



(51) 국제특허분류:

A61K 47/68 (2017.01)

C07K 16/24 (2006.01)

A61K 47/59 (2017.01)

A61K 39/00 (2006.01)

A61P 37/00 (2006.01)

(72) 발명자: 나건 (NA, Kun); 14574 경기도 부천시 옥산로 7, A동 4003호, Gyeonggi-do (KR). 노재원 (ROH, Jae Won); 10119 경기도 김포시 풍무로69번길 51, 316동 303호, Gyeonggi-do (KR).

(21) 국제출원번호:

PCT/KR2023/006411

(22) 국제출원일:

2023년 5월 11일 (11.05.2023)

(25) 출원언어:

한국어

(26) 공개언어:

한국어

(30) 우선권정보:

10-2022-0058579 2022년 5월 12일 (12.05.2022) KR

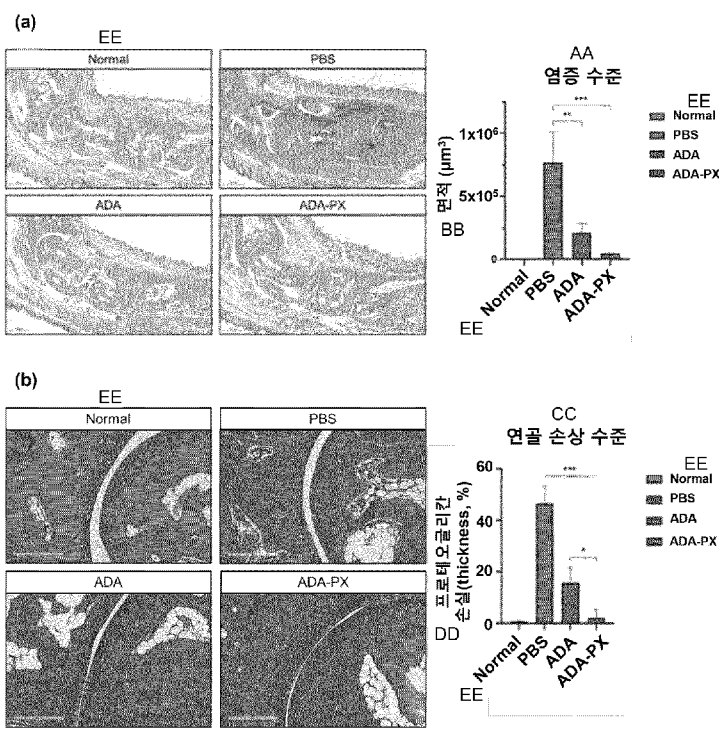
(71) 출원인: 가톨릭대학교 산학협력단 (THE CATHOLIC UNIVERSITY OF KOREA INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION) [KR/KR]; 06591 서울특별시 서초구 반포대로 222, Seoul (KR).

(74) 대리인: 김경교 등 (KIM, Kyeongkyo et al.); 06194 서울특별시 강남구 테헤란로70길 13, 2층, 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, CV, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IQ, IR, IS, IT, JM, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MU, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW,

(54) Title: POLYMER-BASED CONJUGATE, COMPRISING POLYPROPYLENE OXIDE, FOR IMPROVING THERAPEUTIC EFFECTS OF ANTIBODIES FOR TREATING AUTOIMMUNE DISEASES

(54) 발명의 명칭: 자가면역질환 치료용 항체의 치료 효과 개선을 위한 폴리프로필렌옥사이드가 포함된 고분자 기반 접합체



(57) Abstract: The present invention relates to: a block polymer conjugate comprising an antibody-linker-polypropylene oxide, in which block polymer comprising polypropylene oxide is conjugated to an antibody through a linker; and a pharmaceutical composition for treating autoimmune diseases, comprising the conjugate. The block polymer conjugate comprising an antibody-linker-polypropylene oxide, according to the present invention, exhibits the effects of maintaining specific reactions of conventional antibodies and, simultaneously, increasing the stability from proteolytic enzymes and improving in vivo half-life. When the conjugate according to the present invention is administered to a disease site, effects can be exhibited for longer than those of a conventional antibody and biostability and anti-inflammatory effects greater than those of a conventional antibody are exhibited.

SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN,
TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW.

(84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의
역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, CV, GH, GM,
KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SC, SD, SL, ST, 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,
ME, 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:

— 국제조사보고서와 함께 (조약 제21조(3))

(57) 요약서: 본 발명은 링커를 통해 항체에 폴리프로필렌옥사이드 포함 블록 고분자를 접합시킨 항체-링커-폴리프로필렌옥사이드 포함 블록 고분자 접합체 및 이를 포함하는 자가면역질환 치료용 약학조성물에 관한 것이다. 본 발명에 따른 항체-링커-폴리프로필렌옥사이드 포함 블록 고분자 접합체는 기존 항체의 특이적 반응을 유지하는 동시에 단백질 분해 효소로부터의 안정성을 증대하고 생체 내 반감기를 개선하는 효과를 나타낸다. 즉, 본 발명에 따른 접합체를 질병 부위에 투여시 기존 항체 대비 더 오랜 시간동안 효과를 나타낼 수 있으며, 기존 항체 대비 개선된 생체 안정성 및 항염증 효과를 나타낸다.

명세서

발명의 명칭: 자가면역질환 치료용 항체의 치료 효과 개선을 위한 폴리프로필렌옥사이드가 포함된 고분자 기반 접합체 기술분야

- [1] 본 발명은 항체-링커-폴리프로필렌옥사이드 포함 블록 고분자 접합체 및 이를 포함하는 자가면역 질환의 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것이다.

배경기술

- [2] 자가면역질환은 질환의 진행 단계에 따라서 다양한 치료법이 사용되고 있고, 환자의 약물에 대한 효과나 내성이 치료제를 선택하는 데 중요하게 작용한다. 전통적으로, 사이클로옥시제네이스(cyclooxygenase, COX) 단백질을 억제하는 비스테로이드성 항염증제나, 염증성 신호 전달에 관여하는 사이토카인의 수용체를 억제하는 글루티코르티코이드 약물이 사용됐다. 현재에는 가장 보편적으로 사용되는 메토크렉세이트 혹은 이를 다른 약물과 병용하는 방식이 주로 권장되고 있다.
- [3] 그러나 이러한 약물에 대해 환자가 내성이 있거나, 중증 이상으로 질병이 진행된 경우 생물학적 제제가 처방된다. 생물학적 제제의 경우 병변 부위에 과발현된 염증성 사이토카인이나 그에 대응하는 단백질을 억제하는 항체 기반 치료제들로 구성되어 있다.
- [4] 특히, 염증반응에 중추적인 역할인 NF- κ B 신호 경로에 관여하는 TNF- α 에 대해 특이적으로 작용하는 항체들이 주로 사용되고 있다. TNF- α 의 경우 대식세포나 T세포와 같은 면역세포들에서 분비되는데, 대부분의 세포에 발현된 TNF- α 수용체에 결합하여 세포 내의 NF- κ B 신호 경로를 활성화한다. 이후 염증성 사이토카인 분비와 염증 조절복합체의 활성화, 면역세포들의 증식과 분화 등 여러 염증성 작용을 나타낸다. 이러한 이유로 NF- κ B의 경우 염증성 질환의 홀마크 중 하나로 여겨지고 있다.
- [5] 이러한 이유로 TNF- α 특이적인 항체 치료제들이 지속적으로 연구되고 있으며, 이미 FDA에서 승인된 경우도 다수 존재한다. 현재 승인된 TNF- α 특이적 항체로는 아달리무맙(Adalimumab), 인플릭시맙(Infliximab), 골리무맙(Golimumab), 에타너셉트(Etanercept) 등이 있다. 위 약물들은 여러 조건에도 불구하고 현재 세계에서 가장 많이 팔리는 블록버스터 약물들에 속해 있고, 해당 약물들에 대한 바이오시밀러 승인과 시도가 활발하게 이루어지고 있다.
- [6] 그러나, 항체 치료제의 경우 자가면역성으로 인한 항약물 항체의 생성 가능성이 대두되고 있다. 항약물 항체의 경우 약물의 효과를 감소시킬 뿐만 아니라, 항체 기반 면역 반응을 유도하여 또 다른 염증반응이 유도될 가능성을 시사한다. 그래서 항체 치료제 자체의 특성으로 인한 자가면역성을 감소시켜 치료 효과를 개선하는 것이 주요한 문제이다.

- [7] 이에, 본 발명자는 TNF- α 특이적인 항체에 PEO(polyethylene oxide) 및 PPO(polypropylene oxide) 고분자를 링커를 통해 접합하여 TNF- α 에 특이적으로 상호작용이 가능한 항체 접합체를 개발하였다. PEO 및 PPO 공중합체는 높은 생체적합성과 낮은 독성, 그리고 체내에 사용되기 적합한 유변학적 특성을 나타내어 의약학 보조제로써 FDA에서 승인을 받은 물질이다. PEO 및 PPO 공중합체의 경우 병변 부위에 염증으로 인한 조직의 손상을 감소시키고, 자체로써 항염증 효과가 있다고 알려져 있다. 또한, 항체에 PEO 및 PPO 공중합체를 접합함으로써 기존 항체 대비 생체 내 반감기를 증진시켜 항체가 대사되는 것을 막고 항염증 효과가 유지되는 것을 확인하여, 본 발명을 완성하게 되었다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [8] 본 발명의 목적은 (a) 항체; (b) 상기 항체에 공유결합으로 연결된 링커; (c) 상기 링커에 공유결합으로 연결된 PEO(polyethylene oxide) 및 PPO(polypropylene oxide) 고분자;를 포함하는 접합체를 제공하는데 있다.
- [9] 본 발명의 다른 목적은 (a) 항체; (b) 상기 항체에 공유결합으로 연결된 링커; (c) 상기 링커에 공유결합으로 연결된 PEO(polyethylene oxide) 및 PPO(polypropylene oxide) 고분자;를 포함하는 접합체의 제조방법을 제공하는데 있다.
- [10] 본 발명의 또 다른 목적은 (a) 항체; (b) 상기 항체에 공유결합으로 연결된 링커; (c) 상기 링커에 공유결합으로 연결된 PEO(polyethylene oxide) 및 PPO(polypropylene oxide) 고분자;를 포함하는 접합체를 포함하는 자가면역 질환 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공하는데 있다.

과제 해결 수단

- [11] 하기에서는 중복되는 내용의 혼잡을 방지하기 위하여, 중복되는 내용의 기재를 생략하고자 한다. 즉, 하기의 내용만으로 발명의 내용이 한정되는 것은 아니고, 전체적인 발명의 내용에 따라 발명의 내용이 해석되어야 할 것이다.
- [12] 또한, 본 명세서에서 사용한 용어는 단지 설명을 목적으로 사용된 것으로, 한정하려는 의도로 해석되어서는 안 된다. 단수의 표현은 문맥상 명백하게 다르게 뜻하지 않는 한, 복수의 표현을 포함한다. 본 명세서에서, "포함하다" 또는 "가지다" 등의 용어는 명세서 상에 기재된 특징, 숫자, 단계, 동작, 구성요소, 부품 또는 이들을 조합한 것이 존재함을 지정하려는 것이지, 하나 또는 그 이상의 다른 특징들이나 숫자, 단계, 동작, 구성요소, 부품 또는 이들을 조합한 것들의 존재 또는 부가 가능성을 미리 배제하지 않는 것으로 이해되어야 한다.
- [13] 또한, 다르게 정의되지 않는 한, 기술적이거나 과학적인 용어를 포함해서 여기서 사용되는 모든 용어들은 실시예가 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자에 의해 일반적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 가지고 있다. 일반적으로 사용되는 사전에 정의되어 있는 것과 같은 용어들은 관련 기술의 문맥 상 가지는

의미와 일치하는 의미를 가지는 것으로 해석되어야 하며, 본 출원에서 명백하게 정의하지 않는 한, 이상적이거나 과도하게 형식적인 의미로 해석되지 않는다.

[14] 본 발명의 목적은 (a) 항체; (b) 상기 항체에 공유결합으로 연결된 링커; (c) 상기 링커에 공유결합으로 연결된 PEO(polyethylene oxide) 및 PPO(polypropylene oxide) 고분자;를 포함하는 접합체를 제공한다.

[15] 본 발명의 용어 "항체"는 2개의 전체 길이의 경쇄 및 2개의 전체 길이의 중쇄를 가지는 완전한 형태뿐만 아니라 항체 분자의 단편도 사용될 수 있다. 또한, 항체는 다중클론 항체, 단일클론 항체, 키메라화 또는 키메라 항체, 인간화된 항체, 원시류화 항체, 탈면역화 항체, 및 완전 인간 항체를 포함한다. 항체는 임의의 다양한 종, 예를 들어 포유동물, 예컨대 인간, 비인간 영장류(예를 들어, 오랑우탄, 개코원숭이 또는 침팬치), 말, 소, 돼지, 양, 염소, 개, 고양이, 토끼, 기니아 피그, 게르빌루스쥐, 햄스터, 랫트 및 마우스에서 제조되거나 이로부터 유래할 수 있다. 항체는 정제된 또는 재조합 항체일 수 있다.

[16] 본 발명의 일 실시예에서, 상기 항체는 TNF- α 특이적인 항체일 수 있다. 즉, 항-TNF- α 항체일 수 있다.

[17] TNF- α 는 단핵구 및 대식세포를 포함하는, 다수의 세포 유형에 의해 생성되는 사이토카인으로, 쇼크, 패혈증, 감염, 자가면역 질환, 류마티스 관절염(RA), 크론병, 이식 거부 및 이식편대숙주 질환을 포함하는, 다양한 기타 인간 질환 및 장애의 병리생리학에서 그 원인임이 시사되었다. 이러한 TNF- α 활성 억제제를 위해 TNF- α 에 결합하여 이를 중화시키는 TNF- α 특이적 항체가 치료제로써 사용되고 있다. FDA 승인된 TNF- α 특이적인 항체로는 예를 들어, 아달리무맙(Adalimumab), 인플릭시맙(Infliximab), 골리무맙(Golimumab), 에타너셉트(Etanercept), 세르톨리주맙 페골(Certolizumab pegol) 등이 있다. 해당되는 항체들의 경우 염증성 부위에서 TNF- α 를 특이적으로 중화시킴으로써 염증 진행 정도를 억제하는 효과를 나타낸다. 자가면역질환의 경우 대체로 만성적인 증상을 나타내기 때문에, 폴리프로필렌옥사이드가 포함된 고분자를 통한 체내 반감기 증가 및 안정성 증가로 인한 치료효과를 개선할 수 있다.

