(19)대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(51) 。Int. Cl.[7]
A61K 47/48

(45) 공고일자 2003년09월02일
(11) 등록번호 10-0396983
(24) 등록일자 2003년08월22일

(21) 출원번호 10-2000-0044046
(22) 출원일자 2000년07월29일

(65) 공개번호 특2002-0010363
(43) 공개일자 2002년02월04일

(73) 특허권자 이강춘
서울 강남구 논현2동 86-12

박명옥
서울 노원구 하계2동 학여울청구아파트 107동 1403호

(72) 발명자 박명옥
서울 노원구 하계2동 학여울청구아파트 107동 1403호

조성희
서울특별시영등포구신길7동948

이강춘
서울 강남구 논현2동 86-12

(74) 대리인 이원희

심사관 : 백경업

(54) 고반응성의 가지 달린 고분자 유도체 및 고분자와 단백질또는 펩타이드의 접합체

요약

본 발명은 새로운 생체적합성 고분자 유도체 및 그 생체적합성 고분자 유도체가 생물학적으로 활성을 갖는 단백질(protein) 또는 펩타이드(peptide)와 결합하여 얻어지는 단백질-고분자 또는 펩타이드-고분자 접합체에 관한 것으로서, 보다 구체적으로는 생체적합성 고분자를 활성화하여 얻어지는 고반응성의 가지달린(branched) 고분자 유도체를 얻고 그 유도체에서 단백질에 연결되는 연결쇄를 길게함으로써, 얻어지는 단백질-고분자 또는 펩타이드-고분자 접합체는 고분자 유도체가 단백질의 생리활성 부위에 결합하는 수가 적게되어 단백질의 생리활성 감소를 최소화하면서 생체내 용해도를 증가시키고, 생체내 효소에 의한 분해로부터 분자구조의 보호를 최대화시켜서 단백질의 체내활성이 장시간 유지되므로 활성 단백질 또는 펩타이드의 생체 이용율을 극대화시킨다.

대표도

도 4

명세서

도면의 간단한 설명

도 1 은 고분자 유도체에 의해 수식되지 아니한 인터페론의 HPLC를 수행한 결과에 대한 그래프이며,

도 2 는 Di-PEG 5000와 반응한 인터페론(IFN)의 HPLC 결과에 대한 그래프이며,
1: Di-PEG-IFN, 2: Mono-PEG-IFN, 3: 고분자 수식이 되지 아니한 IFN(unreacted IFN)
도 3 은 Di-PEG 20000과 반응한 IFN의 HPLC 결과에 대한 그래프이며,
1: Mono-PEG-IFN, 2: 고분자 수식이 되지 아니한 IFN
도 4 는 Tri-PEG 5000과 반응한 IFN의 HPLC 결과에 대한 그래프이며,
1: Di-PEG-IFN, 2: Mono-PEG-IFN, 3: 고분자 수식이 되지 아니한 IFN
도 5 는 Tri-PEG 20000과 반응한 IFN의 HPLC 결과에 대한 그래프이다.
1: Di-PEG-IFN, 2: Mono-PEG-IFN, 3: 고분자 수식이 되지 아니한 IFN

발명의 상세한 설명

발명의 목적

발명이 속하는 기술 및 그 분야의 종래기술

본 발명은 새로운 생체적합성 고분자 유도체 및 그 생체적합성 고분자 유도체가 생물학적으로 활성을 갖는 단백질(protein) 또는 펩타이드(peptide)와 결합하여 얻어지는 단백질-고분자 또는 펩타이드-고분자 접합체에 관한 것으로서, 보다 구체적으로는 생체적합성 고분자를 활성화하여 얻어지는 고반응성의 가지달린(branched) 고분자 유도체를 얻고 그 유도체에서 단백질에 연결되는 연결쇄를 길게함으로써, 얻어지는 단백질-고분자 또는 펩타이드-고분자 접합체는 고분자 유도체가 단백질의 생리활성 부위에 결합하는 수가 적게되어 단백질의 생리활성 감소를 최소화하면서 생체내 용해도를 증가시키고, 생체내 효소에 의한 분해로부터 분자구조의 보호를 최대화시켜서 단백질의 체내활성이 장시간 유지되므로 활성 단백질 또는 펩타이드의 생체 이용율을 극대화시키는 고분자 유도체에 관한 것이다.
일반적으로 호르몬(hormone), 사이토카인(cytokine)과 같은 다양한 펩타이드 또는 단백질이 체내에서 중요한 역할을 하고 있다는 것은 잘 알려진 사실이다. 또한 최근에는 대량 합성법이나 유전 공학에 의해 대량 생산이 가능해짐으로써, 다양한 단백질이나 펩타이드들이 의약품으로 사용되고 있다.
그러나, 이러한 펩타이드 또는 단백질을 의약품으로 사용하는 데는 많은 문제점이 있다. 이러한 문제점으로서, 첫째는 체내 투여 후 쉽게 가수분해되거나 효 소에 의해 단시간에 파괴되어 흡수율이 극히 낮게 된다는 것이고, 둘째는 반복적으로 투여되면 면역 반응이 자주 유도되어 생성된 항체의 생리활성 중화작용으로 인해 생명을 위협할 정도의 과민반응(hypersensitivity)이 유발될 뿐만 아니라 망상세포의 내피계(reticuloendothelial system, RES)에 의한 소실(clearance)이 증가하게 된다는 것이다.
이러한 이유로 대부분의 단백질 또는 펩타이드 약물은 현재까지 주로 주사제로서 투여되었으며, 투여횟수는 1일 1회 또는 그 이상의 빈도로 투여되어왔다. 그러나, 이러한 약물의 빈번한 투여는 환자에게 고통을 줄 뿐 아니라 위험을 수반하며, 특히 장기간 치료가 필요한 환자에게 있어서는 양질의 생활을 유지하기가 어려웠다. 따라서, 상기와 같은 문제점이 개선된 보다 안정성 있는 약물의 개발이 요구되고 있다.
단백질 또는 약리 활성을 가진 분자를 합성 고분자와 결합시키는 것은 생체 내(*in vivo*)및 생체 외(*in vitro*) 적용시에 많은 이점을 제공할 수 있다. 생리활성 분자에 대한 고분자의 공유결합은 분자의 표면특성 및 용해성을 변화시켜서, 물 또는 유기용매에 대한 용해성을 증가시킬 수 있다. 또한, 생체적합성(biocompatibility)을 증가시켜서 면역반응성을 감소시키며, 생체 내에서의 안정성을 증가시킬 뿐만 아니라 장관 시스템, 신장(kidney), 비장(spleen) 또는 간(liver)에 의한 소실(clearance)을 연장시킬 수 있다. 따라서, 펩타이드에 고분자를 수식하는 것은 용액 내에서의 안정성을 증가시킬 수 있으며, 펩타이드의 내 인성(intrinsic) 표면 특성을 효과적으로 보호할 수 있어 비특이적 단백질 흡착을 방지할 수 있다.
이에 생물학적으로 활성이 있는 펩타이드나 단백질 물질에 PEG를 결합시켜 체내 반감기를 연장하고 용해도를 증가시키며 체내에서의 면역 반응을 감소시키는 효과에 대한 연구가 진행되었다.
미국특허 제4179337호는 단백질과 폴리펩타이드(polypeptide)를 분자량이 500 ~ 20,000정도의 폴리에틸렌 글리콜(polyethylene glycol, 이하 PEG라 한다) 또는 수용성 폴리머(polymer)에 결합시켜 생물학적 활성을 유지하면서 항원성과 항면역성이 감소된 단백질-고분자 결합체에 대해 언급하였다. 또한 미국특허 제4301144호는 헤모글로빈(hemoglobin)을 PEG나 수용성 폴리머와 결합하였을 때 산소 운반능이 증가됨을 기재하고 있다.
아부초스키 등(Abuchowski *et al* ., *Cancer Biochem. Biophys* ., 7, 175-186, 1984)은 PEG와 결합된 여러 가지 단백질들이 혈장에서 체내 반감기가 증가되고 면역원성이 감소됨을 증명하였으며, 또한 데이비스 등(Davis *et al* ., *Lancet* , 2, 281-283, 1981)은 유리카제(uricase)가 PEG와 결합하면 체내 반감기가 증가되고 요산의 대사시 부작용이 감소됨을 증명하였다.
단백질 또는 폴리펩타이드에 PEG를 결합시키기 위하여 여러 가지 방법이 있 는데, 단백질 또는 폴리펩타이드의 아미노(amino) 잔기, 올리고당 또는 히드록시기에 활성화된 PEG를 반응시키는 방법이 있다.
활성화된 PEG와 결합하는 단백질 또는 폴리펩타이드의 아미노 잔기로는 라이신(lysine)기와 N-말단을 들 수 있으며, PEG를 활성화시키는 방법은 다음과 같다. PEG의 한쪽 하이드록시기(hydroxy group)를 메칠에테르기(methyl ether group)로 치환시키고, 나머지 한쪽 하이드록시기에 친전자성 물질(electrophile)을 함유한 작용기를 결합시킨다.

