(19)대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(51) 。Int. Cl.
A61K 47/48 (2006.01)

(45) 공고일자 2007년03월14일
(11) 등록번호 10-0695587
(24) 등록일자 2007년03월08일

(21) 출원번호 10-2004-0007984
(22) 출원일자 2004년02월06일
심사청구일자 2004년05월19일

(65) 공개번호 10-2004-0086522
(43) 공개일자 2004년10월11일

(30) 우선권주장 1020030019736 2003년03월28일 대한민국(KR)

(73) 특허권자 동국제약 주식회사
서울 강남구 대치3동 997-8

박명옥
서울 노원구 하계2동 학여울청구아파트 107동 1403호

(72) 발명자 차경희
경기도수원시팔달구망포동686번지망포마을동수원LG빌리지106동401호

이계완
서울특별시서초구양재동301-11진산빌라301호

박명옥
서울특별시노원구하계동학여울청구아파트107동1403호

김장현
서울특별시성북구종암2동SKAPT104동2301호

(74) 대리인 손민

심사관 : 신영신

전체 청구항 수 : 총 18 항

(54) 부갑상성 호르몬과 생체적합성 고분자의 1:1 접합체,이의 제조방법과 이를 함유하는 약학 조성물

(57) 요약

본 발명은 생체적합성 고분자가 부갑상선 호르몬(PTH)의 카르복실기에 1:1의 비율로 결합된 생체적합성 고분자-PTH 접합체, 이의 제조방법과 이를 함유하는 약학 조성물을 제공한다.

대표도

도 6

특허청구의 범위

청구항 1.

생체적합성 고분자와 결합한 부갑상선 호르몬(PTH) 전체가 부갑상선 호르몬(PTH)의 카르복실기 부위를 통해 생체적합성 고분자와 1:1의 몰비로 결합함으로써, 2개 이상의 생체적합성 고분자와 결합한 부갑상선 호르몬(PTH)이 처음부터 포함되지 않은 부갑상선 호르몬(PTH)-생체적합성 고분자 접합체를 포함하는 제제.

청구항 2.

제 1 항에 있어서, 생체적합성 고분자가 폴리에틸렌글리콜, 폴리프로필렌글리콜, 폴리옥시에틸렌, 폴리트리메틸렌 글리콜, 폴리락트산 및 이들의 유도체, 폴리아크릴산 및 이의 유도체, 폴리(아미노산), 폴리우레탄, 폴리포스파진, 폴리(L-라이신), 폴리알킬렌 옥사이드, 폴리사카라이드, 덱스트란, 폴리비닐 피롤리돈, 폴리비닐 알콜 및 폴리아크릴 아마이드 및 이들의 둘 이상의 공중합체로 이루어진 그룹 중에서 선택되는 비면역원성 고분자인 제제.

청구항 3.

제 1 항에 있어서, PTH가 재조합된 사람 PTH(1-84 aa)인 제제.

청구항 4.

제 1 항의 제제로 부터 분리한 생체적합성 고분자와 PTH의 1:1 접합체 및 약학적으로 허용되는 담체를 포함하는 약학 조성물.

청구항 5.

PTH, 활성화된 생체적합성 고분자 및 카르복실기 커플링화제를, PTH 대 활성화된 생체적합성 고분자의 몰비가 1 : 1 내지 20, 반응물의 pH가 2 내지 5, PTH와 커플링화제의 몰비가 1 : 1 내지 50의 몰비의 반응조건 하에서 카르복실기 커플링화제를 분할하여 첨가하면서 결합시키는 단계를 포함하는, 제1항 제제의 제조방법.

청구항 6.

제 5 항에 있어서, 생체적합성 고분자가 카르복실산 및 반응성 카르보닐기와 반응할 수 있는 작용기로 활성화되는 방법.

청구항 7.

제 5 항에 있어서, 생체적합성 고분자가 폴리에틸렌글리콜, 폴리프로필렌글리콜, 폴리옥시에틸렌, 폴리트리메틸렌 글리콜, 폴리락트산 및 이들의 유도체, 폴리아크릴산 및 이의 유도체, 폴리(아미노산), 폴리우레탄, 폴리포스파진, 폴리(L-라이신), 폴리알킬렌 옥사이드, 폴리사카라이드, 덱스트란, 폴리비닐 피롤리돈, 폴리비닐 알콜 및 폴리아크릴 아마이드 및 이들의 둘 이상의 공중합체로 이루어진 그룹 중에서 선택되는 비면역원성 고분자인 방법.

청구항 8.

제 5 항에 있어서, PTH가 재조합된 사람 PTH(1-84 aa)인 방법.

청구항 9.

제 5 항의 방법에 의해 수득된 제제로 부터, 생체적합성 고분자가 PTH의 카르복실기 부위를 통해 PTH와 1:1의 몰비로 결합된 생체적합성 고분자-PTH 접합체를 분리함으로써 PTH의 카르복실기 부위를 통해 PTH와 1:1의 몰비로 결합된 생체적합성 고분자-PTH 접합체를 얻는 방법.

청구항 10.

생체적합성 고분자와 결합한 부갑상선 호르몬(PTH) 전체가 부갑상선 호르몬(PTH)의 C-말단 부위를 통해 생체적합성 고분자와 1:1의 몰비로 결합함으로써, 2개 이상의 생체적합성 고분자와 결합한 부갑상선 호르몬(PTH)이 처음부터 포함되지 않은 부갑상선 호르몬(PTH)-생체적합성 고분자 접합체를 포함하는 제제.

청구항 11.

제 10 항에 있어서, 생체적합성 고분자가 폴리에틸렌글리콜, 폴리프로필렌글리콜, 폴리옥시에틸렌, 폴리트리메틸렌 글리콜, 폴리락트산 및 이들의 유도체, 폴리아크릴산 및 이의 유도체, 폴리(아미노산), 폴리우레탄, 폴리포스파진, 폴리(L-라이신), 폴리알킬렌 옥사이드, 폴리사카라이드, 덱스트란, 폴리비닐 피롤리돈, 폴리비닐 알콜 및 폴리아크릴 아마이드 및 이들의 둘 이상의 공중합체로 이루어진 그룹 중에서 선택되는 비면역원성 고분자인 제제.

청구항 12.

제 10 항에 있어서, PTH가 재조합된 사람 PTH(1-84 aa)인 제제.

청구항 13.

제 10 항의 제제로부터 분리한 생체적합성 고분자와 PTH의 1:1 접합체 및 약학적으로 허용되는 담체를 포함하는 약학 조성물.

청구항 14.

PTH, 활성화된 생체적합성 고분자 및 카르복실기 커플링화제를, PTH 대 활성화된 생체적합성 고분자의 몰비가 1 : 1 내지 20, 반응물의 pH가 2 내지 3, PTH와 커플링화제의 몰비가 1 : 1 내지 50의 몰비의 반응조 건하에서 카르복실기 커플링화제를 분할하여 첨가하면서 결합시키는 단계를 포함하는, 제10항 제제의 제조방법.

청구항 15.

제 14 항에 있어서, 생체적합성 고분자가 카르복실산 및 반응성 카르보닐기와 반응할 수 있는 작용기로 활성화되는 방법.

청구항 16.

제 14 항에 있어서, 생체적합성 고분자가 폴리에틸렌글리콜, 폴리프로필렌글리콜, 폴리옥시에틸렌, 폴리트리메틸렌 글리콜, 폴리락트산 및 이들의 유도체, 폴리아크릴산 및 이의 유도체, 폴리(아미노산), 폴리우레탄, 폴리포스파진, 폴리(L-라이신), 폴리알킬렌 옥사이드, 폴리사카라이드, 덱스트란, 폴리비닐 피롤리돈, 폴리비닐 알콜 및 폴리아크릴 아마이드 및 이들의 둘 이상의 공중합체로 이루어진 그룹 중에서 선택되는 비면역원성 고분자인 방법.

청구항 17.

제 14 항에 있어서, PTH가 재조합된 사람 PTH(1-84 aa)인 방법.

청구항 18.

제 14 항의 방법에 의해 수득된 제제로 부터, 생체적합성 고분자가 PTH의 C-말단 부위를 통해 PTH와 1:1의 몰비로 결합된 생체적합성 고분자-PTH 접합체를 분리함으로써, PTH의 C-말단 부위를 통해 PTH와 1:1의 몰비로 결합된 생체적합성 고분자-PTH 접합체를 얻는 방법.

명세서

발명의 상세한 설명

발명의 목적

발명이 속하는 기술 및 그 분야의 종래기술

본 발명은 생체적합성 고분자와 부갑상선 호르몬(PTH)의 1:1 접합체, 이의 제조방법 및 이를 함유하는 약학 조성물에 관한 것이다. 좀더 구체적으로는, 본 발명은 PTH의 카르복실기 부위에 PEG와 같은 생체적합성 고분자를 1:1로 특이적으로 결합시킨 이들의 접합체, 이의 제조방법과 이를 함유하는 약학 조성물에 관한 것이다.

