



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2012년06월28일
(11) 등록번호 10-1160611
(24) 등록일자 2012년06월21일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 47/48 (2006.01) A61K 38/00 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2005-7021599
(22) 출원일자(국제) 2004년05월12일
심사청구일자 2009년05월11일
(85) 번역문제출일자 2005년11월12일
(65) 공개번호 10-2006-0023123
(43) 공개일자 2006년03월13일
(86) 국제출원번호 PCT/US2004/014887
(87) 국제공개번호 WO 2004/100997
국제공개일자 2004년11월25일
(30) 우선권주장
60/469,996 2003년05월12일 미국(US)
(56) 선행기술조사문헌
논문, Bioconjugate Chemistry, vol. 14 (2003)
논문, Advanced Drug Delivery Reviews, Vol. 55
(2003)
US4179337 A
W02000033881 A1

(73) 특허권자
아피맥스, 인크.
미합중국 캘리포니아, 팔로 알토, 미란다 애비뉴
4001 (우편번호 94304)
(72) 발명자
홈즈 크리스토퍼 피.
미국 캘리포니아 95070 사라토가 웨스트오버 드
라이브 13633
인 쿤
미국 캘리포니아 94303 팔로 알토 코스트랜드 드
라이브 747
튜멜터 데이빗
미국 캘리포니아 94085 서니베일 산타 페 테라스
#106 250
(74) 대리인
박장원

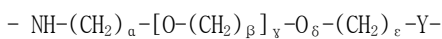
전체 청구항 수 : 총 16 항

심사관 : 이선화

(54) 발명의 명칭 **폴리(에틸렌 글리콜)로 변형된 펩티드 기재 화합물용 신규 스페이서 부분**

(57) 요약

본 발명은 펩티드 부분, 스페이서 부분 및 폴리(에틸렌 글리콜) 부분과 같은 수용성 중합체 부분을 포함하는 화합물에 관한 것이다. 스페이서 부분은 펩티드 부분과 수용성 중합체 부분 사이에 존재한다. 스페이서 부분은 다음의 구조를 갖는다:



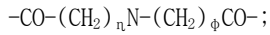
식 중, α , β , γ , δ , 및 ε 는 각각 독립적으로 선택되는 정수이다.

특허청구의 범위

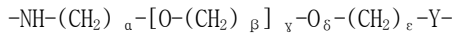
청구항 1

(a) 적어도 두 개의 펩티드 단량체를 포함하는 펩티드 부분;

(b) 상기 두 개의 펩티드 단량체를 연결하며, 하기의 구조를 갖는 링커 부분;



(c) 하기의 구조를 갖는 스페이서 부분;



(식 중, 스페이서 부분의 Y는 상기 링커 부분의 N과 결합된 CO이다)

(d) 상기 스페이서 부분에 결합된 수용성 폴리머 부분

을 포함하는 펩티드계 화합물.

(식 중, α , β , γ , δ , n , ϕ 및 ε 은 각각 독립적으로 선택되는 정수이다)

청구항 2

제1항에 있어서,

α 는 $1 \leq \alpha \leq 6$ 의 정수;

β 는 $1 \leq \beta \leq 6$ 의 정수;

ε 는 $1 \leq \varepsilon \leq 6$ 의 정수;

δ 는 0 또는 1;

γ 는 $0 \leq \gamma \leq 10$ 의 정수;

인 것인 화합물.

청구항 3

제2항에 있어서, $\gamma > 1$ 이고 $\beta = 2$ 인 것인 화합물.

청구항 4

제1항에 있어서,

$\alpha = \beta = \varepsilon = 2$;

$\gamma = \delta = 1$;

인 것인 화합물.

청구항 5

제1항에 있어서, 수용성 중합체 부분은 폴리(에틸렌 글리콜) 부분인 것인 화합물.

청구항 6

제5항에 있어서, 폴리(에틸렌 글리콜) 부분의 분자량은 20 KDalton을 초과하는 것인 화합물.

청구항 7

제5항에 있어서, 폴리(에틸렌 글리콜) 부분은 선형인 것인 화합물.

청구항 8

제5항에 있어서, 폴리(에틸렌 글리콜) 부분은 분자량이 20 내지 40 KDalton인 것인 화합물.

청구항 9

제5항에 있어서, 폴리(에틸렌 글리콜) 부분의 다중 분산도 값 (M_w/M_n)은 1.20 미만인 것인 화합물.

청구항 10

삭제

청구항 11

삭제

청구항 12

제1항에 있어서, 각각의 펩티드 단량체는 아미노산 단량체를 50개 이하로 포함하는 것인 화합물.

청구항 13

제12항에 있어서, 각각의 펩티드 단량체는 아미노산 단량체를 약 10 내지 25개 포함하는 것인 화합물.

청구항 14

제1항에 있어서, 펩티드 부분은 에리트로포이에틴-수용체에 결합하는 펩티드를 하나 이상 포함하는 것인 화합물.

청구항 15

제1항에 있어서, 펩티드 부분은 트롬보포이에틴-수용체에 결합하는 펩티드를 하나 이상 포함하는 것인 화합물.

청구항 16

삭제

청구항 17

삭제

청구항 18

삭제

청구항 19

삭제

청구항 20

삭제

청구항 21

삭제

청구항 22

삭제

청구항 23

삭제

청구항 24

삭제

청구항 25

삭제

청구항 26

삭제

청구항 27

삭제

청구항 28

삭제

청구항 29

삭제

청구항 30

삭제

청구항 31

제1항에 있어서,

$$\alpha=2;$$

$$\gamma = \delta = \beta = \varepsilon = 0;$$

인 것인 화합물.

청구항 32

삭제

청구항 33

제5항에 있어서, 폴리(에틸렌 글리콜) 부분은 적어도 하나의 단량체 폴리(에틸렌 글리콜) 사슬을 포함하는 것인 화합물.

청구항 34

제33항에 있어서, 각각의 폴리(에틸렌 글리콜) 사슬은 분자량이 20 내지 40 KDalton인 것인 화합물.

청구항 35

삭제

청구항 36

삭제

명세서

기술분야

관련 참고 출원

[0001]

본 출원은 35 U.S.C. § 119(e)조 규정에 의거하여, 2003년 5월 12일자 미국 가특허 출원 제60/469,996호를 기초로 하여 우선권을 주장한다. 우선권의 기초가 된 상기 출원 발명의 내용은 본 출원 발명에 그 전체가 참고

[0002]

로 통합되어 있다.

[0003] 본 발명은 예컨대 폴리(에틸렌 글리콜) (PEG)와 같은 수용성 중합체를 펩티드 및 펩티드 기재 화합물에 공유적으로 부착시키기 위한 새로운 방법에 관한 것이다. 본 발명은 또한 이러한 화합물을 포함하는 신규한 치료용 조성물에 관한 것이기도 하다.

배경 기술

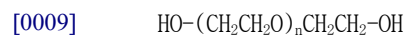
[0004] 최근, 단백질에 대한 연구가 발전함에 따라, 여러 가지 기능을 갖는 펩티드가 다수 밝혀졌다. 유전자 재조합 기술 및 펩티드의 유기 합성법의 발달에 따라, 이들 생리적으로 활성적인 펩티드 및 이들의 구조적 유사체 화합물을 대량으로 수득하는 것이 가능하게 된 것이다. 특이한 활성을 갖는 이들 펩티드 중 다수가 의약품으로서 매우 유용하다.

[0005] 이러한 펩티드의 예로는 에리스로포이에틴 수용체 (EPO-R: erythropoietin receptor)에 결합하는 펩티드를 들 수 있다. EPO는 165개의 아미노산으로 된 당단백질 호르몬으로서, 아미노산 좌위 24, 38, 83 및 126에 4개의 글리코실화 부위를 가지며, 분자량은 약 34,000이다. 이 펩티드는 적혈구 전구체 세포의 유사분열과 분화를 자극하기 때문에 적혈구 생성을 돕는다. EPO는 적혈구 세포 생성 과정에 필수적인 요소로서, 이 호르몬은 적혈구 생산의 저조 또는 결핍을 특징으로 하는 혈액 관련 질환의 진단과 치료 모두에 이용하는데 잠재적으로 유용하다. EPO-R과 상호반응하는 몇가지 펩티드가 알려져 있다 (예컨대, Wrighton *et al.*의 미국 특허 5,773,569호; Wrighton *et al.*의 미국 특허 5,830,851호; Smith-Swintosky *et al.*의 WO 01/91780 참조)

[0006] 그러나, 펩티드는, 특히 순환계로 투여된 경우 일반적으로 매우 빨리 제거된다. 따라서, 이러한 펩티드의 지속성 (내구성)을 증진시키는 것이 요망되고 있다. 또한, 펩티드가, 펩티드 단백질 엔지니어링에 의해 설계된 여러종의 동물로부터 얻어지고/얻어지거나 대상자의 것과는 다른 구조를 갖는 경우, 항체 생산으로 인해 심각한 증상이 나타날 위험이 있다. 따라서, 이러한 펩티드의 항원성을 개선시키는 것 역시 요망되고 있다. 이러한 펩티드가 약품으로서 사용될 수 있기 위해서는 개선된 항원성과 지속성을 모두 갖춰야 한다.

[0007] 폴리(에틸렌 글리콜)과 같은 거대분자 화합물(macromolecular compounds)로 펩티드를 화학적으로 변형(chemical modification)시키면 여러 가지 펩티드의 항원성과 지속성을 개선시키는데 효과적인 것으로 나타났다. 따라서, 폴리(에틸렌 글리콜)과 폴리(에틸렌 글리콜) 유도체는 펩티드 변형을 위한 거대 분자 시약으로서 널리 사용되어 왔다.

[0008] 최광의의 형태로, 폴리(에틸렌 글리콜)의 구조는 다음과 같다.



[0010] 전술한 중합체, 즉, 알파, 오메가-디히드록실 폴리(에틸렌 글리콜)은 간단히 HO-PEG-OH로 표시되며 여기서, -PEG-라는 기호는 다음 구조 단위를 나타내는 것으로 이해된다.



[0012] 작용에 관한 특정 이론이나 메카니즘에 구애됨이 없이, 이 길다란 쇠상 PEG 분자 또는 부분은 수성 매질 중에서 고도로, 그리고 급속한 모션(motion)으로 수화되는 것으로 믿어진다. 이러한 급속한 모션은 PEG로 하여금 큰 부피를 갖는 다른 분자들을 끌어내도록 하여 다른 분자들의 접근과 간섭을 방지해준다. 그 결과, 다른 화학적 개체 (예컨대 펩티드)에 부착될 경우, PEG 중합체 사슬은 이러한 화학적 개체를 면역 반응 및 다른 클리어런스(clearance) 메카니즘으로부터 보호해줄 수 있다. 그 결과, PEG화(PEGylation)는 약동학을 최적화시켜줌으로써, 개선된 약물 효능과 안전성을 확보해주며, 생체이용성을 증진시키고 면역원성과 투여 빈도수를 감소시켜 준다.

[0013] 예컨대, PEG의 몇몇 활성 유도체를 펩티드, 단백질 및 효소에 부착시켜 이로인한 결과를 얻은 바 있다. PEG는 유기 용매에 가용성이다. 효소에 부착된 PEG는 유기 용매에서 가용성이며 활성적인 PEG-효소 접합체(conjugates)를 생성시킬 수 있다. 단백질에 PEG를 부착시키면, 변형되지 않은 단백질과 비교할 때, 면역원성을 감소시킬 수 있고 PEG-단백질의 신장으로부터의 클리어런스 속도를 낮출 수 있는데, 이로 인해 이 접합체의 혈액 순환 기간을 극적으로 증가시킬 수도 있다.

[0014] 예컨대, 인터류킨 (Knauf, M. J. *et al.*, J. Biol. Chem. 1988, 263, 15,064; Tsutsumi, Y. *et al.*, J. Controlled Release 1995,33, 447), 인터페론 (Kita, Y. *et al.*, Drug Des. Delivery 1990, 6, 157), 카탈라제 (Abuchowski, A. *et al.*, J. Biol. Chem. 1977,252, 3,582), 수퍼옥사이드 디스무타제 (Beauchamp, C.O.

et al., Anal. Biochem. 1983,131, 25), 및 아테노신 데아미나제 (Chen, R. *et al.*, Biochim. Biophys. Acta 1981, 660, 293)와 같은 치료용 단백질에 PEG를 공유적으로 부착시켜 이들의 생체내 반감기를 연장시키고/연장시키거나 이들의 면역원성과 항원성을 감소시키는 것이 보고된 바 있다.

[0015] 또한, 표면에 부착된 PEG는 표면에 대한 단백질 및 세포 흡착을 감소시켜 표면의 전기적 특성을 변경시킨다. 마찬가지로, 리포솜에 부착된 PEG는 이들 입자의 혈액 순환 기간을 크게 증가시킴으로써 약물 전달에 있어서 이들의 이용성을 증진시킬 수 있다 (J. M. Harris, Ed., "Biomedical and Biotechnical Applications of Polyethylene Glycol Chemistry", Plenum, New York, 1992).

[0016] PEG와 부착된 거대분자 사이에 아미노산 또는 펩티드 팔 (arm)이 존재하면 적절한 아미노산 또는 펩티드를 이용하여 도입될 수 있는 특성들이 다양하기 때문에 여러 가지 장점이 있는 것으로 입증되었다. 이들 아미노산 또는 펩티드 팔 중, 노르류신 (Nle)는 분석 목적을 위해 사용되고 있다; ¹⁴C 또는 트리튬으로 표지된 Gly는 약동학 연구를 위해 사용되며; Lys은 브랜칭 연구를 위해; 그리고 Met-Nle 또는 Met-βAla는 BrCN 처리에 의한 PEG 제거를 연구하는데 이용된다 (Veronese, F. M. Biomaterials, 2001, 22, 405).

[0017] PEG와 부착된 거대분자 사이에 아미노산 팔을 갖는 또 다른 공지 유형의 PEG 유도체 중, 두개의 선형 PEG 사슬은 3작용성 스페이서 (trifunctional spacer)의 두개의 작용기를 통해 서로 연결되는 반면, 세번째 작용기는 단백질에 결합하는데 사용된다는 특징을 갖는다. 리신은 3작용성 아미노산 스페이서로서 두개의 PEG 사슬은 그의 알파 및 엡실론 아미노기에 연결된 반면 카르복실기는 단백질 결합을 위해 히드록시숙신이미딜 에스테르로서 활성화된다. 이 PEG 유도체는 접합이 일어나는 동안 효소의 불활성화가 낮다는 장점을 가지며 이것의 "우산과 같은" 구조는 단백질이 분해되는 것을 방지하고, 항체의 접근을 방지하며 면역원성을 감소시키는 데 효과적이다 (Veronese, F. M. Biomaterials, 2001,22, 405).

[0018] PEG-링커(linker)-펩티드 또는 PEG-링커-리포솜은 활성화기의 일부가 최종 PEG-펩티드 또는 PEG-리포솜 부가물 (adduct)에 통합될 경우 바람직하지 못한 부산물로서 종종 형성된다. Frances *et al.* (Int. J. Hematol. 1998, 68, 1)은 이러한 링커가 다음과 같은 몇가지 유형의 악영향을 가질 수 있음을 개시하고 있다: (1) 이러한 링커들은 반드시 면역학적으로 불활성인 것은 아니며 이러한 기들이 PEG 단백질의 면역원성/항원성을 담당한다는 실험적 증거가 있다; (2) 어떤 링커들은 효소적 또는 화학적으로 절단될 수 있는 불안정한 결합을 함유한다; (3) 종종 비교적 독성인 활성화 PEG로부터 유도된 링커 부분들은 조절상의 문제를 유발할 수 있다; (4) 트리아진 고리와 같은 어떤 링커는 가교를 일으킬 수 있다.

[0019] PEG-변형 펩티드 기재 화합물 분야에서 행해진 많은 진전에도 불구하고, 항원성과 지속성이 개선된 신규한 PEG-변형 화합물이 요청되고 있다.

[0020] * * * * *

[0021] 명세서 전반에 걸쳐, 참고문헌을 인용 및/또는 개시하였으나, 이것이 곧 이러한 문헌들이 본 발명의 종래기술을 구성함을 인정하는 것은 아니다.

[0022] 발명의 요약

[0023] 본 발명은 펩티드 부분, 스페이서 부분 및 폴리(에틸렌 글리콜)과 같은 수용성 중합체 부분을 포함하는 펩티드 기재 화합물에 관한 것이다. 스페이서 부분은 펩티드와 수용성 중합체 부분 사이에 위치한다.

[0024] 본 발명은 또한 링커 부분을 추가로 포함하는 펩티드 기재 화합물에 관한 것이기도 하다. 스페이서 부분은 링커 부분과 수용성 중합체 부분 사이에 존재하고 링커 부분은 스페이서 부분과 펩티드 사이에 위치한다. 또는 링커 부분은 스페이서 부분을 포함할 수도 있다.

[0025] 본 발명의 일례에서, 스페이서 부분의 구조는 다음과 같다.



[0026] 식 중, α, β, γ, δ, 및 ε는 각각 독립적으로 선택되는 정수이다.

[0028] 양호한 실시 상태에 있어서,

[0029] α는 1 ≤ α ≤ 6의 정수;

[0030] β는 1 ≤ β ≤ 6의 정수;

- [0031] ϵ 는 $1 \leq \epsilon \leq 6$ 의 정수;
- [0032] δ 는 0 또는 1;
- [0033] γ 는 $0 \leq \gamma \leq 10$ 의 정수이고;
- [0034] Y는 NH 또는 CO이다.
- [0035] 특정의 양호한 실시 상태에서, $\gamma > 1$ 이면, $\beta = 2$ 이다.
- [0036] 한가지 양호한 실시 상태에 있어서,
- [0037] $\alpha = \beta = \epsilon = 2$;
- [0038] $\gamma = \delta = 1$ 이고;
- [0039] Y는 NH이다.
- [0040] 또 다른 실시 상태에 있어서,
- [0041] $\gamma = \delta = 0$;
- [0042] $2 \leq \alpha + \epsilon \leq 5$ 이고;
- [0043] Y는 CO이다.
- [0044] 또 다른 실시 상태에 있어서,
- [0045] $\gamma = \delta = 0$;
- [0046] $\alpha + \epsilon = 5$ 이고;
- [0047] Y는 CO이다.
- [0048] 또 다른 실시 상태에 있어서,
- [0049] $\alpha = 2$;
- [0050] $\gamma = \delta = \beta = \epsilon = 0$ 이고;
- [0051] Y는 CO이다.
- [0052] 본 발명의 한 가지 실시 상태에 있어서, 링커 부분의 구조는 다음과 같다.
- [0053] $-\text{CO}-(\text{CH}_2)_n-\text{N}-(\text{CH}_2)_\phi-\text{CO}-$
- [0054] 식 중, n 와 ϕ 는 각각 독립적으로 선택되는 정수이고 N은 스페이서 부분의 Y에 공유적으로 결합될 수 있다.
- [0055] 양호한 실시 상태에 있어서,
- [0056] n 는 $1 \leq n \leq 6$ 의 정수이고;
- [0057] ϕ 는 $1 \leq \phi \leq 6$ 의 정수이다.
- [0058] 또 다른 양호한 실시 상태에서,
- [0059] $n = \phi = 1$ 이다.
- [0060] 또 다른 실시 상태에 있어서, 링커 부분은 리신 잔기 또는 리신 아미드(카르복실기가 아미드 부분 $-\text{CONH}_2$ 로 전환된 경우 리신 잔기)이다.
- [0061] 좋기로는, 수용성 중합체 부분은 폴리(에틸렌 글리콜) 부분이다. 더욱 좋기로는, 폴리(에틸렌 글리콜) 부분은 선형이고 분자량은 10 KDalton을 초과하지 않는다. 더욱 좋기로는 폴리(에틸렌 글리콜) 부분의 분자량은 약 20 내지 60 KDaltons이다. 가장 좋기로는 폴리(에틸렌 글리콜) 부분의 분자량은 20 KDaltons이다. 좋기로는 폴리(에틸렌 글리콜) 부분은 다중 분산도(polydispersity) 값 (M_w/M_n)이 1.20 미만, 더욱 좋기로는 1.1 미만, 가장 좋기로는 1.05 미만이다. 수용성 중합체 부분은 이량체일 수 있고 링커 또는 스페이서 부분에 의해 연결된 두개의 단량체형 수용성 중합체를 함유한다.

