



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2008-0098686
(43) 공개일자 2008년11월11일

(51) Int. Cl.

C12N 9/06 (2006.01) C12N 9/00 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2008-7024272(분할)
(22) 출원일자 2008년10월02일
심사청구일자 2008년10월02일
(62) 원출원 특허 10-2002-7010189
원출원일자 2002년08월07일
심사청구일자 2006년02월06일
번역문제출일자 2008년10월02일
(86) 국제출원번호 PCT/US2001/040069
국제출원일자 2001년02월07일
(87) 국제공개번호 WO 2001/59078
국제공개일자 2001년08월16일
(30) 우선권주장
09/501,730 2000년02월10일 미국(US)

(71) 출원인

마운틴 뷰 파마슈티컬즈 인크.

미합중국 캘리포니아 94025 멘로 파크 슈트 에스
에디슨 웨이 3475

듀크 유니버시티

미합중국 노스 캐롤라이나 27705 더럼 피.오.박스
90083 슈트 306 어원 로드 2812 오피스 오브 라이
센싱 앤드 벤처스

(72) 발명자

서면, 메리, 알.

미합중국 캘리포니아 94070 샌 칼로스 로얄 레인
1114

사이퍼, 마아크, 지., 피.

미합중국 캘리포니아 94070 샌 칼로스 로얄 레인
1114

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

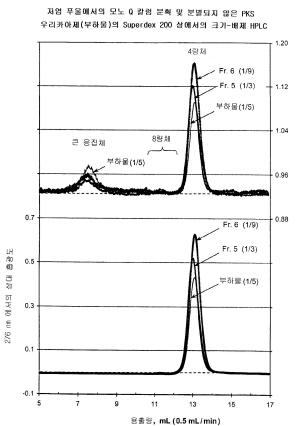
채윤

전체 청구항 수 : 총 7 항

(54) 정제된 요산산화효소 제제 및 이를 포함한 조성물, 그리고 그 정제법

(57) 요약

필수적으로 큰 응집체가 없는 자연 발생적 또는 재조합 단백질, 특히 돼지 요산산화효소(우리카아제)의 뮤테인(돌연변이단백질)은, 단백질의 생활성(bioactivity)이 컨쥬게이트 내에서 필수적으로 유지되도록, 중합체의 충분히 적은 가닥 수와 컨쥬게이션 됨으로써, 실질적으로 비면역원성으로 될 수 있다. 그러한 컨쥬게이트는 만성 증상의 치료에 특이하게 잘 적합한데, 그것은 그들이 큰 응집체를 미량 함유하는 단백질 제제로부터 제조되는 유사한 컨쥬게이트들 보다 항체의 형성 및/또는 가속화된 제거(clearance)를 덜 일으키기 때문인 것 같다.

대 표 도 - 도2

(72) 발명자

윌리엄스, 웨., 데이비드

미합중국 캘리포니아 94536 프리몬트 알린 코트
37709

허쉬필드, 마이클, 에스.

미합중국 노스 캐롤라이나 27707 더햄 브리스톨 로
드 4019

켈리, 수잔, 제이.

미합중국 노스 캐롤라이나 27516 차펠 힐 레이 코
트 8104

특허청구의 범위

청구항 1

정제된 요산산화효소(urate oxidase, 우리카아제(uricase)) 제제로서,
상기 우리카아제 제제의 0%에서 2%까지의 응집체가 8량체보다 더 크며,
상기 우리카아제 제제는 4량체(tetramer) 및 8량체(octamer) 형태의 우리카아제를 포함하는 우리카아제 제제.

청구항 2

우리카아제(uricase) 분획을 포함하는 조성물로서,
상기 우리카아제 분획의 0%에서 2%까지의 응집체가 상기 분획 중 8량체보다 더 크며,
상기 분획은 아미노 말단에서, 카르복시 말단에서, 또는 아미노 및 카르복시 말단 모두에서 절단되어(truncated) 있는 재조합 우리카아제이며,
상기 절단되어 있는 우리카아제는 효소적으로 활성인 4량체(tetramer) 형태 및 8량체(octamer) 형태인 것을 특징으로 하는 우리카아제 분획을 포함하는 조성물.

청구항 3

감소된 면역원성을 갖는 우리카아제 제제를 정제하는 방법으로서,
8량체 우리카아제와 8량체보다 큰 우리카아제 응집체를 포함하는 우리카아제 혼합물을 제공하는 단계와,
상기 우리카아제 혼합물로부터 상기 8량체보다 큰 우리카아제 응집체의 일부나 전부를 분리하는 단계와,
8량체를 포함하는 나머지를 회수하는 단계
를 포함하며,
상기 나머지에 존재하는 우리카아제 제제의 0%에서 2%까지의 응집체가 8량체보다 더 크며,
상기 우리카아제 제제는 4량체 및 8량체 형태의 우리카아제를 포함하며,
상기 분리하는 단계는, 이온-교환 크로마토그래피, 크기-배제 크로마토그래피 및 한외여과(ultrafiltration)로 이루어지는 군으로부터 선택되는
것을 특징으로 하는, 우리카아제 제제를 정제하는 방법.

청구항 4

제 3 항에 있어서, 상기 분리하는 단계는,
우리카아제 분획에서 8량체보다 더 큰 응집체를 검출하는 단계와,
상기 응집체를 포함하는 분획을 배제하는 단계
를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 5

제 4 항에 있어서, 상기 검출하는 단계는 광 산란(light scattering) 측정방법을 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 6

요산산화효소(urate oxidase, 우리카아제(uricase)) 제제를 포함하며,
상기 우리카아제 제제는 4량체(tetramer) 및 8량체(octamer) 형태의 우리카아제를 포함하며,
상기 우리카아제 제제의 0%에서 2%까지의 응집체가 8량체보다 더 큰

것을 특징으로 하는 체액 또는 조직 내 요산 수준을 낮추기 위한 제약학적 조성물.

청구항 7

요산산화효소(urate oxidase, 우리카아제(uricase)) 제제를 포함하며,

상기 우리카아제 제제는 4량체(tetramer) 및 8량체(octamer) 형태의 우리카아제를 포함하며,

상기 우리카아제 제제는 상기 8량체 형태보다 더 큰 우리카아제 응집체가 거의 없는

것을 특징으로 하는 체액 또는 조직 내 요산 수준을 낮추기 위한 제약학적 조성물.

명세서

발명의 상세한 설명

기술 분야

- <1> 본 출원에 기재된 연구의 일부는 유.에스.-이스라엘 양국 산업 연구 및 개발원(U.S.-Israel Binational Industrial Research and Development Foundation)의 지원에 의하여 이루어졌다. 따라서, 미합중국 정부는 이 발명에 일정한 권리를 가질 수 있다.
- <2> 본 발명은 단백질의 순환 수명을 연장하고 그들의 면역원성을 감소시키기 위한 단백질의 정제 및 화학적 변형에 관한 것이다. 보다 상세히, 본 발명은 폴리(에틸렌 글리콜)(poly(ethylene glycol)) 또는 폴리(에틸렌 옥사이드)(poly(ethylene oxide))의 컨쥬게이션(conjugation) 전에 요산산화효소(Urate Oxidase)(우리카아제(uricase))로부터 8량체(octamer) 보다 큰 응집체들을 제거하는 것에 관한 것이다. 이것은 우리카아제의 요산분해 활성을 손상시키지 않으면서 그것의 면역원성을 실질적으로 제거한다.

배경기술

- <3> 본 배경에 포함된 진술은 선행 기술의 인정이라기 보다는, 본 발명이 이루어진 시기에 본 기술 분야의 상태에 대한 본 발명자 자신들의 주관적인 언급 및 해석을 반영하는 것이다. 이러한 해석들은 사적이며, 지금까지 공개되지 않은 발명자들의 의견을 포함할 수 있고, 이러한 의견 자체는 선행 기술의 일부가 아니다.
- <4> 요산산화효소들(우리카아제들; E.C.1.7.3.3)은 요산(uric acid)을 보다 용해성인 산물, 즉 보다 쉽게 분비되는 퓨린 대사산물인 알란토인(allantoin)으로 산화시키는 것을 촉매하는 효소이다. 인간은 고등 영장류로의 진화 과정 동안 얻어진 우리카아제에 대한 유전자에 있어서의 여러 돌연변이의 결과로서, 효소적으로 활성인 우리카아제를 생산하지 못한다. Wu, X 일동, (1992), *J. Mol. Evol* 34: 78-84. 따라서, 민감한 사람들에게 있어서, 혈액 내에 과잉 농도의 요산이 존재하는 것(고뇨산혈증: hyperuricemia) 및 소변 내에 과잉 농도의 요산이 존재하는 것(고뇨산감소증: hyperuricosuria)은 고통스러운 관절염(통풍), 불균형적인 요산염 침착(통풍결절) 및 신장염을 일으킬 수 있다. 일부 감염 환자들에게 있어서는, 알로퓨리놀(allopurinol)(요산합성 억제제)과 같이 시중에서 구입할 수 있는 약물이 치료 제한적인 부작용을 초래하거나 또는 이러한 증상들을 적절히 치료하지 못하기도 한다. Hande, KR, 일동., (1984) *Am J. Med.* 76:47-56; Fam, AG, (1990) *Bailliere's Clin Rheumatol* 4:177-192. 우리카아제를 주사하면 최소한 일시적으로는 고뇨산혈증 및 고뇨산감소증을 경감시킬 수 있다. 그러나, 우리카아제는 인간에게 있어 외래 단백질이므로, 아스페길러스 플라부스(*Aspergillus flavus*)로부터의 변형되지 않은 단백질의 일차 주사조차도, 처치된 환자 중 몇 퍼센트에 있어서는 아나필락시형 반응(anaphylactic reaction)을 일으키며(Pui, C-H 일행, (1997) *Leukemia* 11:1813-1816), 또한 면역학적 반응들은 장기간 또는 간헐적인 치료에 대한 그것의 효용을 제한한다. Donadio, D. 일행, (1981) *Nouv Press Med* 10:711-712; Leaustic, M. 일행, (1983) *Rev. Rhum Mal Osteoartic* 50:553-554.
- <5> 미합중국 특허출원 제 09/370,084 호 및 공개된 국제출원 PCT/US99/17514 호는 컨쥬게이트되지 않은 우리카아제의 요산분해 활성의 최소 약 75%를 보유하면서 실질적으로 감소된 면역원성을 가지는 폴리(에틸렌 글리콜)-요산산화효소(PEG-우리카아제)를 개시한다. 그와 같이 정제된 하나의 우리카아제에 있어서, 각 서브유니트는 PEG의 평균 2 내지 10 개의 가닥들에 공유적으로 결합되어 있고, 여기서, PEG의 각 분자는 약 5 kDa 내지 100 kDa 사이의 분자량을 가질 수 있다.
- <6> 단백질들의 응집은 그들의 면역원성을 증가시키는 것으로 알려져 있다. 이러한 이해는 백신의 제조에 사용하기 전에 글루타르알데히드에 노출시켜 가교결합(cross-linking)을 형성하거나 열변성(thermal denaturation)과 같

은 처치를 함으로써 의도적으로 단백질을 응집시키는 방법, 또는 항혈청(antisera)을 제조하기 위하여 동물을 면역화하는 방법의 개발에 기여하였다.

