

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2017년 6월 8일 (08.06.2017)



(10) 국제공개번호
WO 2017/095201 A1

- (51) 국제특허분류: A61K 47/48 (2006.01) A61K 38/00 (2006.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2016/014144
- (22) 국제출원일: 2016년 12월 2일 (02.12.2016)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보: 10-2015-0170929 2015년 12월 2일 (02.12.2015) 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). 박영진 (PARK, Young Jin); 18469 경기도 화성시 동탄기흥로 550, Gyeonggi-do (KR). 배성민 (BAE, Sung Min); 18469 경기도 화성시 동탄기흥로 550, Gyeonggi-do (KR). 정성엽 (JUNG, Sung Youb); 18469 경기도 화성시 동탄기흥로 550, Gyeonggi-do (KR). 권세창 (KWON, Se Chang); 18469 경기도 화성시 동탄기흥로 550, Gyeonggi-do (KR).

(74) 대리인: 손민 (SON, Min); 06302 서울시 강남구 양재천로 163 6층 한얼국제특허사무소, Seoul (KR).

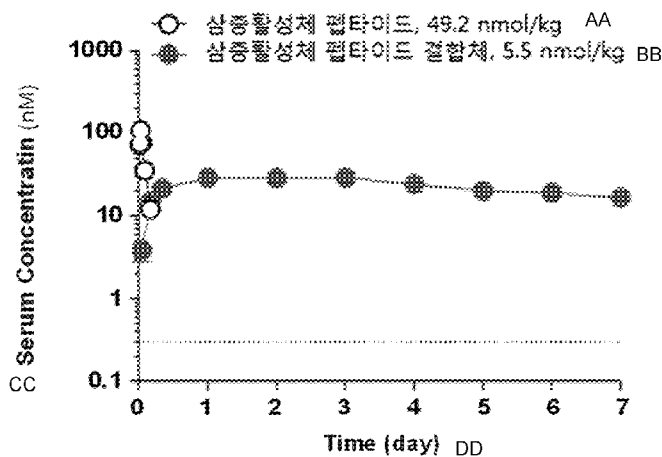
(81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, 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.

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

[다음 쪽 계속]

(54) Title: PROTEIN COMPLEX USING FATTY ACID DERIVATIVE, AND PREPARATION METHOD THEREFOR

(54) 발명의 명칭: 지방산 유도체를 이용한 단백질 결합체 및 이의 제조방법



AA ... Triple-activator peptide
BB ... Triple-activator peptide complex
CC ... Serum concentration (nM)
DD ... Time (day)

(57) Abstract: The present invention relates to: a protein complex in which the duration of biological activity is extended in comparison to that of a natural type since a bioactive polypeptide and a biocompatible material are linked through a fatty acid derivative; and a method for preparing the same. In the protein complex, of the present invention, having a biocompatible material, a fatty acid and a bioactive polypeptide, which are linked to each other, it was ascertained that the blood half-life of the bioactive polypeptide increased, and thus the protein complex can be widely used in the protein drug field.

(57) 요약서: 본 발명은 생리활성 폴리펩타이드와 생체적합성 물질이 지방산 유도체를 통해 연결되어 생리활성 지속기간이 천연형에 비해 연장된 단백질 결합체 및 이를 제조하는 방법에 관한 것이다. 본 발명의 생체적합성 물질, 지방산 및 생리활성 폴리펩타이드가 연결된 단백질 결합체는 생리활성 폴리펩타이드의 혈중 반감기가 증가됨을 확인하였는바, 단백질 약물 분야에서 널리 사용될 수 있다.

공개:

— 국제조사보고서와 함께 (조약 제 21 조(3))

— 명세서의 서열목록 부분과 함께 (규칙 5.2(a))

명세서

발명의 명칭: 지방산 유도체를 이용한 단백질 결합체 및 이의 제조방법

기술분야

- [1] 본 발명은 생리활성 폴리펩타이드와 생체적합성 물질이 지방산 유도체를 통해 연결되어 생리활성 지속기간이 천연형에 비해 연장된 단백질 결합체 및 이를 제조하는 방법에 관한 것이다.

[2]

배경기술

- [3] 일반적으로, 생리활성 폴리펩타이드는 안정성이 낮아 쉽게 변성되고 혈액 내 단백질 가수분해효소에 의해 분해되어 신장이나 간을 통해 쉽게 제거된다. 따라서, 약리성분으로 생리활성 폴리펩타이드를 포함하는 단백질 의약품의 혈중 농도 및 역가를 유지하기 위해서는 단백질 약물을 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, 단백질 약물의 혈중 안정성을 증가시키고 혈중 약물 농도를 오랫동안 높게 지속시켜 약효를 극대화하려는 노력이 계속되어 왔다. 이러한 단백질 약물의 지속성 제제는 단백질 약물의 안정성을 높이는 동시에 환자에게 면역반응을 유발하지 않아야 한다.
- [4] 단백질을 안정화시키고 단백질 가수분해효소와의 접촉 및 신장 소실을 억제하기 위한 방법으로, 종래에는 폴리에틸렌글리콜(polyethylene glycol, 이하 "PEG")과 같이 용해도가 높은 고분자를 단백질 약물 표면에 화학적으로 부가시키는 단백질 폐길화(Pegylation) 방법이 사용되어 왔다. PEG는 목적 단백질의 특정 부위 또는 다양한 부위에 비특이적으로 결합하여 용해도를 높임으로써 단백질을 안정화시키고, 단백질의 가수분해를 방지하는데 효과가 있으며 특별한 부작용도 일으키지 않는 것으로 알려져 있다(Sada *et al.*, J. Fermentation Bioengineering, 71: pp 137-139, 1991). 그러나, PEG의 결합에 의해 단백질의 안정성은 증가할 수 있지만 생리활성 단백질의 역가가 현저히 낮아지고, PEG의 분자량이 증가할수록 단백질과의 반응성이 낮아져 수율이 감소하는 문제가 있으며, 반감기의 증가도 충분치 않은 것으로 알려져 있다.
- [5] 그리고, 종래에는 지방산을 생리활성 폴리펩타이드의 약물 표면에 화학적으로 부가시키는 방법 또한 사용되어 왔다. 이와 같이 지방산을 약물 표면에 결합시키는 경우 장기 지속성 약물로서의 효과를 보기에는 어려움이 있었다.
- [6] 따라서, 해당 분야에서는 생체 내에서 생리활성 폴리펩타이드를 더욱 안정화시키고, 신장 소실을 억제하며 생리활성 폴리펩타이드의 혈중 반감기를

높게 유지할 수 있는 방법의 개발이 여전히 요구되고 있다.

[7]

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [8] 본 발명자들은 폐길화를 통한 단백질 안정성 증가가 아닌, 생리활성 폴리펩타이드와 단백질의 생체내 안정성을 증가시키는 생체적합성 물질을 지방산 유도체를 링커로 사용하여 공유결합시킴으로써, 생리활성 폴리펩타이드를 더욱 안정화시키고, 신장 소실을 억제하여 생리활성 폴리펩타이드의 혈중 반감기를 획기적으로 증가시킬 수 있음을 확인하고 본 발명을 완성하였다.

[9]

과제 해결 수단

- [10] 본 발명의 하나의 목적은 생리활성 폴리펩타이드 및 생체적합성 물질이 지방산 유도체를 통해 연결된, 단백질 결합체를 제공하는 것이다.
- [11] 본 발명의 다른 목적은 상기 단백질 결합체를 제조하는 방법을 제공하는 것이다.
- [12] 본 발명의 또 다른 목적은 생리활성 단백질의 혈중 반감기를 증가시키기 위해, 생리활성 폴리펩타이드와 생체적합성 물질을 지방산을 통해 연결시킨 단백질 결합체를 제공하는 것이다. 구체적으로, 상기 생리활성 폴리펩타이드와 생체적합성 물질은 링커인 지방산의 반응기를 통해 연결되는 것일 수 있다.

[13]

발명의 효과

- [14] 본 발명의 생체적합성 물질, 지방산 유도체 및 생리활성 폴리펩타이드가 연결된 단백질 결합체는 생리활성 폴리펩타이드의 혈중 반감기가 증가되었음을 확인하였는바, 단백질 약물 분야에서 널리 사용될 수 있다.

[15]

도면의 간단한 설명

- [16] 도 1은 본 발명의 일 실시예에 따라 제조된 면역글로불린 Fc 결합체 및 GLP-1, 글루카곤 및 GPI 수용체를 동시에 활성화시키는 삼중 활성체와 면역글로불린 Fc가 지방산 유도체를 통해 연결된 결합체에 대한 SDS-PAGE를 나타낸 도이다. M은 마커를, 1은 비환원 면역글로불린 Fc 결합체를, 2 및 3은 각각 비환원 및 환원 단백질 결합체를 나타낸다.
- [17] 도 2는 본 발명의 일 실시예에 따라 제조된 면역글로불린 Fc 결합체 및 삼중 활성체와 면역글로불린 Fc가 지방산 유도체를 통해 연결된 결합체의 인 비보 약물동태 측정 결과를 나타낸 도이다. 구체적으로, 비교군으로는 기존의 삼중 활성체를 사용하여, 시간에 따른 약물의 혈중농도 변화를 도시하였다.

[18]

발명의 실시를 위한 최선의 형태

- [19] 본 발명의 하나의 양태는 생리활성 폴리펩타이드 및 생체적합성 물질이 지방산 유도체를 통해 연결된, 단백질 결합체이다.
- [20] 하나의 구체예로서, 본 발명에 따른 단백질 결합체는 상기 생리활성 폴리펩타이드 및 생체적합성 물질이 지방산 유도체와 각각 공유 결합으로 연결된 것을 특징으로 한다. 구체적으로, 상기 지방산 유도체는 생리활성 폴리펩타이드 및 생체적합성 물질을 연결시키는 링커로서 작용한다.
- [21] 다른 구체예로서, 본 발명에 따른 단백질 결합체에 포함되는 지방산 유도체는 지방산 골격에 직접 또는 링커를 통해 연결된 두 개 이상의 반응기를 가지며, 상기 반응기를 통해 생리활성 폴리펩타이드 및 생체적합성 물질과 각각 연결된 것을 특징으로 한다.
- [22] 다른 구체예로서, 본 발명에 따른 단백질 결합체에 포함되는 지방산 유도체의 반응기는 각각 독립적으로 2,5-디옥소피롤리디닐, 2,5-디옥소피롤릴, 알데하이드, 아릴디설파이드, 헤테로아릴디설파이드, 할로겐화 아세트아마이드(haloacetamide), 또는 C_{7-10} 알키닐(alkynyl)인 것을 특징으로 한다.
- [23] 다른 구체예로서, 본 발명에 따른 단백질 결합체에 포함되는 지방산 유도체의 반응기는 말레이미드, N-하이드로석신이미드, 석신이미드, C_{1-4} 알킬렌 알데하이드, 오르소피리딜 디설파이드(Orthopyridyl disulfide; OPSS), 요오드화 아세트아마이드(iodoacetamide; IA), 상기 요오드 대신에 브롬, 불소, 염소, 또는 아스타틴을 포함하는 할로겐화 아세트아마이드, 디플루오로사이클로옥틴(difluorocyclooctyne; DIFO), 디벤조사이클로옥틴(dibenzocyclooctyne; DIBO), 디벤조-아자-사이클로옥틴(Dsibenzo-aza-cyclooctyne; DIBAC 또는 DBCO), 바이아릴아자사이클로옥티논(biarylazacyclooctynones; BARAC), 테트라메틸티아사이클로헵틴(tetramethylthiacycloheptyne; TMTH), 바이사이클로노닌(bicyclononyne; BCN) 손드하이머 디인(Sondheimer diyne), 사이클로옥틴(cyclooctyne; OCT), 단불소화 사이클로옥틴(monofluorinated cyclooctyne; MOFO), 디메톡시아자사이클로옥틴(dimethoxyazacyclooctyne; DIMAC), 2,3,6,7-테트라메톡시-디벤조사이클로옥틴(2,3,6,7-tetramethoxy-DIBO, TMDIBO), 술폰화 디벤조사이클로옥틴(sulfonylated DIBO; S-DIBO), 카르복시메틸모노벤조사이클로옥틴(carboxymethylmonobenzocyclooctyne; COMBO), 피롤로사이클로옥틴(pyrrolocyclooctyne; PYRROC) 또는 알카인(alkyne)인 것을 특징으로 한다.
- [24] 다른 구체예로서, 본 발명에 따른 단백질 결합체에 포함되는 지방산 유도체의 링커는 C_{1-3} 알킬아미노, $(C_{1-3}$ 알콕시) $_n$ (C_{1-3} 알킬아미노) 사슬을 포함하는 것을 특징으로 한다.
- [25] 다른 구체예로서, 본 발명에 따른 단백질 결합체에 포함되는 생체적합성

물질에 생리활성 폴리펩타이드와 지방산 유도체의 연결체가 1개 이상 연결된 것을 특징으로 한다.

