



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2020년08월12일
(11) 등록번호 10-2144139
(24) 등록일자 2020년08월06일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 14/805 (2006.01) A61K 35/14 (2015.01)
A61P 9/10 (2006.01)
- (21) 출원번호 10-2014-7030304
- (22) 출원일자(국제) 2013년03월15일
심사청구일자 2018년03월15일
- (85) 번역문제출일자 2014년10월29일
- (65) 공개번호 10-2015-0009533
- (43) 공개일자 2015년01월26일
- (86) 국제출원번호 PCT/US2013/032694
- (87) 국제공개번호 WO 2013/148375
국제공개일자 2013년10월03일
- (30) 우선권주장
61/617,639 2012년03월29일 미국(US)
- (56) 선행기술조사문헌
인용발명 : Biochemistry, Vol. 48,
pp11912-11919 (2009. 11. 9.)*
US8106011 A
US4529719 A
US4670417 A
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

- (73) 특허권자
선들러, 윌리엄
미국 87506 뉴멕시코주 산타페 이. 와일드플라워
드라이브 40
- (72) 발명자
반데그리프, 킴 디.
미국 92101 캘리포니아주 샌디에고 아파트먼트
409 포스 애비뉴 311
말라발리, 아쇼크
미국 92129 캘리포니아주 샌디에고 셔본 레인
7225
울슨, 스콧 디.
미국 92109 캘리포니아주 샌디에고 아파트먼트 6
터쿠아즈 스트리트 1099
- (74) 대리인
양영준, 김영

전체 청구항 수 : 총 15 항

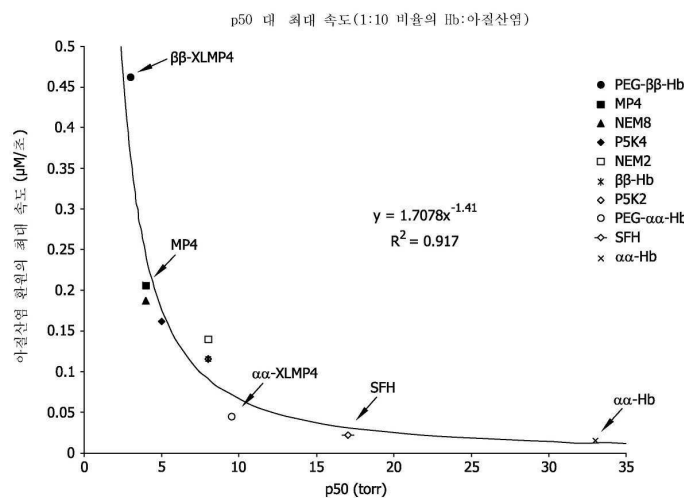
심사관 : 김경미

(54) 발명의 명칭 **다이아스피린 가교결합된 폐길화 헤모글로빈**

(57) 요약

산소, 일산화탄소, 일산화질소 또는 이들의 혼합물을 조직에 전달하여 다양한 질환 및 병증을 치료하기 위해, 아질산염 환원효소 활성이 증대된, 산소 친화도가 높은 폐길화 다이아스피린-가교결합된 헤모글로빈 접합체가 기재되어 있다.

대표도 - 도5



명세서

청구범위

청구항 1

37°C 및 pH 7.4에서 측정될 때 약 2 내지 5mmHg 범위의 P50을 갖는 β , β -분자내 가교결합된 폴리옥시알킬렌 옥사이드 헤모글로빈 사합체 접합체이며,

25°C에서 완전 탈산소화된 경우, 동일한 조건 하에 측정되는 탈산소화된 간질 비함유 헤모글로빈보다 적어도 10 배 큰 최대 아질산염 환원효소 활성을 나타내는 헤모글로빈 사합체 접합체.

청구항 2

제1항에 있어서, 25°C에서 완전 탈산소화된 경우에 최대 아질산염 환원효소 활성이 적어도 0.25 μ M/초인 헤모글로빈 사합체 접합체.

청구항 3

제2항에 있어서, 상기 최대 아질산염 환원효소 활성이 0.25 내지 약 0.50 μ M/초 범위인 헤모글로빈 사합체 접합체.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 헤모글로빈 사합체가 사합체당 평균 약 7개 내지 약 11개의 폴리알킬렌 옥사이드 분자에 접합된 것인 헤모글로빈 사합체 접합체.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 폴리알킬렌 옥사이드가 티올 반응성 모이어티를 통해 상기 헤모글로빈 분자 상의 노출된 아미노산 측쇄의 티올기에 공유 결합되는 한편 상기 헤모글로빈은 산소화 상태인 헤모글로빈 사합체 접합체.

청구항 6

제1항에 있어서, 상기 헤모글로빈 사합체가, 상기 헤모글로빈 사합체 분자의 2개의 β 82 라이신 잔기에서 가교결합된 비스(2,5-다이브로모살리실) 푸마레이트인 헤모글로빈 사합체 접합체.

청구항 7

제1항에 있어서, 콜로이드 삼투압이 적어도 75mmHg이고, P50이 약 2 내지 약 4mmHg인 헤모글로빈 사합체 접합체.

청구항 8

제1항에 있어서,

상기 폴리알킬렌 옥사이드가 평균 분자량이 약 2,000 내지 약 20,000달톤인 폴리에틸렌 글라이콜(PEG)이고,

상기 PEG가 말레이미드-PEG이며,

상기 말레이미드가 알킬렌 또는 페닐렌 링커를 통해 상기 PEG에 연결된 것인

헤모글로빈 사합체 접합체.

청구항 9

제8항에 있어서, 상기 알킬렌 링커가 에틸렌 링커인 헤모글로빈 사합체 접합체.

청구항 10

제8항에 있어서, 상기 말레이미드-PEG가 상기 헤모글로빈 사합체의 시스테인 잔기의 내재성 티올 모이어티, 상

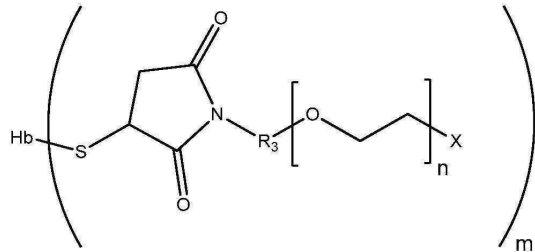
기 헤모글로빈 사합체의 티올화 라이신 잔기의 티올 모이어티 또는 이들의 조합으로부터 선택되는 헤모글로빈 사합체의 티올 모이어티에 접합된 것인 헤모글로빈 사합체 접합체.

청구항 11

제1항에 있어서, 상기 헤모글로빈 사합체의 β93 시스테인 잔기에 N-에틸 말레이미드가 접합된 것인 헤모글로빈 사합체 접합체.

청구항 12

제8항에 있어서, 상기 말레이미드-PEG가 하기 구조를 갖는 것인 헤모글로빈 사합체 접합체:



식 중,

Hb는 헤모글로빈 사합체이고,

S는 헤모글로빈 사합체의 티올이고,

R₃은 알킬렌 또는 페닐렌기이고,

X는 말단기이고,

m은 상기 헤모글로빈 사합체에 접합된 말레이미딜 활성화 PEG 중합체의 평균 수이며,

n은 평균 분자량이 약 2,000 내지 약 20,000달톤인 PEG의 옥시에틸렌 단위의 평균 수이다.

청구항 13

제12항에 있어서,

R₃이 에틸렌이고,

X가 메톡시 또는 카복시이고,

n이 약 3,000 내지 약 10,000달톤이며,

m이 약 7 내지 약 11인

헤모글로빈 사합체 접합체.

청구항 14

제1항 내지 제13항 중 어느 한 항의 β,β-분자내 가교결합된 폴리옥시알킬렌 옥사이드 헤모글로빈 사합체 접합체 및 약제학적으로 허용되는 담체를 포함하는 약제학적 조성물.

청구항 15

제14항에 있어서,

급성 간부전, 베타 지중해빈혈, 화상, 만성 중증 하지 허혈, 이산화탄소 또는 사이아나이드 중독, 만성 폐쇄성 폐 질환(COPD), 울혈성 심부전, 저산소증, 말라리아, 장기 허혈 (임의로, 급성 장 허혈(비틀림), 급성 장 허혈(색전증), 심인성 쇼크, 급성 혈관 장기 허혈, 뇌졸중, 심근 경색 또는 중증 심장 허혈 포함), 말초 혈관 질환, 포르피린증, 임신중독증, 패혈증, 겸상 적혈구 질환, 망막 질환, 안내 병증, 고환 염전, 외상, 쇼크, 외상성 뇌

손상, 폐양, 혈관경련 또는 이들의 조합의 치료에 사용하기 위한 것이거나,

비외상성 출혈성 쇼크, 입원전 환경 외상, 외상성 출혈성 쇼크, 급성 폐 손상, 성인 호흡 곤란 증후군, 외상성 뇌 손상, 뇌졸중, 고형 종양 압, 장기 기능저하(생체외), 장기 기능저하(수혜자에서), 중증 패혈증, 패혈성 쇼크, 심근 경색, 심장 허혈, 심인성 쇼크, 급성 심부전, 폐 색전증 또는 이들의 조합의 치료에 사용하기 위한 것이거나,

혈관성형술에 대한 보조제로서, 성형 수술에 대한 보조제로서 또는 심실 보조 장치 이식 시 보조제로서; 대용 혈액, 심장보호제, 냉동보존제, 혈액투석 보조제, 종양 물질, 장기 보존제, 성능 증대제, 수술 보조제 또는 상처 치유제로서; 조영에서; 폐 기능을 개선하기 위해; 또는 이들의 조합으로서 사용하기 위한 것이거나,

손상으로 인한 혈액 손실, 용혈성 빈혈, 감염성 빈혈, 박테리아 감염, IV 인자 단편화, 비대증 및 비종대, 가금류에서의 출혈 증후군, 저형성 빈혈, 재생불량성 빈혈, 특발성 면역 용혈성 병증, 철 결핍증, 동종면역 용혈성 빈혈, 미세혈관병 용혈성 빈혈, 기생 또는 수술-마취 유발 뇌 손상의 수의학적 치료를 위한 것인

약제학적 조성물.

청구항 16

삭제

청구항 17

삭제

청구항 18

삭제

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
- 청구항 42
- 삭제

청구항 43

삭제

청구항 44

삭제

청구항 45

삭제

청구항 46

삭제

청구항 47

삭제

청구항 48

삭제

청구항 49

삭제

청구항 50

삭제

청구항 51

삭제

청구항 52

삭제

청구항 53

삭제

청구항 54

삭제

청구항 55

삭제

청구항 56

삭제

청구항 57

삭제

청구항 58

삭제

청구항 59

삭제

청구항 60

삭제

청구항 61

삭제

청구항 62

삭제

청구항 63

삭제

청구항 64

삭제

청구항 65

삭제

청구항 66

삭제

청구항 67

삭제

청구항 68

삭제

청구항 69

삭제

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 일반적으로 네이티브 헤모글로빈과 비교하여 미소혈관계에서 증대 속도로 일산화질소로 아질산염을 환원시키기 위한 가교결합된 폐길화 헤모글로빈 및 헤모글로빈 조성물에 관한 것이다. 구체적으로, 본 발명은 산소, 일산화탄소, 일산화질소 또는 이들의 혼합물을 조직에 또한 전달할 수 있는 아질산염 환원효소 활성이 증대된 고 산소 친화도의 분자내 가교결합된 폐길화 헤모글로빈 접합체를 사용하는 것에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 헤모글로빈 기반 산소 캐리어(hemoglobin-based oxygen carrier: "HBOC")는 헴(heme)에 의한 일산화질소(NO) 소거에 기여하는 혈관수축과 오랫동안 관련되어 왔다. 산소 치료제(때때로 "산소 운반 혈장 증량제"라 칭함), 예컨대 안정화 헤모글로빈(Hb)으로서 유용한 산소 캐리어는 일산화질소를 소거하여 혈관수축 및 고혈압을 야기하므로 제한된 효과를 갖는 것으로 나타났다. 혈관수축을 야기하는 이 산소 운반 용액의 성향은 동물 및 사람에게서 고혈압으로 나타날 수 있다. HBOC의 혈관수축 효과에 기초한 기전이 잘 알려져 있지 않지만, 헴철이 강력한 혈관확장제인 내생 NO와 신속히 비가역적으로 조합되어 혈관수축을 야기할 수 있다는 것이 제시되었다.

