



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2013-0067243
(43) 공개일자 2013년06월21일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 38/42 (2006.01) *G01N 33/72* (2006.01)
C08H 1/00 (2006.01) *A61K 38/00* (2006.01)
- (21) 출원번호 10-2012-7025030
- (22) 출원일자(국제) 2011년02월23일
심사청구일자 없음
- (85) 번역문제출일자 2012년09월25일
- (86) 국제출원번호 PCT/US2011/025888
- (87) 국제공개번호 WO 2011/106396
국제공개일자 2011년09월01일
- (30) 우선권주장
61/308,238 2010년02월25일 미국(US)
- (71) 출원인
생가트, 인코포레이티드
미국 캘리포니아 92121 샌디에고 러스크 불러바드 6175
- (72) 발명자
마라바리 아쇼크
미국 캘리포니아 92126 샌디에고 9185 헐러리 드 라이브
밴드그리프 킴 디.
미국 캘리포니아 92101 샌디에고 100 하버 드라이브 #1106
- (74) 대리인
최광호

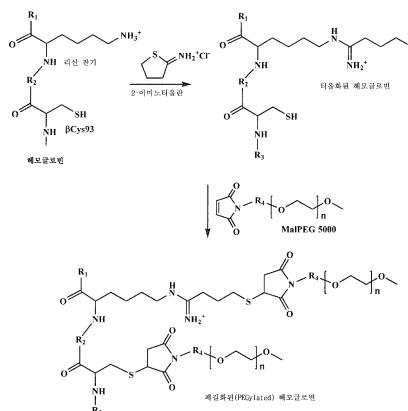
전체 청구항 수 : 총 8 항

(54) 발명의 명칭 감소된 반응물 비율을 이용하여 PEG-헤모글로빈 접합물을 제조하는 방법

(57) 요 약

본 발명은 일반적으로 감소된 반응물 비율을 이용하여 폴리에틸렌 글리콜("PEG") 접합된 혈액글로빈("Hb")을 제조하는 방법에 관한 것이다. 더욱 자세하게는, 본 발명은 향상된 수율과 순도로 PEG 접합된 Hb("PEG-Hb")를 제조하는 방법에 관한 것이다.

대 표 도 - 도1



특허청구의 범위

청구항 1

다음 단계를 포함하는 폴리에틸렌 글리콜 접합된 헤모글로빈(PEG-Hb)을 제조하는 방법:

a) 헤모글로빈(Hb)을, 수성 희석제 중에서 2-이미노티올란(2-IT)과 혼합하여 티올화된 Hb를 형성하는 단계,

이때 상기 2-IT는 Hb 농도에 대하여 7 내지 8 몰 과량의 농도로 존재하고; 및

b) 상기 티올화된 Hb에 수성 희석제 중에서 폴리에틸렌 글리콜(PEG)-말레이미드(Mal)를 부가하여 PEG-Hb 접합물을 형성하는 단계,

이때 상기 PEG-Mal은 Hb 농도에 대하여 희석제 중에서 9 내지 15몰 과량의 농도로 존재하며,

상기 PEG-Mal은 4,000 내지 6,000 달톤(Da)의 평균 분자량을 갖고;

상기 PEG-Hb 접합물은 Hb당 평균 7.1 내지 8.9개의 PEG 분자를 함유하며; 또

상기 PEG-Hb 접합물은 더 높은 몰비의 2-IT 또는 PEG-Mal을 사용하여 제조된 PEG-Hb 접합물에 비하여 더 긴밀한 분자량 분포를 가짐.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 2-IT는 Hb 농도에 대하여 희석제 중에서 7.5 몰 과량의 농도로 존재하는 방법.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 PEG-Mal은 Hb 농도에 대하여 희석제 중에서 12 몰 과량의 농도로 존재하는 방법.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 PEG-Mal은 5,000 Da의 평균 분자량을 갖는 방법.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 PEG-Hb 접합물은 본질적으로 동일한 조건하에서 측정할 때 등등 공급원으로부터 얻은 천연 기질 자유 헤모글로빈에 비교하여, Hb가 50% 포화되는 산소 부분압(p50)이 더 적은 방법.

청구항 6

제5항에 있어서, 상기 PEG-Hb 접합물의 p50이 10 밀리리터의 수온(mmHg)보다 적은 방법.

청구항 7

제5항에 있어서, 상기 PEG-Hb 접합물의 p50이 4 내지 8 mmHg 사이인 방법.

청구항 8

제5항에 있어서, 상기 단계 a)는 7 내지 9 pH에서 실시되는 방법.

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 일반적으로 감소된 반응물 비율을 이용하여 폴리에틸렌 글리콜("PEG") 접합된(conjugated) 헤모글로빈("Hb")을 제조하는 방법에 관한 것이다. 더욱 자세하게는, 본 발명은 향상된 수율과 순도로 PEG 접합된

Hb("PEG-Hb")를 제조하는 방법에 관한 것이다.