- [26] 다른 구체예로서, 본 발명에 따른 단백질 결합체에 포함되는 생리활성 폴리펩타이드는 호르몬, 사이토카인, 인터루킨, 인터루킨 결합 단백질, 효소, 항체, 성장인자, 전사조절인자, 혈액인자, 백신, 구조단백질, 리간드 단백질 또는 수용체, 세포표면항원 또는 수용체 결합물질인 것을 특징으로 한다.
- [27] 다른 구체예로서, 본 발명에 따른 단백질 결합체에 포함되는 생리활성 폴리펩타이드는 글루카곤 유사 펩타이드-1(GLP-1), 글루카곤, GIP(Gastric inhibitory polypeptide), 옥신토모듈린, 제닌(Xenin), 인슐린, CCK(Cholecystokinin) 아밀린(amylin), 가스트린(gastrin), 그렐린(ghrelin), PYY(peptide YY) 등과 같이 위나 장에서 혈당과 체중을 조절하는 인크레틴류(incretins); 렙틴(Leptin), 아디포넥틴(adiponectin), 아디포린(adipolin), 아펠린(apelin), 카르토넥틴(cartonectin)과 같이 지방질(adipose)에서 분비되는 아디포카인류(adipokines); 키스펩틴(Kisspeptin), 네스파틴-1(Nesfatin-1)과 같이 뇌에서 분비되는 뉴로펩타이드류(neuropeptides); 이리신(Irisin), 마이오넥틴(myonectin), 데코린(decorin), 폴리스타틴(follistatin), 머슬린(musclin)과 같이 머슬(muscle)에서 분비되는 펩타이드 혹은 단백질류; 혈관작용성장펩타이드(Vasoactive intestinal peptide), 나트륨이뇨펩타이드류(natriuretic peptides), 호중구 증가 인자(G-CSF), 인간 성장 호르몬(hGH), 에리스로포이에틴(EPO), 성장 호르몬 방출 호르몬, 성장 호르몬 방출 펩타이드, 인터페론, 인터페론 수용체, 지프로테인 관련수용체(G protein-coupled receptor), 인터루킨류, 인터루킨 수용체, 효소류, 인터루킨 결합 단백질, 사이토카인 결합 단백질, 마크로파지 활성화인자, 마크로파지 펩타이드, B 세포인자, T 세포인자, 단백질 A, 알러지 억제인자, 세포 괴사 당단백질, 면역독소, 림포독소, 중앙 괴사인자, 중앙 억제인자, 전이 성장인자, 알파-1 안티트립신, 알부민, α -락트알부민, 아포리포단백질-E, 고 당쇄화 적혈구 생성인자, 안지오프에이틴류, 헤모글로빈, 트롬빈, 트롬빈 수용체 활성화 펩타이드, 트롬보모듈린, 혈액인자 VII, VIIa, VIII, IX, 및 XIII, 플라즈미노겐 활성화인자, 피브린-결합 펩타이드, 유로키나제, 스트렙토키나제, 히루딘, 단백질 C, C-반응성 단백질, 레닌 억제제, 콜라게나제 억제제, 수퍼옥사이드 디스무타제, 혈소판 유래 성장인자, 상피세포 성장인자, 표피세포 성장인자, 안지오택틴, 안지오텐신, 골 형성 성장인자, 골 형성 촉진 단백질, 칼시토닌, 아트리오펩틴, 연골 유도인자, 엘카토닌, 결합조직 활성화인자, 조직인자 경로 억제제, 여포 자극 호르몬, 황체 형성 호르몬, 황체 형성 호르몬 방출 호르몬, 신경 성장인자, 부갑상선 호르몬, 릴렉신, 씨크레틴, 소마토메딘, 인슐린 유사 성장인자, 부신피질 호르몬, 콜레시스토키닌, 췌장 폴리펩타이드, 가스트린 방출 펩타이드, 코티코트로핀 방출인자, 갑상선 자극호르몬, 오토탁신, 락토페린, 미오스타틴, 세포표면항원, 바이러스 유래 백신 항원, 단일클론 항체, 다중클론 항체 및 항체

- 단편으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 한다.
- [28] 다른 구체예로서, 본 발명에 따른 생리활성 폴리펩타이드는 2개 이상의 수용체를 동시에 활성화시키는 것을 특징으로 한다.
- [29] 다른 구체예로서, 본 발명에 따른 생리활성폴리펩타이드는 천연형으로 존재하는 것이 아닌 천연형 생리활성폴리펩타이드의 유도체들에서 선택되는 것을 특징으로 한다. 생리활성폴리펩타이드의 유도체는 아미노산의 치환, 삽입, 삭제, 당쇄첨가, 당쇄삭제, 비천연형 아미노산 삽입, 링삽입, 메틸잔기와 같은 화학적 수식 등을 통해 고유의 수용체에 대한 결합력이 변경되었거나 물리화화적인 성질, 즉 수용성 증가, 면역원성 감소와 같이 성질이 변이된 것을 의미하며, 서로 다른 2개 이상의 수용체에 결합력을 갖도록 조작된 인위의 펩타이드류도 포함한다.
- [30] 다른 구체예로서, 본 발명에 따른 단백질 결합체에 포함되는 생체적합성 물질은 폴리에틸렌 글리콜(polyethylene glycol, PEG), 콜레스테롤, 알부민 및 이의 단편, 알부민 결합물질, 특정 아미노산 서열의 반복단위의 중합체, 항체, 항체 단편, FcRn 결합물질, 생체 내 결합조직 혹은 그 유도체, 뉴클레오타이드, 파이브로넥틴, 트랜스페린(Transferrin), 사카라이드(saccharide), 고분자 중합체 및 이들의 조합으로 이루어진 군에서 선택된 것을 특징으로 한다.
- [31] 다른 구체예로서, 본 발명에 따른 단백질 결합체에 포함되는 상기 FcRn 결합물질은 면역글로불린 Fc 영역을 포함하는 폴리펩타이드인 것을 특징으로 한다.
- [32] 다른 구체예로서, 본 발명에 따른 단백질 결합체에 포함되는 면역글로불린 Fc 영역은 비당쇄화된 것을 특징으로 한다.
- [33] 다른 구체예로서, 본 발명에 따른 단백질 결합체에 포함되는 면역글로불린 Fc 영역은 힌지(hinge) 영역을 추가로 포함하는 것을 특징으로 한다.
- [34] 다른 구체예로서, 본 발명에 따른 단백질 결합체에 포함되는 면역글로불린 Fc 영역은 IgG, IgA, IgD, IgE, IgM, 이들의 조합(combination) 및 이들의 하이브리드(hybrid)로 이루어진 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 한다.
- [35] 다른 구체예로서, 본 발명에 따른 단백질 결합체에 포함되는 면역글로불린 Fc 영역은 IgG4 Fc 단편인 것을 특징으로 한다.
- [36] 다른 구체예로서, 본 발명에 따른 단백질 결합체에 포함되는 지방산 유도체는 탄소수가 1 내지 40인 포화 지방산 또는 불포화 지방산의 유도체인 것을 특징으로 한다.
- [37] 다른 구체예로서, 본 발명에 따른 단백질 결합체에 포함되는 상기 지방산은 포름산(HCOOH, form acid), 아세트산(CH₃COOH), 프로피온산(C₂H₅COOH), 부티르산(C₃H₇COOH), 발레르산(C₄H₉COOH), 카프로산(C₅H₁₁COOH), 에난트산(C₆H₁₃COOH), 카프릴산(C₇H₁₅COOH), 펠라르곤산(C₈H₁₇COOH), 카프르산(C₉H₁₉COOH), 운데실산(C₁₀H₂₁COOH), 라우르산(C₁₁H₂₃COOH), 트리데실산(C₁₂H₂₅COOH), 미리스트산(C₁₃H₂₇COOH), 펜타데실산(C₁₄H₂₉COOH),

팔미트산($C_{15}H_{31}COOH$), 헵타데실산($C_{16}H_{33}COOH$), 스테아르산($C_{17}H_{35}COOH$), 노나데칸산($C_{18}H_{37}COOH$), 이라크산($C_{19}H_{39}COOH$), 베헨산($C_{21}H_{43}COOH$), 리그노세르산($C_{23}H_{47}COOH$), 세로트산($C_{25}H_{51}COOH$), 헵타코산산($C_{26}H_{53}COOH$), 몬탄산($C_{28}H_{57}COOH$), 펠리스산($C_{29}H_{59}COOH$), 락세르산($C_{31}H_{63}COOH$), 아크릴산($CH_2=CHCOOH$), 크로톤산($CH_3CH=CHCOOH$), 이소크로톤산($CH_3CH=CHCOOH$), 운데실렌산($CH_2=CH(CH_2)_8COOH$), 올레산($C_{17}H_{33}COOH$), 엘라이드산($C_{17}H_{33}COOH$), 세톨레산($C_{21}H_{41}COOH$), 에루크산($C_{21}H_{41}COOH$), 브라시드산($C_{21}H_{41}COOH$), 소르브산(C_5H_7COOH , F2), 리놀레산($C_{17}H_{31}COOH$, F2), 리놀렌산($C_{17}H_{29}COOH$, F3), 아라키돈산($C_{19}H_{31}COOH$, F4), 프로피올산($CH\equiv CCOOH$) 및 스테아롤산($C_{17}H_{31}COOH$, F1)으로 이루어진 군으로부터 선택된 지방산 또는 이의 유도체인 것을 특징으로 한다.

- [38] 다른 구체예로서, 본 발명에 따른 단백질 결합체에 포함되는 지방산은 팔미트산, 미리스트산, 스테아르산 또는 올레산의 지방산 또는 이의 유도체인 것을 특징으로 한다.
- [39] 본 발명의 또 하나의 양태는 (a) 생리활성 펩타이드 및 생체적합성 물질을 두 개 이상의 반응기를 갖는 지방산 유도체를 통해 연결하는 단계; 및 (b) 상기 (a) 단계의 반응 결과물인 단백질 결합체를 분리하는 단계를 포함하는, 단백질 결합체를 제조하는 방법이다.
- [40] 하나의 구체예로서, 본 발명에 따른 제조방법에서 상기 (a) 단계는
- [41] (a1) 지방산 유도체의 하나의 반응기에 생체적합성 물질과 생리활성 폴리펩타이드 중 어느 하나를 연결시키는 단계;
- [42] (a2) 상기 (a1) 단계의 반응 혼합물로부터 지방산 유도체와 생체적합성 물질과 생리활성 폴리펩타이드 중 어느 하나가 연결된 연결체를 분리하는 단계; 및
- [43] (a3) 상기 (a2) 단계에서 분리된 연결체의 지방산 유도체의 다른 하나의 반응기에 생체적합성 물질과 생리활성 폴리펩타이드 중 다른 하나를 연결하여, 지방산 유도체의 반응기가 각각 생리활성 폴리펩타이드와 생체적합성 물질에 연결된 단백질 결합체를 생성하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 한다.
- [44] 다른 구체예로서, 본 발명에 따른 제조방법에서 상기 (a1) 단계 및 (a3) 단계는 환원제의 존재하에서 수행되는 것을 특징으로 한다.
- [45] 다른 구체예로서, 본 발명에 따른 제조방법에서 상기 환원제가 나트륨 시아노보로하이드라이드($NaCNBH_3$), 수소화붕소나트륨, 디메틸아민 붕산염, 피콜린 보란 킴플렉스 또는 피리딘 붕산염(borane pyridine)인 것을 특징으로 한다.
- [46] 다른 구체예로서, 본 발명에 따른 제조방법에서 상기 (a1) 단계에서 생리활성 폴리펩타이드와 지방산 유도체의 반응 몰비는 1:1 내지 1:20이고, 생체적합성 물질과 지방산 유도체의 반응 몰비는 1:1 내지 1:20인 것을 특징으로 한다.
- [47] 다른 구체예로서, 본 발명에 따른 제조방법에서 상기 (a3) 단계에서 (a2) 단계에서 분리된 연결체와 생체적합성 물질 또는 생리활성 폴리펩타이드의 반응 몰비는 1:0.5 내지 1:20인 것을 특징으로 한다.

[48]

발명의 실시를 위한 형태

[49]

본 발명의 하나의 양태는 생리활성 폴리펩타이드 및 생체적합성 물질이 지방산 유도체를 통해 연결된, 단백질 결합체를 제공한다. 특히, 본 발명의 단백질 결합체는 상기 생리활성 폴리펩타이드 및 생체적합성 물질이 지방산 유도체와 각각 공유 결합으로 연결된 것일 수 있다.

[50]

[51]

본 발명에서 용어, "생리활성 폴리펩타이드"는 상기 결합체의 모이어티(moiety)를 이루는 일 구성일 수 있는 것으로, 생체 내에서 어떤 생리작용을 가지는 폴리펩타이드를 총칭하는 개념으로서, 폴리펩타이드 구조를 가진다는 공통점을 가지며, 다양한 생리활성을 가진다. 상기 생리활성 폴리펩타이드는 유전표현과 생리기능을 조정하여 생체 내에서 기능조절에 관여하는 물질의 결핍이나 과도한 분비에 의해 비정상적인 병태를 보일 때 이를 바로잡아 주는 역할을 하는 것을 포함하며, 일반적인 단백질 치료제 역시 포함할 수 있다. 또한, 상기 생리활성 폴리펩타이드는 천연형 폴리펩타이드 외에도 이의 유도체도 모두 포함하는 개념이다.

[52]

본 발명의 결합체에서, 생리활성 폴리펩타이드는 본 발명의 결합체 구조를 통하여 혈중 반감기 증대를 나타낼 수 있는 생리활성 폴리펩타이드라면 특별히 그 종류 및 크기에 제한되지 않는다.

[53]

본 발명의 생리활성 폴리펩타이드는 호르몬, 사이토카인, 인터루킨, 인터루킨 결합 단백질, 효소, 항체, 성장인자, 전사조절인자, 혈액인자, 백신, 구조단백질, 리간드 단백질 또는 수용체, 세포표면항원, 수용체 길항물질인 것을 특징으로 한다.