활성화된 고분자의 예로는 아마이드 결합(amide bond)을 가진 PEG-N-하이드록시석신이미드-활성화된 에스테르(PEG-N-Hydroxysuccinimide-activated esters), 알킬 결합(alkyl bond)을 가진 PEG-에폭사이드(PEG-epoxide)와 PEG-트레실레이트(PEG-tresylate), 우레탄 결합(urethane bond)을 가진 PEG-카보닐 이미다졸(PEG-carbonyl imidazole)과 PEG-니트로페닐 카보네이트(PEG-nitrophenyl carbonates), N-말단에 쉬프 베이스(Schiff's base)를 가진 PEG-알데하이드(PEG-aldehyde) 등이 있다.
그러나, 단백질 및 폴리펩타이드에는 라이신 잔기가 무작위적으로 존재하므로 아미노기에 반응하는 PEG를 사용하게 되면 PEG가 비특이적으로 결합하게 되어 불균일한 혼합물이 된다. 따라서, 최근에는 균일한 PEG 결합체를 만들기 위해 단백질 또는 폴리펩타이드의 시스테인(cysteine)기, 올리고당(oligo sugar), 하이드록시기, 아르기닌(arginine)기 등 목적하는 특정부위에 PEG를 결합시키는 방법들이 시도되고 있다.
단백질 또는 폴리펩타이드의 시스테인기에 특이적으로 반응하는 PEG 유도체로는 PEG-비닐 설폰(vinyl sulphone), PEG-아이오도아세트아마이드(iodoacetamide), PEG-말레이미드(maleimide), PEG-오르소피리딜 디설파이드(orthopyridyl disulfide) 등이 있으며, 주로 말레이미드(maleimide)를 함유한 PEG를 이용하는 방법이 많이 쓰이고 있다. PEG-비닐 설폰은 수용액 상에서 안정성이 가장 좋으며, PEG-오르소피리딜 디설파이드는 디설파이드 결합을 가지고 있어 가역적으로 체내에서 분해될 수 있다. 이러한 유도체들을 이용한 펩타이드의 예로는 인터루킨-3(interleukin-3) 및 인터루킨-2(interleukin-2) 등이 있다.
단백질 또는 폴리펩타이드의 올리고당에 특이적으로 반응하는 PEG 유도체로는 알데하이드(aldehyde)를 함유한 물질과 반응하여 비교적 안정한 히드라존(hydrazone) 결합을 형성할 수 있는 PEG-히드라자이드(hydrazide)를 들 수 있다. PEG-히드라자이드는 특히 당단백질(glycoprotein)의 당부위에 특이적으로 결합하는 특징을 가지고 있어 특정부위 결합을 위한 목적으로 많이 쓰인다.
단백질 또는 폴리펩타이드의 하이드록시기에 특이적으로 반응하는 PEG 유도체로는 PEG-이소시아네이트(PEG-isocyanate)를 들 수 있으며, 단백질 또는 폴리펩타이드의 아르기닌기에 PEG를 결합시킬 때는 구아니디노(guanidino)기에 잘 반응하 는 페닐글리옥살(phenylglyoxal)을 함유한 PEG 유도체가 사용된다.
일반적으로 단백질을 수식하는 모노메톡시 폴리에틸렌 글리콜(monomethoxy- polyethylene glycol, 이하 "mPEG"이라 함)은 선형 고분자로서 분자량은 1,000 내지 25,000 정도의 것이 사용되고 있다. 그런데, 단백질 또는 펩타이드의 생리활성 부위는 한정되어 있으므로, 활성을 유지하면서 다수의 선형 고분자를 상기 단백질 등에 접합시키는 데에는 한계가 있다. 특히 저분자량의 단백질 등의 경우 상대적으로 생리활성부위가 적어 고분자의 접합에 의해 급격히 활성이 저하되는 등의 문제가 있다. 이에 단백질의 활성을 유지하면서 다수의 고분자 물질을 결합시키는 방법에 대한 연구가 진행되었다. 우선, 분자량 20,000 이상의 선형 고분자를 접합시키는 방법이 시도되었는데, 분자량 20,000 이상의 선형 고분자를 접합시킴으로써 종래의 분자량 1,000 내지 25,000의 선형 고분자를 결합시키는 것보다 체내 반감기는 연장시킬 수 있으나, 이와 같이 생성된 접합체는 그 수율이 극히 낮은 것이 확인되었으며 그로인해 경제적이지 못하다는 단점이 있다.
상기와 같은 선형의 고분자를 접합시키는 방법의 이용에는 한계가 있으므로, 이를 극복하기 위하여 가지달린 mPEG를 접합시키는 방법이 모색되었는데, 이러한 방법은 와나 (Wana, H et al., 'Antitumor enzymes: polyethylene glycol-modified asparaginase', *Ann. N.Y. Acad.* Sci. 613, 95-108, 1990) 등의 보고에 따른 것으로서, 트리 클로로 트리아진(trichlorotriazine)을 이용하여 가지 달린 mPEG 유도체를 단백질에 접합하는 것이 기재되어 있다.
또한, 야마사키 (yamasaki, N. et al., *Agric. Biol. Chem.* , **52** , 2125-2127, 1988) 등은 노르루신(norleucine)을 가지 달린 mPEG 합성에 이용함으로써 분석을 용이하게 한 바 있다. 상기 야마시키 방법은 아미노산 분석방법으로 노르루신을 측정함으로써 고분자 물질과 단백질의 결합정도를 용이하게 측정할 수 있다는 장점이 있다.
그러나 상기한 바와 같은 활성화된 가지 달린 고분자들은 그 크기가 거대하여 수식된 단백질의 표면에 입체적 장애(steric hindrance)를 유발함으로써 단백질의 반응성을 저하시키고 수율을 떨어뜨리는 문제가 있다.
이에 본 발명자는 가지 달린 고분자와 단백질을 연결하는 연결쇄(linker)를 길게 함으로써, 생리활성부위에 결합하는 수를 최소화하고 가지달린 고분자에 의한 입체적 장애를 감소시키면서도 단백질의 구조 보호를 극대화하여 생리활성의 감소를 최소화할 수 있음을 발견하여 본 발명을 완성하게 되었다.

발명이 이루고자 하는 기술적 과제

본 발명은 단백질과 결합하는 연결쇄를 길게한 가지달린 생체적합성 고분자 유도체를 제공함으로써, 단백질 또는 펩타이드에 결합하는 고분자의 수를 최소화하고, 또한 단백질 활성부위에 가해지는 입체적 장애를 감소시켜 단백질 또는 펩타이드의 활성을 최적으로 유지하면서도 단백질 또는 펩타이드의 용해도 및 체내 안정성이 극대화된 단백질-고분자 또는 펩타이드-고분자 접합체를 제공하는 것을 목적 으로 한다.

발명의 구성 및 작용

상기 목적을 달성하기 위해, 본 발명은 연결쇄를 길게 한 가지달린 생체적합성 고분자 유도체를 제공하고, 이러한 고분자 유도체를 생물학적 활성 단백질 또는 펩타이드와 결합시킨 단백질-고분자 또는 펩타이드-고분자 접합체를 제공한다.
이하, 본 발명을 상세히 설명한다.
본 발명은 연결쇄를 길게 한 가지달린 생체적합성 고분자 유도체를 제공한다.

본 발명의 생체적합성 고분자 유도체는 하나 또는 그 이상의 생체적합성 고분자가 결합된 가지달린 구조를 갖는 활성화된 고분자이다. 우선 생체적합성 고분자를 활성화하고, 활성화된 고분자로부터 하나의 활성화된 고분자 가지를 갖는 고분자 유도체(Di-고분자 유도체)를 합성하고, 상기 고분자 가지가 결합하는 가지점(branched point)에 단백질 또는 펩타이드에 접합하는 연결쇄로 긴 사슬의 생체적합성 고분자를 포함하는 구조의 고분자 유도체(Tri-고분자 유도체)를 본 발명의 바람직한 가지달린 고분자 유도체의 예로서 제공한다.

