(19)대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(51) 。Int. Cl.[7]
C07K 14/61
A61K 38/27
A61K 47/48

(11) 공개번호 10-2005-0044858
(43) 공개일자 2005년05월13일

(21) 출원번호 10-2004-7007708
(22) 출원일자 2004년05월20일
번역문 제출일자 2004년05월20일
(86) 국제출원번호 PCT/US2002/037270
국제출원출원일자 2002년11월20일
(87) 국제공개번호 wo 2003/044056
국제공개일자 2003년05월30일

(30) 우선권주장 60/331,907 2001년11월20일 미국(US)

(71) 출원인 파마시아 코포레이션
미국 미주리주 63017-1732 체스터필드 체스터필드 파크웨이 웨스트 700
(72) 발명자 펀,로리,에프.
미국63021미주리주맨체스터선버스트시티976
라오,웨이
미국63005미주리주체스터필드힐크레스트메도우드라이브17143
시겔,네드,알.
미국일리노이주62223벨르빌노오쓰파우더밀로드312
(74) 대리인 장수길
김영

심사청구 : 있음

(54) 화학적으로 개질된 인간 성장 호르몬 콘쥬게이트

명세서

기술분야

본원은 미국 법 §119, 제35장에 의거하여, 2001년 11월 20일 출원된 미국 가출원 제60/331,907호에 대해 우선권을 주장하며, 상기 출원은 본원에 기재된 것과 같이 그 전체가 인용됨으로써 삽입된다.

배경기술

본 발명은 인간 성장 호르몬(hGH)의 화학적 및(또는) 생리학적 성질을 변화시킬 수 있는, hGH 및 그 아고니스트 변이체의 화학적 개질에 관한 것이다. PEG 수식된 hGH는 혈장 체류 기간의 증가, 제거율의 감소, 안정성의 증가, 항원성의 감소, 또는 이들이 조합된 성질을 가질 수 있다. 본 발명은 또한 hGH의 개질을 위한 방법에 관한 것이다. 또한, 본 발명은 개질된 hGH를 포함하는 제약 조성물에 관한 것이다. 추가적 태양은 성장 및 발달 장애의 치료를 위한 개질된 hGH의 용도이다.

발명의 배경

인간 성장 호르몬(hGH)는 두 개의 디설파이드 브릿지에 의해 가교된 191 개의 아미노산의 단일 사슬을 포함하는 단백질이고, 단량체 형태는 22 kDa의 분자량을 갖는다. 인간 GH는 뇌하수체에서 분비되고 재조합 유전자 조작에 의해 생성될 수도 있다. hGH는 성장할 수 있는 모든 신체 조직에서 성장을 일으킬 것이다. 재조합 hGH는 수 년 전부터 시판되어 왔다. 두 가지 유형의 치료적으로 유용한 재조합 hGH 제제가 현재 시판된다: 정품인, 예를 들면 게노트로핀(Genotropin)™, 또는 뉴트로핀(Nutropin)™ 및 N-말단에 추가의 메티오닌 잔기를 갖는 유사체인, 예를 들면 소마토놈(Somatonorm)™. hGH는 성장 호르몬 결핍증(GHD) 또는 터너 증후군(Turner's syndrome)으로도 불리는 뇌하수체 저하 왜소증 환자에게서 직선 성장을 자극하는데 사용되지만, 임신기간에 비한 저체중아(SGA)로 태어난 소아의 성장 부진의 장기 치료, 프라더-윌리 증후군(Prader-Willi syndrome; PWS), 만성 신기능부전(CRI), 에이즈 소모성 증후군, 및 노화 환자의 치료를 포함하는 다른 적응증에도 제안되었다.

성장 호르몬(GH)의 주요한 생물학적 효과는 어린 포유류의 성장 및 나이 든 포유류에서 조직의 유지를 촉진시키는 것이다. 영향을 받는 장기 시스템은 골격, 연결 조직, 근육 및 간, 소장 및 신장과 같은 내장을 포함한다. 성장 호르몬은 표적 세포막 상의 특이적 수용체와의 상호작용을 통해 효과를 발휘한다. hGH는 태반 락토겐, 프로락틴 및 기타 유전적 및 종 변이체 또는 성장 호르몬을 포함하는 상동성 호르몬의 패밀리의 일원이다(Nicoll, C. S., et al. (1986) Endocrine Reviews 7: 169). hGH는 넓은 종 특이성을 나타내고 클로닝된 소마토겐(Leung, D. W., et al. [1987] Nature 330:537) 또는 프로락틴 수용체(Boutin, J. M., et al. [1988] Cell; 53: 69)에 결합한다는 점에 있어서 이들 중에서 특징을 갖는다. hGH에 대해 클로닝된 유전자는 에스케리치아 콜라이에서 분비된 형태로 발현되었고(Chang, C. N., et al. [1987] Gene 55:189), 그의 DNA 및 아미노산 서열이 보고되었다(Goeddel, et al. [1979] Nature 281: 544; Gray, et al. [1985] Gene 39:247).

인간 성장 호르몬(hGH)는 정상적 인간 성장 및 발달의 조절의 많은 부분에 관여한다. 이 뇌하수체 호르몬은 직선 성장(소마토제네시스), 유즙분비, 대식세포의 활성화, 인슐린-유사 및 당뇨병 유발 효과를 포함하는 다양한 생물학적 효과를 나타낸다(Chawla, R. K. (1983) Ann. Rev. Med. 34, 519; Edwards, C. K. et al. (1988) Science 239, 769; Thomer, M. O., et al. (1988) J. Clin. Invest. 81:745). 소아에 있어서 성장 호르몬 결핍은 왜소증을 유발하고, 이는 hGH의 외부 투여에 의해 10년 이상 동안 성공적으로 치료되었다.

인간 성장 호르몬(hGH)는 191 개의 아미노산으로 이루어진 단일 사슬 폴리펩티드이다(분자량 21,500). 디설파이드 결합은 53번 및 165번 위치 및 182번 및 189번 위치를 연결한다[Niall, Nature, New Biology, 230:90 (1971)]. hGH는 특히 질소, 인, 칼륨 및 칼슘의 저류에 기인하는 강력한 동화제이다. 뇌하수체 절제된 래트를 GH로 치료하면 래트의 성장율의 적어도 일부분을 회복시킬 수 있다[Moore et al., Endocrinology 122:2920-2926 (1988)]. 뇌하수체 저하(GH-결핍) 환자에 있어서 가장 두드러진 효과 중에는 키의 성장을 일으키는 골-성장-판-연골의 직선 성장의 가속화가 있다(Kaplan, Growth Disorders in Children and Adolescents (Springfield, IL: Charles C. Thomas, 1964)].

hGH는 다양한 동물 모델에서 직선 골 성장, 유즙분비, 대식세포의 활성화, 인슐린-유사 및 당뇨병성 효과 등을 비롯한 다양한 생리학적 및 대사적 효과를 일으킨다(R. K. Chawla et al., Annu. Rev. Med. 34: 519 (1983); 0. G. P. Isaksson et al. , Annu. Rev. Physiol. 47, 483 (1985); C. K. Edwards et al., Science 239, 769 (1988); M. 0. Thomer and M. L. Vance, J. Clin. Invest. 82: 745 (1988); J. P. Hughes and H. G. Friesen, Ann. Rev. Physiol. 47: 469 (1985)). 특히 폐경기 후의 여성에게서 GH 분비가 연령에 따라 감소하는 것으로 보고되었다[Millard et al., Neurobiol. Aging, 11: 229-235 (1990); Takahashi et al., Neuroendocrinology M, L6-137-142 (1987)]. 또한, 문헌[Rudman et al., J. Clin. Invest., 67: 1361-1369 (1981)] 및 [Blackman, Endocrinology and Aging, 16: 981 (1987)]을 참조하라. 더우기, 제지방 체중의 감소, 지방 조직 크기의 팽창, 및 피부의 얇아짐을 포함하는 노화의 징후 중 일부가 1 주에 3 번 GH 치료에 의해 감소될 수 있다는 보고가 존재한다. 예를 들면 문헌[Rudman et al., N. Eng. J. Med., 323: 1-6 (1990)] 및 동일한 저널에 반스 박사(Dr. Vance)가 저술한 논문(pp. 52-54)을 참조하라. 이 생물학적 효과는 hGH 및 특이적 세포 수용체 사이의 상호작용으로부터 유래한다. 두 개의 상이한 인간 수용체가 클로닝되었으며, 이는 hGH 간 수용체(D. W. Leung et al., Nature 330: 537 (1987)) 및 인간 프로락틴 수용체(J. M. Boutin et al., Mol. Endocrinology. 3: 1455 (1989))이다. 그러나, 인간 태반 락토겐 수용체를 비롯한 다른 수용체도 존재하는 것 같다(M. Freemark, M. Comer, G. Komer, and S. Handwerger, Endocrinol. 120: 1865 (1987)). 이 상동성 수용체는 글리코실화 세포외 호르몬 결합 도메인, 단일 막횡단 도메인, 및 서열 및 크기에서 상당히 상이한 세포질 도메인을 함유한다. 하나 이상의 수용체가 hGH에 대한 생리적 반응에서 결정적 역할을 하는 것으로 추정된다.

일반적으로 체내에 투여된 생리적 활성 단백질은 체내에서의 높은 제거율로 인하여 짧은 기간 동안만 약물학적 활성을 나타낼 수 있는 것으로 관찰된다. 또한, 이 단백질의 상대적 소수성은 이들의 안정성 및(또는) 용해도에 제한을 가할 수 있다.

치료적 단백질의 제거율을 감소시키거나, 안정성을 개선시키거나 항원성을 제거할 목적으로, 수용성 중합체로 단백질을 화학적으로 개질하는 몇몇 방법이 제안되었다. 이 유형의 화학적 개질은 단백분해 효소가 단백질 골격 자체에 물리적으로 접촉하는 것을 효과적으로 차단하여 분해를 방지할 수 있다. 특정 수용성 중합체의 화학적 부착은 분자의 유체역학 부피의 증가로 인해 신 제거율을 효과적으로 감소시킬 수 있다. 추가적 이점은 특정한 경우, 치료적 단백질의 안정성 및 순환 시간을 증가시키고, 용해도를 증가시키고, 면역원성을 감소시키는 것을 포함한다. 폴리(알킬렌 옥시드), 특히 폴리(에틸렌 글리콜)(PEG)는 치료적 단백질 생성물의 제조에 사용된 이러한 화학적 모이티이다("PEG화하다(pegylate)"라는 동사는 하나 이상의 PEG 분자를 부착시키는 것을 의미한다). 폴리(에틸렌 글리콜)의 부착은 단백분해에 대해 보호하는 것으로 나타났고[Sada, et al., J. Fermentation Bioengineering 71: 137-139 (1991)], 특정 폴리(에틸렌 글리콜) 모이티의 부착 방법은 입수 가능하다. 발명의 명칭이 "비-면역원성 폴리펩티드"인 1979년 12월 18일 특허된 데이비스(Davis) 등의 미국 특허 제4,179,337호; 및 발명의 명칭이 "폴리에틸렌 글리콜을 사용한 효소의 개질 및 그에 의해 생성된 생성물"인, 1977년 1월 11일에 특허된 로이어(Royer)의 미국 특허 제4,002,531호를 참조. 리뷰를 위해서는 문헌[Abuchowski et al., in Enzymes as Drugs. (J. S. Holcerberg and J. Roberts, eds. pp. 367-383 (1981)]를 참조.

에틸렌 글리콜/프로필렌 글리콜의 공중합체, 카르복시메틸셀룰로스, 덱스트란, 폴리(비닐 알콜), 폴리(비닐 피롤리돈), 폴리(-1,3-디옥솔란), 폴리(-1,3,6-트리옥산), 에틸렌/말레산 무수물 공중합체, 폴리-아미노산(동종중합체 또는 랜덤 공중합체)와 같은 다른 수용성 중합체가 사용되었다.

PEG가 부착된 치료적 단백질의 다수의 예가 기재되었다. 아데노신 데아미나제의 PEG가 부착된 제제인 아다겐(ADAGEN)(등록상표)은 중증 복합 면역결핍 질병을 치료용으로 허가되었다. PEG가 부착된 L-아스파라기나제인 온카스파르(ONCASPAR)(등록상표)는 과민성 ALL 환자의 치료용으로 허가되었다. PEG가 부착된 과산화물 디스뮤타제는 두부상처 치료용으로 임상 실험 중에 있다. PEG가 부착된 α-인터페론(미국 특허 제5,738,846호, 제5,382,657호)은 간염 치료용으로 허가되었고; PEG가 부착된 글루코세레브로시다제 및 PEG가 부착된 헤모글로빈은 전임상 시험 중에 있는 것으로 보고되었다. 다른 예는 IL-6에 첨가된 폴리(에틸렌 글리콜) 분자를 개시하는, 발명의 명칭이 "개질된 hIL-6"인 EF 0 442 724호의 PEG가 부착된 IL-6이다.

화학적으로 개질된 다른 특이적 치료 단백질은 과립구 콜로니 자극 인자(G-CSF)이다. G-CSF는 호중성 과립구의 혈류로의 방출 및 급속한 증식을 유도함으로써 감염에 대항하는 치료적 효과를 제공한다. 발명의 명칭이 "화학적으로 개질된 과립구 콜로니 자극 인자"인, 1990년 12월 12일에 공고된 유럽 특허 공보 EP 0 401 384호에서는 폴리(에틸렌 글리콜) 분자

가 부착된 G-CSF를 제조하는 방법 및 재료에 대해 기재한다. 개질된 G-CSF 및 그의 유사체는 발명의 명칭이 "수용성 중합체에 공유 콘쥬게이트된 폴리펩티드를 포함하는 연속 방출 제약 조성물"인, 1992년 3월 4일에 공고된 EO 0 473 268호에서도 보고되었고, 이 문헌에서는 폴리(에틸렌 글리콜)과 같은 수용성 입자 중합체에 공유 콘쥬게이트된 다양한 G-CSF 및 유도체의 용도에 대해 기재한다. 인간 과립구 콜로니 자극 인자 활성을 갖는 개질된 폴리펩티드는 1989년 10월 4일에 공고된 EP 0 335 423호에 보고되었다. 미국 특허 제5,824,784호에는 단백질 또는 그의 유사체를 N-말단에서 개질시키는 방법, 및 단백질 또는 그의 유사체, 및 N-말단에 화학적으로 개질된 신규 G-CSF 조성물을 포함하는, 그 결과 생성된 조성물을 제공한다. 미국 특허 제5,824,778호에는 화학적으로 개질된 G-CSF가 개시되어 있다.

폴리(에틸렌 글리콜)에 대해서는, 폴리(에틸렌 글리콜) 분자를 단백질에 부착시키기 위하여 다양한 방법이 사용된다. 일반적으로, 폴리(에틸렌 글리콜) 분자는 단백질에서 발견되는 반응성 기를 통해 단백질에 연결된다.

리신 잔기 상 또는 N-말단에서의 것과 같은 아미노기가 이러한 부착에 편리하다. 예를 들면 로이어(Royer)(상기 미국 특허 제4,002,531호)는 폴리(에틸렌 글리콜) 분자를 효소에 부착시키기 위하여 환원적 알킬화를 사용하였다고 기재하였다. 발명의 명칭이 "Peg 이미데이트 및 그의 단백질 유도체"인 1993년 4월 28일에 공고된 라이트(Wright)의 EP 0 539 167호에서는 유리 아미노기를 갖는 유기 화합물 및 펩티드를 PEG의 이미데이트 유도체 또는 관련 수용성 유기 중합체로 개질한다고 기재하고 있다. 미국 특허 제5,298,643호 및 미국 특허 제5,637,749호에서는 PEG 아릴 이미데이트를 개시한다.

문헌[Chamow et al., Bioconjugate Chem. 5: 133-140 (1994)]에서는 환원적 알킬화를 통해 CD4 면역어드헤신을 모노메톡시폴리(에틸렌 글리콜) 알데히드로 개질시키는 것에 대해 보고한다. 저자는 PEG가 부착된의 정도를 조절할 수 있는 조건 하에서 50%의 CD4-Ig가 MePEG-개질되었다고 보고한다(동일 문헌, 137 페이지). 저자는 또한 개질된 CD4-Ig의 (단백질 gp 120에 대한) 시험관내 결합 능력은 MePEG 수식의 정도와 연관된 속도로 감소한다고 보고한다(동일문헌). 1990년 2월 27일에 특허된 쇼(Shaw)의 미국 특허 제4,904,584호는 반응성 아민기를 통한 폴리(에틸렌 글리콜) 분자의 부착을 위해 단백질에서 리신 잔기의 수를 변경시키는 것에 관계된 것이다.

단백질에 중합체를 부착시키는 많은 방법은 연결기로서 작용하는 모이티를 사용하는 것과 관계된다. 그러나, 이러한 모이티는 항원성일 수 있다. 연결기를 관계시키지 않는 트레실(tresyl) 클로라이드 방법을 사용할 수 있지만, 트레실 클로라이드의 사용으로 인해 독성 부산물이 생성될 수 있기 때문에 이 방법은 치료적 생성물을 생산하는데 사용하기 어려울 수 있다. 문헌[Francis et al., In: Stability of protein pharmaceuticals: in vivo pathways of degradation and strategies for protein stabilization (Eds. Ahern, T. and Manning, M.C.) Plenum, New York, 1991)] 및 [Delgado et al., "Coupling of PEG to Protein By Activation With Tresyl Chloride, Applications In Immunoaffinity Cell Preparation", in Separations Using Aqueous Phase Systems, Applications In Cell Biology and Biotechnology, Fisher et al., eds. Plenum Press, New York, N.Y., 1989 pp. 211-213] 참조.

또한, 단백질 기질 (인슐린)의 C-말단 카르복실 기에 연결기 카르보히드라지드를 선택적으로 부착시키는 것을 보고하는 문헌[Rose 등, Bio콘쥬게이트 Chemistry 2: 154-159 (1991)]을 참고할 것.

