



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2012년07월06일
(11) 등록번호 10-1162908
(24) 등록일자 2012년06월29일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 31/74 (2006.01) C08G 63/48 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2005-7012120
(22) 출원일자(국제) 2003년12월23일
심사청구일자 2008년12월22일
(85) 번역문제출일자 2005년06월27일
(65) 공개번호 10-2005-0089860
(43) 공개일자 2005년09월08일
(86) 국제출원번호 PCT/US2003/041162
(87) 국제공개번호 WO 2004/060300
국제공개일자 2004년07월22일
(30) 우선권주장
60/436,020 2002년12월26일 미국(US)
60/479,914 2003년06월20일 미국(US)
(56) 선행기술조사문헌
KR1020000029673 A*
US20020044921 A1*
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
마운틴 뷰 파마슈티컬즈, 인크.
미국 캘리포니아(우편번호 94025-1821), 먼로 파
아크, 스위트 에스, 에디슨 웨이 3475
(72) 발명자
바스카란, 샤이암, 에스.
미국 94066 캘리포니아주 샌 브루노 이스턴 애비
뉴 953
서만, 메리, 알.
미국 94070 캘리포니아주 샌 카를로스 로얄 레인
1114
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
김영, 장수길

전체 청구항 수 : 총 80 항

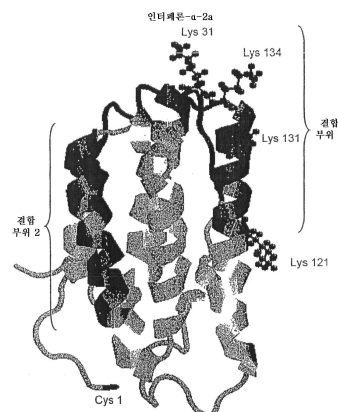
심사관 : 박정웅

(54) 발명의 명칭 수용체-결합 활성이 보존된, 사이토카인, 케모카인, 성장인자, 폴리펩티드 호르몬 및 이들의 길항제의 중합체접합체

(57) 요약

사이토카인, 케모카인, 성장 인자, 폴리펩티드 호르몬 및 이들의 수용체-결합성 길항제의 중합체 접합체의 합성 방법이 제공되며, 상기 접합체는 매우 높은 수용체-결합 활성을 유지한다. 본 발명의 방법에 따른 중합체 접합체의 제조는, 사이토카인, 케모카인, 성장 인자 및 폴리펩티드 호르몬의 수용체-결합 영역, 및 이들의 효현 및 길항 유사체에 대한 중합체의 부착의 결과로 일반적으로 야기되는 수용체-리간드 상호작용의 입체적 억제체를 감소 또는 방지한다. 본 발명은 또한, 그러한 방법에 의해 제조된 접합체 및 조성물을 제공한다. 본 발명의 접합체는, 사이토카인, 케모카인, 성장 인자 및 폴리펩티드 호르몬의 수용체-결합 영역을 회피하도록 목적되지 않은 종래의 중합체 커플링 방법에 의해 제조된 것보다 높은 수준의 수용체-결합 활성을 유지한다. 본 발명의 접합체는 또한 생체내 및 시험관내에서, 비접합체화된 사이토카인, 케모카인, 성장 인자 및 폴리펩티드 호르몬과 비교할 때 연장된 반감기를 나타낸다. 본 발명은 또한, 그러한 접합체 및(또는) 조성물을 포함하는 키트; 그러한 접합체 및 조성물을, 다양한 진단, 예방, 치료 및 생처리 용도에 사용하는 방법을 제공한다.

대표도 - 도1a



(72) 발명자

세이퍼, 마크, 쥐., 피.

미국 94070 캘리포니아주 샌 카를로스 로얄 레인
1114

윌리엄스, 엘., 데이비드

미국 94536 캘리포니아주 프레몬트 아틀렌 코트
37709

특허청구의 범위

청구항 1

(a) 사이토카인, 케모카인, 성장 인자 또는 폴리펩티드 호르몬의 아미노-말단 아미노산이 상기 사이토카인, 케모카인, 성장 인자 또는 폴리펩티드 호르몬의 하나 이상의 수용체-결합 영역으로부터 멀리 떨어져 위치하는 것임을 확인하는 단계;

(b) 랜덤 커플링될 때보다 상기 멀리 떨어져 위치하는 아미노-말단 아미노산에의 커플링을 선호하는 조건하에서 하나 이상의 중합체를 상기 멀리 떨어져 위치하는 아미노-말단 아미노산의 α -아미노기에 커플링시키는 단계; 및

c) 상기 b) 단계에서 제조된 접합체를 정제하는 단계

를 포함하며, 상기 사이토카인이 과립구-콜로니 자극 인자 (G-CSF), IL-1, IL-10, 상피 성장인자 (EGF), 에리트로포이에틴 (EPO), IL-8, 컨센서스 인터페론 및 과립구 대식세포-콜로니 자극 인자 (GM-CSF)가 아니고,

상기 c) 단계의 정제된 접합체 중 커플링된 중합체의 90% 초과가 상기 멀리 떨어져 위치하는 아미노-말단 아미노산에 결합하고,

상기 중합체가 랜덤 커플링될 때 유지되는 것보다 더 높은 상기 사이토카인, 케모카인, 성장 인자 또는 폴리펩티드 호르몬의 시험관 내 수용체-결합 효능을 유지하는, 인간 사이토카인, 케모카인, 성장 인자 또는 폴리펩티드 호르몬의 아미노-말단 아미노산의 α -아미노기와 하나 이상의 합성 수용성 중합체와의 접합체의 합성 방법.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 하나 이상의 중합체가, 하나 이상의 폴리알킬렌 글리콜, 하나 이상의 폴리알킬렌 옥사이드, 하나 이상의 폴리비닐 알코올, 하나 이상의 폴리카르복실레이트, 하나 이상의 폴리(비닐피롤리돈), 하나 이상의 폴리(옥시에틸렌-옥시메틸렌), 하나 이상의 폴리(아미노산), 하나 이상의 폴리(아크릴로일모르폴린), 하나 이상의 아미드와 하나 이상의 알킬렌 옥사이드의 하나 이상의 공중합체, 하나 이상의 텍스트란, 및 하나 이상의 히알루론산으로 이루어지는 군에서 선택된 방법.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 사이토카인, 케모카인, 성장 인자 또는 폴리펩티드 호르몬이 4중 나선 다발 구조를 갖는 방법.

청구항 4

제3항에 있어서, 상기 사이토카인, 케모카인, 성장 인자 또는 폴리펩티드 호르몬이 대식세포-콜로니 자극 인자 (M-CSF), 백혈병 억제 인자 (LIF), 트롬보포이에틴 (Tpo), 줄기 세포 인자 (SCF), Flt3 리간드, 온코스타틴 M (OSM), 인터루킨-2 (IL-2), IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-9, IL-11, IL-12 (p35 서브유닛), IL-13, IL-15, IL-17, 인터페론- α (IFN- α), 인터페론- β (IFN- β), 프롤락틴 및 성장 호르몬으로 이루어지는 군에서 선택되는 방법.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 사이토카인, 케모카인, 성장 인자 또는 폴리펩티드 호르몬이 β -시트 또는 β -배럴 구조를 갖는 방법.

청구항 6

제5항에 있어서, 상기 사이토카인, 케모카인, 성장 인자 또는 폴리펩티드 호르몬이 종양 괴사 인자- α (TNF- α), IL-12 (p40 서브유닛), IL-16, 염기성 섬유모세포 성장 인자 (bFGF), 산성 FGF, FGF-4 및 각화세포 성장 인자 (KGF; FGF-7)로 이루어지는 군에서 선택되는 방법.

청구항 7

제1항에 있어서, 상기 사이토카인, 케모카인, 성장 인자 또는 폴리펩티드 호르몬이 혼합된 α/β 구조를 갖는

방법.

청구항 8

제7항에 있어서, 상기 사이토카인, 케모카인, 성장 인자 또는 폴리펩티드 호르몬이 호중구 활성 펩티드-2 (NAP-2), 간질 세포-유도 인자-1 α (SDF-1 α), 단핵세포 화학유인물질 단백질-1 (MCP-1), MCP-2, MCP-3, 에오타신-1, 에오타신-2, 에오타신-3, 란테즈 (RANTES), 골수 전구세포 억제 인자-1 (MPL-1), 뉴로타킨, 대식세포 이동 억제 인자 (MIF) 및 성장-관련 종양유전자/흑색종 성장 자극 활성 (GRO- α /M-CSF)로 이루어지는 군에서 선택되는 방법.

청구항 9

제1항에 있어서, 상기 사이토카인, 케모카인, 성장 인자 또는 폴리펩티드 호르몬이 인터페론- α , 인터페론- β , IL-2, IL-4, TNF- α , IGF-1, bFGF 및 인슐린으로 이루어지는 군에서 선택되는 방법.

청구항 10

제9항에 있어서, 상기 사이토카인이 IL-2인 방법.

청구항 11

제9항에 있어서, 상기 사이토카인이 인터페론- α 인 방법.

청구항 12

제9항에 있어서, 상기 사이토카인이 TNF- α 인 방법.

청구항 13

삭제

청구항 14

삭제

청구항 15

제9항에 있어서, 상기 성장 인자가 IGF-1인 방법.

청구항 16

제1항에 있어서, 상기 중합체가 상기 아미노-말단 아미노산의 α 아미노기에 공유적으로 커플링하는 방법.

청구항 17

제16항에 있어서, 상기 중합체의 상기 α 아미노기에의 상기 공유 커플링이 2차 아민 결합에 의한 것인 방법.

청구항 18

제1항에 있어서, 상기 중합체가 상기 아미노-말단 아미노산의 화학 반응성 측사슬기에 커플링하는 방법.

청구항 19

제18항에 있어서, 상기 반응성 측사슬이 히드록시기, 술폰히드릴기, 구아니디노기, 이미다졸기, 아미노기, 카르복실기 및 알데히드기로 이루어지는 군에서 선택되는 방법.

청구항 20

제1항에 있어서, 상기 수용성 중합체가 폴리알킬렌 글리콜인 방법.

청구항 21

제20항에 있어서, 상기 폴리알킬렌 글리콜이 폴리(에틸렌 글리콜), 모노메톡시폴리(에틸렌 글리콜) 및 모노히

드록시폴리(에틸렌 글리콜)로 이루어지는 군에서 선택되는 방법.

청구항 22

제21항에 있어서, 상기 폴리알킬렌 글리콜이 모노메톡시폴리(에틸렌 글리콜)인 방법.

청구항 23

제21항에 있어서, 상기 폴리알킬렌 글리콜이 모노히드록시폴리(에틸렌 글리콜)인 방법.

청구항 24

제20항에 있어서, 상기 폴리알킬렌 글리콜이 1 kDa 내지 100 kDa의 분자량을 갖는 방법.

청구항 25

청구항 25은(는) 설정등록료 납부시 포기되었습니다.

제24항에 있어서, 상기 폴리알킬렌 글리콜이 1 kDa 내지 5 kDa의 분자량을 갖는 방법.

청구항 26

청구항 26은(는) 설정등록료 납부시 포기되었습니다.

제24항에 있어서, 상기 폴리알킬렌 글리콜이 10 kDa 내지 20 kDa의 분자량을 갖는 방법.

청구항 27

청구항 27은(는) 설정등록료 납부시 포기되었습니다.

제24항에 있어서, 상기 폴리알킬렌 글리콜이 18 kDa 내지 60 kDa의 분자량을 갖는 방법.

청구항 28

청구항 28은(는) 설정등록료 납부시 포기되었습니다.

제24항에 있어서, 상기 폴리알킬렌 글리콜이 12 kDa 내지 30 kDa의 분자량을 갖는 방법.

청구항 29

청구항 29은(는) 설정등록료 납부시 포기되었습니다.

제28항에 있어서, 상기 폴리알킬렌 글리콜이 20 kDa의 분자량을 갖는 방법.

청구항 30

청구항 30은(는) 설정등록료 납부시 포기되었습니다.

제24항에 있어서, 상기 폴리알킬렌 글리콜이 30 kDa의 분자량을 갖는 방법.

청구항 31

제4항에 있어서, 상기 폴리펩티드 호르몬이 프롤락틴인 방법.

청구항 32

제4항에 있어서, 상기 폴리펩티드 호르몬이 성장 호르몬인 방법.

청구항 33

삭제

청구항 34

제1항에 있어서, 상기 중합체와 상기 사이토카인, 케모카인, 성장 인자 또는 폴리펩티드 호르몬과의 상기 아미노-말단 아미노산에서의 커플링은 상기 사이토카인, 케모카인, 성장 인자 또는 폴리펩티드 호르몬의 당질화

또는 과당질화의 효과를 모방하는 방법.

청구항 35

제1항에 있어서, 상기 수용체-결합 효능을 초원심분리, 세포-기반 측정법, 경쟁적 결합 측정법, 방사선 수용체 측정법, 표면 플라스몬 공명 및 동적 광산란을 포함하는 군에서 선택된 하나 이상의 방법에 의해 측정하는 방법.

청구항 36

제1항의 방법에 의해 제조된 접합체.

청구항 37

제36항의 1종 이상의 접합체 및 제약학적으로 허용되는 1종 이상의 부형제 또는 담체를 포함하는 제약학적 조성물.

청구항 38

1종 이상의 합성 수용성 중합체에 커플링된 사이토카인, 케모카인, 성장 인자 또는 폴리펩티드 호르몬을 포함하는 접합체로서, 여기서 상기 사이토카인, 케모카인, 성장 인자 또는 폴리펩티드 호르몬은 아미노-말단 아미노산이 하나 이상의 수용체-결합 도메인에서 멀리 떨어진 수용체-결합 단백질 및 폴리펩티드의 군에서 선택되고, 상기 사이토카인은 과립구-콜로니 자극 인자 (G-CSF), IL-1, IL-10, 상피 성장인자 (EGF), 에리스로포이에틴 (EPO), IL-8, 컨센서스 인터페론 및 과립구 대식세포-콜로니 자극 인자 (GM-CSF)이 아니며, 상기 1종 이상의 중합체는 상기 아미노-말단 아미노산에 커플링되는 것인 접합체.

청구항 39

제38항에 있어서, 하나 이상의 중합체가, 하나 이상의 폴리알킬렌 글리콜, 하나 이상의 폴리알킬렌 옥사이드, 하나 이상의 폴리비닐 알코올, 하나 이상의 폴리카르복실레이트, 하나 이상의 폴리(비닐피롤리돈), 하나 이상의 폴리(옥시에틸렌-옥시메틸렌), 하나 이상의 폴리(아미노산), 하나 이상의 폴리아크릴로일모르폴린, 하나 이상의 아미드와 하나 이상의 알킬렌 옥사이드의 하나 이상의 공중합체, 하나 이상의 텍스트란, 및 하나 이상의 히알루론산으로 이루어지는 군에서 선택된 것인 접합체.

청구항 40

제38항에 있어서, 상기 사이토카인, 케모카인, 성장 인자 또는 폴리펩티드 호르몬이 4중 나선 다발 구조를 갖는 접합체.

청구항 41

제40항에 있어서, 상기 사이토카인, 케모카인, 성장 인자 또는 폴리펩티드 호르몬이 대식세포-콜로니 자극 인자 (M-CSF), 백혈병 억제 인자(LIF), 트롬보포이에틴 (Tpo), 줄기세포 인자 (SCF), Flt3 리간드, 온코스타틴 M (OSM), 인터루킨-2 (IL-2), IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-9, IL-11, IL-12 (p35 서브유닛), IL-13, IL-15, IL-17, 인터페론- α (IFN- α), 인터페론- β (IFN- β), 프롤락틴 및 성장 호르몬으로 이루어지는 군에서 선택되는 접합체.

청구항 42

제38항에 있어서, 상기 사이토카인, 케모카인, 성장 인자 또는 폴리펩티드 호르몬이 β -시트 또는 β -배럴 구조를 갖는 접합체.

청구항 43

제42항에 있어서, 상기 사이토카인, 케모카인, 성장 인자 또는 폴리펩티드 호르몬이 종양 괴사 인자- α (TNF- α), IL-12 (p40 서브유닛), IL-16, 염기성 섬유모세포 성장 인자 (bFGF), 산성 FGF, FGF-4 및 각질세포 성장 인자 (KGF; FGF-7)로 이루어지는 군에서 선택되는 접합체.

청구항 44

제38항에 있어서, 상기 사이토카인, 케모카인, 성장 인자 또는 폴리펩티드 호르몬이 혼합 α/β 구조를 갖는 접합체.

청구항 45

제44항에 있어서, 상기 사이토카인, 케모카인, 성장 인자 또는 폴리펩티드 호르몬이 호중구 활성화 펩티드-2 (NAP-2), 간질 세포-유도 인자-1 α (SDF-1 α), 단핵세포 화학유인물질 단백질-1 (MCP-1), MCP-2, MCP-3, 에오타신-1, 에오타신-2, 에오타신-3, 란테스, 골수 전구세포 억제 인자-1 (MPIF-1), 뉴로타킨, 대식세포 이동 억제 인자(MIF) 및 GRO/흑색종 성장 자극 활성 (GRO- α /MGSA)로 이루어지는 군에서 선택되는 접합체.

청구항 46

제38항에 있어서, 상기 사이토카인, 케모카인, 성장 인자 또는 폴리펩티드 호르몬이 인터페론- α , 인터페론- β , IL-2, IL-4, TNF- α , IGF-1, bFGF, hGH, 인슐린 및 프롤락틴으로 이루어지는 군에서 선택되는 접합체.

청구항 47

제46항에 있어서, 상기 사이토카인이 IL-2인 접합체.

청구항 48

제46항에 있어서, 상기 사이토카인이 인터페론- α 인 접합체.

청구항 49

제46항에 있어서, 상기 사이토카인이 TNF- α 인 접합체.

청구항 50

삭제

청구항 51

삭제

청구항 52

제46항에 있어서, 상기 성장 인자가 IGF-1인 접합체.

청구항 53

제38항에 있어서, 상기 중합체가 상기 아미노-말단 아미노산의 α -아미노기에 공유적으로 커플링된 것인 접합체.

청구항 54

제53항에 있어서, 상기 중합체의 상기 α -아미노기와 공유적 커플링이 2차 아민 결합을 통한 것인 접합체.

청구항 55

제38항에 있어서, 상기 중합체가 상기 아미노-말단 아미노산의 화학 반응성 측사슬기에 커플링된 것인 접합체.

청구항 56

제55항에 있어서, 상기 반응성 측사슬이 히드록실기, 술포히드릴기, 구아니디노기, 이미다졸기, 아미노기, 카르복실기 및 알데히드기로 이루어지는 군에서 선택된 것인 접합체.

청구항 57

제38항에 있어서, 상기 수용성 중합체가 폴리알킬렌 글리콜인 접합체.

청구항 58

제57항에 있어서, 상기 폴리알킬렌 글리콜이 폴리(에틸렌 글리콜), 모노메톡시폴리(에틸렌 글리콜) 및 모노히드록시폴리(에틸렌 글리콜)로 이루어지는 군에서 선택된 것인 집합체.

청구항 59

제58항에 있어서, 상기 폴리알킬렌 글리콜이 모노메톡시폴리(에틸렌 글리콜)인 집합체.

청구항 60

제58항에 있어서, 상기 폴리알킬렌 글리콜이 모노히드록시폴리(에틸렌 글리콜)인 집합체.

청구항 61

제57항에 있어서, 상기 폴리알킬렌 글리콜이 1 kDa 내지 100 kDa의 분자량을 가지는 것인 집합체.

청구항 62

청구항 62은(는) 설정등록료 납부시 포기되었습니다.

제61항에 있어서, 상기 폴리알킬렌 글리콜이 1 kDa 내지 5 kDa의 분자량을 가지는 것인 집합체.

청구항 63

청구항 63은(는) 설정등록료 납부시 포기되었습니다.

제61항에 있어서, 상기 폴리알킬렌 글리콜이 10 kDa 내지 20 kDa의 분자량을 가지는 것인 집합체.

청구항 64

청구항 64은(는) 설정등록료 납부시 포기되었습니다.

제61항에 있어서, 상기 폴리알킬렌 글리콜이 18 kDa 내지 60 kDa의 분자량을 가지는 것인 집합체.

청구항 65

청구항 65은(는) 설정등록료 납부시 포기되었습니다.

제61항에 있어서, 상기 폴리알킬렌 글리콜이 12 kDa 내지 30 kDa의 분자량을 가지는 것인 집합체.

청구항 66

청구항 66은(는) 설정등록료 납부시 포기되었습니다.

제65항에 있어서, 상기 폴리알킬렌 글리콜이 20 kDa의 분자량을 가지는 것인 집합체.

청구항 67

청구항 67은(는) 설정등록료 납부시 포기되었습니다.

제61항에 있어서, 상기 폴리알킬렌 글리콜이 30 kDa의 분자량을 가지는 것인 집합체.

청구항 68

제40항에 있어서, 상기 폴리펩티드 호르몬이 프롤락틴인 집합체.

청구항 69

제40항에 있어서, 상기 폴리펩티드 호르몬이 성장 호르몬인 집합체.

청구항 70

삭제

청구항 71

제38항에 있어서, 상기 중합체와, 상기 사이토카인, 케모카인, 성장 인자 또는 폴리펩티드 호르몬과의 상기

아미노-말단 아미노산에서의 커플링이, 상기 사이토카인, 케모카인, 성장 인자 또는 폴리펩티드 호르몬의 당 질화 또는 과당질화의 효과를 모방하는 접합체.

청구항 72

제38항의 접합체 및 제약학적 허용가능한 담체 또는 부형제를 포함하는 제약학적 조성물.

청구항 73

제37항의 제약학적 조성물을 포함하는 키트.

청구항 74

제38항의 접합체를 포함하는 키트.

청구항 75

제40항의 접합체를 포함하는 키트.

청구항 76

제72항의 제약학적 조성물을 포함하는 키트.

청구항 77

삭제

청구항 78

삭제

청구항 79

삭제

청구항 80

삭제

청구항 81

삭제

청구항 82

삭제

청구항 83

삭제

청구항 84

삭제

청구항 85

삭제

청구항 86

삭제

청구항 87

삭제

청구항 88

삭제

청구항 89

삭제

청구항 90

삭제

청구항 91

삭제

청구항 92

삭제

청구항 93

삭제

청구항 94

삭제

청구항 95

삭제

청구항 96

삭제

청구항 97

삭제

청구항 98

삭제

청구항 99

삭제

청구항 100

삭제

청구항 101

삭제

청구항 102

삭제

청구항 103

삭제

청구항 104

삭제

청구항 105

삭제

청구항 106

삭제

청구항 107

삭제

청구항 108

삭제

청구항 109

삭제

청구항 110

삭제

청구항 111

삭제

청구항 112

삭제

청구항 113

삭제

청구항 114

삭제

청구항 115

삭제

청구항 116

삭제

청구항 117

삭제

청구항 118

삭제

청구항 119

삭제

청구항 120

삭제

청구항 121

삭제

청구항 122

삭제

청구항 123

삭제

청구항 124

삭제

청구항 125

삭제

청구항 126

삭제

청구항 127

삭제

청구항 128

삭제

청구항 129

삭제

청구항 130

삭제

청구항 131

삭제

청구항 132

삭제

청구항 133

삭제

청구항 134

삭제

청구항 135

삭제

청구항 136

삭제

청구항 137

삭제

청구항 138

삭제

청구항 139

삭제

청구항 140

삭제

청구항 141

삭제

청구항 142

삭제

청구항 143

삭제

청구항 144

제36항 또는 제38항에 있어서, 신체적 장애를 겪고 있거나 소견이 있는 동물에서 신체적 장애를 예방, 진단 또는 치료하기 위한 집합체.

청구항 145

제37항 또는 제72항에 있어서, 신체적 장애를 겪고 있거나 소견이 있는 동물에서 신체적 장애를 예방, 진단 또는 치료하기 위한 제약학적 조성물.

청구항 146

제144항에 있어서, 상기 동물이 포유동물인 집합체.

청구항 147

제145항에 있어서, 상기 동물이 포유동물인 제약학적 조성물.

청구항 148

제146항에 있어서, 상기 포유동물이 인간인 집합체.

청구항 149

제144항에 있어서, 상기 신체적 장애가 암, 전염병, 신경퇴행성 장애, 자가면역장애 및 유전적 장애로 이루어지는 군에서 선택되는 집합체.

청구항 150

제149항에 있어서, 상기 암이 유방암, 자궁암, 난소암, 전립선암, 고환암, 폐암, 백혈병, 림프종, 결장암, 위암, 췌장암, 방광암, 신장암, 뼈암, 신경암, 두경부암, 피부암, 육종, 악성종양, 선종 및 골수종으로 이루어지는 군에서 선택되는 집합체.

청구항 151

제149항에 있어서, 상기 전염병이 박테리아성 질환, 곰팡이성 질환, 바이러스성 질환 및 기생충성 질환으로

이루어지는 군에서 선택되는 집합체.

청구항 152

제151항에 있어서, 상기 바이러스성 질환이 간염 B, 간염 C, 심장선택성 바이러스 및 HIV/AIDS에 기인한 질환으로 이루어지는 군에서 선택되는 집합체.

청구항 153

제149항에 있어서, 상기 자가면역 장애가 전신 홍반성 루푸스, 류마티스성 관절염 및 건선으로 이루어지는 군에서 선택되는 집합체.

청구항 154

제149항에 있어서, 상기 유전적 장애가 빈혈, 호중구 감소증, 저혈소판증, 혈우병, 왜소증 및 중증 합병 면역 결핍 질환("SCID")으로 이루어지는 군에서 선택되는 집합체.

청구항 155

제149항에 있어서, 상기 신경퇴행성 장애가 다발성경화증인 집합체.

청구항 156

제149항에 있어서, 상기 신경퇴행성 질환이 크로이츠펠트-자콥 질환 또는 알츠하이머 질환인 집합체.

청구항 157

제145항에 있어서, 상기 신체적 장애가, 암, 전염병, 신경퇴행성 장애, 자가면역장애, 및 유전적 장애로 이루어지는 군에서 선택되는 제약학적 조성물.

청구항 158

제157항에 있어서, 상기 암이 유방암, 자궁암, 난소암, 전립선암, 고환암, 폐암, 백혈병, 림프종, 결장암, 위암, 췌장암, 방광암, 신장암, 뼈암, 신경암, 두경부암, 피부암, 육종, 악성종양, 선종 및 골수종으로 이루어지는 군에서 선택되는 제약학적 조성물.

청구항 159

제157항에 있어서, 상기 전염병이 박테리아성 질환, 곰팡이성 질환, 바이러스성 질환 및 기생충성 질환으로 이루어지는 군에서 선택되는 제약학적 조성물.

청구항 160

제159항에 있어서, 상기 바이러스성 질환이 간염 B, 간염 C, 심장선택성 바이러스 및 HIV/AIDS에 기인한 질환으로 이루어지는 군에서 선택되는 제약학적 조성물.

청구항 161

제157항에 있어서, 상기 자가면역 장애가 전신성 홍반성 루푸스, 류마티스성 관절염 및 건선으로 이루어지는 군에서 선택되는 제약학적 조성물.

청구항 162

제157항에 있어서, 상기 유전적 장애가 빈혈, 호중구 감소증, 저혈소판증, 혈우병, 왜소증 및 중증 합병 면역 결핍 질환("SCID")으로 이루어지는 군에서 선택되는 제약학적 조성물.

청구항 163

제157항에 있어서, 상기 신경퇴행성 장애가 다발성경화증인 제약학적 조성물.

청구항 164

제157항에 있어서, 상기 신경퇴행성 질환이 크로이츠펠트-자콥 질환 또는 알츠하이머 질환인 제약학적

조성물.

청구항 165

제147항에 있어서, 상기 포유동물이 인간인 제약학적 조성물.

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 단백질 생화학 분야이고 제약학 및 의학에 속한다. 특히, 본 발명은 수용성 중합체 (예를 들면, 폴리(에틸렌 글리콜) 및 이의 유도체)와 특정의 생체활성 성분 간의 접합체의 제조방법을 제공하는데, 여기에서 접합체는 표준 중합체 생체활성 성분 접합체에 비해 향상된 수용체-결합 활성을 갖는다. 더욱 구체적으로는, 본 발명은 비정상적으로 높은 수용체-결합 활성을 지닌 특정 수용체 결합 단백질의 중합체 접합체의 제조방법을 제공한다. 본 발명은 또한 이러한 방법에 의해 제조된 접합체, 이러한 접합체를 포함하는 조성물, 이러한 접합체와 조성물을 포함하는 키트 및 각종 의학적 및 수의학적 증상을 예방하고, 진단하며 치료하는 데 있어서 접합체 및 조성물의 사용방법을 제공한다.

배경기술

[0002] 하기하는 관련 기술의 기재는 선행 기술 분야에 있지 않은 본 발명자들의 해석을 포함한다. 사이토카인은 내분비, 축분비 또는 자가분비 방식으로 세포의 생존, 성장, 분화 및/또는 작동 기능을 제어하는 분비된 조절 단백질이다 (Nicola, N. A. (1994) in: Guidebook to Cytokines and Their Receptors, Nicola, N. A. , ed. , pp. 1-7, Oxford University Press, New York). 케모카인은 백혈구 활성능 및/또는 화학주성 활성을 갖는 구조적으로 연관된 글리코단백질의 계통이다 (문헌 [Oppenheim, J.J., et al., (1997) Clin Cancer Res 3: 2682-2686]에서 검토). 그들의 가까운 친족과 마찬가지로, 폴리펩티드 호르몬 및 성장인자, 사이토카인 및 케모카인은 그들의 표적 세포 표면상의 특정 수용체 단백질에 결합함으로써 그들의 조절 기능을 개시한다 (문헌 [Koskiakoff, A.A., et al., (1998) Adv Protein Chem 52:67-108; Onuffer, J.J., et al., (2002) Trends Pharmacol Sci 23: 459-467]에서 검토). 그것의 효능, 특이성, 작은 크기 및 재조합 기관에서 비교적 생산이 용이하다는 점 때문에, 사이토카인, 케모카인, 성장인자 및 폴리펩티드 호르몬은 치료제로서 많은 적용 가능성을 가지고 있다.

[0003] 두가지 핵심 요인이 치료제로서의 재조합 단백질, 특히 사이토카인의 개발을 방해해왔다 - 순환계에서의 일반적으로 짧은 반감기 및 잠재적인 항원성 및 면역원성. 본원 및 당분야에서 일반적으로 사용되는 바와 같이, 용어 "항원성"은 분자의 선제하는 항체와의 결합능을 지칭하고, 용어 "면역원성"은 그 반응이 항체의 형성을 수반하든("체액성 반응") 세포성 면역반응의 자극을 수반하든 어느 쪽이든지 생체내 면역반응의 도출능을 지칭한다.

[0004] 재조합 치료용 단백질의 투여에 있어서, 최고 순환 활성을 달성하고 생체이용률 및 분해 문제를 최소화하기 위해서는 정맥내 (*i.v.*) 투여가 종종 바람직하다. 그러나, 정맥내 투여 후에 작은 단백질의 반감기는 보통 극히 짧다 (참조, 문헌 [Mordenti, J., et al., (1991) Pharm Res 8:1351-1359; Kuwabara, T., et al., (1995) Pharm Res 12:1466-1469]의 예). 건강한 신장은 일반적으로 약 36 Å 스토크스 반경 및 약 66,000 달톤 (66 kDa)의 분자량을 가지는 혈청 알부민의 값을 초과하는 유체역학적 반경의 혈류 단백질을 보유하고 있다. 그러나, 더 작은 단백질, 예컨대 과립구 콜로니-자극 인자 (G-CSF), 인터루킨-2 (IL-2), 인터페론-알파 (IFN- α) 및 인터페론-감마 (IFN- γ)는 사구체 여과에 의해 혈류로부터 신속히 제거된다 (문헌 [Brenner, B. M., et al. (1978) Am J Physiol 234:F455-F460; Venkatachalam, M. A., et al. (1978) Circ Res 43:337-347; Wilson, G., (1979) J Gen Physiol 74:495-509; Knauf, M. J., et al., (1988) J Biol Chem 263: 15064-15070; Kita, Y., et al., (1990) Drug Des Deliv 6 : 157-167; Rostaing, L., et al., (1998), J Am Soc Nephrol 9: 2344-2348]). 그 결과, 순환계에서 작은 재조합 단백질의 치료학적으로 유용한 농도의 유지가 주사 후에 문제화된다. 따라서, 대개는 고농도의 이러한 단백질과 더욱 빈번한 주사가 투여되어야 한다. 결과적인 용량 요법은 치료 비용을 증가시키고, 환자 순응도의 가능성을 감소시키며 악영향, 예를 들면 면역반응의 위험성을 증가시킨다. 세포성 및 체액성 면역반응 모두 유효 투여량의 투여를 방해할 수 있거나 가속화된 제거, 효능의 중화 및 아나필락시스를 비롯한 치료-제한 결과를 유도할 수 있을 정도로, 주사한 재조합 단백질의 순환 농도를 감소시킬 수 있다 (문헌 [Ragnhammar, P., et al., (1994) Blood 84 : 4078-4087; Wadhwa, M., et al., (1999) Clin Cancer Res 5: 1353-1361; Hjelm Skog, A.-L., et al., (2001) Clin Cancer Res 7:1163-

1170; Li, J., et al., (2001) *Blood* 98 : 3241-3248; Bassar, R.L., et al., (2002) *Blood* 99 : 2599-2602; Schellekens, H., (2002) *Clin Ther* 24 : 1720-1740]).

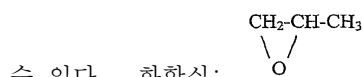
[0005] 폴리(에틸렌 글리콜) ("PEG") 유도체의 공유 부착에 의한 재조합 단백질의 변형이 전술한 단점을 해결하기 위한 수단으로서 광범위하게 조사되었다 (문헌 [Sherman, M. R., et al. (1997) in: *Poly(ethylene glycol): Chemistry and Biological Applications*, Harris, J. M., et al., eds., pp. 155-169, American Chemical Society, Washington, D. C.; Roberts, M. J., et al. (2002) *Adv Drug Deliv Res* 54:459-476]에서 검토). PEG의 단백질에의 부착은 생체내에서 단백질을 안정화시키고, 이들의 생체이용률을 개선하며/개선하거나 이들의 면역원성을 감소시키는 것으로 보여진다. (PEG 유도체의 단백질 또는 기타 기질에의 공유 부착은 본원에서 "PEG화"로 지칭되고 당분야에 공지되어 있다.) 또한, PEG화는 단백질의 유체역학적 반경을 상당히 증가시킬 수 있다. 사이토카인, 케모카인, 성장인자 또는 폴리펩티드 호르몬과 작은 단백질이 (예를 들면, 약 18 kDa 이상의 분자량을 가지는) PEG의 단일의 긴 스트랜드에 커플링되면, 생성되는 접합체는 혈청 알부민보다 더 큰 유체역학적 반경을 가지고 신장 사구체를 통한 순환에서의 이의 제거가 현저히 지연된다. PEG화의 복합 효과 - 감소한 단백질 분해, 감소한 면역 인식 및 감소한 신장 제거 속도 - 는 PEG화된 단백질에 치료제로서의 실질적인 장점을 부여한다.

