

명세서

발명의 명칭: 폴리에틸렌글리콜 유도체, 이를 포함하는 조성물 및 이를 이용한 생리활성 폴리펩타이드 결합체의 제조 방법 기술분야

- [1] 본 발명은 폴리에틸렌글리콜 유도체, 이를 포함하는 조성물 및 이러한 폴리에틸렌글리콜 유도체를 이용한 생리활성 폴리펩타이드 결합체의 제조에 관한 것이다.
- #### 배경기술
- [2] 펩타이드 의약품은 두 개 이상의 아미노산이 일정한 화학결합 형태로 연결된 물질로서 주로 화학적인 합성을 통해서 생산하는 의약품을 말한다. 펩타이드 의약품은 '생체 친화적', '생체내 특이성'이라는 특성을 가져서 부작용은 적으면서 소량으로도 강력한 약리작용 및 활성을 나타낼 수 있는 것으로 알려져 있다. 따라서 펩타이드 의약품은 합성 의약품과 단백질 의약품의 단점들을 보완할 것으로 기대받고 있다.
- [3] 그러나 펩타이드 의약품은 소화관에서 단백질 효소에 의하여 아미노산으로 분해되기 쉬우므로 경구 투여가 어려워 주사를 통해 전달해야 하고, 혈중 반감기가 짧기 때문에 생체 이용률이 낮고 반복적인 투여가 필요하다. 또한, 단백질 의약품보다 작은 크기로 인하여 약물 투여시 표적까지 도달하지 못하고 신장을 통해 체내에서 빠르게 소실되는 한계를 가진다.
- [4] 이러한 문제를 해결하기 위하여 펩타이드 약물의 생체막 투과도를 증가시켜 구강 또는 비강을 통한 흡입으로 펩타이드 약물을 체내로 전달하는 방법, 펩타이드의 단백질 가수분해 효소에 의한 분해를 억제하기 위하여 단백질 가수분해 효소에 민감한 특정 아미노산 서열을 변경하는 방법, 재조합 융합 기술을 이용한 생리활성 폴리펩타이드와 인간 혈청 알부민 또는 면역글로불린 절편(Fc)과의 융합 단백질 제조 및 용해도가 높은 비펩타이드성 중합체를 펩타이드 표면에 화학적으로 부가시키는 방법 등이 연구되어 왔다.
- [5] 비펩타이드성 중합체인 폴리에틸렌글리콜(PEG)은 비이온성, 비독성, 생체 적합성 및 높은 친수성을 갖는 중합체이다. PEG는 화학적으로 용이하게 변형이 가능하므로, 펩타이드나 단백질 약물에 공유결합으로 부착하여 해당 약물의 분자량을 증가시킴으로써 신장에 의한 소실을 억제하고, 단백질 분해 효소로부터 약물을 보호할 수 있다. PEG는 특별한 부작용도 일으키지 않으므로, 최근 펩타이드 약물의 혈중 반감기를 연장시키기 위한 방법으로서 활발하게 연구되고 있다.
- [6] PEG는 미국식품의약국에 의해 "일반적으로 안전한 것으로 인정(GRAS)"되는 물질로 승인을 받았다. 국제특허공개 WO 06/076471호는 울혈성 심부전증(Congestive heart failure) 치료제로 사용되는 B형 나트륨 배설 증가

펩타이드(B-type natriuretic peptide, BNP)에 PEG를 결합하여 생리 활성을 지속시키는 것에 대해 기술하고 있다. 미국 특허 제 6,924,264호는 엑센딘-4(exendin-4)의 라이신(lysine) 잔기에 PEG를 결합시켜 생체 내 지속 시간을 증가시키는 방법을 기술하고 있다.

- [7] 개질 또는 변형되지 않은 PEG인 에틸렌글리콜의 호모중합체에는 양쪽 또는 한쪽 말단에 히드록시기가 있다. 약물과 결합시키기 위한 용도를 위해 PEG 유도체를 사용할 수도 있는데, 예컨대 PEG 사슬 일 말단 또는 양 말단의 히드록시기를 반응성이 높은 작용기로 변환시킨 PEG 유도체를 사용할 수도 있다. 예를 들어 PEG 유도체로서 PEG-알데하이드, PEG-아세트알데하이드, PEG-프로피온알데하이드 등을 사용할 수 있다. 이러한 알데하이드 PEG 유도체는 말단에 존재하는 알데하이드기가 단백질의 아미노산 일단과 선택적으로 반응하여 펩타이드 약물과 화학 결합을 형성하여 연결될 수 있다.
- [8] 그러나 약물 결합에 양쪽 말단이 모두 알데하이드기인 PEG 유도체를 사용할 경우, 양쪽 알데하이드기가 모두 반응에 참여할 수 있으므로, 원하지 않는 부가 생성물의 생성이나 PEG의 과량 사용 등을 초래하여 결과적으로 수율과 순도에 나쁜 영향을 미칠 수 있다.

발명의 상세한 설명

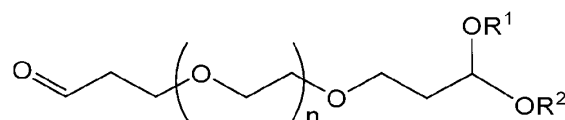
기술적 과제

- [9] 본 발명의 일 목적은 펩타이드 의약품 제조에 사용될 수 있는 폴리에틸렌글리콜 유도체 및 이를 포함하는 조성물을 제공하는 것이다.
- [10] 본 발명의 다른 한 목적은 전술한 폴리에틸렌글리콜 유도체를 이용하는 생리활성 펩티드 결합체의 제조방법을 제공하는 것이다.

기술적 해결방법

- [11] 일 양태에 따른 폴리에틸렌글리콜 유도체 화합물은 하기 화학식 1로 표시된다:
- [12] <화학식 1>

[13]

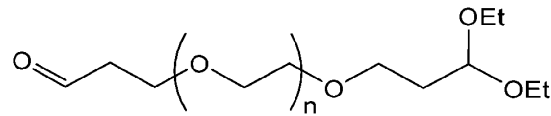


- [14] 상기 화학식 1에서 n은 30 내지 115의 자연수이고,
- [15] R¹과 R²는 서로 같거나 다른 C₁~C₅알킬이다.
- [16] 상기 C₁~C₅ 알킬은 메틸, 에틸, 프로필 또는 부틸일 수 있다.
- [17] 상기 R¹ 및 R²는 에틸일 수 있다.
- [18] n은 50 내지 100의 자연수일 수 있다.
- [19] n은 67 내지 83의 자연수일 수 있다.
- [20] 일 양태에 따른 폴리에틸렌글리콜 유도체 조성물은
- [21] 하기 화학식 1A로 표시되는 폴리에틸렌글리콜 유도체;
- [22] 하기 화학식 2로 표시되는 폴리에틸렌글리콜 유도체; 및

[23] 하기 화학식 3으로 표시되는 폴리에틸렌글리콜 유도체; 를 포함한다:

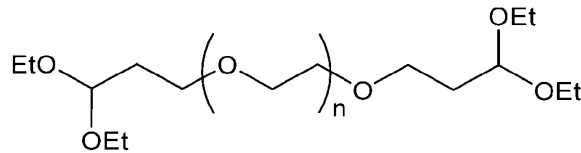
[24] <화학식 1A>

[25]



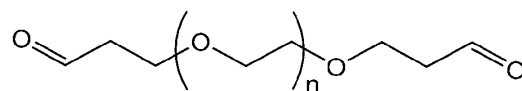
[26] <화학식 2>

[27]



[28] <화학식 3>

[29]



[30] n은 30 내지 115의 자연수일 수 있다.

[31] 상기 조성물 중,

[32] 수평균 분자량 2950 내지 3650의 범위 내에 있는 상기 화학식 1A로 표시되는 폴리에틸렌글리콜 유도체의 함량비가 고성능 액체 크로마토그래피(HPLC) 기준으로 적어도 70 면적%으로 나타나고,

[33] 수평균 분자량 범위 2950 내지 3650의 범위 내에 있는 상기 화학식 2로 표시되는 폴리에틸렌글리콜 유도체의 함량비가 고성능 액체 크로마토그래피(HPLC) 기준으로 15 면적% 이하로 나타나고,

[34] 수평균 분자량 범위 2950 내지 3650의 범위 내에 상기 화학식 3으로 표시되는 폴리에틸렌글리콜 유도체의 함량비가 고성능 액체 크로마토그래피(HPLC) 기준으로 10 면적% 이하로 나타난다.

[35] 상기 조성물 중 상기 폴리에틸렌글리콜 유도체들의 수평균 분자량은 겔 투과 크로마토그래피로 측정하였을 때 2950 ~ 3650의 범위 내이다.

[36] 상기 조성물 중 상기 폴리에틸렌글리콜 유도체의 수평균 분자량은 겔 투과 크로마토그래피로 측정하였을 때 3000 ~ 3200의 범위 내이다.

[37] 일 양태에 따른 생리활성 폴리펩타이드 결합체의 제조 방법은

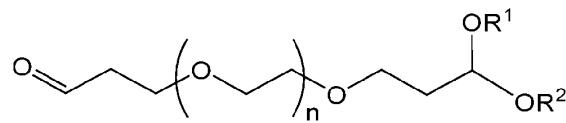
[38] (a) 하기 화학식 1의 폴리에틸렌글리콜 유도체를 생리활성 폴리펩타이드와 반응시켜 하기 화학식 1의 폴리에틸렌글리콜 유도체의 알데하이드 탄소에 상기 생리활성 폴리펩타이드가 공유결합으로 연결된 연결체를 생성하는 폐길화(pegylation) 단계;

[39] (b) 상기 연결체를 산성의 수성 조건으로 처리하여 연결체 가수분해물을 생성하는 가수분해 단계; 및

[40] (c) 상기 연결체 가수분해물을 면역글로불린 Fc 절편 또는 그 유도체에 반응시켜 결합체를 생성하는 연결(conjugation) 단계;를 포함한다.

[41] <화학식 1>

[42]



[43] 상기 화학식 1에서 n은 50 내지 100의 자연수고,

[44] R¹과 R²는 서로 같거나 다른 C₁~C₅알킬이다.

[45] 상기 결합체는 상기 연결체 가수분해물 내의 상기 화학식 1의 폴리에틸렌글리콜 유도체의 아세탈 탄소로부터 유래한 탄소 원자에 Fc 절편 또는 그 유도체가 공유결합으로 연결되어 있는 구조이다.

[46] 상기 생리활성 폴리펩타이드는 호르몬, 사이토카인, 효소, 항체, 성장 인자, 전사조절인자, 혈액 응고인자, 백신, 구조 단백질, 리간드 단백질 및 수용체로 이루어지는 군에서 선택될 수 있다.

