

(19)대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(51) 。 Int. Cl. (45) 공고일자 2006년09월13일
A61K 47/48 (2006.01) (11) 등록번호 10-0622796
(24) 등록일자 2006년09월04일

(21) 출원번호	10-2000-7011587	(65) 공개번호	10-2001-0071158
(22) 출원일자	2000년10월19일	(43) 공개일자	2001년07월28일
번역문 제출일자	2000년10월19일		
(86) 국제출원번호	PCT/US1999/009161	(87) 국제공개번호	WO 1999/55377
국제출원일자	1999년04월28일	국제공개일자	1999년11월04일

(81) 지정국 국내특허 : 알바니아, 아르메니아, 오스트리아, 오스트레일리아, 아제르바이잔, 보스니아 헤르체고비나, 바르바도스, 불가리아, 브라질, 벨라루스, 캐나다, 스위스, 중국, 쿠바, 체코, 독일, 덴마크, 에스토니아, 스페인, 핀란드, 영국, 그루지야, 헝가리, 이스라엘, 아이슬란드, 일본, 케냐, 키르기스스탄, 북한, 대한민국, 카자흐스탄, 세인트루시아, 스리랑카, 리베이라, 레소토, 리투아니아, 룩셈부르크, 라트비아, 몰도바, 마다가스카르, 마케도니아공화국, 몽고, 말라위, 멕시코, 노르웨이, 뉴질랜드, 폴란드, 포르투갈, 루마니아, 러시아, 수단, 스웨덴, 싱가포르, 슬로베니아, 슬로바키아, 타지키스탄, 투르크멘, 터키, 트리니다드토바고, 우크라이나, 우간다, 미국, 우즈베키스탄, 베트남,

AP ARIPO특허 : 케냐, 레소토, 말라위, 수단, 스와질랜드, 우간다, 시에라리온, 가나, 감비아, 짐바브웨,

EA 유라시아특허 : 아르메니아, 아제르바이잔, 벨라루스, 키르기스스탄, 카자흐스탄, 몰도바, 러시아, 타지키스탄, 투르크멘,

EP 유럽특허 : 오스트리아, 벨기에, 스위스, 사이프러스, 독일, 덴마크, 스페인, 핀란드, 프랑스, 영국, 그리스, 아일랜드, 이탈리아, 룩셈부르크, 모나코, 네덜란드, 포르투갈, 스웨덴,

OA OAPI특허 : 부르키나파소, 베닌, 중앙아프리카, 콩고, 코트디부아르, 카메룬, 가봉, 기니, 말리, 모리타니, 니제르, 세네갈, 차드, 토고, 기니 비사우,

(30) 우선권주장 60/083,339 1998년04월28일 미국(US)

(73) 특허권자 어플라이드 리서치 시스템스 에이알에스 홀딩 엔.브이.
네덜란드, 큐라카오, 피터마엘 15

(72) 발명자 엘타야르,나빌
미국,매사추세츠02186,밀톤,겔라드로드143

로버츠,마이클제이.
미국,알라바마35758,마디슨,케인브루크코트104

하리스,밀톤
미국,알라바마35801,헌즈빌,하이랜드플라자3119

사월비치,웨인
미국,매사추세츠01887,윌밍톤,모르스애버뉴24

(74) 대리인 강명구
 강석용

심사관 : 신영신

(54) 폴리올-I F N-베타 공액체

요약

PEG 성분이 사람 IFN-β의 Cys17과 공유결합된 PEG-IFN-β 공액체는 티올 반응성 PEG화 작용제를 이용한 부위특이적 PEG화 방법으로 만든다. 제약학적 조성물 및 감염, 종양, 자가면역, 염증질환을 치료하는 방법을 또한, 제공한다. 또한, 본 발명은 폴리펩티드, 특히, IFN-β에 PEG 성분을 단계적으로 부착하는 방법에 관한다.

대표도

도 1

명세서

기술분야

관련 출원에 대한 참고

본 출원은 35 U.S.C. §119(e)에 따라 U.S 분할 출원 60/083,339에 대해 우선권을 주장하고, 상기 우선권 자료는 여기에 참고문헌으로 한다.

본 발명은 폴리올-IFN-β공액체에 관한데, 여기서, 폴리올 단위체는 Cys¹⁷와 공유결합한다. 본 발명의 다른 목적은 박테리아 감염, 바이러스 감염, 자가면역질환, 염증질환의 치료, 예후 또는 진단에서 이들의 용도를 비롯하여, 이들의 부위-특이적 생산을 위한 방법에 관한다. 본 발명은 2개 또는 복수 PEG 성분을 폴리펩티드에 단계적으로 부착하는 방법에 관한다.

배경기술

사람 섬유아세포 인터페론(IFN-β)은 항바이러스 활성을 보유하고, 또한, 신종양세포에 대항하는 고유 킬러세포를 자극할 수 있다. 이것은 바이러스와 이중-가닥 RNA에 의해 유도된 대략 20,000 Da의 폴리펩티드이다. 재조합 DNA 기술로 클론한 섬유아세포 인터페론 유전자(Derynk et al., Nature, 285:542-547, 1980)의 뉴클레오티드 서열로부터, 단백질의 완전 아미노산 서열을 추정하였다. 이의 길이는 166개 아미노산이다.

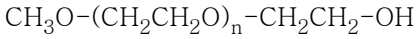
Shepard등(Nature, 294:563-565, 1981)은 항-바이러스 활성을 제거한 842번 염기(141번 위치에서 Cys →Tyr) 돌연변이와 뉴클레오티드 1119-1121이 결실된 변이 클론을 기술하였다.

Mark등은 469번 염기(T)를 (A)로 치환하는 인공돌연변이를 도입하여, 17번 위치에서 Cys →Ser으로 아미노산을 치환하였다(Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 81(18):5662-5666, 1984). 생성된 IFN-β는 '고유' IFN-β와 동일한 활성을 보유하고, 장기간 저장(-70℃)동안 안정하게 유지되는 것으로 보고되었다.

폴리에틸렌 산화물(PEO)로 알려져 있는 친수성중합체인 폴리에틸렌 글리콜(PEG)과 분자와의 공유결합은 생물공학과 의 약분야에서 중요한 의미를 갖는다. PEG의 가장 일반적인 형태는 각 말단에 하이드록실기가 결합된 선형 중합체다: HO-CH₂-CH₂O(CH₂CH₂O)_nCH₂CH₂-OH

이 화학식은 간단히 HO-PEG-OH로 표현할 수 있는데, 여기서, -PEG-는 말단기가 존재하지 않는 중합체 골격을 나타낸다:

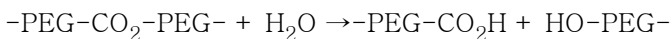
"-PEG-"는 " $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n\text{CH}_2\text{CH}_2-$ "를 의미한다. PEG는 일반적으로 메톡시-PEG-OH(m-PEG)로 사용하는데, 여기서, 한쪽 말단은 상대적으로 불활성인 메톡시기이고, 다른 말단은 화학적으로 변형되는 하이드록실기이다.



분지된 PEG가 통상적으로 사용된다. 분지된 PEG는 $\text{R}(\text{-PEG-OH})_m$ 으로 표현할 수 있는데, 여기서, R은 펜타에리트리톨 또는 글리세롤과 같은 중심의 핵심성분을 나타내고, (m)은 분지되는 팔(branching arm)의 수를 나타낸다. 분지되는 팔 (m)의 수는 3 내지 100개 또는 그 이상이 된다. 하이드록실기는 화학적으로 변형된다.

PCT 특허출원 WO 96/21469에서 제시한 다른 분지형은 화학적으로 변형되는 단일 말단을 보유한다. 이런 형태의 PEG는 $(\text{CH}_3\text{O-PEG-})_p\text{R-X}$ 로 표현할 수 있는데, 여기서, P는 2 내지 3이고, R은 리신 또는 글리세롤과 같은 중심의 핵심성분을 나타내고, X는 화학적으로 활성화되는 카르복실과 같은 기능기를 나타낸다. 또 다른 분지형인 "돌출 PEF"는 PEG 말단보다는 오히려 PEG 골격을 따라 카르복실과 같은 반응기를 보유한다.

이런 형태의 PEG이외에, 골격에서 약한 또는 분해 결합으로 중합체를 만들 수 있다. 가령, Harris는 U.S. 특허 출원 06/026,716에서, 가수분해되는 중합체 골격에서 에스테르 결합으로 PEG를 만들 수 있다는 것을 보였다. 이런 가수분해의 결과로, 중합체는 다음의 반응식에 따라 저분자량 단편으로 쪼개진다:



본 발명에 따라, 폴리에틸렌 글리콜 또는 PEG에는 전술한 모든 유도체가 포함된다.

