



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2012-0119921  
(43) 공개일자 2012년10월31일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
*A61K 38/17* (2006.01) *A61K 38/16* (2006.01)  
*A61P 35/00* (2006.01)

(21) 출원번호 10-2012-7022673(분할)

(22) 출원일자(국제) 2006년06월05일  
심사청구일자 2012년09월28일

(62) 원출원 특허 10-2008-7000166  
원출원일자(국제) 2006년06월05일  
심사청구일자 2009년12월09일

(85) 번역문제출일자 2012년08월29일

(86) 국제출원번호 PCT/US2006/021845

(87) 국제공개번호 WO 2006/133144  
국제공개일자 2006년12월14일

(30) 우선권주장  
60/687,655 2005년06월03일 미국(US)

(71) 출원인  
아페맥스, 임크.  
미합중국 캘리포니아, 팔로 알토, 미란다 애비뉴  
4001 (우편번호 94304)

(72) 발명자  
둘리지 앤-마리  
미국 캘리포니아 94303 팔로 알토 루이스 로드  
2125  
스테드 리차드  
미국 워싱턴 98004 벨레뷰 에스이 96번 애비뉴  
691  
(뒷면에 계속)

(74) 대리인  
박장원

전체 청구항 수 : 총 19 항

(54) 발명의 명칭 에리스로포이에틴 수용체 웨პ티드 포뮬레이션 및 용도

### (57) 요 약

본 발명은 에리스로포이에틴 수용체 (EPO-R)의 작용제인 웨პ티드 화합물에 관한 것이다. 또한, 본 발명은 그러한 웨პ티드 화합물을 사용하여 적혈구 생산 부재 또는 저하와 관련된 질환을 치료하는 치료 방법에 관한 것이다. 본 발명의 웨პ티드 화합물을 포함하는 의약 조성물 및 투여량도 역시 제공된다.

(72) 발명자

루터 케어스틴

미국 캘리포니아 95148 산호세 캠비 로드 4805

우드번 캐서린 윈

미국 캘리포니아 95008 캠벨 카프리 드라이브 1171

나소 로버트 바넷

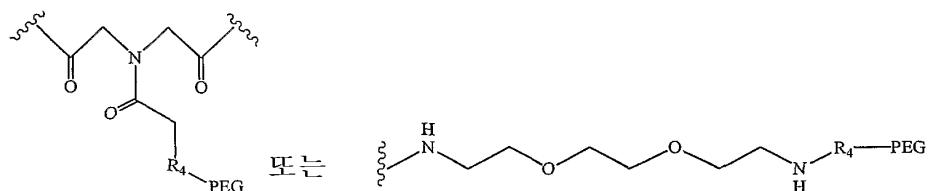
미국 캘리포니아 94025 멘로 파크 산타 크루즈 애비뉴 2059

## 특허청구의 범위

### 청구항 1

에리트로포이에틴의 결핍 또는 저(低)적혈구 세포 집단 또는 결손 적혈구 세포 집단에 특징이 있는 질환을 가진 환자의 치료 방법으로서, 상기 방법은 에리트로포이에틴 수용체 (EPO-R)에 결합되고 이를 활성화시키는 화합물의 치료적 유효량을 환자에게 투여하는 것을 포함하고, 상기 치료적 유효량은 환자의 체중 1 kg당 상기 화합물 0.025 내지 0.5 mg의 투여량이며, 상기 화합물은,

- (a) 제1 펩타이드 단량체 및 제2 펩타이드 단량체를 포함하는 펩타이드 이량체 부분 (여기서, 상기 제1 및 제2 펩타이드 단량체는 아미노산 서열 (AcG)GLYACHMGPIT(1-na1)VCQPLR을 포함하는 것이다)과,
- (b) 상기 펩타이드 단량체를 공유 결합시키는 링커 부분과,
- (c) 분자량이 10,000 내지 60,000 달톤인 선형의 비분지형 PEG를 포함하는 폴리(에틸렌 글리콜) (PEG) 부분과,
- (d) 상기 PEG 부분을 상기 링커 부분에 공유 결합시키고 화학식이



인 스페이서 부분 (식 중,  $\text{R}_4$ 는  $\text{NH}$ ,  $\text{NHCO}$ ,  $\text{CO}$ ,  $\text{COO}$  및  $\text{NHCOO}$ 로 구성되는 군에서 선택되는 것이다)을 포함하는 것인 치료 방법.

### 청구항 2

제1항에 있어서, 상기 아미노산 서열은 (MeG), K 또는 (MeG)K를 더 포함하는 것인 방법.

### 청구항 3

제2항에 있어서, 상기 아미노산 서열은 (AcG)GLYACHMGPIT(1-na1)VCQPLRK인 것인 방법.

### 청구항 4

제2항에 있어서, 상기 아미노산 서열은 (AcG)GLYACHMGPIT(1-na1)VCQPLR(MeG)인 것인 방법.

### 청구항 5

제2항에 있어서, 상기 아미노산 서열은 (AcG)GLYACHMGPIT(1-na1)VCQPLR(MeG)K인 것인 방법.

### 청구항 6

제1항에 있어서, 상기 스페이서는 이미노디아세트산 링커(iminodiacetic linker)인 것인 방법.

### 청구항 7

제1항에 있어서, 상기 스페이서는 10 원자 PEG(Ten-atom-PEG) (2,2'-(에틸렌디옥시(비스(에틸아민)))인 것인 방법.

### 청구항 8

제1항에 있어서, 상기 링커는 리신인 것인 방법.

### 청구항 9

제1항에 있어서, 상기 PEG는 10,000 내지 60,000 달톤인 것인 방법.

**청구항 10**

제9항에 있어서, 상기 PEG는 20,000 내지 40,000 달톤인 것인 방법.

**청구항 11**

제1항에 있어서, 상기 방법은 약학적으로 허용 가능한 담체를 더 포함하는 것인 방법.

**청구항 12**

제1항에 있어서, 상기 질환은 신부전 또는 투석(dialysis)인 것인 방법.

**청구항 13**

제12항에 있어서, 상기 치료적 유효량은 환자의 체중 1 kg당 상기 화합물 0.025 내지 0.2 mg의 투여량인 것인 방법.

**청구항 14**

제13항에 있어서, 상기 투여량은 환자의 체중 1 kg당 상기 화합물 0.05 내지 0.1 mg인 것인 방법.

**청구항 15**

제1항에 있어서, 상기 질환은 악성 종양(malignancy)과 관련된 빈혈인 것인 방법.

**청구항 16**

제15항에 있어서, 상기 치료적 유효량은 환자의 체중 1 kg당 상기 화합물 0.075 내지 0.5 mg의 투여량인 것인 방법.

**청구항 17**

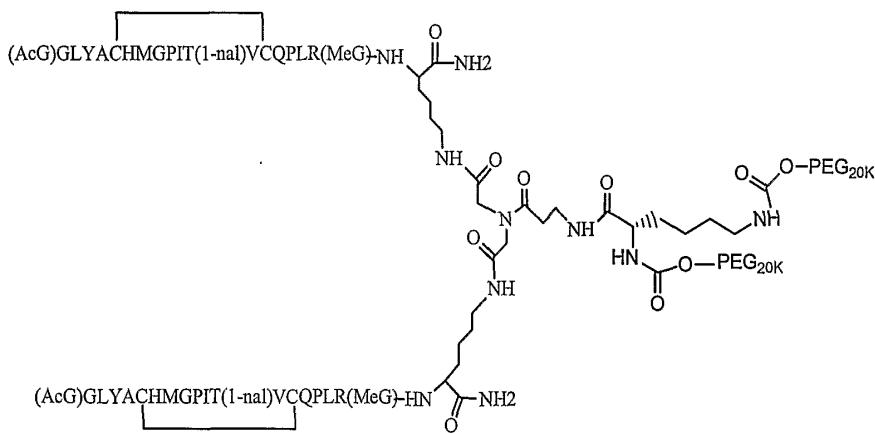
제16항에 있어서, 상기 투여량은 환자의 체중 1 kg당 상기 화합물 0.2 내지 0.4 mg인 것인 방법.

**청구항 18**

제1항에 있어서, 상기 치료적 유효량은 3 내지 4 주에 한 번씩 투여되는 것인 방법.

**청구항 19**

제1항, 제2항, 제5항, 제6항 및 제8항 내지 제18항 중 어느 하나의 항에 있어서, 상기 화합물은



인 것인 방법.

**명세서****기술분야**

- [0001] 본 출원은 2005년 6월 3일자 미국 특허 출원 번호 제60/687,655호를 기초로 하여 우선권을 주장한다. 이 우선권 주장의 기초가 되는 출원의 내용은 참조로서 그 내용 전체가 본 명세서에 통합된다.
- [0002] 본 발명은 에리스로포이에틴 수용체(erythropoietin receptor, EPO-R)의 작용제인 펩티드 화합물에 관한 것이다. 또한, 본 발명은 이러한 펩타이드 화합물을 사용하는 적혈구 생산 부재 또는 저하와 관련된 질병의 치료 방법에 관한 것이다. 본 발명의 펩티드 화합물을 포함하는 의약 조성물도 역시 제공된다.

## 배경기술

- [0003] 에리스로포이에틴 (EPO)은 분자량이 약 34 칠로달톤 (kD)이고, 종기로는 24, 38, 83 및 126번 아미노산 위치가 글리코실화 자리인 165개의 아미노산으로 된 당단백질 호르몬이다. 그것은 23개 아미노산의 신호 펩티드를 가진 전구체 단백질로서 최초로 생산된다. EPO는  $\alpha$ ,  $\beta$  및 아시알로(asialo)의 세 가지 형태로 발생할 수 있다.  $\alpha$  및  $\beta$  형은 그들의 탄수화물 성분에 있어서 약간의 차이가 있지만, 성능, 생물학적 활성 및 분자량은 동일하다. 아시알로형은 말단 탄수화물(시알산)이 제거된  $\alpha$  또는  $\beta$  형태이다. EPO를 암호화하는 DNA 서열은 보고된 바 있다 [Lin의 미국 특허 번호 제4,703,008호].
- [0004] EPO는 유사 분열과 적혈구(erythrocyte) 전구체 세포의 분화를 자극하여 적혈구가 생산되게 한다. 그것은 저산소 상태가 우세할 때 신장에서 생산된다. 적혈구 전구체 세포의 EPO 유도 분화가 일어나는 동안, 글로빈 (globin) 합성이 유도되고; 헴(heme) 복합체 합성이 자극되며; 페리틴(ferritin) 수용체의 수가 증가한다. 이러한 변화는 세포가 좀더 많은 철을 흡수하도록 하여 성숙한 적혈구에 산소를 결합시키는 기능적인 혈모글로빈을 합성하도록 한다. 따라서, 적혈구 및 그들의 혈모글로빈은 신체에 산소를 공급하는 핵심 역할을 한다. 이러한 변화들은 EPO와 적혈구 전구체 세포의 표면에 존재하는 적절한 수용체 사이의 상호 작용에 의해 개시된다 [예컨대, Gruber and Krantz (1978) Ann. Rev. Med. 29:51-66를 참조].
- [0005] 신체가 건강한 상태일 때에는 EPO는 혈장에 매우 저농도로 존재하여, 존재하고 있는 수의 적혈구로부터 조직들이 충분한 산소를 받도록 한다. 이 정상적으로 낮은 EPO 농도는 노화로 인하여 통상적으로 상실되는 적혈구의 대체를 자극하는데 충분하다.
- [0006] 혈액 순환(circulation)에 있어서 EPO의 양은 혈액 순환에서 혈액 세포들에 의한 산소 수송이 감소할 때 저산소증(hypoxia) 상태 하에서 증가된다. 저산소증은 예를 들어 출혈을 통한 실재적인 혈액 손실에 의해, 방사선 과잉 노출에 의한 적혈구 세포의 파괴에 의해, 고소(high altitude) 또는 무의식의 지속에 의한 산소 흡입의 감소에 의해 또는 다양한 형태의 빈혈에 의해 야기될 수 있다. 그러한 저산소 스트레스에 대한 반응으로, 증가된 EPO 수치는 에리트로이드 전구 세포(erythroid progenitor cells)의 증식을 자극함으로써 적혈구 세포 생산을 증가시킨다. 혈액 순환에서 적혈구 세포의 수가 정상 조직의 산소 요구량보다 더 클 때, 혈액 순환에서 EPO 수준은 감소한다.
- [0007] EPO가 적혈구 세포 형성 과정에서 필수적이기 때문에, 이 호르몬은 낮은 또는 불완전한 적혈구 세포 생산을 특징으로 하는 혈액 질환의 진단 및 치료 모두에 있어서 잠재적으로 유용한 적용성을 가진다. 최근 연구들이 베타-지중해빈혈(beta-thalassemia) [Vedovato, et al. (1984) Acta. Haematol. 71:211-213 참조]; 낭포성 섬유증(cystic fibrosis) [Vichinsky, et al. (1984) J. Pediatric 105:15-21 참조]; 임신 및 월경 질환 [Cotes, et al. (1993) Brit. J. Obstet. Gynaecol. 90:304-311 참조]; 미숙아 조기 빈혈 [Haga, et al (1983) Acta Paediatr. Scand. 72; 827-831 참조]; 척수 손상 [Claus-Walker, et al. (1984) Arch. Phys. Med. Rehabil. 65:370-374 참조]; 우주 비행 [Dunn, et al. (1984) Eur. J. Appl. Physiol. 52:178-182 참조]; 급성 실혈 [Miller, et al. (1982) Brit. J. Haematol. 52:545-590 참조]; 노화 [Udupa, et al. (1984) J. Lab. Clin. Med. 103:574-580 and 581-588 및 Lipschitz, et al. (1983) Blood 63:502-509 참조]; 비정상적인 적혈구 생성을 동반하는 다양한 종양 질환 상태들 [Dainiak, et al. (1983) Cancer 5:1101-1106 및 Schwartz, et al. (1983) Otolaryngol. 109:269-272 참조]; 및 신부전 [Eschbach, et al. (1987) N. Eng. J. Med. 316:73-78 참조]을 비롯한 다양한 질병 상태, 질환 및 혈액 불규칙 상태에 대한 EPO 치료법의 효능의 예측을 위한 기초를 제공해 주고 있다.
- [0008] 정제된 균질 EPO는 특징 분석된 바 있다 [Hewick의 미국 특허 제4,677,195호]. EPO를 암호화하는 DNA 서열이 정제, 클로닝 및 발현되어 천연 EPO와 동일한 생화학적 및 면역학적 특성을 가진 재조합 폴리펩티드가 생산되었다. 천연 EPO에서의 올리고당류와 동일한 올리고당류를 가진 재조합 EPO 분자가 또한 생산된 바 있다

[Sasaki, et al. (1987) J. Biol. Chem. 262: 12059-12076 참조].

[0009]

EPO의 생물학적 효과는 부분적으로 세포막 결합 수용체와의 상호 작용을 통하여 매개되는 것으로 나타난다. 마우스의 지라에서 분리한 미성숙 에리스로이드 세포를 이용한 초기 연구들은 EPO 결합 세포 표면 단백질이 각각 분자량 약 85,000 달톤 및 100,000 달톤의 두 개의 폴리펩티드를 포함한다는 것을 제시하였다 [Sawyer, et al. (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:3690-3694]. EPO 결합 위치의 수는 세포 표면당 평균 800 내지 1000 개로 계산되었다. 이들 결합 부위들 중에서, 약 300 개는 약 90 pM (피코몰)의  $K_d$ 로 EPO와 결합하였고, 나머지는 약 570 pM의 감소된 친화도로 EPO에 결합하였다 [Sawyer, et al. (1987) J. Biol. Chem. 262:5554-5562]. 또 다른 연구에서는 프랜드 백혈병 바이러스(Friend leukemia virus)의 빈혈 균주(FVA)를 마우스에 주입하여 제조된 EPO 반응성 지라 적혈구 모세포(EPO-responsive splenic erythroblasts)는 각각 약 100 pM 및 800 pM의  $K_d$  값을 가진 총 약 400개 이상의 낮은 친화도의 EPO 결합 위치를 가진다는 것을 제안하였다 [Landschulz, et al. (1989) Blood 73:1476-1486].

[0010]

그 이후의 연구들은 두 가지 형태의 EPO 수용체 (EPO-R)가 하나의 유전자에 의해 암호화된다는 것을 보여주었다. 이 유전자는 클로닝된 바 있다 [예컨대 Jones, et al. (1990) Blood 76, 31-35; Noguchi, et al. (1991) Blood 78:2548-2556; Maouche, et al. (1991) Blood 78:2557-2563 참조]. 예를 들어, 마우스 및 인간의 EPO-R 단백질의 DNA 서열 및 암호화된 펩티드 서열은 디앙드레 등 (D'Andrea, et al.)의 PCT 공개 번호 WO 90/08822에 기재되어 있다. 현재의 모델들은 EPO와 EPO-R의 결합이 두 개의 EPO-R 분자들의 이량체화 및 활성화를 가져오고, 이는 신호 전달의 후속 단계들을 초래한다는 것을 제시한다 [예컨대, Watowich, et al. (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:2140- 2144 참조].

[0011]

EPO-R의 클로닝된 유전자들의 이용은 이 중요한 수용체의 작용제 및 길항제에 대한 검색을 용이하게 해준다. 재조합 수용체 단백질의 이용은 다양한 랜덤 및 준랜덤 펩티드 다양성 생성 시스템(random and semi-random peptide diversity generation systems)에 있어서 수용체-리간드 상호작용의 연구를 가능하게 해준다. 이들 시스템은 다음을 포함한다: "플라스미드 상의 펩티드" 시스템, [미국 특허 제6,270,170호에 기재되어 있음]; "파아지 상의 펩티드" 시스템 [미국 특허 제5,432,018호 및 Cwirla, et al. (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:6378-6382에 기재되어 있음]; "암호화된 합성 라이브러리" (ESL) 시스템 [1992년 9월 16일 출원된 미국 특허 출원 제946,239호에 기재되어 있음]; 및 "대규모의 고정된 폴리머 합성" 시스템 [미국 특허 제5,143,854호; PCT 공개 90/15070호; Fodor, et al. (1991) Science 251:767-773; Dower and Fodor (1991) Ann. Rep. Med. Chem. 26:271-180; 및 미국 특허 제5,424,186호].

[0012]

적어도 어느 정도로는 EPO-R과 상호작용하는 펩티드가 동정되었고, 예를 들어 링톤 등(Wrighton et al.)의 미국 특허 제5,773,569호, 제5,830,851호 및 제5,986,047호; 링톤 등(Wrighton et al.)의 PCT 공개 WO 96/40749; 존슨 및 지빈(Johnson and Zivin)의 미국 특허 제5,767,078호 및 PCT 공개 96/40772; 발루(Balu)의 PCT 공개 WO 01/38342; 및 스미스-스위토스키 등(Smith-Swintosky et al.)의 WO 01/91780 등의 문헌에 기재되어 있다. 특히, 펩티드 모티프를 함유하는 펩티드 그룹이 동정된 바 있는데, 이러한 그룹의 일원들은 EPO-R에 결합하여 EPO 의존 세포 증식을 자극한다. 그 모티프를 함유하는 것으로 동정된 펩티드는 EC50 값이 약 20 나노몰(nM) 내지 250 nM으로 시험관내(*in vitro*)에서 EPO 의존 세포 증식을 자극한다. 따라서, 20 nM 내지 250 nM의 펩티드 농도가 EPO에 의해 자극되는 최대 세포 증식의 50%를 자극하는데 요구된다. EPO 수용체에 결합하는 또 다른 펩티드 및 그의 구조물(constructs)이 미국 가출원 제60/470,244호, 제60/470,245호 및 제60/469,993호 (모두 2003년 5월 12일에 출원됨); 미국 가출원 제60/627,432호 및 제60/627,433호 (모두 2004년 11월 11에 출원됨); 미국 출원 제10/844,968호 (2004년 5월 12일에 출원됨); 및 국제출원 PCT/US2004/14886 및 PCT/US2004/014889 (모두 2004년 5월 12일에 출원되고, 각각 WO 2004/101611 및 WO 2004/101606로 공개됨)에 기재된 바 있다. 이들 각각의 출원들은 그 전체가 참조로서 본 명세서에 통합된다.

[0013]

EPO-R 작용제의 막대한 잠재력을 감안하면, 이 수용체에 의해 매개되는 중요한 생물학적 활성의 연구 및 질병의 치료 양쪽 모두를 위하여, 능력 및 활성이 증강된 펩티드 EPO-R 작용제의 동정이 요구된다. 본 발명은 그러한 화합물을 제공한다.

[0014]

이번 섹션에서 및 명세서 전체를 통하여 인용된 참조문헌의 인용 및/또는 논의는 단지 본 발명의 기재 내용을 명확히 하기 위하여 제공되는 것이고, 그러한 모든 인용문헌이 본 발명의 "선행 기술"임을 자인하는 것이 아니다.

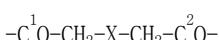
## 발명의 내용

### 해결하려는 과제

#### 발명의 요약

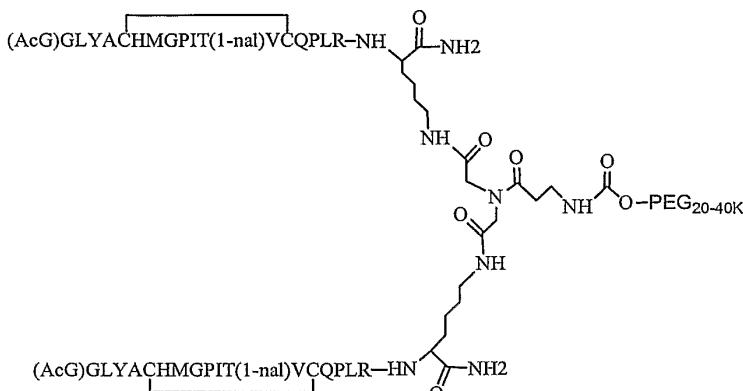
[0015] 본 발명은 능력 및 활성이 극적으로 증가된 EPO-R 작용제인 신규한 펩티드 화합물을 제공한다. 이들 펩티드 화합물은 아미노산 서열이 (AcG)GLYACHMGPIT(1-na1)VCQPLRK (SEQ ID NO: 1)인 펩티드 단량체의 동종이량체 (homodimers), 아미노산 서열이 (AcG)GLYACHMGPIT(1-na1)VCQPLR(MeG)K (SEQ ID NO: 2)인 펩티드 단량체의 동종이량체 또는 아미노산 서열이 (AcG)GLYACHMGPIT(1-na1)VCQPLR(MeG) (SEQ ID NO: 3)인 펩티드 단량체의 동종이량체로서, 여기서 각 아미노산은 표준 단문자 약어에 의하여 표시된 것이고, "(AcG)"는 N-아세틸글리신이며, "(1-na1)"은 1-나프틸알라닌이고, "(MeG)"는 사르코신으로도 알려져 있는 N-메틸글리신이다. 펩티드 이량체의 각 펩티드 단량체는 단량체의 시스테인 잔기들 사이에서 분자 내 이황화 결합을 함유한다.

[0017] 펩티드 단량체는 분지형 3차 아미드 링커(branched tertiary amide linker)에 공유적으로 부착됨으로써 이량체화될 수 있다. 상기 3차 아미드 링커는 다음과 같이 나타낼 수 있다.

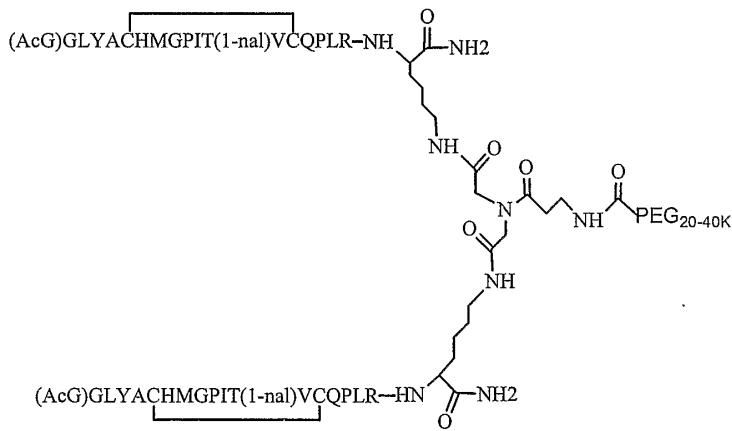


[0019] 식 중, X는  $\text{NCO}-(\text{CH}_2)_2-\text{N}^1\text{H}-$ 이고, 링커의  $\text{C}^1$ 은 제1 펩티드 단량체의 C-말단 리신 잔기의  $\varepsilon$ -아미노기와 아미드 결합을 형성하며, 링커의  $\text{C}^2$ 는 제2 펩티드 단량체의 C-말단 리신 잔기의  $\varepsilon$ -아미노기와 아미드 결합을 형성하고, X의  $\text{N}^1$ 은 카르바메이트(carbamate) 결합 또는 아미드 결합을 통하여 활성화 폴리에틸렌 글리콜 (PEG) 부분 (moiety)에 결합되는데, 여기서 상기 PEG는 분자량이 약 20,000 내지 약 40,000 달톤인 것이다 ("약"이라는 용어는 PEG의 제조에 있어서 일부 분자의 분자량이 상기 언급한 분자량보다 더 많거나 약간 적을 수 있음을 나타내는 것이다).

[0020] 동종이량체의 각 단량체의 아미노산 서열이 (AcG)GLYACHMGPIT(1-na1)VCQPLRK (SEQ ID NO: 1)이고, 링커의  $\text{N}^1$ 이 카르바메이트 결합을 통하여 활성화 폴리에틸렌 글리콜 (PEG) 부분에 부착될 때, 본 발명의 신규한 펩티드 화합물은 다음과 같이 표현될 수 있다.

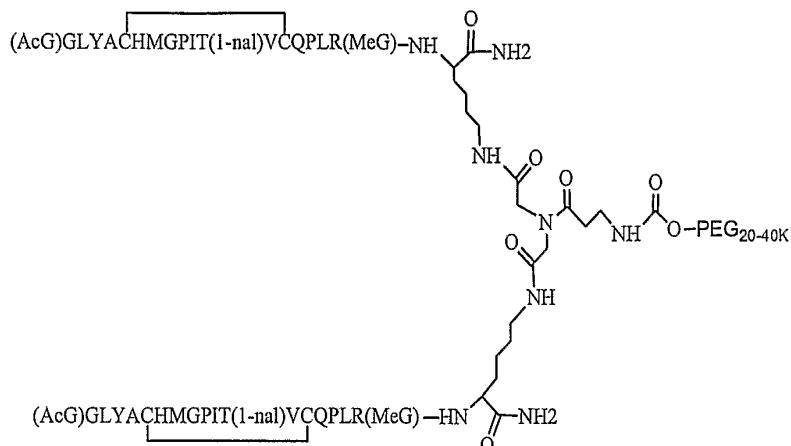


[0021] 동종이량체의 각 단량체의 아미노산 서열이 (AcG)GLYACHMGPIT(1-na1)VCQPLRK (SEQ ID NO: 1)이고, 링커의  $\text{N}^1$ 이 아미드 결합을 통하여 활성화 폴리에틸렌 글리콜 (PEG) 부분에 부착될 때, 본 발명의 신규한 펩티드 화합물은 다음과 같이 표현될 수 있다.



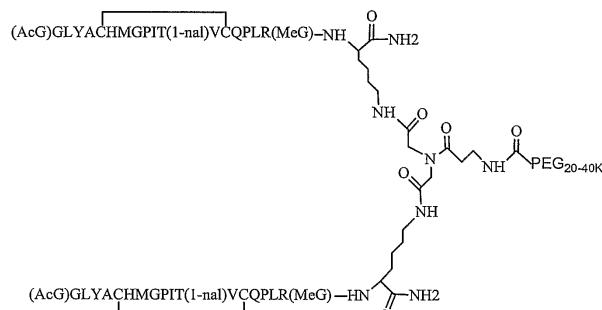
[0023]

[0024] 동종이량체의 각 단량체의 아미노산 서열이 (AcG)GLYACHMGPIT(1-nal)VCQPLR(MeG)K (SEQ ID NO: 2)이고, 링커의  $N^1$ 이 카르바메이트 결합을 통하여 활성화 폴리에틸렌 글리콜 (PEG) 부분에 부착될 때, 본 발명의 신규한 펩티드 화합물은 다음과 같이 표현될 수 있다.



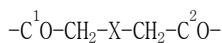
[0025]

[0026] 동종이량체의 각 단량체의 아미노산 서열이 (AcG)GLYACHMGPIT(1-nal)VCQPLR(MeG)K (SEQ ID NO: 2)이고, 링커의  $N^1$ 이 아미드 결합을 통하여 활성화 폴리에틸렌 글리콜 (PEG) 부분에 부착될 때, 본 발명의 신규한 펩티드 화합물은 다음과 같이 표현될 수 있다.



[0027]

[0028] 펩티드 단량체는 또한 분지형 3차 아미드 링커에 공유적으로 부착됨으로써 이량체화 될 수 있다. 상기 3차 아미드 링커는 다음과 같이 나타낼 수 있다.



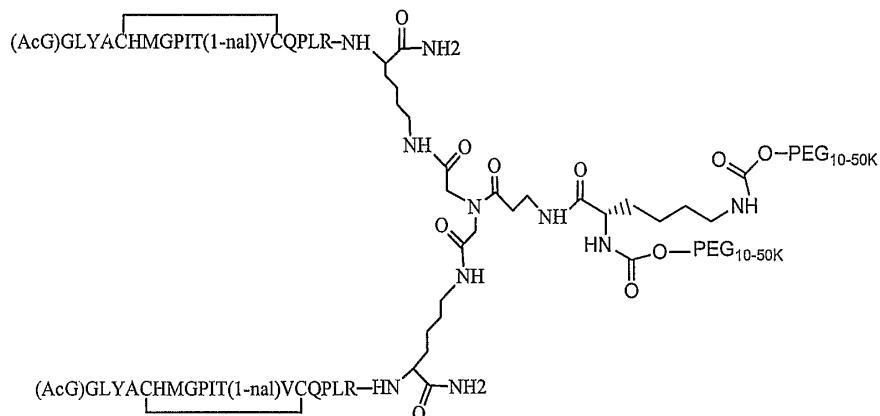
[0030] 식 중, X는  $NCO-(CH_2)_2-NH-C^3O-$  이고, 링커의  $C^1$ 은 제1 펩티드 단량체의 C-말단 리신 잔기의  $\epsilon$ -아미노기와 아미

드 결합을 형성하며, 링커의 C<sup>2</sup>는 제2 펩티드 단량체의 C-말단 리신 잔기의 ε-아미노기와 아미드 결합을 형성한다. 본 발명의 펩티드 이량체는 다음과 같은 구조의 스페이서 부분을 더 포함한다.

[0031] -N<sup>1</sup>H-(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>-C<sup>4</sup>H-N<sup>2</sup>H-

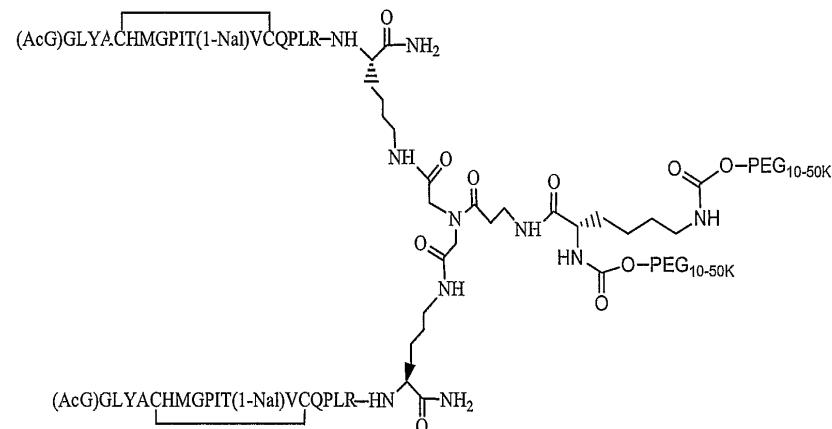
[0032] 식 중, 상기 스페이서의 C<sup>4</sup>는 X의 C<sup>3</sup>에 공유적으로 부착되고, 상기 스페이서의 N<sup>1</sup>은 카르바메이트 또는 아미드 결합을 통하여 활성화 폴리에틸렌 글리콜 (PEG) 부분에 공유적으로 부착되며, 상기 스페이서의 N<sup>2</sup>는 카르바메이트 또는 아미드 결합을 통하여 활성화 폴리에틸렌 글리콜 (PEG) 부분에 공유적으로 부착되는데, 여기서 상기 PEG는 분자량이 약 10,000 내지 약 50,000 달톤인 것이다 ("약"이라는 용어는 PEG의 제조에 있어서 일부 분자의 분자량이 상기 언급한 분자량보다 더 많거나 약간 적을 수 있음을 나타내는 것이다). 각각의 PEG 부분의 분자량은 독립적으로 10,000 달톤 (10 kD), 20 kD, 30 kD, 40 kD 또는 50 kD일 수 있다.

[0033] 동종이량체의 각 단량체의 아미노산 서열이 (AcG)GLYACHMGPIT(1-nal)VCQPLRK (SEQ ID NO: 1)이고, 상기 스페이서의 N<sup>1</sup> 및 N<sup>2</sup> 양쪽 모두가 카르바메이트 결합을 통하여 활성화 PEG 부분에 공유적으로 부착될 때, 본 발명의 신규한 펩티드 화합물은 다음과 같이 나타낼 수 있다.



[0034] \*

[0035] 양호한 실시 상태에 있어서, 두 개의 펩티드 단량체의 C-말단 리신은 L-리신이다. 또한, 당해 기술 분야의 숙련자는 상기 화학 구조식으로부터 두 개의 선형 PEG 부분이 리신 (예컨대, mPEG<sub>2</sub>-Lys-NHS 또는 mPEG<sub>2</sub>-리신올-NPC로서)에 의하여, 좋기로는 L-리신에 의하여 연결되어 다음과 같은 입체 화학 구조를 만든다는 것을 이해할 수 있을 것이다.

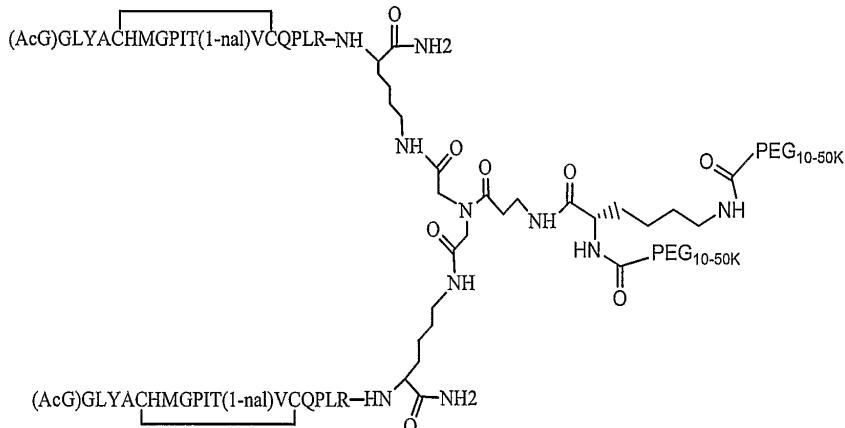


[0036]

[0037] 그와는 달리, 상기 1개 이상의 리신 잔기들은 D-리신일 수 있고, 이 때에는 당해 기술 분야의 숙련자들이라면 용이하게 인식할 수 있는 또 다른 입체 구조를 만들 수 있다.

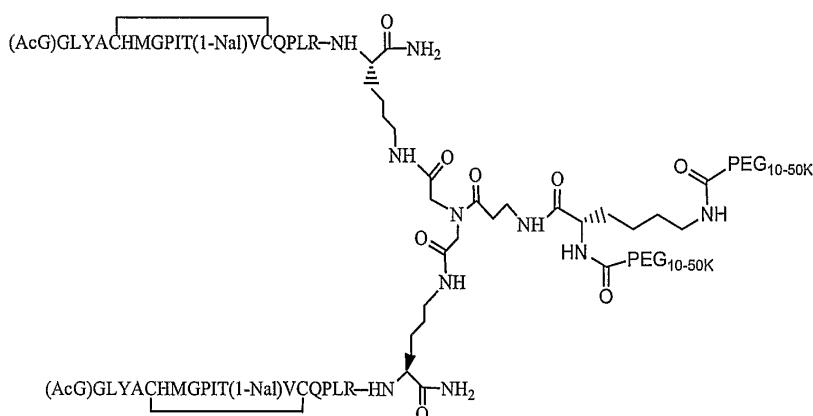
[0038] 동종이량체의 각 단량체의 아미노산 서열이 (AcG)GLYACHMGPIT(1-nal)VCQPLRK (SEQ ID NO: 1)이고, 상기 스페이

서의  $N^1$  및  $N^2$  양쪽 모두가 아미드 결합을 통하여 활성화 PEG 부분에 공유적으로 부착될 때, 본 발명의 신규한 펩티드 화합물은 다음과 같이 나타낼 수 있다.



[0039]

또한, 좋기로는 이러한 화합물에서의 리신 분자들이 모두 L-리신일 때, 다음과 같은 입체 구조를 만든다.

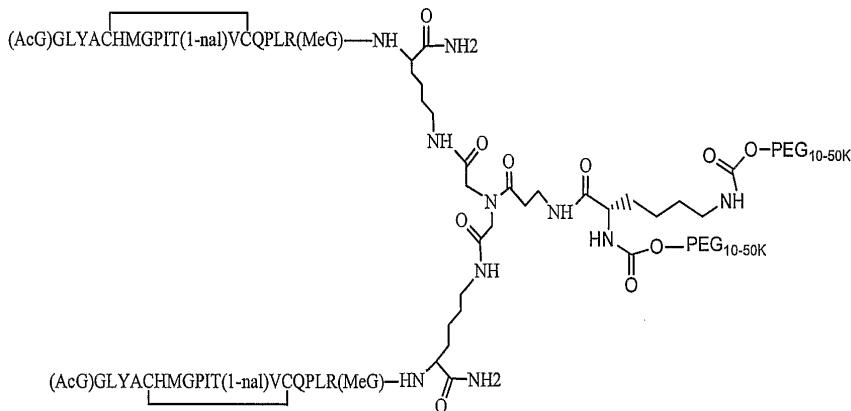


[0041]

그와는 달리, 상기 1개 이상의 리신 잔기들은 D-리신일 수 있고, 이 때에는 당해 기술 분야의 숙련자들이라면 용이하게 인식할 수 있는 또 다른 입체 구조를 만들 수 있다.

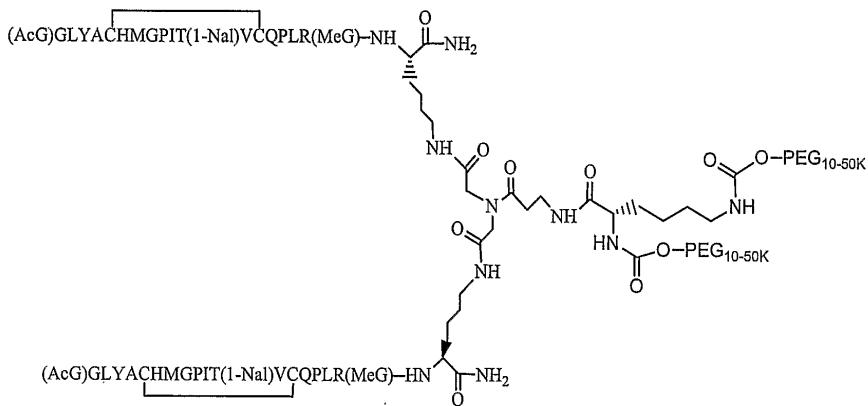
[0042]

동종이량체의 각 단량체의 아미노산 서열이 (AcG)GLYACHMGPIT(1-nal)VCQPLR(MeG)K (SEQ ID NO: 2)이고, 상기 스페이서의  $N^1$  및  $N^2$  양쪽 모두가 카르바메이트 결합을 통하여 활성화 PEG 부분에 공유적으로 부착되어, 여기서 Y는 카르바메이트기일 때, 본 발명의 신규한 펩티드 화합물은 다음과 같이 나타낼 수 있다.



[0044]

좋기로는, 이러한 분자에서 펩티드 단량체와 선형 PEG 부분을 연결하는 상기 리신 잔기들은 모두 L-리신이고, 이때 다음과 같은 입체 구조를 만든다.

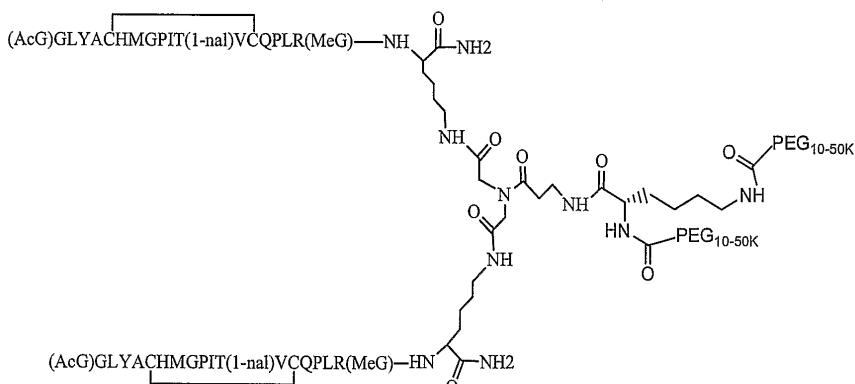


[0046]

\*그와는 달리, 1개 이상의 상기 리신 잔기는 D-리신일 수 있고, 이 때에는 당해 기술 분야의 숙련자들이라면 용이하게 인식할 수 있는 또 다른 입체 구조를 만들 수 있다.

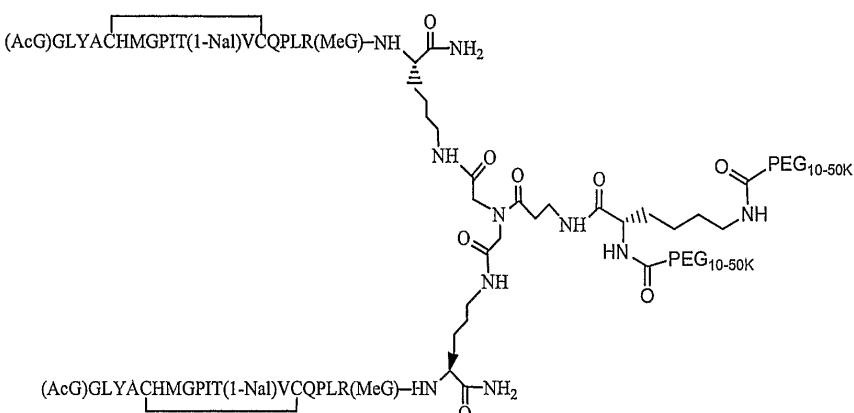
[0048]

동종이량체의 각 단량체의 아미노산 서열이 (AcG)GLYACHMGPIT(1-nal)VCQPLR(MeG)K (SEQ ID NO: 2)이고, 상기 스페이서의 N<sup>1</sup> 및 N<sup>2</sup> 양쪽 모두가 아미드 결합을 통하여 활성화 PEG 부분에 공유적으로 부착될 때, 본 발명의 신규한 웨티드 화합물은 다음과 같이 나타낼 수 있다.



[0049]

좋기로는, 이러한 분자에서 웨티드 단량체와 선형 PEG 부분을 연결하는 상기 리신 잔기들은 모두 L-리신이고, 이 때 다음과 같은 입체 구조를 만든다.



[0051]

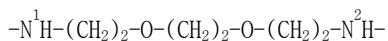
한 가지 실시 상태에 있어서, 1개 이상의 상기 리신 잔기는 D-리신일 수 있고, 이 때에는 당해 기술 분야의 숙련자들이라면 용이하게 인식할 수 있는 또 다른 입체 구조를 만들 수 있다.

[0052]

상기 웨티드 단량체들은 또한 리신 링커에 부착됨으로써 이량체화 될 수 있는데, 그에 따라 제1 웨티드 단량체는 그의 C-말단에서 리신의 ε-아미노기에 부착되고, 제2 웨티드 단량체는 그의 C-말단에서 리신의 α-아미노기

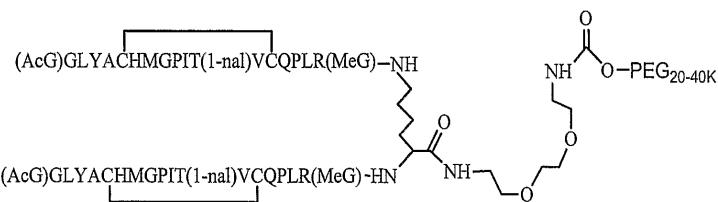
에 부착된다.

[0054] 상기 본 발명의 펩티드 이량체는 다음과 같은 구조의 스페이서 부분을 더 포함한다.

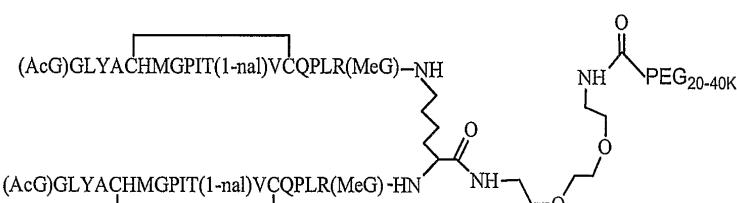


[0056] 한쪽 말단에서, 상기 스페이서의  $\text{N}^1$ 은 아미드 결합을 통하여 리신 링커의 카르보닐 탄소에 부착된다. 반대쪽 말단에서, 상기 스페이서의  $\text{N}^2$ 는 카르바메이트 결합 또는 아미드 결합을 통하여 활성화 폴리에틸렌 글리콜 (PEG) 부분에 부착되는데, 여기서 상기 PEG는 분자량이 약 20,000 내지 약 40,000 달톤인 것이다 ("약"이라는 용어는 PEG의 제조에 있어서 일부 분자의 분자량이 상기 언급한 분자량보다 더 많거나 약간 적을 수 있음을 나타내는 것이다).

[0057] 상기 스페이서가 카르바메이트 결합을 통하여 활성화 폴리에틸렌 글리콜 (PEG) 부분에 부착될 때, 본 발명의 신규한 펩티드 화합물 (SEQ ID NO: 3)은 다음과 같이 나타낼 수 있다.



[0058] [0059] 상기 스페이서가 아미드 결합을 통하여 활성화 폴리에틸렌 글리콜 (PEG) 부분에 부착될 때, 본 발명의 신규한 펩티드 화합물 (SEQ ID NO: 3)은 다음과 같이 나타낼 수 있다.



[0060] [0061] 본 발명은 상기 펩티드 화합물들을 사용하여 다양한 의학적 증상을 치료하기 위한 방법을 또한 제공한다. 상기 방법은 상기 화합물 중 하나를 치료적 유효량으로 환자에게 투여하는 것에 의하여, 에리스로포이에틴의 결핍 또는 적혈구 증식의 결손 또는 저하를 특징으로 하는 질환을 가진 환자를 치료하는 것을 포함한다. 구체적인 실시 상태에 있어서, 상기 질환은 말기 신부전 또는 투석; AIDS, 자가 면역 질환 또는 악성 종양(malignancy)과 관련된 빈혈; 베타-지중해빈혈; 낭포성 섬유증; 미숙아의 조기 빈혈 (early anemia of prematurity); 만성 염증성 질병과 관련된 빈혈; 척수 손상; 급성 실혈(急性失血); 노화; 또는 적혈구생성 이상을 수반하는 종양성 질환이다. 더욱이, 특정 실시 상태에 있어서, 상기 질환은 신부전 또는 투석이고, 상기 치료적 유효량은 환자 몸무게 1 kg 당 상기 화합물 0.025 내지 0.2 mg의 투여량이다. 다른 실시 상태에 있어서, 상기 질환은 신부전 또는 투석이고, 상기 치료적 유효량은 환자 몸무게 1 kg 당 상기 화합물 0.05 내지 0.1 mg의 투여량이다. 특정 실시 상태에 있어서, 상기 질환은 악성 종양과 관련된 빈혈이고, 상기 치료적 유효량은 환자 몸무게 1 kg 당 상기 화합물 0.075 내지 0.5 mg의 투여량이다. 다른 실시 상태에 있어서, 상기 질환은 악성 종양과 관련된 빈혈이고, 상기 치료적 유효량은 환자 몸무게 1 kg 당 상기 화합물 0.2 내지 0.4 mg의 투여량이다. 상기 치료적 유효량은 매 3~4 주에 한 번씩 투여될 수 있다.

[0062] 본 발명은 상기 펩티드 화합물들을 포함하는 의약 조성물도 제공한다. 특정 실시 상태에 있어서, 상기 PEG의 분자량은 약 20,000 달톤이다. 다른 실시 상태에 있어서, 상기 의약 조성물은 상기 화합물들 중의 어느 하나 및 약제학적으로 허용 가능한 캐리어 (carrier)를 포함한다.

### 과제의 해결 수단

[0063] 정의:

[0064] 웨პ티드의 아미노산 잔기는 다음과 같이 약어로 표시된다: 페닐알라닌은 Phe 또는 F; 루신은 Leu 또는 L; 이소루신은 Ile 또는 I; 메티오닌은 Met 또는 M; 발린은 Val 또는 V; 세린은 Ser 또는 S; 프롤린은 Pro 또는 P; 트레오닌은 Thr 또는 T; 알라닌은 Ala 또는 A; 티로신은 Tyr 또는 Y; 히스티딘은 His 또는 H; 글루타민은 Gln 또는 Q; 아스파라긴은 Asn 또는 N; 리신은 Lys 또는 K; 아스파르트산은 Asp 또는 D; 글루탐산은 Glu 또는 E; 시스테인은 Cys 또는 C; 트립토판은 Trp 또는 W; 아르기닌은 Arg 또는 R; 글리신은 Gly 또는 G. 웨პ티드 중의 비통상적인 아미노산은 다음과 같이 약어로 표시된다: 1-나프틸알라닌은 1-nal 또는 Np; N-메틸글리신 (사르코신으로도 알려짐)은 MeG 또는 Sc; 아세틸화 글리신 (N-아세틸글리신)은 AcG.

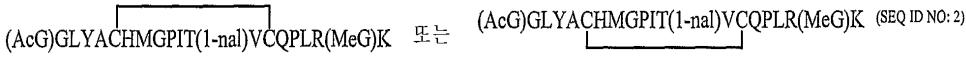
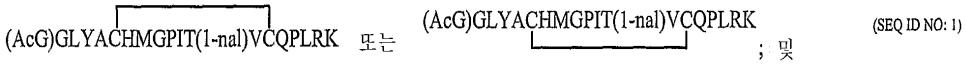
[0065] 본 명세서에서 사용되는 "폴리웨პ티드" 또는 "단백질"이라는 용어는 알파 아미노산들이 아미드 결합을 통하여 서로 연결된 아미노산 단량체의 중합체를 말한다. 따라서, 폴리웨პ티드는 길이가 적어도 2개의 아미노산 잔기인 것 및 통상적으로 더 긴 것이다. "웨პ티드"라는 용어는 통상적으로 길이가 단지 수개의 아미노산 잔기인 폴리웨პ티드를 말한다. 본 발명의 신규의 EPO-R 작용제 웨პ티드는 종기로는 길이가 50개 아미노산 잔기 이하이다. 이들은 길이가 약 17개 내지 약 40개 아미노산 잔기인 것이 더욱 바람직하다. 웨პ티드와는 달리 폴리웨პ티드는 어떠한 수의 아미노산 잔기도 모두 포함할 수 있다. 따라서, 폴리웨პ티드라는 용어는 웨პ티드 뿐만 아니라 더 긴 아미노산들의 서열도 포함한다.

