방식으로 포장된 본 발명의 조성물을 포함하는 키트를 포함한다. 일 실시형태에서, 이 같은 키트는 본원에 개시된 화합물 또는 조성물(예를 들어, 접합된 단백질을 포함하는 조성물)을 포함하며, 상기 화합물 또는 조성물은 밀봉된 병 또는 용기와 같은 컨테이너에 포장되며, 이때 상기 방법을 실시하는 경우에 상기 화합물 또는 조성물의 용도를 기재하고 있는 라벨이 컨테이너에 첨부되거나 패키지(package)에 포함된다. 일 실시형태에서, 상기 키트는 접합된 단백질을 포함하는 조성물을 갖는 제 1 컨테이너, 및 제 1 컨테이너 중의 조성물을 위한 생리학적으로 허용 가능한 재구성 용액(reconstitution solution)을 갖는 제 2 컨테이너를 포함한다. 일 양태에서, 상기 화합물 또는 조성물은 단위 투여 형태로 포장된다. 상기 키트는 특정 투여 경로에 따라 조성물을 투여하기에 적합한 장치를 포함할 수 있다. 바람직하게는, 상기 키트는 치료용 단백질 또는 펩티드 조성물의 용도를 기재하고 있는 라벨을 포함한다.
- [0072] 일 실시형태에서, 상기 유도체는 고유의 치료용 화합물의 완전한 기능성 활성을 보유하고, 고유의 치료용 화합물에 비해 증가된 생체 내 반감기를 제공한다. 다른 실시형태에서, 상기 유도체는 고유 화합물에 대해 적어도 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 110, 120, 130, 140, 또는 150 퍼센트(%)의 생물학적 활성을 보유한다.

[0073] **시알산 및 PSA**

[0074] 본원에서 사용된 바와 같이, "시알산 부분"은 수용액 또는 현탁액에서 용해성이고 약학적으로 유효량으로 PSA-단백질 접합체의 투여 시에 포유동물에 부작용과 같은 악영향을 거의 미치지 않거나 실제로 악영향을 미치지 않는 시알산 단량체 또는 중합체("다당류")를 포함한다. PSA 및 mPSA는 일 양태에서 1, 2, 3, 4, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 200, 300, 400, 또는 500개의 시알산 단위를 갖는 것으로 특징지어 진다. 특정 양태에서, 상이한 시알산 단위가쇄 내에서 조합된다.

[0075] 본 발명의 일 실시형태에서, PSA 또는 mPSA 화합물의 시알산 부분은 고도로 친수성이고, 다른 실시형태에서 전체 화합물은 고도로 친수성이다. 친수성은 히드록실기뿐만 아니라 시알산 단위의 부속 카복실기에 의해 주로 부여된다. 당류 단위는 아민기, 히드록실기 또는 설페이트기, 또는 이들의 조합과 같은 기타 기능성 기를 함유할 수 있다. 이들 기는 자연적으로 발생하는 당류 화합물 상에 존재할 수 있거나, 유도체 다당류 화합물 내로 도입될 수 있다. 본 발명의 방법 및 접합체에서 사용된 PSA 및 mPSA는 본 발명의 배경기술에서 상술한 바와 같이 특징지어질 수 있다.

[0076] 자연적으로 발생하는 중합체 PSA는 광범위한 크기 분포(예를 들어, 시그마(Sigma) C-5762) 및 높은 다분산도 (polydispersity, PD)를 나타내는 다분산 제제(polydisperse preparation)로서 이용 가능하다. 엔도톡신 (endotoxin, 내독소)을 동시 정제하는 고유의 위험성을 내포하는 박테리아에서 일반적으로 다당류가 생성되기 때문에 시알산 중합체 장치의 정제는 엔도톡신 함량이 증가할 가능성을 증가시킬 수 있다. 1 내지 4개의 시알산 단위를 갖는 짧은 PSA 분자는 또한 합성에 의해 제조될 수 있으며(Kang SH 등, Chem Commun. 2000; 227-8; Ress DK and Linhardt RJ, Current Organic Synthesis. 2004; 1 :31 -46), 따라서 엔도톡신의 높은 수준의 위험성을 최소화할 수 있다. 그러나 엔도톡신이 또한 존재하지 않는, 좁은 크기 분포 및 낮은 다분산도를 갖는 PSA 제제가 현재 제조될 수 있다. 본 발명을 위한 특정 용도를 갖는 다당류 화합물은 일 양태에서 박테리아에 의해 생산된 것이다. 이들 자연적으로 발생하는 다당류 중 일부는 당지질로서 공지되어 있다. 일 실시형태에서, 다당류 화합물에는 실질적으로 말단 갈락토스 단위가 없다.

[0077] 다양한 실시형태에서, 상기 화합물은 PSA 또는 mPSA 화합물에 화학량적인 양(예를 들어, 1:1, 1:2, 1:3, 1:4, 1:5, 1:6, 1:7, 1:7, 1:8, 1:9, 또는 1:10, 등)으로 연결되거나 연관되어 있다. 다양한 실시형태에서, 1 내지 6개, 7 내지 12개 또는 13 내지 20개의 PSA 및/또는 mPSA 단위가 상기 화합물에 연결되어 있다. 또 다른 기타 실시형태에서, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20개 이상의 PSA 및/또는 mPSA 단위가 상기 화합물에 연결되어 있다.

[0078] 선택적으로, 상기 화합물은 글리코실화 부위(즉, 고유의 글리코실화 부위가 아닌 부위)를 도입하기 위해 변형된다. 이 같은 변형은 당해 기술분야에 공지된 표준 분자 생물학적 기법을 이용하여 달성될 수 있다. 또한 상기 화합물은 하나 이상의 탄수화물 부분을 통한 접합 이전에 생체 내 또는 시험관 내에서 글리코실화될 수 있다.

[0079] **아미노옥시 결합**

[0080] 본 발명의 일 실시형태에서, 옥심기를 형성하기 위한 하이드록실아민 또는 하이드록실아민 유도체와 할데히드의 반응(예를 들어, 과요오드산나트륨에 의한 산화 이후에 탄수화물 부분 상에서의 반응)은 화합물의 접합체 제조에 적용된다. 예를 들어, 먼저 당단백질은 과요오드산나트륨(NaIO_4)과 같은 산화제에 의해 산화된다(Rothfus JA and Smith EL., J Biol Chem 1963, 238, 1402-10; 및 Van Lenten L and Ashwell G., J Biol Chem 1971, 246, 1889-94). 예를 들어, 당단백질의 과요오드염(periodate) 산화는 1928년에 개시된 전형적인 말라프레이드 (Malaprade) 반응, 즉 활성 알데히드기를 형성하기 위한 과요오드염에 의한 인접한 디올의 산화에 기반을 두고 있다(Malaprade L., Analytical application, Bull Soc Chim France, 1928, 43, 683-96). 이 같은 산화제의 또 다른 예로는 테트라아세트산납($\text{Pb}(\text{OAc})_4$), 아세트산망간($\text{Mn}(\text{OAc})_3$), 아세트산코발트($\text{Co}(\text{OAc})_2$), 아세트산탈륨(TlOAc), 황산세륨($\text{Ce}(\text{SO}_4)_2$)(미국 특허 제 4,367,309 호) 또는 칼륨과루테늄산염(KRuO_4)(Marko 등, J Am Chem Soc 1997, 119, 12661-2)이 있다. "산화제"는 탄수화물 중의 인접한 디올을 산화시킬 수 있어, 생리학적 반응 조건 하에서 활성 알데히드기를 생성할 수 있는 온건한 산화용 화합물을 의미한다.

[0081] 제 2 단계는 옥심 결합을 형성하기 위해 산화된 탄수화물 부분에 대한 아미노옥시기를 함유하는 중합체의 결합이다. 본 발명의 일 실시형태에서, 이러한 단계는 촉매량의 친핵성 촉매 아닐린 또는 아닐린 유도체의 존재 하에 수행될 수 있다(Dirksen A and Dawson PE, Bioconjugate Chem. 2008; Zeng Y 등, Nature Methods 2009; 6: 207-9). 아닐린 촉매작용은 옥심 라이게이션을 현저하게 가속화시키며, 이는 매우 낮은 농도의 시알의 사용을

허용한다. 본 발명의 다른 실시형태에서, 옥심 결합은 알콕시아민 결합을 형성하기 위한 NaCNBH₃과의 반응에 의해 안정화된다.

