(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2010-0098619
(43) 공개일자 2010년09월08일

(51) Int. Cl.
A61K 47/48 (2006.01) *A61K 38/18* (2006.01)
C07K 14/475 (2006.01) *A61P 3/10* (2006.01)
(21) 출원번호 10-2010-7012303
(22) 출원일자(국제출원일자) 2008년11월05일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2010년06월04일
(86) 국제출원번호 PCT/EP2008/009320
(87) 국제공개번호 WO 2009/059755
국제공개일자 2009년05월14일
(30) 우선권주장
07021493.7 2007년11월05일
유럽특허청(EPO)(EP)

(71) 출원인
데벨로겐 악틴게젤샤프트
독일 37079 괴팅겐 마리-퀴리-슈트라쎄 7
(72) 발명자
오스틴, 마티아스
독일, 고팅겐 37079, 라르첸베그 17
기즈, 마르쿠스
독일, 고팅겐 37073, 빌헬름-베버-스트라쎄 35
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
강명구

전체 청구항 수 : 총 16 항

(54) 제약학적으로 용도되는 신규한 뉴트린 접합체

(57) 요 약

본 발명은 폴리올에 접합된 뉴트린 단백질 산물, 그리고 생체이용성이 증가된, 활성 성분으로 뉴트린 접합체, 바람직하게는 페길화된 뉴트린 접합체 또는 이의 변이체를 포함하는 약학 조성물에 관한 것이다.

(72) 발명자
뮤즈만, 라이너
스위스, 매그덴 체하-4312, 발트베그 17
하더, 프레드리히
독일, 린다운 88131, 쉐베스테른베르그 6
지그문트, 토마스
독일, 랜돌프샤우젠 37136, 포츠벤덴 5
슈나이더, 마틴
독일, 고팅겐 37085, 쉴드베그 16

특허청구의 범위

청구항 1

인간 뉴트린과 비교하여 최소 하나의 아미노산 변화가 있는 인간 뉴트린 단백질 변이체에 있어서, 아미노산 변화는 성숙 인간 뉴트린의 아미노산 위치 47-69 부위, 바람직하게는 아미노산 위치 51-65 부위, 가장 바람직하게는 아미노산 위치 51, 52, 54, 56, 57, 58, 60, 61, 63 또는 65에 있는 것을 특징으로 하는 인간 뉴트린 단백질 변이체.

청구항 2

제 1 항에 있어서, 최소 하나의 리신 잔기가 도입된, 인간 뉴트린 단백질 변이체.

청구항 3

제 2 에 있어서, 성숙 인간 뉴트린 코딩 서열에 다음의 돌연변이들 중 하나가 도입된, 인간 뉴트린 단백질 변이체:

R51K, R52K, R54K, R56K, R57K, R58K, R60K, R61K, R63K, 또는 R65K.

청구항 4

제 1 항, 제2항 또는 제 3항중 어느 한 항에 있어서, 최소 하나의 아르기닌 잔기는 중성 또는 산성 아미노산, 바람직하게는 글루타메이트 또는 아스파르테이트에 의해 치환된, 인간 뉴트린 단백질 변이체.

청구항 5

제 4 항에 있어서, 성숙 인간 뉴트린 코딩 서열에 다음의 돌연변이들 중 하나가 도입된, 인간 뉴트린 단백질 변이체:

R51E, R52E, R54E, R56E, R57E, R58E, R60E, R61E, R63E 또는 R65E.

청구항 6

제 1 항 내지 제 5 항중 어느 한 항에 있어서, 폴리올 모이어티가 공유적으로 결합된 접합체가 되는, 인간 뉴트린 단백질 변이체.

청구항 7

제 6 항에 있어서, 폴리올 모이어티는 폴리알킬렌 모이어티, 바람직하게는 폴리에틸렌 글리콜 모이어티가 되는, 인간 뉴트린 단백질 변이체.

청구항 8

제 6 항 또는 제 7 항에 있어서, 폴리올 모이어티는 단일 쇄 또는 가지형 쇄 폴리올 모이어티가 되는, 인간 뉴트린 단백질 변이체.

청구항 9

제 6항 내지 제 8 항중 임의의 한 항에 있어서, 폴리에틸렌 글리콜 분자는 이의 치환된 리신 잔기 또는 N-말단 아미노산에 연결된, 인간 뉴트린 단백질 변이체.

청구항 10

제 6-9항중 임의 어느 한 항에 있어서, 접합체는 단일 폴리에틸린 글리콜 분자 쇄를 포함하는 모노-페길화된 접합체이거나 또는 두개, 세개, 네개 또는 여러개 폴리에틸렌 글리콜 분자를 포함하는 올리고 또는 폴리-페길화된 접합체이고, 그리고 접합체는 최소 하나의 선형 또는 최소 하나의 가지형 폴리에틸렌 글리콜 분자 쇄를 포함하는, 인간 뉴트린 단백질 변이체.

청구항 11

제 6-10항중 어느 한 항에 있어서, 폴리에틸렌 글리콜 분자는 평균 분자량이 100 내지 10000Da, 바람직하게는 200 내지 8000Da, 가장 바람직하게는 1000 내지 7000Da이며, 이때 폴리에틸렌 글리콜 분자는 변형된 뉴크린 단백질에 바람직하게는 아실 또는 알킬 연결을 통하여 연결되며, 여기서 폴리에틸렌 글리콜 분자는 바람직하게는 OH-, OCH_3 또는 OEt-기로 종료되는, 인간 뉴트린 단백질 변이체.

청구항 12

활성 성분으로 제1-11항중 어느 한 항에 따른 최소 하나의 뉴트린 접합체 또는 변이체와함께 약학적으로 수용가능한 캐리어, 희석제 및/또는 어쥬번츠를 포함하는 약학 조성물.

청구항 13

제 12 항에 있어서, 변형안된 대조 뉴트린 단백질 산물의 조성물과 비교하였을 때 활성 성분의 생체이용성이 증가되며, 이때 변형된 뉴트린 단백질은 활성 성분의 생체 이용성이 최소 2배, 바람직하게는 최소 5배, 좀더 바람직하게는 최소 10배 증가시키는 양으로 존재하는, 약학 조성물.

청구항 14

제 12-13 항중 어느 한 항에 있어서, 주사 또는 주입용, 특히 피하 또는 정맥 주사용, 약학 조성물.

청구항 15

제 12항-제14항중 어느 한 항에 있어서, 췌장 또는 신경 퇴행성 질환, 특히 진성 당뇨병 타입 I, LADA 및 진성 당뇨병 타입 II의 치료 또는 예방용으로 이용되는, 약학 조성물.

청구항 16

제 12-15 항중 어느 한 항에 있어서, 포유류, 특히 인간에 투여용으로 이용되는, 약학 조성물.

명 세 서

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 뉴트린의 혈청 반감기와 약리역학적 프로파일을 증가시키기 위한 인간 뉴트린(neurturin)의 변형에 관한 것이다. 특히, 본 발명은 뉴트린 또는 폴리올 모이어티, 바람직하게는 폴리에틸렌 글리콜에 공유적으로 부착된 뉴트린 또는 이의 생물학적 활성 단편들을 포함하는 신규한 뉴트린 접합체(conjugates)에 관한 것이다. 본 발명은 또한 당뇨병 및 신경퇴행성 질환의 치료법, 치료, 예방 및/또는 진단을 위한 활성 성분으로 사용될 수 있는 신규한 뉴트린 접합체를 포함하는 생체이용성이 증가된 약학 조성물에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 췌장 베타-세포들은 상승된 혈당 수준에 반응하여 인슐린을 배출시킨다. 여러 호르몬들 중에서 인슐린은 연료 대사 조절에 중요한 역할을 한다. 인슐린은 글리코겐 및 트리글리세리드의 저장과 단백질 합성을 유도한다. 인슐린에 의해 근육 및 지방세포내로 포도당의 유입이 자극된다. 진성 당뇨병 I 또는 LADA(지연성 자가면역성 당뇨병: latent autoimmue diabetes in adults, *Pozzilli & Di Mario, 2001, diabetes Care. 8:1460-1467*)을 앓고 있는 환자들에서 자가면역 공격 때문에 베타-세포들이 파괴된다. 남아있는 췌장섬 세포들에 의해 만들어지는 인슐린의 양이 너무 적어서, 혈당 수준의 상승을 초래한다(혈당 과다). 진성 당뇨병 II에서 간과 근육 세포들은 정상적인 혈액 인슐린 수준에 반응하는 능력을 상실한다(인슐린 저항성). 다시, 높은 혈당 수준(및 높은 혈액 지질 수준)으로 베타-세포 기능이 손상되고, 흥미로운 것은, 타입 II 당뇨병에서 조직 재생과 유사한 베타-세포 재생 공정 및 복제가 베타-세포양의 손상을 보상하는 것으로 보이지 않으며, 시간의 경과에 따라 전체 베타-세포양을 감소시킨다. 결국, 혈당 수준을 적절하게 조절하기 위하여 타입 II 당뇨병에서 외인성 인슐린의 사용이 필수적인 것이 된다.

[0003] 타입 I 당뇨병의 경우, 자가면역 공격에 의해 베타-세포들이 파괴되는데, 이 질환의 치료는 면역계를 조절할 수 있는 치료가 고안되었으며, 그리고 치료에 의해 섬(islet)의 파괴를 중단하거나 또는 강력하게 감소시킬 수 있을 것이다(*Raz et al., 2001, Lancet 358: 1749-1753; Chatenoud et al., 2003, Nat Rev Immunol. 3: 123-132; Homann et al., Immunity. 2002, 3:403-415*). 그러나, 인간 베타-세포들은 상대적으로 느리게 재생되기

때문에, 이와 같은 치료는 베타-세포 재생을 촉진시킬 수 있는 치료와 복합되는 경우에 성공가능성이 더 클 수 있다.

[0004] 당뇨병은 현재 통상의 항-당뇨약물이 혈당 수준의 높고 낮음을 완벽하게 차단시키는데 충분한 정도로 혈당 수준을 조절할 수 없기 때문에 상당한 장애성 질환이다. 빈번한 혈당 수준의 상승은 유해하여, 예를 들면, 신증(nephropathy), 망막증(retinopathy), 신경 장애(neuropathy) 그리고 말초 맥관 질환과 같은 장기 복합증의 원인이 된다. 베타-세포의 상당한 손실로 췌장 알파 세포들로부터 글루카곤 분비의 조절에 실패하고, 이는 유해한 저혈당 발생의 위험을 증가시킨다. 또한 당뇨병 환자에게 실질적으로 위험한 비만, 고혈압, 심장 질환 및 고지혈증과 같은 다수의 관련 이상이 있다.

[0005] 환자들의 피폐해진 삶의 질을 제외하고도 당뇨병 치료 및 이의 장기 합병증은 건강관리 시스템에 엄청난 경제적 부담을 준다. 따라서, 진성 당뇨병 타입 I 및 LADA의 치료 뿐만 아니라 진성 당뇨병 타입 II의 후기 단계 치료를 위해서, 인슐린을 생산하는 췌장 베타-세포들의 재생을 유도하는 인자들을 확인시키는 기술이 당분야에 절실하다. 이들 인자들은 췌장 엔도크린의 기능이 손상된 후에 정상적으로 기능을 복원시킬 수 있고, 당뇨병 타입 I, LADA 또는 당뇨병 타입 II의 발생 또는 진행을 저해할 수 있다.

[0006] 뉴트린은 배아 췌장에서 발현되는 분비된 단백질이다. 재조합 뉴트린은 생쥐 배아 줄기세포들이 인슐린을 생산하는 세포로의 분화를 촉진시키는 것으로 나타났다. 더욱이, 췌장내에 뉴트린 수준이 상승된 유전자전이 생쥐는 실질적으로 증가된 양의 췌장 베타-세포를 보유하였다. 이와 같은 발견들에 기초하여, 당뇨병과 같은 췌장 질환 치료에서 뉴트린의 사용이 제안되었다(예를 들면, WO 03/99318 및 WO 2005/051415을 참고, 이들 내용은 참고문헌으로 첨부됨).

[0007] 뉴트린은 아교세포주-유도된 신경영양 인자(Glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF)), 뉴트린, 아르테민(Artemin) 및 퍼세핀(Persephin)으로 구성된 GDNF 패밀리 리간드(GFL)의 구성일원이다. 성숙 뉴트린은 102개 아미노산 단량체로 구성된 23.6 kDa 크기의 동종이량체다. 각 단량체는 시스틴 매듭을 형성하는 3개 쇄내에 이황화결합을 가진다. 추가적인 이황화결합은 단량체들을 연결시킨다.

[0008] 뉴트린은 파킨슨 질환, 알츠하이머 질환 및 헝틴턴 질환과 같은 신경퇴행성 질환, 운동 신경 질환, 척추 손상 및 청력 질환의 치료에 이미 제의된 바 있다 (*WO 97/08196, WO 99/06064; Akerud et al. J Neurochem. 1999;73(1):70-78; Koeberle & Ball Neuroscience. 2002; 110(3):555-567; Bilak et al. MoI Cell Neurosci. 1999;13(5):326-336; Perez-Navarro et al. Neuroscience. 2000; 98(1):89-96; Rosenblad et al, Eur J Neurosci. 1999; 11 (5): 1554-1566,* 이들 내용은 참고문헌으로 첨부된다).