[0066] 본 명세서에서 "약제학적으로 허용 가능한"이라는 표현은 "일반적으로 안전한 것으로 간주되는", 예컨대 생리학적으로 관용되고, 인간에게 투여되었을 때 급성위연동이상황진(gastric upset), 현기증 등과 같은 알레르기성 또는 유사한 바람직하지 않은 반응을 일반적으로 일으키지 않는 분자적 실재(molecular entities) 및 조성물을 말한다. 종기로는 본 명세서에서 "약제학적으로 허용 가능한"이라는 용어는 미국 연방 또는 주 정부의 관리 기관에 의해 승인되거나, 미국 약전 또는 동물에게의 사용을 위한 및 더 구체적으로는 인간에게의 사용을 위한 기타의 일반적으로 인정되는 약전에 열거된 것을 의미한다. "캐리어"라는 용어는 화합물과 함께 투여되는 희석제, 애주번트, 부형제 또는 비히클(vehicle)를 말한다. 이러한 약제학적 캐리어는 땅콩유, 대두유, 광유, 참기름 등과 같은 석유, 동물성, 식물성 또는 합성 오일을 포함하는 오일과, 물 등의 멸균 액체일 수 있다. 물 또는 수성 용액, 식염수 및 수성 텍스트로스 및 글리세롤 용액이 캐리어로서 바람직하게 사용되고, 특히 주사 용액으로서 사용된다. 적절한 약제학적 캐리어는 E.W. 마틴 (E.W. Martin)의 "Remington's Pharmaceutical Sciences"에 기재되어 있다.

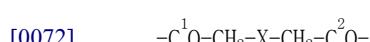
[0067] 본 명세서에서 사용되는 "작용제"라는 용어는 그의 상보적인 생물학적 활성 수용체에 결합하고, 상기 수용체를 활성화시켜 수용체에서 생물학적 반응을 일으키거나 수용체에 이미 존재하는 생물학적 반응을 증강시키는 생물학적으로 활성인 리간드를 말한다.

#### EPO-R 작용제인 신규의 웨პ티드

[0069] 본 발명은 능력 및 활성이 극적으로 증강된 EPO-R 작용제인 신규의 웨პ티드 화합물을 제공한다. 이를 웨პ티드 화합물은 아미노산 서열 (AcG)GLYACHMGPIT(1-nal)VCQPLRK (SEQ ID NO: 1)를 가지는 웨პ티드 단량체의 동종이량체 또는 아미노산 서열 (AcG)GLYACHMGPIT(1-nal)VCQPLR(MeG)K (SEQ ID NO: 2)를 가지는 웨პ티드 단량체의 동종이량체로서, 여기서, 각각의 아미노산은 표준 단문자 약어로서 표현된 것으로서, "(AcG)"는 N-아세틸글리신이고, "(1-nal)"은 1-나프틸알라닌이며, "(MeG)"는 사르코신으로도 알려져 있는 N-메틸글리신이다. 웨პ티드 이량체의 각 웨პ티드 단량체는 그 단량체의 시스테인 잔기들 사이에 분자내 이황화 결합을 함유한다. 이러한 단량체는 다음과 같이 도식적으로 나타낼 수 있다.



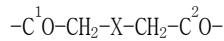
[0070] [0071] 이들 단량체 웨პ티드는 이량체화되어 EPO-R 작용제 활성이 증강된 웨პ티드 이량체를 제공한다. 링커 ( $L_K$ ) 부분은 각각의 단량체의 C-말단 리신 잔기에 동시에 부착되어 두 개의 웨პ티드 단량체의 C-말단을 연결하는 분자형 3차 아미드이다. 상기 3차 아미드 링커는 다음과 같이 표현할 수 있다.



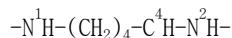
[0073] 식 중, X는  $NCO-(CH_2)_2-N^1H-$  이고, 링커의  $C^1$ 은 제1 웨პ티드 단량체의 C-말단 리신 잔기의  $\epsilon$ -아미노기와 아미드

결합을 형성하며, 링커의 C<sup>2</sup>는 제2 펩티드 단량체의 C-말단 리신 잔기의 ε-아미노기와 아미드 결합을 형성하고, X의 N<sup>1</sup>은 카르바메이트(carbamate) 결합 또는 아미드 결합을 통하여 활성화 폴리에틸렌 글리콜(PEG) 부분(moiety)에 부착되는데, 여기서 상기 PEG는 분자량이 약 20,000 내지 약 40,000 달톤인 것이다 ("약"이라는 용어는 PEG의 제조에 있어서 일부 분자의 분자량이 상기 언급한 분자량보다 더 많거나 약간 적을 수 있음을 나타내는 것이다).

[0074] 상기 3차 아미드 링커는 또한 다음과 같이 표현할 수도 있다.



[0076] 식 중, X는  $\text{NCO}-(\text{CH}_2)_2-\text{NH}-\text{C}^3\text{O}-$ 이고, 링커의 C<sup>1</sup>은 제1 펩티드 단량체의 C-말단 리신 잔기의 ε-아미노기와 아미드 결합을 형성하며, 링커의 C<sup>2</sup>는 제2 펩티드 단량체의 C-말단 리신 잔기의 ε-아미노기와 아미드 결합을 형성한다. 본 발명의 펩티드 이량체는 다음과 같은 구조의 스페이서 부분을 더 포함한다.



[0078] 식 중, 상기 스페이서의 C<sup>4</sup>는 X의 C<sup>3</sup>에 공유적으로 결합되고, 상기 스페이서의 N<sup>1</sup>은 카르바메이트 또는 아미드 결합을 통하여 활성화 폴리에틸렌 글리콜(PEG) 부분에 공유적으로 부착되며, 상기 스페이서의 N<sup>2</sup>는 카르바메이트 또는 아미드 결합을 통하여 활성화 폴리에틸렌 글리콜(PEG) 부분에 결합되는데, 여기서 상기 PEG는 분자량이 약 10,000 내지 약 60,000 달톤인 것이다 ("약"이라는 용어는 PEG의 제조에 있어서 일부 분자의 분자량이 상기 언급한 분자량보다 더 많거나 약간 적을 수 있음을 나타내는 것이다).

[0079] 따라서, 본 발명의 신규의 펩티드는 카르바메이트 결합 또는 아미드 결합을 통하여 펩티드 이량체의 3차 아미드 링커에 공유적으로 부착된 PEG 부분을 또한 함유할 수 있다. PEG는 약제학적으로 허용 가능한 수용성(水溶性) 중합체이다. 본 발명에서의 사용을 위한 PEG는 분자량이 약 20 킬로달톤(20 K) 내지 약 60 K인 선형, 비분지형 PEG일 수 있다 ("약"이라는 용어는 PEG의 제조에 있어서 일부 분자의 분자량이 상기 언급한 분자량보다 더 많거나 약간 적을 수 있음을 나타내는 것이다). 가장 좋기로는, PEG는 분자량이 약 30 K 내지 약 40 K인 것이다. 당해 기술 분야의 숙련자는 목적하는 투여량; 순환 시간; 단백질 분해에 대한 저항성; 만약 존재한다면 생물학적 활성에 대한 효과; 취급의 용이성; 항원성의 정도 및 결핍; 및 치료적 펩티드에 대한 PEG의 기타의 알려진 효과 등의 고려에 기초하여 목적하는 중합체 크기를 선택할 수 있을 것이다.

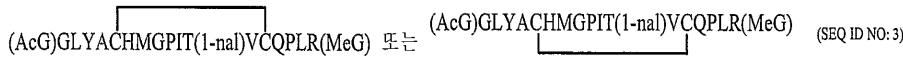
[0080] 본 발명의 펩티드, 펩티드 이량체 및 기타의 펩티드 기재 분자는 수용성(水溶性) 중합체(예컨대, PEG)를 그 분자의 수용체 결합 부분(예컨대, 펩티드 + 스페이서)에 결합시키기 위한 모든 다양한 화학을 사용하여 수용성 중합체에 부착시킬 수 있다. 일반적인 실시 상태에 있어서는 수용성 중합체의 수용체-결합 부분에 공유적 부착을 위한 단일 부착 정션(single attachment junction)을 사용하지만, 또 다른 실시 상태에 있어서는 별개의 부착 정션에서 수용체 결합 부분에 부착되는 추가의 변형을 포함하는 다중 부착 정션(들)을 포함할 수 있고, 이는 스페이서 및/또는 하나 또는 양쪽 펩티드 사슬에 공유적 부착 정션(들)을 포함할 수 있다. 일부 실시 상태에 있어서는, 이량체 또는 더 높은 차수의 다량체는 다른 종의 펩티드 사슬을 포함할 것이다(즉, 이종이량체 또는 기타의 이종다량체). 한정을 위해서가 아니라 예로서, 이량체는 PEG 부착 정션을 가지는 제1 펩티드 사슬을 포함할 수 있고, 제2 펩티드 사슬은 PEG 부착 정션이 결핍되거나 또는 제1 펩티드 사슬과 상이한 결합 화학을 이용할 수 있으며, 일부 변형예에 있어서 스페이서는 PEG 부착 정션을 함유하거나 결핍될 수 있고, 상기 스페이서는 만약 PEG화(PEGylated)되었다면 제1 및/또는 제2 펩티드 사슬의 그것과 상이한 결합 화학을 이용할 수 있다. 또 다른 실시 상태에 있어서 수용체 결합 부분의 스페이서 부분에 부착된 PEG 및 분자의 펩티드 부분의 아미노산 중 하나의 측쇄에 접합된(conjugated) 다른 수용성 중합체(예컨대, 탄수화물)를 사용한다.

[0081] 광범위한 종류의 폴리에틸렌 글리콜(PEG)이 수용체 결합 부분(펩티드 + 스페이서)의 PEG화를 위해 사용될 수 있다. 실질적으로 모든 적합한 반응성 PEG 시약이 사용될 수 있다. 양호한 실시 상태에 있어서, 상기 반응성 PEG 시약은 수용체 결합 부분과의 접합시 카르바메이트 또는 아미드 결합의 형성을 가져올 것이다. 적절한 반응성 PEG 화학종들은 NOF사(社)(일본 도쿄 150-6019 시부야-구 20-3 에비수 4-쵸메 에비수 가든 플레이스 타워)의 약물 전달 시스템 카탈로그(2003) 및 넥타 테라퓨틱스(Nektar Therapeutics)(미국 알라바마 35806 헌츠빌 디스커버리 드라이브 490)의 분자 공학 카탈로그(2003)에서 시판 중인 것을 포함하지만 이에 한정되는 것은 아니다. 비제한적인 예로서, 다음의 PEG 시약들이 다양한 실시 상태에서 빈번하게 선호된다: mPEG2-NHS, mPEG2-

ALD, multi-Arm PEG, mPEG(MAL)2, mPEG2(MAL), mPEG-NH2, mPEG-SPA, mPEG-SBA, mPEG-티오에스테르, mPEG-더블에스테르, mPEG-BTC, mPEG-ButyralD, mPEG-ACET, 이중관능성(heterofunctional) PEGs (NH2-PEG-COOH, Boc-PEG-NHS, Fmoc-PEG-NHS, NHS-PEG-VS, NHS-PEG-MAL), PEG 아크릴레이트 (ACRL-PEG-NHS), PEG-포스포리피드 (예컨대, mPEG-DSPE), 당해 기술 분야의 숙련자에 의해서 선택된 화학에 의해 활성화된 글리세린 기재 PEGs의 GL 시리즈를 포함하는 SUNBRITE 시리즈의 멀티암(multiarmed) PEGs, 임의의 SUNBRITE 활성화 PEGs (카르복실-PEGs, p-NP-PEGs, 트레실-PEGs, 알데하이드 PEGs, 아세탈-PEGs, 아미노-PEGs, 티올-PEGs, 말레이미도-PEGs, 히드록실-PEG-아민, 아미노-PEG-COOH, 히드록실-PEG-알데하이드, 카르복실릭 안하이드라이드 타입-PEG, 관능화된 PEG-포스포리피드를 포함하지만 이에 한정되지 않는 것) 및 그들의 특정 응용 및 용례를 위하여 당해 기술 분야의 숙련자에 의해서 선택된 기타의 유사한 및/또는 적합한 반응성 PEGs.

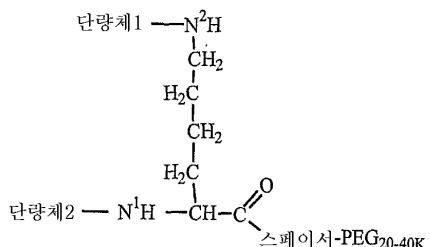
[0082] 본 발명의 신규의 웨티드는 카르바메이트 또는 아미드 결합을 통하여 스페이서 부분에 공유적으로 부착된 두 개의 PEG 부분을 또한 함유할 수 있는데, 여기서 상기 스페이서 부분은 웨티드 이량체의 3차 아미드 링커에 공유적으로 결합된 것이다. 본 발명의 이러한 실시 상태에서 사용된 상기 두 개의 PEG 부분 각각은 선형일 수 있고, 부착 단일 지점(single point of attachment)에서 함께 연결될 수 있다. 각각의 PEG 부분의 분자량은 좋기로는 약 10 킬로달톤 (10 K) 내지 약 60 K이다 ("약"이라는 용어는 PEG의 제조에 있어서 일부 분자의 분자량이 상기 언급한 분자량보다 더 많거나 약간 적을 수 있음을 나타내는 것이다). 선형 PEG 부분이 특히 좋다. 더욱 좋기로는, 상기 두 개의 PEG 부분 각각은 분자량이 약 20 K 내지 약 40 K이고, 또한 더욱 좋기로는 약 20 K 내지 약 40 K이다. 더욱 더 좋기로는, 상기 두 개의 PEG 부분의 각 분자량은 약 20 K이다. 당해 기술 분야의 숙련자는 목적하는 투여량; 순환 시간; 단백질 분해에 대한 저항성; 만약 존재한다면 생물학적 활성에 대한 효과; 취급의 용이성; 항원성의 정도 또는 결핍; 및 치료용 웨티드에 대한 PEG의 기타의 알려진 효과 등의 고려에 기초하여 목적하는 중합체 크기를 선택할 수 있을 것이다.

[0083] 본 발명은 아미노산 서열 (AcG)GLYACHMGPIT(1-nal)VCQPLR(MeG) (SEQ ID NO: 3)를 가지는 웨티드 단량체의 동종 이량체인 웨티드 작용제를 또한 포함하는데, 여기서 각 아미노산은 표준 단문자 약어에 의하여 표시된 것으로서, "(AcG)"는 N-아세틸글리신이고, "(1-nal)"은 1-나프틸알라닌이며, "(MeG)"는 사르코신으로도 알려져 있는 N-메틸글리신이다. 상기 웨티드 이량체의 각 웨티드 단량체는 그 단량체의 시스테인 잔기들 사이의 분자내 이화화 결합을 함유한다. 그러한 단량체는 다음과 같이 도식적으로 표현될 수 있다.

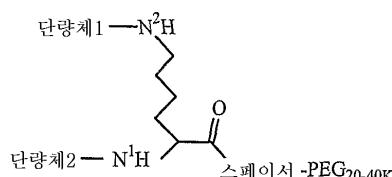


[0084] [0085] 이들 단량체 웨티드는 이량체화되어, EPO-R 작용제 활성이 증강된 웨티드 이량체를 제공한다. 링커 ( $L_k$ ) 부분은 각 단량체의 C-말단 아미노산에 동시적으로 부착됨으로써 두 개의 웨티드 단량체의 C-말단들을 연결하는 리신 잔기이다. 제1 웨티드 단량체는 그의 C-말단에서 리신의  $\epsilon$ -아미노기에 부착되고, 제2 웨티드 단량체는 그의 C-말단에서 리신의  $\alpha$ -아미노기에 부착된다. 예를 들어, 상기 이량체는 아래 화학식 I에 표시한 것처럼 구조적으로 도해할 수 있고, 아래 화학식 II에서 표현한 것처럼 축약할 수 있다.

화학식 I



화학식 II



[0086] [0087] 상기 화학식 I 및 화학식 II 중,  $N^2$ 는 리신의  $\epsilon$ -아미노기의 질소 원자를 나타내고,  $N^1$ 은 리신의  $\alpha$ -아미노기의 질소 원자를 나타낸다.

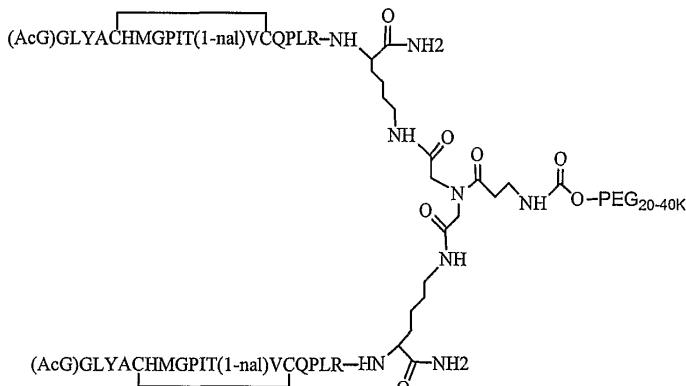
[0088] 본 발명의 웨티드 이량체은 다음 구조의 스페이서 부분을 더 포함한다.



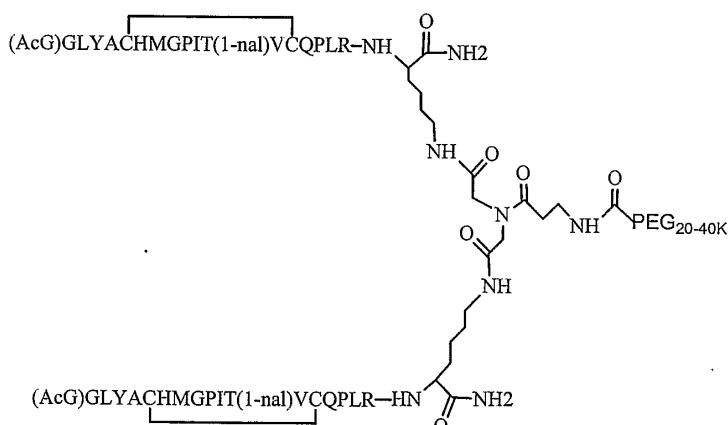
[0090] 한쪽 말단에서, 상기 스페이서의 N<sup>1</sup>은 아미드 결합을 통하여 리신 링커의 카르보닐 탄소에 결합된다. 반대쪽 말단에서, 상기 스페이서의 N<sup>2</sup>는 카르바메이트 결합 또는 아미드 결합을 통해서 활성화 폴리에틸렌 글리콜 (PEG) 부분에 연결되는데, 여기서 상기 PEG는 분자량이 약 10,000 내지 약 60,000 달톤인 것이다 ("약"이라는 용어는 PEG의 제조에 있어서 일부 분자의 분자량이 상기 언급한 분자량보다 더 많거나 약간 적을 수 있음을 나타내는 것이다). 더욱 좋기로는, 상기 PEG는 분자량이 약 20,000 내지 40,000 달톤이다.

[0091] 따라서, 본 발명의 신규의 웨티드는 웨티드 이량체에 공유적으로 부착된 PEG 부분을 또한 함유한다. PEG는 약제학적으로 허용 가능한 수용성(水溶性) 중합체이다. 본 발명에서의 사용을 위한 PEG는 분자량이 약 20 칠로달톤(20 K) 내지 약 60 K인 선형, 비분지형 PEG일 수 있다 ("약"이라는 용어는 PEG의 제조에 있어서 일부 분자의 분자량이 상기 언급한 분자량보다 더 많거나 약간 적을 수 있음을 나타내는 것이다). 가장 좋기로는, 상기 PEG의 분자량은 약 20 K 내지 약 40 K이고, 또한 더욱 좋기로는 분자량이 약 30 K 내지 약 40 K이다. 당해 기술 분야의 숙련자는 목적하는 투여량; 순환 시간; 단백질 분해에 대한 저항성; 만약 존재한다면 생물학적 활성에 대한 효과; 취급의 용이성; 항원성의 정도 또는 결핍; 및 치료적 웨티드에 대한 PEG의 기타의 알려진 효과 등의 고려에 기초하여 목적하는 중합체 크기를 선택할 수 있을 것이다.

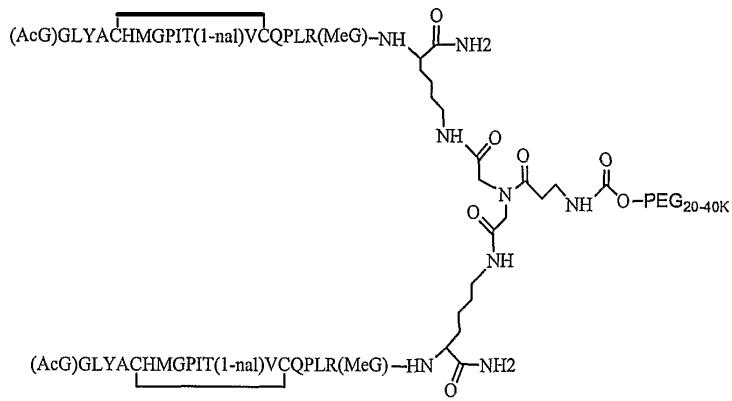
[0092] 동종이량체의 각 단량체의 아미노산 서열이 (AcG)GLYACHMGPIT(1-na1)VCQPLRK (SEQ ID NO: 1)이고, 링커의 N<sup>1</sup>이 카르바메이트 결합을 통하여 활성화 폴리에틸렌 글리콜 (PEG) 부분에 부착되는 경우, 본 발명의 신규의 웨티드 화합물은 다음과 같이 나타낼 수 있다.



[0093] [0094] 동종이량체의 각 단량체의 아미노산 서열이 (AcG)GLYACHMGPIT(1-na1)VCQPLRK (SEQ ID NO: 1)이고, 링커의 N<sup>1</sup>이 아미드 결합을 통하여 활성화 폴리에틸렌 글리콜 (PEG) 부분에 부착되는 경우, 본 발명의 신규의 웨티드 화합물은 다음과 같이 나타낼 수 있다.



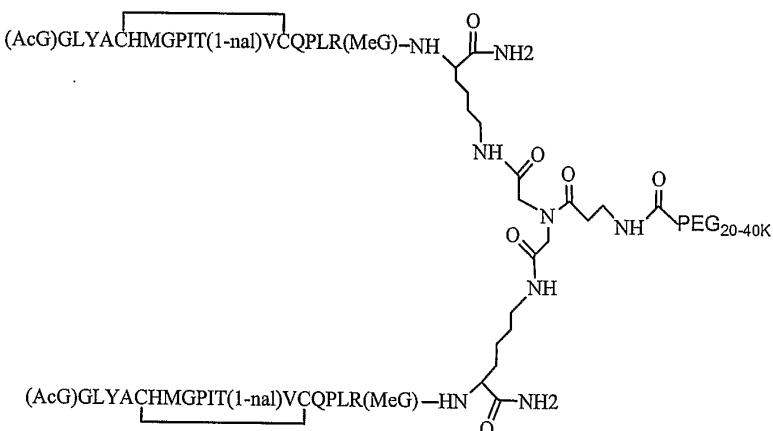
[0095] [0096] 동종이량체의 각 단량체의 아미노산 서열이 (AcG)GLYACHMGPIT(1-na1)VCQPLR(MeG)K (SEQ ID NO: 2)이고, 링커의 N<sup>1</sup>이 카르바메이트 결합을 통하여 활성화 폴리에틸렌 글리콜 (PEG) 부분에 부착되는 경우, 본 발명의 신규의 웨티드 화합물은 다음과 같이 나타낼 수 있다.



[0097]

[0098]

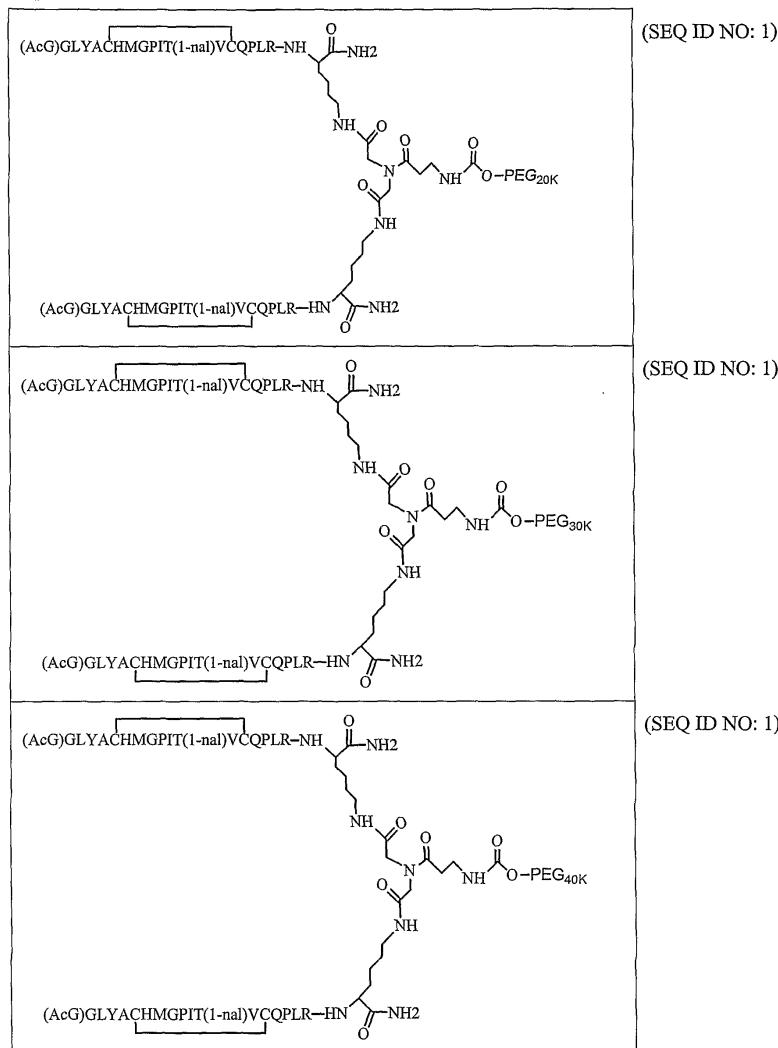
동종이량체의 각 단량체의 아미노산 서열이 (AcG)GLYACHMGPIT(1-nal)VCQPLR(MeG)K (SEQ ID NO: 2)이고, 링커의 N<sup>1</sup>이 아미드 결합을 통하여 활성화 폴리에틸렌 글리콜 (PEG) 부분에 부착되는 경우, 본 발명의 신규의 웹티드 화합물은 다음과 같이 나타낼 수 있다.



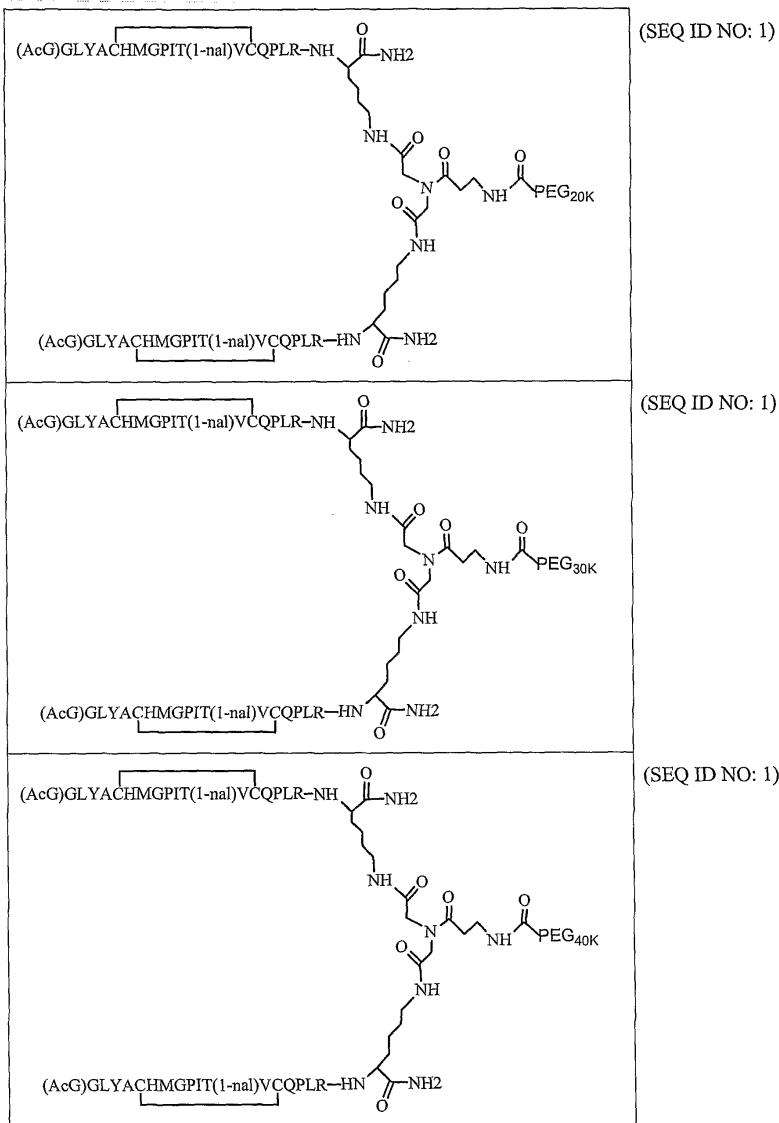
[0099]

[0100]

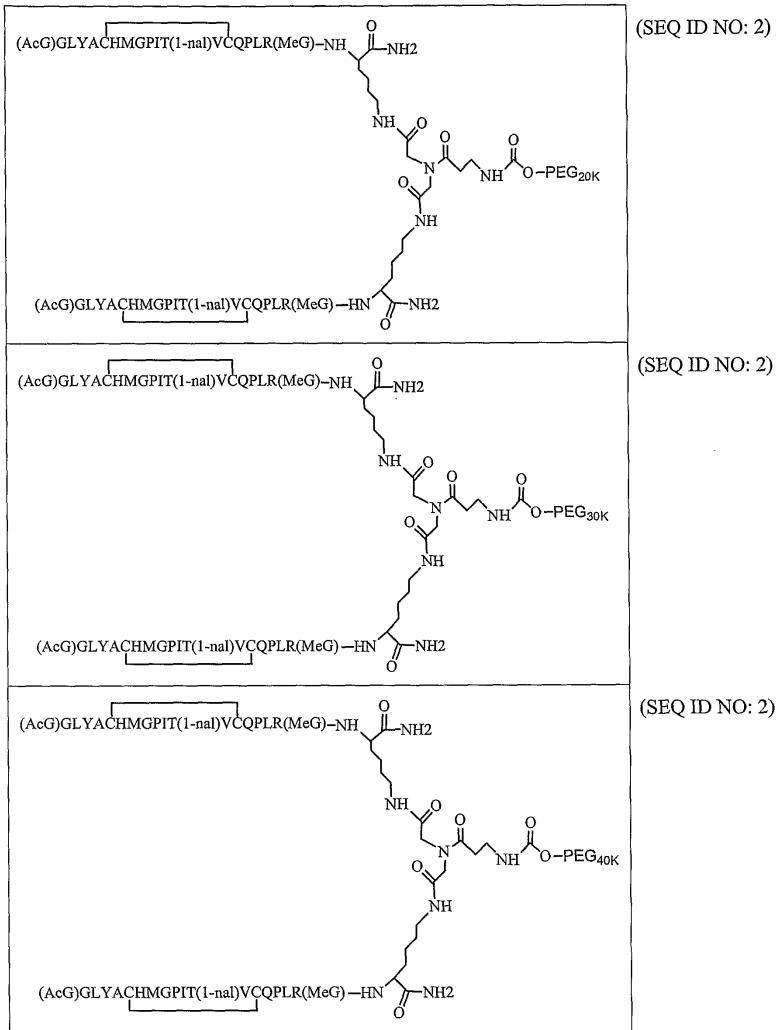
\*본 발명의 양호한 웹티드 이량체로는 다음과 같은 것들이 있지만 이에 한정되는 것은 아니다.



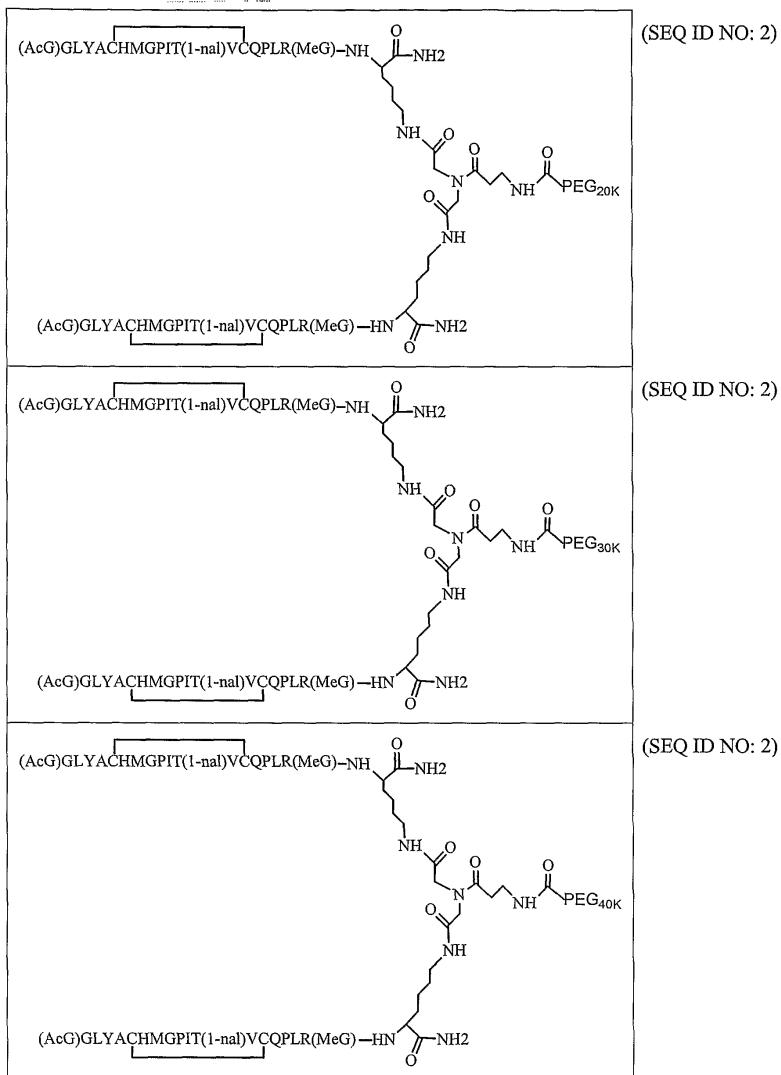
[0101]



[0102]



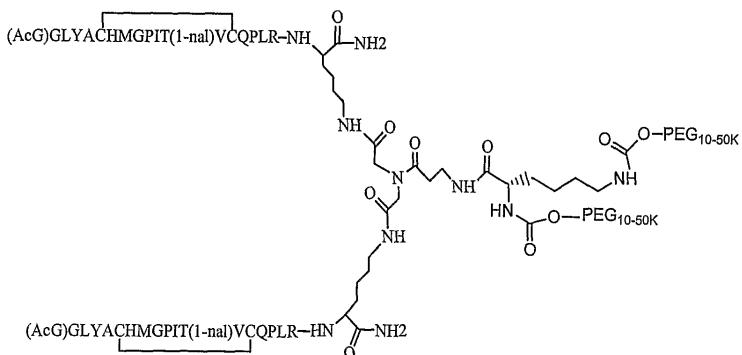
[0103]



[0104]

[0105]

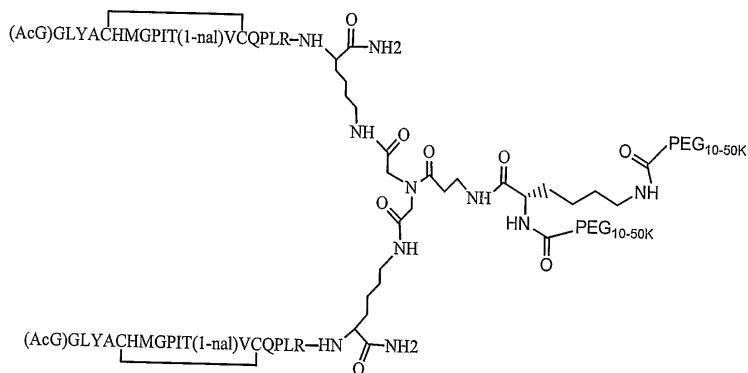
동종이량체의 각 단량체의 아미노산 서열이 (AcG)GLYACHMGPIT(1-na1)VCQPLRK (SEQ ID NO: 1)이고, 스페이서의 N<sup>1</sup> 및 N<sup>2</sup> 양쪽 모두가 카르바메이트 결합을 통하여 활성화 PEG 부분에 부착되는 경우, 본 발명의 신규의 웹티드화합물은 다음과 같이 나타낼 수 있다.



[0106]

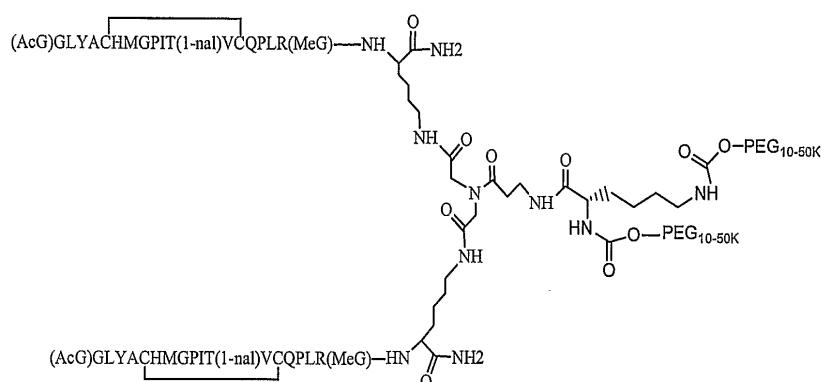
[0107]

동종이량체의 각 단량체의 아미노산 서열이 (AcG)GLYACHMGPIT(1-nal)VCQPLRK (SEQ ID NO: 1)이고, 스페이서의 N<sup>1</sup> 및 N<sup>2</sup> 양쪽 모두가 아미드 결합을 통하여 활성화 PEG 부분에 부착되는 경우, 본 발명의 신규의 펩티드 화합물을 다음과 같이 나타낼 수 있다.



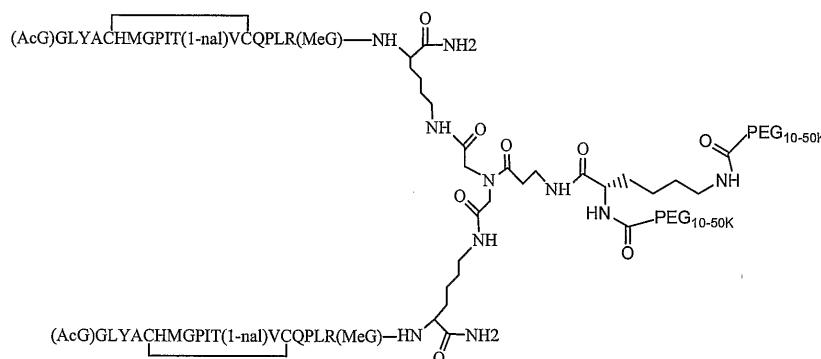
[0108]

동종이량체의 각 단량체의 아미노산 서열이 (AcG)GLYACHMGPIT(1-nal)VCQPLR(MeG)K (SEQ ID NO: 2)이고, 스페이서의 N<sup>1</sup> 및 N<sup>2</sup> 양쪽 모두가 카르바메이트 결합을 통하여 활성화 PEG 부분에 부착되는 경우, 본 발명의 신규의 펩티드 화합물은 다음과 같이 나타낼 수 있다.



[0110]

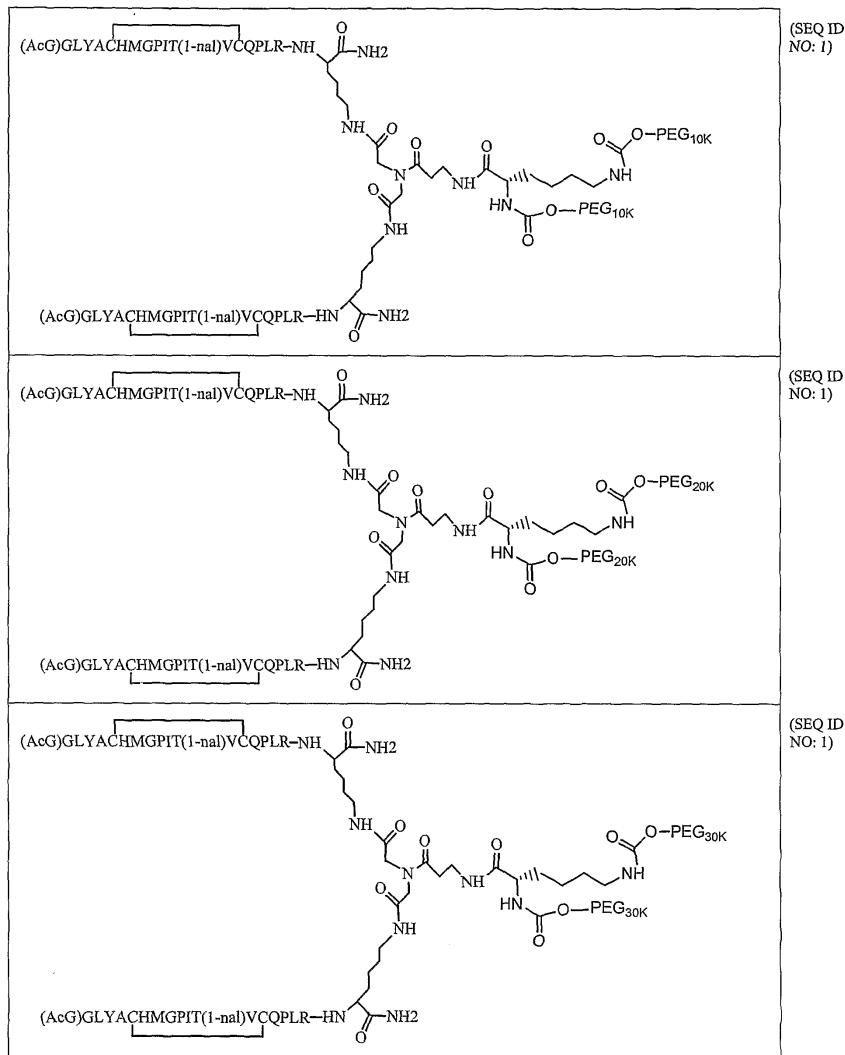
동종이량체의 각 단량체의 아미노산 서열이 (AcG)GLYACHMGPIT(1-nal)VCQPLR(MeG)K (SEQ ID NO: 2)이고, 스페이서의 N<sup>1</sup> 및 N<sup>2</sup> 양쪽 모두가 아미드 결합을 통하여 활성화 PEG 부분에 부착되는 경우, 본 발명의 신규의 펩티드 화합물은 다음과 같이 나타낼 수 있다.



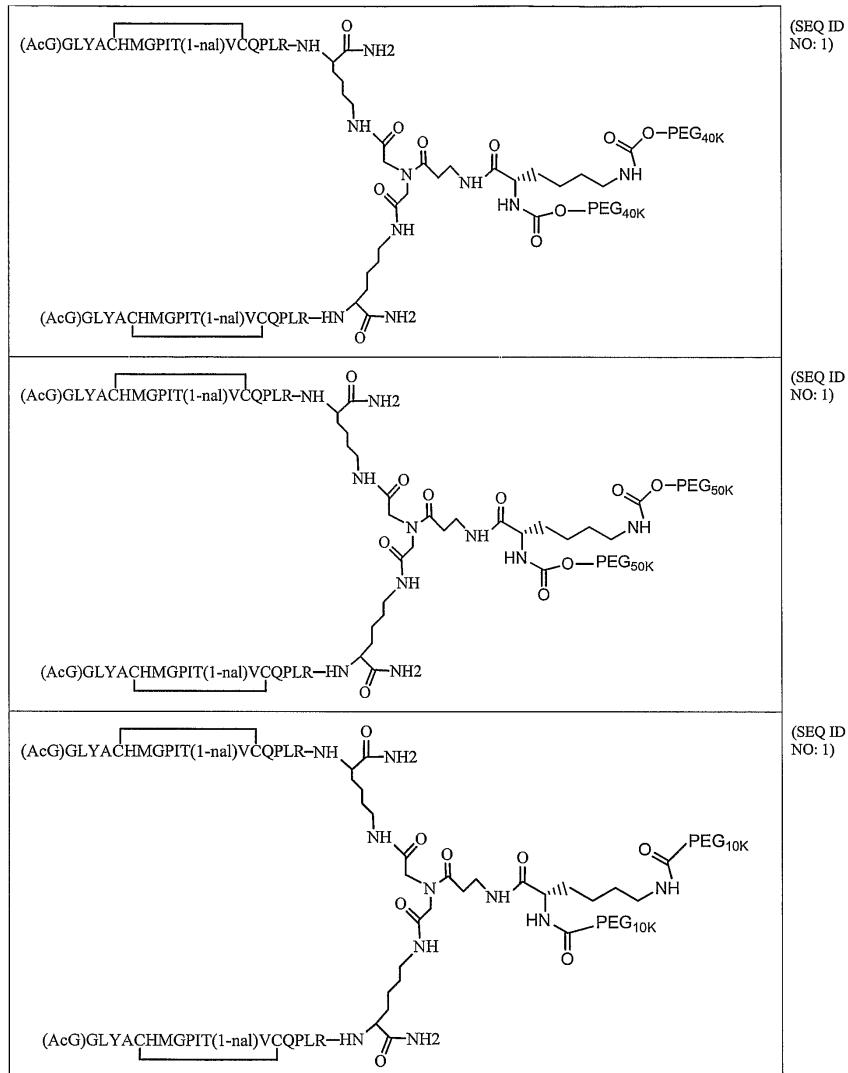
[0112]

[0113]

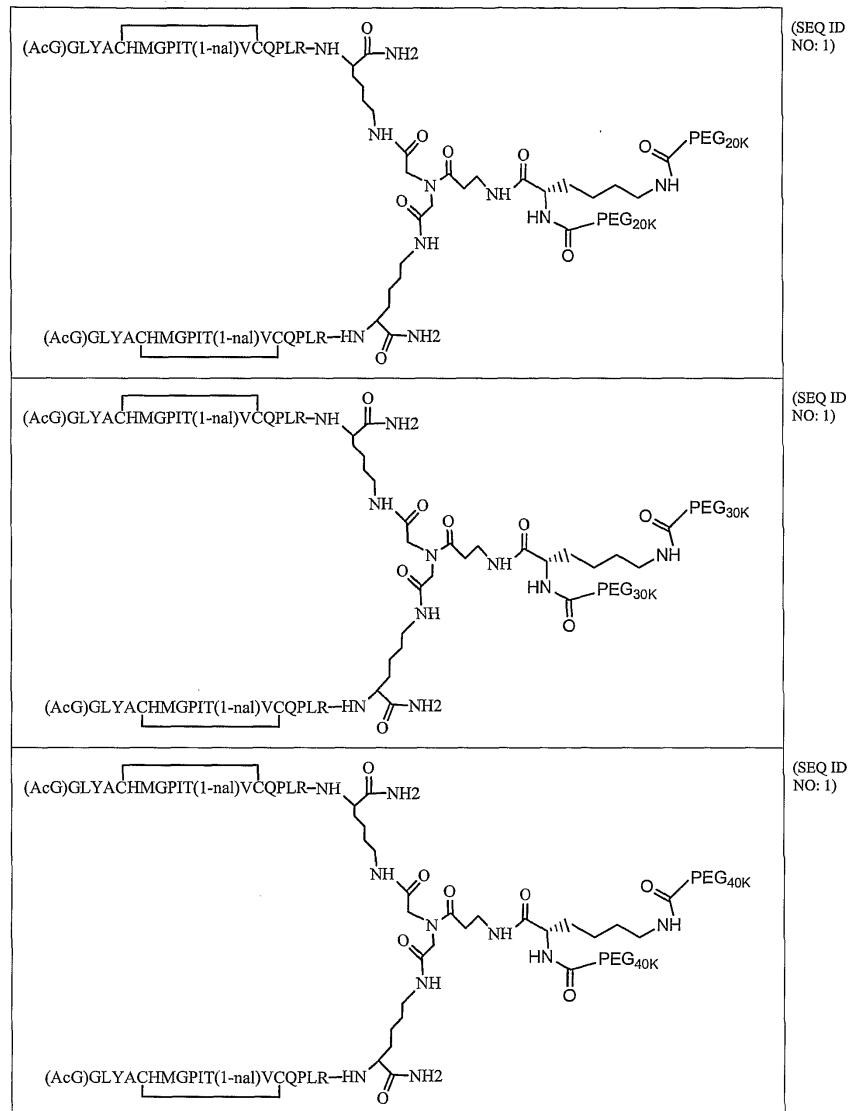
본 발명의 양호한 펩티드 이랑체로는 아래에 제시된 것들이 있지만, 이에 한정되는 것은 아니다.