배경 기술

- [0002] 산소 효법으로 유용한 산소 운반제(때때로 "산소운반 혈장증량제"라고도 칭함)는 다음 3가지 카테고리로 대별될 수 있다: i) 퍼플루오로카본계 에멀젼, ii) 리포솜-캡슐화된 Hb 및 iii) 변형된 Hb. 이하에 논의된 바와 같이, 변형된 무세포(cell-free) Hb를 포함하는 생성물이 가장 유망할 것으로 생각되지만 이를 중 어떤 것도 전반적으로 성공적이지 않았다. 퍼플루오로케미컬계 에멀젼은 산소를 리간드로서 결합시키는 것과 반대로 산소를 용해시킨다. 생물학적 계에서 사용되기 위해서는, 퍼플루오로케미컬은 지질, 전형적으로 난황 인지질에 의해 유화되어야 한다. 상기 퍼플루오로카본 에멀젼은 제조하기가 저렴하지만, 이들은 임상적으로 효과적인 것으로 허용되는 투여량에서 충분한 산소를 운반하지 않는다. 역으로, 리포솜-캡슐화된 Hb가 효과적인 것으로 밝혀져 있으나, 비용이 많이 들어서 폭넓게 사용될 수 없다.(참고: 일반적으로 Winslow, R.M., "Hemoglobin-based Red Cell Substitutes," Johns Hopkins University Press, Baltimore(1992)).
- [0003] 적혈구 용혈물로부터 자유 Hb를 적혈구 대체물로서 사용하려는 초기의 시도는 성공하지 못했다. 기질 성분은 독성인 것으로 밝혀져, 응고병증 및 관련 신부전을 초래하였다. 1967년, 기질 자유(stroma-free) Hb("SFH") 용액을 제조하였다(Rabiner, S.F. et al., 1967, J. Exp. Med. 126:1 127-1 142). 그러나, 이들은 약 100분 정도의 수혈 반감기를 갖는 것으로 밝혀졌다.
- [0004] SFH의 짧은 순환에 대한 이유는 상기 단백질이 그의 사량체 형태로부터 이량체로 분해되어, 신장에 의해 순환으로부터 급속하게 여과되는 능력에 기인한다. 따라서, Hb의 분출을 제한하거나 방지하기 위하여, Hb를 가교(crosslinking)시키는 다수의 방법 및 거대분자와의 접합에 의해 Hb의 유체역학적 크기를 증가시키는 다른 수법이 고안되었다. SFH를 가교시켜 폴리-Hb를 형성하는 것은 미국특허 번호 4,001,200호 및 미국특허 번호 4,001,401호에 기재되어 있다. 서브유닛 사이의 아미노산 잔기를 결합하는 내부 가교된 Hb는 디아스피린(미국특허 번호 4,529,719호에 기재된 바와 같은 비스-3,5-디브로모살리오실레이트의 디에스테르) 또는 2-N-2-포밀-파리독살-5'-포스페이트 및 보로하이드리드에 의해 달성될 수 있다(Benesch, R.E. et al., 1975, Biochem. Biophys. Res. Commun. 62: 1 123-1 129). 이량체의 형성을 방지하기 위하여 사량체 Hb 유닛의 서브유닛을 화학적으로 결합시키는 분자내 가교는 미국특허 번호 5,296,465호에 개시되어 있다. 또한, 시몬, 에스. 알 및 오니그스베르크, 더블유.에이치.는 래트(rat) 및 개에게 주입될 때 반감기에서 4배 증가를 갖는 것으로 보고된 분자내 가교된 Hb(1966, PNAS 56:749-56)를 생성하기 위하여 비스-(N-말레이미도메틸) 에테르("BME")를 사용하는 것을 개시한다(Bunn, H.F. et al., 1969, J. Exp. Med. 129:909-24). 그러나, Hb와 BME의 가교는 Hb의 산소 친화성에서 동시에 증가를 초래하며, 그와 동시에 잠재적 Hb-계 산소운반제("HBOC")로서 그의 사용을 방지하는 것으로 생각되었다.
- [0005] SFH는 텍스트란(Chang, J.E. et al., 1977, Can. J. Biochem. 55:398-403), 히드록시에틸 녹말(DE 2,161,086호), 젤라틴(DE 2,449,885호), 알부민(DE 2,449,885) 및 PEG(DE 3,026,398호, 미국특허 번호 4,670,417호, 4,412,989호 및 4,301,144호)와 같은 다른 거대분자에도 결합되었다. 이들 산소운반 용액의 생리학적 효과의 일부는 충분히 알려져 있지 않다. 이들 중, 아마도 가장 논란이 많은 것은 혈관수축을 초래하는 성향이며, 이는 동물 및 사람에서 고혈압으로 주로 나타난다(Amberson, W., 1947, Science 106:117-1 17)(Keipert, P. et al., 1993, Transfusion 33:701-708). α-사슬과 비스-디브로모살리실-푸마레이트("aaHb") 사이에서 가교된 인간 Hb는 미국 육군에 의해 적혈구 대체물 한 모델로서 개발되었지만, 폐 및 전신 혈관 내성의 심각한 증가를 보인 후에 포기되었다(Hess, J. et al., 1978, Blood 78:356A). 상기 생성물의 시판품 역시 실망스런 III 상 임상 시험 후 포기되었다(Winslow, R. M., 2000, Vox Sang 79:1-20).
- [0006] 무세포 Hb에 의해 생성된 혈관수축에 대한 가장 일반적인 설명은 이것이 상피세포-유도된 이완인자(EDRF), 산화질소("NO")와 용이하게 결합하는 것이다. Hb의 NO 결합 활성을 극복하기 위한 시도에서 2분자 접근법이 진전을 이루었다. 최초의 접근법은 재조합 DNA를 이용하여, 멀리 떨어진 헴 포켓(heme pocket)의 부위 특이적 돌연변이에 의해 Hb의 NO 결합을 감소시키려는 것이었다(Eich, R.F. et al., 1996, Biochem. 35:6976-83). 두번째 접근법은 화학적 변형법을 이용하였는데, 이는 Hb의 크기가 올리고머화를 통하여 향상되어, 혈관 공간으로부터 간극 공간으로 Hb의 분출을 감소시키거나 가능하게는 완전히 억제하려 하였다(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; Macdonal, V.W. et al., 1994, Biotechnology 22:565-75; Furchtgott, R., 1984, Ann. Rev. Pharmacol. 24:175-97; and Kilbourne, R. et al., 1994, Biochem. Biophys. Res. Commun. 199:155-62).
- [0007] 사실, NO에 대한 친화성이 감소된 재조합 Hb는 탑로드(top-load) 래트 실험에서 덜 민감성으로 제조되었다

(Doherty, D.H. etg al. 1998, *Nature Biotechnology* 16: 672-676 및 Lemon, D.D. et al. 1996, *Biotech* 24: 378). 그러나, 연구에 의하면 NO 결합은 Hb의 혈관활동성에 대한 유일한 설명일 수 없다고 제시하였다. PEG에 의해 변형된 것과 같이 특정의 대형 Hb 분자는, 이들의 NO 결합율이 고도로 과민성인 $\alpha\alpha$ Hb의 NO 결합율과 동일하다고 하더라도, 과민증 효과를 실질적으로 갖지 않는다는 것이 밝혀졌다(Rohlf, R.J. et al. 1998, *J. Biol. Chem.* 273: 12128-12134). 또한, PEG-Hb는 출혈 이전에 교환 수혈(exchange transfusion)로 제공될 때 출혈의 결과를 예방함에 있어서 굉장히 효과적이라는 것이 밝혀졌다(Winslow, R.M. et al. 1998, *J. Appl. Physiol.* 85: 993-1003).

[0008] PEG를 Hb에 접합하는 것은 그의 항원성을 감소시키고 또 순환반감성을 연장한다. 그러나, PEG 접합반응은 Hb 테트라머를 $\alpha\beta$ -이량체 서브유닛으로 해리반응을 초래하여 40,000 달톤("Da") 아래의 Hb 단량체 단위의 PEG-접합물을 수용하는 교환수혈된 래트에서 전반적 혈색소뇨증을 초래한다고 보고되어 있다(Iwashita and Ajisaka Organ-Directed Toxicity: *Chem. Indicices Mech.*, Proc. Symp., Brown et al. 1981, Eds. Pergamon, Oxford, England pgs 97-101). 84,000 Da 보다 더 큰 분자량을 갖는 폴리알킬렌 옥사이드("PAO") 접합된 Hb는 α 및 ϵ -아미노기에서 Hb에 연결된 PEG-5000 사슬의 10 카페를 갖게 엔존 인코포레이티드(미국특허 번호 5,650,388호)에 의해 제조되었다. 이러한 치환도는 포유동물에서 혈색소뇨증과 관련된 임상적으로 현저한 신독성(nephrotoxicity)을 피하려는 것으로 기재되었다. 그러나, 접합반응은 이질 접합체 집단을 초래하였고 또 컬럼 크로마토그래피에 의해 제거되어야 하는 기타 바람직하지 않는 반응물을 함유하였다.