- <7> 단백질의 비의도적인 응집 또한 치료적 단백질들, 예를 들어 인간 감마 글로불린(human gamma globulin)(Henney et al.(1968) *N. Engl. J. Med.* 278: 2244-2246) 및 인간 성장 호르몬(human growth hormone)(Moore et al.(1980) *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 51: 691-697)의 임상적 사용 동안 면역화 또는 감작(sensitization)에 기여하는 것으로 인식되고 있다. 인간 인터페론 알파의 면역원성에 대한 응집체의 기여는 BALB/c 생쥐(Braun et al.(1997) *Pharm. Res.* 14: 1472-1478)에서 보여지고 있으며, 효소결합 면역흡착 검정(ELISA: enzyme-linked immunosorbent assay)이 그들의 측정을 위해 개발되었다(Braun et al.(1997) *Pharm. Res.* 14: 1394-1400).

발명의 내용

해결 하고자하는 과제

- <8> 단백질의 면역원성에 대한 응집의 알려진 효과와는 대조적으로, PEG와 같은 폴리(알킬렌 글리콜)에 컨쥬게이트된 단백질의 면역원성에 대한 응집의 효과에 대한 보고는 없다. 요산분해 활성을 감소시키지 않으면서 우리카아제의 면역원성을 실질적으로 제거하는 폴리(알킬렌 글리콜)-우리카아제 컨쥬게이트에 대한 요구가 있다. 본 발명은 그러한 조성물을 제공하는 것이다.

과제 해결수단

- <9> 본 발명의 일 측면에 의하면, 정제된 요산산화효소(urate oxidase, 우리카아제(uricase)) 제제로서, 상기 우리카아제 제제의 0%에서 2%까지의 응집체가 8량체보다 더 크며, 상기 우리카아제 제제는 4량체(tetramer) 및 8량체(octamer) 형태의 우리카아제를 포함하는 우리카아제 제제가 제공된다.
- <10> 본 발명의 다른 측면에 의하면, 우리카아제(uricase) 분획을 포함하는 조성물로서, 상기 우리카아제 분획의 0%에서 2%까지의 응집체가 상기 분획 중 8량체보다 더 크며, 상기 분획은 아미노 말단에서, 카르복시 말단에서, 또는 아미노 및 카르복시 말단 모두에서 절단되어(truncated) 있는 재조합 우리카아제이며, 상기 절단되어 있는 우리카아제는 효소적으로 활성인 4량체(tetramer) 형태 및 8량체(octamer) 형태인 것을 특징으로 하는 우리카아제 분획을 포함하는 조성물이 제공된다.
- <11> 본 발명의 또 다른 측면에 의하면, 감소된 면역원성을 갖는 우리카아제 제제를 정제하는 방법으로서, 8량체 우리카아제와 8량체보다 큰 우리카아제 응집체를 포함하는 우리카아제 혼합물을 제공하는 단계와, 상기 우리카아제 혼합물로부터 상기 8량체보다 큰 우리카아제 응집체의 일부나 전부를 분리하는 단계와, 8량체를 포함하는 나머지를 회수하는 단계를 포함하며, 상기 나머지에 존재하는 우리카아제 제제의 0%에서 2%까지의 응집체가 8량체보다 더 크며, 상기 우리카아제 제제는 4량체 및 8량체 형태의 우리카아제를 포함하며, 상기 분리하는 단계는, 이온-교환 크로마토그래피, 크기-배제 크로마토그래피 및 한외여과(ultrafiltration)로 이루어지는 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는, 우리카아제 제제를 정제하는 방법이 제공된다.
- <12> 바람직하게, 상기 분리하는 단계는, 우리카아제 분획에서 8량체보다 더 큰 응집체를 검출하는 단계와, 상기 응집체를 포함하는 분획을 배제하는 단계를 포함하며,
- <13> 더욱 바람직하게는, 상기 검출하는 단계는 광 산란(light scattering) 측정방법을 포함하는 것을 특징으로 한다.
- <14> 본 발명의 또 다른 측면에 의하면, 요산산화효소(urate oxidase, 우리카아제(uricase)) 제제를 포함하며, 상기 우리카아제 제제는 4량체(tetramer) 및 8량체(octamer) 형태의 우리카아제를 포함하며, 상기 우리카아제 제제의 0%에서 2%까지의 응집체가 8량체보다 더 큰 것을 특징으로 하는 체액 또는 조직 내 요산 수준을 낮추기 위한 제약학적 조성물, 또는
- <15> 요산산화효소(urate oxidase, 우리카아제(uricase)) 제제를 포함하며, 상기 우리카아제 제제는 4량체(tetramer) 및 8량체(octamer) 형태의 우리카아제를 포함하며, 상기 우리카아제 제제는 상기 8량체 형태보다 더 큰 우리카아제 응집체가 거의 없는 것을 특징으로 하는 체액 또는 조직 내 요산 수준을 낮추기 위한 제약학적 조성물이 제공된다.
- <16> 더욱이, 폴리(알킬렌 글리콜), 특히 PEG와의 단백질의 컨쥬게이션은 감소된 면역원성 및 혈류(bloodstream) 내

에서의 증가된 지속성을 가지는 컨쥬케이트를 생성한다. 변형되지 않은 우리카아제 체제의 요산분해 활성의 거의 모두를 보유하면서 실질적으로 비면역원성인 우리카아제의 컨쥬케이트를 제조하려는 의도에 있어서, 출발 물질에 있어 우리카아제의 큰 응집체의 미량의 존재가 항체의 형성 및 순환으로부터의 가속화된 제거(clearance) 모두를 일으키는데 놀라울 정도로 효과적임을 발견하였는데, 상기 항체의 형성 및 순환으로부터의 가속화된 제거 모두는 그러한 응집체를 함유하는 우리카아제로부터 제조된 PEG 컨쥬케이트의 반복된 주사 후에 일어나는 것으로서, 해로운 것이다. 놀랍게도, 본 발명자들은 증가된 면역원성 및 가속화된 제거가, 천연 4량체(tetramer)보다 큰, 즉 잘 정의된 중간 크기 우리카아제 서브유니트의 응집체들(예컨대 여덟 개의 서브유니트를 함유하는 응집체(8량체들))의 존재로 인한 것이 아님을 발견하였다. 우리카아제의 8량체 형태는 그의 UV 광 흡수(예컨대 214nm 또는 276nm에서) 또는 단백질 농도에 대한 다른 측정 또는 굴절율에 대한 그의 기여에 의하여 감지할 수 있을 정도로, 대부분의 우리카아제 체제에서 충분히 높은 농도로 존재한다. 그럼에도 불구하고, 테스트되는 조건 하에서 UV 흡수에 의해서는 검출될 수 없지만 정적(static)(Raleigh) 또는 동적(dynamic) 광 산란(light scattering)에 의해서는 곧 검출되는 훨씬 큰 응집체들의 훨씬 적은 양과는 대조적으로, 8량체 자체들은 PEG-우리카아제 컨쥬케이트의 면역원성 및 가속화된 제거에 최소한으로 기여한다는 것을 알게 되었다. 따라서, PEG와의 컨쥬케이션 전에 그러한 미량의 매우 큰 응집체들을 제거하는 것이, 결과 PEG-우리카아제 컨쥬케이트들의 면역원성 및 가속화된 제거를 놀라울 정도로 감소시킨다는 것을 발견하게 되었다.

<17>

본 발명의 한 구현예는 8량체보다 큰 응집체가 거의 없는 정제된 요산산화효소(우리카아제)이다. 바람직하게, 그 우리카아제는 포유동물 우리카아제이다. 더욱 바람직하게, 그 우리카아제는 돼지 간(肝), 소 간 또는 양 간 우리카아제이다. 본 바람직한 구현예의 한 측면에서, 그 우리카아제는 재조합체이다. 본 바람직한 구현예의 또 다른 측면에서, 그 우리카아제는 실질적으로, 돼지, 소, 양 또는 비비 간 우리카아제의 서열을 갖는다. 유리하게, 그 우리카아제는 키메릭이다. 바람직하게, 그 우리카아제는 PKS 우리카아제이다. 본 바람직한 구현예의 또 다른 측면에서, 그 우리카아제는 실질적으로, 97번 티로신이 허스티딘으로 치환된 비비 간 우리카아제의 서열을 갖는다. 바람직하게, 그 우리카아제는 아미노 말단과 카르복시 말단을 포함하며, 여기서 그 우리카아제는 한 말단 또는 양쪽 말단 모두에서 절단되어(truncated) 있다. 유리하게, 그 우리카아제는 균류(fungal) 또는 미생물(microbial) 우리카아제이다. 바람직하게, 균류 또는 미생물 우리카아제는 아스페질러스 플라부스(*Aspergillus flavus*), 아쓰로박터 글로비포미스(*Arthrobacter globiformis*), 바실러스 에스피.(*Bacillus sp.*) 또는 캔디다 유틸리스(*Candida utilis*)로부터 분리되거나, 또는 상기 우리카아제 중 하나의 서열을 실질적으로 가지는 재조합 효소이다. 대안적으로는, 그 우리카아제는 무척추 동물 우리카아제이다. 바람직하게, 그 무척추 동물 우리카아제는 드로소필라 멜라노가스터(*Drosophila melanogaster*) 또는 드로소필라 수도옵스큐라(*Drosophila pseudoobscura*)로부터 분리되거나, 또는 상기 우리카아제 중 하나의 서열을 실질적으로 가지는 재조합 효소이다. 본 바람직한 구현예의 또 다른 측면에서, 그 우리카아제는 식물 우리카아제이다. 바람직하게, 그 식물 우리카아제는 글라이신 맥스(*Glycine max*)의 뿌리 결절로부터 분리되거나, 또는 그 우리카아제의 서열을 실질적으로 가지는 재조합 효소이다.