일반적으로 펩타이드 또는 단백질과 같은 생물학적 활성물질을 의약품으로 사용하는 경우에는 체내에서 쉽게 가수분해가 되거나 단백질 분해 효소에 의하여 분해되어 생체 흡수율이 낮아지거나 반복 투여에 의하여 면역반응이 유도되는 문제점이 있다. 이러한 이유로 대부분의 단백질 또는 펩타이드 약물은 주로 주사제로서 투여되며, 투여횟수는 1일 1회 또는 그 이상의 빈도로 투여되어 왔는데 이러한 약물의 빈번한 투여는 환자에게 고통과 위험을 수반하며, 특히 장기 치료를 요하는 환자의 경우에는 일상 생활에 많은 불편을 주게되어 시간적 및 경제적으로 비효율적이다.

따라서, 상기와 같은 문제점을 해결하는 보다 안정성 있는 약물의 개발이 요구되며, 그에 따라 펩타이드 또는 단백질과 같은 생물학적 활성물질을 생체적합성 고분자로 수식하는 기술이 개발되었다. 단백질 또는 약리 활성을 가진 분자를 합성 고분자와 결합시키는 것은 생체 내(*in vivo*) 및 생체 외(*in vitro*) 적용 시에 많은 이점을 제공할 수 있다. 예를 들어, 생리활성 분자에 대한 고분자의 공유결합은 분자의 표면특성 및 용해성을 변화시켜서, 물 또는 유기용매에 대한 용해성을 증가시킬 수 있고, 또한, 생체적합성(biocompatibility)을 증가시켜서 면역 반응성을 감소시키며, 생체 내에서의 안정성을 증가시킬 뿐만 아니라 장관 시스템, 신장, 비장 또는 간에 의한 소실(clearance)을 연장시킬 수 있다.

이와 같이, 목적하는 단백질이나 펩타이드 등의 생물학적 활성물질에 PEG 등의 생체적합성 고분자를 결합시킬 경우 많은 장점이 있지만 지금까지 알려진 기술로 단백질 또는 펩타이드 등의 생물학적 활성물질에 생체적합성 고분자가 결합된 접합체를 만드는 경우 해결하여야 할 문제점이 남아 있다. 예를 들면, 가장 일반적인 방법으로는 PEG가 라이신과 같은 아민기에 결합하는 것인데, 대개의 결합할 단백질 또는 펩타이드의 하나 또는 그 이상의 자유 라이신 잔기는 단백질의 활성 부위에 근접해 있는 경우가 많아, 단백질의 표면 부위 중 단백질의 활성과 직접 관계가 있는 부위가 PEG와 결합할 경우에는, 그 부위는 더 이상 생물학적 기능을 수행할 수 없게 되어 단백질의 활성이 감소하게 된다. 또한, PEG와 라이신 잔기의 결합은 상당히 용이하게 일어나는 반응으로 PEG-생물학적 활성물질 접합체는 2개 이상의 PEG가 하나의 단백질에 수식된다. 예를 들어 인터페론, CSF, 인터루킨과 같은 사이토카인류, EGF, hGH, 인슐린과 같은 폴리펩타이드는 2개 이상의 PEG가 표면에 수식되게 되면 활성이 급격하게 감소되어 더 이상의 역할을 할 수 없게 된다. 또한 이러한 반응은 대개 무작위적으로 일어나게 되므로 많은 종류의 PEG-단백질 접합체들의 혼합물로 존재하게 되고, 따라서 원하는 접합체를 순수

분리하는 과정이 복잡하고 어려워지게 된다. 즉, 너무나 많은 활성 중합체가 표적 단백질 또는 펩타이드에 부착되는 경우, 생물학적 활성은 현저히 감소되거나 상실되며, 단백질에 중합체를 연결시키는 강력한 링커가 사용되거나 불충분한 양의 중합체가 표적에 부착되는 경우, 수득되는 접합체의 치료학적 가치가 오히려 제한되기도 한다.

이러한 문제점을 극복하기 위한 방안으로 많은 연구자들이 특정부위에 생체고분자를 결합하기 위하여 단백질의 아미노산기를 유전학적으로 변환하여 변환된 부위에 고분자를 결합시키는 연구도 많이 시도하고 있다. 그러나 이러한 방법은 유전학적으로 단백질을 변화하는 것으로 본래의 단백질과는 성질이 달라지기도 하며 치료용으로 인체내에 투여하기에는 안전성을 증명해야 문제가 있다.

화학적으로 생물학적 활성물질의 특정 부위를 생체고분자로 수식함으로써 문제를 해결하고자 한 시도의 예로서 미국특허 제5951974호 및 미국특허 제5985263호에는 인터페론의 히스티딘 잔기에 PEG를 공유결합시켜 체내 반감기를 증가시키는 등 약물의 효능을 증가시키고자 하였다. 그러나 이러한 방법도 여전히 활발한 아민기와의 반응이라 여러 부위의 히스티딘에 무작위로 고분자가 접합되어 PEG와 인터페론이 1:1로 접합된 고활성 PEG-인터페론을 분리하기 위하여 이온-교환 컬럼을 사용하여야만 하였다.

미국특허 제5766897호에는 생리활성 거대분자 및 그의 돌연변이체의 시스테인 잔기에 활성화된 PEG를 접합시켜 특정부위를 수식하였다. 대부분의 단백질은 1개 정도의 유리 시스테인을 갖거나 디설파이드 결합을 형성하여 여분의 시스테인을 갖지 못하는 경우가 있다. 이러한 경우 돌연변이 과정을 거쳐 활성 부위와 관계없는 잔기를 시스테인으로 변화시킨 후, 고분자를 결합시키고 있다. 이러한 방법은 특정 부위에 고분자가 접합되는 장점은 있으나 다른 반응기, 즉, 아민기나 카르복실기와 같은 것에 비해 활성이 상당히 떨어지는 경향이 있다.

미국특허 제5985265호는 G-CSF나 IFN의 N-말단 잔기에 PEG를 수식하는 특정 부위 접합체를 개시하였다. 그러나 이 방법은 반응하는 고분자의 활성 부위가 상당히 반응성이 낮아 반응시간이 상당히 길어지며 생성물의 수율이 낮고 단백질의 안정성을 우려하게 된다. 특히, 이러한 방법은 단백질의 활성 부위가 N-말단 부근일 경우에는, 고분자가 N-말단의 아민기에 접합됨으로써 급격한 활성 저하 또는 상실을 가져올 수 있게 된다.

미국특허 제5824778호는 G-CSF의 아민기나 카르복실기에 PEG를 결합한 접합체에 대해 개시하였다. 그러나 상기 미국특허에서는 단백질의 카르복실기를 활성화하기 위해 사용되는 EDAC를 지나치게 과량으로 사용함으써 여러 잔기의 카르복실기가 활성화되어 다수의 PEG가 결합되었으며 수득된 PEG-G-CSF 접합체의 분자량 측정 결과 다양한 분자량 분포의 불균질 혼합물 형태로 접합체가 생성되었으며 단백질 활성이 상당히 저하되었다.

생물학적 활성물질중의 하나로서 부갑상선 호르몬(PTH)은 부갑상선에서 분비되는 84개의 아미노산으로 이루어진 펩타이드 호르몬이며 주 작용부위는 부신피질로서 부신피질 막에 결합하여 cAMP와 IP_3(이노시톨 트리포스페이트), DAG(디아실 글리세롤)의 생산을 증가시키는 생리활성 물질이다. 신장과 뼈에서 칼슘이온의 균형을 유지하면서 항상성을 조절하여 신진대사와 골형성을 촉진시키는 것으로 알려져 있기 때문에 골다공증 치료제로서 활발한 연구가 진행되고 있는 물질이다. PTH는 PTH-1 수용체와 결합하고 이를 활성화시켜 포스포리파제 C(PLC) 뿐만 아니라 아데닐레이트 사이클라제(AC)의 활성화를 유발한다. PTH-1 수용체를 통한 AC의 활성화는 체내에서 cAMP를 생성하게 하며 PTH-1 수용체를 통한 PLC 활성화는 PKC 및 일시적인 세포내 칼슘을 생성한다. 골다공증 치료제로서 사용되고 있는 에스트로젠, 칼시토닌, 비스포스포네이트 등은 예방 효과와 더불어 골 흡수를 저해하는 효과가 있는 반면에, PTH는 골 형성 촉진 활성을 가지고 있어서 골 재형성이 감소된 제2형 골다공증 또는 이미 진행된 골다공증 환자에 유리하다. 골 흡수를 촉진하는 약제들만으로는 이미 진행된 골다공증 환자의 골량을 증가시키기에 미흡하지만 골 형성을 직접적으로 촉진하는 PTH의 경우, 손상된 뼈의 밀도를 회복시키는 실질적인 의미에서 최초의 골다공증 치료제가 될 것으로 예상된다. PTH는 천연 또는 합성의 것 및 이의 유도체와 동족체가 골다공증 치료제로 사용되고 있다(Hefti et al., Clinical Science, 62, 389-396(1982); Liu et al., J. Bone Miner. Res., 6: 10, 1071-1080(1991); Hock et al., J. Bone. Min. Res., 7: 1. 65-71(1992)).