[0006] 1970년대 이래로, 중합체의 공유 부착을 사용하여 각종 단백질의 제약용으로서의 안전성과 효능을 개선하기 위한 시도가 행해져왔다 (참조, 예를 들면 미국 특허 제4,179,337호 (Davis, F.F. 등)). 일부 예로 중증 복합 면역결핍증의 치료에 사용하기 위한 PEG 또는 폴리(에틸렌 옥사이드) (PEO)의 아테노신 디아미나제 (EC 3.5.4.4)에의 커플링이 포함된다 (문헌 [Davis, S., et al. (1981) *Clin Exp Immunol* 46:649-652; Hershfield, M. S., et al. (1987) *N Engl J Med* 316:589-596]). 다른 예로는 염증 증상의 치료를 위한 PEG의 과산화 디스무타아제 (EC 1.15.1.1)에의 커플링 (Saifer, M. et al., 미국 특허 제5,006,333호 및 제5,080,891호) 및 혈액과 요로부터 과량의 요산의 제거를 위한 요산염 산화제 (EC 1.7.3.3)에의 커플링 (문헌 [Kelly, S. J., et al. (2001) *J Am Soc Nephrol* 12:1001-1009]; Williams, L. D., et al., PCT 공보 WO 00/07629 A2 및 A3, 및 미국 특허 제6,576,235호; Sherman, M. R., et al., PCT 공보 WO 01-59078 A2)이 포함된다.

[0007] PEO 및 PEG는 공유 결합된 에틸렌 옥사이드 단위로 이루어지는 중합체이다. 이들 중합체는 하기 화학식을 가진다:



[0009] 여기에서, R_2 는 히드록실기 (또는 이의 반응성 유도체)일 수 있고 R_1 은 디히드록시 PEG ("EG 디올")에서와 같이 수소, 모노메톡시PEG ("mPEG")에서와 같이 메틸기, 또는 예를 들면, 이소-프로폭시PEG 또는 t-부톡시PEG에서와 같이 또다른 저급 알킬기일 수 있다. PEG의 화학식에서 변수 n 은 중합체 중 에틸렌 옥사이드 단위 수를 나타내고 본원에서 그리고 당분야에서 "중합도"라고 지칭된다. 동일한 화학식의 중합체 (R_1 이 C_{1-7} 알킬기)가 또한 옥시란 유도체로 언급되어 왔다 (미국 특허 제 6,455,639호 (Yasukochi, T. 등)). PEG 및 PEO는 선형, 분지형 (문헌 [Fuke, I., et al. (1994) *J Control Release* 30:27-34]) 또는 스타형 (star-shaped) (문헌 [Merrill, E. W. (1993) *J Biomater Sci Polym Ed* 5:1-11])일 수 있다. PEG 및 PEO는 양친매성, 즉 물 및 특정 유기 용매에서 가용성이고 외피 바이러스와 동물 및 박테리아의 세포막을 비롯한 지질-함유 물질에 부착할



수 있다. 화학식: 을 가지는, 에틸렌 옥사이드 (OCH_2CH_2)와 프로필렌 옥사이드의 특정 랜덤 또는 블록 또는 교호 공중합체는 이들 공중합체가 특정 용도에서는 PEG의 적합한 대체물이라고 여겨지는 PEG의 성질과 충분히 유사한 성질을 가진다 (참조, 예를 들면, 미국 특허 제4,609,546호 (Hiratani, H.) 및 제5,283,317호 (Saifer, M. 등)). 용어 "폴리알킬렌 옥사이드" 및 약어 "PAO"는 본원에서 이러한 공중합체 뿐만 아니라 PEG 또는 PEO 및 폴리(옥시에틸렌-옥시메틸렌) 공중합체를 지칭하는 데 사용된다 (미국 특허 제5,476,653호 (Pitt, C.G. 등)). 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "폴리알킬렌 글리콜" 및 약어 "PAG"는 일반적으로 본 발명의 접합체에 사용하기에 적합한 중합체, 특히 PEG, 보다 특히 단일 반응기를 함유하는 PEG ("단일관능성 활성화된 PEG")를 지칭하는 데 사용된다.

[0010] PEG 또는 폴리알킬렌 옥사이드의 단백질에의 공유 부착은, 중합체의 말단기 중 하나 이상이 우선 반응성 작용기로 전환되어야 하는 것을 요한다. 이 방법은 흔히 "활성화"라고 지칭되고 생성물은 "활성화된 PEG" 또는 활성화된 폴리알킬렌 옥사이드라고 불린다. 일 말단에서는 비반응성이고 화학적으로 안정한 메틸기 ("메톡실기")

로 또다른 말단에서는 단백질 분자 상의 아미노기에 대해 반응성인 작용기로 캡핑된 모노메톡시PEG가 이러한 접근법을 위해 가장 통상적으로 사용된다. 활성화된 일 작용기로부터 원위에 있는 둘 이상의 메톡실기를 함유하는 이른바 "분지형" mPEG는 통상적으로 덜 사용된다. 분지형 PEG의 예로는 PEG가 양 아미노기에 커플링되고 리신의 카르복실기가 N-히드록시숙신이미드로의 에스테르화에 의해 가장 종종 활성화되는, 디-mPEG-리신이 있다 (미국 특허 제5,643, 575호 (Martinez, A. 등); 미국 특허 제5,919, 455호 (Greenwald, R.B. 등); 미국 특허 제5,932,462호 (Harris, J. M. 등)).

[0011] 보통, 활성화된 중합체는 부착 부위로 소요되는 친핵성 작용기를 가지는 치료제와 반응한다. 부착 부위로 통상 사용되는 일 친핵성 작용기는 리신 잔기의 입실론 아미노기이다. 용매 접근성 알파-아미노기, 카르복실산기, 구아니디노기, 이미다졸기, 적합하게는 활성화된 카르보닐기, 산화된 탄수화물 잔기 및 티올기 또한 부착 부위로 사용된다.

[0012] PEG의 히드록실기는 단백질에 부착하기 전에 염화시아누르로 활성화된다 (상기 문헌 [Abuchowski, A., et al. (1977) J Biol Chem 252:3582-3586; Abuchowski, A., et al. (1981); Cancer Treat Rep 65: 1077-1081]). 그러나, 이 방법의 사용은 단점, 예컨대 염화시아누르의 독성 및 아민 외의 작용기를 가지는 단백질, 예컨대 용매-접근성이 있는 시스테인 또는 기능을 위해 필수적일 수 있는 티로신 잔기에 대해 비-특이적 반응성을 가진다. 이러한 단점 및 기타 단점을 극복하기 위해, 대안의 활성화된 PEG, 예컨대 PEG의 숙신이미드 숙신에이트 유도체 ("SS-PEG") (문헌 [Abuchowski, A., et al. (1984) Cancer Biochem Biophys 7:175-186]), PAG의 숙시니미드 카르보네이트 유도체 ("SC-PAG") (문헌 [미국 특허 제5,006,333호 (Saifer, M. 등)]) 및 PEG의 알데히드 유도체 (문헌 [미국 특허 제4,002,531 (Royer, G.P.)])이 도입되었다.

[0013] 통상적으로, 하나 이상의 PAG, 예를 들면 약 5 kDa 내지 약 10 kDa의 분자량을 지니는 하나 이상의 mPEG의 다수의 (예를 들면, 5 내지 10) 스트랜드는 1급 아미노기 (리신 잔기의 입실론 아미노기 및 아마도, 아미노-말단 (N-말단) 아미노산의 알파 아미노기)를 통해 표적 단백질과 커플링된다. 더욱 최근에는, 더 큰 분자량, 예를 들면 12 kDa, 20 kDa 또는 30 kDa의 mPEG의 단일 스트랜드를 함유하는 접합체가 합성되었다. 접합체의 혈장 반감기와 커플링된 PEG의 증가하는 분자량 및/또는 증가하는 스트랜드 수 사이의 직접적인 상관관계가 규명되었다 (문헌 [Knauf, M.J., et al., supra ; Katre, N. V. (1990) J Immunol 144 : 209-213; Clark, R., et al., (1996) J Biol Chem 271 : 21969-21977; Leong, S.R., et al., (2001) Cytokine 16: 106-119]). 또 다른 한편, 각각의 단백질 분자에 커플링된 PEG의 스트랜드 수가 증가할수록, 단백질의 필수 영역에서 아미노기가 변형되고, 그리하여 단백질의 생물학적 기능이 손상될 가능성도 증가한다 (특히, 수용체-결합 단백질의 경우). 다수의 아미노기를 함유하는 더 큰 단백질 및 저분자량의 기질을 지니는 효소의 경우에, 이는 생체내 PEG-함유 접합체의 생물학적 활성의 순증가를 초래하기 때문에 길어진 작용 지속시간과 감소한 특정 활성 사이의 이 트레이드오프 (tradeoff)가 허용될 수 있다. 그러나, 세포-표면 수용체와 상호작용을 통해 기능하는 더욱 작은 단백질, 예컨대 사이토카인, 케모카인, 성장인자 및 폴리펩티드 호르몬인 경우에는, 비교적 높은 치환 정도가 혈류내 연장된 반감기의 장점을 무효화할 정도까지 작용 활성을 감소시킬 것이다 (상기 문헌 [Clark, R., et al.]).

[0014] 따라서, 중합체 접합체는 생체활성을 연장시키고 사이토카인과 같은 치료용 단백질의 면역활성을 감소시키기 위한 잘 정립된 기술이다 (그 전체로 본원에 참조되는 미국 가출원 60/436,020호 (2002년 12월 26일 출원), 제 60/479,913 및 60/479,914호 (둘다 2003년 6월 20일 출원) 참조). 그러나, 특히 세포-표면 수용체에 결합함으로써 기능하는 수용체 결합 단백질에 대한 중합체의 접합은, 대개는 (1) 그러한 결합을 방해하고, (2) 사이토카인, 케모카인, 성장인자 및 폴리펩티드 호르몬 작용제의 신호 전달 효능을 크게 감소시키고, (3) 사이토카인, 케모카인, 성장인자 및 폴리펩티드 호르몬 길항제의 경쟁적 효능을 크게 감소시킨다. 수용체-결합 활성이 감소된 그러한 접합체의 간행된 예는 인간 성장 호르몬 ("hGH") (상기 Clark, R. 등의 문헌); hGH 길항제 (문헌 [Ross, R. J. M., et al., (2001) J Clin Endocrinol Metab 86 : 1716-1723]); IFN-알파 (Bailon, P., et al., (2001) Bioconjug Chem 12 : 195-202; Wylie, D.C., et al., (2001) Pharm Res 18: 1354-1360; and Wang, Y.-S., et al., (2002) Adv Drug Deliv Rev 54: 547-570) 및 G-CSF (PCT 공보 제WO 96/11953호 (Kinstler, O. 등), 문헌 [Bowen, S., et al., (1999) Exp Hemato 27: 425-432]) 등의 중합체 접합체를 포함한다. 극단적인 경우로, 인터루킨-15 ("IL-15")에 대한 중합체의 커플링은 이런 IL-2-유사 성장인자를 세포 증식의 억제제로 전환시킨다 (Pettit, D. K., et al., (1997) J Biol Chem 272: 2312-2318). 이론을 한정하려는 것은 아니지만, 그러한 바람직하지 않은 PEG화의 효과에 대한 메커니즘은 부피가 큰 PEG기, 전하 중화, 또는 양자 모두에 의한 수용체 상호작용의 입체 장애와 관련있을 수 있다.

[0015] 따라서, 실질적인 생체 활성이 보존되고 (예컨대, 약 40% 이상), 거의 완전한 생체활성 (예컨대 약 80% 이상)

또는 실질상 완전한 생체활성 (예컨대 약 90% 이상)을 지니는 PAG-함유 (예를 들면, PEG- 및/또는 PEO-함유) 접합체, 특히 이러한 수용성 중합체와 치료용 단백질 간의 접합체의 제조방법을 규명할 필요가 있다. 이러한 접합체는 생체내에서 증가한 용해성, 안정성 및 생체이용률의 중합체 성분에 의해 제공되는 이점을 가질 것이고, 접합체가 예방용, 치료용 또는 진단용으로 도입된 동물에서 통상의 중합체 접합체에 비해 실질적인 효능 또는 유용성의 증가를 보이지는 않을 것이다.

[0016] <발명의 간단한 설명>

[0017] 본 발명은 전술한 필요성을 해결하고, 수용성 중합체 (예를 들면, 폴리(에틸렌 글리콜) 및 이의 유도체)와 생체활성 성분, 특히 수용체-결합 단백질, 구체적으로 사이토카인, 케모카인, 폴리펩티드 호르몬 및 폴리펩티드 성장인자와 같은 치료학적 또는 진단학적 생체활성 성분을 제공한다. 본 발명은 또한 이러한 방법에 의해 제조된 접합체를 제공한다. 상응하는 비접합된 생체활성 성분과 비교하여, 본 발명의 접합체는 증가된 안정성 (즉, 생체내에서의 더 긴 저장 수명 및 더 긴 반감기)을 갖는다. 또한, 폴리펩티드쇄를 따라 용매-접근가능 부위에 불규칙하게 부착된 중합체쇄로 제조된 동이한 생체활성 성분의 접합체에 비해, 본 발명의 접합체는 증가된 수용체-결합 활성을 갖고 (이는 시험관 내에서 측정되거나 이용될 수 있음) 생체내에서의 증가된 효능을 갖는다. 또한, 본 발명은 또한 이러한 접합체를 포함하는 조성물, 이러한 접합체와 조성물을 함유하는 키트 및 다양한 예방, 진단 및 치료적 요법에서 접합체와 조성물의 사용방법을 제공한다.

[0018] 일 실시태양에서, 본 발명은 1종 이상의 합성 수용성 중합체를 사이토카인, 케모카인, 성장인자 또는 폴리펩티드 호르몬, 또는 이들의 길항제의 아미노-말단 아미노산 (여기서 아미노-말단 아미노산은 사이토카인, 케모카인, 성장인자 및 폴리펩티드 호르몬, 또는 이들의 길항제의 하나 이상의 수용체-결합 도메인으로부터 멀리 떨어져 있음)에 선택적으로 커플링시키는 것을 포함하는, 사이토카인, 케모카인, 성장인자 또는 폴리펩티드 호르몬의 수용체-결합 효능을 보존하는 방법을 제공한다. 관련된 실시태양에서 본 발명은 하나 이상의 합성 수용성 중합체를 사이토카인, 케모카인, 성장인자 또는 폴리펩티드 호르몬, 또는 이들의 길항제의 하나 이상의 당질화 부위에 또는 그에 근접하여 선택적으로 커플링하는 것을 포함하는, 사이토카인, 케모카인, 성장인자 또는 폴리펩티드 호르몬, 또는 이들의 길항제의 수용체 결합 효능을 보존하기 위한 방법을 제공하고, 여기서 하나 이상의 당질화 부위는 사이토카인, 케모카인, 성장인자 또는 폴리펩티드 호르몬, 또는 이들의 길항제의 하나 이상의 수용체-결합 도메인에서 멀리 떨어져 위치한다.

[0019] 본 발명의 이들 방법의 용도로 적당한 중합체는 1종 이상의 폴리알킬렌 글리콜 (1종 이상의 폴리(에틸렌 글리콜), 1종 이상의 모노메톡시-폴리(에틸렌 글리콜) 및 1종 이상의 모노히드록시폴리(에틸렌 글리콜)을 포함하나 이에 한하지 않음), 1종 이상의 폴리알킬렌 옥사이드, 1종 이상의 폴리옥시란, 1종 이상의 폴리올레핀 알콜, 예컨대 폴리비닐 알콜, 1종 이상의 폴리카르복실레이트, 1종 이상의 폴리(비닐피롤리돈), 1종 이상의 폴리(옥시에틸렌-옥시메틸렌), 1종 이상의 폴리(아미노산), 1종 이상의 폴리(아크릴로일-모르폴린), 1종 이상의 아미드와 1종 이상의 알킬렌 옥사이드의 1종 이상의 공중합체, 1종 이상의 텍스트란 및 1종 이상의 히알루론산을 포함하나 이에 한하지는 않는다. 본 발명의 방법의 용도로 적당한 중합체는 전형적으로 분자량 약 1 kDa 이상 약 100 kDa 이하, 또는 더욱 구체적으로는 분자량 약 1 kDa 이상 약 5 kDa 이하; 약 10 kDa 이상 약 20 kDa 이하; 약 18 kDa 이상 약 60 kDa 이하; 약 12 kDa 이상 약 30 kDa 이하; 또는 약 10 kDa, 약 20 kDa 또는 약 30 kDa를 갖는다.

[0020] 다양한 사이토카인, 케모카인, 성장인자 및 폴리펩티드 호르몬 (및 특정 세포-표면 수용체에 의해 매개된 상응하는 사이토카인, 케모카인, 성장인자 또는 폴리펩티드 호르몬의 생물학적 효과를 모방하거나 (즉, 작용성) 또는 길항하는 유사체들)이 본 접합체의 제조용으로 적당하다. 이것들은 4중 나선 다발 구조를 갖는 사이토카인, 케모카인, 성장인자 또는 폴리펩티드 호르몬 (과립구 콜로니-자극 인자 (G-CSF), 대식세포 콜로니-자극 인자 (M-CSF), 과립구-대식세포 콜로니-자극 인자 (GM-CSF), 백혈병 억제 인자 (LIF), 에리스로포이에틴 (Epo), 트롬보포이에틴 (Tpo), 줄기 세포 인자 (SCF), Flt3 리간드, 오크스타틴 M (OSM), 인터루킨-2 (IL-2), IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12 (p35 서브유닛), IL-13, IL-15, IL-17, 인터페론-알파 (IFN- α), 인터페론 베타 (IFN- β) (IFN- β -1b 등), 콘센서스 (consensus) 인터페론, 프롤락틴 및 성장 호르몬, 및 이들의 뮤테인, 변이체, 유사체 및 유도체를 포함하나 이에 한하지 않음); β -시트 또는 β -배럴 구조를 갖는 사이토카인, 케모카인, 성장인자 또는 폴리펩티드 호르몬 (종양 괴사 인자 알파 (TNF- α), IL-1 α , IL-1 β , IL-12 (p40 서브유닛), IL-16, 상피 성장인자 (EGF), 인슐린 유사 성장인자-1 (IGF-1), 염기성 섬유 모세포 성장인자 (bFGF), 산성 FGF, FGF-4 및 각질세포 성장인자 (KGF; FGF-7), 및 이들의 뮤테인, 변이체, 유사체 및 유도체를 포함하나 이에 한하지 않음) 및 혼합된 α/β 구조를 갖는 사이토카인, 케모카인, 성

장 인자 또는 폴리펩티드 호르몬 (호중구 활성 펩티드-2 (NAP-2), 간질세포-유도 인자-1 α (SDF-1 α), IL-8, 단핵세포 화학유인물질 단백질-1 (MCP-1), MCP-2, MCP-3, 에오타신-1, 에오타신-2, 에오타신-3, 란테스 (RANTES), 골수전구세포 억제 인자-1 (MPlF-1), 뉴로타신, 대식세포 억제 인자 (MIF) 및 GRO/흑색종 성장 자극 활성 (GRO- α /MGSA), 및 이들의 뮤테인, 변이체, 유사체 및 유도체를 포함)을 포함한다. 본 발명의 용도에 적합한 폴리펩티드 호르몬은 인슐린 및 인슐린 수용체에 의해 매개되는 인슐린의 생물학적 효과를 모방하거나 길항하는 인슐린 유도체; 프로타틴 및 프로타틴 유도체에 의해 매개되는 프로타틴의 생물학적 효과를 모방하거나 길항하는 프로타틴 유도체; 성장 호르몬 (특히 인간 성장 호르몬) 및 성장 호르몬 수용체에 의해 매개되는 성장 호르몬의 생물학적 효과를 모방하거나 길항하는 그들의 수용체를 포함하나 이에 한정되는 것은 아니다.

[0021] 본 발명의 용도에 알맞는 특히 바람직한 사이토카인, 케모카인, 성장인자 및 폴리펩티드 호르몬은 IL-2; IL-10; IFN- α ; IFN- β (IFN- β -1b 등); TNF-알파; IGF-1; EGF; bFGF; hGH; 프롤락틴; 및 인슐린을 포함한다. 또한 이용하기에 특히 적합한 것은 전술한 사이토카인, 케모카인, 성장인자 및 폴리펩티드 호르몬의 경쟁적 길항제, 예컨대 TNF-알파, hGH 또는 프롤락틴의 길항제, 및 이들 사이토카인, 케모카인, 성장인자 및 폴리펩티드 호르몬의 뮤테인, 변이체 및 유도체이다.

[0022] 특정 실시태양에서, 1종 이상의 중합체가 공유적으로 사이토카인, 케모카인, 성장인자 또는 폴리펩티드 호르몬 상의 아미노-말단 아미노산의 알파 아미노기에 커플링된다 (특히 2차 아민 연결을 통해). 다른 실시태양에서는 1종 이상의 중합체가 사이토카인, 케모카인, 성장인자 또는 폴리펩티드 호르몬상의 아미노-말단 아미노산의 화학적으로 반응성인 측쇄기 (예컨대, 히드록실기, 술프히드릴기, 구아니디노기, 이미다졸기, 아미노기, 카르복실기 또는 알데히드 유도체)에 공유적으로 커플링된다. 추가적인 실시태양에서, 중합체가 아미노-말단 아미노산에서 또는 당질화 부위 또는 그에 인접한 부위에서 사이토카인, 케모카인, 성장인자 또는 폴리펩티드 호르몬에 커플링하는 것은 사이토카인, 케모카인, 성장인자 또는 폴리펩티드 호르몬 당질화의 유리한 효과와 흡사하다. 관련된 실시태양에서, 중합체가 사이토카인, 케모카인, 성장인자 또는 폴리펩티드 호르몬 상의 1 이상의 당질화 부위에 또는 그에 인접한 부위에서 사이토카인, 케모카인, 성장인자 또는 폴리펩티드 호르몬에 커플링하는 것은 사이토카인, 케모카인, 성장인자 또는 폴리펩티드 호르몬 과당질화의 유리한 효과와 흡사한데, 여기서 "과당질화"란 원래 구조로 존재하는 것 이외에 단순하거나 복잡한 탄수화물 잔기가 공유적으로 부착되는 것을 의미한다.

[0023] 본 발명은 또한 본 발명의 방법에 의해 제공되는 접합체를 제공한다. 본 발명의 접합체는 1종 이상의 합성 수용성 중합체에 (앞서 기술한 것 등) 커플링된 선택된 사이토카인, 선택된 케모카인, 선택된 성장인자, 선택된 폴리펩티드 호르몬, 또는 그의 선택된 길항제 (앞서 기술한 것 등)를 포함하고, 이때 1종 이상의 중합체는 사이토카인, 케모카인, 성장인자 또는 폴리펩티드 호르몬의 아미노-말단 아미노산에 커플링되고 아미노-말단 아미노산은 선택된 사이토카인, 케모카인, 성장인자 또는 폴리펩티드 호르몬의 하나 이상의 수용체-결합 도메인으로부터 멀리 떨어져 위치한다. 추가적으로, 본 발명의 접합체는 하나 이상의 합성 수용성 중합체 (앞서 기술한 것 등)에 커플링된 선택된 사이토카인, 선택된 케모카인, 선택된 성장인자 또는 선택된 폴리펩티드 호르몬 또는 그의 선택된 길항제를 포함하며, 이때 1종 이상의 중합체가 선택된 사이토카인, 케모카인, 성장인자 또는 폴리펩티드 호르몬, 또는 이들의 길항제의 하나 이상의 당질화 부위에 커플링되고 하나 이상의 당질화 부위는 사이토카인의 하나 이상의 수용체-결합 도메인에서 멀리 떨어져 위치한다. 본 발명의 작용제의 중합체 접합체에 있어, 중합체 부착의 부위가 수용체-결합 도메인 모두에서 멀리 떨어진 것이 바람직하다. 본 발명의 특정 길항제의 중합체 접합체에 있어, 중합체 부착의 부위가 결합이 일어나는데 필수적인 특정 수용체-결합 도메인에서 멀리 위치하는 것이 바람직할 수 있으나, 작용제에 의한 신호전달에 필수적인 수용체-결합 도메인 모두로부터 필수적으로 멀리 떨어져야 하는 것은 아니다. 본 발명은 또한 1종 이상의 본 발명의 접합체, 및 1종 이상의 추가 성분, 예컨대 1종 이상의 제약학적으로 허용되는 희석제, 부형제 또는 담체를 포함하는 조성물, 특히 제약 조성물을 제공한다. 본 발명은 또한 본 발명의 1종 이상의 접합체, 조성물 및/또는 제약 조성물을 포함하는 키트를 제공한다.

[0024] 본 발명은 또한 신체 장애를 겪거나 소인을 갖는 동물 (예컨대 인간과 같은 포유동물)에서 신체장애를 예방, 진단 또는 치료하는 방법을 제공한다. 그러한 방법은 예컨대 동물에게 본 발명의 1종 이상의 접합체, 조성물 또는 제약 조성물을 투여하는 것을 포함할 수 있다. 본 발명의 방법에 따라 적절하게 치료되거나 예방되는 신체 장애는 암 (예컨대, 유방암, 자궁암, 난소암, 전립선암, 고환암, 폐암, 백혈병, 림프종, 결장암, 위암, 췌장암, 방광암, 신장암, 뼈암, 신경암, 두경부암, 피부암, 육종, 악성종양, 선종 및 골수종); 전염병 (예컨대, 박테리아성 질환, 진균성 질환, 기생충성 질환 및 바이러스성 질환 (예컨대, 바이러스성 간염, 심장선택성 바이러스에 기인한 질환 및 HIV/AIDS 등)); 유전적 장애 (예컨대, 빈혈, 호중구 감소증, 저혈소판증, 혈

우병, 소인증 및 중증 복합 면역결핍증 (SCDI); 자가면역 장애 (예컨대, 건선, 전신성 홍반성 루프스 및 류마티스 관절염) 및 신경퇴행성 장애 (예컨대, 여러가지 형태 및 단계의 다발성 경화증 (MS); 크로이츠펠트-야콥병; 알츠하이머 질환 등)을 포함하나 이에 한하는 것은 아니다

[0025] 본 발명의 기타 바람직한 실시태양은 하기 도면 및 발명의 상세한 설명, 그리고 청구범위에 의해 당업자에게 명백할 것이다.

발명의 상세한 설명

[0043] 달리 정의되지 않는 한, 본원에서 사용되는 모든 기술적 및 과학적 용어는 본 발명이 속하는 기술 분야의 당업자들에게 통상적으로 이해되는 바와 동일한 의미를 갖는다. 본원에서 기술된 것과 유사하거나 또는 동일한 임의의 방법 및 물질이 본 발명의 실시 및 시험에 사용될 수 있지만, 바람직한 방법 및 물질을 하기에서 기술한다.

[0044] 정의

[0045] **약:** 본원에서 임의의 수치를 나타낼 때 사용된 것과 같이, "약"이란 용어는 언급된 수치의 $\pm 10\%$ 의 수치를 의미한다(예를 들어, "약 50°C"는 45°C 내지 55°C의 온도 범위를 포함한다: 또한, "약 100 mM"은 90 mM 내지 110 mM의 농도 범위를 포괄한다).

[0046] **아미노산 잔기:** 본원에서 사용된 것과 같이, "아미노산 잔기"란 용어는 폴리펩티드 골격 또는 측쇄에서 두 펩티드 결합에 관여한 결과, 또한, 직쇄 폴리펩티드 사슬의 각각의 말단에서 일어나는 것과 같이, 아미노산이 한 펩티드 결합에 관여한 결과, 일반적으로 탈수된 특정 아미노산을 지칭한다. 아미노산은 당업계에서 통상적인 3 문자 코드 또는 1 문자 코드로 지칭된다.

[0047] **길항제:** 본원에서 사용된 것과 같이, "길항제"는 해당 사이토카인, 케모카인, 성장 인자 또는 폴리펩티드 호르몬에 대한 수용체를 통해 매개되는, 세포, 조직 또는 생물체 상의 해당 사이토카인, 케모카인, 성장 인자 또는 폴리펩티드 호르몬의 생물학적 및(또는) 생리학적 효과를 실질적으로 감소시키거나 또는 완전히 억제하는 화합물, 분자, 잔기 또는 복합체를 지칭한다. 길항제는 이같은 효과를 이에 제한되는 것은 아니지만, 세포 표면 상의 결합 부위(들) 또는 수용체(들)에 대해 아고니스트와 경쟁; 아고니스트가 세포 표면 수용체에 결합하는 능력을 실질적으로 감소시키거나 또는 완전히 억제하는 방식으로 아고니스트와 상호작용; 세포 표면 수용체에 결합하고, 수용체가 아고니스트가 더 이상 결합할 수 없는 구조를 가지도록(또는 감소되거나 또는 실질적으로 감소된 친화도 및(또는) 효율로만 결합하도록) 세포 표면 수용체 중의 구조적 변화를 유도; 아고니스트의 결합, 또는 아고니스트가 세포에 결합한 후 아고니스트에 의해 유도되는 생리학적 시그날이 감소되거나, 실질적으로 감소되거나 또는 완전히 억제되도록 세포, 조직 또는 생물체 내에서 생리적인 변화를 유도(예를 들어, 세포내 시그날 전달 복합체의 증가; 전사 억제제의 증가; 세포 표면 리간드 수용체 발현의 감소 등); 및 당업자들에게 잘 알려져 있는 다른 기작에 의해서 길항제가 그 활성을 발휘할 수 있도록 하는 것을 비롯하여 다양한 경로를 통해서 수용할 수 있다. 당업자들이 이해할 수 있는 바와 같이, 길항제는 길항하는 리간드와 유사한 구조를 가질 수 있거나(예를 들어, 길항제는 아고니스트의 뮤테인, 변이체, 단편 또는 유도체일 수 있음), 또는 전혀 무관한 구조를 가질 수 있다.

[0048] **생체활성 성분:** 본원에서 사용된 것과 같이, "생체활성 성분"이란 용어는 생체내, 시험관내 또는 생체외에서 세포, 조직, 기관 또는 생물체에 대해서 특정 생물학적 활성을 갖고, 하나 이상의 폴리알킬렌 글리콜과 결합하여 본 발명의 접합체를 형성할 수 있는, 화합물, 분자, 잔기 또는 복합체를 지칭한다. 바람직한 생체활성 성분은 본원에서 기술된 것과 같은 단백질 및 폴리펩티드를 포함하지만, 이에 제한되지는 않는다.

[0049] **결합:** 본원에서 사용된 것과 같이, "결합"이란 용어는 공유결합(예를 들어, 화학적 커플링) 또는 비공유결합(예를 들어, 이온 상호작용, 수소성 상호작용, 수소 결합 등)일 수 있는 결합 또는 부착을 지칭한다. 공유결합은 예를 들어, 에스테르, 에테르, 포스포에스테르, 티오에스테르, 티오에테르, 우레탄, 아마이드, 아민, 펩티드, 이미드, 히드라존, 히드라지드, 탄소-황 결합, 탄소-인 결합 등일 수 있다. "결합"이란 용어는 그보다 넓은 범위의 용어로, "커플링된," "접합된" 및 "부착된"과 같은 용어를 포함한다.

[0050] **접합체/접합:** 본원에서 사용된 것과 같이, "접합체"란 용어는 중합체(예를 들어, PEG 또는 PEO)의 생체활성 성분(예를 들어, 단백질 또는 당단백질)로의 공유결합 부착의 생성물을 지칭한다. "접합"은 상기에서 정의된

바와 같은 접합체의 형성을 지칭한다. 중합체의 생물학적 활성 물질로의 접합 분야에서 당업자들에게 일반적으로 사용되는 임의의 방법이 본 발명에서 사용될 수 있다.

[0051] **커플링된**: 본원에서 사용된 것과 같이, "커플링된"이란 용어는 공유결합 또는 강한 비공유결합 상호작용에 의한 부착, 일반적으로 또한 바람직하게는 공유결합에 의한 부착을 지칭한다. 생물학적 활성 물질들의 커플링 분야에서 당업자들에게 일반적으로 사용되는 임의의 방법이 본원에서 사용될 수 있다.

[0052] **사이토카인/케모카인**: 본원에서 사용된 것과 같이, "사이토카인"이란 용어는 세포의 생존, 성장, 분화 및(또는) 작용 기능을 내분비, 측분비 또는 자가분비 방식으로 조절하는 분비된 조절 단백질로 정의된다(Nicola, N.A., 상기 참조; Kossiakoff, A.A., et al. 에서 리뷰됨, 상기 참조). 유사하게, 본원에서 사용된 것과 같이, "케모카인"은 강력한 백혈구 활성화 및(또는) 주화성 활성(Oppenheim, J.J., et al.에서 리뷰됨, 상기 참조)을 갖는 구조적으로 관련된 당단백질 패밀리의 구성원으로 정의된다. 이 정의에 따라서, 사이토카인 및 케모카인은 이에 제한되지는 않으나 본원에서 구체적으로 개시되거나 또는 예시된 것들을 비롯하여, 인터루킨, 콜로니-자극 인자, 성장 인자 및 다양한 세포에 의해 생성되는 기타 펩티드 인자를 포함한다. 폴리펩티드 호르몬 및 성장 인자와 같은 가까운 유사체와 같이, 사이토카인 및 케모카인은 그 표적 세포의 표면 상의 특정 수용체 단백질로의 결합에 의해 조절 작용을 개시한다.

[0053] **질환, 질병, 증상**: 본원에서 사용된 것과 같이, "질환" 또는 "질병"은 종양, 암, 알러지, 중독, 자가면역, 감염, 중독 또는 최적의 정신적 또는 신체 기능의 손상을 비롯한 인간 또는 동물의 불리한 증상을 지칭한다. "증상"은 본원에서 사용된 것과 같은 질환 및 질병을 포함하지만, 또한 생리적 상태를 지칭한다. 예를 들어, 생식 능력은 생리적인 상태이지만, 질환 또는 질병은 아니다. 따라서, 생식 능력을 감소시켜 임신을 예방하는데 적합한 본 발명의 조성물은 증상(생식 능력)의 치료로 기술되고, 질환 또는 질병의 치료로 기술되지는 않는다. 기타 증상은 당업자들에게 이해될 것이다.

