

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2014년 9월 4일 (04.09.2014)



(10) 국제공개번호
WO 2014/133327 A1

- (51) 국제특허분류:
C07K 14/62 (2006.01) A61K 38/28 (2006.01)
C07K 17/08 (2006.01) A61P 3/10 (2006.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2014/001597
- (22) 국제출원일: 2014년 2월 26일 (26.02.2014)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보:
10-2013-0020703 2013년 2월 26일 (26.02.2013) KR
- (71) 출원인: 한미약품 주식회사 (HANMI PHARM. CO., LTD.) [KR/KR]; 445-958 경기도 화성시 팔탄면 무하로 214, Gyeonggi-do (KR).
- (72) 발명자: 장명현 (JANG, Myung Hyun); 134-715 서울시 강동구 고덕로 131 137 동 2403 호, Seoul (KR). 김대진 (KIM, Dae Jin); 445-764 경기도 화성시 병점 2로 103 506 동 1901 호, Gyeonggi-do (KR). 황상연 (HWANG, Sang Youn); 445-855 경기도 화성시 동탄반석로 231 154 동 601 호, Gyeonggi-do (KR). 김현욱 (KIM, Hyun Uk); 600-810 부산시 중구 초량상로 13 1302 호, Busan (KR). 정성엽 (JUNG, Sung Youb); 442-754 경기도 수

원시 팔달구 권광로 373 109 동 105 호, Gyeonggi-do (KR). 권세창 (KWON, Se Chang); 135-506 서울시 강남구 선릉로 221 408 동 1804 호, Seoul (KR).

(74) 대리인: 손민 (SON, Min); 135-855 서울시 강남구 양재천로 163, STX R&D 센터 6층 (한얼국제특허사무소), Seoul (KR).

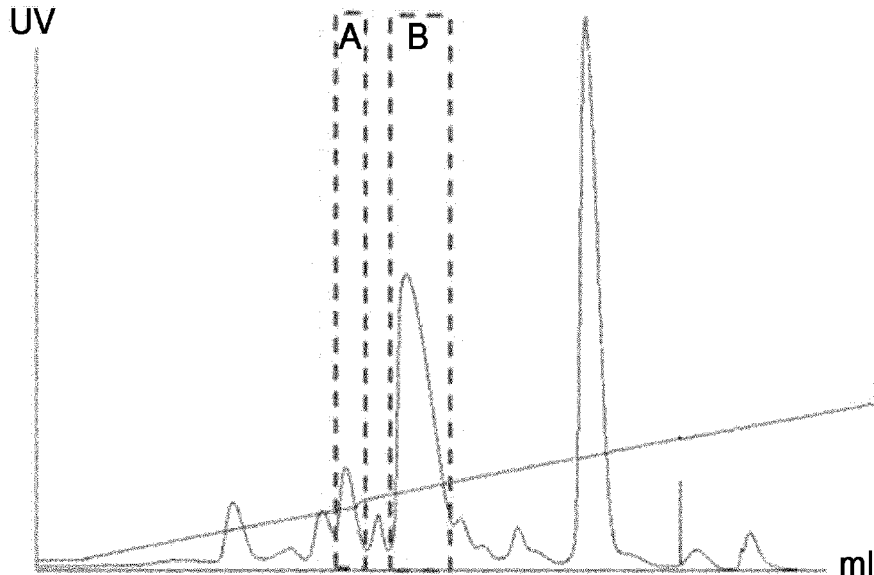
(81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC,

[다음 쪽 계속]

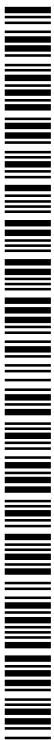
(54) Title: SITE-SPECIFIC INSULIN CONJUGATE

(54) 발명의 명칭: 인슐린 위치 특이적 결합체



(57) Abstract: The present invention relates to: an insulin conjugate, wherein a non-peptidic polymer and an immunoglobulin Fc region are site-selectively connected, by a covalent bond, to an amino acid residue of a region excluding the N terminal of insulin β chain, and thus the binding force to an insulin receptor is improved, thereby increasing activity; an extended release preparation containing the same; and a method for preparing the same. The insulin conjugate of the present invention can provide an insulin preparation with remarkably improved *in vivo* activity of a peptide.

(57) 요약서: 본 발명은 비펩타이드성 중합체 및 면역글로불린 Fc 영역이 상호 공유결합에 의해 인슐린 베타 체인 N 말단을 제외한 영역의 아미노산 잔기에 부위 선택적으로 연결되어 있어 인슐린 수용체와의 결합력이 향상되고 이에 따라 활성이 증가된 인슐린 결합체, 이를 포함하는 지속성 제제, 및 이의 제조방법에 관한 것이다. 본 발명의 인슐린 결합체는 펩타이드의 생체 내 활성이 현저히 증가된 인슐린 제제를 제공할 수 있다.



WO 2014/133327 A1



MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, 공개:
TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW,
KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

- 국제조사보고서와 함께 (조약 제 21 조(3))
- 명세서의 서열목록 부분과 함께 (규칙 5.2(a))

명세서

발명의 명칭: 인슐린 위치 특이적 결합체

기술분야

- [1] 본 발명은 인슐린 베타 체인의 N 말단을 제외한 아미노산 잔기에 특이적으로 비펩타이드성 중합체 링커 및 면역글로불린 불변영역이 공유결합에 의해 연결된 결합체 및 이를 제조하는 방법에 관한 것이다.

[2]

배경기술

- [3] 인슐린은 사람의 췌장의 베타세포에서 분비되는 펩타이드로서 체내의 혈당을 조절하는데 매우 중요한 역할을 담당하는 물질이다. 이러한 인슐린이 제대로 분비되지 않거나 분비된 인슐린이 체내에서 제대로 작용하지 못하는 경우 체내의 혈당이 조절되지 못하고 상승하며 이러한 상태를 당뇨병이라고 한다. 앞에서 언급한 경우를 제2형 당뇨병이라고 하며, 췌장에서 인슐린을 분비하지 못하여 혈당이 상승하는 경우를 제1형 당뇨병이라고 한다. 제2형 당뇨병의 경우 화학물질을 주성분으로 하는 경구용 혈당 강하제를 이용하여 치료를 하며 일부 환자에는 인슐린을 사용하여 치료하기도 한다. 반면, 제1형 당뇨병의 경우에는 인슐린의 투여가 필수적으로 요구된다.
- [4] 현재 많이 사용되고 있는 인슐린 치료법은 식사 전, 후에 주사를 통하여 인슐린을 투여하는 방법이다. 하지만, 이러한 인슐린 치료법은 하루에 3번씩 지속적으로 투여되어야하기 때문에 환자들에게 많은 고통과 불편을 야기한다. 이러한 문제점을 극복하기 위하여 다양한 시도가 있어왔으며, 그 중 하나로서, 펩타이드의 약물의 생체막 투과도를 증가시켜 구강 또는 비강을 통한 흡입으로 펩타이드의 약물을 체내로 전달하는 시도가 있었다. 그러나 이러한 방법은 주사제에 비해 펩타이드의 체내 전달 효율이 현저히 낮으며 따라서 펩타이드 약물의 체내 활성을 요구되는 조건으로 유지하는데 아직까지는 어려움이 많다.
- [5] 또한, 과량의 약물을 피하에 투여한 후 흡수가 지연되도록 하는 방법이 있었으며 이를 통하여 하루에 한 번 투여로 지속적인 혈중농도를 유지하는 방법이 있었다. 그 중 일부는 의약품(예, Lantus, Sanofi-aventis)으로 허가를 받아 현재 환자에게 투여되고 있다. 또한, 인슐린에 지방산을 수식하여 인슐린 중합체의 결합을 강하게 하며 투여부위 및 혈중의 알부민과 결합하여 지속시간을 늘리는 연구가 진행되었으며, 그 중 일부는 의약품(예, Levemir, NovoNordisk)으로 허가를 받았다. 하지만, 이러한 방법은 투여부위에서 통증이나 나타나는 부작용이 있으며, 아직도 주사를 통한 투여간격이 하루 한 번으로서 여전히 환자에게 큰 부담이 되고 있다.

[6]

- [7] 한편, 인슐린 베타 체인의 N 말단 및 C 말단 부분 예컨대, 29번 위치의

아미노산은 인슐린 수용체와의 결합에 대해 상대적으로 영향이 적음이 보고된 바 있다(Jens Brange and Aage Volund, Adv. Drug Deliv. Rev., 35(2-3): 307-335 (1999); Peter Kurtzhals et al., Diabetes, 49(6): 999-1005 (2000)).

[8]

[9] 이에 본 발명자는 연구를 거듭한 끝에 인슐린의 베타 체인 C 말단 영역의 아미노산 잔기에 비펩타이드성 중합체와 면역글로불린 불변영역을 수식하는 방법을 개발하였으며, 이와 같이 제조하는 방법을 사용하는 경우 인슐린의 N 말단 등 다른 위치에 수식하여 결합체를 제조하는 것보다 인슐린 수용체와의 결합력이 상승됨을 확인하여 본 발명을 완성하였다.

[10]

발명의 상세한 설명

기술적 과제

[11] 본 발명의 목적은 면역글로불린 Fc 영역이 비펩타이드성 중합체를 통하여 인슐린 베타 체인의 N 말단을 제외한 아미노산 잔기에 위치 선택적으로 연결된 인슐린 결합체 및 그의 제조 방법을 제공하는 것이다.

[12]

과제 해결 수단

[13] 상기 목적을 달성하기 위한 하나의 양태로서, 본 발명은 인슐린 및 면역글로불린 Fc 영역이 폴리에틸렌글리콜, 폴리프로필렌글리콜, 에틸렌글리콜-프로필렌글리콜 공중합체, 폴리옥시에틸화폴리올, 폴리비닐알콜, 폴리사카라이드, 덱스트란, 폴리비닐에틸에테르, 생분해성 고분자, 지질 중합체, 키틴류, 히아루론산 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 비펩타이드성 중합체 링커를 통해 연결되고, 상기 비펩타이드성 중합체는 일 말단이 인슐린 베타 체인의 N 말단을 제외한 아미노산 잔기에 결합되고 다른 말단이 면역글로불린 Fc 영역에 결합된 것을 특징으로 하는 인슐린 결합체를 제공한다.

[14] 바람직하게, 상기 비펩타이드성 중합체는 인슐린 베타 체인의 20 내지 29번 중 어느 하나의 아미노산 잔기에 결합된 것일 수 있다.

[15] 보다 바람직하게, 상기 비펩타이드성 중합체는 인슐린 베타 체인의 25 내지 29번 중 어느 하나의 아미노산 잔기에 결합된 것일 수 있다.

[16] 보다 더 바람직하게, 상기 비펩타이드성 중합체는 인슐린 베타 체인의 29번 라이신 잔기에 결합된 것일 수 있다.

[17] 바람직하게, 상기 비펩타이드성 중합체가 결합하는 인슐린 베타 체인의 아미노산 잔기는 아민 그룹 또는 티올 그룹을 갖는 것일 수 있다.

