



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2008-0041755  
(43) 공개일자 2008년05월13일

- |   |   |
|---|---|
| <p>(51) Int. Cl.<br/><i>A61K 38/22</i> (2006.01)</p> <p>(21) 출원번호 10-2008-7010285(분할)</p> <p>(22) 출원일자 2008년04월29일<br/>심사청구일자 2008년04월29일</p> <p>(62) 원출원 특허 10-2003-7008843<br/>원출원일자 2003년06월28일<br/>심사청구일자 2006년12월28일<br/>번역문제출일자 2008년04월29일</p> <p>(86) 국제출원번호 PCT/US2001/049479<br/>국제출원일자 2001년12월28일</p> <p>(87) 국제공개번호 WO 2002/53580<br/>국제공개일자 2002년07월11일</p> <p>(30) 우선권주장<br/>09/753,132 2000년12월29일 미국(US)<br/>60/259,245 2000년12월29일 미국(US)</p> | <p>(71) 출원인<br/>더 케네쓰 에스. 워렌 인스티튜트 인코포레이티드<br/>미국 뉴욕주 10562 오시닝 키차완 로드 712</p> <p>(72) 발명자<br/>브라인스 마이클<br/>미국 코네티컷주 06525 우드브릿지 위파워그 로드 1<br/>세라미 앤소니<br/>미국 뉴욕주 10012 뉴욕 메르세르 스트리트 170<br/>세라미 칼라<br/>미국 뉴욕주 10591 슬리피 할로우 파링톤 애비뉴 121</p> <p>(74) 대리인<br/>김창세, 장성구</p> |
|---|---|

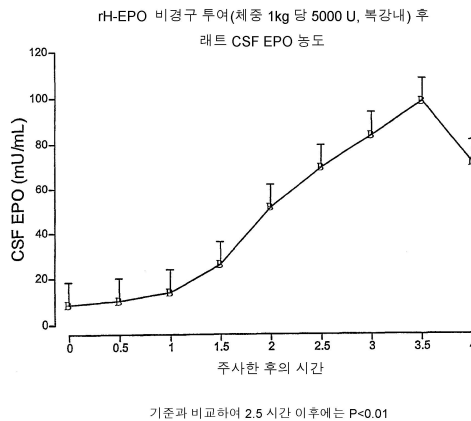
전체 청구항 수 : 총 25 항

(54) 에리트로포이에틴-응답 세포, 조직 및 기관의 보호, 회복 및 향상

(57) 요약

본 발명은 에리트로포이에틴 또는 개질된 에리트로포이에틴과 같은 에리트로포이에틴 수용체 활성 조절제를 전신 또는 국부 투여함으로써, 포유동물(인간 포함)의 생체내에서, 원위치에서 또는 생체 외에서 에리트로포이에틴-응답 세포, 조직, 기관 또는 신체부위의 기능 또는 생존을 보호하거나 향상시키는 방법 및 조성물을 제공한다.

대표도 - 도1



**특허청구의 범위**

**청구항 1**

에리트로포이에틴과 회합(association)한 분자를 포함하는 조성물을 포유동물 신체로부터 단리된 조직 또는 기관에 투여함을 포함하는, 포유동물 신체로부터 단리된 조직 또는 기관의 내피 세포 장벽을 가로지르는 분자의 수송을 촉진하는 방법.

**청구항 2**

제 1 항에 있어서,

상기 회합이 불안정한 공유 결합, 안정한 공유 결합 또는 상기 분자의 결합 부위와의 비-공유 회합인 방법.

**청구항 3**

제 1 항에 있어서,

상기 내피 세포 장벽이 혈액-뇌 장벽, 혈액-눈 장벽, 혈액-정소 장벽, 혈액-난소 장벽 및 혈액-태반 장벽으로 이루어진 군으로부터 선택되는 방법.

**청구항 4**

제 1 항에 있어서,

상기 분자가 수용체 작용제 또는 길항제, 호르몬, 항신경성 인자, 항균제, 방사성 의약품, 안티센스(antisense) 올리고뉴클레오타이드, 항체, 면역 억제제, 독소 또는 항암제인 방법.

**청구항 5**

하기의 변형 중에서 적어도 하나를 갖는 개질된 에리트로포이에틴과 회합한 분자를 포함하는, 내피 세포 장벽을 가로질러 분자를 수송하는 조성물:

- i) 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 또는 13개의 시알산 잔기;
- ii) N-결합된 탄수화물을 감소한 숫자로 갖거나 또는 갖지 않거나 또는 O-결합된 탄수화물을 갖지 않음;
- iii) O-결합된 탄수화물을 감소한 숫자로 갖거나 또는 갖지 않음;
- iv) 감소한 탄수화물 함량;
- v) 포유동물의 당화 패턴이 아닌 당화 패턴;
- vi) 하나 이상의 산화 탄수화물;
- vii) 화학적으로 환원된 하나 이상의 산화 탄수화물;
- viii) 하나 이상의 개질된 아르기닌 잔기;
- ix) 하나 이상의 개질된 리신 잔기;
- x) N-말단 아미노기의 개질;
- xi) 하나 이상의 개질된 티로신 잔기;
- xii) 하나 이상의 개질된 아스파르트산 또는 글루탐산 잔기;
- xiii) 하나 이상의 개질된 트립토판 잔기;
- xiv) 하나 이상의 아미노기의 제거;
- xv) 하나 이상의 시스틴 결합의 결손;
- xvi) 하나 이상의 아미노산의 치환;
- xvii) 절단; 또는

xviii) 알킬화.

**청구항 6**

제 5 항에 있어서,

상기 회합이 불안정한 공유 결합, 안정한 공유 결합 또는 상기 분자의 결합 부위와의 비-공유 회합인 조성물.

**청구항 7**

제 5 항에 있어서,

상기 분자가 수용체 작용제 또는 길항제, 호르몬, 항신경성 인자, 항균제, 방사성 의약품, 안티센스 올리고뉴클레오타이드, 항체, 면역 억제제, 독소 또는 항암제인 조성물.

**청구항 8**

제 5 항에 있어서,

상기 에리트로포이에틴이 비-적혈구조혈성인 조성물.

**청구항 9**

제 5 항에 있어서,

상기 에리트로포이에틴이 카바밀화 되는 조성물.

**청구항 10**

제 5 항에 있어서,

상기 에리트로포이에틴이 알킬화 되는 조성물.

**청구항 11**

제 5 항에 있어서,

상기 에리트로포이에틴이 무-시알산 에리트로포이에틴(asialoerythropoietin)인 조성물.

**청구항 12**

(a) 하기 (i) 내지 (xviii)에 기재된 적어도 하나의 변형을 가지며 분자와 회합한 개질된 에리트로포이에틴 및  
 (b) 약학적으로 허용가능한 담체를 포함하고, 이때 상기 개질된 에리트로포이에틴은 내피 세포 장벽을 가로질러 상기 분자를 수송할 수 있는,

세포, 에리트로포이에틴 수용체를 갖는 에리트로포이에틴-응답 세포를 포함하는 조직, 또는 에리트로포이에틴 수용체를 갖는 에리트로포이에틴-응답 세포를 포함하고 내피 세포 장벽에 의해 둘러싸인 기관에서의 증상을 치료하는 데에 효과적인 약학 조성물:

- i) 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 또는 13개의 시알산 잔기;
- ii) N-결합된 탄수화물을 감소한 숫자로 갖거나 또는 갖지 않거나 또는 O-결합된 탄수화물을 갖지 않음;
- iii) O-결합된 탄수화물을 감소한 숫자로 갖거나 또는 갖지 않음;
- iv) 감소한 탄수화물 함량;
- v) 포유동물의 당화 패턴이 아닌 당화 패턴;
- vi) 하나 이상의 산화 탄수화물;
- vii) 화학적으로 환원된 하나 이상의 산화 탄수화물;
- viii) 하나 이상의 개질된 아르기닌 잔기;
- ix) 하나 이상의 개질된 리신 잔기;

- x) N-말단 아미노기의 개질;
- xi) 하나 이상의 개질된 티로신 잔기;
- xii) 하나 이상의 개질된 아스파르트산 또는 글루탐산 잔기;
- xiii) 하나 이상의 개질된 트립토판 잔기;
- xiv) 하나 이상의 아미노기의 제거;
- xv) 하나 이상의 시스틴 결합의 결손;
- xvi) 하나 이상의 아미노산의 치환;
- xvii) 절단; 또는
- xviii) 알킬화.

**청구항 13**

제 12 항에 있어서,

상기 회합이 불안정한 공유 결합, 안정한 공유 결합 또는 상기 분자의 결합 부위와의 비-공유 회합인 약학 조성물.

**청구항 14**

제 12 항에 있어서,

상기 분자가 수용체 작용제 또는 길항제, 호르몬, 향신경성 인자, 항균제, 방사성 의약품, 안티센스 올리고뉴클레오타이드, 항체, 면역 억제제, 독소 또는 항암제인 약학 조성물.

**청구항 15**

제 12 항에 있어서,

상기 에리트로포이에틴이 비-적혈구조혈성인 약학 조성물.

**청구항 16**

제 12 항에 있어서,

상기 개질된 에리트로포이에틴이 카바밀화 되는 약학 조성물.

**청구항 17**

제 12 항에 있어서,

상기 개질된 에리트로포이에틴이 알킬화 되는 약학 조성물.

**청구항 18**

제 12 항에 있어서,

상기 개질된 에리트로포이에틴이 무-시알산 에리트로포이에틴인 조성물.

**청구항 19**

글루시톨릴 리신 에리트로포이에틴을 포함하는 조성물.

**청구항 20**

프록토실 리신 에리트로포이에틴을 포함하는 조성물.

**청구항 21**

3-데옥시글루코손 에리트로포이에틴을 포함하는 조성물.

**청구항 22**

카바밀화 무-시알산 에리트로포이에틴을 포함하는 조성물.

**청구항 23**

비오틴화 무-시알산 에리트로포이에틴을 포함하는 조성물.

**청구항 24**

숙시닐화 무-시알산 에리트로포이에틴을 포함하는 조성물.

**청구항 25**

아세틸화 무-시알산 에리트로포이에틴을 포함하는 조성물.

**명세서**

**발명의 상세한 설명**

**기술분야**

<1> 미국 특허법 제 119(e)(1) 항에 따라, 본원에 참고로 인용된, 2000년 12월 29일자로 출원된 가출원 제 60/259,245 호에 기초한 우선권을 주장한다.

**배경기술**

<2> 수년동안, 에리트로포이에틴(erythropoietin)의 유일한 명백한 생리학적 역할은 적혈구 세포의 생성을 조절하는 것이었다. 최근, 몇 가지 계열의 증거에 의해, 사이토카인 상과(superfamily)의 일원으로서의 에리트로포이에틴이 에리트로포이에틴 수용체(에리트로포이에틴-R)와의 상호작용을 통해 매개되는 다른 중요한 생리학적 기능을 수행함이 암시되고 있다. 이러한 작용은 마이토지네시스(mitogenesis), 평활근 세포 및 신경 세포로의 칼슘 유입 조절 및 중간 대사에 대한 효과를 포함한다. 에리트로포이에틴이 세포의 저산소성 환경을 개선시킬뿐만 아니라 대사 스트레스에 의해 야기되는 프로그래밍된 세포 사멸을 조절하는 역할을 하는 보상 반응(compensatory response)을 제공하는 것으로 생각된다. 연구 결과, 두개내로 주사된 에리트로포이에틴이 저산소성 신경 손상으로부터 뉴런을 보호하는 것으로 밝혀졌지만, 두개내 투여는 치료 용도의 경우, 특히 보통의 환자에게는 비현실적이고 허용불가능한 투여 경로이다. 뿐만 아니라, 에리트로포이에틴을 투여받은 빈혈 환자에 대한 이전의 연구에서는 말초 혈관에 투여된 에리트로포이에틴이 뇌로 수송되지 않는 것으로 결론을 내렸다(마티(Marti) 등, 1997, *Kidney Int.* 51:416-8; 줄(Juul) 등, 1999, *Pediatr. Res.* 46:543-547; 부에미(Buemi) 등, 2000, *Nephrol. Dial. Transplant.* 15:422-433).

<3> 미국 특허 제 5,457,089 호 및 제 4,835,260 호에 기재되어 있는 카복시 말단에 개질된 아미노산을 갖는 것; 미국 특허 제 5,856,292 호에 기재되어 있는 것과 같은 분자 1개당 다양한 수의 시알산 잔기를 갖는 에리트로포이에틴 이소폼(isoform); 미국 특허 제 4,703,008 호에 기재되어 있는 폴리펩티드; 미국 특허 제 5,767,078 호에 기재되어 있는 작용제; 미국 특허 제 5,773,569 호 및 제 5,830,851 호에 기재되어 있는, 에리트로포이에틴 수용체에 결합하는 펩티드; 및 미국 특허 제 5,835,382 호에 기재되어 있는 작은-분자 의사 화합물 등의, 분자의 적혈구 조혈 활성을 개선시키고자 하는 활성을 갖는 에리트로포이에틴의 다양한 개질된 형태가 기재되어 있다.

**발명의 내용**

**해결하고자하는 과제**

<4> 본 발명은 에리트로포이에틴-응답 세포 및 이에 결합된 세포, 조직 및 기관을 원위치에서(*in-situ*) 및 생체 외에서 보호, 유지, 향상 또는 회복시키고, 혈관으로부터 먼 에리트로포이에틴-응답 세포 및 이에 결합된 세포, 조직 및 기관을 보호 및 향상시킬 목적으로 내피 세포 장벽을 가로질러 에리트로포이에틴을 전달하거나, 또는

결합된 분자를 옮기기 위한, 에리트로포이에틴의 용도에 관한 것이다.

**과제 해결수단**

<5> 발명의 개요

<6> 한 양태에서, 본 발명은 에리트로포이에틴-응답 포유동물 세포 및 이들에 결합된 세포, 조직 및 기관의 기능 또는 생존을 보호, 유지, 향상 또는 회복시키는 약학 조성물을 제조하기 위한 에리트로포이에틴의 용도에 관한 것이다. 한 가지 구체적인 양태에서, 에리트로포이에틴-응답 포유동물 세포 및 이들에 결합된 세포, 조직 또는 기관은 치밀 내피 세포 장벽으로 인해 혈관으로부터 멀다. 다른 구체적인 양태에서, 이식을 위한 것과 같은 세포, 조직, 기관 또는 다른 신체부위는 포유동물 신체로부터 단리된다. 비제한적인 예로서, 에리트로포이에틴-응답 세포 또는 조직은 신경, 망막, 근육, 심장, 폐, 간, 신장, 소장, 부신피질, 부신수질, 모세혈관 내피, 고환, 난소, 췌장 또는 자궁내막 세포 또는 조직일 수 있다. 이들 에리트로포이에틴-응답 세포의 예는 예시하기 위한 것이다. 한 양태에서, 에리트로포이에틴-응답 세포 또는 이들에 결합된 세포, 조직 또는 기관은 흥분성 세포, 조직 또는 기관이 아니거나 또는 흥분성 세포 또는 조직을 주로 포함하지 않는다. 구체적인 실시태양에서, 전술한 에리트로포이에틴 유도체가 사용되는 포유동물 세포, 조직 또는 기관은 소진된 것이거나 또는 세포, 조직 또는 기관의 생존에 불리한 하나 이상의 조건하에서 시간에 따라 소진되게 된다. 이러한 조건은 원위치에서의 외상성 저산소증 또는 대사 기능장애, 수술에 의해 유도된 원위치에서의 저산소증 또는 대사 기능장애, 또는 원위치에서의 독소 노출을 포함하며, 원위치에서의 독소 노출은 화학요법 또는 방사선 요법에 수반될 수 있다. 한 실시태양에서, 불리한 조건은 특정 수술 절차를 위해 이용되는 심폐 회로술(인공 심폐기)의 결과이다.

<7> 에리트로포이에틴은 주로 신경 또는 정신 증상을 갖는 인간의 CNS 또는 말초신경계 질환, 및 안질환, 심혈관 질환, 심폐 질환, 호흡기 질환, 신장, 비뇨생식기 질환, 위장관 질환 및 내분비 및 대사 이상을 치료 또는 예방하는데 유용하다.

<8> 본 발명은 또한 포유동물, 바람직하게는 인간에게 투여하기 위한 특정 에리트로포이에틴 유도체를 포함하는 약학 조성물에 관한 것이다. 이러한 약학 조성물은 경구, 비강내 또는 비경구 투여를 위해, 또는 생체 외에서 세포, 조직 또는 기관의 생존을 유지하기 위한 관류액의 형태로 제형화될 수 있다.

<9> 전술한 목적에 유용한 에리트로포이에틴 유도체는 임의의 천연 에리트로포이에틴, 또는 에리트로포이에틴 유사체, 에리트로포이에틴 의사 화합물(mimetic) 및 에리트로포이에틴 분절, 혼성(hybrid) 에리트로포이에틴 분자, 에리트로포이에틴-수용체-결합 분자, 에리트로포이에틴 작용제, 신장 에리트로포이에틴, 뇌 에리트로포이에틴, 이들의 올리고머, 이들의 다합체, 이들의 뮤테인(mutein), 이들의 동류물, 이들의 천연 형태, 이들의 합성 형태, 이들의 재조합 형태, 이들의 당화 변형체, 이들의 탈당화 변형체, 또는 이들의 혼합물일 수 있다. 에리트로포이에틴-응답 세포에 유리하게 작용할 수 있는 에리트로포이에틴의 형태는 본 발명의 요지에 포함된다.

<10> 전술한 목적 및 약학 조성물에 유용한 다른 에리트로포이에틴 유도체는 천연 에리트로포이에틴, 및 천연 에리트로포이에틴과 비교하여, 바람직하게는 인간의 천연 에리트로포이에틴과 비교하여, 하나 이상 개질된 에리트로포이에틴을 포함한다. 하나 이상 개질된다는 것은 에리트로포이에틴 분자의 하나 이상의 아미노산이 개질되거나 또는 에리트로포이에틴 분자의 하나 이상의 탄수화물이 개질된 것일 수 있다. 물론, 본원의 목적에 유용한 에리트로포이에틴 분자는 천연 분자와 비교하여 다수 개질(예: 분자의 아미노산 부분이 다수 개질되거나, 분자의 탄수화물 부분이 다수 개질되거나, 또는 분자의 아미노산 부분의 하나 이상 개질되고 분자의 탄수화물 부분이 하나 이상 개질됨)될 수 있다. 개질된 에리트로포이에틴 분자는 에리트로포이에틴-응답 포유동물 세포의 기능 또는 생존을 보호, 유지, 향상 또는 회복시키는 능력을 유지하지만, 전술한 바람직한 특징에 관련되지 않은 에리트로포이에틴 분자의 다른 특징은 천연 분자와 비교하여 없을 수 있다. 바람직한 실시태양에서, 에리트로포이에틴 유도체는 적혈구 조혈성이 아니다.

<11> 한 실시태양에서, 본 발명의 에리트로포이에틴은 시알산 잔기를 갖지 않는다. 바람직한 실시태양에서, 개질된 에리트로포이에틴은 무-시알산 에리트로포이에틴(asialoerythropoietin)이고, 가장 바람직하게는 인간의 무-시알산 에리트로포이에틴이다. 다른 실시태양에서, 개질된 에리트로포이에틴은 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 또는 13개의 시알산 잔기를 갖는다.

<12> 제 2 실시태양에서, 개질된 에리트로포이에틴은 N-결합된 탄수화물 또는 O-결합된 탄수화물을 갖지 않는다.

<13> 제 3 실시태양에서, 개질된 에리트로포이에틴은 하나 이상의 글라이코시다제로 천연 탄수화물을 갖는 에리트로

포이에틴을 처리함으로써 적어도 탄수화물 함량이 적어도 감소된다.

- <14> 제 4 실시태양에서, 개질된 에리트로포이에틴 분자의 탄수화물 부분은 포유동물 세포가 아닌 세포에서 재조합 에리트로포이에틴을 발현시킴으로써 적어도 포유동물의 당화 패턴이 아닌 당화 패턴을 갖는다. 바람직한 실시태양에서, 개질된 에리트로포이에틴은 곤충 세포 또는 식물 세포에서 발현된다.
- <15> 제 5 실시태양에서, 개질된 에리트로포이에틴은 화학적으로 환원될 수도 있는 하나 이상의 산화 탄수화물을 갖는다. 바람직한 실시태양에서, 개질된 에리트로포이에틴은 과요오드산염-산화 에리트로포이에틴이고; 다른 바람직한 실시태양에서, 과요오드산염-산화 에리트로포이에틴은 나트륨 보로하이드라이드 또는 나트륨 시아노보로하이드라이드와 같은 보로하이드라이드 염으로 화학적으로 환원된다.
- <16> 제 6 실시태양에서, 전술한 용도를 위한 개질된 에리트로포이에틴은 하나 이상의 개질된 아르기닌 잔기를 갖는다. 한 실시태양에서, 개질된 에리트로포이에틴은 하나 이상의 아르기닌 잔기 상에 글리옥살 잔기(예: 아틸글리옥살 또는 알킬글리옥살 잔기)를 포함한다. 다른 실시태양에서, 하나 이상의 아르기닌 잔기는 2,3-부탄디온 또는 사이클로헥산디온과 같은(그러나, 이들로 한정되지는 않음) 인접한 디케톤과 반응함으로써 개질된다.
- <17> 제 7 실시태양에서, 개질된 에리트로포이에틴은 하나 이상의 개질된 리신 잔기를 갖거나 또는 에리트로포이에틴 분자의 N-말단 아미노기가 개질되는데, 예컨대 리신 잔기의 반응에 의해 개질되거나, 또는 N-말단 아미노기와 아미노기-개질제의 반응에 의해 개질된다. 개질된 리신 잔기는 또한 화학적으로 환원될 수 있다. 한 가지 바람직한 실시태양에서, 에리트로포이에틴은 하나 이상의 리신기를 통해 비오티닐화 또는 카바밀화다. 다른 바람직한 실시태양에서, 리신은 알데히드 또는 환원당과 반응하여 이민을 형성하고, 이를 나트륨 시아노보로하이드라이드로 환원시켜 글루시톨릴 리신과 같은 N-알킬화된 리신을 형성함으로써 안정화시킬 수 있거나, 또는 환원당의 경우, 아마도리(Amadori) 또는 헤인즈(Heyns) 전위에 의해  $\alpha$ -데옥시- $\alpha$ -프록토실리신과 같은  $\alpha$ -데옥시  $\alpha$ -아미노 당을 형성함으로써 안정화시킬 수 있다. 다른 바람직한 실시태양에서는, 리신기를 예컨대 시아네이트 이온과 반응시킴에 의해 카바밀화(카바모일화)시키거나; 각각 알킬-이소시아네이트, 아틸-이소시아네이트 또는 아틸-이소티오시아네이트와의 반응에 의해 알킬-카바밀화, 아틸-카바밀화 또는 아틸-티오카바밀화시키거나, 또는 리신기를 반응성 알킬카복실산 또는 아틸카복실산 유도체에 의해 아실화시킬 수 있다(예컨대, 아세트산 무수물, 숙신산 무수물 또는 프탈산 무수물과의 반응에 의해). 하나 이상의 리신기를 또한 트리니트로벤젠설포산 또는 바람직하게는 그의 염과 반응시킴으로써 트리니트로페닐 개질시킬 수 있다. 다른 실시태양에서는, 리신 잔기를 글리옥살 유도체(예컨대, 글리옥살, 메틸글리옥살 또는 3-데옥시글루코손)와 반응시켜 상응하는  $\alpha$ -카복시알킬 유도체를 생성시킴으로써 개질시킬 수 있다.
- <18> 제 8 실시태양에서는, 에리트로포이에틴의 하나 이상의 티로신 잔기를 친전자성 시약에 의해 방향족 고리 위치에서 개질시킬 수 있다(예컨대, 질화 또는 요오드화에 의해).
- <19> 제 9 실시태양에서는, 에리트로포이에틴의 아스파르트산 또는 글루탐산 잔기를 예를 들어 카보디이미드와 반응시킨 후 글리신아미드와 같은(그러나, 이것으로 국한되지는 않음) 아민과 반응시킴으로써 개질시킬 수 있다.
- <20> 제 10 실시태양에서는, 예컨대 n-브로모숙신이미드 또는 n-클로로숙신이미드와 반응시킴으로써 에리트로포이에틴의 트립토판 잔기를 개질시킨다.
- <21> 제 11 실시태양에서는, 예를 들어 닐하이드린과 반응시킨 다음 생성된 카보닐기를 보로하이드라이드와 반응시켜 환원시킴으로써 하나 이상의 에리트로포이에틴 아미노기가 제거된 개질된 에리트로포이에틴 분자가 제공된다.
- <22> 제 12 실시태양에서는, 디티오프라이톨과 같은 환원제와 반응시킨 후 설프하이드릴을 요오도아세트아미드, 요오도아세트산 또는 다른 친전자체와 반응시켜 디설파이드 결합의 재형성을 방지함으로써, 에리트로포이에틴 분자의 하나 이상의 시스틴 결합이 적어도 결손된 개질된 에리트로포이에틴이 제공된다.
- <23> 제 13 실시태양에서는, 분자생물학 기법을 이용하여, 다수의 아미노산중 임의의 하나(예: 류신)를 에리트로포이에틴의 리신, 아르기닌, 트립토판, 티로신 또는 시스테인 잔기로 적어도 일치환시킨 개질된 에리트로포이에틴이 제공된다.
- <24> 제 14 실시태양에서는, 개질된 에리트로포이에틴에 대해 특정 잔기를 표적으로 하는(예를 들어, 트립토판 잔기 뒤를 절단하는) 단백질 가수분해를 수행한다. 이렇게 하여 생성된 에리트로포이에틴 분자는 본원에 포함된다.
- <25> 상기 나타낸 바와 같이, 본원의 목적에 유용한 에리트로포이에틴은 상기와 같이 하나 이상 개질될 수도 있고, 그보다 더 많이 개질될 수도 있다. 분자의 탄수화물 부분이 한 가지 개질되고 아미노산 부분이 한 가지 개질된, 개질된 에리트로포이에틴의 예로서, 개질된 에리트로포이에틴은 무-시알산 에리트로포이에틴이고, 비오

티닐화 또는 카바밀화 리신 잔기를 갖는다. 본 발명은 또한 하나 이상의 전술한 에리트로포이에틴을 포함하는 약학 조성물을 비롯한 조성물도 포함한다.

