



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2015-0064246  
(43) 공개일자 2015년06월10일

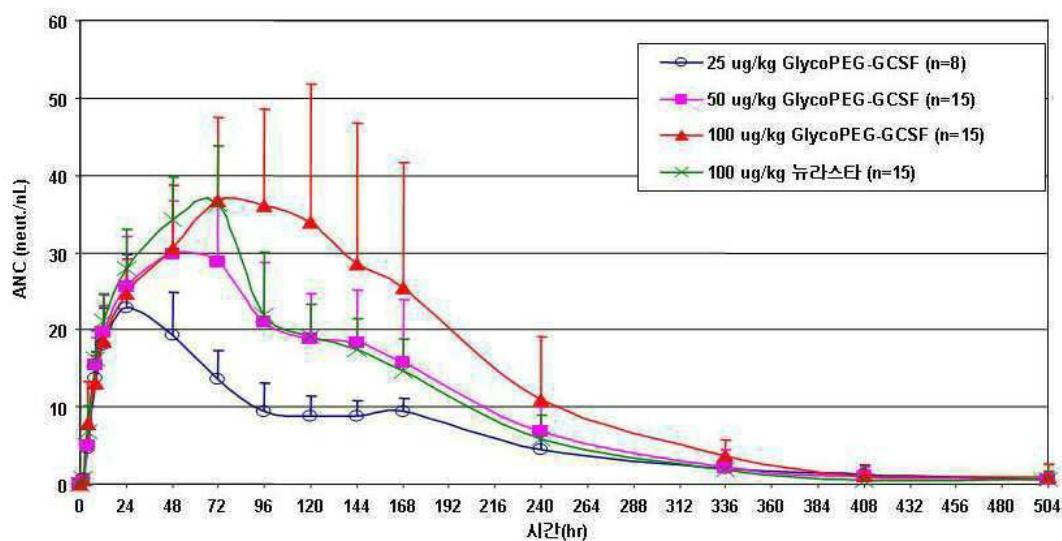
- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
*A61K 38/19* (2006.01) *A61K 47/48* (2006.01)  
*A61K 9/00* (2006.01)
- (52) CPC특허분류  
*A61K 38/193* (2013.01)  
*A61K 47/48215* (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2015-7013979(분할)
- (22) 출원일자(국제) 2008년04월01일  
심사청구일자 空
- (62) 원출원 특허 10-2009-7022943  
원출원일자(국제) 2008년04월01일  
심사청구일자 2013년03월29일
- (85) 번역문제출일자 2015년05월27일
- (86) 국제출원번호 PCT/US2008/059045
- (87) 국제공개번호 WO 2008/124406  
국제공개일자 2008년10월16일
- (30) 우선권주장  
60/909,917 2007년04월03일 미국(US)  
(뒷면에 계속)
- (71) 출원인  
바이오제너릭스 케엠베하  
독일 89079 울름 그라프-아르코-스트라쎄 3
- (72) 발명자  
조프 데이비드 에이  
미국 펜실베이니아 19807 웨인 웨스트 비츠트리  
레인 560  
루벤나우 하인즈  
독일 67435 노이슈타트 안 데어 에셀샤우트 12
- (74) 대리인  
특허법인신성

전체 청구항 수 : 총 43 항

## (54) 발명의 명칭 글리코페길화 G-CSF를 이용하는 치료 방법

**(57) 요약**

본 발명은 치료학적으로 활성이며, 글리코페길화되지 않은 동일한 또는 매우 유사한 G-CSF 웹티드에 비하여 향상된 약물동력학적 파라미터 및 특성을 갖는 글리코페길화 G-CSF를 제공한다. 또한, 본 발명은 대상, 특히 방사선 치료 또는 화학치료를 받았던, 또는 치료를 받을 것인 대상에서 조혈을 가동화하는 방법을 제공한다. 본 발명의 방법 및 조성물은 그러한 치료의 골수억제 효과를 예방, 완화 및 치료하는데 이용될 수 있다.

**대 표 도 - 도1**

(52) CPC특허분류  
**A61K 9/0056** (2013.01)

(30) 우선권주장  
60/911,788 2007년04월13일 미국(US)  
60/986,240 2007년11월07일 미국(US)

---

## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

G-CSF 웹티드와 폴리머 변형기(polymeric modifying group) 간의 공유 콘주게이트(covalent conjugate)인 웹티드의 상당한 양을 공여자에게 투여하는 것을 포함하며, 상기 폴리머 변형기는 글리코실 결합기를 통하여 상기 웹티드의 글리코실 또는 아미노산 잔기에서 상기 웹티드에 공유적으로 부착되는

공여자에서 줄기 세포 생산을 증가시키는 방법.

#### 청구항 2

제1항에 있어서,

상기 폴리머 변형기는 수용성 폴리머인

방법.

#### 청구항 3

제2항에 있어서,

상기 수용성 폴리머는 폴리(에틸렌글리콜)인

방법.

#### 청구항 4

제2항에 있어서,

상기 수용성 폴리머는 선형 수용성 폴리머 및 가지 달린 수용성 폴리머로부터 선택되는 일원인

방법.

#### 청구항 5

제1항에 있어서,

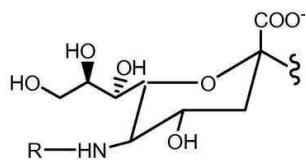
상기 폴리머 변형기 및 상기 글리코실 결합기는 링커를 통하여 공유적으로 부착되는

방법.

#### 청구항 6

제5항에 있어서,

상기 글리코실 결합기는 변형 시알산 잔기를 포함하며, 상기 변형 시알산 잔기는 하기 화학식:



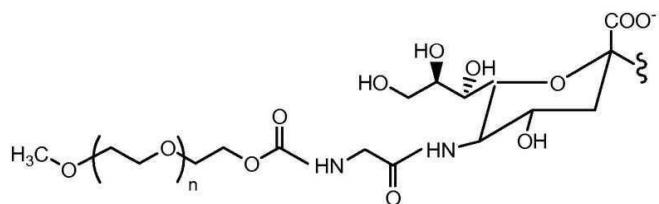
에 따른 구조를 가지며, 상기에서 R은 상기 폴리머 변형기이며, 상기 폴리머 변형기는 상기 링커를 통하여 상기 시알산 잔기에 부착되는

방법.

### 청구항 7

제6항에 있어서,

상기 변형 시알산 잔기는 하기 화학식:



에 따른 구조를 가지며, 상기에서 n은 1 내지 2000의 정수인

방법.

### 청구항 8

제1항에 있어서,

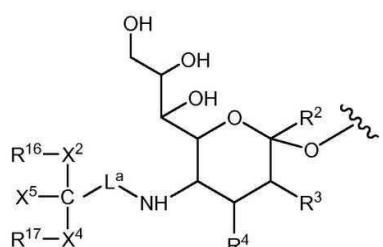
상기 폴리머 변형기는 본질적으로 균일분산(homodisperse)된 분자량 분포를 갖는

방법.

### 청구항 9

제1항에 있어서,

상기 글리코실 결합기는 하기 화학식:



을 갖는 변형 시알릴 잔기를 포함하며, 상기에서,

R<sup>7</sup>는 H, CH<sub>2</sub>OR<sup>7</sup>, COOR<sup>7</sup> 또는 OR<sup>7</sup>이며,

상기에서,

R<sup>7</sup>은 H, 치환 또는 비치환 알킬 또는 치환 또는 비치환 헤테로알킬을 나타내며;

R<sup>3</sup> 및 R<sup>4</sup>는 H, 치환 또는 비치환 알킬, OR<sup>8</sup>, NHC(O)R<sup>9</sup>로부터 독립적으로 선택되는 일원이며,

상기에서,

R<sup>8</sup> 및 R<sup>9</sup>는 H, 치환 또는 비치환 알킬, 치환 또는 비치환 헤�테로알킬 또는 시알산으로부터 독립적으로 선택되며;

L<sup>a</sup>는 결합(bond), 치환 또는 비치환 알킬 및 치환 또는 비치환 헤�테로알킬로부터 선택되는 링커이며,

R<sup>16</sup> 및 R<sup>17</sup>은 독립적으로 선택된 폴리머 팔(arms)이며,

X<sup>2</sup> 및 X<sup>4</sup>는 폴리머 부분(moieties) R<sup>16</sup> 및 R<sup>17</sup>을 C에 결합시키는 독립적으로 선택된 결합 단편(linkage fragments)이며, 및

X<sup>5</sup>은 비-반응성기인

방법.

## 청구항 10

제1항에 있어서,

상기 아미노산 잔기는 세린 또는 트레오닌으로부터 선택되는 일원인

방법.

## 청구항 11

제1항에 있어서,

상기 G-CSF 웹티드는 서열식별번호:1(SEQ. ID. NO:1)의 아미노산 서열을 갖는

방법.

## 청구항 12

제11항에 있어서,

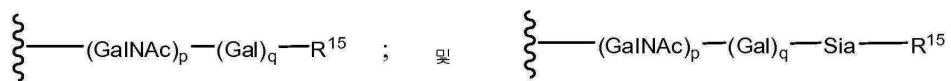
상기 아미노산 잔기는 서열식별번호:1의 134 위치에서 트레오닌인

방법.

## 청구항 13

제6항에 있어서,

상기 글리코실 결합기는 하기:



로부터 선택되는 구조를 포함하며, 상기에서

$R^{15}$  는 상기 변형 시알산 잔기이며; 및

p 및 q 는 0 또는 1로부터 독립적으로 선택된 정수인

방법.

#### 청구항 14

제13항에 있어서,

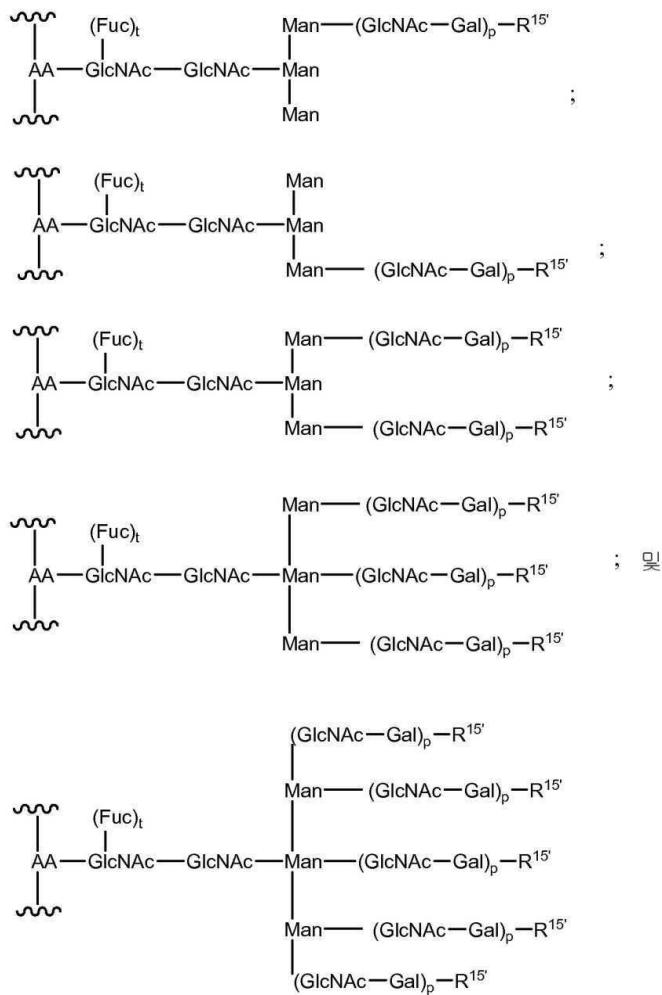
q는 0인

방법.

#### 청구항 15

제6항에 있어서,

상기 글리코실 결합기는 하기:



로부터 선택되는 화학식을 가지며, 상기에서,

AA는 상기 웨티드의 아미노산 잔기이며;

t 는 0 또는 1과 동일한 정수이며;

p 는 1 내지 10의 정수이며; 및

$R^{15'}$ 은 H, OH, 시알란, 상기 변형 시알릴 잔기 및  $Sia-Sia^p$ 로부터 선택되는 일원이며,

상기에서,

$Sia^p$ 는 상기 변형 시알릴 잔기이며,

적어도 하나의  $R^{15'}$ 는 상기 변형 시알릴 잔기 및  $Sia-Sia^p$ 로부터 선택되는

방법.

## 청구항 16

제15항에 있어서,

상기 아미노산 잔기는 아스파라긴 잔기인

방법.

### 청구항 17

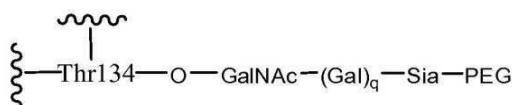
대상에서 과립구(granulocytes) 수를 증가시키는 방법으로서,

상기 대상은 골수 이식에 적격이며, 상기 방법은 G-CSF 웨티드와 폴리머 변형기 간의 공유 콘주게이트(covalent conjugate)인 웨티드의 상당한 양을 상기 대상에게 투여하는 것을 포함하며, 상기 G-CSF 웨티드는 서열식별번호:1의 아미노산 서열을 가지며, 상기 폴리머 변형기는 126 위치의 글리신으로부터 143 위치의 세린 까지 뻗은 상기 G-CSF 웨티드의 영역에서 상기 G-CSF 웨티드에 공유적으로 부착되는

방법.

### 청구항 18

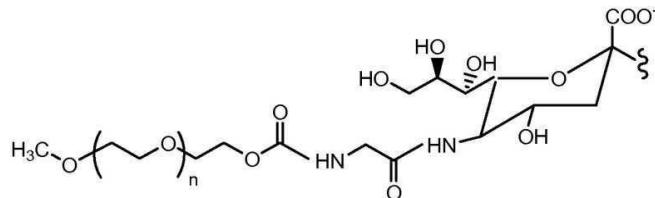
G-CSF 웨티드와 폴리머 변형기 간의 공유 콘주게이트(covalent conjugate)인 웨티드의 상당한 양을 대상에게 투여하는 것을 포함하며, 상기 G-CSF 웨티드는 하기 화학식:



에 따른 구조를 포함하며, 상기에서,

$q$ 는 0 또는 1이며; 및

Sia-PEG는 하기 화학식:



에 따른 구조를 가지며, 상기에서  $n$ 은 1 내지 2000의 정수인

대상에서 줄기 세포 생산을 증가시키는 방법.

### 청구항 19

제18항에 있어서,

$n$ 은 400 내지 500의 정수인

방법.

### 청구항 20

제18항에 있어서,

상기 G-CSF 웨티드는 서열식별번호:1의 아미노산 서열을 갖는

방법.

### 청구항 21

G-CSF 웨티드와 폴리머 변형기 간의 공유 콘주게이트(covalent conjugate)인 웨티드의 상당한 양을 암 치료의 수용자에게 투여하는 것을 포함하며, 상기 폴리머 변형기는 글리코실 결합기를 통하여 상기 웨티드의 글리코실 또는 아미노산 잔기에서 상기 웨티드에 공유적으로 부착되는

암 치료에 기인하는 골수 억제(myelosuppression)를 예방, 치료 및 완화시키는 방법.

### 청구항 22

제21항에 있어서,

상기 암 치료는 방사선 치료 및 화학치료로부터 선택된 일원을 포함하는

방법.

### 청구항 23

제21항에 있어서,

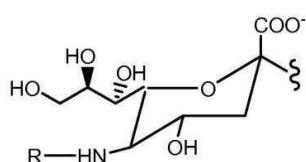
상기 폴리머 변형기 및 상기 글리코실 결합기는 링커를 통하여 공유적으로 부착되는

방법.

### 청구항 24

제23항에 있어서,

상기 글리코실 결합기는 변형 시알산 잔기를 포함하며, 상기 변형 시알산 잔기는 하기 화학식:



에 따른 구조를 가지며, 상기에서 R은 상기 폴리머 변형기이며, 상기 폴리머 변형기는 상기 링커를 통하여 상기 시알산 잔기에 부착되는

방법.

### 청구항 25

상태(condition)의 치료를 필요로 하는 대상에서 상태를 치료하는 방법으로서,

상기 상태는 상기 대상에서의 손상된 백혈구 생산에 의하여 특징지워지며, 상기 방법은 G-CSF 웨티드와 폴리머 변형기 간의 공유 콘주게이트(covalent conjugate)인 웨티드의 상당한 양을 상기 대상에게 투여하는 단계를 포함하며, 상기 폴리머 변형기는 글리코실 결합기를 통하여 상기 웨티드의 글리코실 또는 아미노산 잔기에서 상기 웨티드에 공유적으로 부착되며, 상기 양은 상기 대상에서 상기 상태를 개선하기 위하여 유효한 것인

방법.

### 청구항 26

제25항에 있어서,

상기 손상된 백혈구 생산은 화학치료, 방사선 치료, 또는 특발성 혈소판 감소증 자반병(idiopathic thrombocytopenia purpura)의 결과인

방법.

### 청구항 27

G-CSF 웨პ티드와 폴리머 변형기 간의 공유 콘주게이트(covalent conjugate)인 웨პ티드의 약학적 유효량을 투여하는 것을 포함하며, 상기 폴리머 변형기는 글리코실 결합기를 통하여 상기 웨პ티드의 글리코실 또는 아미노산 잔기에서 상기 웨პ티드에 공유적으로 부착되는

포유류에서 호중구 감소증(neutropenia)을 치료하는 방법.

### 청구항 28

G-CSF 웨პ티드와 폴리머 변형기 간의 공유 콘주게이트(covalent conjugate)인 웨პ티드의 약학적 유효량을 투여하는 것을 포함하며, 상기 폴리머 변형기는 글리코실 결합기를 통하여 상기 웨პ티드의 글리코실 또는 아미노산 잔기에서 상기 웨პ티드에 공유적으로 부착되는

포유류에서 혈소판 감소증(thrombocytopenia)을 치료하는 방법.

### 청구항 29

G-CSF 웨პ티드와 폴리머 변형기 간의 공유 콘주게이트(covalent conjugate)인 웨პ티드의 유효량을 줄기 세포에 투여하는 단계를 포함하며, 상기 폴리머 변형기는 글리코실 결합기를 통하여 상기 웨პ티드의 글리코실 또는 아미노산 잔기에서 상기 웨პ티드에 공유적으로 부착되는

배양물에서 조혈 줄기 세포(hematopoietic stem cell)를 확장하는 방법.

### 청구항 30

G-CSF 웨პ티드와 폴리머 변형기 간의 공유 콘주게이트(covalent conjugate)인 웨პ티드의 유효량을 대상에게 투여하는 단계를 포함하며, 상기 폴리머 변형기는 글리코실 결합기를 통하여 상기 웨პ티드의 글리코실 또는 아미노산 잔기에서 상기 웨პ티드에 공유적으로 부착되는

대상에서 조혈을 증가시키는 방법.

### 청구항 31

G-CSF 웨პ티드와 폴리머 변형기 간의 공유 콘주게이트(covalent conjugate)인 웨პ티드의 유효량을 대상에게 투여하는 것을 포함하며, 상기 폴리머 변형기는 글리코실 결합기를 통하여 상기 웨პ티드의 글리코실 또는 아미노산 잔기에서 상기 웨პ티드에 공유적으로 부착되는

대상에서 조혈 프로제니터 세포(hematopoietic progenitor cell)의 수를 증가시키는 방법.

### 청구항 32

제31항에 있어서,

상기 조혈 프로제니터 세포(hematopoietic progenitor cell)는 CD34+ 세포인  
방법.

### 청구항 33

G-CSF 웨პ티드와 폴리머 변형기 간의 공유 콘주게이트(covalent conjugate)인 웨პ티드의 유효량을 공여자에게 투여하는 단계를 포함하며, 상기 폴리머 변형기는 글리코실 결합기를 통하여 상기 웨პ티드의 글리코실 또는 아미노산 잔기에서 상기 웨პ티드에 공유적으로 부착되는

공여자에서 줄기 세포 생산을 증가시키는 방법.

### 청구항 34

(a) G-CSF 웨პ티드와 폴리머 변형기 간의 공유 콘주게이트(covalent conjugate)인 웨პ티드를 골수의 공여자에게 투여하는 단계, 여기에서 상기 폴리머 변형기는 글리코실 결합기를 통하여 상기 웨პ티드의 글리코실 또는 아미노산 잔기에서 상기 웨პ티드에 공유적으로 부착되며;

- (2) 상기 골수를 상기 공여자로부터 분리하는 단계; 및
  - (3) 상기 골수를 수용자에게 주입하는 단계를 포함하는
- 골수의 안정한 생착(engraftment)을 제공하는 방법.

### 청구항 35

제34항에 있어서,

상기 공여자는 상기 수용자와 동일한 개체인

방법.

### 청구항 36

제35항에 있어서,

상기 공여자는 상기 수용자와 상이한 개체인

방법.

### 청구항 37

(a) 화학식(1)  $1,1'-(1,4-\text{페닐렌}-\text{비스}-(\text{메틸렌})-\text{비스}-1,4,8,11-\text{테트라아자시클로테트라데칸}$  (AMD3100)의 화합물을 포함하는 제1 조성물; 및

(b) G-CSF 웨პ티드와 폴리머 변형기 간의 공유 콘주게이트(covalent conjugate)인 웨პ티드 - 여기에서 상기 폴리머 변형기는 글리코실 결합기를 통하여 상기 웨პ티드의 글리코실 또는 아미노산 잔기에서 상기 웨პ티드에 공유적으로 부착됨 - 을 포함하는 제2 조성물을 대상에게 투여하는 것을 포함하는

대상에서 조혈 프로제니터 세포(hematopoietic progenitor cell)의 수를 증가시키는 방법.

### 청구항 38

제37항에 있어서,  
상기 제1 조성물 및 제2 조성물은 순차적으로 및 임의의 순서로 투여되는  
방법.

### 청구항 39

제37항에 있어서,  
상기 제1 조성물 및 제2 조성물은 동시에 투여되는  
방법.

### 청구항 40

제37항에 있어서,  
상기 조혈 프로제니터 세포(hematopoietic progenitor cell)는 CD34+ 세포인  
방법.

### 청구항 41

하기 성분:

(a) G-CSF 웨პ티드와 폴리머 변형기 간의 공유 콘주게이트(covalent conjugate)인 웨პ티드, 여기에서 상기 폴리머  
변형기는 글리코실 결합기를 통하여 상기 웨პ티드의 글리코실 또는 아미노산 잔기에서 상기 웨პ티드에 공유적으로  
부착됨;

(b) 계면활성제;

(c) 지방산; 및

(d) 장용성 물질(enteric material)을 포함하며,

여기에서, 상기 성분 (a), (b) 및 (c)는 성분 (d)와의 혼합 전에 액상으로 혼합되고 동결건조되는  
경구 제형.

### 청구항 42

G-CSF 웨პ티드와 폴리머 변형기 간의 공유 콘주게이트(covalent conjugate)인 웨პ티드의 상당한 양을 공여자에게  
투여하는 것을 포함하며, 상기 폴리머 변형기는 글리코실 결합기를 통하여 상기 웨პ티드의 글리코실 또는 아미  
노산 잔기에서 상기 웨პ티드에 공유적으로 부착되며, 상기 양은 약 1mg 내지 약 20mg의 범위인  
공여자에서 줄기 세포 생산을 증가시키는 방법.

### 청구항 43

G-CSF 웨პ티드와 폴리머 변형기 간의 공유 콘주게이트(covalent conjugate)인 웨პ티드의 상당한 양을 공여자에게

투여하는 것을 포함하며, 상기 폴리머 변형기는 글리코실 결합기를 통하여 상기 웨티드의 글리코실 또는 아미노산 잔기에서 상기 웨티드에 공유적으로 부착되며, 상기 양은 25  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , 50  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , 100  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , 및 200  $\mu\text{g}/\text{kg}$ 로부터 선택된 단위 제형(unit dosage form)인

공여자에서 줄기 세포 생산을 증가시키는 방법.

### 발명의 설명

#### 기술 분야

[0001] 본 출원은 모든 목적을 위하여 전체적으로 본 명세서에 병합되는, 2007년 4월 3일 출원된 미국 출원 제 60/909,917호, 2007년 4월 13일 출원된 미국 출원 제60/911,788호, 및 2007년 11월 7일 출원된 미국 출원 제60/986,240호의 출원일의 이익을 주장한다.

#### 배경 기술

[0002] 과립구 콜로니 자극 인자(Granulocyte colony stimulating factor, G-CSF)는 호중성 과립구(neutrophil granulocyte) 프로제니터 세포 및 성숙 호중구(mature neutrophils)의 생존, 증식, 분화 및 기능을 자극하는 당단백질이다. 임상적 용도의 재조합 인간 G-CSF의 2가지 형태는 호중성 과립구 형성(neutrophil granulopoiesis)의 강력한 자극제이며, 일부 뉴트로페닉(neutropenic) 상태의 감염성 합병증 예방에 효능을 나타낸다. 이들은 골수 억제(myelosuppressive) 치료로부터의 호중구 회복을 촉진하는데 이용될 수 있다.

[0003] G-CSF는 발열성 호중구 감소증(neutropenia)의 발생을 감소시킴으로써 암 화학치료의 사망률을 저하시키고, 골수 이식에 의하여 뒷받침되는 고용량 화학치료의 사망률을 저하시키고, 또한 심각한 만성 호중구 감소증(neutropenia)을 앓는 환자의 감염 발생 및 지속을 저하시킨다. 또한, G-CSF는 심근 경색의 발병 후에 투여되는 경우 치료학적 효과를 갖는 것으로 나타났다.

[0004] 세포독성 화학치료의 결과로서 급성 골수 억제(myelosuppression)는 암 치료에서 용량-제한 인자(dose-limiting factor)로서 널리 알려져 있다. 다른 정상 조직은 불리한 영향을 받을 수 있으나, 골수는 화학치료 및 방사선 치료와 같은 증식-특이적 치료에 특히 민감하다. 일부 암 환자들에 대하여, 조혈 독성(hematotoxicity)은 화학치료 용량의 단계적 증가에 대한 기회를 빈번하게 제공한다. 화학치료의 반복 또는 고용량 사이클은 조혈 줄기 세포(hematopoietic stem cell) 및 그의 프로제니(progeny)의 줄기 세포 감소를 가져올 수 있다.

[0005] 화학치료 및 방사선 치료의 부작용의 예방 및 부작용으로부터의 보호는 암 환자들에게 큰 이점일 수 있다. G-CSF 및 다른 성장 인자들은 정상적인 중요 표적 세포(critical target cells), 특히 조혈 프로제니터 세포(hematopoietic progenitor cells)의 수를 증가시킴으로써 그와 같은 부작용을 완화시키는 것으로 나타났다.

[0006] G-CSF의 인간 형태는 1986년에 일본 및 미국으로부터의 그룹에 의하여 클론화되었다(예를 들어, Nagata et al. *Nature* 319: 415-418, 1986 참조). 천연의 인간 당단백질은 2가지 형태, 하나는 175개 아미노산, 다른 하나는 178개 아미노산의 것으로 존재한다. 좀더 풍부하고 좀더 활성인 175개 아미노산 형태는 재조합 DNA 기술에 의한 약학적 제품 개발에 이용되어왔다.

[0007] 대장균(*E. coli*) 발현 시스템(expression system)에서 합성된 재조합 인간 G-CSF는 필그라스팀(filgrastim)이라고 불린다. 필그라스팀(filgrastim)의 구조는 천연 당단백질과 약간 상이하다. 재조합 인간 G-CSF의 다른 형태는 레노그라스팀(lenograstim)이라고 불리며, 중국 햄스터 난소(Chinese hamster ovary, CHO) 세포에서 합성된다.

[0008] hG-CSF는 2개의 G-CSF 분자 및 2개의 수용체의 2:2 복합체(complex) 형성에 의하여 G-CSF 수용체를 다이머(dimer)화하는 모노머 단백질이다(Horan et al. *Biochemistry*, 35(15): 4886-96 (1996)). 하기 hG-CSF 잔기는 수용체 결합 인터페이스의 일부로서 X-선 크리스탈로그ラ피 연구(X-ray crystallographic studies)에 의하여 확 인되었다: G4, P5, A6, S7, S8, L9, P10, Q11, S12, L15, K16, E19, Q20, L108, D109, D112, T115, T116, Q119, E122, E123, 및 L124 (예를 들어, Aritomi et al., (1999) *Nature* 401: 713 참조).

[0009] rhG-CSF의 상업적으로 구입 가능한 형태는 단기간의 약리학적 효과를 가지며, 백혈구 감소증 상태의 지속기간 동안 하루에 한 번 이상 자주 투여되어야 한다. 더 긴 순환 반감기(circulation half-life)를 갖는 분자는 백혈

구 감소증을 완화하는데 필요한 투여 횟수를 감소시키고, 결과적인 감염을 예방할 것이다. 현재 이용가능한 rG-CSF 제품의 다른 문제점은 용량-의존성 뼈 통증을 발생시키는 것이다. 뼈 통증은 rG-CSF에 의한 치료의 심각한 부작용으로서 환자들에 의하여 경험되므로, 본래 이러한 효과를 갖지 않거나, 또는 뼈 통증을 야기하지 않는 충분히 적은 용량으로 효과적인 제품에 의하여 뼈 통증을 야기하지 않는 rG-CSF 제품을 제공하는 것이 바람직할 것이다. 따라서, 향상된 재조합 G-CSF 분자에 대한 요구가 명확하게 존재한다.

[0010] hG-CSF의 단백질-변형 변이체(protein-engineered variants)가 보고되었다(미국특허 제5,581,476호, 미국특허 제5,214,132호, 미국특허 제5,362,853호, 미국특허 제4,904,584호 및 Riedhaar-Olson et al. *Biochemistry* 35: 9034-9041, 1996). 본래 폴리펩티드에 비하여 적어도 하나의 추가적인 탄수화물 사슬을 도입시키도록 하는 hG-CSF 및 다른 폴리펩티드의 변형(modification)이 보고되었다(미국특허 제5,218,092호). 또한, PEG기의 부착을 포함하는, 본래 hG-CSF의 폴리머 변형이 보고되고 연구되었다(예를 들어, Satake-Ishikawa et al., (1992) *Cell Structure & Function* 17: 157; Bowen et al. (1999) *Experimental Hematology* 27: 425; 미국특허 제5,824,778호, 미국특허 제5,824,784호, 국제공개공보 WO 96/11953, 국제공개공보 WO 95/21629, 및 국제공개공보 WO 94/20069 참조).

[0011] 당단백질 치료제의 약동학적 특성을 향상시키기 위한 시도로, 웨პ티드 골격에 대한 합성 폴리머의 부착(attachment)이 알려져 있다. 웨პ티드에 콘주케이트된 폴리머의 예는 폴리(에틸렌글리콜)(PEG)이다. 웨პ티드 치료제의 유도체 합성에 PEG를 이용하는 것은 웨პ티드의 면역원성(immunogenicity)을 감소시키는 것으로 나타났다. 예를 들어, 미국특허 제4,179,337호(Davis et al.)는 폴리에틸렌글리콜(PEG) 또는 폴리프로필렌글리콜에 결합된 효소 및 웨პ티드 호르몬과 같은 비-면역성 폴리펩티드를 개시한다. 감소된 면역원성에 더하여, 당해 폴리펩티드의 PEG-콘주케이트(conjugate)의 증가된 크기에 기인하여, 순환에서의 제거 시간(clearance time)이 연장된다.

[0012] 웨პ티드에 대한 PEG(및 그의 유도체)의 부착의 하나의 형태는 웨პ티드 아미노산 잔기를 통한 비특이적 결합이다(예를 들어, 미국특허 제4,088,538호, 미국특허 제4,496,689호, 미국특허 제4,414,147호, 미국특허 제4,055,635호, 및 국제공개공보 WO 87/00056 참조). 웨პ티드에 대한 PEG의 부착의 다른 형태는 글리코웨პ티드 상의 글리코실 잔기의 비특이적 산화를 통해서이다(예를 들어, 국제공개공보 WO 94/05332호 참조).

[0013] 이러한 비특이적 방법에서, 폴리(에틸렌글리콜)은 무작위의, 비특이적 방식으로 웨პ티드 골격의 반응성 잔기에 부가된다. 물론, PEG 분자의 무작위 부가는 최종 생성물의 균질성(homogeneity) 결여를 포함하는 결점을 가지며, 웨პ티드의 생물학적 또는 효소적 활성 감소 가능성을 갖는다. 따라서, 치료학적 웨პ티드 제조를 위하여, 특이적으로 표지되고, 용이하게 특성화되며, 본질적으로 균질한 생성물의 형성에 이르는 유도체화 전략(derivatization strategy)이 우수하다. 그러한 방법이 개발되었다.

[0014] 특이적으로 표지된, 균질한 웨პ티드 치료제는 효소의 작용을 통하여 시험관 내에서(*in vitro*) 제조될 수 있다. 웨პ티드에 대하여 합성 폴리머 또는 다른 표지(label)를 부착하는 전형적인 비특이적 방법과 달리, 효소-기반의 합성은 위치 선택성(regioselectivity) 및 입체선택성(stereoselectivity)의 이점을 갖는다. 표지된 웨პ티드의 합성에 이용되는 효소의 두 가지 주요 분류는 글리코실트랜스페라제(glycosyltransferase)(예, 시알릴트랜스페라제(sialyltransferase), 올리고사카릴트랜스페라제(oligosaccharyltransferase), N-아세틸글루코사미닐트랜스페라제(N-acetylglucosaminyltransferase)), 및 글리코시다제(glycosidases)이다. 이러한 효소는 치료 부분(therapeutic moiety)을 포함하기 위하여 후속적으로 변형될 수 있는 당(sugars)의 특이적 부착에 이용될 수 있다. 또는, 글리코실트랜스페라제 및 변형 글리코시다제(modified glycosidases)는 변형 당을 웨პ티드 골격에 직접적으로 전달하는데 이용될 수 있다(예를 들어, 참조로서 본 명세서에 병합되는 미국특허 제6,399,336호, 및 국제출원공개공보 제2003/0040037호, 제2004/0132640호, 제2004/0137557호, 제2004/0126838호, 및 제2004/0142856호 참조). 화학적 및 효소적 합성 성분의 결합 방법은 알려져 있다(예를 들어, 참조로 본 명세서에 병합되는 Yamamoto et al. *Carbohydr. Res.* 305: 415-422 (1998) 및 미국출원공개공보 제2004/0137557호 참조).

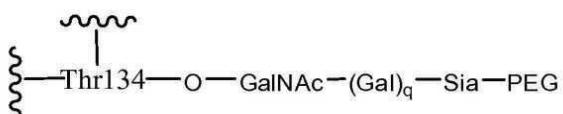
[0015] 향상된 치료적 G-CSF에 대한 요구에 대하여, 본 발명은 치료학적으로 활성이며, 글리코페길화되지 않은, 동일한 또는 매우 유사한 G-CSF에 비하여 향상된 약동학 파라미터 및 특성을 갖는 글리코페길화(glycopegylated) G-CSF를 제공한다. 또한, 본 발명은 대상, 특히 방사선 또는 화학치료를 받았거나, 또는 받을 것인 대상의 조혈(hematopoiesis)을 증가시키는 방법을 제공한다.

## 발명의 내용

[0016] 따라서, 일 측면에서, 본 발명은 골수 이식 수용자(recipient)의 줄기 세포 생산을 가동화(mobilizing)하는 방법 및 조성물을 제공한다. 이러한 방법 및 조성물은 골수 이식 수용자에게, G-CSF 웨티드와 폴리머 변형기(polymeric modifying group) 간의 공유 콘주게이트(covalent conjugate)인 웨티드의 상당한 양을(an amount of) 투여하는 것을 포함한다. 일 측면에서, 폴리머 변형기는 무손상 글리코실 결합기(intact glycosyl linking group)를 통하여 웨티드의 글리코실 또는 아미노산 잔기에서 웨티드에 공유 부착(covalently attached)된다.

[0017] 다른 측면에서, 본 발명은 대상의 과립구(granulocytes) 수를 증가시키는 방법 및 조성물을 제공한다. 본 방법은 대상에게, G-CSF 웨티드와 폴리머 변형기(polymeric modifying group) 간의 공유 콘주게이트(covalent conjugate)인 웨티드의 상당한 양을 투여하는 단계를 포함한다. 일 측면에서, G-CSF 웨티드는 서열식별번호:1(SEQ ID NO: 1)의 아미노산 서열을 가지며, 폴리머 변형기는 126 위치의 글리신으로부터 143위치의 세린까지의 아미노산 서열의 영역에서 G-CSF 웨티드에 공유 부착된다.

[0018] 또 다른 측면에서, 본 발명은 대상의 줄기 세포 생산을 증가시키는 방법 및 조성물을 제공한다. 본 방법은 G-CSF 웨티드와 폴리머 변형기(polymeric modifying group) 간의 공유 콘주게이트(covalent conjugate)인 웨티드의 상당한 양을 투여하는 단계를 포함한다. 다른 측면에서, G-CSF 웨티드는 하기 식에 따른 구조를 포함한다:

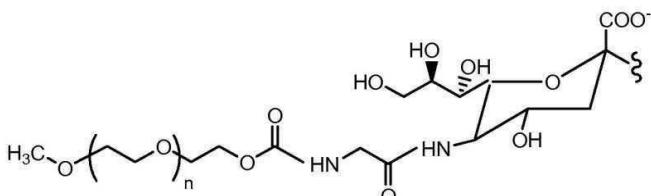


[0019]

[0020] 상기에서,

[0021] q는 0 또는 1; 및

[0022] Sia-PEG는 하기 식에 따른 구조를 가지며:



[0023]

[0024] 여기에서, n은 정수 1 내지 2000의 정수이다.

[0025] 일 측면에서, 본 발명은 골수 억제(myelosuppression), 특히 암 치료(cancer therapy)로부터 기인하는 골수 억제를 예방, 치료 또는 완화하는 방법을 제공한다. 일 측면에서, 본 방법은 수용자에게, G-CSF 웨티드와 폴리머 변형기(polymeric modifying group) 간의 공유 콘주게이트(covalent conjugate)인 웨티드의 상당한 양을 투여하는 것을 포함한다. 공유 콘주게이트(covalent conjugate)의 폴리머 변형기는 무손상 글리코실 결합기(intact glycosyl linking group)를 통하여 G-CSF 웨티드의 글리코실 또는 아미노산 잔기에서 G-CSF 웨티드에 공유 부착(covalently attached)될 수 있다.

[0026] 다른 측면에서, 본 발명은 대상의 상태(condition)를 치료하는 방법을 제공하며, 여기에서 상태는 대상에서의 손상된 백혈구 생산을 특징으로 한다. 일 측면에서, 상태를 치료하는 방법은 대상에게, G-CSF 웨티드와 폴리머 변형기(polymeric modifying group) 간의 공유 콘주게이트(covalent conjugate)인 웨티드의 상당한 양을 투여하는 단계를 포함한다. 공유 콘주게이트(covalent conjugate)의 폴리머 변형기는 무손상 글리코실 결합기(intact glycosyl linking group)를 통하여 G-CSF 웨티드의 글리코실 또는 아미노산 잔기에서 G-CSF 웨티드에 공유 부착(covalently attached)될 수 있다. 대상에게 투여되는 웨티드의 양은 대상의 상태를 개선하는데 유효한 것이다.

[0027] 또 다른 측면에서, 본 발명은 포유류의 호중구 감소증(neutropenia)을 치료하는 방법을 제공한다. 이러한 방법은 G-CSF 웨티드와 폴리머 변형기(polymeric modifying group) 간의 공유 콘주게이트(covalent conjugate)인 웨티드의 약학적 유효량을 투여하는 단계를 포함한다. 공유 콘주게이트(covalent conjugate)의 폴리머 변형기

는 무손상 글리코실 결합기(intact glycosyl linking group)를 통하여 G-CSF 웨티드의 글리코실 또는 아미노산 잔기에서 G-CSF 웨티드에 공유 부착(covalently attached)될 수 있다.

[0028] 또 다른 측면에서, 본 발명은 포유류의 혈소판 감소증(thrombocytopenia)을 치료하는 방법을 제공한다. 이러한 방법은 G-CSF 웨티드와 폴리머 변형기(polymeric modifying group) 간의 공유 콘주게이트(covalent conjugate)인 웨티드의 약학적 유효량을 투여하는 단계를 포함한다. 공유 콘주게이트(covalent conjugate)의 폴리머 변형기는 무손상 글리코실 결합기(intact glycosyl linking group)를 통하여 G-CSF 웨티드의 글리코실 또는 아미노산 잔기에서 G-CSF 웨티드에 공유 부착(covalently attached)될 수 있다.

[0029] 일 측면에서, 본 발명은 배양물(culture)에서 조혈 줄기 세포(hematopoietic stem cell)를 확장(expanding)하는 방법을 제공한다. 이러한 방법은 줄기 세포에, G-CSF 웨티드와 폴리머 변형기(polymeric modifying group) 간의 공유 콘주게이트(covalent conjugate)인 웨티드의 유효량을 투여하는 단계를 포함한다. 공유 콘주게이트(covalent conjugate)의 폴리머 변형기는 무손상 글리코실 결합기(intact glycosyl linking group)를 통하여 G-CSF 웨티드의 글리코실 또는 아미노산 잔기에서 G-CSF 웨티드에 공유 부착(covalently attached)될 수 있다.

[0030] 다른 측면에서, 본 발명은 대상의 조혈(hematopoiesis)을 자극하는 방법을 제공한다. 이러한 방법은 대상에게, G-CSF 웨티드와 폴리머 변형기(polymeric modifying group) 간의 공유 콘주게이트(covalent conjugate)인 웨티드의 유효량을 투여하는 단계를 포함한다. 공유 콘주게이트(covalent conjugate)의 폴리머 변형기는 무손상 글리코실 결합기(intact glycosyl linking group)를 통하여 G-CSF 웨티드의 글리코실 또는 아미노산 잔기에서 G-CSF 웨티드에 공유 부착(covalently attached)될 수 있다.

[0031] 또 다른 측면에서, 본 발명은 대상의 조혈 프로제니터 세포(hematopoietic progenitor cell)의 수를 증가시키는 방법을 제공한다. 이러한 방법은 대상에게, G-CSF 웨티드와 폴리머 변형기(polymeric modifying group) 간의 공유 콘주게이트(covalent conjugate)인 웨티드의 유효량을 투여하는 단계를 포함한다. 공유 콘주게이트(covalent conjugate)의 폴리머 변형기는 무손상 글리코실 결합기(intact glycosyl linking group)를 통하여 G-CSF 웨티드의 글리코실 또는 아미노산 잔기에서 G-CSF 웨티드에 공유 부착(covalently attached)될 수 있다.

[0032] 일 측면에서, 본 발명은 공여자(donor)의 줄기 세포 생산을 가동화(mobilizing)하는 방법을 제공한다. 이러한 방법은 공여자에게, G-CSF 웨티드와 폴리머 변형기(polymeric modifying group) 간의 공유 콘주게이트(covalent conjugate)인 웨티드의 유효량을 투여하는 단계를 포함한다. 공유 콘주게이트(covalent conjugate)의 폴리머 변형기는 무손상 글리코실 결합기(intact glycosyl linking group)를 통하여 G-CSF 웨티드의 글리코실 또는 아미노산 잔기에서 G-CSF 웨티드에 공유 부착(covalently attached)될 수 있다.

[0033] 다른 측면에서, 본 발명은 수용자에게 제공된 골수의 장기간 생착(engraftment)을 강화시키는 방법을 제공한다. 이러한 방법은 골수 수용자에게, G-CSF 웨티드와 폴리머 변형기(polymeric modifying group) 간의 공유 콘주게이트(covalent conjugate)인 웨티드를 투여하는 단계를 포함한다. 공유 콘주게이트(covalent conjugate)의 폴리머 변형기는 무손상 글리코실 결합기(intact glycosyl linking group)를 통하여 G-CSF 웨티드의 글리코실 또는 아미노산 잔기에서 G-CSF 웨티드에 공유 부착(covalently attached)될 수 있다.

[0034] 또 다른 측면에서, 본 발명은 대상의 조혈 프로제니터 세포(hematopoietic progenitor cell)를 가동화(mobilizing)하는 방법을 제공한다. 이러한 방법은 대상에게, 화학식 1,1'-[1,4-페닐렌-비스-(메틸렌)-비스-1,4,8,11-테트라아자시클로테트라데칸(1,1'-[1,4-phenylene-bis-(methylene)-bis-1,4,8,11-tetraazacyclotetradecane)(AMD3100)의 화합물을 포함하는 제1 조성물 및 G-CSF 웨티드와 폴리머 변형기(polymeric modifying group) 간의 공유 콘주게이트(covalent conjugate)인 웨티드를 포함하는 제2 조성물을 투여하는 단계를 포함한다. 폴리머 변형기는 무손상 글리코실 결합기(intact glycosyl linking group)를 통하여 G-CSF 웨티드의 글리코실 또는 아미노산 잔기에서 G-CSF 웨티드에 공유 부착(covalently attached)될 수 있다. 제1 및 제2 조성물은 대상에게, 임의의 순서로 순차적으로 또는 동시에 투여될 수 있다.

[0035] 일 측면에서, 본 발명은 경구 제형을 제공한다. 이 경구 제형은 하기 성분: (a) G-CSF 웨티드와 폴리머 변형기(polymeric modifying group) 간의 공유 콘주게이트(covalent conjugate)인 웨티드, 폴리머 변형기는 무손상 글리코실 결합기(intact glycosyl linking group)를 통하여 G-CSF 웨티드의 글리코실 또는 아미노산 잔기에서 G-CSF 웨티드에 공유 부착(covalently attached)될 수 있음; (b) 계면활성제; (c) 지방산; 및 (d) 장용성 물질(enteric material)을 포함할 수 있다. 일 측면에서, 성분 (d)의 결합 이전에, 성분 (a), (b) 및 (c)는 액상(liquid phase)으로 혼합되고, 동결건조된다.

[0036] 다른 측면에서, 본 발명은 공여자의 줄기 세포 생산을 증가시키는 방법을 제공하며, 여기에서, 상기 방법은 공

여자에게, G-CSF 웨티드와 폴리머 변형기(polymeric modifying group) 간의 공유 콘주게이트(covalent conjugate)인 웨티드의 상당한 양을 투여하는 단계를 포함한다. 다른 측면에서, 폴리머 변형기는 글리코실 결합기를 통하여 웨티드의 글리코실 또는 아미노산 잔기에서 웨티드에 공유 부착(covalently attached)된다. 또 다른 측면에서, 공여자에게 투여되는 웨티드의 양은 약 1mg 내지 약 20mg의 범위이다..

[0037] 또 다른 측면에서, 본 발명은 공여자의 줄기 세포 생산을 증가시키는 방법을 제공하며, 여기에서, 상기 방법은 공여자에게, G-CSF 웨티드와 폴리머 변형기(polymeric modifying group) 간의 공유 콘주게이트(covalent conjugate)인 웨티드의 상당한 양을 투여하는 단계를 포함한다. 다른 측면에서, 폴리머 변형기는 글리코실 결합기를 통하여 웨티드의 글리코실 또는 아미노산 잔기에서 웨티드에 공유 부착(covalently attached)된다. 또 다른 측면에서, 공여자에게 투여되는 웨티드의 양은 단위 투약량 제형(unit dosage form) 내에 있다. 일 측면에서, 단위 투약량(unit dosage)은 하기: 25 $\mu$ g/kg, 50 $\mu$ g/kg, 100 $\mu$ g/kg, 및 200 $\mu$ g/kg로부터 선택된다.

### 도면의 간단한 설명

[0038] 도 1은 XM22(25  $\mu$ g/kg; 50  $\mu$ g/kg; 100  $\mu$ g/kg) 및 뉴라스타(Neulasta)(100 $\mu$ g/kg)에 반응하는 절대 호중구 수치 (absolute neutrophil count (ANC))에 관련된 데이터를 도시한다.

도 2는 XM22 (25  $\mu$ g/kg; 50  $\mu$ g/kg; 100  $\mu$ g/kg) 및 뉴라스타(Neulasta)(100 $\mu$ g/kg)에 반응하는 CD34+ 세포 수치 (cell count)에 관련된 데이터를 도시한다.

도 3은 4개의 상이한 시험군에 있어서 약물동력학 파라미터에 관련된 데이터의 표이다.

도 4는 XM22(6 mg) 및 뉴라스타(Neulasta)(6 mg)에 반응하는 절대 호중구 수치(ANC)에 관련된 데이터를 도시한다.

도 5는 XM22(6 mg) 및 뉴라스타(Neulasta)(6 mg)에 반응하는 CD34+ 세포 수치(cell count)에 관련된 데이터를 도시한다.

도 6은 시노몰구스 원숭이(cynomolgus monkeys)에서 G-CSF, GlycoPEG-G-CSF, 뉴라스타(Neulasta), 및 대조군 조성물에 반응하는 호중구 수치에 관련된 약력학 데이터를 도시한다.

도 7은 시노몰구스 원숭에서 표시된 화합물의 혈장 농도에 관련된 약물동력학 데이터를 도시한다.

도 8은 Glyco-PEG-GCSF 및 그의 수용체 구조의 개략적 모델이다.

도 9은 3종의 상이한 용량의 XM22 및 100  $\mu$ g/kg 뉴라스타(Neulasta)의 투여 후에 XM22 및 뉴라스타의 혈청 농도에 관련된 데이터를 도시한다.

도 10은 6 mg XM22 및 6 mg 뉴라스타(Neulasta)의 투여 후에 XM22 및 뉴라스타의 혈청 농도에 관련된 데이터를 도시한다.