[18] 본 발명의 일 실시예에서, TNF- α 특이적인 항체는 단일클론 IgG 형태를 갖는 아달리무맙(Adalimumab), 인플릭시맙(Infliximab) 및 골리무맙(Golimumab)으로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나 이상일 수 있다.

[19] 본 발명의 "링커(linker)"는 항체와 PEO(polyethylene oxide) 및 PPO(polypropylene oxide) 고분자를 연결시키는 물질을 말한다. 본 발명에서 링커는 다이펩타이드를 포함하는 펩티드 류, 이당류를 포함하는 카보하이드레이트 류, 포스페이트 및 파이로포스페이트를 포함하는 인산결합류, 설페이트류를 포함한 링커로써 외부 자극원에 의해 분해될 수 있는 링커일 수 있으며, 바람직하게는 말레이미드-씨올, 씨올, 말레이미드, 석시닉 안하이드라이드, 엔-하이드록시석신이미드 에스터, 카르복실-아민, 하이드라존, 및 다이설파이드 결합으로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나일 수 있다.

- [20] 보다 바람직하게, 본 발명의 일 실시예에서 상기 링커는 말레이미드-씨올일 수 있으며, 말레이미드-씨올은 대표적인 클릭 화학 반응으로, 버퍼에서 반응할 수 있는 장점이 있다. 말레이미드-씨올에 형성된 싸이오이써 결합은 안정성이 높아 분해 가능성이 낮기 때문에 체내 반감기 및 안정성을 높이기 위한 폴리프로필렌 옥사이드 포함 고분자의 효과를 오랫동안 유지할 수 있다.
- [21] 본 발명의 용어 "PEO(polyethylene oxide) 및 PPO(polypropylene oxide) 고분자"는 폴리프로필렌옥사이드 (polypropylene oxide) 고분자 및 폴리에틸렌옥사이드 (polyethylene oxide) 고분자를 교대로 포함하는 고분자를 말한다. 보다 구체적으로, "PEO 및 PPO를 포함하는 블록 공중합체(이하, PEO-PPO 블록 공중합체로 기재함)"는 폴리프로필렌옥사이드 (polypropylene oxide) 블록 및 폴리에틸렌옥사이드 (polyethylene oxide) 블록을 교대로 포함하는 공중합체를 말한다.
- [22] 바람직하게는 PEO(polyethylene oxide) 및 PPO(polypropylene oxide) 고분자는 폴리에틸렌옥사이드 (polyethylene oxide) 고분자를 교대로 포함하는 삼중 공중합체인 PEO-PPO-PEO 고분자일 수 있다.
- [23] 본 발명에서 PEO(polyethylene oxide) 및 PPO(polypropylene oxide) 고분자는 중량평균분자량이 1 kDa 내지 20 kDa, 바람직하게는 3 kDa 내지 17 kDa, 더욱 바람직하게는 5 kDa 내지 15 kDa일 수 있고, 더욱 더 바람직하게는 7 kDa 내지 13 kDa일 수 있다. 여기서 1 kDa는 1000g/mol이다.
- [24] 또한 구체적으로 상기 PEO(polyethylene oxide) 및 PPO(polypropylene oxide) 고분자는 중량평균분자량이 1kDa 내지 5kDa인 폴리프로필렌옥사이드(PPO)를 포함할 수 있고, 바람직하게는 1.3kDa 내지 4.5kDa, 더욱 바람직하게는 1.5 kDa 내지 4 kDa 인 폴리프로필렌옥사이드(PPO)를 포함할 수 있다.
- [25] 바람직하게는 상기 PEO(polyethylene oxide) 및 PPO(polypropylene oxide) 고분자의 상용화되어 판매되는 예시는 폴록사머 68, 폴록사머 124, 폴록사머 127, 폴록사머 184, 폴록사머 185, 폴록사머 188 (플로로닉 F-68), 폴록사머 237, 폴록사머 338 및 폴록사머 407 (플루로닉 F-127)로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나일 수 있으나, 이에 한정되지 않는다. 더욱 바람직하게 PEO-PPO-PEO 고분자는 폴록사머 188 (플로로닉 F-68) 또는 폴록사머 407 (플루로닉 F-127)일 수 있다.
- [26] 본 발명에서 상기 항체, 링커 및 PEO(polyethylene oxide) 및 PPO(polypropylene oxide) 고분자는 각각 공유결합에 의해 연결될 수 있다. 이때, 상기 공유결합은 싸이오이써 결합(thioether bond), 아마이드 결합(amide bond), 카보닐 결합(carbonyl bond), 에스터 결합(ester bond), 황화 에스터 결합(thioester bond), 설포 아마이드 결합(sulfonamide bond) 및 우레탄 결합(urethane bond)으로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나 이상일 수 있다.
- [27] 본 발명의 일 실시예에 의하면, 구체적으로, 항체의 아민 그룹 말단에 설포-SMCC(sulfo-succinimidyl 4-(N-maleimidomethyl)cyclohexane-1-carboxylate)를 반응시켜 아마이드 결합으로 연결된 항체-말레이미드를 준비하고, 폴리프로필렌옥사이드 포함 고분자의 양 말단에 존재하는 하이드록실 그룹을 아민화한 물질에

서 아민을 씨올화한 폴리프로필렌옥사이드 포함 고분자-씨올을 준비한 후, 말레이미드와 씨올의 클릭 화학반응을 유도함으로써 두 물질을 싸이오이써 결합으로 연결할 수 있다.

- [28] 본 발명의 일 실시예에 의하면, 본 발명에 따른 접합체는 기존 항체에 비해 체내 반감기와 안정성이 향상된 특징을 갖는다.
- [29] 본 발명의 다른 실시예에 의하면, 본 발명에 따른 접합체는 기존 항체에 비해 손상된 조직에 대한 재생 효과가 향상된 특징을 갖는다.
- [30] 본 발명은 또한 (a) PEO(polyethylene oxide) 및 PPO(polypropylene oxide) 고분자와 링커가 공유결합으로 연결된 제1 접합체를 제조하는 단계; 및 (b) 상기 제1 접합체의 링커와 항체가 공유결합으로 연결된 제2 접합체를 제조하는 단계;를 포함하는 접합체의 제조방법을 제공한다.
- [31] 본 발명은 또한 (a) 항체; (b) 상기 항체에 공유결합으로 연결된 링커; (c) 상기 링커에 공유결합으로 연결된 PEO(polyethylene oxide) 및 PPO(polypropylene oxide) 고분자;를 포함하는 접합체를 포함하는 자가면역질환 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.
- [32] 여기서 "자가면역질환"은 원인을 알 수 없는 면역체계 이상으로 면역체계가 자신의 정상적인 조직, 기관 또는 기타 체내 성분 등을 공격하게 되어 발생하는 질환을 총칭하며, 신경계, 위장관계, 내분비계, 피부, 골격계, 혈관 조직 등 거의 모든 신체 부위에 발생할 수 있는 전신적인 질환이다.
- [33] 상기 자가면역질환은 예를 들어, 아토피성 피부염, 원형탈모증, 알레르기, 천식, 결막염, 치주염, 비염, 중이염, 인후염, 편도염, 폐렴, 위궤양, 위염, 크론병, 건선, 궤양성 대장염, 베체트 장염, 화농성 한선염, 포도막염, 치질, 통풍, 강직성 척추염, 류마티스 열, 루푸스, 섬유근통 (fibromyalgia), 건선성 관절염, 축성 척추관절염, 골관절염, 류마티스 관절염, 건관절주위염, 건염, 건초염, 건주위염, 근육염, 간염, 방광염, 신장염, 쇼그렌 증후군(sjogren's syndrome) 및 다발성 경화증으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상일 수 있다.
- [34] 여기서 "예방"은 본 발명의 상기 조성물을 개체에 투여하여 자가면역질환을 억제하거나 지연시키는 모든 행위를 의미한다.
- [35] 여기서 "치료"는 본 발명의 상기 조성물을 개체에 투여하여 자가면역질환의 증세가 호전되도록 하거나 이롭게 되도록 하는 모든 행위를 의미한다.
- [36] 약학적 조성물의 제조를 위하여, 본 발명에서 사용될 수 있는 담체의 종류는 특별히 제한되지 아니하며 당해 기술 분야에서 통상적으로 사용되는 담체라면 어느 것이든 사용할 수 있다. 상기 담체의 비제한적인 예로는, 식염수, 멸균수, 링거액, 완충 식염수, 알부민 주사 용액, 락토오스, 텍스트로오스, 수크로오스, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 말토덱스트린, 글리세롤, 에탄올 등을 들 수 있다. 이들은 단독으로 사용되거나 2종 이상을 혼합하여 사용될 수 있다.
- [37] 또한, 본 발명의 조성물은 필요한 경우, 부형제, 희석제, 항산화제, 완충액 또는 정균제 등 기타 약학적으로 허용 가능한 첨가제들을 첨가하여 사용할 수 있으며,

충진제, 증량제, 습윤제, 봉해제, 분산제, 계면 활성제, 결합제 또는 윤활제 등을 부가적으로 첨가하여 사용할 수 있다.

- [38] 본 발명의 조성물은 경구 투여 또는 비경구 투여를 위한 적합하고 다양한 제형으로 제제화되어 사용될 수 있으나, 보다 바람직하게는 비경구 투여를 위한 제형으로 제제화될 수 있고, 더욱 바람직하게는 주사제 또는 주입제로 제제화될 수 있다.
- [39] 본 발명의 조성물을 비경구 투여용으로 제제화하기 위하여, 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결 건조 제제, 외용제 등을 사용할 수 있으며, 상기 비수성용제, 현탁제로는 프로필렌글리콜, 폴리에틸렌글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 또한, 주사제 또는 주입제로 제제화하는 경우, 본 발명의 조성물을 안정제 또는 완충제와 함께 물에서 혼합하여 용액 또는 현탁액으로 제조하고 이를 앰플(ampoule) 또는 바이알(vial)의 단위 투여용으로 제제화할 수 있다.
- [40] 또한, 당업계에서 통상적으로 사용하는 투여방법을 이용하여 이식 및 투여될 수 있으며, 바람직하게는 치료가 필요한 환자의 질환 부위에 직접 생착 또는 이식이 가능하나 이에 한정되지는 않는다. 예컨대, 본 발명의 조성물은 직장, 피하, 근육, 복강, 정맥, 동맥, 뇌척수강내, 골수 내 등으로 투여 가능하며, 바람직하게는 정맥 내로 투여될 수 있다. 또한, 상기 투여는 카테터를 이용한 비외과적 투여 및 질환부위 절개 후 주입 또는 이식 등 외과적 투여방법 모두 가능하다.
- [41] 유효성분의 실제 투여량은 치료하고자 하는 질환, 질환의 중증도, 투여경로, 환자의 체중, 연령 및 성별 등의 여러 관련 인자에 비추어 결정되어야 하는 것으로 이해되어야 하며, 따라서, 상기 투여량은 어떠한 면으로든 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다.
- [42] 본 발명의 조성물의 유효량, 유효 투여량은 조성물의 제제화 방법, 투여 방식, 투여 시간 및/또는 투여 경로 등에 의해 다양해질 수 있으며, 조성물의 투여로 달성하고자 하는 반응의 종류와 정도, 투여 대상이 되는 개체의 종류, 연령, 체중, 일반적인 건강 상태, 질병의 중세나 정도, 성별, 식이, 배설, 해당 개체에 동시 또는 이시에 함께 사용되는 기타 조성물의 성분 등을 비롯한 여러 인자 및 의약 분야에서 잘 알려진 유사 인자에 따라 다양해질 수 있으며, 당해 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자는 목적하는 효과가 충분히 발휘될 수 있도록 투여량을 용이하게 결정할 수 있다.
- [43] 본 발명은 또한 하기 실시양태를 포함한다:
- [44] 약제로서 사용하기 위한, (a) 항체; (b) 상기 항체에 공유결합으로 연결된 링커; (c) 상기 링커에 공유결합으로 연결된 PEO(polyethylene oxide) 및 PPO(polypropylene oxide) 고분자;를 포함하는 접합체;
- [45] 자가면역 질환의 예방 또는 치료에 사용하기 위한 (a) 항체; (b) 상기 항체에 공유결합으로 연결된 링커; (c) 상기 링커에 공유결합으로 연결된 PEO(polyethylene

oxide) 및 PPO(polypropylene oxide) 고분자;를 포함하는 접합체를 포함하는 약학 조성물;

[46] 자가면역 질환의 치료용 약제의 제조를 위한 (a) 항체; (b) 상기 항체에 공유결합으로 연결된 링커; (c) 상기 링커에 공유결합으로 연결된 PEO(polyethylene oxide) 및 PPO(polypropylene oxide) 고분자;를 포함하는 접합체의 용도;

[47] 치료학적으로 유효한 양의 (a) 항체; (b) 상기 항체에 공유결합으로 연결된 링커; (c) 상기 링커에 공유결합으로 연결된 PEO(polyethylene oxide) 및 PPO(polypropylene oxide) 고분자;를 포함하는 접합체를 이를 필요로 하는 대상체에 투여하는 단계를 포함하는 자가면역 질환의 치료 방법;

[48] (a) 항체; (b) 상기 항체에 공유결합으로 연결된 링커; (c) 상기 링커에 공유결합으로 연결된 PEO(polyethylene oxide) 및 PPO(polypropylene oxide) 고분자;를 포함하는 접합체 및 약제학적으로 허용 가능한 담체를 포함하는 약학 조성물.