- [0003] 부분적으로 이 혈관수축 효과 때문에, 현재까지 산소 캐리어는 산소 치료제(oxygen therapeutic agent: OTA)로서 전적으로 성공적이지 않지만, 변형 세포 비함유 Hb를 포함하는 제품이 가장 유망하다. 미국 국방부가 모델 대용 적혈구로서 비스-다이브로모살리실-퓨마레이트를 갖는 α 사슬 사이에 가교결합된 인간 Hb($\alpha\alpha$ Hb)를 개발 하였지만, 심각한 폐 및 전신 혈관 저항 증가를 나타낸 후 이를 포기하였다(Hess, J. et al., 1991, Blood 78:356A). 이 제품의 상업적 버전은 실망스러운 III상 임상 실험 후 또한 포기되었다(Winslow, R. M., 2000, Vox Sang 79:1-20).
- [0004] Hb의 NO 결합 활성을 극복하도록 시도하는 데 있어서 2가지 분자 접근법이 제기되었다. 제1 접근법은 NO 결합 친화도가 감소한 재조합 헤모글로빈을 생성하고자 하는 시도로 원위 헴 포켓의 자리 지정 돌연변이유발을 이용 하였다(Eich, R.F. et al., 1996, Biochem. 35:6976-83). 제2 접근법은 화학 변형 접근법을 이용하였고, 여기서 혈관 공간으로부터 간질 공간으로의 Hb의 유출을 감소시키거나 가능하게는 완전히 억제하고자 하는 시도로 올리고머화를 통해 Hb의 크기가 증대되었다(Hess, J.R. et al., 1978, J. Appl. Physiol. 74:1769-78; Muldoon, S.M. et al., 1996, J. Lab. Clin. Med. 128:579-83; Macdonald, V.W. et al., 1994, Biotechnology 22:565-75; Furchgott, R., 1984, Ann. Rev. Pharmacol. 24:175-97; 및 Kilbourne, R. et al., 1994, Biochem. Biophys. Res. Commun. 199:155-62).
- [0005] 사실, 상부-하중(top-load) 래트 실험에서 덜 혈압 상승시키는 NO에 대한 회합 결합 속도가 감소한 재조합 Hb가 제조되었다(Doherty, D.H. et al. 1998, Nature Biotechnology 16:672-676 및 Lemon, D.D. et al. 1996, Biotech 24:378). 그러나, 연구는 NO 결합이 Hb의 혈관활성에 대한 유일한 설명이지 않을 수 있다고 제시한다. 특정한 큰 Hb 분자, 예컨대 폴리에틸렌 글라이콜(PEG)에 의해 변형된 것은 이의 NO 회합 속도가 심각하게 혈압 상승시키는 $\alpha\alpha$ Hb와 동일하더라도 실질적으로 혈관수축이 없다는 것이 발견되었다(Rohlfes, R.J. et al. 1998, J Biol. Chem. 273:12128-12134). 더욱이, PEG-Hb가 출혈 전에 교환 수혈로서 제공될 때 출혈의 결과를 방지하는 데 이례적으로 효과적인 것으로 발견되었다(Winslow, R.M. et al. 1998, J. Appl. Physiol. 85:993-1003).
- [0006] Hb에 대한 PEG의 접합은 이의 항원성을 감소시키고 이의 순환 반감기를 연장한다. 그러나, PEG 접합 반응은 $\alpha\beta$ 이합체 아단위로의 Hb 사합체의 해리를 발생시켜 40,000달톤("Da") 미만의 Hb 단량체 단위의 PEG-접합체를 투여받은 교환 수혈된 래트에서 그로스 헤모글로빈뇨증을 발생시키는 것으로 보고되었다(Iwashita and Ajisaka Organ-Directed Toxicity: Chem. Indicies Mech., Proc. Symp., Brown et al. 1981, Eds. Pergamon, Oxford, England pgs 97-101). 엔존, 인크.(Enzon, Inc.(미국 특허 제5,650,388호)는 α 및 ϵ -아미노기에서 Hb에 연결된 약 10개의 카피의 PEG-5,000 사슬을 보유하는 분자량이 84,000달톤 초과인 폴리알킬렌 옥사이드("PAO") 접합 Hb를 제조하였다. 이 치환도는 포유동물에서 헤모글로빈뇨증과 관련된 임상적으로 유의적인 신독성을 회피하는 것으로 기재되어 있다. 그러나, 접합 반응은 이질성 접합체 집단을 발생시키고 칼럼 크로마토그래피에 의해 제거되어야 하는 다른 원치 않는 반응물을 포함한다.
- [0007] 생물분자의 표면에서 활성화 PEG 모이어티와 작용기의 반응을 통해 PEG 접합을 통상적으로 수행한다. 가장 흔한 작용기는 라이신의 아미노기, 히스티딘 잔기의 이미다졸기 및 단백질의 N-말단; 시스테인 잔기의 티올기; 및 세린, 트레오닌 및 티로신 잔기의 히드록실기 및 단백질의 C-말단이다. 히드록실 말단을 온화한 수성 환경에서 이 작용기와 반응할 수 있는 반응성 모이어티로 전환함으로써 PEG는 보통 활성화된다. 치료학적 생물의약품의 접합에 사용되는 가장 흔한 1작용성 PEG 중 하나는 오직 1개의 작용기(즉, 히드록실)를 가져, 2작용성 PEG와 관련된 가교결합 및 응집 문제를 최소화하는 메톡시-PEG("mPEG-OH")이다. 그러나, mPEG-OH는 대개 고분자량 2작용성 PEG(즉, "PEG 다이올")로 오염되고, 이는 이의 제조 공정으로 인해 10% 내지 15% 범위만큼 높을 수 있다(Dust J.M. et al. 1990, Macromolecule 23:3742-3746). 이 2작용성 PEG 다이올은 바람직한 1작용성 PEG의 크기의 거의 2배이다. 오염 문제점은 PEG의 분자량이 증가하면서 더 악화된다. mPEG-OH의 순도는 PEG화 생물치료제의 제조에 특히 중요한데, 왜냐하면 FDA가 높은 수준의 제조 공정의 재현성 및 최종 약물 제품의 품질을 요구하기 때문이다.
- [0008] 산소화 상태 및 탈산소화 상태 둘 다에서 PAO에 대한 Hb의 접합을 수행한다. 미국 특허 제6,844,317호는 생성된 PEG-Hb 접합체의 산소 친화도를 증대시키기 위해 접합 전에 Hb를 대기와 평형시킴으로써 산소화 또는 "R" 상태에서의 Hb를 접합하는 것을 기술한다. 다른 특허는 산소 친화도를 감소시키고 구조 안정성을 증가시켜 Hb가 화학 변형의 물리적 응력, 정용여과 및/또는 무균 여과 및 저온살균을 견디도록 하게 하는 접합 전의 탈산소화 단계를 기술한다(미국 특허 제5,234,903호). Hb의 분자내 가교결합을 위해, 변형 전에 Hb를 탈산소화하는 것은 α 사슬의 99번 라이신을 가교결합 시약에 노출시키는 것을 요할 수 있는 것으로 제시되었다(미국 특허 제 5,234,903호).

[0009] 아카르야(Acharya) 등(미국 특허 제7,501,499호)은 PEG와의 접합 전의 2-이미노티올란에 의한 Hb 티올화의 동력학을 조사하였다. 10배(사합체당 평균 5개의 외재성 티올을 도입함)로부터 30배로 이미노티올란의 농도를 증가시키는 것은 Hb에서 외재성 티올의 수를 거의 2배로 만드는 것으로 관찰되었다. 그러나, 티올 수의 2배에도 불구하고 PEG 접합이 오직 미미한 후 크기 증대가 관찰되었다. 이는 20배 물 초과인 말레이미딜 PEG-5000의 존재 하의 접합 반응이 덜 반응성인 티올을 갖는 Hb의 표면을 덮어, 더 반응성인 티올을 갖는 Hb의 추가의 변형을 견디는 입체 장애를 발생시킨다는 것을 제시한다. 결과적으로, 변형된 Hb의 원하는 접합도(즉, Hb 분자마다 6±1개의 PEG)를 성취하기 위해, 아카르야 등은 Hb를 8 내지 15배 물 초과인 이미노티올란으로 티올화하고 이후 티올화된 Hb를 16-30배 물 초과인 말레이미딜 PEG-5000과 반응시켰다. 그러나, 대규모 제조에서의 이 높은 물 초과 반응물 농도는 HBOC를 제조하는 비용을 유의적으로 증가시키고 최종 생성물의 이질성을 증가시킨다. 더욱이, 이러한 높은 물 초과인 말레이미딜 PEG-5000은 또한 더 많은 수의 원치않는 부산물의 생성과 함께 더 이질적인 생성물을 생성시킨다.

[0010] 선행 연구에서, 표면 개질된 헤모글로빈의 분자 크기가 신장에 의해 청소되는 것을 피하고 원하는 순환 반감기를 성취하도록 충분히 커야 한다는 것이 관찰되었다. 블루멘스테인, 제이.(Blumenstein, J.) 등은 84,000달톤("Da") 이상의 분자량에서 이것이 성취된다고 결론지었다("Blood Substitutes and Plasma Expanders," Alan R. Liss, editors, New York, N.Y., pages 205-212 (1978)). 이 연구에서, 저자는 다양한 분자량의 텍스트란을 Hb에 접합하였다. 저자는 Hb(64,000Da의 분자량을 가짐) 및 텍스트란(20,000Da의 분자량을 가짐)의 접합체가 "순환으로부터 무시할만하게 신장을 통해 천천히 청소된다"고 보고하였다. 추가로, 84,000Da 초과인 분자량 증가가 이 청소를 곡선을 유의적으로 변경시키지 않는 것으로 관찰되었다. 분자내 가교결합은 사합체 헤모글로빈 단위의 아단위와 함께 화학적으로 결합하여 신장에 의해 조기 배설되는 이합체의 형성을 방지한다. (예를 들면, 미국 특허 제5,296,465호 참조).

[0011] 아질산염은 옥시헤모글로빈과 반응하여 메트헤모글로빈을 형성하고 데옥시헤모글로빈과 반응하여 메트헤모글로빈 및 일산화질소를 형성한다. 아질산염의 혈관확장 효과는 헤모글로빈의 존재 하에 전통적인 NO 도너와 다르고, 헤모글로빈의 아질산염 환원효소 활성에 의해 부분적으로 설명될 수 있다. 문헌[Crawford *et al.* 2006 Blood 107:566-574; Huang *et al.* 2005 J Biol Chem 280:31126-31131; Huang *et al.* 2005 J Clin Invest 115:2099-2107]을 참조한다. 연구는 아질산염이 데옥시 헴과 헤모글로빈 사합체의 반응을 통해서만 NO로 전환되고(Cosby, K. *et al.* 2003, Nat. Med. 9:1498), 추가로 단백질 헴이 이완된 또는 R 상태 입체구성에 있을 때 아질산염의 더 신속한 환원이 발생한다는 것을 나타낸다. 헤모글로빈의 이 아질산염 환원효소 활성이 다른자리입체성 제어 하에 있고 탈산소화된 헴이 R 상태 입체구성에 있을 때 최대 속도로 NO를 생성한다고 생각된다. 예를 들면, β Cys93 자리에서의 변형을 통해 R 상태 안정화 효과가 발생할 수 있고, 예컨대 말레이미딜 PEG 접합은 아질산염 환원효소 활성을 증가시킨다. 추가로, 세포 비함유 Hb가 혈관수축을 발생시키고 관류를 감소시키는 반면, MalPEG-Hb는 혈액 흐름 및 미세혈관 관류 압력을 유지시키는(혈관수축의 기여와 관련되는 것으로 생각됨) 것으로 나타났다(Tsai, A. G. *et al.* 2006, Blood 108:3603). 다른 연구는 또한 PEG의 다수의 사슬을 갖는 세포 비함유 헤모글로빈 유도체의 변형이 혈관활성을 억제할 수 있다는 것을 제시한다. 5개 내지 6개의 PEG 사슬을 갖는 R 상태 안정화된 Hb를 이용한 실험은 네이티브 Hb와 비교하여 10배 더 신속한 아질산염 환원효소 활성을 입증하였다(Lui, F. E. *et al.* 2008, Biochemistry 47(40), 10773-10780). 그러나, 접근 가능한 라이신 잔기에서의 임의의 추가의 PEG 접합이 아질산염 환원효소 활성 증가에 기여하지 않는다고 결론지어졌다.

[0012] 결과적으로, 산소, 일산화탄소, 일산화질소 또는 이들의 혼합물을 조직에 전달하고 기존의 Hb와 비교하여 아질산염 환원효소 특성이 증가한 높은 산소 친화도 헤모글로빈을 사용하여 미소혈관계에서 증대 속도로 아질산염을 일산화질소로 환원시키는 방법에 대한 수요가 존재한다.

발명의 내용

[0013] 일 양태에서, 본 발명은 37°C 및 pH 7.4에서 측정된 때에 약 2 내지 5mmHg 범위의 P50을 갖는 β, β-분자내 가교결합된 폴리옥시알킬렌 옥사이드(PAO) 헤모글로빈 접합체에 관한 것이다. 헤모글로빈 접합체는, 25°C에서 완전 탈산소화된 경우, 동일한 조건 하에 측정된 때에 탈산소화된 간질 비함유 헤모글로빈보다 적어도 10배 큰 최대 아질산염 환원효소 활성을 나타낸다.