### 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

#### 약어

[0040] PEG, 폴리(에틸렌글리콜); PPG, 폴리(프로필렌글리콜); Ara, 아라비노실(arabinosyl); Fru, 프럭토실(fructosyl); Fuc, 푸코실(fucosyl); Gal, 갈락토실(galactosyl); GalNAc, N-아세틸갈라토사미닐(N-acetylgalactosaminyl); Glc, 글루코실(glucosyl); GlcNAc, N-아세틸글루코사미닐(N-acetylglucosaminyl); Man, 만노실(mannosyl); ManAc, 만노사미닐 아세테이트(mannosaminyl acetate); Xyl, 크실로실(xylosyl); 및 NeuAc, 시알릴(N-아세틸뉴라마린(sialyl (N-acetylneuraminy1)); M6P, 만노스-6-포스페이트(mannose-6-phosphate); Sia, 시알산, N-아세틸뉴라마린, 및 그의 유도체 및 유사체(analogues).

[0041] "G-CSF"는 과립구 콜로니 자극 인자(Granulocyte colony stimulating factor)를 나타낸다.

#### 정의

[0043] 다르게 정의되지 않으면, 본 명세서에 이용된 모든 기술적 및 과학적 용어는 본 발명이 속하는 기술분야의 통상의 기술자에게 통상적으로 이해되는 의미를 일반적으로 갖는다. 일반적으로, 본 명세서에 이용된 명명법 및 세

포 배양, 분자 유전학, 유기 화학 및 핵산 화학의 실험 과정 및 하이브리다이제이션(hybridization)은 본 기술 분야에서 잘 알려져 있고, 통상적으로 채용된다. 표준 기술이 핵산 및 웨პ티드 합성이 이용된다. 기술 및 과정은 본 기술분야의 통상의 방법 및 다양한 일반적 참조문헌에 따라 일반적으로 수행되며(일반적으로, 참조로서 본 명세서에 병합되는 Sambrook *et al.* MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL, 2d ed. (1989) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 참조), 이는 본 문서 전체에 걸쳐 제공된다. 본 명세서에 이용된 명명법 및 분석 화학의 실험과정 및, 후술되는 유기 합성은 본 기술분야에서 널리 알려져 있으며, 통상적으로 채용된다. 표준 기술 또는 그의 변형은 화학 합성 및 화학 분석에 이용된다.

[0044] 본 명세서에 기재된 모든 올리고당류(oligosaccharide)는 비환원당류에 대한 이름 또는 약어, 이어서 글리코시드 결합(glycosidic bond)( $\alpha$  또는  $\beta$ ), 고리결합(ring bond)(1 또는 2), 결합에 포함되는 환원당의 고리 위치(2, 3, 4, 6 또는 8), 및 다음으로 환원당류의 이름 또는 약어 (즉, GlcNAc)로 기재된다. 각각의 당류는 바람직하게는 피라노스(pyranose)이다. 표준 당생물학 명명법의 검토를 위하여, *Essentials of Glycobiology* Varki *et al.* eds. CSHL Press (1999)을 참조.

[0045] 올리고당류는 환원 말단(reducing end)의 당류가 실제로 환원당이든지 아니든지 환원 말단(reducing end) 및 비환원 말단(non-reducing end)을 갖는 것으로 여겨진다. 수용된 명명법에 따라, 올리고당류는 왼쪽에 비환원 말단 및 오른쪽에 환원 말단으로 여기에 묘사된다.

[0046] 용어 "시알산"은 9개 탄소 카르복실화 당(nine-carbon carboxylated sugars)페밀리의 임의의 일원이다. 시알산 페밀리의 가장 흔한 일원은 N-아세틸-뉴라민산(N-acetyl-neuraminic acid(2-케토-5-아세트아미도-3,5-디데옥시-D-글리세로-D-갈락토노눌로피라노스-1-온산(2-keto-5-acetamido-3,5-dideoxy-D-glycero-D-galactononulopyranos-1-onic acid)))((종종 Neu5Ac, NeuAc, 또는 NANA로 약칭됨)이다. 상기 페밀리의 두 번째 일원은 N-글리콜릴-뉴라민산(N-glucolyl-neuraminic acid(Neu5Gc 또는 NeuGc))이며, 여기에서 NeuAc의 N-아세틸기는 하이드록실화된다. 세 번째 시알산 페밀리 일원은 2-케토-3-데옥시-노눌로손산(2-keto-3-deoxy-nonulosonic acid(KDN))(Nadano *et al.* (1986) *J. Biol. Chem.* **261**: 11550-11557; Kanamori *et al.*, *J. Biol. Chem.* **265**: 21811-21819 (1990))이다. 또한, 9-O-락틸-Neu5Ac 또는 9-O-아세틸-Neu5Ac와 같은 9-O-C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> 아실-Neu5Ac, 9-데옥시-9-플루오로-Neu5Ac 및 9-아지도-9-데옥시-Neu5Ac과 같은 9-치환 시알산도 포함된다. 시알산 페밀리의 검토를 위하여, 예를 들어, Varki, *Glycobiology* **2**: 25-40 (1992); 시알산: *Chemistry, Metabolism* 및 *Function*, R. Schauer, Ed. (Springer-Verlag, New York (1992))를 참조. 시알릴화 과정(sialylation procedure)에서 시알산 화합물의 합성 및 이용은 1992년 10월 1일 공개된 국제공개공보 WO 92/16640에 개시되어 있다.

[0047] "웨პ티드"는 모노머가 아미노산이고 아미드 결합(amide bonds)을 통하여 서로 결합된 폴리머를 나타내며, 또는 폴리웨პ티드로도 나타내어진다. 또한, 비천연(unnatural) 아미노산, 예를 들어  $\beta$ -알라닌, 폐닐글리신 및 호모아르기닌도 포함된다. 유전자-코딩(gene-encoded)되지 않는 아미노산도 본 발명에 포함될 수 있다. 또한, 반응성 기, 글리코실화 자리(glycosylation sites), 폴리머, 치료 부분(therapeutic moieties), 바이오분자 등을 포함하도록 변형된 아미노산도 본 발명에 이용될 수 있다. 본 발명에 이용된 모든 아미노산은 D- 또는 L- 이성체(isomer)의 어느 하나일 수 있다. L-이성체가 일반적으로 바람직하다. 또한, 다른 웨პ티도미메틱(peptidomimetics)도 본 발명에 유용하다. 본 명세서에 이용된 바와 같이, "웨პ티드"는 글리코실화 및 비글리코실화 웨პ티드를 모두 나타낸다. 또한, 웨პ티드를 발현하는 시스템에 의하여 불완전하게 글리코실화된 웨პ티드도 포함된다. 일반적인 검토를 위하여, Spatola, A. F., in CHEMISTRY AND BIOCHEMISTRY OF AMINO ACIDS, PEPTIDES AND PROTEINS, B. Weinstein, eds., Marcel Dekker, New York, p. 267 (1983) 참조.

[0048] 웨პ티드의 아미노산 또는 핵산 서열은 둘 사이에 어느 정도 서열 동일성(sequence identity)이 있는 경우, 다른 것과 "상동(homologous)"이다. 바람직하게는, 상동 서열(homologous sequence)은 참조 서열(reference sequence)에 대하여 적어도 약 85% 서열 동일성을 가질 것이며, 바람직하게는 참조 아미노산 또는 뉴클레오티드 서열에 대하여, 적어도 약 90% 내지 100% 서열 동일성, 더욱 바람직하게는 적어도 약 91% 서열 동일성, 적어도 약 92% 서열 동일성, 적어도 약 93% 서열 동일성, 적어도 약 94% 서열 동일성, 더욱 더 바람직하게는 적어도 약 95% 내지 99% 서열 동일성, 바람직하게는 적어도 약 96% 서열 동일성, 적어도 약 97% 서열 동일성, 적어도 약 98% 서열 동일성, 더욱더 바람직하게는 적어도 약 99% 서열 동일성, 및 약 100% 서열 동일성을 가질 것이다.

[0049] 용어 "웨პ티드 콘주계이트(peptide conjugate)"는 웨პ티드가 본 명세서에 설명된 변형 당(modified sugar)과 콘주계이트된 본 발명의 종(species)을 나타낸다.

[0050] 용어 "아미노산"은 천연 발생 및 합성 아미노산, 및 천연 발생 아미노산과 유사한 방식으로 기능하는 아미노산

유사체(analogs) 및 아미노산 미메틱(mimetics)을 나타낸다. 천연 발생 아미노산은 유전 코드(genetic code)에 의하여 코딩되는 것, 및 후에 변형되는 아미노산, 예를 들어, 하이드록시프롤린, γ-카르복시글루타메이트, 및 O-포스포세린이다. 아미노산 유사체는 천연 발생 아미노산과 동일한 기본 화학 구조, 즉 수소, 카르복실기, 아미노기 및 R기에 결합된 탄소를 갖는 화합물, 예를 들어, 호모세린, 노르류신(norleucine), 메티오닌 설폐사이드(methionine sulfoxide), 메티오닌 메틸 설폐늄(methionine 메틸 sulfonium)을 나타낸다. 그러한 유사체는 변형 R기(modified R groups)(예를 들어, 노르류신) 또는 변형 웨티드 골격을 가지나, 천연 발생 아미노산과 동일한 기본 화학 구조를 보유한다. 아미노산 미메틱은 아미노산의 일반 화학 구조와 상이한 구조를 가지나, 천연 발생 아미노산과 유사한 방식으로 기능하는 화학 화합물을 나타낸다.

[0051] 본 명세서에 이용된 바와 같이, 용어 "변형 당(modified sugar)"은 본 발명의 방법에서, 웨티드의 아미노산 또는 글리코실 잔기 상에 효소적으로 부가되는 천연- 또는 비천연- 발생 탄수화물을 나타낸다. 변형 당은 당 뉴클레오티드(모노-, 디-, 및 트리-포스페이트), 활성화 당(예를 들어, 글리코실 할라이드, 글리코실 메실레이트) 및 활성되지 않거나 또는 뉴클레오티드가 아닌 당을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아닌 효소 기질(enzyme substrates)로부터 선택된다. "변형 당"은 "변형기(modifying group)"로 공유적으로 기능화된다. 유용한 변형기는 PEG 부분(moieties), 치료 부분(therapeutic moieties), 진단 부분(diagnostic moieties), 바이오분자 등을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 변형기는 천연 발생이 아니거나 비변형 탄수화물이 아닌 것이 바람직하다. 변형기에 의한 기능화(functionalization)의 위치(locus)는 "변형 당"이 웨티드에 효소적으로 부가되는 것을 막지 않도록 선택된다.

[0052] 용어 "수용성"은 물에서 약간의 감지 가능한 정도의 용해도를 갖는 부분(moieties)을 나타낸다. 수용성을 감지 및/또는 정량화하는 방법은 기술분야에 널리 알려져 있다. 수용성 폴리머의 예는 웨티드, 당류, 폴리(에테르), 폴리(아민), 폴리(카르복실산) 등을 포함한다. 웨티드는 단일 아미노산으로 구성된 혼합 서열(mixed sequences), 예를 들어, 폴리(라이신)을 가질 수 있다. 다당류의 예는 폴리(시알산)이다. 폴리(에테르)의 예는 폴리(에틸렌글리콜)이다. 폴리(에틸렌 아민)은 폴리아민의 예이며, 폴리(아크릴)산은 폴리(카르복실산)의 대표적 예이다.

[0053] 수용성 폴리머의 폴리머 골격은 폴리(에틸렌글리콜)(즉, PEG)일 수 있다. 그러나, 다른 관련 폴리머도 본 발명의 실시에 이용되는데 적합하며, 이런 점에 있어서 용어 PEG 또는 폴리(에틸렌글리콜)의 이용은 포괄적이며, 배제적이 아닌 것으로 의도되는 것임을 이해하여야 한다. 용어 PEG는 알콕시 PEG, 2기능성(difunctional) PEG, 멀티암(multiarmed) PEG, 포크(forked) PEG, 가지(branched) PEG, 펜던트(pendent) PEG(즉, 폴리머 골격에 매달린 일 이상의 기능기를 갖는 PEG 또는 관련 폴리머), 또는 내부에 분해 가능한 결합(linkages)을 갖는 PEG를 포함하는 임의의 형태의 폴리(에틸렌글리콜)을 포함한다.

[0054] 폴리머 골격은 선형 또는 가지형일 수 있다. 가지달린 폴리머 골격은 일반적으로 기술분야에 공지되어 있다. 전형적으로, 가지달린 폴리머는 중앙 가지 코어 부분(central branch core moiety) 및 상기 중앙 가지 코어에 결합된 복수의 선형 폴리머 사슬을 갖는다. PEG는 글리세롤, 펜타에리스리톨 및 소르비톨과 같은, 다양한 폴리올에 대한 에틸렌 옥사이드의 첨가에 의하여 제조될 수 있는 가지달린 형태로 일반적으로 이용된다. 중앙 가지 부분(central branch moiety)은 라이신과 같은 몇몇 아미노산으로부터 유래될 수 있다. 가지달린 폴리(에틸렌글리콜)은 R(-PEG-OH)<sub>n</sub>로서의 일반형으로 나타내어질 수 있으며, 상기에서 R은 글리세롤 또는 펜타에리스리톨과 같은 코어 부분을 나타내며, 및 n은 팔(arm)의 수를 나타낸다. 전체적으로 본 명세서에 참조로 병합되는, 미국 특허 제5,932,462호에 기재된 것과 같은, 멀티암 PEG 분자는 폴리머 골격으로서 이용될 수 있다.

[0055] 많은 다른 폴리머도 본 발명에 있어서 적합하다. 2개 내지 약 300개의 말단(termini)을 가지며, 비-웨티드성(non-peptidic) 및 수용성인 폴리머 골격은 본 발명에 특히 유용하다. 적합한 폴리머의 예는 폴리(프로필렌 글리콜)("PPG"), 에틸렌글리콜과 프로필렌글리콜의 코폴리머 등과 같은 다른 폴리(알킬렌 글리콜s), 폴리(옥시에틸레이티드 폴리올), 폴리(올레피닉 알코올), 폴리(비닐파롤리돈), 폴리(하이드록시프로필메타크릴아민드), 폴리(α-하이드록시 산), 폴리(비닐 알코올), 폴리포스파젠(polyphosphazene), 폴리옥사졸린(polyoxazoline), 전체적으로 본 명세서에 참조로서 병합되는 미국특허 제5,629,384호에 기재된 것과 같은, 폴리(N-아크릴로일모르 폴린), 및 그의 코폴리머, 테르폴리머, 및 혼합물을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 폴리머 골격의 각 사슬의 분자량이 다양할 수 있으나, 전형적으로는 약 100 Da 내지 약 100,000 Da의 범위이며, 종종 약 6,000 Da 내지 약 80,000 Da의 범위이다.

[0056] 본 명세서에서 환자에 대한 웨티드 약물의 투여와 관련하여 이용된 바와 같이, "곡선하 면적(area under the curve)" 또는 "AUC"는 환자의 전신 순환(systemic circulation)에서의 약물 농도를 0에서 무한대(infinity)까-

지의 시간의 함수로서 기술하는, 곡선하 총면적으로 정의된다.

[0057] 본 명세서에서 환자에 대한 웹티드 약물의 투여와 관련하여 이용된 바와 같이, 용어 "반감기(half-life)" 또는 " $t_{1/2}$ "는 환자에서 약물의 혈장 농도가 절반으로 감소되는데 필요한 시간으로 정의된다. 다중 제거 메커니즘 (multiple clearance mechanisms), 재분포(redistribution) 및 기술분야에 공지된 다른 메커니즘에 따라, 웹티드 약물과 관련된 일 이상의 반감기가 있을 수 있다. 일반적으로, 알파 및 베타 반감기는 알파상(alpha phase)이 재분포와 관련되고, 베타상(beta phase)이 제거와 관련되도록 정의된다. 그러나, 대부분 혈류에 한정되는 단백질 약물로는, 적어도 2개의 제거 반감기가 있을 수 있다. 일부 글리코실화 웹티드에 있어서, 급속한 베타상 제거는 말단 갈락토오스(terminal galactose), N-아세틸갈락토사민, N-아세틸글루코사민, 만노스, 또는 푸코스(fucose)를 인지하는 대식 세포(macrophages) 또는 내피 세포(endothelial cells) 상의 수용체를 통하여 매개될 수 있다. 더 느린 베타상 제거는 유효 반경(effective radius)  $< 2\text{nm}$ (약 68 kD)을 갖는 분자에 대한 신장 신사구체 여과 및/또는 조직에서의 특이적 또는 비특이적 흡수(uptake) 및 대사(metabolism)를 통하여 일어날 수 있다. 글리코페길화(GlycoPEGylation)는 말단 당(terminal sugars)(예를 들어, 갈락토오스 또는 N-아세틸 갈락토사민)을 덮을 수 있으며, 이에 의하여 이러한 당을 인지하는 수용체를 통하여 급속한 알파상(alpha phase) 제거를 차단할 수 있다. 또한, 이는 더 큰 유효 반경을 줄 수 있으며, 이에 의하여 분포 및 조직 흡수의 부피를 감소함으로써 이전의 베타상을 연장시킬 수 있다. 따라서, 알파상 및 베타상 반감기에 대한 글리코페길화(GlycoPEGylation)의 정확한 효과는 크기, 글리코실화의 상태 및 기술분야에 잘 알려진, 다른 파라미터에 따라 달라질 수 있다. "반감기"의 추가적인 설명은 Pharmaceutical Biotechnology (1997, DFA Crommelin and Sindelar, eds., Harwood Publishers, Amsterdam, pp 101-120)에서 발견된다.

[0058] 본 명세서에 이용된 용어 "글리코콘주제이션(glycoconjugation)"은 폴리웹티드, 예를 들어 본 발명의 G-CSF 웹티드의 아미노산 또는 글리코실 잔기에 대한 변형 당 종(species)의 효소적으로 매개된 콘주제이션(enzymatically mediated conjugation)을 나타낸다. "글리코콘주제이션(glycoconjugation)"의 아속(subgenus)은 변형 당의 변형기가 폴리(에틸렌글리콜), 및 그의 알킬 유도체(예를 들어, m-PEG) 또는 반응성 유도체(예를 들어, H<sub>2</sub>N-PEG, HOOC-PEG)인 "글리코-페길화(glyco-PEGylation)"이다.

[0059] 용어 "대규모(large-scale)" 및 "산업적 규모(industrial-scale)"는 상호교환적으로 이용되며, 단일 반응 사이클의 완결시에 적어도 약 250mg, 바람직하게는 약 500mg, 더욱 바람직하게는 적어도 약 1g의 글리코콘주제이트(glycoconjugate)를 생산하는 반응 사이클을 나타낸다.

[0060] 본 명세서에 이용된 용어 "글리코실 결합기(glycosyl linking group)"는 변형기(예를 들어, PEG 부분, 치료 부분, 바이오분자)가 공유적으로 부착된 글리코실 잔기를 나타내며; 글리코실 결합기는 변형기를 콘주제이트의 나머지 부분(remainder)에 결합시킨다. 본 발명의 방법에서, "글리코실 결합기"는 글리코실화 또는 비글리코실화 웹티드에 공유적으로 부착되게 되며, 이에 의하여 작용제(agent)를 웹티드 상의 아미노산 및/또는 글리코실 잔기에 결합시킨다. "글리코실 결합기"는 웹티드의 아미노산 및/또는 글리코실 잔기에 대한 "변형 당"의 효소적 부착(enzymatic attachment)에 의하여 "변형 당"으로부터 일반적으로 유래된다. 글리코실 결합기는 변형기-변형 당 카세트(modifying group-modified sugar cassette)의 형성(예를 들어, 산화 → 쉬프 염기(Schiff base) 형성 → 환원) 중에 분해되는 당류-유래 구조(saccharide-derived structure)일 수 있으며, 또는 글리코실 결합기는 무손상(intact)일 수 있다. "무손상(intact) 글리코실 결합기"는 변형기와 콘주제이트의 나머지 부분을 결합하는 당류 모노머가 분해되지 않는, 예를 들어 소듐 메타페리오데이트(sodium metaperiodate)에 의하여 산화되지 않는, 글리코실 부분으로부터 유래되는 결합기를 나타낸다. 본 발명의 "무손상 글리코실 결합기"는 글리코실 단위(들)의 첨가 또는 모 당류 구조(parent saccharide structure)로부터의 일 이상의 글리코실 단위의 제거에 의하여 천연 발생 올리고당류로부터 유래될 수 있다.

[0061] 본 명세서에 이용된 용어 "표적화 부분(targeting moiety)"은 신체의 특정 조직 또는 부위에 선택적으로 국부화(localize)되는 종(species)을 나타낸다. 국부화는 분자 결정자(molecular determinants)의 특이적 인지(specific recognition), 표적화제 또는 콘주제이트의 분자 크기, 이온성 상호작용, 소수성 상호작용 등에 의하여 매개된다. 작용제(agent)를 특정 조직 또는 부위에 표적화하는 다른 메커니즘은 당업자에게 알려져 있다. 표적화 부분의 예는 항체, 항체 단편(antibody fragments), 트랜스페린(transferrin), HS-당단백질, 응고인자(coagulation factors), 혈청 단백질,  $\beta$ -당단백질, G-CSF, GM-CSF, M-CSF, EPO 등을 포함한다.

[0062] 본 명세서에 이용된 "치료 부분(therapeutic moiety)"은 항생제, 항염증제, 항종양 약물, 세포 독소(cytotoxins) 및 방사성 작용제(radioactive agents)를 포함하나, 이에 한정되는 것은 아닌 치료에 유용한 임의의 작용제를 의미한다. "치료 부분(therapeutic moiety)"은 생활성제(bioactive agents)의 프로드러그

(prodrugs), 일 이상의 치료 부분이 담체에 결합되어 있는 구성체(constructs), 예를 들어, 다가 작용제 (multivalent agents)를 포함한다. 치료 부분은 단백질 및 단백질을 포함하는 구성체를 포함한다. 단백질의 예는 과립구 콜로니 자극 인자(GCSF), 과립구 대식 세포 콜로니 자극 인자(Granulocyte Macrophage Colony Stimulating Factor(GM-CSF)), 인터페론(Interferon(예를 들어, 인터페론- $\alpha$ , - $\beta$ , - $\gamma$ ), 인터류킨(Interleukin(예를 들어, 인터류킨 II)), 혈청 단백질(예를 들어, 인자 VII, VIIa, VIII, IX 및 X), 인간 융모성 생식선 자극 호르몬(Human Chorionic Gonadotropin(HCG)), 여포 자극 호르몬(Follicle Stimulating Hormone(FSH)) 및 황체 형성 호르몬(Lutenizing Hormone(LH)) 및 항체 융합 단백질(antibody fusion protein)(예를 들어, 종양 괴사 인자 수용체(Tumor Necrosis Factor Receptor((TNFR)/Fc 도메인 융합 단백질(domain fusion protein)))을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0063]

본 명세서에 이용된 "약학적으로 허용가능한 담체"는 콘주케이트와 결합된 경우, 콘주케이트의 활성을 유지하고, 대상의 면역 시스템과 비반응성인 임의의 물질을 포함한다. 예는 인산염 완충 식염수, 물, 수중유형(oil/water) 에멀젼과 같은 에멀젼, 및 다양한 형태의 습윤제(wetting agents)와 같은 표준 약학적 담체(carriers)를 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 다른 담체들은 멸균 용액, 코팅된 정제를 포함하는 정제(tablets) 및 캡슐을 포함할 수 있다. 전형적으로, 그러한 담체는 전분, 우유, 당, 특정 형태의 클레이, 젤라틴, 스테아르산 또는 그의 염, 마그네슘 또는 칼슘 스테아레이트, 탈크, 식물성 지방 또는 오일, 검, 글리콜 또는 다른 공지의 부형제(excipients)와 같은 부형제(excipients)를 함유한다. 그러한 담체는 향미 또는 색 첨가제 또는 다른 성분을 포함할 수 있다. 그러한 담체를 포함하는 조성물은 공지된 통상적인 방법에 의하여 제제화된다.

[0064]

본 명세서에 이용된 "투여하는(administering)"은 경구 투여, 좌약으로서의 투여, 국부 접촉, 정맥내, 복강내, 근육내, 병소에 직접적으로, 비강내, 또는 피하 투여, 또는 서방출 장치(slow-release device), 예를 들어, 미니-삼투 펌프(mini-osmotic pump)의 대상에 대한 이식을 의미한다. 투여는 비경구적(parenteral) 및 경접막(예를 들어, 경구, 코, 질, 직장 또는 경피)을 포함하는 임의의 경로에 의한다. 비경구 투여는 예를 들어, 정맥내, 근육내, 소동맥내, 피내, 피하, 복강내, 뇌실내 및 구개내를 포함한다. 또한, 주사(injection)가 종양을 치료하기 위한 경우에, 예를 들어, 아포토시스(apoptosis)를 유도하는 경우에, 투여는 종양에 대하여 직접적으로 및/또는 종양 주위 조직으로 될 수 있다. 다른 전달 형태는 리포솜 제제(liposomal formulations), 정맥내 주입, 경피 패취 등을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0065]

용어 "개선하는(ameliorating)" 또는 "개선하다(ameliorate)"는 증상의 경감(abatement), 완화(remission) 또는 감소(diminishing), 또는 환자의 신체적 또는 정신적 웰빙의 향상과 같은 임의의 객관적 또는 주관적 파라미터를 포함하는, 병상(pathology) 또는 상태(condition)의 치료에서의 성공의 임의의 징후(indicia)를 나타낸다. 증상의 개선은 신체 검사 및/또는 정신의학적 평가의 결과를 포함하는 객관적 또는 주관적 파라미터에 근거할 수 있다.

[0066]

용어 "치료(therapy)"는 병에 걸리기 쉬울 수 있는, 그러나 아직 질병의 증상을 경험 또는 나타내지 않은 동물에서 질병 또는 상태가 발생하는 것을 방지하는 것(예방적 치료(prophylactic treatment)), 질병을 억제하는 것(질병의 진전을 늦추거나 또는 저지하는 것), 질병의 증상 또는 부작용을 경감시키는 것(고식 치료(palliative treatment)를 포함) 및 질병을 경감시키는 것(질병의 퇴화를 야기하는 것)을 포함하는, 질병 또는 상태를 "치료하는(treating)" 또는 "치료(treatment)"를 나타낸다.

[0067]

용어 "유효량(effective amount)" 또는 "~에 유효한 양(an amount effective to)" 또는 "치료학적 유효량(therapeutically effective amount)" 또는 임의의 문법적으로 균등한 용어는 질병을 치료하기 위하여 동물에게 투여된 경우, 그 질병에 대하여 치료를 이루는데 충분한 양을 의미한다.

[0068]

용어 "분리된(isolated)"은 그 물질 제조에 이용된 성분이 실질적으로 또는 본질적으로 없는 물질을 나타낸다. 본 발명의 웹티드 콘주케이트에 있어서, 용어 "분리된(isolated)"은 웹티드 콘주케이트를 제조하는데 이용된 혼합물에서 그 물질에 정상적으로 수반되는 성분이 실질적으로 또는 본질적으로 없는 물질을 나타낸다. "분리된(Isolated)" 및 "순수(pure)"는 상호교환적으로 이용된다. 전형적으로, 분리된 본 발명의 웹티드 콘주케이트는 바람직하게는 범위로서 표현된 순도의 수준을 갖는다. 웹티드 콘주케이트에 있어서 순도 범위의 하한은 약 60%, 약 70% 또는 약 80%이며, 순도 범위의 상한은 약 70%, 약 80%, 약 90% 또는 약 90%를 넘는다.

[0069]

웹티드 콘주케이트의 순도가 약 90%를 넘는 경우, 그 순도는 범위로서 표현되는 것이 바람직하다. 순도 범위의 하한은 약 90%, 약 92%, 약 94%, 약 96% 또는 약 98%이다. 순도 범위의 상한은 약 92%, 약 94%, 약 96%, 약 98% 또는 약 100% 순도이다.

[0070] 순도는 임의의 기술분야에 인식된 분석 방법(예를 들어, 은 염색 젤 상의 밴드 강도(band intensity on a silver stained gel), 폴리아크릴아미드 젤 전기영동(polyacrylamide gel electrophoresis), HPLC, 또는 유사한 수단)에 의하여 결정된다.

[0071] 본 명세서에 이용된 "집단의 본질적인 각 일원(Essentially each member of the population)"은 웹티드에 부가된 변형 당의 선택된 퍼센티지가 웹티드 상의 다중의 동일한 수용체 자리(multiple, identical acceptor sites)에 부가되는 본 발명의 웹티드 콘주케이트의 집단의 특성을 기술한다. "집단의 본질적인 각 일원(Essentially each member of the population)"은 변형 당에 콘주케이트된 웹티드 상의 자리의 "균질성(homogeneity)"을 말하는 것이며, 적어도 약 80%, 바람직하게는 적어도 약 90% 및 더욱 바람직하게는 적어도 약 95% 균질한 본 발명의 콘주케이트를 나타내는 것이다. "균질성(Homogeneity)"은 변형 당이 콘주케이트된 수용체 부분(acceptor moieties)의 집단에 걸쳐서 구조적 일관성(structural consistency)을 나타낸다. 따라서, 각각의 변형 당이 모든 다른 변형 당이 콘주케이트된 수용체 자리와 동일한 구조를 갖는 수용체 자리에 콘주케이트된 본 발명의 웹티드 콘주케이트에서, 웹티드 콘주케이트는 약 100% 균질한 것으로 말해진다. 균질성(Homogeneity)은 전형적으로 범위로서 표현된다. 웹티드 콘주케이트에 있어서 균질성 범위의 하한은 약 60%, 약 70% 또는 약 80%이며, 순도 범위의 상한은 약 70%, 약 80%, 약 90% 또는 약 90%를 넘는다.

[0072] 웹티드 콘주케이트가 약 90% 이상 균질한 경우, 그 균질성은 범위로서 표현되는 것이 바람직하다. 균질성 범위의 하한은 약 90%, 약 92%, 약 94%, 약 96% 또는 약 98%이다. 순도 범위의 상한은 약 92%, 약 94%, 약 96%, 약 98% 또는 약 100% 균질성이다. 웹티드 콘주케이트의 순도는 당업자에게 공지된 일 이상의 방법, 예를 들어, 액체 크로마토그래피-질량분광법(liquid chromatography-mass spectrometry(LC-MS)), 매트릭스 보조 레이저 탈착 비행 시간 질량분광법(matrix assisted laser desorption mass time of flight spectrometry(MALDI-TOF)), 모세관 전기영동(capillary electrophoresis) 등에 의하여 전형적으로 결정된다.

[0073] 글리코웹티드 종에 대한 경우, "실질적으로 균일한 글리코폼(Substantially uniform glycoform)" 또는 "실질적으로 균일한 글리코실화 패턴(Substantially uniform glycosylated pattern)"은 대상 글리코실트랜스페라제(예를 들어, 푸코실트랜스페라제)에 의하여 글리코실화된 수용체 부분의 퍼센티지를 나타낸다. 예를 들어,  $\alpha$ 1,2 푸코실트랜스페라제의 경우, 실질적으로 모든(하기에 정의되는 것과 같음) Gal $\beta$ 1,4-GlcNAc-R 및 그의 시알화 유사체가 본 발명의 웹티드 콘주케이트에서 푸코실화되면, 실질적으로 균일한 푸코실화 패턴(fucosylation pattern)이 존재한다. 본 명세서에 설명된 푸코실화 구조에서, Fuc-GlcNAc 결합(linkage)은 일반적으로  $\alpha$ 1,6 또는  $\alpha$ 1,3이며,  $\alpha$ 1,6이 일반적으로 바람직하다. 출발물질이 글리코실화 수용체 부분(예를 들어, 푸코실화 Gal $\beta$ 1,4-GlcNAc-R 부분)을 함유할 수 있음이 당업자에게 이해될 것이다. 따라서, 산출된 퍼센트의 글리코실화는 본 발명의 방법에 의하여 글리코실화된 수용체 부분, 및 출발물질에서 이미 글리코실화된 그들의 수용체 부분을 포함할 것이다.

[0074] "실질적으로 균일한"의 상기 정의에서 용어 "실질적으로(substantially)"는 특정 글리코실트랜스페라제에 대한 수용체 자리의 적어도 약 40%, 적어도 약 70%, 적어도 약 80%, 또는 더욱 바람직하게는 적어도 약 90%, 및 더욱 더 바람직하게는 적어도 약 95%가 글리코실화되는 것을 일반적으로 의미한다.

[0075] 치환기가 일반적인 왼쪽으로부터 오른쪽으로 기재된 통상적인 화학식으로 특정되는 경우, 그것은 오른쪽으로부터 왼쪽으로 구조를 기재하는 것으로부터 이루어지는 화학적으로 동일한 치환기를 동등하게 포함하며, 예를 들어,  $-\text{CH}_2\text{O}-$ 는  $-\text{OCH}_2-$ 를 나타내는 것으로도 의도된다.

[0076] 그 자체로, 또는 다른 치환기의 부분으로서의 용어 "알킬"은 다르게 언급되지 않으면, 칙체 또는 분지쇄, 또는 시클릭 탄화수소 라디칼, 또는 그 조합을 의미하며, 이들은 완전히 포화되거나, 모노- 또는 폴리불포화(monounsaturated)될 수 있으며, 표시된 수의 탄소 원자를 갖는(즉, C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>은 1 내지 10개의 탄소를 의미함) 이-(di-) 및 다가(multivalent) 라디칼을 포함할 수 있다. 포화 탄화수소 라디칼의 예는 메틸, 에틸, n-프로필, 이소프로필, n-부틸, t-부틸, 이소부틸, sec-부틸, 시클로헥실, (시클로헥실)메틸, 시클로프로필메틸과 같은 기, 그의 동족체(homologs) 및 이성체(isomers), 예를 들어 n-펜틸, n-헥실, n-헵틸, n-옥틸 등의 기를 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 불포화 알킬기는 일 이상의 이중 결합 또는 삼중 결합을 갖는 것이다. 불포화 알킬기의 예는 비닐, 2-프로페닐, 크로틸(crotyl), 2-이소펜테닐, 2-(부타디에닐), 2,4-펜타디에닐, 3-(1,4-펜타디에닐), 에티닐, 1- 및 3-프로피닐, 3-부티닐, 및 고급 동족체 및 이성체를 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 다르게 언급되지 않으면, 용어 "알킬"은 "헤테로알킬"과 같은, 하기에 더욱 상세하게 정의된 알킬의 유도체를 포함하는 것으로 의도된다. 탄화수소기에 한정되는 알킬기는 "호모알킬"로

칭해진다.

[0077] 그 자체로, 또는 다른 치환기의 부분으로서, 용어 "알킬렌"은 예를 들어  $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$ 이나, 이에 한정되는 것은 아닌, 알칸으로부터 유래된 2가 라디칼을 의미하며, 하기에 "헤테로알킬렌"으로 기재되는 기를 더 포함한다. 전형적으로, 알킬(또는 알킬렌)기는 1 내지 24개의 탄소 원자를 가질 것이며, 10개 이하의 탄소 원자를 가지는 것이 본 발명에서 바람직하다. "저급 알킬" 또는 "저급 알킬렌"은 일반적으로 8개 이하의 탄소 원자를 갖는 짧은 사슬 알킬 또는 알킬렌기이다.

[0078] 용어 "알콕시" "알킬아미노" 및 "알킬티오"(또는 티오알콕시)는 그들의 일반적인 의미로 이용되며, 각각 산소 원자, 아미노기 또는 황 원자를 통하여 분자의 나머지 부분에 부착된 알킬기를 나타낸다.

[0079] 그 자체로, 또는 다른 용어와 조합으로서, 용어 "헤테로알킬"은 다르게 언급되지 않으면, 언급된 수의 탄소 원자 및 O, N, Si 및 S로 이루어진 군으로부터 선택된 적어도 하나의 헤테로원자로 이루어진 안정한 직쇄 또는 분지쇄, 또는 시클릭 탄화수소 라디칼, 또는 그 조합을 의미하며, 여기에서, 질소 및 황 원자는 선택적으로 산화될 수 있으며, 질소 헤테로원자는 선택적으로 4급화(quaternized)될 수 있다. 헤테로원자(들) O, N 및 S 및 Si는 헤테로알킬기의 임의의 내부 위치에 또는 알킬기가 분자의 나머지 부분에 부착된 위치에 위치할 수 있다. 예는  $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_3$ ,  $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{CH}_3$ ,  $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{N}(\text{CH}_3)-\text{CH}_3$ ,  $-\text{CH}_2-\text{S}-\text{CH}_2-\text{CH}_3$ ,  $-\text{CH}_2-\text{CH}_2,-\text{S}(\text{O})-\text{CH}_3$ ,  $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{S}(\text{O})_2-\text{CH}_3$ ,  $-\text{CH}=\text{CH}-\text{O}-\text{CH}_3$ ,  $-\text{Si}(\text{CH}_3)_3$ ,  $-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{N}-\text{OCH}_3$ , 및  $-\text{CH}=\text{CH}-\text{N}(\text{CH}_3)-\text{CH}_3$ 를 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 2개 이하의 헤테로원자는 예를 들어,  $-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{OCH}_3$  및  $-\text{CH}_2-\text{O}-\text{Si}(\text{CH}_3)_3$ 와 같이 연속적(consecutive)일 수 있다. 유사하게, 그 자체로, 또는 다른 치환기의 부분으로서 용어 "헤테로알킬렌"은 예를 들어,  $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{S}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$  및  $-\text{CH}_2-\text{S}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{CH}_2-$ 이나 이에 한정되는 것은 아닌, 헤테로알킬로부터 유래된 2가 라디칼을 의미한다. 헤테로알킬렌기에 있어서, 헤테로원자는 사슬 말단의 어느 한쪽 또는 양쪽을 차지할 수 있다(예를 들어, 알킬렌옥시, 알킬렌디옥시, 알킬렌아미노, 알킬렌디아미노 등). 또한, 알킬렌 및 헤�테로알킬렌 결합기에 있어서, 결합기의 배향(orientation)은 결합기의 화학식이 기재된 방향에 의하여 나타내어지지 않는다. 예를 들어, 화학식  $-\text{C}(\text{O})_2\text{R}'-$ 은  $-\text{C}(\text{O})_2\text{R}'-$  및  $-\text{R}'\text{C}(\text{O})_2-$ 를 모두 나타낸다.

[0080] 그 자체로, 또는 다른 용어와 조합으로서, 용어 "시클로알킬" 및 "헤테로시클로알킬"은 다르게 언급되지 않으면, 각각 "알킬" 및 "헤테로알킬"의 시클릭 형태(cyclic versions)를 나타낸다. 또한, 헤테로시클로알킬에 있어서, 헤테로원자는 헤테로사이클이 분자의 나머지 부분에 부착된 위치를 차지할 수 있다. 시클로알킬의 예는 시클로펜틸, 시클로헥실, 1-시클로헥세닐, 3-시클로헥세닐, 시클로헵틸 등을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 헤테로시클로알킬의 예는 1-(1,2,5,6-테트라하이드로페리딜), 1-페페리디닐, 2-페페리디닐, 3-페페리디닐, 4-모르폴리닐, 3-모르폴리닐, 테트라하이드로푸란-2-일, 테트라하이드로푸란-3-일, 테트라하이드로티엔-2-일, 테트라하이드로티엔-3-일, 1-페페라지닐, 2-페페라지닐 등을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0081] 그 자체로 또는 다른 치환기의 부분으로서 용어 "할로" 또는 "할로겐"은 다르게 언급되지 않으면, 불소, 염소, 브롬 또는 요오드 원자를 의미한다. 또한, "할로알킬"과 같은 용어는 모노할로알킬 및 폴리할로알킬을 포함하는 것을 의미한다. 예를 들어, 용어 "할로( $\text{C}_1-\text{C}_4$ )알킬"은 트리플루오로메틸, 2,2,2-트리플루오로에틸, 4-클로로부틸, 3-브로모프로필 등을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아님을 의미한다.

[0082] 다르게 언급되지 않으면, 용어 "아릴"은 함께 융합되거나 또는 공유적으로 결합된, 단일 고리 또는 다중 고리(바람직하게는 1 내지 3개 고리)일 수 있는 폴리불포화 방향족 치환기를 의미한다. 용어 "헤테로아릴"은 N, O, 및 S로부터 선택된 1 내지 4개의 헤�테로원자를 함유하는 아릴기(또는 고리)를 나타내며, 여기에서, 질소 및 황 원자는 선택적으로 산화되며, 질소 원자(들)는 선택적으로 4급화된다. 헤�테로아릴기는 헤�테로원자를 통하여 분자의 나머지 부분에 부착될 수 있다. 아릴 및 헤�테로아릴기의 비제한적 예는 페닐, 1-나프틸, 2-나프틸, 4-비페닐, 1-피롤릴, 2-피롤릴, 3-피롤릴, 3-피라졸릴, 2-이미다졸릴, 4-이미다졸릴, 피라지닐, 2-옥사졸릴, 4-옥사졸릴, 2-페닐-4-옥사졸릴, 5-옥사졸릴, 3-이속사졸릴, 4-이속사졸릴, 5-이속사졸릴, 2-티아졸릴, 4-티아졸릴, 5-티아졸릴, 2-퓨릴, 3-퓨릴, 2-티에닐, 3-티에닐, 2-피리딜, 3-피리딜, 4-피리딜, 2-피리미딜, 4-피리미딜, 5-벤조티아졸릴, 퓨리닐, 2-벤즈이미다졸릴, 5-인돌릴, 1-이소퀴놀릴, 5-이소퀴놀릴, 2-퀴녹살리닐, 5-퀴녹살리닐, 3-퀴놀릴, 테트라졸릴, 벤조[b]퓨라닐, 벤조[b]티에닐, 2,3-디하이드로벤조[1,4]디옥신-6-일, 벤조[1,3]디옥솔-5-일 및 6-퀴놀릴을 포함한다. 전술한 아릴 및 헤�테로아릴 고리 시스템 각각에 대한 치환기는 후술하는 수용가능한 치환기의 군으로부터 선택된다.

[0083] 간략하게, 다른 용어와 조합되어 이용된 용어 "아릴"(예를 들어, 아릴옥시, 아릴티옥시, 아릴알킬)은 상기에 정

의된 아릴 및 헤테로아릴 고리를 모두 포함한다. 따라서, 용어 "아릴알킬"은 탄소 원자(예를 들어, 메틸렌기)가 예를 들어, 산소 원자로 치환된 알킬기(예를 들어, 폐녹시메틸, 2-파리딜옥시메틸, 3-(1-나프탈옥시)프로필 등)를 포함하는 알킬기에 아릴기가 부착된 라디칼(예를 들어, 벤질, 폐네틸, 파리딜메틸 등)을 포함하는 것을 의미한다.

[0084] 전술한 용어(예를 들어, "알킬," "헤테로알킬," "아릴" 및 "헤테로아릴")의 각각은 표시된 라디칼의 치환 및 비치환 형태를 모두 포함하는 것을 의미한다. 바람직한 치환기는 하기에 제공되는 각 형태의 라디칼이다.

[0085] 알킬 및 헤테로알킬 라디칼(종종 알킬렌, 알케닐, 헤테로알케닐, 알키닐, 시클로알킬, 헤테로시클로알킬, 시클로알케닐, 및 헤테로시클로알케닐로 나타내어지는 기를 포함함)에 대한 치환기는 "알킬기 치환기"로 일반적으로 나타내어지며, 그들은 0 내지  $(2m'+1)$ (여기에서  $m'$ 은 그 라디칼의 탄소 원자의 총수임) 범위의 수인, 하기:  $-OR'$ ,  $=O$ ,  $=NR'$ ,  $=N-OR'$ ,  $-NR'R''$ ,  $-SR'$ ,  $- 할로겐$ ,  $-SiR'R''R'''$ ,  $-O(C)OR'$ ,  $-C(O)R'$ ,  $-CO_2R'$ ,  $-CONR'R''$ ,  $-OC(O)NR'R''$ ,  $-NR''C(O)R'$ ,  $-NR''-C(O)NR''R'''$ ,  $-NR''C(O)_2R'$ ,  $-NR-C(NR'R''R''')=NR'''$ ,  $-NR-C(NR'R'')=NR'''$ ,  $-S(O)R'$ ,  $-S(O)_2R'$ ,  $-S(O)_2NR'R''$ ,  $-NRSO_2R'$ ,  $-CN$  및  $-NO_2$ 로부터 선택되나, 이에 제한되는 것은 아닌, 일 이상의 다양한 기일 수 있다.  $R'$ ,  $R''$ ,  $R'''$  및  $R''''$ 은 각각 독립적으로 수소, 치환 또는 비치환 헤테로알킬, 치환 또는 비치환 아릴, 예를 들어, 1 내지 3개의 할로겐으로 치환된 아릴, 치환 또는 비치환 알킬, 알콕시 또는 티오알콕시기, 또는 아릴알킬기를 나타내는 것이 바람직하다. 본 발명의 화합물은 일 이상의  $R$ 기를 포함하는 경우, 예를 들어, 각각의  $R$ 기가, 일 이상의 이러한 기가 존재하는 경우  $R'$ ,  $R''$ ,  $R'''$  및  $R''''$  기의 각각이 되도록 독립적으로 선택된다.  $R'$  및  $R''$ 가 동일한 질소 원자에 부착되는 경우, 그들은 질소 원자와 결합하여 5-, 6-, 또는 7-원 고리를 형성할 수 있다. 예를 들어,  $-NR'R''$ 은 1-페리리디닐 및 4-모르폴리닐을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아님을 의미한다. 상기 치환기의 논의로부터, 당업자는 용어 "알킬"이 할로알킬(예를 들어,  $-CF_3$  및  $-CH_2CF_3$ ) 및 아실(예를 들어,  $-C(O)CH_3$ ,  $-C(O)CF_3$ ,  $-C(O)CH_2OCH_3$  등)과 같은, 수소 기 이외의 기에 결합된 탄소 원자를 포함하는 기를 포함함을 의미하는 것임을 이해할 것이다.

[0086] 알킬 라디칼에 대하여 기재한 치환기와 유사하게, 아릴 및 헤테로아릴기에 대한 치환기는 "아릴기 치환기"로 일 반적으로 나타내어진다. 상기 치환기는 예를 들어: 0 내지 방향족 고리 시스템의 열린 원자가(open valences)의 총수의 범위인 수인, 할로겐,  $-OR'$ ,  $=O$ ,  $=NR'$ ,  $=N-OR'$ ,  $-NR'R''$ ,  $-SR'$ ,  $- 할로겐$ ,  $-SiR'R''R'''$ ,  $-OC(O)R'$ ,  $-C(O)R'$ ,  $-CO_2R'$ ,  $-CONR'R''$ ,  $-OC(O)NR'R''$ ,  $-NR''C(O)R'$ ,  $-NR''C(O)NR''R'''$ ,  $-NR''C(O)_2R'$ ,  $-NR-C(NR'R''R''')=NR'''$ ,  $-NR-C(NR'R'')=NR'''$ ,  $-S(O)R'$ ,  $-S(O)_2R'$ ,  $-S(O)_2NR'R''$ ,  $-NRSO_2R'$ ,  $-CN$  및  $-NO_2$ ,  $-R'$ ,  $-N_3$ ,  $-CH(Ph)_2$ , 플루오로( $C_1-C_4$ )알콕시, 및 플루오로( $C_1-C_4$ )알킬로부터 선택되며; 및  $R'$ ,  $R''$ ,  $R'''$  및  $R''''$ 는 수소, 치환 또는 비치환 알킬, 치환 또는 비치환 헤테로알킬, 치환 또는 비치환 아릴 및 치환 또는 비치환 헤테로아릴로부터 독립적으로 선택되는 것이 바람직하다. 본 발명의 화합물은 일 이상의  $R$ 기를 포함하며, 각각의  $R$ 기는, 이러한 기가 일 이상 존재하는 경우 각각의  $R'$ ,  $R''$ ,  $R'''$  및  $R''''$ 기가 되도록 독립적으로 선택된다. 후술되는 반응식에서, 기호 X는 전술한 "R"을 나타낸다.

[0087] 아릴 또는 헤테로아릴 고리의 인접한 원자들 상의 2개의 치환기는 화학식  $-T-C(O)-(CRR')_u-U-$ 의 치환기로 선택적으로 대체될 수 있으며, 여기에서 T 및 U는 독립적으로  $-NR-$ ,  $-O-$ ,  $-CRR'$  또는 단일 결합이며, u는 0 내지 3의 정수이다. 또는, 아릴 또는 헤테로아릴 고리의 인접한 원자들 상의 2개의 치환기는 화학식  $-A-(CH_2)_rB-$ 의 치환기로 선택적으로 대체될 수 있으며, 여기에서, A 및 B는 독립적으로  $-CRR'$ ,  $-O-$ ,  $-NR-$ ,  $-S-$ ,  $-S(O)-$ ,  $-S(O)_2-$ ,  $-S(O)_2NR'$  또는 단일 결합이며, r은 1 내지 4의 정수이다. 이렇게 형성된 새로운 고리의 단일 결합의 하나는 이중 결합으로 선택적으로 대체될 수 있다. 또는, 아릴 또는 헤테로아릴 고리의 인접한 원자들 상의 2개의 치환기는 화학식  $-(CRR')_z-X-(CR''R'')_d-$ 의 치환기로 선택적으로 대체될 수 있으며, 여기에서, z 및 d는 독립적으로 0 내지 3의 정수이며, X는  $-O-$ ,  $-NR'-$ ,  $-S-$ ,  $-S(O)-$ ,  $-S(O)_2-$ , 또는  $-S(O)_2NR'-$ 이다. 치환기 R,  $R'$ ,  $R''$  및  $R'''$ 는 수소 또는 치환 또는 비치환 ( $C_1-C_6$ )알킬로부터 독립적으로 선택되는 것이 바람직하다.