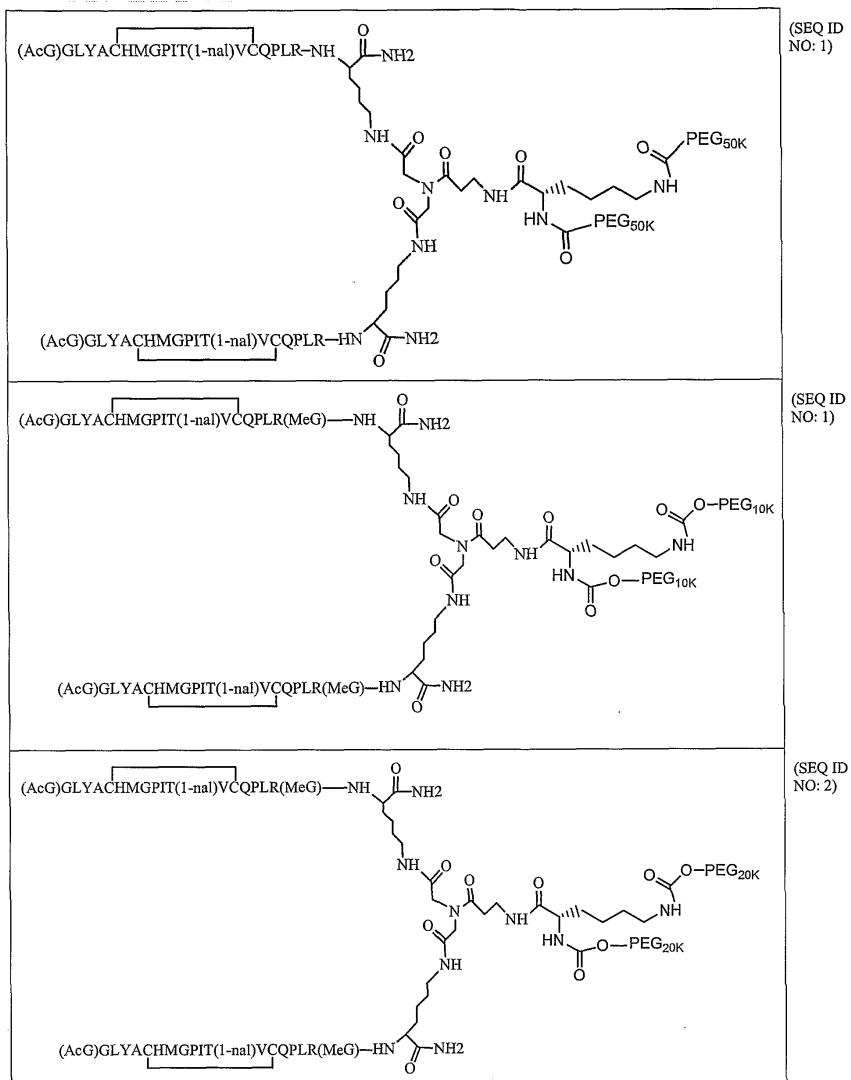
[0114]



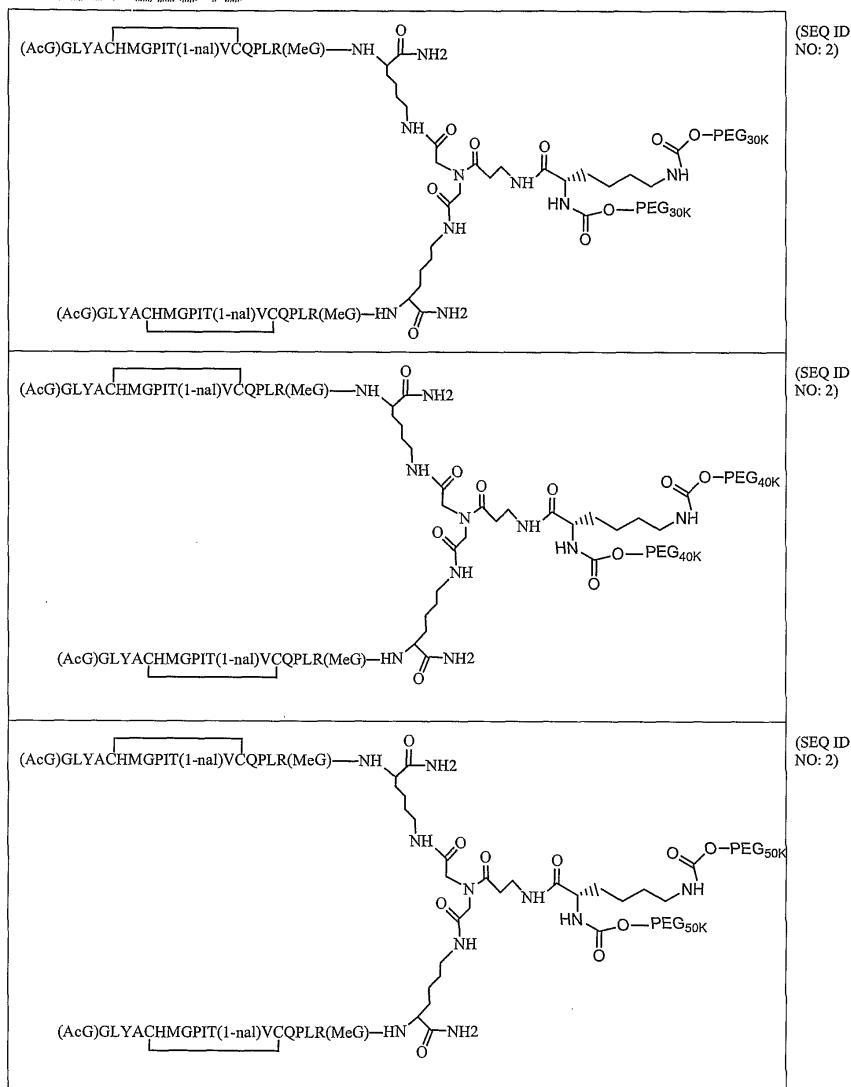
[0115]



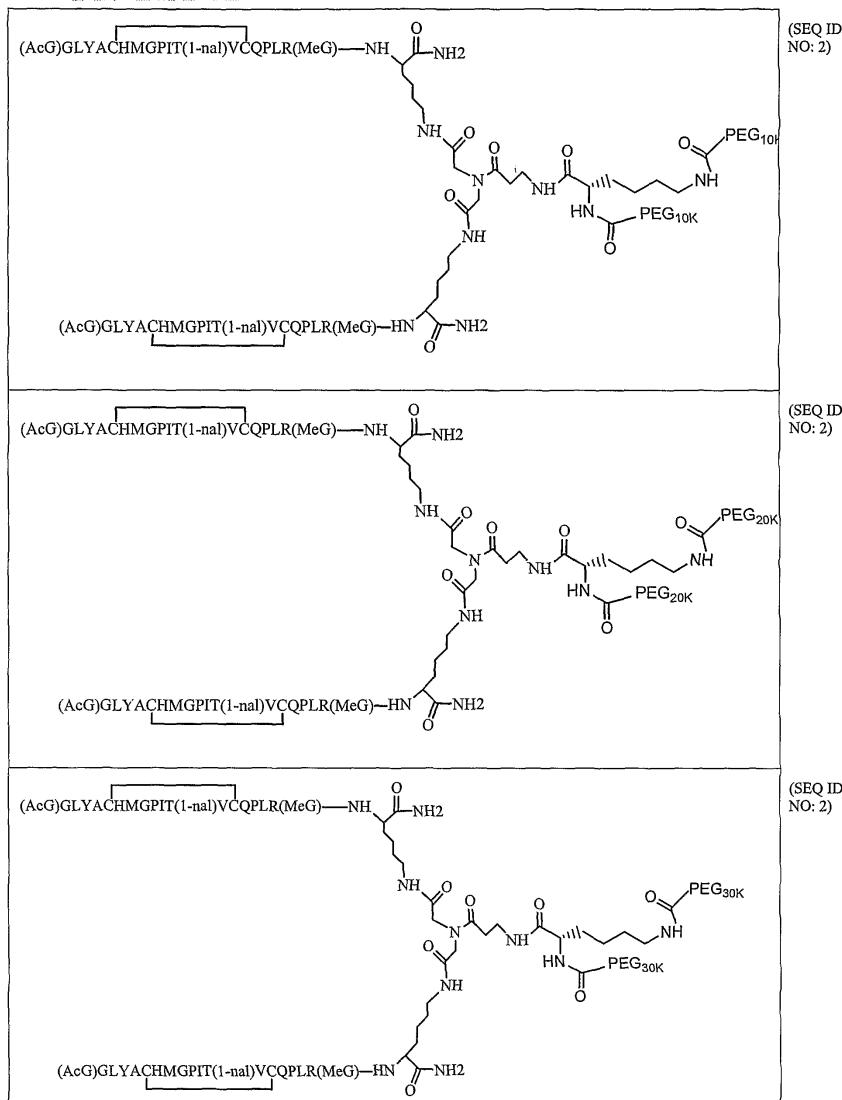
[0116]

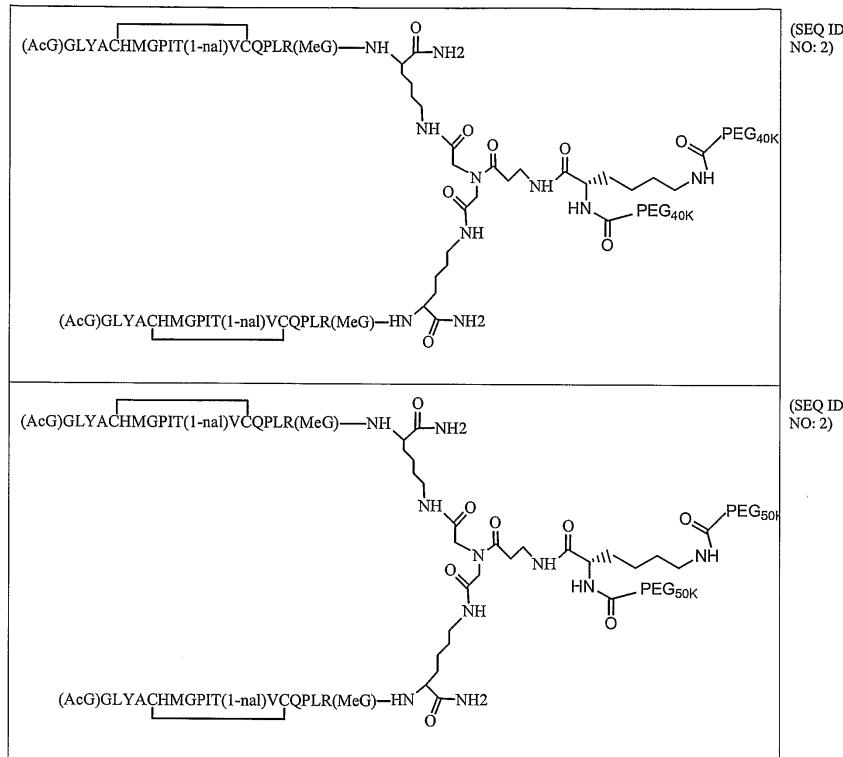


[0117]



[0118]

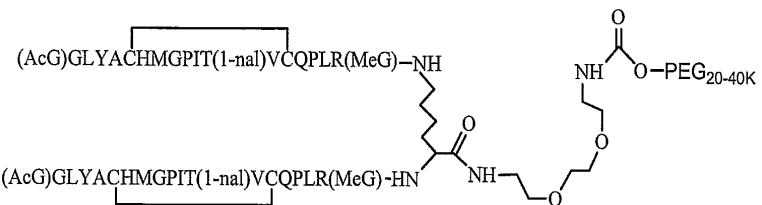




[0120]

[0121]

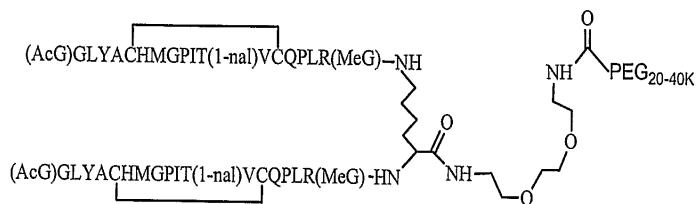
스페이서가 카르바메이트 결합을 통하여 활성화 폴리에틸렌 글리콜 (PEG) 부분에 부착되는 경우, 본 발명의 신규의 펩티드 화합물 (SEQ ID NO: 3)은 다음과 같이 나타낼 수 있다.



[0122]

[0123]

스페이서가 아미드 결합을 통하여 활성화 폴리에틸렌 글리콜 (PEG) 부분에 부착되는 경우, 본 발명의 신규의 웹 티드 화합물 (SEQ ID NO: 3)은 다음과 같이 나타낼 수 있다.



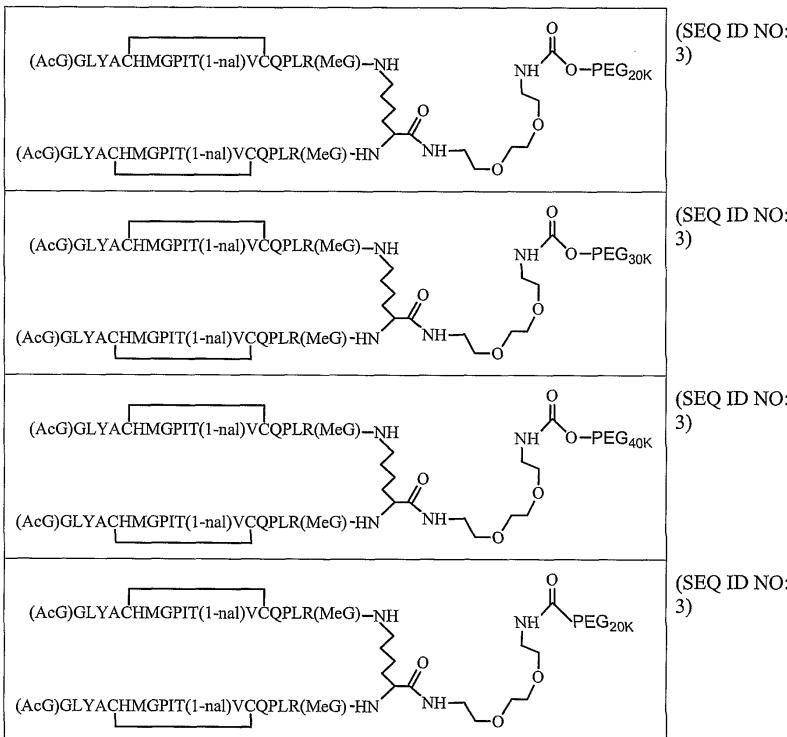
[0124]

[0125]

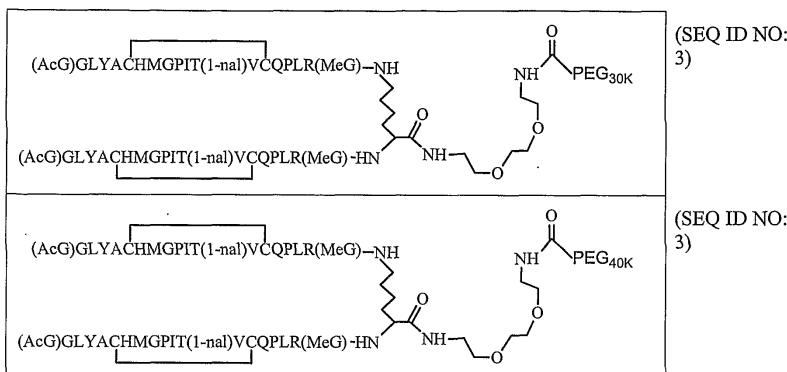
이러한 이량체성 구조는  $[Ac\text{-펩티드, 이황화}]_2\text{Lys-스페이서-PEG}_{20\text{-}40\text{K}}$ 로 표현할 수 있는데 이는 펩티드가 리신의  $\alpha$ - 및  $\epsilon$ -아미노기 양쪽에 결합되어 있고, 각각의 펩티드는 분자내 이황화 고리를 함유하며, 스페이서 분자는 리신의 C-말단과 PEG 부분 사이에서 공유 결합을 형성시키는 것인 N-말단 아세틸화 펩티드를 나타내고, 상기 PEG는 분자량이 약 20,000 내지 약 40,000 달톤인 것을 나타낸다.

[0126]

본 발명의 양호한 펩티드 이랑체로는 아래의 것들이 있지만, 이에 한정되는 것은 아니다.



[0127]



[0128]

[0129]

20개의 일반 아미노산의 입체이성질체(stereoisomers) (예컨대, D-아미노산), 비천연(unnatural) 아미노산, 예컨대 a,a-이치환 아미노산(a,a-disubstituted amino acids), N-알킬 아미노산, 락트산(lactic acid) 및 기타의 비통상적인 아미노산이 또한 본 발명의 화합물의 적합한 성분이 될 수 있다. 비통상적인 아미노산의 예로는  $\beta$ -알라닌, 3-페리딜알라닌, 4-히드록시프롤린, 0-포스포세린, N-메틸글리신, N-아세틸세린, N-포르밀메티오닌, 3-메틸히스티딘, 5-히드록시리신, 노르-루신 및 기타의 유사한 아미노산 및 이미노산이 있지만 이에 한정되지 않는다. 아미노 말단의 변형, 카르복시 말단의 변형, 자연 발생하는 유전학적으로 암호화된 아미노산 잔기 중 1개 이상을 비통상적인 아미노산으로 치환하는 것, 아미노산 잔기 중 1개 또는 그 이상의 측쇄를 변형시키는 것, 펩티드 인산화 등을 포함하는 기타의 변형이 또한 가능하다.

[0130]

본 발명의 펩티드 서열은 단독으로 또는 펩티드 사슬의 N-말단 및/또는 C-말단 확장부(extensions)와 함께 존재할 수 있다. 그러한 확장부는 필요에 따라 비자연적으로 발생하는 서열과 함께 또는 실질적으로 비자연적으로 발생하는 서열이 없는 자연적으로 암호화된 펩티드 서열일 수 있고; 그 확장은 당해 기술 분야의 숙련자에 의하여 목적하는 바에 따라 임의의 첨가, 결실, 점돌연변이 또는 기타의 서열 변형 또는 조합을 포함할 수 있다. 비제한적인 예로서, 자연적으로 발생하는 서열은 전장 또는 부분 길이일 수 있고, 아미노산 치환을 포함하여 탄수화물, PEG, 기타의 중합체의 결합을 위한 자리를 제공하거나 또는 측쇄 결합을 통하여 이와 유사한 것을 제공할 수 있다. 한가지 변형에서는, 아미노산 치환은 인간 면역 시스템에 적합하도록 만들기 위한 서열의 인간화(humanization)을 가져온다. 비면역글로불린 스페이서 서열과 함께 또는 비면역글로불린 스페이서 서열 없이 본 발명의 EPO-R 활성화 서열에 접하거나 또는 매우 근접한 면역글로불린 서열을 포함하는 모든 종류의 융합 단

백질이 제공된다. 한가지 종류의 구체적인 예는 중쇄 및/또는 경쇄의 가변(V) 부위 대신에 EPO-R 활성화 서열을 가지는 면역글로불린 체인이다.

**[0131] 본 발명의 펩티드 화합물의 제조:**

**[0132] 펩티드 합성**

본 발명의 펩티드는 당해 기술 분야에 공지의 전형적인 방법에 의하여 제조될 수 있다. 이를 표준 방법으로는 단독 고상 합성법(exclusive solid phase synthesis), 부분적 고상 합성법(partial solid phase synthesis methods), 단편 축합(fragment condensation), 전형적인 용액 합성법 및 재조합 DNA 기술 [예컨대, Merrifield J. Am. Chem. Soc. 1963 85:2149 참조]이 있다.

한 가지 실시 상태에 있어서, 펩티드 이량체의 펩티드 단량체는 독립적으로 합성되고, 합성에 이어 이량체화된다.

또 다른 실시 상태에 있어서, 이량체의 펩티드 단량체는 이들의 C-말단을 통하여 펩티드 합성을 위한 개시 자리로서 제공될 수 있는 두 개의 작용기와, 또 다른 분자 부분 (예컨대, 고형 지지체의 표면에 존재할 수 있는 것)에 결합할 수 있는 제3의 작용기 (예컨대, 카르복실기 또는 아미노기)를 가지는 분지형 3차 아미드 링커  $L_K$  부분에 의하여 결합된다. 이러한 경우, 고상 합성 기술의 변형으로서 2개의 펩티드 단량체는 링커  $L_K$  부분의 2개의 반응성 질소기 위에서 직접적으로 합성될 수 있다. 이러한 합성은 순차적이거나 또는 동시적일 수 있다.

또 다른 실시 상태에 있어서, 상기 두 개의 펩티드 단량체는 고상 합성 기술의 변형으로서 링커  $L_K$  부분의 2개의 반응성 질소기 위에서 직접적으로 합성될 수 있다. 이러한 합성은 순차적이거나 또는 동시적일 수 있다. 이러한 실시 상태에 있어서, 펩티드 합성을 위한 개시 자리로서 제공될 수 있는 2개의 아미노기와 또 다른 분자 부분 (예컨대, 고형 지지체의 표면에 존재할 수 있는 것)에 결합할 수 있는 제3의 작용기 (예컨대, 리신의 카르복실기; 또는 리신 아미드의 아미노기, 카르복실기가 아미드 부분  $-CONH_2$ 로 전환된 리신 잔기)를 함유하는 리신 링커 ( $L_K$ ) 부분이 사용된다.

링커 위에서 이량체의 펩티드 사슬의 순차적인 합성이 수행되는 경우, 링커 분자 위의 2개의 아민 작용기는 2개의 상이한 직각으로(orthogonally) 제거될 수 있는 아민 보호기(amine protecting groups)로 보호된다. 보호된 링커는 링커의 제3의 작용기를 통하여 고체 지지체에 결합된다. 제1 아민 보호기가 제거되고, 탈보호된 제1 아민 부분 위에서 이량체의 제1 펩티드가 합성된다. 그 후, 제2 아민 보호기가 제거되고, 이량체의 제2 펩티드가 탈보호된 제2 아민 부분 위에서 합성된다. 예를 들어, 링커의 제1 아미노 부분이 Alloc으로 보호되고, 제2 아미노 부분이 Fmoc으로 보호될 수 있다. 이 경우, Fmoc기 (Alloc기는 아님)가 약 염기 [예컨대, 디메틸포름아미드 (DMF) 중의 20% 피페리딘]로의 처리에 의하여 제거될 수 있고, 제1 펩티드 사슬이 합성될 수 있다. 그 이후, Alloc기가 적합한 시약 [예컨대, Pd(PPh<sub>3</sub>)/4-메틸 모르폴린 및 클로로포름]으로 제거될 수 있고, 제2 펩티드 사슬이 합성될 수 있다. 시스테인을 위한 다양한 티올-보호기가 이황화 결합의 형성을 조절하기 위하여 사용되는 경우 (아래에서 설명함), 이러한 기술은 이량체의 펩티드 사슬의 최종 아미노산 서열이 동일한 경우에도 사용되어야 함을 주의하여야 한다.

링커 위로 이량체의 펩티드 사슬의 동시적 합성을 수행하는 경우, 그 링커 분자의 2개의 아민 작용기는 동일한 제거 가능한 아민 보호기로 보호된다. 상기 보호된 링커는 링커의 제3 작용기를 통하여 고체 지지체에 결합된다. 이 경우, 링커 분자의 2개의 보호된 작용기는 동시에 탈보호되고, 2개의 펩티드 사슬은 탈보호된 아민들 위에서 동시에 합성된다. 이러한 기술을 사용하는 경우, 이량체의 펩티드 사슬의 서열은 동일할 것이고, 시스테인 잔기들에 대한 티올 보호기는 모두 동일하다는 점을 유의해야 한다.

펩티드 합성의 바람직한 방법은 고상 합성법(solid phase synthesis)이다. 고상 펩티드 합성법은 당해 기술 분야에 잘 공지되어 있다 [예컨대, Stewart Solid Phase Peptide Syntheses (Freeman and Co.: San Francisco) 1969; 2002/2003 General Catalog from Novabiochem Corp, San Diego, USA; Goodman Synthesis of Peptides and Peptidomimetics (Houben-Weyl, Stuttgart) 2002 참조]. 고상 합성법에 있어서, 합성은  $\alpha$ -아미노 보호 수지 ( $\alpha$ -amino protected resin)를 사용하여 펩티드의 C-말단 끝에서부터 일반적으로 수행된다. 적절한 출발 물질은, 예컨대 필요한  $\alpha$ -아미노산을 클로로메틸화 수지, 히드록시메틸 수지, 폴리스티렌 수지 또는 벤즈히드릴아민 수지 등에 부착시키는 것에 의하여 제조될 수 있다. 그러한 클로로메틸화 수지 중 하나는 바이오 라드 연구소 (Bio Rad Laboratories; Richmond, CA)에 의하여 BIO-BEADS SX-1 이라는 상품명으로 시판되는 것이다. 히드

록시메틸 수지의 제조법은 문헌 [Bodonszky, et al. (1966) Chem. Ind. London 38:1597]에 기재된 바 있다. 벤즈히드릴아민 (BHA) 수지는 문헌 [Pietta and Marshall (1970) Chem. Commun. 650]에 기재된 바 있고, 그 염산 염 형태가 Beckman Instruments, Inc. (Palo Alto, CA)에서 시판 중에 있다. 예를 들어,  $\alpha$ -아미노 보호된 아미노산 ( $\alpha$ -amino protected amino acid)은 문헌 [Gisin (1973) Helv. Chim. Acta 56:1467]에 기재되어 있는 방법에 따라 중탄산염세슘(cesium bicarbonate) 촉매의 도움으로 클로로메틸화 수지에 결합될 수 있다.

[0140] 최초의 커플링 후에,  $\alpha$ -아미노 보호기를, 예컨대 실온에서 유기 용매 중의 트리플루오로아세트산 (TFA) 또는 염산 (HCl) 용액을 사용하여 제거한다. 그 이후,  $\alpha$ -아미노 보호 아미노산은 신장하고 있는 지지체 결합 펩티드 사슬에 연속적으로 결합된다. 아실형 보호기 (예컨대, 포르밀, 트리플루오로아세틸, 아세틸), 방향성 우레탄형 보호기 [예컨대, 벤질옥시카르보닐 (Cbz) 및 치환된 Cbz], 지방족 우레탄 보호기 [예컨대, t-부틸옥시카르보닐 (Boc), 이소프로필옥시카르보닐, 시클로헥실옥시카르보닐] 및 알킬형 보호기 (예컨대, 벤질, 트리페닐메틸), 플루오레닐메틸 옥시카르보닐 (Fmoc), 알릴옥시카르보닐 (Alloc) 및 1-(4,4-디메틸-2,6-디옥소시클로헥-1-실리덴)에틸 (dioxocyclohex-1-ylidene)ethyl; Dde)를 비롯한  $\alpha$ -아미노 보호기는 펩티드의 단계적 합성의 기술 분야에 있어서 유용한 것으로 알려져 있다.

[0141] 측쇄 보호기 (일반적으로 에테르, 에스테르, 트리틸, PMC 등)는 커플링 동안에 그대로 남아있고, 아미노-말단 보호기가 탈보호하는 동안 또는 커플링 동안 분리되지 않는다. 측쇄 보호기는 최종 펩티드의 합성의 완료까지 및 목적 펩티드를 변형시키지 않는 반응 조건하에서 제거될 수 있어야만 한다. Tyr에 대한 측쇄 보호기의 예로는 테트라히드로페라닐, tert-부틸, 트리틸, 벤질, Cbz, Z-Br-Cbz 및 2,5-디클로로벤질이 있다. Asp에 대한 측쇄 보호기로는 벤질, 2,6-디클로로벤질, 메틸, 에틸 및 시클로헥실이 있다. Thr 및 Ser에 대한 측쇄 보호기로는 아세틸, 벤조일, 트리틸, 테트라히드로페라닐, 벤질, 2,6-디클로로벤질 및 Cbz가 있다. Arg에 대한 측쇄 보호기로는 니트로, 토실 (Tos), Cbz, 아다만틸옥시카르보닐, 메시토일술포닐 (Mts), 2,2,4,6,7-펜타메틸디히드로벤조퓨란-5-술포닐 (Pbf), 4-메톡시-2,3,6-트리메틸-벤젠술포닐 (Mtr) 또는 Boc가 있다. Lys에 대한 측쇄 보호기로는 Cbz, 2-클로로벤질옥시카르보닐 (2-Cl-Cbz), 2-브로모벤질옥시카르보닐 (2-Br-Cbz), Tos 또는 Boc가 있다.

[0142]  $\alpha$ -아미노 보호기의 제거 후에, 남아있는 보호된 아미노산은 목적하는 순서로 단계적으로 커플링된다. 각각의 보호된 아미노산을, 예컨대 메틸렌 클로라이드 ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ), N-메틸 피롤리돈, 디메틸 포름아미드 (DMF) 또는 이들의 혼합물 중의, 예컨대 2-(1H-벤조트리아졸-1-일)-1,1,3,3-테트라메틸우로니움 (HBTU) 또는 디시클로헥실카르보이미드 (DCC) 용액을 비롯한 적절한 카르복시기 활성제를 약 3배 과량으로 사용하여 일반적으로 반응시킨다.

[0143] 목적하는 아미노산 서열을 완성한 후, 그 목적하는 펩티드를 트리플루오로아세트산 (TFA) 또는 불화수소 (HF) 등의 시약으로 처리하여 수지 지지체로부터 분리시킨다. 상기 시약은 펩티드를 수지로부터 분리시킬 뿐만 아니라 모든 잔류 측쇄 보호기도 분리시킨다. 클로로메틸화 수지가 사용되는 경우, 불화수소 처리는 유리 펩티드산 (free peptide acids)을 형성하는 결과를 가져온다. 벤즈히드릴아민 수지가 사용되는 경우, 불화수소 처리는 유리 펩티드 아미드를 직접적으로 생성한다. 또 다른 한편으로는, 클로로메틸화 수지가 사용되는 경우, 펩티드 수지를 암모니아로 처리하면 측쇄 보호된 펩티드가 분리되어 목적하는 측쇄 보호된 아미드를 생성시킬 수 있고, 알킬아민으로 처리하면 측쇄 보호된 알킬아미드 또는 디알킬아미드를 생성시킬 수 있다. 그 후, 측쇄 보호는 불화수소로의 처리에 의하여 통상적인 방식으로 제거되어 유리 아미드, 알킬아미드 또는 디알킬아미드를 생성한다.

[0144] 본 발명의 에스테르의 제조에 있어서, 펩티드 산을 제조하는데 사용되는 수지가 사용되고, 측쇄 보호된 펩티드는 염기 또는 적절한 알콜 (예컨대, 메탄올)로 절단한다. 그 후, 측쇄 보호기는 불화수소로의 처리에 의하여 통상적인 방식으로 제거되어 목적하는 에스테르를 얻는다.

[0145] 이들 방법은 본 발명의 화합물 중의 1개, 2개 또는 그 이상의 자리가 20개의 천연적으로 존재하는 유전학적으로 암호화된 아미노산 이외의 아미노산으로 치환되는 펩티드를 합성하기 위하여 또한 사용될 수 있다. 본 발명의 펩티드 내로 치환될 수 있는 합성 아미노산으로는 N-메틸, L-히드록시프로필, L-3,4-디히드록시페닐알라닐, 예컨대 L- $\delta$ -히드록실리실(L- $\delta$ -hydroxylysyl) 및 D- $\delta$ -메틸알라닐 등의  $\delta$ -아미노산, L- $\alpha$ -메틸알라닐,  $\beta$ -아미노산 및 이소퀴놀릴이 있지만 이에 한정되지 않는다. D-아미노산 및 천연적으로 만들어지지 않는 합성 아미노산이 또한 본 발명의 펩티드 내로 포함될 수 있다.

[0146] 펩티드 변형(Peptide modifications)

[0147] 본 발명의 펩티드 화합물의 아미노 말단 및/또는 카르복시 말단을 변형시켜 본 발명의 다른 화합물을 또한 생성 시킬 수 있다. 예를 들어, 아미노 말단은 아세트산 또는 그의 할로겐화 유도체 (예컨대,  $\alpha$ -클로로아세트산,  $\alpha$ -

-브로모아세트산 또는  $\alpha$ -요오드아세트산)로 아세틸화될 수 있다.

[0148]

천연적으로 존재하는 20개의 유전적으로 암호화된 아미노산 (또는 입체이성질체 D 아미노산)의 측쇄를, 예컨대 알킬, 저급(lower) 알킬, 4, 5, 6, 또는 7환 시클로알킬, 아미드, 아미드 저급 알킬, 아미드 디(저급 알킬), 저급 알콕시, 히드록시, 카르복시 및 이들의 저급 에스테르 유도체와, 4, 5, 6, 또는 7환 헤테로시클릭과 같은 다른 측쇄로 치환시킬 수 있다. 특히, 프롤린 잔기의 고리 크기가 5환에서 4, 6 또는 7환으로 변화된 프롤린 유사체가 사용될 수 있다. 고리기(Cyclic groups)는 포화이거나 불포화일 수 있고, 불포화인 경우 방향족 또는 비방향족일 수 있다. 헤테로시클릭기는 종기로는 1개 또는 그 이상의 질소, 산소 및/또는 황 헤테로원자를 함유한다. 이러한 기의 예로는 퓨라자닐, 퓨릴, 이미다졸리디닐, 이미다졸릴, 이미다졸리닐, 이소티아졸릴, 이소옥사졸릴, 모르폴리닐 (예컨대, 모르폴리노), 옥사졸릴, 피페라지닐 (예컨대, 1-피페라지닐), 피페리딜 (예컨대, 1-피페리딜, 피페리디노), 피라닐, 피라지닐, 피라졸리디닐, 피라졸리닐, 피라졸릴, 피리다지닐, 피리딜, 피리미디닐, 피롤리디닐 (예컨대, 1-피롤리디닐), 피롤리닐, 피롤릴, 티아디아졸릴, 티아졸릴, 티에닐, 티오모르폴리닐 (예컨대, 티오모르폴리노) 및 트리아졸릴을 들 수 있다. 이들 헤테로시클릭기는 치환되거나 또는 치환되지 않을 수 있다. 치환되는 경우에 그 치환기는 알킬, 알콕시, 할로겐, 산소 또는 치환된 또는 치환되지 않은 페닐일 수 있다.

[0149]

포스포릴화 및 기타의 방법 [예컨대, Hruby, *et al.* (1990) *Biochem J.* 268:249-262에 기재되어 있는 방법]에 의하여 웨티드를 또한 용이하게 변화시킬 수 있다.

[0150]

본 발명의 웨티드 화합물은 또한 생물학적 활성이 유사한 비웨티드성 화합물(non-peptidic compounds)을 위한 구조적 모델로서 제공된다. 당해 기술 분야의 숙련자는 앞선 웨티드 화합물(the lead peptide compound)과 목적하는 생물학적 활성이 동일한 또는 유사하지만, 용해성, 안정성 및 민감성 가수분해 및 단백질분해의 측면에서 그것보다 활성이 더 우수한 화합물을 만드는데 다양한 기술을 이용할 수 있다는 것을 인식하고 있을 것이다 [Morgan and Gainor (1989) *Ann. Rep. Med. Chem.* 24:243-252 참조]. 이들 기술은 웨티드 골격을 포스포네이트, 아미레이트, 카르바메이트, 출폰아미드, 2차 아민 및 N-메틸아미노산으로 이루어지는 골격으로 치환시키는 것을 포함한다.

[0151]

이황화 결합의 형성

[0152]

본 발명의 화합물은 2개의 분자내 이황화 결합을 함유한다. 그러한 이황화 결합은 각 웨티드 단량체의 시스테인 잔기의 산화에 의하여 형성될 수 있다.

[0153]

한가지 실시 상태에 있어서, 시스테인 결합의 형성은 목적하는 이성질체(isomer)의 형성을 최적화하는데 효과적인 농도 및 종류의 산화제를 선택하는 것에 의하여 조절된다. 예를 들어, 산화제가 DMSO 또는 요오드 ( $I_2$ )인 경우, 분자내 이황화 결합을 형성 (각각의 웨티드 사슬에서 하나)을 위한 웨티드 이량체의 산화가 (분자내 이황화 결합의 형성보다) 우선적으로 이루어진다.

[0154]

다른 실시 상태에 있어서, 시스테인 결합의 형성은 웨티드 합성 도중에 티올 보호기의 선택적인 사용에 의하여 조절된다. 예를 들어, 2개의 분자내 이황화 결합을 가진 이량체를 소망하는 경우, 제1 단량체 웨티드 사슬은 제1 티올 보호기 [예컨대, 트리틸(Trt), 알릴옥시카르보닐 (Alloc) 및 1-(4,4-디메틸-2,6-디옥소시클로헥-1-실리덴)에틸 (Dde) 등]로 보호된 코어 (core) 서열의 2개의 시스테인 잔기를 사용하여 합성되고, 제2 단량체 웨티드 사슬은 제1 티올 보호기와 상이한 제2 티올 보호기 [예컨대, 아세트아미도메틸 (Acm), t-부틸 (tBu) 등]로 보호된 코어 (core) 서열의 2개의 시스테인 잔기를 사용하여 합성된다. 그 이후, 제1 티올 보호기를 제거하여 제1 단량체의 이황화 고리화(bisulfide cyclization)를 수행하고, 제2 티올 보호기를 제거하여 제2 단량체의 이황화 고리화를 수행한다.

[0155]

본 발명의 다른 실시 상태에 있어서는 황(sulfur) 중의 하나가  $CH_2$ 기 또는 다른 황의 이소테레(isotere)에 의하여 치환된 이를 이황화 유도체의 유사체를 제공한다. 이들 유사체는 본 발명의 화합물로부터 제조될 수 있는데, 여기서 각 웨티드 단량체는 당해 기술 분야에 공지의 방법 [예컨대, Barker, *et al.* (1992) *J. Med. Chem.* 35:2040-2048 and Or, *et al.* (1991) *J. Org. Chem.* 56:3146-3149 참조]을 사용한 분자내 또는 분자간 이동을 통하여, 제2 시스테인 잔기 대신에 C 한 개 이상 또는 호모시스테인 잔기 및  $\alpha$ -아미노- $\gamma$ -부티르산을 함유한다. 당해 기술 분야의 숙련자는  $\alpha$ -아미노- $\gamma$ -부티르산 및 호모시스테인의 기타의 동족체(homologs)를 사용하여 이러한 이동이 또한 일어날 수 있다는 것을 용이하게 인식할 수 있을 것이다.

[0156]

전술한 고리화 전략 이외에, 기타의 비(非)이황화 웨티드 고리화 전략이 사용될 수 있다. 그러한 또 다른 고리

화 전략으로는 예를 들어 아미드-고리화 전략 및 티오-에테르 결합의 형성과 관련된 전략을 포함한다. 따라서, 본 발명의 화합물은 분자내 아미드 결합 또는 분자내 티오-에테르 결합을 가진 고리화된 형태로 존재할 수 있다.

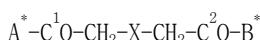
[0157] 예를 들어, 코어 서열의 제1 시스테인이 리신으로 치환되고, 제2 시스테인이 글루탐산으로 치환된 웨티드가 합성될 수 있고, 그 후 이를 두 잔기들의 측쇄 사이에서 아미드 결합을 통하여 고리형 단량체가 형성될 수 있다. 또 다른 것으로, 코어 서열의 제1 시스테인이 리신 (또는 세린)으로 치환된 웨티드가 합성될 수 있고, 그 후 리신 (또는 세린) 잔기의 측쇄 및 코어 서열의 제2 시스테인 잔기 사이에서 티오-에테르 결합을 통하여 고리형 단량체가 형성될 수 있다. 이황화 고리화 전략 이외에, 그러한 아미드 고리화 전략 및 티오-에테르 고리화 전략 모두가 본 발명의 화합물의 고리화에 용이하게 사용될 수 있다. 또 다른 것으로서, 웨티드의 아미노-말단이  $\alpha$ -치환된 아세트산으로 캡핑될 수 있는데, 여기서 상기  $\alpha$ -치환체는  $\alpha$ -할로아세트산(예컨대,  $\alpha$ -클로로아세트산,  $\alpha$ -브로모아세트산 또는  $\alpha$ -요오도아세트산)과 같은 이탈기이다.

[0158] 분자형 3차 아미드 링커의 첨가

[0159] 웨티드 단량체는 분자형 아미드 링커 부분에 의하여 이량체화 될 수 있다. 한가지 실시 상태에 있어서, 상기 링커는 웨티드 합성 동안에 웨티드 내로 포함된다. 예를 들어, 링커  $L_k$  부분이 웨티드 합성을 위한 개시 자리로서 제공될 수 있는 2개의 작용기와, 1개 또는 그 이상의 다른 분자 부분에 결합하는 것이 가능한 1개 또는 그 이상의 다른 작용기 (예컨대, 카르복실기 또는 아미노기)를 함유하는 경우, 상기 링커는 고체 지지체에 접합될 수 있다. 그 후, 변화된 고상 합성 기술로 2개의 웨티드 단량체는 링커  $L_k$  부분의 2개의 반응성 질소기 위로 직접적으로 합성될 수 있다.

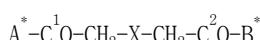
[0160] 또 다른 실시 상태에 있어서, 링커는 웨티드 합성 후에 웨티드 이량체의 2개의 웨티드 단량체에 접합될 수 있다. 그러한 접합은 당해 기술 분야에서 잘 확립된 방법에 의하여 수행될 수 있다. 한가지 실시 상태에 있어서, 링커는 합성된 웨티드 단량체의 표적 작용기에 부착하는데 적합한 2개의 작용기를 함유한다. 예를 들어, 미리 활성화되거나 또는 적절한 커플링 시약이 존재하는 경우에 2개의 카르복실기를 함유하는 링커는 2개의 웨티드 단량체 각각의 표적 리신 측쇄 아민기와 반응할 수 있다.

[0161] 예를 들어, 웨티드 단량체는 다음과 같이 3차 아미드 링커에 화학적으로 결합될 수 있다.

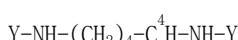


[0163] 식 중, X는  $NCO-(CH_2)_2-NH-Y$ 이고 Y는 적절한 보호기, 예컨대  $t$ -부틸옥시카르보닐 (Boc) 보호기이며;  $A^*$ 는 링커의  $C^1$ 을 제1 웨티드 단량체의 C-말단 리신 잔기의  $\epsilon$ -아미노기에 접합시키기 위해 사용되는 적절한 작용기, 예컨대 N-옥시 숙신이미드이고;  $B^*$ 는 링커의  $C^2$ 를 제2 웨티드 단량체의 C-말단 리신 잔기의  $\epsilon$ -아미노기에 접합시키기 위해 사용되는 적절한 작용기, 예컨대 N-옥시 숙신이미드이다.

[0164] 또한, 예를 들어, 웨티드 단량체는 다음과 같이 3차 아미드 링커에 화학적으로 결합될 수 있다.



[0166] 식 중, X는  $NCO-(CH_2)_2-NH-C^3 O-$ 이고;  $A^*$ 는 링커의  $C^1$ 을 제1 웨티드 단량체의 C-말단 리신 잔기의  $\epsilon$ -아미노기에 접합시키기 위해 사용되는 적절한 작용기, 예컨대 N-옥시 숙신이미드이며;  $B^*$ 는 링커의  $C^2$ 를 제2 웨티드 단량체의 C-말단 리신 잔기의  $\epsilon$ -아미노기에 접합시키기 위해 사용되는 적절한 작용기, 예컨대 N-옥시 숙신이미드이고; 상기 3차 아미드 링커는 다음의 스페이서 부분에 화학적으로 결합된 것으로서,



[0168] 식 중, X의  $C^3$ 은 스페이서의  $C^4$ 에 공유적으로 결합되고; Y는 적절한 보호기, 예컨대  $t$ -부틸옥시카르보닐 (Boc) 보호기이다.

[0169] 리신 링커의 첨가

- [0170] 웹티드 단량체는 리신 링커  $L_K$  부분에 의하여 이량체화될 수 있다. 한가지 실시 상태에 있어서, 리신 링커는 웹티드 합성 중에 웹티드 내로 포함될 수 있다. 예를 들어, 리신 링커  $L_K$  부분이 웹티드 합성을 위한 개시 자리로서 제공될 수 있는 2개의 작용기와, 또 다른 분자 부분에 결합할 수 있는 제3 작용기 (예컨대, 카르복실기 또는 아미노기)를 함유하는 경우, 링커는 고체 지지체에 접합될 수 있다. 그 후, 변형 고상 합성 기술로 2개의 웹티드 단량체가 리신 링커  $L_K$  부분의 2개의 반응성 질소기 위로 직접적으로 합성될 수 있다.
- [0171] 또 다른 실시 상태에 있어서, 웹티드 이량체가 리신 링커  $L_K$  부분에 의하여 이량체화 되는 경우, 상기 링커는 웹티드 합성 이후에 웹티드 이량체의 2개의 웹티드 단량체에 접합될 수 있다. 그러한 접합은 당해 기술 분야에서 잘 확립된 방법에 의하여 수행될 수 있다. 한가지 실시 상태에 있어서, 링커는 합성된 웹티드 단량체의 표적 작용기에 부착하기 위해 적합한 적어도 2개의 작용기를 함유한다. 예를 들어, 리신의 2개의 유리(free) 아미노 그룹은 2개의 웹티드 단량체의 C-말단 카르복실기와 반응할 수 있다.
- [0172] **스페이서의 침가**
- [0173] 본 발명의 웹티드 화합물은 스페이서 부분을 더 포함한다.
- [0174] 한가지 실시 상태에 있어서, 스페이서는 웹티드 합성 중에 웹티드 내로 포함될 수 있다. 예를 들어, 스페이서가 유리 아미노기 및 또 다른 분자 부분에 결합할 수 있는 제2 작용기(예컨대, 카르복실기 또는 아미노기)를 함유하는 경우, 스페이서는 고체 지지체에 접합될 수 있다.
- [0175] 한가지 실시 상태에 있어서, 2개의 작용기를 함유하는 스페이서는 제1 작용기를 통하여 고체 지지체에 우선 결합된다. 다음으로 웹티드 합성을 위한 개시 자리로서 제공될 수 있는 2개의 작용기와 또 다른 분자 부분에 결합할 수 있는 제3 작용기 (예컨대, 카르복실기 또는 아미노기)를 가지는 리신 링커  $L_K$  부분이 스페이서의 제2 작용기 및 링커의 제3 작용기를 통하여 스페이서에 접합된다. 그 후, 변형 고상 합성 기술로 2개의 웹티드 단량체는 링커  $L_K$  부분의 2개의 반응성 질소기 위로 직접적으로 합성될 수 있다. 예를 들어, 유리 아민기를 가진 스페이서와 결합된 고체 지지체는 링커의 유리 카르복실기를 통하여 리신 링커와 반응할 수 있다.
- [0176] 또 다른 실시 상태에 있어서, 스페이서는 웹티드 합성 후에 웹티드 이량체에 접합될 수 있다. 그러한 접합은 당해 기술 분야에서 잘 확립된 방법에 의하여 수행될 수 있다. 한가지 실시 상태에 있어서, 링커는 합성된 웹티드의 표적 작용기에 부착하기 위해 적합한 적어도 하나의 작용기를 함유한다. 예를 들어, 유리 아민기를 가지는 스페이서는 웹티드의 C-말단 카르복실기와 반응할 수 있다. 또 다른 예에서, 유리 카르복실기를 가지는 링커는 리신 아미드의 유리 아민기와 반응할 수 있다.
- [0177] **폴리에틸렌 글리콜 (PEG)의 부착**
- [0178] 최근 수년간, 수용성(水溶性) 중합체, 예컨대 폴리에틸렌 글리콜 (PEG)은 치료적 및 진단적으로 중요한 웹티드의 공유적 변형을 위하여 사용되어 왔다. 그러한 중합체의 부착은 생물학적 활성을 강화시키고, 혈액 순환 시간을 연장시키며, 면역원성을 감소시키고, 물에 대한 용해도를 증가시키며, 단백질 분해 효소의 분해에 대한 저항성을 증가시키는 것으로 생각된다. 예를 들어, 치료용 웹티드, 예컨대 인터루킨 (Knauf, *et al.* (1988) *J. Biol. Chem.* 263:15064; Tsutsumi, *et al.* (1995) *J. Controlled Release* 33:447), 인터페론 (Kita, *et al.* (1990) *Drug Des. Delivery* 6:157), 카탈라제 (Abuchowski, *et al.* (1977) *J. Biol. Chem.* 252:582), 슈퍼옥사이드 디스뮤타제 (Beauchamp, *et al.* (1983) *Anal. Biochem.* 131:25) 및 아데노신 테아미나제 (Chen, *et al.* (1981) *Biochim. Biophys. Acta* 660:293)에 PEG를 공유적으로 부착하면 그들의 생체 내 반감기의 연장 및/또는 그들의 면역원성 및 항원성의 감소를 가져온다고 보고된 바 있다.
- [0179] 본 발명의 웹티드 화합물은 카르바메이트 결합을 통해서 또는 아미드 결합을 통해서 분자형 3차 아미드 링커 또는 웹티드 이량체의 스페이서에 공유적으로 결합된 폴리에틸렌 글리콜 (PEG) 부분을 포함할 수 있다. 본 발명에 사용되는 PEG의 예로는 분자량이 약 20 킬로달톤(20 K) 내지 약 40 K인 선형, 비분자형 PEG를 들 수 있다 ("약"이라는 용어는 PEG의 제조에 있어서 일부 분자의 분자량이 상기 언급한 분자량보다 더 많거나 약간 적을 수 있음을 나타내는 것이다). 좋기로는, 상기 PEG의 분자량은 약 30 K 내지 약 40 K이다.
- [0180] 본 발명에서 사용되는 또 다른 PEG의 예로는 분자량이 약 10 K 내지 약 60 K인 선형 PEG를 들 수 있다 ("약"이라는 용어는 PEG의 제조에 있어서 일부 분자의 분자량이 상기 언급한 분자량보다 더 많거나 약간 적을 수 있음

을 나타내는 것이다). 좋기로는, 상기 PEG는 분자량이 약 20 K 내지 약 40 K이다. 더욱 좋기로는, 상기 PEG의 분자량은 약 20 K이다.

[0181] PEG의 공유적 부착 (PEG화)의 방법의 예들은 아래에 기재되어 있다. 이들 예시적 설명은 한정을 위한 것이 아니다. 당해 기술분야의 숙련자는 광범위한 PEG의 공유적 부착을 위한 다양한 방법들이 당해 기술 분야에서 잘 확립되어 있다는 것을 인식할 것이다. 그러므로, 당해 기술 분야에서 공지의 다양한 부착 방법 중 임의의 방법에 의하여 PEG가 부착된 웨티드 화합물이 본 발명에 포함된다.

[0182] 예를 들어, PEG는 활성화 PEG 분자가 결합될 수 있는 반응성 기 (예컨대, 유리 아미노기 또는 카르복실기)를 통하여 링커에 공유적으로 결합될 수 있다. PEG 분자는 상이한 반응성 부분을 가진 메톡실화 PEG ("mPEG")를 사용하여 아미노기에 부착될 수 있다. 그러한 종합체로는 mPEG-숙신이미딜 숙시네이트, mPEG-숙신이미딜 카르보네이트, mPEG-이미데이트, mPEG-4-니트로페닐 카르보네이트 및 mPEG-시아누릭 클로라이드가 있다. 이와 유사하게, PEG 분자는 유리 아민기를 가진 메톡실화 PEG (mPEG-NH<sub>2</sub>)를 사용하여 카르복실기에 부착될 수 있다.

[0183] 일부 실시 상태에 있어서, 링커 또는 스페이서는 말단 아미노기 (즉, 스페이서의 말단에 위치한 것)를 함유한다. 이러한 말단 아미노기는 적절하게 활성화 PEG 분자, 예컨대 mPEG-파라-니트로페닐카르보네이트 (mPEG-NPC)와 반응하여 안정한 카르바메이트 공유 결합을 만들 수 있다. 또 다른 예로, 이러한 말단 아미노기는 적절하게 활성화 PEG 분자, 예컨대 반응성 N-히드록실-숙신이미드 (NHS)기를 함유하는 mPEG-숙신이미딜 부티레이트 (mPEG-SBA) 또는 mPEG-숙신이미딜 프로피오네이트 (mPEG-SPA)와 반응하여 안정한 카르바메이트 공유 결합을 만들 수 있다. 다른 실시 상태에 있어서, 링커 반응성 기는 적절한 반응 조건하에서 아민 함유 PEG 분자와 공유 결합을 형성하도록 활성화될 수 있는 카르복실기를 함유한다. 적절한 PEG 분자는 mPEG-NH<sub>2</sub>를 포함하고, 적절한 반응 조건은 카르보이미드-매개(媒介) 아미드 형성 등을 포함한다.

[0184] EPO-R 작용제 활성 분석:

[0185] 시험관내 기능(functional) 분석

[0186] 시험관내 경쟁적 결합 분석은 EPO-R에 대한 결합을 놓고, EPO와 경쟁하는 테스트 웨티드의 활성을 정량적으로 평가하는 것이다. 예를 들어 (미국 특허 5,773,569 참조), 인간 EPO-R의 세포외 도메인 (EPO 결합 단백질, EBP)을 대장균 (*E. coli*)에서 재조합적으로 생산할 수 있으며, 재조합 단백질을 마이크로타이터 접시 또는 합성 비드 (예, 술포링크 비드, Pierce Chemical Co. (Rockford, IL)) 등의 고체 지지체에 결합시킬 수 있다. 그 후, 고정된 EBP를 표지된 재조합 EPO 또는 표지된 재조합 EPO 및 테스트 웨티드와 함께 배양한다. 이러한 실험을 위해서, 테스트 웨티드의 계단 회석액들을 사용한다. 테스트 웨티드가 첨가되지 않은 분석 수치는 EBP에 대한 총 EPO 결합을 의미한다. 테스트 웨티드를 함유하는 반응에 있어서, 결합된 EPO의 양을 정량하고, 대조군 결합 (총=100%)에 대한 비율로서 표현한다. 이러한 수치를 웨티드 농도에 대하여 그래프화한다. IC50 수치는 EBP에 대한 EPO의 결합을 50%까지 감소시키는 테스트 웨티드 농도로 정의된다 (예, EPO 결합을 50% 억제).

[0187] 다른 시험관내 경쟁적 결합 분석은 두 개의 비드, 즉 EPO-결합 비드와 EPO-R-결합 비드의 근접성에 대한 함수로서 발생하는 빛 신호를 측정하는 것이다. 비드 근접성은 EPO-R에 EPO가 결합함으로써 유발된다. EPO-R 결합에 있어서 EPO와 경쟁하는 테스트 웨티드는 이러한 결합을 억제하고, 발광량을 감소시킨다. 발광량을 50% 감소시키는 테스트 웨티드 농도를 IC50 수치로 정의한다.

[0188] 본 발명의 웨티드는 EPO-R에 대한 결합에 있어서 EPO와 매우 효과적으로 경쟁한다. 이러한 기능 향상은 이 웨티드가 실질적으로 더욱 낮은 농도에서 EPO의 결합을 억제할 수 있다는 것으로도 알 수 있다 (즉, IC50 값이 매우 낮다).

