



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2007년09월11일  
(11) 등록번호 10-0758044  
(24) 등록일자 2007년09월05일

(51) Int. Cl.

A61K 38/22(2006.01)

(21) 출원번호 10-2002-7015429  
(22) 출원일자 2002년11월15일  
심사청구일자 2002년11월15일  
번역문제출일자 2002년11월15일  
(65) 공개번호 10-2003-0001509  
공개일자 2003년01월06일  
(86) 국제출원번호 PCT/EP2001/005187  
국제출원일자 2001년05월08일  
(87) 국제공개번호 WO 2001/87329  
국제공개일자 2001년11월22일

(30) 우선권주장  
00110355.5 2000년05월15일  
유럽특허청(EPO)(EP)

(56) 선행기술조사문헌  
WO 96/400073 A1

(뒷면에 계속)

전체 청구항 수 : 총 49 항

(73) 특허권자

에프. 호프만-라 로슈 아게

스위스 체하-4070 바젤 그렌짜체스트라세 124

(72) 발명자

파파디미트리오우아폴론

독일83673비츨바흐스트라세38아

(74) 대리인

김창세

심사관 : 김경미

(54) 신규한 약학 조성물

(57) 요약

본 발명은 에리트로포이에틴 단백질, 용액의 pH를 약 5.5 내지 7.0 범위로 유지하기에 적합한 약학적으로 허용가능한 완충액 중의 다중 하전된 무기 음이온, 및 선택적으로 1종 이상의 약학적으로 허용가능한 부형제를 포함하는 액체 약학 조성물에 관한 것이다. 상기 조성물은 적혈구 생성과 관련된 질병의 예방 및 치료에 특히 유용하다.

(56) 선행기술조사문헌

EP 178665 A1  
EP 909564 A1  
WO 98/05363 A1

(81) 지정국

국내특허 : 알바니아, 아르메니아, 오스트리아, 오스트레일리아, 아제르바이잔, 보스니아 헤르체고비나, 바베이도스, 불가리아, 브라질, 벨라루스, 캐나다, 스위스, 중국, 쿠바, 체코, 독일, 덴마크, 에스토니아, 스페인, 핀란드, 영국, 그루지야, 헝가리, 이스라엘, 아이슬랜드, 일본, 케냐, 키르기스스탄, 북한, 대한민국, 카자흐스탄, 세인트루시아, 스리랑카, 리베이라, 레소토, 리투아니아, 룩셈부르크, 라트비아, 몰도바, 마다가스카르, 마케도니아공화국, 몽고, 말라위, 멕시코, 노르웨이, 뉴질랜드, 슬로베니아, 슬로바키아, 타지키스탄, 투르크멘, 터어키, 트리니다드토바고, 우크라이나, 우간다, 우즈베키스탄, 베트남, 폴란드, 포르투갈, 루마니아, 러시아, 수단, 스웨덴, 싱가포르, 아랍에미리트, 모로코, 남아프리카, 그라나다, 가나, 감비아, 크로아티아, 인도, 인도네시아, 시에라리온, 세르비아 앤 몬테네그로, 짐바브웨, 콜롬비아, 에콰도르

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

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

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

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

## 특허청구의 범위

### 청구항 1

페길레이트화된 인간 에리트로포이에틴 단백질, 용액의 pH를 5.5 내지 7.0의 범위로 유지하기에 적합한 약학적으로 허용가능한 완충액 중의 다중 하전된 설페이트 음이온, 및 선택적으로 1종 이상의 약학적으로 허용가능한 부형제를 포함하고, 실온에서 안정한, 만성 신부전(CRF) 환자, AIDS 또는 화학요법을 받는 암 환자의 빈혈을 치료 또는 예방하기 위한 액체 약학 조성물.

### 청구항 2

제 1 항에 있어서,  
수용액인 조성물.

### 청구항 3

제 1 항에 있어서,  
등장액인 조성물.

### 청구항 4

삭제

### 청구항 5

삭제

### 청구항 6

삭제

### 청구항 7

제 1 항에 있어서,  
10 내지 200 mmol/l의 설페이트를 포함하는 조성물.

### 청구항 8

제 1 항 내지 제 3 항 중 어느 한 항에 있어서,  
pH가 5.8 내지 6.7인 조성물.

### 청구항 9

제 8 항에 있어서,  
pH가 6.0 내지 6.5인 조성물.

### 청구항 10

제 9 항에 있어서,  
pH가 6.2인 조성물.

### 청구항 11

제 1 항 내지 제 3 항 중 어느 한 항에 있어서,  
완충액이 포스페이트 완충액 및 아르기닌/ $\text{H}_2\text{SO}_4/\text{Na}_2\text{SO}_4$  완충액으로 이루어진 군으로부터 선택되는 조성물.

### 청구항 12

제 11 항에 있어서,

완충액이 10 내지 50 mmol/l 의 포스페이트 완충액인 조성물.

### 청구항 13

제 1 항 내지 제 3 항 중 어느 한 항에 있어서,

1종 이상의 약학적으로 허용가능한 부형제를 포함하는 조성물.

### 청구항 14

제 13 항에 있어서,

1종 이상의 약학적으로 허용가능한 부형제가 약학적으로 허용가능한 염, 희석제, 용매 및 보존제로 이루어진 군 으로부터 선택되는 조성물.

### 청구항 15

제 13 항에 있어서,

약학적으로 허용가능한 부형제가 등장화제, 폴리올, 항산화제 및 비이온성 세정제로 이루어진 군 으로부터 선택 되는 조성물.

### 청구항 16

제 15 항에 있어서,

약학적으로 허용가능한 부형제가 폴리올인 조성물.

### 청구항 17

제 16 항에 있어서,

폴리올이 만니톨, 소비톨, 글리세롤, 트레할로스 및 사카로스로 이루어진 군 으로부터 선택되는 조성물.

### 청구항 18

제 17 항에 있어서,

폴리올이 만니톨인 조성물.

### 청구항 19

제 13 항에 있어서,

항산화제를 포함하는 조성물.

### 청구항 20

제 19 항에 있어서,

항산화제가 메티오닌인 조성물.

### 청구항 21

제 13 항에 있어서,

1 mmol/l 이하의  $\text{CaCl}_2$ 를 포함하는 조성물.

### 청구항 22

제 15 항에 있어서,

비이온성 세정제가 폴리소베이트 80, 폴리소베이트 20 또는 플루로닉 F68(폴리에틸렌-폴리프로필렌 글리콜)인

조성물.

**청구항 23**

제 22 항에 있어서,

비이온성 세정제가 플루로닉 F68(폴리에틸렌-폴리프로필렌 글리콜)인 조성물.

**청구항 24**

제 22 항 또는 제 23 항에 있어서,

1 %(중량/부피) 이하의 비이온성 세정제를 포함하는 조성물.

**청구항 25**

제 24 항에 있어서,

0.1 %(중량/부피) 이하의 비이온성 세정제를 포함하는 조성물.

**청구항 26**

제 1 항에 있어서,

인간 에리트로포이에틴 단백질이 서열번호: 1 또는 서열번호: 2의 아미노산 서열을 갖는 조성물.

**청구항 27**

제 26 항에 있어서,

에리트로포이에틴 단백질이 내생(endogenous) 유전자 활성화에 의해 발현되는 조성물.

**청구항 28**

삭제

**청구항 29**

삭제

**청구항 30**

삭제

**청구항 31**

삭제

**청구항 32**

삭제

**청구항 33**

삭제

**청구항 34**

삭제

**청구항 35**

제 1 항에 있어서,

에리트로포이에틴 단백질이 접합체이며,

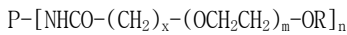
이때 상기 접합체는 1개 이상의 유리 아미노기를 갖는 인간 에리트로포이에틴 당단백질을 포함하고; 상기 당단백질은 상기 아미노기 중의 하나와 아미드 결합을 형성하는 각각의 폴리(에틸렌 글리콜) 기의  $-CO$ 와 화학식  $-CO-(CH_2)_x-(OCH_2CH_2)_m-OR$ 의  $n$ 개의 폴리(에틸렌 글리콜) 기에 공유결합되며, 이때  $R$ 은  $C_{1-6}$  알킬이고,  $x$ 는 2 또는 3이고,  $m$ 은 450 내지 900이고,  $n$ 은 1 내지 3이고,  $n$  및  $m$ 은 접합체의 분자량에서 에리트로포이에틴 당단백질을 뺀 값이 20 내지 100 kDa이 되도록 선택되는 조성물.

### 청구항 36

제 35 항에 있어서,

하기 화학식 I의 에리트로포이에틴 단백질을 갖는 조성물:

화학식 I



상기 식에서,

$m$ ,  $n$ ,  $x$  및  $R$ 은 제 35 항에 정의된 바와 같고,  $P$ 는 폴리(에틸렌 글리콜) 기(들)와 아미드 결합(들)을 형성하는  $n$ 개의 아미노기(들)가 없는 당단백질의 잔기이다.

### 청구항 37

제 36 항에 있어서,

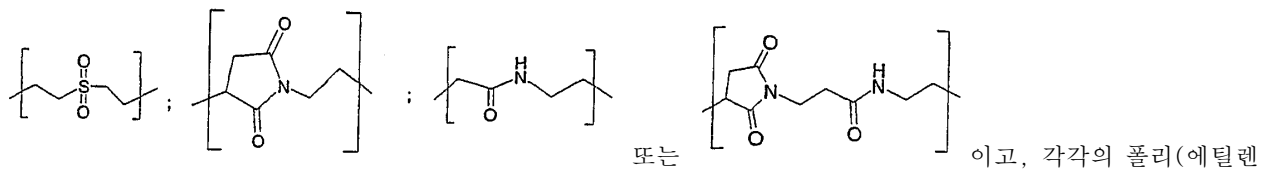
화학식 I에서  $x$ 가 2이고,  $m$ 이 650 내지 750이고,  $n$ 이 1이고,  $R$ 이 메틸인 조성물.

### 청구항 38

제 1 항에 있어서,

에리트로포이에틴 단백질이 접합체이며,

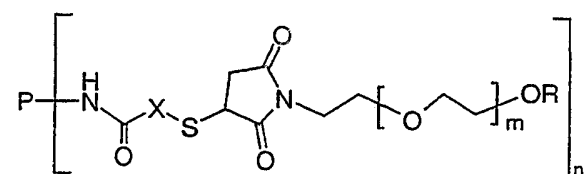
이때 상기 접합체는 1개 이상의 유리 아미노기를 갖는 인간 에리트로포이에틴 당단백질을 포함하고; 상기 당단백질은 1 내지 3개의  $C_{1-6}$ -알콕시 폴리(에틸렌 글리콜) 기와 공유결합되고, 각각의 폴리(에틸렌 글리콜) 기는 상기 아미노기 중의 하나와 아미드 결합을 형성하는 연결기의  $C(O)$ 와 화학식  $-C(O)-X-S-Y$ 의 연결기를 통해 당단백질에 공유결합되며, 이때  $X$ 는  $-(CH_2)_k-$  또는  $-CH_2(O-CH_2-CH_2)_k-$ 이고,  $k$ 는 1 내지 10이고,  $Y$ 는



### 청구항 39

제 38 항에 있어서,

에리트로포이에틴 단백질이 하기 화학식의 접합체인 조성물:



상기 식에서,

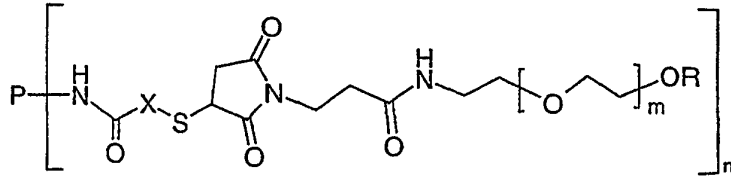
$n$ 은 1 내지 3의 정수이고,  $m$ 은 450 내지 900의 정수이고,  $R$ 은  $C_{1-6}$  알킬이고,  $X$ 는  $-(CH_2)_k-$  또는  $-CH_2(O-CH_2-$

$(CH_2)_k$ -이고, P는 X와 아마이드 결합을 형성하는 아미노기(들)가 없는 에리트로포이에틴 당단백질의 잔기이다.

#### 청구항 40

제 39 항에 있어서,

에리트로포이에틴 단백질이 하기 화학식의 접합체인 조성물:



상기 식에서,

n은 1 내지 3의 정수이고, m은 450 내지 900의 정수이고, R은  $C_{1-6}$  알킬이고, X는  $-(CH_2)_k-$  또는  $-CH_2(O-CH_2-CH_2)_k-$ 이고, P는 X와 아마이드 결합을 형성하는 아미노기(들)가 없는 에리트로포이에틴 당단백질의 잔기이다.

#### 청구항 41

제 1 항 내지 제 3 항 중 어느 한 항에 있어서,

10 내지 10000  $\mu g/ml$ 의 에리트로포이에틴 단백질을 포함하는 조성물.

#### 청구항 42

제 1 항에 있어서,

10 내지 10000  $\mu g/ml$ 의 에리트로포이에틴 단백질, 10 내지 200 mmol/l의 설페이트 및 10 내지 50 mmol/l의 포스페이트(pH 6.0 내지 6.5)를 포함하는 조성물.

#### 청구항 43

제 42 항에 있어서,

20 mM 이하의 메티오닌, 1 내지 5 %(중량/부피)의 폴리올, 0.1 %(중량/부피) 이하의 플루로닉 F68(폴리에틸렌-폴리프로필렌 글리콜) 및 선택적으로 1 mM 이하의  $CaCl_2$ 를 포함하는 조성물.

#### 청구항 44

제 42 항 또는 제 43 항에 있어서,

10 내지 10000  $\mu g/ml$ 의 에리트로포이에틴 단백질, 40 mmol/l의 설페이트, 10 mmol/l의 포스페이트, 3 %(중량/부피)의 만니톨, 10 mM의 메티오닌 및 0.01 %(중량/부피)의 플루로닉 F68(폴리에틸렌-폴리프로필렌 글리콜)을 포함하는 조성물(pH 6.2).

#### 청구항 45

제 1 항에 있어서,

10 내지 10000  $\mu g/ml$ 의 에리트로포이에틴 단백질, 10 내지 100 mmol/l의 NaCl, 10 내지 50 mmol/l의 포스페이트(pH 6.0 내지 7.0) 및 선택적으로 1 내지 5 %의 폴리올을 포함하는 조성물.

#### 청구항 46

제 45 항에 있어서,

20 mM 이하의 메티오닌, 0.1 % 이하의 플루로닉 F68(폴리에틸렌-폴리프로필렌 글리콜) 및 선택적으로 7.5  $\mu mol/l$ 의  $CaCl_2$ 를 포함하는 조성물.

#### 청구항 47

제 45 항 또는 제 46 항에 있어서,

10 내지 10000  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 에리트로포이에틴 단백질, 100 mmol/ℓ의 NaCl, 10 mM의 메티오닌, 0.01 %의 플루로닉 F68(폴리에틸렌-폴리프로필렌 글리콜) 및 10 mmol/ℓ의 포스페이트(pH 7.0)를 포함하는 조성물.

#### 청구항 48

제 1 항에 있어서,

10 내지 10000  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 에리트로포이에틴 단백질, 10 내지 50 mmol/ℓ의 아르기닌(pH 6.0 내지 6.5) 및 10 내지 100 mmol/ℓ의 황산나트륨을 포함하는 조성물.

#### 청구항 49

제 48 항에 있어서,

20 mM 이하의 메티오닌, 0.1 % 이하의 플루로닉 F68(폴리에틸렌-폴리프로필렌 글리콜), 선택적으로 1 mmol/ℓ 이하의  $\text{CaCl}_2$  및 선택적으로 1 내지 5 %의 폴리올을 포함하는 조성물.

#### 청구항 50

제 48 항 또는 제 49 항에 있어서,

10 내지 10000  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 에리트로포이에틴 단백질, 40 mmol/ℓ의 아르기닌(pH 6.2), 30 mmol/ℓ의 황산나트륨, 3 %의 만니톨, 10 mM의 메티오닌, 0.01 %의 플루로닉 F68(폴리에틸렌-폴리프로필렌 글리콜) 및 선택적으로 1 mmol/ℓ의  $\text{CaCl}_2$ 를 포함하는 조성물.

#### 청구항 51

제 1 항 내지 제 3 항 중 어느 한 항에 있어서,

25 내지 2500  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 에리트로포이에틴, 및

(a) 10 mM의 인산나트륨/인산칼륨, 100 mM의 NaCl(pH 7.0),

(b) 10 mM의 인산나트륨, 120 mM의 황산나트륨(pH 6.2),

(c) 10 mM의 인산나트륨, 40 mM의 황산나트륨, 3 %의 만니톨(pH 6.2),

(d) 10 mM의 인산나트륨, 40 mM의 황산나트륨, 3 %의 만니톨, 10 mM의 메티오닌, 0.01 %의 플루로닉 F68(폴리에틸렌-폴리프로필렌 글리콜)(pH 6.2),

(e) 40 mM의 아르기닌, 30 mM의 황산나트륨, 3 %의 만니톨(pH 6.2), 또는

(f) 40 mM의 아르기닌, 30 mM의 황산나트륨, 3 %의 만니톨, 10 mM의 메티오닌, 0.01 %의 플루로닉 F68(폴리에틸렌-폴리프로필렌 글리콜)(pH 6.2)을 포함하는 조성물.

#### 청구항 52

제 1 항 내지 제 3 항 중 어느 한 항에 있어서,

에리트로포이에틴 단백질의 양이 50, 100, 400, 800 또는 2500  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 인 조성물.

#### 청구항 53

제 52 항에 있어서,

10 mM의 인산나트륨, 40 mM의 황산나트륨, 3 %의 만니톨, 10 mM의 메티오닌, 0.01 %의 플루로닉 F68(폴리에틸렌-폴리프로필렌 글리콜)(pH 6.2)을 포함하는 조성물.

#### 청구항 54



제 52 항에 있어서,

40 mM의 아르기닌, 30 mM의 황산나트륨, 3 %의 만니톨, 10 mM의 메티오닌, 0.01 %의 플루로닉 F68(폴리에틸렌-폴리프로필렌 글리콜)(pH 6.2)을 포함하는 조성물.

#### 청구항 55

제 1 항 내지 제 3 항 중 어느 한 항에 있어서,

동결건조물 또는 분무-건조 분말인 조성물.

#### 청구항 56

폐길레이트화된 인간 에리트로포이에틴 단백질을 다중 하전된 음이온 및 선택적으로 1종 이상의 약학적으로 허용가능한 부형제를 포함하는 용액과 혼합하고, 약학적으로 허용가능한 완충액을 사용하여 pH를 5.5 내지 7.0으로 조정하는 것을 포함하는, 제 1 항 내지 제 3 항 중 어느 한 항에 따른 조성물의 제조 방법.

#### 청구항 57

삭제

#### 청구항 58

삭제

#### 청구항 59

제 1 항 내지 제 3 항 중 어느 한 항에 따른 조성물을 포함하고, 이식체, 주사기 및 흡입 장치로 이루어진 군으로부터 선택되는 국부 또는 전신 서방성 장치.

#### 청구항 60

제 41 항에 있어서,

10 mM의 인산나트륨, 40 mM의 황산나트륨, 3 %(중량/부피)의 만니톨 및 1 mM의 메티오닌(pH 6.2)을 포함하는 조성물.

#### 청구항 61

제 52 항에 있어서,

10 mM의 인산나트륨, 40 mM의 황산나트륨, 3 %(중량/부피)의 만니톨 및 1 mM의 메티오닌(pH 6.2)을 포함하는 조성물.

### 명세서

#### 기술분야

<1> 본 발명은 에리트로포이에틴 단백질을, 용액의 pH를 약 5.5 내지 약 7.0의 범위로 유지하기에 적합한 약학적으로 허용가능한 완충액 중의 다중 하전된 무기 음이온, 및 선택적으로 1종 이상의 약학적으로 허용가능한 부형제를 포함하는 액체 약학 조성물에 관한 것이다. 이 조성물은 적혈구 생성과 관련된 질병의 예방 및 치료에 특히 유용하다.