[0009] PEG 접합은 활성화된 PEG와 생분자의 표면 상에 있는 작용기와의 반응을 통하여 전형적으로 실시되었다. 가장 일반적인 작용기는 리신 및 히스티딘 잔기 및 단백질의 N-말단의 아미노 기; 시스테인 잔기의 티올 기; 및 세린, 트레오닌 및 티로신 잔기 및 단백질의 C-말단의 히드록실 기이다. PEG는 히드록실 말단을 온화한 수성 환경에서 이를 작용기와 반응할 수 있는 반응성 잔기로 전환하는 것에 의해 활성화된다. 치료성 생물약제(biopharmaceutical)의 접합을 위해 사용된 가장 일반적인 일작용성 PEG의 하나는 1개의 작용기(즉, 히드록실)만을 갖는 메톡시-PEG("mPEG")이므로, 고분자량 이작용성 PEG와 관련된 가교 및 응집 문제를 최소화한다. 그러나, mPEG는 그의 제조 공정으로 인하여 10 내지 15% 정도로 높은 범위일 수 있는 고분자량 이작용성 PEG(즉 "PEG 디올")에 의해 흔히 오염된다(Dust J. M. et al. 1990, *Macromolecule* 23: 3742-3746). 이작용성 PEG 디올은 소망하는 일작용성 PEG 크기의 대략 2배인 크기를 갖는다. 이러한 오염 문제는 PEG의 분자량이 증가함에 따라서 더욱 악화된다. mPEG의 순도는 폐질화된 바이오치료제의 제조에 특히 중요한데, 이는 FDA가 제조 방법 및 최종 약품 생성물의 품질에서 높은 수준의 재현성을 필요로 하기 때문이다.

[0010] Hb를 PAO에 접합시키는 것은 산소화된 상태 및 탈산소화된 상태에서 실시되었다. 미국특허 번호 6,844,317호는 산소화된 또는 "R" 상태의 Hb를 접합하여 그로 인하여 생성한 PEG-Hb 접합물의 산소 친화성을 향상시키는 것을 개시한다. 이것은 접합 이전에 Hb를 분위기와 균등화시키는 것에 의해 달성된다. 다른 것은 산소 친화성을 감소시키고 또 구조적 안정성을 증가시키기 위하여 접합하기 전에 탈산소화 단계를 개시하며, 그로 인하여 Hb는 화학적 변형, 투석여과 및/또는 멸균 여과 및 멸균의 물리적 스트레스를 견디게 한다(미국특허 번호 5,234,903호). Hb를 분자내 가교하기 위하여, 변형 이전에 Hb를 탈산소화하는 것은 α -사슬의 리신 99을 가교 시약에 노출시키는 것을 필요로 할 수 있다(미국특허 번호 5,234,903호).

[0011] PEG를 사용하여 접합시키기 전에 이미노티올란을 사용하여 Hb 티올화하는 역학은 아카르야 등에 의해 조사되었다.(미국특허 번호 7,501,499호). 사량체당 평균 5개의 외래 티올을 도입한 이미노티올란의 농도를 10배로부터 30배로 증가시키는 것은 Hb에 대한 외래 티올의 수를 배가시키는 것이 관찰되었다. 그러나, PEG 접합후 나타난 크기 증가는, 티올의 수가 배가됨에도 불구하고, 미미하였다. 이는 20-배 몰 과량의 말레이미딜 PEG-5000의 존재하에서 접합 반응이 Hb의 표면을 반응성이 덜한 티올에 의해 덮어, 그 결과 더욱 반응성 티올에 의한 Hb의 변형을 견디는 입체적 간섭(steric interference)을 초래함을 제시하였다. 결과적으로, 변형된 Hb의 소망하는 분자량을 달성하기 위하여(즉 6 ± 1 개 PEG/Hb 분자), 아카르야 등은 8-15 몰 과량의 이미노티올란을 사용하여 Hb를 티올화한 다음, 티올화된 Hb를 16-30배 몰 과량의 말레이미딜 PEG-5000과 반응시켰다. 그러나, 대규모 생산에서 이들 고분자량 반응물 농도는 HBOC를 제조하기 위한 비용을 현저히 증가시킨다. 또한, 이러한 고 몰 과량의 말레이미딜 PEG-5000은 다수의 원하지 않는 반응물의 생성과 더불어 더 많은 이질적 생성물을 초래한다.

[0012] 따라서, 적은 비용으로 증가된 효율을 갖고, 불순물이 적고 또 분자량 범위가 협소한 특정 크기 범위의 PEG 접합된 Hb를 제조하는 방법이 요청된다.

발명의 내용

[0013] **발명의 요약**

[0014] 본 발명은 일반적으로 헤모글로빈(Hb)을 수성 희석제 중에서 2-이미노티올란(2-IT)과 반응시켜 티올화된 Hb를 형성하는 단계, 이때 2-IT는 Hb 농도에 비하여 희석제가 7 내지 8몰 과량의 농도로 존재하며; 또 이어 상기 티올화된 Hb에 수성 희석제 중에 폴리에틸렌 글리콜(PEG)-말레이미드(Mal)를 부가하여 PEG-Hb 접합물을 형성하는 단계를 포함하며, 이때 상기 PEG-Mal은 Hb 농도에 비하여 희석제 중에 9 내지 15몰 과량의 농도로 존재하고; 상기 PEG-Mal은 4,000 내지 6,000 달톤(Da) 범위의 평균 분자량을 갖고; 상기 생성한 PEG-Hb 접합물은 Hb당 평균 7.1 내지 8.9 개의 PEG 분자를 함유하는, 폴리에틸렌 글리콜 접합된 헤모글로빈(PEG-Hb)을 제조하는 방법에 관한 것이다.

[0015] 일 실시양태에서, 상기 2-IT는 Hb 농도에 대하여 희석제 중에서 7.5 몰 과량의 농도로 존재하고, 상기 PEG-Mal은 Hb 농도에 대하여 희석제 중에서 12 몰 과량의 농도로 존재하며, 및/또는 상기 PEG-Mal은 5,000 달톤의 평균 분자량을 갖는다.

[0016] 본 발명의 예시적 방법에 따라 제조된 상기 PEG-Hb 접합물은 본질적으로 동일한 조건하에서 측정될 때 동등(equivalent) 공급원으로부터 얻은 천연의 기질 자유 헤모글로빈보다 적게 Hb가 50% 포화(p50)되는 산소의 부분 압을 갖는다. 일 실시양태에서, PEG-Hb 접합물의 p50은 4 내지 8 mmHg 범위와 같이 10 밀리미터의 수은(mmHg)보다 적다.

[0017] 본 발명의 다른 요지는 명세서를 통하여 발견되었다.

도면의 간단한 설명

[0018] 도 1: Hb의 β Cys93 잔기 및 티올화된 리신은 폐길화(PEGylated)된다. R_1 , R_2 및 R_3 은 Hb 주체를 나타내고; R_4 는 알킬기이며, 또 "n"은 5,000 Da PEG의 옥시에틸렌 단위의 평균 수를 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0019] **발명의 상세한 설명**

[0020] 본 발명은 일반적으로 감소된 반응물 비율을 이용하여 폴리에틸렌 글리콜("PEG") 접합된 헤모글로빈("Hb")을 제조하는 방법에 관한 것이다. 더욱 자세하게는, 본 발명은 향상된 수율과 순도를 갖는 PEG 접합된 Hb("PEG-Hb")를 제조하는 방법에 관한 것이다.

