명세서

발명의 명칭: 치료학적 효소 융합단백질의 파브리병에 기인하거나 동반되는 신경병증 예방 및 치료 용도

기술분야

[1] 본 발명은 치료학적 효소를 포함하는 효소 융합단백질의 파브리병에 기인하거나 동반되는 신경병증의 예방 및 치료 용도에 관한 것이다.

[2]

배경기술

[3] 신경병증(neuropathy)은 당뇨, 외상, 자가면역질환, 신장 질환, 종양, 음주, 유전 질환 등의 다양한 이유로 신경계에 기능적 장애 또는 병적 변화가 일어나는 질병이다. 신경병증의 원인이 되는 유전 질환이자 리소좀 축적 질환 중 하나인 파브리병은 알파 갈락토시다제 (alpha-galactosidase)의 효소 활성 결핍 또는 부족으로 인해 축적된 Gb3 및 lyso-Gb3가 신경계에 영향을 미쳐 다양한 말초신경증상(예를 들어, 말초신경병증(polyneuropathy), 소섬유 신경병증(small fiber neuropathy), 신경병증성 통증)들이 나타나는 것으로 알려져 있다.

[4] 알파 갈락토시다제는 Gb3 (globotriaosylceramide) 및 lyso-Gb3를 락토실세라마이드(lactosylceramide)로 분해하는 효소로서, 상기 효소의 이상에 의해 혈관벽과 신체의 다양한 부위에 Gb3 및 lyso-Gb3가 비정상적으로 축적됨으로써, 파브리병이 발병되는 것으로 알려져 있다. 알파 갈락토시다제의 결함으로 인해 Gb3 및 lyso-Gb3가 세포, 특히 배근 신경절(dorsal root ganglion, DRG) 라고 불리우는 신경세포 집합체에서 침착되면 공포화(vacuolation) 등 세포의 변형이 발생되어 결국 감각 및 감각운동성 장애를 초래한다. 이러한 이유로 파브리병 환자는 온도 감각에 대한 역치가 상승하며 찌르는 듯 하거나 화상을 입은 듯한 견딜 수 없는 말초신경증상이나 자율신경계증상, 중추신경증상 등이 동반된다.

[5] 파브리병을 비롯한 리소좀 축적 질환의 치료를 위한 방법으로, 효소-대체 요법 (ERT: enzyme-replacement therapy)이 주로 연구되고 있다 (Frances M. Platt et al., J Cell Biol. 2012 Nov 26;199(5):723-34). 특히 파브리병은 알파 갈락토시다제의 결함으로 인해 생기는 병이므로, 알파 갈락토시다제의 보충치료가 필수적이다.

[6] 그러나, 이러한 치료 효과를 나타내는 단백질은 일반적으로 안정성이 낮아 쉽게 변성되고, 혈액 내 단백질 가수분해효소에 의해 분해되므로, 혈중 농도 및 활성을 유지하기 위해서는 환자에게 자주 투여해야 한다. 그러나, 혈중 농도를 유지하기 위해 자주 주사를 놓는 것은 환자에게 엄청난 고통을 야기하게 된다. 이러한 문제점을 해결하기 위해, 효소-대체 요법에 이용되는 치료제의 혈중 안정성을 증가시키고 혈중 약물 농도를 오랫동안 높게 지속시키면서 단백질의 활성이 유지되는 치료제의 개발이 필요하다.

[7] 이에, 체내에서 높은 지속성을 가지면서도 말초 감각 신경에 대한 보호 효과를 가져 신경병증을 치료할 수 있는 치료제 개발의 중요성이 대두되고 있다.

[8]

발명의 상세한 설명

기술적 과제

[9] 말초 감각 신경에 대한 보호 효과를 가져 신경병증을 치료할 수 있는 치료제를 개발하는 것이 요구된다.

과제 해결 수단

[10] 본 발명의 하나의 목적은 하기 화학식 1으로 표시되는, 효소 융합단백질을 포함하는 파브리병에 기인하거나 동반되는 신경병증(neuropathy)의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공하는 것이다:

[11] [화학식 1]

[12]

X - L - F
: |
X' - L' - F

[13] 여기서, X 및 X'은 알파 갈락토시다제이고;

[14] L 및 L'은 링커로, 각각 독립적으로 동일하거나 다른 종류의 링커이며;

[15] F는 면역글로불린 Fc 영역의 하나의 폴리펩티드 사슬이며;

[16] |은 공유 결합이고;

[17] :는 공유 또는 비공유 결합임.

