

(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2021-0106384

(43) 공개일자 2021년08월30일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C07K 1/10 (2006.01) A61K 38/31 (2006.01)
A61K 47/12 (2006.01) A61K 47/22 (2017.01)
A61K 47/62 (2017.01) A61K 47/68 (2017.01)
C07K 1/02 (2006.01)

(52) CPC특허분류

C07K 1/10 (2013.01)
A61K 38/31 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2021-0022501

(22) 출원일자 2021년02월19일

심사청구일자 2021년02월19일

(30) 우선권주장

1020200021064 2020년02월20일 대한민국(KR)

(71) 출원인

연세대학교 산학협력단

서울특별시 서대문구 연세로 50 (신촌동, 연세대학교)

(72) 발명자

정진현

경기도 고양시 일산동구 정발산로 95, 803동 104호 (마두동, 정발마을8단지청구빌라)

전주현

서울특별시 송파구 위례성대로12길 25, 102동 301호 (방이동, 신구블레스밸리아파트)

김정동

경기도 부천시 신흥로276번길 15, 105동 1203호 (중동, 래미안부천중동)

(74) 대리인

특허법인다나

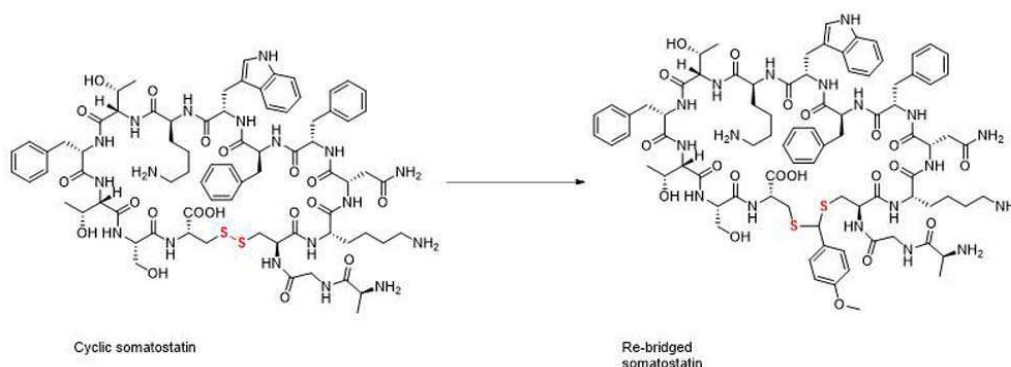
전체 청구항 수 : 총 10 항

(54) 발명의 명칭 단백질의 환원된 이황화 결합을 알데히드 작용기를 포함하는 단일탄소링커로 재연결하는 신규한 방법

(57) 요약

본 발명은 이황화 결합이 존재하는 단백질 내 이황화 결합을 환원한 후 알데히드 작용기를 포함한 단일탄소링커를 이용해 재연결하는 신규한 합성방법에 관한 것이다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

A61K 47/12 (2013.01)

A61K 47/22 (2013.01)

A61K 47/62 (2017.08)

A61K 47/6889 (2017.08)

C07K 1/02 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

| | |
|-------------|--|
| 과제고유번호 | 1465028652 |
| 과제번호 | HI16C0179020019 |
| 부처명 | 보건복지부 |
| 과제관리(전문)기관명 | 한국보건산업진흥원 |
| 연구사업명 | 질환극복기술개발사업 |
| 연구과제명 | [withKHIDI](2세부) 맞춤형 중앙 제어를 위한 다중표적 항체-약물 플랫폼 개발(4/4 |
| 년) | (2016.04.01.~2019.03.31.) |
| 기 여 율 | 1/1 |
| 과제수행기관명 | 연세대학교 산학협력단 |
| 연구기간 | 2019.01.01 ~ 2019.03.31 |

명세서

청구범위

청구항 1

이황화 결합(disulfide bond)을 포함하는 단백질에서 상기 이황화 결합을 환원시키는 단계; 및

상기 이황화 결합이 환원된 단백질 및 알데히드 작용기를 포함하는 단일탄소링커를 반응시켜 이황화 결합을 재연결시키는 단계를 포함하는

환원된 이황화결합을 재연결시키는 방법.

청구항 2

제 1 항에 있어서,

이황화 결합을 포함하는 단백질은 소마토스타틴(somatostatin), 라이소자임(lysozyme), 단사슬 Fv 절편(single-chain Fv fragment, ScFvOx), 인터페론 α -2b(interferon α -2b), 알파-락트알부민(α -lactalbumin), 콜레시스토키닌 방출 펩타이드(CCK-releasing peptide), 칼시토닌(calcitonin), 코노톡신(conotoxins), 아파민(apamin), 엔도텔린(endothelin), 뇌하수체 후엽 펩타이드(posterior pituitary peptide), β -hANP(antiparallel dimer of α -ANP), μ -코노톡신(μ -Conotoxins(geographutoxins)), ω -코노톡신(ω -Conotoxin), 호박 트립신 저해제(C. maximatrypsin inhibitor), 디펜신(defensins), 카리브도톡신(charybdotoxin), 누에의 small PTTH인 bombyxins, 말미잘 신경독(sea anemone neurotoxin), 사람 인슐린(human insulin), 상피세포성장인자(epidermal growth factors), 소 췌장 트립신 저해제(bovine pancreatic trypsin inhibitor), C5a 아나필락톡신(C5a anaphylatoxin), 엔지오제닌(angiogenin), 에키스타틴(echistatin), 엘라핀(elafin), RNA 분해효소 A(ribonuclease A), 베타-1,4-엔도글루카나제(β -1,4 endoglucanase, EGPh) 및 항체(antibody)로 이루어진 그룹으로부터 선택된 하나 이상인 환원된 이황화 결합을 재연결시키는 방법.

청구항 3

제 1 항에 있어서,

이황화 결합을 환원시키는 단계는 환원제의 존재하에서 수행되며,

상기 환원제는 트리스(2-클로로에틸)인산염(Tris(2-carboxyethyl) phosphine, TCEP), β -메트캅토에탄올(β -mercaptoethanol), 디티오프레이톨(Dithiothreitol, DTT) 및 글루타티온(glutathione, GSH)으로 이루어진 그룹으로부터 선택된 하나 이상인 환원된 이황화 결합을 재연결시키는 방법.

청구항 4

제 3 항에 있어서,

환원제의 당량은 이황화 결합을 포함하는 단백질 1 equiv. 대비 0.1 내지 10 equiv. 인 환원된 이황화 결합을 재연결시키는 방법.

청구항 5

제 1 항에 있어서,

이황화 결합을 환원시키는 단계는 18 내지 40℃에서 30 분 내지 5 시간 동안 수행되는 것인 환원된 이황화 결합

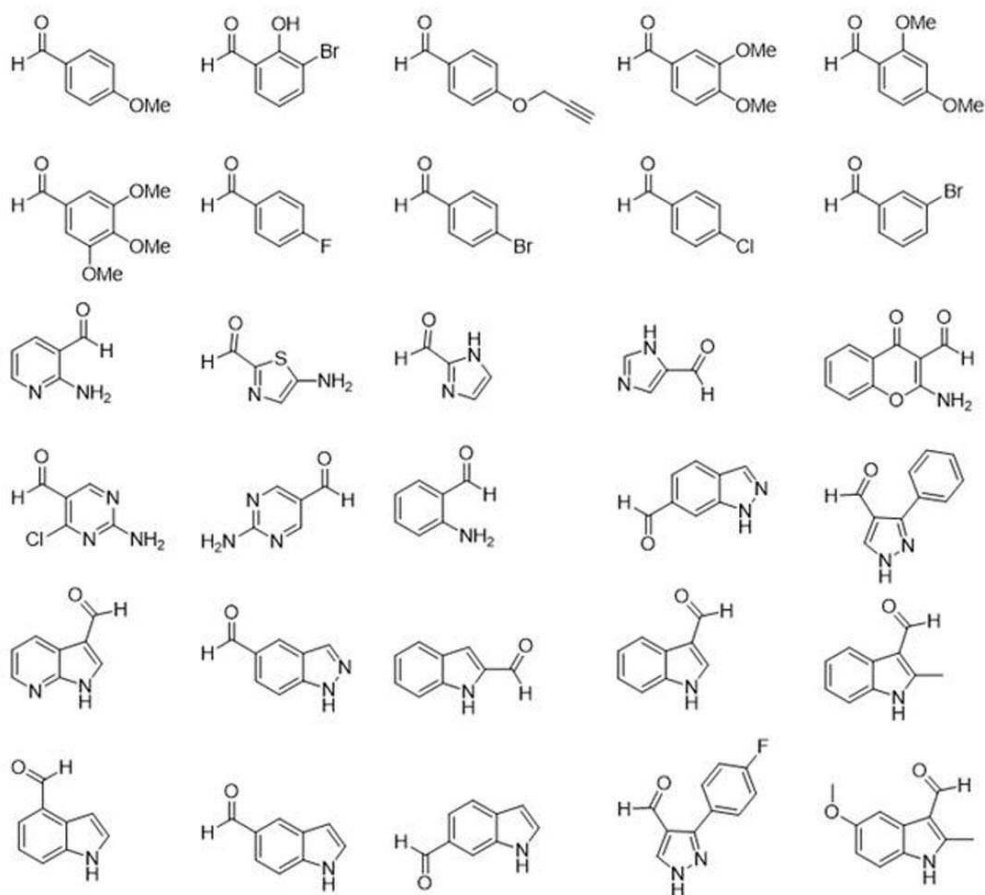
을 재연결시키는 방법.

청구항 6

제 1 항에 있어서,

알데히드 작용기를 포함하는 단일탄소링커는 하기의 화학식 2로 표현되는 화합물인 것인 환원된 이황화 결합을 재연결시키는 방법.