[0021] 이하의 설명에서, 분자생물학, 면역학 및 의학 분야에서 사용된 다수의 용어가 광범위하게 이용된다. 명세서 및 특허청구의 범위의 분명하고 일치되는 이해를 제공하기 위하여, 이러한 용어에 대한 정의를 비롯하여 이하의 하기 정의가 제공된다:

[0022] 용어 "하나" "일개" 또는 "1개"가 본 명세서에 사용될 때, 이들은 특별히 다르게 정의하지 않는 한 "적어도 하나" 또는 "1 또는 그 이상"을 의미한다.

[0023] 본 명세서에서 사용된 바와 같은 용어 "활성화된 폴리알킬렌 옥사이드" 또는 "활성화된 PAO"는 적어도 하나의 작용기를 갖는 PAO 분자를 지칭한다. 작용기는 PAO에 의해 접합될 분자 상에서 자유 아민, 설프히드릴 또는 카복실 기와 상호작용하는 반응성 부분이다. 예컨대, 자유 설프히드릴과 상호작용하는 이러한 1개 작용기는 말레이미드 기이다. 상응하게는, 자유 아민과 상호작용하는 작용기는 숙신이미드기이다.

[0024] 본 명세서에 사용된 바와 같은 용어 "약"은 지시된 값 범위 내의 실제 값을 지칭한다. 일반적으로, 실제 값은 지시된 값의(즉, + 또는 -) 10%일 것이다.

[0025] 본 명세서에 사용된 바와 같은 용어 "헤모글로빈" 또는 "Hb"는 일반적으로 산소를 수송하는 적혈구 세포 내에 함유된 단백질을 지칭한다. Hb의 각 분자는 사량체 구조로 배열된, 4개 서브유닛, 2개의 α -사슬 서브유닛 및 2개의 β -사슬 서브유닛을 갖는다. 각 서브유닛은 또한 1개의 헴(heme) 기를 함유하며, 이는 산소를 결합하는 철-함유 중심이다. 따라서, 각 Hb 분자는 4개 분자의 산소를 결합할 수 있다.

[0026] 본 명세서에 사용된 바와 같은 용어 "MalPEG-Hb"는 말레이미딜-활성화된 PEG가 접합된 Hb를 지칭한다. 상기 접합은 MalPEG를 Hb 상의 표면 티올 기와 반응하여(및 더 적은 정도의 아미노기) MalPEG-Hb를 형성하는 것에 의해 실시된다. 티올기는 Hb의 아미노산 잔기에 존재하는 시스테인 잔기에서 발견되며, 또 티올기를 함유하도록 표면 아미노기를 조절하는 것에 의해 도입될 수 있다.

- [0027] 본 명세서에 사용된 바와 같은 용어 "메트헤모글로빈" 또는 "metHb"는 제2철(ferric) 상태의 철을 함유하는 Hb의 산화된 형태를 지칭한다. MetHb는 산소 운반체로서 작용하지 않는다. 본 명세서에 사용된 바와 같은 용어 "메트헤모글로빈 %"는 전체 Hb에 대한 산화된 Hb의 비율을 지칭한다.
- [0028] 본 명세서에 사용된 바와 같은 용어 "메톡시-PEG" 또는 "mPEG"는 PEG 히드록실 말단의 수소가 메틸(-CH₃) 기에 의해 치환된 PEG를 지칭한다.
- [0029] 본 명세서에 사용된 바와 같은 용어 "혼합물" 또는 "혼합"은 개별 특성을 손실시키는 반응 발생 없이 2 이상의 물질과 섞는 것을 지칭한다. 용어 "용액"은 액체 혼합물을 지칭하고 또 용어 "수성 용액"은 약간의 물을 함유하며 또 물과 함께 1 이상의 다른 액체 물질을 함유하여 다성분 용액을 형성하는 것을 지칭한다.
- [0030] 본 명세서에 사용된 바와 같은 용어 "변형된 헤모글로빈" 또는 "변형된 Hb"는 비제한적으로, 화학 반응에 의해, 예컨대 분자내 및 분자간 가교반응, 재조합 수법에 의해 변형되는 Hb를 지칭하며, 상기 Hb는 더 이상 "천연" 상태가 아니다. 본 명세서에 사용된 바와 같이, 용어 "헤모글로빈" 또는 "Hb" 그 자체는 변형된 Hb뿐만 아니라 천연 비변형 Hb 모두를 지칭한다.
- [0031] 본 명세서에 사용된 바와 같은 용어 "산소 친화성"은 분자 산소를 결합하는 Hb와 같은 산소 운반체에 대한 결합력을 지칭한다. 이러한 특징은 산소의 부분압(X 축)에 대한 산소에 의한 Hb 분자의 포화 정도(Y 축)를 관련시키는 산소 평형 곡선에 의해 정의된다. 상기 곡선의 위치는 산소 운반체가 산소에 의해 반(half) 포화되고 또 산소 친화성에 대해 역으로 관계된 P50 값으로 표시된다. 따라서 P50이 더 낮을 수록, 산소 친화성은 더 높아진다. 전체 혈액의 산소 친화성(및 전혈의 성분, 예컨대 적혈구 세포 및 Hb)은 당해 분야에 공지된 다양한 방법에 의해 측정될 수 있다(참고: 예컨대 Winslow, R.M. et al, J. Biol. Chem. 1977, 252:2331-37). 산소 친화성은 시판되는 HEMOX™ 분석기(TCS Scientific Corporation 제조, 미국 필라델피아 뉴 호프 소재)를 이용하여 결정될 수 있다(참고: 예컨대 Vande griff and Shrager in "Methods in Enzymology"(Everse et ah, eds.) 232:460(1994)).
- [0032] 본 명세서에 사용된 바와 같은 용어 "퍼플루오로카본"은 플루오르 원자를 함유하고, 또 전체적으로 할로겐(Br, F, Cl) 및 탄소 원자로 이루어지는 합성 불활성 분자를 지칭한다. 예мел젼 형태에서, 이들은 혈액 물질로서 개발 중인데, 이들은 등량의 혈액 또는 물보다 다수배 더 많은 산소를 용해시키는 능력을 갖기 때문이다.
- [0033] 본 명세서에 사용된 바와 같은 용어 "폴리에틸렌 글리콜" 또는 "PEG"는 화학식 H(OCH₂CH₂)_nOH의 액체, 또는 고체, 중합체(α -히드로- ω -히드록시폴리-(옥시-1,2-에탄디일)로도 공지됨)를 지칭하며, 상기 "n"은 4 이상이다. 치환되거나 또는 치환되지 않은 PEG 제형은 상기 용어에 포함된다. PEG는 다수의 제형으로 시판되고 있다(예컨대, Carbowax™(Dow Chemical, Midland, MI), Poly-G®(아치 케미컬스 제조, 코네티컷 노르워크 소재) 및 Solbase).
- [0034] 본 명세서에 사용된 바와 같은 용어 "폴리에틸렌 글리콜접합된 헤모글로빈" 또는 "PEG-Hb 접합물"은 PEG가 공유 결합으로 부착된 헤모글로빈을 지칭한다.
- [0035] 본 명세서에 사용된 바와 같은 용어 "기질-자유 헤모글로빈" 또는 "SFH"는 적혈구 세포막이 제거될 Hb를 지칭한다.
- [0036] 본 명세서에 사용된 바와 같은 용어 "표면-변형된 헤모글로빈"은 화학기, 보통 텍스트란 또는 폴리알킬렌 옥사이드와 같은 중합체가 부착된 헤모글로빈을 지칭한다. 용어 "표면 변형된 산소화된 헤모글로빈"은 표면이 변형될 때 "R" 상태인 Hb를 지칭한다.
- [0037] 유기 중합체
- [0038] 이전의 연구에서, 표면 변형된 헤모글로빈의 분자 크기는, 신장에 의해 제거되어 소망하는 순환 반감기를 달성할 만큼, 충분히 커야 한다는 것이 관찰되었다. Blumenstein, J. 등은 이것이 84,000 달톤("Da")의 분자량에서 또는 그 이상에서 달성될 수 있을 것이라고 결정하였다("Blood Substitutes and Plasma Expanders," Alan R. Liss, editors. New York, N.Y., pages 205-212(1978)). 이 연구에서, 저자들은 다양한 분자량의 텍스트란을 Hb에 접합하였다. 이들은 Hb(64,000 Da의 분자량 가짐)와 텍스트란(20,000 Da의 분자량 가짐)의 접합물이 순환으로부터 서서히 또 신장을 통하여 무시할 만큼 제거된다고 보고하였다. 또한, 분자량을 84,000 Da 위로 증가시키는 것은 이를 제거 곡선을 현저하게 변경시키지 않는다는 것도 밝혀졌다.