[0088] 본 명세서에 이용된 용어 "헤테로원자"는 산소(O), 질소(N), 황(S) 및 실리콘(Si)을 포함하는 것을 의미한다.

[0089] "줄기 세포"는 그의 복제품을 무한정 만들 수 있는 "일반적(generic)" 또는 미분화(undifferentiated) 세포를 나타내며, 이는 신체의 다양한 조직에 대하여 분화되어질 수 있다. 줄기 세포는 적혈구, 백혈구 및 혈소판을 포함하는 정상적인 혈액 성분을 발생시킬 수 있다. 줄기 세포는 보통 골수 내에 및 혈액 내에 위치하며, 이식을

위하여 채취될 수 있다.

[0090] 용어 "조혈 세포(hematopoietic cell)"는 혈액 세포의 형성에 관련된 세포를 나타낸다. 이 용어는 상기 정의된 "줄기 세포"와 상호교환적으로 이용될 수 있다.

[0091] 본 명세서에 이용된 용어 "줄기 세포 생산을 가동화하는(mobilizing stem cell production)"은 생체 내(*in vivo*) 또는 시험관 내(*in vitro*)에서 줄기 세포의 수를 증가시키는 모든 과정을 포함하는 것을 의미한다. 줄기 세포의 증가된 수는 프로제니터 세포 수의 증가의 결과일 수 있다. 또한, 상기 용어 내에는 줄기 세포의 골수로의 또는 골수에서부터의 운반 과정(transport process)이 포함된다.

[0092] 유사하게, 용어 "조혈 세포 생산을 가동화하는(mobilizing hematopoietic cell production)"은 생체 내(*in vivo*) 또는 시험관 내(*in vitro*)에서 조혈 세포의 수를 증가시키는 모든 과정을 포함하는 것을 의미한다. 조혈 세포의 증가된 수는 고프로제니터 세포 수의 증가, 만능 줄기 세포(pluripotent stem cells)의 조혈 세포로의 성숙(maturation) 속도의 증가 및 이들의 일부 조합의 결과일 수 있다. 또한, 상기 용어 내에는 조혈 세포의 골수로의 또는 골수에서부터의 운반 과정이 포함된다.

[0093] 용어 "과립구(granulocytes)"는 그 세포질 내 과립의 존재를 특징으로 하는 백혈구를 나타낸다.

## 도입

[0095] 본 발명은 흔히 화학치료, 방사선 치료, 및 혈소판 감소증(thrombocytopenia)에 의하여 야기되는, 조혈 결핍(hematopoietic deficiency)에 관련된 장애(disorders) 및 상태(conditions)를 예방, 완화 및 치료하기 위하여 글리코페길화(glycophylated) G-CSF를 투여하는 방법을 포함한다. G-CSF는 우선 골수에 작용하여 염증성 백혈구(inflammatory leukocytes)의 생산을 증가시키고, 내분비 호르몬(endocrine hormone)으로 기능하여 염증성 작용(inflammatory functions) 중에 소비된 호중구(neutrophils)의 보충을 개시한다. G-CSF는 또한 화학치료에 이어지는 골수 대체(replacement)에서 임상적 적용성을 가진다.

[0096] 본 발명은 과립구 콜로니 자극 인자(G-CSF)를 포함하는 콘주게이트(conjugate)를 제공한다. 본 발명은 또한 과립구 코로니 자극 활성을 갖는 글리코실화 및 비글리코실화 웨პ티드를 포함하는 콘주게이트를 포함한다. 상기 콘주게이트는 치료 부분(therapeutic moieties), 진단 부분(diagnostic moieties), 표적화 부분(targeting moieties) 등과 같은 다양한 종파의 추가적인 콘주게이션에 의하여 추가적으로 변형될 수 있다. 본 명세서에 기재된 G-CSF 콘주게이트에 있어서, 폴리머 변형기(polymeric modifying group)는 바람직하게는 글리코실 결합기를 통하여, G-CSF 웨პ티드의 글리코실 또는 아미노산 잔기에서 G-CSF 웨პ티드에 공유적으로 부착될 수 있다. 예시적인 실시예에서, 폴리머 변형기는 수용성 폴리머이다. 더 바람직한 실시예에서, 수용성 폴리머는 폴리(에틸렌글리콜)이다.

[0097] 예시적 실시예에서, 본 발명의 G-CSF 웨პ티드는 방사선 치료, 화학치료, 및 골수 이식을 받는 암 환자의 감염을 예방하기 위한 목적으로, 말단 혈액 프로제니터 세포 이식에서 수집(collection)을 위하여 프로제니터 세포를 가동화하기 위하여, 원인에 무관하게 심각한 만성 또는 상대적 백혈구 감소증의 치료를 위하여, 및 급성 골수성 백혈병 환자의 치료를 뒷받침하기 위하여 환자에게 투여될 수 있다. 또한, 본 발명의 폴리웨პ티드 콘주게이트 또는 조성물은 AIDS 또는 다른 면역 결핍 질환, 및 박테리아 감염, 심장병 및 A, B, 및 C형 간염의 치료를 위하여 이용될 수 있다.

[0098] 일 실시예에서, 본 발명의 G-CSF 웨პ티드 콘주게이트는 조혈을 증가시키기 위하여 대상에게 투여될 수 있다. 조혈은 그에 의하여 전구체 세포가 적혈구, 백혈구 및 혈소판을 포함하는 성숙 혈액 세포로 발달되는 과정이다. 정상적인 조혈은 콜로니 자극 인자와 같은 당단백질을 포함하는 다양한 조절자(regulators)에 의하여 기능하게 된다. 그러한 조절자는 프로제니터 및 전구체 세포의 생존, 증식 및 분화, 및 성숙 세포의 활성화 상태(activation state)를 조절한다. 조혈이 손상된 경우, 결과는 혈액 세포 및 혈소판 생산의 감소이며, 이에 의하여 면역이 손상되며, 상체 및 감염으로부터 치유가 불가능해지게 된다.

[0099] 본 발명은 대상의 조혈을 자극하는 방법 및 조성물을 제공한다. 본 발명의 방법은 G-CSF 웨პ티드와 폴리머 변형기(폴리머 변형기) 간의 공유 콘주게이트(covalent conjugate)인 웨პ티드의 유효량을 대상에게 투여하는 단계를 포함한다.

[0100] 일 측면에서, 조혈을 자극하는 것은 대상의 조혈 프로제니터 세포(hematopoietic progenitor cell)의 수를 증가시키는 것을 포함하며, 이는 성숙 조혈 세포(혈액 세포)의 수가 또한 증가되는 결과를 낳는다. 조혈 프로제니

터 세포(hematopoietic progenitor cell)는 그들이 적혈구 및 백혈구가 되도록 성숙할 수 있는 골수에 통행하고 골수 내에 보유된다. 조혈 프로제니터 세포(hematopoietic progenitor cell) 수를 자극하기 위한 본 발명의 방법은 G-CSF 웨티드와 폴리머 변형기(폴리머 변형기)의 공유 콘주게이트(covalent conjugate)인 웨티드의 유효량을 대상에게 투여하는 단계를 포함한다. 일 실시예에서, 웨티드의 적용에 의하여 증가된 조혈 프로제니터 세포(hematopoietic progenitor cell)는 CD34+ 세포이다.

#### [0101] 골수 억제(Myelosuppression)

골수 억제는 혈액 세포의 생산 감소이다. 정상적인 혈액은 산소를 운반하기 위한 적혈구 및 감염과 싸우기 위한 백혈구를 포함하는, 다수의 세포를 함유한다. 정상적 혈액은 또한 혈액 응고를 시작하는 작은 세포 단편인 혈소판을 함유한다. 이러한 세포 및 단편은 일부 뼈의 중앙에서 발견되는 물질인 골수에서 만들어진다. 건강한 골수는 매일 다수의 적혈구, 백혈구 및 혈소판을 만든다. 골수 억제에서, 골수는 이러한 세포를 너무나 적게 만든다. 본 발명은 골수 억제를 치료, 완화 및 예방하는 방법 및 조성물을 제공한다.

[0103] 골수 억제의 하나의 특징은 대상의 백혈구 생산이 손상되는 것이다. 그와 같이 손상된 백혈구 생산은 일부 종류의 치료, 특히, 화학치료 및 방사선 치료와 같은 암치료에 의하여 야기될 수 있다. 손상된 백혈구 생산은 특발성 혈소판 감소증 자반병(idiopathic thrombocytopenia purpura)과 같은 장애(disorders)의 결과일 수 있다. 일 측면에서, 본 발명의 콘주게이트는 손상된 백혈구 생산을 특징으로 하는 장애(disorders)를 치료 및 완화하는데 이용된다.

[0104] 골수 억제로부터 야기되는 장애는 호중구 감소증(neutropenia)(발열성 호중구 감소증(febrile neutropenia)을 포함함) 및 혈소판 감소증(thrombocytopenia)을 포함한다. 호중구 감소증(neutropenia)은 혈액에서 호중구(neutrophils)(가장 흔한 형태의 백혈구) 수의 비정상적 감소를 특징으로 하는 상태이다. 상기 감소는 상대적 또는 절대적일 수 있다. 일 측면에서, 본 발명은 포유류의 호중구 감소증(neutropenia)의 치료를 위한 방법을 제공한다. 이러한 방법은 본 발명의 G-CSF 콘주게이트의 약학적 유효량을 투여하는 단계를 포함한다. G-CSF는 성인 암 환자의 발열성 호중구 감소증(febrile neutropenia) 및 사망률(mortality)에 영향을 미치는 것으로 나타났다(Kuderer et al., *J. Clin. Onc.* (2007), 25(21):3158-67).

[0105] 혈소판 감소증(thrombocytopenia)은 혈액의 혈소판 수가 비정상적으로 낮은 장애이며, 종종 비정상적 출혈과 관련된다. 본 발명의 방법은 포유류의 혈소판 감소증(thrombocytopenia) 치료를 포함한다. 이 방법은 본 발명의 G-CSF 콘주게이트의 약학적 유효량을 투여하는 단계를 포함한다. 본 명세서에 이용된 용어 혈소판 감소증(thrombocytopenia)은 알려진 근원의 장애 및 특발성 혈소판 감소증을 포함한다. 혈소판 감소증(thrombocytopenia) 및 특발성 혈소판 감소증(idiopathic thrombocytopenia)은 본 명세서에서, "혈소판 감소증 자반병(thrombocytopenia purpura)" 및 "특발성 혈소판 감소증 자반병(idiopathic thrombocytopenia purpura)"으로도 나타내어진다.

#### [0106] 줄기 세포 가동화

[0107] 골수 억제와 싸우는 하나의 방법은 줄기 세포 생산을 가동화시키는 것이다. 줄기 세포 생산의 가동화는 조혈 프로제니터 세포(hematopoietic progenitor cell)의 수 및 호중구(neutrophils)와 호산구(eosinophils)를 포함하는 과립구의 수를 포함하는, 줄기 세포의 수를 증가시키는 것을 포함한다. 줄기 세포 생산의 가동화는 골수로부터 말초 혈액(peripheral blood)으로의 줄기 세포의 운반을 증가시키는 것을 포함한다. 말초 혈액이 골수보다 좀더 용이하게 이용할 수 있기 때문에, 이러한 가동화는 줄기 세포의 채취에 도움이 된다. 일 측면에서, 본 발명은 대상의 줄기 세포 생산을 가동화시키는 방법을 제공한다.

[0108] 다른 측면에서, 대상의 조혈 프로제니터 세포(hematopoietic progenitor cell)를 가동화함으로써, 본 발명의 방법 및 조성물을 이용하여 골수 억제가 예방, 완화 및 치료된다. 조혈 프로제니터 세포(hematopoietic progenitor cell)의 가동화는 조혈 프로제니터 세포(hematopoietic progenitor cell)의 수를 증가시키는 것 및 상기 세포의 골수로의, 및 골수로부터의 운반을 증가시키는 것을 포함한다.

[0109] CD34+ 세포와 같은 조혈 프로제니터 세포(hematopoietic progenitor cell)는 혈액의 성분, 즉 적혈구 및 백혈구로 성숙 및 분화된다. 본 발명은 (i) 화학식(1)의 화합물인 1,1'-[1,4-페닐렌-비스-(메틸렌)-비스-1,4,8,11-테트라아자시클로테트라데칸(AMD3100)을 포함하는 제1 조성물, 및 (ii) G-CSF 웨티드와 폴리머 변형기 간의 공유

콘주케이트(covalent conjugate)인 웨პ티드를 포함하는 제2 조성물을 대상에게 투여하는 단계를 포함하는, 대상의 조혈 프로제니터 세포(hematopoietic progenitor cell)를 가동화하는 방법을 제공한다. 일 실시예에서, 제1 조성물 및 제2 조성물은 대상에게 순차적으로 및 임의의 순서로 투여된다. 다른 실시예에서, 제1 조성물 및 제2 조성물은 동시에 투여된다. 일 실시예에서, 양 조성물은 대상에게 피하로 투여된다.

[0110] AMD3100은 정상적인 대상 및 암 환자 모두에게서 상당한 수의 CD34+ 세포를 가동화하여 순환시키는 것으로 나타난 바이시클암 유도체(bicyclam derivatives)이다(Liles et al., *Blood*, (2003), 102:2728-30; Devine et al., *J. Clin. Oncol.*, (2004), 22:1095-1102). 연구는 AMD3100을 G-CSF의 비-글리코실화 형태와 결합하면 G-CSF 단독에 비하여 더 많은 수의 CD34+ 세포를 가동화하여 순환시키는 것을 나타내었다(Flomenberg et al., *Blood*, (2005), 106(5): 1867-1874).

[0111] 일 실시예에서, 줄기 세포 생산은 골수 또는 조혈 세포 공여자로서 작용하는 대상에서 가동화된다. 공여자는 전술한 웨პ티드 콘주케이트를 제공받는다. 공여자로부터의 줄기 세포는 수가 증가하고 가동화되어 골수로부터 말초 혈액으로 이동된다. 이후, 이러한 세포는 기술분야에 공지된 방법을 이용하여 공여자로부터 용이하게 분리된다. 이러한 실시예에서 공여자는 골수 또는 조혈 세포의 수용자(recipient)와 동일할 수 있으며(자가 공여자(autologous donor), 또는 공여자는 수용자가 아닌 대상일 수 있다(동종 공여자(allogenic donor)).

[0112] 다른 측면에서, 본 발명의 웨პ티드 콘주케이트는 적어도 하나의 화학치료제(chemotherapeutic agent)와 조합되어 제공된다.

### 골수 이식

[0114] 일부 측면에서, 본 발명은 골수 이식 수용자의 줄기 세포 생산을 가동화하는 방법 및 조성물을 제공한다. 이러한 방법은 G-CSF 웨პ티드와 폴리머 변형기 간의 공유 콘주케이트(covalent conjugate)인 웨პ티드의 상당량을 수용자에게 투여하는 단계를 포함한다. 일 실시예에서, 폴리머 변형기는 바람직하게는 무순상 글리코실 결합기를 통하여, G-CSF 웨პ티드의 글리코실 또는 아미노산 잔기에서 G-CSF 웨პ티드에 공유적으로 결합될 수 있는 수용성 폴리머이다. 상기 웨პ티드는 골수 이식 전에, 이식 후에, 또는 이식과 동시에 수용자에게 투여될 수 있다.

[0115] 성공적인 이식을 위하여, 장기간의 생착(engraftment)이 결정적이다. 용어 "생착(engraftment)"은 수용자의 골수로 가서 모든 형태의 혈액 세포를 생산하는 주입(*infused*) 또는 이식된 공여자 줄기 세포의 과정을 나타낸다. 생착은 줄기 세포 이식 후에, 새로운 백혈구, 적혈구 및 혈소판이 수용자의 혈액에서 나타나기 시작할 때 처음으로 명백해진다. 장기간 생착은 주입된 또는 이식된 공여자 세포가 수용자의 골수에 잔류하여 수용자의 면역 시스템에 의한 거부반응 없이 연장된 시간 주기에 걸쳐 혈액 세포를 생산하는 과정을 나타낸다. 이식물에 중간 및 말기 프로제니터 세포(intermediate and late progenitor cells)를 포함시키면 공여자-유래 성숙 세포의 생산을 가속화하며, 생착 과정을 뒷받침할 수 있다.

[0116] 따라서, 본 발명은 수용자에게 제공된 골수의 장기간 생착(engraftment)을 높이는 방법 및 조성물을 제공한다. 일 실시예에서, 본 발명의 웨პ티드는 골수 이식 전에 공여자에게 투여된다. 상기 웨პ티드는 공여자의 조혈, 특히 프로제니터 세포의 수를 증가시키며, 이는 골수 및/또는 조혈 세포가 수용자에게 이식되는 경우 생착의 성공 및 수명을 증가시킨다. 이식된 골수는 수용자 자신의 골수일 수 있으며(자가), 또는 골수는 동일 종의 공여자로부터 이식될 수 있다(동종).

[0117] 다른 실시예에서, 골수가 수용자 자신으로부터 유래한 것이든지 아니면 다른 개체로부터 유래한 것이든지, 본 발명의 웨პ티드는 제공된 골수의 장기간 생착을 높이기 위하여 골수의 수용자에게 투여된다. 수용자에 대한 웨პ티드의 적용은 수용자의 조혈을 증가시키도록 작용할 수 있으며, 따라서 제공된 골수를 자극시켜 조혈 프로제니터 세포(hematopoietic progenitor cell)의 생산을 증가시킴으로써 생착을 높일 수 있다.

### 조혈 세포 이식(Hematopoietic cell transplants)

[0119] 조혈 세포의 이식은 다양한 유전적 질환 또는 악성 질환에 대한 일반적인 치료이다. 일부 이식 과정이 전체 골수 집단을 이용하는 반면에, 다른 과정은 줄기 세포가 농축된 좀더 한정된 집단을 이용한다. 골수에 더하여, 이러한 세포는 말초 혈액 및 신생아 제대혈(neonatal umbilical cord blood)과 같은 다른 근원으로부터 유래할 수 있다. 말초 혈액으로부터의 줄기 세포를 이용하는 이점의 하나는 이러한 세포가 골수에서보다 말초 혈액에서 좀더 용이하게 입수된다는 것이다. 그러나, 말초 혈액 줄기 세포 이식에 대한 제한 인자(limiting factor)

는 순환 만능 줄기/프로제니터 세포(circulating pluripotent stem/progenitor cells)의 낮은 수이다. 따라서, 이식에 이용되는 생체 외(*ex vivo*) 줄기 세포를 확장할 필요가 있다.

[0120] 따라서, 본 발명은 배양물에서 조혈 세포를 확장하는 방법을 제공한다. 예시적인 실시예에서, 그러한 방법은 본 발명의 웨티드의 유효량을 조혈 세포의 배양물에 투여하는 것을 포함한다. 예시적인 실시예에서, 그와 같은 웨티드는 G-CSF 웨티드와 폴리머 변형기 간의 콘주게이트일 것이다. 일 실시예에서, 폴리머 변형기는 바람직하게는 무순상 글리코실 결합기를 통하여, G-CSF 웨티드의 글리코실 또는 아미노산 잔기에서 G-CSF 웨티드에 공유적으로 부착될 수 있는 수용성 폴리머이다. 일 실시예에서, 본 발명은 이식에 이용될 수 있는 줄기 세포의 확장된 집단 및 프로제니터 세포를 제공하는 방법을 제공한다. 이 방법은 줄기 세포의 배양물에 본 발명의 웨티드의 유효량을 투여하는 단계를 포함한다.

### [0121] 기관 이식(Organ transplants)

[0122] 골수 이식과 유사하게, 간, 신장, 심장 및 폐와 같은 고형 기관 이식물은 수용자의 다양한 면역 반응을 유발할 수 있다. 그러한 면역 반응은 이 이식 조직(grafts)의 급성 거부 반응을 야기할 수 있다. G-CSF 및 다른 조혈 성장 인자(hematopoietic growth factors)는 이와 같은 반응을 치료하는데 이용될 수 있다 (미국특허 제 5,718,893호). 따라서, 본 발명의 방법 및 조성물은 환자의 기관 이식의 급성 거부 반응의 발생을 예방 또는 감소시키는데 이용될 수 있다.

### [0123] 심장병(Heart disease)

[0124] 일 실시예에서, 본 발명의 방법 및 조성물은 심장병을 완화하고, 심장 기능을 향상시키는데 이용될 수 있다. 일 실시예에서, 본 발명의 방법 및 조성물은 혈관-형성(blood vessel-forming) 줄기 세포의 방출을 자극하는데 이용된다. G-CSF에 의한 치료는 다중 수술을 겪은 환자 및 종래 의약의 최대 용량을 투여받았던 환자를 포함하는, 심장병 환자의 안기나(angina)를 감소시킬 수 있다(예를 들어, *Medical News Today*, June 4, 2007, "Severe Heart Disease Patients Offered New Hope" 참조). 다른 연구는 G-CSF가 심장 근육을 구하고 보호하여, 근육이 심장병에 의하여 손상되는 경우에서도 이러한 근육이 죽는 것을 예방할 수 있음을 나타내었다(예를 들어, *Sunday Telegraph News*, August 5, 2007, "Our World-first hearts that Repair Themselves" 참조). G-CSF 단독 또는 환자로부터의 성체 줄기 세포와의 결합은 심장의 죽은 조직을 회복시키고, 새로운 혈관을 생성하기 위한 치료로서 이용될 수 있다.

### [0125] 신경 질환(Neurological disease)

[0126] 일 실시예에서, 본 발명의 방법 및 조성물은 알츠하이머병 및 다른 퇴화성 뇌 장애를 포함하며, 이에 한정되는 것은 아닌 신경 질환을 치료하는데 이용될 수 있다. 알츠하이머병의 쥐 모델에서의 연구는 G-CSF가 이러한 모델에서의 알츠하이머-유사 증상을 역전시킬 수 있음을 나타내었다(Tsai et al., (2007), *J. Exp. Med.* 204(6): 1273-80 참조). 이러한 연구는 혈류로의 G-CSF의 주입이 골수로부터의 조혈 줄기 세포(hematopoietic stem cell)의 방출을 촉진시키는 것을 나타낸다. 이러한 줄기세포는 혈류로부터 뇌로 이동되며, 여기에서 줄기세포는 손상 자리에 부착하여 새로운 세포로 분화되어진다. G-CSF의 적용은 뉴런 손상이 가장 큰 경우에 새로운 세포를 성장시키게 된다.

### [0127] G-CSF 콘주게이트

[0128] 전술한 임의의 방법에 따르면, 웨티드는 G-CSF 웨티드와 폴리머 변형기 간의 공유 콘주게이트(covalent conjugate)이다. 폴리머 변형기는 바람직하게는 글리코실 결합기를 통하여, G-CSF 웨티드의 글리코실 또는 아미노산 잔기에서 G-CSF 웨티드에 공유적으로 부착될 수 있다. 일 실시예에서, 글리코실 결합기는 무순상 글리코실 결합기이다. 바람직한 실시예에서, 폴리머 변형기 및 글리코실 결합기는 링커(linker)를 통하여 공유적으로 부착된다. 예시적 실시예에서, 폴리머 변형기는 폴리(에틸렌글리콜)과 같은 수용성 폴리머이다.

[0129] G-CSF는 클론화되고, 서열화된다. 예시적 실시예에서, G-CSF는 서열식별번호:1(SEQ ID NO:1)에 따른 아미노산 서열을 갖는다. 당업자는 본 발명이 본 명세서에 기재된 서열에 한정되지 않음을 쉽게 인식할 것이다.

[0130]

본 발명은 당업계에 공지된 G-CSF 변이체(variants)를 더 포함한다. 예로서, 그러나 본 발명을 한정하도록 의도되지 않게, G-CSF 변이체가 미국특허 제6,166,183에 기재되어 있으며, 여기에서 라이신 잔기의 천연 보충물(natural complement)을 포함하고, 1 또는 2개의 폴리에틸렌글리콜 분자에 더 결합된 G-CSF가 기재되어 있다. 또한, 미국특허 제6,004,548호, 제5,580,755호, 제5,582,823호, 및 제5,676,941호는 17, 36, 42, 64, 및 74 위치에서 시스테인 잔기의 일 이상이 알라닌 또는 양자택일로 세린에 의하여 대체된 G-CSF 변이체를 기재한다. 미국특허 제5,416,195호는 17 위치의 시스테인, 27 위치의 아스파르트산 및 65 및 66 위치의 세린이 각각 세린, 세린, 프롤린 및 프롤린으로 치환된 G-CSF 분자를 기재한다. 다른 변이체들이 당업계에 공지되어 있으며, 예를 들어, 미국특허 제5,399,345호에 기재되어 있다. 다른 변이체는 서열식별번호 3 내지 11(SEQ ID Nos:3-11)로부터 선택되는 아미노산을 갖는다.

[0131]

본 발명의 변형된 G-CSF 분자의 발현 및 활성은 당업계에 공지된 방법, 및 예를 들어 미국특허 제4,810,643호에 기재된 방법에 의하여 분석될 수 있다. 예로서, 활성(activity)은 방사성-표지 티미딘 흡수 분석(radio-labeled thymidine uptake assays)을 이용하여 측정될 수 있다. 간략하게, 건강한 공여자로부터의 인간 골수는 Ficoll-Hypaque(1.077 g/ml, Pharmacia, Piscataway, NJ)로 밀도에 따라 나뉘어지고(density cut), 저밀도 세포는 10% 우태 혈청(fetal bovine serum), 글루타민 및 항생 물질을 함유하는 이스코베 배지(Iscoove's medium)(GIBCO, La Jolla, CA)에 혼탁된다. 약  $2 \times 10^4$  개의 인간 골수 세포가 약 2일 동안, 공기중의 5% CO<sub>2</sub>에서, 약 37°C로, 96-웰 평평한 바닥 플레이트(96-well flat bottom plates)에서 대조군 배지 또는 본 발명의 G-CSF의 어느 하나로 배양된다. 이후, 배양물은 0.5 μCi/웰의 <sup>3</sup>H-티미딘(thymidine)(New England Nuclear, Boston, Mass)과 함께 약 4시간 동안 박동으로 보내지며(pulsed), 흡수(uptake)는 예를 들어, Ventua, et al.(1983, Blood 61:781)에 기재된 바와 같이 측정된다. 대조군 화합물로 처리된 골수 세포와 비교하여, 인간 골수 세포로의 <sup>3</sup>H-티미딘의 결합의 증가는 활성이며 실용적인 G-CSF 화합물을 나타내는 것이다.

[0132]

본 발명의 콘주케이트는 글리코실화 또는 비글리코실화 G-CSF 웨프티드에 대한 변형 당의 효소적 부착(enzymatic attachment)에 의하여 형성된다. G-CSF 웨프티드와 당 위의 변형기 사이에 삽입된 경우의 변형 당은 예를 들어, "무손상 글리코실 결합기"로 나타내어질 수 있는 것이 된다. 글리코실트랜스페라제와 같은 효소의 예민한 선택성을 이용하여, 본 방법은 일 이상의 특정 위치에 원하는 기를 함유하는 웨프티드를 제공한다. 따라서, 본 발명에 따르면, 변형 당은 G-CSF 웨프티드 사슬 상의 선택된 위치에 직접적으로 부착되거나, 또는 변형 당은 글리코웨프티드의 탄수화물 부분 상에 부가된다. 변형 당이 글리코웨프티드 탄수화물에, 및 G-CSF 웨프티드 골격의 아미노산 잔기에 직접적으로 모두 결합된 웨프티드도 본 발명의 범위 이내이다.

[0133]

공지된 화학적 및 효소적 웨프티드 제조 전략과 달리, 실질적으로 균질한 유도체화(derivatization) 패턴을 갖는 웨프티드 및 글리코웨프티드를 만들기 위하여 본 발명의 방법을 이용하는 것이 가능하다; 본 발명에 따라 이용된 효소는 G-CSF 웨프티드의 특정 아미노산 잔기 또는 아미노산 잔기의 결합에 대하여 일반적으로 선택적이다. 이 방법은 변형 웨프티드 및 글리코웨프티드의 대규모 생산을 위하여 적용될 수 있다. 따라서, 본 발명의 방법은 미리 선택된 균일한 유도체화 패턴을 갖는 글리코웨프티드의 대규모 제조를 위한 실용적인 수단을 제공한다. 본 방법은 세포 배양물에서의 세포(예를 들어, 포유류 세포, 곤충 세포, 식물 세포, 진균류 세포, 효모 세포 또는 원핵 생물 세포) 생산 중에 불완전하게 글리코실화되는 글리코웨프티드 또는 유전자 도입 식물 또는 동물을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아닌 치료 웨프티드(therapeutic peptides)의 변형에 특히 매우 적합하다.

[0134]

본 발명은 또한 예를 들어, 면역계 또는 세망내피계(reticuloendothelial system(RES))에 의한 감소된 제거 속도(clearance rate) 또는 감소된 흡수 속도(rate of uptake)에 기인하여 증가된 치료 반감기를 갖는 글리코실화 및 비글리코실화 G-CSF 웨프티드의 콘주케이트를 제공한다. 또한, 본 발명의 방법은 웨프티드 상에서 항원 결정자(antigenic determinants)를 차단함으로써, 웨프티드에 대한 숙주 면역 반응을 감소 또는 제거하는 수단을 제공한다. 표적화제의 선택적 부착이 웨프티드를 특정 표적화제에 대하여 특이적인 특정 조직 또는 세포 표면 수용체에 표적화하기 위하여 이용될 수 있다.

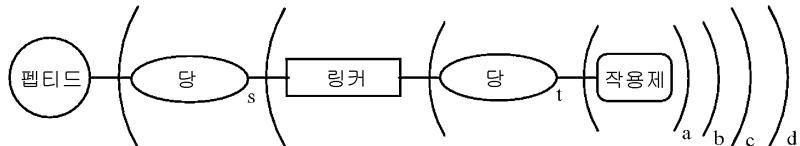
[0135]

일 실시예에서, 본 발명은 선택된 변형기와 G-CSF 웨프티드 간의 콘주케이트를 제공한다. 웨프티드와 변형 부분 간의 결합(link)은 웨프티드와 선택된 부분 사이에 삽입된 글리코실 결합기를 포함한다. 본 명세서에서 논의된 바와 같이, 선택된 변형 부분(selected modifying moiety)은 당류 단위(saccharide unit)에 부착하여, 적합한 트랜스페라제 효소에 의하여 인식되는 "변형 당"이 될 수 있는 본질적으로 임의의 종이며, 트랜스페라제 효소는 변형 당을 웨프티드 또는 그에 부착된 글리코실 잔기 상에 부가시킨다. 웨프티드와 선택된 부분 사이에 삽입된 경우의, 변형 당의 당류 성분은 "글리코실 결합기" 예를 들어, "무손상 글리코실 결합기"가 된다. 글리코실 결합

기는, 변형기에 의한 변형 후에 변형 당을 웨티드의 아미노산 또는 글리코실 잔기에 부가시키는 효소에 대한 기질인 임의의 모노- 또는 올리고-당류로부터 형성된다.

[0136] 글리코실 결합기는 변형기의 첨가 이전에 또는 첨가 중에 분해적으로(degradatively) 변형되는 당류 부분일 수 있거나, 그러한 당류 부분을 포함할 수 있다. 예를 들어, 글리코실 결합기는 예를 들어 메타페리오데이트(metaperiodate)의 작용을 통하여, 무손상 당류의, 상응하는 알데하이드로의 산화적 분해(oxidative degradation)에 의하여 생성되며, 이어서 적합한 아민에 의하여 쉬프 염기로 변환되는 당류 잔기로부터 유래될 수 있으며, 이는 이후 상응하는 아민으로 환원된다.

[0137] 본 발명의 콘주케이트는 하기 일반 구조에 전형적으로 상응할 것이다:



[0138]

[0139] 상기에서, 기호 a, b, c, d 및 s는 양이며, 0이 아닌 정수를 나타내며; t는 0 또는 양의 정수의 어느 하나이다. "작용제(agent)"는 전형적으로 수용성 부분, 예를 들어, PEG 부분이다. 링커는 아래의 광범위하게 나열된 결합기의 임의의 것일 수 있다. 또는, 링커는 단일 결합이거나, 또는 "0차 링커(zero order linker)"일 수 있다.

[0140] 변형기는 본 명세서에서 더 논의되는 바와 같이, 당류 단위에 부착될 수 있는 임의의 종을 포함할 수 있다. 그러한 기는 수용성 및 수불용성 폴리머를 포함하는 폴리머를 포함하며, 치료 부분(therapeutic moieties), 진단 부분(diagnostic moieties), 표적화 부분(targeting moieties), 독소 부분(toxin moieties) 등을 포함할 수 있다. 예시적 실시예에서, 선택된 변형기는 수용성 폴리머, 예를 들어, m-PEG이다. 수용성 폴리머는 G-CSF 웨티드의 아미노산 또는 글리코실 잔기에 공유적으로 부착된 글리코실 결합기를 통하여 G-CSF 웨티드에 공유적으로 부착된다. 본 발명은 아미노산 잔기 및 글리코실 잔기가 글리코실 결합기로 변형된 콘주케이트를 제공한다.

[0141] 본 발명의 웨티드는 적어도 하나의 N- 또는 O-결합된 글리코실화 자리(N- 또는 O-linked glycosylation site)를 포함한다. 효소적으로 부가된 글리코실 결합기를 통하여 형성된 콘주케이트를 제공하는 것에 더하여, 본 발명은 그 치환 패턴이 매우 균질한 콘주케이트를 제공한다. 본 발명의 방법을 이용하여, 본 발명의 콘주케이트의 집단에 걸쳐 본질적으로 모든 변형 당이 구조적으로 동일한 아미노산 또는 글리코실 잔기의 다중 복제물(multiple copies)에 부착되어 있는 웨티드 콘주케이트를 형성하는 것이 가능하다. 따라서, 일 측면에서, 본 발명은 무손상 글리코실 결합기를 통하여 G-CSF 웨티드에 공유적으로 결합된 수용성 폴리머 부분의 집단을 갖는 웨티드 콘주케이트를 제공한다. 본 발명의 콘주케이트의 예시적 실시예에서, 수용성 폴리머 부분의 본질적인 각각의 일원이 글리코실 결합기를 통하여 G-CSF 웨티드의 글리코실 잔기에 결합되며, 글리코실 결합기가 부착된 G-CSF 웨티드의 각각의 글리코실 잔기는 동일한 구조를 갖는다.

[0142] 또한, 글리코실 결합기를 통하여 공유적으로 결합된 수용성 폴리머 부분의 집단을 갖는 웨티드 콘주케이트가 제공된다. 일 실시예에서, 수용성 폴리머 부분의 집단의 본질적인 모든 일원이 글리코실 결합기를 통하여 G-CSF 웨티드의 아미노산 잔기에 결합되며, 그에 부착된 글리코실 결합기를 갖는 각각의 아미노산 잔기는 동일한 구조를 갖는다.

[0143] 본 발명은 또한 무손상 글리코실 결합기를 통하여 G-CSF 웨티드가 치료 부분, 진단 부분, 표적화 부분, 독소 부분 등에 콘주케이트된, 전술한 것에 유사한 콘주케이트를 제공한다. 전술한 부분들의 각각은 소형 문자, 천연 폴리머(예를 들어, 폴리펩티드) 또는 합성 폴리머일 수 있다.

#### 변형 당(Modified sugars)

[0144] 본 발명은 변형 당, 변형 당 뉴클레오티드 및 변형 당의 콘주케이트를 제공한다. 본 발명의 변형 당에서, 당 부분은 바람직하게는 당류(saccharide), 테옥시-당(deoxy-saccharide), 아미노-당(amino-saccharide), 또는 N-아실 당(N-acyl saccharide)이다. 용어 "당류(saccharide)" 및 그의 균등물인, "당류의(saccharyl)", "당(sugar)" 및 "글리코실(glycosyl)"은 모노머, 다이머, 올리고머 및 폴리머를 나타낸다. 당 부분은 또한 변형기로 기능화된다. 변형기는 당 위의 아민, 설프하이드릴 또는 하이드록실, 예를 들어 일차 하이드록실 부분에 의한 콘주케이션을 통하여 전형적으로, 당 부분에 콘주케이트된다. 예시적 실시예에서, 변형기는 당 위의 아민

부분을 통하여, 예를 들어, 아민과, 변형기의 반응성 유도체의 반응을 통하여 형성되는 아미드, 우레탄 또는 우레아를 통하여 부착된다.

[0146] 임의의 당이 본 발명의 콘주게이트의 당 코어로서 이용될 수 있다. 본 발명의 조성물 형성에 유용한 예시적 당 코어는 글루코오스, 갈락토오스, 만노스, 푸코오스 및 시알산을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 다른 유용한 당은 글루코사민, 갈락토사민, 만노사민, 시알산의 5-아민 유사체 등과 같은 아미노 당(amino sugars)을 포함한다. 당 코어는 천연에서 발견되는 구조일 수 있거나, 또는 변형기를 콘주게이트하기 위한 자리를 제공하도록 변형될 수 있다. 예를 들어, 일 실시예에서, 본 발명은 9-하이드록시 부분이 아민으로 대체된 시알산 유도체를 포함하는 웨티드 콘주게이트를 제공한다. 아민은 선택된 변형기의 활성화 유사체에 의하여 쉽게 유도체화된다.

[0147]

#### 글리코실 결합기

[0149]

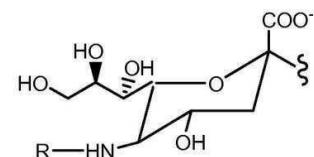
전술한 임의의 방법의 웨티드 콘주게이트에 따르면, 웨티드 콘주게이트의 일부 실시예는 시알산 잔기인 글리코실 결합기를 포함한다.

[0150]

G-CSF 웨티드와, 수용성 폴리머와 같은 선택된 부분의 결합(link)은 웨티드와 선택된 부분 사이에 삽입된 무손상 글리코실 결합기를 포함한다. 본 명세서에 논의된 바와 같이, 선택된 부분은 당류 단위에 부착되어, 적합한 트랜스페라제 효소에 의하여 인지되는 "변형 당"이 될 수 있는 본질적으로 임의의 종이며, 트랜스페라제 효소는 변형 당을 G-CSF 웨티드 상에 부가시킨다. G-CSF 웨티드와 선택된 부분 사이에 삽입되는 경우의 변형 당의 당류 성분은 "무손상 글리코실 결합기"가 된다. 글리코실 결합기는 선택된 부분에 의한 변형 후, 적합한 트랜스페라제에 의한 기질인 임의의 모노- 또는 올리고-당류로부터 형성된다.

[0151]

일 실시예에서, 글리코실 결합기는 하기 구조:



[0152]

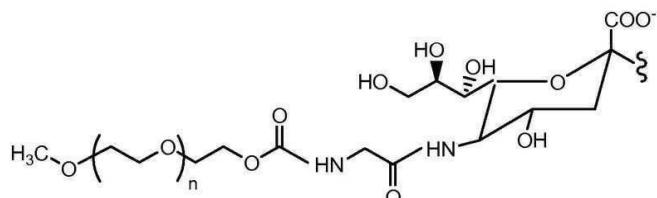
를 갖는 시알산 잔기이며,

[0154]

상기에서, R은 수용성 폴리머이며, 상기 수용성 폴리머는 상기 링커를 통하여 시알산 잔기에 부착된다.

[0155]

다른 실시예에서, 글리코실 결합기는 하기 구조:



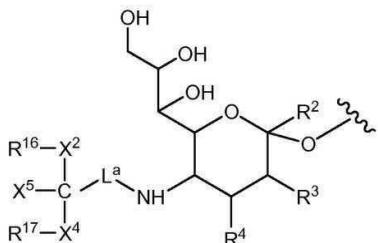
[0156]

를 갖는 시알산 잔기이며,

[0158]

상기에서, n은 1 내지 2000의 정수이다.

[0159] 또 다른 실시예에서, 글리코실 결합기는 하기 구조:



[0160]

[0161] 를 갖는 변형 시알릴 잔기(modified sialyl residue)를 포함하며,

[0162] 상기에서,

[0163] R<sup>2</sup>는 H, CH<sub>2</sub>OR<sup>7</sup>, COOR<sup>7</sup> 또는 OR<sup>7</sup>이며,

[0164] 여기에서,

[0165] R<sup>7</sup>은 H, 치환 또는 비치환 알킬 또는 치환 또는 비치환 헤테로알킬;

[0166] R<sup>3</sup> 및 R<sup>4</sup>는 H, 치환 또는 비치환 알킬, OR<sup>8</sup>, NHC(O)R<sup>9</sup>로부터 독립적으로 선택되는 일원이며,

[0167] 여기에서,

[0168] R<sup>8</sup> 및 R<sup>9</sup>는 H, 치환 또는 비치환 알킬, 치환 또는 비치환 헤�테로알킬 또는 시알산으로부터 독립적으로 선택되며;

[0169] L<sup>a</sup>는 결합(bond), 치환 또는 비치환 알킬 및 치환 또는 비치환 헤�테로알킬로부터 선택된 링커이며;

[0170] R<sup>16</sup> 및 R<sup>17</sup>는 폴리머 암(arms)으로부터 독립적으로 선택되며;

[0171] X<sup>2</sup> 및 X<sup>4</sup>는 폴리머 부분 R<sup>16</sup> 및 R<sup>17</sup>를 C에 결합시키는 독립적으로 선택된 결합 단편(linkage fragments)이며; 및

[0172] X<sup>5</sup>은 비]-반응성기이다.

[0173] 다른 실시예에서, 아미노산 잔기는 세린 또는 트레오닌으로부터 선택되는 일원이다. 또 다른 실시예에서, 아미노산 잔기는 서열식별번호:1(SEQ. ID. NO:1)의 133 위치에서 트레오닌이다.

[0174] 일 실시예에서, 글리코실 결합기는 하기:



[0175]

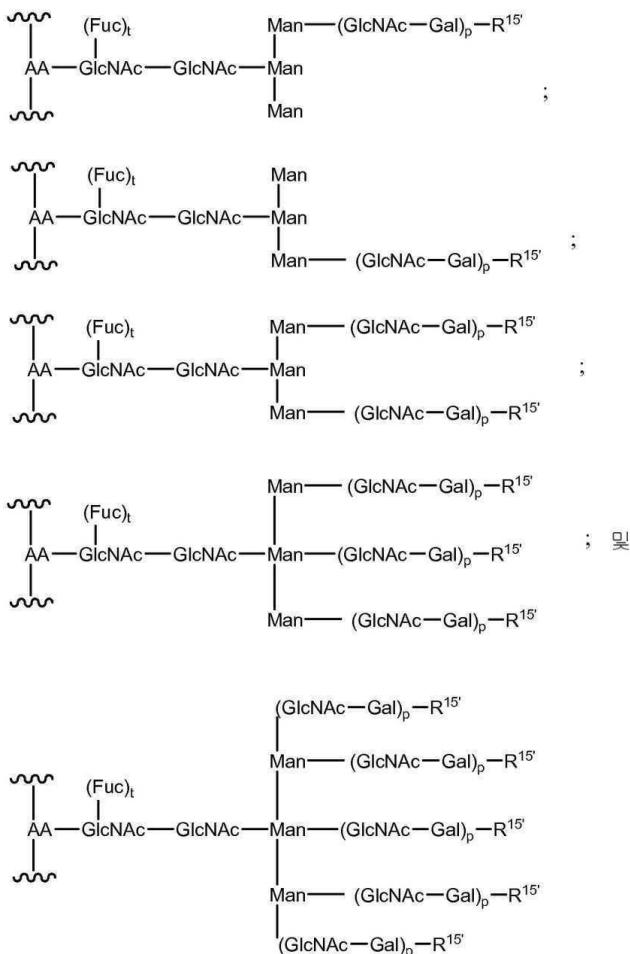
[0176]로부터 선택되는 구조를 포함하며,

[0177] 상기에서,

[0178] R<sup>15</sup>는 변형 시알릴 잔기; 및

[0179] p는 1 내지 10의 정수이다.

[0180] 다른 실시예에서, 글리코실 결합기는 하기:



[0181]

[0182]로부터 선택되는 화학식을 가지며,

[0183]상기에서,

[0184]AA는 상기 웨티드의 아미노산 잔기;

[0185]t는 0 또는 1과 동일한 정수;

[0186]p는 1 내지 10의 정수; 및

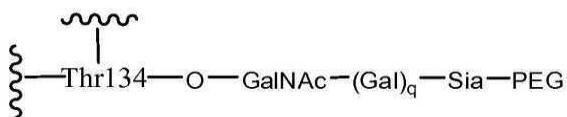
[0187] $R^{15'}$ 는 H, OH, 시알산, 상기 변형 시알릴 잔기 및  $Sia-Sia^p$ 로부터 선택되는 일원이며,

[0188]여기에서,

[0189] $Sia^p$ 는 상기 변형 시알릴 잔기이며,

[0190]여기에서, 적어도 하나의  $R^{15'}$ 는 상기 변형 시알릴 잔기 및  $Sia-Sia^p$ 로부터 선택된다. 일 실시예에서, 아미노산 잔기는 아스파라긴 잔기이다.

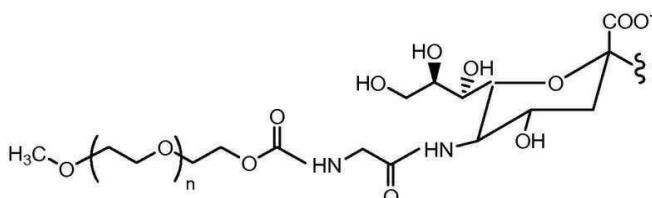
[0191] 다른 실시예에서, 상기 G-CSF 웨티드는 하기 화학식:



[0192]

[0193] 예 따른 구조를 포함하며,

[0194] 상기에서, q는 0 또는 1; 및 Sia-PEG는 하기 화학식:



[0195]

[0196] 예 따른 구조를 가지며,

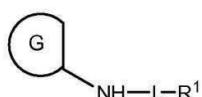
[0197] 상기에서, n은 정수 1 내지 2000의 정수이다. 다른 실시예에서, n은 400 내지 500의 정수이다. 또 다른 실시

예에서, G-CSF 웨티드는 서열식별번호:1(SEQ ID NO:1)의 아미노산 서열을 가진다.

[0198]

후술하는 논의에서, 본 발명은 시알산의 선택된 유도체의 이용을 참조하여 설명된다. 당업자는 논의의 초점이 설명의 명확성을 위한 것이며, 설명된 구조 및 조성물은 당류 군, 변형 당류 군, 활성화 변형 당류 군 및 변형 당류 군의 콘주케이트의 종류에 걸쳐 일반적으로 적용된다는 것을 인식할 것이다.

[0199] 예시적 실시예에서, 본 발명은 하기 화학식:



[0200]

[0201] 를 갖는 변형 당 아민을 포함하는 웨티드 콘주케이트를 제공하며,

[0202] 상기에서,

[0203] G는 글리코실 부분, L은 결합 또는 링커, 및 R<sup>1</sup>은 변형기이다. 예시적인 결합은 글리코실 부분 상의 NH<sub>2</sub>와 변형기 상의 상보적 반응성 기(group of complementary reactivity) 간에 형성되는 것이다. 따라서, 예시적인 결합은 NHR<sup>1</sup>, OR<sup>1</sup>, SR<sup>1</sup> 등을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 예를 들어, R<sup>1</sup>이 카르복실산 부분을 포함하는 경우, 이 부분은 활성화되어 글리코실 잔기 상의 NH<sub>2</sub> 부분과 결합되어, 구조 NHC(O)R<sup>1</sup>를 갖는 결합을 제공할 수 있다. 유사하게, OH 및 SH 기는 각각 상응하는 에테르 또는 티오에테르 유도체로 변환될 수 있다.

[0204] 예시적인 링커는 알킬 및 헤테로알킬 부분을 포함한다. 링커는 결합기, 예를 들어, 아실-기반 결합기, 예를 들어, -C(O)NH-, -OC(O)NH- 등을 포함한다. 결합기는 본 발명의 종의 성분들 간에, 예를 들어 글리코실 부분과 링커(L) 간에, 또는 링커와 변형기(R<sup>1</sup>) 간에 형성된 결합이다. 다른 결합기는 에테르, 티오에테르 및 아민이다. 예를 들어, 일 실시예에서, 링커는 글리신 잔기와 같은 아미노산 잔기이다. 글리신의 카르복실산 부분은 글리코실 잔기 상의 아민과의 반응에 의하여 상응하는 아미드로 변환되며, 글리신의 아민은 변형기의 활성화 카르복실산 또는 카보네이트와의 반응에 의하여 상응하는 아미드 또는 우레탄으로 변환된다.