[49] 본 발명의 조성물, 용도, 치료방법에서 언급된 사항은 서로 모순되지 않는 한 동일하게 적용된다.

발명의 효과

[50] 본 발명에 따른 항체-링커-폴리프로필렌옥사이드 포함 블록 고분자 접합체는 기존 항체의 특이적 반응을 유지하는 동시에 단백질 분해 효소로부터의 안정성을 증대하고 생체 내 반감기를 개선하는 효과를 나타낸다. 즉 본 발명에 따른 접합체를 질병 부위에 투여시 기존 항체 대비 더 오랜 시간동안 효과를 나타낼 수 있으며, 기존 항체 대비 개선된 생체 안정성 및 항염증 효과를 나타낸다.

도면의 간단한 설명

[51] 도 1은 본 발명의 일실시예에 따른 (a)아민-폴리프로필렌옥사이드 1.7k 포함 블록 고분자 및 (b)아민-폴리프로필렌옥사이드 3.8k 포함 블록 고분자의 ¹H-NMR 스펙트럼을 나타낸 도면이다.

[52] 도 2는 본 발명의 일실시예에 따른 (a)아달리무맙-말레이미드-씨올-폴리프로필렌옥사이드 1.7k 포함 블록 고분자, (b)인플릭시맙-말레이미드-씨올-폴리프로필렌옥사이드 1.7k 포함 블록 고분자, (c)콜리무맙-말레이미드-씨올-폴리프로필렌옥사이드 1.7k 포함 블록 고분자의 MALDI-TOF/MS 스펙트럼을 나타낸 도면이다.

[53] 도 3은 본 발명의 일실시예에 따른 (a)아달리무맙-말레이미드-씨올-폴리프로필렌옥사이드 1.7k 포함 블록 고분자, (b)인플릭시맙-말레이미드-씨올-폴리프로필렌옥사이드 1.7k 포함 블록 고분자, (c)콜리무맙-말레이미드-씨올-폴리프로필렌옥사이드 1.7k 포함 블록 고분자의 SDS-PAGE 결과를 나타낸 도면이다.

[54] 도 4는 본 발명의 일실시예에 따른 아달리무맙-말레이미드-씨올-폴리프로필렌옥사이드 1.7k 포함 블록 고분자의 HIC-HPLC 스펙트럼을 나타낸 도면이다

[55] 도 5는 본 발명의 일실시예에 따른 (a)아달리무맙-말레이미드-씨올-폴리프로필렌옥사이드 1.7k 포함 블록 고분자, (b)인플릭시맙-말레이미드-씨올-폴리프로필

렌옥사이드 1.7k 포함 블록 고분자, (c)폴리무랍-말레이미드-씨올-폴리프로필렌 옥사이드 1.7k 포함 블록 고분자를 원평광 이색법을 이용하여 항체의 2차구조를 나타낸 도면이다.

[56] 도 6은 본 발명의 일실시예에 따른 (a)아달리무랍 및 (b)아달리무랍-말레이미드-씨올-폴리프로필렌옥사이드 1.7k 포함 블록 고분자의 생체 조건 내 안정성을 나타낸 도면이다.

[57] 도 7은 본 발명의 일실시예에 따른 (a)아달리무랍 및 (b)아달리무랍-말레이미드-씨올-폴리프로필렌옥사이드 1.7k 포함 블록 고분자의 효소 단백질 분해 속도 및 (c)효소 단백질 분해 안정성을 나타낸 도면이다.

[58] 도 8은 본 발명의 일실시예에 따른 (a)아달리무랍-말레이미드-씨올-폴리프로필렌옥사이드 1.7k 포함 블록 고분자, (b)인플릭시맙-말레이미드-씨올-폴리프로필렌옥사이드 1.7k 포함 블록 고분자, (c)폴리무랍-말레이미드-씨올-폴리프로필렌옥사이드 1.7k 포함 블록 고분자의 정상 세포에 대한 독성 효과를 나타낸 도면이다.

[59] 도 9는 본 발명의 일실시예에 따른 (a)음성 대조 그룹, (b)TNF- α 와 CHX 모두 처리한 양성 대조 그룹, (c,e,g)양성 대조 그룹에 기존 항체를 처리한 그룹, (d,f,h)양성 대조 그룹에 항체-링커-폴리프로필렌옥사이드 포함 블록 고분자 접합체를 처리한 그룹의 유세포 분석 및 (i)종양괴사인자-알파 중화를 통한 세포자살 억제 효과를 나타낸 도면이다.

[60] 도 10은 본 발명의 일실시예에 따른 아달리무랍-말레이미드-씨올-폴리프로필렌옥사이드 1.7k 포함 블록 고분자의 류머티스 관절염 마우스 모델에 대한 치료 효과를 (a)체중 변화, (b)관절염 수치 변화, (c) 발목 두께 변화로 나타낸 도면이다.

[61] 도 11은 본 발명의 일실시예에 따른 아달리무랍-말레이미드-씨올-폴리프로필렌옥사이드 1.7k 포함 블록 고분자의 류머티스 관절염 마우스 모델에 대한 치료 효과를 (a)x선 단층 촬영 이미지, (b)골 표면적 비(BS/BV) 분석으로 나타낸 도면이다.

[62] 도 12는 본 발명의 일실시예에 따른 아달리무랍-말레이미드-씨올-폴리프로필렌옥사이드 1.7k 포함 블록 고분자의 류머티스 관절염 마우스 모델에 대한 치료 효과를 (a)H&E 염색 및 염증 수준, (b)Safranin O 염색 및 연골 손상 수준으로 나타낸 도면이다.

[63] 도 13은 본 발명의 일실시예에 따른 아달리무랍-말레이미드-씨올-폴리프로필렌옥사이드 1.7k 포함 블록 고분자에 의한 염증성 사이토카인의 발현 수준 변화를 나타낸 도면이다.

발명의 실시를 위한 최선의 형태

[64] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 예시하기 위한 것으로서, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의

해 제한되는 것으로 해석되지 않는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.

[65] <실시예> 항체-링커-폴리프로필렌옥사이드 포함 블록 고분자 접합체 제조

[66] 실시예 1-1: 아달리무맙-말레이미드-싸울-폴리프로필렌옥사이드 1.7k 포함 블록 고분자 접합체 제조 및 정제

[67] 폴리프로필렌옥사이드 1.7k 포함 블록 고분자(폴록사머 188) 1 g과 4-니트로페닐클로로포르메이트(4-nitrophenyl chloroformate: 4-NPC) 480 mg, 4-디메틸아미노피리딘(dimethylaminopyridine: DMAP) 2.9 mg을 디클로로메탄(Dichloromethane: DCM) 5 mL에 녹인 후 4 °C에서 30분 동안 교반하고 이후 상온에서 12시간 교반하여 반응시켰다. 반응 용액 5mL를 디에틸에테르 (Diethylether: DE) 40mL에 침전시킨 후 원심분리(3500rpm, 5분)하여 상층액을 제거하고 침전물을 수득하였다. 원심분리를 총 3회 반복한 후 감압 건조하여 잔여 시약과 잔여 DE를 제거하였다. 건조된 합성물 500mg을 DCM 5 mL에 녹인 후 에틸렌다이아민(Ethylenediamine :EDA) 75.8μL를 첨가하여 약 12시간 교반하여 반응시켰다. 하루 동안 투석막(MWCO: 3,500Da)을 이용하여 반응 용액에 대해 투석을 진행시킨 후 얻은 아민-폴리프로필렌옥사이드 1.7k 포함 블록 고분자를 동결건조하여 파우더 형태로 보관하였다. 결과는 도 1(a)와 같이 핵자기공명스펙트럼(¹H-NMR)을 통하여 확인하였다.

[68] 이 후 아민-폴리프로필렌옥사이드 1.7k 포함 블록 고분자 3mg을 0.1 M PBS에 10mg/ml 농도로 녹이고 2mg/ml의 2-머캅토에탄올(2-Mercaptoethanol: 2-ME)을 47.8μL 첨가한 뒤 1시간 동안 교반하여 싸울-폴리프로필렌옥사이드 1.7k 포함 블록 고분자를 제조하였다.

[69] 아달리무맙 제형 내 부형제 제거를 위해 투석 카세트(MWCO: 20KDa)와 0.1M PBS 용매를 이용하여 하루 동안 투석을 진행하였다. 투석 후 항체 용액을 수득하여 BCA assay 방법을 이용하여 항체를 정량하였다. 4mg의 항체 용액에 1mg/mL 농도의 설포-SMCC(sulfo-succinimidyl 4-(N-maleimidomethyl)cyclohexane-1-carboxylate: sulfo-SMCC)를 59μL 첨가한 후 1시간 동안 교반하여 항체의 아민 그룹을 말레이미드 그룹으로 치환하였다. 미반응 sulfo-SMCC를 제거하기 위해 PD-10 컬럼으로 정제한 후, 말레이미드 그룹으로 치환된 항체 용액 4mL에 싸울-폴리프로필렌옥사이드 1.7k 포함 블록 고분자를 233μL 넣고 4°C에서 18시간 교반하였다. 이 후 아미콘 울트라 (Amicon Ultra 2mL, MWCO: 100kDa) 튜브에서 원심분리(6500g, 20분)하여 미 반응물을 제거 한 최종 합성물을 얻었으며, 최종 합성물은 용액 상태로 냉장 보관하였다.

[70] 실시예 1-2: 아달리무맙-말레이미드-싸울-폴리프로필렌옥사이드 3.8k 포함 블록 고분자 접합체 제조 및 정제

[71] 폴리프로필렌옥사이드 3.8k 포함 블록 고분자(폴록사머 407) 1g과 4-니트로페닐클로로포르메이트(4-nitrophenyl chloroformate: 4-NPC) 320mg, 4-디메틸아미노피리딘(dimethylaminopyridine: DMAP) 1.9mg을 디클로로메탄(Dichloromethane:

DCM) 5mL에 녹인 후 4°C에서 30분 동안 교반하고 이후 상온에서 12시간 교반하여 반응시켰다. 반응 용액 5ml를 디에틸에테르 (Diethylether: DE) 40mL에 침전시킨 후 원심분리(3500rpm, 5분)하여 상층액을 제거하고 침전물을 수득하였다. 원심분리를 총 3회 반복한 후 감압 건조하여 잔여 시약과 잔여 DE를 제거하였다. 건조된 합성물 500mg을 DCM 5 ml에 녹인 후 에틸렌다이아민 (Ethylenediamine :EDA) 75.8μL를 첨가하고, 약 12시간 교반하여 반응시켰다. 반응 용액을 하루 동안 투석막(MWCO: 3500Da)을 이용하여 투석을 진행시킨 후 얻은 아민-폴리프로필렌옥사이드 3.8k 포함 블록 고분자를 동결건조하여 파우더 형태로 보관하였다. 결과는 도 1(b)와 같이 핵자기공명스펙트럼(¹H-NMR)을 통하여 확인하였다.

[72] 이후 아민-폴리프로필렌옥사이드 3.8k 포함 블록 고분자 4mg을 0.1 M PBS에 10mg/ml 농도로 녹이고, 2mg/ml의 2-머캅토에탄올(2-Mercaptoethanol: 2-ME)을 42.9μL 첨가한 뒤 1시간 동안 교반하여 씨올-폴리프로필렌옥사이드 3.8k 포함 블록 고분자를 제조하였다.

[73] 아달리무맙 제형 내 부형제 제거를 위해 투석 카세트(MWCO: 20KDa)와 0.1M PBS 용매를 이용하여 하루 동안 투석을 진행하였다. 투석 후 항체 용액을 수득하여 BCA assay 방법을 이용하여 항체를 정량하였다. 4mg의 항체 용액에 1mg/mL 농도의 설포-SMCC(sulfo-succinimidyl 4-(N-maleimidomethyl)cyclohexane-1-carboxylate: sulfo-SMCC)를 59μL 첨가한 후 1시간 동안 교반하여 항체의 아민 그룹을 말레이미드 그룹으로 치환하였다. 미반응 sulfo-SMCC를 제거하기 위해 PD-10 컬럼으로 정제한 후, 말레이미드 그룹으로 치환된 항체 용액 4mL에 씨올-폴리프로필렌옥사이드 3.8k 포함 블록 고분자를 347μL 넣고 4°C에서 18시간 교반하였다. 이 후 아미콘 울트라 (Amicon Ultra 2mL, MWCO: 100kDa) 튜브에서 원심분리(6500g, 20분)하여 미 반응물을 제거 한 최종 합성물을 얻었으며, 최종 합성물은 용액 상태로 냉장 보관하였다.

[74] 실시예 2: 인플릭시맙-말레이미드-씨올-폴리프로필렌옥사이드 1.7k 포함 블록 고분자 접합체 제조 및 정제

[75] 제조 방법은 상기 아달리무맙-말레이미드-씨올-폴리프로필렌옥사이드 1.7k 포함 블록 고분자 접합체(실시예 1-1)의 제조 방법과 동일하나, 항체 종류로 아달리무맙 대신 인플릭시맙을 사용하여 인플릭시맙-말레이미드-씨올-폴리프로필렌옥사이드 1.7k 포함 블록 고분자를 제조하였다.

[76] 실시예 3: 골리무맙-말레이미드-씨올-폴리프로필렌옥사이드 1.7k 포함 블록 고분자 접합체 제조 및 정제

[77] 제조 방법은 상기 아달리무맙-말레이미드-씨올-폴리프로필렌옥사이드 1.7k 포함 블록 고분자 접합체(실시예 1-1)의 제조 방법과 동일하나, 항체 종류로 아달리무맙 대신 골리무맙을 사용하여 골리무맙-말레이미드-씨올-폴리프로필렌옥사이드 1.7k 포함 블록 고분자를 제조하였다.