[0039] 본 발명은 PAO를 Hb에 접합하는 방법을 제공하며, 이때 적어도 84,000 Da의 분자량이 달성될 수 있다. 적합한 폴리알킬렌 옥사이드 중합체는 폴리에틸렌 옥사이드(-(CH₂CH₂O)_n-), 폴리프로필렌 옥사이드(-(CH(CH₃)CH₂O)_n-) 및 폴리에틸렌/폴리프로필렌 옥사이드 공중합체(-(CH₂CH₃O)_n-(CH(CH₃)CH₂O)_n-)를 포함한다. 본 발명을 실시하는데 적합할 수 있는 다른 직쇄, 분기된(branched) 사슬 및 경우에 따라 치환된 합성 중합체는 의료 분야에서 잘 알려져 있다.

[0040] Hb의 표면을 변형하기 위하여 현재 사용되는 가장 일반적인 PAO는 약학적 허용성 및 상업적 이용가능성의 점에서 PEG이다. 또한, PEG는 분자 내의 에틸렌 옥사이드(즉 -OCH₂CH₂-)의 반복되는 서브유닛의 수를 기본으로 한 다양한 분자량으로 입수할 수 있다. PEG 제형은 이들의 평균 분자량에 상응하는 수가 뒤따른다. 예컨대, PEG-200은 200 Da의 평균 분자량을 갖고 또 190-210 Da의 분자량 범위를 가질 수 있다.

헤모글로빈 변형

[0042] 본 발명의 방법에 사용된 Hb는 그의 공급원에 의해 제한되지 않으며 또 인간 또는 동물로부터 유도될 수 있거나, 또는 재조합 수법으로부터 얻을 수 있다. 이것은 천연(비변형) 또는 변형되거나, 또는 재조합적으로 엔지니어링된 것일 수 있다. 인간 α- 및 β-글로빈 유전자는 클로닝되어 서열결정화되어 있다(Liebhaber, S.A. et al., PNAS 1980, 77:7054-7058; Marotta, C.A. et al., J. Biol. Chem. 1977, 353: 5040-5053(β-globin cDNA)). 또한, 다수의 재조합적으로 변형된 Hb는 부위특이적(site-directed) 돌연변이를 이용하여 현재 제조되고 있으나, 이를 "돌연변이" Hb 변종은 바람직하지 않게 높은 산소 친화력을 갖는 것으로 보고되어 있다(예를 들어, Nagai, K. et al., PNAS 1985, 82:7252-7255). 바람직하게는, Hb는 기질 자유 및 내독소 자유이다.

[0043] Hb 상에서 이용가능한 접합 부위의 수를 증가시키는 한가지 방법은 설프히드릴 기("-SH")를 도입하는 것으로, 이것은 자유 아민에 비하여 PEG-Mal과 더욱 반응성인 경향이 있다. 단백질의 티올화에 대해서는 다수의 방법이 당해 분야에 공지되어 있다. 이들은 예컨대 숙신이미딜 3-(2-페리딜디티오) 프로피오네이트와의 반응에 의해 단백질의 자유 아민 함유 잔기를 티올화하고, 이어 디티오프레이탈("DTT") 또는 트리스(2-카복시에틸)포스핀("TCEP")을 사용하여 상기 3-(2-페리딜디티오) 프로피오닐 접합물을 환원시키는 것을 포함한다. 아민은 숙신이미딜 아세틸티오아세테이트와의 반응에 이어, 중성에 가까운 pH에서 50 mM 히드록실아민, 또는 히드라진을 사용하여 아세틸기를 제거하는 것에 의해 간접적으로 티올화될 수 있다. 또한, 2-이미노티올란(2-IT)은 자유 아민기를 티올기로 전환하기 위해 사용될 수 있다.

[0044] 천연 인간 Hb는 티올화에 이어 말레이이미드-활성화된 PAO 분자에 대한 접합에 의해 접근될 수 있는 고정된 수의 아미노산 잔기 측쇄를 갖는다. 이들은 하기 차트에 다음과 같이 제공된다:

알파 글로빈	
Lys	7, 16 및 40
베타 글로빈	
Lys	8, 17, 59, 66, 95
Cys	93, 132

[0045]

[0046] 접합 후에도 Hb의 아미노(α- 또는 ε-)기의 원래의 양전하를 유지한다면 유리할 것이라는 것이라는 것이 제시되었다. 이를 달성하기 위하여, 표면 리신 잔기의 ε-아미노기를 사용하여 PEG를 Hb에 부착하고, 이때 Hb는 상기 아미노기의 원래의 양전하를 그대로 유지하는 방법이 개발되었다(미국특허 번호 5,585,484호). 이것은 말레이이미드-PEG를 사용한 접합 반응 동안 PEG에 대한 부착 부위로서 이후에 표적화될 설프히드릴 기를 단백질에 도입하기 위하여 2-아미노티올란에 의해 Hb의 ε-아미노기를 아미드화하는 것을 포함한다.

[0047] 이러한 방법은 이전에 사용된 숙신이미딜 화학에 비하여 적어도 2개의 부가적인 특이적 이점을 갖는다: (1) 말레이이미드 기와 설프히드릴 기의 아주 높은 반응성과 선택성은 제한된 과량의 시약을 사용하여 티올의 거의 정량적 변형을 용이하게 실시할 수 있다; 및 (2) 2-이미노티올란의 티올기가 잠재적이어서 단백질 아미노기와 시약의 반응 결과로서만 그자리에서 생성된다. 따라서, Hb는 PEG를 사용한 표면 수식을 위해 티올화 및 폐길화 시약에 의해 동시에 배양될 수 있다.