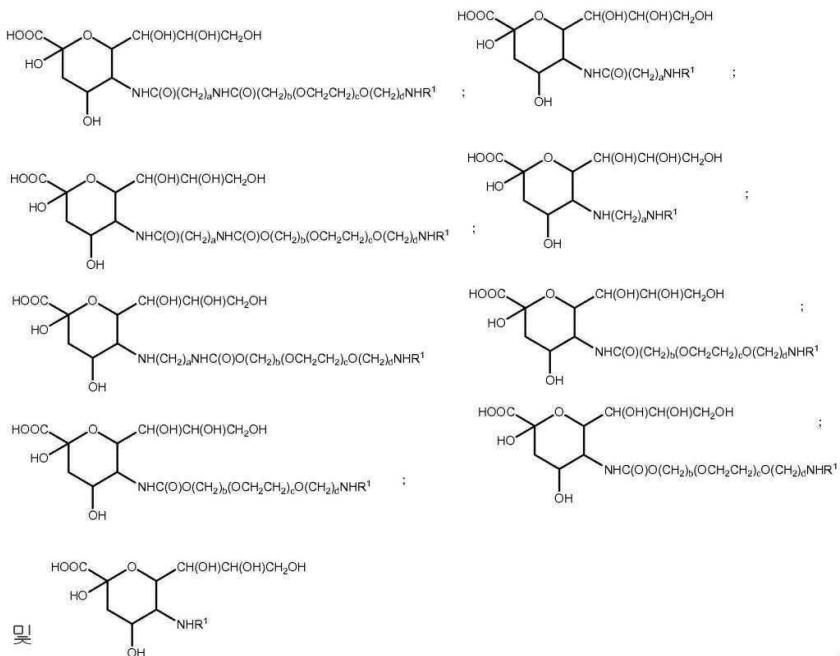
[0205] 다른 예시적인 링커는 PEG 부분, 또는 아미노산 잔기로 기능화되는 PEG 부분이다. PEG는 하나의 PEG 말단에서 아미노산 잔기를 통하여 글리코실기에 결합되며, 다른 PEG 말단을 통하여 R<sup>1</sup>에 결합된다. 또는, 아미노산 잔기는 R<sup>1</sup>에 결합되며, 아미노산에 결합되지 않은 PEG 말단은 글리코실기에 결합된다.

[0206]  $\text{NH-L-R}^1$ 에 대한 예시적인 좋은 하기 구조:

[0207]  $-\text{NH}\{\text{C(O)(CH}_2\}_a\text{NH}\}_s\{\text{C(O)(CH}_2\}_b(\text{OCH}_2\text{CH}_2\}_c\text{O(CH}_2\}_d\text{NH}\}_t\text{R}^1$ 를 가지며, 여기에서 지수 s 및 t는 독립적으로 0 또는 1이 다. 지수 a, b 및 d는 독립적으로 0 내지 20의 정수이며, c는 1 내지 2500의 정수이다. 다른 유사한 링커는  $-\text{NH}$  부분이 예를 들어,  $-\text{S}$ ,  $-\text{O}$  및  $-\text{CH}_2$ 로 대체된다.

[0208] 특히, 본 발명은  $\text{NH-L-R}^1$ 의 하기:  
 $\text{NHC(O)(CH}_2\}_a\text{NHC(O)(CH}_2\}_b(\text{OCH}_2\text{CH}_2\}_c\text{O(CH}_2\}_d\text{NHR}^1$ ,  
 $\text{NHC(O)(CH}_2\}_b(\text{OCH}_2\text{CH}_2\}_c\text{O(CH}_2\}_d\text{NHR}^1$ ,  
 $\text{NH}(\text{CH}_2\}_a\text{NHC(O)(CH}_2\}_b(\text{OCH}_2\text{CH}_2\}_c\text{O(CH}_2\}_d\text{NHR}^1$ ,  $\text{NHC(O)(CH}_2\}_a\text{NHR}^1$ ,  $\text{NH}(\text{CH}_2\}_a\text{NHR}^1$ , 및  $\text{NHR}^1$ 인 화합물을 포함하는 웨티드 콘주게이트를 제공한다. 이 화학식들에서, 지수 a, b 및 d는 0 내지 20, 바람직하게는 1 내지 5의 정수로부터 독립적으로 선택된다. 지수 c는 1 내지 2500의 정수이다.

[0209] 예시적 실시예에서, G는 시알산이며, 및 본 발명의 선택된 화합물은 하기 화학식:

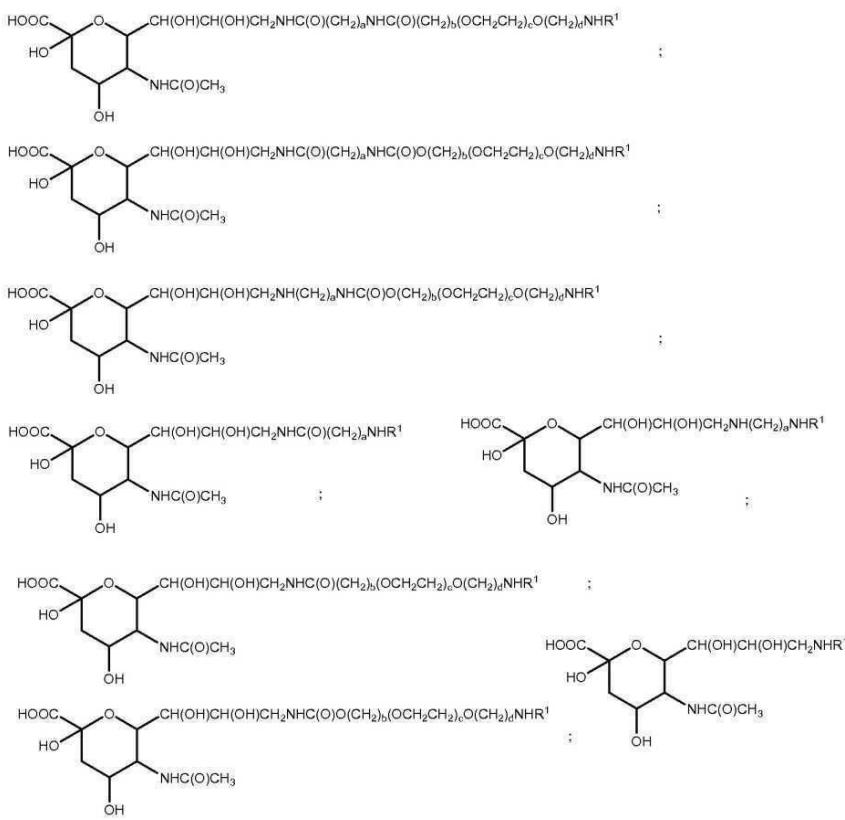


[0210]

[0211] 를 갖는다.

[0212] 당업자가 인지하는 바와 같이, 상기 예시적 화합물에서 시알산 부분은 글루코사민, 갈락토사민, 만노사민, 그들의 N-아세틸 유도체 등을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아닌 임의의 다른 아미노-당류로 대체될 수 있다.

[0213] 다른 예시적 실시예에서, 당의 일차 하이드록실 부분(primary hydroxyl moiety)은 변형기로 기능화된다. 예를 들어, 시알산의 9-하이드록실은 상응하는 아민으로 변환되어 본 발명에 따른 화합물로 기능화될 수 있다. 이 실시예에 따른 화학식은 하기:

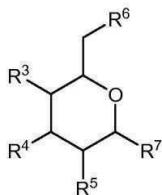


[0214]

를 포함한다.

[0215]

다른 예시적 실시예에서, 본 발명은 6-하이드록실 위치가 상응하는 아민 부분으로 변환된 변형 당을 포함하는 태피드 콘주게이트를 제공하며, 이는 전술한 바와 같은 링커-변형기 카세트(linker-modifying group cassette)를 포함한다. 이 변형 당의 코어로서 이용될 수 있는 예시적인 당류 기(saccharyl groups)는 Gal, GalNAc, Glc, GlcNAc, Fuc, Xyl, Man 등을 포함한다. 본 실시예에 따른 대표적인 변형 당은 하기 화학식:



[0217]

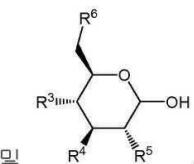
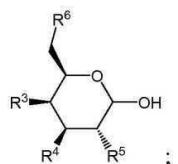
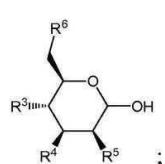
를 가지며,

[0218]

상기에서,  $R^3-R^5$  및  $R^7$ 은 전술한 바와 같이, H, OH, C(O)CH<sub>3</sub>, NH, 및 NH C(O)CH<sub>3</sub>로부터 독립적으로 선택되는 일원이다.  $R^6$ 은 전술한 바와 같은 OR<sup>1</sup>, NHR<sup>1</sup> 또는 NH-L-R<sup>1</sup>으로부터 독립적으로 선택되는 일원이다.

[0220]

본 발명의 선택된 콘주게이트는 만노스, 갈락토오스 또는 글루코오스에 기초하거나, 또는 만노스, 갈락토오스 또는 글루코오스의 입체 화학을 갖는 종에 기초한다. 이러한 콘주게이트의 일반식은 하기:



[0221]

[0222]

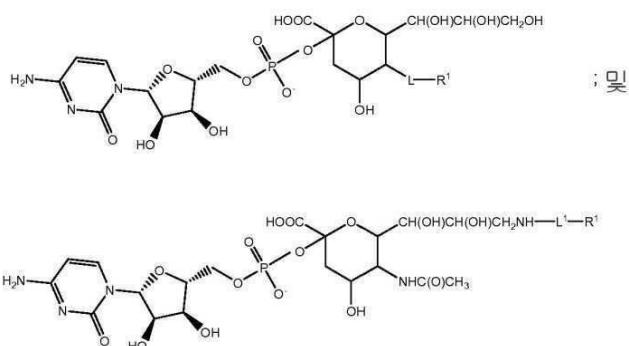
이다.

[0223]

다른 예시적 실시예에서, 본 발명은 상응하는 뉴클레오티드 당(nucleotide sugars)으로서 활성화되는 전술한 바와 같은 화합물을 제공한다. 그들의 변형 형태로 본 발명에 이용되는 예시적인 당 뉴클레오티드는 그의 모노-, 디- 또는 트리포스페리트 또는 그의 유사체를 포함한다. 일 실시예에서, 변형 당 뉴클레오티드는 UDP-글리코시드, CMP-글리코시드, 또는 GDP-글리코시드로부터 선택된다. 더욱 바람직하게는, 변형 당 뉴클레오티드의 당 뉴클레오티드 부분은 UDP-갈락토오스, UDP-갈락토사민, UDP-글루코오스, UDP-글루코사민, GDP-만노스, GDP-푸코오스, CMP-시알산, 또는 CMP-NeuAc로부터 선택된다. 예시적 실시예에서, 뉴클레오티드 포스페이트는 C-1에 부착된다.

[0224]

따라서, 글리코실 부분이 시알산인 예시적 실시예에서, 본 발명은 하기 화학식:



[0225]

[0226]

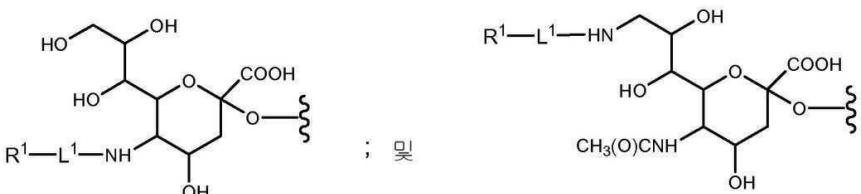
를 갖는 화합물을 이용하여 형성되는 콘주게이트를 제공하며,

[0227]

상기에서,  $L-R^1$ 은 전술한 바와 같으며, 및  $L^1-R^1$ 은 변형기에 결합된 링커를 나타낸다.  $L$ 과 같이,  $L^1$ 에 따른 예시적인 링커 종은 결합, 알킬 또는 헤테로알킬 부분을 포함한다.

[0228]

다른 예시적 실시예에서, 본 발명은 본 발명의 변형 당과, 기질, 예를 들어 웨티드, 지질, 아글리콘(aglycone) 등 간에 형성된 콘주게이트, 특히 변형 당과, 글리코웨티드 또는 글리코리피드의 글리코실 잔기 간에 형성된 콘주게이트를 제공한다. 이 실시예에서, 변형 당의 당 부분은 기질과 변형기 간에 삽입된 글리코실 결합기가 된다. 예시적인 글리코실 결합기는 글리코실 부분 또는 결합기를 형성하는 부분이 화학적(예를 들어, 소듐 메타페리오데이트) 또는 효소적 과정(예를 들어, 옥시다아제)에 의하여 분해되지 않는, 무손상 글리코실 결합기이다. 본 발명의 선택된 콘주게이트는 아미노-당류(amino-saccharide), 예를 들어, 만노사민, 글루코사민, 갈락토사민, 시알산 등의 아민 부분에 부착되는 변형기를 포함한다. 이러한 기조에 따른 예시적인 변형기-무손상 글리코실 결합기 카세트(cassette)는 하기 화학식:



[0229]

[0230]

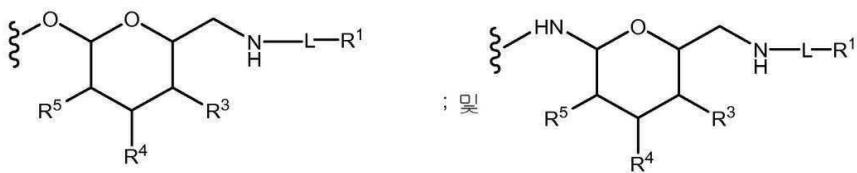
을 갖는 것과 같은, 시알산 구조에 근거하며,

[0231]

상기에서,  $R^1$ ,  $L^1$  및  $L^2$ 은 전술한 바와 같다.

[0232]

또 다른 예시적 실시예에서, 콘주게이트는 기질과, 변형기가 당류 부분의 6-탄소 위치에서 링커를 통하여 부착된 당류 부분의 1-위치 간에 형성된다. 따라서, 이 실시예에 따른 예시적인 콘주게이트는 하기 화학식:

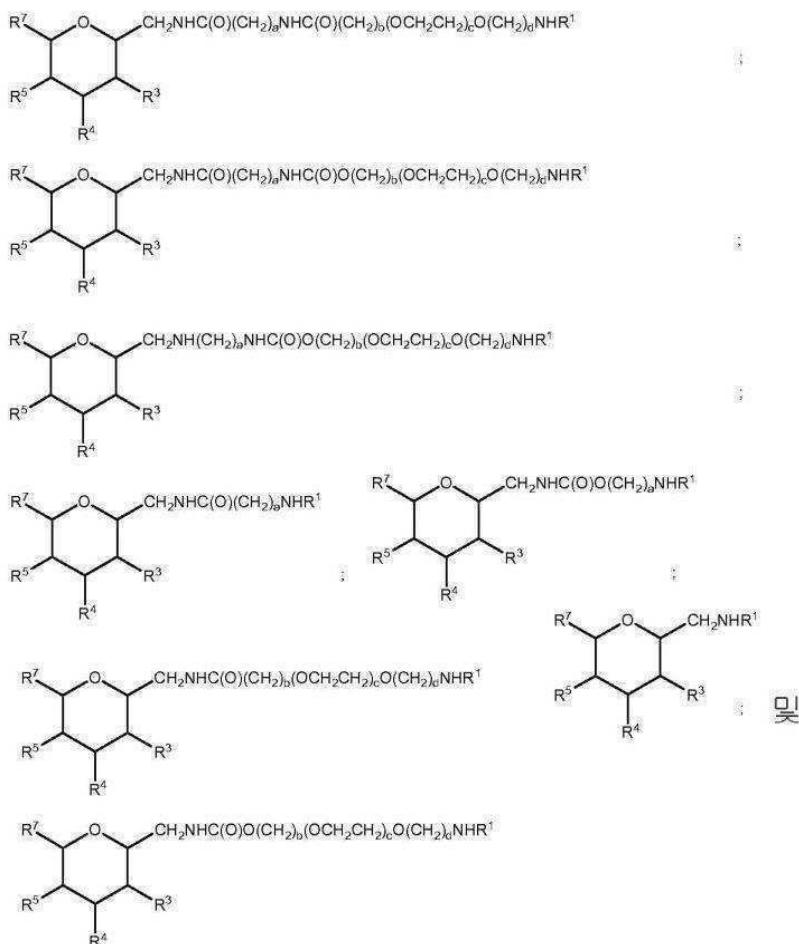


[0233]

를 가지며,

[0234] 상기에서, 라디칼은 전술한 바와 같다. 당업자는 상기 설명된 변형 당류 부분이 2, 3, 4, 또는 5개의 탄소 원자에서 기질에 콘주게이트될 수 있음을 인지할 것이다.

[0235] 본 실시예에 따른 예시적 화합물은 하기 화학식:

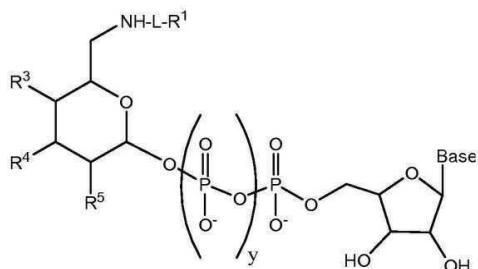


[0236]

[0237] 을 갖는 화합물을 포함하며,

[0238] 상기에서, R기 및 지수는 전술한 바와 같다.

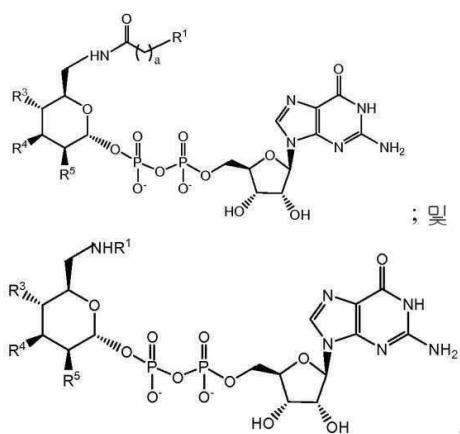
[0239] 본 발명은 또한 6-탄소 위치에서 L-R<sup>1</sup>으로 변형된 당 뉴클레오티드를 제공한다. 본 실시예에 따른 예시적인 종은 하기:



[0241]

를 포함하며, 상기에서, R기 및 L은 전술한 바와 같다. 지수 "y"는 0, 1 또는 2이다.

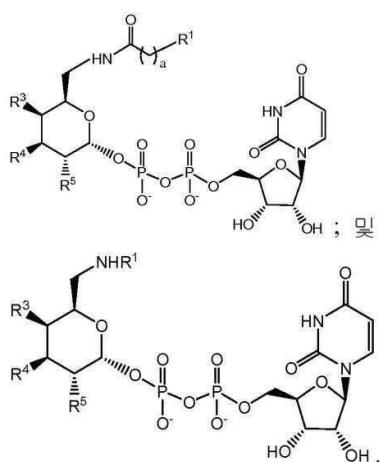
본 발명의 다른 예시적인 뉴클레오티드당(nucleotide sugar)은 GDP 만노스의 입체화학을 갖는 종에 기초한다. 본 실시예에 따른 예시적 종은 하기 구조:



[0244]

를 갖는다.

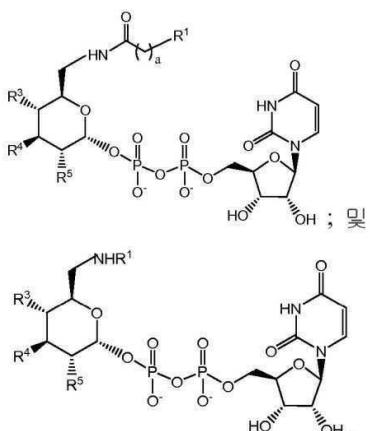
또 다른 예시적인 실시예에서, 본 발명은 UDP 갈락토오스의 입체화학에 기초하는 콘주케이트를 제공한다. 본 실시예에 따른 예시적인 화합물은 하기 구조:



[0247]

를 갖는다.

다른 예시적 실시예에서, 뉴클레오티드당은 글루코오스의 입체화학에 기초한다. 본 실시예에 따른 예시적인 종은 하기 화학식:



[0250]

을 갖는다.

[0252] 변형기 R<sup>1</sup>은 수용성 폴리머, 수불용성 폴리머, 치료제(therapeutic agents), 진단제(diagnostic agents) 등을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아닌 다수의 종의 임의의 것이다. 예시적인 변형기의 성질은 하기에 상세하게 논의된다.

### 수용성 폴리머

[0254] 일부 실시예에서, 본 발명의 G-CSF 콘주게이트의 폴리머 변형기는 수용성 폴리머이다. 이러한 수용성 폴리머는 선형 또는 가지달린 폴리머일 수 있다. 일 실시예에서, 수용성 폴리머는 본질적으로 균질분산(homodisperse)인 분자량 분포를 갖는다.

[0255] 일부 실시예에서, 본 발명의 콘주게이트는 폴리(에틸렌글리콜), 예를 들어, 메톡시-폴리(에틸렌글리콜)인 수용성 폴리머를 포함한다. 본 발명에 이용되는 폴리(에틸렌글리콜)은 특정 형태 또는 분자량 범위로 제한되지 않는다. 가지 없는 폴리(에틸렌글리콜) 분자에 있어서, 분자량은 500 내지 100,000인 것이 바람직하다. 2,000-60,000의 분자량이 바람직하게 이용되며, 약 5,000 내지 약 30,000의 분자량이 더욱 바람직하게 이용된다.

[0256] 다른 실시예에서, 폴리(에틸렌글리콜)은 부착된 일 이상의 PEG 부분을 갖는 가지 달린 PEG이다. 가지 달린 PEGs의 예는 미국특허 제5,932,462호; 미국특허 제5,342,940호; 미국특허 제5,643,575호; 미국특허 제5,919,455호; 미국특허 제6,113,906호; 미국특허 제5,183,660호; 국제공개공보 WO 02/09766; Kodera Y., *Bioconjugate Chemistry* 5: 283-288 (1994); 및 Yamasaki et al., *Agric. Biol. Chem.*, 52: 2125-2127, 1998에 기재되어 있다. 다른 유용한 가지 달린 PEG 구조는 본 명세서에 개시된다.

[0257] 예시적 실시예에서, 가지 달린 PEG의 각각의 폴리(에틸렌글리콜)의 분자량은 약 2,000, 5,000, 10,000, 15,000, 20,000, 40,000 또는 60,000 달톤(Daltons) 이상이다.

[0258] 많은 수용성 폴리머가 당업자에게 공지되어 있으며, 본 발명을 실시하는데 이용된다. 용어 수용성 폴리머는 당류(예를 들어, 텍스트란, 아밀로오스, 히알루론산, 폴리(시알산), 혜파란/heparans), 혜파린/heparins 등); 폴리(아미노산), 예를 들어, 폴리(아스파르트산) 및 폴리(글루탐산); 혁산; 합성 폴리머(예를 들어, 폴리(아크릴산), 폴리(에테르), 예를 들어, 폴리(에틸렌글리콜); 웨티드, 단백질 등과 같은 종을 포함한다. 본 발명은 폴리머가 콘주게이트의 나머지 부분이 부착될 수 있는 지점(point)을 포함하여야 한다는 하나의 제한을 갖는, 임의의 수용성 폴리머에 의하여 실시될 수 있다.

[0259] 폴리머의 활성화 방법은 국제공개공보 WO 94/17039, 미국특허 제5,324,844호, 국제공개공보 WO 94/18247, 국제공개공보 WO 94/04193, 미국특허 제5,219,564호, 미국특허 제5,122,614호, 국제공개공보 WO 90/13540, 미국특허 제5,281,698호, 및 더욱 국제공개공보 WO 93/15189에서 찾을 수 있으며, 활성화 폴리머와 웨티드 간의 콘주게이션에 대하여, 예를 들어, 응고 인자(Coagulation Factor) VIII(WO 94/15625), 혜모글로빈(국제공개공보 WO 94/09027), 산소 운반 분자(미국특허 제4,412,989호), 리보뉴클레아제(ribonuclease) 및 수퍼옥사이드 디스뮤타제(superoxide dismutase)(Veronese et al., *App. Biochem. Biotech.* 11: 141-45 (1985))에서 찾을 수 있다.

[0260] 본 발명의 일 실시예에서, 이용된 수용성 폴리머는 폴리머의 샘플에서 폴리머 분자의 실질적 비율이 거의 동일한 분자량을 갖는 것인 폴리머이다; 그러한 폴리머는 "균질분산(homodisperse)"된다.

[0261] 본 발명은 폴리(에틸렌글리콜) 콘주케이트를 참조로 하여 더 설명된다. PEG의 기능화 및 콘주케이션에 대한 몇몇 리뷰 및 모노그래프가 이용가능하다. 예를 들어, Harris, *Macromol. Chem. Phys.* **C25**: 325-373 (1985); Scouten, *Methods in Enzymology* **135**: 30-65 (1987); Wong *et al.*, *Enzyme Microb. Technol.* **14**: 866-874 (1992); Delgado *et al.*, *Critical Reviews in Therapeutic 약물 Carrier Systems* **9**: 249-304 (1992); Zalipsky, *Bioconjugate Chem.* **6**: 150-165 (1995); 및 Bhadra, *et al.*, *Pharmazie*, **57**: 5-29 (2002) 참조. 반응성 PEG 분자를 제조하고, 반응성 분자를 이용하여 콘주케이트를 형성하는 경로는 당업계에 공지되어 있다. 예를 들어, 미국특허 제5,672,662호는 선형 또는 가지 달린 폴리(알킬렌 옥사이드), 폴리(옥시에틸화 폴리올), 폴리(올레핀 알코올), 및 폴리(아크릴로모르폴린)으로부터 선택된 폴리머 산의 활성 에스테르의 수용성 및 분리 가능한 콘주케이트를 개시한다.

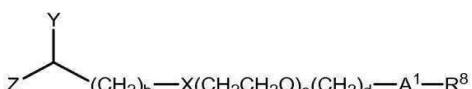
[0262] 미국특허 제6,376,604호는 폴리머의 말단 하이드록실을 유기용매에서 디(1-벤조트리아조일)카보네이트와 반응시킴으로써 수용성 및 비펩티드 폴리머의 수용성 1-벤조트리아졸릴카보네이트 에스테르를 제조하는 방법을 설명한다. 활성 에스테르는 단백질 또는 웨პ티드와 같은 생물학적 활성제와 콘주케이트를 형성하는데 이용된다.

[0263] 국제공개공보 WO 99/45964는 생물학적 활성제 및 안정한 결합을 통하여 폴리머 골격에 결합된 적어도 하나의 말단을 갖는 폴리머 골격을 포함하는 활성화 수용성 폴리머를 포함하는 콘주케이트를 기재하며, 여기에서, 적어도 하나의 말단은 가지 부분(branching moiety)에 결합된 인접하는 반응성 기를 갖는 적어도 하나의 가지 부분을 포함하며, 여기에서, 생물학적 활성제는 적어도 하나의 인접하는 반응성 기에 결합된다. 다른 가지 달린 폴리(에틸렌글리콜)은 국제공개공보 WO 96/21469에 기재되어 있으며, 미국특허 제5,932,462호는 반응성 기능기를 포함하는 가지 달린 말단을 포함하는 가지 달린 PEG 분자에 의하여 형성되는 콘주케이트가 기재되어 있다. 자유 반응기(free reactive groups)는 단백질 또는 웨პ티드와 같은 생물학적 활성 종과 반응하여, 폴리(에틸렌글리콜)과 생물학적 활성 종 간의 콘주케이트를 형성하는데 이용될 수 있다. 미국특허 제5,446,090호는 2기능성 PEG 링커 및 PEG 링커 말단의 각각에 웨პ티드를 갖는 콘주케이트 형성에서의 그의 용도를 기재한다.

[0264] 분해성(degradable) PEG 결합을 포함하는 콘주케이트는 국제공개공보 WO 99/34833; 및 국제공개공보 WO 99/14259, 및 미국특허 제6,348,558호에 기재되어 있다. 그러한 분해성 결합은 본 발명에 적용가능하다.

[0265] 전술한 폴리머 활성에 대하여 기술분야에서 인식된 방법은 본 명세서에 설명된 가지 달린 폴리머 형성에서, 및 이러한 폴리머와 다른 종들, 예를 들어, 당, 당 뉴클레오티드 등과의 콘주케이션에 있어서, 본 발명에 관하여 이용된다.

[0266] 본 발명에 이용되는 예시적인 폴리(에틸렌글리콜) 분자는 하기 구조:



[0267]

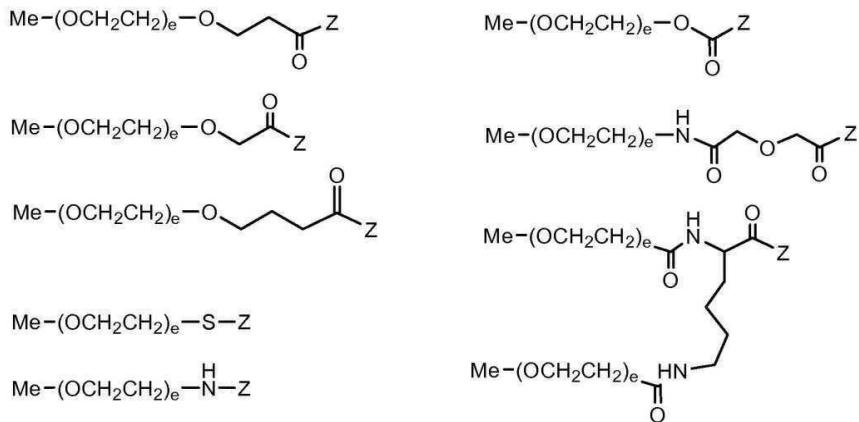
[0268] 를 갖는 것을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니며,

[0269] 상기에서,  $R^8$ 은 H, OH, NH<sub>2</sub>, 치환 또는 비치환 알킬, 치환 또는 비치환 아릴, 치환 또는 비치환 헤테로아릴, 치환 또는 비치환 헤테로시클로알킬, 치환 또는 비치환 헤테로알킬, 예를 들어, 아세탈, OHC-, H<sub>2</sub>N-(CH<sub>2</sub>)<sub>q</sub>-, HS-(CH<sub>2</sub>)<sub>q</sub>, 또는 -(CH<sub>2</sub>)<sub>q</sub>C(Y)Z<sup>1</sup>이다. 지수 "e"는 1 내지 2500의 정수를 나타낸다. 지수 b, d, 및 q는 독립적으로 0 내지 20의 정수를 나타낸다. 기호 Z 및 Z<sup>1</sup>은 독립적으로 OH, NH<sub>2</sub>, 이탈기(leaving groups), 예를 들어, 이미 다졸, p-니트로페닐, HOBT, 테트라졸, 할라이드, S-R<sup>9</sup>, 활성화 에스테르의 알코올 부분; -(CH<sub>2</sub>)<sub>p</sub>C(Y)V, 또는 -(CH<sub>2</sub>)<sub>p</sub>U(CH<sub>2</sub>)<sub>s</sub>C(Y)<sup>1</sup>V를 나타낸다. 기호 Y는 H(2), =O, =S, =N-R<sup>10</sup>를 나타낸다. 기호 X, Y, Y<sup>1</sup>, A<sup>1</sup>, 및 U는 독립적으로 O, S, N-R<sup>11</sup>을 나타낸다. 기호 V는 OH, NH<sub>2</sub>, 할로겐, S-R<sup>12</sup>, 활성화 에스테르의 알코올 성분, 활성화 아미드의 아민 성분, 당-뉴클레오티드, 및 단백질을 나타낸다. 지수 p, q, s 및 v는 0 내지 20의 정수로부터 독립적으로 선택된 일원이다. 기호 R<sup>9</sup>, R<sup>10</sup>, R<sup>11</sup> 및 R<sup>12</sup>는 독립적으로 H, 치환 또는 비치환 알킬, 치환 또는 비

치환 헤테로알킬, 치환 또는 비치환 아릴, 치환 또는 비치환 헤테로시클로알킬 및 치환 또는 비치환 헤테로아릴을 나타낸다.

[0270]

다른 예시적인 실시예에서, 폴리(에틸렌글리콜) 분자는 하기:

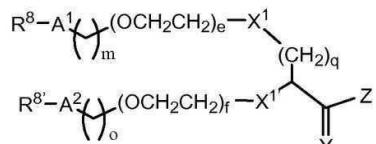


[0271]

로부터 선택된다.

[0272]

본 발명의 콘주게이트를 형성하는데 유용한 폴리(에틸렌글리콜)은 선형 또는 가지 달린 형태의 어느 하나이다. 본 발명에 이용되는데 적합한 가지 달린 폴리(에틸렌글리콜) 분자는 하기 화학식:



[0274]

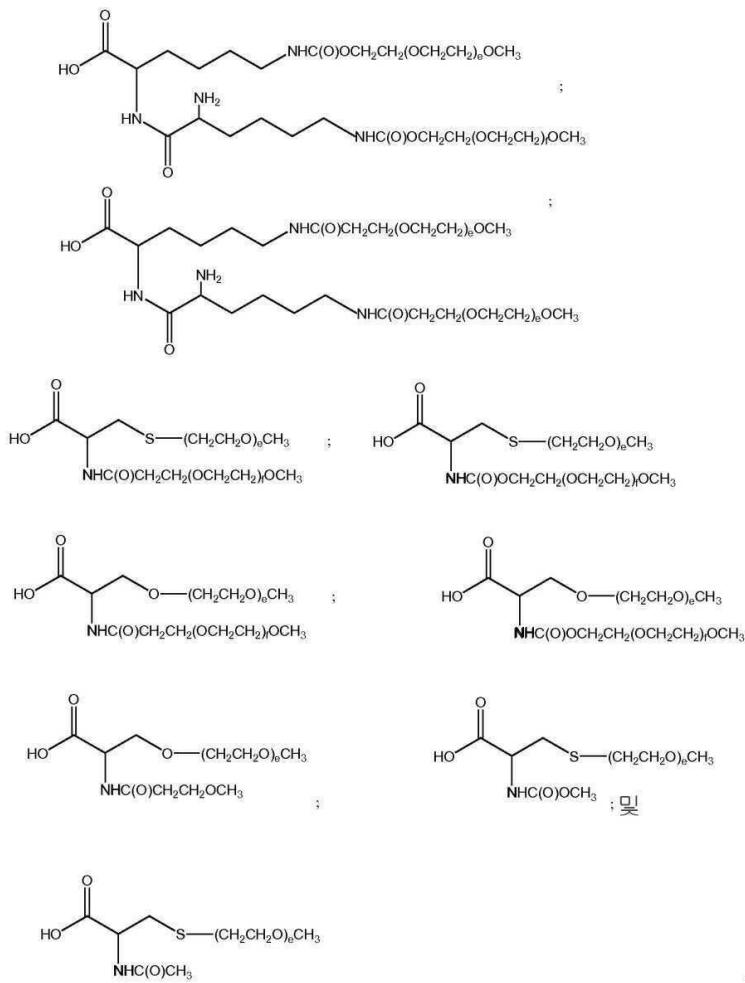
에 의하여 기재되는 것을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니며,

[0276]

상기에서,  $R^8$  및  $R^{8'}$ 은 전술한  $R^8$ 에 대하여 정의된 기로부터 독립적으로 선택되는 일원이다.  $A^1$  및  $A^2$ 은 전술한  $A^1$ 에 대하여 정의된 기로부터 독립적으로 선택된다. 지수  $e$ ,  $f$ ,  $o$ , 및  $q$ 는 전술한 바와 같다.  $Z$  및  $Y$ 는 전술한 바와 같다.  $X^1$  및  $X^{1'}$ 는  $S$ ,  $\text{SC(O)NH}$ ,  $\text{HNC(O)S}$ ,  $\text{SC(O)O}$ ,  $O$ ,  $NH$ ,  $\text{NHC(O)}$ ,  $(O)\text{CNH}$  및  $\text{NHC(O)O}$ ,  $\text{OC(O)NH}$ 로부터 독립적으로 선택되는 일원이다.

[0277]

다른 예시적인 실시예에서, 가지 달린 PEG는 시스테인, 세린 또는 디-라이신 코어(di-lysine core)에 기초한다. 따라서, 다른 예시적인 PEG는 하기:

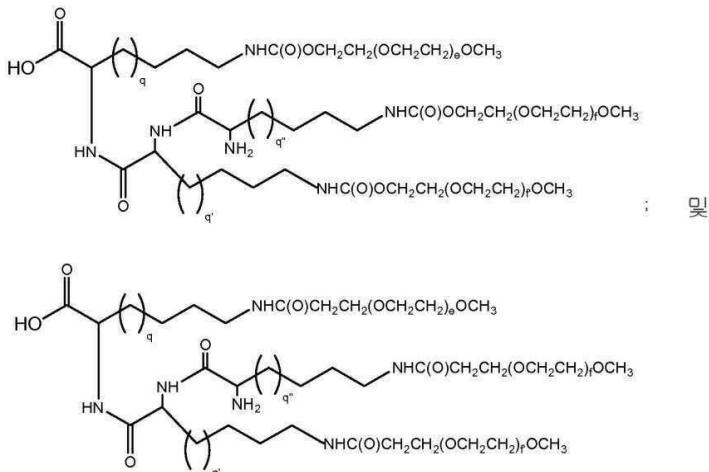


[0278]

를 포함한다..

[0279]

또 다른 실시예에서, 가지 달린 PEG 부부은 트리-라이신 펩티드(tri-lysine peptide)에 기초한다. 트리-라이신은 모노-, 디-, 트리- 또는 테트라-PEG화(mono-, di-, tri-, 또는 tetra-PEG-ylated)될 수 있다. 본 실시예에 따른 예시적인 종은 하기 화학식:



[0281]

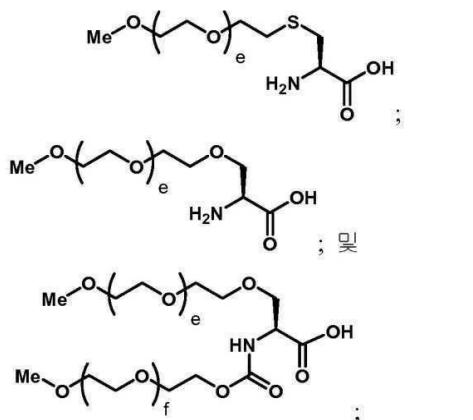
를 가지며,

[0283] 상기에서, e, f 및 f'는 독립적으로 선택된 1 내지 2500의 정수이며; 및 q, q' 및 q"는 독립적으로 선택된 1 내지 20의 정수이다.

[0284] 본 발명의 예시적인 실시예에서, PEG는 m-PEG(5 kD, 10 kD, 또는 20 kD)이다. 예시적인 가지 달린 PEG 종은 m-PEG가 20kD m-PEG인, 세린- 또는 시스테인-(m-PEG)<sub>2</sub>이다.

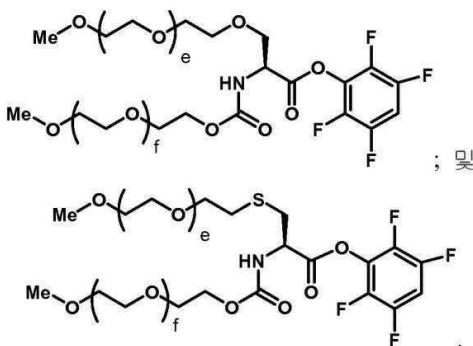
[0285] 당업자에게 명백한 바와 같이, 본 발명에 이용되는 가지 달린 폴리머는 상기 설명된 주제에 대한 다양한 변화를 포함한다. 예를 들어, 상기 나타낸 디-라이신-PEG(di-lysine-PEG) 콤주케이트는 3개의 폴리머 서브유닛(polymeric subunits)을 포함할 수 있으며, 제3 서브유닛은 상기 구조에서 변형되지 않은 것으로 나타낸 -아민에 결합된다. 유사하게, 3 또는 4개의 폴리머 서브유닛으로 기능화된 트리-라이신의 이용도 본 발명의 범위 이내이다.

[0286] 본 발명에 따른 특정 실시예는 하기:



[0287]

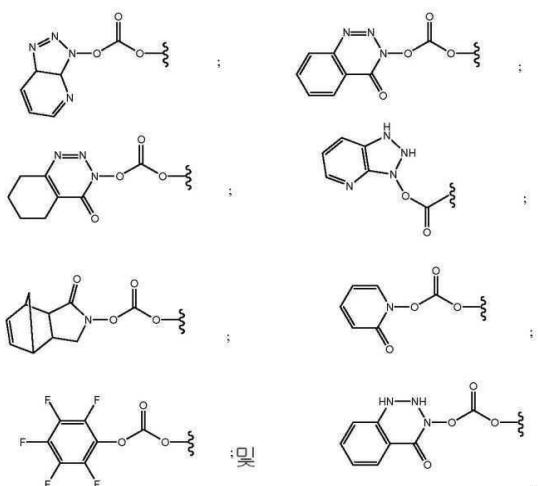
및 하기:



[0289]

[0290] 와 같은 그 종의 카보네이트 및 활성 에스테르를 포함한다.

[0291] 전술한 화합물 제조에 이용되는 선형 PEG를 활성화하는데 적합한, 다른 활성화 기 또는 이탈기는 하기:



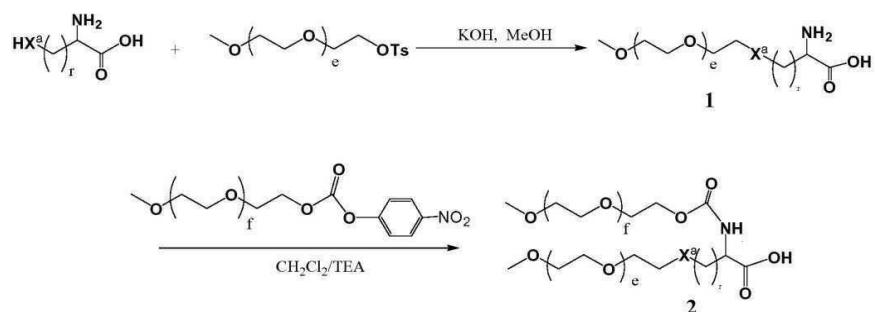
[0292]

[0293] 종을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다..

[0294] 이러한 종 및 다른 종들로 활성화되는 PEG 분자 및 활성화 PEG를 제조하는 방법은 국제공개공보 WO 04/083259에 설명되어 있다.

[0295] 당업자는 가지 달린 폴리머의 일 이상의 m-PEG 팔(arms)이, 상이한 말단, 예를 들어, OH, COOH, NH<sub>2</sub>, C<sub>2</sub>-C<sub>10</sub>-알킬 등을 갖는 PEG 부분에 의하여 대체될 수 있음을 인지할 것이다. 또한, 상기 구조들은 α-탄소 원자와 측쇄의 기능기 사이에 알킬 링커를 삽입함으로써(또는 탄소 원자를 제거함으로써) 쉽게 변형된다. 따라서, "호모(homo)" 유도체 및 고급 동족체(higher homologues), 또한 저급 동족체(lower homologues)는 본 발명에 이용되는 가지 달린 PEGs에 대한 코어(core)의 범위 이내이다.

[0296] 본 명세서에 설명된 가지 달린 PEG 종은 하기 반응식:



[0297]

[0298]에서 설명된 것과 같은 방법에 의하여 쉽게 제조되며,

[0299] 상기에서, X<sup>a</sup>는 O 또는 S이며, r은 1 내지 5의 정수이다. 지수 e 및 f는 독립적으로 선택된 1 내지 2500의 정수이다.

[0300] 따라서, 본 반응식에 따르면, 천연 또는 비천연 아미노산이 활성화 m-PEG 유도체, 이 경우에는 토실레이트(tosylate)와 접촉하여, 측쇄 헤테로원자 X<sup>a</sup>를 알킬화함으로써 1을 형성한다. 모노-기능화(mono-functionalized) m-PEG 아미노산은 반응성 m-PEG 유도체와의 N-아실화 조건에 놓여지며, 이에 의하여 가지 달린 m-PEG 2를 만든다. 당업자가 인지하는 바와 같이, 토실레이트 이탈기는 임의의 적합한 이탈기, 예를 들어, 할로겐, 메실레이트(mesylate), 트리플레이트(triflate) 등으로 대체될 수 있다. 유사하게, 아민을 아실화하는데 이용되는 반응성 카보네이트는 활성 에스테르, 예를 들어, N-하이드록시숙신이미드 등으로 대체될 수 있으며, 또는 산이 디시클로헥실카보이미드, 카르보닐디이미다졸 등과 같은 탈수제를 이용하여 인 시츄(*in situ*)로 활성화될 수 있다.

[0301] 예시적 실시예에서, 변형기는 PEG 부분이나, 임의의 변형기, 예를 들어, 수용성 폴리머, 수불용성 폴리머, 치료부분(therapeutic moiety) 등이 적합한 결합을 통하여 글리코실 부분에 결합될 수 있다. 변형 당은 효소적 수단, 화학적 수단 또는 그 결합에 의하여 형성되며, 이에 의하여 변형 당이 생산된다. 예시적 실시예에서, 당은 변형 부분이 부착되도록 하는, 또한 변형 당을 G-CSF 웨პ티드에 결합시킬 수 있는 효소에 대한 기질로서 당이 기능하도록 하는 임의의 위치에서 활성 아민으로 대체된다. 예시적 실시예에서, 갈락토사민이 변형 당인 경우, 아민 부분은 6-위치에서 탄소 원자에 부착된다.

[0302] 치료적 글리웹티드의 생체 내(*in vivo*) 반감기는 폴리에틸렌글리콜(PEG)과 같은 PEG 부분에 의하여 향상될 수 있다. 예를 들어, PEG에 의한 단백질의 화학적 변형(폐길화)은 그들의 분자 크기를 증가시키고, 그들의 표면- 및 기능기-접근성을 감소시키며, 이를 각각은 단백질에 부착된 PEG의 크기에 의존한다. 이는 혈장 반감기 및 단백질 가수분해-안정성(proteolytic-stability)의 향상, 및 면역원(immunogenicity) 및 간 흡수의 감소에 이르게 된다(Chaffee *et al.* *J. Clin. Invest.* **89**: 1643-1651 (1992); Pyatak *et al.* *Res. Commun. Chem. Pathol Pharmacol.* **29**: 113-127 (1980)). 인터류킨-2(interleukin-2)의 폐길화(PEGylation)는 그의 생체 내 (*in vivo*) 항종양 효능(antitumor potency)을 증가시키는 것으로 보고되었고(Katre *et al.* *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**: 1487-1491 (1987)), 단일 클론 항체 A7로부터 유래된 F(ab')2의 폐길화는 향상된 종양 국재성(localization)을 갖는 것으로 보고되었다(Kitamura *et al.* *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **28**: 1387-1394 (1990)). 따라서, 다른 실시예에서, 본 발명의 방법에 의하여 PEG 부분으로 유도체화된 웨პ티드의 생체 내(*in vivo*) 반감기는 비-유도체화된 웨პ티드의 생체 내 반감기에 대하여 증가되었다.

[0303] 웨პ티드 생체 내 반감기의 증가는 이 양의 퍼센트 증가(percent increase)의 범위로 가장 잘 표현된다. 퍼센트 증가의 범위의 하한은 약 40%, 약 60%, 약 80%, 약 100%, 약 150% 또는 약 200%이다. 상기 범위의 상한은 약 60%, 약 80%, 약 100%, 약 150%이거나, 또는 약 250%를 넘는다.

[0304]

#### G-CSF 웨პ티드

[0306] 임의의 서열을 갖는, 본질적으로 임의의 과립구 콜로니 자극 인자 웨პ티드 또는 작용제(agent)는 본 발명의 콘주케이트의 웨პ티드 성분으로서 이용된다. 과립구 콜로니 자극 인자는 클론화되고, 서열화되었다. 예시적 실시예에서, G-CSF 웨პ티드는 서열식별번호:1(SEQ ID NO:1):

```
MTPLGPASSLPQSFLKCLEQVRKIQGDGAALQEKLCAKYK
LCHPEELVLLGHSLGIPWAPLSSCPSQALQLAGCLSQLHSGL
FLYQGLLQALEGISPELGPTLDTLQLDVADFATTIWQQMEE
LGMAPALQPTQGAMPAFASAFQRRAGGVLVASHLQSFLEV
SYRVLRLHLAQP (SEQ ID NO: 1).
```

[0307]로 나타내어지는 서열을 갖는다.

[0308] 다른 예시적 실시예에서, G-CSF 웨პ티드는 서열식별번호:2(SEQ ID NO:2):

```
TPLGPASSLPQSFLKCLEQVRKIQGDGAALQEKLCAKYKL
CHPEELVLLGHSLGIPWAPLSSCPSQALQLAGCLSQLHSGLF
LYQGLLQALEGISPELGPTLDTLQLDVADFATTIWQQMEEL
GMAPALQPTQGAMPAFASAFQRRAGGVLVASHLQSFLEVS
YRVLRLHLAQP (SEQ ID NO: 2).
```

[0309]로 나타내어지는 서열을 갖는다.