[0014] 본 발명의 다른 양태는 37°C 및 pH 7.4에서 측정된 때에 약 2.0 내지 5.0mmHg 범위의 P50을 갖는 β, β-분자내 가교결합된 PAO 헤모글로빈 접합체로서, 헤모글로빈 접합체가 25°C에서 완전 탈산소화된 경우 적어도 0.25 μM/초의 최대 아질산염 환원효소 활성을 나타내는 것인 헤모글로빈 접합체에 관한 것이다.

- [0015] 본 발명의 또 다른 양태는 β, β -분자내 가교결합된 폴리옥시알킬렌 옥사이드 헤모글로빈 접합체 및 억제학적으로 허용되는 담체를 포함하는 억제학적 조성물에 관한 것이다. 상기 조성물은 급성 간부전, 베타 지중해빈혈, 화상, 만성 중증 하지 허혈, 이산화탄소 또는 사이아나이드 중독, 만성 폐쇄성 폐 질환(COPD), 울혈성 심부전, 저산소증, 말라리아, 장기 허혈, 말초 혈관 질환, 포르피린증, 임신중독증, 패혈증, 겸상 적혈구 질환, 망막 질환, 안내 병증, 고환염전, 외상, 쇼크, 외상성 뇌 손상, 췌양, 혈관경련 또는 이들의 조합의 치료를 위해 사용될 수 있다. 상기 조성물은 또한 혈관성형술에 대한 보조제로서, 성형 수술에 대한 보조제로서 또는 심실 보조 장치의 이식 시 보조제로서; 대용 혈액, 심장보호제, 냉동보존제, 혈액투석 보조제, 종양 물질, 장기 보존제, 성능 증대제, 수술 보조제 또는 상처 치유제로서; 조영에서; 폐 기능을 개선하기 위해; 또는 이들의 조합으로 사용될 수 있다. 상기 조성물은 또한 손상으로 인한 혈액 손실, 용혈성 빈혈, 감염성 빈혈, 박테리아 감염, IV 인자 단편화, 비대증(hypersplenation) 및 비종대(splenomegaly), 가금류에서의 출혈 증후군, 저형성 빈혈, 재생불량성 빈혈, 특발성 면역 용혈성 병증, 철 결핍증, 동중면역 용혈성 빈혈, 미세혈관병 용혈성 빈혈, 기생 또는 수술-마취 유발 뇌 손상 또는 이들의 조합의 수의학적 치료를 위한 것일 수 있다.
- [0016] 본 발명의 또 다른 양태는 이러한 헤모글로빈 접합체 또는 억제학적 조성물을 이를 필요로 하는 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는 치료 방법에 관한 것이다. 상기 방법은 상기 기재된 임의의 하나 이상의 병증의 치료를 위한 것이다.
- [0017] 본 발명의 다른 양태는 산소, 일산화질소, 일산화탄소 또는 이들의 혼합물을 조직에 전달하고 미소혈관계에서 아질산염을 일산화질소(NO)로 환원시키는 방법에 관한 것이다. 상기 방법은 β, β -분자내 가교결합된 폴리옥시알킬렌 옥사이드 헤모글로빈 접합체 또는 억제학적 조성물을 이를 필요로 하는 대상체에게 투여하는 단계를 포함하고, 투여 후, 헤모글로빈은 비리간드화되고 미소혈관계에서 아질산염을 일산화질소로 전환시킨다.
- [0018] 본 발명의 다른 양태는 상기 기재된 β, β -분자내 가교결합된 폴리옥시알킬렌 옥사이드 헤모글로빈 접합체를 제조하는 방법에 관한 것이다. 상기 방법은 β, β -분자내 가교결합된 헤모글로빈을 수성 희석제 중에 2-이미노티올란(2-IT)과 혼합하여 티올화 헤모글로빈을 형성하는 단계; 및 PAO를 수성 희석제 중에 티올화 헤모글로빈에 첨가하여 β, β -분자내 가교결합된 폴리옥시알킬렌 옥사이드 헤모글로빈 접합체를 형성하는 단계를 포함한다.
- [0019] 다른 목적 및 특징은 부분적으로 명확하고 부분적으로 이하 기재되어 있다.

도면의 간단한 설명

- [0020] 도 1은, $\beta \beta$ -Hb의 DBBF 가교결합의 확인을 입증하는, 비해리 조건(PBS)에서 각각 간질 유리 Hb(SFH)(- - -) 및 $\beta \beta$ -Hb(---)의 크기 배제 크로마토그램;
 - 도 2는, $\beta \beta$ -Hb의 DBBF 가교결합의 확인을 입증하는, 해리 조건(PBS)에서 각각 간질 유리 Hb(SFH)(- - -) 및 $\beta \beta$ -Hb(---)의 크기 배제 크로마토그램;
 - 도 3은 각각 (SFH)(- - -) 및 $\beta \beta$ -Hb(---)인 β -아단위의 DBBF 가교결합의 확인을 나타내는 역상 고성능 액체 크로마토그램;
 - 도 4는 PEG- $\beta \beta$ -Hb의 PEG화를 나타내는 비해리 조건에서 각각 PEG- $\beta \beta$ -Hb(- - -) 및 $\beta \beta$ -Hb(---)의 크기 배제 크로마토그램;
 - 도 5는 다양한 헤모글로빈의 아질산염 환원 특성의 그래프 묘사도.
- 상응하는 참조 부호는 도면에 걸쳐 상응하는 부분을 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0021] 종래의 헤모글로빈 치료제와 비교하여 치료학적 특성이 증대된, 높은 산소 친화도의 β, β -분자내 가교결합된 폴리옥시알킬렌 옥사이드 헤모글로빈 접합체가 발견되었다. 이 헤모글로빈 접합체는, 탈산소화될 때, 동일한 조건 하에 측정될 때 탈산소화된 간질 비함유 헤모글로빈보다 적어도 10배 큰 최대 아질산염 환원효소 활성을 나타낸다. 헤모글로빈 접합체는 완전 탈산소화된 상태에서 25°C에서 적어도 0.25 μ M/초의 최대 아질산염 환원효소 활성을 갖는다. 헤모글로빈은 산소, 일산화탄소 또는 일산화질소를 대상체에 전달하도록 리간드 형태로 전달될 수 있고, 또한 비리간드되던 미소혈관계에서 아질산염을 일산화질소로 전환시킨다.
- [0022] 임의의 특정한 이론에 구속됨이 없이, 산소화된, R 상태 입체구성의 헤모글로빈을 가교결합함으로써, 해리 불가능한 사합체에서의 탈산소화된 헴이 이 데옥시 헴에서 아질산염의 환원을 증대시키는 비가역성 R 상태로 잠기는

것으로 생각된다. 본 발명의 헤모글로빈 접합체의 예상치 못하게 훨씬 더 큰 아질산염 환원효소 활성은 헴 포켓을 탈출시키고 Hb로부터 조직으로 방출되는 더 많은 NO를 생성하여, 다른 헤모글로빈 치료제와 비교하여 더 높은 혈관확장 효과를 발생시킨다. 이는 고 친화도의, R 상태 구조의 가교결합이 헴 포켓 내에 아질산염의 환원을 증대시키는 특성을 촉진하기 때문에 발생하는 것으로 생각된다. 가교결합 없이, T 및 R 상태 헴 입체구성 구조 사이를 교대시키는, 더 많은 헤모글로빈 다른자리입체성 입체구성 변화가 존재한다. 가교결합된 완전 안정화된 R 상태 구조는, 사합체 내의 탈산소화된 헴 포켓 내에서도, 헴 포켓 내에 NO로의 아질산염 환원을 증대시키는 것으로 생각된다.

- [0023] 본 발명은 37°C 및 pH 7.4에서 측정된 때에 약 2 내지 5mmHg 범위의 P50을 갖는 β, β -분자내 가교결합된 폴리옥시알킬렌 옥사이드(PAO) 헤모글로빈 접합체에 관한 것이다. 헤모글로빈 접합체는, 25°C에서 완전 탈산소화된 경우, 동일한 조건 하에 측정된 때에 탈산소화된 간질 비함유 헤모글로빈보다 적어도 10배 큰 최대 아질산염 환원효소 활성을 나타낸다.
- [0024] 헤모글로빈 접합체는, 25°C에서 완전 탈산소화된 경우, 동일한 조건 하에 측정된 때에 탈산소화된 간질 비함유 헤모글로빈보다 적어도 15배 또는 적어도 20배 큰 최대 아질산염 환원효소 활성을 나타낼 수 있다. 바람직하게는, 헤모글로빈 접합체는, 25°C에서 완전 탈산소화된 경우, 동일한 조건 하에 측정된 때에 탈산소화된 간질 비함유 헤모글로빈보다 10배 내지 약 25배 큰, 더 바람직하게는 동일한 조건 하에 측정될 때 탈산소화된 간질 비함유 헤모글로빈보다 약 15배 내지 약 25배 큰, 10배 내지 약 21배 큰 또는 약 15배 내지 약 21배 큰 최대 아질산염 환원효소 활성을 나타낸다.
- [0025] 본 발명의 β, β -분자내 가교결합된 PAO 헤모글로빈 접합체는 37°C 및 pH 7.4에서 측정된 때에 약 2.0 내지 5.0mmHg 범위의 P50 및 25°C에서 완전 탈산소화된 경우 적어도 0.25 μ M/초의 최대 아질산염 환원효소 활성을 가질 수 있다. 바람직하게는, 헤모글로빈 접합체의 최대 아질산염 환원효소 활성은 25°C에서 완전 탈산소화된 경우 적어도 0.30 μ M/초, 더 바람직하게는 0.35, 0.40 또는 0.45 μ M/초이다. 헤모글로빈 접합체의 최대 아질산염 환원효소 활성은 0.25 내지 약 0.50 μ M/초 또는 약 0.30 내지 약 0.47 μ M/초 범위일 수 있다.
- [0026] 본 발명에서 다양한 Hb를 사용할 수 있다. Hb를 동물 공급원, 예컨대 인간, 소, 돼지 또는 말 헤모글로빈으로부터 얻을 수 있다. 인간 Hb가 바람직하다. Hb를 천연 공급원으로부터 얻거나 공지된 재조합 방법에 의해 제조할 수 있다.
- [0027] 본 발명의 헤모글로빈 접합체는 간질 비함유 헤모글로빈보다 큰 산소 친화도가 높다. 이는 헤모글로빈이 37°C 및 pH 7.4에서 측정된 때에 15mmHg 미만, 바람직하게는 약 2 내지 약 5mmHg, 가장 바람직하게는 약 2 내지 약 4mmHg 또는 3mmHg의 P50을 갖는다는 것을 의미한다.
- [0028] 헤모글로빈 접합체는 적어도 약 50mmHg, 바람직하게는 적어도 약 60, 65, 70 또는 75mmHg의 콜로이드 삼투압(COP)을 가질 수 있다.
- [0029] 헤모글로빈은 β, β -분자내 가교결합되어 이합체로의 해리를 방지하고 신장에 의해 청소되는 것을 피하고, 순환 반감기를 연장시킨다. 헤모글로빈 분자의 2개의 β 82 라이신 잔기를 가교결합하기 위해 비스(2,5-다이브로모살리실) 퓨마레이트(DBBF) 가교결합제를 사용한다. 문헌[Walder et al, Biochemistry, 1979; 18(20): 4265-70]에 기재된 방법과 같은 DBBF 가교결합의 임의의 공지된 방법을 이용할 수 있다.
- [0030] 본 발명의 헤모글로빈의 접합에 사용되는 폴리에틸렌 옥사이드는 폴리에틸렌 옥사이드, 폴리프로필렌 옥사이드 및 폴리에틸렌/폴리프로필렌 옥사이드 공중합체를 포함하지만, 이들로 제한되지는 않는다. PAO는 분자량이 약 2,000 내지 약 20,000달톤, 바람직하게는 약 3,000 내지 약 10,000달톤, 더 바람직하게는 4,000 내지 약 6,000 달톤, 가장 바람직하게는 약 5,000달톤이다. Hb의 표면을 개질하기 위해 현재 사용되는 가장 흔한 PAO는 이의 약제학적 허용성 및 상업적 이용성으로 인해 PEG이다. PEG는 Hb에 접합된 PEG 분자의 수 및 크기에 기초하여 원하는 분자량을 성취하기 위해 분자 내에 에틸렌 옥사이드(즉, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}-$)의 반복 아단위의 수에 기초하여 다양한 분자량으로 이용 가능하다.
- [0031] 헤모글로빈을 헤모글로빈 사합체당 평균 약 7개 내지 약 11개의 PAO 분자로 접합할 수 있다. 바람직하게는, 헤모글로빈을 사합체당 평균 약 9개 내지 약 10개의 PAO 분자에 접합한다.
- [0032] PAO 중합체의 말단 기 중 하나 또는 둘 다를 반응성 작용기로 전환시킨다("활성화"). 예를 들면, PEG-OH는 PEG-할라이드, 메실레이트 또는 토실레이트를 제조하기 위해 사용되고, 이들은 이후 수성 암모니아(Zalipsky, S. et al., 1983, Eur. Polym. J. 19:1177-1183), 나트륨 아지드 또는 칼륨 프탈이미드에 의한 친핵 치환 반응을 수

행함으로써 PEG-아민("PEG-NH₂")으로 전환된다. 이후, 활성화 PEG를 PEG 아민기("-NH₂")와 헵 단백질의 카복실기("-COOH")와의 상호작용을 통해 헵 단백질에 접합할 수 있다.