[47] 상기 (a) 단계의 반응은 환원적 아민화이고,

[48] 상기 연결체는 상기 생리활성 폴리펩타이드의 N-말단 질소 또는 라이신의 ε-아미노기 질소 원자가 상기 화학식 1의 화합물의 알데히드 탄소 원자에 공유결합으로 연결된 물질일 수 있다.

[49] 상기 (a) 단계의 폐길화 반응은 pH 3.0 ~ 9.0의 범위에서 이루어질 수 있다.

[50] 상기 (b) 단계의 가수분해는 pH 1.0 ~ 5.0의 범위에서 이루어질 수 있다.

[51] 상기 (c) 단계의 연결 반응은 환원적 아민화일 수 있다.

[52] 상기 환원적 아민화는 pH 5.0 ~ 8.5의 범위에서 이루어질 수 있다.

[53] 상기 Fc 절편 또는 유도체의 서열은 N-말단이 프롤린일 수 있다.

[54] 상기 결합체는 상기 아세탈 탄소로부터 유래한 탄소 원자에 Fc 절편 또는 유도체의 N-말단 프롤린의 질소 원자가 공유결합으로 연결되어 있을 수 있다.

[55] 상기 Fc 절편 또는 유도체는 서열번호 2의 아미노산 서열을 가질 수 있다.

[56] 상기 R¹과 R²는 에틸일 수 있다.

[57] n은 67 내지 83의 자연수일 수 있다.

발명의 효과

[58] 일단에는 반응성 알데하이드기를 갖고 다른 일단에는 미반응성 아세탈기를 갖는 폴리에틸렌글리콜 유도체에 생리활성 폴리펩타이드 및 Fc 절편 또는 그 유도체를 결합시킴으로써 생리활성 폴리펩타이드 결합체를 고수율로 제조할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[59] 도 1은 일 양태에 따른 생리활성 폴리펩타이드 결합체의 제조방법을 설명하는 순서도이다.

[60] 도 2a 및 도 2b는 각각 시험예 2에서 제조된 ALD-PEG-DEP 및 상용의 ALD-PEG-ALD의 MALDI-TOF 질량분석 그래프이다.

[61] 도 3a 및 도 3b는 각각 시험예 2의 ALD-PEG-DEP 및 상용의 ALD-PEG-ALD의

핵자기공명(^1H NMR) 스펙트럼의 그래프이다.

[62] 도 3c 및 도 3d는 각각 시험예 2의 ALD-PEG-DEP 및 상용의 ALD-PEG-ALD의 핵자기공명(^{13}C NMR) 스펙트럼의 그래프이다.

[63] 도 4a 및 도 4b는 각각 시험예 2의 ALD-PEG-DEP 및 상용의 ALD-PEG-ALD의 FT-IR 스펙트럼이다.

[64] 도 5는 실시예 1의 연결체 가수분해물과 및 비교예 1의 연결체의 알데하이드기 활성도를 나타낸 그래프이다.

발명의 실시를 위한 최선의 형태

[65] 이하 본 발명을 상세히 설명한다.

[66] 본 발명에서 사용되는 모든 기술용어는 달리 정의되지 않는 이상 본 발명의 관련 분야의 통상의 기술자가 일반적으로 이해하는 바와 같은 의미로 사용된다. 또한, 본 명세서에는 바람직한 방법이나 시료가 기재되지만, 이와 유사하거나 동등한 것들도 본 발명의 범주에 포함된다. 또한, 본 명세서에 기재된 수치는 명시하지 않아도 "약"의 의미를 포함하는 것으로 간주한다. 본 명세서에 참고문헌으로 기재되는 모든 간행물의 내용은 전체가 본 명세서에 참고로 통합된다.

[67] 본 발명의 일 양태에 따른 폴리에틸렌글리콜 유도체를 설명한다.

[68] 상기 폴리에틸렌글리콜 유도체는 폴리에틸렌 글리콜(PEG)의 일단에 알데하이드기(ALD)를 갖고, 다른 일단에 아세탈기(ACT)를 갖는 폴리에틸렌 글리콜 유도체이다. 상기 폴리에틸렌글리콜 유도체는 하기 식 1로 표시할 수 있다.

[69] ALD-PEG-ACT <식 1>

[70] 식 1에서, ALD는 알데하이드 작용기이고, PEG는 폴리에틸렌글리콜 부위이고, ACT는 아세탈기다.

[71] 식 1에서 상기 폴리에틸렌글리콜(PEG) 부위는 $(-\text{O}-\text{C}_2\text{H}_4)_n-\text{O}-$ 로 나타낼 수 있으며, 이때 n 은 30 내지 115 또는 50 내지 100 일 수 있다. 더 구체적인 예에서 n 은 67 내지 83 의 범위일 수 있다. 상기 폴리에틸렌글리콜(PEG)은 생리활성 폴리펩타이드 및 Fc 절편 또는 그 유도체와 결합하여 생리활성 폴리펩타이드의 생체내 반감기를 증가시키고, 생리활성 폴리펩타이드를 체내에 운반하는 역할을 할 수 있다.

[72] 상기 알데하이드기(ALD)는 반응성 작용기로서 알킬 알데하이드, 예컨대 C_2-C_6 알킬 알데하이드일 수 있다. 상기 알데하이드기(ALD)는 구체적으로 프로피온 알데하이드기, 부틸 알데하이드기 등일 수 있으나, 특별히 이에 제한되지 않는다. 상기 알데하이드기(ALD)는 생리활성 폴리펩타이드와 반응하여 생리활성 폴리펩타이드를 폴리에틸렌글리콜(PEG)에 결합시킬 수 있다. 또는 상기 알데하이드기(ALD)는 Fc 절편 또는 그 유도체와 반응하여 Fc 절편 또는 그 유도체를 폴리에틸렌글리콜(PEG)에 결합시킬 수 있다.

[73] 상기 아세탈기(ACT)는 미반응성 작용기로서 생리활성 폴리펩타이드 또는 Fc 절편 또는 그 유도체와 반응하지 않는다. 따라서 알데하이드기(ALD)의 반응을 통하여 폴리에틸렌글리콜(PEG)의 일단이 생리활성 폴리펩타이드 또는 Fc 절편 또는 그 유도체에 결합되는 동안 폴리에틸렌글리콜(PEG)의 다른 일단은 미반응성인 아세탈기(ACT)에 의하여 보호될 수 있다.

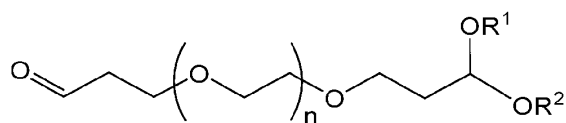
[74] 상기 아세탈기(ACT)는 $-R_1CH(OR_2)(OR_3)$ 로 나타낼 수 있으며, R_1 내지 R_3 은 서로 독립적으로 C_2-C_6 알킬기일 수 있다. 상기 아세탈기(ACT)는 구체적으로 1,1-디에톡시 프로필기, 1,1-디에톡시 부틸기 등일 수 있으나, 특별히 이에 제한되지 않는다.

[75] 한편, 상기 아세탈기(ACT)는 알데하이드기로 가수분해되어 제2의 알데하이드기(ALD)를 형성할 수 있다. 제2의 알데하이드기(ALD)는 생리활성 폴리펩타이드 또는 Fc 절편 또는 그 유도체와 반응하여 생리활성 폴리펩타이드 또는 Fc 절편 또는 그 유도체를 폴리에틸렌글리콜(PEG)의 다른 일단에 결합시킬 수 있다.

[76] 상기 식 1의 폴리에틸렌글리콜 유도체의 구체적인 일 예는 하기 화학식 1로 표시될 수 있다.

[77] <화학식 1>

[78]



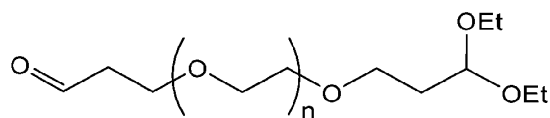
[79] 상기 화학식 1에서 R^1 과 R^2 는 서로 같거나 다른 C_1-C_5 알킬기일 수 있다. 이때 C_1-C_5 알킬기는 선형, 분지형 또는 고리형 알킬기를 포함할 수 있다. C_1-C_5 알킬기는 예를 들어 메틸, 에틸, 프로필 또는 부틸일 수 있다. R^1 및 R^2 는 예를 들어 에틸기일 수 있다.

[80] n 은 30 내지 115, 예를 들어 50 내지 100, 예를 들어 67 내지 83의 범위일 수 있다. 상기 화학식 1의 아세탈기는 생리활성 펩타이드 결합체 형성과정에서 가수분해되어 제2의 알데하이드기로 변환될 수 있다.

[81] 구체적으로 화학식 1의 폴리에틸렌글리콜 유도체는 하기 화학식 1A로 표시될 수 있다.

[82] <화학식 1A>

[83]



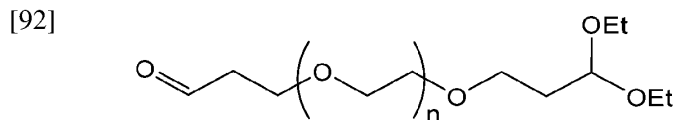
[84] n 은 화학식 1의 n 을 참조한다.

[85] 본 발명의 다른 일 양태에 따른 폴리에틸렌글리콜 유도체 조성물을 설명한다.

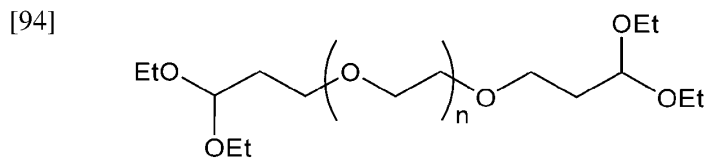
[86] 전술한 폴리에틸렌글리콜 유도체는 불순물을 포함하는 조성물을 형성할 수 있다. 상기 불순물은 폴리에틸렌글리콜의 양단이 모두 아세탈기인

폴리에틸렌글리콜 유도체 및/또는 폴리에틸렌글리콜의 양단이 모두 알데하이드기인 폴리에틸렌글리콜 유도체를 포함할 수 있다. 상기 조성물 중 일단은 알데하이드기를 갖고 다른 일단은 아세탈기를 갖는 폴리에틸렌글리콜 유도체의 함량 비율을 일단은 알데하이드기를 갖고 다른 일단은 아세탈기를 갖는 폴리에틸렌글리콜 유도체의 순도라고 볼 수 있다. 이러한 불순물의 함량은 고성능 액체 크로마토그래피(HPLC)로 측정된 해당 피크의 면적%로 계산될 수 있다.