[0312]

다른 예시적 실시예에서, G-CSF 패티드는 하기 서열식별번호:3 내지 11:

MTPLGPASSLPQSFLKCLEARVKIQGDGAALQEKLVSECA  
 TYKLCHPEELVLLGHSLGIPWAPLSSCPSQALQLAGCLSQL  
 HSGFLYQGLLQALEGISPELGPTLDLQLDVADFATTIWQ  
 QMEELGMAPALQPTQGAMPAFASAFQRRAGGVLVASHLQ  
**SFLEVSYRVLRLAQP (SEQ ID NO:3)**

MAGPATQSPMKLMALQLLLWHSALWTVQEATPLGPASSL  
 PQSFLLKCLEQVRKIQGDGAALQEKLCATYKLCHPEELVLL  
 GHSLGIPWAPLSSCPSQALQLAGCLSQLHSGFLYQGLLQA  
 LEGISPELGPTLDLQLDVADFATTIWQQMEELGMAPALQP  
 TQGAMPAFASAFQRRAGGVLVASHLQSFLEVSYRVLRLA  
**QP (SEQ ID NO:4)**

MAGPATQSPMKLMALQLLLWHSALWTVQEATPLGPASSL  
 PQSFLLKCLEQVRKIQGDGAALQEKLVSECATYKLCHPEEL  
 VLLGHSLGIPWAPLSSCPSQALQLAGCLSQLHSGFLYQGL  
 LQALEGISPELGPTLDLQLDVADFATTIWQQMEELGMAPA  
 LQPTQGAMPAFASAFQRRAGGVLVASHLQSFLEVSYRVLRLA  
**HLAQP (SEQ ID NO:5)**

MVTPLGPASSLPQSFLKCLEARVKIQGDGAALQEKLCATY  
 KLCHPEELVLLGHTLGIPWAPLSSCPSQALQLAGCLSQLHS  
 GLFLYQGLLQALEGISPELGPTLDLQLDVADFATTIWQQM  
 EELGMAPALQPTQGAMPAFASAFQRRAGGVLVASHLQSFLE  
 EVSYRVLRLAQP(**SEQ ID NO:6**);

MTPLGPASSLPQSFLKCLEARVKIQGDGAALQEKLCATYK  
 LCHPEELVLLGHTLGIPWAPLSSCPSQALQLAGCLSQLHSGL  
 FLYQGLLQALEGISPELGPTLDLQLDVADFATTIWQQMEE  
 LGMAPALQPTQGAMPAFASAFQRRAGGVLVASHLQSFLEV  
**SYRVLRLAQP(SEQ ID NO:7)**;

[0313]

MVTPLGPASSLPQSFLLKCLEQVRKIQGDGAALQEKL<sup>C</sup>ATY  
 KLCHPEELVLLGSSLGIPWAPLSSCPSQALQLAGCLSQLHSG  
 LFLYQGLLQALEGISPELGPTLDLQLDVADFATTI<sup>W</sup>QQME  
 ELGMAPALQPTQGAMPAFASAFQRRAAGGVLVASHLQS<sup>F</sup>LE  
 VSYRVLRLAQP(**SEQ ID NO:8**);

MQTPLGPASSLPQSFLLKCLEQVRKIQGDGAALQEKL<sup>C</sup>ATY  
 KLCHPEELVLLGHSLGIPWAPLSSCPSQALQLAGCLSQLHS  
 GLFLYQGLLQALEGISPELGPTLDLQLDVADFATTI<sup>W</sup>QQM  
 EELGMAPALQPTQGAMPAFASAFQRRAAGGVLVASHLQS<sup>F</sup>LE  
 EVSYRVLRLAQP(**SEQ ID NO:9**);

MTPLGPASSLPQSFLLKCLEQVRKIQGDGAALQEKL<sup>C</sup>ATYK  
 LCHPEELVLLGHSLGIPWAPLSSCPSQALQLAGCLSQLHSGL  
 FLYQGLLQALEGISPELGPTLDLQLDVADFATTI<sup>W</sup>QQMEE  
 LGMAPALQPTQGAMPAFASAFQRRAAGGVLVASHLQS<sup>F</sup>LEV  
 SYRVLRLAQP(**SEQ ID NO:10**) and

MTPLGPASSLPQSFLLKCLEQVRKIQGDGAALQEKL<sup>C</sup>ATYK  
 LCHPEELVLLGSSLGIPWAPLSSCPSQALQLAGCLSQLHSGL  
 FLYQGLLQALEGISPELGPTLDLQLDVADFATTI<sup>W</sup>QQMEE  
 LGMAPTTPTQTAMP<sup>A</sup>FASAFQRRAAGGVLVASHLQS<sup>F</sup>LEV  
 SYRVLRLAQP(**SEQ ID NO:11**)

[0314]

로 나타내어지는 서열을 갖는다.

[0315]

본 발명은 결코 본 명세서에 설명된 서열로 한정되지 않는다.

[0316]

예시적 실시예에서, 본 발명의 G-CSF 웨티드는 PEG 부분을 포함하는 글리코실 잔기로 글리코실화되는, 적어도 하나의 O-결합(O-linked) 글리코실화 자리를 포함한다. PEG는 무손상 글리코실 결합기를 통하여 G-CSF 웨티드에 공유적으로 부착된다. 글리코실 결합기는 G-CSF 웨티드의 아미노산 잔기 또는 글리코실 잔기의 어느 하나에 공유적으로 부착된다. 또는, 글리코실 결합기는 글리코웨티드의 일 이상의 글리코실 단위에 부착된다. 본 발명은 또한 글리코실 결합기가 아미노산 잔기 및 글리코실 잔기 모두에 부착된 콘주게이트를 제공한다.

[0318]

PEG 부분은 직접적으로, 또는 비-글리코실 링커, 예를 들어 치환 또는 비치환 알킬, 치환 또는 비치환 헤테로알킬을 통하여 무손상 글리코실 링커에 부착된다.

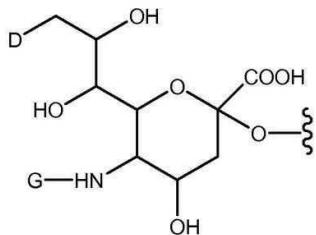
[0319]

예시적 실시예에서, G-CSF 웨티드는 하기 화학식 I:

[0320]

[화학식 I]

**Formula I**



[0321]

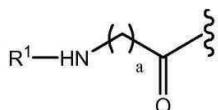
을 갖는 부분(moiety)을 포함하며,

[0323]

상기에서, D는 -OH 및 R<sup>1</sup>-L-HN-으로부터 선택되는 일원이며; G는 R<sup>1</sup>-L- 및 -C(O)(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)알킬로부터 선택되는 일

원이며;  $R^1$ 은 적쇄 또는 가지 달린 폴리(에틸렌글리콜) 잔기를 포함하는 부분으로부터 선택된 일원을 포함하는 부분이며; 및 L은 D가 OH인 경우, G가  $R^1-L-$ 이고, G가  $-C(O)(C_1-C_6)$ 알킬인 경우, D가  $R^1-L-NH-$ 가 되도록, 결합, 치환 또는 비치환 알킬 및 치환 또는 비치환 헤테로알킬로부터 선택되는 일원이다. 본 명세서에 설명된 변형 시알산 구조에서, COOH는 또한  $COO^-$  및/또는 그의 염을 나타낸다.

[0324] 일 실시예에서,  $R^1L$ 은 하기 화학식:

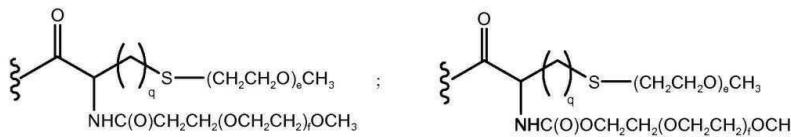


[0325]

을 가지며,

[0327] 상기에서, a는 0 내지 20의 정수이다.

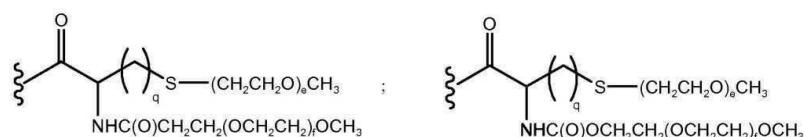
[0328] 예시적 실시예에서,  $R^1$ 은 하기:



[0329]

[0330]로부터 선택되는 일원인 구조를 가지며,

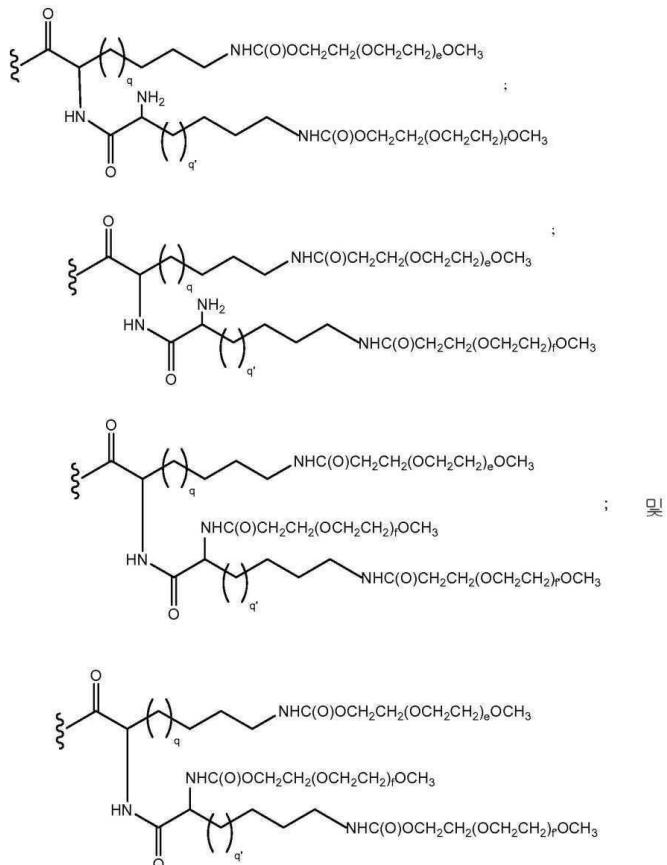
[0331] 상기에서, e 및 f는 1 내지 2500으로부터 독립적으로 선택되는 정수이며; 및 q는 1 내지 20의 정수이다. 다른 실시예에서,  $R^1$ 은 하기:



[0332]

[0333]로부터 선택되는 일원인 구조를 가지며,

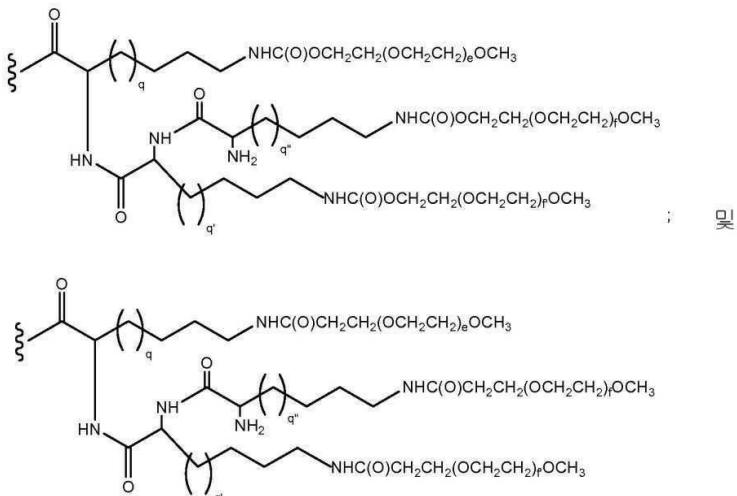
[0334] 상기에서, e 및 f는 1 내지 2500으로부터 독립적으로 선택되는 정수이며; 및 q는 1 내지 20의 정수이다. 다른 실시예에서,  $R^1$ 은 하기:



[0335]

로부터 선택되는 일원인 구조를 가며,

상기에서, e, f 및 f'는 1 내지 2500으로부터 독립적으로 선택되는 정수이며; 및 q 및 q'은 1 내지 20으로부터 독립적으로 선택되는 정수이다.

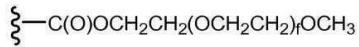
또 다른 실시예에서, 본 발명은 R<sup>1</sup>[o] 하기:

[0339]

로부터 선택되는 일원인 구조를 갖는 G-CSF 웨티드를 제공하며,

상기에서, e, f 및 f'는 1 내지 2500으로부터 독립적으로 선택되는 정수이며; q, q' 및 q"는 1 내지 20으로부터 독립적으로 선택되는 정수이다.

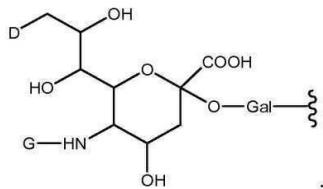
[0342] 다른 실시예에서, R<sup>1</sup>은 하기:



[0343]로부터 선택되는 일원인 구조를 가지며,

[0344] 상기에서, e 및 f는 1 내지 2500으로부터 독립적으로 선택되는 정수이다.

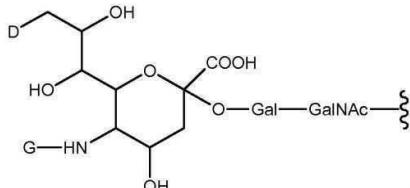
[0345] 다른 예시적 실시예에서, 본 발명은 하기 화학식:



[0346]을 갖는 부분을 포함하는 펩티드를 제공한다.

[0347] Gal은 아미노산에, 또는 글리코실 잔기에 부착될 수 있으며, 직접적으로 또는 간접적으로(예를 들어, 글리코실 잔기를 통하여) 아미노산에 부착될 수 있다.

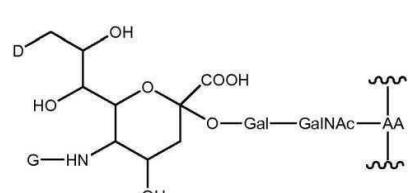
[0348] 다른 실시예에서, 상기 부분은 하기 화학식:



[0349]을 갖는다.

[0350] GalNAc는 아미노산에, 또는 글리코실 잔기에 부착될 수 있으며, 직접적으로 또는 간접적으로(예를 들어, 글리코실 잔기를 통하여) 아미노산에 부착될 수 있다.

[0351] 또 다른 예시적 실시예에서, 펩티드는 하기 화학식:

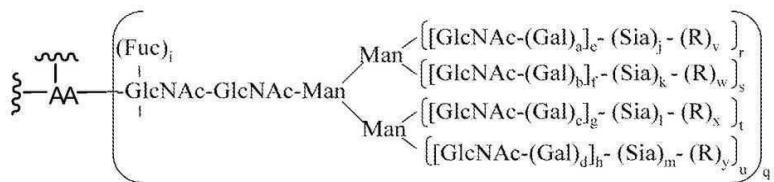


[0352]에 따른 부분을 포함하며,

[0353] 상기에서, AA는 상기 펩티드의 아미노산 잔기이며, 상기 구조의 각각에서, D 및 G는 본 명세서에서 전술한 바와 같다.

[0354] 일 이상의 상기 종들이 콘주게이트될 수 있는 G-CSF 펩티드의 아미노산 잔기는 세린 및 트레오닌, 예를 들어, 서열식별번호:1(SEQ. ID. No.:1)의 트레오닌 133을 포함한다.

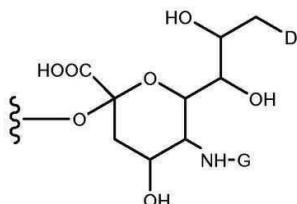
다른 실시예에서, 본 발명은 하기 화학식:



을 갖는 글리코실 잔기를 포함하는 G-CSF 콘주게이트를 제공하며,

상기에서, a, b, c, d, i, r, s, t, 및 u는 0 및 1로부터 독립적으로 선택된 정수이다. 지수 q는 1이다. 지수 e, f, g, 및 h는 0 내지 6의 정수로부터 독립적으로 선택된다. 지수 j, k, l, 및 m는 0 내지 100의 정수로부터 독립적으로 선택된다. 지수 v, w, x, 및 y는 0 및 1로부터 독립적으로 선택되며, v, w, x 및 y의 적어도 하나는 1이다. 기호 AA는 G-CSF 웹티드의 아미노산 잔기를 나타낸다.

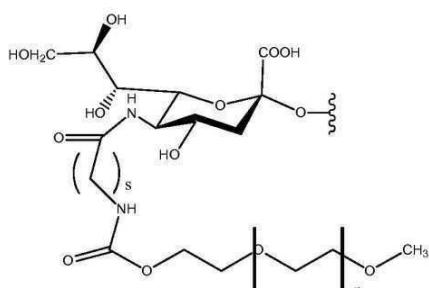
기호  $Sia-(R)$ 는 하기 화학식:



을 갖는 기를 나타내며,

상기에서, D는  $-OH$  및  $R^1-L-NH$ 로부터 선택된다. 기호 G는  $R^1-L-$  또는  $-C(O)(C_1-C_6)$ 알킬을 나타낸다.  $R^1$ 은 직쇄 또는 가지 달린 폴리(에틸렌글리콜) 잔기를 포함하는 부분을 나타낸다. L은 결합, 치환 또는 비치환 알킬 및 치환 또는 비치환 헤테로알킬로부터 선택되는 일원인 링커이다. 일반적으로, D가 OH인 경우, G는  $R^1-L-$ 이고, G가  $-C(O)(C_1-C_6)$ 알킬인 경우, D는  $R^1-L-NH$ 이다.

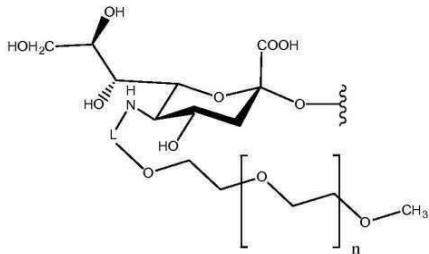
다른 예시적 실시예에서, 본 발명의 콘주게이트에서 PEG-변형 시알산 부분은 하기 화학식:



을 가지며

상기에서, 지수 "s"는 0 내지 20의 정수를 나타내며, n은 1 내지 2500의 정수이다. 일 실시예에서, s는 1과 동일하며, m-PEG 부분은 약 20 kDa의 분자량을 갖는다.

[0371] 또 다른 예시적 실시예에서, PEG-변형 시알산은 하기 화학식:



[0372]

[0373] 을 가지며,

[0374] 상기에서, L은 시알산 부분 및 PEG 부분과 결합하는, 치환 또는 비치환 알킬 또는 치환 또는 비치환 헤테로알킬 링커 부분이다.

[0375] 일 실시예에서, 상기 지정된 아스파라긴 잔기의 적어도 2개, 더욱 바람직하게는 적어도 3개, 더욱 바람직하게는 적어도 4개가 전술한 바와 같은 N-결합된 글리칸 사슬(N-linked glycan chain)로 기능화된다.

[0376] 본 발명의 콘주게이트는 일가(mono-) 또는 다가(multi-valent((예를 들어, 안테나 구조(antennary structures))인 무손상 글리코실 결합기를 포함한다. 따라서, 본 발명의 콘주게이트는 선택된 부분이 일가 그리코실 결합기 및 다가 결합기를 통하여 웨პ티드에 부착된, 2종을 모두 포함한다. 또한, 본 발명은 일 이상의 선택된 부분이 다가 결합기를 통하여 웨პ티드에 부착된, 콘주게이트를 포함한다.

### 수불용성 폴리머

[0377] 다른 실시예에서, 전술한 바와 유사하게, 변형 당은 수용성 폴리머 보다는 수불용성 폴리머를 포함한다. 본 발명의 콘주게이트는 일 이상의 수불용성 폴리머를 포함할 수 있다. 본 발명의 이 실시예는 치료 웨პ티드(therapeutic peptide)를 조절 방식으로 전달하는 비히클(vehicle)로서의 상기 콘주게이트의 이용에 의하여 설명된다. 폴리머성 약물 전달 시스템은 당업계에 공지되어 있다. 예를 들어, Dunn et al., Eds. POLYMERIC DRUGS AND DRUG DELIVERY SYSTEMS, ACS Symposium Series Vol. 469, American Chemical Society, Washington, D.C. 1991 참조. 당업자는 실질적으로 임의의 공지된 약물 전달 시스템이 본 발명의 콘주게이트에 적용될 수 있음을 인지할 것이다.

[0378] R<sup>1</sup>, L-R<sup>1</sup>, R<sup>15</sup>, R<sup>15'</sup> 및 다른 라디칼에 대하여 전술한 바는 수불용성 폴리머에 대하여 동일하게 적용가능하며, 이는 당업자가 용이하게 이용가능한 화학을 이용하여, 제한 없이 선형 및 가지 달린 구조로 결합될 수 있다.

[0379] 예시적인 수불용성 폴리머는 폴리포스파진, 폴리(비닐 알코올), 폴리아미드, 폴리카보네이트, 폴리알킬렌, 폴리아크릴아미드, 폴리알킬렌 글리콜, 폴리알킬렌 옥사이드, 폴리알킬렌 테레프탈레이트, 폴리비닐 에테르, 폴리비닐 에스테르, 폴리비닐 할라이드, 폴리비닐피롤리돈, 폴리글리콜리드, 폴리실록산, 폴리우레탄, 폴리(메틸 메타크릴레이트), 폴리(에틸 메타크릴레이트), 폴리(부틸 메타크릴레이트), 폴리(이소부틸 메타크릴레이트), 폴리(헥실 메타크릴레이트), 폴리(이소데실 메타크릴레이트), 폴리(라우릴 메타크릴레이트), 폴리(페닐 메타크릴레이트), 폴리(메틸 아크릴레이트), 폴리(이소프로필 아크릴레이트), 폴리(이소부틸 아크릴레이트), 폴리(옥타데실 아크릴레이트) 폴리에틸렌, 폴리프로필렌, 폴리(에틸렌글리콜), 폴리(에틸렌 옥사이드), 폴리(에틸렌 테레프탈레이트), 폴리(비닐 아세테이트), 폴리비닐 클로라이드, 폴리스티렌, 폴리비닐 피롤리돈, 플루로닉s 및 폴리비닐페놀 및 그의 코폴리머를 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0380] 본 발명의 콘주게이트에 이용되는 합성적으로 변형된 천연 폴리머는 알킬 셀룰로오스, 하이드록시알킬 셀룰로오스, 셀룰로오스 에테르, 셀룰로오스 에스테르, 및 니트로셀룰로오스를 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 합성적으로 변형된 천연 폴리머의 광범위한 분류의 특히 바람직한 일원은 메틸 셀룰로오스, 에틸 셀룰로오스, 하이드록시프로필 셀룰로오스, 하이드록시프로필 메틸 셀룰로오스, 하이드록시부틸 메틸 셀룰로오스, 셀룰로오스 아세테이트, 셀룰로오스 프로피오네이트, 셀룰로오스 아세테이트 부티레이트, 셀룰로오스 아세테이트 프탈레이트, 카르복시메틸 셀룰로오스, 셀룰로오스 트리아세테이트, 셀룰로오스 세페이트 소듐 염, 및 아크릴 에스테르 및 메타크릴 에스테르 및 알긴산의 폴리머를 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다.

- [0382] 본 명세서에 논의된 이러한 폴리머 및 다른 폴리머는 Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO.), Polysciences (Warrenton, PA.), Aldrich (Milwaukee, WI.), Fluka (Ronkonkoma, NY), 및 BioRad (Richmond, CA)와 같은 상업적 공급원, 또는 표준 기술을 이용하는 이러한 공급원으로부터 얻어진 모노머로부터 합성된 다른 것으로부터 용이하게 얻을 수 있다.
- [0383] 본 발명의 콘주게이트에 이용되는 예시적인 생분해성(biodegradable) 폴리머는 폴리락티드, 폴리글리콜리드 및 그의 코폴리머, 폴리(에틸렌 테레프탈레이트), 폴리(부티르산), 폴리(발레르산), 폴리(락티드-코-카프로락톤), 폴리(락티드-코-글리콜리드), 폴리안하이드라이드(polyanhydrides), 폴리오르토에스테르(polyorthoesters), 그의 혼합물(blends) 및 코폴리머를 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 콜라겐, 플루로닉 등을 포함하는 것인, 젤을 형성하는 조성물이 특히 이용된다.
- [0384] 본 발명에 이용되는 폴리머는 그 구조의 적어도 일부분 내에 생재흡수성 분자(bioresorbable molecule)를 갖는 수불용성 물질을 포함하는 "혼성(hybrid)" 폴리머를 포함한다. 그러한 폴리머의 예는 생재흡수성 영역, 친수성 영역 및 폴리머 사슬 당 복수의 가교결합가능한 기능기를 갖는, 수불용성 코폴리머를 포함하는 것이다.
- [0385] 본 발명을 위하여, "수불용성 물질"은 물 또는 물-함유 환경에서 실질적으로 불용성인 물질을 포함한다. 따라서, 코폴리머의 특정 영역 또는 단편이 친수성 또는 수용성일 수 있더라도, 전체적으로 상기 폴리머 분자는 실질적으로 물에 용해되지 않는다.
- [0386] 본 발명을 위하여, 용어 "생재흡수성 분자(bioresorbable molecule)"는 대사되거나 또는 분해되고, 및 신체에 의한 정상적 분비 경로를 통하여 재흡수 및/또는 제거될 수 있는 영역을 포함한다. 그러한 대사산물 또는 분해 생성물은 신체에 대해 실질적으로 비독성인 것이 바람직하다.
- [0387] 생재흡수성 영역은 코폴리머 조성물이 전체적으로 수용성으로 되지 않는 동안 소수성 또는 친수성의 어느 하나일 수 있다. 따라서, 생재흡수성 영역은 폴리머가 전체적으로 수불용성으로 유지되는 선택에 기초하여 선택된다. 따라서, 상대적인 특성, 즉, 함유되는 기능기의 종류, 및 생재흡수성 영역의 상대적인 비율, 및 친수성 영역은 이용되는 생재흡수성 조성물이 수불용성으로 유지되는 것을 확실하게 하도록 선택된다.
- [0388] 예시적인 재흡수성 폴리머는 예를 들어, 폴리( $\alpha$ -하이드록시-카르복실산)/폴리(옥시알킬렌)의 합성적으로 제조된 재흡수성 블록 코폴리머를 포함한다(Cohn *et al.*, 미국특허 제4,826,945호 참조). 이러한 코폴리머는 가교 결합되지 않으며, 수용성이어서, 신체는 분해된 블록 코폴리머 조성물을 분비할 수 있다. Younes *et al.*, *J Biomed. Mater. Res.* **21**: 1301-1316 (1987); 및 Cohn *et al.*, *J Biomed. Mater. Res.* **22**: 993-1009 (1988) 참조.
- [0389] 바람직한 생재흡수성 폴리머는 폴리(에스테르), 폴리(하이드록시산), 폴리(락تون), 폴리(아미드), 폴리(에스테르-아미드), 폴리(아미노산), 폴리(안하이드라이드), 폴리(오르토에스테르), 폴리(카보네이트), 폴리(포스파진), 폴리(포스포에스테르), 폴리(티오에스테르), 다당류 및 그 혼합물로부터 선택되는 일 이상의 성분을 포함한다. 더욱 바람직하게는, 생재흡수성 폴리머는 폴리(하이드록시)산 성분을 포함한다. 폴리(하이드록시)산 중에서, 폴리락트산, 폴리글리콜산, 폴리카프로산(polycaproic acid), 폴리부티르산, 폴리발레르산 및 그의 코폴리머 및 혼합물이 바람직하다.
- [0390] 생체 내에서 흡수되는(생재흡수되는) 단편의 형성에 더하여, 본 발명의 방법에 이용되는 바람직한 폴리머 코팅은 분비가능한(excretable) 및/또는 대사가능한(metabolizable) 단편을 형성할 수 있다.
- [0391] 더 높은 차수(order)의 코폴리머도 본 발명에 이용될 수 있다. 예를 들어, 1984년 3월 20일 발행된 Casey *et al.*, 미국특허 제4,438,253호는 폴리(글리콜산)과 하이드록실-말단(hydroxyl-ended) 폴리(알킬렌글리콜)의 트랜스에스테르화로부터 제조된 트리-블록 코폴리머를 개시한다. 이러한 조성물은 재흡수성 모노필라멘트 봉합사로 이용되는 것으로 개시되어 있다. 이러한 조성물의 유연성(flexibility)은 테트라-p-톨릴 오르토카보네이트와 같은 방향족 오르토카보네이트(orthocarbonate)의 코폴리머 구조로의 결합에 의하여 조절된다.
- [0392] 락트산 및/또는 글리콜산에 기초하는 다른 폴리머도 이용될 수 있다. 예를 들어, 1993년 4월 13일에 발행된 Spinu, 미국특허 제5,202,413호는 락티드 및/또는 글리콜리드의, 올리고머 디올 또는 디아민 잔기의 어느 하나상으로의 개환 중합화(ring-open polymerization) 및 이후 디이소시아네이트, 디아실클로라이드 또는 디클로로실란과 같은 2기능성 화합물에 의한 사슬 확장(chain extension)에 의하여 제조되는, 폴리락티드 및/또는 폴리글리콜리드의 순차적 차수의 블록(sequentially ordered blocks)을 갖는 생분해성 다중-블록(multi-block) 코폴리머를 개시한다.

[0393]

본 발명에 유용한 코팅의 생재흡수성 영역은 가수분해적으로 및/또는 효소적으로 절단될 수 있도록 설계될 수 있다. 본 발명을 위하여, "가수분해적으로 절단될 수 있는"은 코폴리머, 특히 생재흡수성 영역의, 물 또는 물-함유 환경에서의 가수분해에 대한 민감성(sceptibility)을 나타낸다. 유사하게, 본 명세서에 이용된 "효소적으로 절단될 수 있는"은 코폴리머, 특히 생재흡수성 영역의, 내생성(endogenous) 또는 외생성(exogenous) 효소에 의한 절단에 대한 민감성을 나타낸다.

[0394]

생체 내에 놓여지는 경우, 친수성 영역은 분비가능한 및/또는 대사가능한 단편으로 처리될 수 있다. 따라서, 친수성 영역은 예를 들어, 폴리에테르, 폴리알킬렌 옥사이드, 폴리올, 폴리(비닐 피롤리딘), 폴리(비닐 알코올), 폴리(알킬 옥사졸린), 다당류, 탄수화물, 웨티드, 단백질 및 그의 코폴리머 및 혼합물을 포함할 수 있다. 또한, 친수성 영역은 예를 들어, 폴리(알킬렌) 옥사이드를 포함할 수 있다. 그러한 폴리(알킬렌) 옥사이드는 예를 들어, 폴리(에틸렌) 옥사이드, 폴리(프로필렌) 옥사이드 및 그의 혼합물 및 코폴리머를 포함할 수 있다.

[0395]

하이드로겔의 성분인 폴리머도 본 발명에 유용하다. 하이드로겔은 상대적으로 많은 양의 물을 흡수할 수 있는 폴리머 물질이다. 하이드로겔 형성 화합물의 예는 폴리아크릴산, 소듐 카르복시메틸셀룰로오스, 폴리비닐 알코올, 폴리비닐 피롤리딘, 젤라틴, 카라기난 및 다른 다당류, 하이드록시에틸렌메타크릴산(HEMA), 및 그의 유도체 등을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 안정하고, 생분해성이며, 생재흡수성인 하이드로겔이 제조될 수 있다. 또한, 하이드로겔 조성물은 이러한 특징의 일 이상을 나타내는 서브유닛을 포함할 수 있다.

[0396]

그의 완전성(integrity)이 가교결합을 통하여 조절될 수 있는 생적합성(Bio-compatible) 하이드로겔 조성물은 공지되어 있으며, 본 발명의 방법에 이용되는데 바람직하다. 예를 들어, 1995년 4월 25일 발행된 Hubbell *et al.*, 미국특허 제5,410,016호 및 1996년 6월 25일 발행된 미국특허 제5,529,914호는 2개의 가수분해적으로 불안정한 확장 부분(hydrolytically labile extensions) 사이에 삽입된 수용성 중앙 블록 단편을 갖는 가교결합된 블록 코폴리머인, 수용성 시스템을 개시한다. 그러한 코폴리머는 광중합성 아크릴레이트 기능기로 더 말단-캡핑된다. 가교결합된 경우, 이러한 시스템은 하이드로겔이 된다. 그러한 코폴리머의 수용성 중앙 블록은 폴리(에틸렌글리콜)을 포함할 수 있는 반면; 가수분해적으로 불안정한 확장 부분은 폴리글리콜산 또는 폴리락트산과 같은 폴리( $\alpha$ -하이드록시산)일 수 있다. Sawhney *et al.*, *Macromolecules* 26: 581-587 (1993) 참조.

[0397]

다른 바람직한 실시예에서, 젤은 열가역성(thermoreversible) 젤이다. 플루로너, 콜라겐, 젤라틴, 히알루론산, 다당류, 폴리우레탄 하이드로겔, 폴리우레탄-우레아 하이드로겔 및 그의 조합과 같은 성분을 포함하는 열가역성 젤이 특히 바람직하다.

[0398]

또 다른 예시적인 실시예에서, 본 발명의 콘주게이트는 리포솜의 성분을 포함한다. 리포솜은 당업자에게 공지된 방법, 예를 들어, Eppstein *et al.*, 미국특허 제4,522,811호에 기재된 방법에 따라 제조될 수 있다. 예를 들어, 리포솜 포뮬레이션은 적합한 리피드(스테아로일 포스파티딜 에탄올아민, 스테아로일 포스파티딜 콜린, 아라카도일 포스파티딜 콜린 및 클레스테롤과 같은)를 무기 용매에 용해시킨 후, 증발시켜 용기 표면 상에 건조 리피드의 박막을 남김으로써 제조될 수 있다. 다음으로, 활성 화합물 또는 그의 약학적으로 허용 가능한 염의 수성 용액을 용기 내로 도입한다. 이후, 용기를 손으로 빙빙 돌려서, 용기의 측면으로부터 리피드 물질을 제거하고, 리피드 응집체를 분산시킴으로써 리포솜 서스펜션을 형성한다.

[0399]

전술한 마이크로입자 및 마이크로입자의 제조방법은 예로서 주어지는 것이며, 이들은 본 발명에 이용된 마이크로입자의 범위를 한정하기 위한 것이 아니다. 상이한 방법으로 제조된 일련의 마이크로입자가 본 발명에 이용되는 것은 당업자에게 명백하다.

[0400]

수용성 폴리머에 관하여 전술한 구조적 포맷인 직쇄 및 가지 달린 것 모두가 또한 수불용성 폴리머에 대하여 일반적으로 적용가능하다. 따라서, 예를 들어, 시스테인, 세린, 디라이신 및 트리라이신 가지 달린 코어(branching cores)는 2개의 수불용성 폴리머 부분으로 기능화될 수 있다. 이러한 종을 제조하는데 이용되는 방법은 수용성 폴리머 제조에 이용된 것과 일반적으로 매우 유사하다.

[0401]

### G-CSF 콘주게이트의 제조방법

[0402]

전술한 콘주게이트에 더하여, 본 발명은 이러한 및 다른 콘주게이트를 제조하는 방법을 제공한다. 따라서, 일측면에서, 본 발명은 선택된 부분과 G-CSF 웨티드 간에 공유 콘주게이트(covalent conjugate)를 형성하는 방법을 제공한다. 또한, 본 발명은 본 발명의 콘주게이트를 신체의 특정 조직 또는 부위에 표적화하는 방법을 제공한다.

[0403]

예시적인 실시예에서, 콘주게이트는 PEG 부분(또는 PEG 부분을 포함하는 효소적으로 전달가능한 글리코실 부분)과 글리코실화 또는 비-글리코실화 웨티드 간에 형성된다. PEG는 G-CSF 웨티드와 PEG 부분 사이에 삽입되거나, 또는 둘 다에 공유적으로 결합된, 또는 PEG-비-글리코실 링커(예를 들어, 치환 또는 비치환 알킬, 치환 또는 비치환 헤테로알킬) 구조체에 공유적으로 결합된, 무순상 글리코실 결합기를 통하여 G-CSF 웨티드에 콘주게이트된다. 상기 방법은 G-CSF 웨티드를, 변형 당 및 변형 당이 기질인 글리코실트랜스페라제를 함유하는 혼합물과 접촉시키는 것을 포함한다. 상기 반응은 변형 당과 G-CSF 웨티드 사이에 공유 결합을 형성하기에 충분한 조건 하에서 수행된다. 변형 당의 당 부분은 뉴클레오티드당(nucleotide sugar), 활성화 당(activated sugars) 및 뉴클레오티드나 활성화 당이 아닌 당으로부터 선택된다.

[0404]

수용체(acceptor) 웨티드(글리코실화 또는 비-글리코실화)는 신생으로(*de novo*) 전형적으로 합성되거나, 또는 원핵세포(예를 들어, 대장균(*E. coli*)과 같은 박테리아 세포)에서, 또는 포유류, 흐모, 곤충, 진균류 또는 식물세포와 같은 진핵 세포에서 재조합적으로 발현된다. G-CSF 웨티드는 전체 길이 단백질 또는 단편의 어느 하나일 수 있다. 또한, G-CSF 웨티드는 야생형(wild type) 또는 돌연변이(mutated) 웨티드일 수 있다. 예시적 실시예에서, G-CSF 웨티드는 일 이상의 N- 또는 O-결합 글리코실화 자리를 웨티드 서열에 부가하는 돌연변이를 포함한다.

[0405]

예시적 실시예에서, 인자 IX(Factor IX)는 하기 방식으로 O-글리코실화되고 수용성 폴리머로 기능화된다. 웨티드는 이용가능한 아미노산 글리코실화 자리에 의하여 제조되거나, 또는 글리코실화된 경우, 글리코실 부분은 노출된 아미노산에 대하여 제거된다. 예를 들어, 세린 또는 트레오닌은 α-1 N-아세틸 아미노 갈락토실화되어(GalNAc), NAc-갈락토실화 웨티드는 ST6GalNAcT1를 이용하여 시알산-변형기 카세트로 시알릴화된다(sialylated). 또는, NAc-갈락토실화 웨티드는 코어-1-GalT-1(Core-1-GalT-1)을 이용하여 갈락토실화되며, 생성물은 ST3GalT1을 이용하여 시알산-변형기 카세트로 시알릴화된다(sialylated). 본 방법에 따른 예시적인 콘주게이트는 하기 결합: Thr-α-1-GalNAc-β-1,3-Gal-α 2,3-Sia\*을 가지며, 여기에서, Sia\*은 시알산-변형기 카세트(cassette)이다.

[0406]

본 발명의 방법에서, 전술한 바와 같이, 다중 효소(multiple enzymes) 및 당류 도너(saccharyl donors)를 이용하여, 개별적인 글리코실화 단계는 개별적으로 수행될 수 있거나, 또는 "단일 용기(single pot)" 반응에 결합될 수 있다. 예를 들어, 전술한 3가지 효소 반응에서, GalNAc 트랜스페라제인, GalT 및 SiaT 및 그들의 도너는 단일 용기에서 결합될 수 있다. 또는, GalNAc 반응은 단독으로 수행되고, GalT 및 SiaT 및 적합한 당류 도너는 단일 단계로 가해질 수 있다. 반응을 진행하는 다른 형태는 각 효소 및 적합한 도너를 순서대로 가하고, 반응을 "단일 용기" 모티브로 수행하는 것을 포함한다. 전술한 각각의 방법의 결합이 본 발명의 화합물을 제조하는데 이용된다.

[0407]

본 발명의 콘주게이트에서, 특히 글리코페길화 N-결합 글리칸, Sia-변형기 카세트는 α 2,6, 또는 α 2,3 결합으로 Gal에 결합될 수 있다.

[0408]

본 발명의 방법은 또한, 재조합적으로 제조된 불완전하게 글리코실화된 웨티드의 변형을 위하여 제공된다. 본 발명의 방법에서 변형 당을 채용하여, G-CSF 웨티드는 예를 들어, PEG 부분, 치료제 등으로 동시에 더 글리코실화되고 유도체화될 수 있다. 변형 당의 당 부분은 완전하게 글리코실화된 웨티드에서 수용체에 적합하게 콘주게이트되는 잔기, 또는 바람직한 특성을 갖는 다른 당 부분일 수 있다.

[0409]

본 발명의 방법에 의하여 변형된 G-CSF 웨티드는 합성 또는 야생형 웨티드일 수 있거나, 또는 그들은 부위-지향성 돌연변이 유발(site-directed mutagenesis)과 같은 당업계에 공지된 방법에 의하여 제조되는 돌연변이 웨티드일 수 있다. 웨티드의 글리코실화는 전형적으로 N-결합 또는 O-결합의 어느 하나이다. N-결합의 예는 변형 당의, 아스파라긴 잔기의 측쇄에 대한 부착이다. X가 프롤린을 제외한 임의의 아미노산인, 트리웨티드 서열 아스파라긴-X-세린 및 아스파라긴-X-트레오닌은 아스파라긴 측쇄에 대한, 탄수화물 부분의 효소적 부착에 대한 인지 서열이다. 따라서, 폴리웨티드에서 이러한 트리웨티드 서열의 어느 하나의 존재는 잠재적인 글리코실화 자리를 생성한다. O-결합 글리코실화는 5-하이드록시프롤린 또는 5-하이드록시라이신이 이용되더라도, 하이드록시아미노산, 바람직하게는 세린 또는 트레오닌의 하이드록시 측쇄에 대한 하나의 당(예를 들어, N-아세틸갈락토사민, 갈락토오스, 만노스, GlcNAc, 글루코오스, 푸코오스 또는 크실로오스)의 부착을 나타낸다.

[0410]

일 예시적 실시예에서, G-CSF는 포유류 시스템에서 발현되며, 말단 시알산 잔기를 깊게 자르기 위하여 시알리다아제(sialidase)로 처리한 후, ST3Gal13 및 PEG-시알산의 도너를 이용하여 폐길화함으로써 변형된다.

[0411]

다른 예시적 실시예에서, 포유류에서 발현된 G-CSF는 먼저 말단 시알산 잔기를 깊게 자르기 위하여 시알리다아

제로 처리된 후, ST3Gal3 및 PEG-시알산의 도너를 이용하여 폐길화된 후, ST3Gal3 및 시알산 도너로 시알릴화(sialylated)된다.

[0412] 포유류 시스템에서 발현된 G-CSF는 그의 시알산 및 갈락토오스 잔기를 짧게 자르기 위하여 시알리다아제 및 갈락토시아다아제로 처리된 후, 갈락토오스 도너 및 갈락토실트랜스페라제(galactosyltransferase)를 이용하여 갈락토실화된 후, ST3Gal3 및 PEG-시알산의 도너를 이용하여 폐길화된다.

[0413] 또 다른 실시예에서, G-CSF는 먼저 시알리다아제로 처리되지 않고, 변형기-시알산 카세트(modifying group-sialyl acid cassette)와의 시알산 전달 반응 및 ST3Gal3와 같은 효소를 이용하여 글리코폐길화된다.

[0414] 다른 예시적 실시예에서, G-CSF는 곤충 세포에서 발현되고, 하기 과정으로 변형된다: N-아세틸글루코사민이 먼저 적합한 N-아세틸글루코사민 도너 및 일 이상의 GnT-I, II, IV 및 V을 이용하여 G-CSF에 가해지고; 다음으로, G-CSF는 PEG-갈락토오스의 도너 및 갈락토실트랜스페라제를 이용하여 폐길화된다.

[0415] 효모에서 제조된 G-CSF도 또한 글리코폐길화될 수 있다. 예를 들어, G-CSF는 글리코실기를 짧게 자르기 위하여 엔도글리카나아제(endoglycanase)로 먼저 처리되고, 갈락토오스 도너 및 갈락토실트랜스페라제를 이용하여 갈락토실화된 후, ST3Gal3 및 PEG-시알산의 도너로 폐길화된다.

[0416] 웨티드 또는 다른 구조에 대한 글리코실화 자리의(glycosylation sites) 부가는 일 이상의 글리코실화 자리를 함유하도록 아미노산 서열을 변화시킴으로써 편리하게 이루어진다. 상기 부가는 -OH기, 바람직하게는 세린 또는 트레오닌 잔기를 나타내는 일 이상의 종을 G-CSF 웨티드의 서열(O-결합 글리코실화 자리에 대하여) 내에 결합시킴으로써 이루어질 수 있다. 상기 부가는 G-CSF 웨티드의 돌연변이에 의하여, 또는 완전한 화학적 합성에 의하여 이루어질 수 있다. G-CSF 웨티드 아미노산 서열은 DNA 수준에서의 변화를 통하여, 특히 원하는 아미노산으로 번역되는 코돈(codons)이 생성되도록 미리 선택된 염기에서 웨티드를 코딩하는 DNA를 돌연변이시킴으로써 변화되는 것이 바람직하다. DNA 돌연변이는 당업계에 공지된 방법을 이용하여 이루어지는 것이 바람직하다.

[0417] 예시적 실시예에서, 글리코실화 자리는 폴리뉴클레오티드를 서플링함으로써 부가된다. 후보 웨티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드는 DNA 서플링 프로토콜(DNA shuffling protocols)로 조절될 수 있다. DNA 서플링은 관련 유전자 풀(pool)의 무작위 단편화(random fragmentation) 및 이후의 폴리머라제 사슬 반응-유사 과정(polymerase chain reaction-like process)에 의한 단편의 재집합(reassembly)에 의하여 수행되는, 순환 재조합(recursive recombination) 및 돌연변이(mutation)의 과정이다. Stemmer, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:10747-10751 (1994); Stemmer, *Nature* 370:389-391 (1994); 및 미국특허 제5,605,793호, 제5,837,458호, 제5,830,721호 및 제5,811,238호 참조.

[0418] 본 발명은 일 이상의 선택된 글리코실 잔기를 웨티드에 부가(또는 제거)하는 수단을 제공하며, 이후, 변형 당이 웨티드의 적어도 하나의 선택된 글리코실 잔기에 콘주케이트된다. 본 실시예는 예를 들어, 웨티드 상에 존재하지 않거나 또는 바람직한 양으로 존재하지 않는 선택된 글리코실 잔기에 변형 당을 콘주케이트하는 것이 바람직한 경우, 유용하다. 따라서, 변형 당을 웨티드에 결합하기 전에, 선택된 글리코실 잔기는 효소적 또는 화학적 결합에 의하여 G-CSF 웨티드에 콘주케이트된다. 다른 실시예에서, 글리코웨티드의 글리코실화 패턴은 글리코웨티드로부터 탄수화물 잔기의 제거에 의하여 변형 당의 콘주케이션 이전에 변화된다. 예를 들어 국제공개공보 WO 98/31826 참조.

[0419] 글리코웨티드 상에 존재하는 임의의 탄수화물의 부가 또는 제거는 화학적으로 또는 효소적으로 이루어진다. 화학적 탈글리코실화(deglycosylation)는 폴리웨티드 변이체를 화합물 트리플루오로메탄설폰산 또는 균등한 화합물에 노출시킴으로써 야기되는 것이 바람직하다. 이러한 처리에 의하여 결합 당(linking sugar)(N-아세틸글루코사민 또는 N-아세틸갈락토사민)을 제외한 대부분의 또는 모든 당이 절단(cleavage)되며, 반면에 웨티드는 무손상으로 남는다. 화학적 탈글리코실화는 Hakimuddin *et al.*, *Arch. Biochem. Biophys.* 259: 52 (1987) 및 Edge *et al.*, *Anal. Biochem.* 118: 131 (1981)에 의하여 기술된다. 폴리웨티드 변이체 상의 탄수화물 부분의 효소적 절단은 Thotakura *et al.*, *Meth. Enzymol.* 138: 350 (1987)에 의하여 기재된 바와 같은 다양한 엔도- 및 엑소-글리코시다아제의 이용에 의하여 이루어질 수 있다.

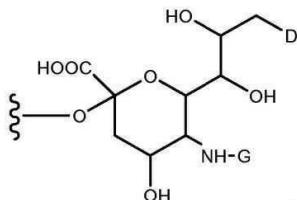
[0420] 글리코실 부분의 화학적 부가는 임의의 당업계의 인지 방법에 의하여 수행된다. 당 부분의 효소적 부가는 본 발명에 이용되는 변형 당 대신에 천연 글리코실 단위를 이용하여, 전술한 변형 방법을 이용하여 이루어지는 것이 바람직하다. 당 부분을 부가하는 다른 방법은 미국특허 제5,876,980호, 제6,030,815호, 제5,728,554호, 및 제5,922,577호에 기재되어 있다.

[0421] 선택된 글리코실 잔기에 대한 예시적인 부착 지점(attachment points)은 (a) N- 및 O-글리코실화에 대한 일치

자리(consensus sites); (b) 글리코실트랜스페라제에 대한 수용체인 말단 글리코실 부분; (c) 아르기닌, 아스파라긴 및 히스티딘; (d) 자유 카르복실기; (e) 시스테인의 것과 같은 자유 셀프하이드릴기(sulfhydryl groups); (f) 세린, 트레오닌 또는 하이드록시프롤린의 것과 같은 자유 하이드록실기; (g) 페닐알라닌, 티로신 또는 트립토판의 것과 같은 방향족 잔기; 또는 (h) 글루타민의 아미드기를 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 본 발명에 이용되는 예시적인 방법은 1987년 9월 11일에 공개된 국제공개공보 WO 87/05330 및 Aplin and Wriston, CRC CRIT. REV. BIOCHEM., pp. 259-306 (1981)에 기재되어 있다.

[0422]

예시적 실시예에서, 본 발명은 하기 부분:



[0423]

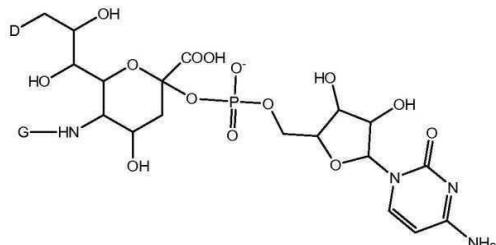
을 포함하는 폐길화 G-CSF를 제조하는 방법을 제공하며,

[0425]

상기에서, D는  $-OH$  또는  $R^1-L-HN-$ 이다. 기호 G는  $R^1-L-$  또는  $-C(O)(C_1-C_6)$ 알킬을 나타낸다.  $R^1$ 은 칙쇄 또는 가지 달린 폴리(에틸렌글리콜) 잔기를 포함하는 부분이다. 기호 L은 결합, 치환 또는 비치환 알킬 및 치환 또는 비치환 헤테로알킬로부터 선택되는 링커를 나타낸다. 일반적으로, D가 OH인 경우, G는  $R^1-L-$ 이며, G가  $-C(O)(C_1-C_6)$ 알킬인 경우, D는  $R^1-L-NH-$ 이다. 본 발명의 방법은 (a) 기질 G-CSF 웨티드를, PEG-시알산 도너 및 PEG-시알산 부분을 도너로부터 기질 G-CSF 웨티드로 전달할 수 있는 효소와 접촉시키는 것을 포함한다.