[18] 바람직하게, 상기 인슐린은 천연형 인슐린, 천연형 인슐린에서 일부 아미노산이 치환(substitution), 추가(addition), 제거(deletion) 및 수식(modification) 중에 어느 하나의 방법 또는 이들 방법의 조합을 통해 제조된 변이체, 인슐린

- 유도체, 인슐린 아고니스트 또는 이들의 단편일 수 있다.
- [19] 바람직하게, 비펩타이드성 중합체의 양 말단이 각각 면역글로불린 Fc 영역과 인슐린 베타 체인 아미노산 잔기 측쇄의 아민 그룹 또는 티올 그룹(thiol group)에 결합된 것일 수 있다.
- [20] 바람직하게, 아미노산은 천연 또는 비천연 아미노산일 수 있다.
- [21] 바람직하게, 면역글로불린 Fc 영역이 비당쇄화된 것일 수 있다.
- [22] 바람직하게, 면역글로불린 Fc 영역이 CH1, CH2, CH3 및 CH4 도메인으로 이루어진 군으로부터 선택되는 1개 내지 4개 도메인으로 이루어진 것일 수 있다.
- [23] 바람직하게, 면역글로불린 Fc 영역이 힌지영역을 추가로 포함할 수 있다.
- [24] 바람직하게, 면역글로불린 Fc 영역이 IgG, IgA, IgD, IgE 또는 IgM에서 유래된 Fc 영역일 수 있다.
- [25] 바람직하게, 면역글로불린 Fc 영역의 각각의 도메인이 IgG, IgA, IgD, IgE, IgM로 이루어진 군에서 선택되는 면역글로불린에서 유래된 상이한 기원을 가진 도메인의 하이브리드일 수 있다.
- [26] 바람직하게, 면역글로불린 Fc 영역이 동일한 기원의 도메인으로 이루어진 단쇄 면역글로불린으로 구성된 이량체 또는 다량체일 수 있다.
- [27] 바람직하게, 면역글로불린 Fc 영역이 IgG4 Fc 영역일 수 있다.
- [28] 바람직하게, 면역글로불린 Fc 영역이 인간 비당쇄화 IgG4 Fc 영역일 수 있다.
- [29] 바람직하게, 비펩타이드성 중합체는 인슐린 베타 체인의 아미노산 잔기 측쇄의 아민 그룹 또는 티올 그룹과 펩티드(peptide), 헤미티오아세탈(hemithioacetal), 이민(imine) 또는 티오디옥소피롤리디닐(thiodioxopyrrolidinyl) 결합을 형성할 수 있다.
- [30] 바람직하게, 비펩타이드성 중합체가 양 말단에 각각 독립적으로 알데히드 그룹, 프로피온알데히드 그룹, 부틸알데히드 그룹, 말레이미드 그룹 및 석신이미드 유도체로 이루어진 군으로부터 선택되는 반응기를 갖는 것일 수 있다.
- [31] 바람직하게, 석신이미드 유도체가 석신이미딜 카르복시메틸, 석신이미딜 발레르에이트, 석신이미딜 메틸부타노에이트, 석신이미딜 메틸프로피온에이트, 석신이미딜 부타노에이트, 석신이미딜 프로피온에이트, N-하이드록시석신이미드인 또는 석신이미딜 카보네이트일 수 있다.
- [32] 바람직하게, 비펩타이드성 중합체가 양 말단에 각각 부틸알데히드 그룹과 석신이미딜 발레르에이트 반응기를 갖는 것일 수 있다.
- [33]
- [34] 다른 하나의 양태로서, 본 발명은 상기 인슐린 결합체를 포함하는 생체 내 지속성 및 안정성이 증가된 인슐린의 지속성 제제를 제공한다.
- [35] 바람직하게, 상기 제제는 당뇨병 치료용일 수 있다.
- [36]
- [37] 또 하나의 양태로서, 본 발명은 (1) 비펩타이드성 중합체를 인슐린 베타 체인의

N 말단을 제외한 아미노산 잔기에 공유결합으로 연결하는 단계; (2) 상기 (1)의 반응 혼합물로부터 인슐린 베타 체인의 N 말단을 제외한 아미노산 잔기에 비펩타이드성 중합체가 공유결합된 인슐린 연결체를 분리하는 단계; 및 (3) 분리된 연결체의 비펩타이드성 중합체의 다른 쪽 말단에 면역글로불린 Fc 영역을 공유결합으로 연결하여 비펩타이드성 중합체의 양쪽 말단이 각각 면역글로불린 Fc 영역 및 인슐린과 결합된 인슐린 결합체를 생성하는 단계를 포함하는, 인슐린 결합체의 제조방법을 제공한다.

- [38] 바람직하게, 비펩타이드성 중합체는 인슐린 베타 체인의 아미노산 잔기 측쇄의 아민 그룹 또는 티올 그룹과 펩티드(peptide), 헤미티오아세탈(hemithioacetal), 이민(imine) 또는 티오디옥소피롤리디닐(thiodioxopyrrolidinyl) 결합을 형성할 수 있다.
- [39] 바람직하게, 상기 비펩타이드성 중합체는 양 말단에 각각 독립적으로 알데히드 유도체, 말레이미드 유도체, 또는 석신이미드 유도체를 반응기로 가질 수 있다.
- [40] 바람직하게, 상기 비펩타이드성 중합체의 양 말단은 각각 인슐린 베타 체인의 N 말단을 제외한 아미노산 잔기 및 면역글로불린 Fc 영역의 아민 그룹 또는 티올 그룹(thiol group)을 통해 결합할 수 있다.
- [41] 바람직하게, 비펩타이드성 중합체는 양 말단에 각각 독립적으로 알데히드 유도체 및 석신이미드 유도체를 반응기로 가질 수 있다.
- [42] 바람직하게, 상기 (1) 단계는 pH 9.0±2의 알칼리 환경에서 수행할 수 있다.
- [43] 바람직하게, 상기 (1) 단계의 인슐린과 비펩타이드성 중합체의 몰 비는 1:1.5 내지 1:10일 수 있다.
- [44] 바람직하게, 상기 (3) 단계의 인슐린 연결체와 면역글로불린 Fc 영역의 몰 비는 1:1 내지 1:10일 수 있다.

[45]

발명의 효과

- [46] 본 발명의 인슐린 결합체는 인슐린 수용체에 대한 결합력이 현저히 증가되어 인슐린의 생체 내 활성이 현저히 향상되므로, 고효율의 인슐린의 지속형 제형 개발에 유용하게 이용될 수 있다.

[47]

도면의 간단한 설명

- [48] 도 1a 내지 도 1b는 Source 15S 컬럼을 이용하여 모노 폐길화 인슐린을 정제한 프로파일과 SDS-PAGE gel 사진이다.
- [49] 도 2 내지 도 3은 인슐린-PEG 폐길화가 베타 체인 29번 아미노산 잔기에 특이적으로 이루어졌음을 나타낸 결과이다.
- [50] 도 3은 최종 정제된 결합체의 순도 분석 결과이다.
- [51] 도 4는 인슐린 수용체에 대한 인슐린 결합체의 결합 센소 그람이다.(A)는 N 말단 인슐린 결합체이고, (B)는 B29 인슐린 결합체이며, 위쪽에서부터

아래쪽으로 각 물질의 농도는 1000, 500, 250, 125, 62.5 nM이다.

[52]

발명의 실시를 위한 최선의 형태

[53]

상기 목적을 달성하기 위한 하나의 양태로서, 본 발명은 인슐린 및 면역글로불린 Fc 영역이 폴리에틸렌글리콜, 폴리프로필렌글리콜, 에틸렌 글리콜-프로필렌 글리콜 공중합체, 폴리옥시에틸화폴리올, 폴리비닐알콜, 폴리사카라이드, 덱스트란, 폴리비닐에틸에테르, 생분해성 고분자, 지질 중합체, 키틴류, 히아루론산 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 비펩타이드성 중합체 링커를 통해 연결되고, 상기 비펩타이드성 중합체는 일 말단이 인슐린 베타 체인의 N 말단을 제외한 아미노산 잔기에 결합되고 다른 말단이 면역글로불린 Fc 영역에 결합된 것을 특징으로 하는 인슐린 결합체를 제공한다.

[54]

[55]

본 발명에서 인슐린은 체내의 혈당이 높을 때 췌장에서 분비되어 간, 근육, 지방 조직에서 당을 흡수하여 글리코젠으로 저장하도록 하며, 지방을 분해하여 에너지원으로 사용되는 것을 억제하여 혈당을 조절하는 기능을 가지는 생리활성 펩타이드의 일종이다. 본 발명에 있어서, 용어 '인슐린'은 천연형 인슐린 뿐만 아니라, 인슐린 아고니스트(agonist), 전구물질(precursors), 유도체(derivatives), 단편(fragments), 변이체(variants) 등을 포함하며 바람직하게는 천연형 인슐린, 속효성 인슐린, 지속형 인슐린 등을 제한없이 포함한다.

[56]

천연형 인슐린은 췌장에서 분비되는 호르몬으로서 일반적으로 세포 내 글루코스 흡수를 촉진하고 지방의 분해를 억제하여 체내의 혈당을 조절하는 역할을 한다. 인슐린은 혈당조절 기능이 없는 프로인슐린(proinsulin) 전구체의 형태에서 프로세싱을 거쳐 혈당조절 기능을 가지는 인슐린이 된다. 천연형 인슐린의 아미노산 서열은 하기와 같다.

[57]

[58]

-알파 체인 :

[59]

Gly-Ile-Val-Glu-Gln-Cys-Cys-Thr-Ser-Ile-Cys-Ser-Leu-Tyr-Gln-Leu-Glu-Asn-Tyr-Cys-Asn(서열번호 1)

[60]

-베타 체인 :

[61]

Phe-Val-Asn-Gln-His-Leu-Cys-Gly-Ser-His-Leu-Val-Glu-Ala-Leu-Tyr-Leu-Val-Cys-Gly-Glu-Arg-Gly-Phe-Phe-Tyr-Thr-Pro-Lys-Thr(서열번호 2)

[62]

[63]

바람직하게, 상기 인슐린은 천연형 인슐린, 천연형 인슐린에서 일부 아미노산이 치환(substitution), 추가(addition), 제거(deletion) 및 수식(modification) 중에 어느 하나의 방법 또는 이들 방법의 조합을 통해 제조된 변이체, 인슐린

유도체, 인슐린 아고니스트 또는 이들의 단편일 수 있다.

[64] 인슐린 아고니스트는 인슐린의 구조와 상관없이 인슐린의 생체 내 수용체에 결합하여 인슐린과 동일한 생물학적 활성을 나타내는 물질을 의미한다.

[65] 인슐린 유도체는 천연형 인슐린과 비교시 최소한 80% 이상 아미노산 서열에서 상동성을 보이며, 아미노산 잔기의 일부 그룹이 화학적으로 치환(예; α -methylation, α -hydroxylation), 제거(예; deamination) 또는 수식(예; N-methylation, glycosylation, fatty acid)된 형태일 수 있고, 체내에서 혈당을 조절하는 기능을 보유한 펩타이드를 의미한다.