[54]

다른 구체예로서, 본 발명에 따른 단백질 결합체에 포함되는 생리활성 폴리펩타이드는 글루카곤 유사 펩타이드-1(GLP-1), 글루카곤, GIP, 옥신토모듈린, 제닌, 인슐린, CCK 아밀린, 가스트린, 그렐린, PYY 등과 같이 위나 장에서 혈당과 체중을 조절하는 인크레틴류; 렙틴, 아디포넥틴, 아디포린, 아페린, 카르토넥틴과 같이 지방질에서 분비되는 아디포카인류; 키스펩틴, 네스파틴-1과 같이 뇌에서 분비되는 뉴로펩타이드류; 이리신, 마이오넥틴, 데코린, 폴리스타틴, 머슬린과 같이 근육에서 분비되는 펩타이드 혹은 단백질류; 혈관작동성장펩타이드, 나트륨이뇨펩타이드류, 호중구 증가 인자(G-CSF), 인간 성장 호르몬(hGH), 에리스로포이에틴(EPO), 성장 호르몬 방출 호르몬, 성장 호르몬 방출 펩타이드, 인터페론, 인터페론 수용체, 지프로데인 관련수용체, 인터루킨류, 인터루킨 수용체, 효소류, 인터루킨 결합 단백질, 사이토카인 결합 단백질, 마크로파지 활성화인자, 마크로파지 펩타이드, B 세포인자, T 세포인자, 단백질 A, 알러지 억제인자, 세포 괴사 당단백질, 면역독소, 림포독소, 종양 괴사인자, 종양 억제인자, 전이 성장인자, 알파-1 안티트립신, 알부민,

α -락트알부민, 아포리포단백질-E, 고 당쇄화 적혈구 생성인자, 안지오프에이틴류, 헤모글로빈, 트롬빈, 트롬빈 수용체 활성 펩타이드, 트롬보모듈린, 혈액인자 VII, VIIa, VIII, IX, 및 XIII, 플라즈미노젠 활성인자, 피브리-결합 펩타이드, 유로키나제, 스트렙토키나제, 히루딘, 단백질 C, C-반응성 단백질, 레닌 억제제, 콜라게나제 억제제, 수퍼옥사이드 디스뮤타제, 혈소판 유래 성장인자, 상피세포 성장인자, 표피세포 성장인자, 안지오프스타틴, 안지오프텐신, 골 형성 성장인자, 골 형성 촉진 단백질, 칼시토닌, 아트리오펩틴, 연골 유도인자, 엘카토닌, 결합조직 활성인자, 조직인자 경로 억제제, 여포 자극 호르몬, 황체 형성 호르몬, 황체 형성 호르몬 방출 호르몬, 신경 성장인자, 부갑상선 호르몬, 릴렉신, 씨크레틴, 소마토메딘, 인슐린 유사 성장인자, 부신피질 호르몬, 콜레시스토키닌, 췌장 폴리펩타이드, 가스트린 방출 펩타이드, 코티코트로핀 방출인자, 갑상선 자극호르몬, 오토탁신, 락토페린, 미오스타틴, 세포표면항원, 바이러스 유래 백신 항원, 단일클론 항체, 다중클론 항체 및 항체 단편으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 한다.

[55] 다른 구체예로서, 본 발명에 따른 생리활성폴리펩타이드는 천연형으로 존재하는 것이 아닌 천연형 생리활성폴리펩타이드의 유도체들에서 선택되는 것을 특징으로 한다. 생리활성폴리펩타이드의 유도체는 아미노산의 치환, 삽입, 삭제, 당쇄첨가, 당쇄삭제, 비천연형 아미노산 삽입, 링삽입, 메틸잔기와 같은 화학적 수식 등을 통해 고유의 수용체에 대한 결합력이 변경되었거나 물리화학적인 성질, 즉 수용성 증가, 면역원성 감소와 같이 성질이 변이된 것을 의미하며, 서로 다른 2개 이상의 수용체에 결합력을 갖도록 조작된 인위의 펩타이드류도 포함한다.

[56] 본 발명에서 "생리활성 폴리펩타이드", "생리활성 단백질", "활성 단백질" 또는 "단백질 약물"이란 생체 내에서 생리적 현상에 길항작용을 나타내는 폴리펩타이드 또는 단백질을 의미하는 용어로 상호 교환적으로 사용될 수 있다.

[57]

[58] 본 발명에서, "생체적합성 물질"은 상기 결합체의 모이어티(moiety)를 이루는 일 구성일 수 있는 것으로, 생리활성 폴리펩타이드와 결합되어 생체 내 반감기를 증가시킬 수 있는 물질을 의미한다. 본 발명에서 "생체적합성 물질"은 생체 내 반감기를 연장시킬 수 있는 물질로서 "캐리어"로써 표현되어 상호 교환적으로 사용될 수 있다. 상기 생체적합성 물질 혹은 캐리어는 생리활성 폴리펩타이드와 결합되어 이의 반감기를 연장시킬 수 있는 물질이라면 모두 포함하며, 그 예로 폴리에틸렌 글리콜(polyethylene glycol, PEG), 콜레스테롤, 알부민 및 이의 단편, 알부민 결합물질, 특정 아미노산 서열의 반복단위의 중합체, 항체, 항체 단편, FcRn 결합물질, 생체 내 결합조직 혹은 그 유도체, 뉴클레오타이드, 파이브로넥틴, 트랜스페린(Transferrin), 사카라이드(saccharide), 고분자 중합체 및 이들의 조합으로 이루어진 군에서 선택된 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 상기 FcRn 결합물질은 면역글로불린 Fc 영역을 포함하는

폴리펩타이드일 수 있으며, 그 예로 IgG Fc일 수 있다. 상기 생체적합성 물질 혹은 캐리어는 지방산 유도체를 통해서 생리활성 폴리펩타이드에 결합될 수 있다.

[59]

[60] 폴리에틸렌 글리콜을 캐리어로 사용할 경우, 위치특이적으로 폴리에틸렌 글리콜을 부착할 수 있는 Ambrx사의 Recode기술이 포함될 수 있으며, 당쇄부위에 특이적으로 부착할 수 있는 Neose사의 당페길화(glycopegylation) 기술이 포함될 수 있다. 또한 생체 내에서 폴리에틸렌 글리콜이 천천히 제거되는 releasable PEG 기술이 이에 포함될 수 있으나, 이에 한정되지 않으며 PEG를 이용하여 생체 내 이용율을 높인 기술들이 포함될 수 있다. 또한, 폴리에틸렌 글리콜, 폴리프로필렌 글리콜, 에틸렌 글리콜-프로필렌 글리콜 공중합체, 폴리옥시에틸화폴리올, 폴리비닐알콜, 다당류, 덱스트란, 폴리비닐에틸에테르, 생분해성 고분자, 지질 중합체, 키틴류, 히아루론산과 같은 고분자 중합체 역시 상기 기술에 의해 본 발명의 결합체에 결합될 수 있다.

[61]

[62] 본 발명에서 알부민을 캐리어로 사용할 경우, 본 발명의 단백질 결합체는 알부민 혹은 알부민 단편이 지방산 유도체에 직접 공유결합된 결합체일 수 있으며, 알부민을 직접 결합하지 않더라도 알부민에 결합하는 물질, 예를 들어 알부민 특이적 결합 항체 혹은 항체 단편을 지방산 유도체에 결합시켜 알부민에 결합한 결합체일 수 있다. 또한, 알부민에 결합력을 가지는 특정 펩타이드/단백질/화합물 등을 지방산 유도체에 결합하여 결합되는 단백질 결합체일 수 있으며, 알부민에 결합력을 가지는 지방산 자체가 결합된 단백질 결합체일 수 있으나 이에 한정되지 않는다.

[63]

[64] 본 발명에서 항체 혹은 항체 단편을 캐리어로 사용할 수 있으며, 이는 FcRn 결합 부위를 갖는 항체 혹은 항체 단편일 수 있고, Fab 등 FcRn 결합부위를 포함하지 않는 항체 단편일 수 있으나 이에 제한되지 않는다. 구체적으로, 본 발명에서는 면역글로불린 Fc 영역을 캐리어로 이용할 수 있다.

[65]

[66] 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 부분이 제거되기 때문에 물질의 동질성이 크게 증가되고 혈중 항원성의 유발 가능성도 낮아지게 되는 효과도 기대할 수 있다.

[67]

[68] 본 발명에서, "면역글로불린 Fc 영역"은, 면역글로불린의 중쇄와 경쇄

가변영역, 중쇄 불변영역 1(CH1)과 경쇄 불변영역(CL1)을 제외한, 중쇄 불변영역을 의미한다. 다만, 상기 Fc 단편은 중쇄 불변영역에 힌지(hinge) 부분을 포함하기도 한다.

- [69] 또한, 본 발명의 면역글로불린 Fc 영역은 면역글로불린의 중쇄와 경쇄 가변영역만을 제외하고, 일부 또는 전체 중쇄 불변영역 1(CH1) 및/또는 경쇄불변영역 1(CL1)을 포함하는 확장된 Fc 단편일 수 있다.
- [70] 이러한 면역글로불린 Fc 영역은 생체 내에서 대사되는 생분해성의 폴리펩타이드이기 때문에, 약물의 캐리어로 사용하기에 안전하다. 또한, 면역글로불린 Fc 영역은 면역글로불린 전체 분자에 비해 상대적으로 분자량이 작기 때문에 결합체의 제조, 정제 및 수율 면에서 유리할 뿐만 아니라, 아미노산 서열이 항체마다 다르기 때문에 높은 비균질성을 나타내는 Fab 부분이 제거되어 물질의 동질성이 크게 증가되고 혈중 항원성의 유발 가능성도 낮아지게 되는 효과도 기대할 수 있다.
- [71] 본 발명에서, 상기 면역글로불린 Fc 영역은 천연형 아미노산 서열뿐만 아니라 이의 서열 변이체(mutant)를 포함한다. 아미노산 서열 변이체란 천연 아미노산 서열 중의 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.
- [72] 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 변이체가 가능하다. 또한, 이펙터 기능을 없애기 위해 보체결합부위, 예로 C1q 결합부위가 제거될 수도 있고, ADCC(antibody dependent cell mediated cytotoxicity) 부위가 제거될 수도 있다. 이러한 면역글로불린 Fc 단편의 서열 유도체를 제조하는 기술은 국제특허공개 제WO 97/34631호, 국제특허공개 제96/32478호 등에 개시되어 있다.
- [73] 분자의 활성을 전체적으로 변경시키지 않는 단백질 및 펩타이드에서의 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, Thy/Phe, Ala/Pro, Lys/Arg, Asp/Asn, Leu/Ile, Leu/Val, Ala/Glu, Asp/Gly 간의 교환이다.
- [74] 경우에 따라서는 인산화(phosphorylation), 황화(sulfation), 아크릴화 (acrylation), 당화(glycosylation), 메틸화(methylation), 파네실화(farnesylation), 아세틸화(acetylation) 및 아밀화(amidation) 등으로 수식(modification)될 수도 있다.
- [75] 상기 기술한 Fc 변이체는 본 발명의 Fc 단편과 동일한 생물학적 활성을

나타내나 Fc 단편의 열, pH 등에 대한 구조적 안정성을 증대시킨 변이체다.

[76] 또한, 이러한 Fc 영역은 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 유도체 일 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.

[77] 바람직하게는 인간 유래의 Fc 영역을 미생물로부터 수득한 재조합형 면역글로불린 Fc 영역이다.

[78] 또한, 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.

[79] 본 발명에서 "당쇄의 제거(Deglycosylation)"된 Fc 영역은 효소로 당을 제거한 Fc 영역을 말하며, "비당쇄화(Aglycosylation)"된 Fc 영역은 원핵동물, 바람직하게는 대장균에서 생산하여 당쇄화되지 않은 Fc 단편을 의미한다.

[80] 한편, 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.

[81] 한편, 본 발명에서 "조합(combination)"은 이량체 또는 다량체를 형성할 때, 동일 기원 단쇄 면역글로불린 Fc 단편을 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.

[82] 본 발명에서 "하이브리드(hybrid)"는 단쇄의 면역글로불린 Fc 단편 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.

[83] 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 구체적으로는 보체 의존적 독성(CDC, complement-dependent cytotoxicity)과 같은 이펙터 기능(effector function)이 거의 없는 IgG4의 Fc 영역이다. 특히, 본 발명의 단백질 결합체에 포함되는 캐리어용 면역글로불린 Fc 영역은 인간 IgG4 유래의 비당쇄화된 Fc 단편일 수 있다. 인간 유래의 Fc 단편은 인간 생체에서 항원으로 작용하여 이에 대한 새로운 항체를 생성하는 등의 바람직하지 않은 면역 반응을 일으킬 수 있는 비인간 유래의 Fc 단편에 비하여 우수한 효과를 나타낼 수 있다.

[84] 본 발명에서는 생체 내 반감기를 증가시키기 위해 펩타이드 혹은 단백질 단편을 캐리어로 사용할 수 있다. 사용되는 펩타이드 혹은 단백질 단편은 특정 아미노산의 조합의 반복단위로 구성된 Elastin like polypeptide (ELP)일 수 있으며, 생체 내 안정성이 높다고 알려진 트랜스페린(transferrin) 혹은 결합조직의 구성성분인 피브로넥틴(fibronectin) 등과 이의 유도체 등도 포함될 수 있으나, 이에 한정되지 않으며 생체 내 반감기를 증가시키는 어떠한 펩타이드 혹은 단백질은 본 발명의 범주에 포함된다.

[85]

[86] 본 발명에서 용어, "지방산(fatty acid)"은 상기 결합체의 모이어티(moiety)를 이루는 일 구성일 수 있는 것으로, 1개의 카복시기(-COOH)를 가지는 탄화수소 사슬의 카복실산을 의미하며, R-COOH의 화학식을 가지는 1가의 카복실산을 총칭하여 지방산이라 한다. 본 발명의 지방산은 탄화수소 사슬을 이루는 탄소 골격 간의 결합에 따라 포화지방산 또는 불포화지방산일 수 있다. 상기 불포화지방산은 탄화수소 사슬을 이루는 탄소 골격의 결합 중에 이중 결합을 한 개 이상 가지는 지방산을 의미하며, 탄소 골격의 결합이 모두 단일결합만으로 이루어진 지방산은 포화지방산이다.

[87] 또한, 본 발명의 지방산은 노르말 사슬 구조를 가지는 지방산일 수 있으며 알킬기에 결사슬이 있는 지방산일 수 있다. 지방산은 탄화수소 사슬을 이루는 탄소수에 따라 단쇄/ 중쇄/ 장쇄 지방산으로 분류될 수 있으며, 일반적으로 탄소수 1 내지 6개를 가지는 경우에 단쇄 지방산, 6 내지 12개를 가지는 경우에 중쇄 지방산, 14 이상은 장쇄 지방산으로 분류될 수 있다. 아울러, 불포화 지방산의 경우에는 이중 결합의 위치에 따라 특성이 달라질 수 있다.