[0189] EPO-수용체에 특이적으로 결합하는, 본 발명의 단량체 및 이량체형 웨티드 EPO-R 작용제의 생물학적 활성과 효능은 세포를 기초로 한 시험관내 활성 분석을 이용하여 측정될 수 있다.

[0190] 한 가지 분석은 인간 EPO-R를 발현하는 것으로서, fos 프로모터-작동 루시페라제 리포터 유전자 구조체에 의하여 트랜스펙션된 쥐과 (murine) 전 B 세포주 (pre-B Cell line)를 기초로 하고 있다. EPO 또는 다른 EPO-R 작용제에 노출되는 경우, 이러한 세포는 루시페라제를 합성함으로써 반응한다. 루시페라제는 기질인 루시페린을 첨가하면 발광하게 된다. 따라서, 이러한 세포에서 EPO-R 활성 수준은 루시페라제 활성 측정으로 정량할 수 있다. 테스트 웨티드의 활성은 테스트 웨티드의 계단 회석액을 세포 내로 첨가한 후, 이를 4시간 동안 배양함으로써 측정된다. 배양 후, 루시페린 기질을 세포에 첨가하고, 발광량을 측정한다. 최대 발광량의 절반을 유발시키는 테스트 웨티드 농도를 EC50으로 나타낸다.

- [0191] 이러한 분석에서, 본 발명의 웨티드는 EPO-R 신호 의존성 루시페라제 발현을 촉진하는 데 있어, 매우 증강된 활성을 나타낸다. 이러한 기능 향상은 이 웨티드가 실질적으로 저농도에서 최대 루시페라제 활성의 절반을 유발시킬 수 있다는 것으로도 알 수 있다 (즉, 이들의 EC50 값은 매우 낮다). 이러한 분석은 본 발명의 EPO-R 작용제 웨티드의 효능과 활성을 평가하는 유용한 방법이다.
- [0192] 또 다른 분석은 안정하게 트랜스펙션된 EPO-R 내로의 비형질전환 젖과 골수 유래 세포주, FDC-P1/ER 세포를 이용하여 수행할 수 있다 (Dexter, *et al.* (1980), *J. Exp. Med.* 152:1036-1047). 이러한 세포는 EPO 의존성 증식을 나타낸다.
- [0193] 이러한 분석에서, 세포는 필수 성장 인자 (예, 미국 특허 제5,773, 569호 참조)의 존재하에서 반 정지 밀도 (half stationary density)까지 성장한다. 그 후, 세포를 PBS로 세척하고, 성장 인자가 결핍된 전체 배지에서 16~24시간 동안 기아 상태로 한다. 세포가 생존하고 있는 것을 확인한 후 (예, 트리판 블루 염색에 의함), 스톡 솔루션 (성장 인자가 결핍된 전체 배지 중)을 만들어, 50 $\mu$ l 당 세포가 약  $10^5$  개인 스톡 솔루션을 만든다. 테스트되는 웨티드 EPO-R 작용제 화합물 (일반적으로 파지나 다른 것과 결합되거나, 또는 고정 웨티드와는 대조적인 유리된 용액상 웨티드)의 계단 희석액을 각 웰 당 최종 부피가 50  $\mu$ l가 되도록 96 웰 조직 배양 플레이트에서 제조한다. 세포 (50 $\mu$ l)를 각 웰에 첨가하고, 세포는 24~48시간 배양한다. 이때, 음성 대조군은 죽거나 정지 상태에 있어야 한다. 그 후, 세포 증식의 표시로서  $^3$ H-티미딘 유입을 측정하는 MTT 분석 (Mosmann, (1983), *J. Immunol. Methods* 65: 55-63 참조)과 같은, 본 기술 분야에서 잘 알려진 방법에 따라 세포 증식을 측정한다. 웨티드를 EPO-R 발현 세포주와 비발현 모세포주 모두에서 측정한다. 세포 증식 최대치의 절반을 유발시키는 데 필요한 테스트 웨티드 농도를 EC50으로 나타낸다.
- [0194] 본 분석에서, 본 발명의 웨티드는 EPO 의존성 세포 성장을 촉진하는데 있어서, 매우 향상된 활성을 나타낸다. 이러한 기능 향상은 이 웨티드가 실질적으로 저농도에서 세포 증식 자극 활성의 최대치의 절반을 유발시킬 수 있다는 것으로도 알 수 있다 (즉, 이들의 EC50 값은 매우 낮다). 이러한 분석은 본 발명의 EPO-R 작용제 웨티드의 효능과 활성을 평가하는 유용한 방법이다.
- [0195] 또 다른 분석에서, 세포를 EPO-보충 배지에서 정지 상태까지 성장시키고, 수집한 후, EPO 결핍 배지에서 추가로 18시간 동안 배양한다. 세포를 동일한 세포 밀도로 3 그룹, 즉 추가된 인자가 없는 그룹 (음성 대조군), EPO 함유 그룹 (양성 대조군) 및 테스트 웨티드 함유 실험군으로 분리한다. 그 후, 배양된 세포를 여러 시점에서 수집하고, 고정한 후, DNA 결합 형광 염색 (예, 프로파이어 아이오드 또는 Hoechest 염색, 모두 Simga로부터 입수 가능함)으로 염색한다. 그 후, 형광을 측정하는데, 예를 들어, 팩스 스캔 흐름 세포측정기 (FACS Scan Flow cytometer)를 이용하여 측정할 수 있다. 이어서, 세포 주기 각 단계에서의 세포의 비율을 측정하는데, 예를 들어, CellFIT 소프트웨어 (Becton Dickinson)의 SOBR 모델을 이용하여 측정할 수 있다. EPO 또는 활성 웨티드로 처리된 세포는 음성 대조군과 비교하여, S 기의 세포 비율이 상대적으로 더 높다 (증가된 DNA 함량의 표지인 증가된 형광을 측정함).
- [0196] 유사한 분석을 FDCP-1 (예, Dexter *et al.* (1980), *J. Exp. Med.*, 152:1036-1047 참조) 또는 TF-1 (Kitamura, *et al.* (1989), *Blood*, 73: 375-380) 세포주를 이용하여 수행할 수 있다. FDCP-1은 성장 인자 의존성 젖과 전능 초기 조혈성 전구 세포주 (growth factor dependent murine multi-potential primitive hematopoietic progenitor cell line)이며, WEHI-3-조절 배지 (IL-3를 함유하는 배지, ATCC 번호 TIB-68)가 보충될 때, 이 세포주는 증식할 수 있으나 분화할 수 없다. 이러한 실험을 위해서, FDCP-1 세포주는 인간 또는 젖과 EPO-R로 트랜스펙션되어, FDCP-1-hEPO-R 또는 FDCP-1-mEPO-R 세포주를 각각 생산한다. 이들 세포는 EPO 존재하에서, 증식할 수 있으나, 분화할 수 없다. TF-1, EPO-의존성 세포주는 세포성 증식에서 웨티드 EPO-R 작용제의 효능을 평가하는데 또한 사용될 수 있다.
- [0197] 또 다른 분석에서, 비장 세포로의  $^3$ H-티미딘 유입을 기초로 한 마이크로분석을 위한 문헌 [Krystal, (1983), *Exp. Hematol.*, 11:649-660]에 기재된 방법을 EPO 작용제로서 작용하는 본 발명의 화합물의 활성을 확인하기 위해 이용할 수 있다. 약술하자면, B6C3F<sub>1</sub> 마우스에 페닐히드라진 (60 mg/kg)을 이틀 동안 매일 주사한다. 3일째 되는 날, 비장 세포를 제거하고, 24시간에 걸쳐, 증식하는 이들의 활성을 MTT 분석을 이용하여 측정한다.
- [0198] 에리스로포이에틴 반응 세포주에서 EPO-R에 EPO가 결합하면 수용체와 Shc, vav 및 JAK2 키나제 등의 각종 세포내 단백질 모두의 티로신 인산화를 유발한다. 따라서, 또 다른 시험관내 분석은 EPO-R와 하류 세포내 트랜스듀서 단백질의 티로신 인산화를 유발하는, 본 발명 웨티드의 활성을 측정하는 것이다. 상기 기재된 결합 및 증식 분석

에 의해 확인되는 것처럼, 활성 펩티드는 에리스로포이에틴 반응 세포에서의 EPO와 거의 동일한 인산화 패턴을 나타낸다. 이러한 분석에 대해, FDC-P1/ER 세포 (Dexter, *et al.* (1980), *J Exp. Med.*, 152:1036-47)는 EPO-보충 배지에 유지시키고, 정지 상태까지 성장시킨다. 그 후, 이를 세포를 EPO가 없는 배지에서 24시간 배양한다. 이어서, 정해진 수의 이들 세포를 약 10분간 37°C에서 테스트 펩티드와 배양한다. EPO를 함유한 세포의 대조 시료 또한, 각 분석에서 이용된다. 그 후, 처리된 세포를 원심분리로 회수하고, SDS 용해 완충제 내에서 재현탁시킨 후, SDS 폴리아크릴아미드 겔 전기영동한다. 겔 상에서 전기영동된 단백질을 니트로셀룰로스에 전달시키고, 블록 위의 포스포티로신 함유 단백질을 표준 면역학적 기술로 가시화한다. 예를 들어, 블록을 항-포스포티로신 항체 (예, 마우스 항-포스포티로신 IgG, Upstate Biotechnology, Inc.)로 검출하고, 세척한 후, 2차 항체 (예, 페옥시다제 표지된 염소의 항-마우스 IgG, Kirkegaard & Perry Laboratories, Inc. (Washington, DC))로 검출한다. 그 후에, 포스포티로신 함유 단백질을 비색계, 화학 발광 또는 형광 분석을 포함하는 표준 기술로서 가시화한다. 예를 들어, 화학발광 분석은 아미샵의 ECL 웨스턴 블로팅 시스템을 이용하여 수행할 수 있다.

[0199]

본 발명의 펩티드의 활성을 분석하는 데 이용되는, 또 다른 세포 기초 시험관내 분석으로는 젖과의 골수 또는 인간 말초 혈액 세포를 이용하는 콜로니 분석이 있다. 젖과 골수는 마우스의 대퇴골로부터 얻을 수 있으며, 인간 말초 혈액 시료는 건강한 기증자로부터 얻을 수 있다. 말초 혈액의 경우, 단핵구 세포는 혈액으로부터 처음으로 분리되는 것이며, 예를 들어, 피콜-하이파크 그래디언트 [Ficoll-Hypaque gradient (Stem Cell Technologies, Inc. (Vancouver, Canada))]로 원심 분리하여 얻을 수 있다. 이 분석에서, 원시료에서 유핵 세포의 수와 농도를 확인하기 위하여 유핵 세포수를 계수한다. 정해진 수의 세포를 제조사의 지침에 따라 [Stem Cell Technologies, Inc. (Vancouver, Canada)], 메틸셀룰로오스에 도말한다. 실험군은 테스트 펩티드로 처리하고, 양성 대조군은 EPO로 처리하며, 음성 대조군은 어떠한 처리도 하지 않는다. 그 후, 각 그룹에 대하여 성장 콜로니의 수를 일반적으로 10일 및 18일 정도의 정해진 배양 기간 후에 측정한다. 활성 펩티드는 콜로니 형성을 촉진할 것이다.

[0200]

본 발명의 화합물의 활성을 확인하는데 사용될 수 있는 다른 시험관내 생물학적 분석은 다음의 문헌 [Greenberger, *et al.*, (1983), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80:2931-2935 (EPO-dependent hematopoietic progenitor cell line); Quelle and Wojchowski, (1991), *J. Biol. Chem.* 266:609-614 (protein tyrosine phosphorylation in B6SUT.EP cells); Dusander-Fourt, *et al.*, (1992), *J. Biol. Chem.*, 267:10670-10678 (tyrosine phosphorylation of EPO-receptor in human EPO-responsive cells); Quelle, *et al.*, (1992), *J. Biol. Chem.*, 267:17055-17060 (tyrosine phosphorylation of a cytosolic protein, pp 100, in FDC-ER cells); Worthington, *et al.*, (1987), *Exp. Hematol.*, 15:85-92 (colorimetric assay for hemoglobin); Kaiho and Miuno, (1985), *Anal. Biochem.*, 149:117-120 (detection of hemoglobin with 2,7-diaminofluorene); Patel, *et al.*, (1992), *J. Biol. Chem.*, 267:21300-21302 (expression of c-myb); Witthuhn, *et al.*, (1993), *Cell*, 74:227-236 (association and tyrosine phosphorylation of JAK2); Leonard, *et al.*, (1993), *Blood* 82:1071-1079 (expression of GATA transcription factors); and Ando, *et al.*, (1993), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:9571-9575 (regulation of G<sub>1</sub> transition by cycling D2 and D3)]에 기재되어 있다.

[0201]

마이크로피지오미터(microphysiometer)로도 알려져 있는 Molecular Devices Corp.에 의해 고안된 장치는 다양한 수용체에 대한 작용제와 길항제의 효과 측정시 유용하게 사용될 수 있다고 알려져 있다. 이러한 기구의 원리는 수용체 활성화에 반응에 의하여 유발된 세포외 매질의 산성화 비율 변화를 측정하는 것이다.

[0202]

생체내 기능 분석

[0203]

테스트 펩티드의 효능을 분석하는 생체내 활성 분석에는 적혈구 증가 탈저산소성 마우스 생물학적 분석 (Polycythemic exhypoxic mouse bioassay)이 있다. 이 분석을 위하여, 마우스를 수일간에 걸쳐 교차 컨디션 조절 주기에 노출시킨다. 이 주기에 있어서, 마우스는 저압 상태와 대기압 상태 주기 사이에 번갈아 노출된다. 그 후, 마우스를 테스트 시료 투여 2~3일 전 대기압 하에 둔다. 테스트 펩티드 시료 또는 양성 대조군 마우스에서는 EPO 표준체를 컨디션 조절된 마우스 내로 피하 주사한다. 방사능 표지된 철 (예, Fe<sup>59</sup>)을 2일 후에 투여하고, 방사능 표지된 철 투여 2일 후에 혈액 시료를 채취한다. 표준 기술을 이용하여 적혈구 용적률과 방사능 수치를 각 혈액 시료로부터 측정한다. 활성 테스트 펩티드가 주입된 마우스로부터 채취한 혈액 시료는 테스트 펩티드 또는 EPO가 주입되지 않은 마우스보다 더 큰 방사능을 나타내었다 (이는 적혈구 혜모글로빈에 의한 Fe<sup>59</sup>의 결합에 의한 것이다).

- [0204] 테스트 웨티드의 효능을 분석하는 또 다른 생체내 활성 분석에는 망상 적혈구 분석이 있다. 이 분석을 위하여, 정상의 비처리된 마우스에게 연속 3일간 EPO 또는 테스트 웨티드를 피하 주사한다. 3일째, 마우스에 철 텍스트란을 복강 주사한다. 5일째, 마우스로부터 혈액을 채취한다. 각 혈액에서 망상 적혈구의 비율(%)은 티아졸 오렌지 염색과 흐름 세포 측정기 (retic-count program)로 확인한다. 추가로, 적혈구 용적률을 계산한다. 망상 적혈구의 정확한 비율은 아래의 식을 이용하여 측정할 수 있다.
- $$\% \text{ RETIC}_{\text{CORRECTED}} = \% \text{ RETIC}_{\text{OBSERVED}} \times (\text{Hematocrit}_{\text{INDIVIDUAL}} / \text{Hematocrit}_{\text{NORMAL}})$$
- [0205]
- [0206] 활성 테스트 화합물은 테스트 웨티드 또는 EPO가 주입되지 않은 마우스와 비교하여 증가된 % RETIC<sub>CORRECTED</sub> 수치를 나타낼 것이다.
- [0207] 본 발명의 EPO-R 작용제 웨티드의 용도
- [0208] 본 발명의 웨티드 화합물은, EPO의 생성 및 EPO-R에 대한 EPO의 결합에 영향을 주거나 영향을 받는 많은 인자들의 평가를 비롯 (예, EPO/EPO-R 신호 전달/수용체 활성화 메카니즘)하여, EPO의 생물학적 기능을 이해하기 위한 수단으로서 시험관내에서 유용하다. 또한, 본 발명은 EPO-R에 결합하는 다른 화합물의 개발에 있어서도 유용한데, 이는 본 발명의 화합물이 개발을 촉진하는 중요한 구조-활성에 대한 정보를 제공하기 때문이다.
- [0209] 더욱이, EPO-R에 결합하는 이들의 활성에 근거하여, 본 발명의 웨티드는 살아있는 세포; 고정 세포; 생물학적 액체; 조직균질액; 정제, 천연의 생물학적 제제 등에서 EPO-R를 검출하는 제제로서 사용할 수 있다. 예를 들어, 이러한 웨티드를 표지화함으로써, 세포 표면에 EPO-R를 갖는 세포를 확인할 수 있다. 또, EPO-R에 결합하는 이들의 활성에 근거하여, 본 발명의 웨티드는 현장 (*in situ*) 염색, FACS (fluorescence-activated cell sorting) 분석, 웨스턴 블로팅, ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) 등에 사용될 수 있다. 또한, EPO-R에 결합하는 이들의 활성에 근거하여, 본 발명의 웨티드는 수용체 정제에 이용되거나, 세포 표면에서 EPO-R을 발현하는 세포 (또는 내부 침투된 세포) 정제에도 이용할 수 있다.
- [0210] 또한 본 발명의 웨티드는 다양한 의학적 연구나 진단을 위한 상업적 제제로서 이용될 수 있다. 이러한 이용은 다음을 포함하지만, 이에 한정되는 것은 아니다. (1) 다양한 기능 분석에 있어서, 후보 EPO-R 작용제의 활성을 정량하는 측정 표준체로서의 이용; (2) EPO-R 웨티드 리간드의 새로운 패밀리를 모색하는 것과 같은, 무작위 웨티드 스크리닝에서 블록킹제 (blocking agents)로서 이용, 이러한 웨티드는 본 발명의 EPO 웨티드의 회수를 블록킹하는데 사용됨; (3) EPO-R와 공결정화에서 이용, 예를 들어 EPO-R에 결합된 본 발명의 웨티드 결정이 형성되고, X선 결정학에 의해서 수용체/웨티드의 구조가 확인됨; (4) 글로빈 합성과 헴 복합체 합성을 유도하고, 분화가 개시됨으로써 폐리틴 수용체의 수를 증가시키는 적혈구 전구체 세포의 능력 측정을 위한 이용; (5) FDCP-1-mEPO-R 및 TF-1 세포주 등의 EPO 의존성 세포주의 증식과 성장을 유지하기 위한 이용; (6) 방사능 발색단으로 본 발명의 웨티드를 표지시키는 것에 관한 용도; 및 (7) EPO-R이 유리하게 활성화되는 경우와, 이러한 활성화를 EPO-R 작용제의 알려진 양에 대하여 간편하게 측정하는 경우의 다른 연구나 진단에의 이용 등이 있다.
- [0211] 본 발명의 또 다른 실시 형태로서, 치료 방법과 의약을 제조하는 방법을 제공한다. 본 발명의 웨티드 화합물은 인간을 비롯한 온혈 동물에 투여되어, 생체내에서 EPO-R에 대한 EPO 결합을 자극한다. 따라서, 본 발명은 EPO 결핍과 관련되는 질환을 치료하는 방법을 포함한다. 이러한 방법은 EPO-R을 자극하기에 충분한 양의 본 발명의 웨티드를 투여함으로써, 생체내에서 EPO 결핍과 관련된 증상을 완화하는 것을 포함한다. 예를 들어, 본 발명의 웨티드는 신부전 및/또는 말기 신부전/투석; AIDS와 관련된 빈혈; 만성 염증성 질환 및 자가 면역 질환 (예, 류마티스성 관절염 및 만성 장 염증성 질환)과 관련된 빈혈의 치료에 이용될 수 있으며, 수술 전 환자의 적혈구 수치를 올리는데 이용할 수 있다. 본 발명의 웨티드 투여로서 치료될 수 있는 다른 질환, 질병 및 적혈구 비정상 상태로는, 베타-지중해빈혈; 낭포성 섬유증; 임신 및 월경 장애; 초기 미숙아 빈혈; 척수 손상; 우주 비행; 급성 실혈; 노화; 뇌졸중, 허혈 (CNS 및 심장성 모두) 및 비정상적 적혈구 생성을 수반하는 다양한 종양성 질환 상태가 있다.
- [0212] 다른 실시 상태로서, 본 발명의 웨티드 화합물은 적혈구의 부족 또는 결핍을 특징으로 하지 않는 질환을 치료하는데 사용될 수 있다. 예를 들어, 수혈전의 전 처치에 이용될 수 있다. 더욱이, 본 발명의 화합물의 투여는 출혈 시간을 감소시키므로, 수술 전에 환자에게 투여하거나, 출혈이 일어날 수 있는 증상에 사용 가능하다. 또한, 본 발명의 화합물은 거대핵세포의 활성화에 사용될 수 있다.
- [0213] EPO가 중추 콜린성 신경뿐 아니라, 혈관 내피 세포에 대해서도 분열 촉진능 및 주화능이 있기 때문에 (예컨대, Amagnostou, *et al.*, (1990), Proc. Nati. Acad. Sci. USA 87:5978-5982 및 Konishi, *et al.*, (1993), Brain

Res., 609:29-35 참조), 본 발명의 화합물은 다양한 혈관 질환을 치료하는데 이용될 수 있으며, 예컨대 상처 치유 촉진; 측부 심장 혈관 증식 촉진 (이는 심근 경색증 후에 발생할 수 있다); 외상 치료; 및 혈관 이식 후 치료 등에 이용할 수 있다. 또한, 본 발명의 화합물은 다양한 신경성 질환을 치료하는데 이용될 수 있으며, 일반적으로 이러한 신경성 질환은 신경 전달 물질과 같은 다른 신경 자극성 물질과 비교할 때, 아세틸콜린의 절대적인 수치의 저하 또는 상대적인 수치의 저하를 특징으로 한다.

#### [0214] 의약 조성물

본 발명의 또 다른 측면에 따르면, 전술한 EPO-R 작용제 웨პ티드 화합물로 구성되는 의약 조성물이 제공된다. 이러한 조성물을 투여함으로써 경감되거나 완화될 수 있는 증상으로는 전술한 것들이 포함된다. 이러한 의약 조성물은 경구 경로, 비경구 경로 (근육내, 복강내, 정맥내 (IV) 또는 피하 주사), 경피 경로 (수동적으로 또는 이온삼투요법 또는 전기영동을 이용함), 점막을 경유한 경로 (코, 질, 직장 또는 설하)로 투여되거나 또는 생체침식 가능한 삽입물을 이용하여 투여될 수 있으며, 각각의 투여 경로에 적합한 제형으로 조제될 수 있다. 일반적으로, EPO-R 작용제 웨პ티드, 또는 이의 유도체 생성물의 유효량을, 약제학적으로 허용 가능한 희석제, 보존제, 가용화제, 유화제, 애쥬번트 및/또는 캐리어와 함께 포함하는 의약 조성물이 본 발명에 포함된다. 이러한 조성물은 완충 성분 (예컨대, Tris-HCl, 아세테이트, 포스페이트), pH 및 이온 강도를 달리하는 희석제; 계면활성제 및 가용화제 (예컨대 Tween 80, Polysorbate 80), 항산화제 (예컨대 아스코르브산, 소듐 메타바이설파이트), 보존제 (예컨대, Thimersol, 벤질 알코올) 및 별킹제 (예컨대, 락토스, 만니톨)과 같은 첨가제와, 폴리락트산, 폴리글리콜산 등과 같은 중합체 화합물의 입자상 제제로 혼입시키는 물질 또는 리포좀을 포함한다. 히알루론산 역시 사용가능하다. 이러한 조성물은 신체 상태, 본 발명 단백질 및 유도체의 안정성, 생체내 방출 속도, 및 생체내 클리어런스 속도에 영향을 미칠 수 있다. 예컨대, 문헌 [Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th Ed. (1990, Mack Publishing Co., Easton, PA18042) pages 1435-1712] 참조 (이 문헌의 내용은 본 발명에 참조로 통합된다). 이 조성물은 액상 또는 건조 분말 (예컨대 동결 건조형) 형태로 조제될 수 있다.

#### [0216] 경구 전달

본 발명 조성물은 본 발명에 그 내용이 참고로 통합된 문헌 [Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th Ed. 1990 (Mack Publishing Co. Easton PA18042), at chapter 89]에 상세히 설명된 경구용 고상 제형으로서 사용될 수 있다. 고상 제형으로는 정제, 캡슐제, 알약 (pill), 트로키제, 로젠키제, 카쉐, 펠럿제, 분말, 또는 과립제를 들 수 있다. 또한, 리포좀 또는 단백질 유사체 (proteinoid) 캡슐화 방법을 이용하여 본 발명의 조성물을 조제할 수 있다. (예컨대, 미국특허 4,925,673호에 설명된 바와 같은 단백질 유사체 미세구). 리포좀 캡슐화를 이용할 수 있으며 리포좀은 여러 가지 중합체로 유도화시킬 수 있다 (예컨대 미국특허 5,013,556호 참조). 치료용으로 가능한 고상 제형에 관해서는 본 발명에 그 내용이 참조로 통합된 문헌 [Marshall, K. In : *Modern Pharmaceutics* Edited by G. S. Bunker and C. T. Rhodes, chapter 10, 1979]에 제시된 설명을 참조할 수 있다. 일반적으로, 이 포뮬레이션은 EPO-R 작용제 웨პ티드 (또는 이의 화학적 변형 형태) 및 불활성 성분을 포함하는데, 후자는 위장 환경으로부터 보호해주고, 소장에서 생물학적 활성 물질을 방출시킨다.

본 발명 조성물은 또한 제약제학적으로 허용 가능한 에밀젼, 용액제, 혼탁제, 및 시럽제를 비롯한 경구 투여용 액상 제형으로서 사용될 수 있으며, 이들은 불활성 희석제; 습윤제, 유화제 및 혼탁제와 같은 애쥬번트; 및 감미료, 풍미제 및 향료를 비롯한 기타 성분들을 함유할 수 있다.

웨პ티드는 그 유도체의 경구 전달에 효과적이도록 화학적으로 변형시킬 수 있다. 일반적으로, 고려되는 화학적 변형은 적어도 하나의 부분을 성분 분자 자체에 부착시키는 것으로, 여기서 상기 부분은 (a) 단백질 분해의 억제; 및 (b) 위장 또는 소장으로부터 혈류내로의 흡수 (uptake)를 허용하는 것이다. 성분 또는 성분들의 전반적인 안정성 증가 및 체내 순환 시간의 연장 역시 요망된다. 전술한 바와 같이, PEG화는 약학적 용도에 있어 바람직한 화학적 변경 수단이다. 사용가능한 기타 부분으로는 다음을 들 수 있다: 프로필렌 글리콜, 에틸렌 글리콜과 프로필렌 글리콜과의 공중합체, 카르복시메틸 셀룰로스, 테스트란, 지방산 (예컨대 미리스트산), 웨პ티드 [Dennis, M. S. et al., Biol. Chem. 2002, 277, 35035 참조], 폴리비닐 알코올, 폴리비닐 피롤리돈, 폴리프롤린, 폴리-1,3-디옥솔란 및 폴리-1,3,6-트리옥소케인 [예컨대, 문헌 (Abuchowski and Davis (1981) "Soluble Polymer-Enzyme Adducts," in *Enzymes as Drugs*. Hocenberg and Roberts, eds. (Wiley-Interscience: New York, NY) pp. 367-383; 및 Newmark et al., (1982) J. Appl. Biochem. 4: 185-189) 참조].

경구용 포뮬레이션의 경우, 방출 장소는 위장, 소장 (십이지장, 공장, 또는 회장) 또는 대장일 수 있다. 당업자에게는 위장에서는 용해되지 않으나 십이지장이나 그 밖에 소장에서는 방출되는 포뮬레이션이 알려져 있다. 웨პ티드 (또는 유도체)를 보호하거나 또는 웨პ티드 (또는 유도체)를 소장내에서와 같이, 위장 환경을 벗어난 곳에

방출시키는 방법에 의해 위장 환경의 불리한 효과를 회피시켜 방출시키는 것이 좋다.

- [0221] 완전한 위장 보호를 위해, 적어도 pH 5.0까지 불투과성인 피막이 필수적이다. 장용 피복에서 사용되는 것과 같은 보다 일반적인 불활성 성분의 예로는 셀룰로스 아세테이트 트리멜리테이트 (CAT), 히드록시프로필메틸셀룰로스 프탈레이트 (HPMCP), HPMCP 50, HPMCP 55, 폴리비닐 아세테이트 프탈레이트 (PVAP), Eudragit L30D, Aquateric, 셀룰로스 아세테이트 프탈레이트 (CAP), Eudragit L, Eudragit S, 및 Shellac을 들 수 있다. 이들 피복물은 혼합 피막으로서 사용될 수 있다.
- [0222] 위장으로부터의 보호용으로 의도되지 않은 피복 또는 피복 혼합물도 정제에 이용될 수 있다. 그 예로는 당의, 또는 정제를 삼키기 쉽게 해주는 피복을 들 수 있다. 캡슐은 건조 치료제 (즉, 분말)의 전달용으로는 경질 셀 (예컨대 젤라틴)로 이루어질 수 있고, 액상 형태용으로는 연질 젤라틴이 사용될 수 있다. 카세제의 셀 재료는 농후한 전분 또는 기타 식용 종이일 수 있다. 알약, 로젠지, 성형 정제 또는 정제의 경우, 습식 매싱 (massing) 기술이 이용될 수 있다.
- [0223] 웨티드 (또는 유도체)는 입경이 약 1 mm인 펠릿이나 과립 형태의 미세한 멀티파립으로서 조제될 수 있다. 캡슐 투여를 위한 포뮬레이션은 분말, 살짝 압착된 플러그일 수 있고, 심지어는 정제일 수도 있다. 이러한 치료제는 압착시켜 제조할 수 있다.
- [0224] 착색제 및/또는 풍미제 역시 포함될 수 있다. 예컨대, 웨티드 (또는 유도체)를 약제화 한 다음 (예컨대 리포좀 또는 미세구 캡슐화에 의해), 착색제와 풍미제를 함유하는 냉장 음료와 같은 식용 제품에 함유시킬 수 있다.
- [0225] 또한 불활성 물질을 이용하여 웨티드 (또는 유도체)의 부피를 희석 또는 증가시키는 것 역시 가능하다. 이러한 희석제로는 탄수화물, 특히 만니톨, α-락토스, 무수 락토스, 셀룰로스, 수크로스, 변형 텍스트란 및 전분을 들 수 있다. 삼인산칼슘, 탄산마그네슘 및 염화나트륨을 비롯한 어떤 무기염들도 충전제로서 사용될 수 있다. 시판되는 희석제의 예로는 Fast-Flo, Emdex, STA-Rx 1500, Emcompress 및 Avicell을 들 수 있다.
- [0226] 고상 제형의 치료제 포뮬레이션에 봉해제를 포함시킬 수 있다. 봉해제로서 사용되는 물질로는 전분을 기재로 한 시판 봉해제인 Explotab과 같은 전분을 들 수 있으나 이에 한정되지 않는다. 글리콜산나트륨 전분, Amberlite, 카르복시메틸셀룰로스 나트륨, 울트라밀로펙틴, 알긴산나트륨, 젤라틴, 오렌지 껌질, 산 카르복시메틸 셀룰로스, 천연 스폰지 및 벤토나이트를 모두 사용할 수 있다. 봉해제는 또한 불용성 양이온 교환 수지일 수 있다. 분말상 검을 봉해제 및 결합제로서 사용할 수 있고, 여기에는 한천, 카라야 (Karaya) 또는 트라가칸트와 같은 분말상 검이 포함될 수 있다. 알긴산 및 그의 나트륨 역시 봉해제로서 유용하다.
- [0227] \*웨티드 (또는 유도체) 제제를 한데 결속시켜 경질 정제를 만들기 위해 결합제를 사용할 수 있으며 결합제 재료로는 아카시아, 트라가칸트, 전분 및 젤라틴과 같은 천연 산물을 들 수 있다. 그 밖에 메틸 셀룰로스 (MC), 에틸 셀룰로스 (EC) 및 카르복시메틸 셀룰로스 (CMC)도 사용 가능하다. 웨티드 (또는 유도체)를 과립화시키기 위해 폴리비닐 피롤리돈 (PVP)과 히드록시프로필메틸 셀룰로스 (HPMC) 두 가지 모두를 알코올 형태로 사용할 수 있다.
- [0228] 포뮬레이션 공정 중 들러붙는 것을 방지하기 위해 마찰방지제를 웨티드 (또는 유도체) 포뮬레이션에 포함시킬 수 있다. 웨티드 (또는 유도체)와 다이 벽 간의 충으로서 유흘제를 사용할 수 있으며, 여기에는 마그네슘염 및 칼슘염을 비롯한 스테아르산, 폴리테트라플루오로에틸렌 (PEFE), 액상 파라핀, 식물성 오일 및 왁스가 포함되나 이에 한정되지 않는다. 소듐 라우릴 설페이트, 마그네슘 라우릴 설페이트, 다양한 분자량의 폴리에틸렌 글리콜, Carbowax 4000 및 6000 등의 가용성 유흘제 역시 사용 가능하다.
- [0229] 포뮬레이션 공정 중 약물의 유통 특성을 증진시키고 압착 공정시 재조립을 도와주는 활택제 (glidants)도 첨가할 수 있다. 활택제의 예로는 전분, 탈크, 밸열성 실리카 및 수화 실리코알루미네이트를 들 수 있다.
- [0230] 웨티드 (또는 유도체)가 수용성 환경에서 용해되는 것을 돋기 위해, 습윤제로서 계면활성제를 첨가할 수 있다. 계면활성제로는 소듐 라우릴 설페이트, 디옥틸 소듐 설포숙시네이트 및 디옥틸 소듐 설포네이트와 같은 음이온 성 계면활성제 (detergent)를 들 수 있다. 양이온성 계면활성제로도 사용 가능하며 벤잘코늄 클로라이드 또는 벤제토늄 클로라이드가 그 예이다. 계면활성제로서 포뮬레이션에 포함될 수 있는 잠재적인 비이온계 계면활성제로는 라우로마크로골 400, 폴리옥실 40 스테아레이트, 폴리옥시에틸렌 수소첨가된 카스터유 10, 50 및 60, 글리세롤 모노스테아레이트, 폴리소르베이트 40, 60, 65 및 80, 수크로스 지방산 에스테르, 메틸 셀룰로스 및 카르복시메틸 셀룰로스를 들 수 있다. 이러한 계면활성제는 단백질 또는 유도체의 포뮬레이션 중에 단독으로 또는 상이한

비율의 혼합물로서 존재할 수 있다.

[0231] 웨티드 (또는 유도체)의 흡수를 잠재적으로 증진시키기 위한 첨가제로는 예컨대 지방산 올레산, 리놀레산 및 리놀렌산을 들 수 있다.

[0232] 조절 방출성 경구용 포뮬레이션이 소망될 수 있다. 확산 또는 침출 (leaching) 메카니즘에 의해 방출되는, 예컨대 검과 같은 불활성 매트릭스에 웨티드 (또는 유도체)를 혼합시킬 수 있다. 서서히 분해되는 매트릭스 역시 포뮬레이션에 포함시킬 수 있다. 어떤 장용 피복은 서방 효과를 갖기도 한다. 또 다른 조절 방출 유형으로서, 삼투효과에 의해 작은 소형 개구부를 통해 물은 들어가게 하고 약물은 빠져나오게 하는 반투과막에 약물을 봉입시키는 Oros 치료 시스템 (Alza Corp.)에 기초하는 방법을 들 수 있다.

[0233] 다른 피복물 역시 본 발명 포뮬레이션에 이용가능하다. 여기에는 피복 팬에 적용가능한 다양한 당 (sugar)이 포함된다. 웨티드 (유도체)는 피막 처리된 정제로서 주어질 수도 있으며, 이 경우 사용되는 재료는 2 그룹으로 나뉜다. 그 첫번째는 비장용 물질로서 여기에는 메틸 셀룰로스, 에틸 셀룰로스, 히드록시에틸 셀룰로스, 메틸히드록시-에틸 셀룰로스, 히드록시프로필 셀룰로스, 히드록시프로필-메틸 셀룰로스, 소듐 카르복시-메틸 셀룰로스, 프로비돈 및 폴리에틸렌 글리콜이 포함된다. 두번째 그룹은 널리 사용되는 프탈산 에스테르인 장용 물질로 이루어진다. 물질의 혼합물 (믹스)를 이용하여 최적 피막을 제공할 수 있다. 피막은 팬 피복기를 이용하여 형성할 수도 있고 유동층을 이용하거나 압착 피복법에 의해 형성시킬 수도 있다.

#### 비경구 전달

[0235] 본 발명에 따른 비경구 투여용 제제에는 멸균 수용액 또는 비수성 용액, 혼탁액, 또는 에멀션이 포함된다. 비수성 용매 또는 비히클의 예로는 프로필렌 글리콜, 폴리에틸렌 글리콜, 식물성 오일, 예컨대 올리브유와 옥수수유, 젤라틴, 및 에틸 올리에이트와 같은 주사가능한 유기 에스테르를 들 수 있다. 이러한 제형은 또한 보존제, 습윤제, 유화제 및 분산제와 같은 애쥬번트도 함유할 수 있다. 이들은 예컨대, 세균보류 필터를 통한 여과, 조성물에 살균제 혼합, 조성물의 광선 조사 처리, 또는 조성물의 가열에 의해 멸균시킬 수 있다. 이들은 또한 멸균수를 이용하건, 기타 멸균 주사용 매질을 이용하여 사용 직전에 제조할 수 있다.

#### 직장 또는 질 전달

[0237] 직장 또는 질에 투여하기 위한 조성물은 활성 물질에 더해, 코코아 버터나 좌약용 왁스와 같은 부형제를 함유할 수 있는 좌약인 것이 좋다. 코 또는 설하 투여용 조성물 역시 기술 분야에 잘 알려진 표준 부형제를 이용하여 조제할 수 있다.

#### 폐 전달

[0239] EPO-R 작용제 웨티드 (또는 그의 유도체)를 폐에 전달하는 것도 고려할 수 있다. 웨티드 (또는 유도체)는 흡입에 의해 폐 상피 내막을 통해 혈류 내로 전달된다. 예컨대 문헌 [Adjei, *et al.*, (1990) *Pharmaceutical Research* 7: 565-569; Adjei, *et al.*, (1990) *Int. J.Pharmaceutics* 63: 135-144 (류프롤리드 아세테이트); Braquet, *et al.*, (1989) *J.Cardiovascular Pharmacology* 13 (sup5): 143-146 (엔도셀린-1); Hubbard, *et al.*, (1989) *Annals of Internal Medicine*, Vol. III, pp. 206-212 ( $\alpha$ -1-항트립신); Smith, *et al.*, (1989) *J. Clin. Invest.* 84 : 1145-1146 ( $\alpha$ -1-프로테이나제); Oswein, *et al.*, (1990) "Aerosolization of Proteins", *Proceedings of Symposium on Respiratory Drug Delivery II Keystone*, Colorado (인간 재조합 성장 호르몬); Debs, *et al.*, (1988) *J. Immunol.* 140:3482-3488 (인터페론- $\gamma$  및 종양 피사인자  $\alpha$ ); 및 Platz *et al.*의 미국 특허 5,284,656호 (과립구 콜로니 자극 인자)] 참조. 전신 효과를 위해 약물을 폐에 전달하기 위한 방법과 조성물은 Wong *et al.*의 미국 특허 제5,451,569호에 설명되어 있다.

[0240] 분무기, 투여량 계량기가 달린 흡입기, 및 분말 흡입기와 같은 (이에 한정되지 않음) 치료 제제를 폐에 전달하기 위해 고안된 광범위한 기계 장치 역시 본 발명에 포함되며, 이를 모두는 당업자에게 친숙한 것들이다. 본 발명을 실시하는데 적합한 시판되는 장치의 몇가지 구체적인 예로는 Ultravent 분무기(Mallinckrodt Inc., St. Louis, MO); Acorn II 분무기 (Marquest Medical Products, Englewood, CO); Ventolin 투여량 계량기가 달린 흡입기 (Glaxo Inc., Research Triangle Park, NC); 및 Spinhaler 분말 흡입기 (Fisons Corp., Bedford, MA)를 들 수 있다.

[0241] 이러한 장치는 모두 웨티드 (또는 유도체)를 분산시키기에 적합한 포뮬레이션을 사용할 것을 필요로 한다. 일반적으로, 각각의 포뮬레이션은 치료에 유용한 통상적인 희석제, 애쥬번트 및/또는 캐리어에 더해, 사용된 장치 종류에 특이적이며 적절한 추진제 물질을 함유할 수 있다. 또한, 리포좀, 마이크로캡슐 또는 미세구, 봉입 복합

체, 또는 기타 유형의 캐리어를 사용하는 것도 고려된다. 화학적으로 변경된 웨티드는 또한 화학적 변경의 종류나 사용된 장치의 종류에 따라 여러 가지 다른 포뮬레이션으로 조제될 수 있다.

[0242] 제트식 또는 초음파식 분무기를 이용하여 사용하는데 적합한 포뮬레이션은, 일반적으로 용액 1 mL 당 생물학적 활성 단백질 약 0.1 내지 25 mg의 농도로 물에 용해된다. 이 포뮬레이션은 또한 완충액과 단순당 (예컨대, 단백질 안정화 및 삼투압 조절 목적)을 함유할 수도 있다. 분무기용 포뮬레이션은 또한 에어로졸 형성시 용액의 분무에 의해 야기되는 웨티드 (또는 유도체)의 표면 유도성 응집을 감소 또는 방지하기 위해, 계면활성제를 함유할 수도 있다.

[0243] \*투여량 계량기가 달린 흡입 장치에 사용되기 위한 포뮬레이션은 일반적으로 계면활성제의 보조를 받아 추진체 중에 혼탁된 웨티드 (또는 유도체)를 함유하는 미분된 분말을 함유한다. 추진체는 클로로플루오로카본, 히드로클로로플루오로카본, 히드로플루오로카본 또는 탄화수소, 예컨대 트리클로로플루오로메탄, 디클로로디플루오로메탄, 디클로로테트라플루오로에탄을, 및 1,1,1,2-테트라플루오로에탄 또는 이들의 복합체와 같이, 이러한 목적에 사용되는 여하한 통상적인 물질이어도 무방하다. 적절한 계면활성제로는 소르비탄 트리올리에이트와 대두 레이신을 들 수 있다. 올레산 역시 계면활성제로서 유용하다.

[0244] 분말 흡입 장치로부터의 분산을 위한 포뮬레이션은 웨티드 (또는 유도체)를 함유하는 미분된 건조한 분말을 포함하며, 락토스, 소르비톨, 수크로스 또는 만니톨과 같은 벌킹제를, 장치로부터의 분말의 분산을 용이하게 해주는 양, 예컨대 포뮬레이션의 50 내지 90 중량%의 양으로 함유할 수도 있다. 웨티드 (또는 유도체)는 가장 유리하게는 평균 입경이 10 mm (또는 마이크론) 미만, 가장 좋기로는 0.5 내지 5 mm인 입자 형태로 제조되는 것이 원위부 폐까지 전달하는데 가장 효과적이다.

#### 코 전달

[0245] EPO-R 작용제 웨티드 (또는 유도체)를 코를 통해 전달하는 것도 고려된다. 코 전달은 폐에 이 치료 제품을 침착시킬 필요 없이 이 제품을 코에 투여한 직후 웨티드가 혈류내로 직접 통과되도록 해준다. 코에 전달하기 위한 포뮬레이션은 엑스트란 또는 시클로엑스트란을 포함한다.

[0246] 코 전달을 촉진시키기 위하여 사용되는 다른 침투 촉진제도 본 발명의 웨티드와 함께 사용할 수 있다 (본 발명에 참조로서 포함되는 2003년 12월 17일자 국제 특허 출원 WO 2004/056314 참조).

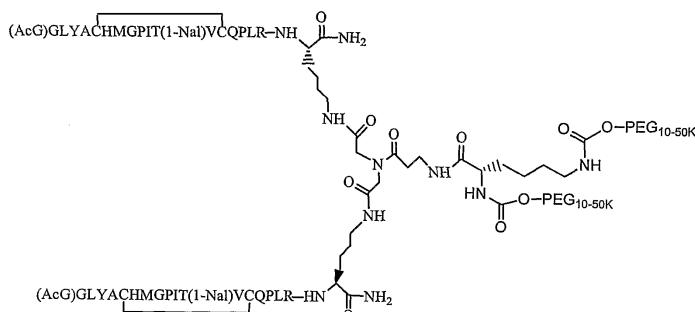
#### 투여량

[0247] 모든 상기 웨티드 화합물에 있어서, 추가적인 연구가 수행됨에 따라 다양한 환자들에 있어서 다양한 조건들의 치료를 위한 적절한 투여량 수준에 관한 정보가 나타날 것이고, 통상의 숙련된 실시자는 수용자의 치료 상황, 연령 및 건강 상태를 고려하여 적절한 투여를 확실히 할 수 있을 것이다. 선택된 투여량은 목적하는 치료 효과, 투여 경로 및 목적하는 치료의 기간에 따라 달라진다. 일반적으로, 매일 0.001 내지 10 mg/체중 kg의 투여량의 수준으로 포유류에게 투여된다. 일반적으로, 정맥 주사 또는 주입에 있어서, 투여량은 더 낮을 수 있다.

[0248] 특정의 구체적인 예에 있어서, 본 발명의 웨티드 중 어느 하나가 투석 전 또는 투석 중인 (예비투석(pre-dialysis) 또는 투석 환자) 신부전을 가진 환자를 치료하기 위하여 사용될 수 있다. 이러한 실시 상태에 있어서 그 치료 투여량의 범위는 그 개체의 체중 1 kg 당 화합물 0.025 내지 0.2 mg (0.025~0.2 mg/kg)일 수 있다. 더 구체적으로, 상기 투여 범위는 0.05~0.1 mg/kg인 것이 좋다. 더욱이, 내과의는 처음에 단계적으로 증가하는 투여량을 사용할 수 있는데, 치료를 받는 각 개체에 있어서 그들의 개별적인 혜모글로빈 반응에 기초하여 0.025 mg/kg으로 시작하여, 약 0.025 mg/kg의 증가분으로 투여량을 적정(titrate)할 수 있다. 따라서, 적절한 혜모글로빈 반응을 얻을 때까지 각 개체에 있어서 투여량을 적정할 수 있다. 예비 투석 또는 투석 환자인 개체의 경우에 있어서, 적합한 혜모글로빈 반응은 정상 혜모글로빈 수준 (14~15 g/dL) 또는 내과의에 의하여 결정될 수 있는 또 다른 혜모글로빈 수준을 대략적으로 달성하는 것일 수 있다. 이러한 실시 상태에 있어서, 각각의 예비투석 또는 투석 환자에 대한 약리학적 활성 투여량 (PAD)은 0.067~0.075 mg/kg일 것으로 예상된다. 이러한 실시 상태의 이점은 각 개별 환자에 있어서 다른 기준의 적혈구생성 자극제 (ESAs)의 경우처럼 매주가 아니라 3 내지 4 주에 한 번인 더 낮은 투여 빈도일 것으로 예상된다. 다수의 투여 경로가 사용될 수 있다 (전술한 바와 같이 경구, 정맥 내 등). 투석 환자에 있어서 양호한 투여 경로는 정맥내 투여일 것이다. 예비투석 환자에 있어서 양호한 투여 경로는 피하 투여일 것이다. 다른 특정의 실시 상태에 있어서, 전술한 화합물 중의 하나가 악성종양과 연관된 빈혈을 가진 개체 (종양 환자)를 치료하기 위해 사용될 수 있다. 이러한 실시 상태에 있어서 치료 투여량의 범위는 예비투석 또는 투석 환자의 투여량 범위의 3 내지 5 배일 것으로 예상된다 (즉, 0.075~0.5

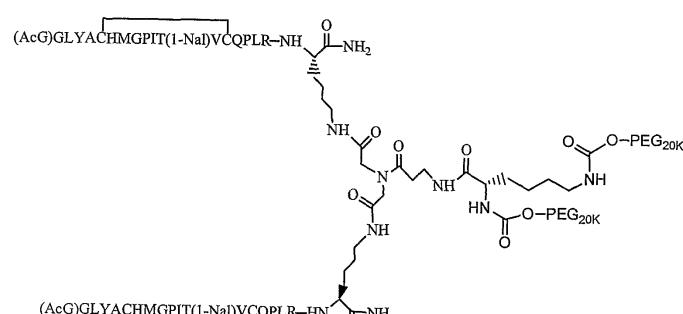
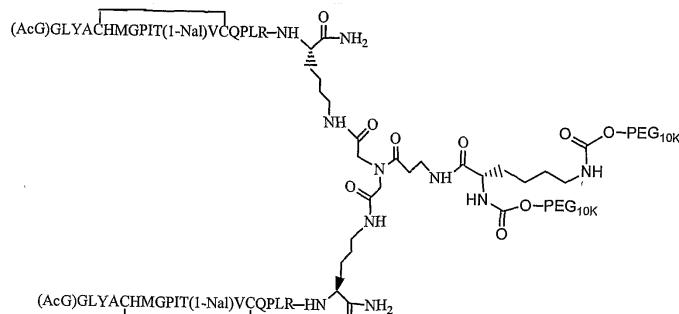
mg/kg). 더 구체적으로, 상기 투여량 범위는 0.2~0.4 mg/kg가 양호할 것이다. 전술한 것처럼, 종양 환자를 치료하는 내파의는 0.075 mg/kg으로 시작하여, 적절한 헤모글로빈 반응을 얻을 때까지 약 0.075 mg/kg의 증가분으로 투여량을 증가시켜 그 투여량을 적정할 수 있다. 각각의 개별 종양 환자를 위한 PAD는 약 0.25 mg/kg일 것으로 예상된다. 또한, 각 개별 환자에 있어서 매 3 내지 4 주의 더 낮은 빈도로 투여한다는 이점이 예상된다. 더욱이, 종양 환자에 있어서 다른 이점은 망상 적혈구(reticulocyte) 자극 및 헤모글로빈 발생 사이의 지체기(lag phase) 동안 헤모글로빈의 감소를 막기 위하여 화학요법 전 (예를 들어, 3~5 일 전)에 그 투여량이 투여되거나 또는 화학요법과 함께 공동 투여될 수 있다는 것이다. 많은 투여 경로가 사용될 수 있다 (전술한 바와 같이 경구, 정맥 내 등). 종양 환자에게는 피하 투여가 양호한 투여 경로 일 것이다. 예비 투석, 투석 또는 종양 환자를 치료하는데 사용되는 양호한 화합물은 아래에 기재되어 있는 것들을 포함한다.