[0062] 하나의 실시 상태에 있어서, 펩티드 부분은 에리스로포이에틴-수용체에 결합하는 펩티드 중에서 선택된다. 이러한 EPO-R 결합 펩티드의 예로는 공개된 국제 특허 출원 PCT/US00/32224 (공개 번호 WO 01/38342A2, 미국 지정됨), PCT/US96/09810 (공개 번호 WO 96/40749, 미국 지정됨) 및 PCT/US01/16654 (공개 번호 WO 01/91780 A1); 및 미국 특허 5,767,078호, 5,773,569호, 5,830,851호, 5,986,047호 및 6,221,608호에 기재된 것들을 들 수 있으나, 이에 한정되지 않는다. 이러한 EPO-R 결합 펩티드의 부가적인 예는 미국 가특허 출원 60/470,245호; 60/469,993호; 및 60/470,244호에 개시되어 있으며 이 출원들은 모두 2004년 5월 12일 출원되었다.

[0063] 또 다른 실시 상태에 있어서, 펩티드 부분은 트롬보포이에틴-수용체 ("TPO-R")에 결합하는 펩티드 중에서 선택된다. TPO-R 결합 펩티드의 예로서 미국 특허 6,552,008호, 6,506,362호, 6,498,155호, 6,465,430호, 6,333,031호, 6,251,864호, 6,121,238호, 6,083,913호, 5,932,546호, 5,869,451호, 5,683,983호, 5,677,280호, 5,668,110호, 및 5,654,276호; 및 공개된 미국 특허 출원 2003/0083361호, 2003/0009018호, 2002/0177166호 및 2002/0160013호에 개시된 것들을 들 수 있으나 이에 한정되지 않는다.

[0064] 본 발명은 또한 전술한 화합물(들)을 함유하는 의약 조성물에 관한 것이기도 하다.

발명의 상세한 설명

[0065] 정의

[0066] 펩티드 중의 아미노산 잔기는 다음과 같이 약칭된다: 페닐알라닌은 Phe 또는 F; 류신은 Leu 또는 L; 이소류신은 Ile 또는 I; 메티오닌은 Met 또는 M; 발린은 Val 또는 V; 세린은 Ser 또는 S; 프롤린은 Pro 또는 P; 트레오닌은 Thr 또는 T; 알라닌은 Ala 또는 A; 티로신은 Tyr 또는 Y; 히스티딘은 His 또는 H; 글루타민은 Gln 또는 Q; 아스파라긴은 Asn 또는 N; 리신은 Lys 또는 K; 아스파르트산은 Asp 또는 D; 글루탐산은 Glu 또는 E; 시스테인은 Cys 또는 C; 트립토판은 Trp 또는 W; 아르기닌은 Arg 또는 R; 그리고 글리신은 Gly 또는 G로 약기한다. 펩티드 중 통상적이지 않은 아미노산은 다음과 같이 약기한다: 1-나프틸알라닌은 1-nal 또는 Np; 2-나프틸알라닌은 2-nal; N-메틸글리신 (사르코신이라고도 알려져 있음)은 MeG 또는 S_G; 그리고 아세틸화 글리신 (N-아세틸글리신)은 AcG.

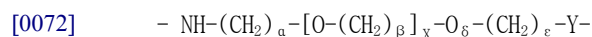
[0067] "펩티드" 또는 "폴리펩티드"는 아마이드 결합을 통해 서로 결합되어 있는 알파 아미노산인 단량체들이 중합하여 이루어진 중합체를 가리킨다. 펩티드는 두개 또는 그 이상의 아미노산 단량체들의 길이를 갖는다. 종기로는, 본 발명의 펩티드는 아미노산 단량체 약 50개 미만의 길이를 갖는다.

[0068] 본 발명에서, "약제학적으로 허용 가능한"이라는 표현은 "일반적으로 안전한 것으로 간주되는" 분자 개체 및 조성물을 가리키는 것으로, 예컨대, 생리학적으로 관용될 수 있는 것을 말하며, 사람에게 투여시 일반적으로 급성 위연동이상항진, 현기증 등과 같은 알레르기성 또는 유사한 원치 않는 반응을 일으키지 않는 것을 의미한다. 종기로는, 본 발명에서 "약제학적으로 허용 가능한"이라는 표현은 연방정부 또는 주정부의 규제당국에 의해 승인된 것이거나 미국 약전 (U.S. Pharmacopeia) 또는 동물, 더욱 구체적으로는 사람에게 대해 사용가능한 것으로 일반적으로 승인된 약전에 수록된 것을 의미한다. "캐리어 (carrier)"라 함은 본 발명 화합물과 함께 투여되는 희석제, 애주번트 (adjuvant), 부형제 또는 비히클을 가리킨다. 이러한 약제학적 캐리어는 물과, 예컨대, 땅콩유, 대두유, 광물유, 참기름 등과 같은 페트롤류, 동물성, 식물성 또는 합성 기원의 것을 비롯한 오일 등의 멸균 액체일 수 있다. 물 또는 수용성 식염수 용액과 수용성 텍스트로스 및 글리세롤 용액은 캐리어, 특히 주사가 가능한 용액으로서 바람직하게 사용된다. 적절한 약제학적 캐리어는 E. W. Martin의 "Remington's Pharmaceutical Sciences"에 설명되어 있다.

[0069] 본 발명에서 "작용제 (agonist)"라 함은 그의 상보적인 생물학적 활성 수용체에 결합하는 생물학적 활성 리간드를 가리키는 것으로서, 수용체를 활성화시켜 수용체에서 생물학적 반응을 일으키거나, 또는 수용체의 기준의 생물학적 활성을 증진시키는 역할을 한다.

[0070] 스페이서 부분 (Spacer Moiety)

[0071] 본 발명에서, 펩티드 부분은 다음 구조를 갖는 스페이서 부분을 통해 PEG 부분에 부착된다.



[0073] 식 중, α , β , γ , δ , 및 ϵ 는 각각 독립적으로 선택되는 정수이다.

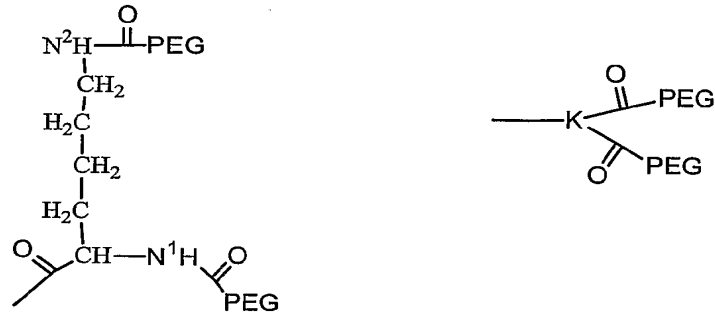
[0074] 양호한 실시 상태에 있어서

- [0075] α 는 $1 \leq \alpha \leq 6$ 의 정수;
- [0076] β 는 $1 \leq \beta \leq 6$ 의 정수;
- [0077] ϵ 는 $1 \leq \epsilon \leq 6$ 의 정수;
- [0078] δ 는 0 또는 1;
- [0079] γ 는 $0 \leq \gamma \leq 10$ 의 정수이고;
- [0080] Y는 NH 또는 CO이다.
- [0081] 특정의 양호한 실시 상태에 있어서, $\gamma > 1$ 이면, $\beta = 2$ 이다.
- [0082] 한가지 양호한 실시 상태에 있어서,
- [0083] $\alpha = \beta = \epsilon = 2$;
- [0084] $\gamma = \delta = 1$ 이고;
- [0085] Y는 NH이다.
- [0086] 또 다른 실시 상태에 있어서,
- [0087] $\gamma = \delta = 0$;
- [0088] $2 \leq \alpha + \epsilon \leq 5$ 이고;
- [0089] Y는 CO이다.
- [0090] 또 다른 실시 상태에 있어서,
- [0091] $\gamma = \delta = 0$;
- [0092] $\alpha + \epsilon = 5$ 이고;
- [0093] Y는 CO이다.
- [0094] 또 다른 실시 상태에 있어서,
- [0095] $\alpha = 2$;
- [0096] $\gamma = \delta = \beta = \epsilon = 0$ 이고;
- [0097] Y는 CO이다.
- [0098] 본 발명에 따라, 수용성 중합체 부분 (종기로는 PEG)은 스페이서의 NH 말단에 부착된다. 이 수용성 부분은 직접 스페이서에 부착될 수도 있고, 또는 간접적으로, 예컨대 아미드 또는 카르바메이트 결합(들)을 통해 부착될 수도 있다. 이러한 실시 상태에서, PEG 부분은 적어도 하나의 단량체 PEG 사슬을 갖는다.
- [0099] 특정 실시 상태에서, PEG 부분은 두개의 단량체 PEG 사슬을 갖는다. 종기로는 이 두개의 단량체 PEG 사슬은 리신 잔기 또는 리신 아미드 (카르복실기가 아미드 부분 $-\text{CONH}_2$ 로 전환된 리신 잔기)를 통해 서로 연결되는 것이 좋다. 더욱 종기로는, 이들 두개의 PEG 사슬은 리신의 알파 및 엡실론 아미노기에 연결되는 반면, 카르복실기는 스페이서 부분에 결합하기 위해 히드록시숙신이미딜 에스테르로서 활성화되는 것이 좋다. 예컨대, 리신 아미드가 두개의 단량체 PEG 사슬에 연결되면 이 이량체는 다음 화학식 I에 도시된 바와 같은 구조를 가질 수 있으며, 화학식 II에 도시된 바와 같이 요약될 수 있다.

[0100]

화학식 I

화학식 II



[0101]

[0102]

화학식 I에서, N²는 리신의 ε-아미노기의 질소 원자를 나타내고 N¹은 리신의 α-아미노기의 질소 원자를 나타낸다. 양호한 실시 상태에 있어서, 두개의 펩티드 단량체들의 C 말단 리신은 L-리신이다. 또 다른 실시 상태에 있어서, 하나 이상의 리신 잔기는 D-리신일 수 있다.

[0103]

본 발명에 따라 펩티드 부분은 스페이서의 Y 말단에 부착된다. 이 스페이서는 펩티드의 C 말단 또는 N 말단에 부착될 수 있다. 따라서, 스페이서가 펩티드의 C 말단에 부착된 실시 상태에서, Y는 NH이다. 스페이서가 펩티드의 N 말단에 부착된 실시 상태에서는, Y는 CO이다. 또 다른 양호한 실시 상태에 있어서, Y가 NH인 경우 본 발명의 스페이서는 펩티드 단량체의 C 말단 리신 잔기의 ε-아미노기에 아마이드 결합에 의해 부착된다.

[0104]

링커 부분 (Linker Moiety)

[0105]

또 다른 양호한 실시 상태에서, 본 발명의 스페이서는 3작용성 링커의 일부로서 펩티드에 부착된다 (후술 내용 참조). 이 실시 상태에서, 스페이서 부분의 Y는 CO이고 스페이서 부분의 Y는 3작용성 링커의 N 원자와 함께 아마이드 결합을 형성한다.

[0106]

특히 바람직한 한가지 실시 상태에 있어서, 링커 부분은 다음 구조식의 3작용성 링커인 것이 좋다.



[0107]

[0108]

식 중, η와 φ는 각각 독립적으로 선택되는 정수이고 N은 스페이서 부분의 Y에 공유 결합하며, 스페이서 부분의 Y는 CO이다.

[0109]

양호한 실시 상태에 있어서,

[0110]

η는 1 ≤ η ≤ 6의 정수이고;

[0111]

φ는 1 ≤ φ ≤ 6의 정수이다.

[0112]

또 다른 양호한 실시 상태에 있어서,

[0113]

η=φ=1이다.

[0114]

스페이서 부분은 펩티드 합성시 펩티드 내로 통합될 수 있다. 예컨대, 스페이서가 자유 아미노기 및 다른 분자 부분에 대한 결합을 가능케 하는 제2의 작용기 (예컨대, 카르복실기 또는 아미노기)를 함유할 경우, 스페이서는 고체상 지지체에 접합될 수 있다. 그 후, 펩티드는 표준 고상 기술에 의해 스페이서의 자유 아미노기 상으로 직접 합성될 수 있다.

[0115]

양호한 실시 상태에 있어서, 두개의 작용기를 갖는 스페이서는 제1 작용기를 통하여 고상 지지체에 먼저 커플링된다. 이량체 펩티드를 합성하고자 할 경우에는, 임의로 펩티드 합성의 개시 부위로서 작용할 수 있는 두개 이상의 작용기와 다른 분자 부분에 결합할 수 있게 하는 부가적인 작용기 (예컨대, 카르복실기 또는 아미노기)를 갖는 링커 L_k 부분을, 스페이서의 제2 작용기와 링커의 제3 작용기를 통하여 스페이서에 접합시킨다. 그 후, 두개의 펩티드 단량체들을 다양한 고상 합성 기법에 따라, 링커 L_k 부분의 두개의 반응성 질소기 상으로 직접 합성할 수 있다. 예컨대, 자유 아미노기를 갖는 고상 지지체에 커플링된 스페이서를 링커의 자유 카르복실기를 통해 리신 링커와 반응시킬 수 있다.

[0116]

또 다른 실시 상태에서는, 펩티드 합성 후 스페이서 부분을 펩티드에 접합시킬 수 있다. 이러한 접합은 기술

분야에 잘 수립된 방법에 의해 달성 가능하다. 한 가지 실시 상태에 있어서, 링커는 합성된 펩티드의 표적 작용기에 부착되는데 적당한 적어도 1종의 작용기를 함유한다. 예컨대, 자유 아민기를 갖는 스페이서는 펩티드의 C 말단 카르복실기와 반응할 수 있다.

[0117] 수용성 중합체/PEG 부분

[0118] 본 발명의 수용성 중합체 부분으로는 (a) PEG, mPEG, PEG 동중중합체, 프로필렌 글리콜 동중중합체, 에틸렌 글리콜과 프로필렌 글리콜과의 공중합체를 비롯한 폴리알킬렌 글리콜 및 이의 유도체; 여기서 상기 동중중합체와 공중합체는 치환되지 않거나 또는 한쪽 말단이 알킬기로 치환될 수 있다; (b) 메틸셀룰로스 및 카르복시 메틸 셀룰로스를 비롯한 셀룰로스 및 셀룰로스 유도체; (c) 전분 및 텍스트린, 및 이의 유도체; (d) 텍스트란 설페이트, 가교된 텍스트린 및 카르복시메틸 텍스트린을 비롯한 텍스트란 및 텍스트란 유도체; (e) 헤파린 및 헤파린의 단편; (f) 폴리비닐 알코올 및 폴리비닐 에틸 에테르; (g) 폴리비닐피롤리돈; (h) a,b-폴리[(2-히드록시에틸)-DL-아스파르트아미드; 및 (i) 폴리옥시에틸화 폴리올을 들 수 있으나 이에 한정되지 않는다.

[0119] 이들 중합체들은 선형, 분지형, 별모양일 수 있고 분자량이 다양하다.

[0120] 수용성 중합체 부분은 PEG인 것이 좋다. 본 발명에서 사용되기에 양호한 PEG는 분자량이 20 KDaltons를 초과하는 선형 PEG이다. 좋기로는, PEG의 분자량은 약 20 내지 60 KDaltons이다. 더욱 좋기로는, PEG의 분자량이 약 20 Kdaltons 내지 약 40 KDalton이다. 가장 좋기로는, PEG의 분자량이 약 20 KDaltons이다.

[0121] 수용성 중합체 부분은 스페이서 또는 링커 부분에 공유적으로 결합된다. 한가지 실시 상태에 있어서, PEG 부분은 스페이서의 N 말단에 부착된다.

[0122] 본 발명의 화합물은 복수개의 수용성 중합체 부분 (좋기로는 PEG 부분) (예컨대 2, 3, 4개 또는 그 이상)을 포함할 수 있고, 이러한 복수개의 수용성 중합체 부분 중 적어도 하나는 스페이서 부분에 연결되어 있다. 이 화합물이 1개보다 많은 수용성 중합체 부분을 포함할 경우, 복수개의 수용성 중합체 부분은 동일하거나 상이한 화학적 부분일 수 있다 (예컨대 분자량을 달리하는 PEG들). 본 발명의 한가지 실시 상태에서, 수용성 중합체 부분은 스페이서 부분에 의해 연결된 두개의 단량체 PEG들을 함유하는 이량체이다. 몇가지 경우, PEG화도 (degree of PEGylation: 펩티드에 부착된 PEG 부분의 수 및/또는 PEG가 부착된 펩티드의 총수)는 PEG화 반응 시 PEG 분자 대 펩티드 분자의 비율과, 반응 혼합물 중 각각의 총 농도에 의해 영향을 받을 수 있다. 일반적으로, PEG 대 펩티드의 최적 비율 (미반응 펩티드 및/또는 PEG를 과량으로 제공하지 않기 위한 반응 효율 면에서)은 소망되는 PEG화도 (예컨대, 모노-, 디-, 트라이- 등), 선택된 중합체 분자량과 같은 인자, 중합체가 분지형인지 여부, 및 특정 부착 방법의 경우 반응 조건 등에 의해 결정된다.