[88] 나아가, 본 발명의 "지방산 유도체"는 전술한 지방산의 골격에 두 개 이상의 반응기가 직접 또는 링커를 통해 결합된 물질일 수 있다. 예컨대, 상기 반응기로는 2,5-디옥소피롤리디닐, 2,5-디옥소피롤릴, 알데하이드, 아릴디설파이드, 헤테로아릴디설파이드, 할로젠화 아세트아마이드, 또는 C₇₋₁₀

알킬닐을 포함할 수 있다. 구체적으로, 상기 반응기는 말레이미드, N-하이드로석신이미드, 석신이미드, 포름알데하이드, 아세트알데하이드, 프로피온알데하이드, 부틸알데하이드, 오르소피리딜 디설파이드(Orthopyridyl disulfide; OPSS), 요오드화 아세트아마이드, 상기 요오드 대신에 브롬, 불소, 염소, 또는 아스타틴을 포함하는 할로젠화 아세트아마이드, 디플루오로사이클로옥틴(difluorocyclooctyne; DIFO), 디벤조사이클로옥틴(dibenzocyclooctyne; DIBO), 디벤조-아자-사이클로옥틴(Dsibenzo-aza-cyclooctyne; DIBAC 또는 DBCO), 바이아릴아자사이클로옥티논(biarylazacyclooctynones; BARAC), 테트라메틸티아사이클로헵틴(tetramethylthiacycloheptyne; TMTH), 바이사이클로노닌(bicyclononyne; BCN) 손드하이머 디인(Sondheimer diyne), 사이클로옥틴(cyclooctyne; OCT), 단불소화 사이클로옥틴(monofluorinated cyclooctyne; MOFO), 디메톡시아자사이클로옥틴(dimethoxyazacyclooctyne; DIMAC), 2,3,6,7-테트라메톡시-디벤조사이클로옥틴(2,3,6,7-tetramethoxy-DIBO, TMDIBO), 술폰화 디벤조사이클로옥틴(sulfonylated DIBO; S-DIBO), 카르복시메틸모노벤조사이클로옥틴(carboxymethylmonobenzocyclooctyne; COMBO), 피롤로사이클로옥틴(pyrrolocyclooctyne; PYRROC) 또는 알카인(alkyne)일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[89] 또한, 상기 반응기는 C_{1-3} 알킬아미노, $(C_{1-3}$ 알콕시) $_n$ (C_{1-3} 알킬아미노) 사슬(여기서, n 은 1 내지 3의 정수)을 포함하는 링커를 통해 지방산 골격에 결합될 수 있으나, 링커의 종류는 이에 제한되지 않는다.

[90] 본 발명의 지방산은 R-COOH의 화학식을 가지는 카복실산이고 해당 R기는 선형 또는 분지형 포화 탄화수소기를 포함하는 것일 수 있으며, 포화지방산 또는 불포화지방산일 수 있고, 단쇄, 중쇄 또는 장쇄 지방산일 수 있으며, 구체적으로 탄화수소 사슬을 이루는 탄소수가 1 내지 40인 것일 수 있으며, 더욱 구체적으로는 탄소수가 4 내지 30인 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 예를 들어, 본 발명의 지방산은 포름산(HCOOH, form acid), 아세트산(CH₃COOH), 프로피온산(C₂H₅COOH), 부티르산(C₃H₇COOH), 발레르산(C₄H₉COOH), 카프로산(C₅H₁₁COOH), 에난트산(C₆H₁₃COOH), 카프릴산(C₇H₁₅COOH), 펠라르곤산(C₈H₁₇COOH), 카프르산(C₉H₁₉COOH), 운데실산(C₁₀H₂₁COOH), 라우르산(C₁₁H₂₃COOH), 트리데실산(C₁₂H₂₅COOH), 미리스트산(C₁₃H₂₇COOH), 펜타데실산(C₁₄H₂₉COOH), 팔미트산(C₁₅H₃₁COOH), 헵타데실산(C₁₆H₃₃COOH), 스테아르산(C₁₇H₃₅COOH), 노나데칸산(C₁₈H₃₇COOH), 이라크산(C₁₉H₃₉COOH), 베헨산(C₂₁H₄₃COOH), 리그노세르산(C₂₃H₄₇COOH), 세로트산(C₂₅H₅₁COOH), 헵타코산산(C₂₆H₅₃COOH), 몬탄산(C₂₈H₅₇COOH), 펠리스산(C₂₉H₅₉COOH), 락세르산(C₃₁H₆₃COOH), 아크릴산(CH₂=CHCOOH), 크로톤산(CH₃CH=CHCOOH), 이소크로톤산(CH₃CH=CHCOOH), 운데실렌산(CH₂=CH(CH₂)₈COOH), 올레산(C₁₇H₃₃COOH), 엘라이드산(C₁₇H₃₃COOH), 세톨레산(C₂₁H₄₁COOH), 에루크산(C₂₁H₄₁

COOH), 브라시드산($C_{21}H_{41}COOH$), 소르브산(C_5H_7COOH , F2), 리놀레산($C_{17}H_{31}COOH$, F2), 리놀렌산($C_{17}H_{29}COOH$, F3), 아라키돈산($C_{19}H_{31}COOH$, F4), 프로피올산(CH_3CH_2COOH) 및 스테아롤산($C_{17}H_{31}COOH$, F1)으로 이루어진 군으로부터 선택된 것일 수 있으며, 더욱 구체적으로 팔미트산, 미리스트산, 스테아르산 또는 올레산일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[91] 또한, 본 발명의 지방산은 상기 설명된 지방산의 유도체, 유사체 등일 수 있으며, 특히 지방산을 이루는 탄화수소가 선형, 분지형 외의 고리기를 포함하는 변이체일 수 있다. 상기 탄화수소에 포함될 수 있는 고리기는 포화 호모사이클, 헤테로사이클, 방향족 축합 또는 비축합 호모사이클 또는 헤테로사이클일 수 있으며 에테르 결합, 불포화 결합 및 치환기를 가질 수 있다.

[92] 또한, 본 발명의 지방산으로 미국 등록 US8129343호 및 국제공개특허 WO2015/067715호, WO2015/055801, WO2013/041678, WO2014/133324, WO2014/009316, WO2015/052088에 기재된 지방산 유도체가 사용될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 예컨대, 2개 이상의 카르복실기를 포함하는 다중 지방산, 지방산의 카르복실기 대신에 카르복실산 동배체(carboxylic acid (bio)isostere), 인산기 또는 술폰산기를 포함하는 물질, 지방산 에스테르 등을 제한없이 포함할 수 있다.

[93] 이외에도 본 발명의 지방산은 당해 분야에 이미 알려진 상기 지방산의 유도체, 유사체 및 당해 분야의 기술 수준에서 용이하게 제조할 수 있는 유도체, 및 유사체들도 본 발명의 범위에 포함된다. 본 발명의 지방산은 분자량이 0.1 내지 100 kDa 범위, 구체적으로 0.1 내지 30 kDa 범위인 것일 수 있으며, 본 발명의 지방산은 한 종류의 중합체뿐만 아니라 상이한 종류의 중합체들의 조합이 사용될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[94] 본 발명의 단백질 결합체에 포함된 지방산 유도체의 두 개 이상의 반응기는 서로 같거나 다를 수 있다. 예를 들어, 한쪽 반응기에는 말레이미드 그룹을, 다른 쪽 반응기에는 알데히드 그룹, 프로피온 알데히드 그룹, 또는 부틸 알데히드 등의 알킬 알데히드 그룹을 가질 수 있다. 두 개의 반응기에 히드록시 반응기를 갖는 지방산을 이용하는 경우에는 공지의 화학반응에 의해 상기 히드록시기를 상기 다양한 반응기로 활성화하거나, 상업적으로 입수 가능한 변형된 반응기를 갖는 지방산을 이용하여 본 발명의 결합체를 제조할 수 있다.

[95]

[96] 본 발명의 단백질 결합체는 상기 생리활성 폴리펩타이드의 N 말단 또는 C 말단이나 폴리펩타이드의 말단이 아닌 중간 아미노산 잔기에 지방산이 연결되고, 생리활성 폴리펩타이드와 연결된 지방산 부분에 생체적합성 물질이 연결된 것일 수 있다. 상기 N 말단 또는 C 말단은 말단 그 자체가 아닌 N 말단 또는 C 말단 쪽의 1 내지 25개의 아미노산으로 이루어진 영역을 포함한다.

[97] 본 발명의 단백질 결합체는 [생리활성 폴리펩타이드-지방산 유도체-생체적합성 물질]의 구조를 하나 이상 포함할 수 있으며, 이를 구성하는

요소들은 공유결합에 의해 선형 또는 분지형으로 연결될 수 있으며, 본 발명의 단백질 결합체는 각각의 구성요소를 하나 이상 포함할 수 있다. 본 발명의 지방산은 두 개 이상의 반응기를 포함하고 있어 이를 통해 생리활성 폴리펩타이드 및 생체적합성 물질과 각각 공유결합으로 연결될 수 있다. 또한, 하나의 생체적합성 물질에, 생리활성 폴리펩타이드와 지방산 유도체가 결합된 연결체가 하나 이상이 공유결합으로 연결됨으로써, 생체적합성 물질을 매개체로 하여 생리활성 폴리펩타이드 단량체, 이량체 또는 다량체를 형성할 수 있으며, 이를 통해 생리활성 폴리펩타이드의 생체 내 활성 및 안정성 증가를 보다 효과적으로 달성할 수 있다.

[98]

[99] 본 발명의 단백질 결합체에 있어 생리활성 폴리펩타이드와 생체적합성 물질은 다양한 물비로 결합될 수 있다.

[100]

[101] 본 발명의 또 하나의 양태는 (a) 생리활성 펩타이드 및 생체적합성 물질을 지방산 유도체를 통해 연결하는 단계; 및 (b) 상기 (a) 단계의 반응 결과물인 단백질 결합체를 분리하는 단계를 포함하는, 단백질 결합체를 제조하는 방법을 제공한다.

[102] 상기 생리활성 펩타이드, 생체적합성 물질 및 지방산 유도체에 대해서는 앞서 설명한 바와 같다.

[103] 상기 (a) 단계에서, 세 구성요소의 연결은 공유결합일 수 있으며, 해당 공유결합은 순차적으로 또는 동시에 일어날 수 있다. 예를 들어, 두 개 이상의 반응기를 가지는 지방산 유도체의 반응기에 각각 생리활성 폴리펩타이드 및 생체적합성 물질을 결합시키는 경우, 생리활성 폴리펩타이드와 생체적합성 물질 중 어느 하나를 먼저 지방산 유도체의 하나의 반응기에 결합시킨 후, 나머지 성분을 지방산 유도체의 다른 하나의 반응기에 결합시키는 방식으로 순차적으로 반응을 진행하는 것이 목적하는 단백질 결합체 외의 부산물 생성을 최소화하는데 유리하다.

[104]

[105] 따라서, 상기 (a) 단계는

[106] (a1) 지방산 유도체의 하나의 반응기에 생체적합성 물질과 생리활성 폴리펩타이드 중 어느 하나를 연결시키는 단계;

[107] (a2) 상기 (a1) 단계의 반응 혼합물로부터 지방산 유도체와 생체적합성 물질과 생리활성 폴리펩타이드 중 어느 하나가 연결된 연결체를 분리하는 단계; 및

[108] (a3) 상기 (a2) 단계에서 분리된 연결체의 지방산 유도체의 다른 하나의 반응기에 생체적합성 물질과 생리활성 폴리펩타이드 중 다른 하나를 연결하여, 지방산의 반응기가 각각 생리활성 폴리펩타이드와 생체적합성 물질에 연결된 단백질 결합체를 생성하는 단계를 포함할 수 있으나 이에 제한되지 않는다.

[109] 상기 (a1) 단계 및 (a3) 단계의 반응은 반응에 참가하는 지방산 유도체의

반응기의 종류를 고려하여 필요에 따라 환원제의 존재하에서 수행될 수 있다. 구체적인 환원제로는 나트륨 시아노 보로하이드라이드(NaCNBH_3), 수소화붕소나트륨, 디메틸아민 붕산염, 피콜린 보란 콤플렉스 또는 피리딘 붕산염(borane pyridine) 등이 사용될 수 있다.

[110] 상기에서 (a2) 단계 및 (b)는 요구되는 순도 및 생성된 산물의 분자량 및 전하량과 같은 특성을 고려하여, 단백질의 분리에 사용되는 통상의 방법들 중에서 필요에 따라 적절히 선택하여 수행할 수 있다. 예를 들어, 크기 배제 크로마토그래피 또는 이온 교환 크로마토그래피를 포함하는 다양한 공지의 방법들을 적용할 수 있으며, 필요에 따라서는 보다 높은 순도로 정제하기 위해 복수개의 서로 다른 방법을 조합하여 사용할 수 있다.

[111] 상기 (a1) 단계에서 생리활성 폴리펩타이드와 지방산 유도체의 반응 몰비 및 생체적합성 물질과 지방산 유도체의 반응 몰비는 각각 독립적으로 1:1 내지 1:20의 범위에서 선택되는 비율일 수 있다. 구체적으로, 생리활성 폴리펩타이드와 지방산 유도체의 반응 몰비는 1:2 내지 1:10일 수 있으며, 생체적합성 물질과 지방산 유도체의 반응 몰비는 1:4 내지 1:20일 수 있다. 한편, 상기 (a3)에서 (a2)에서 분리된 연결체와 생체적합성 물질 또는 생리활성 폴리펩타이드의 반응 몰비는 1:0.5 내지 1:20 범위일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[112]

[113] 본 발명의 또 하나의 양태는 본 발명의 단백질 결합체를 제조하는 방법을 통해 제조한 단백질 결합체와 상기 제조된 단백질 결합체를 포함하는 약제학적 조성물을 제공한다. 본 발명의 약제학적 조성물은 생체 내 지속성 및 안정성이 천연형 생리활성 폴리펩타이드에 비하여 증가된 지속성 제제일 수 있다.