#### 배경기술

<2> 적혈구 생성(erythropoiesis)은 세포 파괴를 보충하기 위해 발생하는 적혈구의 생산이다. 적혈구 생성은 충분한 적혈구가 적절한 조직 산소공급에 이용되게 하는 제어된 생리 기작이다. 자연적으로 발생하는 인간 에리트로포이에틴(hEPO)은 신장에서 생산되고, 적혈구 생산을 자극하는 체액 혈장 인자이다(문헌[Carnot, P. and Deflandre, C., C.R. Acad. Sci. 143: 432 (1906)], [Erslev, A.J., Blood 8: 349 (1953)], [Reissmann, K.R., Blood 5: 372 (1950)], [Jacobson, LO, Goldwasser, E., Freid, W. and Plzak, L.F., Nature 179: 6331-4 (1957)]). 자연적으로 발생하는 EPO는 골수에서 수임 적혈구 선구물질의 분열 및 분화를 자극하고, 적

혈구 전구체 상의 수용체와 결합함으로써 생물학적 활성을 나타낸다(문헌[Krantz, B.S., Blood 77:419 (1991)]).

<3> 에리트로포이에틴은 재조합 DNA 기술을 사용하여 생합성적으로 제조되었고(문헌[Egrie, J.C., Strickland, T.W., Lane, J. et al., Immunobiol. 72: 213-224 (1986)]), 중국산 햄스터 난소 조직 세포(CHO 세포)에 삽입되어 발현된 클로닝된 인간 EPO 유전자의 산물이다. 우세하고 완전히 가공된 형태의 hEPO의 일차구조는 서열번호: 1에 예시되어 있다. Cys<sup>7</sup>과 Cys<sup>161</sup> 및 Cys<sup>29</sup>과 Cys<sup>33</sup> 사이에 두 개의 이황 가교가 존재한다. 당 부분이 없는 EPO의 폴리펩티드 쇄의 분자량은 18,236 Da이다. 완전한 EPO 분자에서 단백질 상의 글리코실화 부위에서 그 단백질을 글리코실화시키는 탄수화물 기는 분자량의 약 40 %를 차지한다(문헌[Sasaki, H., Bothner, B., Dell, A. and Fukuda, M., J. Biol. Chem. 262: 12059 (1987)]).

<4> 인간 에리트로포이에틴은 적혈구 형성에 필수적이기 때문에, 상기 호르몬은 낮은 적혈구 생성 또는 결손 적혈구 생성에 의해 특징지어지는 혈액질환의 치료에 유용하다. 임상적으로, EPO는 만성 신부전(CRF) 환자의 빈혈 치료(문헌[Eschbach, J.W., Egri, J.C., Downing, M.R. et al., NEJM 316: 73-78 (1987)], [Eshcbach, J.W., Abdulhadi, M.H., Browne, J.K. et al., Ann. Intern. Med. 111: 992 (1989)], [Egrie, J.C., Eschbach, J.W., McGuire, T. and Adamson, J.W., Kidney Intl. 33: 262 (1988)], [Lim, V.S., Degowin, R.L., Zavala, D. et al., Ann. Intern. Med. 110: 108-114 (1989)]) 및 화학요법을 받는 AIDS 및 암 환자의 빈혈 치료(문헌[Danna, RP, Rudnick, SA, Abels, RI In: MB, Garnick, ed. Erythropoietin in Clinical Applications-An International Perspective. New York, NY: Marcel Dekker; 1990: p. 301-324])에 사용된다.

<5> 공지된 약학 조성물은 하기 단점 중 한가지 이상을 갖고 있다.

<6> - 이들은 동결건조물이다. 동결건조물은 복잡한 제조 과정 이외에 인간에게 주사하기 전에 재구성되어야 한다는 단점을 갖는다. 이로 인해, 의료기관 종사원에 의한 추가의 조제가 필요하게 되어 불편하고 약학 제품의 부정확한 조제의 위험이 있다.

<7> - 이들은 인간 혈청 알부민을 첨가제로서 함유한다. 인간 혈청 알부민은 인간 체액으로부터 유도된 생성물이므로, 알부민 제제내의 오염물에 의한 바이러스성 감염의 위험이 있다. 또한, 알레르기성 반응도 가능하다.

<8> - 현재 시판되는 모든 에리트로포이에틴 조성물은 고온, 즉 냉장 온도 이상(일반적으로 2 내지 8 °C)에서 불안정하다. 따라서, 이들은 냉장고(2 내지 8 °C)에서 저장되어야 하고, 실온(약 20 °C)에서 저장할 수 없다. 이로 인해, 저온에서의 저장 및 선적에 의해 야기되는 비용이 증가하게 되고, 또한 약품의 취급시 불편함을 야기한다. 본의 문맥에서 "불안정한"이란 용어는 장시간(즉, 수개월 또는 6개월 이상) 동안 고온, 예를 들어 25 °C에서 저장하면 단백질의 분해가 일어난다는 것을 의미한다. 본의 문맥에서 "분해"는 바람직하게는 고온(8 °C 초과)에서 발생하는 것으로 알려진 단백질 분자의 물리적 변화(예를 들어, 응집 또는 변성) 및 화학적 변화(예를 들어, 일반적인 화학결합의 산화 또는 변경)를 말한다. 단백질을 그의 전이 온도(용융 온도라고도 함) 근처 또는 전이 온도보다 높은 온도에서 배양하면 단백질의 전개가 일어난다(즉, 폴리펩티드의 천연형 구조 및 생물학적 활성을 잃게된다). 전이 온도는 단백질의 온도 안정성과 밀접하게 관련되어 있고, 단백질의 환경(예를 들어, pH, 염, 이온 강도, 완충 물질 등)에 의존한다. 예를 들어, 변성은 에리트로포이에틴 분자의 응집, 즉 이합체의 형성(공유 및 비공유결합성), 고차 응집체 및 심지어 미립자를 생성시킨다. 이로 인해, 약물의 효능이 감소하게 되고, 인간에게 주사한 후에 원하지 않는 부작용이 야기된다.

#### <9> 발명의 요약

<10> 따라서, 본 발명의 근저가 되는 문제는 상기 단점을 최소화하거나 억제할 수 있는 조성물을 제공하는 것이다.

<11> 본 발명에 따라, 에리트로포이에틴 단백질, 약 5.5 내지 약 7.0의 pH의 완충액 중의 다중 하전된 무기 음이온, 및 선택적으로 1종 이상의 약학적으로 허용가능한 부형제를 포함하는 약학적 조성물을 제공함으로써 상기 문제를 해결한다.

<12> 놀랍게도, 이 조성물에 에리트로포이에틴을 제제화하면 냉장 온도(2 내지 8 °C)를 초과한 온도, 특히 실온(즉, 25 °C 이하) 및 심지어는 고온(예를 들어, 40 °C)에서도 안정성이 개선된다는 것이 밝혀졌다. 이것은 장시간 동안 냉각시키지 않고 상당량의 활성을 잃지 않으면서 현저한 분해도 없이 상기 조성물을 저장할 수 있다는 것을 의미한다.

<13> 달리 지시하지 않는 한, 본원의 발명을 기술하기 위해 사용된 다양한 용어의 의미 및 범주를 예시하고 정의하기 위해 하기의 정의가 사용된다.

- <14> "다중 하전된 무기 음이온"이란 용어는 분자당 2개 이상의 음전하를 갖는 무기 음이온, 예를 들어 설페이트( $\text{SO}_4^{2-}$ ) 또는 포스페이트 음이온(즉, 히드로겐포스페이트( $\text{HPQ}^{2-}$ ))를 지칭한다. 다중 하전된 무기 음이온을 상용하는 염, 예를 들어 나트륨 염, 칼륨 염 및 이들의 혼합물의 형태 및/또는 완충 물질, 예를 들어 포스페이트 완충액의 형태로 첨가할 수 있다.
- <15> "등삼투압성 또는 등장성"이란 용어는 체액의 성분에 영향을 주지 않고 이와 혼합될 수 있는 용액을 지칭한다. 혈액과 등장성인 0.9 %의 염화나트륨과 같은 용액은 혈청과 동일한 삼투압을 갖고, 적혈구 막에 영향을 주지 않는다. 일반적으로, 혈액과 등장성인 용액은 약 290 mosm/kg의  $\text{pD}$ 이다.
- <16> "무기 강산"이란 용어는 1 N 용액에서 20 내지 100 %의 해리도를 나타내는 무기산(예를 들어,  $\text{H}_2\text{SO}_4$ )을 지칭한다.
- <17> 본원에서 사용된 "약학적으로 허용가능한"이란 용어는 완충액 또는 염이 독성의 관점으로부터 허용가능하다는 것을 의미한다.
- <18> "희석제"란 용어는 약리학적인 활성은 없지만 약학적으로 필요하거나 바람직한 의약 제제 중의 성분을 의미한다. 예를 들어, 희석제는 주사될 약물(들)의 용해를 위한 액체, 예를 들어 물일 수 있다.
- <19> "용매"란 용어는 용액에 다른 물질을 보유하는 액체, 즉 이를 용해시키는 액체, 예를 들어 물을 지칭한다.
- <20> "보존제"란 용어는 박테리아 성장을 방지하기 위해 약학 조성물에 첨가되는 물질, 예를 들어 염화 벤잘코늄 또는 벤질 알콜을 지칭한다.
- <21> "폴리올"이란 용어는 다가 알콜 및 탄수화물을 비롯한, 다중 히드록실 기를 갖는 임의의 물질을 지칭한다. 다가가 알콜로는 소비톨, 만니톨 및 글리세롤과 같은 화합물을 포함한다. 탄수화물은 케토 또는 알데히드 기를 가질 수 있는 환형 분자, 예를 들어 수크로스 또는 트레할로스이다.
- <22> "에리트로포이에틴" 또는 "에리트로포이에틴 단백질"이란 용어는 골수세포가 망상적혈구 및 적혈구의 생성을 증가시키도록 하는 생체내 생물학적 활성을 갖고, 인간 에리트로포이에틴 및 하기에 정의된 이의 유사체로 이루어진 군으로부터 선택되는 단백질을 지칭한다.
- <23> "페길레이트화된 에리트로포이에틴(페그-EPO 또는 PEG-EPO)"란 용어는 하기한 바와 같은 1 내지 3개의 폴리에틸렌 유도체와 공유결합된 에리트로포이에틴 단백질을 지칭한다.
- <24> "장치"란 용어는 특정의 목적을 위한 고안품을 의미한다. 본 발명에서의 목적은 액체 약학 조성물의 투여를 가능하게 하거나 지지하거나 또는 용이하게 하는 것이다.

### 발명의 상세한 설명

- <36> 더욱 상세하게, 본 발명은 에리트로포이에틴 단백질, 용액의 pH를 약 5.5 내지 약 7.0의 범위로 유지하기에 적합한 약학적으로 허용가능한 완충액 중의 다중 하전된 무기 음이온, 및 선택적으로 1종 이상의 약학적으로 허용가능한 부형제를 포함하는 액체 약학 조성물에 관한 것이다.
- <37> 바람직한 실시태양에서, 조성물은 액체 용액, 예를 들어 수용액이다. 본 발명의 바람직한 실시태양에서, 상기 약학 조성물은 등장액이다.
- <38> 음이온은  $\text{H}_2\text{SO}_4$ ,  $\text{H}_3\text{PO}_4$  또는 시트르산과 같은 무기 강산의 음이온으로부터 선택되는 것이 바람직하다. 따라서, 바람직한 음이온은 설페이트, 포스페이트 및 시트레이트로 이루어진 군으로부터 선택되고, 바람직하게는 설페이트 또는 포스페이트, 가장 바람직하게는 설페이트이다. 다중 하전된 무기 음이온의 농도는 10 내지 200 mmol/ $\ell$  일 수 있고, 예를 들어 설페이트 음이온은 10 내지 200 mmol/ $\ell$  일 수 있다.
- <39> pH를 약 5.5 내지 약 7.0의 범위, 바람직하게는 5.8 내지 6.7의 범위, 더욱 바람직하게는 6.0 내지 6.5의 범위, 가장 바람직하게는 약 6.2로 유지하기 위해 본 발명에서 사용되는 완충액은 유기산 또는 무기산(예를 들어, 포스페이트 완충액, 아르기닌/ $\text{H}_2\text{SO}_4/\text{Na}_2\text{SO}_4$  완충액 또는 임의의 다른 약학적으로 허용가능한 완충액 시스템)의 통상적인 완충액일 수 있다. 바람직한 실시태양에서, 조성물은 포스페이트 완충액 또는 아르기닌/ $\text{H}_2\text{SO}_4/\text{Na}_2\text{SO}_4$  완충액, 더욱 바람직하게는 10 내지 50 mmol/ $\ell$ 의 포스페이트 완충액을 포함한다. 물론, 이들 완충액 시스템의 조합도 본 발명의 일부일 수 있다. pH 값은 대응하는 염기(예를 들어, 포스페이트 완충액 시스템 중의 NaOH) 및

대응하는 산(예를 들어, 아르기닌 완충액 시스템 중의 황산)으로 각각 조절할 수 있다.

- <40> 본 발명의 조성물은 1종 이상의 약학적으로 허용가능한 부형제를 포함할 수 있다. 이들 약학적으로 허용가능한 부형제는 약학적으로 허용가능한 염, 희석제 및/또는 용매 및/또는 보존제 등, 예를 들어, 등장화제, 폴리올, 항산화제 및 비이온성 세정제로부터 선택될 수 있다. 이들 물질의 예는 염화나트륨, 염화칼슘, 소비톨, 만니톨, 글리세롤, 사카로스, 트레할로스, 아세틸시스테인, 폴리소베이트 20, 폴리소베이트 80 또는 플루로닉 F68이다.
- <41> 본 발명의 바람직한 실시태양에서, 약학 조성물은 만니톨, 소비톨, 글리세롤, 트레할로스 및 사카로스로 이루어진 군으로부터 선택된 폴리올을 함유할 수 있고, 바람직하게는 만니톨을 함유할 수 있다. 폴리올의 농도는 1 내지 10 %(중량/부피)일 수 있다.
- <42> 항산화제의 예는 시스테인, 메티오닌, 아세틸시스테인 또는 아스코르브산, 바람직하게는 메티오닌이다. 항산화제는 통상적으로 0.01 내지 0.5 %(중량/부피) 또는, 예를 들어 메티오닌의 경우에는 1 내지 20 mM의 농도로 첨가될 수 있다.
- <43> 또한, 상기 조성물은 약 0.01 내지 약 0.9 %(중량/중량)의 등장화제를 선택적으로 포함할 수 있다. 이들 등장화제는 당해 기술분야에 공지되어 있고, 그 예는 염화나트륨 또는 황산나트륨이다. 본 발명의 바람직한 실시태양에서, 조성물은 등장액이다. 상기 조성물은 또한 비이온성 세정제, 예를 들어 폴리소베이트 20, 폴리소베이트 80 또는 플루로닉 F68, 바람직하게는 플루로닉 F68을 예를 들어 1 %(중량/부피) 이하, 더욱 바람직하게는 0.1 %(중량/부피) 이하, 예를 들어 0.001 내지 0.01 %(중량/부피)로 함유할 수도 있다.
- <44> 상기 조성물은 또한 추가의 염, 예를 들어 1 mmol/l 이하의 CaCl<sub>2</sub>를 포함할 수도 있다.
- <45> 본 발명은 약학적 활성 성분으로서 에리트로포이에틴을 포함하는 약학 조성물의 제조에 특히 유용하다. "에리트로포이에틴", "에리트로포이에틴 단백질" 또는 "EPO"란 용어는 하기와 같다: 특히 이 용어는 당단백질, 예를 들어 인간 에리트로포이에틴(예를 들어, 서열번호: 1 또는 서열번호: 2 에 나타난 아미노산 서열 또는 이와 실질적으로 상동인 아미노산 서열을 가짐)를 지칭하며, 이들의 생물학적 특성은 골수에서 적혈구 생성을 자극하고 수임 적혈구 선구물질의 분열 및 분화를 자극하는 것과 관련이 있다. 본원에서 사용된 이들 용어는, 예를 들어 부위 지정 돌연변이(site directed mutagenesis) 또는 자연발생적 돌연변이(accidentally through mutation)에 의해 의도적으로 변형된 단백질을 포함한다. 이들 용어는 또한 글리코실화를 위한 1 내지 6개의 추가의 부위를 갖는 유사체, 당단백질의 카르복실 말단에 1개 이상의 추가의 아미노산을 갖고 추가의 아미노산이 1 이상의 글리코실화 부위를 함유하는 유사체, 및 1개 이상의 글리코실화 부위의 재배열을 포함하는 아미노산 서열을 갖는 유사체를 포함한다. 이들 용어는 천연 인간 에리트로포이에틴 및 재조합으로 생성된 인간 에리트로포이에틴 모두를 포함한다.
- <46> 하기에 상세하게 기술된 바와 같이, EPO의 제조 및 정제는 당해 기술분야에 잘 알려져 있다. 에리트로포이에틴은, 천연 또는 재조합 세포를 사용한 조직, 단백질 합성, 세포 배양과 같은 임의의 통상적인 공급원으로부터 수득된 바와 같은, 천연 또는 재조합 단백질, 바람직하게는 인간 단백질을 의미한다. 뮤테인 또는 달리 변형된 단백질과 같은 에리트로포이에틴의 활성을 갖는 임의의 단백질을 포함한다. 재조합 EPO는 재조합 DNA 기술 또는 내생 유전자 활성화에 의해 CHO-, BHK- 또는 HeLa 세포주에서의 발현을 통해 제조할 수 있다. 내생 유전자 활성화에 의한 단백질의 발현은 당해 기술분야에 잘 알려져 있고, 예를 들어 미국 특허 제 5,733,761 호, 제 5,641,670 호 및 제 5,733,746 호, 및 국제 공개 공보 제 WO 93/09222 호, 제 WO 94/12650 호, 제 WO 95/31560 호, 제 WO 90/11354 호, 제 WO 91/06667 호 및 제 WO 91/09955 호에 개시되어 있다(이들 각각의 내용은 본원에 참고로 인용되어 있음). 에리트로포이에틴 당단백질 생성물의 제조에 바람직한 EPO 종은 인간 EPO 종이다. 더욱 바람직하게는, EPO 종은 서열번호: 1 또는 서열번호: 2, 더욱 바람직하게는 서열번호: 1에 나타난 아미노산 서열을 갖는 인간 EPO이다.
- <47> 또한, 에리트로포이에틴은 1 내지 6개의 추가의 글리코실화 부위를 갖는 당단백질 유사체일 수 있다. 1개 이상의 올리고당 기를 갖는 단백질의 글리코실화는 폴리펩티드 주쇄를 따라 특정의 위치에서 발생하고, 단백질의 안정성, 분비, 아세포 배치 및 생물학적 활성과 같은 단백질의 물리적 특성에 많은 영향을 미친다. 글리코실화는 통상적으로 2개의 유형이 존재한다. O-결합된 올리고당은 세린 또는 트레오닌 잔기에 결합하고, N-결합된 올리고당은 아스파라긴 잔기에 결합한다. N-결합 및 O-결합된 올리고당 모두에서 발견되는 올리고당의 한가지 유형은 9개 이상의 탄소 원자를 함유하는 아미노당의 일종인 N-아세틸뉴라민산(시알산)이다. 시알산은 통상적으로 N-결합 및 O-결합된 올리고당 모두에 존재하는 말단 잔기이고, 이는 음전하를 갖기 때문에 당단백질에 산성 특

성을 부여한다. 165개의 아미노산을 갖는 인간 에리트로포이에틴은 당단백질의 전체 분자량의 약 40 %를 구성하는 3개의 N-결합 및 1개의 O-결합된 올리고당쇄를 함유한다. N-결합된 글리코실화는 24, 38 및 83번 위치에 위치한 아스파라긴 잔기에서 발생하고, O-결합된 글리코실화는 126번 위치에 위치한 세린 잔기에서 발생한다. 올리고당쇄는 말단 시알산 잔기로 변형된다. 글리코실화된 에리트로포이에틴로부터 모든 시알산 잔기를 효소적으로 제거하면, 에리트로포이에틴의 시알릴화가 간 결합 단백질에 의해 이의 결합 및 후속적인 제거를 방해하기 때문에 생체내 활성을 잃지만 생체외 활성은 잃지 않는다.