<18>

본 바람직한 구현예의 한 측면에서, 상기에서 기술된 우리카아제는, 컨쥬케이트 내의 우리카아제가 실질적으로 8량체보다 큰 응집체는 없는 조건 하에서, 폴리(에틸렌 글리콜) 또는 폴리(에틸렌 옥사이드)에 컨쥬케이트된다. 바람직하게, 그 우리카아제는 폴리(에틸렌 글리콜) 또는 폴리(에틸렌 옥사이드)에 우레탄(카바메이트), 이차 아민 또는 아미드 결합을 통하여 컨쥬케이트 된다. 본 바람직한 구현예의 한 측면에서, 폴리(에틸렌 글리콜)은 모노메톡시 폴리(에틸렌 글리콜)이다. 본 바람직한 구현예의 또 다른 측면에서, 폴리(에틸렌 글리콜) 또는 폴리(에틸렌 옥사이드)는 약 5 kDa 내지 30 kDa 사이의 분자량을 가진다. 바람직하게, 폴리(에틸렌 글리콜) 또는 폴리(에틸렌 옥사이드)는 약 10 kDa 내지 20 kDa 사이의 분자량을 가진다. 유리하게, 상기 폴리(에틸렌 글리콜) 또는 폴리(에틸렌 옥사이드)의 평균 가닥(strand) 수는 우리카아제 서브유니트 당 약 2 내지 12 가닥 사이이다. 더욱 유리하게, 상기 폴리(에틸렌 글리콜) 또는 폴리(에틸렌 옥사이드)의 평균 가닥 수는 우리카아제 서브유니트 당 약 6 내지 10 개 사이이다. 가장 유리하게, 상기 폴리(에틸렌 글리콜) 또는 폴리(에틸렌 옥사이드)의 평균 가닥 수는 우리카아제 서브유니트 당 약 7 내지 9 개 사이이다. 바람직하게, 폴리(에틸렌 글리콜) 또는 폴리(에틸렌 옥사이드)는 선형(linear)이다. 대안적으로, 폴리(에틸렌 글리콜) 또는 폴리(에틸렌 옥사이드)는 분지형(branched)이다.

<19>

본 발명은 또한 체액 또는 조직 내 요산 수준을 낮추기 위한 제약학적 조성물을 제공하는데, 상기 조성물은 상기에서 기술한 우리카아제와 제약학적으로 허용가능한 담체를 포함하여 구성된다. 바람직하게, 그 조성물은 동결탈수(lyophilization)에 의하여 안정화되고 비경구 투여를 위한 적절한 용액을 제공하기 위하여 재구성(reconstitution)에 의해 용해된다.

<20> 본 발명의 또 다른 구현에는 감소된 면역원성을 가지는 우리카아제를 정제하는 방법으로서, 우리카아제 분획들에서 8량체보다 큰 우리카아제 응집체를 분리하고, 그러한 응집체를 정제된 우리카아제로부터 배제하는 단계를 포함한다. 바람직하게, 상기 분리 단계는 우리카아제 분획들의 적어도 일부로부터 8량체보다 큰 응집체를 검출하고, 그 응집체를 함유하는 분획을 배제하는 단계를 포함한다. 유리하게, 상기 검출 단계는 광 산란(light scattering)의 측정을 포함한다.

<21> 본 발명은 또한 상기 기술된 방법에 의해 제조되는, 분리된 우리카아제를 제공한다.

효과

<22> 본 발명에 의하면, 상기 기재한 본 발명의 목적을 모두 달성할 수 있다.

발명의 실시를 위한 구체적인 내용

<23> 이전의 연구들은, PEG와의 컨쥬게이션(PEG화)에 의해 우리카아제의 면역원성 및/또는 항원성에 있어서 현저한 감소가 이루어질 때, 그것은 반드시 요산분해 활성의 상당한 감소를 수반하는 것을 보여왔다. 본 발명은 8량체보다 큰 요산산화효소 응집체의 미량이 PEG-우리카아제 컨쥬게이트의 면역원성 및 가속화된 제거의 유도에 실질적으로 기여한다는 관찰을 포함한다. 이러한 발견은 우리카아제 외에 인터페론과 성장인자(growth factors)를 비롯한 다른 단백질들에도 대부분 적용되는 것 같다.

<24> 생물약제학적 약(biopharmaceuticals)의 안전성, 편리성 및 비용-효과 모두는 그들의 효능에 있어서의 감소 및 결과 투여량을 증가시켜야 할 필요에 의하여 불리하게 영향받는다. 따라서, 혈액 및 소변을 비롯한 체액 내 요산의 상승된 수준을 감소시키기 위한 안전하고도 효과적인 대안이 요구된다. 본 발명은 PEG-우리카아제의 합성에 사용하기 위하여, 8량체보다 큰 우리카아제 응집체를 배제하는 우리카아제의 제조방법을 제공한다. 이 PEG-우리카아제는 변형되지 않은 효소의 요산분해 활성의 전부 또는 거의 전부를 보유한다. 본 발명은 또한 8량체보다 큰 응집체가 실질적으로 없는 정제된 우리카아제를 제공한다. "실질적으로 없는"이라는 말은, 정제된 우리카아제가 8량체보다 큰 응집체를 약 2% 이하, 바람직하게는 약 1% 이하로 함유한다는 것을 나타낸다.

<25> 본 발명은 정제된 제제로부터 8량체보다 큰 응집체가 배제되도록 하는 우리카아제의 정제 방법을 제공한다. 이들 보다 큰 응집체들은 매우 면역원성이기 때문에, 정제된 우리카아제 제제 내 그들의 존재는 바람직하지 않다. 응집체들은 자외선 흡수에 의해 검출되기에에는 너무 희석될 수 있기 때문에, 상기 방법은 280 nm에서의 자외선 흡수에 부가하여, 또는 자외선 흡수보다는 광 산란에 의하여 칼럼 분획물들을 모니터하는 것과 관련된다. 정제된 우리카아제는 그 후, 동시 계류 중인 미합중국 특허출원 제09/370,084호에 기재된 바와 같이, 수용성 중합체들, 바람직하게는 폴리(에틸렌 글리콜) 또는 폴리(에틸렌 옥사이드)에 컨쥬게이트 된다.

<26> 우세하게 4량체 우리카아제로 이루어지는 제제로부터 응집된 우리카아제를 제거하는 것은, 크기-배제 크로마토그래피, 이온-교환 크로마토그래피, 미세다공성 막을 통한 한외여과(ultrafiltration), 및 초원심분리를 포함한 원심분리를 비롯하여, 당 분야에 통상의 지식을 가진 자들에게 알려진 방법을 사용하여 달성될 수 있다. 분리 방법은 분리 및 분획들의 분석, 그리고 큰 응집체를 과량 함유하는 그들 분획의 거부, 즉 배제를 포함할 수 있다. 결과 우리카아제 제제는 분별되지 않은 우리카아제보다 실질적으로 비면역원성인 우리카아제 컨쥬게이트의 합성에 더욱 적합하다. 장기간 투여를 위하여, 예를 들어 PEG-우리카아제와 같은 단백질의 PEG 컨쥬게이트들은 낮은 면역원성을 가지며 반복 투여 후에도 혈류로부터 점진적으로 더 빠른 제거를 야기하지 않는 것이 중요하다.

<27> 본 발명은 또한 중합체-우리카아제 컨쥬게이트의 제약학적 조성물을 제공한다. 이들 컨쥬게이트들은 실질적으로 비면역원성이며, 변형되지 않은 효소의 요산분해 활성의 적어도 75%, 바람직하게는 85%, 더욱 바람직하게는 95% 또는 그 이상을 보유한다. 수용성 중합체에 컨쥬게이션 하기에 적합한 우리카아제들은 박테리아, 균류(곰팡이), 및 식물 및 척추 및 무척추 동물의 조직으로부터 분리된 자연 발생적 요산산화효소 뿐만 아니라, 돌연변이되거나, 교잡되거나(hybrid), 및/또는 절단된(truncated) 효소적으로 활성인 우리카아제의 변형체를 포함하는 우리카아제의 재조합체들을 포함한다. 본 발명에 사용하기에 적합한 수용성 중합체들은, 모두 통상 PEG로서 알려진, 선형 및 분지형 폴리(에틸렌 글리콜) 또는 폴리(에틸렌 옥사이드)를 포함한다. 분지된 PEG의 예는 미합중국 특허 제 5,643,575 호의 주제이다. 선형 PEG의 바람직한 한 예는, 일반식 $\text{CH}_3\text{O}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n\text{H}$ (여기서 n은 약 100 내지 약 2,300 사이에서 변한다)의 모노메톡시 PEG이다.

<28>

본 발명의 한 구현예는 컨쥬게이트되지 않은 우리카아제의 요산분해 활성의 적어도 약 75%를 보유하며 실질적으로 감소된 면역원성을 가지는 요산산화효소(우리카아제)의 컨쥬게이트이다. 본 발명의 이 측면에 따르는 우리카아제는 재조합체일 수 있다. 재조합체이든 아니든, 그 우리카아제는 포유동물 기원의 것일 수 있다. 이 구현예의 한 측면에서, 그 우리카아제는 돼지, 소 또는 양 간(肝)의 우리카아제일 수 있다. 이 구현예의 또 다른 측면에서, 그 우리카아제는 키메릭일 수 있다. 그 키메릭 우리카아제는 돼지 간 및/또는 비비 간 우리카아제의 부분들을 함유할 수 있다. 예를 들어, 그 키메릭 우리카아제는 돌연변이 R291K 및 T301S(PKS 우리카아제)를 포함하는 돼지 우리카아제일 수 있다. 또는, 그 우리카아제는 97번 티로신이 히스티딘으로 치환되어 우리카아제의 비활성(specific activity)이 적어도 약 60% 정도 증가될 수 있는 비비 간 우리카아제일 수 있다. 본 발명의 우리카아제는, 기원이 무엇이든 간에, 아미노 말단, 또는 카르복실 말단, 또는 양 말단 모두에서 절단된(truncated) 형태일 수도 있다. 마찬가지로, 그 우리카아제는 균류 또는 미생물 우리카아제일 수 있다. 본 구현예의 한 측면에서, 균류 또는 미생물 우리카아제는 아스페릴러스 플라부스(*Aspergillus flavus*), 아쓰로박터 글로비포미스(*Arthrobacter globiformis*), 바실러스 에스피.(*Bacillus sp.*) 또는 캔디다 유틸리스(*Candida utilis*)로부터의 우리카아제의 자연 발생적 형태 또는 재조합 형태일 수 있다. 대안적으로, 그 우리카아제는, 예컨대, 드로소필라 멜라노가스터(*Drosophila melanogaster*) 또는 드로소필라 수도옵스큐라(*Drosophila pseudoobscura*) 우리카아제의 자연발생적 형태 또는 재조합 형태와 같은 무척추 동물 우리카아제일 수 있다. 본 발명의 우리카아제는 또한, 예컨대 대두(soybean) 뿐리 결절(*Glycine max*)로부터의 우리카아제의 자연 발생적 형태 또는 재조합 형태와 같은 식물 우리카아제일 수 있다. PEG는 약 5 kDa 내지 100 kDa 사이의 평균 분자량을 가질 수 있으며; 바람직하게, PEG는 약 8 kDa 내지 60 kDa 사이의 평균 분자량을 가질 수 있고; 더욱 바람직하게, PEG는, 예컨대 10 내지 20 kDa 과 같은, 약 10 kDa 내지 약 40 kDa 사이의 평균 분자량을 가질 수 있다. PEG의 공유적으로 결합되는 평균 가닥 수는 우리카아제 서브유니트 당 2 내지 12 가닥일 수 있고; 바람직하게, 공유적으로 결합되는 평균 가닥 수는 서브유니트 당 6 내지 10 일 수 있고; 더욱 바람직하게, PEG의 평균 가닥 수는 서브유니트 당 7 내지 9 일 수 있다. 본 구현예의 한 측면에서, 그 우리카아제는 4량체일 수 있다. PEG의 가닥들은 우레탄(카바메이트) 결합, 이차(secondry) 아민 결합 및/또는 아미드 결합을 통하여 우리카아제에 공유적으로 결합될 수 있다. 우리카아제가 여기 언급된 우리카아제들 중 어느 것의 재조합 형태일 때, 그 재조합 형태는 실질적으로 자연발생적 형태의 서열을 가질 수 있다.