[0251] 카르바메이트 결합, 사르코신이 없음 및 PEG 분자량의 범위 (여기서는 SEQ ID NO: 1을 나타냄)의 경우:

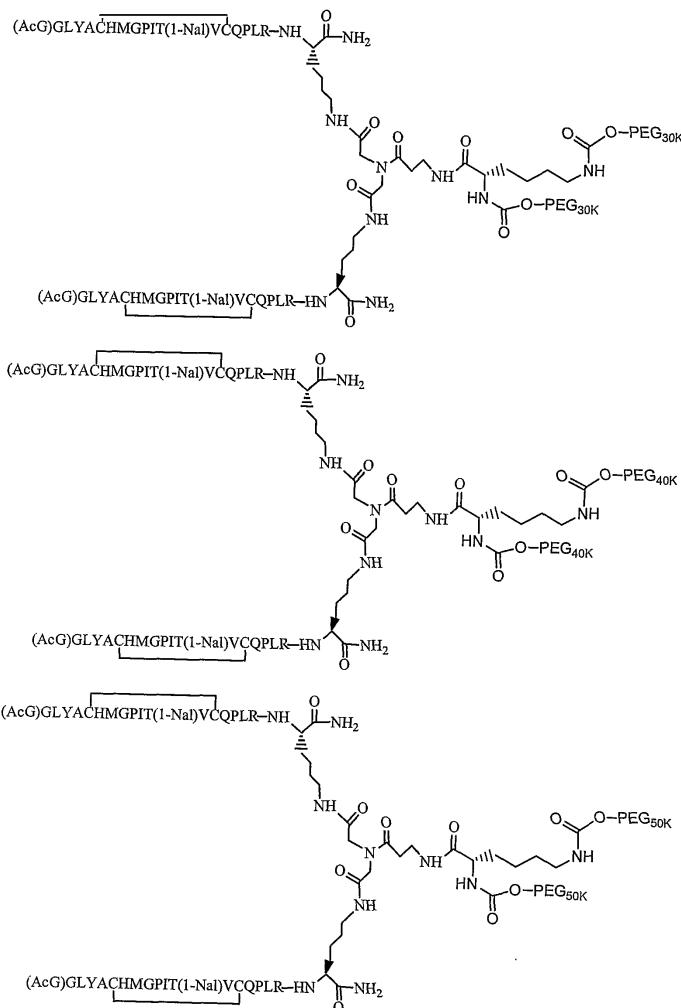


[0252]

[0253] 카르바메이트 결합, 사르코신이 없음 및 양호한 PEG 분자량 (여기서는 SEQ ID NO: 1을 나타냄)의 경우:

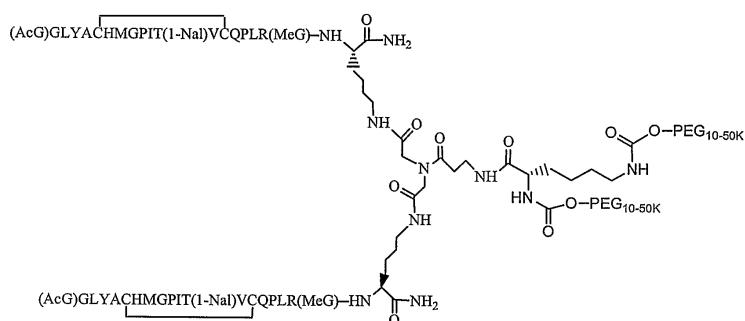


[0254]



[0255]

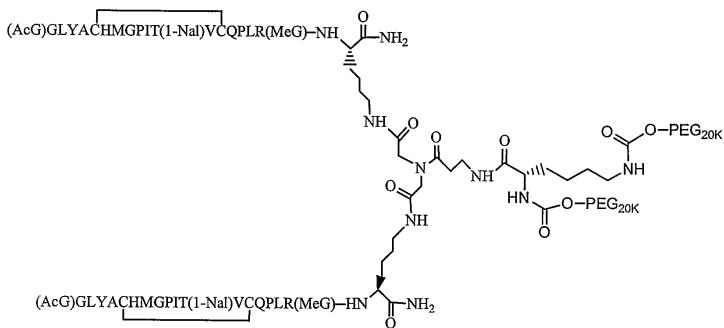
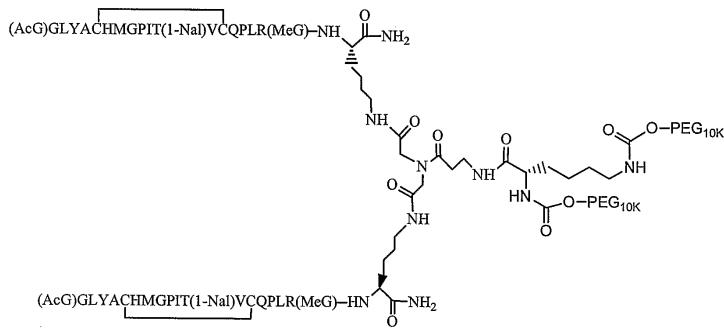
카르바메이트 결합, 사르코신이 있음 및 PEG 분자량의 범위 (여기서는 SEQ ID NO: 2를 나타냄)의 경우:



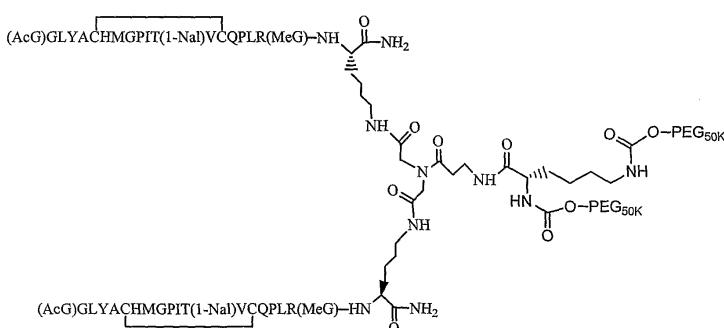
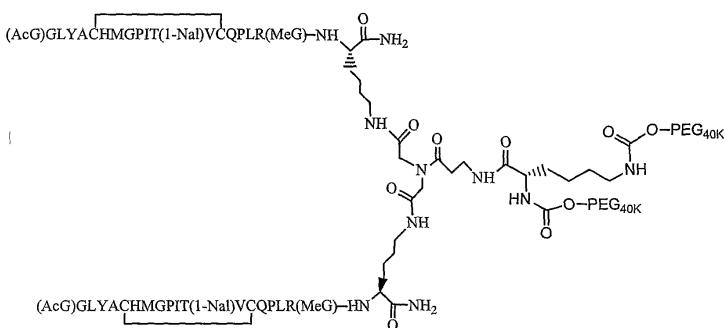
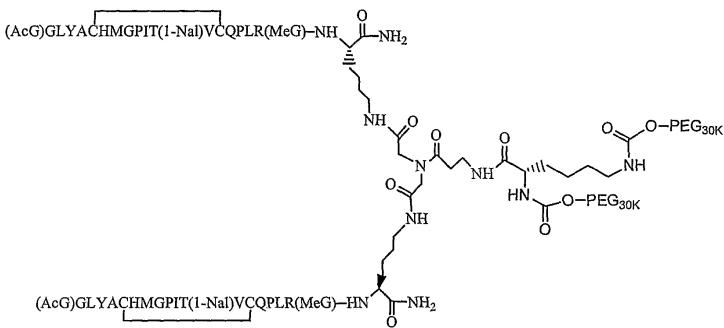
[0257]

[0258]

카르바메이트 결합, 사르코신이 있음 및 양호한 PEG 분자량 (여기서는 SEQ ID NO: 2을 나타냄)의 경우:



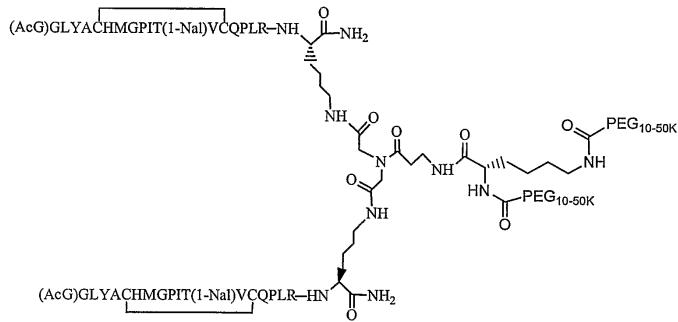
[0259]



[0260]

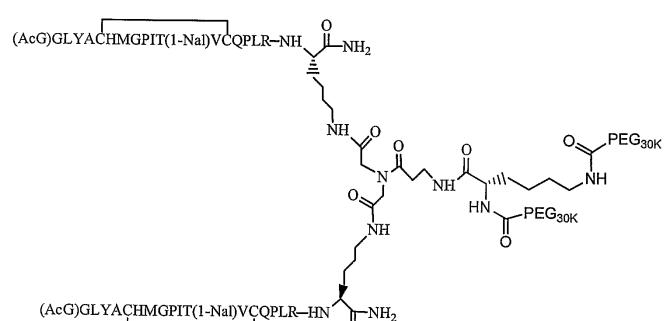
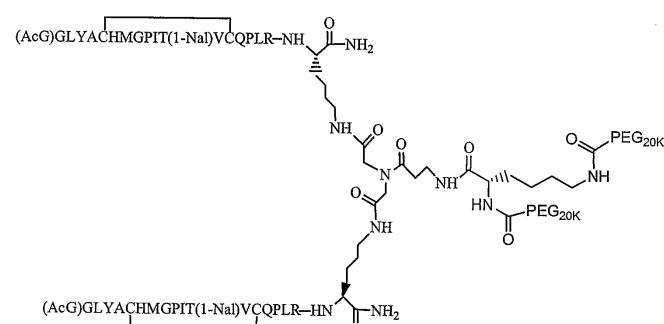
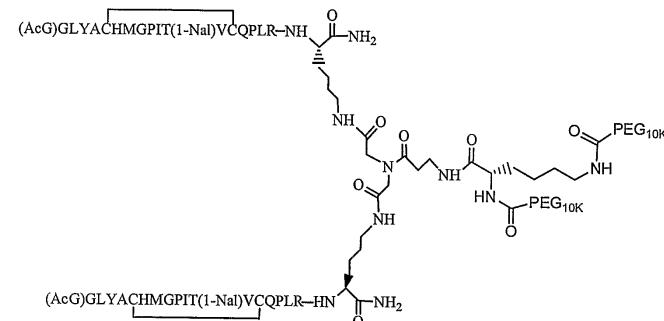
[0261]

아미드 결합, 사르코신 없음, PEG 분자량의 범위 (여기서는 SEQ ID NO: 1을 나타냄)의 경우:

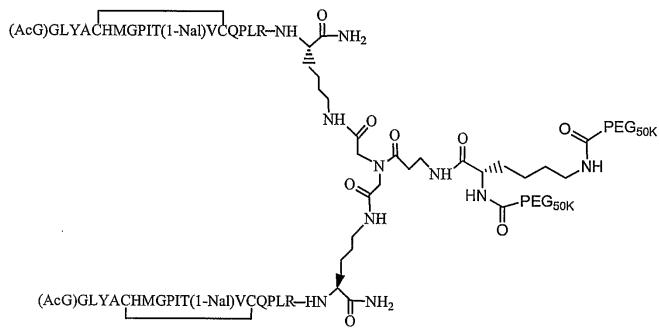
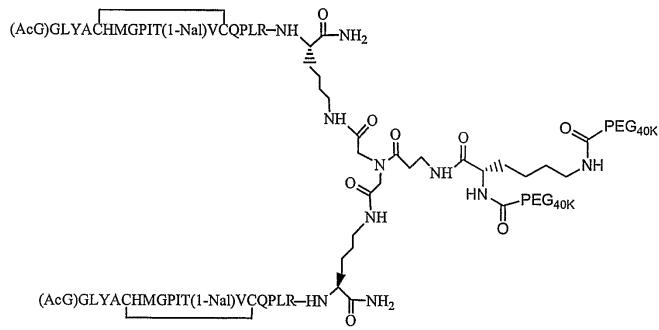


[0262]

아미드 결합, 사르코신 없음, 양호한 PEG 분자량 (여기서는 SEQ ID NO: 1을 나타냄)의 경우:

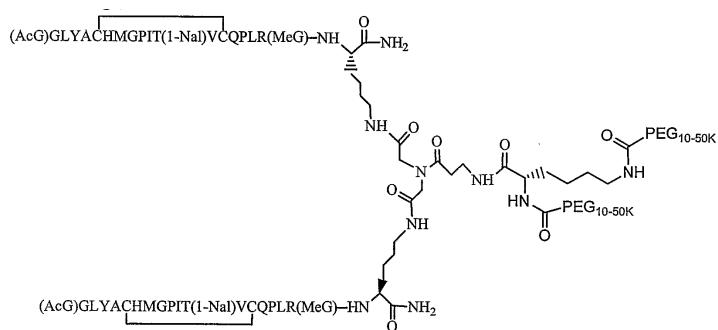


[0264]



[0265]

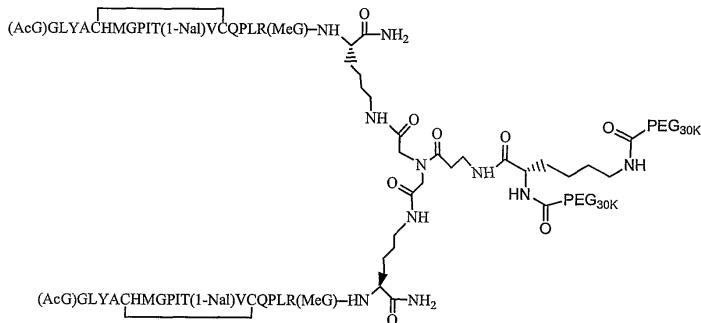
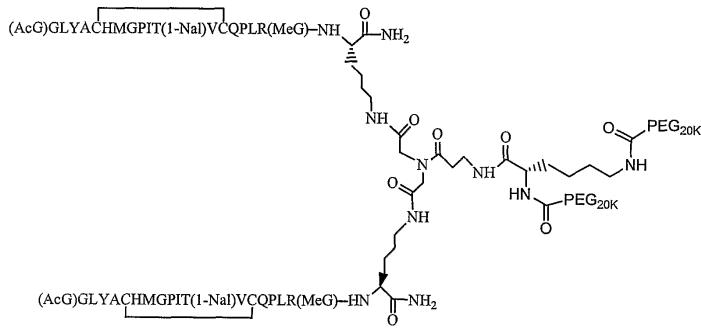
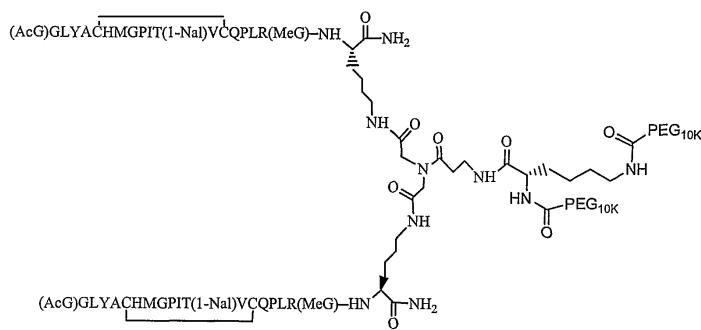
o]미드 결합, 사르코신이 있음 및 PEG 분자량의 범위 (여기서는 SEQ ID NO: 2를 나타냄)의 경우:



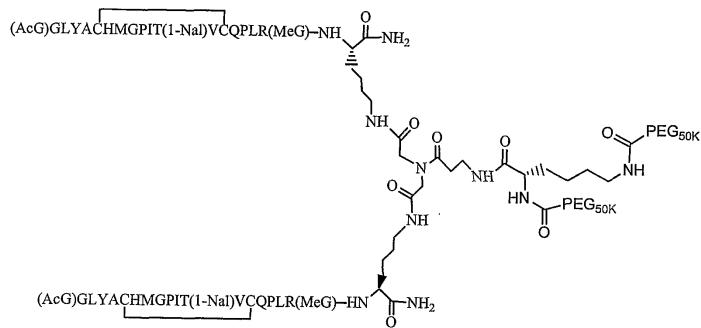
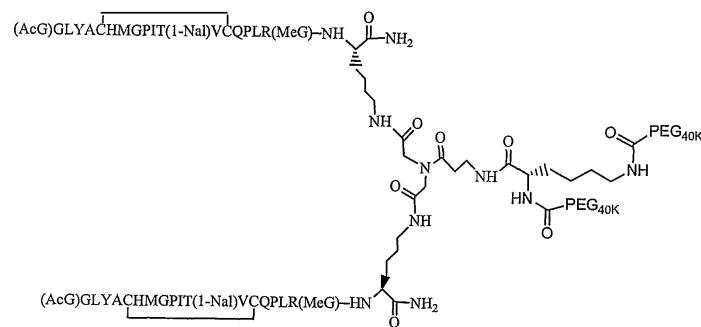
[0267]

[0268]

아미드 결합, 사르코신이 있음 및 양호한 PEG 분자량 (여기서는 SEQ ID NO: 2를 나타냄)의 경우:



[0269]



[0270]

본 발명의 웹티드 (또는 그들의 유도체)는 하나 또는 그 이상의 추가적인 활성 성분 또는 의약 조성물과 함께 투여될 수 있다.

[0271]

## 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0272] 본 발명을 다음의 실시예를 통하여 다시 설명한다. 그러나, 이러한 실시예 및 본 명세서 전체에 기재된 기타의 예는 단지 설명을 위한 것이며, 본 발명 또는 임의의 예시적 형태의 범위 및 의미를 제한하는 것이 아니다. 마찬가지로, 본 발명은 본 명세서에 기재되어 있는 임의의 구체적인 바람직한 실시 상태로 한정되지 않는다. 사실, 본 발명의 많은 변형 및 변화가 본 명세서의 기재를 통하여 당해 기술 분야의 숙련자에게 명백할 수 있으며, 본 발명의 사상과 범위로부터 벗어나지 않고 만들어질 수 있다. 따라서, 본 발명은 청구항의 용어와 청구항에 의하여 부여되는 전체 등가물의 범위에 의하여서만 한정될 것이다.

### 실시예 1: 고상 합성법에 의한 EPO-R 작용제 펩티드 이량체의 합성

#### 단계 1 - Cbz-TAP의 합성:

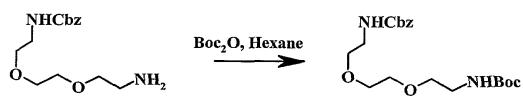
[0275] 무수 DCM (100 ml) 중의 시판중인 디아민 (Aldrich Chemical Co.의 "TAP") (10 g, 67.47 mmol)을 함유하는 용액을 0°C로 냉각시켰다. 반응 혼합물의 온도를 계속해서 0°C로 유지하면서 적가 깔때기를 통하여 6~7 시간에 걸쳐 무수 DCM (50 ml) 중의 벤질 클로로포르메이트 (4.82 ml, 33.7 mmol) 용액을 천천히 첨가하고, 그 후 실온으로 온도를 승온시켰다 (~25°C). 추가로 16 시간이 지난 후에, 상기 DCM을 진공하에서 제거하고, 그 잔류물을 3N HCl 및 에테르 사이에서 분배시켰다 (partitioned). 수성(水性)층을 회수하여 50% NaOH 수용액으로 pH 8~9 까지 중화시키고, 아세트산 에틸층을 무수 Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>로 건조시킨 후, 진공하에서 농축시켜 크루드(crude) 모노-Cbz-TAP을 만들었다 (5g, 약 50% 수율). 이 화합물을 추가적인 정제 없이 다음 반응을 위해 사용하였다.



[0276]

#### 단계 2 - Cbz-TAP-Boc의 합성:

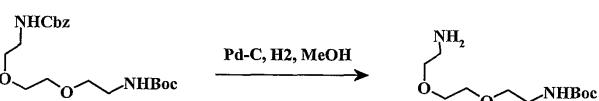
[0277] 핵산 (25 ml) 중의 상기 Cbz-TAP (5 g, 17.7 mmol)의 강하게 교반된 혼탁액에 Boc<sub>2</sub>O (3.86 g, 17.7 mmol)을 첨가하고, 밤새 RT에서 계속하여 교반하였다. 그 반응 혼합물을 DCM (25 ml)으로 희석하고, 10% 시트르산 수용액 (2X), 물 (2X) 및 염수로 세척하였다. 유기층을 무수 Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>로 건조시키고, 진공하에서 농축시켰다. 이러한 조절 생성물 (5g 수득량)을 다음 반응에 직접적으로 사용하였다.



[0279]

#### 단계 3 - Boc-TAP의 합성:

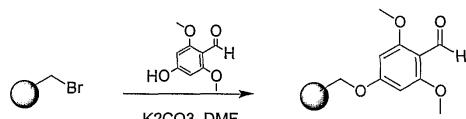
[0281] 전술한 반응으로부터의 조절 생성물을 메탄올(25 ml)에 용해시키고, 풍선 압력(balloon pressure)하에서 16 시간 동안 탄소 상의 5% Pd (5% w/W) 존재하에 수소화시켰다. 그 혼합물을 여과하고 메탄올로 세척한 후, 그 여과물을 진공에서 농축시켜 조절 H-TAP-Boc 생성물 (3.7 g 수득량)을 얻었다. 단계 1~3 후의 Boc-TAP의 대략적인 전체 수율은 44%이었다 (사용된 Cbz-Cl의 양에 기초하여 계산함).



[0282]

#### 단계 4 - 텐타겔-링커(TentaGel-Linker)의 합성:

[0284] 텐타겔 브로마이드 (2.5 g, 0.48 mmol/g, 독일의 Rapp Polymere로부터 입수), 폐놀릭 링커 (5 당량) 및 K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (5 당량)을 20 ml DMF 중에서 14 시간 동안 70°C로 가열하였다. 실온으로 냉각시킨 후, 그 수지를 세척하고 (0.1 N HCl, 물, ACN, DMF, MeOH), 건조시켜 호박색의 수지를 만들었다.

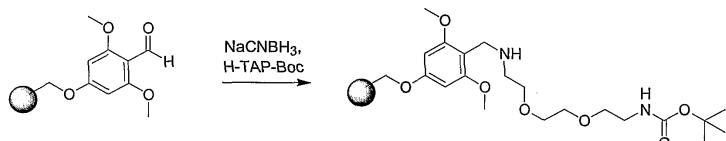


[0285]

## 단계 5 - 텐타겔-링커-TAP(Boc)의 합성:

[0287]

상기 수지 2.5 gm 및 H-TAP-Boc (1.5 gm, 5 당량) 및 빙초산 (34  $\mu$ l, 5 당량)을 1:1 MeOH-THF의 혼합물 중에 넣어, 밤새 진탕시켰다. THF 중의 소듐 시아노보로하이드라이드 (5 당량)의 1 M 용액을 여기에 첨가하고, 또다시 7 시간 동안 진탕시켰다. 상기 수지를 여과하고 세척 (DMF, THF, 0.1 N HCl, 물, MeOH)한 후 건조시켰다. 소량의 수지를 DCM 중의 Bz-Cl 및 DIEA로 벤조일화 시키고, 70% TFA-DCM로 절단한 후, LCMS 및 HPLC로 확인하였다.

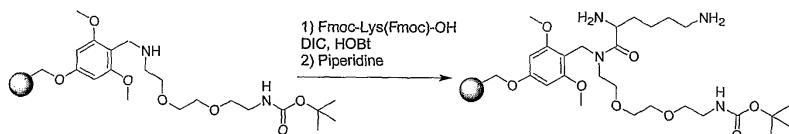


[0288]

## 단계 6 - 텐타겔-링커-TAP-Lys의 합성:

[0290]

얻어진 수지를 Fmoc-Lys(Fmoc)-OH의 활성화 용액 (5 당량의 아미노산 및 5 당량의 HATU)을 DMF 중에 0.5 M로 용해시키고, 이어서 10 당량의 DIEA를 첨가하여 제조됨으로 처리하고, 14 시간 동안 온화하게 진탕시켰다. 이 수지를 세척 (DMF, THF, DCM, MeOH)하고, 건조시켜 보호된 수지를 얻었다. DCM 중의 10% 무수초산, 20% 피리딘 용액으로 그 수지를 20분 동안 처리하여 잔류 아민기를 캡핑하고(capped), 이어서 전술한 것처럼 세척하였다. DMF 중의 30% 피페리딘에서 그 수지를 20분 동안 온화하게 진탕하여 Fmoc기를 제거하고, 이어서 세척(DMF, THF, DCM, MeOH)하여 건조시켰다.

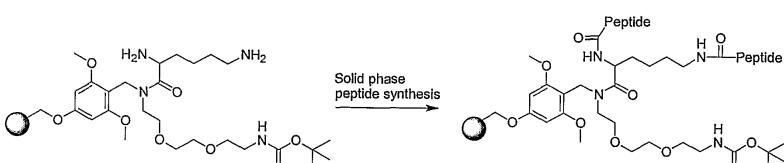


[0291]

단계 7 - 텐타겔-링커-TAP-Lys(펩티드)<sub>2</sub>의 합성:

[0293]

앞에서 얻은 수지로, HBTU/HOBt 활성화로 Fmoc-아미노산을 커플링하는 단계와, 피페리딘으로 Fmoc를 제거하는 단계의 반복 사이클을 수행하여 양쪽 펩티드 사슬을 동시에 만들었다. 이것은 Applied Biosystems, Inc.로부터 구득한 ABI 433 자동화 펩티드 합성장치에서 편리하게 수행되었다. 최종 Fmoc 제거 후에, 말단 아민기를 DMF에서 20분 동안 무수초산 (10 당량) 및 DIEA (20 당량)으로 아실화시킨 후, 전술한 것처럼 세척하였다.

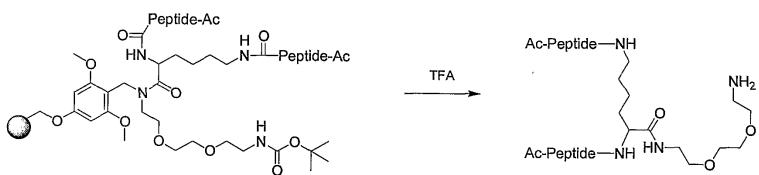


[0294]

## 단계 8 - 수지로부터의 절단:

[0296]

전술한 수지를 TFA (82.5%), 페놀 (5%), 에탄디티올 (2.5%), 물 (5%) 및 티오아니솔 (5%)의 용액 중에 3시간 동안 실온에서 혼탁시켰다. 또 다른 절단 혼합물(cocktails), 예컨대 TFA (95%), 물 (2.5%) 및 트리이소프로필 실란 (2.5%)이 또한 사용될 수 있다. TFA 용액을 5°C까지 냉각시키고, Et<sub>2</sub>O 속으로 부어 펩티드를 침전시켰다. 감압하에서의 여과 및 건조로 목적하는 펩티드를 얻었다. C18 칼럼을 가진 제조용 HPLC를 통한 정제로 순수한 펩티드를 얻을 수 있었다.

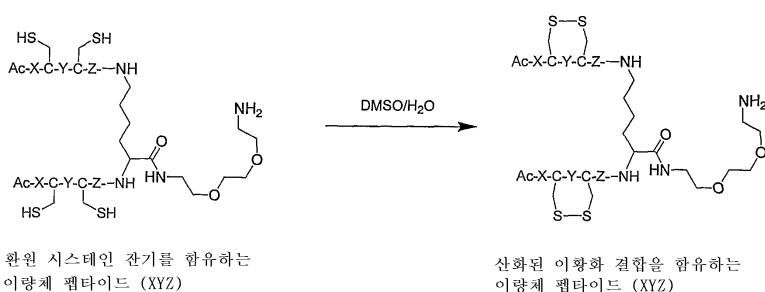


[0297]

## 단계 9 - 분자내 이황화 결합의 형성을 위한 펩티드의 산화:

[0299]

펩티드 이량체를 20% DMSO/물 (1 mg 건조 중량 펩티드/mL)에 용해시키고, 실온에서 36 시간동안 방치하였다. 그 반응 혼합물을 C18 HPLC 칼럼 (Waters Delta-Pak C18, 입도 15 미크론, 세공 크기 300 옹스트롬, 길이 40 mm x 200 mm)으로 로딩한 후, 5 내지 95% ACN 구배의 선형 ACN/물/0.01% TFA으로 40분에 걸쳐 그 펩티드를 정제하였다. 목적하는 펩티드를 함유하는 분획의 동결건조(Iyophilization)로 솜털 같은 백색 고체로서 생성물을 얻을 수 있었다.

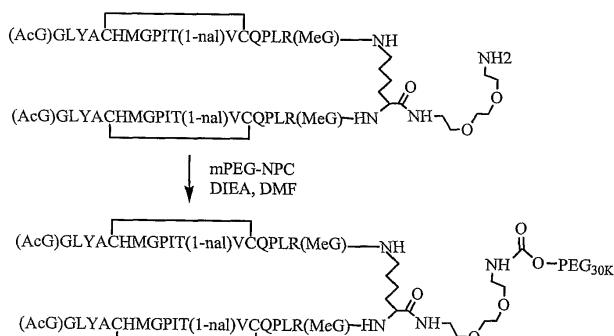


[0300]

단계 10 - 말단 -NH<sub>2</sub>기의 PEG화:

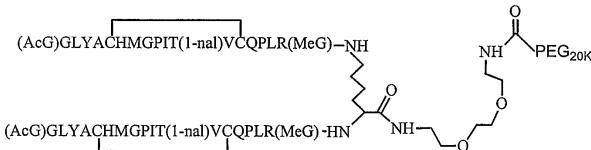
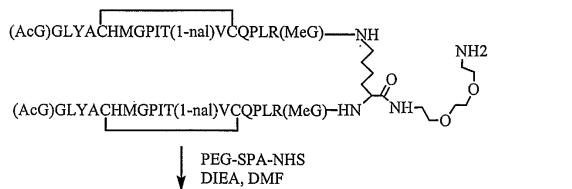
[0302]

**카르바메이트 결합을 통한 PEG화:** 상기 펩티드 이량체를 건조 DMF 중에서 1.5 당량 (몰 기준)의 활성화 PEG 화학종 (mPEG-NPC, NOF Corp., Japan)과 혼합하여 투명한 용액을 얻을 수 있었다. 5분 후에 4 당량의 DIEA를 상기 용액에 첨가하였다. 그 혼합물을 주위 온도에서 14 시간 동안 교반한 후, C18 역상 HPLC로 정제하였다. PEG화 펩티드의 구조를 MALDI 질량분석기(mass)로 확인하였다. 정제된 펩티드를 아래에 개괄한 양이온 교환 크로마토그래피를 통하여 정제하였다. 아래의 개요는 SEQ ID NO: 3을 사용한 mPEG-NPC PEG화를 나타낸 것이다.



[0303]

**아미드 결합을 통한 PEG화:** 상기 펩티드 이량체를 건조 DMF 중에서 1.5 당량 (몰 기준)의 1 당량 활성화 PEG 화학종 (PEG-SPA-NHS, Shearwater Corp, U.S.A.)과 혼합하여 투명한 용액을 얻는다. 5분 후에 10 당량의 DIEA를 상기 용액에 첨가한다. 그 혼합물을 주위 온도에서 2 시간 동안 교반한 후, C18 역상 HPLC로 정제한다. PEG화 펩티드의 구조를 MALDI 질량분석기(mass)에 의하여 확인한다. 정제된 펩티드를 아래에 개괄한 양이온 교환 크로마토그래피를 통하여 정제하였다. 아래의 개요는 SEQ ID NO: 3을 사용한 PEG-SPA-NHS PEG화를 나타낸 것이다.



[0305]

**단계 11 - 이온 교환 정제:**

[0307]

출발 이량체 펫티드를 보유하는 능력 이외에, 상기 펫티드-PEG 접합체를 미반응 (또는 가수분해된) PEG로부터 분리하는 능력에 있어서, 몇 가지 교환 지지체(exchange supports)를 조사하였다. 이온 교환 수지 (2~3 g)를 1 cm 칼럼 속으로 로딩하고, 이어서 그 나트륨 형으로 전환시키고 (용리액(elutant)이 pH 14, 약 5 칼럼 부피에 이를 때까지 칼럼 위로 0.2 N NaOH를 로딩시킴), 그 후 수소 형으로 전환시키고 (용리액이 로딩 pH, 약 5 칼럼 부피에 대등할 때까지, 0.1 N HCl 또는 0.1 M HOAc로 용리시킴), 이어서 25% ACN/물로 pH 6에 이를 때까지 세척하였다. 접합 전의 펫티드 또는 펫티드-PEG 접합물을 25% ACN/물 (10 mg/mL) 중에 용해시키고, TFA로 <3으로 pH를 조절한 후, 칼럼 위에 로딩하였다. 2~3 칼럼 부피의 25% ACN/물로 세척 및 5 mL 분획의 수집 후에, 그 펫티드를 25% ACN/물 중의 0.1 M NH<sub>4</sub>OAc로 용리시켜 칼럼으로부터 방출시키고, 다시 5 mL 분획을 수집하였다.

HPLC를 통한 분석은 목적하는 펫티드를 함유하는 분획을 나타내었다. 증발성 빛-분산 검출기 (Evaporative Light-Scattering Detector; ELSD)로의 분석은 펫티드가 칼럼에 보유되고 NH<sub>4</sub>OAc 용액으로 용리되었을 때 접합되지 않은 PEG가 오염물로서 관찰되지 않았다는 것을 나타내었다. 펫티드가 최초 세척 베퍼 (일반적으로 첫 번째 2개 분획) 중에 용리되었을 때, 목적하는 PEG-접합물 및 과량의 PEG의 분리가 없음이 관찰되었다.

[0308]

다음의 칼럼은 펫티드 및 펫티드-PEG 접합물 양쪽 모두를 성공적으로 보유하였고, 펫티드-PEG 접합물을 비접합 펫티드로부터 성공적으로 정제하였다.

[0309]

**[표 1]**

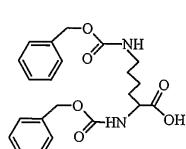
이온 교환 수지	
지지체	출처
모노 S HR 5/5 강한 양이온 교환 예비 로딩 칼럼 (Mono S HR 5/5 strong cation exchange pre-loaded column)	Amersham Biosciences
SE53 세룰로오스, 마이크로파립 강한 양이온 교환 지지체 (SE53 Cellulose, microgranular strong cation exchange support)	Whatman
SP 세파로스 빠른 흐름 강한 양이온 교환 지지체 (SP Sepharose Fast Flow strong cation exchange support)	Amersham Biosciences

[0310]

**실시예 2: 단편 축합에 의한 EPO-R 작용제 펫티드 이량체의 합성****단계 1 - (Cbz)<sub>2</sub>-Lys의 합성:**

[0313]

리신을 표준 조건하에서 벤질 클로로포르메이트 용액과 반응시켜 그의 두 개의 아미노기가 Cbz로 보호된 리신을 얻었다.



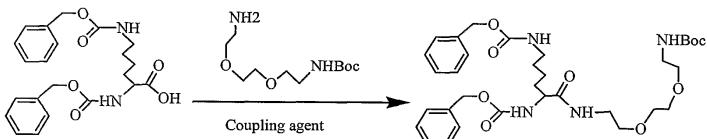
[0314]

**단계 2 - Boc-TAP의 합성:**

[0316] 실시예 1의 단계 1 내지 3에 기재되어 있는 것과 같이 Boc-TAP을 합성하였다.

[0317] 단계 3 -  $(\text{Cbz})_2\text{-Lys}$  및  $\text{Boc-TAP}$ 의 결합:

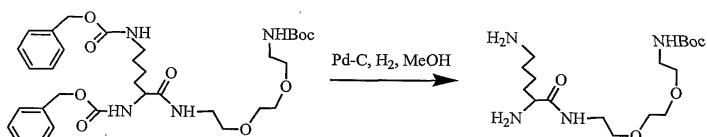
[0318]  $(\text{Cbz})_2\text{-Lys}$  및  $\text{Boc-TAP}$ 을 표준 결합 조건하에서 결합시켜  $(\text{Cbz})_2\text{-Lys-TAP-Boc}$ 을 얻었다.



[0319]

단계 4 -  $\text{Lys-TAP-Boc}$ :

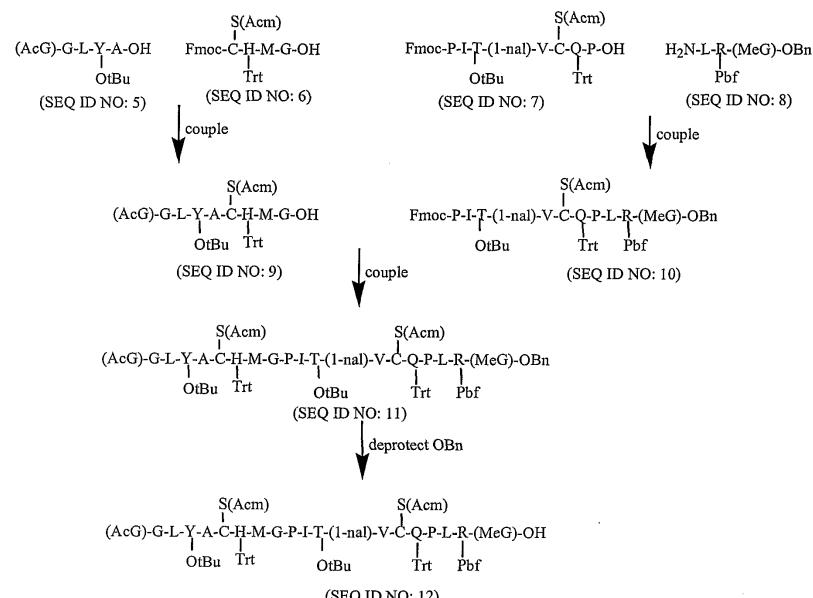
[0320] 상기 반응으로부터의 크루드 생성물을 메탄올 (25 ml)에 용해시킨 후, 탄소 상 5% Pd (5% w/W)의 존재하에서 풍선 압력하에서 16 시간 동안 수소화시켰다. 그 혼합물을 여과하고, 메탄올로 세척한 후, 그 여과물을 진공에서 농축시켜 조질  $\text{Lys-TAP-Boc}$  생성물을 만들었다.



[0322]

단계 5 - 단편 축합에 의한 펩티드 단량체의 합성:

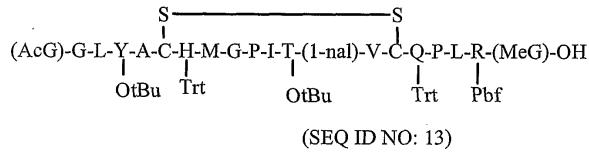
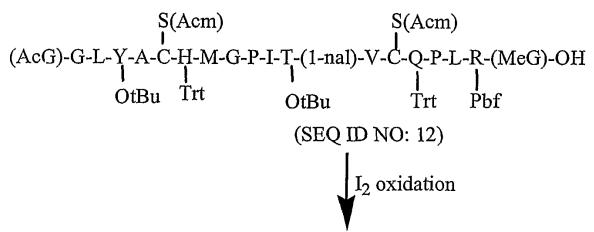
[0324] 펩티드 단량체 서열의 4개의 펩티드 단편을 표준 기술에 의하여 합성하였다. 그 후, 이들 부분적으로 보호된 단편에 대해, 독립적으로 2회의 커플링을 수행하였다. 제1회 커플링에서는, 단량체의 N-말단 절반을 두 개의 펩티드 단편을 결합시키는 것에 의하여 형성시키고, 단량체의 C-말단 절반을 나머지 두 개의 펩티드 단편을 결합시키는 것에 의하여 형성시켰다. 제2회 커플링에서는, 상기 N-말단 및 C-말단 절반들을 결합시켜 완전히 보호된 단량체를 형성시켰다. 그 후, 그 단량체는 표준 기술에 의하여 OBn-탈보호하였다.



[0325]

단계 6 - 분자내 이황화 결합의 형성을 위한 펩티드 단량체의 산화:

[0326] 그 후, OBn-탈보호된 축합 펩티드 단량체 (SEQ ID NO: 12)를 요오드화물 하에서 산화시켜 단량체의 Acm-보호 시스테인 잔기들 사이에서 분자내 이황화 결합을 형성시켰다.

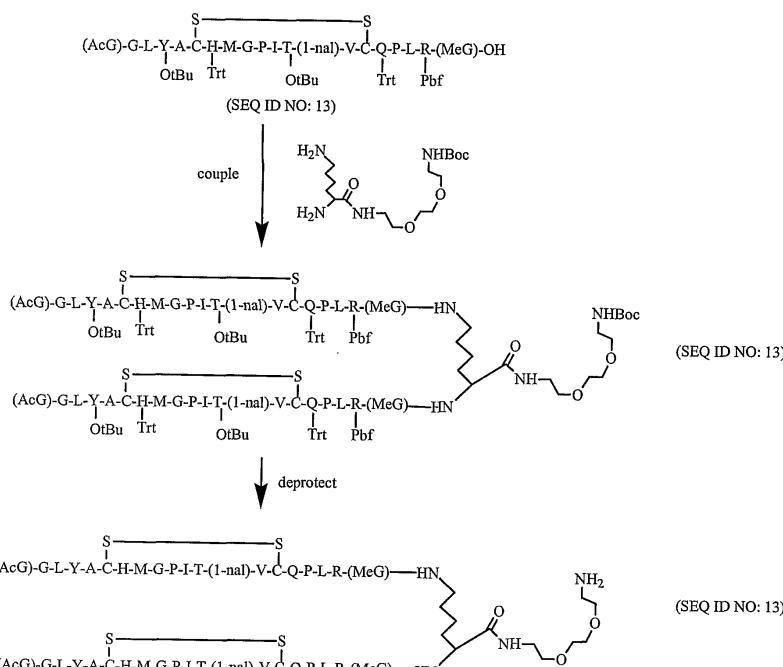


[0328]

단계 7 - 산화된 OBn-탈보호 단량체에 Lys-TAP-Boc을 커플링하여 웨티드 이량체를 형성

[0330]

Lys-TAP-Boc를 표준 조건하에서 2 배 몰(molar) 과량의 산화된 OBn-탈보호 단량체에 커플링하여 웨티드 이량체를 형성시켰다. 그 후, 그 웨티드 이량체를 표준 조건하에서 탈보호시켰다.



[0331]

단계 8 - 탈보호 이량체의 PEG화:

[0333]

그 후, 탈보호된 웨티드 이량체를 실시예 1의 단계 10에서 설명한 바와 같이 PEG화 시켰다.

[0334]

단계 9 - 이온 교환 정제:

[0335]

그 후, PEG화 웨티드 이량체를 실시예 1의 단계 11에서 설명한 바와 같이 정제하였다.

[0336]

실시예 3: 시험관내 활성 분석

[0337]

이번 실시예에서는 본 발명의 EPO-R 작용제 웨티드의 활성 및 능력을 평가하는데 유용한 다양한 시험관내 분석법을 설명한다. 이들 분석에서의 결과들은 본 발명의 신규한 웨티드가 EPO-R에 결합하고 EPO-R 신호를 활성화시킨다는 것을 증명한다. 더욱이, 이들 분석에서의 결과는 그 신규의 웨티드 조성물이 이전에 기재된 바 있었던 EPO 유사 웨티드와 비교할 때 EPO-R 결합 친화도 및 생물학적 활성의 놀랄만한 증가를 나타낸다는 것을 보여준다.

[0338]

EPO-R 작용제 웨티드 이량체를 실시예 1 또는 실시예 2에서 기재된 방법에 따라 제조하였다. 이들 웨티드 이량체의 능력을 리포터(reporter) 분석, 증식 분석, 경쟁적 결합 분석 및 C/BFU-e 분석을 비롯한 일련의 시험관내 활성 분석법을 사용하여 평가하였다. 이들 4가지 분석을 아래에서 더 상세하게 설명한다.

[0339] 이를 시험관내 분석의 결과를 표 2에 요약하였다.

#### 1. 리포터 분석

[0340] 이 분석은 젖과의 전 B 세포주 (pre-B Cell line) 유래 수용체 세포인, Baf3/EpoR/GCSFRfos/lux를 기초로 하고 있다. 이 리포터 세포주는 인간 GCSF 수용체의 세포 내 부분에 인간 EPO 수용체 세포 외 부분을 포함하는 키메라 수용체이다. 이러한 세포주는 fos 프로모터-작동 루시페라제 리포터 유전자 구조체로 추가 트랜스펙션 된다. 적혈구 생성 제제의 첨가로 인한, 이러한 키메라 수용체의 활성은 루시페라제 리포터 유전자의 발현을 초래하고, 루시페라제 기질 루시페린을 첨가하면 빛을 발산하게 된다. 따라서, 이러한 세포에서 EPO-R 활성 수준은 루시페라제 활성 측정으로 정량할 수 있다.

[0341] Baf3/EpoR/GCSFR fos/lux 세포를 10% 소 태아 혈청 (FBS; Hyclone), 10% WEHI-3 상징액 (WEHI-3 세포 배양물로부터의 상징액, ATCC #TIB-68) 및 페니실린/스트렙토마이신을 함유한 DMEM/F12 배지(Gibco)에서 배양한다. 분석 약 18시간 전에, 세포를 10% FBS와 0.1% WEHI-3 상징액을 보충한 DMEM/F12 배지로 옮겨 기아 생태(starvation)로 한다. 분석 당일 날, 세포를 10% FBS (WEHI-3 상징액 비 함유)를 보충한 DMEM/F12 배지로 한번 세척하고, 1ml 당  $1 \times 10^6$  세포를 기지 농도의 테스트 웨비드 존재 하에서, 또는, 양성 대조군으로서 EPO(R&D Systems Inc., Minneapolis, MN)를 이용하여 10% FBS (WEHI-3 상징액 비 함유)를 보충한 DMEM/F12 배지에서 배양한다. 이 분석에서 테스트 웨비드의 계단 회석액을 동시에 테스트한다. 루시페린 (steady-Glo; Promega, Madison, WI)을 각 웰에 첨가한 후에, 분석 플레이트를 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 기압 하에서, 4시간 배양하였다. 5분 간의 배양 후에, 팩커드 톱카운트 루미노미터 (Packard Instrument Co., Downers Grove, IL)로 발광량을 측정한다. 광자 수를 테스트 웨비드 농도에 대하여 그래프화하고, 그래프 패드 소프트웨어로 분석한다. 최대 발광량의 절반값을 유발하는 테스트 웨비드의 농도를 EC<sub>50</sub>으로 나타낸다 (표 2 참조: 리포터 EC<sub>50</sub>).

#### 2. 증식 분석

[0342] 이 분석은 인간 EPO-R를 발현하도록 트랜스펙션된 젖과의 전 B 세포주인, Baf3를 기초로 하고 있다. 그 결과 나타나는 세포주, BaF3/Ga14/E1k/EPOR의 증식은 EPO-R 활성에 좌우된다. 세포 증식의 정도는 MTT를 이용하여 정량 할 수 있으며, MTT 분석에서의 신호는 살아있는 세포 수에 비례한다.

[0343] BaF3/Ga14/E1k/EPOR 세포를 10% FBS (Hyclone) 및 2% WEHI-3 상징액 (ATCC # TIB-68)이 보충된 DMEM/F12 배지 (Gibco) 중에서, 스피너 플라스크 내에서 배양한다. 배양된 세포를 10% FBS 및 0.1% WEHI-3 상징액이 보충된 DMEM/F12 배지에서 1ml 당  $10^6$  세포의 밀도로 스피너 플라스크 내에서 밤새 기아 상태로 한다. 그 후, 기아 상태가 된 세포를 둘베코의 PBS (Dulbecco's PBS (Gibco))로 2번 세척하고, 10% FBS (WEHI-3 상징액 미함유)가 보충된 DMEM/F12 배지에서 1ml 당  $10^6$  세포 밀도로 재현탁시킨다. 그 후, 세포 혼탁액 50  $\mu$ l (~50,000 세포)를 96 웰 분석 플레이트에서 3회 도말한다. 10% FBS (WEHI-3 상징액 미함유)가 보충된 DMEM/F12 배지 중에서의 테스트 EPO 모사 웨비드 계단 회석액 50  $\mu$ l 또는 EPO 50  $\mu$ l (R&D Systems Inc., Minneapolis, MN) 또는 Aranesp<sup>TM</sup> (darbepoetin  $\alpha$ , 암젠사로부터 입수 가능한 EPO-R 작용제)를 96 웰 분석 플레이트 (최종 웰 부피 100  $\mu$ l)에 첨가한다. 예를 들어, 테스트 웨비드 (또는 대조 EPO 웨비드)의 최종 농도 범위가 810 pM 내지 0.0045 pM일 때, 12개의 다른 회석액을 테스트한다. 그 후, 도말된 세포를 37°C에서 48시간 배양한다. 이어서, MTT (Roche Diagnostics) 10  $\mu$ l를 각 배양 접시 웰에 첨가하고, 4시간 동안 배양한다. 그 후, 10% SDS와 0.01N HC1을 첨가하여 반응을 종료시킨다. 이어서, 플레이트를 37°C에서 밤새 배양한다. 595nm 광장에서 각 웰의 흡광도를 분광 광도계로 측정한다. 테스트 웨비드의 농도에 대한 흡광도 수치 그래프를 작성하고, 그래프 패드 소프트웨어를 이용하여 EC<sub>50</sub>을 측정한다. 최대 흡광도의 절반을 유발하는 테스트 웨비드의 농도를 EC<sub>50</sub>으로 나타낸다 (표 2 참조: 증식 EC<sub>50</sub>).

#### 3. 경쟁적 결합 분석

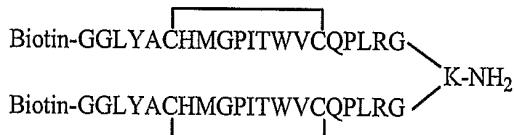
[0344] 경쟁적 결합 결과는 두 개의 비드의 근접 작용으로 유발되는 빛 신호의 분석을 이용하는 것이며, 상기 두 개의 비드는 비오틴 부착된 EPO-R-결합 웨비드 트레이서를 함유하는 스트렙타비딘 도너(donor) 비드와 EPO-R에 결합하는 억셉터(acceptor) 비드이다. 빛은 단일항(singlet) 산소가 조명에 의해서 첫 번째 비드로부터 방출되고, 방출된 단일항 산소가 두 번째 비드에서 빛을 방출시키는 동안의, 비방사능 에너지 전이에 의해 발생한다. 이러한 비드들은 시판되고 있다 (Packard). 비드의 근접성은 EPO-R-결합 웨비드 트레이서가 EPO-R에 결합함으로써 발생한다. EPO-R 결합에 있어서 EPO-R-결합 웨비드 트레이서와 경쟁하는 테스트 웨비드는 이러한 결합을 억제하

고, 빛 발산을 감소시킨다.

[0348]

그 방법을 더 구체적으로 설명하면 다음과 같다. 테스트 EPO-R 작용제 펩티드, 또는 양성 또는 음성 대조군의 계단 회석액  $4\mu\text{l}$ 를 384 웰 플레이트의 웰에 첨가한다. 이어서, 웰 당 수용체/비드 혼합물  $2\mu\text{l}$ 을 첨가한다. 수용체 비드 혼합물은 다음으로 구성된다.  $5\text{ mg/ml}$  스트렙타비딘 도너 비드 (Packard)  $15\mu\text{l}$ ,  $5\text{ mg/ml}$  단일 클론 항체 ab179 (이 항체는 재조합 EPO-R에 포함되어 있는 인간 태반 알칼리성 포스파타제 단백질의 부위를 인식한다)  $15\mu\text{l}$ , 단백질 A-코팅된 억셉터 비드 (단백질 A는 ab179 항체에 결합한다, Packard), 재조합 EPO-R (ab179 표적 에피토프를 함유하는 인간 태반 알칼리성 포스파타제 단백질의 일부에 대한 융합 단백질로서, 차이니즈 햄스터 난소 세포에서 생산함)의 1:6.6 회석액  $112.5\mu\text{l}$  및 알파퀘스트 완충제 ( $40\text{ mM}$  HEPES, pH7.4;  $1\text{ mM}$   $\text{MgCl}_2$ ;  $0.1\%$  BSA,  $0.05\%$  트윈 20)  $607.5\mu\text{l}$ 이다. 가볍게 두드리면서 혼합한다. 비오틴 부착된 EPO-R-결합 펩티드 트레이서, AF33068 (최종 농도  $30\text{nM}$ )를 웰 당  $2\mu\text{l}$  첨가한다. 실시예 1에서 설명한 방법에 따라, 비오틴-GGLYACHMGPITWVCQPLRG (SEQ ID NO: 4)의 서열을 가지는 펩티드 트레이서, 즉 EPO-R 결합 펩티드 (표의 "리포터 EC50 (pM)" 참조)를 만들었다.

### 펩타이드 트레이서



[0349]

\*1분간 원심기를 이용하여 혼합한다. 패커드 톱 봉인으로 플레이트를 봉하고, 호일로 감싼다. 실온에서 밤새 배양한다. 18시간 후, 알파퀘스트 판독기 (Packard)를 이용하여 발광량을 판독한다. 펩티드 농도에 대한 발광량 그래프를 작성하고, 그래프 패드 또는 액셀로 분석한다.

[0351]

테스트 펩티드가 없는 상태에서 관찰된 것과 비교하여 발광량의 50% 감소를 유발하는 테스트 펩티드의 농도를 IC50으로 나타낸다 (표 2 참조: AQ IC50).