에틸렌 산화물과 프로필렌 산화물의 공중합체는 화학성질의 측면에서 PEG와 매우 유사하여, PEG를 대신하여 다양한 목적에 사용할 수 있다. 이들은 다음의 화학식을 갖는다: $\text{HO-CH}_2\text{CHRO}(\text{CH}_2\text{CHRO})_n\text{CH}_2\text{CHR-OH}$,

여기서, R은 H 또는 CH_3 이다.

PEG는 높은 물 용해성 및 다수의 유기용매에서 높은 용해성을 보유한 유용한 중합체다. PEG는 또한, 비-독성, 비-면역원성이다. PEG를 물 불용성 화합물에 화학적으로 부착(PEG화)하는 경우, 생성된 공액체는 일반적으로, 다수의 유기용매와 물에서 녹는다.

PEG-단백질 공액체는 현재 단백질 대체 요법과 다른 치료용으로 사용되고 있다. 가령, PEG화된 아데노신 디아미나제(ADAGEN²)는 중증 복합성 면역결핍질환(SCIDS)을 치료하는데 사용하고, PEG화된 L-아스파라기나제(ONCAPSPAR³)는 급성 림프아구성 백혈병(ALL)을 치료하는데 사용하고, PEG화된 인터페론- α (INTRON(R) A)은 C형 감염치료를 위한 임상실험 중에 있다.

PEG-단백질 공액체의 임상 효능에 대한 전반적인 검토는 N.L. Burnham, Am. J. Hosp. Pharm., 15:210-218, 1994를 참고로 한다.

단백질을 PEG화시키기 위한 다양한 방법이 개발되었다. 단백질에서 발견된 반응기에 PEG를 부착시키는 것은 일반적으로, 전기친화적으로 활성화된 PEG 유도체를 이용하여 실시한다. 리신잔기와 N-말단에서 발견되는 α -와 ϵ -아미노기에 PEG를 부착시키면, 혼합산물로 이루어진 공액체가 만들어진다.

일반적으로, 이런 공액체는 단백질에서 영(zero) 내지 아미노기 수량 범위에서, 단백질 분자당 수개의 PEG 분자("PEGmers")로 구성된다. 단일 변형된 단백질 분자의 경우, PEG 단위체는 다수의 상이한 아민 부위에 부착할 수 있다.

이와 같이 비-특이적으로 PEG화되면, 거의 불활화된 다수의 공액체가 만들어진다. 다수의 사이토킨과 항체에서와 같이, 단백질의 활성결합부위를 봉쇄하여 활성을 감소시킨다. 가령, Katre등은 U.S. 특허 4,766,106과 U.S. 특허 4,917,888에

서, 과량의 메톡시-폴리에틸렌 글리콜일 N-숙시니미딜 글루타레이트와 메톡시-폴리에틸렌 글리콜일 N-숙시니미딜 숙시네이트를 이용한 IFN- β 와 IL-2의 PEG화를 제시한다. 양 단백질은 미생물 숙주세포에서 생산되는데, 이것은 자유 시스템에서 세린으로의 특정부위-돌연변이를 가능하게 하였다. IFN- β 의 미생물 발현에서 단백질 접합을 용이하게 하려면 돌연변이가 필요하다. 특히, 이들 실험에 사용된 IFN- β 는 Betaseron²이라는 이름으로 상업적으로 판매되고 있는데, 여기서, Cys¹⁷ 잔기는 세린으로 치환된다. 또한, 당부가(glycosylation)가 없는 경우, 수용액에서 이의 용해도는 감소되었다. 비-특이적으로 PEG화되면, 용해도는 증가하는 반면, 활성과 산출량이 감소하는 문제가 발생하였다.

PEG-IFN- β 인터페론 공액체라는 발명명칭의 유럽 특허 출원 EP 593 868에서는 PEG-IFN- β 공액체의 제조방법을 기술하고 있다. 하지만, PEG화 반응은 부위-특이적이지 않기 때문에, PEG-IFN- β 공액체의 혼합된 위치이성질체가 수득된다(Monkarsh et al., ACS Symp. Ser., 680:207-216, 1997).

Kinstler등은 유럽 특허 출원 EP 675 201에서, mPEG-피로피온알데하이드를 이용한 거핵세포 생장 및 발달인자(MGDF)의 N-말단잔기의 선택적인 변형을 설명하였다. 이를 통해, 재현가능한 PEG화와 임의의 약리동태학이 가능해졌다. Gilbert등은 U.S. 특허 5,711,944에서, 최적활성을 보유한 IFN- β 의 PEG화가 가능하다는 것을 입증하였다. 이 경우에, 최적 공액체를 얻기 위해서는 힘든 정제 단계가 필요하였다.

다른 단백질을 비롯하여, 대부분의 사이토킨은 특이적 PEG 부착위치를 보유하지 않기 때문에, 전술한 실례와는 별개로, PEG화 반응을 통해 만들어진 이성질체중 일부는 부분적으로 또는 완전히 불활화되고, 따라서, 최종혼합물의 활성이 상실된다.

이런 측면에서, 특정부위 단일-PEG화는 단백질 공액체의 제조에서 바람직한 목표가 된다.

Woghiren등은 이런 특정부위 PEG화를 위한 티올-선택적 PEG 유도체를 합성하였다(Bioconjugate Chem., 4(5):314-318, 1993). 오르토피리딜 디설파이드 반응기 형태의 안정한 티올-보호된 PEG 유도체는 단백질(과파인)상의 자유 시스템인 과 특이적으로 결합하는 것으로 밝혀졌다. 과파인과 PEG사이에 새롭게 형성된 이황화 결합은 중간정도의 환원 조건 하에서 절단하여, 고유 단백질을 재생할 수 있다.

이 글에서 언급된 문서는 본 발명의 임의 청구항의 특허가능성에 관한 선행기술 또는 관련 자료가 결코 아니다. 임의 자료의 내용 또는 날짜에 대한 어떤 진술도 출원시점에 출원인에게 입수가능한 정보에 기초한 것으로, 이런 진술의 정확성을 담보하지 않는다.

본 발명의 요약

본 발명에서, 폴리올-IFN- β 공액체, 특히, PEG-IFN- β 공액체를 제공하는데, 여기서, 폴리올 단위체는 Cys¹⁷과 공유결합한다. 특이적 공액은 티올-반응성 폴리올 작용제와 IFN- β 의 Cys¹⁷잔기와 반응시켜 얻는다. 이런 공액체는 *in vivo*에서 향상된 효능을 보일 것으로 예상된다. '고유'IFN- β 에 비하여, 중성 pH에서 향상된 용해도, 향상된 안정성(줄어든 응집), 감소된 면역원성, 활성의 무손실을 얻는 것이 목표다. 이런 공액의 결과로, 원하는 효과를 위해 필요한 투여량은 감소되고, 제약학적 조성물 제제는 간소화, 안정화되고, 장기간 효능이 증가하게 될 것이다.

본 발명은 또한, 폴리펩티드에 대한 PEG 성분의 단계적 부착방법을 제공한다.

도면의 간단한 설명

도1은 정제에 앞서 PEG-IFN- β 공액체의 모세관 전기영동(CE) 그래프를 보여준다.

도2A-2C는 크기 배제 크로마토그래피(Superose 12)로 실시한 PEG-IFN- β 공액체의 정제를 보여준다: 도2A-일차 패스; 도2B-이차 패스; 도2C-3차 패스.

도3은 크로마토그래피 3차 패스에서 얻은 정제된 PEG-IFN- β 공액체의 SDS-PAGE 크로마토그래피를 보여준다. 라인 1과 4는 단백질 중량 기준이고, 라인 2는 "고유"IFN- β 이고, 라인 3은 PEG-IFN- β 공액체이다.

도4는 정제된 PEG-IFN- β 공액체의 모세관 전기영동(CE) 그래프를 보여주는데, 여기서, IFN- β 는 mPEG-OPSS_{5k}로 PEG화시킨다.

도5는 정제된 PEG-IFN- β 공액체의 MALDI MS 스펙트럼을 보여준다.

도6은 "고유"IFN- β 와 PEG-IFN- β 공액체의 항-바이러스 활성을 비교한 것이다. WISH 세포는 수포성 구내염 바이러스의 세포 변성량으로 자극하기 전에, 지정된 농도의 IFN- β 샘플로 24시간동안 배양하였다. 세포변성 효과는 추가된 48시간후, MTT 전환으로 측정하였다.