[0033] PEG를 아민기로 작용기화하고 이를 말레이미드기로 전환하는 것 이외에, 이에 의해 활성화된 PEG는 당해 분야에서 사용되는 것으로 공지되어 있다. 예를 들면, PEG를 몇몇 열거하자면 p-나이트로페닐 카보네이트, 알데히드, 아미노프로필, 아미노에틸, 티올, 아미녹시, 히드라지드 및 요오도아세트아마이드로 활성화할 수 있다. 이러한 작용성 PEG를 공지된 방법을 이용하여 단백질의 표면 아미노산 측쇄에 접합할 수 있다.

[0034] PEG-NH₂를 카복실 이외의 기에 접합시키도록 추가로 작용기화할 수 있다. 예를 들면, 미국 특허 제6,828,401호는 mPEG-말레이미드를 형성시키기 위한 PEG-NH₂와 말레이미드의 반응을 개시한다. 이 반응에서, mPEG-OH를 유기 용매(다이클로로메탄)의 존재 하에 토실화 시약(p-톨루엔설폰일 클로라이드) 및 염기 촉매(트라이에틸렌아민)와 반응시켜 mPEG-토실레이트를 제조한다. 이후, mPEG-토실레이트를 N,N-다이메틸아세트아마이드("DMAc")와 N-사이클로헥실피롤리딘("CHP")의 유기 용매 혼합물 중에 28% 암모니아 물 및 말레산 무수물과 반응시켜 말레아민화합물을 제조한다. 이후, 이 화합물을 다이클로로메탄의 존재 하에 펜타플루오로페닐트라이플루오로아세테이트와 반응시켜 mPEG-말레이미드를 제조한다.

[0035] 대안적으로, 유기 용매(다이클로로메탄)의 존재 하에 mPEG-OH를 토실화 시약(p-톨루엔설폰일 클로라이드) 및 염기 촉매(트라이에틸렌아민)와 반응시켜 mPEG-토실레이트를 제조함으로써 mPEG-말레이미드를 만들 수 있다. 이후, mPEG-토실레이트를 28% 암모니아와 반응시켜 mPEG-NH₂를 제조한다. 이후, mPEG-NH₂를 포화 중탄산나트륨(NaHCO₃)의 존재 하에 N-메톡시 카보닐 말레이미드(MCM)와 반응시켜 mPEG-말레이미드를 제조한다.

[0036] PAO에 대한 접합을 위해 아민 반응성 화학을 이용하여 변형될 수 있는 인간 Hb의 아미노산 잔기 측쇄의 비제한적인 예가 하기 표 1에 제시되어 있다:

표 1

아민 반응성 화학 및 변형의 잠재적 자리

α-사슬		
잔기	위치	하기와 반응
Lys	7, 11, 16, 40, 56, 60, 61, 90, 99, 127 및 139	숙신이미드; NPC(p-나이트로페닐 카보네이트); 아이소시아아네이트; 알데하이드; 아이소티오시아아네이트; 에폭사이드.
His	20, 45, 50, 58, 72, 87, 112 및 122	숙신이미드; NPC(p-나이트로페닐 카보네이트); 아이소시아아네이트; 알데하이드; 아이소티오시아아네이트; 에폭사이드.
Val	1	숙신이미드; NPC(p-나이트로페닐 카보네이트); 아이소시아아네이트; 알데하이드; 아이소티오시아아네이트; 에폭사이드.
β-사슬		
잔기	위치	하기와 반응
Lys	8, 17, 59, 61, 65, 66, 82, 95, 120, 132 및 144	숙신이미드; NPC(p-나이트로페닐 카보네이트); 아이소시아아네이트; 알데하이드; 아이소티오시아아네이트; 에폭사이드.
His	2, 63, 77, 92, 97, 116, 117, 143 및 146	숙신이미드; NPC(p-나이트로페닐 카보네이트); 아이소시아아네이트; 알데하이드; 아이소티오시아아네이트; 에폭사이드.
Val	1	숙신이미드; NPC(p-나이트로페닐 카보네이트); 아이소시아아네이트; 알데하이드; 아이소티오시아아네이트; 에폭사이드.

[0037]

[0038] Hb에서 이용 가능한 접합 자리의 수를 증가시키는 하나의 방법은 설프하이드릴기를 도입하는 것(티올화로도 공지됨)이고, 이 기는 유리 아민보다 MalPEG와 더 반응성인 경향이 있다. 단백질 티올화에 대한 다양한 방법이 공지되어 있다. 일 방법에서, 단백질 유리 아민을 숙신이미드 3-(2-피리딘다이티오) 프로피오네이트와 반응시킨 후 다이티오프로판("DTT") 또는 트라이스(2-카복시에틸)포스핀("TCEP")으로 환원시킨다. 이 반응은 티올화도를 결정하기 위해 사용될 수 있는 2-피리딘티온 발색단을 방출한다. 아민은 거의 중성 pH에서 숙신이미드아세틸 티오아세테이트, 이어서 50mM 히드록실아민 또는 히드라진과의 반응에 의해 간접적으로 또한 티올화될 수 있다.

[0039] 미국 특허 제5,585,484호에 기재된 다른 방법은 접합 후 Hb의 아미노(α- 또는 ε-)기의 양전하를 유지시킨다. 이 방법은 단백질에 설프하이드릴기를 도입하기 위해 2-IT에 의한 Hb의 ε-아미노기의 아민화도를 포함한다. 이 접근법은 이전에 사용된 숙신이미드 화학물질에 비해 적어도 2가지 추가의 이점을 갖는다: 1) 말레이미드기와 설프하이드릴기의 높은 반응성 및 선택도는 제한된 초과 시약으로 티올의 거의 정량적 변형을 수월하게 하고,

2) 2-IT의 티올기는 잠재적이고 시약과 단백질 아미노기의 반응의 결과로서 오직 인 시츄 생성된다. 이 이점은 하나의 추가의 이익을 제공하고; 이들은 표면 장식을 위해 Hb와 티올화 및 PEG화 시약 둘 다의 동시 향온처리를 허용한다.

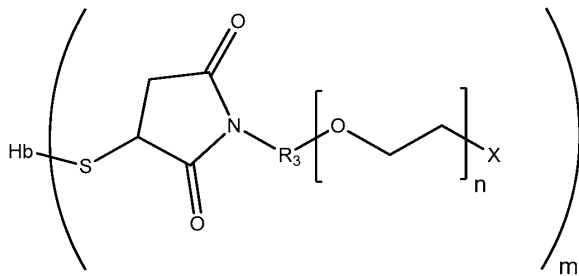
[0040] 예를 들면, Ma1PEG는 Hb의 표면 상에 티올기를 도입하도록 Hb의 아민을 티올화함으로써 Hb에 접합될 수 있다. 반응에 이용 가능한 Hb의 2개의 내재성 티올기는 βCys93에 있고, Hb의 표면 상에 첨가된 티올기는 말레이미딜 PAO의 말레이미드와 반응하여 폐길화 Hb 접합체를 형성할 수 있다.

[0041] 폴리알킬렌 옥사이드는 헤모글로빈 분자 상의 노출된 아미노산 측쇄의 티올기에 티올 반응성 모이어티를 통해 공유 결합될 수 있는 반면, 헤모글로빈은 산소화 상태에 있다.

[0042] 말레이미드-PEG는 헤모글로빈의 시스테인 잔기의 내재성 티올 모이어티, 헤모글로빈의 티올화 라이신 잔기의 티올 모이어티 또는 이들의 조합으로부터 선택되는 헤모글로빈의 티올 모이어티에 접합될 수 있다.

[0043] 말레이미드-PEG는 말레이미드를 PEG에 부착시키는 링커를 포함한다. 링커는 알킬렌, 예컨대 에틸렌, 프로필렌 또는 아이소프로필렌, 페닐렌, 아마이드(-NH-C(O)-) 또는 페닐 카바메이트(예를 들면, -Ph-NH-C(O)-)를 포함할 수 있지만, 이들로 제한되지는 않는다. 바람직하게는, 폴리알킬렌 옥사이드는 알킬렌 또는 페닐렌, 더 바람직하게는 알킬렌, 예컨대 에틸렌으로 이루어진 링커에 의해 티올 반응성 모이어티에 연결된다.

[0044] 말레이미드-PEG는 하기 구조를 가질 수 있다:



[0045] 식 중, Hb는 헤모글로빈이고, S는 헤모글로빈의 티올이며, R₃은 알킬렌 또는 페닐렌기이고, X는 말단기이며, m은 헤모글로빈에 접합된 말레이미딜 활성화 PEG 중합체의 평균 수이고, n은 평균 분자량이 약 2,000 내지 약 20,000달톤인 PEG의 옥시에틸렌 단위의 평균 수이다. 바람직하게는, R₃은 알킬렌, 예컨대 에틸렌이고; X는 히드록시, 아릴옥시, 예컨대 벤질옥시 또는 C₁-C₂₀ 알콕시, 더 바람직하게는 C₁-C₁₀ 알콕시기, 훨씬 더 바람직하게는 C₁-C₅ 알콕시기, 예컨대 메톡시 또는 에톡시이며; n은 약 3,000 내지 약 10,000달톤, 더 바람직하게는 4,000 내지 약 6,000달톤, 가장 바람직하게는 약 5,000달톤이고; m은 약 7 내지 약 11, 더 바람직하게는 약 9 또는 약 10이다.

[0047] 티올 반응성 화학을 이용하여 변형될 수 있는 아미노산 잔기 측쇄의 비제한적인 예는 하기 표 2에 제시되어 있다:

표 2

티올 반응성 화학 및 변형의 잠재적 자리

α-사슬		
잔기	위치	하기와 반응
Cys	104	말레이미드; 요오도아세트아마이드; 오쏘피리딜-다이설파이드(OPSS); 비닐설펜.
β-사슬		
잔기	위치	하기와 반응
Cys	93 및 112	말레이미드; 요오도아세트아마이드; 오쏘피리딜-다이설파이드(OPSS); 비닐설펜.

[0048]

[0049] 헤모글로빈의 βCys93 잔기에서의 2개의 내재성 티올은 폐길화되거나 N-에틸 말레이미드와 반응할 수 있다. 이

시스테인 잔기의 이러한 변형은 P50을 감소시키고 R 상태 안정화 효과를 갖는다.

