명세서

발명의 명칭: 생리활성 폴리펩타이드 결합체의 고수율 생산을 위한 개선된 제조 방법

기술분야

[1] 본 발명은 생리활성 폴리펩타이드, 비펩타이드성 중합체 링커 및 면역글로불린 불변영역이 공유결합에 의해 연결된 결합체를 제조하는 방법에 관한 것이다. 보다 구체적으로 본 발명은 생리활성 폴리펩타이드 결합체 제조시 커플링 반응에 염을 사용함으로써 낮은 제조수율의 문제점을 개선하여 효율적으로 생리활성 폴리펩타이드 결합체를 제조할 수 있는 방법에 관한 것이다.

[2]

배경기술

[3] 일반적으로, 생리활성 폴리펩타이드는 안정성이 낮아 쉽게 변성되고 혈액 내 단백질 가수분해효소에 의해 분해되어 신장이나 간을 통해 쉽게 제거되기 때문에, 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, 생리활성 폴리펩타이드의 혈중 농도를 유지하기 위해 자주 주사를 놓는 것은 환자에게 엄청난 고통을 야기하게 되며 높은 치료비용의 원인이 된다. 이러한 문제점을 해결하기 위해, 단백질 약물의 혈중 안정성을 증가시키고 혈중 약물 농도를 오랫동안 높게 지속시켜 약효를 극대화하려는 노력이 계속되어 왔다. 이러한 단백질 약물의 지속형 제제는 단백질 약물의 안정성을 높이는 동시에 약물 자체의 역가가 충분히 높게 유지되어야 하고 환자에게 면역반응을 유발하지 않아야 한다.

[4] 단백질을 안정화시키고 단백질 가수분해효소와의 접촉 및 신장 소실을 억제하기 위한 방법으로, 종래에는 폴리에틸렌글리콜(polyethylene glycol: 이하 "PEG"라 약칭함)과 같이 용해도가 높은 고분자를 단백질 약물 표면에 화학적으로 부가시키는 방법이 사용되어 왔다. PEG는 목적단백질의 특정 부위 또는 다양한 부위에 비특이적으로 결합하여 용해도를 높임으로써 단백질을 안정화시키고, 단백질의 가수분해를 방지하는데 효과가 있으며 특별한 부작용도 일으키지 않는 것으로 알려져있다(Sada et al., J. Fermentation Bioengineering 71: 137-139, 1991).

[5] 그러나 PEG를 이용하는 방법은 PEG 분자량을 증가시켜 펩타이드 약물의 생체 내 지속시간을 연장할 수 있는 반면, 분자량이 증가할수록 펩타이드 약물의 역가가 현저히 낮아지고, 또한 펩타이드와의 반응성이 낮아져 수율이 감소하는 문제가 있다.

[6] 또한, 면역글로불린 단편과 생리활성 폴리펩타이드의 융합단백질을 제조하는

방법은 낮은 페길화(pegylation) 수율 문제와 비특이성을 극복할 수 있는 반면에, 혈중반감기 증가효과가 예상보다 획기적이지 못하고 경우에 따라서는 역가가 낮은 문제점을 지니고 있다. 혈중반감기 증가효과를 극대화하기 위하여 다양한 종류의 펩타이드 링커가 사용되기도 하지만 면역 반응을 유발할 수 있는 가능성이 있다. 또한 BNP와 같이 디설파이드 결합(disulfide bond)을 가지고 있는 펩타이드를 이용할 경우 미스폴딩(misfolding)의 확률이 높아 적용이 어렵다는 문제점, 및 천연에 존재하지 않는 아미노산 잔기가 있는 경우 유전자 재조합의 형태로 생산이 불가능하다는 문제점이 있다.

[7] 인슐린은 사람의 췌장의 베타세포에서 분비되는 펩타이드로서 체내의 혈당을 조절하는데 매우 중요한 역할을 담당하는 물질이다. 이러한 인슐린이 제대로 분비되지 않거나 분비된 인슐린이 체내에서 제대로 작용하지 못하는 경우 체내의 혈당이 조절되지 못하고 상승하며 이러한 상태를 당뇨병이라고 한다. 앞에서 언급한 경우를 제2형 당뇨병이라고 하며, 췌장에서 인슐린을 분비하지 못하여 혈당이 상승하는 경우를 제1형 당뇨병이라고 한다. 제2형 당뇨병의 경우 화학물질을 주성분으로 하는 경구용 혈당 강하제를 이용하여 치료를 하며 일부 환자에는 인슐린을 사용하여 치료하기도 한다. 반면, 제1형 당뇨병의 경우에는 인슐린의 투여가 필수적으로 요구된다.

[8] 현재 많이 사용되고 있는 인슐린 치료법은 식사 전, 후에 주사를 통하여 인슐린을 투여하는 방법이다. 하지만, 이러한 인슐린 치료법은 하루에 3번씩 지속적으로 투여되어야하기 때문에 환자들에게 많은 고통과 불편을 야기한다. 이러한 문제점을 극복하기 위하여 다양한 시도가 있어왔으며, 그 중 하나로서, 펩타이드의 약물의 생체막 투과도를 증가시켜 구강 또는 비강을 통한 흡입으로 펩타이드의 약물을 체내로 전달하는 시도가 있었다. 그러나 이러한 방법은 주사제에 비해 펩타이드의 체내 전달 효율이 현저히 낮으며 따라서 펩타이드 약물의 체내 활성을 요구되는 조건으로 유지하는데 아직까지는 어려움이 많다.

[9] 또한, 과량의 약물을 피하에 투여한 후 흡수가 지연되도록 하는 방법이 있었으며 이를 통하여 하루에 한 번 투여로 지속적인 혈중농도를 유지하는 방법이 있었다. 그 중 일부는 의약품(예, Lantus, Sanofi-aventis)으로 허가를 받아 현재 환자에게 투여되고 있다. 또한, 인슐린에 지방산을 수식하여 인슐린 중합체의 결합을 강하게 하며 투여부위 및 혈중의 알부민과 결합하여 지속시간을 늘리는 연구가 진행되었으며, 그 중 일부는 의약품(예, Levemir, NovoNordisk)으로 허가를 받았다. 하지만, 이러한 방법은 투여부위에서 통증이 나타나는 부작용이 있으며, 아직도 주사를 통한 투여간격이 하루 한 번으로서 여전히 환자에게 큰 부담이 되고 있다.

[10]

[11] 이러한 문제점을 해결하기 위해 본 발명자들은 인슐린을 비롯한 생리활성 폴리펩타이드의 혈중반감기 증가 및 생체 내 활성유지를 동시에 극대화할 수 있는 방법으로서, 비펩타이드성 중합체를 링커로 사용하여 생리활성

폴리펩타이드와 면역글로불린 불변영역을 포함하는 결합체를 제조한 바 있다. 그러나, 결합체를 구성하는 원료 물질의 높은 단가에 의해 여전히 상기 결합체를 수율 및 순도가 높도록 제조하는 방법이 절실하게 요구된다. 이러한 배경 하에서, 본 발명자들은 결합체 제조 반응 중 커플링 단계에서 반응용액에 적정 종류 및 농도의 염을 사용할 경우, 높은 수율 및 순도로 생리활성 폴리펩타이드 결합체를 제조할 수 있어 제조비용을 절감할 수 있음을 확인하고 본 발명을 완성하였다.

[12]

발명의 상세한 설명

기술적 과제

[13] 본 발명의 목적은 생리활성 폴리펩타이드, 비펩타이드성 중합체 링커 및 면역글로불린 불변영역이 공유결합에 의해 연결된 결합체를 제조 시, 낮은 제조수율의 문제점을 개선할 수 있는 효율적인 제조방법을 제공하는 것이다.

[14]

과제 해결 수단

[15] 상기 목적을 달성하기 위한 하나의 양태로서, 본 발명은 (1) 비펩타이드성 중합체를 생리활성 폴리펩타이드 또는 면역글로불린 불변영역 중 어느 하나와 반응시키는 단계; 및 (2) 염 존재하에, 상기 단계 (1)의 반응혼합물을 생리활성 폴리펩타이드 또는 면역글로불린 불변영역 중 다른 하나와 반응시키는 단계를 포함하는 생리활성 폴리펩타이드 - 비펩타이드성 중합체 - 면역글로불린 불변영역 결합체의 제조방법을 제공한다.

[16] 바람직하게, 상기 비펩타이드성 중합체는 양 말단에 각각 독립적으로 알데하이드 유도체, 말레이미드 유도체 및 석신이미드 유도체로 이루어진 군으로부터 선택되는 반응기를 가질 수 있다.

[17] 보다 바람직하게, 비펩타이드성 중합체는 상기 양 말단의 반응기를 통해 생리활성 폴리펩타이드 및 면역글로불린 불변영역과 각각 공유결합으로 연결될 수 있다.

[18] 바람직하게, 상기 단계 (1) 이후, 반응혼합물로부터 생리활성 폴리펩타이드 - 비펩타이드성 중합체 연결체 또는 면역글로불린 불변영역 - 비펩타이드성 중합체 연결체를 분리하는 단계를 더 포함할 수 있다.