도7은 Daudi 세포에서 IFN- β 와 PEG-IFN의 결합 프로파일을 보여준다.

도8은 정맥투여후, 생쥐에서 IFN- β 와 PEG-IFN의 약리동태 프로파일을 보여준다. 점선은 각 표준곡선에 대한 분석 LOQ를 표시한다.

도9는 피하 투여후, 생쥐에서 IFN- β 와 PEG-IFN의 약리동태 프로파일을 보여준다. 점선은 각 표준곡선에 대한 분석 LOQ를 표시한다.

발명의 상세한 설명

본 발명은 폴리올 성분, 좀더 구체적으로는 PEG 성분을 사람 IFN- β 의 Cys¹⁷에 부착시키면, 고유 사람 인터페론- β 의 IFN- β 생물활성을 예상할 수 없을 정도로 향상시킨다(또는 적어도 감소시키지는 않는다)는 발견에 기초한다. 따라서, Cys¹⁷ 잔기에 부착된 폴리올 성분을 보유한 폴리올-IFN- β 공액은 동일 또는 향상된 IFN- β 생물활성을 보일 뿐만 아니라, 폴리올 성분에 의해 공여된 바람직한 성질, 예를 들면, 향상된 용해도를 제공하게 된다.

이 글에서 "IFN- β "는 생물유체로부터 분리하여 수득한 또는 진핵이나 원핵 숙주세포로부터 DNA 재조합 기술로 수득한 사람 섬유아세포 인터페론, 이의 염, 기능유도체, 전구물질, 활성 분취물을 의미하는데, 단 이들은 자연발생형의 17번 위치에서 나타나는 시스테인 잔기를 보유하고 있어야 한다.

본 발명에 따른 폴리올-IFN- β 공액체상의 폴리올 성분은 직쇄 또는 분지쇄를 보유한 물-용해성 단일-또는 이중-기능 폴리(알킬렌 산화물)이 된다. 일반적으로, 폴리올은 폴리(에틸렌 글리콜)(PEG)와 같은 폴리(알킬렌 글리콜)이다. 하지만, 당업자는 다른 폴리올, 예를 들면, 폴리(프로필렌 글리콜) 및 폴리에틸렌 글리콜과 폴리프로필렌 글리콜의 공중합체를 적절히 사용할 수 있다.

이 글에서, "PEG 성분"에는 선형과 분지형 PEG, 메톡시 PEG, 가수분해된 또는 효소분해된 PEG, 돌출 PEG, 수지체 PEG, PEG와 하나 또는 복수 폴리올의 공중합체, PEG와 PLGA(폴리(락트/글리콜산))의 공중합체가 포함되지만, 이들에 한정하지 않는다.

이 글에서 "염"은 공지된 방법으로 수득할 수 있는 화합물의 카르복실기 염과 아미노기 염을 의미한다. 카르복실기 염에는 비유기 염(예, 나트륨, 칼륨, 칼슘염) 및 아민(예, 트리에탄올아민, 아르기닌 또는 리신)으로 형성된 염과 같은 유기 염기 염이 포함된다. 아미노기 염에는 염산과 같은 비유기산을 포함한 염과 아세트산과 같은 유기산을 포함한 염이 포함된다.

이 글에서 "기능 유도체"는 공지된 방법에 따라, 아미노산 성분의 측면사슬, 또는 말단 N- 내지 C-기에 존재하는 기능기로 부터 만들 수 있는 유도체를 의미하는데, 이들이 제약학적으로 수용가능한 경우, 다시 말하면, 이들이 단백질 활성을 파괴하지 않거나 또는 이들을 함유한 제약학적 조성물에 독성을 전달하지 않는 경우, 본 발명에 포함된다. 이런 유도체에는 카르복실기의 에스테르 또는 지빙족 아마이드와 자유 아미노기의 N-아실 유도체 또는 자유 하이드록실기의 O-아실 유도체가 포함되는데, 아실기, 예를 들면, 알카노일-또는 아로일-기로 만들어진다.

"전구물질"은 사람 또는 동물 체내에서 IFN- β 로 전환되는 화합물이다.

본 발명에서, 단백질의 "활성 분취물"은 단독 또는 관련된 분자 내지 이와 결합된 잔기, 예를 들면, 당 또는 인산염의 잔기와 혼합하는 화합물 자체의 폴리펩티드 사슬의 임의 단편 또는 전구물질, 또는 이런 단편 내지 전구물질이 약물로서 IFN- β 의 동일활성을 보이는 경우의 폴리펩티드 응집체를 의미한다.

본 발명의 공액체는 당분야에 공지된 임의의 방법으로 만들 수 있다. 본 발명의 구체예에 따라, IFN- β 는 적당한 용매에서 PEG화 작용제와 반응시키고, 원하는 공액체는 하나 또는 복수의 크로마토그래피 방법을 이용하여 분리하고, 정제한다.

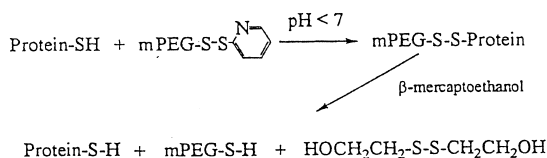
"크로마토그래피 방법"은 용매(이동상)가 흘러가는 지지체(정지상)에 혼합물을 가하여, 이의 성분을 분리하는데 사용하는 임의의 기술을 의미한다. 크로마토그래피의 분리 원칙은 정지상과 이동상의 상이한 물리적 성질에 기초한다.

기존 문헌에 공지된 일부 크로마토그래피 방법은 다음과 같다: 액체, 고압 액체, 이온 교환, 흡수, 친화성, 분배, 소수성, 역상, 겔 여과, 한외여과 또는 박막 크로마토그래피.

이 글에서 "티올-반응성 PEG화 작용제"는 시스테인 잔기의 티올기와 상호작용할 수 있는 임의의 PEG 유도체를 의미한다. 예로는 오르토퍼리딜 디설파이드, 비닐술폰, 말레이미드, 요오도아세트아미드등과 같은 기능기를 보유한 PEG를 들 수 있다. 본 발명의 적절한 구체예에 따라, 티올-반응성 PEG화 작용제는 PEG의 오르토퍼리딜 디설파이드(OPSS) 유도체가 된다.

PEG화 작용제는 한쪽 말단만 공액에 이용가능한 단일-메톡실화된 형태, 또는 양쪽 말단을 공액에 이용할 수 있는 이중기능 형태(예, 단일 PEG 성분에 2개의 IFN- β 가 공유결합된 공액체 형태)로 사용한다. 가급적, 500내지 100,000 분자량을 보유한다.

본 발명의 공액체를 만들기 위한 일반적인 반응식은 아래와 같다:



상기 반응식의 두 번째 선은 PEG-단백질 결합을 절단하기 위한 방법을 보여준다. mPEG-OPSS 유도체는 자유 설피드릴기에 대해 매우 특이적이고, IFN- β 가 안정한 상태를 유지하는 산성 pH 조건하에서 신속하게 반응한다. 공액체의 IFN- β 와 PEG 고유 형태로의 환원에서 고 특이성을 확인할 수 있다.

단백질과 PEG 성분사이에 생성된 이황화결합은 순환계에서는 안정적인 반면, 세포환경으로 들어간 직후에 환원되는 것으로 밝혀졌다. 따라서, 세포로 들어가지 않은 공액체는 제거될 때까지 순환계에서 안정적으로 유지될 것으로 예상된다.

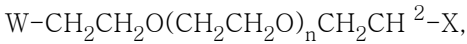
상기 반응은 부위 특이적인데, 그 이유는 자연발생형 사람 IFN- β 의 31번과 141번에서 나타나는 Cys 잔기는 이황화결합을 형성하고, 따라서 티올-반응성 PEG화 작용제와 반응하지 않기 때문이다.