[0009] 그러나, 쥐의 뇌로 전도 촉진 투여(convection-enhanced delivery: CED)시에, 뉴트린의 분포 용적 및 관련 인자 GDNF가 제한되었다(Hamilton et al., Exp Neurol. 2001 ; 168(1):155-161). 단백질들은 일반적으로 주사에 의해 투여되어야 한다. 주사후, 대부분의 단백질들이 신체밖으로 신속하게 제거되어, 부득이하게 빈번한 투여가 요구된다. 자체 연구에서, 포유류에서 뉴트린의 피하 및 정맥 주사후 뉴트린의 생체이용성이 낮다는 것을 알았다. 피하로 주사된 뉴트린의 약 10%만이 순환계로 유입된다. 결과적으로, 환자들에게서 치료요법적으로 유용한 혈액내 단백질 수준을 얻는 것은 어렵다.

[0010] 따라서, "사용자 친화적" 단백질 치료에서 환자의 요구를 만족시키기 위하여환자들에게서 이용성이 강화된 뉴트린 변이체 개발과, 이와 함께, 활성 물질인 뉴트린의 빈번한 투여가 필요없도록 신체내에서 치료 단백질의 순환 반감기를 연장시키는-생체이용성-방법의 개발이 절실하다.

[0011] 따라서, 본 발명의 잠재적 문제점은 뉴트린의 생체이용성이 강화된 뉴트린의 신규한 변이체 및 조성물을 제공하는 것이었다.

[0012] 이 문제점은 청구범위에서 특징화된 구체예들이 제공됨으로써 해결된다.

[0013] **발명의 요약**

[0014] 본 발명은 인간 뉴트린 단백질 산물에 공유적으로 결합된 폴리올 모이어티를 포함하는 신규한 뉴트린 접합체에 관한 것이다.

[0015] 본 발명은 또한 최소 하나의 폴리에틸렌 글리콜 분자에 접합된 최소 하나의 뉴트린 단백질 산물 및/또는 이의 생물학적 활성 단편을 활성 성분으로 하고, 약학적으로 수용가능한 캐리어, 희석제 및/또는 어쥬번트를 포함하는 약학 조성물에 관한 것이다.

[0016] 추가 구체예에서, 본 발명은 활성 성분으로 최소 하나의 폴리에틸렌 글리콜 분자에 접합된 최소 하나의 변형된 뉴트린 단백질 산물 또는 이의 생물학적 활성 단편의 약리학적으로 활성을 가진 양과, 약학적으로 수용가능한 캐리어, 희석제 및/또는 어쥬번트를 포함하는 약학 조성물을 치료를 요하는 환자에 투여하는 방법에 관한 것이다.

[0017] 본 발명의 또 다른 측면은 활성 성분으로 최소 하나의 폴리에틸렌 글리콜 분자에 접합된 최소 하나의 변형된 뉴트린 단백질 산물 또는 이의 생물학적 활성 단편의 약리학적으로 활성을 가진 양과, 분자량이 적은 물질과 함께 약학적으로 수용가능한 캐리어, 희석제 및/또는 어쥬번트를 포함하는 약학 조성물을 이를 필요로 하는 환자에 투여하는 방법을 제공하는 것이다.

[0018] 본 발명의 조성물은 췌장 질환 또는 신경퇴행성 질환, 특히 췌장 자가면역 질환, 예를 들면, 타입 I 당뇨병 또는 LADA 뿐만 아니라 타입 II 당뇨병과 같은 자가면역성 당뇨병의 예방 또는 치료에 적합하다.

도면의 간단한 설명

[0019] 다음의 도면과 실시예들은 본 발명을 설명하며, 하기에서 청구하는 바와 같이 본 발명의 비-제한적 구체예들이다. 다수의 추가 측면들과 본 발명의 장점들은 다음의 도면 설명을 고려하면 당업자에게 명백한 것들이다.

도 1 : 세포 배양물에서 페길화된 뉴트린의 생물학적 활성.

리포터 세포주에 뉴트린 또는 PEG로 접합된 뉴트린(페길화된 뉴트린)의 농도를 증가시킨다. 생성된 리포터 유전자 활성(y 축상에 주어진 상대적 빛 단위(RLU))은 테스트 물질의 최종 농도에 대응하여 플롯되었다(도 1A와 B에서 x 축상에 제시됨, ng/ml). 변형안된 뉴트린의 두 개 별도 배취(batch)를 실험 대조군(PeproTech; Lot0805112 및 Lot0106112)으로 이용하며, 이들 각 상대적 활성은 세 가지 페길화된 접합체(모노-mPEG-NHS-뉴트린, 모노-mPEG-CHO-뉴트린 및 모노-CES0310-뉴트린)의 활성과 비교하였다. 주어진 값은 최소 3개 웰± S.D.의 평균이다. 다양한 테스트에서 계산된 EC_{50}은 다음과 같다: 뉴트린 (Lot0805112, 변형안된 단백질): EC_{50}= 2.2 ng/ml, 뉴트린 (Lot0106112, 변형안된 단백질): EC_{50} = 1.2 ng/ml, 모노-CES0310-뉴트린: EC_{50} = 12 ng/ml (도 1A), 그리고 뉴트린 (Lot0106112, 변형안된 단백질): EC_{50} = 3.8 ng/ml, 모노-mPEG-NHS-뉴트린: EC_{50} = 9,7 ng/ml, 그리고 모노-mPEG- CHO-뉴트린: EC_{50} = 7,4 ng/ml (도 1 B).

도 2: 생쥐에 테스트 물질들의 피하 투여후 약리역학(PK) 연구

도 2A 및 B에서는 0.050 mg/kg BW (도. 2A) 또는 0.50mg/kg BW (도 2B) 뉴트린 또는 페길화된 뉴트린을 생쥐에 투여한 후 다양한 시간대에서 뉴트린 혈장 농도(ng/ml)를 나타낸다. 생성된 혈장 수준은 뉴트린 ELISA 분석에 의해 결정되었다. 0 시간대에서는 ELISA 분석을 이용한 생쥐 혈청내 뉴트린의 평균 배경 시그날을 보여준다. 12 마리의 처리안된 생쥐 (도 2A) 또는 11 마리의 처리안된 생쥐(도 2B)의 혈장으로부터 독립적으로 측정된 값으로부터 배경 값이 계산되었다. 다른 표시된 값은 세 마리 동물의 측정된 혈청 수준의 평균 ± SD이다. 도 2A에서는 두 개 독립적인 실험(모노-NHS-뉴트린_Exp.1 및-_Exp.2)으로부터 생성된 뉴트린 접합체 모노-NHS-뉴트린의 PK 데이터이다. 도 2B에서는 0.50 mg/kg BW 모노-NHS-뉴트린으로 처리된 생쥐의 또 다른 실험으로부터 유도된 데이터를 보여준다.

측정된 모든 시간대를 커버하는 곡선(AUC) 분석아래 면적의 경우, 기본선은 0.6 ng/ml (0 시간대에 평균 배경치)으로 설정되었고: 변형안된 뉴트린 단백질: 18.8 ng*min/ml, 모노-mPEG-NHS- 뉴트린_Exp1 : 409 ng*min/ml, 모노-mPEG-NHS-뉴트린_Exp2: 918 ng*min/ml, 모노-CES0310-뉴트린: EC_{50} = 142 ng*min/ml (도 2A), 그리고 변형안된 뉴트린 단백질: 324 ng*min/ml, 모노-mPEG-NHS-뉴트린: 1157 ng*min/ml, 그리고 모노-mPEG-CHO-뉴트린: 845 ng*min/ml (도 2B).

뉴트린 혈청 수준의 곡선(AUC) 분석 아래 면적의 경우, 기본선은 처리안된 생쥐의 혈청에서 측정된 평균 배경 수준에 상응하는 0.6 ng/ml (0 시간대에 평균 배경 치)으로 설정되었다.

도 3: National Center for Biotechnology Information (NCBI) (수탁번호: NP_004549)에 의해 공개된 인간 뉴트린 전구물질의 단백질 서열. 생물학적으로 활성인 그리고 약리학적으로 활성 형태에 상응하는 성숙한 단백질의 서열은 굵게 표시되어 있다.

도 4:

도 4A. 인간 뉴트린 및 돌연변이된 뉴트린 변이체의 발현. 뉴트린 및 뉴트린 변이체(인간 성숙 뉴트린의 서열에 따른 위치들에 번호를 붙임, R: 아르기닌, E: 글루타민산)를 발현시키는 HEK-293 세포로부터 농출된 상청액의 고유-PAGE/웨스턴 블랏.

도 4B. 뉴트린 ELISA: 대장균으로부터 발현된 인간 재조합 뉴트린을 이용한 대표적인 표준 곡선.

도 5: 뉴트린의 생물학적 활성의 정량화

도 5A. 세포 뉴트린의 생물학적 활성 분석: 혈청 농도 증가와 복합된 농도 증가에서 대장균으로부터 외생 인간 재조합 뉴트린에 의해 자극된 티로신 하이드록시라제 리포터 유전자의 활성

도 5B. 뉴트린 변이체의 생물학적 활성(n.d. : 감지되지 않음)

도 6: 상이한 척추동물종으로부터의 뉴트린 서열의 배열

인간의 성숙 뉴트린의 아미노산 47-69을 나타낸다(인간의 성숙 뉴트린 펩티드의 서열에 따라 위치들에 번호가 부여됨, 유전자 은행 수탁번호 NP_004549, 성숙 펩티드 aa 96-197). 인간 뉴트린과 상이한 아미노산 변이는 굵게, 그리고 밑줄로 표시됨(괄호안에는 GenBank 수탁번호를 나타냄).

도 7: 뉴트린 발현 구조체의 DNA 서열: Kr-G3- H6-G3-Xa-rh뉴트린 (wt)

pMA 벡터내로 클론된 Kr-G3-H6-G3-Xa-rh뉴트린(wt). 센스 및 안티 센스 가닥의 DNA 서열을 제한효소 부위와 코딩 부분의 결과적 아미노산 서열과 함께 표시되어있다.

도 8: 항-뉴트린 항체 ELISA

항-뉴트린 항체 ELISA: 좌: 항-뉴트린 IgG를 이용한 표준 곡선, 우: 항-뉴트린 IgG/IgM을 이용한 표준 곡선.

본 발명의 하나 또는 몇 가지 측면에 대해 논의된 모든 바람직한 구체예에서,는 모든 다른 측면과도 관련있는 것이다.

다음의 실시예를 통하여 본 발명의 다재다능성이 설명되나 이에 한정되지 않는다.

실시예

실시예 1 - 뉴트린의 페길화(PEGylation)

폴리에틸렌글리콜기(PEG)는 페길화(PEGylation)로 불리는 공정에 의해 뉴트린에 접합되었다. 이 기술은 치료 단백질의 변형을 광범위하게 이용하며, 이 과정은 당업자에게 잘 알려진 것이다. 본 발명에서, 모노-PEG-뉴트린 접합체는 동종이량체의 두 소단위중 하나의 N-말단 아미노산에 한 개 PEG 분자가 연결됨으로써 만들어졌다. 부착된 PEG의 크기 및 구조가 상이하고, 뿐만 아니라 단백질에 PEG를 접합시키는데 이용되는 방법이 상이한 모노-PEG-뉴트린의 두 가지 상이한 접합체가 만들어졌다. 여기에서 "모노-mPEG-NHS-뉴트린"로 공지된 접합체는 약 5 kDa 선형 PEG-시약(mPEG-숙시니미딜 succinat; NOF, Japan)를 이용하여 만들어졌다. 소위 "NHS-방법"은 가용성 단백질의 페길화에 가장 흔히 이용되는 방법이다. 또한, 선형 5 kDa 폴리에틸렌 글리콜 부티알데히드(Nektar, 082MOH01)를 이용하여 "모노-mPEG-CHO-뉴트린"로 공개된 접합체를 만들었다. 특정 실험 조건들하에, HNS 에스테르 또는 알데히드는 효과적으로 단백질 및 펩티드의 자유 아미노기와 반응한다. "모노-CES0310-뉴트린"을 개시한 또 다른 접합체의 구체예에서, 뉴트린 동종이량체의 하나의 쇄에 N-말단 아미노산은 당분야에 공지된 페길화 방법(예를 들면, DE 2005 100 04 157.0, EP 1 631 545 A2; WO 04/108634; WO 07/025763; CA 2528667)을 이용하여 약 5kDa의 6개 가지를 가지는 PEG에 접합되었다. 뉴트린은 리신 잔기를 포함하지 않아서, 상기에서 설명된 페길화 반응으로 뉴트린의 동종이량체의 N-아미노 말단의 반응성 아미노 기를 통하여 주로 N-말단 페길화가 유도되는 것으로 기대된다. 페길화된 산물의 질(크기 및 순도)은 당업자에 공지된 표준 화학 방법을 통하여 확인되었다.