[0054] **유효량**: 본원에서 사용된 것과 같이, "유효량"은 목적인 생물학적 효과를 보여주기 위해 필요하거나 충분한 해당 접합체 또는 조성물의 양을 지칭한다. 본원 발명의 해당 접합체 또는 조성물의 유효량은 선택된 결과를 달성하는 양일 수 있으며, 이같은 양은 당업계에 공지된 방법을 사용하고(또는), 본원에서 기술된 방법을 사용하여, 과도한 실험을 필요로 하지 않고, 당업자들에게 통상적인 방식으로 결정될 수 있다. 예를 들어, 면역계의 결핍을 치료하기 위한 유효량은 면역계의 활성화를 초래하여, 항원에 노출된 후 항원 특이적 면역 반응의 발달을 가져오기 위해서 필요한 양일 수 있다. 또한, 이 용어는 "충분한 양"과 동의어이다. 임의의 응용에 대한 유효량은 치료되는 질환 또는 증상, 투여되는 특정 조성물, 투여 경로, 개체의 크기 및(또는) 질환 또는 증상의 심도와 같은 인자에 따라 달라질 수 있다. 당업자들은 본 발명의 특정 접합체 또는 조성물의 유효량을 과도한 실험을 필요로 하지 않고, 경험적으로 결정할 수 있다.

[0055] **하나 또는 한개**: 본 개시 내용에서 "하나" 또는 "한개"란 용어가 사용되었을 때, 달리 지시되지 않는 한, 이들은 "최소한 하나의" 또는 "하나 이상의"를 의미한다.

[0056] **PEG**: 본원에서 사용된 것과 같이, "PEG"는 직쇄 또는 분지쇄 또는 다수개의 가지를 가진(multi-armed) 또는 말단 봉쇄되거나 또는 히드록실기로 종결된 에틸렌 옥사이드의 중합체를 포함한다. "PEG"는 에틸렌 옥사이드의 중합체에 대해서 당업계에서 사용되는 다른 명칭들 중에서 당업계에서 폴리(에틸렌 글리콜), 메톡시폴리(에틸렌 글리콜) 또는 mPEG 또는 폴리(에틸렌 글리콜)-모노메틸 에테르, 알콕시폴리(에틸렌 글리콜), 폴리(에틸렌 옥사이드) 또는 PEO, α -메틸- ω -히드록시-폴리(옥시-1,2-에탄디일) 및 폴리옥시란으로 당업계에 공지된 중합체들을 포함한다.

[0057] **PEG화, PEG화된 및 Mock PEG화된**: 본원에서 사용된 것과 같이, "PEG화"는 PEG의 생체활성 표적 분자, 특히 수용체-결합 단백질로의 공유결합 커플링을 위한 임의의 방법을 지칭한다. 이로써 생성된 접합체는 "PEG화된" 것으로 지칭된다. 본원에서 사용된 것과 같이, "Mock PEG화된"이란 PEG가 공유결합 부착되지 않은 PEG화 반응 혼합물 중의 단백질 부분 또는 기타 생체활성 성분을 지칭한다. 그럼에도 불구하고, Mock PEG화된 생성물은 반응 또는 추후 정제 단계에서 변형될 수 있다(예를 들어, 환원적 알킬화에 의한 PEG화 중 환원제에 노출된 결과로 및(또는) 하나 이상의 억제제 화합물 등이 가공 및(또는) 정제 단계에서 제거됨으로써).

[0058] **폴리펩티드**: 본원에서 사용된 것과 같이, "폴리펩티드"란 용어는 아미드 결합(펩티드 결합으로도 알려져 있음)에 의해 직쇄상으로 연결된 단량체들(아미노산들)로 이루어지는 분자를 지칭한다. 이는 아미노산의 분자쇄를 나타내는 것이고, 특정한 길이의 생성물을 지칭하는 것은 아니다. 따라서, 펩티드, 디펩티드, 트리펩티드, 올리고펩티드 및 단백질이 폴리펩티드의 정의에 포함된다. 또한, 이 용어는 폴리펩티드의 발현후 개질

의 생성물, 예를 들어, 당질화, 과당질화, 아세틸화, 인산화 등의 생성물을 지칭하는 것으로 의도된다. 폴리펩티드는 천연 생물학적 공급원으로부터 유래하거나, 또는 재조합 DNA 기술에 의해 유래할 수 있지만, 반드시 지정된 핵산 서열로부터 번역될 필요는 없다. 이는 화학 합성을 비롯한 임의의 방법으로 생성될 수 있다.

[0059] 단백질 및 당단백질: 본원에서 사용된 것과 같이, 단백질이란 용어는 일반적으로 약 10개 이상, 20개 이상, 25개 이상, 50개 이상, 75개 이상, 100개 이상, 200개 이상, 500개 이상, 1,000개 이상, 또는 2,000개 이상의 아미노산 크기의 폴리펩티드를 지칭한다. 단백질은 일반적으로 한정된 3차원 구조를 갖지만, 이들이 반드시 이같은 구조를 가질 필요는 없고, 흔히 한정된 3차원 구조를 갖지 않고, 다수의 상이한 형태를 가질 수 있으며 폴딩되지 않은 것으로 지칭되는 펩티드 및 폴리펩티드와는 달리 흔히 폴딩된 것으로 지칭된다. 그러나, 펩티드도 또한 한정된 3차원 구조를 가질 수 있다. 본원에서 사용된 것과 같이, 당단백질이란 용어는 아미노산 잔기(예를 들어, 세린 잔기 또는 아스파라긴 잔기)의 산소 함유 또는 질소 함유 측쇄를 통해 단백질에 부착되는 하나 이상의 탄수화물 잔기에 커플링된 단백질을 지칭한다.

[0060] 멀리 떨어진: 본원에서 사용된 것과 같이, "멀리 떨어진"이란 용어("멀리 떨어진 N-말단 아미노산" 또는 "멀리 떨어진 당질화 부위"와 같이)는 단백질 상의 하나 이상의 수용체-결합 영역 또는 도메인으로부터 원위에 있거나 또는 공간적으로 멀리 떨어져 있는 것을 지칭한다. 이같이 멀리 떨어진 부착 부위에서의 중합체의 접합체(일반적으로 N-말단 아미노산(이에 따라 수용체-결합 단백질의 경우, "멀리 떨어진 N-말단" 또는 "RN" 수용체-결합 단백질로 지칭됨) 또는 당단백질 상의 하나 이상의 탄수화물 잔기 또는 당질화 부위(이에 따라 수용체-결합 단백질의 경우, "멀리 떨어진 당질화" 또는 "RG" 수용체-결합 단백질로 지칭됨)는 단백질의 그 수용체(들)로 결합의 실질적인 입체적 방해로 초래하지 않는다. 따라서, 수용성 중합체의 각각 아미노-말단 아미노산 또는 당질화 부위의 접합(예를 들어, 공유결합 부착)이 사이토카인, 케모카인, 성장 인자 또는 폴리펩티드 호르몬이 그 수용체(들), 특히 세포 표면 수용체들로 결합하는 능력을 실질적으로 방해하지 않을 때, 사이토카인, 케모카인, 성장 인자 또는 폴리펩티드 호르몬 상의 아미노-말단 아미노산 또는 당질화 부위는 사이토카인, 케모카인, 성장 인자 또는 폴리펩티드 호르몬의 "하나 이상의 수용체 결합 도메인으로부터 떨어져 위치하는 것"으로 언급된다. 따라서, 해당 사이토카인, 케모카인, 성장 인자 또는 폴리펩티드 호르몬은 당연히 하나 이상의 수용체 결합 도메인을 함유할 수 있는 것으로 인식된다. 이같은 경우, 사이토카인, 케모카인, 성장 인자 또는 폴리펩티드 호르몬의 아미노-말단 아미노산 또는 당질화 부위는 한개의 이같은 도메인 또는 하나 이상의 이같은 도메인으로부터 떨어져서 위치할 수 있으며, 아미노-말단 아미노산 또는 당질화 부위의 접합체가 하나 이상의 수용체 결합 도메인을 통한 사이토카인, 케모카인, 성장 인자 또는 폴리펩티드 호르몬이 그 수용체(들)로의 결합을 실질적으로 저해하지 않는 한, "하나 이상의 수용체-결합 도메인으로부터 멀리 떨어져 위치하는 것"으로 생각될 수 있다. 접합이 단백질이 그 수용체(들)로 결합 하는 능력을 실질적으로 방해하는지 여부는 당업자들에게 잘 알려져 있는 리간드-수용체 결합 분석법을 사용하여 용이하게 결정될 수 있다.

[0061] 리간드-수용체 결합을 평가하는 방법은 이에 제한되는 것은 아니나, 경쟁적 결합 분석, 방사능수용체 결합 분석, 세포 기재 분석, 표면 플라즈몬 공명 측정법, 동적 광산란 및 초원심분리를 포함한다.

[0062] 본 명세서의 도 1d에 나타낸 바와 같이, PEG는 비슷한 분자량의 단백질에 비해 용액 중에서 큰 부피를 차지하는 고도로 확장되고 가요성인 중합체이다. PEG가 부착된 아미노산 잔기가 하나 이상의 수용체 결합 부위로부터 멀리 떨어져 있을 수 있지만, 그럼에도 불구하고, 중합체의 부분은 어느 정도 수용체 결합을 저해할 수 있다. 이같은 방해의 가능성은 분자량 및 그에 따라 용액 중에서 중합체가 차지하는 부피에 따라 증가한다. 결국, 수용체 결합 영역들로부터 멀리 떨어진 PEG화는 랜덤 PEG화보다 수용체 결합을 덜 방해할 것이다.

[0063] 실질적으로, 실질적인: 본원에서 사용된 것과 같이, 접합된 단백질의 수용체로의 결합 속도 및(또는) 양이 접합되지 않은 해당 사이토카인, 케모카인, 성장 인자 또는 폴리펩티드 호르몬의 결합 속도 및(또는) 양의 약 40% 이상, 약 50% 이상, 약 60% 이상, 약 65% 이상, 약 70% 이상, 약 75% 이상, 약 80% 이상, 약 85% 이상, 약 90% 이상, 약 91% 이상, 약 92% 이상, 약 93% 이상, 약 94% 이상, 약 95% 이상, 약 96% 이상, 약 97% 이상, 약 98% 이상, 약 99% 이상 또는 약 100% 이상이면, 단백질의 접합은 단백질이 그 수용체(들)로 결합하는 능력을 "실질적으로" 저해하지 않는 것으로 언급된다.

[0064] 치료: 본원에서 사용된 것과 같이, "치료," "치료하다," "치료된," 또는 "치료하는"이란 용어들은 예방 및(또는) 치료를 지칭한다. 예를 들어, 감염성 질환과 관련하여 사용되었을 때, 용어는 병원체에 의한 감염에 대한 개체의 내성을 증가시키는, 또는 달리 말해, 개체가 병원체에 감염되거나, 감염으로 인한 병의 증상을 나타낼 가능성을 감소시키는 예방적 치료와 아울러, 개체가 감염된 후 감염에 대해 싸우기 위한, 예를 들어 감

염을 감소시키거나 또는 제거하거나 감염이 악화되는 것을 방지하기 위한 치료를 지칭할 수 있다.

[0065] 개요

[0066] 본 발명은 하나 이상의 중합체가 랜덤하게 부착된 동일한 수용체-결합 단백질의 중합체 접합체에 비해 예상외로 높은 수용체-결합 활성을 보유하는 수용체-결합 단백질의 중합체 접합체의 합성 방법을 제공한다. x-선 결정학 및 핵자기 공명 기체 구조 분석, 돌연변이 분석 및 분자 모델링 소프트웨어를 사용하여, 본 발명자들은 그 수용체로의 결합에 관여하거나 또는 관여하지 않는, 사이토카인, 케모카인, 성장 인자 및 폴리펩티드 호르몬의 PEG화의 표적 부위를 확인하였다. 단백질 부류로서, 이들 사이토카인, 케모카인, 성장 인자 및 폴리펩티드 호르몬 아고니스트 및 길항제는 본원에서 수용체-결합 단백질로 지칭된다. 수용체 상호작용에 관여하지 않는 수용체-결합 단백질의 영역(들)로의 중합체 부착을 표적화시키는 합성 전략을 선택하여, 어떤 바람직하지 않은 입체 장애를 회피하고, 생성된 중합체 접합체는 특이하게 높은 효능을 보유한다. 하나 이상의 그 수용체-결합 영역 또는 도메인으로부터 멀리 떨어져 있는 아미노-말단 잔기를 갖는 이들 수용체-결합 단백질은 본원에서 "멀리 떨어진 N-말단" 또는 "RN" 수용체-결합 단백질로 정의된다: 이들은 그 아미노-말단 아미노산이 단백질의 수용체-결합 부위 또는 부위들로부터 멀리 떨어져 있는 모든 사이토카인, 케모카인, 성장 인자 및 폴리펩티드 호르몬 또는 이들의 길항제를 포함한다.

[0067] 본 발명의 다른 실시태양에서, 하나 이상의 그 수용체-결합 영역 또는 도메인으로부터 멀리 떨어져 있는 천연 당질화 부위를 갖는 사이토카인, 케모카인, 성장 인자 및 폴리펩티드 호르몬에 공유결합으로 커플링된 하나 이상의 합성 중합체(예를 들어, 하나 이상의 폴리(에틸렌 글리콜))를 포함하는 접합체가 제조된다. 본 발명의 이 실시태양에 따르면, 접합체의 생체활성 성분(예를 들어, 단백질들)이 합성 중합체가 당질화 부위(들)의 영역 내에서 커플링되었을 때, 잘 보존된 수용체-결합 활성을 나타낼 것이다. 수용체-결합 단백질의 이 아류는 본원에서 "RG" 수용체-결합 단백질로 지칭된다. 친수성 또는 양쪽성 중합체가 이같은 "멀리 떨어진 당질화" 부위에서 또는 그 근처에서 선택적으로 커플링될 때, 특히, 표적 단백질이 천연적으로 당질화되는 단백질의 비당질화된 형태일 때, 중합체는 천연형 탄수화물의 예를 들어, 응집, 안정성 및(또는) 가용성에 대한 유리한 효과를 모방할 수 있고, 따라서 그 부착은 본원에서 "유사당질화"로 지칭된다. 따라서, 본 발명은 합성 중합체의 위치 선택적 커플링이 천연 탄수화물 잔기를 효과적으로 대체하는 접합체의 합성 방법을 제공한다. 결과적으로 유사당질화는 단백질의 다른 비당질화된 형태와 비교하여 개선된 가용성, 감소된 응집 및 혈류로부터 지연된 제거율에 기여한다. 따라서, 이 접근법은 원핵세포 숙주 세포(예를 들어, 대장균(*Escherichia coli*)과 같은 박테리아)에서 재조합 DNA 기술로 생성된 단백질의 접합체 및 조성물을 제조하는데 특히 유리한데, 이는 원핵 생물체는 일반적으로 이들이 발현하는 단백질을 당화시키지 않기 때문이다. 유사하게, 당단백질의 탄수화물 잔기의 선택적 PEG화는 당단백질의 "유사과당질화"를 초래할 수 있다. 이 과정은 예를 들어, 문헌[C. Bona et al., PCT 공개 WO 제96/40731호](그 전체가 본원에 참조용으로 삽입됨)에 기술되어 있다. 따라서, 이 접근법은 진핵 숙주 세포(예를 들어, 효모, 식물 세포 및 동물 세포(포유동물 및 곤충 세포 포함))에서 재조합 DNA 기술에 의해 생성된 단백질의 접합체 및 조성물에 대해 특히 유리한데, 이는 그 단백질이 천연 당질화 시그널 또는 재조합 DNA 기술에 의해 도입된 당질화 시그널을 갖고 있다면, 진핵 생물체는 일반적으로 이들이 발현하는 단백질을 당질화시키기 때문이다. 이같은 유사당질화 및 유사과당질화된 RG 수용체-결합 단백질은 본 발명의 범위 내에 있다.

[0068] 따라서, 본 발명은 실질적인, 거의 완전한 또는 본질적으로 완전한 수용체-결합 활성을 보유하는 "RN" 수용체-결합 단백질 및 실질적인, 거의 완전한 또는 본질적으로 완전한 수용체-결합 활성을 보유하는 "RG" 수용체-결합 단백질의 중합체 접합체를 포함한다. 본원에서 사용된 것과 같이, 사이토카인, 케모카인, 성장 인자 또는 폴리펩티드 호르몬의 접합이 단백질이 그 수용체(들)로 결합하는 능력을 실질적으로 방해하지 않는다면, 즉, 접합된 단백질의 그 해당 수용체(들)로의 결합 속도 및(또는) 양이 해당 단백질의 접합되지 않은 형태의 결합 속도 및(또는) 양의 약 40% 이상, 약 50% 이상, 약 60% 이상, 약 65% 이상, 약 70% 이상, 약 75% 이상, 약 80% 이상, 약 85% 이상, 약 90% 이상, 약 91% 이상, 약 92% 이상, 약 93% 이상, 약 94% 이상, 약 95% 이상, 약 96% 이상, 약 97% 이상, 약 98% 이상, 약 99% 이상 또는 약 100% 이상이면, 사이토카인, 케모카인, 성장 인자 또는 폴리펩티드 호르몬은 본 발명에 따른 하나 이상의 수용성 중합체에 접합되었을 때, "실질적인, 거의 완전한 또는 본질적으로 완전한 수용체-결합 활성을 유지하는 것"으로 언급된다. 또한, "RN" 및 "RG" 수용체-결합 단백질 모두로 분류되는 수용체-결합 단백질들의 중합체 접합체가 본 발명의 범위 내에 포함된다. 후자의 단백질의 두가지 예는 인터페론 β (특히 인터페론- β -1b) 및 IL-2이다.

[0069] 추가 실시태양에서, 본 발명은 하나 이상의 중합체들이 랜덤하게 부착된 동일한 수용체-결합 단백질의 중합체

접합체에 비해 예상외로 높은 수용체-결합 활성을 보유하는 수용체-결합 단백질의 중합체 접합체의 합성 방법을 제공한다. 또한, 본 발명은 이같은 방법으로 제조된 접합체 및 본 발명의 하나 이상의 이들 접합체를 포함하는 조성물로 추가적으로 하나 이상의 추가적인 성분 또는 시약, 예를 들어, 하나 이상의 완충액염, 하나 이상의 탄수화물 부형제, 하나 이상의 담체 단백질, 하나 이상의 효소, 하나 이상의 계면활성제, 하나 이상의 핵산 분자, 하나 이상의 비접합된 PEG 또는 폴리알킬렌 글리콜과 같은 중합체 등을 포함할 수 있는 조성물을 제공한다. 또한, 본 발명은 본 발명의 접합체 및(또는) 조성물을 포함하는 키트를 제공한다.

[0070] 또한, 본 발명은 본 발명의 접합체 및 제약학적 또는 수의학적 용도에 적합한 하나 이상의 부형제 또는 담체를 포함하는 제약학적 또는 수의학적 조성물을 제공한다. 또한, 본 발명은 본 발명의 하나 이상의 접합체 또는 접합체의 유효량을 신체적 질환 또는 증상에 걸리기 쉬운 체질이거나 또는 이같은 질환 또는 증상을 앓고 있는 동물에게 투여하는 것을 포함하는, 이같은 조성물을 사용하여 다양한 신체적 질환을 치료 또는 예방하는 방법을 제공한다.

[0071] 아울러, 본 발명은 상업적인 세포 배양에서 사용하기 위해 이들의 생성을 위해 안정화된 수용체-결합 단백질 및 방법을 제공하여, 산업적인 사용에서 실질적인 생체활성의 유지 및 작용 지속의 증가의 결합된 효과로 인해 예상외의 높은 효능을 얻는다. 본 발명의 접합체의 예상외로 높은 효능은 예상외로 높은 생체량 생산, 예상외로 높은 수준의 재조합 단백질의 발현 및 바이오프로세싱의 효능 면에서 기타 개선을 통해 반영될 수 있다.

[0072] 방법

[0073] 본 발명자들은 "RN" 수용체-결합 단백질의 아미노-말단 아미노산 또는 "RG" 수용체-결합 단백질의 당질화 부위 근처로의 중합체의 표적화가 단백질의 하나 이상의 수용체-결합 영역 또는 도메인으로부터 멀리 떨어진 위치에서 중합체가 부착되도록 하고, 이로써 부착된 중합체 분자에 의한 수용체 상호작용의 입체적 방해를 최소화시킬 수 있다는 것을 발견하였다. 따라서, 중합체가 수용체(들)로의 결합에 관여하는 분자의 부분 내에 또는 근처에 부착된 경우에 나타나는 것보다 본 발명의 방법에 따라 단백질을 접합시킬 때 높은 퍼센트의 수용체-결합 활성이 보존될 수 있다. 예상외로 높은 수용체 결합 활성의 보존을 가져오는 이 원리는 염기성 섬유모세포 성장 인자("bFGF" 또는 "FGF-2"), 외피 성장 인자("EGF"), 인슐린 유사 성장 인자-1("IGF-1"), 인터페론- α ("IFN- α "), 인터페론- β ("IFN- β " (IFN- β -1b를 포함하지만, 이에 제한되지는 않음)), 과립구-대식세포-콜로니 자극 인자("GM-CSF"), 단핵구 콜로니 자극 인자("M-CSF"), Flt3 리간드, 줄기세포 인자("SCF"), 인터루킨 2, 3, 4, 6, 10, 12, 13 및 15, 종양 괴사 인자- α ("TNF- α "), 종양 괴사 인자- β ("TNF- β "), 형질전환 인자 α ("TGF- α "), 형질전환 인자 β ("TGF- β "), 각화세포 성장 인자("KGF"), 인간 성장 호르몬("hGH"), 프롤락틴, 태반 최유호르몬, 섬모 신경성장 인자("CNTF"), 램틴 및 이들 단백질의 작용을 모방하거나, 또는 이들의 수용체-결합 길항제인 이들 수용체-결합 단백질의 구조적 유사체로부터 선택된 수용체-결합 단백질에 대해 입증될 수 있다. 반면, 거대 중합체의 IFN- γ 의 아미노 말단으로의 선택적 부착은 이 사이토키인의 활성 대부분을 유지할 것으로 예상되지 않는데, 이는 이같은 커플링이 활성 이량체가 그 수용체와 결합하는 것을 방해할 것으로 예상되기 때문이다(Walter, M.R., et al., (1995) Nature 376:230-235 및 Thiel, D.J., et al.의 데이터에 기초함, 상기 참조).

[0074] 본 발명의 관련된 이같은 실시태양에서, 시그널 전달을 개시하지 않으면서, 하나 이상의 동일 수용체(들)에 결합하여 천연 단백질의 경쟁적 길항제로서 작용하는 수용체-결합 단백질의 뮤테인의 아미노-말단 잔기에 중합체가 커플링된다. 그 예는 G120R의 점 돌연변이를 함유하는 hGH 길항제의 중합체 접합체(Sundstrom, M., et al., (1996) J Biol Chem 271: 32197-32203) 및 G129R의 점 돌연변이를 함유하는 프롤락틴의 길항제이다(Goffin, V., et al., (1997) J Mammary Gland Biol Neoplasia 2: 7-17; Chen, W.Y., et al., (1999) Clin Cancer Res 5: 3583-3593; Chen, W. Y., PCT 공개 WO 제99/58142 A1호). 수용체-결합 단백질의 기타 길항제는 선택적 점 돌연변이, 절단 또는 결실에 의해 생성될 수 있다(예를 들어, Tchelet, A., et al., (1997) Mol Cell Endocrinol 130: 141-152; Peterson, F.C., (1998) Identification of Motifs Associated with the Lactogenic and Somatotrophic Actions of Human Growth Hormone, Ph.D. Dissertation, Ohio State University, UMI # 9822357 참조).

[0075] 본 발명의 다른 실시태양에서, "RG" 수용체-결합 단백질의 경우, 본 발명의 방법은 당단백질인 수용체-결합 단백질의 탄수화물 잔기의 천연 부착 위치에 근접해서 하나 이상의 합성 중합체를 부착시킨다. 이는 이들 수용체-결합 단백질의 "유사당질화"를 초래하거나(예를 들어, 대장균 또는 번역후 당질화를 수행하지 않는 다른

원핵 세포 내에서 제조함 DNA 기술에 의해 발현되는 경우) 또는 이들 당단백질 형태의 "유사과당질화"를 초래한다(예를 들어, 천연 당단백질의 경우 또는 번역후 당질화를 수행하는 진핵 숙주 세포(예를 들어, 효모, 식물 세포 및 동물 세포(포유동물 및 곤충 세포 포함)에 의해 생성된 당단백질의 경우). 그 예는 인터페론 α 및 β 와 아울러, 에리스로포이에틴("Epo") 및 인터루킨-2의 중합체 접합체이다. 천연 당질화 부위 또는 그 근처에서 합성 중합체의 부착은 탄수화물의 사전 산화를 수반하는 문헌[R.J. Goodson et al., ((1990) Biotechnology 8: 343-346) 및 R.S. Larson et al., ((2001) Bioconjug Chem 12: 861-869)](이들은 그 전체가 본원에 참조용으로 삽입되었음)에 기술된 방법을 비롯하여 당연계에 공지된 임의의 방법으로 수행될 수 있다.

[0076] 특정 단백질의 아미노-말단 개질은 이전에 개시된 바 있다(Dixon, H.B.F. , (1984) J Protein Chem 3: 99-108). 예를 들어, 단백질의 N-말단 개질은 다른 것들 중에서도, 아미노펩티다아제의 작용에 대해 특정 단백질을 안정화시키는 것으로 보고되거나(Guerra, P.I, et al. (1998) Pharm Res 15: 1822-1827), 단백질의 가공성을 개선시키는 것으로 보고되거나(Hinds, K., et al., (2000) Bioconjug Chem 11: 195-201), N-말단 아미노기의 하전을 감소시키는 것으로 보고되었거나, 또는 생성된 접합체의 동질성을 개선시키는 것으로 보고되었다(Kinstler, O., et al., 유럽 특허 공개 EP 제0822199 A2호; Kinstler, O., et al., (2002) Adv Drug Deliv Rev 54:477-488). 당연계에서 "천연 화학적 연결"로 알려진 방법의 채택에 의한 N-말단 시스테인 또는 히스티딘 잔기의 α 아미노기로의 중합체의 커플링에 대한 대체 방법이 개시되어 있다(Roberts, M.J., et al., PCT 공개 WO 제03/031581 A2호 및 U.S. 특허 출원 공개 제2003/0105224 A1호). 그러나, 일반적으로 이들 부류의 구성원을 선택하기 위해 적용할 수 있는 방법으로 수용체-결합 단백질의 "RN" 및 "RG"하위군의 존재 및 "RN" 수용체-결합 단백질의 예상외의 높은 기능적 활성을 보존하기 위해 이같은 수용체-결합 단백질의 중합체 접합체의 제조 및 사용은 이전에 인식된 바 없고, 기술되지 않았었다.

[0077] 따라서, 주어진 사이토카인, 케모카인, 성장 인자 또는 폴리펩티드 호르몬이 리간드의 수용체 결합 부위(들)로부터 떨어져 있는 N-말단 및(또는) 당질화 부위(들)를 갖는지를 결정하는것에 대한 이점이 있다. 주어진 사이토카인, 케모카인, 성장 인자 또는 폴리펩티드가 중합체와의 리간드의 결합 전에 "RN" 또는 "RG" 리간드 인지를 예측하는 능력은 중합체-리간드 접합체(예를 들어, 중합체, 예를 들어 PEG와 결합된, 사이토카인, 케모카인, 성장 인자, 폴리펩티드 호르몬 또는 이들의 길항물질)를 생성하는데 요구되는 실험을 실질적으로 감소시키는데, 여기서 접합체의 항원성 및 면역원성이 결합되지 않은 리간드의 항원성 및/ 면역원성에 비하여 감소되지만, 결합된 리간드의 수용체-결합 및 생리학적 활성을 실질적으로 감소시키지는 않는다.

[0078] 따라서, 추가의 실시태양에서는, 본 발명은 단백질 리간드의 수용체-결합 부위로부터 떨어진 N-말단 및(또는) 당질화 부위(들)를 갖는 수용체-결합 단백질 리간드(예를 들어, 사이토카인, 케모카인, 성장 인자, 폴리펩티드 호르몬 및 이들의 길항물질)를 동정하고 선택하는 방법을 제공한다(즉, "RN" 또는 "RG" 단백질 동정 및 선택 방법). 본 발명의 그러한 특정 실시태양에서는, 하나 이상의 중합체(예를 들어, 하나 이상의 PEG)의 결합을 위한 최적 위치는 분자 모델링, 예를 들어 단백질(사이토카인, 케모카인, 성장 인자, 폴리펩티드 호르몬 또는 이들의 길항물질)의 3-차원 구조를 분자 모델링 소프트웨어를 이용하여 가시화함에 의해 단백질의 생물학적 또는 수용체-결합 활성의 실질적 손실 없이 하나 이상의 중합체가 단백질에 부착될 수 있는 위치를 예측하여 결정할 수 있다(Schein, C.H.의 상기 문헌 참조). 유사한 접근법이, 예를 들어, 단백질 분해 소화에 대한 내성을 개선시키는 시도에서 G-CSF에 대한 PEG의 결합에 대하여 실행되었다(공개된 미국 출원 2001/0016191 A1(T.D. Osslund) 참조, 그 개시내용 전문이 본 명세서에 참고로 인용됨). 본 발명에 사용하기에 적합한 분자 모델링 소프트웨어(예를 들어, RASMOL(Sayle, R.A. 등의 상기 문헌) 및 단백질 데이터 뱅크(PDB; Laskowski, R.A.의 상기 문헌)에 기탁된 거대분자 구조의 데이터베이스를 발생시키는데 사용된 기타 프로그램)는 당연계에 공지되어 있고 당연계의 숙련자에게 익숙할 것이다. 상기 분자 모델링 소프트웨어를 사용하여, 폴리펩티드, 예를 들어 사이토카인, 케모카인, 성장 인자, 폴리펩티드 호르몬 또는 이들의 길항물질의 3차원 구조를 예측할 수 있거나 리간드 및 이들의 수용체의 결정학 분석에 기초하여 고도의 확실성을 갖고 결정될 수 있다. 이러한 방식으로, 당업자는 용이하게 어느 리간드가 본 발명에 따라 사용하기에 적합한 "RN" 또는 "RG" 리간드인지 결정할 수 있다.

[0079] 본 발명을 실시하기 위하여, 단백질의 N-말단 아미노산 잔기의 알파 아미노기에 수용성 중합체를 공유적으로 커플링시키는 통상적인 경로는, 예를 들어 미국특허 제4,002,531호(G.P.Royer)에 청구된 바와 같은, 그러나 미국특허 제5,252,714호(J.M Harris 등)에서 청구된 것은 아닌, 단일 알데히드기를 지니는 중합체로 형성된 쉬프 염기(Schiff's base)의 환원적 알킬화에 의하는데, 이것은 후자가 알데히드기를 양 말단(end)에 유도체

화된 중합체만 청구하고 있는데, 이것이 가교제이고 따라서 실질적 수용체-결합 활성을 보유한 장기활성(long-acting) 수용체-결합 단백질의 합성에 적합하지 않기 때문이다.

[0080] 수용체-결합 단백질의 N-말단 아미노산의 알파 아미노기에 대하여, 그 리신 잔기의 엡실론 아미노기로부터는 떨어져서 PEG-모노알데히드의 쉬프 염기를 환원적 알킬화를 시키는 것은 본 명세서에 그 전문이 참고로 인용되는 문헌[Proteins Amino Acids and Peptides as Ions and Dipolar Ions((1943), pp. 75-115 and pp. 116-139, Reinhold Publishing Corporation, New York)](J.T. Edsall)의 제4 및 5장의 개시내용에 기초하여, 다양한 방법에 의해 달성할 수 있다. 펩티드의 N-말단 아미노산의 알파 아미노기의 산 해리 상수("pKa")는 7.6 미만인 것으로 생각되지만, 펩티드 중의 리신 잔기들의 엡실론 아미노기의 pKa 값은 대략 9.5일 것으로 예상된다. 에드살(Edsall)의 상기 문헌(1943)은 알데히드는 "그의 등전점의 알칼리 쪽에서만" 아미노산의 아미노기와 결합될 것이라고 명백히 언급하고 있다.

[0081] 따라서, 당업계에서 용이하게 입수가능한 상기 문헌 및 정보에 기초하여, 통상적인 숙련자들은 (1) 단백질의 알파 아미노기와 알데히드의 선택적 반응은 9.5(단백질의 엡실론 아미노기의 대략적 pKa) 미만의 pH 범위에서 선호될 것이고; (2) 엡실론 아미노기를 갖는 알데히드의 반응속도는 반응 pH가 7.6으로 낮아진다면(단백질의 알파 아미노기의 대략적 pKa) 감소할 것이고; (3) 알파 아미노기를 갖는 알데히드의 반응 속도는 반응 pH가 7.6을 향해 낮아짐에 따라 엡실론 아미노기보다 낮게 감소할 것이고; (4) 알파 아미노기를 갖는 알데히드의 반응에 대한 선택성은 pH를 6.6으로 낮춤에 의해 다소 개선될 것이라는 것을 알 수 있을 것이다. 후자의 값이 대략 알파 아미노기의 pKa의 한 pH 단위 밑이고, 엡실론 아미노기의 pKa의 세 pH 단위 밑이기 때문에, 대략 10%의 알파 아미노기 및 0.1%의 엡실론 아미노기가 그의 반응성인 비양자화 상태에 있을 것이다. 따라서, pH 6.6에서, 비양자화 알파 아미노기의 분획은 비양자화 엡실론 아미노기 분획보다 100배 더 높다. 그러므로, 반응의 pH를 예를 들어 5.6(이론적으로 알파 아미노기의 1% 및 엡실론 아미노기의 0.01%가 그의 반응성인 비양자화 상태에 있게 되는 pH)으로 낮춤에 의해 얻어지는 선택성에서의 개선은 매우 적을 것이다. 따라서, 본 발명의 특정 실시태양에서는, 단백질 리간드(특히 사이토카인, 케모카인, 성장 인자, 폴리펩티드 호르몬 및 이들의 길항물질을 포함하는, "RN" 또는 "RG" 리간드)는 리간드(들)와 하나 이상의 중합체 사이의 혼합물을 pH 약 5.6 내지 약 7.6, pH 약 5.6 내지 약 7.0, pH 약 6.0 내지 약 7.0, pH 약 6.5 내지 약 7.0, pH 약 6.6 내지 약 7.6, pH 약 6.6 내지 약 7.0, 또는 pH 약 6.6에서 형성시킴에 의해 하나 이상의 중합체와 접합된다. 따라서, 본 방법들은 pH 약 5에서 리간드의 N-말단 아미노산 잔기들 상의 알파 아미노기에 대하여 중합체를 커플링시키는 당업계의 공지된 방법들(Kinstler, O., 등의 문헌[(2002) Adv Drug Deliv Rev 54:477-485], 유럽특허공개 EP 0 822 199 A2, 미국특허 제5,824,784호 및 제5,985,265호, Roberts, M.J., 등의 상기 문헌(2002), 미국특허출원 2002/0127244 A1(Delgado, C., 등))과 현저히 상이하다. 동일한 방식으로, 본 발명의 방법은 또한 pH 7.5에서 행해지는 트랜스글루타미나제를 사용하여 특정 단백질에 폴리(에틸렌 글리콜)의 알킬아민 유도체를 커플링하는데 사용된 효소적 방법(Sato, H.,의 문헌[(2002) Adv Drug Deliv Rev 54:487-504])과는 현저히 구분된다.