[0123] 당업자는 몇가지 PEG 부착 방법을 이용할 수 있다 [예컨대, Goodson, *et al.*, (1990) Bio/Technology 8:343 (PEGylation of interleukin-2 at its glycosylation site after site-directed mutagenesis); EP 0 401 384 (coupling PEG to G-CSF); Malik, *et al.*, (1992) Exp. Hematol. 20: 1028-1035 (PEGylation of GM-CSF using tresyl chloride); PCT 공개 번호 WO 90/12874 (PEGylation of erthropoietin containing a recombinantly introduced cysteine residue using a cysteine-specific mPEG derivative); 미국 특허 제5,757,078호 (PEGylation of EPO peptide); 미국 특허 제5,672,662호 (Poly(ethylene glycol) and related polymers monosubstituted with propionic or butanoic acids and functional derivatives thereof for biotechnical applications); 미국 특허 제6,077,939호 (PEGylation of an N-terminal α -carbon of a peptide); Veronese *et al.*, (1985) Appl. Biochem. Biochnol 11: 141- 142 (PEGylation of an N-terminal α -carbon of a peptide with PEG-nitrophenylcarbonate ("PEG-NPC") or PEG-trichlorophenylcarbonate); and Veronese (2001) Biomaterials 22:405-417 (Review article on peptide and protein PEGylation) 참조].

[0124] 예컨대, PEG는 반응성기를 통하여 아미노산 잔기에 공유적으로 결합될 수 있다. 반응성기는 활성화된 PEG 분자가 결합될 수 있는 것들 (예컨대, 자유 아미노기 또는 카르복실기)을 가리킨다. 예컨대, N 말단 아미노산 잔기와 리신 (K) 잔기에는 자유 아미노기가 있고, C 말단 아미노기 잔기에는 자유 카르복실기가 있다. 설프히드릴기 (예컨대, 시스테인 잔기 상에서 발견됨) 역시 PEG를 부착하는데 있어서 반응성기로서 사용될 수 있다. 이에 더하여, 폴리펩티드의 C 말단에 특이적으로 활성화기 (예컨대, 히드라지드, 알데히드 및 방향족 아미노기)를 도입하기 위한 효소 보조법이 설명된 바 있다 [Schwarz, *et al.*, (1990) Methods Enzymol. 184: 160; Rose, *et al.*, (1991) Bioconjugate Chem. 2: 154; Gaertner, *et al.*, (1994) J. Biol. Chem. 269: 7224].

[0125] 예컨대, PEG 분자는 상이한 반응성 부분들을 갖는 메톡실화 PEG ("mPEG")를 이용하여 아미노기에 부착될 수 있다. 이러한 반응성 부분의 예로는 숙신이미딜 숙시네이트 (SS), 숙신이미딜 카르보네이트 (SC), mPEG-다이

미데이트, 파라-니트로페닐카르보네이트 (NPC), 숙신이미딜 프로피오네이트 (SPA), 및 시아누릭 클로라이드를 들 수 있으나 이에 한정되지 않는다. 이러한 mPEG들의 예로는 mPEG-숙신이미딜 숙시네이트(mPEG-SS), mPEG₂-숙신이미딜 숙시네이트(mPEG₂-SS); mPEG-숙신이미딜 카르보네이트(mPEG-SC), mPEG₂-숙신이미딜 카르보네이트(mPEG₂-SC); mPEG-이미데이트, mPEG-파라-니트로페닐카르보네이트 (mPEG-NPC), mPEG-이미데이트; mPEG₂-파라-니트로페닐카르보네이트 (mPEG₂-NPC); mPEG-숙신이미딜 프로피오네이트 (mPEG-SPA); mPEG₂-숙신이미딜 프로피오네이트 (mPEG₂-SPA); mPEG-N-히드록시-숙신이미드 (mPEG-NHS); mPEG₂-N-히드록시-숙신이미드 (mPEG₂-NHS); mPEG-시아누릭 클로라이드; mPEG₂-시아누릭 클로라이드; mPEG₂-리신을-NPC, 및 mPEG₂-Lys-NHS를 들 수 있으나 이에 한정되지 않는다.

[0126] PEG 부착이 비특이적이고, 특이적인 PEG 부착을 함유하는 펩티드가 소망될 경우, PEG화 화합물의 혼합물로부터 소망되는 PEG화 화합물을 정제할 수 있다. 예컨대, N 말단이 PEG화된 펩티드가 소망될 경우, 무작위적으로 PEG화된 펩티드들의 집단으로부터 N 말단이 PEG화된 형태를 정제해낼 수 있다 (즉, 다른 모노PEG화 부분으로부터 이 부분을 분리한다).

[0127] 몇가지 실시 상태에 있어서는, PEG를 펩타이드 또는 스페이서에 좌위 특이적으로 부착시킨다. 성장 호르몬 분비 인자의 효능을 갖는 유사체의 N 말단, 측쇄 및 C 말단에서의 좌위 특이적 PEG화가 고상 합성 기술을 통해 수행된 바 있다 [Felix, *et al.*, (1995) Int. J. Peptide Protein Res. 46: 253]. 또 다른 좌위 특이적 방법은 N 말단 트레오닌을 과요오드산나트륨 산화시켜 생성된 N 말단에서 반응성 알데히드기를 통하여 좌위 특이적인 방식으로 리포좀 표면 그래프트 PEG 사슬의 극단에 펩티드를 부착하는 방법이다 [Zalipsky *et al.*, (1995) Bioconj. Chem. 6: 705]. 그러나, 이 방법은 N 말단에 세린 또는 트레오닌 잔기를 갖는 폴리펩티드만으로 제한된다.

[0128] 한가지 방법에서, 특정 펩티드 또는 스페이서 부분에서의 유도화에 이용될 수 있는 타입이 상이한 일차 아미노기의 차별적 반응성 (리신 대 N 말단)을 이용하는 환원적 알킬화에 의해 선택적인 N 말단 PEG화를 수행할 수 있다. 적절한 반응 조건 하에서, PEG를 함유하는 카르보닐기를 펩티드 또는 스페이서의 N 말단에 선택적으로 부착시킨다. 예컨대, 펩티드 또는 스페이서의 N 말단 잔기의 α-아미노기와 리신의 ε-아미노기 사이의 pK_a 차이를 이용하여 어떤 pH에서 반응을 수행함으로써 단백질의 N 말단을 선택적으로 PEG화시킬 수 있다. 이러한 선택적 부착에 의하면, 다른 반응성기 (예컨대 리신 측쇄 아미노기)를 유의적으로 변형시킴이 없이, 단백질의 N 말단에서 PEG화가 지배적으로 일어난다. 환원적 알킬화를 이용하면, PEG는 단백질에 대한 커플링을 위해 단일 반응성 알데하이드를 가져야 한다 (예컨대, PEG 프로피온알데히드를 이용할 수 있다).

[0129] 좌위 특이적인 돌연변이는 좌위특이적 중합체 부착을 위한 펩티드를 제조하는데 사용될 수 있는 또 다른 접근법이다. 이 방법에 의해, 펩티드의 아미노산 서열을 펩티드 내의 소망되는 위치에서 적절한 반응성기를 통합시키도록 설계한다. 예컨대, WO 90/12874호는 시스테인 잔기의 삽입 또는 시스테인 잔기를 다른 잔기로 치환함으로써 변형시킨 단백질의 좌위 지향성 PEG화를 설명하고 있다. 이 공개문헌은 또한 시스테인 특이적인 mPEG 유도체를 EPO 상에 재조합적으로 도입시킨 시스테인 잔기와 반응시킴으로써 mPEG-에리스로포이에틴 ("mPEG-EPO")를 제조하는 것에 관해서도 설명하고 있다.

[0130] PEG 부분이 스페이서 부분 또는 링커 부분에 부착될 경우, 유사한 부착법을 사용할 수 있다. 이 경우, 링커 또는 스페이서는 반응성기를 함유하며 적절한 상보적 반응성기를 함유하는 활성화된 PEG 분자를 사용하여 공유 부착을 수행한다. 양호한 실시 상태에 있어서, 링커 또는 스페이서 반응성기는 말단 반응성기이다 (즉, 반응성기가 연결자 또는 스페이서의 말단에 위치함).

[0131] 본 발명의 펩티드, 펩티드 이량체 및 기타 펩티드 기체 분자들은 수용성 중합체(들)을 그 분자의 수용체-결합 부분 (예컨대, 펩티드 + 스페이서)에 연결시키기 위한 다양한 화학을 이용하여 수용성 중합체 (예컨대 PEG)에 부착시킬 수 있다. 그 전형적인 실시 상태에 있어서는 수용성 중합체(들)을 수용체-결합 부분에 공유적으로 부착시키기 위한 단일 부착 정션 (junction)을 사용하는 것이지만, 또 다른 실시 상태에서는 다른 종의 수용성 중합체를 다른 부착 정션들에서 수용체-결합 부분에 부착시키는 것과 같은 부가적인 변형을 포함하는, 다중 부착성 정션을 이용할 수 있으며, 여기에는 스페이서 및/또는 하나 또는 두가지 모두의 펩티드 사슬에 대한 공유 부착 정션(들)이 포함될 수 있다. 몇가지 실시 상태에 있어서, 이량체 또는 이보다 고차수의 다량체 (멀티머)들은 독특한 펩티드 사슬 종을 포함할 것이다 (즉, 이중이량체 또는 기타 이중다량체). 일례로서 (한정하려는 의도가 아님), 이량체는 PEG 부착 정션을 갖는 제1 펩티드 사슬을 함유할 수 있고 제2의 펩티드 사슬은 PEG 부착 정션이 결여되어 있을 수 있고 또는 제1 펩티드 사슬과는 다른 유형의 결합 화학을 이용하는

것일 수 있으며 어떤 변형예에서는 스페이서가 PEG 부착 정선을 함유하거나 함유하지 않을 수도 있으며, PEG화된 경우, 상기 스페이서는 제1 및/또는 제2 펩티드 사슬의 그것과는 다른 종류의 결합 화학을 이용할 수 있다. 또 다른 실시 상태에 있어서는 수용체-결합 부분의 스페이서 부분에 부착된 PEG 및, 그 분자의 펩티드 부분의 아미노산들 중 한 아미노산의 측쇄에 접합된 다른 수용성 중합체 (예컨대 탄수화물)를 사용한다.

[0132] 수용체-결합 부분 (펩티드 + 스페이서)의 PEG화에 다양한 종류의 폴리에틸렌 글리콜 (PEG) 종을 사용할 수 있다. 실제로, 적당한 반응성 PEG 시약이면 어느 것이든 사용가능하다. 양호한 실시 상태에 있어서, 반응성 PEG 시약은 수용체 결합 부분에 대한 접합에 의해 카르바메이트 또는 아마이드 결합의 형성을 초래할 것이다.

[0133] 적절한 반응성 PEG 종으로는 NOF Corporation (Yebisu Garden Place Tower, 20-3 Ebisu 4-chome, Shibuya-ku, Tokyo 150-6019)의 Drug Delivery Systems catalog (2003) 및 Nektar Therapeutics(490 Discovery Drive, Huntsville, Alabama 35806)의 Molecular Engineering catalog (2003)에 수록된 시판품을 들 수 있다. 예컨대, 다음의 PEG 시약이 여러 가지 실시 상태에 있어서 좋다: mPEG₂-NHS, mPEG₂-ALD, multi-Arm PEG, mPEG (MAL)₂, mPEG₂ (MAL), mPEG-NH₂, mPEG-SPA, mPEG-SBA, mPEG-티오에스테르, mPEG-Double Esters, mPEG- BTC, mPEG-ButyrALD, mPEG-ACET, 헤테로작용성 PEGs (NH₂-PEG-COOH, Boc- PEG-NHS, Fmoc-PEG-NHS, NHS-PEG-VS, NHS-PEG-MAL), PEG 아크릴레이트 (ACRL-PEG- NHS), PEG-인지질 (예컨대, mPEG-DSPE), 당업자에 의해 선택된 화학에 의해 활성화된 글리세린 기재 PEGs의 GL 시리즈를 비롯한 SUNBRITE 시리즈의 multiarmed PEGs, 모든 SUNBRITE 활성화된 PEGs (예컨대 다음의 것들을 들 수 있으나 이에 한정되지 않음: 카르복실-PEGs, p-NP-PEGs, 트레실-PEGs, 알데히드 PEGs, 아세탈-PEGs, 아미노-PEGs, 티올-PEGs, 말레이미도-PEGs, 히드록실-PEG-아민, 아미노-PEG-COOH, 히드록실-PEG-알데히드, 무수 카르복실형-PEG, 관능화된 PEG-인지질, 및 기타 유사한 PEG 및/또는 특정의 응용 목적과 용도에 따라 당업자가 선택한 적절한 반응성 PEG.

[0134] 펩티드 부분

[0135] 사람, 미생물을 비롯한 다양한 동물 또는 식물로부터 유도된 펩티드 및 유전공학 및 합성법에 의해 생산된 모든 펩티드들을 펩티드 부분으로서 사용할 수 있다. 이러한 펩티드로는 예컨대, EPO-R에 결합하는 펩티드; TPO-R에 결합하는 펩티드, 여러 가지 인터페론 (예컨대, 인터페론- α , 인터페론- β , 인터페론- γ), 인터류킨-2 및 인터류킨-3 등의 사이토킨, 예컨대, 인슐린, 성장호르몬 분비 인자 (GRF), 칼시토닌, 칼시토닌 유전자 관련 펩티드 (CGRP), 심방 나트륨 펩티드 (ANP), 바소프레신, 코르티코트로핀 방출 인자 (CRF), 혈관작용 소장 펩티드 (VIP), 세크레틴, α -멜라노사이트 자극 호르몬 (α -MSH), 아드레노코르티코트로픽 호르몬 (ACTH), 콜레시스토키닌 (CCK), 글루카곤, 부갑상선 호르몬 (PTH), 소마토스타틴, 엔도셀린, 서브스틴스 P, 디노르핀, 옥시토신 및 성장 호르몬 분비 펩티드 [GHRP, 예컨대, Endocrinology, 114,1537 (1984)] 등의 호르몬, 예컨대, 성장 호르몬 (GH), 인슐린 유사 성장 인자 (IGF-I, IGF-II), -신경 성장 인자 (β -NGF), 염기성 섬유아세포 성장 인자 (bFGF), 형질전환 성장 인자, 에리스로포이에틴, 과립구 콜로니 자극인자 (G-CSF), 과립구 마크로파지 콜로니 자극 인자 (GM-CSF), 혈소판 유도성 성장 인자 (PDGF) 및 상피 성장 인자 (EGF) 등의 성장 인자, 예컨대 조직 플라스미노겐 활성화제 (t-PA), 엘라스타제, 수퍼옥사이드 디스뮤타제 (SOD) 빌리루빈 옥시다제, 카탈라제, 우리카아제 및 아스파라지나제 등의 효소, 예컨대, 유비퀴틴, 랑게르한스섬 활성화 단백질 (IAP), 혈청 갑상선 인자 (STF), 펩티드-T 및 트립신 억제제 등의 기타 단백질 및 이들의 유도체를 들 수 있다.

[0136] 좋기로는, 펩티드 부분은 각각의 길이가 50개 미만의 아미노산, 더욱 좋기로는 약 10 내지 25개의 아미노산, 가장 좋기로는 약 12-18개 아미노산인 펩티드를 하나 이상 포함하는 것이 좋다.

[0137] 한가지 양호한 실시 상태에 있어서, 펩티드 부분은 예컨대, Wrighton *et al.*의 미국 특허 5,773,569호; 5,830,851호; 및 5,986,047호; Wrighton *et al.*의 PCT 공개 번호 WO 96/40749; Johnson 및 Zivin의 미국 특허 5,767,078호 및 PCT 공개 번호 96/40772호; Balu의 PCT 공개 번호 WO 01/38342; 및 Smith-Swintosky *et al.*의 WO 01/91780에 설명된 것과 같이 EPO-R에 결합하는 펩티드들 중에서 선택될 수 있다. 다른 예시적인 EPO-R 결합 펩티드로는 본 발명에서 펩티드 부분으로서 사용될 수 있으면서 2003년 5월 12일자 미국 가특허 출원 60/470,245호에 설명된 것들을 들 수 있다. 본 발명에서 펩티드 부분으로서 사용될 수 있는 또 다른 예시적인 EPO-R 결합 펩티드로는 2003년 5월 12일자 미국 가특허 출원 60/469,993호에 설명된 것을 들 수 있다. 본 발명에서 펩티드 부분으로서 사용가능한 또 다른 예시적인 EPO-R 결합 펩티드로는 2003년 5월 12일자 미국 가특허 출원 60/470,244호에 설명된 것을 들 수 있다.

[0138] 또 다른 양호한 실시 상태에서, 펩티드 부분은 트롬보포이에틴-수용체 ("TPO-R")에 결합하는 펩티드들 중에서 선택된다. 이러한 TPO-R 결합 펩티드의 비제한적인 예는 미국 특허 6,552,008호, 6,506,362호, 6,498,155호,

6,465,430호, 6,333,031호, 6,251,864호, 6,121,238호, 6,083,913호, 5,932,546호, 5,869,451호, 5,683,983호, 5,677,280호, 5,668,110호 및 5,654,276호에 설명된 것; 및 공개된 미국 특허 출원 2003/0083361호, 2003/0009018호, 2002/0177166호 및 2002/0160013호에 기재된 것들을 들 수 있으나 이에 한정되지 않는다.

[0139] 한가지 실시 상태에 있어서, 펩티드 부분은 에리스로포이에틴 수용체 (EPO-R)에 결합하여 이를 활성화시키거나 또는 EPO 작용체로서 작용하는, 길이가 아미노산 잔기 10 내지 40개 또는 그 이상인 단량체 펩티드로서 X₃X₄X₅GPX₆TW₇7X₈의 서열을 갖는다 (여기서 각각의 아미노산은 표준 단문자 약어로 표시된 것으로서, X₃는 C이고; X₄는 R, H, L, 또는 W이며; X₅는 M, F, 또는 I이고; X₆는 20개의 유전적으로 코딩된 L-아미노산 중 어느 하나 중에서 독립적으로 선택되며; X₇은 D, E, I, L, 또는 V이고; 그리고 X₈은 C임)

[0140] 또 다른 실시 상태에 있어서, 펩티드 부분은 코어 아미노산 서열 LYACHMGPITX₁VCQPLR을 포함하고, 길이가 17 내지 약 40개 아미노산인 단량체 펩티드이다 (여기서, 각각의 아미노산은 표준 단문자 약어로 표시된 것으로서; X₁은 트립토판 (W), 1-나프틸알라닌 (1-nal), 또는 2-나프틸알라닌 (2-nal)을 나타낸다).

[0141] 또 다른 실시 상태에 있어서, 펩티드 부분은 Ac-Ile-Glu-Gly-Pro-Thr-Leu-Arg-Gln-Nal(1)-Leu-Ala-Ala-Arg-Sar, 또는 Ac-Ile-Glu-Gly-Pro-Thr-Leu-Arg-Gln-Trp-Leu-Ala-Ala-Arg-Sar 등의 서열을 갖는 하나 이상의 TPO-R 결합 펩티드를 포함한다.

