

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국



(43) 국제공개일
2010년 5월 20일 (20.05.2010)

PCT

(10) 국제공개번호
WO 2010/056040 A2

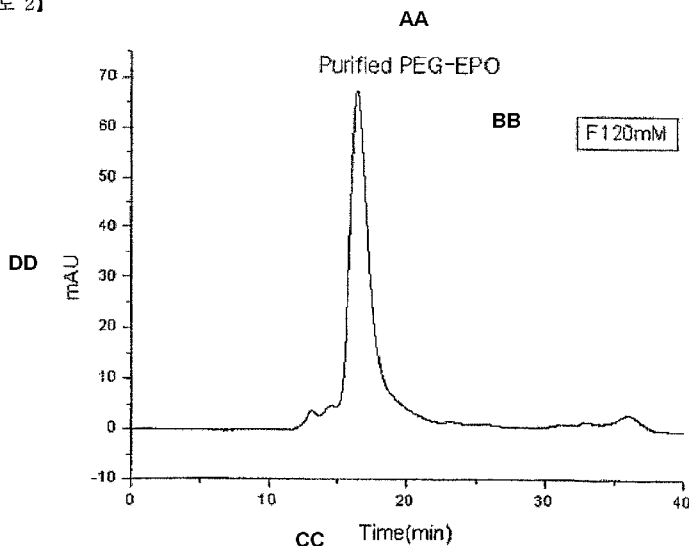
- (51) 국제특허분류:
A61K 47/30 (2006.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2009/006620
- (22) 국제출원일: 2009년 11월 11일 (11.11.2009)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보:
10-2008-0111568 2008년 11월 11일 (11.11.2008) KR
- (71) 출원인 (US 을(를) 제외한 모든 지정국에 대하여): 주식회사 바이오폴리메드 (BIOPOLYMED, INC.) [KR/KR]; 서울 성북구 안암동 고려대학교 산학관 711 호, 136-713 Seoul (KR). 한국유니온제약 주식회사 (UNION KOREA PHARM CO., LTD.) [KR/KR]; 강원도 원주시 문막읍 반계리 5-9, 220-805 Gangwon-do (KR).
- (72) 발명자: 겸
- (75) 발명자/출원인 (US 에 한하여): 박명옥 (PARK, Myung-Ok) [KR/KR]; 서울 노원구 하계 2 동 학여울 청구아파트 107 동 1403 호, 139-734 Seoul (KR).
- (74) 대리인: 유미특허법인 (YOU ME PATENT & LAW FIRM); 서울 강남구 역삼동 649-10 서림빌딩, 135-080 Seoul (KR).
- (81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), 유럽 (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

[다음 쪽 계속]

(54) Title: NOVEL ERYTHROPOIETIN CONJUGATES BONDED WITH A BIOCOMPATIBLE POLYMER

(54) 발명의 명칭: 생체적합성 고분자와 결합한 신규한 에리스로포이에틴 접합체

【도 2】



AA ... PEG-EPO purifiée
BB ... F120mM
CC ... Temps (en minstre)
DD ... mAU

(57) Abstract: The present invention relates to conjugates in which a non-antigenic hydrophilic biocompatible polymer is conjugated to the carboxyl group of an amino acid-containing C-terminal of erythropoietin which is a biologically active material. Said conjugates of erythropoietin and said biocompatible polymer prevent the degradation of the physiological activity of erythropoietin as much as possible, and prolong in-blood serum half-life to enhance the in vivo effects of drugs. Therefore, the conjugates of the present invention are useful for treating diseases related to erythropoiesis and hematopoiesis.

(57) 요약서: 본 발명은 생물학적 활성 물질인 에리스로포이에틴의 C-말단(C-terminal)을 포함한 아미노산의 카복실기에 비항원 친수성 생체적합성 고분자를 접합한 접합체에 관한 것이다. 상기 에리스로포이에틴과 생체적합성 고분자의 접합체는 에리스로포이에틴의 생리활성의 저하를 최대한 감소시키고 혈중 혈청 반감기를 증가시켜 체내 약물의 효능을 높임으로써, 적혈구 생성 및 조혈에 관련된 질환의 치료에 유용하게 사용될 수 있다.

공개:

- 국제조사보고서 없이 공개하며 보고서 접수 후 이를 별도 공개함 (규칙 48.2(g))

【명세서】

【발명의 명칭】

생체적합성 고분자와 결합한 신규한 에리스로포이에틴 접합체

【기술분야】

- <1> 본 발명은 생물학적 활성 물질인 에리스로포이에틴(EPO)의 C-말단 (C-terminal)을 포함한 아미노산의 카르복실기에 비항원성, 친수성 생체적합성 고분자를 접합한 접합체 및 이의 제조 방법에 관한 것이다.

【배경기술】

<2> EPO

- <3> 에리스로포이에틴(EPO)은 적혈구 합성 조절에 관련된 당단백질로, 콜로니 자극인자로 기능한다. EPO는 골수에서 EPO 수용체를 통해 적혈구 세포의 증식과 성장을 조절한다.

- <4> 인간 EPO는 1906년에 적혈구 조혈(erythropoiesis)을 조절할 수 있는 체액성 인자의 존재 가능성이 보고되면서 처음으로 알려지기 시작하였고, 1957년에 에리스로포이에틴으로 명명된 적혈구 생성을 촉진하는 호르몬이 신장에서 생성된다는 것이 밝혀졌다(Jacobson 등, Nature, 179, 633, 1957).

- <5> 인간 EPO는 1977년에 미야케 등이 재생불량성 빈혈환자의 뇨로부터 대량 분리, 정제하는데 최초로 성공한 이후(Miyake 등, J. Biol. Chem., 252(15), 5558, 1977), 분자생물학과 당생물학에서 연이은 연구가 본격화되기 시작하여 야나가와 등에 의해 N-말단 30개의 아미노산 서열이 처음으로 보고되었고(Yanagawa 등, J. Biol. Chem., 259(5), 2707, 1984), 2년 후에는 레이 등이 인간 뇨 유래 EPO로부터 전체 아미노산 서열을 결정하여 보고하였다(Lai 등, J. Biol. Chem., 261, 3116, 1986).

- <6> 인간 EPO는 적혈구 전구세포의 마지막 성숙과 성장을 조절하는 역할을 하는 호르몬으로서(Goldwasser 등, Ann. NY Acad. Sci., 149, 49, 1968) 주로 태아 간이나 성인 신장에서 생산되며, 혈액내 인간 EPO의 양은 저산소 혈중상태에서 증가하여, 그 결과로 성숙한 산소전달 적혈구 세포의 생산을 조절한다. 인간은 정상적인 조직의 기능을 위해 적절한 수준의 적혈구 수를 유지하고 있으므로 적혈구 수가 감소하면 조직의 기능 장애가 일어나 빈혈을 일으키게 된다.

- <7> 천연형 인간 EPO는 산성(acid), 단일형(monomer)의 당단백질로서 전체 분자량이 약 34,000 달톤 정도이며, 당을 제외한 단백질 부분만의 분자량은 약 18,000

달톤이다(Wang 등, Endocrinology, 116, 2286, 1985). 인간 EPO에서 전체 분자량의 약 40%인 당쇄 부분은 인간 EPO의 생체 내(in vivo) 활성 및 구조 안정성에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 왔다(Linda et al, J. Biological Chemistry 266, 23022-23026(1991)). 따라서, 인간 EPO의 당 함량이 감소되면 인간 EPO 분자의 생물학적 반감기가 급격히 감소되어 인간 EPO의 생체 내 생물학적 활성이 소실된다(Goto 등, Biotechnology, 6, 67, 1988).