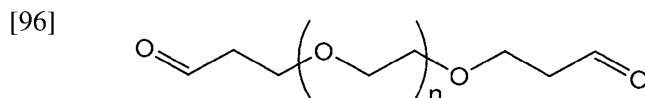
- [87] 예를 들어 폴리에틸렌글리콜 유도체 조성물은
 [88] 하기 화학식 1A로 표시되는 폴리에틸렌글리콜 유도체;
 [89] 하기 화학식 2로 표시되는 폴리에틸렌글리콜 유도체; 및
 [90] 하기 화학식 3으로 표시되는 폴리에틸렌글리콜 유도체; 를 포함할 수 있다.
 [91] <화학식 1A>



[93] <화학식 2>



[95] <화학식 3>



- [97] 화학식 1A, 화학식 2 및 화학식 3에서 n은 30 내지 115의 자연수일 수 있다.
 [98] 상기 조성물 중,
 [99] 상기 화학식 1A로 표시되는 폴리에틸렌글리콜 유도체는 2950 내지 3650의 범위 내에 있는 수평균 분자량을 가질 수 있고, 고성능 액체 크로마토그래피(HPLC) 기준으로 적어도 75 면적%로 나타나는 함량비를 가질 수 있다.
 [100] 상기 화학식 2로 표시되는 폴리에틸렌글리콜 유도체는 2950 내지 3650의 범위 내에 있는 수평균 분자량을 가질 수 있고, 고성능 액체 크로마토그래피(HPLC) 기준으로 15 면적% 이하로 나타나는 함량비를 가질 수 있다.
 [101] 상기 화학식 3로 표시되는 폴리에틸렌글리콜 유도체는 2950 내지 3650의 범위 내에 있는 수평균 분자량을 가질 수 있고, 고성능 액체 크로마토그래피(HPLC) 기준으로 10 면적% 이하로 나타나는 함량비를 가질 수 있다.
 [102] 상기 조성물 중 상기 폴리에틸렌글리콜 유도체들의 수평균 분자량은 겔 투과 크로마토그래피로 측정된 값일 수 있다.

- [103] 상기 조성물 중 상기 폴리에틸렌글리콜 유도체들의 수평균 분자량은 겔 투과 크로마토그래피로 측정하였을 때 3000 ~ 3200의 범위 내일 수 있다.
- [104] 화합물의 수평균 분자량은 겔 투과 크로마토그래피에 의하여 측정할 수 있다.
- [105] 발명의 다른 일 양태에 따른 생리활성 폴리펩타이드 결합체의 제조방법을 설명한다. 도 1은 일 양태에 따른 생리활성 폴리펩타이드 결합체의 제조방법을 설명하는 순서도이다.
- [106] 도 1을 참조하면, 상기 생리활성 폴리펩타이드 결합체의 제조방법은 먼저 일단에 알데하이드 작용기를 갖고, 다른 일단에 아세탈 작용기를 갖는 폴리에틸렌 글리콜(PEG)을 포함하는 폴리에틸렌글리콜 유도체를 제공한다(S110). 상기 폴리에틸렌 글리콜 유도체는 상기 식 1, 화학식 1 또는 화학식 1A로 나타나는 화합물이며, 전술한 식 1, 화학식 1 또는 화학식 1A의 화합물에 대한 설명을 참조한다.
- [107] 이어서 상기 폴리에틸렌글리콜 유도체를 생리활성 폴리펩타이드와 반응시킨다(S120). 상기 반응에 의하여 폴리에틸렌글리콜 유도체의 알데하이드 탄소에 상기 생리활성 폴리펩타이드가 공유결합으로 연결된 연결체를 형성할 수 있다. 이러한 연결체 형성 반응은 폐길화 반응(pegylation reaction)일 수 있다. 이 폐길화 반응은 환원적 아민화 반응일 수 있다. 상기 폐길화 반응은 pH 3.0 ~ 9.0의 범위, 예를 들어 pH 5.0 ~ 9.0의 범위에서 이루어질 수 있다.
- [108] 상기 생리활성 폴리펩타이드는 예를 들어 호르몬, 사이토카인, 효소, 항체, 성장 인자, 전사조절인자, 혈액 응고인자, 백신, 구조 단백질, 리간드 단백질 또는 수용체를 포함할 수 있다. 예를 들어 생리활성 폴리펩타이드는 엑센딘-4 또는 이미다조-아세틸 엑센딘-4(imidazoacetyl exendin-4)일 수 있다. 예를 들어 상기 연결체는 상기 생리활성 폴리펩타이드의 N-말단 질소 또는 라이신의 ϵ -아미노기 질소 원자가 상기 화학식 1의 화합물의 알데하이드 탄소 원자에 공유결합으로 연결된 물질일 수 있다.
- [109] 이어서 일단이 상기 생리활성 폴리펩타이드와 결합된 상기 폴리에틸렌글리콜 유도체의 다른 일단의 상기 아세탈기를 알데하이드기로 변환시킬 수 있다(S130).
- [110] 예를 들어 가수분해에 의하여 아세탈기를 알데하이드기로 변환시킬 수 있다. 이때 가수분해는 예를 들어 산성의 수성 조건에서 이루어질 수 있다. 상기 가수분해는 pH 1.0 ~ 5.0의 범위, 예를 들어 pH 2.0 ~ 5.0의 범위에서 이루어질 수 있다. 상기 화학식 1의 아세탈기의 R¹ 및/또는 R²가 프로필기일 경우 가수분해되어 생성되는 알데하이드기는 프로피온 알데하이드기일 수 있다.
- [111] 이어서 상기 폴리에틸렌글리콜 유도체의 변환된 알데하이드기를 Fc 절편 또는 그 유도체와 반응시킬 수 있다(S140). 상기 반응에 의하여 상기 폴리에틸렌글리콜 유도체의 다른 일단이 Fc 절편 또는 그 유도체와 연결(conjugation)될 수 있다. 이때 Fc 절편 또는 그 유도체는 아세탈기의 탄소로부터 유래한 탄소 원자에 공유결합으로 연결될 수 있다.

- [112] 예를 들어, 폴리에틸렌글리콜 유도체가 상기 화학식 1로 표시되는 폴리에틸렌글리콜 유도체인 경우 이 폴리에틸렌글리콜 유도체의 알데하이드기를 먼저 생리활성 폴리펩타이드와 반응시켜 폴리에틸렌글리콜 유도체의 일단에 생리활성 폴리펩타이드를 결합시킬 수 있다. 이때 생리활성 폴리펩타이드가 알데하이드기와 폐길화 반응(pegylation reaction)할 수 있다. 이 폐길화 반응에는 예를 들어, 환원적 아민화 반응을 이용할 수 있다. 이어서 이렇게 하여 얻은 폴리에틸렌글리콜 유도체-생리활성 폴리펩타이드 연결체에서 반응하지 않고 남아 있던 작용기인 아세탈기(ACT)를 가수분해하여 반응성을 갖는 제2의 알데하이드기로 변환시킬 수 있다. 이 폴리에틸렌글리콜 유도체-생리활성 폴리펩타이드 연결체의 변환된 제2의 알데하이드기를 Fc 절편 또는 그 유도체와 반응시킬 수 있다. 이 반응은 연결반응(conjugation reaction)으로서, 예를 들어 환원적 아민화 반응을 이용할 수 있다. 상기 환원적 아민화는 pH 5.0 ~ 8.5의 범위에서 이루어질 수 있다. 이 반응에 의하여 폴리에틸렌 글리콜 유도체-생리활성 폴리펩타이드 연결체의 다른 일단에 Fc 절편 또는 그 유도체를 결합시킬 수 있다. 이와 같은 과정에 의하여 폴리에틸렌 글리콜 유도체의 일단은 생리활성 폴리펩타이드와 연결되고, 다른 일단은 Fc 절편 또는 그 유도체와 연결된 생리활성 폴리펩타이드 결합체를 형성할 수 있다. 상기 결합체는 예를 들어 폴리에틸렌 글리콜 유도체의 아세탈 탄소로부터 유래한 탄소 원자에 Fc 절편 또는 유도체의 N-말단 프롤린의 질소 원자가 공유결합으로 연결되어 있는 결합체일 수 있다. 아세탈 탄소는 아세틸기에서 -OR기가 연결된 탄소이다.
- [113] 본 발명의 구현예들에 따른 폴리에틸렌글리콜 유도체를 이용한 생리활성 폴리펩타이드 결합체의 제조 방법은 불순물 또는 유연물질(related substance)의 발생을 억제하는 한편 수율이 높은 장점이 있다.
- [114] 말단에 작용기를 포함하는 폴리에틸렌글리콜 유도체에 생리활성 폴리펩타이드를 연결시키는 단계(폐길화)에서 부산물로서 한 단위의 생리활성 폴리펩타이드에 두 단위 이상의 폴리에틸렌글리콜 유도체가 연결된 유연물질 중간체가 불가피하게 생성될 수 있다. 폴리에틸렌글리콜 유도체의 분자량이 크지 않으면 통상적인 크로마토그래피 방법만으로는 이러한 유연물질 중간체를 후속 연결 반응 단계 돌입 전에 완벽하게 정제하여 걸러내는 것이 쉽지 않다.
- [115] 양 말단이 모두 알데하이드 작용기를 갖는 종래 기술의 폴리에틸렌 글리콜 유도체를 사용하는 경우, 이와 같이 잔류하는 유연물질 중간체가 후속 연결 단계에서 Fc 절편과 반응하여 다중체(이량체, 삼량체 등) 형태의 불순물을 발생시킬 수 있다. 또한 종래 기술의 폴리에틸렌글리콜 유도체를 이용한 제조에서는 폐길화 단계에서 생리활성 폴리펩타이드-폴리에틸렌글리콜 유도체-생리활성 폴리펩타이드와 같은 샌드위치 구조의 폴리에틸렌글리콜 연결체도 생성될 수 있어서, 이러한 반응 부산물로 인해 수율이 감소하는 단점이 있었다.