[0082] 본 발명의 일 실시형태에서, PSA 또는 mPSA를 단백질에 접합시키기 위한 반응 단계는 개별적으로 및 순차적으로 수행된다(즉, 출발 물질(예를 들어, 단백질, 중합체, 등), 시약(예를 들어, 산화제, 아닐린, 등) 및 반응 생성물(예를 들어, 단백질 상의 산화된 탄수화물, 활성화된 아미노옥시 중합체, 등)이 개별 반응 단계들 사이에 분리됨).

[0083] 아미노옥시 기술에 대한 또 다른 정보는 하기 인용문헌에서 찾아볼 수 있으며, 이들 각각은 전체가 본원에서 참고로 인용된다: EP 1681303 A1(하이드록시알킬 전분화된(HASylated) 에리스로포이에틴); WO 2005/014024(옥심 연결기에 의해 연결된 단백질과 중합체의 접합체); WO 96/40662(아미노옥시 함유 링커 화합물 및 접합체에서의 이들의 적용); WO 2008/025856(변형된 단백질); Peri F 등, Tetrahedron 1998, 54, 12269-78; Kubler-Kielb J and Pozsgay V., J Org Chem 2005, 70, 6887-90; Lees A 등, Vaccine 2006, 24(6), 716-29; 및 Heredia KL 등, Macromolecules 2007, 40(14), 4772-9.

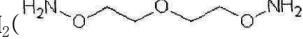
[0084] 본 발명의 이점은 접합체의 회수율이 높고, 접합되지 않은 단백질에 비해 접합된 당단백질의 활성이 높게 유지되며, 접합 효율이 높다는 것이다.

[0085] 본 발명은 하기 실시예를 참고하여 예시되어 있다. 실시예 1 내지 3, 실시예 9 및 실시예 11 내지 27은 본 발명의 특정 실시형태를 예시하고 있다. 실시예 4 내지 8 및 실시예 10은 본 발명의 상응하는 접합체의 제조와 관련하여 참고 실시예로서 포함된다.

[0086] **실시예**

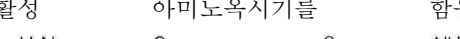
[0087] **실시예 1**

[0088] 단일 이작용성 링커인 NH₂FOCH₂CH₂]₂ONH₂의 제조

[0089] 2개의 활성 아미노옥시기를 함유하는 단일 이작용성 링커인 NH₂FOCH₂CH₂]₂ONH₂(, 3-옥사-펜탄-1,5-디옥시아민)을 보투린(Boturyn) 등(Tetrahedron 1997; 53: 5485-92)에 따라 일차 아민의 변형된 가브리엘 합성(modified Gabriel-Synthesis)을 이용하는 2단계 유기 반응으로 합성하였다. 제 1 단계에서, 하나의 2,2-클로로디에틸에테르 분자는 디메틸포름아미드(DMF)에서 2개의 엔도-N-하이드록시-5-노르보넨-2,3-디카복스이미드 분자와 반응하였다. 목적하는 단일 이작용성 생성물은 에탄올 중에서 히드라진 첨가분해(hydrazinolysis)에 의해 상기 얻어진 중간산물로부터 제조되었다. 달리 규정되지 않는 한, 이는 하기 실시예에서 디아미노옥시 링커로서 지칭된다.

[0090] **실시예 2**

[0091] 단일 이작용성 링커인 NH₂[OCH₂CH₂]₄ONH₂의 제조

[0092] 2개의 활성 아미노옥시기를 함유하는 단일 이작용성 링커인 NH₂[OCH₂CH₂]₄ONH₂(, (3,6,9-트리옥사-운데칸-1,11-디옥시아민)를 보투린 등(Tetrahedron 1997; 53: 5485-92)에 따라 일차 아민의 변형된 가브리엘 합성을 이용하는 2단계 유기 반응으로 합성하였다. 제 1 단계에서, 하나의 비스-(2-(2-클로로에톡시)-에틸)-에테르 분자는 DMF에서 2개의 엔도-N-하이드록시-5-노르보넨-2,3-디카복스이미드 분자와 반응하였다. 목적하는 단일 이작용성 생성물은 에탄올 중에서 히드라진 첨가분해에 의해 상기 얻어진 중간산물로부터 제조되었다.

[0093] **실시예 3**

[0094] 아미노옥시-PSA의 제조

[0095] 인도 세럼 인스티튜트(Serum Institute of India, 인도의 펀(Pune) 소재)로부터 수득된 500 mg의 산화된 PSA(MW: 18.8 kD)를 8 ml의 50 mM 아세트산나트륨 완충액(pH 5.5)에 용해하였다. 다음으로, 100 mg의 3-옥사-펜탄-1,5-디옥시아민을 첨가하였다. 실온에서 2시간 동안 교반한 후, 44 mg의 나트륨 시아노보로하이드리드를 첨가하였다. 4°C에서 4시간 동안 교반한 후, 반응 혼합물을 슬라이드-A-라이저(Slide-A-Lyzer, 일리노이즈주 록퍼드 소재의 피어스(Pierce)) 투석 카세트(dialysis cassette, 3.5 kD 멤브레인, 재생된 셀룰로스)에 적재하고,

4일 동안 PBS(pH 7.2)에 대해 투석하였다. 생성물을 -80℃에서 냉동하였다. 이러한 과정에 따른 아미노옥시-PSA의 제조는 도 2에 도시되어 있다.

[0096] **실시예 4**

[0097] rFIX에 대한 아미노옥시-PSA의 결합 및 접합체의 정제

[0098] 6.3 ml의 50 mM 아세트산나트륨 완충액(pH 6.0)에서 용해된 12.6 mg의 rFIX에 289 μl의 과요오드산나트륨 수용액(10 mM)을 첨가하였다. 혼합물을 4℃에서 1시간 동안 암 상태에서 교반하고, 6.5 μl의 1 M 글리세롤을 첨가함으로써 실온에서 15분 동안 급냉(quenching)하였다. 저분자량 오염물질은 비바스핀(Vivaspin, 독일 괴팅엔 소재의 스타토리우스(Sartorius)) 집진기(30 kD 멤브레인, 재생된 셀룰로스)를 이용하는 한외여과(ultrafiltration)/정용여과(diafiltration)(UF/DF)에 의해 제거되었다. 다음으로, 43 mg의 아미노옥시-PSA를 UF/DF 잔류액(retentate)에 첨가하고, 혼합물을 4℃에서 14시간 동안 교반하였다. 과량의 PSA 시약은 소수성 상호작용 크로마토그래피(HIC)에 의해 제거되었다. 냉각된 반응 혼합물의 전도율은 180 mS/cm까지 올리고, 50 mM 헤피스(HEPES), 3 M 염화나트륨, 6.7 mM 염화칼슘, 0.01% 트윈(Tween) 80(pH 6.9)으로 예비 평형된 5 ml 부피의 힐트랩 부틸(HiTrap Butyl) FF(코네티컷주 페어필드(Fairfield) 소재의 GE 헬스케어(Healthcare)) HIC 칼럼(1.6 x 2.5 cm) 상에 적재되었다. 접합체를 50 mM 헤피스, 6.7 mM 염화칼슘, 0.005% 트윈 80(pH 7.4)을 포함한 2.4의 칼럼 부피(CV) 내에서 분당 5 ml의 유속으로 용리하였다. 제제는 총 단백질(BCA) 및 FIX 발색 활성을 측정함으로써 분석적으로 특성 분석하였다. PSA-rFIX 접합체의 경우, 80.2 IU/mg 단백질의 특정 활성이 결정되었다(고유 rFIX 대비 56.4 %). 결과는 표 3에 요약되어 있다.