<26> 본 발명의 다른 양태에서는, 하나 이상의 전술한 에리트로포이에틴을 효과량으로 투여함으로써, 에리트로포이에틴-응답 포유동물 세포 및 이들에 결합된 세포, 조직 및 기관의 기능 또는 생존을 보호, 유지, 향상 또는 회복시키는 방법을 제공한다. 이러한 방법의 한 가지 구체적인 양태에서는, 에리트로포이에틴-응답 포유동물 세포 및 이에 결합된 세포, 조직 및 기관이 치밀 내피 세포 장벽으로 인해 혈관으로부터 멀다. 다른 구체적인 양태에서는, 이식하고자 하는 것과 같은 세포, 조직, 기관 또는 다른 신체부위를 포유동물 신체로부터 단리해낸다. 비제한적인 예로서, 에리트로포이에틴-응답 세포 또는 조직은 신경, 망막, 근육, 심장, 폐, 간, 신장, 소장, 부신피질, 부신수질, 모세혈관 내피, 고환, 난소 또는 자궁내막 세포 또는 조직일 수 있다. 에리트로포이에틴-응답 세포의 이러한 예는 단지 예일 뿐이다. 구체적인 실시태양에서, 에리트로포이에틴-응답 세포 또는 이에 결합된 세포, 조직 또는 기관은 흥분성 세포, 조직 또는 기관이 아니거나, 흥분성 세포 또는 조직을 주로 포함하지 않는다. 다른 구체적인 실시태양에서, 전술한 에리트로포이에틴 유도체가 투여될 수 있는 포유동물 세포, 조직 또는 기관은 세포, 조직 또는 기관의 생존에 불리한 하나 이상의 조건하에서 소진된 것이거나 시간에 따라 소진되게 된다. 이러한 조건은 원위치에서의 외상성 저산소증 또는 대사 기능장애, 수술에 의해 유도된 원위치에서의 저산소증 또는 대사 기능장애, 또는 원위치에서의 독소 노출(이는 화학요법 또는 방사선 요법에 수반될 수 있음)을 포함할 수 있다. 한 실시태양에서, 본 발명은 심폐 회로술로부터 야기되는 불리한 조건에 대해 보호한다.

<27> 본 발명의 또다른 양태에서, 에리트로포이에틴-응답 포유동물 세포 및 이에 결합된 세포, 조직 및 기관의 기능 또는 생존을 보호, 유지, 향상 또는 회복시키고자 하는 목적으로 세포, 조직 또는 기관을 생체 외에서 처리하기 위한 약학 조성물을 제조하는데, 전술한 임의의 에리트로포이에틴 및 천연 인간 에리트로포이에틴을 비롯한 임의의 다른 에리트로포이에틴 분자를 사용할 수 있다. 이러한 생체의 처리는 예를 들어 이식(자가 이식 또는 외래 이식(xenotransplant))을 위한 세포, 조직 또는 기관의 보존에 유용하다. 세포, 조직 또는 기관이 공여자 또는 수령자의 혈관과 결합되지 않은 기간동안 세포 기능을 유지하기 위하여, 혈관 또는 다른 수단을 통해 기관 내로 스며들게 하는 관류액 또는 에리트로포이에틴을 함유하는 용액에 세포, 조직 또는 기관을 담가둘 수 있다. 기관을 떼어내기 전의 공여자, 및 떼어낸 기관 및 수령자에게 관류액을 투여할 수 있다. 또한, 에리트로포이에틴의 전술한 용도는 세포, 조직 또는 기관이 개인의 혈관으로부터 단리되어 일정 기간동안 본질적으로 생체 외에서 존재할 경우에 유용하며, 이 때 용어 단리된이란 구체적으로 심폐 회로술과 같은 수술 동안; 혈관이 세포, 조직, 기관 또는 신체 부위를 우회하는 동안; 포유동물 신체로부터 세포, 조직, 기관 또는 신체 부위를 제거(이는 외래 이식에 앞서 또는 자がい식 전에 또한 자がい식 동안 수행될 수 있음)하는 동안; 또는 세포, 조직, 기관 또는 신체 부위의 외상성 절단 동안 수행될 수 있는 것처럼, 세포, 조직, 기관 또는 신체 부위의 혈관 또는 세포, 조직, 기관 또는 신체 부위의 혈관을 제한시키거나 클램프로 죄는 것을 의미한다. 따라서, 본 발명의 이 양태는 원위치에서 또한 생체 외에서 에리트로포이에틴을 사용한 관류에 적합하다. 생체 외에서, 에리트로포이에틴은 세포, 조직 또는 기관 보존 용액에 제공될 수 있다. 어느 양태에서나, 노출은 연속 관류, 박동성 관류, 주입, 침지, 주사 또는 카테터 삽입에 의해 이루어질 수 있다.

<28> 또다른 양태에서, 본 발명은 포유동물 신체로부터 단리된, 에리트로포이에틴-응답 세포 또는 조직을 포함하는 포유동물 세포, 조직, 기관 또는 신체 부위의 생존을 보호, 유지, 향상 또는 회복시키는 방법에 관한 것이다. 이 방법은, 단리된 포유동물 세포, 조직, 기관 또는 신체 부위를, 전술한 생존을 보호, 유지, 향상 또는 회복시키는데 효과적인 시간동안 소정량의 에리트로포이에틴에 노출시킴을 포함한다. 비제한적인 예에서, 단리된이란 심폐 회로술과 같은 수술 동안; 혈관이 세포, 조직, 기관 또는 신체 부위를 우회하는 동안; 포유동물 신체로부터 세포, 조직, 기관 또는 신체 부위를 제거(이는 외래이식에 앞서 또는 자がい식 전에 또한 자がい식 동안 수행될 수 있음)하는 동안; 또는 세포, 조직, 기관 또는 신체 부위가 외상에 의해 절단되어 있는 동안 수행될 수 있는 것처럼, 세포, 조직, 기관 또는 신체 부위의 혈관 또는 세포, 조직, 기관 또는 신체 부위의 혈관을 제한시키거나 클램프로 죄는 것을 의미한다. 따라서, 본 발명의 이 양태는 원위치에서 또한 생체 외에서 에리트로포이에틴을 사용한 관류에 적합하다. 생체 외에서, 에리트로포이에틴은 세포, 조직 또는 기관 보존 용액에 제공될 수 있다. 어느 양태에서나, 노출은 연속 관류, 박동성 관류, 주입, 침지, 주사 또는 카테터 삽입에 의해 이루어질 수 있다.

<29> 전술한 단리 또는 생체의 실시태양에서, 유용한 에리트로포이에틴은 천연 에리트로포이에틴, 또는 에리트로포이에틴 유사체, 에리트로포이에틴 의사 화합물 및 에리트로포이에틴 분절, 혼성 에리트로포이에틴 분자, 에리트로포이에틴-수용체-결합 분자, 에리트로포이에틴 작용제, 신장 에리트로포이에틴, 뇌 에리트로포이에틴, 이들의

올리고머, 이들의 다합체, 이들의 뮤테인, 이들의 동류물, 이들의 천연 형태, 이들의 합성 형태, 이들의 재조합 형태, 이들의 당화 변형체, 이들의 탈당화 변형체 또는 이들의 혼합물을 비롯한 전술한 임의의 에리트로포이에틴일 수 있다. 에리트로포이에틴-수용체 세포에게 유리하게 작용할 수 있는 에리트로포이에틴의 임의의 형태는 본 발명의 영역 내에 포함된다. 다른 에리트로포이에틴은 무-시알산 에리트로포이에틴, N-탈당화 에리트로포이에틴, O-탈당화 에리트로포이에틴, 탄수화물 함량이 적어도 감소된 에리트로포이에틴, 변화된 당화 패턴을 갖는 에리트로포이에틴, 산화 후 환원된 탄수화물을 갖는 에리트로포이에틴, 아릴글리옥살-개질된 에리트로포이에틴, 알킬글리옥살-개질된 에리트로포이에틴, 2,3-부탄디온-개질된 에리트로포이에틴, 사이클로헥산디온-개질된 에리트로포이에틴, 비오틴화 에리트로포이에틴, N-알킬화된-리실-에리트로포이에틴, 글루시톨릴 리신 에리트로포이에틴, α-데옥시-α-프록토실리신-에리트로포이에틴, 카바밀화 에리트로포이에틴, 아세틸화 에리트로포이에틴, 숙시닐화 에리트로포이에틴, α-카복시알킬 에리트로포이에틴, 질화된 에리트로포이에틴, 요오드화된 에리트로포이에틴(본원의 교시에 기초하여 몇몇 대표적이지만 비제한적인 예를 명명함)을 포함하지만 이들로 한정되는 것은 아니다. 인간의 에리트로포이에틴이 바람직하고; 인간의 천연 에리트로포이에틴이 가장 바람직하다. 다른 실시태양에서는, 인간의 무-시알산 에리트로포이에틴이 바람직하다. 또 다른 실시태양에서는, 인간의 페닐글리옥살 에리트로포이에틴이 바람직하다.

<30> 비제한적인 예로서, 전술한 생체의 에리트로포이에틴-응답 세포 또는 조직은 신경, 망막, 근육, 심장, 폐, 간, 신장, 소장, 부신피질, 부신수질, 모세혈관 내피, 고환, 난소 또는 자궁내막 세포 또는 조직일 수 있거나 상기 세포 또는 조직을 포함할 수 있다. 에리트로포이에틴-응답 세포의 이들 예는 단지 예일 뿐이다.

<31> 전술한 방법 및 용도는 모두 인간에게 바람직하게 적용될 수 있지만, 애완동물, 집안에서 키우는 동물, 가축 및 동물원 동물과 같은(그러나 이들로 국한되지는 않음) 임의의 동물에도 마찬가지로 유용하다. 전술한 약학 조성물의 투여 경로는 경구, 정맥내, 비강내, 국부, 관강내, 흡입 또는 비경구 투여를 포함하며, 비경구 투여는 정맥내, 동맥내, 피하, 근육내, 복강내, 점막하 또는 피내 투여를 포함한다. 생체의 용도의 경우, 관류액 또는 침지 용액이 바람직하다. 이는 혈관의 단리된 부분을 원위치에서 관류시킴을 포함한다.

<32> 본 발명의 또 다른 양태에서, 전술한 임의의 에리트로포이에틴은, 기능장애에 책임이 있는 질환 또는 증상의 개시 후에 투여될 때, 기능장애 세포, 조직 또는 기관을 회복시키는 약학 조성물을 제조하는데 유용하다. 비제한적인 예로서, 에리트로포이에틴을 포함하는 약학 조성물을 투여하면, 외상이 진정된지 한참(예컨대 3일, 5일, 1주일, 한 달 이상) 지난 뒤에 투여될 때에도, 뇌 외상을 받은 동물의 인지 기능이 회복된다. 이러한 용도에 유용한 에리트로포이에틴은 전술한 임의의 특정 에리트로포이에틴 또는 임의의 천연 에리트로포이에틴, 또는 에리트로포이에틴 유사체, 에리트로포이에틴 의사 화합물 및 에리트로포이에틴 분절, 혼성 에리트로포이에틴 분자, 에리트로포이에틴-수용체-결합 분자, 에리트로포이에틴 작용제, 신장 에리트로포이에틴, 뇌 에리트로포이에틴, 이들의 올리고머, 이들의 다합체, 이들의 뮤테인, 이들의 동류물, 이들의 천연 형태, 이들의 합성 형태, 이들의 재조합 형태, 이들의 당화 변형체, 이들의 탈당화 변형체, 또는 이들의 혼합물을 포함한다. 에리트로포이에틴-응답 세포에게 유리하게 작용할 수 있는 에리트로포이에틴의 임의의 형태는 본 발명의 영역에 포함된다. 전술한 목적 및 약학 조성물에 유용한 다른 에리트로포이에틴 유도체는 천연 에리트로포이에틴, 및 천연 에리트로포이에틴(바람직하게는 인간의 천연 에리트로포이에틴)와 비교하여 하나 이상 개질된 에리트로포이에틴을 포함한다. 하나 이상 개질되었다는 것은 에리트로포이에틴 분자의 하나 이상의 아미노산이 개질되거나 또는 에리트로포이에틴 분자의 하나 이상의 탄수화물이 개질된 것일 수 있다. 물론, 본원의 목적에 유용한 에리트로포이에틴은 천연 분자와 비교하여, 분자의 아미노산 부분이 다수 개질되거나, 분자의 탄수화물 부분이 다수 개질되거나, 또는 분자의 아미노산 부분이 하나 이상 개질되고 분자의 탄수화물 부분이 하나 이상 개질되는 것과 같이 다수 개질될 수 있다. 개질된 에리트로포이에틴 분자는 에리트로포이에틴-응답 포유동물 세포의 기능 또는 생존을 보호, 유지, 향상 또는 회복시키는 그의 능력을 보유하지만, 전술한 바람직한 특징과 관계 없는 에리트로포이에틴 분자의 다른 특성은 천연 분자와 비교하여 없을 수 있다. 인간의 에리트로포이에틴이 바람직하고; 인간의 천연 에리트로포이에틴이 가장 바람직하다. 다른 실시태양에서는, 인간의 무-시알산 에리트로포이에틴이 바람직하다.

<33> 또 다른 실시태양에서, 본 발명은 기능장애에 책임이 있는 질환 또는 증상이 개시된 후에 투여될 때 기능장애 세포, 조직 또는 기관을 회복시키기 위해 전술한 에리트로포이에틴을 사용하는 방법을 제공한다. 비제한적인 예로서, 에리트로포이에틴을 포함하는 약학 조성물을 투여하는 방법은, 외상이 진정된지 한참(예컨대, 3일, 5일, 1주일, 한 달 이상) 후에 투여될 때에도, 뇌 외상을 가진 동물의 인지 기능을 회복시킨다. 이러한 방법에 유용한 에리트로포이에틴은 전술한 임의의 특정 에리트로포이에틴 또는 임의의 천연 에리트로포이에틴, 또는 에리트로포이에틴 유사체, 에리트로포이에틴 의사 화합물 및 에리트로포이에틴 분절, 혼성 에리트로포이에틴

분자, 에리트로포이에틴-수용체-결합 분자, 에리트로포이에틴 작용제, 신장 에리트로포이에틴, 뇌 에리트로포이에틴, 이들의 올리고머, 이들의 다합체, 이들의 뮤테인, 이들의 동류물, 이들의 천연 형태, 이들의 합성 형태, 이들의 재조합 형태, 이들의 당화 변형체, 이들의 탈당화 변형체, 또는 이들의 혼합물을 포함한다. 에리트로포이에틴-응답 세포에게 유리하게 작용할 수 있는 에리트로포이에틴의 임의의 형태는 본 발명의 영역에 포함된다. 진술한 목적 및 약학 조성물에 유용한 다른 에리트로포이에틴 유도체는 천연 에리트로포이에틴, 및 천연 에리트로포이에틴(바람직하게는 인간의 천연 에리트로포이에틴)와 비교하여 하나 이상 개질된 에리트로포이에틴을 포함한다. 하나 이상 개질되었다는 것은 에리트로포이에틴 분자의 하나 이상의 아미노산이 개질되거나, 또는 에리트로포이에틴 분자의 하나 이상의 탄수화물이 개질된 것일 수 있다. 물론, 본원의 목적에 유용한 에리트로포이에틴은 천연 분자와 비교하여, 분자의 아미노산 부분이 다수 개질되거나, 분자의 탄수화물 부분이 다수 개질되거나, 또는 분자의 아미노산 부분이 하나 이상 개질되고 분자의 탄수화물 부분이 하나 이상 개질되는 것과 같이 다수 개질될 수 있다. 개질된 에리트로포이에틴 분자는 에리트로포이에틴-응답 포유동물 세포의 기능 또는 생존을 보호, 유지, 향상 또는 회복시키는 그의 능력을 보유하지만, 진술한 바람직한 특징과 관계 없는 에리트로포이에틴 분자의 다른 특성은 천연 분자와 비교하여 없을 수 있다. 인간의 에리트로포이에틴이 바람직하고; 인간의 천연 에리트로포이에틴이 가장 바람직하다. 다른 실시태양에서는, 인간의 무-시알산 에리트로포이에틴이 바람직하다.

<34> 본 발명의 다른 양태에서는, 시알산 잔기를 갖지 않은 에리트로포이에틴; N-결합된 탄수화물 또는 O-결합된 탄수화물을 갖지 않은 에리트로포이에틴; 하나 이상의 글라이코시다제로 천연 에리트로포이에틴을 처리함으로써 탄수화물 함량이 적어도 감소된 에리트로포이에틴; 포유동물 세포가 아닌 세포에 재조합 에리트로포이에틴을 발현시킴으로써 포유동물의 당화 패턴이 아닌 당화 패턴을 갖는 에리트로포이에틴 분자의 탄수화물 부분을 갖는 에리트로포이에틴; 화학적으로 환원될 수도 있는 하나 이상의 산화 탄수화물을 갖는 에리트로포이에틴; 하나 이상의 개질된 아르기닌 잔기를 갖는 에리트로포이에틴; 하나 이상의 개질된 리신 잔기를 갖거나 또는 에리트로포이에틴 분자의 N-말단 아미노기가 개질된 에리트로포이에틴; 적어도 하나 이상의 개질된 티로신 잔기를 갖는 에리트로포이에틴; 적어도 하나 이상의 개질된 아스파르트산 또는 글루탐산 잔기를 갖는 에리트로포이에틴; 적어도 하나 이상의 개질된 트립토판 잔기를 갖는 에리트로포이에틴; 하나 이상의 아미노기가 제거된 에리트로포이에틴; 에리트로포이에틴 분자의 하나 이상의 시스틴 결합이 적어도 결손된 에리트로포이에틴; 하나 이상의 아미노산이 적어도 일치환된 에리트로포이에틴 또는 절단된 에리트로포이에틴과 같은 에리트로포이에틴과 결합된 분자의 조성물을 투여함으로써, 포유동물의 내피 세포 장벽을 가로지르는 분자의 세포간 수송(transcytosis)을 촉진시키는 방법이 제공된다.

<35> 수송될 분자와 에리트로포이에틴 사이의 결합은 예를 들어 불안정한 공유 결합, 안정한 공유 결합, 또는 분자의 결합 부위와의 비공유 결합일 수 있다. 내피 세포 장벽은 혈액-뇌 장벽, 혈액-눈 장벽, 혈액-고환 장벽, 혈액-난소 장벽 및 혈액-태반 장벽일 수 있다. 본 발명의 방법에 의해 수송하는데 적합한 분자는 성장 호르몬과 같은 호르몬, 항생제 및 항암제를 포함한다.

<36> 본 발명의 다른 양태는, 시알산 잔기를 갖지 않은 에리트로포이에틴; N-결합된 탄수화물 또는 O-결합된 탄수화물을 갖지 않은 에리트로포이에틴; 하나 이상의 글라이코시다제로 천연 에리트로포이에틴을 처리함으로써 탄수화물 함량이 적어도 감소된 에리트로포이에틴; 포유동물 세포가 아닌 세포에 재조합 에리트로포이에틴을 발현시킴으로써 포유동물의 당화 패턴이 아닌 당화 패턴을 갖는 개질된 에리트로포이에틴 분자의 탄수화물 부분을 갖는 에리트로포이에틴; 화학적으로 환원될 수도 있는 하나 이상의 산화 탄수화물을 갖는 에리트로포이에틴; 하나 이상의 개질된 아르기닌 잔기를 갖는 에리트로포이에틴; 하나 이상의 개질된 리신 잔기를 갖거나 또는 에리트로포이에틴분자의 N-말단 아미노기가 개질된 에리트로포이에틴; 적어도 하나 이상의 개질된 티로신 잔기를 갖는 에리트로포이에틴; 적어도 하나 이상의 개질된 아스파르트산 또는 글루탐산 잔기를 갖는 에리트로포이에틴; 적어도 하나 이상의 개질된 트립토판 잔기를 갖는 에리트로포이에틴; 하나 이상의 아미노기가 제거된 에리트로포이에틴; 에리트로포이에틴 분자의 하나 이상의 시스틴 결합이 적어도 결손된 에리트로포이에틴; 하나 이상의 아미노산이 적어도 일치환된 에리트로포이에틴 또는 절단된 에리트로포이에틴과 같은 에리트로포이에틴과 결합된 분자를 포함하는, 포유동물의 내피 세포 장벽을 가로지르는 분자의 세포간 수송을 촉진하는 조성물을 제공하는 것이다.

<37> 결합은 예를 들어 불안정한 공유 결합, 안정한 공유 결합, 또는 분자의 결합 부위와의 비공유 결합일 수 있다. 내피 세포 장벽은 혈액-뇌 장벽, 혈액-눈 장벽, 혈액-고환 장벽, 혈액-난소 장벽 및 혈액-태반 장벽일 수 있다. 본 발명의 방법에 의해 수송하는데 적합한 분자는 성장 호르몬과 같은 호르몬, 항생제 및 항암제를 포함한다.

<38> 본 발명의 다른 양태에서, 진술한 임의의 에리트로포이에틴은 포유동물의 내피 세포 장벽을 가로지르는 분자의

세포간 수송을 촉진하는 약학 조성물을 제조하는데 유용하며, 이 때, 상기 조성물은 시알산 잔기를 갖지 않은 에리트로포이에틴; N-결합된 탄수화물 또는 O-결합된 탄수화물을 갖지 않은 에리트로포이에틴; 하나 이상의 글라이코시다제로 천연 에리트로포이에틴을 처리함으로써 탄수화물 함량이 적어도 감소된 에리트로포이에틴; 포유동물 세포가 아닌 세포에 재조합 에리트로포이에틴을 발현시킴으로써 포유동물의 당화 패턴이 아닌 당화 패턴을 갖는 개질된 에리트로포이에틴 분자의 탄수화물 부분을 갖는 에리트로포이에틴; 화학적으로 환원될 수도 있는 하나 이상의 산화 탄수화물을 갖는 에리트로포이에틴; 하나 이상의 개질된 아르기닌 잔기를 갖는 에리트로포이에틴; 하나 이상의 개질된 리신 잔기를 갖거나 또는 에리트로포이에틴 분자의 N-말단 아미노기가 개질된 에리트로포이에틴; 적어도 하나 이상의 개질된 티로신 잔기를 갖는 에리트로포이에틴; 적어도 하나 이상의 개질된 아스파르트산 또는 글루탐산 잔기를 갖는 에리트로포이에틴; 적어도 하나 이상의 개질된 트립토판 잔기를 갖는 에리트로포이에틴; 하나 이상의 아미노기가 제거된 에리트로포이에틴; 에리트로포이에틴 분자의 하나 이상의 시스틴 결합이 적어도 결손된 에리트로포이에틴; 하나 이상의 아미노산이 적어도 일치환된 에리트로포이에틴 또는 절단된 에리트로포이에틴과 같은 에리트로포이에틴과 결합된 분자를 포함한다.

<39> 결합은 예를 들어 불안정한 공유 결합, 안정한 공유 결합, 또는 분자의 결합 부위와의 비공유 결합일 수 있다. 내피 세포 장벽은 혈액-뇌 장벽, 혈액-눈 장벽, 혈액-고환 장벽, 혈액-난소 장벽 및 혈액-태반 장벽일 수 있다. 본 발명의 방법에 의해 수송하는데 적합한 분자는 성장 호르몬과 같은 호르몬, 항생제 및 항암제를 포함한다.

<40> 본 발명의 이러한 양태 및 다른 양태는 하기 도면 및 상세한 설명을 참조하여 더욱 잘 이해할 수 있다.

**발명의 실시를 위한 구체적인 내용**

<41> "에리트로포이에틴-응답 세포"는 에리트로포이에틴에 노출됨으로써 그의 기능 또는 생존이 유지, 촉진, 향상, 재생 또는 다른 방식으로 유리해질 수 있는 포유동물 세포를 일컫는다. 이러한 세포의 비제한적인 예는 신경, 망막, 근육, 심장, 폐, 간, 신장, 소장, 부신피질, 부신수질, 모세혈관 내피, 고환, 난소 및 자궁내막 세포를 포함한다. 또한, 이러한 에리트로포이에틴-응답 세포 및 에리트로포이에틴에 의해 이들에게 주어지는 이점은, 직접 에리트로포이에틴에 반응성이지는 않은 다른 세포 또는 이러한 에리트로포이에틴-응답이 아닌 세포를 함유하는 조직 또는 기관을 간접적으로 보호 또는 향상시키도록 확장될 수 있다. 에리트로포이에틴-응답 세포의 향상에 의해 간접적으로 이점을 갖는 이들 다른 세포, 조직 또는 기관은 "결합된" 세포, 조직 및 기관으로서 상기 세포, 조직 또는 기관의 일부로 존재한다. 따라서, 본원에 기재된 에리트로포이에틴의 이점은 조직 또는 기관의 소수 또는 소량의 에리트로포이에틴-응답 세포, 예를 들어 이들 조직에 존재하는 흥분성 또는 신경 세포 또는 테스토스테론을 생성시키는 고환의 레이디히(Leydig) 세포가 존재함으로써 제공될 수 있다. 한 양태에서, 에리트로포이에틴-응답 세포 또는 이들에 결합된 세포, 조직 또는 기관은 흥분성 세포, 조직 또는 기관이 아니거나, 또는 흥분성 세포 또는 조직을 주로 포함하지 않는다.

<42> 본 발명의 방법은 매우 광범위한 정상적인 조건 및 불리한 조건 하에서 포유동물 신체 내의 세포, 조직 및 기관을 국부적으로 또는 전신적으로 보호 또는 향상시키거나, 또는 다른 포유동물 신체에 이식하기로 예정된 세포, 조직 및 기관을 보호한다. 또한, 기능장애를 회복 또는 재생시킬 수도 있다. 상기 언급된 바와 같이, 치밀 내피 세포 장벽을 가로지르고 혈관에서 먼 에리트로포이에틴-응답 세포(및 다른 유형의 세포)에 긍정적인 효과를 나타내도록 하는 에리트로포이에틴의 능력으로 인해, 인간을 비롯한 동물에 상당한 세포 및 조직 손상을 야기하게 되는 다양한 증상 및 질환을 예방 및 치료할 수 있는 가능성이 생기고, 더욱이 전통적으로 위험이 이점보다 커서 이전에는 시도할 수 없었던 수술 절차가 성공할 수 있게 되었다. 고농도의 화학요법, 방사선 요법, 장기간의 생체외 이식 생존 및 장기간의 수술로 인해 유도되는 허혈증과 같은, 궁극적으로 이점을 달성하기 위해 유도되는 소정 지속기간 및 소정 정도의 의도적인 불리한 조건은 본원 발명의 이점을 취함으로써 수행될 수 있다. 그러나, 본 발명은 이로 한정되는 것은 아니며, 하나의 양태로서 표적 에리트로포이에틴-응답 세포가 내피-세포 장벽 또는 내피의 치밀 이음부로 인해 혈관으로부터 먼 방법 또는 조성물을 포함한다. 일반적으로, 본 발명은 에리트로포이에틴에 노출됨으로써 이점을 취할 수 있는 임의의 에리트로포이에틴-응답 세포 및 결합된 세포, 조직 및 기관에 관한 것이다. 또한, 단기간의 불리한 사건(예컨대, 외상) 후 에리트로포이에틴에 노출시킴으로써 세포, 조직 또는 기관 기능장애를 회복 또는 재생시킬 수 있다.