[화학식 2]



청구항 7

제 1 항에 있어서,

알데히드 작용기를 포함하는 단일탄소링커의 당량은 이황화 결합을 포함하는 단백질 1 equiv. 대비 1 내지 1,000 equiv. 인 환원된 이황화 결합을 재연결시키는 방법.

청구항 8

제 1 항에 있어서,

이황화 결합을 재연결시키는 단계는 촉매의 존재하에서 수행되며,

상기 촉매는 Cu(I)계 촉매, Cu(II)계 촉매, Zn(II)계 촉매 및 Hg(II)계 촉매로 이루어진 그룹으로부터 선택된 하나 이상인 환원된 이황화 결합을 재연결시키는 방법.

청구항 9

제 1 항에 있어서,

이황화 결합을 재연결시키는 단계는 18 내지 45℃에서 1 내지 5 시간 동안 수행되는 것인 환원된 이황화 결합을 재연결시키는 방법.

청구항 10

제 1 항에 있어서,

재연결된 이황화 결합은 -S-C-S-의 구조를 가지는 것인 환원된 이황화 결합을 재연결시키는 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 이황화 결합이 존재하는 단백질 내 이황화 결합을 환원한 후 알데히드 작용기를 포함하는 단일탄소링커를 이용해 재연결하는 신규한 합성방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 이황화 결합이 존재하는 단백질의 이황화 결합을 환원한 후 탄소다리링커를 이용해 재연결하는 연구는 항체-약물접합(Antibody-drug conjugates, ADCs) 또는 단백질-약물접합(Protein-drug conjugates, PDCs)의 개발에 이용된다. 탄소다리링커의 말단에 연결된 항암제나 진단용 방사성동위원소 등 접합된 링커-약물의 종류에 따라 새로운 단백질 의약품을 만들 수 있다.

[0004] 단백질 이황화 결합의 재연결시 두 개 이상의 탄소다리를 이용하는 경우(비특허문헌 1), 두 황 원자 사이에 있는 두 개 이상의 탄소다리는 한 개의 탄소다리에 비해 그 길이가 길어 단백질 3차 구조를 더 많이 변형시킬 우려가 있다.

[0005] 본 발명자들은 알데히드 작용기를 포함한 단일탄소링커를 사용하여 단백질 내 환원된 이황화 결합을 연결해 기존 링커보다 우수한 단일탄소링커가 접합된 단백질을 합성하였다.

선행기술문헌

비특허문헌

[0007] (비특허문헌 0001) 1. Chem. Commun., 2013, 49, 8187 Chem. Sci., 2016, 7, 799 Bioconjugate Chem. 2014, 25, 1124-1136

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 본 발명은 이황화 결합이 존재하는 단백질 내 상기 이황화 결합을 환원한 후 알데히드 작용기를 포함하는 단일탄소링커를 이용해 재연결하는 신규한 합성방법을 제공하는 것을 목적으로 한다.

과제의 해결 수단

- [0010] 상기와 같은 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 이황화 결합(disulfide bond)을 포함하는 단백질에서 상기 이황화 결합을 환원시키는 단계; 및
- [0011] 상기 이황화 결합이 환원된 단백질 및 알데히드 작용기를 포함하는 단일탄소링커를 반응시켜 이황화 결합을 재연결시키는 단계를 포함하는 환원된 이황화 결합을 재연결시키는 방법을 제공한다.

발명의 효과

- [0013] 본 발명은 알데히드 작용기를 포함하는 단일탄소링커로 환원된 단백질의 이황화 결합을 재연결하는 신규한 합성 방법을 제공한다. 본 발명에서는 알데히드 작용기를 포함하는 단일탄소링커를 사용함으로써, 상기 재연결된 이황화 결합은 단백질에 반응하지 않아 상기 단백질의 3차원 변성이 적으며 안정성을 증가시킬 수 있다.
- [0014] 본 발명의 합성 방법은 새로운 단백질 의약품을 개발하는 공정에서 플랫폼 기술로서 사용될 수 있다.
- [0015] 본 발명의 효과는 상기한 효과로 한정되는 것은 아니며, 본 발명의 상세한 설명 또는 청구범위에 기재된 발명의 구성으로부터 추론 가능한 모든 효과를 포함하는 것으로 이해되어야 한다.

도면의 간단한 설명

- [0017] 도 1은 실시예 1에 따른 재연결 소마토스타틴 합성의 전체 scheme을 나타낸 것이다.
- 도 2는 단일탄소링커를 첨가하지 않은 대조군을 액체크로마토그래피-질량분석기(Liquid Chromatography-Mass Spectrometry, LC-MS)의 총이온 크로마토그램(Total Ion Chromatogram, TIC)으로 나타낸 것이다.
- 도 3은 단일탄소링커를 첨가하지 않은 대조군을 액체크로마토그래피-질량분석기(LC-MS)의 추출 이온 크로마토그램(Extracted Ion Chromatogram, EIC)으로 나타낸 것이다.
- 도 4는 단일탄소링커를 첨가하지 않은 대조군을 액체크로마토그래피-질량분석기(LC-MS)의 Mass-to-charge(m/z)로 나타낸 것이다.
- 도 5는 단일탄소링커를 10 당량 넣은 실험군인 재연결-소마토스타틴(Re-bridged somatostatin)을 액체크로마토그래피-질량분석기(LC-MS)의 총이온 크로마토그램(TIC)으로 나타낸 것이다.
- 도 6은 단일탄소링커를 50 당량 넣은 실험군인 재연결-소마토스타틴을 액체크로마토그래피-질량분석기(LC-MS)의 총이온 크로마토그램(TIC)으로 나타낸 것이다.
- 도 7은 단일탄소링커를 100 당량 넣은 실험군인 재연결-소마토스타틴을 액체크로마토그래피-질량분석기(LC-MS)의 총이온 크로마토그램(TIC)으로 나타낸 것이다.
- 도 8은 단일탄소링커를 500 당량 넣은 실험군인 재연결-소마토스타틴을 액체크로마토그래피-질량분석기(LC-MS)의 총이온 크로마토그램(TIC)으로 나타낸 것이다.
- 도 9는 단일탄소링커를 10 당량 넣은 실험군인 재연결-소마토스타틴을 액체크로마토그래피-질량분석기(LC-MS)의 추출 이온 크로마토그램(EIC)으로 나타낸 것이다.
- 도 10은 단일탄소링커를 50 당량 넣은 실험군인 재연결-소마토스타틴을 액체크로마토그래피-질량분석기(LC-MS)의 추출 이온 크로마토그램(EIC)으로 나타낸 것이다.
- 도 11은 단일탄소링커를 100 당량 넣은 실험군인 재연결-소마토스타틴을 액체크로마토그래피-질량분석기(LC-MS)의 추출 이온 크로마토그램(EIC)으로 나타낸 것이다.
- 도 12는 단일탄소링커를 10 당량 넣은 실험군인 재연결-소마토스타틴을 액체크로마토그래피-질량분석기(LC-MS)의 Mass-to-charge(m/z)로 나타낸 것이다.
- 도 13은 단일탄소링커를 50 당량 넣은 실험군인 재연결-소마토스타틴을 액체크로마토그래피-질량분석기(LC-MS)의 Mass-to-charge(m/z)로 나타낸 것이다.

도 14는 단일탄소링커를 100 당량 넣은 실험군인 재연결-소마토스타틴을 액체크로마토그래피-질량분석기(LC-MS)의 Mass-to-charge(m/z)로 나타낸 것이다.

도 15는 실험군에서 재연결-소마토스타틴의 면적(Peak area, Abundance), 즉 단백질의 상대적인 양을 나타낸 그래프이다.

도 16은 단일탄소링커의 당량에 따른 총이온 크로마토그램의 머무름 시간(Retention time, RT)을 나타낸 그래프이다. A는 0 당량, B는 10 당량, C는 50 당량, D는 100 당량, E는 500 당량이다.

도 17은 단일탄소링커의 당량에 따른 추출이온 크로마토그램의 그래프의 면적(Peak area), 즉 단백질의 상대적인 양을 나타낸 그래프이다. A-C는 소마토스타틴, D-F는 환원된 소마토스타틴, G-I는 재연결-소마토스타틴이다.

도 18은 실시예 2에 따른 재연결 소마토스타틴 합성의 전체 scheme을 나타낸 것이다.

도 19는 단일탄소링커를 첨가하기 전의 중간 반응물(somatostatin(reduced form))을 액체크로마토그래피-질량분석기(LC-MS)의 총이온 크로마토그램(TIC) 및 추출 이온 크로마토그램(EIC)으로 나타낸 것이다.

도 20 및 21은 단일탄소링커를 첨가하기 전의 중간 반응물을 액체크로마토그래피-질량분석기의 Mass-to-charge(m/z)로 나타낸 것이다.

도 22는 단일탄소링커를 첨가한 실험군인 재연결-소마토스타틴을 액체크로마토그래피-질량분석기(LC-MS)의 총이온 크로마토그램(TIC) 및 추출 이온 크로마토그램(EIC)으로 나타낸 것이다.

도 23 및 24는 단일탄소링커를 첨가한 실험군인 재연결-소마토스타틴을 액체크로마토그래피-질량분석기(LC-MS)의 Mass-to-charge(m/z)로 나타낸 것이다.