[19] 바람직하게, 상기 염은 소디움 클로라이드(sodium chloride), 소디움 아세테이트(sodium acetate), 소디움 설페이트(sodium sulfate), 소디움 포스페이트(sodium phosphate), 소디움 카보네이트(sodium carbonate), 소디움 시아나이드(sodium cyanide), 소디움 시트레이트(sodium citrate), 소디움 나이트레이트(sodium nitrate), 포타슘 클로라이드(potassium chloride), 포타슘 아세테이트(potassium acetate), 포타슘 설페이트(potassium sulfate), 포타슘 포스페이트(potassium phosphate), 포타슘 카보네이트(potassium carbonate),

포타슘 시아나이드(potassium cyanide), 포타슘 시트레이트(potassium citrate), 포타슘 나이트레이트(potassium nitrate), 마그네슘 클로라이드(magnesium chloride), 마그네슘 아세테이트(magnesium acetate), 마그네슘 설페이트(magnesium sulfate), 마그네슘 포스페이트(magnesium phosphate), 마그네슘 카보네이트(magnesium carbonate), 마그네슘 시아나이드(magnesium cyanide), 마그네슘 시트레이트(magnesium citrate), 마그네슘 나이트레이트(magnesium nitrate), 암모늄 클로라이드(ammonium chloride), 암모늄 아세테이트(ammonium acetate), 암모늄 설페이트(ammonium sulfate), 암모늄 포스페이트(ammonium phosphate), 암모늄 카보네이트(ammonium carbonate), 암모늄 시아나이드(ammonium cyanide), 암모늄 시트레이트(ammonium citrate), 암모늄 나이트레이트(ammonium nitrate), 칼슘 클로라이드(calcium chloride), 칼슘 아세테이트(calcium acetate), 칼슘 설페이트(calcium sulfate), 칼슘 포스페이트(calcium phosphate), 칼슘 카보네이트(calcium carbonate), 칼슘 시아나이드(calcium cyanide), 칼슘 시트레이트(calcium citrate) 또는 칼슘 나이트레이트(calcium nitrate)로 구성된 군으로부터 선택된 것일 수 있다.

[20] 보다 바람직하게, 상기 염은 소디움 클로라이드, 소디움 아세테이트, 소디움 설페이트, 소디움 포스페이트 및 포타슘 클로라이드로 구성된 군으로부터 선택된 것일 수 있다.

[21] 바람직하게, 상기 염은 0.1 내지 3.0 M의 최종농도로 첨가될 수 있다.

[22] 보다 바람직하게, 상기 염은 0.3 내지 2.5 M의 최종농도로 첨가될 수 있다.

[23] 바람직하게, 상기 염이 소디움 클로라이드인 경우 3.0 M 미만, 소디움 아세테이트인 경우 2.5 M 미만, 소디움 설페이트인 경우 0.7 M 미만, 소디움 포스페이트인 경우 0.8 M 미만 또는 포타슘 클로라이드인 경우 1.0 M 이하의 최종농도로 첨가할 수 있다.

[24] 바람직하게, 상기 단계 (2)의 반응 시간은 4 내지 18 시간일 수 있다.

[25] 바람직하게, 상기 단계 (2)의 반응 온도는 0 내지 25℃일 수 있다.

[26] 바람직하게, 상기 비펩타이드성 중합체가 하나 이상의 알데하이드 유도체를 반응기로 갖는 경우, 반응혼합물에 추가로 환원제를 1 내지 100 mM의 최종농도로 포함할 수 있다.

[27] 바람직하게, 상기 (1) 단계는 pH 5.0 내지 6.5에서 (2) 단계는 pH 6.0 내지 8.5의 조건에서 수행될 수 있다.

[28] 바람직하게, 상기 (1) 단계에서 비펩타이드성 중합체를 생리활성 폴리펩타이드와 반응시키고, (2) 단계에서 (1) 단계의 반응 혼합물을 면역글로불린 불변영역과 반응시킬 수 있다.

[29] 바람직하게, 상기 (1) 단계는 생리활성 폴리펩타이드와 비펩타이드성 중합체를 1:1 내지 1:20의 몰비로 반응시키고, (2) 단계는 (1) 단계 생성물과 면역글로불린 불변영역을 1:0.5 내지 1:10의 몰비로 반응시키는 것일 수 있다.

[30] 보다 바람직하게, 상기 (2) 단계는 염이 소디움 클로라이드인 경우 3.0 M 미만, 소디움 아세테이트인 경우 2.5 M 미만, 소디움 설페이트인 경우 0.7 M 미만, 소디움 포스페이트인 경우 0.8 M 미만 또는 포타슘 클로라이드인 경우 1.0 M 이하의 최종농도로 첨가하여 수행할 수 있다.

[31] 바람직하게, 상기 비펩타이드성 중합체의 반응기는 각각 생리활성 폴리펩타이드 및 면역글로불린 불변영역의 N-말단 아민기 또는 Lys 잔기 측쇄의 아민기에 결합될 수 있다.

[32] 바람직하게, 상기 비펩타이드성 중합체는 폴리에틸렌 글리콜, 폴리프로필렌 글리콜, 에틸렌 글리콜과 프로필렌 글리콜의 공중합체, 폴리옥시 에틸화 폴리올, 폴리비닐 알콜, 폴리사카라이드, 덱스트란, 폴리비닐 에틸 에테르, PLA(폴리락트산, polylactic acid), PLGA(폴리락틱-글리콜산, polylactic-glycolic acid), 지질 중합체, 키틴, 히아루론산 및 이들의 조합으로 구성된 군으로부터 선택되는 것일 수 있다.

[33] 보다 바람직하게, 상기 비펩타이드성 중합체는 폴리에틸렌 글리콜일 수 있다.

[34] 바람직하게, 상기 비펩타이드성 중합체는 분자량이 1 내지 100 kDa 범위인 것일 수 있다.

[35] 바람직하게, 상기 면역글로불린 불변영역은 비당쇄화된 것일 수 있다.

[36] 바람직하게, 상기 면역글로불린 불변영역은 CH1, CH2, CH3 및 CH4 도메인으로 이루어진 그룹으로부터 선택된 1개 내지 4개 도메인으로 이루어진 것일 수 있다.

[37] 바람직하게, 상기 면역글로불린 불변영역은 힌지영역을 추가로 포함할 수 있다.

[38] 바람직하게, 면역글로불린 불변영역은 IgG, IgA, IgD, IgE, IgM, 이들의 조합(combination) 및 이들의 하이브리드(hybrid)에 의한 불변영역으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것일 수 있다.

[39] 바람직하게, 상기 면역글로불린 불변영역은 IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, 이들의 조합 및 이들의 하이브리드의 불변영역으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것일 수 있다.

[40] 보다 바람직하게, 상기 면역글로불린 불변영역은 IgG4 Fc 영역일 수 있다.

[41] 보다 더 바람직하게, 상기 면역글로불린 불변영역은 인간 비당쇄화 IgG4 Fc 영역일 수 있다.

[42] 바람직하게, 상기 생리활성 폴리펩타이드는 인간 성장 호르몬, 성장 호르몬 방출 호르몬, 성장 호르몬 방출 펩타이드, 인터페론, 인터페론 수용체, 콜로니 자극인자, 글루카콘-유사 펩타이드 (GLP-1등), 옥신토모듈린, 지프로테인 관련수용체 (Gprotein-coupled receptor), 인터루킨, 인터루킨 수용체, 효소류, 인터루킨 결합 단백질, 사이토카인 결합 단백질, 마크로파지 활성인자, 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, 적혈구 생성인자, 고 당쇄화 적혈구 생성인자, 안지오포에이틴류, 헤모글로빈, 트롬빈, 트롬빈 수용체 활성 펩타이드, 트롬보모듈린, 혈액인자 VII, VIIa, VIII, IX, 및 XIII, 플라즈미노젠 활성인자, 피브린-결합 펩타이드, 유로키나제, 스트렙토키나제, 히루딘, 단백질 C, C-반응성 단백질, 레닌 억제제, 콜라게나제 억제제, 수퍼옥사이드 디스뮤타제, 렙틴, 혈소판 유래 성장인자, 상피세포 성장인자, 표피세포 성장인자, 안지오스타틴, 안지오텐신, 골 형성 성장인자, 골 형성 촉진 단백질, 칼시토닌, 인슐린, 아트리오펩틴, 연골 유도인자, 엘카토닌, 결합조직 활성인자, 조직인자 경로 억제제, 여포 자극 호르몬, 황체 형성 호르몬, 황체 형성 호르몬 방출 호르몬, 신경 성장인자, 부갑상선 호르몬, 릴랙신, 씨크레틴, 소마토메딘, 인슐린 유사 성장인자, 부신피질 호르몬, 글루카곤, 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 것일 수 있다.

[43] 보다 바람직하게, 상기 생리활성 폴리펩타이드는 인슐린일 수 있다.

[44] 바람직하게, (1) 단계는 pH 5.0 내지 6.5의 조건에서 생리활성 폴리펩타이드와 비펩타이성 중합체를 1:1 내지 1:20의 몰비로 반응시키는 단계이고, (2) 단계는 염 존재하에, pH 6.0 내지 8.5의 조건에서 상기 단계 (1)의 반응혼합물을 면역글로불린 불변영역과 1:0.5 내지 1:10의 몰비로 반응시키는 단계이며, 상기 염은 소디움 클로라이드인 경우 3.0 M 미만, 소디움 아세테이트인 경우 2.5 M 미만, 소디움 설페이트인 경우 0.7 M 미만, 소디움 포스페이트인 경우 0.8 M 미만 또는 포타슘 클로라이드인 경우 1.0 M 이하의 최종농도로 첨가되는 것일 수 있다.

[45]

발명의 효과

[46] 본 발명의 제조방법을 통해 높은 순도와 수율로 생리활성 폴리펩타이드 - 비펩타이드성 중합체 - 면역글로불린 불변영역 결합체를 제조할 수 있으며, 이를 이용하여 제조한 생리활성 폴리펩타이드 결합체는 제조비용이 절감되어 산업성을 높이고 환자의 복약순응도를 높일 수 있는 생리활성 폴리펩타이드의 지속형 제형 개발에 유용하게 이용될 수 있다.

[47]

도면의 간단한 설명

[48] 도 1은 실시예 2와 3의 커플링 반응 용액을 Source 15Q 컬럼으로 정제한 프로파일을 나타낸 도이다. 반응하지 않은 면역글로불린 Fc, 지속형 인슐린 결합체(인슐린-PEG-면역글로불린 Fc 단편 결합체) 및 불순물의 함량을 비교할 수 있다.

[49]

발명의 실시를 위한 최선의 형태

[50] 상기 목적을 달성하기 위한 하나의 양태로서, 본 발명은 (1) 비펩타이드성 중합체를 생리활성 폴리펩타이드 또는 면역글로불린 불변영역 중 어느 하나와 반응시키는 단계; 및 (2) 염 존재하에, 상기 단계 (1)의 반응혼합물을 생리활성 폴리펩타이드 또는 면역글로불린 불변영역 중 다른 하나와 반응시키는 단계를 포함하는 생리활성 폴리펩타이드 - 비펩타이드성 중합체 - 면역글로불린 불변영역 결합체의 제조방법을 제공한다.