<8> EPO는 유전자 클로닝 및 발현을 통한 재조합 DNA 기술을 이용하여 제조되어 만성 신부전, 골수억제 화학치료에 있는 암 환자와 관련된 빈혈을 포함한 다양한 형태의 빈혈 치료에 유용하게 사용되어 왔다(Lin, US5618698). 그러나, 이와 같은 EPO의 효능은 입증되었으나, EPO는 체내에서의 반감기가 짧아(약 4시간) 자주 투여하여야 하므로, 환자들에게 만족감을 주는 데에는 한계가 있었다.

<9>

<10> 생물학적 활성 물질의 생체적합성 고분자와의 접합체 제조

<11> EPO와 같은 생물학적 활성 물질을 합성 고분자와 결합시키는 것은 생체 내(in vivo) 및 생체 외(in vitro) 적용 시에 많은 이점을 제공할 수 있다. 생물학적 활성 물질에 대한 고분자의 공유결합은 분자의 표면특성 및 용해성을 변화시켜서, 물 또는 유기용매에 대한 용해성을 증가시킬 수 있다. 또한, 생체적합성(biocompatibility)을 증가시켜서 면역 반응성을 감소시키며, 생체 내에서의 안정성을 증가시킬 뿐만 아니라, 장관 시스템, 신장, 비장 또는 간에 의한 소실을 연장시킬 수 있다.

<12> 생물학적 활성 물질을 폴리에틸렌 글리콜(polyethylene glycol, PEG) 및 유사한 수용성 폴리알킬렌 옥사이드(polyalkylene oxides, PAO)에 결합시키는 개념은 많은 특허공보 및 문헌에서 찾아 볼 수 있다.

<13> EPO에 PEG 유도체를 접합시킨 예로, WO 94/28024는 EPO의 라이신의 아민기나 당의 산화된 기에 PEG를 접합한 것을 개시하였다. US6340742B1에서는 EPO 표면에 라이신과 같은 아미노기에 20K 내지 40K PEG 유도체를 접합하여 PEG가 없는 EPO에 비해 반감기가 증가한다는 것을 보여 주고 있다. 또한 US 6586398B1에서는 노블에 리스로포이에틴 자극 단백질(Novel erythropoietin stimulating protein, NESP)의 N-말단을 포함하는 자유(free) 아민기 또는 산화된 당사슬에 선형(linear) 또는 분지된(branched) 형태의 PEG 유도체를 접합하여 적혈구 생성 효능을 보여 주었다.

<14> 그러나, 기존의 PEG-EPO의 접합체는 주로 EPO의 아민기에 PEG가 접합된 것으

로서, 많은 생물학적 활성 물질, 예를 들어 단백질의 경우, 단백질 내에 여러 라이신 잔기가 존재하므로, 라이신에 PEG가 접합되면, 다수의 접합체 이성질체(isomer)들이 존재하여, 접합체 내에 PEG가 접합된 위치(site)를 규명하기가 어려우며 또한 상당한 생물학적 활성을 잃게 된다는 보고가 있다. EPO 역시 8개의 라이신기를 가지고 있어 라이신에 PEG가 접합될 경우 활성 감소의 문제가 있을 수 있으며, 또한 라이신에 접합되는 PEG의 수가 많을수록 EPO의 생리 활성은 더 감소하는 것으로 보고 되고 있다(WO 94/28024). 그 예로, PCT/JP01/08539에서 PEG 유도체가 EPO의 라이신의 아민기에 결합한 경우, PEG의 결합 수가 증가함에 따라 생물학적 활성이 천연(native) EPO에 비해 13 % 내지 0.79 %만 유지되는 것으로 보고 되고 있다.

<15> 한편, US 5252714에서는 PEG 유도체가 PEG-아세틸(acetyl)- 일 때 수용액 상태에서 불안정하여, PEG-프로필(propyl)- 또는 PEG-부틸(butyl)- 유도체를 발명하여 PEG 유도체의 안전성을 증가시킨 예가 있다.

<16> 따라서, 기존의 생체적합성 고분자와 결합된 EPO 보다 생체 내 생리활성의 감소가 적고 생체 내 반감기가 증가되어 유효한 치료 효과를 나타낼 수 있는 새로운 EPO-생체적합성 공중합체의 접합체에 대한 요구가 있다.

【발명의 상세한 설명】

【기술적 과제】

<17> 본 발명은 야생형 또는 재조합 EPO의 카르복실기에 생체적합성 고분자를 선택적으로 결합시킨 접합체를 제공하여, 생체적합성 공중합체와 결합하지 않은 EPO, 또는 기존의 라이신기, 아민기 또는 당쇄를 통해 생체적합성 고분자와 결합된 EPO 등과 비교할 때 낮은 투여 횟수로도 약물학적 효능을 증가시킬 수 있는 새로운 EPO-생체적합성 고분자의 접합체 및 이를 포함하는 약학 조성물을 제공하는 것을 목적으로 한다.

<18> 본 발명은 또한 체내에서 더욱 안정한 폴리에틸렌 글리콜 유도체를 함성함으로써, 이를 EPO의 카르복실기에 선택적으로 결합시켜 체내에서 장시간 결합이 유지되는 새로운 PEG-EPO 접합체를 제공하고자 한다.

【기술적 해결방법】

<19> 따라서, 본 발명의 첫 번째 양태에서는, 생물학적 활성물질인 에리스로포이에틴(EPO)의 카르복실기에 생체적합성 고분자를 접합시킨 것을 특징으로 하는 EPO-생체적합성 고분자 접합체를 제공한다.

<20> 상기 생물학적 활성물질인 에리스로포이에틴(EPO)은 인간 또는 포유동물 유

래의 EPO로서, 바람직하게는 인간 EPO이고, 야생형 또는 재조합 EPO 일 수 있다. 본 발명에 따라, 상기 EPO의 카르복실기에 생체적합성 고분자를 결합시키는 경우, 상기 카르복실기는 EPO의 C-말단의 카르복실기를 포함하여 아미노산의 카르복실기 잔기를 의미한다. 본 발명에 따라 EPO의 C-말단에 생체적합성 고분자를 접합시킨 접합체는 기존의 아민기, 라이신 또는 당쇄 등을 통해 생체적합성 고분자와 결합된 EPO 접합체보다 체내 생물학적 활성의 감소가 적었다.

<21>

<22>

본 발명에 있어서, 상기 생체적합성 고분자는, 천연 또는 인공 합성 고분자 물질 등 EPO와 같은 생물학적 활성물질에 부가될 수 있는 인체에 유용한 모든 생체적합성 고분자를 총칭한다. 본원에서 사용되는 "생체적합성"이란 용어는, 생체 독성 반응, 염증 반응, 면역 반응, 발암성 등을 일으키지 않고, 생체에 무독 무해하고 면역학적 거부 반응을 일으키지 않으면서 생체 조직이나 생체 시스템과 좋은 친화성으로 양립할 수 있는 능력을 말한다.