본 발명은 또한, 하나 또는 복수 성분을 단계적으로 폴리펩티드에 부착하는 방법에 관한다. 이 방법은 저분자량 활성화 PEG가 고분자량 활성화 PEG보다 단백질상의 입체적으로 방해받은 반응부위와 좀더 완벽하게 반응할 수 있다는 인식에 기초한다. 값비싼 치료단백질의 PEG-변형은 PEG 공액체를 실용적으로 생산할 수 있을 만큼 경제적이어야 한다. 또한, 사구여과를 줄이고, PEG-단백질 공액체의 약리학적 성질을 최적화하기 위하여, 공액체는 70 kDa 분자량의 단백질 크기와 동등한 크기를 보유해야 한다. 이것은 하나의 PEG를 부착하는 부위특이적 변형의 경우, 가급적, 20 kDa이상의 분자량을 보유한 PEG 유도체를 부착시킨다는 것을 의미한다. 변형부위가 입체적으로 밀집되어있는 경우, 큰 PEG 성분상의 반응기는 변형부위에 도달하기가 어려워지고, 따라서, 산출량이 줄어든다. 본 발명에 따른 폴리펩티드를 PEG화시키는 적절한 방법은 소량의 이형 또는 동형이중기능 PEG 성분을 먼저 부착시켜 부위-특이적 PEG화 수율을 증가시키는 것인데, 상기 PEG 성분은 상대적으로 작은 크기로 인해 입체적으로 밀집된 위치와 반응할 수 있다. 이후 고 분자량 PEG 유도체를 작은 PEG에 부착시켜, 원하는 PEG화된 단백질을 다량 산출할 수 있다.

두개 또는 복수 PEG 성분을 본 발명에 따른 폴리펩티드에 단계적으로 부착하는 방법에는 저분자량 이형이중기능 또는 동형이중기능 PEG 성분을 먼저 폴리펩티드에 부착시키고, 이후, 폴리펩티드에 부착된 저분자량 PEG 성분의 자유 말단에 단일기능 또는 이중기능 PEG 성분을 부착시키는 것이 포함된다. 두개 또는 복수 PEG 성분을 폴리펩티드(여기서, 폴리펩티

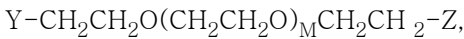
드는 가급적 IFN-β이고, PEG 부착부위는 가급적 입체적으로 밀집된 부위에 위치한 Cys¹⁷이 된다)에 단계적으로 부착한 후, PEG-폴리펩티드 공액체는 하나 또는 복수의 정제 기술, 예를 들면, 이온 교환 크로마토그래피, 크기 배제 크로마토그래피, 소수성 상호작용 크로마토그래피, 친화성 크로마토그래피, 역상 크로마토그래피를 이용하여 정제할 수 있다.

저분자량 PEG 성분은 다음의 화학식을 갖는다:



여기서, W와 X는 아민, 설피드릴, 카르복실 또는 하이드록실 기능기와 독립적으로 상호작용하여, 저분자량 PEG 성분을 폴리펩티드에 부착시키는 기이다. W와 X는 가급적, 오르토포리딜 디설파이드, 말레이미드, 비닐술폰, 요오도아세트아마이드, 아민, 티올, 카르복실, 활성 에스테르, 벤조트리아졸 탄산염, p-니트로페놀 탄산염, 이소시아네이트, 비오틴에서 독립적으로 선택된다. 저분자량 PEG 성분은 가급적, 100 내지 5,000달톤의 분자량을 보유한다.

폴리펩티드에 부착된 저분자량 PEG의 자유 말단에 부착시키는 단일기능 또는 이중기능 PEG 성분은 가급적, 100달톤 내지 200kDa범위의 분자량을 보유하고, 가급적, 메톡시 PEG, 분지된 PEG, 가수분해된 또는 효소분해된 PEG, 돌출 PEG 또는 수지체 PEG가 된다. 이중기능 또는 단일기능 PEG는 또한 다음의 화학식을 갖는다:



여기서, Y는 폴리펩티드에 부착되는 저분자량 PEG 성분의 자유말단에 위치한말단기와 반응하고, Z는 -OCH₃이거나 또는 상기 PEG 성분과 반응하여 이중기능 공액체를 형성하는 기이다.

두 개 또는 복수의 PEG 성분을 단계적으로 부착하기 위한 상기 방법으로 만들어진 PEG-폴리펩티드 공액체를 사용하여, 상기 폴리펩티드가 활성성분으로 효과적인 질환 또는 질병을 치료하기 위한 약물 또는 제약학적 조성물을 생산할 수 있다.

본 발명의 다른 목적은 제약학적 조성물에 사용하기 적합하도록 정제된 형태의 공액체를 박테리아와 바이러스 감염, 자가면역, 염증 질환, 종양의 치료, 진단 또는 예후를 위한 활성성분으로 제공하는 것이다. 이런 제약학적 조성물 또한, 본 발명의 목적중 하나다.

전술한 질환의 무제한적 예로는 폐혈 쇼크, AIDS, 류머티스 관절염, 홍반성 낭창, 다발성 경화증을 들 수 있다.

본 발명의 다른 구체예와 장점은 다음의 명세서 분명해질 것이다.

본 발명의 한 구체예는 본 발명 공액체의 약리학적 효과량을 전술한 질병이 발병할 위험성이 높은 개체 또는 벌써 이런 증상을 보이는 개체에 투여하는 것에 관한다.

활성성분에 상응하는 투여경로를 사용할 수 있다. 피하, 근육내 또는 정맥주사와 같은 장관외 투여가 바람직하다. 활성성분의 투여량은 환자의 나이, 체중, 개별반응에 따른 처방에 기초한다.

약량은 75kg의 평균체중의 경우, 일일 10μg 내지 1mg이고, 바람직한 일일 분량은 20μg내지 200μg이다.

장관외 투여를 위한 제약학적 조성물은 활성 주성분과 적당한 담체로 구성된 주사액으로 만들 수 있다. 장관외 투여를 위한 담체는 당분야에 공지된 것으로, 이의 예로는 물, 식염수 용액, 링거 용액 또는 텍스트로스를 들 수 있다. 담체는 제약학적 조성물의 안정성과 등장성을 유지하기 위하여 소량의 부형제를 함유할 수 있다. 용액제조는 통상의 방법에 따라 실시할 수 있다.

본 발명은 특정 구체예를 참고하여 설명하지만, 본 발명 명세서의 내용에는 청구항의 의미와 목적을 벗어나지 않고, 당분야에 통상적 지식을 가진 자가 이해할 수 있는 모든 변형과 대용을 포함한다.

본 발명은 다음의 실시예를 통하여 설명하는데, 이들 실시예는 본 발명의 범위를 결코 한정하지 않는다.

실시예

실시예 1: PEG-IFN-β 공액체의 제조

mPEG_{5K}-OPSS를 이용한 IFN-β의 변형

PEG-IFN-β 공액체 제조를 위하여, 50mM 아세트산나트륨 버퍼(pH 3.6)에서 0.37mg/ml 농도로 안정적인 재조합 사람 IFN-β를 사용하였다. 대략 1.0ml의 6M 요소는 0.37mg/ml(0.75mg, 3.7×10^{-8} moles) 농도로 2ml의 IFN-β에 첨가하였다. mPEG_{5K}-OPSS는 50 몰 내지 1몰의 IFN-β에 첨가하고, 이들 둘은 37℃에서 2시간 또는 50℃에서 1시간동안 프로필렌 바이알에서 반응시켰다. 반응혼합물은 모세관 전기영동(CE) 그래프로 분석하여, 정제이전 pEG화 반응에 의해 형성된 PEG-IFN-β 공액체의 함량을 측정하였다(도1). 이런 반응의 일반적인 수율은 50% PEG-IFN-β이다. 반응 산물은 0.22mm 시린지 필터로 반응혼합물로부터 여과하고, 여과된 용액은 이후, 크기 배제 칼럼(Superose 12 또는 Superdes 75, Pharmacia)에 적하하고, 50mM 인산나트륨, 150mM NaCl, pH 7.0 버퍼로 용출하였다. 도2A는 Superose 12 크기 배제 크로마토그래피 칼럼상에서, PEG-IFN-β 공액체의 정제로부터 용출 프로파일을 보여준다. 피크를 수거하고, SDS-PAGE로 분석하였다(도3). PEG-IFN-β 공액체를 함유한 분취물은 함께 모으고, 농축물은 이후, 동일한 크기 배제 칼럼에 다시 적하하여, "고유" IFN-β 피크의 근접성에 따라 PEG-IFN-β를 추가로 정제하였다(도2B). 이 과정은 반복(3번)하여 정제를 담보하였다(도2C). 도 4와 5는 각각, 정제된 PEG-IFN-β 공액체의 모세관 전기영동 그래프와 MALDI MS 스펙트럼을 보여준다.

mPEG_{30K}-OPSS를 이용한 IFN-β의 변형

제공한 재조합 사람 IFN-β는 50mM 아세트산나트륨 버퍼(pH 3.6)에서 0.36mg/ml 농도로 안정한 상태를 유지시킨다. 3ml 탈이온화된 H₂O에 녹인 대략 36mg의 mPEG_{30K}-OPSS는 3ml의 IFN-β에 0.36mg/ml(1.08mg, 4.9×10^{-8} moles)로 첨가하고, 이들 둘은 50℃에서 2시간동안 폴리에틸렌 바이알에서 반응시켰다. 반응 혼합물은 모세관 전기영동으로 변형정도를 분석하였다. 이 반응에 대한 일반적 수율은 <30%이다. 용액은 이후, 크기 배제 칼럼(Superose 12, Pharmacia)으로 다시 적하하고, 50mM 인산나트륨, 150mM NaCl, pH 7.0 버퍼로 용출하였다. 피크는 수거하고, SDS-PAGE로 이들의 함량을 분석하였다.