[51] 상기 단계 (1)은 비펩타이드성 중합체에 생리활성 폴리펩타이드 또는 면역글로불린 불변영역을 결합시키는 단계로서, 비펩타이드성 중합체와 생리활성 폴리펩타이드 또는 면역글로불린 불변영역을 결합시키기 위해 사용되는 공지의 방법을 이용할 수 있으며, 예를 들어, 0 내지 25℃에서 1 내지 16시간 동안 반응시킴으로써 달성될 수 있다. 바람직하게 상기 반응을 통하여 생리활성 폴리펩타이드 또는 면역글로불린 불변영역에 하나의 비펩타이드성 중합체가 반응기를 통하여 공유결합될 수 있다. 이때, 상기 반응에 참여하는 반응기의 종류에 따라 1 내지 20 mM 환원제를 추가로 포함하여 수행할 수 있다.

[52] 상기 비펩타이드성 중합체는 이에 포함된 반응기를 통해 생리활성 폴리펩타이드 및 면역글로불린 불변영역과 각각 공유결합으로 연결될 수 있다. 바람직하게, 상기 비펩타이드성 중합체의 반응기는 각각 생리활성 폴리펩타이드 및 면역글로불린 불변영역의 N-말단 아민기 또는 Lys 잔기 측쇄의 아민기에 결합할 수 있다. 이때, 생리활성 폴리펩타이드 및 면역글로불린 불변영역 상에서 Lys 잔기의 위치는 특정한 자리에 제한되지 않는다. 상기 Lys 잔기는 천연형 Lys에 제한되지 않으며, 비펩타이드성 중합체의 반응기와 연결될 수 있는 아민기를 포함하는 한 비천연형 아미노산 및 Lys 유도체를 비제한적으로 포함한다.

[53] 상기 반응혼합물은 반응 생성물인 비펩타이드성 중합체와 생리활성 폴리펩타이드와의 연결체 또는 비펩타이드성 중합체와 면역글로불린 불변영역과의 연결체 및/또는 반응하지 않은 반응혼합물들을 포함할 수 있다. 따라서, 단계 (1) 이후, 반응혼합물로부터 생리활성 폴리펩타이드 - 비펩타이드성 중합체 연결체 또는 면역글로불린 불변영역 - 비펩타이드성 중합체 연결체를 분리하는 단계를 더 포함할 수 있다.

[54] 본 발명에서 "비펩타이드성 중합체"는 반복 단위가 2개 이상 결합된 생체적합성 중합체를 의미하며, 상기 반복 단위들은 펩타이드 결합이 아닌 임의의 공유결합을 통해 서로 연결된다. 본 발명에 사용가능한 비펩타이드성 중합체는 폴리에틸렌 글리콜, 폴리프로필렌 글리콜, 에틸렌 글리콜과 프로필렌 글리콜의 공중합체, 폴리옥시 에틸화 폴리올, 폴리비닐 알콜, 폴리사카라이드, 덱스트란, 폴리비닐 에틸 에테르, PLA(폴리락트산, polylactic acid) 및

PLGA(폴리락틱-글리콜산, polylactic-glycolic acid)와 같은 생분해성 고분자, 지질 중합체, 키틴류, 히아루론산 및 이들의 조합으로 구성된 군으로부터 선택될 수 있으며, 바람직하게는 폴리에틸렌 글리콜(PEG)일 수 있다. 당해 분야에 알려진 이들의 유도체 및 당해 분야의 기술 수준에서 용이하게 제조할 수 있는 유도체들도 본 발명의 범위에 포함된다.

[55] 기존 인프레임 퓨전(inframe fusion) 방법으로 제조된 융합 단백질에서 사용된 펩타이드성 링커의 단점은 생체 내에서 단백질분해효소에 의해 쉽게 절단되어 캐리어에 의한 활성약물의 혈중반감기 증가 효과를 기대만큼 얻을 수 없다는 것이다. 그러나, 본 발명에서는 단백질분해효소에 저항성 있는 중합체를 사용하여 캐리어와 유사하게 펩타이드의 혈중반감기를 유지할 수 있다. 그러므로, 본 발명에서 사용될 수 있는 비펩타이드성 중합체는 상기와 같은 역할을 할 수 있는, 즉 생체 내 단백질분해 효소에 저항성 있는 중합체이면 제한없이 사용될 수 있다. 비펩타이드성 중합체는 분자량이 1 내지 100 kDa 범위, 바람직하게는 1 내지 20 kDa 범위인 것이 바람직하다. 또한, 생리활성 폴리펩타이드와 결합되는 본 발명의 비펩타이드성 중합체는 한 종류의 중합체뿐만 아니라 상이한 종류의 중합체들의 조합이 사용될 수도 있다.

[56] 본 발명에서 사용되는 비펩타이드성 중합체는 면역글로불린 Fc 영역 및 단백질 약물과 결합될 수 있는 반응기를 가진다.

[57] 바람직하게, 상기 비펩타이드성 중합체는 생리활성 폴리펩타이드의 아미노산 잔기 측쇄의 아민 그룹 또는 티올 그룹과 펩티드(peptide), 헤미티오아세탈(hemithioacetal), 이민(imine) 또는 티오디옥소피롤리디닐(thiodioxopyrrolidinyl) 결합을 형성할 수 있다.

[58] 상기 비펩타이드성 중합체의 말단 반응기의 비제한적인 예는 프로피온알데하이드 그룹, 부틸알데하이드 그룹 등의 알데하이드 유도체, 말레이미드(maleimide) 유도체 및 석신이미드(succinimide) 유도체 등이 있다. 상기 석신이미드 유도체로는 석신이미딜 카르복시메틸, 석신이미딜 발레르에이트, 석신이미딜 메틸부타노에이트, 석신이미딜 메틸프로피온에이트, 석신이미딜 부타노에이트, 석신이미딜 프로피온에이트, N-하이드록시석신이미드인 또는 석신이미딜 카보네이트가 이용될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니며, 면역글로불린 Fc 영역과 생리활성 폴리펩타이드의 아미노산 잔기의 아민 그룹 또는 티올 그룹과 선택적으로 공유결합을 형성할 수 있는 반응기를 제한없이 사용할 수 있다.

[59] 상기 비펩타이드성 중합체의 말단 반응기는 서로 같거나 다를 수 있다. 예를 들어, 한쪽 말단에는 석신이미드 그룹을, 다른 쪽 말단에는 프로피온알데하이드 그룹 또는 부틸알데하이드 그룹 등의 알데하이드 유도체를 가질 수 있다. 양쪽 말단에 하이드록시 반응기를 갖는 폴리에틸렌글리콜을 비펩타이드성 중합체로 이용하는 경우에는 공지의 화학반응에 의해 상기 하이드록시기를 상기 다양한 반응기로 활성화하거나, 상업적으로 입수 가능한 변형된 반응기를 갖는

폴리에틸렌글리콜을 이용하여 본 발명의 단백질 결합체를 제조할 수 있다.

[60] 바람직하게, 비펩타이드성 중합체는 반응기로 양 말단에 프로피온알데하이드 그룹을 가질 수 있다.

[61] 종래에 단백질 지속형 제제를 제조하기 위하여 PEG를 결합시키는 것은 단백질의 안정성은 증가시킬 수 있는 장점이 있지만 PEG의 분자량이 증가할수록 단백질과의 반응성이 낮아져 수율이 감소하는 문제가 있다. 제조 수율은 제조단가와 이에 따른 산업성과 밀접한 관계가 있기 때문에 수율을 높이는 것은 매우 중요하다. 알데하이드 반응기를 포함하고 있는 PEG는 폴리펩타이드의 N-말단 아민기 또는 Lys 잔기 R 그룹의 아민기에 결합할 수 있으며 PEG와 단백질의 몰비, 반응 용액의 농도, 시간, pH, 온도 등을 조절함으로써 페길화(PEGylation) 반응 수율이 변화할 수 있다.

[62] 그러나 두 개 이상의 반응기를 가지는 PEG를 비롯한 비펩타이드성 중합체를 서로 다른 폴리펩타이드 간의 링커로 사용할 경우, 두 번 이상의 반응 단계를 거치며 전체적으로 낮은 수율을 보이게 된다. 특히 2차 반응 단계(두 개 이상의 반응기를 가지는 비펩타이드성 중합체가 연결된 생리활성 폴리펩타이드 또는 면역글로불린 불변영역을 각각 면역글로불린 불변영역 또는 생리활성 폴리펩타이드와 반응시키는 단계, 이하 "커플링 반응")가 두 개 이상의 반응기를 가지는 비펩타이드성 중합체를 생리활성 폴리펩타이드 또는 면역글로불린 불변영역과 반응시키는 1차 반응 단계보다 현저히 낮은 수율을 보이는 것을 관찰할 수 있다.

[63] 본 발명자는 커플링 반응 중 염의 첨가와 반응 수율과의 상관성을 발견하였으며, 염을 사용함에 따라 커플링 반응 수율이 향상됨을 확인하였다.