상기한 바와 같이, 골다공증 치료제에 PTH를 사용하는 경우 골형성 및 골량이 증가하는 것으로 알려져 있지만, PTH는 안정성이 약하여 투여 후 생체내에서 84개의 아미노산으로 이루어진 펩타이드가 34개의 아미노산으로 이루어진 단편으로 분해되며 그 반감기가 짧기 때문에(1시간 이하) 이렇게 골형성 및 골량을 증가시키려면 PTH를 자주 투여해야 하는 불편함이 있다. 임상적으로, PTH 치료법의 작용 효과는 매일 피하투여 주사를 요하는데, 이는 PTH의 광범위한 사용에 큰 방해 요인이 되고 있다.

PTH를 고분자 물질로 수식하는 시도로서, 미국 특허 제6,506,730호에는 생물학적 활성 펩타이드의 아민기에 활성화된 생체적합성 고분자를 수식함으로써 난용성인 펩타이드의 용해도를 증가시키고 체내 효소에 의한 분해를 방지하여 안정성

과 생체이용률을 증가시키기 위하여, PEG 5000 및 PEG 2000으로부터 mPEG를 제조하여 PEG의 하이드록시기 하나를 보호하고, 여기에 포스젠 및 N-하이드록시석신이미드를 가하여 석시닐-N-하이드록시석신이미드 에스테르(SS-PEG)형으로 활성화시킨 다음, 이를 PTH(1-34)와 5:1의 몰비로 반응시켜 SS-PEG(5000, 2000)-PTH(1-34) 접합체를 제조하는 방법이 개시되어 있다. 또한, 미국 특허 5,342,940에는 고분자로 수식된 단백질이 최소의 항원성, 긴 생체 반감기 및 향상된 조직 전달성을 갖도록 균질한 상태로 수득하기 위하여, 종래 기술보다 고순도의 2,4-비스-메톡시폴리에틸렌 글리콜-6-클로로-s-트리아진(PEG2)을 제조하고 이를 인간 PTH(1-34)와 반응시켜 PEG2-수식 인간 PTH(1-34) 접합체를 제조하는 방법이 개시되어 있다. 이들 특허에서는 전장 PTH(1-84)의 활성 단편인 1-34개 아미노산의 PTH, PTH(1-34)의 N-말단 부위에서 생체적합성 고분자가 결합되는 것을 개시하고 있으며, N-말단 부위의 수식이 활성 부위에서 이루어질 경우 PTH의 활성 부위를 차단하여 PTH의 생물학적 활성이 상당히 저하 또는 상실될 수 있다.

따라서, PTH에 생체적합성 고분자를 부위 특이적으로 특정비율로 결합시켜, 고분자가 결합된 후에도 PTH의 생리활성이 유지되고, 나아가 부위 특이적으로 고분자를 수식한 것이 균질한 형태로 수득될 수 있다면 PTH의 임상적 응용에 크게 기여하게 될 것이다.

발명이 이루고자 하는 기술적 과제

본 발명자는 아민기 보다는 반응성이 낮은 카르복실기에 1:1의 특정 비율로 PEG가 PTH에 결합된 PEG-PTH 접합체를 제조하였으며, 이러한 접합체가 체내에서 결합되지 않은(native) 단백질에 비해 상당히 안정하며 긴 반감기를 가지고 있으므로 치료제로서의 효능이 증가되며, 또한 PEG가 카르복실기에 1:1을 초과한 비율로 결합된 접합체 및 PEG가 아민기에 결합된 접합체 보다 우수한 특성을 나타낸다는 것을 확인하였다.

따라서, 본 발명은 생체적합성 고분자가 PTH의 카르복실기에 선택적으로 1:1의 비율로 결합되어, 천연의 PTH이 나타내는 생리활성을 유지하면서도 고분자의 수식에 의해 안정성과 생체이용률 및 체내 반감기가 증가된, 생체적합성 고분자-PTH 접합체, 그 제조방법 및 이를 함유하는 약학 조성물을 제공하는 것을 목적으로 한다.

발명의 구성

일 양태로, 본 발명은 생체적합성 고분자가 PTH의 카르복실기 부위를 통해 PTH과 1:1의 비율로 결합됨을 특징으로 하는 생체적합성 고분자-PTH 접합체에 관한 것이다.

일 양태로, 본 발명은 치료 유효량의 상기 생체적합성 고분자-PTH 접합체 및 약학적으로 허용되는 담체를 포함하는 약학 조성물에 관한 것이다.

일 양태로, 본 발명은 PTH, 활성화된 생체적합성 고분자 및 카르복실기 커플링화제를, PTH 대 활성화된 생체적합성 고분자의 몰비가 1 : 1 내지 20, PTH과 커플링화제의 몰비가 1 : 1 내지 50, 반응물의 pH가 2 내지 5의 반응조건하에서 결합시키는 단계를 포함함을 특징으로 하는, 생체적합성 고분자가 PTH의 카르복실기 부위를 통해 PTH과 1:1의 비율로 결합된 생체적합성 고분자-PTH 접합체의 제조방법에 관한 것이다. 상기 방법에서 커플링화제, 예를 들어 EDAC는 수용액에서 불안정하여 가수분해되므로 한번에 첨가시키는 것 보다 수회, 바람직하게는 5회 이상, 보다 바람직하게는 5회 또는 6회에 나누어 첨가한다.

상기한 방법에 의해 생체적합성 고분자가 PTH의 카르복실기에 1:1의 비율로 결합한 접합체가 얻어진다. 즉, 본 발명은 반응성 그룹으로 활성화시킨 고분자 수식물질을 PTH의 카르복실기 부위에만 실질적으로 1:1의 비율로 선택적으로 결합시킴으로써, PTH의 생물학적 활성에 관여하는 부위에의 결합에 의한 활성 부위의 차단과 이로 인한 PTH의 활성 상실 또는 감소 등의 문제를 방지하고, 활성 부위의 다수의 반응성 잔기와의 무작위 결합에 의한 다양한 종류의 불균질 접합체의 혼합물 형성을 회피하여 1:1 비율의 생체적합성 고분자-PTH 접합체를 수득할 수 있게 한다. 나아가 본 발명의 접합체는 생체적합성 고분자가 부여하는 여러 특성에 의하여 생체내 안정성이 증가하고 그에 따른 생체이용률과 생체 반감기가 증가되는 이점이 있다. 따라서, 균질한 생체적합성 고분자-PTH 접합체의 생산으로 인하여 불균질 혼합물이 생성되는 종래 기술에 비해 생산시간 및 경비가 단축되어 경제적이다.

국제 특허 제WO92/16555호는 PEG-하이드라지드(Hz) 또는 아미노산 잔기를 스페이서 한 PEG-하이드라지드를 오브알부민의 당 부위나 카르복실기에 결합시키는 것을 개시하였으나, 상기 특허는 생물학적 활성물질에 다수의 PEG가 결합되는 것에 대해서만 기술하고 있을뿐 1:1 비율의 생체적합성 고분자와 PTH 접합체의 제조 및 이의 활성에 대해서는 언급이 없다.

일반적으로 아미노산의 pKa 따른 반응성을 이용하여 부위 특이적으로 반응시키나 특정 부위에 결합되는 고분자의 수를 조절하는 것이 용이하지 않아 실질적으로 응용하기에는 어려움이 많았다. 반응물의 pH를 7-8로 하여 아민기에 반응시킬 때, 라이신 잔기와 더불어 히스티딘 잔기에도 동시에 무작위로 반응한다. 이러한 배경하에서, 본 발명자는 상기한 바와 같은 접합체의 방법에서 반응물의 반응 pH를 3이하로 조절하는 경우 PEG가 PTH의 카르복실기, 특히 C-말단에서 1:1 결합한다는 것을 밝혀내었다.

따라서, 일 양태로, 본 발명은 생체적합성 고분자가 PTH의 C-말단 부위에서 PTH과 1:1의 비율로 결합됨을 특징으로 하는 생체적합성 고분자-PTH 접합체에 관한 것이다.

또 다른 양태로, 본 발명은 치료 유효량의 상기한 바와 같은 C-말단에서 1:1 결합된 생체적합성 고분자-PTH 접합체 및 약학적으로 허용되는 담체를 포함하는 약학 조성물에 관한 것이다.

또 다른 양태로, 본 발명은 PTH, 활성화된 생체적합성 고분자 및 카르복실기 커플링화제를, PTH 대 활성화된 생체적합성 고분자의 몰비가 1 : 1 내지 20, PTH과 커플링화제의 몰비가 1 : 1 내지 50, 반응물의 pH가 2 내지 3의 반응조건하에서 결합시키는 단계를 포함함을 특징으로 하는, 생체적합성 고분자가 PTH의 카르복실기 부위를 통해 PTH과 1:1의 비율로 결합된 생체적합성 고분자-PTH 접합체의 제조방법에 관한 것이다.

생체적합성 고분자

본 발명에서 PTH의 수식에 사용되는 "수식물질"이란 천연 또는 인공 합성 고분자 물질 등 PTH에 부가될 수 있는 인체에 유용한 모든 생체적합성 고분자를 총칭한다.

본원에서 사용되는 "생체적합성"이란 용어는 생체 독성 반응, 염증 반응, 면역 반응, 발암성 등을 일으킴이 없이 생체에 무독 무해하고 면역학적 거부 반응을 일으키지 않으면서 생체 조직이나 생체 시스템과 좋은 친화성으로 양립할 수 있는 능력을 말한다.