[66] 인슐린 단편은 인슐린의 아미노 말단 또는 카르복시 말단에 하나 또는 그 이상 아미노산이 추가 또는 삭제된 형태를 의미하며 추가된 아미노산은 천연에 존재하지 않는 아미노산(예; D형 아미노산)일 수 있고, 이러한 인슐린 단편은 체내에서 혈당조절 기능을 보유한다.

[67] 인슐린 변이체는, 인슐린과 아미노산 서열이 하나 이상 다른 펩타이드로서, 체내에서 혈당조절 기능을 보유한 펩타이드를 의미한다.

[68] 또한, 인슐린 아고니스트, 유도체, 단편 및 변이체에서 각각 사용된 제조방법은 독립적으로 사용될 수 있고 조합도 가능하다. 예를 들어, 본 발명의 인슐린 펩타이드는 천연형 인슐린과 아미노산 서열이 하나 이상 다르고 N-말단 아미노산 잔기가 탈아미노화(deamination)된, 체내에서 혈당조절 기능을 보유한 펩타이드도 포함된다.

[69] 구체적인 일 양태로서 본 발명에서 사용한 인슐린은 제조합 방법을 통하여 생산될 수 있으며, Solid phase 합성법을 통하여 합성하는 방법으로도 생산 가능하다.

[70]

[71] 본 발명의 인슐린 결합체는 양 말단에 반응기를 갖는 비펩타이드성 중합체를 링커로 사용하여 중합체의 각 말단을 인슐린 베타 체인 및 면역글로불린 Fc 영역에 각각 공유결합시켜 제조한 것이 특징이다. 바람직하게, 비펩타이드성 중합체의 양 말단이 각각 면역글로불린 Fc 영역과 인슐린 베타 체인 아미노산 잔기 측쇄의 아민 그룹 또는 티올 그룹(thiol group)에 결합된 것일 수 있다.

[72] 이때, 아미노산은 천연 또는 비천연 아미노산일 수 있으나, 아민 그룹 또는 티올 그룹을 포함하여 비펩타이드성 중합체와 공유결합을 형성할 수 있는 한 제한되지 않는다.

[73]

[74] 본 발명은 인슐린의 혈중 안정성을 향상시키기 위하여 폴리에틸렌글리콜(PEG) 및 면역글로불린 불변 영역(이하, 면역글로불린 Fc 또는 Fc로 기재)와의 결합체를 제조함에 있어서, 인슐린 베타 체인 상에서 PEG-Fc의 결합 위치에 따라 인슐린 수용체에 대한 결합력이 변화함을 확인하고, 나아가 인슐린 결합력이 증가되어 활성을 향상시킬 수 있는 결합자리를 규명한 것이 특징이다. 예컨대, PEG-Fc와의 결합에 의해 혈중 안정성을 향상시키되 상기

결합이 인슐린 수용체와의 결합을 저해하여 활성을 감소시키지 않는 위치를 확인하였다. 인슐린 알파 체인의 경우 결합체를 형성할 때 활성이 현저히 감소한다는 사실이 알려져 있으므로, 인슐린의 베타 체인 상에서 최적의 결합 위치를 탐색하였다. 그 결과, 비펩타이드성 중합체의 결합 위치는 인슐린 베타 체인의 N 말단 6개 제외, 아민기 또는 티올기를 가진 임의의 아미노산 잔기일 수 있음을 확인하였다.

- [75] 바람직하게, 상기 비펩타이드성 중합체는 인슐린 베타 체인의 20 내지 29번 중 어느 하나의 아미노산 잔기에 결합된 것일 수 있다. 보다 바람직하게, 상기 비펩타이드성 중합체는 인슐린 베타 체인의 25 내지 29번 중 어느 하나의 아미노산 잔기에 결합된 것일 수 있다. 보다 더 바람직하게, 상기 비펩타이드성 중합체는 인슐린 베타 체인의 29번 라이신 잔기에 결합된 것일 수 있다.
- [76] 바람직하게, 상기 비펩타이드성 중합체가 결합하는 인슐린 베타 체인의 아미노산 잔기는 아민 그룹 또는 티올 그룹을 갖는 것일 수 있다. 예컨대, 라이신, 시스테인 또는 이들의 유도체일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [77] 본 발명의 구체적인 실시예에서는 인슐린 베타 체인의 N 말단과 29번 라이신 위치에 각각 PEG-Fc가 결합된 결합체를 제조하여, 각각의 인슐린 결합체의 인슐린 수용체에 대한 결합력을 확인하였으며, 그 결과 인슐린 베타 체인의 N 말단에 PEG-Fc가 결합된 인슐린 결합체에 비해 29번 라이신 위치에 PEG-Fc가 결합된 인슐린 결합체가 보다 높은 결합력(약 3.6배)을 나타냄을 확인하였다(실시예 4, 표 1). 이와 같이 인슐린 수용체에 대한 결합력의 증가는 해당 인슐린 결합체의 활성 증가를 의미한다.
- [78] 그러나, 상기 인슐린의 활성을 유지하고 안정성이 향상된 결합체를 제조하기 위한 비펩타이드성 중합체의 결합 위치는 인슐린 베타 체인의 29번에 한정되지 않는다. 인슐린 베타 체인, 바람직하게는 C 말단 영역, 보다 바람직하게는 20 내지 29번 중 어느 하나의 아미노산 잔기에, 보다 더 바람직하게는 25 내지 29번 중 어느 하나의 아미노산 잔기에 비펩타이드성 중합체가 연결된 결합체도 모두 본 발명의 범주에 포함된다. 예컨대, 천연형 인슐린은 베타 체인의 29번에 위치한 유일한 라이신의 ϵ -아민기를 통해 비펩타이드성 중합체와 공유결합할 수 있다. 이 외의 위치에 아민기 또는 티올기를 갖는 아미노산 잔기를 포함하는 인슐린 변이체, 유도체 등의 경우 해당 아미노산 위치에 비펩타이드성 중합체가 결합할 수 있으며, 이들 결합체 또한 본 발명의 범주에 포함된다.
- [79] 상기 인슐린의 활성을 유지하는 결합체 제조시 인슐린 베타 체인의 아미노산 잔기는 제조상의 용이성을 위하여 라이신 또는 시스테인 잔기로 치환될 수 있다. 예컨대, 인슐린 베타 체인 C 말단 영역의 아미노산 잔기가 라이신 또는 시스테인 잔기로 치환된 인슐린 유도체를 이용하여 보다 용이하게 인슐린 결합체를 제조할 수 있으며, 상기 인슐린 유도체를 이용하여 제조한 인슐린 결합체 또한 본 발명의 범주에 포함된다.

[80]

- [81] 본 발명에서 "비펩타이드성 중합체"는 반복 단위가 2개 이상 결합된 생체 적합성 중합체를 의미하며, 상기 반복 단위들은 펩타이드 결합이 아닌 임의의 공유결합을 통해 서로 연결된다. 본 발명에 사용가능한 비펩타이드성 중합체는 폴리에틸렌 글리콜, 폴리프로필렌 글리콜, 에틸렌 글리콜과 프로필렌 글리콜의 공중합체, 폴리옥시 에틸화 폴리올, 폴리비닐 알콜, 폴리사카라이드, 텍스트란, 폴리비닐 에틸 에테르, PLA(폴리락트산, polylactic acid) 및 PLGA(폴리락틱-글리콜산, polylactic-glycolic acid)와 같은 생분해성 고분자, 지질 중합체, 키틴류, 히알루론산 및 이들의 조합으로 구성된 군으로부터 선택될 수 있으며, 바람직하게는 폴리에틸렌 글리콜(PEG)일 수 있다. 당해 분야에 알려진 이들의 유도체 및 당해 분야의 기술 수준에서 용이하게 제조할 수 있는 유도체들도 본 발명의 범위에 포함된다.
- [82] 기존 인프레임 퓨전(inframe fusion) 방법으로 제조된 융합 단백질에서 사용된 펩타이드성 링커의 단점은 생체 내에서 단백질분해효소에 의해 쉽게 절단되어 캐리어에 의한 활성약물의 혈중반감기 증가 효과를 기대만큼 얻을 수 없다는 것이다. 그러나, 본 발명에서는 단백질분해효소에 저항성 있는 중합체를 사용하여 캐리어와 유사하게 펩타이드의 혈중반감기를 유지할 수 있다. 그러므로, 본 발명에서 사용될 수 있는 비펩타이드성 중합체는 상기와 같은 역할을 할 수 있는, 즉 생체 내 단백질분해 효소에 저항성 있는 중합체이면 제한없이 사용될 수 있다. 비펩타이드성 중합체는 분자량이 1 내지 100 kDa 범위, 바람직하게는 1 내지 20 kDa 범위인 것이 바람직하다. 또한, 생리활성 폴리펩타이드와 결합되는 본 발명의 비펩타이드성 중합체는 한 종류의 중합체뿐만 아니라 상이한 종류의 중합체들의 조합이 사용될 수도 있다.
- [83] 본 발명에서 사용되는 비펩타이드성 중합체는 면역글로불린 Fc 영역 및 단백질 약물과 결합될 수 있는 반응기를 가진다.
- [84] 바람직하게, 상기 비펩타이드성 중합체는 인슐린 베타 체인의 아미노산 잔기 측쇄의 아민 그룹 또는 티올 그룹과 펩티드(peptide), 헤미티오아세탈(hemithioacetal), 이민(imine) 또는 티오디옥소피롤리디닐(thiodioxopyrrolidiny) 결합을 형성할 수 있다.
- [85] 상기 비펩타이드성 중합체의 양 말단 반응기의 비제한적인 예는 프로피온알데히드 그룹, 부틸알데히드 그룹 등의 알데히드 그룹, 말레이미드(maleimide) 그룹 및 석신이미드(succinimide) 유도체 등이 있다. 상기 석신이미드 유도체로는 석신이미딜 카르복시메틸, 석신이미딜 발레르에이트, 석신이미딜 메틸부타노에이트, 석신이미딜 메틸프로피온에이트, 석신이미딜 부타노에이트, 석신이미딜 프로피온에이트, N-하이드록시석신이미드인 또는 석신이미딜 카보네이트가 이용될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니며, 면역글로불린 Fc 영역과 인슐린 베타 체인 아미노산 잔기의 아민 그룹 또는 티올 그룹과 선택적으로 공유결합을 형성할 수 있는 반응기를 제한없이 사용할 수 있다.

[86] 상기 비펩타이드성 중합체의 양 말단 반응기는 서로 같거나 다를 수 있다. 예를 들어, 한쪽 말단에는 석신이미드 그룹을, 다른 쪽 말단에는 프로피온알데히드 그룹 또는 부틸알데히드 그룹 등의 알데히드 그룹을 가질 수 있다. 양쪽 말단에 하이드록시 반응기를 갖는 폴리에틸렌글리콜을 비펩타이드성 중합체로 이용하는 경우에는 공지의 화학반응에 의해 상기 하이드록시기를 상기 다양한 반응기로 활성화하거나, 상업적으로 입수 가능한 변형된 반응기를 갖는 폴리에틸렌글리콜을 이용하여 본 발명의 단백질 결합체를 제조할 수 있다.