[64] 본 발명에서 염은 동일한 수(전자가를 고려)의 음이온과 양이온이 전기적으로 결합하여 중성의 알짜전하를 갖는 이온성 물질로, 수용액 상에서 각각 양이온과 음이온으로 해리되는 화합물을 의미하며 본 발명의 목적상 비펩타이드성 중합체와 생리활성 폴리펩타이드의 연결체 또는 비펩타이드성 중합체와 면역글로불린 불변영역의 연결체가 각각 면역글로불린 불변영역 또는 생리활성 폴리펩타이드와 공유결합될 수 있도록 하기 위하여 반응용액에 포함될 수 있다. 일반적으로 염을 형성하는 양이온은 암모늄(NH_4^+), 칼슘(Ca^{2+}), 철(Fe^{2+} 또는 Fe^{3+}), 마그네슘(Mg^{2+}), 포타슘(K^+), 피리디늄($C_5H_5NH^+$), 4차 암모늄(NR_4^+) 또는 소디움(Na^+)일 수 있으며, 음이온은 아세테이트(CH_3COO^-), 카보네이트(CO_3^{2-}), 클로라이드(Cl^-), 시트레이트($HOC(COO^-)(CH_2COO^-)_2$), 시아나이드(CN^-), 나이트레이트(NO_3^-), 나이트라이트(NO_2^-), 포스페이트(PO_4^{3-}) 또는 설페이트(SO_4^{2-})일 수 있다. 상기 염은 전술한 양이온종과 음이온의 조합으로 형성되는 것일 수 있다. 상기 염은 당업계에서 통상적으로 사용하는 염을 모두 사용할 수 있으며, 이에 제한되지는 않으나 바람직하게는 소디움 클로라이드(sodium chloride), 소디움 아세테이트(sodium acetate), 소디움 설페이트(sodium sulfate), 소디움 포스페이트(sodium phosphate), 소디움 카보네이트(sodium carbonate), 소디움

시아나이드(sodium cyanide), 소디움 시트레이트(sodium citrate), 소디움 나이트레이트(sodium nitrate), 포타슘 클로라이드(potassium chloride), 포타슘 아세테이트(potassium acetate), 포타슘 설페이트(potassium sulfate), 포타슘 포스페이트(potassium phosphate), 포타슘 카보네이트(potassium carbonate), 포타슘 시아나이드(potassium cyanide), 포타슘 시트레이트(potassium citrate), 포타슘 나이트레이트(potassium nitrate), 마그네슘 클로라이드(magnesium chloride), 마그네슘 아세테이트(magnesium acetate), 마그네슘 설페이트(magnesium sulfate), 마그네슘 포스페이트(magnesium phosphate), 마그네슘 카보네이트(magnesium carbonate), 마그네슘 시아나이드(magnesium cyanide), 마그네슘 시트레이트(magnesium citrate), 마그네슘 나이트레이트(magnesium nitrate), 암모늄 클로라이드(ammonium chloride), 암모늄 아세테이트(ammonium acetate), 암모늄 설페이트(ammonium sulfate), 암모늄 포스페이트(ammonium phosphate), 암모늄 카보네이트(ammonium carbonate), 암모늄 시아나이드(ammonium cyanide), 암모늄 시트레이트(ammonium citrate), 암모늄 나이트레이트(ammonium nitrate), 칼슘 클로라이드(calcium chloride), 칼슘 아세테이트(calcium acetate), 칼슘 설페이트(calcium sulfate), 칼슘 포스페이트(calcium phosphate), 칼슘 카보네이트(calcium carbonate), 칼슘 시아나이드(calcium cyanide), 칼슘 시트레이트(calcium citrate) 또는 칼슘 나이트레이트(calcium nitrate) 일 수 있다. 보다 바람직하게 소디움 클로라이드, 소디움 아세테이트, 소디움 설페이트, 소디움 포스페이트 또는 포타슘 클로라이드일 수 있다. 상기 염은 생리활성 폴리펩타이드의 종류와 반응 용매에 따라 적합한 염을 자유롭게 선택할 수 있다.

[65] 상기 염은 하나의 반응기를 통해 생리활성 폴리펩타이드 또는 면역글로불린 불변영역이 결합된 비펩타이드성 중합체가 다른 하나의 반응기를 통해 각각 면역글로불린 불변영역 또는 생리활성 폴리펩타이드와 효율적으로 결합하도록 하기 위해 반응용액에 포함될 수 있다. 비펩타이드성 중합체의 연결 반응 수율을 높이기 위해 첨가되는 염의 최종농도는 비교적 높은 농도로, 예컨대 3.0 M 미만으로 부가할 수 있다. 염의 농도의 하한값은 당업자가 반복 실험을 통하여 결정할 수 있으며, 예시의 목적으로 적절한 염의 농도 범위를 제시하자면, 커플링 반응시 0.1 내지 3 M의 최종농도로 포함될 수 있으며, 더욱 구체적으로는 0.3 내지 2.5 M의 최종농도로 포함될 수 있다.

[66] 바람직하게, 상기 염이 소디움 클로라이드인 경우 3.0 M 미만의 최종농도로, 소디움 아세테이트인 경우 2.5 M 미만의 최종농도로, 소디움 설페이트인 경우 0.7 M 미만의 최종농도로, 소디움 포스페이트인 경우 0.8 M 미만의 최종농도로 또는 포타슘 클로라이드인 경우 1.0 M 이하의 최종농도로 첨가될 수 있다. 염의 종류에 따라 상기 농도를 초과하는 경우, 수율은 증가하지만 응집이 발생할 수 있어 바람직하지 않다. 응집이 발생하더라도 결합체의 제조는 가능하나 공정상에 어려움을 유발할 수 있으므로, 공정의 용이성을 위해 과도한 응집을

유발하지 않는 즉, 응집이 발생하지 않거나 발생하더라도 미량으로 형성되는 수준의 농도로 염을 첨가하는 것이 바람직하다. 예컨대 염 부가에 의하여 연결 반응에서 응집이 일어나더라도 전체 제조 공정의 수율이 염 부가 전보다 늘어난다면, 그러한 수준의 응집은 분리 및/또는 정제 상에 심각한 문제를 야기하지 않는 한 허용할 수 있다.

[67] 본 발명의 구체적인 실시예에서는 인슐린, 두 개의 알데하이드기를 반응기로 포함하는 PEG 링커 및 면역글로불린 불변영역이 연결된 결합체 제조시 수율을 증가시키기 위해 염을 다양한 조건에서 사용하여 반응을 진행하였으며, 커플링 반응 중 염을 사용함에 따라 수율이 향상됨을 확인하였다(표 1). 또한, 본 발명자는 이러한 염의 첨가로 인한 커플링 반응 수율의 향상이 부반응으로 생성되는 불순물 예컨대, 하나의 면역글로불린 불변영역 상의 2개의 N 말단이 각기 다른 2개의 인슐린-PEG 연결체에 결합하여 형성될 수 있는 멀티머의 생성을 억제함으로써 달성되는 것임을 확인하였다(도 1).

[68] 본 발명에서 커플링 반응 즉, 상기 단계 (2)의 반응은, 바람직하게, 4 내지 18 시간 동안 수행될 수 있다. 또한 상기 커플링 반응은 0 내지 25℃에서 수행될 수 있다. 그러나 상기 반응조건에 제한되지 않는다.

[69] 본 발명에서 비펩타이드성 중합체가 반응기로 알데하이드 유도체를 하나 이상 포함하는 경우 반응혼합물은 최종농도 1 내지 100 mM의 환원제를 추가로 포함할 수 있다.

[70] 본 발명에서 환원제는 비펩타이드성 중합체의 반응기인 알데하이드와 폴리펩타이드(생리활성 폴리펩타이드, 면역글로불린 불변영역)의 아민기가 결합하여 생성되는 가역적 이민 이중결합을 환원시킴으로써 공유결합을 생성시킬 수 있는 당해분야에 알려진 모든 환원제를 의미하며, 본 발명의 목적상 비펩타이드성 중합체가 생리활성 폴리펩타이드 또는 면역글로불린 불변영역과 공유결합될 수 있도록 하기 위하여 반응용액에 포함될 수 있다. 상기 환원제는 당업계에서 통상적으로 사용하는 환원제를 모두 사용할 수 있으며, 이에 제한되지는 않으나 바람직하게는 소디움 시아노보로하이드라이드(Sodium cyanoborohydride), 보란 피리딘 콤플렉스(Borane pyridine complex), 소디움 보로하이드라이드(Sodium borohydride), 보란 디메틸아민 콤플렉스(Borane dimethylamine complex), 보란 트리메틸아민 콤플렉스(Borane trimethylamine complex) 또는 소디움 트리아세톡시보로하이드라이드(Sodium triacetoxyborohydride) 일 수 있다. 상기 환원제는 생리활성 폴리펩타이드 또는 면역글로불린 불변영역의 종류와 반응 용매에 따라 적합한 환원제를 자유롭게 선택할 수 있다.

[71] 상기 환원제는 생리활성 폴리펩타이드 또는 면역글로불린 불변영역과 비펩타이드성 중합체 간의 연결을 위해 반응용액에 포함되는 것으로서, 생리활성 폴리펩타이드와 비펩타이드성 중합체 또는 면역글로불린 불변영역과 비펩타이드성 중합체 간의 연결 반응(단계 (1)의 반응)시 1~20 mM, 커플링

반응(단계 (2)의 반응)시 1~100 mM로 포함될 수 있다.

[72]

[73] 바람직하게, (1) 단계는 pH 5.0 내지 6.5에서 (2) 단계는 pH 6.0 내지 8.5의 조건에서 수행할 수 있다. 또한 각각 소디움 시트레이트 및 포타슘 포스페이트 또는 HEPES를 이용하여 이온강도를 20 내지 500 mM로 조절한 조건에서 수행할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[74]

[75] 본 발명의 구체적인 실시예에서는 양 말단에 각각 프로피온알데하이드를 반응기로 포함하는 PEG를 비펩타이드성 중합체로 사용하여 생리활성 폴리펩타이드로서 인슐린과 반응시켜 PEG-인슐린 연결체를 제조한 후, 염 존재하에 면역글로불린 불변영역과 커플링 반응을 수행하여 인슐린-PEG-면역글로불린 불변영역 결합체를 제조하였다.