[0426]

예시적인 PEG-시알산 도너는 하기 구조:



[0427]

를 갖는 것과 같은 뉴클레오티드당(nucleotide sugar) 및 전달에 적합한 조건 하에서, G-CSF 웨티드의 아미노산 또는 글리코실 잔기 상에 PEG-시알산을 전달하는 효소이다.

[0429]

일 실시예에서, 기질 G-CSF 웨티드는 본 발명의 콘주케이트의 형성 이전에 숙주 세포에서 발현된다. 예시적인 숙주 세포 포유류 세포이다. 다른 실시예에서, 숙주 세포는 곤충 세포, 식물 세포, 박테리아 또는 진균류이다.

[0430]

여기 제시된 방법은 상기 본문에 설명된 G-CSF 콘주케이트 각각에 대하여 적용 가능하다.

[0431]

본 발명의 방법에 의하여 변형된 G-CSF 웨티드는 합성 또는 야생형 웨티드일 수 있으며, 또는 그들은 부위-지향 돌연변이 유발과 같은, 당업계에 공지된 방법에 의하여 제조된 돌연변이 웨티드일 수 있다. 웨티드의 글리코실화는 전형적으로 N-결합 또는 O-결합의 어느 하나이다. 예시적인 N-결합은 아스파라긴 잔기의 측쇄에 대한 변형 당의 부착이다. X가 프롤린을 제외한 임의의 아미노산인 경우의 트리웨티드 서열 아스파라긴-X-세린 및 아스파라긴-X-트레오닌은 아스파라긴 측쇄에 대한 탄수화물 부분의 효소적 부착을 위한 인지 서열이다. 따라서, 폴리웨티드 내에서의 이러한 트리웨티드 서열의 어느 하나의 존재는 잠재적인 글리코실화 자리를 생성한다. O-결합 글리코실화는 드문 또는 비천연 아미노산, 예를 들어 5-하이드록시프롤린 또는 5-하이드록시라이신이 이용될 수 있는 하나, 하이드록시아미노산, 바람직하게는 세린 또는 트레오닌의 하이드록시 측쇄에 대한 하나의 당(예를 들어, N-아세틸갈락토사민, 갈락토오스, 만노스, GlcNAc, 글루코오스, 푸코오스 또는 크실로오스)의 부착을 나타낸다.

[0432]

웨티드 또는 다른 구조에 대한 글리코실화 자리의 부가는 아미노산 서열이 일 이상의 글리코실화 자리를 함유하도록 아미노산 서열을 변경시킴으로써 본 발명에 따라 이루어질 수 있다. 글리코실화 자리의 부가는 웨티드의

서열 내에(0-결합 글리코실화 자리에 대한), -OH기를 나타내는 일 이상의 종, 바람직하게는 세린 또는 트레오닌 잔기를 결합함으로써 이루어질 수 있다. 이러한 부가는 돌연변이에 의하여, 또는 웨프티드의 완전한 화학적 합성에 의하여 이루어질 수 있다. 일부 실시예에서의 웨프티드 아미노산 서열은 DNA 수준에서의 변화를 통하여, 특히 원하는 아미노산으로 번역되는 코돈이 생성되도록 미리 선택된 염기에서 웨프티드를 코딩하는 DNA를 돌연변이시킴으로써 변경된다. DNA 돌연변이(들)는 당업계에 공지된 방법을 이용하여 이루어진다.

[0433] 예시적 실시예에서, 글리코실화 자리는 폴리뉴클레오티드를 셔플링(shuffling)함으로써 부가된다. 후보 웨프티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드는 DNA 셔플링 프로토콜로 조절될 수 있다. DNA 셔플링은 관련 유전자 풀(pool)의 무작위 단편화(random fragmentation) 및 이후의 폴리머라제 사슬 반응-유사 과정(polymerase chain reaction-like process)에 의한 단편의 재집합(reassembly)에 의하여 수행되는, 순환 재조합(recursive recombination) 및 돌연변이(mutation)의 과정이다. 예를 들어, Stemmer, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:10747-10751 (1994); Stemmer, *Nature* 370:389-391 (1994); 및 미국특허 제5,605,793호, 제5,837,458호, 제5,830,721호 및 제5,811,238호 참조.

[0434] 글리코실화 자리의 부가 또는 제거 방법, 및 글리코실 구조 또는 서브구조(substructures)의 부가 또는 제거 방법의 예는 국제공개공보 WO 04/099231, WO03/031464 및 관련 미국 및 PCT 출원에 상세하게 기재되어 있다.

[0435] 본 발명은 또한 일 이상의 선택된 글리코실 잔기를 G-CSF 웨프티드에 부가(또는 제거)하는 수단을 이용하며, 이후 변형 당이 웨프티드의 적어도 하나의 선택된 글리코실 잔기에 콘주케이트된다. 이러한 기술은 예를 들어, G-CSF 웨프티드 상에 존재하지 않거나, 또는 원하는 양으로 존재하지 않는 선택된 글리코실 잔기에, 변형 당을 콘주케이트하는 것이 바람직한 경우에 유용하다. 따라서, 변형 당을 웨프티드에 결합하기 전에, 선택된 글리코실 잔기가 효소적 또는 화학적 결합에 의하여 G-CSF 웨프티드에 콘주케이트된다. 다른 실시예에서, 글리코웨프티드의 글리코실화 패턴은 변형 당의 콘주케이션 이전에, 글리코웨프티드로부터 탄수화물 잔기를 제거함으로써 변경된다. 예를 들어 국제공개공보 WO 98/31826 참조.

[0436] 선택된 글리코실 잔기의 부착 지점의 예는: (a) N-결합 글리코실화 및 O-결합 글리코실화에 대한 일치 자리 (consensus sites); (b) 글리코실트랜스페라제에 대한 수용체인 말단 글리코실 부분; (c) 아르기닌, 아스파라긴 및 히스티딘; (d) 자유 카르복실기; (e) 시스테인의 것과 같은 자유 셀프하이드릴기(sulphydryl groups); (f) 세린, 트레오닌 또는 하이드록시프롤린의 것과 같은 자유 하이드록실기; (g) 페닐알라닌, 티로신 또는 트립토판의 것과 같은 방향족 잔기; 또는 (h) 글루타민의 아미드기를 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 본 발명에 이용되는 예시적인 방법은 1987년 9월 11일에 공개된 국제공개공보 WO 87/05330 및 Aplin and Wriston, CRC CRIT. REV. BIOCHEM., pp. 259-306 (1981)에 기재되어 있다.

[0437] 본 발명에 따르면, PEG 변형 당은 콘주케이션을 매개하는 적절한 효소를 이용하여 글리코실화 또는 비-글리코실화 웨프티드에 콘주케이트된다. 바람직하게는, 변형 도너 당(들), 효소(들) 및 수용체 웨프티드(들)의 농도는 바람직한 정도의 수용체 변형이 이루어질 때까지 글리코실화 과정이 진행되도록 선택된다. 시알릴트랜스페라제에 관하여 설명되기는 하나 하기 논의된 고려 사항은 일반적으로 다른 글리코실트랜스페라제 반응에 대하여 적용 가능한 것으로 인지될 것이다.

[0438] 원하는 올리고당류 구조를 합성하기 위하여 글리코실트랜스페라제를 이용하는 다수의 방법이 공지되어 있으며, 일반적으로 본 발명에 적용 가능하다. 예시적인 방법은 예를 들어, 참조로 본 명세서에 명합되는, 국제공개공보 WO 96/32491, Ito et al., *Pure Appl. Chem.* 65: 753 (1993), 미국특허 제5,352,670호, 제5,374,541호, 제5,545,553호, 및 공유 미국특허 제6,399,336호 및 제6,440,703호에 기재되어 있다.

[0439] 본 발명은 단일 글리코실트랜스페라제 또는 글리코실트랜스페라제의 조합을 이용하여 실시된다. 예를 들어, 시알릴트랜스페라제와 갈락토실트랜스페라제의 조합이 이용될 수 있다. 일 이상의 효소를 이용하는 이러한 실시 예에서, 효소 및 기질은 초기 반응 혼합물에 혼합되는 것이 바람직하며, 또는 제2 효소 반응을 위한 효소 및 반응물은 제1 효소 반응이 완전히 또는 거의 완결된 후에 반응 매질에 가해진다. 단일 용기에서 순서대로 2개의 효소 반응을 수행함으로써, 중간체 종이 분리되는 과정에 비하여 전체 수율이 향상된다.

[0440] 일 실시예에서, 제1 및 제2 효소는 각각 글리코실트랜스페라제이다. 다른 바람직한 실시예에서, 하나의 효소는 엔도글리코시다아제(endoglycosidase)이다. 다른 실시예에서, 2 이상의 효소가 본 발명의 변형 당단백질을 제조하는데 이용된다. 효소는 변형 당의 웨프티드에 대한 첨가 이전, 또는 이후의 임의의 시점에서, G-CSF 웨프티드 상의 당류 구조를 변경시키는데 이용된다.

[0441] 또 다른 실시예에서, 본 발명의 방법은 일 이상의 엑소- 또는 엔도글리코시다아제를 이용한다. 글리코시다아제

는 글리코실 결합을 절단하기 보다는 글리코실 결합을 형성하는, 또는 형성하도록 설계된, 돌연변이 및/또는 변이체일 수 있다. 이러한 돌연변이 글리카나제(glycanase)는 일반적으로 활성 자리 산성 아미노산 잔기의, 아미노산 잔기에 의한 치환을 포함한다. 예를 들어, 엔도글라카나제가 엔도-H(endo-H)인 경우, 치환 활성 자리 잔기는 전형적으로 130 위치에서 Asp, 132 위치에서 Glu 또는 그 조합일 것이다. 아미노산은 일반적으로 세린, 알라닌, 아스파라긴, 또는 글루타민으로 대체된다.

[0442] 그러한 돌연변이 효소는 엔도글리카나제 가수분해 단계의 역반응과 유사한 합성 단계에 의하여 반응을 촉진시킬 수 있다. 그러한 실시예에서, 글리코실 도너 분자(예를 들어, 원하는 올리고- 또는 단-당류 구조)는 이탈기를 함유하며, 반응은 단백질 상의 GlcNAc 잔기에 대한 도너 분자의 부가로 진행된다. 예를 들어, 이탈기는 불소와 같은 할로겐일 수 있다. 다른 실시예에서, 이탈기는 Asn, 또는 Asn-펩티드 부분이다. 또 다른 실시예에서, 글리코실 도너 분자 상의 GlcNAc 잔기는 변형된다. 예를 들어, GlcNAc 잔기는 1,2 옥사졸린 부분(1,2 oxazoline moiety)을 포함할 수 있다.

[0443] 일 실시예에서, 본 발명의 콘주케이트를 제조하는데 이용되는 효소는 촉매량(catalytic amount)으로 존재한다. 특정 효소의 촉매량은 효소 기질의 농도에 따라, 및 온도, 시간 및 pH와 같은 반응 조건에 따라 변화한다. 미리 선택된 기질 농도 및 반응 조건 하에서, 소정 효소의 촉매량을 결정하는 수단은 당업자에게 잘 알려져 있다.

[0444] 본 발명에 따른 반응이 수행되는 온도는 빙점 이상의 온도에서부터 가장 민감한 효소가 변성되는 온도까지의 범위일 수 있다. 바람직한 온도 범위는 약 0°C 내지 약 55°C, 더욱 바람직하게는 약 20°C 내지 약 37°C이다. 다른 예시적 실시예에서, 본 방법의 일 이상의 구성요소는 호열성 효소(thermophilic enzyme)를 이용하여 상승 온도에서 수행된다.

[0445] 일 측면에서, 반응 혼합물은 수용체가 글리코실화되기에 충분한 시간 동안 유지되며, 이에 의하여 원하는 콘주케이트가 형성된다. 콘주케이트의 일부는 종종 몇 시간 후에 겹출될 수 있으며, 회수 가능한 양은 일반적으로 24시간 이하 이내에 얻어진다. 당업자는 반응 속도가 선택된 시스템에 대하여 최적화되는, 다양한 변수 요인(예를 들어, 효소 농도, 도너 농도, 수용체 농도, 온도, 용매 부피)에 의존하는 것임을 인지할 것이다.

[0446] 본 발명은 또한 변형 펩티드의 산업적 규모의 생산을 위하여 제공된다. 본 명세서에 이용된 "산업적 규모(industrial scale)"는 일반적으로 적어도 1g의 완료된, 정제 콘주케이트의 생산을 나타낸다.

[0447] 후술하는 논의에서, 본 발명은 글리코실화-펩티드에 대한 변형 시알산 부분의 콘주케이션에 의하여 예시된다. 예시적인 변형 시알산은 PEG로 표지된다. PEG-변형 시알산 및 글리코실화 펩티드의 이용에 대한 하기 논의의 초점은 설명의 명확화를 위한 것이며, 본 발명이 이러한 두개의 파트너의 콘주케이션에 한정되는 것을 의미하고자 하는 것이 아니다. 당업자는 하기 논의가 시알산 이외의 변형 글리코실 부분의 첨가에 대해서 일반적으로 적용가능함을 이해한다. 또한, 하기 논의는 다른 PEG 부분, 치료 부분 및 생분자를 포함하는, PEG 이외의 작용제를 갖는 글리코실 단위의 변형에 대해서 동등하게 적용된다.

[0448] 효소적 접근은 펩티드 또는 글리코펩티드 상에의 폐길화 또는 폐길화 탄수화물의 선택적 도입을 위하여 이용될 수 있다. 본 방법은 PEG, PPG 또는 마스크된 반응성 기능기(masked reactive functional group)를 함유하는 변형 당을 이용하며, 적합한 글리코실트랜스페라제 또는 글리코신타제와 결합된다. 원하는 탄수화물 결합을 만드는 글리코실트랜스페라제를 선택하고, 도너 기질로서 변형 당을 이용함으로써, PEG 또는 PPG는 직접적으로 G-CSF 펩티드 골격 상에, 글리코펩티드의 존재하는 당 잔기 상에, 또는 펩티드에 부가된 당 잔기 상에 도입될 수 있다.

[0449] 시알릴트랜스페라제에 대한 수용체는 천연 발생 구조로, 또는 재조합적으로, 효소적으로 또는 화학적으로 그에 놓여진 것의 어느 하나로, 본 발명의 방법에 의하여 변형되는 G-CSF 펩티드 상에 존재한다. 적합한 수용체는 예를 들어, Gal $\beta$ 1,4GlcNAc, Gal $\beta$ 1,4GalNAc, Gal $\beta$ 1,3GalNAc, 락토-N-테트라로스(lacto-N-tetraose), Gal $\beta$ 1,3GlcNAc, Gal $\beta$ 1,3Ara, Gal $\beta$ 1,6GlcNAc, Gal $\beta$ 1,4Glc(락토오스)와 같은 갈락토실 수용체, 및 당업자에게 공지된 다른 수용체(예를 들어, Paulson *et al.*, *J. Biol. Chem.* **253**: 5617-5624 (1978) 참조)를 포함한다.

[0450] 일 실시예에서, 시알릴트랜스페라제에 대한 수용체는 글리코펩티드의 생체 내 합성 시에 변형되는 글리코펩티드 상에 존재한다. 그러한 글리코펩티드는 글리코펩티드의 글리코실화 패턴의 사전 변형 없이 청구된 방법을 이용하여 시알릴화될 수 있다. 또는, 본 발명의 방법은 적합한 수용체를 포함하지 않는 펩티드를 시알릴화하는데 이용될 수 있으며: 먼저, 당업자에게 공지된 방법에 의하여 수용체를 포함하도록 G-CSF 펩티드를 변형시킨다. 예시적 실시예에서, GalNAc 잔기는 GalNAc 트랜스페라제의 작용에 의하여 부가된다.

[0451] 예시적 실시예에서, 갈락토실 수용체는 갈락토오스 잔기를 G-CSF 웨티드에 결합된 적합한 수용체, 예를 들어 GlcNAc에 부착시킴으로써 제조된다. 본 방법은 적합한 양의 갈락토실트랜스페라제(예를 들어, gal $\beta$ 1,3 또는 gal $\beta$ 1,4) 및 적합한 갈락토실 도너(예를 들어, UDP-갈락토오스)를 함유하는 반응 혼합물과 함께, 변형되는 G-CSF 웨티드를 배양하는 것을 포함한다. 반응은 완결될 때까지 실질적으로 진행되거나, 또는 반응은 미리 선택된 양의 갈락토오스 잔기를 가할 때 종료되도록 한다. 선택된 당류 수용체를 제조하는 다른 방법은 당업자에게 자명할 것이다.

[0452] 또 다른 실시예에서, 시알릴트랜스페라제에 대한 수용체, 또는 적합한 수용체를 얻기 위하여 일 이상의 적합한 잔기가 부가될 수 있는 부분의 어느 하나를 노출시키기 위하여, 글리코웨티드-결합 올리고당류는 먼저 전체적으로 또는 부분적으로 "잘라져 다듬어진다(trimmed)". 글리코실트랜스페라제 및 엔도글리코시다아제와 같은 효소(예를 들어 미국특허 제5,716,812호 참조)는 부착 및 "잘라져 다듬기(trimming)" 반응에 유용하다.

[0453] 후술되는 논의에서, 본 발명의 방법은 그에 부착된 PEG 부분을 갖는 변형 당의 이용에 의하여 예시된다. 논의의 초점은 설명의 명확화를 위한 것이다. 당업자는 본 논의가 변형 당이 치료 부분, 생분자 등을 함유하는 그려한 실시예에 관하여 동등하게 관련됨을 인지할 것이다.

[0454] 탄수화물 잔기가 변형 당의 부가 이전에 "잘라져 다듬어진" 본 발명의 예시적 실시예에서, 고 만노스(hight mannose)는 제1 세대 바이안테나 구조(first generation biantennary structure)로 짧게 잘라진다. PEG 부분을 함유하는 변형 당은 "짧게 자르기(trimming back)"에 의하여 노출된 일 이상의 당 잔기에 콘주케이트된다. 일 실시예에서, PEG 부분은 PCE 부분에 콘주케이트된 GlcNAc 부분을 통하여 부가된다. 변형 GlcNAc은 바이안테나 구조의 말단 만노스 잔기의 1개 또는 2개에 부착된다. 또는, 비변형 GlcNAc가 가지 달린 종의 말단의 1개 또는 2개에 부가될 수 있다.

[0455] 다른 예시적 실시예에서, PEG 부분은 말단 만노스 잔기 상에 부가된 GlcNAc 잔기에 콘주케이트된, 갈락토오스 잔기를 갖는 변형 당을 통하여 바이안테나 구조의 말단 만노스 잔기의 1개 또는 2개에 부가된다. 또는, 비변형 Gal은 1개 또는 2개의 말단 GlcNAc 잔기에 부가될 수 있다.

[0456] 또 다른 실시예에서, PEG 부분은 변형 시알산을 이용하여 Gal 상에 부가된다.

[0457] 다른 예시적 실시예에서, 고 만노스 구조는 바이안테나 구조가 파생하는 만노스로 "짧게 잘라진다(trimmed back)". 일 실시예에서, PEG 부분은 폴리머로 변형된 GlcNAc을 통하여 부가된다. 또는, 비변형 GlcNAc는 만노스, 이어서 부착된 PEG 부분을 갖는 Gal에 부가된다. 또 다른 실시예에서, 비변형 GlcNAc 및 Gal 잔기는 만노스, 및 PEG 부분으로 변형된 시알산 부분에 순서대로 부가된다.

[0458] 다른 예시적인 실시예에서, 고 만노스는 제1 만노스가 부착된 GlcNAc로 "짧게 잘라진다(trimmed back)". GlcNAc은 PEG 부분을 함유하는 Gal 잔기에 콘주케이트된다. 또는, 비변형 Gal이 GlcNAc에 부가된 후, 수용성 당으로 변형된 시알산이 부가된다. 또 다른 실시예에서, 말단 GlcNAc는 Gal과 콘주케이트되고, 이어서 GlcNAc는 PEG 부분을 함유하는 변형된 푸코스로 푸코실화된다.

[0459] 고 만노스는 웨티드의 Asn에 부착된 제1 GlcNAc로 짧게 잘라질 수 있다. 일 실시예에서, GlcNAc-(Fuc)<sub>a</sub> 잔기의 GlcNAc는 수용성 폴리머를 함유하는 GlcNAc와 콘주케이트된다. 다른 실시예에서, GlcNAc-(Fuc)<sub>a</sub> 잔기의 GlcNAc는 수용성 폴리머를 함유하는 Gal에 의하여 변형된다. 또 다른 실시예에서, GlcNAc는 Gal에 의하여 변형된 후, PEG 부분으로 변형된 시알릴산의 Gal로 콘주케이션된다.

[0460] 다른 예시적인 실시예는 각각 참조로 본 명세서에 명합되는, 공유 미국출원공개공보 제2004/0132640호; 제2004/0063911호; 제2004/0137557호; 미국특허출원 제10/369,979호; 제10/410,913호; 제10/360,770호; 제10/410,945호 및 국제출원PCT/US02/32263에 설명되어 있다.

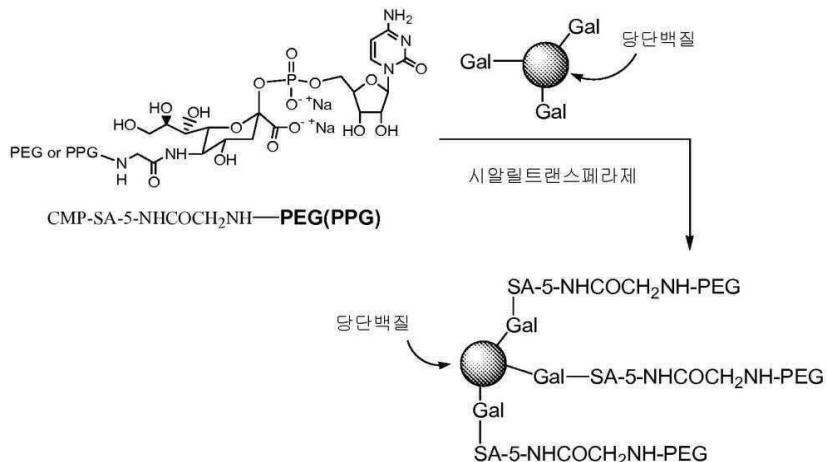
[0461] 전술한 실시예는 본 명세서에 설명된 방법의 능력에 대한 설명을 제공한다. 본 명세서에 기재된 방법을 이용하여, 실질적으로 임의의 원하는 구조의 탄수화물 잔기를 "짧게 자르고(trim back)", 형성하는 것이 가능하다. 변형 당은 전술한 바와 같이 탄수화물 부분의 말단에 부가될 수 있으며, 또는 웨티드 코어와 탄수화물 말단 사이의 중간체(intermediate)일 수 있다.

[0462] 예시적 실시예에서, 존재하는 시알산은 시알릴다아제를 이용하여 G-CSF 글리코웨티드로부터 제거되며, 이에 의하여 하부에 있는 갈락토실 잔기의 전부 또는 대부분을 노출시킨다. 또는, 웨티드 또는 글리코웨티드는 갈락토오스 잔기, 또는 갈락토오스 단위에서 종결되는 올리고당류 잔기로 표지된다. 갈락토오스 잔기의 노출 또는 부

가 후에, 적합한 시알릴트랜스페라제가 변형 시알산을 부가하는데 이용된다. 이러한 접근은 하기 반응식 1에 요약된다.

[0463]

[반응식 1]



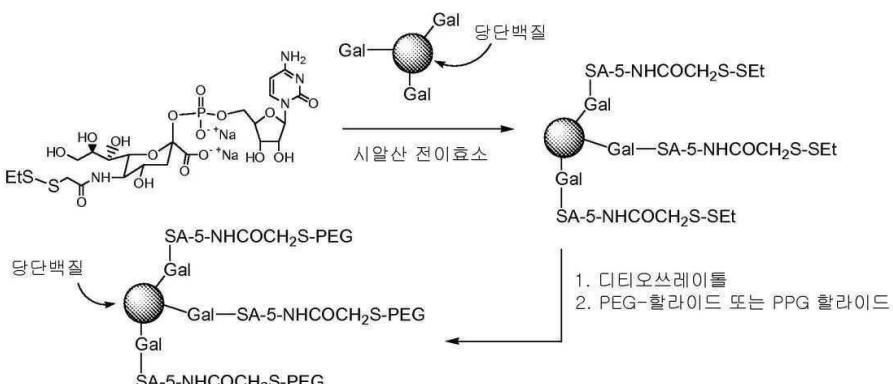
[0464]

[0465]

반응식 2에 요약된 또 다른 접근에서, 마스크된(masked) 반응성 기능기는 시알산 상에 존재한다. 마스크된 반응성 기능기는 변형 시알산을 G-CSF에 부착시키는데 이용된 조건에 의하여 영향받지 않는 것이 바람직하다. 변형 시알산의 G-CSF 웨티드에 대한 공유 부착 후에, 마스크는 제거되고 G-CSF 웨티드는 PEG와 같은 작용제와 콘주게이트된다. 작용제는 변형 당 잔기 상의 노출된 반응성 기와의 반응에 의하여 특이적 방식으로(specific manner) 웨티드에 콘주게이트된다.

[0466]

[반응식 2]

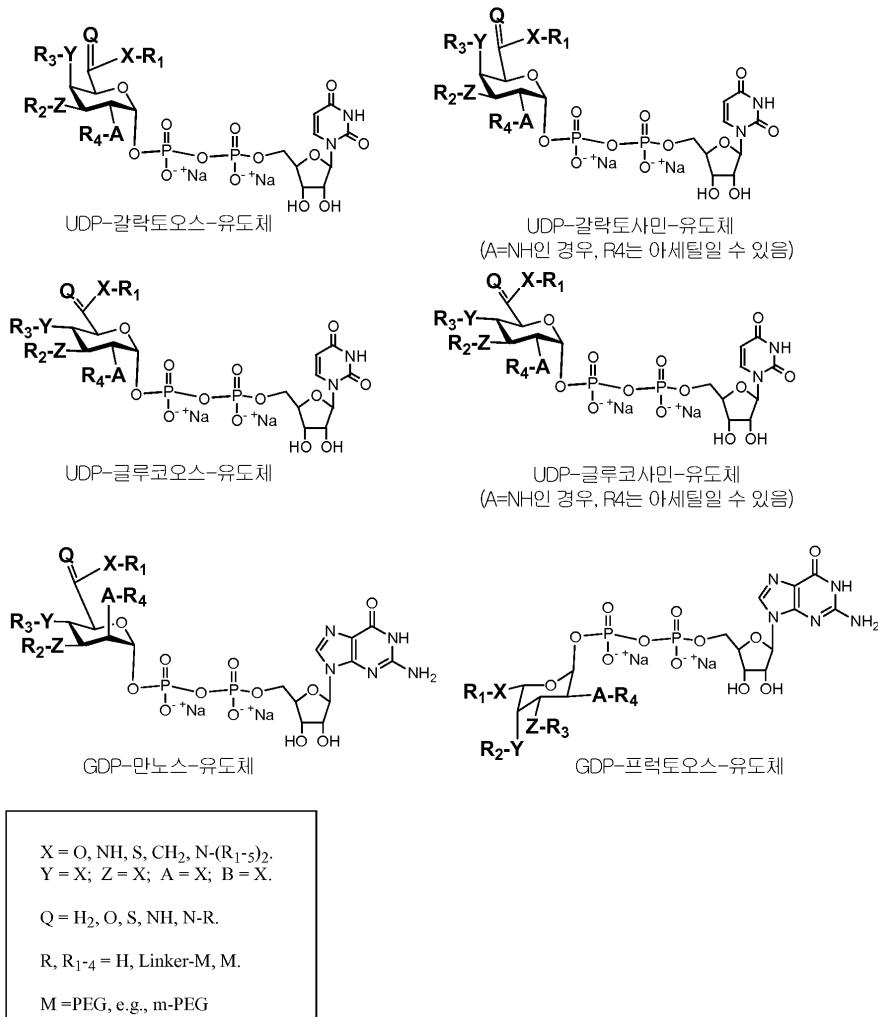


[0467]

[0468]

본 명세서에 설명된 임의의 변형 당은 글리코웨티드의 올리고당류 측쇄의 말단 당에 따라서, 적합한 글리코실트랜스페라제와 함께 이용될 수 있다(표 1). 상기에서 논의된 바와 같이, 폐길화 구조의 도입에 요구되는 글리코웨티드의 말단 당은 발현 중에 자연적으로 도입될 수 있으며, 또는 적합한 글리코시다아제(들), 글리코실트랜스페라제(들) 또는 글리코시다아제(들) 및 글리코실트랜스페라제(들)의 혼합물을 이용하여 발현 후에 제조될 수 있다.

표 1



[0469]

[0470]

다른 예시적인 실시예에서, UDP-갈락토오스-PEG는 우유(bovine milk)  $\beta$  1,4-갈락토실트랜스페라제와 반응함으로써, 변형 갈락토오스를 적합한 말단 N-아세틸글루코사민 구조로 전달한다. 글리코펩티드 상의 말단 GlcNAc 잔기는 포유류, 곤충, 식물 또는 진균류와 같은 발현 시스템에서 발생할 수 있는 것과 같이, 발현 중에 제조될 수 있으며, 또한 필요에 따라 시알릴다이아제 및/또는 글리코시다이아제 및/또는 글리코실트랜스페라제로 글리코펩티드를 처리함으로써 제조될 수 있다.

[0472]

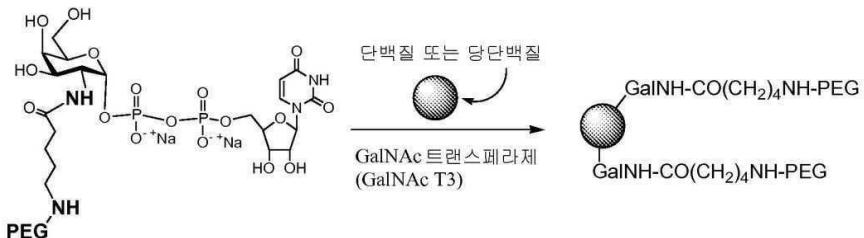
다른 예시적 실시예에서, GNT1-5과 같은 GlcNAc 트랜스페라제는 페길화-GlcN을 글리코펩티드 상의 말단 만노스 잔기에 전달하는데 이용된다. 또 다른 예시적 실시예에서, N- 및/또는 O-결합 글리칸 구조(glycan structures)는 글리코펩티드로부터 효소적으로 제거되어, 후속적으로 변형 당과 콘주케이트되는 아미노산 또는 말단 글리코실 잔기를 노출시킨다. 예를 들어, 엔도글리카나아제는 글리코펩티드의 N-결합 구조를 제거하여, 글리코펩티드 상에 GlcNAc-결합된 Asn로서 말단 GlcNAc를 노출시키는데 이용된다. UDP-Gal-PEG 및 적합한 갈락토실트랜스페라제는 노출된 GlcNAc 상에 PEG-갈락토오스 기능기를 도입시키는데 이용된다.

[0473]

양자택일적인 실시예에서, 변형 당은 당 잔기를 웹티드 골격에 전달하는 것으로 알려진 글리코실트랜스페라제를 이용하여 G-CSF 웹티드 골격에 직접적으로 부가된다. 이 예시적 실시예는 반응식 3에 설명된다. 본 발명의 실시에 이용될 수 있는 예시적인 글리코실트랜스페라제는 GalNAc 트랜스페라제(GalNAc T1-14), GlcNAc 트랜스페라제, 푸코실트랜스페라제, 글루코실트랜스페라제, 크실로실트랜스페라제, 만노실트랜스페라제 등을 포함하나, 이

에 한정되는 것은 아니다. 이러한 접근의 이용에 의하여 임의의 탄수화물이 결여된 웨티드 상에, 또는 양자택 일적으로 존재하는 글리코웨티드 상에 변형 당의 직접적 부가가 가능하다. 두 가지 경우에서, 변형 당의 부가는 화학적 방법을 이용하는 단백질의 웨티드 골격의 변형 중에 발생하는 것과 같은 무작위 방식이 아니라, 글리코실트랜스페라제의 기질 특이성에 의하여 정의된 웨티드 골격 상의 특정 위치에서 일어난다. 다수의 작용제가 적합한 아미노산 서열을 폴리웨티드 사슬 내에 설계함으로써 글리코실트랜스페라제 기질 웨티드 서열이 결여된 단백질 또는 글리코웨티드 내에 도입될 수 있다.

## [0474] [반응식 3]



## [0475]

## [0476]

전술한 각각의 예시적 실시예에서, 일 이상의 추가적인 화학적 또는 효소적 변형 단계가 웨티드에 대한 변형 당의 콘주케이션 후에 이용될 수 있다. 예시적 실시예에서, 효소(예를 들어, 푸코실트랜스페라제)는 G-CSF 웨티드에 부착된 말단 변형 당 상에 글리코실 단위(예를 들어, 푸코오스)를 부가하는데 이용된다. 다른 실시예에서, 효소적 반응이 변형 당이 콘주케이트하지 못한 자리를 "덮기 위하여(cap)" 이용된다. 양자택일적으로, 화학적 반응이 콘주케이트된 변형 당의 구조를 변경시키기 위하여 이용된다. 예를 들어, 콘주케이트 변형 당은 변형 당이 부착된 웨티드 성분과의 결합을 안정화 또는 불안정화시키는 작용제와 반응한다. 다른 실시 예에서, 변형 당의 성분은 웨티드에 대한 콘주케이션 후에 탈보호된다. 당업자는 변형 당이 G-CSF 웨티드에 콘주케이트된 후의 단계에서, 본 발명의 방법에 이용되는 다수의 효소적 및 화학적 과정이 있음을 인지할 것이다. 변형 당-웨티드 콘주케이트의 추가적인 작업도 본 발명의 범위 이내이다.

[0477] 효소

## [0478]

아실-결합 콘주케이트의 형성에 관하여 전술한 효소에 더하여, 콘주케이트 및 출발 기질(예를 들어, 웨티드, 리피드)의 글리코실화 패턴은 다른 효소를 이용하는 방법에 의하여 만들어지고, 짧게 잘라지고 또는 다르게 변형 될 수 있다. 당 도너를 수용체에 전달하는 효소를 이용하는 웨티드 및 리피드의 리모델링 방법은 2003년 4월 17일에 공개된 DeFrees의 국제공개공보 WO 03/031464 A2에서 상세하게 논의된다. 본 발명에 이용되는 선택된 효소의 간략한 요약은 하기에 설명된다.

[0479] 글리코실트랜스페라제

## [0480]

글리코실트랜스페라제는 단계적 방식(step-wise fashion)으로 활성화 당(도너 NDP- 또는 NMP-당)의, 단백질, 글리코웨티드, 리피드 또는 글리코리피드에 대한, 또는 성장하는 올리고당류의 비활원 말단에 대한 부가를 촉진시킨다. N-결합 글리코웨티드는 엔 블록 전달(en block transfer)에서 트랜스페라제 및 리피드-결합 올리고당류 도너 Dol-PP-NAG<sub>2</sub>Glc<sub>3</sub>Man<sub>9</sub>을 통하여 합성된 후, 코어를 잘라서 다듬는다(trimming). 이 경우에, "코어(core)" 당류의 성질은 이어지는 부착물(attachments)과 다소 상이하다. 매우 다수의 글리코실트랜스페라제가 당업계에 공지되어 있다.

## [0481]

본 발명에 이용되는 글리코실트랜스페라제는 변형 당을 당 도너로 이용할 수 있는 한 임의의 것일 수 있다. 그러한 효소의 예는 갈락토실트랜스페라제(galactosyltransferase), N-아세틸글루코사미닐트랜스페라제(N-acetylglucosaminyltransferase), N-아세틸갈락토사미닐트랜스페라제(N-acetylgalactosaminyltransferase), 푸코실트랜스페라제(fucosyltransferase), 시알릴트랜스페라제(sialyltransferase), 만노실트랜스페라제(mannosyltransferase), 크실로실트랜스페라제(xylosyltransferase), 글루쿠로노닐트랜스페라제(glucurononyltransferase) 등과 같은 르루아르 경로(Leloir pathway) 글리코실트랜스페라제를 포함한다.

## [0482]

글리코실트랜스페라제 반응에 관여하는 효소적 당류 합성에 있어서, 글리코실트랜스페라제는 클론화될 수 있으

며, 또는 임의의 근원으로부터 분리될 수 있다. 많은 클론화된 글리코실트랜스페라제 및 그들의 폴리뉴클레오티드 서열이 알려져 있다. 예를 들어, "The WWW Guide To Cloned Glycosyltransferase," ([http://www.vei.co.uk/TGN/gt\\_guide.htm](http://www.vei.co.uk/TGN/gt_guide.htm)) 참조. 글리코실트랜스페라제 아미노산 서열 및 상기 아미노산 서열이 유래될 수 있는 글리코실트랜스페라제를 코딩하는 뉴클레오티드 서열은 GenBank, Swiss-Prot, EMBL 및 다른 것을 포함하는, 다양한 공개적으로 이용가능한 데이터베이스에서 찾을 수 있다.

[0483] 본 발명의 방법에 채용될 수 있는 글리코실트랜스페라제는 갈락토실트랜스페라제, 푸코실트랜스페라제, 글루코실트랜스페라제, N-아세틸갈락토사미닐트랜스페라제, N-아세틸글루코사미닐트랜스페라제, 글루쿠로닐트랜스페라제, 시알릴트랜스페라제, 만노실트랜스페라제, 글루쿠론산 트랜스페라제, 갈락ту론산 트랜스페라제, 및 올리고사카릴 트랜스페라제를 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 적합한 글리코실트랜스페라제는 진핵 생물로부터, 및 원핵 생물로부터 얻어진 것을 포함한다.

[0484] 글리코실트랜스페라제를 코딩하는 DNA는 화학 합성에 의하여, 적합한 세포 또는 세포주 배양물로부터 mRNA의 역전사(reverse transcripts)를 스크리닝함으로써, 적합한 세포로부터 계놈 도서관(genomic libraries)을 스크리닝함으로써, 또는 이러한 과정의 조합에 의하여 얻어질 수 있다. mRNA 또는 계놈 DNA의 스크리닝은 글리코실트랜스페라제 유전자 서열로부터 생성된 올리고뉴클레오티드 프로브로 수행될 수 있다. 이 프로브는 공지된 방법에 따라 형광기(fluorescent group), 방사성 원자(radioactive atom) 또는 화학발광기(chemiluminescent group)와 같은 검출가능한 기로 표지될 수 있으며, 종래 혼성화 분석(hybridization assays)에 이용될 수 있다. 양자택일적 방법에서, 글리코실트랜스페라제 유전자 서열은 PCR 올리고뉴클레오티드 프라이머가 글리코실트랜스페라제 유전자 서열로부터 생성되는 중합효소 연쇄 반응(PCR) 방법의 이용에 의하여 얻어질 수 있다. 미국특허 제4,683,195호(Mullis et al.) 및 미국특허 제4,683,202호(Mullis) 참조.

[0485] 글리코실트랜스페라제는 글리코실트랜스페라제 효소를 코딩하는 DNA를 함유하는 벡터로 형질전환되는 숙주 세포에서 합성될 수 있다. 벡터는 글리코실트랜스페라제 효소를 코딩하는 DNA를 증폭시키는 것 및/또는 글리코실트랜스페라제 효소를 코딩하는 DNA를 발현시키는 것의 어느 하나에 이용된다. 발현 벡터(expression vector)는 글리코실트랜스페라제 효소를 코딩하는 DNA 서열이 적합한 숙주에서 글리코실트랜스페라제 효소의 발현을 초래할 수 있는 적합한 제어 서열(control sequences)에 실시가능하게 결합되어 있는(operably linked), 복제가능한 DNA 구성체(replicable DNA construct)이다. 그러한 제어 서열에 대한 필요성은 선택된 숙주 및 선택된 형질전환 방법에 따라 달라질 것이다. 일반적으로, 제어 서열은 전사 프로모터(transcriptional promoter), 전사를 제어하기 위한 선택적인 작동자 서열(operator sequence), 적합한 mRNA 리보솜 결합 자리를 코딩하는 서열 및 전사와 번역의 종료를 제어하는 서열을 포함한다. 증폭 벡터(amplification vectors)는 발현 제어 도메인(expression control domains)을 필요로 하지 않는다. 요구되는 모든 것은 일반적으로 복제의 근원에 의하여 주어지는, 숙주에서 복제할 수 있는 능력 및 형질전환주(transformants) 인지를 용이하게 하는 선택 유전자(selection gene)이다.

[0486] 예시적 실시예에서, 본 발명은 원핵생물 효소를 이용한다. 그러한 글리코실트랜스페라제는 많은 그람 음성 박테리아(gram negative bacteria)에 의하여 생성되는, 리포올리고당류(LOS)의 합성에 관여하는 효소를 포함한다 (Preston et al., *Critical Reviews in Microbiology* 23(3): 139-180 (1996)). 그러한 효소는  $\beta$ 1,6 갈락토실트랜스페라제 및  $\beta$ 1,3 갈락토실트랜스페라제(예를 들어, EMBL Accession Nos. M80599 및 M86935(대장균(*E. coli*)); EMBL Accession No. S56361(살모넬라 티피무리움(*S. typhimurium*))), 글루코실트랜스페라제(Swiss-Prot Accession No. P25740(대장균(*E. coli*)),  $\beta$ 1,2-글루코실트랜스페라제(*rfaJ*)(Swiss-Prot Accession No. P27129(대장균(*E. coli*)) 및 Swiss-Prot Accession No. P19817 (살모넬라 티피무리움(*S. typhimurium\beta1,2-N-아세틸글루코사미닐트랜스페라제(*rfaK*)(EMBL Accession No. U00039(대장균(*E. coli*)))를 포함하는, 대장균(*E. coli*) 및 살모넬라 티피무리움(*Salmonella typhimurium*)과 같은 종의 *rfa* 오퍼론(operons)의 단백질을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 아미노산 서열이 알려진 다른 글리코실트랜스페라제는 클래브시엘라 뉴모니에(*Klebsiella pneumoniae*), 대장균(*E. coli*), 살모넬라 티피무리움(*Salmonella typhimurium*), 살모넬라 엔테리카(*Salmonella enterica*), 여시니아 엔테로콜리티카(*Yersinia enterocolitica*), 마이코박테리움 레프로섬(*Mycobacterium leprae*)과 같은 유기체인 것을 특징으로 하는 *rfaB*와 같은 오퍼론, 및 슈도모나스 애루지노사(*Pseudomonas aeruginosa*)의 *rh1* 오퍼론에 의하여 코딩되는 것을 포함한다.*

[0487] 점막 병원균 나이세리아 고노르호에(*Neisseria gonorrhoeae*) 및 나이세리아 메닝기티디스(*N. meningitidis*)의 LOS에서 확인된, 락토-N-네오텐트라오제(lacto-N-neotetraose), D-갈락토실- $\beta$ -1,4-N-아세틸-D-글루코사미닐- $\beta$ -1,3-D-갈락토실- $\beta$ -1,4-D-글루코오스 및  $P^k$  혈액형 삼당류 서열( $P^k$  blood group trisaccharide sequence),

D-갈락토실- $\alpha$ -1,4-D-갈락토실- $\beta$ -1,4-D-글루코오스를 함유하는 구조를 생성하는데 관여하는 글리코실트랜스페라제도 본 발명에의 이용에 적합하다(Scholten *et al.*, *J. Med. Microbiol.* **41**: 236-243 (1994)). 이러한 구조의 생합성에 관여하는 글리코실트랜스페라제를 코딩하는 나이세리아 메닝기티디스(*N. meningitidis*) 및 나이세리아 고노르호에(*N. gonorrhoeae*)로부터의 유전자는 나이세리아 메닝기티디스(*N. meningitidis*) 면역형(immunotypes) L3 및 L1(Jennings *et al.*, *Mol. Microbiol.* **18**: 729-740 (1995)) 및 나이세리아 고노르호에 돌연변이 F62(*N. gonorrhoeae* mutant F62) (Gotshlich, *J. Exp. Med.* **180**: 2181-2190 (1994))로부터 확인되었다. 나이세리아 메닝기티디스(*N. meningitidis*)에서, 3개의 유전자 *IgtA*, *IgtB* 및 *IgE*로 이루어진 유전자 좌( locus )는 락토-N-네오텐트라오제(lacto-N-neotetraose) 사슬에서 마지막 3개의 당의 부가에 필요한 글리코실트랜스페라제 효소를 코딩한다(Wakarchuk *et al.*, *J. Biol. Chem.* **271**: 19166-73 (1996)). 최근 *IgtB* 및 *IgtA* 유전자 산물의 효소 활성이 증명되었으며, 이는 그들의 제안된 글리코실트랜스페라제 기능에 대한 첫 번째 직접적인 증거를 제공하는 것이다(Wakarchuk *et al.*, *J. Biol. Chem.* **271**(45): 28271-276 (1996)). 나이세리아 고노르호에(*N. gonorrhoeae*)에서, 2개의 추가적인 유전자인, 락토-N-네오텐트라오제의 말단 갈락토오스의 3 위치에  $\beta$ -D-GalNAc를 부가하는 *IgtD* 및 잘려진 LOS의 락토오스 성분에 말단  $\alpha$ -D-Gal을 부가하는 *IgtC*가 있으며, 따라서 P<sup>k</sup> 혈액형 항원 구조(P<sup>k</sup> blood group antigen structure)를 생성한다(Gotshlich(1994), *supra*). 나이세리아 메NING기티디스(*N. meningitidis*)에서, 분리된 면역형 L1은 P<sup>k</sup> 혈액형 항원을 발현하며, *IgtC* 유전자를 운반하는 것으로 나타났다(Jennings *et al.*, (1995), *supra*). 나이세리아(*Neisseria*) 글리코실트랜스페라제 및 관련 유전자는 미국특허 제5,545,553호(Gotschlich)에 기재되어 있다. 헬리코박터 파일로리(*Helicobacter pylori*)로부터의  $\alpha$ 1,2-푸코실트랜스페라제 및  $\alpha$ 1,3-푸코실트랜스페라제에 대한 유전자는 특성화되었다(Martin *et al.*, *J. Biol. Chem.* **272**:21349-21356(1997)). 캄필로박터 제주니(*Campylobacter jejuni*)의 글리코실트랜스페라제도 본 발명에 이용된다(예를 들어, [http://afmb.cnrs-mrs.fr/~pedro/CAZY/gtf\\_42.html](http://afmb.cnrs-mrs.fr/~pedro/CAZY/gtf_42.html) 참조).

#### [0488] 푸코실트랜스페라제

[0489] 일부 실시예에서, 본 발명의 방법에 이용된 글리코실트랜스페라제는 푸코실프랜스페라제이다. 푸코실트랜스페라제는 당업자에게 공지되어 있다. 예시적인 푸코실트랜스페라제는 L-푸코오스를 GDP-푸코오스로부터 수용체 당의 하이드록시 위치로 전달하는 효소를 포함한다. 비-뉴클레오티드당을 수용체에 전달하는 푸코실트랜스페라제도 본 발명에 이용된다.

[0490] 일부 실시예에서, 수용체 당은 올리고다당류 글리코시드에서 Gal $\beta$ (1→3,4)GlcNAc $\beta$ -기의 GlcNAc이다. 이 반응에 있어서 적합한 푸코실트랜스페라제는 모유에서 처음으로 특성화된(Palcic, *et al.*, *Carbohydrate Res.* **190**: 1-11 (1989); Prieels, *et al.*, *J. Biol. Chem.* **256**: 10456-10463 (1981); 및 Nunez, *et al.*, *Can. J. Chem.* **59**: 2086-2095 (1981) 참조), Gal $\beta$ (1→3,4)GlcNAc $\beta$ - $\alpha$ (1→3,4)푸코실트랜스페라제(FTIII E.C. No. 2.4.1.65), 및 인간 혈청에서 발견되는 Gal $\beta$ (1→4)GlcNAc $\beta$ - $\alpha$ 푸코실트랜스페라제(FTIV, FTV, FTVI)를 포함한다. FTVII(E.C. No. 2.4.1.65)인 시알릴  $\alpha$ (2→3)Gal $\beta$ ((1→3)GlcNAc $\beta$  푸코실트랜스페라제도 특성화되었다. Gal $\beta$ (1→3,4)GlcNAc $\beta$ - $\alpha$ (1→3,4)푸코실트랜스페라제의 재조합 형태도 특성화되었다(Dumas, *et al.*, *Bioorg. Med. Letters* **1**: 425-428 (1991) 및 Kukowska-Latallo, *et al.*, *Genes & Development* **4**: 1288-1303 (1990) 참조). 다른 예시적인 푸코실트랜스페라제는 예를 들어,  $\alpha$ 1,2 푸코실트랜스페라제(E.C. No. 2.4.1.69)를 포함한다. 효소적인 푸코실화는 Mollincone, *et al.*, *Eur. J. Biochem.* **191**: 169-176 (1990) 또는 미국특허 제5,374,655호에 기재된 방법에 의하여 수행될 수 있다. 푸코실트랜스페라제 제조에 이용된 세포는 GDP-푸코오스를 합성하기 위한 효소 시스템을 포함할 것이다.