실시예 2: PEG-IFN-β 공액체의 생물활성

사람 재조합 IFN-β의 항-바이러스 활성에 대한 PEG화 효과를 평가하기 위하여, 양막이 존재하는 사람 WISH 세포는 새롭게 만든 IFN-β(PEG화에 사용한 것과 동일한 세척액) 또는 PEG-IFN-β 공액체로 선배양하였다. WISH-VSV 세포변성 분석으로 측정한 바와 같이, IFN-β 매개된 항-바이러스 활성은 Novick et al., (J. Immunol., 129:2244-2247(1982))의 프로토콜에 기초하여 개발된 항-바이러스 WISH 생물분석에 따라 측정하였다. WISH 분석에 사용한 재료는 다음과 같다:

WISH 세포 (ATCC CCL 25)

수포성 구내염 바이러스 원액(ATCC V-520-001-522), -70℃로 저장

IFN-β, 사람 재조합, InterPharm Laboratories LTD (32, 075-타입, Batch # 205035), 82×10^6 IU/ml, 특이적 활성: 222×10^6 IU/mg

실시예 1에서와 동일하게 만들고, PBS(pH 7.4)에 보관한 PEG-IFN-β 공액체

WISH 성장 배지(Earls 염이 포함된 MEM 고 글루코오스 + 10% FBS + 1.0% L-글루타민 + 페니실린/스트렙토마이신 (100U/ml, 100μg/ml))

WISH 분석 배지(Earls 염이 포함된 MEM 고 글루코오스 + 5% FBS + 1.0% L-글루타민 + 페니실린/스트렙토마이신 (100U/ml, 100μg/ml))

PBS에 5mg/ml로 녹인 MTT, -70℃로 저장.

WISH 분석을 위한 프로토콜은 다음과 같다:

IFN-β 샘플은 WISH 분석배지에서 2X 출발농도로 희석한다.

편형-바닥 96-웰 평판내 WISH 분석 배지에서 IFN-β 샘플을 3배 희석하여, 각 웰이 50μl의 희석된 IFN-β 샘플을 보유하도록 한다(일부 기준 웰은 50μl의 WISH 분석배지만을 보유한다).

로그 성장기 WISH 세포는 트립신/EDTA 용액으로 수거하고, WISH 분석배지에서 세척하고, 최종 농도는 0.8×10^6 세포/ml가 되도록 하였다.

50μl WISH 세포 현탁액(4×10^4 세포/웰)을 각 웰에 첨가한다. 세포에 노출된 IFN-β의 최종 농도는 1X이다.

5% CO₂ 가습한 배양기에서 24시간동안 배양한 후, 50μl의 1:10 희석된(WISH 분석 배지에서) VSV 원액(100% WISH 세포를 48시간내에 분해하기 위해 미리 결정된 분량)은 무-바이러스 기준 웰(이들은 동량의 분석배지만을 함유)을 제외한 모든 웰에 첨가한다.

추가로 48시간동안 배양한 후, 25μl의 MTT 용액을 각 웰에 첨가하고, 이후, 평판은 배양기에서 추가로 2시간동안 배양한다.

웰의 내용물은 평판을 뒤집어 옮기고, 200μl의 100% 에탄올을 각 웰에 첨가한다.

1시간 후, 평판은 Soft max Pro 소프트웨어 패키지와 Spectromax 분광광도장치(Molecular devices)를 이용하여, 595nm에서 판독한다.

[표 1]

PEG화되고, Mock-PEG화된 IFN-베타 샘플의 항바이러스 활성

IFN-베타 샘플 *	EC50**
PEG-IFN-B 공액체	3.9+/- 0.7 pg/ml
IFN-B	16.4 +/- 1.0 pg/ml

* 아미노산 분석으로 결정된 샘플상의 IFN-B의 원액농도

** EC50(+/- S.D.)은 소프트웨어 프로그램 microcal origin 4.1로 측정하였다.

상기 도6과 표1에서 보인 바와 같이, PEG-IFN-β공액체는 새롭게 만든 IFN-β 세척액보다 우수한 항-바이러스 활성 수준을 유지하였다. PEG-IFN-β공액체가 새롭게 만든 IFN-β보다 4배나 높은 생물활성을 보유하는 것 또한, WISH 세포 분석 배지를 첨가한 후, "고유" IFN-β에 비하여 PEG-IFN-β공액체의 안정성이 향상된 결과인 것으로 보인다.

실시예 3: PEG-IFN 샘플의 상대적 활성의 *in vitro* 분석

PEG[30kD]-IFN-β와 PEG[2 x 20 kD]-IFN-β의 상대적 활성은 실시예 2에서 제시한 표준 프로토콜을 이용한 WISH 분석으로 측정하였다(표2). 상이한 시간동안 3명의 다른 사람이 3번의 개별분석을 실시하였다.

[표 2]

PEG-IFN-β의 상대적인 항바이러스 활성

샘플	상대적인 인터페론 활성*(3번의 연구)			
	분석 1	분석 2	분석 3	분석(S.D.)
PEG[30kD]-IFN-β	3.2 X 이상	3.1 X 이상	1.8 X 이상	3.0 X(0.78)이상
PEG[20 x 20 kD]-IFN-β	4.2 X 이상	1.3 X 이상	0.85 X 이상	2.0 X(1.8)이상

* 각 분석에 포함된 표준 IFN-β와 비교한 EC50 투여량

** 330ug/ml의 IFN-β 농도에 기초한 비교. PEG[30kD]-IFN-β(5.41 ug/ml)와 PEG[2 X 20 kD]-IFN-β(6.86 ug/ml)의 원농도는 AAA로 측정하였다.

PEG-IFN-β와 세포상의 수용체와의 결합은 고정된 양의 ^{125}I -IFN-α2a 존재하에서 평가하였다. IFN-α2a는 클로라민 T 방법을 이용하여 ^{125}I 로 방사라벨하였다. 반응물을 Sephadex G25 칼럼에 통과시키고, 분취물을 함유한 단백질을 한데 모아, ^{125}I 결합된 IFNα2a를 자유 요오드로부터 제거하였다(Pharmacia). ^{125}I -IFN-α2a는 IFN-α2a ELISA 분석(Biosource, USA)으로 정량하고, 특이적 활성을 측정하였다. 기하급수적으로 성장시킨 Daudi 세포는 수거하고, 2×10^6 세포는 분석 버퍼에서 희석한 상이한 농도의 PEG-IFN-β 또는 IFN-α2a 존재하에, 실온에서 3시간동안 0.5 nM ^{125}I -IFN-α2a로 배양하였는데, 상기 분석 버퍼는 2% 태아 소 혈청과 0.1% 아지드나트륨을 함유한 RPMI 1640이다. 배양 종결시점에서, 세포는 파탈레이트 기름층을 통하여 회전시키고, 세포에 결합된 방사활성은 감마 계수기에서 계수하였다. 또한, PEG[30kD]-IFN-β와 PEG[25 x 20kD]-IFN-β의 수용체에 대한 결합은 도7에서 보인 IFN-β의 결합 활성과 매우 유사하였다.

또한, Daudi 세포(사람 B 세포 림프종) 항-증식분석에서 상대적인 활성을 측정하였다(표3). 모든 IFN는 200ng/ml의 2x 농도로 만들었다. 샘플은 100μl의 최종 부피로 평판길이의 3배이하로 희석하였다. 1×10^5 세포/웰(100μls)은 각 웰에 첨가하고, CO₂ 가습한 배양기에서 37℃로 72시간동안 배양하였다. 48시간 후, 삼중(^3H)티미딘은 20μl에 1μCi/웰로 첨가하였다. 72시간 배양의 종결시점에서, 평판은 Tomtek 평판 수거기로 수거하였다. 표3에서 보인 결과에서, PEG화에서 감지 가능한 IFN 활성의 손실은 관찰되지 않는다는 것을 알 수 있다. 사실, 활성은 자유 IFN-β보다 다소 높은 것으로 밝혀졌다. 이것은 자유 IFN에서 불활성 응집체의 형성 또는 정량방법(PEG-IFN 샘플에 대한 아미노산 분석과 IFN-β에 대한 RP-HPLC)의 차이에 기인하는 것으로 보인다.