[76] 전술한 바와 같이 상기 비펩타이드성 중합체와의 결합은 비펩타이드성 중합체의 반응기와 생리활성 폴리펩타이드 또는 면역글로불린 불변영역의 N 말단 아민기 또는 이들을 구성하는 아미노산 잔기의 측쇄에 포함된 아민기 또는 티올기를 통해 이루어진다. 한편, 면역글로불린 불변영역은 2개의 N 말단을 가지기 때문에 하나의 면역글로불린 불변영역이 동일한 비펩타이드성 중합체 분자 상의 2개의 반응기를 통해 결합하거나, 또는 서로 다른 2개의 비펩타이드성 중합체 분자 상의 반응기에 각각 결합할 수 있다. 그러나, 본 발명에 따른 제조방법에 의해 생성된 결합체는 생리활성 폴리펩타이드, 비펩타이드성 중합체 및 면역글로불린 불변영역 각 1분자가 서로 결합된 즉, 하나의 비펩타이드성 중합체의 양 말단에 각각 생리활성 폴리펩타이드 1분자 및 면역글로불린 불변영역 1분자가 결합된 형태인 것이 바람직하다. 반면, 하나의 면역글로불린 불변영역이 동일한 비펩타이드성 중합체 분자 상의 2개의 반응기를 통해 결합한 경우 비펩타이드성 중합체의 양 말단의 반응기가 모두 면역글로불린 불변영역과 결합하여 생리활성 폴리펩타이드와의 커플링 반응이 불가능할 수 있으며, 서로 다른 2개의 비펩타이드성 중합체 분자 상의 반응기에 각각 결합한 경우에는 유사 이량체 형태의 멀티머가 형성될 수 있다.

[77] 따라서, 본 발명의 한 실시 형태에서는, (1) 단계에서 비펩타이드성 중합체를 생리활성 폴리펩타이드와 반응시키고, (2) 단계에서 (1) 단계의 반응 혼합물을 면역글로불린 불변영역과 반응시킬 수 있다. 비펩타이드성 중합체를 생리활성 폴리펩타이드와 먼저 반응시켜 생리활성 폴리펩타이드-비펩타이드성 중합체의 연결체를 형성한 후 면역글로불린 불변영역과 커플링 반응을 수행하면, 면역글로불린 불변영역과 비펩타이드성 중합체를 먼저 반응시켰을 때 나타날 수 있는 현상인 하나의 면역글로불린 불변영역이 하나의 비펩타이드성 중합체의 양 말단 반응기와 모두 결합한 형태의 연결체가 형성되는 것을 예방할 수 있다.

[78] 상기 실시 형태의 한 구체적인 사례에서, (1) 단계는 생리활성 폴리펩타이드와

비펩타이드성 중합체를 1:1 내지 1:20의 몰비로 반응시키고, (2) 단계는 (1) 단계 생성물인 생리활성 폴리펩타이드와 비펩타이드성 중합체의 연결체와 면역글로불린 불변영역을 1:0.5 내지 1:10의 몰비로 반응시키는 것이 바람직하나, 이에 제한되지 않는다.

[79] 더욱 구체적으로, 상기 (2) 단계는 소디움 클로라이드인 경우 3.0 M 미만, 소디움 아세테이트인 경우 2.5 M 미만, 소디움 설페이트인 경우 0.7 M 미만, 소디움 포스페이트인 경우 0.8 M 미만 또는 포타슘 클로라이드인 경우 1.0 M 이하의 최종농도로 첨가하여 수행될 수 있다. 그러나, 상기 염의 종류 및 농도에 제한되는 것은 아니며, 반응혼합물에서 공정을 저해할 정도로 과도한 응집을 유발하지 않는 한, 다양한 종류의 염을 다양한 농도로 첨가하여 수행할 수 있으며, 염의 부가가 없을 경우에 허용가능한 것으로 인정되는 응집 수준에 상응하는 응집을 유발하는 농도의 염을 이용할 수 있다.

[80]

[81] 더욱 구체적으로, (1) 단계는 pH 5.0 내지 6.5의 조건에서 생리활성 폴리펩타이드와 비펩타이성 중합체를 1:1 내지 1:20의 몰비로 반응시키는 단계이고, (2) 단계는 염 존재하에, pH 6.0 내지 8.5의 조건에서 상기 단계 (1)의 반응혼합물을 면역글로불린 불변영역과 1:0.5 내지 1:10의 몰비로 반응시키는 단계이며, 상기 염은 소디움 클로라이드인 경우 3.0 M 미만, 소디움 아세테이트인 경우 2.5 M 미만, 소디움 설페이트인 경우 0.7 M 미만, 소디움 포스페이트인 경우 0.8 M 미만 또는 포타슘 클로라이드인 경우 1.0 M 이하의 최종농도로 첨가되는 것일 수 있다.

[82] 상기 (1) 단계는 생리활성 폴리펩타이드-비펩타이드성 중합체의 연결체를 제조하기 위한 반응으로, 이후에 상기 생성물을 정제하는 단계를 추가로 수행할 수 있다. 상기 (2) 단계는 (1) 단계의 생성물인 생리활성 폴리펩타이드-비펩타이드성 중합체의 연결체를 면역글로불린 불변영역과 반응시켜 생리활성 폴리펩타이드-비펩타이드성 중합체-면역글로불린 불변영역의 결합체를 제조하기 위한 반응으로 상기와 같이 반응 조건 및 반응물의 몰비를 조절하여 향상된 수율로 결합체를 제조할 수 있다.

[83]

[84] 본 발명에서 "생리활성 폴리펩타이드"는 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 것으로서, 일반적인 단백질 치료제를 포함할 수 있다.

[85] 생리활성 폴리펩타이드는 인간 성장 호르몬, 성장 호르몬 방출 호르몬, 성장 호르몬 방출 펩타이드, 인터페론, 인터페론 수용체, 콜로니 자극인자, 글루카콘-유사 펩타이드 (GLP-1등), 옥신토모듈린, 지프로테인 관련수용체

(Gprotein-coupled receptor), 인터루킨, 인터루킨 수용체, 효소류, 인터루킨 결합 단백질, 사이토카인 결합 단백질, 마크로파지 활성인자, 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, 적혈구 생성인자, 고당쇄화 적혈구 생성인자, 안지오포에이틴류, 헤모글로빈, 트롬빈, 트롬빈 수용체 활성 펩타이드, 트롬보모듈린, 혈액인자 VII, VIIa, VIII, IX, 및 XIII, 플라즈미노젠 활성인자, 피브린-결합 펩타이드, 유로키나제, 스트렙토키나제, 히루딘, 단백질 C, C-반응성 단백질, 레닌 억제제, 콜라게나제 억제제, 수퍼옥사이드 디스뮤타제, 렙틴, 혈소판 유래 성장인자, 상피세포 성장인자, 표피세포 성장인자, 안지오스타틴, 안지오텐신, 골 형성 성장인자, 골 형성 촉진 단백질, 칼시토닌, 인슐린, 아트리오펩틴, 연골 유도인자, 엘카토닌, 결합조직 활성인자, 조직인자 경로 억제제, 여포 자극 호르몬, 황체 형성 호르몬, 황체 형성 호르몬 방출 호르몬, 신경 성장인자, 부갑상선 호르몬, 릴랙신, 씨크레틴, 소마토메딘, 인슐린 유사 성장인자, 부신피질 호르몬, 글루카곤, 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 것일 수 있다. 바람직하게, 상기 생리활성 폴리펩타이드는 인슐린일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[86] 본 발명의 실시예에서 사용된 인슐린은 체내의 혈당이 높을 때 췌장에서 분비되어 간, 근육, 지방 조직에서 당을 흡수하여 글리코겐으로 저장하도록 하며, 지방을 분해하여 에너지원으로 사용되는 것을 억제하여 혈당을 조절하는 기능을 가지는 생리활성 펩타이드의 일종이다. 구조적인 면에서 인슐린은 알파 체인 및 베타 체인을 포함한다. 상기 인슐린 알파 체인 및 인슐린 베타 체인이라는 용어는 각각 인슐린 A 체인 및 인슐린 B 체인과 혼용하여 사용될 수 있다. 이러한 펩타이드는, 인슐린 아고니스트(agonist), 전구물질(precursors), 유도체(derivatives), 단편(fragments), 변이체(variants) 등을 포함하며 바람직하게는 천연형 인슐린, 속효성 인슐린, 지속형 인슐린 등일 수 있다.

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

[88] -알파 체인 :

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

[90] -베타 체인 :

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

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

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

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

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

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

[97] 본 발명에서, "면역글로불린 불변영역"은 면역글로불린의 중쇄와 경쇄 가변영역, 중쇄 불변영역 1(CH1)과 경쇄 불변영역(CL)을 제외한, 중쇄 불변영역 2(CH2) 및 중쇄 불변영역 3(CH3) (또는 중쇄 불변영역 4(CH4) 포함)부분을 포함하는 Fc 단편을 의미할 수 있으며, 중쇄 불변영역에 힌지(hinge) 부분을 포함하기도 한다. 또한 본 발명의 면역글로불린 불변영역은 천연형과 실질적으로 동등 하거나 향상된 효과를 갖는 한, 면역 글로불린의 중쇄와 경쇄 가변영역만을 제외하고, 일부 또는 전체 중쇄 불변영역 1(CH1) 및/또는 경쇄불변영역(CL)을 포함하는 확장된 면역글로불린 불변영역일 수 있다. 또한, CH2 및/또는 CH3에 해당하는 상당히 긴 일부 아미노산 서열이 제거된 영역일 수도 있다. 즉, 본 발명의 면역글로불린 불변영역은 (1) CH1 도메인, CH2 도메인, CH3 도메인 및 CH4 도메인, (2) CH1 도메인 및 CH2 도메인, (3) CH1 도메인 및 CH3 도메인, (4) CH2 도메인 및 CH3 도메인, (5) 1개 또는 2개의 이상의 불변영역 도메인과 면역글로불린 힌지 영역(또는 힌지 영역의 일부)과의 조합, (6) 중쇄 불변영역 각 도메인과 경쇄 불변영역의 이량체일 수 있다.

[98] 면역글로불린 Fc 단편을 비롯한 불변영역은 생체내에서 대사되는 생분해성의 폴리펩타이드이기 때문에, 약물의 캐리어로 사용하기에 안전하다. 또한, 면역글로불린 Fc 단편은 면역글로불린 전체 분자에 비해 상대적으로 분자량이 적기 때문에 결합체의 제조, 정제 및 수율 면에서 유리할 뿐만 아니라 아미노산

서열이 항체마다 다르기 때문에 높은 비균질성을 나타내는 Fab 부분이 제거되기 때문에 물질의 동질성이 크게 증가되고 혈중 항원성의 유발 가능성도 낮아지게 되는 효과도 기대할 수 있다.