<29>

하나의 바람직한 포유동물 우리카아제는 재조합 돼지-비비 키메릭 우리카아제로서, 돼지 간과 비비 간 우리카아제의 서열의 부분들로 구성되며, 이를 모두는 Wu et al. (1989)에 의해 처음으로 결정되었다. 그러한 키메릭 우리카아제의 한 예는 돼지서열(서열번호: 1)로부터의 첫 번째 288개 아미노산과 비비서열(서열번호: 2)로부터의 마지막 16개 아미노산을 함유한다. Hershfield, et al., International Publication WO 00/08196, Urate Oxidase, published February 17, 2000. 후자의 서열은 돼지 서열과 오직 두 위치에서만 차이가 나므로(291번 잔기에서 아르기닌 대신 라이신(K)을, 301번 위치에서 쓰레오닌 대신 세린(S)을 가진다), 이 돌연변이는 돼지(pig)-K-S, 즉 PKS 우리카아제(서열번호: 3)로 불린다. PKS 우리카아제는 라이신 잔기를 하나 더 가지므로, 돼지 또는 비비 서열보다 PEG화(PEGylation)의 잠재적 위치를 하나 더 가진다.

<30>

PKS 우리카아제를 비롯한 다양한 포유동물 우리카아제에 대한 cDNA들이 서브클로닝되었고, 표준 방법을 사용하여 이.콜라이(*E.coli*)에서 발현시키기 위한 최적 조건이 결정되었다. Erlich, HA, (Ed.) (1989) *PCR Technology, Principles and Applications for DNA Amplification*. New York: Stockton Press; Sambrook, J, et al., (1989) *Molecular Cloning. A Laboratory Manual, Second Edition*. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.를 보라. 재조합 우리카아제들은 추출되고 정제되어, 표준 검정assay)의 수정을 사용하여 그들의 안정성 및 활성이 평가되었다. Fridovich, I (1965) *J. Biol Chem* 240: 2491-2494; Nishimura, et al. (1979), 및 실시예 1 내지 5를 보라.

<31>

본 발명의 한 구현예에서, 우리카아제는 상대적으로 적은 수의 PEG 가닥에 생물학적으로 안정하며 비독성인 공유 결합을 통하여 컨쥬게이트 될 수 있다. 그러한 결합은 우레탄(카바메이트) 결합, 이차 아민 결합, 및 아미드 결합을 포함할 수 있다. 그러한 컨쥬게이션에 적합한 다양한 활성화된 PEG들은 Huntsville, AL. 소재의 Shearwater Polymers 사로부터 구입할 수 있다.

<32>

예를 들어, 우리카아제로의 우레탄 결합은 PEG의 p-니트로페닐 카보네이트(NPC) 또는 숙신이미딜 카보네이트(SC: succinimidyl carbonate) 유도체의 존재 하에 우리카아제를 배양함으로써 형성될 수 있다. SC-PEG는 미합중국 특허 제 5,612,460 호에 기재된 절차를 사용하여 합성될 수 있다. NPC-PEG는 Veronese, FM, et al., (1985) *Appl Biochem Biotechnol* 11: 141-152 및 미합중국 특허 제 5,286,637 호에 기재된 방법에 따라 PEG를 p-니트로페닐 클로로포르메이트와 반응시킴으로써 합성할 수 있다. '637 특허에 기재된 방법은, 비슷한 화학양

론을 유지하기 위하여 반응물들의 농도를 조정함으로써, 보다 큰 분자량을 가지는 PEG에 적용된다. NPC-PEG 합성의 또 다른 한 방법은 Buttner W. et al., 서독 특허 명세서 DD 279 486 A1에 기재되어 있다.

<33> 우리카아제로의 아미드 결합은 PEG의 카르복실산 유도체의 N-히드록시숙신이미드 에스테르(Shearwater Polymers)를 사용하여 얻어질 수 있다. 이차 아민 결합은 2,2,2-트리플루오로에탄설포닐 PEG(tresyl PEG; Shearwater Polymers)를 사용하거나, 또는 PEG 알데히드(Shearwater Polymers) 및 소디움 시아노보로하이드라이드(cyanoborohydride)를 사용한 환원성 알킬화에 의하여 형성될 수 있다.

<34> 분자량 10 kDa의 PEG를 함유하는 컨쥬게이트에 있어서, 변형되지 않은 효소의 요산분해 활성의 적어도 75%를 보유하면서 서브유니트 당 결합되는 PEG의 최대 가닥 수는 포유동물 우리카아제(예를 들어 PKS 우리카아제, 돼지 우리카아제의 뮤테인(mutein: 돌연변이단백질); 실시예 5에서의 검정 조건을 보라)에 대하여 약 12 가닥이다. 후자의 PEG화의 정도는 총 아미노기의 약 40%에 상당한다. 본 발명의 한 구현예에서, 우리카아제 서브유니트 당 결합되는 PEG의 평균 가닥 수는 약 2 내지 12 사이이다. 바람직한 구현예에서, 우리카아제 서브유니트 당 결합되는 PEG의 평균 가닥 수는 약 6 내지 10 사이이다. 보다 바람직한 구현예에서, 우리카아제 서브유니트 당 PEG의 공유적으로 결합되는 가닥의 평균 수는 약 7 내지 9 사이이다. 또 다른 구현예에서, 결합 반응을 위하여 사용되는 PEG의 분자량은 약 5 kDa 내지 30 kDa 사이이고, 바람직하게는 약 10 kDa 내지 20 kDa 사이이다.

<35> 우리카아제의 주어진 형태에 결합하기 위한 PEG의 적정 분자량과 가닥 수의 선택에 영향을 미칠 수 있는 여러 요인들이 있다. 일반적으로, 요산분해 활성의 상당한 손실 없이 면역원성을 감소 또는 제거하는 것은, 보다 큰 분자량의 PEG의 상대적으로 적은 가닥 수에 비하여, 보다 낮은 분자량의 PEG의 상대적으로 많은 가닥 수의 결합을 요구할 수 있다. 마찬가지로, 우리카아제의 각각의 상이한 형태는 크기 및 가닥 수 모두에 대하여 상이한 적정 조건을 가질 수 있다. PEG의 적정 가닥 수와 PEG 분자량은 여기 기술된 방법을 사용하여 즉시 결정될 수 있다.

<36> 포유동물 우리카아제의 PEG 컨쥬게이트가 정제된 4량체 및 8량체 형태의 효소로부터 제조되었을 때(약 35 kDa의 4개 또는 8개 서브유니트를 포함하는 것), 그들은, 큰 응집체들을 함유하는 우리카아제 제제들의 PEG 컨쥬게이트의 중간 정도의 면역원성(도6을 보라) 및 변형되지 않은 효소의 매우 높은 면역원성과 대조적으로, 생쥐에 있어서 현저하게 감소된 면역원성을 보였다.

<37> 자연발생적 및 재조합 우리카아제들의 정제된 제제는 일반적으로 4량체(140-kDa) 및 8량체(280-kDa) 형태들과 함께 매우 큰 효소 응집체들의 혼합물을 포함한다. 4량체 또는 8량체 형태로 있는 각 우리카아제 제제의 백분율은 일반적으로 약 20%에서 95%까지 다양하다(도 2-4를 보라). 여러 다른 단백질들의 PEG화되지 않은 응집체들이 매우 면역원성이라는 증거에도 불구하고(예를 들어, Moore, WV, et al., (1980) *J. Clin. Endocrinol Metab* 51: 691-697을 보라), PEG-우리카아제에 대한 이전 연구들은 응집체의 함량을 제한하기 위한 어떠한 노력도 기술하지 않았는데, 이는 PEG-변형된 응집체의 잠재적 면역원성이 고려되지 않았음을 나타낸다. 본 발명 관찰의 기초 위에서, 그러한 응집체는 PEG-우리카아제의 이전의 합성을 위하여 사용되는 효소 제제 내에 존재하였던 것 같다. 그들의 존재가 비면역원성 컨쥬게이트 제조에 대한 임무를 더욱 어렵게 해온 것 같다. 또한, 우리카아제를 PEG화하기 위한 이전의 노력들에 있어서 관찰되는 요산분해 활성의 상당한 손실이, 결합된 저분자량 PEG의 보다 많은 가닥 수와 관련되었던 것 같다. 한편, 여기 기술된 PEG화 및 우리카아제 정제 방법은, 적어도 특정 우리카아제들, 예컨대 PKS 우리카아제(돼지 우리카아제의 뮤테인) 및 호열성(thermophilic) 바실러스 에스피. (*Bacillus sp.*)로부터의 효소에 대하여, 요산분해 활성의 75% 이상을 보유하면서, 서브유니트 당 PEG의 12 가닥까지 공유적으로 결합할 수 있게 한다.

<38> 또 다른 바람직한 구현예에서, 그 효소의 실질적으로 모든 큰 응집체들은, 결과 실질적으로 응집체가 없는 우리카아제 제제의 PEG로의 컨쥬게이션 이전에, pH 약 9 내지 10.5, 바람직하게 10.2에서, 이온-교환 크로마토그래피(도 1-3) 또는 크기-배체 크로마토그래피에 의하여 제거될 수 있다. 제조용 칼럼으로부터의 각 분획에 있어서 우리카아제의 분자량은, 예를 들어, HPLC, 통상의 크기-배체 크로마토그래피, 원심분리, 광 산란, 비변성 완충액 내에서의 겔 전기영동 또는 모세관 전기영동을 비롯한 임의의 크기-의존적 분석 기술에 의하여 모니터 될 수 있다. 크기-배체 크로마토그래피를 사용하여 분리된 응집체 없는 우리카아제에 대하여, 140-kDa 내지 280-kDa 사이의 효소들만을 함유하는 분획들을 모아 PEG로의 컨쥬게이션을 위해 사용할 수 있다. 이온-교환 크로마토그래피를 사용하여 분리된 4량체 및 8량체 우리카아제에 대해서는, 이온-교환 칼럼으로부터의 분획들은 어떤 분획이 광 산란에 의하여 검출되는 큰 응집체 없이 4량체 및 8량체 형태들의 상당량을 함유하는지를 결정하기 위하여 크기에 대하여 분석될 수 있다. 따라서, 정제된 생성물에 있어서 바람직하지 않은 큰 응집체들은 총 우리카아제의 약 1% 정도로 소량, 또는 그 보다 적은 양을 구성할 수 있다.