- [116] 양 말단이 모두 알데하이드 작용기를 갖는 종래 기술의 폴리에틸렌 글리콜 유도체를 사용하는 경우, 또한 알데하이드기의 높은 반응성 때문에 알데하이드기가 반응 표적 외의 물질과 먼저 반응하여 소실될 수 있다. 또한, 폴리에틸렌글리콜 유도체의 제조 과정에서 말단기가 변질된 불순물이 생성되어 폴리에틸렌글리콜 유도체 자체가 불순물을 어느 정도 포함할 수 있다. 이러한 알데하이드기의 활성 소실이나 변질에 의하여 일단의 알데하이드기가 히드록시기나 에테르기 등으로 변환되어 단일 알데하이드기를 갖는 유연물질이 폐길화 반응을 할 경우, 그에 대응하는 구조의 폴리에틸렌글리콜 연결체가 생성될 수 있다. 이러한 폴리에틸렌글리콜 연결체에는 후속 연결 반응에 의하여 Fc 절편 또는 그 유도체와 반응할 수 있는 알데하이드기가 없기 때문에 최종 결합체로 이어지지 못한다. 그러므로 이러한 단일 알데하이드기를 갖는 유연물질의 발생은 종래 기술의 결합체의 제조 방법에서 불순물을 낳고 수율을 떨어뜨리는 원인이 될 수 있다.
- [117] 본 발명의 구현예에 의한 폴리에틸렌글리콜 유도체를 생리활성 폴리펩타이드 결합체의 제조에 사용하는 경우 이러한 불순물 발생을 원천적으로 예방할 수 있다. 종래 기술의 폴리에틸렌글리콜 유도체와 달리 본 발명의 구현예에 의한 폴리에틸렌글리콜 유도체는 일단에만 알데하이드기를 포함하므로 원천적으로 다중체를 형성할 수 없다. 또한 본 발명의 구현예에 의한 폴리에틸렌글리콜 유도체를 이용한 제조 방법에서는 폐길화 전에 알데하이드기가 소실되거나 유연물질로 바뀌게 되면 폐길화 생성물인 생리활성 폴리펩타이드-폴리에틸렌글리콜 연결체를 처음부터 생성할 수 없다. 따라서 유연물질 발생을 억제할 수 있고 정제가 간편해지며, 이는 폐길화 단계의 수율 향상으로 이어진다. 나아가 후술하는 바와 같이 폐길화 후의 연결 반응 단계의 효율도 종래 기술보다 높고, 정제 공정에서의 순도도 개선되는 효과가 있다.
- [118] 전술한 이점과 관련하여 본 발명의 제법과 종래 기술의 제법의 수율을 개괄적으로 비교한다. 먼저 본 발명의 구체적인 실시 형태에서는 통상적으로 폐길화 산물인 생리활성 폴리펩타이드-폴리에틸렌글리콜 연결체의 알데하이드 활성화도(알데하이드기가 연결 반응 직전까지 유지되는 정도)가 80~95% 수준이다. 이는 종래 기술의 폴리에틸렌글리콜 유도체를 이용한 연결체의 알데하이드 활성화도인 60~75%와 비교하여 상당히 높다. 또한 본 발명의 제조 방법에서는 연결 단계의 수율도 향상되기 때문에, 본 발명의 구체적인 실시 형태에서 생리활성 폴리펩타이드 결합체의 최종 수율은 통상적으로 종래 기술의 제조 방법의 약 1.2배 내지 1.7배 수준으로 향상된다.

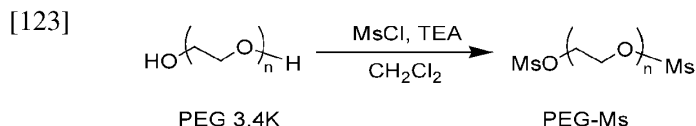
발명의 실시를 위한 형태

- [119] 이하에서 본 발명의 생리활성 폴리펩타이드 결합체의 제조 방법을 구체적인 실시예를 들어 설명한다.
- [120] 먼저, 에틸렌글리콜 반복부의 양쪽 말단을 각각 프로필알데하이드기와

3-디에톡시프로필기로 개질한 폴리에틸렌글리콜 유도체(ALD-PEG-DEP)를 제조하였다.

[121] 시험예 1: ALD-PEG-DEP의 제조 1

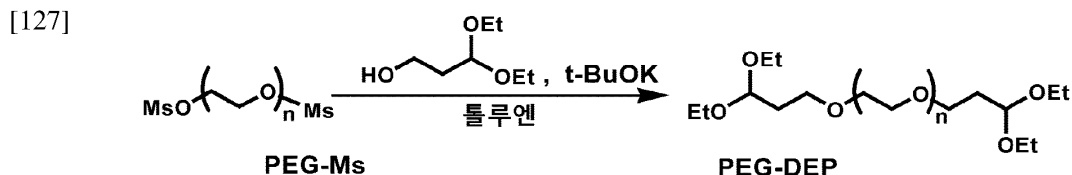
[122] (a) PEG-Ms의 제조



[124] 질소 대기 하의 반응기에서 PEG(수평균 분자량 3400) 100 g을 디클로로메탄(CH_2Cl_2) 300 mL에 용해시킨 용액을 5°C로 냉각하였다. 이 용액에 트리에틸아민(TEA) 23.0mL를 가하고, 5°C를 유지하며 메탄설폰일 클로라이드(MsCl) 12.6 mL를 가하였다. 이 반응액을 5°C에서 2.5시간 동안 교반한 후, 증류수 300 mL를 가하고 10분 동안 교반한 후 유기층을 분리하였다.

[125] 수층에 디클로로메탄 300 mL를 가하여 유기층을 추가 추출한 후 이미 분리된 유기층에 합하였다. 합한 유기층을 증류수로 세척한 후 무수 황산마그네슘으로 건조하고 여과하였다. 여액을 감압 농축한 후, 이 농축액을 디클로로메탄 100 mL에 용해하고, 메틸 *t*-부틸에테르 1500 mL에 30분 동안 적가하였다. 반응액을 실온에서 1시간 동안 교반한 후 고체를 여과하고, 메틸 *t*-부틸에테르로 고체를 세척한 후 실온에서 질소 건조하여 목적 화합물인 PEG-Ms(mesylate) 97 g (수율: 92.6%)을 수득하였다.

[126] (b) PEG-DEP의 제조

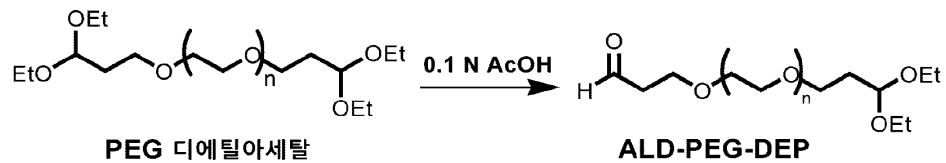


[128] 질소 대기 하에서 제 1 반응기에 3,3-디에톡시-1-프로판올 1.8 mL와 톨루엔 40 mL를 투입하였다. 칼륨 *t*-부톡사이드(*t*-BuOK) 1.4 g을 투입하고 50°C로 승온하여 1시간 동안 교반하고, 반응액을 실온으로 냉각하였다.

[129] 질소 대기 하에서 제 2 반응기에 전술한 바와 같이 제조한 PEG-Ms 10 g과 톨루엔 40 mL를 투입하였다. 여기에 활성화된 제1 반응기의 용액을 1시간 동안 천천히 적가하였다. 실온에서 2시간 동안 교반하고 반응이 완결된 후 반응물에 포화된 염화암모늄 수용액을 첨가하였다. 반응물을 5분 동안 교반한 후 디클로로메탄을 첨가하여 유기층을 추출하였다. 수층에 디클로로메탄을 첨가하여 유기층을 추가 추출하였다. 유기층을 모아 감압 농축하고 디클로로메탄 10mL에 완전히 녹인 후 메틸 *t*-부틸에테르를 적가하여 결정화하였다. 실온에서 2시간 교반 후 결정을 여과하고 메틸 *t*-부틸에테르로 세척하였다. 결정을 실온에서 질소 건조하여 목적 화합물인 PEG-DEP(PEG-디에틸아세탈) 9.3 g (수율: 90.0 %)을 얻었다.

[130] (c) ALD-PEG-DEP의 제조

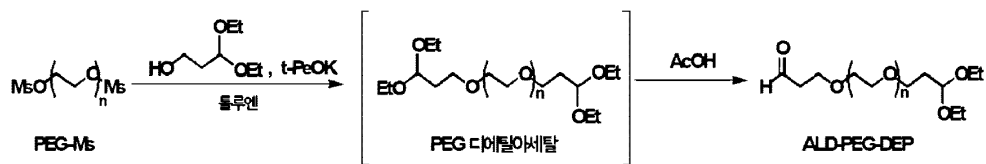
[131]



[132] 반응기에 0.1 N 아세트산 360 mL와 PEG-DEP 60 g을 투입하여 용해시킨 후 20°C에서 4시간 교반하였다. 이 용액에 5% 탄산수소나트륨 수용액과 증류수를 투입한 후 5분 동안 교반하였다. 반응액에 디클로로메탄과 헥산을 투입하여 10분 동안 교반한 후 수층을 분리하였다. 수층에 디클로로메탄과 헥산을 투입하여 10분 동안 교반한 후 유기층을 분리하였다. 유기층을 모아 황산마그네슘으로 건조하고 여과한 후 감압농축하였다. 농축액에 디클로로메탄을 가하여 용해한 후 메틸 *t*-부틸에테르를 적가하여 결정화하였다. 실온에서 30분 동안 교반한 후 결정을 여과하고 메틸 *t*-부틸에테르로 세척하였다. 결정을 실온에서 질소 건조하여 목적 화합물을 얻었다. 목적 화합물은 3.4 kDa 에틸렌글리콜 반복부의 양쪽 말단이 각각 프로필알데하이드기와 3-디에톡시프로필기로 개질된 폴리에틸렌글리콜 유도체인 3.4 kDa ALD-PEG-DEP로서 생성량은 16.0 g(수율: 26.7%)이었다. 겔 투과 크로마토그래피(GPC)로 측정한 수평균 분자량은 3111이었다.

[133] 시험예 2: ALD-PEG-DEP의 제조 2

[134]



[135] (a) PEG-MS의 제조

[136] 시험예 1의 PEG-Ms의 제조 방법과 동일한 방법으로 PEG-Ms을 제조하였다.

[137] (b) ALD-PEG-DEP의 제조

[138] 질소 대기 하에서 제 1 반응기에 3,3-디에톡시-1-프로판올 45 mL와 톨루엔 400 mL를 투입하였다. 칼륨 *t*-펜톡사이드(*t*-PeOK) 15.7 g을 투입하고 50°C로 승온하여 1시간 동안 교반하였다. 반응액을 실온으로 냉각하였다.

[139] 질소 대기 하에서 제 2 반응기에 전술한 바와 같이 제조한 PEG-*Ms* 100 g과 톨루엔 400 mL를 투입하였다. 여기에 활성화된 제 1 반응기의 용액을 1시간 동안 천천히 적가하였다. 실온에서 2.5시간 동안 교반하고 반응이 완결된 후 반응물에 증류수를 첨가하였다. 반응물을 5분 동안 교반한 후 수층을 분리하였다. 수층에 디클로로메탄, 톨루엔을 첨가하여 유기층을 추출하였다. 유기층에 증류수를 첨가하여 5분 동안 교반한 후 수층을 추가로 분리하였다.