<48> 본 발명의 약학 조성물의 "에리트로포이에틴"란 용어는 시알산 부착 부위의 수를 증가시키는 인간 에리트로포이에틴의 아미노산 서열의 1개 이상의 변화를 갖는 인간 에리트로포이에틴의 유사체를 포함한다. 이들 당단백질 유사체는 글리코실화에 이용가능한 부위를 증가시키거나 변화시키는 아미노산 잔기의 부가, 결실 또는 치환을 갖는 부위 지정 돌연변이에 의해 생성할 수 있다. 인간 에리트로포이에틴에서 발견되는 것 보다 더 많은 양의 시알산을 갖고 있는 당단백질 유사체는 생물학적 활성에 필요한 이차구조 또는 삼차구조를 방해하지 않는 글리코실화 부위를 부가함으로써 생성된다. 본 발명의 당단백질은 N-결합 또는 O-결합된 부위에 인접한 1개 이상의 아미노산의 치환을 통상적으로 포함하는 글리코실화 부위에 증가한 양의 탄수화물 부착점을 갖는 유사체를 또한 포함한다. 본 발명의 당단백질은 에리트로포이에틴의 카르복실 말단으로부터 연장되고, 1개 이상의 추가의 탄수화물 부위에 제공되는 1개 이상의 아미노산을 갖는 유사체를 또한 포함한다. 본 발명의 에리트로포이에틴 단백질은 1개 이상의 글리코실화 부위의 재배열을 포함하는 아미노산 서열을 갖는 유사체를 또한 포함한다. 이러한 글리코실화 부위의 재배열은 인간 에리트로포이에틴에서 1개 이상의 글리코실화 부위의 결실 및 1개 이상의 비천연적으로 발생하는 글리코실화 부위의 부가를 포함한다. 에리트로포이에틴 상의 탄수화물쇄의 수를 증가시켜 에리트로포이에틴 분자당 시알산의 수를 증가시키면, 용해도의 증가, 단백질 분해에 대한 보다 큰 저항성, 면역성의 감소, 혈청 반감기의 증가 및 생물학적 활성의 증가와 같은 유리한 특성이 부여될 수 있다. 추가의 글리코실화 부위를 갖는 에리트로포이에틴 유사체는 엘리엇(Elliot)에 의해 유럽 특허출원 제 640,619 호 (1995년 3월 1일자로 공개됨)에 보다 상세하게 개시되어 있다.

<49> 바람직한 실시태양에서, 본 발명의 약학 조성물은 하기로부터 선택된 변형에 의해 변형된 인간 에리트로포이에틴의 서열을 포함하는 에리트로포이에틴(이에 제한되지는 않음)과 같은, 1개 이상의 추가의 글리코실화 부위를 포함하는 아미노산 서열을 갖는 에리트로포이에틴 단백질을 포함한다.



Asn<sup>30</sup>Thr<sup>32</sup>;  
 Asn<sup>51</sup>Thr<sup>53</sup>;  
 Asn<sup>57</sup>Thr<sup>59</sup>;  
 Asn<sup>69</sup>;  
 Asn<sup>69</sup>Thr<sup>71</sup>;  
 Ser<sup>68</sup>Asn<sup>69</sup>Thr<sup>71</sup>;  
 Val<sup>87</sup>Asn<sup>88</sup>Thr<sup>90</sup>;  
 Ser<sup>87</sup>Asn<sup>88</sup>Thr<sup>90</sup>;  
 Ser<sup>87</sup>Asn<sup>88</sup>Gly<sup>89</sup>Thr<sup>90</sup>;  
 Ser<sup>87</sup>Asn<sup>88</sup>Thr<sup>90</sup>Thr<sup>92</sup>;  
 Ser<sup>87</sup>Asn<sup>88</sup>Thr<sup>90</sup>Ala<sup>162</sup>;  
 Asn<sup>69</sup>Thr<sup>71</sup>Ser<sup>87</sup>Asn<sup>88</sup>Thr<sup>90</sup>;  
 Asn<sup>30</sup>Thr<sup>32</sup>Val<sup>87</sup>Asn<sup>88</sup>Thr<sup>90</sup>;  
 Asn<sup>89</sup>Ile<sup>90</sup>Thr<sup>91</sup>;  
 Ser<sup>87</sup>Asn<sup>89</sup>Ile<sup>90</sup>Thr<sup>91</sup>;  
 Asn<sup>136</sup>Thr<sup>138</sup>;  
 Asn<sup>138</sup>Thr<sup>140</sup>;  
 Thr<sup>125</sup>; 및  
 Pro<sup>124</sup>Thr<sup>125</sup>.

<50>

<51> 아미노산 서열의 변형에 대해 본원에서 사용된 표시법은 위첨자의 번호(들)로 표시된 대응하는 변형되지 않은 단백질(예를 들어, 서열번호: 1 또는 서열번호: 2의 hEPO)의 위치(들)가 각각의 위첨자의 번호(들)에 바로 선행하는 아미노산(들)으로 변경된다는 것을 의미한다.

<52> 에리트로포이에틴 단백질은 당단백질의 카르복실 말단에 1개 이상의 추가의 아미노산을 갖고, 추가의 아미노산이 1개 이상의 글리코실화 부위를 포함하는 유사체일 수도 있다. 추가의 아미노산은 인간 융모막 생식샘 자극 호르몬의 카르복실 말단으로부터 유도된 펩티드 단편을 포함할 수 있다. 바람직하게는, 당단백질은 (a) 아미노산 서열 Ser Ser Ser Ser Lys Ala Pro Pro Pro Ser Leu Pro Ser Pro Ser Arg Leu Pro Gly Pro Ser Asp Thr Pro Ile Leu Pro Gln(서열번호: 3)을 갖고, 카르복실 말단으로부터 연장된 인간 에리트로포이에틴; (b) (a)에서 Ser<sup>87</sup> Asn<sup>88</sup> Thr<sup>90</sup> EPO를 추가로 포함하는 유사체; 및 (c) (a)에서 Asn<sup>30</sup> Thr<sup>32</sup> Val<sup>87</sup> Asn<sup>88</sup> Thr<sup>90</sup> EPO를 추가로 포함하는 유사체로 이루어진 군으로부터 선택된 유사체이다.

<53> 에리트로포이에틴 단백질은 1개 이상의 글리코실화 부위의 재배열을 포함하는 아미노산 서열을 갖는 유사체일 수도 있다. 재배열은 인간 에리트로포이에틴에서 N-결합된 탄수화물 부위의 결실 및 인간 에리트로포이에틴의 아미노산 서열의 88번째 위치에서 임의의 N-결합된 탄수화물 부위의 부가를 포함할 수 있다. 바람직하게는, 당단백질은 Gln<sup>24</sup> Ser<sup>87</sup> Asn<sup>88</sup> Thr<sup>90</sup> EPO; Gln<sup>38</sup> Ser<sup>87</sup> Asn<sup>88</sup> Thr<sup>90</sup> EPO; 및 Gln<sup>83</sup> Ser<sup>87</sup> Asn<sup>88</sup> Thr<sup>90</sup> EPO로 이루어진 군으로부터 선택된 유사체이다.

<54> 더욱 바람직하게는, 상기에서 기술한 본 발명의 약학 조성물의 에리트로포이에틴 단백질은 이들의 페길레이트화된 유도체를 또한 포함할 수 있다. 에리트로포이에틴의 페길레이트화된 유도체 및 이의 제조는 당해 기술분야에 공지되어 있고, 예를 들어 EP-A 539,167, EP-A 605,963, WO 93/25212, WO 94/20069, WO 95/11924, 미국 특허 제 5,56 호, EP-A 584,876, WO 92/16555, WO 94/28024, WO 97/04796, 미국 특허 제 5,359,030 호, 미국 특허 제 5,681,811 호, 미국 특허 제 4,179,337 호, 일본 특허, WO 98/32466 및 미국 특허 제 5,324,650 호에 기술되어 있다. 페길레이트화된 에리트로포이에틴 종의 바람직한 실시태양은 하기에 기술된 바와 같이 유도체를 지칭한다.

<55> 따라서, 본 발명은 또한 에리트로포이에틴 접합체에 관한 것이고, 이때 상기 접합체는 1개 이상의 유리 아미노

기를 갖고, 골수 세포가 망상적혈구 및 적혈구의 생성을 증가시키도록 하는 생체내 생물학적 활성을 가지며, 인간 에리트로포이에틴, 및 1 내지 6개의 글리코실화 부위의 부가 또는 1개 이상의 글리코실화 부위의 재배열에 의해 변형된 인간 에리트로포이에틴의 서열을 갖는 그의 유사체로 이루어진 군으로부터 선택된 상기 에리트로포이에틴 단백질을 포함하고; 상기 에리트로포이에틴은 상기 아미노기 중의 하나와 아미드 결합을 형성하는 각각의 폴리(에틸렌 글리콜) 기의  $-CO(즉, 카르보닐)와 화학식 -CO-(CH_2)_x-(OCH_2CH_2)_m-OR$ 의 n개의 폴리(에틸렌 글리콜) 기에 공유결합되며, 이때 R은 저급 알킬이고, x는 2 또는 3이고, m은 약 450 내지 약 900이고, n은 1 내지 3이고, n 및 m은 접합체의 분자량에서 에리트로포이에틴 당단백질을 뺀 값이 20 내지 100 kDa이 되도록 선택된다. 본 발명은 본원에서 기술된 접합체를 함유하는 약학 조성물을 추가로 제공하며, 이때 n이 1인 접합체의 백분율이 조성물의 모든 접합체의 90 % 이상, 바람직하게는 92 % 이상, 더욱 바람직하게는 96 %이다.

<56> 더욱 구체적으로는, 상기 접합체는 화학식 I로 표시될 수 있다:

### 화학식 I

<57>  $P-[NHCO-(CH_2)_x-(OCH_2CH_2)_m-OR]_n$

<58> 상기 식에서,

<59> P는 골수세포가 망상적혈구 및 적혈구의 생성을 증가시키도록 하는 생체내 생물학적 활성을 갖는, 본원에서 기술된 에리트로포이에틴의 잔기(즉, 아미노기 또는 화학식 1에 나타난 카르보닐과 아미드 결합을 형성하는 아미노기가 없음)이고, R은 저급 알킬이고, x는 2 또는 3이고, m은 약 450 내지 약 900이고, n은 1 내지 3이고, n 및 m은 접합체의 분자량에서 에리트로포이에틴 당단백질을 뺀 값이 20 내지 100 kDa이 되도록 선택된다.

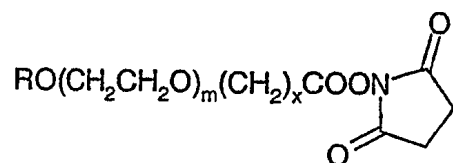
<60> 본원에서 사용된 "저급 알킬"이란 용어는 1 내지 6개의 탄소 원자를 갖는 선형 또는 분지형 알킬기를 의미한다. 저급 알킬기의 예는 메틸, 에틸 및 이소프로필을 포함한다. 본 발명에 따라, R은 임의의 저급 알킬이다. R이 메틸인 접합체가 바람직하다.

<61> "m"이란 부호는 폴리(에틸렌 옥사이드) 기에서 에틸렌 옥사이드 잔기( $OCH_2CH_2$ )의 수를 나타낸다. 에틸렌 옥사이드의 단일 PEG(폴리에틸렌 글리콜) 소단위는 약 44 Da의 분자량을 갖는다. 따라서, 접합체의 분자량(EPO의 분자량을 제외함)은 "m" 값에 의존한다. 본 발명의 접합체에서, "m"은 약 450 내지 약 900(약 20 내지 약 40 kDa의 분자량에 대응함), 바람직하게는 약 650 내지 약 750(약 30 kDa의 분자량에 대응함)이다. "m" 값은 얻어진 본 발명의 접합체가 변형되지 않은 EPO에 필적하는 생리적 활성(이 활성은 변형되지 않은 EPO의 대응하는 활성과 동일한 활성, 보다 큰 활성 또는 활성의 일부를 나타낼 수 있음)을 갖도록 선택된다. "약" 특정 값의 분자량은 이것이 통상적인 분석 기술에 의해 결정된 값의 합리적인 범위내에 있다는 것을 의미한다. "m" 값은 에리트로포이에틴 당단백질에 공유결합된 폴리(에틸렌 글리콜) 기 각각의 분자량이 약 20 내지 약 40 kDa, 바람직하게는 약 30 kDa이 되도록 선택된다.

<62> 본 발명의 접합체에서, "n" 값은 아미드 결합(들)을 통해 에리트로포이에틴 단백질의 유리 아미노기(리신 아미노산의  $\epsilon$ -아미노기 및/또는 아미노 말단 아미노기를 포함함)에 공유결합된 폴리(에틸렌 글리콜) 기의 수이다. 본 발명의 접합체는 EPO 분자당 1, 2 또는 3개의 PEG 기를 가질 수 있다. "n"은 1 내지 3의 정수이고, 바람직하게는 "n"은 1 또는 2이고, 더욱 바람직하게는, "n"은 1이다. 상기 접합체 중에서 바람직한 접합체는 x가 2이고, m이 650 내지 750이고, n이 1이고, R이 메틸인 화합물을 포함한다.

<63> 상기 화학식 I의 화합물은 하기 화학식 II의 화합물을 에리트로포이에틴 당단백질과 축합반응시킴으로써 공지된 중합체성 물질로부터 제조할 수 있다:

### 화학식 II



<64>

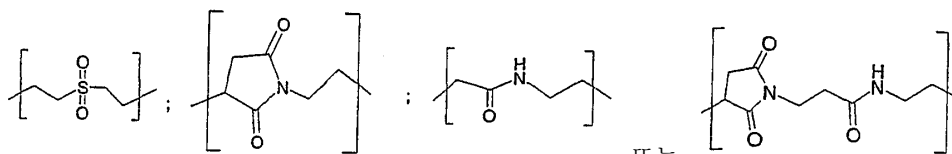
<65> 상기 식에서,

<66> R 및 m은 상기에서 기술된 바와 같다. x가 3인 화학식 II의 화합물은 폴리(에틸렌 글리콜)의  $\alpha$ -저급 알콕시,

부티르산 숙신이미딜 에스테르(저급 알콕시-PEG-SBA)이다.  $x$ 가 2인 화학식 II의 화합물은 폴리(에틸렌 글리콜)의  $\alpha$ -저급 알콕시, 프로피온산 숙신이미딜 에스테르(저급 알콕시-PEG-SPA)이다. 활성화된 에스테르를 아민과 반응시켜 아마이드를 형성하는 임의의 통상적인 방법을 사용할 수 있다. 상기 반응에서, 예시된 숙신이미딜 에스테르는 아마이드 형성을 야기하는 이탈기이다. 단백질과 접합체를 생성하기 위한 화학식 II의 화합물과 같은 숙신이미딜 에스테르의 사용은 미국 특허 제 5,672,662 호(1997년 9월 30일자로 해리스(Harris) 등에게 허여됨)에 개시되어 있다.

<67> 인간 EPO는 9개의 유리 아미노기, 즉 아미노-말단 아미노기에 더해서 8개의 리신 잔기의  $\epsilon$ -아미노기를 함유한다. 페길레이트화 시약을 화학식 II의 SBA 화합물과 결합하였을 때, pH 7.5, 1:3의 단백질:PEG 비율 및 20 내지 25 °C의 반응 온도에서 모노-, 디- 및 소량의 트리-페길레이트화된 종의 혼합물이 생성되었다. 페길레이트화 시약이 화학식 II의 SPA 화합물이었을 때, 단백질:PEG 비율이 1:2라는 것을 제외하고는 동일한 조건에서 주로 모노-페길레이트화된 종이 생성되었다. 페길레이트화된 EPO를 혼합물로서, 또는 양이온 교환 크로마토그래피에 의해 분리된 개개의 페길레이트화된 종으로서 투여할 수 있다. 반응 조건(예를 들어, 시약의 비율, pH, 온도, 단백질 농도, 반응 시간 등)을 조절함으로써, 개개의 페길레이트화된 종의 상대적인 양을 달리할 수 있다.

<68> 상기 약학 조성물은 1개 이상의 유리 아미노기를 갖고, 골수가 망상적혈구 및 적혈구의 생성을 증가시키도록 하는 생체내 생물학적 활성을 가지며, 인간 에리트로포이에틴, 및 1 내지 6개의 글리코실화 부위의 부가에 의해 변형된 인간 에리트로포이에틴의 일차구조를 갖는 그의 유사체로 이루어진 군으로부터 선택된 상기 에리트로포이에틴 단백질을 포함할 수도 있고; 상기 당단백질은 1 내지 3개의 저급-알콕시 폴리(에틸렌 글리콜) 기와 공유 결합되고, 각각의 폴리(에틸렌 글리콜) 기는 상기 아미노기 중의 하나와 아마이드 결합을 형성하는 연결기의 C(0)와 화학식  $-C(0)-X-S-Y$ 의 연결기를 통해 당단백질과 공유결합되며, 이때  $X$ 는  $-(CH_2)_k-$  또는  $-CH_2(O-CH_2-CH_2)_k-$ 이고,  $k$ 는 1 내지 10이고,  $Y$ 는



<69> 또는 이고, 각각의 폴리(에틸렌 글리콜) 부분의 평균 분자량은 약 20 내지 약 40 kDa이고, 접합체의 분자량은 약 51 내지 약 175 kDa이다.

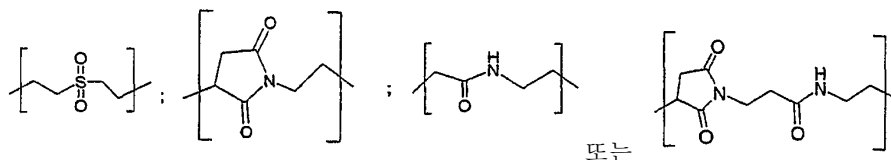
<70> 이 에리트로포이에틴 종은 하기 화학식 III으로 표시될 수도 있다:

### 화학식 III

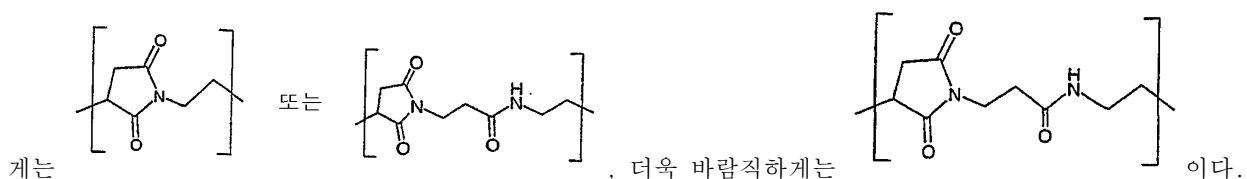
<71>  $P-[NH-CO-X-S-Y-(OCH_2CH_2)_m-OR]_n$

<72> 상기 식에서,

<73> R은 메틸, 에틸, 이소프로필 등과 같은 1 내지 6개의 탄소 원자를 갖는 선형 또는 분지형 알킬기를 의미하는 임의의 저급 알킬일 수 있다. 바람직한 알킬은 메틸이다.  $X$ 는  $-(CH_2)_k-$  또는  $-CH_2(O-CH_2-CH_2)_k-$ 이고, 이때  $k$ 는 1 내지 약 10이다. 바람직하게는,  $k$ 는 1 내지 약 4이고, 더욱 바람직하게는,  $k$ 는 1 또는 2이다. 가장 바람직하게는,  $X$ 는  $-(CH_2)$ 이다.