실시예 2 - 페길화된 뉴트린 접합체 또는 이의 변이체들의 생물학적 활성

세포계 리포터 분석을 이용하여 뉴트린 접합체의 생물학적 활성이 평가되었다. 세포 표면상에 뉴트린 수용체들을 발현시키는 세포주에서 뉴트린 또는 이의 페길화된 접합체가 리포터 유전자 구조체를 어느 정도 강하게 활성화시키는지에 대해 측정되었다. 이와 같은 분석에서, 변형안된 뉴트린의 활성과 비교하여 두 가지 페길화된 뉴트린 접합체의 활성은 3 내지 10배 감소된 것으로 나타났다(도 1A 및 B).

세포 표면상에 뉴트린에 대한 수용체를 발현시키는 인간 신경아세포종 세포주 TGW (JCRB0618)에 뉴트린 리포터

유전자 구조물을 안정적으로 형질감염시켰다. 리포터 유전자 구조물에는 반복적 혈청 반응 요소들(SRE)의 전사 조절하에 다른 조절 요소가운데 있는 루시페라제 유전자가 포함된다. 이들 세포에서, 뉴트린이 세포 표면의 뉴트린 수용체에 결합됨으로써 MKPK 경로의 활성화에 반응하여 루시페라제 발현이 자극된다. 분석은 96 웰 플레이트에서 실시된다. 웰에 루시페린 기질을 첨가하고, 발광 모드에서 작동하는 분석 판독기(Molecular Devices) 상에서 판독을 함으로써 루시페라제 활성이 측정되었다.

실시예 3 - 페길화된 뉴트린 접합체 또는 이의 변이체의 개선된 생체이용성

생쥐에서 PK 연구의 도움으로 뉴트린의 페길화된 접합체의 상대적 생체 이용성이 평가되었다(도. 2A 및 B). 이들 실험에서, 생쥐의 목 부분의 피하로 단백질이 주사되었다. 그 다음, 특정 뉴트린 ELISA 분석을 이용하여 단백질 운반 후에, 정해진 시간대에서 뉴트린의 혈청 농도가 측정되었다(도. 2A 및 B). 뉴트린으로 처리안된 생쥐의 혈청(0 시점 값)을 이용하여 감지되었기 때문에 생쥐 혈청내 상대적으로 높은 배경 시그날로 인하여 뉴트린 ELISA 분석의 감응성이 제한되었다. 변형안된 뉴트린 0.050 mg/체중(BW) kg 주사후에, 임의 시간대에 뉴트린 혈청 수준이 이 배경 수준을 유의적으로 초과하지 않았다. 반대로, 동량의 페길화된 뉴트린을 사용한 경우, PEG 변형 형태와 무관하게, 주사된 단백질의 혈청 수준이 상당히 증가된 것으로 감지되었다(도. 2A). 주사된 변형안된 뉴트린의 양이 10배 증가되면(0.5 mg/kg BW), 60분, 90분, 120분 그리고 180분에서 혈청내 단백질이 상당히 감지되었다(도 2B). T-테스트를 이용하여 상기 관찰의 유의성이 확인되었고, p-값은 < 0.05으로 계산되었다. 또한, 0.5 mg/kg BW 약량으로 제공된 페길화된 뉴트린 유도체의 혈청 수준은 변형안된 뉴트린의 혈청 수준에 몇배 더 높았다.(도 2A 및 B).

여기에서 제시된 뉴트린 접합체는 변형안된 단백질의 수준과 비교하여 훨씬 높은 혈청 수준을 가진다고 일관되게 설명되고 있다. 결론은 뉴트린의 페길화로 인하여 뉴트린의 생체이용성이 상당히 개선된다는 것이다.

실시예 4- 뉴트린 변이체들

부위-직접적인 PCR을 이용한 돌연변이 생성을 통하여 뉴트린의 기본 패취(성숙 단백질의 아미노산 51-65)내에 위치한 염기성 아르기닌 잔기는 산성 글루타민산으로 치환되었다. 간단히 설명하면, 원하는 돌연변이를 도입시키는 미스메취 프라이머를 이용한 PCR 기초된 돌연변이 생성을 통하여, 추가 N-말단 진핵 분비 시그날 펩티드를 가지는 인간의 성숙 뉴트린의 코딩 서열이 변형되었다:

R51E, R52E, R54E, R56E, R57E, R58E, R60E, R61E, R63E, 또는 R65E

(Genbank 수탁번호 NP_004549, 성숙 펩티드 아미노산 96-197, 인간의 성숙 뉴트린 펩티드에 기초하여 위치에 번호 부여, 이 서열은 도 3에도 나타냄; R: 아르기닌; E: 글루타민산).

생성 플라스미드는 정제되고, 코딩 서열의 정확성은 시퀀싱으로 점검되었다. 코딩 서열은 진핵 발현을 위하여, HindIII 및 XhoI 클로닝 부위 측면을 경유하여 pCDNA3.1+벡터 (Invitrogen Cat. No. V790-20)내로 클론되었다.

진핵 발현을 위하여, 175㎠ 조직 배양 용기(각 25㎖ 배지를 포함한)상에 배양된 HEK-293 세포내에서 이들 벡터 및 빈 대조군 벡터, 그리고 형질감염 대조군으로써 GFP 발현 벡터를 일과적으로 형질감염시켰다. 형질감염후 48시간에 배지 수득이 실행되고, 그리고 한외여과 컬럼을 이용하여 배지 상청액은 각 약 0.4㎖로 농축되었다.

감지용 뉴트린-특이적 항체를 이용하여 고유-PAGE/웨스턴 블럿으로 와일드 타입 인간 뉴트린과 돌연변이된 변이체의 발현은 우선 조절되었다(도 4 참고). 대조군으로, 대장균으로부터 발현된 인간 재조합 뉴트린이 이용되었다.

도 4A에서는 와일드 타입(wt) 인간 뉴트린 뿐만 아니라 R63E를 제외한 모든 변형된 뉴트린 변이체도 유사한 양으로 발현되었다. 뉴트린 변이체의 실질 분자량(mass)은 wt 뉴트린과 유사한 20 내지 25 kDa 범위였다.

뉴트린 특이적인 ELISA에 의해 발현된 뉴트린의 수율이 결정되었다. 간략하게 설명하면, 뉴트린을 포함하는 농축된 배지 상청액으로부터 뉴트린 포획을 위해 마이크로-웰상에 토끼 항-뉴트린 항체를 피복시켰다. 세척후, 바이오틴-접합된 염소 항-뉴트린 항체와 이어서 퍼옥시다제-접합된 스트렙타아비딘을 이용한 발광 판독으로 포획된 뉴트린을 정량화시켰다. 대장균으로부터 발현된 인간 재조합 뉴트린을 이용하여 표준 곡선을 만들었다(도 4B 참고).

더욱이, 발현된 뉴트린 변이체의 생물학적 활성은 특정 세포 분석으로 정량화되었다. 이 분석의 원리는 인간 TGW 신경아세포종 세포주에서 안정적으로 발현된 뉴트린에 의해 티로신 하이드록시라제(TH) 리포터 유전자 구조물의 유도를 보여주는 Tanaka et al., 2002, 2003 (*Tanaka M, Xiao H, Kiuchi K. Heparin facilitates glial*

cell line-derived neurotrophic factor signal transduction. Neuroreport. 2002 Oct 28;13(15):1913-6; Tanaka M, Xiao H, Hirata Y, Kiuchi K. A rapid assay for glial cell line-derived neurotrophic factor and Neurturin based on transfection of cells with tyrosine hydroxylase promoter-luciferase construct. Brain Res Brain Res Protoc. 2003 May; 11 (2): 119-22.)에 의한 실험에 기초된다. 간단히 설명하면, 티로신 하이드록시라제(TH) 리포터 유전자 구조물를 과다 발현시키는 TGW 세포는 뉴트린 시그날링에 의해 MAPK 경로를 유도하는 뉴트린을 포함하는 샘플로 처리되었다. 반복적 혈청 반응 요소(SRE)의 제어하에 리포터 유전자 구조물은 루시페라제 유전자를 포함한다. 루시페라제의 발현은 MAPK 경로 활성화에 따라 달라진다. 이 분석은 96 웰 플레이트상에서 실시되며, 루시페린을 첨가하고, 발광 반독기로 분석함으로써 뉴트린 매개된 루시페라제 발현이 측정된다.

표준으로 대장균에서 발현된 인간 재조합 뉴트린을 이용하여, 혈청 농도의 증가와 복합되어 뉴트린의 생물학적 활성의 정량화를 설명하는 대표적인 실험은 도 5A에서 보여준다.

도 5B에서는 와일드-타입 재조합 인간 뉴트린 뿐만 아니라 R63E를 제외한 모든 뉴트린 변이체들이 단백질 농도가 1.2 내지 1.7g/ℓ의 유사한 양으로 발현되고, 모든 발현된 변이체들은 야생형 재조합 인간 뉴트린과 비교하였을 때, 유사한 EC_{50}이 2.20ng/mℓ인 *in vitro* 생물학적 활성을 나타내었다(도 5B).

따라서, 도 5에서는 음전하를 띈 산성 아미노산을 염기 패취내로 도입하는 것과 같은 뉴트린의 "힐(heel)" 부분에 변형이 일반적으로 뉴트린의 생물학적 활성을 손상시키지 않는다는 것을 보여준다. 이는 선행 기술에서는 힐 부분에서 염기성 아미노산을 산성 아미노산으로 변형시키는 경우 뉴트린의 생물학적 활성을 간섭할 수 있다는 것을 보여주었기 때문에 놀라운 것이다. (상기에서 논의된 바와 같이, 다른 GFL과 비교한 서열 및 구조 참고).

뉴트린 변이체 R63E의 발현 실패는 이 위치에서 아르기닌에서 글루타민산으로 변화가 내성이 없다는 것을 보여준다. 그럼에도 불구하고, 아미노산 하전의 완벽한 변화를 초래하는 다른 변형은 기능을 한다. 공지된 뉴트린 상동체의 서열 비교에서, 오르니소린쿠스 아나티누스(*Ornithorhynchus anatinus*), 모노델피스 도메스티카(*Monodelphis domestica*), 그리고 갈루스 갈루스(*Gallus gallus*)의 인간 뉴트린 상동체내에 R63E 변이체가 존재한다는 것을 보여준다. 상이한 뉴트린 상동체내에 위치 52, 57, 58, 61에서 아르기닌 잔기의 자연 변이체가 존재한다(도 6 참고).

개선된 생체이용성을 가지는 생물학적으로 활성인 뉴트린 변이체를 창조하기 위해, 발명자들은 "힐" 부분에 염기성 아르기닌을 리신으로 대체시켰다. 아르기닌과 리신은 구조적으로 관련있기 때문에, 이와 같은 변화는 뉴트린 분자의 구조에 최소한의 영향을 줄 것으로 기대된다. 이와 같은 변화는 실질적인 아미노산 변화에 내성을 보이고, 따라서, 단백질에서 생물학적 활성에 중요하지 않는 부분에 리신 측쇄의 1차 아민을 통하여 뉴트린의 부위-특이적 페길화를 가능하게 만든다. 이 반응은 성숙한 고유의 인간 뉴트린 서열에는 리신이 없기 때문에 매우 특이적이다. 반응 조건 가령, pH, 온도 및 반응 시간을 최적화시킴으로써 활성화된 PEG 와 다른 아민의 반응을 최소화시킨다. "힐" 부분의 염기성 패취내에 PEG 변형을 배치시킴으로써, 두 가지 목적을 얻는다; 즉, (i) 단백질 활성에는 최소한의 영향을 주면서 단백질 페길화로 인한 잇점(감소된 신장 청정을 통한 개선된 생체이용성, 감소된 면역원성, 개선된 단백질 안정성)을 획득할 수 있고; 그리고 (ii) 이 부위에서 패길화로 음전하를 띈 세포 표면 프로테오글리칸과의 상호작용을 방해함으로써 염기성 패취를 차단할 것으로 기대되며, 이 또한 단백질 생체이용성을 개선시키는 것으로 기대된다.

제 1 단계에서, PCR에 근거한 부위 직접적인 돌연변이 생성을 통하여, 인간 코돈 이용(진핵생물 분비를 위해 추가의 N-말단 시그날 펩티드) 그리고 추가 정제 태그(6개의 히스트딘 잔기의 반복과 정제 태그와 인자 Xa의 절단을 위한 추가 부위)로 최적화된 성숙한 인간 뉴트린의 코딩 서열이 변형된다. 여기에서, 아르기닌 잔기 51, 52, 54, 56, 57, 58, 60, 61, 63, 또는 65에서 코돈은 리신 잔기를 위한 코돈으로 교환된다.