[140] 분리된 수층에 아세트산 13 mL를 투입하여 상온에서 2.5시간 동안 교반하였다. 여기에 5% 탄산수소나트륨 수용액을 투입한 후 5분 동안 교반하였다. 제 3

반응기에 디클로로메탄과 헥산을 혼합한 후 앞의 반응액을 첨가하였다. 혼합액을 10분 교반한 후 수층을 분리하였다. 분리된 수층에 5% 탄산수소나트륨 수용액을 첨가하여 5분 동안 교반하였다. 제 3 반응기에 디클로로메탄과 헥산을 혼합한 후 앞의 반응액을 첨가하여 10분 교반 후 유기층을 분리하였다. 분리된 유기층에 증류수를 투입하여 교반한 후 유기층을 분리하였다. 유기층을 황산마그네슘으로 건조하고 여과한 후 감압농축하였다. 농축액을 디클로로메탄을 가하여 용해한 후 메틸 *t*-부틸에테르를 적가하여 결정화하였다. 실온에서 30분 동안 교반한 후 결정을 여과하고 메틸 *t*-부틸에테르로 세척하였다. 결정을 실온에서 질소 건조하여 목적 화합물인 3.4 kDa ALD-PEG-DEP 10.1 g(수율: 10.1%)을 얻었다. 겔 투과 크로마토그래피로 측정된 수평균 분자량은 3163이었다.

[141] 분석예: ALD-PEG-DEP와 ALD-PEG-ALD의 특성 비교

[142] 본 발명의 구현예에 의한 방법에 따라 제조한 폴리에틸렌글리콜 유도체인 ALD-PEG-DEP와 양 말단이 프로필알데하이드기로 개질된, 상용의 폴리에틸렌글리콜 유도체인 ALD-PEG-ALD(한국 한미정밀화학 사제, 에틸렌글리콜 반복부의 화학식량이 3.4 kDa)의 특성을 측정하여 비교하였다. 이를 위하여 MALDI-TOF 질량분석, 핵자기공명 분석(^1H NMR, ^{13}C NMR)과 푸리에 변환 적외선 분광법(FT-IR)을 수행하였다.

[143] 도 2a 및 도 2b는 각각 시험예 2에서 제조된 ALD-PEG-DEP 및 상용의 ALD-PEG-ALD의 MALDI-TOF 질량분석 그래프이다. 아래의 표 1은 얻은 시험예 2에서 제조된 ALD-PEG-DEP 및 상용의 ALD-PEG-ALD의 분자량을 비교한 표이다.

[144] [표1]

분자량	ALD-PEG-DEP	ALD-PEG-ALD
Mn	3538.8	3520.7
Mw	3551.8	3536.4
Mw/Mn	1.00	1.00

[145] 도 2a, 2b 및 표 1을 참조하면, 시험예 2의 ALD-PEG-DEP와 시판 중인 ALD-PEG-ALD 사이에 유의적인 분자량의 차이가 없음을 알 수 있다. 도 3a 및 도 3b는 각각 시험예 2의 ALD-PEG-DEP 및 상용의 ALD-PEG-ALD의 핵자기공명(^1H NMR) 스펙트럼의 그래프이다. 도 3a 및 도 3b의 ^1H -NMR 스펙트럼에서 디에톡시기와 부합하는 피크들(3중선인 4.6 ppm 부근의 (b)와 1.2 ppm 부근의 (i), 다중선인 1.8 ppm 부근의 (h)을 통해 시험예의 ALD-PEG-DEP이 아세탈 말단기를 갖는 것을 확인할 수 있다. 반면, 도 2b의 ^1H -NMR 스펙트럼에서는 디에톡시기와 부합하는 피크들이 나타나지 않는다.

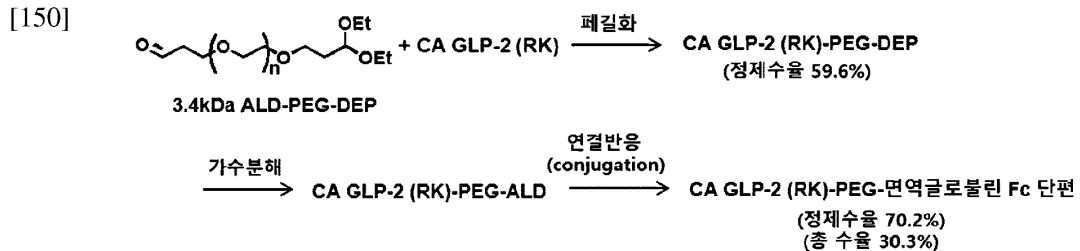
[146] 도 3c 및 도 3d는 각각 시험예 2의 ALD-PEG-DEP 및 상용의 ALD-PEG-ALD의

핵자기공명 (^{13}C NMR) 스펙트럼의 그래프이다. 도 3c의 ^{13}C -NMR 스펙트럼에서 δ 15 ppm (i), 62 ppm (f)에서 에틸기와 부합하는 피크와 δ 101 ppm (b)에서 2차 탄소의 피크가 관찰되었다. 도 3c의 그래프에서는 분자 구조상 비대칭인 구조를 갖는 ALD-PEG-DEP의 피크들이, 이와 대비해 도 3d의 그래프에서는 분자 구조상 대칭인 구조를 이루는 ALD-PEG-ALD의 피크들이 관찰되었다(ALD-PEG-DEP의 (e), (f) 피크 대 ALD-PEG-ALD (c) 피크, ALD-PEG-DEP의 (h), (i) 피크 대 ALD-PEG-ALD의 (d) 피크).

[147] 도 4a 및 도 4b는 각각 시험예 2의 ALD-PEG-DEP 및 상용의 ALD-PEG-ALD의 FT-IR 스펙트럼이다. 도 4a 및 도 4b의 FT-IR 스펙트럼이 유사한 피크 패턴을 갖는 것으로부터 시험예 2의 ALD-PEG-DEP와 상용의 ALD-PEG-ALD가 유사한 고분자 골격을 지니고 있음을 알 수 있다.

[148] ALD-PEG-DEP를 포함하는 이 폴리에틸렌글리콜 유도체 조성물의 순도를 파악하기 위하여 고성능 액체 크로마토그래피(HPLC)로 분석하였다. 컬럼으로는 옥틸실릴화 실리카겔로 충전한 컬럼(내경 4.6 mm × 길이 250 mm, 5.0 μ m)을 사용하였고 정제수 및 아세트나이트릴을 이동상으로 하여 역상 크로마토그래피법을 이용하여 분석하였다. 폴리에틸렌글리콜 유도체의 함량의 비율을 고성능 액체 크로마토그래피에서 측정된 해당 피크의 면적 비율로 계산하였다.

[149] 실시예 1: ALD-PEG-DEP 를 이용한 CA GLP-2(RK)-PEG-면역글로불린 Fc
결합체의 제조



[151] 생리 활성 폴리펩타이드로서 사람 글루카곤 유사 펩타이드-2(GLP-2)의 유도체인 서열번호 1의 폴리펩타이드 CA GLP-2(RK)를 사용하여 생리 활성 폴리펩타이드 결합체를 제조하였다.

[152] 서열번호 1의 폴리펩타이드 CA GLP-2(RK)의 아미노산 서열은 아래와 같다:

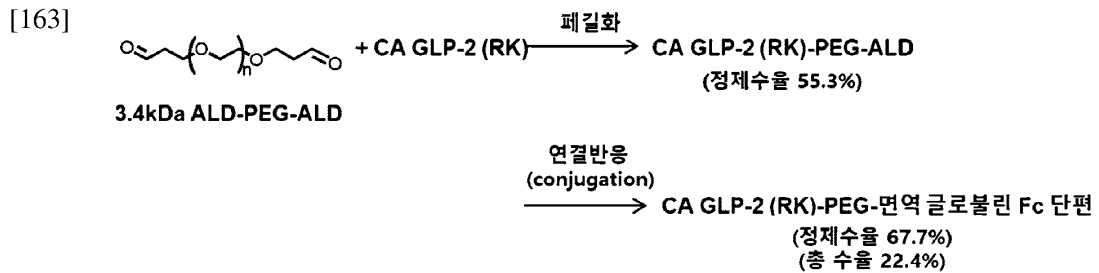
[153] (4-imidazoacetyl-Gly-Asp-Gly-Ser-Phe-Ser-Asp-Glu-Met-Asn-Thr-Ile-Leu-Asp-Asn
-Leu-Ala-Ala-Arg-Asp-Phe-Ile-Asn-Trp-Leu-Ile-Gln-Thr-Arg-Ile-Thr-Asp-Lys)

[154] (1) CA GLP-2(RK)-PEG-DEP 결합체의 제조

[155] 3.4 kDa ALD-PEG-DEP의 알데하이드 말단에 CA GLP-2(RK)의 34번 라이신 잔기를 연결시켜 CA GLP-2(RK)-PEG-DEP를 제조하였다. 이때 CA GLP-2(RK)와 ALD-PEG-ALD의 몰비를 1:8로 하고, CA GLP-2(RK) 펩타이드의 농도를 10 mg/mL로 하여 상온에서 약 25시간 반응시켰다. 이 때 반응액으로는 50 mM

트리에탄올아민(pH 8.0)에 환원제로서 100 mM 시안화수소화붕소나트륨(NaBH_3CN)을 포함하는 용액을 사용하였다. 반응 종결 후 반응 혼합물을 20 mM 비스트리스(Bis-Tris) 완충액(pH 6.2)과 NaCl 농도 구배를 이용한 음이온 교환 크로마토그래피를 이용하여 정제함으로써 CA GLP-2(RK)-PEG-DEP를 분리하였다. 정제 수율은 59.6%이었고, SE-HPLC와 RP-HPLC 분석 결과 순도는 각각 99%, 99%였다.