<23>

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 5,000 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. 이들 생체적합성 고분자는 선형(linear) 형태 뿐만 아니라 가지 달린(branched) 형태의 고분자도 포함되는 것으로 의도된다.

<24>

본 발명의 바람직한 실시예에 있어서, 상기 생체적합성 고분자는 폴리에틸렌글리콜(PEG: Poly Ethyleneglycol)이다. PEG는 $\text{HO}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n-\text{H}$ 의 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 100,000, 바람직하게는 5,000 내지 40,000 이다. 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.

<25>

<26>

PEG 등 생체적합성 고분자를 단백질 등의 생물학적 활성 물질과 결합시키기 위해서는, 일반적으로 생체적합성 고분자의 양 말단 중 하나 또는 둘 다를 알데히드기, 석신이미딜기, 하이드로자이드기, 이민기 등의 고 반응성 작용기로 치환한 후, 상기 고 반응성 작용기가 생물학적 활성 물질의 아민기, 카르복실기, 티올기 등과 화학 반응을 통해 결합하여 접합체를 이루도록 한다. 경우에 따라서는, 바람직하게 PEG 등 생체적합성 고분자의 한 하이드록시 말단을 메톡시기 등으로 보호한 후, 나머지 한 말단만 고 반응성 작용기를 치환하여 반응시키거나, 또는 한쪽 말단을 보호하고 나머지 말단에 특정 생물학적 활성 물질을 결합시킨 후, 다른 쪽 말단의 보호기를 제거하고 이를 활성화시켜 또 다른 생물학적 활성 물질을 결합시킬 수도 있다.

<27>

상기와 같이 생체적합성 고분자를 생물학적 활성물질에 결합시키기 위해 말단 그룹 중 하나 또는 둘 모두를 반응성 작용기로 전환시키는 과정을 "활성화"라고 하며, 이 과정에 의해 반응성 작용기로 치환, 생성된 고분자 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 C₁₋₄ 말단 그룹을 함유하는 것들과 같은 다른 적당한 알킬-치환 PAO 유도체가 있다.

<28>

본 발명에서 사용될 수 있는 바람직한 반응성 작용기는 EPO의 카르복실기와 결합할 수 있도록 생체적합성 고분자를 활성화하는 그룹 또는 잔기를 말한다. 바람직하게, 상기 반응성 작용기는 1급 아민, 또는 하이드라진 및 하이드라자이드 작용기(아실 하이드라자이드, 카르바제이트, 세미카르바제이트, 티오키타제이트 등)와 같이 카르복실산 및 반응성 카르보닐기와 반응할 수 있는 작용기 중에서 선택될 수 있다.

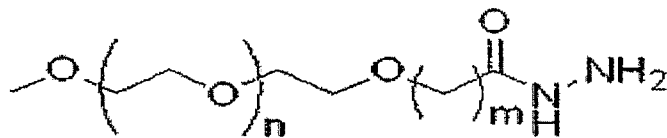
<29>

<30>

본 발명에서는 또한, 특히 바람직한 실시예로서, 기존에 3-브로모아세테이트

(3-bromoacetate)를 사용하여 제조된 mPEG-O-CH₂CO-NHNH₂(Hz)보다 더 안정한 PEG-하이드라자이드(Hz) 유도체를 합성하여 이를 EPO의 카르복실기와 결합시켰다. 이들 새로운 PEG 유도체는 EPO와 결합하는 경우 더욱 안정하여, 장기간 보관 시 더 안정한 PEG-EPO 접합체를 제조할 수 있다. 본 발명에서 합성한 상기 PEG-Hz 유도체의 일반 구조는 다음의 화학식 (I)로 표시할 수 있다.

<31> 【화학식 1】

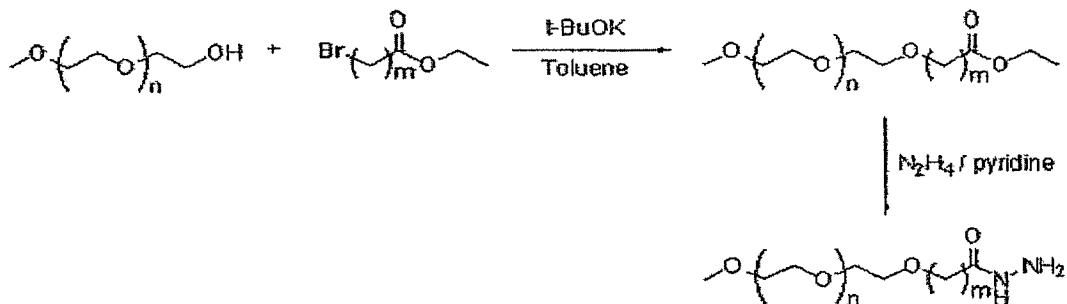


<32>

<33> 상기 식에서, m 은 2 내지 5의 정수이다.

<34> 상기 화학식 (I)의 PEG 유도체는 하기 반응식에 따라 제조될 수 있다.

<35> (반응식 1)



<36>

<37> 상기 반응식에서, m은 2 내지 5의 정수이다.

<38> 즉, mPEG를 tert-부톡사이드의 존재 하에 Br-(CH₂)_m-CO-OCH₂CH₃와 반응시킨 후, 그 생성물을 피리딘 존재 하에서 N₂H₄와 반응시켜 얻어지는 PEG-Hz 유도체가 본 발명의 실시예 특히 바람직하다.

<39>

<40> 한편, 생체적합성 고분자를 생물학적 활성 물질에 접합시키는 경우, 생체적합성 고분자의 생물학적 활성 물질에의 확실한 접합을 위해 생물학적 활성 물질 1 분자 당 화학량론적(stoichiometric) 과량의 생체적합성 고분자를 반응시키게 되며, 그 결과 생물학적 활성 물질 1 분자에 2 분자 이상의 생체적합성 고분자가 무작위

로 결합하는 경우가 많았다. 이 때, 1 분자의 생물학적 활성 물질에 2 분자 이상 다수의 생체적합성 고분자가 결합하게 되면, 그 생물학적 활성 물질과 생체적합성 고분자의 접합체는 생물학적 활성 물질의 생리 활성이 상당히 감소하는 것으로 알려졌다. 이러한 문제를 해결하기 위하여, 상기 다수의 생체적합성 고분자가 무작위로 접합된 생물학적 활성 물질과 생체적합성 고분자의 접합체로부터, 오직 하나의 생체적합성 고분자가 결합된 접합체만 분리하여 사용하려는 시도가 있었다.

<41> 본 발명에 따른 EPO의 카르복실기에 생체적합성 고분자를 결합시킨 접합체에 있어서도, 한 분자의 EPO에 2 이상의 생체적합성 고분자가 결합한 경우에 비해, 하나의 EPO에 하나의 생체적합성 고분자가 결합한 접합체의 생리 활성의 감소가 보다 적은 것으로 나타났다.

<42> 따라서, 더욱 바람직한 양태로서, 본 발명에 따른 EPO-생체적합성 고분자의 접합체는, EPO의 카르복실기를 통해 생체적합성 고분자와 1:1의 몰비로 결합한 EPO-생체적합성 고분자의 접합체이다.