표 3

[0099]

항목	BCA (mg/ml)	FIX:크롬 (IU/ml)	특이적 활성 [FIX:크롬(IU)/BCA(mg)]	특이적 활성(%)
rFIX	8.58	1221	142.3	100
PSA-rFIX	1.15	92.2	80.2	56.4

[0100] **실시예 5**

[0101] 친핵성 촉매로서 아닐린의 존재 하에 rFIX에 대한 아미노옥시-PSA의 결합

[0102] 1.4 ml의 50 mM 아세트산나트륨 완충액(pH 6.0)에 용해된 3.0 mg의 rFIX에 14.1 μl의 과요오드산나트륨 수용액(10 mM)을 첨가하였다. 혼합물은 4℃에서 1시간 동안 암 상태에서 교반하고, 1.51 ml의 M 글리세롤을 첨가함으로써 실온에서 15분 동안 급냉하였다. 저분자량 오염물질은 PD-10 탈염 칼럼(코네티컷주 페어필드 소재의 GE 헬스케어)을 이용하는 크기 배제 크로마토그래피(SEC)에 의해 제거되었다. 1.33 ml의 50 mM 아세트산나트륨 완충액(pH 6.0)에 용해된 1.2 mg의 산화된 rFIX를 70 μl의 아닐린(200 mM 저장 수용액)과 혼합하고, 실온에서 45분 동안 교반하였다. 다음으로, 4.0 mg의 아미노옥시-PSA를 첨가하고, 혼합물을 실온에서 2시간, 및 4℃에서 추가의 16시간 동안 교반하였다. 1시간 이후, 2시간 이후, 및 18시간 이후의 반응이 끝날 무렵에 샘플을 채취하였다. 다음으로, 과량의 PSA 시약 및 유리 rFIX를 HIC에 의해 제거하였다. 냉각된 반응 혼합물의 전도율을 180 mS/cm까지 올리고, 50 mM 헤피스, 3 M 염화나트륨, 6.7 mM 염화칼슘, 0.01% 트윈 80(pH 6.9)으로 예비 평형된 5 ml 부피의 힐트랩 부틸 FF(코네티컷주 페어필드 소재의 GE 헬스케어) HIC 칼럼(1.6 x 2.5 cm) 상에 적재되었다. 접합체를 20의 CV에서 50 mM 헤피스, 6.7 mM 염화칼슘, 0.005% 트윈 80(pH 7.4)에 대한 선형 구배로 분당 5 ml의 유속으로 용리하였다.

[0103] **실시예 6**

[0104] rFIX에 대한 아미노옥시-PSA의 결합 및 NaCNBH₃에 의한 환원

[0105] 5.25 ml의 50 mM 아세트산나트륨 완충액(pH 6.0)에 용해된 10.5 mg의 rFIX에 53 μl의 과요오드산나트륨 수용액(10 mM)을 첨가하였다. 혼합물을 4℃에서 1시간 동안 암 상태에서 교반하고, 5.3 μl의 1 M 글리세롤을 첨가함으로써 실온에서 15분 동안 급냉하였다. 저분자량 오염물질은 비바스핀(독일 괴팅엔 소재의 스타토리우스) 집진기(30 kD 멤브레인, 재생된 셀룰로스)를 이용하는 UF/DF에 의해 제거되었다. 다음으로, 35.9 mg의 아미노옥시-PSA를 UF/DF 잔류액에 첨가하고, 혼합물을 실온에서 2시간 동안 교반하였다. 이어 53 μl의 나트륨 시아노보로하이드리드 수용액(5 M)을 첨가하고, 추가의 16시간 동안 반응을 진행하도록 하였다. 이어 과량의 PSA 시약을 HIC에 의해 제거하였다. 냉각된 반응 혼합물의 전도율은 180 mS/cm까지 올리고, 50 mM 헤피스, 3 M 염화나트륨,

6.7 mM 염화칼슘, 0.01% 트윈 80(pH 6.9)으로 예비 평형된 5 ml 부피의 힐트랩 부틸 FF(코네티컷주 페어필드 소재의 GE 헬쓰케어) HIC 칼럼(1.6 x 2.5 cm) 상에 적재되었다. 접합체를 2.4의 CV 내에서 50 mM 헤피스, 6.7 mM 염화칼슘, 0.005% 트윈 80(pH 7.4)에 의해 분당 5 ml의 유속으로 용리하였다.

[0106] **실시예 7**

[0107] rFIX에 대한 아미노옥시-PSA(링커: NH₂[OCH₂CH₂]₄ONH₂)의 결합 및 접합체의 정제

[0108] 2.8 ml의 50 mM 아세트산나트륨 완충액(pH 6.0)에 용해된 5.6 mg의 rFIX에 102 μl의 과요오드산나트륨(10 mM)의 수용액을 첨가하였다. 혼합물을 4°C에서 1시간 동안 암 상태에서 교반하고, 2.9 μl의 1 M 글리세롤을 첨가함으로써 실온에서 15분 동안 급냉하였다. 저분자량 오염물질은 비바스핀(독일 괴팅엔 소재의 스타토리우스) 집진기(30 kD 멤브레인, 재생된 셀룰로스)를 이용하는 UF/DF에 의해 제거되었다. 다음으로, 35.9 mg의 아미노옥시-PSA를 UF/DF 잔류액에 첨가하고, 혼합물을 실온에서 2시간 동안 교반하였다. 이어 19 mg의 아미노옥시-PSA를 UF/DF 잔류액에 첨가하고, 혼합물을 4°C에서 18시간 동안 교반하였다. 과량의 PSA 시약을 HIC에 의해 제거하였다. 냉각된 반응 혼합물의 전도율은 180 mS/cm까지 올리고, 50 mM 헤피스, 3 M 염화나트륨, 6.7 mM 염화칼슘, 0.01% 트윈 80(pH 6.9)으로 예비 평형된 5 ml 부피의 힐트랩 부틸 FF(코네티컷주 페어필드 소재의 GE 헬쓰케어) HIC 칼럼(1.6 x 2.5 cm) 상에 적재되었다. 접합체를 2.4의 CV 내에서 50 mM 헤피스, 6.7 mM 염화칼슘, 0.005% 트윈 80(pH 7.4)에 의해 분당 5 ml의 유속으로 용리하였다.

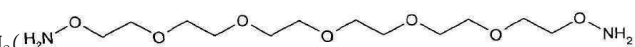
[0109] **실시예 8**

[0110] rFVIII에 대한 아미노옥시-PSA의 결합

[0111] 11 ml의 헤피스 완충액(pH 6, 50 mM 헤피스, 5 mM CaCl₂, 150 mM NaCl, 0.01% 트윈)에 용해된 11 mg의 rFVIII에 57 μl의 10 mM 과요오드산나트륨을 첨가하였다. 혼합물을 4°C에서 30분 동안 암 상태에서 교반하고, 107 μl의 1 M 글리세롤 수용액을 첨가함으로써 4°C에서 30분 동안 급냉하였다. 이어 19.8 mg의 아미노옥시-PSA(18.8 kD)를 첨가하고, 혼합물을 4°C에서 하룻밤 동안 교반하였다. 8M 아세트산암모늄을 함유하는 완충액(8M 아세트산암모늄, 50mM 헤피스, 5mM CaCl₂, 350 mM NaCl, 0.01% 트윈 80, pH 6.9)을 첨가함으로써 이온 강도를 증가시켜 최종 농도의 2.5 M 아세트산암모늄을 수득하였다. 다음으로, 반응 혼합물을 평형 완충액(2.5 M 아세트산암모늄, 50 mM 헤피스, 5 mM CaCl₂, 350 mM NaCl, 0.01% 트윈 80, pH 6.9)으로 평형된 힐트랩 부틸 FF(코네티컷주 페어필드 소재의 GE 헬쓰케어) 칼럼 상에 적재되었다. 생성물은 용리 완충액(50 mM 헤피스, 5 mM CaCl₂, 0.01% 트윈 80, pH 7.4)로 용리하고, 용리액은 MWC가 30,000인 비바스핀(독일 괴팅엔 소재의 스타토리우스) 장치를 이용하는 원심분리성 여과에 의해 농축하였다.