- [156] (2) CA GLP-2(RK)-PEG-ALD 결합체의 제조
- [157] 정제한 CA GLP-2(RK)-PEG-DEP의 디에톡시 작용기(DEP)를 가수분해하여 알테하이드기(ALD)로 변환하기 위하여 20 mM 시트르산나트륨(pH 2.0) 완충액을 이용하여 pH를 낮춘 후, 다음 공정을 위해 20 mM 비스트리스(pH 6.5) 완충액을 이용하여 완충액을 교환하여 CA GLP-2(RK)-PEG-ALD를 얻었다.
- [158] (3) CA GLP-2(RK)-PEG-면역글로불린 Fc 결합체의 제조
- [159] 다음으로 이와 같이 하여 얻은 CA GLP-2(RK)-PEG-ALD와 면역글로불린 Fc 절편(서열번호 2)의 물 비를 1:2로 하고, 전체 단백질(CA GLP-2(RK) 및 면역글로불린 Fc 절편)의 농도를 30 mg/mL로 하여 실온에서 14~16 시간 연결 반응(conjugation)을 진행하였다. 이때 반응액에 20 mM 비스트리스(pH 6.2) 및 에탄올, 환원제로서 30 mM NaBH_3CN 을 첨가하였다. 반응이 종결된 후 이 반응 혼합물로부터 소수성 상호작용 크로마토그래피(HIC)와 음이온 교환 크로마토그래피를 이용하여 CA GLP-2(RK)-PEG-면역글로불린 Fc를 정제하였다. 정제 수율은 70.2%이었고, SE-HPLC와 RP-HPLC 분석 결과 순도는 각각 98.1%, 97%였다.
- [160] 서열번호 2의 면역글로불린 Fc의 아미노산 서열은 아래와 같다:
- [161] (Pro-Ser-Cys-Pro-Ala-Pro-Glu-Phe-Leu-Gly-Gly-Pro-Ser-Val-Phe-Leu-Phe-Pro-Pro-Lys-Pro-Lys-Asp-Thr-Leu-Met-Ile-Ser-Arg-Thr-Pro-Glu-Val-Thr-Cys-Val-Val-Val-Asp-Val-Ser-Gln-Glu-Asp-Pro-Glu-Val-Gln-Phe-Asn-Trp-Tyr-Val-Asp-Gly-Val-Glu-Val-His-Asn-Ala-Lys-Thr-Lys-Pro-Arg-Glu-Glu-Gln-Phe-Asn-Ser-Thr-Tyr-Arg-Val-Val-Ser-Val-Leu-Thr-Val-Leu-His-Gln-Asp-Trp-Leu-Asn-Gly-Lys-Glu-Tyr-Lys-Cys-Lys-Val-Ser-Asn-Lys-Gly-Leu-Pro-Ser-Ser-Ile-Glu-Lys-Thr-Ile-Ser-Lys-Ala-Lys-Gly-Gln-Pro-Arg-Glu-Pro-Gln-Val-Tyr-Thr-Leu-Pro-Pro-Ser-Gln-Glu-Glu-Met-Thr-Lys-Asn-Gln-Val-Ser-Leu-Thr-Cys-Leu-Val-Lys-Gly-Phe-Tyr-Pro-Ser-Asp-Ile-Ala-Val-Glu-Trp-Glu-Ser-Asn-Gly-Gln-Pro-Glu-Asn-Asn-Tyr-Lys-Thr-Thr-Pro-Pro-Val-Leu-Asp-Ser-Asp-Gly-Ser-Phe-Phe-Leu-Tyr-Ser-Arg-Leu-Thr-Val-Asp-Lys-Ser-Arg-Trp-Gln-Glu-Gly-Asn-Val-Phe-Ser-Cys-Ser-Val-Met-His-Glu-Ala-Leu-His-Asn-His-Tyr-Thr-Gln-Lys-Ser-Leu-Ser-Leu-Ser-Leu-Gly-Lys)
- [162] 비교예 1: ALD-PEG-ALD를 이용한 CA GLP-2(RK)-PEG-면역글로불린 Fc 결합체의 제조



[164] (1) CA GLP-2(RK)-PEG-ALD 결합체의 제조

[165] 3.4 kDa ALD-PEG-ALD(한국 한미정밀화학, 제품명 PGA)를 CA GLP-2(RK)의 34번 라이신 잔기에 폐길화시키기 위하여 CA GLP-2(RK)와 3.4 kDa ALD-PEG-ALD의 물비를 1:8로 하고, CA GLP-2(RK)의 농도를 12 mg/mL로 하여 상온에서 약 2~4시간 반응시켰다. 이때 반응액으로 50 mM 트리에탄올아민(pH 8.0)과 이소프로판올에 환원제로서 200 mM 2-피콜린 보레인 복합체를 첨가하였다. 반응 종결 후 반응액을 20 mM 비스트리스(pH 6.2) 완충액과 염화나트륨 농도 구배를 이용한 음이온 교환 컬럼에 적용하여 CA GLP-2(RK)-PEG-ALD를 정제하였다. 정제 수율은 55.3%였고, SE-HPLC와 RP-HPLC 분석 결과 순도는 각각 90%, 87%이었다(표 1).

[166] (2) CA GLP-2(RK)-PEG-면역글로불린 Fc 결합체의 제조

[167] 다음으로, CA GLP-2(RK)-PEG-ALD와 면역글로불린 Fc 절편(서열번호 2)의 몰비를 1:2로 하고, 면역글로불린 Fc 절편 농도를 30 mg/mL로 하여 실온에서 14~16시간 반응시켰다. 이때 반응액으로 20 mM 비스트리스(pH 6.2)와 이소프로판올에 환원제로서 20 mM 2-피콜린 보레인 복합체를 포함하는 용액을 사용하였다. 반응 종결 후 이 반응 혼합물로부터 소수성 상호작용 크로마토그래피(HIC)와 음이온 교환 크로마토그래피를 이용하여 CA GLP-2(RK)-PEG-면역글로불린 Fc를 정제하였다. 정제 수율은 67.7%이었고, SE-HPLC와 RP-HPLC 분석 결과 순도는 각각 98.6%과 96.1%이었다.

[168] 분석예: 폴리에틸렌글리콜 유도체의 알데하이드기 활성 유지

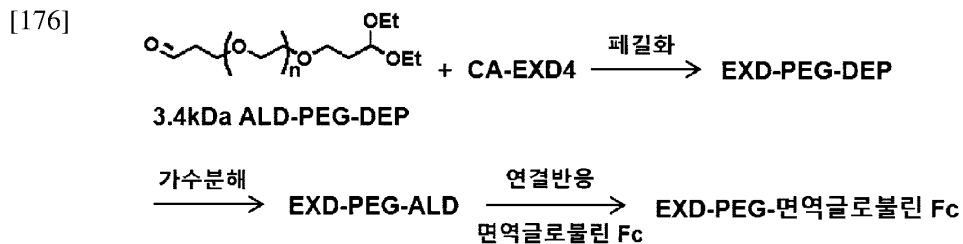
[169] 생리활성 폴리펩타이드 결합체 제조 방법에서 Fc 절편과의 연결 반응 단계 직전까지 알데하이드기가 잔류하는 정도(활성도)에 대하여 본 발명의 폴리에틸렌글리콜 유도체를 이용한 실시예와 종래 기술의 양 말단 알데하이드기 PEG 유도체를 이용한 비교예를 비교하였다.

[170] 실시예 1의 결합체 제조 공정에서 사용한 생리활성 폴리펩타이드인 GLP-2 유도체에 대하여 실시예 1에 기재한 폐길화, 크로마토그래피 정제와 가수분해 단계까지 수행하여 연결체 가수분해물을 얻었다. 같은 생리활성 폴리펩타이드에 대하여 비교예 1에 기재한 폐길화와 크로마토그래피 정제까지 수행하여 대응하는 연결체를 얻었다.

[171] 이어서 상기 연결체 가수분해물 및 연결체를 시약과 반응시켜 유도체를 형성하고, 유도체 생성 정도를 자외선·가시광선 분광광도법으로 정량함으로써

알데하이드기의 활성도를 측정하였고, 이를 도 5에 나타내었다.

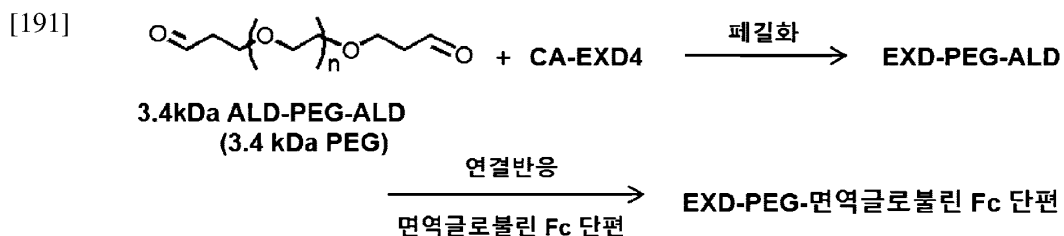
- [172] 도 5를 참조하면, 본 발명에 따른 ALD-PEG-DEP를 이용하여 얻은 연결체 가수분해물의 알데하이드기 활성도는 87.2%로서 종래의 ALD-PEG-ALD를 이용하여 얻은 연결체의 알데하이드기 활성도 69.8%에 비해 상당히 높은 비율로 알데하이드기가 유지되고 있는 것을 확인하였다.
- [173] 이와 같이 본 발명의 실시예에 따른 폴리에틸렌글리콜 유도체 화합물을 이용한 생리활성 폴리펩타이드 결합체의 제조 방법에서 알데하이드 말단의 활성을 더 높게 유지할 수 있다. 나아가 이후 공정에서 종래 기술의 제법과 동일한 정제 공정을 사용하더라도 본 발명의 제조 방법의 연결(conjugation) 반응 단계의 제조 수율이 종래 기술보다 향상되었다. 본 발명의 실시예의 경우 연결 반응 제조 수율은 50.8%로서 종래의 ALD-PEG-ALD 사용시의 40.5% 보다 25% 이상 증가되었다.
- [174] CA GLP-2(RK)-PEG-면역글로불린 Fc 결합체 제조에서 본 발명의 실시예 1에서의 전체적 수율은 30.3%로서 종래 기술의 비교예 1의 22.4%에 비하여 약 35% 향상된 결과를 나타내었다.
- [175] 실시예 2: ALD-PEG-DEP 를 이용한 CA EXD4(Lys27)-PEG-면역글로불린 Fc 결합체의 제조



- [177] (1) CA EXD4-PEG-DEP 결합체의 제조
- [178] 생리 활성 폴리펩타이드로서 엑센딘-4의 유도체인 이미다조아세틸-엑센딘-4(imidazoacetyl-Exendin-4, 한미 정밀화학, 한국)(이하, CA EXD4로 표시함. 서열번호 3)를 사용하여 생리 활성 폴리펩타이드 결합체를 제조하였다.
- [179] 서열번호 3의 CA EXD4의 아미노산 서열은 다음과 같다:
- [180] (4-imidazoacetyl-Gly -Glu -Gly -Thr -Phe -Thr -Ser -Asp -Leu -Ser -Lys -Gln -Met -Glu -Glu -Glu -Ala -Val -Arg -Leu -Phe -Ile -Glu -Trp -Leu -Lys -Asn -Gly -Gly -Pro -Ser -Ser -Gly -Ala -Pro -Pro -Pro -Ser -NH₂)
- [181] 시험예 1에서 제조한 3.4 kDa ALD-PEG-DEP를 CA EXD4의 라이신27(Lys27) 위치에 페길화시키기 위하여, CA EXD4 : ALD-PEG-DEP의 몰 비를 1:3으로 하고, CA EXD4의 농도를 12 g/L로 하여 8±2°C에서 약 16시간 동안 반응시켰다. 구체적으로 반응은 0.1 M 비스-트리스(pH 7.9), 45% (v/v) 이소프로판올 하에서 이루어졌으며, 환원제로서 SCB(NaCNBH₃, sodium cyanoborohydride)를 50 mM이

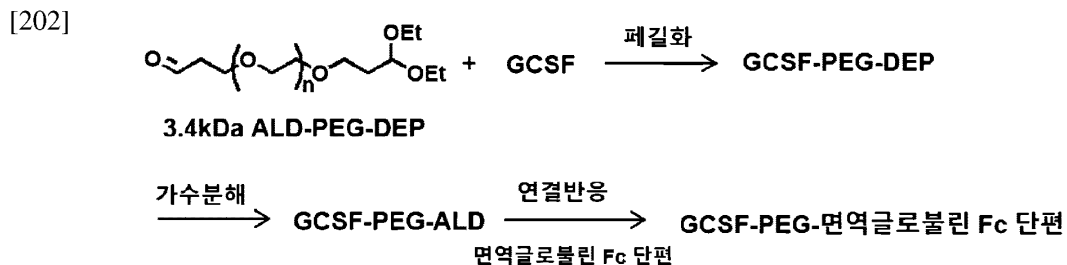
되도록 첨가하여 반응시켰다.