- [0050] 접합 반응에 의해 PAO-Hb의 분자량을 조절할 수 있다. 종래의 관념은 반응물의 몰 비의 증가가 Hb에 결합된 PEG 분자의 수를 증가시킨다고 제시하였다. 이는 Hb의 티올화 과정(즉, 티올화제 대 Hb의 몰 비 증가) 및 접합 과정(즉, 티올 활성화 PEG 대 티올화 Hb의 몰 비 증가) 둘 다를 포함한다. 그러나, 이 초과분의 몰 비는 Hb마다 오직 6 ± 1 개의 PEG 분자의 결합을 발생시킨다(미국 특허 제7,501,499호 참조).
- [0051] 최근에, 더 낮은 몰 비의 반응물을 사용하여 더 많은 수의 PAO 분자가 Hb에 결합한다고 결정되었다. 다이티오피리딘 비색 검정을 이용하여 티올화 전에 및 후에 및 접합 후에 Hb 상의 이용 가능한 티올기의 수를 결정하였다(Ampulski, R.S. *et al.*, 1969, Biochem. Biophys. Acta 32:163-169). 인간 Hb는 β 93시스테인 잔기에서 2개의 내재성, 반응성 티올기를 포함하고, 이는 다이티오피리딘 반응에 의해 확인되었다. 2-IT에 의한 SFH의 티올화 후, 반응성 티올기의 수는 2개로부터 7개 초과로 증가하였다. 이 예에서, 평균 8개의 PEG 분자가 Hb에 결합하였다. 티올화 반응에서 SFH에 비해 7.5배 몰 초과인 2-IT를 사용하고 접합 반응에서 티올화 Hb에 비해 12배 몰 초과인 MaIPEG를 사용하여 이를 성취하였다.
- [0052] 헤모글로빈은 산소화 상태에 있을 때 폴리알킬렌 옥사이드와 접합되어 Hb-PAO 접합체의 산소 친화도를 증가시킨다.
- [0053] 따라서, 본 발명의 다른 양태는 헤모글로빈 접합체를 제조하는 방법에 관한 것이다. 상기 방법은 β, β -분자내 가교결합된 헤모글로빈을 수성 희석제 중에 2-이미노티올란(2-IT)과 혼합하여 티올화 헤모글로빈을 형성하는 단계; 및 PAO를 수성 희석제 중에 티올화 헤모글로빈에 첨가하여 β, β -분자내 가교결합된 폴리옥시알킬렌 옥사이드 헤모글로빈 접합체를 형성하는 단계를 포함한다.
- [0054] 이 방법에서, 2-이미노티올란은 헤모글로빈 농도에 비해 8배 내지 약 25배 몰 초과, 바람직하게는 약 15배 몰 초과인 농도로 존재한다.
- [0055] 티올화를 약 7 내지 약 9의 pH에서 수행할 수 있다.
- [0056] 접합을 약 7 내지 약 9의 pH에서 수행할 수 있다.
- [0057] 상기 방법에서, PAO-말레이미드는 100% 말단 활성화에 기초하여 헤모글로빈 농도에 비해 약 10배 내지 약 40배 몰 초과, 바람직하게는 약 28배 몰 초과인 농도로 존재한다.
- [0058] 본 발명의 헤모글로빈 접합체는 산소화 형태 또는 탈산소화 형태에 있거나, CO 또는 NO에 리간드화되거나, 이 4개의 형태 중 2개 이상을 포함하는 혼합물일 수 있다. 비산소화 헤모글로빈을 공기, 순수한 O₂ 가스 또는 O₂/질소 가스 혼합물과 평형화시켜 HbO₂를 제조한다.
- [0059] 당해 분야에 공지된 임의의 방법에 의해 탈산소화를 수행할 수 있다. 하나의 단순한 방법은 헤모글로빈 용액을 불활성 가스, 예컨대 질소, 아르곤 또는 헬륨에 노출하는 것이다. 탈산소화가 비교적 균일하도록 보장하기 위해, Hb 용액을 이 과정에서 순환시킨다. 코옥시미터 682(Instrument Laboratories)를 사용하여 원하는 수준을 얻기 위한 탈산소화의 모니터링을 수행할 수 있다. 부분 재산소화가 바람직한 경우, 탈산소화된 Hb를 산소 또는 산소를 포함하는 가스 혼합물, 예컨대 공기에 노출할 수 있다.
- [0060] 가스 투과성 막, 예컨대 폴리프로필렌 또는 셀룰로스 아세테이트 막을 통해 분자 산소를 다른 가스로 대체하는 가스 교환을 성취할 수 있다. 예를 들면, 공개 미국 특허 출원 제2006/0234915호를 참조한다. 이 막을 사용하는 상업적으로 구입 가능한 가스 교환 장치는 헥스트-셀라네스(Hoechst-Celanese)(미국 텍사스주 달라스)사제의 셀가드(Celgard)(상표명) 폴리프로필렌 미세다공성 중공 섬유 장치 또는 아메리칸 래버러토리(American Laboratory)(미국 코네티컷주 이스트 라임)사제의 셀팜(Cell-Pharm)(상표명) 중공 섬유 산화기를 포함한다. 헥스트-셀라네스 셀가드(상표명) 장치에서, 10-100ml/분/ft²에서 폴리프로필렌 미세다공성 중공 필터를 통해 수성 Hb 용액을 통과시킴으로써 산소화된 Hb를 탈산소화하는 반면, 시스템을 5-20psi에서 질소로 퍼징한다. 원하는 백분율의 데옥시Hb를 성취하기 위해 Hb를 약 5 내지 30분 동안 일반적으로 순환시킨다. 탈산소화된 Hb를 제조하는 다른 방법은 Hb 용액을 화학 환원제, 예컨대 나트륨 아스코르베이트, 나트륨 다이티오네이트 및 중아황산나트륨에 노출하는 단계를 포함한다. 환원제 농도, 반응 시간 및 온도를 조정함으로써 Hb는 부분 탈산소화된다. 대안적으로, Hb를 실질적으로 탈산소화하도록 환원제를 사용할 수 있고, 이후 산소를 재도입하여 부분 탈산소화된 생성물을 형성할 수 있다. 예를 들면, 황산화제를 첨가하기 전에 Hb를 약 1시간 동안 중아황산나트륨의 100mM 농도에 노출할 수 있다.

- [0061] 단순히 O₂에 대해 CO를 치환함으로써 옥시헤모글로빈을 형성하는 임의의 공지된 방법을 이용하여 Hb를 CO로 리간드화할 수 있다. 이는 헤모글로빈이 O₂ 대신에 CO와 리간드화되도록 CO의 공급원을 헤모글로빈의 용액에 도입하는 것을 일반적으로 포함한다(K. D. Vandegriff, et al., Biochem. J. 382:183-189(2004)). 헤모글로빈이 산소에 대해서보다 CO에 대해 더 높은 친화도를 가지므로, 처음에 헤모글로빈을 탈산소화하는 것이 필요하지 않을 수 있다. 따라서, CO-Hb 복합체를 형성하는 가장 편리한 방식은 100% 가스 CO를 헤모글로빈의 용액에 도입하는 것이다.
- [0062] 탈산소화된 헤모글로빈을 일산화질소 gas와 반응시킴으로써 또는 NO가 CO에 교환하도록 CO-Hb를 NO gas에 노출함으로써 HbNO를 제조할 수 있다. 탈산소화된 헤모글로빈을 프로리 노노에이트(PROLI NONOate)(상표명)(즉, 1-(히드록시-NNO-아족시)-L-프롤린, 이나트륨염; 카이만 케미컬(Cayman Chemical), 미국 미시간주 앤 아버)와 같은 작은 NO-도너 분자와 반응시킴으로써 HbNO를 또한 만들 수 있다.
- [0063] 자유 라디칼인 NO가 글로빈 사슬에서의 아미노산 측기에 결합된 헤모글로빈이 본 명세서에 정의된 NO-Hb 복합체가 아니라는 것에 유의해야 하는데, 왜냐하면 이 화합물이 산소 대신에 헴 포켓에서 리간드로서 이원자성(비이온성) NO를 포함하지 않기 때문이다. 예를 들면, 네이티브 헤모글로빈이 유리 설프하이드릴기에 결합하도록 하는 조건 하에 이를 NO 도너에 노출할 때 나이트로실헤모글로빈이 형성된다(미국 특허 제6,627,738호). 이 나이트로실헤모글로빈은 여전히 산소를 운반하는 반면, 본 발명의 NO-Hb 복합체는 그렇지 않다. 더욱이, 상기 기재된 것과 같은 설프하이드릴 모이어티에 지향된 반응에 의해 변형된 헤모글로빈을 형성할 때, 이 모이어티는 NO 결합에 더 이상 이용 가능하지 않다.
- [0064] 본 발명의 PAO-Hb 접합체는 비경구 투여를 위한 약제학적으로 허용되는 담체, 예컨대 수성 희석제 중에 PAO-Hb 접합체를 포함하는 약제학적 조성물로서 제제화될 수 있다. 담체 중의 PAO-Hb 접합체의 농도는 분야에 따라 변할 수 있다. 바람직하게는, PAO-Hb 접합체 농도는 약 0.1g/dl 내지 약 10g/dl, 더 바람직하게는 약 2.0g/dl 내지 약 8.0g/dl, 가장 바람직하게는 약 4.0 내지 약 6.0g/dl 범위이다. 헤모글로빈의 적절한 농도의 선택은 최종 헤모글로빈 생성물의 콜로이드성 삼투(삼투성) 특성에 따라 달라진다. 바람직하게는, 본 발명의 조성물은 전혈과 비교하여 정상 삼투성이거나 혈장과 비교하여 과삼투성일 수 있다. 각각의 적응증에 대해 원하는 삼투압을 얻기 위해 헤모글로빈 농도를 조정할 수 있다.
- [0065] 상기 조성물을 비경구로서 제제화할 때, 용액은 일반적으로 헤모글로빈의 가역적인 산소, CO 또는 NO 운반 및 전달 특성을 유지시키고 전혈과 등장성인 생리학적으로 상용성인 전해질 담체를 포함한다.
- [0066] 약제학적으로 허용되는 담체는 수성 희석제일 수 있다. 수성 희석제는 콜로이드의 수용액 또는 산소 비운반 성분의 수용액, 예컨대 단백질, 예컨대 알부민의 수용액, 당단백질의 수용액, 다당류의 수용액 또는 이들의 조합을 포함할 수 있다. 수성 희석제는 세포 비함유 수용액을 포함할 수 있다.
- [0067] 적합한 수성 희석제는 생리학 적 식염수, 식염수-글루코스 혼합물, 링거 용액, 락트산염 링거 용액, 록커(Locke)-링거 용액, 크렙스(Krebs)-링거 용액, 하트만(Hartmann) 균형 식염수, 헤파린화 시트르산나트륨-시트르산-텍스트로스 용액, 아세테이트 용액, 다중 전해질 용액(예를 들면, 박스터 인터내셔널(Baxter International)(미국 일리노이주 디어필드)사제의 플라즈마 라이트(Plasma Lyte)(등록상표) 또는 플라즈마 라이트-A(등록상표)), 락토탐이오네이트 용액 및 대용 중합체 혈장, 예컨대 폴리에틸렌 옥사이드, 폴리비닐 피롤리돈, 폴리비닐 알코올, 에틸렌 옥사이드-프로필렌 글라이콜 축합물 또는 이들의 조합을 포함하지만, 이들로 제한되지는 않는다.
- [0068] 상기 조성물은 약제학적으로 허용되는 충전제, 염 및 당해 분야에 널리 공지된 다른 재료를 추가로 포함할 수 있고, 이의 선택은 제형, 치료하고자 하는 병증, 당해 분야의 당업자의 결정에 따라 성취하고자 하는 특정 목적 및 이 첨가제의 특성에 따라 달라진다. 예를 들면, 상기 조성물은 생리학 적 완충제, 탄수화물(예를 들면, 글루코스, 만니톨 또는 솔비톨), 알코올 또는 폴리 알코올, 약제학적으로 허용되는 염(예를 들면, 나트륨 또는 염화칼륨), 계면활성제(예를 들면, 폴리솔베이트 80), 항산화제, 항박테리아제, 교질 삼투압제(예를 들면, 알부민 또는 폴리에틸렌 글라이콜) 또는 환원제(예를 들면, 아스코르브산, 글루타티온 또는 N-아세틸 시스테인)를 포함할 수 있다.
- [0069] 약제학적 조성물은 점도가 적어도 약 2센티포이즈(cP)이다. 더 구체적으로, 점도는 약 2 내지 약 5cP, 특히 약 2.5 내지 약 4.5cP 범위이다.
- [0070] 투여 시 합병증을 피하기 위해, 약제학적 조성물은 높은 순도를 갖고, 즉 간질, 인지질 및 발열원이 없고, LAL

(리몰루스 변형세포 용해물) 시험에 의해 측정될 때 내독소 수준이 0.25 EU/ml 미만이고 메트헤모글로빈이 8% 미만이다.