<43>

<44> 상기 EPO의 카르복실기를 통해 생체적합성 고분자와 1:1의 몰비로 결합한 EPO-생체적합성 고분자의 접합체는, EPO의 카르복실기에 한 분자의 생체적합성 고분자가 결합한 접합체와 2 이상의 생체적합성 고분자가 결합한 접합체의 혼합물로부터 이온교환 크로마토그래피 또는 크기배제 크로마토그래피 등을 통해, 1:1의 몰비로 결합한 접합체만을 분리하여 얻을 수 있다. 또는, 후술하는 바와 같이, EPO와 생체적합성 고분자의 반응 몰비 및 EPO와 카르복실기 커플링화제의 반응 몰비 등 반응 조건을 엄격하게 조정함으로써, 생체적합성 고분자와 결합하는 EPO의 대부분이 생체적합성 고분자와 1:1의 몰비로 결합한 접합체를 얻을 수도 있다.

<45> 따라서, 본 발명은 두 번째 양태로서, EPO의 카르복실기를 통해 생체적합성 고분자가 결합된 EPO-생체적합성 고분자의 접합체를 제조하는 방법을 제공한다.

<46> 본원 발명의 두 번째 양태에 따른 상기 방법은, EPO의 고유 생리 활성의 적어도 일부를 유지하면서 결합이 이루어지도록 하기에 충분한 조건하에서, 활성화된 생체적합성 고분자, 바람직하게는 상기 화학식 (I)의 PEG-Hz 유도체와 EPO를 접촉시키는 단계를 포함하며, 더 구체적으로는, 상기 방법은 카르복실기의 커플링화제(이하, 커플링화제)의 존재 하에, 상기 PEG-Hz 유도체와 EPO를 반응시키는 단계를 포함한다.

<47>

<48> 상기 카르복실기의 커플링화제는 생물학적 활성 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.

<49>

<50> 특히 바람직한 양태로서, 본 발명은 EPO, 활성화된 생체적합성 고분자 (활성화된 PEG 유도체) 및 카르복실기 커플링화제를, EPO : 활성화된 생체적합성 고분자 (활성화된 PEG 유도체)의 몰비가 1 : 1 내지 20, EPO : 커플링화제의 몰비가 1 : 1 내지 50의 비율이 되도록 하고, 반응물의 pH를 2 내지 5의 범위로 조절함으로써 반응시키는 단계를 포함하는, 생체적합성 고분자-EPO 접합체의 제조 방법을 제공한다.

<51>

상기 바람직한 양태에 따르면, 제조되는 EPO-생체적합성 고분자 접합체의 대부분은 EPO 한 분자 당 생체적합성 고분자 한 분자가 결합한, 1:1 몰비의 접합체를 제공한다.

<52>

<53> 본 발명의 세 번째 양태에서는, 치료 유효량의 상기 EPO-생체적합성 고분자 접합체 및 약학적으로 허용되는 담체를 포함하는 약학 조성물을 제공한다. 바람직하게, 상기 EPO-생체적합성 고분자 접합체를 구성하는 생체적합성 고분자는 PEG 이며, 더욱 바람직하게, 상기 PEG는 EPO의 카르복실기를 통해 EPO와 1:1의 몰비로 결합한다.

<54>

본 발명에 따른 상기 조성물은 기존의 EPO를 유효 성분으로 포함하는 약학 조성물의 용도, 즉, 빈혈 관련 질병의 치료 및 예방 또는 조혈 작용을 위한 용도 등에 적용될 수 있다.

<55>

본 발명에 따른 상기 조성물은, EPO에 상대적으로 많이 존재하는 카르복실기에 PEG-Hz를 접합한 신규 EPO 접합체를 포함함으로써, 체내에서 EPO의 생리 활성의 감소를 최소화하며, 체내 반감기가 기존의 EPO보다 최소 10 배 내지 20 배 이상 증가됨으로써, 보다 적은 투여 횟수로 동등한 치료 효과를 기대할 수 있어 매우 바람직하며, 보다 바람직한 양태로서, 상기 EPO-PEG의 접합체가 EPO의 카르복실기를 통

해 1:1의 몰비로 결합한 접합체인 경우, 생리활성의 감소를 더욱 줄일 수 있다.

<56> 본 발명에 따른 상기 약학 조성물은 상기 접합체를 유효 성분으로 하고 통상적인 방법에 따라 약제학적으로 허용되는 적절한 담체 또는 부형제와 혼합하거나 희석제로 희석될 수 있다. 적합한 담체 및 부형제 및 희석제의 예로는, 락토즈, 텍스트로즈, 수크로즈, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에레스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 미정질 셀룰로즈, 폴리비닐피롤리돈, 물, 메틸하이드록시벤조에이트, 프로필하이드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트, 및 광물유를 들 수 있다. 상기 약학 조성물은 충진제, 항응집제, 윤활제, 습윤제, 향료, 유화제, 방부제 등을 추가로 포함할 수 있다. 본 발명의 약학 조성물은 포유동물에 투여된 후 활성성분의 신속, 지속 또는 지연된 방출을 제공할 수 있도록 당업계에 잘 알려진 방법을 사용하여 제형화될 수 있다. 제형은 정제, 알약, 분말, 새세이(sachet), 엘릭서(elixir), 현탁액, 에멀전, 용액, 시럽, 에어로졸, 연질 또는 경질 젤라틴 캡셀, 멸균 주사용액, 멸균 분말 등의 형태일 수 있다.

<57> 본 발명의 약학 조성물은 경구, 경피, 피하, 정맥 또는 근육을 포함한 여러 경로를 통해 투여될 수 있으며, 이의 통상적인 1일 투여량은 1 내지 1000 $\mu\text{g/kg}$ 체중, 바람직하게는 1 내지 100 $\mu\text{g/kg}$ 체중의 범위이고, 더욱 바람직하게는 1 내지 20 $\mu\text{g/kg}$ 체중의 범위로 1회 또는 수회로 나누어 투여할 수 있다. 그러나, 활성성분의 실제 투여량은 투여 경로, 환자의 연령, 성별 및 체중, 및 질환의 중증도 등의 여러 관련 인자에 비추어 조절하여 결정될 수 있다.

<58>

<59> 본 발명의 네 번째 양태에서는, EPO의 생체 내 반감기를 증가시키고 생리활성의 감소를 억제하는 방법을 제공한다.

<60>

<61> 전술한 바와 같이, 본 발명은 EPO의 라이신 기나 다른 아민기 또는 당쇄가 아닌, C-말단을 포함한 아미노산의 카르복실기에 PEG 등 생체적합성 고분자를 결합 시킴으로써 EPO의 생체 내 반감기를 현저히 증가시키고 생리활성의 감소를 억제할 수 있었으며, PEG와 EPO의 결합 몰비를 1:1로 조정함으로써, 생리활성의 감소를 더욱 억제할 수 있는 방법을 제공하였다.

<62>

【유리한 효과】

<63> 이상 설명한 바와 같이, 본 발명은 EPO의 카르복실기에 PEG 등 생체적합성 고분자를 결합시킨 접합체를 제공함으로써, 에리스로포이에틴의 생리활성의 저하를 최대한 억제하고 혈중 혈청 반감기를 증가시켜 체내 약물의 효능을 높임으로써, 적혈구 생성 및 조혈에 관련된 질환의 치료에 유용한 치료제를 제공할 수 있다.