생성된 발현 구조물은 다음의 특징들을 가지는 본 발명의 Kr-G3-H6-G3-Xa-rh뉴트린으로 명명된다:

o Kr: 인간 코돈 사용을 위해 최적화된 세포질 분비를 위한 생쥐 크링글(kringle) 함유 막통과 단백질 2, 아미노산 1-26, 시그날 펩티드(GenBank Accession Number NP_082692)의 DNA-서열(아미노산 서열: MGTPHLQGFLLLFPLLLRLHGASAGS; SEQ ID NO: 2).

o G3: 인간 코돈 이용을 위해 최적화된 글리신 스페이스의 DNA-서열(아미노산 서열: GGG; SEQ ID NO: 3).

o H6: 인간 코돈 사용을 위해 최적화된 정제 목적을 위한 6개 히스티딘 태그의 DNA-서열(아미노산 서열: HHHHHH; SEQ ID NO: 4).

o Xa: 인간 코돈 사용을 위해 최적화된 인자-Xa 프로테아제 인지 부위의 DNA-서열(아미노산 서열: IEGR; SEQ ID NO: 5). 인자-Xa 프로테아제는 아르기닌 다음의 C-말단을 절단한다.

o rh뉴트린: 인간 코돈 이용을 위해 최적화된 성숙한 재조합 인간 뉴트린의 DNA 서열(아미노산 서열: ARLGARPCGLRELEVRVSELGLGYASDETVLFRYCAGACEAAARVY DLGLRRLRQRRRLRRERVRAQPCCRPTAYEDEVSFLDAHSRYHTVHELSARECACV; SEQ ID NO: 6). 대표적인 뉴트린 변이체 발현 구조물에서 위치 51, 52, 54, 56, 57, 58, 60, 61, 63, 또는 65에서 한 개 아르기닌 코돈은 리신 코돈 AAG로 대체된다.

도 7 및 SEQ ID NO: 7에서는 pMA 벡터로 클론된 Kr-G3-H6-G3-Xa-rh뉴트린(wt)의 온전한 DNA 서열을 나타낸다.

실시예 5 - 뉴트린 변이체의 페길화

생성된 구조물을 진핵 발현 벡터 pcDNA3.1+로 클론시키고, 이를 상기에서 설명된 것과 같이 변형된 뉴트린 변이체를 발현시키기 위하여 HEK-293 세포내로 형질감염시킨다.

한외-여과 및 도입된 정제 테그를 이용한 친화성 크로마토그래피를 이용하여 발현된 뉴트린 변이체들이 정제된다.

생성된 뉴트린 변이체 준비물의 구조, 순도 및 생물학적 활성은 상기에서 나타낸 것과 같이 고유-PAGE/웨스턴 블랏 및 뉴트린 활성 분석을 통하여 점검된다.

충분한 수률로 발현되고, 수용가능한 순도로 정제된 생물학적으로 활성을 가진 뉴트린 변이체는 상이한 단분산(mono-disperse) PEG로 공유 변형되는데 이용된다. 이 PEG들은 바람직하게는 2.5 - 30 kDa 크기를 가지며, 선형 또는 분지형이며, *N*-하이드록시숙시니미드(NHS) 에스테르로 활성화된다. *N*-하이드록시숙시니미드(NHS) 에스테르는 1차 아민과 자발적 반응을 보여, 단백질의 효과적인 페길화를 제공한다. 다른 PEG 유도체, 예를 들면, 상이한 크기, 단분산이 아닌 분자 또는 상이한 분지 패턴을 가지는 분자가 되나 이에 국한되지 않으며, 연결 화학물질도 적용될 수 있다.

반응 후, 정제 테그는 인자-Xa에 의해 도입된 프로테아제 부위에서 절단되고, PEG-뉴트린 변이체는 크기 압출 및/또는 친화력 크로마토그래피를 통하여 정제된다.

추가되는 정제 테그 및 프로테아제 부위/재조합 프로테아제 복합등 다수가 당분야에 공지되어 있고, His-Tag 및/또는 인자-Xa 부위/인자 Xa 절단등이 대체될 수 있다. 대안으로, 뉴트린 단백질을 포함하는 도입된 페길화 부위는 크로마토그래피 방법을 통한 정제 테그없는 진핵 발현 시스템의 상청액 또는 과다발현 박테리아의 상청액 또는 용출액으로부터 정제될 수 있다.

생성된 PEG-뉴트린 변이체 준비물의 구조, 순도 및 생물학적 활성은 상기에서 나타낸 것과 같이 SDS-PAGE/웨스턴 블랏, 고유-PAGE/웨스턴 블랏 및 뉴트린 활성 분석을 통하여 점검된다.

*in vitro*에서 충분한 생물학적 활성을 보이는 정제된 PEG-뉴트린 변이체는 생쥐 및 쥐에게 50 μmol/kg s.c.로 피하 투여후 이들의 약리역동학적 거동에 대해 in vivo 분석되었다. 혈장 뉴트린 농도는 기저선 및 투여후 0.25, 0.5, 1, 1.5, 2, 3, 4, 6, 8시간에 뉴트린 ELISA에 의해 결정되었다.

wt 뉴트린과 비교하여 개선된 생체이용성을 보이는 선택된 PEG-뉴트린 변이체는 n대 STZ 쥐에 매일 50 μmol/kg씩 6일간 피하 투여후 *in vivo*에서 이들 효과가 테스트되었다. 베타-세포 기능을 분석하기 위하여, 매일 혈당을 측정하고, 비이클 대조군 및 wt 뉴트린 군과 비교하여 처리 6일후에 췌장 인슐린 함량이 측정된다.

실시예 6 - 페길화된 뉴트린의 면역성 잠재력

인간 재조합 wt 뉴트린은 2주 이상 성장한 생쥐에 투여후 항-뉴트린 항체의 존재로 설명된 것과 같이 면역성 잠재력을 가진다. 항-뉴트린 항체는 특정 분석으로 감지되었다. 간략하게 설명하면, 재조합 인간 뉴트린을 미량플레이트에 피복시켜 혈청 항체를 포획하였다. 세척후, 바이오틴-접합된 염소 항-IgG 항체 또는 염소 항-IgG/IgM 항체와 퍼옥시다제 접합된 스트렙타아비빈을 이용한 발광 판독으로 포획된 항-뉴트린 항체가 정량화되었다. 혈청으로 희석된 항-뉴트린 IgG 및 항-뉴트린 IgM를 이용하여 표준 곡선을 만들었다(도 8 참고).

약리학적으로 활성 단백질의 페길화는 이들의 면역성 잠재력을 감소시키기 때문에, 개선된 생체이용성과 지속된 효능을 가지는 선택된 PEG-뉴트린 변이체들은 성장한 생쥐에게 일일 50 μmol/kg을 투여한 후 면역성 잠재력에 대해 테스트되었다. 매주 항-뉴트린 항체 ELISA를 통하여, 비이클 대조군과 wt 뉴트린 군과 비교하여 항-뉴트린

항체의 출현이 결정된다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0020] 본 발명은 폴리에틸렌 글리콜 (PEG)과 같은 공유적으로 부착된 폴리올 모이어티를 포함하는 뉴트린 접합체 뿐만 아니라 이의 변이체, 유도체 또는 이의 생물학적 활성 단편들을 포함하는 약학 조성물을 제공한다.

[0021] 특정 정의가 제공되지 않는 한, 여기에서 설명된 명명법, 실험 과정, 기술 및 방법들은 이에 속하는 기술분야에 공지된 것들이다. 표준 화학 기호 및 약어들은 이와 같은 기호들에 의해 표현되는 온전한 이름과 상호 호환적이다. 표준 기술은 화학 합성, 화학 분석, 약학 조제, 조성물, 운반 및 환자의 치료에 이용될 수 있다. 재조합 DNA 방법, 올리고뉴클레오티드 합성, 조직 배양 및 이와 유사한 것들에 표준 기술들이 이용될 수 있다. 당분야에서 통상적으로 확립된 또는 여기에서 설명되는 반응 및 정제 기술은 제조업자들의 설명에 따라 키트를 사용하여 실시될 수 있다. 전술한 기술 및 과정들은 당분야에 공지된 그리고 명세서를 통하여 언급되거나 논의된 다양한 일반 문헌 또는 좀더 특별히 언급된 문헌에서 설명된 통상적인 방법에 따라 일반적으로 실시될 수 있다.

[0022] 유사체("analog")는 구조적으로 뉴트린과 닮은, 유사한 기능을 가지는 폴리펩티드를 지칭한다.

[0023] 여기에서 사용된 바와 같이, "생물학적으로 활성인" 또는 "생물학적 활성"이란 뉴트린 산물이 줄기세포와 같은 선조세포로부터 인슐린을 생산하는 세포의 분화를 유도 및/또는 촉진시키거나 및/또는 *in vivo* 또는 *in vitro* 인슐린 생산 세포들, 가령, 베타-세포들의 보호, 생존 또는 재생을 촉진시킨다는 것을 의미한다. 여기에서 사용된 바와 같이, GDNF 활성의 결정을 위해 설명된 바와 같은 표준 *in vitro* 분석(WO 93/06116 및U.S. 특허 출원 No. 08/535,681 또는 본 실시예들에서 설명된 것과 같이)으로 용이하게 결정될 수 있다.

[0024] 여기에서 사용된 바와 같이, 뉴트린의 단편은 임의의 방법, 예를 들면, 뉴트린의 효소적 절단 및 화학적 절단 (가령, CNBr) 그리고 폴리펩티드의 물리적 절단을 포함하나 이에 국한되지 않은 방법에 의해 생성되는 뉴트린의 일부분을 지칭한다. 뉴트린의 단편들은 재조합 DNA 기술 및 아미노산 합성에 의해서도 만들어질 수 있다.

[0025] 본 발명에서 이용된 바와 같이, 뉴트린의 "활성 단편" 또는 "생물학적으로 활성 단편"은 뉴트린 단독 또는 이에 결합된, 예를 들면, 당 또는 인산염 또는 폴리펩티드 관련 분자 또는 잔기와 복합된, 뉴트린의 폴리펩티드 쇄의 임의 단편 또는 전구물질을 지칭하고, 이때 이와 같은 단편 또는 전구물질은 뉴트린과 동일한 생물학적 활성을 나타낸다. "생물학적으로 활성 단편"은 또한 줄기세포와 같은 선조세포로부터 인슐린을 생산하는 세포의 분화를 유도 및/또는 촉진시키거나 및/또는 *in vivo* 또는 *in vitro* 인슐린 생산 세포들, 가령, 베타-세포들의 보호, 생존 또는 재생을 촉진시키는 뉴트린 산물의 단편에 관계한다. 여기에서 사용된 바와 같이, 변형된 뉴트린 단백질 산물들 단편의 생물학적 활성은 GDNF 활성의 결정을 위해 설명된 바와 같은 표준 *in vitro* 분석(WO 93/06116 및 U.S. 특허 출원 No. 08/535,681 또는 본 실시예들에서 설명된 것과 같이)으로 용이하게 결정될 수 있다.

[0026] 여기에서 사용된 바와 같이, "상동체(homologue)"는 통상의 선조 단백질 서열로부터 내려온 뉴트린에 관련된 폴리펩티드에 관련된 경우 사용된다. 상동체는 유전적 복제에 의해 분리된 단백질들의 상관관계에도 적용될 수 있다.

[0027] "분자량이 낮은 물질"은 평균 분자량이 100 내지 12000 Da 사이의 물질을 지칭하고, 바람직하게는 200 내지 8000 Da 그리고 가장 바람직하게는 약 500 내지 7000 Da의 물질을 지칭한다.

[0028] 분자량이 낮은 물질은 천연 또는 합성된, 그리고 카르복실레이트 및/또는 설페이트 기와 같은 다수의 음이온 기를 보유하는 다가음이온 폴리머가 될 수 있다. 예를 들면, 다가음이온 폴리머는 낮은 분자량 술페이트화된 사카라이드, 술페이트화된 사이클로덱스트린 또는 술페이트화된 합성 폴리머 가령, 아크릴 폴리머, 방향족 폴리머 및/또는 폴리알코올로부터 선택될 수 있다. 좀더 특별하게는 다가음이온 폴리머는 분자량이 낮은 헤파린 또는 헤파린 유도체, 헤파린 황산염, 콘드로이틴 황산염, 덱스트란 황산염, 나프탈렌 술포네이트 폴리머변형된 헤파린-유도된 올리고사카라이드 (*Wang et al. (2002), supra*), 헤파린-유사 올리고사카라이드, 덱스트란 황산염, 술페이트화된 분자량이 낮은 글리코사미노글리칸, 덱스트린-2-황산염, 셀룰로오즈 황산염 나프탈렌 술포네이트 폴리머 (예를 들면, PRO 2000), PAVAS (아크릴산과 비닐 알코올 설페이트의 코폴리머), 술폰화된 폴리머 PAMPS [폴리(2-아크릴-아미도-2-메틸-1-프로판술폰산] (Mw 약 7000-12000), 콘드로이틴 황산염, 술페이트화된 사이클로덱스트린, 라미나린 황산염(Alban, S. in Carbohydrates in Drug Design (Ed. ZJ. Witczak, K. A. Nieforth) Dekker, New York, 1997, pp 209.), 폴리글리세린 황산염 (Turk, H., Haag, R., Alban, S. Bioconjugate Chem. 2004, 15, 162;), 펜토산 폴리설페이트 (PPS) 및 락토즈-변형된 펜토산 폴리설페이트와 같은 이의 유도체, 분절화된 PPS/분자량이 낮은 PPS, 퓨코이단 또는 이의 유도체 또는 복합체로부터 선택된다.