<74> 화학식 III에서,  $Y$ 는 바람직하게는



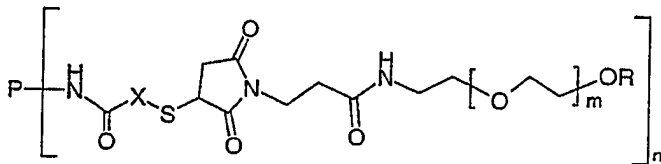
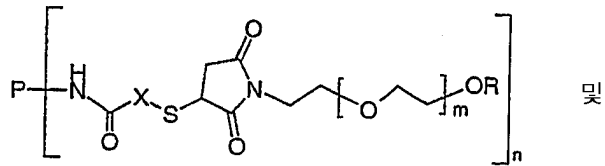
<75> 화학식 III에서,  $m$ 값은 얻어진 화학식 III의 접합체가 변형되지 않은 EPO에 필적하는 생리적 활성(이 활성은 변



형되지 않은 EPO의 대응하는 활성과 동일한 활성, 보다 큰 활성 또는 활성의 일부를 나타낼 수 있음)을 가질 정도로 선택된다.  $m$ 은 PEG 단위에서 에틸렌 옥사이드 잔기의 수를 나타낸다.  $-(OCH_2CH_2)-$ 의 단일 PEG 소단위는 약 44 Da의 분자량을 갖는다. 따라서, 접합체의 분자량(EPO의 분자량을 제외함)은  $m$ 값에 의존한다. "약" 특정 값의 분자량은 이것이 통상적인 분석 기술에 의해 결정된 값의 합리적인 범위내에 있다는 것을 의미한다.  $m$ 은 약 450 내지 약 900(20 내지 40 kDa의 분자량에 대응함)의 범위, 바람직하게는 약 550 내지 약 800(약 24 내지 35 kDa)의 범위, 가장 바람직하게는 약 650 내지 약 700(약 29 내지 약 31 kDa)의 범위의 정수이다.

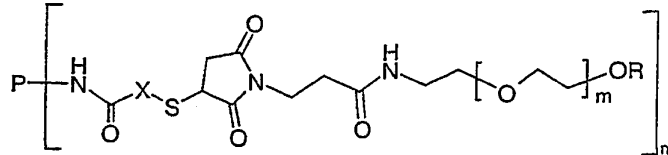
<76> 화학식 III에서,  $n$ 값은 아마이드 결합을 통해 PEG 단위에 공유결합된 에리트로포이에틴 단백질 중의 리신 아미노산의  $\epsilon$ -아미노기의 수이다. 본 발명의 접합체는 EPO 분자당 1, 2 또는 3개의 PEG 단위를 가질 수 있다.  $n$ 은 1 내지 3의 범위의 정수, 바람직하게는 1 또는 2, 더욱 바람직하게는 1인 정수이다.

<77> 화학식 III의 바람직한 에리트로포이에틴 단백질은 하기 화학식으로 표시된다:



<78>

<79> 가장 바람직한 에리트로포이에틴 당단백질 생성물은 하기 화학식으로 표시된다:

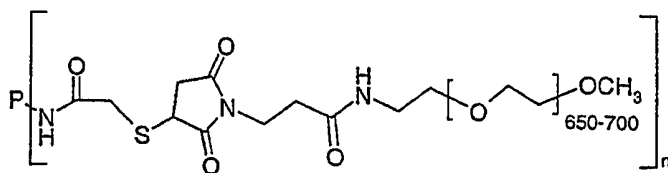
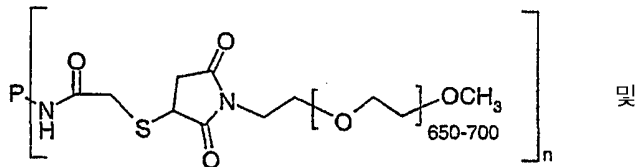


<80>

<81> 상기 식에서,

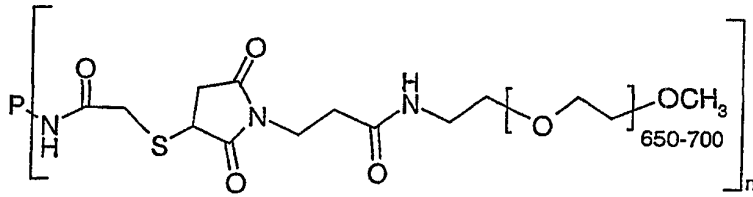
<82>  $n$ 은 1 내지 3의 정수이고,  $m$ 은 450 내지 900의 정수이고, R은 저급 알킬이고, X는  $-(CH_2)_k-$  또는  $-\text{CH}_2(\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2)_k-$ 이고, P는 아미노기 또는 X와 아마이드결합을 형성하는기가 없는 에리트로포이에틴 당단백질의 잔기이다.

<83> 다른 바람직한 에리트로포이에틴 당단백질 생성물은 하기 화학식으로 표시된다:



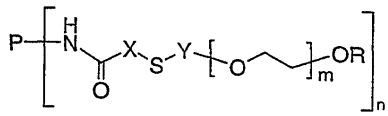
<84>

<85> 더욱 바람직한 에리트로포이에틴 당단백질 생성물은 하기 화학식으로 표시된다:



<86>

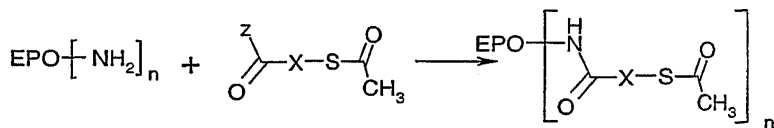
<87> 이들 에리트로포이에틴 단백질은 (a) 화학식  $\text{P}-(\text{NH}_2)_n$ 으로 표시되는 에리트로포이에틴 단백질의 리신 아미노산의  $\epsilon$ -아미노기를 화학식  $\text{Z}-\text{CO}-\text{X}-\text{S}-\text{Q}$ 로 표시되는 이작용성 시약과 공유결합 반응시켜 화학식  $\text{P}-(\text{NH}-\text{CO}-\text{X}-\text{S}-\text{Q})_n$ 로 표시되는 아마이드결합을 갖는 중간체를 형성하고; (b) 단계 (a)로부터의 아마이드결합을 갖는 중간체를 화학식  $\text{W}-[\text{OCH}_2\text{CH}_2]_m-\text{OR}$ 로 표시되는 활성화된 폴리(에틸렌 글리콜) 유도체와 공유결합 반응시켜 화학식



로 표시되는 에리트로포이에틴 당단백질 생성물을 형성함으로써 제조할 수 있다(상기 식에서, P는 아마이드결합을 형성하는 아미노기를 갖지 않는 에리트로포이에틴 단백질이고; n은 1 내지 3 범위의 정수이고; Z는 반응성기, 예를 들어 카르복실-NHS 에스테르이고; X는  $-(\text{CH}_2)_k-$  또는  $-\text{CH}_2-(\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2)_k-$ (여기서, k는 1 내지 약 10임)이고; Q는 알카노일(예를 들어, 아세틸)과 같은 보호기이고, W는 Y의 설포하이드릴 반응성 형태이고; m은 약 450 내지 약 900 범위의 정수이고; R은 저급 알킬이고; Y는 상기에 정의한 바와 같다).

<88> 이 실시태양에서, 이작용성 시약은 N-숙신이미딜-S-아세틸티오프로피오네이트 또는 N-숙신이미딜-S-아세틸티오아세테이트인 것이 바람직하고, Z는 N-히드록시숙신이미드인 것이 바람직하며, 활성화된 폴리(에틸렌 글리콜) 유도체  $\text{W}-[\text{OCH}_2\text{CH}_2]_m-\text{OR}$ 은 요도-아세틸-메톡시-PEG, 메톡시-PEG-비닐설펜 및 메톡시-PEG-말레이미드로 이루어진 군으로부터 선택되는 것이 바람직하다.

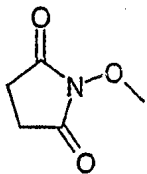
<89> 더욱 상세하게는, 화학식 III의 에리트로포이에틴 단백질은 티올기를 EPO에 공유결합시키고("활성화"), 얻어진 활성화된 EPO를 폴리(에틸렌 글리콜)(PEG) 유도체와 커플링시킴으로써 제조할 수 있다. 본 발명에 따른 폐길레이트화된 EPO의 제조를 위한 제 1 단계는 EPO의  $\text{NH}_2$ 기를 통해 티올기를 공유결합시키는 것을 포함한다. 이 EPO의 활성화는 보호된 티올기 및 추가의 반응성기(예를 들어, 활성 에스테르(예를 들어, 숙신이미딜에스테르), 무수물, 설포산의 에스테르, 및 카르복실산 및 설포산의 할로젠화물) 각각을 갖고 있는 이작용성 시약을 사용하여 수행된다. 티올기는 당해 기술분야에 공지된 기, 예를 들어 아세틸기에 의해 보호된다. 이들 이작용성 시약은 아마이드결합을 형성함으로써 리신 아미노산의  $\epsilon$ -아미노기와 반응할 수 있다. 반응의 제 1 단계는 하기에 나타낸다:



<90>

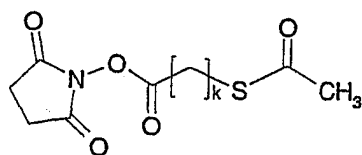
<91> 상기 식에서,

<92> EPO, n 및 X는 상기에서 정의된 바와 같고, Z는 당해 기술분야에서 공지된 반응성기, 예를 들어 화학식



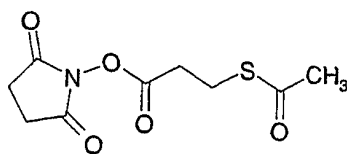
의 N-히드록시-숙신이미드(NHS) 치환기이다.

<93> 바람직한 실시태양에서,  $\epsilon$ -아미노 리신기의 활성화는 숙신이미딜 부분을 갖는 이작용성 시약과의 반응에 의해 수행된다. 이작용성 시약은 다양한 스페이서 중, 예를 들어  $-(\text{CH}_2)_k-$  또는  $-\text{CH}_2-(\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2)_k-$  부분을 가질 수 있고, 이때 k는 1 내지 약 10, 바람직하게는 1 내지 약 4, 더욱 바람직하게는 1 또는 2, 가장 바람직하게는 1이다. 이들 시약의 예는 N-숙신이미딜-S-아세틸티오프로피오네이트(SATP) 및 N-숙신이미딜-S-아세틸티오아세테이트

 $\Xi(\text{SATA}),$ 

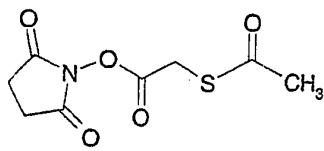
(아세틸티오알킬-카르복실-NHS-에스테르),

예를 들어

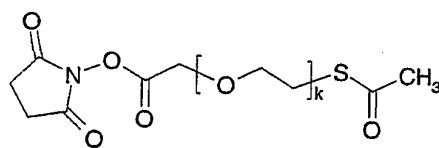


SATP

또는

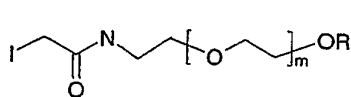


SATA

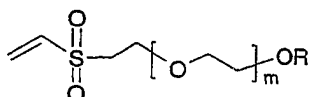
(2-(아세틸티오)-(에톡시)<sub>k</sub>-아세트산-

NHS-에스테르)이고, 이때  $k$ 는 상기에서 정의된 바와 같다.

- <94> 이작용성 시약의 제조는 선행 기술분야에 공지되어 있다. 2-(아세틸티오)-(에톡시)-아세트산-NHS-에스테르의 전구체는 독일 특허 제 3924705 호에 기술되어 있는 반면, 아세틸티오 화합물의 유도체화는 문헌[March, J., Advanced Organic Chemistry, McGraw-Hill, 375-376, (1977)]에 기술되어 있다. SATA는 시판되고 있다(미국 오리건주 유진 소재의 몰레큘러 프로브스(Molecular Probes) 및 일리노이주 록포트 소재의 피어스(Pierce)).
- <95> EPO 분자에 부가될 티올기의 수는 반응 파라미터, 즉 단백질(EPO) 농도 및 단백질/이작용성 시약의 비율을 조절 함으로써 선택될 수 있다. 바람직하게는, EPO를 EPO 분자당 1 내지 5개의 티올기, 더욱 바람직하게는 1.5 내지 3개의 티올기와 공유결합시킴으로써 활성화시킨다. 이들 범위는 EPO 단백질 집합체에 대한 티올기의 통계학적 인 분포를 지칭한다.
- <96> 반응은, 예를 들어 수성 완충액(pH 6.5 내지 8.0), 예를 들어 10 mM의 인산칼륨, 50 mM의 NaCl(pH 7.3)에서 수행한다. 이작용성 시약을 DMSO에 첨가할 수도 있다. 반응이 끝난 후, 바람직하게는 30분 후, 리신을 첨가하여 반응을 정지시킨다. 과량의 이작용성 시약을 선행 기술분야에 공지된 방법, 예를 들어 투석 또는 컬럼 여과에 의해 분리할 수 있다. EPO에 부가된 티올기의 평균값은 문헌[Grasetti, D.R. and Murray, J.F., J. Appl. Biochem. Biotechnol. 119: 41-49 (1967)]에 기술된 광도 측정 방법에 의해 결정할 수 있다.
- <97> 상기 반응 이후에 활성화된 폴리(에틸렌 글리콜)(PEG) 유도체의 공유결합 반응이 수행된다. 적합한 PEG 유도체는 약 20 내지 약 40 kDa, 더욱 바람직하게는 약 24 내지 약 35 kDa, 가장 바람직하게는 약 30 kDa의 평균 분자량을 갖는 활성화된 PEG 분자이다.
- <98> 활성화된 PEG 유도체는 선행 기술분야에 공지되어 있고, 예를 들어 PEG-비닐설폰에 대해서는 문헌[Morpurgo, M. et al., J. Bioconj. Chem. 7: p. 363 ff (1996)]에 기술되어 있다. 직쇄 및 분지쇄 PEG 종은 화학식 I의 화합물의 제조에 적합하다. 반응성 PEG 시약의 예는 요도-아세틸-메톡시-PEG 및 메톡시-PEG-비닐설폰, 즉

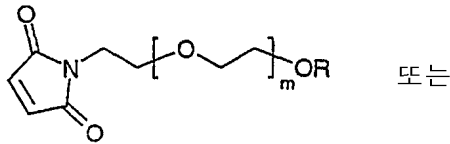


또는

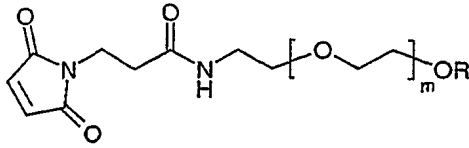


이다.

- <99> 이들 요도-활성화된 물질의 사용은 선행 기술분야에 공지되어 있고, 예를 들어 문헌[Hermanson, G.T., Bioconjugate Techniques, Academic Press, San Diego, p. 147-148 (1996)]에 기술되어 있다.
- <100> 가장 바람직하게는, PEG 종은 메톡시-PEG-말레이미드(분자량: 30000, 쉬어워터 폴리머스 인코포레이티드 (Shearwater Polymers, Inc))와 같은 (알콕시-PEG-말레이미드)를 사용함으로써 말레이미드에 의해 활성화될 수 있다. 알콕시-PEG-말레이미드의 구조는 다음과 같다:



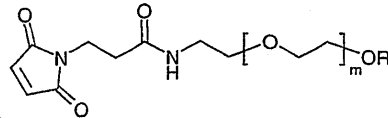
또는



<101>

<102>

상기 식에서,



<103>

R 및 m은 상기에 정의된 바와 같고, 바람직하게는

이다.

<104>

알콕시-PEG-말레이미드와의 커플링 반응은 수성 완충액, 예를 들어 10 mM의 인산칼륨, 50 mM의 NaCl, 2 mM의 EDTA(pH 6.2)에서 티올 보호기의 동일 반응계 절단 후에 일어난다. 보호기의 절단은, 예를 들어 DMSO 중의 히드록실아민을 사용하여 25 °C 및 pH 6.2에서 약 90분 동안 수행할 수 있다. PEG 변형에 있어서, 활성화된 EPO/알콕시-PEG-말레이미드의 몰비는 약 1:3 내지 약 1:6, 바람직하게는 1:4이어야 한다. 시스테인을 첨가하여 반응을 정지시키고, N-메틸말레이미드 또는 이황 결합을 형성할 수 있는 기타 적절한 화합물과 잔류 티올(-SH)기를 반응시킨다. N-메틸말레이미드와 같은 보호기 또는 기타 적합한 보호기와 임의의 잔류 활성 티올기가 반응하기 때문에, 본 발명의 접합체내의 EPO 당단백질은 이러한 보호기를 함유할 수 있다. 일반적으로, 본원에서 기술된 방법은 PEG-말레이미드에 접합되지 않은 당단백질 상의 활성화된 티올기의 수에 따라 상이한 수의 보호기에 의해 보호된 다양한 수의 티올을 갖는 분자 혼합물을 생성할 것이다.

<105>

N-메틸말레이미드는 페길레이트화된 단백질 상의 잔류 티올기를 차단하기 위해 사용될 때 동일한 유형의 공유결합을 형성하는 반면, 이황 화합물은 차단 시약의 분자내 황화물/이황화물 교환 반응에서 이황 가교된 커플링을 유도할 것이다. 이 유형의 차단 반응에 바람직한 차단 시약은 산화된 글루타티온(GSSG), 시스테인 및 시스타민이다. 시스테인으로는 추가의 순전하(net charge)를 페길레이트화된 단백질에 도입하지 못하는 반면, 차단 시약 GSSG 또는 시스타민을 사용하면 추가의 음전하 또는 양전하를 도입할 수 있다.

<106>

모노-, 디- 및 트리-페길레이트화된 EPO 종의 분리를 비롯한 화학식 III의 화합물의 추가의 정제는 선행 기술분야에 공지된 방법, 예를 들어 컬럼 크로마토그래피에 의해 수행될 수 있다.

<107>

페길레이트화된 에리트로포이에틴 유도체를 포함하는 조성물은 90 % 이상의 모노-PEG 접합체(즉, n이 1인 접합체)를 함유하는 것이 바람직하고, 실시예 5에 나타난 바와 같이 제조될 수 있다. 통상적으로, 에리트로포이에틴 당단백질의 모노-PEG 접합체는 이들이 디-PEG 접합체보다 높은 활성을 나타내는 경향이 있기 때문에 바람직하다. 모노- 및 디-PEG 종의 비율뿐만 아니라 모노-PEG 접합체의 백분율은 용출 피크 부근에서 보다 넓은 분획을 모아 조성물내의 모노-PEG의 백분율을 감소시키거나 보다 좁은 분획을 모아 조성물내의 모노-PEG의 백분율을 증가시킴으로써 조절할 수 있다. 약 90 %의 모노-PEG 접합체는 수율과 활성의 균형이 우수하다. 종종, 예를 들어 92 % 이상 또는 96 % 이상의 접합체가 모노-PEG 종(n이 1임)인 조성물이 요구될 수 있다. 본 발명의 실시태양에서, n이 1인 접합체의 백분율은 90 내지 96 %이다.

<108>

본 발명에 따른 조성물은 상기에 정의된 바와 같이 10 내지 10000  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 에리트로포이에틴 단백질을 포함할 수 있다. 바람직하게는, 조성물은 10 내지 1000  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , 예를 들어 10, 50, 100, 400, 800 또는 2500  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 을 포함한다.