[114]

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

[116] 한편, 제제화에 적합한 담체, 부형제 및 희석제의 예로는 락토즈, 텍스트로즈, 수크로즈, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸

셀룰로즈, 미정질 셀룰로즈, 폴리비닐피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 또는 광물유 등이 사용될 수 있다.

[117] 또한, 본 발명의 약제학적 조성물은 충전제, 항응집제, 윤활제, 습윤제, 향료 및 방부제 등을 추가로 포함할 수 있다.

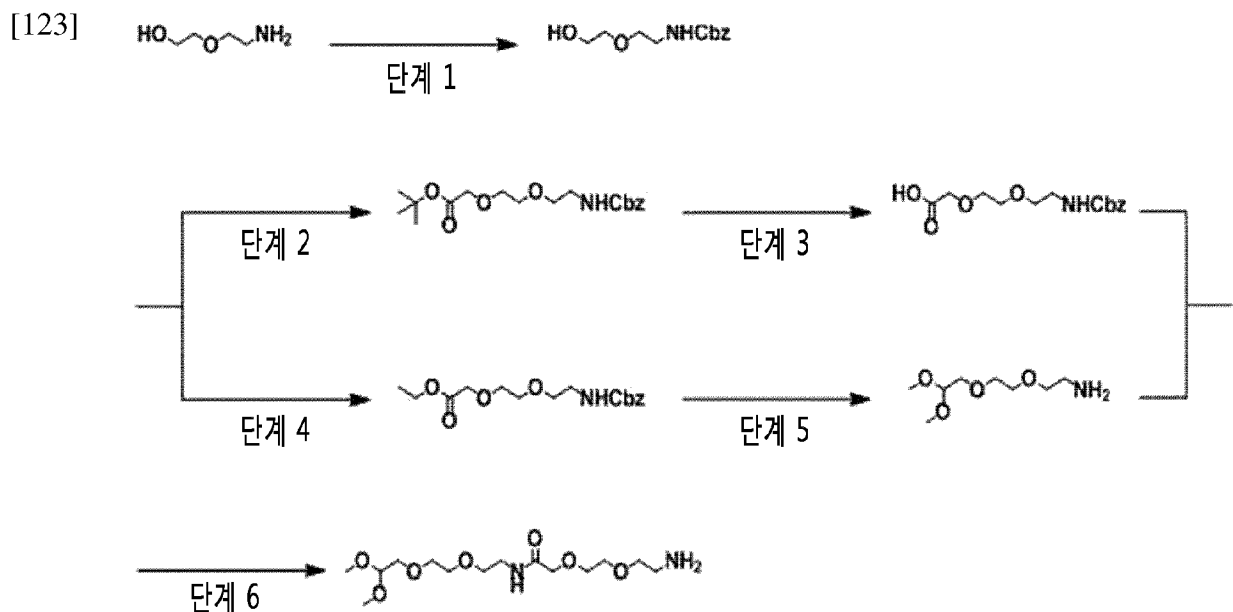
[118]

[119] 이하, 하기 예에 의하여 본 발명을 보다 상세하게 설명한다. 단, 하기 예는 본 발명을 예시하기 위한 것일 뿐 본 발명의 범위가 이들로 한정되는 것은 아니다.

[120]

[121] 제조예 1: 2 이상의 반응기를 갖는 지방산 유도체의 제조를 위한 중간체 1-2-(2-(2-아미노에톡시)에톡시)-N-(2-(2-(2,2-디메톡시에톡시)에톡시)에틸)아세트아미드의 합성

[122] [반응식 1]



[124]

[125] 단계 1. 벤질 2-(2-히드록시에톡시)에틸카바메이트의 제조

[126] 테트라하이드로퓨란(tetrahydrofuran; THF, 5 L)에 녹인 2-(2-아미노에톡시)에탄올(150 mL, 1.459 mol)에 트리에틸아민(229 mL, 1.645 mol), 벤질 클로로포름에이트(211 mL, 1.495 mol)를 가한 후, 12시간 동안 교반하였다. 고체를 여과하고 에틸아세테이트로 세척한 후 여과액을 농축하였다. 컬럼 크로마토그래피로 정제하여 표제화합물(202 g)을 수득하였다.

[127] ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 7.37-7.29(m, 5H), 5.25(br, 1H), 5.10(s, 2H), 4.13-4.11(m, 2H), 3.57-3.54(m, 4H), 3.43-3.38(m, 2H), 2.24(br, 1H).

[128]

[129] 단계 2. t-부틸 3-옥소-1-페닐-2,7,10-트리옥사-4-아자도데칸-12-오에이트의 제조

- [130] 상기 단계 1로부터 수득한 벤질 2-(2-히드록시에톡시)에틸카바메이트(129 g, 0.539 mol)를 THF(2 L)에 녹인 후, 포타슘 t-부톡사이드(60.5 g, 0.593 mol)를 0°C에서 적가하였다. 30분 후 t-부틸 브로모아세테이트를 가하고 0°C에서 3시간 동안 교반하고 상온에서 15시간 더 교반하였다. 상기 반응 용액에 물을 넣어 반응을 종결한 후, 농축하고 에틸아세테이트를 넣어 추출하였다. 유기층을 무수황산마그네슘으로 건조한 후 여과하고, 여과액을 농축한 후 컬럼 크로마토그래피로 정제하여 표제화합물(87.5 g)을 수득하였다.
- [131] ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 7.36-7.30(m, 5H), 5.38(br, 1H), 5.10(s, 2H), 4.00(s, 2H), 3.70-3.64(m, 4H), 3.60-3.56(m, 2H), 3.43-3.40(m, 2H), 1.46(s, 9H).
- [132]
- [133] 단계 3. 3-옥소-1-페닐-2,7,10-트리옥사-4-아자도데칸-12-오익산의 제조
- [134] 상기 단계 2로부터 수득한 t-부틸 3-옥소-1-페닐-2,7,10-트리옥사-4-아자도데칸-12-오에이트(22.0 g, 62.249 mmol)를 디클로로메탄(138 mL)에 녹인 후, 트리플루오로아세트산(138 mL)을 가하고 상온에서 5시간 동안 교반하였다. 상기 반응 용액을 여과하고, 여과액을 농축하여 표제화합물(13.0 g)을 수득하였다.
- [135] ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 7.36-7.31(m, 5H), 5.11(s, 2H), 4.15(s, 2H), 3.74-3.58(m, 6H), 3.42-3.40(m, 2H).
- [136]
- [137] 단계 4. 에틸 3-옥소-1-페닐-2,7,10-트리옥사-4-아자도데칸-12-오에이트의 제조
- [138] 상기 단계 1로부터 수득한 벤질 2-(2-히드록시에톡시)에틸카바메이트(15.0 g, 62.691 mmol)를 THF(240 mL)에 녹인 후, 포타슘 t-부톡사이드(7.0 g, 62.691 mmol)를 0°C에서 적가하였다. 30분 후 에틸 브로모아세테이트를 가하고 0°C에서 3시간 동안 교반하고 상온에서 15시간 더 교반하였다. 상기 반응 용액에 물을 넣어 반응을 종결한 후, 농축하고 에틸아세테이트를 넣어 추출하였다. 유기층을 무수황산마그네슘으로 건조한 후 여과하고, 여과액을 농축한 후 컬럼 크로마토그래피로 정제하여 표제화합물(8.6 g)을 수득하였다.
- [139] ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 7.36-7.30(m, 5H), 5.32(br, 1H), 5.10(s, 2H), 4.19(q, 2H), 4.12(s, 2H), 3.72-3.65(m, 4H), 3.59-3.56(m, 2H), 3.41-3.38(m, 2H), 1.26(t, 3H).
- [140]
- [141] 단계 5. 2-(2-(2,2-디메톡시에톡시)에톡시)에탄-1-아민의 제조
- [142] 상기 단계 4로부터 수득한 에틸 3-옥소-1-페닐-2,7,10-트리옥사-4-아자도데칸-12-오에이트(5.0 g, 15.368 mmol)를 무수 THF(30 mL)에 녹이고, 아르곤 분위기 하에 -78°C에서 디이소부틸알루미늄 하이드라이드(diisobutylaluminium hydride; DIBAL-H, 23.0 mL, 23.051 mmol)를 천천히 적가한 후 0°C에서 1시간 동안 교반하였다. 상기 반응 용액에 10% 염산을 가하고 0°C에서 30분 동안 교반한 후 에틸아세테이트를 넣고 추출하였다. 유기층을 무수황산마그네슘으로 건조한 후 여과하고, 여과액을 농축하였다.

생성물을 아르곤 분위기 하에 메탄올(18 mL)에 녹이고 트리메틸오르소포르메이트(13.4 mL, 122.941 mmol), p-톨루엔술폰산(146 mg, 0.768 mmol)을 넣고 상온에서 2시간 동안 교반하였다. 에틸아세테이트를 넣고 추출한 후 유기층을 무수황산마그네슘으로 건조한 후 여과하고, 여과액을 농축하여 컬럼 크로마토그래피로 정제하였다. 생성물은 다시 메탄올(10 mL)에 녹이고 10% Pd/C(76 mg, 0.4wt%)을 넣고 수소 분위기 하에 상온에서 3시간 동안 교반하였다. 반응 용액을 여과하고 여과액을 농축한 후 감압 건조하여 표제화합물(673 mg)을 수득하였다.

[143] ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 4.53(t, 1H), 3.68-3.62(m, 6H), 3.56-3.50(m, 2H), 3.40(s, 6H), 2.87(t, 2H).

[144]

[145] 단계 6. 2-(2-(2-아미노에톡시)에톡시)-N-(2-(2-(2,2-디메톡시에톡시)에톡시)에틸)아세트아미드의 제조

[146] 상기 단계 3으로부터 수득한

3-옥소-1-페닐-2,7,10-트리옥사-4-아자도데칸-12-오익산(952 mg, 3.204 mmol)를 아세트니트릴(30 mL)에 녹이고,

BOP((benzotriazol-1-yloxy)tris(dimethylamino)phosphonium hexafluorophosphate, 1.6 g, 3.522 mmol), N,N-디이소프로필에틸아민(N,N-diisopropylethylamine; DIPEA, 1.7 mL, 9.606 mmol)을 넣은 후 상온에서 30분 동안 교반하였다. 상기 반응 용액에 단계 5로부터 수득한

2-(2-(2,2-디메톡시에톡시)에톡시)에탄-1-아민(650 mg, 3.364 mmol)을 넣고 상온에서 3시간 동안 교반하였다. 반응 종료 후, 에틸아세테이트를 첨가하고 증조(탄산수소타르름)으로 세척하였다. 이후 무수황산마그네슘을 사용하여 건조하고, 여과하여 여과액을 농축하고 컬럼 크로마토그래피로 정제하였다. 생성물은 다시 메탄올(8 mL)에 녹이고 10% Pd/C(104 mg, 0.4wt%)을 넣고 수소 분위기 하에 상온에서 3시간 동안 교반하였다. 반응 용액을 여과하고 여과액을 농축한 후 감압 건조하여 중간체 1(173 mg)을 수득하였다.

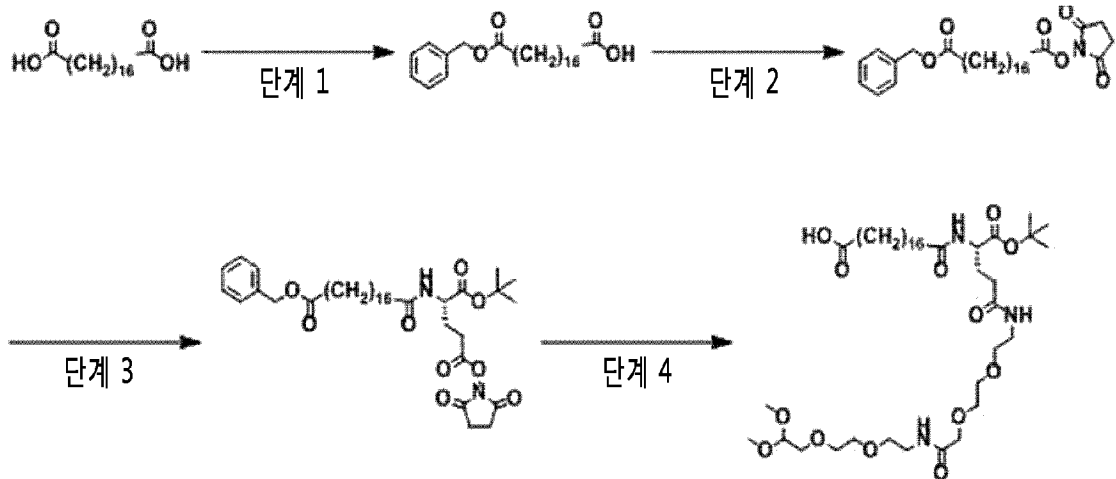
[147] ^1H NMR (300 MHz, MeOD) δ 4.52(t, 1H), 4.03(s, 2H), 3.71-3.32(m, 22H), 2.97(t, 2H).

[148]

[149] 제조예 2: 2 이상의 반응기를 갖는 지방산 유도체의 제조를 위한 중간체 2-(S)-24-(t-부톡시카보닐)-3-메톡시-12,21,26-트리옥소-2,5,8,14,17-펜타옥사-11,20,25-트리아자트리테트라콘탄-43-오익산의 합성

[150] [반응식 2]

[151]



[152]

[153] 단계 1. 18-(벤질옥시)-18-옥소옥타데칸산의 제조

[154] 톨루엔(3.7 L)에 옥타데칸디온산(octadecandioic acid, 100 g, 318 mmol), p-톨루엔술폰산(756 mg, 3.975 mmol), 벤질알콜(26.4 mL, 254.4 mol)을 가하고 증류하였다. 상기 반응 용액에 셀라이트를 넣고 40°C로 냉각하여 1시간 동안 교반한 후 실리카겔에 여과하였다. 여과액을 감압 농축하고 50°C에서 헤파탄을 가하였다. 고체를 여과하고 헤파탄으로 세척한 후 건조하여 표제화합물(67.9 g)을 수득하였다.