<64>

【도면의 간단한 설명】

<65> 도1은 실시예 5에 따라 제조된 PEG(20000)-EPO 접합체를 HPLC 칼럼을 통해 분리한 그래프로서, 제조된 PEG-EPO 접합체는 대부분 EPO와 PEG가 1:1의 몰비로 결합된 1:1 접합체이고, 1:2 이상의 몰비로 결합한 결합체가 소량 존재함을 나타낸다.

<66> 도2는 실시예 5에서 제조한 EPO-PEG 접합체 중 크기배제 크로마토그래피를 통해 1:1의 접합체만을 분리한 상태의 HPLC 그래프이다.

<67> 도3은 실시예 5에서 제조된 EPO-PEG 접합체로부터 1:1의 접합체만을 분리한 본 발명에 따른 EPO-PEG 접합체의 생물학적 활성을, 실시예 8에서 기술한 바와 같이, PEG와 결합하지 않은 천연 EPO의 활성과 비교하여 나타낸 그래프이다.

<68> 도4는 실시예 5에서 제조된 EPO-PEG 접합체의 랫드에서의 체내 반감기를, 실시예 9에서 기술한 바와 같이, PEG와 결합하지 않은 천연 EPO의 반감기와 비교하여 나타낸 그래프이다.

<69> 도5는 실시예 5에서 제조된 EPO-PEG 접합체를 실시예 10에서 기술한 바와 같이 트립신으로 자른 후 SDS-PAGE를 실시하여 요오드(iodine) 염색을 한 그림이다.

<70> 도6은 실시예10에서 기술한 바와 같이 SDS-PAGE에서 요오드 염색(iodine staining)된 단편을 추출하여 아미노산 서열 분석을 한 결과를 나타낸 것이다.

<71>

【발명의 실시를 위한 최선의 형태】

<72> 이하, 실시예에 의해 본 발명을 좀더 구체적으로 설명한다. 이들 실시예는 본원 발명을 설명하기 위한 예시에 불과하며, 이로써 본 발명이 제한되는 것은 아니다.

【발명의 실시를 위한 형태】

<73> 실시예

<74> PEG-Hz 유도체의 합성 (실시예 1 ~ 4)

<75> <실시예 1> mPEG(20000)-O-CH₂CH₂CO-Hz 제조

- <76> 폴리에틸렌글리콜 메틸 에테르(Polyethylene glycol methyl ether) (mPEG-OH, MW 20,000)(100 mg, 0.005 mmol) 와 포타슘 t-부톡사이드(Potassium *t*-butoxide)(1.1 mg, 0.01 mmol)를 톨루엔에 녹이고 질소 가스 하 80℃에서 1시간 동안 교반하였다. 상기 용액에 에틸 3-브로모프로피오네이트(ethyl 3-bromopropionate)(1.3 ul, 0.01 mmol)를 톨루엔(1 ml)에 녹인 용액을 천천히 가한 후, 질소 가스 하 90℃에서 12시간 동안 교반하였다. 반응이 끝난 후, 상기 반응액을 감압 농축하고 최소량의 디클로로메탄(dichloromethane)으로 녹여 과량의 디에틸에테르(diethyl ether)에 부어 침전시켰다. 감압 여과하여 고형물을 얻고 진공 건조시켰다.
- <77> 상기에서 얻어진 mPEG-에틸프로피오네이트(ethylpropionate)(100 mg, 0.005 mmol)를 피리딘(pyridine)(1 ml)에 녹이고, 여기에 하이드라진(hydrazine)(4.7 ul, 0.15 mmol)을 첨가하여 6시간 동안 환류시켰다. 상기 반응액을 감압 농축하고 디에틸 에테르(diethyl ether)에 부어 침전시켰다. 감압 여과하여 고형물을 얻고 진공 건조시켰다(85 mg, 수율: 85%).
- <78>
- <79> <실시예 2> mPEG(20000)-O-CH₂CH₂CH₂CO-Hz 제조
- <80> mPEG-에틸프로피오네이트(ethylpropionate) 대신 에틸 4-브로모부티레이트(ethyl 4-bromobutyrate)(1.4 ul, 0.01 mmol)를 사용한 것 외에는, 실시예 1과 동일한 방법을 사용하여 mPEG(20000)-O-CH₂CH₂CH₂CO-Hz를 제조하였다 (76 mg, 수율: 76%).
- <81>
- <82> <실시예 3> mPEG(20000)-O-CH₂CH₂CH₂CH₂CO-Hz 제조
- <83> mPEG-에틸프로피오네이트(ethylpropionate) 대신 에틸 에틸 4-브로모발리레이트(ethyl ethyl 4-bromovalerate)(1.6 ul, 0.01 mmol)를 사용한 것 외에는, 실시예 1과 동일한 방법을 사용하여 mPEG(20000)-O-CH₂CH₂CH₂CH₂CO-Hz를 제조하였다 (70 mg, 수율: 70%).
- <84>
- <85> <실시예 4> mPEG(30000)-O-CH₂CH₂CO-Hz 제조
- <86> 폴리에틸렌글리콜 메틸 에테르(Polyethylene glycol methyl ether) (mPEG-OH, MW 30,000) (150 mg, 0.005 mmol)와 포타슘 t-부톡사이드(Potassium *t*-butoxide)(1.1 mg, 0.01 mmol)를 톨루엔에 녹이고, 질소 가스 하 80℃에서 1시간 동안 교반하였다. 상기 용액에 에틸 3-브로모프로피오네이트(ethyl 3-bromopropionate)(1.3 ul,

0.01 mmol)를 톨루엔(1 ml)에 녹인 용액을 천천히 가한 후, 질소 가스 하 90℃에서 12시간 동안 교반하였다. 반응이 끝난 후, 상기 반응액을 감압 농축시키고 최소량의 디클로로메탄(dichloromethane)으로 녹여 과량의 디에틸 에테르(diethyl ether)에 부어 침전시켰다. 감압 여과하여 고형물을 얻고 진공 건조시켰다.

<87> 상기에서 얻어진 mPEG-에틸프로피오네이트(ethylpropionate)(100 mg, 0.005 mmol)를 피리딘(pyridine)(1 ml)에 녹이고, 여기에 하이드라진(hydrazine)(4.7 μ l, 0.15 mmol)을 첨가하여 6시간 동안 환류시켰다.

<88> 상기 반응액을 감압 농축시키고 디에틸 에테르(diethyl ether)에 부어 침전시켰다. 감압 여과하여 고형물을 얻고 진공 건조시켰다(97.5 mg, 수율: 65%).

<89>

<90> EPO의 카르복실기에 PEG 접합 반응 (실시예 5 ~ 7)

<91> <실시예 5> mPEG(20000)-O-CH₂CO-Hz-EPO 접합체의 제조

<92> 1 mg의 EPO 용액(0.000033 mmol)을 50 mM MES 완충 용액(pH 2.0)으로 투석여과(VIVASPIN2, Sartorius, Germany)하여 농도를 5 mg/ml로 유지시켰다. 여기에 mPEG(20000)-O-CH₂CO-Hz 6.6 mg(0.00033 mmole, 10배, IDB, 한국)을 가하였다. 2 mg의 EDAC를 50 mM MES 완충 용액(pH 2.0) 20 μ l에 용해시킨 후 1.9 μ l(0.00099 mmol, 30배)를 가하였다. 실온에서 1시간 동안 교반 하에 반응을 진행시켰다.