[18] 본 발명의 다른 하나의 목적은 상기 효소 융합 단백질 또는 이를 포함하는 조성물을 이를 필요로 하는 개체에 투여하는 단계를 포함하는 파브리병에 기인하거나 동반되는 신경병증(neuropathy)의 예방 또는 치료 방법을 제공하는 것이다.

[19] 본 발명의 또 다른 목적은 파브리병에 기인하거나 동반되는 신경병증(neuropathy)의 예방 또는 치료를 위한 상기 효소 융합 단백질 또는 이를 포함하는 조성물의 용도를 제공하는 것이다.

[20]

발명의 효과

[21] 본 발명은 치료학적 효소를 포함하는 융합단백질의 파브리병에 기인하거나 동반되는 신경병증의 예방 또는 개선 용도에 관한 것으로, 상기 효소 융합단백질은 증가된 지속시간에 의해 환자에게 유용하게 이용될 수 있다.

[22]

도면의 간단한 설명

[23] 도 1은 알파 갈락토시다제-Fc 융합단백질 (α-galactosidase-Fc) 및 아갈시다제 베타의 신경병증 치료 효과를 비교한 결과이다.

[24] 도 2는 알파 갈락토시다제-Fc 융합단백질 (α-galactosidase-Fc) 및 아갈시다제

베타의 배근 신경절에서의 공포화(vacuolation)된 신경세포 수치를 나타낸 결과이다.

[25]

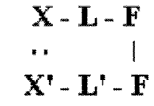
발명의 실시를 위한 최선의 형태

[26] 본 발명을 구현하는 하나의 양태는 치료학적 효소와 면역글로불린 Fc 영역이 융합된 효소 융합단백질을 포함하는 파브리병에 기인하거나 동반되는 신경병증(neuropathy)의 예방 또는 치료용 약학적 조성물이다.

[27] 하나의 구체예에 따른 약학적 조성물로서, 상기 효소 융합단백질은 하기 화학식 1로 표시되는, 효소 융합단백질인 것을 특징으로 한다.

[28] [화학식 1]

[29]



[30] 여기서, X 및 X'은 알파 갈락토시다제이고;

[31] L 및 L'은 링커로, 각각 독립적으로 동일하거나 다른 종류의 링커이며;

[32] F는 면역글로불린 Fc 영역의 하나의 폴리펩티드 사슬이며;

[33] |은 공유 결합이고;

[34] :는 공유 또는 비공유 결합임.

[35] 앞선 구체예 중 어느 하나에 따른 약학적 조성물로서, 상기 효소는 X와 X'이 서로 반평행(anti-parallel)으로 이량체를 형성한 것을 특징으로 한다.

[36] 앞선 구체예 중 어느 하나에 따른 약학적 조성물로서, 상기 면역글로불린 Fc 영역은 비당쇄화된 것을 특징으로 한다.

[37] 앞선 구체예 중 어느 하나에 따른 약학적 조성물로서, 상기 면역글로불린 Fc 영역은 서열번호 15의 아미노산 서열을 갖는 힌지 영역을 포함하는 것을 특징으로 한다.

[38] 앞선 구체예 중 어느 하나에 따른 약학적 조성물로서, 상기 면역글로불린 Fc 영역은 IgG, IgA, IgD, IgE 또는 IgM에서 유래된 것을 특징으로 한다.

[39] 앞선 구체예 중 어느 하나에 따른 약학적 조성물로서, 상기 면역글로불린 Fc 영역은 IgG Fc 영역 유래인 것을 특징으로 한다.

[40] 앞선 구체예 중 어느 하나에 따른 약학적 조성물로서, 상기 면역글로불린 Fc 영역은 IgG4 Fc 영역에서 유래한 것을 특징으로 한다.

[41] 앞선 구체예 중 어느 하나에 따른 약학적 조성물로서, 상기 면역글로불린 Fc 영역은 인간 IgG4 유래의 비-당쇄화된 Fc 영역에서 유래한 것을 특징으로 한다.