국제 공개 제WO 93/00109호는 3일 이상의 기간 동안 연속적, 효과적 혈장 GH 농도를 유지시키는 것을 포함하는 포유동물 또는 조류의 GH 반응성 조직을 자극하는 방법에 관한 것이다. 그러한 혈장농도를 달성하는 한 방법은 PEG (폴리에틸렌 글리콜)과 같은 거대분자 물질에 커플링된 GH를 사용하는 것으로 기재되어 있다. 거대분자 물질에 커플링하면 개선된 반감기를 나타내는 것으로 언급되어 있다. PEG가 부착된 인간 성장 호르몬은 mPEG 알데히드-5000 및 mPEGN-히드록시숙신이미딜 에스테르 (mPEG-NHS-5000)를 사용하는 국제 공개 제WO 93/00109호에 보고되어 있다. mPEG-NHS를 사용하면, 다수의 PEG가 부착된 형태의 hGH의 불균일한 혼합물이 생성된다. 국제 공개 제WO 93/00109호는 mPEG-말레이미드의 PEG가 부착된 시스테인 hGH 변이체의 사용을 또한 개시한다.

국제 공개 제WO 99/03887호는 PEG가 부착된 시스테인 변이체 성장 호르몬을 개시한다. BT-005로 명명된 이 콘쥬게이트는 성장 호르몬 결핍 래트에서 체중 증가를 자극시키는데 보다 효과적이고, hGH 보다 긴 반감기를 갖는 것으로 주장된다.

PEG가 부착된 인간 성장 호르몬은 또한 카르보메틸화된 PEG의 숙신이미딜 에스테르를 사용하는 클라크(Clark) 등의 문헌[Journal of Biological Chemistry 271: 21969-21977, 1996]에도 보고되어 있다. 클라크 등은, 일차 아민에 선택적으로 콘쥬게이트된 mPEG-NHS-5000 사용하여 크기를 증가시킨 hGH 유도체를 기술한다. PEG 개질 수준이 증가하면 그 수용체에 대한 친화도가 감소되고, 세포계(cell-based) 분석에서의 EC_{50}을 1500 배까지 증가시킨다. 올슨(Olson) 등의 문헌[Polymer Preprints 38: 568-569, 1997]은 N-히드록시숙신이미드 (NHS) PEG 및 숙신이미딜 프로피오네이트 (SPA) PEG를 사용하여 다수의 PEG가 부착된 hGH 종을 얻는 것을 개시한다.

국제 공개 제WO 94/20069호는 PEG가 부착된 hGH를 흡입제형(formulation for pulmonary delivery)의 일부로서 예상하여 기술한다.

미국 특허 제4,179,337호는 효소 및 호르몬에 PEG를 부착시켜 생리적으로 활성 비-면역원성, 수용성 폴리펩티드 콘쥬게이트를 수득하는 방법을 개시한다. GH는 PEG가 부착되는 호르몬의 한 예로서 언급된다.

EP 공개 제458064 A2호는 소마토트로핀 중에 도입되거나 천연적으로 존재하는 시스테인 잔기에 PEG를 부착시키는 것을 개시한다. EP 공개 제458064 A2호는 또한, 야생형 소 소마토트로핀의 잔기 102-112에서 위치하는 것으로 제시된 오메가 루프라는 명칭의 루프 내에 두 개의 시스테인 잔기를 도입하는 것을 언급한다. 보다 특정하게는 EP 공개 제458064 A2호는 소 소마토트로핀의 번호 102 및 112로 명명된 잔기가 Ser에서 Cys로, Tyr에서 Cys로 각각 치환되는 것을 개시한다.

국제 공개 제WO 95/11987호는 모분자에 존재하거나 부위 지향 돌연변이에 의해 도입된 시스테인 잔기의 티올기에 PEG를 부착시키는 것을 제안한다. 국제 공개 제WO 95/11987호는 단백질분해효소 넥신-1에 PEG를 부착시키는 것에 관한 것이나, hGH 및 기타 단백질에 일반적으로 PEG를 부착시키는 것도 역시 제안되어 있다.

국제 공개 제WO 99/03887호는 예를 들면, 세린 잔기에 대하여 추가의 시스테인을 삽입하고, 도입된 시스테인 잔기에 PEG를 부착시켜 개질된 성장 호르몬을 개시한다.

국제 공개 제WO 00/42175호는 PEG 부착을 위한 유리 시스테인 잔기를 함유하는 단백질의 제조방법에 관한 것이다. 국제 공개 제WO 00/42175호는 다음의 hGH 돌연변이 T3C, S144C 및 T148C와, 이들의 시스테인 PEG 부착을 개시한다.

국제 공개 제WO 9711178호 (및 미국 특허 제5849535호, 제6004931호, 및 제6022711호)는 hGH의 아고니스트 또는 길항제로서의 GH 변이체의 사용에 관한 것이다. 국제 공개 제WO 9711178호는 또한 리신 PEG 부착 및 리신의 도입 또는 대체(예, K168A 및 K172R)를 비롯한 hGH의 PEG 부착을 또한 개시한다. 국제 공개 제WO 9711178호는 또한, G120K 치환을 개시한다.

문헌 [Knauf, M. J. 등, J. Biol. Chem. 263: 15064- 15070,1988]에 기술된 바와 같이, PEG가 부착된 hGH에 대한 이전의 보고는, 다중의 PEG 부착을 요구하는데, 이는 바람직하지 않은 생성물 비균일성을 야기시켜 신장 여과의 70K 분자량 컷-오프 보다 큰 유체역학적 부피를 얻는다.

보다 긴 주기의 반감기를 갖는 GH 분자는 필요한 투여 횟수를 감소시키고, 감재적으로는 보다 최적의 치료 hGH 농도와 부수적으로 증가된 치료 효과를 제공할 것이다.

본 발명은 감소된 불균일성, 감소된 제거율, 증가된 혈장 체류 기간, 개선된 용해도, 증가된 안정성, 감소된 항원성, 또는 그의 조합을 갖는 화학적으로 개질된 hGH 콘쥬게이트를 제공한다.

발명의 요약

본 발명은 감소된 제거율, 증가된 혈장 체류 기간, 증가된 안정성, 개선된 용해도 및 감소된 항원성으로부터 선택되나, 이로 제한되지는 않는 하나 이상의 개선된 화학적 또는 생리학적 성질을 갖는 화학적으로 개질된 hGH 및 그 아고니스트 변이체에 관한 것이다. 따라서, 하기에서 보다 상세히 기술하는 바와 같이, 본 발명은 hGH 및 그 아고니스트 변이체의 화학적 개질 뿐 아니라 다양한 폴리(에틸렌 글리콜) 잔기를 이용한 특정 개질에 관한 다수의 측면을 갖는다.

본 발명은 또한, 화학적으로 개질된 hGH 및 그 아고니스트 변이체의 제조방법에 관한 것이다.

본 발명은 또한 화학적으로 개질된 hGH 및 그 아고니스트 변이체를 포함하는 조성물에 관한 것이다.

본 발명의 개질된 hGH 및 그 아고니스트 변이체는, 왜소증 (GHD), 성인 GHD, 터너 증후군, 임신 기간에 비하여 작은 아기(SGA)의 성장 부전의 장기간의 치료, 프레이더-윌리 증후군(PWS)을 앓는 환자의 치료, 만성 신부전증(CRI), 에이즈 관련 소모성 질환(Aids wasting), 노화, 말기 신부전, 및 낭포성 섬유증의 치료에 유용할 수 있으나 이로 제한되는 것은 아니다.

도면의 간단한 설명

도 1은 hGH와 20K PEG-ALD의 반응 생성물의 환원 및 비환원 SDS-PAGE 분석 및 음이온 교환 정제된 20K PEG-ALD hGH의 사진이다. 레인 1. MW 단백질 표준; 레인 2. 환원된 hGH-10 ug; 레인 3. 환산된 20 K 직쇄 PEG-ALD hGH 반응 mix-10 ug; 레인 4. 환원된 음이온 교환 정제된 20 K 직쇄 PEG-ALD hGH-10 ug 레인 5. 블랭크; 레인 6. 비-환원된 hGH-10 ug; 레인 7. 비-환원된 20 K 직쇄 PEG-ALD hGH 반응 mix-10 ug; 레인 8. 비-환원된 음이온 교환 정제된 20 K 직쇄 PEG-ALD hGH-10 ug; 레인 9. 블랭크; 레인 10. MW 단백질 표준.

도 2는 다양한 음이온 교환 정제된 PEG가 부착된 hGH 분자의 비-환원 SDS-PAGE 분석의 사진이다. 레인 1. MM 단백질 표준; 레인 2. hGH-10 ug; 레인 2. 4-6 x 5K PEG-SPA hGH-10 ug; 레인 3. 20 K 직쇄 PEG-ALD hGH-10 ug; 레인 4.20 K 분지쇄 PEG-ALD hGH-10 ug 레인 5.40 K 분지쇄 PEG hGH-10 ug.

도 3은 hGH, 40K Br PEG-ALD hGH 및 40K Br PEG-NHS hGH의 트립신 소화물에 대한 RP-HPLC 용출 프로파일의 사진이다. (40K Br ALD hGH에서 보인 바와 같이) 주로 hGH의 N-말단에 커플링된 PEG는 새로운 PEG가 부착된 T1 피크가 생성되면서 N-말단(T1) 단편 피크를 감소시킨다.

도 4는 11일 동안, 뇌하수체가 제거된(hypophysectomized) 래트에서의 체중 증가를 나타냄으로써, 단일 PEG가 부착된 hGH를 매 6일 마다 피하(SC) 주사(1.8 mg/Kg)한 경우에 대한 PEG가 부착되지 않은 hGH를 매일 투여한 (0.3 mg/Kg/일) 경우의 생체내 생물학적 활성을 비교한 것이다.

도 5는 11일 동안, 뇌하수체가 제거된 래트에서의 체중 증가를 나타냄으로써, 각각 4-6 x 5K PEG-SPA-hGH, 단일 PEG가 부착된 20K 분지쇄 PEG-ALD hGH, 및 단일 PEG가 부착된 40K 분지쇄 PEG-ALD hGH를 매 6일 마다 피하(SC) 주사(1.8 mg/Kg)한 경우에 대한 PEG가 부착되지 않은 hGH를 매일 SC 투여한 (0.3 mg/Kg/일) 경우의 생체내 생물학적 활성을 비교한 것이다.

도 6은 11일 동안, 뇌하수체가 제거된 래트에서의 체중 증가를 나타냄으로써, 각각 4-6 x 5K PEG-CMHBA-hGH, 단일 PEG가 부착된 20K 직쇄 ALD, 단일 PEG가 부착된 30K 직쇄 ALD, 단일 PEG가 부착된 20K 분지쇄 PEG-ALD hGH, 및 단일 PEG가 부착된 40K 분지쇄 PEG-ALD hGH를 매 6일 마다 피하(SC) 주사(1.8 mg/Kg)한 경우에 대한 PEG가 부착되지 않은 hGH를 매일 SC 투여한 (0.3 mg/Kg/일) 경우의 생체내 생물학적 활성을 비교한 것이다.

도 7은 9일 동안의, 뇌하수체가 제거된 래트의 혈장 IGF-1 수준의 증가를 나타냄으로써, PEG가 부착되지 않은 hGH, 단일 PEG가 부착된 5K 직쇄 PEG-ALD hGH, 단일 PEG가 부착된 20K 직쇄 PEG-ALD hGH, 단일 PEG가 부착된 20K 분지쇄 PEG-ALD hGH, 단일 PEG가 부착된 20K 직쇄 PEG-히드라지드 hGH, 단일 PEG가 부착된 30K 직쇄 PEG-ALD hGH, 단일 PEG가 부착된 40K 분지쇄 PEG-ALD hGH, 4-6 x 5K PEG SPA hGH, 4-6 x 5K PEG-CMHBA를 1.8 mg/Kg SC 단일 투여한 경우의 생체내 생물학적 활성을 비교한 것이다.

발명의 상세한 설명

hGH 및 그 아고니스트 변이체는 미국특허 제4,658,021호 및 제5,633,352호에 기술된 재조합 단백질 부류의 일원이다. 이들의 재조합 생산 및 사용 방법은 미국 특허 제4,342,832호, 제4,601,980호, 제4,898,830호, 제5,424,199호 및 제5,795,745호에 상세히 기술되어 있다.

재조합 유전 기술을 사용하여 형질전환되거나 트랜스펙트된(transfected) 이. 콜라이 및 동물 세포와 같은 숙주 세포에 의해 생산되는, 임의의 정제되고 단리된 hGH 또는 그 아고니스트 변이체가 본 발명에 사용될 수 있다. 추가의 hGH 변이체는 미국특허출원 일련번호 제07/715,300호(1994년 6월 14일 출원) 및 제07/743,614호(1991년 8월 9일), 및 국제공개 제WO 92/09690호(1992년 6월 11일 공개)에 기술되어 있다. 이들 중에서, 형질전환된 이. 콜라이에 의해 제조된 hGH 또는 그 아고니스트 변이체가 특히 바람직하다. 그러한 hGH 또는 그 아고니스트 변이체는 높은 순도 및 균일성으로 대량으로 수득될 수 있다. 예를 들면, 상기 hGH 또는 그 아고니스트 변이체는 미국 특허 제4,342,832호, 제4,601,980호, 제4,898,830호, 제5,424,199호 및 제5,795,745호에 개시된 방법에 따라 제조될 수 있다. 용어 "실질적으로 하기의 아미노산 서열을 갖는다"는, hGH 또는 그 아고니스트 변이체에 대한 작용에 있어서 어떠한 불리한 비-유사성을 일으키지 않는 한, 상기 아미노산 서열이 하나 이상의 아미노산 변화 (삭제, 부가, 삽입 또는 대체)를 포함할 수 있다는 것을 의미한다. 하나 이상의 리신, 아스파르트산, 글루탐산, 쌍을 이루지 않은 시스테인 잔기, 유리 N-말단 α-아미노 기 또는 유리 C-말단 카르복실 기가 포함된 아미노산 서열을 실질적으로 갖는 hGH 또는 그 아고니스트 변이체를 사용하는 것이 보다 바람직하다.

본 발명에 따르면, 폴리 (에틸렌 글리콜)은 hGH 또는 그 아고니스트 변이체의 아미노산 잔기를 통해서 공유결합되어 있다. 다수의 상이한 관능기, 연결기, 구조, 및 분자량를 갖는 다양한 활성화된 폴리 (에틸렌 글리콜)이 당분야에 공지되어 있으며, PEG-hGH 콘쥬게이트 또는 PEG-hGH 아고니스트 변이체 콘쥬게이트를 제조하는데 사용된다 (문헌[Roberts M. J. 등, Adv. Drug Del. Rev. 54: 459-476, 2002), Harris J.M. 등, Drug Delivery Sytems 40: 538-551,2001] 참조). 아미노산 잔기는 예를 들면, 활성화된 폴리 (에틸렌 글리콜)의 말단 반응성 기가 결합될 수 있는 유리 아미노, 카르복실, 설프히드릴 (티올), 히드록실, 구아니디닐, 또는 이미디조일 기를 갖는 임의의 반응성 아미노산 잔기일 수 있다. 유리 아미노 기를 갖는 아미노산 잔기는 리신 및(또는) N-말단 아미노 산 잔기를 포함할 수 있고, 유리 카르복실 기를 갖는 아미노산 잔기는 아스파르트 산, 글루탐산 및(또는) C-말단 아미노산 잔기를 포함할 수 있고, 시스테인과 같은 유리 설프히드릴 (티올)을 갖는 아미노산 잔기, 세린 또는 티로신과 같은 유리 히드록실을 갖는 아미노산 잔기, 아르기닌과 같은 유리 구아니디닐을 갖는 아미노산 잔기, 및 히스티딘과 같은 유리 이미디조일을 갖는 아미노산 잔기 등이 있다.

다른 실시태양에서, 옥심 화학(문헌[Lemieux & Bertozzi Tib Tech 16: 506-513,1998] 참조)이 N-말단 세린 잔기를 표적화하는데 사용된다.

본 발명에 사용되는 폴리 (에틸렌 글리콜)은 임의의 특정 형태 또는 분자량 범위로 제한되지 않는다. 폴리 (에틸렌 글리콜) 분자량은 500 내지 100,000 사이이다. 통상적으로, 500-60,000의 분자량, 바람직하게는 1,000-40,000 이다. 보다 바람직하게는, 5,000 초과 내지 약 40,000 까지의 분자량이 사용된다.

다른 실시태양에서, 폴리 (에틸렌 글리콜)은 하나 이상의 PEG 잔기가 부착된 분지쇄 PEG이다. 분지쇄 PEG의 바람직한 예들은 미국특허 제5,932,462호, 제5,342,940호, 제5,643,575호, 제5,919,455호, 제6,113,906호, 제5,183,660호; 국제공개 제WO 02/09766호; 문헌[Kodera Y., Bioconjugate Chemistry 5: 283-288 (1994); 및 Yamasaki 등, Agric. Biol. Chem., 52: 2125-2127, 1998]에 기술되어 있다. 바람직한 실시태양에서, 분지쇄 PEG의 각각의 폴리 (에틸렌 글리콜)의 분자량은 5,000 내지 20,000이다.