- [78] <실험예 1> 항체-링커-폴리프로필렌옥사이드 포함 블록 고분자 접합체 합성 여부 분석
- [79] 실험예 1-1: 말디-토프-무게분석을 이용한 분자량 측정
- [80] 상기 실시예 1-1, 2 및 3에서 제조한 항체-링커-폴리프로필렌옥사이드 포함 블록 고분자 접합체의 고분자 접합 여부를 확인하기 위해 MALDI-TOF/MS 장치를 이용하여 분자량을 측정하였다.
- [81] MALDI-TOF/MS 분석에서, 각 시료는 BCA assay를 통해 정량한 후 항체 기준으로 1mg/mL 농도로 제작하여 준비하였다. 장비는 Applied Biosystems사의 MALDI TOF Voyager DE-STR모형을 사용하여 positive mode, linear mode로 진행하였고, 매트릭스는 시나핀산(Sinapic acid, SA) 매트릭스를 사용하였다.
- [82] MALDI-TOF/MS 분석 결과, 도 2와 같이 아달리무맙-폴리프로필렌옥사이드 1.7k 포함 블록 고분자, 인플릭시맙-폴리프로필렌옥사이드 1.7k 포함 블록 고분자, 골리무맙-폴리프로필렌옥사이드 1.7k 포함 블록 고분자의 분자량이 각각 약 157kDa, 158kDa, 159kDa로 측정되었다. 이는 아달리무맙(148kDa) 인플릭시맙(149kDa), 골리무맙(150kDa)에 아민-폴리프로필렌옥사이드 1.7k 포함 블록 고분자(8640Da) 한 분자의 분자량을 더한 값과 유사하며, 이를 통해 항체-링커-폴리프로필렌옥사이드 포함 블록 고분자 접합체가 합성된 것을 확인하였다.
- [83] 실험예 1-2: SDS-PAGE 분석을 이용한 분자량 측정
- [84] 상기 실시예 1-1, 2 및 3에서 제조한 항체-링커-폴리프로필렌옥사이드 포함 블록 고분자 접합체의 고분자 접합 여부를 확인하기 위해 SDS-PAGE를 이용하여 분자량을 측정하였다.
- [85] SDS-PAGE 분석을 위해서 각 시료의 최종 농도를 0.5mg/mL 과 0.25mg/mL로 설정하여 loading buffer와 혼합하였다. 환원 조건의 경우 30% 글리세롤과 0.05% 디티오프레이트(Dithiothreitol, DTT)가 포함된 5X loading buffer를 사용하였다. 겔은 BIORAD사의 Mini-PROTEAN TGX gels (4-15% gradient)을 사용하였고, 쿠마시 블루(Coomassie blue) 염색을 통해 단백질 염색을 진행하였다. 이후 염색을 제거하고 화학형광이미지분석장치(Chemi Image Documentation System)을 이용하여 겔을 촬영하였다.
- [86] SDS-PAGE 분석 결과, 도 3과 같이 환원 조건의 시료에서 약 50kDa 위치에서 항체의 중쇄의 밴드가 나타나고, 밴드의 윗부분에는 폴리프로필렌옥사이드 포함 블록 고분자에 접합으로 인하여 분자량이 증가한 항체-링커-폴리프로필렌옥사이드 포함 블록 고분자 접합체로 추측되는 밴드가 2개 관찰되었다. 해당 결과를 통해 아달리무맙, 인플릭시맙, 골리무맙 각각에 폴리프로필렌옥사이드 포함 블록 고분자 분자가 1개 내지 3개 접합된 것을 확인하였다.
- [87] 실험예 1-3: 액체 크로마토그래피를 이용한 접합체의 정량
- [88] 상기 실시예 1-1에서 제조한 항체-링커-폴리프로필렌옥사이드 포함 블록 고분자 접합체의 고분자 접합 여부를 확인하기 위해 소수성-상호작용 컬럼을 이용한 액체 크로마토그래피(HIC-HPLC)이용하여 접합체를 정량하였다.

- [89] HIC-HPLC 분석은 Waters사의 W2690/5 분리 모듈을 이용하였고, W2489 UV/Visible detector를 통해 280nm에서 시료를 측정하였다. 컬럼은 Thermo fisher scientific 사의 MAbPac HIC-Butyl 5 μ m, 4.6x100mm 컬럼을 사용하였고, 분석에 사용된 용매는 1.5M ammonium sulfate, 50mM sodium phosphate (pH 7.0)과 50mM sodium phosphate (pH 7.0) : Isopropyl alcohol = 8:2 용매를 사용하였다. 유속은 0.8mL/min, 컬럼 온도는 25°C로 설정하여 분석을 진행하였다. 기존 항체의 5, 2.5, 1, 0.5, 0.25, 0.1, 0.05, 0.025, 0.01, 0mg/mL를 레퍼런스로하여 분석을 진행하였다.
- [90] HIC-HPLC 분석 결과, 도 4와 같이 표준물질의 경우 13분대에서 항체의 peak이 나타나는 것을 확인할 수 있었다. 항체-링커-폴리프로필렌옥사이드 포함 블록 고분자 접합체의 경우 폴리프로필렌옥사이드 포함 블록 고분자가 접합되지 않은 기존 항체의 peak이 마찬가지로 13분대에서 나타났고, 20분대와 25분대에서 각각 peak이 형성된 것을 확인했다. 폴리프로필렌옥사이드 포함 블록 고분자 접합 시 증가된 소수성을 고려하였을 때, 각 peak은 폴리프로필렌옥사이드 포함 블록 고분자가 각각 1개, 2개가 붙은 항체-링커-폴리프로필렌옥사이드 포함 블록 고분자 접합체로 판단하였다.
- [91] 상기 MALDI-TOF-MS와 SDS-PAGE, HIC-HPLC 분석 결과로부터 같은 접합 경향이 나타난 것을 확인하였고, 이를 통해 항체-링커-폴리프로필렌옥사이드 포함 블록 고분자 접합체가 합성된 것을 확인하였다.
- [92] <실험예 2> 항체-링커-폴리프로필렌옥사이드 포함 블록 고분자 접합체의 안정성 평가
- [93] 실험예 2-1. 원편광 이색성 분석을 이용한 안정성 평가
- [94] 상기 실시예 1-1, 2 및 3에서 제조한 항체-링커-폴리프로필렌옥사이드 포함 블록 고분자 접합체의 2차구조 변형 여부를 확인하기 위해서 원편광 이색성 (Circular dichroism spectrometer, CD) 분석을 진행하였다.
- [95] 항체 및 항체-링커-폴리프로필렌옥사이드 포함 블록 고분자 접합체를 BCA assay로 정량하여 항체 기준 0.5mg/mL 농도로 준비하고 CD 스펙트럼을 분석하였다. 분석 범위는 200nm-300nm에서 실시하였으며, 총 10회 accumulation을 수행하였다.
- [96] 항체 및 항체-링커-폴리프로필렌옥사이드 포함 블록 고분자 접합체의 CD 스펙트럼을 확인한 결과, 도 5과 같이 두 물질 모두 항체에서 특이적으로 나타나는 베타-시트 구조와 이황화 결합 peak을 확인할 수 있었으며, 항체와 항체-링커-폴리프로필렌옥사이드 포함 블록 고분자의 스펙트럼에서 차이가 없는 것을 통해 2차구조의 변형이 없는 것을 확인하였다. 따라서 해당 항체-링커-폴리프로필렌옥사이드 포함 블록 고분자가 항원과의 상호작용이 가능한 것으로 판단하였다.
- [97] 실험예 2-2. 생체조건 내 안정성 평가
- [98] 상기 실시예 1-1에서 제조한 항체-링커-폴리프로필렌옥사이드 포함 블록 고분자 접합체의 기존 항체 대비 안정성을 평가하기 위하여, PBS에서 기존 항체와 항

체-링커-폴리프로필렌옥사이드 포함 블록 고분자 접합체의 구조 안정성을 비교하였다.

- [99] 항체와 항체-링커-폴리프로필렌옥사이드 포함 블록 고분자의 최종 농도가 0.5mg/ml이 되도록 준비하고 섭씨 37도 조건에서 4주간 배양하였다. 항체의 안정성은 상기 실험예 2-1에서 사용된 원평광 이색성 분석 방법을 통해 시간 경과에 따른 2차구조 변화 양상을 확인하였다.
- [100] PBS에서의 항체 안정성 평가 결과, 도 6와 같이 기존 항체 및 항체-링커-폴리프로필렌옥사이드 포함 블록 고분자 접합체 모두 0일차 대비 CD spectrum에 유의한 변화가 나타나지 않았다. 이를 통해, 항체-링커-폴리프로필렌옥사이드 포함 블록 고분자 접합체가 기존 항체와 마찬가지로 생체 내에서 단백질의 2차 구조를 4주 이상 유지할 것으로 예상할 수 있다.
- [101] 실험예 2-3. 단백질 분해 효소에서 분해 안정성 평가
- [102] 상기 실시예 1-1에서 제조한 항체-링커-폴리프로필렌옥사이드 포함 블록 고분자 접합체의 기존 항체 대비 안정성을 평가하기 위하여, 기존 항체와 항체-링커-폴리프로필렌옥사이드 포함 블록 고분자 접합체에 단백질 분해 효소를 처리하였다. 단백질 분해 효소는 프로테아제 K(Proteinase K)를 선정하였다.
- [103] 1X HBSS, 1mM EDTA에 프로테아제 K를 250ug/ml로 준비하고, 항체는 기존 완충용액인 0.1M PBS를 이용해 4mg/ml로 준비하였다. 두 용액을 1:1 부피비로 혼합한 후 37도씨에서 각각 0시간, 1시간, 2시간 처리하였다. 이후 분해효소의 작용을 종결시키기 위해서 4-벤젠설포닐 플루오라이드(4-benzenesulfonyl fluoride, AEBSF)를 최종 용액에서 100mM이 되도록 첨가하였다. 각 시료는 역상 고성능 액체크로마토그래피(RP-HPLC)로 분석하기 위해 같은 부피의 이동상 용매와 혼합하여 분석을 진행하였다. 컬럼은 Thermo MAbPac RP column (2.1mm, 100mm)을 사용하였으며, 이동상 용매는 각각 물(0.1% 포름산)과 아세트니트릴(0.1% 포름산)을 사용하여 농도구배로 측정을 진행하였다. 기기 분석 시 유속은 0.4ml/min으로 섭씨 65도에서 측정을 진행하였다.
- [104] 효소 단백질 분해 안정성 평가 결과, 도 7과 같이 기존 항체 대비 항체-링커-폴리프로필렌옥사이드 포함 블록 고분자 접합체에서 시간 경과에 따른 프로테아제 K의 분해 정도가 감소하였다. 이는 항체에 폴리프로필렌옥사이드 포함 블록 고분자가 접합됨으로써 분해 효소의 접근을 물리적으로 방해하는 ‘Steric hindrance’ 효과에 의해 항체의 분해 작용이 저해된 것으로 판단하였다. 이를 통해, 항체-링커-폴리프로필렌옥사이드 포함 블록 고분자 접합체가 기존 항체 대비 생체 내 안정성이 높을 것으로 예상할 수 있다.
- [105] <실험예 3> 항체-링커-폴리프로필렌옥사이드 포함 블록 고분자 접합체의 세포 독성 및 생체 내 TNF- α 중화 효과 확인
- [106] 실시예 1-1, 2 및 3에서 제조한 항체-링커-폴리프로필렌옥사이드 포함 블록 고분자 접합체가 TNF- α 를 중화시키는 능력을 유지하고 독성이 나타나지 않는지 확인하기 위한 세포 실험을 진행하였다.

- [107] 항체-링커-폴리프로필렌옥사이드 포함 블록 고분자 접합체의 세포 독성을 확인하기 위해서 마우스 섬유아세포 세포주인 L929에 대한 독성평가를 진행하였다. L929는 RPMI에 FBS 10%, 페니실린-스트렙토마이신 1% 조성의 배지에서 배양하였다. 세포를 96well plate에 1×10^4 세포수로 맞추어 실험을 진행하였다. 이후 단백질 기준 최대 $100 \mu\text{g/ml}$ 의 농도로 각 세포 그룹에 처리하였다. 이후 37°C , 5% CO_2 상태에서 24시간 동안 배양한 후, 배양액을 제거하고 Dulbecco's phosphate-buffered saline (DPBS)로 한 번 세척한 후 MTT assay를 진행하였다. MTT 시약 (0.4 mg/mL) 처리 후 37°C , 5% CO_2 상태에서 4시간 동안 배양하고, 시약을 제거한 뒤 DMSO로 포르마잔을 녹이고 microplate reader를 이용하여 570 nm 에서 흡광도를 측정하여 세포 생존율을 분석하였다. 도 8과 같이, 정상 세포에 대한 독성 효과를 먼저 확인한 후 기존 항체와 항체-링커-폴리프로필렌옥사이드 포함 블록 고분자의 세포 독성을 이와 비교하였다. 그 결과, 기존 항체 및 항체-링커-폴리프로필렌옥사이드 포함 블록 고분자 모두 최대 $100 \mu\text{g/ml}$ 에서도 유의미한 세포 독성 수치가 나타나지 않음을 확인하였다.
- [108] 이후 항체-링커-폴리프로필렌옥사이드 포함 블록 고분자 접합체의 생물학적 기능이 유지되는지 확인하기 위해, 생체 내 $\text{TNF-}\alpha$ 중화 효과를 실험하였다. 세포주는 인간 각질형성세포인 HaCaT 세포주를 사용하였으며, DMEM에 FBS 10%, 페니실린-스트렙토마이신 1% 조성의 배지에서 배양하였다. 세포는 6 well plate에 5×10^4 세포수로 맞추어 실험을 진행하였다. 세포의 세포자멸사를 유도하기 위해서 재조합 인간 $\text{TNF-}\alpha$ 와 사이클로헥시미드(Cycloheximide, CHX)를 사용하였다.
- [109] 실험은 $\text{TNF-}\alpha$ 및 CHX를 처리하지 않은 음성 대조 그룹(SF), $\text{TNF-}\alpha$ 와 CHX 모두 처리한 양성 대조 그룹(TNF+CHX), 양성 대조 그룹에 기존 항체를 처리한 그룹(ADA, IFX, GOL), 양성 대조 그룹에 항체-링커-폴리프로필렌옥사이드 포함 블록 고분자 접합체를 처리한 그룹(ADA-PX, IFX-PX, GOL-PX) 총 4그룹으로 나누어 진행하였다. 각 항체와 항체-링커-폴리프로필렌옥사이드 포함 블록 고분자 접합체는 BCA assay를 통해 정량하여, 단백질 기준으로 $1 \mu\text{g/ml}$ 의 농도로 각 세포 그룹에 처리하였다. $\text{TNF-}\alpha$ 의 경우 50 ng/mL 로 처리하였고, CHX의 경우 $5 \mu\text{g/mL}$ 로 처리하였다. 이후 37°C , 5% CO_2 상태에서 24시간 동안 배양한 후, 세포자멸사 정도를 확인하기 위해 AnnexinV-PI 염색을 진행하였다. 각 그룹의 세포에 배양했을 당시의 미디어와 트립신-EDTA를 처리하여 탈착시킨 세포를 원심분리(2000 rpm , 5분)하고, DPBS(5% FBS)를 이용하여 세포를 세척해주었다. 이후 AnnexinV-PI 염색 키트(Abcam, ab14085)의 설명서에 따라 각 그룹에 AnnexinV-FITC와 PI 시약을 처리하고 유세포분석기(Becton Dickinson Sciences, FACS Canto II)를 이용한 유세포 분석을 실시하였다.
- [110] 그 결과, 도 9와 같이, 양성 대조군 그룹(TNF+CHX)에서는 AnnexinV 및 PI의 형광이 높아져 세포자멸사가 $\text{TNF-}\alpha$ 및 CHX에 의해 잘 유도되었음을 확인할 수 있었다. 다음으로 기존 항체를 처리한 그룹(ADA, IFX, GOL) 및 항체-링커-폴리