본 발명의 생체적합성 고분자는 자연적이거나 합성에 의한 물질로 기본적으로는 물에 용해되는 성질을 갖는 것으로서, 이러한 고분자로는 폴리에틸렌글리콜(polyethylene glycol, 이하 "PEG"라 한다), 폴리프로필렌글리콜(polypropylene glycol, PPG), 폴리옥시에틸렌(polyoxyethylene, POE), 폴리트리메틸렌 글리콜(polytrimethylene glycol), 폴리락트산(polylactic acid) 및 그 유도체, 폴리아크릴산 및 그 유도체, 폴리(아미노산), 폴리(비닐 알코올), 폴리우레탄(polyurethane), 폴리포스파진(polyphosphazenes), 폴리(L-라이신)[poly (L- lysine)], 폴리알킬렌 옥사이드(polyalkylene oxide, PAO), 폴리사카라이드(polysaccharide) 등의 수용성 고분자 및 덱스트란(dextran), 폴리비닐 피롤리돈(polyvinyl pyrrolidone), 폴리비닐 알코올(polyvinyl alcohol, PVA), 폴리아크릴 아마이드(polyacryl amide) 등의 비면역성 고분자로 이루어진 그룹에서 선택되는 하나 또는 그 이상을 사용할 수 있다.

또한, 본 발명의 가지달린 고분자 유도체의 합성에 사용되는 생체적합성 고분자의 분자량은 약 200 내지 100,000인 것이 바람직하며, 1,000 내지 40,000인 것이 보다 바람직하다.

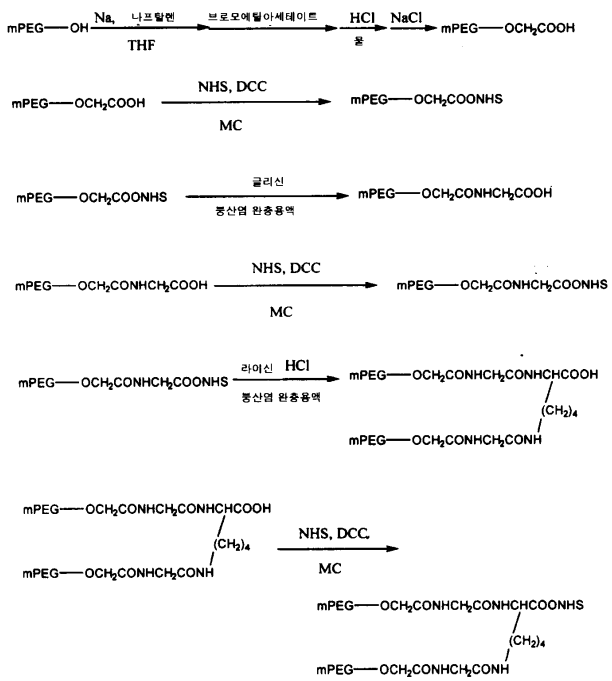
본 발명의 고분자 유도체의 연결쇄는 긴 사슬의 활성화된 생체적합성 고분자이며, 바람직하게는 분자량 200 내지 20,000인 것을 사용할 수 있다.

본 발명의 가지달린 고분자 유도체를 제조하기 위해서는 우선적으로 상기 생체적합성 고분자가 활성화되도록 반응을 진행시키는데 이때 본 발명에서는 글라이신을 사용하여 반응성이 큰 말단 작용기가 결합될 말단부가 형성되도록 한다. 본 발명의 고분자 유도체의 말단 작용기는 N-하이드록시석신이미드 에스테르(N-hydroxysuccinimide ester, 이하 "NHS"로 약칭함), 히드라진 하이드레이트(hydrazine hydrate, NH_2NH_2), 카르보닐 이미다졸(carbonyl imidazole), 니트로페닐(nitrophenyl), 이소시아네이트(isocyanate), 설포닐 클로라이드(sulfonyl chloride), 알데히드(aldehyde), 글리옥살(glyoxal), 에폭시드(epoxide), 탄산염(carbonate), 할로겐화 시안눌기(cyanuric halide), 디티오카보네이트(dithiocarbonate), 토실레이트(tosylate), 말레이미드(maleimide) 등이 사용가능하며, 가장 바람직하게는 NHS 또는 NH_2NH_2를 사용할 수 있다.

본 발명의 생체적합성 고분자의 활성화 방법에 대해서는, 본 발명의 바람직한 하나의 구체적인 예로서 제공되는 PEG를 상기 생체적합성 고분자로 하여 상세히 설명하면 다음과 같다.

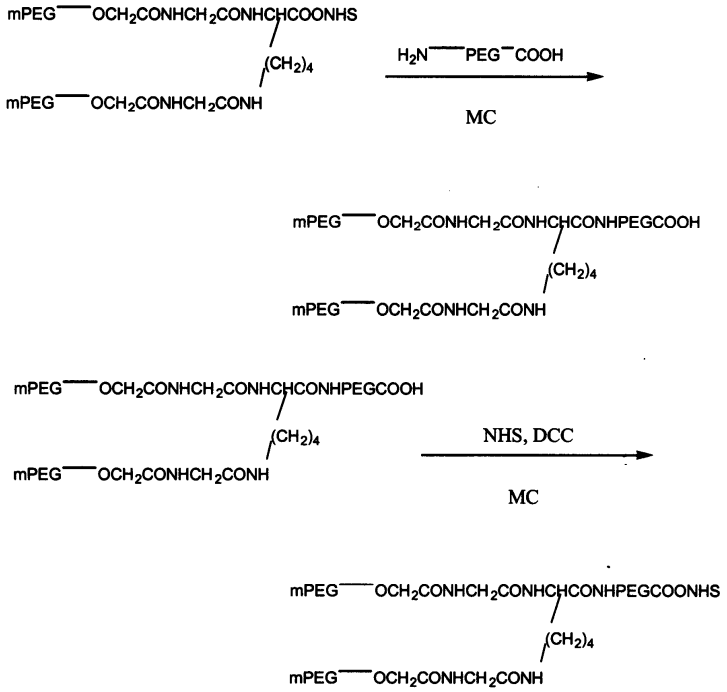
먼저 고분자가 모노메톡시-폴리(에틸렌 글리콜)[monomethoxy-poly(ethylene glycol), mPEG]과 같은 폴리알킬렌 옥사이드(polyalkylene oxide, 이하 PAO라 한다)가 되도록 하고, 이 PAO의 다른 말단부분을 반응성이 큰 작용기로 전환하여 이 루어진다. 특히 바람직한 예로서 생체적합성 고분자를 N-하이드록시석신이미드 에스테르(N-hydroxysuccinimide ester, NHS) 형으로 활성화시키는 반응식을 하기 반응식 1 및 반응식 2에 나타내었다.

반응식 1



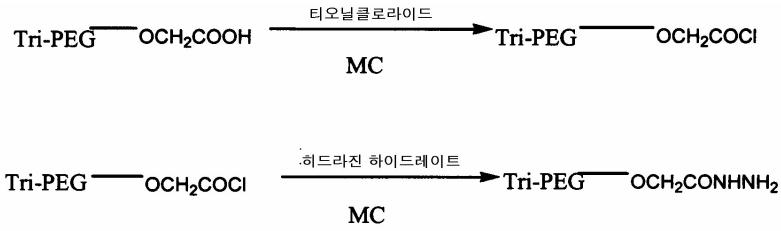
상기 반응식 1은 하나의 활성화된 생체적합성 고분자 가지를 포함하는 활성화된 Di-고분자 유도체 합성 과정을 단계적으로 나타낸 것이다.

반응식 2



상기 반응식 2는 활성화된 Di-고분자 유도체의 가지점에 긴 사슬의 활성화된 생체적합성 고분자를 단백질 또는 펩타이드에 대한 연결쇄로서 결합하여 활성화된 Tri-고분자 유도체 합성 과정을 나타낸 것이다.
상기와 같은 활성화된 가지달린 고분자 유도체에 있어 단백질 또는 펩타이드와 결합하는 말단에 작용기로서 상기 반응식 1 및 2의 NHS외에 NH_2NH_2, 카르보닐 이미다졸(carbonyl imidazole), 니트로페닐(nitrophenyl), 이소시아네이트(isocyanate), 설포닐 클로라이드(sulfonyl chloride), 알데히드(aldehyde), 글리옥살(glyoxal), 에폭시드(epoxide), 탄산염(carbonate), 할로겐화 시안눌기(cyanuric halide), 디티오카보네이트(dithiocarbonate), 토실레이트(tosylate), 말레이미드(maleimide) 등이 사용가능하며, NH_2NH_2를 사용한 경우의 반응식을 하기 반응식 3에 나타내었다.