폴리(알킬렌 옥사이드), 특히, 폴리(에틸렌 글리콜)은 PEG와 단백질 사이에 결합 잔기(이격기)를 제공할 수 있거나 제공할 수 없는 말단 반응성기를 통해 hGH 또는 그 아고니스트 변이체와 결합된다. 본 발명의 hGH 콘쥬게이트 또는 그 아고니스트 변이체를 형성하기 위해, 폴리(알킬렌 옥사이드)와 같은 고분자를 당업자에게 공지된 활성 형태로 전환시킨다. 반응성기는 예를 들어, 단백질 상에서 화학 잔기들, 예를 들어, 아미노기, 카르복실기 또는 티올기 및 폴리(에틸렌 글리콜) 사이에 결합을 매개하는 말단 반응성기이다. 통상적으로 말단 고분자 히드록시 종단-기(즉, 알파 및 오메가 말단 히드록실 기) 중의 하나 또는 둘다가 공유 콘쥬게이션을 가능하게 하는 반응성 관능기로 전환된다. 상기 공정은 종종 "활성화"로서 언급되며, 반응성기를 갖는 폴리(에틸렌 글리콜) 생성물은 이하에서는 "활성화 폴리(에틸렌 글리콜)"이라고 언급된다. α및 ε결합기 모두를 함유하는 고분자를 "비스-활성화 폴리(알킬렌 옥사이드)"라고 언급하며, "이관능기"이라고 언급된다. α및 ε말단 히드록실 상에 동일한 반응성기를 함유하는 고분자는 종종 "호모이관능기" 또는 "호모비스-활성화"라고 언급된다. α및 ε 말단 히드록실 상에 상이한 반응성기를 함유하는 고분자는 종종 "헤테로이관능기"(예를 들어, WO 01/26692 참고) 또는 "헤테로비스-활성화"로 언급된다. 단일 반응성기를 함유하는 고분자는 "모노-활성화" 폴리알킬렌 옥사이드 또는 "단일-관능기"이라고 언급된다. 다른 실질적으로 비-항원성 고분자는 유사하게 "활성화" 또는 "관능화"된다.

따라서, 활성화 고분자는 단백질 상에 화학 잔기, 예를 들어, α- 또는 ε-아미노, 카르복실 또는 티올기 및 폴리(에틸렌 글리콜) 사이에 결합을 매개하는데 적절하다. 비스-활성화 고분자는 2개의 단백질 분자 또는 한개의 단백질 분자와 한 개의 다른 실시태양의 반응성 소분자와 상기 방식으로 반응하여 가교 결합을 통해 단백질 고분자 또는 단백질-소분자 콘쥬게이트를 효과적으로 형성하도록 할 수 있다.

hGH 또는 그 아고니스트 변이체 상에서 발견되는 라이신(lysine)의 아미노 말단 α-아미노기 또는 ε-아미노기 중의 하나와 반응할 수 있는 관능기는 N-히드록시숙신이미딜 에스테르, 카르보네이트, 예를 들어, p-니트로페닐 또는 숙신이미딜(미국 특허 제5,808,096호, 미국 특허 제5,612,460호, 미국 특허 제5,324,844호, 미국 특허 제5,5,122,614호); 카르보닐 이미다졸; 아즈락톤(미국 특허 제5,321,095호, 미국 특허 제5,567,422호); 시클릭 이미드 티온(미국 특허 제5,405,877호, 제5,349,001호); 이소시아네이트 또는 이소티오시아네이트(그린왈드(Greenwald) R.B.의 문헌[J. Org. Chem., 60:331-336, 1995]); 트레실 클로라이드(EP 714 402, EP 439 508); 할로겐 포르미에이트(WO 96/40792) 및 알데히드를 포함한다.

hGH 또는 그 아고니스트 변이체의 카르복실산기, 반응성 카르보닐기 및 산화 카르보히드레이트 잔기와 반응할 수 있는 관능기는 1급 아민; 및 히드라진 및 히드라지드 관능기, 예를 들어, 아실 히드라지드, 카르바제이트, 세미카르바메이트, 티오카르바제이트 등(WO 01/70685)을 포함한다.

hGH 또는 그 아고니스트 변이체 상에서 이용가능한 메르캡토 기는 또한 반응성기, 예를 들어, 티올; 말레이미드, 술폰 및 페닐 글리옥살기를 갖는 적절히 활성화 고분자를 위한 부착 자리로서 사용될 수 있다(예를 들어, 미국 특허 제5,093,531호 참고, 상기 특허는 본원에 인용문헌으로 삽입됨). 친전자체 중심과 반응할 수 있는 다른 친핵체는 이에 제한되는 것은 아니며, 예를 들어, 히드록실, 아미노, 카르복실, 티올, 활성 메틸렌 등을 포함한다.

또한, 미국 특허 제5,359,030호; 미국 특허 제5,681,811호; 미국 특허 제5,438,040; 및 미국 특허 제5,359,030호에 개시되어 있는 친유성 및 친수성 잔기를 포함하는 고분자도 포함된다.

또한, PEG를 단백질과 직접 공유결합시키는 아미노기, 티올기 및 방향족 히드록시기와 반응할 수 있는 할로겐화 PEG도 WO 98/32466에 개시된다. 본 발명의 바람직한 일 실시태양에는, 2급 아민 또는 아미드 결합이 hGH 또는 그 아고니스트 변이체의 라이신의 N-말단 α- 아미노기 또는 ε- 아미노기 및 활성화 PEG를 사용하여 형성된다. 본 발명의 바람직한 또다른 실시태양에서는 2급 아민 결합은 (차모우(Chamow) 등의 문헌[바이오콘쥬게이트 켐. 5:133-140(1994)] 및 미국 특허 제5,824,784호에 개시된 바와 같은) $NaCNBH_3$, $NaBH_3$, 피리딘 보란 등과 같은 적절한 환원제를 이용한 환원에 의해 hGH 또는 그 아고니스트 변이체의 N-말단 1급 α- 또는 ε-아미노기와 직쇄 또는 분지쇄 PEG 알데히드 사이에 형성된다.

바람직한 실시태양에서는, 70% 이상, 바람직하게는 80%이상, 바람직하게는 81% 이상, 바람직하게는 82% 이상, 바람직하게는 83% 이상, 바람직하게는 84% 이상, 바람직하게는 85% 이상, 바람직하게는 86% 이상, 바람직하게는 87% 이상, 바람직하게는 88% 이상, 바람직하게는 89% 이상, 바람직하게는 90% 이상, 바람직하게는 91% 이상, 바람직하게는 92% 이상, 바람직하게는 93% 이상, 바람직하게는 94% 이상, 바람직하게는 95% 이상, 바람직하게는 96% 이상, 바람직하게는 96% 이상, 바람직하게는 97% 이상, 가장 바람직하게는 98% 이상의 폴리(에틸렌 글리콜)이 아미노 말단 α-아미노기상에 존재한다.

본 발명의 또다른 바람직한 실시태양에서, 아미드-형성 결합기, 예를 들어, 숙신이미딜 에스테르, 시클릭 이미드 티온 등으로 활성화시킨 고분자는 hGH 또는 그 아고니스트 변이체 사이의 결합 및 고분자에 효과를 미치도록 사용된다 (예를 들어, 미국 특허 제5,349,001호; 미국 특허 제5,405,877호 및 그린왈드 등의 문헌[*Crit.Rev.Ther.Drug Carrier Syst.* 17:101-161, 2000] 참고, 상기 문헌들은 본원에 인용문헌으로 삽입되었음). hGH 또는 그 아고니스트 변이체의 유리 아미노기와 결합될 수 있는 하나의 바람직한 활성화 폴리(에틸렌 글리콜)은 직쇄 또는 분지쇄 N-히드록시숙시닐이미드 폴리(에틸렌 글리콜)을 포함하며, N-히드록시숙시닐이미드를 이용하여 폴리(에틸렌 글리콜)의 숙신산 에스테르를 활성화함으로써 제조될 수 있다.

본 발명의 다른 바람직한 실시태양은 ε-아미노 또는 다른 기를 통해 hGH 또는 그 아고니스트 변이체를 이용하여 고분자의 공유 결합을 형성하기 위해 다른 활성화 고분자를 사용하는 것을 포함한다. 예를 들어, 말단 활성화 고분자의 이소시아네이트 또는 이소티오시아네이트 형태는 라이신 아미노기를 이용하여 우레아 및 티오우레아-기재 결합을 형성하도록 사용될 수 있다(그린왈드 R.B.의 문헌[*J. Org. Chem.*, 60:331-336, 1995]).

본 발명의 또다른 바람직한 면은 카르바메이트 (우레탄) 결합은 미국 특허 제5,122,614호, 제5,324,844호 및 제5,612,640호(상기 특허들은 본원에 인용문헌으로 삽입됨)에 개시된 바와 같은 단백질 아미노기를 이용하여 형성된다. 그 예에는 N-숙신이미딜 카르보네이트, 파라-니트로페닐 카르보네이트 및 카르보닐 이미다졸 활성화 고분자를 포함한다. 본 발명의 다른 바람직한 실시태양에서, PEG의 벤조트리아졸 카르보네이트 유도체는 hGH 또는 그 아고니스트 변이체 상에 아미노기와 연결된다.

본 발명의 또다른 면은 유리 hGH 또는 그 아고니스트 변이체 또는 다른 hGH 또는 그 아고니스트 변이체 유도체를 방출하는 효소적 또는 pH 지시 가수분해에 의해 분해될 것으로 예상되는 관능성 결합기에 의해 hGH 또는 그 아고니스트 변이체 분자에 부착된 수용성 고분자, 예를 들어, 폴리(에틸렌 글리콜)을 포함하는 hGH 또는 그 아고니스트 변이체의 전구약물 또는 지연 방출형을 제공한다. 전구약물은 또한 다단계 잠재화의 이용을 포함하는 "이중 전구약물"(Bundgaard in *Advanced Drug Delivery Reviews* 3: 39-65, 1989)일 수 있다. 이러한 시스템에서, 가수분해 반응은 초기 속도-제한 (저속) 효소적 또는 pH 지시 단계 및 제1단계 발생후에만 일어나는 고속 비-효소 가수분해를 포함하는 제2단계를 포함한다. 이러한 방출 가능 고분자는 임시적이며 hGH 또는 그 아고니스트 변이체를 연속으로 방출하는 저장소로서 작용할 수 있는 단백질 콘쥬게이트를 제공한다. 상기 관능성 결합기는 미국 특허 제5,614,549호; 미국 특허 제5,840,900호; 미국 특허 제5,880,131호; 미국 특허 제5,965,119호; 미국 특허 제5,965,565호; 미국 특허 제6,011,042호; 미국 특허 제6,153,655호; 미국 특허 제6,180,095B1호; 미국 특허 제6,413,507호; 그린왈드 R.B.등의 문헌[*J. Med. Chem.* 42;3657-3667, 1999]; 리(Lee), S. 등의 문헌[*Bioconjugate Chem.* 12:163-169, 2001]; 가만(Garman) A.J. 등의 문헌[*FEBS Lett.* 223:361-

365,1987]; 워그히렌(Woghiren) C. 등의 문헌[*Bioconjugate Chem.* 4:314-318,1993]; 로버츠(Roberts) M.J. 의 문헌[*J. Pharm. Sci.* **87**;1440-1445,1998]; 자오(Zhao) X.의 문헌[*Ninth Int. Symp. Recent Adv. Drug Delivery Syst.* 199]; 그린왈드 R.B. 등의 문헌[*J.Med.Chem.* **43**:475-487, 2000] 및 그린왈드 R.B.의 문헌[*Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.* **17**:101-161, 2000], 잘리프스키(Zalipsky) 등의 문헌[28th Int. Symp. On controlled Release of Bioactive Materials 1; 73-74, 2001]에 기재되어 있다.

PEG 부착 반응으로 불리는 콘쥬게이션 반응은 역사적으로 과량의 고분자를 갖는 용액 중에서 고분자가 단백질과 부착될 수 있는 곳 이외에서 수행되었다. 그러나, 이러한 일반적인 기술은 충분한 생체활성을 보유하면서 비-항원성 고분자와 생체활성 단백질을 콘쥬게이트시키기에 부적절한 것으로 입증되었다. hGH 또는 그 아고니스트 변이체 생체활성을 유지하는 한가지 방법은 고분자 커플링 방법에서 수용체 결합 자리와 결합된 hGH 또는 그 아고니스트 변이체 반응성 기와의 콘쥬게이션을 실질적으로 방지하는 것이다. 본 발명의 또다른 면은 보유 활성을 높은 수준으로 유지시키면서 폴리(에틸렌 글리콜)을 hGH 또는 그 아고니스트 변이체와 콘쥬게이션시키는 방법을 제공하는 것이다.

공유 결합을 통한 화학적 개질은 활성화 폴리(에틸렌 글리콜)을 이용하여 생체 활성 물질의 반응에서 일반적으로 채택되는 임의의 적절한 조건하에서 수행될 수 있다. 콘쥬게이션 반응은 hGH 또는 그 아고니스트 변이체를 불활성화시키는 것을 방지하기 위한 상대적으로 온화한 조건하에서 수행된다. 온화한 조건은 3 내지 10의 범위의 반응 용액의 pH 및 약 0℃내지 37℃ 범위의 반응 온도를 유지하는 것을 포함한다. hGH 또는 그 아고니스트 변이체 중의 반응성 아미노산 잔기가 유리 아미노기를 갖는 경우에는 상기 개질은 포스페이트, MES, 시트레이트, 아세테이트, 숙시네이트 또는 HEPES를 포함하는 적절한 완충액(pH 3 내지 10)의 비제한적 종류 중에서, 1 내지 48 시간 동안 4℃ 내지 37℃의 온도에서 수행되는 것이 바람직하다. PEG 알데히드와 같은 시약을 이용하여 N-말단 아미노기를 표적으로 하는 경우 바람직하게는 pH 4-8이 유지된다. 활성화 폴리(에틸렌 글리콜)은 hGH 또는 그 아고니스트 변이체의 유리 아미노기의 수의 몰수의 약 0.05 내지 100 배, 바람직하게는 0.01 내지 2.5배로 사용될 수 있다. 다른 한편, hGH 또는 그 아고니스트 변이체 중의 반응성 아미노산 잔기가 유리 바르복실기를 갖는 경우, 상기 개질은 약 3.5 내지 약 5.5의 pH에서 수행되는 것이 바람직하고, 폴리(옥시에틸렌 디아민)을 이용한 개질은 4℃ 내지 37℃에서 1 내지 24시간 동안 카르보디이미드(pH 3.5-5)의 존재하에서 수행된다. 활성화 폴리(에틸렌 글리콜)은 hGH 또는 그 아고니스트 변이체의 유리 카르복실기의 몰수의 0.05 내지 300배로 사용될 수 있다.

별도의 실시태양에서, 콘쥬게이션 반응에 포함되는 고분자의 양을 위한 상한은 실질적인 양의 고분자량 물질을 형성하지 않고 활성화 고분자 및 hGH 또는 그 아고니스트 변이체를 반응시키는 것이 가능할 정도로, 즉, hGH 또는 그 아고니스트 변이체의 1 분자 당 약 1 이상의 고분자 스트랜드를 함유하는 콘쥬게이트의 약 20% 이상으로 약 1:1을 초과한다. 예를 들어, 본 발명의 상기 면을 고려하면 약 6:1 이하의 비율을 사용하여 다음단계에서 임의의 고분자량 물질들로부터 단리될 수 있는 상당한 양의 목적하는 콘쥬게이트를 형성할 수 있다.

본 발명의 다른 면에서, 이관능기 활성화 PEG 유도체는 다수 hGH 또는 그 아고니스트 변이체 분자가 PEG를 통해 가교결합되어 있는 고분자 hGH 또는 그 아고니스트 변이체-PEG 분자를 생성하기 위해 사용될 수 있다. 본원에 기재된 반응 조건은 상당한 양의 비개질 hGH 또는 그 아고니스트 변이체를 제공할 수 있지만, 비개질 hGH 또는 그 아고니스트 변이체는 추가 콘쥬게이션 반응을 위한 다음 배치(batch)로 용이하게 재순환될 수 있다. 본 발명의 방법은 놀랍게도 매우 소량의, 즉, 약 30% 미만, 더 바람직하게는 약 10% 미만의 고분자량 물질 및 hGH 또는 그 아고니스트 변이체 당 1 이상의 고분자 스트랜드를 함유하는 물질을 생성한다. 상기 반응 조건은 고분자 콘쥬게이션 반응에서 통상적으로 사용되던 조건과는 대조적인 것이고, 여기서, 활성환 고분자는 목적 물질에 대해 수배의 초과 몰수로 존재한다. 본 발명의 다른 면에서, 고분자는 hGH 또는 그 아고니스트 변이체의 1당량 당 약 0.1/아미노 기 내지 약 50 당량의 양으로 존재한다. 본 발명의 다른 면에서, 고분자는 hGH 또는 그 아고니스트 변이체의 1당량 당 약 1 내지 약 10 당량의 양으로 존재한다.

본 발명의 콘쥬게이트 반응은 처음에 모노- 및 디-PEG-hGH 콘쥬게이트, 비반응 hGH, 비반응 고분자, 및 대개 약 20% 미만의 고분자량 종을 함유하는 반응 혼합물 또는 풀을 제공한다. 고분자량 종은 고분자 가닥 및(또는) 중합된 PEG-hGH의 하나 이상 또는 이의 아고니스트 변이체 종을 함유하는 콘쥬게이트를 포함한다. 비반응 종 및 고분자량 종이 제거된 후, 일차적으로 모노- 및 디-고분자-hGH 또는 그 아고니스트 변이체와의 콘쥬게이트를 함유하는 조성물을 회수한다. 대부분에 대한 콘쥬게이트가 단일 고분자 가닥을 포함한다는 사실로 미루어 보면, 콘쥬게이트는 실질적으로 균질하다. 이들 개질된 hGH 또는 그 아고니스트 변이체는 표준 FDC-P1 세포 증식 검정법(클라크(Clark) 등 문헌[Journal of Biological Chemistry 271:21969-21977, 1996), 수용체 결합 검정법(US 5,057,417) 또는 뇌하수체가 절제된 쥐 성장 (클라크, 문헌[Journal of Biological Chemistry 271:21969-21977, 1996]) 을 사용하여 측정한 바처럼 천연 또는 비개질된 hGH 또는 그 아고니스트 변이체와 관련하여 0.1% 이상의 시험관 내 생물적 활성을 갖는다. 그러나 본 발명의 선호되는 측면으로, 개질된 hGH 또는 그 아고니스트 변이체는 시험관 내 생물적 활성의 약 25%를 갖고, 바람직하게는 개질된 hGH 또는 그 아고니스트 변이체는 시험관 내 생물적 활성의 약 50%를 갖고, 더 바람직하게는 개질된 hGH 또는 그 아고니스트 변이체는 시험관 내 생물적 활성의 약 75%를 갖고, 매우 바람직하게는 개질된 hGH 또는 그 아고니스트 변이체는 동등한 또는 개선된 시험관 내 생물적 활성을 갖는다.