[42] 앞선 구체예 중 어느 하나에 따른 약학적 조성물로서, 상기 면역글로불린 Fc 영역은 (a) CH1 도메인, CH2 도메인, CH3 도메인 및 CH4 도메인; (b) CH1 도메인 및 CH2 도메인; (c) CH1 도메인 및 CH3 도메인; (d) CH2 도메인 및 CH3 도메인; 및 (e) CH1 도메인, CH2 도메인, CH3 도메인 및 CH4 도메인 중 1개 또는 2개

이상의 도메인과 면역글로불린 힌지 영역 또는 힌지 영역의 일부와의 조합으로 구성된 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 한다.

[43] 앞선 구체예 중 어느 하나에 따른 약학적 조성물로서, 상기 면역글로불린 Fc 영역은, 서열번호 8의 아미노산 서열을 갖는 면역글로불린 Fc 영역의 2번째 아미노산이 프롤린으로 치환되거나; 71번째 아미노산이 글루타민으로 치환되거나; 또는 2번째 아미노산은 프롤린으로, 71번째 아미노산은 글루타민으로 치환된 것을 특징으로 한다.

[44] 앞선 구체예 중 어느 하나에 따른 약학적 조성물로서, 상기 면역글로불린 Fc 영역은 서열번호 9의 아미노산 서열을 갖는 단량체를 포함하는 것을 특징으로 한다.

[45] 앞선 구체예 중 어느 하나에 따른 약학적 조성물로서, 상기 링커는 1개 내지 100개의 아미노산으로 이루어진 것을 특징으로 한다.

[46] 앞선 구체예 중 어느 하나에 따른 약학적 조성물로서, 상기 펩타이드 링커는 [GS]x, [GGGS]x 또는 [GGGGS]x의 아미노산 서열로 이루어지고, 여기서 x는 자연수 1 내지 20 중 하나인 것을 특징으로 한다.

[47] 앞선 구체예 중 어느 하나에 따른 약학적 조성물로서, 상기 펩타이드 링커는 서열번호 11의 아미노산 서열인 것을 특징으로 한다.

[48] 앞선 구체예 중 어느 하나에 따른 약학적 조성물로서, 상기 신경병증은 말초신경병증, 또는 소섬유 신경병증인 것을 특징으로 한다.

[49] 앞선 구체예 중 어느 하나에 따른 약학적 조성물로서, 상기 약학적 조성물은 말초 감각 신경에 대한 보호 효과를 갖는 것을 특징으로 한다.

[50] 앞선 구체예 중 어느 하나에 따른 약학적 조성물로서, 상기 약학적 조성물은 배근 신경절(dorsal root ganglion, DRG) 세포의 공포화(vacuolation)를 억제하는 것을 특징으로 한다.

[51] 앞선 구체예 중 어느 하나에 따른 약학적 조성물로서, 상기 효소 융합단백질은 이를 필요로 하는 개체에 투여되는 횟수가 융합단백질이 아닌 효소에 비해 감소된 것을 특징으로 한다.

[52] 앞선 구체예 중 어느 하나에 따른 약학적 조성물로서, 상기 약학적 조성물은 2주에 1회 또는 1개월에 1회 개체에 투여되는 것을 특징으로 한다.

[53] 앞선 구체예 중 어느 하나에 따른 약학적 조성물로서, 상기 효소 융합단백질은 서열번호 13의 아미노산 서열을 포함하는 단량체를 포함하는 것을 특징으로 한다.

[54] 앞선 구체예 중 어느 하나에 따른 약학적 조성물로서, 상기 효소 융합단백질은 한 분자의 알파 갈락토시다제와 한 분자의 면역글로불린 Fc 영역이 펩타이드 링커를 통해 연결된 단량체가 이량체를 형성한 것을 특징으로 한다.

[55] 앞선 구체예 중 어느 하나에 따른 약학적 조성물로서, 상기 X 및 X'은 각각 동일하거나 다른 아미노산 서열을 포함하는 효소인 것을 특징으로 한다.

[56] 본 발명을 구현하는 다른 하나의 양태는 상기 효소 융합단백질 또는 이를

포함하는 조성물을 이를 필요로 하는 개체에 투여하는 단계를 포함하는, 파브리병에 기인하거나 동반되는 신경병증(neuropathy)의 예방 또는 치료 방법이다.