반응식 3



본 발명은 상기 활성화된 가지달린 고분자 유도체가 수식된 단백질-고분자 또는 펩타이드-고분자 접합체를 제공한다.
본 발명은 상기와 같이 합성된 활성화된 가지달린 고분자 유도체와 생물학적 활성을 가진 단백질 또는 펩타이드을 반응시켜 단백질 또는 펩타이드에 상기 고반응성의 활성화된 가지달린 고분자가 결합된 단백질-고분자 또는 펩타이드-고분자 접합체를 제공한다. 이 때, 단백질과 고분자 유도체의 결합에 있어 결합의 종류는 공유결합은 물론 친유성(lipophilic) 또는 소수성(hydrophilic) 작용에 의한 비공유결합을 포함한다.
상기 활성화된 가지달린 고분자는 단백질 또는 펩타이드 내 라이신의 ε-아민기와 반응함으로써 단백질-고분자 또는 펩타이드-고분자 접합체를 형성하게 되며, 이 경우 라이신의 아민기외에도 단백질 또는 펩타이드 내의 카르복실기, 활성화된 카르보닐기 또는 산화된 당이 상기 활성화된 가지달린 고분자와의 접합 부분이 될 수 있다.
상기 하나 또는 그 이상의 가지달린 고분자 유도체는 일반적인 화학 방법에 의해 생물학적으로 활성인 단백질 또는 펩타이드에 접합될 수 있으며, 이러한 접합 반응의 조건으로서 반응온도는 0 내지 40 ℃인 것이 바람직하며 4 내지 30 ℃인 것이 보다 바람직하고, 반응 pH는 4 내지 9, 반응시간은 5 분 내지 10 시간으로 하는 것이 바람직하다.
또한, 단백질-고분자 또는 펩타이드-고분자 접합체를 제조하는 반응에 사용되는, 단백질 또는 펩타이드와 활성화된 생체적합성 고분자 유도체의 몰비는 약 1:1 내지 1:100이며, 1:1 내지 1:20인 것이 보다 바람직하다.
본 발명에 사용되는 단백질 또는 펩타이드는 특정 치료용 약물에 한정되지 않고 생물학적으로 활성이 있는 모든 물질이 사용될 수 있다. 구체적으로는 알파, 베타, 감마 인터페론(α-, β-, γ-interferon), 아스파라기나아제(asparaginase), 아르기나아제(arginase), 아르기닌 디이미나아제(arginine deiminase), 아데노신 디아미나아제(adenosine de

aminase), 수퍼옥사이드 디스뮤타아제(superoxide dismutase), 엔도톡시나아제(endotoxinase), 카탈라아제(catalase), 키모트립신(chymotrypsin), 리파아제(lipase), 유리카제(uricase), 아데노신 디포스파타아제(adenosine diphosphatase), 티로시나아제(tyrosinase), 글루코오스 옥시다아제(glucose oxidase), 글루코시다아제(glucosidase), 갈락토시다아제(galactosidase), 글루코유로니다아제(glucouronidase), 헤모글로빈(hemoglobin), 혈액 인자 VII, VIII 및 IX(blood factor VII, VIII and IX), 면역글로불린(immunoglobulins), 사이토카인(cytokines) 즉, 인터루킨(interleukins), G-CSF, GM-CSF, PDGF, 렉틴(lectins), 리신(ricins), TNF, TGFs, EGF, PTH, 칼시토닌(calcitonin), 부갑상선 호르몬(Parathyroid hormone, PTH), 인슐린(insulin), 합성 엔케팔린(enkephalin), 성장호르몬 분비 펩타이드(growth hormone releasing peptide, GHRP), 황체호르몬 분비 호르몬(luteinizing hormone releasing hormone, LHRH) 및 그 유도체, 시상하부의 분비물질, 칼시토닌 유전자 관련 펩타이드(calcitonin gene related peptide, CGRP), 갑상선 자극 호르몬, 흉선 체액성 인자(thymic humoral factor, THF) 등을 사용하는 것이 바람직하다.

본 발명의 활성화된 가지달린 고분자 유도체는 단백질-고분자 또는 펩타이드-고분자 접합체를 형성하는 반응성이 매우 우수하다. 특히 Di-고분자 유도체의 경우에 비해 Tri-고분자 유도체의 경우 단백질에 활성화된 생체적합성 고분자를 결합시키는 반응성이 상당히 우수함을 확인하였다(**도 2** 내지 **도 5** 및 표 1 참 조). 이로서 Tri-고분자 유도체의 단백질 또는 펩타이드에 결합하는 연결쇄 고분자의 긴 사슬 구조가 상기와 같이 반응성을 증가시킴을 알 수 있다.

상기와 같이 제조된 단백질-고분자 또는 펩타이드-고분자 접합체를 분리 정제하는데 있어서 사용 용액의 pH는 7 내지 9, 바람직하게는 7.5 내지 8.5이다. 이 때 분리정제에 사용할 수 있는 완충용액으로는 KCl, NaCl, Tris-HCl, K_2HPO_4, KH_2PO_4, Na_2HPO_4, NaH_2PO_4, $NaHCO_3$, $NaBO_4$, $(NH_4)_2CO_3$, 글리신(glycine) NaOH이며, 바람직하게는 Tris-HCl과 인산완충용액을 사용할 수 있다. 또한, 사용할 수 있는 이온교환수지로는 Q-HD(BioSepra, USA), QA-TRISACRYL과 QMA-SPHEROSIL (sepracore, USA), TMAE650M(EM separation, USA), Mono-Q과 Q-Sepharose (Pharmacia, Sweden) 등이 있다.

이하, 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명한다.

단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다.

1. 활성화된 생체적합성 고분자 PEG의 합성

<실시예 1> 활성화된 고분자 mPEG-$OCH_2CONHCH_2COONHS$(5000)의 합성

(단계 1) mPEG-OCH_2COOH(5000)의 합성

분자량이 5000인 PEG를 이용하여 mPEG를 제조하고, mPEG-OH(5000)(10g, 2mmole)를 질소 기체(nitrogen gas) 하에서 THF에 녹인후 실온에서 교반(stirring) 하면서 나트륨, 나프탈렌(naphthalene) 용액을 가하고 3시간 동안 실온에서 교반하였다. 브로모에틸렌아세테이트(bromoethylacetate)(1.0g, 6.0mmole)를 실온에서 교반하면서 적하시키는 방법으로(dropwise) 넣어 주었다. 실온에서 15시간 이상 반응시킨 후 냉각조(ice bath) 하에서 아이스 에테르(ice ether)를 가해 응고시켰다. 생성된 고형분을 여과(solid filter)하여 회수한 후 이를 에테르로 세척하고, 진공 건조하였다.

그 결과 고형분(crude solid)는 15.5 g이 얻어졌다.

그 후 상기 고형분을 물에 녹인 후 1N NaOH를 가해 pH를 11로 맞추고 55 ℃에서 24 시간 동안 교반한 후 실온으로 식히고 HCl을 가해 pH를 3으로 조정한 다음 증발시켰다. 염화메틸렌(methylene chloride, 이하 "MC"라 약칭함)에 녹이고 실온에 1 시간 방치한 후 셀라이트 여과(celite filter)하여 증발시켰다. 그 다음 이소프로필 알코올(isopropyl alcohol, 이하 "ipa"라 약칭함)을 넣고 녹인 후 냉각조하에서 결정화시켰다. 그 결과 얻어진 연갈색 고형분을(pale brown solid) 여과하고 에테르로 세척한 후 진공 건조하였다.

그 결과 얻어진 상기 연갈색 고형분은 10.3 g (수율 : 100 %)이었다.

(단계 2) mPEG-$OCH_2COONHS$(5000)의 합성

단계 1에서 얻어진 mPEG-OCH_2COOH(5000)(3g, 0.6mmole)을 MC에 녹인 후 교반하면서 NHS(0.2g, 1.8mmole)와 N,N'-디시클로헥실 카보디이미드(N,N'-dicyclohexyl carbodiimide, 이하 "DCC"라 약칭함)(0.37g, 1.8mmole)를 넣어 주었다. 30 ℃로 가열하면서 교반하여 18 시간 동안 반응시킨 후 실온으로 식혀, 셀라이트 여과한 다음 석탄(charcoal; 활성탄소)로 여과하고 증발시켰다.

ipa를 넣어 녹인 후 냉각조하에서 결정화하였으며, 그 결과 얻은 백색의 고형분을 여과하고 에테르로 세척한 다음 진공 건조하였다. 결과적으로 얻어진 mPEG-$OCH_2COONHS$(5000)를 포함하고 있는 상기 백색 고형분은 2.81 g (수율 : 91 %)이었다.

(단계 3) mPEG-$OCH_2CONHCH_2COOH$(5000)의 합성

글리신(glycine)(0.06 g, 0.8 mmole)을 붕산염 완충용액(0.1 M, pH 8.5)에 녹인 후 교반하면서 mPEG-$OCH_2COONHS$(5000)(0.5, 0.1mmole)을 적하하여 넣어 주었다. 1.5 일 동안 실온에서 반응시킨 후 물을 넣고 옥살산(oxalic acid)을 가하여 pH를 3으로 조정하였다. MC로 3 회 추출한 후 MC 분획층을 Na_2SO_4로 건조시켜 여 과하고 증발시켰다.

ipa를 넣고 녹인 후 냉각조하에서 결정화시키고 얻어진 백색 고형분을 여과하고 에테르로 세척, 진공 건조하였다. 그 결과 mPEG-$OCH_2CONHCH_2COOH$(5000)를 포함하는 백색 고형분이 0.50 g (수율 : 98 %) 얻어졌다.