<43> 따라서, 본 발명은 일반적으로 세포 기능을 유지, 촉진, 향상, 재생 또는 다른 방식으로 세포 기능에 유리하게 작용하는 전술한 목적을 위한 약학 조성물을 제조함에 있어서의 에리트로포이에틴의 용도에 관한 것이다. 본 발명은 또한 본원에 기재된 에리트로포이에틴 효과량을 포유동물에게 투여함으로써 세포 기능을 유지, 향상, 촉진 또는 재생시키는 방법에 관한 것이다. 본 발명은 또한 에리트로포이에틴에 세포, 조직 또는 기관을 노출시킴으로써 생체 외에서 세포 기능을 유지, 촉진, 향상 또는 재생시키는 방법에 관한 것이다. 본 발명은 또한 기

관 또는 조직 보존에 사용하기 위한, 에리트로포이에틴을 포함하는 관류 조성물에 관한 것이다.

- <44> 본 발명의 다양한 방법은 포유동물 신체 내의 또는 포유동물 신체로부터 제거된 에리트로포이에틴-응답 세포에 긍정적인 효과 또는 이점을 주기 위한 특정 경로 및 노출 지속시간에 효과적인 양으로 에리트로포이에틴을 포함하는 약학 조성물을 이용한다. 치료하고자 하는 표적 세포, 조직 또는 기관이, 에리트로포이에틴이 내피 세포 장벽을 가로질러야 할 것으로 요구하는 경우, 약학 조성물은 내피 세포 장벽을 가로지른 후 에리트로포이에틴-응답 세포에 그의 목적하는 효과를 줄 수 있는 농도로 에리트로포이에틴을 포함한다. 에리트로포이에틴 수용체와 상호작용할 수 있고 수용체의 활성을 조절할 수 있는 분자(본원에서는 에리트로포이에틴 또는 에리트로포이에틴 수용체 활성 조절제라고 함)가 본 발명에서 유용하다. 이들 분자는 예를 들어 상기 기재된 바와 같은 에리트로포이에틴 분자의 천연, 합성 또는 재조합 형태, 또는 본원에 기재된 바와 같이 에리트로포이에틴-응답 세포 활성을 조절하는 것을 제외하고는 반드시 임의의 방식으로 에리트로포이에틴과 유사할 필요는 없는 다른 분자일 수 있다.
- <45> 에리트로포이에틴은 분자량이 약 34kDa인 인간의 당단백 호르몬이다. 성숙 단백질은 165개의 아미노산을 포함하고, 글리코실 잔기가 분자의 약 40중량%를 구성한다. 본 발명을 실행하는데 유용한 에리트로포이에틴의 형태는 하기 인간 및 다른 포유동물의 에리트로포이에틴-관련 분자의 천연, 합성 및 재조합 형태를 포함한다: 에리트로포이에틴, 무-시알산 에리트로포이에틴, 탈당화 에리트로포이에틴, 에리트로포이에틴 유사체, 에리트로포이에틴 의사 화합물, 에리트로포이에틴 분절, 혼성 에리트로포이에틴 분자, 에리트로포이에틴-수용체-결합 분자, 에리트로포이에틴 작용제, 신장 에리트로포이에틴, 뇌 에리트로포이에틴, 이들의 올리고머, 이들의 다합체, 이들의 뮤테인 및 이들의 동류물. 또한, 본 발명을 실행하는데 유용한 에리트로포이에틴 형태는 기능면에서 동일한 유전자 생성물을 제공하는 단백질을 포함한다. 이러한 동일한 에리트로포이에틴 유전자 생성물은 결실(deletion)(내부 결실 포함), 첨가(융합 단백질을 생성시키는 첨가 포함) 또는 아미노산 서열 내의 및/또는 아미노산 서열에 인접한 아미노산 잔기의 보수적인 치환(그러나, 이러한 변화로 인해 기능면에서 동일한 에리트로포이에틴이 생성된다는 점에서 "사일런트(silent)" 변화를 일으킴)를 함유할 수 있는 돌연변이성 에리트로포이에틴을 포함한다. 이러한 아미노산 치환은 관련된 잔기의 극성, 전하, 용해도, 소수성, 친수성 및/또는 양쪽성에서의 유사성에 기초하여 이루어질 수 있다. 예를 들어, 비극성(소수성) 아미노산은 알라닌, 류신, 이소류신, 발린, 프롤린, 페닐알라닌, 트립토판 및 메티오닌을 포함하고; 극성 중성 아미노산은 글리신, 세린, 트레오닌, 시스테인, 티로신, 아스파라긴 및 글루타민을 포함하며; 양으로 하전된 (염기성) 아미노산은 아르기닌, 리신 및 히스티딘을 포함하고; 음으로 하전된 (산성) 아미노산은 아스파르트산 및 글루탐산을 포함한다. 다르게는, 보수적이지 않은 아미노산 변화 및 보다 큰 삽입 및 결실을 이용하여 기능면에서 변화된 에리트로포이에틴 돌연변이체를 생성시킬 수 있다. 이러한 돌연변이체는 에리트로포이에틴 특성을 목적하는 방식으로 변화시키는데 사용될 수 있다. 예를 들어, 한 실시태양에서, 본 발명을 실행하는데 유용한 에리트로포이에틴은 수용체 결합에 영향을 끼치는 에리트로포이에틴의 4가지 기능 도메인(VLQRY 및/또는 TKVNFYAW 및/또는 SGLRSLTTL 및/또는 SNFLRG) 내의 아미노산을 하나 이상 변화시킨 돌연변이성 에리트로포이에틴일 수 있다. 다른 실시태양에서는, 분자의 동력학 또는 수용체-결합 특성에 영향을 끼치는 분자의 주변 영역에서의 돌연변이를 함유하는 에리트로포이에틴을 사용할 수 있다.
- <46> 용어 "에리트로포이에틴" 및 "하나의 에리트로포이에틴"은 호환적으로 또는 결합하여 사용될 수 있으며, 다양한 유사체, 분절, 혼성 분자, 작용제, 뮤테인, 및 전술한 다른 형태는 천연, 탈당화, 시알산 잔기 제거를 비롯한 에리트로포이에틴의 당화 한도 및 부위 내에서의 변형체, 및 에리트로포이에틴의 다른 부분적으로 당화된 형태를 포함한다. 이러한 변형체의 비제한적인 예는 본원에 참고로 인용되어 있는 쓰다(Tsuda) 등의 문헌[1990, *Eur. J. Biochem.* 188:405-511]에 기재되어 있다. 또한, 세균, 효모, 곤충, 식물 및 인간을 비롯한 포유동물의 세포 시스템을 포함하지만 이들로 한정되지는 않는 다양한 숙주 시스템을 재조합 에리트로포이에틴의 발현 및 제조에 이용할 수 있다. 예를 들어, 생성물을 당화시키거나 시알화시키지 않는 세균 내에서 생성된 재조합 에리트로포이에틴을 사용하여 에리트로포이에틴의 당화되지 않은 형태를 생성시킬 수 있다. 다르게는, 재조합 에리트로포이에틴은 당화시키는 다른 시스템(예: 인간 세포를 포함하는 식물) 내에서 생성될 수도 있다.
- <47> 상기 나타낸 바와 같이, 본원의 발명은 에리트로포이에틴과 분자의 임의의 구조적 관계에 상관없이 에리트로포이에틴-응답 세포에 대해 긍정적인 작용을 나타낼 수 있는 임의의 모든 에리트로포이에틴 수용체 활성 조절제 분자를 포함한다.
- <48> 또한, 에리트로포이에틴 자체는 특정 조직 또는 조직들에 대한 그의 활성을 맞추도록 개질될 수 있다. 이러한 바람직한 조직 특이성을 달성하기 위해 수행될 수 있는 몇가지 비제한적인 방법은 순환 반감기를 단축시켜 에리트로포이에틴이 적혈구 전구체와 반응할 수 있는 시간을 감소시키는 개질, 또는 에리트로포이에틴 분자의 주요

구조의 개질을 포함한다. 순환 반감기를 단축시키는 한 가지 방법은 에리트로포이에틴이 3개의 N-결합 및 1개의 O-결합을 갖는 당화 잔기를 제거하거나 개질시키는 것이다. 당화된 에리트로포이에틴의 이러한 변형체는 다수의 방식으로 제조될 수 있다. 예를 들어, 시알산을 당 쇄에 결합시키는 화학적 결합에 따라 특정한 시알리다제에 의해 당 쇄의 말단을 종결시키는 시알산을 제거할 수 있다. 다르게는, 특정 결합을 절단하는 다른 효소를 사용함으로써 상이한 방식으로 당화된 구조를 분해할 수 있다. 주요 구조를 개질시키는 기법은 무수히 많으며, 특정 아미노산의 치환, 아미노산의 화학적 개질, 또는 임의의 수용체와 에리트로포이에틴의 반응을 방해하는 다른 구조의 첨가를 포함한다. 에리트로포이에틴의 이러한 형태의 사용은 본원에 완전히 포함된다. 바람직한 실시태양에서는, 본 발명의 비-적혈구 조혈성 에리트로포이에틴의 반감기를 천연 에리트로포이에틴의 반감기에서 약 90%만큼 감소시킨다.

<49> 이러한 분자중 일부는 다른 조직 또는 기관에서 에리트로포이에틴 자체의 작용을 모방한다. 예를 들어, 천연 에리트로포이에틴의 31 내지 47번째 아미노산 서열을 함유하는 17량체는 적혈구 생성에는 불활성이지만 생체 외에서 신경세포에는 매우 활성이다(캠페나(Campana) & 오브라이언(O'Brien), 1998: Int. J. Mol. Med. 1:235-41).

<50> 또한, 구아니딘화, 아미드화, 카바밀화(카바모일화), 트리니트로페닐화, 아세틸화, 숙시닐화, 질화에 의해; 또는 제한된 단백질 가수분해, 아미노기의 제거 및/또는 분자생물학적 기법에 의한 아르기닌, 리신, 티로신, 트립토판 또는 시스테인 잔기의 돌연변이 치환과 같은 다른 절차 중에서도, 아르기닌, 리신, 티로신, 트립토판 또는 시스테인 잔기 또는 카복실기의 개질에 의해, 특정 기관 및 조직에 대해 적절한 수준의 활성을 유지하지만 적혈구와 같은 다른 조직에 대해서는 그렇지 않은 에리트로포이에틴을 생성시킴으로써, 본원에 사용하기 바람직한 에리트로포이에틴 유도체 분자를 제조할 수 있다(예컨대 사타케(Satake) 등; 1990, *Biochim. Biophys. Acta* 1038:125-9; 본원에 참고로 인용됨). 아래에 기재되는 한 가지 비한정적인 예는 페닐글리옥살과 같은 글리옥살과 반응시킴으로써 에리트로포이에틴의 아르기닌 잔기를 개질시키는 것이다(다카하시(Takahashi)의 문헌[1977, *J. Biochem.* 81:395-402]에 따름). 아래에서 볼 수 있는 바와 같이, 이러한 에리트로포이에틴 분자는 그의 항신경성 효과를 완전히 보유한다. 이러한 에리트로포이에틴 분자는 본원에 기재된 다양한 용도 및 조성물에 포함된다.

<51> 뇌 에리트로포이에틴 및 신장 에리트로포이에틴, 포유동물의 에리트로포이에틴의 재조합 형태, 및 그의 천연, 암-유도된 및 재조합 이소폼(예: 재조합 기법에 의해 발현된 분자 및 동종 재조합에 의해 제조된 분자)과 같은 합성 및 재조합 분자가 본원에 제공된다. 또한, 본 발명은 에리트로포이에틴 수용체를 결합시키는 펩티드를 포함하는 분자, 및 에리트로포이에틴의 구조적 및/또는 생물학적 특성을 일부 또는 모두 갖는 재조합 구조물 또는 다른 분자(에리트로포이에틴의 분절 및 다합체 또는 그의 분절 포함)를 비롯한 분자를 포함한다. 본원의 에리트로포이에틴은 에리트로포이에틴 수용체 결합 활성이 변화된 분자, 바람직하게는 수용체 친화력이 증가된 분자, 특히 내피 세포 장벽을 가로지르는 수송을 향상시키는데 적합한 분자를 포함한다. 당화 부위의 수가 증가되거나 감소된 분자를 포함하는 뮤테인이 본원에 포함된다. 상기 지적인 바와 같이, 용어 "에리트로포이에틴" 및 "의사 화합물" 및 다른 용어는 본원에서 에리트로포이에틴에 관련되어 에리트로포이에틴-응답 세포를 보호하고 향상시키는 분자 및 내피 세포 장벽을 가로지를 수 있는 분자를 나타내기 위해 호환적으로 사용된다.

<52> 뿐만 아니라, 트랜스제닉(transgenic) 동물에 의해 생성된 분자도 본원에 포함된다. 본원에 포함된 에리트로포이에틴 분자는, 본원에 기재된 바와 같이, 에리트로포이에틴 수용체와 반응하거나 또는 에리트로포이에틴 수용체 활성을 조절하거나 또는 에리트로포이에틴-활성화된 일련의 신호 체계를 활성화시키는 능력을 제외하고는, 반드시 구조적으로 또는 임의의 다른 방식으로 에리트로포이에틴과 유사할 필요는 없다.

<53> 비제한적인 예로서, 본 발명을 실행하는데 유용한 에리트로포이에틴의 형태는 미국 특허 제 5,457,089 호 및 제 4,835,260 호에 기재된, 카복시 말단에 변경된 아미노산을 갖는 것; 무-시알산 에리트로포이에틴 및 미국 특허 제 5,856,298 호에 기재되어 있는 것과 같은 분자 1개당 다양한 수의 시알산 잔기를 갖는 에리트로포이에틴 이소폼; 미국 특허 제 4,703,008 호에 기재되어 있는 폴리펩티드; 미국 특허 제 5,767,078 호에 기재되어 있는 작용제; 미국 특허 제 5,773,569 호 및 제 5,830,851 호에 기재되어 있는, 에리트로포이에틴 수용체에 결합하는 펩티드; 미국 특허 제 5,835,382 호에 기재되어 있는 것과 같은 에리트로포이에틴 수용체를 활성화시키는 작용-분자 의사 화합물; 및 WO 9505465 호, WO 9718318 호 및 WO 9818926 호에 기재되어 있는 에리트로포이에틴 유사체 등의, 에리트로포이에틴 뮤테인을 포함한다. 상기 인용된 것들은 모두, 이들 개시된 것들이 본 발명의 에리트로포이에틴의 다양한 대체 형태 또는 본 발명의 에리트로포이에틴의 이들 형태를 제조하는 방법을 나타내는

한도 내에서, 본원에 인용되어 있다.

- <54> 에리트로포이에틴은 뉴저지주 래리턴 소재의 오르토 바이오테크 인코포레이티드(Ortho Biotech Inc.)에서 상표명 프로크릿(PROCRIT)으로, 또한 캘리포니아주 싸우전드 오크스 소재의 암젠 인코포레이티드(Amgen, Inc.)에서 상표명 에포젠(EPOGEN)으로 구입할 수 있다.
- <55> 에리트로포이에틴 및 에리트로포이에틴-유사 분자의 활성(U)은 전통적으로 설치류 모델에서 적혈구 생산을 촉진시키는 그의 효율에 기초하여(또한 에리트로포이에틴의 국제 기준에 의해 유도되어) 정의된다. 정상적인 에리트로포이에틴(MW 약 34,000) 1단위(U)는 단백질 약 8ng이다(1mg 단백질은 약 125,000U이다). 그러나, 에리트로포이에틴에 대한 효과가 본원에서 목적하는 활성에 부수적으로 일어나고 반드시 본 발명의 특정 에리트로포이에틴의 검출가능한 특성이 아닐 수도 있기 때문에, 에리트로포이에틴 활성에 기초한 활성 정의는 적절하지 않다. 따라서, 본원에서는, 동일한 시스템에서 WHO 국제 기준 에리트로포이에틴에 의해 도출된 것과 같이, 에리트로포이에틴 또는 에리트로포이에틴-관련 분자의 활성 단위는 신경 세포 시스템 또는 다른 에리트로포이에틴-응답 세포 시스템에서 동일한 활성을 이끌어내는데 필요한 단백질의 양으로서 정의된다. 당해 분야의 숙련자는 본원에 기재된 안내에 따라 비-에리트로포이에틴성 에리트로포이에틴 또는 관련 분자의 단위를 용이하게 결정한다.
- <56> 본원에 유용한 전술한 에리트로포이에틴 변형에 덧붙여, 본 발명의 다양한 에리트로포이에틴에 대해 논의를 확대코자 한다.
- <57> 본 발명의 에리트로포이에틴은 시알산 잔기를 갖지 않을 수 있다(이를 무-시알산 에리트로포이에틴이라고 일컫음). 바람직하게는, 본 발명의 에리트로포이에틴은 인간의 무-시알산 에리트로포이에틴이다. 다른 실시태양에서, 본 발명의 에리트로포이에틴은 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 또는 13개의 시알산 잔기를 가질 수 있다. 캘리포니아주 샌 린드로 소재의 프로자임 인코포레이티드(ProZyme Inc.) 제품인 시알리다제 A의 패키지에 기재되어 있는 것과 같은 시알리다제를 사용하여 에리트로포이에틴로부터 시알산 잔기를 제거함으로써 이를 제조할 수 있다. 전형적으로는, 프로자임(PROZYME; 등록상표) 글리코프로(GLYCOPRO; 등록상표) 서열 결정-등급 시알리다제 A(SIALYDASE A; 상표명)(N-아세틸글라미네이트 글리코하이드롤라제, EC 3.2.1.18)를 사용하여 에리트로포이에틴과 같은 탄수화물과 당단백 복합체로부터 비-환원성 말단 시알산 잔기를 모두 절단해낸다. 이는 또한 분지된 시알산(내부 잔기에 결합되어 있음)도 절단해낸다. 시알리다제 A는 아르트로박터 우레아파시엔스(*Arthrobacter ureafaciens*)의 클론으로부터 단리된다.
- <58> 에리트로포이에틴은 적어도 감소된 수의 N-결합된 탄수화물을 가질 수 있다. N-결합된 탄수화물을 제거하기 위해, 예컨대 허멘틴(Hermentin) 등의 문헌[1996, *Glycobiology* 6(2):217-30]에 기재되어 있는 방법에 따라 에리트로포이에틴을 하이드라진으로 처리할 수 있다. 상기 나타낸 바와 같이, 에리트로포이에틴은 3개의 N-결합된 탄수화물 잔기를 갖고; 본 발명은 N-결합된 탄수화물을 2개 또는 1개 갖거나 갖지 않은 에리트로포이에틴을 포함한다.
- <59> 본 발명의 에리트로포이에틴은 하나 이상의 글라이코시다제로 천연 에리트로포이에틴을 처리한 결과 적어도 감소된 탄수화물 함량을 가질 수 있다. 예를 들어, 첸(Chen) 및 에반젤리스트아(Evangelista)(1998, *Electrophoresis* 19(15):2639-44)의 절차를 수행할 수 있다. 또한, 호크(Hokke) 등의 문헌[1995, *Eur. J. Biochem.* 228(3):981-1008]에 기재된 방법에 따라 O-결합된 탄수화물을 제거할 수 있다.
- <60> 에리트로포이에틴 분자의 탄수화물 부분은 포유동물 세포가 아닌 세포에서 재조합 에리트로포이에틴을 발현시킨 결과 적어도 포유동물의 당화 패턴이 아닌 당화 패턴을 가질 수 있다. 바람직하게는, 에리트로포이에틴은 곤충 또는 식물 세포에 발현된다. 비제한적인 예로서, 쿠엘(Quelle) 등의 문헌[1989, *Blood* 74(2):652-657]에 따라 baculovirus 발현 시스템을 이용하여 곤충 세포에서 에리트로포이에틴을 발현시킬 수 있다. 다른 방법은 미국 특허 제 5,637,477 호에 기재되어 있다. 마쓰모토(Matsumoto) 등의 방법(1993, *Biosci. Biotech. Biochem.* 57(8):1249-1252)에 따라 식물 시스템에서 발현시킬 수 있다. 다르게는, 세균에서 발현시키면 에리트로포이에틴의 당화되지 않은 형태가 생성된다. 이들은 본 발명의 에리트로포이에틴의 제조에 유용한 예시적인 방법이며, 어떠한 방식으로든 한정하는 의미는 아니다.
- <61> 본 발명의 에리트로포이에틴은 화학적으로 환원될 수 있는 하나 이상의 산화 탄수화물을 함유할 수 있다. 예를 들어, 에리트로포이에틴은 과요오드산염-산화 에리트로포이에틴일 수 있고; 과요오드산염-산화 에리트로포이에틴은 나트륨 보로하이드라이드 또는 나트륨 시아노보로하이드라이드로 화학적으로 환원될 수 있다. 예컨대, 린슬리(Linsley) 등의 문헌[1994, *Anal. Biochem.* 219(2):207-17]에 기재되어 있는 방법에 의해 에리트로포이에틴의 과요오드산염 산화를 수행할 수 있다. 토넬리(Tonelli) 및 메인츠(Meints)의 방법(1978, *J. Supramol.*

Struct. 8(1):67-78)에 따라, 과요오드산염 산화에 후속하는 화학적 환원을 수행할 수 있다.

<62> 전술한 용도를 위한 에리트로포이에틴은 하나 이상의 개질된 아르기닌 잔기를 가질 수 있다. 예를 들어, 개질된 에리트로포이에틴은 하나 이상의 아르기닌 잔기 상에 R-글리옥살(이때, R은 아릴, 헤테로아릴, 저급 알킬, 저급 알콕시 또는 사이클로알킬기, 또는  $\alpha$ -데옥시글루코시톨릴기일 수 있음) 잔기를 포함할 수 있다. 본원에 사용되는 용어 저급 "알킬"은 바람직하게는 1 내지 6개의 탄소원자를 함유하는 직쇄 또는 분지쇄 포화 지방족 탄화수소기를 의미한다. 이들 대표적인 기는 메틸, 에틸, 이소프로필, 이소부틸, 부틸, 펜틸, 헥실 등이다. 용어 "알콕시"는 산소에 의해 분자의 나머지 부분에 결합된 상기 정의된 저급 알킬기를 의미한다. 알콕시의 예로는 메톡시, 에톡시, 프로폭시, 이소프로폭시 등이 있다. 용어 "사이클로알킬"은 3 내지 약 8개의 탄소를 갖는 환상 알킬기를 일컬으며, 예로는 사이클로프로필, 사이클로부틸, 사이클로헥실 등이 있다. 용어 아릴은 페닐 및 나프틸기를 나타낸다. 용어 헤테로아릴은 4 내지 10개의 고리원 및 산소, 질소 및 황으로 구성된 군에서 선택되는 1 내지 3개의 헤테로원자를 함유하는 헤테로환상 기를 일컫는다. 예로는 이속사졸릴, 페닐이속사졸릴, 푸릴, 피리미디닐, 퀴놀릴, 테트라하이드로퀴놀릴, 피리디, 이미다졸릴, 피롤리디닐, 1,2,4-트리아조일릴, 티아졸릴, 티에닐 등이 있으나 이들로 한정되지는 않는다. R 기는 3-데옥시글루코손의 2,3,4-트리하이드록시부틸기에서와 같이 치환될 수 있다. R-글리옥살 화합물의 전형적인 예는 글리옥살, 메틸글리옥살, 3-데옥시글루코손 및 페닐글리옥살이다. 바람직한 R-글리옥살 화합물은 메틸글리옥살 또는 페닐글리옥살이다. 페닐글리옥살을 사용하는 각 개질에 바람직한 방법은 워버(Werber) 등의 문헌[1975, *Isr. J. Med. Sci.* 11(11): 1169-70]에서 찾아볼 수 있다.

<63> 다른 예에서는, 하나 이상의 아르기닌 잔기를 pH 8 내지 9의 보레이트 완충액 약 50밀리몰 중에서 2,3-부탄디온 또는 사이클로헥산디온과 같은 인접한 디케톤과 반응시킴으로써 개질시킬 수 있다. 2,3-부탄디온을 사용한 개질 절차는 리오르단(Riordan)의 문헌[1973, *Biochemistry* 12(20): 3915-3923]에 따라 수행될 수 있으며; 사이클로헥산디온을 사용한 개질 절차는 패티(Patthy) 등의 문헌[1975, *J. Biol. Chem* 250(2):565-9]에 따라 수행될 수 있다.

<64> 본 발명의 에리트로포이에틴은 하나 이상의 개질된 리신 잔기를 포함할 수 있거나, 또는 리신 잔기를 아미노기-개질제와 반응시킴으로써 개질시키는 것과 같이 에리트로포이에틴 분자의 N-말단 아미노기를 개질시킬 수 있다. 다른 실시태양에서는, 글리옥살, 메틸글리옥살 및 3-데옥시글루코손과 같은 글리옥살 유도체와 반응시켜  $\alpha$ -카복시알킬 유도체를 형성함으로써 리신 잔기를 개질시킬 수 있다. 예로는, 글롬(Glomb) 및 모니에르(Monnier)의 문헌[1995, *J. Biol. Chem.* 270(17):10017-26]에서와 같이 글리옥살과 반응시켜 카복시메틸리신을 제조하는 것, 또는 데겐하르트(Degenhardt) 등의 문헌[1998, *Cell. Mol. Biol.(Noisy-le-grand)* 44(7):1139-45]에서와 같이 메틸글리옥살과 반응시켜 (1-카복시에틸)리신을 제조하는 것이 있다. 개질된 리신 잔기는 추가로 화학적으로 환원될 수 있다. 예를 들어, 실시예 5에 기재된 방법(여기에서는, 워초우스키(Wojchowski) 및 카스레이크(Caslake)의 문헌[1989, *Blood* 74(3):952-8]에 기재되어 있는 바와 같이, D-비오틴- $\epsilon$ -아미노카프로산-N-하이드록시숙신이미드 에스테르를 에리트로포이에틴과 반응시킨 후 센트리콘(Centricon) 10 칼럼에서 겔 투과시킴으로써 반응되지 않은 비오틴을 제거함)에 따라, 에리트로포이에틴을 리신기를 통해 비오틴화시킬 수 있다. 상기 문헌에서, 저자는 에리트로포이에틴을 비오틴화시키는 3가지 상이한 방법을 이용하는데, 이들중 임의의 방법을 이용하여 본원에 사용하기 위한 에리트로포이에틴을 제조할 수 있다. 비오틴을 (1) 시알산 잔기, (2) 카복실레이트기 또는 (3) 아미노기에 첨가할 수 있다.