본 발명의 방법은 바람직하게는 고분자 대 hGH 또는 그 아고니스트 변이체의 다소 제한된 비를 포함한다. 따라서, hGH 또는 그 아고니스트 변이체와의 콘쥬게이트가 단지 한 가닥의 고분자만 함유하는 종에 주로 한정된다고 생각되어졌다. 더구나, 고분자의 hGH 또는 그 아고니스트 변이체 반응성 기와의 부착이 더 많은 몰 과량의 고분자 링커가 사용되는 경우보다 실질적으로 덜 무작위적이다. 반응 풀 내에 존재하는 비개질된 hGH 또는 그 아고니스트 변이체는, 콘쥬게이트 반응이 켄칭된 후에, 이온 교환 또는 크기별 배제 크로마토그래피 또는 유사한 분리 기술을 사용하여 다음 반응으로 재생할 수 있다.

폴리(에틸렌 글리콜)-개질된 hGH 또는 그 아고니스트 변이체, 즉 본 발명에 따른 화학적으로 개질된 단백질을 단백질의 정제에 사용되는 전통적인 방법, 예컨대 투석, 염석, 한외여과, 이온 교환 크로마토그래피, 소수성 상호작용 크로마토그래피(HIC), 겔 크로마토그래피 및 전기영동에 의하여 반응 혼합물로부터 정제할 수있다. 이온 교환 크로마토그래피가 비반응 폴리(에틸렌 글리콜), 및 hGH 또는 그 아고니스트 변이체를 제거하는 데에 특히 효과적이다. 본 발명의 추가의 태양으로, 모노- 및 디-고분자-hGH 또는 그 아고니스트 변이체 종을 반응 혼합물로부터 단리하여 고분자량 종, 및 비개질된 hGH 또는 그 아고니스트 변이체를 제거한다. 혼합된 종을 약 0.5-10mg/ml의 hGH 또는 그 아고니스트 변이체-고분자의

콘쥬게이트를 함유하는 버퍼 용액에 두어 분리시킨다. 적합한 용액은 pH가 약 4 내지 약 8이다. 용액은 바람직하게는 KCl, NaCl, K_2HPO_4, KH_2PO_4, Na_2HPO_4, NaH_2PO_4, $NaHCO_3$, $NaBO_4$, CH_3CO_2H 및 NaOH로부터 선택된 하나 이상의 버퍼 염을 함유한다.

반응 버퍼에 따라서, hGH 또는 그 아고니스트 변이체와 고분자의 콘쥬게이트 용액이 처음에 버퍼 교환/한외여과를 받아서 임의의 비반응 고분자를 제거하여야 할 수 있다. 예를 들어, PEG-hGH 또는 그 아고니스트 변이체와의 콘쥬게이트 용액을 저분자량 차단(10,000 내지 30,000 돌턴) 반투막을 통해서 한외여과하여 원치않는 물질의 대부분, 예컨대 비반응 고분자, 있다면 계면활성제 등을 제거한다.

콘쥬게이트를 원하는 종을 함유하는 풀로의 분배는 바람직하게는 이온 교환 크로마토그래피 매개를 사용하여 수행된다. 상기 매개는 PEG-hGH 또는 그 아고니스트 변이체와의 콘쥬게이트를 다소 예상가능하게 변하는 전하의 차이를 통하여 선택적으로 결합할 수 있다. 예를 들면, hGH 또는 그 아고니스트 변이체의 표면 전하는 단백질의 표면의 가능한 전하가 있는 기들의 수에 의하여 결정된다. 이들 전하가 있는 기들은 전형적으로 폴리(알킬렌 옥사이드) 고분자의 전위 부착의 지점으로 작용한다. 따라서, hGH 또는 그 아고니스트 변이체와의 콘쥬게이트는 다른 종들과는 다른 전하를 가질 것이며 선택적인 단리를 가능하게 한다.

강한 극성 음이온 또는 양이온 교환 수지, 예컨대 각각 4차 아민 또는 술포프로필 수지가 본 발명의 방법을 위해 사용된다. 이온 교환 수지가 특히 바람직하다. 본 발명에 사용하기 적합한 상업적으로 시판되는 양이온 교환 수지를 비제한적으로 나열하면 SP-히트랩(SP-hitrap)(등록상표), SP 세파로스 HP(SP Sepharose HP)(등록상표), 및 SP 세파로스(등록상표) 패스트 플로우(fast flow)가 있다. 다른 적합한 양이온 교환 수지, 예를 들어 S 및 CM 수지도 사용될 수 있다. 본 발명에 사용하기 적합한 상업적으로 시판되는 음이온 교환 수지의 비제한적으로 나열하면 Q-히트랩(등록상표), Q 세파로스 HP(등록상표), 및 Q 세파로스(등록상표) 패스트 플로우가 있다. 다른 적합한 음이온 교환 수지, 예를 들어 DEAE 수지도 사용될 수 있다.

예를 들어, 음이온 또는 양이온 교환 수지는 바람직하게 칼럼에 채워지고, 통상적인 수단에 의하여 평형화될 수 있다. 고분자 콘쥬게이트된 hGH 또는 그 아고니스트 변이체 용액과 동일한 pH 및 삼투압의 버퍼가 사용된다. 용출 완충액은 바람직하게는 KCl, NaCl, K_2HPO_4, KH_2PO_4, Na_2HPO_4, NaH_2PO_4, $NaHCO_3$, $NaBO_4$, 및 $(NH_4)_2CO_3$ 로부터 선택된 하나 이상의 염을 함유한다. 다음에 콘쥬게이트-함유 용액은 칼럼 위에서 비반응 고분자와 흡착되고, 일부 고분자량 종은 계속 유지되지 않는다. 로딩의 종결시에, 염의 증가되는 농도로 구배되는 유동을 칼럼에 가하여 원하는 폴리알킬렌 옥사이드-콘쥬게이트된 hGH 또는 그 아고니스트 변이체의 분획을 용출한다. 양이온 또는 음이온 교환 분리 단계 후에 용출된 모인 분획들은 균일 고분자 콘쥬게이트로 한정되는 것이 바람직하다. 다음에 임의의 콘쥬게이트 되지 않는 hGH 또는 그 아고니스트 변이체 종은 통상적인 기술에 의하여 칼럼으로부터 후세척될 수 있다. 원한다면, 모노 및 다중 PEG가 부착된 hGH 또는 그 아고니스트 변이체 종을 부가적으로 이온 교환 크로마토그래피 또는 크기별 배제 크로마토그래피를 통하여 추가로 서로 분리할 수 있다.

염의 농도나 pH를 증가시키는 다중 등용매 단계를 사용하는 기술도 사용할 수 있다. 농도를 증가하는 다중 등용매 용출 단계로 디- 및 다음에 모노-hGH 또는 그 아고니스트 변이체-고분자의 콘쥬게이트의 연속적인 용출을 얻을 수 있다.

용출에 대한 온도 범위는 약 4℃ 내지 약 25℃이다. 바람직하게는, 용출은 약 4℃ 내지 약 22℃의 온도에서 수행된다. 예를 들어, PEG-hGH 또는 그 아고니스트 변이체 분획의 용출을 280nm의 자외선 흡광도에서 검출된다. 분획 수집은 단순 시간 용출 프로파일을 통하여 달성할 수 있다.

폴리(에틸렌 글리콜) 고분자와 hGH 또는 그 아고니스트 변이체 잔기를 콘쥬게이트하는 과정에서 계면활성제를 사용할 수 있다. 적합한 계면활성제로 이온형 제제, 예컨대 소듐 도데실 술페이트(SDS)를 포함한다. 다른 이온 계면활성제, 예컨대 리튬 도데실 술페이트, 사차 암모늄 화합물, 타우로콜산, 카프릴산, 데칸 술폰산, 등도 사용할 수 있다. 비이온 계면활성제도 사용될 수 있다. 예를 들어, 폴리(옥시에틸렌) 소르비탄 (트윈류), 폴리(옥시에틸렌) 에테르(트리톤류)와 같은 물질이 사용될 수 있다. 또한, 노이게바우어(Neugebauer) 문헌[A Guide to the Properties and Uses of Detergents in Biology and Biochemistry (1992), Calbiochem Corp.]를 참조한다. 본 발명에 사용되는 계면활성제에 대한 유일한 제한으로 hGH 또는 그 아고니스트 변이체의 실질적인 비가역적인 변성을 야기하지 않고 고분자 콘쥬게이트을 완전히 억제하지 않는 농도 및 조건에서 사용한다는 것이다. 계면활성제는 반응 혼합물에서 약 0.01-0.5%, 바람직하게는 0.05-0.5%, 및 매우 바람직하게는 약 0.075-0.25%의 양으로 존재한다. 계면활성제의 혼합물도 또한 고려된다.

계면활성제가 고분자 콘쥬게이트 과정 동안 일시적, 가역적인 보호 시스템을 제공한다고 생각된다. 계면활성제는 라이신-기초 또는 아미노 말단 기초 콘쥬게이트이 진행되도록 하는 동안 고분자 응집을 선택적으로 방해하는 데에 효과적임을 보여준다.

본 폴리(에틸렌 글리콜)-개질된 hGH 또는 그 아고니스트 변이체는 아마도 생체 내에서 연장된 반감기에 기인하는 더 지속적인 약리 효과를 갖는다.

또한, 본 폴리(에틸렌 글리콜) 개질된 hGH 또는 그 아고니스트 변이체는 성장 호르몬 결핍증(GHD), 어른 성장 호르몬 결핍, 터너 증후군, 임신 기간 동안에 작게 태어난 아이의 성장 실패(SGA), 프라더 윌리 증후군(PWS), 만성 신장 기능부족(CRI), 에이즈 쇠약 및 노화의 치료에 유용할 수 있다.

이를 환자에게 투여하기 위하여, 본 폴리(에틸렌 글리콜)-개질된 hGH 또는 그 아고니스트 변이체를 제약적으로 허용되는 희석제, 등장액을 제조하기 위한 제제, pH-조절제 등을 함유하는 제약물로 제제화 할 수 있다.

상기 제약물은 치료 목적에 따라 피하, 근육내, 정맥내, 폐로, 피부내, 또는 경구로 투여될 수 있다. 투여량은 치료하고자 하는 환자의 질환의 상태 및 종류에 기초할 수 있고, 어른에 대해 보통 0.1mg 내지 5mg 주입량 및 0.1mg 내지 50mg의 경구 투여량일 수 있다.

포함되는 고분자 물질은 또한 바람직하게는 상온에서 수용성일 수 있다. 이런 고분자를 비제한적으로 나열하면, 폴리(알킬렌 옥사이드) 단독고분자 예컨대 폴리(에틸렌 글리콜) 또는 폴리(프로필렌 글리콜), 폴리(옥시에틸렌화 폴리올), 이들의 공고분자 및 블록 공고분자의 수 용해도가 유지된다는 조건으로 이들의 블록 공고분자를 포함한다.

PEG-기재 고분자의 대체물로서 유효한 비항원 물질, 예컨대 덱스트란, 폴리(비닐 피롤리돈), 폴리(아크릴아미드), 폴리(비닐 알콜), 카르보하이드레이트 기재 고분자 등이 사용될 수 있다. 실로, 이들 고분자 물질의 α- 및 ω-말단 기의 활성화를 폴리(알킬렌 옥사이드)를 전환하는 데에 사용하는 것과 유사한 방식으로 할 수 있고 이는 당업자에게 자명할 것이다. 당업자는 상기의 나열이 단지 예시적이고, 본원에서 기술한 양을 갖는 모든 고분자 물질을 예기할 수 있을 것이다. 본 발명의 목적상, "효과적으로 비항원적"이란 당업계에서 이해되는 비독성이고 포유류에서 명백한 항원 반응을 도출하지 않는 모든 물질을 의미한다.

용어의 정의

다음은 약어와 본원에서 상호교환적으로 사용되는 대응 의미의 목록이다:

g 그람

mg 밀리그람

ml 또는 mL 밀리리터

RT 실온

PEG 폴리(에틸렌 글리콜)

여기에 개시된 모든 공개, 특허 및 특허 출원의 완전한 내용은 각 개별 공개, 특허, 또는 특허출원이 참고로 혼입되도록 구체적이고 개별적으로 나타낸 것처럼 참고로 혼입되어 있다.

비록 앞선 발명은 이해의 명료함을 목적으로 예시 및 실시예에 의하여 상세하게 기술하였지만, 본 발명의 교시를 비추어 보면 본 발명의 취지 및 범위로부터 벗어나지 않고 변화 및 변형이 가능함이 당업자에게는 충분히 자명할 것이다. 다음의 실시예는 예시의 목적으로만 제공되고, 상기 가장 넓은 의미로 기술된 본 발명의 범위를 제한하고자 함이 아니다.

다음의 실시예에서, hGH는 서열 번호(SEQ ID) 제 1의 것이다. 폴리펩티드 군의 hGH 또는 그 아고니스트 변이체의 다른 일원도 다음의 실시예에서 예시된 것과 같은 방식으로 PEG가 부착될 수 있다.

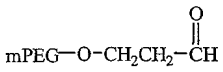
본원에서 인용된 모든 참고문헌, 특허 또는 출원은 본원에서 전체로서 모두 쓰여진 것처럼 혼입되어 있다.

본 발명의 범위를 제한하고자 해석되지 않는 다음의 실시예를 통해 본 발명은 더욱 예시될 것이다.

실시예

실시예 1

직쇄 분자량 20,000의 PEG-ALD hGH



실시예 1은 환원적 알킬화에 의해 N-말단에 1개의 PEG가 부착된 hGH를 실질적으로 균일하게 제조하는 방법을 보여 주는 것이다. 라이신 잔기의 N-말단에 있는 1차 아민의 상대적 pKa 값과 ε-아미노 위치에 있는 1차 아민의 상대적 pKa 값의 차이를 이용하여 환원적 아민화를 통해 분자량이 약 20,000인 메톡시-직쇄 PEG-프로피온알데히드 반응물(Shearwater Corp.)을 hGH의 N-말단에 선택적으로 커플링했다. pH 6.0의 25 mM MES(Sigma Chemical, St. Louis, MO), pH 7.0의 25 mM Hepes(Sigma Chemical, St. Louis, MO), 또는 pH 4.5의 10 mM 소듐 아세테이트(Sigma Chemical, St. Louis, MO)에 10 mg/mL로 용해시킨 hGH 단백질에 M-PEG-ALD를 첨가하여 메톡시-PEG-프로피온알데히드, M-PEG-ALD(Shearwater Corp., Huntsville, AL)와 반응시켜 아민에 대한 PEG:hGH 상대적 몰비 0.1:0.7을 얻었다(임의로 8% 아세토니트릴을 첨가할 수도 있다). H_20에 용해시킨 1M $NaCNBH_4$ 모액(Sigma Chemical, St. Louis, MO)을 첨가하여 반응을 촉매화하여 최종 농도 10-50 mM을 얻었다. 반응은 18-24시간 동안 4℃ 내지 실온에서 어두운 곳에서 수행하였다. pH 약 7.6의 1M 트리스(Sigma Chemical, St. Louis, MO)를 최종 농도 50 mM까지 첨가하여 반응을 종결시키거나 또는 다음 정제를 위해 적당한 버퍼에 희석시켰다.

실시예 2

직쇄 분자량 30,000의 PEG-ALD hGH

실시예 1에 기재된 방법을 사용하여 메톡시-직쇄 분자량 30,000의 PEG-프로피온알데히드 반응물(Shearwater Corp.)를 hGH의 N-말단에 커플링했다.

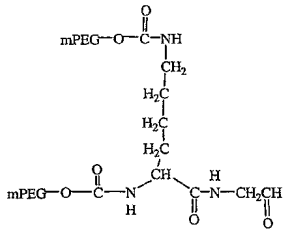
실시예 3

직쇄 분자량 5,000의 PEG-ALD hGH

실시예 1에 기재된 방법을 사용하여 메톡시-직쇄 분자량 5,000의 PEG-프로피온알데히드 반응물(Fluka)를 hGH의 N-말단에 커플링했다.

실시예 4

분지쇄 분자량 40,000의 PEG-ALD hGH



실시예 1에 기재된 방법을 사용하여 메톡시-분지쇄 분자량 40,000의 PEG-알데히드(PEG2-ALD) 반응물(Shearwater Corp.)를 hGH의 N-말단에 커플링했다.

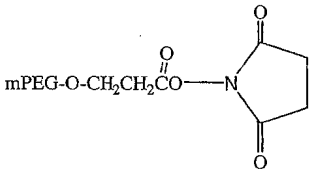
실시예 5

분지쇄 분자량 20,000의 PEG-ALD hGH

실시예 1에 기재된 방법을 사용하고 아민을 기준으로 hGH에 대한 PEG의 몰비를 0.1 내지 0.5로 하여 메톡시-분지쇄 분자량 20,000의 PEG-알데히드(PEG2-ALD) 반응물(Shearwater Corp.)를 hGH의 N-말단에 커플링했다.

실시예 6

직쇄 분자량 30,000의 SPA-PEG hGH



실시예 6은 N-히드록시숙신이미딜(NHS) 활성 에스테르를 이용하여 PEG가 1개 부착된 hGH를 실질적으로 균일하게 제조하는 방법을 보여 주는 것이다. hGH 단백질 모액 용액을 pH 7.2의 0.25 M HEPES 완충액에 10 mg/mL로 용해시켰다(임의로 8% 아세토니트릴을 첨가할 수도 있다). 다음, SPA-PEG를 첨가하여 상기 용액을 메톡시-PEG-숙신이미딜 프로피오네이트(SPA-PEG)와 반응시켜 아민에 대한 PEG:hGH 상대적 몰비 0.1-0.65를 얻었다. 반응은 5분 내지 1시간 동안 4℃ 내지 실온에서 수행하였다. 0.1N 아세트산으로 pH를 4.0까지 낮추거나 5배몰 과량의 트리스 HCl을 첨가함으로써 반응을 종결시켰다.