#### [0491]

#### [0492] 갈락토실트랜스페라제

[0493] 다른 군의 실시예에서, 글리코실트랜스페라제는 갈락토실트랜스페라제이다. 예시적인 갈락토실트랜스페라제는  $\alpha$ (1,3) 갈락토실트랜스페라제(E.C. No. 2.4.1.151, 예를 들어, Dabkowsky *et al.*, *Transplant Proc.* **25**:2921 (1993) 및 Yamamoto *et al.*, *Nature* **345**: 229-233 (1990)), 소(bovine)(GenBank j04989, Joziasse *et al.*, *J. Biol. Chem.* **264**: 14290-14297 (1989)), 쥐(murine)(GenBank m26925; Larsen *et al.*, *Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA* **86**: 8227-8231 (1989)), 돼지(porcine)(GenBank L36152; Strahan *et al.*, *Immunogenetics* **41**: 101-105 (1995))를 포함한다. 다른 적합한  $\alpha$ 1,3 갈락토실트랜스페라제는 혈액형 B 항원의 합성에 관여하는 것이다(EC 2.4.1.37, Yamamoto *et al.*, *J. Biol. Chem.* **265**: 1146-1151 (1990) (인간)). 또 다른 예시적인 갈락토실

트랜스페라제는 코어 Gal-T1(core Gal-T1)이다.

[0494] 예를 들어, EC 2.4.1.90(LacNAc 신타아제) 및 EC 2.4.1.22(락토오스 신타아제)(소 (D'Agostaro *et al.*, *Eur. J. Biochem.* **183**: 211-217 (1989)), 인간(Masri *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **157**: 657-663 (1988)), 쥐(Nakazawa *et al.*, *J. Biochem.* **104**: 165-168 (1988)), 및 E.C. 2.4.1.38을 포함하는  $\beta$ (1,4) 갈락토실트랜스페라제 및 세라마이드 갈락토실트랜스페라제(ceramide galactosyltransferase)(EC 2.4.1.45, Stahl *et al.*, *J. Neurosci. Res.* **38**: 234-242 (1994))도 본 발명의 방법에 적합하게 이용된다. 다른 적합한 갈락토실트랜스페라제는 예를 들어,  $\alpha$ 1,2 갈락토실트랜스페라제(예를 들어, 시조사카로미세스 품베 (*hizosaccharomyces pombe*)로부터의, Chapell *et al.*, *Mol. Biol. Cell* **5**: 519-528 (1994))를 포함한다.

### 시알릴트랜스페라제

[0496] 시알릴트랜스페라제는 본 발명의 재조합 세포 및 반응 혼합물에 유용한, 다른 형태의 글리코실트랜스페라제이다. 재조합 시알릴트랜스페라제를 생산하는 세포는 시알릴트랜스페라제에 대한 시알산 도너인, CMP-시알산을 생성한다. 본 발명에의 이용에 적합한 시알릴트랜스페라제의 예는 ST3Gal III(예를 들어, 래트 또는 인간 ST3Gal III), ST3Gal IV, ST3Gal I, ST3Gal II, ST6Gal I, ST3Gal V, ST6Gal II, ST6GalNAc I, ST6GalNAc II, 및 ST6GalNAc III를 포함한다(본 명세서에 이용된 시알릴트랜스페라제의 명명법은 Tsuji *et al.*, *Glycobiology* **6**: v-xiv (1996)에 기재된 것이다).  $\alpha$ (2,3)시알릴트랜스페라제(EC 2.4.99.6)로 나타내어지는 예시적인  $\alpha$ (2,3)시알릴트랜스페라제는 시알산을 Gal  $\beta$ 1→3Glc 이당류 또는 글리코시드의 비환원 말단 Gal로 전달한다. Van den Eijnden *et al.*, *J. Biol. Chem.* **256**: 3159 (1981), Weinstein *et al.*, *J. Biol. Chem.* **257**: 13845 (1982) 및 Wen *et al.*, *J. Biol. Chem.* **267**: 21011 (1992) 참조. 다른 예시적인  $\alpha$ 2,3-시알릴트랜스페라제(EC 2.4.99.4)는 시알산을 이당류 또는 글리코시드의 비환원 말단 Gal로 전달한다. Rearick *et al.*, *J. Biol. Chem.* **254**: 4444 (1979) 및 Gillespie *et al.*, *J. Biol. Chem.* **267**: 21004 (1992) 참조. 또 다른 예시적인 효소는 Gal- $\beta$ -1,4-GlcNAc  $\alpha$ -2,6 시알릴트랜스페라제를 포함한다(Kurosawa *et al.*, *Eur. J. Biochem.* **219**: 375-381 (1994) 참조).

[0497] 바람직하게, 글리코펩티드의 탄수화물의 글리코실화에 있어서, 시알릴트랜스페라제는 시알산을, 완전히 시알릴화된 탄수화물 구조 상의 말단 시알산 하부에 놓인 가장 흔한 끝에서 두번째 서열(penultimate sequence)인, 서열 Gal  $\beta$ 1,4GlcNAc-에 전달한다(표 2 참조).

**표 2**

수용체 기질로서 Gal  $\beta$ 1,4GlcNAc 서열을 이용하는 시알릴트랜스페라제

시알릴트랜스페라제	근원	형성된 서열(들)	Ref.
ST6Gal I	포유류	NeuAc $\alpha$ 2,6Gal $\beta$ 1,4GlcNAc-	1
ST3Gal III	포유류	NeuAc $\alpha$ 2,3Gal $\beta$ 1,4GlcNAc- NeuAc $\alpha$ 2,3Gal $\beta$ 1,3GlcNAc-	1
ST3Gal IV	포유류	NeuAc $\alpha$ 2,3Gal $\beta$ 1,4GlcNAc- NeuAc $\alpha$ 2,3Gal $\beta$ 1,3GlcNAc-	1
ST6Gal II	포유류	NeuAc $\alpha$ 2,6Gal $\beta$ 1,4GlcNA	
ST6Gal II	포토박테리움	NeuAc $\alpha$ 2,6Gal $\beta$ 1,4GlcNAc-	2
ST6Gal V	N.메닝기티스 N.고노르호에	NeuAc $\alpha$ 2,3Gal $\beta$ 1,4GlcNAc-	3

[0499] 1) Goochee *et al.*, *Bio/Technology* **9**: 1347-1355 (1991)

[0500] 2) Yamamoto *et al.*, *J. Biochem.* **120**: 104-110 (1996)

[0501] 3) Gilbert *et al.*, *J. Biol. Chem.* **271**: 28271-28276 (1996)

[0502] 청구된 방법에 유용한 시알릴트랜스페라제의 예시는  $\alpha$ (2,3)시알릴트랜스페라제로 나타내어지는, ST3Gal III이다. 이 효소는 시알산의, Gal  $\beta$ 1,3GlcNAc 또는 Gal  $\beta$ 1,4GlcNAc 글리코시드의 Gal로의 전달을 촉진하며(예를 들어, Wen *et al.*, *J. Biol. Chem.* **267**: 21011 (1992); Van den Eijnden *et al.*, *J. Biol. Chem.* **256**: 3159 (1991) 참조), 글리코펩티드에서 아스파라긴-결합 올리고당류의 시알릴화를 책임진다. 시알산은 두 가지

당류 사이의  $\alpha$ -결합 형성과 함께 Gal에 결합된다. 당류 사이의 결합(결합)은 NeuAc의 2 위치와 Gal의 3 위치 사이이다. 이러한 특정 효소는 래트 간(Weinstein *et al.*, *J. Biol. Chem.* **257**: 13845 (1982)); 인간 cDNA (Sasaki *et al.* (1993) *J. Biol. Chem.* **268**: 22782-22787; Kitagawa & Paulson (1994) *J. Biol. Chem.* **269**: 1394-1401)으로부터 분리될 수 있으며, 재조합 발현에 의하여 이러한 효소의 생성을 촉진하는 게놈 (Kitagawa *et al.* (1996) *J. Biol. Chem.* **271**: 931-938) DNA 서열은 알려져 있다. 일 실시예에서, 청구된 시알릴화 방법은 래트 ST3Gal III를 이용한다.

[0503] 본 발명에 이용되는 다른 예시적인 시알릴트랜스페라제는 CST-I 및 CST-II을 포함하는 캄피로박ter 제주니 (*Campylobacter jejuni*)로부터 분리된 것, 및  $\alpha$ (2,3)결합을 형성하는 것을 포함한다. 예를 들어, 국제공개공보 WO99/49051 참조.

[0504] 표 2에 나열된 것 이외의 시알릴트랜스페라제도 상업적으로 중요한 글리코펩티드의 경제적이고 효율적인 시알릴화 과정에 유용하다. 이러한 다른 효소의 유용성을 알아보기 위한 간단한 시험으로서, 다양한 양의 각 효소 (1~100mU/mg 단백질)를 아시알로- $\alpha_1$  AGP(asialo- $\alpha_1$  AGP)(1mg/ml로)과 반응시켜, 대상 시알릴트랜스페라제의 글리코펩티드를 시알릴화하는 능력을 소(bovine) ST6Gal I, ST3Gal III 또는 이들 모두의 시알릴트랜스페라제 대하여 비교한다. 또는, 다른 글리코펩티드 또는 글리코펩티드, 또는 웨프티드 골격으로부터 효소적으로 방출된 N-결합 올리고당류는 이 평가를 위하여 아시알로- $\alpha_1$  AGP 대신에 이용될 수 있다. ST6Gal I보다 더욱 효율적으로 글리코펩티드의 N-결합 올리고당류를 시알릴화하는 능력을 갖는 시알릴트랜스페라제는 실용적인 대규모 웨프티드 시알릴화 방법에 이용된다.

#### GalNAc 트랜스페라제

[0506] N-아세틸갈락토사미닐트랜스페라제는 본 발명을 실시하는데, 특히 GalNAc 부분을 웨프티드의 O-결합 글리코실화 자리의 아미노산에 결합하는데 이용된다. 적합한 N-아세토실갈락토사미닐트랜스페라제는  $\alpha$ (1,3) N-아세틸갈락토사미닐트랜스페라제,  $\beta$ (1,4) N-아세틸갈락토사미닐트랜스페라제(Nagata *et al.*, *J. Biol. Chem.* **267**: 12082-12089 (1992) 및 Smith *et al.*, *J. Biol. Chem.* **269**: 15162 (1994)) 및 폴리웨프티드 N-아세틸갈락토사미닐트랜스페라제(Homa *et al.*, *J. Biol. Chem.* **268**: 12609 (1993))를 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0507] 유전 공학에 의하여 클론화된 유전자로부터 효소 GalNAc T<sub>I-XX</sub>와 같은 단백질의 제조는 잘 알려져 있다. 예를 들어, 미국특허 제4,761,371호 참조. 일 방법은 충분한 샘플의 수집을 포함하며, 이후 효소의 아미노산 서열이 N-말단 시퀀싱에 의하여 결정된다. 이후, 이러한 정보는 발현 시에 곤충 세포주 Sf9에서 완전한 활성 효소의 합성에 이르게 되는, 전체 길이(결합된 막)(full-length(membrane bound)) 트랜스페라제를 코딩하는 cDNA 클론을 분리하는데 이용된다. 다음으로 이 효소에 대한 수용체 특이성이 16개의 상이한 단백질에서 알려진 글리코실화 자리 주위의 아미노산의 반정량적 분석 및 이어지는 합성 웨프티드의 시험관 내 글리코실화 연구에 의하여 결정된다. 이러한 연구는 특정 아미노산 잔기가 글리코실화된 웨프티드 단편에서 과발현되며(overrepresented), 글리코실화 세린 및 트레오닌 잔기 주위의 특정 위치에서의 잔기가 다른 아미노산 부분보다 수용체 효율에 좀더 현저한 영향을 미칠 수 있음을 증명하였다.

#### 세포 결합(Cell-Bound) 글리코실트랜스페라제

[0509] 다른 실시예에서, 본 발명의 방법에 이용되는 효소는 세포 결합 글리코실트랜스페라제이다. 많은 가용성 글리코실트랜스페라제가 공지되어 있으나(예를 들어, 미국특허 제5,032,519호 참조), 글리코실트랜스페라제는 세포와 회합될 때 일반적으로 막 결합 형태(membrane-bound form)이다. 지금까지 연구된 많은 막-결합 효소는 내재적 단백질(intrinsic proteins)인 것으로 생각되며, 즉 그들은 초음파 처리(sonication)에 의하여 막으로부터 방출되지 않으며, 가용화를 위하여 세제(detergents)를 필요로 한다. 표면 글리코실트랜스페라제는 척추동물 및 무척추 동물 세포의 표면에서 확인되었으며, 이러한 표면 트랜스페라제는 생리적 조건 하에서 촉매 활성을 유지하는 것으로 인정되었다. 그러나, 더욱 인정된 세포 표면 글리코실트랜스페라제의 기능은 세포 내 인지를 위한 것이다(Roth, MOLECULAR APPROACHES TO SUPRACELLULAR PHENOMENA, 1990).

[0510] 세포에 의하여 발현된 글리코실트랜스페라제를 변경시키는 방법이 개발되었다. 예를 들어, Larsen *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**: 8227-8231 (1989)은 세포 표면 올리고당류 구조의 발현을 결정하는 클론화 cDNA 및 그들의 동족(cognate) 글리코실트랜스페라제를 분리하는 유전학적 접근을 보고한다. UDP-갈락토오

스: . $\beta$ .-D-갈락토실-1,4-N-아세틸-D-글루코사미드  $\alpha$ -1,3-갈락토실트랜스페라제를 발현하는 것으로 알려진 쥐 세포주로부터 분리된 mRNA로부터 생성된 cDNA 도서관이 COS-1 세포로 트랜스펙션되었다(transfected). 이후 트랜스펙션된 세포는 배양되어,  $\alpha$ -1-3갈락토실트랜스페라제 활성에 대하여 분석되었다.

[0511] Francisco et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 2713-2717(1992)는  $\beta$ -락타마제를 대장균(Escherichia coli.)의 외부 표면에 고정시키는 방법을 개시한다. (i) 외부 막 단백질의 신호 서열, (ii) 외부 막 단백질의 막-스페닝(spanning) 부분, 및 (iii) 완전한 성숙  $\beta$ -락타마제(lactamase) 서열로 이루어진 3자 융합(tripartite fusion)이 생성되어 활성 표면 결합  $\beta$ -락타마제 분자에 이르게 된다. 그러나, Francisco의 방법은 원핵생물 세포 시스템에만 제한되며, 저자가 인지하는 바와 같이, 적합한 기능화를 위하여 완전한 3자 융합이 필요하다.

#### 설포트랜스페라제(Sulfotransferase)

[0512] 본 발명은 예를 들어, 해파린, 해파란 설레이트/heparan sulfate), 카라기넨(carragenen) 및 관련 화합물과 같은 황산염화 다당류(sulfated polysaccharides)를 포함하는 황산염화 분자를 포함하는 웨티드의 제조방법을 제공한다. 적합한 설포트랜스페라제는 예를 들어, 콘드로이틴-6-설포트랜스페라제(chondroitin-6-sulphotransferase)(Fukuta et al., J. Biol. Chem. 270: 18575-18580 (1995)에 의하여 기재된 닭 cDNA; GenBank Accession No. D49915), 글리코사미노글리칸 N-아세틸글루코사민 N-데아세틸라제/N-설포트랜스페라제 1(glycosaminoglycan N-acetylglucosamine N-deacetylase/N-sulphotransferase 1)(Dixon et al., Genomics 26: 239-241 (1995); UL18918), 및 글리코사미노글리칸 N-아세틸글루코사민 N-데아세틸라제/N-설포트랜스페라제 2(glycosaminoglycan N-acetylglucosamine N-deacetylase/N-sulphotransferase 2)(Orellana et al., J. Biol. Chem. 269: 2270-2276 (1994) 및 Eriksson et al., J. Biol. Chem. 269: 10438-10443 (1994)에 의하여 기재된 쥐 cDNA; GenBank Accession No. U2304에 기재된 인간 cDNA)를 포함한다.

#### 글리코시다제(Glycosidases)

[0513] 본 발명은 또한 야생형 및 돌연변이 글리코시다제를 포함한다. 돌연변이  $\beta$ -갈락토시다제 효소는  $\alpha$ -글리코실플루오라이드의 갈락토실 수용체 분자에 대한 결합을 통하여 이당류의 형성을 촉진하는 것으로 증명되었다 (Withers, 미국특허 제6,284,494호; 2001년 9월 4일에 발행됨). 본 발명에 이용되는 다른 글리코시다제는 예를 들어,  $\beta$ -글루코시다제( $\beta$ -glucosidases),  $\beta$ -갈락토시다제( $\beta$ -galactosidases),  $\beta$ -만노시다제( $\beta$ -mannosidases),  $\beta$ -N-아세틸 글루코사민이다제( $\beta$ -acetyl glucosaminidases),  $\beta$ -N-아세틸 갈락토사민이다제( $\beta$ -N-acetyl galactosaminidases),  $\beta$ -크실로시다제( $\beta$ -xylosidases),  $\beta$ -푸코시다제( $\beta$ -fucosidases), 셀룰라제(cellulases), 크실라나제(xylanases), 갈락타나제(galactanases), 만나나제(mannanases), 헤미셀룰라제(hemicellulases), 아밀라제(amylases), 글루코아밀라제(glucoamylases),  $\alpha$ -글루코시다제( $\alpha$ -glucosidases),  $\alpha$ -갈락토시다제( $\alpha$ -galactosidases),  $\alpha$ -만노시다제( $\alpha$ -mannosidases),  $\alpha$ -N-아세틸 글루코사민이다제( $\alpha$ -N-acetyl glucosaminidases),  $\alpha$ -N-아세틸 갈락토오스-아미니다제( $\alpha$ -N-acetyl galactose-aminidases),  $\alpha$ -크실로시다제( $\alpha$ -xylosidases),  $\alpha$ -푸코시다제( $\alpha$ -fucosidases), 및 뉴라미니다제/시알리다제(neuraminidases/sialidases)를 포함한다.

#### 고정화 효소(Immobilized Enzyme)

[0514] 본 발명은 고체 및/또는 가용성 지지체 상에 고정화된 효소의 이용을 제공한다. 예시적 실시예에서, 본 발명의 방법에 따라 무손상 글리코실 링커를 통하여 PEG에 콘주게이트된 글리코실트랜스페라제가 제공된다. PEG-링커-효소 콘주게이트는 고체 지지체 상에 선택적으로 부착된다. 본 발명의 방법에서 고체 지지된 효소의 이용은 반응 혼합물의 워크업 및 반응 생성물의 정제를 간소화하고, 효소의 회수를 쉽게 할 수 있다. 글리코실트랜스페라제 콘주게이트는 본 발명의 방법에 이용된다. 효소 및 지지체의 다른 조합은 당업자에게 자명할 것이다.

#### 융합 단백질(Fusion Protein)

[0515] 다른 예시적인 실시예에서, 본 발명의 방법은 원하는 글리코펩티드 콘주게이트의 합성에 관여하는 일 이상의 효

소 활성을 갖는 융합 단백질을 이용한다. 융합 폴리펩티드는 예를 들어, 부효소(accessory enzyme)의 촉매적 활성 도메인(catalytically active domain)에 결합된 글리코실트랜스페라제의 촉매적 활성 도메인으로 구성될 수 있다. 부효소 촉매 도메인은 예를 들어, 글리코실트랜스페라제에 대한 도너인 뉴클레오티드당(nucleotide sugar)의 형성 단계를 촉진시킬 수 있거나, 또는 글리코실트랜스페라제 순환에 관여된 반응을 촉진시킬 수 있다. 예를 들어, 글리코실트랜스페라제를 코딩하는 폴리뉴클레오티드는 뉴클레오티드당 합성에 관여하는 효소를 코딩하는 폴리뉴클레오티드에, 인-프레임으로(in-frame) 결합될 수 있다. 수득된 융합 단백질은 이후 뉴클레오티드당의 합성뿐 아니라 당 부분의 수용체 분자로의 전달을 촉진할 수 있다. 융합 단백질은 하나의 발현 가능한 뉴클레오티드 서열 내에 결합된 2 이상의 순환 효소(cycle enzymes)일 수 있다. 다른 실시예에서, 융합 단백질은 2 이상의 글리코실트랜스페라제의 촉매 활성 도메인을 포함한다. 예를 들어, 5,641,668 참조. 본 발명의 변형 글리코펩티드는 다양한 적합한 융합 단백질을 이용하여 쉽게 설계되고 제조될 수 있다(예를 들어, 1999년 6월 24일에 국제공개공보 WO 99/31224으로 공개된, 국제출원 PCT/CA98/01180 참조).

#### [0520] 변형 당의 제조

본 발명의 방법은 일반적으로 변형 당을 이용한다. 일 측면에서, 당 부분(sugar moiety) 또는 당 부분-링커 카세트(sugar moiety-linker cassette) 및 PEG 또는 PEG-링커 카세트(PEG-linker cassette) 기는, 전형적으로 결합 과정(linking process)에 의하여 새로운 유기 기능기 또는 비반응성 종으로 변형되는 반응성 기의 이용을 통하여, 함께 결합된다. 당 반응성 기능기는 당 부분 상의 임의의 위치에 위치한다. 본 발명을 실시하는데 유용한 반응성 기 및 반응의 분류는 일반적으로 바이오콘주제이트 화학의 기술분야에 널리 공지된 것이다. 반응성 당 부분과 함께 이용가능한 반응의 현재 선호되는 분류는 상대적으로 온화한 조건 하에게 진행되는 것이다. 이는 친핵성 치환반응(nucleophilic substitutions)(예를 들어, 아민 및 알코올과 아실 할라이드, 활성 에스테르 와의 반응), 친전자성 치환반응(electrophilic substitutions)(예를 들어, 에나민 반응) 및 탄소-탄소 및 탄소-헤테로원자 다중 결합에 대한 첨가반응(예를 들어, 마이클 반응(Michael reaction), 디엘스-알더 첨가반응(Diels-Alder addition))을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 이러한 및 다른 유용한 반응은 예를 들어, March, ADVANCED ORGANIC CHEMISTRY, 3rd Ed., John Wiley & Sons, New York, 1985; Hermanson, BIOCONJUGATE TECHNIQUES, Academic Press, San Diego, 1996; 및 Feeney *et al.*, MODIFICATION OF PROTEINS; Advances in Chemistry Series, Vol. 198, American Chemical Society, Washington, D.C., 1982에서 논의된다.

[0522] 당 핵 또는 변형기로부터 매달린(pendent) 유용한 반응성 기능기는 하기를 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0523] (a) N-하이드록시숙신이미드 에스테르, N-하이드록시벤즈트리아졸 에스테르, 산 할라이드, 아실 이미다졸, 티오 에스테르, p-니트로페닐 에스테르, 알킬, 알케닐, 알키닐 및 방향족 에스테르를 포함하나, 이에 한정되는 것은 아닌, 카르복실기 및 다양한 그의 유도체;

[0524] (b) 예를 들어, 에스테르, 에테르, 알데하이드 등으로 변환될 수 있는, 하이드록실기;

[0525] (c) 할라이드가 이후 아민, 카르복실레이트 음이온, 티올 음이온, 탄소 음이온(carbanion) 또는 알콕사이드 이온과 같은 친핵성 기로 치환될 수 있으며, 이에 의하여 할로겐 원자의 기능기에서 새로운 기의 공유 부착이 되는, 할로알킬기;

[0526] (d) 말레이이미도기와 같은, 디엘스-알더 반응에 참여할 수 있는, 친디엔기(dienophile groups);

[0527] (e) 후속적인 유도체화가 예를 들어, 이민, 하이드라존(hydrzones), 세미카르바존(semicarbazones)과 같은 카르보닐 유도체의 형성을 통하여, 또는 그리나드 첨가 반응(Grignard addition) 또는 알킬리튬 첨가반응과 같은 메커니즘을 통하여 가능하도록 하기 위한, 알데하이드기 또는 캐톤기;

[0528] (f) 예를 들어, 셀폰아미드를 형성하기 위한 아민과의 후속 반응을 위한, 셀포닐 할라이드기;

[0529] (g) 예를 들어, 디설파이드로 변환될 수 있거나, 또는 아실 할라이드와 반응할 수 있는, 티올기;

[0530] (h) 예를 들어, 아실화, 알킬화 또는 산화될 수 있는, 아민기 또는 셀프하이드릴기;

[0531] (i) 예를 들어, 고리첨가반응, 아실화 반응, 마이클 첨가반응 등이 이루어질 수 있는, 알켄; 및

[0532] (j) 예를 들어, 아민 및 하이드록실 화합물과 반응할 수 있는, 에폭시드.

[0533]

반응성 기능기는 반응성 당 핵 또는 변형기를 제조하는데 필요한 반응에 참여하거나 또는 방해하지 않도록, 선택될 수 있다. 또는, 반응성 기능기는 보호기의 존재에 의하여 반응에 참여하는 것으로부터 보호될 수 있다. 당업자는 특정 기능기가 선택된 반응 조건을 방해하지 않기 위하여 특정 기능기를 보호하는 방법을 이해한다. 유용한 보호기의 예에 있어서, 예를 들어, Greene *et al.*, PROTECTIVE GROUPS IN ORGANIC SYNTHESIS, John Wiley & Sons, New York, 1991 참조.

[0534]

후술되는 논의에서, 본 발명을 실시하는데 유용한 변형 당의 다수의 특정 예가 설명된다. 예시적 실시예에서, 시알산 유도체는 변형기가 부착되는 당 핵으로서 이용된다. 시알산 유도체에 대한 논의의 초점은 단지 설명의 명확화를 위한 것이며, 본 발명의 범위를 제한하는 것으로 해석되어서는 안된다. 당업자는 예로서 시알산을 이용하여 설명된 것과 유사한 방식으로 다양한 다른 당 부분이 활성화 및 유도체화될 수 있음을 인지할 것이다. 예를 들어, 당업계에 인식된 방법에 의하여 쉽게 변형되는 몇몇 당 기질을 지정하기 위하여, 다수의 방법이 갈락토오스, 글루코오스, N-아세틸갈락토사민 및 푸코오스를 변형시키는데 이용될 수 있다. 예를 들어, Elhalabi *et al.*, *Curr. Med. Chem.* 6: 93 (1999); 및 Schafer *et al.*, *J. Org. Chem.* 65: 24 (2000) 참조.

[0535]

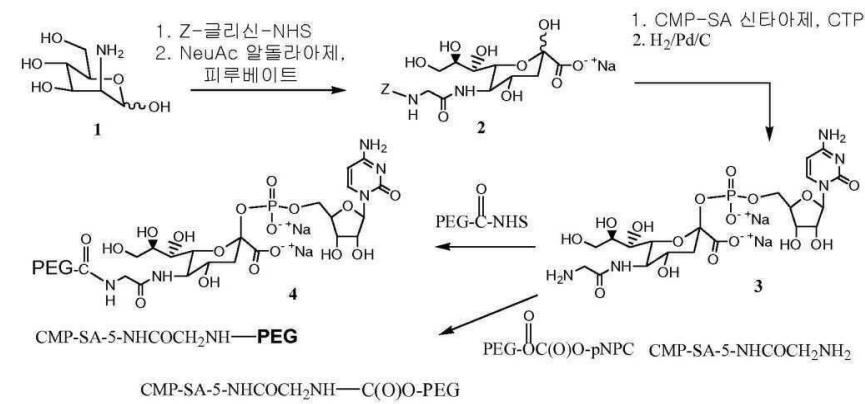
예시적 실시예에서, 본 발명의 방법에 의하여 변형되는 G-CSF 웨티드는 포유류 세포(예를 들어, CHO 세포)에서 또는 유전자 도입 동물에서 제조되므로, 불완전하게 시알릴화되는 N- 및/또는 O-결합 올리고당류 사슬을 함유하는 글리코웨티드이다. 시알산이 결여되고 말단 갈락토오스 잔기를 함유하는 글리코웨티드의 올리고당류 사슬은 폐길화(PEGylated), 프길화(PPGylated) 또는 변형 시알산으로 다르게 변형될 수 있다.

[0536]

반응식 4에서, 아미노 글리코시드 1은, 당 아민 잔기를 상응하는 보호된 아미노산 아미드 부가물로 변환시키는, 보호된 아미노산(예를 들어, 글리신) 유도체의 활성 에스테르로 처리된다. 이 부가물은 알돌라제(aldoerase)로 처리되어  $\alpha$ -하이드록시 카르복실레이트 2를 형성한다. 화합물 2는 CMP-SA 신타제의 작용에 의하여 상응하는 CMP 유도체로 변환된 후, CMP 유도체를 촉매수소화하여 화합물 3을 제조한다. 글리신 부가물의 형성을 통하여 도입된 아민은 화합물 3을, 각각 4 또는 5와 같은 종을 제조하는 활성화 PEG 또는 PPG 유도체(예를 들어, PEG-C(O)NHS, PEG-OC(O)O-p-니트로페닐)와 반응시킴으로써 PEG 부착물의 위치로 이용된다.

[0537]

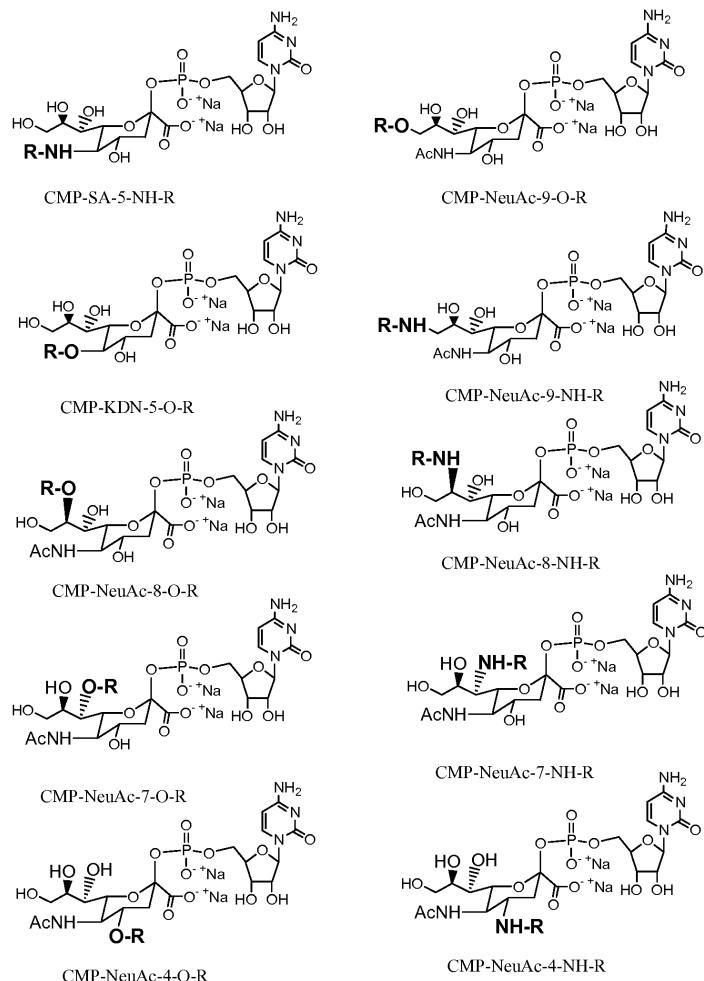
[반응식 4]



[0538]

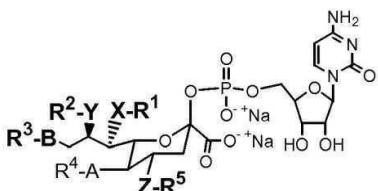
표 3은 PEG 부분으로 유도체화된 당 모노포스페이트의 대표적인 예를 설명한다. 표 3의 일부 화합물은 반응식 4의 방법에 의하여 제조된다. 다른 유도체는 당업계에 인지된 방법에 의하여 제조된다. 예를 들어, Keppler *et al.*, *Glycobiology* 11: 11R (2001); 및 Charter *et al.*, *Glycobiology* 10: 1049 (2000) 참조. 다른 아민 반응성 PEG 또는 PPG 유사체는 상업적으로 구입 가능하며, 또는 그들은 당업자가 용이하게 이용할 수 있는 방법에 의하여 제조될 수 있다.

표 3



[0540]

[0541] 본 발명의 실시에 이용되는 변형 당 포스페이트는 전술한 것 뿐 아니라, 다른 위치에서 치환될 수 있다. 현재 바람직한 시알산의 치환기는 하기 화학식:



[0542]

[0543]로 설명되며,

[0544]상기에서, X는  $-O-$ ,  $-N(H)$ ,  $-S-$ ,  $CH_2-$  및  $-N(R)_2$ 로부터 선택되는 것이 바람직한 결합기이며, 여기에서 각각의 R은  $R^1-R^5$ 로부터 독립적으로 선택되는 일원이다. 기호 Y, Z, A 및 B는 각각 X에 대하여 전술한 기로부터 선택되는 기를 나타낸다. X, Y, Z, A 및 B은 각각 독립적으로 선택되므로, 그들은 동일하거나 또는 상이할 수 있다. 기호  $R^1$ ,  $R^2$ ,  $R^3$ ,  $R^4$  및  $R^5$ 은 H, PEG 부분, 치료 부분(therapeutic moiety), 생분자 또는 다른 부분을 나타낸다. 또는, 이러한 기호들은 PEG 부분, 치료 부분, 생분자 또는 다른 부분에 결합된 링커를 나타낸다.

[0545]

본 명세서에 논의된 콘주게이트에 부착된 예시적인 부분은 PEG 유도체(예를 들어, 아실-PEG, 아실-알킬-PEG, 알

킬-아실-PEG 카바모일-PEG, 아릴-PEG), PPG 유도체(예를 들어, 아실-PPG, 아실-알킬-PPG, 알킬-아실-PPG 카바모일-PPG, 아릴-PPG), 치료 부분, 진단 부분, 만노스-6-포스페이트, 헤파린, 헤파란, SLe<sub>x</sub>, 만노스, 만노스-6-포스페이트, 시알릴 루이스 X(Sialyl Lewis X), FGF, VFGF, 단백질, 콘드로이틴(chondroitin), 케라탄(keratan), 더마탄(dermatan), 알부민(albumin), 인테그린(integrins), 안테나 올리고당류(antennary oligosaccharides), 웨티드 등을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 다양한 변형기를 당류 부분에 콘주게이트하는 방법은 당업자가 용이하게 이해할 수 있다(POLY(ETHYLENE GLYCOL CHEMISTRY: BIOTECHNICAL AND BIOMEDICAL APPLICATIONS, J. Milton Harris, Ed., Plenum Pub. Corp., 1992; POLY(ETHYLENE GLYCOL CHEMISTRY: BIOTECHNICAL AND BIOMEDICAL APPLICATIONS, J. Milton Harris, Ed., ACS Symposium Series No. 680, American Chemical Society, 1997; Hermanson, GIOCONJUGATE TECHNIQUES, Academic Press, San Diego, 1996; and Dunn *et al.*, Eds. POLYMERIC DRUGS AND DRUG DELIVERY SYSTEMS, ACS Symposium Series Vol. 469, American Chemical Society, Washington, D.C. 1991.).

#### [0546] 링커기(가교결합기)

본 발명의 방법에 이용되는 변형 당의 제조는 당 잔기에 대한 PEG 부분의 부착 및 바람직하게는 글리코실트랜스페라제에 대한 기질인 안정한 부가물의 형성을 포함한다. 따라서, 예를 들어, PEG와 당을 콘주게이트하기 위하여, 가교결합제(cross-linking agent) 및 PEG와 당 부분의 반응에 의하여 형성되는 것인, 링커를 이용하는 것이 종종 바람직하다. 변형기를 탄수화물 부분에 부착시키는데 이용될 수 있는 예시적인 2기능성 화합물은 2기능성 폴리(에틸렌글리콜), 폴리아미드, 폴리에테르, 폴리에스테르 등을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 탄수화물을 다른 분자에 결합하기 위한 일반적인 접근은 문헌에 공지되어 있다. 예를 들어, Lee *et al.*, *Biochemistry* **28**: 1856 (1989); Bhatia *et al.*, *Biochem.* **178**: 408 (1989); Janda *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.* **112**: 8886 (1990) 및 Bednarski *et al.*, WO 92/18135 참조. 후술하는 논의에서, 반응성 기는 발생기(nascent) 변형 당의 당 부분 상에서 양성(benign)으로 다루어진다. 논의의 초점은 설명의 명확화를 위한 것이다. 당업자는 논의가 또한 변형기 상의 반응성 기에 관련되는 것임을 인지할 것이다.

다양한 반응물들이 변형 당의 성분을 분자내 화학적 가교결합으로 변형시키는데 이용된다(가교결합제 및 가교결합 과정의 검토를 위하여, 참조로 본 명세서에 병합되는, Wold, F., *Meth. Enzymol.* **25**: 623-651, 1972; Weetall, H. H., 및 Cooney, D. A., In: ENZYME AS DRUGS (Holcberg, 및 Roberts, eds.) pp. 395-442, Wiley, New York, 1981; Ji, T. H., *Meth. Enzymol.* **91**: 580-609, 1983; Mattson *et al.*, *Mol. Biol. Rep.* **17**: 167-183, 1993 참조). 바람직한 가교결합제는 다양한 0-길이(zero-length), 호모-2기능성(homo-bifunctional) 및 혜테로-2기능성(hetero-bifunctional) 가교결합제로부터 유래된다. 0-길이 가교결합제는 외재적 물질의 도입이 없는 2개의 내재적 화학기의 직접적인 콘주게이션을 포함한다. 디설파이드 결합의 형성을 촉진하는 작용제는 이러한 카테고리에 속한다. 다른 예는 카보디아미드, 에틸클로로포르메이트, 우드워즈 시약 K(Woodward's reagent K)(2-에틸-5-페닐이속사졸리움-3'-설포네이트), 및 카르보닐디아미다졸과 같은 아미드 결합을 형성하는 일차 아미노기와 카르복실기의 축합을 유도하는 반응물이다. 이러한 화학적 시약에 더하여, 효소 트랜스글루타미나제(transglutaminase)(글루타밀-웹티드 γ-글루타밀트랜스페라제; EC 2.3.2.13)가 0-길이 가교결합제로 이용될 수 있다. 이러한 효소는 일반적으로 기질로서 일차 아미노기를 갖는, 단백질-결합 글루타민 잔기의 카르복사미드기에서 아실 전달 반응을 촉진시킨다. 바람직한 호모- 및 혜테로-2기능성 반응물은 아미노, 설프하이드릴, 구아니디노, 인돌 또는 비특이적기에 대하여 반응성일 수 있는, 2개의 동일한 또는 2개의 유사하지 않은 자리를 각각 포함한다.

#### [0549] 불용성 G-CSF 리폴딩(refolding)

박테리아에서 발현되는 많은 재조합 단백질은 박테리아 봉입체(bacterial inclusion bodies)에서 불용성 응집체로 발현된다. 봉입체는 박테리아의 세포질(cytoplasmic) 및 세포막 주위(periplasmic) 공간 모두에서 발견되는 단백질 축적물(protein deposit)이다(*e.g.*, Clark, *Cur. Op. Biotech.* **12**:202-207 (2001) 참조). 재조합 G-CSF 단백질은 박테리아 봉입체에서 발현되며, 활성 G-CSF 단백질을 제조하기 위하여 이러한 단백질을 리폴딩하는 방법은 본 명세서에 제공된다.

### 활성 G-CSF를 리풀딩하기 위한 조건

[0551] **활성 G-CSF를 리풀딩하기 위한 조건**

[0552] 박테리아 세포로부터 활성 G-CSF 단백질을 제조하기 위하여, G-CSF 단백질은 박테리아 봉입체에서 발현되고, 박테리아는 수확, 파괴되고, 봉입체는 분리 및 세척된다. 일 실시예에서, 3종의 세척이 수행된다: 6.0 내지 9.0의 pH; 일가 염, 예를 들어 소듐 클로라이드; 비이온성 세제, 예를 들어, Triton X-100; 이온성 세제, 예를 들어, 소듐 데옥시콜레이트; 및 EDTA의 베퍼에서의 제1 세척; 무세제 베퍼에서 제2 세척; 및 H<sub>2</sub>O에서의 제3 세척. 이후 봉입체 내의 단백질은 가용화된다. 가용화는 변성제(denaturants), 구아니디닐 클로라이드 또는 우레아; 극단의 pH; 또는 세제 또는 이들의 임의의 조합을 이용하여 수행될 수 있다. 일 실시예에서, 5~6M 구아니딘 HC1 또는 우레아가 GCSF를 가용화하는데 이용된다. 다른 실시예에서, DTT가 첨가된다.

[0553] 가용화 후에, 변성제는 GCSF 단백질 혼합물로부터 제거된다. 변성제 제거는 리풀딩 베퍼에의 희석 또는 베퍼 교환 방법을 포함하는, 다양한 방법에 의하여 이루어질 수 있다. 베퍼 교환 방법은 투석(dialysis), 정용여과(diafiltration), 젤여과(gel filtration) 및 고체 지지체상에의 단백질의 고정화를 포함한다(예를 들어, Clark, *Cur. Op. Biotech.* 12:202-207 (2001) 참조).

[0554] GCSF 단백질에서의 디설파이드 결합 형성은 산화환원종(redox couple)을 포함하는 리풀딩 베퍼의 첨가에 의하여 촉진된다. 산화환원종은 환원된 및 산화된 글루타티온(-JSF-I/GSSG), 시스테인/시스틴, 시스테아민/시스타민, DTT/GSSG, 및 DTE/GSSG를 포함한다(예를 들어, Clark, *Cur. Op. Biotech.* 12:202-207 (2001) 참조). 일 실시예에서, 산화환원종은 10:1의 비율인 GSH/GSSG이다.

[0555] 리풀딩은 예를 들어 6.0 내지 10.0 범위의 pH의 베퍼에서 수행될 수 있다. 리풀딩 베퍼는 리풀딩을 향상시키기 위한 다른 첨가제, 예를 들어, L-아르기닌(0.4~1 M); PEG; 우레아(1~2M) 및 구아니디움 클로라이드(0.5~1.5M)와 같은 저농도의 변성제; 및 세제(예를 들어, Chaps, SDS, CTAB, 라우릴 말토시드(lauryl maltoside), Tween 80, 및 Triton X-100)를 포함할 수 있다.

[0556] 리풀딩 후에, GCSF 단백질은 산화환원종 또는 다른 원하지 않는 베퍼 성분을 제거하기 위하여 투석될 수 있다. 일 실시예에서, 투석은 소듐 아세테이트, 글리세롤 및 비이온성 세제, 예를 들어, Tween-80을 포함하는 베퍼를 이용하여 수행된다. 투석 후에, GCSF 단백질은 이온교환크로마토그래피에 의하여 추가적으로 정제 및/또는 농축될 수 있다. 일 실시예에서, SP-세파로오스 양이온 교환 수지가 이용된다.

[0557] 당업자는 리풀딩된 단백질이 검출 가능한 생물학적 활성을 갖는 경우, 단백질이 정확하게 리풀딩되었음을 인정할 것이다. GCSF 단백질에 있어서, 생물학적 활성은 다양한 방법들을 이용하여 측정될 수 있다. 예를 들어, 생물학적으로 활성인 GCSF 단백질은 모든 목적을 위하여 본 명세서에 참조로 병합되는, 2004년 1월 8일 출원된 미국 특허출원 제60/535,284호; 2004년 2월 12일 출원된 제60/544411호 및 2004년 2월 20일 출원된 대리인명부 번호 (Attorney Docket Number) 019957-018820US에 기재된 0-결합 글리코실화에 대한 기질이다. GCSF 단백질 활성은 래트에서의 세포 증식 분석 또는 백혈구(WBC) 분석을 이용하여 측정될 수 있다(모든 목적을 위하여 본 명세서에 참조로 병합되는, 2004년 1월 8일 출원된 미국특허출원 제60/535284호; 2004년 2월 12일 출원된 제 60/544411호; 및 2004년 2월 20일 출원된 대리인명부 번호(Attorney Docket Number) 019957-018820US에 기재되어 있음). 증식 분석 및 WBC 분석은 리풀딩된 GCSF 단백질의 0-결합 글리코실화 이전에, 또는 이후에 이루어질 수 있다.

### **본 발명의 콘주케이트의 분리 방법**

[0558] 본 발명의 콘주케이트의 분리 방법

[0559] 또는, 전술한 방법에 의하여 제조된 생성물은 정제 없이 이용될 수 있다. 그러나, 생성물을 회수하는 것이 일반적으로 바람직하다. 막막 또는 후막 크로마토그래피, 컬럼 크로마토그래피, 이온 교환 크로마토그래피, 또는 막 여과와 같은 글리코실화 당류의 회수에 대하여 잘 알려진 표준 기술들이 이용될 수 있다. 막 여과, 더욱 바람직하게는 역삼투막을 이용하는 막 여과, 및 이후 논의되며, 본 명세서에 인용된 문헌에 기재된 일 이상의 컬럼 크로마토그래피 기술을 이용하는 것이 바람직하다. 예를 들어, 막이 약 3000 내지 약 10,000의 분자량 범위를 갖는 막 여과(membrane filtration)가 글리코실 트랜스페라제와 같은 단백질을 제거하는데 이용될 수 있다. 이후 나노여과(Nanofiltration) 또는 역삼투(reverse osmosis)가 염을 제거하고, 및/또는 생성된 당류를 정제하는데 이용될 수 있다(예를 들어, 국제공개공보 WO 98/15581 참조). 나노필터막은 일가 염은 통과시키고, 이용된 막에 따라 약 100 내지 약 2,000 달톤보다 큰 다가염 및 하전되지 않은 용질은 보유하는 역삼투막의 분류이다. 따라서, 전형적인 어플리케이션에서, 본 발명의 방법에 의하여 제조된 당류는 막에 보유되고, 오염시키는

염은 통과된다.

[0560] 변형 당단백질이 세포내에서 제조되는 경우, 제1 단계로서, 미립자 파편(particulate debris)인, 숙주 세포 또는 용해된 단편이, 예를 들어, 원심분리, 또는 한외여과(ultrafiltration)에 의하여 제거되고; 선택적으로, 단백질이 상업적으로 구입가능한 단백질 농축 필터로 농축될 수 있으며, 이후 면역친화성(immunoaffinity) 크로마토그래피, 이온-교환 컬럼 분류(ion-exchange column fractionation)(예를 들어, 디에틸아미노에틸(DEAE) 또는 카르복시메틸 또는 설포프로필기를 함유하는 매트릭스 상에서), 블루-세파로오스(Blue-Sepharose), CM 블루-세파로오스(CM Blue-Sepharose), MONO-Q, MONO-S, 렌틸 렉틴-세파로오스(lentil lectin-Sepharose), WGA-세파로오스(WGA-Sepharose), 콘 A-세파로오스(Con A-Sepharose), 에테르 토요펄(Ether Toyopearl), 부틸 토요펄(Butyl Toyopearl), 페닐 토요펄(Phenyl Toyopearl), 또는 단백질 A 세파로오스(Protein A Sepharose) 상에서의 크로마토그래피, SDS-PAGE 크로마토그래피, 실리카 크로마토그래피, 크로마토포커싱(chromatofocusing), 역상 HPLC(reverse phase HPLC)(예를 들어, 첨부된 지방족기를 갖는 실리카겔), 예를 들어 세파덱스 분자체(Sephadex molecular sieve) 또는 크기-배제 크로마토그래피를 이용하는 겔여과(gel filtration), 폴리펩티드에 선택적으로 결합하는 컬럼 상에서의 크로마토그래피, 및 에탄올 또는 암모늄 설페이트 침전으로부터 선택된 일 이상의 단계에 의하여 다른 불순물로부터 폴리펩티드 변이체를 분리한다.

[0561] 배양물에서 제조된 변형 글리코펩티드는 세포, 효소 등으로부터의 초기 추출에 의하여 일반적으로 분리된 후, 일 이상의 농축, 염석, 수성 이온-교환 또는 크기 배제 크로마토그래피 단계들이 이루어진다. 또한, 변형 당단백질은 친화성 크로마토그래피에 의하여 정제될 수 있다. 마지막으로, HPLC가 최종 정제 단계에 채용될 수 있다.

[0562] 프로테아제 억제제(protease inhibitor), 예를 들어, 메틸설포닐플루오라이드(PMSF)가 단백질 가수분해(proteolysis)를 억제하기 위한 임의의 상기 단계에 포함될 수 있으며, 항생물질이 우발적 오염물의 성장을 방지하기 위하여 포함될 수 있다.

[0563] 다른 실시예에서, 본 발명의 변형 글리코펩티드를 제조하는 시스템으로부터의 상청액(supernatants)은 먼저 상업적으로 구입가능한 단백질 농축 필터, 예를 들어 Amicon 또는 Millipore Pellicon 한외여과 단위(ultrafiltration unit)를 이용하여 농축된다. 농축 단계 후에, 농축액은 적합한 정제 매트릭스에 적용될 수 있다. 예를 들어, 적합한 친화성 매트릭스는 웨이퍼에 대한 리간드, 적합한 지지체에 결합된 렉틴 또는 항체 분자를 포함할 수 있다. 또는, 이온-교환 수지, 예를 들어, 펜던트 DEAE 기를 갖는 매트릭스 또는 기질이 채용될 수 있다. 적합한 매트릭스는 아크릴아미드, 아가로오스, 텍스트란, 세룰로오스, 또는 단백질 정제에 일반적으로 채용되는 다른 형태를 포함한다. 또는, 양이온-교환 단계가 채용될 수 있다. 적합한 양이온 교환기는 설포프로필 또는 카르복시메틸기를 포함하는 다양한 불용성 매트릭스를 포함한다. 설포프로필기가 특히 바람직하다.