[0029] 적절한 폴리머의 바람직한 예로는 에녹사파린(Enoxaparin), 달테파린(Dalteparin) 또는 프라그민(Fragmin)과 같은 분자량이 낮은 헤파린 (LMWH) 유사체다. 이들은 헤파린의 분절 및/또는 제한된 효소적 절단 또는 화학적 절단으로 수득되고, 바람직하게는 약 3000 내지 약 7000 Dalton (Weitz 1997 supra)의 평균 분자량을 가진다.

[0030] 여기에서 사용된 바와 같이, "변형된 뉴트린 단백질 산물"은 나프탈렌 술포네이트 폴리머변형된 뉴트린 단백질 접합체 뿐만 아니라 공유적으로 부착된 폴리올 모이어티를 포함하는 세포에서 발현된 접합체에 관련된다.

[0031] 화학적으로 변형된 뉴트린 접합체는 명세서에서 제공된 또는 당분야에 공지된 임의의 방법에 의해 준비될 수 있다.

[0032] 본 발명의 뉴트린 접합체의 폴리올 모이어티는 선형 또는 분지형 쇄를 가지는 수용성 단기능 또는 다기능 폴리(알킬렌 옥시드)가 될 수 있다. 일반적으로, 폴리올은 폴리(에틸렌 글리콜)(PEG)와 같은 폴리(알킬렌 글리콜)이다. 그러나, 당업자들은 다른 폴리올, 예를 들면, 폴리(프로필렌 글리콜) 그리고 폴리에틸렌 글리콜과 폴리프로필렌 글리콜의 코폴리머도 뉴트린을 수용성 폴리머에 결합시켜 만들 수 있다는 것을 인지할 것이다. 이와 같은 폴리머의 비-제한적인 예로는 기타 폴리알킬렌 옥시드 동종폴리머 가령, 폴리프로필렌 글리콜, 폴리옥시에틸렌화된 폴리올 및 이의 코폴리머 및 블록 코폴리머가 포함된다. 폴리알킬렌 옥시드 계 폴리머의 또 다른 예로, 효과적인 비-항원성 물질, 예를 들면, 덱스트란, 폴리비닐 피롤리돈, 폴리아크릴아미드, 폴리비닐 알코올, 탄수화물계 폴리머 및 이와 유사한 것들이 이용될 수 있다.

[0033] 단백질 접합체는 당분야에 잘 공지된 진핵 또는 원핵 세포에서도 발현될 수 있다.

[0034] "뉴트린 접합체"는 뉴트린의 아미노산에 공유적으로 결합된 폴리에틸렌 글리콜과 같은 폴리올 모이어티를 포함하는 뉴트린 단백질 산물을 말한다. 아미노산은 N-말단 아미노산 또는 임의의 다른 아미노산에 부위-특이적일 수 있다. PEG 접합체는 뉴트린 단백질 분자의 임의의 적절한 부위에 공유적으로 결합된 하나 또는 그 이상의 PEG 분자를 포함할 수 있다.

[0035] 여기에서 호환될 수 있는 "뉴트린 단백질 산물", "뉴트린 산물", "뉴트린 단백질" 또는 "뉴트린"은 GenBank 수탁번호 NP_004549 (SEQ ID NO: 1, 도. 3) 에 공개된 아미노산 서열을 가지는 뉴트린 전구물질의 절단 또는 인간 뉴트린 자체의 절단으로 생물학적으로 활성인 인간 뉴트린 산물에 대해 70%이상의 상동성 정도를 가지는 단백질 또는 펩티드를 말하며, 바람직하게는 80%, 좀더 바람직하게는 90% 그리고 가장 바람직하게는 95%를 가지며, 이의 변이체 또는 이의 유도체도 포함된다. 생쥐와 인간 단백질 간에 상동성 정도는 약 91%이며, 바람직한 포유류 뉴트린 단백질은 유사한 높은 상동성 정도를 가질 것으로 간주된다. 뉴트린 산물과 인간 뉴트린 단백질 또는 전구물질의 상동성 비율은 BLAST 알고리즘을 이용한 표준 과정에 따라 결정될 수 있을 것이다. 바람직하게는, 상동성 비율은 나란히 배열된 두 서열에서, 배열에 도움을 주기 위하여 100개 아미노산 길이에 4개 갭이 도입될 경우, 더 짧은 서열에서, 비교되는 서열과 동일한 아미도산 잔기의 비율로 계산된다.

[0036] 오르소로그("ortholog")는 분류에 의해 공통의 조상 유전자로부터 진화된 상이한 종내에 폴리펩티드에 관한 것이다. 진화 과정에서 오르소로그는 동일한 기능을 유지한다.

[0037] "폴리에틸렌 글리콜" 또는 "PEG"는 PEG 자체 뿐만 아니라 이의 유도체에 관한 것이다. 폴리머 PEG는 일반적으로 메톡시-PEG-OH, (m-PEG)로 이용되는데 이때 한 말단은 상대적으로 비활성인 메톡시 기가 되며, 다른 말단은 화학적 변형을 받게 되는 하이드록시기가 된다. 분지형 PEG도 흔히 이용될 수 있다. 분지의 수(m)는 3부터 100 또는 그 이상의 범위가 될 수 있다. 하이드록실 기는 화학적 변형을 더 받게 된다. PCT 특허 출원 WO 96/21469에서 설명된 것과 같은 또 다른 분지형도 화학적 변형을 받게되는 단일 말단을 보유한다. 또 다른 분지형은 PEG 쇄의 말단보다는 PEG 기본 골격을 따라 카르복실과 같은 반응기들을 보유한다. 이와 같은 형태의 PEG에 추가하여, 폴리머는 기본골격에 약한 또는 분해가능한 링키지를 가지도록 만들어질 수 있다. 예를 들면, Harris는 U.S. 특허 출원 No. 06/026,716(참고문헌으로 전문이 첨부됨) 폴리머 기본골격에 가수분해될 에스테르 링키지를 가지도록 만들어진 PEG를 보여주었다. 가수분해로 폴리머가 절단되어 분자량이 더 낮은 단편이 된다. 에틸렌 옥시드와 프로필렌 옥시드 코폴리머는 화학 성질이 PEG와 상당히 관련되며, 그리고 많은 응용 부분에서 PEG를 대신하여 사용될 수 있다.

[0038] 페길화("PEGylation"-이하 "페길화"로 통칭)는 기질에 폴리에틸렌 글리콜 분자의 공유 결합으로 구성된다. 단백질의 PEG화는 당분야에 공지된 것이며, 그리고 Veronese, F. M., Biomaterials 22 (2001) 405-417에서 검토할 수 있다. 상이한 기능기 그리고 상이한 분자량의 폴리에틸렌 글리콜, 선형 및 분지형 뿐만 아니라 상이한 연결기를 이용하여 PEH가 연결될 수 있다(*Francis, G. E., et al., Int. J. Hematol. 68 (1998) 1-18; Delgado, C1 et al., Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Systems 9 (1992 (249-304)*).

[0039] PEG화는 WO 00/44785에서 설명된 것과 같이, 페길화 시약으로 수용액내에서 실행될 수 있는데, 바람직하게는 5 내지 40kDa의 분자량을 가지는 NHS-활성화된 선형 또는 분지형 PEG 분자들을 이용하여 실행될 수 있다. 페길화는 또한 *Lu, Y. et al., Reactive Polymers 22 (1994) 221-229*에 따라 고형상에서 실행될 수도 있다.

[0040] *Felix, A. M., et al., ACS Symp. Ser 680 (Poly(ethylene glycol)) (1997) 218-238*에 따라 N-말단 아미노산에서 선택적 페길화가 실행될 수도 있다. 펩티드 쇄의 N 말단 아미노산에 N-PEG화된 아미노산 유도체를 결합시킴으로써 고형상 합성동안 선택적 N-말단 페길화가 이루어진다. 커져가는 쇄에 N-페길화된 아미노산 유도체를 결합시킴으로써 고형상 합성 동안 측쇄 페길화가 실행된다. 상기에서 설명된 바와 같이 고형상 합성내에서 또는 적절히 아미노 탈보호된 펩티드에 활성화된 PEG 시약들을 사용한 용액 상 합성에 의해 N-말단 및 측쇄의 복합 페길화가 진행된다.

[0041] 적절한 PEG 유도체는 약 5 내지 약 40kDa의 바람직한 평균 분자량, 더욱 바람직하게는 약 20 내지 약 40 kDa, 그리고 가장 바람직하게는 약 30 kDa의 분자량 범위를 가지는 활성화된 PEG 분자들이다. PEG 유도체는 선형 또는 분지형 PEG가 될 수 있다.

[0042] 활성화된 PEG 유도체는 당분야에 공지된 것이며, 그리고 PEG-비닐술폰의 경우 *Morpurgo, M., et al., J. Bioconj. Chem. 7 (1996) 363-368*에 설명되어 있다. 페길화된 단편 준비에는 선형 쇄 및 분지형 쇄 PEG종들이 적합하다. 반응성 PEG 시약의 예는 요오드-아세틸-메톡시-PEG 및 메톡시-PEG-비닐술론(m은 바람직하게는 약 450 내지 약 900이며, R은 1 내지 6개 탄소원자, 예를 들면, 메틸, 에틸, 이소프로필과 같은 선형 및 분지형의 저급 알킬이며, 이중 메틸이 바람직하다)이 포함된다.

[0043] 여기에서 사용된 바와 같이, "PEG" 또는 "PEG 모이어티"는 선형 및 분지형 PEG, 메톡시 PEG, 가수분해적으로 또는 효소적으로 분해가능한 PEG, 펜던트 PEG, 덴드리머(dendrimer) PEG, PEG 와 하나 또는 그 이상의 폴리올의 코폴리머, 그리고 PEG 및 PLGA (폴리(락트/글리콜산))의 코폴리머를 포함하나 이에 국한되지 않는 것을 의미한다.

[0044] "페길화된(PEGylated) 뉴트린" 또는 "페길화에 의해 변형된 뉴트린" 또는 "폴리에틸렌 글리콜 모이어티를 포함하는 뉴트린"은 이와 같은 페길화된 단백질을 만들기 위해 PEG 모이어티를 공유적으로 부착시키는 방법에 의해 생성된 뉴트린 단백질 산물이다.

[0045] "약학적으로 수용가능한 캐리어, 희석제 및/또는 어쥬번트"는 활성 성분들을 조제물로 프로세싱되도록 하며, 약리학적으로 이용될 수 있는 부형제 및 보조제와 같은 하나 또는 그 이상의 약리학적으로 그리고 생리학적으로 수용가능한 화합물을 말한다. 상세한 내용은 최신판 *Remington's Pharmaceutical Sciences (Maack Publishing Co., Easton, Pa.)*에서 찾아볼 수 있을 것이다.

[0046] "변형안된 기준(control) 뉴트린 단백질 산물"은 관련 변형된 뉴트린 단백질 산물과 동일한 기원의 뉴트린 단백질 산물로써, 대조군으로 이용된다.

[0047] 여기에서 사용된 것과 같이, "변이체(variant)"는 하기에서 추가 상술되는 것과 같이, 고유 폴리펩티드에 대해 하나 또는 그 이상의 치환, 추가, 결손 및/또는 삽입을 포함하는 폴리뉴클레오티드 변이체를 말하는 것이다. "변이체"에는 이종(xenogenic) 기원의 상동성 폴리펩티드도 포함된다. 일반적으로, 뉴트린 변이체는 하기에서 설명되는 특정 분석을 이용하여 결정될 수 있는 것과 같이 온전한, 이의 실질적 비율의 또는 최소 부분적 활성을 보유한다. 여기에서 사용된 "변이체"에는 당분야에 공지된 것과 같이, 기능적 등가 분자를 제공하기 위해 치환, 추가 또는 결손에 의해 단백질 서열을 변경시킴으로써 변형된 뉴트린이 포함된다. 후자의 경우, 기능상 등가의 아미노산 잔기들이 서열내에서 생물학적으로 침묵 교환을 초래하는 잔기에 의해 치환되는 변형된 서열들이 포함된다.

[0048] 뉴트린 변이체는 적절한 뉴클레오티드 변화를 DNA 인코드 폴리펩티드내로 도입시켜 만들거나 또는 *in vitro* 화학 합성을 통하여 원하는 폴리펩티드를 만들 수 있다. 결손, 삽입 및 치환으로 뉴트린의 생물학적으로 활성을 제공하는 단백질 산물 변이체가 만들어질 수 있다는 것을 당업자는 인지할 것이다.

[0049] 하나 또는 그 이상의 선택된 아미노산 잔기들의 치환, 삽입 또는 결손을 위한 돌연변이생성 기술은 당분야에 잘 공지되어 있다(가령, U.S. Patent No. 4,518,584, 이 내용은 참고문헌으로 첨부된다).