[0048] 일 실시양태에서, 상기 티올화 반응은 반응이 완료되기 전에 2-IT가 현저하게 가수분해하는 pH 미만이고 또 상기 반응의 정도를 최적화하기 위한 리신의 pKa 미만인 7 내지 9 범위의 pH에서 실시된다.

[0049] **접합(conjugation)**

[0050] 본 명세서의 다른 곳에서 논의한 바와 같이, 접합 반응에서 반응물의 몰비를 증가시키면 Hb에 접합될 PEG 분자의 수 증가를 초래할 것이라고 이전에 추정되었다. 이것은 Hb의 티올화 과정(즉, Hb에 대한 티올화제의 몰비를 증가시킴) 및 표면 변형 과정(즉, 티올화된 Hb에 대한 활성화된 PEG의 몰비를 증가시킴)을 포함하였다. 이들 연구는 10-배 몰 과량 이상의 이미노티올란은 반응의 최초 2시간 이내에 사량체당 4개의 신규 반응성 -SH기로부터 8시간 후 사량체당 약 7개의 신규 반응성 -SH 기로 Hb 상의 티올화된 부위의 개수를 실질적으로 증가시켰음을 밝혀내었다. 10배로부터 30배로 몰비를 증가시키면 Hb 상의 티올의 총 수를 거의 배가시켰다. 상응하게, 티올화된 Hb에 대한 티올 활성화된 PEG의 몰비 증가(즉, 20배)는 티올화된 Hb에 접합될 수 있었던 말레이미드 활성화된 PEG 분자의 수도 증가시켰다.(참고: 미국특허 번호 7,501,499호). 이러한 과량의 몰비는 Hb 표면 상에 공유 결합적으로 결합된 6±1개의 PEG 분자를 갖는 Hb를 초래하였다. 그러나, 상기 기재한 바와 같은 반응물 비율 증가는 반응 역학을 느리게 하고, 바람직하지 않은 부생성물의 양을 증가시키며, 또 PEG-Hb 접합물의 분자량 분포를 증가시켰다.

[0051] 본 발명은 특정 분자량의 PEG 및 정밀하게 제어된 반응물 비율에 의해, 아주 우수한 PEG-Hb 접합물이 제조될 수 있다는 예상치 못한 발견을 기초로 하고 있다. 본 발명의 방법은 Hb 티올화 반응에서 뿐만 아니라 PEG 접합 반응에서 반응물의 감소된 몰비를 이용한다. 예기치 못하게 또 더 높은 농도의 반응물이 수율 및 접합 효율을 증가시킬 것이라는 종래의 가르침과 상반되게, 낮은 몰비의 반응물을 사용하여 더 많은 수의 PEG 분자를 변형된 Hb에 접합시킬 수 있다는 것이 밝혀졌다. 다른 이점으로서, 생성한 접합 생성물은 더 높은 비율의 반응물을 사용하여 얻은 동일 생성물에 비하여 더욱 긴밀한(tighter) 분자량 분포를 갖는 것이 밝혀졌다. 더욱 자세하게는, 티올화 반응에서, 8배 몰 과량 미만, 특히 7 내지 8배 몰 과량, 더욱 특히 7.5배 몰 과량의 2-IT; 및 접합 반응에서 15배 몰 과량 미만, 특히 9- 내지 15배 몰 과량, 더욱 특히 12배 몰 과량의 PEG-Mal은 Hb당 PEG 분자의 평균 수 7.1 내지 8.9, 특히 약 8을 초래하였다. 논의한 바와 같이, 낮은 몰비의 반응물을 사용하는 것은 몇 가지 이점을 갖는다. 이것은 최종 생성물에서 불순물을 감소시켜서, 정제 과정 효율을 용이하게 하고 또 개선된 분자 분산을 통하여 반응 효율을 증가시킨다. 효율 증가는 또한 말레이미드 고리의 가수분해 및 탈활성화를 완성하는데 걸리는 반응 시간을 감소시킨다. 또한, 반응물의 양을 감소시키는 것에 의해, 이들 각 반응으로부터의 부생성물도 또한 감소된다. 특히, 2-IT로부터의 가수분해 부생성물인 4-부티리티올아세톤 및 4-티오부티르산 뿐만 아니라 개환된 비반응성 PEG 부생성물이 현저히 감소되었다.

[0052] 상기 기재한 바와 같이, 접합 반응에서 Hb에 대한 PEG-Mal의 몰비는 15배 미만이다. 이 몰비는 반응성 PEG-Mal의 농도를 기준한 것이고, 또 Hb에 대한 PEG-Mal의 절대 비율을 기준으로 하는 것이 아니다. PEG-Mal 중의 폐환 구조를 갖는 반응성 말레이미드의 비율을 "말단 활성"이라고 칭한다. 따라서, 모든 말레이미드가 반응성이면, PEG-Mal은 100%의 말단 활성을 갖는다. 본 명세서에 기재된 바와 같이 Hb에 대한 PEG-Mal의 몰비는 Hb에 대한 말단 활성 PEG-Mal의 몰비를 기준으로 한다. 따라서, PEG-Mal 시약의 말단 활성이 90% 이면, 동일 몰비를 달성하기 위하여 10%가 더 Hb에 부가될 필요가 있을 것이다.

[0053] 잔류하는 미반응 PEG의 감소는 제조 효율 및 최종 생성물의 품질 증가의 부가된 이점을 갖는다. PEG 접합 반응에 이어, 잔류하는 반응물은 링거의 락테이트 또는 아세테이트 용액과 같은 10 부피의 최종 생성 희석액을 사용하여 투석여과에 의해 제거되었다. 이 단계에 필요한 시간의 양은 상기 투석여과 과정의 부피 플럭스에 의해 결정된다. 소정 필터 크기의 경우, 상기 투석여과 과정은 본 발명의 반응 비율이 이용될 때 더 신속하게 종료된다. 반응물의 세척으로 지수함수형 봉괴가 뒤따라오고 그 결과 불순물의 초기 농도를 감소시키는 것(잔류 반응물 및 반응물 중의 불순물)은 생성물에서 최종 농도를 감소시킬 것이다. 따라서, 시약의 총 양은 생성물 중의 불순물의 총량을 감소시킬 수 있다.