<93> 생성된 모노(mono)-PEG20000-카르복실-EPO 및 다이(di)-PEG20000-카르복실-EPO를 크기 배제 칼럼(Superdex 250, Pharmacia, USA) 또는 이온 교환 칼럼(SP Sepharose, Q-Sepharose, 또는 CM-Sepharose, Pharmacia, USA)으로 분리 정제하였다. 0.3 mg 이상의 mPEG(20000)-O-CH₂CO-Hz-EPO 접합체가 수득되었다.

<94>

<95> <실시예 6> mPEG(20000)-O-CH₂CH₂CO-Hz-EPO 접합체의 제조

<96> 1 mg의 EPO 용액(0.000033 mmol)을 50 mM MES 완충 용액(pH 4.0)으로 투석여과(VIVASPIN2, Sartorius, Germany)하여 농도를 5 mg/ml로 유지시켰다. 여기에 실시예 1에서 제조한 mPEG(20000)-O-CH₂CH₂CO-Hz 6.6 mg(0.00033 mmole, 10배)을 가하였다. 2 mg의 EDAC를 50 mM MES 완충 용액(pH 4.0) 20 μ l에 용해시킨 후 1.9 μ l(0.00099 mmol, 30배)를 가하였다. 실온에서 1시간 동안 교반 하에 반응을 진행시켰다. mono-PEG(20000)-카르복실-EPO, di-PEG(20000)-카르복실-EPO는 크기 배제 칼럼(Superdex 250, Pharmacia, USA) 또는 이온 교환 칼럼(SP Sepharose, Q-

Sepharose, 또는 CM-Sepharose, Pharmacia, USA)으로 분리 정제하였다. 0.3 mg 이상의 mPEG(20000)-Hz-EPO 접합체가 수득되었다.

<97>

<98> <실시예 7> mPEG(30000)-CH₂CH₂CO--Hz-EPO 접합체의 제조

<99> 1 mg의 EPO 용액(0.000033 mmol)을 50 mM MES 완충 용액(pH 2.0)으로 투석여과(VIVASPIN2, Sartorius, Germany)하여 농도를 5 mg/ml로 유지시켰다. 여기에 실시예 4에서 제조된 mPEG(30000)-CH₂CH₂CO-Hz 9.9 mg(0.00033 mmole, 10배)을 가하였다. 2 mg의 EDAC를 50 mM MES 완충 용액(pH 2.0) 20 μ l에 용해시킨 후 1.9 μ l(0.00099 mmol, 30배)를 가하였다. 실온에서 1시간 동안 교반 하에 반응을 진행시켰다. mono-PEG(30000)-카르복실-EPO, di-PEG(30000)-카르복실-EPO는 크기 배제 칼럼(Superdex 250, Pharmacia, USA) 또는 이온 교환 칼럼(SP Sepharose, Q-Sepharose, 또는 CM-Sepharose, Pharmacia, USA)으로 분리 정제하였다. 0.3 mg 이상의 mPEG(30000)-Hz-EPO 접합체가 수득되었다.

<100>

<101> <실시예 8> PEG(20000)-EPO 접합체의 생물학적 활성 측정

<102> 배양중인 세포(F36E)를 세포배양배지(RPMI-1640 배지, 10% FBS)로 3회 세척한 후 헤모사이토미터(hemocytometer)로 계수하여 100 $\times$ 10⁴ 세포/ml 농도로 희석하여 현탁시켰다. 96웰 마이크로플레이트 각 웰에 10% FBS/RPMI 80 μ l를 넣고 EPO와 실시예 5에서 제조된 PEG-EPO 접합체를 2.5IU/ml로 희석하여 각각의 첫 번째 웰에 80 μ l 씩을 넣은 후 2배씩 단계 희석하였다. 이어서 각 웰에 계수해 놓은 세포 현탁액 20 μ l (2 $\times$ 10⁴ 세포/웰) 씩을 넣고 배양기 (37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂)에서 4일 동안 배양하였다. 각 well 에 XTT reagent 50ul (Cell proliferation kit II, Cat#11 465 015 001, Roche, 독일) 씩을 첨가하여 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ incubator에서 4시간 반응한 후 플레이트의 발색 정도를 490 nm에서 ELISA 판독기로 분석하였다.

<103> 분석 결과, 도3에 나타낸 바와 같이, 실시예 5에 따른 mPEG(20000)-Hz-EPO 접합체의 생물학적 활성은 천연(native) EPO와 비교하여 35% 내지 40% 정도의 활성을 가지는 것으로 확인되었다.

<104>

<105> <실시예 9> PEG(20000)-EPO 접합체의 반감기 측정

- <106> 7주령의 Sprague-Dawley 랫트(체중 220-240g, male 각 군 5마리씩)를 케타민/조레틸로 마취시킨 후 수술하여, 대정맥에 PE 튜브를 삽입하였다. 마취에서 회복된 후, 실시예 5에서 제조된 mPEG(20000)-Hz-EPO 접합체를 5 ug/kg 꼬리 정맥(tail vein)으로 단회 투여하였다. 대조군으로는 생리식염수만을 투여하고, 접합되지 않은 EPO 5 ug/kg을 같은 방법으로 투여하여 비교하였다.
- <107> 투여 후 0h, 1h, 2h, 4h, 8h, 12h, 24h(시간)까지 미리 삽입된 캐놀라를 통해 hepatin이 처리된 튜브에 혈액을 200 μ l씩 채혈하였으며, 그 이후로는 하루에 한번씩 일주일간 채혈하였다. 혈액 샘플은 원심분리(13,000 rpm, 10 min, 4)로 혈청을 분리하여 검정에 사용할 때까지 -20℃에 보관하였다. 혈청 안에 있는 EPO의 농도는 면역검정 키트(Immunoassay kit)(R&D Systems, USA)를 통하여 측정하였으며, 그 결과를 도4에 나타내었다.
- <108>
- <109> <실시예 10> PEG 접합 위치(site) 규명 실험
- <110> 10-1. 트립신 소화(Tryptic digestion)
- <111> 실시예 5에서 제조된 mono-PEG-EPO를 2mg/ml 농도로 맞춘 후 50mM Tris pH8.0 완충액에서 10 mM DTT(Dithiothreitol)를 첨가하여 1시간 반응시킨다. 여기에 요오도아세트아미드(Iodoacetamide) 40mM을 첨가하여 실온에서 1시간 더 반응시킨다. 이후 PEG-EPO 시료의 반응 농도를 1mg/ml로 희석하여 시료 : 트립신(Trypsin)을 1:20(W/W) 비율로 첨가하여 37℃ 에서 4시간 반응시키고, 트립신(Trypsin)을 1:20 비율로 한번 더 첨가하여 37℃ 에서 16~18시간 동안 반응시킨다.
- <112>
- <113> 10-2. 젤 추출(Gel extraction)
- <114> 실시예 10-1에서 트립신으로 소화된 펩타이드 단편 샘플을 SDS-PAGE(4~12% Nupage, Invitrogen)에 로드(loading)한 후, PEG 염색(staining)으로 단편(fraction)을 확인한 후(도 5 참조) PEG가 붙어있는 밴드(band)를 잘라낸다. 잘라낸 밴드를 50% 메탄올(MetOH)을 첨가하여 탈색한다. 그리고 100% 메탄올을 첨가하여 15분간 볼텍싱(vortexing)하여 젤(gel)에서 소화 단편(digestion fragment)을 추출한다. 100% 메탄올을 한번 더 첨가하여 위 과정을 반복한다.
- <115>
- <116> 상기에서 추출된 단편을 Procise 491 HT 단백질 서열화기(protein sequencer)(Applied Biosystems, USA)로 N-말단 아미노산 서열 분석을 하였다. 결과로, EPO의

C-말단 잔기인 트레오닌(T)-글리신(G)-아스파르트산(D)-PEG로 확인되었다. 이 때 마지막 잔기인 아스파르트산은 PEG가 접합되어 있어 아미노산 서열 분석에서는 원래의 체류시간(retention time)에 측정되지 않음을 알 수 있었다. 이들 결과를 도 6에 나타내었다.