[57] 본 발명을 구현하는 다른 하나의 양태는 파브리병에 기인하거나 동반되는 신경병증(neuropathy)의 후유증의 예방 또는 치료를 위한 약제의 제조에 있어서 상기 효소 융합단백질 또는 이를 포함하는 조성물의 용도이다.

[58] 본 발명을 구현하는 다른 하나의 양태는 파브리병에 기인하거나 동반되는 신경병증(neuropathy)의 예방 또는 치료를 위한 상기 효소 융합단백질 또는 이를 포함하는 조성물의 용도이다.

[59]

발명의 실시를 위한 형태

[60] 본 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용을 설명하면 다음과 같다. 한편, 본원에서 개시되는 각각의 설명 및 실시형태는 각각의 다른 설명 및 실시형태에도 적용될 수 있다. 즉, 본원에서 개시된 다양한 요소들의 모든 조합이 본 발명의 범주에 속한다. 또한, 하기 기술되는 구체적인 서술에 의하여 본 발명의 범주가 제한된다고 할 수 없다.

[61] 또한, 당해 기술분야의 통상의 지식을 가진 자는 통상의 실험만을 사용하여 본 출원에 기재된 본 발명의 특정 양태에 대한 다수의 등가물을 인지하거나 확인할 수 있다. 또한, 이러한 등가물은 본 발명에 포함되는 것으로 의도된다.

[62] 본 명세서 전반을 통하여, 천연적으로 존재하는 아미노산에 대한 통상의 1문자 및 3문자 코드가 사용될 뿐만 아니라 Aib(α-아미노이소부티르산), Sar(N-methylglycine) 등과 같은 다른 아미노산에 대해 일반적으로 허용되는 3문자 코드가 사용된다. 또한 본 명세서에서 약어로 언급된 아미노산은 IUPAC-IUB 명명법에 따라 기재되었다.

[63]

[64] 알라닌 A 아르기닌 R

[65] 아스파라긴 N 아스파르트산 D

[66] 시스테인 C 글루탐산 E

[67] 글루타민 Q 글리신 G

[68] 히스티딘 H 이소류신 I

[69] 류신 L 리신 K

[70] 메티오닌 M 페닐알라닌 F

[71] 프롤린 P 세린 S

[72] 트레오닌 T 트립토판 W

[73] 티로신 Y 발린 V

[74]

[75] 본 발명을 구현하는 하나의 양태는 하기 화학식 1으로 표시되는, 효소

융합단백질을 포함하는 파브리병에 기인하거나 동반되는 신경병증의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다:

[76] [화학식 1]

[77]

$$\begin{array}{l} \mathbf{X - L - F} \\ \text{:}\quad\quad\ \ | \\ \mathbf{X' - L' - F} \end{array}$$

[78] 여기서, X 및 X'은 알파 갈락토시다제이고;

[79] L 및 L'은 링커로, 각각 독립적으로 동일하거나 다른 종류의 링커이며;

[80] F는 면역글로불린 Fc 영역의 하나의 폴리펩티드 사슬이며;

[81] |은 공유 결합이고;

[82] :는 공유 또는 비공유 결합임.

[83]

[84] 하나의 구현예로, 상기 약학적 조성물은 약학적으로 허용되는 부형제와 상기 화학식 1로 표시되는 효소 융합단백질을 약학적 유효량으로 포함하는 약학적 조성물일 수 있다. 본 발명에서, “약학적 유효량”이란, 상기 효소 융합단백질이 파브리병에 기인하거나 동반되는 신경병증에 대해 예방 또는 치료 효과를 나타내면서도 환자에게 독성이나 부작용을 나타내지 않는 안전한 투여 용량을 의미하며, 구체적으로는 말초 감각 신경에 대한 보호 효과를 갖거나, 배근 신경절(dorsal root ganglion, DRG) 세포의 공포화(vacuolation)를 억제하는 효과를 얻을 수 있는 용량을 의미할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[85]

[86] 본 발명에서 용어, "효소 융합단백질"은 치료학적 효소에 면역글로불린 Fc 영역이 융합된 것으로, 면역글로불린 Fc 영역의 융합으로 인해, 면역글로불린 Fc 영역과 융합되지 않은 치료학적 효소에 비하여, 치료학적 효소의 활성은 유지되면서도 리소좀 수용체에 대한 결합력이 감소되어, 혈중 반감기가 증가되는 것일 수 있다. 본 발명의 효소 융합단백질은 효소 대체 요법 (enzymatic replacement therapy, ERT)의 약물로서 사용될 수 있다. 상기 효소 대체 요법은 질환의 원인이 되는 결핍 또는 부족 효소를 보충함으로써, 저하된 효소 기능의 회복을 통해 질병을 예방 또는 치료할 수 있다.