[0054] **PEG-Hb 접합물**

[0055] 본 발명의 PEG-Hb 접합물은 보통 전혈(whole blood)보다 큰 산소 친화성을 가지며, 더욱 자세하게는, 전혈의 2 배 또는 3배이다. 상이하게 기재된 바와 같이, PEG-Hb는 보통 동일 조건하에서 측정될 때 기질 자유 혜모글로빈(SFH)에 비하여 더 높은 산소 친화성을 갖는다. 이는 PEG-Hb 접합물이 10 밀리미터 수은(mmHg), 그러나 3 mmHg 이상의 P50을 갖는 것을 의미한다. SFH는 37°C, pH 7.4에서 약 15 mmHg의 p50을 갖는 반면에, 전혈에 대한 p50은 동일 조건하에서 약 28 mmHg이다. 혜모글로빈-계 산소 운반체(HBOC)의 산소 친화성을 증가시켜 그에 의해 p50을 저하시키는 것은 조직에 대한 산소의 전달을 향상시키지만, SFH의 산소 친화성보다 낮은 산소 친화성은 허용될 수 없다는 것이 제시되었다. 참고: Winslow, R.M. et al., in "Advances in Blood Substitutes"(1997), Birkhauser, eds. Boston, Mass.. at page 167, 및 미국특허 번호 6,054,427호. 이러한 제안은 HBOC는 낮은 산

소 친화성, 및 특히 전혈의 p50과 거의 상응하는 p50을 가져야한다는 통념과는 상반된다. 따라서, 다수의 연구자들은 SFH의 p50을 10 mmHg에서부터 약 20-22 mmHg로 증가시키기 위하여 피리독실 포스페이트를 사용하여 왔는데, 이는 피리독실화된 Hb가 SFH와 비교하여 용이하게 산소를 방출하기 때문이다.

[0056] 높은 산소 친화성을 갖는 HBOC(즉, SFH보다 적은 p50을 갖는 것)를 제조하기 위하여 다수의 상이한 과학적 방법이 있다. 예컨대, 상기 연구들은 β 93 시스테인과 같이 산소 친화성에서 중요한 역할을 하는 아미노산 잔기를 확인하였다. 이를 발견으로 인하여, 부위 특이적 돌연변이가 용이하게 실시되어 산소 친화성을 소망하는 수준으로 조작할 수 있다(참고: 예를들어, 미국특허 번호 5,661,124호). 상기 β 93 시스테인 잔기는 헴(heme) 철에 직접적으로 배위된 β -서브유닛에서 유일한 잔기인 β 92 히스티딘 잔기에 바로 인접하여 위치한다. 강성의 별기(bulky)한 말레이미드기를 상기 β 93 시스테인에 부착하는 것은 저 친화성 T-상태 Hb 입체구조를 보통 안정화시키는 염 브릿지를 교체한다(Perutz M.F. et al., Biochemistry 1 74, 13:2163-2173). 이것은 4급 입체형태(conformation)를 R 상태로 전환시켜, 더 높은 O_2 친화성을 초래한다(Imai, K. et al., Biochemistry 1973, 12:798-807). 다수의 다른 방법들은 미국특허 번호 6,054,427호에서 논의되어 있다.

[0057] 생체내 투여를 위한 제형

[0058] 본 발명의 PEG-Hb 접합물은 생체내 투여에 적합한 수성 희석제로 제형화된다. 희석제 중의 산소 운반제의 농도는 용도에 따라서 다양할 수 있지만, Hb의 10 g/dl 농도를 보통 초과하지 않는데, 이는 PEG-Hb 접합물의 개선된 산소 전달 및 치료 효과 때문이다. 더욱 자세하게는, 상기 농도는 보통 0.1 내지 8 g/dl Hb 범위이다.

[0059] 적합한 수성 희석제(즉, 정맥 주사를 위해 약학적으로 허용되는 것)는 그 중에서도, 단백질, 당단백질, 다당류 및 기타 콜로이드의 수성 용액을 포함한다. 이를 실시양태는 특정 희석제에 한정되는 것이 아니다. 따라서, 희석제는 알부민, 기타 콜로이드 또는 기타 비-산소운반 성분의 수성 무세포 용액을 포함할 수 있다.

[0060] PEG-Hb 접합물의 용액 특성은 PEG 사슬과 용매 물 분자 사이의 강한 상호작용에 기인한다. 이것은 다음 2개 이유 때문에 HBOC에 대한 중요한 특징인 것으로 믿어진다: 1) 더 높은 점도는 PEG-Hb 분자의 확산 상수를 감소시킨다, 및 2) 더 높은 점도는 상피세포 벽을 따라 훌러들어가는 용액의 전단 응력을 증가시켜 혈관수축에 대응하는 혈관확장제의 방출을 유도한다. 따라서, 수성 희석제 중의 PEG-Hb 제형은 보통 적어도 2 센티포아즈(cP)의 점도를 갖는다. 더욱 자세하게는, 2 내지 4 cP, 및 특히 약 2.5 cP이다. 다른 실시양태에서, 수성 용액의 점도는 6 cP 또는 그 이상일 수 있지만, 보통 8 cP 미만이다.

[0061] PEG-Hb 접합물은 다른 생성물에서와 같이 혜모글로빈-계 산소 운반제로서 사용하기 적합하다. 예컨대, 이것은 수술하는 동안 혈류역학 안정성을 증진하기 위하여 기관 저장에 있어서 혈액 대체물로서 유용하다.

[0062] 실시예

[0063] 실시예 1

[0064] Hb의 티올화

[0065] 1. SFH의 제조

[0066] 포장된 혈구 세포("RBC")는 지역 혈액 은행, 뉴욕 혈액 센터 또는 미국 적십자와 같은 상업적 공급처로부터 구입하였다. 상기 원료는 채혈한지 45일 이전의 것을 입수하였다. 바이러스 감염에 대하여 모든 유닛을 스크리닝하였고 또 사용하기 전에 혁산 시험 처리하였다. 백혈구 제거되지 않은(non-leukodepleted) 모아진 유닛은 백혈구 세포를 제거하기 위한 막 여과에 의해 백혈구 제거하였다. 포장된 RBC는 멸균 용기에 모으고 또 가공할 때까지 2-15°C에서 저장하였다. 부피를 측정하고, 또 시판되는 코옥시미터(cooximeter) 또는 기타 당업자에게 인지된 방법을 이용하여 Hb 농도를 결정하였다.

[0067] RBC는 0.45 μm 탄젠트 유동 여과를 이용하여 0.9% 염화 나트륨 6부피에 의해 세척한 다음, 염의 농도를 감소시키는 것에 의해 세포 용균시켰다. Hb 추출은 동일 막을 이용하여 실시하였다. 세포 세척을 분석하여 알부민에 대한 분광광도계 에세이에 의해 혈장 성분의 제거를 확인하였다. Hb를 정제하기 위하여 용균물은 냉소, 0.16 μm 막을 통하여 가공하였다. 정제된 Hb는 멸균 발열원제거(depyrogenated)로 수집한 다음 한외여과하여 바이러스를 제거하였다. 용매/세제 처리, 나노 여과 및 음이온 Q 막 정제를 비롯한 부가적 바이러스 감소 단계가 실시될 수 있다. 이 방법에서 모든 단계는 2-15°C에서 실시된다.

