



(51) 국제특허분류:

A61K 47/68 (2017.01)

A61K 38/46 (2006.01)

A61K 47/60 (2017.01)

도 화성시 동탄기흥로 550, Gyeonggi-do (KR). 권세창 (KWON, Se Chang); 18469 경기도 화성시 동탄기흥로 550, Gyeonggi-do (KR).

(21) 국제출원번호:

PCT/KR2018/008547

(74) 대리인:

손민 (SON, Min); 05836 서울시 송파구 법원로 135 대명타워 6층 한얼국제특허사무소, Seoul (KR).

(22) 국제출원일:

2018 년 7 월 27 일 (27.07.2018)

(25) 출원언어:

한국어

(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, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, 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.

(26) 공개언어:

한국어

(30) 우선권정보:

10-2017-0096470 2017 년 7 월 28 일 (28.07.2017) KR

(71) 출원인: 한미약품 주식회사 (HANMI PHARM. CO., LTD.) [KR/KR]; 18536 경기도 화성시 팔탄면 무하로 214, Gyeonggi-do (KR).

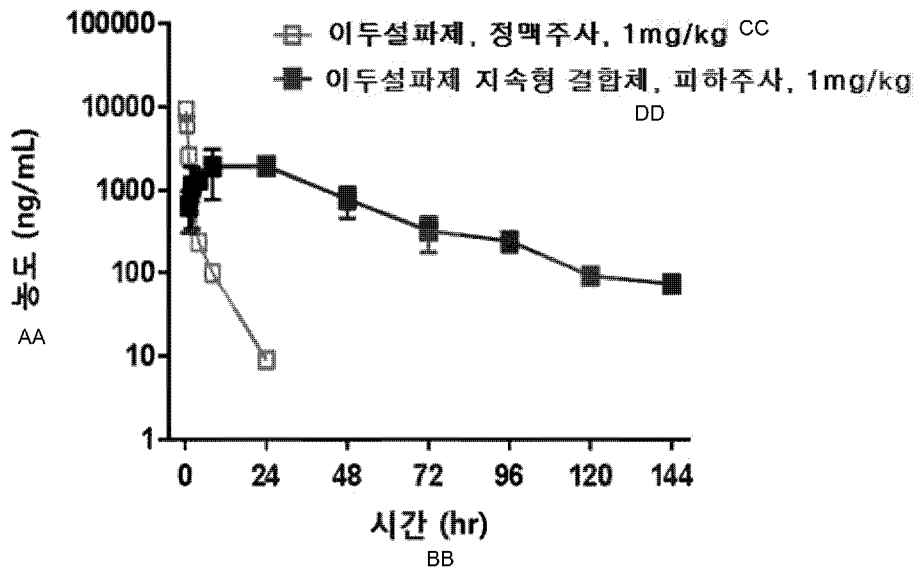
(72) 발명자: 김대진 (KIM, Dae Jin); 18469 경기도 화성시 동탄기흥로 550, Gyeonggi-do (KR). 김정국 (KIM, Jung Kuk); 18469 경기도 화성시 동탄기흥로 550, Gyeonggi-do (KR). 정성엽 (JUNG, Sung Youb); 18469 경기

(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, ST, SZ, TZ, UG, ZM,

(54) Title: IDURONATE-2-SULFATASE CONJUGATE

(54) 발명의 명칭: 이두로네이트 2-설파타제 결합체



AA ... Concentration (mg/mL)

BB ... Time (hr)

CC ... Idursulfase, intravenous injection, 1mg/kg

DD ... Sustained-release idursulfase conjugate, subcutaneous injection, 1mg/kg

(57) Abstract: The present invention relates to a conjugate in which the Fc region of an immunoglobulin is attached to an iduronate-2-sulfatase enzyme by means of a non-peptide polymer linker. Disclosed are a conjugate in which a non-peptide polymer linker is specifically attached to the Fc region of an immunoglobulin, a method for producing the conjugate, and a composition comprising same.

(57) 요약서: 본 발명은 면역글로불린 Fc 영역이 비펩타이드성 중합체 연결부를 통하여 이두로네이트 2-설파타제(iduronate-2-sulfatase) 효소에 결합한 결합체에 관한 것이다. 비펩타이드성 중합체 연결부가 면역글로불린 Fc와 특이적으로 연결된 결합체, 이의 제조 방법 및 이를 포함하는 조성물에 관한 것이다.



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

공개:

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

명세서

발명의 명칭: 이두로네이트 2-설파타제 결합체

기술분야

- [1] 본 발명은 면역글로불린 Fc 영역이 비펩타이드성 중합체 연결부를 통하여 치료학적 효소류에 결합한 치료학적 효소류 결합체, 상기 결합체의 제조 방법, 및 이를 포함하는 조성물에 관한 것이다.

[2]

배경기술

- [3] 치료학적 효소류와 같은 단백질은 일반적으로 안정성이 낮아 쉽게 변성되고 혈액 내 단백질 가수분해효소에 의해 분해되어 혈중 농도 및 역가를 유지하기 위해서는 환자에게 자주 투여할 필요가 있다. 그러나 대부분 주사제 형태로 환자에게 투여되는 단백질 의약품의 경우, 활성 폴리펩타이드의 혈중 농도를 유지하기 위해 자주 주사를 놓는 것은 환자에게 엄청난 고통을 야기하게 된다. 이러한 문제점을 해결하기 위해, 치료학적 효소류의 혈중 안정성을 증가시키고 혈중 약물 농도를 오랫동안 높게 지속시켜 약효를 극대화하려는 노력이 계속되어 왔다. 이러한 치료학적 효소류의 지속성 제제는 치료학적 효소류의 안정성을 높이는 동시에 약물 자체의 역가가 충분히 높게 유지되어야 하고 환자에게 면역반응을 유발하지 않아야 한다.
- [4] 특히, 헌터 증후군 (Hunter syndrome, 또는 Hunter disease)은 뮤코다당체침착증 II (mucopolysaccharidosis II, MPS II) 이라고도 불리며, 리소좀 축적 질환(lysosomal storage disease, LSD)의 일종이다. 상기 질환은 특정 효소의 유전적 결함으로 인해 생기는 병으로 사망에 까지 이르는 치명적인 병이며, 결함이 있는 효소의 보충치료가 필수적이다 (Frances M. Platt et al., J Cell Biol. 2012 Nov 26;199(5):723-34).
- [5] 효소 보충 치료는 리소좀 축적 질환에서 표준이 되는 치료로 부족한 효소를 보충하는 것을 통해 기존의 증상이 완화되거나 질환의 진행을 늦추는 효과를 볼 수 있다. 그러나 지속적으로 1-2주마다 2-6시간 동안 약물을 정맥으로 투여해야 된다는 점에서 환자 및 가족의 일상 생활이 제한 받을 수 있다.
- [6] 더욱이 헌터 증후군의 치료에 사용되는 재조합 효소의 경우, 사람에서의 반감기는 짧게는 10분에서 3시간 미만으로 그 지속시간이 매우 짧아 평생 효소를 투여해야 하는 환자의 불편함을 야기 하고 있어 그 반감기의 연장이 매우 필요하다.
- [7] 또한, 헌터 증후군 치료에 사용되는 효소의 생체 내 축적 위치가 상이한 문제점, 및 치료 효소가 골수에 도달하지 않는 등의 문제점이 있어, 헌터 증후군 치료제의 개발 필요성은 더욱 더 커지고 있는 상황이다.

[8]

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [9] 본 발명의 하나의 목적은 이두로네이트 2-설파타제 (iduronate-2-sulfatase)를 포함하는 효소 결합체를 제공하는 것이다.
- [10] 본 발명의 다른 하나의 목적은 상기 효소 결합체를 포함하는 리소좀 축적 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공하는 것이다.
- [11] 본 발명의 또 다른 하나의 목적은 상기 효소 결합체를 제조하는 방법을 제공하는 것이다.

[12]

과제 해결 수단

- [13] 본 발명의 하나의 양태는 이두로네이트 2-설파타제 (iduronate-2-sulfatase)와 면역글로불린 Fc 영역이 비펩타이드성 중합체 연결부를 통하여 연결된 효소 결합체를 제공한다.
- [14]
- [15] 하나의 구체적인 양태로서, 상기 이두로네이트 2-설파타제는 뮤코다당체침착증 II(mucopolysaccharidosis II, MPS II)를 치료할 수 있는 것인 효소 결합체를 제공한다.
- [16] 또 다른 하나의 구체적인 양태로서, 상기 효소 결합체는 면역글로불린 Fc 영역이 결합하지 않은 이두로네이트 2-설파타제 효소 보다 세포외배출 (transcytosis), 및 생체 이용율 (bioavailability, BA)이 증가된 것인 효소 결합체를 제공한다.
- [17] 또 다른 하나의 구체적인 양태로서, 상기 세포외배출은 면역글로불린 Fc 영역과 FcRn (neonatal Fc receptor)와의 결합에 의한 것인 효소 결합체를 제공한다.
- [18] 또 다른 하나의 구체적인 양태로서, 상기 효소 결합체는 면역글로불린 Fc 영역이 결합하지 않은 이두로네이트 2-설파타제 효소 보다 조직 분포성 (tissue distribution)이 증가된 것인 효소 결합체를 제공한다.
- [19] 또 다른 하나의 구체적인 양태로서, 상기 효소 결합체는 면역글로불린 Fc 영역이 결합하지 않은 이두로네이트 2-설파타제 효소 보다 골수 표적성이 증가된 것인 효소 결합체를 제공한다.
- [20] 또 다른 하나의 구체적인 양태로서, 상기 면역글로불린 Fc 영역은 비당쇄화된 것인 효소 결합체를 제공한다.
- [21] 또 다른 하나의 구체적인 양태로서, 상기 면역글로불린 Fc 영역은 CH1, CH2, CH3 및 CH4 도메인으로 이루어진 군으로부터 선택되는 1개 내지 4개 도메인으로 이루어진 것인 효소 결합체를 제공한다.
- [22] 또 다른 하나의 구체적인 양태로서, 상기 면역글로불린 Fc 영역은 힌지영역을 추가로 포함하는 것인 효소 결합체를 제공한다.

- [23] 또 다른 하나의 구체적인 양태로서, 상기 면역글로불린 Fc 영역이 IgG, IgA, IgD, IgE 또는 IgM에서 유래된 면역글로불린 Fc 단편인 것인 효소 결합체를 제공한다.
- [24] 또 다른 하나의 구체적인 양태로서, 상기 면역글로불린 Fc 영역의 각각의 도메인이 IgG, IgA, IgD, IgE, IgM로 이루어진 군에서 선택되는 면역글로불린에서 유래된 상이한 기원을 가진 도메인의 하이브리드인 것인 효소 결합체를 제공한다.
- [25] 또 다른 하나의 구체적인 양태로서, 상기 면역글로불린 Fc 영역은 동일한 기원의 도메인으로 이루어진 단쇄 면역글로불린으로 구성된 이량체 또는 다량체인 것인 효소 결합체를 제공한다.
- [26] 또 다른 하나의 구체적인 양태로서, 상기 면역글로불린 Fc 영역은 IgG4 Fc 단편인 것인 효소 결합체를 제공한다.
- [27] 또 다른 하나의 구체적인 양태로서, 상기 면역글로불린 Fc 영역은 인간 비당쇄화 IgG4 Fc 단편인 것인 효소 결합체를 제공한다.
- [28] 또 다른 하나의 구체적인 양태로서, 상기 효소 결합체는 이두로네이트 2-설파타제 또는 이의 유도체의 N-말단에 비펩타이드성 중합체 연결부가 결합된 것인 효소 결합체를 제공한다.
- [29] 본 발명의 또 다른 하나의 양태는 이두로네이트 2-설파타제 (iduronate-2-sulfatase) 효소 결합체를 포함하는 뮤코다당체침착증 II (mucopolysaccharidosis II, MPS II) 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.
- [30] 하나의 구체적인 양태로서, 상기 약학적 조성물은 세포외배출, 생체 이용율, 조직 분포성, 및 골수 표적성을 증가시키는 것인 약학적 조성물을 제공한다.
- [31] 본 발명의 또 다른 하나의 양태는 (a) 양 말단에 각각 같거나 서로 다른 반응성 작용기가 위치하는 비펩타이드성 중합체의 어느 한 반응성 작용기를 유리된 이두로네이트 2-설파타제(iduronate-2-sulfatase)와 반응시켜 상기 말단을 통하여 비펩타이드성 중합체가 이두로네이트 2-설파타제에 공유결합으로 연결된 연결체를 얻는 단계; 및
- [32] (b) 상기 연결체의 반응하지 않은 말단의 반응성 작용기를 생체 내 반감기를 증가시킬 수 있는 생체적합성 물질과 반응시켜 상기 연결체와 생체적합성 물질을 공유결합으로 연결하는 단계를 포함하는, 효소 결합체를 제조하는 방법을 제공한다.
- [33] 하나의 구체적인 양태로서, 상기 방법에 의해 제조되는 효소 결합체는 하기 화학식 1로 표시될 수 있다.
- [34] [화학식 1]
- [35] X-La-F
- [36] 여기서, X는 이두로네이트 2-설파타제 이고;
- [37] L은 비펩타이드성 중합체 연결부이며;
- [38]