<65> 다른 바람직한 실시태양에서는, 리신을 알데히드 또는 환원당과 반응시켜 아민을 제조할 수 있고, 이를 나트륨 시아노보로하이드라이드로 환원시켜 글루시톨릴 리신과 같은 N-알킬화된 리신을 제조함으로써 안정화시킬 수 있거나, 또는 환원당의 경우, 아마도리 또는 헤인즈 전위에 의해  $\alpha$ -데옥시- $\alpha$ -프록토실리신과 같은  $\alpha$ -데옥시  $\alpha$ -아미노 당을 형성함으로써 안정화시킬 수 있다. 예로서, pH 7.4의 인산나트륨 완충액 중에서 0.5M 글루코즈를 사용하여 60일간 배양함으로써 프록토실리신-개질된 단백질을 제조함이 마키타(Makita) 등의 문헌[1992, *J. Biol. Chem.* 267:5133-5138]에 기재되어 있다. 다른 예에서는, 예컨대 시아네이트 이온과 반응시켜 카바미화시킬 수 있거나, 또는 알킬- 또는 아릴-이소시아네이트 또는 -이소티오시아네이트와 반응시켜 알킬- 또는 아릴-카바미화 또는 -티오카바미화시킬 수 있거나, 또는 예컨대 아세트산 무수물, 숙신산 무수물 또는 프탈산 무수물과 반응시키는 것과 같은 반응성 알킬- 또는 아릴카복실산 유도체에 의해 아실화시킬 수 있다. 예로는, 4-설포페닐이소티오시아네이트 또는 아세트산 무수물을 사용하여 리신기를 개질시키는 것이 있다(이들 방법은 둘다 가오(Gao) 등의 문헌[1994, *Proc Natl Acad Sci USA* 91(25):12027-30]에 기재되어 있다). 리신기는 또한 트리니트로벤젠설포산 또는 바람직하게는 그의 염과 반응시킴으로써 트리니트로페닐 개질될 수 있다. 이러한 방법은 하기 실시예 5에 기재되어 있다.

- <66> 예컨대 질화 또는 요오드화에서와 같은 친전자성 시약에 의해 에리트로포이에틴의 하나 이상의 티로신 잔기를 방향족 고리 위치에서 개질시킬 수 있다. 비제한적인 예로서, 에리트로포이에틴을 테트라니트로메탄과 반응시키거나(네슬러(Nestler) 등, 1985, J. Biol. Chem. 260(12):7316-21) 또는 실시예 5에 기재되어 있는 바와 같이 요오드화시킬 수 있다.
- <67> 예컨대 카보디이미드와 반응시킨 후 글리신아미드와 같은(그러나 이에 국한되지는 않음) 아민과 반응시킴으로써, 에리트로포이에틴의 아스파르트산 또는 글루탐산 잔기를 개질시킬 수 있다. 이러한 개질의 예는 실시예 5에서 찾아볼 수 있다.
- <68> 다른 예에서는, 예컨대 요스(Josse) 등의 문헌[Chem Biol Interact 1999년 5월 14:119-120]에 기재되어 있는 방법에 따라 n-브로모숙신아미드 또는 n-클로로숙신아미드와 반응시킴으로써 에리트로포이에틴의 트립토판 잔기를 개질시킬 수 있다.
- <69> 또 다른 예에서는, 닐하이드린과 반응시킨 후, 보로하이드라이드와 반응시켜 카보닐기를 후속 환원시킴으로써 획득할 수 있는 것과 같이, 하나 이상의 아미노기를 제거함으로써 에리트로포이에틴 분자를 제조할 수 있다.
- <70> 여전히 다른 예에서는, 디티오프레이틀과 같은 환원제와 반응시킨 후 요오도아세트아미드, 요오도아세트산 또는 다른 친전자체와 후속 설프하이드릴을 반응시켜 디설파이드 결합의 재형성을 방해함으로써, 에리트로포이에틴 분자의 하나 이상의 시스틴 결합이 적어도 결손된 에리트로포이에틴이 제공된다.
- <71> 분자생물학적 기법을 이용하여, 다수의 아미노산중 임의의 하나(예: 류신)를 에리트로포이에틴의 하나 이상의 리신, 아르기닌, 트립토판, 티로신 또는 시스테인 잔기로 적어도 일치환시킨 에리트로포이에틴이 제공된다.
- <72> 에리트로포이에틴에 대해, 특정 잔기를 표적으로 하는, 예를 들어 트립토판 잔기 뒤를 절단하는 제한된 화학적 단백질 가수분해를 수행함으로써 개질된 에리트로포이에틴을 제조할 수 있다. 이렇게 생성된 에리트로포이에틴 분자는 본원에 포함된다.
- <73> 상기 나타낸 바와 같이, 본원의 목적에 유용한 에리트로포이에틴은 전술한 바와 같이 하나 이상 개질될 수 있으나, 그보다 많은 개질될 수도 있다. 분자의 탄수화물 부분이 개질되고 아미노산 부분이 또한 개질되는, 개질된 에리트로포이에틴의 예로서, 개질된 에리트로포이에틴은 무-시알산 에리트로포이에틴일 수 있으며, 비오틴화 또는 카바밀화 리신 잔기를 가질 수 있다.
- <74> 따라서, 본원에 사용하기 위한 다양한 에리트로포이에틴 분자 및 이를 함유하는 약학 조성물이 포함된다. 이러한 에리트로포이에틴 분자는 무-시알산 에리트로포이에틴, N-탈당화 에리트로포이에틴, O-탈당화 에리트로포이에틴, 탄수화물 함량이 적어도 감소된 에리트로포이에틴, 변화된 당화 패턴을 갖는 에리트로포이에틴, 산화 후 환원된 탄수화물을 갖는 에리트로포이에틴, 아릴글리옥살-개질된 에리트로포이에틴, 알킬글리옥살-개질된 에리트로포이에틴, 2,3-부탄디온-개질된 에리트로포이에틴, 사이클로헥산디온-개질된 에리트로포이에틴, 비오틴화 에리트로포이에틴, N-알킬화된-리신-에리트로포이에틴, 글루시톨릴 리신 에리트로포이에틴, α-데옥시-α-프록토실리신-에리트로포이에틴, 카바밀화 에리트로포이에틴, 아세틸화 에리트로포이에틴, 숙시닐화 에리트로포이에틴, α-카복시알킬 에리트로포이에틴, 질화된 에리트로포이에틴, 요오드화된 에리트로포이에틴을 포함하지만 이들로 한정되지는 않는다(본원의 교시에 기초하여 대표적이지만 비-제한적인 예를 명명함). 바람직한 것은 인간의 에리트로포이에틴을 기제로 하는 전술한 개질 형태이다.
- <75> 또한, 전술한 에리트로포이에틴중 특정한 것은 신규하고, 본 발명은 이러한 화합물 및 이들을 포함하는 약학 조성물에 관한 것이다. 비제한적인 예로서, 이러한 신규 에리트로포이에틴은 과요오드산염-산화 에리트로포이에틴, 글루시톨릴 리신 에리트로포이에틴, 프록토실 리신 에리트로포이에틴, 3-데옥시글루코손 에리트로포이에틴 및 카바밀화 무-시알산 에리트로포이에틴을 포함한다.
- <76> 다양한 숙주-발현 벡터 시스템을 사용하여 본 발명의 에리트로포이에틴 및 에리트로포이에틴-관련 분자를 제조할 수 있다. 이러한 숙주-발현 벡터는 해당 에리트로포이에틴을 제조한 다음 정제할 수 있는 비히클을 나타내지만, 또한 적절한 뉴클레오타이드 코딩 서열로 형질전환 또는 형질감염될 때 원위치에서 개질된 에리트로포이에틴 유전자 생성물을 나타낼 수 있는 세포도 나타낸다. 이들은, 개질된 에리트로포이에틴 생성물 코딩 서열을 함유하는 재조합 바이러스 발현 벡터로 감염된 곤충 세포 시스템(예: baculovirus); 에리트로포이에틴-관련 분자 코딩 서열을 함유하는 재조합 바이러스 발현 벡터(예: 콜리플라워 모자이크 바이러스, CaMV; 담배 모자이크 바이러스, TMV)로 감염되거나, 또는 재조합 플라스미드 발현 벡터(예: Ti 플라스미드)로 형질전환된 식물 세포 시스템; 또는 포유동물 세포의 계놈으로부터 유도된 프로모터(예: 메탈로티오네인 프로모터) 또는 포유동물 바

이러스로부터 유도된 프로모터(예: 아데노바이러스 레이트 프로모터, 백시니아 바이러스 7.5K 프로모터)를 함유하는 재조합 발현 구조를 갖는 인간 세포 시스템을 비롯한 포유동물 세포 시스템(예: HT1080, COS, CHO, BHK, 293, 3T3)과 같은(그러나, 이들로 한정되지는 않음) 세균, 곤충, 식물, 인간을 비롯한 포유동물 숙주 시스템을 포함하지만 이들로 한정되지는 않는다.

<77> 또한, 삽입된 서열의 발현을 조절하거나 또는 목적하는 특정 방식으로 유전자 생성물을 개질 및 처리하는 숙주 세포주를 선택할 수 있다. 단백질 생성물의 이러한 개질(예: 당화) 및 처리(예: 절단)는 단백질의 기능에 중요할 수 있다. 상이한 숙주 세포는 단백질 및 유전자 생성물의 유전암호해독 후 처리 및 개질에 특이적인 특징적 메커니즘을 갖는다. 발현된 외래 단백질을 확실히 올바르게 개질 및 처리하는데 적절한 세포주 또는 숙주 시스템을 선택할 수 있다. 이를 위해, 유전자 생성물의 주요 전사, 당화 및 포스포릴화의 적절한 처리를 위한 세포 기관을 갖는 진핵 숙주 세포를 이용할 수 있다. 이러한 인간 숙주 세포를 비롯한 포유동물 숙주 세포는 HT1080, CHO, VERO, BHK, HeLa, COS, MDCK, 293, 3T3 및 WI38을 포함하지만 이들로 국한되지는 않는다.

<78> 재조합 단백질의 장기간의 고수를 생산을 위해서는 안정한 발현이 바람직하다. 예를 들어, 에리트로포이에틴-관련 분자 유전자 생성물을 안정하게 발현하는 세포주를 조작할 수 있다. 바이러스성 복제원을 함유하는 발현 벡터를 사용하기보다는 적절한 발현 제어 요소(예: 프로모터, 증진인자, 서열, 전사 종결제, 폴리아데닐화 부위 등) 및 선택가능한 마커에 의해 조절되는 DNA로 숙주 세포를 형질전환시킬 수 있다. 외래 DNA를 도입한 후, 조작된 세포를 풍부한 배지에서 1 내지 2일간 성장시킨 다음 선택적인 배지에 바꿔놓는다. 재조합 플라스미드 내의 선택가능한 마커는 선택에 대한 저항성을 부여하며, 세포가 플라스미드를 염색체로 안정되게 통합하고 성장되도록 함으로써 다시 클로닝되어 세포주 내로 전개시킬 수 있는 포커스를 형성하도록 한다. 에리트로포이에틴-관련 분자 유전자 생성물을 발현하는 세포주를 조작하는데 이 방법을 유리하게 사용할 수 있다. 이러한 조작된 세포주는 에리트로포이에틴-관련 분자 유전자 생성물의 내인성 활성화에 영향을 끼치는 화합물의 선별 및 평가에 특히 유용할 수 있다.

<79> 다르게는, 삽입된 조절 요소가 내인성 에리트로포이에틴 유전자에 작동가능하게 결합되도록 안정한 세포주 또는 클로닝된 미생물의 게놈내로 이중 DNA 조절 요소를 삽입함으로써 세포주 또는 미생물 내에서의 내인성 에리트로포이에틴 유전자의 발현 특징을 개질시킬 수 있다. 예를 들어, 이러한 세포주 또는 미생물 내에서 통상적으로 발현되는 유전자 생성물의 발현을 촉진할 수 있는 조절 요소를 삽입함으로써, 통상 "무전사성"인 내인성 에리트로포이에틴 유전자, 즉 세포주에서 통상 발현되지 않거나 매우 낮은 수준으로만 발현되는 에리트로포이에틴 유전자를 활성화시킬 수 있다. 다르게는, 세포 유형에 관계없이 작용하는 무차별적인 조절 요소를 삽입함으로써 내인성 에리트로포이에틴 유전자를 활성화시킬 수 있다.

<80> 당해 분야의 숙련자에게 공지되어 있고 예컨대 인스티튜트 파스퇴르(Institute Pasteur)에게 허여된 프랑스 특허 제 2646438 호, 차펠(Chappel)에게 허여된 미국 특허 제 4,215,051 호, 셔윈(Sherwin) 등에게 허여된 미국 특허 제 5,578,461 호, 셀덴(Selden) 등의 국제 특허원 PCT/US92/09627(WO 93/09222) 호 및 스킴치(Skoultschi) 등의 국제 특허원 PCT/US90/06436(WO91/06667) 호(이들 인용된 문헌은 각각 본원에 참고로 인용되어 있다)에 기재되어 있는 표적화된 동종 재조합과 같은 기법을 이용하여, 이중 조절 요소가 내인성 에리트로포이에틴 유전자와 작동가능하게 결합되도록 이중 조절 요소를 안정한 세포주 또는 클로닝된 미생물에 삽입할 수 있다.

<81> 본 발명의 한 가지 실시태양에서는, 시알산 잔기가 부족하거나 시알산 잔기가 완전히 결핍된 에리트로포이에틴-관련 분자를 인간 세포를 비롯한 포유동물 세포에서 생성시킬 수 있다. 이러한 세포를 조작하여 시알산을 첨가시키는 효소, 즉  $\beta$ -갈락토시드  $\alpha$  2,3 시알릴트랜스퍼라제("  $\alpha$  2,3 시알릴트랜스퍼라제") 및  $\beta$ -갈락토시드  $\alpha$  2,6 시알릴트랜스퍼라제("  $\alpha$  2,6 시알릴트랜스퍼라제") 활성이 부족해지도록 하거나 결핍시킬 수 있다. 한 실시태양에서는,  $\alpha$  2,3 시알릴트랜스퍼라제 유전자 및/또는  $\alpha$  2,6 시알릴트랜스퍼라제 유전자중 하나 또는 둘 모두가 결실된 포유동물 세포를 이용한다. 당해 분야에 널리 공지되어 있는 유전자 결실(knock-out) 기법을 이용하여 이렇게 결실시킬 수 있다. 다른 실시태양에서는, 재조합 에리트로포이에틴-관련 분자를 생성시키기 위한 숙주 세포로서 디하이드로폴레이트 리덕타제(DHFR)가 결핍된 차이니즈 햄스터 난소(CHO) 세포를 이용한다. CHO 세포는  $\alpha$  2,6 시알릴트랜스퍼라제를 발현하지 않으며, 따라서 이들 세포에서 생성된 당단백의 N-결합된 올리고당으로의 2,6 결합에 시알산을 첨가하지 않는다. 그 결과, CHO 세포에서 생성된 재조합 단백질은 갈락토즈로의 2,6-결합에 시알산을 갖지 않는다(사사키(Sasaki) 등(1987); 다케우치(Takeuchi) 등; 무차스(Mutsaers) 등, Eur. J. Biochem. 156, 651 (1986); 다케우치 등, J. Chromatogr. 400, 207 (1987)). 한 실시태양에서는, 무-시알산 에리트로포이에틴을 생성시키기 위한 숙주 세포를 생성시키기 위해, CHO 세포의  $\alpha$  2,3-시알릴트랜스퍼라제를 코딩하는 유전자를 결실시킨다. 이러한  $\alpha$  2,3 시알릴트랜스퍼라제가 결실된 CHO 세포는 시알릴트랜스

퍼라제 활성을 완전히 상실하고, 그 결과 무-시알산 에리트로포이에틴의 재조합 발현 및 생성에 유용하다.

- <82> 다른 실시태양에서는, 골지(golgi) 장치 내로의 시알산 수송을 방해함으로써 무-시알산 당단백을 생성시킬 수 있다(예컨대, 에크하르트 등, 1998, J. Biol. Chem. 273:20189-95). 당해 분야의 숙련자에게 널리 공지되어 있는 방법(예를 들어, 올만(Oelmann) 등, 2001, J. Biol. Chem. 276:26291-300)을 이용하여, 뉴클레오타이드 당 CMP-시알산 수송인자의 돌연변이를 유발시켜 차이니즈 햄스터 난소 세포의 돌연변이체를 생성시킬 수 있다. 이들 세포는 에리트로포이에틴과 같은 당단백에 시알산 잔기를 첨가할 수 없으며, 무-시알산 에리트로포이에틴만을 생성시킨다. 에리트로포이에틴을 생성시키는 형질감염된 포유동물 세포는 또한 세포질 시알리다제를 생성시키는데, 이 효소는 배양 매질 내로 흘러들어갈 경우 시알로에리트로포이에틴을 높은 효율로 분해시킨다(예를 들어, 그래머(Gramer) 등, 1995 Biotechnology 13:692-698). 당해 분야의 숙련자에게 널리 공지되어 있는 방법(예컨대, 페라리(Ferrari) 등의 문헌[1994, Glycobiology 4:367-373]에 기재되어 있는 정보)을 이용하여, 구조적으로 시알리다제를 생성시키도록 세포주를 형질감염시키거나 돌연변이 유발시키거나 또는 다른 방식으로 유도할 수 있다. 이러한 방식으로, 무-시알산 에리트로포이에틴의 제조동안 무-시알산 에리트로포이에틴을 생성시킬 수 있다.
- <83> 본 발명의 한 양태를 실시하는데 있어서, 에리트로포이에틴을 함유하는 상기 기재된 약학 조성물은, 내피 세포 장벽을 가로질러 이동시키고 에리트로포이에틴-응답 세포에 유리한 효과를 제공하기에 충분한 수준의 에리트로포이에틴을 혈관에 제공하는 임의의 경로에 의해 포유동물에게 투여될 수 있다. 조직 또는 기관에 관류시키기 위해 사용될 때에도 동일한 결과를 얻는 것이 바람직하다. 에리트로포이에틴을 생체의 관류에 사용하는 경우, 에리트로포이에틴은 전술한 에리트로포이에틴과 같은(이들로 한정되는 것은 아님) 에리트로포이에틴의 임의의 형태일 수 있으며, 인간의 에리트로포이에틴을 비롯한 천연 에리트로포이에틴을 포함할 수 있다. 세포 또는 조직이 혈관을 포함하지 않고/않거나 세포 또는 조직을 본 발명의 조성물에 침투시킴으로써 투여하는 경우, 약학 조성물은 에리트로포이에틴-응답 세포에 유리한 양의 에리트로포이에틴을 제공한다. 에리트로포이에틴이 가로질러 이동할 수 있는 내피 세포 장벽은 치밀 이음부, 관통된 이음부, 작은 구멍이 있는 이음부 및 포유동물에 존재하는 내피 장벽의 임의의 다른 유형을 포함한다. 바람직한 장벽은 내피 세포 치밀 이음부이지만, 본 발명은 그것으로만 한정되지는 않는다.
- <84> 전술한 에리트로포이에틴은 일반적으로 주로 신경 또는 정신 증상을 갖는 인간의 중추신경계 또는 말초신경계의 질환, 안질환, 심혈관 질환, 심폐 질환, 호흡기 질환, 신장, 비뇨생식기 질환, 위장관 질환 및 내분비 및 대사 이상을 치료 또는 예방하는데 유용하다. 특히, 이러한 증상 및 질병은 흥분성 조직, 예를 들어 뇌, 심장 또는 망막/눈과 같은 중추신경계 조직, 말초신경계 조직, 또는 심조직 또는 망막 조직의 흥분성 조직에 불리한 영향을 끼치는 저산소증을 포함한다. 따라서, 다양한 조건 및 환경에서의 저산소증으로부터 야기되는 흥분성 조직의 손상을 치료 또는 예방하는데 본 발명을 이용할 수 있다. 이러한 조건 및 환경의 비제한적인 예가 하기 표에 기재되어 있다.
- <85> 본 발명에 따라 치료될 수 있는 신경조직 병증의 보호의 예에서, 이러한 병증은 신경 조직의 산소화 감소로 인해 야기된 것을 포함한다. 신경 조직의 산소 이용효율을 감소시키는 임의의 증상(이로 인해, 스트레스, 손상이 생기고, 최종적으로는 신경 세포가 사멸함)은 본 발명의 방법에 의해 치료될 수 있다. 일반적으로 저산소증 및/또는 허혈증으로 일컬어지는 이들 증상은 뇌졸중, 혈관 폐색, 출산 전 또는 출산 후 산소 차단, 질식, 기도폐색, 거의 의식할 뻔한 상태, 일산화탄소 중독, 연기 흡입, 수술 및 방사선치료를 비롯한 외상, 질식, 간질, 저혈당증, 만성 폐쇄폐질환, 폐기종, 성인 호흡곤란 증후군, 고혈압 쇼크, 패혈증 쇼크, 아나필락시스 쇼크, 인슐린 쇼크, 낙적혈구 뇌졸중, 심폐정지, 울동장애, 질소 마취, 및 심폐 회로술에 의해 야기된 신경 결핍으로부터 일어나거나 이러한 질환을 포함하지만 이들로 한정되지는 않는다.
- <86> 한 실시태양에서는, 예를 들어 종양 절제 또는 동맥류 치유와 같은 수술 과정동안의 손상 또는 조직 손상으로부터 야기되는 손상 또는 조직 손상을 방지하기 위해, 특정 EPO 조성물을 투여할 수 있다. 본원에 기재된 방법에 의해 치료될 수 있는 저혈당증에 의해 야기되거나 발병되는 다른 병증은 원인불명 고인슐린혈증으로도 불리는 인슐린 과다투여, 인슐린중, 성장 호르몬 결핍, 저코티솔혈증, 약물 과다투여 및 특정 암을 포함한다.
- <87> 흥분성 신경세포 손상으로부터 발병되는 다른 병증은 간질, 경련 또는 만성 발작 장애와 같은 발작 장애를 포함한다. 다른 치료가능한 증상 및 질환은 뇌졸중, 다발성 경화증, 고혈압, 심폐정지, 알츠하이머병(Alzheimer's disease), 파킨슨병(Parkinson's disease), 뇌성마비, 뇌 또는 척수 외상, AIDS 치매, 연령-관련 인지 기능 상실, 기억 상실, 근위축성 측삭 경화증, 발작 장애, 알콜 중독, 망막 허혈증, 녹내장으로 인한 시신경 손상 및 신경 손상과 같은 질환을 포함한다.

- <88> 본 발명의 특정 조성물 및 방법을 이용하여 망막 조직의 질환 및 손상을 치료할 수 있다. 이러한 증상은 망막 허혈증, 황반 변성, 망막 박리, 망막 색소변성, 동맥경화성 망막병증, 고혈압 망막변증, 망막 동맥 폐색, 망막 정맥 폐색, 저혈압 및 당뇨병성 망막병증을 포함하지만 이들로 국한되지는 않는다.
- <89> 다른 실시태양에서는, 본 발명의 방법 원리를 이용하여 흥분성 조직의 방사성 손상으로부터 야기되는 손상을 보호하거나 치료할 수 있다. 본 발명의 방법은 도모산 조개 중독, 신경 갯완두중독 및 괄(Guam)병과 같은 신경독 중독, 근위축성 측삭 경화증 및 파킨슨병을 치료하는 데에도 이용될 수 있다.
- <90> 상기 나타낸 바와 같이, 본 발명은 또한 전술한 에리트로포이에틴을 말초혈관에 투여함으로써 포유동물에서 흥분성 조직 기능을 향상시키는 방법에 관한 것이다. 다양한 질환 및 증상에 대해 이 방법을 이용하여 치료하고, 또한, 이 방법은 다른 증상 또는 질환이 없는 경우 인지 기능을 향상시키는데 유용하다. 본 발명의 이들 용도는 아래에 더욱 상세하게 기재되며, 인간 및 인간이 아닌 포유동물의 학습 및 훈련 향상을 포함한다.
- <91> 중추신경계에 관련된 본 발명의 이러한 양태의 방법에 의해 치료될 수 있는 증상 및 질환은 기분 장애, 불안 장애, 우울증, 자폐증, 주의력 결핍 과다운동 장애 및 인지 장애를 포함하지만 이들로 한정되지는 않는다. 신경 기능을 향상시키면 이들 증상에 유리하다. 본 발명의 교시에 따라 치료될 수 있는 다른 질환은 수면 방해, 예를 들면 수면 무호흡증 및 여행-관련 질환; 거미막밑 및 동맥류 출혈, 저혈압 쇼크, 진탕 손상, 패혈증 쇼크, 아나필락시스 쇼크, 다양한 뇌염 및 수막염의 후유증 속발증, 예를 들면 루푸스와 같은 결합조직-관련 수막뇌염을 포함한다. 다른 용도는 신경 독소에 의한 중독(예컨대 도모산 조개 중독, 신경 갯완두중독 및 괄병), 근위축성 측삭 경화증, 파킨슨병; 수술후 색전 또는 허혈 손상 치료; 전뇌 조사; 낮적혈구 발작; 및 자간의 예방 또는 보호를 포함한다.
- <92> 본 발명의 방법에 의해 치료될 수 있는 다른 증상의 군은 미토콘드리아 기능장애(선천성 또는 후천성)를 포함하며, 이는 신경 손상 및 사멸에 의해 대표되는 다양한 신경 질환의 원인이다. 예를 들어, 라이병(Leigh disease)(아급성 괴사뇌병증)은 신경 결실로 인한 점진적인 시력 상실 및 뇌병증, 및 근육병증을 그 특징으로 한다. 이들 경우, 불완전한 미토콘드리아 대사는 흥분성 세포의 대사에 연료를 공급하기에 충분히 높은 에너지 기질을 공급하지 못한다. 에리트로포이에틴 수용체 활성 조절제는 다양한 미토콘드리아 질병의 기능 상실을 최적화시킨다. 상기 언급한 바와 같이, 저산소증은 흥분성 조직에 불리한 영향을 끼친다. 흥분성 조직은 중추신경계 조직, 말초신경계 조직 및 심장 조직을 포함하지만 이들로 한정되지는 않는다. 상기 기재된 증상에 덧붙여, 본 발명의 방법은 일산화탄소 및 연기 흡입과 같은 흡입 중독, 중증 천식, 성인 호흡 곤란 증후군, 기도 폐색 및 거의 의사할 뻔한 상태를 치료하는데 유용하다. 저산소증을 발생시키거나 또는 흥분성 조직 손상을 유도하는 다른 수단에 의한 다른 증상은 인슐린을 적절하게 투여하지 못할 경우 또는 인슐린에 의해 생기는 중앙(인슐린종)과 함께 발생할 수 있는 저혈당증을 포함한다.
- <93> 흥분성 조직 손상으로부터 유래된 것으로 생각되는 다양한 신경정신 질환을 본 방법에 의해 치료할 수 있다. 신경 손상이 포함되고 본 발명에 의해 치료되는 만성 질환은 연령-관련 인지 기능 상실 및 노인성 치매, 만성 발작 장애, 알츠하이머병, 파킨슨병, 치매, 기억상실, 근위축성 측삭 경화증, 다발성 경화증, 결절 경화증, 윌슨(Wilson's)병, 뇌성마비, 진행성 핵상마비, 괄병, 루이 소체(Lewy body) 치매, 해면 뇌병증과 같은 프리온 질환, 예컨대 크로이츠펠트-야콥병(Creutzfeldt-Jakob disease), 헌팅톤병, 근육긴장퇴행위축, 프리드리히(Freidrich's) 조화운동불능 및 다른 조화운동불능, 및 길 드 라 토렛(Gilles de la Tourette's) 증후군, 간질 및 만성 발작 장애와 같은 발작 장애, 뇌졸중, 뇌 및 척수 외상, AIDS 치매, 알콜 중독, 자폐증, 망막 허혈증, 녹내장, 고혈압 및 수면 장애와 같은 자율 기능 장애; 및 정신분열증, 정신분열정동장애, 주의력 결핍 장애, 기분저하 장애, 주요 우울 장애, 조증, 강박 장애, 정신작용 물질 사용 장애, 불안증, 공황 장애, 및 단극성 및 양극성 정동장애를 포함하지만 이들로 한정되지는 않는 신경정신병을 비롯한 중추신경계 및/또는 말초신경계에 관련된 질환을 포함한다. 추가의 신경정신병 및 신경퇴행성 질환은 예를 들어 미국 정신과 협회의 정신 질환 진단 통계 매뉴얼(DSM)에 나열된 것을 포함하며, 이들 매뉴얼의 가장 최근 버전이 본원에 참고로 인용된다.
- <94> 다른 실시태양에서는, 암과 같은 증식성 질환, 또는 아급성 경화 범뇌염과 같은 바이러스성 질환을 치료하기 위한 독소의 치료용 전달에 에리트로포이에틴을 포함하는 재조합 키메라 독소 분자를 사용할 수 있다.
- <95> 하기 표는 전술한 에리트로포이에틴에 의해 치료될 수 있는 다양한 증상 및 질환에 대한 추가의 예시적이고 비제한적인 목록이다.