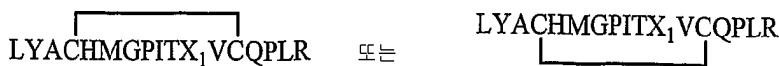
[0142] 한 가지 실시 상태에 있어서, 이 펩티드 부분은 스페이스 부분에 직접 부착된다.

[0143] 또 다른 예에서는, 펩티드 부분이 링커를 통해 스페이스 부분에 부착된다.

[0144] 본 발명의 몇가지 실시 상태에 따르면, 20개의 유전적으로 코딩된 L-아미노산 또는 입체이성체인 D 아미노산 중에서 독립적으로 선택된 2개 이상, 줄기로는 2 내지 6개 아미노산 잔기를 전술한 중심 서열의 한쪽 또는 양쪽 말단에 커플링시킨다. 예컨대, 용이한 펩티드 합성을 위해, 중심 서열의 한쪽 또는 양쪽 말단 모두에 종종 서열 GG를 부착시킨다. 본 발명은 또한 이들 펩티드 및 유도체의 접합체 및 EPO-R 결합 특성을 보유하는 펩티드의 펩티드모방체 (peptidomimetics)도 제공한다.

[0145] 20개의 통상의 아미노산과, a,a-이치환(disubstituted) 아미노산, N-알킬 아미노산, 락트산 및 기타의 통상의 것이 아닌 아미노산 등의 비천연 아미노산의 입체 이성질체 (예를 들면, D-아미노산) 역시 본 발명의 화합물의 적합한 성분이 될 수 있다. 통상의 것이 아닌 아미노산의 예로는 β-알라닌, 3-피리딜알라닌, 4-하이드록시프롤린, 0-포스포세린, N-메틸글리신, N-아세틸세린, N-포름메티오닌, 3-메틸히스티딘, 5-히드록시리신, 노르-류신, 1- 또는 2-나프틸알라닌, 사르코신 및 기타 이와 유사한 아미노산 및 이미노산이 있지만, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0146] 양호한 실시 상태에 있어서, 본 발명의 펩티드 단량체는 코어 서열의 2개의 시스테인 잔기 사이에 분자내 이황화 결합을 함유한다. 예컨대,



[0147] 이량체 및 올리고머 펩티드

[0149] 본 발명의 양호한 실시 상태에 있어서, 단량체 펩티드를 이량화 또는 올리고머화시켜 이량체나 올리고머를 만든다. 또한, 이러한 이량체와 기타 다량체는 이중이량체이거나 이중다량체일 수 있다.

[0150] 한 가지 실시 상태에 있어서, 본 발명의 펩티드 단량체를 비오틴/스트렙타비딘(streptavidin) 시스템을 이용하여 올리고머화할 수 있다. 펩티드 단량체의 비오틴화 유사체는 표준 기술로 합성될 수 있다. 예를 들면, 펩티드 단량체는 C-말단 비오틴화될 수 있다. 그 다음, 이들 비오틴화 단량체를 스트렙타비딘과 함께 배양 [예를 들면, 실온에서 인산염 완충 식염수 (PBS) 또는 HEPES-완충 RPMI 배지 (Invitrogen) 내에서 4:1 몰비로 1 시간 동안]함으로써 올리고머화한다. 이 실시 상태의 한 가지 변형에 있어서, 비오틴화 펩티드 단량체를 상업적으로 구입 가능한 다양한 항비오틴 항체 중의 어느 한 가지 [예를 들면, Kirkegaard & Perry Laboratories, Inc. (Washington, DC)의 염소 항 비오틴 IgG]와 함께 배양함으로써 올리고머화할 수 있다.

[0151] 링커

[0152] 양호한 실시 상태에 있어서, 본 발명의 펩티드 단량체는 1개 이상의 링커 부분에 공유 결합시킴으로써 이량화된다. 이 링커(L_k) 부분은, 필수적인 것은 아니지만, 질소-기재 링커인 것이 바람직하다. 가장 좋기로는 이 링커 부분이 하나 또는 두개의 -CO-결합으로 임의로 종결되는 3작용기 링커인 것이 좋다. 본 발명의 양호한 실시 상태에 있어서, 링커 L_k는 다음의 구조를 갖는 것이 좋다.



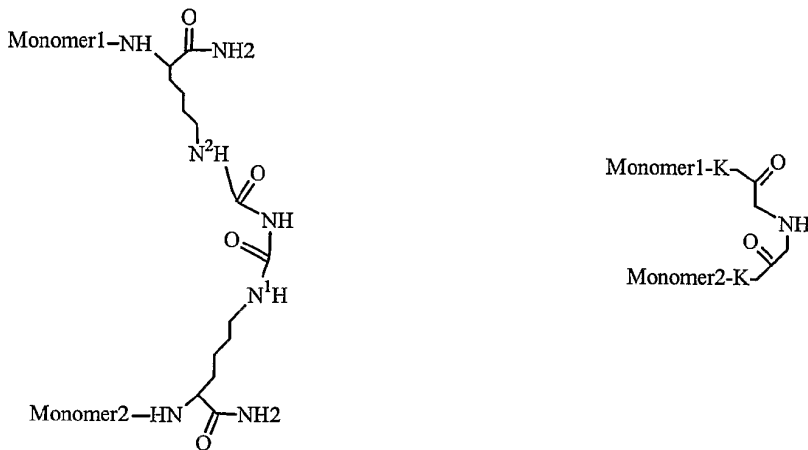
[0153]

[0154] 식 중, η과 φ는 각각 독립적으로 선택되는 정수이고, N은 스페이서 부분 Y에 공유적으로 결합되며, 스페이서 부분의 Y는 CO이다. 가장 좋기로는, 링커는 각각의 단량체의 C 말단 아미노산에 동시에 부착됨으로써 두개의 펩티드 단량체의 C 말단을 연결시킨다. 예컨대, 링커 L_k가 제1 및 제2 펩티드 단량체의 C 말단 리신 잔기의 ε-아미노기와 아미드 결합을 형성하면, 이 이량체는 다음 화학식 III에 도시된 바와 같은, 그리고 화학식 IV에 요약된 바와 같은 구조를 갖는다.

[0155]

화학식 III

화학식 IV



[0156]

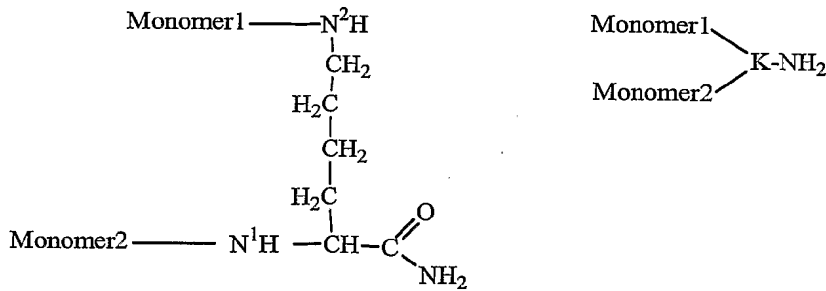
[0157] 화학식 IV에서, N²는 리신의 ε-아미노기의 질소 원자를, N¹은 리신의 ε-아미노기의 질소 원자를 나타낸다. 이 이량체 구조는 [펩티드-Lys]₂-L_k로서 표시할 경우 C 말단 리신 잔기의 ε-아미노기가 링커 부분에 결합된 리신 잔기를 함유하는 펩티드를 나타내며, [펩티드-Lys, 이황화]₂-L_k로 표시하는 경우, C 말단 리신 잔기의 ε-아미노기가 링커 부분에 결합되어 있고, 각각의 펩티드는 분자내 이황화 루프를 함유하는 것인 리신 잔기를 함유하는 펩티드를 나타내고, [펩티드-Lys, 이황화]₂-L_k-스페이서-PEG로 표시하는 경우, C 말단 리신 잔기의 ε-아미노기가 링커 부분에 결합되어 있고, 각각의 단백질은 분자내 이황화 루프를 함유하고, 스페이서 분자는 PEG 부분과 리신의 C 말단 사이에 공유 결합을 형성하는 것인 리신 잔기를 함유하는 펩티드를 나타내며, 또는 [펩티드-Lys, 이황화]₂-L_k-스페이서-PEG₂로 표시하는 경우, C 말단 리신 잔기의 ε-아미노기가 링커 부분에 결합되어 있고, 각각의 단백질은 분자내 이황화 루프를 함유하고, 스페이서 분자는 PEG 부분과 리신의 C 말단 사이에 2개의 공유 결합을 형성하는 것인 리신 잔기를 함유하는 펩티드를 나타내는 것이다.

[0158] 또 다른 양호한 실시 상태에 있어서, 링커는 리신 잔기 또는 리신 아미드 (카르복실기가 아미드 부분 -CONH₂로 전환된 리신 잔기)이다. 더욱 좋기로는, 링커가 각 단량체의 C-말단 아미노산에 동시에 부착됨으로써 2개의 펩티드 단량체의 C-말단을 연결시키는 것이 좋다. 예를 들면, C-말단 링커 L_k가 리신 아미드인 경우, 상기 이량체는 다음 화학식 V에 제시된 것과 같은 구조로 설명될 수 있고, 화학식 VI에 제시된 것과 같이 간략화될 수 있다.

[0159]

화학식 V

화학식 VI



[0160]

[0161]

화학식 V에서, N²는 리신의 ε-아미노기의 질소 원자를 나타내는 것이고, N¹은 리신의 α-아미노기의 질소 원자를 나타낸다. 상기 이량체 구조는 [펩티드]₂-L_k로 표시된 경우, 리신을 포함하는 링커 부분의 α 및 ε 아미노기 양쪽 모두에 결합되어 있는 펩티드를 나타내는 것이고, 또는 [Ac-펩티드]₂-L_k로 표시되는 경우, 리신을 포함하는 링커 부분의 아미노기의 α 및 ε 아미노기 양쪽 모두에 결합되어 있는 N-말단 아세틸화 펩티드를 나타내는 것이며, 또는 [Ac-펩티드, 이황화]₂-L_k로 표시되는 경우, 분자내 이황화 루프를 갖는 각각의 펩티드가 리신을 포함하는 링커 부분의 α 및 ε 아미노기 양쪽 모두에 결합되어 있는 N-말단 아세틸화 펩티드를 나타내는 것이고, 또는 [Ac-펩티드, 이황화]₂-L_k-스페이서-PEG로 표시되는 경우, 리신을 함유하는 링커 부분의 α 및 ε 아미노기 양쪽 모두에 결합되어 있는 N-말단 아세틸화 펩티드로서, 각 펩티드는 분자내 이황화 루프를 함유하고, 스페이서 분자는 링커 부분의 C-말단과 PEG 부분 사이에 공유 결합을 형성하는 것인 N-말단 아세틸화 펩티드를 나타내는 것이다.

[0162]

반드시는 아닐지라도, 일반적으로, 분자간 이황화 결합을 형성하는 것 이외의 기술에 의해 이량화된 펩티드 이량체도 역시 펩티드 단량체의 시스테인 잔기들 사이에 하나 이상의 이황화 결합을 함유할 것이다. 예컨대, 이들 두개의 단량체들은 하나 이상의 분자간 이황화 결합에 의해 가교될 수 있다. 좋기로는 이들 두개의 단량체가 적어도 하나의 분자내 이황화 결합을 함유하는 것이 좋다. 가장 좋기로는, 각각의 단량체가 고리기를 함유하도록, 펩티드 이량체의 단량체 두개가 모두 분자내 이황화 결합을 함유하는 것이 좋다.

[0163]

펩티드 변형 (Peptide Modification)

[0164]

본 발명의 펩티드 화합물의 아미노 및/또는 카르복시 말단을 변형시킴으로써 본 발명의 다른 화합물을 제조할 수 있다. 아미노 말단 변경으로는 메틸화 (예를 들면, -NHCH₃ 또는 -N(CH₃)₂), (예를 들면, 아세트산으로 또는 α-클로로아세트산, α-브로모아세트산 또는 α-요오도아세트산과 같은 이들의 할로젠화 유도체로의) 아세틸화, 벤질옥시카르보닐 (Cbz) 기의 첨가, 또는 RCOO-로 정의되는 카복실레이트 작용기 또는 R-SO₂-로 정의되는 술폰 작용기 [여기서, R은 알킬, 아릴, 헤테로아릴, 알킬 아릴 등 및 이와 유사한 것들로부터 선택되는 것임]로 아미노 말단을 블록킹하는 것을 포함한다. 프로테아제에 대한 감수성을 감소시키기 위하여 또는 펩티드 화합물의 배열(conformation)을 제한하기 위하여 N-말단에 데스아미노산(desamino acid)을 도입할 수 있다 (이 경우, N-말단 아미노기가 존재하지 않는다). 양호한 실시 상태에 있어서, N-말단을 아세틸화한다. 특히 양호한 실시 상태에 있어서, N-말단 글리신을 아세틸화하여 N-아세틸글리신 (AcG)을 얻는다.

[0165]

카르복시 말단 변형으로는 자유산을 카르복사미드기로 치환하거나 또는 카르복시 말단에 고리형 락탐을 생성시켜 구조적 제한을 가하는 것이 있다. 본 발명의 펩티드를 고리화하거나 또는 펩티드의 말단에 데스아미노 또는 데스카르복시(descarboxy) 잔기를 도입하여 말단 아미노 또는 카복실기가 존재하지 않도록 함으로써, 프로테아제에 대한 감수성을 감소시키거나 또는 펩티드의 배열을 제한한다. 본 발명의 화합물의 C-말단 작용기로는 아미드, 아미드 저급 알킬, 아미드 디(저급 알킬), 저급 알콕시, 하이드록시 및 카르복시, 및 이들의 저급 에스테르 유도체, 및 약제학적으로 허용 가능한 이들의 염이 있다.

[0166]

유전적으로 암호화되는 20개의 천연 아미노산 (또는 입체 이성체성 D 아미노산)의 측쇄를 다른 측쇄, 예를 들면, 알킬, 저급 알킬, 고리형 4-, 5-, 6- 내지 7-원 알킬, 아미드, 아미드 저급 알킬, 아미드 디(저급 알킬), 저급 알콕시, 하이드록시, 카르복시 및 이들의 저급 에스테르 유도체로, 그리고 4-, 5-, 6- 내지 7-원 헤테로고리와 같은 기로 교체할 수 있다. 특히, 프롤린 잔기의 고리 크기가 5원 에서 4, 6, 또는 7원까지 변하는 프롤린 유사체가 사용될 수 있다. 고리기는 포화 또는 불포화될 수 있고, 불포화되는 경우 방향족 또는 비방향

족일 수 있다. 헤테로고리기는 종기로는 1개 이상의 질소, 산소, 및/또는 황 헤테로 원자를 갖는다. 이러한 기의 예로는 퓨라자닐, 퓨릴, 이미다졸리디닐, 이미다졸릴, 이미다졸리닐, 이소티아졸릴, 이소옥사졸릴, 모폴리닐 (예를 들면 모폴리노), 옥사졸릴, 피페라지닐 (예를 들면, 1-피페라지닐), 피페리딜 (예를 들면, 1-피페리딜, 피페리디노), 피라닐, 피라지닐, 피라졸리디닐, 피라졸리닐, 피라졸릴, 피리다지닐, 피리딜, 피리미디닐, 피롤리디닐 (예를 들면, 1-피롤리디닐), 피롤리닐, 피롤릴, 티아디아졸릴, 티아졸릴, 티에닐, 티오모폴리닐 (예를 들면, 티오모폴리노) 및 트리아졸릴이 있다. 이들 헤테로고리기는 치환되거나 치환되지 않을 수 있다. 이들 기가 치환되는 경우, 치환기는 알킬, 알콕시, 할로젠, 산소, 또는 치환되거나 또는 치환되지 않은 페닐일 수 있다.

[0167] 펩티드는 인산화 및 [예를 들면, 문헌 (Hruby, *et al.*, (1990) *Biochem J.* 268: 249-262)에 기술되어 있는 것과 같은] 기타의 방법으로 용이하게 변경될 수 있다.

[0168] 본 발명의 펩티드 부분은 생물학적 활성이 유사한 비펩티드 화합물을 위한 구조적 모형으로 작용할 수도 있다. 본 발명 분야의 숙련자는 선도(lead) 펩티드 화합물과 생물학적 활성이 동일하거나 유사하지만, 용해도, 안정성, 및 가수 분해 및 단백질 분해 반응에 있어서는 선도 물질에 비하여 활성이 더 좋은 화합물을 설계하는 데에 다양한 기술이 이용될 수 있다는 것을 알고 있다. 문헌 [Morgan and Gainor (1989) *Ann. Rep. Med. Chem.* 24:243-252] 참조. 이들 기술은 펩티드 골격을 포스포네이트, 아미데이트, 카르바메이트, 설펜아미드, 2차 아민 및 N-메틸아미노산으로 이루어진 골격으로 치환하는 것을 포함한다.

[0169] 의약 조성물

[0170] 본 발명의 또 다른 측면에 따르면, 전술한 PEG로 변형된 펩티드 기재 화합물의 의약 조성물이 제공된다. 이러한 조성물을 투여함으로써 경감되거나 완화될 수 있는 증상으로는 전술한 것들이 포함된다. 이러한 의약 조성물은 경구 경로, 비경구 경로 (근육내, 복강내, 정맥내 (IV) 또는 피하 주사), 경피 경로 (수동적으로 또는 이온삼투요법 또는 전기영동을 이용함), 점막을 경유한 경로 (코, 질, 직장 또는 설하)로 투여되거나 또는 생체침식가능한 삽입물을 이용하여 투여될 수 있으며, 각각의 투여 경로에 적합한 제형으로 조제될 수 있다. 일반적으로, 치료용 펩티드 (예컨대 EPO-R에 결합하는 펩티드)의 유효량을, 제약학적으로 허용 가능한 희석제, 보존제, 가용화제, 유화제, 애쥬번트 및/또는 캐리어와 함께 포함하는 의약 조성물이 본 발명에 포괄된다. 이러한 조성물은 완충 성분 (예컨대, Tris-HCl, 아세테이트, 포스페이트), pH 및 이온 강도를 달리하는 희석제; 계면활성제 및 가용화제 (예컨대 Tween 80, Polysorbate 80), 향산화제 (예컨대 아스코르브산, 소듐 메타바이설파이트), 보존제 (예컨대, Thimersol, 벤질 알코올) 및 벌킹제 (예컨대, 락토스, 만니톨)과 같은 첨가제와, 폴리락트산, 폴리글리콜산 등과 같은 중합체 화합물의 입자상 제제로 혼입시키는 물질 또는 리포솜을 포함한다. 히알루론산 역시 사용가능하다. 이러한 조성물은 신체 상태, 본 발명 단백질 및 유도체의 안정성, 생체내 방출 속도, 및 생체내 클리어런스 속도에 영향을 미칠 수 있다. 예컨대, 문헌 [Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th Ed. (1990, Mack Publishing Co., Easton, PA18042) pages 1435-1712] 참조 (이 문헌의 내용은 본 발명에 참조로 통합된다). 이 조성물은 액상 또는 건조 분말 (예컨대 동결 건조형) 형태로 조제될 수 있다.