[0352]

### 4. C/BFU-e 분석

[0353]

EPO-R 시그널은 골수 줄기 세포가 적혈구 세포 전구체로 분화되는 것을 촉진시킨다. 이러한 분석은 초기 인간 골수 전능 줄기 세포로부터의 적혈구 세포 전구체의 증식과 분화를 촉진하는 테스트 펩티드의 활성을 측정한다.

[0354]

이러한 분석을 위해서,  $10\%$  FBS(Hyclone)가 보충된 IMDM 배지(Gibco) 중에서 테스트 펩티드 계단 회석액을 만든다. 그 후, 이러한 계단 회석액 또는 양성 대조군 EPO 펩티드를 메틸셀룰로스에 첨가하여, 최종 부피가  $1.5\text{ ml}$ 가 되게 한다. 메틸셀룰로스와 펩티드 혼합물을 완벽하게 볼테싱한다. 인간 골수 유래 CD34+ 세포 (Poietics/Cambrex)의 분취액 ( $100,000$  세포/ $\text{ml}$ )을 해동한다. 해동한 세포를  $50\text{ ml}$  퓨브 중에서  $1\text{ mg/ml}$  DNase (줄기 세포)  $0.1\text{ ml}$ 에 서서히 첨가한다. 그 후, IMDM 배지  $40\text{-}50\text{ml}$ 를 세포에 천천히 첨가한다. 이 배지의 처음  $10\text{ ml}$ 를  $50\text{ ml}$  퓨브의 측면을 따라 적가하고, 나머지 남은 용량은 퓨브의 측면을 따라 천천히 가한다. 이어서, 세포를 20분간  $900\text{ rpm}$ 에서 회전시키고, 배지는 서서히 흡인하여 조심스럽게 제거한다. 세포를 IMDM 배지  $1\text{ ml}$ 에 재현탁시키고,  $\text{ml}$  당 세포의 밀도를 혈구 계산기 슬라이드 상에서 측정한다 (슬라이드 상 세포 혼탁액  $10\mu\text{l}$  분취액, 세포 밀도는 평균 총수  $\times 10,000$  세포/ $\text{ml}$ 이다). 그 후, 세포 밀도가  $15,000$  세포/ $\text{ml}$ 가 되도록 세포를 IMDM 배지 중에서 회석한다. 회석된 세포  $100\mu\text{l}$ 를 펩티드 시료가 추가된 각각의 메틸셀룰로스  $1.5\text{ ml}$ 에 첨가하고 (분석 배지 중의 최종 세포 농도는  $1000$  세포/ $\text{ml}$ 이다), 이 혼합물을 볼테싱한다. 혼합물 중의 거품이 사라지게 한 후, 굽은 바늘을 이용하여  $1\text{ ml}$ 를 흡인한다. 각 시료로부터 흡인된 혼합액  $0.25\text{ ml}$ 를 24 웰 플레이트 (Falcon brand)의 4 웰에 첨가한다. 도말한 혼합액을  $37^\circ\text{C}$ ,  $5\%$   $\text{CO}_2$ , 습기 배양기에서 14일간 배양한다. 상 혼미경 ( $5\text{X-}10\text{X}$  대물렌즈,  $100\text{X}$ 의 최종 배율)을 이용하여 적혈구 콜로니의 존재를 계산한다. EPO 양성 대조군으로 관찰한 것과 비교하여, 형성된 콜로니의 수가 최대치의  $90\%$ 인 테스트 펩티드 농도를 EC90으로 나타낸다 (표 2 참조: C/BFU-e EC90).

[0355]

### \*5. 방사능리간드 경쟁적 결합 분석

[0356] 또한, 본 발명 펩티드의 IC<sub>50</sub> 수치를 측정하기 위하여 방사능 리간드 경쟁 결합 분석을 이용할 수 있다. 이 분석은 EPOr에 대한 <sup>125</sup>I-EPO의 결합을 측정하는 것이다. 분석은 하기의 예시되는 프로토콜에 따라 수행될 수 있다.

[0357]

#### A. 재료

제조합 인간 EPO R/Fc 키메라	<ul style="list-style-type: none"> <li>동정: 제조합 인간 EPO R/Fc 키메라</li> <li>공급원: R&amp;D systems (Minneapolis, MN, US)</li> <li>카탈로그 No.:963-ER</li> <li>로트 No.:EOK033071</li> <li>보관: 4°C</li> </ul>
요오드화 제조합 인간 에리스로포이에틴	<ul style="list-style-type: none"> <li>동정: (3[<sup>125</sup>I]아이오도티로실)에리스로포이에틴, 인간 제조합, 고 특이적 활성, 370kBq, 10 μCi</li> <li>공급원: Amersham Biosciences (Piscataway, NJ, US)</li> <li>카탈로그 No.:IM219-10 μCi</li> <li>로트 No.:</li> <li>보관: 4°C</li> </ul>
단백질-G 세파로스	<ul style="list-style-type: none"> <li>동정: 단백질-G 세파로스 4 고속</li> <li>공급원: Amersham Biosciences (Piscataway, NJ, US)</li> <li>카탈로그 No.:17-0618-01</li> <li>로트 No.:</li> <li>보관: 4°C</li> </ul>
분석 버퍼	<ul style="list-style-type: none"> <li>0.1% 소 테아 혈청 알부민과 10% 소디움 아자이드를 함유하는 PBS (Phosphate 완충재ed Saline), pH7.4</li> <li>보관: 4°C</li> </ul>

[0358]

#### B. 적합한 수용체 농도의 측정

[0359] 인간 IgG1의 Fc 부위에 응합된 동결 건조된 제조합 EPOr 세포와 도메인의 50μg 바이얼을 분석 완충제 1 ml 중에서 복원시켰다. 분석에 사용하는 수용체의 적절한 양을 측정하기 위해, 본 수용체 제제의 계단 희석액 100 μl를 요오드 처리한 제조합 인간 에리스로포이에틴 (<sup>125</sup>I-EPO) 200μl 내에, 12 × 75mm 폴리프로필렌 테스트 투브 내에서 약 20,000cpm으로 결합시켰다. 투브는 뚜껑을 덮어, 4°C, 랩퀘이크 (LabQuake) 회전 진탕기에서 밤새 서서히 혼합시킨다.

[0360] 다음날, 단백질-G 세파로스의 50% 슬러리 50 μl를 각 투브에 첨가한다. 그 후, 투브는 4°C에서 2시간 배양하고, 서서히 혼합한다. 이어서, 투브를 4000RPM (3297 x G)에서 15분간 원심분리하고, 단백질-G 세파로스를 펠렛으로 만든다. 상정액을 조심스럽게 제거한 후, 폐기한다. 4°C 분석 완충제 1 ml로 3회 세척한 후, 상기 펠렛을 왈락 위저드 감마 카운터(Wallac Wizard gamma counter)로 계산한다. 그 후, 결과를 분석하고 최대 결합 수치의 50%에 도달될 필요가 있는 희석액을 계산한다.

[0361]

#### C. 펩티드에 대한 IC<sub>50</sub> 측정

[0362] 본 발명의 펩티드의 IC<sub>50</sub>을 측정하기 위해서, 펩티드의 계단 희석액 100 μl를 12 × 75 mm 폴리프로필렌 테스트 투브 중에서 제조합 에리스로포이에틴 수용체 (100pg/투브) 100 μl와 결합시킨다. 그 후, 요오드 처리한 제조합 인간 에리스로포이에틴 (<sup>125</sup>I-EPO) 100 μl를 각 투브에 첨가하고, 각 투브는 뚜껑을 덮고, 4°C에서 밤새 서서히 혼합한다.

[0363]

다음날, 결합된 <sup>125</sup>I-EPO를 상기 설명한 바와 같이 정량한다. 결과를 분석하고, 그래프패드 프리즘 버전 4.0(GraphPad Software, Inc., San Diego, CA)을 이용하여 IC<sub>50</sub> 수치를 측정한다. 총 3회 이상의 레플리케이트 IC<sub>50</sub> 수치 측정을 위하여, 피검 펩티드 각각에 대하여 이 분석을 2회 이상 반복한다.

[0365]

[표 2]

펩타이드 이량체에 대한 시험관 내 활성 분석					
화합물 명칭	펩타이드 이량체	리포트 EC50 (pM)	증식 EC50 (nM)	IC50 (pM)	CBRUe EC50 (nM)
Peptide II (SEQ ID NO: 3)	(AcG)GLY(YAC)HMGPTI(1-nal)YCQPLR(MeG)-NH  	—	—	110	2.2
Peptide III (SEQ ID NO: 3)	(AcG)GLY(YAC)HMGPTI(1-nal)YCQPLR(MeG)-NH  	150	72	—	2.7

[0366]

## 실시예 4: 생체내 활성 분석

[0367]

이 실시예는 본 발명의 EPO-R 작용제 펩타이드의 활성과 효능을 평가하는데 유용한 다양한 생체내 분석을 설명한다. EPO-R 작용제 펩타이드 단량체 및 이량체는 실시예 1의 방법에 따라 제조된다. 이러한 펩타이드 단량체 및 이량체의 활성은 일련의 분석으로 평가되며, 이러한 분석은 적혈구 증가 탈저산소성 마우스 생물학적 분석과 망상적 혈구 분석이 있다. 이러한 2가지 분석은 아래에서 더 자세하게 설명한다.

[0368]

## 1. 적혈구 증가 탈저산소성 마우스 생물학적 분석

[0369]

코즈와 뱅햄 (Cotes and Bangham (1961), *Nature* 191: 1065-1067)이 기재한 방법으로부터 채택된 적혈구 증가 탈저산소성 마우스 생물학적 분석으로 테스트 펩타이드의 생체내 활성을 분석한다. 이 분석은 EPO 모사체로서 작용하는, 즉 EPO-R을 활성화하고 새로운 적혈구 세포 합성을 유도하는, 테스트 펩타이드의 활성을 분석한다. 적혈구 세포 합성은 방사성 표지된 철이 합성된 적혈구 세포의 혈액글로빈 내로 흡입하는 것에 근거하여 정량된다.

[0370]

BDF1 마우스를 상온에서 7~10일간 적응시킨다. 모든 동물에 대해서 체중을 측정한 후, 저체중의 동물 (<15g)을 제외한다. 마우스를 총 14일간 저압실에서 연속적인 컨디션 조절 주기에 노출시킨다. 각 24시간 주기는 0.400 ± 0.02% 기압에서 18시간 및 대기압에서 6시간으로 이루어진다. 컨디션 조절 후, 마우스를 주입 전에 72시간 더

대기압하에 둔다.

[0372] 테스트 웨티드, 또는 재조합 인간 EPO 표준체를 PBS+0.1% BSA 비히클 (PBS/BSA)에 희석시킨다. 처음에 웨티드 단량체 스톡 솔루션을 디메틸 솔록사이드 (DMSO)에 용해시킨다. 음성 대조군에는 PBS/BSA를 단독으로 주입한 마우스 그룹과 1% DMSO를 주입한 마우스 그룹이 있다. 각 그룹은 10 마리의 마우스로 구성된다. 마우스에 적절한 시료 0.5 ml를 피하 주사한다 (목덜미 부위).

[0373] 시료 주입 48시간 후, 마우스에 0.75  $\mu$ Curies/마우스 용량에 대해,  $^{59}\text{Fe}$  (Dupont, NEN) 0.2 ml를 복막 주사한다. 마우스 체중을  $^{59}\text{Fe}$  투여 24시간 후 측정하고,  $^{59}\text{Fe}$  투여 48시간 후 마우스를 희생시킨다. 혈액을 각 동물로부터 심장 천자로 채취하고, 적혈구 용적률을 측정한다 (헤파린을 항응고제로서 사용하였다). 팩커드 갑마 카운터를 사용하여  $^{59}\text{Fe}$  흔입을 확인하기 위해, 각 혈액 시료(0.2 ml)을 분석한다. 비 반응 마우스 (예를 들어, 음성 대조군보다 더 적은 방사능 유입을 나타내는 마우스)는 적절한 데이터로부터 제거한다. 음성 대조군의 53% 미만의 적혈구 용적률을 가지는 마우스도 또한 제거한다. 각 실험 용량에 대해 10 마리로부터 결과가 도출된다. 각 그룹으로부터, 혈액 시료로 유입된 방사능의 평균 양 (분당 카운트, CPM)을 측정한다.

## 2. 망상적혈구 분석(*Reticulocyte Assay*)

[0375] 정상의 BDF1 마우스에 연속 3일간, EPO 대조군 또는 테스트 웨티드를 접종한다 (0.5 ml, 피하 주사). 3일째, 마우스에 철 텍스트란(100 mg/ml)을 또한, 접종한다 (0.1 ml, 복강 주사). 5일째, 마우스를  $\text{CO}_2$ 로 마취하고, 심장 천자로 혈액을 채취한다. 각 혈액 시료에서 망상 적혈구의 비율(%)은 티아졸 오렌지 염색과 흐름 세포 측정기 (retic-count program)로 확인한다. 적혈구 용적률을 계산한다. 망상 적혈구의 정확한 비율은 아래의 식을 이용하여 측정할 수 있다.

$$\% \text{ RETIC}_{\text{CORRECTED}} = \% \text{ RETIC}_{\text{OBSERVED}} \times (\text{Hematocrit}_{\text{INDIVIDUAL}} / \text{Hematocrit}_{\text{NORMAL}})$$

## 3. 혈액학적 분석(*Hematological Assay*)

[0378] 정상의 CD1 마우스에, EPO 양성 대조군, 테스트 웨티드 또는 비히클을 4주일에 한번, 일시 정맥 주사한다. mg/kg으로 표현되는 양성 대조군과 테스트 웨티드의 투여량 범위는 제제 내 활성 화합물의 농도를 변화시킴으로써 테스트된다. 주사량은 5 ml/kg이다. 비히클 대조군은 12 마리로 구성되는 반면, 그외 투여 그룹은 각각 8마리로 구성된다. 매일 생존 능력을 측정하고, 매주 체중을 측정한다.

[0379] 상기 웨티드를 투여받은 마우스는 금식시킨 후, 이소플루란 흡입으로 마취시킨다. 최종 혈액 시료를 심장 또는 복강 대동맥 천자로 1일째 (비히클 대조군 마우스), 15일째 및 29일째 (4마리/그룹/일) 채취한다. 혈액 시료는 Vacutainer® 브랜드 투브로 옮긴다. 바람직한 항응고제는 에틸렌디아민테트라아세트산(EDTA)이다. 혈액 시료는 본 기술 분야에서 잘 알려진 자동 임상 분석기 (예, Coulter, Inc. 제조품)를 이용하여, 적혈구 합성과 적혈구 용적률 (Hct), 해모글로빈 (Hgb) 및 적혈구 계산 (RBC)과 같은 생리 기능을 측정하는 종점으로 평가된다.

[0380] 실시예 5: 웨티드 단량체의 아미노산 서열이 (AcG)GLYACHMGPIT(1-na1)VCQPLRK (SEQ ID NO: 1)인 EPO-R 작용제 웨티드 동종이량체의 합성

## 단계 1 - 웨티드 단량체의 합성:

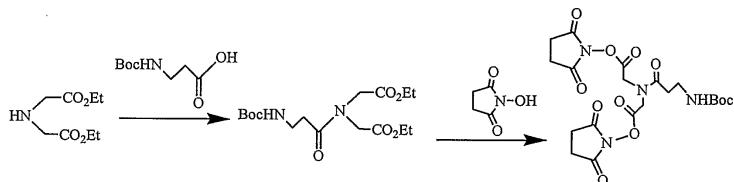
[0382] 웨티드 단량체를 ABI 431A 웨티드 합성기(synthesizer)의 표준 Fmoc 화학반응 및 TG-RAM 수지 (0.18 mmol/g Rapp Polymere, Germany)를 사용하여 합성하였다. 아미드화 카르복시 말단을 지닌 웨티드 단량체의 합성을 위하여, 완전히 조립된 웨티드를 TFA 82.5%, 물 5%, 아니솔 6.25%, 에탄디티올 6.25%를 이용하여 상기 수지로부터 절단시켰다. 이 탈보호 생성물을 수지로부터 여과하고, 디에틸에테르로 침전시켰다. 건조 과정 후에, 상기 생성물을 0.1% 트리플루오로아세트산 중의 아세토니트릴/물의 구배로 C18 역상 고속 크로마토그래피하여 정제시켰다. 웨티드의 구조는 전자 분자 질량 분석기로 확인하였다. 상기 웨티드를 DMSO : 물이 1 : 1인 용액에 1 mg/mL의 농도로 용해시켜 이황화 결합을 형성시켰다. 상기 생성물은 0.1% 트리플루오로아세트산 용액 중의 아세토니트릴/물의 구배로 C18 역상 고속 크로마토그래피하여 정제하였다. 상기 웨티드 단량체를 아래와 같이 나타낼 수 있다 :

(AcG)GLYACHMGPIT(1-nal)VCQPLRK-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO: 1)

[0383]

[0384] 단계 2 - 삼작용성(trifunctional) 링커의 합성:

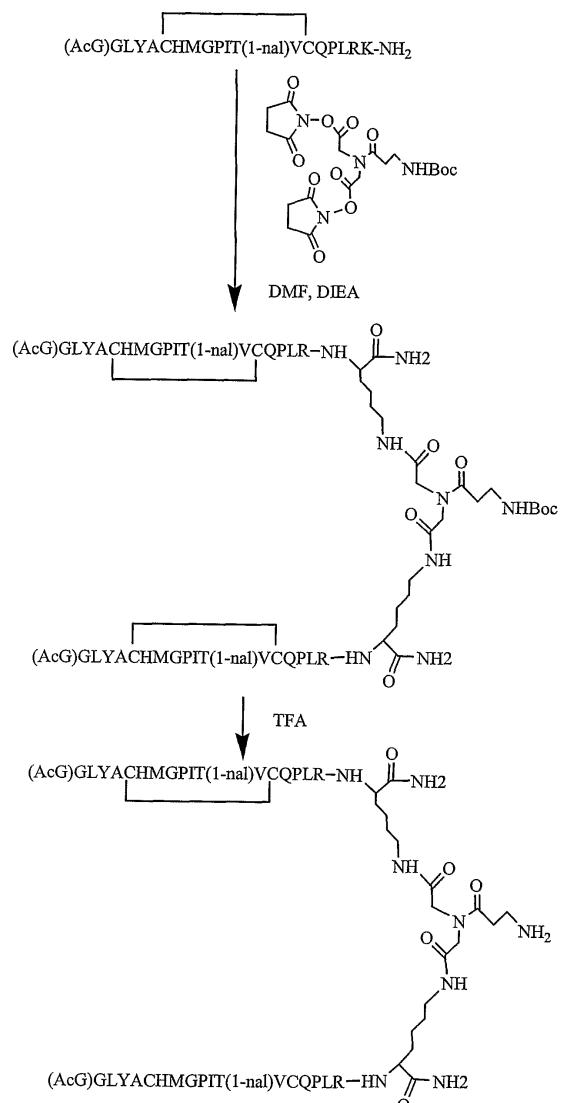
DCM 100 mL 중의 디에틸 아미노아세테이트 용액 (10.0 g, 52.8 mmol) 및 Boc-베타-알라닌 (10.0 g, 52.8 mmol) 용액을 디이소프로필카르보디이미드 (8.0 mL, 51.1 mmol)에 실온에서 10분간 첨가하였다. 상기 반응 혼합물을 첨가하는 동안 10도 정도 승온되었는데, 이어서 20분에 걸쳐 실온으로 다시 냉각시켰다. 상기 반응 혼합물을 밤새 교반하고 나서 침전된 디이소프로필우레아를 여과하였다. 감압 하에서 용액을 제거하여 겉 및 에틸아세테이트에 용해된 잔여분을 얻었으며 이를 다시 여과하여 추가로 침전된 요소를 제거하였다. 이 유기상을 분별깔대기에 넣어 세척 (sat. NaHCO<sub>3</sub>, 식염수, 0.5 N HCl, 식염수), 건조(MgSO<sub>4</sub>), 여과 및 감압하에 농축하여 무색 오일인 디에스테르 생성물을 얻었다. 상기 디에스테르를 MeOH : THF(100 mL)가 1 : 1인 혼합물 중에서 취하고, 물 (25 mL), 및 NaOH (5 g, 125 mmol)을 첨가하였다. pH는 > 10으로 측정되었다. 상기 반응 혼합물을 실온에서 2시간 동안 교반하고, 그 뒤 6N HCl로 pH 1이 되도록 산성화시켰다. 수성상을 NaCl로 포화시켰으며, 에틸 아세테이트로 4회 추출하였다. 위의 한데 모은 유기상을 세척 (염수), 건조 (MgSO<sub>4</sub>), 및 감압하에 농축하여 백색의 반고체를 얻었다. 상기 고체를 DCM 50 mL 중에 용해시키고 300 mL 헥산을 첨가하여 백색의 슬러리를 얻었다. 이 용매를 감압하에 제거하여 백색의 2가 산을 얻었다 (14.7 g, 2 단계에서 91.5% 수득). 20 mL DMF 중의 2가 산 (1 g, 3.29 mmol) 용액에 N-하이드록시숙신이미드 (770 mg, 6.69 mmol), 디이소프로필카르보디이미드 (1.00 mL, 6.38 mmol) 및 4-디메틸아미노페리딘 (3 mg, 0.02 mmol)을 첨가하였다. 상기 반응 혼합물을 밤새 교반하고 상기 용매를 감압하에 제거하였다. 잔여물은 에틸 아세테이트로 흡수시키고 여과하여 침전된 요소를 제거하였다. 이 유기상을 분별깔대기에 넣어 두고, 세척 (sat. NaHCO<sub>3</sub>, 염수, 0.5 N HCl, 염수), 건조(MgSO<sub>4</sub>), 여과 및 감압하에 농축하여 백색 고체인 디-NHS 에스테르 생성물을 얻었다 (1.12 g, 68% 수율).



[0386]

[0387] 단계 3 - 웨티드 단량체에 삼작용성 링커의 결합

링커에 커플링하기 위하여, 2 당량의 웨티드를 건조 DMF 중 1 당량의 3 작용성 링커 용액과 혼합하여 투명한 용액을 얻었고, 5 당량의 DIEA를 2 분 후 첨가하였다. 이 혼합물을 상온에서 14 시간 동안 교반하였다. 용매를 감압하에 제거하였고 이 조질의 생성물을 DCM 중의 80% TFA 용액으로 30 분간 용해시켜 Boc기를 제거하였고 이어 C18 역상 HPLC로 정제하였다. 이량체의 구조는 전자분사 질량 분석기로 확인하였다. 이 커플링 반응에 의해 각 단량체의 리신 잔기의 ε-아미노기의 질소 원자에 링커를 접합하였다. SEQ ID NO: 1을 사용하는 경우 그 제조 방법을 아래에 나타내었다.



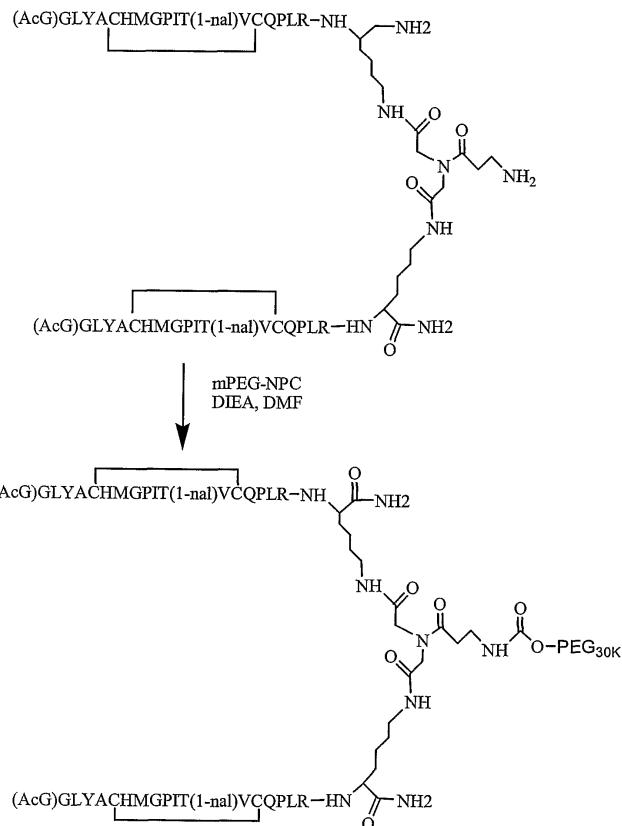
[0389]

[0390]

#### 단계 4 - 펩티드 이량체의 PEG화:

[0391]

카르바메이트 결합을 통한 PEG화: 펩티드 이량체를 건조 DMF 중의 같은 양 (몰 기준)의 활성화 PEG 종 (mPEG-NPC, NOF Corp. Japan) 용액과 혼합하여 투명한 용액을 얻었다. 5 분 후, 4 당량의 DIEA를 상기 용액에 첨가하였다. 이 혼합물을 상온에서 14 시간 동안 교반하였고 이어 C18 역상 HPLC로 정제하였다. 상기 PEG화 펩티드의 구조는 MALDI 질량 분석기로 확인하였다. 이 정제된 펩티드를 아래 도시한 바와 같이 양이온 이온 교환 크로마토그래피를 통하여 정제하였다. SEQ ID NO: 1을 사용한 mPEG-NPC PEG화를 아래에 개괄한다.

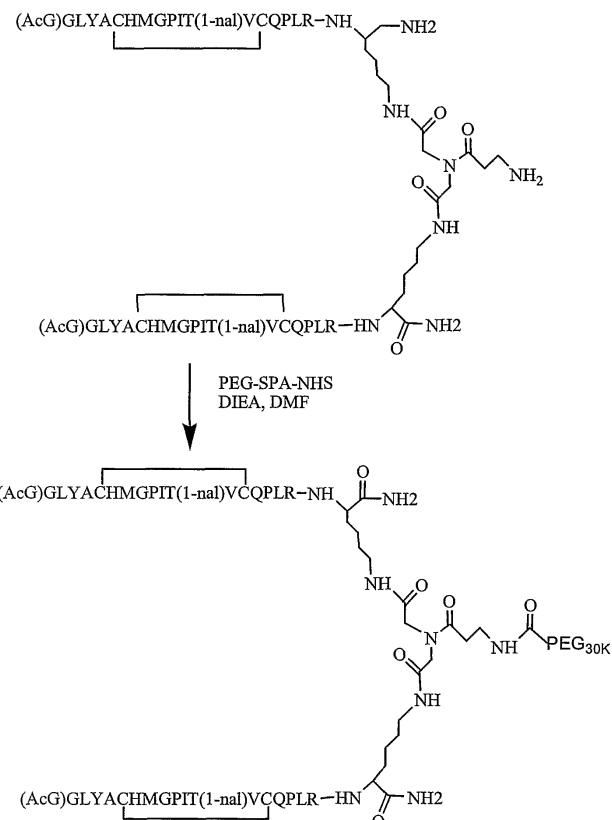


[0392]

아미드 결합을 통한 PEG화:

[0394]

펩티드 이량체를 건조 DMF 중의 같은 양(몰 기준)의 활성화 PEG 종 (PEG-SPA-NHS, Shearwater Corp, USA) 용액과 혼합하여 투명한 용액을 얻었다. 5분 후 이 용액에 10 당량의 DIEA를 첨가하였다. 이 혼합물을 상온에서 2시간 동안 교반하였고, 이어 C18 역상 HPLC로 정제하였다. PEG화 펩티드의 구조는 MALDI 질량 분석기로 확인하였다. 이 정제 펩티드를 아래에서 도시한 바와 같이 양이온 이온 교환 크로마토그래피에 의하여 정제하였다. SEQ ID NO: 1을 사용한 PEG-SPA-NHS PEG화를 아래에 개괄한다.



[0395]

## 단계 5 - 웹티드의 이온 교환 정제:

[0397]

출발 이랑체 펩티드를 보유하는 능력에 더하여, 상기 펩티드-PEG 접합체를 미반응 (또는 가수분해된) PEG로부터 분리하는 능력에 대하여 몇 가지의 교환 지지체를 평가하였다. 이온 교환 수지(2-3g)를 1cm 컬럼에 적재한 후, 나트륨 형 (용리액이 pH 14에 도달할 때까지 컬럼에 0.2N NaOH를 적재함, ca.5 컬럼 부피)으로, 이어서, 수소 형 (용리액이 적재 pH에 도달할 때까지 0.1N HCl 또는 0.1M HOAc로 용리함, ca.5 컬럼 부피)으로 전환시켰다. 그 후, pH가 6에 도달할 때까지, 25% ACN/물로 세척하였다. 접합 단계 이전의 펩티드 또는 펩티드-PEG 접합체를 25% ACN/물 (10 mg/ml)중에 용해시키고, TFA로 pH를 3 미만으로 조정한 후, 컬럼에 적재시켰다. 25% ACN/물 2~3 컬럼 부피로 세척하고, 분획 5 ml를 수집한 후, 펩티드를 25% ACN/물 중의 0.1M NH<sub>4</sub>OAc로 용리하여 컬럼으로부터 분리시켰다. 그 후, 다시 분획 5 ml를 수집하였다. 목적하는 펩티드를 함유하고 있는 분획을 HPLC로 확인하였다. 증발 빛 산란 검출기 (ELSD)를 이용한 분석으로, 펩티드가 컬럼에 머물러 있을 때와 NH<sub>4</sub>OAc 용액으로 용리될 때 (일반적으로 분획 4 및 10 사이임), 불순물로서 비접합된 PEG가 관찰되지 않는 것을 알 수 있었다. 펩티드가 초기 세척 완충제에서 용리될 때 (일반적으로 처음 2 분획), 원하는 PEG-접합체와 과량의 PEG의 어떠한 분리도 관찰되지 않았다.

[0398]

아래의 컬럼은 웨티드와 웨티드-PEG 접합체 모두를 성공적으로 보유하고, 비접합체 웨티드로부터 웨티드-PEG 복합체를 성공적으로 정제하였다.

[0399]

[頁 3]

이온 교환 수지 지지체	출처
모노 S HR 5/5 강력 양이온 교환 사전 적재 컬럼 (Mono S HR 5/5 strong cation exchange pre-loaded column)	Amersham Biosciences
SE53 세룰로스, 미세파립 강력 양이온 교환 지지체 (SE53 Cellulose, microgranular strong cation exchange support)	Whatman
SP 세파로스 고속 강력 양이온 교환 지지체 (SP Sepharose Fast Flow strong cation exchange support)	Amersham Biosciences

〔0400〕

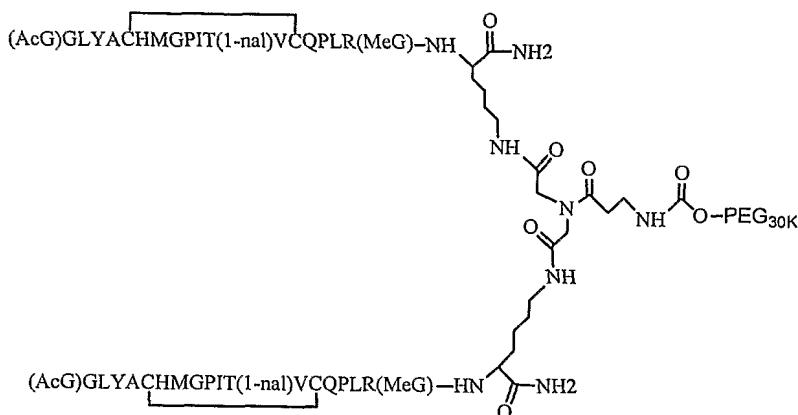
[0401] 실시예 6: 펩티드 단량체의 아미노산 서열이 (AcG)GLYACHMGPIT(1-nal)VCQPLR(MeG)K (SEQ ID NO: 2)인 EPO-R 작용제 펩티드 동종이량체의 합성

[0402] EPO-R 작용제인, 아미노산 서열 (AcG)GLYACHMGPIT(1-nal)VCQPLR(MeG)K (SEQ ID NO: 2)를 지닌 펩티드 단량체의 펩티드 동종이량체를 실시예 1에서 설명한 바와 같이 합성한다. 그러나 단계 1에서 합성되는 펩티드 단량체는 다음과 같다.

(AcG)GLYACHMGPIT(1-nal)VCQPLR(MeG)K (SEQ ID NO: 2)

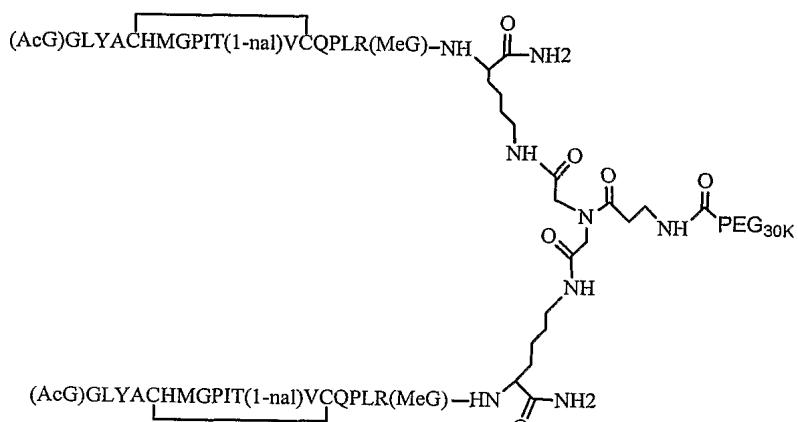
[0403]

[0404] PEG가 카르바메이트 연결을 통하여 링커에 결합된 경우, 이 합성의 최종 생성물은 아래와 같이 구조적으로 나타낼 수 있다.



[0405]

[0406] PEG가 아미드 결합을 통하여 링커에 부착되는 경우, SEQ ID NO: 2를 사용한 본 합성의 최종 생성물은 다음과 같은 구조식으로 나타낼 수 있다.



[0407]

[0408] 실시예 7: 시험관내 활성 분석

[0409] 이 실시예는 본 발명의 EPO-R 작용제 펩티드의 활성과 효능을 평가하는데 유용한 다양한 시험관내 분석을 설명한다. 이러한 분석의 결과는 본 발명의 새로운 펩티드가 EPO-R에 결합하고 EPO-R 신호를 활성화하는 것을 뒷받침한다. 더욱이, 이러한 분석의 결과는 앞서 설명한 EPO 모사 펩티드에 비해 본 발명의 새로운 펩티드 조성물이 EPO-R 결합 친화력과 생물학적 활성에 있어서 놀랄만한 증가를 나타내는 것을 보여준다.

[0410] EPO-R 작용제 펩티드 단량체 및 이량체는 실시예 1 또는 2의 방법에 따라 제조된다. 이러한 펩티드 이량체의 효능은 일련의 시험관내 활성 분석으로 평가되며, 이러한 분석으로는 리포터 분석, 증식 분석, 경쟁적 결합 분석 및 C/BFU-e 분석이 있다. 이러한 4가지 분석은 아래에서 더욱 자세하게 설명한다.

[0411] 이들 시험관내 분석의 결과를 표 2에 요약하였다.

[0412] 1. 리포터 분석

[0413]

이 분석은 젖과의 전 B 세포주 (pre-B Cell line) 유래 수용체 세포인, Baf3/EpoR/GCSFRfos/lux를 기초로 하고 있다. 이 리포터 세포주는 인간 GCSF 수용체의 세포 내 부분에 인간 EPO 수용체 세포 외 부분을 포함하는 키메라 수용체이다. 이러한 세포주는 fos 프로모터-작동 루시페라제 리포터 유전자 구조체로 추가 트랜스펙션 된다. 적혈구 생성 제제의 첨가로 인한, 이러한 키메라 수용체의 활성은 루시페라제 리포터 유전자의 발현을 초래하고, 루시페라제 기질 루시페린을 첨가하면 빛을 발산하게 된다. 따라서, 이러한 세포에서 EPO-R 활성 수준은 루시페라제 활성 측정으로 정량할 수 있다.

[0414]

Baf3/EpoR/GCSFR fos/lux 세포를 10% 소 태아 혈청 (FBS; Hyclone), 10% WEHI-3 상징액 (WEHI-3 세포 배양물로부터의 상징액, ATCC #TIB-68) 및 페니실린/스트렙토마이신을 함유한 DMEM/F12 배지(Gibco)에서 배양한다. 분석 약 18시간 전에, 세포를 10% FBS와 0.1% WEHI-3 상징액을 보충한 DMEM/F12 배지로 옮겨 기아 생태(starvation)로 한다. 분석 당일 날, 세포를 10% FBS (WEHI-3 상징액 비 함유)를 보충한 DMEM/F12 배지로 한번 세척하고, 1ml 당  $1 \times 10^6$  세포를 기지 농도의 테스트 웨티드 존재 하에서, 또는, 양성 대조군으로서 EPO(R&D Systems Inc., Minneapolis, MN)를 이용하여 10% FBS (WEHI-3 상징액 비 함유)를 보충한 DMEM/F12 배지에서 배양한다. 이 분석에서 테스트 웨티드의 계단 희석액을 동시에 테스트한다. 루시페린 (steady-Glo; Promega, Madison, WI)을 각 웰에 첨가한 후에, 분석 플레이트를 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 기압 하에서, 4시간 배양하였다. 5분 간의 배양 후에, 팩커드 톱카운트 루미노미터 (Packard Instrument Co., Downers Grove, IL)로 발광량을 측정한다. 광자 수를 테스트 웨티드 농도에 대하여 그래프화하고, 그래프 패드 소프트웨어로 분석한다. 최대 발광량의 절반값을 유발하는 테스트 웨티드의 농도를 EC<sub>50</sub>으로 나타낸다.

[0415]

## 2. 증식 분석

[0416]

이 분석은 인간 EPO-R를 발현하도록 트랜스펙션된 젖과의 전 B 세포주인, Baf3를 기초로 하고 있다. 그 결과 나타나는 세포주, BaF3/Ga14/E1k/EPOR의 증식은 EPO-R 활성에 좌우된다. 세포 증식의 정도는 MTT를 이용하여 정량 할 수 있으며, MTT 분석에서의 신호는 살아있는 세포 수에 비례한다.

[0417]

BaF3/Ga14/E1k/EPOR 세포를 10% FBS (Hyclone) 및 2% WEHI-3 상징액 (ATCC # TIB-68)이 보충된 DMEM/F12 배지 (Gibco) 중에서, 스피너 플라스크 내에서 배양한다. 배양된 세포를 10% FBS 및 0.1% WEHI-3 상징액이 보충된 DMEM/F12 배지에서 1ml 당  $10^6$  세포의 밀도로 스피너 플라스크 내에서 밤새 기아 상태로 한다. 그 후, 기아 상태가 된 세포를 둘베코의 PBS (Dulbecco's PBS (Gibco))로 2번 세척하고, 10% FBS (WEHI-3 상징액 미함유)가 보충된 DMEM/F12 배지에서 1ml 당  $10^6$  세포 밀도로 재현탁시킨다. 그 후, 세포 혼탁액 50  $\mu$ l (~50,000 세포)를 96 웰 분석 플레이트에서 3회 도말한다. 10% FBS (WEHI-3 상징액 미함유)가 보충된 DMEM/F12 배지 중에서의 테스트 EPO 모사 웨티드 계단 희석액 50  $\mu$ l 또는 EPO 50  $\mu$ l (R&D Systems Inc., Minneapolis, MN) 또는 Aranesp™ (darbepoetin α, 암젠사로부터 입수 가능한 EPO-R 작용제)를 96 웰 분석 플레이트 (최종 웰 부피 100  $\mu$ l)에 첨가한다. 예를 들어, 테스트 웨티드 (또는 대조 EPO 웨티드)의 최종 농도 범위가 810 pM 내지 0.0045 pM일 때, 12개의 다른 희석액을 테스트한다. 그 후, 도말된 세포를 37°C에서 48시간 배양한다. 이어서, MTT (Roche Diagnostics) 10  $\mu$ l를 각 배양 접시 웰에 첨가하고, 4시간 동안 배양한다. 그 후, 10% SDS와 0.01N HC1을 첨가하여 반응을 종료시킨다. 이어서, 플레이트를 37°C에서 밤새 배양한다. 595nm 파장에서 각 웰의 흡광도를 분광광도계로 측정한다. 테스트 웨티드의 농도에 대한 흡광도 수치 그래프를 작성하고, 그래프 패드 소프트웨어를 이용하여 EC<sub>50</sub>을 측정한다. 최대 흡광도의 절반을 유발하는 테스트 웨티드의 농도를 EC<sub>50</sub>으로 나타낸다.

[0418]

## 3. 경쟁적 결합 분석

[0419]

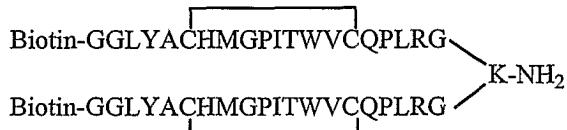
경쟁적 결합 결과는 두 개의 비드의 근접 작용으로 유발되는 빛 신호의 분석을 이용하는 것이며, 상기 두 개의 비드는 비오틴 부착된 EPO-R-결합 웨티드 트레이서를 함유하는 스트렙타비딘 도너(donor) 비드와 EPO-R에 결합하는 억셉터(acceptor) 비드이다. 빛은 단일항(singlet) 산소가 조명에 의해서 첫 번째 비드로부터 방출되고, 방출된 단일항 산소가 두 번째 비드에서 빛을 방출시키는 동안의, 비방사능 에너지 전이에 의해 발생한다. 이러한 비드들은 시판되고 있다 (Packard). 비드의 근접성은 EPO-R-결합 웨티드 트레이서가 EPO-R에 결합함으로써 발생한다. EPO-R 결합에 있어서 EPO-R-결합 웨티드 트레이서와 경쟁하는 테스트 웨티드는 이러한 결합을 억제하고, 빛 발산을 감소시킨다.

[0420]

그 방법을 더 구체적으로 설명하면 다음과 같다. 테스트 EPO-R 작용제 웨티드, 또는 양성 또는 음성 대조군의 계단 희석액 4  $\mu$ l를 384 웰 플레이트의 웰에 첨가한다. 이어서, 웰 당 수용체/비드 혼합물 2  $\mu$ l를 첨가한다. 수용체 비드 혼합물은 다음으로 구성된다. 5 mg/ml 스트렙타비딘 도너 비드 (Packard) 15  $\mu$ l, 5 mg/ml 단일 클론 항

체 ab179 (이 항체는 재조합 EPO-R에 포함되어 있는 인간 태반 알칼리성 포스파타제 단백질의 부위를 인식한다) 15  $\mu\text{l}$ , 단백질 A-코팅된 억셉터 비드 (단백질 A는 ab179 항체에 결합한다, Packard), 재조합 EPO-R (ab179 표적 에피토프를 함유하는 인간 태반 알칼리성 포스파타제 단백질의 일부에 대한 융합 단백질로서, 차이니즈 햄스터 난소 세포에서 생산함)의 1:6.6 희석액 112.5  $\mu\text{l}$  및 알파퀘스트 완충제 (40 mM HEPES, pH7.4; 1mM MgCl<sub>2</sub>; 0.1% BSA, 0.05% 트윈 20) 607.5  $\mu\text{l}$ 이다. 가볍게 두드리면서 혼합한다. 비오틴 부착된 EPO-R-결합 웨티드 트레이서, AF33068 (최종 농도 30nM)를 웰 당 2  $\mu\text{l}$  첨가한다. 실시예 1에서 설명한 방법에 따라, 비오틴-GGLYACHMGPITWVCQPLRG (SEQ ID NO: 4)의 서열을 사용하여, 웨티드 트레이서, 즉 EPO-R 결합 웨티드 (표의 "리포터 EC50 (pM)" 참조)를 만들었다.

### 웨티드 트레이서



[0421]

[0422] 1분간 원심기를 이용하여 혼합한다. 패커드 톱 봉인으로 플레이트를 봉하고, 호일로 감싼다. 실온에서 밤새 배양한다. 18시간 후, 알파퀘스트 판독기 (Packard)를 이용하여 발광량을 판독한다. 웨티드 농도에 대한 발광량 그래프를 작성하고, 그래프 패드 또는 엑셀로 분석한다.

[0423]

[0423] 테스트 웨티드가 없는 상태에서 관찰된 것과 비교하여 발광량의 50% 감소를 유발하는 테스트 웨티드의 농도를 IC50으로 나타낸다.

#### 4. C/BFU-e 분석

[0425]

[0425] EPO-R 시그널은 골수 줄기 세포가 적혈구 세포 전구체로 분화되는 것을 촉진시킨다. 이러한 분석은 초기 인간 골수 전능 줄기 세포로부터의 적혈구 세포 전구체의 증식과 분화를 촉진하는 테스트 웨티드의 활성을 측정한다.

[0426]

[0426] 이러한 분석을 위해서, 10% FBS(Hyclone)가 보충된 IMDM 배지(Gibco) 중에서 테스트 웨티드 계단 희석액을 만든다. 그 후, 이러한 계단 희석액 또는 양성 대조군 EPO 웨티드를 메틸셀룰로스에 첨가하여, 최종 부피가 1.5 ml가 되게 한다. 메틸셀룰로스와 웨티드 혼합물을 완벽하게 볼텍싱한다. 인간 골수 유래 CD34+ 세포 (Poietics/Cambrex)의 분취액 (100,000 세포/ml)을 해동한다. 해동한 세포를 50 ml 퓨브 중에서 1 mg/ml DNase (줄기 세포) 0.1 ml에 서서히 첨가한다. 그 후, IMDM 배지 40-50ml를 세포에 천천히 첨가한다. 이 배지의 처음 10 ml를 50 ml 퓨브의 측면을 따라 적가하고, 나머지 남은 용량은 퓨브의 측면을 따라 천천히 가한다. 이어서, 세포를 20분간 900 rpm에서 회전시키고, 배지는 서서히 흡인하여 조심스럽게 제거한다. 세포를 IMDM 배지 1 ml에 재현탁시키고, ml 당 세포의 밀도를 혈구 계산기 슬라이드 상에서 측정한다 (슬라이드 상 세포 혼탁액 10  $\mu\text{l}$  분취액, 세포 밀도는 평균 총수 X 10,000 세포/ml이다). 그 후, 세포 밀도가 15,000 세포/ml가 되도록 세포를 IMDM 배지 중에서 희석한다. 희석된 세포 100  $\mu\text{l}$ 를 웨티드 시료가 추가된 각각의 메틸셀룰로스 1.5 ml에 첨가하고 (분석 배지 중의 최종 세포 농도는 1000 세포/ml이다), 이 혼합물을 볼텍싱한다. 혼합물 중의 거품이 사라지게 한 후, 굵은 바늘을 이용하여 1 ml를 흡인한다. 각 시료로부터 흡인된 혼합액 0.25 ml를 24 웰 플레이트 (Falcon brand)의 4 웰에 첨가한다. 도말한 혼합액을 37°C, 5% CO<sub>2</sub>, 습기 배양기에서 14일간 배양한다. 상 현미경 (5X-10X 대물렌즈, 100X의 최종 배율)을 이용하여 적혈구 콜로니의 존재를 계산한다. EPO 양성 대조군으로 관찰한 것과 비교하여, 형성된 콜로니의 수가 최대치의 90%인 테스트 웨티드 농도를 EC90으로 나타낸다 (표 2 참조: C/BFU-e EC90).

[0427]

[표 4]

펩타이드 이량체에 대한 시험관 내 활성 분석					
화합물 명칭	펩타이드 이량체	리포터 BC50 (pM)	증식 BC50 (pM)	AQ IC50 (nM)	C/BRFU-e BC90 (nM)
Peptide IV (SEQ ID NO: 1)	(AcG)GLYAC <sup>1</sup> CH <sup>2</sup> MGPT <sup>11</sup> (1-nal)VCQPLR-NH <sub>2</sub>	...	...	...	6.2

(AcG)GLYAC<sup>1</sup>CH<sup>2</sup>MGPT<sup>11</sup>(1-nal)VCQPLR-NH<sub>2</sub>

[0428]

[0429]

#### 실시예 8: 생체내 활성 분석

[0430]

이 실시예는 본 발명의 EPO-R 작용제 펩타이드의 활성과 효능을 평가하는데 유용한 다양한 생체내 분석을 설명한다. EPO-R 작용제 펩타이드 단량체 및 이량체는 실시예 1의 방법에 따라 제조된다. 이러한 펩타이드 단량체 및 이량체의 활성은 일련의 분석으로 평가되며, 이러한 분석은 적혈구 증가 탈저산소성 마우스 생물학적 분석과 망상적 혈구 분석이 있다. 이러한 2가지 분석은 아래에서 더 자세하게 설명한다.

[0431]

#### 1. 적혈구 증가 탈저산소성 마우스 생물학적 분석

[0432]

코츠와 뱅햄 (Cotes and Bangham (1961), Nature 191: 1065-1067)이 기재한 방법으로부터 채택된 적혈구 증가 탈저산소성 마우스 생물학적 분석으로 테스트 펩타이드의 생체내 활성을 분석한다. 이 분석은 EPO 모사체로서 작용하는, 즉 EPO-R을 활성화하고 새로운 적혈구 세포 합성을 유도하는, 테스트 펩타이드의 활성을 분석한다. 적혈구 세포 합성은 방사성 표지된 철이 합성된 적혈구 세포의 혈액글로빈 내로 흡입하는 것에 근거하여 정량된다.

[0433]

BDF1 마우스를 상온에서 7~10일간 적응시킨다. 모든 동물에 대해서 체중을 측정한 후, 저체중의 동물 (<15g)을 제외한다. 마우스를 총 14일간 저압실에서 연속적인 컨디션 조절 주기에 노출시킨다. 각 24시간 주기는 0.400±0.02% 기압에서 18시간 및 대기압에서 6시간으로 이루어진다. 컨디션 조절 후, 마우스를 주입 전에 72시간 더 대기압하에 둔다.

[0434] 테스트 펩티드, 또는 재조합 인간 EPO 표준체를 PBS+0.1% BSA 비히클 (PBS/BSA)에 희석시킨다. 처음에 펩티드 단량체 스톡 솔루션을 디메틸 술폴사이드 (DMSO)에 용해시킨다. 음성 대조군에는 PBS/BSA를 단독으로 주입한 마우스 그룹과 1% DMSO를 주입한 마우스 그룹이 있다. 각 그룹은 10 마리의 마우스로 구성된다. 마우스에 적절한 시료 0.5 ml를 피하 주사한다 (목덜미 부위).

[0435] 시료 주입 48시간 후, 마우스에 0.75  $\mu$ Curies/마우스 용량에 대해,  $^{59}\text{Fe}$  (Dupont, NEN) 0.2 ml를 복막 주사한다. 마우스 체중을  $^{59}\text{Fe}$  투여 24시간 후 측정하고,  $^{59}\text{Fe}$  투여 48시간 후 마우스를 희생시킨다. 혈액을 각 동물로부터 심장 천자로 채취하고, 적혈구 용적률을 측정한다 (해파린을 항응고제로서 사용하였다). 팩카드 감마 카운터를 사용하여  $^{59}\text{Fe}$  혼입을 확인하기 위해, 각 혈액 시료(0.2 ml)을 분석한다. 비 반응 마우스 (예를 들어, 음성 대조군보다 더 적은 방사능 유입을 나타내는 마우스)는 적절한 데이터로부터 제거한다. 음성 대조군의 53% 미만의 적혈구 용적률을 가지는 마우스도 또한 제거한다. 각 실험 용량에 대해 10 마리로부터 결과가 도출된다. 각 그룹으로부터, 혈액 시료로 유입된 방사능의 평균 양 (분당 카운트, CPM)을 측정한다.