- [39] a는 0 또는 자연수이고, 다만 a가 2이상 일 때, 각각의 L은 서로 독립적이고,
- [40] F는 X의 생체 내 반감기를 증가시킬 수 있는 물질이다.
- [41] 하나의 구체적인 양태로서, 상기 F는 고분자 중합체, 지방산, 콜레스테롤, 알부민 및 이의 단편, 알부민 결합물질, 특정 아미노산 서열의 반복단위의 중합체, 항체, 항체 단편, FcRn 결합물질, 생체 내 결합조직, 뉴클레오타이드, 파이브로넥틴, 트랜스페린(Transferrin), 사카라이드(saccharide), 헤파린, 및 엘라스틴으로 이루어진 군에서 선택되는 것인 효소 결합체를 제조하는 방법을 제공한다.
- [42] 보다 구체적인 양태로서, 상기 FcRn 결합 물질은 면역글로불린 Fc 영역인 것인, 효소 결합체를 제조하는 방법을 제공한다.
- [43] 또 다른 하나의 구체적인 양태로서, 상기 이두로네이트 2-설파타제는 뮤코다당체침착증 II (mucopolysaccharidosis II, MPS II)를 치료할 수 있는 것인 효소 결합체를 제조하는 방법을 제공한다.
- [44] 또 다른 하나의 구체적인 양태로서, 상기 비펩타이드성 중합체는 폴리에틸렌글리콜, 폴리프로필렌 글리콜, 에틸렌 글리콜-프로필렌 글리콜 공중합체, 폴리옥시에틸화폴리올, 폴리비닐알콜, 폴리사카라이드, 텍스트란, 폴리비닐에틸에테르, 생분해성 고분자, 지질 중합체, 키틴, 히아루론산 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 효소 결합체를 제조하는 방법을 제공한다.
- [45] 또 다른 하나의 구체적인 양태로서, 상기 비펩타이드성 중합체는 폴리에틸렌글리콜인 것인, 효소 결합체를 제조하는 방법을 제공한다.
- [46] 또 다른 하나의 구체적인 양태로서, 상기 (a) 단계의 비펩타이드성 중합체의 반응기는 알데하이드기, 말레이미드기 및 석신이미드 유도체로 이루어진 군으로부터 선택하는 것인 효소 결합체를 제조하는 방법을 제공한다.
- [47] 또 다른 하나의 구체적인 양태로서, 상기 알데하이드기는 프로피온 알데하이드기 또는 부틸 알데하이드기인 것인 효소 결합체를 제조하는 방법을 제공한다.
- [48] 또 다른 하나의 구체적인 양태로서, 상기 석신이미드 유도체는 석신이미딜 카르복시메틸, 석신이미딜 발레르에이트, 석신이미딜 메틸부타노에이트, 석신이미딜 메틸프로피온에이트, 석신이미딜 부타노에이트, 석신이미딜 프로피온에이트, N-하이드록시석신이미드인 또는 석신이미딜 카보네이트인 것인, 효소 결합체를 제조하는 방법을 제공한다.
- [49] 또 다른 하나의 구체적인 양태로서, 상기 반응성 작용기는 양 말단에서 모두 알데하이드기인, 효소 결합체를 제공한다.
- [50] 또 다른 하나의 구체적인 양태로서, 상기 비펩타이드성 중합체는 양 말단에 각각 알데하이드기와 및 말레이미드기를 반응성 작용기로 갖는 것인 효소 결합체를 제공한다.
- [51] 또 다른 하나의 구체적인 양태로서, 상기 비펩타이드성 중합체는 양 말단에

각각 알데하이드기와 석신이미드기를 반응성 작용기로 갖는 효소 결합체를 제공한다.

[52]

발명의 효과

[53] 본 발명의 지속형 이두로네이트 2-설파타제(iduronate-2-sulfatase) 효소 결합체는 상기 효소의 생체 내 지속성이 향상될 뿐만 아니라, 세포외배출(transcytosis), 생체 이용율, 조직 분포성, 및 골수 표적성이 향상된 효소 결합체로, 제조된 효소 결합체는 뮤코다당체침착증 II (mucopolysaccharidosis II, MPS II)의 치료에 유용하게 이용될 수 있다.

[54]

도면의 간단한 설명

[55] 도 1은 이두로네이트 2-설파타제 지속형 결합체의 PK 실험 결과를 나타낸 도이다.

[56] 도 2는 이두로네이트 2-설파타제 지속형 결합체의 in vitro 효소 활성을 나타낸 도이다.

[57] 도 3은 이두로네이트 2-설파타제 지속형 결합체의 in vitro 세포내 흡수 활성을 나타낸 도이다.

[58] 도 4는 이두로네이트 2-설파타제 지속형 결합체의 ICR 마우스에서 조직 분포(tissue distribution)를 지속형 결합체를 형성하지 않은 이두로네이트 2-설파타제와 비교하여 확인한 결과를 나타낸 도이다 (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.0005$ vs 이두로네이트 2-설파타제, 비대응 t-검정법(unpaired t-test)).

[59]

발명의 실시를 위한 최선의 형태

[60] 본 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용을 설명하면 다음과 같다. 한편, 본원에서 개시된 각각의 설명 및 실시형태는 각각의 다른 설명 및 실시 형태에도 적용될 수 있다. 즉, 본원에서 개시된 다양한 요소들의 모든 조합이 본 발명의 범주에 속한다. 또한, 하기 기술되는 구체적인 서술에 의하여 본 발명의 범주가 제한된다고 할 수 없다.

[61]

[62] 상기 목적을 달성하기 위한 본 발명의 일 양태는 이두로네이트 2-설파타제(iduronate-2-sulfatase) 효소 및 면역글로불린 Fc 영역이 비펩타이드성 중합체 연결부를 통하여 연결된, 효소 결합체를 제공한다.

[63] 본 발명의 하나의 구체예에서는, 상기 효소 결합체는 양 말단에 반응성 작용기를 갖춘 비펩타이드성 중합체를 유리 Fc 영역과 유리 이두로네이트 2-설파타제(iduronate-2-sulfatase) 효소에 반응시켜 공유결합을 형성하여 얻은 것으로서, 이 때 상기 비펩타이드성 중합체는 상기 비펩타이드성 중합체 연결부와 반복 단위들의 종류와 수, 위치 면에서 동일한 물질이다. 상기 유리 Fc

영역 및 유리 효소 반응에 사용되는 비펩타이드성 중합체는 이 반복 단위들의 양 끝에 상기 반복 단위와 화학적 구조를 달리하는 말단 반응성 작용기를 지니고 있는 물질일 수 있다. 이러한 효소 결합체의 제조 과정에서는 이 비펩타이드성 중합체의 양 말단 반응성 작용기를 통해 유리 효소 및 유리 면역글로불린 Fc 영역과 각각 화학 반응을 일으키고 이 화학 반응으로 말단 반응성 작용기가 전환되면서 생기는 공유결합으로 비펩타이드성 중합체의 반복 단위들이 효소와 Fc 영역에 각각 연결되어 있는 효소 결합체를 얻는다. 즉 본 발명의 상기 구체예에서는 비펩타이드성 중합체가 제조 과정을 거쳐 효소 결합체내 비펩타이드성 중합체 연결부로 전환된다.

[64]

[65] 본 발명의 용어, "치료학적 효소" 또는 "효소"는, 효소의 부족, 결핍, 기능 이상 등에 의해 발병되는 질병을 치료하기 위한 효소로서, 효소 대체 요법 (enzyme replacement therapy), 투여 등을 통해 상기 질병을 가진 개체를 치료할 수 있는 효소를 의미한다. 구체적으로, 특정 효소의 부족 또는 결핍 등으로 인해 발병하는 뮤코다당체침착증 II (mucopolysaccharidosis II, MPS II)의 치료를 위한 효소일 수 있고, 보다 구체적으로, 이두로네이트 2-설파타제(iduronate-2-sulfatase)일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[66]

[67] 본 발명의 용어, "뮤코다당체침착증 (mucopolysaccharidosis, MPS)"은 점액성 다당의 유전성분해효소결핍증으로서, "뮤코다당증"이라고도 알려져 있다. 리소솜 효소의 부족으로 인한 리소솜 축적 질환의 하나이다. 당사슬분해효소, 설파타아제나 아세틸기 전이 효소의 결핍 등이 원인으로 알려져 있다. 지방연골이영양증 (gargoylis) 이라고도 한다. 주증상은 요(尿)에 점액성 다당이 과잉 배설되는 것이다. 현재는 6가지 병형으로 분류하는데, I형은 후틀러 증후군(Hurler syndrome), 샤이증후군(Scheie syndrome)이고, II형은 헌터 증후군(Hunter syndrome), III형은 산필립포증후군(Sanfilippo syndrome) A, B, C, D형이고, IV형은 모르키오증후군(Morquio syndrome) A, B형, VI형은 마로트-라미증후군(Maroteaux-Lamy syndrome), VII형은 슬라이증후군(Sly syndrome)이다.

[68]

[69] 본 발명의 용어, "헌터 증후군(Hunter syndrome, Hunter disease)"은 성염색체 열성 유전병으로서, 이두로네이트 2-설파타제 (Iduronate 2-sulfatase, IDS)의 결핍에 의해 발병하며, 상기 효소의 결핍으로 헤파란 설페이트(heparan sulfate), 및 데르마탄 설페이트(dermatan sulfate)가 축적되는 것으로 알려져 있다. 기능 저하, 점진적 청력 소실, 색소성 망막변성, 울혈유두(papilledema) 및 뇌수종 등의 증상을 나타낸다. 본 발명에서 "뮤코다당체침착증 II"와 "헌터 증후군"은 혼용될 수 있다.

[70]

- [71] 본 발명의 용어, "이두로네이트 2-설파타제 결합체" 또는 "효소 결합체"는 상기 헨터 증후군의 치료 효과를 가지는 이두로네이트 2-설파타제(iduronate-2-sulfatase)가 비펩타이드성 중합체 연결부를 통해 면역글로불린 Fc 영역에 연결된 것으로, 상기 효소에 의해 헨터 증후군의 예방 또는 치료 효과를 얻을 수 있다.
- [72] 본 발명의 효소 결합체는 이두로네이트 2-설파타제 의 반감기를 증가시킬 수 있는 물질을 상기 효소와 연결함으로써, 지속성이 증가되는 효과를 가질 수 있다. 이에, 본 발명의 "효소 결합체"는 "지속형 결합체"와 혼용될 수 있다.
- [73]
- [74] 또한, 본 발명의 효소 결합체는 효소 대체 요법 (enzymatic replacement therapy, ERT)의 약물로서 사용될 수 있다. 상기 효소 대체 요법은 질환의 원인이 되는 결핍 또는 부족 효소를 보충함으로써, 저하된 효소 기능의 회복을 통해 질병을 예방 또는 치료할 수 있다.
- [75] 이두로네이트 2-설파타제가 결핍된 헨터 증후군 환자에게 본 발명의 이두로네이트 2-설파타제를 포함하는 결합체를 투여함으로써, 헨터 증후군 환자의 증상을 완화, 또는 치료할 수 있다. 또한, 본 발명의 결합체는 지속성이 증가되고, 세포외배출 및 생체내 이용율이 높은 효과를 가지므로, 적은 양의 투여로도 효과적인 헨터 증후군의 예방, 개선, 또는 치료 효과를 나타낼 수 있다.
- [76]
- [77] 구체적으로, 본 발명의 Fc 영역과 연결된 효소 결합체는 상기 Fc 영역이 FcRn과 결합하여, 세포외배출(transcytosis)이 Fc 영역이 연결되지 않은 효소에 비하여 증가되는 효과를 가진다.
- [78] FcRn을 매개로 하는 증가된 세포외배출은 효소가 Fc 영역과 연결되어 큰 분자를 형성함에도 불구하고, 세포 내 흡수율을 유지하게 도와줄 뿐만 아니라, 치료 효소가 효소 활성을 오래 유지하면서 체내에 흡수되어 효소 자체의 기능을 수행할 수 있게 함으로써, 헨터 증후군의 치료를 가능케 한다.
- [79]
- [80] 한편, 치료학적 효소류 특히 헨터 증후군 치료에 사용되는 이두로네이트 2-설파타제는 생체내 이용율 (BA, bioavailability)이 낮아 정맥주사 (iv, intravenous)로 투여 해야 하는 단점이 있으며, 이러한 정맥주사는 매번 환자가 병원을 방문해야 하는 불편함을 야기한다. 또한, 이러한 정맥주사는 알레르기 타입의 과민성 반응을 유발하여 많은 빈도수로 약물 주입 관련 부작용 (infusion reaction)을 초래한다.
- [81] 본 발명의 효소 결합체는 FcRn 결합 부위에 의한 세포외배출 (transcytosis)로 인하여 생체내 이용율을 높여 정맥주사가 아닌 피하주사를 가능케 하고, 이러한 투여 방법의 변화는 자가주사를 가능케 하여 환자의 편의성을 높이며, infusion reaction을 감소시켜 부작용을 최소화 할 수 있다.
- [82]