<39> 여기 제시된 결과들은, 심하게 PEG화된 경우에도, 8량체보다 큰 PKS 우리카아제 형태들은 가속화된 제거(도 5)를 야기하며 생쥐에 있어 다소 면역원성임(도 6)을 나타낸다. 반대로, 필수적으로 큰 응집체들(광산란에 의해 검출될 수 있는)이 없는 우리카아제로부터 제조된 컨쥬케이트들은 가속화된 제거율의 훨씬 낮은 증거를 가지고 일주일 간격으로 적어도 여섯 번 재주사될 수 있었고(도 5), 민감성 효소-결합 면역 검정에 의하여 측정된 바와 같이, 검출 가능한 항체의 형성이 없었다(도 6). 고도로 정제된 4량체 또는 8량체 우리카아제의 사용은, 본 발명의 개선된 컨쥬케이트를 이전에 기술된 PEG-우리카아제 제제들로부터 한층 더 구별하게 한다. 반대로, 일부 이전의 연구자들에 의해 사용된 우리카아제 제제에서의 큰 응집체의 상당한 함량의 존재는, 그들로 하여금 면역 원성을 억제하고자 하는 노력에 있어서 PEG의 많은 가닥 수에 대한 결합으로 이끌어 왔다. 결과적으로, 결과 컨쥬케이트의 효소적 활성은 상당히 감소되었다.

<40> 본 발명의 PEG-우리카아제 컨쥬케이트는 포유동물, 바람직하게 인간의 조직 및 체액에서 요산 수준을 낮추는데 유용하며, 따라서 통풍(gout), 통풍결절(tophi) 및 신부전(renal insufficiency), 장기이식(organ transplantaion) 및 악성 병을 비롯한 증상들에 수반되는 상승된 요산 수준의 치료를 위해 사용될 수 있다. PEG-우리카아제 컨쥬케이트는 정맥내, 피하(subcutaneous), 피내(intradermal), 근육내, 및 복강내(intraperitoneal) 경로를 비롯한 많은 경로 중 하나에 의하여 과잉 요산 수준을 가지는 포유동물로 주사될 수 있다. 또는, 그들은 분무화되어 흡입될 수 있다. Patton JS. (1996) *Adv. Drug Delivery Rev.* 19: 3-36 및 미합중국특허 제5,458,135호를 보라. 본 발명의 PEG-우리카아제의 효과적인 투여량은 요산의 수준 및 개체의 크기에 따라 달라질 것이다. 본 발명에 따른 이러한 측면의 한 구현예에서, PEG-우리카아제는 약 10 µg 내지 약 1 g 범위의 양으로 제약학적으로 허용가능한 부형제 또는 희석제 내에서 투여될 수 있다. 바람직한 구현예에서, 투여되는 양은 약 100 µg 내지 500 mg 사이이다. 보다 바람직하게, 컨쥬케이트된 우리카아제는 1 mg 내지 100 mg 사이의 양, 예컨대 5 mg, 20 mg, 또는 50 mg 과 같은 양으로 투여된다. 구현예들의 투여량에 대해 주어지는 질량은 컨쥬케이트 내 단백질의 양을 의미한다.

<41> PEG-우리카아제를 함유하는 제약학적 제제는, 예를 들어 Gennaro, AR.(Ed.)(1990) *Remington's Pharmaceutical Sciences*, 18th Edition Easton, PA: Mack Publishing Co.에 기술된 바와 같이, 종래 기술에 의하여 제조될 수 있다. 주사가능한 용액의 제조를 위한 적절한 부형제로는, 예를 들어, 인산염 완충 생리식염수, 유산염화(lactated) 링거(Ringer's) 용액, 물, 폴리울 및 글리세롤을 포함한다. 비경구 주사를 위한 제약학적 조성물들은 제약학적으로 허용가능한 살균된 수용성 또는 비수용성 액체, 분산액, 혼탁액, 또는 에멀젼들과, 살균된 주사가능한 용액 또는 분산액 내로 사용 직전에 재구성하기 위한 살균된 분말을 포함하여 구성된다. 이러한 제제들은, 예컨대, 보존제, 용해제, 안정화제, 습윤제, 에멀젼화제, 완충액, 항산화제 및 희석제와 같은 부가적인 성분들을 함유할 수 있다.

<42> PEG-우리카아제는 또한 체액 내에서 상승된 요산 수준을 지속적으로 억제하기 위하여 개체 내로 이식(implantation)하기 위한 조절된 방출 조성물로서 제공될 수도 있다. 예를 들어, 폴리락트산, 폴리글리콜산, 재생 콜라겐, 폴리-L-라이신, 소디움 알지네이트(alginate), 젤란(gellan) 검, 키토산, 아가로스, 멀티라멜라(multilamellar) 리포좀 및 많은 다른 종래의 데포우(depot) 제제들이 생물학적으로 활성인 조성물과 함께 제제화될 수 있는 생부식성(bioerodible) 또는 생분해성(biodegradable) 물질들을 포함한다. 이 물질들은, 이식 또는 주사될 때, 서서히 붕해되어 주위 조직으로 활성 물질을 방출한다. 예를 들어, PEG-우리카아제를 캡슐화하는 한 방법은 미합중국 특허 제 5,653,974 호에 개시된 방법을 포함한다. 생부식성, 생분해성 및 다른 데포우 제제들의 사용이 본 발명에서 광범위하게 고려되었다. PEG-우리카아제의 전달을 위한 매트릭스 트래핑 시스템(matrix entrapment systems) 및 주입 펌프의 사용 또한 본 발명의 범위 내에 있다. PEG-우리카아제는 또한 미포(micelles) 또는 리포좀(liposomes)에 유용하게 싸여질(enclosed) 수 있다. 리포좀 캡슐화 기술은 당 분야에 잘 알려져 있다. Lasic D. et al., (Eds.)(1995) *Stealth Liposomes*. Boca Raton, FL: CRC Press를 참조하라.

<43> 본 발명의 PEG-우리카아제 제약학적 조성물들은, 예컨대, 장기 이식 수여자(Venkataseshan, VS, et al., (1990) *Nephron* 56:317-321을 보라)와 일부 악성 병을 앓고 있는 환자와 같이, 요산염에 의해 유도되는 신장 질환에 대한 높은 위험을 안고 있는 환자들에 있어서 혈액투석에 대한 필요를 감소시킬 것이다. 결정성 요산염이 많이 축적된(통풍결절) 환자들에 있어서, 그러한 제약학적 조성물은 현재 가능한 치료법 보다 더 빨리 생명의 질을 향상시킬 것이다.

<44> 어떠한 의미에서도 본 발명을 제한하는 것으로 의도되지 않는 이하의 실시예들이 상기 다양한 측면들을 설명한다. 이들 실시예는 활성화된 PEG(예컨대, p-니트로페닐 카보네이트 유도체)를 돼지 우리카아제의 뮤테인에 결합시켜 제조된 PEG-우리카아제들을 기술한다. 이들 실시예는, 당 분야에서 통상의 지식을 가진 자에게, 변형되

지 않은 효소의 요산분해 활성의 적어도 약 75%를 보유하며 또한 장기 투여에 매우 적합한, 실질적으로 비면역 원성인 우리카아제 컨쥬게이트들을 제조하기 위한 안내를 제공한다.

<45>

실시예 1

<46>

우리카아제의 제조용 이온-교환 크로마토그래피

<47>

제조용 이온-교환 크로마토그래피를 고속 단백질 액체 크로마토그래피(FPLC: Fast Protein Liquid Chromatography) 장치(NJ. Piscataway 소재 Amersham Pharmacia) 상에서 수행하였다. 모노 Q 칼럼(1×10 cm, Amersham Pharmacia)을 50 mM 소디움 카보네이트, pH 10.3, 0.1 M NaCl(완충액 A)로부터 50 mM 소디움 카보네이트, pH 10.3, 0.6 M NaCl(완충액 B)의 그레디언트(gradient)로 0.5 mL/min 의 유속으로 용출시켰으며, 샘플은 보다 낮은 유속으로 부하되었다. 이 기술은 PKS 우리카아제 (pH 10.3) 용액 25 mL를 분별하기 위하여 사용되었다. PKS 우리카아제는 Bio-Technology General Limited(Rehovot, Israel)로부터 얻었다. 후자는, 어버이 돼지 서열에서 하나의 라이신(K) 잔기와 하나의 세린(S) 잔기가 각각 하나의 아르기닌 잔기 및 하나의 쓰레오닌 잔기로 치환된 재조합 돼지 우리카아제이다(Lee et al. (1988) Science 239: 1288-1291; Wu et al. (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 86: 9412-9416). 샘플이 부하된 후, 칼럼을 완충액 A 100 mL로 셋었다. 우리카아제 피크는 0 내지 26% 완충액 B의 31 mL 선형(linear) 그레디언트의 마지막에서 용리되기 시작하였다. 대부분의 우리카아제는 26% 완충액 B를 함유하는 완충액 7 mL에 의해 등용매적으로(isocratically) 용리되었다. 회수된 우리카아제의 나머지는 26% 내지 100% 완충액 B의 선형 89-mL 그레디언트에 의해 용리되었다. 4 mL 또는 6 mL의 분획들을 합했다. #4-11 번 분획들을 우리카아제 및 총 단백질에 대하여 검정하였으며(도 1), 실시예 2에 기술하는 바와 같은 크기-배제 고속 액체 크로마토그래피(HPLC: high performance liquid chromatography)에 의하여 분석하였다(도 2 및 도 3). #5-10 번의 나머지 분획들은 실시예 3에 기술한 바와 같이, PEG에 결합되었다. 실시예 2에서의 분석 결과에 기초하여, 도1에 나타낸 바와 같이, #5 번 및 #6번 분획의 PEG 컨쥬게이트를 "저염 푸울(low-salt pool)"로서 합하고, #7-10 번 분획들의 PEG-컨쥬게이트를 "고염 푸울(high-salt pool)"로서 합했다.

<48>

실시예 2

<49>

광 산란 및 자외선 흡수에 의하여 모니터된 우리카아제의 크기-배제 크로마토그래피

<50>

크기-배제 HPLC를 상온, Superdex 200 칼럼(1×30 cm, Amersham Pharmacia Biotech) 상에서, 분별되지 않은 PKS 우리카아제 및 실시예 1의 PKS 우리카아제의 제조용 모노 Q 크로마토그래피로부터의 선택된 분획들을 대하여 수행하였다. Thermo Separations HPLC (Sunnyvale, CA)의 흡수 모니터(UV 2000)로부터의 용출물을, Wyatt Technologies(Santa Barbara, CA) 사의 MiniDawn 검출기를 사용하여, 입사 광에 대하여 90°에서의 광산란에 의하여 분석하였다.

<51>

도 2-4에 나타난 결과들은 우리카아제 서브유니트의 4량체, 8량체 및 보다 큰 응집체들 사이의 분해능 및 다양한 샘플들에서 이들 우리카아제 형태들로부터 검출된 신호들의 상이한 비율을 나타낸다. 농도에 직접적으로 비례하는 흡수 신호와는 달리, 광 산란 신호는 광 산란 유니트의 크기와 농도를 곱한 것에 비례한다. 매우 응집된 우리카아제의 매우 적은 양에 대한 광 산란 검출기의 결과 민감성은 가장 큰 응집체의 존재를 밝혔는데, 이들은 보이드 볼륨(void volume)(약 7 mL) 또는 그 근처에서 용리되었다.