## 2. 망상적혈구 분석(Reticulocyte Assay)

[0437] 정상의 BDF1 마우스에 연속 3일간, EPO 대조군 또는 테스트 펩티드를 접종한다 (0.5 ml, 피하 주사). 3일째, 마우스에 철 텍스트란(100 mg/ml)을 또한, 접종한다 (0.1 ml, 복강 주사). 5일째, 마우스를  $\text{CO}_2$ 로 마취하고, 심장 천자로 혈액을 채취한다. 각 혈액 시료에서 망상 적혈구의 비율(%)은 티아졸 오렌지 염색과 흐름 세포 측정기 (retic-count program)로 확인한다. 적혈구 용적률을 계산한다. 망상 적혈구의 정확한 비율은 아래의 식을 이용하여 측정할 수 있다.

$$\% \text{ RETIC}_{\text{CORRECTED}} = \% \text{ RETIC}_{\text{OBSERVED}} \times (\text{Hematocrit}_{\text{INDIVIDUAL}} / \text{Hematocrit}_{\text{NORMAL}})$$

[0438]

## \*3. 혈액학적 분석(Hematological Assay)

[0440] 정상의 CD1 마우스에, EPO 양성 대조군, 테스트 펩티드 또는 비히클을 4주일에 한번, 일시 정맥 주사한다. mg/kg으로 표현되는 양성 대조군과 테스트 펩티드의 투여량 범위는 제제 내 활성 화합물의 농도를 변화시킴으로써 테스트된다. 주사량은 5 ml/kg이다. 비히클 대조군은 12 마리로 구성되는 반면, 그외 투여 그룹은 각각 8마리로 구성된다. 매일 생존 능력을 측정하고, 매주 체중을 측정한다.

[0441] 상기 펩티드를 투여받은 마우스는 금식시킨 후, 이소플루란 흡입으로 마취시킨다. 최종 혈액 시료를 심장 또는 복강 대동맥 천자로 1일째 (비히클 대조군 마우스), 15일째 및 29일째 (4마리/그룹/일) 채취한다. 혈액을 Vacutainer<sup>®</sup> 브랜드 투브로 옮긴다. 바람직한 항응고제는 에틸렌디아민테트라아세트산(EDTA)이다.

[0442] 혈액 시료는 본 기술 분야에서 잘 알려진 자동 임상 분석기 (예, Coulter, Inc. 제조품)를 이용하여, 적혈구 합성과 적혈구 용적률 (Hct), 혜모글로빈 (Hgb) 및 적혈구 계산 (RBC)과 같은 생리 기능을 측정하는 종점으로 평가된다.

[0443] 실시예 9: 펩티드 단량체의 아미노산 서열이 (AcG)GLYACHMGPIT(1-nal)VCQPLRK (SEQ ID NO: 1)인 EPO-R 작용제 펩티드 동종이량체의 합성

### 단계 1 - 펩티드 단량체의 합성:

[0445] 펩티드 단량체를 ABI 431A 펩티드 합성기(synthesizer)의 표준 Fmoc 화학반응 및 TG-RAM 수지 (0.18 mmol/g Rapp Polymere, Germany)를 사용하여 합성하였다. 아미드화 카르복시 말단을 지닌 펩티드 단량체의 합성을 위하여, 완전히 조립된 펩티드를 TFA 82.5%, 물 5%, 아니솔 6.25%, 에탄디티올 6.25%를 이용하여 상기 수지로부터 절단시켰다. 이 탈보호 생성물을 수지로부터 여과하고, 디에틸에테르로 침전시켰다. 건조 과정 후에, 상기 생성물을 0.1% 트리플루오로아세트산 중의 아세토니트릴/물의 구배로 C18 역상 고속 크로마토그래피하여 정제시켰다. 펩티드의 구조는 전자 분자 질량 분석기로 확인하였다. 상기 펩티드 단량체를 아래와 같이 나타낼 수 있다 :

(AcG)GLYACHMGPIT(1-nal)VCQPLRK-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO: 1)

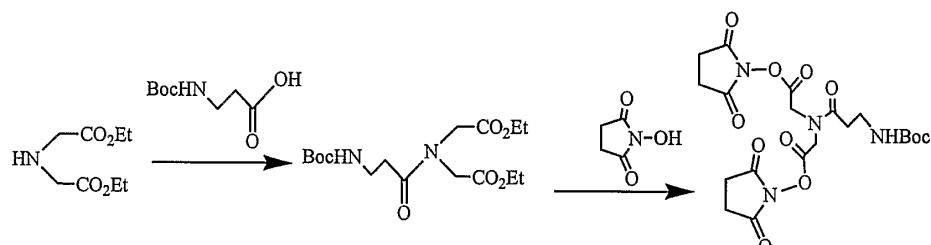
[0446]

[0447]

## 단계 2 - 삼작용성(trifunctional) 링커의 합성:

[0448]

DCM 100 mL 중의 디에틸 이미노아세테이트 용액 (10.0 g, 52.8 mmol) 및 Boc-베타-알라닌 (10.0 g, 52.8 mmol) 용액을 디이소프로필카르보디이미드 (8.0 mL, 51.1 mmol)에 실온에서 10분간 첨가하였다. 상기 반응 혼합물은 첨가하는 동안 10도 정도 승온되었는데, 이어서 20분에 걸쳐 실온으로 다시 냉각시켰다. 상기 반응 혼합물을 밤새 교반하고 나서 침전된 디이소프로필우레아를 여과하였다. 감압 하에서 용액을 제거하여 검 및 에틸아세테이트에 용해된 잔여분을 얻었으며 이를 다시 여과하여 추가로 침전된 요소를 제거하였다. 이 유기상을 분별깔대기에 넣어 세척 (sat.  $\text{NaHCO}_3$ , 식염수, 0.5 N  $\text{HCl}$ , 식염수), 건조( $\text{MgSO}_4$ ), 여과 및 감압하에 농축하여 무색 오일인 디에스테르 생성물을 얻었다. 상기 디에스테르를  $\text{MeOH} : \text{THF}$  (100 mL)가 1 : 1인 혼합물 중에서 취하고, 물 (25 mL), 및  $\text{NaOH}$  (5 g, 125 mmol)을 첨가하였다. pH는 > 10으로 측정되었다. 상기 반응 혼합물을 실온에서 2시간 동안 교반하고, 그 뒤 6N  $\text{HCl}$ 로 pH 1이 되도록 산성화시켰다. 수성상을  $\text{NaCl}$ 로 포화시켰으며, 에틸 아세테이트로 4회 추출하였다. 위의 한데 모은 유기상을 세척 (염수), 건조 ( $\text{MgSO}_4$ ), 및 감압하에 농축하여 백색의 반고체를 얻었다. 상기 고체를 DCM 50 mL 중에 용해시키고 300 mL 혼산을 첨가하여 백색의 슬러리를 얻었다. 이 용매를 감압하에 제거하여 백색의 2가 산을 얻었다 (14.7 g, 2 단계에서 91.5% 수득). 20 mL DMF 중의 2가 산 (1 g, 3.29 mmol) 용액에 N-하이드록시숙신이미드 (770 mg, 6.69 mmol), 디이소프로필카르보디이미드 (1.00 mL, 6.38 mmol) 및 4-디메틸아미노페리딘 (3 mg, 0.02 mmol)을 첨가하였다. 상기 반응 혼합물을 밤새 교반하고 상기 용매를 감압하에 제거하였다. 잔여물을 에틸 아세테이트로 흡수시키고 여과하여 침전된 요소를 제거하였다. 이 유기상을 분별깔대기에 넣어 두고, 세척 (sat.  $\text{NaHCO}_3$ , 염수, 0.5 N  $\text{HCl}$ , 염수), 건조( $\text{MgSO}_4$ ), 여과 및 감압하에 농축하여 백색 고체인 디-NHS 에스테르 생성물을 얻었다 (1.12 g, 68% 수율).



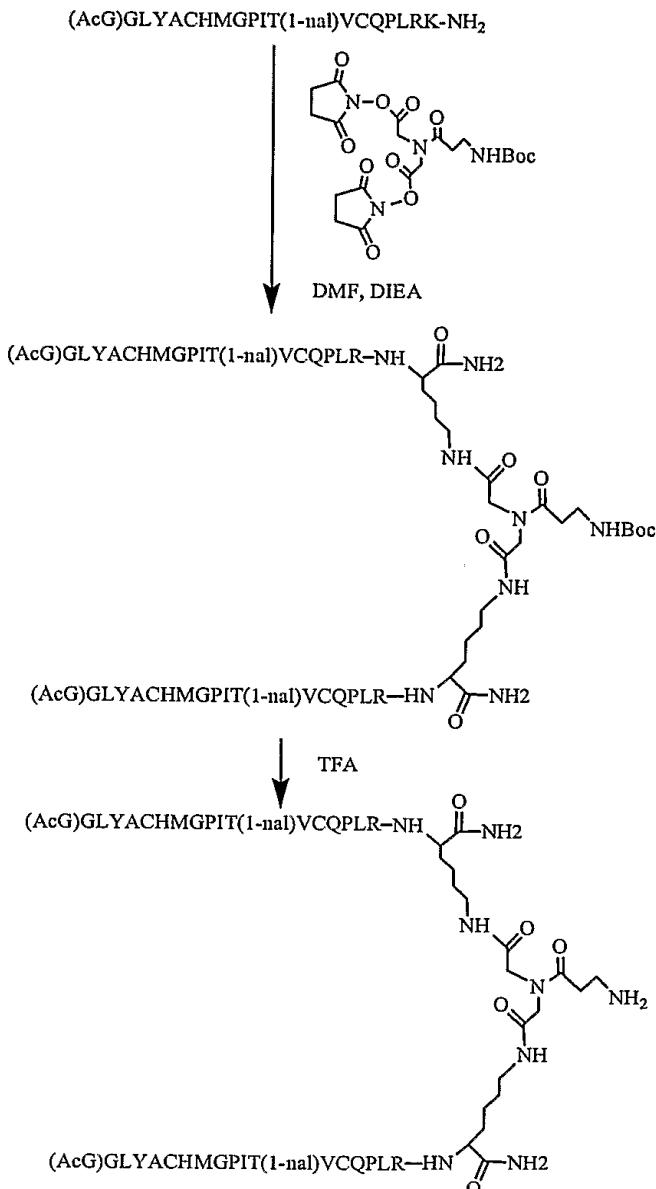
[0449]

[0450]

## 단계 3 - 웨티드 단량체에 삼작용성 링커의 커플링

[0451]

링커에 커플링하기 위하여, 2 당량의 웨티드를 건조 DMF 중 1 당량의 3 작용성 링커 용액과 혼합하여 투명한 용액을 얻었고, 5 당량의 DIEA를 2 분 후 첨가하였다. 이 혼합물을 상온에서 14 시간 동안 교반하였다. 용매를 감압하에 제거하였고 이 조질의 생성물을 DCM 중의 80% TFA 용액으로 30 분간 용해시켜 Boc기를 제거하였고 이어 C18 역상 HPLC로 정제하였다. 이량체의 구조는 전자분사 질량 분석기로 확인하였다. 이 커플링 반응에 의해 각 단량체의 리신 잔기의  $\epsilon$ -아미노기의 질소 원자에 링커를 접합하였다. SEQ ID NO:1을 사용한 커플링 과정을 아래에 도시한다.



[0452]

[0453] 단계 4 - 리신 mPEG2-리신올-NPC에 의하여 연결된 2개의 선형 PEG 사슬을 포함하는 PEG 부분의 합성

[0454]

시판중인 리신올(lysinol)을 과량의 mPEG2-NPC로 처리하여 MPEG2-리신올을 얻은 후, NPC와 반응시켜 mPEG2-리신올-NPC를 만들었다.

[0455]

mPEG2-Lys-NHS

[0456]

이러한 제품은, 예를 들어 넥타 테라퓨틱스(Nektar Therapeutics; 알라바마 35806 헌츠빌, 디스커버리 드라이브 490)의 분자공학 카탈로그(Molecular Engineering catalog) (2003)의 물품 번호 2Z3X0T01로 구입가능하다.

[0457]

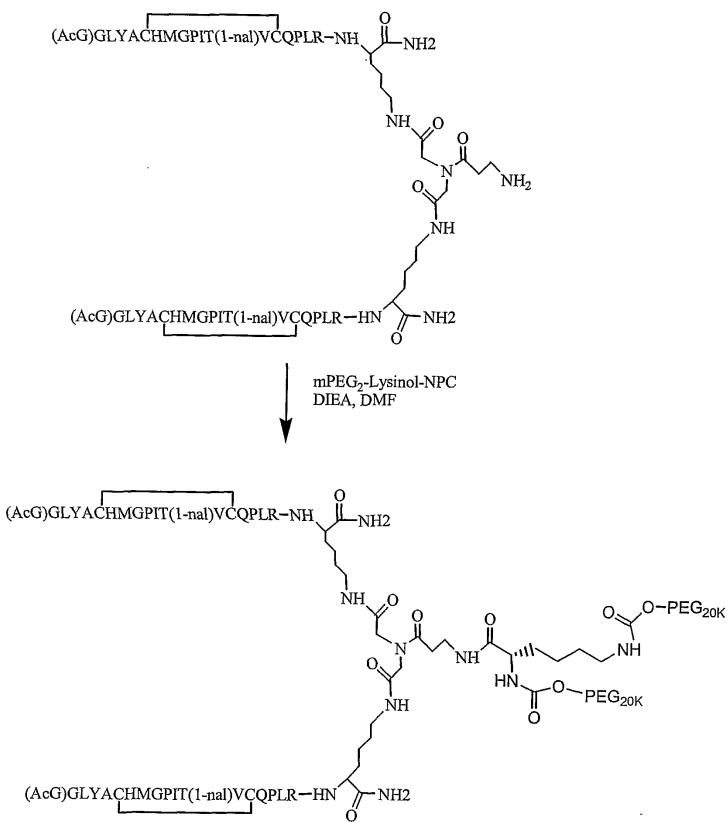
단계 5 - 웨이드 이량체의 PEG화:

[0458]

카르바메이트 결합을 통한 PEG화:

[0459]

상기 웨이드 이량체 및 PEG 화학종 (mPEG<sub>2</sub>-리신올-NPC)을 1:2 몰비로 건조 DMF 중에서 혼합하여 투명한 용액을 얻을 수 있었다. 5분 후에 4 당량의 DIEA를 상기 용액에 첨가하였다. 그 혼합물을 주위 온도에서 14 시간 동안 교반한 후, C18 역상 HPLC로 정제하였다. PEG화 웨이드의 구조를 MALDI 질량분석기(mass)로 확인하였다. 정제된 웨이드를 아래에 개괄한 양이온 교환 크로마토그래피를 통하여 다시 정제하였다. SEQ ID NO: 1을 사용한 경우 mPEG-리신올-NPC를 사용한 PEG화를 아래에 개괄한다.

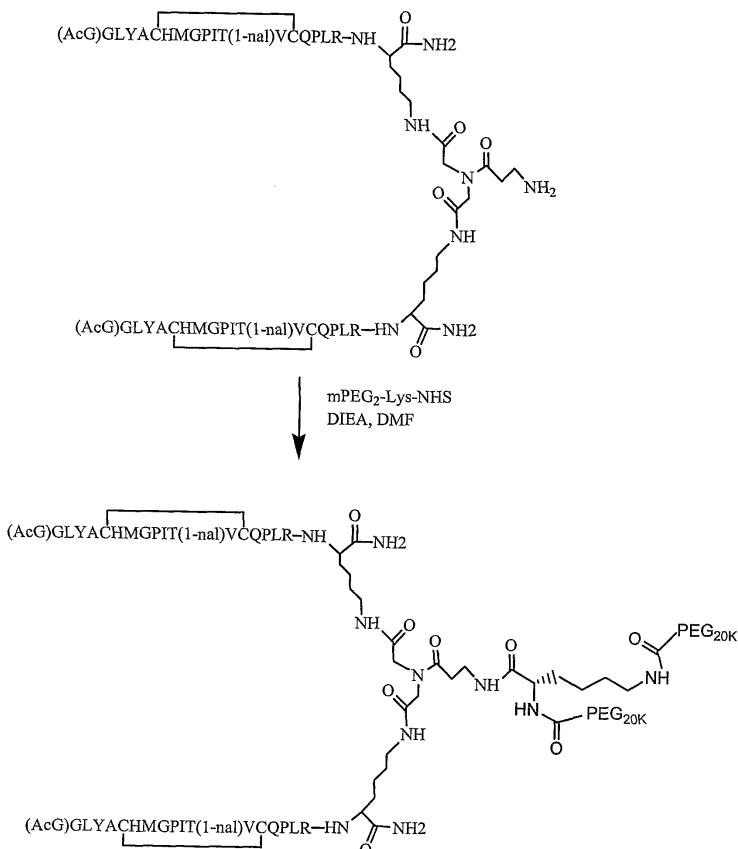


[0460]

아미드 결합을 통한 PEG화:

[0461]

상기 웨티드 이량체 및 PEG 화학종 (mPEG<sub>2</sub>-Lys-NHS, Shearwater Corp, U.S.A.)을 1:2 몰비로 건조 DMF 중에서 혼합하여 투명한 용액을 얻을 수 있었다. 5분 후에 10 당량의 DIEA를 상기 용액에 첨가하였다. 그 혼합물을 주위 온도에서 2 시간 동안 교반한 후, C18 역상 HPLC로 정제하였다. PEG화 웨티드의 구조를 MALDI 질량분석기 (mass)로 확인하였다. 정제된 웨티드를 아래에 개괄한 양이온 교환 크로마토그래피를 통한 정제도 또한 수행하였다. SEQ ID NO: 1을 사용한 PEG<sub>2</sub>-Lys-NHS PEG를 사용한 PEG화를 아래에 개괄한다.



[0463]

## 단계 6 - 펩티드의 이온 교환 정제:

[0465]

출발 이량체 펩티드를 보유하는 능력 이외에, 상기 펩티드-PEG 접합체를 미반응 (또는 가수분해된) PEG로부터 분리하는 능력에 있어서, 몇 가지 교환 지지체(exchange supports)를 조사하였다. 이온 교환 수지 (2~3 g)를 1 cm 칼럼 속으로 로딩하고, 이어서 그 나트륨 형으로 전환시키고 (용리액(elutant)이 pH 14, 약 5 칼럼 부피에 이를 때까지 칼럼 위로 0.2 N NaOH를 로딩시킴), 그 후 수소 형으로 전환시키고 (용리액이 로딩 pH, 약 5 칼럼 부피에 대등할 때까지, 0.1 N HCl 또는 0.1 M HOAc로 용리시킴), 이어서 25% ACN/물로 pH 6에 이를 때까지 세척하였다. 접합 전의 펩티드 또는 펩티드-PEG 접합물을 25% ACN/물 (10 mg/mL) 중에 용해시키고, TFA로 <3으로 pH를 조절한 후, 칼럼 위에 로딩하였다. 2~3 칼럼 부피의 25% ACN/물로 세척 및 5 mL 분획의 수집 후에, 그 펩티드를 25% ACN/물 중의 0.1 M NH<sub>4</sub>OAc로 용리시켜 칼럼으로부터 방출시키고, 다시 5 mL 분획을 수집하였다.

HPLC를 통한 분석은 목적하는 펩티드를 함유하는 분획을 나타내었다. 증발성 빛-분산 검출기 (Evaporative Light-Scattering Detector; ELSD)로의 분석은 펩티드가 칼럼에 보유되고 NH<sub>4</sub>OAc 용액으로 용리되었을 때 (일반적으로 4 내지 10번째 분획) 접합되지 않은 PEG가 오염물로서 관찰되지 않았다는 것을 나타내었다. 펩티드가 최초 세척 버퍼 (일반적으로 첫 번째 2개 분획) 중에 용리되었을 때, 목적하는 PEG-접합물 및 과량의 PEG의 분리가 없음이 관찰되었다.

[0466]

다음의 칼럼은 펩티드 및 펩티드-PEG 접합물 양쪽 모두를 성공적으로 보유하였고, 펩티드-PEG 접합물을 비접합 펩티드로부터 성공적으로 정제하였다.

[0467]

## [표 5]

이온 교환 수지	
지지체	출처
모노 S HR 5/5 강한 양이온 교환 예비 로딩 칼럼	Amersham Biosciences
SE53 세룰로오스, 마이크로파립 강한 양이온 교환 지지체	Whatman
SP 세파로스 빠른 흐름 강한 양이온 교환 지지체	Amersham Biosciences

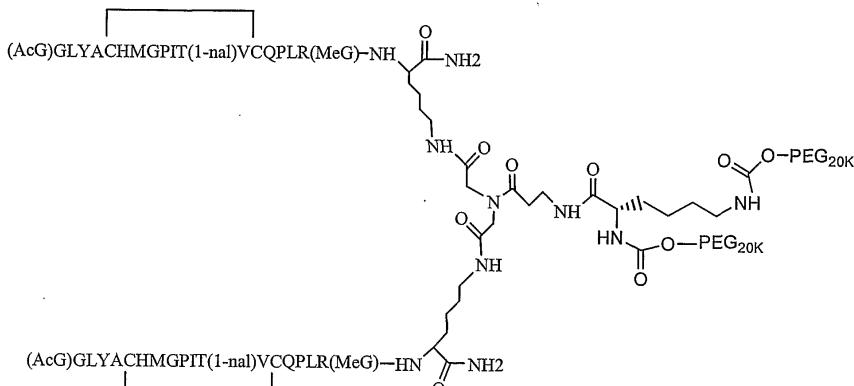
[0468]

실시예 10: 펩티드 단량체의 아미노산 서열이 (AcG)GLY-ACH-MGPIT(1-nal)-VCQPLR(MeG)K (SEQ ID NO: 2)인 EPO-R 작용제 펩티드 동종이량체의 합성

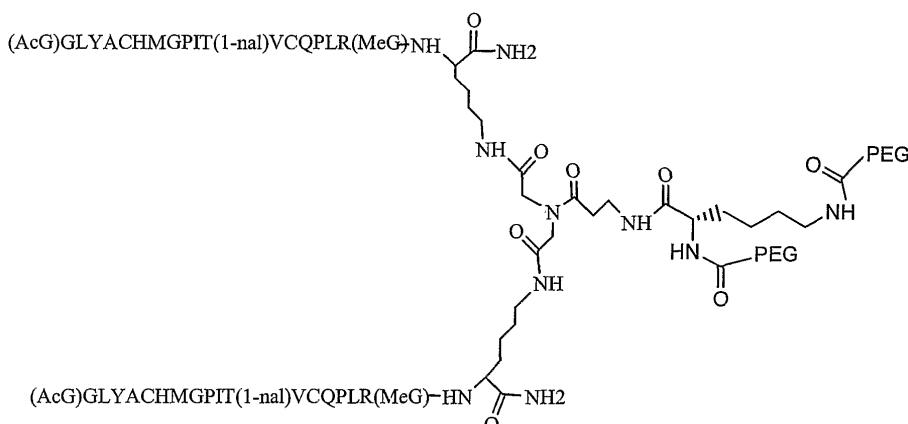
펩티드 단량체의 아미노산 서열이 (AcG)GLYACHMGPIT(1-na1)VCQPLR(MeG)K (SEQ ID NO: 2)인 EPO-R 작용제 펩티드 동종이량체를 실시예 1에 설명한 것과 같이 합성하였는데, 다만 단계 1에서의 합성된 펩티드 단량체는 아래의 것이다.

(AcG)GLYACHMGPIT(1-nal)VCQPLR(MeG)K (SEO ID NO: 2)

PEG가 카르바메이트 결합을 통하여 스페이서에 부착되는 경우, SEQ ID NO: 2를 사용한 본 합성의 최종 생성물은 다음과 같은 구조식으로 나타낼 수 있다:



PEG가 아미드 결합을 통하여 스페이서에 부착되는 경우, SEQ ID NO: 2를 사용한 본 합성의 최종 생성물은 다음과 같은 구조식으로 나타낼 수 있다:



### 실시예 11: 시험관내 활성 분석

\*이 실시예는 본 발명의 EPO-R 작용제 펩티드의 활성과 효능을 평가하는데 유용한 다양한 시험관내 분석을 설명한다. 이러한 분석의 결과는 본 발명의 새로운 펩티드가 EPO-R에 결합하고 EPO-R 신호를 활성화하는 것을 뒷받침한다. 더욱이, 이러한 분석의 결과는 본 발명의 새로운 펩티드 조성물이 앞서 설명한 EPO 모사 펩티드에 비해 EPO-R 결합 친화력과 생물학적 활성에 있어서 놀랄만한 증가를 나타내는 것을 보여준다.

EPO-R 작용제 웨프티드 단량체 및 이량체는 실시예 1 또는 2의 방법에 따라 제조된다. 이러한 웨프티드 단량체 및 이량체의 효능은 일련의 시험관내 활성 분석으로 평가되며, 이러한 분석으로는 리포터 분석, 증식 분석, 경쟁적 결합 분석 및 C/BFU-e 분석이 있다. 이러한 4가지 분석은 아래에서 더욱 자세하게 설명한다.

이들 시험관내 분석의 결과를 표 2에 요약하였다.

## 1. 리포터 분석

이 분석은 첫파의 전 B 세포주 (pre-B Cell line) 유래 수용체 세포인, Baf3/EpoR/GCSFRfos/lux를 기초로 하고 있다. 이 리포터 세포주는 인간 GCSF 수용체의 세포 내 부분에 인간 EPO 수용체 세포와 부분을 포함하는 키메라

수용체이다. 이러한 세포주는 fos 프로모터-작동 루시페라제 리포터 유전자 구조체로 추가 트랜스펙션 된다. 적혈구 생성 제제의 첨가로 인한, 이러한 키메라 수용체의 활성은 루시페라제 리포터 유전자의 발현을 초래하고, 루시페라제 기질 루시페린을 첨가하면 발광하게 된다. 따라서, 이러한 세포에서 EPO-R 활성 수준은 루시페라제 활성 측정으로 정량할 수 있다.

[0482] Baf3/EpoR/GCSFR fos/lux 세포를 10% 소 태아 혈청 (FBS; Hyclone), 10% WEHI-3 상징액 (WEHI-3 세포 배양물로부터의 상징액, ATCC #TIB-68) 및 페니실린/스트렙토마이신을 함유한 DMEM/F12 배지(Gibco)에서 배양한다. 분석 약 18시간 전에, 세포를 10% FBS와 0.1% WEHI-3 상징액을 보충한 DMEM/F12 배지로 옮겨 기아 생태(starvation)로 한다. 분석 당일 날, 세포를 10% FBS (WEHI-3 상징액 비 함유)를 보충한 DMEM/F12 배지로 한번 세척하고, 1ml 당  $1 \times 10^6$  세포를 기지 농도의 테스트 웨티드 존재 하에서, 또는, 양성 대조군으로서 EPO(R&D Systems Inc., Minneapolis, MN)를 이용하여 10% FBS (WEHI-3 상징액 비 함유)를 보충한 DMEM/F12 배지에서 배양한다. 이 분석에서 테스트 웨티드의 계단 회석액을 동시에 테스트한다. 루시페린 (steady-Glo; Promega, Madison, WI)을 각 웰에 첨가한 후에, 분석 플레이트를 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 기압 하에서, 4시간 배양하였다. 5분 간의 배양 후에, 팩커드 톰카운트 루미노미터 (Packard Instrument Co., Downers Grove, IL)로 발광량을 측정한다. 광자수를 테스트 웨티드 농도에 대하여 그래프화하고, 그래프 패드 소프트웨어로 분석한다. 최대 발광량의 절반값을 유발하는 테스트 웨티드의 농도를 EC<sub>50</sub>으로 나타낸다.

## 2. 증식 분석

[0483] 이 분석은 인간 EPO-R를 발현하도록 트랜스펙션된 첫과의 전 B 세포주인, Baf3를 기초로 하고 있다. 그 결과 나타나는 세포주, BaF3/Ga14/E1k/EPOR의 증식은 EPO-R 활성에 좌우된다. 세포 증식의 정도는 MTT를 이용하여 정량할 수 있으며, MTT 분석에서의 신호는 살아있는 세포 수에 비례한다.

[0484] BaF3/Ga14/E1k/EPOR 세포를 10% FBS (Hyclone) 및 2% WEHI-3 상징액 (ATCC # TIB-68)이 보충된 DMEM/F12 배지 (Gibco) 중에서, 스피너 플라스크 내에서 배양한다. 배양된 세포를 10% FBS 및 0.1% WEHI-3 상징액이 보충된 DMEM/F12 배지에서 1ml 당  $10^6$  세포의 밀도로 스피너 플라스크 내에서 밤새 기아 상태로 한다. 그 후, 기아 상태가 된 세포를 둘베코의 PBS (Dulbecco's PBS (Gibco))로 2번 세척하고, 10% FBS (WEHI-3 상징액 미함유)가 보충된 DMEM/F12 배지에서 1ml 당  $10^6$  세포 밀도로 재현탁시킨다. 그 후, 세포 혼탁액 50  $\mu$ l (~50,000 세포)를 96 웰 분석 플레이트에 3회 도말한다. 10% FBS (WEHI-3 상징액 미함유)가 보충된 DMEM/F12 배지 중에서의 테스트 EPO 모사 웨티드의 계단 회석액 50  $\mu$ l, 또는 EPO 50  $\mu$ l (R&D Systems Inc., Minneapolis, MN) 또는 Aranesp™ (darbepoetin α, 암젠사로부터 입수가능한 EPO-R 작용제)를 96 웰 분석 플레이트 (최종 웰 부피 100  $\mu$ l)에 첨가한다. 예를 들어, 테스트 웨티드 (또는 대조 EPO 웨티드)의 최종 농도 범위가 810 pM 내지 0.0045 pM일 때, 12개의 다른 회석액을 테스트한다. 그 후, 도말된 세포를 37°C에서 48시간 배양한다. 이어서, MTT (Roche Diagnostics) 10  $\mu$ l를 각 배양 접시 웰에 첨가하고, 4시간 동안 배양한다. 그 후, 10% SDS와 0.01N HC1을 첨가하여 반응을 종료시킨다. 이어서, 플레이트를 37°C에서 밤새 배양한다. 595 nm 파장에서 각 웰의 흡광도를 분광광도계로 측정한다. 테스트 웨티드의 농도에 대한 흡광도 수치 그래프를 작성하고, 그래프 패드 소프트웨어를 이용하여 EC<sub>50</sub>을 측정한다. 최대 흡광도의 절반을 유발하는 테스트 웨티드의 농도를 EC<sub>50</sub>으로 나타낸다.

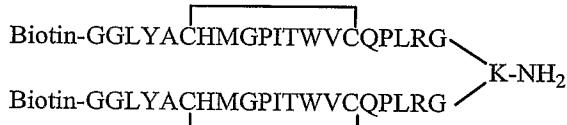
## 3. 경쟁적 결합 분석

[0485] 경쟁적 결합 결과는 두 개의 비드의 근접 작용으로 유발되는 빛 신호의 분석을 이용하는 것이며, 상기 두 개의 비드는 비오틴 부착된 EPO-R-결합 웨티드 트레이서를 함유하는 스트렙타비딘 도너(donor) 비드와 EPO-R에 결합하는 억셉터(acceptor) 비드이다. 빛은 단일항(singlet) 산소가 조명에 의해서 첫 번째 비드로부터 방출되고, 방출된 단일항 산소가 두 번째 비드에서 빛을 방출시키는 동안의, 비방사능 에너지 전이에 의해 발생한다. 이러한 비드들은 시판되고 있다 (Packard). 비드의 근접성은 EPO-R-결합 웨티드 트레이서가 EPO-R에 결합함으로써 발생한다. EPO-R 결합에 있어서 EPO-R-결합 웨티드 트레이서와 경쟁하는 테스트 웨티드는 이러한 결합을 억제하고, 발광량을 감소시킨다.

[0486] 그 방법을 더 구체적으로 설명하면 다음과 같다. 테스트 EPO-R 작용제 웨티드, 또는 양성 또는 음성 대조군의 계단 회석액 4  $\mu$ l를 384 웰 플레이트의 웰에 첨가한다. 이어서, 웰 당 수용체/비드 혼합물 2  $\mu$ l를 첨가한다. 수용체 비드 혼합물은 다음으로 구성된다. 5 mg/ml 스트렙타비딘 도너 비드 (Packard) 15  $\mu$ l, 5 mg/ml 단일 항체 ab179 (이 항체는 재조합 EPO-R에 포함되어 있는 인간 태반 일칼리성 포스파타제 단백질의 부위를 인식한다) 15  $\mu$ l, 단백질 A-코팅된 억셉터 비드 (단백질 A는 ab179 항체에 결합한다, Packard), 재조합 EPO-R (ab179 표

적 에피토프를 함유하는 인간 태반 알칼리성 포스파타제 단백질의 일부에 대한 융합 단백질로서, 차이니즈 햄스터 난소 세포에서 생산함)의 1:6.6 희석액 112.5  $\mu$ l 및 알파퀘스트 완충제 (40 mM HEPES, pH7.4; 1mM MgCl<sub>2</sub>; 0.1% BSA, 0.05% 트원 20) 607.5  $\mu$ l이다. 가볍게 두드리면서 혼합한다. 비오틴 부착된 EPO-R-결합 웨티드 트레이서, AF33068 (최종 농도 30nM)를 웰 당 2  $\mu$ l 첨가한다. 실시예 1에서 설명한 방법에 따라, 비오틴-GGLYACHMGPITWVCQPLRG (SEQ ID NO: 4)의 서열을 사용하여, 웨티드 트레이서, 즉 EPO-R 결합 웨티드 (표의 "리포터 EC50 (pM)" 참조)를 만들었다.

### 웨티드 트레이서



[0489]

[0490] 1분간 원심기를 이용하여 혼합한다. 패커드 톱 봉인으로 플레이트를 봉하고, 호일로 감싼다. 실온에서 밤새 배양한다. 18시간 후, 알파퀘스트 판독기 (Packard)를 이용하여 발광량을 판독한다. 웨티드 농도에 대한 발광량 그래프를 작성하고, 그래프 패드 또는 엑셀로 분석한다.

[0491]

테스트 웨티드가 없는 상태에서 관찰된 것과 비교하여 발광량의 50% 감소를 유발하는 테스트 웨티드의 농도를 IC50으로 나타낸다.

[0492]

#### 4. C/BFU-e 분석

[0493]

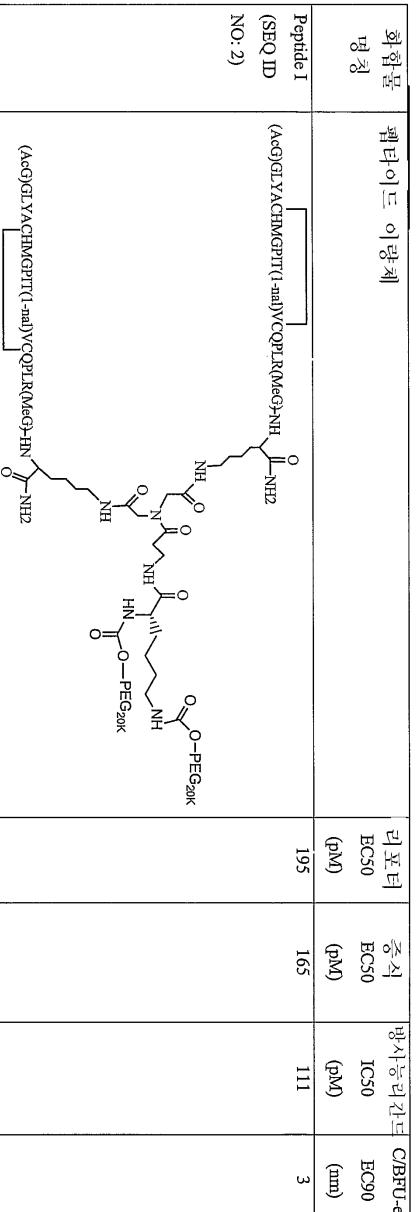
EPO-R 시그널은 골수 줄기 세포가 적혈구 세포 전구체로 분화되는 것을 촉진시킨다. 이러한 분석은 초기 인간 골수 전능 줄기 세포로부터의 적혈구 세포 전구체의 증식과 분화를 촉진하는 테스트 웨티드의 활성을 측정한다.

[0494]

이러한 분석을 위해서, 10% FBS(Hyclone)가 보충된 IMDM 배지(Gibco)중에서 테스트 웨티드 계단 희석액을 만든다. 그 후, 이러한 계단 희석액 또는 양성 대조군 EPO 웨티드를 메틸셀룰로스에 첨가하여, 최종 부피가 1.5 ml가 되게 한다. 메틸셀룰로스와 웨티드 혼합물을 완벽하게 불택싱한다. 인간 골수 유래 CD34+ 세포 (Poietics/Cambrex)의 분취액 (100,000 세포/ml)을 해동한다. 해동한 세포를 50 ml 퓨어 중에서 1 mg/ml DNase (줄기 세포) 0.1ml에 서서히 첨가한다. 그 후, IMDM 배지 40-50ml를 세포에 천천히 첨가한다. 이 배지의 처음 10 ml를 50 ml 퓨어의 측면을 따라 적가하고, 나머지 남은 용량은 퓨어의 측면을 따라 천천히 가한다. 이어서, 세포를 20분간 900 rpm에서 회전시키고, 배지는 서서히 흡인하여 조심스럽게 제거한다. 세포를 IMDM 배지 1ml에 재현탁시키고, ml 당 세포의 밀도를 혈구 계산기 슬라이드 상에서 측정한다 (슬라이드 상 세포 혼탁액 10  $\mu$ l 분취액, 세포 밀도는 평균 총수 X 10,000 세포/ml이다). 그 후, 세포 밀도가 15,000 세포/ml가 되도록 세포를 IMDM 배지 중에서 희석한다. 희석된 세포 100  $\mu$ l를 웨티드 시료가 추가된 각각의 메틸셀룰로스 1.5 ml에 첨가하고 (분석 배지 중의 최종 세포 농도는 1000 세포/ml이다), 이 혼합물을 불택싱한다. 혼합물 중의 거품이 사라지게 한 후, 굵은 바늘을 이용하여 1 ml를 흡인한다. 각 시료로부터 흡인된 혼합액 0.25 ml를 24 웰 플레이트 (Falcon brand)의 4 웰에 첨가한다. 평판화된 혼합액을 37°C, 5% CO<sub>2</sub>, 습기 배양기에서 14일간 배양한다. 상 현미경 (5X-10X 대물렌즈, 100X의 최종 배율)을 이용하여 적혈구 콜로니의 존재를 계산한다. EPO 양성 대조군으로 관찰한 것과 비교하여, 형성된 콜로니의 수가 최대치의 90%인 테스트 웨티드 농도를 EC90으로 나타낸다 (표 2 참조: C/BFU-e EC90).

[0495]

[표 6]

펩타이드 명칭	펩타이드 이량체에 대한 시험 관리 활성 분석		펩타이드 이량체에 대한 시험 관리 활성 분석			
	펩타이드 명칭	펩타이드 이량체	리포터 BC50 (pM)	증식 BC50 (pM)	방사능리간트 IC50 (pM)	CBF1L-e EC90 (nm)
Peptide I (SEQ ID NO. 2)	(AcG)GLYACMGPIT(1-nal)YCQPLR(MeG)NH		195	165	111	3

[0496]

[0497]

### 실시예 12: 생체내 활성 분석

[0498]

이 실시예는 본 발명의 EPO-R 작용제 펩티드의 활성과 효능을 평가하는데 유용한 다양한 생체내 분석을 설명한다. EPO-R 작용제 펩티드 단량체 및 이량체는 실시예 1의 방법에 따라 제조한다. 이러한 펩티드 단량체 및 이량체의 생체내 활성은 일련의 분석으로 평가되며, 이러한 분석으로는 적혈구 증가 탈저산소성 마우스 생물학적 분석과 망상적혈구 분석이 있다. 이러한 2가지 분석을 아래에서 더 자세하게 설명한다.

[0499]

#### 1. 적혈구 증가 탈저산소성 마우스 생물학적 분석

[0500]

코즈와 뱅햄 (Cotes and Bangham (1961), *Nature* 191: 1065-1067)이 기재한 방법으로부터 채택된 적혈구 증가 탈저산소성 마우스 생물학적 분석으로, 테스트 펩티드의 생체내 활성을 분석한다. 이 분석은 EPO 모사체로서 작용하는, 즉 EPO-R을 활성화하고 새로운 적혈구 세포 합성을 유도하는, 테스트 펩티드의 활성을 분석한다. 적혈구 세포 합성은 방사성 표지된 철이 합성된 적혈구 세포의 혈모글로빈 내로 흔입하는 것에 근거하여 정량된다.

[0501]

BDF1 마우스를 상온에서 7~10일간 적응시킨다. 모든 동물에 대해서 체중을 측정한 후, 저체중의 동물 (<15g)을 제외한다. 마우스를 총 14일간 저압실에서 연속적인 컨디션 조절 주기에 노출시킨다. 각 24시간 주기는 0.40±0.02% 기압에서 18시간 및 대기압에서 6시간으로 이루어진다. 컨디션 조절 후, 마우스를 주입 전에 72시간 동안 더 대기압하에 둔다.

- [0502] 테스트 펩티드, 또는 재조합 인간 EPO 표준체를 PBS+0.1% BSA 비히클 (PBS/BSA)에 희석시킨다. 처음에 펩티드 단량체 스톡 솔루션을 디메틸 술폴사이드 (DMSO)에 용해시킨다. 음성 대조군에는 PBS/BSA를 단독으로 주입한 마우스 그룹과 1% DMSO를 주입한 마우스 그룹이 있다. 각 그룹은 10 마리의 마우스로 구성된다. 마우스에 적절한 시료 0.5 ml를 피하 주사한다 (목덜미 부위).
- [0503] 시료 주입 48시간 후, 마우스에  $0.75 \mu\text{Curies}/\text{마우스}$  용량에 대해,  $\text{Fe}^{59}$  (Dupont, NEN) 0.2 ml를 복막 주사한다. 마우스 체중을  $\text{Fe}^{59}$  투여 24시간 후 측정하고,  $\text{Fe}^{59}$  투여 48시간 후 마우스를 희생시킨다. 혈액을 각 동물로부터 심장 천자로 채취하고, 적혈구 용적률을 측정한다 (항응고제로서 헤파린을 사용하였다). 팩카드 감마 카운터를 사용하여  $\text{Fe}^{59}$  혼입을 확인하기 위해, 각 혈액 시료(0.2 ml)을 분석한다. 비 반응 마우스 (예를 들어, 음성 대조군보다 더 적은 방사능 유입을 나타내는 마우스)는 적절한 데이터로부터 제거한다. 음성 대조군의 53% 미만의 적혈구 용적률을 가지는 마우스도 또한 제거한다.
- [0504] 각 실험 용량에 대해 10 마리로부터 결과가 도출된다. 각 그룹으로부터, 혈액 시료로 유입된 방사능의 평균 양 (분당 카운트, CPM)을 측정한다.
- [0505] 2. 망상적혈구 분석(*Reticulocyte Assay*)
- [0506] 정상의 BDF1 마우스에 연속 3일간, EPO 대조군 또는 테스트 펩티드를 접종한다(0.5 ml, 피하 주사). 3일째, 마우스에 철 텍스트란(100 mg/ml)을 또한, 접종한다 (0.1 ml, 복강 주사). 5일째, 마우스를  $\text{CO}_2$ 로 마취하고, 심장 천자로 혈액을 채취한다. 각 혈액 시료에서 망상 적혈구의 비율(%)은 티아졸 오렌지 염색과 흐름 세포 측정기 (retic-count program)로 확인한다. 적혈구 용적률을 계산한다. 망상 적혈구의 정확한 비율은 아래의 식을 이용하여 측정할 수 있다.
- $$\% \text{ RETIC}_{\text{CORRECTED}} = \% \text{ RETIC}_{\text{OBSERVED}} \times (\text{Hematocrit}_{\text{INDIVIDUAL}} / \text{Hematocrit}_{\text{NORMAL}})$$
- [0507]
- [0508] 3. 혈액학적 분석(*Hematological Assay*)
- [0509] 정상의 CD1 마우스에, EPO 양성 대조군, 테스트 펩티드 또는 비히클을 4주일에 한번, 일시 정맥 주사한다. mg/kg으로 표현되는 양성 대조군과 테스트 펩티드의 투여량 범위는 제제 내 활성 화합물의 농도를 변화시킴으로써 테스트된다. 주사량은 5 ml/kg이다. 캐리어 대조군은 12 마리로 구성되는 반면, 그 밖의 투여 그룹은 각각 8 마리로 구성된다. 매일 생존 능력을 측정하고 매주 체중을 측정한다.
- [0510] 상기 펩티드를 투여받은 마우스는 금식시킨 후, 이소플루란 흡입으로 마취시킨다. 최종 혈액 시료를 심장 또는 복강 대동맥 천자로 1일째 (캐리어 대조군 마우스), 15일째 및 29일째 (4마리/그룹/일) 채취한다. 혈액을 Vacutainer® 브랜드 투브로 끊긴다. 바람직한 항응고제는 에틸렌디아민테트라아세트산(EDTA)이다.
- [0511] 혈액 시료는 본 기술 분야에서 잘 알려진 자동 임상 분석기 (예, Coulter, Inc. 제조품)를 이용하여, 적혈구 합성의 종점과, 적혈구 용적률 (Hct), 혜모글로빈 (Hgb) 및 적혈구 계산 (RBC) 등의 생리 기능에 대해 평가한다.
- [0512] 실시예 13: 동물 및 건강한 정상의 인간 자원자 (NHV)에서 혜모글로빈 수준의 증가
- [0513] 1. 일반론
- [0514] 비임상적 및 임상적 데이터에 기초할 때, 펩티드 I, 즉 완전한 합성 EPO 수용체 작용제는 불충분한 EPO 생산에 부차적인 빈혈을 안전하고 효과적으로 경감시키는 잠재력을 가진다. 펩티드 I은 현재 이용중인 EPO 제품에 비하여 다음과 같은 몇 가지 잠재적 이점을 가질 것이다: 매 3 내지 4 주로 예상되는 투여 간격을 가진 연장된 반감기 및 약역학(pharmacodynamic) 활성, 이로 인해 향상된 편리성 및 순응성을 가져올 수 있다; 내인성 EPO와 공유하는 공통의 아미노산 서열이 없기 때문에, 항체 매개 순수적혈구 무형성증(pure red cell aplasia; PRCA)에 대한 발생 가능성의 감소; 내인성 EPO와 교차 반응(cross-react)하는 시판중인 EPOs에 대한 항체에 의해 일어나는 PRCA를 가진 환자의 치료에 대한 잠재력; 단백질 치료제에 비하여 실온에서 연장된 저장 기간을 가지는 향상된 안정성.
- [0515] 펩티드 I의 첫번째(primary) 아미노산 서열이 재조합 인간 EPO (rHuEPO)의 서열과 상이하기 때문에, 내인성 EPO에 대한 교차 반응성 면역 반응을 유도할 가능성이 더 낮다. 비록 매우 드물지만, 재조합 인간 ESAs 및 내인성 EPO 양쪽 모두에 대한 능력의 손실과 관련된 심각한 부작용으로서 교차 반응성 면역 반응이 일어날 수 있다. 또한, 펩티드 I은 합성 펩티드이기 때문에, 그의 생산은 재조합 단백질 제품에서 일어날 수 있는 숙주 세포 물질

로 약물이 오염되는 잠재적 위험을 회피한다.

[0516] 2. 동물에서 펩티드 I의 약역학

[0517] 펩티드 I은 마우스, 래트 (노르모시테믹(normocythemic) 및 신장절제된(nephrectomized)), 개, 토끼 및 원숭이에서 단일 또는 반복 투여량 투여에 따라 관찰된 투여량 의존적 활성을 가진 적혈구 생성(erythropoiesis)의 강력한 자극제(stimulator)이다. 래트 및 원숭이에서의 약리학적 연구는 혈액으로의 수준이 투여량에 비례하는 것에 의하여 측정된 것으로서 망상 적혈구 (미성숙 RBCs) 및 RBCs의 증가를 보여주었다.

[0518] 래트, 개 및 원숭이에서의 약역학 연구는 현재 시판중인 rHuEPO 제품과 비교하여 펩티드 I의 지속된 혈장 존속성(persistence)을 증명하였다. 제거 반감기 (Elimination half time; t1/2)의 범위는 래트의 경우 21.5~30.7 시간이고, 개의 경우 73.7 시간까지였다. 펩티드 I의 생체분포(biodistribution)는 주로 혈장 부분(plasma fraction)이다. 5/6의 신장절제 래트에 9.87 mg 펩티드 I/kg의 IV 투여에 따라, 그 t1/2는 약 48시간이었고, 제거는 (노르모시테믹 래트에서의 1.44 mL/h/kg과 비교하여) 0.763 mL/h/kg로 낮아서, 1.8의 증가된 AUC 규모를 가져왔다.

[0519] 2. 인간에서 펩티드 I의 약동학 및 약역학

[0520] 2.1. 개요 및 방법

[0521] 펩티드 I을 1 상 1 연구(one Phase 1 study)에서 20 NHP에서 테스트하였다. 펩티드 I으로의 이러한 제1 인간 연구(first-in-human study)는 무작위, 이중맹검, 플라세보 대조군, 일회량(single-dose), IV, 단계적 상승 투여량, 안전성 및 내인성 시험이었다. 이 연구의 주요 목표는 펩티드 I의 안전성 및 약동학을 평가하는 것과, 약리학적 활성 투여량 (PAD)를 확립하는 것이다. 7명의 남성 자원자의 코호트(cohorts)를 5:2의 비율로 펩티드 I 또는 플라세보의 일회량을 투여하도록 계획하였다. 코호트를 기준 값으로부터 혈액으로의 증가가 관찰되는 것에 의해 측정되는 PAD 까지 증가시킨 투여 수준으로 첨가하였고, 그 PAD로서 확인된 투여량 수준의 지점은 다른 자원자들의 코호트에서 반복될 것이다.

[0522] 각각 펩티드 I 투여 0.025, 0.05, 0.1 mg/kg 및 0.1 mg/kg (코호트 당 일회량)의 연속 방식으로 들어간 4개의 코호트에서 연구를 개시하였다. 연구의 결과는 망상 적혈구 개수 및 혈액으로의 증가가 0.1 mg/kg의 펩티드 I을 투여받은 제3 코호트 이후에 달성되었다는 것을 보여주었다. 이러한 투여량을 제4 코호트에서 반복하여, 제3 코호트에서 관찰된 결과를 확인하였다. 그것으로서 연구를 종료하였다. 비맹검(unblinded) 결과를 아래에 요약한다.

[0523] 2.2. 약역학적(pharmacodynamic) 결과

[0524] 망상적혈구 개수 (절대 수 및 백분율)는 펩티드 I 투여의 증가에 따라 투여량 의존 증가를 보여주었다. 망상적혈구 개수는 최대 약 7일 모든 투여 코호트에서 투여 후 약 7일에 최대값에 도달하였다. 최대 망상적혈구 반응과, 망상적혈구 대 시간 곡선 ( $AUC_{0-14\text{일}}$  및  $AUC_{0-28\text{일}}$ )의 비교는 투여 군들 간에 유의미한 차이를 보여주었다 ( $p<0.05$ ).

[0525] 적혈구 생성의 부수적 외인성 자극이 없는 혈액의 제거(blood draws)에 관련된 연구 다음으로, 투여 후 28일에 걸친 혈액으로의 변화 (평균 및 최대 양쪽 모두)는 펩티드 I의 투여량 증가에 따라 투여량 의존 증가를 보여준 반면, 대조군은 시간에 따라 혈액으로의 감소를 나타내었다 [일방향 분산분석(one-way Analysis of Variance; ANOVA) 0.0001의  $p$ -값]. 혼합모델을 사용한 일방향 공분산 분석(one-way Analysis of Covariance; ANCOVA)을 사용하여 모든 4개의 군들 간의 시간에 따른 기준선으로부터의 개별적 변화를 비교하였다. 이러한 분석의 결과는 0.025 대 0.1 mg/kg 군들 사이 ( $p=0.0027$ )에서 및 0.05 대 0.1 mg/kg 군들 사이 ( $p=0.0113$ )에서 유의미한 차이를 가지고, 4개의 투여량 군 ( $p=0.0001$ ) 모두에서 유의미한 투여량 반응을 보여주었다. 혈액으로의 적어도 1.0 g/dL 증가와 관련된 펩티드 I의 PAD는 0.1 mg/kg이었다.