PTH와 결합하여 접합체를 형성하는 것은 생체적합성 고분자이다. 본 발명에 사용될 수 있는 인체에 유용한 생체적합성 고분자 물질로는 다양한 용매에 쉽게 용해될 수 있고 수평균 분자량이 바람직하게는 약 300 달톤 내지 약 100,000 달톤, 더욱 바람직하게는 약 2,000 달톤 내지 약 40,000 달톤인 생체적합성 고분자로서, 예를 들면 폴리에틸렌글리콜, 폴리프로필렌글리콜, 폴리옥시에틸렌, 폴리트리메틸렌글리콜, 폴리락트산 및 이들의 유도체, 폴리아크릴산 및 그의 유도체, 폴리아미노산, 폴리비닐 알콜, 폴리우레탄, 폴리포스파진, 폴리(L-라이신), 폴리알킬렌 옥사이드, 폴리사카라이드, 덱스트란, 폴리비닐 피롤리돈, 폴리아크릴아마이드 및 이들의 둘 이상의 공중합체로 이루어진 그룹 중에서 선택된 비면역원성 고분자 물질이 포함되며 이에 한정되지 않는다.

본 발명의 생체적합성 고분자에는 선형 고분자뿐만 아니라 하기와 같은 고분자들이 포함되는 것으로 의도된다. 본 발명의 생체적합성 고분자에는 문헌[미국 특허 제5,643,575호 및 미국 특허 제5,919,455호]에 기재된 바와 같이, 지방족 연결 잔기를 통해 친핵성 치환을 수행할 수 있는 활성화 작용기에 결합된 수용성 비항원성 고분자가 포함된다. 또한, 본 발명의 생체적합성 고분자에는 문헌[미국 특허 제5,932,462호]에 기재된 바와 같이, 중심 탄소 원자에 고분자 암(arm)을 각각 갖는 두 개의 링커 단편, 단백질 등과 같은 생물학적 활성 분자에 부착되도록 활성화될 수 있는 잔기, 및 수소 또는 메틸기이거나 또 다른 링커 단편일 수 있는 측쇄를 갖는 다중-암(armed), 일작용성 및 가수분해 안정성 고분자가 포함된다. 또한, 본 발명의 생체적합성 고분자에는 문헌[WO 제00/33881호]에 기재된 바와 같이, PEG 등의 작용성 잔기가 리포터 잔기를 갖는 링커 암을 통해 생물학적 활성 분자에 결합되어져 있는 가지달린 PEG의 중합체가 포함된다.

이중에서도 PEG는 본 발명 생체적합성 고분자의 대표적인 물질 중의 하나이다. PEG는 HO-(-CH_2CH_2O-)-H의 반복 구조를 가지는 수용성, 무독성의 고분자로서 생물학적 반감기 (Plasma half-life)의 증가, 용해도 및 안정성의 증가, 면역원성의 감소 효과가 있는 것으로 알려져 있다. 펩타이드 또는 단백질 등의 생물학적 활성물질에 결합되는 PEG의 분자량 범위는 대략 1,000 내지 100,000으로, PEG의 분자량이 1,000 이상일 경우 독성은 상당히 낮은 편으로 알려져 있다. 분자량 범위 1,000 내지 6,000의 PEG는 전신에 분포하며 신장을 통해 대사되고, 특히 분자량 40,000의 측쇄형 PEG는 혈액과 간을 포함한 기관들에 분포되고 대사는 간에서 이루어진다.

상업적으로 이용 가능한 분자량의 범위가 다양하고, 옥시에틸렌 골격이 각 단위당 물 분자 2-3개가 결합 가능한 친수성 성질을 갖고 있으며, 메톡시 폴리에틸렌글리콜로부터 단일 작용기를 갖는 유도체를 합성하는 것이 용이하며, 항원-항체 반응을 유발할 위험이 낮고 관련 기술도 많이 개발되어 있기 때문에 생체적합성 고분자 수식물질로는 PEG가 가장 바람직하다.

부갑상선 호르몬(PTH)

PTH는 부갑상선의 주세포에서 생성된 아미노산 115개로 구성된 preproPTH가 소포체를 거치면서 절단되어 아미노산 92개로 된 펩타이드 proPTH로 변형되고, 이어 골지 기관을 거치면서 또 다시 절단되어 아미노산 84개로 이루어진 성숙 PTH로 되는 일련의 과정을 거쳐 합성되는 폴리펩타이드 호르몬이며 주 작용부위는 부신피질로서 부신피질 막에 결합하여 cAMP와 IP_3(이노시톨 트리포스페이트), DAG(디아실 글리세롤)의 생산을 증가시키는 생리활성 물질이다. 포유동물 부갑상선 호르몬, 예들 들면 인간, 소 및 돼지의 부갑상선 호르몬(hPTH, bPTH, pPTH)은 분자량이 대략 9500 달톤이며 84개 아미노산 잔기로 이루어진 폴리펩타이드이다. 인간 PTH의 N-말단 단편은 소 및 돼지의 호르몬의 N-말단 단편과 각각 단지 3개 및 2개의 아미노산 잔기만이 상이하다. PTH의 생물학적 활성은 N-말단 부위와 연관되어 있으며, PTH는 (1-84 aa)의 전장 펩타이드 뿐만이 아니라 N-말단 단편도 유사한 활성을 가지는 것으로 보고 되어 있다. 이러한 활성에는 잔기 (1-34)가 최소한 필요한 것으로 보인다. 그렇기 때문에 PTH는 전장 펩타이드 및 그 단편이 모두 치료제로 개발되고 있으며, PTH를 외부에서 간헐적으로 소량씩 투여할 경우 골 형성을 촉진시킴이 보고되어 있다(Tam, C.S. et al., Endocrinology, 110:506-512(1982)). 이러한 골 형성 촉진기능이 PTH를 골다공증 치료제로 이용할 수 있는 근거가 되고 있다. 예를 들어, 인간 PTH(34 aa)를 유효성분으로 한 골다공증 치료제로는 Eli Lilly and Co.에서 Forteo라는 이름으로 시판하고 있는 상품이 있으며, NPS Pharmaceutical에서는 효모로부터 재조합된 PTH(84 aa)를 유효성분으로 하는 골다공증 치료제가 임상 3상 단계에 있는 것으로 알려져 있다.

본 발명에 따라 사용되는 PTH는 바람직하게는 사람 PTH이며, 보다 바람직하게는 84개의 아미노산으로 이루어진 사람 PTH(1-84 aa)이다.

본 발명에 사용되는 PTH에는 천연형의 PTH가 갖는 생물학적 활성 또는 그의 적어도 일부를 보유하는 이의 단편과 변이체, 이들의 동족체와 상동체 및 이들의 생리적 활성 염이 포함된다. PTH는 인간, 동물 기원의 천연의 것이거나 재조합 핵산 기술 등에 의해 합성된 것, 예를 들면 PTH, PTH 관련 펩타이드(PTHrp)의 합성 동족체, 또는 PTH 또는 PTHrp의 생리적 활성을 갖는 절두된 상동체 또는 동족체, 또는 이들의 염일 수 있다.

PTH와 유사한 활성을 가진 것으로 알려진 PTH의 펩타이드 동족체인 상기 PTHrp가 최근에 와서 발견되었는데, 인간의 PTHrp는 141개의 아미노산으로 구성된 펩타이드로서 PTH와 유사한 생물학적 활성, 즉 혈액 중의 칼슘 함량 증가, 골 흡수 촉진, 혈액 중의 인 함량의 저하, 소변 중의 칼슘 함량의 저하, 소변 중의 cAMP 함량의 증가 및 비타민 D의 1 위치에 있는 수산화 효소의 신장에서의 활성화 등에 관하여 최근 보고 되고 있다(Horiuchi, et al., Science, Vol. 238, 1988; Kemp, et al., Science, Vol. 238, 1988). 이러한 동족체는 천연 PTH와 상이한 기능을 보유할 수 있거나, 동일한 기능 또는 동일한 기능을 다양한 정도로 보유할 수 있다. 예를 들면, 동족체는 더 높거나 낮은 생물학적 활성을 갖도록 디자인될 수 있다.

PTH의 동족체는 전장 펩타이드와 적어도 70 내지 95%, 바람직하게는 80 내지 90%, 좀더 바람직하게는 90 내지 95%의 서열 동일성을 갖는 것들을 포함한다. PTH는 사람, 동물 등을 포함한 다양한 공급원으로부터 입수될 수 있고, 유전공학적 처리에 의해 생물학적 활성에는 영향을 주지 않으면서 1 이상의 아미노산 잔기의 결실, 삽입, 치환 등에 의해 다양하게 변형시킬 수 있으며 당해 분야의 통상적인 재조합 DNA 기술로 상업적 규모로도 생산해 낼 수 있다.

PTH는 또한 반감기의 향상, 생체활성의 변화(예를 들면, 효소학적 성질, 해리된 생체활성 또는 유기 용매에서의 활성 등), 독성의 감소, 면역반응성의 변화(예를 들면, 감소된 면역원성, 감소된 항원성) 또는 물리적 성질(예를 들면, 증가된 용해도, 향상된 열 안정성, 향상된 기계적 안정성, 또는 구조적 안정화)을 위해 화학적으로 변형된 것일 수 있다.