<52>

실시예 3

<53>

PEG-우리카아제 컨쥬게이트의 합성

<54>

분별되지 않은 PKS 우리카아제(Bio-Technology General Limited 사로부터)와 실시예 1의 모노 Q 칼럼으로부터의 분획들에서의 우리카아제를 Shearwater Polymers(Huntsville, AL.)로부터 얻은 PEG의 p-니트로페닐 카보네이트 유도체(NPC-PEG)를 사용하여 10-kDa PEG에 결합시켰다. 페닐클로로포르메이트를 사용한 PEG로부터의 NPC-PEG의 제조는 여러 보고들에 기술되어 있고(예를 들어, Veronese, FM, et al., (1985) *Appl. biochem. Biotechnol.* 11: 141-152; Kito, M. et al., (1996) *J. Clin. Biochem Nutr.* 21: 101-111) 또한 NPC-PEG는 본원 발명자를 비롯한 이전 연구자들에 의하여 PEG-단백질 컨쥬게이트들의 합성에 사용되어 왔다(예를 들어, Veronese et al., *supra*; Sherman, MR, et al., in JM Harris, et al., (Eds.) *Poly(ethylene glycol) Chemistry and Biological Applications. ACS Symposium Series 680* (pp. 155-176) Washington, DC: American Chemical Society). 우리카아제의 각 서브유니트에 결합되는 10-kDa PEG의 가닥 수는 Kunitani, M. et al., (1991) *J. Chromatogr.* 588: 125-137에 기술된 방법에 의하여 여섯(6)으로 결정되었다.

<55> 실시예 4

<56> 우리카아제 및 PEG-우리카아제의 생체 내 혈청 지속성 및 면역원성

<57> 실시예 3의 방법에 따라 제조된 재조합 포유동물 우리카아제의 PEG 컨쥬케이트를, 주사률 위하여, pH 7.4, 인산 염-완충 생리식염수(PBS: phosphate-buffered saline) 내에 1 mg단백질/mL로 조정하였다. 샘플을 동결시켜 분석 또는 주사 시까지 보관하였다. 8마리 BALB/c 암컷 생쥐의 그룹들에 주사하기 전 1 시간 이내에 샘플을 37°C 까지 가열하였다. 생쥐 그룹은 연구의 초기에 18-22 g 범위의 평균 체중을 가졌다.

<58> 모든 생쥐의 체중을 모니터하고, 주사에 대한 좋지 않은 반응의 증거 또는 다른 나쁜 건강의 증거를 기록하였다. 여섯 번의 매주 주사 후 24 시간 후에, 동물들을 케타민(ketamine)으로 마취하고, 보다 많은 양의 혈액을 수집할 때 희생시키는 것(피를 뽑는 것)을 제외하고는, 100-200 μL 의 피를 안구 뒤쪽에서 뽑았다. 혈청은 2-8°C에서 4 내지 32 시간 동안 응고된 혈액으로부터 제조되었다. 혈청은 -20°C에 보관하였다. 혈청은 실시예 5에 기술된 바와 같이 요산분해 활성에 대해 분석되었고, 실시예 6에 기술된 바와 같이 우리카아제에 대한 항체에 대하여 분석되었다.

<59> 실시예 5

<60> PEG-우리카아제로 주사된 생쥐로부터의 혈청 내 PEG-우리카아제의 요산분해 활성의 검정<61> 자외선 광 흡수(UV 검정)에 기초한 활성 검정을, 기질로서 pH 9.2, 200 mM 소디움 보레이트 내 100 μM 요산에 대하여, I. Fridovich (*J. Biol Chem.* (1965) 240: 2491-2494) 방법의 마이크로평판(microplate) 적응 내에서 수행하였다. Molecular Devices사(Sunnyvale, CA)로부터의 SpectraMAX 250 마이크로평판 리더(microplate reader)를 사용하여, UV-투과성 바닥을 가지는 96-웰(well) 평판에서, 상온에서 15분 동안, 292 nm에서의 흡수도에 있어서의 감소를 모니터 하였다. 이 데이터는, 10 내지 40% 사이의 기질이 산화되는 동안의 간격 동안 이루어진 흡수도 측정의 최대 경사도(분 당 밀리-흡수 유니트로서)를 찾음으로써 분석되었다. 이 검정에 의하여 얻어진 결과는 도 1 및 5에 나타나 있다.<62> 서브유니트 당 10-kDa PEG의 여섯 가닥에 결합된 PKS 우리카아제($6 \times 10\text{-kDa}$ PEG PKS)로 처음 주사된 생쥐의 혈청에서의 평균 반감기는, 주사 후 24 시간 및 72 시간에 얻어진 혈청으로부터의 데이터에 기초하여, 29 ± 4 시간이었다.<63> 별도 실험들에서, PEG-우리카아제로 주사된 생쥐 혈청에서의 검출할만한 요산분해 활성은 -20°C에서의 보관 동안 감소하고, 이 활성의 최대 회복(recovery)은, 검정 전, 37°C에서 4시간 배양함으로써 얻어진다는 것이 확립되었다. 도5는 $6 \times 10\text{-kDa}$ PEG-PKS 우리카아제로 매주 반복적인 주사 후의 요산분해 활성의 회복이, 실시예 3의 방법에 따라 PEG화하기 전에, 실시예 1에서와 같이, 그 효소를 모노 Q 칼럼 크로마토그래피로 정제했을 때 최대 옆음을 보여준다. 회복은 실시예 1의 고염 용리 푸울로부터 제조된 컨쥬케이트의 주사 후 최고였는데(도1을 보라), 그것은 매우 큰 응집체들의 최소 함량을 가지는 것이다(도3에서 7-10 번 분획들의 광 산란 프로파일을 보라). 중간 정도의 회복은 실시예 1의 모노 Q 칼럼으로부터의 저염 용리 푸울로부터 제조된 컨쥬케이트에 의해 얻어졌으며, 가장 낮은 회복은 분별되지 않은 PKS 우리카아제로부터 제조된 컨쥬케이트에 의하여 얻어졌는데, 그것은 매우 큰 응집체의 가장 높은 함량을 가진다(도2 참조). 상기에서 기술된 UV 검정을 사용하든 P. Fossati et al. (*J. Clin. Chem.* (1980) 26: 227-231)로부터 적응된 컬러리메트릭(colorimetric) 검정을 사용하든 상관없이, 또한 혈청이 검정되기 전 37°C에서 배양되었는지의 여부에 상관없이, 반복된 주사 후의 혈청 내에서의 회복된 상대 활성의 동일한 순서(고염 푸울 > 저염 푸울 > 분별되지 않은 우리카아제)가 관찰되었다.

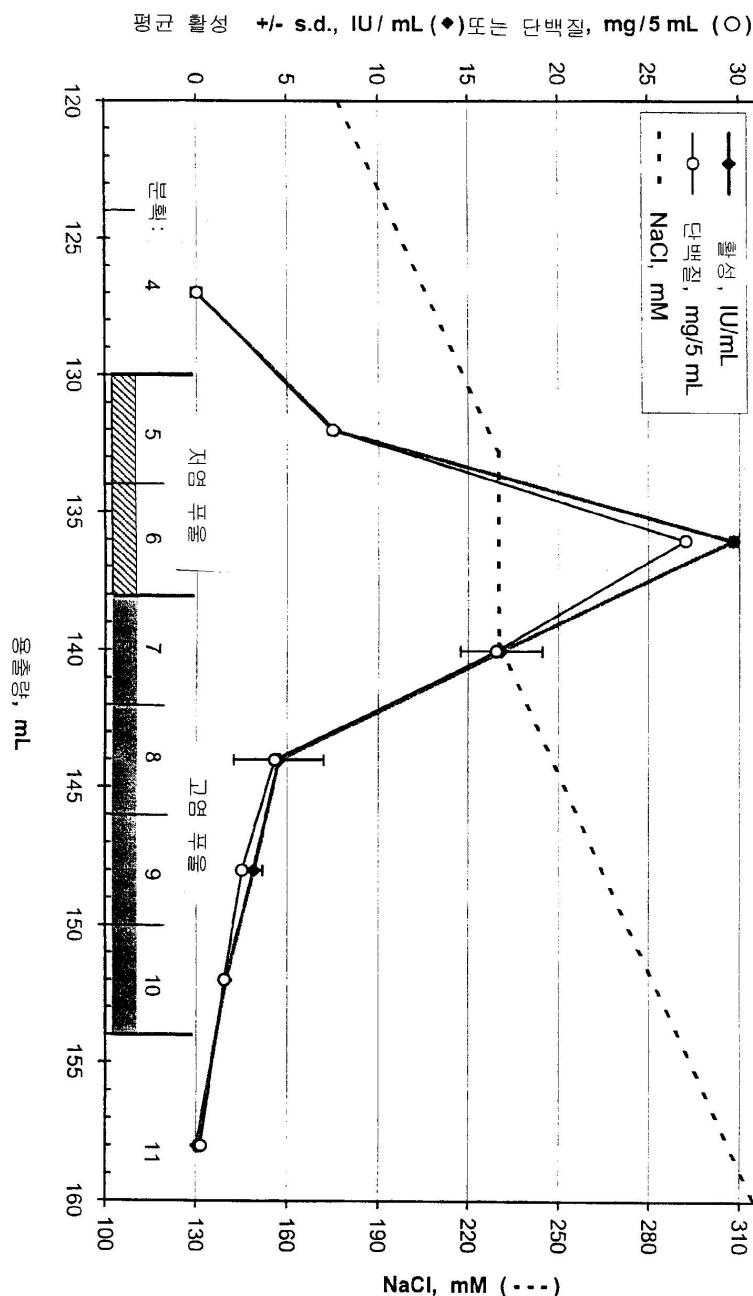
<64> 실시예 6

<65> PEG-우리카아제로 주사된 생쥐로부터의 혈청의 효소-결합된 면역흡착 검정(ELISA: enzyme-linked immunosorbent assay)<66> 96-웰(well) 이뮬론(Immuron) 2 평판들(Dynex Technologies, from VWR Scientific, San Francisco, CA)에 결합된 돼지 우리카아제에 대하여 비경쟁적 ELISA 분석을 수행하였다. 제 1 (primary) 항혈청은 실시예 3의 방법에 따라 제조된 $6 \times 10\text{-kDa}$ PEG 컨쥬케이트 또는 우리카아제로 주사된 생쥐로부터였다. 제 2 (secondary) 항체는 서양고추냉이(horseradish) 퍼옥시다제(peroxidase)에 결합된 염소 항-생쥐 IgG 이었고(Calbiochem-Novabiochem #401 253, La Jolla, CA), 기질은 B. Porstmann et al. (*J. Clin. Chem. Clin. Biochem.* (1981) 19: 435-440)에 의하여 기술된 바와 같은 o-페닐렌디아민 디히드로클로라이드(Sigma P-9187, St. Louis, MO)였다.