프로필렌옥사이드 포함 블록 고분자 접합체를 처리한 그룹(ADA-PX, IFX-PX, GOL-PX)에서는 양성 대조군 그룹(TNF+CHX)에 비해 세포자멸사 정도가 감소한 것을 확인할 수 있었다. 이는 기존 항체가 재조합 TNF- α 를 중화시킴으로써 세포자멸사를 억제한 효과이며, 기존 항체를 처리한 그룹(ADA, IFX, GOL)과 항체-링커-폴리프로필렌옥사이드 포함 블록 고분자 접합체를 처리한 그룹(ADA-PX, IFX-PX, GOL-PX) 사이에 유의미한 차이가 나타나지 않는 것을 통해, 항체-링커-폴리프로필렌옥사이드 포함 블록 고분자 접합체가 기존 항체와 유사한 수준의 TNF- α 중화 효과를 나타내는 것을 확인하였다.

- [111] <실험예 4> 항체-링커-폴리프로필렌옥사이드 포함 블록 고분자 접합체의 항염증 효과
- [112] 실험예 4-1. collagen-induced arthritis(CIA) 모델에서 항염증 효과 평가
- [113] 기존 항체와 항체-링커-폴리프로필렌옥사이드 포함 블록 고분자 접합체의 항염증 효과를 비교하기 위해, DBA/1J 종을 이용한 collagen-induced arthritis(CIA) 모델을 제작하였다. 0 일차에 Collagen type-II와 complete freund's adjuvant를 1:1 부피 비율로 혼합한 에멀전 100 μ l을 꼬리에 투여하여 CIA 모델을 제작하였다. 이후 21 일차에 관절염 병리 진행 속도를 높이기 위해 collagen type-II와 incomplete freund's adjuvant를 1:1 부피 비율로 혼합한 에멀전 100 μ l을 꼬리에 투여하여 염증을 유도하였다. 시료는 모델이 평균적으로 유도되었다고 판단한 시점에 10mg/kg만큼 복강 주사로 투여하였다. 염증 유도 이후 질병 경과를 확인하기 위해 3일에 한 번 발바닥과 발목의 두께 및 형성된 부종을 확인하였고 염증에 의한 무게 감소 확인을 위해 체중을 측정하였다. 발바닥 및 발목의 두께는 버니어 캘리퍼스 같은 위치에서 측정을 진행하였다. 관절염 수치의 경우 발가락에 형성된 부종의 개수 및 발목 부종에 따라 점수를 평가하였다. 부종이 없는 개체는 0점, 부종이 발가락 1-2개에서 발생한 경우 1점, 부종이 발가락 3-4개에서 발생한 경우 2점, 부종이 발가락 모두에서 발생한 경우 3점, 부종이 발가락 모두에서 발생하고, 발목 및 발바닥에서 관절 강직증 현상이 발생한 경우 4점을 부여하였다. 이후 다리 조직을 수거하고 염증 수준을 확인하기 위한 H&E 염색과 연골 손상을 확인하기 위한 Safranin O 염색, 그리고 뼈 침식 수준을 확인하기 위한 micro-CT 영상 이미지를 촬영하였다.
- [114] CIA 모델에 대한 치료 효과를 확인한 결과, 도 10과 같이 항체-링커-폴리프로필렌옥사이드 포함 블록 고분자 접합체를 처리한 마우스 그룹에서 대조군 대비 유의미한 관절염 수치 감소를 확인하였고, 시간이 경과할수록 기존 항체와 항체-링커-폴리프로필렌옥사이드 포함 블록 고분자 접합체의 효과 차이가 발생하였다. 발목 두께의 경우 또한 항체-링커-폴리프로필렌옥사이드 포함 블록 고분자 접합체를 처리한 마우스 그룹에서 대조군 대비 유의미한 감소를 확인하였고, 4주 보다 8주차에서 기존 항체 대비 항체-링커-폴리프로필렌옥사이드 포함 블록 고분자 접합체의 효과가 현저히 높았다. 이는 기존 항체 대비 항체-링커-폴리프로필렌옥사이드 포함 블록 고분자 접합체의 체내 반감기가 증가함에 따라 개선된 치

로 효과를 나타낸 것으로 판단하였다. 체중은 전체 기간 동안 정상 그룹의 체중이 가장 높고 대조군의 체중이 가장 낮았으며, 기존 항체 처리군 및 항체-링커-폴리프로필렌옥사이드 포함 블록 고분자 접합체 처리 군은 대체로 유사했다.

[115] CIA 모델에 대한 해부학적 분석에서는 도 11과 같이, 관절염이 유도된 그룹에 비해 항체-링커-폴리프로필렌옥사이드를 처리한 그룹에서 뼈 침식 수준을 의미하는 뼈의 표면적/부피 수치가 낮아진 것을 확인하였고, 이는 정상 그룹과 유사한 수치를 나타냈다.

[116] CIA 모델에 대한 조직학적 분석에서는 도 12와 같이, 항체-링커-폴리프로필렌옥사이드 포함 블록 고분자 접합체를 처리한 그룹이 항체 처리 그룹 및 대조군 대비 염증, 연골 및 뼈의 손상 수준이 현저히 낮은 것을 확인하였다.

[117] 실험예 4-2. ELISA 분석을 통한 염증성 인자 발현 수준 확인

[118] TNF- α 중화를 통한 염증성 인자들의 발현 수준을 확인하기 위해 Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) 분석을 진행하였다. 염증성 인자 분석을 위해 실험 마지막 주차에 마우스의 혈액에서 혈청을 수거하여 ELISA 분석을 진행하였으며, 염증성 사이토카인인 인터류킨-1 β (IL-1 β)의 발현 수준을 확인하였다. ELISA kit는 모두 abcam사의 제품을 사용하였고, 분석 과정은 해당 키트의 지시사항에 따라 진행되었다.

[119] ELISA 분석 결과, 도 13과 같이 아달리무맙-링커-폴리프로필렌옥사이드 포함 블록 고분자 접합체를 처리한 그룹이 음성 대조군 대비 IL-1 β 발현 수준이 유의하게 낮아짐을 확인하였다.

[120] 본 명세서는 본 발명의 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자이면 충분히 인식하고 유추할 수 있는 내용은 그 상세한 기재를 생략하였으며, 본 명세서에 기재된 구체적인 예시들 이외에 본 발명의 기술적 사상이나 필수적 구성을 변경하지 않는 범위 내에서 보다 다양한 변형이 가능하다. 따라서 본 발명은 본 명세서에서 구체적으로 설명하고 예시한 것과 다른 방식으로도 실시될 수 있으며, 이는 본 발명의 기술 분야에 통상의 지식을 가진 자이면 이해할 수 있는 사항이다.

청구범위

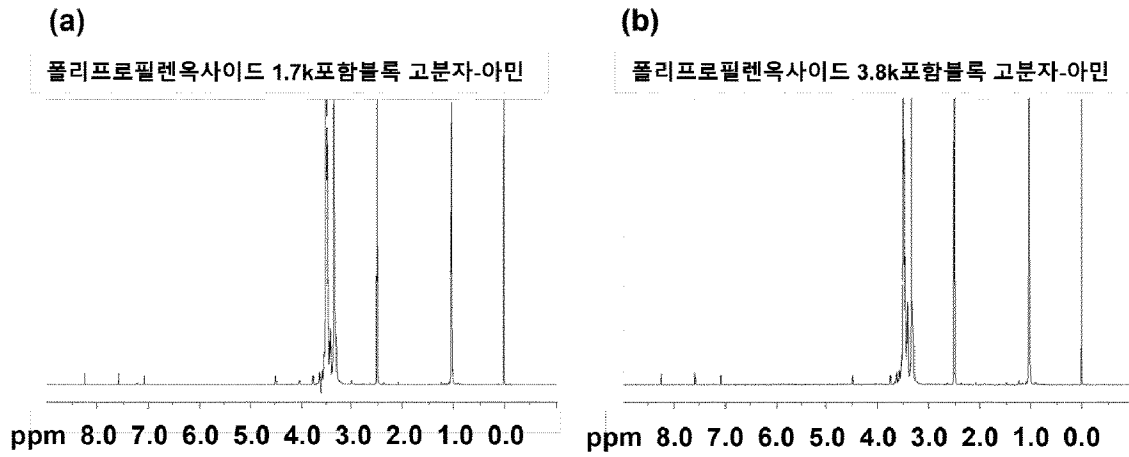
- [청구항 1] (a) 항체;
(b) 상기 항체에 공유결합으로 연결된 링커;
(c) 상기 링커에 공유결합으로 연결된 PEO(polyethylene oxide) 및 PPO(polypropylene oxide) 고분자;를 포함하는 접합체.
- [청구항 2] 제1항에 있어서, 상기 (a) 항체는 TNF- α 특이적 항체인, 접합체.
- [청구항 3] 제1항에 있어서, 상기 (a) 항체는 아달리무맙(Adalimumab), 인플릭시맙(Infliximab) 및 골리무맙(Golimumab)으로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나인, 접합체.
- [청구항 4] 제1항에 있어서, 상기 (b)의 링커는 말레이미드-씨올, 씨올, 말레이미드, 석시닉 안하이드라이드, 엔-하이드록시석신이미드 에스터, 카르복실-아민, 하이드라존, 및 다이설파이드 결합으로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나인, 접합체.
- [청구항 5] 제1항에 있어서, 상기 (c)의 PEO(polyethylene oxide) 및 PPO(polypropylene oxide) 고분자는 중량평균분자량이 1 kDa 내지 20 kDa인, 접합체.
- [청구항 6] 제1항에 있어서, 상기 공유결합은 싸이오이써 결합(thioether bond), 아마이드 결합(amide bond), 카보닐 결합(carbonyl bond), 에스터 결합(ester bond), 황화 에스터 결합(thioester bond), 설펜 아마이드 결합(sulfonamide bond) 및 우레탄 결합(urethane bond)으로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나 이상인, 접합체.
- [청구항 7] (a) PEO(polyethylene oxide) 및 PPO(polypropylene oxide) 고분자와 링커가 공유결합으로 연결된 제1 접합체를 제조하는 단계; 및
(b) 상기 제1 접합체의 링커와 항체가 공유결합으로 연결된 제2 접합체를 제조하는 단계를 포함하는, 접합체의 제조방법.
- [청구항 8] 제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 따른 접합체를 포함하는 자가면역 질환 예방 또는 치료용 약학 조성물.
- [청구항 9] 제8항에 있어서,
상기 자가면역 질환은 아토피성 피부염, 원형탈모증, 알레르기, 천식, 결막염, 치주염, 비염, 중이염, 인후염, 편도염, 폐렴, 위궤양, 위염, 크론병, 건선, 궤양성 대장염, 베체트 장염, 화농성 한선염, 포도막염, 치질, 통풍, 강직성 척추염, 류마티스 열, 루푸스, 섬유근통(fibromyalgia), 건선성 관절염, 축성 척추관절염, 골관절염, 류마티스 관절염, 건관절주위염, 건염, 건초염, 건주위염, 근육염, 간염, 방광염, 신장염, 쇼그렌 증후군(sjogren's syndrome) 및 다발성 경화증으로 이루어진 군 중에서 선택되는 어느 하나 이상인 약학 조성물.
- [청구항 10] 자가면역 질환의 예방 또는 치료에 사용하기 위한 (a) 항체; (b) 상기 항체에 공유결합으로 연결된 링커; (c) 상기 링커에 공유결합으로 연결된

PEO(polyethylene oxide) 및 PPO(polypropylene oxide) 고분자;를 포함하는 접합체를 포함하는 약학 조성물.