도 25는 소마토스타틴 재연결 실험의 TIC 및 EIC 데이터를 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

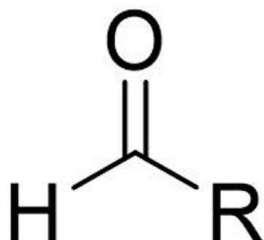
- [0018] 본 발명은 다양한 변경을 가할 수 있고 여러 가지 실시예를 가질 수 있는 바, 특정 실시예들을 도면에 예시하고 상세한 설명에 상세하게 설명하고자 한다.
- [0019] 그러나, 이는 본 발명을 특정한 실시 형태에 대해 한정하려는 것이 아니며, 본 발명의 사상 및 기술 범위에 포함되는 모든 변경, 균등물 내지 대체물을 포함하는 것으로 이해되어야 한다.
- [0021] 본 발명은 단백질의 환원된 이황화 결합을 알데히드 작용기를 포함하는 단일탄소링커로 재연결하는 방법에 관한 것이다.
- [0022] 본 발명에서는 이황화 결합을 포함하는 단백질에서 상기 이황화 결합을 환원시키는 단계(이하, 이황화 결합 환원 단계); 및
- [0023] 상기 이황화 결합이 환원된 단백질 및 알데히드 작용기를 포함하는 단일탄소링커를 반응시켜 이황화 결합을 재연결시키는 단계(이하, 이황화 결합 재연결 단계)를 통해 단백질의 환원된 이황화 결합을 재연결할 수 있다.
- [0024] 본 발명에서 이황화 결합 환원 단계 및 이황화 결합 재연결 단계는 하나의 반응기 내에서 동시에 수행될 수 있으며, 또는 순차적으로 수행될 수 있다. 즉, 반응기에 이황화 결합을 포함하는 단백질, 환원제 및 단일탄소링커를 첨가하여 이황화 결합 환원 단계 및 이황화 결합 재연결 단계를 동시에 수행할 수 있으며, 또는 이황화 결합을 포함하는 단백질 및 환원제를 반응시켜 이황화 결합 환원 단계를 수행한 후, 단일탄소링커를 첨가한 후 반응시켜 이황화 결합 재연결 단계를 수행할 수 있다.
- [0026] 본 발명에서 이황화 결합 환원 단계는 이황화 결합을 포함하는 단백질에서 상기 이황화 결합을 환원시키는 단계이다.
- [0027] 본 발명에서 이황화 결합(disulfide bond 또는 disulfide bridge)은 두 개의 싸이올(R-SH) 작용기 사이에 형성된 공유 결합을 의미한다. 이러한 이황화 결합은 R-S-S-R 또는 -S-S-로 표현할 수 있다. 본 발명에서 이황화 결합을 포함하는 단백질은 그 구조 내에 하나 이상의 이황화 결합을 포함하는 단백질을 의미한다.

- [0028] 상기 이황화 결합은 수소 결합, 소수성 상호작용 등과 더불어 단백질의 구조를 안정화시키는 역할을 할 수 있다. 즉, 단백질 내에 존재하는 이황화 결합은 단백질의 3차 구조를 안정화시킬 수 있다.
- [0029] 본 발명에서 이황화 결합이 환원된 단백질을 중간 반응물, 또는 "환원된 단백질"이라 표현할 수 있다. 예를 들어, 단백질로 소마토스타틴을 사용할 경우, 상기 단계의 생성물을 환원된 소마토스트틴(somatostatin(reduced form))이라 표현할 수 있다.
- [0030] 일 구체예에서, 이황화 결합을 포함하는 단백질의 종류는 특별히 제한되지 않는다. 본 발명에서는 예를 들어, 소마토스타틴(somatostatin), 라이소자임(lysozyme), 단사슬 Fv 절편(single-chain Fv fragment, ScFvOx), 인터페론 α -2b(interferon α -2b), 알파-락탈부민(α -lactalbumin), 콜레시스토키닌 방출 펩타이드(CCK-releasing peptide), 칼시토닌(calcitonin), 코노톡신(conotoxins), 아파민(apamin), 엔도텔린(endothelin), 뇌하수체 후엽 펩타이드(posterior pituitary peptide), β -hANP(antiparallel dimer of α -ANP), μ -코노톡신(μ -Conotoxins(geographutoxins)), ω -코노톡신(ω -Conotoxin), 호박 트립신 저해제(C. maximatrypsin inhibitor), 디펜신(defensins), 카리브도톡신(charybdotoxin), 누에의 small PTTH인 bombyxins, 말미잘 신경독(sea anemone neurotoxin), 사람 인슐린(human insulin), 상피세포성장인자(epidermal growth factors), 소 췌장 트립신 저해제(bovine pancreatic trypsin inhibitor), C5a 아나필락톡신(C5a anaphylatoxin), 엔지오제닌(angiogenin), 에키스타틴(echistatin), 엘라핀(elafin), RNA 분해효소 A(ribonuclease A), 베타-1,4-엔도글루카나제(β -1,4 endoglucanase, EGPh) 및 항체(antibody)로 이루어진 그룹으로부터 선택된 하나 이상을 사용할 수 있다. 이때, 항체는 full antibody, Half antibody 또는 Fab 등일 수 있다.
- [0031] 본 발명의 실시예에서는 이황화 결합을 포함하는 단백질로 소마토스타틴을 사용하여, 상기 소마토스타틴의 이황화 결합을 환원시킨 후, 재연결시키는 공정을 수행하였다.
- [0032] 일 구체예에서, 단백질 중의 이황화 결합의 환원은 환원제의 존재하에서 수행할 수 있다.
- [0033] 상기 환원제의 종류는 단백질의 이황화 결합을 환원시킬 수 있다면 특별히 제한되지 않으며, 예를 들어, 트리스(2-클로로에틸)인산염(Tris(2-carboxyethyl) phosphine, TCEP), β -메르카프토에탄올(β -mercaptoethanol), 디티오트레이톨(Dithiothreitol, DTT) 및 글루타티온(glutathione, GSH)으로 이루어진 그룹으로부터 선택된 하나 이상을 사용할 수 있다.
- [0034] 상기 환원제의 당량은 이황화 결합을 포함하는 단백질 1 equiv. 대비 0.1 내지 10 equiv. 또는 1 내지 3 equiv.일 수 있다. 상기 함량 범위에서 이황화 결합의 환원이 용이하게 수행될 수 있으며, 0.1 equiv. 미만이면 환원물이 저하되며, 10 equiv.를 초과할 경우 반응하지 않고 남은 환원제가 존재하게 되므로, 적절한 당량을 사용하는 것이 좋다.
- [0035] 일 구체예에서, 이황화 결합 환원 단계는 단백질이 첨가된 물과 완충용액을 혼합한 상태에서, 일정 비율의 유기용매 및 환원제를 첨가한 후 반응시키는 방법으로 수행될 수 있다.
- [0036] 상기 완충용액은 인산완충생리식염수(Phosphate-buffered saline, PBS) 및 붕산염완충식염수(Borate-buffered saline, BBS)로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상일 수 있다. 또한, 유기용매는 다이메틸 설폭사이드(Dimethyl sulfoxide, DMSO) 및 테트라하이드로퓨란(Tetrahydrofuran, THF)으로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상일 수 있다.
- [0037] 일 구체예에서, 이황화 결합 환원 단계는 18 내지 40℃, 18 내지 27℃ 또는 20 내지 25℃에서 30 분 내지 5 시간 30 분 또는 90 분 동안 수행될 수 있다.
- [0038] 일 구체예에서, 이황화 결합을 포함하는 단백질에서 상기 이황화 결합의 환원율은 50 내지 100% 또는 70 내지 100%일 수 있다.
- [0039] 본 발명에서 이황화 결합 재연결 단계는 적절한 이황화 결합 환원 단계를 통해 환원된 이황화 결합을 재연결하는 단계로서, 상기 이황화 결합이 환원된 단백질 및 알데히드 작용기를 포함하는 단일탄소링커를 반응시킨다.
- [0040] 본 발명에서는 상기 이황화 결합이 환원된 단백질 및 알데히드 작용기를 포함하는 단일탄소링커의 반응을 재연결(re-bridge) 반응이라 표현할 수 있으며, 상기 단계를 통해 이황화 결합이 재연결된 단백질을 "재연결(re-bridge) 단백질"이라 표현할 수 있다.
- [0041] 본 발명에서 알데히드 작용기를 포함하는 단일탄소링커는 단백질 내 환원된 이황화 결합을 재연결하는 역할을 수행할 수 있다.

[0042] 상기 알데히드 작용기를 포함하는 단일탄소링커는 내부에 한 개 이상의 알데히드 작용기를 가지는 소분자(small molecule)를 의미한다. 상기 단일탄소링커는 알데히드기를 포함함으로써 단백질의 3차 구조의 변형을 최소화할 수 있다.

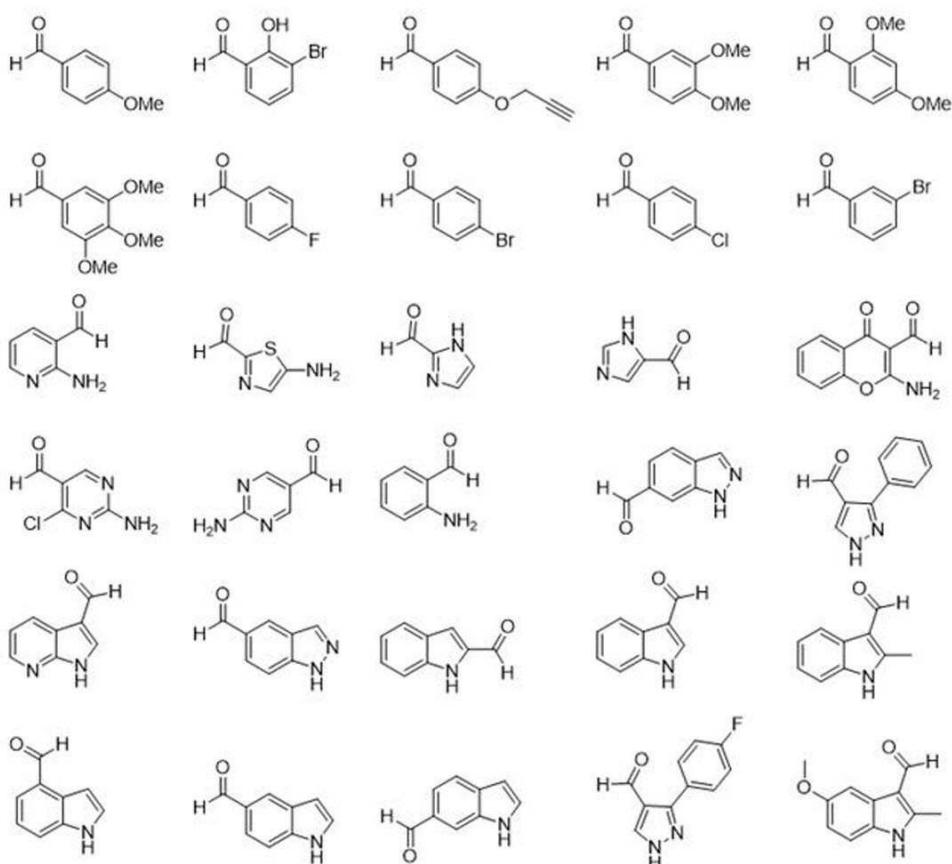
[0043] 일 구체예에서, 단일탄소링커는 하기 화학식 1로 표현되는 화합물일 수 있다.