<109>

또한, 본 발명에 따른 조성물은 10 내지 10000  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 에리트로포이에틴 단백질, 10 내지 200 mmol/l의 설페이트 및 10 내지 50 mmol/l의 포스페이트(pH 6.0 내지 6.5)를 포함할 수 있다. 이 조성물은 또한 20 mM 이하의 메티오닌, 1 내지 5 %(중량/부피)의 폴리올, 0.1 %(중량/부피) 이하의 플루로닉 F68 및 선택적으로 1 mM 이하의  $\text{CaCl}_2$ 를 포함할 수도 있다. 이 조성물의 일례는 10 내지 10000  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 에리트로포이에틴 단백질, 40 mmol/l의 설페이트, 10 mmol/l의 포스페이트, 3 %(중량/부피)의 만니톨, 10 mM의 메티오닌 및 0.01 %(중량/부피)의 플루로닉 F68(pH 6.2)을 포함한다.

- <110> 본 발명의 추가의 실시태양에서, 조성물은 10 내지 10000  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 에리트로포이에틴 단백질, 10 내지 100 mM/ℓ의 NaCl, 10 내지 50 mmol/ℓ의 포스페이트(pH 6.0 내지 7.0) 및 선택적으로 1 내지 5 %(중량/부피)의 폴리올을 포함할 수 있다. 또한, 이 조성물은 20 mM 이하의 메티오닌, 0.1 %(중량/부피) 이하의 플루로닉 F68 및 선택적으로 7.5  $\mu\text{mol}/\ell$ 의  $\text{CaCl}_2$ 를 포함할 수 있다. 특히, 이 조성물은 10 내지 10000  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 에리트로포이에틴 단백질, 100 mmol/ℓ의 NaCl, 10 mM의 메티오닌, 0.01 %(중량/부피)의 플루로닉 F68 및 10 mmol/ℓ의 포스페이트(pH 7.0)를 포함할 수 있다.
- <111> 본 발명은 또한 10 내지 10000  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 에리트로포이에틴 단백질, 10 내지 50 mmol/ℓ의 아르기닌(pH 6 내지 6.5) 및 10 내지 100 mmol/ℓ의 황산나트륨을 포함하는 조성물에 관한 것이다. 또한, 이 조성물은 20 mM 이하의 메티오닌, 0.1 %(중량/부피) 이하의 플루로닉 F68, 선택적으로 1 mmol/ℓ 이하의  $\text{CaCl}_2$  및 선택적으로 1 내지 5 %(중량/부피)의 폴리올을 포함할 수 있다. 특히, 이 조성물은 10 내지 10000  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 에리트로포이에틴 단백질, 40 mmol/ℓ의 아르기닌(pH 6.2), 30 mmol/ℓ의 황산나트륨, 3 %(중량/부피)의 만니톨, 10 mM의 메티오닌, 0.01 %(중량/부피)의 플루로닉 F68 및 선택적으로 1 mmol/ℓ의  $\text{CaCl}_2$ 를 포함할 수 있다.
- <112> 본 발명의 바람직한 실시태양은 10 내지 10000  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , 바람직하게는 25 내지 2500  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 에리트로포이에틴 단백질, 및
- <113> (a) 10 mM의 인산나트륨/인산칼륨, 100 mM의 NaCl(pH 7.0),
- <114> (b) 10 mM의 인산나트륨, 120 mM의 황산나트륨(pH 6.2),
- <115> (c) 10 mM의 인산나트륨, 40 mM의 황산나트륨, 3 %(중량/부피)의 만니톨(pH 6.2),
- <116> (d) 10 mM의 인산나트륨, 40 mM의 황산나트륨, 3 %(중량/부피)의 만니톨, 10 mM의 메티오닌, 0.01 %(중량/부피)의 플루로닉 F68(pH 6.2),
- <117> (e) 40 mM의 아르기닌, 30 mM의 황산나트륨, 3 %(중량/부피)의 만니톨(pH 6.2), 또는
- <118> (f) 40 mM의 아르기닌, 30 mM의 황산나트륨, 3 %(중량/부피)의 만니톨, 10 mM의 메티오닌, 0.01 %(중량/부피)의 플루로닉 F68(pH 6.2)을 포함하는 조성물에 관한 것이다.
- <119> 가장 바람직한 실시태양에서, 조성물은 에리트로포이에틴 단백질을 50, 100, 400, 800 또는 2500  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 양으로 포함한다. 가장 바람직한 조성물은 10 mM의 인산나트륨, 40 mM의 황산나트륨, 3 %(중량/부피)의 만니톨, 10 mM의 메티오닌, 0.01 %(중량/부피)의 플루로닉 F68(pH 6.2)을 포함하거나 40 mM의 아르기닌, 30 mM의 황산나트륨, 3 %(중량/부피)의 만니톨, 10 mM의 메티오닌, 0.01 %(중량/부피)의 플루로닉 F68(pH 6.2)을 포함할 수 있다.
- <120> 본 발명의 조성물은 분무-건조 분말의 형태일 수 있다.
- <121> 또한, 본 발명은 상기 조성물의 동결건조물 또는 분무-건조 분말인 조성물에 관한 것이다. 조성물은 용매, 예를 들어 물을 첨가하여 액체 용액을 형성하기 위해 재구성되거나 흡입 장치 또는 경피 적용 장치에 의해 직접 적용될 수 있다.
- <122> 본 발명은 또한 에리트로포이에틴 단백질을 다중 음하전된 음이온 및 선택적으로 1종 이상의 상기 약학적으로 허용가능한 부형제를 포함하는 용액과 혼합하는 것을 포함하는 상기 조성물의 제조 방법을 포함한다.
- <123> 또한, 본 발명은 만성 신부전(CRF) 환자, AIDS 및/또는 화학요법을 받는 암 환자의 빈혈과 관련된 질병의 치료 또는 예방에 유용한 약제의 제조를 위한 상기 조성물의 용도에 관한 것이다. 본 발명은 상기 조성물을 환자에게 투여하는 단계를 포함하는, 만성 신부전(CRF), AIDS 및 화학요법을 받는 암 환자의 빈혈을 포함하는 질병의 치료 및 예방을 위한 방법을 포함한다.
- <124> 본 발명의 추가의 실시태양은 상기 조성물을 포함하는 국부 및 전신 서방성 장치에 관한 것이다. 이는 예를 들어 중합체계 미립자 또는 초미립자와 같은 상기 조성물을 포함하는 에리트로포이에틴의 제어된 방출을 제공하는 임의의 종류의 이식체일 수 있다. 상기 조성물을 사전-충전 주사기 또는 예를 들어 니들-프리 주사 장치와 같은 임의의 기타 응용 장치 또는 흡입 장치로 제공할 수 있다.
- <125> 본 발명의 조성물은 주사 투여 또는 정맥내 투여를 위한 단위 투여량으로서 존재할 수 있다. 다른 한편으로, 본 발명의 조성물은 액체 형태 또는 고체 형태로 저장될 수 있고, 이후에 정맥내 투여 또는 주사 투여를 위한 단위 투여량 형태로 분리될 수 있다. 따라서, 본 발명의 액체 조성물은 1회용 투여 형태로서 사용하기 위해



0.3 ml 정도의 양으로 존재할 수 있다. 다른 한편으로, 포장된 투여 형태로 유통하기 전에 저장할 경우에 청구된 조성물의 부피는 60 l 정도일 수 있다. 안정성의 증가면에서, 본 발명의 조성물은 차후에 의사, 환자 및 병원에 유통하기에 적합한 포장 수단에 넣기 위해 큰 용기에 저장할 수 있다.

<126> 본 발명의 주사용 용액은 일반적으로 1회 단위 투여량으로서 0.3 내지 20 ml의 조성물의 투여를 허용하는 주사기와 같은 통상적인 주사 수단에 의해 투여될 수 있다. 다른 한편으로, 본 발명의 조성물은 주사하기 전에 통상적인 방법으로 재구성된 동결건조물 또는 분무-건조 분말로서 조성물을 함유하는 앰플을 사용하여 주사로 투여될 수 있다. 다른 한편으로, 본 발명의 조성물은 그의 안정성 때문에, 약 0.3 내지 약 10 ml의 조성물을 함유하는 바이알과 같은 단위 투여 형태로 투여될 수 있다. 또한, 본 발명의 조성물은 정맥주사용 백(bag)을 사용하여 정맥내로 투여될 수 있다. 이들 백은 용액을 환자에게 투여해야 할 기간에 따라 약 20 내지 약 500 ml의 용액을 함유한다. 본 발명에 따라, 본 발명의 액체 용액은 저장 용기에 저장될 수 있고, 이 용기로부터 의사, 병원 및 환자에게 유통하기 위한 소량의 투여 형태 패키지로 추가로 분리될 수 있다. 본 발명의 조성물은 그의 안정성 때문에, 이 조성물을 투여하기 전에 장기간 동안 이러한 저장 용기에 저장할 수 있다.

<127> 상기 조성물을 위한 성분으로서 또는 상기 에리트로포이에틴 유도체의 제조를 위한 출발 물질로서 에리트로포이에틴의 제조는 예를 들어 미국 특허 제 5,547,933 호, 미국 특허 제 5,621,080 호, 유럽 특허 제 0 148 605 호, 문헌[Huang, S.L., Proc. Natl. Acad. Sci. USA(1984) 2708-2712], 유럽 특허 제 0 205 564 호, 유럽 특허 제 0 209 539 호, 유럽 특허 제 0 411 678 호, 문헌[Lai, P.H. et al., J. Biol. Chem. 261(1986) 3116-3121] 및 [Sasaki, H. et al., J. Biol. Chem. 262(1987) 12059-12076]에 상세하게 기술되어 있다. 치료 용도를 위한 에리트로포이에틴은 재조합 수단에 의해 생성될 수 있다(유럽 특허 제 0 148 605 호, 유럽 특허 제 0 209 539 호 및 문헌[Egrie, J.C., Strickland, T.W., Lane, J. et al., Immunobiol. 72, 213-224, 1986]).

<128> 무혈청 배지에서 에리트로포이에틴의 발현 및 제조 방법은 예를 들어 1996년 11월 14일자로 공개된 버그(Burg)의 WO 96/35718 및 1992년 6월 12일자로 공개된 코크(Koch)의 유럽 특허공개 제 513 738 호에 기술되어 있다. 상기의 공개공보 이외에, EPO 유전자를 함유하는 재조합 CHO 세포의 무혈청 발효를 수행할 수 있다는 것이 알려져 있다. 이러한 방법은 예를 들어 EP-A 0 513 738 및 EP-A 0 267 678에 기술되어 있고, 문헌[Kawamoto, T. et al., Analytical Biochem. 130(1983) 445-453], EP-A 0 248 656, 문헌[Kowar, J. and Franek, F., Methods in Enzymology 421(1986) 277-292], [Bavister, B., Expcology 271(1981) 45-51], EP-A 0 481 791, EP-A 0 307 247, EP-A 0 343 635 및 WO 88/00967에 일반적인 형태로 기술되어 있다.

<129> EP-A 0 267 678에서, 투석 이후에 무혈청 배지에서 생성된 EPO의 정제를 위한 S-세파로스상의 이온 교환 크로마토그래피, C<sub>8</sub> 컬럼상의 제조용 역상 HPLC 및 겔 여과 크로마토그래피가 기술되어 있다. 이와 관련하여, 겔 여과 크로마토그래피 단계는 S-세파로스의 빠른 유속상의 이온 교환 크로마토그래피에 의해 교체될 수 있다. 이온 교환 크로마토그래피 이전에 블루 트리사크릴 컬럼 상의 염료 크로마토그래피를 수행할 수 있다는 것이 또한 제안되어 있다.

<130> 재조합 EPO의 정제 방법은 문헌[Nobuo, I. et al., J. Biochem. 107(1990) 352-359]에 기술되어 있다. 그러나, 이 방법에서 EPO는 정제 단계 이전에 트윈(Tween, 등록상표) 20, 페닐메틸설포닐 플루오라이드, 에틸말레이미드, 펩스타틴 A, 황산구리 및 옥삼산의 용액으로 처리한다. 1996년 11월 14일자로 공개된 버그의 WO 96/35718을 비롯한 간행물은 무혈청 발효 방법으로 에리트로포이에틴(EPOsf)을 제조하는 방법을 개시하고 있다.

<131> 본 발명에 따른 EPO 또는 EPO 접합체의 특이적 활성은 당해 기술분야에 공지된 다양한 분석법에 의해 측정될 수 있다. 본 발명의 정제된 EPO 단백질의 생물학적 활성은 인간 환자에게 EPO를 주사로 투여했을 경우에 대상의 주사되지 않거나, 또는 대조군과 비교해서 골수 세포가 망상적혈구 및 적혈구의 생성을 증가시키도록 하는 정도의 활성이다. 본 발명의 방법에 따라 수득되고 정제된 EPO 단백질 또는 이의 단편의 생물학적 활성은 문헌[Annable et al., Bull. Wld. Hlth. Org.(1972) 47, 99-112] 및 [Pharm. Europa Spec. Issue Erythropoietin BRP Bio, 1997(2)]에 따른 방법에 의해 시험될 수 있다. EPO 단백질의 활성을 측정하기 위한 또 다른 생물학적 분석법인 정적혈구병(normocythaemic) 마우스 분석법은 실시예 6에 기술되어 있다.

<132> 본 발명은 본원에 기술된 발명을 예시하지만 제한하지는 않는 하기 실시예를 참고로 하여 좀 더 충분히 이해될 것이다.

## 실시예

<133> 실시예 1: 인간 EPO의 발효 및 정제

- <134> a) 접종물 제조 및 발효
- <135> EPO-생산 CHO 세포주(유럽 특허 제 411 678호에 개시되어 있는 ATCC CRL8695(Genetics Institute)를 사용할 수 있음)로부터 유래한 제조용 세포 은행(Working Cell Bank)의 하나의 바이얼을 액체 질소 저장 탱크의 기체상으로부터 꺼낸다. 세포를 유리 교반 플라스크로 옮기고, 습윤 CO<sub>2</sub> 배양기에서 탄산수소-완충된 배지에서 배양한다. 접종물 제조 및 발효를 위해 사용된 전형적인 무혈청 배지는 1992년 6월 12일자로 공개된 코크의 유럽 특허출원 제 513 738 호 또는 1996년 11월 14일자로 공개된 버그의 WO 96/35718에 개시되어 있고, 예를 들어 배지로서 DMEM/F12(예를 들어, 미국 덴버 소재의 JRH 바이오사이언스/해즐턴 바이올로지스(JRH Biosciences/Hazleton Biologics), 주문 번호 제 57-736 호) 및 추가적으로 탄산수소 나트륨, L-글루타민, D-글루코즈, 재조합 인슐린, 아셀렌산 나트륨, 디아미노부탄, 히드로코티손, 제 2 황산철, 아스파라긴, 아스파르트산, 세린 및 포유류 세포용 안정화제, 예를 들어 폴리비닐 알콜, 메틸 셀룰로스, 폴리텍스트란, 폴리(에틸렌 글리콜), 플루로닉 F68, 혈장 증량제 폴리겔린(HEMACCEL<sup>®</sup>) 또는 폴리비닐 피롤리돈(WO 96/35718)을 함유한다.
- <136> 오염 미생물의 부재를 확인하기 위해 배지를 현미경으로 체크하고, 세포 농도를 측정한다. 각각의 분할 단계에서 이들 시험을 수행한다.
- <137> 초기 성장 기간 이후에 세포 배양액을 초기 세포 농도가 되도록 신선한 배지로 희석하고, 또 한번의 성장 사이클을 수행한다. 유리 교반 플라스크당 약 2 ℓ의 배양 부피를 수득할 때까지 이 과정을 반복한다. 약 12배 수행 이후에 1 내지 5 ℓ의 상기 배양액을 얻을 수 있으며, 이는 이어서 10 ℓ 접종물 발효기용 접종물로서 사용된다.
- <138> 3 내지 5일 후에, 10 ℓ 발효기내의 배양액을 100 ℓ 접종물 발효기용 접종물로서 사용할 수 있다.
- <139> 3 내지 5일 동안 추가로 배양한 후에, 100 ℓ 배양기내의 배양액을 1000 ℓ 생산 발효기용 접종물로서 사용할 수 있다.
- <140> b) 수거 및 세포 분리
- <141> 회분식 재공급 방법을 사용하는데, 즉, 목적하는 세포 밀도에 도달했을 때 배양액의 약 80 %를 수거한다. 나머지 배양액에 신선한 배양 배지를 다시 공급하고, 다음에 수거할 때까지 배양한다. 1회 생산 공정은 최고 10회 연속 수거, 즉 9회의 부분적 수거 및 발효 말기의 1회의 전체 수거로 이루어진다. 3 내지 4일마다 1회씩 수거한다.
- <142> 측정된 수거량을 냉각된 용기에 옮긴다. 원심분리 또는 여과에 의해 세포를 제거하여 버린다. 원심분리 단계에서의 EPO 함유 상층액을 직렬 여과하고, 제 2의 냉각된 용기에 수집한다. 수거물 각각은 정제 동안에 별도로 가공처리한다.
- <143> EPO-단백질의 전형적인 정제 방법은 1996년 11월 14일자로 공개된 버그의 WO 96/35718에 개시되어 있다. 하기에 그 정제 방법이 설명되어 있다.
- <144> a) 블루 세파로스 크로마토그래피
- <145> 블루 세파로스(Blue Sepharose, 파마시아(Pharmacia))는 세파로스 비드로 이루어지며, 이들 비드 표면에 시바크론 블루(Cibacron blue) 염료가 공유결합되어 있다. EPO는 대부분의 비-단백질성 오염물, 일부 단백질성 불순물 및 PVA보다 블루 세파로스에 더 강하게 결합하므로, 이 단계에서 EPO를 풍부하게 할 수 있다. 블루 세파로스 컬럼의 용출을 pH뿐만 아니라 염 농도를 증가시킴으로써 수행한다.
- <146> 컬럼을 80 내지 100 ℓ의 블루 세파로스로 충전하고, NaOH로 재생시키고, 평형화 완충액(염화나트륨/염화칼슘 및 아세트산나트륨)으로 평형화시킨다. 산성화되고 여과된 발효 상층액을 적재한다. 적재가 끝난 후, 컬럼을 높은 염화나트륨 농도를 함유하는 평형 완충액과 비슷한 완충액으로 먼저 세척하고, 이어 트리스-염기 완충액으로 세척한다. 생성물을 트리스-염기 완충액으로 용출하고, 마스터 용출 프로필에 따라 단일 분획으로 수집한다.
- <147> b) 부틸 토요펠 크로마토그래피
- <148> 부틸 토요펠 650 C(Butyl Toyopearl 650 C, 토소 하스(Toso Haas))는 지방족 부틸-잔기가 공유결합된 폴리스티렌계 기질이다. EPO는 대부분의 불순물 및 PVA보다 이 겔에 더 강하게 결합하므로, 이소프로판올을 함유하는 완충액으로 용출되어야 한다.