<117>

<118>

이상 자세히 설명한 바와 같이, 본 발명에 따라 EPO의 C-말단을 포함한 카르복실기에 생체적합성 고분자를 결합시킨 접합체는 기존의 아민기나 라이신기 등을 통해 생체적합성 고분자를 결합시킨 EPO 유도체에 비해 생리활성의 감소가 억제되었으며, 천연 EPO에 비해 생체내 반감기가 연장됨을 알 수 있다.

【청구의 범위】**【청구항 1】**

에리쓰로포이에틴(EPO)의 C-말단을 포함한 아미노산의 카르복실기를 통해 생체적합성 고분자를 결합시킨 생체적합성 고분자와 EPO의 접합체.

【청구항 2】

제1항에 있어서, 상기 에리쓰로포이에틴(EPO)은 인간 유래의 것인 접합체.

【청구항 3】

제2항에 있어서, 상기 EPO는 재조합 EPO인 접합체.

【청구항 4】

제1항에 있어서, 상기 생체적합성 고분자는 폴리에틸렌글리콜(PEG)인 접합체.

【청구항 5】

제4항에 있어서, 상기 PEG의 분자량은 1,000 내지 100,000인 접합체.

【청구항 6】

제5항에 있어서, 상기 PEG의 분자량은 5,000 내지 40,000인 접합체.

【청구항 7】

제4항에 있어서, 상기 PEG는 한 말단이 카르복실산 또는 반응성 카르보닐기와 반응할 수 있는 1급 아민, 하이드라진 또는 하이드라자이드 작용기로 치환된 것인 방법.

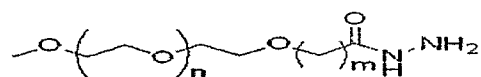
【청구항 8】

제7항에 있어서, 상기 하이드라진 또는 하이드라자이드 작용기는 아실 하이드라자이드, 카르바제이트, 세미카르바제이트 및 티오카르바제이트로 구성되는 군으로부터 선택되는 것인 방법. 하이드라자이드 기로 치환된 것인 접합체.

【청구항 9】

제7항에 있어서, 상기 PEG는 하기 화학식 (I)로 표시되는 것인 접합체:

화학식 (I)



상기 화학식에서, m 은 1 내지 5의 정수이다.

【청구항 10】

제1항 내지 제9항 중 어느 한 항에 있어서, 생체적합성 고분자가 EPO의 카르복실기에 1:1 의 몰비로 결합한 접합체.

【청구항 11】

카르복실기 커플링화제의 존재 하에, 카르복실산 또는 반응성 카르보닐기와 반응할 수 있는 작용기로 활성화된 생체적합성 고분자와 에리스로포이에틴(EPO)을 접촉시키는 것을 포함하는, 에리스로포이에틴(EPO)의 C-말단을 포함한 아미노산의 카르복실기를 통해 생체적합성 고분자를 결합시킨, 생체적합성 고분자와 EPO의 접합체를 제조하는 방법.

【청구항 12】

제11항에 있어서, 상기 생체적합성 고분자는 PEG인 방법.

【청구항 13】

제11항에 있어서, 상기 카르복실산 또는 반응성 카르보닐기와 반응할 수 있는 작용기는 1급 아민, 하이드라진 또는 하이드라자이드 작용기인 방법.

【청구항 14】

제13항에 있어서, 상기 하이드라진 또는 하이드라자이드 작용기는 아실 하이드라자이드, 카르바제이트, 세미카르바제이트 및 티오키르바제이트로 구성되는 군으로부터 선택되는 것인 방법.

【청구항 15】

제11항에 있어서, EPO : 활성화된 생체적합성 고분자의 몰비가 1 : 1 내지 20, EPO : 카르복실기 커플링화제의 몰비가 1 : 1 내지 50, pH가 2 내지 5의 반응 조건하에서 생체적합성 고분자와 에리스로포이에틴(EPO)을 접촉시키는 것을 포함하는 방법.

【청구항 16】

제11항에 있어서, 상기 커플링화제는 EDAC[N-(3-디메틸아미노프로)-N'-에틸 카르보디이미드 하이드로클로라이드], DIC[1,3-디이소프로필카르보디이미드], DCC[디사이클로헥실 카르보디이미드], 및 EDC[1-에틸-3-(3-디메틸아미노프로필)-카르보디이미드]로 구성되는 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 제조 방법.

【청구항 17】

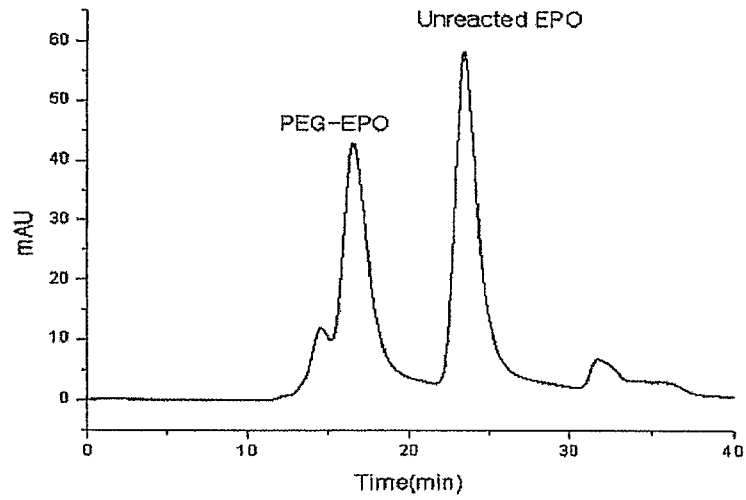
제1항 내지 제9항 중 어느 한 항에 따른 접합체 및 약제학적으로 허용 가능한 담체를 포함하는, 빈혈 또는 조혈 관련 질환의 치료 또는 예방을 위한 약학 조성물.