[0082] 결과의 쉬프 염기의 나트륨 시아노보로히드라이드 또는 피리딘 보란과 같은 순한 환원제로의 환원(문헌[(1982) Anal Biochem 124:272-278](Cabacungan, J.C. 등))은 생리학적 pH에서 단백질의 N-말단 알파 아미노기의 양전하를 보전하는 이차 아민 결합을 형성한다. 원 단백질과 같은 전하를 보유하는 그러한 결합은 예를 들면 아미드 결합(PCT 특허 공보 WO 02/49673 A2(Burg, J., 등), 유럽특허출원 EP 0 822 199 A2, 문헌[(1996) Pharm Res, 13:996-1002](Kinstler, O.B., 등), Kita Y. 등의 상기 문헌) 또는 우레탄 결합(미국특허 제6,042,822호(Gilbert, C.W., 등), 문헌[(2001) J Interferon Cytokine Res 21:1103-1115](Grace, M., 등), [(2002) Curr Pharm Des 8:2139-2157](Youngster, S., 등))의 형성에 의해 전하를 중화시키는 별법적 결합 화학보다 그 생물학적 활성을 더 잘 보전할 것이다.

[0083] N-말단 아미노산 잔기에 대한 중합체의 선택적 커플링에 대한 별법적 접근법은 당업계의 숙련자에게 공지되어 있다. 페리오데이트로 산화적으로 알데히드로 분리된 N-말단 세린 또는 트레오닌 잔기에 대하여 히드라지드, 히드라진, 세미카르바미드 또는 기타 아민-함유 중합체들을 커플링시키기 위한 방법(Dixon, H.B.F.의 상기 문헌, 미국특허 제5,362,852호(Geoghegan, K.F.), [(1996) Bioconjug Chem 7:38-44](Gaertner, H.F., 등), 미국특허 제6,423,685호(Drummond, R.J. 등))이 포함된다.

[0084] 적합한 중합체

[0085] 본 발명의 특정 실시태양에서는, 중합체가 생체활성 성분에 커플링되어 본 발명의 접합체를 생성하는 반응 동

안에 PEG와 같은 중합체에 의해 분자내 및 분자간 가교결합의 형성을 최소화하는 것이 바람직하다. 이것은 오직 한 말단(end)에서 활성화된 중합체(본 명세서에서 "단관능성 활성화 PEG" 또는 "단관능성 활성화된 PAG"로 지칭됨), 또는 이관능성 활성화된 중합체(선형 PEG의 경우 "비스-활성화 PEG 디올"로 지칭됨) 또는 다관능성 활성화된 중합체의 백분율이 약 30% 미만, 더 바람직하게는 약 10% 미만, 가장 바람직하게는 약 2%(w/w) 미만인 중합체 제제를 사용하여 이루어질 수 있다. 전체적으로 또는 거의 전체적으로 단관능성인 활성화 중합체의 사용은 하기한 것들 전부의 형성을 최소화할 수 있다: 개별 단백질 분자 내의 분자내 가교결합, "덤벨" 구조(중합체의 한 스트랜드가 두 단백질 분자를 연결), 및 더 큰 응집체 또는 겔.

[0086] 본 발명의 방법 및 조성물에 사용하기에 적합한 중합체의 활성화 형태는 당업계에 공지된 중합체의 임의의 선형 또는 분지된 단관능성 활성화 형태를 포함할 수 있다. 예를 들면, 약 1kDa 내지 약 100kDa 범위 내의 분자량을 갖는 것들(활성기의 질량 제외)이 포함된다. 분자량의 적합한 범위는 약 5kDa 내지 약 30kDa, 약 10kDa 내지 약 20kDa, 약 12kDa 내지 약 30kDa, 약 5kDa, 약 10kDa, 약 20kDa 또는 약 30kDa를 포함하지만 이에 한하지 않는다. 선형 PEG의 경우, 약 10kDa, 약 20kDa 또는 약 30kDa의 분자량은 각각 에틸렌 옥사이드 단량체 단위 약 230, 약 450 또는 약 680의 중합도(n)에 해당한다. 생체의 시험에 사용하기에는, 활성화 중합체의 분자량의 적합한 범위는 약 1kDa 내지 약 5kDa를 포함한다. 수용체-결합 단백질의 "RN" 및 "RG" 부류의 존재가 인식되기 오래 전에, 상대적으로 높은 분자량(즉, 약 20-30kDa 보다 큰 분자량)을 갖는 중합체에 치료적 단백질을 커플링시키는 이점이 먼저 관찰되었다는 것을 알아야 한다(그 전문이 본 명세서에 참고로 인용되는 PCT 공보 WO 89/01033 A1(1989. 2. 9. 공개)(Saifer, M., 등)).

[0087] 본 발명의 다른 실시태양에서는, 보유된 생체활성이 비정상적으로 높은 백분율을 갖는 수용체-결합 단백질의 접합체를 본 발명의 방법에 따라 약 1kDa, 약 2kDa 또는 약 5kDa의 단관능성 활성화 단백질을 커플링시켜 생체의, 예를 들어 세포 배양에서 사용하기 위해 제조할 수 있다. 그러한 생체의 응용의 경우, 이러한 더 낮은 범위의 분자량이 바람직할 수 있다.

[0088] 경우에 따라서, 선형 중합체는 한 말단(end) 또는 양 말단에서 반응성 기를 가짐에 의해, "반응성 중합체"를 생성시킬 수 있다. 본 발명의 특정 실시태양에서는, 참고로 전체가 본 명세서에 인용되는 미국특허 제 5,672,662호(J.M. Harris 등)에 개시된 PEG의 모노프로피온산 유도체의 N-히드록시숙신이미딜 에스테르, 또는 기타 N-히드록실숙신이미드-활성화 PEG-모노카르복실산을 사용하는 것이 바람직할 수 있다. 기타 특정 실시태양에서는, 미국특허 제5,006,333호(M. Saifer 등), 제5,080,891호, 제5,283,317호, 및 제5,468,478호에 기술된 바와 같이 PEG의 모노숙신이미딜 카르보네이트 유도체, 또는 상기 S.J. 켈리 등의 문헌, PCT 공보 WO 00/07629 A2 및 A3(L.D. Williams 등), 미국특허 제6,576,235호(L.D. Williams 등) 및 PCT 공보 WO 01/59078 A2(M.R. Sherman 등)에 개시된 바와 같은 PEG의 모노-p-니트로페닐 카르보네이트 유도체 중 어느 하나를 사용하는 것이 바람직할 수 있다. 더욱이, 다른 형태의 반응성 기를 단백질의 중합체 접합체를 합성하는데 사용할 수 있다. 이러한 유도체로는 PEG의 모노알데히드 유도체(미국특허 제4,002,531호(Royer, G.P.), 미국특허 제5,252,714호(Harris, J.M. 등)), PEG의 모노아민, 모노-트리브로모페닐 카르보네이트, 모노카르보닐이미다졸, 모노트리클로로페닐 카르보네이트, 모노-트리플루오로페닐 카르보네이트, 모노히드라지드, 모노히드라진, 모노세미카르바지드, 모노카르바제이트, 모노티오세미카르바지드, 모노요오도아세트아미드, 모노말레이미드, 모노-오르토피리딜 디술피드, 모노-옥심, 모노-페닐글리옥살, 모노-티아졸리딘-2-티온, 모노티오에스테르, 모노티올, 모노트리아진 및 모노비닐술폰 유도체가 있지만, 이에 한하지 않는다. 추가 실시태양에서는, 사이토카인, 케모카인, 성장 인자, 폴리펩티드 호르몬 및 이들의 길항물질을 그 전문이 참고로 본 명세서에 인용되는, 공유이며 계류중인 미국특허출원 10/669,597에 기술된 바와 같은 하나 이상의 중합체에 커플링될 수 있다.

[0089] 생체활성 성분

[0090] 상기한 바와 같이, 본 발명의 접합체는 하나 이상의 생체활성 성분에 공유적으로 결합된, 하나의 PAG 또는 PAO, 및 특히 PEG의 한 스트랜드를 포함한다. 하나 이상의 중합체(또는 그의 스트랜드)가 공유적으로 결합된 생체활성 성분은 본 명세서에서 "접합된 생체활성 성분" 또는 "변형된 생체활성 성분"로서 다양하고 균등하게 지칭된다. 이들 용어들은 본 명세서에서 공유적으로 결합된 중합체를 갖지 않는 생체활성 성분을 일컫는 "비접합된 생체활성 성분", "개시(initial) 생체활성 성분" 또는 "비변형된 생체활성 성분"과 구분된다. 그러나, 본 명세서에서 "Mock PEG화된"으로 지칭되는 생체활성 성분의 경우에서처럼, 생체활성 성분이 중합체의 부착에 관하여 "비접합된", "비변형된" 또는 "개시"일 수 있기 때문에, "비접합된", "비변형된" 또는 "개시" 생체활성 성분이 야생형 또는 원 분자와 비교시 다른 비-고분자 접합체 또는 변형물을 함유할 수 있고 본

발명에 따라 여전히 "비접합된", "비변형된" 또는 "개시"로 간주될 수 있다는 것을 이해해야 한다.

[0091] 용어 생체활성 성분 "안정화(stabilizing)"(또는 "안정화 방법" 또는 "안정화된 생체활성 성분")는 생체활성 성분이 본 발명의 방법에 따라 안정화된 것(즉, 중합체가 본 발명의 방법에 따라 공유적으로 결합된 생체활성 성분)을 가리킨다. 그러한 안정화된 생체활성 성분은 안정화되지 않은 생체활성 성분(즉, 중합체가 공유적으로 결합되지 않은 생체활성 성분)과 비교시 변경된 생화학 및 생물리학적 특성을 보일 것이다. 그러한 변경된 생화학 및 생물리학적 파라미터들, 특히 수용체-결합 단백질에 대한 것들 중에는, 단백질분해성 붕괴에 대한 감소된 경향 및 특히 특정 가혹 환경 또는 실험 조건하에서 인큐베이션하는 동안 수용체-결합 단백질의 활성의 유지가 포함될 수 있다. 본 발명의 특정 실시태양에서는, 변경된 생화학 및 생물리학적 파라미터들은, 예를 들어 생체내 순환에서의 증가된 반감기, 증가된 생체이용성, 증가된 생체의 작용기 등을 포함할 수 있다.

[0092] 그의 아미노 말단 또는 천연형이거나 돌연변이적으로 도입된 당질화 부위로부터 떨어진 분자의 부분과 관련된 생물학적(즉, 생리학적, 생화학적 또는 약학적) 활성을 갖는 임의의 수용체-결합 단백질(전형적으로 사이토카인, 케모카인, 성장 인자 또는 폴리펩티드 호르몬)는 본 발명에서 개시 성분으로서 적합하게 사용될 수 있다. 그러한 생체활성 성분으로는 펩티드, 폴리펩티드, 단백질 등이 있으나, 이에 한하지 않는다. 생체활성 성분은 그러한 펩티드, 폴리펩티드, 단백질 등의 단편, 뮤테인 및 유도체들, 특히 생물학적(즉, 생리학적, 생화학적 또는 약학적) 활성을 갖는 그러한 단편, 뮤테인 및 유도체들도 포함한다.

[0093] 본 발명에서 생체활성 성분으로서 유용한 적합한 펩티드, 폴리펩티드 및 단백질, 당단백질 등은 생체활성 성분의 수용체-결합 영역 또는 영역들로부터 떨어져 있고 중합체가 선택적으로 부착될 수 있는 하나 이상의 허용가능한 아미노기, 티올기 또는 기타 기를 갖는 임의의 펩티드, 폴리펩티드 또는 단백질 등을 포함한다. 그러한 펩티드, 폴리펩티드, 단백질, 당단백질 등은 사이토카인, 케모카인, 성장 인자 및 폴리펩티드 호르몬을 포함하는데, 이들은 임의의 다양한 구조를 가질 수 있다(Nicola, N.A.의 상기 문헌; Schiein, C.H.의 상기 문헌).

[0094] 예를 들어, 주목하는 적합한 펩티드, 폴리펩티드 및 단백질로는 4중 α -나선 다발을 포함하는 구조를 갖는 사이토카인의 군(장쇄 및 단쇄 아군 모두)이 있지만, 이에 한하지 않는다(검토를 위해, Schein, C.H.의 상기 문헌 참조). 그러한 다양한 4중 나선 다발 단백질들은 본 발명에 사용하기에 적합하며, 인터루킨, 예를 들면 IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12(p35 서브유닛), IL-13, IL-15 및 IL-17; 콜로니-자극 인자, 예를 들면 대식세포 콜로니-자극 인자(M-CSF) 및 과립구-대식세포 콜로니-자극 인자(GM-CSF; 문헌[Proteins 26:304-313 (1996)](Rozwarski, D.A. 등)); 인터페론, 예를 들면 IFN- α , IFN- β (IFN- β -1b 포함하지만 이에 한하지 않음) 및 컨센서스 IFN; 백혈병 억제 인자(LIF); 에리스로포이에틴(Epo); 트롬보포이에틴(Tpo); 거대핵세포 성장 및 발현 인자(MGDF); 줄기세포 인자(SCF)(당업계에서 스틸 팩터(Steel Factor)로도 알려짐)(문헌[(1994) Cell Immunol 157:118-131](Morrissey, P.J. 등); [(1995) J Leukoc Biol 58:14-22](McNiece, I.K. 등)); 온코스타틴 M(OSM); 포스포리파제-활성 단백질(PLAP); 신경영양 인자; 및 이들의 펩티드 모방물질을 포함하지만, 이에 한하지 않는다. 프롤락틴 및 성장 호르몬이 그들의 표적 세포 근처에서 일반적으로 생성되는 사이토카인과 달리 체내에 광범위하게 순환하는 전통적 호르몬이지만, 프롤락틴과 성장 인자는 4중 α -나선 다발을 갖는 사이토카인과 동일 구조군에 속하며(Nicola, N.A.의 상기 문헌; Goffin, V. 등의 상기 문헌), 이들은 마찬가지로 본 발명에 따른 중합체 커플링 및 접합체의 생산을 위한 적합한 표적들이다. 이들 펩티드, 폴리펩티드 및 단백질들의 유사체, 뮤테인, 길항물질, 변이체 및 유도체들도 또한 본 발명에서 사용하기에 적합하며 따라서 본 발명에 속한다.

[0095] 장쇄 β -시트 또는 β -배럴 구조군들의 수용체-결합 단백질(검토를 위해 Schein, C.H.의 상기 문헌 참조)도 본 발명의 접합체 및 조성물을 제조하는데 사용하기에 적합하다. 이들은 사이토카인의 종양 괴사 인자류, 예를 들면 TNF- α , TNF- β 및 β -젤리 롤 구조를 보이는 Fas 리간드; IL-1(IL-1 α 및 IL-1 β 포함) 및 베타-트레포일 폴드를 보이는 FGF류(염기성 섬유아세포 성장 인자(bFGF), 산성 FGF, FGF-4 및 각질세포 성장 인자(KGF; FGF-7)포함)(Schein, C.H. 등의 상기 문헌; Schlessinger, J. 등의 상기 문헌); IL-12; IL-16; 외피 성장 인자(EGF; Lu, H.S. 등의 상기 문헌); 및 혈소판 유도 성장 인자(PDGF), 전환 성장 인자(전환 성장 인자- α 및 전환 성장 인자- β (TGF- β) 포함) 및 시스틴-매듭 구조를 갖는 신경 성장 인자를 포함하지만, 이에 한하지 않는다. 이들 펩티드, 폴리펩티드 및 단백질의 유사체, 뮤테인, 길항물질, 변이체 및 유도체들도 본 발명에 사용하기에 적합하며, 따라서 본 발명에 속한다.

[0096] 본 발명의 접합체 및 조성물에 유리하게 사용되는 추가의 단백질 구조군은 이황화물-풍부 혼합 α/β 사이토카인, 케모카인 및 성장 인자(검토를 위해, Schein, C.H.의 상기 문헌 참조)의 군이며, 이것은 베타-굴곡 구

조를 갖는 EGF류; IL-8; RANTES; 호중구 활성 펩티드-2 (NAP-2); 기질세포(stromal cell)-유도 인자-1 α (SDF-1 α); 단핵세포 화학유인 단백질(MCP-1, MCP-2 및 MCP-3); 에오타신(예; 에오타신-1, 에오타신-2 및 에오타신-3); 골수 전구세포 억제 인자-1(MIPF-1); 뉴로타틴, 대식세포 이동 저지 인자(MIF); 성장-관련 종양유전자/흑색종 성장 자극 활성(GRO- α /MGSA); 소마토메딘; 및 인슐린 및 인슐린-유사 성장 인자(예; IGF-1 및 IGF-2)를 포함하지만, 이에 한하지 않는다. 본 발명의 접합체 및 조성물에의 용도의 단백질의 관련 구조군은 IL-12 및 간세포 성장 인자와 같은 성장 인자를 포함하는 모자이크 구조를 갖는 사이토카인이다(Nicola, N.A.의 상기 문헌 참조). 이들 펩티드, 폴리펩티드 및 단백질의 유사체, 뮤테인, 길항물질, 변이체 및 유도체들도 본 발명에 사용하기에 적합하며, 따라서 본 발명에 속한다.

[0097] 주목하는 기타 단백질은 성장 호르몬(특히 인간 성장 호르몬(hGH; Tchelet, A. 등의 상기 문헌 참조)) 및 이들의 길항물질(예를 들어, Sundstroem, M. 등의 상기 문헌 참조), 프롤락틴 및 이들의 길항물질, 융모막 고나도트로핀, 여포 자극 호르몬, 갑상선 자극 호르몬, 색소 호르몬, 각질세포 성장 인자, 시상하부 방출 인자, 항이노 호르몬 및 사이토카인의 수용체-결합 길항물질, 상기 모든 구조 군의 사이토카인 및 케모카인, 성장 인자 및 폴리펩티드 호르몬을 포함하지만, 이에 한하지 않는다. 다수의 그러한 단백질들은 당질화 및 비당질화 형태 둘 다에 존재한다. 비당질화 형태는 원핵세포에서의 재조합 DNA 기술을 이용하거나 화학적 합성을 이용하는 이들의 생성으로부터 얻어질 수 있다. 그러한 비당질화 생성물은 본 발명의 적합한 생체활성 성분인 펩티드 및 단백질에 속한다. 마지막으로, 일부 항체는 수용체-결합 작용물질 또는 길항물질로서 기능하지만(예를 들어, 문헌[(2000) Ann Rheum Dis 59 (Suppl 1):i109-i114](Morris, J.C. 등) 참조), 그러한 면역글로불린들은 본 발명의 범위에 속하는 N-말단 중합체 커플링을 위한 적합한 후보물질이 아니다. 즉, 이들은 가벼운 사슬 및 무거운 사슬의 아미노-말단 영역 둘 다 항원 인식에 관여하기 때문에, RN 수용체-결합 단백질이 아니다.

[0098] 본 발명의 중합체 접합체를 제조하는데 사용하기 위한 생체활성 성분으로서 특히 유용한 것은 인터페론-알파, 인터페론-베타(IFN-베타-1b 포함), IL-2, IL-4, IL-10, TNF-알파, hGH, 프롤락틴, 인슐린, IGF-1, EGF, bFGF 및 에리스로포이에틴(Epo)이다. 또한, 상기 생체활성 성분들의 뮤테인 및 단편, 특히 상응하는 야생형 또는 변형되지 않은 폴리펩티드에 대한 수용체에 결합할 수 있는 것들도 이 결합이 생물학적 또는 생리학적 효과를 유도하는 하지 않든, 특히 유용하다. 그러한 특정 실시태양에서는, 생체활성 성분의 뮤테인 및 단편은, 그들의 수용체에 대한 리간드의 결합 및(또는) 그들의 표적 세포, 조직 및(또는) 기관 상의 리간드의 활성을 실질적으로 감소시키거나 완전히 억제하는, 상응하는 리간드에 대한 길항물질로서 작용할 수 있다. 주목하는 리간드의 구조적 유사체, 뮤테인, 변이체 또는 유도체이거나 아닐 수 있는 기타 길항물질도 본 발명에 따른 접합체의 제조에 적합하다. 실제로, 주어진 뮤테인, 단편, 변이체, 유도체 또는 길항물질이 주어진 리간드의 생물학적 및(또는) 생리학적 효과를 길항하는지의 여부는 과도한 실험 없이, 당업계에 공지되고(되거나) 본 명세서에 기술된 다양한 리간드 자체의 생물학적/생리학적 효과에 대한 분석법을 이용하여 결정할 수 있다.

[0099] 본 발명에 따라 유리하게 사용되는 주목하는 이러한 폴리펩티드 및 기타 폴리펩티드에 대한 구조(일차, 이차, 삼차 및 가능한 경우 사차)는 당업계에 공지되어 있고 통상의 숙련자에게 친숙할 것이며, 특히 본 명세서에 제공된 구조의 관점 및 그 전문이 참고로 인용되는 본 명세서에 인용된 참고 문헌들로부터 그러할 것이다.

[0100] 접합체

[0101] 본 발명은 다양한 응용예에 사용하기 위한, 안정한 생체활성 성분의 접합체, 특히 사이토카인, 케모카인, 성장 인자 및 폴리펩티드 호르몬의 접합체를 제공한다. 그러한 본 발명의 접합체들은 하기 당업계 공지 접합체와의 비제한적이며 예시적인 비교에 의해 알 수 있듯이, 당업계에 이전에 공지된 것들에 대하여 많은 이점들을 가진다:

[0102] H. 히라타니(유럽특허 EP 0 098 110 B1 및 미국특허 제4,609,546호)는 수용체 결합에 포함된 단백질의 영역을 회피하는 것에 대한 선택을 전혀 개시하지 않고, 인터페론 및 인터루킨을 포함하는 단백질과의 에틸렌 옥사이드 및 프로필렌 옥사이드의 공중합체("PEG-PPG", PAG의 포괄적 군의 일원)의 접합체를 개시한다. 이러한 참고 문헌들에서는, 인터페론-감마는 이 사이토카인의 수용체-결합 영역 내에 아미노 말단이 있기 때문에 N-말단 커플링을 위한 적합한 표적으로 간주되지 않는 본 발명과는 달리, 인터페론 알파, 베타 및 감마를 PAG의 커플링을 위한 균등 표적물로 간주하고 있다. 또한, 히라타니는 1 kDa 내지 10 kDa의 PAG만으로 합성된 접합체를 개시하고 있는 반면, 본 발명의 방법은 치료적 응용을 위해 10 kDa를 초과하는 분자량을 갖는 수용성 합성 중합체의 커플링을 선호한다. 유사하게, N.V. 카트레(문헌[(1990) J Immunol 144:209-213])는 인간 제조

합 인터루킨-2에 대한 다수의 5-kDa mPEG의 스트랜드의 커플링이 생쥐 및 토끼의 혈류에서 생성 접합체의 수명을 증가시킨다는 것을 개시하고 있다. 그러나, 본 참고문헌은 본 발명에 의해 제공된 바와 같은, PEG의 더 소수의 더 긴 스트랜드를 커플링하거나 IL-2의 아미노 말단에 대한 고분자량 PEG의 단일 스트랜드를 커플링하는 이점을 개시하거나 인식하고 있지 않다.

[0103] G. 샤우(미국특허 제4,904,584호 및 PCT 공보 WO 89/05824 A2)는 표적 단백질, 특히 Epo, G-CSF 및 IL-2에 리신 잔기를 도입, 치환 또는 제거함에 의해 아민-반응성 중합체의 부위-선택적 부착을 유도하기 위한 방법을 개시한다. 그러나, 본 발명의 개시와는 달리, 이들 참고문헌들은 아민-반응성 중합체가 리신 잔기의 엡실론 아미노기와 다른 표적 단백질 중의 임의의 아민과 반응할 수 있다는 것을 개시하지 않으며, 이러한 개시는 본 발명과 명확히 구분된다.

[0104] D.E. 니테키 등(미국특허 제4,902,502호)은 리신 잔기의 엡실론 아미노기와 반응시키고자 하는 PEG의 다양한 클로로포르메이트 유도체로부터 제조된 다중 PEG화된 IL-2 접합체를 개시한다. 그러나, 본 발명과 대조적으로, 이 참고문헌은 수용체 결합에 포함되는 IL-2 단백질의 영역 중의 리신 잔기의 PEG화를 회피하는 방법을 개시하지 않으며, 그러한 부위의 회피가 이점이 있다는 인식이 전혀 없다.

[0105] N. 카트레 등(미국특허 제5,206,344호)은 PEG가 리신 잔기의 엡실론 아미노기에 커플링되거나, 125 위치(아미노 말단으로부터 계산)에서 천연형 시스테인 잔기의 짝을 이루지 못한 술포히드릴기에 커플링되거나, IL-2의 아미노 말단으로부터 첫번째와 12번째 잔기 사이에 돌연변이적으로 도입된 시스테인 잔기의 술포히드릴기에 커플링된, PEG IL-2 접합체를 개시한다. 상기 특허에 개시된 류테인 중에는 "des-ala-1" IL-2, 즉 아미노-말단 알라닌이 제거되고 PEG화되지 않은 류테인이 포함된다. 그러나, 본 발명의 개시와는 대조적으로, 상기 특허는 수용체와의 결합에 포함되는 아미노산 잔기에 대한 PEG의 커플링을 회피하는 방법을 전혀 개시하고 있지 않으며, 그러한 접근법이 이점이 있을 것이라는 인식도 없다. 이러한 점에 따라, 본 발명과 대조적으로, 상기 특허에 제공된 광범위한 부착 지점은 IL-2의 아미노 말단에 대한 PEG의 커플링이 특히 유리하다는 것을 제시하지 않는다.

[0106] 문헌[(1997) Anal Biochem 247:434-440](S.P. Monkarsh 등) 및 [(1997) Harris, J.M., et al., eds., Poly(ethylene glycol):Chemistry and Biological Applications, pp. 207-216, American Chemical Society, Washington, D.C.](S.P. Monkarsh 등)는 분자량 5,300 달톤을 갖는 활성화 PEG의 3배 몰 과량과 인터페론-알파-2a를 반응시키는 것이 인터페론-알파-2a 중의 11 리신 잔기들에 상응하는 모노PEG-인터페론의 11 위치 이성질체를 제공한다는 것을 개시한다. PEG가 인터페론의 아미노 말단의 알파 아미노기에 커플링되는 PEG-인터페론은 전혀 보고되지 않았다. 이들 참고문헌에 보고된 11 위치 이성질체는 비변형 인터페론의 6% 내지 40% 범위의 세포 배양물에서의 항바이러스 활성을 보였고 비변형 인터페론의 9% 내지 29% 범위의 세포 배양물에서의 항증식성 활성을 보였다. 이러한 결과는 이 연구자들에 의해 실행된 리신 잔기들의 랜덤한 PEG화가 본 발명의 방법에 의해 제조된 접합체와 대조적으로 그 수용체에 의해 매개된 인터페론-알파-2a의 기능과 간섭하였다는 것을 명백히 보여준다. 또한, 본 발명의 접합체와는 달리, 이들 문헌에 보고된 접합체에는 N-말단으로 PEG화된 인터페론이 없다.

[0107] O. 니시무라 등(미국특허 발명의 법정등록 제H1662호)은 pH 7.0(인터페론 접합체의 경우) 또는 pH 7.15(IL-2 접합체의 경우)에서 나트륨 시아노보로히드라이드로의 활성화 "폴리에틸렌 글리콜 메틸 에테르 알데히드"의 환원적 알킬화에 의해 제조되는 인터페론-알파, 인터페론-감마 및 IL-2의 접합체를 개시한다. 그러나, 상기 방법에 의해 제조된 접합체들은 명백히 모두 리신 잔기의 엡실론 아미노기인 것으로 보고된 중합체 부착의 다중 부위의 존재 때문에 비변형된 단백질의 생체활성의 95%까지 상실하는 것으로 보고되었다(본 발명의 도 1 및 4 참조).

[0108] D.K. 페티트 등의 상기 문헌은 인터루킨-15("IL-15")의 중합체 접합체를 개시한다. 그러나, 이 문헌에서 보고된 접합된 IL-15는 수용체 결합에 포함된 단백질의 영역 중의 리신 잔기에 중합체가 커플링된 결과 그의 IL-2 유사 성장-촉진 능력을 상실할 뿐 아니라, 또한 작용성이라기보다는 길항성을 나타낸다. 이 문헌의 저자들은 몇몇 세포 표면 수용체중 하나에 IL-15 결합의 선택적 억제가 중합체 접합의 결과일 수 있다고 결론짓고, 그러한 억제는 수용체 결합을 감소시킬뿐 아니라 단백질의 생물학적 효과를 역전시킬 수 있다고 결론내리고 있다. 그의 수용체와의 상호작용에 포함된 수용체-결합 단백질의 부분들에 대한 중합체의 커플링을 회피함에 의해, 본 발명은 이러한 바람직하지 못한 중합체 커플링의 결과를 회피한다.

[0109] J. 하키미 등(미국특허 제5,792,834호 및 제5,834,594호)은 보고된 바에 의하면 면역원성을 감소시키기 위해 제조되었고, 가용성을 증가시키고, 각 단백질의 생물학적 반감기를 증가시키는, 인터페론-알파, IL-2, 인터루

킨-1("IL-1") 및 IL-1-수용체의 길항물질을 포함하는, 단백질의 우레탄-결합된 PEG 접합체를 개시한다. 이들 문헌에서는, N-말단 PEG화에 대한 언급 및 N-말단 알파 아미노기가 PEG화될 수 있거나 되어야한다는 개시내용 없이, PEG가 "다양한 유리 아미노기"에 커플링되었다. 이들 특허는 또한 개시된 접합체가 출발 단백질의 원 생물학적 활성의 "적어도 일부를 가짐"을 언급하고, 따라서 실질적인 생체활성의 손실 가능성을 나타낸다. 이 결과는 개시된 비표적화 PEG화 방법의 용도와 일치할 것이다. 본 발명과 대조적으로, 이들 특허는 개시된 PEG화 공정의 선택도를 변경함에 의해 그의 접합체의 생체활성의 보유를 개선하는 어떠한 시도도 개시하고 있지 않다.

[0110] O.B. 킨슬러 등(유럽특허출원 공보 EP 0 822 199 A2)은 폴리펩티드, 특히 이 특허 출원의 양수인인 암젠 인크(Amgen, Inc.)에 의해 제조된 단백질 중 2 개인, 킨센서스 인터페론 및 G-CSF의 아미노 말단에서 아미노산의 알파 아미노기를 갖는 폴리(에틸렌 글리콜)을 반응시키는 방법을 개시한다. 이 공보는 "알파 아미노기를 선택적으로 활성화하기에 충분히 산성인 pH"가 개시된 공정의 필요적 특징이라고 지적하고 있다. 대조적으로, 본 발명에 의하면 pH를 낮추는 것이 PEG 알데히드를 갖는 아미노기의 반응성을 감소시키고 알파 아미노기가 양자화되지 않았을 때, 즉 그의 pKa보다 높은 pH에서 더 반응성이라는 것이 밝혀졌다. 따라서, 본 발명자들은 본 발명의 임의의 RN 사이토카인의 "알파 아미노기를 선택적으로 활성화하기에 충분히 산성인" pH는 없다는 것을 발견하였다. J.T. 에드살(상기 문헌) 및 R.S. 라르센 등(문헌 [(2001) Bioconjug Chem 12:861-869])에 의해 제공된 알데히드를 갖는 N-말단 알파 아미노기의 반응성의 pH 의존성의 설명이 본 발명자들의 경험과 더 잘 들어맞는다. 나아가, 킨슬러 등은 단백질 분해효소에 의한 분해로부터 아미노 말단의 보호 및 생성 접합체의 증가된 동질성을 위한 폴리펩티드의 N-말단 PEG화의 용도를 보고하지만, N-말단 PEG화가 특정 수용체-결합 단백질(예를 들어 PCT 공보 WO 96/11953, 유럽특허 EP 0 733 067 및 미국특허 제5,770,577호, 제5,824,784호 및 제5,985,265호(전부 Kinstler, O.B. 등) 참조)의 수용체-결합 활성의 더 큰 분획을 보전할 수 있다는 것을 개시하지 않는다.

[0111] 킨슬러 등의 유럽 출원(EP 0 822 199 A2)는 또한 모든 폴리펩티드에 대한 N-말단 PEG화의 이점을 일반화하는데, 이것은 본 발명자들이 경험한 바 없다. 구체적으로는, 항체 단백질(Chapman, A.P. (2002) Adv Drug Deliv Rev 54:531-545)의 항원-결합 영역 근처에서 항체 분자의 아미노 말단이 발생하기 때문에, 항체의 N-말단 PEG화는 라르센 등의 상기 문헌에 개시된 바와 같이 리신 잔기의 랜덤한 PEG화와 비교시, 예상밖으로 생체 활성에 대해 유해하다. 유사하게, "RN" 수용체-결합 단백질, 예를 들어 인터페론-감마(도 8 참조)가 아닌 수용체-결합 단백질의 N-말단 PEG화는 그러한 수용체-결합 단백질의 리신 잔기의 랜덤한 PEG화보다 수용체와의 상호작용의 억제자가 더 많을 것으로 기대된다.