[0045] [화학식 1]



[0048] 상기 화학식 1로 표현되는 화합물로 하기 화학식 2로 표현되는 화합물을 제한 없이 사용할 수 있다.

[0050] [화학식 2]



[0051]

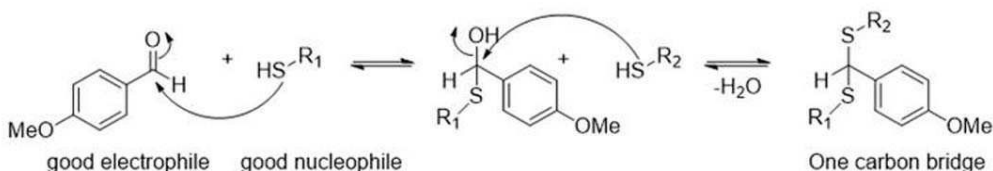
[0053] 구체적으로, 단일탄소링커는 4-아니스알데히드(4-Anisaldehyde, 4-Methoxybenzaldehyde), 3-브로모살리실알데히드(3-Bromosalicylaldehyde), 4-(프로파르길옥시)벤즈알데히드(4-(Propargyloxy)benzaldehyde), 3,4-디메톡시벤즈알데히드(3,4-Dimethoxybenzaldehyde), 2,4-디메톡시벤즈알데히드(2,4-Dimethoxybenzaldehyde), 3,4,5-

트리메톡시벤즈알데히드(3,4,5-Trimethoxybenzaldehyde), 4-4-플루오로벤즈알데히드(Fluorobenzaldehyde), 4-브로모벤즈알데히드(4-Bromobenzaldehyde), 4-클로로벤즈알데히드(4-Chlorobenzaldehyde), 3-브로모벤즈알데히드(3-Bromobenzaldehyde), 2-아미노니코틴알데히드(2-Aminonicotinaldehyde), 5-아미노티아디아졸-2-카르발데히드(5-aminothiazole-2-carbaldehyde), 이미다졸-2-카르복스알데히드(Imidazole-2-carboxaldehyde), 아미다졸-4-카르복스알데히드(Imidazole-4-carboxaldehyde), 2-아미노-3-포르밀크로몬(2-Amino-3-formylchromone), 2-아미노-4-클로로피리미딘-5-카르발데히드(2-amino-4-chloropyrimidine-5-carbaldehyde), 2-아미노피리미딘-5-카복스알데히드(2-Aminopyrimidine-5-carboxaldehyde), 2-아미노벤즈알데히드(2-Aminobenzaldehyde), 1H-인다졸-6-카복스알데히드(1H-Indazole-6-carboxaldehyde), 3-페닐-1H-피라졸-4-카복스알데히드(3-Phenyl-1H-pyrazole-4-carboxaldehyde), 7-아자인돌-3-카복스알데히드(7-Azaindole-3-carboxaldehyde), 인다졸-5-카복스알데히드(Indazole-5-carboxaldehyde), 인다졸-2-카복스알데히드(Indole-2-carboxaldehyde), 인다졸-3-카복스알데히드(Indole-3-carboxaldehyde), 2-메틸인돌-3-카복스알데히드(2-Methylindole-3-carboxaldehyde), 인돌-4-카르복스알데히드(Indole-4-carboxaldehyde), 인돌-5-카르복스알데히드(Indole-5-carboxaldehyde), 인돌-6-카르복스알데히드(Indole-6-carboxaldehyde), 3-(4-플로오로페닐)피라졸-4-카르복스알데히드(3-(4-Fluorophenyl)pyrazole-4-carboxaldehyde) 및 5-메톡시-2-메틸-1H-인돌-3-카르발데히드(5-Methoxy-2-methyl-1H-indole-3-carbaldehyde)로 이루어진 그룹으로부터 선택된 하나 이상일 수 있다.

[0054] 특히, 본 발명에서는 말단에 알카인(Alkyne) 작용기를 가지는 알데히드를 단백질에 연결할 수 있다. 이를 통해 알카인에 다른 약물(예: 아지드 작용기(Azido group), $R-N_3$)을 연결할 수 있는 가능성을 확보할 수 있다. 이는 본 발명에 따른 단일탄소링커에 다른 약물을 연결하여 새로운 항체약물접합체(Antibody-drug Conjugate, ADC) 혹은 단백질약물접합체(Protein-drug Conjugate, PDC)를 합성하여 신약개발에 중요한 플랫폼기술로 활용될 수 있음을 의미한다.

[0055] 일 구체예에서, 단일탄소링커로 4-아니스알데히드(4-Anisaldehyde, 4-Methoxybenzaldehyde)를 사용할 경우, 하기 반응식 1과 같은 반응을 통해 환원된 이황화 결합을 재연결할 수 있다. 구체적으로, 4-아니스알데히드의 알데히드 작용기는 카보닐 탄소가 한 개이며, 상기 탄소에 두 개의 -SH 작용기가 결합하여 -S-C-S-가 제조될 수 있다. 즉, “단일탄소”로 재연결(re-bridged)된 단백질이 제조될 수 있다.

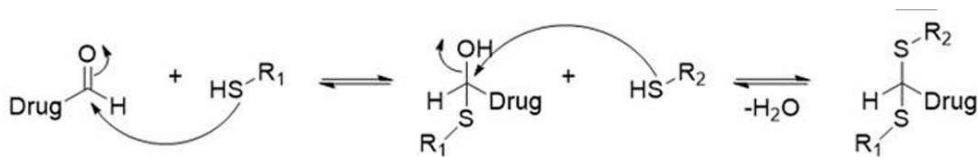
[0057] [반응식 1]



[0058]

[0060] 또한, 단일탄소링커의 단일탄소, 즉, 알데히드기를 구성하는 탄소 원자는 두 -SH를 연결시킬 뿐만 아니라, 하기 반응식 2와 같이 탄소의 결합팔을 이용하여 다른 화합물에 연결될 수 있으므로 “단일탄소” 링커로 기능할 수도 있다.

[0062] [반응식 2]



[0063]

[0065] 상기 단일탄소링커를 사용하여 재연결된 -S-C-S- 구조를 가지는 이황화 결합의 결합길이는 기존 이황화 결합(-S-S-의 구조)의 길이와 큰 차이를 보이지 않으며, 이황화 결합을 환원시키는 약물에 반응하지 않으므로 안정성

이 증가할 수 있다.

- [0066] 종래 기술에서는 링커화합물로서 두 개의 탄소다리를 포함하는 링커화합물을 사용하였다. 이러한 화합물로는 예를 들어, Dibromomaleimide(DBM)이 있다. 상기 DBM을 사용할 경우, 단일탄소링커에 비해 연결되는 황과 황 사이의 결합이 더 멀고, 대부분 이중 결합으로 연결된 탄소이므로 결합 후 체내에서 쉽게 해리될 우려가 높다.
- [0067] 즉, 본 발명에 따른 알데히드기를 포함하는 단일탄소링커를 사용하는 것이 단백질의 안정성 측면에서 바람직하다.
- [0068] 일 구체예에서, 알데히드 작용기를 포함하는 단일탄소링커의 당량은 이황화 결합을 포함하는 단백질 1 equiv. 대비 1 내지 1,000 equiv., 1 내지 500 equiv. 또는 10 내지 400 equiv.일 수 있다.
- [0069] 일 구체예에서, 이황화 결합 재연결 단계는 촉매의 존재하에서 수행할 수 있다.
- [0070] 상기 촉매로 Cu(I)계 촉매, Cu(II)계 촉매, Zn(II)계 촉매 및 Hg(II)계 촉매로 이루어진 그룹으로부터 선택된 하나 이상을 사용할 수 있으며, 구체적으로 Zn(II)계 촉매인 염화아연을 사용할 수 있다.
- [0071] 상기 촉매의 당량은 이황화 결합을 포함하는 단백질 1 equiv. 대비 0.01 내지 10 equiv.일 수 있다.
- [0072] 일 구체예에서, 이황화 결합 재연결 단계는 하나의 반응기 내에서 이황화 결합 환원 단계와 동시에 수행될 수 있다. 또는, 이황화 결합 환원 단계의 반응 결과물에 알데히드 작용기를 포함하는 단일탄소링커 화합물과 반응 촉매를 함께 혼합 및 반응시키는 방법으로 수행할 수 있다.
- [0073] 일 구체예에서, 이황화 결합 재연결 단계는 18 내지 45℃ 또는 30 내지 45℃에서 1 내지 5 시간 동안 수행될 수 있다.
- [0074] 일 구체예에서, 이황화 결합의 재연결율은 0.5 내지 90%, 0.5 내지 30% 또는 20 내지 80% 또는 50 내지 80%일 수 있다. 재연결율은 환원된 소마토스타틴을 기준으로 재연결된 소마토스타틴의 비율을 나타낸다.
- [0075] 본 발명에서 재연결된 이황화 결합은 -S-C-S-의 구조를 가질 수 있다.
- [0076] 본 발명의 실시예에서는 적절한 촉매와 환원제를 함유한 수용액에서 소마토스타틴을 환원하고 다시 연결하였다. 그 결과 단일탄소링커의 당량에 따라 재연결 패턴이 다른 것을 확인하였다. 또한, alkyne을 포함하는 단일탄소링커 10 당량을 링커로 사용할 수 있음을 알아 냈는데, 이 재연결 조건을 이용하면 항체나 펩타이드에 적용하여 다양한 ADC(Antibody-drug Conjugate)와 PDC(Peptide-drug Conjugate)를 합성할 수 있다. 또한, MS-QTOF를 사용하여 소마토스타틴과 재연결 소마토스타틴의 상대적 정량화에 성공하였다.
- [0078] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 바람직한 실시예를 제시한다. 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐 본 발명의 범주 및 기술사상 범위 내에서 다양한 변경 및 수정이 가능함은 당업자에게 있어서 명백한 것이며, 이러한 변경 및 수정이 첨부된 특허청구범위에 속하는 것도 당연한 것이다.
- [0080] **실시예**
- [0081] **실시예 1.**
- [0082] 하기의 방법으로 소마토스타틴의 이황화 결합을 환원시킨 후 재연결시켰다.
- [0083] 반응에 사용된 화합물의 당량과 반응 조건은 하기 표 1과 같다.
- [0085] 1. 1 ml ep 튜브에 인산완충생리식염수(Phosphate-buffered saline, PBS)와 소마토스타틴(somatostatin) 20 μ L (1.0 equiv., 약 0.75 mM)를 첨가하였다.
- [0086] 2. 튜브에 트리스(2-클로로에틸)인산염(Tris(2-carboxyethyl) phosphine, TCEP)을 첨가한 다음 다이메틸 설펝사이드(Dimethyl sulfoxide, DMSO)를 첨가하였다.
- [0087] 3. 4-아니스알데히드(4-Methoxybenzaldehyde)(표 1에 Aldehyde로 기재함)를 튜브에 첨가하였다.
- [0088] (각각, 0, 10, 50, 100, 500 euiv)