(단계 4) mPEG-$OCH_2CONHCH_2COONHS$(5000)의 합성

단계 3에서 얻은 mPEG-$OCH_2CONHCH_2COOH$(5000)(0.5g, 0.1mmole)을 MC에 녹인 후 교반하면서 NHS(0.034g, 0.3mmole)와 DCC(0.062g, 0.3mmole)를 넣어 주었다. 30 ℃로 가열하면서 교반하여 24 시간 동안 반응시킨 후 실온으로 식히고 셀라이트 여과한 후 석탄로 여과하고 증발시켰다.

ipa를 넣고 녹인후 냉각조하에서 결정화하고 그 결과 얻은 백색 고형분을 여과하고 에테르로 세척하여 진공 건조 시켰다. 그 결과 mPEG-$OCH_2CONHCH_2COONHS$(5000)에 대한 백색 고형분이 0.43 g (수율 : 83%) 얻어졌다.

<실시예 2> 활성화된 고분자 mPEG-OCH $_2$ CONHCH $_2$ COONHS(20000)의 합성

(단계 1) mPEG-OCH $_2$ COOH(20000)의 합성

분자량 20000의 mPEG-OH(20000)(5g, 0.25mmole)를 실시예 1의 단계 1과 동일 하게 반응시켜 mPEG-OCH $_2$ COOH(20000)에 대한 연갈색 고형분을 5.0 g (수율 : 100 %) 얻었다.

(단계 2) mPEG-OCH2COONHS(20000)의 합성

mPEG-OCH $_2$ COOH(20000)(3g, 0.15mmole)을 실시예 1의 단계 2와 동일하게 반응시켜 mPEG-OCH2COONHS(20000)에 대한 백색 고형분 2.2 g (수율 : 73%)을 얻었다.

(단계 3) mPEG-OCH $_2$ CONHCH $_2$ COOH(20000)의 합성

mPEG-OCH $_2$ COONHS(20000)(0.5g, 0.025mmole)을 실시예 1의 단계 3과 동일하게 반응시켜 mPEG-OCH $_2$ CONHCH $_2$ COOH(20000)에 대한 백색 고형분 0.50 g (수율 : 100 %)을 얻었다.

(단계 4) mPEG-OCH $_2$ CONHCH $_2$ COONHS(20000)의 합성

mPEG-OCH $_2$ CONHCH $_2$ COOH(20000)(0.5g, 0.025mmole)을 실시예 1의 단계 4와 동일하게 반응시켜 mPEG-OCH $_2$ CONHCH $_2$ COONHS(20000)에 대한 백색 고형분 0.45 g (수율 : 90 %)을 얻었다.

2. 활성화된 가지달린 고분자 유도체 Di-PEG 및 Tri-PEG의 합성

<실시예 3> 활성화된 가지달린 고분자 유도체 Di-PEG-NHS (5000)의 합성

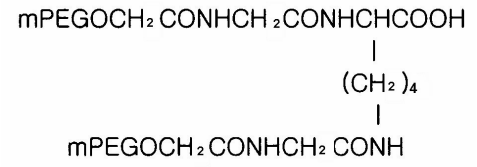
(단계 1) Di-PEG-COOH (5000)의 합성

라이신-HCl(lysine-HCl)(0.08 g, 0.042 mmole)을 붕산염 완충용액(0.1 M pH 8.5)에 녹인 후 교반하면서 mPEG-OCH $_2$ CONHCH $_2$ COONHS(5000)(0.4, 0.076mmole)을 적하하여 넣어 주었다. 2 일동안 실온에서 반응시킨 후 물을 넣고 옥살산을 가하여 pH 3으로 조정하였다. MC로 3 회 추출한 뒤 MC 분획층에 Na $_2$ SO $_4$ 를 가하여 건조시킨 후여과하고, 증발시켰다.

ipa를 넣고 녹인 후 냉각조하에서 결정화하여 백색의 고형분을 얻어 여과하고 에테르로 세척한 다음 진공 건조하였다.

그 결과 얻어진 백색 고형분(Di-PEG-COOH)이 0.33 g (수율 : 84%)을 얻어졌다. 상기 백색 고형분은 하기 화학식 1과 같은 구조식을 갖는다.

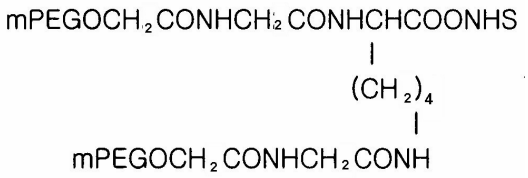
화학식 1



(단계 2) Di-PEG-NHS (5000)의 합성

상기 단계 1에서 얻은 Di-PEG-COOH(5000)(0.3g, 0.029mmole)를 NHS(0.01 g, 0.087 mmole) 및 DCC(0.018 g, 0.087 mmole)과 혼합하여 실시예 1의 단계 4와 동일한 방법으로 반응시켜 백색 고형분 0.25 g (수율 : 82 %)을 얻었다. 상기 백색 고형분(Di-PEG-NHS)은 하기 화학식 2와 같은 구조식을 갖는 화합물이다.

화학식 2



<실시예 4> 활성화된 가지달린 고분자 유도체 Di-PEG-NHS (20000)의 합성

(단계 1) Di-PEG-COOH (20000)의 합성

mPEG-OCH $_2$ CONHCH $_2$ COONHS(20000)(0.4g, 0.02mmole)을 실시예 3의 단계 1과 동일하게 반응시켜 백색 고형분 0.35 g (수율 : 87 %)을 얻었다. 결과 백색 고형분은 Di-PEG-COOH로서 상기 화학식 1의 구조식을 갖는 화합물이다(상기 화학식 1에서 PEG 의 분자량은 20000이다).

(단계 2) Di-PEG-NHS (20000)의 합성

Di-PEG-COOH(20000)(0.3 g, 0.025 mmole)을 실시예 3의 단계 2와 동일하게 반응시켜 백색의 고형분 0.25 g (수율 : 83 %)를 얻었다. 이렇게 얻어진 백색 고형분(Di-PEG-NHS)은 상기 화학식 2와 같은 구조식의 화합물이다(상기 화학식 2에서 PEG의 분자량은 20000이다).

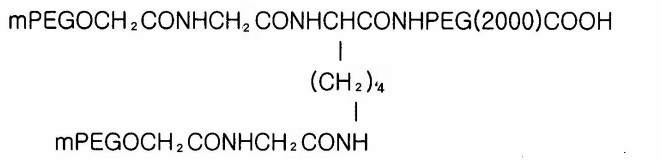
<실시예 5> 긴사슬의 연결쇄를 포함하는 활성화된 가지달린 고분자 유도체 Tri-PEG-NHS (5000)의 합성

(단계 1) Tri-PEG-COOH (5000)의 합성

실시예 3에서 얻은 Di-PEG-COONHS(5000)(0.1 g, 0.0096 mmole)을 MC에 녹이고 실온에서 교반하면서 NH $_2$ PEG-COOH(2000)(0.038 g, 0.0192 mmole)를 가하였다. 40 ℃에서 2 일 동안 반응시킨 후 셀라이트로 여과하고, 증

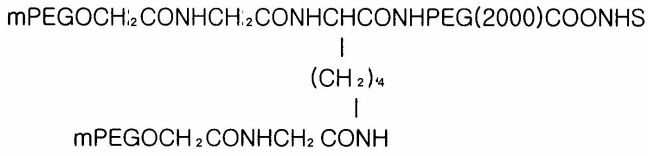
발시켰다.
ipa를 넣고 녹인 후 냉각조하에서 결정화시켜 백색의 고형분을 얻었으며 이를 여과하고 에테르로 세척한 후 진공건조하였다.
그 결과 얻어진 백색 고형분은 0.12 g (수율 : 92 %)이었다. 이렇게 얻어진 백색 고형분(Tri-PEG-COOH)은 하기 화학식 3과 같은 구조의 화합물이다.