[0112] 따라서, 상기한 바와 같이, 본 발명의 방법들은 본 발명의 접합체들이 pH 약 5.6 내지 약 7.6에서, pH 약 5.6 내지 약 7.0, pH 약 6.0 내지 약 7.0, pH 약 6.5 내지 약 7.0, pH 약 6.6 내지 약 7.6, pH 약 6.6 내지 약 7.0, 또는 pH 약 6.6에서 하나 이상의 중합체와 리간드(들)의 사이에 혼합물을 형성하여 하나 이상의 중합체와 RN 수용체-결합 단백질로서 선택된 하나 이상의 사이토카인, 케모카인, 성장 인자, 폴리펩티드 호르몬 또는 이들의 길항물질을 접합시켜 제조된다는 점에서 본 명세서에 인용된 공보에서 킨슬러 등에 의해 개시된 것들과 구분된다. 대조적으로, 킨슬러 등의 방법은 pH 5.5 미만에서 리간드의 접합에 의존하는데, 이 pH 범위는 본 발명자들에 의해 떨어진 N-말단 아미노산 및(또는) 떨어진 당질화 부위에서 중합체와 선택적으로 접합된 리간드의 제제를 제조하는 경우 차선이거나 열등한 것으로 밝혀졌다.

[0113] R.B. 페핀스키 B. 등(PCT 공보 WO 00/23114 및 미국특허 출원 공보 2003/0021765 A1)은 항바이러스 분석에서 비당질화 인터페론-베타-1b보다 더 활성인 당질화 인터페론-베타-1a의 중합체 접합체를 개시한다. 이 참고문헌은 또한 당질화 단백질의 아미노 말단, 카르복실 말단 및 탄수화물 부분을 포함하는, 다양한 부위들에서의 다양한 커플링 기들을 통하여 폴리알킬렌 글리콜이 인터페론-베타-1a에 커플링될 수 있다는 것을 개시한다. 그러나, 이 공보에서는 기술된 방법이 다른 단백질들로 일반화될 수 있다는 것을 개시하지 않는다: "이 연구들은, 인터페론-베타-1a와 인터페론-베타-1b 사이의 서열에서의 보전에도 불구하고, 이들이 구분되는 존재이고 따라서 인터페론-베타-1b에 대하여 알려진 것들의 대부분이 인터페론-베타-1a에 적용할 수 없거나, 또는 그 반대의 경우도 같음을 지적한다". 대조적으로, 본 발명은 본 명세서에 정의된 바와 같이 "RN" 및 "RG" 수용체-결합 단백질에 구체화된 공통 특징들을 개시한다. 본 발명에 따라, 인터페론-베타-1a 및 인터페론-베타-1b 둘 다 "RN" 수용체-결합 단백질이다. 또한, 인터페론-베타-1b는 "RG" 수용체-결합 단백질이다. 따라서, WO 00/23114의 방법과 대조적으로, 본 발명의 방법은 인터페론-베타-1b 및 인터페론-베타-1a 둘 다의 안정한 생체활성 접합체를 제조하는데 유용하다.

[0114] Z. 바이(Wei) 등(미국특허 제6,077,939호)는 폴리펩티드(특히 에리트로포이에틴)의 N-말단 알파 탄소 원자에

수용성 중합체(특히 PEG)를 커플링하는 방법을 개시하는데, 여기서 N-말단 아미노산의 알파 탄소에서 아민을 우선 알파 카르보닐기로 아미노전달반응을 시킨 다음 PEG 유도체와 반응시켜 옥심 또는 히드라존 결합을 형성한다. 이 문헌의 개시된 목적이 일반적으로 단백질에 적용가능한 방법을 개발하는 것이므로, 특정 수용체-결합 단백질의 PEG화 부위로서 아미노 말단의 선택으로부터 초래될 수 있는 수용체-결합 활성의 보전은 전혀 고려하고 있지 않다. 따라서, 바이 등의 개시와 대조적으로 본 발명은 N-말단 알파 아미노기의 제거를 요구하지 않지만, 대조적으로 단백질과 중합체 사이에 이차 아민 연결의 형성을 통하여 중성 pH에서 N-말단 알파 아미노기의 전하를 보전할 수 있다.

[0115] C.W. 길버트 등(미국특허 제6,042,822호, 유럽특허 EP 1 039 922 B1)은 특히 바람직한 이성질체가 인터페론-알파-2b의 히스티딘 잔기, 특히 히스티딘-34에 커플링된 PEG를 갖는, 히스티딘-34에 대한 PEG 연결이 불안정한 PEG-인터페론-알파-2b의 위치 이성질체의 혼합물이 바람직함을 개시한다. 히스티딘-34가 신호전달과정을 촉발하기 위하여 인터페론 수용체와 친밀한 접촉이 되어야하는 영역의 인터페론-알파-2b의 표면에 있기 때문에(본 명세서 도 1b 참조), 이 참고문헌에 개시된 PEG와 히스티딘-34 사이의 연결의 불안정성은 개시된 PEG-인터페론 접합체의 기능에 매우 중요한 것으로 보인다. 실질적으로 순수한 히스티딘-연결 단백질 중합체 접합체들은 미국특허 제5,985,263호(S. Lee 등)에 의해 기술되었다. 대조적으로, 본 발명은 한 바람직한 접합체는 PEG가 인터페론 성분의 수용체-결합 도메인으로부터 떨어진 부위에서 안정적으로 연결된 PEG-인터페론 접합체임을 증명한다.

[0116] P. 바일론 등의 문헌[(2001) Bioconj Chem 12:195-202)]은 인터페론 분자 당 40 kDa 디-mPEG-리신의 한 분자로 PEG화된 인터페론-알파-2a는 4개의 주 위치 이성질체로 구성된다는 것을 개시한다. 이 문헌은 거의 모든 PEG가 각각이 인터페론-알파-2a의 수용체-결합 도메인(바일론 등에 따르면 잔기 29-35 및 123-140; 본 명세서 도 1a 참조)에 인접하거나 안에 있는 리신 31, 121, 131 또는 134에 아마이드결합에 의해 부착되었음을 개시한다. N-말단 PEG화는 바일론 등에 의해 보고되지 않았다. 생체의 마딘-다비(Madin-Darby) 소 신세포의 수포성 구내염 바이러스 감염에 대한 PEG-인터페론의 위치 이성질체의 단리된 혼합물의 항바이러스 활성은 시험한 비접합 인터페론-알파-2a의 7%로 보고되었다. 따라서, N-말단 PEG화 인터페론을 포함하지 않는 이들 PEG-인터페론 접합체에 대하여 관찰된 생체활성의 실질적 손실은 본 발명의 것들로부터 바일론 등의 접합체를 뚜렷이 구분되게 한다.

[0117] R.B. 페핀스키 등의 문헌[(2001) J Pharmacol Exp Ther 297:1059-1066)]은 (1) N-말단 메티오닌 잔기를 갖는 당질화 인터페론-베타-1a 및 (2) 20 kDa PEG-알데히드로부터의 접합체의 합성을 개시한다. N-말단 메티오닌에서 단일PEG화되는 것으로 상기 문헌에 언급된 접합체는 항바이러스 분석에서 완전 생체활성을 보유하는 것으로 언급되는 반면, 더 고분자량의 PEG 커플링은 항바이러스 활성을 감소시키거나 제거하였다. 이 문헌의 저자들은 그들의 당질화 인터페론-베타-1a의 PEG화를 위한 N-말단 부위의 선택이 부위-선택적 PEG화 반응시약 및 분자 모델링의 허용성을 따랐음을 개시하고 있지만, 이들은 "일부 효과는 생성물 특이적이다"라는 것을 인정한다. 더욱이, 본 발명과 대조적으로, 문헌에 보고된 관찰들은 "RN" 수용체-결합 단백질로서 본 명세서에 정의된 수용체-결합 단백질 군을 포함하도록 일반화되지 않았다.

[0118] J. 버그 등(PCT 공보 WO 01/02017 A2)은 에리스로포이에틴 당단백질의 알콕시PEG 접합체의 생성을 개시하는데, 여기서 메톡시PEG의 1개 내지 3개의 스트랜드가 당단백질의 표면에 리신 잔기들의 엡실론 아미노기의 변형에 의해 화학적으로 도입된 술폰히드릴기와 반응되었다. 그러나, 본 발명과 대조적으로, 이 문헌은 에리스로포이에틴의 N-말단 아미노산의 유리 알파 아미노기에 PEG를 커플링시키거나 에리스로포이에틴 수용체와의 상호작용에 필수적인 에리스로포이에틴 당단백질의 영역의 리신 잔기들을 변형시키는 것을 회피하는 시도를 전혀 개시하지 않는다.

[0119] J. 버그 등(PCT 공보 WO 02/49673 A2)은 PEG화 전 및 당단백질의 리신 잔기의 모든 엡실론 아미노기들의 가역 시트라코닐화 후에 분열되는 선택적으로 분리될 수 있는 N-말단 펩티드 연장을 이용하는 방법에 의해 천연 및 유제인 에리스로포이에틴 당단백질의 N-말단 아마이드-연결 PEG 접합체의 합성을 개시한다. 이 문헌에서 개시된 다단계 공정을 위한 이론적 근거는 N-말단 아미노산의 유리 알파 아미노기에 대하여 PEG화 공정을 선택적으로 만들어 균질화 단일PEG화된 접합체를 생성시켜 다중 PEG화된 유도체로부터 단일PEG화된 접합체를 분리할 필요성을 피하는 것이다. 이 방법은 하기한 점들을 포함하지만 이에 한하지 않는 다수의 중요한 관점에서 본 발명과 다르다: (1) 버그 등의 접근법이 알콕시PEG가 아마이드결합을 통해 연결되는 에리스로포이에틴 당단백질로 제한되지만, 본 발명은 다양한 합성 중합체를 사용하여 접합된 다양한 생체활성 성분들에 적용가능하고, (2) 본 발명은 당질화 및 비당질화 "RN" 및 "RG" 수용체-결합 단백질 모두에 대하여 적용되는 반면, 버그 등은 단지 당단백질의 접합만을 개시하고, (3) 본 발명은 알콕시PEG(예, mPEG) 및 일관능성-활성 히드록시PEG

들 다 포함하는 반면, 버그 등은 알콕시PEG의 용도만을 개시하고, (4) 본 발명에서는, 중합체와 단백질 간의 이차 아민 연결이 버그 등에 의해 사용된 아미드 연결보다 아미노기에 대한 양전하를 보전하고 더 안정하기 때문에, 후자보다 바람직하다. 동일기로부터 유사한 작업에서, J. 버그 등(미국특허 제6,430,742호)은 에리스로포이에틴 당단백질의 아미드-연결 접합체의 생성을 개시하는데, 여기서 알콕시PEG의 1개 내지 3개의 스트랜드가 단백질의 1개 내지 3개의 아미노기에 연결된다. 그러나, 본 발명과 대조적으로, 이 문헌은 수용체들과의 상호작용에 포함되는 영역 내가 아닌 아미노기에 대하여 또는 N-말단 아미노산의 알파 아미노기에 대하여 바람직한 점이 없음을 보고한다.

[0120] C. 텔가도 등(미국특허 제6,384,195호)은 트레실 모노메톡시PEG로서 표현되고 문헌에서 "TMPEG"로 칭하는 반응성 중합체를 사용하여 제조된 과립구-대식세포 콜로니-자극 인자의 접합체를 개시한다. 이 문헌은 TMPEG가 제조함 인간 GM-CSF와 접촉시, "변형된 물질은 활성이 없는 중 및 비변형된 물질보다 활성이 더 높은 종들을 함유한다"고 지적한다. 당업계의 숙련자라면 쉽게 인지할 수 있듯이, 활성이 없는 종들은 중합체-생체활성 성분 접합체의 혼합물에서, 특히 상기 접합체를 포함하는 치료적 용도를 위한 조성물에서 바람직하지 못하며, 이것은 투여가 유익한 효과에는 기여하지 않고 요구되는 환자에 접합체를 투여하는 위험에 기여할 수 있기 때문이다. 본 명세서에 언급된 바와 같이, 본 발명은 그 수용체-결합 활성에 포함된 단백질 상의 부위들에서 GM-CSF 및 기타 수용체-결합 단백질의 변형을 회피하여 활성이 없는 종들의 합성을 감소시키거나 제거함에 의해 적어도 부분적으로 당업계의 이러한 제한을 극복한다. 본 발명은 또한 중합체에 의한 단백질 상의 전하 보호의 상이한 크기, 상이한 전하 및(또는) 상이한 정도를 갖는 접합체들의 분류 및 정제 방법을 제공한다(도 9 내지 12 참조).

[0121] 미국특허 제6,384,195호는 GM-CSF의 N-말단 PEG화를 언급하지 않아 본 발명의 방법의 이점들을 인식하지 못한다는 것은 주목할 가치가 있다. 마지막으로, 미국특허 제6,384,195호는 그 PEG 분자들이 GM-CSF 분자에 부착되는 곳(리신 잔기에 접합되지 않음)을 고려하지 않고, 하나 이상의 PEG가 GM-CSF의 각 분자에 커플링되는 접합체에 대한 바람직함을 지적한다. GM-CSF 당 최대 여섯개의 PEG 분자들을 갖는 접합체를 바람직하다고 함에 의해, 이 문헌은 모든 가능한 리신 잔기에 PEG가 부착될 수 있어, PEG가 그 세포-표면 수용체의 입체장애로 가까이 접근하지 못하는 위치에 부착될 것을 확보하는 접합체에 대한 바람직함을 언급한다(본 명세서의 도 3 참조). 대조적으로, 본 발명은 리신 잔기들이 신호전달을 위해(작용물질의 경우) 또는 신호전달을 경쟁적으로 억제하기 위해(길항물질의 경우) 수용체와의 상호작용에 필수적인 수용체-결합 단백질의 도메인들로부터 떨어진 경우를 제외하고, 리신 잔기에 PEG를 커플링시키는 것은 바람직하지 못함을 지적한다.

[0122] PCT 공개 번호 제 WO 02/32957 A1호(T. Nakamura 등)은 에리스로포이에틴 당단백의 52번 위치에서 리신 잔기의 엡실론(epsilon) 아미노기에 커플링된 PET의 분자량 증가가 생체내(in vivo)에서 접합체의 에리스로포이에틴 효과를 증가시키는 반면 에리스로포이에틴 수용체에 대한 접합체의 친화도를 감소시킴을 개시한다. 그러나, 본 발명과 달리, 상기 문헌은 아미노 말단에서 또는 당질화 부위 근처에서 PEG의 커플링을 개시하지도 않으며, 이렇게 하는 임의의 잇점을 인식하지 못한다.

[0123] 따라서, 본 발명은 종래 개시된 것에 비하여 상이한 구조 및 기능적 잇점을 갖는 합성 폴리머에 커플링된 생체활성 성분의 접합체 및 이의 접합체의 합성 방법을 제공한다.

[0124] 조성물

[0125] 본 발명은 1 이상의 PEG와 같은 1 이상의 안정화 폴리머에 커플링된 1 이상의 생체활성 성분 (적합하게는 1 이상의 사이토카인, 케모카인, 성장 인자 또는 폴리펩티드 호르몬)을 포함하는 접합체 또는 복합체를 제공한다. 통상적으로, 상기 접합체는 본원에 개시된 본 발명의 방법에 의해 제조되나, 본원에 기술된 것 이외의 구조 및 활성을 갖는 접합체는 본 발명의 방법에 의해 제조된다면 동등한 것으로 여겨지고, 따라서 본 발명에 포함된다. 관련된 측면에서, 본 발명은 또한 1 이상의 상기 접합체 또는 복합체를 포함하는 조성물을 제공한다. 본 발명의 이러한 측면에 따른 조성물은 1 이상(예를 들면, 1, 2, 3, 4, 5, 10 등)의 상기 기술된 본 발명의 접합체 또는 복합체를 포함할 수 있다. 상기의 특정 측면에서, 조성물은 1 이상의 추가 성분, 예를 들면 1 이상의 완충 염, 1 이상의 카오트로프제(chaotropic agent), 1 이상의 세정제, 1 이상의 단백질(예: 알부민 또는 1 이상의 효소), 1 이상의 비결합 폴리머, 1 이상의 삼투 활성제 등을 포함할 수 있다. 본 발명의 이러한 측면의 조성물은 고체(예: 건조 분말) 또는 용액(특히 1 이상의 본 발명의 접합체를 포함하는 생리적 친화성의 완충 염 용액의 형태)을 비롯한 임의의 형태로 존재할 수 있다.

- [0126] A. 제약 조성물
- [0127] 본 발명의 특정 조성물은 예방, 진단 또는 치료 용도에 사용되기 위한 제약 조성물로서 사용되도록 구체적으로 제제화된다. 상기 조성물은 통상적으로 1 이상의 본 발명의 접합체, 복합체 또는 조성물, 및 1 이상의 제약적으로 허용가능한 담체 또는 부형제를 포함할 수 있다. 본원에서 사용된 용어 "제약적으로 허용가능한 담체 또는 부형제"는 제약 조성물이 도입되는 인간 또는 다른 포유동물을 비롯한 수령체 동물에서 그 첨가에 의해 일어나는 부작용 없이 허용되는 것이 가능한 임의의 유형의 비독성 고체, 반고체 또는 액체 충전제, 희석제, 캡슐화 물질 또는 제제 보조제를 지칭한다.
- [0128] 본 발명의 제약 조성물은 경구, 직장, 비경구, 전신내, 질내, 복막내, 국소적으로(분발, 연고, 드롭제 또는 경피 패치로), 설하, 경구 또는 비강 스프레이로 또는 흡입에 의한 등의 임의의 적합한 투여 양식을 통하여 수령체에 투여될 수 있다. 본원에서 사용된 용어 "비경구"는 정맥내, 동맥내, 근육내, 복막내, 수조내, 피하 및 관절내 주사 또는 주입을 포함하는 투여 양식을 지칭한다.
- [0129] 비경구 주사용으로 본 발명에 의해 제공되는 제약 조성물은 제약적으로 허용가능한 무균 수성 또는 비수성 용액, 분산액, 현탁액 또는 에멀전 뿐만 아니라 사용전 무균 주사가 가능한 용액 또는 분산액으로 재구성하기 위한 무균 분말을 포함할 수 있다. 적합한 수성 및 비수성 담체, 희석제, 용매 또는 비히클의 예로는 물, 에탄올, 폴리올(예: 글리세롤 등, 프로필렌 글리콜, 폴리(에틸렌글리콜)), 카르복시메틸셀룰로스 및 이의 적합한 혼합물, 식물유(예: 올리브유) 및 주사가 가능한 유기에스테르(예: 에틸 올레이트)를 들 수 있다. 적절한 유동성은 예를 들면, 레시틴과 같은 코팅 재료의 사용에 의해서, 분산액의 경우 필요한 입자 크기의 유지에 의해서 및 계면활성제의 사용에 의해서 유지될 수 있다.
- [0130] 이러한 본 발명의 제약 조성물은 또한 보존제, 습윤제, 유화제 및 분산제와 같은 보조제를 함유할 수 있다. 미생물의 작용의 억제는 다양한 항균 및 항진균제, 예를 들면 파라벤, 벤질 알콜, 클로로부탄올, 페놀, 소르빈산 등의 함유에 의해 보장될 수 있다. 또한, 당, 염화나트륨 등과 같은 삼투제를 포함하는 것이 바람직할 수 있다. 주사가 가능한 제약 형태의 연장된 흡수는 흡수를 지연시키는 제제(예: 알루미늄 모노스테아레이트, 히드로겔 및 젤라틴)의 함유에 의해서 일어날 수 있다.
- [0131] 일부 경우, 약물의 효과를 연장시키기 위하여, 피하 또는 근육내 주사로부터의 흡수를 지연시키는 것이 바람직하다. 이는 수성 체액 중에서 용해도가 낮은 결정성 또는 무정형 물질의 액체 현탁액을 사용하는 것에 달성될 수 있다. 이어서, 약물의 흡수 속도는 용해도 속도에 의존하고, 이는 다시 물리적 형태에 의존할 수 있다. 별법으로, 비경구 투여된 약물 형태의 지연 흡수는 약물을 오일 비히클 중에 용해하거나 또는 현탁하는 것에 의해 달성될 수 있다.
- [0132] 주사가 가능한 저장(depot) 형태는 폴리아크티드-폴리글리콜리드와 같은 생분해성 폴리머 중 약물의 마이크로캡슐화된 매트릭스를 형성하는 것에 의해 제조된다. 약물 대 담체 폴리머의 비 및 이용되는 특정 담체 폴리머의 성질에 따라서, 약물 방출 속도가 제어될 수 있다. 다른 생분해성 폴리머의 예는 생체적합성(biocompatible) 폴리(오르쏘에스테르) 및 폴리(안히드리드)를 포함한다. 저장 주사가 가능한 제제는 또한 약물을 리포솜 또는 신체 조직에 적합한 마이크로캡슐 중에 포획하는 것에 의해 제조된다.
- [0133] 주사가 가능한 제제는 예를 들면 세균-유지 필터를 통하여 여과하는 것에 의해서, 또는 사용 전 무균수 또는 다른 무균 주사가 가능한 매질 중에 용해 또는 분산될 수 있는 무균 고체 조성물의 형태로 살균제를 혼입하는 것에 의해 살균될 수 있다.
- [0134] 경구 투여용 고체 투약 형태는 캡슐, 정제, 환제(pill), 산체 및 과립제를 포함한다. 이러한 고체 투약 형태에서, 활성 화합물은 1 이상의 제약적으로 허용가능한 부형제 또는 담체, 예를 들면 소듐 시트레이트 또는 디칼슘 포스페이트 및(또는) a) 충전제 또는 증진제, 예를 들면 전분, 락토스, 수크로스, 글루코스, 만니톨 및 실리카, b) 결합제, 예를 들면 카르복시메틸셀룰로스, 알기네이트, 젤라틴, 폴리비닐피롤리돈, 수크로스 및 아라비아검, c) 습윤제, 예를 들면 글리세롤, d) 붕해제, 예를 들면, 아가-아가, 칼슘 카르보네이트, 감자 또는 타피오카 전분, 알긴산, 특정 실리카이트 및 소듐 카르보네이트, e) 용액 유지제, 예를 들면 파라핀, f) 흡수 촉진제, 예를 들면 4차 암모늄 화합물, g) 습윤제, 예를 들면 세틸 알콜 및 글리세롤 모노스테아레이트, h) 흡착제, 예를 들면 카올린 및 벤토나이트 점토 및 i) 활택제, 예를 들면 활석, 칼슘 스테아레이트, 마그네슘 스테아레이트, 고체 PEGs, 소듐 라우릴 술페이트 및 이의 혼합물과 혼합된다. 캡슐, 정제 및 환제의 경우, 투약 형태는 또한 완충제를 포함할 수 있다.
- [0135] 유사한 형태의 고체 조성물이 또한 락토즈 (유당)과 같은 부형제 뿐만 아니라 고분자량 PEGs 등을 이용한 연

질 및 경질 젤라틴 캡슐에서 충전제로 이용될 수 있다.

- [0136] 정제, 당의정, 캡슐제, 환제 및 과립제의 고체 투약 형태는 코팅 및 장용성과 같은 외피 또는 시간제어 코팅 및 제약 제제 분야에 공지된 다른 코팅을 이용하여 제조될 수 있다. 이들은 임의로 불투명화제를 함유할 수 있고, 또한 위장의 특정 부분에서만 또는 우선적으로, 임의로는 지연된 양식으로 활성 성분(들)을 방출하는 조성물일 수 있다. 사용될 수 있는 삽입(embedding) 조성물은 폴리머 성분 및 왁스를 함유할 수 있다. 활성 화합물은 또한 적합한 경우 1 이상의 상기 언급된 부형제와 함께 마이크로캡슐화된 형태로 존재할 수 있다.
- [0137] 경구 투여를 위한 액체 투약 형태는 제약적으로 허용가능한 에멀전, 용액, 현탁액, 시럽 및 엘릭시르(elixir)를 포함할 수 있다. 활성 화합물에 더하여, 액체 투약 형태는 당업계에서 통상적으로 사용되는 불활성 희석제, 예를 들면 물 또는 다른 용매, 용해제 및 유화제, 예를 들면 에틸 알콜, 이소프로필 알콜, 에틸 카르보네이트, 에틸 아세테이트, 벤질 알콜, 벤질 벤조에이트, 프로필렌 글리콜, 1,3-부틸렌 글리콜, 디메틸 포름아미드, 오일(특히, 목화씨유, 평지씨유, 옥수수유, 배유, 올리브유, 피마자유 및 참깨씨유), 글리세롤, 테트라히드로프루피루알콜, 폴리(에틸렌 글리콜) 및 소르비탄의 지방산 에스테르, 및 이의 혼합물을 포함할 수 있다.
- [0138] 불활성 희석제에 더하여, 경구 조성물은 또한 습윤제, 유화제 및 현탁화제, 감미제, 풍미제 및 방향제와 같은 보조제를 포함할 수 있다.
- [0139] 현탁액은 활성 화합물에 더하여 현탁화제, 예를 들면 에톡실화 이소스테아릴알콜, 폴리옥시에틸렌 소르비톨 및 소르비탄 에스테르, 미세결정성 셀룰로스, 알루미늄 메타히드록시드, 벤토나이트, 아가-아가, 트라가칸트 및 이의 혼합물을 포함할 수 있다.
- [0140] 국소 투여는 피부 또는 점막(폐 및 눈의 표면을 포함)에의 투여를 포함한다. 흡입용 조성물을 포함하는 국소 투여용 조성물은 가압(pressurize) 또는 비-가압될 수 있는 건조 분말로 제조될 수 있다. 비-가압 분말 조성물에서, 미분된 형태의 활성 성분이 예를 들면 직경 100 μm 이하의 크기를 갖는 입자를 포함하는 더 큰 크기의 제약적으로 허용가능한 불활성 담체와 혼합되어 사용될 수 있다. 적당한 불활성 담체는 락토즈 및 수크로즈와 같은 당을 포함한다. 바람직하게는, 95 중량% 이상의 활성 성분 입자가 0.01 내지 10 μm 의 유효 입자 크기를 갖는다.
- [0141] 별법으로, 제약 조성물은 가압되고, 가압 기체, 예를 들면 질소 또는 액화 기체 추진체를 함유할 수 있다. 액체 추진제 매질 및 실제 총 조성물은 바람직하게는 활성 성분이 이에 실질적인 정도로 용해되지 않는 것일 수 있다. 가압 조성물은 또한 표면 활성제를 함유할 수 있다. 표면 활성제는 액체 또는 고체 비이온성 표면 활성제일 수 있거나, 또는 고체 음이온성 표면 활성제일 수 있다. 나트륨 염 형태의 고체 음이온 표면 활성제를 사용하는 것이 바람직하다.
- [0142] 국소 투여의 추가 형태는 눈에 투여하는 것이다. 이러한 투여 양식에서, 본 발명의 접합체 또는 조성물은 제약적으로 허용가능한 안과용 비히클 중에서 전달되어, 활성 화합물은 안구 표면과 충분한 시간 기간 동안 접촉을 유지하여 화합물이 결막 또는 각막 및 눈의 내부영역으로, 예를 들면 전방, 후방, 유리체, 방수, 유리체액, 각막, 홍채/섬모, 렌즈, 맥락막/망막 및 공막으로 투과되도록 한다. 제약적으로 허용가능한 안과용 비히클은 예를 들면 연고, 식물유 또는 캡슐화 물질일 수 있다.
- [0143] 직장 또는 질내 투여용 조성물은 바람직하게는 본 발명의 접합체 또는 조성물을 실온에서 고체이나 체온에서 액체이고 따라서 직장 또는 질에서 용해되어 약물을 방출하는, 코코아 버터, PEG 또는 좌제 왁스와 같은 적합한 비자극성 부형제 또는 담체와 혼합하여 제조될 수 있다.
- [0144] 본 치료 방법에서 사용되는 제약 조성물은 또한 리포솜(liposome)의 형태로 투여될 수 있다. 당업계에 공지된 바와 같이, 리포솜은 일반적으로 인지질 또는 다른 성분으로부터 유도된다. 리포솜은 액체 매질 중에 분산된 단일- 또는 복수-라멜라 수화 액체 결정에 의해 형성된다. 리포솜을 형성가능한 임의의 비독성, 생리적으로 허용가능하고 대사가가능한 액체가 사용될 수 있다. 1 이상의 본 발명의 접합체 또는 조성물에 더하여, 리포솜 형태의 본 발명의 제약 조성물은 또한 1 이상의 안정화제, 보존제, 부형제 등을 함유할 수 있다. 바람직한 지질은 인지질 및 포스파티딜 콜린 (레시틴)이고, 이들 양자는 천연 및 합성이다. 리포솜의 형성 방법은 당업계에 공지되어 있다 (예를 들면, 미국 특허 제5,395,619호(Zalipsky, S. 등) 참조). 인지질을 포함하는 리포솜은 PEG에 접합된 인지질, 가장 통상적으로는 모노메톡시-PEG에 커플링된 포스파티딜 에탄올아민을 포함하고, 포유동물의 혈액 순환에서의 연장된 수명을 비롯하여 유익한 성질을 갖는다(미국 특허 제6,132,763호(Fisher D.)).

[0145] B. 용도

[0146] 상기한 바와 같이, 본 발명의 방법, 접합체 및 조성물은 생물학적 성분이 그들의 수용체에 결합하는 능력을 방해함이 없이 생물학적 성분의 생활성을 유지 또는 증강시키는 방법에 유익하게 이용된다. 특정의 이러한 본 발명의 방법은 1 이상의 접합체 및 조성물을 세포, 조직, 기관 또는 유기체에 전달하는 것을 수반한다. 특히, 본 발명은 1 이상의 성분의 복합체 또는 조성물의 세포, 조직, 기관 또는 유기체로의 제어된 전달을 제공하고, 이에 의해 사용자에게 세포, 조직, 기관 또는 유기체 상에서의 활성을 위해 방출되는 특정 성분의 양을 시간적으로 및 공간적으로 조절하는 능력을 제공한다.

[0147] 일반적으로, 본 발명의 상기 방법은 1 이상의 활동을 포함한다. 예를 들면, 하나의 이러한 본 발명의 방법은 다음을 포함한다: (a) 1 이상의 본원에 상술된 바와 같은 본 발명의 접합체 또는 조성물을 제조하고, (b) 1 이상의 세포, 조직, 기관 또는 유기체를 1 이상의 접합체 또는 조성물과 1 이상의 본 발명의 접합체 또는 조성물의 세포, 조직, 기관 또는 유기체로의 결합에 유리한 조건하에서 접촉시킨다. 생활성 성분의 본 발명의 접합체 및(또는) 조성물이 세포, 조직, 기관 또는 유기체에 의해 결합되면(또는 일부 경우 내재화되면), 상기 성분들은 그들의 목적하는 생물학적 기능을 수행하기 시작한다. 예를 들면, 펩티드 성분은 세포, 조직, 기관 또는 유기체 상의 또는 내의 수용체 또는 다른 성분에 결합하고; 세포, 조직, 기관 또는 유기체 내의 대사 반응에 참여하고; 세포, 조직, 기관 또는 유기체 내의 1 이상의 효소 활성을 수행, 상승조절 또는 활성화, 또는 하강조절 또는 억제하고; 세포, 조직, 기관 또는 유기체에 상실된 구조 성분을 제공하고; 세포, 조직, 기관 또는 유기체에 1 이상의 영양학적 필요물을 제공하고; 질환 또는 신체 장애의 1 이상의 과정 또는 증상을 억제, 치료, 역전 또는 달리 개선하는 등일 수 있다.

[0148] 추가 실시태양에서, 본 발명의 접합체 및 조성물은 가혹한 산업적 사용 조건하에서도 이들의 생활성의 실질적 유지 및 증가된 활동 지속의 연합 효과의 결과로서 얻어지는 접합체의 생활성 성분의 예상치않은 높은 효능으로 인하여, 산업적 세포 배양에서 이용될 수 있다. 이러한 본 발명 접합체의 예상치않은 높은 효능은 현저히 높은 바이오매스 생산, 현저히 높은 수준의 재조합 단백질의 발현 및 생물학적가공의 효율에서 다른 개선을 가져올 수 있다.

[0149] C. 투여 요법

[0150] 본 발명의 접합체, 복합체 또는 조성물은 세포, 조직, 기관 또는 유기체에 시험관내(in vitor), 생체외(ex vivo) 또는 생체내(in vivo) 투여되어 이들에 1 이상의 생활성 성분 (즉, 1 이상의 사이토카인, 케모카인, 성장 인자 또는 폴리펩티드 호르몬 또는 이의 길항제)를 전달할 수 있다. 당업자들은 주어진 활성 화합물, 접합체, 복합체 또는 조성물의 유효량을 경험적으로 결정할 수 있고, 순수한 형태로 이용될 수 있거나, 또는 이러한 형태가 존재하는 경우, 제약적으로 허용가능한 제제 또는 프로드럭 형태로 이용될 수 있다. 본 발명의 화합물, 접합체, 복합체 또는 조성물은 1 이상의 제약적으로 허용가능한 부형제와 함께 수의(veterinary) 또는 제약 조성물로서 이를 필요로 하는 동물 (포유동물, 예를 들면 인간을 포함함) 환자에게 투여될 수 있다. 임의의 특정 환자에 대한 치료적 유효 투여 수준은 얻어지는 세포 반응의 유형 및 정도; 이용되는 특정 화합물(들), 접합체(들), 복합체(들) 또는 조성물(들)의 특성 및(또는) 활성; 환자의 연령, 체중 또는 표면적, 일반적 건강, 성별 및 식이; 활성 화합물의 투여 시간, 투여 경로 및 배설 속도; 치료 지속기간; 특정 화합물(들), 접합체(들), 복합체(들) 또는 조성물(들)과 병용하여 또는 동시에 사용되는 다른 약물; 및 제약 및 의약 분야 당업자들에게 공지된 유사 인자를 비롯한 다양한 인자에 의존할 수 있다. 예를 들면, 주어진 본 발명의 화합물, 접합체, 복합체 또는 조성물의 투여량을 요망되는 치료 효과를 달성하는데 필요한 것보다 낮은 수준에서 시작하고, 요망되는 효과가 달성될 때까지 투여량을 점차 증가시키는 것이 당업자들에게 공지되어 있다.

[0151] 투여 요법은 또한 당업자들에게 허용되고 통상적인 기술(예: 크기-배제, 이온-교환 또는 역상 고성능 액체 크로마토그래피("HPLC"), 생물검정 또는 면역검정)에 의해 측정되는 바와 같은 혈액 중 주어진 활성 화합물의 예정된 농도를 제공하도록 환자-특이적 방식으로 조정될 수 있다. 따라서, 환자 투여 요법은 의학, 제약 및 (또는) 약리학 분야의 당업자들에게 통상적이고 익숙한 방법에 따라서, HPLC 또는 면역검정에 의해 측정되는 바와 같은 상대적으로 일정한 혈액 수준을 달성하도록 조절될 수 있다.