[0171] 경구 전달 (Oral Delivery)

[0172] 본 발명 조성물은 본 발명에 그 내용이 참고로 통합된 문헌 [Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th Ed. 1990 (Mack Publishing Co. Easton PA18042), at chapter 89]에 상세히 설명된 경구용 고상 제형으로서 사용될 수 있다. 고상 제형으로는 정제, 캡슐제, 알약 (pill), 트로키제, 로젠지제, 카체, 펠릿제, 분말, 또는 과립제를 들 수 있다. 또한, 리포솜 또는 단백질 유사체 (proteinoid) 캡슐화 방법을 이용하여 본 발명의 조성물을 조제할 수 있다. (예컨대, 미국특허 4,925,673호에 설명된 바와 같은 단백질 유사체 미세구). 리포솜 캡슐화를 이용할 수 있으며 리포솜은 여러 가지 중합체로 유도화시킬 수 있다 (예컨대 미국특허 5,013,556호 참조). 치료용으로 가능한 고상 제형에 관해서는 본 발명에 그 내용이 참조로 통합된 문헌 [Marshall, K. In: *Modern Pharmaceutics* Edited by G. S. Banker and C. T. Rhodes, chapter 10, 1979]에 제시된 설명을 참조할 수 있다. 일반적으로, 이 포물레이션은 EPO-R 작용제 펩티드 (또는 이의 화학적 변형 형태) 및 불활성 성분을 포함하는데, 후자는 위장 환경으로부터 보호해주고, 소장에서 생물학적 활성 물질을 방출시킨다.

[0173] 본 발명 조성물은 또한 제약학적으로 허용 가능한 에멀전, 용액제, 현탁제, 및 시럽제를 비롯한 경구 투여용 액상 제형으로서 사용될 수 있으며, 이들은 불활성 희석제; 습윤제, 유화제 및 현탁제와 같은 애쥬번트; 및 감미료, 풍미제 및 향료를 비롯한 기타 성분들을 함유할 수 있다.

[0174] 펩티드는 그 유도체의 경구 전달에 효과적이도록 화학적으로 변형시킬 수 있다. 일반적으로, 고려되는 화학적

변형은 적어도 하나의 부분을 성분 분자 자체에 부착시키는 것으로, 여기서 상기 부분은 (a) 단백질 분해의 억제; 및 (b) 위장 또는 소장으로부터 혈류내로의 흡수 (uptake)를 허용하는 것이다. 성분 또는 성분들의 전반적인 안정성 증가 및 체내 순환 시간의 연장 역시 요망된다. 전술한 바와 같이, PEG화는 약학적 용도에 있어 바람직한 화학적 변경 수단이다. 사용가능한 기타 부분으로는 다음을 들 수 있다: 프로필렌 글리콜, 에틸렌 글리콜과 프로필렌 글리콜과의 공중합체, 카르복시메틸 셀룰로스, 텍스트란, 지방산 (예컨대 미리스트산), 펩티드 [Dennis, M. S. *et al.*, Biol. Chem. 2002,277, 35035 참조], 폴리비닐 알코올, 폴리비닐 피롤리돈, 폴리프롤린, 폴리-1,3-디옥솔란 및 폴리-1,3,6-트리옥소케인 [예컨대, 문헌 (Abuchowski and Davis (1981) "Soluble Polymer-Enzyme Adducts," in *Enzymes as Drugs*. Hocenberg and Roberts, eds. (Wiley-Interscience: New York, NY) pp. 367-383; 및 Newmark *et al.*, (1982) J. Appl. Biochem. 4: 185-189) 참조].

- [0175] 경구용 포물레이션의 경우, 방출 장소는 위장, 소장 (십이지장, 공장, 또는 회장) 또는 대장일 수 있다. 당업자에게는 위장에서는 용해되지 않으나 십이지장이나 그 밖에 소장에서는 방출되는 포물레이션이 알려져 있다. 펩티드 (또는 유도체)를 보호하거나 또는 펩티드 (또는 유도체)를 소장내에서와 같이, 위장 환경을 벗어난 곳에 방출시키는 방법에 의해 위장 환경의 불리한 효과를 회피시켜 방출시키는 것이 좋다.
- [0176] 완전한 위장 보호를 위해, 적어도 pH 5.0까지 불투과성인 피막이 필수적이다. 장용 피복에서 사용되는 것과 같은 보다 일반적인 불활성 성분의 예로는 셀룰로스 아세테이트 트리멜리테이트 (CAT), 히드록시프로필메틸셀룰로스 프탈레이트 (HPMCP), HPMCP 50, HPMCP 55, 폴리비닐 아세테이트 프탈레이트 (PVAP), Eudragit L30D, Aquateric, 셀룰로스 아세테이트 프탈레이트 (CAP), Eudragit L, Eudragit S, 및 Shellac을 들 수 있다. 이들 피복물은 혼합 피막으로서 사용될 수 있다.
- [0177] 위장으로부터의 보호용으로 의도되지 않은 피복 또는 피복 혼합물도 정제에 이용될 수 있다. 그 예로는 당의, 또는 정제를 삼키기 쉽게 해주는 피복을 들 수 있다. 캡슐은 건조 치료제 (즉, 분말)의 전달용으로는 경질 셀 (예컨대 젤라틴)로 이루어질 수 있고, 액상 형태용으로는 연질 젤라틴이 사용될 수 있다. 카세제의 셀 재료는 농후한 전분 또는 기타 식용 종이일 수 있다. 알약, 로젠지, 성형 정제 또는 정제의 경우, 습식 매싱 (massing) 기술이 이용될 수 있다.
- [0178] 펩티드 (또는 유도체)는 입경이 약 1 mm인 펠릿이나 과립 형태의 미세한 멀티과립으로서 조제될 수 있다. 캡슐 투여를 위한 포물레이션은 분말, 살짝 압착된 플러그일 수 있고, 심지어는 정제일 수도 있다. 이러한 치료제는 압착시켜 제조할 수 있다.
- [0179] 착색제 및/또는 풍미제 역시 포함될 수 있다. 예컨대, 펩티드 (또는 유도체)를 약제화 한 다음 (예컨대 리포솜 또는 미세구 캡슐화에 의해), 착색제와 풍미제를 함유하는 냉장 음료와 같은 식용 제품에 함유시킬 수 있다.
- [0180] 또한 불활성 물질을 이용하여 펩티드 (또는 유도체)의 부피를 희석 또는 증가시키는 것 역시 가능하다. 이러한 희석제로는 탄수화물, 특히 만니톨, α -락토스, 무수 락토스, 셀룰로스, 수크로스, 변형 텍스트란 및 전분을 들 수 있다. 삼인산칼슘, 탄산마그네슘 및 염화나트륨을 비롯한 어떤 무기염들도 충전제로서 사용될 수 있다. 시판되는 희석제의 예로는 Fast-Flo, Emdex, STA-Rx 1500, Emcompress 및 Avicell을 들 수 있다.
- [0181] 고상 제형의 치료제 포물레이션에 붕해제를 포함시킬 수 있다. 붕해제로서 사용되는 물질로는 전분을 기재로 한 시판 붕해제인 Explotab과 같은 전분을 들 수 있으나 이에 한정되지 않는다. 글리콜산나트륨 전분, Amberlite, 카르복시메틸셀룰로스 나트륨, 울트라밀로펙틴, 알긴산나트륨, 젤라틴, 오렌지 껍질, 산 카르복시메틸 셀룰로스, 천연 스폰지 및 벤토나이트를 모두 사용할 수 있다. 붕해제는 또한 불용성 양이온 교환 수지일 수 있다. 분말상 검을 붕해제 및 결합제로서 사용할 수 있고, 여기에는 한천, 카라야 (Karaya) 또는 트라가칸트와 같은 분말상 검이 포함될 수 있다. 알긴산 및 그의 나트륨 역시 붕해제로서 유용하다.
- [0182] 펩티드 (또는 유도체) 제제를 한데 결속시켜 경질 정제를 만들기 위해 결합제를 사용할 수 있으며 결합제 재료로는 아카시아, 트라가칸트, 전분 및 젤라틴과 같은 천연 산물을 들 수 있다. 그 밖에 메틸 셀룰로스 (MC), 에틸 셀룰로스 (EC) 및 카르복시메틸 셀룰로스 (CMC)도 사용가능하다. 펩티드 (또는 유도체)를 과립화시키기 위해 폴리비닐 피롤리돈 (PVP)와 히드록시프로필메틸 셀룰로스 (HPMC) 두가지 모두를 알코올 형태로 사용할 수 있다.
- [0183] 포물레이션 공정 중 들러붙는 것을 방지하기 위해 마찰방지제를 펩티드 (또는 유도체) 포물레이션에 포함시킬 수 있다. 펩티드 (또는 유도체)와 다이 벽 간의 층으로서 윤활제를 사용할 수 있으며, 여기에는 마그네슘염

및 칼슘염을 비롯한 스테아르산, 폴리테트라플루오로에틸렌 (PEFE), 액상 파라핀, 식물성 오일 및 왁스가 포함되나 이에 한정되지 않는다. 소듐 라우릴 설페이트, 마그네슘 라우릴 설페이트, 다양한 분자량의 폴리에틸렌 글리콜, Carbowax 4000 및 6000 등의 가용성 윤활제 역시 사용가능하다.

[0184] 포물레이션 공정 중 약물의 유동 특성을 증진시키고 압착 공정시 재조립을 도와주는 활택제 (glidants)도 첨가할 수 있다. 활택제의 예로는 전분, 탈크, 발열성 실리카 및 수화 실리코알루미네이트를 들 수 있다.

[0185] 펩티드 (또는 유도체)가 수용성 환경에서 용해되는 것을 돕기 위해, 습윤제로서 계면활성제를 첨가할 수 있다. 계면활성제로는 소듐 라우릴 설페이트, 디옥틸 소듐 설포숙시네이트 및 디옥틸 소듐 설포네이트와 같은 음이온성 계면활성제 (detergent)를 들 수 있다. 양이온성 계면활성제도 사용가능하며 벤잘코늄 클로라이드 또는 벤제토폴 클로라이드가 그 예이다. 계면활성제로서 포물레이션에 포함될 수 있는 잠재적인 비이온계 계면활성제로는 라우로마르코폴 400, 폴리옥실 40 스테아레이트, 폴리옥시에틸렌 수소첨가된 카스터유 10, 50 및 60, 글리세롤 모노스테아레이트, 폴리소르베이트 40, 60, 65 및 80, 수크로스 지방산 에스테르, 메틸 셀룰로스 및 카르복시메틸 셀룰로스를 들 수 있다. 이러한 계면활성제는 단백질 또는 유도체의 포물레이션 중에 단독으로 또는 상이한 비율의 혼합물로서 존재할 수 있다.

[0186] 펩티드 (또는 유도체)의 흡수를 잠재적으로 증진시키기 위한 첨가제로는 예컨대 지방산 올레산, 리놀레산 및 리놀렌산을 들 수 있다.

[0187] 조절 방출성 경구용 포물레이션이 소망될 수 있다. 확산 또는 침출 (leaching) 메카니즘에 의해 방출되는, 예컨대 검과 같은 불활성 매트릭스에 펩티드 (또는 유도체)를 혼입시킬 수 있다. 서서히 분해되는 매트릭스 역시 포물레이션에 포함시킬 수 있다. 어떤 장용 피복은 서방 효과를 갖기도 한다. 또 다른 조절 방출 유형으로서, 삼투효과에 의해 작은 소형 개구부를 통해 물은 들어가게 하고 약물은 빠져나오게 하는 반투과막에 약물을 봉입시키는 Oros 치료 시스템 (Alza Corp.)에 기초하는 방법을 들 수 있다.

[0188] 다른 피복물 역시 본 발명 포물레이션에 이용가능하다. 여기에는 피복 팬에 적용가능한 다양한 당 (sugar)이 포함된다. 펩티드 (유도체)는 피막 처리된 정제로서 주어질 수도 있으며, 이 경우 사용되는 재료는 2 그룹으로 나뉜다. 그 첫번째는 비장용 물질로서 여기에는 메틸 셀룰로스, 에틸 셀룰로스, 히드록시에틸 셀룰로스, 메틸히드록시-에틸 셀룰로스, 히드록시프로필 셀룰로스, 히드록시프로필-메틸 셀룰로스, 소듐 카르복시-메틸 셀룰로스, 프로비돈 및 폴리에틸렌 글리콜이 포함된다. 두번째 그룹은 널리 사용되는 프탈산 에스테르인 장용 물질로 이루어진다.

[0189] 물질의 혼합물 (믹스)를 이용하여 최적 피막을 제공할 수 있다. 피막은 팬 피복기를 이용하여 형성할 수도 있고 유동층을 이용하거나 압착 피복법에 의해 형성시킬 수도 있다.

[0190] 비경구 전달

[0191] 본 발명에 따른 비경구 투여용 제제에는 멸균 수용액 또는 비수성 용액, 현탁액, 또는 에멀전이 포함된다. 비수성 용매 또는 비히클의 예로는 프로필렌 글리콜, 폴리에틸렌 글리콜, 식물성 오일, 예컨대 올리브유와 옥수수유, 젤라틴, 및 에틸 올리에이트와 같은 주사가 가능한 유기 에스테르를 들 수 있다. 이러한 제형은 또한 보존제, 습윤제, 유화제 및 분산제와 같은 애쥬번트도 함유할 수 있다. 이들은 예컨대, 세균보류 필터를 통한 여과, 조성물에 살균제 혼합, 조성물의 광선 조사 처리, 또는 조성물의 가열에 의해 멸균시킬 수 있다. 이들은 또한 멸균수를 이용하건, 기타 멸균 주사용 매질을 이용하여 사용 직전에 제조할 수 있다.

[0192] 직장 또는 질 전달

[0193] 직장 또는 질에 투여하기 위한 조성물은 활성 물질에 더해, 코코아 버터나 좌약용 왁스와 같은 부형제를 함유할 수 있는 좌약인 것이 좋다. 코 또는 설하 투여용 조성물 역시 기술 분야에 잘 알려진 표준 부형제를 이용하여 조제할 수 있다.

[0194] 폐 전달

[0195] EPO-R 작용제 펩티드 (또는 그의 유도체)를 폐에 전달하는 것도 고려할 수 있다. 펩티드 (또는 유도체)는 흡입에 의해 폐 상피 내막을 통해 혈류 내로 전달된다. 예컨대 문헌 [Adjei, *et al.*, (1990) *Pharmaceutical Research* 7: 565-569; Adjei, *et al.*, (1990) *Int. J. Pharmaceutics* 63: 135-144 (류프롤리드 아세테이트); Braquet, *et al.*, (1989) *J. Cardiovascular Pharmacology* 13 (sup5): 143-146 (엔도셀린-1); Hubbard, *et al.*, (1989) *Annals of Internal Medicine*, Vol. III, pp. 206-212 (α 1-항트립신); Smith, *et al.*, (1989) *J. Clin. Invest.* 84 : 1145-1146 (α -1-프로테이나제); Oswein, *et al.*, (1990) "Aerosolization of

Proteins", Proceedings of Symposium on Respiratory Drug Delivery II Keystone, Colorado (인간 재조합 성장 호르몬); Debs, *et al.*, (1988) J. Immunol. 140:3482-3488 (인터페론- γ 및 중앙 과사인자 α); 및 Platz *et al.*의 미국 특허 5,284,656호 (과립구 콜로니 자극 인자) 참조. 전신 효과를 위해 약물을 폐에 전달하기 위한 방법과 조성물은 Wong *et al.*의 미국 특허 제5,451,569호에 설명되어 있다.

[0196] 분무기, 투여량 계량기가 달린 흡입기, 및 분말 흡입기와 같은 (이에 한정되지 않음) 치료 제제를 폐에 전달하기 위해 고안된 광범위한 기계 장치 역시 본 발명에 포함되며, 이들 모두는 당업자에게 친숙한 것들이다. 본 발명을 실시하는데 적합한 시판되는 장치의 몇가지 구체적인 예로는 Ultravent 분무기(Mallinckrodt Inc., St. Louis, MO); Acorn II 분무기 (Marquest Medical Products, Englewood, CO); Ventolin 투여량 계량기가 달린 흡입기 (Glaxo Inc., Research Triangle Park, NC); 및 Spinhaler 분말 흡입기 (Fisons Corp., Bedford, MA)를 들 수 있다.

[0197] 이러한 장치는 모두 펩티드 (또는 유도체)를 분산시키기에 적합한 포물레이션을 사용할 것을 필요로 한다. 일반적으로, 각각의 포물레이션은 치료에 유용한 통상적인 희석제, 애쥬번트 및/또는 캐리어에 더해, 사용된 장치 종류에 특이적이며 적절한 추진제 물질을 함유할 수 있다. 또한, 리포솜, 마이크로캡슐 또는 미세구, 봉입 복합체, 또는 기타 유형의 캐리어를 사용하는 것도 고려된다. 화학적으로 변경된 펩티드는 또한 화학적 변경의 종류나 사용된 장치의 종류에 따라 여러 가지 다른 포물레이션으로 조제될 수 있다.

[0198] 제트식 또는 초음파식 분무기를 이용하여 사용하는데 적합한 포물레이션은, 일반적으로 용액 1 mL 당 생물학적 활성 단백질 약 0.1 내지 25 mg의 농도로 물에 용해된다. 이 포물레이션은 또한 완충액과 단순당 (예컨대, 단백질 안정화 및 삼투압 조절 목적)을 함유할 수도 있다. 분무기용 포물레이션은 또한 에어로졸 형성시 용액의 분무에 의해 야기되는 펩티드 (또는 유도체)의 표면 유도성 응집을 감소 또는 방지하기 위해, 계면활성제를 함유할 수도 있다.

[0199] 투여량 계량기가 달린 흡입 장치에 사용되기 위한 포물레이션은 일반적으로 계면활성제의 보조를 받아 추진제 중에 현탁된 펩티드 (또는 유도체)를 함유하는 미분된 분말을 함유한다. 추진제는 클로로플루오로카본, 히드로클로로플루오로카본, 히드로플루오로카본 또는 탄화수소, 예컨대 트리클로로플루오로메탄, 디클로로디플루오로메탄, 디클로로테트라플루오로에탄올, 및 1,1,1,2-테트라플루오로에탄 또는 이들의 복합체와 같이, 이러한 목적에 사용되는 여하한 통상적인 물질이어도 무방하다. 적절한 계면활성제로는 소르비탄 트리올리이트와 대두 레시신을 들 수 있다. 올레산 역시 계면활성제로서 유용하다.