[0112] **실시예 9**

[0113] 단일 이작용성 링커인 NH₂[OCH₂CH₂]₆ONH₂의 제조

[0114] 2개의 활성 아미노옥시기를 함유하는 단일 이작용성 링커인 H₂[OCH₂CH₂]₆ONH₂(, 3,6,9,12,15-헵톡옥사-헵타데칸-1,17-디옥시아민)를 보투린 등(Tetrahedron 1997; 53: 5485-92)에 따라 일차 아민의 변형된 가브리엘 합성을 이용하는 2단계 유기 반응으로 합성하였다. 제 1 단계에서, 하나의 헥사에틸렌글리콜 디클로라이드 분자는 DMF에서 2개의 엔도-N-하이드록시-5-노르보넨-2,3-디카복시미드 분자와 반응하였다. 목적하는 단일 이작용성 생성물은 에탄올 중에서 히드라진 첨가분해에 의해 상기 얻어진 중간산물로부터 제조되었다.

[0115] **실시예 10**

[0116] 말레이미도/아미노옥시 링커 시스템을 이용한 rFIX의 폴리시알화

[0117] A. 개질 시약의 제조

[0118] 아미노옥시-PSA 시약은 말레이미도/아미노옥시 링커 시스템(Toyokuni 등, Bioconjugate Chem 2003; 14, 1253-9)을 이용하여 제조된다. 유리 말단 SH-기를 함유하는 PSA-SH(20 kD)는 2단계 과정, 즉 a) WO 05016973 A1 호에 따른 NH₄Cl에 의한 산화된 PSA의 환원적 아민화를 이용한 PSA-NH₂의 제조, 및 b) 미국 특허 제 7645860 호에 개시된 바와 같은 2-이미노티올란(트라우트(Traut) 시약, 일리노이즈주 록퍼드 소재의 피어스)과 말단 1차 아미노기의 반응에 의한 설피하이드릴기의 도입을 이용하여 제조된다. PSA-SH는 10배 물량의 과량의 링커 및 50

mg/ml 농도의 PSA-SH를 이용한 PBS-완충액 중에서 pH 7.5에서 링커의 말레이미도기에 결합된다. 반응 혼합물을 실온에서 부드럽게 교반하면서 2시간 동안 배양하였다. 이어 과량의 링커 시약을 제거하고, 아미노옥시-PSA는 정용여과에 의해 산화 완충액(50 mM 인산나트륨, pH 6.0) 내로 교체된다. 상기 완충액은 펠리콘(Pellicon) XL5kD 재생된 셀룰로스 멤브레인(매사추세츠 주 빌레리카(Billerica) 소재의 밀리포어(Millipore)를 이용하여 25회 교체하였다.

[0119] B. NaIO₄에 의한 사전 산화 이후에 rFIX의 변형

[0120] rFIX는 완충액 중의 100 μM 과요오드산나트륨을 이용하여 50 mM 인산나트륨 완충액(pH 6.0)에서 산화된다. 혼합물을 4°C에서 1시간 동안 암 상태에서 교반하고, 5 mM의 최종 농도가 될 때까지 글리세롤을 첨가함으로써 실온에서 15분 동안 급냉하였다. 저분자량 오염물질은 PD-10 탈염 칼럼(코네티컷주 페어필드 소재의 GE 헬쓰케어)을 이용하는 크기 배제 크로마토그래피(SEC)에 의해 제거되었다. 이어 산화된 rFIX를 아닐린으로 스파이킹(spiking)하여 10 mM의 최종 농도를 얻었으며, 아미노옥시-PSA 시약과 혼합하여 5배 물량의 과량의 PSA를 달성하였다. 반응 혼합물을 실온에서 암 상태에서 부드럽게 교반하면서 2시간 동안 배양하였다.

[0121] C. 접합체의 정제

[0122] 과량의 PSA 시약 및 유리 rFIX를 HIC에 의해 제거하였다. 반응 혼합물의 전도율을 180 mS/cm까지 올리고, 50 mM 헤피스, 3 M 염화나트륨, 6.7 mM 염화칼슘, 0.01% 트윈 80(pH 6.9)로 예비 평형된 48 ml 부피의 부틸-세파로스(Butyl-Sepharose) FF(코네티컷주 페어필드 소재의 GE 헬쓰케어)로 충전된 칼럼 상에 적재되었다. 후속적으로, 상기 접합체를 40의 CV에서 60% 용리 완충액(50 mM 헤피스, 6.7mM 염화칼슘, pH 7.4)의 선형 구배로 용리한다. 최종적으로, PSA-rFIX 함유 분획을 수집하고, 재생된 셀룰로스로 제조된 30 kD 멤브레인(밀리포어)을 이용하여 UF/DF에 적용한다. 상기 제제는 총 단백질(BCA) 및 FIX 발색 활성을 측정함으로써 분석적으로 특성 분석하였다. 변이체 둘 모두를 이용하여 제조된 PSA-rFIX 접합체의 경우, 고유 rFIX 대비 80% 초과와 특정 활성이 결정되었다.

[0123] **실시예 11**

[0124] 아미노옥시-PSA 시약의 제조

[0125] 실시예 3에 따라 아미노옥시-PSA 시약을 제조하였다. 최종 생성물은 5 kD 멤브레인(재생된 셀룰로스, 밀리포어)을 이용하여 완충액(pH 7.2, 50 mM 헤피스)에 대해 정용여과되고, -80°C에서 냉동되고, 동결 건조된다. 동결 건조 이후, 시약을 적절한 부피의 물에 용해하고, 탄수화물 변형을 통한 PSA-단백질 접합체의 제조용으로 사용하였다.

[0126] **실시예 12**

[0127] 아미노옥시-PSA 시약의 상세한 합성

[0128] 3-옥사-펜탄-1,5-디옥시아민을 보타린 등(Tetrahedron 1997; 53: 5485-92)에 따라 실시예 1에 개시된 바와 같은 2단계 유기 합성으로 합성하였다.

[0129] 단계 1:

[0130] 700 ml의 무수 N,N-디메틸포름아미드 중의 엔도-N-하이드록시-5-노르보넨-2,3-디카복시이미드(59.0 g; 1.00 등가량)의 용액에 무수 K₂CO₃(45.51 g; 1.00 등가량) 및 2,2-디클로로디에틸에테르(15.84 ml; 0.41 등가량)를 첨가하였다. 반응 혼합물을 50°C에서 22시간 동안 교반하였다. 혼합물을 감압 하에서 건조 상태가 될 때까지 증발시켰다. 잔류물을 2 L의 디클로로메탄에 현탁하고, 포화 NaCl 수용액(각 1 L)으로 2회 추출하였다. 디클로로메탄 층을 Na₂SO₄ 상에서 건조하고, 감압 하에서 건조 상태가 될 때까지 증발시키고, 높은 진공 하에서 건조하여 64.5 g의 3-옥사펜탄-1,5-디옥시-엔도-2',3'-디카복시이미드노르보넨을 백색을 띤 황색 고체로서 수득하였다(중간산물 1).

[0131] 단계 2:

[0132] 800 ml의 무수 에탄올 중의 중간산물 1(64.25 g; 1.00 등가량)의 용액에 31.0 ml의 히드라진 수화물(4.26 등가량)을 첨가하였다. 이어 반응 혼합물을 2시간 동안 환류시켰다. 혼합물을 감압 하에서 용매를 증발시킴으로써 초기 부피의 1/2이 될 때까지 농축하였다. 생성된 침전물을 여과 제거하였다. 잔류 에탄올 층을 감압 하에서 건조 상태가 될 때까지 증발시켰다. 미가공 생성물인 3-옥사-펜탄-1,5-디옥시아민을 함유하는 잔류물을 진공 하에

건조하여 46.3 g을 수득하였다. 미가공 생성물을 칼럼 크로마토그래피(실리카 겔(Silica gel) 60; 디클로로메탄/메탄올 혼합물(9:1)을 이용한 등용매 용리(isocratic elution))에 의해 추가로 정제하여 11.7 g의 순수한 최종 생성물인 3-옥사-펜탄-1,5-디옥시아민을 수득하였다.