[0526] 추가적으로, 코호트 3 및 4 (0.1 mg/kg 펩티드 I 또는 플라세보)에서의 대상을 투여 후 42일 동안 추적하였다. 42일째에, 평균 혈액으로의 증가는 0.1 mg/kg 펩티드 I으로 처리한 환자에서의 기준선으로 되돌아왔지만, 플라세보 환자에서는 여전히 기준선을 초과하였다. 따라서, 그 연구 기간 전부로서, 42일째에서의 기준선 혈액으로부터의 변화에서 차이는 0.1 mg/kg 펩티드 I로 투여된 환자와 플라세보로 투여된 환자 사이에서  $\geq 0.5$  g/dL 이었다.

[0527] 혈청 EPO 수준은 펩티드 I 투여의 증가에 따라 일시적으로 감소하였다. 다른 약역학적 변수에서의 변화 (증가된

적혈구 개수 및 헤마토크리트, 폐리틴 및 망상적혈구 혜모글로빈 함량의 일시적 감소, 가용성 트랜스페린 수용체 단백질의 일시적 증가 및 EPO의 일시적 감소)는 적혈구 생성의 자극과 일치하였다.

### [0528] 2.3 약동학적(Pharmacokinetic) 결과

[0529] 5분에 걸친 펩티드 I 0.025, 0.05 및 0.1 mg/kg의 IV 투여 다음, 약물 농도는 주입의 개시 후 일반적으로 약 5분 내지 1시간 사이에 피크가 되었다. 0.025 mg/kg 투여 군에서 펩티드 I 농도는 5~15분 사이에서 피크가 되고, 반면 0.1 mg/kg 투여량에 대한  $t_{max}$ 는 1시간 근처였다.  $C_{max}$ 가 얻어진 후, 플라즈마 농도가 감소하였는데, 0.025 mg/kg 투여 후 96시간까지 일반적으로 정량할 수 있었고 (>25 ng/mL), 0.05 mg/kg 투여의 경우 5일째 까지, 그리고 0.1 mg/kg 투여의 경우 7일째까지 정량할 수 있었다. 계산된 반감기는 0.025 mg/kg 투여의 경우 16.7~21.9시간 (평균 19.2시간); 0.05 mg/kg 투여의 경우 15.3~25.1시간 (평균 18.7시간); 및 0.1 mg/kg 투여의 경우 17.7~33.1시간 (평균 23.5시간)의 범위를 가지는데, 0.1 mg/kg 투여에서 약간 증가함을 보여주었다.

[0530] 약물의 분포 및 제거는 표준 1 또는 2 성분 속도론(standard one or two compartment kinetics)를 따르지 않는 것으로 나타났다. 낮은 약물 농도에서만 1차 반응 속도(First order kinetics)가 관찰되었고, 이는 약 400 ng/mL를 초과하는 혈장 농도에서 대사/제거 공정의 포화가 일어난다는 것을 제시한다. 분포의 부피(volume of distribution)는 투여량에 따라 거의 변화하지 않음을 보여주었다(0.025, 0.05 및 0.1 mg/kg 투여량에 대해 각각 평균 2165, 1903 및 2010 mL). 혈장 제거(plasma clearance)는 투여량에 따라 약간의 감소를 보여주었다(0.025, 0.05 및 0.1 mg/kg 투여에 대하여 각각 기하 평균으로 78.0, 70.7 및 59.2 mL/시간).  $C_{max}$ 를 표준화한 투여량의 ANOVA(ANOVA of dose normalized  $C_{max}$ ), 및  $AUC_{(0-\infty)}$  데이터는  $C_{max}$ 가 투여량과 1차 관계(1linear relationship)를 가진다는 것을 보여주었다. 그러나,  $AUC_{(0-\infty)}$ 는 아마도 더 높은 투여량에서의 약물 제거에서 관찰된 작은 감소와 관련된, 최고 투여량 0.1 mg/kg에서의 비선형성(non-linearity)의 증거를 보여주었다.

### [0531] 2.4. 안전성 결과

[0532] 15명의 환자 (플라세보를 투여받은 8명 중의 4명과 펩티드 I을 투여받은 20명 중 11명)가 총 28개의 유해 사례(AEs)를 경험하였다 (플라세보 군에서 6 및 펩티드 I 군에서 22). 펩티드 I이 투여된 환자의 경우, 두통 (4/20, 20.0%) 및 복통 (2/20, 10.0%), 구역(嘔逆) (2/20, 10.0%) 및 비인두염 (2/20, 10.0%)이 매우 빈번하게 보고된 사례였다.

[0533] 한 가지를 제외한 모든 AEs는 경증상(mild) (등급 1)으로 등급매겨졌다. 펩티드 I 수령자 중 관찰된 대부분의 AEs (15/22)는 본 연구 약물, 즉 펩티드 I과는 아마도 관련이 없는 것으로 판단되었다. 4개 군 사이에 AEs의 빈도, 심각성 또는 패턴에서 차이가 없었다. 심각한 유해 사례(SAEs) 또는 AE에 기인한 연구의 취소는 없었다; 그러나, 펩티드 I의 0.025 mg/kg 투여량으로 할당된 1명의 환자에 대해서 경증의 약물 작용(mild drug reaction) 때문에 약물 연구가 중단되었다. 주입 2분 내에 시작된 이러한 작용은 뜨거운 느낌, 불편함 및 따끔거리는 목의 감각과 함께 가슴에서 시작되어 얼굴로 확장된 홍조(flush)였다. 안전성을 위한 조치로서, 이 환자에 대한 주입을 중단하였다. 증상은 자연적으로 신속하게 해결되었다. 치료적인 개입은 필요하지 않았다. 바이탈 사인에 변화는 없었다. 실험 변수는 추가적인 면역학적 테스트를 포함하여 정상이었고, 따라서, 이러한 반응의 특별한 특징을 밝힐 수 없었다. 다른 ESAs를 포함하는 많은 약물에 있어서 유사한 (또는 더 심각한) 약물 작용들이 관찰된 바 있다. 더욱이, 펩티드의 IV 투여 도중에 환자들을 관찰하여야 한다. 만약 환자에게 유사한 증상이 발생하면, 주입을 중단해야만 한다.

[0534] 1명의 플라세보 수용자 및 1명의 펩티드 I 수용자에게 각각 경증의 두통 및 경증의 복부 경련에 대한 투약을 동시에 하였다. 바이탈 사인, 심전도(ECGs) 또는 실험값(laboratory values)에 임상적으로 중요한 변화는 없었다. 이러한 실험의 환자 중 누구도 펩티드 I에 대해 특이적인 항체를 생성시키지 않았다.

### [0535] 2.5. 요약

[0536] 요약하면, 펩티드 I은 안전하고, 플라세보에 유사한 안전성 특성(profile)을 가지며 0.025, 0.05 또는 0.1 mg/kg의 일회 IV 투여 후에 잘 관용(well tolerated)되는 것으로 나타났다. 약동학적 결과는 0.1 mg/kg 투여시 약 15내지 33시간의 범위이고, 평균 23.5시간인 반감기를 나타내었다. 그 중앙값(median)은 주입 시작 후 15분에 일어나며 모든 투여량에 있어서 유사하다.  $C_{max}$ 는 투여량과 선형 관계를 가지는 것으로 나타났고;  $AUC_{(0-\infty)}$ 는 0.1 mg/kg 투여량에서 비선형인 것으로 나타났다. 1차 반응 속도는 더 낮은 약물 농도에서만 관찰되었고, 이는 혈장 농도 > 400 ng/mL에서 대사/제거 단계가 포화됨을 제시하는 것이다. 펩티드 I은 평가된 모든 투여량에서

망상적혈구에 대한 약리학적 활성을 보여주었다; 일반적으로 반응은 증가하는 투여량에 따라 더 크고 더 오랜 반응을 가져 투여량 의존적이었다. 10명의 웨პ티드 I 수용자 중의 기준선인  $1.36 \pm 0.39$  g/dL로부터의 평균 최대 증가가 그 기준으로부터 혈액글로빈의 임상적 및 통계학적으로 유의미한 증가와 관련하여 0.1 mg/kg 투여 군에서 NHO에서 PAD를 규정하였다. 다른 약리학적 변수에서의 변화 (적혈구 세포수 및 혈마토크립트의 증가, 페리틴 및 망상적혈구 혈액글로빈 함량의 일시적 감소, 가용성 트랜스페린 수용체 단백질의 일시적 증가 및 EPO의 일시적 감소)는 적혈구 생성의 자극과 일치한다.

[0537] 2005년 6월 4일 스톡홀름에서 열린 유럽 혈액학회 10주년 기념 회의에서 제공된 포스터 및 요약 #0470은 그 전체가 참조로서 본 명세서에 통합된다.

#### 실시예 14: 예비투석, 투석 및 종양 환자의 혈액글로빈 수준의 증가

##### 1. 예비투석(*pre-dialysis*) 환자

투석중이 아니고, 이전에 적혈구 생성 자극제 (ESA) 치료를 받은 적이 없는 만성 신질환 (CKD)을 가진 환자에 있어서, 무작위, 이중맹검, 플라세보 대조군, 일회량의 정맥내 웨პ티드 I 주사의 안전성, 약리학 및 약동학의 연속적인 투여량 상승 연구를 수행할 것이다. 이 연구는 투석 중이 아닌 CKD 환자 (예비 투석 환자)에 있어서 웨პ티드 I의 일회량 정맥내(IV) 투여 수준의 안전성 프로파일(profile)을 평가할 것이다. 이 연구는 또한 혈액글로빈, 망상적혈구 및 철 보유를 포함하는 약동학적 변수에 있어서 웨პ티드 I의 일회량의 용량 반응 관계(dose response relationships)을 평가하고; 예비 투석 환자에 있어서 정맥 내로의 웨პ티드 I의 일회량 수준의 약리학적 프로파일을 평가하며; 예비 투석 환자에 있어서 정맥 내 투여의 약리학적 활성 투여량 (PAD), 예컨대, 그 투여량은 환자의  $>70\%$ 이 기준선으로부터  $\geq 1$  g/dL의 혈액글로빈 증가를 달성하는 것을 결과를 가져오는 투여량을 결정할 것이다.

[0541] 본 연구의 최종 목적은 유해 사례 (AEs); 심각한 유해 사례 (SAEs);  $C_{max}$ ,  $AUC_{0-t}$ ,  $AUC_{0-infinity}$ ,  $t_{1/2\beta}$ ,  $Vd$  및  $CL$ 을 포함하는 약동학적 변수; 망상적혈구, 혈액글로빈, 망상적혈구 혈액글로빈 함량 및 철 보유의 혈청 측정 (예컨대, 혈청 페리틴, 트랜스페린 포화 및 트랜스페린 수용체 단백질)을 포함하는 약리학적 변수; 기준선으로부터 평균 혈액글로빈 변화; 기준선으로부터 최대 혈액글로빈 변화; 기준선으로부터  $\geq 1$  g/dL의 혈액글로빈 증가를 얻은 치료 환자의 비율; 및 적혈구 세포 수혈의 빈도를 포함한다.

[0542] 본 연구를 위해 선택된 환자들은 혈액글로빈이  $\geq 9$  g/dL 및  $\leq 11$  g/dL인 연령이 18~75세인 만성 신질환에 걸친 예비 투석 환자로서 ESAs로 이전에 치료받은 적이 없고, 적격 기준에 부합하는 자로 포함시킬 것이다. 9명 환자의 각각의 코호트에서, 환자들은 웨პ티드 I ( $n=7$ ) 또는 플라세보 ( $n=2$ )의 일회량을 투여받은 것을 무작위로 할당될 것이다. 코호트 당 5명의 웨პ티드 I 치료 환자에서 최소 22일 동안의 데이터의 유용성을 확인하기 위하여, 22일 전에 연구가 종료된 코호트 내의 제3의 다음의 환자들로 대체될 것이다. 각각의 대체 환자는 취소된 환자와 동일한 치료군으로 할당될 것이다. 22일 후에 연구가 종료된 환자는 대체되지 않을 것이다.

[0543] 6개 이하의 투여 수준 코호트 (4개 이하의 계획된 투여 수준과, 2개 이하의 추가적인 더 낮은, 중간 및/또는 반복 [확인] 투여 수준)가 독립적인 안전성 모니터(Independent Safety Monitor), 조사원 및 스폰서에 의하여 연속적으로 참여되는 것으로 계획되었다. 최대 54 명의 평가할 수 있는 환자가 이번 실험에 참여할 것이다.

[0544] 이 연구에서 각각의 환자는 투여 후 적어도 28일 동안 참여하는 것으로 예상된다.

[0545] 각 환자는 웨პ티드 I 또는 플라세보의 일회량을 투여받을 것이다.

[0546] 계획된 순차적 웨პ티드 I 투여 수준은 다음과 같다.

웨პ티드 I 투여량 (mg/kg)	
	0.05
	0.1
	0.2
	0.3
추가적 확인, 중간 또는 더 낮은 투여량	
추가적 확인, 중간 또는 더 낮은 투여량	

[0547]

[0548] 이것은 코호트 당 9명의 예비 투석 환자를 가진 6개 이하의 투여량 코호트를 가진 무작위, 이중맹검, 플라세보

대조군, 연속 투여량 상승 연구이다. 각각의 코호트에서, 환자들은 29일에 걸쳐 또는 후에 일어난 여하한 유해 사례의 안정화에 이를 때까지 연구될 것이다. 혈모글로빈 수준이 모든 환자에서 상승된 수준이 기준선 수준의 0.5 g/dL 이내로 돌아갈 때까지 추적될 것이다.

[0549] 기준선 혈모글로빈 농도는 약물 투여 연구 전의 3번의 가장 최근의 혈모글로빈 수치로서 정의한다. 연구 도중에, 코호트 개시 또는 정지 결정을 위한 혈모글로빈의 변화는 다음의 연속적인 혈모글로빈 수치에 의하여 확인하는 것이 필요하다.

[0550] 만약 환자의 혈모글로빈 수준이 14 g/dL에 도달하면, 그 환자는 임상적으로 지시되는 경우 피를 뽑아야 할 것이다. 만약 환자의 혈모글로빈 수치가 16 g/dL (확인됨)에 이르게 되면, 그 환자는 피를 뽑아야 할 것이다.

[0551] 제1 코호트의 투여 후에, 그 다음 투여량 수준의 다음 코호트의 연속적인 참여는 투여량 상승 기준으로 특정된 프로토콜에 기초하게 될 것이다. 그 다음 투여량 수준 코호트에 대한 투여량의 증가는 정지 기준으로 특정된 프로토콜에 기초하여 멈추어질 것이다. 비맹검(unblinded)의 독립 안전성 모니터가 투여량 상승 또는 정지 기준에 부합하게 될 때 결정되는 진행중인 기준상에서 비맹검 임상 및 실험 데이터를 검토할 것이다.

[0552] 조사자 임상 직원(Investigator clinic personnel) 및 스폰서 임상 직원(Sponsor clinical personnel)에게는 개별 환자 치료 할당 및 환자 확인 PK, 혈액학, 및 혈마토크릿, 혈모글로빈, MCHC (평균 적혈구 혈모글로빈 농도), MCH (평균 적혈구 혈모글로빈), MCV (평균 적혈구 용적), 망상적혈구 개수, 및 망상적혈구 혈모글로빈 함량을 포함하는 철 변수 결과, 또는 폐리틴, 트랜스페린 포화 및 트랜스페린 수용체 단백질을 포함하는 철 저장 결과에 대해서 가려지게(blinded) 될 것이다; 그러나, 이들 직원은 연구 진행 도중에 이들 변수에 대한 확인된 결과를 검토할 수 있을 것이다. 이들 직원은 이들 변수에 대해 결과가 확인된 환자에게 접근할 수 없을 것인데, 이는 만약 환자에 의한 확인의 경우, 치료 할당에 대해 잠재적으로 가려지지 않을 수(unblind) 있기 때문이다.

[0553] 코호트 중의 모든 평가될 수 있는 환자 (7명 이상)가 22일째에 도달할 때 시작되는, 그 다음 코호트에 대한 투여량 증가가 안전성에 대한 염려가 확인되지 않는다면 허용될 것이고: 그 코호트 중에  $\geq 1.0$  g/dL의 혈모글로빈 증가가 이루어진 환자가 없거나; 또는 웨티드 I을 투여받거나 또는 기준선으로부터  $> 1.0$  g/dL의 혈모글로빈 증가가 이루어진 모든 환자는 2개의 시점 중 최소값에 대하여 안전성 (0.5 g/dL 이내의 피크 혈모글로빈 수치) 또는 가역성 (피크 혈모글로빈 수치로부터의 감소)을 증명한다.

[0554] 만약 다음의 기준에 부합하게 되면, 진행중인 코호트 내로의 새로운 환자의 참여 및 새로운 투여량으로의 증가가 멈추어질 것이다: 한 코호트 내의 2명 이상의 환자가 웨티드 I 관련 유해 사례의 등급 3 또는 4를 가짐; 한 코호트 내에서 웨티드 I을 투여받은 2명 이상의 환자가 모든 4 주 기간에 걸쳐 혈모글로빈의  $\geq 2.0$  g/dL 증가를 가짐 (출발 상기 기준선 수준의 증가); 또는 한 코호트 내에서 웨티드 I을 투여받은 2명 이상의 환자가 혈모글로빈의 목적 범위의 상한을 초과함 ( $> 13$  g/dL).

[0555] 만약 안전성에 대한 염려가 확인되지 않는다면, 코호트 내의 모든 평가가능한 환자 (7명 이상)가 22일째에 도달한 후, 확인 (반복), 더 낮은 또는 중간 투여량 연구를 위하여 9명 환자의 추가적인 코호트가 개시될 수 있다.

[0556] 예비 투석 환자에 대하여, 0.025 내지 0.2 mg/kg, 가능하다면 0.05~0.1 mg/kg, 가능하다면 0.067~0.075 mg/kg의 PAD가 측정될 것으로 예상된다.

## 2. 투석 환자

[0558] 만성 혈액 투석 환자의 유지 치료를 위한 정맥 내 투여된 웨티드 I 주입의 개방표지(open-label), 다중 센터(multi-center), 연속, 안전한 투여량 검색 연구, 약역학 및 약동학 연구가 혈모글로빈 수치가 에포틴 알파(Epoetin alfa)에서 안정한 혈액투석 환자에서 기준선 위 또는 아래로 1.0 g/dL 이내로 혈모글로빈을 유지하는 매달 정맥 내 투여되는 웨티드 I 투여량의 범위를 결정하기 위하여 수행될 수 있다. 이 연구는 혈액투석 환자에서 정맥 내 투여된 웨티드 I의 3번 이하의 투여량의 안전성 프로파일을 또한 평가할 것이고; 혈액투석 환자에서 정맥 내 투여된 웨티드 I의 3번 이하의 투여량의 약동학적 프로파일을 평가할 것이다 (연구 환자의 아집단에서).

[0559] 이 연구의 최종 목적은 기준선으로부터 평균 매주 혈모글로빈 변화; 13 주 동안 줄곧 기준선 위 또는 아래 1.0 g/dL 이내로 혈모글로빈을 가진 환자의 수 (%); 13 주 동안 줄곧 9.5~13.0 g/dL 이내로 혈모글로빈을 유지한 환자의 수 (%); 연구하는 동안 투여량의 조정이 없었던 환자의 수 (%) 및 연구하는 동안 투여량의 증가 또는 감소를 가진 환자의 수 (%); 적혈구 수혈의 빈도; 망상적혈구 개수 (절대 및 AUC), 망상적혈구 혈모글로빈 함량 및 철 저장의 혈청 측정 (예컨대, 혈청 폐리틴, 트랜스페린 포화 및 가용성 트랜스페린 수용체 단백질)을 포함하는

추가적인 약리학적 변수; 유해 사례; 심각한 유해 사례; 및  $C_{max}$ ,  $AUC_{0-t}$ ,  $AUC_{0-infinity}$ ,  $t_{1/2\beta}$ ,  $Vd$ ,  $Vss$  및  $CL$ 을 포함하는 약동학 변수 (연구 환자의 아집단에서)를 포함한다. 약동학 및 약역학 분석의 결과는 에포틴 알파의 매주 투여량에 기초한 펩티드 I의 매달 투여량을 최선을 예측하는 예비(preliminary) 변환 인자를 측정하기 위해 사용될 것이다.

[0560] 연구를 위해 선택된 환자들은 혈액투석 환자로서 연령이 18세 또는 그 이상이고 시판중인 에포틴 알파의 안정적인 투여에 따라 안정하게 유지되는 혼모글로빈을 가지는 적합한 기준에 부합하는 환자가 참여하게 될 것이다. 코호트당 15명의 환자인 4번 이하의 연속 투여량 수준의 코호트가 3 내지 10개의 임상 센터에서 참여하도록 계획한다.

[0561] 펩티드 I 투여량을 3회 투여받은 코호트 당 최소 10명의 환자에서의 데이터의 유용성을 확인하기 위하여, 3번째 투여를 받기 전에, 연구가 종결된 코호트의 6번째 및 그 이후의 환자가 최대 4번의 교체 이하로 교체될 것이다. 3번의 투여량을 투여받고 연구가 종결된 환자는 교체되지 않을 것이다.

[0562] 2번의 투여량의 수준 코호트는 순차적으로 편입되도록 최초에 계획되었다. 관찰된 안전성 프로파일 및 약리학적 반응에 의존하여, 15명의 환자의 2 이하의 추가적인 코호트가 각각 더 낮은, 중간 및/또는 반복(확인) 투여 수준, 및/또는 투여 빈도를 연구하기 위하여 추가될 수 있다.

[0563] 최소 30명 및 최대 60명의 평가할 수 있는 환자가 이번 실험에 참여될 수 있다. 연구에서의 각 환자는 약 15 주 동안 참여될 것으로 예상되며, 이어서 4 주의 스크리닝 기간을 가진다.

[0564] 뒷받침하는 데이터의 유용성을 확인하여 추가적인 12 주 동안 투여 기간을 연장시키기 위한 수정이 계획된다.

[0565] 펩티드 I의 투여량은 투석의 마지막 15분 동안 30 초에 걸친 빠른 정맥 내 일시 주사로서 총 3번의 투여량에 대해 매 4주마다 투여될 것이다. 코호트 중의 각 환자는 미리 특정된 에포에틴 알파에서 시작하여 펩티드 I으로 전환된 수준으로 펩티드 I의 개방표지 투여량을 투여받을 것이다. 이전 코호트에서 관찰된 투여량 반응 관계에 기초한 다음 코호트에 있어서 그 투여량은 단계적으로 증가되거나 또는 감소될 것이다. 계획된 출발 펩티드 I 투여량 수준 전환은 다음과 같다:

코호트	100 U/kg/주 에포에틴 알파에서 펩티드 I 투여량 (mg/kg/Q4W) 전환 인자
출발 코호트	0.33
단계적 증가 또는 감소 코호트	증가에 있어 0.041~0.050 감소에 있어 0.017~0.025
중간 또는 확인 코호트(들)	결정될 것임
중간 또는 확인 코호트들	결정될 것임

[0566]

[0567] 펩티드 I 투여량은 개별 환자에 있어서 다음과 같이 조절될 수 있다. 펩티드 I 연구 약물로의 3번째 투여량으로 출발하여, 환자의 확인된 혼모글로빈이 기준선으로부터  $> 1.0$  g/dL로 감소한 경우, 또는 환자의 확인된 혼모글로빈이 기준선으로부터  $\geq 0.5$  g/dL로 감소하여 11 g/dL 아래 수준이 되는 경우, 투여량은 25% 만큼 증가될 것이다. 펩티드 I 연구 약물로의 3번째 투여량으로 출발하여, 환자의 확인된 혼모글로빈이 기준선으로부터  $> 1.5$  g/dL로 증가한 경우, 또는 환자의 확인된 혼모글로빈이 기준선으로부터  $\geq 0.5$  g/dL로 증가하여 12 g/dL을 넘는 수준이 되는 경우, 투여량은 25% 만큼 감소될 것이다. 연구 도중의 임의의 시점에서 환자의 확인된 혼모글로빈이 임의의 2 주의 기간 내에  $> 1.0$  g/dL로 증가 (출발 상한 기준선 증가)한 경우 그 다음 투여량은 25% 만큼 감소될 것이다. 연구 도중의 임의의 시점에 있어서, 환자의 확인된 혼모글로빈이 12.5 g/dL를 초과하는 경우, 혼모글로빈이 12.0 g/dL로 감소될 때까지 그 다음 투여가 연기될 것이고, 그 투여량은 25% 만큼 감소될 것이다.

[0568] 기준선 혼모글로빈 농도는 연구 약물의 투여 전 3주에 수집된 3번의 가장 최근의 주중반(mid-week) 투석 전 혼모글로빈 수치의 평균으로 정의하였다. 연구 도중에, 개별적인 투여량 조정 또는 코호트 개시 또는 중지 기준 결정에 대한 혼모글로빈 수치의 변화는 7 주 내의 임의의 시간에서 반복 혼모글로빈 수치로의 확인이 필요하다.

[0569] 이것은 코호트 당 15명의 혈액투석 환자의 2~4 치료 코호트로의 개방표지, 연속 투여량 검색 시험이다. 각 환자

는 매 4주마다 총 3번의 투여량으로 펩티드 I의 정맥 내 투여를 받게 될 것이다. 펩티드 I의 첫번째 투여량을 투여받은 후, 환자는 연구 전체에 걸쳐 적어도 매주 관찰될 것이다. 연구 도중에, 철 상태는 Kidney Disease Outcomes Quality Initiative (K/DOQI) 치료 가이드라인에 따라 유지될 것이다.

- [0570] 환자는 펩티드 I의 마지막 투여 후 최소 42일 동안 또는 후에 발생한 여하한 유해 사례가 안정화될 때까지 추적될 것이다. 치료를 중단한 후, 모든 환자에서 헤모글로빈 수준을 목적 범위로 돌아갈 때까지 추적할 것이다.
- [0571] 만약 환자의 헤모글로빈 수준이 14 g/dL에 도달하면 (확인됨), 환자는 조사자의 판단에 따라 피를 뽑게 (phlebotomized)될 것이다. 만약 환자의 헤모글로빈 수준이 16 g/dL에 도달하면 (확인됨), 환자는 피를 뽑게 될 것이다. 방혈(phlebotomy)의 방법은 그 부위의 표준 임상 절차에 따라 수행될 것이다. 방혈된 혈액의 부피는 기록될 것이다. 방혈된 환자는 펩티드 I의 투여를 중단할 것이고, 방혈 이후의 약동학 데이터는 분석에서 제외될 것이다.
- [0572] 제1 코호트의 투여 후, 다음 코호트의 연속적인 참여는 투여량 증가 및 감소 기준이 특정된 프로토콜에 기초한다. 적절한 투여량 수준 변환 인자가 확인되면, 그 변환 인자 투여량 수준이 확인 코호트에서 반복될 수 있다. 독립 안전성 모니터(Independent Safety Monitor) 및 스폰서(Sponsor)는 투여량 상승, 감소, 추가적인 코호트 또는 정지 기준을 부합하게 되었을 때를 결정하기 위한 진행 기준(ongoing basis)에 대한 임상적 및 실험적 데이터를 검토할 것이다.
- [0573] 한 코호트에 등록된 6명 이상의 환자의 데이터 검토를 7주째에 시작하여, 현재의 코호트 내로의 참여가 중단될 수 있고, 안전성 염려가 독립 안전성 모니터에 의하여 확인되지 않은 경우 그 다음 코호트에 대한 투여량 상승이 허용되며, 총 6명 이상의 환자는 7주 또는 그 후에 기준선에서 1.0 g/dL이 감소된 확인된 헤모글로빈 양을 보인다.
- [0574] 한 코호트에 등록된 6명 이상의 환자의 데이터 검토를 7주째에 시작하여, 현재의 코호트 내로의 참여가 중단될 수 있고, 안전성 염려가 독립 안전성 모니터에 의하여 확인되지 않은 경우 그 다음 코호트에 대한 투여량 감소가 허용되며, 총 6명 이상의 환자는 7주째 이후 기준선으로부터  $> 1.0 \text{ g/dL}$  만큼 증가된 확인된 헤모글로빈 양을 가지거나 헤모글로빈 수치가  $> 13.0 \text{ g/dL}$ 이 되거나, 연구 개시 후 임의의 2 주의 기간 내에 확인된 헤모글로빈 증가가  $> 1.0 \text{ g/dL}$  (상기 기준선에서 출발하여) 이다.
- [0575] 한 코호트에 등록된 10명 이상의 환자의 데이터 검토를 7주째에 시작하여, 안전성 염려가 독립 안전성 모니터에 의하여 확인되지 않는다면, 추가적인 코호트가 더 낮은 또는 중간 (현재 및 이전 연구 사이) 변환 인자 및/또는 투여 빈도를 연구하기 위하여 개시될 수 있다. 최대 2개의 추가적인 코호트가 참여될 수 있다.
- [0576] 7주째의 한 코호트에 등록된 10명 이상의 환자의 데이터 검토 후, 안전성 염려가 독립 안전성 모니터에 의하여 확인되지 않는 경우, 동일한 변환 인자를 이용하는 확인 코호트가 동일한 변환 인자 및/또는 투여 빈도를 반복하도록 개시될 수 있고, 투여량 상승 또는 투여량 감소 규정을 만족하지 않았다.
- [0577] 현재의 코호트 내로의 새로운 환자의 등록 및 새로운 투여량으로 증가는 다음의 기준에 부합하게 되면 중단될 것이다: 코호트 내의 3명의 환자가 단계 3 또는 4의 펩티드 I 관련 유해 사례를 가짐.
- [0578] 투석 환자에 대해서, PAD는 0.025~0.2 mg/kg, 가능하다면 0.05~0.1 mg/kg, 가능하다면 0.067~0.075 mg/kg로 측정될 것이라고 예상된다.
- [0579] 3. 종양 환자
- [0580] 화학 요법 유래 빈혈 (CIA)을 가진 암환자에서 피하 투여된 펩티드 I의 안전성, 약동학 및 약역학의 개방 표지, 다중 센터 투여량 상승 연구가 화학요법 유래 빈혈을 가진 환자에서의 헤모글로빈 반응과 연관하여 매 3주마다 피하(SC) 주사에 의하여 펩티드 I 투여량을 결정하기 위하여 수행될 것이다. 다른 목적은 다음을 포함한다: 골 수 억제 화학요법을 동시에 받고 있는 암환자에서 매 3주마다 피하로 투여되는 펩티드 I의 4번 이하의 투여량의 안전성 프로파일을 평가함; 펩티드 I의 상이한 투여량 수준에서 CIA를 가진 환자에서 Hgb의 기준선으로부터의 변화를 측정함; 펩티드 I에 대한 Hgb 반응(최종점에서 정의한)을 가지는 환자의 비율을 측정함; CIA 환자에서 11~13 g/dL의 표적 범위로 헤모글로빈을 증가 및 유지시키는 피하로 투여된 펩티드 I의 투여량을 결정함; CIA 환자에서 피하로 투여된 펩티드 I의 4번 이하의 투여량의 약동학 프로파일을 평가함 (연구 환자의 아집단에서); 및 펩티드 I의 활성 투여량에서 투여 빈도 및 비경구 철 교환(replacement)의 효과를 조사함.
- [0581] 연구의 최종점은 다음을 포함할 것이다: 치료 군당  $> 2 \text{ g/dL}$ 의 헤모글로빈 증가를 가지는 환자 또는  $> 1 \text{ g/dL}$ 에서 그 이전 28일 내에 적혈구 세포 수혈 없이 4주, 9주 및 12주째에 적어도 12 g/dL로 헤모글로빈이 증가된 환

자의 비율; 그 이전 28일 내에 적혈구 세포 수혈 없이 4주, 9주 및 12주째에 기준선으로부터  $> 1 \text{ g/dL}$ 의 혈모글로빈 증가를 가지는 환자의 비율; 4주, 9주 및 12주째에  $11\text{--}13 \text{ g/dL}$ 의 목적 범위 내의 혈모글로빈을 가지는 환자의 비율; 4주째 후에  $11\text{--}13 \text{ g/dL}$ 의 목적 범위 내의 혈모글로빈 수치를 가지는 환자의 비율; 기준선으로부터 평균 혈모글로빈 변화; 적혈구 세포 수혈의 빈도; 망상적혈구 개수 (절대 및 AUC), 망상적혈구 혈모글로빈 함량을 포함하는 추가적인 약리학적 변수; 철 보유 (iron stores) 측정에서의 변화, 예컨대 트랜스페린 포화 및 혈청 폐리틴; 유해 사례 (AEs); 심각한 유해 사례 (SAEs); 및 연구 환자의 아집단에서,  $C_{\max}$ ,  $AUC_{0-t}$ ,  $AUC_{0-\infty}$ ,  $t_{1/2\beta}$  (제거 반감기),  $V_d$  (분포의 외관상 부피 (apparent volume of distribution)),  $V_{ss}$  (정상상태 부피 (steady-state volume)) 및  $CL$  (제거 (clearance))를 포함하는 약동학 변수.

[0582] 연구를 위해 선택된 환자는 고령 종양 또는 램프종을 가진 환자로서 연령이 18~80세이고, 혈모글로빈 수치가  $\geq 9 \text{ g/dL}$  및  $\leq 11 \text{ g/dL}$ 이며, 화학요법을 더불어 받고, 지난 90일 내에 ESAs로 미리 치료받은 적이 없으며, 적격 기준을 만족하는 환자이고, 이들에게 메디칼 모니터 (Medical Monitor; MM)에 의하여 승인된 출발 투여량 또는 이어지는 연속 투여량 수준에서 웨티드 I이 투여될 것이다. 치료군 당 최소 10명의 치료 환자의 데이터의 유용성을 확인하기 위하여, 8주 전에 연구가 종료된 치료군 내에 6번째 및 그 다음의 환자들이 대체될 것이고, 최대 5번의 대체가 될 것이다. 각 대체 환자는 취소된 환자와 동일한 치료군에 할당될 것이다. 이어서 15명의 환자의 4개 이하의 개방표지 치료군이 더 낮은, 중간 및/또는 반복 투여 수준, 및/또는 웨티드 I의 투여빈도, 및/또는 트랜스페린 포화 수준 25~50%를 유지하기 위한 비경구적 철 교환 (replacement)을 연구하기 위하여 추가될 수 있다. 모든 가능한 투약 계획을 조사한다면, 최소 30명 및 최대 90명의 환자 (대체를 포함하지 않음)가 이번 시험에 참여될 것이다.

[0583] 본 연구에서 각 환자는 12주째까지 참여하고 뒤 이어서 4주의 스크리닝 기간을 가질 것으로 예상된다.

[0584] 15명 환자의 일련의 코호트는 웨티드 I의 증가되는 투여량을 투여받을 것이다. 개방 표지 투여량은 총 4번의 투여량에 대해 매 3주마다 SC 주사로 투여될 것이다 (연구 주 1, 4, 7, 10). 통상적으로, 웨티드 I은 화학요법 사이클의 1일째에 투여될 것이다. 웨티드 I 출발 투여량 및 투여 빈도는 건강한 자원자의 단계 (Phase) 1 데이터뿐만 아니라 웨티드 I 및 다른 적혈구 생성 자극제 (ESAs)에 대한 적혈구 생성 반응의 PK/PD 데이터로부터 모델링된 예측된 반응에 기초한다. 계획된 웨티드 I 투여량 수준 및 각 군에서 환자의 수는 다음과 같다.

N	치료	투여량 (mg/kg) Q3W
15	웨티드 I	0.1 mg/kg
15	웨티드 I	0.2 mg/kg
15	웨티드 I	0.4 mg/kg
15	웨티드 I	0.6 mg/kg

[0585]

[0586] 환자들은 마지막 주사 후 28일 동안, 또는 유해 사례가 안정화될 때까지, 또는 혈모글로빈 수치가  $11\text{--}13 \text{ g/dL}$ 이 될 때 중 어느 것이든 마지막에 발생하는 시점까지 추적될 것이다. 투여량 증가는 허용되지 않을 것이다. 4주째 후, 목적 범위의 혈모글로빈을 유지하기 위하여 적혈구 세포의 수혈이 필요하다면, 그 환자는 약물 연구로부터 제외되고, 표준적인 치료로 돌아가며, 안전성을 위해 추가적인 28일 동안 추적될 것이다. 연구 중의 임의의 시점에서, 환자의 혈모글로빈이 임의의 2주 기간 내에  $> 1.0 \text{ g/dL}$  만큼 증가하는 경우, 혈모글로빈이 안정화 (1주에  $< 0.5 \text{ g/dL}$ 의 증가)될 때까지 그 다음 투여가 연기될 것이고, 그 투여량은 50%만큼 감소될 것이다. 기준선 혈모글로빈 농도는 연구 약물의 투여 전 주에 수집된 2번의 최근 주간 혈모글로빈 수치의 평균으로서 정의한다 (예컨대, 스크리닝 및 기준선 수치). 연구 도중에, 코호트 개시 또는 정지 기준 결정을 위한 혈모글로빈 수준의 변화는 7일 이내에 그 다음의 연속적인 혈모글로빈 수치에 의한 확인이 필요하다.

[0587]

이것은 그룹당 15명의 CIA를 가진 환자로 이루어지는 6개 이하의 치료군을 가진 개방표지, 다중 센터 시험이다. 최초 치료군에서, 개방표지 웨티드 I은 총 4번 이하의 투여량으로 매 3주마다 피하주사로 투여될 것이다. 첫 번째 투여 후에, 환자들은 연구 전체에 걸쳐 적어도 매주 관찰될 것이다. 환자들은 연구 약물의 마지막 투여 후 최소 28일 동안, 또는 유해 사례가 안정화될 때까지, 또는 혈모글로빈 수치가  $11\text{--}13 \text{ g/dL}$ 가 되는 것 중 어느 것이든 마지막으로 일어날 때까지 추적될 것이다. 만약 환자의 혈모글로빈 수준이  $14 \text{ g/dL}$ 에 도달하게 되면 (확정), 그 환자는 임상적으로 지시되는 경우 피를 뽑게 (phlebotomized)될 수 있고, 방혈의 부피가 기록된다. 방혈 (phlebotomized)된 환자는 연구 약물의 투여가 중단될 것이고, 방혈 후의 약역학 데이터는 분석에서 제외될 것이다. 메디칼 모니터 (Medical Monitor; MM) 및 스플론서는 정지 기준에 부합되었을 경우 또는 때를 결정하기 위한 진행 기준에 대한 안전성 및 약역학 데이터를 검토할 것이다.

[0588]

한 코호트 내의 6명 이상의 환자가 적어도 6주의 추적이 완료된 후에는 (즉, 2번째 투여 후 적어도 3주), 현재

코호트 내로의 참여가 중단될 것이고, 다음 코호트로의 투여량 상승이 다음의 경우 허용될 것이다: MM에 의해 안전성 염려가 없음이 확인됨; 및 6명 이상의 환자가 4주째 후에 수혈되거나 또는 6주째에 <1 g/dL의 확인된 혜모글로빈 증가를 가짐.

[0589] 한 코호트 내에 등록된 6 이상의 환자들이 적어도 6주의 추적이 완료된 후 (즉, 2번째 투여 후 적어도 3주), 현재 코호트 내로의 참여가 중단될 것이고, 다음 코호트에서 더 낮은 수준으로 투여량의 감소가 다음의 경우에 허용될 것이다:

[0590] 웨티드 I과 아마도 관련될 수 있는 적어도 단계 3 또는 4의 AEs의 발생 또는 MM이 웨티드 I에 대한 임의의 구체적인 염려를 확인한 경우; 또는 총 6명 이상의 환자가 > 13.0 g/dL의 확인된 혜모글로빈 수준 (수혈과 무관) 또는 임의의 2주 기간 내에 > 1.0 g/dL로 확인된 증가된 혜모글로빈 (수혈과 무관)을 가짐.

[0591] 상기 MM 및 스폰서(Sponsor)에 의하여 안전상의 염려가 없다고 확인되면, 15명의 환자의 2 이하의 추가적인 개방 표지(open-label) 치료군에 대해 더 낮은, 중간 (현재 및 이전 연구들 사이) 또는 반복 투여 수준에서 개시될 수 있을 것이다. 또한, 일단 매 3 주마다 투여된 활성 투여량이 결정되면, 2 이하의 추가적인 코호트가 동일한 총 투여량이 상이한 주기 (예컨대, 매 4주마다 투여된 매 3주 투여량의 4/3)로 부분에 투여된 경우의 상대적인 효과를 측정하기 위하여 시험될 수 있다. 25~50%의 트랜스페린 포화를 얻기 위하여 비경구적 철의 투여의 효과가 또한 분리 코호트(separate cohort)에서 조사될 수 있다.

[0592] 종양 환자에 있어서 PAD는 0.075-0.5 mg/kg, 가능하다면 0.2-0.4 mg/kg, 가능하다면 0.25 mg/kg로 측정될 것으로 예측된다.

[0593] 본 발명은 여기에 기재된 특정 구체예에 의해 그 범위가 제한되지 않는다. 진정으로, 여기에 기재된 것에 추가하여 본 발명의 다양한 변형이 상기 기재 및 동반되는 도면들로부터 당업자에게 인식될 것이다. 그런 변형은 청구범위의 범위 내에 포함되는 것이다.

[0594] 또한 모든 수치들은 개략적인 것으로 이해되고 설명을 위해 제공된 것이라는 점이 이해될 것이다.

[0595] 특히, 특히 출원 및 다양한 공개를 포함하는 수많은 참고자료들이 인용되었고 명세서 전체로서 논의되었다. 그런 참고자료의 인용 및/또는 논의는 거의 본 발명의 기재를 명확화하기 위하여 제공되는 것이고, 임의의 그런 참고자료가 본 발명의 선행 기술로 인정되는 것은 아니다. 본 명세서에서 인용되고 논의된 모든 참고자료는 그들 전체로서 여기에 참고자료로 통합되고 만약 각 참고자료가 개별적으로 참고로써 통합된다면 그와 동일한 범위에서 통합된다.

## 서 열 목 록

- <110> AFFYMAX, INC.
- <120> ERYTHROPOIETIN RECEPTOR PEPTIDE FORMULATIONS AND USES
- <130> KP-CI-077805
- <150> US 60/687,655
- <151> 2006-06-05
- <160> 13
- <170> Kopatent In 1.71
- <210> 1
- <211> 20
- <212> PRT
- <213> artificial
- <220><223> synthetic peptide
- <220><221> MISC\_FEATURE
- <222> (1)..(1)

<223> Xaa is N-acetylglycine

<220><221> MISC\_FEATURE

<222> (13)..(13)

<223> Xaa is 1-naphthylalanine

<400> 1

Xaa Gly Leu Tyr Ala Cys His Met Gly Pro Ile Thr Xaa Val Cys Gln

1 5 10 15

Pro Leu Arg Lys

20

<210> 2

<211> 21

<212> PRT

<213> artificial

<220><223> synthetic protein

<220><221> MISC\_FEATURE

<222> (1)..(1)

<223> Xaa is N-acetylglycine

<220><221> MISC\_FEATURE

<222> (13)..(13)

<223> Xaa is 1-naphthylalanine

<220><221> MISC\_FEATURE

<222> (20)..(20)

<223> Xaa is N-methylglycine

<400> 2

Xaa Gly Leu Tyr Ala Cys His Met Gly Pro Ile Thr Xaa Val Cys Gln

1 5 10 15

Pro Leu Arg Xaa Lys

20

<210> 3

<211> 20

<212> PRT

<213> artificial

<220><223> synthetic protein

<220><221> MISC\_FEATURE

<222> (1)..(1)

<223> Xaa is N-acetylglycine

<220><221> MISC\_FEATURE

<222> (13)..(13)

<223> Xaa is 1-naphthylalanine

<220><221> MISC\_FEATURE

<222> (20)..(20)

<223> Xaa is N-methylglycine

<400> 3

Xaa Gly Leu Tyr Ala Cys His Met Gly Pro Ile Thr Xaa Val Cys Gln

1	5	10	15
---	---	----	----

Pro Leu Arg Xaa

20

<210> 4

<211> 20

<212> PRT

<213> artificial

<220><223> synthetic peptide

<220><221> MISC\_FEATURE

<222> (1)..(1)

<223> biotinylated

<400> 4

Gly Gly Leu Tyr Ala Cys His Met Gly Pro Ile Thr Trp Val Cys Gln

1	5	10	15
---	---	----	----

Pro Leu Arg Gly

20

<210> 5

<211> 5

<212> PRT

<213> artificial

<220><223> synthetic peptide

<220><221> MISC\_FEATURE

<222> (1)..(1)

<223> Xaa is N-acetylglycine

<220><221> MISC\_FEATURE

<222> (4)..(4)

<223> Y side chain tBu protected

<400> 5

Xaa Gly Leu Tyr Ala

1 5

<210> 6

<211> 4

<212> PRT

<213> artificial

<220><223> synthetic peptide

<220><221> MISC\_FEATURE

<222> (1)..(1)

<223> NH2 protected by Fmoc

<220><221> MISC\_FEATURE

<222> (1)..(1)

<223> side chain Acm protected

<220><221> MISC\_FEATURE

<222> (2)..(2)

<223> side chain Trt protected

<400> 6

Cys His Met Gly

1

<210> 7

<211> 8

<212> PRT

<213> artificial

<220><223> synthetic peptide

<220><221> MISC\_FEATURE

<222> (1)..(1)

<223> NH2 protected by Fmoc

<220><221> MISC\_FEATURE

<222> (3)..(3)  
 <223> side chain tBu protected  
 <220><221> MISC\_FEATURE  
 <222> (4)..(4)  
 <223> Xaa is 1-naphthylalanine  
 <220><221> MISC\_FEATURE  
 <222> (6)..(6)  
 <223> side chain Acm protected  
 <220><221> MISC\_FEATURE  
 <222> (7)..(7)  
 <223> side chain Trt protected  
 <400> 7  
 Pro Ile Thr Xaa Val Cys Gln Pro

1 5  
 <210> 8  
 <211> 3  
 <212> PRT  
 <213> artificial  
 <220><223> synthetic peptide  
 <220><221> MISC\_FEATURE  
 <222> (2)..(2)  
 <223> side chain Pbf protected  
 <220><221> MISC\_FEATURE  
 <222> (3)..(3)  
 <223> Xaa is N-methylglycine  
 <220><221> MISC\_FEATURE  
 <222> (3)..(3)  
 <223> COOH Bn protected  
 <400> 8  
 Leu Arg Xaa

1  
 <210> 9  
 <211> 9  
 <212> PRT

<213> artificial

<220><223> synthetic peptide

<220><221> MISC\_FEATURE

<222> (1)..(1)

<223> Xaa is N-acetyl glycine

<220><221> MISC\_FEATURE

<222> (4)..(4)

<223> side chain tBu protected

<220><221> MISC\_FEATURE

<222> (6)..(6)

<223> side chain Acm protected

<220><221> MISC\_FEATURE

<222> (7)..(7)

<223> side chain Trt protected

<400> 9

Xaa Gly Leu Tyr Ala Cys His Met Gly

1 5

<210> 10

<211> 11

<212> PRT

<213> artificial

<220><223> synthetic peptide

<220><221> MISC\_FEATURE

<222> (1)..(1)

<223> NH2 protected by Fmoc

<220><221> MISC\_FEATURE

<222> (3)..(3)

<223> side chain tBu protected

<220><221> MISC\_FEATURE

<222> (4)..(4)

<223> Xaa is 1-naphthylalanine

<220><221> MISC\_FEATURE

<222> (6)..(6)

<223> side chain Acm protected

<220><221> MISC\_FEATURE

<222> (7)..(7)

<223> side chain Trt protected

<220><221> MISC\_FEATURE

<222> (10)..(10)

<223> side chain Pbf protected

<220><221> MISC\_FEATURE

<222> (11)..(11)

<223> Xaa is N-methylglycine

<220><221> MISC\_FEATURE

<222> (11)..(11)

<223> COOH Bn protected

<400> 10

Pro Ile Thr Xaa Val Cys Gln Pro Leu Arg Xaa

1	5	10
---	---	----

<210> 11

<211> 20

<212> PRT

<213> artificial

<220><223> synthetic peptide

<220><221> MISC\_FEATURE

<222> (1)..(1)

<223> Xaa is N-acetylglycine

<220><221> MISC\_FEATURE

<222> (4)..(4)

<223> side chain tBu protected

<220><221> MISC\_FEATURE

<222> (6)..(6)

<223> side chain Acm protected

<220><221> MISC\_FEATURE

<222> (7)..(7)

<223> side chain Trt protected

<220><221> MISC\_FEATURE  
 <222> (12)..(12)  
 <223> side chain tBu protected  
 <220><221> MISC\_FEATURE  
 <222> (13)..(13)  
 <223> Xaa is 1-naphthylalanine  
 <220><221> MISC\_FEATURE  
 <222> (15)..(15)  
 <223> side chain Acm protected  
 <220><221> MISC\_FEATURE  
 <222> (16)..(16)  
 <223> side chain Trt protected  
 <220><221> MISC\_FEATURE  
 <222> (19)..(19)  
 <223> side chain Pbf protected  
 <220><221> MISC\_FEATURE  
 <222> (20)..(20)  
 <223> Xaa is N-methylglycine  
 <220><221> MISC\_FEATURE  
 <222>  
 > (20)..(20)  
 <223> COOH Bn protected  
 <400> 11  
 Xaa Gly Leu Tyr Ala Cys His Met Gly Pro Ile Thr Xaa Val Cys Gln  
 1 5 10 15  
 Pro Leu Arg Xaa  
 20  
 <210> 12  
 <211> 20  
 <212> PRT  
 <213> artificial  
 <220><223> synthetic peptide  
 <220><221> MISC\_FEATURE  
 <222> (1)..(1)  
 <223> Xaa is N-acetylglycine

<220><221> MISC\_FEATURE

<222> (4)..(4)

<223> side chain tBu protected

<220><221> MISC\_FEATURE

<222> (6)..(6)

<223> side chain Acm protected

<220><221> MISC\_FEATURE

<222> (7)..(7)

<223> side chain Trt protected

<220><221> MISC\_FEATURE

<222> (12)..(12)

<223> side chain tBu protected

<220><221> MISC\_FEATURE

<222> (13)..(13)

<223> Xaa is 1-naphthylalanine

<220><221> MISC\_FEATURE

<222> (15)..(15)

<223> side chain Acm protected

<220><221> MISC\_FEATURE

<222> (16)..(16)

<223> side chain Trt protected

<220><221> MISC\_FEATURE

<222> (19)..(19)

<223> side chain Pbf protected

<220><221> MISC\_FEATURE

<222> (20)..(20)

<223> Xaa is N-methylglycine

<400> 12

Xaa Gly Leu Tyr Ala Cys His Met Gly Pro Ile Thr Xaa Val Cys Gln

1

5

10

15

Pro Leu Arg Xaa

20

<210> 13

&lt;211&gt; 20

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; artificial

&lt;220&gt;&lt;223&gt; synthetic peptide

&lt;220&gt;&lt;221&gt; MISC\_FEATURE

&lt;222&gt; (1)..(1)

&lt;223&gt; Xaa is N-acetylglycine

&lt;220&gt;&lt;221&gt; MISC\_FEATURE

&lt;222&gt; (4)..(4)

&lt;223&gt; side chain tBu protected

&lt;220&gt;&lt;221

&gt; MISC\_FEATURE

&lt;222&gt; (7)..(7)

&lt;223&gt; side chain Trt protected

&lt;220&gt;&lt;221&gt; MISC\_FEATURE

&lt;222&gt; (12)..(12)

&lt;223&gt; side chain tBu protected

&lt;220&gt;&lt;221&gt; MISC\_FEATURE

&lt;222&gt; (13)..(13)

&lt;223&gt; Xaa is 1-naphthylalanine

&lt;220&gt;&lt;221&gt; MISC\_FEATURE

&lt;222&gt; (16)..(16)

&lt;223&gt; side chain Trt protected

&lt;220&gt;&lt;221&gt; MISC\_FEATURE

&lt;222&gt; (19)..(19)

&lt;223&gt; side chain Pbf protected

&lt;220&gt;&lt;221&gt; MISC\_FEATURE

&lt;222&gt; (20)..(20)

&lt;223&gt; Xaa is N-methylglycine

&lt;400&gt; 13

Xaa Gly Leu Tyr Ala Cys His Met Gly Pro Ile Thr Xaa Val Cys Gln

1

5

10

15

Pro Leu Arg Xaa

20