[0050] 적절한 구체예에서, 아미노산 변화는 성숙한 인간 뉴트린(도 3에서 볼 수 있는 것과 같이, 아미노산 141-164, 바람직하게는 147-160)의 아미노산 47-69사이, 바람직하게는 51-65 사이 부분에 도입된다. 이와 같은 아미노산 변화는 이 부위내에 아르기닌 잔기(가령, 아르기닌 잔기 51, 52, 54, 56, 57, 58, 60, 61 및/또는 65)의 최소

하나의 치환 또는 결손을 포함한다. 아르기닌이 중성 또는 산성 아미노산, 가령, 글리신, 세린, 알라닌, 아스파르테이트, 또는 글루타메이트에 의해 치환되는 것이 바람직하다. 특별히, 글루타메이트로의 치환이 바람직한데, 예를 들면, R51E, R52E, R54E, R56E, R57E, R58E, R60E, R61E 및 R65E 또는 이들 치환을 최소 2개 포함하는 뉴트린 변이체가 특히 바람직하다.

[0051] 대안으로 및/또는 추가적으로, 상기 명시된 부분내, 뉴트린의 아미노산 잔기 특히, 아르기닌 잔기는 폴리올기에 결합이 실시되도록 리신으로 치환될 수 있다. 성숙한 인간 뉴트린에는 리신이 없기 때문에, 이와 같은 변화로 폴리올기에 의한 부위-특이적 변화가 허용된다. 상기 명시된 부분내에서 리신에 의한 치환이 특히 바람직한데, 예를 들면, R51K, R52K, R54K, R56K, R57K, R58K, R60K, R61K 그리고 R65K 또는 이들 치환들중 최소 2개를 포함하는 뉴트린 변이체가 바람직하다.

[0052] 뉴트린 치환 변이체는 인간 또는 생쥐 뉴트린 아미노산 서열에서 최소 하나의 아미노산 잔기가 제거되고 그 위치에 상이한 잔기가 삽입된 것이다. 이와 같은 치환 변이체에는 대립형질 변이체(allelic variant)가 포함되는데, 이는 종 집단에서 자연 발생적 뉴클레오티드 서열의 변화를 특징으로 하며, 이로 인하여 아미노산 변화가 초래되거나 초래되지 않을 수 있다.

[0053] 놀라운 것은, 여기에서 명시된 약학 조성물은 접합된 뉴트린을 포함하지 않은 약학 조성물과 비교하였을 때, 접합된 뉴트린 및/또는 이의 생물학적으로 활성 단편의 활성 성분의 증가된 생체이용성을 가진다는 것이 본 발명자들에 의해 발견되었다. 본 발명은 PEG와 같은 폴리올에 뉴트린 단백질의 접합으로 뉴트린 산물의 혈청 반감기 및 생체 이용성이 상당히 개선된다는 것을 설명한다. 생체 이용성 개선된 뉴트린 산물이 피하로 투여된다면, 주사 부위에 활성 물질의 축적 또는 처리가 감소될 것이며, 이와 같은 방식으로 국소 내성이 개선될 것이다.

[0054] 본 발명은 치료요법적 효과를 가지기 위하여, 변형안된 대조군 뉴트린과 비교하였을 때, 환자에게 훨씬 적은 약량의 뉴트린 접합체 활성 성분을 제공하는 방법을 제공한다. 이는 "사용자 친화적 단백질 치료법"의 요구에 부응되며, 그리고 활성 물질 및/또는 약학 조성물의 생산 단가를 더 낮추는 결과를 얻을 수도 있다.

[0055] 본 발명의 뉴트린 접합체는 변형안된 뉴트린과 비교하여 수용액에서 더 높은 용해성을 보유하여, 활성 물질 조제를 더 간단하게 할 수도 있을 것이다.

[0056] 추가 장점으로, PEG와 같은 폴리올을 뉴트린에 결합시키면 뉴트린에 대한 면역원성이 감소될 수 있고, 따라서, 항체 또는 활성 성분에 대한 알레르기 반응을 중화시킬 수 있다.

[0057] 바람직하게는, 본 발명의 뉴트린 단백질 산물은 인간 뉴트린 또는 이의 생물학적 활성 단편이다. 뉴트린 단백질 산물은 재조합 기술을 통하여 생산되는 것이 바람직한데, 그 이유는 이와 같은 방법으로 상당한 순도를 가진 단백질을 다량 수득할 수 있고, 박테리아, 식물, 포유류, 또는 곤충 세포계에서 발현되는 산물에 국한되지 않기 때문이다.

[0058] 재조합 뉴트린 단백질 산물에는 글리코실화된 그리고 글리코실화안된 단백질도 포함된다. 일반적으로 재조합 기술은 뉴트린 단백질 산물을 인코드하는 유전자의 분리, 적절한 벡터 및/또는 세포 타입에 유전자 클로닝, 원하는 변이체를 인코드하도록 필요할 경우, 유전자의 변형 그리고, 뉴트린 단백질 산물을 만들기 위해 유전자를 발현시키는 것과 관련된다.

[0059] 대안으로, 원하는 뉴트린 산물을 인코드하는 뉴클레오티드 서열은 화학적으로 합성될 수도 있다. 유전자 코드의 축퇴 또는 대립형질 변화로 인하여 또는 선택된 세포에 의해 단백질 산물의 생산이 실시되도록 만들어진 변화로 인하여 이용 코돈에서 변화되는 뉴클레오티드 서열을 이용하여, 뉴트린 산물이 발현될 수 있다.

[0060] Kotzbauer et al., Nature 384:467-470에서는 뉴트린 단백질의 생쥐 cDNA 아미노산 서열 및 인간 cDNA 아미노산 서열-여기에서 SEQ ID NO:1로 확인된-을 동정하는 것에 대해 설명된다.

[0061] 본 발명에 따른 뉴트린 산물은 다양한 수단을 통하여 분리되거나 생성될 수 있다. 뉴트린 산물을 생산하는 예시적인 방법은 특허 출원 WO 97/08196에서 설명되며 이는 참고문헌으로 첨부된다. 뉴트린 단백질의 발현을 위한 다양한 벡터, 숙주 세포, 배양 생장 조건들 뿐만 아니라 뉴트린 단백질 산물의 변이체들을 합성하는 방법들도 설명된다. 대장균(*E. coli*)에서 뉴트린 단백질 산물의 발현에 적절한 추가 벡터는 EP 특허 0 423 980에서 설명되며, 이 내용은 참고문헌으로 첨부된다.

[0062] 생물학적으로 활성인 형태의 단백질 뉴트린은 이황화결합된 이량체로 정제된 뉴트린의 분자량에 의해 결정될 수 있다. 박테리아 시스템에서 발현된 후에 분리된 물질은 기본적으로 생물학적으로 비활성이며, 단량체로 존재한다. 생물학적으로 활성인 이량체를 만들기 위해서 리폴딩(Refolding)이 필수적이다. 박테리아 시스템에서 발현

된 뉴트린의 리폴딩과 성숙을 위한 적절한 과정은 WO 93/06116에서 설명된 것과 실질적으로 유사하다. 뉴트린 활성을 측정하는 *in vitro* 표준 분석 또한 WO 93/06116 및 U.S. 특허 출원 No. 08/535,681(참고문헌으로 첨부됨)에서 설명된 것과 같이, GDNF 활성을 결정하는 것과 실질적으로 유사하다.

[0063] 비활성, 비-독성, 생분해가능한 폴리머 폴리에틸렌 글리콜 (PEG)-폴리에틸렌 옥시드(PEO)로 공지되기도 함-을 뉴트린에 공유적으로 부착시키는 것은 생명과학 및 의학 분야에 중요한 용도들을 가진다. 뉴트린의 페길화로 기간의 지속, 안정성 개선(가령, 더 낮은 독성, 면역원성 및 항원성), 효과의 증가, 투약 빈도의 감소, 약물 용해도 및 안정성의 개선, 단백질 분해 감소, 조절된 약물 방출 실행의 결과를 얻는다.

[0064] 본 발명은 뉴트린 단백질 산물의 용도, 예를 들면, 원핵생물에서 발현된 최소 하나의 폴리에틸렌 글리콜 분자에 연결된 뉴트린 또는 이의 변이체인 유도체 뿐만 아니라 아실 또는 알킬 링키지를 통하여 하나 또는 그 이상의 폴리에틸렌 글리콜 분자에 부착된 뉴트린 또는 이의 변이체들의 용도를 고려한다. 페길화는 당분야에 공지된 임의의 페길화 반응에 의해 실시될 수 있다. 예를 들면, *Focus on Growth Factors, 3 (2):4-10, 1992*; EP 0 154 316, -내용은 참고문헌으로 첨부됨-; EP 0 401 384; 그리고 페길화와 관련된 여기에서 언급된 다른 공고물 참고.

[0065] 본 발명의 약학 조성물은 페길화된 뉴트린을 포함하지 않는 약학 조성물과 비교하였을 때, 포유류 예를 들면, 인간에서 활성 성분의 생체이용성이 증가된다.(도 2 참고). 바람직하게는, 페길화된 뉴트린은 활성 성분의 생체이용성이 최소 2배, 바람직하게는 최소 5배, 더욱 바람직하게는 최소 10배 증가되는 양으로 제공된다.

[0066] 본 발명의 실시예에서 나타낸 바와 같이 생체 이용성 증가를 측정할 수 있다. 좀더 특별히, 주어진 양 또는 약량에서 활성 성분을 포함하는 조성물은 페길화없이 동일한 약량의 활성 성분을 포함하는 약학 조성물과 비교되었다. 이들 두 조성물의 생체이용성은 실험 동물, 예를 들면, 생쥐에 피하 투여후 혈장 농도로부터 측정될 수 있다. 바람직하게는, 혈장 농도는 최소 120분, 바람직하게는 240분, 가장 바람직하게는 24시간의 시간에 걸쳐 측정된다(도 2 참고).

[0067] 본 발명의 약학 조성물은 임의의 효과적인 경로, 예를 들면, 경구, 비강, 직장, 국소, 경피 또는 장관외 투여 경로로 투여되기에 적합할 수 있다. 따라서, 조성물은 고체 또는 액체 조성물, 예를 들면, 정제, 캡슐, 분말, 크림, 겔, 연고, 용액, 에멀젼, 현탁액, 리오필리세이트(lyophilisate)가 될 수 있다. 그러나, 바람직하게는, 조성물은 주사 또는 주입에 의해 투여되며, 더욱 바람직하게는 피하 또는 정맥 주사와 같이 주사에 의해 투여된다. 약학 조성물은 수용액이 바람직하다.

[0068] 활성 성분 및 선택적으로 다가음이온 폴리머와 같은 분자량이 낮은 물질에 추가적으로, 약학 조성물은 약학적으로 수용가능한 캐리어, 희석제 및/또는 어쥬번트, 예를 들면, 완충액, 강장성 조정 물질, 안정화제, 충진제, 붕해제, 농후제 등을 포함할 수 있다.

[0069] 약학 조성물에는 치료요법적으로 효과적인 양 또는 약량의 활성 성분이 포함된다. 치료요법적으로 효과적인 약량은 활성 성분의 타입, 치료될 질환의 타입 및 다양성, 그리고 투여 타입에 따라 달라진다. 활성 성분으로 뉴트린을 포함하는 장관외 조성물의 경우, 치료요법적으로 효과적인 약량은 바람직하게는 일일 약 0.001 mg 내지 500 mg의 범위, 더욱 바람직하게는 약 0.05 내지 약 100 mg, 가장 바람직하게는 약 0.01 내지 약 5 mg의 범위가 된다.

[0070] 조성물은 포유류에 투여되는 것이 바람직하며, 특히 사람에게 투여되는 것이 바람직하다. 따라서, 조성물은 인간 및 수의학적 약물로 적절하다. 조성물은 특히 췌장 질환 또는 신경퇴행성 질환, 특히 타입 I 당뇨병 및 LADA 또는 타입 I1 당뇨병과 같은 췌장 자가면역성 질환의 예방 및/또는 치료에 특히 적합하다.

[0071] 여기에서 설명된 뉴트린 접합체는 당업자에 공지된 것과 같은 임의의 적절한 수단, 바람직하게는 장관내 또는 장관외 또는 췌장으로 직접 국소 투여될 수 있다. 체중, 신체 표면 또는 기관 크기 등을 고려하여 특정 약량이 계산될 수 있다. 치료를 위해 상기 언급된 조성물의 적정 약량을 결정하는데 필수적인 계산에서 추가적인 정비는 당업자가 통상적으로 할 수 있는 것이며, 일상적으로 실시되는 작업 범위내에 있다. 적정한 약량-반응 데이터와 함께 이용될 약량을 결정하기 위한 이미 확립된 분석법들을 이용함으로써 적정 약량이 확인될 수 있다. 상기 설명된 질환을 치료하는 방법에 관련된 최종 약량 섭생은 환자의 나이, 상태, 체중, 성별 및 식이, 임의 감염 심각성, 투여 시간 및 다른 임상적 인자들과 같은 약물 작용을 변화시키는 다양한 인자들을 고려하여 주치의가 결정할 수 있다. 연구가 진행되고 있기 때문에, 다양한 질환 및 상태를 치료하기 위한 적정 약량 수준에 대한 추가 정보가 나올 수 있을 것이다.