- [83] 또한, 치료학적 효소류 특히 헌터 증후군에 사용되는 효소 대체 요법(ERT)을 위한 효소들은 특정 조직에 쌓인 노폐물을 제거해야 하므로, 각 조직으로의 고른 분포가 매우 중요하다. 그러나 현재 사용되고 있는 ERT 효소류들은 주로 간으로 많은 분포를 나타내고 있어, 다양한 장기로의 분포를 나타낼 수 있는 약물의 개발이 필수적이다.
- [84] 본 발명의 이두로네이트 2-설파타제를 포함하는 효소 결합체는 증가된 혈중 반감기와 FcRn 결합 부위에 의한 세포외배출(transcytosis)로 인하여 간 외의 다양한 조직, 특히 골수, 비장, 신장 등에서도 생체내 농도가 높은 우수한 분포를 지니므로, 치료학적 효율을 극대화시킬 수 있다. 특히, 본 발명의 효소 결합체는 높은 골수 표적성을 나타낸다. 골수 조직은 골 내부에 존재하는 유연한 구조의 조직으로, 골수 조직으로의 표적성을 증대시킴으로써, 효소 대체 요법에 의한 골수에서의 약리 작용을 통해 추가 효과를 기대할 수 있어, 헌터 증후군을 효과적으로 치료할 수 있다.
- [85] 특히 골수에서의 질환은 뼈의 이상증상 혹은 뼈의 생성 억제, 골수에서 필수적으로 만들어져야 되는 적혈구 생성 호르몬과 혈소판 생성 호르몬의 생성 억제를 통해 빈혈 등 다양한 부작용을 야기하나 현재 상용화된 효소 치료제는 골수의 분포가 매우 낮아 상기와 같은 부작용이 빈번히 발생한다. 이러한 측면에서, 본 발명의 이두로네이트 2-설파타제를 포함하는 효소 결합체는 높은 골수 표적성을 가짐으로써, 우수한 효소 대체 요법의 치료제가 될 수 있다.
- [86]
- [87] 따라서, 본 발명의 효소 결합체는 면역글로불린 Fc 영역과 FcRn과의 결합에 의해, 면역글로불린 Fc 영역이 결합하지 않은 효소 보다 세포외배출, 생체 이용율, 조직 분포성, 및 골수 표적성이 증가한 것일 수 있다.
- [88]
- [89] 본 발명의 용어, "이두로네이트 2-설파타제(iduronate-2-sulfatase)"는, 헌터 증후군(Hunter syndrome, MPS-II)에 관계된 설파타제 효소로서, 헤파란 설페이트(heparin sulfate) 및 데르마탄 설페이트(dermatan sulfate)의 리소좀 분해에 필요한 효소이다. 본 발명의 한 구체적인 형태에서는 "이두로네이트 2-설파타제(iduronate-2-sulfatase)"로 사람 이두로네이트 2-설파타제의 한 정제 형태인 "이두설파제(idursulfase)"를 사용할 수 있다. 상기 이두설파제는 예를 들어 이두설파제 알파 또는 이두설파제 베타일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [90] 상기 이두로네이트 2-설파타제 효소는 당업계에서 알려진 방법으로 준비 또는 제조할 수 있으며, 구체적으로, 동물세포 발현 벡터를 삽입한 동물세포를 배양하여, 배양물로부터 정제할 수 있고, 또는 상업적으로 이용 가능한 효소를 구입하여 사용할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [91]
- [92] 본 발명의 일 실시예에서는 이두로네이트 2-설파타제를 면역글로불린 Fc

영역과 비펩타이드성 중합체와 연결한 결합체를 제조하였으며 (실시예 3), 상기 효소 결합체의 *in vitro* 및 *in vivo* 활성을 확인하였다(실시예 4 내지 6).

- [93] 그 결과, 효소 결합체의 이두로네이트 2-설파타제는 Fc 영역과의 결합에도 불구하고, 효소 활성을 유지하면서도, 반감기, 생체 이용율, 및 조직 분포성이 모두 증가되는 것을 확인하였다.

[94]

- [95] 본 발명의 효소 결합체에 포함될 수 있는 이두로네이트-2-설파타제는 천연형일 수 있으며, 천연형 전장(全長) 길이일 수도 있고, 그 일부로 구성된 단편일 수 있다. 혹은 이두로네이트-2-설파타제는 천연형 서열에서 일부 아미노산에 치환(substitution), 추가(addition), 제거(deletion), 수식(modification) 및 이들의 조합으로 이루어지는 군에서 선택된 변형이 일어난 효소 유도체(analog)일 수 있다. 이러한 이두로네이트-2-설파타제의 유도체가 천연형의 활성보다 증가한 활성을 가지는 경우는 물론이고, 천연형에 견주어 적어도 유의한 수준 이상의 활성을 갖는 한, 본 발명에 제한없이 포함된다.

- [96] 상기 효소 유도체는 해당 효소의 바이오시밀러와 바이오베터 형태를 포함하는데, 바이오시밀러의 예를 들자면 공지 효소와 발현 숙주의 차이, 당화의 양상과 정도의 차이, 특정 위치의 잔기가 해당 효소의 기준 서열에 비추어 볼 때 100% 치환이 아닌 경우, 그 치환 정도의 차이도 본 발명의 효소 결합체에서 사용할 수 있는 바이오시밀러 효소에 해당한다. 상기 효소는 유전자 재조합을 통해 동물세포, 대장균, 효모, 곤충세포, 식물세포, 살아있는 동물 등에서 생산할 수 있으며 생산 방법은 이에 한정되지 않으며, 상업적으로 이용 가능한 효소일 수도 있다.

- [97] 또한, 상기 효소 또는 이의 유도체와 80% 이상, 구체적으로 90% 이상, 보다 구체적으로 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 이상의 상동성을 갖는 아미노산 서열을 포함할 수 있고, 상기 효소는 재조합 기술에 의해 미생물로부터 수득하거나, 상업적으로 이용가능한 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다..

- [98] 본 발명의 용어, "상동성(homology)"은, 야생형(wild type) 단백질의 아미노산 서열 또는 이를 코딩하는 염기 서열과의 유사한 정도를 나타내기 위한 것으로서, 본 발명의 아미노산 서열 또는 염기 서열과 상기와 같은 퍼센트 이상의 동일한 서열을 가지는 서열을 포함한다. 이러한 상동성은 두 서열을 육안으로 비교하여 결정할 수도 있으나, 비교대상이 되는 서열을 나란히 배열하여 상동성 정도를 분석해 주는 생물정보 알고리즘(bioinformatic algorithm)을 사용하여 결정할 수 있다. 상기 두 개의 아미노산 서열 사이의 상동성은 백분율로 표시할 수 있다. 유용한 자동화된 알고리즘은 Wisconsin Genetics Software Package (Genetics Computer Group, Madison, W, USA)의 GAP, BESTFIT, FASTA와 TFasta 컴퓨터 소프트웨어 모듈에서 이용가능하다. 상기 모듈에서 자동화된 배열 알고리즘은 Needleman & Wunsch와 Pearson & Lipman과 Smith & Waterman 서열 배열

알고리즘을 포함한다. 다른 유용한 배열에 대한 알고리즘과 상동성 결정은 FASTP, BLAST, BLAST2, PSIBLAST와 CLUSTAL W를 포함하는 소프트웨어에서 자동화되어 있다.

[99] 상기 효소 또는 이의 유도체의 서열 및 이를 코딩하는 염기서열의 정보는 NCBI 등 공지의 데이터베이스에서 얻을 수 있다.

[100]

[101] 본 발명의 용어, "면역글로불린 Fc 영역"은 면역글로불린의 중쇄와 경쇄 가변영역, 중쇄 불변영역 1 (C_H1)과 경쇄 불변영역 1 (C_L1)을 제외한 나머지 부분을 의미하며, 면역글로불린 Fc 영역은 중쇄 불변영역에 힌지(hinge) 영역을 추가로 포함하기도 한다. 특히 면역글로불린 Fc 영역 전체 및 이의 일부를 포함하는 단편일 수 있어, 본 발명에서는 면역글로불린 Fc 영역은 면역글로불린 단편과 혼용될 수 있다.

[102] 천연형 Fc는 중쇄 불변영역 1에서 Asn297 부위에 당쇄가 존재하지만, 대장균 유래 재조합 Fc는 당쇄가 없는 형태로 발현된다. Fc에서 당쇄가 제거되면 중쇄 불변영역 1에 결합하는 Fc 감마 수용체 1,2,3과 보체(c1q)의 결합력이 저하되어 항체-의존성 세포독성 또는 보체-의존성 세포독성이 감소 또는 제거된다.

[103] 본 발명에서, "면역글로불린 불변영역"은 면역글로불린의 중쇄와 경쇄 가변영역, 중쇄 불변영역 1(CH1)과 경쇄 불변영역(CL)을 제외한, 중쇄 불변영역 2(CH2) 및 중쇄 불변영역 3(CH3) (또는 중쇄 불변영역 4(CH4) 포함)부분을 포함하는 Fc 단편을 의미할 수 있으며, 중쇄 불변영역에 힌지(hinge) 부분을 포함하기도 한다. 또한 본 발명의 면역글로불린 불변영역은 천연형과 실질적으로 동등하거나 향상된 효과를 갖는 한, 면역글로불린의 중쇄와 경쇄 가변영역만을 제외하고, 일부 또는 전체 중쇄 불변영역 1(CH1) 및/또는 경쇄 불변영역(C_L)을 포함하는 확장된 면역글로불린 불변영역일 수 있다. 또한, CH2 및/또는 CH3에 해당하는 상당히 긴 일부 아미노산 서열이 제거된 영역일 수도 있다. 즉, 본 발명의 면역글로불린 불변영역은 (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 불변영역 도메인과 면역글로불린 힌지 영역(또는 힌지 영역의 일부)과의 조합, (6) 중쇄 불변영역 각 도메인과 경쇄 불변영역의 이량체일 수 있다. 면역글로불린 Fc 단편을 비롯한 불변영역은 생체 내에서 대사되는 생분해성의 폴리펩타이드이기 때문에, 약물의 캐리어로 사용하기에 안전하다. 또한, 면역글로불린 Fc 단편은 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 부분이 제거되기 때문에 물질의 동질성이 크게 증가되고 혈중 항원성의 유발 가능성도 낮아지게 되는 효과도 기대할 수 있다.

[104] 한편, 면역글로불린 불변영역은 인간 또는 소, 염소, 돼지, 마우스, 래빗, 햄스터,

랫트, 기니아 픽 등의 동물기원일 수 있으며, 바람직하게는 인간기원이다. 또한, 면역글로불린 불변영역은 IgG, IgA, IgD, IgE, IgM 유래 또는 이들의 조합(combination) 또는 이들의 혼성(hybrid)에 의한 불변영역으로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있다. 바람직하게는 인간 혈액에 가장 풍부한 IgG 또는 IgM 유래이며 가장 바람직하게는 리간드 결합 단백질의 반감기를 향상시키는 것으로 공지된 IgG 유래일 수 있다. 본 발명에서 면역글로불린 Fc 영역은 동일한 기원의 도메인으로 이루어진 단쇄 면역글로불린으로 구성된 이량체 또는 다량체일 수 있다.