- <67> 도6은 비경쟁적 ELISA 분석의 결과를 나타낸다. 결과는, 실시예 1의 모노 Q 칼럼으로부터의 고염 용리물(도1에 나타나 있다)로부터 실시예 3의 방법에 따라 합성된 $6 \times 10\text{-kDa}$ PEG-PKS 우리카아제가 6 주 동안 매주 주사를 맞은 8마리의 생쥐 중 어느 것에서도 검출할만한 면역 반응을 생성하지 않았음을 나타낸다. 실시예 3의 방법에 따라 분별되지 않은 PKS 우리카아제로부터 제조된 컨쥬케이트로 주사된 몇몇 생쥐는 낫지만 검출 가능한 면역 반응을 나타내었다. 면역 반응이 가장 높게 발생한 것은 실시예 1의 모노 Q 칼럼으로부터의 저염 용리 푸울로부터 실시예 3의 방법에 따라 제조된 컨쥬케이트로 주사된 생쥐에서였다.
- <68> 실시예 2에서 기술한 바와 같이, 크기-배제 HPLC 분석용 광 산란 검출기의 혜택 없이는, 우리카아제의 8량체 형태의 것이 아닌, 가장 큰 응집체들의 존재가, 실시예 5에서 관찰한 바(도5)와 같은, 반복된 주사 후의 PEG-우리카아제 컨쥬케이트의 점진적으로 감소되는 회복 및 실시예 6(도6)에서 관찰된 바와 같은, BALB/c 생쥐에 있어서의 면역원성에 있어서의 증가와 수반된다는 것이 명확하지 않았을 것이다. 이를 결과는 임상적 사용을 위한 PEG-우리카아제의 제조를 위한 출발 물질로서 사용되는 우리카아제의 명세(specification)를 위한 중요한 암시를 가진다.
- <69> 상기 발명이 도면 및 이해의 명확성을 위한 실시예에 의해 다소 상세하게 기술되었으나, 당 분야에서 통상의 지식을 가진 자들에게는, 본 발명의 가르침의 견지에서, 기술되고 청구된 범위 및 정신을 벗어나지 않고, 거기에 어떤 변화나 수정이 가능할 수 있다는 것이 명백할 것이다.
- ### 도면의 간단한 설명
- <70> 도1은 Pharmacia Biotech Mono Q($1 \times 10\text{ cm}$) 음이온 교환 칼럼으로부터의 분획들에서의 우리카아제 활성, 총 단백질 및 염 농도를 나타낸다. 우리카아제 활성은 상온에서, 200 mM 소디움 보레이트(sodium borate), pH 9.2 내 $100\text{ }\mu\text{M}$ 요산의 292 nm 에서의 흡수에 있어서의 감소를 모니터함으로써 측정하였다. 총 단백질은 크기-배제 HPLC 분석에서 우리카아제의 흡수 피크 곡선 아래 영역으로부터 결정되었다.
- <71> 도2는 R291K 및 T301S (PKS 우리카아제) 돌연변이를 포함하는 돼지 우리카아제의 제조용 모노 Q 크로마토그래피로부터의 선택된 분획들 및 부하물(load)의 Pharmacia Superdex 200 칼럼($1 \times 30\text{ cm}$) 상에서의 크기-배제 HPLC 분석을 나타내는 것으로서, 90°C 에서의 광 산란 검출기에 의해(상부 곡선), 그리고 276 nm 에서의 흡수에 의해(하부 곡선) 얻어진 데이터를 보여준다. 분별되지 않은(unfractionated) 샘플(부하물) 및 다양한 분획들에서의 4량체, 8량체 및 보다 높게 응집된 우리카아제 형태들의 상이한 신호 세기가 분명하다. 부하물은 모노 Q 칼럼 완충액으로 $1/5$ 로, 분획 5는 $1/3$ 로, 그리고 분획 6은 $1/9$ 로 회석되었다. 분획 5와 6은 합해져 "저염 푸울(low salt pool)"을 형성하였다.
- <72> 도3은 도1의 모노 Q 칼럼으로부터의 분획들의 크기-배제 분석을 나타내는 것으로서, 도2에서와 같이, 276 nm 에서의 흡수에 의한 것 및 90°C 에서의 광 산란 검출기에 의해 얻어진 데이터를 보여준다. 이 도에 나타난 분획들은 "고염 푸울(high salt pool)"을 형성하기 위해 사용되었고, 이로부터 PEG 컨쥬케이트들이 제조되어 BALB/c 생쥐에 주사되었다. 결과 BALB/c 생쥐에서의 면역원성 반응들 및 혈청 활성이 도5 및 6에 나타나 있다.
- <73> 도4는 PKS 우리카아제의 제조용 모노 Q 칼럼 크로마토그래피로부터의 선택된 분획들(도1) 및 분별되지 않은 PKS 우리카아제의, 도2 및 도3의 데이터로부터 계산된, 90°C 에서의 광 산란 및 276 nm 에서의 흡수에 의하여 결정된 8량체 함량을 도시한다.
- <74> 도5는 PKS 우리카아제 또는 모노 Q 칼럼 분획들로부터의 푸울의 $6 \times 10\text{-kDa}$ PEG 컨쥬케이트로 6주 동안 매주 주사한 후 24 시간 후에 뽑은 혈청들에서, 37°C 에서 4시간 배양한 후의 우리카아제의 활성에 대한, 도1에서와 같은 UV 검정을 나타낸다.
- <75> 도6은 PKS 우리카아제의 PEG 컨쥬케이트, 및 체중 20 g 당 우리카아제 단백질 0.2 mg 으로 암컷 BALB/c 생쥐에게 6주 동안 매주 주사한 후 24 시간 후에 뽑은 혈청 내의, 도1에 나타난 모노 Q 칼럼으로부터의 분획들의 푸울의 PEG 컨쥬케이트들에 대한 IgG 항체 형성의 ELISA 분석을 나타낸다. 각각의 생쥐에 대하여, 첫 번째부터 여섯 번째 주사 후 24 시간 후의 방혈(防血)로부터의 데이터가 왼쪽으로부터 오른쪽으로 나타나 있다. 검정 조건들은 실시예 6에 기재되어 있다. 각 그룹에서 8마리의 생쥐에 대한 데이터가 증가하는 면역 반응의 순으로, 왼쪽으로부터 오른쪽으로 배열되어 있다.