[0072] 여기에서 설명된 것과 같이, 뉴트린 접합체의 연속 투여 또는 지속적 운반이 주어진 치료에 유익할 수 있다고

본다. 연속 투여는 기계적 수단 가령, 주입 펌프를 통하여 이루어질 수 있고, 다른 방식의 연속 또는 거의 연속적 투여가 실시될 수도 있다. 예를 들면, 화학적 유도화 또는 포집화(encapsulation)로 결정된 약량 섭생에 근거하여, 예측가능한 양의 연속 주입 효과를 가지는 단백질의 지속 방출 결과를 얻을 수 있을 것이다. 따라서, 뉴트린 단백질 산물에는 유도화된 단백질이 포함되거나 또는 이와 같은 연속 투여를 달성하게 하도록 다른 방식으로 조제될 수도 있다.

[0073] 추가 바람직한 구체예에서, *in vitro* 또는 *in vivo*에서 인슐린 생산 세포들의 분화를 촉진시키기 위하여 줄기세포와 같은 조상세포에 뉴트린 접합체가 직접적으로 운반될 수도 있다. 본 발명의 이와 같은 구체예에서, 뉴트린 접합체는 바람직하게는 0.1 ng/ml 내지 500 ng/ml사이의 농도, 더욱 바람직하게는 1 ng/ml 내지 100 ng/ml의 농도, 더욱더 바람직하게는 20 내지 80 ng/ml 범위의 농도, 그리고 가장 바람직하게는 50 ng/ml의 농도로 첨가될 수 있다.

[0074] 여기에서 설명된 바와 같이, 뉴트린 접합체는 단일요법으로 이용되거나 또는 다른 약리학적 물질과 함께 복합요법으로 이용될 수 있다. 예를 들면, 췌장 질환및/또는 비만 및/또는 대사 증후군의 치료 또는 예방에 적합한 다른 약리학적 물질, 특히, 조상 세포들로부터 인슐린 생산 세포들의 분화를 촉진 및/또는 유도하는데 적절한 다른 약리학적 물질과 함께 뉴트린 접합체가 투여될 수 있다. 추가로, WO 2005/51415에서 설명되는 것과 같이, 항체, 폴리펩티드 및/또는 펩티드성 또는 비-펩티드성 분자량이 낮은 물질과 같은 면역억제성 활성을 보유하는 약리학적 물질과 함께 뉴트린 접합체가 이용될 수도 있다.

[0075] 본 발명의 추가 구체예는 야생형 인간 뉴트린과 비교할 때, 최소 하나의, 예를 들면, 1개, 2개, 3개 또는 4개 아미노산 변화가 포함된 인간 뉴트린 변이체다. 인간 뉴트린의 변이체는 상기에서 설명된 것과 같이, 인간 고유 폴리펩티드에 대해 하나 또는 그 이상의 치환, 추가, 결손 및/또는 삽입을 포함할 수 있다. 뉴트린 변이체들은 상기에서 설명된 바와 같이 준비될 수 있다.

[0076] 바람직한 구체예에서, 아미노산 변화는 인간의 성숙한 뉴트린의 아미노산 47-69, 바람직하게는 51-65 사이 부분(도 3에서 볼 수 있는 것과 같이, 아미노산 141-164, 바람직하게는 147-160)에 있다. 이와 같은 아미노산 변화는 이 부위내에 아르기닌 잔기(가령, 아르기닌 잔기 51, 52, 54, 56, 57, 58, 60, 61 및/또는 65)의 최소 하나의 치환 또는 결손을 포함한다. 아르기닌이 중성 또는 산성 아미노산, 가령, 글리신, 세린, 알라닌, 아스파르테이트, 또는 글루타메이트에 의해 치환되는 것이 바람직하다. 특별히, 글루타메이트로의 치환이 바람직한데, 예를 들면, R51E, R52E, R54E, R56E, R57E, R58E, R60E, R61E 및 R65E 또는 이들 치환을 최소 2개 포함하는 뉴트린 변이체가 특히 바람직하다.

[0077] 대안으로 및/또는 추가적으로, 상기 명시된 부분내, 아미노산 잔기 특히, 아르기닌 잔기는 리신으로 치환된 인간 뉴트린 변이체 또한 바람직하다. 따라서, 폴리올기에 뉴트린 변이체의 특정 결합이 실시된다. 상기 명시된 부분내에서 리신에 의한 치환이 특히 바람직한데, 예를 들면, R51K, R52K, R54K, R56K, R57K, R58K, R60K, R61K 그리고 R65K 또는 이들 치환들중 최소 2개를 포함하는 뉴트린 변이체가 바람직하다.

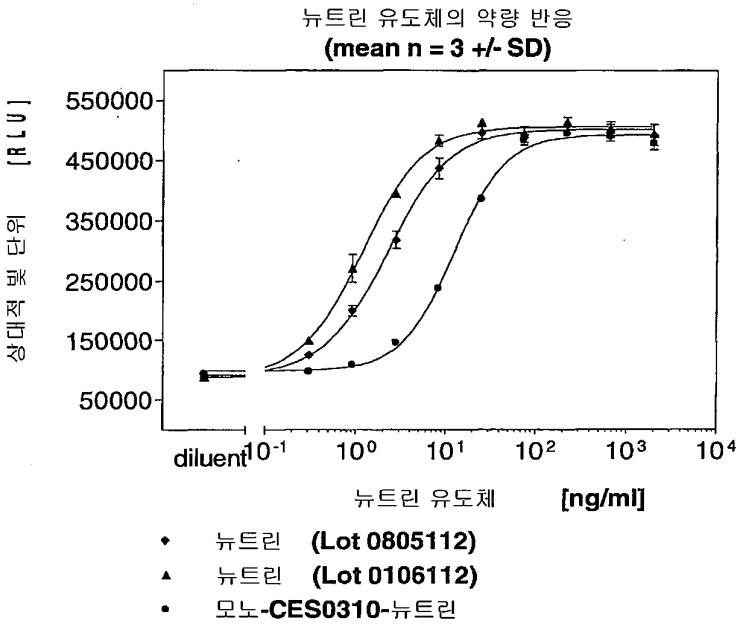
[0078] 본 발명에 따른 뉴트린 치환 변이체는 인간 뉴트린 아미노산 서열에서 최소 하나의 아미노산 잔기가 제거되고, 그 위치에 상이한 잔기가 삽입된 것이다. 이와 같은 치환 변이체에는 대립형질 변이체(allelic variant)가 포함되는데, 이는 종 집단에서 자연 발생적 뉴클레오티드 서열의 변화를 특징으로 하며, 이로 인하여 아미노산 변화가 초래되거나 초래되지 않을 수 있다.

[0079] 본 발명은 또한 투여를 요하는 환자에게 약학 조성물을 투여하는 방법을 제공하는데, 이때 약학 조서물은 활성성분으로 최소 하나의 폴리에틸렌 글리콜 분자에 접합된 최소 하나의 뉴트린 단백질 산물의 약리학적으로 활성을 가진 양 또는 약량과, 약학적으로 수용가능한 캐리어, 희석제 및/또는 어쥬번트를 포함한다.

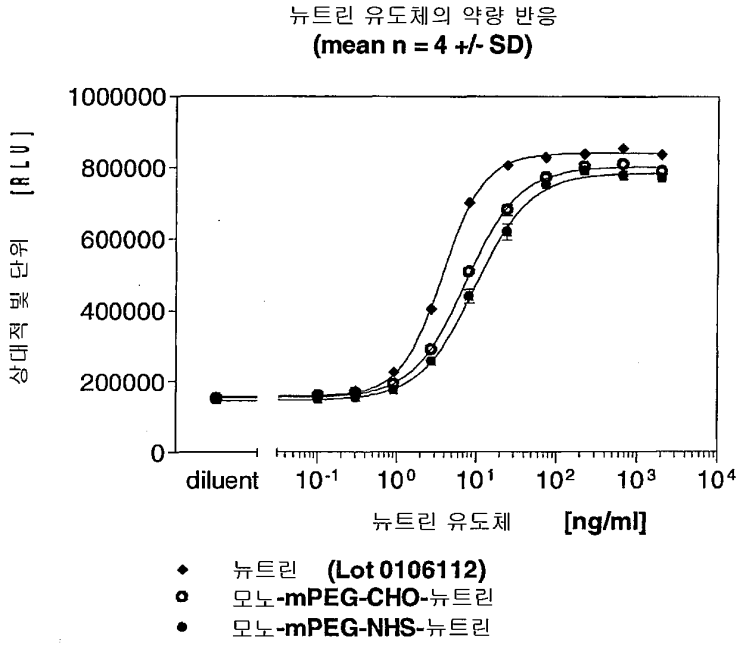
[0080] 본 발명은 또한 투여를 요하는 환자에게 약학 조성물을 투여하는 방법을 제공하는데, 이때 약학 조성물은 활성성분으로 최소 하나의 폴리에틸렌 글리콜 분자에 접합된 최소 하나의 뉴트린 단백질 산물의 약리학적으로 활성을 가진 양 또는 약량과, 분자량이 낮은 물질 그리고 약학적으로 수용가능한 캐리어, 희석제 및/또는 어쥬번트를 포함한다.

도면

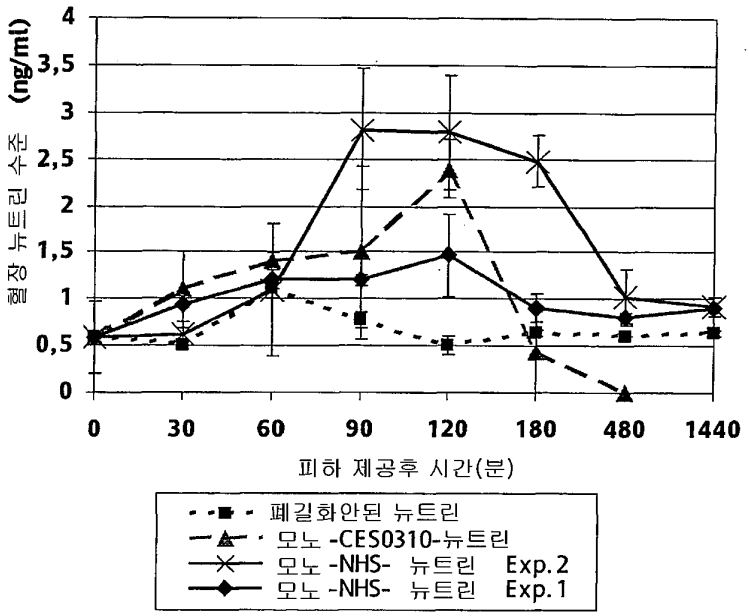
도면1a


뉴트린 유도체의 약량 반응
(mean n = 3 +/- SD)
상대적 빛 단위 [RLU]
550000
450000
350000
250000
150000
50000
diluent
10-1
100
101
102
103
104
뉴트린 유도체 [ng/ml]
뉴트린 (Lot 0805112)
뉴트린 (Lot 0106112)
모노-CES0310-뉴트린

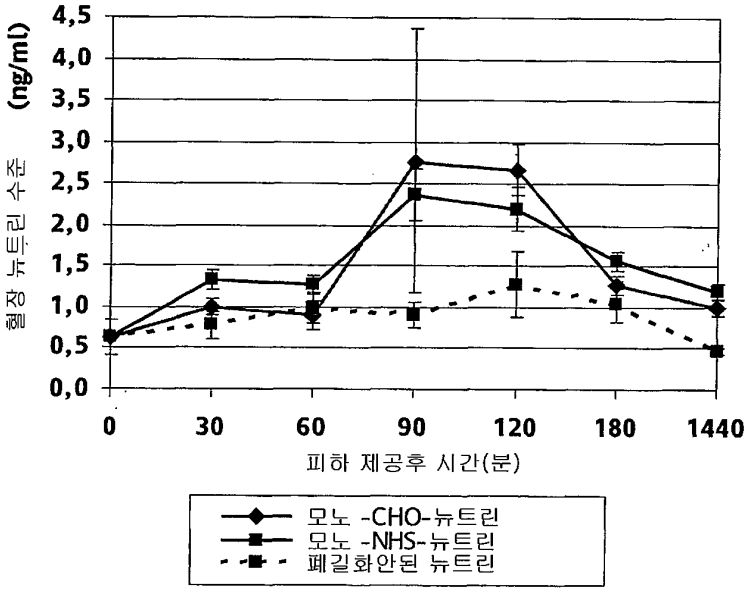
도면1b


뉴트린 유도체의 약량 반응
(mean n = 4 +/- SD)
상대적 빛 단위 [RLU]
1000000
800000
600000
400000
200000
0
diluent
10-1
100
101
102
103
104
뉴트린 유도체 [ng/ml]
뉴트린 (Lot 0106112)
모노-mPEG-CHO-뉴트린
모노-mPEG-NHS-뉴트린