[87] 바람직하게, 비펩타이드성 중합체는 양 말단에 각각 부틸알데히드 그룹과 석신이미딜 발레르에이트 반응기를 가질 수 있다.

[88]

[89] 본 발명에서, "면역글로불린 Fc 영역"은, 면역글로불린의 중쇄와 경쇄 가변영역, 중쇄 불변영역 1(CH1)과 경쇄 불변영역(CL1)을 제외한, 중쇄 불변영역 2(CH2) 및 중쇄 불변영역 3(CH3)부분을 의미하며, 중쇄 불변영역에 힌지(hinge)부분을 포함하기도 한다. 또한 본 발명 의 면역글로불린 Fc 영역은 천연형과 실질적으로 동등하거나 향상된 효과를 갖는 한, 면역 글로불린의 중쇄와 경쇄 가변영역만을 제외하고, 일부 또는 전체 중쇄 불변영역 1(CH1) 및/또는 경쇄불변영역 1(CL1)을 포함하는 확장된 Fc영역일 수 있다. 또한, CH2 및/또는 CH 3에 해당하는 상당히 긴 일부 아미노산 서열이 제거된 영역일 수 도 있다. 즉, 본 발명의 면역글로불린 Fc 영역은 (1) CH1 도메인, CH2 도메인, CH3 도메인 및 CH4 도메인, (2) CH1 도메인 및 CH2 도메인, (3) CH1 도메인 및 CH3 도메인, (4) CH2 도메인 및 CH3 도메인, (5) 1개 또는 2개의 이상의 도메인과 면역글로불린 힌지 영역(또는 힌지 영역의 일부)와의 조합, (6) 중쇄 불변영역 각 도메인과 경쇄 불변영역의 이량체일 수 있다.

[90]

[91] 상기 면역글로불린 Fc 영역은 생체 내에서 대사되는 생분해성의 폴리펩타이드이기 때문에, 약물의 캐리어로 사용하기에 안전하다. 또한, 면역글로불린 Fc 영역은 면역글로불린 전체 분자에 비해 상대적으로 분자량이 적기 때문에 결합체의 제조, 정제 및 수율 면에서 유리할 뿐만 아니라 아미노산 서열이 항체마다 다르기 때문에 높은 비균질성을 나타내는 Fab 부분을 제거함으로써 물질의 동질성이 크게 증가되고 혈중 항원성의 유발 가능성도 낮아지게 되는 효과도 기대할 수 있다.

[92]

[93] 상기 면역글로불린 Fc 영역은 인간 또는 소, 염소, 돼지, 마우스, 래빗, 햄스터, 랫트, 기니아 피그 등의 동물기원일 수 있으며, 바람직하게는 인간기원이다. 또한, 면역글로불린 Fc 영역은 IgG, IgA, IgD, IgE, IgM 유래 또는 이들의 조합(combination) 또는 이들의 혼성(hybrid)에 의한 Fc 영역일 수 있다. 바람직하게는 인간 혈액에 가장 풍부한 IgG 또는 IgM 유래이며 가장 바람직하게는 리간드 결합 단백질의 반감기를 향상시키는 것으로 공지된 IgG

유래이다.

[94] 한편, 본 발명에서 "조합(combination)"이란 이량체 또는 다량체를 형성할 때, 동일 기원 단쇄 면역글로불린 Fc 영역을 암호화하는 폴리펩타이드가 상이한 기원의 단쇄 폴리펩타이드와 결합을 형성하는 것을 의미한다. 즉, IgG Fc, IgA Fc, IgM Fc, IgD Fc 및 IgE의 Fc 단편으로 이루어진 그룹으로부터 선택된 2개 이상의 단편으로부터 이량체 또는 다량체의 제조가 가능하다.

[95] 본 발명에서 "하이브리드(hybrid)"란 단쇄의 면역글로불린 Fc 영역 내에 2개 이상의 상이한 기원의 면역글로불린 Fc 단편에 해당하는 서열이 존재함을 의미하는 용어이다. 본 발명의 경우 여러 형태의 하이브리드가 가능하다. 즉, IgG Fc, IgM Fc, IgA Fc, IgE Fc 및 IgD Fc의 CH1, CH2, CH3 및 CH4로 이루어진 그룹으로부터 1개 내지 4개 도메인으로 이루어진 도메인의 하이브리드가 가능하며, 힌지를 포함할 수 있다.

[96]

[97] 한편, IgG 역시 IgG1, IgG2, IgG3 및 IgG4의 서브클래스로 나눌 수 있고 본 발명에서는 이들의 조합 또는 이들의 혼성화도 가능하다. 바람직하게는 IgG2 및 IgG4 서브클래스이며, 가장 바람직하게는 보체 의존적 독성(CDC, Complement-dependent cytotoxicity)과 같은 이펙터 기능(effector function)이 거의 없는 IgG4의 Fc 영역이다.

[98] 즉, 가장 바람직한 본 발명의 약물의 캐리어용 면역글로불린 Fc 영역은, 인간 IgG4 유래의 비-당쇄화된 Fc 영역이다. 인간 유래의 Fc 영역은 인간 생체에서 항원으로 작용하여 이에 대한 새로운 항체를 생성하는 등의 바람직하지 않은 면역 반응을 일으킬 수 있는 비-인간 유래의 Fc 영역에 비하여 바람직하다.

[99]

[100] 한편, 면역글로불린 Fc 영역은 천연형 당쇄, 천연형에 비해 증가된 당쇄, 천연형에 비해 감소한 당쇄 또는 당쇄가 제거된 형태일 수 있다. 이러한 면역글로불린 Fc 당쇄의 증감 또는 제거에는 화학적 방법, 효소학적 방법 및 미생물을 이용한 유전 공학적 방법과 같은 통상적인 방법이 이용될 수 있다. 여기서, Fc에서 당쇄가 제거된 면역글로불린 Fc 영역은 보체(c1q)의 결합력이 현저히 저하되고, 항체-의존성 세포독성 또는 보체-의존성 세포독성이 감소 또는 제거되므로, 생체 내에서 불필요한 면역반응을 유발하지 않는다. 이런 점에서 약물의 캐리어로서의 본래의 목적에 보다 부합하는 형태는 당쇄가 제거되거나 비당쇄화된 면역글로불린 Fc 영역이라 할 것이다.

[101] 본 발명에서 "당쇄의 제거(Deglycosylation)"는 효소를 이용하여 Fc 영역으로부터 당을 제거하는 것을 말하며, "비당쇄화(Aglycosylation)"는 원핵동물, 바람직하게는 대장균에서 당쇄화되지 않은 Fc 영역을 생산하는 것을 의미한다.

[102]

[103] 또한, 본 발명의 면역글로불린 Fc 영역은 천연형 아미노산 서열뿐만 아니라

이의 서열유도체(mutant)를 포함한다. 아미노산 서열 유도체란 천연 아미노산 서열중의 하나 이상의 아미노산 잔기가 결실, 삽입, 비보전적 또는 보전적 치환 또는 이들의 조합에 의하여 상이한 서열을 가지는 것을 의미한다. 예를 들면, IgG Fc의 경우 결합에 중요하다고 알려진 214 내지 238, 297 내지 299, 318 내지 322 또는 327 내지 331번 아미노산 잔기들이 변형을 위해 적당한 부위로서 이용될 수 있다. 또한, 이황화 결합을 형성할 수 있는 부위가 제거되거나, 천연형 Fc에서 N-말단의 몇몇 아미노산이 제거되거나 또는 천연형 Fc의 N-말단에 메티오닌 잔기가 부가될 수도 있는 등 다양한 종류의 유도체가 가능하다. 또한, 이펙터 기능을 없애기 위해 보체결합부위, 예로 C1q 결합부위가 제거될 수도 있고, ADCC 부위가 제거될 수도 있다. 이러한 면역글로불린 Fc 영역의 서열 유도체를 제조하는 기술은 국제특허공개 제97/34631호, 국제특허공개 제96/32478호 등에 개시되어 있다.

- [104] 분자의 활성을 전체적으로 변경시키지 않는 단백질 및 펩티드에서의 아미노산 교환은 당해 분야에 공지되어 있다(H.Neurath, R.L.Hill, The Proteins, Academic Press, New York, 1979). 가장 통상적으로 일어나는 교환은 아미노산 잔기 Ala/Ser, Val/Ile, Asp/Glu, Thr/Ser, Ala/Gly, Ala/Thr, Ser/Asn, Ala/Val, Ser/Gly, Thr/Phe, Ala/Pro, Lys/Arg, Asp/Asn, Leu/Ile, Leu/Val, Ala/Glu, Asp/Gly 간의 교환이다.
- [105] 경우에 따라서는 인산화(phosphorylation), 황화(sulfation), 아크릴화(acrylation), 당화(glycosylation), 메틸화(methylation), 파네실화(farnesylation), 아세틸화(acetylation), 아밀화(amidation) 등으로 수식(modification)될 수도 있다.
- [106] 상기 기술한 면역글로불린 Fc 유도체는 본 발명의 면역글로불린 Fc 영역과 동일한 생물학적 활성을 나타내나 면역글로불린 Fc 영역의 열, pH 등에 대한 구조적 안정성을 증대시킨 유도체일 수 있다. 또한, 이러한 면역글로불린 불변영역은 인간 및 소, 염소, 돼지, 마우스, 래빗, 햄스터, 랫트, 기니아 피그 등의 동물의 생체 내에서 분리한 천연형으로부터 얻어질 수도 있고, 형질전환된 동물세포 또는 미생물로부터 얻어진 재조합형 또는 이의 유도체일 수 있다. 여기서, 천연형으로부터 획득하는 방법은 전체 면역글로불린을 인간 또는 동물의 생체로부터 분리한 후, 단백질 분해효소를 처리하여 얻을 수 있다. 파파인을 처리할 경우에는 Fab 및 Fc로 절단되고, 펩신을 처리할 경우에는 pFc 및 F(ab)₂로 절단된다. 이를 크기 배제 크로마토그래피(size-exclusion chromatography) 등을 이용하여 Fc 또는 pFc를 분리할 수 있다.
- [107] 바람직하게는 인간 유래의 면역글로불린 Fc 영역을 미생물로부터 수득한 재조합형 면역글로불린 불변영역일 수 있다.
- [108] 본 발명에서 면역글로불린 Fc 영역과 비펩타이드성 중합체의 결합은 상기 인슐린 베타 체인과 비펩타이드성 중합체의 결합과 마찬가지로 인슐린과 결합하지 않은 비펩타이드성 중합체의 다른 말단 반응기와 면역글로불린 Fc 영역의 아미노산 잔기의 아민 그룹 또는 티올 그룹 사이의 공유결합에 의해 형성된다. 따라서, 비펩타이드성 중합체는 면역글로불린 Fc 영역의 N 말단 또는

면역글로불린 Fc 영역 내의 라이신 잔기의 아민 그룹 또는 시스테인 잔기의 티올 그룹에 결합한다. 이때, 면역글로불린 Fc 영역 상에서 비펩타이드성 중합체가 결합되는 아미노산 잔기의 위치는 제한되지 않는다.