[표 3]

Daudi 항-증식 분석

	IC50 투여량*	접합 증가 vs IFN
IFN-β(평판 1)	1153.1	--
PEG[30kD]-IFN(71A)	695.6	1.6X
IFN-β(평판 2)	1005.8	--
PEG[40kD]-IFN(71B)	629.4	1.7X

* pg/ml

실시예 4: 생쥐에서 약리동태적 연구

정맥내 투여

생쥐에 100ng의 IFN-β, PEG[30kD]-IFN-β 또는 PEG[2 X 20kD]-IFN-β를 주사하고, 이후 지정된 시간에 혈액을 뽑았다. IFN-β의 혈청 농도는 IFN-β특이적 ELIAS(Toray Industries)로 측정하고, 결과는 도8에 제시한다. 28마리의 암컷 B6D2F1 계통 생쥐(6-8 주)(대략 각각 20g)는 다음과 같이 4개의 군으로 나누었다: 1군의 9마리 생쥐에는 500ng/ml 사람 IFN-β의 200μl 단일 환약(생쥐당 100ng의 최종 분량)을 주사하였다; 2군의 9마리 생쥐는 200μl 등중량의 PEG30kD-IFN-β를 섭취하였다; 3군은 200μl 등중량의 PEG(2 x 20kD)-IFN-β를 섭취하였다; 4군은 네거티브 기준역할을 하는 3마리의 비접종된 생쥐다. 혈액 샘플(200μl/샘플)은 지정된 시간에, 모세관 튜브로 레트로-오비탈 정맥총을 파괴하여 수거하였다. 혈액 샘플은 1시간동안 실온에서 응고시키고, 테를 붙이고, 마이크로원심분리하였다. 여기서 떼어낸 혈청은 모든

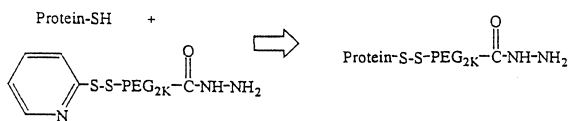
샘플이 수거될 때까지 -70℃로 저장하였다. Total 분석을 이용하여, 혈청에서 생물활성 사람 IFN-β의 존재를 분석하였다. 결과에서, 곡선아래의 영역(AUC)은 PEG-IFN 샘플 대 자유 IFN-베타와 PEG-IFN 샘플 대 자유 IFN-β에서 눈에 띄게 향상되고, PEG[2 x 20 kD]-IFN-β는 PEG[30kD]-IFN-β보다 우월하다는 것을 알 수 있다.

피하 투여

생쥐의 피하에 IFN-β와 PEG-IFN(100ng/생쥐)를 투여하였다. 도9에서 곡선아래의 전체 영역(AUC)은 자유 IFN-β와 비교할 때, PEG-IFN 샘플에서 급격하게 향상되는 것을 알 수 있다. 약리동태학적 연구는 더 오랜 반감기와 향상된 AUC를 보유한 PEG-IFN 샘플에서 일관적으로 나타난다.

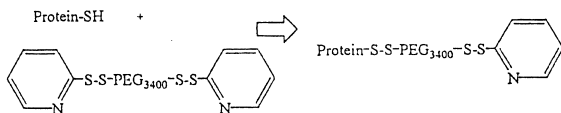
실시예 5: 폴리펩티드에 대한 저분자량 PEG 성분의 부착

OPSS-PEG_{2K}-하이드라지드를 이용한 인터페론-베타 표지



재조합 사람 인터페론-β는 50mM 아세트산나트륨 버퍼(pH 3.8)에 0.33mg/ml로 녹인 용액으로 제공한다. 2ml 탈이온화된 물에 녹인 대략 3.6mg(40몰 내지 수몰의 단백질)의 이형이중기능 PEG 시약(OPSS-PEG_{2K}-하이드라지드)은 3ml IFN-β에 0.33mg/ml(0.99mg)로 첨가하고, 이들 둘은 45℃에서 1시간동안 폴리프로필렌 바이알에서 반응시켰다. 반응혼합물은 이후, 모세관 전기영동으로 분석하여, 변형정도를 측정하였다. 일반적인 수율은 인터페론β와 PEG 시약의 순도에 따라 90-97%범위였다. 용액은 크기 배제 칼럼(Superdex 75, Pharmacia)에 적하하고, 5mM 인산나트륨, 150mM NaCl, pH 7.0으로 용출하였다. 피크는 수거하고, SDS-PAGE로 분석하였다. 단일 PEG화된 인터페론-β 분취물은 고분자량 PEG의 단계적 변형에 사용하기보다는 오히려 한데 모아놓았다.

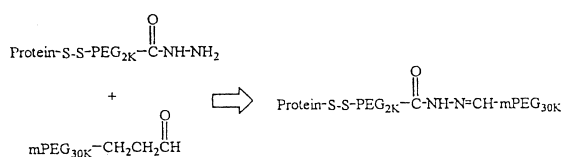
(OPSS)₂-PEG₃₄₀₀을 이용한 인터페론-β의 표지



재조합 사람 인터페론-β는 50mM 아세트산나트륨 버퍼(pH 3.8)에 0.33mg/ml로 녹인 용액으로 제공한다. 2ml 탈이온화된 물에 녹인 대략 6.1mg(40몰 내지 수몰의 단백질)의 동형이중기능 PEG 시약((OPSS)₂-PEG₃₄₀₀)은 3ml 인터페론-β에 0.33mg/ml(0.99mg)로 첨가하고, 이들 둘은 50℃에서 2시간동안 폴리프로필렌 바이알에서 반응시켰다. 반응은 비-환원 SDS-PAGE로 모니터하고, 최종 반응혼합물은 모세관 전기영동으로 분석하여, 변형정도를 측정하였다. 인터페론-β와의 반응에서 일반적인 변형율은 >95%이었다. 용액은 이후, 크기 배제 칼럼(Superdex 75, Pharmacia)에 적하하고, 50mM 인산나트륨, 150mM NaCl, pH 7.0 버퍼로 용출하였다. 피크는 수거하고, SDS-PAGE로 이들의 함량을 분석하였다. 단일 PEG화된 인터페론-β 분취물은 한데 모았다.

실시예 6: PEG화되는 저분자량 폴리펩티드에 대한 제 2 PEG 성분의 부착

mPEG_{30k}-알데하이드(ALD)를 이용한 IFN-S-S-PEG_{2k}-하이드라지드의 변형



실시에 5에서 IFN-S-S-PEG_{2k}-하이드라지드의 모아진 분취물에 20몰의 단백질상의 mPEG_{30k}-ALD를 첨가하였다. 반응은 4시간동안 실온(25℃)에서 진행시키고, 샘플은 크기 배제 칼럼(Superose 6, Pharmacia)에 첨가하여, 변형율을 측정하였다. 이런 반응의 변형율은 PEG 시약과 반응조건에 따라 >80%이었다.

본 발명을 완전히 이해한 당업자는 본 발명의 범위를 벗어나지 않고, 과도한 실험없이 광범위한 범위의 동등 변수, 농도, 조건하에서 동일하게 실시할 수 있을 것이다.

본 발명은 특정 구체예와 관련하여 설명하고 있지만, 이는 추가로 변형할 수 있다. 본 발명이 속하는 당분야에 통상적 지식을 가진 자가 인정하는 바와 같이, 본 출원에는 본 발명의 전반적인 원칙에 따른 본 발명의 변이, 용도, 개조가 포함되고, 또한 이후의 첨부된 청구항의 범위에서 제시한 모든 필수적 특징이 이에 포함된다.

저널 사설 또는 초록, 공개나 비공개된 미국 또는 외국의 특허출원, 허여된 미국 또는 외국 특허, 다른 참고문헌, 또는 상기 참고문헌들에서 언급한 모든 데이터, 표, 도면, 문장을 비롯한 이 글에서 언급한 모든 자료는 순전히 참고문헌으로 한다. 또한, 이 글에서 언급된 자료의 전체 내용 또한, 여기에 참고문헌으로 한다.