[0152] D. 진단 및 치료 용도

[0153] 본 발명의 접합체의 진단 용도는 접합체 (또는 1 이상의 성분, 즉 생활성 성분 및(또는) 합성 폴리머)가 라벨링되거나 또는 1 이상의 검출가능한 라벨을 포함하여 검출을 가능하게 하는(예를 들면, 당업계에서 공지된 방법에 따라 광학, 방사측정, 형광 또는 공명 검출에 의한), 본 발명의 접합체 또는 조성물의 투여에 의해, 사이토카인, 케모카인, 성장 인자 또는 폴리펩티드 호르몬에 대하여 통상적으로 높은 결합 능력을 갖는 세포 또는 조직, 예를 들면, 암을 동물, 특히 인간의 체내에 위치시키는 것일 수 있다. 예를 들면, 대부분의 비소 세포 폐암은 통상적으로 높은 농도의 상피성장 인자에 대한 수용체를 발현한다 (Bunn, P.A., et al., (2002) Semin Oncol 29 (Suppl 14):38-44). 따라서, 본 발명의 다른 측면에서, 본 발명의 접합체 또는 조성물은 진단 또는 치료 방법에서, 예를 들면 장애의 소견이 있거나 이에 걸린 동물, 특히 포유동물(예: 인간)에서 다양한 신체적 장애의 진단, 치료 또는 방지에서 사용될 수 있다. 이러한 접근법에서, 치료의 목적은 장애의 발전을 지연 또는 방지하고(하거나) 장애를 치료, 장애의 경감을 유발 또는 장애의 경감을 유지하고(하거나) 다른 치료요법의 부작용을 감소 또는 최소화하는 것이다.

[0154] 따라서, 본 발명의 접합체, 복합체 및 조성물은 신체적 장애, 예를 들면 감염 또는 질환의 보호, 억제 또는 치료에 사용될 수 있다. 본원에서 사용된 신체적 장애로부터의 "보호"라는 용어는 "방지", "억제" 및 "치료"를 포함한다. "방지"은 질환 또는 신체적 장애의 유발 전에 본 발명의 복합체 또는 조성물의 투여를 포함하는 반면, "억제"는 질환의 임상적 발현에 앞서 접합체 또는 조성물의 투여를 포함하고, 따라서 신체적 장애의 "방지" 및 "억제"는 통상적으로 장애의 소견이 있거나 걸리기 쉽지만, 아직 걸리지는 않은 동물에서 행해진다. 그러나, 신체적 장애의 "치료"는 질환의 발현 후 본 발명의 치료 접합체 또는 조성물의 투여를 포함한다. 인간 및 수의학 약품에서, 신체적 장애의 "방지" 및 "억제"를 구별하는 것이 항상 가능하지는 않다는 것이 이해될 것이다. 많은 경우, 최종 유발 사건 또는 사건들은 알려지지 않거나 잠재성일 수 있고, 환자 및 의사도 발생 후 상당기간 까지도 유발 사건을 알지 못할 수 있다. 따라서, "치료"와 상이하게 "예방"이라는 용어를 본원에서 정의된 "방지" 및 "억제"를 모두 포함하도록 사용하는 것이 통상적이다. 따라서, 본 발명의 방법에 따라서 사용되는 "보호"라는 용어는 "예방"을 포함하는 것으로 의도된다. 본 발명의 이러한 측면에 따른 방법은 임상가가 상기 기술된 치료 목적을 달성하도록 하는 1 이상의 단계를 포함할 수 있다. 본 발명의 상기 방법 중 하나는 예를 들면, (a) 신체적 장애에 걸렸거나 소견이 있는 동물 (바람직하게는 포유동물, 예를 들면 인간)을 확인하고, (b) 상기 동물에게 유효량의 본원에 기술된 1 이상의 본 발명의 접합체, 복합체 또는 조성물을 투여하여, 상기 접합체, 복합체 또는 조성물의 투여가 상기 동물에서 신체적 장애의 발전을 방지, 지연 또는 진단하거나, 또는 신체적 장애를 치료하거나, 신체적 장애의 경감을 유발하거나 또는 유지하는 단계를 포함한다.

[0155] 본원에서 사용된, 신체적 장애에 대해 "소견이 있는" 동물은 장애의 다수의 명백한 신체적 증상을 나타내지 않으나, 일반적으로, 생리적으로 또는 달리 장애로 발전할 위험이 있는 동물로 정의된다. 본 발명의 방법에서, 주어진 신체적 장애의 소견이 있거나, 위험성이 있거나 또는 걸린 동물 (예를 들면, 인간을 비롯한 포유동물)의 확인은 당업자들에게 익숙할 수 있는 표준적 당업계의 공지 방법에 따라서 달성될 수 있으며, 예를 들면 방사선 검정, 생화학적 검정(예를 들면, 동물로부터 얻은 샘플 중에서 특정 펩티드, 단백질, 전해질 등의 상대적 수준의 검정), 수술적 방법, 유전적 스크리닝, 가족력, 신체 촉진, 병리적 또는 조직학적 시험(예를 들면, 조직 또는 체액 샘플 또는 도말표본의 현미경 검사, 면역 검정 등), 체액의 시험(예를 들면, 혈액, 혈청, 혈장, 뇌척수액, 소변, 침, 정액 등), 영상화, (예를 들면, 방사성, 형광, 광학, 공명(예를 들면, 핵 자기 공명("NMR") 또는 전자 스핀 공명("ESR")) 등을 포함한다. 일단 1 이상의 상기 방법에 의해 동물이 확인되면, 동물은 적극적으로 및(또는) 전향적으로 처리되어 신체적 장애를 방지, 억제, 지연 또는 치료할 수 있다.

[0156] 본 발명의 접합체, 복합체, 조성물 및 방법으로 방지, 진단 또는 치료될 수 있는 신체적 장애는 접합체 또는 조성물의 생활성 성분 (통상적으로, 사이토카인, 성장 인자, 케모카인 또는 폴리펩티드 호르몬 성분 또는 이의 길항제)가 방지, 진단 또는 치료에 사용될 수 있는 모든 신체적 장애를 포함한다. 이러한 장애는 다양한 암(예를 들면, 유방암, 자궁암, 난소암, 전립선암, 고환암, 백혈병, 림프종, 폐암, 신경계암, 피부암, 두부 및 경부(neck) 암, 골암, 결장 및 다른 위장관암, 췌장암, 방광암, 신장암 및 다른 암종, 육종, 샘종 및 골수종); 의원 질환(iatrogenic disease); 감염성 질환(예를 들면, 세균성 질환, 진균성 질환, 바이러스성 질환 (간염, 심장전염성 바이러스, HIV/AIDS 등), 기생충 질환 등); 유전적 장애(예를 들면, 낭성 섬유증, 근위축성 측삭 경화증, 근위축성 이상증, 가우처 질환(Gaucher's disease), 폼프병(Pompe's disease), 심각한 합병 면역결핍 장애, 난장이증 등), 빈혈, 호중성백혈구감소증, 저혈소판증, 혈우병 및 다른 혈액장애; 신경퇴행성

장애(예를 들면, 다발성 경화증, 크로이츠펔트-야콥병(Creutzfeldt-jakob Disease), 알츠하이머병 등); 효소적 장애(예를 들면, 통풍, 요독증, 고콜레스테롤혈증 등); 불특정 또는 다초점 병인(예를 들면, 심혈관 질환, 고혈압, 염증성 대장 질환 등); 자가면역 장애(예를 들면, 전신성 홍반성 낭창증, 류마티스성 관절염, 건선 등) 및 다른 당업자들에게 용이하게 이해될 수 있는 다른 의학적 중요 장애를 포함하나, 이에 한정되지 않는다. 본 발명의 접합체, 복합체, 조성물 및 방법은 또한 전-악성 손상의 악성 손상으로의 진행의 화학적 방지와 같은 질환 진행의 방지에 사용될 수 있다.

[0157] 따라서, 본 발명의 치료 방법은 1 이상의 본 발명의 접합체, 복합체 또는 조성물, 또는 1 이상의 본 발명의 제약 조성물을 이용하고, 이는 다양한 투여 경로에 의해 이를 필요로 하는 동물에게 투여될 수 있고, 이러한 투여 경로는 경구, 직장, 비경구(정맥내, 동맥내, 근육내, 복강내, 수조내, 피하내 및 관절내 주사 및 주입을 포함함), 전신내, 질내, 복강내, 국소(분말, 연고, 드립제 또는 경피 패치에 의해서), 구내, 경구 또는 비강 스프레이로 또는 흡입에 의한 것을 포함한다. 본 발명에 의해서, 유효량의 접합체, 복합체 또는 조성물은 시험관내(in vitro), 생체외(ex vivo) 또는 생체내(in vivo)로 세포 또는 특정 장애에 걸렸거나 소견이 있는 동물에게 투여되고, 이에 의해 상기 동물에서 장애를 방지, 지연, 진단 또는 치료할 수 있다. 본원에서 사용된, "유효량의 접합체 (또는 복합체 또는 조성물)"은 접합체 (또는 복합체 또는 조성물)이 접합체, 복합체 또는 조성물의 생활성 성분 (즉, 사이토카인, 케모카인, 성장 인자, 폴리펩티드 호르몬 또는 이의 길항제)의 생물학적 활성을 수행하고, 이에 의해 본 발명의 접합체, 복합체 또는 조성물이 투여되는 동물에서 신체적 장애를 방지, 지연, 진단, 치료 또는 치유하도록 하는 양을 지칭한다. 당업자는 유효량의 본 발명의 접합체, 복합체 또는 조성물이 제약 및 의약 분야 당업자들에게 공지된 표준 방법에 따라서 경험적으로 결정될 수 있음을 이해할 수 있다: 예를 들면, 문헌[Beers, M.H., et al., eds. (1999) Merck Manual of Diagnosis & Therapy, 17th edition, Merck and Co. Rahway, NJ]; [Hardman, J.G., et al., eds. (2001) Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics, 10th edition, McGraw, Hill Medical Publishing Division, New York]; [Speight, T.M., et al., eds. (1997) Avery's Drug Treatment, 4th edition, Adis International, Auckland/Aukland, New Zealand]; [Katzung, B.G., editor (2000) Basic & Clinical Pharmacology, 8th edition, Lange Medical Books/McGraw-Hill, New York]을 참조. 이들 문헌들 및 본원에 인용된 문헌들은 전체로서 본원에 참고문헌으로 삽입된다.

[0158] 인간 환자에게 투여되는 경우, 본 발명의 접합체, 복합체 및 조성물의 총 일일, 일주일 또는 일개월 투여량은 정상적 의학적 판단의 범위 내에서 주치의에 의해 결정될 수 있는 것으로 이해될 것이다. 예를 들면, 만족스러운 결과는 특정 본 발명의 접합체, 복합체 또는 조성물을 사용되는 구체적인 생활성 화합물에 따른 적합한 투여량으로 투여하는 것에 의해 얻어지고, 이 투여량은 당업자들에게 용이하게 이해될 수 있거나, 또는 단지 통상적인 실험을 이용하여 경험적으로 용이하게 결정될 수 있다. 본 발명의 방법에 따라서, 접합체, 복합체 또는 조성물은 한번에, 또는 분할 용량으로, 예를 들면 하루 1회 또는 2회, 또는 일주일에 1회 또는 2회, 또는 1개월에 1회 또는 2회 등으로 투여될 수 있다. 다양한 투여 양식(예: 비경구, 피하, 근육내, 안내, 비강내 등)에 대한 적합한 투여 요법은 또한 단지 통상적인 실험을 이용하여 경험적으로 결정될 수 있거나, 또는 접합체, 복합체 또는 조성물의 생활성 성분(즉, 사이토카인, 케모카인, 성장 인자, 폴리펩티드 호르몬 또는 이의 길항제)의 특성에 따라서 당업자들에게 용이하게 이해될 수 있다.

[0159] 추가 응용에서, 본 발명의 접합체, 복합체 및 조성물은 진단 또는 치료제를 접합체, 복합체 또는 조성물의 생활성 성분(즉, 사이토카인, 케모카인, 성장 인자, 폴리펩티드 호르몬 또는 이의 길항제)을 결합, 혼입 또는 달리 수용할 수 있는 수용체를 발현하는 세포, 조직, 기관 또는 유기체에 특이적으로 표적화하기 위해 사용될 수 있다. 본 발명의 이러한 측면에 따른 방법은 예를 들면, 세포, 조직, 기관 또는 유기체를 1 이상의 진단 또는 치료제를 추가로 포함하는 1 이상의 본 발명의 접합체, 복합체 또는 조성물과 접촉시켜 접합체, 복합체 또는 조성물이 세포, 조직, 기관 또는 유기체에 결합 또는 수용되도록 하여, 진단 또는 치료제를 세포, 조직, 기관 또는 유기체에 전달할 수 있다. 본 발명의 이러한 측면에 따른 진단 또는 치료제는 본원에 기술된 바와 같은 검출가능하게 라벨링될 수 있는, 핵산, 유기 화합물, 단백질 또는 펩티드, 항체, 효소, 당단백, 지단백, 원소, 지질, 당류, 동위원소, 탄수화물, 영상화제, 검출가능한 탐침 또는 이의 임의의 조합으로부터 선택되는 1 이상의 제제일 수 있으나, 이에 한정되지 않는다. 본 발명의 이러한 측면에서 사용되는 치료제는 표적 세포 (또는 조직, 기관 또는 유기체)에 치료 효과를 가질 수 있으며, 상기 효과는 결합있는 유전자 또는 단백질의 보정, 약물 작용, 독성 효과, 성장 촉진 효과, 성장 억제 효과, 대사 효과, 이화 효과, 동화 효과, 항바이러스 효과, 항진균 효과, 항균 효과, 호르몬성 효과, 세포 분화 억제 효과, 신경조절 효과, 항-신생물 효과, 항-종양 효과, 인슐린 자극 또는 억제 효과, 골수 자극 효과, 다능성 줄기 세포 자극 효과, 면역계 자극 효과, 및 본 발명의 이러한 측면에 따른 전달 시스템을 통하여 세포 (또는 조직, 기관 또는 유기체)에 전달되

는 치료제에 의하여 제공될 수 있는 임의의 다른 공지의 치료 효과로부터 선택되는 효과이나, 이에 한정되지 않는다.

[0160] 이러한 추가 치료제는 항생제, 스테로이드, 세포독성제, 혈관활성 약물, 항체 및 다른 치료제를 비롯한 공지 및 신규 화합물 및 조성물로부터 선택될 수 있으나, 이에 한정되지 않는다. 이러한 제제의 비제한적 예로는 항생제, 및 세균성 쇼크의 치료에 사용되는 다른 약물을 들 수 있고, 예를 들면, 겐타마이신, 토브라마이신, 나프실린, 비경구 세팔로스포린 등; 부신피질스테로이드 및 이의 유사체, 예를 들면 텍사메타손, 내독소에 의해 야기되는 세포 손상의 완화제; 혈관활성 약물, 예를 들면 알파 아드레날린성 수용체 봉쇄제(예: 페녹시벤즈아민), 베타 아드레날린성 수용체 아고니스트(예: 이소프로테레놀) 및 도파민이 있다.

[0161] 본 발명의 접합체, 복합체 및 조성물은 또한 질환의 진단, 및 치료 반응을 모니터링하기 위하여 사용될 수 있다. 특정의 상기 방법에서, 본 발명의 접합체, 복합체 또는 조성물은 1 이상의 검출가능한 라벨(예를 들면, 본원에 기술된 것들)을 포함할 수 있다. 구체적인 상기 방법에서, 이들 검출가능하게 라벨링된 본 발명의 접합체, 복합체 또는 조성물은 접합체, 복합체 또는 조성물의 생활성 성분(예: 사이토카인, 케모카인, 성장 인자 또는 폴리펩티드 호르몬 또는 이의 길항제)에 대한 수용체를 발현하거나 또는 달리 수용하는 세포, 조직, 기관 또는 유기체를 검출하기 위해 사용될 수 있다. 이러한 방법의 한 예에서, 세포, 조직, 기관 또는 유기체는 1 이상의 본 발명의 접합체, 복합체 또는 조성물과 세포, 조직 또는 기관에 의한 접합체의 결합 또는 섭취에 양호한 조건하에서 접촉시키고(예를 들면, 접합체를 세포-표면 수용체에 결합함으로써 또는 세포흡수작용 또는 접합체의 세포로의 확산에 의해서), 이어서 세포에 결합 또는 세포 혼입된 접합체를 이용된 라벨에 특이적인 검출 수단을 이용하여(예를 들면, 형광 라벨링 접합체에 대하여 형광 검출; 자기 라벨링 접합체에 대해 자기 공명 영상화; 방사성라벨링 접합체에 대하여 방사성영상화 등) 검출한다. 상기 검출가능하게 라벨링된 접합체의 다른 용도는 예를 들면, 유효량의 라벨링된 형태의 1 이상의 본 발명의 접합체를 투여하고 세포, 조직, 기관 또는 유기체 (또는 동물)과 연관된 검출가능한 방사선을 측정하는 것에 의해 세포, 조직, 기관 또는 유기체, 또는 동물(예: 인간)의 내부 구조를 영상화하는 것을 포함한다. 진단 및 치료 영상화에 이용되는 다양한 유형의 라벨의 검출 방법 및 이들의 용도는 당업자들에게 공지되어 있으며, 본원에 기술되어 있다.

[0162] 다른 측면에서, 본 발명의 접합체 및 조성물은 수용체를 발현하는 세포의 표면 상의 접합체의 생활성 성분에 대한 특이적 수용체의 농도 및 활성을 조절하는 방법에서 사용될 수 있다. 주어진 수용체의 활성을 "조절"하는 것은 접합체가 수용체에 결합하는 것에 의해 이 수용체를 통하여 매개되는 생리 활성(예: 세포내 신호전달 캐스케이드)를 활성화 또는 억제하는 것을 의미한다. 본 발명의 접합체의 조절 활성에 대하여 임의의 특정 기전의 설명에 얽매는 것을 의도하지 않지만, 이러한 접합체는 접합체의 생활성 성분을 통한 수용체에 대한 결합에 의해 세포 수용체의 생리 활성을 길항하고, 이에 의해 천연 아고니스트(예: 접합되지 않은 생활성 성분)의 결합을 봉쇄하고, 천연 아고니스트에 의한 수용체의 활성화를 방지하는 한편, 수용체 자체의 생리적 활성의 실질적 활성화를 유도하지 않을 수 있다. 본 발명의 이러한 측면에 따른 방법은 1 이상의 단계, 예를 들면 접합체(즉, 접합체의 생활성 성분 부분)이 세포 표면 상의 생활성 성분에 대한 수용체에 결합하나 수용체를 실질적으로 활성화하지 않도록 하는 조건하에서, 세포를 1 이상의 본 발명의 접합체와 접촉(시험관내(in vitro), 생체외(ex vivo) 또는 생체내(in vivo)로 행해질 수 있음)하는 단계를 포함한다. 이러한 방법은 당업자들이 용이하게 이해할 수 있는 바와 같이 다양한 진단 및 치료 용도에 유용할 수 있다.

[0163] **키트**

[0164] 본 발명은 또한 본 발명의 접합체 및(또는) 조성물을 포함하는 키트를 제공한다. 상기 키트는 통상적으로 바이알, 튜브, 앰플, 병, 시린지 등과 같은 1 이상의 컨테이너의 내부에 밀접히 제한된 담체, 예를 들면 박스, 판지, 튜브 등을 포함하고, 여기서 제1 컨테이너는 1 이상의 본 발명의 접합체 및(또는) 조성물을 함유한다. 본 발명의 이러한 측면에 포함되는 키트는 본 발명의 접합체 및 조성물의 1 이상의 특정 용도를 수행하기 위하여 필요한 1 이상의 추가 성분(예를 들면, 시약 및 화합물), 예를 들면 특정 질환 또는 신체적 장애의 진단, 치료 또는 방지에 유용한 1 이상의 성분(예를 들면, 1 이상의 추가 치료 화합물 또는 조성물, 1 이상의 진단 시약, 1 이상의 담체 또는 부형제 등), 1 이상의 추가 본 발명의 접합체 또는 조성물 등을 더 포함할 수 있다.

[0165] 당업자들은 본원에 기술된 방법 및 응용에 대하여 다른 적당한 변형 및 적응이 본 발명 또는 이의 임의의 실시태양의 범위를 벗어남이 없이 가해질 수 있음을 이해할 수 있다. 본 발명의 상세한 기술로서, 하기 실시예

를 참조하여 더욱 명확히 이해될 수 있으며, 하기 실시예는 단지 예시를 목적으로 하는 것이고, 본 발명을 제한할 의도가 아니다.

실시예

[0166] 실시예 1: PEG-인터페론-알파 접합체

[0167] 인터페론-알파는 2001년 세계 시장이 US \$ 2조가 넘는 상업적으로 중요한 의학용 단백질이고, 주로 C형 간염 바이러스("HCV") 감염된 환자의 치료를 위한 것이다. 미국에서, 3백만 내지 4백만의 환자들이 만성 C형 감염되어 있고, 약 10,000건의 HCV 관련 사망이 매년 발생한다 (Chander, G., et al., (2002) *Hepatology* 36:5135-5144). IFN- α 의 유용성을 개선하기 위한 노력으로, 그 개발 및 마케팅에 대하여 우선적 책임이 있는 2 회사(Schering-Plough Corp. 및 F. Hoffmann-La Roche AG)가 모노메톡시폴리(에틸렌 글리콜) 또는 "mPEG"와 IFN- α 의 접합체를 개발하고 상업적으로 시판하였다. 각 경우, mPEG는 한 부착점에서만 인터페론- α 의 각 분자에 연결된다. 각 경우에서, 생성물은 비변형 인터페론과 비교하여 감소된 수용체-결합 활성과 함께 위치상 이성질체의 혼합물을 함유한다. 각 경우, 만성 HCV 감염의 치료에 대하여 비변형 단백질의 1주 3회 주사와 비교하여, 접합체의 1주 1회 주사의 개선된 임상적 유효성에 의해 측정되는 바와 같이, 생체내(in vivo)에서의 접합체의 작용 지속 및 증가된 생체이용율은 PEG 접합으로 인한 시험관내(in vitro)에서의 감소된 생활성을 보다 상쇄한다 (Manns, M.P., et al., (2001) *Lancet* 358:958-965).

[0168] 에프. 호프만-라 로슈(F. Hoffmann-La Roche)의 PEG-인터페론-알파-2a 접합체인 PEGASYS®에서, 2 가닥의 20-kDa mPEG가 모두 인터페론-알파-2a의 수용체-결합 도메인 내에 또는 근접한 Lys 31, Lys 121, Lys 131 또는 Lys 134 (Bailon, P., et al., 상기 문헌) 중 하나에 주로 연결된 단일 리신 링커(소위 "분지된 PEG")에 커플링된다 (도 1a의 결합 부위 및 서열 번호 1).

[0169] 셰링-플라우 코포레이션(Schering-Plough Corp.)의 PEG-인터페론-알파-2b에서, 단일 가닥의 12-kDa mPEG가 수용체 결합에 중요한 영역에 있는 위치 34의 히스티딘 잔기(His 34; Wylie, D.C., et al., supra; Gilbert, C.W., et al., 미국 특허 제6,042,822호; Wang, Y.S., et al., supra)에 주로 커플링된다 (도 1b 참조). 셰링-플라우(Schering-Plough)의 PEG-INTRON 제품에서의 다른 PEG 부착 부위(Lys 121, Tyr 129 및 Lys 131)는 또한 결합 부위 1에 또는 근처에 존재하는 것으로 나타난다(도 1b 및 서열 번호 2).

[0170] 상기 2개의 상업적 제품과 대비하여, 본 발명의 접합체는 단백질의 수용체-결합 영역으로부터 멀리 떨어진 N-말단 아미노산에 연결된 단일 가닥의 수용성 합성 폴리머, 바람직하게는 PEG 또는 mPEG를 가지고(도 1c 및 1d의 Cys-1과 결합 부위간의 공간적 관계를 참조), 인터페론-알파가 "RN" 사이토카인이라는 것을 보여준다. 도 9 및 10은 각각 본 발명의 예시적 PEG-인터페론-알파 접합체의 양이온-교환 및 크기-배제 크로마토그램을 나타낸다. 반응 혼합물은 메티오닌 잔기가 아미노 말단에 존재하고, 이에 선행하여 천연 서열의 제1 잔기인 Cys-1이 존재하는 인터페론- α -2b를 함유하였다. 반응성 PEG는 0.2 mM의 농도로 존재하는 20-kDa PEG-알데히드였다. 환원제는 최종 농도 14 mM의 소듐 시아노보로하이드라이드였다. 반응 과정은 4°C에서의 인큐베이션 도중 크기-배제 크로마토그래피에 의해 주기적으로 모니터링하였다. IFN- α 가 기술한 조건 하에서 PEG화되기에 충분히 가용성이나, 다른 사이토카인(예: IFN- β)는 덜 가용성이고, 계면활성제 존재하에서 PEG화될 필요가 있을 수 있다(IFN- α 에 대하여 미국 특허 제5,711,944호(C.W. Gilbert 등) 및 인터페론 알파 및 베타에 대하여 미국 특허 제5,738,846호(R.B. Greenwald 등)에 의해 기술된 바와 같이 수행).

[0171] 도 9에 나타난 분류에 사용되는 양이온-교환 칼럼은 ToyoPearl MD-G Sp (1 x 68 cm; Tosoh Biosep, Montgomeryville, PA)였고, 이는 0.5 mL/분의 유속에서 pH 4.6의 20 mM 소듐 아세테이트 완충액 중 0-0.4 M NaCl의 선형 구배로 전개하였다. 도 10의 데이터를 얻기 위하여 사용된 크기-배제 칼럼은 Superdex® 200 (HR 10.30; Amersham Biosciences, Piscataway, NJ)였고, 이는 pH 4.6의 150 mM NaCl을 함유하는 20 mM 소듐 아세테이트 완충액 중 0.5 mL/분에서 용리하였다. 다른 적당한 이온-교환 및 크기-배제 크로마토그래피 매질 및 분류 조건은 당업자들에게 공지되어 있다. 본 발명의 정제된 모노PEG-IFN- α -2b의 자동화 에드만(Edman) 분해에 의한 아미노-말단 아미노산 분석은 90% 초과 PEG가 N-말단 잔기에 부착되었음을 나타내었다. 분석은 커먼웰스 바이오테크놀로지스 인크(Commonwealth Biotechnologies, Inc.; Richmond, VA)에 의해 수행하였다.

[0172] 실시예 2: PEG-인터루킨-2 접합체

- [0173] 인터루킨-2 ("IL-2")는 신장 세포 암종 및 악성 흑색종을 비롯한 특정 암들에 대하여 면역조절 활성을 나타내는 사이토카인이다. 그러나, 임상적 효능은 부족하여, 단지 소수의 환자들만이 부분 또는 완전한 반응을 경험한 결과를 가진다(Weinreich, D.M., et al., (2002) J Immunother 25:185-187). IL-2는 혈류에서 짧은 반감기를 가지고, 이는 암 환자에서 낮은 속도의 경감 유도과 연관된다. IL-2를 리신 잔기의 무작위 PEG화에 의해 더욱 유용하게 하고자하는 시도는 최선적인 것이 아니었다(Chen, S.A., et al., (2000) J Pharmacol Exp Ther 293:248-259). PEG를 당질화 부위에서(Goodson, R.J., 등, 상기 문헌) 또는 비필수 시스테인 (Cys-125)에서 IL-2에, 또는 잔기 1 내지 20 사이의 시스테인을 함유하는 IL-2의 뮤테인(미국 특허 제5,206,344호 (Katre, N., 등))에 선택적으로 부착하려는 시도는 임상적으로 유용한 제품에 이르지 못하였다.
- [0174] 도 4는 IL-2의 수용체-결합 부위에 대한 리신 잔기의 분포를 나타내고, 이는 많은 표면-접근가능한 리신 잔기가 수용체 결합에 관여하는 영역에 존재함을 보여준다. 실제, Lys-35 및 Lys-43은 IL-2의 알파-수용체와의 상호작용에 필요한 것으로 확인되었고, 이는 리신 잔기의 PEG화에 의한 IL-2의 불활성화의 기전을 시사한다(서열 번호 6 참조). 도 4는 또한 IL-2의 N-말단 영역이 단백질의 수용체-결합 영역과 멀리 떨어진 것을 나타내고 이는 IL-2가 "RN" 사이토카인의 구조를 가짐을 나타낸다. IL-2가 "RN" 사이토카인이라는 본 발명자들의 결론은 문헌[H. Sato, et al., (2000) Bioconjug Chem 11:502-509]의 관찰과 일관되는 것이고, 상기 논문에서는 1 또는 2 가닥의 10-kDa mPEG를 서열 AQQIVM 중의 1 또는 2개의 글루타민 잔기("Q")에 커플링하기 위하여 효소적 트랜스글루타민화를 이용하였고, 상기 논문의 저자들은 IL-2 뮤테인으로 N-말단 연장으로 도입하였다. 사토(Sato) 등은 그들의 뮤테인의 트랜스글루타민화에 의한 아미노 말단 근처에서 PEG화된 접합체가 IL-2 뮤테인 중의 리신의 무작위 PEG화에 의해 제조된 접합체 보다 더욱 생활성을 유지하였음을 보고하였다. 다른 단백질의 PEG화에 대한 유사 접근법에 대한 검토는 상기 문헌(Sato, H., (2002))을 참조. 도 4에 나타난 바와 같은, 단백질의 수용체-결합 영역으로부터의 IL-2의 아미노 말단의 공간적 분리에 기초하여, 당업자들은 잔기 Thr-3 (도시하지 않음)에서의 당질화 부위가 본원에 규정된 바와 같이, IL-2를 "RG" 수용체-결합 단백질이 되게 함을 이해할 수 있다. 따라서, IL-2는 RN 사이토카인이자 RG 사이토카인이다.
- [0175] 도 11 및 12는 실시예 1에서와 같이 N-말단 선택적으로 환원적 알킬화에 의해 PEG화된 본 발명의 예시적 PEG-IL-2 접합체의 양이온-교환 및 크기 배제 크로마토그램을 각각 나타낸다. 분류에 사용된 조건은 각각 도 9 및 10에 기술된 것과 동일하였다. 도 13은 도 11에 나타난 바와 같은 이온-교환 크로마토그래피에 의한 정제 전 및 후의 소듐 도데실 황산염의 존재하에서 동일 접합체의 폴리아크릴아미드 겔 전기영동 분석("SDS-PAGE")을 나타낸다. 겔은 비스-트리스 완충액(카탈로그 # NP0335, Invitrogen, Carlsbad, CA) 중 4-12% 총 아크릴아미드의 구배를 함유하였다. 약 1 - 2 mcg 단백질을 각각 함유하는 샘플을 분석에 앞서 90°C에서 10 분 동안 가열하였다. 겔을 냉각하면서 약 135 분 동안 117-120의 일정한 전압에서 수행시켰다. 일 부분의 겔을 Sypro[®] Ruby 단백질 겔 염색(Molecular Probes, Eugene, OR)로 염색하고, 다른 부분을 문헌[C.E. Childs (1975) Microchem J 20:190-192] 및 [B. Skoog (1979) Vox Sang 37:345-349]의 방법을 적용하여 PEG로 염색하였다. 도 11의 각각 2 피크의 정제된 모노PEG-IL-2의 자동화 에드만(Edman) 분해에 의한 아미노-말단 아미노산 분석은 90% 초과와 PEG가 N-말단 잔기에 부착되었음을 나타내었다. 분석은 커먼웰스 바이오테크놀로지스 인크(Commonwealth Biotechnologies, Inc.; Richmond, VA)에 의해 수행하였다.

[0176] **실시예 3: N-말단 PEG화된 EGF 및 IGF-1의 합성 및 분석**

- [0177] 상피 성장 인자("EGF", 서열 번호 7) 및 인슐린 유사 성장 인자 -1("IGF-1; 서열 번호 9)를 EGF 및 IGF-1이 RN 성장 인자임을 나타내는 각각 도 5 및 7의 분자 모델에 기초하여 N-말단 PEG화에 대하여 선택하였다. 5-kDa PEG-알데히드의 3 mM 용액을 15 mg/mL의 최종 농도에서 1 mM HCl 중 5-kDa PEG-프로피온알데히드 (NOF Corporation, Tokyo)를 용해하는 것에 의해 제조하였다. 보란-피리딘을 0.3 mL 아세트니트릴 + 0.15 mL 중 8 M 보란-피리딘 (Aldrich) 35 μ L (mL)의 희석에 의하여 제조하여 0.58 M의 최종 농도를 얻었다. 각각 0.2 M의 소듐 포스페이트 및 소듐 아세테이트를 함유하는 완충액(pH 6.3)을 제조하고, 0.1 미크론 공극 무균 필터를 통하여 여과하였다. 인비트로젠 코퍼레이션(Invitrogen Corp; Carlsbad, CA)로부터 입수한 제조합 인간 EGF를 1 mg/mL의 농도에서 물 중에 용해하였다. 0.6 mL의 상기 용액에, 70 mL의 3 mM PEG-알데히드 용액, 35 mL의 포스페이트-아세테이트 완충액 및 30 mL의 0.58 M 보란-피리딘 용액을 첨가하고, 혼합물을 냉장하였다. 4-8°C에서 4일 동안 인큐베이션한 후 100 mM NaCl을 함유하는 소듐 카르보네이트 완충액(pH 10.1) 중에서 슈퍼덱스(Superdex) 75 HR 10/30 칼럼 상에서 크기-배제 HPLC에 의해 분취액을 분석하고, 용리물을 280 nm에서 흡광도 및 굴절 인덱스에 의해 모니터링하였다. 5 일 동안 인큐베이션 한 0.65 mL의 반응 혼합물을 주사한 후, 분획을 280 nm의 주요 흡광도 피크의 중심으로부터 수집하였다. 상기 풀(pool)의 pH를 아세트산

의 첨가에 의해 약 5.5로 저하시켰다. 상기 생성물 풀의 크기-배제 HPLC에 의한 재분석은 100%의 단백질이 PEG₁-EGF ("모노-PEG-EGF")에 상응하는 위치에 있고, 상기 풀의 단백질 농도가 약 0.32 mg/mL임을 나타내었다. SDS-PAGE에 의한 분석으로 모든 단백질이 EGF의 모노-PEG 접합체로 구성됨을 확인하였다. 생성물 풀을 실시예 4에 기술된 바와 같은, 세포-기재 생물검정에서 시험하기 앞서 0.2 미크론 공극 코닝(Corning) 시린지 필터를 통하여 무균 여과하였다. EGF의 10-kDa PEG 접합체를 5-kDa PEG-알데히드 대신 10-kDa PEG-프로피온알데히드(NOF 코퍼레이션으로부터 입수)를 사용한 것을 제외하고는 유사한 방법에 의해 합성, 정제 및 분석하였다. 10-kDa PEG 접합체의 최종 단백질 농도는 약 0.36 mg/mL이었다.