<96>

세포, 조직 또는 기관	기능장애 또는 병증	증상 또는 질환	유형
심장	허혈증	관상동맥 질환	급성, 만성 안정성, 불안정성
		심근경색증	드레슬러(Dressler's) 증후군
		앙기나	
		선천성 심장병	관막 심근병증
		프린즈메탈 앙기나	
		심장 파열	동맥류 사이막 구멍
		관염	
	부정맥	빠른 부정맥, 느린 부정맥, 심실위, 심실 전도 이상	안정성, 불안정성 과민 목동맥 굴절절
	선천성 심장기능 상실	좌심실, 우심실, 이심실	특발성 가족성, 감염성, 대사성, 저장 질환, 결핍, 결합조직 장애, 침윤 및 육아종, 신경혈관성과 같은 심근병증
		심근염	자가면역, 감염성, 특발성
		폐심장증	
	둔기 외상 및 관통 외상		
	독소	코카인	
혈관	고혈압	원발성, 속발성	
	갑압병		
	심유근육과다형성		
	동맥류	박리, 파열, 확장	

세포, 조직 또는 기관	기능장애 또는 병증	증상 또는 질환	유형
폐	폐색성	천식 만성 기관지염, 기종 및 기도폐색	
	허혈성 폐 질환	폐 색전증, 폐 혈전증, 지방 색전증	
	환경성 폐 질환		
	허혈성 폐 질환	폐 색전증 폐 혈전증	
	간질 폐병	특발성 폐 섬유증	
	선천성	낭 섬유증	
	폐 심장증		
	외상		
	허파염 및 폐렴	감염성, 기생형, 독성, 외상성, 화상, 흡인	
	사르코이드증		
췌장	내분비	당뇨병, 유형 I 및 II	베타 세포 기능상실, 기능장애 당뇨병성 신경병증
		췌장의 다른 내분비 세포 기능상실	
	외분비	외분비 췌장 기능상실	췌장염
뼈	골감소증	원발성 속발성	생식샘 저하증 부동화 월경후 연령-관련 부갑상샘 항진증 갑상샘과다증 칼슘, 마그네슘, 인 및/또는 비타민 D 결핍
	골수염		
	무혈관 괴사		
	외상		
	파제트(Paget's)병		

<97>

<98>

세포, 조직 또는 기관	기능장애 또는 병증	증상 또는 질환	유형
성기능장애	중추 및 말초	투약에 수반되는 발 기불능	
간	간염	바이러스성, 세균성, 기생충	
	허혈성 질환		
	경화, 지방간		
	침윤성/대사성 질환		

위장관	허혈성 장 질환		
	염증성 장 질환		
	괴사 소장결장염		
기관 이식	공여자와 수령자의 처치		
생식계	불임	혈관 자가면역 자궁 이상 이식 장애	
내분비	샘 기능항진 및 기능저하		

- <99> 상기 언급한 바와 같이, 이들 질환, 장애 또는 증상은 본 발명의 에리트로포이에틴에 의해 이점을 취할 수 있는 예시적인 범주일 뿐이다. 따라서, 본 발명은 일반적으로 기계적 외상 또는 인간 질환의 결과의 치료 또는 예방을 제공한다. CNS 및/또는 말초신경계의 질환, 장애 또는 증상을 치료 또는 예방하는 것이 바람직하다. 정신병적 요소가 있는 질환, 장애 또는 증상을 치료 또는 예방할 수 있다. 눈, 심혈관, 심폐, 호흡기, 신장, 비뇨기, 생식시, 소화관, 내분비 또는 대사적 요소가 있는 질환, 장애 또는 증상(이들로 한정되지는 않음)을 치료 또는 예방할 수 있다.
- <100> 한 실시태양에서, 이들 에리트로포이에틴의 약학 조성물은 전신 투여되어 표적 세포, 조직 또는 기관을 보호 또는 향상시킬 수 있다. 이러한 투여는 비경구, 흡입 또는 점막통과, 예를 들어 경구, 비강, 직장, 질내, 설하, 점막하 또는 경피 투여일 수 있다. 바람직하게는, 투여는 비경구, 예를 들어 정맥내 또는 복강내 주사이고, 또한 동맥내, 근육내, 피내 및 피하 투여도 포함하지만, 이들로 한정되지는 않는다.
- <101> 관류액 사용, 기관 내로의 주사 또는 다른 국부 투여와 같은 다른 투여 경로의 경우, 유사한 수준의 전술한 에리트로포이에틴을 투여할 수 있는 약학 조성물이 제공된다. 약 15pM 내지 30nM의 양이 바람직하다.
- <102> 본 발명의 약학 조성물은 치료 효과량의 화합물 및 약학적으로 허용가능한 담체를 포함할 수 있다. 특정 실시태양에서, 용어 "약학적으로 허용가능한"이란, 동물, 더욱 특히 인간에 사용하는 것으로 연방정부 또는 주정부의 규제국에 의해 승인되거나 미국 약전 또는 다른 통상적으로 인정되는 외국 약전에 기재되어 있음을 의미한다. 용어 "담체"는 치료제와 함께 투여되는 희석제, 보조제, 부형제 또는 비히클을 일컫는다. 이러한 약학 담체는 석유, 동물유, 식물유 또는 합성유(예: 땅콩유, 대두유, 광유, 호마유 등)를 비롯한 오일 및 물중 염수 용액과 같은 멸균 액체일 수 있다. 약학 조성물이 정맥내 투여되는 경우에는, 염수 용액이 바람직한 담체이다. 염수 용액, 및 텍스트로즈 및 글리세롤 수용액도 특히 주사 용액용 액체 담체로서 사용할 수 있다. 적합한 약학적 부형제는 전분, 글루코즈, 락토즈, 슈크로즈, 젤라틴, 맥아, 쌀, 밀가루, 초크, 실리카겔, 스테아르산나트륨, 글리세롤 모노스테아레이트, 활석, 염화나트륨, 건조된 탈지유, 글리세롤, 프로필렌, 글리콜, 물, 에탄올 등을 포함한다. 필요한 경우, 조성물은 소량의 습윤제 또는 유화제, 또는 pH 완충제도 함유할 수 있다. 이들 조성물은 용액, 현탁액, 유화액, 정제, 환약, 캡슐, 분말, 서방성 제제 등의 형태를 취할 수 있다. 조성물은 전통적인 결합제 및 트리글리세라이드와 같은 담체를 사용하여 좌약으로 제형화될 수 있다. 본 발명의 화합물은 중성 형태 또는 염 형태로 제형화될 수 있다. 약학적으로 허용가능한 염은 염산, 인산, 아세트산, 옥살산, 타르타르산 등으로부터 유도된 것과 같은 유리 아미노기로 형성된 것, 및 나트륨, 칼륨, 암모늄, 칼슘, 수산화철, 이소프로필아민, 트리에틸아민, 2-에틸아미노 에탄올, 히스티딘, 프로카인 등으로부터 유도되는 것과 같은 유리 카복실기로 형성된 것을 포함한다. 적합한 약학 담체의 예는 문헌["Remington's Pharmaceutical Sciences", 마틴(E.W. Martin)]에 기재되어 있다. 이러한 조성물은 화합물을 환자에게 적절하게 투여하기에 적합한 양의 담체와 함께 바람직하게는 정제된 형태의 화합물 치료 효과량을 함유한다. 제형은 투여 방식에 적합해야 한다.
- <103> 경구 투여에 적합한 약학 조성물은 캡슐 또는 정제로서; 분말 또는 과립으로서; 용액, 시럽 또는 현탁액(수성 또는 비수성 액체중)으로서; 식용 포움 또는 휘프(whip)으로서; 또는 유화액으로서 제공될 수 있다. 정제 또는 경질 젤라틴 캡슐은 락토즈, 전분 또는 그의 유도체, 스테아르산마그네슘, 나트륨 사카린, 셀룰로즈, 탄산마그네슘, 스테아르산 또는 그의 염을 포함할 수 있다. 연질 젤라틴 캡슐은 식물유, 왁스, 지방, 반고체 또는 액체

폴리올 등을 포함할 수 있다. 용액 및 시럽은 물, 폴리올 및 당을 포함할 수 있다.

- <104> 경구 투여에 의도되는 활성 약제는 위장관에서 활성 약제의 분해 및/또는 흡수를 지연시키는 물질(예컨대, 글리세릴 모노스테아레이트 또는 글리세릴 디스테아레이트 등을 사용할 수 있음)로 피복되거나 상기 물질과 혼합될 수 있다. 이렇게 하여, 활성 약제가 수시간에 걸쳐 서서히 방출될 수 있고, 필요한 경우 활성 약제를 위 내에서 분해되지 않도록 보호할 수 있다. 경구 투여용 약학 조성물은 특정 pH 또는 효소 조건으로 인해 위장관의 특정 위치에서 활성 약제를 방출시키도록 제형화될 수 있다.
- <105> 경피 투여에 적합한 약학 조성물은 장기간동안 수령인의 피부와 긴밀하게 접촉되어 유지되는 별도의 패치로서 제공될 수 있다. 국부 투여에 적합한 약학 조성물은 연고, 크림, 현탁액, 로션, 분말, 용액, 페이스트, 겔, 스프레이, 에어로졸 또는 오일로서 제공될 수 있다. 피부, 입, 눈 또는 다른 외부 조직으로의 국부 투여의 경우에는, 국부 연고 또는 크림을 바람직하게 사용한다. 연고로 제형화되는 경우에는, 활성성분을 파라인 또는 수산화성 연고 기제와 함께 사용할 수 있다. 다르게는, 활성성분을 수중유적형 기제 또는 유중수적형 기제와 함께 크림으로 제형화시킬 수 있다. 눈으로의 국부 투여에 적합한 약학 조성물은 점안액을 포함한다. 이들 조성물에서는, 활성성분을 적합한 담체, 예를 들어 수성 용매에 용해 또는 현탁시킬 수 있다. 구강내로의 국부 투여에 적합한 약학 조성물은 로젠지, 향내나는 알약(pastille) 및 구강세정제를 포함한다.
- <106> 비강 투여 및 폐로의 투여에 적합한 약학 조성물은 분말(바람직하게는 20 내지 500 μ의 입자 크기를 가짐)과 같은 고체 담체를 포함할 수 있다. 코 가까이에서 둔 분말 용기로부터 코를 통해 빨리 흡입함으로써, 분말을 코로 들이마시는 방식으로 투여할 수 있다. 다르게는, 비강 투여에 적합한 조성물은 액체 담체를 포함할 수 있다(예컨대, 비강 스프레이 또는 비강 점적약제). 다르게는, 깊이 흡입하거나 또는 마우스피스를 통해 입인두 내로 넣음으로써 폐로 직접 흡입할 수 있다. 이들 조성물은 활성성분의 수용액 또는 오일 용액을 포함할 수 있다. 흡입에 의해 투여하기 위한 조성물은 소정 투여량의 활성성분을 제공하기 위하여 제작될 수 있는 가압된 에어로졸, 연무기 또는 취입기를 비롯한(이들로 한정되지는 않음) 특별하게 맞춤형 장치에 공급할 수 있다. 바람직한 실시태양에서는, 본 발명의 약학 조성물을 비강내로 바로 또는 비강 또는 입인두를 통해 폐 내로 투여할 수 있다.
- <107> 직장 투여에 적합한 약학 조성물은 좌약 또는 관장약으로서 제공될 수 있다. 질강 투여에 적합한 약학 조성물은 질좌제, 탐폰, 크림, 겔, 페이스트, 폼 또는 스프레이 제형으로서 제공될 수 있다.
- <108> 비경구 투여에 적합한 약학 조성물은, 산화방지제, 완충액, 정균제 및 사용이 고려되는 수령자의 혈액과 혼합될 때 조성물을 실질적으로 등장성이 되게 하는 용질을 함유할 수 있는 수성 및 비수성 멸균 주사 용액 또는 현탁액을 포함한다. 이러한 조성물에 존재할 수 있는 다른 성분은 예컨대 물, 알콜, 폴리올, 글리세린 및 식물유를 포함한다. 비경구 투여에 적합한 조성물은 단위 투여량 용기 또는 다회 투여량 용기, 예컨대 밀봉된 앰플 및 바이알에 제공될 수 있으며, 동결건조 조건에서 저장될 수 있고, 사용 직전에 멸균 액체 담체(예: 주사용 멸균 염수 용액)만 첨가하면 된다. 멸균 분말, 과립 및 정제로부터 임시처방 주사 용액 및 현탁액을 제조할 수 있다. 한 실시태양에서는, 앰블런스, 응급실 및 전쟁상황에서 응급용으로, 또한 심지어는 집에서, 특히 잔디 깎는 기계를 부주의하게 사용함으로써 외상성 절단이 일어날 수 있는 경우 자가 투여용으로, 에리트로포이에틴의 주사 용액을 포함하는 자동주사기를 제공할 수 있다. 가능한 한 빨리, 심지어는 의료진이 사고 장소에 도착하거나 다친 사람이 절단된 발가락을 끌면서 응급실에 도착하기 전에라도, 절단된 부분의 여러 부위에 에리트로포이에틴을 투여함으로써, 재부착 후 절단된 발 또는 발가락의 세포 및 조직이 생존할 가능성이 증가될 수 있다.
- <109> 바람직한 실시태양에서는, 통상적인 절차에 따라 조성물을 인간으로의 정맥내 투여에 적합한 약학 조성물로서 제형화시킨다. 전형적으로, 정맥내 투여용 조성물은 멸균 등장성 수성 완충액중 용액이다. 필요한 경우, 조성물은 또한 주입 부위에서의 통증을 경감하기 위하여 인도카인과 같은 국부 마취제 및 가용화제를 추가로 포함할 수 있다. 일반적으로, 성분을 별도로 공급하거나, 또는 단위 투여 형태로, 예를 들어 활성 약제의 양을 나타내는 앰플 또는 사체(sachette)와 같은 밀폐된 용기 내의 동결건조된 분말 또는 무수 농축제로서 함께 혼합하여 공급한다. 주입에 의해 조성물을 투여해야 하는 경우에는, 멸균 약제 등급의 물 또는 염수를 함유하는 주입용 병을 사용하여 투여할 수 있다. 조성물을 주사에 의해 투여하는 경우, 투여 전에 성분들을 혼합할 수 있도록 멸균 염수의 앰플을 제공할 수 있다.
- <110> 좌약은 일반적으로 0.5 내지 10중량%의 활성성분을 함유하고; 경구 제제는 바람직하게는 10 내지 95중량%의 활성성분을 함유한다.

- <111> 이식되는 기관을 침지시키기 위해서, 원위치에서 관류시키기 위해서, 또는 기관을 떼어내기 전에 기관 공여자의 혈관에 투여하기 위해서 관류 용액을 제공할 수 있다. 이러한 약학 조성물은 소정량의 에리트로포이에틴 또는 개별 환자에게의 단기 또는 장기, 국부 또는 전신 투여에 적합하지 않은 에리트리포이에틴의 형태를 포함할 수 있으나, 처리된 기관 또는 조직을 일상적인 순환에 복귀시키거나 노출시키기 전에 이에 함유된 에리트로포이에틴의 양이 없어지거나 감소되기 전에 사체, 기관 침지액, 기관 관류액 또는 원위치에서의 관류액에서 본원에서 의도한 기능을 나타낸다. 본 발명의 이 양태를 위한 에리트로포이에틴은 비제한적인 예로서 천연 에리트로포이에틴(예: 인간의 에리트로포이에틴) 또는 전술된 임의의 에리트로포이에틴(예: 무-시알산 에리트로포이에틴 및 페닐글리옥살-에리트로포이에틴)과 같은 임의의 에리트로포이에틴일 수 있다.
- <112> 본 발명은 또한 본 발명의 약학 조성물의 하나 이상의 성분으로 채워진 하나 이상의 용기를 포함하는 약학 팩 또는 키트를 제공한다. 이러한 용기(들)에는 임의적으로 약학 제품 또는 생물학적 제품의 제조업체, 용도 또는 판매를 규제하는 정부 기관이 규정한 고지문이 부착될 수 있으며, 이러한 고지문은 인간에 대해 제조, 사용 또는 판매함에 대한 정부 기관의 승인을 반영한다.
- <113> 다른 실시태양에서는, 예컨대 에리트로포이에틴을 조절된-방출 시스템으로 전달할 수 있다. 예를 들어, 정맥내 주입, 이식가능한 삼투압 펌프, 경피 패치, 리포솜 또는 다른 투여 방식을 이용하여 이 폴리펩티드를 투여할 수 있다. 한 실시태양에서는, 펌프를 사용할 수 있다(랑거(Langer), 상기 문헌; 세프톤(Sefton), 1987, CRC Crit. Ref. Biomed. Eng. 14:201; 부흐발트(Buchwald) 등, 1980, Surgery 88:597; 소텍(Saudek) 등, 1989, N. Engl. J. Med. 321:574 참조). 다른 실시태양에서는, 화합물을 소포, 특히 리포솜에 전달할 수 있다(랑거, Science 249:1527-1533 (1990); 트리트(Treat) 등, Liposomes in the Therapy of Infectious Disease and Cancer, 로페즈-베레스타인 및 피들러(편집), Liss, New York, pp. 353-365 (1989); WO 91/04014 호; 미국 특허 제 4,704,355 호; 로페즈-베레스타인(Lopez-Berestein)과 같은 책, pp. 317-327 참조). 다른 실시태양에서는, 중합체 물질을 사용할 수 있다[Medical Applications of Controlled Release, 랑거 및 와이즈(Wise)(편집), CRC Press; 플로리다주 보카 레이튼, 1974; Controlled Drug Bioavailability, Drug Product Design and Performance, 스몰렌(Smolén) 및 볼(Ball)(편집), Wiley: New York (1984); 랑거 및 페파스(Peppas), J. Macromol. Sci. Rev. Macromol. Chem. 23:61, 1953; 레비(Levy) 등, 1985, Science 228:190; 듀링(During) 등, 1989, Ann. Neurol. 25:351; 하워드(Howard) 등, 1989, J. Neurosurg. 71:105 참조].
- <114> 또 다른 실시태양에서는, 조절된 방출 시스템을 치료 표적, 즉 표적 세포, 조직 또는 기관 근처에 위치시켜 전신 투여량의 일부만 필요로 할 수 있다(예컨대 굿선(Goodson), pp. 115-138, Medical Applications of Controlled Release, vol. 2, 상기 문헌, 1984 참조). 다른 조절된 방출 시스템이 랑거의 개월에 논의되어 있다(1990, Science 249:1527-1533).
- <115> 다른 실시태양에서는, 적절한 제형화된 에리트로포이에틴을 비강, 경구, 직장, 질강 또는 설하 투여할 수 있다.
- <116> 특정 실시태양에서는, 본 발명의 에리트로포이에틴 조성물을 치료가 필요한 부분에만 국부적으로 투여하는 것이 바람직할 수 있으며; 이는 예컨대(한정하지는 않음) 수술시 국부 주입, 예를 들어 수술 후 상처 드레싱과 함께 국부 투여, 주사, 카테터, 좌약 또는 이식물에 의해 달성될 수 있으며, 상기 이식물은 막, 예컨대 실라스틱(silastic) 막, 또는 섬유를 비롯한 다공성, 비다공성 또는 젤라틴성 물질이다.
- <117> 바람직한 유효 투여량의 선택은 당해 분야의 숙련자에게 공지되어 있는 몇가지 인자를 고려하여 숙련자가 결정한다. 이러한 인자는 에리트로포이에틴의 특정 형태, 및 생체내이용효율, 대사, 반감기 등과 같은 약동학적 변수(이는 약제 화합물의 규제 승인을 받는데 전형적으로 이용되는 통상적인 개발 과정동안 얻어짐)를 포함한다. 투여량을 고려하는데 있어서의 다른 인자는 치료되는 증상 또는 질환 또는 정상적인 개인에게서 얻어지는 이점, 환자의 체질량, 투여 경로, 투여가 단기 투여인지 장기 투여인지의 여부, 동시 투약 여부, 및 투여되는 약제의 효능에 영향을 끼치는 것으로 잘 알려져 있는 다른 인자를 포함한다. 따라서, 정확한 투여량은 표준 임상 기법에 따라, 개별 환자의 증상 및 면역 상태에 의존하는 각 환자의 환경 및 담당 의사의 판단에 따라 결정되어야 한다.
- <118> 본 발명의 다른 양태에서는, 관류 및 이식용 기관의 저장을 위해 관류액 또는 관류 용액을 제공하며, 이 때 관류 용액은 에리트로포이에틴-응답 세포 및 이에 결합된 세포, 조직 또는 기관을 보호하는데 효과적인 양의 에리트로포이에틴을 포함한다. 이식물은, 한 공여자로부터 기관(세포, 조직 또는 다른 신체 부위 포함)을 떼어내고 상이한 수령자에게 이식하는 외래 이식; 및 신체의 한 부분으로부터 기관을 제거하여 다른 부분을 대체하는 자가이식(기관을 제거하고, 생체 외에서 예컨대 중앙 제거를 위해 절제, 치료 또는 달리 조작한 다음 원래 위치에 되돌려놓는 벤치 수술 절차 포함)을 포함하지만, 이들로 한정되지는 않는다. 한 실시태양에서, 관류 용액은 약

1 내지 약 25U/ml의 에리트로포이에틴, 5% 하이드록시에틸 전분(약 200,000 내지 약 300,000의 분자량을 갖고, 에틸렌 글리콜, 에틸렌 클로로하이드린, 염화나트륨 및 아세트산을 실질적으로 함유하지 않음), 25mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 3mM 글루타티온, 5mM 아테노신, 10mM 글루코즈, 10mM HEPES 완충액, 5mM 글루콘산마그네슘, 1.5mM CaCl<sub>2</sub>, 105mM 글루콘산나트륨, 200,000단위 페니실린, 40단위 인슐린, 16mg 텍사메타손, 12mg 페놀 레드를 함유하고, 7.4 내지 7.5의 pH 및 약 320mOsm/l의 삼투압을 갖는 위스콘신 대학(UW) 용액(미국 특허 제 4,798,824 호)이다. 이 용액을 사용하여 이식하기 전에 사체의 신장 및 체장을 유지시킨다. 이 용액을 사용하여, 사체 신장 보존을 위해 권장되는 30시간 한계를 넘어 보존을 연장시킬 수 있다. 이 특정 관류액은 에리트로포이에틴 효과량을 포함시킴으로써 현재 사용하는데 적합화시킬 수 있는 다수의 용액의 예일 뿐이다. 다른 실시태양에서, 관류 용액은 에리트로포이에틴 약 5 내지 약 35U/ml, 또는 에리트로포이에틴 약 10 내지 약 30U/ml를 함유한다. 상기 언급한 바와 같이, 본 발명의 이 양태에 임의의 에리트로포이에틴 형태를 사용할 수 있다.