4. 염화 아연(Zinc chloride, ZnCl_2) 용액을 첨가하고, 37 °C에서 3 시간 동안 반응시켰다. 이때, 염화아연은 테트라하이드로퓨란(Tetrahydrofuran, THF)에 녹아있다.

5. 3 시간 후, Sep-Pak 필터로 반응 혼합물을 여과하고, 모든 액체를 증발시켰다.

6. 여과 후, 잔류물을 용출 완충액(elution buffer)으로 용해시키고 LC-MS/Q-ToF로 분석하였다.

표 1

| | Entry 1 | Entry 2 | Entry 3 | Entry 4 | Entry 5 |
|----------------------|----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-------------------------------|-------------------------------------|
| 소마토스타틴 | 20 ul (1 equiv.) | 20 ul (1 equiv.) | 20 ul (1 equiv.) | 20 ul (1 equiv.) | 20 ul (1 equiv.) |
| Aldehyde* | 0 ul (diluted) 0 equiv. | 1 ul (diluted) 10 equiv. | 5 ul (diluted) 50 equiv. | 10 ul (diluted) 100 equiv. | 0.93 ul (not diluted) 500 equiv. |
| ZnCl_2^{**} | 1 ul (diluted) | 1 ul (diluted) | 1 ul (diluted) | 1 ul (diluted) | 1 ul (diluted) |
| TCEP | 3 ul (diluted) | 3 ul (diluted) | 3 ul (diluted) | 3 ul (diluted) | 3 ul (diluted) |
| Buffer(PBS) | 80 ul (diluted) | 80 ul (diluted) | 80 ul (diluted) | 80 ul (diluted) | 80 ul (diluted) |
| DMSO(10% v/v) | 10.44 ul (diluted) | 9.44 ul (diluted) | 5.44 ul (diluted) | 0.44 ul (diluted) | 9.51 ul (diluted) |
| V(total) | 114.44 ul | 114.44 ul | 114.44 ul | 114.44 ul | 114.44 ul |

*Aldehyde solution: 1.86 ul of aldehyde and 98.14 ul of DMSO mixed. (1 ul = 10 equiv.)

**Zinc Chloride solution: 30.525 ul and 969.475 ul mixed. (1 ul = 1 equiv.)

도 1은 본 발명에 따른 공정의 전체 합성 도식을 표현한 그림이다.

소마토스타틴의 이황화 결합은 환원제에 의해 환원된 다음, 단일탄소링커에 의해 재연결된다.

실험예 1. 액체크로마토그래피-질량분석(LC-MS/Q-ToF) 결과

도 2 내지 도 14은 실시예 1에서의 단일탄소링커를 첨가하지 않은 대조군(환원된 소마토스타틴 포함) 및 합성 완료된 물질인 재연결 소마토스타틴을 액체크로마토그래피-질량분석기에 넣고 분석한 결과를 나타낸다.

먼저, 도 2는 단일탄소링커를 첨가하지 않은 대조군을 액체크로마토그래피-질량분석기(Liquid Chromatography-Mass Spectrometry, LC-MS)의 총이온 크로마토그램(Total Ion Chromatogram, TIC)으로 나타낸 것이다.

도 3은 단일탄소링커를 첨가하지 않은 대조군을 액체크로마토그래피-질량분석기(LC-MS)의 추출 이온 크로마토그램(Extracted Ion Chromatogram, EIC)으로 나타낸 것이다.

또한, 도 4는 단일탄소링커를 첨가하지 않은 대조군을 액체크로마토그래피-질량분석기(LC-MS)의 Mass-to-charge(m/z)로 나타낸 것이다.

상기 도 2 내지 도 4에 나타난 바와 같이, 소마토스타틴이 환원제와 반응하여 이황화 결합이 끊어진 것을 확인할 수 있다.

실시예 1의 Entry 1-5에서 모든 당량은 소마토스타틴을 기준으로하며, 단일탄소링커(linker)의 당량은 0, 10, 50, 100, 500의 다섯 가지로 나누어 반응을 진행하였다.

본 발명에서 도 5, 도 9 및 도 12는 단일탄소링커를 10 당량, 도 6, 도 10 및 도 13은 50 당량, 도 7, 도 11 및 도 14는 100 당량의 단일탄소링커를 각각 첨가한 반응의 총이온 크로마토그램(TIC), 추출이온크로마토그램(EIC) 및 Mass-to-charge(m/z) 그래프를 나타낸다.

[0109] 상기 도면에 나타난 바와 같이, 소마토스타틴이 환원제와 반응하여 이황화 결합이 끊어지며, 10, 50 및 100의 단일탄소링커를 첨가한 반응용기에서 재연결-소마토스타틴(Re-bridged somatostatin)이 검출되었음을 확인할 수 있다.

[0110] 다만, 도 8에 나타난 바와 같이, 단일탄소링커를 500 당량 첨가한 반응의 경우, 재연결된 형태의 소마토스타틴이 검출되지 않은 것을 확인할 수 있다. 이는 단백질이 소수성 링커와 응집(aggregation)하고, 응집에 의해 전체 단백질의 양이 줄어들어, 이에 따라 검출한계를 벗어나 재연결 소마토스타틴이 관찰되지 않은 것으로 예측된다.

[0112] 한편, 전술한 도면을 통해 단일탄소링커의 당량에 따른 생성물의 상대적인 양을 확인할 수 있으며, 이를 표 2에 수치화하였다. 표 2에서 재연결 비율(Re-bridging percentage)는 환원된 소마토스타틴을 기준으로 재연결된 소마토스타틴의 비율을 나타낸다.

표 2

| Equiv. of linker | 10 | 50 | 100 | 500 |
|----------------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|
| Area of non-bridged form | 1.58*10 ⁷ | 1.66*10 ⁷ | 2.81*10 ⁶ | 8.65*10 ⁴ |
| Area of bridged form | 1.25*10 ⁵ | 1.84*10 ⁶ | 6.22*10 ⁵ | 0 (not detected) |
| Re-bridging Percentage (%) | 0.79 | 11.13 | 22.14 | 0 |

[0114]

[0116] 상기 표 2에 나타난 바와 같이, 알데히드 당량에 따른 재연결 비율을 비교한 결과, 알데히드 100 당량을 첨가했을 때 재연결 비율이 가장 높은 것을 확인할 수 있다.

[0118] 도 15는 실험군에서 재연결-소마토스타틴(Re-bridged somatostatin)의 면적(Peak area, Abundance), 즉 단백질의 상대적인 양을 나타낸 그래프이다.

[0119] 상기 도 15에 나타난 바와 같이, 알데히드 100 당량을 첨가했을 때 재연결 비율이 가장 높은 것을 확인할 수 있다.

[0121] 한편, 도 16 및 17은 각각 단일탄소링커의 당량에 따른 총이온 크로마토그램과 추출이온 크로마토그램을 도식화한 그래프이다.

[0122] 도 16은 소마토스타틴 재연결 실험의 TIC 데이터이다. 도 16에서 (A), (B), (C), (D), (E)는 각각 0(단일탄소링커를 사용하지 않음), 10, 50, 100, 500 당량의 단일탄소링커를 사용한 경우를 나타낸다. 검출된 소마토스타틴의 머무름 시간(Retention time, RT)은 7-8분 사이이며, 재연결-소마토스타틴의 머무름 시간은 10-10.9분 사이이다. 재연결 소마토스타틴은 (B), (C) 및 (D)에서 검출된 것을 확인할 수 있다.

[0123] 도 17은 소마토스타틴 재연결 실험의 EIC 데이터로, 단일탄소링커의 당량에 따른 추출이온 크로마토그램의 그래프의 면적(Peak area), 즉 단백질의 상대적인 양을 나타낸다. A-C는 소마토스타틴, D-F는 환원된 소마토스타틴, G-I는 재연결-소마토스타틴(Re-bridged somatostatin)이다.