[99] 한편, 면역글로불린 불변영역은 인간 또는 소, 염소, 돼지, 마우스, 래빗, 햄스터, 랫트, 기니아 픽 등의 동물기원일 수 있으며, 바람직하게는 인간기원이다. 또한, 면역글로불린 불변영역은 IgG, IgA, IgD, IgE, IgM 유래 또는 이들의 조합(combination) 또는 이들의 혼성(hybrid)에 의한 불변영역으로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있다. 바람직하게는 인간 혈액에 가장 풍부한 IgG 또는 IgM 유래이며 가장 바람직하게는 리간드 결합 단백질의 반감기를 향상시키는 것으로 공지된 IgG 유래일 수 있다.

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

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

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

[103] 또한, 면역글로불린 불변영역은 천연형 당쇄, 천연형에 비해 증가된 당쇄, 천연형에 비해 감소한 당쇄 또는 당쇄가 제거된 형태일 수 있다. 이러한 면역글로불린 불변영역 당쇄의 증감 또는 제거에는 화학적 방법, 효소학적 방법 및 미생물을 이용한 유전 공학적 방법과 같은 통상적인 방법이 이용될 수 있다. 여기서, 면역글로불린 불변영역에서 당쇄가 제거된 면역글로불린 불변영역은 보체(c1q)의 결합력이 현저히 저하되고, 항체-의존성 세포독성 또는 보체-의존성 세포독성이 감소 또는 제거되므로, 생체 내에서 불필요한 면역반응을 유발하지 않는다. 이런 점에서 약물의 캐리어로서의 본래의 목적에 보다 부합하는 형태는 당쇄가 제거되거나 비당쇄화된 면역글로불린 불변영역이라 할 것이다. 따라서, 더욱 더 바람직하게는, 인간 IgG4 유래의 비-당쇄화된 Fc 영역을 사용할 수 있다. 인간 유래의 Fc 영역은 인간 생체에서 항원으로 작용하여 이에 대한 새로운

항체를 생성하는 등의 바람직하지 않은 면역 반응을 일으킬 수 있는 비-인간 유래의 Fc 영역에 비하여 바람직할 수 있다.

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

[105] 분자의 활성을 전체적으로 변경시키지 않는 단백질 및 펩티드에서의 아미노산 교환은 당해 분야에 공지되어 있다(H.Neurath, R.L.Hill, The Proteins, Academic Press, New York,197 9). 가장 통상적으로 일어나는 교환은 아미노산 잔기 Ala/Ser, Val/Ile, Asp/Glu, Thr/Ser, Ala/Gly, Ala/Thr, Ser/Asn, Ala/Val, Ser/Gly, Thr/Phe, Ala/Pro, Lys/Arg, Asp/Asn, Leu/Ile, Leu/Val, Ala/Glu, Asp/Gly 간의 교환이다. 경우에 따라서는 인산화(phosphorylation), 황화(sulfation), 아크릴화(acrylation), 당화(glycosylation), 메틸화(methylation), 파네실화(farnesylation), 아세틸화(acetylation), 아밀화(amidation) 등으로 수식(modification)될 수도 있다.

[106] 상기 기술한 면역글로불린 불변영역 유도체는 본 발명의 면역글로불린 불변영역과 동일한 생물학적 활성을 나타내나, 면역글로불린 불변영역의 열, pH 등에 대한 구조적 안정성을 증대시킨 유도체일 수 있다. 또한, 이러한 면역글로불린 불변영역은 인간 및 소, 염소, 돼지, 마우스, 래빗, 햄스터, 랫트, 기니아 픽 등의 동물의 생체 내에서 분리한 천연형으로부터 얻어질 수도 있고, 형질전환된 동물세포 또는 미생물로부터 얻어진 재조합형 또는 이의 유도체일 수 있다. 여기서, 천연형으로부터 획득하는 방법은 전체 면역글로불린을 인간 또는 동물의 생체로부터 분리한 후, 단백질 분해효소를 처리하여 얻을 수 있다. 파파인을 처리할 경우에는 Fab 및 Fc로 절단되고, 펩신을 처리할 경우에는 pF'c 및 F(ab)2로 절단된다. 이를 크기 배제 크로마토그래피(size-exclusion chromatography) 등을 이용하여 Fc 또는 pF'c를 분리할 수 있다.

[107] 바람직하게는 인간 유래의 면역글로불린 불변영역을 미생물로부터 수득한 재조합형 면역글로불린 불변영역일 수 있다.

[108]

발명의 실시를 위한 형태

[109] 이하, 하기 실시예에 의하여 본 발명을 보다 상세하게 설명한다. 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하기 위한 것일 뿐 본 발명의 범위가 이들로 한정되는 것은 아니다.

[110]

[111] **실시예 1: 인슐린의 페길화(PEGylation) 반응 및 모노 페길화된 인슐린의 정제**

[112] 인슐린 분말을 10 mM HCl 에 용해시킨 후, 3.4K propion-ALD2 PEG(양 말단에 각각 프로피온 알데하이드기를 하나씩 지니고 있는 PEG, 한국 IDB사)를 인슐린 베타 체인의 N-말단에 페길화시키기 위하여, 인슐린 : PEG의 몰 비를 1 : 4로, 인슐린 농도를 5 mg/ml로 4℃에서 약 2시간 반응시켰다. 이때 반응은 50 mM 소디움 시트레이트(Sodium Citrate) pH 6.0, 45% 이소프로판올에서 이루어졌으며, 3.0 mM 농도의 소디움 시아노보로하이드라이드 환원제를 첨가하여 반응시켰다. 반응액은 소디움 시트레이트(pH 3.0), 45% EtOH가 포함된 버퍼와 KCl 농도 구배를 이용한 SP-HP(GE Healthcare) 컬럼을 사용하여 정제하였다.

[113]

[114] **실시예 2: 염을 첨가하지 않은 커플링 반응에 의한 결합체의 제조**

[115] 인슐린-PEG-면역글로불린 Fc 단편 결합체를 제조하기 위하여, 실시예 1의 방법을 이용하여 얻은 모노 페길화된(mono-PEGylated) 인슐린과 면역글로불린 Fc 단편의 몰비가 1 : 1.2가 되도록 하고 전체 단백질 농도를 20 mg/ml로 하여 25℃에서 13시간 반응시켰다. 이때 반응액은 100 mM HEPES, 22 mM 포타슘 포스페이트(Potassium phosphate), 10% 에탄올, pH 8.2이며, 환원제로서 20 mM 소디움 시아노보로하이드라이드를 첨가하였다.

[116] 반응이 종결된 후 반응액은 Source 15Q(GE Healthcare) 컬럼에 Tris-HCl (pH 7.5) 버퍼와 NaCl 농도 구배를 이용하여 반응하지 않은 인슐린, 반응하지 않은 면역글로불린 Fc 단편, 인슐린-PEG-면역글로불린 Fc 단편 결합체, 모노페길화된 인슐린(인슐린-PEG)이 2개 이상 결합한 면역글로불린 Fc 단편 결합체를 분리 정제하였다. 이때 프로파일 상에서 불순물 함량을 확인하였다(도 1).

[117] 이후 Source 15ISO(GE Healthcare)를 2차 컬럼으로 사용하여, 잔류한 면역글로불린 Fc 및 멀티 커플링된 인슐린 결합체를 제거하여, 인슐린 - PEG - 면역글로불린 Fc 결합체를 얻었다. 이때, Tris-HCl(pH 7.5)가 포함된 암모늄 설페이트(Ammonium sulfate)의 농도구배를 이용하여 용출하였다. 용출된 인슐린 - PEG - 면역글로불린 Fc 결합체는 RP-HPLC, IE-HPLC를 사용하여 분석하였다.

[118]

[119] **실시예 3: 소디움 클로라이드 첨가에 의한 커플링 반응 수율의 향상**

[120] 소디움 클로라이드 첨가가 커플링 반응 수율에 미치는 영향을 관찰하기 위하여, 실시예 1의 방법을 이용하여 얻은 모노 페길화된 인슐린과

면역글로불린 Fc 단편의 몰비가 1 : 1.2가 되도록 하고 전체 단백질 농도를 20 mg/ml로 하여 25℃에서 13시간 반응시켰다. 이때 반응액은 100 mM HEPES, 22 mM 포타슘 포스페이트, 10% 에탄올, pH 8.2이며, 최종농도 0.5 내지 3.0 M이 되도록 소디움 클로라이드를 첨가하였다. 또한 환원제로서 20 mM 소디움 시아노보로하이드라이드를 첨가하였다.

[121] 실시예 2에 기재된 바와 동일하게 반응액을 정제하고 분석하였다. 커플링 용액에 소디움 클로라이드를 첨가하였을 경우, 첨가하지 않았을 경우보다 커플링 수율이 향상되었으며, 이러한 효과는 소디움 클로라이드를 최종농도 2.0 M로 첨가하였을 경우, 가장 현저하게 나타남을 확인하였다(표 1). 이때 Source 15Q 프로파일을 관찰한 결과 수율이 향상된 만큼 부반응에 따른 불순물이 감소되었음을 확인할 수 있었다(도 1). 또한 2.0 M 소디움 클로라이드를 첨가하여 커플링을 진행하였을 경우 순도 95% 이상의 고순도로 인슐린 - PEG - 면역글로불린 Fc 결합체를 제조할 수 있음을 확인하였다(표 2). 한편, 소디움 클로라이드를 최종농도 3.0 M로 첨가하였을 경우, 응집이 관찰되기 시작하였다.