[87]

[88] 본 발명자들은 치료학적 효소의 혈중 반감기를 증가시키기 위해 면역글로불린 Fc 영역과의 융합단백질을 제작하였다. 본 발명의 효소 융합단백질에 포함되는 Fc 영역은 당화를 억제하기 위해 잠재적인 당화 서열을 치환시키고, 추가적으로 IgG4 Fc의 힌지 서열을 치환시켜 사슬 교환 (chain exchange)이 억제된 IgG4 Fc 영역일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[89] 상기 화학식 1에서, F인 면역글로불린 Fc 영역(예를 들어, 힌지 서열이 치환된 IgG4 Fc 영역)은 링커를 통해 치료학적 효소와 연결되어 단량체를 형성할 수 있고, 상기 단량체는 다른 면역글로불린 Fc 영역 및 치료학적 효소를 포함하는

단량체와 이량체를 형성할 수 있다. 이 때, 상기 이량체는 면역글로불린 Fc 영역끼리 공유 결합, 치료학적 효소끼리 공유 또는 비공유 결합으로 이량체를 형성하는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 특히, 상기 면역글로불린 Fc 영역과 융합되는 치료학적 효소가 이량체, 특히 반평행(anti-parallel) 형태로 연결된 이량체를 형성할 경우, 효소의 활성을 유지하면서도 체내 지속성이 증가되는 것을 확인하였으며, 따라서, 본 발명의 효소 융합단백질은 Fc 영역이 융합되지 않은 치료학적 효소에 비해 안정성이 증가되는 장점이 있다.

[90]

[91] 본 발명의 용어, "치료학적 효소"는, 효소의 부족, 결핍, 기능 이상 등에 의해 발병되는 질병을 치료하기 위한 효소로서, 효소 대체 요법 (enzyme replacement therapy), 투여 등을 통해 상기 질병을 가진 개체를 치료할 수 있는 효소를 의미한다. 본 발명의 효소 융합단백질에 포함될 수 있는 치료학적 효소는 특별히 제한되지 않으며, 융합되지 않은 형태의 치료학적 효소보다 생체 내 지속 시간을 늘려 이점을 얻을 수 있는 치료학적 효소이면 본 발명의 효소 융합단백질에 포함될 수 있다. 본 발명의 한 실시 형태에서 효소 융합단백질은 치료학적 효소의 융합단백질이다.

[92] 본 발명에서, 상기 치료학적 효소는 알파 갈락토시다제일 수 있다.

[93]

[94] 본 발명의 효소 융합 단백질에 포함되는 치료학적 효소는 비공유 결합을 통해 이량체를 형성하는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 구체적으로, 상기 치료학적 효소는 융합단백질이 형질전환체에서 발현되어 면역글로불린 Fc영역이 이량체(dimer)를 형성할 때, 치료학적 효소도 이량체 (dimer)를 형성하는 것일 수 있다.

[95] 이러한 치료학적 효소의 이량체는 서로 동일한 2개의 효소가 이량체를 형성한 것일 수도 있고, 또는 서로 상이한 2개의 효소가 이량체를 형성한 것일 수도 있으며, 상기 이량체를 구성하는 효소는 체내에서 목적하는 활성을 갖는 이상, 구체적인 종류에 제한되지 않는다.

[96]

[97] 한편, 상기 이량체를 구성하는 치료학적 효소는 서로 연결되는 방향에 따라, 평행 이량체 (parallel dimer) 또는 반평행 이량체 (anti-parallel dimer)일 수 있으나, 이에 제한된 것은 아니다. 구체적인 예시로, 상기 화학식 1에서 상기 효소는 X와 X'이 서로 반평행(anti-parallel)으로 이량체를 형성한 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[98] 본 발명의 실시예에서는, 치료학적 효소인 알파 갈락토시다제가 면역글로불린 Fc 영역과 융합되어 발현된 융합단백질을 제조하였으며, 상기 융합단백질의 면역글로불린 Fc 영역이 이량체(dimer)를 형성하면서 알파 갈락토시다제가 비공유 결합을 통해 반평행 이량체를 형성하는 것을 확인하였다(실시예 1).