화학식 3



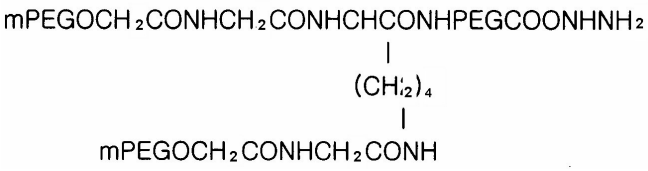
(단계 2) Tri-PEG-NHS (5000)의 합성
실시예 4에서 얻은 Tri-PEG-COOH(0.1 g, 0.007 mmole)를 NHS(0.0024 g, 0.021 mmole) 및 DCC(0.0043 g, 0.021 mmole)과 혼합하여 실시예 3의 단계 2와 동일한 방법으로 반응시켜 백색 고형분 0.1 g (수율 : 99 %)을 얻었다. 이 백색의 고형분(Tri-PEG-NHS)은 하기 화학식 4와 같은 구조의 화합물이다.

화학식 4



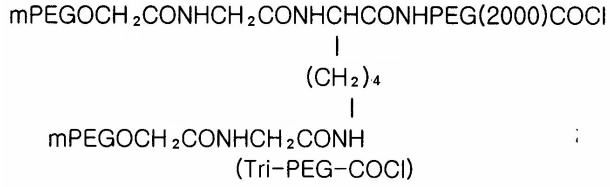
<실시예 6> 긴사슬의 연결쇄를 포함하는 활성화된 가지달린 고분자 유도체 Tri-PEG-NHS (20000)의 합성
(단계 1) Tri-PEG-COOH (20000)의 합성
실시예 4에서 얻은 Di-PEG-COONHS(20000)(0.1 g, 0.00247 mmole)을 실시예 4의 단계 2와 동일한 방법으로 반응시켜 백색의 고형분 0.107 g (수율 : 98 %)을 얻었다. 상기 백색 고형분(Tri-PEG-COOH)은 상기 화학식 3과 같은 구조의 화합물이며, PEG는 분자량 20000이다.
(단계 2) Tri-PEG-NHS (20000)의 합성
실시예 4에서 얻은 Tri-PEG-COOH(20000)(0.08 g, 0.0018 mmole)를 실시예 4의 단계 2와 동일한 방법으로 반응시켜 백색의 고형분 0.080 g (수율 : 99 %)을 얻었다. 이렇게 얻은 백색 고형분(Tri-PEG-NHS)은 상기 화학식 4의 구조를 갖는 화합물이며, 이에서 PEG의 분자량은 20000이다.
<실시예7> Tri-PEG-NHNH $_2$ (5000)의 합성
하기 화학식 5의 화합물을 다음의 단계 1 및 단계 2의 반응을 수행하여 얻었다.

화학식 5



(단계 1) 화학식 6의 고분자 유도체의 합성

화학식 6

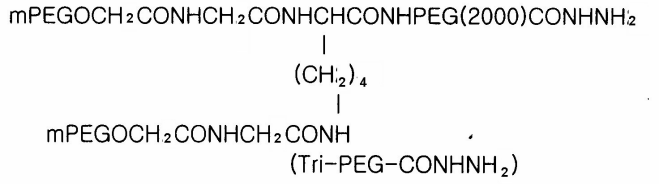


실시예 5의 단계 1의 Tri-PEG-COOH(5000) (1 g, 0.083 mmole)를 MC에 녹인 후 $SOCl_2$ (0.05 g, 0.4 mmole)을 적하하여 넣고 가열하여 3시간 동안 환류(reflux) 반응시킨 후 실온까지 식히고 증발시켰다. 그 결과 갈색의 오일 1 g (수율 : 98 %)이 얻어졌다. 이 때 주의할 것은 결과적으로 얻어진 상기 갈색의 오일은 매우 불안정하여 회수 후 곧바

로 다음반응에 사용하도록 하여야 한다는 것이다.

(단계 2) 화학식 7의 고분자 유도체의 합성

화학식 7



상기 단계 1에서 얻어진 Tri-PEG-COCl (5000) (1.1 mmole)을 MC에 녹인 후 NH_2NH_2, H_2O 10 ml을 적하하여 넣고 실온에서 교반하여 3시간 반응시킨 후 증발시키고, 실리카 칼럼에서 분리하고 이를 증발시키고 진공 건조시켰다.

그 결과 황색 오일이 약 1 mmole (수율 : 92 %) 얻어졌다. 상기 황색 오일은 상기 화학식 7의 구조를 갖는 고분자 유도체이다.

<실시예 8> Tri-PEG-$NHNH_2$ (20000)의 합성

(단계 1) 화학식 6의 고분자 유도체의 합성

실시예 6의 단계 1의 Tri-PEG-COOH(20000) 역시 위와 같은 방법으로 반응시켜 Tri-PEG-COCl(20000)을 합성한다. 그 결과 갈색의 오일 1g (수율 : 98 %)이 얻어졌다. 합성된 갈색 오일은 상기 화학식 6의 구조를 갖는 것으로 PEG의 분자량은 20000이다.

(단계 2) 화학식 7의 고분자 유도체의 합성

상기 단계 1에서 얻어진 Tri-PEG-COCl (20000) (1.1 mmole)을 실시예 7의 단계 2와 동일한 방법으로 Tri-PEG-$NHNH_2$ (20000)을 합성하였다. 그 결과 황색 오일이 약 1 mmole (수율 : 92 %) 얻어졌다. 상기 황색 오일은 상기 화학식 7의 구조를 갖는 고분자 유도체로서 PEG의 분자량은 20000이다.

3. 활성화된 고분자 유도체와 단백질(인터페론)의 접합체의 제조

<실시예 9> Di-PEG(5000)-인터페론의 제조

3 mg의 인터페론(Interferon, INF)을 pH 7.0의 0.1 M 인산 완충용액으로 투석한 후, 실시예 3에서 제조된 석시닐-N-하이드록시석신이미드 에스테르(succinyl-N-hydroxysuccinimide ester)형으로 활성화된 Di-PEG(5000) 3 mg을 넣어 실온에서 30분 동안 교반하였다. 0.1 M의 글리신(glycine)을 첨가하여 반응을 중단시키고, 반응하지 않은 과량의 PEG과 INF를 센트리콘-30(Centricon-30; Amicon, USA)을 사용하여 다량 제거하여 Di-PEG(5000)-INF를 제조하였다.

<실시예 10> Di-PEG(20000)-인터페론의 제조

3 mg의 INF를 pH 7.0인 0.1 M 인산 완충용액으로 투석한 후, 실시예 4에서 제조된 석시닐-N-하이드록시석신이미드 에스테르(succinyl-N-hydroxysuccinimide ester)형으로 활성화된 Di-PEG(20000) 12 mg을 넣어 실온에서 30분 동안 교반하였다. 0.1 M의 글리신을 첨가하여 반응을 중단시키고, 반응하지 않은 과량의 PEG과 INF을 센트리콘-30을 사용하여 다량 제거함으로써 제조하였다.

<실시예 11> Tri-PEG(5000)-인터페론의 제조

실시예 9와 같은 방법으로 Tri-PEG(5000)-INF를 제조하였다. 이 때 사용되는 PEG은 실시예 5에서 만들어진 Tri-PEG(5000)-NHS를 사용하였다.

<실시예 12> Tri-PEG(20000)-인터페론의 제조

실시예 9와 같은 방법으로 Tri-PEG(20000)-INF를 제조하였다. 이 때 사용되는 PEG은 실시예 6에서 만들어진 Tri-PEG(20000)-NHS를 사용하였다.

<실시예 13> Tri-PEG(5000)$NHNH_2$-인터페론의 제조

3 mg의 인터페론을 pH 6.0인 0.1 M 인산 완충용액으로 투석한 후, 10 mg의 1-에틸-3-(3-디메틸아미노프로필)-카보디이미드 하이드로클로라이드[1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimide hydrochloride, 이하 "EDC"라 약칭함]를 첨가하여 단백질의 카르복실기에 중간체를 만든 후, 실시예 7에서 제조된 Tri-PEG(5000)-$NHNH_2$ 3 mg을 넣어 저온에서 2시간 내지 24시간 동안 교반하였다. 반응하지 않은 과량의 PEG과 INF를 센트리콘-30을 사용하여 다량 제거하여 Tri-PEG(5000)$NHNH_2$-INF를 제조하였다.

<실시예 14> Tri-PEG(20000)$NHNH_2$-인터페론 의 제조

3 mg의 인터페론을 pH 6.0인 0.1M 인산 완충용액으로 투석한 후, 10 mg의 EDC를 첨가하여 단백질의 카르복실기에 중간체를 만든 후, 실시예 8에서 제조된 Tri-PEG(20000)NHNH2 12 mg을 넣어 저온에서 2시간 내지 24시간 동안 교반하였다. 반응하지 않은 과량의 PEG과 INF를 센트리콘-30을 사용하여 다량 제거하여 Tri- PEG(20000)$NHNH_2$-INF를 제조하였다.