[122]

[123] **실시예 4: 소디움 아세테이트 첨가에 의한 커플링 반응 수율의 향상**

[124] 소디움 아세테이트 첨가가 커플링 반응 수율에 미치는 영향을 관찰하기 위하여, 실시예 1의 방법을 이용하여 얻은 모노 페길화된 인슐린과 면역글로불린 Fc 단편의 몰비가 1 : 1.2가 되도록 하고 전체 단백질 농도를 20 mg/ml로 하여 25℃에서 13시간 반응시켰다. 이때 반응액은 100 mM HEPES, 22 mM 포타슘 포스페이트, 10% 에탄올, pH 8.2이며, 최종농도 1.5 내지 3.0 M이 되도록 소디움 아세테이트를 첨가하였다. 또한 환원제로서 20 mM 소디움 시아노보로하이드라이드를 첨가하였다.

[125] 실시예 2에 기재된 바와 동일하게 반응액을 정제하고 분석하였다. 커플링 용액에 소디움 아세테이트를 첨가하였을 경우, 첨가하지 않았을 경우보다 커플링 수율이 향상되었으며, 이러한 효과는 소디움 아세테이트를 최종농도 1.5 M로 첨가하였을 경우, 가장 현저하게 나타남을 확인하였다(표 1). 또한 1.5 M 소디움 아세테이트를 첨가하여 커플링을 진행하였을 경우 순도 95% 이상의 고순도로 인슐린 - PEG - 면역글로불린 Fc 결합체를 제조할 수 있음을 확인하였다(표 2). 한편, 소디움 아세테이트를 2.5 M 이상의 최종농도로 첨가하였을 경우, 응집으로 인해 수율을 산출하기 어려웠다.

[126]

[127] **실시예 5: 소디움 설페이트 첨가에 의한 커플링 반응 수율의 향상**

[128] 소디움 설페이트 첨가가 커플링 반응 수율에 미치는 영향을 관찰하기 위하여, 실시예 1의 방법을 이용하여 얻은 모노 페길화된 인슐린과 면역글로불린 Fc 단편의 몰비가 1 : 1.2가 되도록 하고 전체 단백질 농도를 20 mg/ml로 하여 25℃에서 13시간 반응시켰다. 이때 반응액은 100 mM HEPES, 22 mM 포타슘 포스페이트, 10% 에탄올, pH 8.2이며, 최종농도 0.4 내지 0.7 M이 되도록 소디움

설페이트를 첨가하였다. 또한 환원제로서 20 mM 소디움 시아노보로하이드라이드를 첨가하였다.

[129] 실시예 2에 기재된 바와 동일하게 반응액을 정제하고 분석하였다. 커플링 용액에 소디움 아세테이트를 첨가하였을 경우, 첨가하지 않았을 경우보다 커플링 수율이 향상되었으며, 이러한 효과는 소디움 설페이트를 최종농도 0.4 M로 첨가하였을 경우, 가장 현저하게 나타남을 확인하였다(표 1). 한편, 소디움 설페이트를 최종농도 0.5 M로 첨가하였을 경우, 응집이 관찰되기 시작하였으며, 0.7 M 이상으로 첨가하였을 경우에는 응집으로 인해 수율을 산출하기 어려웠다.

[130]

[131] **실시예 6: 소디움 포스페이트 첨가에 의한 커플링 반응 수율의 향상**

[132] 소디움 포스페이트 첨가가 커플링 반응 수율에 미치는 영향을 관찰하기 위하여, 실시예 1의 방법을 이용하여 얻은 모노 페길화된 인슐린과 면역글로불린 Fc 단편의 몰비가 1 : 1.2가 되도록 하고 전체 단백질 농도를 20 mg/ml로 하여 25℃에서 13시간 반응시켰다. 이때 반응액은 100 mM HEPES, 22 mM 포타슘 포스페이트, 10% 에탄올, pH 8.2이며, 최종농도 0.4 내지 0.8 M이 되도록 소디움 포스페이트를 첨가하였다. 또한 환원제로서 20 mM 소디움 시아노보로하이드라이드를 첨가하였다.

[133] 실시예 2에 기재된 바와 동일하게 반응액을 정제하고 분석하였다. 커플링 용액에 소디움 아세테이트를 첨가하였을 경우, 첨가하지 않았을 경우보다 커플링 수율이 향상되었으며, 이러한 효과는 소디움 포스페이트를 최종농도 0.4 M로 첨가하였을 경우, 가장 현저하게 나타남을 확인하였다(표 1). 한편, 소디움 포스페이트를 최종농도 0.6 M로 첨가하였을 경우, 응집이 관찰되기 시작하였으며, 0.8 M로 첨가하였을 경우 응집으로 인해 수율을 산출하기 어려웠다.

[134]

[135] **실시예 7: 포타슘 클로라이드 첨가에 의한 커플링 반응 수율의 향상**

[136] 포타슘 클로라이드 첨가가 커플링 반응 수율에 미치는 영향을 관찰하기 위하여, 실시예 1의 방법을 이용하여 얻은 모노 페길화된 인슐린과 면역글로불린 Fc 단편의 몰비가 1 : 1.2가 되도록 하고 전체 단백질 농도를 20 mg/ml로 하여 25℃에서 13시간 반응시켰다. 이때 반응액은 100 mM HEPES, 22 mM 포타슘 포스페이트, 10% 에탄올, pH 8.2이며, 최종농도 0.5 내지 1.0 M이 되도록 포타슘 클로라이드를 첨가하였다. 또한 환원제로서 20 mM 소디움 시아노보로하이드라이드를 첨가하였다.

[137] 실시예 2에 기재된 바와 동일하게 반응액을 정제하고 분석하였다. 커플링 용액에 소디움 아세테이트를 첨가하였을 경우, 첨가하지 않았을 경우보다 커플링 수율이 향상되었으며, 이러한 효과는 포타슘 클로라이드를 최종농도 1.0 M로 첨가하였을 경우, 가장 현저하게 나타남을 확인하였다(표 1).

[138] 하기 표 1은 인슐린과 면역글로불린 Fc 단편을 포함하는 결합체 제조시 커플링

반응 중의 염의 종류와 농도에 따른 커플링 반응 수율 및 총 수율을 나타낸다.

[139] 표 1

[Table 1]

염 종류	농도 (M)	육안 평가에 의한 응집정도	커플링 수율 (%)	총 수율 (%)
비첨가(대조군)	-	-	32.3	16.2
소디움 클로라이드	0.5	-	35.7	17.9
	1.0	-	39.2	19.7
	1.5	-	41.2	20.6
	2.0	-	42.2	21.2
	2.5	-	39.8	20.0
	3.0	+	37.0	18.9
소디움 아세테이트	**1.5**	-	43.4	21.7
	2.0	-	39.2	19.7
	2.5	+++	-	
	3.0	++++	-	
소디움 설페이트	0.4	-	36.3	18.2
	0.5	+	43.5	21.8
	0.6	+	42.1	21.1
	0.7	+++	-	
소디움 포스페이트	**0.4**	-	40.7	20.4
	0.6	++	39.2	19.7
	0.8	+++	-	
포타슘 클로라이드	0.5	-	35.2	17.6
	1.0	-	35.8	17.9

[140] -: 미생성, +: 미량 생성, ++; 소량 생성, +++; 과량 생성, ++++; 전체 침전

[141]

[142] 상기 표 1에 나타난 바와 같이, 염의 종류 및 농도에 따라 상이하기는 하나, 비첨가 대조군에 비해 염 첨가군에서 커플링 수율은 32.3%에서 35.2% 내지 43.5%로 증가하였으며, 총 수율은 16.2%에서 17.6% 내지 21.8%로 증가하였다. 이를 비첨가 대조군의 수율에 대한 변화율로 환산하여, 각각 9 내지 35%의 높은 수치의 커플링 수율 및 총 수율의 증가율을 나타냄을 확인하였다.

[143]

[144] 하기 표 2는 인슐린과 면역글로불린 Fc 단편을 포함하는 결합체 제조시 커플링 반응액에 2.0 M 소디움 클로라이드 또는 1.5 M 소디움 아세테이트를 첨가하였을 경우, 제조된 최종 결합체의 순도를 나타낸다. 크기배제 크로마토그래피(size exclusion chromatography, 이하 SE) 및 이온교환 크로마토그래피(ion exchange chromatography, 이하 IE)를 이용한 HPLC 분석법을 수행하여 순도를 이중으로 확인하였다.

[145] 표 2

[Table 2]

염	결합체에 대한 HPLC 순도 분석 결과
2.0 M 소디움 클로라이드	SE 98.1%, IE 98.5%
1.5 M 소디움 아세테이트	SE 96.2%, IE 96.9%

[146]

청구범위

[청구항 1] (1) 비펩타이드성 중합체를 생리활성 폴리펩타이드 또는 면역글로불린 불변영역 중 어느 하나와 반응시키는 단계; 및
(2) 염 존재하에, 상기 단계 (1)의 반응혼합물을 생리활성 폴리펩타이드 또는 면역글로불린 불변영역 중 다른 하나와 반응시키는 단계를 포함하는 생리활성 폴리펩타이드 - 비펩타이드성 중합체 - 면역글로불린 불변영역 결합체의 제조방법.

[청구항 2] 제1항에 있어서,
상기 비펩타이드성 중합체는 양 말단에 각각 독립적으로 알데하이드 유도체, 말레이미드 유도체 및 석신이미드 유도체로 이루어진 군으로부터 선택되는 반응기를 갖는 것인 제조방법.

[청구항 3] 제2항에 있어서,
비펩타이드성 중합체는 상기 양 말단의 반응기를 통해 생리활성 폴리펩타이드 및 면역글로불린 불변영역과 각각 공유결합으로 연결되는 것인 제조방법.

[청구항 4] 제1항에 있어서,
상기 단계 (1) 이후, 반응혼합물로부터 생리활성 폴리펩타이드 - 비펩타이드성 중합체 연결체 또는 면역글로불린 불변영역 - 비펩타이드성 중합체 연결체를 분리하는 단계를 더 포함하는 제조방법.