재조합 효모로부터 생산된 재조합 PTH도 본 발명의 PTH로 사용될 수 있다. 인간 PTH는 예를 들어 대한민국 특허 공개 2002-0017754(동국제약)에 개시되어 있는 방법에 의해 제조될 수 있다. 또한 PTH는 예를 들어, 유럽 특허 공보 제 0383751호에 개시되어 있는 방법에 의해 제조될 수 있으며, 이외에도 다양한 문헌에 PTH의 제조방법이 개시되어 있다 (Erickson and Merrifield, The Proteins, Neurath et al., Eds., Academic Press, New York, 1976, page 257, Hodges 등의 변형법: Hodges et al(1988), Peptide Research 1, 19, Atherton 등의 변형법: Atherton, E. And Sheppard, R.C. Solid Phase Peptide Synthesis, IRL Press, Oxford, 1989)).

생체적합성 고분자-PTH 접합체의 제조방법

일반적으로, 생물학적 활성 접합체의 제조에 있어서, 생체적합성 고분자를 PTH에 결합시키기 위해 말단 그룹 중 하나를 반응성 작용기로 전환시키는데 이 과정을 "활성화"라고 하며, 이 과정에 의한 산물을 "활성화된 생체적합성 고분자"라고 한다. 예를 들면, 폴리(알킬렌 옥사이드)를 펩타이드 또는 단백질에 결합시키기 위해 하이드록실 말단 그룹 중 하나를 카르보네이트와 같은 반응성 작용기로 전환시킬 수 있으며 이에 따라 수득된 산물은 실온에서 수용성인 활성화된 폴리(알킬렌 옥사이드)(PAO)가 된다. 이러한 그룹에는 mPEG과 같은 일 치환 폴리알킬렌 옥사이드 유도체 또는 C_{1-4} 말단 그룹을 함유하는 것들과 같은 다른 적당한 알킬-치환 PAO 유도체가 있다.

본원에서 사용되는 "반응성 작용기"란 목적하는 PTH과 결합하기 위해 생체적합성 고분자를 활성화하는 그룹 또는 잔기를 말한다.

본 발명에 사용될 수 있는 반응성 작용기는 1급 아민, 또는 하이드라진 및 하이드라자이드 작용기(아실 하이드라자이드, 카르바제이트, 세미카르바제이트, 티오카르바제이트 등)와 같이 카르복실산 및 반응성 카르보닐기와 반응할 수 있는 작용기 중에서 선택될 수 있다.

본원에서 또한 사용되는 “카르복실기의 커플링화제”(이하, 커플링화제)는 상기 반응성 작용기로 활성화된 생체적합성 고분자와 결합되는 단백질 등의 생리활성 물질의 카르복실 그룹을 커플링화시키는 제제를 의미한다.

본 발명에서 사용될 수 있는 카르복실기의 커플링화제는 이로써 제한되는 것은 아니지만, 카르보디이미드계 커플링화제, 예를 들면, EDAC[N-(3-디메틸아미노프로필)-N'-에틸카르보디이미드 하이드로클로라이드], DIC[1,3-디이소프로필카르보디이미드], DCC[디사이클로헥실 카르보디이미드], 및 EDC[1-에틸-3-(3-디메틸아미노프로필)-카르보디이미드] 등을 포함한다. 바람직한 카르복실기의 커플링화제는 EDAC이다.

생물학적 활성 접합체의 제조방법은 목적하는 PTH의 고유 활성 중 적어도 일부를 유지하면서 결합이 이루어지도록 하기에 충분한 조건하에서 상기 활성화된 생체적합성 고분자와 치환 반응을 할 수 있는 PTH를 접촉시키는 단계를 포함한다.

PTH에 1:1의 비율로 결합된 생체적합성 고분자의 접합체는 화학량론 과량의 고분자를 PTH과 반응시켜 수득할 수 있다. 예를 들면, 단백질-고분자, 펩타이드-고분자, 효소-고분자, 항체-고분자 및 약물-고분자 접합체의 제조시, PTH 대 활성화된 생체적합성 고분자의 몰비는 약 1:1 내지 1:20이며, 보다 바람직하게는 1:1 내지 1:10이다. 또한 PTH의 카르복실기를 활성화시키는 데 사용되는 물질로는 다음의 예로 한정되는 것은 아니나, 다음의 그룹 중에서 선택하여 사용할 수 있다. 예를 들면, N-(3-디메틸아미노프로필)-N'-에틸카르보디이미드 하이드로클로라이드(EDAC), 3-[2-모폴리닐-(4)-에틸] 카르보디이미드와 같은 수용성 카르보디이미드 그룹, p-톨루엔 설포네이트, 우드워드 시약 K(Woodward's Reagent K)와 같은 5-치환 이속사졸리늄 염 등이 있다.

본 발명에서 카르복실기에 수식된 생체적합성 고분자-PTH 접합체의 제조시 사용된 EDAC는 PTH 대 EDAC의 몰비가 약 1:1 내지 1:50이며, 보다 바람직하게는 1:1 내지 1:30인 것이 바람직하며 1:1 내지 1:20이 가장 바람직하다. 그러나, EDAC가 용액상태에 존재할 때 신속히 가수분해되는 경향이 있어 한번에 20배의 EDAC를 첨가하면 반응성이 현저히 낮아지므로 5번 이상, 바람직하게는 5 내지 6번으로 나누어 첨가할 때, PEG-PTH 접합체 형성이 증가된다.

PTH은 완충작용을 하는 수용성 반응매질에서 pH에 의존적으로 활성화된 고분자와 반응할 수 있다. 일반적으로, 단백질/폴리펩타이드 물질을 고려할 때 반응시 pH는 약 2 내지 약 5이고, 바람직하게는 약 2.5 내지 4.5이다. 이들 물질의 안정화 및 반응 효율을 위한 최적 반응 조건은 당업자에게 잘 알려져 있다. 바람직한 온도 범위는 0 내지 60℃이고, 보다 바람직하게는 4 내지 30℃이다. 반응 매질의 온도는 PTH가 변성되거나 또는 분해될 수 있는 온도를 초과하지 않아야 한다. 반응시간은 10분 내지 5시간으로 하는 것이 바람직하다. 형성된 생물학적 활성 접합체는 칼럼 크로마토그래피, 투석여과 또는 상기 방법 등을 조합하여 사용함으로써 회수하고 정제할 수 있다.

약학 조성물

본 발명은 또한 치료 유효량의 본 발명의 활성화된 생체적합성 고분자-PTH 접합체를 활성성분으로 포함하는 약학 조성물에 관한 것이다.

본원에서 "약학적으로 허용되는"이란 용어는 인간에 투여시에 앨러지 반응 또는 그와 유사한 다루기 힘든 반응을 일으키지 않는 분자 또는 조성물을 일컫기 위해 사용된다.

본 발명의 약학 조성물에 사용되는 활성성분으로서 생체적합성 고분자-PTH 접합체는 그 자체가 예방 및 치료제로서 사용되거나 약학적으로 허용되는 담체와 혼합하여 제형된 형태로 사용될 수 있다.

용어 "약학적으로 허용되는 담체"는 신체의 한 기관 또는 부분으로부터 신체의 다른 기관 또는 부분으로 활성 성분을 수송하는 역할을 하는 액체 또는 고체 충진제, 희석제, 부형제 또는 용매와 같은 약학적으로 허용되는 물질, 조성물 또는 비히클을 의미한다.

본 발명의 약학 조성물은 경구, 국소, 주사 또는 비경구 경로를 통해 투여될 수 있으며, 이들 제형은 일반적으로 활성 성분으로서 본 발명의 생체적합성 고분자-PTH 접합체를 치료 유효량으로 함유한다. 본 발명에 따른 경구 투여용 제제는 예를 들면, 환제, 정제, 랙커링된 정제, 제피정, 산제, 과립, 트로키제, 웨이퍼, 엘릭서제, 경질 및 연질 젤라틴 캡슐, 용액, 시럽, 에멀션, 현탁제, 또는 분무 혼합제 등의 형태로 투여될 수 있으며, 비경구 투여용 제제로는 예를 들면 주사액, 마이크로캡슐, 경피제 등이 포함될 수 있다.

약학 제제는 약학적으로 허용되는 불활성 무기 또는 유기 부형제를 사용하는 공지의 방법으로 제조할 수 있다. 예를 들면, 환제, 정제, 제피정, 경질 젤라틴 캡슐 등을 제조하기 위해 락토스 또는 옥수수 전분 또는 이의 유도체, 활석, 스테아르산 또는 이의 염 등을 사용할 수 있다. 연질 젤라틴 캡슐 및 좌제에 대한 부형제로는, 예를 들면 지방, 왁스, 반고형 및 액체 폴리올, 천연 또는 고형화 오일 등이 있다. 용액 및 시럽의 제조에 사용되는 적당한 부형제는, 예를 들면, 물, 수크로스, 전화당, 글루코스, 폴리올 등이 있다. 주사액의 제조에 적당한 부형제로는 물, 알콜, 글리세롤, 폴리올, 식물성 오일 등이 있다. 주사제는 또는 보존제, 무통화제, 가용화제 및 안정제를 혼합하여 사용할 수 있다. 국소 투여용 제제의 경우에는 가스, 부형제, 윤활제 및 보존제 등을 혼합하여 제조할 수 있다. 마이크로캡슐 또는 이식제에 대한 적당한 부형제로는 공중합체 또는 글리콜산 및 락트산이 있다.