- [105] 본 발명에서 "조합(combination)"이란 이량체 또는 다량체를 형성할 때, 동일 기원 단쇄 면역글로불린 불변영역(바람직하게는 Fc 영역)을 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.
- [106] 본 발명에서 "하이브리드(hybrid)"란 단쇄의 면역글로불린 불변영역(바람직하게는 Fc 영역)내에 2개 이상의 상이한 기원의 면역글로불린 불변영역에 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 선택된 1개 내지 4개 도메인으로 이루어진 도메인의 하이브리드가 가능하며, 힌지영역을 추가로 포함할 수 있다.
- [107] IgG 역시 IgG1, IgG2, IgG3 및 IgG4의 서브클래스로 나눌 수 있고 본 발명에서는 이들의 조합 또는 이들의 혼성화된 형태도 가능하다. 구체적으로는 IgG2 및 IgG4 서브클래스이며, 더욱 구체적으로는 보체 의존적 독성(CDC, Complementdependent cytotoxicity)과 같은 이펙터 기능(effector function)이 거의 없는 IgG4의 Fc 영역일 수 있다.
- [108] 또한, 면역글로불린 불변영역은 천연형 당쇄, 천연형에 비해 증가된 당쇄, 천연형에 비해 감소한 당쇄 또는 당쇄가 제거된 형태일 수 있다. 이러한 면역글로불린 불변영역 당쇄의 증감 또는 제거에는 화학적 방법, 효소학적 방법 및 미생물을 이용한 유전 공학적 방법과 같은 통상적인 방법이 이용될 수 있다. 여기서, 면역글로불린 불변영역에서 당쇄가 제거된 면역글로불린 불변영역은 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 불변영역이라 할 것이다. 따라서, 더욱더 구체적으로는, 인간 IgG4 유래의 비-당쇄화된 Fc 영역, 즉 인간 비당쇄화 IgG4 Fc 영역을 사용할 수 있다. 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 바람직할 수 있다.

- [109] 또한, 본 발명의 면역글로불린 불변영역은 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 부가되는 등 다양한 종류의 유도체가 가능하다. 또한, 이펙터 기능을 없애기 위해 보체결합부위, 예를 들어 C1q 결합부위가 제거될 수도 있고, ADCC 부위가 제거될 수도 있다. 이러한 면역글로불린 불변영역의 서열 유도체를 제조하는 기술은 국제특허공개 제97/34631호, 국제특허공개 제96/32478호 등에 개시되어 있다.
- [110] 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. 경우에 따라서는 인산화(phosphorylation), 황화(sulfation), 아크릴화(acrylation), 당화(glycosylation), 메틸화(methylation), 파네실화(farnesylation), 아세틸화(acetylation), 아밀화(amidation) 등으로 수식(modification)될 수도 있다.
- [111]
- [112] 상기 기술한 면역글로불린 불변영역 유도체는 본 발명의 면역글로불린 불변영역과 동일한 생물학적 활성을 나타내나, 면역글로불린 불변영역의 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 pF'c 및 F(ab)2로 절단된다. 이를 크기 배제 크로마토그래피(size-exclusion chromatography) 등을 이용하여 Fc 또는 pF'c를 분리할 수 있다.
- [113] 바람직하게는 인간 유래의 면역글로불린 불변영역을 미생물로부터 수득한 재조합형 면역글로불린 불변영역일 수 있다.
- [114]
- [115] 본 발명의 용어, "비펩타이드성 중합체"는 반복 단위가 2개 이상 결합된 생체

적합성 중합체를 포함하고, "비펩타이드성 링커"와 혼용 된다. 상기 반복 단위들은 펩타이드 결합이 아닌 임의의 공유결합을 통해 서로 연결된다. 본 발명에서 비펩타이드성 중합체는 말단에 반응기를 포함하여, 결합체를 구성하는 다른 구성 요소와 반응을 통해 결합체를 형성할 수 있다.

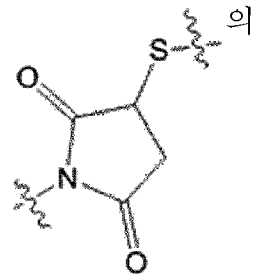
- [116] 본 발명의 용어, "비펩타이드성 중합체 연결부(linker moiety)"는 양 말단에 반응성 작용기를 갖는 비펩타이드성 중합체가 각 반응기를 통해 면역글로불린 Fc 영역 및 이두로네이트 2-설파타제 효소와 결합하여 형성한 결합체 내의 일 구성 요소를 의미한다.
- [117] 하나의 구체적인 실시 형태에서 상기 효소 결합체는 양쪽 말단에 면역글로불린 Fc 영역 및 이두로네이트 2-설파타제 효소와 결합될 수 있는 반응성 작용기를 포함하는 비펩타이드성 중합체를 통하여 면역글로불린 Fc 영역 및 이두로네이트 2-설파타제 효소가 서로 공유결합적으로 연결된 것일 수 있다.
- [118] 구체적으로, 특별히 이에 제한되지 않으나, 상기 비펩타이드성 중합체는 폴리에틸렌 글리콜, 폴리프로필렌 글리콜, 에틸렌 글리콜과 프로필렌 글리콜의 공중합체, 폴리옥시 에틸화 폴리올, 폴리비닐 알콜, 폴리사카라이드, 텍스트란, 폴리비닐 에틸에테르, PLA(poly(lactic acid)) 및 PLGA(poly(lactic-glycolic acid))와 같은 생분해성 고분자, 지질 중합체, 키틴류, 히알루론산, 올리고뉴클레오타이드 및 이들의 조합으로 구성된 군으로부터 선택되는 것일 수 있다. 보다 구체적인 실시형태에서 상기 비펩타이드성 중합체는 폴리에틸렌글리콜일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 또한, 당해 분야에 이미 알려진 이들의 유도체 및 당해 분야의 기술 수준에서 용이하게 제조할 수 있는 유도체들도 본 발명의 범위에 포함된다.
- [119] 본 발명에서 사용될 수 있는 비펩타이드성 중합체의 분자량은 0 초과 200 kDa 범위, 구체적으로, 1 내지 100 kDa 범위, 보다 구체적으로, 1 내지 50 kDa 범위, 보다 더 구체적으로, 1 내지 20kDa 범위, 보다 더 구체적으로 3.4kDa 내지 10 kDa, 범위, 보다 더 구체적으로 약 3.4kDa일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [120] 본 발명의 용어, "약"은 ± 0.5 , ± 0.4 , ± 0.3 , ± 0.2 , ± 0.1 등을 모두 포함하는 범위로, 약이란 용어 뒤에 나오는 수치와 동등하거나 유사한 범위의 수치를 모두 포함하나, 이에 제한되지 않는다.
- [121] 본 발명의 하나의 구체적인 실시 형태에서 상기 비펩타이드성 중합체의 양 말단은 각각 반응성 작용기를 갖출 수 있다. 면역글로불린 Fc 영역의 작용기, 예를 들어 아민기 또는 티올기 및 이두로네이트 2-설파타제 효소의 작용기, 예를 들어 아민기 또는 티올기와 반응하여 공유결합을 형성할 수 있는 반응성 작용기를 갖추고 있다. 이러한 반응성 작용기는 양 말단에서 서로 같을 수도 다를 수도 있다.
- [122] 더욱 구체적으로, 상기 비펩타이드성 중합체는 양쪽 말단에 각각 면역글로불린 Fc 및 이두로네이트 2-설파타제 효소와 결합될 수 있는 반응기, 구체적으로는 이두로네이트 2-설파타제 효소 혹은 면역글로불린 Fc 영역의 N-말단 또는

리신에 위치한 아민기, 또는 시스테인의 티올기와 결합될 수 있는 반응기를 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

- [123] 보다 구체적으로, 상기 비펩타이드성 중합체의 반응성 작용기는 알데하이드기, 말레이미드기 및 석신이미드 유도체로 이루어진 군으로부터 선택할 수 있으나 이에, 제한되지 않는다.
- [124] 상기에서, 알데하이드기로 프로피온 알데하이드기 또는 부틸 알데하이드기를 예로서 들 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [125] 하나의 예로서, 본 발명의 일 실시예에서 사용된 비펩타이드성 중합체는 양 말단에 모두 알데하이드(aldehyde, -CHO)기를 갖는 선형(linear) 중합체로써, 폴리에틸렌 글리콜 백본(backbone)을 갖는다. 백본을 이루는 반복 단위의 갯수에 따라 비펩타이드성 중합체의 크기가 결정되며, 비펩타이드성 중합체의 반응기인 알데하이드는 효소의 아민기, 구체적으로 리신 잔기의 -NH₂ 혹은 N 말단의 -NH₂와 공유결합 할 수 있다. 상기 비펩타이드성 중합체의 알데하이드기는 특정 반응 조건하에서 효소의 N-말단의 -NH₂와 특이적으로 반응하며 반응 후 정제 과정을 통해 효소와 공유 결합한 비펩타이드성 중합체 연결체를 얻을 수 있다.
- [126]
- [127] 상기에서, 상기 석신이미드 유도체는 석신이미딜 카르복시메틸, 석신이미딜 발레르에이트, 석신이미딜 메틸부타노에이트, 석신이미딜 메틸프로피온에이트, 석신이미딜 부타노에이트, 석신이미딜 프로피온에이트, N-하이드록시석신이미드인 또는 석신이미딜 카보네이트가 이용될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [128] 상기 비펩타이드성 중합체는 상기와 같은 반응기를 통해 면역글로불린 Fc 및 이두로네이트 2-설파타제 효소에 연결되어, 비펩타이드성 중합체 연결부로 전환될 수 있다.
- [129] 또한, 알데하이드 결합에 의한 환원성 아민화로 생성된 최종 산물은 아미드 결합으로 연결된 것보다 훨씬 안정적이다. 알데하이드 반응기는 낮은 pH에서 N-말단에 선택적으로 반응하며, 높은 pH, 예를 들어 pH 9.0 조건에서는 리신 잔기와 공유결합을 형성할 수 있다.
- [130] 본 발명의 비펩타이드성 중합체의 말단 반응성 작용기는 서로 같거나 다를 수 있다. 상기 비펩타이드성 중합체는 양 말단에서 알데하이드기를 반응성 작용기로 갖는 것일 수 있고, 또한 상기 비펩타이드성 중합체는 양 말단에 각각 알데하이드기 및 말레이미드기를 반응성 작용기로 가질 수 있거나, 양 말단에 각각 알데하이드기 및 석신이미드기를 반응성 작용기로 가질 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [131] 예를 들어, 한쪽 말단에는 말레이미드기를, 다른 쪽 말단에는 알데하이드기, 프로피온 알데하이드기 또는 부틸 알데하이드기를 반응성 작용기로 가질 수 있다. 또 한 가지 예로, 한쪽 말단에는 석시니미딜기를, 다른 쪽 말단에는

프로피온 알데하이드기 또는 부틸 알데하이드기를 가질 수 있다.

- [132] 프로피온쪽 말단에 하이드록시 반응기를 갖는 폴리(에틸렌글리콜)을 비펩타이드성 중합체로 이용하는 경우에는, 공지의 화학반응에 의해 상기 하이드록시기를 상기 다양한 반응성 작용기로 활성화하거나, 상업적으로 입수가 가능한 변형된 반응성 작용기를 갖는 폴리(에틸렌글리콜)을 이용하여 본 발명의 효소 결합체를 제조할 수 있다.
- [133] 하나의 구체적인 실시 형태에서 상기 비펩타이드성 중합체의 반응성 작용기가 이두로네이트 2-설파타제의 시스테인 잔기, 보다 구체적으로 시스테인의 -SH 기에 연결되는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [134]
- [135] 만약, 말레이미드-PEG-알데하이드를 사용하는 경우, 말레이미드 기는 이두로네이트 2-설파타제 효소의 -SH기와 티오에테르(thioether) 결합으로 연결하고, 알데하이드기는 면역글로불린 Fc의 -NH₂기와 환원적 아민화 반응을 통해 연결할 수 있으나, 이에 제한되지 않으며, 이는 하나의 일례에 해당한다.
- [136] 한 말단에 알데하이드 반응성 작용기를 지닌 폴리에틸렌글리콜을 비펩타이드성 중합체로 사용하는 본 발명의 한 구체적인 실시 형태에서는 이와 같은 환원적 아민화를 통하여 상기 PEG의 상기 말단의 마지막에 위치한 산소 원자에 -CH₂CH₂-의 구조를 가지는 링커 작용기가 비펩타이드성 중합체 연결부를 형성한다. 즉 이 구체적인 실시 형태의 효소 결합체에서는 -PEG-CH₂NH- 또는 NHCH₂CH₂CH₂-PEG-와 같은 화학적 구조의 비펩타이드성 중합체 연결부를 통하여 이두로네이트-2-설파타제가 면역글로불린 Fc에 연결된다.
- [137] 한 말단에 말레이미드 반응성 작용기를 지닌 폴리에틸렌글리콜을 비펩타이드성 중합체로 사용하는 본 발명의 다른 구체적인 실시 형태에서는 티오에테르 결합을 통하여 상기 말레이미드쪽 말단이 시스테인(예를 들어 이두로네이트 2-설파타제의 시스테인) 황 원자에 연결된 구조의 비펩타이드성 중합체 연결부를 형성할 수 있다. 상술한 티오에테르 결합은



구조를 포함할 수 있다.