공지된 단계, 통상적 방법단계, 공지된 방법 또는 통상의 방법에 관한 참고자료는 본 발명의 임의 측면, 설명 또는 구체예가 관련된 선행기술에 포함 또는 제시되었다는 것을 인정하는 것이 아니다.

특정 구체예의 전술한 명세서에서 본 발명의 전반적인 특성을 완전히 공개하였기 때문에, 당분야의 통상적 지식을 이용하면 과도한 실험없이, 본 발명의 범주를 벗어나지 않고, 이런 특정 구체예를 다양하게 변형 또는 개조할 수 있다. 따라서, 이런 개조 또는 변형은 이 글에서 제시한 지침과 가이드스에 기초하여 공개된 구체예와 동등한 의미 및 범위에 포함된다. 이 글에서 용어 또는 어법은 한정이 아닌 설명하기 위한 것으로, 이 글에서 제시한 지침과 가이드스 및 당업자의 지식에 비추어 당업자가 충분히 이해할 수 있다.

(57) 청구의 범위

청구항 1.

사람 인터페론-β의 Cys¹⁷과 공유결합하는 폴리올 성분을 보유하는 것을 특징으로 하는 폴리올-인터페론-β공액체.

청구항 2.

제 1 항에 있어서, 폴리올 성분은 폴리알킬렌 글리콜 성분인 것을 특징으로 하는 폴리올-인터페론-β공액체.

청구항 3.

제 2항에 있어서, 폴리알킬렌 글리콜 성분은 폴리에틸렌 글리콜(PEG) 성분인 것을 특징으로 하는 폴리올-인터페론-β공액체.

청구항 4.

제 1항 내지 3항중 어느 한 항에 있어서, 폴리올-인터페론-β공액체는 고유 사람 인터페론-β와 동일한 또는 더 높은 인터페론-β활성을 보유하는 것을 특징으로 하는 폴리올-인터페론-β공액체.

청구항 5.

제 1 항에 따른 폴리올-인터페론- β 공액체를 생산하는 방법에 있어서,

티올-반응성 폴리올 작용제를 이용하여 인터페론- β 를 특정부위와 반응시키고, 폴리올 성분을 사람 인터페론- β 의 Cys¹⁷에 공유결합시켜 폴리올-인터페론- β 공액체를 만들고;

생산된 폴리올-인터페론- β 공액체를 회수하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 6.

제 5항에 있어서, 티올-반응성 폴리올 작용제는 티올-반응성 PEG화 작용제인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 7.

제 5항 또는 6항에 있어서, 티올-반응성 폴리올 작용제는 단일-메톡시화되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 8.

제 5항 또는 6항에 있어서, 티올-반응성 폴리올 작용제는 이중기능성인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 9.

제 5항 또는 6항에 있어서, 티올-반응성 폴리올 작용제는 오르토피리딜 디설파이드, 비닐술폰, 말레이미드, 요오도아세트 이미드에서 선택된 이중기능기를 보유한 폴리올 유도체인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 10.

제 5항 또는 6항에 있어서, 티올-반응성 폴리올 작용제는 단일-메톡실화된 폴리올의 오르토피리딜 디설파이드 유도체인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 11.

제 5항에 있어서, 반응단계는 인터페론- β 가 안정적으로 유지되는 산성 pH에서 실시하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 12.

삭제

청구항 13.

삭제

청구항 14.

폴리에틸렌 글리콜(PEG) 성분을 단계적으로 폴리펩티드에 부착하는 방법에 있어서,

다음의 화학식: $W-CH_2CH_2O(CH_2CH_2O)_nCH_2CH_2-X$ 을 갖는 저분자량 이형이중기능 또는 동형이중기능 PEG 성분과 폴리펩티드를 반응시키고, 여기서, W와 X는 아민, 설퍼드릴, 카르복실 또는 하이드록실 이중기능기와 독립적으로 반응하여, 저분자량 PEG 성분을 폴리펩티드에 부착시키는 기이고;

폴리펩티드에 부착된 저분자량 PEG 성분을 단일기능 또는 이중기능 PEG 성분과 반응시켜, 단일기능 또는 이중기능 PEG 성분을 저분자량 PEG 성분의 자유말단에 부착시키고, PEG-폴리펩티드 공액체를 만드는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 15.

제 14항에 있어서, 단일기능 또는 이중기능 PEG 성분은 다음의 화학식: $Y-CH_2CH_2O(CH_2CH_2O)_mCH_2CH_2-Z$ 을 갖고, 여기서, Y는 폴리펩티드에 부착된 저분자량 PEG 성분의 자유말단상의 말단기와 반응하고, Z는 $-OCH_3$ 이거나 또는 X와 반응하여 이중기능 공액체를 형성하는 기인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 16.

제 15항에 있어서, 단일기능 또는 이중기능 PEG 성분은 메톡시 PEG, 분지된 PEG, 가수분해된 또는 효소분해된 PEG, 돌출 PEG 또는 수지체 PEG인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 17.

제 14항에 있어서, W와 X는 오르토포리딜 디설파이드, 말레이미드, 비닐술폰, 요오도아세트아마이드, 하이드라지드, 알데하이드, 숙시니미딜 에스테르, 에폭시드, 아민, 티올, 카르복실, 활성 에스테르, 벤조트리아졸 탄산염, p-니트로페놀 탄산염, 이소시아네이트, 비온틴에서 독립적으로 선택되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 18.

제 14항에 있어서, 저분자량 PEG 성분은 100 내지 5,000 달톤 범위의 분자량을 보유하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 19.

제 14항에 있어서, 단일기능 또는 이중기능 PEG 성분은 100 달톤 내지 200 kDa 범위의 분자량을 보유하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 20.

제 14항에 있어서, 저분자량 PEG 성분 또는 단일기능 내지 이중기능 PEG 성분은 폴리에틸렌 글리콜의 공중합체인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 21.

제 20항에 있어서, 폴리에틸렌 글리콜의 공중합체는 폴리에틸렌 글리콜/폴리프로필렌 글리콜 공중합체 또는 폴리에틸렌 글리콜/폴리(락트/글리콜산)공중합체인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 22.

제 14항에 있어서, 2개의 PEG 성분을 폴리펩티드에 단계적으로 부착한 후, PEG-폴리펩티드 공액체를 정제하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 23.

제 22항에 있어서, 정제 단계는 하나 또는 복수의 정제 기술로 구성되고, 상기 정제 기술은 이온 교환 크로마토그래피, 크기 배제 크로마토그래피, 소수성 상호작용 크로마토그래피, 친화성 크로마토그래피, 역상 크로마토그래피에서 선택되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 24.

제 14항 내지 23항중 어느 한 항에 있어서, 폴리펩티드는 인터페론-β인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 25.

제 24항에 따른 방법에 의해 생성된 PEG-인터페론-β 공액체를 활성 성분으로 하며, 폐혈증 쇼크, AIDS, 류마티스 관절염, 홍반성 난창, 다발성 경색등의 질병 치료에 이용되는 약물.

청구항 26.

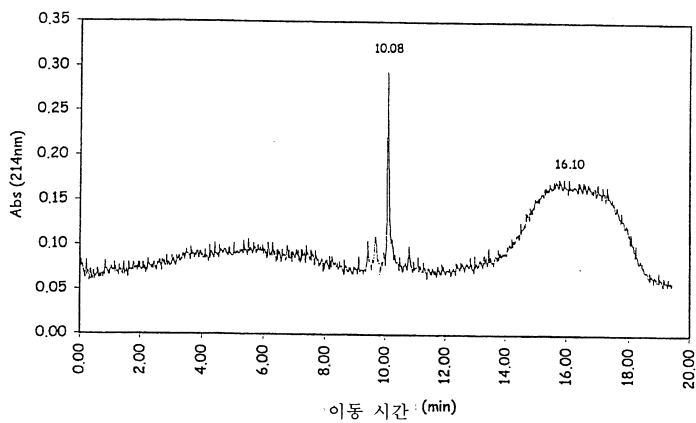
제 1항 내지 3항중 어느 한 항에 있어서, 폐혈증 쇼크, AIDS, 류마티스 관절염, 홍반성 난창, 다발성 경색등의 질병 치료에 이용되는 약물로 이용되는 것을 특징으로 하는 폴리올-인터페론-β공액체.

청구항 27.