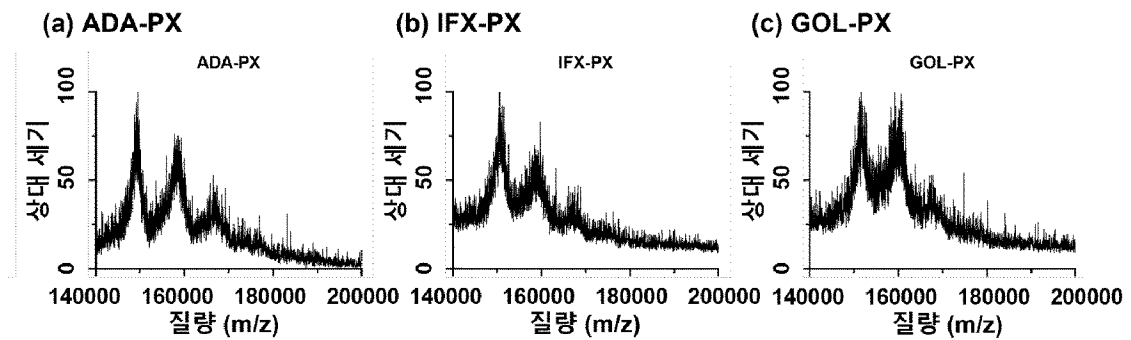
- [청구항 11] 제10항에 있어서,
 상기 자가면역 질환은 아토피성 피부염, 원형탈모증, 알레르기, 천식, 결막염, 치주염, 비염, 중이염, 인후염, 편도염, 폐렴, 위궤양, 위염, 크론병, 건선, 궤양성 대장염, 베체트 장염, 화농성 한선염, 포도막염, 치질, 통풍, 강직성 척추염, 류마티스 열, 루푸스, 섬유근통 (fibromyalgia), 건선성 관절염, 축성 척추관절염, 골관절염, 류마티스 관절염, 건관절주위염, 건염, 건초염, 건주위염, 근육염, 간 염, 방광염, 신장염, 쇼그렌 증후군(sjogren's syndrome) 및 다발성 경화증으로 이루어진 군 중에서 선택되는 어느 하나 이상인 약학 조성물.
- [청구항 12] 자가면역 질환의 치료용 약제의 제조를 위한 (a) 항체; (b) 상기 항체에 공유결합으로 연결된 링커; (c) 상기 링커에 공유결합으로 연결된 PEO(polyethylene oxide) 및 PPO(polypropylene oxide) 고분자;를 포함하는 접합체의 용도.
- [청구항 13] 제12항에 있어서,
 상기 자가면역 질환은 아토피성 피부염, 원형탈모증, 알레르기, 천식, 결막염, 치주염, 비염, 중이염, 인후염, 편도염, 폐렴, 위궤양, 위염, 크론병, 건선, 궤양성 대장염, 베체트 장염, 화농성 한선염, 포도막염, 치질, 통풍, 강직성 척추염, 류마티스 열, 루푸스, 섬유근통 (fibromyalgia), 건선성 관절염, 축성 척추관절염, 골관절염, 류마티스 관절염, 건관절주위염, 건염, 건초염, 건주위염, 근육염, 간 염, 방광염, 신장염, 쇼그렌 증후군(sjogren's syndrome) 및 다발성 경화증으로 이루어진 군 중에서 선택되는 어느 하나 이상인 용도.
- [청구항 14] 치료학적으로 유효한 양의 (a) 항체; (b) 상기 항체에 공유결합으로 연결된 링커; (c) 상기 링커에 공유결합으로 연결된 PEO(polyethylene oxide) 및 PPO(polypropylene oxide) 고분자;를 포함하는 접합체를 이를 필요로 하는 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는 자가면역 질환의 치료 방법.
- [청구항 15] 제14항에 있어서,
 상기 자가면역 질환은 아토피성 피부염, 원형탈모증, 알레르기, 천식, 결막염, 치주염, 비염, 중이염, 인후염, 편도염, 폐렴, 위궤양, 위염, 크론병, 건선, 궤양성 대장염, 베체트 장염, 화농성 한선염, 포도막염, 치질, 통풍, 강직성 척추염, 류마티스 열, 루푸스, 섬유근통 (fibromyalgia), 건선성 관절염, 축성 척추관절염, 골관절염, 류마티스 관절염, 건관절주위염, 건염, 건초염, 건주위염, 근육염, 간 염, 방광염, 신장염, 쇼그렌 증후군(sjogren's syndrome) 및 다발성 경화증으로 이루어진 군 중에서 선택되는 어느 하나 이상인 치료 방법.

[청구항 16] 제1항 내지 6항 중 어느 한 항에 따른 접합체 및 약제학적으로 허용 가능한 담체를 포함하는 약학 조성물.

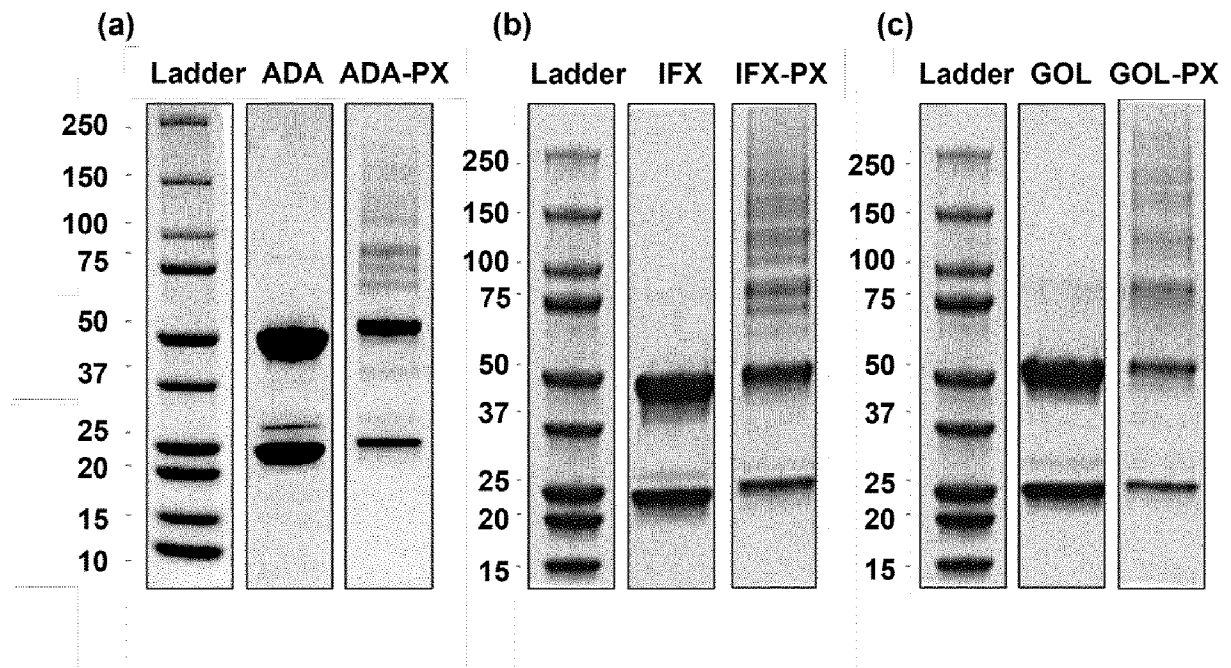
[도1]



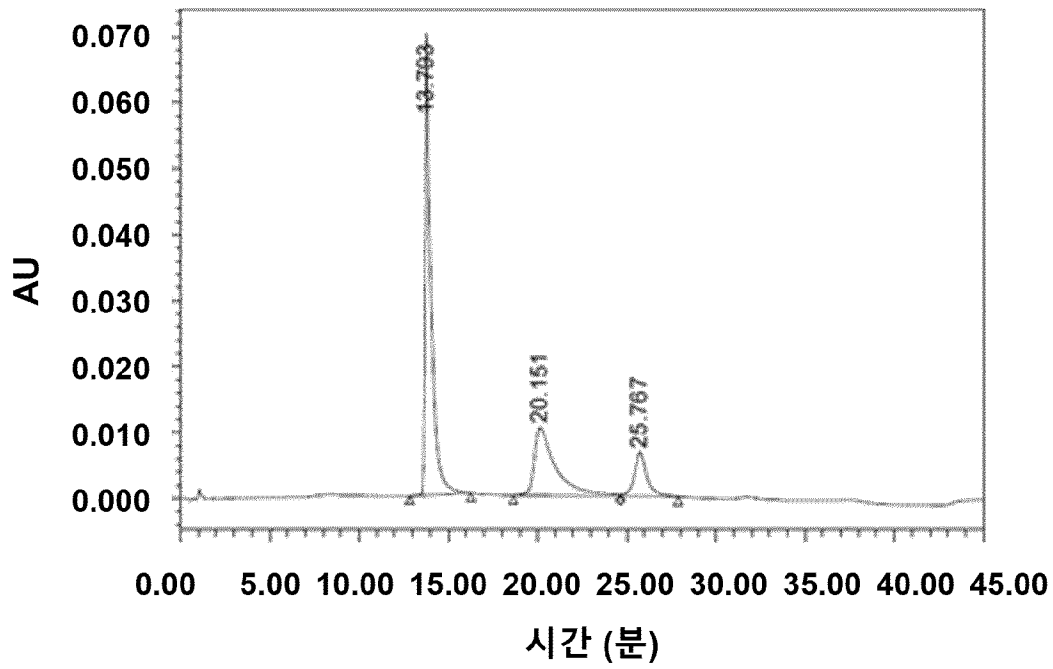
[도2]



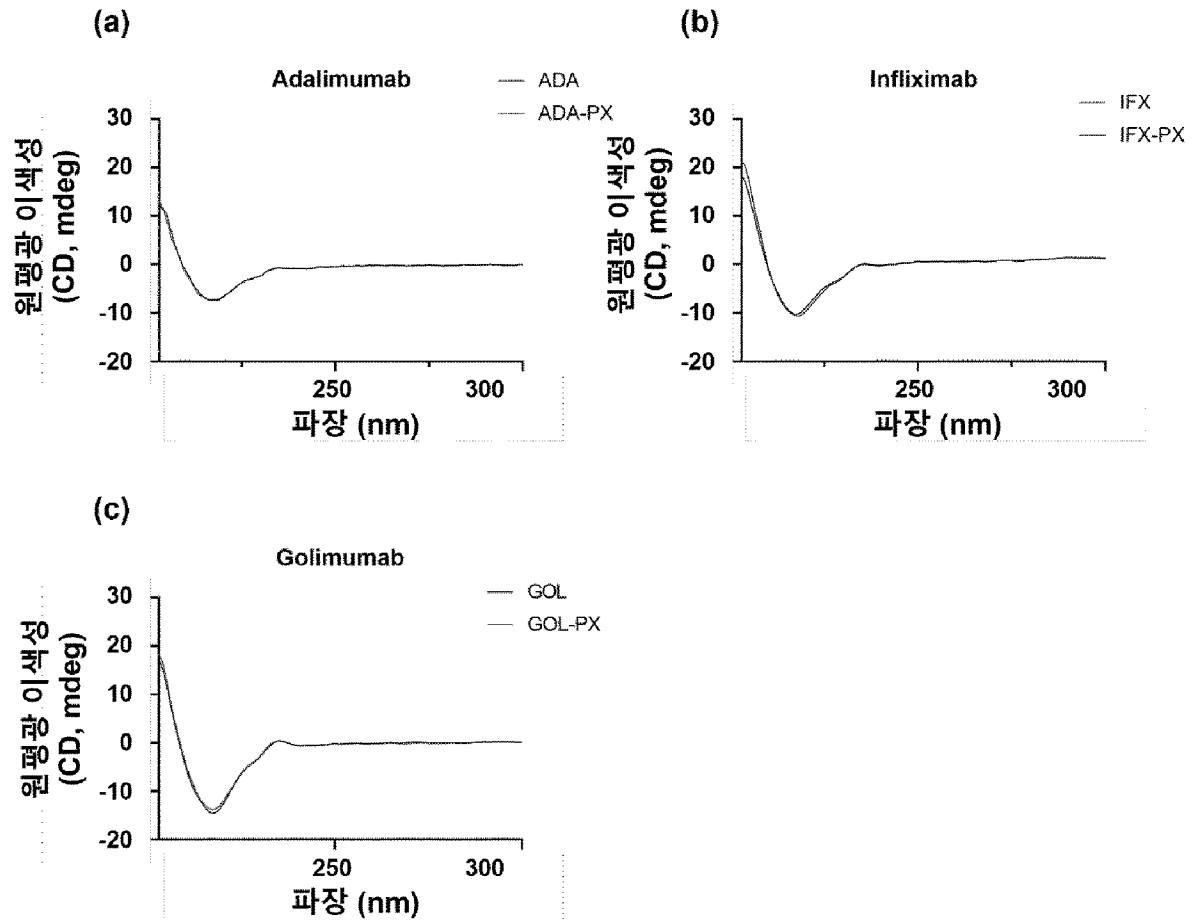
[도3]



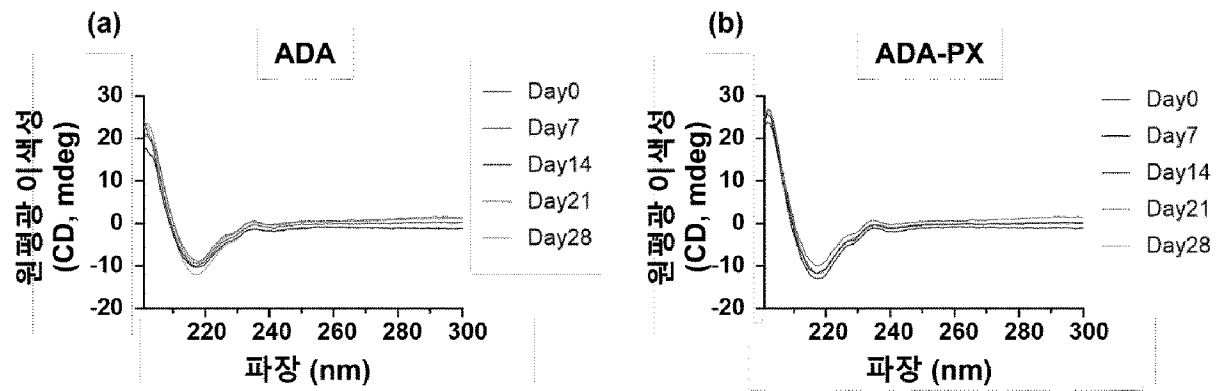
[도4]