- [182] 반응 종결 후 시트르산나트륨과 에탄올이 포함된 완충 용액과 KCl 선형 농도 구배를 적용하여 SOURCE 15S 컬럼(Cytiva)을 사용하여 반응액으로부터 CA EXD4(Lys27)-PEG-DEP 결합체를 분리, 정제하였다.
- [183] 투입된 CA EXD4 대비 CA EXD4(Lys27)-PEG-DEP의 수율은 50% 정도로 확인되었다.
- [184] (2) CA EXD4-PEG-ALD 결합체의 제조
- [185] CA EXD4(Lys27)-PEG-DEP 결합체의 디에톡시프로필(DEP) 작용기를 프로필알데하이드기(ALD)로 가수분해시키기 위하여 산성 용액으로 완충액 교환을 하였다. 구체적으로 CA EXD4(Lys27)-PEG-DEP를 물로 희석한 후, 분리막 한외/투석여과(UF/DF) 방법을 통하여 25 mM 염산으로 완충액 교환 및 농축하여 최종 회수 농도가 약 0.8 g/L 이상이 되도록 CA EXD4(Lys27)-PEG-ALD 결합체를 분리하였다. 말단 작용기의 변환 정도를 RP-HPLC 분석법을 이용하여 분석한 결과, 디에톡시프로필기가 프로필알데하이드기로 95% 이상 변환된 것을 확인하였다.
- [186] (3) CA EXD4(Lys27)-PEG-면역글로불린 Fc 결합체의 제조
- [187] CA EXD4(Lys27)-PEG-면역글로불린 Fc 결합체를 제조하기 위해, (2)에서 얻은 CA EXD4(Lys27)-PEG-ALD 결합체와 면역글로불린 Fc(서열번호 2)를 연결시켰다. 이때 CA EXD4(Lys27)-PEG-ALD 결합체와 면역글로불린 Fc의 물비가 1:2가 되도록 하고 전체 단백질(CA EXD4 및 면역글로불린 Fc)의 농도를 10 g/L로 하여 실온에서 2시간 반응시켰다. 이 때 반응 용액으로는 비스-트리스와 환원제인 SCB를 포함한 용액을 사용하였다.
- [188] 반응이 종결된 후 이 반응 혼합물로부터 소수성 상호작용 크로마토그래피와 음이온 교환 크로마토그래피를 이용하여 CA EXD4(Lys27)-PEG-면역글로불린 Fc 결합체를 수득하였다.
- [189] 투입된 CA EXD4 생리활성 폴리펩타이드 대비 CA EXD4(Lys27)-PEG-면역글로불린 Fc 결합체의 수율은 50% 내지 60% 정도로 확인되었다.
- [190] 비교예 2: ALD-PEG-ALD 를 이용한 CA EXD4(Lys27)-PEG-면역글로불린 Fc 결합체의 제조



- [192] (1) CA EXD4-PEG-ALD 결합체의 제조

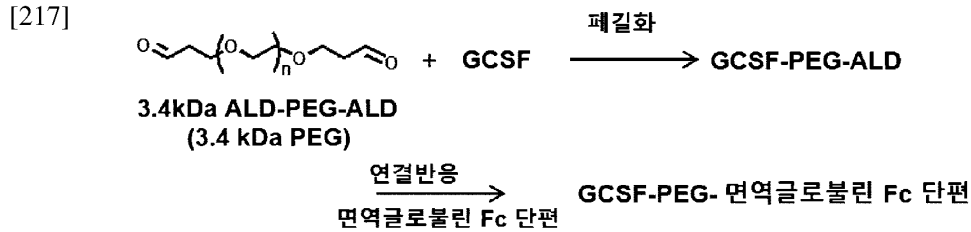
- [193] 3.4 kDa ALD-PEG-ALD(한국 한미정밀화학)를 엑센딘-4의 유도체인 CA EXD4의 Lys27 위치에 폐길화시키기 위하여 CA EXD4:PEG의 몰비를 1: 5로 하고, CA EXD4의 농도를 18 g/L로 하여 $8\pm 2^{\circ}\text{C}$ 에서 약 4시간 동안 반응시켰다. 이때 반응은 0.1 M HEPES 완충 용액(pH 7.5), 45% 이소프로판올에서 이루어졌으며, 환원제로서 SCB(NaCNBH_3 , sodium cyanoborohydride)를 50 mM이 되도록 첨가하여 반응시켰다.
- [194] 반응이 종결된 후 시트르산나트륨, 에탄올이 포함된 완충액과 KCl 선형 농도 구배를 적용하여 SOURCE 15S 컬럼(Cytiva)을 사용하여 반응액으로부터 CA EXD4(Lys27)-PEG-ALD 결합체를 분리, 정제하였다.
- [195] 이 후, CA EXD4(Lys27)-PEG-ALD 결합체의 정제액을 물로 희석한 후, 분리막 한외/투석여과(UF/DF)방법을 통하여 10 mM 인산칼륨 용액으로 완충액 교환 및 농축하여 최종 회수 농도가 약 0.6 g/L 이상이 되도록 하였다.
- [196] 투입된 CA EXD4 생리활성 폴리펩타이드 대비 CA EXD4(Lys27)-PEG-ALD 결합체의 수율은 35% 내지 43%로 확인되었다.
- [197] (2) CA EXD4(Lys27)-PEG-면역글로불린 Fc 결합체의 제조
- [198] CA EXD4(Lys27)-PEG-면역글로불린 Fc 결합체를 제조하기 위해, (1)에서 얻은 CA EXD4(Lys27)-PEG-ALD 결합체와 면역글로불린 Fc(서열번호 2)를 연결시켰다. 이 때 CA EXD4(Lys27)-PEG-ALD 결합체와 면역글로불린 Fc의 몰비가 1:2가 되도록 하고 전체 단백질(CA EXD4 및 면역글로불린 Fc)의 농도를 10 g/L로 하여 실온에서 16시간 동안 반응시켰다. 이때 반응액으로는 HEPES와 에탄올 환원제로서 SCB를 포함한 용액을 사용하였다.
- [199] 반응이 종결된 후 이 반응 혼합물로부터 소수성 상호작용 크로마토그래피와 음이온 교환 크로마토그래피를 이용하여 CA EXD4(Lys27)-PEG-면역글로불린 Fc 결합체를 수득하였다. 투입 생리활성 폴리펩타이드 대비 수율은 35% 내지 40%로 확인되었다.
- [200] CA-EXD4-PEG-면역글로불린 Fc 제조의 전체적 수율을 비교하였을 때 실시예 2의 수율은 비교예 2의 수율보다 향상된 결과를 나타내었다.
- [201] 실시예 3: ALD-PEG-DEP 를 이용한 GCSF 유도체-PEG-면역글로불린 Fc 결합체의 제조



- [203] (1) GCSF-PEG-DEP의 제조
- [204] 생리활성 폴리펩타이드로서 사람 과립구 콜로니 성장 인자(granulocyte colony

stimulating factor, GCSF)의 유도체(서열번호 4)를 이용하여 생리 활성 폴리펩타이드 결합체를 제조하였다.

- [205] 서열번호 4의 GCSF 유도체의 아미노산 서열은 다음과 같다:
- [206] (TPLGPASSLP QSFLKLSLEQ VRKIQGDGAA LQEKLCATYK LCHPEELVLL GHSLGIPWAP LSSCSSQALQ LAGCLSQLHS GLFLYQGLLQ ALEGISPELG PTLDTLQLDV ADFATTIWQQ MEELGMAPAL QPTQGAMPAF ASAFQRRAGG VLVASHLQSF LEVSYRVLRH LAQP)
- [207] 시험예 1에서 제조한 3.4 kDa ALD-PEG-DEP를 상기 GCSF 유도체의 N-말단의 트레오닌 위치에 폐길화시키기 위하여, GCSF 유도체: ALD-PEG-DEP의 물비를 1:4로 하고, GCSF 유도체의 농도를 8 g/L로 하여 6±4°C에서 8 시간 동안 반응시켰다. 구체적으로 반응은 0.1 M 인산칼륨(pH 6.0) 하에서 이루어졌으며, 환원제로서 SCB를 50 mM이 되도록 첨가하여 반응시켰다.
- [208] 결합 반응 이후 GCSF 유도체-PEG-DEP를 SP-HP 컬럼(Cytiva, 양이온 교환 크로마토그래피)을 이용하여 정제하였다. 이때, 아세트산나트륨 완충액을 사용하였으며, 염화나트륨 농도 구배를 이용하여 정제하였다.
- [209] 투입된 GCSF 유도체 대비 GCSF-PEG-DEP의 수율은 61.2%로 확인되었다.
- [210] (2) DEP 작용기의 가수 분해
- [211] GCSF 유도체-PEG-DEP의 디에톡시프로필(DEP) 작용기를 프로필 알데하이드기(ALD)로 가수분해시키기 위하여 산성 용액으로 완충액 교환을 하였다. 구체적으로 정제된 GCSF-PEG-DEP를 분리막 한외/투석여과(UF/DF) 방법을 통하여 완충액의 pH를 2.0으로 낮춘 후 상온에서 16시간 보관하였다.
- [212] (3) GCSF 유도체-PEG-면역글로불린 Fc 결합체의 제조
- [213] GCSF-PEG-면역글로불린 Fc 결합체를 제조하기 위해, (2)에서 얻은 GCSF 유도체-PEG-ALD와 면역글로불린 Fc(서열번호 2)를 연결시켰다. 이때 GCSF 유도체-PEG-ALD 연결체와 면역글로불린 Fc의 물비가 1:4가 되도록 하고, 전체 단백질(GCSF 및 면역글로불린 Fc)의 농도를 50 g/L로 하여 6±4°C에서 16시간 반응시켰다. 구체적으로 반응은 0.1 M 인산칼륨(pH 6.0) 하에서 이루어졌으며, 환원제로서 SCB를 20 mM이 되도록 첨가하여 반응시켰다.
- [214] 반응이 종결된 후 이 반응 혼합물로부터 소수성 상호작용 크로마토그래피와 음이온 교환 크로마토그래피를 이용하여 GCSF 유도체-PEG-면역글로불린 Fc 결합체를 수득하였다.
- [215] 투입된 GCSF 유도체-PEG-DEP 대비 GCSF 유도체-PEG-면역글로불린 Fc 결합체의 수율은 50.2%로 확인되었다.
- [216] 비교예 3: ALD-PEG-ALD를 이용한 GCSF 유도체-PEG-면역글로불린 Fc 결합체의 제조



[218] (1) GCSF-PEG-ALD의 제조

[219] 3.4 kDa ALD-PEG-ALD(NOF)를 GCSF 유도체(서열 번호 4)의 N-말단 트레오닌 위치에 폐길화시키기 위하여, GCSF 유도체 : ALD-PEG-ALD의 물비를 1:10로 하고, GCSF 유도체의 농도를 5 g/L로 하여 6±4°C에서 1.5 시간 동안 반응시켰다. 구체적으로 반응은 0.1 M 인산칼륨(pH 6.0) 하에서 이루어졌으며, 환원제로서 SCB를 20 mM이 되도록 첨가하여 반응시켰다.