- [138]
- [139] 그러나, 상술한 예에 특별히 제한되는 것은 아니며, 이는 하나의 일례에 해당한다.
- [140] 또한, 상기 결합체에서, 비펩타이드성 중합체의 반응성 작용기가 면역글로불린 Fc 영역 또는 이두로네이트 2-설파타제의 N-말단에 위치한 -NH₂와 연결된 것일 수 있으나, 이는 하나의 일례에 해당한다. 구체적으로, 본 발명의 이두로네이트

2-설파타제는 반응성 작용기를 갖는 비펩타이드성 중합체와 N-말단을 통해 연결될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[141] 본 발명의 용어, "N-말단"은, 펩타이드의 아미노 말단을 의미하는 것으로, 본 발명의 목적상 비펩타이드성 중합체와 결합할 수 있는 위치를 말한다. 그 예로, 이에 제한되지는 않으나, N-말단의 최말단 아미노산 잔기뿐만 아니라 N-말단 주위의 아미노산 잔기를 모두 포함할 수 있으며, 구체적으로는 최말단으로부터 첫 번째 내지 20 번째의 아미노산 잔기를 포함할 수 있다.

[142] 또한, 상기 결합체에서, 비펩타이드성 중합체의 반응성 작용기는 이두로네이트 2-설파타제 또는 면역글로불린 Fc 영역의 N-말단이 아닌 다른 잔기의 아민기와 연결된 것일 수 있으나, 이는 하나의 일례에 해당한다. 구체적으로, 상기 잔기는 이두로네이트-2-설파타제 또는 면역글로불린 Fc 영역의 라이신 잔기일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[143] 즉, 본 발명의 효소 결합체는 비펩타이드성 중합체의 반응성 작용기가 이두로네이트 2-설파타제 또는 면역글로불린 Fc 영역의 아민기와 공유결합하여 연결된 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[144]

[145] 본 발명의 효소 결합체는 비펩타이드성 중합체의 결합 위치에 따라 활성에 차이를 나타낼 수 있다. 즉, 비펩타이드성 중합체와 효소의 위치 특이적 결합에 따라 체내 반감기 또는 활성이 향상될 수 있다.

[146] 본 발명의 다른 양태는 이두로네이트 2-설파타제(iduronate-2-sulfatase) 결합체를 포함하는 뮤코다당체침착증 II (mucopolysaccharidosis II, MPS II) 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[147] 상기 이두로네이트 2-설파타제 결합체는 이두로네이트 2-설파타제와 면역글로불린 Fc 영역이 비펩타이드성 중합체 연결부를 통하여 연결된 것일 수 있다.

[148]

[149] 본 발명의 용어, "면역글로불린 Fc 영역", "비펩타이드성 중합체 연결부", "효소 결합체" 및 "뮤코다당체침착증 II"는 상술한 바와 같다.

[150]

[151] 본 발명의 용어, "예방"은 상기 뮤코다당체침착증 II 또는 헌터 증후군 치료를 위한 이두로네이트 2-설파타제 효소 또는 이를 포함하는 조성물의 투여로 상기 질병의 발병을 억제 또는 지연시키는 모든 행위를 의미하며, "치료"는 상기 효소 또는 이를 포함하는 조성물의 투여로 뮤코다당체침착증 II 또는 헌터 증후군의 증세가 호전되거나 이롭게 되는 모든 행위를 의미한다.

[152] 본 발명의 용어 "투여"는 어떠한 적절한 방법으로 환자에게 소정의 물질을 도입하는 것을 의미하며, 상기 조성물의 투여 경로는 특별히 이에 제한되지 않으나, 상기 조성물이 생체 내 표적에 도달할 수 있는 어떠한 일반적인 경로를 통하여 투여될 수 있으며, 예를 들어 복강 내 투여, 정맥 내 투여, 근육 내 투여,

피하 투여, 피 내 투여, 경구 투여, 국소 투여, 비 내 투여, 폐 내 투여, 또는 직장 내 투여 등이 될 수 있다.

[153]

[154] 본 발명의 뮤코다당체침작증 II (mucopolysaccharidosis II, MPS II) 예방 또는 치료용 약학적 조성물은 상기 뮤코다당체침작증 II (mucopolysaccharidosis II, MPS II)의 원인이 되는 결핍 또는 부족 효소를 상기 질환을 가진 개체에 투여함으로써, 결핍 또는 부족한 효소의 기능을 회복시켜 뮤코다당체침작증 II을 치료하는 효과를 가질 수 있다.

[155] 본 발명의 구체적인 일 양태는 세포외배출 (transcytosis), 생체 이용율, 조직 분포성, 및 골수 표적성을 증가시키는 약학적 조성물을 제공한다.

[156] 본 발명의 약학적 조성물은 이두로네이트 2-설파타제가 Fc 영역과 연결된 효소 결합체가 FcRn 수용체와의 고유 결합을 통해 상기 효소 결합체가 세포막을 용이하게 통과할 수 있도록 하는 한편, 혈관에서 조직으로 보다 효과적으로 도달할 수 있도록 한다.

[157] 이에, 세포외배출 (transcytosis), 생체 이용율, 조직 분포성, 및 골수 표적성이 증가된 효과를 가져, 우수한 뮤코다당체침작증 II 치료 효과를 나타낼 수 있다.

[158]

[159] 본 발명의 약학적 조성물은 약학적으로 허용가능한 담체, 부형제 또는 희석제를 추가로 포함할 수 있다. 이러한 약학적으로 허용가능한 담체, 부형제, 또는 희석제는 비자연적으로 발생된 것일 수 있다. 상기 담체는 특별히 이에 제한되지는 않으나, 경구 투여 시에는 결합제, 활택제, 붕해제, 부형제, 가용화제, 분산제, 안정화제, 현탁화제, 색소, 향료 등을 사용할 수 있고, 주사제의 경우에는 완충제, 보존제, 무통화제, 가용화제, 등장화제, 안정화제 등을 혼합하여 사용할 수 있으며, 국소투여용의 경우에는 기제, 부형제, 윤활제, 보존제 등을 사용할 수 있다.

[160] 본 발명에서 용어 "약학적으로 허용가능한"이란 치료효과를 나타낼 수 있을 정도의 충분한 양과 부작용을 일으키지 않는 것을 의미하며, 질환의 종류, 환자의 연령, 체중, 건강, 성별, 환자의 약물에 대한 민감도, 투여 경로, 투여 방법, 투여횟수, 치료 기간, 배합 또는 동시 사용되는 약물 등 의학 분야에 잘 알려진 요소에 따라 당업자에 의해 용이하게 결정될 수 있다.

[161] 본 발명의 조성물의 제형은 상술한 바와 같은 약학적으로 허용가능한 담체와 혼합하여 다양하게 제조될 수 있다. 예를 들어, 경구 투여 시에는 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.

[162] 한편, 제제화에 적합한 담체, 부형제 및 희석제의 예로는 락토스, 텍스트로스, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로스, 메틸

셀룰로스, 미정질 셀룰로스, 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.

[163] 또한, 본 발명의 약학적 조성물은 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제, 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제, 멸균된 수용액, 비수성용제, 동결건조제 및 좌제로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나의 제형을 가질 수 있다.

[164]

[165] 또한, 상기 조성물은 약학적 분야에서 통상의 방법에 따라 환자의 신체 내 투여에 적합한 단위 투여형의 제제, 구체적으로는 단백질 의약품의 투여에 유용한 제제 형태로 제형화시켜 당업계에서 통상적으로 사용하는 투여 방법을 이용하여 경구, 또는 피부, 정맥 내, 근육 내, 동맥 내, 골수 내, 수막강 내, 심실 내, 폐, 경피, 피하, 복 내, 비강 내, 소화관 내, 국소, 설하, 질 내 또는 직장 경로를 포함하는 비경구 투여 경로에 의하여 투여될 수 있으나, 이들에 한정되는 것은 아니다.

[166] 또한, 상기 결합체는 생리식염수 또는 유기용매와 같이 약제로 허용된 여러 전달체(carrier)와 혼합하여 사용될 수 있고, 안정성이나 흡수성을 증가시키기 위하여 글루코스, 수크로스 또는 덱스트란과 같은 탄수화물, 아스코르브산(ascorbic acid) 또는 글루타티온과 같은 항산화제(antioxidants), 킬레이트제, 저분자 단백질 또는 다른 안정화제(stabilizers) 등이 약제로 사용될 수 있다.

[167] 본 발명의 약학적 조성물의 투여량과 횟수는 치료할 질환, 투여 경로, 환자의 연령, 성별 및 체중 및 질환의 중등도 등의 여러 관련 인자와 함께, 활성성분인 약물의 종류에 따라 결정된다.

[168] 본 발명의 조성물의 총 유효량은 단일 투여량 (single dose)으로 환자에게 투여될 수 있으며, 다중 투여량 (multiple dose)으로 장기간 투여되는 분할 치료 방법 (fractionated treatment protocol)에 의해 투여될 수 있다. 본 발명의 약학적 조성물은 질환의 정도에 따라 유효성분의 함량을 달리할 수 있다. 구체적으로, 본 발명의 결합체의 바람직한 전체 용량은 하루에 환자 체중 1 kg당 약 0.0001 mg 내지 500 mg일 수 있다. 그러나 상기 결합체의 용량은 약학적 조성물의 투여 경로 및 치료 횟수뿐만 아니라 환자의 연령, 체중, 건강 상태, 성별, 질환의 중등도, 식이 및 배설을 등 다양한 요인들을 고려하여 환자에 대한 유효 투여량이 결정되는 것이므로, 이러한 점을 고려할 때 당분야의 통상적인 지식을 가진 자라면 상기 본 발명의 조성물의 특정한 용도에 따른 적절한 유효 투여량을 결정할 수 있을 것이다. 본 발명에 따른 약학적 조성물은 본 발명의 효과를 보이는 한 그 제형, 투여 경로 및 투여 방법에 특별히 제한되지 아니한다.

[169]

[170] 본 발명의 또 다른 하나의 양태는 상기 이두로네이트 2-설파타제

(iduronate-2-sulfatase) 효소 결합체를 포함하는 약학적 조성물을 이를 필요로 하는 개체에 투여하는 단계를 포함하는, 뮤코다당체침착증 II (mucopolysaccharidosis II, MPS II)의 예방 또는 치료 방법을 제공한다.

[171] 상기 효소 결합체, 이를 포함하는 조성물, 뮤코다당체침착증 II (mucopolysaccharidosis II, MPS II), 예방 및 치료에 대해서는 상술한 바와 같다.

[172]

[173] 본 발명의 용어, "개체"는 뮤코다당체침착증 II형 이 의심되는 개체로서, 상기 개체는 해당 질환이 발병하였거나 발병할 수 있는 인간을 포함한 쥐, 가축 등을 포함하는 포유 동물을 의미하나, 본 발명의 효소 결합체 혹은 이를 포함하는 상기 조성물로 치료 가능한 개체는 제한 없이 포함된다.

[174] 본 발명의 방법은 상기 효소 결합체를 포함하는 약학적 조성물을 약학적 유효량으로 투여하는 것을 포함할 수 있다. 적합한 총 1일 사용량은 올바른 의학적 판단범위 내에서 처치의에 의해 결정될 수 있으며, 1회 또는 수회로 나누어 투여할 수 있다. 그러나 본 발명의 목적상, 특정 환자에 대한 구체적인 치료적 유효량은 달성하고자 하는 반응의 종류와 정도, 경우에 따라 다른 제제가 사용되는지의 여부를 비롯한 구체적 조성물, 환자의 연령, 체중, 일반 건강 상태, 성별 및 식이, 투여 시간, 투여 경로 및 조성물의 분비율, 치료기간, 구체적 조성물과 함께 사용되거나 동시 사용되는 약물을 비롯한 다양한 인자와 의학 분야에 잘 알려진 유사 인자에 따라 다르게 적용하는 것이 바람직하다.