[109]

[110] 다른 하나의 양태로서, 본 발명은 상기 인슐린 결합체를 포함하는 생체 내 활성이 증가된 인슐린의 지속성 제제를 제공한다. 바람직하게, 상기 인슐린 지속성 제제는 당뇨병 치료용일 수 있다.

[111] 또한, 본 발명은 상기 인슐린 지속성 제제를 이를 필요로 하는 개체에 투여하여 당뇨병을 치료하는 방법을 제공한다.

[112]

[113] 본 발명에서 "투여"는, 어떠한 적절한 방법으로 환자에게 소정의 물질을 도입하는 것을 의미하며, 상기 결합체의 투여 경로는 약물이 목적 조직에 도달할 수 있는 한 어떠한 일반적인 경로를 통하여 투여될 수 있다. 복강내 투여, 정맥내 투여, 근육내 투여, 피하 투여, 피내 투여, 경구 투여, 국소 투여, 비강내 투여, 폐내 투여, 직장 내 투여 등이 될 수 있으나, 이에 제한되지는 않는다. 그러나 경구 투여시, 펩타이드는 소화가 되기 때문에 경구용 조성물은 활성 약제를 코팅하거나 위에서의 분해로부터 보호되도록 제형화 하는 것이 바람직하다. 바람직하게는 주사제 형태로 투여될 수 있다. 또한, 지속성 제제는 활성 물질이 표적 세포로 이동할 수 있는 임의의 장치에 의해 투여될 수 있다.

[114] 본 발명의 결합체를 포함한 지속성 제제는 약제학적으로 허용 가능한 담체를 포함할 수 있다. 약제학적으로 허용되는 담체는 경구투여시에는 결합제, 활택제, 붕해제, 부형제, 가용화제, 분산제, 안정화제, 현탁화제, 색소, 향료 등을 사용할 수 있으며, 주사제의 경우에는 완충제, 보존제, 무통화제, 가용화제, 등장화제, 안정화제 등을 혼합하여 사용할 수 있으며, 국소투여용의 경우에는 기제, 부형제, 윤활제, 보존제 등을 사용할 수 있다. 본 발명의 지속성 제제의 제형은 상술한 바와 같은 약제학적으로 허용되는 담체와 혼합하여 다양하게 제조될 수 있다. 예를 들어, 경구 투여시에는 정제, 트로키, 캡슐, 엘릭서, 서스펜션, 시럽, 웨이퍼 등의 형태로 제조할 수 있으며, 주사제의 경우에는 단위 투약 앰플 또는 다수회 투약 형태로 제조할 수 있다. 기타, 용액, 현탁액, 정제, 환약, 캡슐, 서방형 제제 등으로 제형화할 수 있다.

[115] 한편, 제제화에 적합한 담체, 부형제 및 희석제의 예로는 락토즈, 덱스트로즈, 수크로즈, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 미정질 셀룰로즈, 폴리비닐피롤리돈, 물, 메틸하이드록시벤조에이트, 프로필하이드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 또는 광물유 등이 사용될 수 있다. 또한, 충전제, 항응집제, 윤활제, 습윤제, 향료, 방부제 등을 추가로 포함할 수 있다.

[116] 본 발명의 지속성 제제는 치료할 질환, 투여 경로, 환자의 연령, 성별 및 체중 및

질환의 중등도 등의 여러 관련 인자와 함께, 활성성분인 약물의 종류에 따라 결정된다. 본 발명의 약제학적 조성물은 생체 내 지속성 및 역가가 우수하므로, 본 발명의 약제학적 제제의 투여 횟수 및 빈도를 현저하게 감소시킬 수 있다.

[117] 본 발명의 지속성 제제는 인슐린의 생체 내 안정성을 향상시키는 동시에 활성을 유지하므로 인슐린에 의한 당뇨병 치료에 효과적이다.

[118]

[119] 또 하나의 양태로서, 본 발명은 (1) 비펩타이드성 중합체를 인슐린 베타 체인의 N 말단을 제외한 아미노산 잔기에 공유결합으로 연결하는 단계; (2) 상기 (1)의 반응 혼합물로부터 인슐린 베타 체인의 N 말단을 제외한 아미노산 잔기에 비펩타이드성 중합체가 공유결합된 인슐린 연결체를 분리하는 단계; 및 (3) 분리된 연결체의 비펩타이드성 중합체의 다른 쪽 말단에 면역글로불린 Fc 영역을 공유결합으로 연결하여 비펩타이드성 중합체의 양쪽 말단이 각각 면역글로불린 Fc 영역 및 인슐린과 결합된 인슐린 결합체를 생성하는 단계를 포함하는, 인슐린 결합체의 제조방법을 제공한다.

[120] 전술한 바와 같이, 바람직하게, 비펩타이드성 중합체는 인슐린 베타 체인의 아미노산 잔기 측쇄의 아민 그룹 또는 티올 그룹과 펩티드(peptide), 헤미티오아세탈(hemithioacetal), 이민(imine) 또는 티오디옥소피롤리디닐(thiodioxopyrrolidiny) 결합을 형성할 수 있다. 이때, 상기 비펩타이드성 중합체는 양 말단에 각각 독립적으로 알데히드 유도체, 말레이미드 유도체, 또는 석신이미드 유도체를 반응기로 갖는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[121] 전술한 바와 같이, 바람직하게, 비펩타이드성 중합체의 양 말단은 각각 인슐린 베타 체인의 N 말단을 제외한 아미노산 잔기 및 면역글로불린 Fc 영역의 아미노산 잔기 측쇄의 아민 그룹 또는 티올 그룹(thiol group)을 통해 결합할 수 있다.

[122] 바람직하게, 비펩타이드성 중합체는 양 말단에 각각 독립적으로 알데히드 유도체 및 석신이미드 유도체를 반응기로 가질 수 있다. 이때, 상기 (1) 단계는 pH 9.0±2의 알칼리 환경에서 수행할 수 있다. 상기 반응이 pH가 7 미만의 산성 환경에서 수행되는 경우 N 말단의 아민기에 비펩타이드성 중합체가 결합할 수 있다. 상기 pH 범위는 비펩타이드성 중합체의 반응기 종류 및 이와 반응하는 인슐린 베타 체인의 아미노산 잔기의 반응기의 종류 예컨대, 아민 그룹 또는 티올 그룹에 따라 조절할 수 있다. 예컨대, 비펩타이드성 중합체로서 석신이미드 유도체를 반응기로 갖는 PEG를 인슐린 내의 라이신의 아민기에 결합시키는 경우 pH 9.0로 조절함으로써 N 말단 아민기가 아닌 라이신의 아민기와 선택적으로 결합된 인슐린 연결체를 형성할 수 있다.

[123]

[124] 바람직하게, 인슐린의 베타 체인에 비펩타이드성 중합체를 연결하는 (1) 단계에서 인슐린과 중합체의 반응 몰 비는 1:1.5 내지 1:10 보다 바람직하게는

1:2일 수 있다. 또한, 바람직하게, 상기 인슐린 연결체의 비펩타이드성 중합체의 다른 말단에 면역글로불린 Fc 영역을 공유결합으로 연결하는 (3) 단계에서 인슐린 연결체와 면역글로불린 Fc 영역의 몰 비는 1:1 내지 1:10 보다 바람직하게는 1:1.2일 수 있다.

[125]

[126] 본 발명의 구체적인 실시예에서는 양 말단에 각각 독립적으로 석신이미드와 알데히드 반응기를 포함하는 PEG 링커를 사용하여 인슐린에 높은 수율로 선택적으로 폐길화시켰으며 맵핑 방법을 사용하여 상기 폐길화된 위치가 인슐린 베타 체인의 29번 잔기임을 확인하였다(도 2 내지 3). 또한, 상기와 같이 생성된 모노 폐길화된 인슐린에 면역글로불린 불변영역을 결합하여 인슐린 - 비펩타이드성 중합체 - 면역글로불린 불변영역 결합체를 제조하였다.

[127] 그리고, 제조된 인슐린 결합체의 인슐린 수용체에 대한 결합력을 확인한 결과, 인슐린의 N 말단에 PEG-Fc가 결합된 결합체에 비해 결합력이 약 3.6배 높은 것을 확인하였으며, 이는 본 발명의 결합체의 효력이 보다 우수함을 보여주는 것이다.

[128]

발명의 실시를 위한 형태

[129] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것은 아니다.

[130]

[131] **실시예 1: 인슐린의 베타 체인 29번 아미노산 폐길화(PEGylation) 반응 및 모노 폐길화된 인슐린의 정제**

[132]

[133] 인슐린 분말을 10 mM HCl에 용해시킨 후, 3.4K butyraldehyde-PEG-succinimidyl valerate(양 말단에 각각 부틸 알데히드기와 석신이미딜 발레르에이트를 작용기로 가지고 있는 PEG, Laysan Bio, Inc.미국)로 인슐린 베타 체인의 29번 아미노산 잔기에 폐길화시키기 위하여, 인슐린 : PEG의 몰 비를 1 : 2로, 인슐린 농도를 1.5 mg/ml로 하여 상온에서 약 1시간 동안 반응시켰다. 이때 반응은 60.8 mM 소듐 보레이트(Sodium Borate) pH 9.0, 45% 이소프로판올에서 이루어졌으며, 소듐 시트레이트(pH 3.0), 45% 에탄올을 포함하는 완충액과 KCl 농도 구배를 이용한 Source S 컬럼(GE Healthcare)을 사용하여 반응액으로부터 모노 폐길화된 인슐린을 정제하였다(도1a 내지 도1b).

[134]

[135] **실시예 2: 모노 폐길화된 인슐린의 폐길화 부위 확인**

[136]

[137] 상기 실시예 1에 따라 폐길화된 인슐린에서 3.4K PEG의 결합부위를 확인하기 위해 Glu-C 맵핑방법을 사용하였다. 농도 1 mg/ml의 모노 폐길화된 인슐린 50

μg 에 농도 1 mg/ml의 펩티드 내부 가수분해효소 Glu-C 10 μg 을 첨가하였다. 반응액은 50 mM HEPES, pH 7.5이며 25°C에서 8시간 동안 반응하였다. 이후 1 N HCl 50 μl 를 첨가하여 반응을 종결하였다. 맵핑은 HPLC 역상크로마토그래피를 사용하여 수행하였고 그 결과를 도 2에 나타내었다.

- [138] 도 2에 나타난 바와 같이, 인슐린 베타 체인의 29번 아미노산을 포함하는 피크가 이동하였으며, 이로부터 인슐린 베타 체인 29번 아미노산 잔기에 3.4K PEG가 결합되었음을 확인하였다.