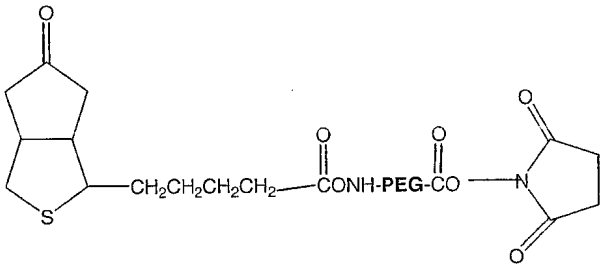
실시예 7

직쇄 분자량 20,000의 SPA-PEG hGH

실시예 6에 기재된 방법을 사용하여 직쇄 분자량 20,000의 SPA-PEG 반응물(Shearwater Corp.)를 hGH의 N-말단에 커플링했다.

실시예 8

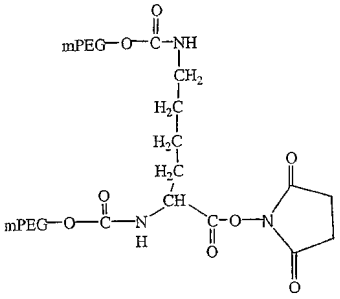
직쇄 분자량 3,400의 바이오틴-SPA-PEG hGH



실시예 6에 기재된 방법을 사용하여 분자량 3,400의 바이오틴-SPA-PEG-CO_2-NHS 반응물(Shearwater Corp.)를 hGH에 커플링했다.

실시예 9

분지쇄 분자량 10,000의 NHS-PEG hGH



실시예 6에 기재된 방법을 사용하여 분자량 10,000의 PEG2-NHS(Shearwater Corp.)를 hGH에 커플링했다.

실시예 10

분지쇄 분자량 20,000의 NHS-PEG hGH

실시예 6에 기재된 방법을 사용하여 분자량 20,000의 PEG2-NHS(Shearwater Corp.)를 hGH에 커플링했다.

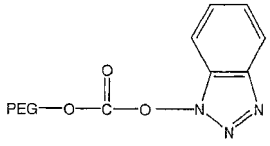
실시예 11

분지쇄 분자량 40,000의 NHS-PEG hGH

실시예 6에 기재된 방법을 사용하여 분자량 40,000의 분지쇄 PEG2-NHS(Shearwater Corp.)를 hGH에 커플링했다.

실시예 12

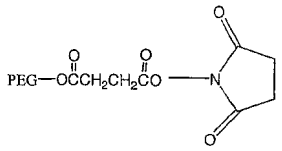
직쇄 분자량 20,000의 PEG-BTC-hGH



실시예 6에 기재된 방법을 사용하여 분자량 20,000의 PEG-BTC(Shearwater Corp.)를 hGH에 커플링했다. 실시예 12는 PEG의 벤조트리아졸 카르보네이트 유도체를 사용하여 PEG가 부착된 hGH를 실질적으로 균일하게 제조하는 방법을 보여주는 것이다.

실시예 13

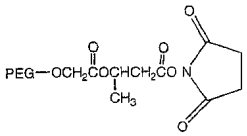
직쇄 분자량 5,000의 PEG-SS-hGH



실시예 6에 기재된 방법을 사용하여 분자량 5,000의 숙신이미딜 숙시네이트-PEG(SS-PEG)(Shearwater Corp.)를 hGH에 커플링했다. 실시예 13은 가수분해가능한 결합을 이용하여 PEG가 부착된 hGH를 실질적으로 균일하게 제조하는 방법을 보여 주는 것이다.

실시예 14

직쇄 분자량 20,000의 PEG-CM-HBA-hGH



실시예 6에 기재된 방법을 사용하여 분자량 20,000의 카르복시메틸 히드록시부티르산-PEG(CM-HBA-PEG)(Shearwater Corp.)를 hGH에 커플링했다. 실시예 14는 가수분해가능한 결합을 이용하여 PEG가 부착된 hGH를 실질적으로 균일하게 제조하는 방법을 보여 주는 것이다.

실시예 15

직쇄 2-4x 분자량 5,000의 PEG-CM-HBA-hGH

실시예 13에 기재된 방법을 사용하여 분자량 5,000의 PEG-CM-HBA(Shearwater Corp.)를 hGH에 커플링했다.

실시예 16

직쇄 분자량 20,000의 HZ-PEG-hGH

$PEG\text{-}OCH_2CONHNH_2$

실시예 16은 분자량 20,000의 메톡시-PEG-히드라지드, HZ-PEG(Shearwater Corp.)를 사용하여 PEG가 부착된 hGH를 실질적으로 균일하게 제조하는 방법을 보여 주는 것이다. hGH 단백질 모액 용액을 pH 4.0의 10 mM MES에 10 mg/mL로 용해시켰다. 다음, HZ-PEG 덩어리를 첨가하여 상기 용액을 HZ-PEG와 반응시켜 카르복실기에 대한 PEG:hGH 상대적 몰비 0.1-5.0을 얻었다. 카르보디이미드(EDC, EOAC, EDEC)로 반응을 촉매화하여 최종 농도 2 mM 내지 4 mM을 얻었다. 반응은 4℃에서 2시간 내지 밤새도록 또는 실온에서 10분 내지 밤새도록 수행하였다. 양이온 교환으로 정제함으로써 콘주게이션되지 않은 PEG와 카르보디이미드를 제거하여 반응을 종결시켰다.

실시예 17

PEG가 다중 부착된 종

실시예 1 및 4에서는 PEG가 2개 이상 부착된 변형된 hGH도 얻었고, 음이온 교환 크로마토그래피를 사용하여 PEG가 1개 부착된 종으로부터 분리하였다. PEG가 2개 이상 부착된 변형된 hGH는 또한 양이온 교환 크로마토그래피를 사용하여서도 PEG가 1개 부착된 종으로부터 분리하였다. PEG가 2개 이상 부착된 변형된 hGH는 또한 실시예 2, 3, 5-13에서도 얻었고, 실시예 1 및 4와 유사한 방법으로 정제하였다.

실시예 18

PEG가 부착된 hGH의 정제

단일 이온 교환 크로마토그래피 단계를 사용하여 PEG가 부착된 hGH 종을 반응 혼합물로부터 95% 이상 정제하였다(SEC 분석).

<음이온 교환 크로마토그래피>

단일 음이온 교환 크로마토그래피 단계를 사용하여 PEG hGH 종을 반응 혼합물로부터 95% 이상 정제하였다(SEC 분석). 음이온 교환 크로마토그래피를 사용하여 PEG가 1개 부착된 hGH를 변형되지 않은 hGH 및 PEG가 다중 부착된 hGH 종으

로부터 정제하였다. 앞에서 언급한 전형적인 20K 알데히드 hGH 반응 혼합물(5-100 mg 단백질)을 pH 7.3의 25 mM HEPES(완충액 A)로 평형을 이룬 Q-세파로즈 하이트랩 칼럼(1 또는 5 mL)(Amershan Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ) 또는 Q-세파로즈 고속 유동 칼럼(26/20, 70 mL 베드 부피)(Amershan Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ)에서 정제하였다. 상기 반응 혼합물을 완충액 A로 5-10배 희석시키고, 2.5 mL/분의 유속으로 칼럼 위에 로딩하였다. 칼럼을 칼럼 8배 부피의 완충액 A로 세척하였다. 이어서, 0-100 mM의 NaCl 선형 구배를 갖는 칼럼에서 이 칼럼 부피의 80 내지 100배의 완충액 A로 다양한 hGH 종을 용출시켰다. 용리액을 280 nm(A_{280})의 흡광도에서 관찰하고, 5 mL의 분획을 모았다. 분획은 PEG 부착 정도가 예를 들면 1, 2, 3 등인 것까지 모았다(실시예 15에서 평가한 것처럼). 모은 분획을 센트리프렙(Centriprep) YM10 농축기(Amicon, Technology Corporation, Northborough, MA)에서 0.5 내지 5 mg/mL까지 농축했다. 모은 분획의 단백질 농도를 흡광 계수 0.78을 사용하여 A_{280}으로 측정하였다. 이 과정에서 얻은 정제된 모노 20K PEG-알데히드 hGH의 총수율은 25 내지 30% 이었다.

<양이온 교환 크로마토그래피>

양이온 교환 크로마토그래피는 pH 4.0의 소듐 아세테이트 10 mM (버퍼 B)로 평형을 이룬 SP 세파로즈 고성능 칼럼(Pharmacia XK 26/20, 70 mL 베드 부피)에서 수행하였다. 상기 반응 혼합물을 완충액 B로 10배 희석시키고, 5 mL/분의 유속으로 칼럼 위에 로딩하였다. 칼럼을 칼럼 5배 부피의 완충액 B로 세척하고, 이어서 칼럼 5배 부피의 12% 완충액 C(10 mM 아세테이트 pH 4.5, 1M NaCl)로 세척하였다. 이어서, 12 내지 27%의 완충액 C 선형 구배를 갖는 칼럼에서 이 칼럼 부피의 20배로 PEG-hGH 종을 용출시켰다. 용리액을 280 nm에서 관찰하고, 10 mL의 분획을 모았다. 분획은 PEG 부착 정도(1, 2, 3 등)에 따라 모으고, pH 4.5의 10 mM 아세테이트 완충액에 교환해 넣고, 아미콘(Amicon) YM10 멤브레인을 부착한 교반 셀에서 1-5 mg/mL까지 농축시켰다. 모은 분획의 단백질 농도는 흡광 계수 0.78을 사용하여 A_{280}으로 측정하였다. 이 과정에서 얻은 정제된 모노 PEG 부착 hGH의 총수율은 10 내지 50% 이었다.

실시예 19

<생화학적 특성>

정제된 PEG 부착 hGH 분획의 특성을 환원 및 비환원 SDS-PAGE, 변성 및 비변성 크기 배제 크로마토그래피, 분석 음이온 교환 크로마토그래피, N-말단 시퀀싱, 소수성 상호작용 크로마토그래피 및 역상 HPLC로 조사하였다.

<크기 배제 고성능 액체 크로마토그래피(SEC-HPLC)>

비변성 SEC-HPLC

비변성 SEC-HPLC를 사용하여 다양한 결합 화학, 크기, 링커(linker) 및 기하학적 배치를 갖는 메톡시-PEG와 hGH의 반응, 음이온 교환 정제 풀(pool), 및 최종 정제품을 평가하였다. 분석 비변성 SEC-HPLC는 토소하스(Tosohaas) G4000PWXL 칼럼, 7.8 mm x 30 cm(Tosohaas Amersham Bioscience, Piscataway, NJ) 또는 수퍼덱스(Superdex) 200(Amersham Bioscience, Piscataway, NJ)를 사용하여 0.5 mL/분의 유속으로 pH 7.2의 20 mM 포스페이트, 150 mM NaCl에서 수행하였다. PEG화는 단백질의 유체역학적 부피(hydrodynamic volume)을 크게 증가시키고, 결과적으로 체제 시간을 감소시켰다. 변형되지 않은 hGH와 함께 새로운 종들도 PEG 알데히드 hGH 반응 혼합물에서 관찰되었다. 이들 PEG 부착 및 미부착 종들을 Q-세파로즈 크로마토그래피에서 분리하였다. 생성된 정제된 모노 PEG-알데히드 hGH 종들은 차례로 용출되어 비변성 SEC에서 단일 피크를 나타내는 것으로 관찰되었다(>95% 순도). Q-세파로즈 크로마토그래피 단계는 PEG가 1개 부착된 hGH에서 유리 PEG, hGH, PEG가 복수개 부착된 hGH 종들을 효과적으로 분리하였다. 비변성 SEC-HPLC는 다양한 PEG 부착 hGH의 유효 크기는 이들 각각의 이론적 분자량보다 훨씬 크다는 것을 보여주었다(표 1).

표 1.
크기 배제 크로마토그래피(SEC)

	(이론)분자량	크기(SEC)
hGH	22,000	21,000
4-6x5K PEG-SPA GH	47,000	128,000
2-4x5K PEG-CMHBA(NHS) GH	37,000	71,000
20K PEG-ALD GH	42,000	120,000
20K 분지쇄 PEG-ALD GH	42,000	114,000
20K PEG-CMHBA(NHS) GH	42,000	115,000
20K PEG-히드라지드 GH	42,000	125,000
2x20K PEG-ALD GH	62,000	250,000
30K PEG-ALD GH	52,000	231,000
30K PEG-SPA GH	52,000	183,000
2x30K PEG-SPA GH	82,000	569,000
40K 분지쇄 PEG-ALD GH	62,000	330,000
40K 분지쇄 PEG-NHS GH	62,000	253,000

변성 SEC-HPLC

다양한 메톡시-PEG와 hGH과의 반응, 음이온 교환 정제 및 최종 정제된 산물을 변성 SEC-HPLC를 사용하여 평가하였다 분석적 변성 SEC-HPLC를 0.8 mL/분 유속으로 100 mM 인산염 pH 6.8, 0.1% SDS에서 토소하스 (Tosohaas) 3000SWXL 컬럼 7.8 mm X 30 cm (Tosohaas Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ)을 사용하여 실행하였다. PEG 부착

은 단백질의 유체역학적 부피를 증가시켜서 더 이른 잔류 시간으로 이동하는 것을 야기하였다. 비개질된 hGH와 함께 20K PEG 알데하이드 hGH 반응 혼합물에서 새로운 종을 관찰하였다. 상기 PEG가 부착된 종 및 PEG가 부착되지 않은 종을 Q-세파로스 크로마토그래피로 분리하고 결과 정제된 단일 20K PEG 알데하이드 hGH를 후에 변성 SEC (> 95 % 순도)에서 단일 피크로 용출하는 것으로 보였다. 상기 Q-세파로스 크로마토그래피 스텝은 유리 PEG, hGH 및 다중 PEG가 부착된 hGH 종을 단일 PEG가 부착된 hGH로부터 효과적으로 제거하였다.

SDS PAGE/PVDF 전이

SDS-PAGE를 다양한 PEG 시약과 hGH 및 정제된 최종 산물과의 반응을 평가하는데 사용하였다. 상기 기술 예를 단일 20K 직쇄 및 분지쇄 20K 및 40K PEG 알데하이드 및 4X6 5K SPA PEG를 이용하여 보였다. (도 1 & 2). SDS-PAGE를 환원 및 비환원 조건하에서 1 mm 두께의 10-20 % 트리스 트리신 겔 (Invitrogen, Carlsbad, CA)에서 실행하고 노벡스 콜로이달 코마시 G-250 (Novex Colloidal Coomassie^{TM} G-250) 염색 키트 (Invitrogen, Carlsbad, CA)를 사용하여 염색하였다. 정제된 단일 PEG-알데하이드 hGH 종은 SDS-PAGE에서 1 종인 주요 밴드로 이동하였다. 밴드를 추후의 N-말단 서열 확인을 위하여 PVDF 멤브레인에 블로팅하였다.

분석적 음이온 교환 HPLC

다양한 mPEG와 hGH와의 반응, 음이온 교환 정제 분획 및 최종 정제된 산물을 평가하기 위하여 분석적 음이온 교환 HPLC을 사용하였다. 분석적 음이온 교환 HPLC를 1 mL/분 유속으로 50 mM 트리스 pH 8.6에서 토소하스 Q5PW 또는 DEAE-PW 음이온 교환 컬럼, 7.5 mm X 75 mm (Tosohaas Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ)을 사용하여 실행하였다. 샘플을 5-200 mM NaCl의 선형 구배를 이용하여 용출하였다.

역상 HPLC (RP-HPLC)

PEG-GH 반응 혼합물 및 정제된 PEG가 부착된 산물을 RP HPLC로 분석하여 hGH 종, 단일 및 다중 PEG가 부착된 hGH 종을 밝혀내고, 산화된 hGH 형태 및 상이한 위치 (예를 들면, N-말단 대 라이신 ε-아미노기)에 연결된 단일 PEG를 갖는 PEG hGH 이소폼을 모니터하였다. RP-HPLC를 조르박스 (Zorbax) SB-CN 150 또는 250 mm x 4.6 mm (3.5 mm or 5 mm) 역상 HPLC 컬럼을 사용하여 실행하였다. 실험을 샘플당 단백질 10 mg을 전형적으로 로딩하여 주위온도에서 실시하였다. 완충액 A는 물에서의 0.1 % 트리플루오로아세트산이고, 완충액 B는 아세토니트릴에서의 0.1 % 트리플루오로아세트산이다. 분당 B에서 ½ % 증가를 야기하는 구배는 하기와 같았다:

스텝	시간	유동	%A	%B	스텝
0	0	1	60	40	0
1	3	1	60	40	0
2	20	1	50	50	1
3	2	1	60	40	1
4	6	1	60	40	0

N-말단 서열 및 펩티드 매핑

자동화된 에드만 (Edman) 분해 화학을 사용하여 NH2-말단 단백질 서열을 결정하였다. 어플라이드 바이오시스템즈 모델 494 프로사이스 시퀀서 (Applied Biosystems Model 494 Procise sequencer) (Perkin Elmer, Wellesley, MA)를 분해에 이용하였다. 퍼킨 엘머/브라운리 2.1 mm (Perkin Elmer/Brownlee 2.1 mm) 상기와 동일한 PTH-C18 컬럼을 이용하여 맞춰진 어플라이드 바이오시스템즈 모델 140C PTH 어낼라이저를 이용하여 온라인 (on-line) 방식으로 RP-HPLC 분석에 의하여 각각의 PTH-AA 유도체를 확인하였다. PVDF 멤브레인에 전이된 20K 직쇄 및 20 및 40K 분지쇄 PEG-ALD hGH 단백질 밴드 또는 정제된 20K 직쇄 및 분지쇄 20 및 40K PEG-ALD hGH의 용액을 서열확인하였다. 주요 신호 (약 88 % 수율)를 산출하는 정제된 20K 직쇄 PEG-hGH가 N-말단 아미노산이 존재하지 않는 때를 제외하고 hGH에 대하여 예측되는 서열을 갖는 것을 관찰하였다. 상기 결과는 알데하이드 화학을 통하여 N-말단에 PEG가 부착된 단백질에 대하여 예측되는 것이다. 첫번째 사이클의 잔기는 부착된 PEG 부분때문에 회수할 수 없었다. 덜 중요한 신호 (약 12 % 수율)은 정확한 N-말단 아미노산 서열을 가졌다. RP-HPCL로부터 수집된 피크가 100 % PEG가 부착된 것을 고려하면, 상기 데이타는 PEG 개질의 약 88 %가 N-말단에서이고 나머지는 명백하게 몇몇 가능한 라이신 잔기에 연결된 것을 의미한다.