- <149> 컬럼을 30 내지 40 ℓ의 부틸 토요필 650 C로 채우고, NaOH로 재생시키고, 트리스-염기 완충액으로 세척하고, 이소프로판올을 함유하는 트리스-염기 완충액으로 평형화시킨다.
- <150> 블루 세파로스 용출액은 컬럼 평형화 완충액 중의 이소프로판올 농도로 조절하고, 컬럼에 적재한다. 이어, 컬럼을 높은 이소프로판올 농도를 갖는 평형화 완충액으로 세척한다. 생성물을 용출 완충액(높은 이소프로판올 함량을 갖는 트리스-염기 완충액)으로 용출하고 마스터 용출 프로필에 따라 단일 분획으로 수집한다.
- <151> c) 히드록시아파타이트 울트로겔 크로마토그래피
- <152> 히드록시아파타이트 울트로겔(Hydroxyapatite Ultrogel, 바이오세프라 (Biosepra))는 기계적 특성을 개선시키기 위해 아가로스 기질내에 혼입되어 있는 히드록시아파타이트로 이루어져 있다. EPO는 히드록시아파타이트에 대해 낮은 친화성을 갖고, 따라서 단백질 분순물보다 낮은 포스페이트 농도에서 용출될 수 있다.
- <153> 컬럼을 30 내지 40 ℓ의 히드록시아파타이트 울트로겔로 충전하고, 인산칼륨/염화칼슘 완충액 및 NaOH로 재생시킨 후, 트리스-염기 완충액으로 재생시킨다. 이어, 이를 소량의 이소프로판올 및 염화나트륨을 함유하는 트리스-염기 완충액으로 평형화시킨다.
- <154> 부틸 토요필 크로마토그래피의 EPO 함유 용출액을 컬럼에 적재한다. 이어, 컬럼을 평형화 완충액, 및 이소프로판올 및 염화나트륨이 없는 트리스-염기 완충액으로 세척한다. 생성물을 저농도의 인산칼륨을 함유하는 트리스-염기 완충액으로 용출하고 마스터 용출 프로필에 따라 단일 분획으로 수집한다.
- <155> d) 비탁 C4 상의 역상 HPLC
- <156> RP-HPLC 물질인 비탁 C4(Vydac C4, 비탁(Vydac))는 실리카겔 입자로 이루어지고, 이 입자의 표면은 C4-알킬쇄를 갖는다. 단백질성 불순물로부터 EPO의 분리는 소수성 상호작용의 강도 차이에 기초하고 있다. 희석된 트리플루오로아세트산 중의 아세트오니트릴 구배로 용출을 수행한다.
- <157> 스테인레스 스틸 컬럼(2.8 내지 3.2 ℓ의 비탁 C4 실리카겔로 충전됨)을 사용하여 제조용 HPLC를 수행한다. 히드록시아파타이트 울트로겔 용출액은 트리플루오로아세트산을 가하여 산성화시키고 비탁 C4 컬럼에 적재한다. 세척 및 용출을 위해, 희석된 트리플루오로아세트산 중의 아세트오니트릴 구배를 사용한다. 분획을 수집하고 포스페이트 완충액으로 즉시 중화시킨다. IPC 한계내에 존재하는 EPO 분획을 모은다.
- <158> e) DEAE 세파로스 크로마토그래피
- <159> DEAE 세파로스(DEAE Sepharose, 파마시아) 물질은 세파로스 비드의 표면에 공유결합하는 디에틸아미노에틸(DEAE)기로 이루어져 있다. DEAE기에 EPO의 결합은 이온 상호작용에 의해 매개된다. 아세트오니트릴 및 트리플루오로아세트산은 지체없이 컬럼을 통과한다. 이들 물질을 세척한 후에, 낮은 pH의 아세테이트 완충액으로 컬럼을 세척함으로써 소량의 불순물을 제거한다. 이어, 컬럼을 중성 포스페이트 완충액으로 세척하고, EPO를 이온 강도가 높은 완충액으로 용출한다.
- <160> 컬럼을 DEAE 세파로스로 빠른 유동으로 채운다. EPO 적재를 3 내지 10 mg EPO/ml 겔의 범위로 확정하기 위해 컬럼 부피를 조절한다. 컬럼을 물 및 평형 완충액(인산나트륨/인산칼륨)으로 세척한다. 모아진 HPLC 용출액 분획을 적재하고 컬럼을 평형 완충액으로 세척한다. 이어, 컬럼을 세척용 완충액(아세트산나트륨 완충액)으로 세척한 후, 평형 완충액으로 세척한다. 이어, EPO를 용출 완충액(염화나트륨 및 인산나트륨/인산칼륨)으로 컬럼으로부터 용출하고 마스터 용출 프로필에 따라 단일 분획으로 수집한다.
- <161> DEAE 세파로스 컬럼의 용출액은 명시된 전도도로 조절한다. 얻어진 약물 물질을 테플론(Teflon) 병에서 멸균여과하여 -70 °C에 저장한다.
- <162> 실시예 2: mPEG-SBA에 의한 EPO의 폐길레이트화
- <163> 실시예 1의 무혈청 과정에 따라 정제된 EPO(EPOsf)는 분석 방법에 의해 측정된 바와 같이 균질하였고, 8개의 동형으로 이루어진 전형적인 동형 패턴을 나타냈다. 이는 정적혈구병 마우스 분석법에 의해 측정된 생물학적 비활성이 190,000 IU/mg이었다. 사용된 폐길레이트화 시약은 R이 메틸이고; x가 3이고; m이 650 내지 750(평균 약 680, 약 30 kDa의 평균 분자량에 상응함)인 화학식 II의 화합물인 메톡시-PEG-SBA이었다.
- <164> 폐길레이트화 시약
- <165> 100 mg의 EPOsf(9.71 ml의 10.3 mg/ml EPOsf 원액, 5.48 μmol)에 506 mg의 30 kDa 메톡시-PEG-SBA(16.5 μmol)(미국 알라바마주 소재의 쉬어워터 폴리머스 인코포레이티드로부터 구입)를 함유하는 10 ml의 0.1 M 인산칼



를 완충액(pH 7.5)을 가하고 실온(20 내지 23 ℃)에서 2시간 동안 혼합하였다. 단백질의 최종 농도는 5 mg/ml 이었고, 단백질:PEG 시약의 비는 1:3이었다. 2시간 후에, 빙초산으로 pH를 4.5로 조절함으로써 반응을 정지시키고, 정제할 준비가 될 때까지 -20 ℃에 저장하였다.

#### <166> 정제

1. 접합체 혼합물: 약 28 ml의 SP-SEPHAROSE FF(설폰-프로필 양이온 교환 수지)를 아미콘(AMICON) 유리 컬럼(2.2 x 7.5 cm)에 채우고 150 ml/시간의 유속으로 20 mM 아세테이트 완충액(pH 4.5)으로 평형화시켰다. 30 mg의 단백질을 함유하는 6 ml의 반응 혼합물을 평형 완충액으로 5배 희석하고 컬럼에 적용하였다. 흡착되지 않은 물질을 완충액으로 세척하여 제거하고, 흡착된 PEG 접합체 혼합물을 평형화 완충액 중의 0.175 M의 NaCl로 컬럼으로부터 용출하였다. 컬럼에 여전히 남아있는 변형되지 않은 EPOsf를 750 mM의 NaCl로 용출하였다. 컬럼을 출발 완충액에서 재 평형화시켰다. 시료를 SDS-PAGE에 의해 분석하고, 이들의 페길레이트화 정도를 측정하였다. 0.175 M의 NaCl 용출액은 모노-, 디- 및 소량의 트리-페길레이트화된 종을 함유하고 있는 반면, 750 mM의 NaCl 용출액은 변형되지 않은 EPOsf를 함유하였음이 밝혀졌다.

2. Di-PEG 및 모노-PEG-EPOsf: 이전 단계에서 컬럼으로부터 용출된 정제된 접합체 혼합물을 완충액으로 4배 희석하고, 컬럼에 다시 적용하고, 상기와 같이 세척하였다. 디-PEG-EPOsf 및 모노-PEG-EPOsf를 0.1 M의 NaCl 및 0.175 M의 NaCl로 컬럼으로부터 각각 용출하였다. 750 mM의 NaCl로 용출을 수행하여 변형되지 않은 임의의 잔류 EPOsf를 용출하였다.

대안으로, 반응 혼합물을 아세테이트 완충액으로 5배 희석하고 SP-세파로스 컬럼(약 0.5 mg 단백질/ml 겔)에 적용하였다. 컬럼을 세척하고 흡착된 모노-PEG-EPOsf, 디-PEG-EPOsf 및 변형되지 않은 EPOsf를 상기에서 기술된 바와 같이 용출하였다.

#### <170> 결과

30 kDa의 평균 분자량을 갖는 선형 PEG 분자를 화학적으로 접합시킴으로써 PEG-EPOsf를 합성하였다. PEG-EPOsf는 EPOsf의 일차 아미노기와 30 kDa PEG-부티르산의 숙신이미딜 에스테르 유도체 사이의 반응으로부터 유도되었는데, 그 결과로서 아미드 결합이 형성된다.

그 결과는 표 1에 요약되어 있다. 정제된 접합체 혼합물은 모노- 및 디-PEG-EPOsf로 이루어져 있고, SDS-PAGE 분석에 의해 측정된 바와 같이 변형되지 않은 EPOsf는 함유하지 않았다. 접합체 혼합물은 23.4 mg, 즉 출발물질의 78 %를 차지하였다. 모노- 및 디-PEG-EPOsf의 양이온 교환 크로마토그래피상의 분리는 접합체 혼합물 내의 모노-PEG 대 디-PEG이 비율이 거의 1:1이었다는 것을 나타냈다. 반응이 끝난 후에, 모노-PEG-EPOsf:디-PEG-EPOsf:변형되지 않은 EPOsf의 개개의 성분의 비율은 40:38:20(%)이었다. 전체 수율은 거의 정량적이었다.

### 【표 1】

EPOsf 페길레이트화 결과의 요약

시료	단백질(mg)	수율(%)
반응 혼합물	30	100
모노-	12.0	40
디-	11.4	38
변형되지 않은	6.0	20
접합체 혼합물	23.4	78

#### <174> 실시예 3: mPEG-SPA에 의한 EPO의 페길레이트화

실시예 2에서 사용된 EPOsf의 분취량을 달리하여 30 kDa 메톡시-PEG-SPA(미국 알라바마주 헨츠빌 소재의 쉬어워터 폴리머스 인코포레이티드)와 반응시켰다. 1:2의 단백질:시약의 비율로 반응을 수행하였고, 정제 기술은 실시예 2에 따라 수행되었다. 주로 모노-페길레이트화된 종이 생성되었다.

#### <176> 실시예 4: EPO에 대한 티올기의 공유결합

이 실시예는 EPO에 티올기를 공유결합시키기 위한 반응 조건의 결정 방법을 기술하고 있다. 조건을 결정하기 위해, 차단된 티올기를 함유하는 시약, 즉 SATA 또는 SATP(10 mg/ml로 DMSO에 용해됨)를 양을 달리하여 EPO 용액에, 즉 10 mM의 인산칼륨, 50 mM의 NaCl(pH 7.3) 중의 1 ml의 5 mg/ml EPO에 첨가하였다. 반응액을 25 ℃에

서 약 30분 동안 교반하고, 1 M의 리신 용액을 10 mM로 첨가하여 중지시켰다. 과량의 SATA 및 SATP를 10 mM의 인산칼륨, 50 mM의 NaCl, 2 mM의 EDTA(pH 6.2)에서 투석에 의해 제거하였다. 히드록실아민으로 보호 아세틸기를 제거한 후에, EPO에 공유결합된 티올기의 수를 문헌[Grasetti, D.R. and Murray, J.F., J. Appl. Biochem. Biotechnol. 119, 41-49(1967)]에 기술된 방법에 따라 디티오디피리딘을 사용한 광도 측정에 의해 측정하였다.

EPO 분자에 공유결합된 티올기의 수는 하기에 나타낸다.

EPO:SATA 또는 SATP의 몰비	티올기(몰)/EPO(몰)
EPO:SATA = 1:3	1.5
EPO:SATA = 1:5	2.4
EPO:SATA = 1:6	3.2
EPO:SATP = 1:3	1.3
EPO:SATP = 1:4	2.5
EPO:SATP = 1:6	3.7

실시예 5: 메톡시-PEG-말레이미드에 의한 활성화된 EPO의 변형

A) EPO의 활성화:

실시예 1에 따라 제조된 100 mg의 EPO(정적혈구형 마우스 분석법에 의해 측정된 190,000 IU/mg)를 실시예 2에 따라 SATA(몰비: EPO/SATA = 1/5)로 활성화시켰다. 공유결합되고 차단된 티올기를 갖는 얻어진 EPO("활성화된 EPO")를 실시예 1에서 기술된 투석에 의해 N-히드록시-숙신아미드 또는 미반응 SATA와 같은 부산물로부터 분리하였다. 10 mM의 인산칼륨, 50 mM의 NaCl, 2 mM의 EDTA(pH 6.2) 중의 4.5 mg/mL의 활성화된 EPO의 용액을 수득하였다

B) 활성화된 EPO의 페길레이트화:

상기에 예시된 "가장 바람직한" 구조를 갖는 380 mg의 메톡시-PEG-말레이미드(분자량: 30,000, 미국 알라바마주 헨즈빌 소재의 쉬어워터 폴리머스 인코포레이티드)를 95 mg의 활성화된 EPO(10 mM의 인산칼륨, 50 mM의 NaCl, 2 mM의 EDTA(pH 6.2) 중의 4.5 mg/mL)를 함유하는 상기 용액에 용해시켰다. 용액 중의 활성화된 EPO와 메톡시-PEG-말레이미드 사이의 얻어진 몰비는 1:4이었다. 1 M 히드록실아민 수용액(pH 6.2)을 30 mM로 상기 용액에 첨가함으로써 활성화된 EPO의 공유결합되고 차단된 티올기를 탈차단시켰다. 용액의 반응 혼합물 중의 얻어진 활성화된 EPO는 유리 티올(-SH)기를 함유하였다. 티올기의 탈차단 직후에 현재 유리 티올(-SH)기를 함유하는 활성화된 EPO와 메톡시-PEG-말레이미드 사이의 연결반응을 25 °C에서 90분 동안 교반하면서 수행하였다. 0.2 M 시스테인 수용액을 2 mM로 반응 혼합물에 첨가함으로써 연결반응을 중지시켰다. 30분 후에, 메톡시-PEG-말레이미드와 반응하지 않은 활성화된 EPO의 과량의 유리 티올기를 5 mM의 농도가 되도록 DMSO 중의 0.5 M의 N-메틸말레이미드 용액을 첨가함으로써 차단시켰다. 30분 후에, 현재 페길레이트화된 EPO 종을 함유하는 얻어진 반응 혼합물을 10 mM의 인산칼륨(pH 7.5)에서 15시간 이상 동안 투석하였다.

C) 페길레이트화된 EPO 종의 정제:

반응 혼합물로부터 페길레이트화된 EPO 종을 분리하기 위해, 하기 정제 방법을 수행하였다: 10 mM의 인산칼륨(pH 7.5)으로 50 mL의 Q-세파로스 ff 컬럼을 평형화시켰다. 단계 B에서 수득된 반응 혼합물을 컬럼(유속: 시간당 3 컬럼 부피(CV))에 적재하였다. 미반응 메톡시-PEG-말레이미드 시약을 분리하기 위해, 5 CV의 10 mM의 인산칼륨(pH 7.5)로 컬럼을 세척하였다. 시간당 3 CV의 유속으로 5 CV의 완충액 A(10 mM의 인산칼륨(pH 7.5)) 및 5 CV의 완충액 B(10 mM의 인산칼륨, 500 mM의 NaCl(pH 7.5))로 이루어진 염 구배를 증가시킴으로써 페길레이트화된 EPO 종을 용출에 의해 분리하였다. NaCl 구배를 기준으로 하여, 페길레이트화된 EPO 종(트리-, 디- 및 모노-페길레이트화된 EPO 종)이 먼저 용출되고, 이어, 페길레이트되지 않은 EPO 종이 용출되었다. 페길레이트화된 EPO 종(트리-, 디- 및 모노-페길레이트화된 EPO 종)을 함유하는 용출액의 분획을 모아서 여과(0.2 µm의 필터로 멸균여과)하였다.

트리-, 디- 및 모노-페길레이트화된 EPO 종의 함량 및 순도를 쿠마시-염색된 SDS-PAA 겔(문헌[Laemmli, Nature 227, 680-685, 1970]) 상에서 평가하는 반면, 단백질의 농도를 비어-람베르트 법(Beer-Lambert law)에 따라 280 nm에서 측정하였다. SDS-PAA 전기영동에 의해 측정된 EPO 종의 겔보기 분자량은 약 68 kDa(모노-페길레이

트화된 EPO 중), 약 98 kDa(디-페길레이트화된 EPO 중) 및 약 128 kDa(트리-페길레이트화된 EPO 중)이었다.

<188> 트리-, 디- 및 모노-페길레이트화된 EPO 중의 추가의 분리는 크로마토그래피, 즉 크기 배제 크로마토그래피(수퍼덱스(Superdex), pg 200; 파마시아)에 의해 달성될 수 있다. 트리-, 디- 및 모노-페길레이트화된 종을 함유하는 용출액의 생체내 생물학적 활성의 측정은 하기 방법에 의해 수행되었다.

<189> 실시예 6: 정적혈구병 마우스 분석법에 의해 측정된 페길레이트화된 EPO의 생체내 활성

<190> 정적혈구병 마우스 생체분석법은 선행 기술분야(문헌[Pharm. Europa. Spec. Issue Erythropoietin BRP Bio 1997(2)] 및 Ph. Eur. BRP.의 에리트로포이에틴의 모노그래피의 방법에 공지되어 있다. 시료를 BSA-PBS로 희석하였다. 7 내지 15주된 표준의 건강한 마우스에게 실시예 2 또는 3으로부터의 페길레이트화되지 않은 EPO 또는 트리-, 디- 또는 모노-페길레이트화된 EPO를 함유하는 EPO 분획 0.2 ml를 피하투여하였다. 6일 동안, 꼬리 정맥에 주사하여 혈액을 채취하고, 1  $\mu$ l의 혈액이 1 ml의 0.15  $\mu$ mol 아크리딘 오렌지 염색 용액에 존재하도록 희석하였다. 염색 시간은 3 내지 10분이었다. 망상적혈구 수의 측정은 적색 형광 히스토그램의 분석법에 의해 유동 세포분석기에서 미세형광분석에 의해 수행되었다. 망상적혈구 수의 측정은 절대값(분석된 30,000 혈구 세포당)으로 나타났다. 제시된 데이터에 있어서, 각각의 군은 1일당 5마리의 마우스로 이루어졌고, 마우스로부터 오직 1회의 혈액을 채취하였다.

<191> 개개의 실험에서, 변형되지 않은 EPO(25 ng의 EPO), 실시예 2로부터의 PEG(SBA)-EPO 혼합물(10 ng의 접합체), 실시예 2로부터의 모노- 및 디-페길레이트화된 EPO(10 ng의 접합체), 실시예 3으로부터의 PEG(SPA)-EPO(10 ng의 접합체) 및 완충액의 1회 투여량을 마우스에게 투여하였다. 그 결과는 표 2에 나타나 있다. 상기 결과는 변형되지 않은 EPO를 25 ng를 투여한 것에 비해, 마우스당 동일한 투여량(10 ng)을 사용함으로써 망상적혈구 수의 상당한 증가 및 망상적혈구 최고 측정값의 이동에 의해 나타난 페길레이트화된 EPO 중의 우수한 활성 및 반감기의 증가를 나타낸다.

**【표 2】**

	EPO(변형되지 않음)	30 kDa SPA PEG	모노 30K SBA	디 30K SBA	PEG-EPO SBA 접합 체 혼합물	대조군 완 충액
72시간	1000	1393	1411	994	1328	857
96시간	500	1406	1501	926	1338	697
120시간	약 200	1100	1182	791	944	701
144시간	약 0	535	607	665	660	708

<192> 삭제

<193> 실시예 7: 우세한 모노-PEG-EPO의 제조

<194> 페길레이트화 시약

<195> 실시예 1에 따라 제조된 100 mM의 인산칼륨 완충액(pH 7.5) 중의 100 mg(5.48  $\mu$ mol)의 EPOsf로 시작하여, 3 ml의 1 mM HCl에 용해된 329 mg(10.96  $\mu$ mol)의 30 kDa PEG-SBA 시약을 가하였다. 100 mM의 인산칼륨 완충액(pH 7.5)을 충분히 가하여 반응 혼합물 부피를 20 ml로 만들었다. 최종 단백질 농도는 5 mg/ml이고, 단백질:PEG 시약의 비율은 1:2이었다. 반응 혼합물을 주위 온도(20 내지 22  $^{\circ}$ C)에서 2시간 동안 혼합하였다. 2시간 후에, 빙초산으로 pH를 4.5로 조절함으로써 반응을 중지시키고, 정제할 준비가 될 때까지 -20  $^{\circ}$ C에서 저장하였다.