[155] ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 7.36-7.34(m, 5H), 5.11(s, 2H), 2.35(t, 4H), 1.64(t, 4H), 1.25(s, 24H).

[156]

[157] 단계 2. 1-벤질 18-(2,5-디옥소피롤리딘-1-일) 옥타데카노에이트의 제조

[158] 상기 단계 1로부터 수득한 18-(벤질옥시)-18-옥소옥타데칸산(20.0 g, 49.43 mmol)을 N-히드록시석신이미드(6.8 g, 59.319 mmol), DIC(N,N'-diisopropylcarbodiimide, 12.24 g, 59.312 mmol)을 NMP(N-methyl-2-pyrrolidone, 200 mL)에 녹인 후, 60°C에서 2.5시간 동안 교반하였다. 반응 종료 후, 반응 용액을 상온으로 냉각시켜 고체를 여과하였다. 여과액에 물을 가하고 생성된 고체를 여과하여 물로 세척하였다. 고체를 이소프로필알코올로 재결정하여 표제화합물(21.6 g)을 수득하였다.

[159] ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 7.37-7.31(m, 5H), 5.11(s, 2H), 2.83(s, 2H), 2.60(t, 2H), 2.35(t, 2H), 1.77-1.53(m, 6H), 1.25(s, 24H).

[160]

[161] 단계 3. (S)-1-t-부틸 5-(2,5-디옥소피롤리딘-1-일) 2-(18-(벤질옥시)-18-옥소옥타데칸아미도)헵탄디오에이트의 제조

[162] 상기 단계 2로부터 수득한 1-벤질 18-(2,5-디옥소피롤리딘-1-일) 옥타데카노에이트(10.0 g, 19.934 mmol), L-글루탐산 5-t-부틸 에스테르(4.3 g, 20.931 mmol)를 NMP(80 mL)에 넣고, 50°C에서 4시간 동안 교반하였다. 반응

종료 후, 반응 용액을 상온으로 냉각시키고, 물(230 mL), 0.5 M 포타슘 바이설페이트(34 mL), 에틸아세테이트를 첨가하여 추출하였다. 유기층을 무수황산마그네슘을 사용하여 건조하고, 여과 후 여과액을 농축하였다. 생성물을 NMP(75 mL)에 녹인 후, N-히드록시석신이미드(3.7 g, 31.894 mmol), DCC(N,N'-dicyclohexylcarbodiimide, 5.4 g, 25.914 mmol)를 가한 후, 상온에서 16시간 동안 교반하였다. 고체를 여과하고 여과액을 물로 세척한 후 유기층을 무수황산마그네슘을 사용하여 건조하고, 여과하여 여과액을 농축하였다. 컬럼 크로마토그래피로 정제하여 표제화합물(7.1 g)을 수득하였다.

[163] ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 7.36-7.31(m, 5H), 6.19(d, 1H), 5.11(s, 2H), 4.64-4.57(m, 1H), 2.83(s, 4H), 2.73-2.62(m, 2H), 2.35(t, 2H), 2.24-2.17(m, 2H), 1.66-1.55(m, 4H), 1.48(s, 9H), 1.24(s, 26H).

[164]

[165] 단계 4. (S)-24-(t-부톡시카보닐)-3-메톡시-12,21,26-트리옥소-2,5,8,14,17-펜타옥사-11,20,25-트리아자트리테트라콘탄-43-오익산의 제조

[166] 상기 단계 3으로부터 수득한 (S)-1-t-부틸 5-(2,5-디옥소피롤리딘-1-일)-2-(18-(벤질옥시)-18-옥소옥타데칸아미도)펜탄디오에이트(329 mg, 0.478 mmol), 상기 제조예 1에 따라 준비한 중간체 1(170 mg, 0.502 mmol), 트리에틸아민(0.2 mL, 1.435 mmol)을 아세트니트릴(8 mL)에 넣고 상온에서 16시간 동안 교반하였다. 반응 종료 후 반응 용액을 농축하고 컬럼 크로마토그래피로 정제하였다. 생성물을 메탄올(10 mL)에 녹이고 10% Pd/C(140 mg, 0.4wt%)을 넣고 수소 분위기 하에 상온에서 3시간 동안 교반하였다. 반응 용액을 여과한 후 여과액을 농축하고 감압 건조하여 중간체 2(300 mg)를 수득하였다.

[167] ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 6.87(br, 1H), 6.63(d, 1H), 4.52(t, 1H), 4.41(m, 1H), 4.04(s, 2H), 3.70-3.47(m, 18H), 3.41(s, 6H), 2.35-2.2.20(m, 7H), 1.93-1.86(m, 1H), 1.63-1.53(m, 4H), 1.46(s, 9H), 1.26(s, 24H).

[168]

[169] 제조예 3: 생체적합성 물질로서 면역글로불린 Fc 단편의 제조

[170]

[171] 단백질 결합체의 생체적합성 물질로 면역글로불린 Fc 단편을 사용하였다. 면역글로불린 Fc 단편은 본 발명자가 기출원하였던 대한민국 등록특허 제10-0824505호 '개시 메티오닌 잔기가 제거된 면역글로불린 Fc 영역의 대량 생산방법'에 따라 제조하였다.

[172]

[173] 실시예 1: 링커로서, 2개의 반응기를 포함하는 지방산 유도체 1 - (S)-22-(18-(2-(2,5-디옥소-2,5-디히드로-1H-피롤-1-일)에틸아미노)-18-옥소옥타데칸아미도)-1,10,19-트리옥소-3,6,12,15-테트라옥사-9,18-디아자트리코산-23-오익산의 제조

[174]

[175] 상기 제조예 2에 따라 준비한 중간체 2(150 mg, 0.183 mmol)를 아세트니트릴(5 mL)에 녹이고

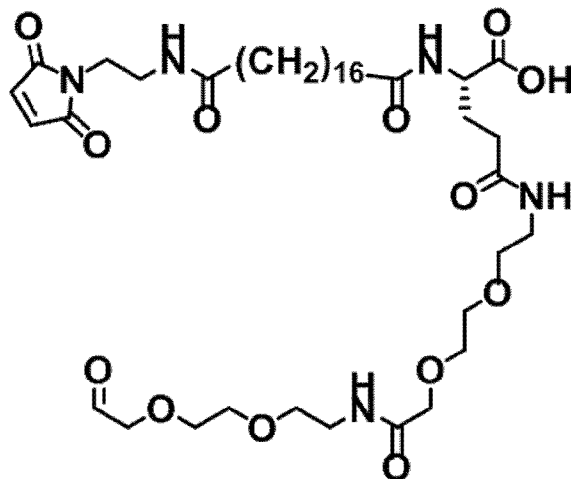
HATU(1-[bis(dimethylamino)methylene]-1H-1,2,3-triazolo[4,5-b]pyridinium 3-oxid hexafluorophosphate, 77 mg, 0.201 mmol), DIPEA(0.1 mL, 0.549 mmol)를 넣은 후 상온에서 20분 동안 교반하였다. 상기 반응 용액에

N-(2-아미노에틸)말레이미드(32 mg, 0.183 mmol)을 넣고 상온에서 12시간 동안 교반하였다. 반응 종료 후, 에틸아세테이트를 첨가하고 중조로 세척한 후 무수황산마그네슘을 사용하여 건조하였다. 여과하여 여과액을 농축하고 컬럼 크로마토그래피로 정제하였다. 생성물을 디클로로메탄에 녹인 후 트리플루오로아세트산(0.16 mL, 2.123 mmol)을 넣고 상온에서 16시간 동안 교반하였다. 반응 용액을 감압 농축한 후 디에틸에테르로 재결정하여 표제화합물(15 mg)을 수득하였다.

[176] ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 9.71(s, 1H), 7.20(br, 1H), 6.97(br, 1H), 6.73(s, 2H), 5.84(br, 1H), 4.48-4.44(m, 1H), 4.05(s, 2H), 3.72-3.45(m, 22H), 2.26-2.07(m, 8H), 1.62-1.57(m, 4H), 1.25(s, 24H);

[177] MS (ESI⁺): [M+H]⁺ m/z 840.5.

[178]



[179]

[180] 실시예 2: 링커로서, 2개의 반응기를 포함하는 지방산 유도체 2 - (S)-22-(18-(2,5-디옥소피롤리딘-1-일옥시)-18-옥소옥타데칸아미도)-1,10,19-트리옥소-3,6,12,15-테트라옥사-9,18-디아자트리코산-23-오익산의 제조

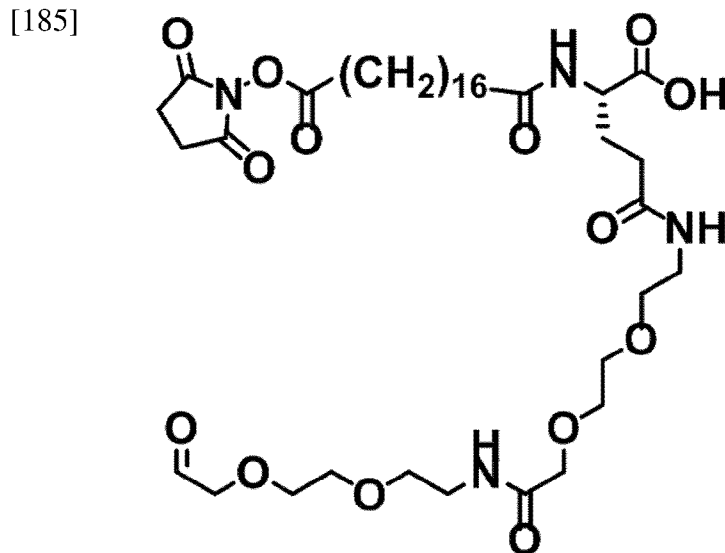
[181]

[182] 상기 제조예 2에 따라 준비한 중간체 2(150 mg, 0.183 mmol)를 디클로로메탄(5 mL)에 녹이고 N-히드록시석신이미드(23 mg, 0.201 mmol), EDC(1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide, 42 mg, 0.219 mmol)를 넣은 후 상온에서 16시간 동안 교반하였다. 반응 종료 후, 중조로 세척하고 무수황산마그네슘을 사용하여 건조하였다. 여과하여 여과액을 농축하고 컬럼 크로마토그래피로 정제하였다. 생성물을 디클로로메탄에 녹인 후

트리플루오로아세트산(0.17 mL, 2.181 mmol)을 넣고 상온에서 16시간 동안 교반하였다. 반응 용액을 감압 농축한 후 디에틸에테르로 재결정하여 표제화합물(25 mg)을 수득하였다.

[183] ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 9.70(s, 1H), 7.21(d, 1H), 7.06(br, 1H), 4.53-4.46(m, 1H), 4.05(s, 2H), 3.76-3.49(m, 16H), 2.84(s, 4H), 2.60(t, 4H), 2.48-2.241(m, 2H), 2.23(t, 2H), 2.12-2.04(m, 2H), 1.78-1.72(m, 2H), 1.65-1.62(m, 2H), 1.25(s, 24H);

[184] MS (ESI⁺): $[\text{M}+\text{H}]^+$ m/z 815.5.



[186]

[187] 실시예 3: 생리활성 폴리펩타이드와 면역글로불린 Fc가 지방산 유도체 링커로 결합된 결합체의 제조

[188]

[189] 상기 실시예 1 또는 2에 따라 제조한, 반응기로서 말레이미드기와 알데하이드기를 포함하는 지방산 유도체 링커를 생리활성 폴리펩타이드의 일종인 GLP-1, GIP 및 글루카곤 수용체에 모두 활성을 나타내는 삼중 활성체(서열번호 1)의 시스테인 잔기에 결합시키기 위하여, 상기 삼중 활성체와 지방산 유도체 링커를 1:1~2의 몰 비율로 혼합하여 4~8°C에서 약 1~2시간 동안 반응시켰다. 이때, 삼중 활성체의 농도는 3~5 mg/mL이었고, 반응은 20 mM 트리스(Tris) pH 7.0~8.0, 이소프로판올 하에서 수행하였다. 반응액은 구연산염(pH 3.0), 에탄올이 포함된 완충액과 염화칼륨 농도 구배를 이용한 SP-HP(GE, 미국) 컬럼을 사용하여 지방산 유도체 링커와 1:1로 결합된 삼중 활성체를 정제하였다.

[190] 다음으로, 상기 정제된 지방산 유도체 링커와 삼중 활성체가 결합된 결합체와 면역글로불린 Fc 단편을 1:2~5의 몰비율로, 전체 단백질 농도는 20~35 mg/mL로 하여 4~8°C에서 12~18시간 동안 반응시켰다. 이때, 반응액은 인산칼륨 pH 6.0~6.5이었으며, 환원제로서 20 mM 소듐 시아노보로하이드라이드(sodium cyanoborohydride, SCB)를 첨가하였다. 반응을 종료한 후, 상기 반응액을

비스-트리스(pH 6.5) 완충액과 염화칼슘 농도 구배를 이용한 Source Q(GE, 미국) 컬럼과 황산암모늄과 20 mM 트리스(pH 7.5)의 농도 구배를 이용한 Source ISO(GE, 미국)에 적용하여, 삼중 활성체와 면역글로불린 Fc가 지방산 유도체 링커를 통해 공유결합으로 연결된 결합체를 정제하였다. 제조된 단백질 결합체는 SDS-PAGE로 확인하였으며, 그 결과를 도 1에 나타내었다.

[191]

[192] 실시예 4: 지방산 종류에 따른 단백질 결합체의 제조

[193]

[194] 지방산 골격의 탄화수소 사슬을 이루는 탄소수가 1 내지 100인 지방산 유도체를 이용하여 단백질 결합체를 제조하였다. 구체적으로 탄소수 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 또는 21의 지방산 유도체를 이용하여 단백질 결합체를 제조하였다.

[195] 구체적으로, 상기 실시예 1 내지 3의 방법을 이용하여, 다양한 지방산 유도체 및 이를 이용한 단백질 결합체를 제조하였다.