[0178] 인비트로젠 코퍼레이션 (Invitrogen Corp.)으로부터의 재조합 인간 인슐린-유사 성장 인자-1 ("IGF-1") 샘플을, 상응하는 EGF 접합체에 대해 기술한 방법으로 5-kDa 또는 10-kDa PEG-알데히드에 커플링했다. 5-kDa PEG-알데히드의 IGF-1에 대한 커플링 및 PEG-EGF에 대해 기술한 바와 같은 접합체 정제의 생성물은 약 99% 순도의 모노-PEG-IGF-1 접합체였고, 최종 단백질 농도는 약 0.20 mg/mL였다. SDS-PAGE 분석으로 모노-PEG 접합체에서 단백질이 우세함을 확인했다. 또한, 전기영동 분석 결과, 겔 상의 로딩양이 많을 때에는 미량의 디-PEG 접합체가 존재하는 것으로 밝혀졌다. 10-kDa PEG-알데히드의 IGF-1에 대한 커플링 생성물의 크기-배제 HPLC 분석 결과, 생성물은 95%의 모노-PEG 접합체 및 약 5%의 디-PEG 접합체로 구성되고 약 0.23 mg/mL의 총 단백질 농도를 가지는 것으로 나타났다.

[0179] 실시예 4: N-말단 PEG화된 EGF 및 IGF-1의 생물학적 측정법

[0180] EGF 및 IGF-1의 N-말단 PEG화 (PEGylation)가 성장 인자 각각의 수용체-결합능을 감소시키는지 여부를 세포 배양 측정법으로 평가했다. PEG-EGF의 측정에 대해서는, EGF에 대해 이미 기술한 바와 같이 (Crouch, M.F., et al., (2001) *J Cell Biol* 152:263-273) 3T3 섬유모세포를 사용했다. PEG-IGF-1의 측정에 대해서는, IGF-1에 대해 이미 기술한 바와 같이 (Amoui, M., et al., (2001) *J. Endocrinol* 171:153-162, Morris, A. E., et al., (2000) *Biotechnol Prog* 16:693-697) 차이나이즈 햄스터 난소 ("CHO") 세포를 사용했다. 실시예 3에 기술한 바와 같이 제조한 PEG-EGF 및 PEG-IGF-1 생성물의 풀을 0.2-미크론 구멍의 코닝(Corning) 주사기 필터로 멸균-여과한 다음, 세포계 생물학적 측정법으로 시험했다. 멸균-여과된 EGF 및 5-kDa과 10-kDa PEG로 합성한 모노-PEG 접합체를 계열 희석하여, 최적의 성장에 필요한 것보다 낮은 백분율의 혈청을 함유하는 배지 내의 3T3 세포 배양물에 첨가했다. 세포를 표준 조건 (37°C, 5% CO₂/공기)하에서 배양하고, 1주일 동안 여러 시간 간격으로 쿨터 (Coulter) 계수기 (모델 Z1, 플로리다주 마이애미)로 카운팅했다. 첨가된 성장 인자의 부재 시 관찰된 세포수에 비해, 본 발명의 모노-PEG 접합체에 의해서 비개질된 EGF에 의한 경우와 적어도 동일한 백분율로 세포수가 증가했다. 마찬가지로, IGF-1 및 비개질된 IGF-1의 멸균-여과된 모노-PEG 접합체를 계열 희석하여 최적 성장에 필요한 것보다 낮은 백분율의 혈청을 함유하는 배지 내의 CHO 세포 배양물에 첨가하고 세포를 배양하여, EGF 시험 배양에 대해 상기 기술한 바와 같이 카운팅했다. EGF 및 그의 N-말단 모노-PEG 접합체에 대해 관찰되는 바와 같이, 수일 후에 관찰된 세포수는 IGF-1의 모노-PEG 접합체에 의해 비개질된 성장 인자에 의한 경우와 적어도 동일한 백분율로 증가했다. 따라서, 수용체-결합 영역으로부터 떨어져 있는 아미노-말단 잔기에 결합된 PEG를 갖는 단백질에 대해 예상되는 바와 같이, EGF와 IGF-1은 모두 N-말단 PEG화 후에 완전한 기능을 하는 것으로 입증되었다.

[0181] 실시예 5: "RN" 수용체-결합 단백질 군의 구성원 및 비구성원

[0182] 도 2, 3 및 5-8은 수용체-결합 단백질 인터페론-베타, 과립구-대식세포 콜로니-자극 인자 ("GM-CSF"), 외피 성장 인자 ("EGF"), 염기성 섬유모세포 성장 인자 ("bFGF," 이는 당 분야에서 "FGF-2"로도 알려져 있음), 인슐린-유사 성장 인자-1 ("IGF-1") 및 인터페론-감마 ("IFN-감마")의 리신 잔기의 표면 분포를 이들의 수용체-결합 영역과 관련하여 보여주고 있고, 이들 중 어느 단백질들이 "RN" 사이토카인 및 성장 인자인지를 보여주고 있다. 또한, 도 2는 인터페론-베타가 "RG" 사이토카인임을 보여주고 있다.

[0183] 도 2는 인터페론-베타의 결합 부위 1 및 결합 부위 2 영역에 걸쳐 분포된 리신 잔기를 보여주고 있지만, 폴리펩티드 사슬의 아미노 말단은 단백질의 수용체-결합 영역으로부터 멀리 떨어져 있어서 IFN-베타가 RN 사이토카인임을 입증해주고 있다 (서열 번호 3 참조).

[0184] 도 3은 GM-CSF의 알파 수용체에 결합하는 결합 부위 1 및 베타 수용체에 결합하는 결합 부위 2 영역에 걸쳐 분포된 리신 잔기를 보여주고 있지만, 폴리펩티드 사슬의 아미노 말단은 단백질의 수용체-결합 영역으로부터

멀리 떨어져 있어서 GM-CSF가 RN 사이토카인임을 입증해주고 있다 (서열 번호 5 참조).

[0185] 도 5는 단백질의 수용체-결합 영역 내에 또는 그에 인접한 리신 잔기를 포함하여 외피 성장 인자 ("EGF")의 폴리펩티드 사슬을 따라 분포된 리신 잔기를 보여주고 있지만, 폴리펩티드 사슬의 아미노 말단이 단백질의 수용체-결합 영역으로부터 보다 멀리 떨어져 있음을 보여주고 있다 (서열 번호 7 참조).

[0186] 도 6은 염기성 섬유모세포 성장 인자 ("bFGF")의 몇몇 리신 잔기가 수용체 또는 헤파린에 대한 결합과 관련됨을 보여주고 있는데, 이들은 모두 bFGF에 의한 신호 전달에 필수적이다 (Schlessinger, *J., et al.*, 상기). bFGF의 아미노 말단은 bFGF의 헤파린-결합 영역으로부터 떨어져 있고, bFGF가 RN 성장 인자일 정도로 수용체 결합 부위로부터 충분히 떨어져 있을 수 있다 (서열 번호 8 참조).

[0187] 도 7은 인슐린-유사 성장 인자-1 ("IGF-1")의 몇몇 리신 잔기가 폴리펩티드의 수용체-결합 영역 내에 또는 그에 인접하여 존재함을 보여주고 있지만, IGF-1의 아미노 말단은 수용체-결합 도메인으로부터 떨어져 있어 IGF-1이 RN 성장 인자임을 입증해주고 있다 (서열 번호 9 참조).

[0188] 도 8은 인터페론-감마 ("IFN-감마")가 두 폴리펩티드 사슬이 현저한 상호작용을 하는 동종이량체로서 존재함을 보여주고 있다. 각 폴리펩티드의 몇몇 리신 잔기는 수용체에 대한 결합에 관련되거나 이합체화 계면에 존재하는 IFN-감마의 아미노산 잔기에 인접한다. 아미노산 잔기 Gln-1의 "볼-앤드-스틱" 형식은 이러한 N-말단 잔기의 기능적 중요성에 대한 증거를 반영하기 위한 것이다. (이 도면이 근거로 하고 있는 결정 구조는 천연 단백질에는 존재하지 않는 "Met 0"으로 불리는 추가의 메티오닌 잔기를 포함한다.) (서열 번호 4 참조). IFN-감마의 N-말단 잔기는 이합체화 계면으로부터 멀리 떨어져 있으므로, N-말단 PEG화로 IFN-감마의 동종이량체화에 대한 리신 PEG화의 억제 효과를 회피할 수 있었다. 반면, 이량체의 수용체와의 상호작용은 특히, 긴 중합체 가닥이 결합되었을 때 중합체의 아미노 말단에 대한 커플링으로 인해 억제될 가능성이 있다.

[0189] IFN-감마, IL-10 및 줄기세포 인자는 동종이량체로서 기능하는 사이토카인의 예이다 (Walter, M. R., et al., 상기; Josephson, K., et al., (2000) *J. Biol Chem* 275:13552-13557; Thiel, D.J., et al., 상기; McNiece, I. K., et al., 상기). 유사하거나 동일한 크기 및 형상을 갖는 접합체의 조제물 내에 가능성 있는 상이한 분자 구조들이 존재할 수 있으므로, 수용체-결합 단백질의 이합체화는 그의 N-말단 모노PEG화 접합체의 특징 규명에 특별한 장점을 제공한다. 예를 들어, 1개의 디PEG화 단량체 및 1개의 PEG화되지 않은 단량체 (PEG₂-단백질₁ + 단백질₁)로 구성되는 이량체는, 이합체성 접합체의 크기에 기초한 대부분의 분석 (예를 들어, 크기-배제 크로마토그래피, 또는 침강 계수, 광 산란 또는 확산 계수의 평가)으로는 2개의 N-말단 PEG화 단량체 (PEG₁-단백질₁)₂로 구성된 이량체로부터 구분하기가 어렵거나 불가능할 것이지만, 단백질 단량체 당 평균 1개의 PEG를 각각 함유하고 있는 이러한 두 접합체의 수용체-결합 효능은 전혀 다를 수 있다.

[0190] 단독 삼량체를 형성하는 장쇄 베타-시트 수용체-결합 단백질, 예를 들어 종양 괴사 인자 알파 ("TNF-알파")에 대해 PEG₃-단백질₃ 삼량체의 이성질체 수는, 심지어 동종이량체로서 용액 내에 나타나는 수용체-결합 단백질보다도 많다. 아미노 말단에 가까운 곳에서의 TNF의 화학적 개질은 사이토카인을 불활성화시키는 것으로 입증되었다 (Utsumi, T., et al., (1992) *Mol Immunol* 29:77-81). TNF-알파는 N-말단 잔기에 대해 선택적인 특정 조건하에서 시약으로 PEG화되었을 때 실질적인 활성을 가질 수 없다. 그럼에도 불구하고, Apo2L/TRAIL과 같은 TNF-알파 길항물질 (Hymowitz, S.G. et al. (2000), *Biochemistry* 39:633-640)은 본 발명을 이용한 PEG화에 적합하다.

[0191] 올리고머로 기능하는 사이토카인 접합체의 특징규명에 대해, 분석 방법을 조합할 필요가 있었다. 아미노-말단 서열 분석으로 유리 N-말단 알파 아미노기를 갖는 단량체의 존재를 검출할 수 있고, 해리된 단량체의 전기영동 분석 (예를 들어, SDS-PAGE 또는 모세관 전기영동)으로 수용체-결합 단백질의 PEG화되지 않은 단량체 및 다수-PEG화된 단량체의 존재를 규명할 수 있다. 이러한 증거 없이는, 상기 동종이량체- 및 동종삼량체-형성 단백질의 모노PEG화 접합체의 합성을 명백하게 입증할 수 없다.

[0192] 특히 도 1-8에 도식적으로 예시한 이러한 실시예들은, 수용체-결합 단백질의 수용체-결합 도메인 내에서의 또는 그에 인접한 곳에서의 이러한 생활성 성분의 PEG화에 의한 단백질-수용체 상호작용에 대한 입체적 장애의 잠재적인 역할을 용이하게 이해하기 위한 시각적인 기초를 제공하고 있다. 또한, 만일 PEG가 단량체 간의 상호작용에 필요한 영역 내에서 커플링되었다면, 고도로 신장되었고 유연한 PEG 가닥은 큰 부피를 차지하므로 (도 1d 참조) 특정 수용체-결합 단백질 단량체의 기능적 동종이량체 또는 단독 삼량체로의 회합을 입체적으로 방해할 것이다. 따라서, 수용체-결합 단백질의 수용체-결합 영역으로부터 멀리 떨어진 부위에 PEG화가 일어나도록 표적화하면, PEG화가 분자의 기능에 필요한 분자간의 상호작용을 방해할 가능성이 줄어든다. 본 발명

에 따라 방법을 수행하면, 수용체-결합 단백질의 PEG화로부터 예상되는 보다 많은 이점들을 실현시킬 수 있다. 이 결과 제조된 접합체는 예상치 못하게 높은 생활성의 유지와 함께 용해도 개선, 생체이용률 증가, 안정성 증가 및 면역원성의 감소와 같은 예상되는 이점들을 겸비하고 있다.

[0193] 본 발명은 본원의 특정 실시태양 및 특정 실시예를 참고로 하여 기술된다. 본 발명의 방법은 사이토카인, 케모카인, 성장 인자 및 폴리펩티드 호르몬 또는 그들의 길항물질 이외의 특정 수용체-결합 펩티드 및 단백질, 및 기타 접합 시약에 마찬가지로 적용될 수 있다. 따라서, 본 발명의 영역은 기술된 실시예에 한정되지 않고, 청구범위에 의해서만 한정된다. 당업자들은 본 발명의 영역에서 벗어남이 없이 다른 실시태양들을 실시할 수 있음을 용이하게 이해할 수 있다. 상기 변화들은 모두 본 발명의 일부로 고려된다.

[0194] 본 명세서에 언급된 모든 문헌, 특허 및 특허출원은 본 발명이 속하는 분야의 당업자의 수준에서 나타냈고, 마치 개별적인 문헌, 특허 또는 특허출원이 참고문헌으로 삽입됨을 구체적 및 개별적으로 나타낸 것과 동일한 정도로 본원에 참고자료로 포함된다.

산업상 이용 가능성

[0195] 본 발명의 방법은 사이토카인, 케모카인, 성장 인자 및 폴리펩티드 호르몬 또는 그들의 길항물질 이외의 특정 수용체-결합 펩티드 및 단백질, 및 기타 접합 시약에 마찬가지로 적용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0026] 도1 내지 8은 결정학적 데이터에 기초하여 RasMol 소프트웨어 (Sayle, R.A., et al., (1995) Trends Biochem Sci 20: 374-376)로 만든 다양한 사이토카인 및 성장인자의 분자 모델을 나타낸 것이다. 각각의 모델은 "공-및-막대" 포맷으로 나타난 특허 관심있는 특정 잔기를 제외하고는 "리본" 또는 "카툰" 포맷으로 표현되어 있다. 이들 포맷은 RasMol 소프트웨어를 이용해 선택된 옵션이다. 리본의 어두운 부분은 수용체에 결합하는데 관련된 것으로 보고된 사이토카인 및 성장인자의 도메인들 나타낸다. 각각의 구조에 있어, 단백질 데이터뱅크 (PDB)의 접근 코드가 제시되어 있다 (Laskowski, R.A., (2001) Nucleic Acids Res 29: 221-222; Peitsch, M.C., (2002) Bioinformatics 18: 934-938; Schein, C.H., (2002) Curr Pharm Des 8: 2113-2129 참조).

[0027] 도 1a는 로쉬(Roche)사의 PEG-인터페론 제품, PEGASYS®의 PEG화의 주요 부위로 보고된 리신 잔기(Lys 31, Lys 121, Lys 131 및 Lys 134)를 "볼 & 스틱" 형식(Bailon, P., et al.의 데이터에 기초함, 상기 참조)으로 나타난 인터페론-α-2a(SEQ ID NO:1)의 모델을 나타내고 있다. 그 수용체의 결합에 관여하는 영역("결합 부위 1 및 2")이 확인되었다. PEGASYS에서 PEG화된 것으로 보고된 4개의 리신 잔기 모두가 결합 부위 1의 영역 내에 있다. (PDB 코드 1ITF).

[0028] 도 1b는 셰링-플라우(Schering-Plough)사의 PEG-INTRON®의 PEG화의 주요 부위로 보고된 잔기(His 34, Lys 31, Lys 121, Tyr 129 및 Lys 131)가 "볼 & 스틱" 형식(Wyllie, D.C., et al.의 데이터에 기초함, 상기 참조)으로 나타난 인터페론-α-2b(SEQ ID NO:2)의 모델을 나타내고 있다. 이들 아미노산 잔기는 결합 부위 1의 영역 내에 있다.

[0029] 도 1c는 본 발명에 따른 PEG화의 표적인 아미노-말단 시스테인 잔기("Cys 1")가 "볼 & 스틱" 형식으로 나타난 인터페론-α-2b의 모델을 나타내고 있다. Cys 1은 결합 부위 1 및 2로부터 멀리 떨어져 있다.

[0030] 도 1d는 도 1c에 나타난 것과 같은 인터페론-α-2b의 모델로 여기에 20 kDa의 PEG 단일쇄가 N-말단 시스테인 잔기("Cys 1")에 부착되어 있는 것이다. PEG 구조는 문헌[Lee, L.S., et al., (1999) Bioconjug Chem 10: 973-981]에 기술된 프로그램의 개작을 사용하여 생성된 것이고, 단백질에서와 같은 스케일이 되도록 한 것이다.

[0031] 도 2는 수용체 결합 도메인 내에 있거나 그에 인접한 수개의 리신 잔기가 표시된(Lys 19, Lys 33, Lys 99 및 Lys 134), 인간 인터페론-β-1a(SEQ ID NO:23 참조)의 분자 모델을 나타내고 있다. 아울러, 당질화 부위(Asn 80) 및 N-말단 메티오닌 잔기("Met 1")를 "볼 & 스틱" 형식(Karpusas, M., et al., (1997) Proc Natl Acad Sci USA 94: 11813-11818; Karpusas, M., et al., (1998) Cell Mol Life Sci 54: 1203-1216; Runkel, L., et al., (2000) Biochemistry 39: 2538-2551)으로 나타내고 있다. Met 1은 결합 부위 1 및 2로부터 멀리 떨어져

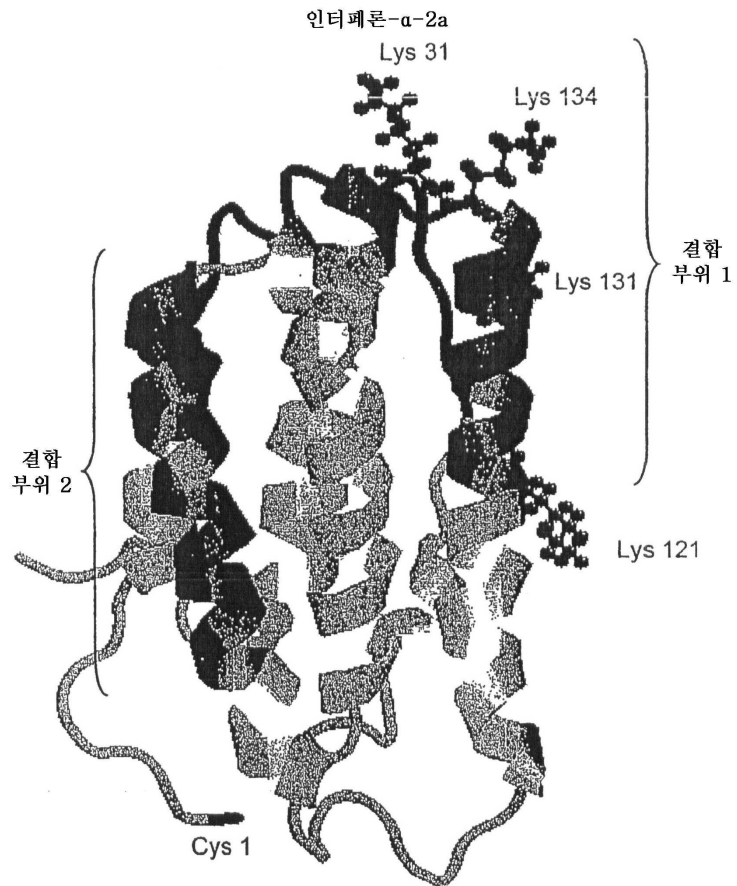
있는 반면, 수개의 리신 잔기는 수용체 결합 도메인 내에 위치한다. (PDB 코드 1AUI) 인터페론- β -1b는 인터페론- β -1a와는 N-말단 메티오닌 잔기 및 탄수화물 잔기가 결합되어 있으며, 쌍을 이루지 않는 시스테인 잔기(Cys 17)를 치환하는 세린 잔기를 갖는다는 면에서 상이하다.

- [0032] 도 3은 수용체-결합 도메인 내의 3개의 리신 잔기(Lys 72, Lys 107 및 Lys 111)와 아울러 결정 구조에서 가시화되는 아미노 말단 근처의 첫번째 아미노산 잔기("Arg 4")가 "볼 & 스틱" 형식(Rozwarski, D.A., et al., (1996) Proteins 26:304-313)으로 나타난 인간 과립구 대식세포 콜로니-자극 인자("GM-CSF," SEQ ID NO:5)의 분자 모델을 나타낸다. GM-CSF의 아미노-말단 영역은 결합 부위 1 및 2로부터 멀리 떨어져 있다. (PDB 코드 2GMF)
- [0033] 도 4는 세개의 수용체(α , β 및 γ) 각각에 관여하는 것으로 보고된 아미노산 잔기가 "볼 & 스틱" 형식으로 나타나고, 수개의 리신 잔기가 수용체-결합 도메인 내에 또는 그 근처에 위치한, 인간 인터루킨-2("IL-2," SEQ ID NO:6)의 분자 모델을 나타낸다. 결정 구조에서 가시화되는 아미노 말단에 가장 가까운 아미노산 잔기는 세린 6("Ser 6")로 이는 수용체 결합 도메인에서 멀리 떨어져 있는 것이다(Bamborough, P., et al., (1994) Structure 2: 839-851; Pettit, D.K., et al., 상기 참조). (PDB 코드 3INK)
- [0034] 도 5는 수용체 결합에 관여하는 잔기와 수용체 결합 영역에 인접한 두 리신 잔기(Lys 28 및 Lys 48)를 제외하고는 "카툰" 형식인 인간 외피 성장 인자("EGF," SEQ ID NO:7)의 분자 모델을 나타내고 있다. 이 사슬 내 이황화 결합은 과선으로 나타내진다. 이 모델이 기초하는 결정 구조에서 가시화되는 아미노 말단에 가장 가까운 아미노산 잔기는 시스테인 6("Cys 6")이다(Carpenter, G., et al., (1990) J Biol Chem 265: 7709-7712; Lu, H.S., et al., (2001) J Biol Chem 276: 34913-34917의 데이터에 기초함). 결정 구조에서 가시화되지 않는 EGF의 아미노 말단의 가요성 부분(잔기 1-5)는 수용체-결합 영역에서 나타나지 않는다. (PDB 코드 1JL9).
- [0035] 도 6은 수용체 및 헤파린 결합에 관여하는 잔기가 "볼 & 스틱" 형식(Schlessinger, J., et al., (2000) Mol Cell 6: 743-750의 데이터에 기초함)으로 제시되어 확인되는 "카툰" 형식인 염기성 섬유모세포 성장 인자("bFGF," SEQ ID NO:8)의 분자 모델을 나타내고 있다. 아미노 말단으로부터의 처음 12개 아미노산은 수용체 결합에 관여하지 않는다. (PDB 코드 1FQ9).
- [0036] 도 7은 수용체 결합에 관여하는 잔기들(23-25 및 28-37) 및 결정 구조에서 가시화되는, 아미노 말단에 대해 가장 가까운 아미노산 잔기인 글루탐산 잔기 3("Glu 3")을 제외하고는, "카툰" 형식인 인슐린-유사 성장 인자-1("IGF-1," SEQ ID NO:9)의 분자 모델을 나타내고 있다. 두개의 리신 잔기가 확인되었고, 이 중 하나(Lys 27)는 수용체-결합 도메인에 인접하고, 다른 하나는 수용체-결합 도메인으로부터 멀리 떨어져 있다(Brzozowski, A.M., et al., (2002) Biochemistry 41: 9389-9397의 데이터에 기초함). IGF-1의 아미노 말단은 수용체-결합 도메인으로부터 멀리 떨어져 있다. (PDB 코드 1GZR).
- [0037] 도 8은 동종이량체인 인터페론- γ ("IFN- γ ," SEQ ID NO:4)의 분자 모델을 나타내고 있다. 두 폴리펩티드 사슬 사이의 상호작용을 밝히기 위해서, 단량체들 중 하나("사슬 A")를 "리본" 형식으로 나타내고, 다른 하나("사슬 B")를 "골격" 형식으로 나타내었다. 리신 잔기(밝은 "볼 & 스틱" 형식으로 나타냄)는 단량체 사이의 접촉 영역에 관여하는 영역 또는 수용체 결합에 관여하는 아미노산 잔기에 인접한 영역을 비롯하여, 펩티드 사슬을 따라 나타난다. IFN- γ 의 아미노-말단 영역은 이량화 접촉 영역에서 멀리 떨어져 있지만, 글루타민 1(Gln 1)은 수용체 결합에 관여한다. (Thiel, D.J., et al., (2000) Structure 8: 927-936; PDB 코드 1FG9)
- [0038] 도 9는 IFN, 20-kDa의 mPEG-알데히드 및 환원제를 함유하는 반응 혼합물의 양이온-교환 크로마토그래피에 의한 PEG화되지 않은 인터페론- α -2b("IFN"), 모노PEG화된 인터페론- α -2b("PEG₁-IFN") 및 디PEG화된 인터페론- α -2b의 분획화를 보여주고 있다.
- [0039] 도 10은 도 9에서 나타난 것과 같이 분획화된 반응 혼합물 및 도 9에서 그 결과를 나타난 이온-교환 칼럼으로부터 수집된 선택된 분획의 크기-배제 크로마토그래피를 나타내고 있다.
- [0040] 도 11은 인간 IL-2, 20-kDa mPEG-알데히드 및 환원제를 함유하는 반응 혼합물의 양이온-교환 크로마토그래피의 분획화를 나타내고 있다. 나타난 용리 조건 하에서, 도 9에 나타난 인터페론- α -2b에 대한 결과와는 달리, PEG화되지 않은 IL-2가 칼럼으로부터 용리되지 않는다.
- [0041] 도 12는 도 11에 나타난 것과 같은 분획된 반응 혼합물과 칼럼으로부터 용리된 선택된 분획의 크기-배제 크로마토그래피 분석을 나타내고 있다.
- [0042] 도 13은 PEG화된 인터루킨-2("PEG-IL-2")의 반응 혼합물과 도 11에 나타난 크로마토그래피의 양이온 칼럼으로

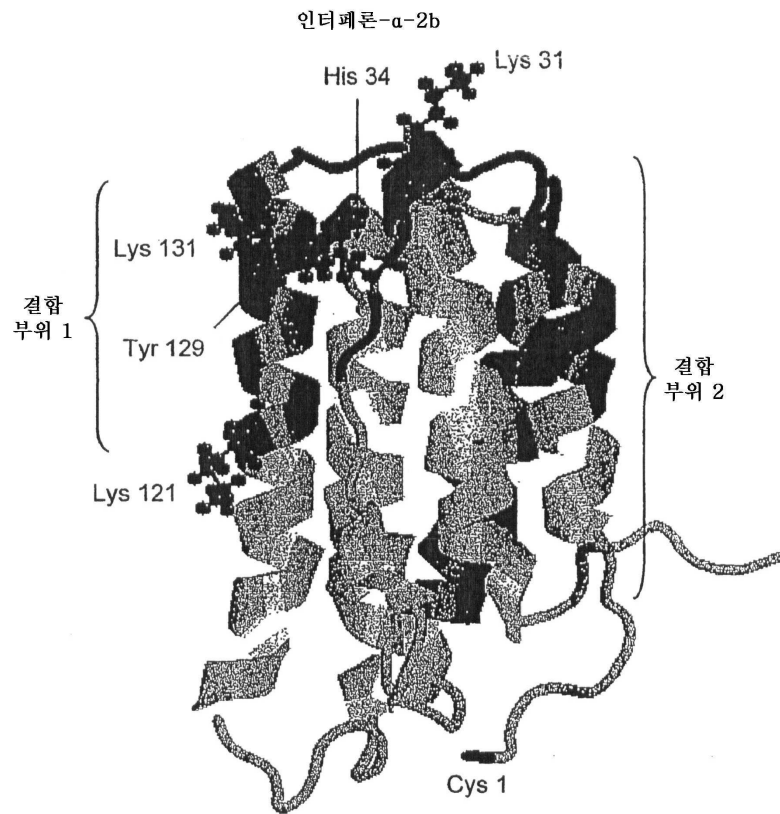
부터 나온 분획의 전기영동 분석을 나타내고 있다.