도면2a



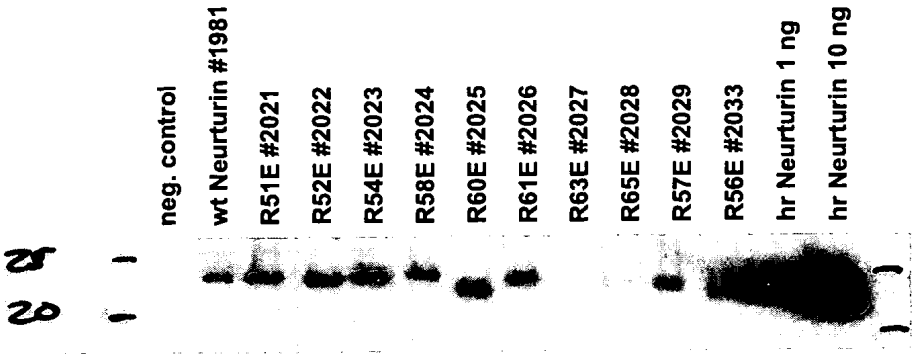
도면2b



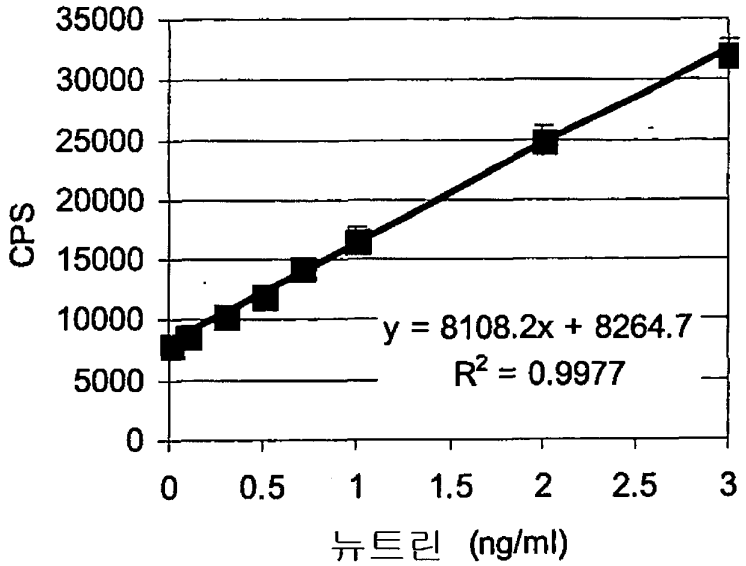
도면3

MQRWKAAALA SVLCSSVLSI WMCREGLLLS HRLGPALVPL HRLPRTLDAR
IARLAQYRAL LQGAPDAMEL RELTPWAGRP PGPRRRAGPR RRRAR**ARLGA**
RPCGLRELEV RVSELGLGYA SDETVLFRYC AGACEAAARV YDLGLRRLRQ
RRRLRRERVR AQPCCRPTAY EDEVSFLDAH SRYHTVHELS ARECACV

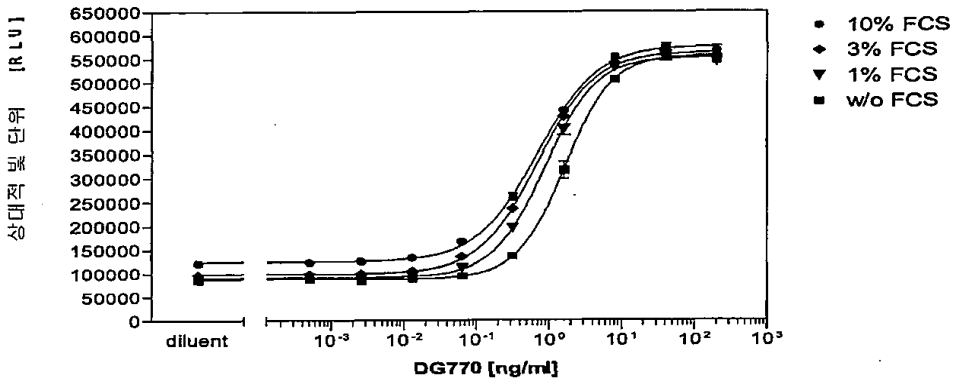
도면4a



도면4b



도면5a



	w/o FCS	1% FCS	3% FCS	10% FCS
EC50	1.657	0.8837	0.6959	0.6994

도면5b

돌연변이된 아미노산 위치(인간 성숙 뉴트린)	뉴트린 농도 ng/ml- 뉴트린 ELISA로 측정	세포 티로신 하이드록시라제 리포터 유전자 분석에 의한 뉴트린 활성의 EC_{50} (ng/ml)
control	n.d.	n.d.
wt	1500	0.71
R51E	1600	0.58
R52E	1500	0.32
R54E	1700	0.41
R56E	1600	0.48
R57E	1300	0.58
R58E	1200	0.89
R60E	1600	0.47
R61E	1600	0.48
R63E	n.d.	n.d.
R65E	1500	0.37
wt (*E.coli*)	1500	2.20

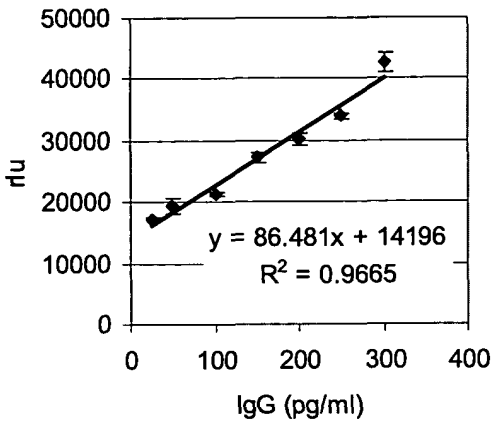
도면6

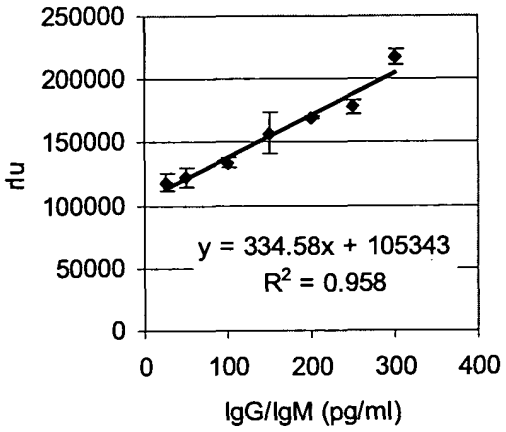
Homo sapiens (NP_004549)	DLGLRRLRGRRRLRRERVRAQPC
Macaca mulatta (XP_001085705.1)	DLGLRRLRGRRRLRRERVRAQPC
Bos taurus (XP_603915.2)	DLGLRRLRGRRRVRRERVRAQPC
Canis familiaris (XP_854570)	DLGLRRLRGRRRVRRERVRAQPC
Mus musculus (NP_032764.1)	DLGLRRLRGRRRVRRERARAHPC
Rattus norvegicus (NP_445851.1)	DLGLRRLRGRRRVRKERVRAHPC
Ornithorhynchus anatinus (XP_001509015.1)	DLGLRRLRGRRRVRKEKVRAQPC
Monodelphis domestica (XP_001369475.1)	DLGLRRLRGRRRVRKEKIRARPC
Gallus gallus (NP_001074973.1)	DLSLRSVRSRKKIRKEKVRARPC

도면7

```
                                PacI       KpnI  HindIII   NcoI
GAGCGGAAGGCCCATGAGGCCAGTTAATTAAGAGGTACCAAGCTTGCCACCATGGGCACC
  1 ---------+---------+---------+---------+---------+---------+
CTCGCCTTCCGGGTACTCCGGTCAATTAATTCTCCATGGTTCGAACGGTGGTACCCGTGG
                                                     M__G__T__

     BspMI                                           KasI
       PstI                                          NarI
CCACACCTGCAGGGCTTTCTGCTGCTGTTCCCCCTGCTGCTGCGGCTGCACGGCGCCTCT
 61 ---------+---------+---------+---------+---------+---------+
GGTGTGGACGTCCCGAAAGACGACGACAAGGGGGACGACGACGCCGACGTGCCGCGGAGA
P__H__L__Q__G__F__L__L__L__F__P__L__L__L__R__L__H__G__A__S__

GCCGGCTCTGGCGGCGGACACCACCACCATCACCACGGCGGAGGGATCGAGGGCAGAGCC
121 ---------+---------+---------+---------+---------+---------+
CGGCCGAGACCGCCGCCTGTGGTGGTGGTAGTGGTGCCGCCTCCCTAGCTCCCGTCTCGG
A__G__S__G__G__G__H__H__H__H__H__H__G__G__G__I__E__G__R__A__

       KasI
       NarI                                                  BstNI
AGACTGGGCGCCAGACCCTGCGGCCTGCGGGAGCTGGAAGTGCGGGTGTCCGAGCTGGGC
181 ---------+---------+---------+---------+---------+---------+
TCTGACCCGCGGTCTGGGACGCCGGACGCCCTCGACCTTCACGCCCACAGGCTCGACCCG
R__L__G__A__R__P__C__G__L__R__E__L__E__V__R__V__S__E__L__G__

                                                KasI
                                                NarI
CTGGGCTACGCCAGCGACGAGACAGTGCTGTTCCGGTACTGCGCTGGCGCCTGCGAGGCC
241 ---------+---------+---------+---------+---------+---------+
GACCCGATGCGGTCGCTGCTCTGTCACGACAAGGCCATGACGCGACCGCGGACGCTCCGG
L__G__Y__A__S__D__E__T__V__L__F__R__Y__C__A__G__A__C__E__A__

     XmaI
     SmaI          BstNI
GCTGCCCGGGTGTACGACCTGGGGCTCCGGAGACTGAGACAGCGGCGGAGACTGAGGCGG
301 ---------+---------+---------+---------+---------+---------+
CGACGGGCCCACATGCTGGACCCCGAGGCCTCTGACTCTGTCGCCGCCTCTGACTCCGCC
A__A__R__V__Y__D__L__G__L__R__R__L__R__Q__R__R__R__L__R__R__

          BssHII          PstI                                BstNI
GAGAGAGTGCGCGCCCAGCCCTGCTGCAGACCCACCGCCTACGAGGACGAGGTGTCCTTC
361 ---------+---------+---------+---------+---------+---------+
CTCTCTCACGCGCGGGTCGGGACGACGTCTGGGTGGCGGATGCTCCTGCTCCACAGGAAG
E__R__V__R__A__Q__P__C__C__R__P__T__A__Y__E__D__E__V__S__F__

CTGGACGCCCACAGCAGATACCACACCGTGCACGAGCTGTCCGCCAGAGAATGCGCCTGC
421 ---------+---------+---------+---------+---------+---------+
GACCTGCGGGTGTCGTCTATGGTGTGGCACGTGCTCGACAGGCGGTCTCTTACGCGGACG
L__D__A__H__S__R__Y__H__T__V__H__E__L__S__A__R__E__C__A__C__

          XhoI
        HinfI         AscI
            SacI      BssHII  StuI
GTGTGATGACTCGAGCTCATGGCGCGCCTAGGCCTTGACGGCCTTCCGCCA
481 ---------+---------+---------+---------+---------+-
CACACTACTGAGCTCGAGTACCGCGCGGATCCGGAACTGCCGGAAGGCGGT
V__*__*__
```

도면8





서 열 목 록

SEQUENCE LISTING

<110> DeveloGen AG

<120> Novel pegylated variants of neurturin for pharmaceutical use

<130> 41112P EP

<160> 1

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 197

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220><221> PEPTIDE

<222> (1)..(197)

<223> human neurturin precursor

<400> 1

Met Gln Arg Trp Lys Ala Ala Ala Leu Ala Ser Val Leu Cys Ser Ser

1 5 10 15

Val Leu Ser Ile Trp Met Cys Arg Glu Gly Leu Leu Leu Ser His Arg

20 25 30

Leu Gly Pro Ala Leu Val Pro Leu His Arg Leu Pro Arg Thr Leu Asp

35 40 45

Ala Arg Ile Ala Arg Leu Ala Gln Tyr Arg Ala Leu Leu Gln Gly Ala

50 55 60

Pro Asp Ala Met Glu Leu Arg Glu Leu Thr Pro Trp Ala Gly Arg Pro

65 70 75 80

Pro Gly Pro Arg Arg Arg Ala Gly Pro Arg Arg Arg Arg Ala Arg Ala

85 90 95

Arg Leu Gly Ala Arg Pro Cys Gly Leu Arg Glu Leu Glu Val Arg Val

100 105 110

Ser Glu Leu Gly Leu Gly Tyr Ala Ser Asp Glu Thr Val Leu Phe Arg

115 120 125

Tyr Cys Ala Gly Ala Cys Glu Ala Ala Ala Arg Val Tyr Asp Leu Gly

130 135 140

Leu Arg Arg Leu Arg Gln Arg Arg Arg Leu Arg Arg Glu Arg Val Arg

145 150 155 160

Ala Gln Pro Cys Cys Arg Pro Thr Ala Tyr Glu Asp Glu Val Ser Phe

165 170 175

Leu Asp Ala His Ser Arg Tyr His Thr Val His Glu Leu Ser Ala Arg

180 185 190

Glu Cys Ala Cys Val

195