[139]

[140] 실시예 3: 모노 폐길화된 인슐린과 면역글로불린 Fc 결합체의 제조

[141]

- [142] 인슐린-PEG-면역글로불린 Fc 단편 결합체를 제조하기 위하여, 실시예 1의 방법을 이용하여 얻은 모노 폐길화된(mono-PEGylated) 인슐린과 면역글로불린 Fc 단편의 물비가 1 : 1.2가 되도록 하고 전체 단백질 농도를 20 mg/ml로 하여 25°C에서 13시간 동안 반응시켰다. 이때 반응액은 100 mM HEPES, 2M 소듐 클로라이드 (NaCl), pH 8.2이며, 환원제로서 20 mM 소듐 시아노보로하이드라이드를 첨가하였다.

- [143] 반응이 종결된 후 Source Q 컬럼(GE Healthcare)에 Tris-HCl 완충액(pH 7.5)과 NaCl 농도 구배를 이용하여 반응액으로부터 반응하지 않은 인슐린, 반응하지 않은 면역글로불린 Fc 단편, 인슐린-PEG-면역글로불린 Fc 단편 결합체, 모노폐길화된 인슐린(인슐린-PEG)이 2개 이상 결합한 면역글로불린 Fc 단편 결합체를 분리 정제하였다.

- [144] 이후 Source ISO(GE Healthcare)를 사용하여, 잔류한 면역글로불린 Fc 및 멀티 커플링된 인슐린 결합체를 제거하여, 인슐린-PEG-면역글로불린 Fc 결합체를 얻었다. 이때, Tris-HCl(pH 7.5)가 포함된 암모늄 설페이트(Ammonium sulfate)의 농도 구배를 이용하여 용출하였다. 제조된 결합체는 역상 크로마토그래피, 이온교환 크로마토그래피, 크기배제 크로마토그래피를 이용하여 HPLC 상에서 순도를 분석하였다 (도 3).

[145]

[146] 실시예 4: 인슐린 베타 체인 내의 PEG-Fc 결합 자리에 따른 인슐린 결합체의 인슐린 수용체에 대한 결합력 측정

[147]

- [148] 인슐린의 N 말단에 PEG-Fc가 결합된 인슐린 결합체와 B29에 PEG-Fc가 결합된 인슐린 결합체의 인슐린 수용체에 대한 결합력의 확인을 위해 SPR(surface Plasmon resonance, BIACORE 3000)을 사용하였다. 인슐린 수용체로는 HEK293F 세포에서 발현시킨 ECD(extracellular domain)를 정제하여 사용하였다. 상기 인슐린 수용체를 CM5칩에 아민 결합법을 이용하여 고정화한 후, 1 μM -6.25 nM의 N 말단 또는 B29 인슐린 결합체를 흘려주어 그 결합력을 확인하였다. 이들 인슐린 결합체들은 결합완충액(HBS-EP)으로 희석하였으며, 인슐린 결합체를

고정화한 칩에 4분간 결합시킨 후, 6분간 해리 과정을 거쳤다. 그 후, 다른 농도의 인슐린 결합체들을 결합시키기 위하여 인슐린 수용체와 결합되어 있는 인슐린 결합체에 50 mM NaCl/5 mM NaOH를 약 30초 동안 흘려주었다. 결합력은 BIAevaluation 프로그램의 1:1 Langmuir binding model을 이용하여 분석하였으며, 그 결과를 도 4에 나타내었다.

- [149] 도 4에 나타난 바와 같이, N 말단 및 B29 인슐린 결합체는 모두 농도에 비례하여 인슐린 수용체와 결합하는 것을 확인하였다. 이들 인슐린 결합체들의 인슐린 수용체에 대한 결합력을 표 1에 나타내었다. 이를 살펴보면, B29 인슐린 결합체는 N 말단 인슐린 결합체에 비해 약 1.8배의 높은 결합 속도 상수 값을 보인다. 이는 B29 인슐린 결합체가 N 말단 인슐린 결합체에 비해 인슐린 수용체와의 결합을 빠르게 할 수 있다는 것을 의미한다. 또한 해리 속도 상수를 비교해 볼 때에도 B29 인슐린 결합체가 N 말단 인슐린 결합체에 비해 약 1.8배 느린 것을 알 수 있다. 이는 인슐린 수용체와 결합한 후 B29 인슐린 결합체가 보다 안정적으로 결합하고 있음을 의미한다. 결과적으로 N 말단 및 B29 인슐린 결합체의 결합력을 비교하여 보면, B29 인슐린 결합체가 N 말단 인슐린 결합체에 비해 결합력이 약 3.6배 높은 것을 확인하였다.

- [150] 표 1

[Table 1]

N 말단 인슐린 결합체 및 B29 인슐린 결합체의 인슐린 수용체에 대한 결합력 비교

인슐린 결합체	k_a (1/ms, $\times 10^5$)	k_d (1/s, $\times 10^3$)	K_D (nM)
N 말단	0.06 ± 0.01	3.86 ± 0.15	692.5 ± 50.2
B29	0.11 ± 0.02	2.15 ± 0.22	191.5 ± 50.2

- [151] k_a : association rate constant

- [152] k_d : dissociation rate constant

- [153] K_D : affinity constant

- [154]

- [155] 이상의 설명으로부터, 본 발명이 속하는 기술분야의 당업자는 본 발명이 그 기술적 사상이나 필수적 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 실시될 수 있다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 이와 관련하여, 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적인 것이 아닌 것으로서 이해해야만 한다. 본 발명의 범위는 상기 상세한 설명보다는 후술하는 특허 청구범위의 의미 및 범위 그리고 그 등가 개념으로부터 도출되는 모든 변경 또는 변형된 형태가 본 발명의 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.

청구범위

- [청구항 1] 인슐린 및 면역글로불린 Fc 영역이 폴리에틸렌글리콜, 폴리프로필렌글리콜, 에틸렌 글리콜-프로필렌 글리콜 공중합체, 폴리옥시에틸화폴리올, 폴리비닐알콜, 폴리사카라이드, 텍스트란, 폴리비닐에틸에테르, 생분해성 고분자, 지질 중합체, 키틴류, 히아루론산 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 비펩타이드성 중합체 링커를 통해 연결되고, 상기 비펩타이드성 중합체는 일 말단이 인슐린 베타 체인의 N 말단을 제외한 아미노산 잔기에 결합되고 다른 말단이 면역글로불린 Fc 영역에 결합된 것을 특징으로 하는 인슐린 결합체.
- [청구항 2] 제1항에 있어서, 상기 비펩타이드성 중합체는 인슐린 베타 체인의 20 내지 29번 중 어느 하나의 아미노산 잔기에 결합된 것을 특징으로 하는 인슐린 결합체.
- [청구항 3] 제1항에 있어서, 상기 비펩타이드성 중합체는 인슐린 베타 체인의 25 내지 29번 중 어느 하나의 아미노산 잔기에 결합된 것을 특징으로 하는 인슐린 결합체.
- [청구항 4] 제1항에 있어서, 상기 비펩타이드성 중합체는 인슐린 베타 체인의 29번 라이신 잔기에 결합된 것을 특징으로 하는 인슐린 결합체.
- [청구항 5] 제1항에 있어서, 비펩타이드성 중합체가 결합하는 인슐린 베타 체인의 아미노산 잔기는 아민 그룹 또는 티올 그룹을 갖는 것인 인슐린 결합체.
- [청구항 6] 제1항에 있어서, 상기 인슐린은 천연형 인슐린, 천연형 인슐린에서 일부 아미노산이 치환(substitution), 추가(addition), 제거(deletion) 및 수식(modification) 중에 어느 하나의 방법 또는 이들 방법의 조합을 통해 제조된 변이체, 인슐린 유도체, 인슐린 아고니스트 또는 이들의 단편인 인슐린 결합체.
- [청구항 7] 제1항에 있어서, 비펩타이드성 중합체의 양 말단이 각각 면역글로불린 Fc 영역과 인슐린 베타 체인 아미노산 잔기 측쇄의 아민 그룹 또는 티올 그룹(thiol group)에 결합된 인슐린 결합체.
- [청구항 8] 제7항에 있어서, 상기 아미노산은 천연 또는 비천연 아미노산인 인슐린 결합체.
- [청구항 9] 제1항에 있어서,

- 면역글로불린 Fc 영역이 비당쇄화됨을 특징으로 하는 인슐린 결합체.
- [청구항 10] 제1항에 있어서,
면역글로불린 Fc 영역이 CH1, CH2, CH3 및 CH4 도메인으로 이루어진 군으로부터 선택되는 1개 내지 4개 도메인으로 이루어진 인슐린 결합체.
- [청구항 11] 제10항에 있어서,
면역글로불린 Fc 영역이 힌지영역을 추가로 포함하는 인슐린 결합체.
- [청구항 12] 제1항에 있어서,
면역글로불린 Fc 영역이 IgG, IgA, IgD, IgE 또는 IgM에서 유래된 Fc 영역인 인슐린 결합체.
- [청구항 13] 제12항에 있어서,
면역글로불린 Fc 영역의 각각의 도메인이 IgG, IgA, IgD, IgE, IgM로 이루어진 군에서 선택되는 면역글로불린에서 유래된 상이한 기원을 가진 도메인의 하이브리드인 인슐린 결합체.
- [청구항 14] 제12항에 있어서,
면역글로불린 Fc 영역이 동일한 기원의 도메인으로 이루어진 단쇄 면역글로불린으로 구성된 이량체 또는 다량체인 인슐린 결합체.
- [청구항 15] 제12항에 있어서,
면역글로불린 Fc 영역이 IgG4 Fc 영역인 인슐린 결합체.
- [청구항 16] 제12항에 있어서,
면역글로불린 Fc 영역이 인간 비당쇄화 IgG4 Fc 영역인 인슐린 결합체.
- [청구항 17] 제1항에 있어서,
비펩타이드성 중합체는 인슐린 베타 체인의 아미노산 잔기 측쇄의 아민 그룹 또는 티올 그룹과 펩티드(peptide), 헤미티오아세탈(hemithioacetal), 이민(imine) 또는 티오디옥소피롤리디닐(thiodioxopyrrolidinyl) 결합을 형성하는 것인 인슐린 결합체.
- [청구항 18] 제1항에 있어서,
비펩타이드성 중합체가 양 말단에 각각 독립적으로 알데히드 그룹, 프로피온알데히드 그룹, 부틸알데히드 그룹, 말레이미드 그룹 및 석신이미드 유도체로 이루어진 군으로부터 선택되는 반응기를 갖는 인슐린 결합체.
- [청구항 19] 제18항에 있어서,
석신이미드 유도체가 석신이미딜 카르복시메틸, 석신이미딜 말레르에이트, 석신이미딜 메틸부타노에이트, 석신이미딜

메틸프로피온에이트, 석신이미딜 부타노에이트, 석신이미딜 프로피온에이트, N-하이드록시석신이미드인 또는 석신이미딜 카보네이트인 인슐린 결합체.