[0124] 전술한 TIC, EIC 및 Mass-to-Charge(m/z) 데이터를 통해, 10, 50, 100 당량의 알데히드 작용기를 포함하는 링

커를 첨가한 반응에서 소마토스타틴의 재연결(re-bridging) 결과를 가지는 것을 확인할 수 있다.

[0126] **실시예 2.**

[0127] 하기의 방법으로 소마토스타틴의 이황화 결합을 환원시킨 후 재연결시켰다.

[0129] 1. stirring bar가 들어있는 10 mL 바이알에 소마토스타틴 분말 1.0 equiv.(5.0 μmol) 및 물 30 μL 를 첨가하였다.

[0130] 2. 물 420 μL 에 TCEP \cdot HCl (2.0 equiv.) 및 K_2CO_3 (3.0 equiv.)을 녹인 용액을 첨가한 다음, 실온에서 1 시간 동안 교반하였다.

[0131] 3. 바이알에 트리에틸아민(triethylamine) 15.0 equiv를 첨가하고, 4-(프로파르길옥시)벤즈알데히드(4-(Propargyloxy)benzaldehyde) 10.0 equiv 및 ZnCl_2 1.0 equiv. 용액(in THF)을 상기 바이알에 순차적으로 첨가하였다.

[0132] 4. 반응 혼합물을 실온에서 밤새 교반 하였다.

[0133] 5. 반응이 끝난 후, 혼합물을 동결 건조한 다음, LC-MS/Q-ToF로 분석하였다.

[0135] 도 18은 본 발명에 따른 공정의 전체 합성 도식을 표현한 그림이다.

[0136] 소마토스타틴의 이황화 결합은 환원제에 의해 환원된 다음, 단일탄소링커에 의해 재연결된다.

[0138] **실험예 2. 액체크로마토그래피-질량분석(LC-MS/Q-ToF) 결과**

[0139] 도 19 내지 24는 실시예 2에서의 중간 반응물인 환원된 소마토스타틴 및 합성 완료된 물질인 재연결 소마토스타틴을 액체크로마토그래피-질량분석기에 넣고 분석한 결과를 나타낸다.

[0140] 먼저, 도 19는 단일탄소링커를 넣기 전의 중간 반응물, 즉 환원된 소마토스타틴을 액체크로마토그래피-질량분석기(LC-MS)의 총이온 크로마토그램(TIC, 위의 그래프) 및 추출 이온 크로마토그램(EIC, 아래 그래프)으로 나타낸 것이다.

[0141] 또한, 도 20 및 21은 단일탄소링커를 첨가하기 전의 중간 반응물, 즉 환원된 소마토스타틴을 액체크로마토그래피-질량분석기의 Mass-to-charge(m/z)로 나타낸 것이다.

[0142] 상기 도 19 내지 21에 나타난 바와 같이, 소마토스타틴이 환원제와 반응하여 이황화 결합이 끊어진 것을 확인할 수 있다.

[0144] 실시예 2에서는 모든 당량은 소마토스타틴을 기준으로하며, 단일탄소링커(linker)의 당량은 10으로 하여 반응을 진행하였다.

[0145] 본 발명에서 도 22는 단일탄소링커를 첨가한 실험군인 재연결-소마토스타틴(Re-bridged somatostatin)을 액체크로마토그래피-질량분석기(LC-MS)의 총이온 크로마토그램(TIC) 및 추출 이온 크로마토그램(EIC)으로 나타낸 것이다.

[0146] 또한, 도 23 및 24는 단일탄소링커를 첨가한 실험군인 재연결-소마토스타틴을 액체크로마토그래피-질량분석기(LC-MS)의 Mass-to-charge(m/z)로 나타낸 것이다.

[0147] 상기 도면에 나타난 바와 같이, 소마토스타틴이 환원제와 반응하여 이황화 결합이 끊어지며, 단일탄소링커를 첨가한 반응용기에서 재연결-소마토스타틴(Re-bridged somatostatin)이 검출되었음을 확인할 수 있다.

[0149] 한편, 전술한 도면을 통해 단일탄소링커의 첨가에 따른 생성물의 상대적인 양을 확인할 수 있으며, 이를 표 3에

수치화하였다.

표 3

| | |
|----------------------------|---------|
| Equiv. of linker | 10 |
| Area of non-bridged form | 138,072 |
| Area of bridged form | 204,942 |
| Re-bridging Percentage (%) | 59.75 |

[0151]

[0153] 실시예 2에 따른 10 당량의 알데히드에서 재연결 비율을 실시예 1(10 당량의 알데히드 사용)과 비교했으며, 재연결 속도는 4-아니스알데히드(4-methoxybenzaldehyde)를 사용하는 것보다 우수한 것을 확인할 수 있다.

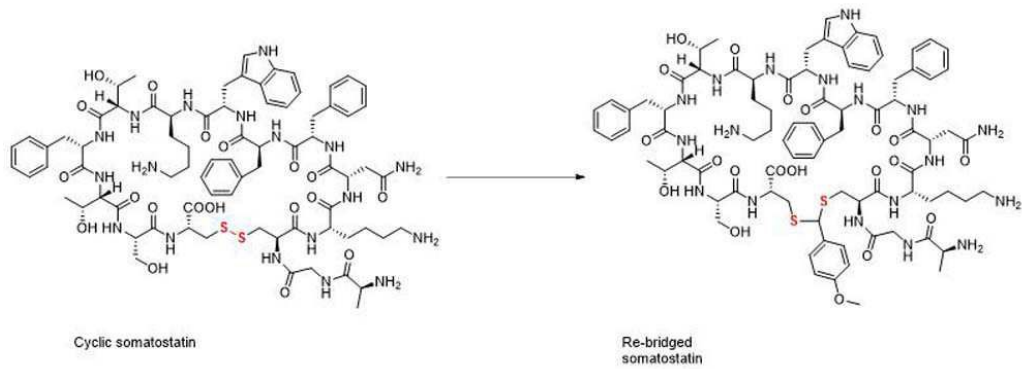
[0154] 또한, 4-(프로파르길옥시)벤즈알데히드(4-(Propargyloxy)benzaldehyde)를 단일탄소링커로 사용하고, 일부 반응 조건(예: K_2CO_3 사용, 시약의 양 조절 등)을 추가 및 수정한 결과, 재연결이 더욱 개선된 것을 확인할 수 있다.

[0156] 한편, 도 25는 소마토스타틴 재연결 실험의 TIC 및 EIC 데이터를 나타낸다.

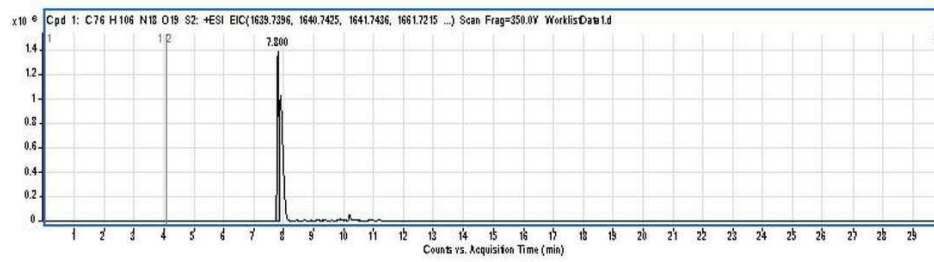
[0157] TIC, EIC, Mass-to-charge(m/z) 데이터를 통해 10 당량의 aldehyde를 첨가 한 실험에서 소마토스타틴의 재연결(re-bridging) 결과를 가지는 것을 확인할 수 있다.