[0200] 분말 흡입 장치로부터의 분산을 위한 포물레이션은 펩티드 (또는 유도체)를 함유하는 미분된 건조한 분말을 포함하며, 락토스, 소르비톨, 수크로스 또는 만니톨과 같은 별킹제를, 장치로부터의 분말의 분산을 용이하게 해주는 양, 예컨대 포물레이션의 50 내지 90 중량%의 양으로 함유할 수도 있다. 펩티드 (또는 유도체)는 가장 유리하게는 평균 입경이 10 μ m (또는 마이크로미터) 미만, 가장 좋기로는 0.5 내지 5 μ m인 입자 형태로 제조되는 것이 원위부 폐까지 전달하는데 가장 효과적이다.

[0201] 코 전달 (Nasal Delivery)

[0202] EPO-R 작용제 펩티드 (또는 유도체)를 코를 통해 전달하는 것도 고려된다. 코 전달은 폐에 이 치료 제품을 침착시킬 필요 없이 이 제품을 코에 투여한 직후 펩티드가 혈류내로 직접 통과되도록 해준다. 코에 전달하기 위한 포물레이션은 텍스트란 또는 시클로텍스트란을 포함한다.

[0203] 투여량

[0204] 모든 펩티드 화합물에 있어서, 추가의 연구가 거듭될 수록, 여러 환자의 여러 가지 상태를 치료하는데 적절한 투여량 수준에 관한 정보가 쏟아져 나올 것이며, 보통의 숙련된 작업자라면 치료 목적, 연령 및 수혜자의 일반적인 건강 상태를 고려해서 적절한 투여량을 결정할 수 있을 것이다. 선택되는 투여량은 소망되는 치료 효과, 투여 경로 및 소망되는 치료 기간에 따라 달라진다. 일반적으로 0.001 내지 10 mg/체중 kg의 투여량 수준으로 포유 동물에게 투여된다. 일반적으로는 정맥 주사를 위해서 그보다 더 양이 적을 수 있다. 투여 스케줄은 순환 반감기, 및 사용된 포물레이션에 따라 달라질 수 있다.

[0205] 본 발명의 펩티드 (또는 그의 유도체)는 1종 이상의 부가적인 활성 성분이나 의약 조성물과 함께 조합적으로 투여될 수 있다.

실시예

[0206] 다음에 실시예를 들어 본 발명을 설명하나 본 발명이 이들 실시예로 한정되는 것은 아니다.

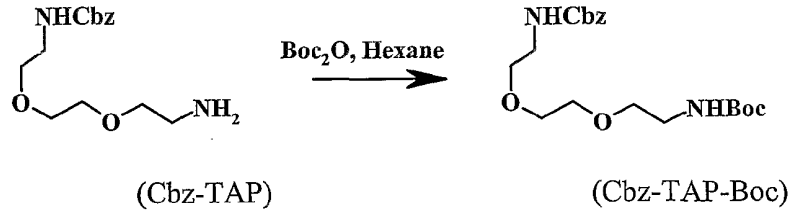
[0207] 실시예 1: H-TAP-Boc 분자의 합성



[0208] 공정 A: Cbz-TAP의 합성

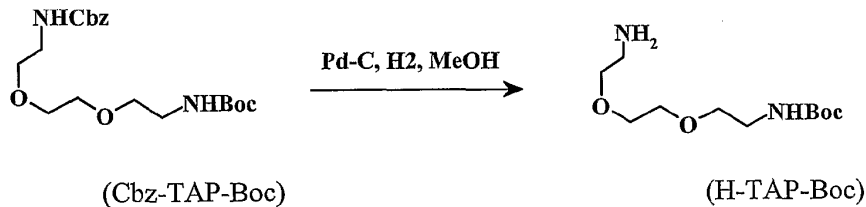
[0209] 무수 디클로로메탄 (DCM) (100 ml) 중 TAP (10 g, 67.47 mmol, Aldrich Chemical Co.에서 구입) 용액을 0°C로 냉각시켰다. 반응 혼합물의 온도를 반응 내내 0°C로 유지하면서, 무수 DCM (50 ml) 중의 벤질 클로로포르메이트 (Cbz-Cl, Cbz = 카르복시벤질옥시) (4.82 ml, 33.7 mmol) 용액을 적가 깔때기를 통하여 6-7 시간 동안 TAP 용액에 천천히 첨가하였다. 이렇게 얻어진 혼합물을 실온 (~25°C)으로 승온시켰다. 16시간 후, DCM을 진공 제거하고 잔사를 3N HCl과 에테르 사이에서 분별시켰다. 수층을 모아 50% NaOH 수용액으로 pH 8-9까지 중화시키고 아세트산에틸로 추출하였다. 아세트산에틸층은 무수 Na₂SO₄로 건조시키고, 진공하에서 농축시켜 조질의 모노-Cbz-TAP (5 g, 약 50% 수율)을 얻었다. 이 화합물을 추가 정제하지 않고 공정 B의 반응에 사용하였다.

[0210] 공정 B: Cbz-TAP-Boc의 합성



[0211] Boc₂O (3.86 g, 17.7 mmol, Boc = tert-부톡시카르보닐)을 격렬히 교반된 헥산 (25 ml) 중 Cbz-TAP (5g, 17.7 mmol)의 현탁액에 첨가하였다. 교반은 실내 온도에서 밤새 계속하였다. 반응 혼합물을 DCM (25 ml)로 희석하고, 10% 시트르산 수용액 (2X), 물 (2X) 및 염수로 세척하였다. 상기 유기층은 무수 Na₂SO₄로 건조시키고 진공하에서 농축시켰다. 조질 생성물 (수득량 5 g)은 공정 C의 반응에 직접 사용하였다.

[0213] 공정 C: H-TAP-Boc의 합성



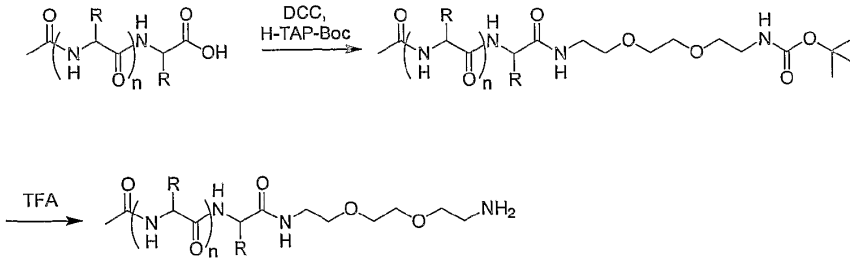
[0214] 공정 B의 조질의 Cbz-TAP-Boc를 메탄올 (25 ml) 중에 용해시키고, 16시간 동안 기구 압력 (balloon pressure) 하에서 탄소상 5% Pd (5% w/w)의 존재하에 수소 첨가하였다. 혼합물을 여과하고, 메탄올로 세척하여 여과액을 진공하에서 농축시켜 조질의 H-TAP-Boc 생성물 (수득량 3.7g)을 얻었다.

[0216] 공정 A-C를 거친 후 전체적인 수율은 약 44% (사용되는 Cbz-Cl의 양에 근거하여 산출)이다.

[0217] 실시예 2: 펩티드의 C-말단에 스페이서 부착

[0218] 아래의 반응식은 펩티드의 C-말단에 어떻게 스페이서를 부착하는지를 도시한 것이다.

자유 C말단을 갖는 펩타이드:



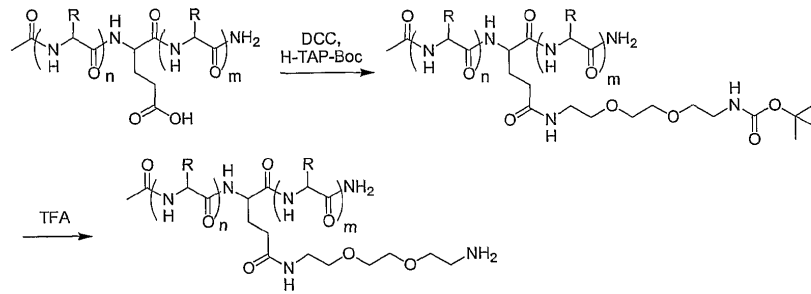
[0219]

[0220] H-TAP-Boc는 실시예 1에 따라 제조하였다. DCC는 N,N'-디사이클로헥실카르보디이미드이다.

[0221] **실시예 3: 자유 측쇄산을 갖는 펩티드에 스페이서 부착**

[0222] 아래의 반응식은 펩티드의 자유 측쇄산에 어떻게 스페이서를 부착하는지를 나타낸다.

자유 측쇄산을 갖는 펩타이드:

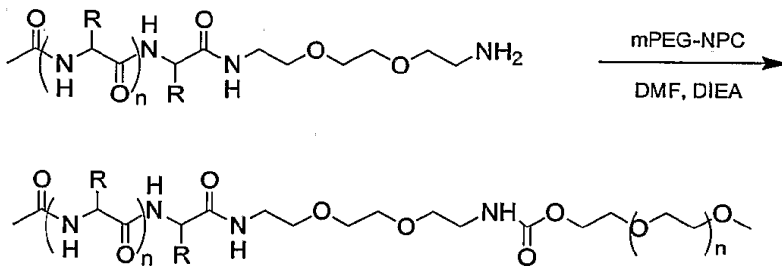


[0223]

[0224] TFA는 트리플루오로아세트산이다.

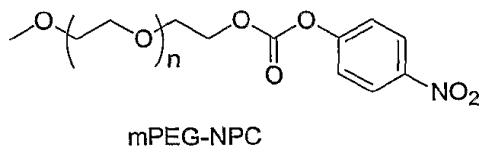
[0225] **실시예 4: mPEG-NPC로 펩티드를 PEG화**

C-말단에 TAP가 있는 펩티드:



[0226]

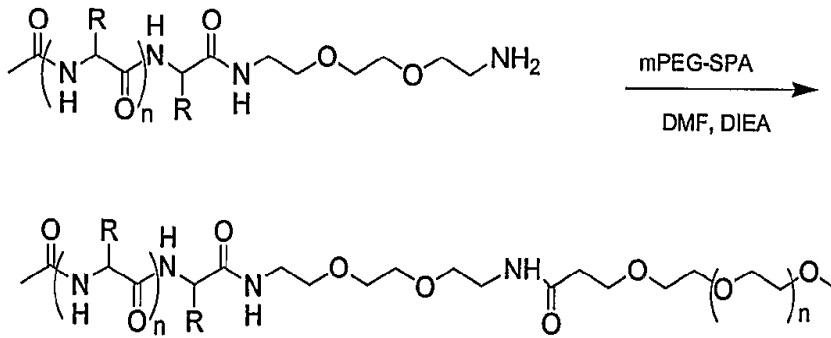
[0227] 식 중, mPEG-NPC는 다음의 구조를 갖는다:



[0228]

[0229] **실시예 5: mPEG-SPA에 의한 펩티드의 PEG화**

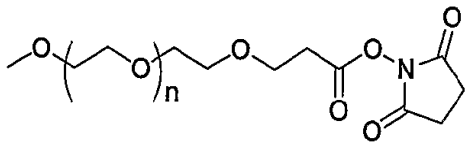
C-말단에 TAP가 있는 펩티드:



[0230]

[0231]

식 중 mPEG-SPA는 다음의 구조를 갖는다:



mPEG-SPA

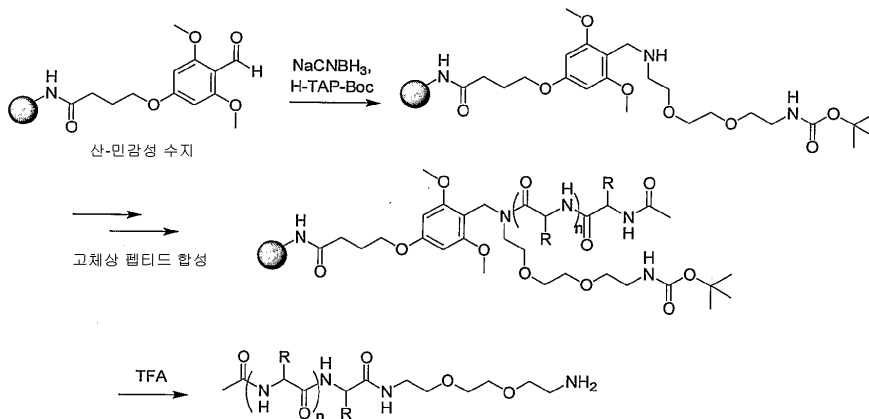
[0232]

[0233]

실시예 6: 스페이서 부착 및 펩티드 합성

[0234]

아래의 반응식은 상기 고체 지지체 상에 어떻게 스페이서를 부착하는지와 상기 고체 지지체에서 어떻게 펩티드를 합성하는지를 나타낸다.



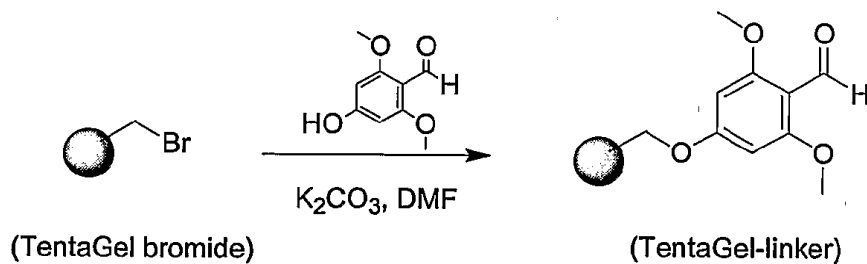
[0235]

[0236]

실시예 7: 수지에 부착된, 스페이서를 갖는 펩티드 이량체의 합성

[0237]

공정 A: 텐타겔 (TentaGel)-링커의 합성:

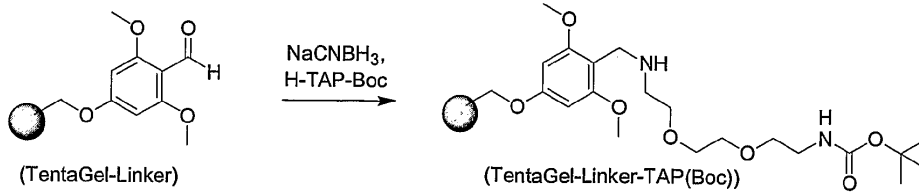


[0238]

[0239]

텐타겔 브로마이드 (2.5 g, 0.48 mmol/g, 독일 Rapp Polymere로부터 입수), 페놀형 링커 (5 당량), 및 K₂CO₃ (5 당량)을 20 ml의 N,N-디메틸포름아미드 (DMF) 중에서 70°C에서 14시간 동안 가열하였다. 실온으로 냉각한 후에, 수지를 세척하고 (0.1 N HCl, 물, 아세토니트릴 (ACN), DMF, MeOH), 건조시켜 호박색의 수지를 얻었다.

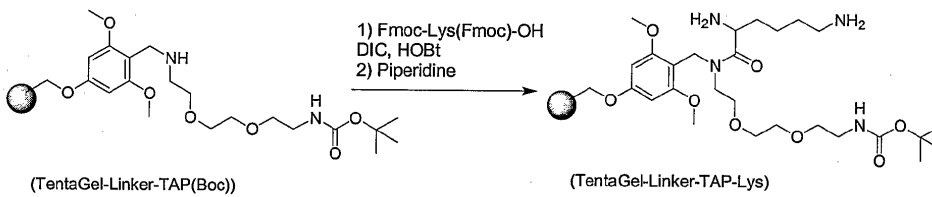
[0240] 공정 B: 텐타겔-링커-TAP (Boc)의 합성



[0241]

[0242] 상기의 공정 A로부터 얻은 수지 2.5 g과 H-TAP-Boc (1.5 gms, 5 당량) 및 빙초산 (34 μl , 5 당량)을 1:1 MeOH/테트라하이드로퓨란 (THF) 혼합물에 첨가하여 밤새 진탕시켰다. THF 중 소듐 시아노보로하이드라이드 (5 당량) 1M 용액을 상기 혼합물에 첨가하고 추가로 7시간 더 진탕시켰다. 상기 수지는 여과 세척한 후 (DMF, THF, 0.1 N HCl, 물, MeOH) 건조하였다. 소량의 수지를 DCM 중 벤질 클로라이드 및 디이소프로필에틸아민 (DIEA)로 벤조일화시키고, 70% 트리플루오로아세트산 (TFA)-DCM으로 분리한 후 LCMS 및 HPLC로 확인하였다.

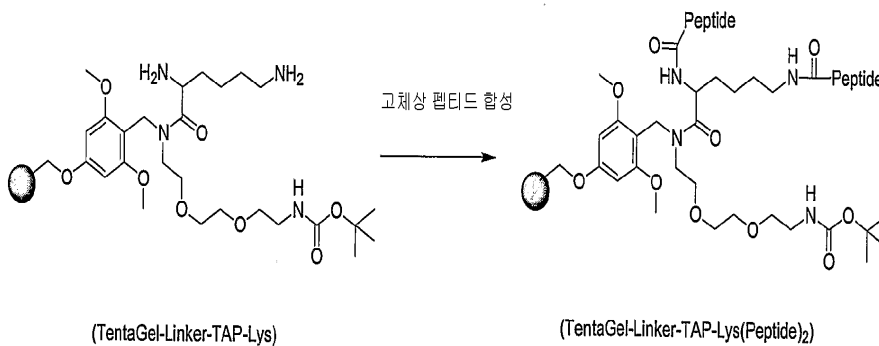
[0243] 공정 C: 텐타겔-링커-TAP-Lys의 합성



[0244]

[0245] 상기 공정 B로부터 얻은 수지를 Fmoc-Lys (Fmoc)-OH (Fmoc = 9-플루오레닐메톡시카르보닐, 5 당량의 아미노산 및 5 당량의 HATU (N,N,N',N'-테트라메틸-O-(7-아자벤조트리아졸-1-일)우로늄 헥사플루오로포스페이트로부터 제조)를 DMF에 0.5 M 농도로 용해시킨 다음, 10 당량의 DIEA를 첨가하여 제조함)의 활성화된 용액으로 처리하고, 14시간 동안 가볍게 진탕시켰다. 이어서 수지를 세척 (DMF, THF, DCM, MeOH)하고 건조시켜 보호된 수지를 얻었다. 수지를 DCM 중 20% 피리딘, 10% 무수아세트산 용액으로 20분간 처리하여 캡핑 (capping)시킨 다음 전술한 바와 같이 세척하였다. DMF 중 30% 피페리딘에서 20분 동안 수지를 가볍게 진탕시켜 Fmoc기를 제거한 다음 세척 (DMF, THF, DCM, MeOH) 및 건조하였다.