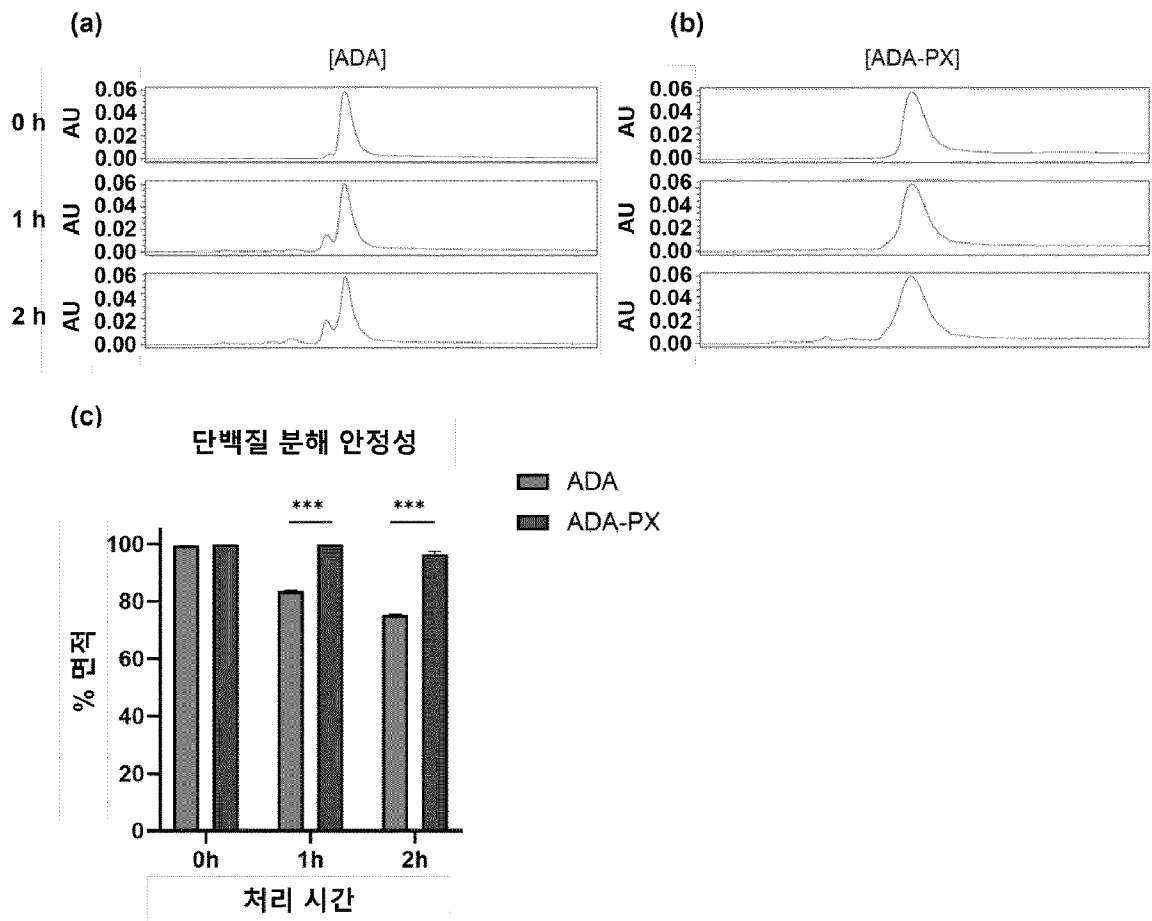
[도5]



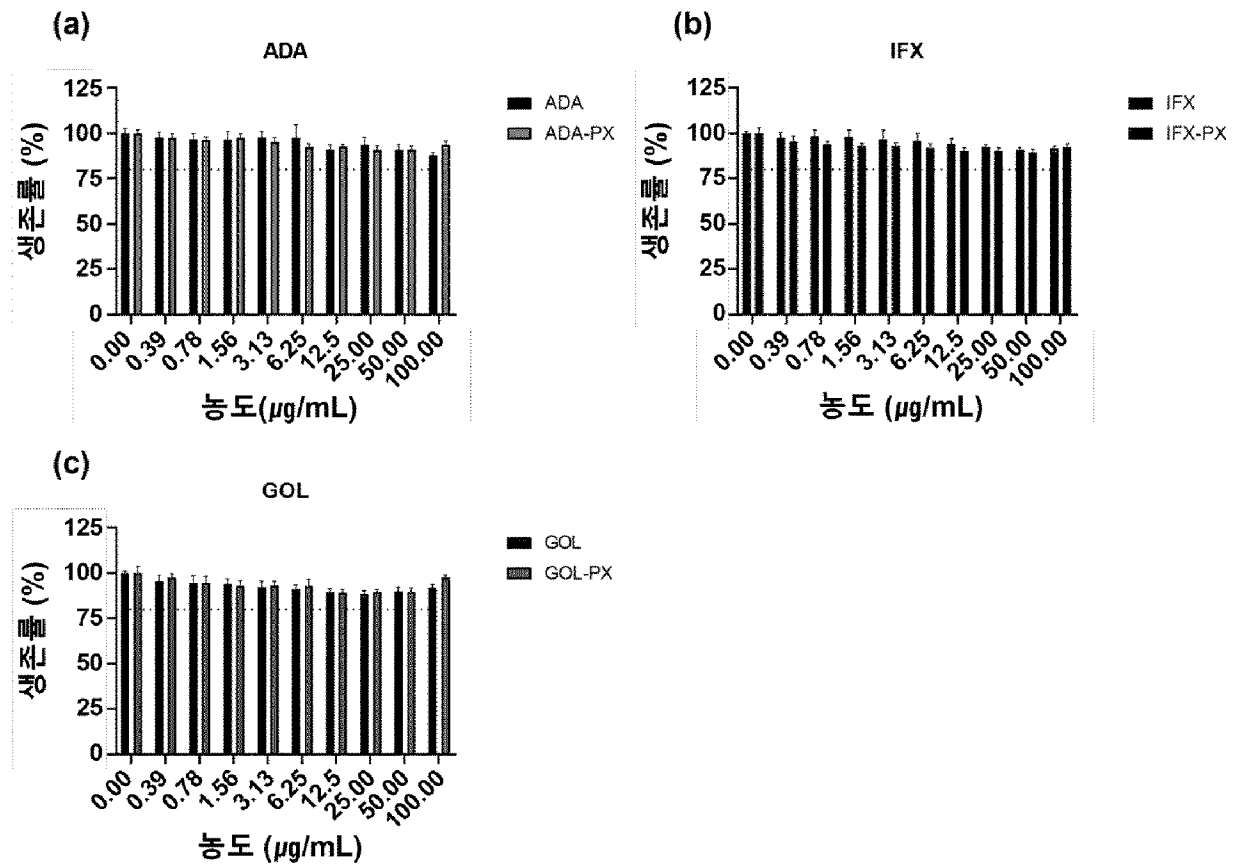
[도6]



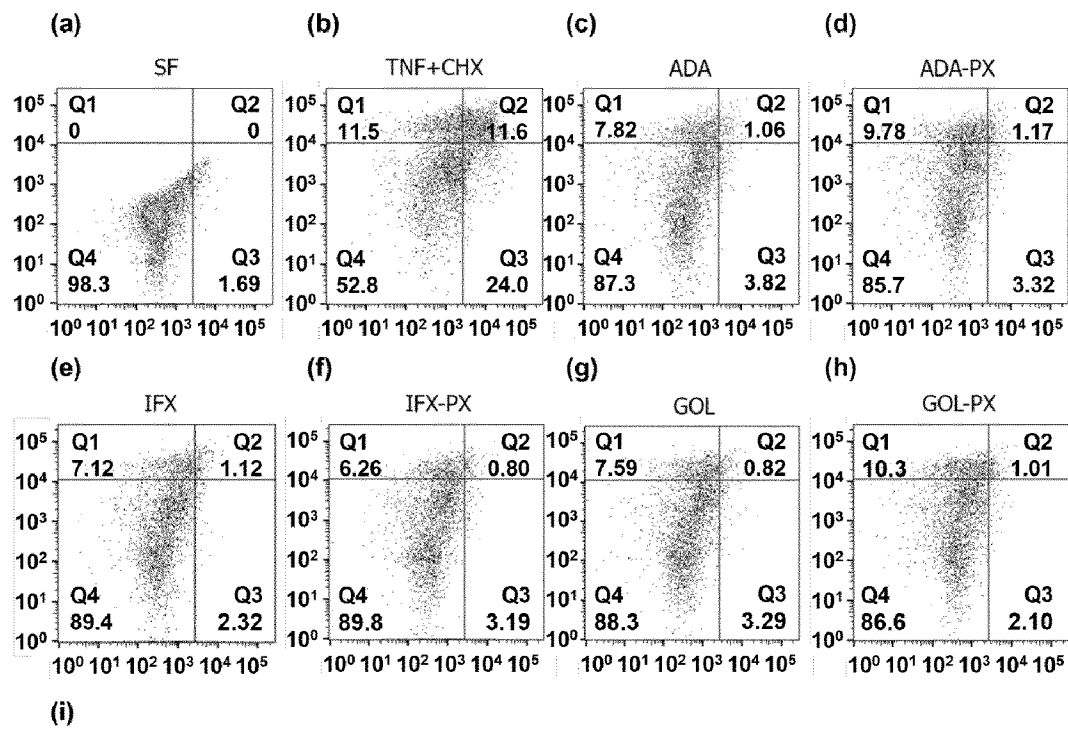
[도7]



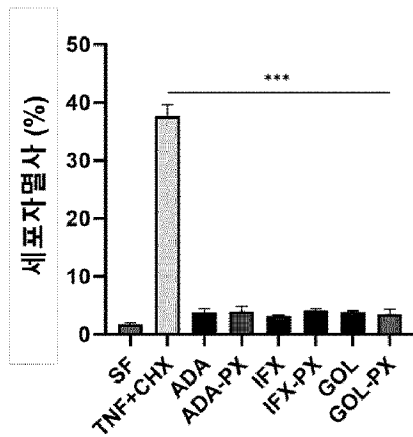
[도8]



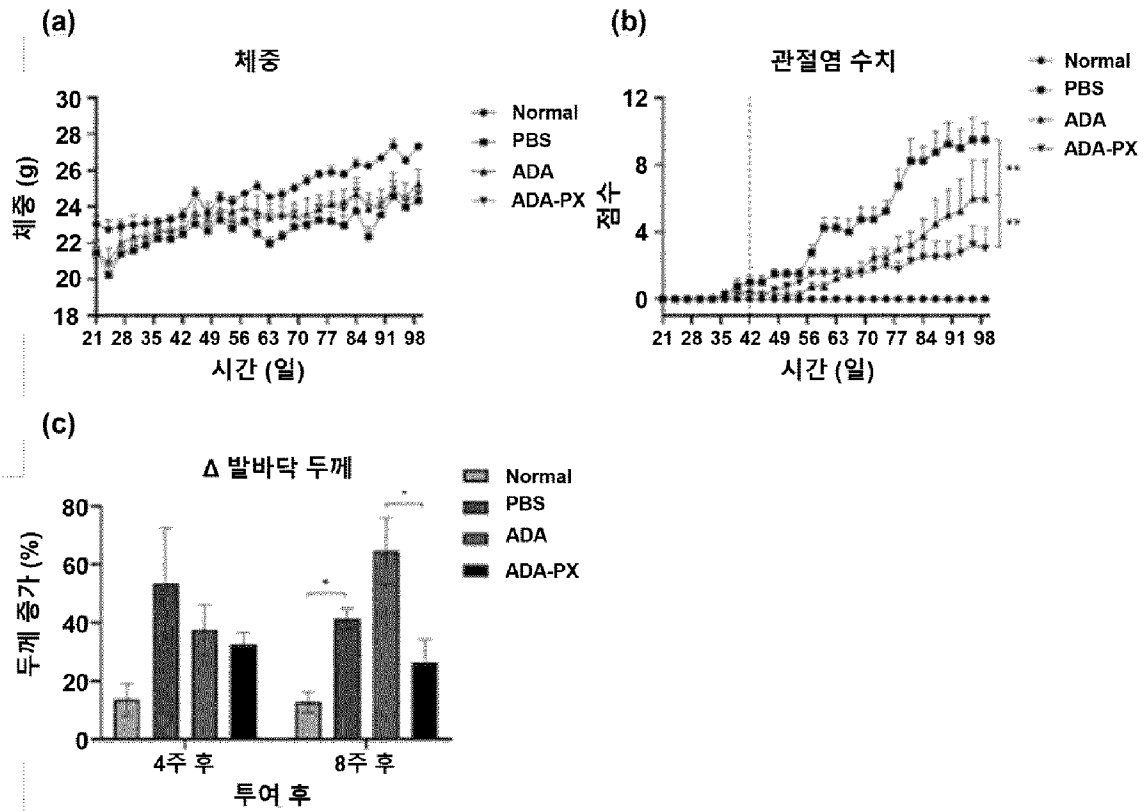
[도9]



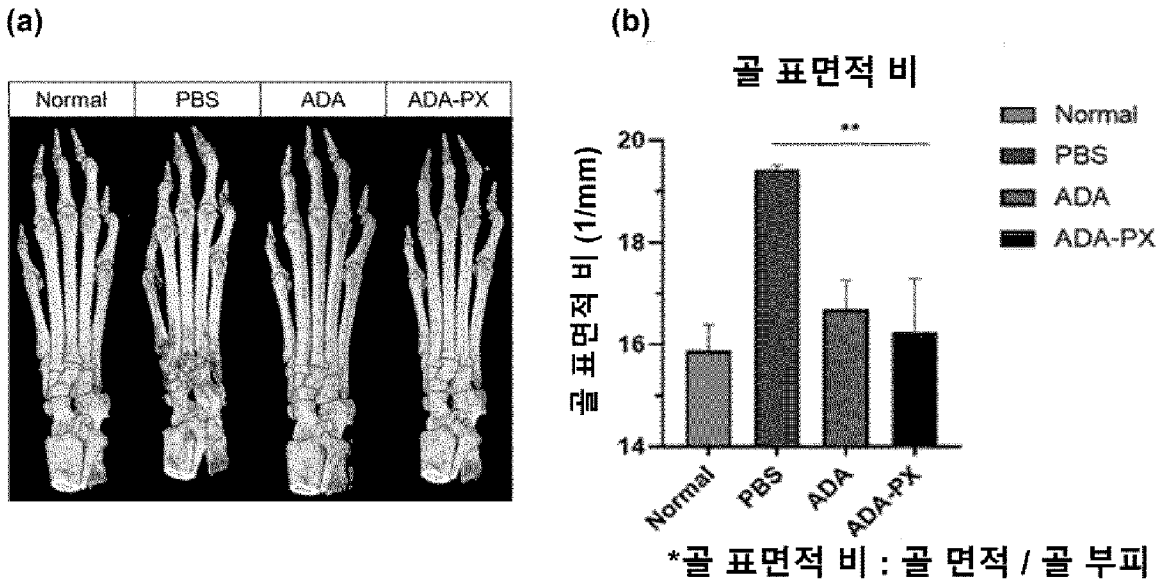
세포자멸사 억제



[도10]