[175]

[176] 본 발명의 또 다른 하나의 양태는 상기 효소 결합체를 포함하는, 효소의 세포외배출, 생체 이용율, 조직 분포성, 및 골수 표적성 증가용 조성물을 제공한다.

[177] 구체적으로, 상기 효소 결합체는 이두로네이트 2-설파타제 (iduronate-2-sulfatase)와 면역글로불린 Fc 영역이 비펩타이드성 중합체 연결부를 통하여 연결된 효소 결합체일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[178]

[179] 본 발명의 또 다른 하나의 양태는 상기 효소 결합체 또는 이를 포함하는 조성물을 이를 필요로 하는 개체에 투여하는 단계를 포함하는, 효소의 세포외배출, 생체 이용율, 조직 분포성, 및 골수 표적성 증가 방법을 제공한다.

[180] 구체적으로, 상기 효소 결합체는 이두로네이트 2-설파타제 (iduronate-2-sulfatase)와 면역글로불린 Fc 영역이 비펩타이드성 중합체 연결부를 통하여 연결된 효소 결합체일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[181]

[182] 본 발명의 또 다른 하나의 양태는 상기 효소 결합체의 뮤코다당체침착증 II (mucopolysaccharidosis II, MPS II) 예방 또는 치료 용도를 제공한다.

[183] 구체적으로, 상기 효소 결합체는 이두로네이트 2-설파타제 (iduronate-2-sulfatase)와 면역글로불린 Fc 영역이 비펩타이드성 중합체 연결부를

통하여 연결된 효소 결합체일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[184]

[185] 본 발명의 또 다른 하나의 양태는 상기 효소 결합체 또는 이를 포함하는 조성물의 효소의 세포외배출, 생체 이용율, 조직 분포성, 및 골수 표적성 증가 용도를 제공한다.

[186] 상기 효소 결합체는 이두로네이트 2-설파타제 (iduronate-2-sulfatase)와 면역글로불린 Fc 영역이 비펩타이드성 중합체 연결부를 통하여 연결된 효소 결합체일 수 있다.

[187]

[188] 본 발명의 또 다른 하나의 양태는 (a) 양 말단에 각각 같거나 서로 다른 반응성 작용기가 위치하는 비펩타이드성 중합체의 어느 한 반응성 작용기를 유리된 이두로네이트 2-설파타제(iduronate-2-sulfatase)와 반응시켜 상기 말단을 통하여 비펩타이드성 중합체가 이두로네이트 2-설파타제에 공유결합으로 연결된 연결체를 얻는 단계; 및

[189] (b) 상기 연결체의 반응하지 않은 말단의 반응성 작용기를 생체 내 반감기를 증가시킬 수 있는 생체적합성 물질과 반응시켜 상기 연결체와 생체적합성 물질을 공유결합으로 연결하는 단계를 포함하는 하기 화학식 1로 표시되는 효소 결합체를 제조하는 방법을 제공한다.

[190] [화학식1]

[191] X-La-F

[192] 여기서, X는 이두로네이트 2-설파타제이고;

[193] L은 비펩타이드성 중합체 연결부이며;

[194] a는 0 또는 자연수이고, 다만 a가 2이상 일 때, 각각의 L은 서로 독립적이고,

[195] F는 X의 생체 내 반감기를 증가시킬 수 있는 물질임.

[196]

[197] 본 발명에서 상기 F는 고분자 중합체, 지방산, 콜레스테롤, 알부민 및 이의 단편, 알부민 결합물질, 특정 아미노산 서열의 반복단위의 중합체, 항체, 항체 단편, FcRn 결합물질, 생체 내 결합조직, 뉴클레오타이드, 파이브로넥틴, 트랜스페린(Transferrin), 사카라이드(saccharide), 헤파린, 및 엘라스틴으로 이루어진 군에서 선택되는 것일 수 있고, 보다 구체적으로, 상기 FcRn 결합 물질은 면역글로불린 Fc 영역일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[198] 상기 F는 X와 공유 화학결합 또는 비공유 화학결합으로 서로 결합되는 것일 수 있으며, 공유 화학결합, 비공유 화학결합 또는 이들의 조합으로 L을 통하여 F와 X가 서로 결합되는 것일 수 있다.

[199]

[200] 또한, 상기 L은 펩타이드성 중합체 또는 비펩타이드성 중합체일 수 있다.

[201] 상기 L이 펩타이드성 중합체일 때, 1개 이상의 아미노산을 포함할 수 있으며, 예컨대 1개부터 1000개의 아미노산을 포함할 수 있으나, 특별히 이에 제한되는

것은 아니다. 본 발명에서 F와 X를 연결하기 위하여 공지의 다양한 펩타이드 링커가 본 발명에 사용될 수 있으며, 그 예로 [GS] x 링커, [GGGS] x 링커 및 [GGGGGS] x 링커 등을 포함하며, 여기서 x 는 1 이상의 자연수일 수 있다. 그러나, 상기 예에 제한되는 것은 아니다.

[202]

[203] 상기 L이 비펩타이드성 중합체일 때, 상기 비펩타이드성 중합체는 폴리에틸렌글리콜, 폴리프로필렌 글리콜, 에틸렌 글리콜-프로필렌 글리콜 공중합체, 폴리옥시에틸화폴리올, 폴리비닐알콜, 폴리스카라이드, 텍스트란, 폴리비닐에틸에테르, 생분해성 고분자, 지질 중합체, 키틴, 히아루론산 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것일 수 있고, 보다 구체적으로, 폴리에틸렌글리콜일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[204]

[205] 본 발명에서 상기 a 는 0또는 자연수 일 수 있으며, a 가 0일 경우, 본 발명의 효소 결합체는 비펩타이드성 중합체를 포함하지 않고, 펩타이드 연결을 통해 (fusion) 이두로네이트 2-설파타제가 면역글로불린 Fc 영역과 결합한 연결체일 수 있다.

[206] 또한, 상기 반응성 작용기는 알데하이드기, 말레이미드기, 및 석신이미드 유도체로 이루어진 군으로부터 선택되는 것일 수 있으며, 보다 구체적으로, 상기 알데하이드 그룹은 프로피온 알데하이드기 또는 부틸 알데하이드기이거나, 상기 석신이미드 유도체는 석신이미딜 카르복시메틸, 석신이미딜 발레르에이트, 석신이미딜 메틸부타노에이트, 석신이미딜 메틸프로피온에이트, 석신이미딜 부타노에이트, 석신이미딜 프로피온에이트, N-하이드록시석신이미드인 또는 석신이미딜 카보네이트일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[207]

[208] 또한, 상기 비펩타이드성 중합체는 양 말단에 모두 알데하이드기를 반응성 작용기로 갖는 것이거나, 양 말단에 각각 알데하이드기 및 말레이미드기를 반응성 작용기로 갖는 것이거나, 양 말단에 각각 알데하이드기 및 석신이미드기를 반응성 작용기로 갖는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[209]

[210] 본 발명의 효소 결합체를 제조하는 방법은 이두로네이트 2-설파타제와 비펩타이드성 중합체가 공유결합된 연결체를 제조하는 단계; 및 상기 연결체를 면역글로불린 Fc 영역과 연결하여 결합체를 제조하여 수득하는 단계를 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[211]

[212] 본 발명의 용어, "연결체"는 효소 결합체의 제조 과정에서, 비펩타이드성 중합체를 이두로네이트 2-설파타제와 공유결합 시킨 중간체로서, 이후 상기 연결체의 비펩타이드성 중합체의 반응하지 않은 말단의 반응성 작용기를 면역글로불린 Fc 영역과 결합시켜 결합체를 제조할 수 있으나, 이에 제한되지

않는다.

[213]

[214] 또한, 본 발명의 구체적인 양태는 상기 이두로네이트 2-설파타제 효소의 N-말단에 비펩타이드성 중합체 연결부가 결합된 결합체를 분리하는 단계를 추가로 포함하는, 효소 결합체를 제조하는 방법을 제공한다.

[215]

[216] 본 발명의 제조 방법에 의해 제조된 효소 결합체는 이두로네이트 2-설파타제를 Fc 영역과 연결시킴으로써, 상기 Fc 영역이 FcRn 수용체와의 고유 결합을 통해 효소 결합체가 세포막을 용이하게 통과할 수 있도록 하는 한편, 혈관에서 조직으로 보다 효과적으로 도달할 수 있도록 한다.

[217]

상기와 같은 이두로네이트 2-설파타제 효소의 증가된 세포외배출, 생체 이용률, 및 조직 분포성은 모두 효소 결합체에 포함된, 이두로네이트 2-설파타제가 체내에서 효소 활성을 유지하면서도 효과적인 헌터 증후군의 치료 효과를 나타낼 수 있도록 한다.

[218]

또한, 본 발명의 효소 결합체는 효소 또는 이의 유도체 (analog)의 반감기를 증가시키는 것일 수 있다.

[219]

[220] 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.

[221]

[222] **실시예 1: 이두로네이트 2-설파타제 효소의 준비**

[223]

[224] 본 발명의 이두로네이트 2-설파타제 효소 결합체를 제조하기 위해, 다음과 같은 과정을 수행하였다. 먼저, 상기 이두로네이트 2-설파타제는 Shire 사에서 제조된 Elaprase를 이용하였다.

[225]

[226] **실시예 2: 효소 결합체 제조-1**

[227]

[228] 실시예 1의 이두로네이트 2-설파타제 효소의 아민기에 비펩타이드성 중합체를 공유 결합으로 연결시킨 이두로네이트 2-설파타제 연결체를 제조하고 정제하였다.

[229]

[230] 10 kDa 알데하이드-폴리에틸렌글리콜-알데하이드(NOF (Japan), M12N535, 10 kDa, ALD-PEG-ALD) 링커를 이두로네이트 2-설파타제의 아민기에 결합시키기 위하여, 이두로네이트 2-설파타제와 10 kDa ALD-PEG-ALD 의 몰 비율 1:20으로, 이두로네이트 2-설파타제의 농도를 10 mg/mL로 4 내지 8 °C에서 약 2시간 반응시켰다. 이때 반응은 100 mM 인산칼륨(Potassium phosphate) pH 6.0에서

이루어졌고, 환원제로서 20 mM 소듐 시아노보로하이드라이드(Sodium cyanoborohydride)를 첨가하였다. 반응액은 10 mM 인산나트륨(Sodium phosphate) pH 6.0이 포함된 버퍼와 염화나트륨 농도 구배를 이용한 Source 15Q(미국 GE사) 컬럼을 사용하여 반응하지 않은 이두로네이트 2-설파타제를 모노 결합된 이두로네이트 2-설파타제 연결체로부터 정제하여 내었다.

[231]

[232] **실시예 3: 효소 결합체 제조-2**

[233]

[234] 실시예 2에서 정제한 비펩타이드성 중합체와 이두로네이트 2-설파타제의 연결체에 면역글로불린 Fc 영역을 결합시킨다.

[235]

[236] 상기 정제된 이두로네이트 2-설파타제 연결체와 면역글로불린 Fc 단편의 물비가 1:10이 되도록 하고, 전체 단백질 농도를 70~75 mg/mL로 하여 4 내지 8 에서 약 16시간 반응시켰다. 이때 반응액은 100 mM 인산칼륨 pH 6.0이며, 환원제로서 20 mM 소듐 시아노보로하이드라이드를 첨가하였다. 반응이 종료된 후, 상기 반응액을 10 mM 인산나트륨 pH 6.0 버퍼와 염화나트륨 농도 구배를 이용한 Source 15Q (GE, 미국) 컬럼과 20 mM 인산나트륨 pH 6.0 버퍼와 황산암모늄 농도 구배를 이용한 Source 15Iso(미국 GE사) 컬럼에 적용하였으며, 마지막으로 20mM 트리스(Tris) pH 7.5, 5%(v/v) 글리세롤과 100mM 구연산 1수화물 pH 3.7, 150mM 염화나트륨, 10% 글리세롤 버퍼의 농도 구배를 이용한 Protein A(미국 GE사)에 적용하여 이두로네이트 2-설파타제에 면역글로불린 Fc가 폴리에틸렌글리콜 링커에 의해 공유결합으로 연결된 결합체를 정제하였다.