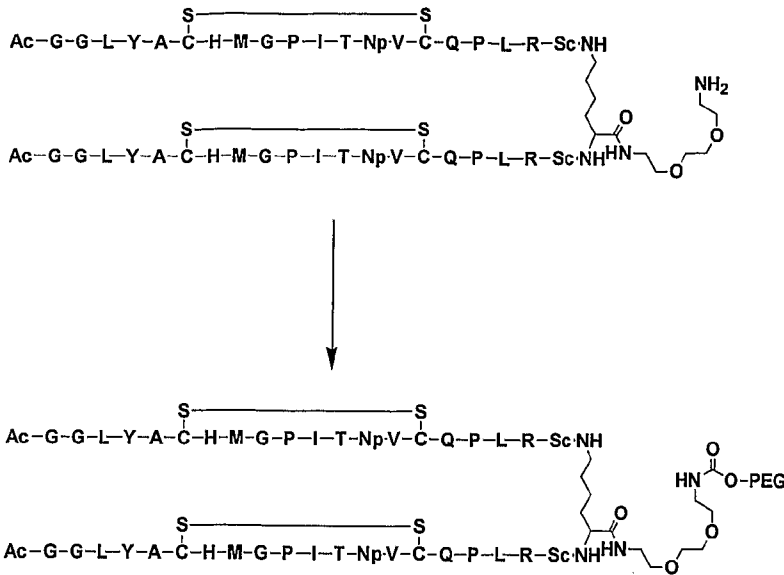
[0246] 공정 D: 텐타겔-링커-TAP-Lys(펩티드)의 합성



[0247]

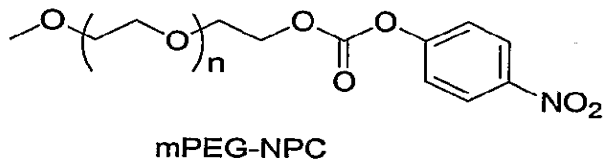
[0248] 상기 공정 C로부터 얻은 수지를, HBTU/HOBt 활성화에 의한 Fmoc-아미노산 커플링 및 피페리딘을 이용한 Fmoc 제거 사이클로 반복 처리하여, 두개의 펩티드 사슬을 동시에 만들었다. 이 공정은 Applied Biosystems, Inc.로부터 입수 가능한 ABI 433 자동 펩티드 합성기로 편리하게 수행할 수 있다. 마지막 Fmoc를 제거한 후에, 말단의 아민기를 DMF 중에서 20분 동안 무수아세트산 (10 당량) 및 DIEA (20 당량)로 아실화한 다음, 상기와 같은 방법으로 세척하였다.

[0258] 예컨대,



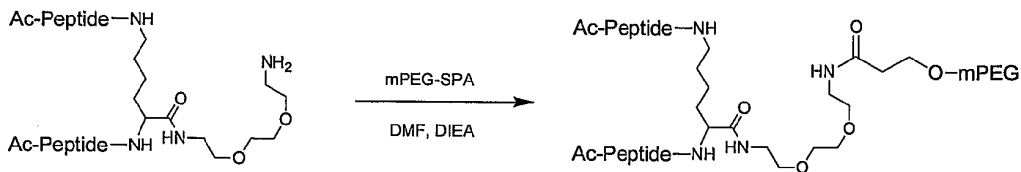
[0259]

[0260] 스페이서에 부착된 이량체 펩티드를 건조 DMF 중 동량 (몰 기준)의 활성화된 PEG종 [NOF Corp., Japan이 제조하고, Nektar Therapeutics, U.S. (전신은 "Shearwater Corp.")를 통해 입수가 가능한 mPEG-NPC]과 혼합하여 투명한 용액을 얻었다. 5분 후에, 4 당량의 DIEA를 상기 용액에 첨가했다. 혼합물을 주변 온도에서 14시간 동안 교반하고, 이어서 C18 역상 HPLC로 정제하였다. PEG화 펩티드의 구조를 매트릭스 지원 레이저 탈착 이온화 (Matrix-assisted-laser-desorption-ionization; MALDI) 질량 분석기로 확인하였다. mPEG-NPC는 다음의 구조를 갖는다:



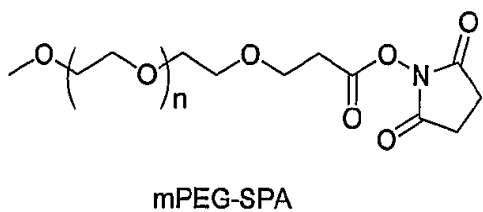
[0261]

[0262] 실시예 9: mPEG-SPA에 의한, 스페이서를 갖는 펩티드 이량체의 PEG화



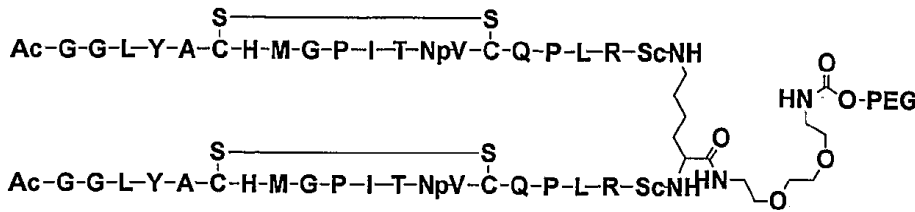
[0263]

[0264] 스페이서를 갖는 펩티드 이량체의 PEG화 역시 mPEG-SPA를 이용하여 수행가능하다. mPEG-SPA는 다음의 구조를 갖는다.



[0265]

[0266] 실시예 10: 이온 교환 정제



[0267]

[0268] 실시예 8에서 얻은 상기 화학식의 시료를 이용하여 펩티드-스페이서-PEG 접합체를 정제하는데 적합한 이온 교환 지지체를 확인하였다.

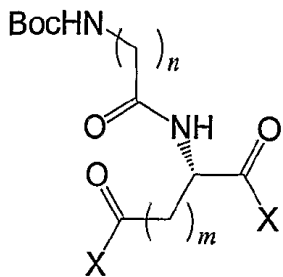
[0269] 일반적인 과정은 다음과 같다.

[0270] 이온 교환 수지 (2-3g)를 1 cm 컬럼에 적재한 후, 나트륨형 (용리액이 pH 14에 도달할 때까지 컬럼에 0.2 N NaOH를 적재함)으로, 이어서, 수소형 (용리액이 적재 pH에 도달할 때까지 0.1 N HCl 또는 0.1 M HOAc로 용리함)으로 전환시켰다. 그 후, pH가 6에 도달할 때까지, 25% ACN/물로 세척하였다. 접합 전의 펩티드 또는 펩티드-PEG 접합체를 25% ACN/물 (10 mg/ml)에 용해시키고, TEA로 pH를 3 미만으로 조정한 후, 별도 실험으로 컬럼에 적재시켰다. 25% ACN/물 2-3 컬럼 부피로 세척하고, 분획 5 ml를 수집한 후, 펩티드를 25% ACN/물 중 0.1M NH₄OAc로 용리하여 컬럼으로부터 분리시켰다. 그 후, 다시 5 ml 분획을 수집하였다. HPLC 분석으로 원하는 펩티드를 함유하고 있는 분획을 확인하였다. 증발 빛 산란 검출기 (ELSD)를 이용한 분석으로, 펩티드가 컬럼에 머물러 있을 때와 NH₄OAc 용액으로 용리될 때 (일반적으로 분획 4 및 10 사이임), 불순물로서 비접합된 PEG가 관찰되지 않는 것을 알 수 있었다. 펩티드가 초기 세척 완충제에서 용리될 때 (일반적으로 처음 2 분획), 원하는 PEG-접합체와 과량의 PEG의 어떠한 분리도 관찰되지 않았다.

[0271] 펩티드-PEG 접합체를 미반응 (또는 가수분해된) PEG로부터 분리하는 능력과 출발 이량체 펩티드를 보유하는 능력을 기준으로 이온 교환 지지체를 선택하였다. 모노 S HR5/5 강양이온 교환 프리 로딩 컬럼 (mono S HR5/5 strong cation exchange pre-loaded column; Amersham Biosciences), SE53 셀룰로오스 미립자 강양이온 교환 지지체 (SE53 Cellulose microgranular strong cation exchange support; Whatman) 및 SP 세파로스 급류 강양이온 교환 지지체 (SP Sepharose Fast Flow strong cation exchange support; Amersham Biosciences)가 적합한 이온 교환 지지체인 것으로 확인되었다.

[0272] 실시예 11: α-아미노산에 의거한 3작용성 분자의 합성

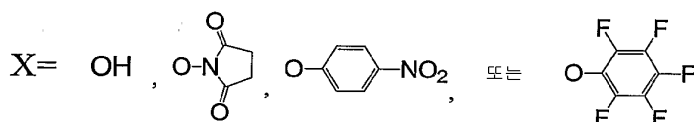
[0273] 다음 구조를 갖는 분지형 3작용성 분자



[0274]

[0275] [상기 식에서, m=1~5, n=1~14, m 및 n은 정수;

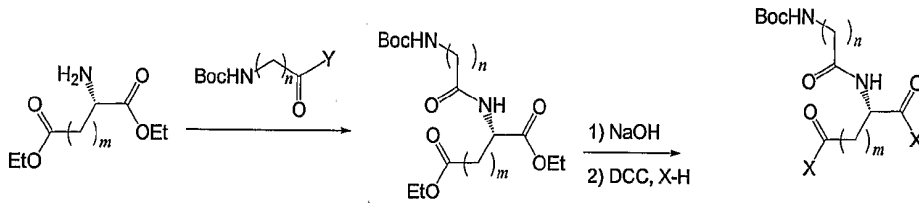
[0276] 삭제



[0277]

이다]

[0278] 를 다음의 반응식에 따라 합성하였다.



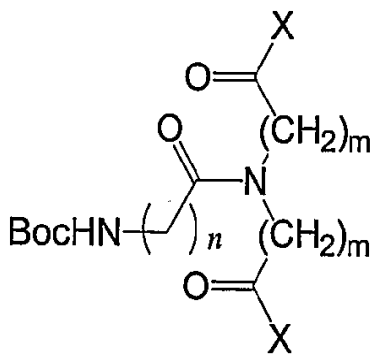
[0279]

[0280] [상기 식에서, m=1~5, n=1~14, m 및 n은 정수이다]

[0281] 이러한 3작용성 분자는 링커 및 스페이서로 동시에 작용한다.

[0282] **실시예 12: 3차 아미드에 기초한 3작용성 분자의 합성**

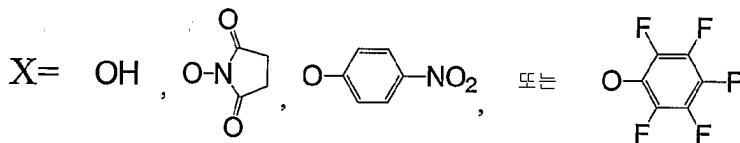
[0283] 다음 구조를 갖는 분자상 3작용성 분자:



[0284]

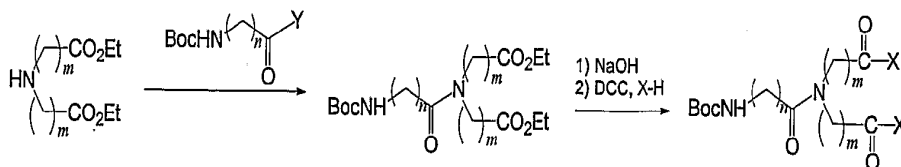
[0285] [식 중, m=1~5, n=1~14, m 및 n은 정수이고,

[0286] 삭제



[0287] 이다]

[0288] 를 다음의 반응식에 따라 합성하였다.



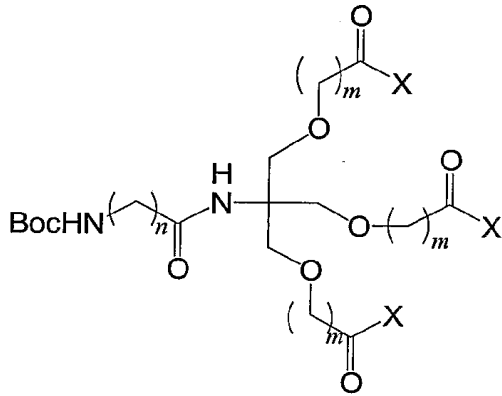
[0289]

[0290] [상기 식에서, m=1~5, n=1~14, m 및 n은 정수이다]

[0291] 상기 3작용성 분자는 링커 및 스페이서로 동시에 작용한다.

[0292] **실시예 13: 동중3작용성 (homotrifunctional) 분자의 합성**

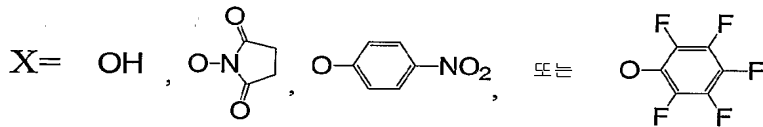
[0293] 다음 구조를 갖는 분지상 동중3작용성 분자:



[0294]

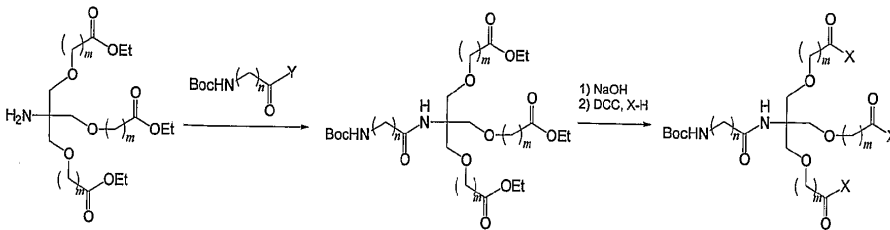
[0295] [식 중, m=1~2, n=1~6, m 및 n은 정수이고,

[0296] 삭제



[0297]

[0298] 를 다음 반응식에 따라 합성하였다.



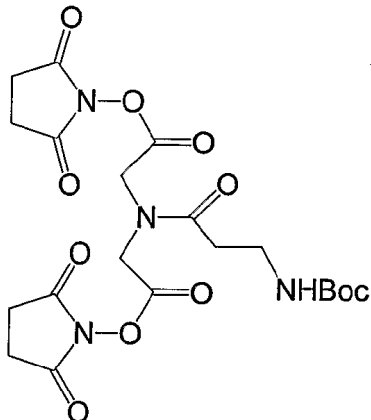
[0299]

[0300] [식중, m=1~2, n=1~6, m 및 n은 정수임]

[0301] 이러한 동중3작용성 분자는 동시에 링커(들) 및 스페이서로서 작용할 수 있다.

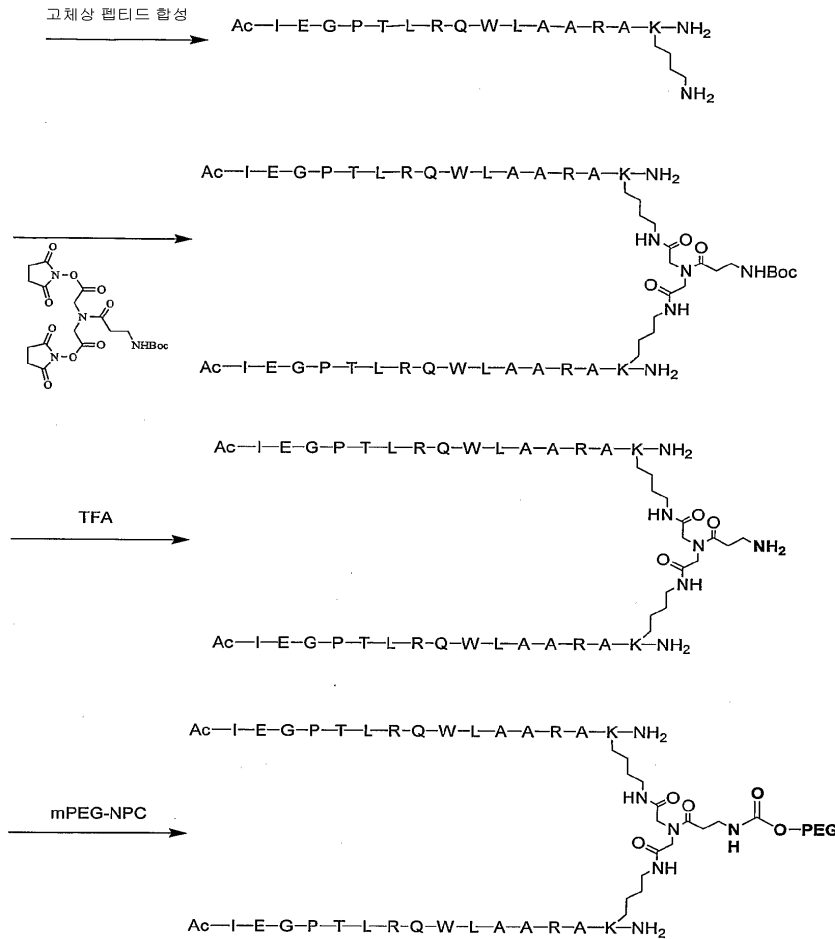
[0302] **실시예 14: 3작용성 분자를 이용한 C-말단 이량화 및 PEG화**

[0303] 다음 구조를 갖는 3작용성 분자를 실시예 12에 따라 제조하였다.



[0304]

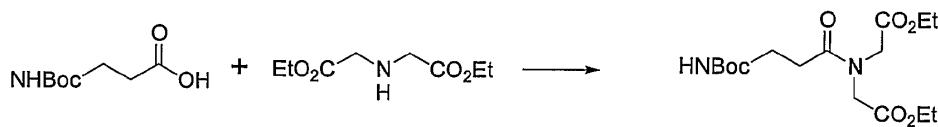
[0305] 다음 반응식에 따라, 상기 3작용성 분자를 C 말단 이량화 및 PEG화에 이용하였다.



[0306]

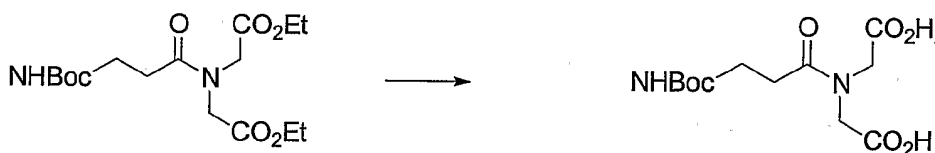
[0307] 실시예 15: 3작용성 분자를 이용한 N-말단 이량화 및 PEG화

[0308] 3작용성 분자는 다음과 같이 제조하였다.