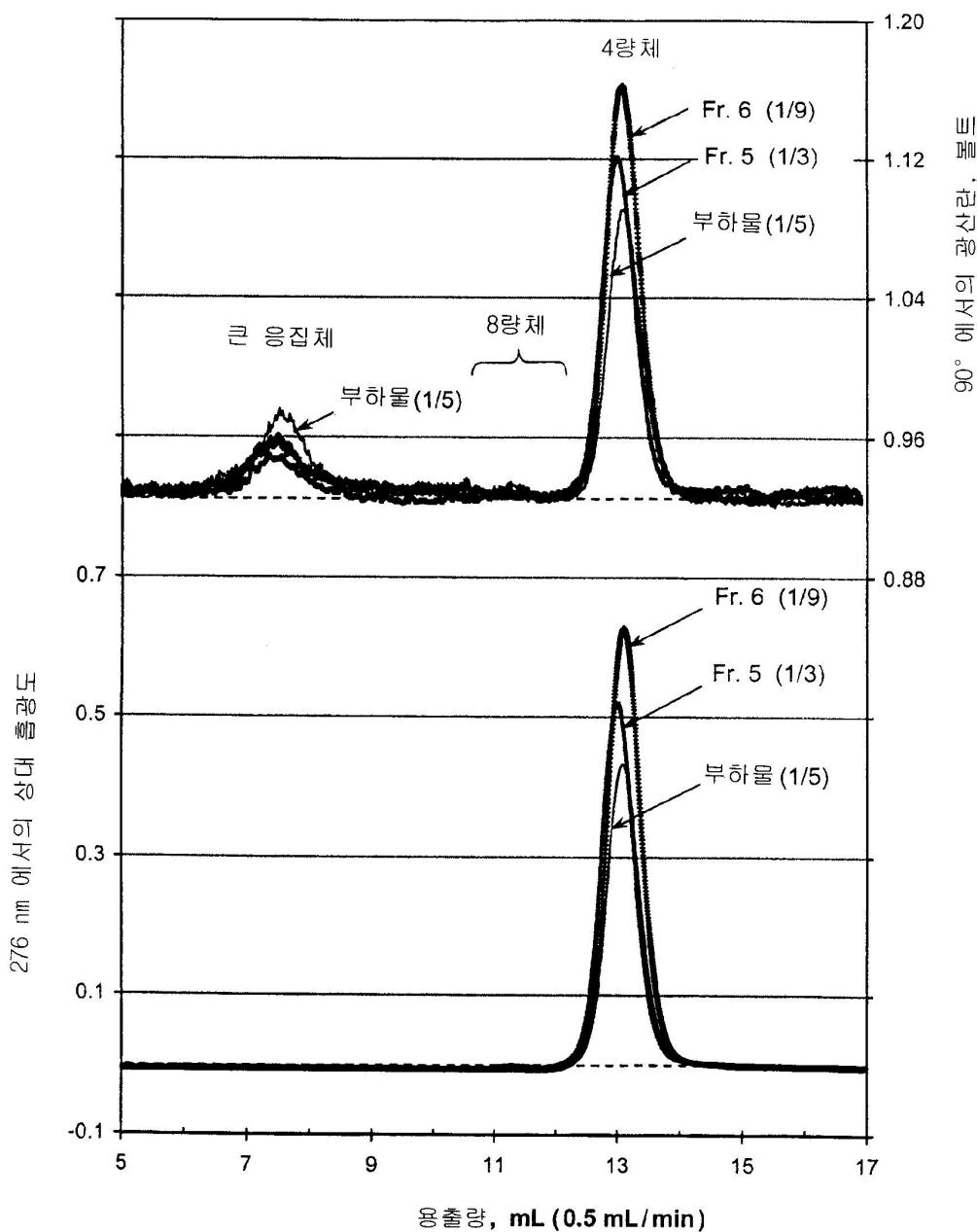
도면

도면1



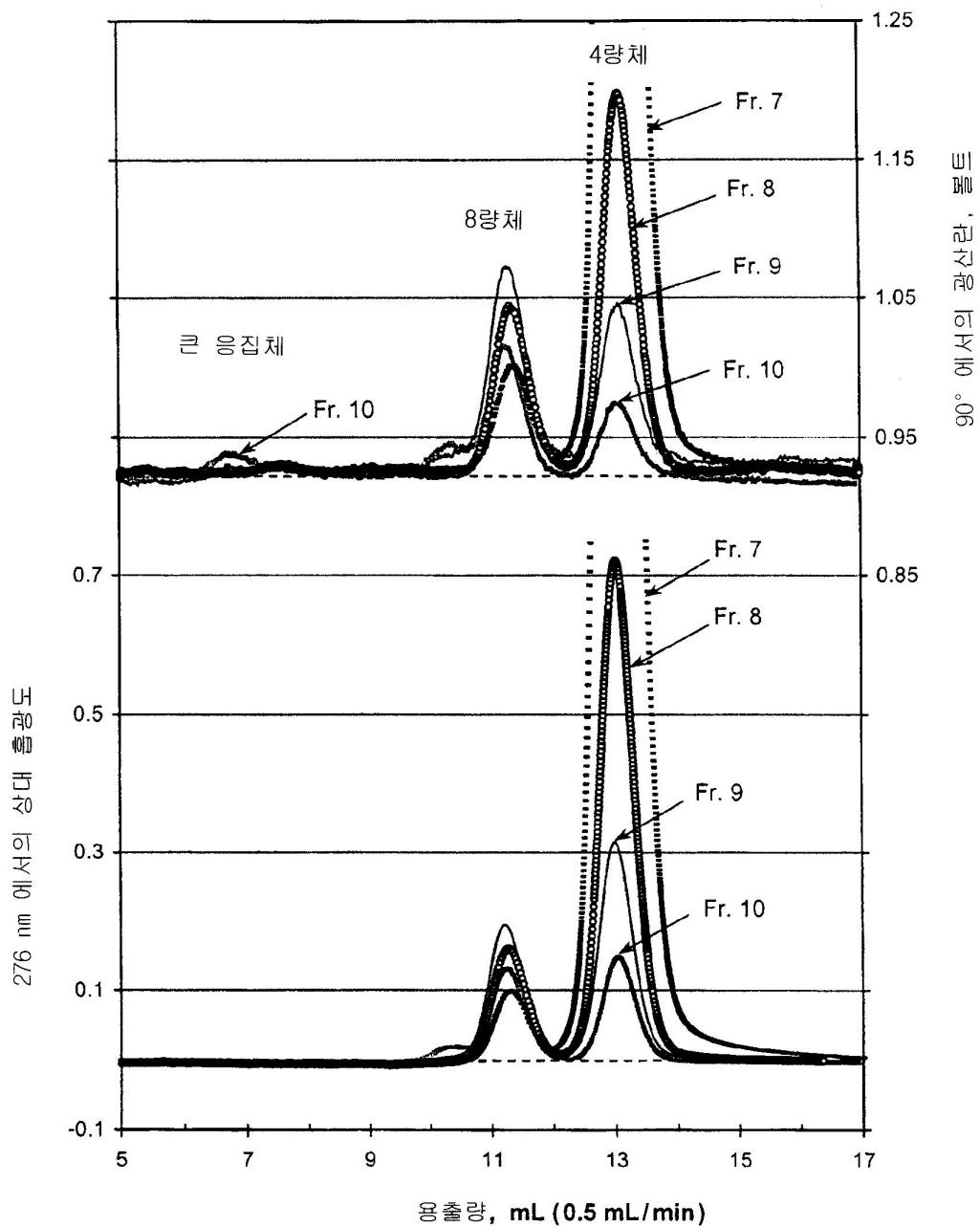
도면2

자염 푸울에서의 모노 Q 칼럼 분획 및 분별되지 않은 PKS
우리카야제(부하물)의 Superdex 200 상에서의 크기-배제 HPLC



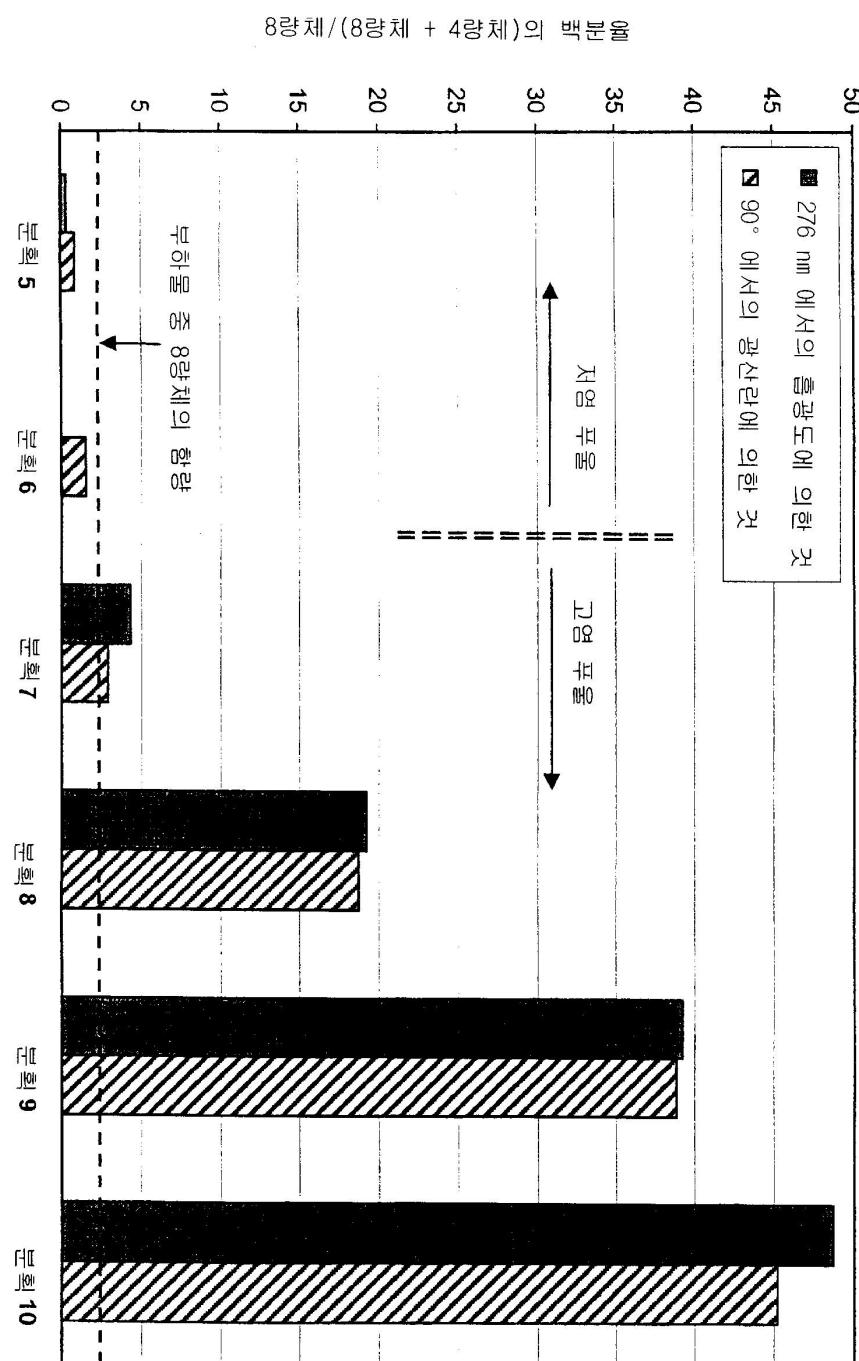
도면3

고염 푸울에서의 PKS 우리카아제의 모노 Q 칼럼 분획들의
Superdex 200 상에서의 크기-배제 HPLC

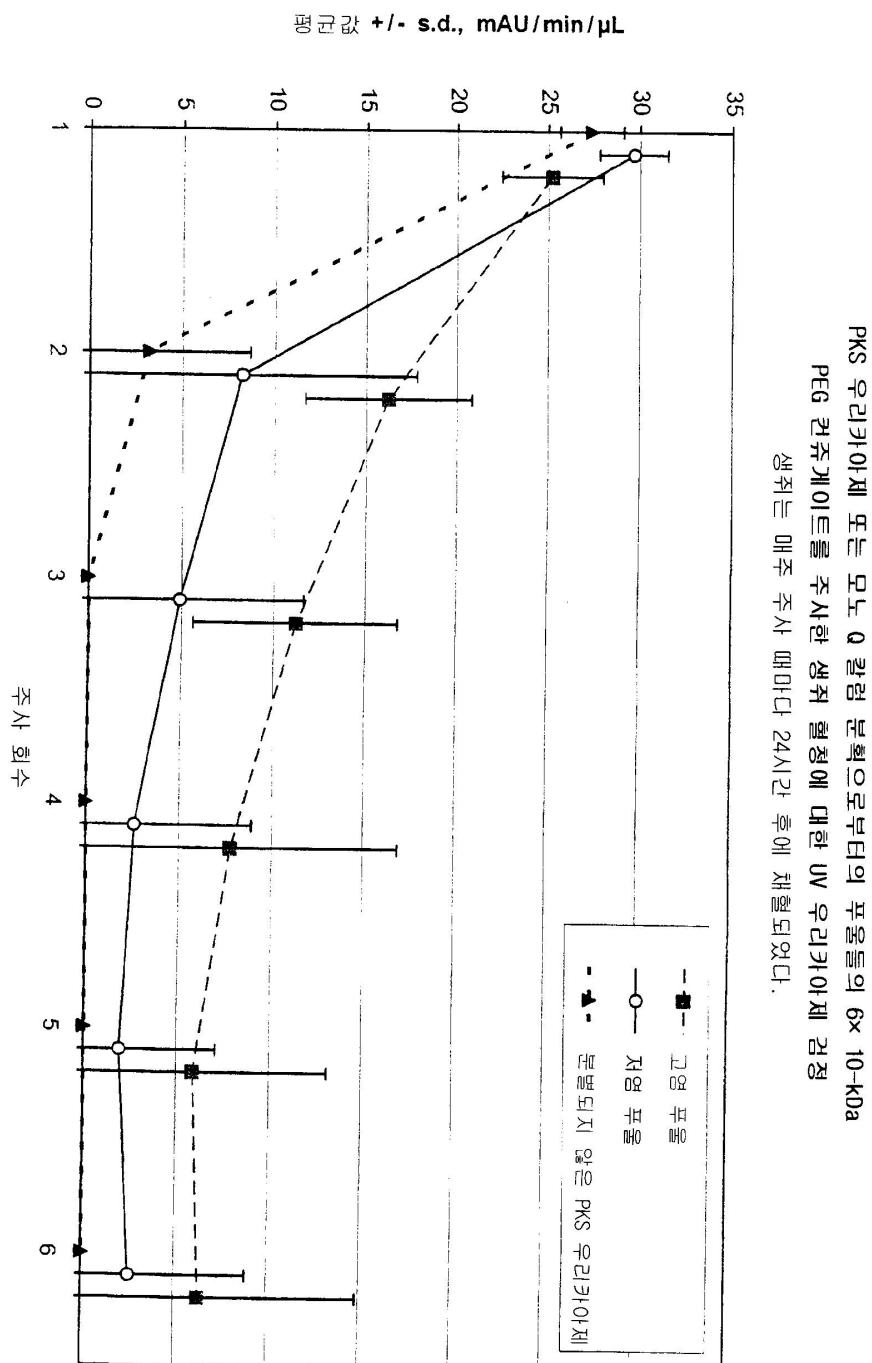


도면4

PKS 우리나라제의 모노 Q 칼럼 분획에서의 8량체 함량



도면5



저영 및 고영 푸울에 대한 데이터들이, x-축 상에서 각각, 0.1 및 0.2 유니트씩 이동되었다.

도면6