[0133] **실시예 13**

[0134] 아미노옥시-PSA 중합체의 제조

[0135] 1.3 g의 산화된 콜로민산(23 kDa)을 18 ml의 50 mM 아세트산나트륨(pH 5.5±0.02)에 용해하였다. 20배 몰량의 과량의 1,11-디아미노-3,6,9-트리옥사운데칸(3,6,9-트리옥사-운데칸-1,11-디옥시아민으로도 지칭됨)을 최소량의 50 mM 아세트산나트륨(pH 5.5±0.02)에 용해하고, PSA 용액에 첨가하였다. 최종 콜로민산의 농도는 62.5 mg/ml 이었다. 이러한 반응 혼합물을 적당한 혼합기(분당 20회의 진동)에서 22±1.0℃에서 2±0.1시간 동안 배양하였다. 그 이후에 0.65 ml의 160 mg/ml NaCNBH₃ 용액을 상기 반응 혼합물에 첨가하여 최종 농도가 5.00 mg/ml이 되도록 하였다. 이를 혼합을 위해 충분한 공간 부분을 갖고 엔도톡신이 없는 기밀성 컨테이너에서 교반기(분당 20회의 진동)에서 4.0±1.0℃에서 3±0.20시간 동안 배양하였다. 정제를 위해 샘플을 2 mM 트리에탄올아민(pH 8.0±0.02)으로 희석하여 최종 콜로민산의 농도가 20 mg/ml가 되도록 하였다. 반응 혼합물을 탈염시켜 과량의 1,11-디아미노-3,6,9-트리옥사운데칸, NaCNBH₃ 및 상기 반응의 부산물을 제거하였다. 이는 20 mM 트리에탄올아민 완충액(pH 8.0±0.02)을 이용하는 세파덱스(Sephadex) G25 칼럼 상에서 탈염에 의해 이루어졌다. 탈염된 샘플의 pH를 pH 7.8 내지 8.0로 조정하고, 20 mM TEA(pH 8.0)로 1회 및 2 mM 트리에탄올아민(TEA, pH 8.0)로 2회 한외여과/정용여과하였다. 샘플을 냉동 건조하고, -80℃에서 저장하였다.

[0136] 대안적으로는, 정제는 탈염 및 한외여과/정용여과(UF/DF) 단계 도중에 높은 염의 존재 하에 수행되었다. 높은 염에서의 음이온 교환 크로마토그래피는 또한 고도로 순수한 아미노옥시-PSA를 제거하기 위해 사용되었다. 따라서, 분자량이 서로 상이한 아미노옥시-PSA를 합성하였다.

[0137] **실시예 14**

[0138] β-갈락토시다제에 대한 디아미노옥시(3,6,9-트리옥사-운데칸-1,11-디옥시아민)-PSA의 결합

[0139] β-갈락토시다제(β-Gal)의 산화를 위해, 상이한 농도의 NaIO₄(0.157 mM 내지 2 mM의 범위)를 사용하였다. 0.5 mg의 β-Gal은 암 상태에서 30분 동안 4℃에서 5.75의 산성 pH 하에서 산화되었다. NaHSO₃을 5 mM의 최종 농도가 될 때까지 첨가함으로써 산화반응을 중단하였다. 접합 반응은 디아미노옥시 PSA 중합체(22 kDa)와 함께 산화된 β-Gal을 이용하여 수행되었다. 반응 혼합물 중의 중합체의 최종 농도는 1.25 mM인 반면, β-Gal의 농도는 0.125 mg/ml 내지 0.76 mg/ml의 범위였다. 모든 반응은 pH 5.75에서 수행되었다. 나트륨 시아노보로하이드리드를 반응 혼합물에 50 mM 또는 3.17 mg/ml의 농도가 될 때까지 첨가하였다. 반응은 4℃에서 수행하고, 샘플은 1, 2 및 24시간의 간격으로 수집하였다. 접합체는 SDS PAGE 및 웨스턴 블로팅(western blotting)을 이용하여 특성 분석하였다. SDS PAGE 중의 접합체에 대해 밴드의 이동이 관측되었고, 이는 또한 웨스턴 블로팅에 의해 확인되었다.

[0140] 최상의 반응 조건에 기초하여, 1.9 mg의 β-Gal을 4℃에서 30분 동안 1.5 mM의 NaIO₄를 이용하여 산화시켰으며, 이어 최종 농도가 5 mM이 될 때까지 NaHSO₃을 첨가함으로써 산화반응을 중단시켰다. 디아미노옥시 PSA 중합체와 함께 산화된 β-Gal을 이용하여 접합 반응을 수행하였다. 반응 혼합물 중의 중합체 및 단백질의 최종 농도는 각각 1.25 mM 및 0.76 mg/ml이었다. 반응 혼합물의 최종 pH는 약 5.75였다. 농도가 50 mM 또는 3.17 mg/ml가 될 때까지 나트륨 시아노보로하이드리드를 반응 혼합물에 첨가하였다. 상기 반응은 4℃에서 2시간 동안 수행하였다. 정제된 접합체 및 정제되지 않은 접합체를 SDS PAGE 및 웨스턴 블로팅을 이용하여 특성 분석하였다. SDS PAGE 중의 접합체에 대해 밴드의 이동이 관측되었고, 이는 또한 항-PSA 항체를 이용한 웨스턴 블로팅에 의해 확인되었다. PSA-βGal 접합체의 시험관 내 활성은 일체형(all in one) βGal 검정 키트(피어스)를 이용하여 고유의 단백질과 비교하였다. 50% 미만의 활성이 알데히드 링커의 화학적 성질을 이용하여 제조된 필적하는 접합체에서 관측되었다. 또한 전반적인 공정은 최대 3배까지 확대하였다.

[0141] **실시예 15**

[0142] 페투인에 대한 디아미노옥시-PSA의 결합

[0143] 페투인을 암 상태에서 4℃에서 60분 동안 10 mM NaIO₄를 이용하여 산화시켰으며, 최종 농도가 10 mM이 될 때까

지 NaHSO₃을 첨가함으로써 상기 산화반응을 중단시켰다. 접합 반응은 디아미노옥시 PSA 중합체(23 kDa)와 함께 산화된 페투인을 이용하여 수행되었다. 반응 혼합물 중의 중합체의 최종 농도는 pH 5.75에서 2.5 mM이었다. 농도가 50 mM 또는 3.17 mg/ml이 될 때까지 나트륨 시아노보로하이드리드를 반응 혼합물에 첨가하였다. 반응물 중의 최종 단백질 농도는 0.714 mg/ml이고, 상기 반응은 4°C에서 2시간 동안 수행되었다. 이들 접합체는 SDS PAGE 및 웨스턴 블로팅을 이용하여 특성 분석하였다. SDS PAGE 중의 접합체에 대해 밴드의 이동이 관측되었으며, 이는 또한 웨스턴 블로팅에 의해 확인되었다.

[0144] 규모가 확대된 반응을 위해, 5 mg의 페투인을 암 상태에서 4°C에서 60분 동안 10 mM NaIO₄를 이용하여 산화시킨 후, 최종 농도가 10 mM이 될 때까지 NaHSO₃을 첨가함으로써 상기 산화반응을 중단시켰다. 접합 반응은 디아미노옥시 PSA 중합체(23 kDa)와 함께 산화된 페투인을 이용하여 수행되었다. 반응 혼합물 중의 중합체의 최종 농도는 pH 5.75에서 2.5 mM이었다. 농도가 50 mM 또는 3.17 mg/ml이 될 때까지 나트륨 시아노보로하이드리드를 반응 혼합물에 첨가하였다. 상기 반응은 4°C에서 수행되었으며, 샘플은 2시간 후에 수집되었다. 정제된 접합체 및 정제되지 않은 접합체는 SDS PAGE 및 웨스턴 블로팅을 이용하여 특성 분석하였다. SDS PAGE 중의 접합체에 대해 밴드의 이동이 관측되었으며, 이는 또한 웨스턴 블로팅에 의해 확인되었다.