본 발명에 따른 생체적합성 고분자-PTH 접합체의 투여 용량은 체내에서 활성성분의 흡수도, 용해도, 환자의 연령, 성별, 상태 및 치료할 질환의 경중에 따라 적당히 선택될 수 있다. 특히, 본 발명에 따른 생체적합성 고분자-PTH 접합체의 투여는 기존의 1일 1회 내지 수 회 또는 2일 1회인 치료용 주사제를 1주 1회 또는 2주 1회의 투여 횟수로 대폭 줄여 빈번한 투여로 인한 약물 독성 및 부작용을 감소시킬 수 있다.

이하, 하기 실시예에 의해 본 발명을 좀더 구체적으로 설명한다. 그러나, 이들 실시예는 단지 본 발명의 예시에 불과하며 이로써 본 발명이 제한되지는 않는다.

실시예

<실시예 1> 부갑상선 호르몬의 제조

대한민국 특허 공개번호 제10-2002-0017754호에 기재된 효모 아스파틱 프로테아제 계열의 앱신 1, 앱신 2, 앱신 3를 코딩하는 *YPS1, YPS2, YPS3* 유전자들이 파쇄된 효모 사카로마이세스 세레비지애(*Sacharomyces cerevisiae*) 균주를 인간 부갑상선 호르몬의 제조에 사용하였다.

상기 균주를 YNBCAD (아미노산 부재하의 효모 질소 기질 0.67%, 포도당 2%, 카사미노산 0.5%, 한천 1.5%) 한천 고체 배지에 도말 후 30℃에서 24시간 배양하여 수득한 콜로니를 한천이 제거된 10 ml의 YNBCAD 액체 배지에 접종하여 30℃에서 15시간 동안 1차 배양하고 이를 다시 100 ml의 YNBCAD 액체 배지에서 15시간 동안 2차 플라스크 배양하였다. 이것을 유가식 배양을 위한 종균으로 사용하였다. 5 L의 발효조에서 작동부피를 2 L로 하고 발효시 배지조성은 포도당 2%, 효모 추출물 4%, 카사미노산 0.5%, 제일인산칼륨 0.1%을 사용하였으며 발효조에 간헐적으로 공급할 용액으로는 에탄올 800 g/L와 갈락토스 400 g/L를 사용하였다. 상기의 배지조성을 포함한 작동부피 2 L에 2차 종 배양액(100 ml)을 접종하였다. 배양 12시간 후에 포도당은 모두 소모되었으며, 이때 에탄올과 갈락토스를 각각 첨가하였다. 그 후로는 pH와 용존산소가 상승할 때마다 각각 20 g/L의 에탄올과 10 g/L의 갈락토스를 간헐적으로 공급하였다. 배양 온도와 pH는 각각 30℃와 5.5로 유지하였으며 발효종료 시점은 종 배양 접종 후 40 내지 45시간 후에 발효를 종료하였다.

발효가 완료된 배양액을 원심분리하여 수득한 약 2000 ml의 발효 상등액을 0.2㎛의 필터로 여과한 후 한외여과(ultrafiltration)를 실행하였다. MWCO(Molecular Weight Cut Off) 50 kDa인 한외여과막을 통과한 분자량 50 kDa 이하

의 여과액 1500 ml를 다시 MWCO 3 kDa인 한외여과막을 이용하여 300 ml로 농축하였다. 농축 발효액에 50 mM 아세테이트 완충액, pH 5.5를 가하여 한외여과하면서 농축 발효액을 세척하였다. 이와 같이 한외여과에 의해 농축되고 세척된 용액을 이온교환 크로마토그래피의 시료로 사용했다.

유리 컬럼(1.1 cm × 25 cm, Amicon, USA)에 SP-세파로스(Pharmacia, Sweden)를 20 ml 채운 후 50 mM 아세테이트 완충액, pH 5.5를 사용하여 평형을 이룰 때까지 컬럼을 세척하였다. 평형을 이룬 후, 한외여과에 의해 농축된 시료를 컬럼에 로딩하고 다시 50 mM 아세테이트 완충액, pH 5.5로 세척하여 컬럼에 결합되지 않은 물질을 제거하였다. 충분히 세척하여 다시 평형에 도달했을 때 50 mM 아세테이트, 1N NaCl, pH 5.5를 사용하여 NaCl의 농도를 120분간 0 N에서 0.8 N로 증가시켜서 PTH의 용리를 수행하였다. 매 2분마다 컬럼을 통과한 용액을 수집하여 각 피크에 해당하는 부분을 전기영동으로 분석하였다. 분석 후 hPTH를 포함하는 부분을 모아서 동결건조하였다. 동결건조 후 수득된 시료를 증류수에 녹인 후 RP-HPLC를 이용하여 PTH의 정제를 수행하였다. RP-HPLC를 이용한 분석 및 정제조건은 다음과 같다: Hypersil BDS(4.6 mm × 15 cm) C18 컬럼을 사용하였으며 이동상은 아세토니트릴/0.1% TFA와 물/0.1% TFA를 이용하여 농도구배 조건으로 분리하였다. 검출파장은 215 nm이었고 유속은 1 ml/min이었다. 분취용 HPLC의 경우 컬럼은 Vydac C18 (1.0 × 25 cm)을 사용하였고 유속(4 ml/min)을 제외한 모든 실험조건은 분석용과 동일하였다. 동결 건조 후 증류수에 녹인 PTH 분획을 컬럼에 로딩하였고 PTH에 해당하는 분획을 모아 hPTH를 정제하였다. 정제 후 수득된 hPTH를 분석한 결과 고순도(>99%)의 hPTH가 수득되었다.

<실시예 2> PEG-HZ(5000)-PTH의 제조

실시예 1에서 제조한 1 mg의 인간 부갑상선 호르몬(0.000119 mmol, Human parathyroid hormone, PTH)과 3.0 mg의 활성화된 mPEG(5000)-하이드라자이드(0.0006 mmol, 이수화학, 한국)를 pH 4.4의 50 mM MES(2-(N-모폴리노)에탄설폰산) 완충용액 0.5 ml에 가하고 실온에서 10분 동안 교반하였다. 100 ㎍/㎕의 농도로 미리 제조된 EDAC(N-(3-디메틸아미노프로필)-N'-에틸카르보디이미드 하이드로클로라이드) 2.5 ㎕ (0.00125 mmol, 10배)를 가하고 실온에서 1시간 동안 반응시켰다. 반응하지 않은 mPEG와 PTH를 센트리콘-10(Centricon-10; Amicon, USA)을 사용하여 다량 제거함으로써 0.4 mg의 mPEG-HZ(5000)-PTH를 수득하였다.

<실시예 3> mPEG-HZ(12000)-PTH의 제조

1 mg의 인간 부갑상선 호르몬(0.00012 mmol)과 7.14 mg의 활성화된 mPEG(12000)-하이드라자이드(0.0006 mmol, 5배, 이수화학, 한국)를 pH 4.4의 50 mM MES(2-(N-모폴리노)에탄설폰산) 완충용액 0.5 ml에 가하여 실온에서 10분 동안 교반하였다. 100 ㎍/㎕의 농도로 미리 제조된 EDAC(N-(3-디메틸아미노프로필)-N'-에틸카르보디이미드 하이드로클로라이드) 2.5 ㎕(0.00125 mmol, 10배)를 가하고 실온에서 1시간 동안 반응시켰다. 반응하지 않은 mPEG와 PTH를 센트리콘-10(Centricon-10; Amicon, USA)를 사용하여 다량 제거함으로써 0.3 mg의 mPEG-HZ(12000)-PTH를 수득하였다.

<실시예 4> mPEG-HZ(20000)-PTH의 제조

1 mg의 인간 부갑상선 호르몬(0.00012 mmol)과 12 mg의 활성화된 mPEG(20000)-하이드라자이드(0.0006 mmol, 5배)를 pH 4.4의 50 mM MES(2-(N-모폴리노)에탄설폰산) 완충용액 0.5 ml에 가하고 실온에서 10분 동안 교반하였다. 100 ㎍/㎕의 농도로 미리 제조된 EDAC(N-(3-디메틸아미노프로필)-N'-에틸카르보디이미드 하이드로클로라이드) 2.5 ㎕ (0.00125 mmol, 10배)를 가하고 실온에서 1시간 동안 반응시켰다. 반응하지 않은 mPEG와 PTH를 센트리콘-30 (Centricon-30; Amicon, USA)을 사용하여 다량 제거함으로써 0.3 mg의 mPEG-HZ(20000)-PTH를 수득하였다.

<실시예 5> mPEG-HZ(12000)-PTH의 제조

1 mg의 인간 부갑상선 호르몬(0.00012 mmol)과 14.4 mg의 활성화된 mPEG(12000)-하이드라자이드(0.0012 mmol, 10배, 이수화학, 한국)를 pH 2.5의 50 mM MES(2-(N-모폴리노)에탄설폰산) 완충용액 0.5 ml에 가하여 실온에서 10분 동안 교반하였다. 100 ㎍/㎕의 농도로 미리 제조된 EDAC(N-(3-디메틸아미노프로필)-N'-에틸카르보디이미드 하이드로클로라이드) 5 ㎕(0.0025 mmol, 20배)를 가하고 실온에서 1시간 동안 반응시켰다. 반응하지 않은 mPEG와 PTH를 센트리콘-10(Centricon-10; Amicon, USA)를 사용하여 다량 제거함으로써 0.2 mg의 mPEG-HZ(12000)-PTH를 수득하였다.