[99] 본 발명의 용어, "평행 이량체(parallel dimer)"는 각각의 단량체가 이량체를

형성할 때 각각의 단량체의 아미노산 서열의 N-말단과 C-말단이 같은 방향으로 이량체를 형성하는 것을 의미한다. 이때 이량체의 형성은 비공유결합 또는 공유결합일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[100] 본 발명의 용어, "반평행 이량체(anti-parallel dimer)"는 각각의 단량체가 이량체를 형성할 때, 각각의 단량체의 아미노산 서열의 N-말단과 C-말단이 서로 다른 방향으로 이량체를 형성하는 것을 의미한다. 이때 이량체의 형성은 비공유결합 또는 공유결합일 수 있으나 이에 제한되는 것은 아니다.

[101] 다시 말해, 본 발명의 효소 융합단백질에서, (i) 하나의 치료학적 효소(X)의 N-말단과 다른 하나의 치료학적 효소(X')의 N-말단이 동일한 방향으로 이량체를 형성하거나, (ii) 하나의 치료학적 효소(X)의 C-말단과 다른 하나의 치료학적 효소(X')의 C-말단이 동일한 방향으로 이량체를 형성하거나, (iii) 하나의 치료학적 효소(X)의 N-말단과 다른 하나의 치료학적 효소(X')의 C-말단이 동일한 방향으로 이량체를 형성하거나, 또는 (iv) 하나의 치료학적 효소(X)의 C-말단과 다른 하나의 치료학적 효소(X')의 N-말단이 동일한 방향으로 이량체를 형성할 수 있다. 상기 (i) 및 (ii)의 경우를 평행 이량체, 상기 (iii) 및 (iv)의 경우를 반평행 이량체라고 하며, 상기 이량체의 형성은 공유 결합 (covalent bond) 또는 비공유 결합 (non-covalent bond)에 의한 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[102] 구체적으로, 상기 이량체의 형성에 있어서, 평행 또는 반평행 이량체 형성은 면역글로불린 Fc 영역이 이량체를 형성함에 따라 이에 연결된 단량체의 알파 갈락토시다제가 공유 또는 비공유 결합을 통해 이량체를 형성하는 것일 수 있다

[103]

[104] 본 발명의 효소 융합단백질에 포함되는 효소는 알파 갈락토시다제(alpha-galactosidase)일 수 있다. 본 발명의 목적상, 효소 융합단백질은 이량체의 치료학적 효소를 포함할 수 있으며, 구체적으로, 알파 갈락토시다제가 이량체를 형성하는 것일 수도 있고, 또는, 알파 갈락토시다제와 다른 치료학적 효소가 이량체를 형성하는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 본 발명의 융합 단백질의 한 예로, 상기 화학식 1에서, X 및 X'은 알파 갈락토시다제일 수 있고, X와 X'의 아미노산 서열은 동일하거나, 다를 수 있다. 예를 들어, X 및 X'이 모두 천연형 알파 갈락토시다제일 수 있고, 또는, X 및 X' 중 어느 하나는 천연형 알파 갈락토시다제이고, 다른 하나는 천연형 알파 갈락토시다제에서 일부 서열이 변형된 변이체일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 또는, X 및 X'은 서로 다른 서열을 갖는 알파 갈락토시다제의 변이체일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[105]

[106] 본 발명의 용어, 알파 갈락토시다제 (alpha galactosidase, α-GAL) 또는 알파 갈락토시다제 A(α-GAL A)는 비장, 뇌, 간 등의 리소좀에 존재하는 효소로서, 당지질과 당단백에서 끝 알파 갈락토실 (galactosyl) 모이어티를 가수분해하는

효소로서, 호모다이머릭 (homodimeric) 당단백이다. 구체적으로, 상기 알파 갈락토시다제는 세라마이드 trihexoside를 가수분해하고, 갈락토스와 포도당으로 melibiose의 가수분해를 촉매하는 것으로 알려져 있으며, 특히, 리소좀 축적 질환인 파브리병(Fabry's disease)와 연관된 것으로 알려져 있다.