- [0071] 약제학적 조성물을 예컨대 피하, 정맥내 또는 근육내 주사에 의해 비경구로 또는 대용적 비경구 용액으로서 투여할 수 있다. 상기 조성물을 경구영양법에 의해 또한 투여할 수 있다.
- [0072] 치료제로서의 헤모글로빈 접합체의 통상적인 용량은 환자 체중의 킬로그램당 약 1 내지 약 15,000밀리그램의 헤모글로빈일 수 있다. 예를 들면, 산소 치료제로서 사용할 때, 용량은 100 내지 7500mg/kg 환자 체중, 더 바람직하게는 500 내지 5000mg/kg 체중, 가장 바람직하게는 700 내지 3000mg/kg 체중 범위이다. 따라서, 인간 환자에 대한 통상적인 용량은 1그램 내지 1000그램 초과이다. 필요한 유효량이 다수의 개별 용량의 투여에 의해 도달되므로, 각각의 제형의 개별 용량에 포함된 활성 성분의 단위 함량이 그 자체로 유효량을 구성할 필요가 없는 것으로 이해된다. 용량 선택은 이용하고자 하는 제형, 치료하고자 하는 병증 및 당해 분야의 당업자의 결정에 따라 성취하고자 하는 특정 목적에 따라 달라진다.
- [0073] 산소, CO 및/또는 NO를 대상체에게 전달하기 위해 PAO-Hb 접합체 및 약제학적 조성물을 사용할 수 있다. 산소, 일산화질소, 일산화탄소 또는 이들의 혼합물을 조직에 전달하고 아질산염을 환원시켜 미소혈관계에서 추가로 내생 일산화질소(NO)를 제조하는 방법은 헤모글로빈 접합체 또는 조성물을 이를 필요로 하는 대상체에게 투여하는 단계를 포함하고, 투여 후, 헤모글로빈은 비리간드화되고 미소혈관계에서 아질산염을 일산화질소로 전환시킨다.
- [0074] 본 발명의 헤모글로빈 접합체 및 이의 조성물을 급성 간부전, 베타 지중해빈혈, 화상, 만성 중증 하지 허혈, 이산화탄소 또는 사이아나이드 중독, 만성 폐쇄성 폐 질환(COPD)(예를 들면, 급성 악화), 울혈성 심부전(예를 들면, 급성 심부전, 만성 심부전), 저산소증(예를 들면, 폐부종, 감압증을 포함하는 높은 고도 사용), 말라리아(예를 들면, 뇌 말라리아(열원충 폐색 사건), 장기 허혈(예를 들면, 급성 장 허혈(비틀림), 급성 장 허혈(색전증), 심인성 쇼크, 급성 혈관 장기 허혈, 뇌졸중(CAT 스캔 전), 뇌졸중(CAT 스캔 후), 심근 경색/중증 심장 허혈), 말초 혈관 질환, 포르피린증, 임신중독증, 폐혈증, 겸상 적혈구 질환(예를 들면, 뇌졸중/일과성 허혈성 발작, 비장 격리, 간 격리, 지속발기), 망막 질환/안내 병증(예를 들면, 중추 망막 동맥 폐색증, 중추 정맥 폐색증), 고환염전, 외상/쇼크(예를 들면, 외상성 출혈성 쇼크, 비외상성 출혈성 쇼크, 입원전/필드 사용(군사/응급), 외상성 뇌 손상/모세포), 궤양 또는 혈관경련을 치료하기 위해; 혈관성형술에 대한 보조제로서, 성형 수술(피판)(예를 들면, 급성 치료, 만성 치료)에 대한 보조제로서 또는 심실 보조 장치 이식 시 보조제로서; 대용 혈액(예를 들면, 급성 혈액 손실, 여호와의 증인(Jehovah's Witness), 환자의 교차 어려움, 희귀 혈액형, 겸상 재생불량성 위기, 겸상 적혈구 빈혈 수술 전후 관리, 급성 용혈성 빈혈(자가면역), 급성 용혈성 빈혈(독소) 또는 다른 불응성 빈혈을 위한), 심장보호제, 냉동보존제, 혈액투석 보조제, 종양 물질(예를 들면, 방사선치료 또는 화학요법, 고행 증양에 대한 보조제), 장기 보존제(예를 들면, 생체외, 공여자에서, 수혜자에서), 성능 증대제(예를 들면, 시민/육상, 군사), 수술 보조제(예를 들면, 심폐 우회(프라임), 심폐 우회(조정), 폐 허혈, 수술전 처리, 과열된 대동맥류, 흉대동맥(절개 또는 동맥류)의 대체) 또는 상처 치유제로서; 조영(x선 또는 자기 공명 영상화(MRI))에서; 폐 기능(예를 들면, 급성 폐 손상, 만성 폐 손상, 일과성 바이러스 폐렴, 신생아 호흡 곤란 증후군)을 개선하기 위해; 또는 이들의 조합으로서 사용할 수 있다. 이러한 사용은 이를 필요로 하는 대상체에 대한 접합체 또는 조성물의 투여를 포함한다.
- [0075] 추가로, 본 발명의 헤모글로빈 및 조성물을 비외상성 출혈성 쇼크, 입원전 환경 외상, 외상성 출혈성 쇼크, 급성 폐 손상, 성인 호흡 곤란 증후군, 외상성 뇌 손상, 뇌졸중, 고행 증양 압, 장기 기능저하(organ degradation)(생체외), 장기 기능저하(수혜자에서), 중증 폐혈증/폐혈성 쇼크, 심근 경색/심장 허혈, 심인성 쇼크, 급성 심부전, 폐 색전증, 수술에 의한 다양한 병증(예를 들면, 혈관성형술에 대한 보조제, 흉부 대동맥류 보수에 대한 보조제, 심폐 우회에 대한 보조제, 심폐 우회에 대한 프라이밍 용액) 또는 이들의 조합을 치료하기 위해 사용할 수 있다.
- [0076] 본 발명의 헤모글로빈 및 조성물이 유용한 다양한 임상 설정은 하기를 포함한다:
- [0077] 외상. 급성 전혈 손실은 피부 및 장을 포함하는 낮은 우선순위 장기로부터 혈액을 문합시키면서 혈액의 손실 용적을 대체하기 위해 간질성 및 세포내 공간으로부터 유체 이동을 발생시킬 수 있다. 장기로부터의 혈액 문합은 이 장기에서 O₂ 수준을 감소시키고 때때로 제거하고 진행성 조직 사멸을 발생시킨다. 1차 목적은 이환 조직을 산소화시키는 것이다. 이 외상은 입원전 환경에 있거나 외상성 출혈성 쇼크 또는 외상성 뇌 손상을 발생시킬 수 있다.
- [0078] 허혈. 적혈구 또는 많은 다른 산소 치료제가 침투할 수 없는 부위로 산소, CO 및/또는 NO를 전달하기 위해 접합

체 및 이의 조성물을 또한 사용할 수 있다. 이 부위는 적혈구 흐름에 대한 폐색의 하류에 위치한 임의의 조직 부위, 예컨대 혈전, 겸상 적혈구 폐색, 동맥 폐색, 혈관성형술 발문, 수술 장치의 하류의 부위, 및 산소 기아로 고생하거나 저산소성인 임의의 조직을 포함할 수 있다. 예를 들면, 뇌졸중, 출현 뇌졸중, 일과성 허혈성 쇼크, 심근 기면 및 동면, 급성 또는 불안정 협심증, 출현 협심증, 경색 등을 포함하는 모든 유형의 조직 허혈을 치료할 수 있다. 특히, 허혈을 발생시키는 병증은 급성 심부전, 심인성 쇼크, 심근 경색/심장 허혈, 뇌졸중, 폐색전증, 비외상성 출혈성 쇼크 또는 뇌혈관 외상을 포함한다.

[0079] **혈액희석.** 이 용도에서, 제거된 자가 혈액의 O₂ 수준을 대체(또는 치환)하도록 치료제를 투여한다. 이는 수술 동안에 및 후에 필요한 수혈에 대한 제거된 자가 혈액의 사용을 허용한다. 수술전 혈액 제거를 요하는 이러한 하나의 수술은 심폐 우회 시술이다.

[0080] **패혈증/패혈성 쇼크.** 패혈증에서, 일부 환자는 엄청난 체액 치료 및 혈관 수축제에 의한 치료에도 불구하고 고혈압이 될 수 있다. 이러한 경우에, 일산화질소(NO)의 과생성은 혈압을 낮춘다. 따라서, 헤모글로빈이 높은 결합도로 NO에 결합하므로 헤모글로빈은 이 환자의 치료를 위한 바람직한 물질이다.

[0081] **저산소증.** 환자가 폐렴 또는 췌장염에 의해 발생한 급성 폐 손상을 앓는 경우, 저산소증이 관찰될 수 있고 본 발명의 헤모글로빈 또는 조성물을 제공하여 이환 조직을 산소화함으로써 경감될 수 있다.

[0082] **앞.** 고행 종양 덩어리의 저산소성 내부 코어로의 O₂의 전달은 방사선치료 및 화학치료에 대한 이의 감수성을 증가시킨다. 종양의 미소혈관계가 다른 조직과 다르므로, O₂ 수준 증가를 통한 감수성화는 저산소성 코어 내에 O₂가 비로딩(unload)될 것을 요한다. 즉, P50은 O₂의 조기 비로딩을 방지하여, O₂ 수준을 증가시키고, 후속 방사선 및 화학요법 치료에 대한 종양의 최적 감수성화를 보장하도록 매우 낮아야 한다.

[0083] **수술.** 본 발명의 헤모글로빈 및 조성물을 다양한 수술 시술 동안 사용할 수 있다. 예를 들면, 이들을 혈관성형술, 흉부 대동맥류 보수, 심폐 우회 시술 동안에 대한 보조제로서 또는 심폐 프라이밍 용액으로서 사용할 수 있다.

[0084] **장기 관류.** 장기가 생체의 또는 장기 공여 수혜자에서 유지되는 동안, O₂ 함량을 유지시키는 것은 구조적 및 세포 통합성을 보존하고 경색 형성을 최소화하는 것을 돕는다. 헤모글로빈 및 조성물은 이러한 장기에 대한 산소요건을 지속시킬 수 있다.

[0085] 헤모글로빈 및 이의 조성물을 비인간, 예컨대 가정용 동물(예를 들면, 가축 및 반려 동물, 예컨대 개, 고양이, 말, 새, 파충류)에서 또한 사용할 수 있다. 본 발명은 손상으로 인한 혈액 손실, 용혈성 빈혈 등을 겪는 가정용 및 야생 동물의 응급 치료에서 유용성을 발견하는 것으로 고려된다. 수의학적 용도는 손상으로 인한 혈액 손실, 용혈성 빈혈, 감염성 빈혈, 박테리아 감염, IV 인자 단편화, 비대증 및 비종대, 가끔류에서의 출혈 증후군, 저형성 빈혈, 재생불량성 빈혈, 특발성 면역 용혈성 병증, 철 결핍증, 동종면역 용혈성 빈혈, 미세혈관병 용혈성 빈혈, 기생 또는 수술-마취 유발 뇌 손상의 치료를 포함한다.

[0086] **정의**

[0087] 용어 "일," "한" 또는 "하나"가 본 개시내용에 사용될 때, 달리 기재되지 않은 한, 이들은 "적어도 하나" 또는 "하나 이상"을 의미한다.

[0088] 본 명세서에 사용되는 "활성화 폴리알킬렌 옥사이드" 또는 "활성화 PAO"는 적어도 하나의 작용기를 갖는 PAO 분자를 의미한다. 작용기는 PAO와 접합하고자 하는 분자 상의 유리 아민, 설프하이드릴 또는 카복실기와 상호작용하는 반응성 모이어티이다. 예를 들면, 유리 설프하이드릴과 반응하는 이러한 하나의 작용기는 말레이미드기이다. 유리 아민과 반응하는 작용기는 숙신이미드기이다.

[0089] "데옥시헤모글로빈" 또는 "비리간드화 헤모글로빈"은 외인성 리간드가 헴에 결합되지 않은 임의의 헤모글로빈을 의미한다.

[0090] "헤모글로빈" 또는 "Hb"는 일반적으로 산소를 수송하는 헴 단백질을 의미한다. 인간에서, Hb의 각각의 분자는 4개의 아단위, 2개의 α 사슬 아단위 및 2개의 β 사슬 아단위를 갖고, 이들은 사합체 구조로 배열된다. 각각의 아단위는 제2철(Fe²⁺)에서 리간드 O₂, NO 또는 CO를 결합시키는 철 함유 중심인 1개의 헴기를 또한 포함한다. 따라서, 각각의 Hb 분자는 4개 이하의 리간드 분자를 결합시켜, 각각 HbO₂, HbNO 또는 HbCO 리간드화 화합물을 만

들 수 있다. 추가로, 헤모글로빈은 O₂, NO 및 CO의 혼합물과 리간드화될 수 있다.

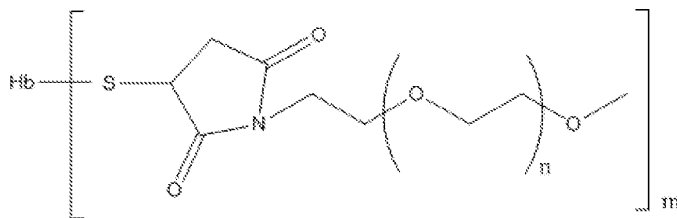
[0091] "헤모글로빈 기반 산소 캐리어"(HBOC)는 산소를 운반하지만, 다른 분자 가스, 예컨대 일산화탄소 및 일산화질소를 운반하는 데 또한 유용한 헤모글로빈을 의미한다.

[0092] "높은 산소 친화도"는 간질 유리 헤모글로빈(stroma free-hemoglobin: SFH)보다 큰 산소 친화도를 나타내도록 변형된 헤모글로빈을 의미한다. 따라서, "높은 산소 친화도" Hb는 37°C 및 pH 7.4에서 측정된 때에 P50이 15mmHg인, SFH보다 낮은 P50을 갖는다.

[0093] "리간드화 헤모글로빈"은 외인성 리간드가 헴에 결합된 헤모글로빈을 의미한다. 보통의 바람직한 리간드는 산소, 일산화탄소 및 일산화질소를 포함한다.

[0094] "MaIPEG"는 말레이미딜 폴리에틸렌 글라이콜을 의미하고, 링커를 통해 폴리에틸렌 글라이콜에 부착된 말레이미딜 모이어티를 포함한다.

[0095] "MaIPEG-Hb"는 말레이미딜 활성화 PEG가 접합된 Hb를 의미한다. MaIPEG를 Hb 상의 티올기(및 적은 정도로, 아미노기)와 반응시켜 MaIPEG-Hb를 형성함으로써 접합을 수행한다. 티올기는 βCys 93에서의 2개의 내재성 티올과 같이 Hb의 아미노산 서열에 존재하는 시스테인 잔기에서 발견되고, 티올기를 포함하도록 표면 아미노기를 변형 시킴으로써 또한 도입될 수 있다. MP4(Sangart, Inc.)로서 공지된 예시적인 MaIPEG-Hb는 하기 화학식을 갖는다:



[0096]

[0097] 식 중, Hb는 헤모글로빈이고; S는 헤모글로빈 상의 티올기이며; n은 5,000달톤 폴리알킬렌 옥사이드 중합체의 옥시에틸렌 단위의 수이고; m은 헤모글로빈에 접합된 말레이미딜 활성화 폴리알킬렌 옥사이드 중합체의 평균 수이며, 7 내지 8이다.