[0068] 용균물로부터 Hb는 30-kD 막을 사용하여 링거의 락테이트("RL") 또는 포스페이트-완충 염수("PBS", pH 7.4)로 교환되었다. Hb를 농축하여 1.1-1.5 mM(사량체)로 만들었다. 10 내지 12 부피의 RL 또는 PBS는 용매 교환을 위

해 사용되었다. 이 과정은 2-15°C에서 실시한다. RL 또는 PBS에서 제조된 용액의 pH는 티올화 이전에 8.0으로 조절되었다. Hb는 0.45 또는 $0.2\mu\text{m}$ 일회용 필터 캡슐을 통하여 멸균 여과하고 화학 변형 반응이 실시되기 전까지 $4\pm2^\circ\text{C}$ 에서 저장하였다.

[0069] 2. SFH의 티올화

[0070] 상기와 같이 제조된 SFH를 사용하여, Hb에 대하여 8배 몰 과량 미만의 2-IT를 사용하여 티올화를 실시하였다. 상기 비율 및 반응 시간은 PEG 접합을 위한 티올기의 수를 최대화하고 또 생성물 이질성을 최소화하도록 최적화 한다. RL(pH 7.0-8.5), PBS 또는 유사 완충액 중의 약 1 mM Hb(사량체)는 동일 완충액 중의 8 mM 미만의 2-IT와 조합하였다. 이 혼합물을 $10\pm5^\circ\text{C}$ 에서 6시간 미만 동안 연속적으로 교반하였다.

[0071] 티올화 전후에, 이어 Hb-PEG 접합 후에 다시 Hb 사량체의 표면 상의 이용가능한 티올기의 수를 측정하기 위하여 디티오피리딘 비색 에세이(Ampulski, R.S. et al, Biochem. Biophys. Acta 1969, 32: 163-169)를 이용한다. 인간 Hb는 p93 시스테인 잔기에서 2개의 고유한 반응성 티올기를 함유하며, 이는 디티오피리딘 반응에 의해 확인된다. 1: < 8의 비율(SFH: 2-IT)로 SFH의 티올화 이후, 반응성 티올기의 수는 2에서부터 7개 이상의 티올로 증가한다.

[0072] 실시예 2

[0073] Hb를 PEG-Mal에 접합하기

[0074] 출발 사량체 Hb 농도에 대하여 100% 말단 활성을 기본으로 하여 15배 미만의 몰 과량의 PEG-Mal을 사용하여, PEG-Mal을 실시예 1로부터 얻은 티올화된 Hb에 접합시켰다. Hb는 먼저 분위기와 균등하게 되도록 하여 Hb를 산소화시켰다. 약, RL(pH 7.0-8.5), PBS 또는 유사 완충액 중의 1 mM 티올화된 Hb를 동일 완충액 중의 15 mM 미만의 PEG-Mal과 조합하였다. 이 혼합물을 $10\pm5^\circ\text{C}$ 에서 6시간 미만 동안 연속적으로 교반하였다.

[0075] 70-kD 막(즉 < 0 - 부피 여과)을 통하여 PEG-Hb 접합물을 가공처리하여 미반응 시약을 제거하였다. 이 과정은 540 nm 및 280 nm에서 크기 배제 액체 크로마토그리피("LC")에 의해 모니터링하였다. 농도는 4 g/dl Hb로 조절하였고 또 pH는 6.0 ± 7.8 로 조절하였다.

[0076] 최종 PEG-Hb 접합물 생성물은 $0.2\mu\text{m}$ 멸균 일회성 캡슐을 사용하여 멸균 여과시키고 또 $4\pm2^\circ\text{C}$ 에서 멸균 발열원 제거된 용기에 수집하였다. PEG-Hb 접합물은 4 g/dl RL로 희석시키고 또 pH는 7.4 ± 0.2 pH로 조절하였고 이어 멸균 여과($0.2\mu\text{m}$)하고 내독소 자유 멸균 용기로 등분하였다.

[0077] 실시예 3

[0078] PEG-Hb 접합물의 특징화

[0079] 1. 이화학적 분석을 위한 방법

[0080] PEG-Hb 접합물의 균일성 및 문자 크기는 LC에 의해 특징화하여 미반응 PEG-Mal의 제거를 확인하였다. 용출액 중의 Hb의 양은 540 nm에서 흡수를 모니터링함으로써 결정하였다. 이는 이들의 문자량 차를 기본으로 하여 피크 위치에 의해 미반응 Hb로부터 PEG-Hb 접합물을 분해한다. 용출액 중의 미반응 PEG-Mal의 양은 280 nm에서 흡수를 모니터링함으로써 결정하였다. 이는 PEG-Mal 중의 말레이미드 고리 구조로 인하여 스펙트럼의 자외선("UV") 영역에서 흡수하는 자유 PEG-Mal로부터 PEG-Hb 접합물을 분해한다.

[0081] 광학 스펙트럼은 Hb 농도 및 다성분 분석에 의한 % metHb를 분석하기 위하여 소렛(Soret) 및 가시 영역에서 급속 미분 다이오드 어레이 분광광도계를 이용하여 수집하였다.

[0082] PEG-Hb 접합물 농도 및 % metHb는 코옥시미터(인스트루멘테이션 라보라토리 제조, 미국 매사추세츠 베드포드 소재)를 이용하여 측정하였다. 점도는 Rheometer(Brookfield Engineering Laboratories, Inc. Middleboro, MA)를 이용하여 측정하였다. 콜로이드성 삼투압력을 콜로이드 삼투계인 Osmomat 050(Gonotec GmbH 제조, 독일 소재)를 이용하여 측정하였다. 산소 결합 변수는 Hemox Analyzer(TCS Scientific Corporation 제조, 필라델피아 뉴 호프 소재)를 이용하여 산소 평형 곡선으로부터 결정하였다.

[0083] 2. PEG-Hb 접합물의 상세 내용

[0084] 본 발명의 예시적 혈액 대체물 조성물에 대한 상세한 내용은 하기 표 1에 나타낸다:

[0085] 표 1

시험	상세내용
헤모글로빈 농도 (g/dL)	4.0내지4.6
메트헤모글로빈 (%)	<10
pH	6.4내지7.9
삼투압 (mOsm/L)	240내지300
내독소 (EU/mL)	<0.5
GPC 에 의한 순도	>95%
점도 (cPs)	2내지4
콜로이드성 삼투 압력 (mmHg)	60-70
p50 (mmHg)	5±2
혈 널버 (p50에서)	1.2 ± 0.5
PEG 접합의 정도	평균 7.1 내지 8.9 PEGs/Hb 사량체
보어 효과 (delta Log)	-0.24
분자량 (kDa)	>100
멸균성	통과

[0086]

[0087] 상기 기재한 실시예는 본 발명의 조성물을 바람직한 실시양태를 제조하여 사용하는 방법에 대한 완전한 개시와 기재를 위하여 당업자에게 제공된 것이고 발명자들이 자신의 발명으로 간주하는 발명의 범위를 제한하려는 것은 아니다. 상술한 실시양태의 변형(당업자에게 명백한 본 발명을 실시하기 위하여)은 이하의 특허청구범위에 속하는 것으로 본다. 본 명세서에 인용된 모든 공보, 특히 및 특허 출원은 각 공보, 특히 또는 특허출원이 참조에 의해 본 명세서에 명시적으로 또 개별적으로 포함되었던 것처럼 참조에 의해 본 명세서에 포함된다.

도면

도면1