[0145] **실시예 16**

[0146] 친핵성 촉매로서 작용하기 위해 아닐린을 이용한 페투인에 대한 디아미노옥시-PSA의 결합

[0147] 0.2 mg의 페투인을 암 상태에서 4°C에서 30분 동안 10 mM NaIO₄를 이용하여 산화시킨 후, 최종 농도가 5 mM이 될 때까지 NaHSO₃을 첨가함으로써 상기 산화반응을 중단시켰다. 접합 반응은 디아미노옥시 PSA 중합체(23 kDa)와 함께 산화된 페투인을 이용하여 수행되었다. 반응 혼합물 중의 중합체의 최종 농도는 1.25 mM이었다. 반응 혼합물의 최종 pH는 5.75이었다. 농도가 50 mM 또는 3.17 mg/ml이 될 때까지 나트륨 시아노보로하이드리드를 반응 혼합물에 첨가하였다. 반응물 중의 최종 단백질 농도는 0.125 mg/ml이었다. 84.21 μl의 200 mM 아닐린 용액을 1.6 ml의 반응 혼합물에 첨가하였다. 상기 반응은 4°C에서 하룻밤 동안 수행되었다.

[0148] **실시예 17**

[0149] 에리스로포이에틴(EPO)에 대한 디아미노옥시-PSA의 결합

[0150] 0.2 mg의 EPO를 4°C에서 30분 동안 10 mM NaIO₄를 이용하여 산화시켰다. 최종 농도가 5 mM이 될 때까지 NaHSO₃을 첨가함으로써 상기 산화반응을 중단시켰다. 접합 반응은 23 kDa의 디아미노옥시 PSA 중합체와 함께 산화된 EPO를 이용하여 수행되었다. 반응 혼합물 중의 중합체의 최종 농도는 1.25 mM이었다. 반응 혼합물 중의 EPO의 최종 농도는 0.125 mg/ml이었다. 반응 혼합물의 최종 pH는 약 5.75이었다. 농도가 50 mM 또는 3.17 mg/ml이 될 때까지 나트륨 시아노보로하이드리드를 반응 혼합물에 첨가하였다. 상기 반응은 4°C에서 24시간 동안 수행되었다. 정제되지 않은 접합체는 SDS PAGE를 이용하여 특성 분석하였다. SDS PAGE 중의 접합체에 대해 밴드의 이동이 관측되었다.

[0151] **실시예 18**

[0152] 친핵성 촉매로서 작용하기 위해 아닐린을 이용한 EPO에 대한 디아미노옥시-PSA의 결합

[0153] 0.2 mg의 EPO를 4°C에서 30분 동안 10 mM NaIO₄를 이용하여 산화시켰다. 최종 농도가 5 mM이 될 때까지 NaHSO₃을 첨가함으로써 상기 산화반응을 중단시켰다. 접합 반응은 디아미노옥시 PSA 중합체(22 kDa)와 함께 산화된 EPO를 이용하여 수행되었다. 반응 혼합물 중의 중합체의 최종 농도는 1.25 mM이었다. 반응 혼합물의 최종 pH는 약 5.75이었다. 농도가 50 mM 또는 3.17 mg/ml이 될 때까지 나트륨 시아노보로하이드리드를 반응 혼합물에 첨가하였다. 반응물 중의 중 단백질 농도는 0.125 mg/ml이었다. 84.21 μl의 200 mM 아닐린 용액을 1.6 ml의 반응 혼합물에 첨가하였다. 상기 반응은 4°C에서 하룻밤 동안 수행되었다. 접합체는 SDS PAGE를 이용하여 특성 분석하였다. 접합체에서 밴드의 이동이 관측되었다. 접합체의 활성에 대한 아닐린의 악영향이 관측되지 않았다.

[0154] **실시예 19**

[0155] DNAse에 대한 디아미노옥시-PSA의 결합

[0156] DNAse의 글리코폴리시알화를 위해, 소 체장 DNAse를 접합 반응에 사용하였다. 이러한 DNAse 공급원은 동결 건조된 분말로서 제공되었으며, 이를 -20°C에서 저장하였다. 반응 이전에 이러한 동결 건조된 분말을 아세트산나트

를 완충액(pH 5.75)에 용해하였다. 글리코폴리시알화용으로 사용된 중합체는 10 내지 22 kDa 범위의 분자량을 가졌다. DNase의 글리콘 부분의 산화를 위해, 산화제로서 NaIO₄를 1 mM의 최종 농도로 사용하였다. DNase는 4°C에서 30분 동안 5.75의 산성 pH에서 산화되었다. 최종 농도가 2 mM이 될 때까지 NaHSO₃을 첨가함으로써 상기 산화반응을 중단시켰다. 산화 반응인 완료된 이후, 최종 농도가 1.25 mM이 될 때까지 디아미노옥시 PSA 중합체를 첨가함으로써 접합 반응을 수행하였다. 최종 농도가 50 mM 또는 3.17 mg/ml가 될 때까지 NaCNBH₃을 반응 혼합물에 첨가하고, DNase의 폴리시알화를 적어도 2시간 동안 4.0±1.0°C에서 수행하였다. 중합체에 대해 25몰량의 과량의 트리스를 이용하여 반응을 중단시켰다. 접합체는 SDS PAGE 및 웨스턴 블로팅을 이용하여 특성 분석하였다. SDS PAGE 중의 접합체에 대해 밴드의 이동이 관측되었고, 웨스턴 블로팅으로부터 양성의 결과를 획득하였다. 활성은 95%로 측정되었다(알데히드 링커의 화학적 성질을 이용하여 제조된 필적하는 접합체에서 관측된 50% 미만과 비교됨).

[0157] **실시예 20**

[0158] β-갈락토시다제에 대한 디아미노옥시(3-옥사-펜탄-1,5-디옥시아민 링커)-PSA의 결합

[0159] β-갈락토시다제의 산화를 위해, NaIO₄를 2 mM의 농도로 사용하였다. 3 mg의 β-갈락토시다제를 4°C에서 30분 동안 5.75의 산성 pH에서 산화시킨 후, 최종 농도가 2 mM이 될 때까지 NaHSO₃을 첨가함으로써 상기 산화반응을 중단시켰다. 접합 반응은 디아미노옥시 PSA 중합체(23 kDa)와 함께 산화된 β-갈락토시다제를 이용하여 수행되었다. 반응 혼합물 중의 중합체의 최종 농도는 1.5 mM이었다. 반응 혼합물 중의 β-갈락토시다제의 최종 농도는 0.867 mg/ml이었다. 반응 혼합물의 최종 pH는 약 5.75이었다. 농도가 50 mM 또는 3.17 mg/ml이 될 때까지 나트륨 시아노보로하이드리드를 반응 혼합물에 첨가하였다. 상기 반응은 4°C에서 24시간 동안 수행되었다. 접합체는 SDS PAGE 및 웨스턴 블로팅을 이용하여 특성 분석하였다. SDS PAGE 중의 접합체에 대해 밴드의 이동이 관측되었고, 웨스턴 블로팅으로부터 양성의 결과를 획득하였다.

[0160] **실시예 21**

[0161] 히드라지드-콜로민산의 제조

[0162] 본 발명자들은 아디프산 디히드라지드를 이용하여 PSA-히드라지드(콜로민산-히드라지드)를 제조하기 위해 하기 프로토콜을 이용하였다. 유사한 방법을 이용하여 기타 PSA-히드라지드를 제조하였다.

[0163] 1. 약 10 ml의 20 mM 아세트산나트륨(pH 5.5±0.02)에서 1 g의 활성화된 콜로민산을 용해한다. 최종 콜로민산 농도는 62.5 mg/ml이어야 한다.

[0164] 2. 최소량의 20 mM 아세트산나트륨(pH 5.5±0.02)에서 (산화된 콜로민산 "CAO"에 대해) 25배 몰량의 과량의 아디프산 디히드라지드(MW: 174.2 gm)를 용해하고, 상기 1로부터의 용액에 첨가한다.

[0165] 3. 첨가될 아디프산 디히드라지드의 양:

$$= \frac{\text{CAO의 중량(g)} \times 25 \times \text{아디프산 디히드라지드의 분자량(gm)}}{\text{CAO의 분자량(Da)}}$$

$$= \frac{1 \times 25 \times 174.2}{15 \times 10^3}$$

$$= 0.290\text{g}$$

[0166] 4. 아디프산 디히드라지드 용액을 첨가한 후, 최종 농도가 62.5 mg/ml가 되도록 콜로민산의 부피를 아세트산나트륨으로 보완한다. 따라서 총 반응 부피는 16 ml이다.

[0167] 5. 교반기(분당 22회의 진동)에서 22.0±1.0°C에서 2±0.1시간 동안 반응 혼합물을 배양한다.