[220] 결합 반응 이후 GCSF 유도체-PEG-ALD 연결체를 SP-HP 컬럼(Cytiva, 양이온 교환 크로마토그래피)을 이용하여 정제하였다. 이때, 아세트산나트륨 완충액을 사용하였으며, 염화나트륨 농도 구배를 이용하여 정제하였다.

[221] 투입 GCSF 유도체 대비 GCSF 유도체-PEG-ALD 연결체의 수율은 56.5%로 확인되었다.

[222] (2) GCSF 유도체-PEG-면역글로불린 Fc 결합체의 제조

[223] GCSF 유도체-PEG-면역글로불린 Fc 결합체를 제조하기 위하여 GCSF 유도체-PEG-ALD와 면역글로불린 Fc(서열번호 2)를 연결시켰다. 이때 GCSF-PEG-ALD 연결체와 면역글로불린 Fc의 물 비가 1:4가 되도록 하고 전체 단백질(GCSF 유도체 및 면역글로불린 Fc)의 농도를 50 g/L로 하여 6±4°C에서 16시간 반응시켰다. 구체적으로 반응은 0.1 M 인산칼륨(pH 6.0) 하에서 이루어졌으며, 환원제로서 SCB를 20 mM이 되도록 첨가하여 반응시켰다.

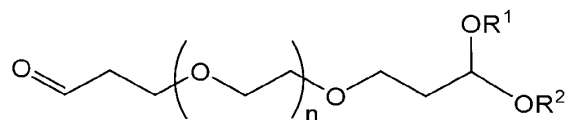
[224] 반응이 종결된 후 이 반응 혼합물로부터 소수성 상호작용 크로마토그래피와 음이온 교환 크로마토그래피를 이용하여 GCSF 유도체-PEG-면역글로불린 Fc 결합체를 수득하였다.

[225] 투입된 GCSF 유도체 대비 GCSF 유도체-PEG-DEP 결합체의 수율은 39.9%로 확인되었다.

[226] GCSF 유도체-PEG-면역글로불린 Fc 결합체 제조의 전체적 수율을 비교하였을 때, 본 발명 제법에 따른 실시예 3은 종래 기술의 비교예 3보다 1.36배 향상된 결과를 나타내었다.

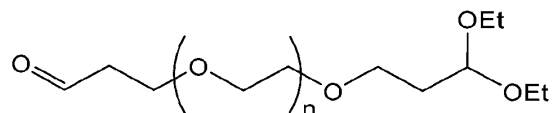
청구범위

- [청구항 1] 하기 화학식 1의 폴리에틸렌글리콜 유도체 화합물:
<화학식 1>

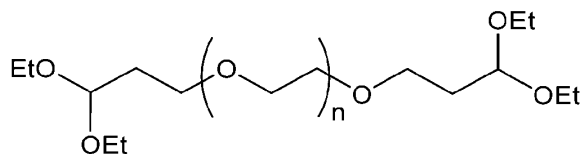


상기 화학식 1에서 n은 30 내지 115의 자연수이고,
R¹과 R²는 서로 같거나 다른 C₁~C₅알킬이다.

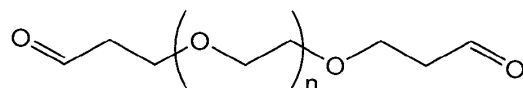
- [청구항 2] 제 1항에 있어서,
상기 C₁~C₅ 알킬은 메틸, 에틸, 프로필 또는 부틸인 폴리에틸렌글리콜 유도체 화합물.
- [청구항 3] 제 1항에 있어서,
상기 R¹ 및 R²는 에틸인 폴리에틸렌글리콜 유도체 화합물.
- [청구항 4] 제 1항 내지 제 3항 중 어느 한 항에 있어서,
n은 50 내지 100의 자연수인 화합물.
- [청구항 5] 제 4항에 있어서,
n은 67 내지 83의 자연수인 화합물.
- [청구항 6] 폴리에틸렌글리콜 유도체 조성물로서,
하기 화학식 1A로 표시되는 폴리에틸렌글리콜 유도체;
하기 화학식 2로 표시되는 폴리에틸렌글리콜 유도체; 및
하기 화학식 3으로 표시되는 폴리에틸렌글리콜 유도체; 를 포함하고,
<화학식 1A>



<화학식 2>



<화학식 3>



상기 조성물 중,
수평균 분자량 2950 내지 3650의 범위 내에 있는 상기 화학식 1A로
표시되는 폴리에틸렌글리콜 유도체의 함량비가 고성능 액체

크로마토그래피(HPLC) 기준으로 적어도 70 면적%로 나타나고,
 수평균 분자량 범위 2950 내지 3650의 범위 내에 있는 상기 화학식 2로
 표시되는 폴리에틸렌글리콜 유도체의 함량비가 고성능 액체
 크로마토그래피(HPLC) 기준으로 15 면적% 이하로 나타나고,
 수평균 분자량 범위 2950 내지 3650의 범위 내에 상기 화학식 3으로
 표시되는 폴리에틸렌글리콜 유도체의 함량비가 고성능 액체
 크로마토그래피(HPLC) 기준으로 10 면적% 이하로 나타나는
 폴리에틸렌글리콜 유도체 조성물.

[청구항 7]

제 6항에 있어서,
 상기 폴리에틸렌글리콜 유도체의 수평균 분자량은 겔 투과
 크로마토그래피로 측정하였을 때 2950 ~ 3650의 범위에 있는 조성물.

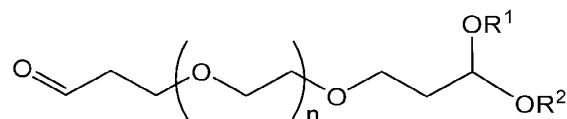
[청구항 8]

제 7항에 있어서,
 상기 폴리에틸렌글리콜 유도체의 수평균 분자량은 겔 투과
 크로마토그래피로 측정하였을 때 3000 ~ 3200의 범위에 있는 조성물.

[청구항 9]

(a) 하기 화학식 1의 폴리에틸렌글리콜 유도체를 생리활성
 폴리펩타이드와 반응시켜 하기 화학식 1의 폴리에틸렌글리콜 유도체의
 알데하이드 탄소에 상기 생리활성 폴리펩타이드가 공유결합으로 연결된
 연결체를 생성하는 폐길화(pegylation) 단계;
 (b) 상기 연결체를 산성의 수성 조건으로 처리하여 연결체 가수분해물을
 생성하는 가수분해 단계; 및
 (c) 상기 연결체 가수분해물을 면역글로불린 Fc 절편 또는 그 유도체에
 반응시켜 결합체를 생성하는 연결(conjugation) 단계;를 포함하며,
 상기 결합체는 상기 연결체 가수분해물 내의 하기 화학식 1의
 폴리에틸렌글리콜 유도체의 아세탈 탄소로부터 유래한 탄소 원자에 Fc
 절편 또는 그 유도체가 공유결합으로 연결되어 있는 구조인 생리활성
 폴리펩타이드 결합체의 제조 방법:

<화학식 1>



상기 화학식 1에서 n은 50 내지 100의 자연수고,
 R¹과 R²는 서로 같거나 다른 C₁~C₅알킬이다.

[청구항 10]

제 9항에 있어서,
 상기 생리활성 폴리펩타이드는 호르몬, 사이토카인, 효소, 항체, 성장
 인자, 전사조절인자, 혈액 응고인자, 백신, 구조 단백질, 리간드 단백질
 또는 수용체로 이루어지는 군에서 선택되는 생리활성 폴리펩타이드
 결합체의 제조 방법.

- [청구항 11] 제 9항에 있어서,
(a) 단계의 반응은 환원적 아민화이고,
상기 연결체는 상기 생리활성 폴리펩타이드의 N-말단 질소 또는 라이신의 ϵ -아미노기 질소 원자가 상기 화학식 1의 화합물의 알데하이드 탄소 원자에 공유결합으로 연결된 물질인 생리활성 폴리펩타이드 결합체의 제조 방법.
- [청구항 12] 제 11항에 있어서,
(a) 단계의 폐길화 반응은 pH 3.0 ~ 9.0의 범위에서 이루어지는 결합체의 제조 방법.
- [청구항 13] 제 11항에 있어서,
(b) 단계의 가수분해는 pH 1.0 ~ 5.0의 범위에서 이루어지는 결합체의 제조 방법.
- [청구항 14] 제 9항에 있어서,
(c) 단계의 연결 반응은 환원적 아민화인 결합체의 제조 방법.
- [청구항 15] 제 14항에 있어서,
상기 환원적 아민화는 pH 5.0 ~ 8.5의 범위에서 이루어지는 결합체의 제조 방법.
- [청구항 16] 제 9항에 있어서,
상기 Fc 절편 또는 유도체의 서열은 N-말단이 프롤린인 결합체의 제조 방법.
- [청구항 17] 제 16항에 있어서,
상기 결합체는 상기 아세탈 탄소로부터 유래한 탄소 원자에 Fc 절편 또는 유도체의 N-말단 프롤린의 질소 원자가 공유결합으로 연결되어 있는 결합체의 제조 방법.
- [청구항 18] 제 17항에 있어서,
상기 Fc 절편 또는 유도체는 서열번호 2인 결합체의 제조 방법.
- [청구항 19] 제 9항에 있어서,
 R^1 과 R^2 는 에틸인 화합물.
- [청구항 20] 제 9항에 있어서,
 n 은 67 내지 83의 자연수인 화합물.