1 mg/mL 농도에서 트립신 분해를 실행하고, 전형적으로 분해당 50 ug 물질을 사용하였다. 트립신 대 PEG-hGH 비가 1:30 (w/w)이 되도록 트립신을 첨가하였다. 트리스 완충액은 30 mM, pH 7.5로 존재하였다. 샘플을 16 ± 0.5 시간 동안 실온에서 인큐베이션하였다. 반응을 분해 용액 mL당 1N HC1 50 μl을 첨가하여 정지시켰다. 자동 샘플러에 샘플을 위치시키기 전에 샘플을 6.25 % 아세토니트릴에서의 0.25 mg/ml인 최종 농도로 희석하였다. 아세토니트릴을 처음 첨가하고 (19.8 % 아세토니트릴로), 서서히 혼합하고, 그 후 물을 최종 부피 (개시 부피의 4 배)가 되도록 첨가하였다. 추가 분해 용액을 제거하고 -20 ℃에서 1 주일까지 저장할 수 있다.

워터스 얼라이언스 2695 HPLC 시스템 (Waters Alliance 2695 HPLC system)을 분석에 사용하나 다른 시스템도 비슷한 결과를 낳아야 한다. 사용된 컬럼은 5 μm 입자를 가진 아스텍 C-4 폴리머릭 (Astec C-4 polymeric) 25 cm x 4.6 mm 컬럼을 사용하였다. 실험을 샘플당 단백질 50 μg을 전형적으로 로딩하여 주위온도에서 실시하였다. 완충액 A는 물에서의 0.1 % 트리플루오로아세트산이고, 완충액 B는 아세토니트릴에서의 0.85 % 트리플루오로아세트산이다. 구배는 하기와 같았다:

시간	A%	B%	C%	D%	유동	곡선
0.00	0.0	0.0	100.0	0.0	1.000	1
90.00	0.0	0.0	55.0	45.0	1.000	6
90.10	0.0	0.0	0.0	100.0	1.000	6
91.00	0.0	0.0	0.0	100.0	1.000	6
91.10	0.0	0.0	100.0	0.0	1.000	6
95.00	0.0	0.0	100.0	0.0	1.000	6

상기 컬럼을 열 재킷을 사용하여 40 ℃로 가열하였다. 210 및 300 nm에서 데이타를 수집하여 워터스 996 PDA 검출기를 사용하여 피크를 검출하였다. 214 nm에서 추출된 크로마토그램을 샘플 분석에 사용하여 N-말단 PEG 부착 정도 (T-1 단편의 손실)를 결정하여 표 2에 나타내었다.

표 2.

샘플	존재하는 % T-1	손실된 % T-1	대조군에 비교하여 존재하는 % T-1
알데하이드			
5K ALD	2.0	98.0	7.4
20K	0.0	100.0	0.0
2x20K	0.0	100.0	0.0
30K	1.3	98.7	4.5
40K 분지쇄	1.9	98.1	6.8
NHS			
4-6x5 SPA	1.3	98.7	4.7
2-4X5 CM	0.0	100.0	0.0
20K CM	23.1	76.9	84.1
30K	18.2	81.8	63.9
2x30K	5.7	94.3	19.9
40K 분지쇄	20.9	79.1	73.5

실시예 20

약동력학적 연구

뇌하수체 제거 래트에서의 효능 연구

할란 랩 (Harlan Lab)에서 뇌하수체가 제거된 암컷 스프라그 돌리 래트 (Sprague Dawley rat)를 7 내지 10 일 기간 동안 성장율에 대하여 미리 선별하였다. 그 후, 성장 연구를 11 일 동안 실행하였다. 래트를 6 내지 8 군으로 나누었다. 군 1은 매일 또는 0 일 및 6 일에 비히클(vehicle)이 피하 투여된 래트로 이루어져 있다. 군 2에게는 매일 GH (0.3 mg/kg/투여량)가 피하 투여되었다. 군 3에게는 0 일 및 6 일에 GH가 피하 투여되었다 (1.8 mg/kg/투여량). 군 4에게는 0, 6 일에 PEG-GH가 피하 투여되었다 (1.8 mg/kg/투여량). 뇌하수체가 제거된 래트를 연구 기간 동안 이틀 간격 이상으로 체중을 재어 중량 증가를 모니터하였다. 일주일에 1 회 20K PEG-ALD hGH, 20K 및 40K 분지쇄 PEG-ALD hGH, 및 4-6x 5PEG-SPA hGH 투여에 대한 중량 증가 (평균 +/- SEM)는 hGH를 매일 투여시킨 것과 비슷하였다. (표 3 & 4). 표 3은 hGH를 매일 투여시킨 것에 비하여 다양한 PEG가 부착된 hGH 분자를 일주일에 1회 투여시킨 것에 대하여 11 일에서의 총 중량 증가 (평균 +/- SEM)를 요약하고 있다.

표 3.

쥐과 중량 증가

화합물	단일 주당 투여량 (mpk)	하루 체중 증가 그램/일 (d0-d11) (Avg. + SEM)	하루 hGH 증가에 비한 중량% 증가 (Avg.)
hGH (PEG가 부착 안된 것)	1.8	0.97 + 0.12	39%
5K 직쇄 PEG-ALD GH	1.8	0.96 + 0.27	36%
20K 직쇄 PEG-ALD GH	1.8	1.99 ± 0.13, 1.43 ± 0.08, 1.7 ± 0.10	73%
20K 직쇄 CM-HBA PEG GH	1.8	2.36 + 0.11	99%
20K 직쇄 PEG-HYD GH	1.8	2.62 + 0.22	99%
20K 분지쇄 PEG-ALD GH	1.8	2.24 + 0.07	87%
30K 직쇄 PEG-ALD GH	1.8	2.11± 0.06; 1.85± 0.14	94%
30K 직쇄PEG-SPA GH	1.8	2.6 +/- 0.1	117%
40K 분지쇄 PEG-ALD GH	1.8	2.57 + 0.08	100%
40K 분지쇄 PEG-NHS GH	1.8	2.53 + 0.09	121%
2x 20K PEG-ALD GH	1.8	2.66 + 0.10	128%
4-6x5K SPA-PEG GH	1.8	3.18 + 0.10	124%
2-4x5K CM-HBA-PEG GH	1.8	3.54 + 0.15	134%
2x 30K 직쇄 PEG-SPA GH	1.8	3.1 + 0.1	134%

각각의 성장 연구를 완결하면서, 동물을 희생시키고 뼈 (정강이뼈) 길이를 분석하였다. 도 6은 다양한 PEG-GH 콘쥬게이트를 0 일 및 6일에 투여시키거나 hGH를 매일 투여시킨 것에 반응하여 11일에서의 정강이뼈 길이 (평균 +/- SEM) 변화를 보여준다.

뇌하수체 제거 래트에서 IGF-1 수준

실험을 상기 중량 증가 연구에서와 같이 실행하나 혈액 샘플을 0, 1, 2, 3, 4, 5 일에 취하고 9 일에 동물을 희생시켰다. IGF-1 수준을 ELISA로 결정하였다. 도 7은 뇌하수체 제거 래트에서 매일 hGH를 투여하거나 또는 hGH를 단일 투여하거나 또는 PEG가 부착된 hGH를 0 일, 6 일에 투여한 후에 혈청 IGF-1 수준 (평균 +/- SEM)에서 증가를 비교하고 있다.

약동학적 연구

약동학적 연구를 정상인, 스프라그-돌리 수컷 래트, 마우스 및 시노몰구스 원숭이 (cynomolgus monkey)에서 실시하였다. 군당 6 마리 래트와 60 마리 이하 마우스를 사용하여 래트와 마우스에서 1.8 mg/kg의 단일 피하 볼루스 또는 1.0 mg/kg GH 또는 PEG-GH의 단일 iv 투여 중 하나로 주입하였다. 시노몰구스 원숭이에서는 군 당 2-4 마리 원숭이를 사용하여 0.18 mg/kg GH 또는 PEG-GH를 단일 피하 볼루스 및 iv 둘 모두로 투여하였다. 관련 PK 변수 (표 4)의 평가를 위하여 적당하게 1 내지 5일에 걸쳐서 혈액 샘플을 취하였다. ($t_{\frac{1}{2}}$) = 최종 반감기, (Cl) = 제거, (T_{max}) = 최대 농도에 이르는 시간, V_{ss} = 정상 상태에서 부피 분포 (외견적) 및 (C_{max}) = GH 최대 농도이고 PEG-GH 혈액 수준을 면역 분석 시험을 사용하여 각각의 샘플한 것에 대하여 모니터하였다.

hGH 면역 분석시험

표준 곡선을 생성하기 위하여 적당한 PEG hGH를 사용하여, hGH 오토델피아 (AutoDELFIA) 키트 형광 면역 시험 분석 (PerkinElmer Life Sciences)을 사용하여래트, 마우스 및 시노몰구스 원숭이 혈장에서 hGH 및 PEG가 부착된 hGH 단백질 농도 수준을 결정하였다.

표 4.

종	변수	40K Br ALD hGH	40K Br NHS hGH	30K ALD hGH	20K ALD hGH	4-6 x 5K SPA
마우스	투여량 (mg/kg)	iv 1.0 sc 1.8	iv 1.0 sc 1.8	iv 1.0 sc 1.8	iv 1.0 sc 1.0	iv 1.0 sc 1.8
	CL (ml/hr/kg)	2.29	2.12	4.43	7.89	4.53
	Vss (ml/kg)	18	16	24	17	51
	$T_{1/2, iv}$ (hr)	4.3	3.8	2.8	1.8	11
	$T_{1/2, sc}$ (hr)	4	6.2	3.7	2.5	9
	Tmax, sc (hr)	11	9	6	3	12
	SC AUC (ug/ml*hr)	682	577	160	31	668
	SC 생체 이용율 (%)	87	67	39	24	167
래트	투여량 (mg/kg)	iv 1.0 sc 1.8	iv 1.0 sc 1.8	iv 1.0 sc 1.8	iv 1.8 sc 1.8	iv 1.0 sc 1.8
	CL (ml/hr/kg)	1.36	1.75	5.75	9.9	2.9
	Vss (ml/kg)	19	25	44	33	36
	$T_{1/2, iv}$ (hr)	5.4	5.8	3.6	2.2	24
	$T_{1/2, sc}$ (hr)	5.8	7.1	6.7	2.9	29
	Tmax, sc (hr)	24	22	12	9	20
	SC AUC (ug/ml*hr)	398	344	97	70	249
	SC 생체 이용율 (%)	30	33	31	39	40
시노 원숭이	투여량 (mg/kg)	iv 0.18 sc 0.18	iv 0.18 sc 0.18	iv 0.18 sc 0.18	iv 0.18 sc 0.18	iv 0.18 sc 0.18
	CL (ml/hr/kg)	1.83	0.78	1.94	2.19	0.49
	Vss (ml/kg)	57	20	29	44	25
	$T_{1/2, iv}$ (hr)	21	13.6	14.9	7.3	38
	$T_{1/2, sc}$ (hr)	19	21	12	8.3	35
	Tmax, sc (hr)	22	22	10	8	32
	SC AUC (ug/ml*hr)	100	483	125	38	242
	SC 생체 이용율 (%)	64	77	97	44	66

(57) 청구의 범위

청구항 1.

생체활성형 인간 성장 호르몬(hGH) 폴리펩티드 또는 그 아고니스트 변이체의 하나 이상의 아미노산 잔기에 공유결합으로 부착된 하나 이상의 수용성 고분자를 포함하는 콘쥬게이트.

청구항 2.

제1항에 있어서, 상기 hGH 폴리펩티드가 SEQ ID NO:1의 아미노산 서열을 포함하는 콘쥬게이트.

청구항 3.

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 고분자가 폴리(에틸렌 옥사이드) 분자인 콘쥬게이트.

청구항 4.

제3항에 있어서, 상기 폴리(에틸렌 옥사이드) 분자가 폴리(에틸렌 글리콜) 분자인 콘쥬게이트.

청구항 5.

제4항에 있어서, 폴리(에틸렌 글리콜)이 자유 아미노기(들), 카르복시기(들) 또는 술프히드릴기(들)을 가진 아미노산 잔기에 부착된 콘쥬게이트.

청구항 6.

제5항에 있어서, 활성화된 폴리(에틸렌 글리콜)을 사용하여 형성된 콘쥬게이트.

청구항 7.

제6항에 있어서, 상기 활성화된 폴리(에틸렌 글리콜)이 관능기를 포함하는 콘쥬게이트.

청구항 8.

제7항에 있어서, 상기 부착이 자유 아미노기를 가진 아미노산에서 일어난 콘쥬게이트.

청구항 9.

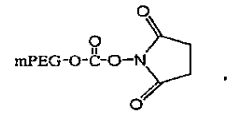
제8항에 있어서, 상기 관능기가 카보네이트, 카르보닐 이미다졸, 카르복실산의 활성 에스테르, 아즐락톤, 시클릭 이미드 티온, 이소시아네이트 또는 이소티오시아네이트, 이미데이트 및 알데히드로 이루어진 군으로부터 선택되는 콘쥬게이트.

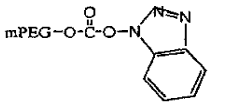
청구항 10.

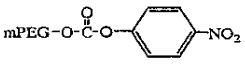
제9항에 있어서, 상기 관능기가 카르보네이트 또는 카르보닐 이미다졸인 콘쥬게이트.

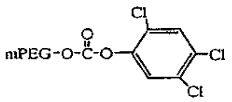
청구항 11.

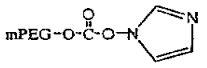
제10항에 있어서, 상기 활성화된 폴리(에틸렌 글리콜)이 하기 화합물들로 이루어진 군으로부터 선택되는 콘쥬게이트:





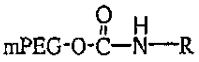



, 및



청구항 12.

제11항에 있어서, 하기 구조를 갖는 콘쥬게이트.



[여기서, R은 인간 성장 호르몬 폴리펩티드]

청구항 13.

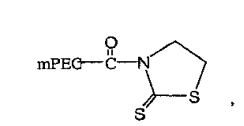
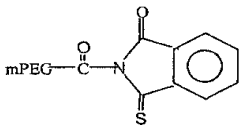
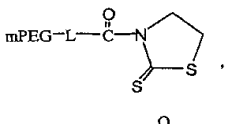
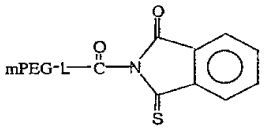
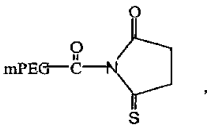
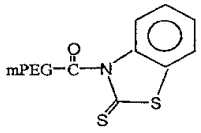
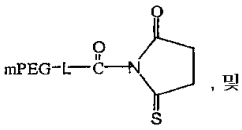
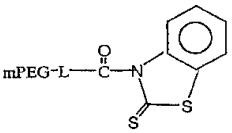
제12항에 있어서, 상기 인간 성장 호르몬 폴리펩티드가 SEQ ID NO:1의 아미노산을 포함하는 콘쥬게이트.

청구항 14.

제9항에 있어서, 상기 관능기가 시클릭 이미드 티온인 콘쥬게이트.

청구항 15.

제14항에 있어서, 상기 활성화된 폴리(에틸렌 글리콜)이 하기 군으로부터 선택되는 콘쥬게이트:


,

,

,

,

,

,

, 및

;

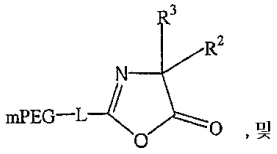
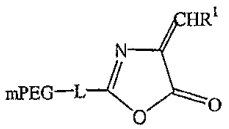
[여기서, L은 -O-, -NH-, $-OCH_2-$, $-NH-CO(CH_2)_n$, $-NH-CO(CH_2)_nO-$, $-CO-NH(CH_2)_n-$, -S-, $-CO-NH(CH_2)_nO-$, $-O(CH_2)_nO-$, $-O(CH_2)_n-$, $-SCH_2CH_2-$ 및 $-NH(CH_2)_n-$으로 이루어진 군으로부터 선택됨]

청구항 16.

제9항에 있어서, 상기 관능기가 아즐락톤인 콘쥬게이트.

청구항 17.

제16항에 있어서, 상기 활성화된 폴리(에틸렌 글리콜이)이 하기 화합물들로 이루어진 군으로부터 선택되는 콘쥬게이트:


, 및


[여기서, R^1은 수소, 알킬, 시클로알킬, 카르보시클릭 및 헤테로시클릭 방향족 환, α, β-불포화 알킬로 이루어진 군으로부터 선택되고;

R^2 및 R^3는 독립적으로 수소, 알킬, 아릴 및 알킬아릴로 이루어진 군으로부터 선택됨]

청구항 18.

제9항에 있어서, 상기 관능기가 이소시아네이트 또는 이소티오시아네이트인 콘쥬게이트.