[0168] 6. 농축 NaCNBH₃ 용액(165 mg/ml)을 준비하고, 0.5 ml를 상기 1로부터의 용액에 첨가하여 최종 반응 혼합물 중의 이의 최종 농도가 5.0 mg/ml가 되도록 한다. 교반기(분당 22회의 진동)에서 4.0±1.0°C에서 3.0±0.20시간 동안 반응 혼합물을 배양한다.

[0170] 7. 적절한 혼합을 위한 충분한 50 ml의 공간 부분이 구비되고 엔도톡신이 없는 기밀성 컨테이너에서 반응 혼합

물을 유지한다(반응 혼합물이 컨테이너의 캡(cap)에 접촉하지 않도록 공간이 충분해야 함).

- [0171] 8. 4°C에서 3시간의 반응 이후, 샘플을 pH 8.0±0.022에서 mM 트리에탄올아민으로 희석하여(부피가 최대 50 ml 가 되도록 하여) 콜로민산의 최종 농도를 20 mg/ml로 만든다.
- [0173] 9. 반응 혼합물을 탈염하여 중합체로부터 과량의 미처리된 아디프산 디히드라이드, NaCNBH₃ 등을 제거한다. UV 224 nm 및 전도율을 관측함으로써 GPC (XK 50 세파텍스 G-25 배지 매트릭스를 이용함; 매트릭스 1 ml당 1.8 mg 초과 CA; 35 cm 층 높이; 칼럼 부피: 687 ml)에 의해 이를 수행할 수 있다. 탈염은 20 mM 트리에탄올아민(pH 8.0±0.02) 완충액을 이용하여 수행된다.
- [0174] 10. 탈염 이후, 콜로민산-히드라이드를 2 mM TEA(pH 8.0±0.02)를 이용하는 한외여과에 1회 및 정용여과에 1회 각각 적용한다. 이는 3 kDa 비바플로우 카세트(vivaflow cassette)를 이용하여 수행된다.
- [0175] 11. 탈염된 샘플의 pH를 pH 7.8 내지 8.0로 조절한다. 임의적으로는, 샘플을 냉동 건조하고, 계속하여 2차 건조를 위해 상기 샘플을 유지하여 과량의 습도를 제거한다.

[0176] **실시예 22**

[0177] 에리스로포이에틴에 대한 히드라이드-PSA의 결합

[0178] 에리스로포이에틴(EPO)의 산화를 위해, NaIO₄를 10 mM의 농도로 사용하였다. EPO(1 mg)를 4°C에서 30분 동안 pH 5.75에서 산화시킨 후, 최종 농도가 5 mM이 될 때까지 NaHSO₃을 첨가함으로써 상기 산화반응을 중단시켰다. 접합 반응은 디아미노옥시 PSA 중합체와 함께 산화된 EPO를 이용하여 수행되었다. 접합을 위해 사용된 히드라이드-PSA의 분자량은 24.34 kDa이었다. 반응 혼합물 중의 히드라이드-PSA의 최종 농도는 1.25 mM이었다. 반응 혼합물 중의 EPO의 최종 농도는 0.125 mg/ml이었다. 반응 혼합물의 최종 pH는 약 5.75이었다. 농도가 50 mM 또는 3.17 mg/ml이 될 때까지 나트륨 시아노보로하이드리드를 반응 혼합물에 첨가하였다. 상기 반응은 4°C에서 24시간 동안 수행되었다. 접합체는 SDS PAGE 및 웨스턴 블로팅을 이용하여 특성 분석하였다. SDS PAGE 중의 접합체에 대해 밴드의 이동이 관측되었고, 웨스턴 블로팅으로부터 양성 결과의 결과를 획득하였다.

[0179] **실시예 23**

[0180] β-갈락토시다제에 대한 히드라이드-PSA의 결합

[0181] β-갈락토시다제(0.5 내지 4.5 mg)를 4°C에서 30분 동안 0.625 내지 2 mM의 NaIO₄를 이용하여 산화시켰다. 최종 농도가 5 mM이 될 때까지 NaHSO₃을 첨가함으로써 상기 산화반응을 중단시켰다. 접합 반응은 24.34 내지 27.9 kDa 범위의 히드라이드-PSA와 함께 산화된 β-갈락토시다제를 이용하여 수행되었다. 반응 혼합물 중의 히드라이드-PSA의 최종 농도는 1.25 mM이었다. 반응 혼합물 중의 β-갈락토시다제의 최종 농도는 0.125 mg/ml 내지 0.76 mg/ml 범위였다. 반응 혼합물의 최종 pH는 약 5.75이어야 한다. 농도가 50 mM 또는 3.17 mg/ml이 될 때까지 나트륨 시아노보로하이드리드를 반응 혼합물에 첨가하였다. 상기 반응은 4°C에서 수행되었고, 1시간, 2시간 및 24시간 이후에 수집되었다. 정제된 접합체 및 정제되지 않은 접합체는 SDS PAGE 및 웨스턴 블로팅을 이용하여 특성 분석하였다. SDS PAGE 중의 접합체에 대해 밴드의 이동이 관측되었고, 웨스턴 블로팅으로부터 양성 결과의 결과를 획득하였다. 상기 활성은 84%로 측정되었다. 50% 미만의 활성은 알데히드 링커의 화학적 성질을 이용하여 제조된 필적하는 접합체에서 관측되었다.

[0182] **실시예 24**

[0183] 페투인에 대한 히드라이드-PSA의 결합

[0184] 페투인(0.25 mg)을 4°C에서 30 또는 60분 동안 NaIO₄(5 또는 10 mM)를 이용하여 산화시켰다. 산화반응으로 사용된 NaIO₄의 농도에 부합하기에 적합하게 최종 농도가 5 또는 10 mM이 될 때까지 NaHSO₃을 첨가함으로써 상기 산화반응을 중단시켰다. 접합 반응은 아디프산 디히드라이드-PSA 중합체와 함께 산화된 페투인을 이용하여 수행되었다. 반응 혼합물 중의 중합체의 최종 농도는 1.25 내지 2.5 mM 범위였다. 반응 혼합물의 최종 pH는 약 5.75이었다. 농도가 50 mM 또는 3.17 mg/ml이 될 때까지 나트륨 시아노보로하이드리드를 반응 혼합물에 첨가하였다. 상기 반응은 4°C에서 1시간 내지 4시간 동안 수행되었다. 접합체는 SDS PAGE 및 웨스턴 블로팅을 이용하여 특성 분석하였다. 각 세트의 반응 조건에 있어서 SDS PAGE 중의 접합체에 대해 밴드의 이동이 관측되었고, 웨스턴 블로팅으로부터 양성 결과의 결과를 획득하였다.

[0185] 5 mg의 페투인에 대해 규모가 확대된 반응을 수행한 이후에 얻어진 접합체를 정제하였다. 5 mg의 페투인을 4℃에서 60분 동안 10 mM NaIO₄를 이용하여 산화시킨 후, 최종 농도가 10 mM이 될 때까지 NaHSO₃을 첨가함으로써 상기 산화반응을 중단시켰다. 접합 반응은 아디프산 디히드라이드-PSA 중합체와 함께 산화된 페투인을 이용하여 수행되었다. 반응 혼합물 중의 중합체의 최종 농도는 2.5 mM이었다. 반응 혼합물의 최종 pH는 약 5.75이었다. 농도가 50 mM 또는 3.17 mg/ml이 될 때까지 나트륨 시아노보로하이드리드를 반응 혼합물에 첨가하였다. 상기 반응은 4℃에서 수행되었고, 샘플은 2시간 후에 수집하였다. 정제된 접합체 및 정제되지 않은 접합체는 SDS PAGE 및 웨스턴 블로팅을 이용하여 특성 분석하였다. SDS PAGE 중의 접합체에 대해 밴드의 이동이 관측되었고, 웨스턴 블로팅으로부터 양성 결과의 결과를 수득하였다.