[196]

[197] 실험예 1: 단백질 결합체의 *in vivo* 약동학(pharmacokinetics) 확인

[198]

[199] 상기 실시예 3에 따라 제조한 단백질 결합체, 구체적으로 GLP-1, GIP 및 글루카곤 수용체에 모두 활성을 나타내는 삼중 활성체와 면역글로불린 Fc가 지방산 유도체를 통해 연결된 결합체의 인 비보(*in vivo*) 약물동태를 확인하고, 기존의 삼중 활성체에 비해 생체 내 지속성이 증가되었는지를 비교하였다. 구체적으로, 정상 동물 모델로 널리 사용되는 ICR 마우스를 약물 동력학 확인에 사용하였다. 비절식 8주령 ICR 마우스를 3일의 순화기간을 거쳐 다음의 2개 군으로 구분하여 시험물질을 투여하였다:

[200] 군 1; 삼중 활성체 49.2 nmol/kg 용량으로 단회 피하 주사, 및

[201] 군 2; 실시예 3의 삼중 활성체와 면역글로불린 Fc가 지방산 유도체를 통해 연결된 결합체 5.5 nmol/kg 용량으로 단회 피하 주사.

[202] 삼중 활성체를 투여한 군 1은 15마리 개체로 구성하였으며, 이들로부터 각각 0.25, 0.5, 1, 2 및 4시간에 안와정맥을 이용하여 0.3 mL의 혈액을 교차 채혈하였다. 한편, 실시예 3의 삼중 활성체와 면역글로불린 Fc가 지방산 유도체를 통해 연결된 결합체를 투여한 군 2는 12마리 개체로 구성하였으며, 이들 개체로부터는 각각 1, 4, 8, 24, 48, 72, 96, 120, 144 및 168시간에 군 1과 동일한 방법으로 교차 채혈하였다. 채취한 혈액은 원심분리(10,000 rpm, 10분, Eppendorf)하여 혈청을 분리한 후, -20°C의 냉동고에 보관하였다.

[203] 혈청 내의 삼중 활성체 또는 삼중 활성체와 면역글로불린 Fc가 지방산 유도체를 통해 연결된 결합체의 농도는 삼중 활성체에 특이적인 항체를 이용한 효소결합면역흡착검사법(Enzyme-linked immunosorbent assay; ELISA)으로 정량하였다. 약물 동력학 파라미터는 A, B 및 C의 시간당 혈청 농도를 바탕으로

Phoenix™ WinNonin® 7.0(Pharsight, USA) 프로그램을 이용하여 비구획방법(non-compartment method)으로 산출하였다. 최고 혈중농도(C_{max}) 및 도달 시간(T_{max})은 기초자료를 통해 확인하였으며, 시간에 따른 혈중 약물농도 곡선 하 면적(AUC)은 로그-선형 사다리꼴 총합(log-linear trapezoidal summation)에 의해 산출하였다. 반감기 $t_{1/2}$, 분포용적 V_d 및 청소율 CL 과 같은 다른 약동력학 파라미터들도 상기 프로그램을 이용하여 산출하였으며, 도 2에 시간에 따른 약물의 혈중농도 변화를 도시하였다.

[204]

[205] 상기 도 2에 나타난 바와 같이, 기존의 삼중 활성체에 대한 결과와 비교하여, 본 발명의 실시예 2에 따른 삼중 활성체와 면역글로불린 Fc 가 지방산 유도체를 통해 연결된 결합체는 혈중 반감기가 현저히 증가된 지속성을 나타내었다.

[206]

[207] 이와 같은 결과는, 본 발명에서 새롭게 제안하는 생리활성 폴리펩타이드 및 생체 적합성 물질을 연결시키는 지방산 링커가 획기적으로, 결합된 생리활성 폴리펩타이드의 지속성을 증가시켜, 투여 용량 및 횟수를 줄일 수 있는 새로운 약물 플랫폼으로서의 지위를 제공할 수 있음을 제안하는 것이다.

[208]

[209] 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.

[210]

청구범위

- [청구항 1] 생리활성 폴리펩타이드 및 생체적합성 물질이 지방산 유도체를 통해 연결된, 단백질 결합체.
- [청구항 2] 제1항에 있어서, 상기 생리활성 폴리펩타이드 및 생체적합성 물질이 지방산 유도체와 각각 공유 결합으로 연결된, 단백질 결합체.
- [청구항 3] 제1항에 있어서, 상기 지방산 유도체는 지방산 골격에 직접 또는 링커를 통해 연결된 두 개 이상의 반응기를 가지며, 상기 반응기를 통해 생리활성 폴리펩타이드 및 생체적합성 물질과 각각 연결된, 단백질 결합체.
- [청구항 4] 제3항에 있어서, 상기 반응기는 2,5-디옥소피롤리디닐, 2,5-디옥소피롤릴, 알데하이드, 아릴디설파이드, 헤테로아릴디설파이드, 할로겐화 아세트아마이드(haloacetamide), 또는 C_{7-10} 알킬닐을 포함하는 것인, 단백질 결합체.
- [청구항 5] 제3항에 있어서, 상기 반응기는 말레이미드, N-하이드록시신이미드, 석신이미드, 포름알데하이드, 아세트알데하이드, 프로피온알데하이드, 부틸알데하이드, 오르소피리딜 디설파이드(Orthopyridyl disulfide; OPSS), 요오드화 아세트아마이드, 상기 요오드 대신에 브롬, 불소, 염소, 또는 아스타틴을 포함하는 할로겐화 아세트아마이드, 디플루오로사이클로옥틴(difluorocyclooctyne; DIFO), 디벤조사이클로옥틴(dibenzocyclooctyne; DIBO), 디벤조-아자-사이클로옥틴(Dsibenzo-aza-cyclooctyne; DIBAC 또는 DBCO), 바이아릴아자사이클로옥티논(biarylazacyclooctynones; BARAC), 테트라메틸티아사이클로헵틴(tetramethylthiacycloheptyne; TMTH), 바이사이클로노닌(bicyclononyne; BCN) 손드하이머 디인(Sondheimer diyne), 사이클로옥틴(cyclooctyne; OCT), 단불소화 사이클로옥틴(monofluorinated cyclooctyne; MOFO), 디메톡시아자사이클로옥틴(dimethoxyazacyclooctyne; DIMAC), 2,3,6,7-테트라메톡시-디벤조사이클로옥틴(2,3,6,7-tetramethoxy-DIBO, TMDIBO), 술폰화 디벤조사이클로옥틴(sulfonylated DIBO; S-DIBO), 카르복시메틸모노벤조사이클로옥틴(carboxymethylmonobenzocyclooctyne; COMBO), 피롤로사이클로옥틴(pyrrolocyclooctyne; PYRROC) 또는 알카인(alkyne)인 것인, 단백질 결합체.
- [청구항 6] 제3항에 있어서, 상기 링커는 C_{1-3} 알킬아미노, $(C_{1-3}$ 알콕시) $_n(C_{1-3}$ 알킬아미노) 사슬(여기서, n은 1 내지 3의 정수)을 포함하는 것인, 단백질 결합체.
- [청구항 7] 제1항에 있어서, 상기 생체적합성 물질에 생리활성 폴리펩타이드와 지방산 유도체의 연결체가 1개 이상 연결된 것인, 단백질 결합체.
- [청구항 8] 제1항에 있어서, 상기 생리활성 폴리펩타이드는 호르몬, 사이토카인,

인터루킨, 인터루킨 결합 단백질, 효소, 항체, 성장인자, 전사조절인자, 혈액인자, 백신, 구조단백질, 리간드 단백질 또는 수용체, 세포표면항원 또는 수용체 길항물질인, 단백질 결합체.

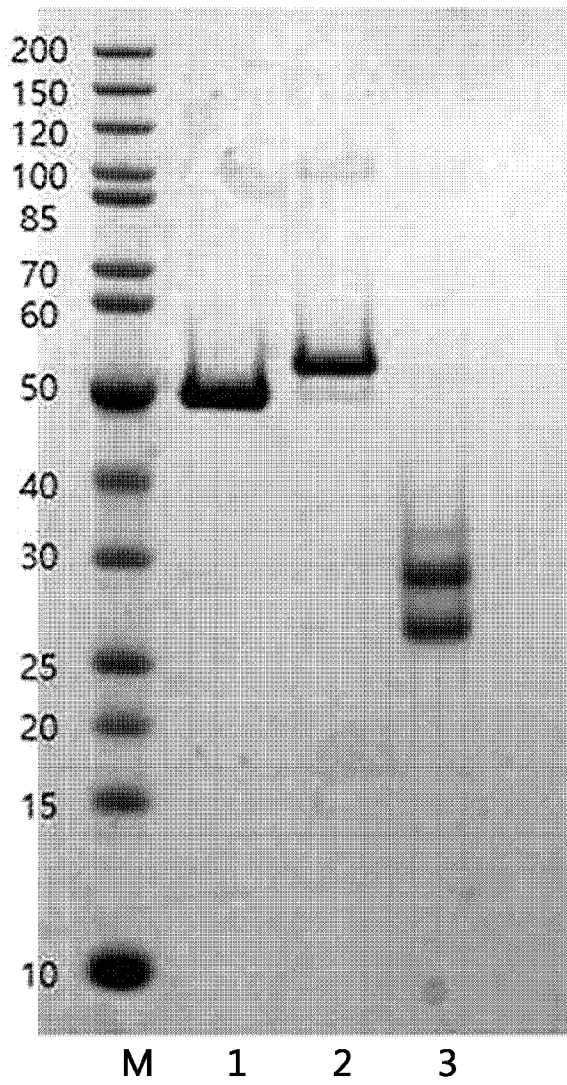
[청구항 9] 제1항에 있어서, 상기 생리활성 폴리펩타이드는 글루카곤 유사 펩타이드-1(GLP-1), 글루카곤, GIP(Gastric inhibitory polypeptide), 옥신토모둘린, 제닌(Xenin), 인슐린, CCK(Cholecystokinin) 아밀린(amylin), 가스트린(gastrin), 그렐린(ghrelin), PYY(peptide YY) 등과 같이 위나 장에서 혈당과 체중을 조절하는 인크레틴류(cretins); 렙틴(Leptin), 아디포넥틴(adiponectin), 아디폴린(adipolin), 아펠린(apelin), 카르토넥틴(cartonectin)과 같이 지방질(adipose)에서 분비되는 아디포카인류(adipokines); 키스펙틴(Kisspeptin), 네스파틴-1(Nesfatin-1)과 같이 뇌에서 분비되는 뉴로펩타이드류(neuropeptides); 이리신(Irisin), 마이오넥틴(myonectin), 데코린(decorin), 폴리스타틴(follistatin), 머슬린(musclin)과 같이 근육(muscle)에서 분비되는 펩타이드 혹은 단백질류; 혈관작용성장펩타이드(Vasoactive intestinal peptide), 나트륨이뇨펩타이드류(natriuretic peptides), 호중구 증가 인자(G-CSF), 인간 성장 호르몬(hGH), 에리스로포이에틴(EPO), 성장 호르몬 방출 호르몬, 성장 호르몬 방출 펩타이드, 인터페론, 인터페론 수용체, 지프로테인 관련수용체(G protein-coupled receptor), 인터루킨류, 인터루킨 수용체, 효소류, 인터루킨 결합 단백질, 사이토카인 결합 단백질, 마크로파지 활성화인자, 마크로파지 펩타이드, B 세포인자, T 세포인자, 단백질 A, 알러지 억제인자, 세포 괴사 당단백질, 면역독소, 림프독소, 종양 괴사인자, 종양 억제인자, 전이 성장인자, 알파-1 안티트립신, 알부민, α -락트알부민, 아포리포단백질-E, 고 당쇄화 적혈구 생성인자, 안지오프에이틴류, 헤모글로빈, 트롬빈, 트롬빈 수용체 활성화 펩타이드, 트롬보모둘린, 혈액인자 VII, VIIa, VIII, IX, 및 XIII, 플라즈미노젠 활성화인자, 피브린-결합 펩타이드, 유로키나제, 스트렙토키나제, 히루딘, 단백질 C, C-반응성 단백질, 레닌 억제제, 콜라게나제 억제제, 수퍼옥사이드 디스무타제, 혈소판 유래 성장인자, 상피세포 성장인자, 표피세포 성장인자, 안지오테스틴, 안지오텐신, 골 형성 성장인자, 골 형성 촉진 단백질, 칼시토닌, 아트리오펩틴, 연골 유도인자, 엘카토닌, 결합조직 활성화인자, 조직인자 경로 억제제, 여포 자극 호르몬, 황체 형성 호르몬, 황체 형성 호르몬 방출 호르몬, 신경 성장인자, 부갑상선 호르몬, 릴렉신, 씨크레틴, 소마토메딘, 인슐린 유사 성장인자, 부신피질 호르몬, 콜레시스토키닌, 췌장 폴리펩타이드, 가스트린 방출 펩타이드, 코티코트로핀 방출인자, 갑상선 자극호르몬, 오토탁신, 락토펙틴, 미오스타틴, 세포표면항원, 바이러스 유래 백신 항원, 단일클론 항체, 다중클론 항체 및 항체 단편으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인,

단백질 결합체.