<실시예 15> Tri-PEG(5000)-EGF의 제조

5 mg의 EGF(epithermal growth factor)를 pH 7.0인 0.1M 인산 완충용액으로 투석한 후, 실시예 5에서 제조된 석시닐-N-하이드록시석신이미드 에스테르(succinyl-N-hydroxysuccinimide ester)형으로 활성화된 Tri-PEG(5000) 5 mg을 넣어 실온에서 30분 동안 교반하였다. 0.1 M의 글리신을 첨가하여 반응을 중단시키고, 반응하지 않은 과량의 PEG과 EGF를 센트리콘-30을 사용하여 다량 제거하여 Tri-PEG(5000)-EGF를 제조하였다. 이의 분리 정제는 상기

실시예 19과 같은 방법으로 수행하였다.

<실시예 16> Tri-PEG(20000)-EGF의 제조

상기 실시예 15의 방법과 동일한 방법에 따라 제조하였는데, 이 때 PEG은 실시예 6에서 제조된 Tri-PEG(20000) 20 mg를 사용하였다. 이의 분리 정제는 하기 실시예 19와 같은 방법으로 수행하였다.

<실시예 17> Tri-PEG(5000)-HGH의 제조

5 mg의 HGH(human growth hormone)를 pH 7.0인 0.1 M 인산 완충용액으로 투석한 후, 실시예 5에서 제조된 석시닐-N-하이드록시석신이미드 에스테르(succinyl- N-hydroxysuccinimide ester)형으로 활성화된 Tri-PEG(5000) 8 mg을 넣어 실온에서 30분 동안 교반하였다. 0.1 M의 글리신을 첨가하여 반응을 중단시키고, 반응하지 않은 과량의 PEG과 EGF를 센트리콘-30을 사용하여 다량 제거하여 상기 Tri-PEG(5000)-HGH를 제조하였으며, 이의 분리 정제는 하기 실시예 19와 같은 방법으로 수행하였다.

<실시예 18> Tri-PEG(20000)-HGH의 제조

상기 실시예 17의 방법에 따라 Tri-PEG(20000)-HGH를 제조하였다. 이 때 PEG은 실시예 6에서 제조된 Tri-PEG(20000) 25 mg을 사용하였다. 이의 분리 정제는 하기 실시예 19와 같은 방법으로 수행하였다.

<실시예 19> Mono-PEG(5000, 20000)-인터페론의 분리 정제

실시예 9 내지 12에서 제조된 PEG-INF를 센트리콘-30을 사용하여 10 mM Tris 완충용액으로 투석한 후 음이온교환수지(mono-Q; Pharmacia, Sweden)로 Mono-PEG-INF를 분리하였다. 분리 과정에 사용된 나트륨 염은 0 으로부터 300 mM까지의 농도구배로 사용하였다. 분리된 Mono-PEG-INF의 양은 크기-배제 HPLC(size-exclusion HPLC) 또는 MALDI-TOF 질량 분석기 (MALDI-TOF mass spectometer)로 확인되었다.

<실험예 1> 활성화된 가지달린 고분자 유도체의 반응성 시험

상기 실시예 1 내지 8에서 합성된 활성화된 고분자 유도체의 단백질 또는 펩타이드와의 반응성을 조사하기 위해, 이들 각각을 INF와 실시예 9 내지 14에서와 같은 방법으로 반응시킨 후 생성되는 Mono-PEG-IFN을 실시예 19에서와 같은 방법으로 정제 분리하여 생성된 Mono-PEG-IFN의 양을 HPLC의 피크면적(**도 2, 도 3, 도 4** 및 **도 5**)으로부터 결정하였으며, 그 결과 상기 활성화된 PEG 유도체의 단백질에 대한 반응성을 알 수 있었다(표 1).

이때, 비교예로서 시판되고 있는 노르루신이 삽입되지 않은 분자량 10000, 20000 또는 40000의 가지달린 PEG 고분자 유도체인 브렌치드 PEG2-NHS 에스터(branched PEG2-NHS ester, Sheawater polymers)의 반응성을 상기와 같은 조건에서 조사하여 상기 본 발명의 고분자 유도체의 반응성과 비교하였다.

[표 1]

활성화된 PEG의 반응성

활성화된 고분자 유도체의 종류	생성된 Mono-PEG-INF	반응하지 않은 INF
실시예 1의 고분자 유도체 mPEG-OCH2CONHCH2COONHS(5000)	45 %	35 %
실시예 2의 고분자 유도체 mPEG-OCH2CONHCH2COONHS(20000)	22 %	57 %
실시예 3의 고분자 유도체 Di-PEG-NHS(5000)	23 %	65 %
실시예 4의 고분자 유도체 Di-PEG-NHS(20000)	18 %	80 %
실시예 5의 고분자 유도체 Tri-PEG-NHS(5000)	45 %	51 %
실시예 6의 고분자 유도체 Tri-PEG-NHS(20000)	43 %	50 %
실시예 7의 고분자 유도체 Tri-PEG-$NHNH_2$ (20000)	35 %	30 %
실시예 8의 고분자 유도체 Tri-PEG-$NHNH_2$ (20000)	30 %	40 %
Sheawater	23 %	63 %

상기 표 1의 결과에서 보듯이, Di-PEG 유도체 및 Tri-PEG 유도체는 모두 인터페론과의 반응성이 있으나, 특히 본 발명의 Tri-PEG 유도체의 경우 활성화된 PEG와 인터페론의 결합을 유도하는 성질이 월등히 우수함을 확인할 수 있다.

발명의 효과

본 발명은 단백질 또는 펩타이드, 특히 분자량이 작아 활성부위가 결합되는 고분자 구조에 의한 입체적 장애에 영향을 많이 받는 단백질 또는 펩타이드를 수식하는데 효과적인 긴사슬구조의 연결쇄를 포함하는 고반응성 가지달린 고분자 유도체를 합성하여 단백질-고분자 또는 펩타이드-고분자 접합체를 제조함으로써, 단백질 또는 펩타이드의 활성을 최대한 유지하면서도 고 수율과 약물의 활성감소를 최소화하며 체내효소로부터의 분해를 방지하여 안정성을 증가시키는 결과, 투여되는 약물의 횟수를 줄여 과다 약물 사용으로 인한 부작용을 감소시키는데 효과적으로 이용될 수 있다.

(57) 청구의 범위

청구항 1.
생물학적 활성을 가지는 단백질 또는 펩타이드에 결합하는 말단작용기를 갖는 연결쇄 고분자를 포함하는 활성화된 가지달린 생체적합성 고분자 유도체로서, 상기 말단작용기는 -NHS, -$NHNH_2$, 카르보닐 이미다졸(carbonyl imidazole), 니트로페닐(nitrophenyl), 이소시아네이트(isocyanate), 설포닐 클로라이드(sulfonyl chloride), 알데히드(aldehyde), 글리옥살(glyoxal), 에폭시드(epoxide), 탄산염(carbonate), 할로겐화 시안눌기(cyanuric halide), 디티오카보네이트(dithiocarbonate), 토실레이트(tosylate), 말레이미드(maleimide)로 이루어지는 군으로부터 선택된 어느 하나이고, 상기 연결쇄 고분자 및 상기 생체적합성 고분자는 폴리에틸렌글리콜(polyethylene glycol, PEG), 폴리프로필렌글리콜(polypropylene glycol, PPG), 폴리옥시에틸렌(polyoxyethylene, POE), 폴리트리메틸렌 글리콜(polytrimethylene glycol), 폴리락트산(polylactic acid) 및 그 유도체, 폴리아크릴산 및 그 유도체, 폴리(아미노산), 폴리(비닐 알코올), 폴리우레탄(polyurethane), 폴리포스파진(polyphosphazenes), 폴리(L-라이신)[poly(L- lysine)], 폴리알킬렌 옥사이드(polyalkylene oxide, PAO), 폴리사카라이드(polysaccharide) 등의 수용성 고분자 및 덱스트란(dextran), 폴리비닐 피롤리돈(polyvinyl pyrrolidone), 폴리비닐 알코올(polyvinyl alcohol, PVA), 폴리아크릴 아마이드(polyacryl amide) 등의 비면역성 고분자로 이루어지는 군으로부터 선택된 하나 이상인 것을 특징으로 하는 고분자 유도체.

청구항 2.
제 1항에 있어서, 상기 고분자 유도체는 활성화된 생체적합성 고분자가 결합되어 하나 또는 그 이상의 가지달린 고분자 유도체를 얻은 뒤, 상기 유도체의 가지점에 활성화된 생체적합성 고분자를 단백질 또는 펩타이드에 대한 연결쇄로 결합시키는 것을 특징으로 하는 고분자 유도체.

청구항 3.
제 1항에 있어서, 상기 생체적합성 고분자는 분자량이 200 내지 100,000인 것을 특징으로 하는 고분자 유도체.