[청구항 5] 제1항에 있어서,
상기 염은 소디움 클로라이드(sodium chloride), 소디움 아세테이트(sodium acetate), 소디움 설페이트(sodium sulfate), 소디움 포스페이트(sodium phosphate), 소디움 카보네이트(sodium carbonate), 소디움 시아나이드(sodium cyanide), 소디움 시트레이트(sodium citrate), 소디움 나이트레이트(sodium nitrate), 포타슘 클로라이드(potassium chloride), 포타슘 아세테이트(potassium acetate), 포타슘 설페이트(potassium sulfate), 포타슘 포스페이트(potassium phosphate), 포타슘 카보네이트(potassium carbonate), 포타슘 시아나이드(potassium cyanide), 포타슘 시트레이트(potassium citrate), 포타슘 나이트레이트(potassium nitrate), 마그네슘 클로라이드(magnesium chloride), 마그네슘 아세테이트(magnesium acetate), 마그네슘 설페이트(magnesium sulfate), 마그네슘 포스페이트(magnesium phosphate), 마그네슘 카보네이트(magnesium carbonate), 마그네슘 시아나이드(magnesium cyanide), 마그네슘 시트레이트(magnesium

citrate), 마그네슘 나이트레이트(magnesium nitrate), 암모늄 클로라이드(ammonium chloride), 암모늄 아세테이트(ammonium acetate), 암모늄 설페이트(ammonium sulfate), 암모늄 포스페이트(ammonium phosphate), 암모늄 카보네이트(ammonium carbonate), 암모늄 시아나이드(ammonium cyanide), 암모늄 시트레이트(ammonium citrate), 암모늄 나이트레이트(ammonium nitrate), 칼슘 클로라이드(calcium chloride), 칼슘 아세테이트(calcium acetate), 칼슘 설페이트(calcium sulfate), 칼슘 포스페이트(calcium phosphate), 칼슘 카보네이트(calcium carbonate), 칼슘 시아나이드(calcium cyanide), 칼슘 시트레이트(calcium citrate) 또는 칼슘 나이트레이트(calcium nitrate)로 구성된 군으로부터 선택된 것인 제조방법.

[청구항 6] 제5항에 있어서,
상기 염은 소디움 클로라이드, 소디움 아세테이트, 소디움 설페이트, 소디움 포스페이트 및 포타슘 클로라이드로 구성된 군으로부터 선택된 것인 제조방법.

[청구항 7] 제1항에 있어서,
상기 염은 0.1 내지 3.0 M의 최종농도로 첨가되는 것인 제조방법.

[청구항 8] 제7항에 있어서,
상기 염은 0.3 내지 2.5 M의 최종농도로 첨가되는 것인 제조방법.

[청구항 9] 제6항에 있어서,
상기 염이 소디움 클로라이드인 경우 3.0 M 미만, 소디움 아세테이트인 경우 2.5 M 미만, 소디움 설페이트인 경우 0.7 M 미만, 소디움 포스페이트인 경우 0.8 M 미만 또는 포타슘 클로라이드인 경우 1.0 M 이하의 최종농도로 첨가되는 것인 제조방법.

[청구항 10] 제1항에 있어서,
상기 단계 (2)의 반응 시간은 4 내지 18 시간인 제조방법.

[청구항 11] 제1항에 있어서,
상기 단계 (2)의 반응 온도는 0 내지 25℃인 제조방법.

[청구항 12] 제2항에 있어서,
상기 비펩타이드성 중합체가 하나 이상의 알데하이드 유도체를 반응기로 갖는 경우, 반응혼합물에 추가로 환원제를 1 내지 100 mM의 최종농도로 포함하는 것인 제조방법.

[청구항 13] 제1항에 있어서,
(1) 단계는 pH 5.0 내지 6.5에서 (2) 단계는 pH 6.0 내지 8.5의 조건에서 수행되는 것인 제조방법.

[청구항 14] 제1항에 있어서,

(1) 단계에서 비펩타이드성 중합체를 생리활성 폴리펩타이드와 반응시키고, (2) 단계에서 (1) 단계의 반응 혼합물을 면역글로불린 불변영역과 반응시키는 것인 제조방법.

[청구항 15] 제14항에 있어서,
(1) 단계는 생리활성 폴리펩타이드와 비펩타이드성 중합체를 1:1 내지 1:20의 몰비로 반응시키고,
(2) 단계는 (1) 단계 생성물과 면역글로불린 불변영역을 1:0.5 내지 1:10의 몰비로 반응시키는 것인 제조방법.

[청구항 16] 제15항에 있어서,
(2) 단계는 소디움 클로라이드인 경우 3.0 M 미만, 소디움 아세테이트인 경우 2.5 M 미만, 소디움 설페이트인 경우 0.7 M 미만, 소디움 포스페이트인 경우 0.8 M 미만 또는 포타슘 클로라이드인 경우 1.0 M 이하의 최종농도로 첨가하여 수행되는 것인 제조방법.

[청구항 17] 제1항에 있어서,
상기 비펩타이드성 중합체의 반응기가 각각 생리활성 폴리펩타이드 및 면역글로불린 불변영역의 N-말단 아민기 또는 Lys 잔기 측쇄의 아민기에 결합되는 것인 제조방법.

[청구항 18] 제1항에 있어서,
상기 비펩타이드성 중합체는 폴리에틸렌 글리콜, 폴리프로필렌 글리콜, 에틸렌 글리콜과 프로필렌 글리콜의 공중합체, 폴리옥시 에틸화 폴리올, 폴리비닐 알콜, 폴리사카라이드, 덱스트란, 폴리비닐 에틸 에테르, PLA(폴리락트산, polylactic acid), PLGA(폴리락틱-글리콜산, polylactic-glycolic acid), 지질 중합체, 키틴, 히아루론산 및 이들의 조합으로 구성된 군으로부터 선택되는 것인 제조방법.

[청구항 19] 제1항에 있어서,
상기 비펩타이드성 중합체는 폴리에틸렌 글리콜인 제조방법.

[청구항 20] 제1항에 있어서,
상기 비펩타이드성 중합체는 분자량이 1 내지 100 kDa 범위인 것인 제조방법.

[청구항 21] 제1항에 있어서,
상기 면역글로불린 불변영역은 비당쇄화됨을 특징으로 하는 것인 제조방법.

[청구항 22] 제1항에 있어서,
상기 면역글로불린 불변영역은 CH1, CH2, CH3 및 CH4 도메인으로 이루어진 그룹으로부터 선택된 1개 내지 4개 도메인으로 이루어진 것인 제조방법.

[청구항 23] 제1항에 있어서,
상기 면역글로불린 불변영역은 힌지영역을 추가로 포함하는 것인 제조방법.

[청구항 24] 제1항에 있어서,
면역글로불린 불변영역은 IgG, IgA, IgD, IgE, IgM, 이들의 조합(combination) 및 이들의 하이브리드(hybrid)에 의한 불변영역으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 제조방법.

[청구항 25] 제1항에 있어서,
상기 면역글로불린 불변영역은 IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, 이들의 조합 및 이들의 하이브리드의 불변영역으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 제조방법.

[청구항 26] 제25항에 있어서,
상기 면역글로불린 불변영역은 IgG4 Fc 영역인 것인 제조방법.

[청구항 27] 제26항에 있어서,
상기 면역글로불린 불변영역은 인간 비당쇄화 IgG4 Fc 영역인 것인 제조방법.

[청구항 28] 제1항에 있어서,
상기 생리활성 폴리펩타이드는 인간 성장 호르몬, 성장 호르몬 방출 호르몬, 성장 호르몬 방출 펩타이드, 인터페론, 인터페론 수용체, 콜로니 자극인자, 글루카콘-유사 펩타이드 (GLP-1등), 옥신토모듈린, 지프로테인 관련수용체 (Gprotein-coupled receptor), 인터루킨, 인터루킨 수용체, 효소류, 인터루킨 결합 단백질, 사이토카인 결합 단백질, 마크로파지 활성인자, 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, 적혈구 생성인자, 고 당쇄화 적혈구 생성인자, 안지오포에이틴류, 헤모글로빈, 트롬빈, 트롬빈 수용체 활성 펩타이드, 트롬보모듈린, 혈액인자 VII, VIIa, VIII, IX, 및 XIII, 플라즈미노젠 활성인자, 피브린-결합 펩타이드, 유로키나제, 스트렙토키나제, 히루딘, 단백질 C, C-반응성 단백질, 레닌 억제제, 콜라게나제 억제제, 수퍼옥사이드 디스뮤타제, 렙틴, 혈소판 유래 성장인자, 상피세포 성장인자, 표피세포 성장인자, 안지오스타틴, 안지오텐신, 골 형성 성장인자, 골 형성 촉진 단백질, 칼시토닌, 인슐린, 아트리오펩틴, 연골 유도인자, 엘카토닌, 결합조직 활성인자, 조직인자 경로 억제제, 여포 자극 호르몬, 황체 형성 호르몬, 황체 형성 호르몬 방출 호르몬, 신경 성장인자, 부갑상선 호르몬, 릴랙신, 씨크레틴, 소마토메딘, 인슐린

유사 성장인자, 부신피질 호르몬, 글루카곤, 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 것인 제조방법.

[청구항 29] 제28항에 있어서,
상기 생리활성 폴리펩타이드는 인슐린인 것인 제조방법.

[청구항 30] 제1항에 있어서,
(1) 단계는 pH 5.0 내지 6.5의 조건에서 생리활성 폴리펩타이드와 비펩타이성 중합체를 1:1 내지 1:20의 몰비로 반응시키는 단계이고, (2) 단계는 염 존재하에, pH 6.0 내지 8.5의 조건에서 상기 단계 (1)의 반응혼합물을 면역글로불린 불변영역과 1:0.5 내지 1:10의 몰비로 반응시키는 단계이며, 상기 염은 소디움 클로라이드인 경우 3.0 M 미만, 소디움 아세테이트인 경우 2.5 M 미만, 소디움 설페이트인 경우 0.7 M 미만, 소디움 포스페이트인 경우 0.8 M 미만 또는 포타슘 클로라이드인 경우 1.0 M 이하의 최종농도로 첨가되는 것인 제조방법.