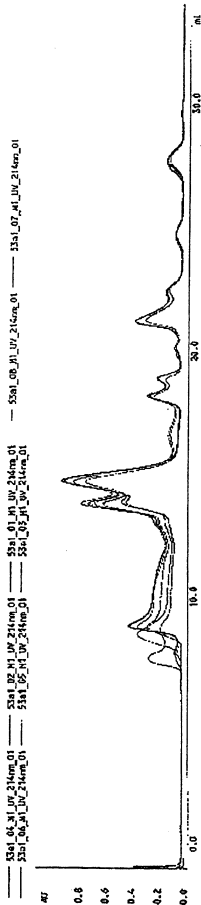
제 1항 내지 3항에 따른 폴리올-인터페론-β공액체를 활성 성분으로 하며, 폐혈증 쇼크, AIDS, 류마티스 관절염, 홍반성 난창, 다발성 경색등의 질병 치료에 이용되는 것을 특징으로 하는 약물.

도면

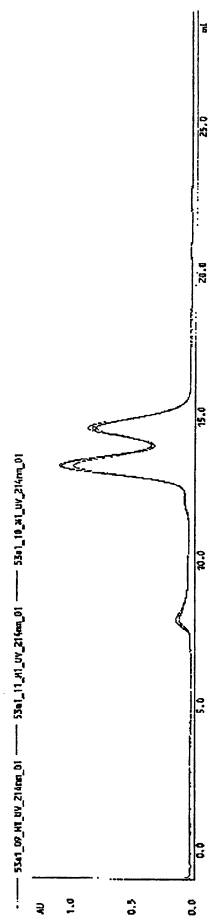
도면1



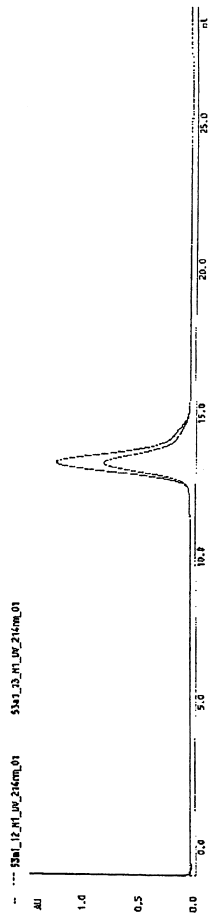
도면2a



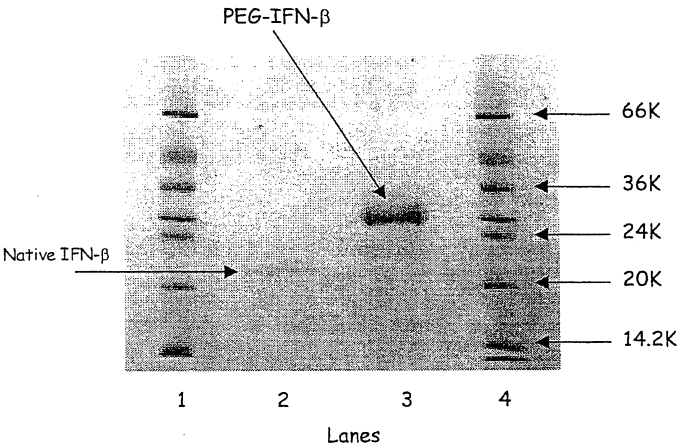
도면2b



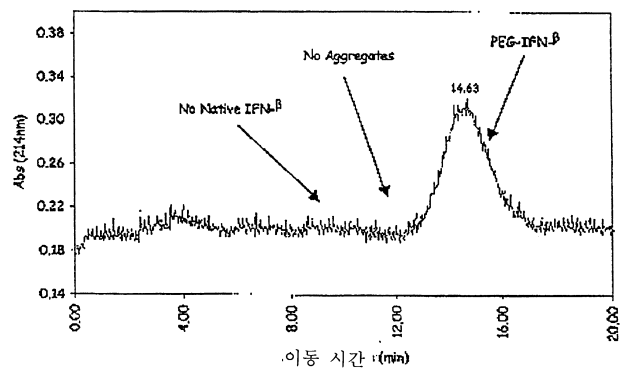
도면2c



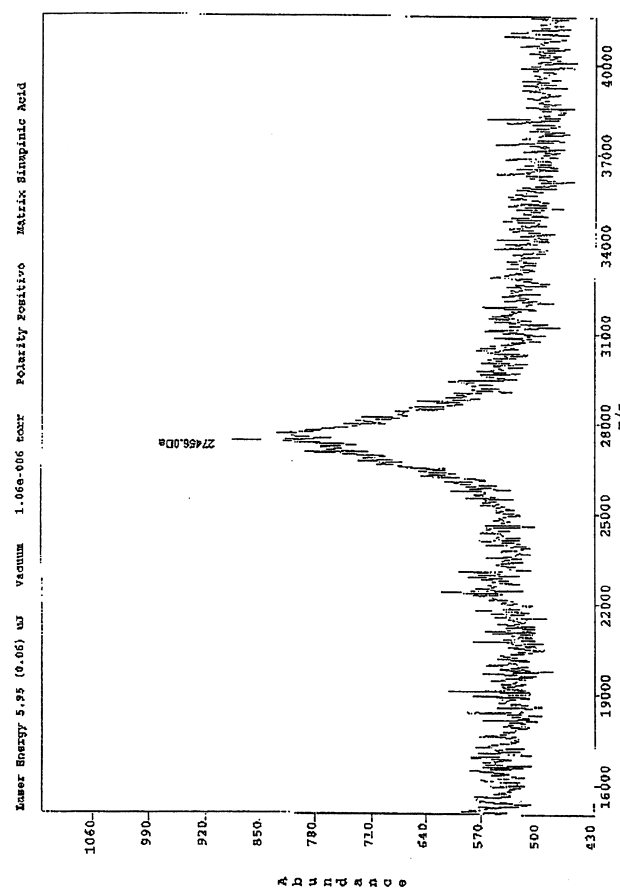
도면3



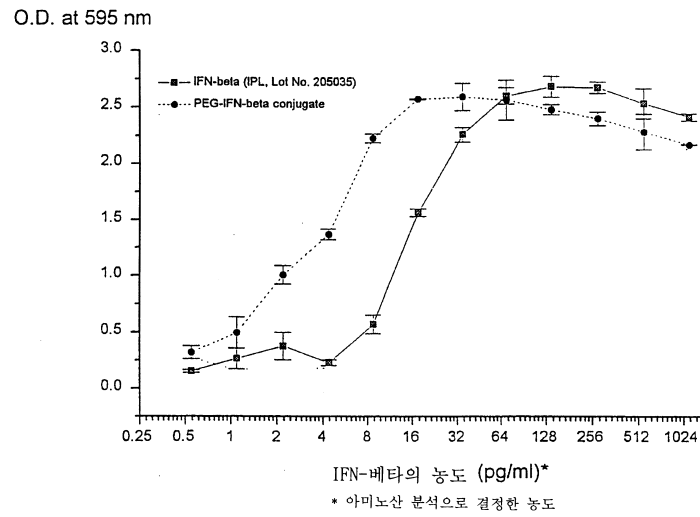
도면4



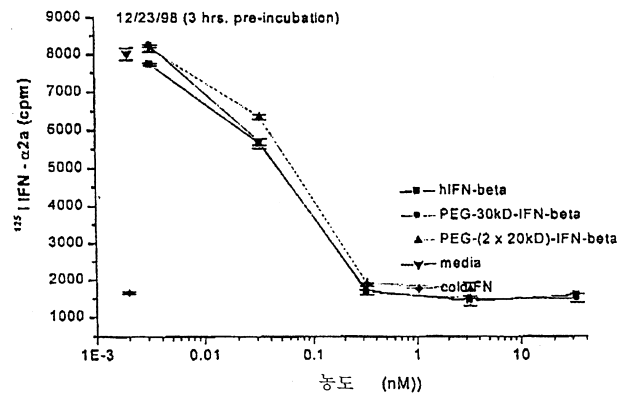
도면5



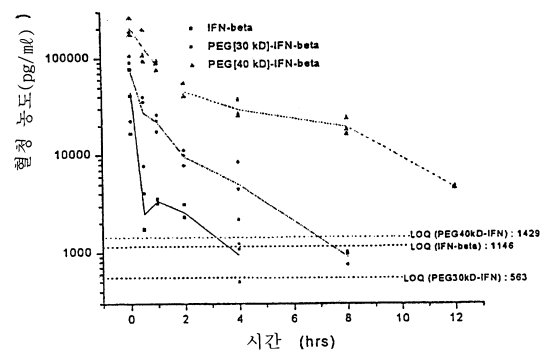
도면6



도면7



도면8



도면9