[청구항 20]

제18항에 있어서,

비펩타이드성 중합체가 양 말단에 각각 부틸알데히드 그룹과 석신이미딜 발레르에이트 반응기를 갖는 인슐린 결합체.

[청구항 21]

제1항 내지 제20항 중 어느 한 항의 인슐린 결합체를 포함하는 생체 내 지속성 및 안정성이 증가된 인슐린의 지속성 제제.

[청구항 22]

제21항에 있어서,

당뇨병 치료용인 지속성 제제.

[청구항 23]

(1) 비펩타이드성 중합체를 인슐린 베타 체인의 N 말단을 제외한 아미노산 잔기에 공유결합으로 연결하는 단계;

(2) 상기 (1)의 반응 혼합물로부터 인슐린 베타 체인의 N 말단을 제외한 아미노산 잔기에 비펩타이드성 중합체가 공유결합된 인슐린 연결체를 분리하는 단계; 및

(3) 분리된 연결체의 비펩타이드성 중합체의 다른 쪽 말단에 면역글로불린 Fc 영역을 공유결합으로 연결하여 비펩타이드성 중합체의 양쪽 말단이 각각 면역글로불린 Fc 영역 및 인슐린과 결합된 인슐린 결합체를 생성하는 단계를 포함하는, 제1항의 인슐린 결합체의 제조방법.

[청구항 24]

제23항에 있어서,

비펩타이드성 중합체는 인슐린 베타 체인의 아미노산 잔기 측쇄의 아민 그룹 또는 티올 그룹과 펩티드(peptide),

헤미티오아세탈(hemithioacetal), 이민(imine) 또는

티오디옥소피롤리디닐(thiodioxopyrrolidinyl) 결합을 형성하는 것인 제조방법.

[청구항 25]

제23항에 있어서,

비펩타이드성 중합체는 양 말단에 각각 독립적으로 알데히드 유도체, 말레이미드 유도체, 또는 석신이미드 유도체를 반응기로 갖는 것인 제조방법.

[청구항 26]

제23항에 있어서,

비펩타이드성 중합체의 양 말단은 각각 인슐린 베타 체인의 N 말단을 제외한 아미노산 잔기 및 면역글로불린 Fc 영역의 아미노산 잔기 측쇄의 아민 그룹 또는 티올 그룹(thiol group)을 통해 결합된 것인 제조방법.

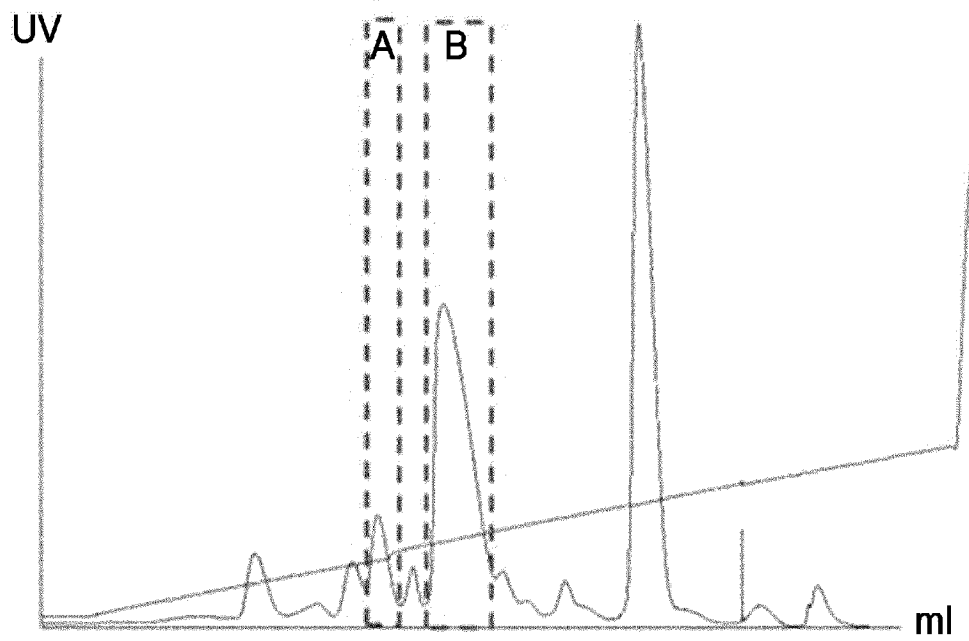
[청구항 27]

제23항에 있어서,

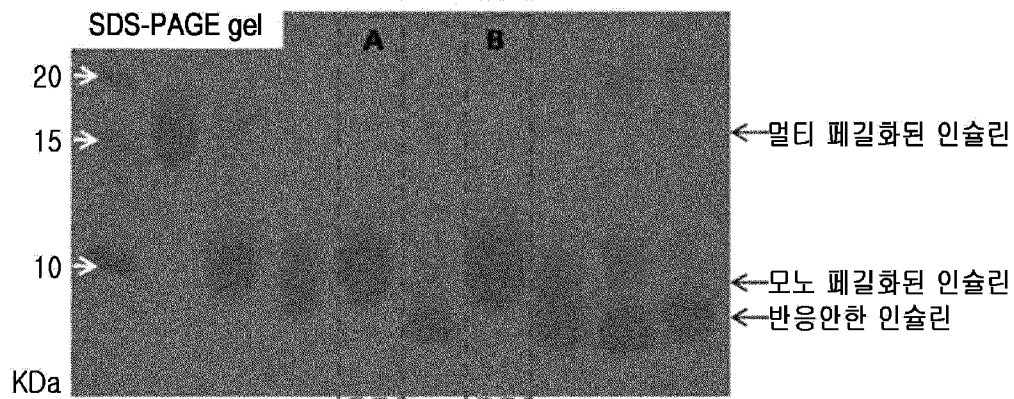
비펩타이드성 중합체가 양 말단에 각각 부틸알데히드 그룹과 석신이미딜 발레르에이트 반응기를 갖는 것인 제조방법.

- [청구항 28] 제23항에 있어서,
(1) 단계는 pH 9.0±2의 알칼리 환경에서 수행되는 것인 제조방법.
- [청구항 29] 제23항 내지 제28항 중 어느 한 항에 있어서,
상기 (1) 단계의 인슐린과 비펩타이드성 중합체의 몰 비는 1:1.5 내지 1:10인 것인 제조방법.
- [청구항 30] 제23항 내지 제28항 중 어느 한 항에 있어서,
상기 (3) 단계의 인슐린 연결체와 면역글로불린 Fc 영역의 몰 비는 1:1 내지 1:10인 것인 제조방법.

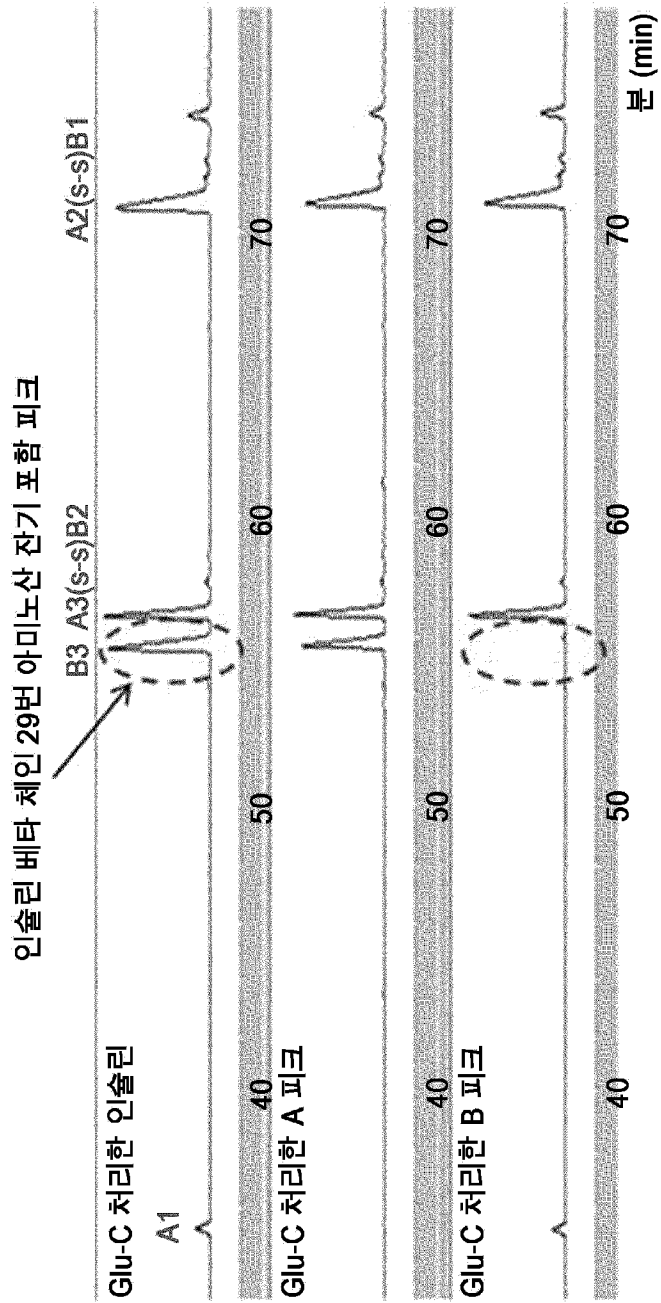
[Fig. 1a]