- <119> 본원 전반에 걸쳐 에리트로포이에틴의 바람직한 수령자는 인간이지만, 본원의 방법은 다른 포유동물, 특히 집안에서 키우는 동물, 가축, 애완동물 및 동물원 동물에도 똑같이 적용된다. 그러나, 본 발명은 이들로 한정되지 않으며, 본 발명의 이점은 어느 포유동물에게나 주어질 수 있다.
- <120> 본 발명의 다른 생체의 양태에서는, 상기 기재된 에리트로포이에틴, 및 천연 에리트로포이에틴 및 그의 유사체, 에리트로포이에틴 의사 화합물, 및 에리트로포이에틴 분절, 혼성 에리트로포이에틴 분자, 에리트로포이에틴-수용체-결합 분자, 에리트로포이에틴 작용제, 망막 에리트로포이에틴, 뇌 에리트로포이에틴, 이들의 올리고머, 이들의 다합체, 이들의 뮤테인, 이들의 동류물, 이들의 천연 형태, 이들의 합성 형태, 이들의 제조합 형태, 이들의 당화 변형체, 이들의 탈당화 변형체 또는 이들의 혼합물과 같은(그러나 이들로 한정되지 않음) 임의의 에리트로포이에틴을 사용할 수 있다.
- <121> 본 발명의 다른 양태에서는, 내피 세포 장벽에 의해 혈관으로부터 단리되지 않은 세포, 조직 또는 기관을 직접 에리트로포이에틴을 포함하는 약학 조성물에 노출시키거나, 또는 에리트로포이에틴-함유 약학 조성물을 조직 또는 기관의 혈관에 투여 또는 접촉시킴으로써, 상기 세포, 조직 또는 기관의 생존을 향상시키는 방법 및 조성물이 제공된다. 처리된 조직 또는 기관에서의 에리트로포이에틴-응답 세포의 향상된 활성이 긍정적인 효과를 나타내도록 한다.
- <122> 전술한 바와 같이, 본 발명은 부분적으로는 에리트로포이에틴 분자가 내피 세포 치밀 이음부를 갖는 기관(예컨대 뇌, 망막 및 고환 포함)의 모세혈관의 내피 세포의 관 표면으로부터 기저막 표면으로 수송될 수 있다는 발견에 기초를 두고 있다. 따라서, 장벽을 가로지르는 에리트로포이에틴-응답 세포는 에리트로포이에틴의 유리한 효과에 대해 감수성인 표적이고, 완전히 또는 부분적으로 에리트로포이에틴-응답 세포를 함유하여 의존하는 다른 세포 유형 또는 조직 또는 기관은 본 발명의 방법의 표적이다. 특정 이론에 얽매려고 하는 것은 아니지만, 에리트로포이에틴의 세포간 수송 후, 에리트로포이에틴은 에리트로포이에틴-응답 세포, 예컨대 신경, 망막, 근육, 심장, 폐, 간, 신장, 소장, 부신피질, 부신수질, 모세혈관 내피, 고환, 난소 또는 자궁내막 세포 상에서 에리트로포이에틴 수용체와 반응할 수 있고, 수용체 결합이 일련의 신호 변환을 개시시켜 에리트로포이에틴-응답 세포 또는 조직 내에서 유전자 발현 프로그램을 활성화시킴으로써 예컨대 독소, 화학요법에 사용되는 약제, 방사선 요법, 저산소증 등에 의한 손상으로부터 세포 또는 조직 또는 기관을 보호할 수 있다. 따라서, 에리트로포이에틴-응답 세포-함유 조직을 손상 또는 저산소성 스트레스로부터 보호하고 이러한 조직의 기능을 향상시키는 방법을 아래에 상세히 기재한다.
- <123> 본 발명의 한 실시태양을 실행함에 있어서, 포유동물은 암 치료를 위한 전신 화학요법(방사선 요법 포함)을 받게 되는데, 이는 신경, 폐, 심장, 난소 또는 고환 손상과 같은 역효과를 갖는다. 전술한 바와 같은 에리트로포이에틴을 포함하는 약학 조성물은 화학요법 및/또는 방사선요법 전에 또한 동안에 투여되어, 화학요법에 사용되는 약제에 의한 손상으로부터 다양한 조직 또는 기관을 보호한다(예를 들어, 고환을 보호한다). 화학요법의 약제의 순환 수준이 포유동물 신체에 위험을 야기할 수 있는 수준 미만으로 떨어질 때까지 계속 치료할 수 있다.
- <124> 본 발명의 다른 실시태양을 실행함에 있어서, 자동차 사고로 사망한 인간으로부터 다수의 수령자에게 이식하기 위해 다양한 기관을 떼어낼 예정이었으며, 이중 일부에서는 먼 거리 및 긴 시간동안의 수송이 필요하였다. 기관을 떼어내기 전에, 사망자에게 전술한 에리트로포이에틴을 포함하는 약학 조성물을 주입하였다. 선적을 위해 떼어낸 기관을 전술한 바와 같은 에리트로포이에틴을 함유하는 관류액으로 관류시키고 에리트로포이에틴을 포함하는 침지액에 저장하였다. 본 발명에 따라 에리트로포이에틴을 함유하는 관류액을 사용하여 박동형 관류 장치로 특정 기관을 연속적으로 관류시켰다. 수송하는 동안, 이식하는 동안 또한 원위에서 기관을 재관류시

키는 동안 기관 기능의 열화는 최소한으로만 일어났다.

- <125> 본 발명의 다른 실시태양에서는, 심장 판막을 치료하는 수술에서 일시적인 심장마비 및 동맥 폐색이 필요하였다. 수술하기 전에, 환자에게 체중 1kg당 500U의 에리트로포이에틴을 주입하였다. 이러한 처치로 인해, 특히 재관류 후 저산소성 허혈증에 의한 세포 손상이 방지되었다.
- <126> 본 발명의 다른 실시태양에서는, 심폐 회로술과 같은 임의의 수술 절차에 천연 에리트로포이에틴 또는 본 발명의 임의의 에리트로포이에틴을 사용할 수 있다. 한 실시태양에서는, 회로술 전에, 동안 및/또는 후에 전술한 에리트로포이에틴을 함유하는 약학 조성물을 투여하여, 뇌, 심장 및 다른 기관의 기능을 보호한다.
- <127> 생체의 용도로 또는 신경 세포, 망막 세포, 심장, 폐, 간, 신장, 소장, 부신피질, 부신수질, 모세혈관 내피, 고환, 난소 또는 자궁내막 세포 또는 조직과 같은 에리트로포이에틴-응답 세포를 처리하는데 천연 에리트로포이에틴을 비롯한 본 발명의 에리트로포이에틴을 사용하는 전술한 예에서, 본 발명은 혈관으로부터 먼 에리트로포이에틴-응답 세포, 조직 또는 기관을 보호 또는 향상시키는데 적합화된 단위 투여 형태의 약학 조성물을 제공하며, 이 약학 조성물은 단위 투여량당 약 50,000 내지 500,000단위, 60,000 내지 500,000단위, 70,000 내지 500,000단위, 80,000 내지 500,000단위, 90,000 내지 500,000단위, 100,000 내지 500,000단위, 150,000 내지 500,000단위, 200,000 내지 500,000단위, 250,000 내지 500,000단위, 300,000 내지 500,000단위, 350,000 내지 500,000단위, 400,000 내지 500,000단위, 또는 450,000 내지 500,000단위의 효과적인 비독성 양의 에리트로포이에틴, 에리트로포이에틴 수용체 활성 조절제, 또는 에리트로포이에틴-활성화된 수용체 조절제, 및 약학적으로 허용가능한 담체를 포함한다. 바람직한 실시태양에서, 에리트로포이에틴의 효과적인 비독성 양은 약 50,000 내지 500,000 단위이다. 바람직한 실시태양에서, 전술한 조성물의 에리트로포이에틴은 비-적혈구조혈성이다.
- <128> 본 발명의 다른 양태에서는, 에리트로포이에틴 투여가 뇌 외상을 입은 동물의 인지 기능을 회복시키는 것으로 밝혀졌다. 5일 또는 30일간 지연시킨 후, 에리트로포이에틴을 투여한 결과 위약-치료된 동물과 비교하여 여전히 기능을 회복시킬 수 있었던 바, 뇌 활성을 재생 또는 회복시키는 에리트로포이에틴의 활성을 보여주었다. 따라서, 본 발명은 또한 뇌 외상 및 다른 인지 기능장애를 치료(손상받는지 상당한 시간(예를 들어 3일, 5일, 1주일, 한달 이상)이 지난 뒤에 치료)하기 위한 약학 조성물을 제조하는데 있어서의 에리트로포이에틴의 용도에 관한 것이다. 본 발명은 또한 에리트로포이에틴 효과량을 투여함으로써 손상 후 인지 기능장애를 치료하는 방법에 관한 것이다. 본원에 기재되어 있는 임의의 에리트로포이에틴을 본 발명의 이 양태에 사용할 수 있다.
- <129> 뿐만 아니라, 본 발명의 이러한 회복 양태는 기능장애를 유발한 최초의 손상을 받은 후에, 또한 그로부터 상당한 시간이 지난 후에 치료를 시작하는, 세포, 조직 또는 기관 기능장애를 회복시키는 약학 조성물을 제조하기 위한 본원의 임의의 에리트로포이에틴의 용도에 관한 것이다. 뿐만 아니라, 본 발명의 에리트로포이에틴을 사용하는 치료는 질환 또는 증상이 급성 상태일 때와 만성 상태일 때의 사이에 걸쳐질 수 있다.
- <130> 본 발명의 에리트로포이에틴이 적혈구 조혈 활성을 갖는 경우, 바람직한 예에서는, 1회 투여당 체중 1kg당 약 300 내지 약 10,000단위, 바람직하게는 약 500 내지 5,000단위, 가장 바람직하게는 약 1,000단위의 투여량으로 에리트로포이에틴을 전신 투여할 수 있다. 이러한 유효 투여량은 에리트로포이에틴 투여 후 혈정 1ml당 약 10,000, 15,000 또는 20,000mU 이상의 혈중 에리트로포이에틴 수준을 획득하기에 충분해야 한다. 이러한 혈중 농도는 투여 후 약 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10시간 후에 달성될 수 있다. 필요한 경우, 이러한 투여량을 반복할 수 있다. 예를 들어, 임상적으로 필요하다면, 매일 반복해서 투여할 수 있거나, 또는 적절한 간격 후, 예를 들어 매 1 내지 12주마다, 바람직하게는 매 1 내지 3주마다 반복해서 투여할 수 있다. 한 실시태양에서는, 효과량의 에리트로포이에틴 및 약학적으로 허용가능한 담체를 단일 투여 바이알 또는 다른 용기에 포장할 수 있다. 다른 실시태양에서, 본원에 유용한 에리트로포이에틴은 적혈구 조혈성이 아니다. 즉, 이 에리트로포이에틴은 본원에 기재된 활성을 나타낼 수는 하지만 헤모글로빈 농도 또는 적혈구용적율을 증가시키지는 않는다. 에리트로포이에틴의 이러한 비-적혈구 조혈성 형태는 본 발명의 방법을 장기간 이용해야 하는 경우에 바람직하다. 다른 실시태양에서는, 적혈구 조혈 작용을 최대한으로 촉진하기 위해 필요한 것보다 더 많은 투여량으로 에리트로포이에틴을 투여한다. 상기 나타낸 바와 같이, 본 발명의 에리트로포이에틴은 반드시 적혈구 조혈 활성을 가질 필요는 없으며, 따라서 조혈 단위로 표현된 상기 투여량은 적혈구 조혈성인 에리트로포이에틴에 대해 예로서 기재한 것일 뿐이며; 임의의 에리트로포이에틴에 적용될 수 있는 상기 투여량에 대한 몰당량을 제공한다.
- <131> 본 발명은 또한 전술한 에리트로포이에틴과 결합된 특정 분자를 함유하는 조성물을 투여함으로써 포유동물의 내피 세포 장벽을 가로지르는 분자의 수송을 촉진시키는 방법에 관한 것이다. 상기 기재된 바와 같이, 신체의 특

정 기관의 내피 세포 사이에 있는 치밀 이음부는 특정 분자가 들어가지 못하게 하는 장벽이 된다. 장벽이 있는 기관 내의 다양한 증상을 치료하기 위해서는, 약제의 통과를 용이하게 하는 수단이 필요하다. 본 발명의 에리트르포이에틴은 혈액-뇌 장벽 및 다른 유사한 장벽을 가로질러 다른 분자를 전달하는 담체로서 유용하다. 에리트르포이에틴과 함께 장벽을 가로질러야 하는 분자를 포함하는 조성물을 제조하고, 이 조성물을 말초혈관에 투여하면 조성물이 장벽을 가로질러 세포간 수송을 달성한다. 장벽을 가로질러 수송될 분자와 에리트르포이에틴 사이의 결합은 불안정한 공유 결합이고, 이 경우 분자는 장벽을 가로지른 후 에리트르포이에틴과의 결합으로부터 유리된다. 에리트르포이에틴과 결합함으로써 분자의 목적하는 약리학적 활성이 유지되거나 영향을 받지 않는다면, 이러한 복합체를 투여할 수 있다.

<132> 당해 분야의 숙련자는 공유 결합, 비-공유 결합 및 다른 수단에 의해 분자를 본 발명의 에리트르포이에틴 및 전술한 다른 약제와 결합시키는 다양한 수단을 알 것이며; 실험 시스템에서 조성물의 효율을 용이하게 평가할 수 있다. 불안정한 공유 결합, 가교결합 등을 비롯한 다수의 수단에 의해 분자를 에리트르포이에틴과 결합시킬 수 있다. 비오틴/아비딘 작용을 이용할 수 있다. 전술한 바와 같이, 예컨대 목적하는 약리학적 활성을 갖는 분자의 도메인과 에리트르포이에틴 수용체 활성 조절을 담당하는 도메인을 둘 다 포함하는 재조합 또는 합성 수단에 의해 혼성 분자를 제조할 수 있다.

<133> 다작용성 분자, 즉 다작용성 가교결합제를 통해 분자를 에리트르포이에틴에 접합시킬 수 있다. 본원에 사용되는 용어 "다작용성 분자"는 2회 이상 연속해서 반응할 수 있는 작용기 하나(예: 포름알데히드)를 갖는 분자, 및 하나보다 많은 반응기를 갖는 분자를 포함한다. 본원에 사용되는 용어 "반응기"는 가교결합제와 분자 사이에 공유 결합을 형성하기 위해 분자(예: 내피 세포 장벽을 가로질러 전달되어야 하는 펩티드, 단백질, 탄수화물, 핵산, 특히 호르몬, 항생제, 또는 항암제)상의 작용기와 반응하는 가교결합제상의 작용기를 일컫는다. 용어 "작용기"는 유기 화학에서의 그의 표준적인 의미를 갖는다. 사용될 수 있는 다작용성 분자는 바람직하게는 생체적합성 결합기이다. 즉, 이들은 생체내에서 발암성이 아니고 독성이 없으며 실질적으로 면역원성이다. 당해 분야에 공지되어 있고 본원에 기재되어 있는 것과 같은 다작용성 가교결합제는 그의 생체적합성을 결정하기 위해 동물 모델에서 용이하게 시험될 수 있다. 다작용성 분자는 바람직하게는 이작용성이다. 본원에 사용되는 용어 "이작용성 분자"란 2개의 반응기를 갖는 분자를 일컫는다. 이작용성 분자는 이중 이작용성 또는 동종 이작용성일 수 있다. 이중 이작용성 가교결합제는 백터같은 접합을 허용한다. pH 6 내지 8로 완충된 수용액과 같은 수용액에서 가교-결합 반응이 이루어지도록 다작용성 분자가 충분히 수용성이고, 또한 보다 효과적인 생체내 분배를 위해 생성된 접합체를 수용성으로 유지하는 것이 특히 바람직하다. 전형적으로, 다작용성 분자는 아미노 또는 설프하이드릴 작용기와 공유 결합한다. 그러나, 다른 작용기(예: 카복실산 또는 하이드록실기)와 반응성인 다작용성 분자도 본 발명에서 고려된다.

<134> 동종 이작용성 분자는 둘 이상의 동일한 반응성 작용기를 갖는다. 동종 이작용성 분자상의 반응성 작용기는 예컨대 알데히드기 및 활성 에스테르기를 포함한다. 알데히드기를 갖는 동종 이작용성 분자는 예를 들어 글루타르알데히드 및 수바르알데히드를 포함한다. 가교결합제로서의 글루타르알데히드의 용도는 포즈난스키(Poznansky) 등의 문헌[Science 223, 1304-1306 (1984)]에 개시되어 있다. 둘 이상의 활성 에스테르 단위를 갖는 동종 이작용성 분자는 디카복실산과 N-하이드록시숙신이미드의 에스테르를 포함한다. 이러한 N-숙신이미딜 에스테르의 몇몇 예는 디숙신이미딜 수베레이트 및 디티오-비스(숙신이미딜 프로피오네이트), 및 이들의 가용성 비스-설프산 및 비스-설프네이트 염(예: 이들의 나트륨 및 칼륨 염)을 포함한다. 이들 동종 이작용성 시약은 일리노이주 록포드 소재의 피어스(Pierce)에서 구입할 수 있다.

<135> 이중 이작용성 분자는 둘 이상의 상이한 반응기를 갖는다. 반응기는 예컨대 에리트르포이에틴 및 분자상에 존재하는 상이한 작용기와 반응한다. 이중 이작용성 가교결합제상의 반응기와 반응하는 이들 두 상이한 작용기는 통상 아미노기, 예를 들어 리신의 ε-아미노기; 설프하이드릴기, 예를 들어 시스테인의 티올기; 카복실산, 예컨대 아스파르트산의 카복실레이트; 또는 하이드록실기, 예컨대 세린의 하이드록실기이다.

<136> 물론, 본 발명의 다양한 에리트르포이에틴 분자가 특정 가교결합제와 함께 사용할 수 있는 적합한 반응기를 가질 수는 없지만, 당해 분야의 숙련자는 본 발명의 에리트르포이에틴의 가교결합에 이용될 수 있는 기에 기초하여 가교결합제를 충분히 선택할 수 있을 것이다.

<137> 이중 이작용성 분자의 반응기가 아미노기와 공유 결합을 형성하는 경우, 공유 결합은 통상 아미노 또는 이미노 결합이다. 아미노기와 공유 결합을 형성하는 반응기는 예컨대 활성화된 카복실레이트기, 할로카보닐기 또는 에스테르기일 수 있다. 바람직한 할로카보닐기는 클로로카보닐기이다. 에스테르기는 바람직하게는 N-하이드록시-숙신이미드 에스테르기와 같은 반응성 에스테르기이다.

- <138> 다른 작용기는 전형적으로 티올기, 티올기로 전환될 수 있는 기, 또는 티올기와 공유 결합을 형성하는 기이다. 공유 결합은 통상 티오에테르 결합 또는 디설파이드이다. 티올기와 공유 결합을 형성하는 반응기는 예를 들어 티올기와 반응하는 이중결합 또는 활성화된 디설파이드일 수 있다. 티올기와 반응할 수 있는 이중결합을 함유하는 반응기는 말레이미도기이지만, 아크릴로니트릴과 같은 다른 기도 가능하다. 반응성 디설파이드 기는 예컨대 2-피리딜디티오기 또는 5,5'-디티오-비스-(2-니트로벤조산)기일 수 있다. 반응성 디설파이드 결합을 함유하는 이중 이작용성 시약의 몇몇 예는 N-숙신이미딜 3-(2-피리딜-디티오)프로피오네이트(칼슨(Carlsson) 등, 1978, *Biochem J.*, 173:723-737), 나트륨 S-4-숙신이미딜옥시카보닐- $\alpha$ -메틸벤질티오설페이트 및 4-숙신이미딜 옥시카보닐- $\alpha$ -메틸-(2-피리딜디티오)톨루엔을 포함한다. N-숙신이미딜 3-(2-피리딜디티오)프로피오네이트가 바람직하다. 티올기와 반응하는 이중결합을 갖는 반응기를 포함하는 이중 이작용성 시약의 몇몇 예는 숙신이미딜 4-(N-말레이미도메틸)사이클로헥산-1-카복실레이트 및 숙신이미딜 m-말레이미도벤조에이트를 포함한다.
- <139> 다른 이중 이작용성 분자는 숙신이미딜 3-(말레이미도)프로피오네이트, 설포숙신이미딜 4-(p-말레이미도-페닐)부티레이트, 설포숙신이미딜 4-(N-말레이미도메틸-사이클로헥산)-1-카복실레이트, 말레이미도벤조일-N-하이드록시-숙신이미드 에스테르를 포함한다. 숙신이미딜 m-말레이미도벤조에이트의 나트륨 설포네이트 염이 바람직하다. 상기 언급된 이중 이작용성 시약 및 이들의 설페이트 염 다수는 미국 일리노이주 록포드 소재의 피어스 케미칼 컴퍼니(Pierce Chemical Co.)에서 구입할 수 있다.
- <140> 가역적이거나 불안정한 상기 기재된 접합의 필요성은 당해 분야의 숙련자가 용이하게 결정할 수 있다. 에리트로포이에틴 및 목적하는 약리학적 활성에 대해 시험관내에서 접합체를 시험할 수 있다. 접합체가 두 특성을 모두 보유하는 경우, 그의 적합성을 생체내에서 시험할 수 있다. 접합 분자가 활성을 위해 에리트로포이에틴로부터 분리될 필요가 있는 경우에는, 에리트로포이에틴과의 불안정한 결합 또는 가역적인 결합이 바람직하다. 생체내 시험 전에 표준 시험관내 절차를 이용하여 불안정성을 시험할 수 있다.
- <141> 이들 다작용성 시약 및 다른 다작용성 시약을 제조 및 사용하는 방법에 대한 추가적인 정보는 하기 문헌 또는 당해 분야에서 입수할 수 있는 다른 문헌으로부터 얻을 수 있다:
- <142> 칼슨 등, 1978, *Biochem. J.* 173:723-737.
- <143> 컴버(Cumber, J.A.) 등, 1985, *Methods in Enzymology* 112:207-224.
- <144> 쥬(Jue, R.) 등, 1978, *Biochem* 17:5399-5405.
- <145> 썬(Sun, T.T.) 등, 1974, *Biochem.* 13:2334-2340.
- <146> 블래틀러(Blattler, W.A.) 등, 1985, *Biochem.* 24:1517-152.
- <147> 리우(Liu, F.T.) 등, 1979, *Biochem.* 18:690-697.
- <148> 율(Youle, R.J.) 및 네빌(Neville, D.M. Jr.), 1980, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 77:5483-5486.
- <149> 러너(Lerner, R.A.) 등, 1981, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 78:3403-3407.
- <150> 정(Jung, S.M.) 및 모로이(Moroi, M.), 1983, *Biochem. Biophys. Acta* 761:162.
- <151> 콜필드(Caulfield, M.P.) 등, 1984, *Biochem.* 81:7772-7776.
- <152> 스타로스(Staros, J.V.), 1982, *Biochem.* 21:3950-3955.
- <153> 요시타케(Yoshitake, S.) 등, 1979, *Eur. J. Biochem.* 101:395-399.
- <154> 요시타케 등, 1982, *J. Biochem.* 92:1413-1424.
- <155> 필치(Pilch, P.F.) 및 체크(Czech, M.P.), 1979, *J. Biol. Chem.* 254:3375-3381.
- <156> 노빅(Novick, D.) 등, 1987, *J. Biol. Chem.* 262:8483-8487.
- <157> 로만트(Lomant, A.J.) 및 페어뱅크스(Fairbanks, G.), 1976, *J. Mol. Biol.* 104:243-261.
- <158> 하마다(Hamada, H.) 및 쓰루오(Tsuruo, T.), 1987, *Anal. Biochem.* 160:483-488.
- <159> 하시다(Hashida, S.) 등, 1984, *J. Applied Biochem.* 6:56-63.
- <160> 또한, 가교결합 방법은 민즈(Means) 및 피니(Feeney)의 문헌[1990, *Bioconjugate Chem.* 1:2-12]에 개괄되어 있

다.

- <161> 본 발명의 기술한 방법 및 조성물이 가로지르는 장벽은 혈액-뇌 장벽, 혈액-눈 장벽, 혈액-고환 장벽, 혈액-난소 장벽 및 혈액-자궁 장벽을 포함하지만 이들로 한정되는 것은 아니다.
- <162> 내피 세포 장벽을 가로질러 수송하고자 하는 분자는 예를 들어 호르몬(예: 성장 호르몬), 향신경성 인자, 항생제 또는 항진균제(예: 뇌 및 다른 장벽을 갖는 기관으로부터 통상 배제되는 것), 펩티드 방사성 의약품, 안티센스(antisense) 약물, 생물학적으로 활성인 약제에 대한 항체, 의약, 및 항암제를 포함한다. 이러한 분자의 비제한적인 예는 성장 호르몬, 신경성장인자(NGF), 뇌-유도된 향신경성 인자(BDNF), 섬모체 향신경성 인자(CNTF), 염기성 섬유모세포 성장 인자(bFGF), 형질전환 성장 인자  $\beta 1$ (TGF  $\beta 1$ ), 형질전환 성장 인자  $\beta 2$ (TGF  $\beta 2$ ), 형질전환 성장 인자  $\beta 3$ (TGF  $\beta 3$ ), 인터류킨 1, 인터류킨 2, 인터류킨 3 및 인터류킨 6, AZT, 중앙괴사인자에 대한 항체, 및 사이클로스포린과 같은 면역억제제를 포함한다.
- <163> 본 발명은 또한 내피 세포 치밀 이음부 장벽을 가로지르는 세포간 수송을 통해 수송되는 분자 및 상기 기재된 에리트로포이에틴을 포함하는 조성물에 관한 것이다. 본 발명은 또한 기술한 장벽을 가로질러 분자를 전달하는 약학 조성물을 제조하기 위한, 상기 기재된 에리트로포이에틴과 분자 사이의 접합의 용도에 관한 것이다.
- <164> 본 발명은, 본 발명의 예로서 제공되는 하기 비제한적인 실시예를 참조함으로써 더욱 잘 이해될 수 있다. 하기 실시예는 본 발명의 바람직한 실시태양을 더욱 자세히 예시하기 위해 제공된다. 그러나, 이들은 어떠한 방식으로든 본 발명의 넓은 영역을 한정하는 것으로 간주되어서는 안된다.

**실시예**

- <165> 실시예 1
- <166> 혈액-뇌척수액 치밀 장벽을 가로지르는 에리트로포이에틴
- <167> 다 큰 숫컷 스프라그-돌리 래트를 마취시키고 재조합 인간 에리트로포이에틴을 복강내 투여하였다. 뇌척수액 샘플을 4시간까지 30분 간격으로 소뇌숨겨수조로부터 채취하고, 민감성의 특이적 효소-결합 면역분석법을 이용하여 에리트로포이에틴 농도를 결정하였다. 도 1에 도시된 바와 같이, CSF에서의 기준 에리트로포이에틴 농도는 8mU/ml이다. 수시간 후, CSF에서 측정된 에리트로포이에틴의 농도가 증가하기 시작하여, 2.5시간 이후부터는  $p < 0.01$  수준에서 기준 농도에서 크게 다르다. 약 100mU/ml의 피크 농도는 시험관 내에서 보호 효과를 나타내는 것으로 알려진 범위(0.1 내지 100mU/ml) 내에 있다. 피크까지의 시간은 약 3.5시간이며, 이는 피크 혈청 농도(1시간 미만)로부터 상당히 지연된 것이다. 이 실험의 결과는 에리트로포이에틴을 적절한 농도로 비경구 투여함으로써 상당한 농도의 에리트로포이에틴이 치밀한 세포 이음부를 가로질렀음을 설명한다.
- <168> 실시예 2
- <169> 이식을 위해 준비된 심장의 기능 유지
- <170> 델케이어(Delcayre) 등의 방법(1992, *Amer. J. Physiol.* 263:H1537-45)에 따라 수행되는 생체의 연구를 위하여 심장을 제거하기 24시간 전에, 체중 300 내지 330g의 위스타(Wistar) 숫컷 래트에게 에리트로포이에틴(체중 1kg 당 5000U) 또는 비히클을 투여한다. 펜토바비탈(0.3mL)로 동물을 죽이고, 정맥내로 헤파린(0.2mL)을 주사한다. 처음에는, 심장을 15분간 평형화시킨다. 이어, 8mmHg의 확장말기압을 나타내는 부피까지 좌심실 풍선을 팽창시킨다. 좌심실 풍선 부피를 0.02mL 분량만큼 증가시키면서 팽창시킴으로써 좌심실 압력-부피 곡선을 만든다. 부피가 0일 때를 좌심실의 확장말기압이 0인 시점으로 정의한다. 압력-부피 곡선을 완성한 후, 좌심실 풍선을 수축시켜 확장말기압을 다시 8mmHg로 만들고, 관상동맥의 흐름을 점검한 후 15분동안 조절기간을 둔다. 이어, 50mL 셸시어(Celsior)+분자로 심장을 정지시켜, 60cm H<sub>2</sub>O의 압력하에 4°C에 둔다. 이어, 심장을 제거하고 동일한 용액으로 채워지고 얼음 조각으로 둘러싸인 플라스틱 용기에 넣어 4°C에서 4시간동안 저장한다.
- <171> 저장기간이 끝난 후, 심장을 랑젠도르프(Langendorff) 장치로 옮긴다. 풍선 카테터를 좌심실에 다시 삽입하고 허혈전 기간동안과 동일한 부피로 다시 팽창시킨다. 심장을 37°C에서 2시간 이상동안 재관류시킨다. 15분동안의 재유동동안 재관류 압력을 50cm H<sub>2</sub>O로 설정한 다음, 이후 2시간동안 100cm H<sub>2</sub>O로 되돌린다. 다시 박동시킨다(1분당 320회 박동). 재관류시킨지 25, 45, 60 및 120분 후에 수축지수 및 확장기압을 3회씩 동등적 측정한다. 이 시점에서, 압력 부피 곡선을 만들고, 45분 재관류동안의 관상 동맥 유출물을 수거하여 크레아틴 키나제 누출을 측정한다. 쌍을 이루지 않은 t-시험을 이용하여 두 처리 군을 비교하고, 확장말기압 데이터를 사용하는 선형 복귀를 이용하여 순응성 곡선을 디자인한다. 도 2에 도시된 바와 같이, 에리트로포이에틴으로 처리한 후 좌

심실 압력이 상당히 개선되었고 부피-압력 곡선이 개선되었으며, 좌심실 확장기압의 감소 및 크레아틴 키나제 누출의 감소가 일어났다.