청구항 19.

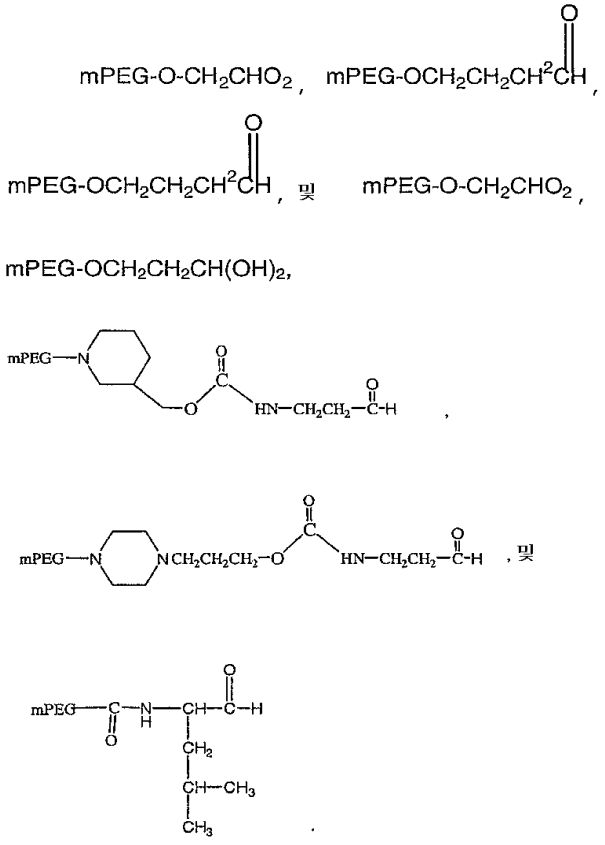
제18항에 있어서, 상기 활성화된 폴리(에틸렌 글리콜)이 mPEG-N=C=O 및 mPEG-N=C=S로 이루어진 군으로부터 선택되는 콘쥬게이트.

청구항 20.

제9항에 있어서, 상기 관능기가 알데히드 또는 알데히드 수화물인 콘쥬게이트.

청구항 21.

제20항에 있어서, 상기 활성화된 폴리(에틸렌 글리콜)이 하기 화합물들로 이루어진 군으로부터 선택되는 콘쥬게이트:



청구항 22.

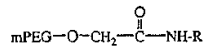
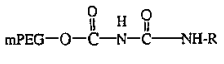
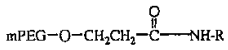
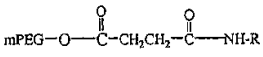
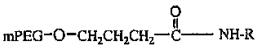
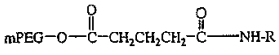
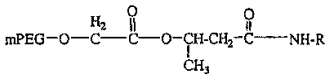
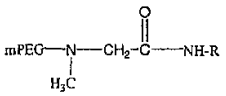
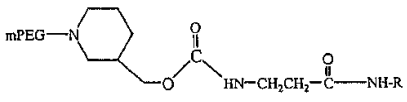
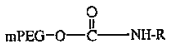
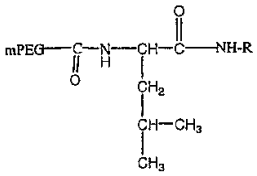
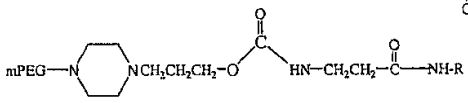
제9항에 있어서, 상기 관능기가 카르복실산의 활성 에스테르인 콘쥬게이트.

청구항 23.

제22항에 있어서, 상기 활성화된 폴리(에틸렌 글리콜)이 하기 화합물들로 이루어진 군으로부터 선택되는 콘쥬게이트:

청구항 24.

제23항에 있어서, 하기 화학식들로 이루어진 군으로부터 선택되는 구조를 갖는 콘쥬게이트:

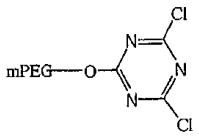
[여기서, R은 인간 성장 호르몬 폴리펩티드]

청구항 25.

제24항에 있어서, 상기 인간 성장 호르몬 폴리펩티드가 SEQ ID NO:1의 아미노산을 포함하는 콘쥬게이트.

청구항 26.

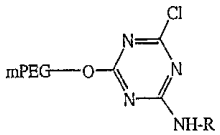
제9항에 있어서, 상기 활성화된 폴리(에틸렌 글리콜)이 하기 화합물들로 이루어진 군으로부터 선택되는 콘쥬게이트:



mPEG-O-SO_2-CH_2CF_3 및

청구항 27.

제26항에 있어서, 하기 화학식들로 이루어진 군으로부터 선택되는 구조를 갖는 콘쥬게이트:



PEG-NH-R 및

[여기서, R은 인간 성장 호르몬 폴리펩티드]

청구항 28.

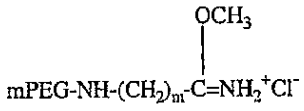
제27항에 있어서, 상기 성장 호르몬 폴리펩티드는 SEQ ID NO:1의 아미노산 서열을 포함하는 콘쥬게이트.

청구항 29.

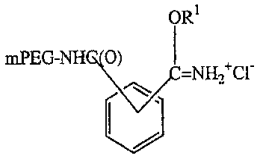
제28항에 있어서, 상기 관능기가 이미데이트인 콘쥬게이트.

청구항 30.

제9항에 있어서, 상기 활성화된 폴리(에틸렌 글리콜)이 하기 화합물들로 이루어진 군으로부터 선택되는 콘쥬게이트:



[여기서, m은 0 내지 20]



[여기서, R^1은 알킬, 페닐, 페닐알킬 및 시클로알킬]

청구항 31.

제9항에 있어서, 상기 자유 아미노기가 아미노 말단 α-아미노기인 콘쥬게이트.

청구항 32.

제31항에 있어서, 상기 아미노 말단 α-아미노기가 페닐알라닌인 콘쥬게이트.

청구항 33.

제8항에 있어서, 상기 부착이 자유 카르복실기를 갖는 아미노산에서 일어난 콘쥬게이트.

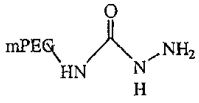
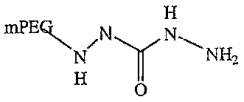
청구항 34.

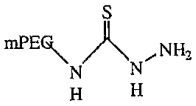
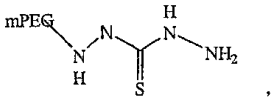
제33항에 있어서, 상기 관능기가 일차 아민, 히드라진 및 히드라지드 관능기로 이루어진 군으로부터 선택되는 콘쥬게이트.

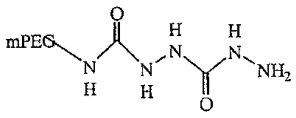
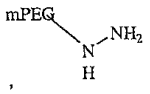
청구항 35.

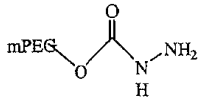
제34항에 있어서, 상기 관능기가 하기 화학식들로 이루어진 군으로부터 선택되는 콘쥬게이트:

mPEG-CH_2CH_2-NH_2, mPEG-O-CH_2-CO-NH-NH_2,


.

,


,

,


,

, 및


.

청구항 36.

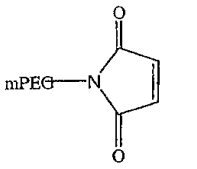
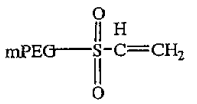
제8항에 있어서, 상기 부착이 자유 술프히드릴기를 갖는 아미노산에서 일어난 콘쥬게이트.

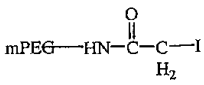
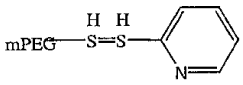
청구항 37.

제36항에 있어서, 상기 관능기가 티올, 말레이미드, 비닐 술폰 및 페닐 글리옥살로 이루어진 군으로부터 선택되는 콘쥬게이트.

청구항 38.

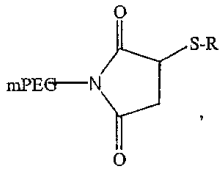
제37항에 있어서, 상기 관능기가 하기 화학식들로 이루어진 군으로부터 선택되는 콘쥬게이트:


,

,

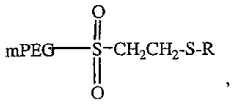

, 및

.

청구항 39.

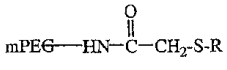
제38항에 있어서, 하기 화학식들로 이루어진 군으로부터 선택되는 구조를 갖는 콘쥬게이트:



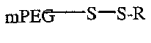
,



,



, 및



[여기서, R은 인간 성장 호르몬 폴리펩티드]

청구항 40.

제39항에 있어서, 상기 인간 성장 호르몬 폴리펩티드가 SEQ ID NO:1의 아미노산을 포함하는 콘쥬게이트.

청구항 41.

제8항에 있어서, 상기 폴리(에틸렌 글리콜이) 약 0.5 kDa 내지 약 100 kDa의 분자량을 갖는 콘쥬게이트.

청구항 42.

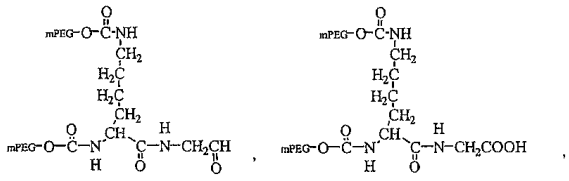
제41항에 있어서, 상기 폴리(에틸렌 글리콜)이 약 5 kDa 내지 약 40 kDa의 분자량을 갖는 콘쥬게이트.

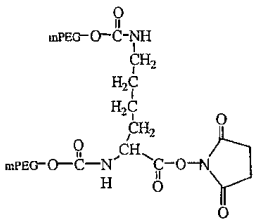
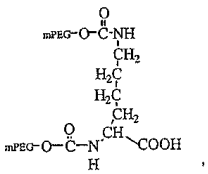
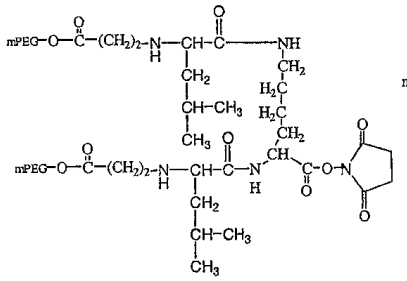
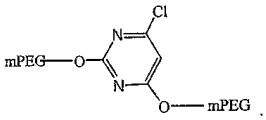
청구항 43.

제8항에 있어서, 상기 폴리(에틸렌 글리콜)이 분지쇄 고분자인 콘쥬게이트.

청구항 44.

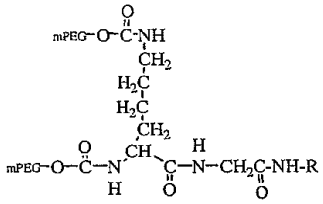
제43항에 있어서, 상기 분지쇄 고분자가 하기 화합물들로 이루어진 군으로부터 선택되는 콘쥬게이트:


,

,

,

,

,

.

청구항 45.

하기 구조를 갖는 인간 성장 호르몬-PEG.



[여기서, R은 인간 성장 호르몬 폴리펩티드]

청구항 46.

제45항에 있어서, 상기 인간 성장 호르몬 폴리펩티드가 SEQ ID NO:1의 아미노산을 포함하는 콘쥬게이트.

청구항 47.

제46항에 있어서, 상기 폴리펩티드 글리콜의 80% 이상이 아미노-말단 페닐알라닌에 콘쥬게이트된 콘쥬게이트.

청구항 48.

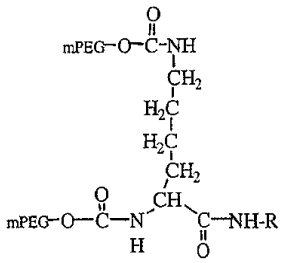
제46항에 있어서, 상기 폴리펩티드 글리콜의 90% 이상이 아미노-말단 페닐알라닌에 콘쥬게이트된 콘쥬게이트.

청구항 49.

제47항 또는 제48항에 있어서, 각각의 mPEG가 약 20 kDa의 분자량을 갖는 콘쥬게이트.

청구항 50.

하기 화학식을 갖는 인간 성장 호르몬-PEG 콘쥬게이트.



[여기서, R은 인간 성장 호르몬 폴리펩티드]

청구항 51.

제50항에 있어서, 상기 인간 성장 호르몬 폴리펩티드가 SEQ ID NO:1의 아미노산을 포함하는 콘쥬게이트.

청구항 52.

제51항에 있어서, 상기 폴리펩티드 글리콜의 80% 이상이 아미노-말단 페닐알라닌에 콘쥬게이트된 콘쥬게이트.

청구항 53.

제51항에 있어서, 상기 폴리펩티드 글리콜의 90% 이상이 아미노-말단 페닐알라닌에 콘쥬게이트된 콘쥬게이트.

청구항 54.

제52항 또는 제53항에 있어서, 각각의 mPEG가 약 20 kDa의 분자량을 갖는 콘쥬게이트.

청구항 55.

하기 구조를 갖는 인간 성장 호르몬-PEG.

mPEG-$OCH_2CH_2CH_2NH$-R

[여기서, R은 인간 성장 호르몬 폴리펩티드]

청구항 56.

제55항에 있어서, 상기 인간 성장 호르몬 폴리펩티드가 SEQ ID NO:1의 아미노산을 포함하는 콘쥬게이트.

청구항 57.

제56항에 있어서, 상기 폴리펩티드 글리콜의 80% 이상이 아미노-말단 페닐알라닌에 콘쥬게이트된 콘쥬게이트.

청구항 58.

제56항에 있어서, 상기 폴리펩티드 글리콜의 90% 이상이 아미노-말단 페닐알라닌에 콘쥬게이트된 콘쥬게이트.

청구항 59.

제57항 또는 제58항에 있어서, 각각의 mPEG가 약 20 kDa의 분자량을 갖는 콘쥬게이트.

청구항 60.

제8항에 있어서, 상기 폴리(에틸렌 글리콜)이 이관능기 고분자인 콘쥬게이트.

청구항 61.

제8항에 있어서, 상기 폴리(에틸렌 글리콜)이 전구약물인 콘쥬게이트.

청구항 62.

제1항의 hGH 및 제약학적으로 허용가능한 담체를 포함하는 조성물.

청구항 63.

제1항의 hGH 콘쥬게이트의 치료적 유효량을 성장 또는 발육 장애가 있는 환자에게 투여하는 것을 포함하는, 성장 또는 발육 장애 환자의 치료 방법.

청구항 64.

제63항에 있어서, 상기 성장 또는 발육 장애가 성장 호르몬 결핍(GHD)인 방법.

청구항 65.

제63항에 있어서, 상기 성장 또는 발육 장애가 터너 증후군(Turner's syndrome)인 방법.

청구항 66.

제63항에 있어서, 상기 성장 또는 발육 장애가 만성 신부전증인 방법.

청구항 67.

제63항에 있어서, 상기 성장 또는 발육 장애가 저체중아(small for gestational age; SGA)인 방법.

청구항 68.

제48항의 hGH 및 제약학적으로 허용가능한 담체를 포함하는 조성물.

청구항 69.

제48항의 hGH 콘쥬게이트의 치료적 유효량을 성장 또는 발육 장애가 있는 환자에게 투여하는 것을 포함하는, 성장 또는 발육 장애 환자의 치료 방법.

청구항 70.

제69항에 있어서, 상기 성장 또는 발육 장애가 성장 호르몬 결핍(GHD)인 방법.

청구항 71.

제69항에 있어서, 상기 성장 또는 발육 장애가 터너 증후군인 방법.

청구항 72.

제69항에 있어서, 상기 성장 또는 발육 장애가 만성 신부전증인 방법.

청구항 73.

제69항에 있어서, 상기 성장 또는 발육 장애가 저체중아(SGA)인 방법.

청구항 74.

제50항 또는 제55항의 hGH 및 제약학적으로 허용가능한 담체를 포함하는 조성물.

청구항 75.

제1항의 hGH 콘쥬게이트의 치료적 유효량을 성장 또는 발육 장애가 있는 환자에게 투여하는 것을 포함하는, 성장 또는 발육 장애 환자의 치료 방법.

청구항 76.

제75항에 있어서, 상기 성장 또는 발육 장애가 성장 호르몬 결핍(GHD)인 방법.

청구항 77.

제75항에 있어서, 상기 성장 또는 발육 장애가 터너 증후군인 방법.

청구항 78.

제75항에 있어서, 상기 성장 또는 발육 장애가 만성 신부전증인 방법.

청구항 79.

제75항에 있어서, 상기 성장 또는 발육 장애가 저체중아(SGA)인 방법.

요약

본 발명은 수용성 고분자를 단백질에 결합시켜 제조된 화학적으로 개질된 인간 성장 호르몬(hGH)를 제공한다. 본 발명에 따라 화학적으로 개질된 단백질은 비개질된 hGH보다 보다 오래 지속하는 hGH 활성을 가질 수 있어, 투여량 감소와 스케쥴 조절을 가능하게 한다.