<196> 정제

<197> 전단계로부터의 반응 혼합물을 10 mM의 아세트산나트륨(pH 4.5)으로 1:5로 희석하고 4.2  $\times$  19 cm 컬럼에 채워진 300 ml의 SP-세파로스 FF(셀포프로필 양이온 교환 수지)에 적용하였다. 컬럼을 먼저 동일한 완충액으로 평형화시켰다. 컬럼 용출액을 길슨(Gilson) UV 모니터를 사용하여 280 nm에서 모니터하고, 키프 및 조넨(Kipp and Zonen) 기록기로 기록하였다. 컬럼을 300 ml 또는 1 층부피의 평형 완충액으로 세척하여 과량의 시약, 반응 부산물 및 올리고머성 PEG-EPO를 제거하였다. 다음으로, 2 층부피의 100 mM의 NaCl로 세척하여 디-PEG-EPO를 제거하였다. 이어, 모노-PEG-EPO를 200 mM의 NaCl로 용출하였다. 모노-PEG-EPO를 용출하는 동안, 첫 번째 50

mL의 단백질 피크를 버리고, 모노-PEG-EPO를 150 mL 분획으로서 수집하였다. 컬럼에 남아있는 변형되지 않은 EPOsf를 750 mM의 NaCl로 용출하였다. 모든 용출 완충액은 평형 완충액으로 만들어졌다. 모든 용출된 시료를 SDS-PAGE 및 고성능 크기 배제 크로마토그래피(SEC)에 의해 분석하였다. 이어, 변형되지 않은 EPOsf가 검출되지 않았던 150 mL 분획으로부터 얻은 모노-PEG-EPO 수집액(pool)을 약 4.5 내지 7.5 mg/mL로 농축하고, 저장 완충액(10 mM의 인산칼륨, 100 mM의 NaCl(pH 7.5))에 투석여과하였다. 50 kDa 차단 밀리포어 펠리콘 XL 바이오맥스 50(Millipore Pellicon XL Biomax 50) 막이 장착된 밀리포어 랩스케일™ TFF 시스템(Millipore LabScale™ TFF System)을 사용하여 주위 온도에서 농축/투석여과를 수행하였다. 농축된 모노-PEG-EPO를 멸균여과하고 -20 °C에서 동결저장하였다.

<198> 약 75 %의 EPOsf가 페길레이트화되었다. 정제 후에, 전체 수율은 변형되지 않은 EPOsf는 검출되지 않으면서 모노-PEG-EPO는 약 30 %이고 디-PEG-EPO는 약 25 %이었다. 올리고머성 및 페길레이트화되지 않은 EPOsf는 잔류 단백질을 나타냈다. 150 mL 분획으로부터 수득된 모노-PEG-EPO 수집액은 약 90 %의 모노-PEG-EPO 및 약 10 %의 디-PEG-EPO를 함유하였다.

<199> 실시예 8: 다양한 제제에서의 EPO 및 페길레이트화된 EPO의 열안정성: DCS(시차 주사 열량측정법)에 의한 분석

<200> 시차 주사 열량측정법에 의해 측정된 열변성의 전이 온도는 단백질의 열안정성에 대한 유효한 지표라는 것이 일반적으로 받아들여지고 있다. 약 0.6 내지 1.2 mg/mL의 농도를 갖는 에리트로포이에틴 용액 또는 페길레이트화된 에리트로포이에틴 용액을 2 K/분의 가열 속도로 나노-DSC(Nano-DSC, 미국 유타주의 칼로리메트릭 사이언스 코포레이션(Calorimetric Sciences Corporation))에 의해 안정제가 있거나 또는 안정제가 없는 다양한 완충액에서 분석하였다. 전이 온도가 증가한다는 것은 단백질의 열안정성이 증가한다는 것을 나타낸다. 측정된 온도 값은 절대값으로 이해되어서는 안되며, 오히려 개개의 제제의 상대적인 안정성의 차이를 나타낸다.

<201> 제제의 최적 pH를 정의하기 위해, pH 4 내지 9의 범위에서 페길레이트화된 에리트로포이에틴의 열변성의 pH-의존성을 조사하였다. 단백질 시료를 30 mM의 Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 30 mM의 구연산나트륨, 30 mM의 붕산염에서 분석하였다. 도 3은 약 pH 6 내지 약 pH 9에서 최고 전이온도의 평탄영역 및 pH 5.5 미만에서 급격한 감소를 나타낸다. 이것은 최고 열안정성에 대한 최적 pH가 pH 5.5를 초과한다는 것을 나타낸다(도 3).

<202> 이온 강도의 효과를 조사하기 위해, 열변성의 포스페이트 농도 의존성을 결정하였다. 도 4는 열안정성이 제제의 이온 강도의 증가에 따라 증가한다는 것을 보여준다.

<203> 완충액 물질의 영향 또한 DSC에 의해 조사하였다. 도 5로부터 높은 열안정성을 위한 가장 적합한 완충액 또는 첨가제가 설페이트, 구연산염 또는 포스페이트이라는 것을 알 수 있을 것이다. 현재 시판되는 제제(상기 참조)에서 완충액으로 사용되는 글리신은 그다지 적합하지 않다.

<204> 도 6은 설페이트가 또한 낮은 pH(예를 들어, pH 6.2)에서 적합한 완충액/첨가제인 반면, 포스페이트는 pH 7.5와 비교시 pH 6.2에서 덜 적합하다는 것을 보여준다. 이것은 설페이트가 낮은 pH에서도 높은 열안정성을 유지한다는 것을 보여준다. 이러한 발견은 에리트로포이에틴의 열안정성에 심각한 손실없이 pH 6.0 내지 6.5에서 제제를 가능하게 한다.

<205> 실시예 9: 열 스트레스하에서의 EPO 및 페그-EPO의 응집: SDS-PAGE(나트륨 도데실 설페이트 폴리아크릴아미드 겔 전기영동)에 의한 분석

<206> 에리트로포이에틴 단백질에 대한 열 스트레스의 효과를 조사하기 위해, 다양한 제제 중의 시료를 열 스트레스(80 °C에서 20 분)에 노출시켰고, 환원 조건(시료 완충액 중에 DTT가 존재함) 및 비환원 조건(시료 완충액 중에 DTT가 존재하지 않음)하에서 나트륨 도데실 설페이트 폴리아크릴아미드 겔 전기영동(SDS-PAGE)에 의해 분석하였다. 이 방법은 공유결합된 응집체의 형성의 검출을 가능하게 한다. 상기에서 약술된 바와 같이, 응집체 형성은 주요한 단백질 분해 경로 중 하나이고, 따라서 단백질의 약학적 제제에서는 방지되어야 한다. 환원제(예를 들어, DTT)의 존재하에서 검출할 수 있지만 환원제의 부재하에서는 검출할 수 없는 응집체는 열 스트레스하에서 산화 반응인 부정확한 이황 가교에 의해 형성될 가능성이 매우 높다. 도 5는 열 스트레스하에서의 응집의 pH 의존성을 보여준다. 이 실험은 응집체의 형성이 pH 6.5 미만에서 억제된다는 것을 명확히 보여준다. pH가 높을수록 응집량이 많다. 형성된 대부분의 응집체는 SDS-PAGE 동안 시료를 환원제로 처리하여 환원시킬 수 있는데, 이는 열 스트레스하에서 형성된 응집체의 대부분이 이황 결합 이합체, 올리고머 및 고차 응집체임을 암시한다. 종합해 보면, 이는 응집체의 형성을 제제의 pH를 6.5 또는 6.5 미만으로 유지함으로써 상당히 방지할 수 있다는 것을 나타낸다.

<207> 도 7은 pH 에 대한 페그-EPO 응집의 의존성을 나타낸다. 열 스트레스(상기에서 기술됨) 후의 페그-EPO 시료를 SDS-PAGE에 의해 분석하였다. 단백질을 은으로 염색하였다. 레인 1: 표준 분자량. 레인 2: pH 5. 레인 3: pH 5, 환원됨. 레인 4: pH 6. 레인 5: pH 6, 환원됨. 레인 6: pH 6.5. 레인 7: pH 6.5, 환원됨. 레인 8: pH 7. 레인 9: pH 7, 환원됨. 레인 10: 페그-EPO, 스트레스 없음.

<208> 응집체의 형성을 항산화제를 사용하여 방지할 수도 있다. 도 8은 항산화제로서 1 mg/ml의 아세틸시스테인을 사용하면 열 스트레스하에서 응집체의 형성을 방지할 수 있다는 것을 보여준다. 따라서, 열 스트레스하에서 응집체의 형성을 방지하기 위해 낮은 pH, 예를 들어 pH 6.2에서 예를 들어 아세틸시스테인과 같은 항산화제를 사용하는 것이 유용하다.

<209> 도 6은 pH 6.2 및/또는 아세틸시스테인에 의해 페그-EPO 응집을 방지할 수 있다는 것을 보여준다. 열 스트레스(상기에 기술됨) 후의 페그-EPO 시료를 SDS-PAGE에 의해 분석하였다. 단백질을 은으로 염색하였다. 레인 1: 페그-EPO, 스트레스 없음. 레인 2: pH 7.5, 스트레스. 레인 3: pH 6.2, 스트레스. 레인 4: pH 6.2, 스트레스, 환원됨. 레인 5: pH 7.5, 1 mg/ml의 아세틸시스테인, 스트레스. 레인 6: pH 7.5, 1 mg/ml의 아세틸시스테인, 스트레스, 환원됨.

<210> 실시예 10: 4, 25, 30 및 40 °C에서 다양한 제제 중의 페그-EPO의 안정성

<211> 다양한 제제 중의 페길레이트화된 EPO를 몇몇 온도에서 배양한다. 지시된 시점에 시료를 취하고 안정성을 역상 고성능 크로마토그래피(rpHPLC), 고성능 크기배제 크로마토그래피(SEC) 및 나트륨 도데실설페이트 폴리아크릴아미드 겔 전기영동(SDS-PAGE)에 의해 측정한다. 표 3에서 몇몇 온도에서 다양한 제제 중의 페그-EPO의 안정성을 비교한다. 이들 데이터는 단백질 회수 및 응집에 관한 본원에서 제조된 제제의 우수성을 명백히 보여준다.

### 【표 3】

<212> 몇몇 온도에서 다양한 제제 중의 페그-EPO의 안정성

제제 *	페그-EPO ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )	각 온도에서 6개월 후 회수율(%)				30 °C에서 검출가능한 응집 (+/-)
		4 °C	25 °C	30 °C	40 °C	
A	10	92	91	n.d.	39	n.d.
B	50	97	98	97	78	-
C	50	95	79	79	52	+
E	50	103	102	100	87	-
A	100	96	97	n.d.	50	n.d.
B	400	101	101	101	77	-
C	400	100	94	90	56	+
D	400	98	96	93	73	-
E	400	99	98	100	66	-
* 제제는 제제 A: 10 mM의 인산나트륨, 100 mM의 염화나트륨(pH 7.5) 제제 B: 10 mM의 인산나트륨, 40 mM의 황산나트륨, 3 %(중량/부피)의 만니톨(pH 6.2 ) 제제 C: 10 mM의 인산나트륨, 100 mM의 NaCl(pH 7.0) 제제 D: 10 mM의 인산나트륨, 120 mM의 황산나트륨(pH 6.2) 제제 E: 40 mM의 아르기닌, 30 mM의 황산나트륨, 3 %의 만니톨, 1 mM의 $\text{CaCl}_2$ (pH 6.2)						

<213> 실시예 11: 최적화된 제제에 의한 EPO 단백질 중의 메티오닌 54(항산화제로서의 메티오닌)의 산화 억제

<214> 다양한 제제 중의 페길레이트화된 EPO를 몇몇 온도에서 배양한다. 6개월 후에, 시료를 취하여 메티오닌 54 산



화의 정도를 하기와 같이 결정한다. 간단하게 설명하면, EPO 시료를 엔도프로테이나제 LysC로 처리한다. 얻어진 펩티드를 역상 크로마토그래피에 의해 분리한다. 산화된 펩티드 T8(산화된 메티오닌 54를 함유함) 대 펩티드 T8(산화되지 않은 메티오닌 54를 함유함)의 비율을 계산한다. 데이터는 표 4에 요약되어 있다.

**【표 4】**

지시된 온도에서 6개월 후 다양한 제제 중의 EPO 단백질의 메티오닌 54 산화도

제제 *	페그-EPO ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	산화된 메티오닌 54(%)			
		4 °C	25 °C	30 °C	40 °C
A	400	2.00	15.89	24.89	37.89
B	400	2.33	6.55	12.88	30.24
C	400	2.51	2.95	5.99	14.4
A	50	5.37	21.36	30.62	48.05
B	50	3.44	13.38	16.59	30.83
C	50	4.41	5.52	10.01	15.62

\* 제제는 하기와 같음.

제제 A: 10 mM의 인산나트륨, 100 mM의 염화나트륨(pH 7.0)

제제 B: 10 mM의 인산나트륨, 40 mM의 황산나트륨, 3 %(중량/부피)의 만니톨(pH 6.2)

제제 C: 10 mM의 인산나트륨, 40 mM의 황산나트륨, 3 %(중량/부피)의 만니톨, 1 mM의 메티오닌(pH 6.2)

이들 데이터는 본 발명의 바람직한 제제(10 mM의 인산나트륨, 40 mM의 황산나트륨, 3 %(중량/부피)의 만니톨(pH 6.2))는 메티오닌 54 산화도에 관해서 다른 제제(10 mM의 인산나트륨, 100 mM의 NaCl(pH 7.0))보다 우수하다는 것을 명백히 보여준다. 1 또는 10 mM의 메티오닌을 제제에 첨가하면 메티오닌 54의 산화를 명백히 억제한다. 따라서, 메티오닌은 항산화제로 작용하고 EPO를 안정화시킨다.

실시예 12: 다양한 제제 중의 페그-EPO 시료의 시알산 함량

페그-EPO 당단백질의 탄수화물 구조의 보전을 분석하기 위해, 다양한 온도에서 6개월 동안 저장한 후에 최적화된 제제 중의 페그-EPO 시료의 시알산 함량을 표준 기술에 의해 분석하였다. 이들 데이터는 탄수화물 구조의 보전이 본원에서 기술된 신규한 제제 중의 단백질 저장에 의해 부정적으로 영향을 받지 않는다는 것을 보여준다(도 9).

실시예 13: 장시간 동안 고온에서 저장한 후 페길레이트화된 EPO의 생물활성

10 mM의 인산나트륨, 40 mM의 황산나트륨 및 3 %(중량/부피)의 만니톨(pH 6.2) 중에 페그-EPO를 저장하여도 생체내 생물활성에 부정적으로 영향을 주지 않는다는 것을 증명하기 위해, 표준 마우스 EPO 분석법을 수행하였다(실시예 6 참조). 10 mM의 인산나트륨, 40 mM의 황산나트륨, 3 %(중량/부피)의 만니톨(pH 6.2) 중에서 지시된 온도에서 6개월 동안 저장된 페그-EPO 시료는 새로운 기준(도 10)과 비교시 4, 25 및 30 °C에서 저장한 이후에도 생체내 활성의 손실이 없었다.

실시예 14: 6개월 동안 고온에서 저장한 후 페길레이트화된 EPO의 응집체 함량

10 mM의 인산나트륨, 40 mM의 황산나트륨, 3 %(중량/부피)의 만니톨(pH 6.2) 중에서 고온에서 저장한 후에 페그-EPO 시료 중의 응집체 함량을 분석하기 위해, 6개월 후에 시료를 취하여 크기 배제 크로마토그래피에 의해 분석하였다.

4, 25 및 30 °C에서 어떠한 응집체도 검출되지 않았는데, 이는 상기 제제 중의 페길레이트화된 EPO의 안정성을 입증하는 것이다. 도 11은 크기 배제 크로마토그램의 개략도를 나타낸 것이다.

## 도면의 간단한 설명

- <25> 도 1은 인간 EPO의 일차구조(165 아미노산)(서열번호: 1)를 나타낸다.
- <26> 도 2는 인간 EPO의 일차구조(166 아미노산)(서열번호: 2)를 나타낸다.
- <27> 도 3은 열안정성에 대한 pH의 영향을 나타낸다. 전이 온도를 pH에 대해 플롯한 것이다.
- <28> 도 4는 열안정성에 대한 이온 강도의 영향을 나타낸다. 전이 온도를 포스페이트 농도에 대해 플롯한 것이다.
- <29> 도 5는 완충액 물질에 대한 열안정성의 의존성을 나타낸다.
- <30> 도 6은 설페이트가 낮은 pH(예를 들어, pH 6.2)에서 적합한 완충액/첨가제이고, 반면에 포스페이트가 pH 7.5에 비해 pH 6.2에서 덜 적합하다는 것을 보여준다. 이것은 설페이트가 낮은 pH에서도 열안정성을 높게 유지한다는 것을 보여준다.
- <31> 도 7은 pH에 대한 페그-EPO 응집의 의존성을 나타낸다. 열 스트레스 후의 상기 페그-EPO 시료를 SDS-PAGE로 분석하였다. 단백질은 은으로 염색하였다. 레인 1: 표준 분자량. 레인 2: pH 5. 레인 3: pH 5, 환원됨. 레인 4: pH 6. 레인 5: pH 6, 환원됨. 레인 6: pH 6.5. 레인 7: pH 6.5, 환원됨. 레인 8: pH 7. 레인 9: pH 7, 환원됨. 레인 10: 페그-EPO, 스트레스 없음.
- <32> 도 8은 1 mg/ml의 아세틸시스테인을 황산화제로 사용하면 열 스트레스 하에서 응집체의 형성을 방지하는 것을 보여준다. 열 스트레스(20분, 80 °C)하에서 페그-EPO의 응집: 레인 1: pH 7.5에서 페그-EPO, 스트레스 없음. 레인 2: pH 7.5에서 페그-EPO, 스트레스. 레인 3: pH 6.2에서 페그-EPO, 스트레스. 레인 4: pH 6.2에서 페그-EPO, 스트레스, 환원됨. 레인 5: pH 7.5에서 페그-EPO, +1 mg/ml N-아세틸시스테인, 스트레스. 레인 6: pH 7.5에서 페그-EPO, +1 mg/ml N-아세틸시스테인, 스트레스, 환원됨.
- <33> 도 9는 다양한 온도에서 6개월 동안 저장된 새로운 제제 중의 페그-EPO 시료의 시알산(NANA) 함량을 나타낸다.
- <34> 도 10은 몇몇 온도에서 10 mM의 인산나트륨, 40 mM의 황산나트륨, 3 %(중량/부피)의 만니톨(pH 6.2)에서 6개월 동안 저장한 후의 페그-EPO 시료의 마우스 생물활성 분석을 나타낸다.
- <35> 도 11은 10 mM의 인산나트륨, 40 mM의 황산나트륨, 3 %(중량/부피)의 만니톨(pH 6.2)에서 6개월 동안 저장된 페그-EPO 시료의 크기 배제 크로마토그램의 개략도이다(하단에서 상단으로: 완충액, 출발물질, 4°C, 25°C, 30°C 및 40°C).