[0564] 마지막으로, 소수성 RP-HPLC 매질, 예를 들어 펜던트 메틸 또는 다른 지방족기를 갖는 실리카겔을 채용하는 일 이상의 RP-HPLC 단계가 폴리펩티드 변이체 조성물을 추가적으로 정제하기 위하여 채용될 수 있다. 다양한 조합의, 전술한 정제 단계의 일부 또는 전부가 균질한 변형 당단백질을 제공하기 위하여 채용될 수 있다.

[0565] 대규모 발효(fermentation)로부터 기인하는 본 발명의 변형 글리코펩티드는 Urdal *et al.*, *J. Chromatog.* 296: 171 (1984)에 개시된 것과 유사한 방법에 의하여 정제될 수 있다. 이 참조문헌은 예비 HPLC 컬럼 상에서의 재조합 인간 IL-2의 정제를 위한 2개의 순차적인 RP-HPLC 단계를 기재하고 있다. 또는, 친화성 크로마토그래피와 같은 기술이 변형 당단백질을 정제하는데 이용될 수 있다.

#### 0566] 약학적 조성물

[0567] 다른 측면에서, 본 발명은 약학적 조성물을 제공한다. 약학적 조성물은 약학적으로 허용가능한 희석제(diluent) 및 비-천연 발생, PEG 부분, 치료 부분 또는 바이오분자와, 글리코실화 또는 비-글리코실화 웨이퍼 간의 공유 콘주게이트(covalent conjugate)를 포함한다. 폴리머, 치료 부분 또는 바이오분자는 G-CSF 웨이퍼와, 폴리머, 치료 부분 또는 바이오분자 사이에 삽입되며, 이를 양자와 공유적으로 결합된 무손상 글리코실 결합기를 통하여 G-CSF 웨이퍼에 콘주게이트된다.

[0568] 본 발명의 약학적 조성물은 다양한 약물 전달 시스템에 이용되기에 적합하다. 본 발명에 이용되는 적합한 포뮬레이션은 *Remington's Pharmaceutical Sciences*, Mace Publishing Company, Philadelphia, PA, 17th ed.

(1985)에서 발견된다. 약물 전달 방법의 간략한 검토를 위하여, Langer, *Science* 249:1527-1533 (1990) 참조.

[0569] 약학적 조성물은 예를 들어, 국부, 경구, 코, 정맥내, 두개내, 복강내, 피하 또는 근육내 투여를 포함하는, 임의의 적합한 투여 방식에 대하여 제제화될 수 있다. 피하 주사와 같은 비경구 투여에 있어서, 담체(carrier)는 물, 염류(saline), 알코올, 지방, 왁스 또는 버퍼를 포함하는 것이 바람직하다. 경구 투여에 있어서, 전술한 담체, 또는 만니톨, 락토오스, 전분, 마그네슘 스테아레이트, 소듐 사카린, 탤크, 셀룰로오스, 글루코오스, 수크로오스 및 마그네슘 카보네이트와 같은 고체 담체의 임의의 것이 채용될 수 있다. 생분해성 마이크로스피어(Biodegradable microspheres)(예를 들어, 폴리아세테이트 폴리글리콜레이트)도 본 발명의 약학적 조성물에 대하여 담체로서 채용될 수 있다. 적합한 생분해성 마이크로스피어는 예를 들어, 미국특허 제4,897,268호 및 제5,075,109호에 개시되어 있다.

[0570] 일반적으로, 약학적 조성물은 비경구적으로, 예를 들어 정맥내로 투여된다. 따라서, 본 발명은 수용가능한 담체, 바람직하게는 수성 담체, 예를 들어, 물, 완충수, 염류, PBS 등에 용해되거나 또는 혼탁된 화합물을 포함하는 비경구 투여용 조성물을 제공한다. 조성물은 pH 조절 및 완충제, 장성 조절제(tonicity adjusting agents), 습윤제(wetting agents), 세제(detergents) 등과 같은, 생리 조건과 유사하게 하는데 요구되는 약학적으로 수용가능한 보조 물질을 함유할 수 있다.

[0571] 이러한 조성물은 종래 멸균 기술에 의하여 멸균될 수 있으며, 또는 멸균 여과될 수 있다. 수득된 수성 용액은 그 자체로 이용되도록 포장되거나, 동결건조될 수 있으며, 동결건조된 제제는 투여 전에 멸균 수성 담체와 혼합된다. 제제의 pH는 전형적으로 3 내지 11이며, 더욱 바람직하게는 5 내지 9이며, 가장 바람직하게는 7 내지 8이다.

[0572] 일부 실시예에서, 본 발명의 글리코펩티드는 표준 비히클-형성 리피드로부터 형성된 리포솜에 결합될 수 있다. 예를 들어, Szoka et al., *Ann. Rev. Biophys. Bioeng.* 9: 467 (1980), 미국특허 제4,235,871호, 제4,501,728호 및 제4,837,028호에 기재된 다양한 방법이 리포솜 제조에 이용될 수 있다. 다양한 표적화제(예를 들어, 본 발명의 시알릴 갈락토시드)를 이용하는 리포솜의 표적화는 당업계에 공지되어 있다(예를 들어, 미국특허 제4,957,773호 및 제4,603,044호 참조).

[0573] 표적화제를 리포솜에 결합하는 표준 방법이 이용될 수 있다. 이러한 방법은 표적화제의 부착을 위하여 활성화될 수 있는, 포스파티딜에탄올아민과 같은, 리피드 성분, 또는 본 발명의 리피드-유도체화 글리코펩티드와 같은 유도체화된 지방친화성 화합물의 리포솜에의 결합을 일반적으로 포함한다.

[0574] 표적화 메커니즘은 표적 부분이 표적, 예를 들어 세포 표면 수용체와 상호작용에 이용될 수 있는 방식으로 표적화제가 리포솜 표면에 위치하는 것을 일반적으로 요구한다. 본 발명의 탄수화물은 리포솜이 당업자에게 공지된 방법(예를 들어, 각각 장쇄 알킬 할라이드 또는 지방산에 의한 탄수화물 상에 존재하는 하이드록실기의 알킬화 또는 아실화)을 이용하여 형성되기 전에 리피드 분자에 부착될 수 있다. 또는, 리포솜은 막 형성 시에 커넥터 부분(connector portion)이 먼저 막에 결합되는 방식으로 형성될 수 있다. 커넥터 부분은 견고하게 막에 삽입되고 고정되는, 지방친화성 부분을 가져야 한다. 이는 또한 리포솜의 수성 표면에서 화학적으로 이용가능한, 반응성 부분을 가져야 한다. 반응성 부분은 이후 첨가되는 표적화제 또는 탄수화물과 안정한 화학결합을 형성하기 위하여 화학적으로 안정하도록 선택된다. 일부 경우, 표적화제를 커넥터 분자(connector molecule)에 직접 부착시킬 수 있으나, 대부분의 경우, 화학적 가교(bridge)로서 작용하여 막 내의 커넥터 분자를 비히클 표면에서 3차원적으로 연장된 표적화제 또는 탄수화물과 결합시키는 제3 분자를 이용하는 것이 좀더 적합하다.

[0575] 본 발명의 방법에 의하여 제조되는 본 발명의 화합물은 진단제로서의 용도를 발견할 수 있다. 예를 들어, 표지된 화합물은 염증을 갖는 것으로 의심되는 환자에서 염증 또는 종양 전이의 영역을 밝히기 위하여 이용될 수 있다. 이러한 용도에 있어서, 화합물은 <sup>125</sup>I, <sup>14</sup>C, 또는 트리튬(tritium)으로 표지될 수 있다.

[0576] 본 발명의 약학적 조성물에 이용되는 활성 성분은 예를 들어, 배란을 증가시키는 여포 자극 호르몬의 생물학적 특성을 갖는 글리코페길화 G-CSF 및 그의 유도체이다. 바람직하게, 본 발명의 G-CSF 조성물은 비경구적(e.g. IV, IM, SC 또는 IP)으로 투여된다. 유효 투여량(effective dosages)은 치료되어야 하는 상태 및 투여 경로에 따라 상당히 다양할 것으로 예상되나, 체중 kg 당 활성 물질 0.1(~7U) 내지 100(~7000U) µg의 범위일 것으로 예상된다. 빈혈(anemic) 상태의 치료를 위한 적합한 용량은 일주일에 세 번 약 50 내지 약 300 유닛(Units)/kg이다. 본 발명은 향상된 생체 내 잔류 시간을 갖는 G-CSF를 제공하므로, 본 발명의 조성물이 투여되는 경우 언급된 투여량은 선택적으로 낮춰진다.

**[0577] 제형****[0578]**

바람직한 측면에서, 전술한 임의의 방법에 따라, 조혈 또는 골수억제와 관련된 상태의 치료에 이용되는 웨티드 콘주게이트는 경구 제형으로 제공된다. 바람직한 실시예에서, 이러한 경구 제형은 하기 성분: (a) G-CSF 웨티드와 수용성 폴리머 간의 공유 콘주게이트(covalent conjugate)인 웨티드, 여기에서 수용성 폴리머는 무순상 글리코실 결합기를 통하여 G-CSF 웨티드의 글리코실 또는 아미노산 잔기에서 G-CSF 웨티드에 공유적으로 부착됨; (b) 일 이상의 계면활성제; (c) 일 이상의 지방산; 및 (d) 장용성 물질(enteric material)을 포함한다. 특히 바람직한 실시예에서, 웨티드, 계면활성제 및 지방산은 장용성 물질과 혼합되기 전에, 액상으로 혼합되고 동결건조된다.

**[0579]**

본 명세서에 기재된 실시예 및 형태는 단지 예시적 목적일 뿐이며, 그로부터 다양한 변형 및 변화가 당업자에게 제안될 것이고, 이들은 본 출원의 정신 및 영역 및 첨부된 특허청구범위의 범위 내에 포함되어야 하는 것으로 이해된다. 본 명세서에 인용된 모든 간행물, 특히, 특허출원은 모든 목적을 위하여 전체적으로 참조로 본 명세서에 병합된다.

**[0580]**

하기 실시예는 본 발명의 조성물 및 방법을 설명하기 위하여 제공되며, 청구된 발명을 제한하기 위한 것이 아니다.

**[0581] 실시예****[0582] 실시예 1: 본 발명의 G-CSF 콘주게이트 웨티드에 반응하는 호중구 수치에 대한 약력학 데이터****[0583]**

본 발명의 G-CSF 콘주게이트 웨티드 및 상업적으로 구입가능한 G-CSF 뉴라스타(Neulasta)에 반응하는 호중구 수치(neutrophil count)에 대한 약력학 연구는 동일한 농도에서 뉴라스타와 유사한 작용의 시간 경로를 나타내었다(도 1). 호중구 수치에는 용량 의존성이 있어, 본 발명의 G-CSF 콘주게이트 (Glyco-PEG G-CSF)의 농도가 증가할수록 활성의 시간 경로의 피크에서 호중구 수가 증가하였다. Glyco-PEG G-CSF는 뉴라스타보다 약 30% 높은 반응을 생성하였으며, 이는 유사한 용량에서 뉴라스타보다 Glyco-PEG G-CSF에 대하여 60% 높은 생이용성 (bioavailability)을 나타내는 것이다.

**[0584]**

이 연구는 53개체의 대상을 포함하였다. 각각의 용량 군에는 20개체의 대상이 있었고, 이 중 15개체의 대상은 Glyco-PEG G-CSF에 무작위배정되었고, 5개체의 대상은 뉴라스타에 무작위배정되었다. Glyco-PEG G-CSF는 뉴라스타와 유사한 유해 사례 프로파일(adverse event profile)을 가지며, 일반적으로 내약성이 우수하였다. 유해 사례를 위한 중단은 없었다. 또한, 어떠한 심각한 유해 사례도 없었다. 또한, Glyco-PEG G-CSF에 대한 어떠한 항체도 검출되지 않았다.

**[0585]**

표 4는 Glyco-PEG G-CSF 투여 후 24시간 내지 168시간의 시간 기간에 걸쳐 3종의 상이한 농도의 Glyco-PEG G-CSF에 대한 일부 대표적인 데이터 포인트를 열거한다.

**표 4**

시간	Glyco-PEG G-CSF (100 µg)	Glyco-PEG G-CSF (50 µg)	Glyco-PEG G-CSF (25 µg)
24	26.0778	27.8917	25.825
72	35.222	31.5167	16.550
96	36.9222	23.7667	12.4625
144	24.2667	19.625	11.7625
168	22.9556	16.8167	12.3625

**[0587] 실시예 2: 본 발명의 G-CSF Conjugate 웨티드에 반응하는 CD34+ 수치에 대한 약력학 데이터****[0588]**

본 발명의 G-CSF 콘주게이트 웨티드 및 상업적으로 구입가능한 G-CSF 뉴라스타(Neulasta)에 반응하는 CD34+ 수치에 대한 약력학 연구는 동일한 농도에서 뉴라스타와 유사한 작용의 시간 경로를 나타내었다(도 2). Glyco-PEG G-CSF은 동일한 농도에서 뉴라스타 보다 그의 활성 피크에서 현저하게 높은 CD34+ 수치를 나타내었다.

**[0589]**

세포 수치에는 용량 의존성이 있어, Glyco-PEG G-CSF의 농도가 증가할수록 활성 시간 경로의 피크에서 호중구의

수가 증가하였다.

[0590] 표 5는 Glyco-PEG G-CSF 투여 후 72시간 내지 168시간의 시간 기간에 걸쳐 3종의 상이한 농도의 Glyco-PEG G-CSF에 대한 일부 대표적인 데이터 포인트를 열거한다.

표 5

시간	Glyco-PEG G-CSF (100 $\mu$ g)	Glyco-PEG G-CSF (50 $\mu$ g)	Glyco-PEG G-CSF (25 $\mu$ g)
72	68.444	33	14
96	101	44.4167	20.125
120	76.222	43.5	18.5
144	43.667	33.9167	13.875
168	33	17.8333	10.375

#### 실시예 3: 본 발명의 G-Csf 콘주게이트 웹티드에 반응하는 호중구 수치에 대한 약력학 데이터: 고정 용량 연구

본 발명의 G-CSF 콘주게이트 웹티드 및 상업적으로 구입 가능한 G-CSF 뉴라스타(Neulasta)에 반응하는 호중구 수치(neutrophil count)에 대한 고정 용량(fixed dose) 약력학 연구는 뉴라스타와 유사한 작용의 시간 경로를 나타내었다(도 4). Glyco-PEG G-CSF는 이 용량에서 뉴라스타보다 약 30% 높은 반응을 생성하였으며, 이는 이 용량에서 뉴라스타보다 Glyco-PEG G-CSF에 대하여 60% 높은 생이용성을 나타내는 것이다.

본 연구는 36개체의 건강한 대상에 대하여 이루졌다. Glyco-PEG G-CSF는 뉴라스타와 유사한 유해 사례 프로파일(adverse event profile)을 가지며, 일반적으로 내약성이 우수하였다. 유해 사례를 위한 중단이 없었고, 또한, 어떠한 심각한 유해 사례도 없었다. Glyco-PEG G-CSF에 대한 항체도 검출되지 않았다.

#### 실시예 4: 본 발명의 G-CSF Conjugate 웹티드에 반응하는 CD34+ 수치에 대한 약력학 데이터: 고정 용량 연구

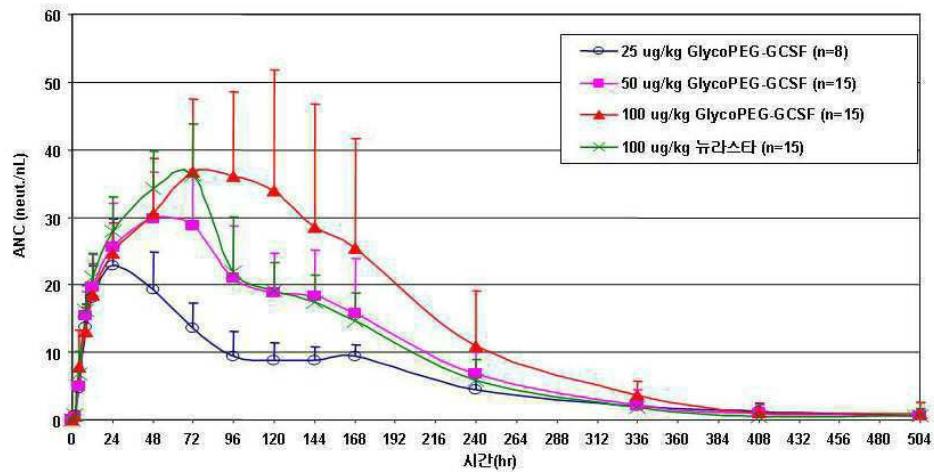
본 발명의 G-CSF 콘주게이트 웹티드 및 상업적으로 구입 가능한 G-CSF 뉴라스타(Neulasta)에 반응하는 CD34+ 수치에 대한 고정 용량 약력학 연구는 뉴라스타와 유사한 작용의 시간 경로를 나타내었다(도 5).

#### 실시예 5: 동종/자가 CD34+ 말초 혈액 프로제니터 세포(allogenic/autologous CD34+ Peripheral Blood progenitor cells)의 고정화

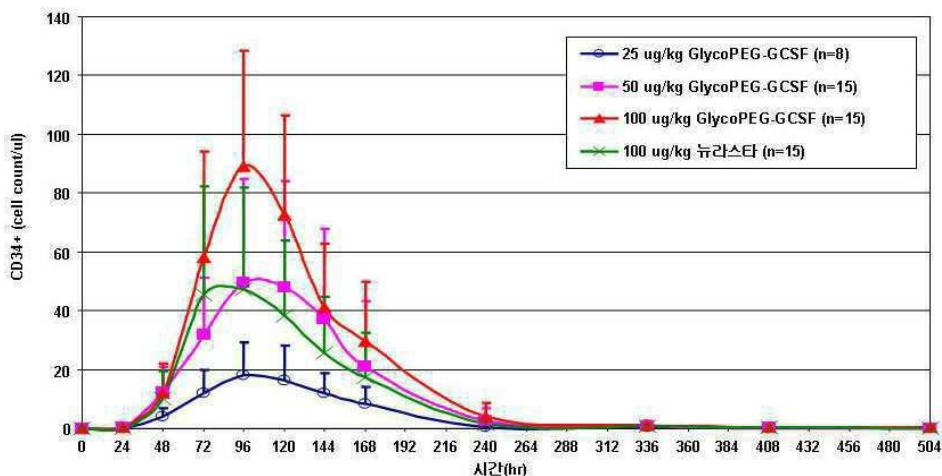
골수 이식 공여자는 5일 동안 글리코페길화 GCSF (Glyco-PEG G-CSF) 10~20  $\mu$ g/kg로 처리되어, CD34+ 세포를 휴면 수준(resting levels)(~2/ $\mu$ l)으로부터, 단일 페레시스(apheresis)에서  $2\sim4 \times 10^6$  CD34+ 세포/kg를 제공하기 위한 충분한 양인 약 10/ $\mu$ l로 증가시켰다. 골수 이식 공여자는 동종(수용자와 동일) 또는 자가(수용자와 상이함) 공여자일 수 있다.

## 도면

### 도면1



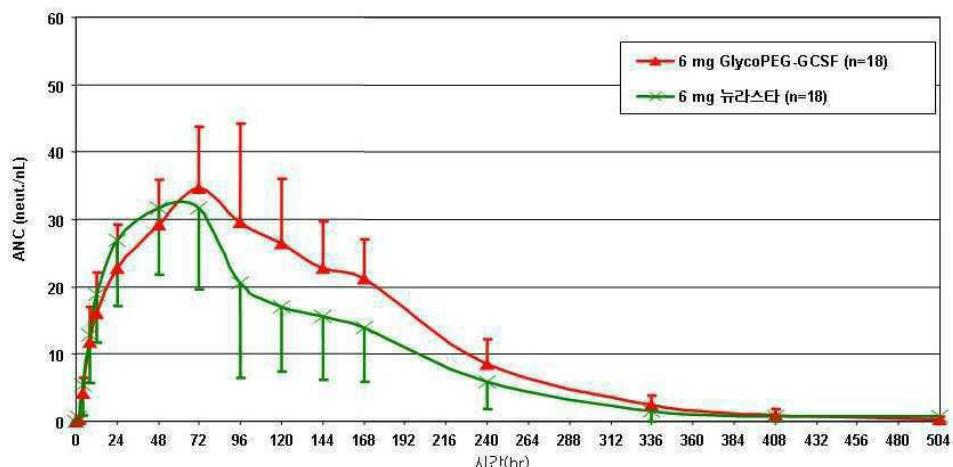
### 도면2



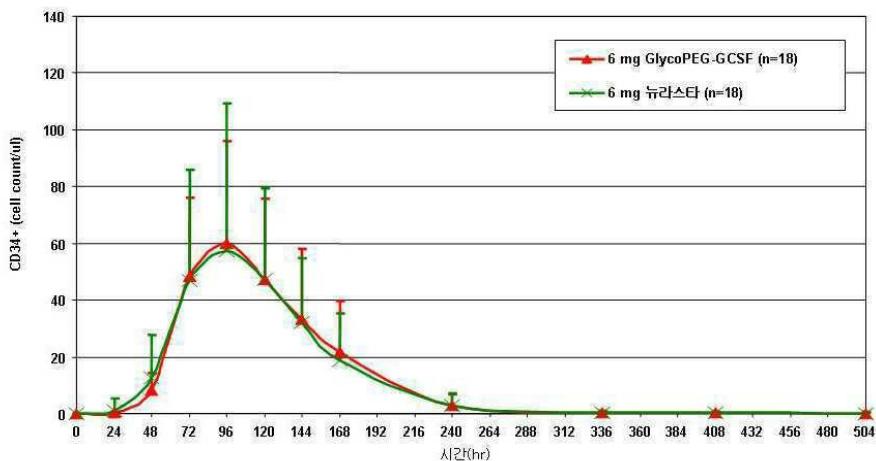
## 도면3

G-CSF 약동학 파라미터 (XM- 22 또는 페그필 그라스틴) [단위]	파일럿 코호 트 (25 µg/kg, 시험)	그룹 A (50 µg/kg XM22, 시험)	그룹 B (100 µg/kg XM22, 시험)	그룹 D (100 µg/kg 뉴라스티®, Reference)
AUC <sub>(0-t<sub>last</sub>)</sub> [hr*pg/mL]	965895.10	2516797.22	15744903.5 9	12450575.03
AUC <sub>(0-∞)</sub> [hr*pg/mL]	1123056.06	2651018.14	15903783.0 4	12617511.87
Cl [mL/hr/kg]	22.26	18.86	6.29	7.93
C <sub>max</sub> [pg/mL]	36424.95	62430.32	296626.65	287545.34
t <sub>max</sub> [hr]	10.00	18.00	30.12	24.00
t <sub>1/2</sub> [hr]	48.84	34.13	35.57	25.35
MRT [hr]	54.55	48.85	45.60	35.37

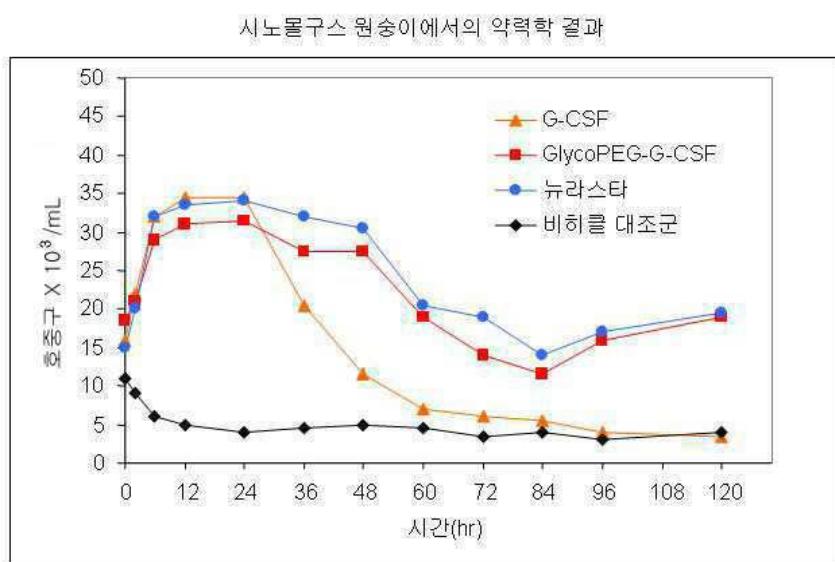
## 도면4



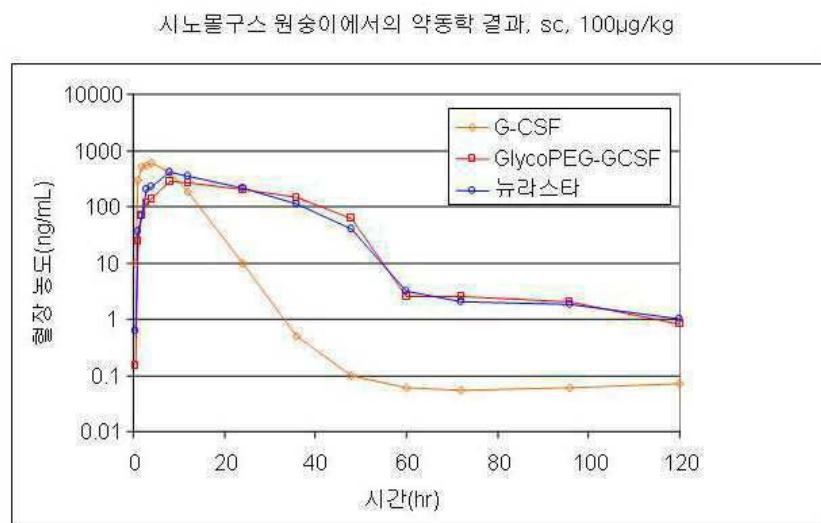
### 도면5



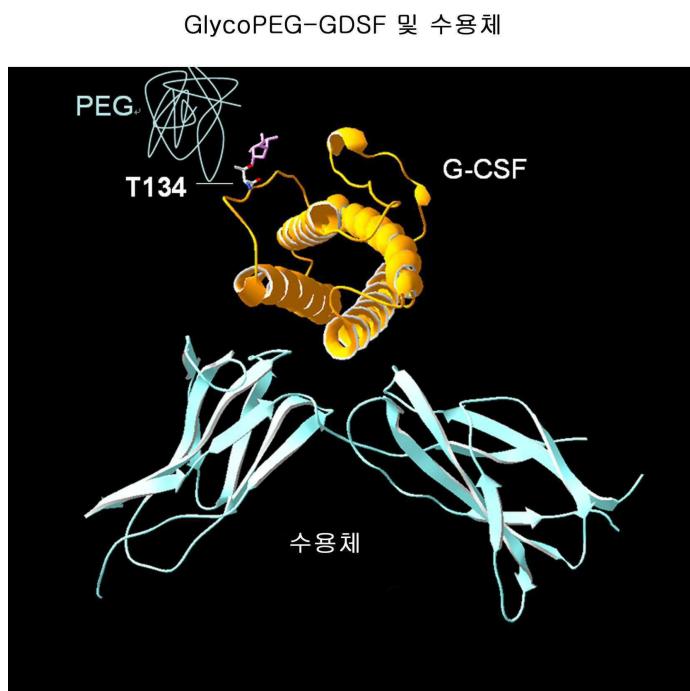
### 도면6



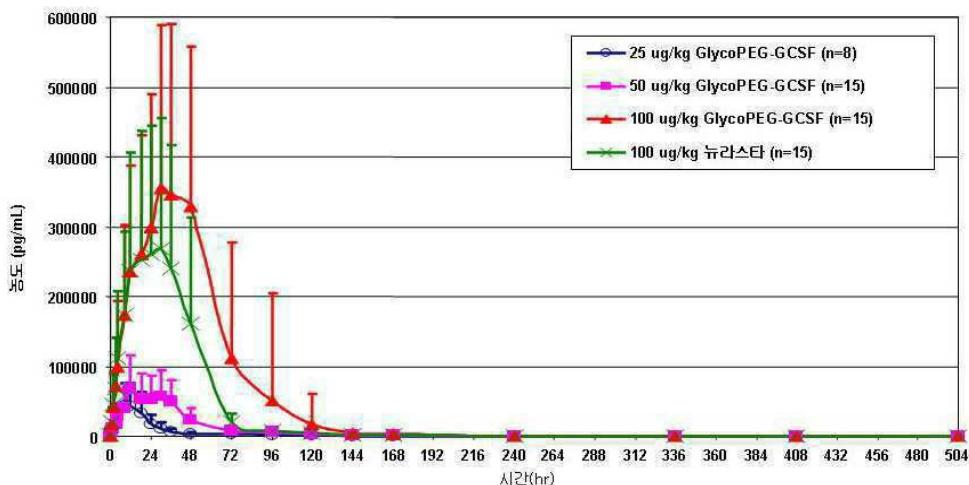
도면7



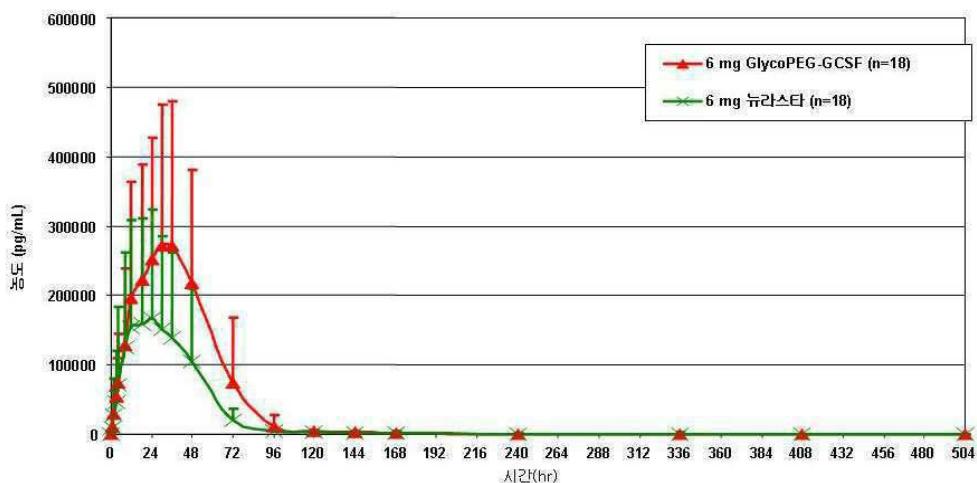
도면8



## 도면9



## 도면10



## 서 열 목 록

- <110> Biogenerix AG
- <120> Methods of treatment using glycopegylated G-CSF
- <130> P09MP079D/KR
- <150> US60/909917
- <151> 2007-04-03
- <150> US60/911788
- <151> 2007-04-13
- <150> US60/986240
- <151> 2007-11-07
- <160> 11

<170> KopatentIn 1.71

<210> 1

<211> 175

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Met Thr Pro Leu Gly Pro Ala Ser Ser Leu Pro Gln Ser Phe Leu Leu

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

Lys Cys Leu Glu Gln Val Arg Lys Ile Gln Gly Asp Gly Ala Ala Leu

20	25	30
----	----	----

Gln Glu Lys Leu Cys Ala Thr Tyr Lys Leu Cys His Pro Glu Glu Leu

35	40	45
----	----	----

Val Leu Leu Gly His Ser Leu Gly Ile Pro Trp Ala Pro Leu Ser Ser

50	55	60
----	----	----

Cys Pro Ser Gln Ala Leu Gln Leu Ala Gly Cys Leu Ser Gln Leu His

65	70	75	80
----	----	----	----

Ser Gly Leu Phe Leu Tyr Gln Gly Leu Leu Gln Ala Leu Glu Gly Ile

85	90	95
----	----	----

Ser Pro Glu Leu Gly Pro Thr Leu Asp Thr Leu Gln Leu Asp Val Ala

100	105	110
-----	-----	-----

Asp Phe Ala Thr Thr Ile Trp Gln Gln Met Glu Glu Leu Gly Met Ala

115	120	125
-----	-----	-----

Pro Ala Leu Gln Pro Thr Gln Gly Ala Met Pro Ala Phe Ala Ser Ala

130	135	140
-----	-----	-----

Phe Gln Arg Arg Ala Gly Gly Val Leu Val Ala Ser His Leu Gln Ser

145	150	155	160
-----	-----	-----	-----

Phe Leu Glu Val Ser Tyr Arg Val Leu Arg His Leu Ala Gln Pro

165	170	175
-----	-----	-----

<210> 2

<211> 174

<212> PRT

<213> Homo sapiens

&lt;400&gt; 2

Thr Pro Leu Gly Pro Ala Ser Ser Leu Pro Gln Ser Phe Leu Leu Lys

1 5 10 15

Cys Leu Glu Gln Val Arg Lys Ile Gln Gly Asp Gly Ala Ala Leu Gln

20 25 30

Glu Lys Leu Cys Ala Thr Tyr Lys Leu Cys His Pro Glu Glu Leu Val

35 40 45

Leu Leu Gly His Ser Leu Gly Ile Pro Trp Ala Pro Leu Ser Ser Cys

50 55 60

Pro Ser Gln Ala Leu Gln Leu Ala Gly Cys Leu Ser Gln Leu His Ser

65 70 75 80

Gly Leu Phe Leu Tyr Gln Gly Leu Leu Gln Ala Leu Glu Gly Ile Ser

85 90 95

Pro Glu Leu Gly Pro Thr Leu Asp Thr Leu Gln Leu Asp Val Ala Asp

100 105 110

Phe Ala Thr Thr Ile Trp Gln Gln Met Glu Leu Gly Met Ala Pro

115 120 125

Ala Leu Gln Pro Thr Gln Gly Ala Met Pro Ala Phe Ala Ser Ala Phe

130 135 140

Gln Arg Arg Ala Gly Gly Val Leu Val Ala Ser His Leu Gln Ser Phe

145 150 155 160

Leu Glu Val Ser Tyr Arg Val Leu Arg His Leu Ala Gln Pro

165 170

&lt;210&gt; 3

&lt;211&gt; 178

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;&lt;223&gt; G-CSF variant

&lt;400&gt; 3

Met Thr Pro Leu Gly Pro Ala Ser Ser Leu Pro Gln Ser Phe Leu Leu

1 5 10 15

Lys Cys Leu Glu Gln Val Arg Lys Ile Gln Gly Asp Gly Ala Ala Leu

20 25 30

Lys Leu Val Ser Glu Cys Ala Thr Tyr Lys Leu

35                  40                  45

Lou Val Lou Lou Gly His Sor Lou Gly Ille Bro

Leu Ser Ser Cys Pro Ser Gln Ala Leu Gln Leu Ala Gly Cys Leu Ser

65                    70                    75                    80

Gln Leu His Ser Gly Leu Phe Leu Tyr Gln Gly Leu Leu Gln Ala Leu

Glu Gly Ile Ser Pro Glu Leu Gly Pro Thr Leu Asp Thr Leu Gln Leu

100 105 110

Asp Val Ala Asp Phe Ala Thr Thr Ile Trp Gln Gln Met Glu Glu Leu

115                    120                    125

Gly Met Ala Pro Ala Leu Gln Pro Thr Gln Gly Ala Met Pro Ala Phe

<sup>120</sup> See, e.g., *U.S. v. Babbitt*, 125 F.3d 1250, 1254 (10th Cir. 1997) (“[T]he [Bald Eagle] Act does not prohibit the killing of bald eagles.”); *U.S. v. Gandy*, 140 F.3d 1250, 1254 (10th Cir. 1998) (“[T]he Bald Eagle Act does not prohibit the killing of bald eagles.”).

Ala Ser Ala Phe Gln Arg Arg Ala Gly Gly Val Leu Val Ala Ser His

145                    150                    155                    160

Lau, Cky, San, Pho, Lau, Cky, Val, San, Tom, Aug, Val, Lau, Aug, His, Lau, All

125 126 127

23

<210> 4

<211>

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> G-CSF variant

<400> 4

Met Ala Gly Pro Ala Thr Gln Ser Pro Met Lys Leu Met Ala Leu Gln

1                    5                    10                    15

Leu Leu Leu Trp His Ser Ala Leu Trp Thr Val Gln Glu Ala Thr Pro

20 25 30

Lys Cys Pro Ala Ser Ser Lys Pro Cln Ser Phe Lys Lys Lys Cys Lys

35                    40                    45

Glu Gln Val Arg Lys Ile Gln Gly Asp Gly Ala Ala Leu Gln Glu Lys  
 50                    55                    60

Leu Cys Ala Thr Tyr Lys Leu Cys His Pro Glu Glu Leu Val Leu Leu  
 65                    70                    75                    80

Gly His Ser Leu Gly Ile Pro Trp Ala Pro Leu Ser Ser Cys Pro Ser

85                    90                    95

Gln Ala Leu Gln Leu Ala Gly Cys Leu Ser Gln Leu His Ser Gly Leu  
 100                  105                  110

Phe Leu Tyr Gln Gly Leu Leu Gln Ala Leu Glu Gly Ile Ser Pro Glu  
 115                  120                  125

Leu Gly Pro Thr Leu Asp Thr Leu Gln Leu Asp Val Ala Asp Phe Ala  
 130                  135                  140

Thr Thr Ile Trp Gln Gln Met Glu Glu Leu Gly Met Ala Pro Ala Leu  
 145                  150                  155                  160

Gln Pro Thr Gln Gly Ala Met Pro Ala Phe Ala Ser Ala Phe Gln Arg  
 165                  170                  175

Arg Ala Gly Gly Val Leu Val Ala Ser His Leu Gln Ser Phe Leu Glu  
 180                  185                  190

Val Ser Tyr Arg Val Leu Arg His Leu Ala Gln Pro  
 195                  200

<210>        5  
 <211>        207  
 <212>        PRT  
 <213>        Artificial Sequence  
 <220><223>    G-CSF variant  
 <400>        5

Met Ala Gly Pro Ala Thr Gln Ser Pro Met Lys Leu Met Ala Leu Gln

1                    5                    10                    15

Leu Leu Leu Trp His Ser Ala Leu Trp Thr Val Gln Glu Ala Thr Pro  
 20                  25                  30

Leu Gly Pro Ala Ser Ser Leu Pro Gln Ser Phe Leu Leu Lys Cys Leu

35	40	45
Glu Gln Val Arg Lys Ile Gln Gly Asp Gly Ala Ala Leu Gln Glu Lys		
50	55	60
Leu Val Ser Glu Cys Ala Thr Tyr Lys Leu Cys His Pro Glu Glu Leu		
65	70	75
Val Leu Leu Gly His Ser Leu Gly Ile Pro Trp Ala Pro Leu Ser Ser		
85	90	95
Cys Pro Ser Gln Ala Leu Gln Leu Ala Gly Cys Leu Ser Gln Leu His		
100	105	110
Ser Gly Leu Phe Leu Tyr Gln Gly Leu Leu Gln Ala Leu Glu Gly Ile		
115	120	125
Ser Pro Glu Leu Gly Pro Thr Leu Asp Thr Leu Gln Leu Asp Val Ala		
130	135	140
Asp Phe Ala Thr Thr Ile Trp Gln Gln Met Glu Glu Leu Gly Met Ala		
145	150	155
Pro Ala Leu Gln Pro Thr Gln Gly Ala Met Pro Ala Phe Ala Ser Ala		
165	170	175
Phe Gln Arg Arg Ala Gly Gly Val Leu Val Ala Ser His Leu Gln Ser		
180	185	190
Phe Leu Glu Val Ser Tyr Arg Val Leu Arg His Leu Ala Gln Pro		
195	200	205
<210>	6	
<211>	176	
<212>	PRT	
<213>	Artificial Sequence	
<220>		
<223>	G-CSF variant	
<400>	6	
Met Val Thr Pro Leu Gly Pro Ala Ser Ser Leu Pro Gln Ser Phe Leu		
1	5	10
Leu Lys Cys Leu Glu Gln Val Arg Lys Ile Gln Gly Asp Gly Ala Ala		
20	25	30
Leu Gln Glu Lys Leu Cys Ala Thr Tyr Lys Leu Cys His Pro Glu Glu		

35	40	45
Leu Val Leu Leu Gly His Thr Leu Gly Ile Pro Trp Ala Pro Leu Ser		
50	55	60
Ser Cys Pro Ser Gln Ala Leu Gln Leu Ala Gly Cys Leu Ser Gln Leu		
65	70	75
His Ser Gly Leu Phe Leu Tyr Gln Gly Leu Leu Gln Ala Leu Glu Gly		
85	90	95
Ile Ser Pro Glu Leu Gly Pro Thr Leu Asp Thr Leu Gln Leu Asp Val		
100	105	110
Ala Asp Phe Ala Thr Thr Ile Trp Gln Gln Met Glu Glu Leu Gly Met		
115	120	125
Ala Pro Ala Leu Gln Pro Thr Gln Gly Ala Met Pro Ala Phe Ala Ser		
130	135	140
Ala Phe Gln Arg Arg Ala Gly Gly Val Leu Val Ala Ser His Leu Gln		
145	150	155
Ser Phe Leu Glu Val Ser Tyr Arg Val Leu Arg His Leu Ala Gln Pro		
165	170	175
<210> 7		
<211> 175		
<212> PRT		
<213> Artificial Sequence		
<220><223> G-CSF variant		
<400> 7		
Met Thr Pro Leu Gly Pro Ala Ser Ser Leu Pro Gln Ser Phe Leu Leu		
1	5	10
15		
Lys Cys Leu Glu Gln Val Arg Lys Ile Gln Gly Asp Gly Ala Ala Leu		
20	25	30
Gln Glu Lys Leu Cys Ala Thr Tyr Lys Leu Cys His Pro Glu Glu Leu		
35	40	45
Val Leu Leu Gly His Thr Leu Gly Ile Pro Trp Ala Pro Leu Ser Ser		
50	55	60
Cys Pro Ser Gln Ala Leu Gln Leu Ala Gly Cys Leu Ser Gln Leu His		

65                    70                    75                    80

Ser Gly Leu Phe Leu Tyr Gln Gly Leu Leu Gln Ala Leu Glu Gly Ile

85                    90                    95

Ser Pro Glu Leu Gly Pro Thr Leu Asp Thr Leu Gln Leu Asp Val Ala

100                105                110

Asp Phe Ala Thr Thr Ile Trp Gln Gln Met Glu Glu Leu Gly Met Ala

115                120                125

Pro Ala Leu Gln Pro Thr Gln Gly Ala Met Pro Ala Phe Ala Ser Ala

130                135                140

Phe Gln Arg Arg Ala Gly Gly Val Leu Val Ala Ser His Leu Gln Ser

145                150                155                160

Phe Leu Glu Val Ser Tyr Arg Val Leu Arg His Leu Ala Gln Pro

165                170                175

<210>      8

<211>      176

<212>      PRT

<213>      Artificial Sequence

<220><223>    G-CSF variant

<400>      8

Met Val Thr Pro Leu Gly Pro Ala Ser Ser Leu Pro Gln Ser Phe Leu

1                5                10                15

Leu Lys Cys Leu Glu Gln Val Arg Lys Ile Gln Gly Asp Gly Ala Ala

20                25                30

Leu Gln Glu Lys Leu Cys Ala Thr Tyr Lys Leu Cys His Pro Glu Glu

35                40                45

Leu Val Leu Leu Gly Ser Ser Leu Gly Ile Pro Trp Ala Pro Leu Ser

50                55                60

Ser Cys Pro Ser Gln Ala Leu Gln Leu Ala Gly Cys Leu Ser Gln Leu

65                70                75                80

His Ser Gly Leu Phe Leu Tyr Gln Gly Leu Leu Gln Ala Leu Glu Gly

85                90                95

Ile Ser Pro Glu Leu Gly Pro Thr Leu Asp Thr Leu Gln Leu Asp Val

100	105	110
Ala Asp Phe Ala Thr Thr Ile Trp Gln Gln Met Glu Glu Leu Gly Met		
115	120	125
Ala Pro Ala Leu Gln Pro Thr Gln Gly Ala Met Pro Ala Phe Ala Ser		
130	135	140
Ala Phe Gln Arg Arg Ala Gly Gly Val Leu Val Ala Ser His Leu Gln		
145	150	155
Ser Phe Leu Glu Val Ser Tyr Arg Val Leu Arg His Leu Ala Gln Pro		
165	170	175
<210> 9		
<211		
> 176		
<212> PRT		
<213> Artificial Sequence		
<220><223> G-CSF variant		
<400> 9		
Met Gln Thr Pro Leu Gly Pro Ala Ser Ser Leu Pro Gln Ser Phe Leu		
1	5	10
Leu Lys Cys Leu Glu Gln Val Arg Lys Ile Gln Gly Asp Gly Ala Ala		
20	25	30
Leu Gln Glu Lys Leu Cys Ala Thr Tyr Lys Leu Cys His Pro Glu Glu		
35	40	45
Leu Val Leu Leu Gly His Ser Leu Gly Ile Pro Trp Ala Pro Leu Ser		
50	55	60
Ser Cys Pro Ser Gln Ala Leu Gln Leu Ala Gly Cys Leu Ser Gln Leu		
65	70	75
His Ser Gly Leu Phe Leu Tyr Gln Gly Leu Leu Gln Ala Leu Glu Gly		
85	90	95
Ile Ser Pro Glu Leu Gly Pro Thr Leu Asp Thr Leu Gln Leu Asp Val		
100	105	110
Ala Asp Phe Ala Thr Thr Ile Trp Gln Gln Met Glu Glu Leu Gly Met		
115	120	125

Ala Pro Ala Leu Gln Pro Thr Gln Gly Ala Met Pro Ala Phe Ala Ser

130 135 140

Ala Phe Gln Arg Arg Ala Gly Gly Val Leu Val Ala Ser His Leu Gln

145 150 155 160

Ser Phe Leu Glu Val Ser Tyr Arg Val Leu Arg His Leu Ala Gln Pro

165 170 175

<210> 10

<211> 181

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> G-CSF variant

<400> 10

Met Thr Pro Leu Gly Pro Ala Ser Ser Leu Pro Gln Ser Phe Leu Leu

1 5 10 15

Lys Cys Leu Glu Gln Val Arg Lys Ile Gln Gly Asp Gly Ala Ala Leu

20 25 30

Gln Glu Lys Leu Cys Ala Thr Tyr Lys Leu Cys His Pro Glu Glu Leu

35 40 45

Val Leu Leu Gly His Ser Leu Gly Ile Pro Trp Ala Pro Leu Ser Ser

50 55 60

Cys Pro Ser Gln Ala Leu Gln Leu Ala Gly Cys Leu Ser Gln Leu His

65 70 75 80

Ser Gly Leu Phe Leu Tyr Gln Gly Leu Leu Gln Ala Leu Glu Gly Ile

85 90 95

Ser Pro Glu Leu Gly Pro Thr Leu Asp Thr Leu Gln Leu Asp Val Ala

100 105 110

Asp Phe Ala Thr Thr Ile Trp Gln Gln Met Glu Glu Leu Gly Met Ala

115 120 125

Pro Ala Leu Gln Pro Thr Gln Gly Ala Met Pro Ala Phe Ala Ser Ala

130 135 140

Phe Gln Arg Arg Ala Gly Gly Val Leu Val Ala Ser His Leu Gln Ser

145 150 155 160

Phe Leu Glu Val Ser Tyr Arg Val Leu Arg His Leu Ala Gln Pro Thr  
 165                          170                          175  
 Gln Gly Ala Met Pro  
 180  
 <210> 11  
 <211> 175  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> G-CSF variant  
 <400> 11  
 Met Thr Pro Leu Gly Pro Ala Ser Ser Leu Pro Gln Ser Phe Leu Leu  
 1                          5                          10                          15  
 Lys Cys Leu Glu Gln Val Arg Lys Ile Gln Gly Asp Gly Ala Ala Leu  
 20                          25                          30  
 Gln Glu Lys Leu Cys Ala Thr Tyr Lys Leu Cys His Pro Glu Glu Leu  
 35                          40                          45  
 Val Leu Leu Gly Ser Ser Leu Gly Ile Pro Trp Ala Pro Leu Ser Ser  
 50                          55                          60  
 Cys Pro Ser Gln Ala Leu Gln Leu Ala Gly Cys Leu Ser Gln Leu His  
 65                          70                          75                          80  
 Ser Gly Leu Phe Leu Tyr Gln Gly Leu Leu Gln Ala Leu Glu Gly Ile  
 85                          90                          95  
 Ser Pro Glu Leu Gly Pro Thr Leu Asp Thr Leu Gln Leu Asp Val Ala  
 100                          105                          110  
 Asp Phe Ala Thr Thr Ile Trp Gln Gln Met Glu Glu Leu Gly Met Ala  
 115                          120                          125  
 Pro Thr Thr Thr Pro Thr Gln Thr Ala Met Pro Ala Phe Ala Ser Ala  
 130                          135                          140  
 Phe Gln Arg Arg Ala Gly Gly Val Leu Val Ala Ser His Leu Gln Ser  
 145                          150                          155                          160  
 Phe Leu Glu Val Ser Tyr Arg Val Leu Arg His Leu Ala Gln Pro  
 165                          170                          175