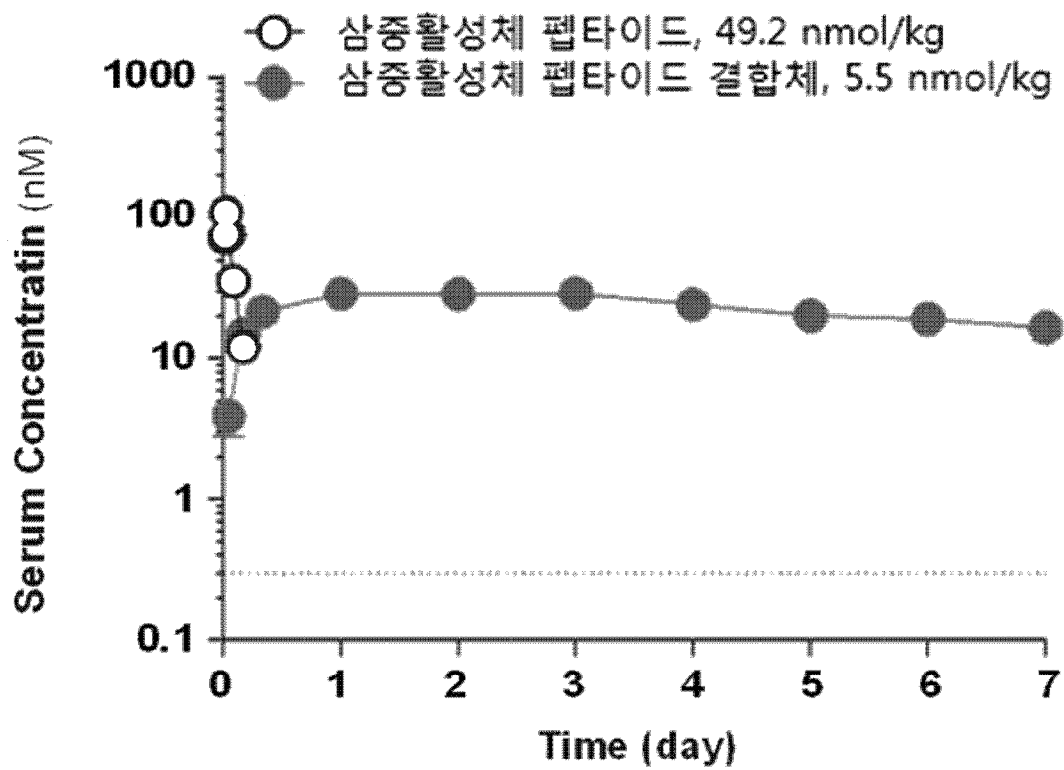
- [청구항 10] 제1항에 있어서, 상기 생리활성 폴리펩타이드는 2개 이상의 수용체를 동시에 활성화시키는 것을 특징으로 하는 단백질 결합체.
- [청구항 11] 제1항에 있어서, 상기 생체적합성 물질은 폴리에틸렌 글리콜(polyethylene glycol, PEG), 콜레스테롤, 알부민 및 이의 단편, 알부민 결합물질, 특정 아미노산 서열의 반복단위의 중합체, 항체, 항체 단편, FcRn 결합물질, 생체 내 결합조직 혹은 그 유도체, 뉴클레오타이드, 파이브로넥틴, 트랜스페린(Transferrin), 사카라이드(saccharide), 고분자 중합체 및 이들의 조합으로 이루어진 군에서 선택된 것인, 단백질 결합체.
- [청구항 12] 제11항에 있어서, 상기 FcRn 결합물질은 면역글로불린 Fc 영역을 포함하는 폴리펩타이드인 것인, 단백질 결합체.
- [청구항 13] 제12항에 있어서, 상기 면역글로불린 Fc 영역은 비당쇄화된 것인, 단백질 결합체.
- [청구항 14] 제12항에 있어서, 상기 면역글로불린 Fc 영역은 힌지(hinge) 영역을 추가로 포함하는 것인, 단백질 결합체.
- [청구항 15] 제12항에 있어서, 상기 면역글로불린 Fc 영역은 IgG, IgA, IgD, IgE, IgM, 이들의 조합(combination) 및 이들의 하이브리드(hybrid)로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인, 단백질 결합체.
- [청구항 16] 제12항에 있어서, 상기 면역글로불린 Fc 영역은 IgG4 Fc 단편인 것인, 단백질 결합체.
- [청구항 17] 제1항에 있어서, 상기 지방산 유도체는 탄소수가 1 내지 40인 포화 지방산 또는 불포화 지방산의 유도체인 것인, 단백질 결합체.
- [청구항 18] 제17항에 있어서, 상기 지방산은 포름산(HCOOH, form acid), 아세트산(CH₃COOH), 프로피온산(C₂H₅COOH), 부티르산(C₃H₇COOH), 발레르산(C₄H₉COOH), 카프로산(C₅H₁₁COOH), 에난트산(C₆H₁₃COOH), 카프릴산(C₇H₁₅COOH), 펠라르곤산(C₈H₁₇COOH), 카프르산(C₉H₁₉COOH), 운데실산(C₁₀H₂₁COOH), 라우르산(C₁₁H₂₃COOH), 트리데실산(C₁₂H₂₅COOH), 미리스트산(C₁₃H₂₇COOH), 펜타데실산(C₁₄H₂₉COOH), 팔미트산(C₁₅H₃₁COOH), 헵타데실산(C₁₆H₃₃COOH), 스테아르산(C₁₇H₃₅COOH), 노나데칸산(C₁₈H₃₇COOH), 이라크산(C₁₉H₃₉COOH), 베헨산(C₂₁H₄₃COOH), 리그노세르산(C₂₃H₄₇COOH), 세로트산(C₂₅H₅₁COOH), 헵타코산산(C₂₆H₅₃COOH), 몬탄산(C₂₈H₅₇COOH), 멜리스산(C₂₉H₅₉COOH), 락세르산(C₃₁H₆₃COOH), 아크릴산(CH₂=CHCOOH), 크로톤산(CH₃CH=CHCOOH), 이소크로톤산(CH₃CH=CHCOOH), 운데실렌산(CH₂=CH(CH₂)₈COOH), 올레산(C₁₇H₃₃COOH), 엘라이드산(C₁₇H₃₃COOH), 세톨레산(C₂₁H₄₁COOH), 에루크산(C₂₁H₄₁COOH), 브라시드산(C₂₁H₄₁COOH), 소르브산(C₅H₇COOH, F2), 리놀레산(C₁₇H₃₁COOH, F2), 리놀렌산(C₁₇H₂₉COOH, F3), 아라키돈산(C₁₉H₃₁COOH, F4), 프로피올산(CH≡CCOOH) 및 스테아롤산(C

- $^{17}\text{H}_{31}\text{COOH}$, F1)으로 이루어진 군으로부터 선택된 지방산 또는 이의 유도체인 것인, 단백질 결합체.
- [청구항 19] 제18항에 있어서, 상기 지방산은 팔미트산, 미리스트산, 스테아르산 또는 올레산의 지방산 또는 이의 유도체인 것인, 단백질 결합체.
- [청구항 20] (a) 생리활성 펩타이드 및 생체적합성 물질을 두 개 이상의 반응기를 갖는 지방산 유도체를 통해 연결하는 단계; 및
(b) 상기 (a) 단계의 반응 결과물인 단백질 결합체를 분리하는 단계를 포함하는, 단백질 결합체를 제조하는 방법.
- [청구항 21] 제20항에 있어서, 상기 (a) 단계는
(a1) 지방산 유도체의 하나의 반응기에 생체적합성 물질과 생리활성 폴리펩타이드 중 어느 하나를 연결시키는 단계;
(a2) 상기 (a1) 단계의 반응 혼합물로부터 지방산과 생체적합성 물질과 생리활성 폴리펩타이드 중 어느 하나가 연결된 연결체를 분리하는 단계; 및
(a3) 상기 (a2) 단계에서 분리된 연결체의 지방산 유도체의 다른 하나의 반응기에 생체적합성 물질과 생리활성 폴리펩타이드 중 다른 하나를 연결하여, 지방산의 반응기가 각각 생리활성 폴리펩타이드와 생체적합성 물질에 연결된 단백질 결합체를 생성하는 단계를 포함하는, 단백질 결합체를 제조하는 방법.
- [청구항 22] 제21항에 있어서, 상기 (a1) 단계 및 (a3) 단계는 환원제의 존재하에서 수행되는 것인, 단백질 결합체를 제조하는 방법.
- [청구항 23] 제22항에 있어서, 상기 환원제가 나트륨 시아노보로하이드라이드(NaCNBH_3), 수소화붕소나트륨, 디메틸아민 붕산염, 피콜린 보란 킴플렉스 또는 피리딘 붕산염(borane pyridine)인 것인, 단백질 결합체를 제조하는 방법.
- [청구항 24] 제21항에 있어서, 상기 (a1) 단계에서 생리활성 폴리펩타이드와 지방산 유도체의 반응 몰비는 1:1 내지 1:20이고, 생체적합성 물질과 지방산의 반응 몰비는 1:1 내지 1:20인 것인, 단백질 결합체를 제조하는 방법.
- [청구항 25] 제21항에 있어서, 상기 (a3) 단계에서 (a2) 단계에서 분리된 연결체와 생체적합성 물질 또는 생리활성 폴리펩타이드의 반응 몰비는 1:0.5 내지 1:20인 것인, 단백질 결합체를 제조하는 방법.

[도1]



[도2]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2016/014144**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER***A61K 47/48(2006.01)i, A61K 38/00(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 47/48; C07K 19/00; A61K 38/00; C07K 14/00; C07K 1/02; A61P 7/00

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: fatty acid derivative, linker, covalent bond, reactor, protein, PEG, antibody, albumin

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 8598311 B2 (LI, Z. et al.) 03 December 2013 See abstract; columns 5, 6; and claims 20-33.	1,7-19
A		2-6,20-25
A	KR 10-2015-0113934 A (HANMI PHARM. CO., LTD.) 08 October 2015 See the entire document.	1-25
A	KLOCKENBUSCH, C. et al., "Optimization of Formaldehyde Cross-linking for Protein Interaction Analysis of Non-tagged Integrin Beta1", Journal of Biomedicine and Biotechnology, 2010, vol. 2010, paper no. 927585, inner pages 1-13 See the entire document.	1-25
A	KRUGER, S. et al., "Study of the Attachment of Linker Molecules and Their Effects on the Charge Carrier Transfer at Lead Sulfide Nanoparticle Sensitized ZnO Substrates", The Journal of Physical Chemistry C, 2011, vol. 115, pages 13047-13055 See the entire document.	1-25
A	WO 2012-087838 A1 (BAXTER INTERNATIONAL INC. et al.) 28 June 2012 See the entire document.	1-25



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

13 MARCH 2017 (13.03.2017)

Date of mailing of the international search report

13 MARCH 2017 (13.03.2017)

Name and mailing address of the ISA/KR

Korean Intellectual Property Office
Government Complex-Daejeon, 189 Seonsa-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/KR2016/014144

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
US 8598311 B2	03/12/2013	US 2010-0272644 A1 US 2014-286863 A1 US 9309303 B2 WO 2009-070234 A2 WO 2009-070234 A3	28/10/2010 25/09/2014 12/04/2016 04/06/2009 12/11/2009
KR 10-2015-0113934 A	08/10/2015	AU 2015-242657 A1 CA 2944138 A1 EP 3127923 A1 HU 1600621 A2 NO 20161667 A SG 11201608120 TA WO 2015-152618 A1	08/10/2015 08/10/2015 08/02/2017 30/01/2017 19/10/2016 29/11/2016 08/10/2015
WO 2012-087838 A1	28/06/2012	AU 2011-349574 A1 CA 2822591 A1 CN 103269723 A EP 2654794 A1 JP 2014-501262 A KR 10-2013-0129254 A US 2012-0190096 A1 US 8945897 B2	11/07/2013 28/06/2012 28/08/2013 30/10/2013 20/01/2014 27/11/2013 26/07/2012 03/02/2015

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))

A61K 47/48(2006.01)i, A61K 38/00(2006.01)i

B. 조사된 분야

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)

A61K 47/48; C07K 19/00; A61K 38/00; C07K 14/00; C07K 1/02; A61P 7/00

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: 지방산 유도체, 링커, 공유결합, 반응기, 단백질, PEG, 항체, 알부민

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
X	US 8598311 B2 (LI, Z. 등) 2013.12.03 요약; 컬럼 5, 6; 및 청구항 20-33 참조.	1,7-19
A		2-6,20-25
A	KR 10-2015-0113934 A (한미약품 주식회사) 2015.10.08 문헌 전체 참조.	1-25
A	KLOCKENBUSCH, C. 등, 'Optimization of formaldehyde cross-linking for protein interaction analysis of non-tagged integrin beta1' Journal of Biomedicine and Biotechnology, 2010, 2010권, 논문번호 927585, 내부페이지 1-13 문헌 전체 참조.	1-25
A	KRUGER, S. 등, 'Study of the attachment of linker molecules and their effects on the charge carrier transfer at lead sulfide nanoparticle sensitized ZnO substrates' The Journal of Physical Chemistry C, 2011, 115권, 페이지 13047-13055 문헌 전체 참조.	1-25
A	WO 2012-087838 A1 (BAXTER INTERNATIONAL INC. 등) 2012.06.28 문헌 전체 참조.	1-25

☐ 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

2017년 03월 13일 (13.03.2017)

국제조사보고서 발송일

2017년 03월 13일 (13.03.2017)

ISA/KR의 명칭 및 우편주소

대한민국 특허청
(35208) 대전광역시 서구 청사로 189,
4동 (둔산동, 정부대전청사)

팩스 번호 +82-42-481-8578

심사관

박정민

전화번호 +82-42-481-3516



국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
US 8598311 B2	2013/12/03	US 2010-0272644 A1 US 2014-286863 A1 US 9309303 B2 WO 2009-070234 A2 WO 2009-070234 A3	2010/10/28 2014/09/25 2016/04/12 2009/06/04 2009/11/12
KR 10-2015-0113934 A	2015/10/08	AU 2015-242657 A1 CA 2944138 A1 EP 3127923 A1 HU 1600621 A2 NO 20161667 A SG 11201608120 TA WO 2015-152618 A1	2015/10/08 2015/10/08 2017/02/08 2017/01/30 2016/10/19 2016/11/29 2015/10/08
WO 2012-087838 A1	2012/06/28	AU 2011-349574 A1 CA 2822591 A1 CN 103269723 A EP 2654794 A1 JP 2014-501262 A KR 10-2013-0129254 A US 2012-0190096 A1 US 8945897 B2	2013/07/11 2012/06/28 2013/08/28 2013/10/30 2014/01/20 2013/11/27 2012/07/26 2015/02/03