도면

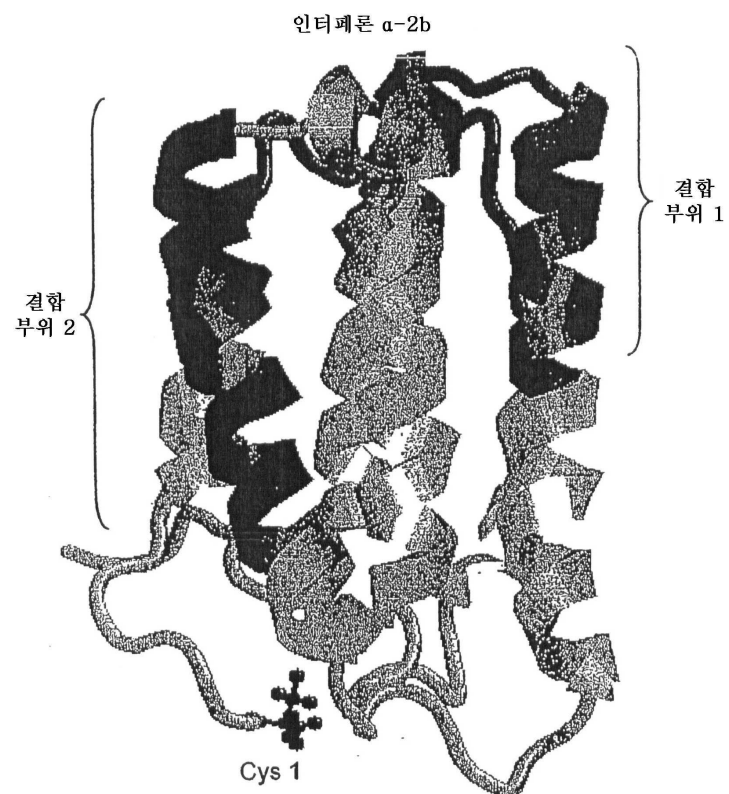
도면1a



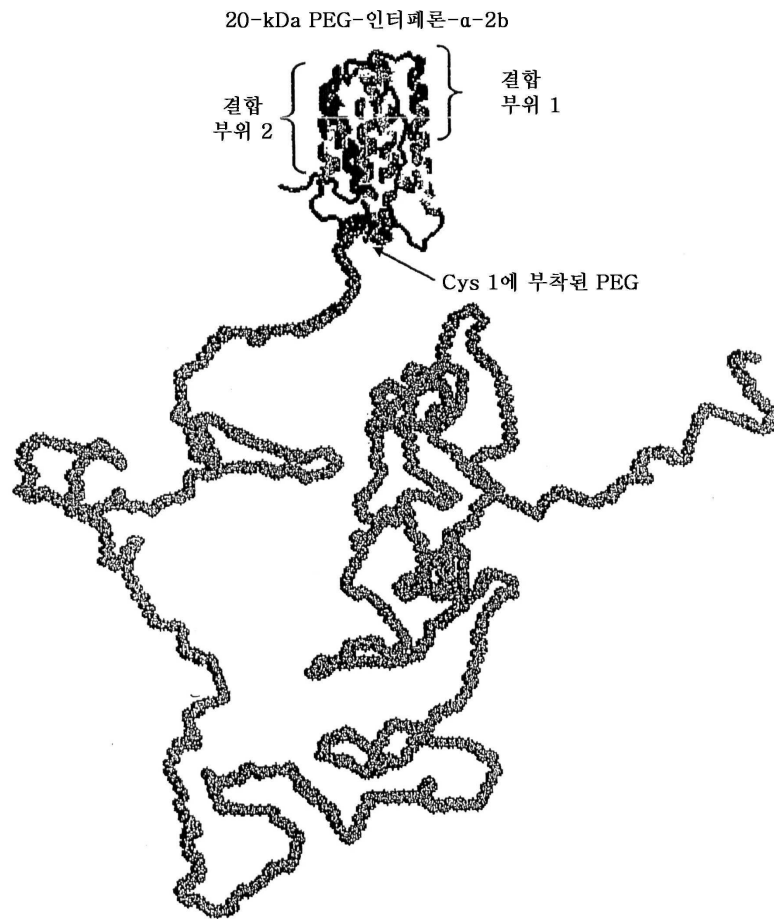
도면1b



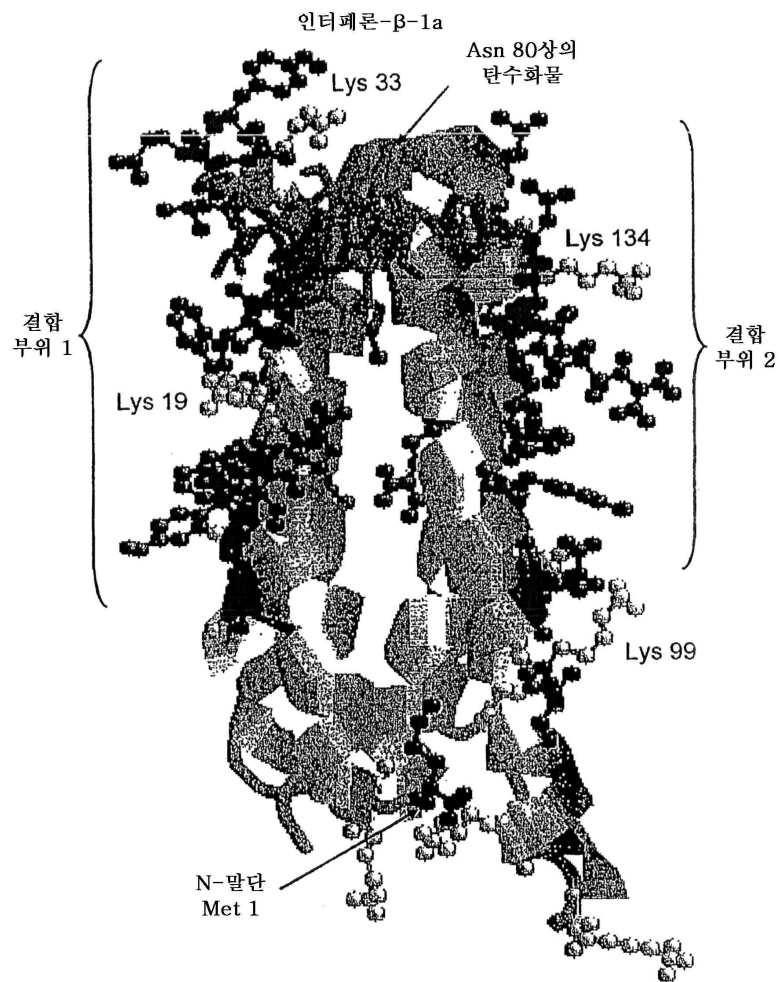
도면1c



도면1d

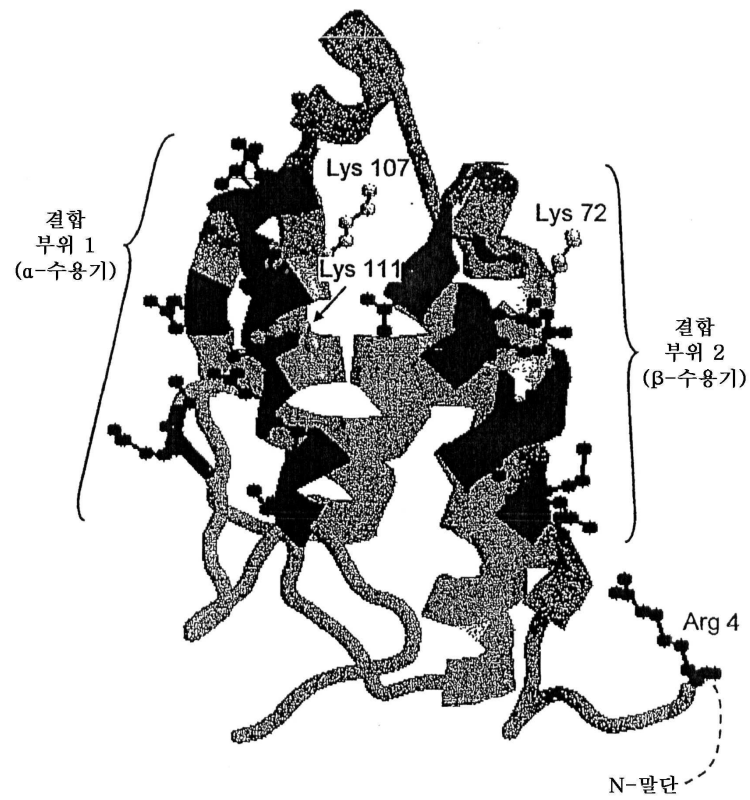


도면2

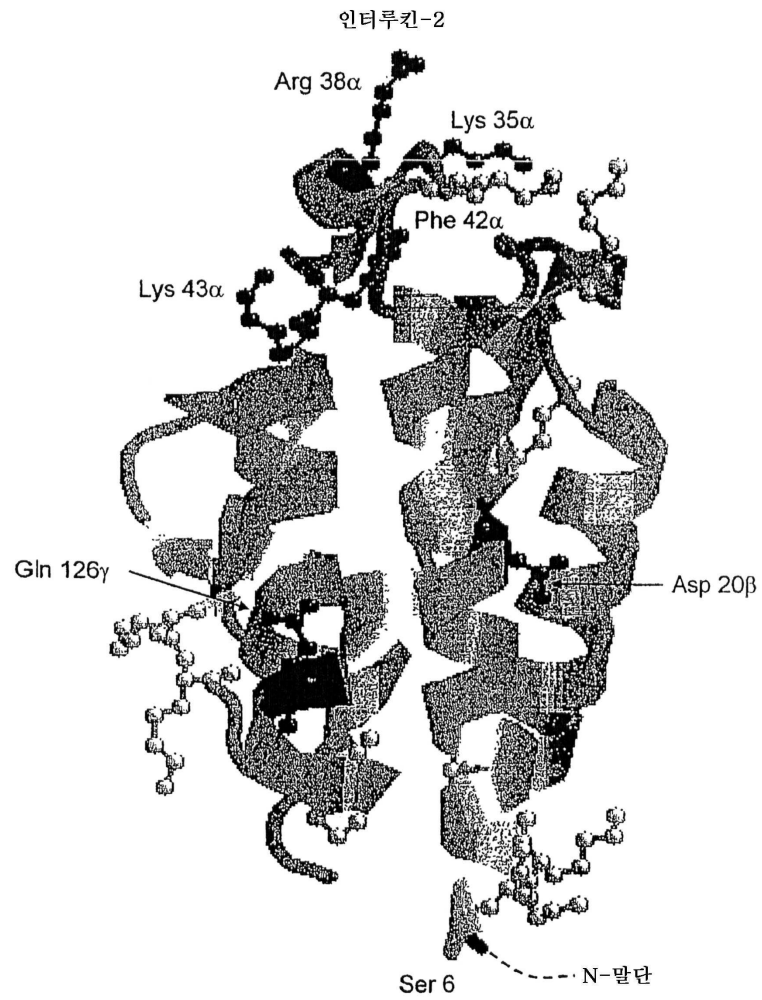


도면3

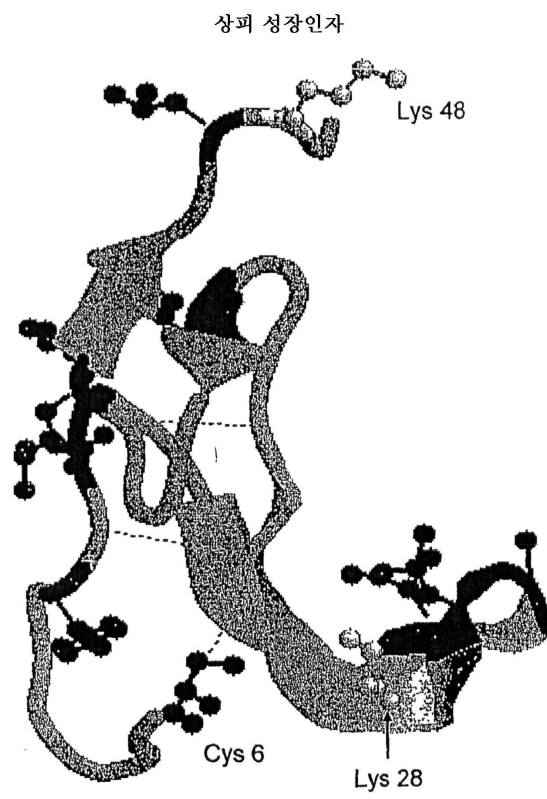
과립-백혈구 대식세포 콜로니-자극 인자



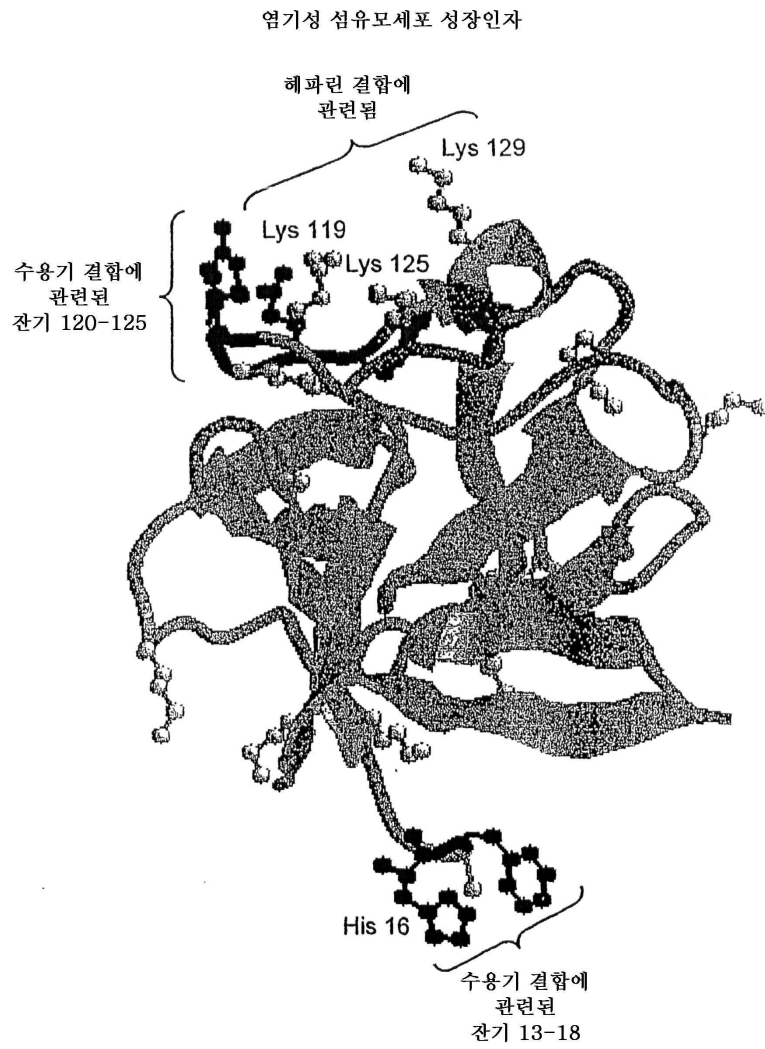
도면4



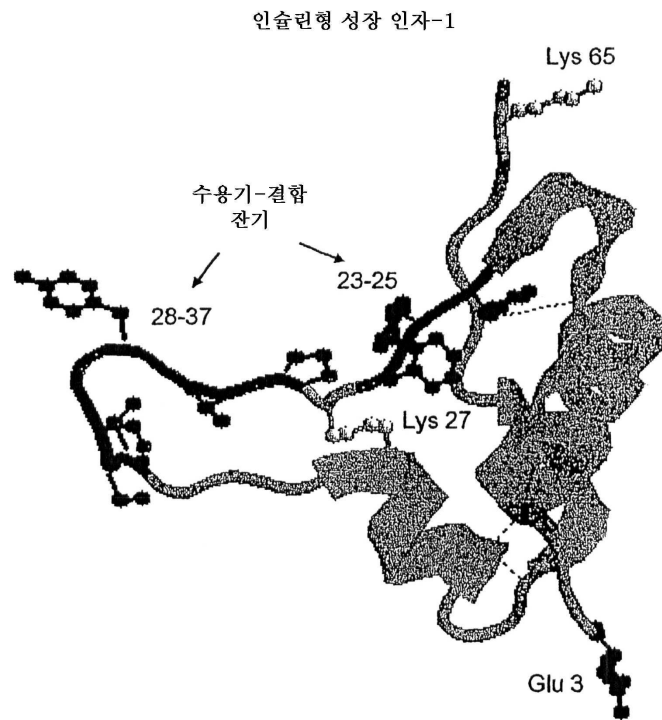
도면5



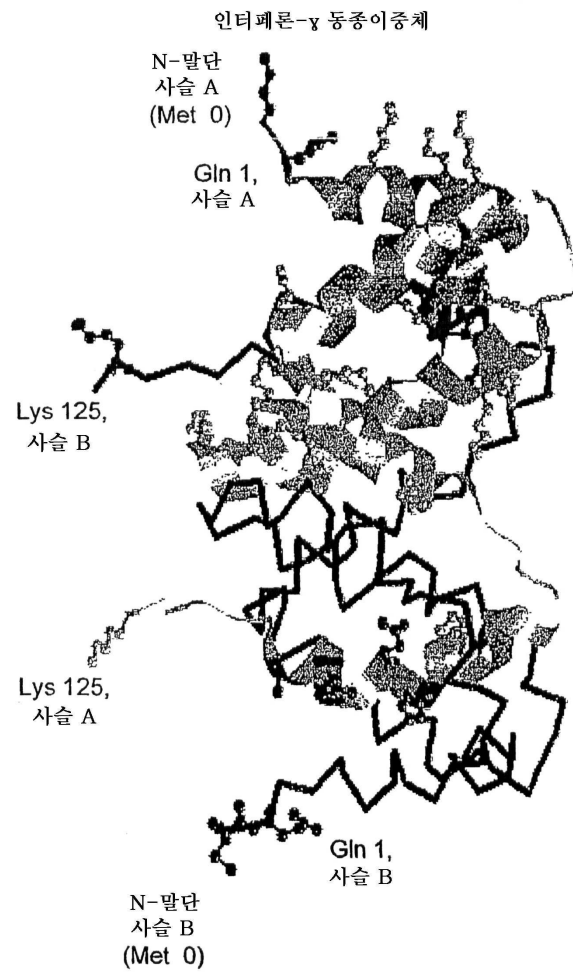
도면6



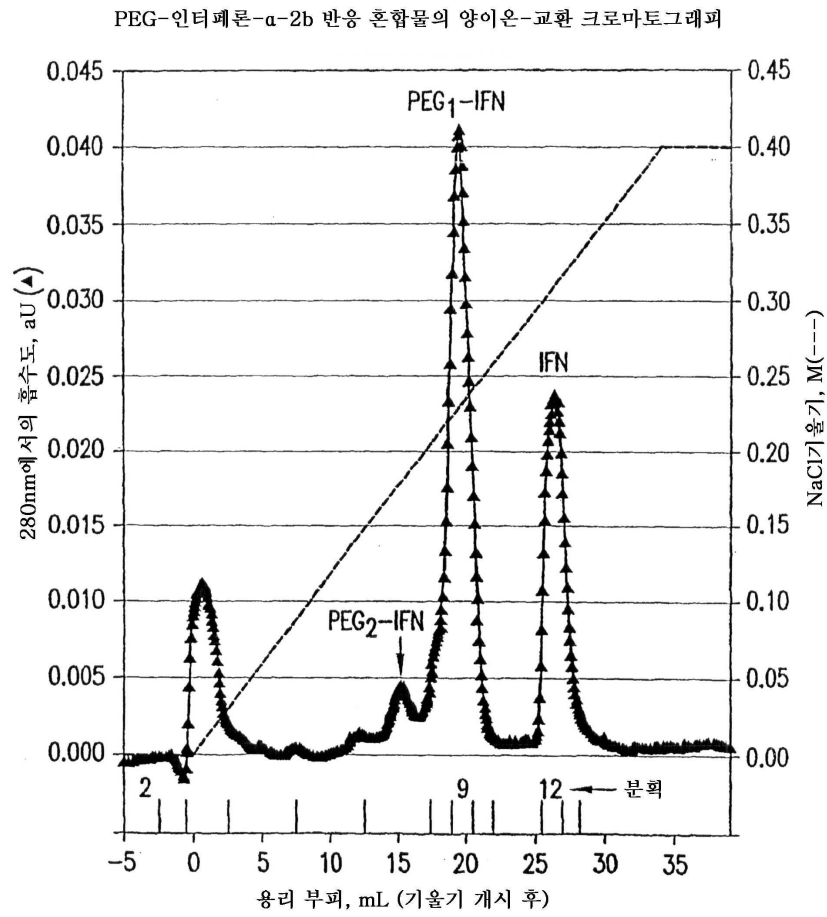
도면7



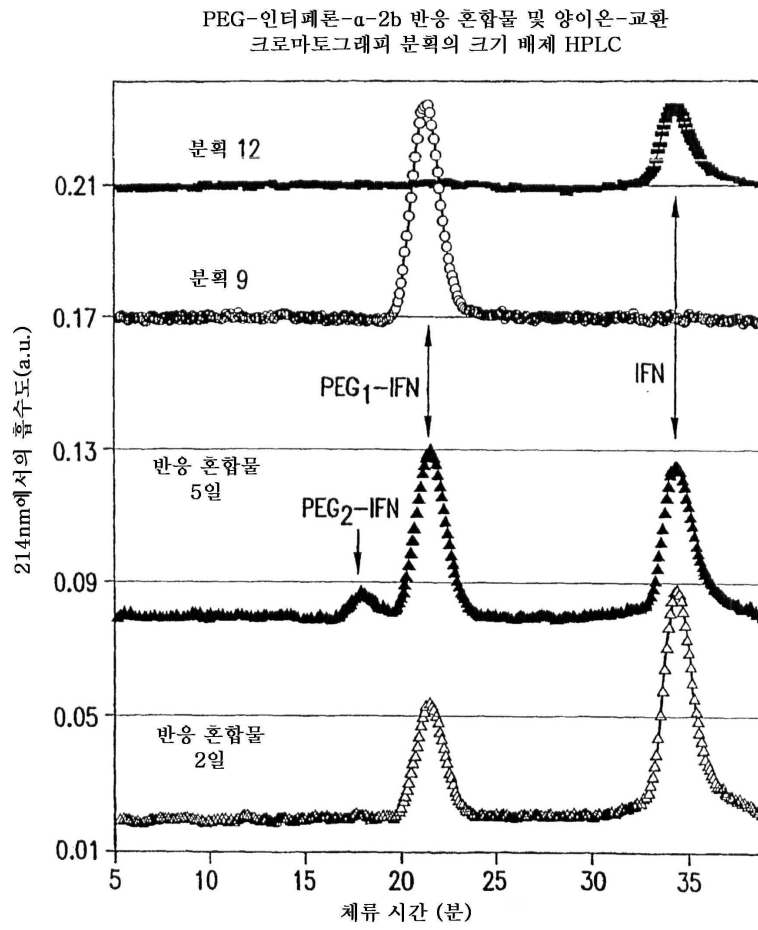
도면8



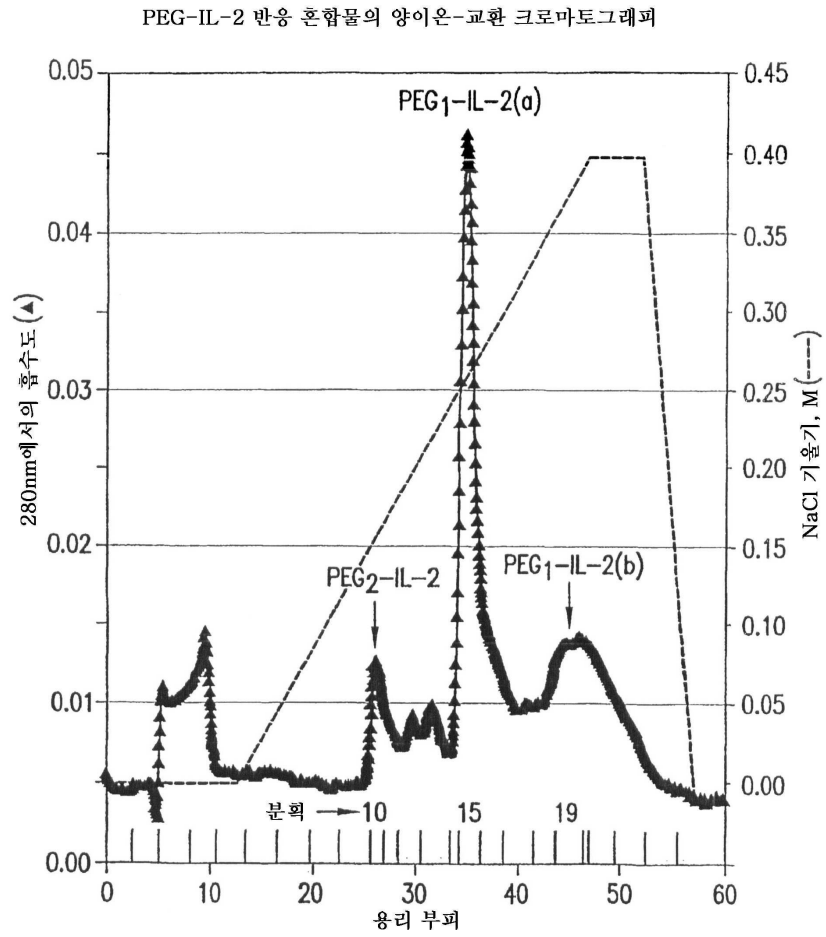
도면9



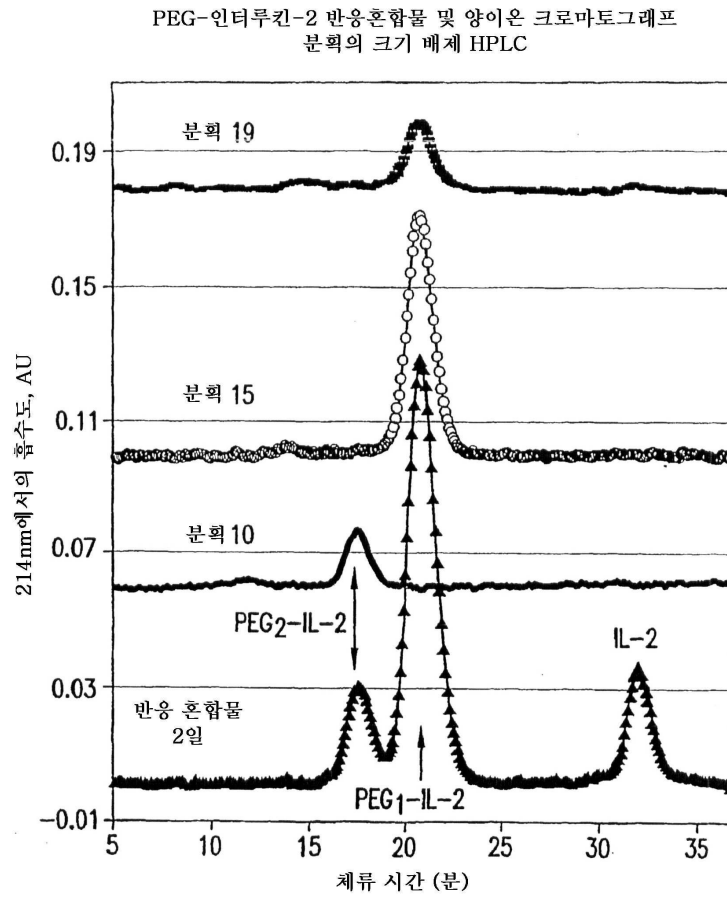
도면10



도면11

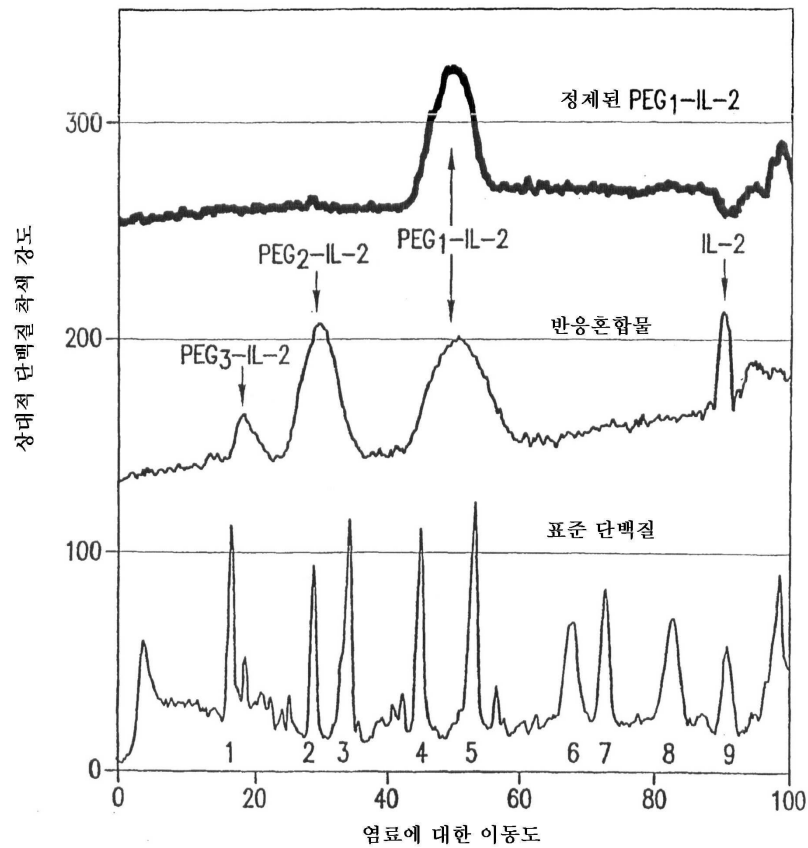


도면12



도면13

PEG-인터루킨-2 반응혼합물 및 정제된 모노 PEG화 접합체의 전기영동 분석



서열 목록

SEQUENCE LISTING

<110> Mountain View Pharmaceuticals, Inc.
3475-S Edison Way
Menlo Park, California 94025
United States of America

<120> POLYMER CONJUGATES OF CYTOKINES, CHEMOKINES, GROWTH FACTORS, POLYPEPTIDE HORMONES AND ANTAGONISTS THEREOF WITH PRESERVED RECEPTOR-BINDING ACTIVITY

<130> 2057.006PC02/JAG/BJD

<140> (To be assigned)

<141> 2003-12-23

<150> US 60/479,914
<151> 2003-06-20

<150> US 60/436,020
<151> 2002-12-26

<160> 9

<170> FastSEQ for Windows Version 4.0

<210> 1
<211> 165
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 1
Cys Asp Leu Pro Gln Thr His Ser Leu Gly Ser Arg Arg Thr Leu Met
1 5 10 15
Leu Leu Ala Gln Met Arg Lys Ile Ser Leu Phe Ser Cys Leu Lys Asp
20 25 30
Arg His Asp Phe Gly Phe Pro Gln Glu Glu Phe Gly Asn Gln Phe Gln
35 40 45
Lys Ala Glu Thr Ile Pro Val Leu His Glu Met Ile Gln Gln Ile Phe
50 55 60

Asn Leu Phe Ser Thr Lys Asp Ser Ser Ala Ala Trp Asp Glu Thr Leu
65 70 75 80
Leu Asp Lys Phe Tyr Thr Glu Leu Tyr Gln Gln Leu Asn Asp Leu Glu
85 90 95
Ala Cys Val Ile Gln Gly Val Gly Val Thr Glu Thr Pro Leu Met Lys
100 105 110
Glu Asp Ser Ile Leu Ala Val Arg Lys Tyr Phe Gln Arg Ile Thr Leu
115 120 125

Tyr Leu Lys Glu Lys Lys Tyr Ser Pro Cys Ala Trp Glu Val Val Arg
130 135 140
Ala Glu Ile Met Arg Ser Phe Ser Leu Ser Thr Asn Leu Gln Glu Ser
145 150 155 160
Leu Arg Ser Lys Glu
165

<210> 2
<211> 165
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 2
Cys Asp Leu Pro Gln Thr His Ser Leu Gly Ser Arg Arg Thr Leu Met

```

1           5           10           15
Leu Leu Ala Gln Met Arg Arg Ile Ser Leu Phe Ser Cys Leu Lys Asp
           20           25           30
Arg His Asp Phe Gly Phe Pro Gln Glu Glu Phe Gly Asn Gln Phe Gln
           35           40           45
Lys Ala Glu Thr Ile Pro Val Leu His Glu Met Ile Gln Gln Ile Phe
           50           55           60

Asn Leu Phe Ser Thr Lys Asp Ser Ser Ala Ala Trp Asp Glu Thr Leu
65           70           75           80
Leu Asp Lys Phe Tyr Thr Glu Leu Tyr Gln Gln Leu Asn Asp Leu Glu
           85           90           95
Ala Cys Val Ile Gln Gly Val Gly Val Thr Glu Thr Pro Leu Met Lys
           100          105          110
Glu Asp Ser Ile Leu Ala Val Arg Lys Tyr Phe Gln Arg Ile Thr Leu
           115          120          125

Tyr Leu Lys Glu Lys Lys Tyr Ser Pro Cys Ala Trp Glu Val Val Arg
130          135          140
Ala Glu Ile Met Arg Ser Phe Ser Leu Ser Thr Asn Leu Gln Glu Ser
145          150          155          160
Leu Arg Ser Lys Glu
           165

```

<210> 3
 <211> 166
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

```

<400> 3
Met Ser Tyr Asn Leu Leu Gly Phe Leu Gln Arg Ser Ser Asn Phe Gln
1           5           10           15
Cys Gln Lys Leu Leu Trp Gln Leu Asn Gly Arg Leu Glu Tyr Cys Leu
           20           25           30
Lys Asp Arg Met Asn Phe Asp Ile Pro Glu Glu Ile Lys Gln Leu Gln
           35           40           45
Gln Phe Gln Lys Glu Asp Ala Ala Leu Thr Ile Tyr Glu Met Leu Gln
           50           55           60

Asn Ile Phe Ala Ile Phe Arg Gln Asp Ser Ser Ser Thr Gly Trp Asn
65           70           75           80
Glu Thr Ile Val Glu Asn Leu Leu Ala Asn Val Tyr His Gln Ile Asn
           85           90           95
His Leu Lys Thr Val Leu Glu Glu Lys Leu Glu Lys Glu Asp Phe Thr
           100          105          110
Arg Gly Lys Leu Met Ser Ser Leu His Leu Lys Arg Tyr Tyr Gly Arg
           115          120          125

Ile Leu His Tyr Leu Lys Ala Lys Glu Tyr Ser His Cys Ala Trp Thr
130          135          140
Ile Val Arg Val Glu Ile Leu Arg Asn Phe Tyr Phe Ile Asn Arg Leu
145          150          155          160
Thr Gly Tyr Leu Arg Asn
           165

```

<210> 4
 <211> 143
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 4
 Gln Asp Pro Tyr Val Lys Glu Ala Glu Asn Leu Lys Lys Tyr Phe Asn
 1 5 10 15
 Ala Gly His Ser Asp Val Ala Asp Asn Gly Thr Leu Phe Leu Gly Ile
 20 25 30
 Leu Lys Asn Trp Lys Glu Glu Ser Asp Arg Lys Ile Met Gln Ser Gln
 35 40 45
 Ile Val Ser Phe Tyr Phe Lys Leu Phe Lys Asn Phe Lys Asp Asp Gln
 50 55 60

Ser Ile Gln Lys Ser Val Glu Thr Ile Lys Glu Asp Met Asn Val Lys
 65 70 75 80
 Phe Phe Asn Ser Asn Lys Lys Lys Arg Asp Asp Phe Glu Lys Leu Thr
 85 90 95
 Asn Tyr Ser Val Thr Asp Leu Asn Val Gln Arg Lys Ala Ile His Glu
 100 105 110

Leu Ile Gln Val Met Ala Glu Leu Ser Pro Ala Ala Lys Thr Gly Lys
 115 120 125
 Arg Lys Arg Ser Gln Met Leu Phe Arg Gly Arg Arg Ala Ser Gln
 130 135 140

<210> 5
 <211> 127
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 5
 Ala Pro Ala Arg Ser Pro Ser Pro Ser Thr Gln Pro Trp Glu His Val
 1 5 10 15
 Asn Ala Ile Gln Glu Ala Arg Arg Leu Leu Asn Leu Ser Arg Asp Thr
 20 25 30
 Ala Ala Glu Met Asn Glu Thr Val Glu Val Ile Ser Glu Met Phe Asp
 35 40 45
 Leu Gln Glu Pro Thr Cys Leu Gln Thr Arg Leu Glu Leu Tyr Lys Gln
 50 55 60
 Gly Leu Arg Gly Ser Leu Thr Lys Leu Lys Gly Pro Leu Thr Met Met
 65 70 75 80
 Ala Ser His Tyr Lys Gln His Cys Pro Pro Thr Pro Glu Thr Ser Cys
 85 90 95
 Ala Thr Gln Ile Ile Thr Phe Glu Ser Phe Lys Glu Asn Leu Lys Asp
 100 105 110
 Phe Leu Leu Val Ile Pro Phe Asp Cys Trp Glu Pro Val Gln Glu
 - 63 -

115

120

125

<210> 6
 <211> 133
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 6
 Ala Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu His
 1 5 10 15
 Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile Asn Asn Tyr Lys
 20 25 30
 Asn Pro Lys Leu Thr Arg Met Leu Thr Phe Lys Phe Tyr Met Pro Lys
 35 40 45

Lys Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Glu Leu Lys
 50 55 60
 Pro Leu Glu Glu Val Leu Asn Leu Ala Gln Ser Lys Asn Phe His Leu
 65 70 75 80
 Arg Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asn Ile Asn Val Ile Val Leu Glu Leu
 85 90 95
 Lys Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp Glu Thr Ala
 100 105 110

Thr Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe Cys Gln Ser Ile
 115 120 125
 Ile Ser Thr Leu Thr
 130

<210> 7
 <211> 53
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 7
 Asn Ser Asp Ser Glu Cys Pro Leu Ser His Asp Gly Tyr Cys Leu His
 1 5 10 15
 Asp Gly Val Cys Met Tyr Ile Glu Ala Leu Asp Lys Tyr Ala Cys Asn
 20 25 30
 Cys Val Val Gly Tyr Ile Gly Glu Arg Cys Gln Tyr Arg Asp Leu Lys
 35 40 45
 Trp Trp Glu Leu Arg
 50

<210> 8
 <211> 146
 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 8

```

Pro Ala Leu Pro Glu Asp Gly Gly Ser Gly Ala Phe Pro Pro Gly His
1           5           10           15
Phe Lys Asp Pro Lys Arg Leu Tyr Cys Lys Asn Gly Gly Phe Phe Leu
           20           25           30
Arg Ile His Pro Asp Gly Arg Val Asp Gly Val Arg Glu Lys Ser Asp
           35           40           45
Pro His Ile Lys Leu Gln Leu Gln Ala Glu Glu Arg Gly Val Val Ser
           50           55           60

Ile Lys Gly Val Cys Ala Asn Arg Tyr Leu Ala Met Lys Glu Asp Gly
65           70           75           80
Arg Leu Leu Ala Ser Lys Cys Val Thr Asp Glu Cys Phe Phe Phe Glu
           85           90           95
Arg Leu Glu Ser Asn Asn Tyr Asn Thr Tyr Arg Ser Arg Lys Tyr Thr
           100          105          110
Ser Trp Tyr Val Ala Leu Lys Arg Thr Gly Gln Tyr Lys Leu Gly Ser
           115          120          125

Lys Thr Gly Pro Gly Gln Lys Ala Ile Leu Phe Leu Pro Met Ser Ala
           130          135          140
Lys Ser
145

```

<210> 9

<211> 70

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 9

```

Gly Pro Glu Thr Leu Cys Gly Ala Glu Leu Val Asp Ala Leu Gln Phe
1           5           10           15
Val Cys Gly Asp Arg Gly Phe Tyr Phe Asn Lys Pro Thr Gly Tyr Gly
           20           25           30
Ser Ser Ser Arg Arg Ala Pro Gln Thr Gly Ile Val Asp Glu Cys Cys
           35           40           45
Phe Arg Ser Cys Asp Leu Arg Arg Leu Glu Met Tyr Cys Ala Pro Leu
           50           55           60

Lys Pro Ala Lys Ser Ala
65           70

```