대표도

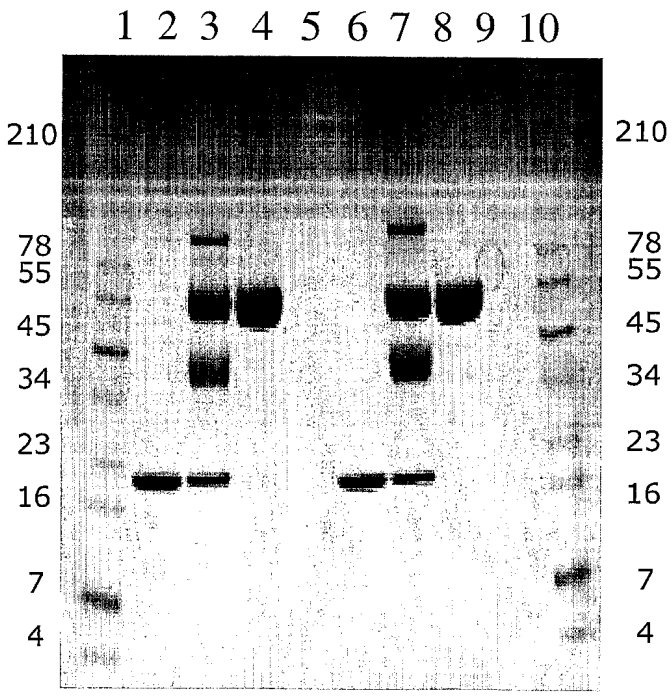
도 7

색인어

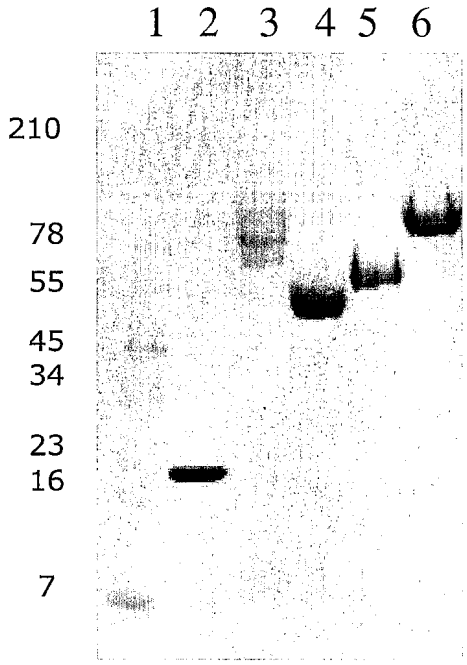
인간 성장 호르몬, 수용성 고분자.

도면

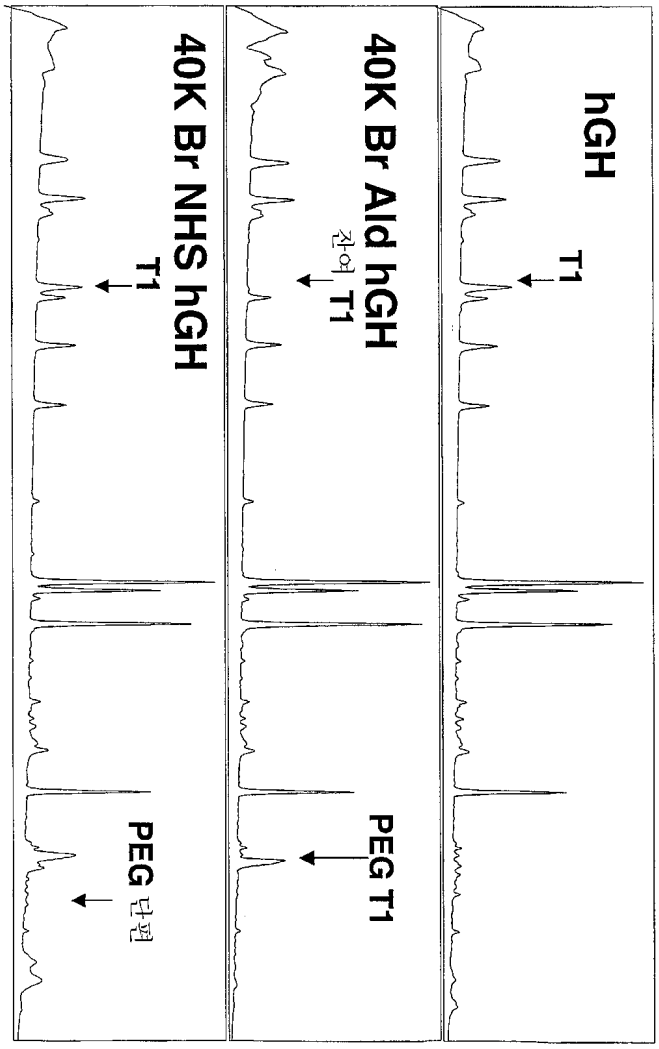
도면1



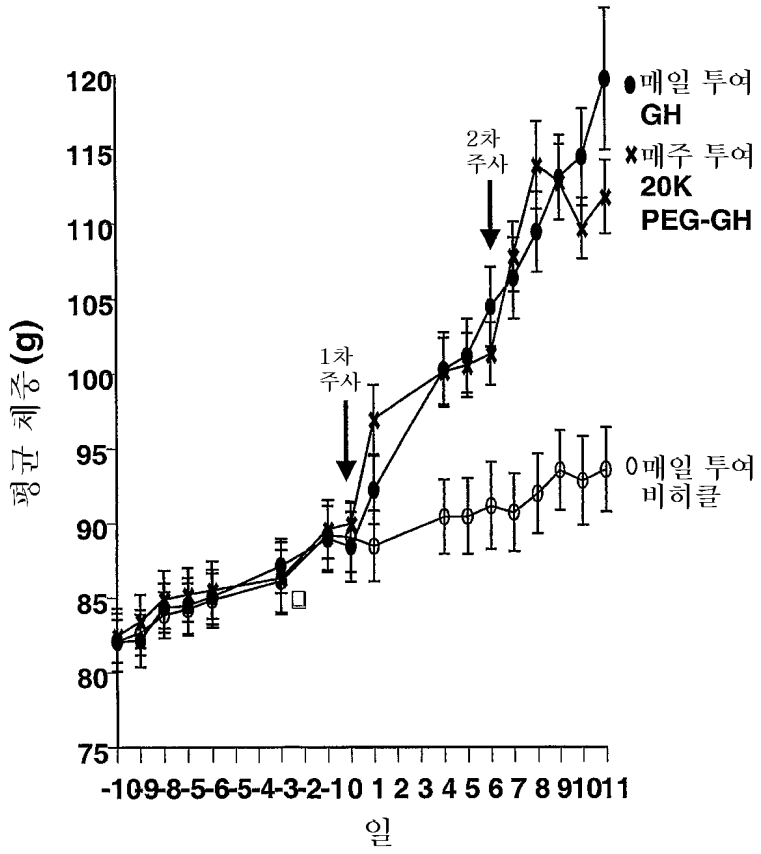
도면2



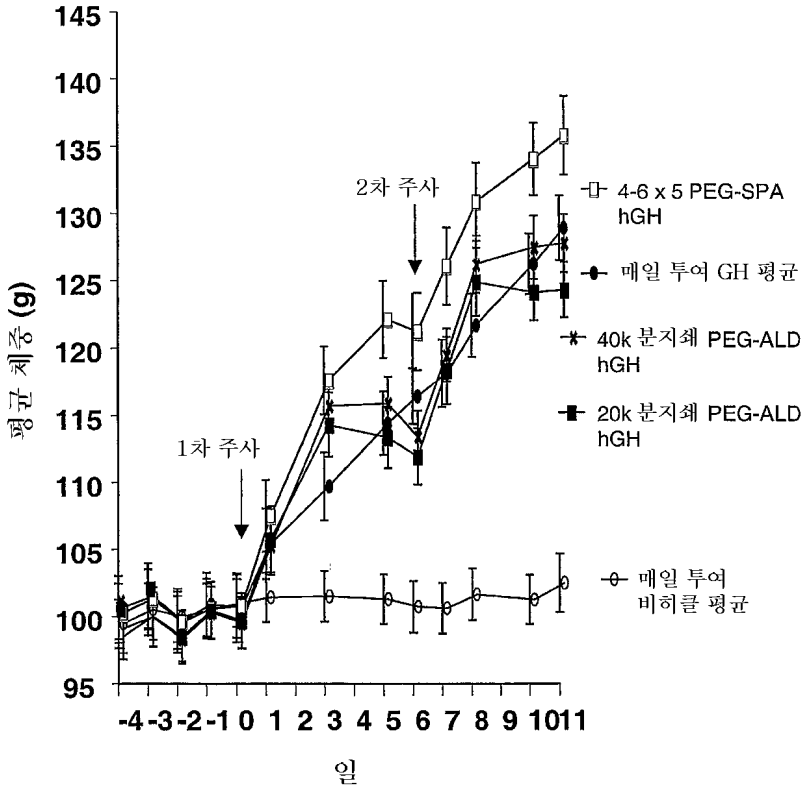
도면3



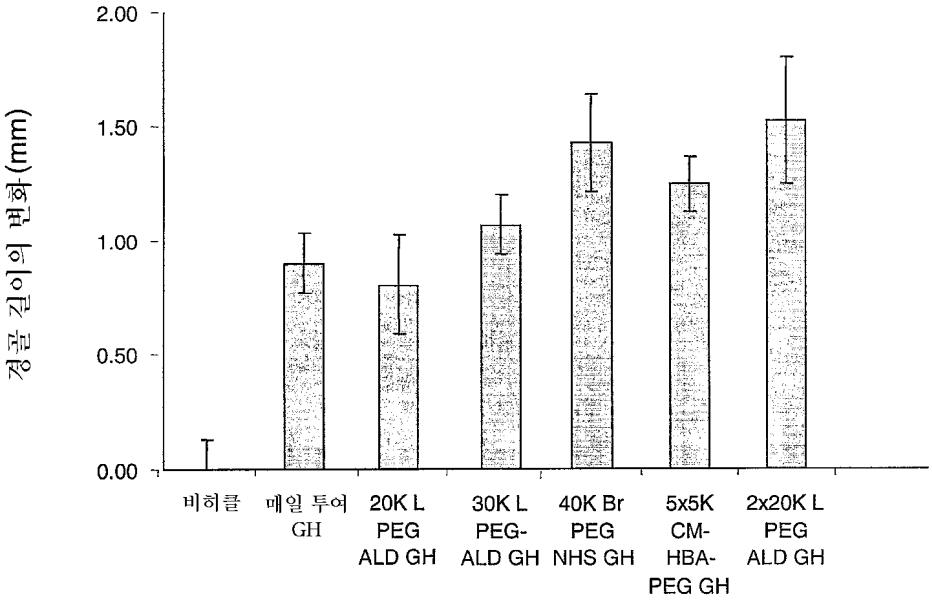
도면4


매일 투여 GH
매주 투여 20K PEG-GH
2차 주사
1차 주사
매일 투여 비히클
평균 체중 (g)
일

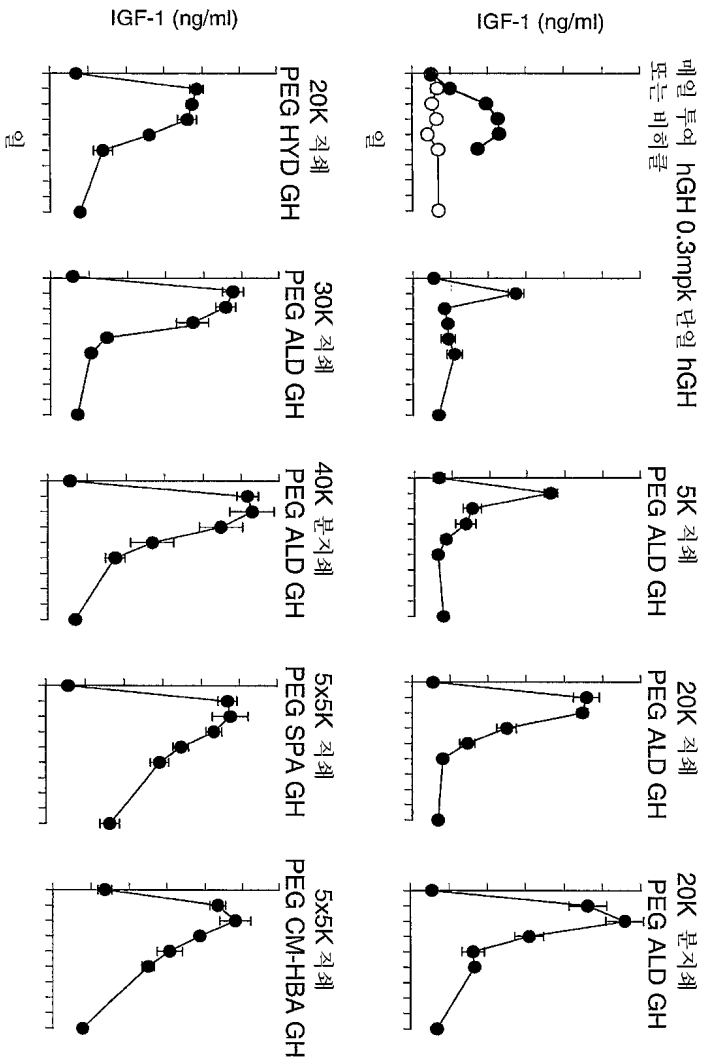
도면5


4-6 x 5 PEG-SPA hGH
매일 투여 GH 평균
40k 분지쇄 PEG-ALD hGH
20k 분지쇄 PEG-ALD hGH
매일 투여 비히클 평균
2차 주사
1차 주사
평균 체중 (g)
일

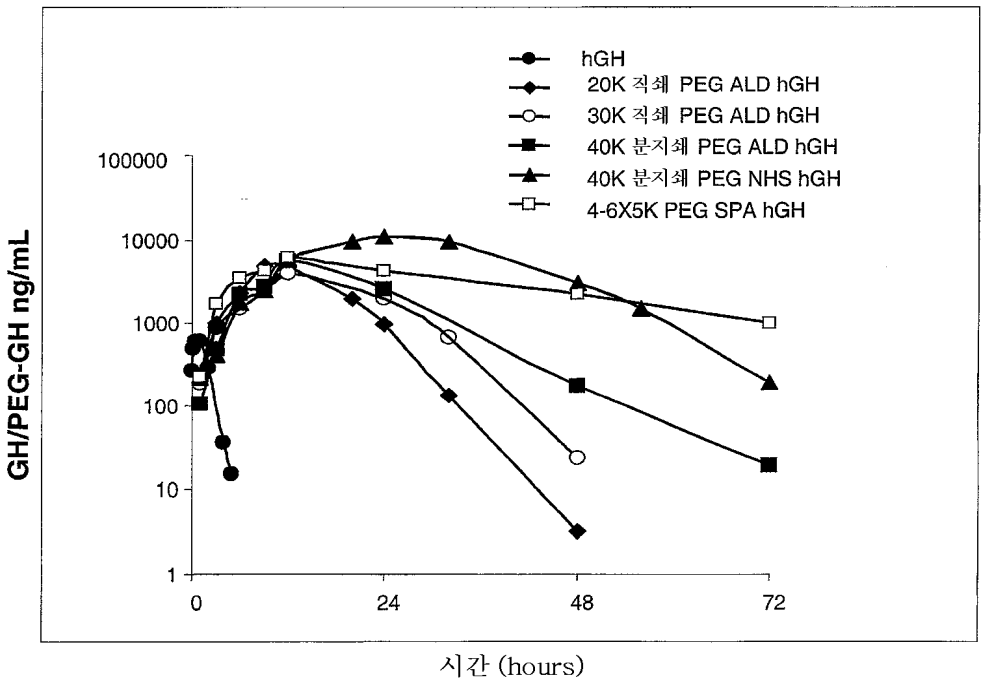
도면6


경골 길이의 변화(mm)
2.00
1.50
1.00
0.50
0.00
비히클
매일 투여 GH
20K L PEG ALD GH
30K L PEG-ALD GH
40K Br PEG NHS GH
5x5K CM-HBA-PEG GH
2x20K L PEG ALD GH

도면7


IGF-1 (ng/ml)
일
매일 투여 hGH 0.3mpk 단일 hGH 또는 비히클
20K 직쇄 PEG HYD GH
30K 직쇄 PEG ALD GH
40K 분지쇄 PEG ALD GH
5x5K 직쇄 PEG SPA GH
5x5K 직쇄 PEG CM-HBA GH
5K 직쇄 PEG ALD GH
20K 직쇄 PEG ALD GH
20K 분지쇄 PEG ALD GH

도면8



SEQUENCE LISTING

<110> Pharmacia Corporation

Finn, Rory

Liao, Wei

Siegel, Ned

<120> CHEMICALLY-MODIFIED HUMAN GROWTH HORMONE CONJUGATES

<130> 03582/1/PCT

<150> US 60/331907

<151> 2001-11-20

<160> 1

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 191

<212> PRT

<213> homo sapiens

<400> 1

```
Phe Pro Thr Ile Pro Leu Ser Arg Leu Phe Asp Asp Ala Met Leu Arg
1               5                  10                  15

Ala His Arg Leu His Gln Leu Ala Phe Asp Thr Tyr Gln Glu Phe Glu
            20                  25                  30

Glu Ala Tyr Ile Pro Lys Glu Gln Lys Tyr Ser Phe Leu Gln Asp Pro
        35                  40                  45

Gln Thr Ser Leu Cys Phe Ser Glu Ser Ile Pro Thr Pro Ser Asp Arg
    50                  55                  60

Glu Glu Thr Gln Gln Lys Ser Asp Leu Glu Leu Leu Arg Ile Ser Leu
65                  70                  75                  80

Leu Leu Ile Gln Ser Trp Leu Glu Pro Val Gln Ser Leu Arg Ser Val
                85                  90                  95

Phe Ala Asp Ser Leu Val Tyr Gly Ala Ser Asp Ser Asp Val Tyr Asp
            100                 105                 110

Leu Leu Lys Asp Leu Glu Glu Gly Ile Gln Thr Leu Met Gly Arg Leu
        115                 120                 125

Glu Asp Gly Ser Pro Arg Thr Gly Gln Ile Phe Lys Gln Thr Tyr Ser
    130                 135                 140

Lys Phe Asp Thr Asp Ser His Asp Asp Asp Ala Leu Leu Lys Asp Tyr
145                 150                 155                 160

Gly Leu Leu Tyr Cys Phe Arg Lys Asp Met Asp Lys Val Glu Thr Phe
                165                 170                 175
```

```
Leu Arg Ile Val Gln Cys Arg Ser Val Glu Gly Ser Cys Gly Phe
            180                 185                 190
```