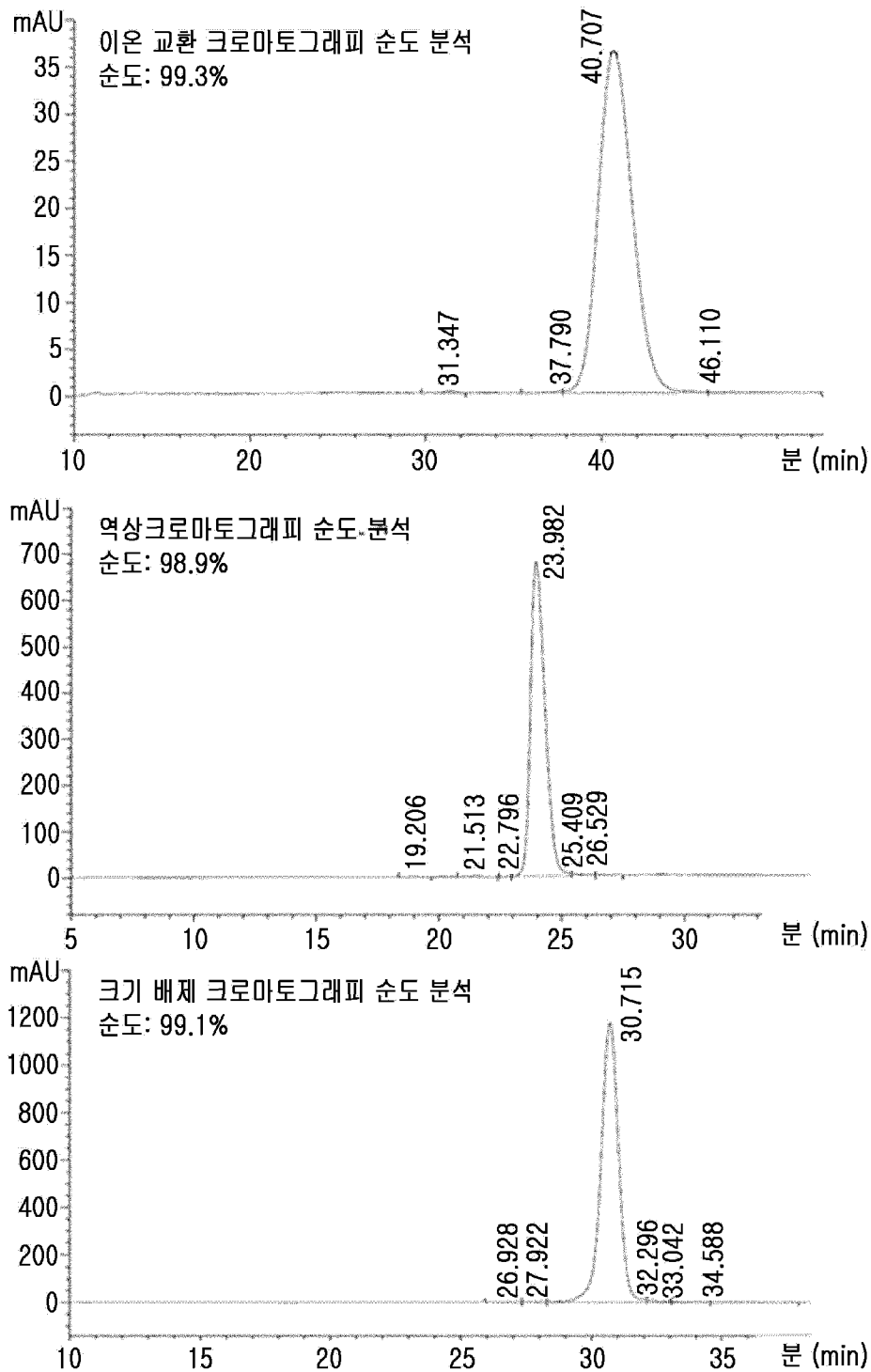
[Fig. 1b]



[Fig. 2]

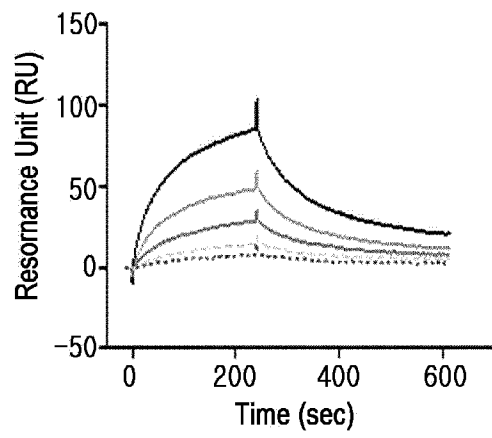


[Fig. 3]

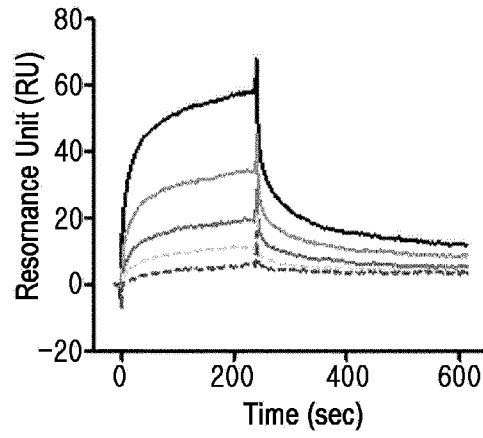


[Fig. 4]

(A)



(B)



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2014/001597**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER*****C07K 14/62(2006.01)i, C07K 17/08(2006.01)i, A61K 38/28(2006.01)i, A61P 3/10(2006.01)i***

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C07K 14/62; A61K 9/22; A61K 9/38; C07C 237/12; A61K 38/28; A61K 47/30; A61K 47/48; C07K 17/08; A61P 3/10

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Korean Utility models and applications for Utility models: IPC as above

Japanese Utility models and applications for Utility models: IPC as above

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

eKOMPASS (KIPO internal) & Keywords: insulin receptor, polyethylene glycol, immunoglobulin, B29

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	KR 10-2011-0111267 A (HANMI SCIENCE CO., LTD) 10 October 2011 See abstract; claims 1-20; and paragraph [0048].	1-30
Y	HINDS et al., "Effects of PEG conjugation on insulin properties" Advanced Drug Delivery Reviews, vol. 54, no. 4, pp. 505-530 (2002) See abstract; page 525; and figure 1.	1-30
A	KR 10-2011-0134210 A (HANMI SCIENCE CO., LTD) 14 December 2011 See the entire document.	1-30
A	WO 2011-159895 A2 (INDIANA UNIVERSITY RESEARCH AND TECHNOLOGY CORPORATION) 22 December 2011 See the entire document.	1-30
A	US 2009-0285780 A1 (LEE) 19 November 2009 See the entire document.	1-30



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

21 MAY 2014 (21.05.2014)

Date of mailing of the international search report

22 MAY 2014 (22.05.2014)

Name and mailing address of the ISA/KR

Korean Intellectual Property Office
Government Complex-Daejeon, 189 Sconsa-ro, Daejeon 302-701,
Republic of Korea

Facsimile No. 82-42-472-7140

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2014/001597

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
KR 10-2011-0111267 A	10/10/2011	CA 2795291 A1	06/10/2011
		CN 102869371 A	09/01/2013
		EP 2552474 A2	06/02/2013
		JP 2013-523722 A	17/06/2013
		TW 201204382 A	01/02/2012
		US 2013-0028918 A1	31/01/2013
		WO 2011-122921 A2	06/10/2011
		WO 2011-122921 A3	08/03/2012
KR 10-2011-0134210 A	14/12/2011	KR 10-1330868 B1	12/11/2013
WO 2011-159895 A2	22/12/2011	AU 2011-268327 A1	10/01/2013
		CA 2802485 A1	22/12/2011
		CN 103068842 A	24/04/2013
		EP 2582719 A2	24/04/2013
		EP 2582719 A4	04/12/2013
		JP 2013-533864 A	29/08/2013
		US 2013-0203665 A1	08/08/2013
		WO 2011-159895 A3	18/05/2012
US 2009-0285780 A1	19/11/2009	EP 2089052 A1	19/08/2009
		EP 2089052 A4	16/02/2011
		WO 2007-140282 A1	06/12/2007

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))

C07K 14/62(2006.01)i, C07K 17/08(2006.01)i, A61K 38/28(2006.01)i, A61P 3/10(2006.01)i

B. 조사된 분야

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)

C07K 14/62; A61K 9/22; A61K 9/38; C07C 237/12; A61K 38/28; A61K 47/30; A61K 47/48; C07K 17/08; A61P 3/10

조사된 기술분야에 속하는 최소문헌 이외의 문헌

한국등록실용신안공보 및 한국공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC
일본등록실용신안공보 및 일본공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC

국제조사에 이용된 전산 데이터베이스(데이터베이스의 명칭 및 검색어(해당하는 경우))

eKOMPASS(특허청 내부 검색시스템) & 키워드: 인슐린 결합체, 폴리에틸렌글리콜, 면역글로불린, B29

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
Y	KR 10-2011-0111267 A (한미홀딩스 주식회사) 2011.10.10 요약; 청구항 1-20; 및 문단 [0048] 참조.	1-30
Y	HINDS 외, 'Effects of PEG conjugation on insulin properties' Advanced Drug Delivery Reviews, Vol.54, No.4, pp.505-530 (2002) 요약; 페이지 525; 및 도면 1 참조.	1-30
A	KR 10-2011-0134210 A (한미홀딩스 주식회사) 2011.12.14 전체 문헌 참조.	1-30
A	WO 2011-159895 A2 (INDIANA UNIVERSITY RESEARCH AND TECHNOLOGY CORPORATION) 2011.12.22 전체 문헌 참조.	1-30
A	US 2009-0285780 A1 (LEE) 2009.11.19 전체 문헌 참조.	1-30

☐ 추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다.

☒ 대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.

* 인용된 문헌의 특별 카테고리:

“A” 특별히 관련이 없는 것으로 보이는 일반적인 기술수준을 정의한 문헌

“T” 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌

“E” 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허 문헌

“X” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신규성 또는 진보성이 없는 것으로 본다.

“L” 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌

“Y” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다.

“O” 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌

“&” 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌

“P” 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌

국제조사의 실제 완료일

2014년 05월 21일 (21.05.2014)

국제조사보고서 발송일

2014년 05월 22일 (22.05.2014)

ISA/KR의 명칭 및 우편주소

 대한민국 특허청
(302-701) 대전광역시 서구 청사로 189,
4동 (둔산동, 정부대전청사)

팩스 번호 +82-42-472-7140

심사관

김승범

전화번호 +82-42-481-3371



제1기제란 핵산염기 및/또는 아미노산 서열(첫 번째 용지의 1.c의 계속)

1. 국제출원에 개시된 핵산염기 및/또는 아미노산 서열과 관련하여, 국제조사는 다음에 기초하여 수행되었습니다.

a. 출원시 또는 추후 제출된 서열목록

☐ 서면

☒ 전자적 형태

b. 제출시기

☒ 출원시 국제출원에 포함

☐ 전자적 형태로 국제출원과 함께 제출

☐ 조사를 위해 본 기관에 추후 제출

2. ☐ 추가로 서열목록에 대하여 하나 이상의 버전이나 사본이 제출된 경우, 후속 버전 또는 추가된 사본에 기재되어 있는 정보가 출원시의 정보와 동일하거나 또는 출원시의 개시범위를 벗어나지 않는다는 진술서가 제출되었습니다.

3. 추가 의견:

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
KR 10-2011-0111267 A	2011/10/10	CA 2795291 A1 CN 102869371 A EP 2552474 A2 JP 2013-523722 A TW 201204382 A US 2013-0028918 A1 WO 2011-122921 A2 WO 2011-122921 A3	2011/10/06 2013/01/09 2013/02/06 2013/06/17 2012/02/01 2013/01/31 2011/10/06 2012/03/08
KR 10-2011-0134210 A	2011/12/14	KR 10-1330868 B1	2013/11/12
WO 2011-159895 A2	2011/12/22	AU 2011-268327 A1 CA 2802485 A1 CN 103068842 A EP 2582719 A2 EP 2582719 A4 JP 2013-533864 A US 2013-0203665 A1 WO 2011-159895 A3	2013/01/10 2011/12/22 2013/04/24 2013/04/24 2013/12/04 2013/08/29 2013/08/08 2012/05/18
US 2009-0285780 A1	2009/11/19	EP 2089052 A1 EP 2089052 A4 WO 2007-140282 A1	2009/08/19 2011/02/16 2007/12/06