- <172> 실시예 3
- <173> 허혈성 손상으로부터 심근육을 보호하는 에리트로포이에틴
- <174> 24시간 전에 재조합 인간 에리트로포이에틴을 투여(체중 1kg당 5000U)한 다 큰 숫컷 래트를 마취시키고, 관상 동맥 폐색을 위해 준비한다. 절차의 개시시 추가적으로 에리트로포이에틴을 투여하고, 좌측 주 관상 동맥을 30 분간 폐색시켰다가 푼다. 처치한 후 1주일동안 매일 동일한 투여량의 에리트로포이에틴을 투여한다. 이어, 동물의 심장 기능에 대해 연구한다. 도 3에 도시되어 있는 바와 같이, 위약 주사(염수)를 맞은 동물은 좌측 확장 말기압의 큰 증가를 나타내어 심근 경색에 수반되는 확장된 강직 심장을 암시한다. 대조적으로, 에리트로포이에틴을 투여한 동물은 위약 처리된 대조용과 비교하여 심장 기능의 저하를 나타내지 않는다( $p < 0.01$  수준에서 유의한 차이).
- <175> 실시예 4
- <176> 에리트로포이에틴 분자
- <177> 특정 조직 또는 조직들에 대해 그의 활성을 맞추기 위해 천연 에리트로포이에틴을 개질시킬 수 있다. 이러한 목적하는 조직 특이성을 달성하기 위해 수행될 수 있는 몇몇 비제한적인 방법은 에리트로포이에틴이 3개의 N-결합 및 하나의 O-결합을 갖는 당화 잔기를 제거하거나 또는 개질시킨다. 이러한 당화된 에리트로포이에틴의 변형체는 여러 방식으로 제조될 수 있다. 예를 들어, 시알산과 당 쇄를 결합하는 화학적 결합에 따라 특이적인 시알리다제에 의해 당 쇄의 말단을 종결시키는 시알산을 제거할 수 있다. 다르게는, 특이적인 결합을 절단하는 다른 효소를 사용함으로써 상이한 방식으로 당화된 구조를 분해시킬 수 있다. 이러한 원리를 유효화시키기 위해, 제조업체의 방법에 따라 시알리다제 A(프로자임 인코포레이티드)를 사용하여 재조합 인간 에리트로포이에틴로부터 시알산을 제거하였다. SDS 폴리아크릴아미드 겔 상에서 반응 생성물을 진행시키고 생성된 밴드를 염색한 결과, 약 34kD이었던 개질되지 않은 에리트로포이에틴과 비교하여, 화학적으로 개질된 에리트로포이에틴이 예상대로 약 31kD의 겔보기 분자량을 가진 것으로 밝혀졌으며, 또한 화학적 수단에 의해 잔류하는 시알산 잔류물을 측정된 결과 에리트로포이에틴 1몰당 0.1몰 미만인 것으로 밝혀진 바, 화학적 개질이 성공적이었음을 확인하였다.
- <178> 에리트로포이에틴의 아미노산 잔기를 개질시킨 다른 개질법에서는, 실온에서 0.5 내지 3시간의 다양한 시간동안 수행되는 다카하시의 방법(1977, *J. Biochem.* 81:395-402)에 따라 페닐글리옥살을 사용함으로써 아르기닌 잔기를 개질시켰다. 반응 혼합물을 물에 대해 투석함으로써 반응을 종결시켰다. 에리트로포이에틴의 이러한 개질된 형태를 사용하는 것은 본원에 포함된다.
- <179> 무-시알산 에리트로포이에틴 및 페닐글리옥살에리트로포이에틴은 도 4 내지 도 6에 도시된 바와 같이 시험관 내에서 신경 세포에 대해 천연 에리트로포이에틴만큼 효과적이었다. 혈청 회수시 자멸사하는 신경-유사 배아암종 세포(P19)를 사용하여 시험관내 시험을 수행하였다. 혈청을 제거하기 2시간 전에, 배양액에 에리트로포이에틴 또는 개질된 에리트로포이에틴 1 내지 1000ng/ml를 첨가하였다. 그 다음 날에 배지를 제거하고 세포를 신선하고 혈청을 함유하지 않는 배지로 세척한 다음, 시험 성분을 함유하는(혈청 없음) 배지를 추가로 48시간동안 배양액에 다시 첨가하였다. 생존 세포 수를 결정하기 위하여, 테트라졸륨 환원 분석을 수행하였다(셀타이터(CellTiter) 96; 프로메가, 인코포레이티드(Promega, Inc.)). 도 4 및 도 5에 도시되어 있는 바와 같이, 무-시알산 에리트로포이에틴은 세포 사멸을 방지하는데 있어서 에리트로포이에틴 자체와 동일한 효능을 갖는 것으로 보인다. 상기 기재된 신경-유사 P19 세포 분석법을 이용하여 페닐글리옥살-개질된 에리트로포이에틴을 시험하였다. 도 6에 도시된 바와 같이, 이 화학적으로 개질된 에리트로포이에틴은 그의 신경보호 효과를 완벽하게 보유한다.
- <180> 상기 기재된 바와 같이(브린즈(Brines) 등, 2000, *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* 97:10526-31) 중간대뇌동맥의 분포의 가역적인 손상을 수행하는 래트 국소 허혈증 모델을 사용하여 생체내에서 신경 보호 활성을 보유함을 확인하였다. 동맥 폐색 개시시에 다 큰 숫컷 스프라그-돌리 래트에게 무-시알산 에리트로포이에틴 또는 에리트로포이에틴(체중 1kg당 5000U, 복강내) 또는 비히클을 투여하였다. 24시간 후, 동물을 죽이고 그의 뇌를 연구하기 위해 제거하였다. 연속 절편을 절단해내고 테트라졸륨 염으로 염색하여 뇌의 생존 영역을 확인하였다. 도 7에 도시된 바와 같이, 무-시알산 에리트로포이에틴은 1시간동안의 허혈로부터 신경을 보호하는데 있어서 천연 에리트로포이에틴만큼 효과적이었다. 도 8은 에리트로포이에틴과 무-시알산 에리트로포이에틴을 사용하여 투여

량-반응을 비교한 다른 국소 허혈증 모델의 결과를 나타낸다. 250U/kg의 가장 낮은 투여량에서, 개질되지 않은 에리트로포이에틴은 보호를 나타내지 않은 반면, 무-시알산 에리트로포이에틴은 보호를 제공하였다.

- <181> 실시예 5
- <182> 에리트로포이에틴의 주요 구조의 개질 및 신경 보호시 효율
- <183> 다수의 돌연변이 에리트로포이에틴 분자는 적혈구 에리트로포이에틴 수용체와 결합하지 않고, 따라서 생체내에서 또는 시험관내에서 적혈구 조혈 작용을 지지하지 않는 것으로 기재되어 있다. 그럼에도 불구하고, 이들 분자중 일부는 다른 조직 또는 기관에서 에리트로포이에틴 자체의 작용을 모방한다. 예를 들어, 천연 에리트로포이에틴의 31 내지 47번째 아미노산 서열을 함유하는 17량체는 적혈구 조혈 작용에 대해서는 불활성이지만 시험관 내에서 신경 세포에 대해서는 매우 활성이다(캠파나 & 오브라이언, 1998: Int. J. Mol. Med. 1:235-41).
- <184> 구아니딘화, 아미드화, 트리니트로페닐화, 아세틸화, 숙시닐화, 질화에 의해 또는 전술된 다른 절차 중에서 아르기닌 잔기 또는 카복실기의 개질에 의해, 특정 기관 및 조직에 대해서 그의 활성을 유지하지만 다른 기관 및 조직(예: 적혈구)에 대해서는 그렇지 않은 에리트로포이에틴을 생성시킴으로써, 본원에 기재된 용도에 바람직한 에리트로포이에틴 유도체를 제조할 수 있다. 에리트로포이에틴을 상기와 같이 반응시킬 때, 일반적으로 생성되는 분자가 생체내 및 시험관내 적혈구 조혈 활성을 나타내지 않는 것으로 밝혀졌다(예를 들어, 사타케 등; 1990, *Biochim. Biophys. Acta* 1038:125-9). 개질된 에리트로포이에틴의 몇몇 제조예가 아래에 기재된다.
- <185> 에리트로포이에틴의 유리 아미노기에서의 비오틴닐화. D-비오틴노일-e-아미노카프로산-N-하이드록시숙신이미드 에스테르(베링거 만하임(Boehringer Mannheim) #1418165) 0.2mg을 DMSO 100 $\mu$ l에 용해시켰다. 이 용액을, 호일로 덮은 관에서 에리트로포이에틴 약 0.2mg을 함유하는 PBS 400 $\mu$ l와 혼합하였다. 실온에서 4시간동안 배양한 후, 센트리콘(Centricon) 10 칼럼 상에서 겔 여과함으로써 반응되지 않은 비오틴을 분리시켰다. 도 10에서 볼 수 있는 바와 같이, 이 비오틴닐화 에리트로포이에틴은 혈청 회수로부터 P19 세포를 보호한다.
- <186> 워초스키 등의 문헌["Biotinylated recombinant human erythropoietins: Bioactivity and Utility as a receptor ligand", *Blood*, 1989, 74(3):952-8]에서, 저자는 에리트로포이에틴을 비오틴닐화시키는 세 가지 상이한 방법을 이용한다. 비오틴을 (1) 시알산 잔기, (2) 카복실레이트기, (3) 아미노기에 첨가한다. 저자는 (1) 시알산 잔기에 비오틴을 첨가해도 에리트로포이에틴의 생물학적 활성을 불활성화시키지 않고, (2) 카복실레이트기에 비오틴을 첨가하면 에리트로포이에틴이 실질적으로 생물학적으로 불활성화되며, (3) 아미노기에 비오틴을 첨가하면 에리트로포이에틴이 생물학적으로 완전히 불활성화됨을 입증하기 위하여 마우스 비장 세포 증식 분석법을 이용한다. 이들 방법 및 개질법은 본원에 모두 포함된다. 도 9는 혈청-결핍된 P19 분석법에서 비오틴닐화 에리트로포이에틴과 무-시알산 에리트로포이에틴의 활성을 도시하고 있다.
- <187> 에리트로포이에틴의 요오드화. 방법 1-요오도 비이드. 유리 Na<sup>125</sup>I 1mCi를 함유하는 PBS(20mM 인산나트륨, 0.15M NaCl, pH 7.5) 100 $\mu$ l에서 하나의 요오도 비이드(일리노이주 록포드 소재의 피어스 제품)를 5분간 배양하였다. 이어, PBS 100 $\mu$ l중 에리트로포이에틴 100  $\mu$ g을 이 혼합물에 첨가하였다. 실온에서 10분간 배양한 후, 반응 용기로부터 용액 200 $\mu$ l를 제거함으로써(요오도 비이드는 남김) 반응을 중지시켰다. 센트리콘 10 칼럼 상에서 겔 여과함으로써 과량의 요오드를 제거하였다. 도 11에 도시된 바와 같이, 이러한 방식으로 제조된 요오도-에리트로포이에틴은 혈청 회수로부터 P19 세포를 보호하는데 효과적이다.
- <188> 방법 2-클로라민 T. 에펜도르프 관에서 PBS 100 $\mu$ l중 에리트로포이에틴 100  $\mu$ g을 500  $\mu$ Ci Na<sup>125</sup>I에 첨가하고 함께 혼합하였다. 클로라민 T(2mg/ml) 25 $\mu$ l를 첨가하고, 혼합물을 실온에서 1분간 배양하였다. PBS중 클로라민 T 중단 완충액(2.4mg/ml 나트륨 베타비실레이트, 10mg/ml 티로신, 10% 글리세롤, 0.1% 크실렌)을 첨가하였다. 센트리콘 10 칼럼상에서 겔 여과함으로써 요오도티로신 및 요오드화 에리트로포이에틴을 분리하였다.
- <189> 리신 개질: 카바미드화: 플랩(Plapp) 등의 문헌["Activity of bovine pancreatic deoxyribonuclease A with modified amino groups", 1971, *J. Biol. Chem.* 246, 939-845]에 기재되어 있는 바와 같이 시알산칼륨으로 에리트로포이에틴(100  $\mu$ g)을 개질시켰다.
- <190> 트리니트로페닐화: 플랩 등의 문헌["Activity of bovine pancreatic deoxyribonuclease A with modified amino groups", 1971, *J. Biol. Chem.* 246, 939-845]에 기재되어 있는 바와 같이 2,4,6-트리니트로벤젠설포네이트로 에리트로포이에틴(100  $\mu$ g)을 개질시켰다.
- <191> 아세틸화: 에리트로포이에틴(100  $\mu$ g)를, 동량의 아세트산 무수물을 함유하는 0.3M 포스페이트 완충액(pH 7.2)중

에서 0℃에서 1시간동안 배양시켰다. 증류수에 대해 투석시킴으로써 반응을 중단시켰다.

- <192> 숙시닐화: 0.5M NaHCO<sub>3</sub> 완충액(pH 8.0)중 에리트로포이에틴(100 μg)를, 15몰 과량의 숙신산 무수물을 사용하여 15℃에서 1시간동안 배양시켰다. 증류수에 대해 투석시킴으로써 반응을 중단시켰다.
- <193> 아르기닌 개질: 리오르단의 문헌["Functional arginyl residues in carboxypeptidase A. Modification with butanedione", Riordan JF, Biochemistry 1973, 12(20):3915-3923]에 기재된 바와 같이 2,3-부탄디온으로 에리트로포이에틴을 개질시켰다.
- <194> 패티(Patthy) 등의 문헌["Identification of functional arginine residues in ribonuclease A and lysozyme", Patty, L, Smith EL, J. Biol. Chem 1975, 250(2):565-9]에 기재된 바와 같이 사이클로헥사논으로 에리트로포이에틴을 개질시켰다.
- <195> 워버 등의 문헌["Proceedings: Carboxypeptidase B: modification of functional arginyl residues" Werber, MM, Sokolovsky M, Isr. J. Med. Sci. 1975 11(11):1169-70]에 기재되어 있는 바와 같이 페닐글리옥살로 에리트로포이에틴을 개질시켰다.
- <196> 티로신 개질: 네슬러(Nestler) 등의 문헌["Stimulation of rat ovarian cell steroidogenesis by high density lipoproteins modified with tetranitromethane", Nestler JE, Chacko GK, Strauss JF 3rd., J. Biol. Chem. 1985년 6월 25일; 260(12):7316-21]에 기재되어 있는 바와 같이 테트라니트로메탄을 사용하여 에리트로포이에틴(100 μg)를 배양하였다.
- <197> 글루탐산(및 아스파르트산) 개질: 카복실기를 개질시키기 위하여, 캐러웨이(Carraway) 등의 문헌["Carboxyl group modification in chymotrypsin and chymotrypsinogen." Carraway KL, Spoerl P, Koshland DE Jr., J. Mol. Biol. 1969년 5월 28일; 42(1):133-7]에 기재되어 있는 바와 같이 1M 글리신아미드(pH 4.5)중 0.02M EDC를 사용하여 실온에서 에리트로포이에틴(100 μg)를 60분간 배양하였다.
- <198> 트립토판 잔기 개질: 알리(AlI) 등의 문헌[J. Biol. Chem. 1995년 3월 3일; 270(9):4570-4]에 기재되어 있는 바와 같이 20mM 인산칼륨 완충액(pH 6.5)중 20 μM n-브로모숙신아미드를 사용하여 실온에서 에리트로포이에틴(100 μg)를 배양하였다.
- <199> 아미노기의 제거: 아미노기를 제거하기 위하여, 코키니(Kokkini, G.) 등의 문헌["Modification of hemoglobin by ninhydrin", Blood, Vol. 556, No. 4 1980:701-705]에 기재되어 있는 바와 같이 20mM 닌하이드린(일리노이주 록포드 소재의 피어스 케미칼 제품)을 함유하는 PBS(pH 7.4) 중에서 37℃에서 에리트로포이에틴(100 μg)를 2시간동안 배양시켰다. 생성물을 나트륨 보로하이드라이드 또는 리튬 알루미늄 하이드라이드와 반응시킴으로써, 생성된 알데히드를 환원시켰다. 구체적으로는, 실온에서 PBS중 0.1M 나트륨 보로하이드라이드를 사용하여 에리트로포이에틴(100 μg)를 30분간 배양시켰다. 샘플을 얼음상에서 10분간 냉각시키고, 이를 PBS에 대해 하룻밤동안 3회 투석시킴으로써 환원을 종결시켰다. (코키니, Blood, Vol. 556, No. 4, 1980:701-705). PBS중 0.1M 리튬 알루미늄 하이드라이드를 사용하여 실온에서 30분간 에리트로포이에틴(100 μg)를 배양시킴으로써 리튬 알루미늄 하이드라이드에 의해 환원시켰다. 샘플을 얼음상에서 10분간 냉각시키고 이를 PBS에 대해 하룻밤동안 3회 투석시킴으로써 환원을 종결시켰다.
- <200> 디설파이드 환원 및 안정화: 500mM DTT를 사용하여 에리트로포이에틴(100 μg)를 60℃에서 15분간 배양하였다. 이어, 물중 20mM 요오도아세트아미드를 혼합물에 첨가하고, 어두운 곳에서 실온에서 25분간 배양하였다.
- <201> 제한된 단백질 가수분해: 에리트로포이에틴에 대해 특정 잔기를 표적으로 하는 제한된 화학적 단백질 가수분해를 실시할 수 있다. 질소 압력하에 뚜껑을 막은 관에서, 50% 아세트산중 50배 과량의, 트립토판 잔기 뒤를 특이적으로 절단하는 2-(2-니트로페닐설페닐)-3-메틸-3'-브로모인돌레린과 에리트로포이에틴을 어두운 곳에서 실온에서 48시간동안 반응시켰다. 트립토판으로 급냉시키고 탈염시킴으로써 반응을 종결시켰다.
- <202> 실시예 6
- <203> 말초 혈관을 통해 투여된 에리트로포이에틴에 의한 망막 허혈증의 보호
- <204> 허혈 스트레스를 받은 지 30분 후에 다수의 세포가 사멸할 정도로 망막 세포는 허혈증에 대해 매우 민감하다. 또한, 당뇨병, 녹내장 및 황반 변성과 같은 다수의 통상적인 인간 질환에 수반되는 시력 저하에는 아급성 또는 만성 허혈증이 잠재되어 있다. 현재, 허혈증으로부터 세포를 보호하는 효과적인 치료법이 없는 상태이다. 혈액과 망막 사이에는 대부분의 큰 분자를 차단하는 치밀 내피 세포 장벽이 존재한다. 말초 혈관을 통해 투여된

에리트르포이에틴이 허혈증에 민감한 세포를 보호할 것인지를 시험하기 위하여, 로젠바움 등의 문헌[1997; *Vis. Res.* 37:3443-51]에 기재되어 있는 바와 같이 급성 가역성 녹내장 래트 모델을 이용하였다. 구체적으로, 염수를 다 큰 숫컷 래트의 눈의 전실에 전신 동맥 혈압보다 높은 압력까지 주입한 다음 60분간 유지시켰다. 허혈증을 유도하기 24시간 전에 동물에게 염수 또는 체중 1kg당 5000U의 에리트르포이에틴을 복강내 투여하고, 3일간 더 매일 계속 투여하였다. 처치한지 1주일 후에 어둠에 익숙해진 래트에 대해 망막전위도검사를 수행하였다. 도 11 및 도 12는 염수만으로 처리된 동물(패널 C)(기능이 거의 유지되지 않음)과는 대조적으로, 에리트르포이에틴을 투여한 동물에서는 망막전위도(ERG)가 양호하게 보존된 것으로 보인다(패널 D). 도 11에서는 에리트르포이에틴으로 치료된 군과 염수로 처리한 군의 전위도 a- 및 b-파 진폭을 비교하고, 에리트르포이에틴에 의해 상당한 보호가 제공되었음을 보여준다.

<205> 실시예 7

<206> 뇌 손상으로 인해 감소된 인지 기능에 대한 에리트르포이에틴의 회복 효과

<207> 뇌 외상을 입은 마우스의 감소된 인지 기능을 회복시키는 에리트르포이에틴의 능력을 입증하는 연구에서는, 브린즈 등의 문헌[PNAS 2000, 97:10295-10672]에 기재된 바와 같이 암컷 Balb/c 마우스에게 둔기 뇌 외상을 입히고, 5일 후에 체중 1kg당 5000U의 에리트르포이에틴을 매일 복강내로 투여하기 시작하였다. 손상을 받은 지 12일 후에, 매일 4회씩 모리스(Morris) 물 미로에서 동물의 인지 기능을 시험하였다. 치료된 동물과 치료되지 않은 동물이 이 시험에서 불량하게 행동하지만(가능한 90초 동안 약 80초간 수영함), 도 13은 에리트르포이에틴로 치료된 동물이 보다 양호하게 행동하였음을 보여준다(이 도면에서는, 마이너스 값이 더 우수한 것이다). 에리트르포이에틴 치료가 외상을 입은 지 30일 후까지 지연되는 경우에도(도 14), 인지 기능의 회복이 보인다.

<208> 실시예 8

<209> 카이네이트 모델

<210> 카이네이트 신경독성 모델에서는, 브린즈 등의 문헌[Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 2000, 97:10295-10672]에 기재된 방법에 따라, 25mg/kg 카이네이트를 투여하기 24시간 전에 체중 1kg당 5000U의 투여량으로 복강내 투여된 무-시알산 에리트르포이에틴이 사망까지의 시간에서 볼 수 있듯이 에리트르포이에틴만큼 효과적임을 보여준다(도 15).

<211> 본 발명은 본 발명의 개별 양태의 일례로서 기재된 특정 실시태양에 의해 그 범위가 한정되지 않으며, 기능적으로 동등한 방법 및 성분은 본 발명의 영역에 속한다. 실제로, 당해 분야의 숙련자는 상기 상세한 설명 및 첨부도면으로부터 본원에 기재되고 도시된 것에 덧붙여 본 발명을 다양하게 변형시킬 수 있음을 명확히 알 것이다. 이러한 변형은 첨부된 청구의 범위의 영역에 속한다.

<212> 본원에 인용된 모든 참조문헌은 본원에 참고로 인용되어 있다.

**도면의 간단한 설명**

<213> 도 1은 뇌척수액 내로 비경구 투여된 에리트르포이에틴의 이동을 도시한다.

<214> 도 2는 일시적인 혈관 폐색 후 에리트르포이에틴에 의해 허혈성 손상으로부터 심근층을 보호함을 도시한다.

<215> 도 3은 이식을 위해 준비된 심장의 기능을 에리트르포이에틴에 의해 유지함을 도시한다.

<216> 도 4는 혈청-결핍된 P19 세포의 생존에 대한 에리트르포이에틴 및 무-시알산 에리트르포이에틴의 시험관내 효율을 비교한다.

<217> 도 5는 혈청-결핍된 P19 세포의 생존에 대한 에리트르포이에틴 및 무-시알산 에리트르포이에틴의 시험관내 효율을 비교하는 다른 실험이다.

<218> 도 6은 혈청-결핍된 P19 세포의 생존에 대한 에리트르포이에틴 및 페닐글리옥살-개질된 에리트르포이에틴의 시험관내 효율을 비교한다.

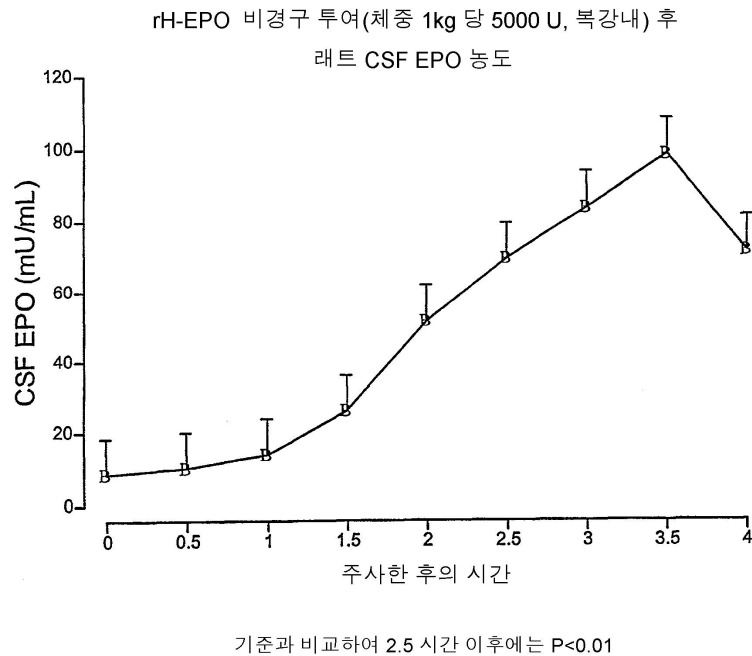
<219> 도 7은 래트 국소성 대뇌 허혈증 모델에서의 에리트르포이에틴 및 무-시알산 에리트르포이에틴의 보호를 도시한다.