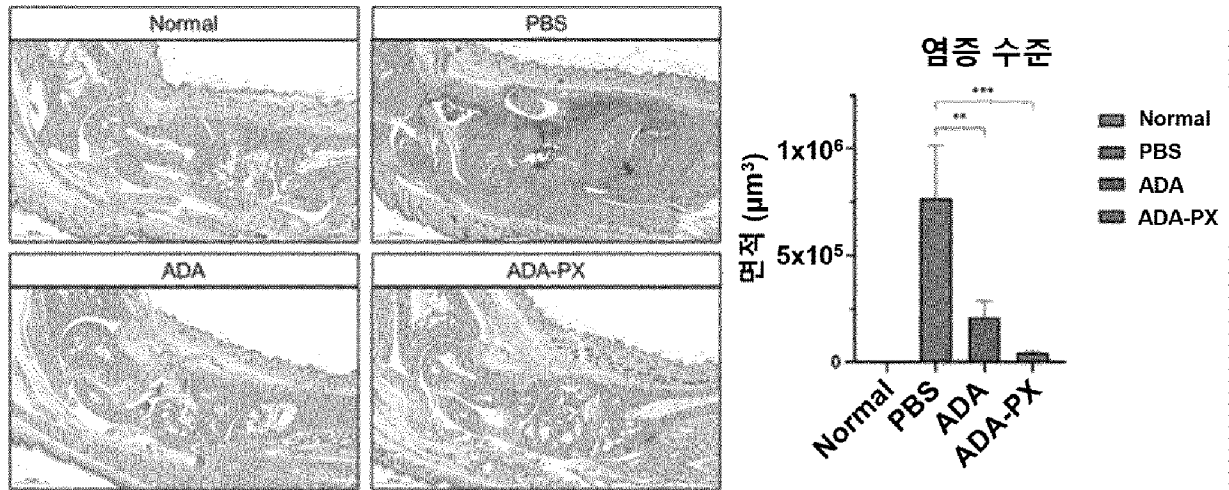


[도11]

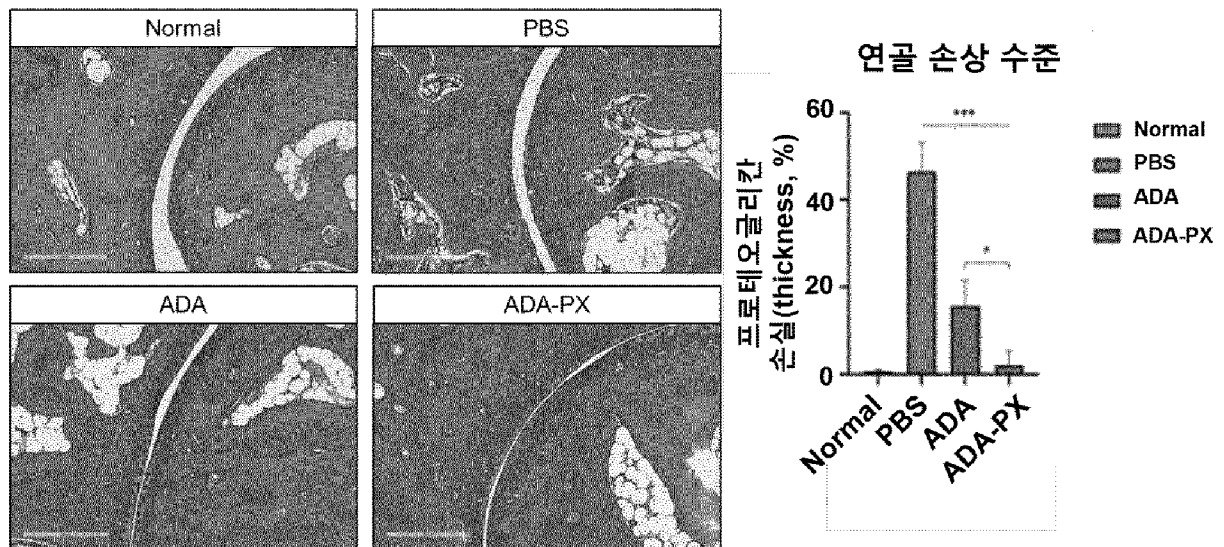


[도12]

(a)

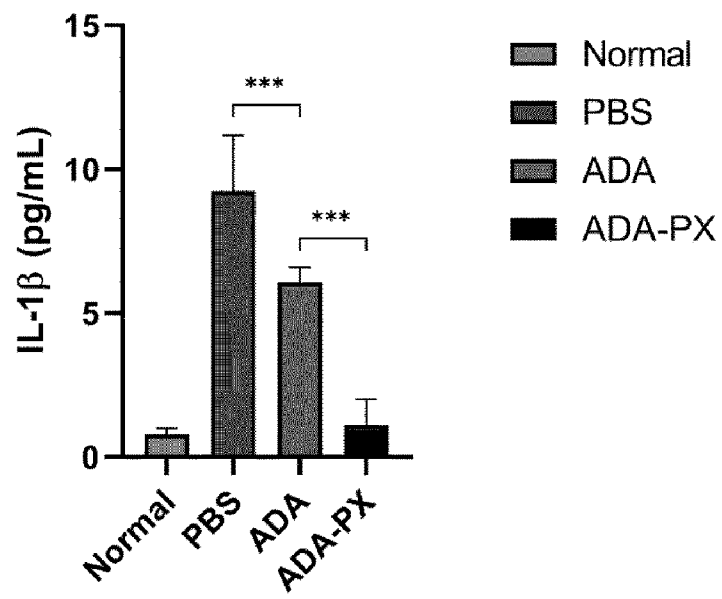


(b)



[도13]

염증성 사이토카인 발현 수준



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2023/006411

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61K 47/68(2017.01)i; A61K 47/59(2017.01)i; A61P 37/00(2006.01)i; C07K 16/24(2006.01)i; A61K 39/00(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)

A61K 47/68(2017.01); A61K 39/395(2006.01); A61K 47/59(2017.01); C07K 16/46(2006.01)

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: 항체(antibody), 아달리무맙(adalimumab), 인플릭시맙(infliximab), 골리무맙(golimumab), 링커(linker), 공유결합(covalent bond), PEO(polyethylene oxide), PPO(polypropylene oxide), 공중합체(copolymer), 접합체(conjugate), 자가면역 질환(autoimmune disease)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2007-117685 A2 (NEKTAR THERAPEUTICS AL, CORPORATION) 18 October 2007 (2007-10-18) See paragraphs [0003], [0007], [0061], [0063], [0071], [0076]-[0078], [0096]-[0098] and [0141].	1-13,16
X	RAFAEL, Diana et al. Efficient EGFR mediated siRNA delivery to breast cancer cells by cetuximab functionalized pluronic® F127/gelatin. Chemical Engineering Journal. 26 December 2017 (online publication date), vol. 340, pp. 81-93. See abstract; pages 82, 84, 87 and 88; and figures 1 and 4.	1,4-7,16
X	SONG, Hua et al. Anti-HIF-1 α antibody-conjugated pluronic triblock copolymers encapsulated with paclitaxel for tumor targeting therapy. Biomaterials. 11 December 2009 (online publication date), vol. 31, pp. 2302-2312. See abstract; and pages 2303 and 2304.	1,4-7,16
A	CHEN, Weiying et al. Intraarticular injection of infliximab-loaded thermosensitive hydrogel alleviates pain and protects cartilage in rheumatoid arthritis. Journal of Pain Research. 2020, vol. 13, pp. 3315-3329. See pages 3315-3328.	1-13,16

☒ 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

“D” document cited by the applicant in the international application

“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

07 August 2023

Date of mailing of the international search report

07 August 2023

Name and mailing address of the ISA/KR

Korean Intellectual Property Office
Government Complex-Daejeon Building 4, 189 Cheongsaro, Seo-gu, Daejeon 35208

Facsimile No. +82-42-481-8578

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2023/006411

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
PX	KR 10-2022-0064293 A (THE CATHOLIC UNIVERSITY OF KOREA INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION) 18 May 2022 (2022-05-18) See claims 1, 3-6 and 11; and paragraphs [0041] and [0042].	1,4-7,16

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2023/006411

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: **14,15**
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Claims 14 and 15 pertain to a method for treatment of the human body by therapy (PCT Article 17(2)(a)(i) and PCT Rule 39.1(iv)).
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2023/006411

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
WO	2007-117685	A2	18 October 2007	CA	2648582	A1	18 October 2007
				CA	2648582	C	06 December 2016
				EP	2004231	A2	24 December 2008
				JP	2009-533347	A	17 September 2009
				US	10232042	B2	19 March 2019
				US	2010-0021481	A1	28 January 2010
				US	2016-0030587	A1	04 February 2016
				US	2017-0196975	A1	13 July 2017
				US	9101670	B2	11 August 2015
				US	9636412	B2	02 May 2017
				WO	2007-117685	A3	02 October 2008
KR	10-2022-0064293	A	18 May 2022	WO	2022-103170	A1	19 May 2022

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC)) A61K 47/68(2017.01)i; A61K 47/59(2017.01)i; A61P 37/00(2006.01)i; C07K 16/24(2006.01)i; A61K 39/00(2006.01)i		
B. 조사된 분야 조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재) A61K 47/68(2017.01); A61K 39/395(2006.01); A61K 47/59(2017.01); C07K 16/46(2006.01) 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: 항체(antibody), 아달리무맙(adalimumab), 인플릭시맙(infliximab), 골리무맙(golimumab), 링커(linker), 공유결합(covalent bond), PEO(polyethylene oxide), PPO(polypropylene oxide), 공중합체(copolymer), 접합체(conjugate), 자가면역 질환(autoimmune disease)		
C. 관련 문헌		
카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
X	WO 2007-117685 A2 (NEKTAR THERAPEUTICS AL, CORPORATION) 2007.10.18 단락 [0003], [0007], [0061], [0063], [0071], [0076]-[0078], [0096]-[0098], [0141]	1-13,16
X	RAFAEL, DIANA 등, "Efficient EGFR mediated siRNA delivery to breast cancer cells by cetuximab functionalized pluronic® F127/gelatin", Chemical Engineering Journal, 2017년 12월 26일(온라인 공개일), 340권, 페이지 81-93 요약; 페이지 82, 84, 87, 88; 및 도면 1, 4	1,4-7,16
X	SONG, HUA 등, "Anti-HIF-1 α antibody-conjugated pluronic triblock copolymers encapsulated with paclitaxel for tumor targeting therapy", Biomaterials, 2009년 12월 11일(온라인 공개일), 31권, 페이지 2302-2312 요약; 및 페이지 2303, 2304	1,4-7,16
A	CHEN, WEIYING 등, "Intraarticular injection of infliximab-loaded thermosensitive hydrogel alleviates pain and protects cartilage in rheumatoid arthritis", Journal of Pain Research, 2020년, 13권, 페이지 3315-3329 페이지 3315-3328	1-13,16
☒ 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 "D" 본 국제출원에서 출원인이 인용한 문헌 "E" 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허 문헌 "L" 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌 "O" 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌 "P" 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌 "T" 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌 "X" 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신규성 또는 진보성이 없는 것으로 본다. "Y" 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다. "&" 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌		
국제조사의 실제 완료일 2023년08월07일(07.08.2023)		국제조사보고서 발송일 2023년08월07일(07.08.2023)
ISA/KR의 명칭 및 우편주소 대한민국 특허청 (35208) 대전광역시 서구 청사로 189, 4동 (둔산동, 정부대전청사) 팩스 번호 +82-42-481-8578		심사관 허주형 전화번호 +82-42-481-5373

제2기재란 일부 청구항을 조사할 수 없는 경우의 의견(첫 번째 용지의 2의 계속)

PCT 제17조(2)(a)의 규정에 따라 다음과 같은 이유로 일부 청구항에 대하여 본 국제조사보고서가 작성되지 아니하였습니다.

1. ☒ 청구항: **14,15**
이 청구항은 본 기관이 조사할 필요가 없는 대상에 관련됩니다. 즉,
청구항 14 및 15는 치료에 의한 사람의 처치방법에 관한 것입니다(PCT 제17조(2)(a)(i) 및 PCT 규칙 39.1(iv)).
2. ☐ 청구항:
이 청구항은 유효한 국제조사를 수행할 수 없을 정도로 소정의 요건을 충족하지 아니하는 국제출원의 부분과 관련됩니다. 구체적으로는,
3. ☐ 청구항:
이 청구항은 종속청구항이나 PCT규칙 6.4(a)의 두 번째 및 세 번째 문장의 규정에 따라 작성되어 있지 않습니다.

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
WO 2007-117685 A2	2007/10/18	CA 2648582 A1	2007/10/18
		CA 2648582 C	2016/12/06
		EP 2004231 A2	2008/12/24
		JP 2009-533347 A	2009/09/17
		US 10232042 B2	2019/03/19
		US 2010-0021481 A1	2010/01/28
		US 2016-0030587 A1	2016/02/04
		US 2017-0196975 A1	2017/07/13
		US 9101670 B2	2015/08/11
		US 9636412 B2	2017/05/02
		WO 2007-117685 A3	2008/10/02
KR 10-2022-0064293 A	2022/05/18	WO 2022-103170 A1	2022/05/19