[0309]

[0310] DCM 200 ml 중 Boc-βAla-OH (10.0 g, 52.8 mmol) (Boc = tert-부톡시카르보닐) 및 디에틸 이미노디아세테이트 (10.0 g, 52.8 mmol) 용액에 0°C에서 DCC (10.5g, 50.9 mmol)를 5분간 첨가하였다. 백색의 침전물이 2분 이내 형성되었다. 상기 반응 혼합물을 실온으로 승온시키고 24시간 동안 교반하였다. 요소 (urea)를 소결체 여과기 (다공성 매체)로 여과시키고 용매를 감압하에 제거하였다. EtOAc (EtOAc= 아세트산에틸) 500 ml 중에서 잔사를 취하고, 상기와 같은 방법으로 여과한 후 분별 깔때기로 옮겼다. 상기 유기상을 세척 (포화 NaHCO₃, 식염수, 1 N HCl, 염수), 건조 (MgSO₄), 여과 및 건조하여 무색의 오일을 얻었다. 상기 오일을 고체화 하여 10분 이내에 백색의 결정체 고체를 얻었다.

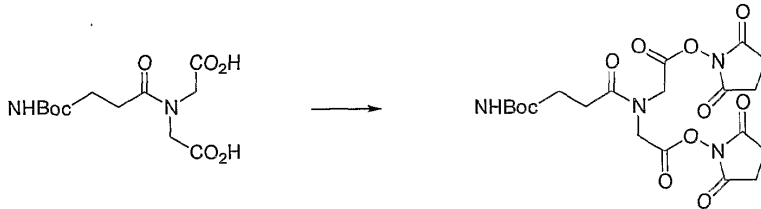


[0311]

[0312] 조질의 디에스테르를 THF (THF = 테트라하이드로퓨란) 75 ml 및 MeOH (MeOH = 메탄올) 75 ml 중에서 취하고 물 50 ml를 첨가하였다. 상기 용액에 물 25 mL 중의 KOH (KOH = 수산화칼륨) (8.6 g, 153 mmol) 용액을 첨가

하였다. 반응 혼합물은 밝은 노란색으로 변화하였다. 12시간 동안 교반한 후에 (pH는 여전히 ~12), 유기 용매를 회전식 증발 건조기에서 제거하고 얻어진 슬러리를 Et₂O (Et₂O = 디에틸 에테르) 및 포화 NaHCO₃ 사이에서 분별시켰다. 결합된 수성상을 pH 1로 산성화하고, NaCl로 포화시킨 다음, EtOAc로 추출하였다. 상기 EtOAc층을 세척 (염수), 건조 (MgSO₄), 및 농축하여 백색의 고체인 생성물 13.97 g을 얻었다 (2개 공정에서 90.2%).

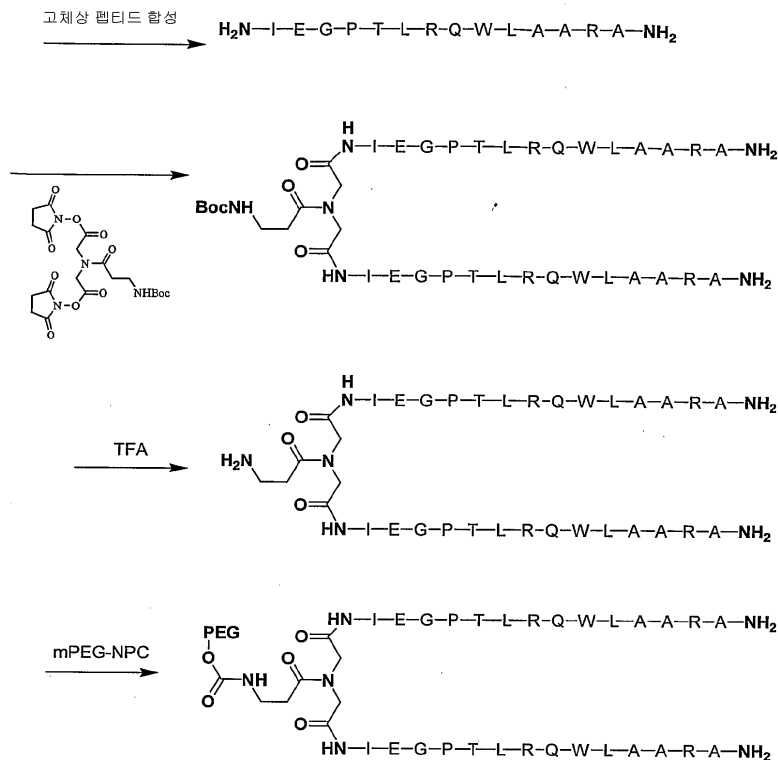
[0313] 주석: DCC 반응을 ACN 중에서 수행할 경우 수율이 73%로 하락하였다. DIC를 사용하는 경우, 크로마토그래피에 의하지 않고는 목적하는 생성물로부터 요소 부산물을 제거할 수 없었다; DCC 요소는 크로마토그래피 없이도 정량적으로 제거할 수 있다. 또한 상기 반응은 또한 수용성 카르보디이미드의 경우에도 적용된다.



[0314] [0315] ACN 50 ml 중 이산 (diacid) (1.00g, 3.29 mmol) 및 히드록시숙신이미드 (0.945 g, 8.21 mmol) 용액에 5분간 DCC (1.36g, 6.59 mmol)를 첨가하였다. 백색의 ppt가 즉시 생성되었다. 이 반응 혼합물을 22시간 동안 교반하고 여과하여 DCC 요소를 제거하였다. 용매는 감압하에 제거하고 잔사를 EtOAc (250 ml)에서 취하여 분별 깔때기로 옮겨담았다. 유기상을 세척하고 (포화 NaHCO₃, 염수, 1 NHCl, 염수), 건조 (MgSO₄), 및 농축하여 백색의 고체를 얻었다. 이 고체를 ACN 75 ml중에서 취하고, 여과 및 농축하여 생성물 1.28 g을 백색 고체로서 얻었다 (수율 78.2%).

[0316] 주석: 수율은 THF 중에서 31%, DMF 중에서 68% (DCC 대신에 DIC로), 그리고 DCM/DMF 중에서 57%로 하락하였다. 출발 이산은 ACN 중에서 가용성이어서, 만일 어떤 물질이 DCC가 첨가되기 전에 용해되지 않았다면, 이를 여과하여 제거할 수 있다.

[0317] 상기 3작용성 분자를 다음의 반응식에 따라 N-말단 이량화 및 PEG화에 사용하였다:

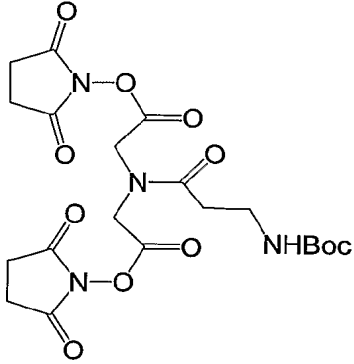


[0318] [0319] 실시예 16: mPEG₂-리신올-NPC의 합성

[0320] 상업적으로 입수 가능한 리신올을 과량의 mPEG₂로 처리하여 mPEG₂-리신올을 얻었다. 그 후, mPEG₂-리신올을 과량의 NPC로 처리하여 mPEG₂-리신올-NPC를 형성하였다.

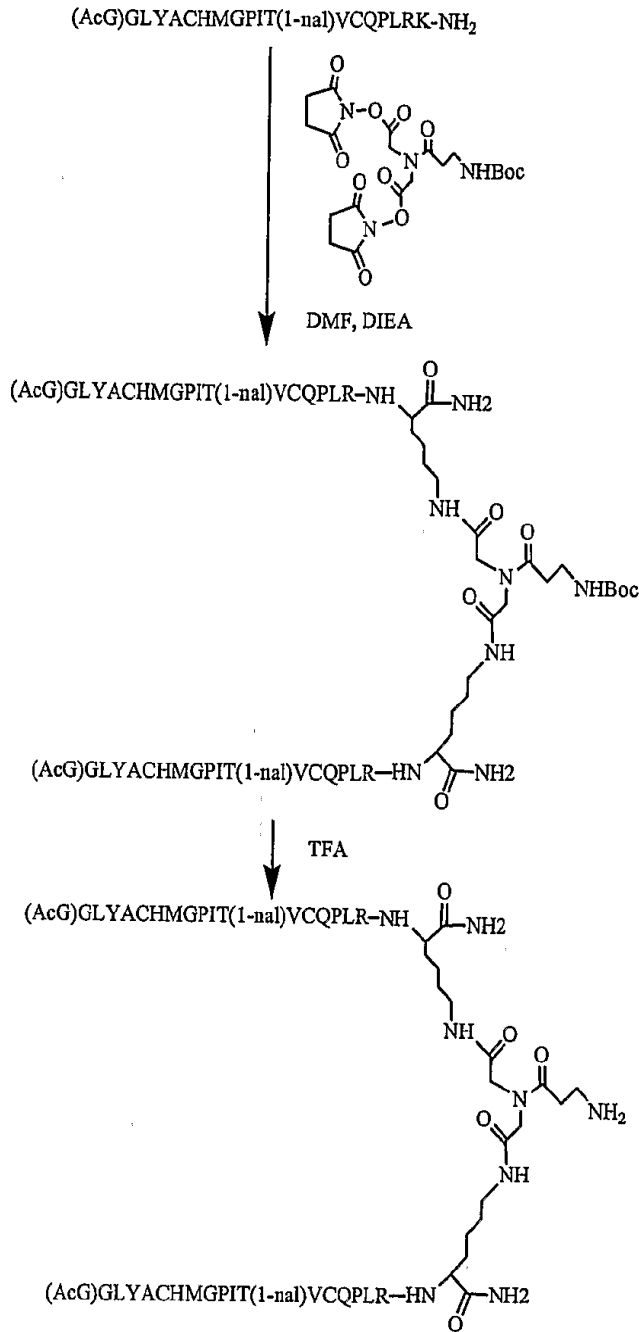
[0321] 실시예 17: 3작용성 분자를 이용한 PEG화 (PEG 부분은 2개의 선형 PEG 사슬을 함유한다)

[0322] 다음 구조를 갖는 3작용성 분자를 실시예 15의 방법에 따라 제조하였다:



[0324] 공정 1- 펩티드 단량체에 3작용성 링커를 커플링:

[0325] 링커에 커플링 하기 위하여, 건조 DMF 중 1 당량의 3작용성 링커와 2당량의 펩티드를 혼합하여 투명한 용액을 얻고, 5 당량의 DIEA를 2분 후에 첨가한다. 혼합물을 주변 온도에서 14시간 동안 교반한다. 용매를 감압하에 제거하고 조질의 생성물을 DCM 중 80% TFA에 30분 동안 용해시켜 Boc기를 제거한 다음, C18 역상 HPLC로 정제한다. 이량체의 구조는 전기 분무 질량 분석기로 확인하였다. 상기 커플링 반응에 의하여 링커가 각 단량체의 리신 잔기의 ε-아미노기의 질소 원자에 부착된다.

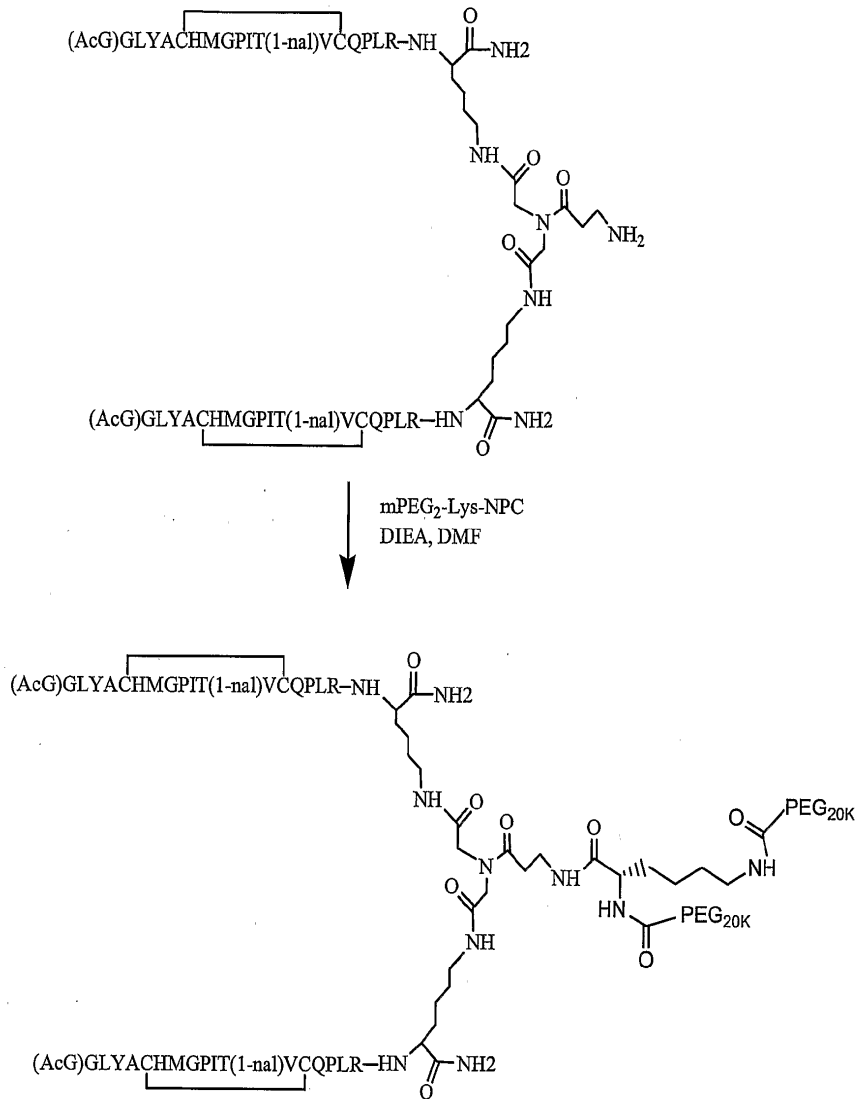


[0327]

[0328] 공정 4 - 펩티드 이량체의 PEG화:

[0329] 카르바메이트 결합을 통한 PEG화:

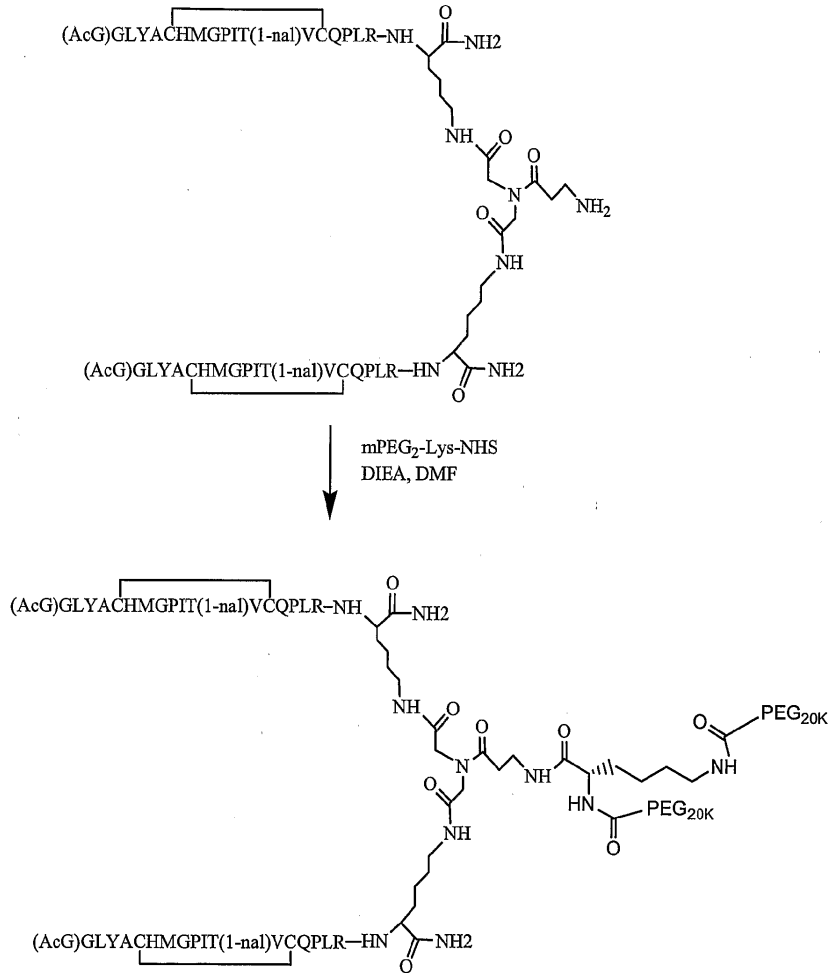
[0330] 펩티드 이량체와 PEG 중 (mPEG₂-리신올-NPC)을 건조 DMF 중에서 1:2의 몰비율로 혼합하여 투명한 용액을 얻는다. 5분 후에 4당량의 DIEA를 상기 용액에 첨가한다. 혼합물을 주변 온도에서 14시간 동안 교반하고, 이어서 C18 역상 HPLC로 정제한다. PEG화 펩티드의 구조는 MALDI 질량 분석기로 확인한다. 정제된 펩티드는 또한 아래 기재한 바와 같이 양이온 교환 크로마토그래피를 통하여 정제한다.



[0331]

[0332] **아미드 결합을 통한 PEG화:**

[0333] 펩티드 이량체와 PEG 중 [mPEG₂-Lys-NHS]을 건조 DMF 중에서 1:2 몰비율로 혼합하여 투명한 용액을 얻는다. 5 분 후, DIEA 10 당량을 상기 용액에 첨가한다. mPEG₂-Lys-NHS는 Nektar Therapeutics (490 Discovery Drive, Huntsville, Alabama 35806)의 Molecular Engineering 카탈로그 (2003), 아이템 No. 2Z3XOT01와 같이, 상업적으로 입수 가능하다, 혼합물을 주변 온도에서 2시간 동안 교반하고, 이어서 C18 역상 HPLC로 정제한다. PEG화 펩티드의 구조는 MALDI 질량분석기로 확인하였다. 정제된 이 펩티드를 또한 아래에 기재한 바와 같이 양이온 교환 크로마토그래피를 통하여 정제시켰다.



[0334]

[0335]

본 발명은 본 명세서에 제시된 구체적인 실시 형태에 의해 그 범위가 제한되는 것은 아니다. 실제로, 본 명세서에 기재된 것 외에, 본 발명에 다양한 실시 형태는 전술한 상세한 설명과 첨부 도면으로부터 본 발명이 속한 기술 분야의 당업자에게 자명할 것이다. 이러한 변형은 기재된 청구 범위에 포함되는 것이다.

[0336]

특히, 특허 출원 및 다양한 공개 문헌을 포함한 수많은 참조 문헌이 본 발명의 설명에서 인용되고 논의된다. 이러한 문헌의 인용 및/또는 논의는 단지 본 발명의 보다 정확하게 기술하기 위함이며, 이러한 문헌을 본 발명의 "종래 기술"로 인정하는 것은 아니다. 본 상세한 설명에서 인용되고 논의된 모든 문헌은, 각각의 인용문헌들이 개별적으로 문헌에 의해 병합된 것처럼, 여기에서 전적으로 같은 범위로 인용문헌으로 병합된다.