도면

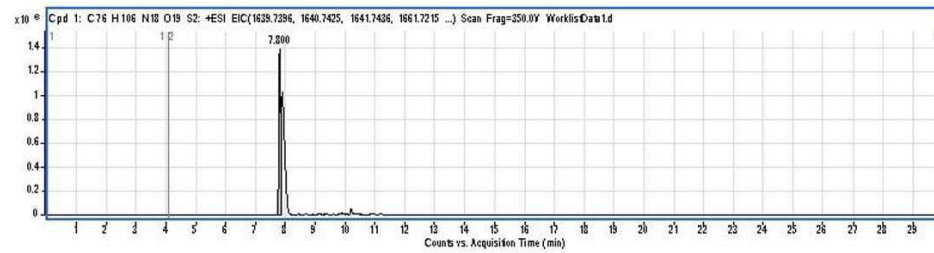
도면1



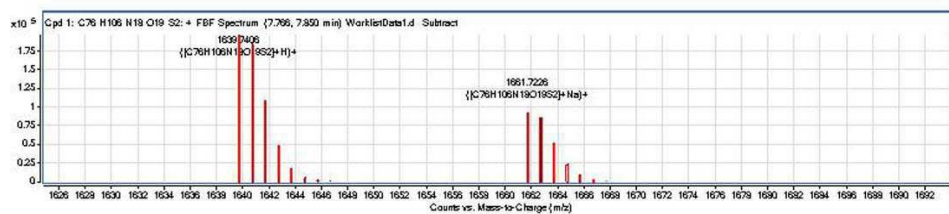
도면2



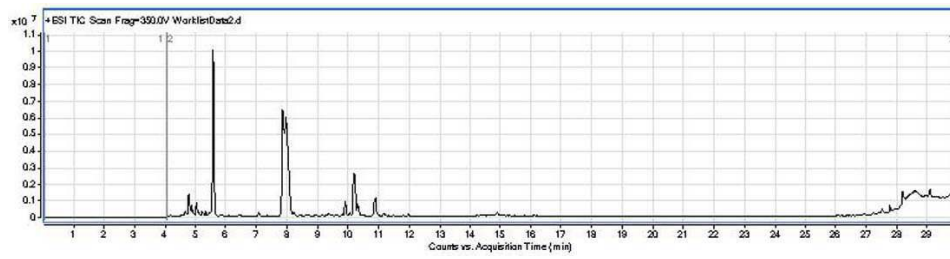
도면3



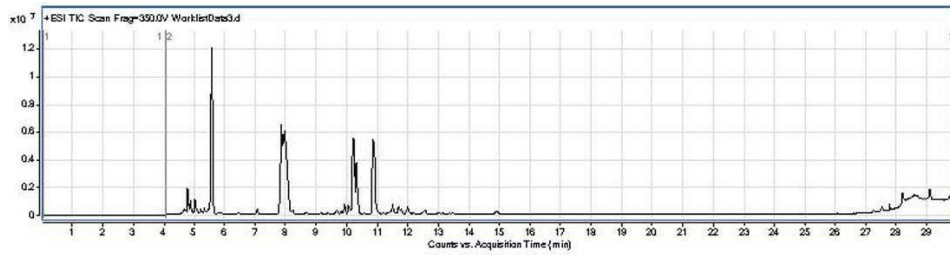
도면4



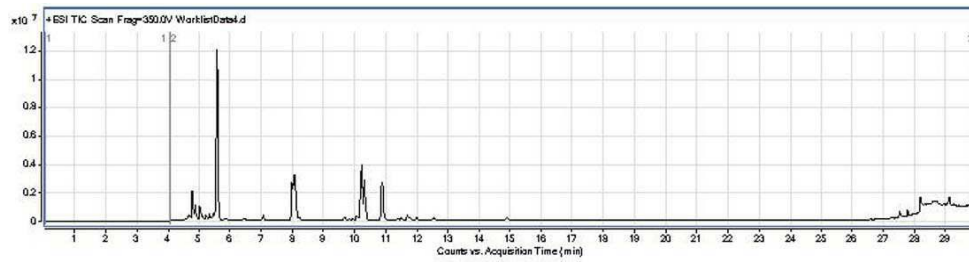
도면5



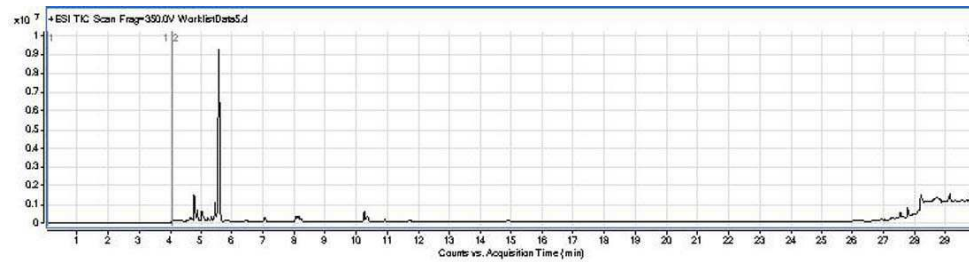
도면6



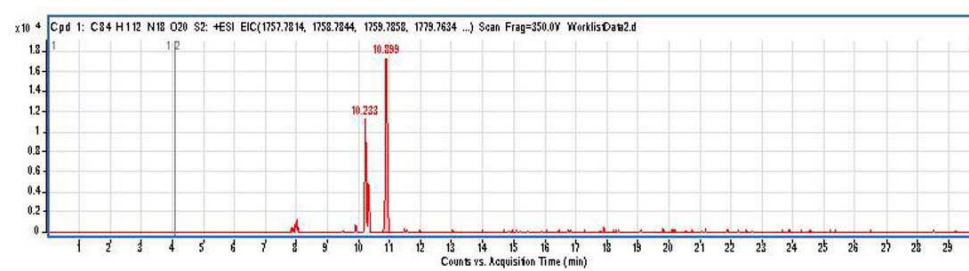
도면7



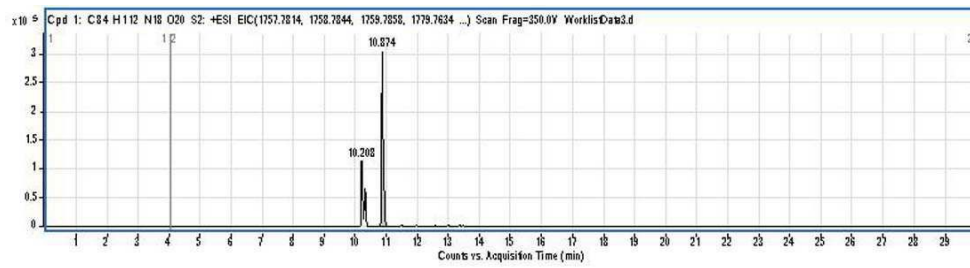
도면8



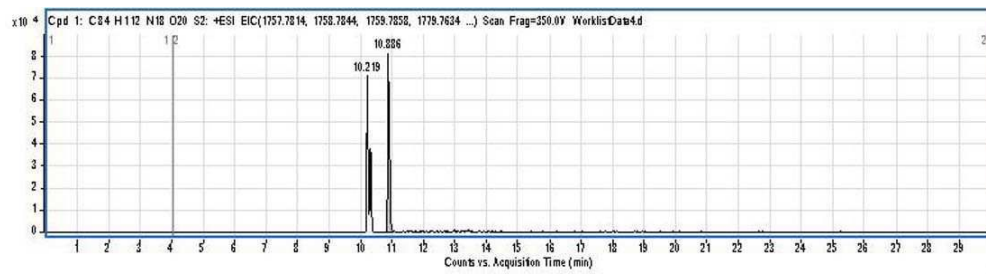
도면9



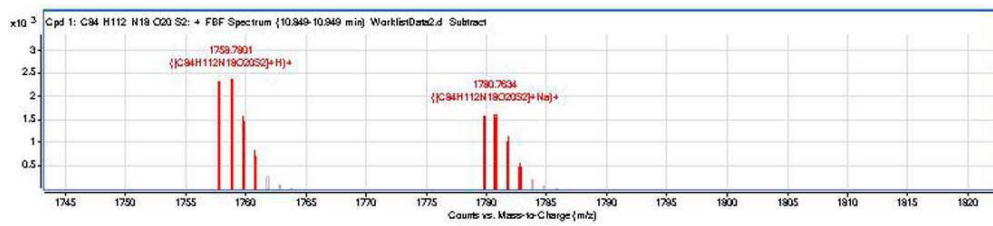
도면10



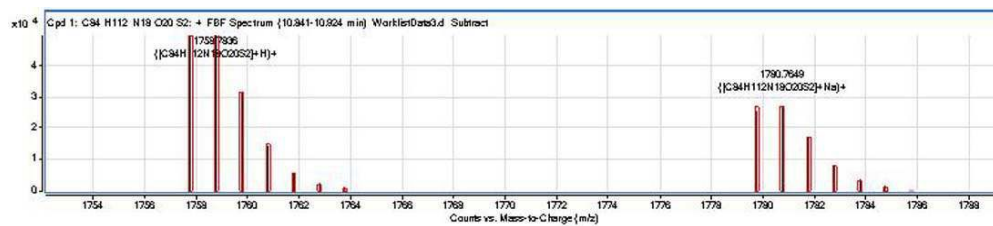
도면11