[237]

[238] 본 실시예에서 최종적으로 제조된 이두로네이트 2-설파타제 결합체는 이두로네이트 2-설파타제 단량체의 N-말단이 두 개의 사슬로 이루어진 면역글로불린 Fc의 한 쪽 사슬에(N-말단 프롤린) 폴리에틸렌글리콜 링커로 연결된 형태이다.

[239]

[240] **실시예 4: 이두로네이트 2-설파타제 지속형 결합체의 약물 동력학 실험**

[241]

[242] 본 발명자들은 상기 실시예에서 제조한 이두로네이트 2-설파타제 효소 결합체의 약물 동력학을 조사하여 결합체의 효과를 확인하고자 하였다.

[243]

[244] 이를 위해, 각 군 별 채혈시점당 3 마리의 ICR 마우스(mouse)에 이두로네이트 2-설파타제(Idursulfase, 대조군) 와 상기 실시예에서 제조한 이두로네이트 2-설파타제 지속형 결합체의 혈액 내 안정성 및 약물 동력학 계수를 비교하였다.

[245]

[246] 구체적으로, 대조군은 이두로네이트 2-설파타제 각 1 mg/kg 씩 정맥 내 주사한 후 0, 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 8, 24, 48, 72, 96, 120 및 144시간 후에 채혈하였고, 실험군은 이두로네이트 2-설파타제 지속형 결합체를 이두로네이트 2-설파타제 기준으로 각 1 mg/kg 씩 피하 주사 후 0, 1, 2, 4, 8, 24, 48, 72, 96, 120 및 144 시간 후에 채혈하였다. 혈청 내 단백질 양은 이두로네이트 2-설파타제에 대한 항체를 이용하여 ELISA 방법으로 측정하였다.

[247]

[248] 약물동력학 분석 결과를 도 1에 나타내었다.

[249]

[250] 구체적으로, 이두로네이트 2-설파타제 지속형 결합체의 경우 대조군에 대비하여 혈중 반감기, 및 약물분자에 대한 체내 노출 정도(area under curve, AUC)가 모두 증가하는 것을 확인하였다. 특히, 이두로네이트 2-설파타제의 혈중 반감기는 4.5 시간인데 비해 이두로네이트 2-설파타제 지속형 결합체는 30.6 시간으로 약 7 배 이상 월등히 우수한 혈중 반감기를 나타냄을 확인하였으며, 체내 노출 정도 역시 약 9 배 이상 증대되었음을 확인하였다.

[251]

[252] 본 발명자들은 제조된 각 효소 결합체의 In vitro 활성을 하기와 같이 확인하고자 하였다.

[253]

[254] 실시예 5: 이두로네이트 2-설파타제 효소 결합체의 활성 확인

[255]

[256] 실시예 5-1: 이두로네이트 2-설파타제 지속형 결합체의 In vitro 효소 활성

[257] 본 발명자들은 이두로네이트 2-설파타제의 지속형 결합체 제조에 따른 효소 활성 변화를 측정하고자 in vitro 시험관 효소 활성 측정을 진행하였다.

[258]

[259] 구체적으로, 효소 기질로 알려진 4-Methylumbelliferyl α -L-Idopyranosiduronic Acid-2-sulfate Sodium Salt (4MU- α -IdopyraA-2) 를 이두로네이트 2-설파타제 및 이두로네이트 2-설파타제 지속형 결합체와 37°C에서 4시간 반응 후, 이차반응 효소인 α -이두로나제 (Iduronidase) 와 다시 37°C에서 24시간 반응하였다. 최종적으로 생성되는 4-Methylumbelliferone (4MU) 에 대한 형광을 측정함으로써 해당 물질에 대한 효소 활성을 측정하였다.

[260]

[261] 그 결과, 이두로네이트 2-설파타제와 이두로네이트 2-설파타제 지속형 결합체의 효소 활성 (specific activity)이 각각 21.6 ± 3.63 , 18.5 ± 3.12 nmol/min/ μ g 임을 확인하였다. 결론적으로 이두로네이트 2-설파타제 대비, 이두로네이트 2-설파타제 지속형 결합체의 효소 활성이 85.7 % 로 이러한 효소활성의 감소는 지속형 결합체의 결합 (conjugation) 으로 개선된 PK에 의해 보상될 수 있다 (도 2).

[262]

[263] 실시예 5-2: 이두로네이트 2-설파타제 지속형 결합체의 세포 내 흡수 활성

[264] 이두로네이트 2-설파타제는 M6PR (mannose phosphate 6 receptor)를 통해 세포에 흡수된 후 작용하므로, 이두로네이트 2-설파타제 지속형 결합체의 제조가 상기 효소의 세포 흡수 활성에 영향을 미치는지를 다음과 같이 확인하였다.

[265]

[266] 먼저, M6PR 가 발현한다고 알려진 HepG2 cell (human hepatocarcinoma) 에 이두로네이트 2-설파타제 및 이두로네이트 2-설파타제 지속형 결합체를 각각 처리한 후, 37°C에서 세포 내 흡수를 유도하였다. 24시간 후, 세포 내 존재하는 이두로네이트 2-설파타제 및 이두로네이트 2-설파타제 지속형 결합체를 ELISA 를 통해 분석하였다.

[267]

[268] 그 결과, 이두로네이트 2-설파타제 지속형 결합체의 세포 내 흡수 활성 ($V_{\max} = 10.83 \text{ ng/mL}$) 이 이두로네이트 2-설파타제의 세포내 흡수 활성 대비 ($V_{\max} = 9.50 \text{ nM}$) 약 81.4 % 임을 확인하였다. 이러한 M6PR 결합 및 세포내 흡수활성 감소 (vs. 이두로네이트 2-설파타제)는 지속형 결합체의 입체장애(steric hindrance) 영향으로, 지속형 결합체의 결합 (conjugation) 으로 개선된 PK 에 의해 보상될 수 있다 (도 3).

[269]

[270] 실시예 5-3: 이두로네이트 2-설파타제 지속형 결합체의 M6PR 결합력 확인

[271] 이두로네이트 2-설파타제와 이두로네이트 2-설파타제 지속형 결합체의 mannose phosphate 6 수용체 (M6PR) 결합력 확인을 위해, surface plasmon resonance (BIACORE T200, GE healthcare)를 이용하여 하기와 같이 분석하였다.

[272]

[273] 구체적으로, M6PR는 CM5 chip에 아민커플링으로 고정화였다. 그 후 이두로네이트 2-설파타제를 HBS-EP 버퍼로 200 nM - 12.5 nM이 되도록 희석하여 M6PR가 고정화된 칩에 10분간 결합시키고, 6분간 해리시키면서 그 결합력을 BIAevaluation software로 계산하였다. 이두로네이트 2-설파타제 지속형 결합체의 상대적인 결합력은 이두로네이트 2-설파타제와 비교하여 수치화하였다.

[274]

[274] 그 결과, 이두로네이트 2-설파타제와 대비하여 이두로네이트 2-설파타제 지속형 결합체는 약 88%의 수용체 결합력이 확인되었다 (표 1). 이두로네이트 2-설파타제 지속형 결합체의 M6PR에 대한 결합력이 상대적으로 낮은 것은 생리 활성 폴리펩타이드가 Fc 영역과 융합 단백질을 형성하면서 통상적으로 자체 수용체에 대한 결합력이 떨어지는 경향을 나타내는 것과 같은 원인으로 보인다. 본 발명의 작용 원리에 관한 어떠한 특정 이론에 얽매하고자 하는 의도가 아니라, 단지 발명의 이해를 돕기 위하여 설명을 해 보자면 면역글로불린 Fc와

이두로네이트 2-설파타제가 공유 결합됨에 따라 이두로네이트 2-설파타제 부위가 입체장애(steric hindrance)를 받아 수용체에 대한 결합력이 감소하였기 때문인 것으로 보여진다.

[275]

[276] [표1]

물질명	k_a (1/Ms, $\times 10^5$)	k_d (1/s, $\times 10^{-3}$)	K_D (nM)
이두로네이트 2-설파타제	1.36 ± 0.03 (100%)	3.95 ± 0.37 (100%)	29.14 ± 3.39 (100%)
이두로네이트 2-설파타제 지속형 결합체	0.92 ± 0.08 (67 %)	3.07 ± 0.76 (78%)	33.15 ± 5.45 (88%)

[277]

[278] 상기 실시예에서 확인한 이두로네이트 2-설파타제 지속형 결합체의 활성을 확인한 결과를 요약하면 하기 표 2과 같다.

[279]

[280] [표2]

In vitro 활성 (vs. 1 st ERT)			In vivo 활성 (vs. 1 st ERT)		
효소 활성	M6PR 결합력	세포 흡수	PK		조직 분포
			$t_{1/2}$	AUC	
86 %	88 %	81 %	6.8 배	9.1 배	높은 타겟 조직 분포성 (신장, 간, 비장, 심장, 골수)

[281]

[282] 실시예 6: 이두로네이트 2-설파타제 지속형 결합체의 조직 분포 확인

[283]

[284] 각 군 별 채혈시점당 3 마리의 ICR 마우스 (mouse)에 이두로네이트 2-설파타제 (대조군) 와 상기에서 제조한 이두로네이트 2-설파타제 지속형 결합체의 조직 및 장기 내 분포를 비교하였다.

[285]

[286] 구체적으로, 대조군은 이두로네이트 2-설파타제 각 1.0 mg/kg 로 정맥 내 주사

후 1, 8, 48, 144 시간에 장기를 적출 하였다. 시험군의 경우 이두로네이트 2-설파타제 지속형 결합체를 이두로네이트 2-설파타제 기준으로 각 1.0 mg/kg 씩 피하 주사한 후 1, 8, 48, 144 시간 에 장기를 적출 한 후 ELISA 방법을 통해 조직 (혈청, 신장, 간, 비장, 심장, 골수 및 폐)에서의 각 물질 농도를 측정 및 비교하였다.

[287]

[288] 그 결과, 대조군으로 사용 된 이두로네이트 2-설파타제와 비교하여, 동일 시간대에서 이두로네이트 2-설파타제 지속형 결합체는 모든 조직에서 높은 조직 분포 결과를 보였다 (도 4).

[289]

[290]

[291] 상기와 같은 결과들은 본 발명의 효소 결합체들이 기존의 다른 치료적 효소에 비하여 체내 노출 정도 및 조직 분포성이 우수하여, 리소좀 축적 질환의 획기적인 치료제로 사용될 수 있음을 시사하는 것이다.

[292]

[293] 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 실시 예들은 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.

[294]

청구범위

- [청구항 1] 이두로네이트 2-설페타제(iduronate-2-sulfatase)와 면역글로불린 Fc 영역이 비펩타이드성 중합체 연결부를 통하여 연결된, 효소 결합체.
- [청구항 2] 제1항에 있어서,
상기 이두로네이트 2-설페타제는 뮤코다당체침착증 II (mucopolysaccharidosis II, MPS II)를 치료할 수 있는 것인, 효소 결합체.
- [청구항 3] 제1항에 있어서,
상기 효소 결합체는 면역글로불린 Fc 영역이 결합하지 않은 이두로네이트 2-설페타제 보다 세포외배출 (transcytosis), 및 생체 이용율 (bioavailability, BA)이 증가된 것인, 효소 결합체.
- [청구항 4] 제3항에 있어서,
상기 세포외배출은 면역글로불린 Fc 영역과 FcRn (neonatal Fc receptor)와의 결합에 의한 것인, 효소 결합체.
- [청구항 5] 제1항에 있어서,
상기 효소 결합체는 면역글로불린 Fc 영역이 결합하지 않은 이두로네이트 2-설페타제 보다 조직 분포성 (tissue distribution)이 증가된 것인, 효소 결합체.
- [청구항 6] 제5항에 있어서,
상기 효소 결합체는 면역글로불린 Fc 영역이 결합하지 않은 이두로네이트 2-설페타제 보다 골수 표적성이 증가된 것인, 효소 결합체.
- [청구항 7] 제1항에 있어서,
상기 면역글로불린 Fc 영역은 비당쇄화된 것인, 효소 결합체.
- [청구항 8] 제1항에 있어서,
상기 면역글로불린 Fc 영역은 CH1, CH2, CH3 및 CH4 도메인으로 이루어진 군으로부터 선택되는 1개 내지 4개 도메인으로 이루어진 효소 결합체.
- [청구항 9] 제1항에 있어서,
상기 면역글로불린 Fc 영역은 힌지영역을 추가로 포함하는 것인, 효소 결합체.
- [청구항 10] 제1항에 있어서,
상기 면역글로불린 Fc 영역이 IgG, IgA, IgD, IgE 또는 IgM에서 유래된 면역글로불린 Fc 단편인 효소 결합체.
- [청구항 11] 제1항에 있어서,
상기 면역글로불린 Fc 영역의 각각의 도메인이 IgG, IgA, IgD, IgE, IgM로 이루어진 군에서 선택되는 면역글로불린에서 유래된 상이한 기원을 가진 도메인의 하이브리드인 것인, 효소 결합체.
- [청구항 12] 제1항에 있어서,