<실시예 6> mPEG-HZ(20000)-PTH의 제조

1 mg의 인간 부갑상선 호르몬(0.00012 mmol)과 24 mg의 활성화된 mPEG(20000)-하이드라자이드(0.0012 mmol, 10배)를 pH 2.5의 50 mM MES(2-(N-모폴리노)에탄설폰산) 완충용액 0.5 ml에 가하고 실온에서 10분 동안 교반하였다. 100 ㎍/㎕의 농도로 미리 제조된 EDAC(N-(3-디메틸아미노프로필)-N'-에틸카르보디이미드 하이드로클로라이드) 5 ㎕(0.0025 mmol, 20배)를 가하고 실온에서 1시간 동안 반응시켰다. 반응하지 않은 mPEG와 PTH를 센트리콘-10(Centricon-10; Amicon, USA)를 사용하여 다량 제거함으로써 0.2 mg의 mPEG-HZ(12000) - PTH를 수득하였다.

<실시예 7> mPEG-HZ- PTH 접합체의 분석

상기 실시예에서 수득된 PEG-PTH 접합체, PTH를 하기 HPLC 조건에 따라 측정하였다:

1. HPLC 조건

컬럼: LiChroCART 125-4 RP-8 (5 ㎛)(MERK)

용매: A: 탈이온수 B: 아세토니트릴 ; 구배

유속: 0.8 ml/min

검출기 (UV) : 220 nm

주입량: 20 ㎕

[표 1]

번호	시간(min)	A (%)	B (%)	유속(ml/min)
1	0.00	70.0	30.0	0.800
2	3.00	70.0	30.0	0.800
3	13.00	10.0	90.0	0.800
4	15.00	10.0	90.0	0.800
5	17.00	70.0	30.0	0.800
6	20.00	70.0	30.0	0.800

HPLC 컬럼에 사용된 LiChroCART 125-4 RP-8 (5 ㎛)은 어떠한 PEG도 크로마토그래프상에서 검출되지 않고 오직 PTH 또는 다른 단백질만이 검출된다.

PTH의 HPLC 상에서의 체류시간(RT 값)을 측정하였다. 고분자 유도체에 의해 수식되지 않은 PTH를 HPLC 수행한 결과, 대략 6.8분을 정점으로 PTH의 피크가 급격히 감소하였다가 18분 정도까지 서서히 증가하다 감소함을 알 수 있다(도 1).

상기 실시예에서 제조된 mPEG-PTH 생성물은 상기의 표 1의 번호 1 및 2에 해당하는 농도 구배에서 수식되지 않은 PTH (6.8분대) 및 PEG - PTH(7.3분대)의 피크가 검출되었다.

mPEG-HZ(20000)으로 수식 반응 종료 직후 정제 전 3종으로 이루어진 수식반응 혼합물(미반응 PTH, mPEG-HZ(20000)-PTH, mPEG-HZ(20000))이 존재하는데 미반응 mPEG-HZ(20000)은 HPLC에서 검출되지 않고 2종(미반응 PTH, mPEG-HZ(20000)-PTH)만이 검출되었음을 보여준다(도 2). mPEG-HZ(20000)-PTH가 최종 정제되었을 때의 크로마토그래프를 도 3에, mPEG-HZ(20000)와 PTH를 반응시켜 SDS-PAGE를 수행한 다음 쿠마시 블루로 염색한 결과를 도 4에 각각 나타내었다.

<실시예 8> 시험관내 생물학적 활성의 측정

PEG 분자량에 따른 생물학적 활성을 측정하기 위해 분자량이 5000(5K), 12000(12K), 20000(20K)의 활성화된 PEG-HZ를 사용하였으며 활성측정은 UMR-106 세포주를 이용하여 cAMP 분석 키트(Amersham Pharmacia, RPN 225)로 cAMP 양의 증가를 측정함으로써 천연 PTH, PEG-PTH(5K), PEG-PTH(12K), PEG-PTH(20K)의 시험관내 생물학적 활성을 비교 측정하였다. PEG-PTH 활성은 PEG의 분자량이 클수록 감소하는 경향을 나타내었으며, 10-8 mol에서 비교하였을 때 수식되지 않은 PTH에 비해 PEG-PTH(5K), PEG-PTH(12K), PEG-PTH(20K)의 생물학적 활성이 각각 40%, 30%, 20% 정도의 활성을 가지고 있는 것으로 나타났다(도 5).

<실시예 9> PEG 분자량에 따른 생체내 반감기의 비교

수식되지 않은 PTH와 PEG-PTH를 SD(Spraugue-Dawley) 웅성 랫트(체중 300-350 g)에 100 ㎍/kg의 농도로 경정맥 투여하고, 투여 후 0, 5, 10, 15, 30, 60, 120분에서 혈액을 채취하여 10,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 혈장을 분리하였다. 이어서, cAMP 분석 키트(Amersham Pharmacia, RPN 225)를 이용하여 혈장 내에 남아있는 cAMP 농도를 측정함으로써 잔류 PTH 농도를 측정하여 간접적으로 PEG - PTH의 반감기를 측정하였다.

수식되지 않은 PTH와 PEG-PTH(5K)는 투여 후 15분 내에 거의 남아있지 않았으나, PEG-PTH(12K), PEG-PTH(20K)는 각각 1시간 및 2시간 정도까지 남아 있었다(도 6).

이상의 설명으로부터, 본 발명이 속하는 기술분야의 당업자는 본 발명이 그 기술적 사상이나 필수적 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 실시될 수 있음을 이해할 수 있다. 이와 관련하여, 이상에서 기술한 실시예 및 실험예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 제한적인 것이 아닌 것으로 이해하여야 한다. 본 발명의 범위는 전술한 상세한 설명보다는 후술되는 특허청구범위의 의미 및 범위 그리고 그 등가개념으로부터 도출되는 모든 변경 또는 변형된 형태가 본 발명의 범위에 포섭되는 것으로 해석되어야 한다.

발명의 효과

본 발명에 따라 생체 적합성 고분자가 단백질이나 펩타이드와 같은 PTH의 카르복실기에 PTH와 1:1의 몰비로 결합됨을 특징으로 하는 생체적합성 고분자-PTH 접합체 및 이의 제조 방법이 제공되며, 상기 접합체가 해당 질환의 치료제로 사용될 때 약물의 생체내 안정성의 증가로 인한 생체내 반감기 및 생체이용률의 증가로 약물 투여의 횟수를 대폭 감소시킬 수 있다.

도면의 간단한 설명

도 1은 생체적합성 고분자에 의해 수식되지 않은 부갑상선 호르몬(PTH)를 HPLC 실행한 결과도이다.

도 2는 PEG-하이드라자이드(HZ)(20000)를 PTH와 반응시킨 후 정제 전 반응 혼합물(미반응 PTH, mPEG-HZ(20000)-PTH, mPEG-HZ(20000))에 대한 HPLC 실행 결과도이다 (피크 1: 고분자 PEG 유도체로 수식되지 않은 PTH, 피크 2: PEG-HZ(20000)-PTH)

도 3은 PEG-HZ(20000)을 PTH와 반응시킨 후 PEG-HZ(20000)-PTH를 최종 정제한 후의 HPLC 실행 결과도이다.

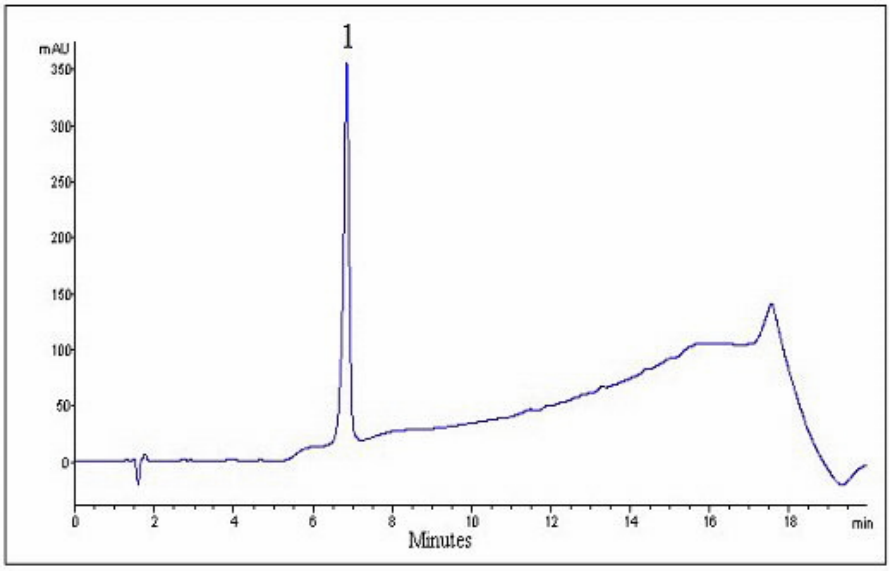
도 4는 PEG-HZ(20000)와 PTH를 반응시켜 SDS-PAGE를 수행한 후 쿠마시 블루로 염색한 결과도이다 (레인 1 : 사이즈 마커; 레인 2 : PTH; 레인 3 : PTH, PEG - PTH (정제하기 전); 레인 4 : PEG-HZ(20000)-PTH)(정제한 후).