## 도면

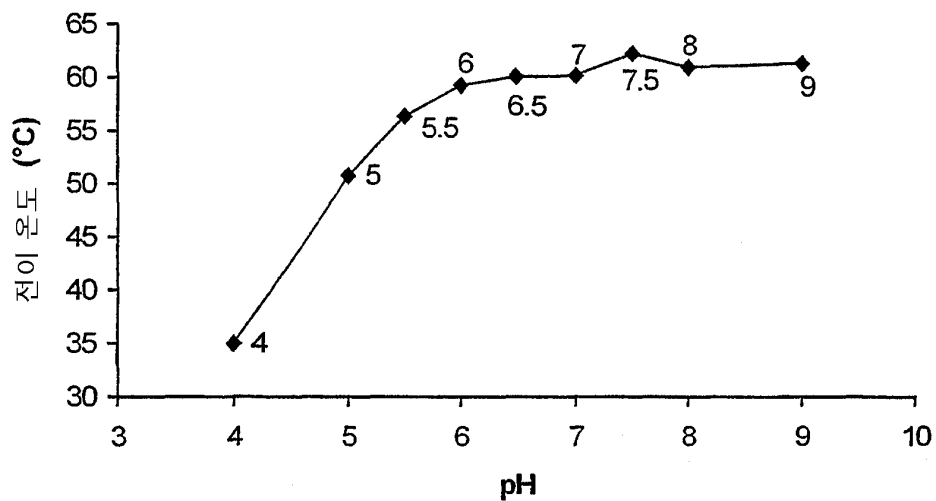
### 도면1

Ala Pro Pro Arg Leu Ile Cys Asp Ser Arg<sup>10</sup> Val Leu Glu Arg Tyr Leu Leu Glu Ala Lys<sup>20</sup>  
 Glu Ala Glu Asn Ile Thr Thr Gly Cys Ala<sup>30</sup> Glu His Cys Ser Leu Asn Glu Asn Ile Thr<sup>40</sup>  
 Val Pro Asp Thr Lys Val Asn Phe Tyr Ala<sup>50</sup> Trp Lys Arg Met Glu Val Gly Gln Gln Ala<sup>60</sup>  
 Val Glu Val Trp Gln Gly Leu Ala Leu Leu<sup>70</sup> Ser Glu Ala Val Leu Arg Gly Gln Ala Leu<sup>80</sup>  
 Leu Val Asn Ser Ser Gln Pro Trp Glu Pro<sup>90</sup> Leu Gln Leu His Val Asp Lys Ala Val Ser<sup>100</sup>  
 Gly Leu Arg Ser Leu Thr Thr Leu Leu Arg<sup>110</sup> Ala Leu Gly Ala Gln Lys Glu Ala Ile Ser<sup>120</sup>  
 Pro Pro Asp Ala Ala Ser Ala Ala Pro Leu<sup>130</sup> Arg Thr Ile Thr Ala Asp Thr Phe Arg Lys<sup>140</sup>  
 Leu Phe Arg Val Tyr Ser Asn Phe Leu Arg<sup>150</sup> Gly Lys Leu Lys Leu Tyr Thr Gly Glu Ala<sup>160</sup>  
 Cys Arg Thr Gly Asp<sup>165</sup>

도면2

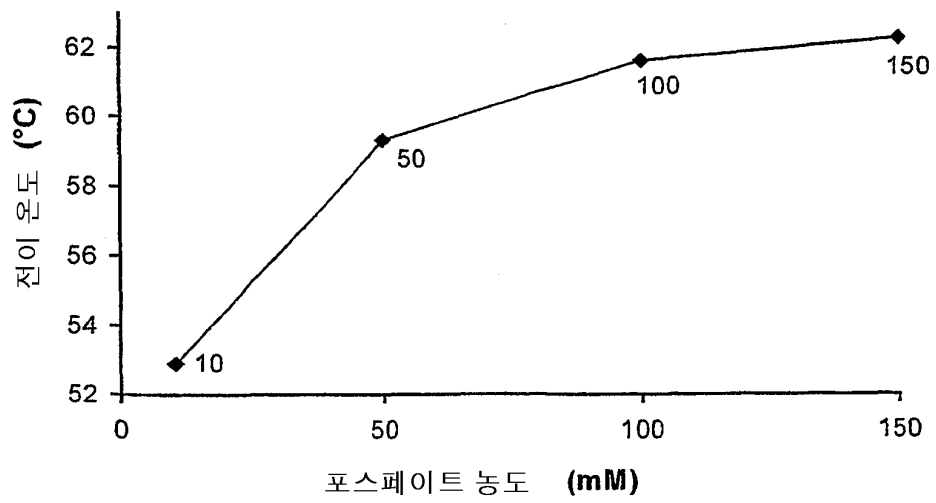
Ala Pro Pro Arg Leu Ile Cys Asp Ser Arg<sup>10</sup> Val Leu Glu Arg Tyr Leu Leu Glu Ala Lys<sup>20</sup>  
 Glu Ala Glu Asn Ile Thr Thr Gly Cys Ala<sup>30</sup> Glu His Cys Ser Leu Asn Glu Asn Ile Thr<sup>40</sup>  
 Val Pro Asp Thr Lys Val Asn Phe Tyr Ala<sup>50</sup> Trp Lys Arg Met Glu Val Gly Gln Gln Ala<sup>60</sup>  
 Val Glu Val Trp Gln Gly Leu Ala Leu Leu<sup>70</sup> Ser Glu Ala Val Leu Arg Gly Gln Ala Leu<sup>80</sup>  
 Leu Val Asn Ser Ser Gln Pro Trp Glu Pro<sup>90</sup> Leu Gln Leu His Val Asp Lys Ala Val Ser<sup>100</sup>  
 Gly Leu Arg Ser Leu Thr Thr Leu Leu Arg<sup>110</sup> Ala Leu Gly Ala Gln Lys Glu Ala Ile Ser<sup>120</sup>  
 Pro Pro Asp Ala Ala Ser Ala Ala Pro Leu<sup>130</sup> Arg Thr Ile Thr Ala Asp Thr Phe Arg Lys<sup>140</sup>  
 Leu Phe Arg Val Tyr Ser Asn Phe Leu Arg<sup>150</sup> Gly Lys Leu Lys Leu Tyr Thr Gly Glu Ala<sup>160</sup>  
 Cys Arg Thr Gly Asp Arg<sup>166</sup>

도면3

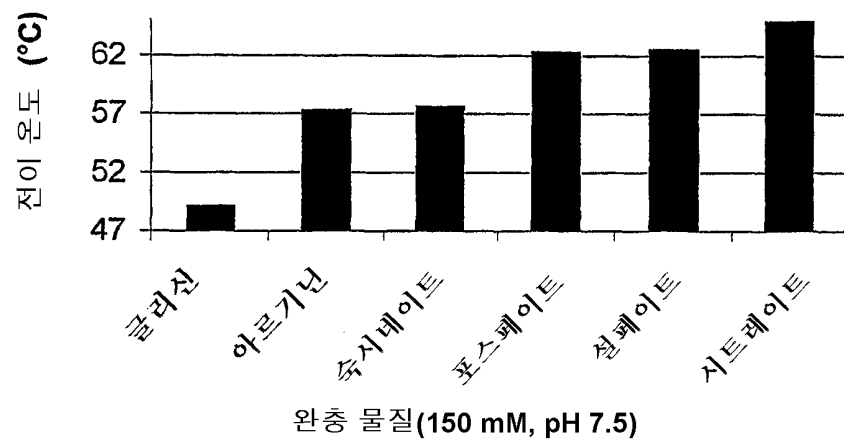




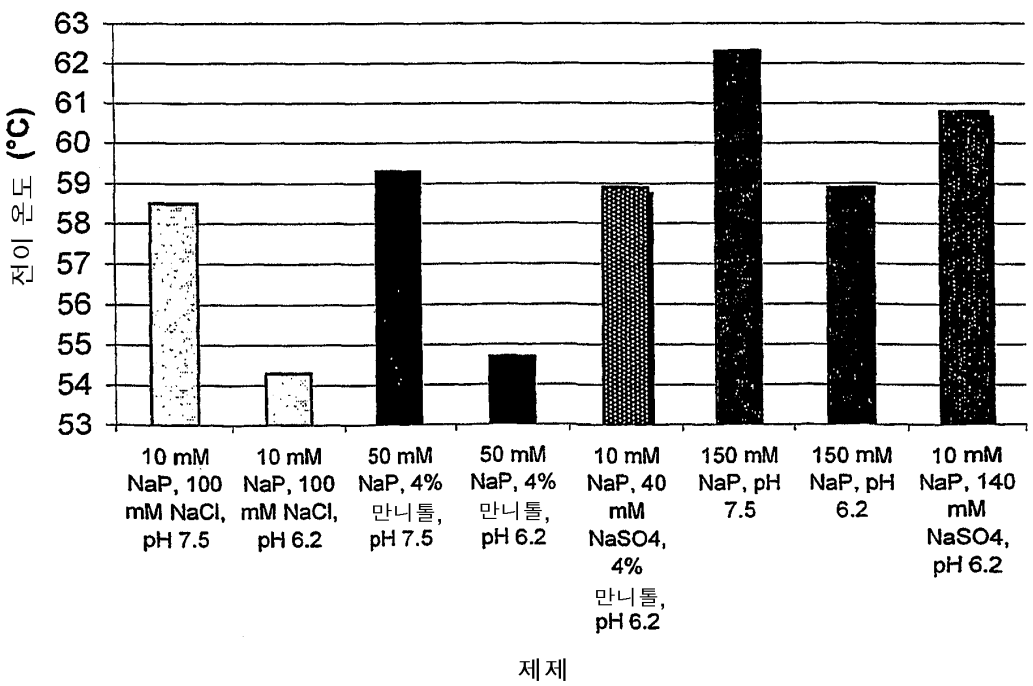
도면4



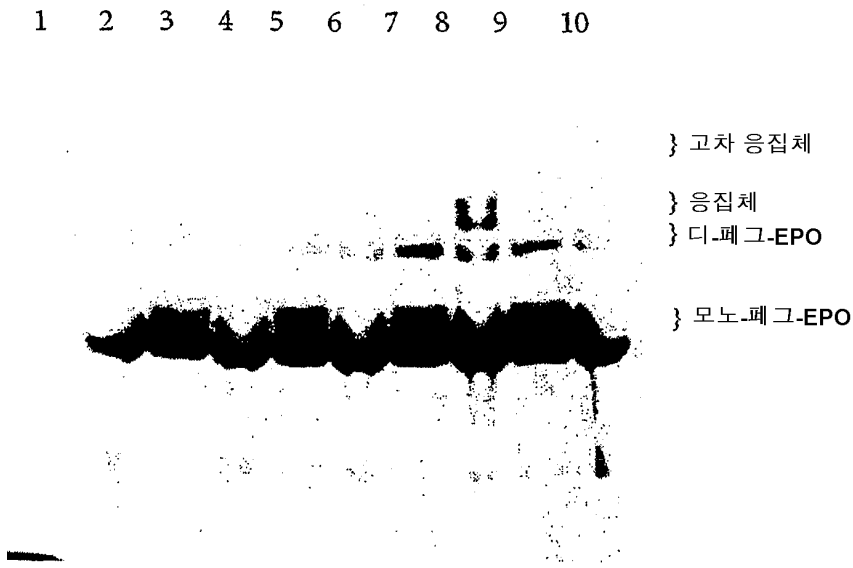
도면5



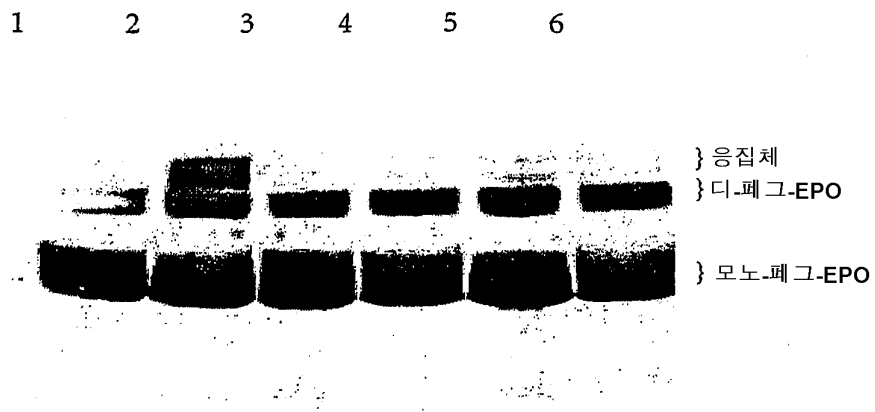
도면6



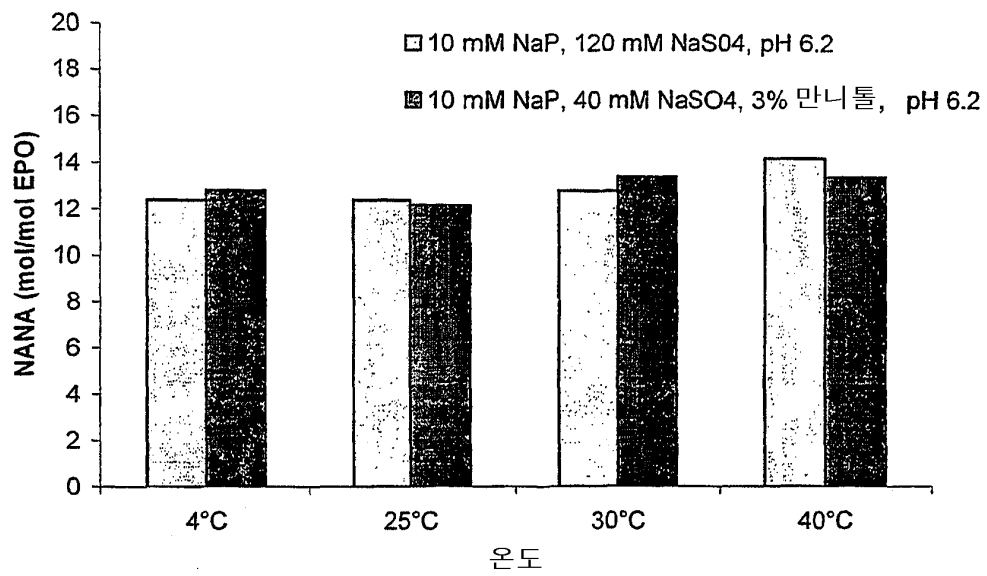
도면7



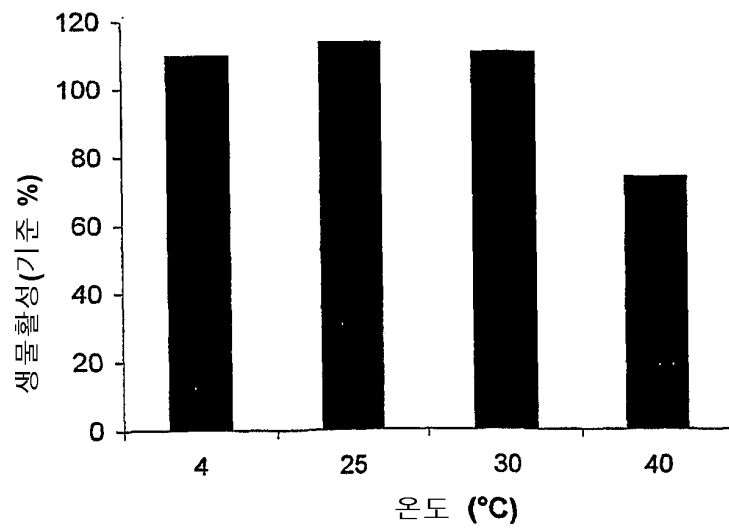
도면8



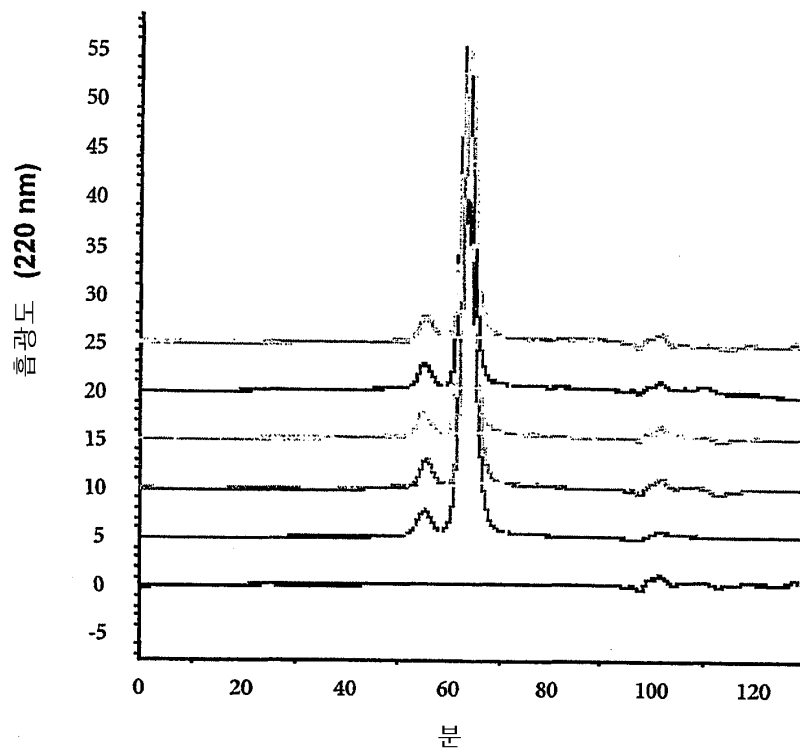
도면9



도면10



도면11



### 서열 목록

- <110> F. HOFFMANN-LA ROCHE AG
- <120> NEW PHARMACEUTICAL COMPOSITION
- <130> 14

<150> 00110355.5

<151> 2000-05-15

<160> 2

<170> Kopatent In 1.71

<210> 1

<211> 165

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Ala Pro Pro Arg Leu Ile Cys Asp Ser Arg Val Leu Glu Arg Tyr Leu  
1 5 10 15 Leu Glu Ala Lys Glu Ala Glu Asn Ile Thr  
Thr Gly Cys Ala Glu His  
20 25 30  
Cys Ser Leu Asn Glu Asn Ile Thr Val Pro Asp Thr Lys Val Asn Phe  
35 40 45  
Tyr Ala Trp Lys Arg Met Glu Val Gly Gln Gln Ala Val Glu Val Trp  
50 55 60  
Gln Gly Leu Ala Leu Leu Ser Glu Ala Val Leu Arg Gly Gln Ala Leu  
65 70 75 80  
Leu Val Asn Ser Ser Gln Pro Trp Glu Pro Leu Gln Leu His Val Asp  
85 90 95  
Lys Ala Val Ser Gly Leu Arg Ser Leu Thr Thr Leu Leu Arg Ala Leu  
100 105 110  
Gly Ala Gln Lys Glu Ala Ile Ser Pro Pro Asp Ala Ala Ser Ala Ala  
115 120 125  
Pro Leu Arg Thr Ile Thr Ala Asp Thr Phe Arg Lys Leu Phe Arg Val  
130 135 140  
Tyr Ser Asn Phe Leu Arg Gly Lys Leu Lys Leu Tyr Thr Gly Glu Ala  
145 150 155 160  
Cys Arg Thr Gly Asp  
165

<210> 2

<211> 166

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Ala Pro Pro Arg Leu Ile Cys Asp Ser Arg Val Leu Glu Arg Tyr Leu

1	5	10	15
Leu Glu Ala Lys Glu Ala Glu Asn Ile Thr Thr Gly Cys Ala Glu His	20	25	30
Cys Ser Leu Asn Glu Asn Ile Thr Val Pro Asp Thr Lys Val Asn Phe	35	40	45
Tyr Ala Trp Lys Arg Met Glu Val Gly Gln Gln Ala Val Glu Val Trp	50	55	60
Gln Gly Leu Ala Leu Leu Ser Glu Ala Val Leu Arg Gly Gln Ala Leu	65	70	75
Leu Val Asn Ser Ser Gln Pro Trp Glu Pro Leu Gln Leu His Val Asp	85	90	95
Lys Ala Val Ser Gly Leu Arg Ser Leu Thr Thr Leu Leu Arg Ala Leu	100	105	110
Gly Ala Gln Lys Glu Ala Ile Ser Pro Pro Asp Ala Ala Ser Ala Ala	115	120	125
Pro Leu Arg Thr Ile Thr Ala Asp Thr Phe Arg Lys Leu Phe Arg Val	130	135	140
Tyr Ser Asn Phe Leu Arg Gly Lys Leu Lys Leu Tyr Thr Gly Glu Ala	145	150	155
Cys Arg Thr Gly Asp Arg	165		