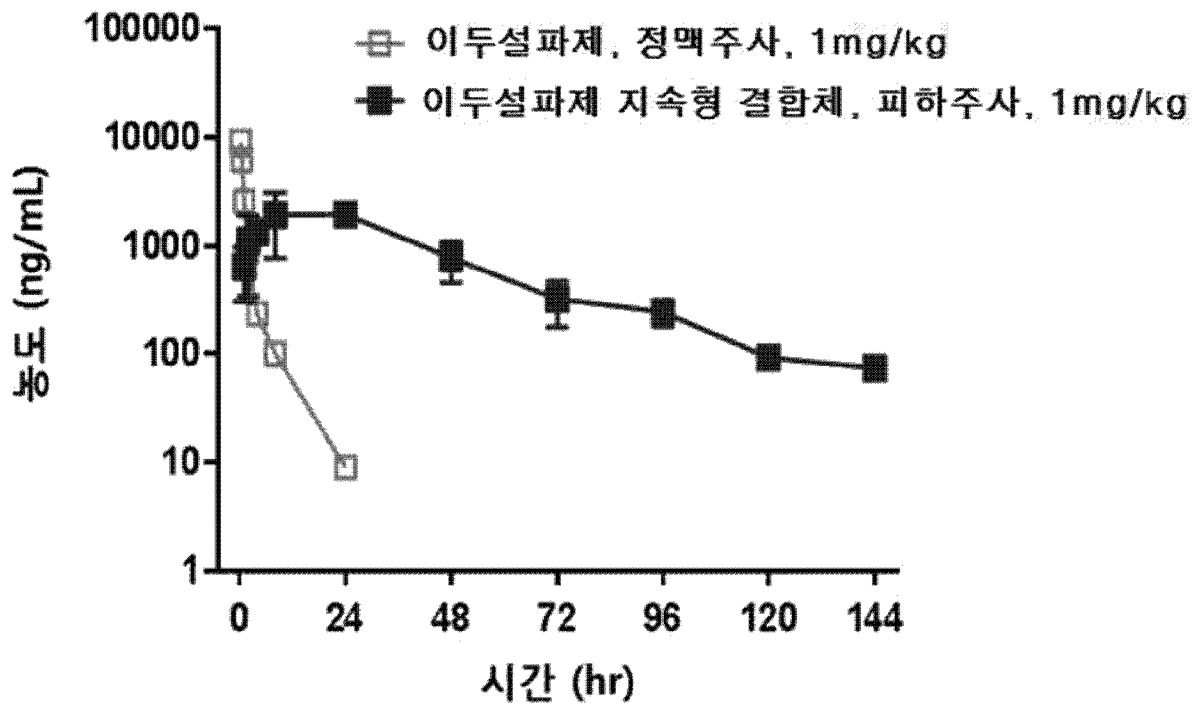
- 상기 면역글로불린 Fc 영역은 동일한 기원의 도메인으로 이루어진 단쇄 면역글로불린으로 구성된 이량체 또는 다량체인 것인, 효소 결합체.
- [청구항 13] 제1항에 있어서,
상기 면역글로불린 Fc 영역은 IgG4 Fc 단편인 것인, 효소 결합체.
- [청구항 14] 제1항에 있어서,
상기 면역글로불린 Fc 영역은 인간 비당쇄화 IgG4 Fc 단편인 것인, 효소 결합체.
- [청구항 15] 제1항에 있어서,
상기 효소 결합체는 이두로네이트 2-설파타제의 N-말단에 비펩타이드성 중합체 연결부가 결합된 것인, 효소 결합체.
- [청구항 16] 제1항의 효소 결합체를 포함하는 뮤코다당체침착증 II (mucopolysaccharidosis II, MPS II) 예방 또는 치료용 약학적 조성물.
- [청구항 17] 제16항에 있어서,
상기 약학적 조성물은 세포외배출, 생체 이용율, 조직 분포성, 및 골수 표적성을 증가시키는 것인, 약학적 조성물.
- [청구항 18] (a) 양 말단에 각각 같거나 서로 다른 반응성 작용기가 위치하는 비펩타이드성 중합체의 어느 한 반응성 작용기를 유리된 이두로네이트 2-설파타제(iduronate-2-sulfatase)와 반응시켜 상기 말단을 통하여 비펩타이드성 중합체가 이두로네이트 2-설파타제에 공유결합으로 연결된 연결체를 얻는 단계; 및
(b) 상기 연결체의 반응하지 않은 말단의 반응성 작용기를 생체 내 반감기를 증가시킬 수 있는 생체적합성 물질과 반응시켜 상기 연결체와 생체적합성 물질을 공유결합으로 연결하는 단계를 포함하는, 하기 화학식 1로 표시되는 효소 결합체를 제조하는 방법.
- [화학식 1]
X-La-F
여기서, X는 이두로네이트 2-설파타제이고;
L은 비펩타이드성 중합체 연결부이며;
a는 0 또는 자연수이고, 다만 a가 2이상 일 때, 각각의 L은 서로 독립적이고,
F는 X의 생체 내 반감기를 증가시킬 수 있는 물질임.
- [청구항 19] 제18항에 있어서,
상기 이두로네이트 2-설파타제는 뮤코다당체침착증 II (mucopolysaccharidosis II, MPS II)를 치료할 수 있는 것인, 효소 결합체를 제조하는 방법.
- [청구항 20] 제18항에 있어서,
상기 F는 고분자 중합체, 지방산, 콜레스테롤, 알부민 및 이의 단편, 알부민 결합물질, 특정 아미노산 서열의 반복단위의 중합체, 항체, 항체

단편, FcRn 결합물질, 생체 내 결합조직, 뉴클레오타이드, 파이브로넥틴, 트랜스페린(Transferrin), 사카라이드(saccharide), 헤파린, 및 엘라스틴으로 이루어진 군에서 선택되는 것인, 효소 결합체를 제조하는 방법.

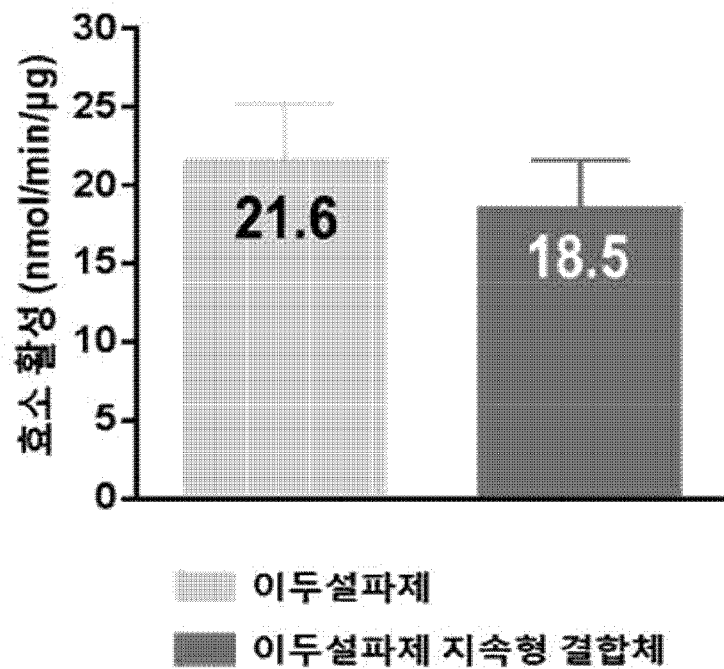
- [청구항 21] 제20항에 있어서,
상기 FcRn 결합 물질은 면역글로불린 Fc 영역인 것인, 효소 결합체를 제조하는 방법.
- [청구항 22] 제18항에 있어서,
상기 비펩타이드성 중합체는 폴리에틸렌글리콜, 폴리프로필렌 글리콜, 에틸렌 글리콜-프로필렌 글리콜 공중합체, 폴리옥시에틸화폴리올, 폴리비닐알콜, 폴리사카라이드, 텍스트란, 폴리비닐에틸에테르, 생분해성 고분자, 지질 중합체, 키틴, 히아루론산 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인, 효소 결합체를 제조하는 방법.
- [청구항 23] 제22항에 있어서,
상기 비펩타이드성 중합체는 폴리에틸렌글리콜인 것인, 효소 결합체를 제조하는 방법.
- [청구항 24] 제18항에 있어서,
상기 반응성 작용기는 알데하이드기, 말레이미드기 및 석신이미드 유도체로 이루어진 군으로부터 선택하는 것인, 효소 결합체를 제조하는 방법.
- [청구항 25] 제24항에 있어서,
상기 알데하이드기는 프로피온알데하이드기 또는 부틸알데하이드기인 것인, 효소 결합체를 제조하는 방법.
- [청구항 26] 제24항에 있어서,
상기 석신이미드 유도체는 석신이미딜 카르복시메틸, 석신이미딜 발레르에이트, 석신이미딜 메틸부타노에이트, 석신이미딜 메틸프로피온에이트, 석신이미딜 부타노에이트, 석신이미딜 프로피온에이트, N-하이드록시석신이미드인 또는 석신이미딜 카보네이트인 것인, 효소 결합체를 제조하는 방법.
- [청구항 27] 제24항에 있어서,
상기 반응성 작용기는 양 말단에서 모두 알데하이드기인, 효소 결합체를 제조하는 방법.
- [청구항 28] 제24항에 있어서,
상기 비펩타이드성 중합체는 양 말단에 각각 알데하이드기와 말레이미드기를 반응성 작용기로 갖는 것인, 효소 결합체를 제조하는 방법.
- [청구항 29] 제24항에 있어서,
상기 비펩타이드성 중합체는 양 말단에 각각 알데하이드기와 석신이미드기를 반응성 작용기로 갖는 것인, 효소 결합체를 제조하는

방법.

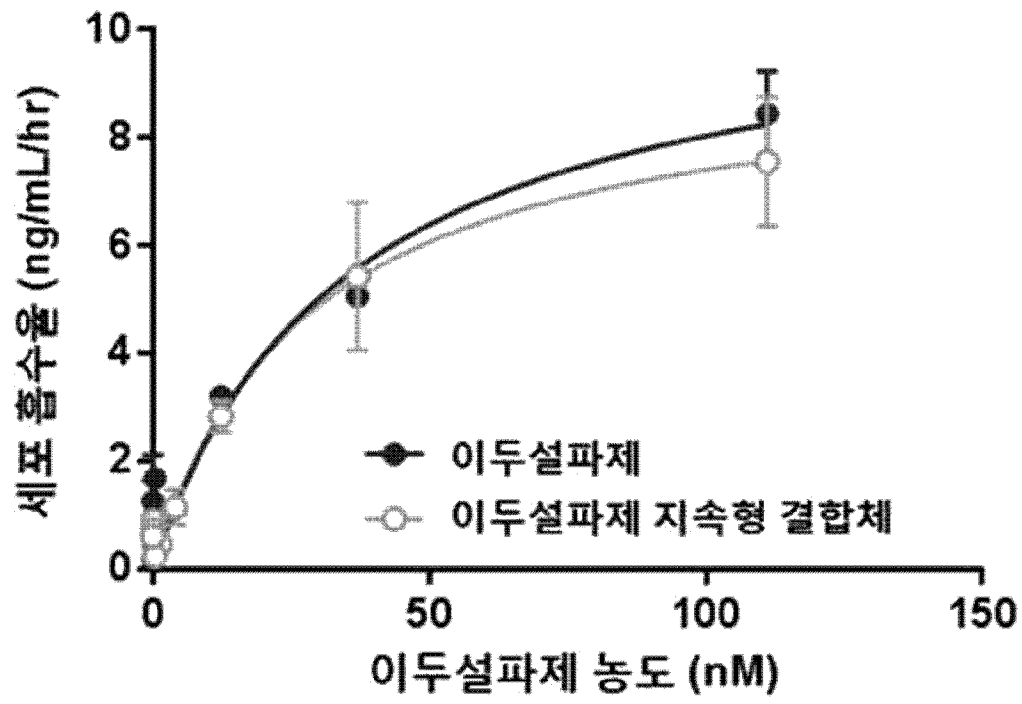
[도1]



[도2]



[도3]



[도4]