<220> 도 8은 허혈성 발작 모델에서 중대뇌 동맥 폐색시 인간의 에리트르포이에틴 및 인간의 무-시알산 에리트르포이에틴의 효율을 비교하는 투여량 반응을 도시한다.

- <221> 도 9는 P19 분석에서 비오틴화 에리트로포이에틴 및 무-시알산 에리트로포이에틴의 효과를 도시한다.
- <222> 도 10은 P19 분석에서 요오드화된 에리트로포이에틴의 활성을 도시한다.
- <223> 도 11은 래트의 녹내장 모델에서 에리트로포이에틴 치료의 효과를 도시한다.
- <224> 도 12는 래트의 녹내장 모델에서 에리트로포이에틴에 의한 망막 기능의 보존 정도를 도시한다.
- <225> 도 13은 외상을 입은지 5일 후에 시작되는 에리트로포이에틴의 투여에 의한, 뇌 외상 후 인지 기능의 회복을 도시한다.
- <226> 도 14는 외상을 입은지 30일 후에 시작되는 에리트로포이에틴의 투여에 의한, 뇌 외상 후 인지 기능의 회복을 도시한다.
- <227> 도 15는 대뇌 독성의 카이네이트(kainate) 모델에서 인간의 무-시알산 에리트로포이에틴의 효율을 도시한다.

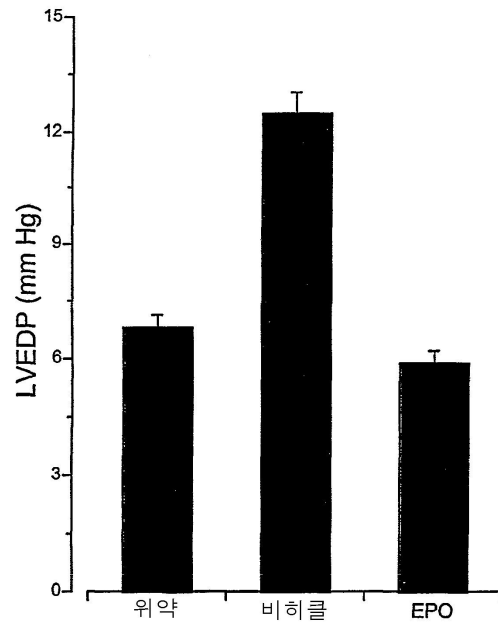
**도면**

**도면1**

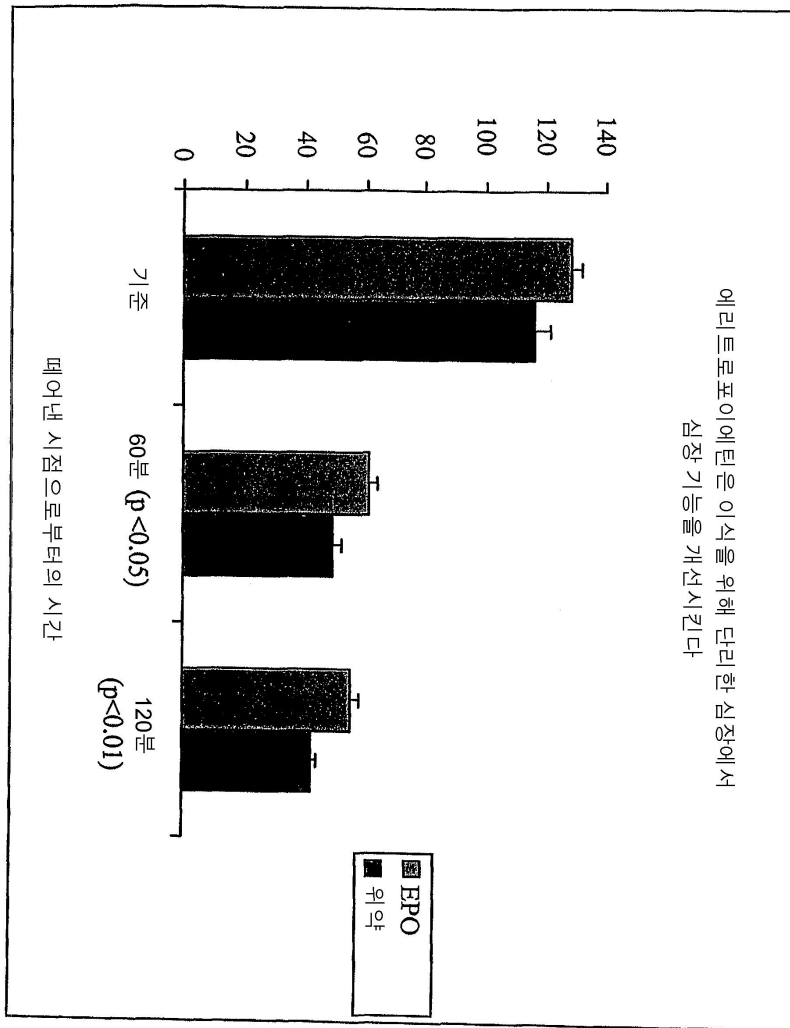


도면2

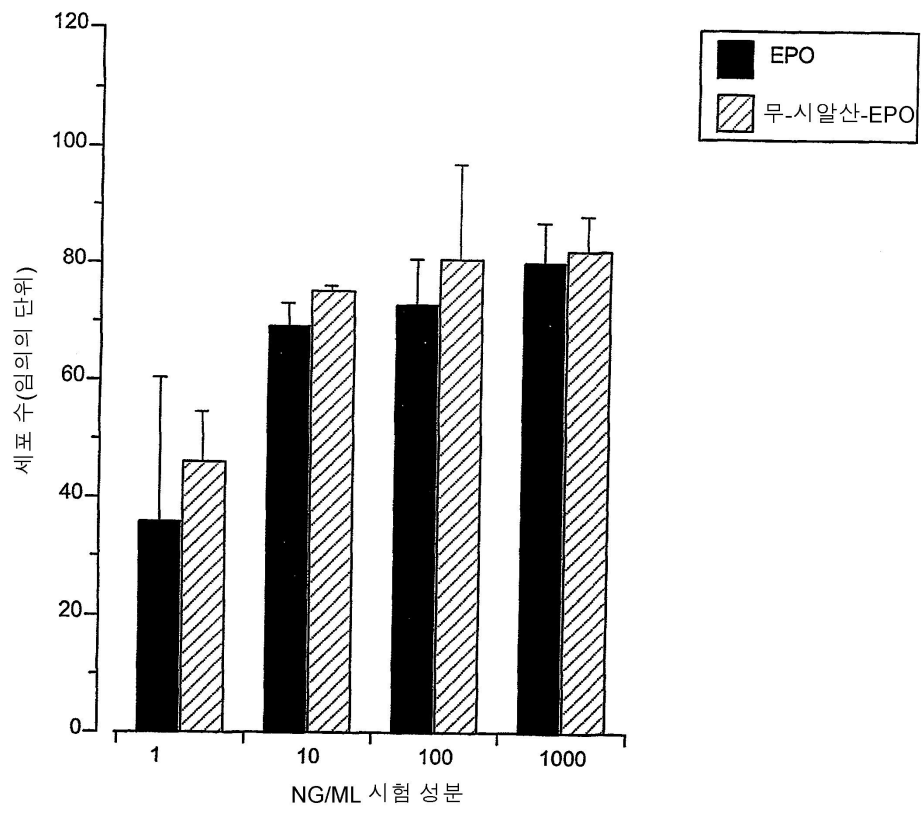
30분간의 허혈이 있는지 7일 후의 래트 심장



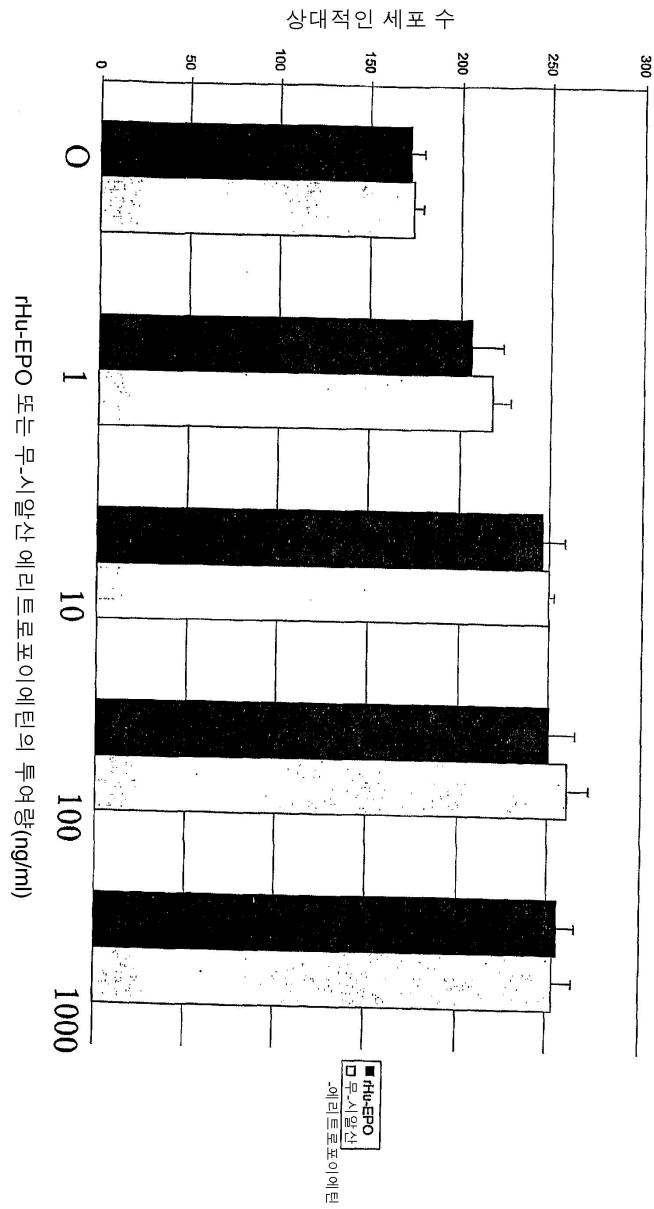
도면3



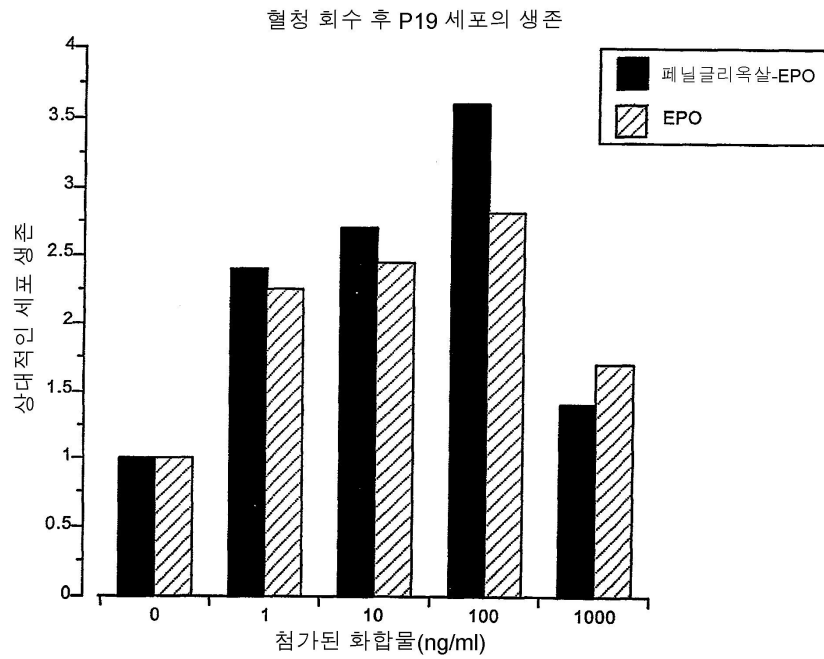
도면4



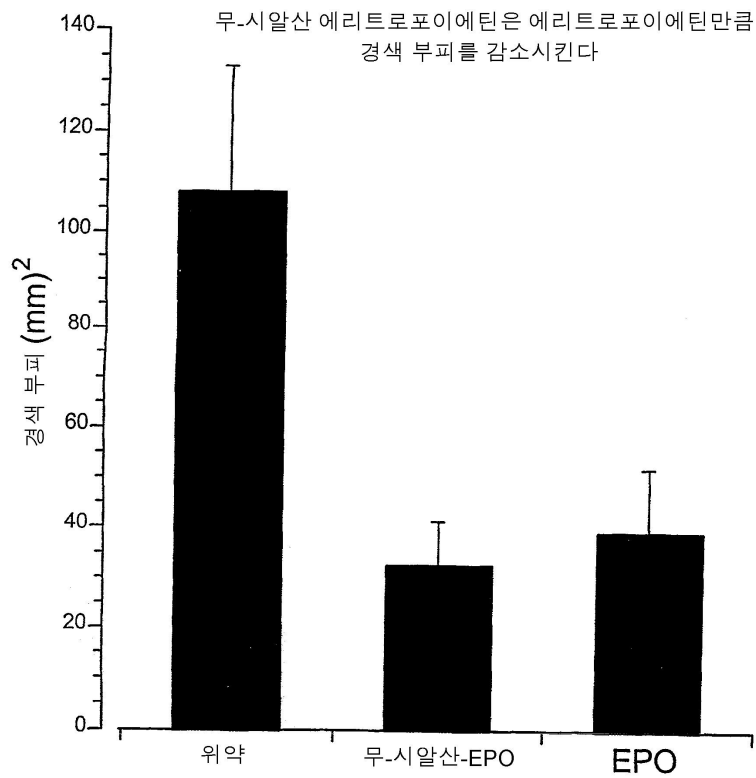
도면5



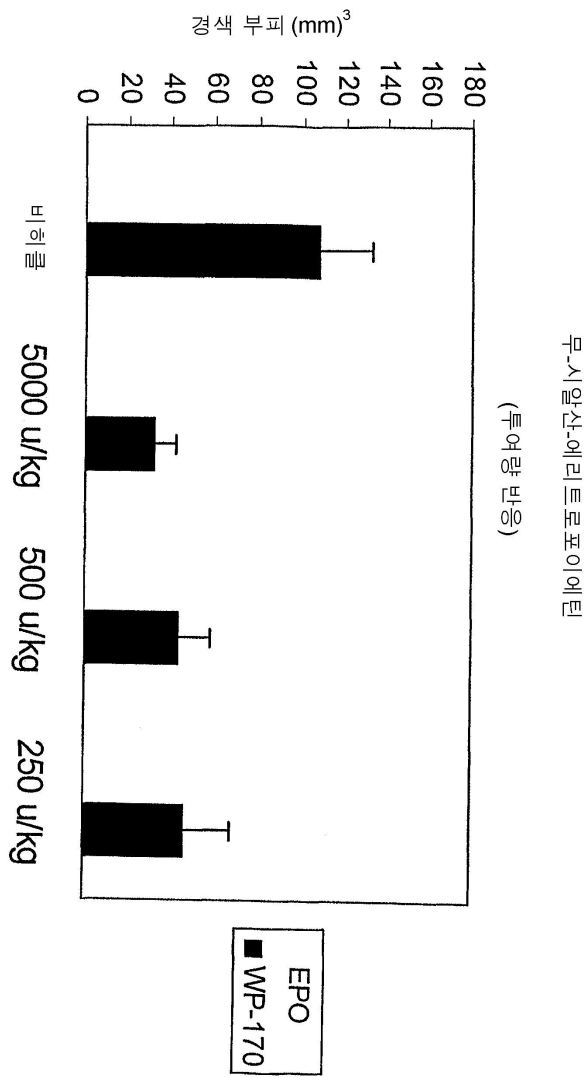
도면6



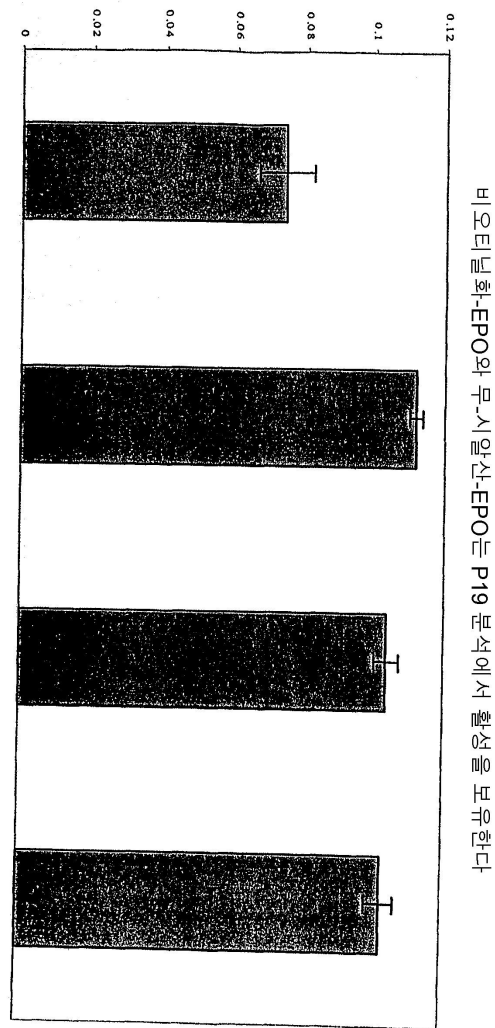
도면7



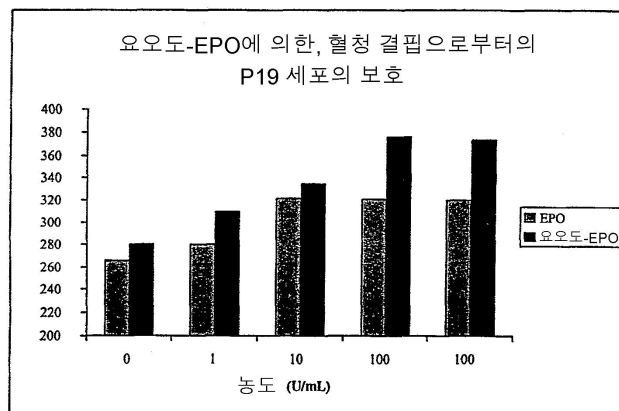
도면8



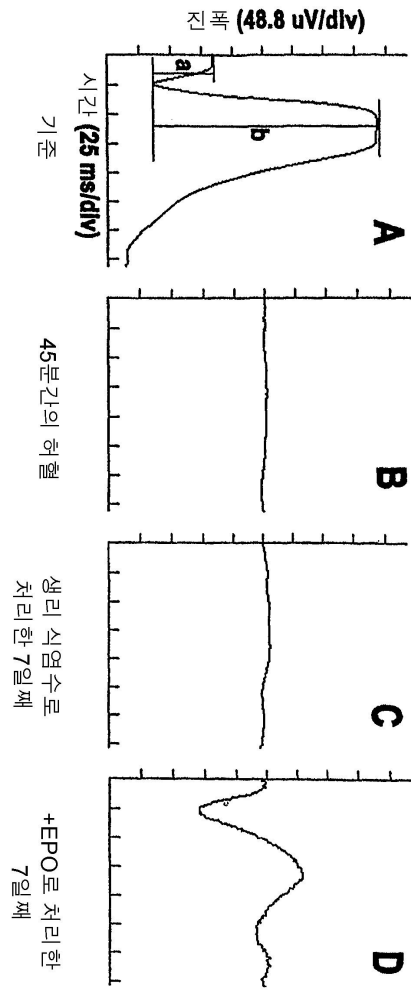
도면9



도면10

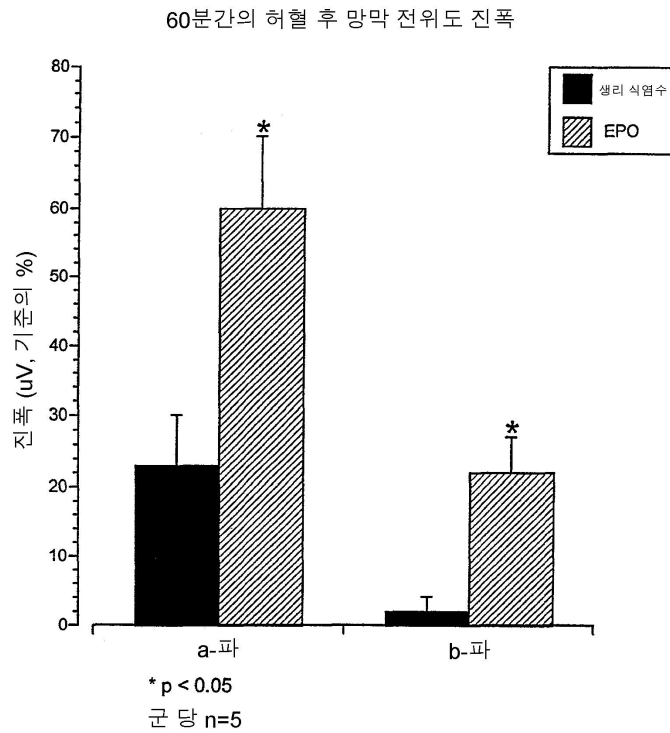


도면11

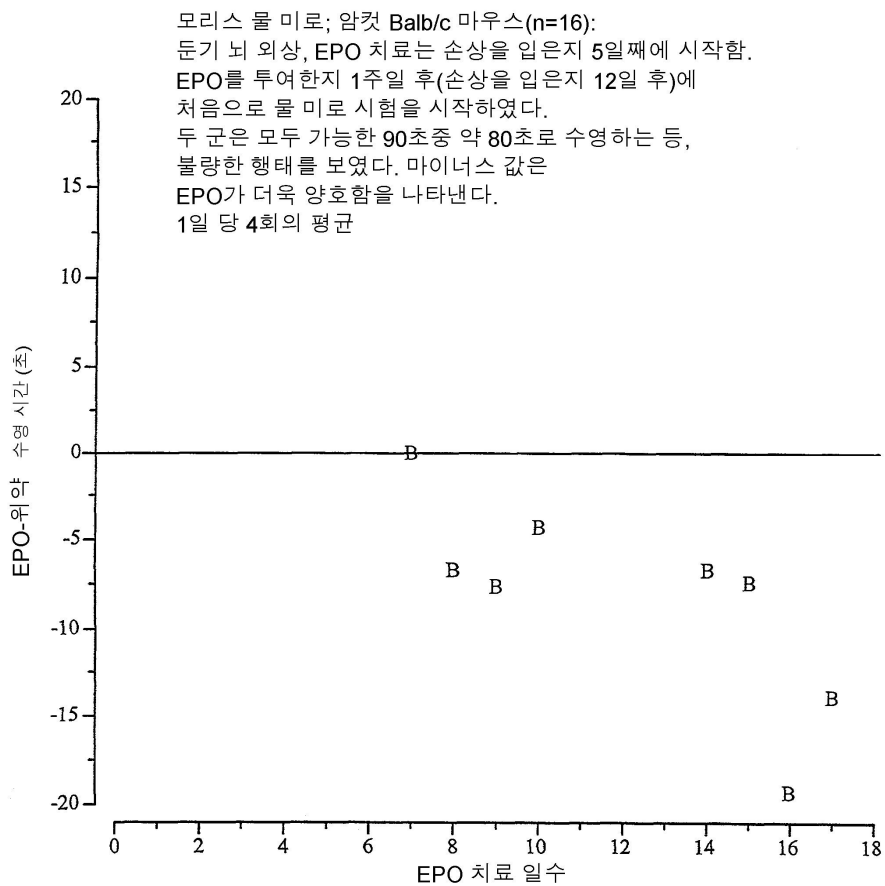


60분간 저혈된 래트의 망막 전위도

도면12

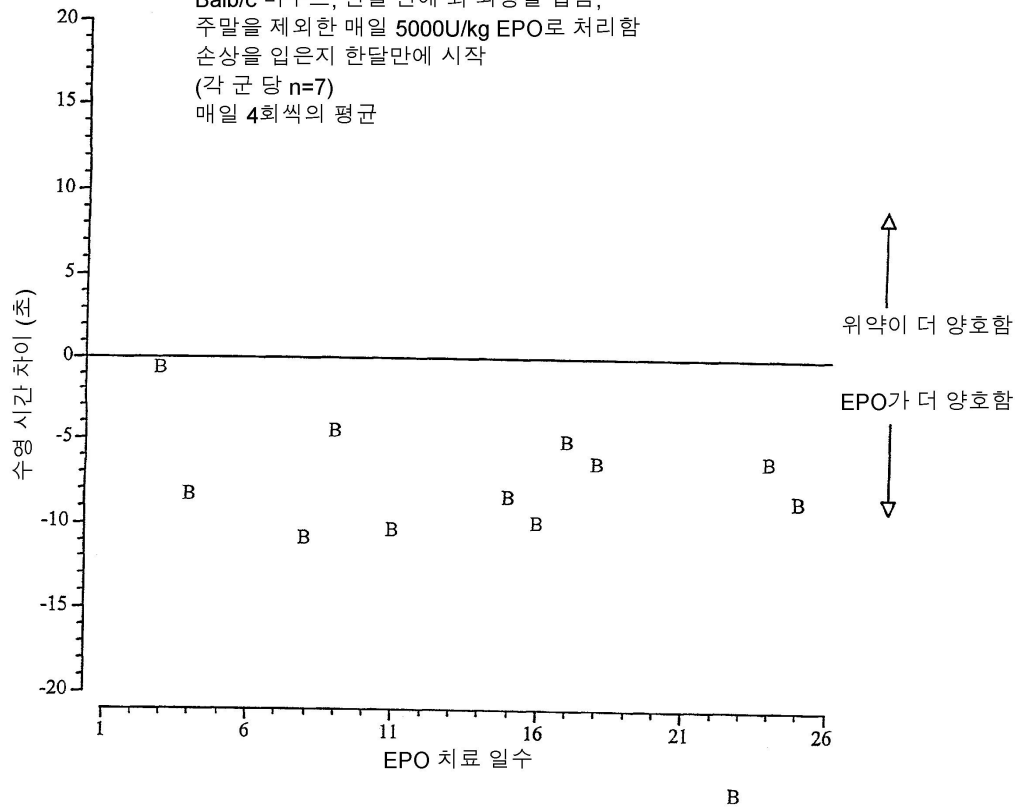


도면13



도면14

모리스 물 미로의 플랫폼까지의 수영 시간의 차이:  
 Balb/c 마우스; 한달 전에 뇌 외상을 입음,  
 주말을 제외한 매일 5000U/kg EPO로 처리함  
 손상을 입은지 한달만에 시작  
 (각 군 당 n=7)  
 매일 4회씩의 평균



도면15