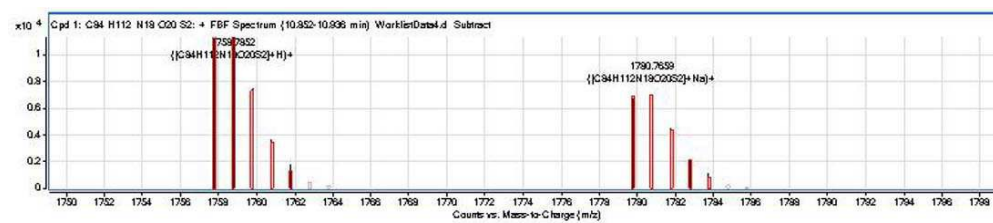
도면12



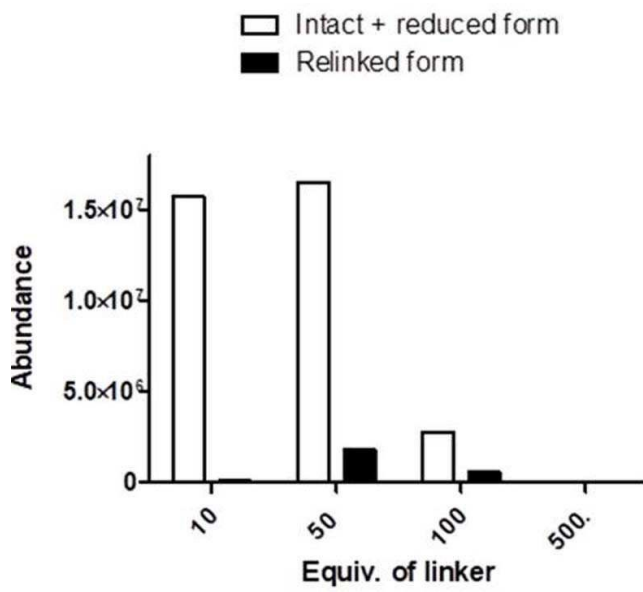
도면13



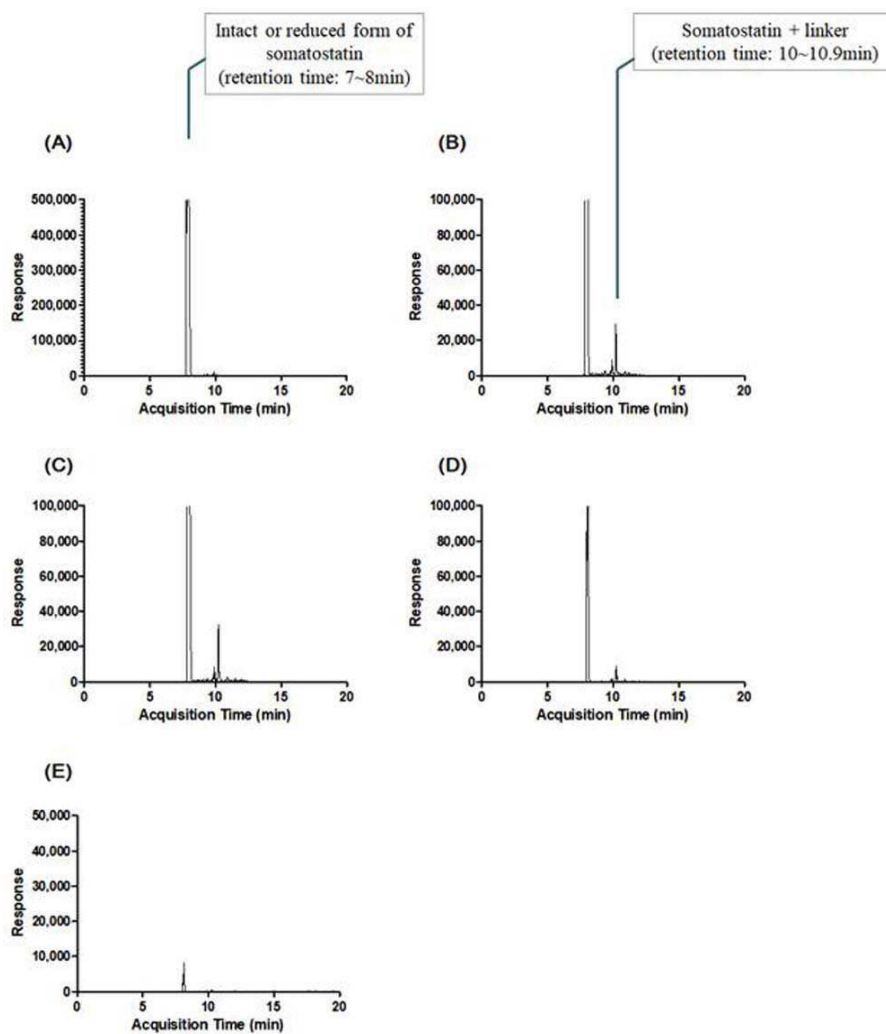
도면14



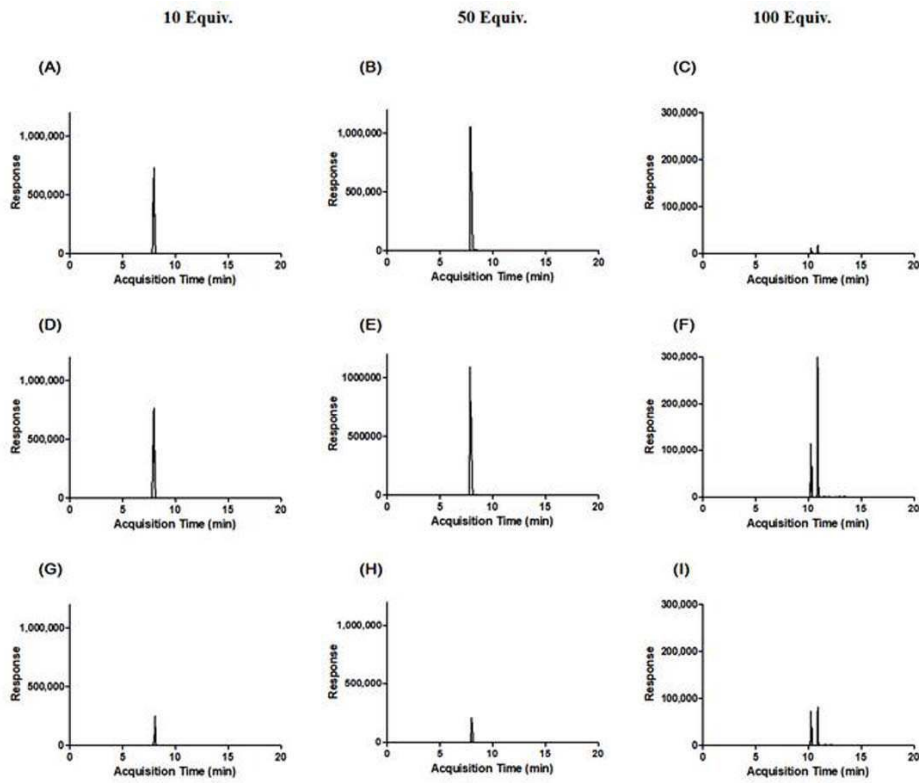
도면15



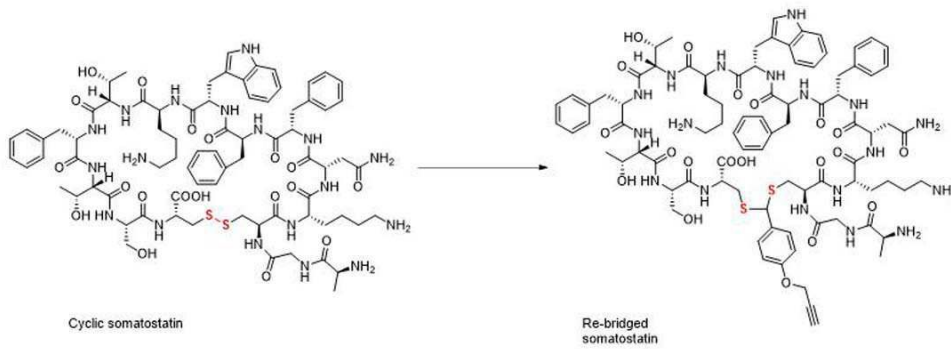
도면16



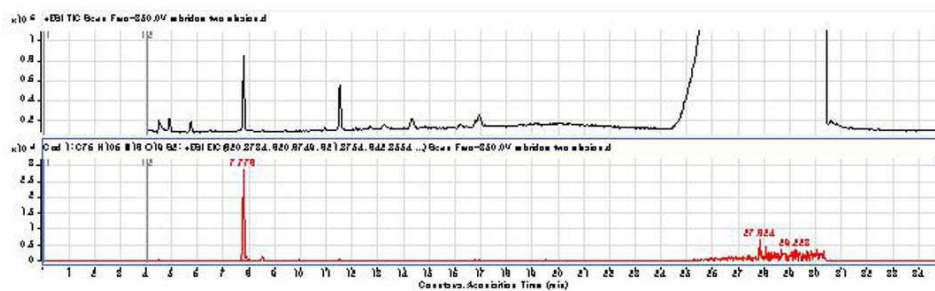
도면17



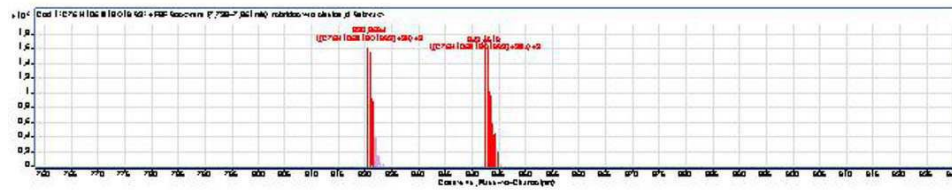
도면18



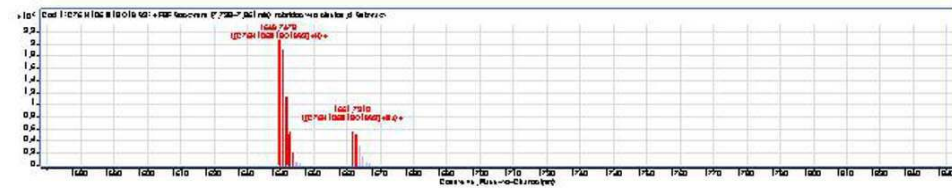
도면19



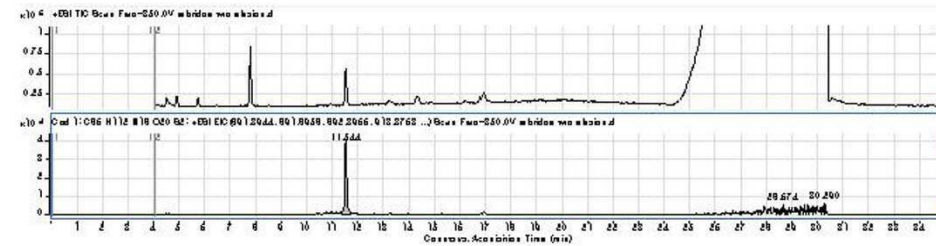
도면20



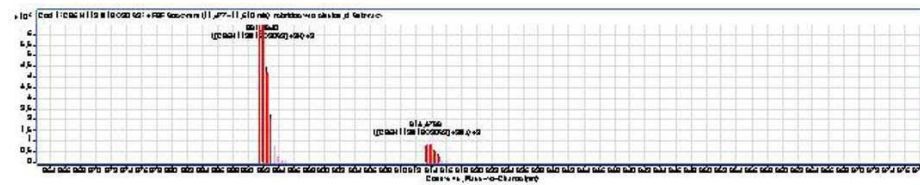
도면21



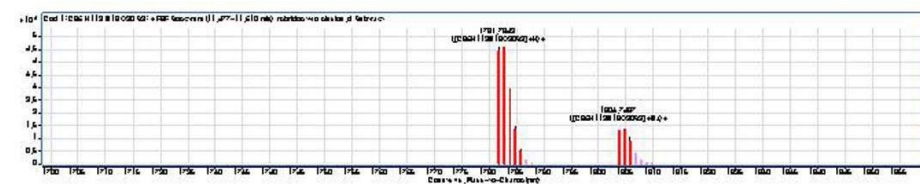
도면22



도면23



도면24



도면25