청구항 4.
제 1항에 있어서, 상기 연결쇄 고분자는 분자량 200 내지 20,000인 것을 특징으로 하는 고분자 유도체.

청구항 5.
삭제

청구항 6.
삭제

청구항 7.
제 1항의 활성화된 생체적합성 고분자 유도체의 말단작용기인 -NHS, -$NHNH_2$, 카르보닐 이미다졸(carbonyl imidazole), 니트로페닐(nitrophenyl), 이소시아네이트(isocyanate), 설포닐 클로라이드(sulfonyl chloride), 알데히드(aldehyde), 글리옥살(glyoxal), 에폭시드(epoxide), 탄산염(carbonate), 할로겐화 시안눌기(cyanuric halide), 디티오카보네이트(dithiocarbonate), 토실레이트(tosylate), 말레이미드(maleimide)로 이루어지는 군으로부터 선택된 어느 하나를 단백질 또는 펩타이드 내 결합부위인 라이신의 아민기, 펩타이드내의 카르복실기, 활성화된 카르보닐기, 산화된 당으로 이루어지는 군으로부터 선택된 어느 하나와 결합시켜 제조되는 단백질-고분자 또는 펩타이드-고분자 접합체.

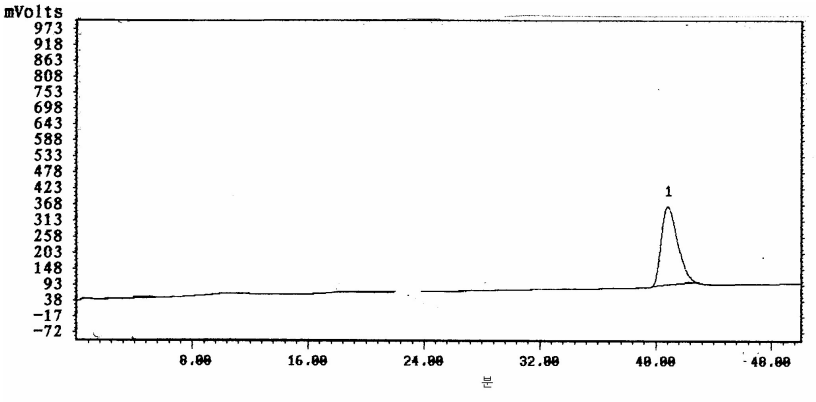
청구항 8.
제 7항에 있어서, 상기 단백질 또는 펩타이드와 활성화된 생체적합성 고분자 유도체의 반응 몰비는 약 1:1 내지 1:100이며, 보다 바람직하게는 1:1 내지 1:20인 것을 특징으로 하는 접합체.

청구항 9.
삭제

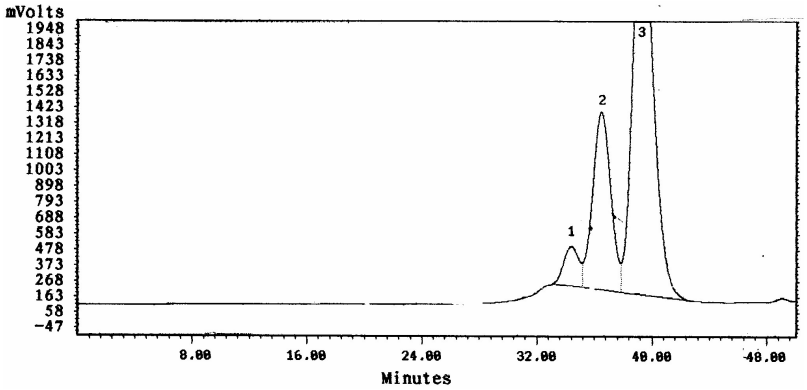
청구항 10.
제 7항에 있어서, 상기 단백질 또는 펩타이드는 알파, 베타, 감마 인터페론 (α-, β-, γ-interferon), 아스파라기나아제(asparaginase), 아르기나아제 (arginase), 아르기닌 디이미나아제(arginine deiminase), 아데노신 디아미나아제 (adenosine deaminase), 수퍼옥사이드 디스뮤타아제(superoxide dismutase), 엔도톡시나아제(endotoxinase), 카탈라아제(catalase), 키모트립신(chymotrypsin), 리파아제(lipase), 유리카제(uricase), 아데노신 디포스파타아제(adenosine diphosphatase), 티로시나아제(tyrosinase), 글루코오스 옥시다아제(glucose oxidase), 글루코시다아제(glucosidase), 갈락토시다아제(galactosidase), 글루코유로니다아제(glucouronidase), 헤모글로빈(hemoglobin), *혈액 인자* VII, VIII 및 IX(blood factor VII, VIII and IX), 면역글로불린(immunoglobulins), 사이토카인(cytokines) 즉, 인터루킨(interleukins), G-CSF, GM-CSF, PDGF, 렉틴(lectins), 리신(ricins), TNF, TGFs, EGF, PTH, 칼시토닌(calcitonin), 부갑상선 호르몬(Parathyroid hormone, PTH), 인슐린(insulin), 합성 엔케팔린(enkephalin), 성장호르몬 분비 펩타이드(growth hormone releasing peptide, GHRP), 황체호르몬 분비 호르몬(luteinizing hormone releasing hormone, LHRH) 및 그 유도체, 시상하부의 분비물질, 칼시토닌 유전자 관련 펩타이드(calcitonin gene related peptide, CGRP), 갑상선 자극 호르몬, 흉선 체액성 인자(thymic humoral factor, THF)로 이루어지는 군에서 선택된 어느 하나인 것을 특징으로 하는 접합체.

도면

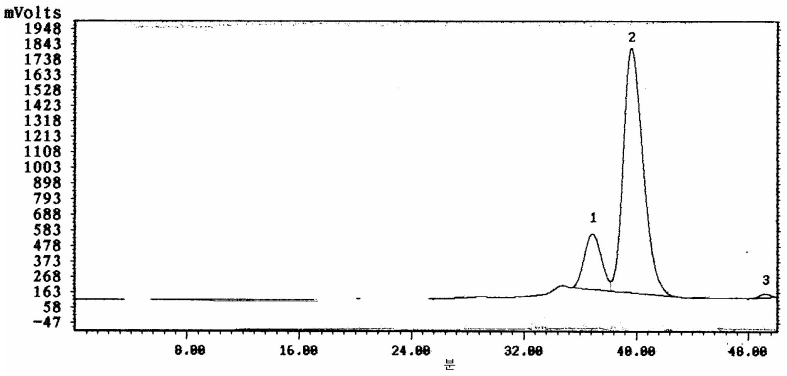
도면1



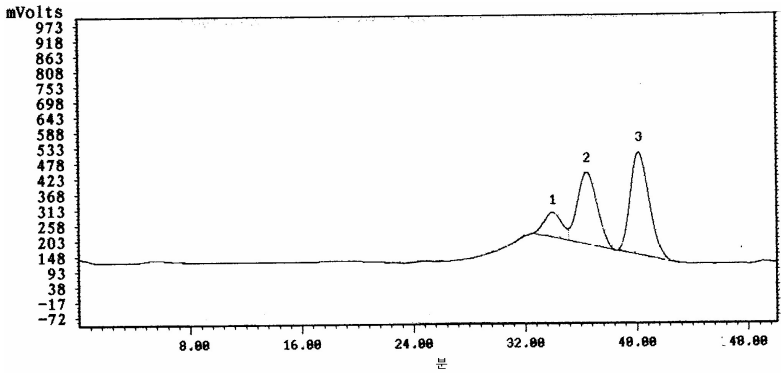
도면2



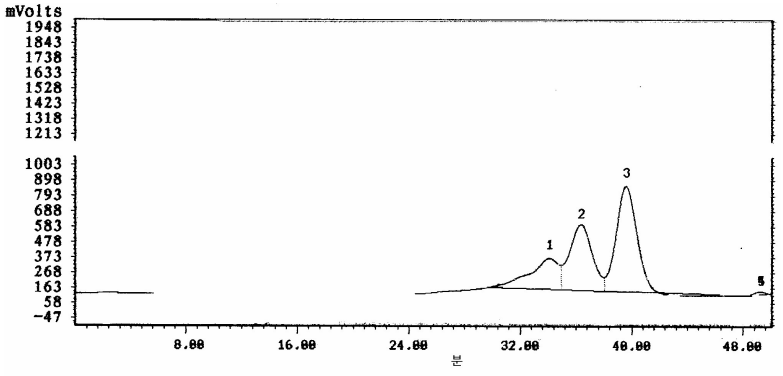
도면3



도면4



도면5


mVolts
1948
1843
1738
1633
1528
1423
1318
1213
1003
898
793
688
583
478
373
268
163
58
-47
1
2
3
8.00
16.00
24.00
32.00
40.00
48.00
분