【청구항 18】

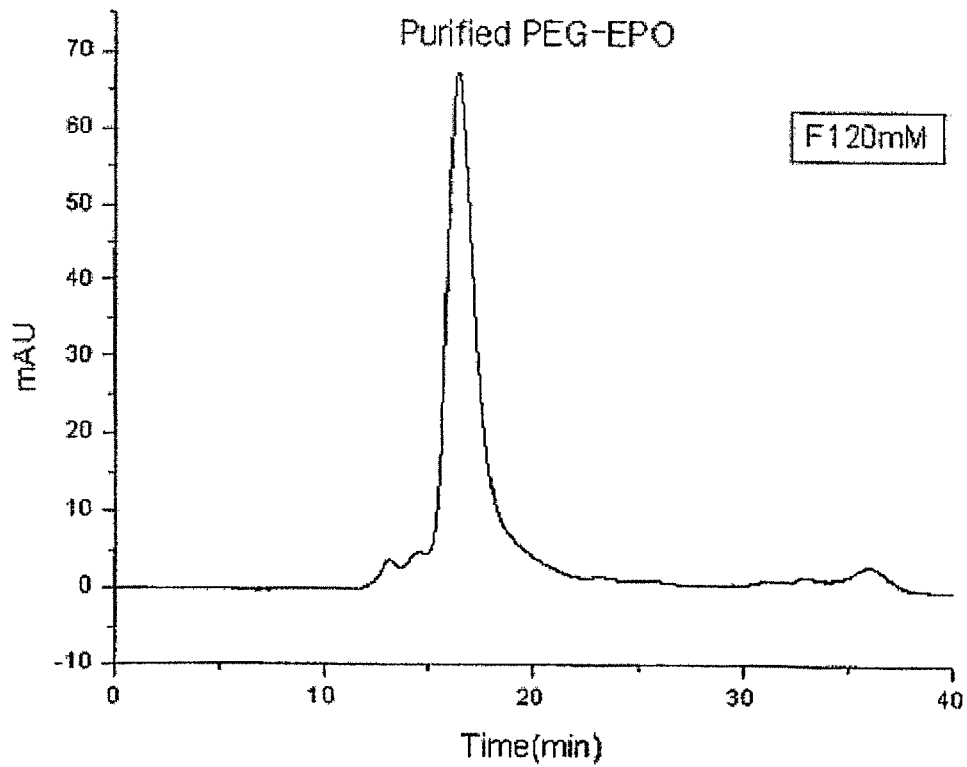
제10항에 따른 접합체 및 약제학적으로 허용 가능한 담체를 포함하는, 빈혈 또는 조혈 관련 질환의 치료 또는 예방을 위한 약학 조성물.

【도면】

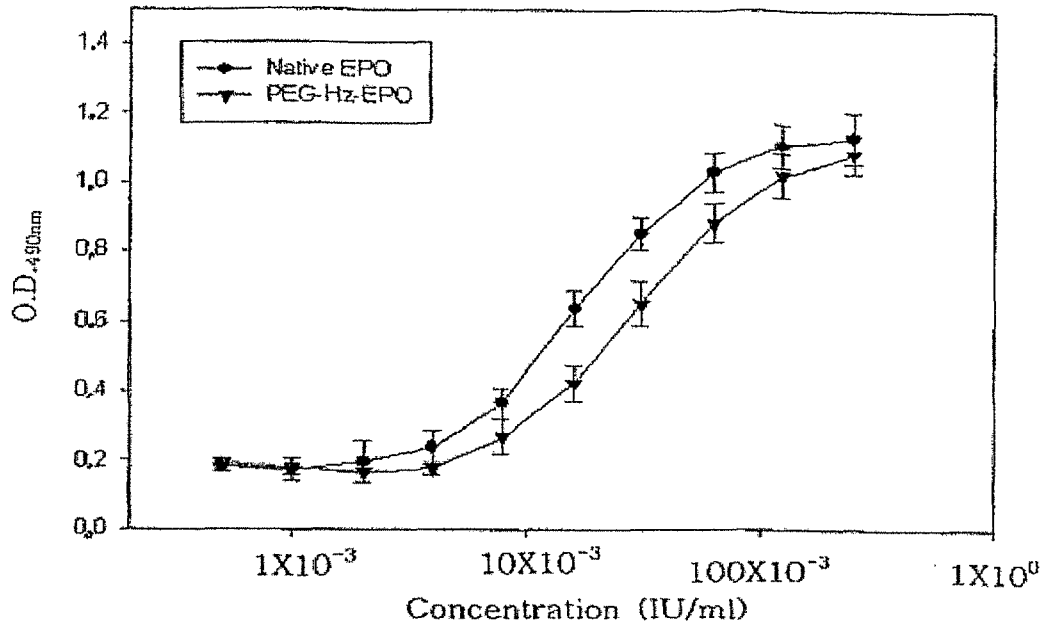
【도 1】



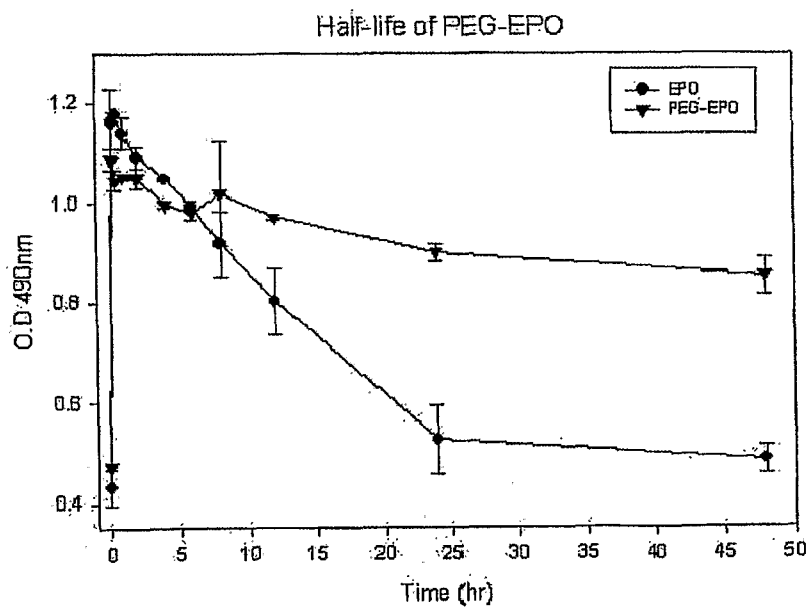
【도 2】



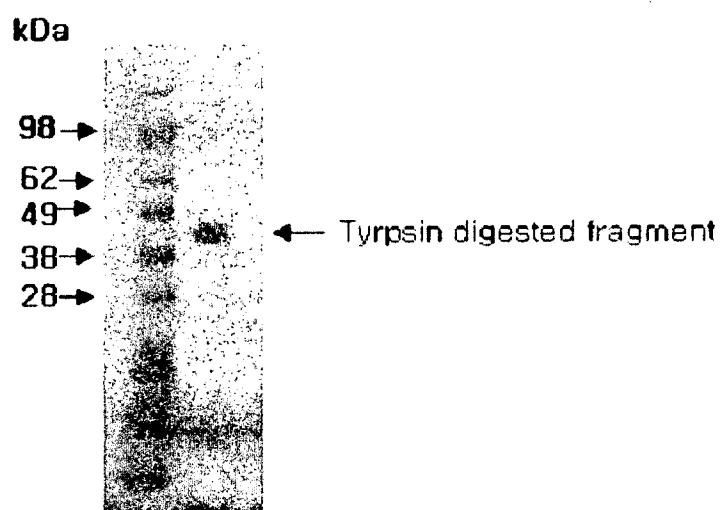
【도 3】



【도 4】



【도 5】



【도 6】