[0186] **실시예 25**

[0187] DNase에 대한 히드라이드-PSA의 결합

[0188] DNase를 0.2 mM 내지 2 mM 범위의 최종 농도로 NaIO₄를 이용하여 4℃에서 30분 동안 산화시켰다. 산화반응용으로 사용된 NaIO₄의 농도에 따라 2 내지 5 mM의 최종 농도로 NaHSO₃을 첨가함으로써 상기 산화 반응을 중단시켰다. 산화된 DNase의 글리코폴리시알화는 산화된 DNase에 히드라이드-PSA 중합체를 1.25 mM의 최종 농도로 첨가함으로써 수행되었다. 최종 농도가 50 mM 또는 3.17 mg/ml이 될 때까지 나트륨 시아노보로하이드리드를 반응 혼합물에 첨가하고, DNase의 글리코폴리시알화를 1시간 내지 2시간 범위의 시간 동안에 4℃에서 수행되었다. 중합체에 대해 25배 물량의 과량의 트리스를 이용하여 반응을 중단시켰다. 접합체는 SDS PAGE 및 웨스턴 블로팅을 이용하여 특성 분석하였다. SDS PAGE 중의 접합체에 대해 밴드의 이동이 관측되었고, 웨스턴 블로팅으로부터 양성 결과의 결과를 수득하였다. 상기 활성은 49%로 측정되었다.

[0189] **실시예 26**

[0190] 아미노옥시 링커(3-옥사-펜탄-1,5-디옥시아민)를 이용한 β-갈락토시다제의 폐길화

[0191] β-갈락토시다제(1 mg)를 4℃에서 30분 동안 NaIO₄를 이용하여 산화시켰다. 최종 농도가 1.5 mM이 될 때까지 NaHSO₃을 첨가함으로써 상기 산화반응을 중단시켰다.

[0192] 접합 반응은 디아미노옥시-PEG 중합체(20 kDa)와 함께 산화된 β-갈락토시다제를 이용하여 수행되었다. 반응 혼합물 중의 중합체의 최종 농도는 1.25 mM이었다. 반응 혼합물 중의 β-갈락토시다제의 최종 농도는 1 mg/ml이었다. 반응 혼합물의 최종 pH는 약 5.75이어야 한다. 농도가 50 mM 또는 3.17 mg/ml이 될 때까지 나트륨 시아노보로하이드리드를 반응 혼합물에 첨가하였다. 상기 반응은 4℃에서 2시간 동안 수행되었다. 정제되지 않은 접합체는 SDS PAGE를 이용하여 특성 분석하였고, SDS PAGE 중의 접합체에 대해 밴드의 이동이 관측되었다. 상기 활성은 59%로 측정되었다.

[0193] **실시예 27**

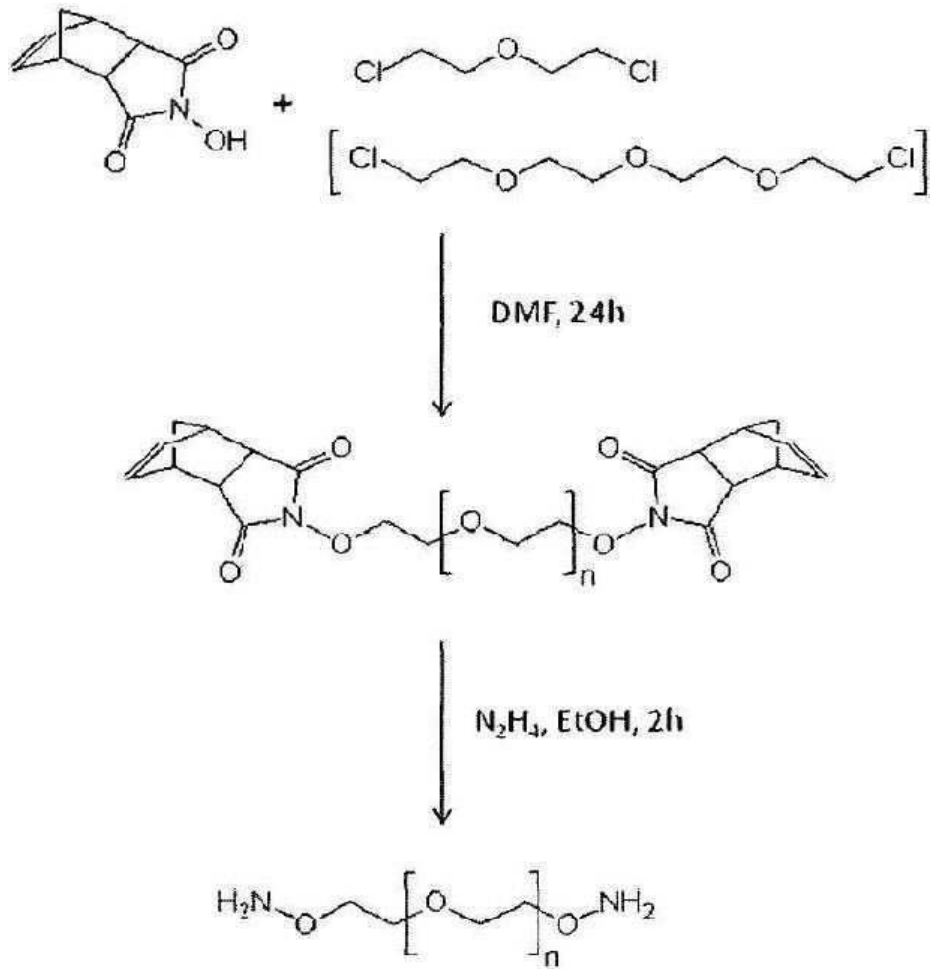
[0194] 아미노옥시 링커를 이용한 에리트로포이에틴의 폐길화

[0195] 에리트로포이에틴(EPO; 0.2 mg)을 pH 5.75에서 50 mM 아세트산나트륨 중의 5 또는 10 mM NaIO₄를 이용하여 4℃에서 45분 동안 산화시킨 후, 최종 농도가 5 또는 10 mM이 될 때까지 NaHSO₃을 첨가함으로써 상기 산화반응을 중단시켰다(산화반응용으로 사용된 NaIO₄의 농도에 부합하기 위함). 접합 반응은 디아미노옥시 PEG 중합체(20 kDa)와 함께 산화된 EPO를 이용하여 수행되었다. 반응 혼합물 중의 중합체의 최종 농도는 1.5 mM이었다. 반응 혼합물의 최종 pH는 약 5.75이어야 한다. 농도가 50 mM 또는 3.17 mg/ml이 될 때까지 나트륨 시아노보로하이드리드를 반응 혼합물에 첨가하였다. 반응물 중의 최종 단백질 농도는 0.4 mg/ml이었다. 접합 반응은 4℃에서 하룻밤 동안 수행되었다.

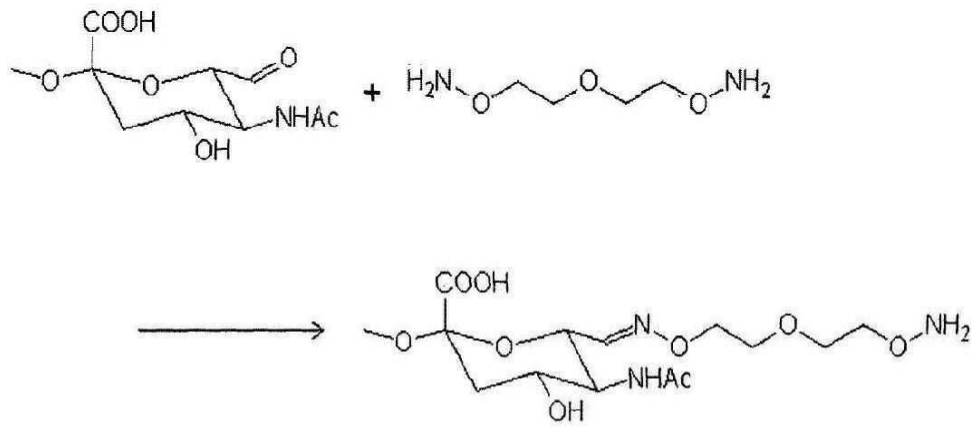
[0196] 따라서 본 발명은 수용성 중합체, 특히 PSA 및 mPSA와 혈액 응고 단백질이 아닌 화합물의 접합체를 제공한다.

도면

도면1



도면2



시프 염기의 안정화를
위한 환원 단계