도 5는 PTH와 PEG-PTH의 시험관내에서의 생물학적 활성 비교도이다.

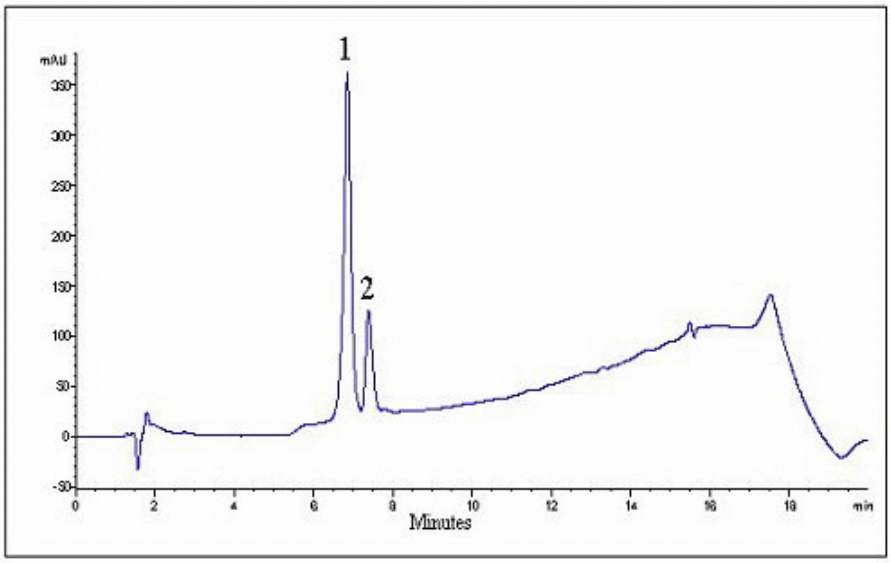
도 6은 PTH와 PEG-PTH의 시험관내에서의 반감기 비교도이다.

도면

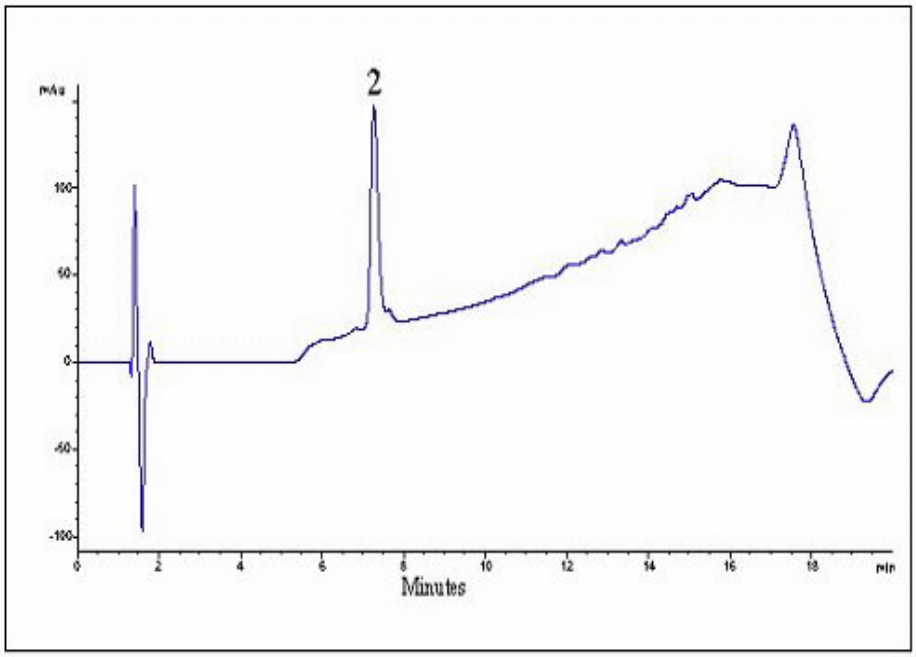
도면1


1
mAU
350
300
250
200
150
100
50
0
0
2
4
6
8
10
12
14
16
18
min
Minutes

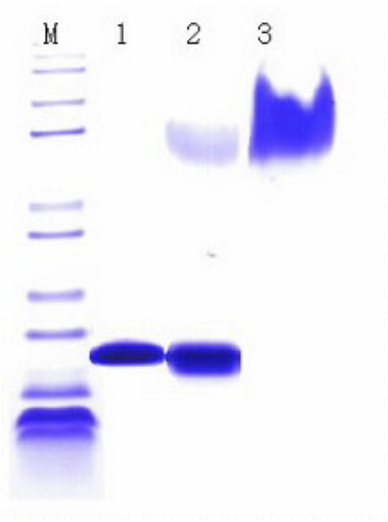
도면2


1
2
mAU
350
300
250
200
150
100
50
0
-50
0
2
4
6
8
10
12
14
16
18
min
Minutes

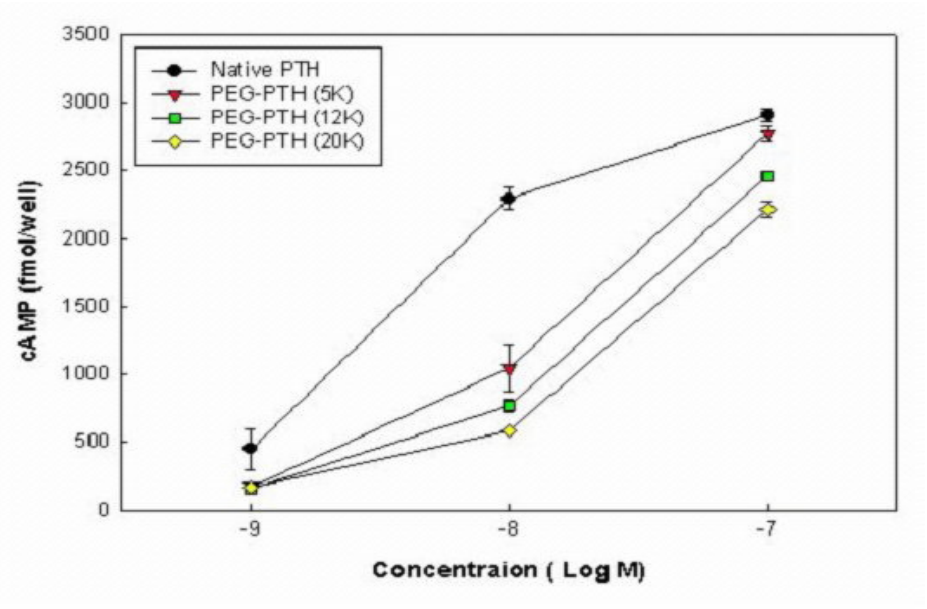
도면3



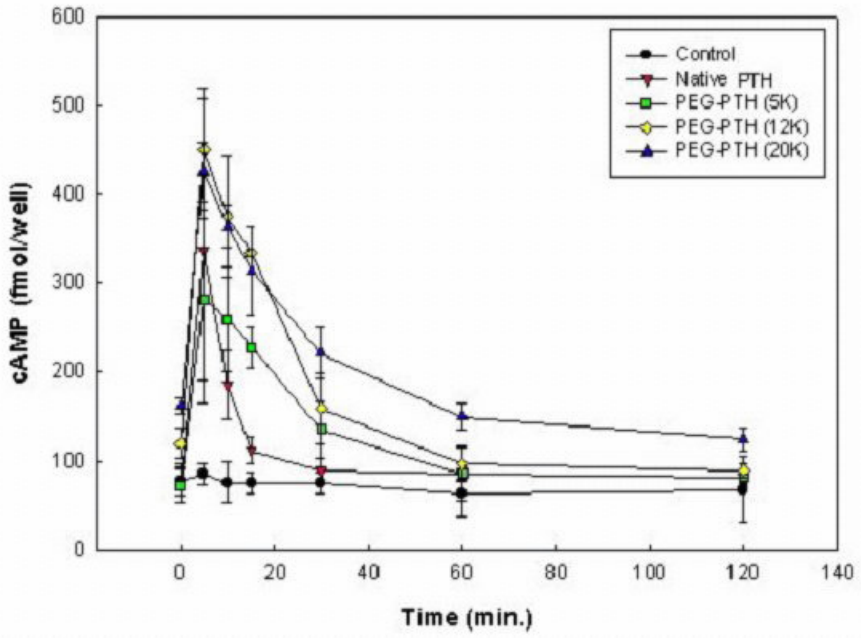
도면4



도면5


Native PTH
PEG-PTH (5K)
PEG-PTH (12K)
PEG-PTH (20K)
cAMP (fmol/well)
3500
3000
2500
2000
1500
1000
500
0
-9
-8
-7
Concentraion (Log M)

도면6


Control
Native PTH
PEG-PTH (5K)
PEG-PTH (12K)
PEG-PTH (20K)
cAMP (fmol/well)
600
500
400
300
200
100
0
0
20
40
60
80
100
120
140
Time (min.)