[0098] "메트헤모글로빈" 또는 "metHb"는 제2철 상태의 철을 포함하는 Hb의 산화 형태를 의미한다. MetHb는 산소 또는 CO 캐리어로서 기능하지 않는다. 본 명세서에 사용되는 용어 "메트헤모글로빈(%)"은 전체 Hb에 대한 산화된 Hb의 백분율을 의미한다.

[0099] "메톡시-PEG" 또는 "mPEG-OH"는 히드록실 말단의 수소가 메틸(-CH₃)기로 대체된 PEG를 의미한다.

[0100] "변형된 헤모글로빈" 또는 "변형된 Hb"는 화학 반응, 예컨대 분자내 및 분자간 가교결합, 중합, 접합 및/또는 재조합 기법에 의해 변경되어 Hb가 더 이상 그의 "네이티브" 상태에 있지 않은 Hb를 의미한다. 본 명세서에 사용되는 용어 "헤모글로빈" 또는 "Hb"는, 달리 기재되지 않은 한, 네이티브 비변형된 Hb 및 변형된 Hb 둘 다를 의미한다.

[0101] "아질산염 환원효소 활성" 또는 "NRA"는 아질산염을 일산화질소로 환원시키는 헤모글로빈 또는 헤모글로빈 기반 단백질의 능력이다. "최대 아질산염 환원효소 활성"은 헤모글로빈 또는 헤모글로빈 기반 단백질이 아질산염을 일산화질소로 환원시킬 수 있는 최대 속도이다. "초기 아질산염 환원효소 활성"은 아질산염이 완전 탈산소화된 단백질에 첨가될 때 헤모글로빈 또는 헤모글로빈 기반 단백질이 아질산염을 일산화질소로 환원시키는 초기 속도이다.

[0102] 용어 "비산소화"는 헴 단백질 또는 헤모글로빈이 비리간드화, 탈산소화 상태로 존재하거나 O₂ 이외의 가스, 예컨대 NO 또는 CO로 리간드화된 것을 의미한다.

[0103] "산소 친화도"는 산소 캐리어, 예컨대 Hb가 분자 산소에 결합하는 결합도를 의미한다. 이 특징은 산소 평형 곡선에 의해 정의되고, 이는 산소에 의한 Hb 분자의 포화도(Y 축)를 산소의 분압(X 축)과 상관시킨다. 이 곡선의 위치는 "P50" 값에 의해 표시되고, 이 값은 산소 캐리어가 산소로 반포화된 산소의 분압이고 산소 친화도와 역비례한다. 그러므로, P50이 더 낮을수록, 산소 친화도가 더 높다. 당해 분야에 공지된 다양한 방법에 의해 전혈(및 전혈의 성분, 예컨대 적혈구 및 Hb)의 산소 친화도를 측정할 수 있다(예를 들면, 문헌[Winslow, R.M. et

al., J. Biol. Chem. 1977, 252:2331-37] 참조). 상업적으로 구입 가능한 헤모스(HEMOX)(상표명) 분석기(TCS Scientific Corporation, 미국 펜실베이니아주 뉴 호프)를 사용하여 산소 친화도를 또한 결정할 수 있다(예를 들면, 문헌[Vandegriff and Shrager in "Methods in Enzymology" (Everse *et al.*, eds.) 232:460 (1994)]; 및 Vandegriff, *et al.*, Anal. Biochem. 256(1): 107-116 (1998)] 참조).

- [0104] 본 명세서에 사용되는 용어 "산소 치료제"는 분자 산소에 결합하고 이를 필요로 하는 세포/조직/장기에 이를 운반할 수 있는 헴 단백질을 의미한다. CO 또는 NO 리간드화 헴 단백질의 형태로 투여될 때, CO 또는 NO가 헴 모이어티로부터 방출되면, 헴기는 분자 산소에 결합하고 이를 운반할 수 있다.
- [0105] "폴리에틸렌 글라이콜" 또는 "PEG"는 일반식 $H(OCH_2CH_2)_n OH$ 의 중합체를 의미하고, "n"은 4 이상, 바람직하게는 약 45 내지 약 500, 더 바람직하게는 약 70 내지 약 250, 가장 바람직하게는 약 90 내지 약 140 또는 약 115이다. 중합체는 치환되거나 비치환될 수 있고, 말단 히드록시기는 상이한 종래의 말단기, 예컨대 메톡시 또는 카복시로 대체될 수 있다. PEG는 많은 공급원(예를 들면, 카보왁스(Carbowax)(상표명)(다우 케미컬(Dow Chemical), 미국 미시간주 미드랜드), 폴리-지(Poly-G)(등록상표)(아르치 케미컬즈(Arch Chemicals), 미국 코네티컷주 노워크) 및 솔베이스(Solbase))로부터 상업적으로 구입 가능하다.
- [0106] "폴리에틸렌 글라이콜 접합 헤모글로빈", "PEG-Hb 접합체" 또는 "PEG-Hb"는 적어도 하나의 PEG가 공유 결합된 Hb를 의미한다.
- [0107] "용액"은 액체 혼합물을 의미하고, 용어 "수용액"은 약간의 물을 포함하고 다성분 용액을 형성하기 위해 물과 함께 하나 이상의 다른 액체 물질을 또한 포함할 수 있는 용액을 의미한다.
- [0108] "간질 비함유 헤모글로빈" 또는 "SFH"는 적혈구 막이 제거된 Hb를 의미한다.
- [0109] "표면 개질된 헤모글로빈"은 화학 그룹, 보통 중합체가 부착된 헤모글로빈, 예컨대 텍스트란 또는 폴리알킬렌 옥사이드를 의미한다. 용어 "표면 개질 산소화된 헤모글로빈"은 이것이 표면 개질될 때 "R" 상태에 있는 Hb를 의미한다.
- [0110] "말단 활성화"는 헴 단백질 또는 헤모글로빈의 반응성 기와 반응할 수 있는 모이어티로 작용기화된 PAO의 백분율의 표시이다. "100% 말단 활성화"는 모든 PAO가 헴 단백질 또는 헤모글로빈의 반응성 기와 반응할 수 있는 모이어티를 갖는다는 것에 기초하여 접합 반응에 사용된 PAO의 몰 초과가 표시된다는 것을 나타낸다. 예를 들면, 이용 가능한 Mal-PEG가 80% 말단 활성을 가져 PEG의 80%가 Mal로 작용기화되고 Mal-PEG가 헤모글로빈에 비해 20배 몰 초과로 사용되는 경우, 이 몰 비는 100% 말단 활성화에 기초하여 헤모글로빈에 비해 16배 몰 초과로 Mal-PEG로 표시될 수 있다.
- [0111] "티올화"는 분자 상의 설프하이드릴기의 수를 증가시키는 과정을 의미한다. 예를 들면, 단백질을 2-이미노티올란("2-IT")과 반응시키는 것은 단백질의 표면 상의 유리 아민을 설프하이드릴기로 전환시킨다. 이후, 티올 반응성 모이어티, 예컨대 말레이미드와의 반응에 이 설프하이드릴기가 이용 가능하다.
- [0112] "비리간드화 헤모글로빈"은 분자 가스, 예컨대 산소, 일산화탄소 또는 일산화질소에 리간드화되지 않은 적어도 하나의 헴 모이어티를 포함하는 임의의 헤모글로빈을 의미한다. 그러므로, 헤모글로빈은 오직 하나의 헴 모이어티가 분자 가스에 리간드화되지 않은 경우 "비리간드화"된 것으로 생각된다.
- [0113] 본 명세서에 인용된 모든 공보, 특허 및 특허 출원은, 각각의 이러한 공보, 특허 또는 특허 출원이 구체적으로 및 개별적으로 본 명세서에 참조문헌으로 포함된 것으로 표시된 것처럼, 본 명세서에 구체적으로 언급된 대상에 대해 본 명세서에 참조문헌으로 포함된다.
- [0114] 본 발명이 자세히 기재되어 있고, 특허청구범위에 정의된 본 발명의 범위를 벗어나지 않고 변형 및 변경이 가능하다는 것이 명확하다.
- [0115] **실시예**
- [0116] 하기 비제한적인 실시예는 본 발명을 추가로 예시하도록 제공된다.
- [0117] 실시예 1: PEG화 $\beta\beta$ -DBBF-가교결합된 헤모글로빈 접합체의 제조
- [0118] 농축(packed) 적혈구("RBC")를 상업적 공급원, 예컨대 지역 혈액 은행, 뉴욕 혈액 센터 또는 미국 적십자사로부터 얻었다. 채혈로부터 45일 이하에 재료를 얻었다. 모든 단위를 바이러스 감염에 스크리닝하고 핵산 시험한 후 사용하였다. 백혈구를 제거하도록 막 여과에 의해 백혈구 비제거된 폴링된 단위를 백혈구 제거하였다. 농축 RBC

를 무균 용기에 폴딩하고 추가의 처리까지 2 내지 15°C에서 저장하였다. 용적을 기록하고, 상업적으로 구입 가능한 코옥시미터 또는 다른 분야 인정 방법을 이용하여 Hb 농도를 결정하였다.

- [0119] RBC를 0.45 μ m 접선 흐름 여과를 이용하여 6 용적의 0.9% 염화나트륨으로 세척한 후, 염의 농도를 감소시켜 세포 용해시켰다. 동일한 막에서 Hb 추출을 수행하였다. 세포 세척을 분석하여 알부민에 대한 분광 검정에 의해 혈장 성분의 제거를 검증하였다. 용해물을 냉소에서 0.16 μ m 막을 통해 처리하여 Hb를 정제하였다. 정제된 Hb를 무균 탈고열 반응으로 수집하고 이후 한외여과하여 바이러스를 제거하였다. 용매/세제 처리, 나노여과 및 음이온 Q 막 정제를 포함하는 추가의 바이러스 감소 단계를 수행할 수 있다. 이 공정에서의 모든 단계를 2 내지 15°C에서 수행하였다.
- [0120] 용해물로부터의 Hb를 30kD 막을 사용하여 링거 락테이트("RL") 또는 인산염 완충 식염수("PBS", pH 7.4)로 교환하였다. Hb를 (사합체 중에) 1.1 내지 1.5mM로 농축시켰다. 10 내지 12용적의 RL 또는 PBS를 용매 교환에 사용하였다. 이 공정을 2 내지 15°C에서 수행하였다. RL 또는 PBS 중에 제조된 용액의 pH를 8.0로 조정한 후 티올화하였다. Hb를 0.45 또는 0.2 μ m 일회용 필터 캡슐을 통해 무균 여과하고 4 \pm 2°C에서 저장한 후 화학 변형 반응을 수행하였다.
- [0121] 가교결합: 문헌[Walder et al, Biochemistry, 1979; 18(20): 4265-70]에 이미 기재된 바대로 농축 적혈구로부터 제조된 간질 비함유 헤모글로빈(SFH)과 비스(3,5-다이브로모살리실)퓨마레이트(DBBF)의 반응에 의해 β β -DBBF 가교결합된 Hb를 제조하였다. 붕산염 완충제(pH 약 8.5) 중의 산소화된 SFH를 약 2 내지 8°C에서 약 16시간 동안 2배 몰 초과 DBBF와 반응시켰다.
- [0122] 티올화: 상기 기재된 바대로 제조된 SFH를 사용하여, Hb에 비해 15배 몰 초과 2-이미노티올란(2-IT)을 사용하여 티올화를 수행하였다. PEG 접합에 대한 티올기의 수를 최대화하고 생성물 이질성을 최소화하기 위해 비율 및 반응 시간을 최적화하였다. RL(pH 7.0 내지 8.5), PBS 또는 임의의 유사한 완충제 중의 대략 1mM Hb(사합체)를 동일한 완충제 중의 15mM 2-IT와 합하였다. 이 혼합물을 10 \pm 5°C에서 약 6시간 동안 계속해서 교반하였다.
- [0123] 티올화 전에 및 후에 및 이후 다시 Hb-PEG 접합 후에 Hb 사합체의 표면 상의 이용 가능한 티올기의 수를 측정하기 위해 다이티오피리딘 비색 검정(Ampulski, R.S. et al., Biochem. Biophys. Acta 1969, 32:163-169)을 이용하였다. 인간 Hb는 β 93 시스테인 잔기에서 2개의 내재성 반응성 티올기를 포함하고, 이는 다이티오피리딘 반응에 의해 확인되었다. 1:<8(SFH:2-IT)의 비율의 SFH의 티올화 후, 반응성 티올기의 수는 2개로부터 7개 초과로 티올을 증가하였다.
- [0124] PEG 접합: 출발 사합체 Hb 농도에 비해 100% 중결 활성에 기초한 28배 몰 초과 MalPEG를 이용하여 MalPEG를 티올화 β β -DBBF 가교결합된 Hb에 접합하였다. Hb를 처음에 대기와 평형이 되게 하여 Hb를 산소화시켰다. RL(pH 7.0 내지 8.5), PBS 또는 임의의 유사한 완충제 중의 대략 1mM 티올화 Hb를 동일한 완충제 중의 28mM MalPEG와 합하였다. 이 혼합물을 10 \pm 5°C에서 약 6시간 동안 계속해서 교반하였다.
- [0125] 생성된 PEG-Hb 접합체를 70kD 막(즉, <0 용적 여과)을 통해 처리하여 미반응 시약을 제거하였다. 540nm 및 217nm에서 크기 배제 액체 크로마토그래피("LC")에 의해 이 공정을 모니터링하였다. 농도를 4.4g/dl Hb로 조정하고, pH를 6.0 내지 7.8로 조정하였다.
- [0126] PEG-Hb 접합체를 0.2 μ m 무균 일회용 캡슐을 이용하여 무균 여과하고, 4 \pm 2°C에서 무균 탈고열반응화 용기로 수집하였다. PEG-Hb 접합체를 4.4g/dl RL로 희석하고, pH를 7.4 \pm 0.2 pH로 조정하고 이후 무균 여과(0.2 μ m)시키고 내독소 비함유 무균 용기에 분취하였다.
- [0127] 최종 폐길화 β β -DBBF 가교결합된 헤모글로빈 접합체("PEG- β β -Hb")는 표 3에 기재된 특성을 갖는다:

표 3

PEG-ββ-Hb의 특성

특성	값
Hb 농도(g/dL)	4.4
pH	7.4
PEG화도	7.6
COP(mmHg)	85
P50 mmHg	2.6
혈 수(n-값)	1.05

[0128]

[0129]

표준 방법론을 통해 PEG-ββ-Hb의 구조를 추가로 확인하였다. 크기 배제 크로마토그래피는 DBBF 가교결합의 존재를 확인시켜준다(도 1 및 도 2). 역상 고성능 액체 크로마토그래피는 헤모글로빈의 β 글로빈 아단위의 DBBF 가교결합의 존재를 확인시켜준다(도 3). 크기 배제 크로마토그래피를 이용하여 ββ-DBBF Hb의 PEG화를 확인하였다(도 4).

[0130]

실시예 2: PEG-ββ-Hb에 의해 나타난 아질산염 환원효소 활성 증대

[0131]

실시예 1로부터의 탈산소화된 PEG화 ββ-DBBF-가교결합된 헤모글로빈 및 비교 목적을 위한 다른 헤모글로빈 중을 실링된 큐벳에서 나트륨 다이티오나이트의 존재 하에 아질산나트륨과 혐기성으로 반응시켰다. 헴에 비해 10배 과량의 아질산염을 사용하고, 분광학으로 반응을 모니터링하였다. 데옥시헤모글로빈, 철-나이트로실-헤모글로빈 및 메트헤모글로빈에 대한 모 스펙트럼을 이용하여 생성된 스펙트럼 데이터를 디콘볼루션하였다. 데옥시헤모글로빈의 소실의 유도체로서 속도를 작도하고, 비교 목적을 위해 최대 속도를 이용하였다.

[0132]

SFH 및 PEG화 ββ-DBBF-가교결합된 헤모글로빈은 각각 0.0215 μM/초 및 0.462 μM/초의 최대 속도로 아질산염을 NO로 환원시켜, SFH와 비교하여 PEG화 ββ-DBBF-가교결합된 헤모글로빈에 대해 21배 더 높은 최대 속도를 나타냈다.

[0133]

도 5를 참조하면, P50을 감소시키기 위해 Hb b93Cys 잔기에서 반응하는, 말레이미드 접합 비가교결합된 헤모글로빈을 포함하는, 몇몇 유형의 변형된 Hb의 아질산염 환원효소 활성을 결정하였다. 시험된 말레이미드는 작은 분자, N-에틸말레이미드(NEM) 및 MP4(Sangart, Inc.) 및 표 4에 기재된 다른 헤모글로빈을 포함한다.

표 4

변형된 헤모글로빈의 특성

Hb	접합 화학	사합체당의 치환도	P50(산소 친화도)
SFH	해당 없음	-	16
MP4OX	말레이미드	8(PEG 5K)	4
P5K2	말레이미드	2(PEG 5K)	8
P5K4	말레이미드	4(PEG 5K)	5
NEM2	말레이미드	2(NEM)	9
NEM8	말레이미드	8(NEM)	5
SVA-PEG-Hb	숙신이미드	비시험	7
αα-Hb	DBBF	-	33
ββ-Hb	DBBF	-	8
PEG-αα-Hb	DBBF/말레이미드	7(PEG 5K)	9
PEG-ββ-Hb	DBBF/말레이미드	7.6(PEG 5K)	3

[0134]

[0135]

α 아단위 또는 β 아단위 사이에 가교결합된 Hb는 다양한 P50을 나타낸다. P50 값은 3mmHg(PEG-ββ-Hb의 경우) 내지 33mmHg(αα-가교결합된 Hb의 경우) 범위였다. P50과 아질산염 환원효소 활성 사이에 직접적인 상관관계가 존재하는 것으로 관찰되었다. 고 산소 친화도(낮은 P50)를 갖는 Hb는 저 친화도 Hb보다 높은 속도로 아

질산염을 NO로 환원시켰다. 10배 과량의 아질산염으로, 아질산염 환원의 최대 속도는 0.46 $\mu\text{M}/\text{초}$ (PEG- $\beta\beta$ -Hb의 경우)로부터 0.015 $\mu\text{M}/\text{초}$ ($\alpha\alpha$ -가교결합된 Hb의 경우)로 변했다. 이 반응에 의해 생성된 NO는 헴 포획을 탈출하고 Hb로부터 방출될 수 있고, NO 방출 속도는 아질산염 환원효소 활성에 비례한다. 종합하면, 이 결과는 산소 친화도가 헤모글로빈 리간드의 전달을 증대시킬 뿐만 아니라 아질산염 환원효소 활성을 최대화하기 위해 세포 비함유 Hb 설계에서 중요하다는 것을 제시한다.

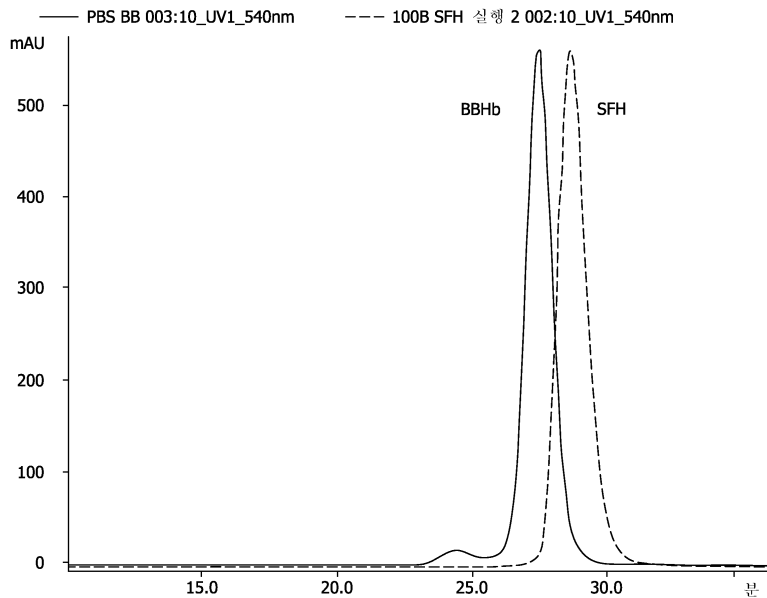
[0136] 본 발명의 부재 또는 이의 바람직한 실시양태(들)를 도입할 때, 관사 "하나", "일", "이" 및 "상기"는 하나 이상의 부재가 존재한다는 것을 의미하도록 의도된다. 용어 "포함하는", "함유" 및 "갖는"은 포괄적이고 기재된 부재 이외의 추가의 부재가 존재할 수 있다는 것을 의미하도록 의도된다.

[0137] 상기 관점에서, 본 발명의 몇몇 목적이 성취되고 다른 유리한 결과가 획득되는 것으로 보인다.

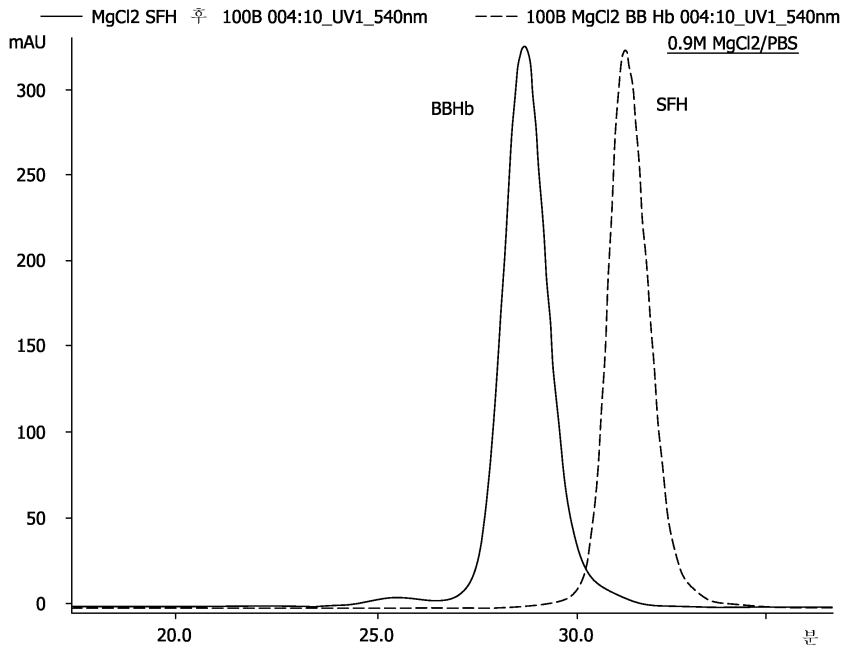
[0138] 본 발명의 범위를 벗어남이 없이 상기 조성물 및 방법에 다양한 변화가 이루어지면서, 상기 명세서에 포함되고 도면에 도시된 모든 대상이 예시적이고 제한적인 의미가 아닌 것으로 해석되어야 하는 것으로 의도된다.

도면

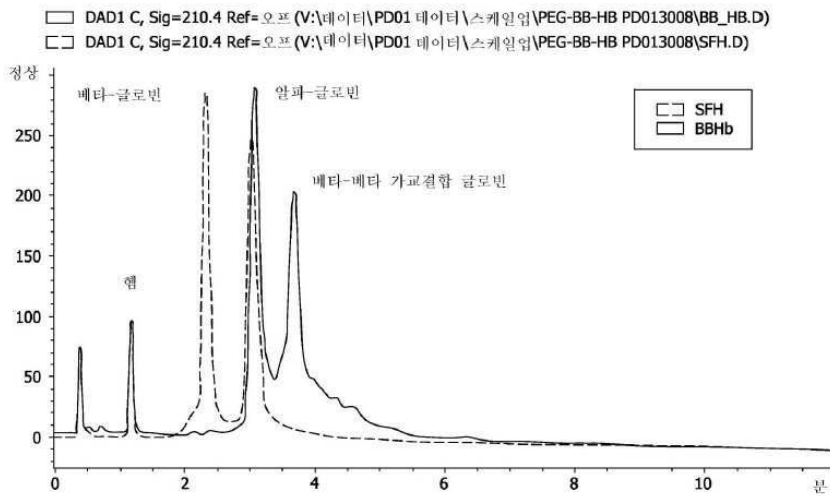
도면1



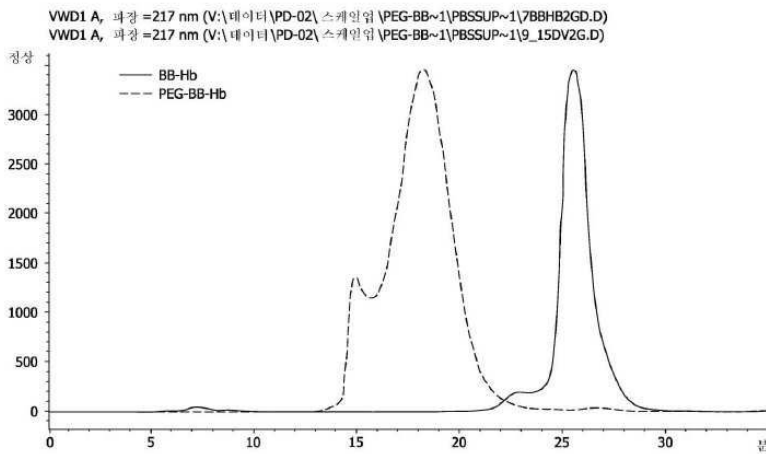
도면2



도면3



도면4



도면5