[107] 본 발명에서, 상기 알파 갈락토시다제는 재조합 형태인 아갈시다제 알파 (agalsidase alpha) 또는 아갈시다제 베타 (agalsidase beta)를 포함할 수 있고, 이와 동등한 활성 및 치료 효과를 나타내는 효소인 한 서열이나 유래, 제법 등에 제한 없이 본 발명의 범주에 포함될 수 있다. 구체적으로, 상기 알파 갈락토시다제는 서열번호 5의 폴리뉴클레오티드 서열에 의해 코딩될 수 있고, 서열번호 6의 아미노산 서열을 포함하거나, (필수적으로) 구성되는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 또는, 본 발명의 알파 갈락토시다제는 천연형 알파 갈락토시다제 또는 서열번호 6의 아미노산 서열과 60%, 70%, 80% 이상, 90% 이상, 보다 구체적으로 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 이상의 상동성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[108]

[109] 본원에서 특정 서열번호로 '구성되는' 펩타이드라고 기재되어 있다 하더라도, 해당 서열번호의 아미노산 서열로 이루어진 펩타이드와 동일 혹은 상응하는 활성을 가지는 경우라면 해당 서열번호의 아미노산 서열 앞뒤의 무의미한 서열 추가 또는 자연적으로 발생할 수 있는 돌연변이, 혹은 이의 잠재성 돌연변이 (silent mutation)를 제외하는 것이 아니며, 이러한 서열 추가 혹은 돌연변이를 가지는 경우에도 본원의 범위 내에 속하는 것이 자명하다. 즉, 일부 서열의 차이가 있더라도 일정 수준 이상의 상동성을 나타내며 천연형 알파 갈락토시다제와 동등 또는 유사한 활성을 나타낸다면 본 발명의 범위에 속할 수 있다.

[110]

[111] 본 발명에서 용어, '상동성(homology)' 또는 '동일성(identity)'은 두 개의 주어진 아미노산 서열 또는 염기 서열과 서로 관련된 정도를 의미하며 백분율로 표시될 수 있다.

[112] 용어 상동성 및 동일성은 종종 상호교환적으로 이용될 수 있다.

[113] 임의의 두 펩타이드 서열이 상동성, 유사성 또는 동일성을 갖는지 여부는 예를 들어, Pearson et al (1988)[Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85]: 2444에서와 같은 디폴트 파라미터를 이용하여 "FASTA" 프로그램과 같은 공지의 컴퓨터 알고리즘을 이용하여 결정될 수 있다. 또는, EMBOSS 패키지의 니들만 프로그램(EMBOSS: The European Molecular Biology Open Software Suite, Rice et al., 2000, Trends Genet. 16: 276-277)(버전 5.0.0 또는 이후 버전)에서 수행되는 바와 같은, 니들만-운치(Needleman-Wunsch) 알고리즘(Needleman and Wunsch, 1970, J. Mol. Biol. 48: 443-453)이 사용되어 결정될 수 있다. (GCG 프로그램 패키지 (Devereux,

J., et al, Nucleic Acids Research 12: 387 (1984)), BLASTP, BLASTN, FASTA (Atschul, [S.] [F.,] [ET AL, J MOLEC BIOL 215]: 403 (1990); Guide to Huge Computers, Martin J. Bishop, [ED.,] Academic Press, San Diego,1994, 및 [CARILLO ETA/.](1988) SIAM J Applied Math 48: 1073을 포함한다). 예를 들어, 국립 생물공학 정보 데이터베이스 센터의 BLAST, 또는 ClustalW를 이용하여 상동성, 유사성 또는 동일성을 결정할 수 있다.

[114] 펩타이드의 상동성, 유사성 또는 동일성은 예를 들어, Smith and Waterman, Adv. Appl. Math (1981) 2:482에 공지된 대로, 예를 들면, Needleman et al. (1970), J Mol Biol.48: 443과 같은 GAP 컴퓨터 프로그램을 이용하여 서열 정보를 비교함으로써 결정될 수 있다. 요약하면, GAP 프로그램은 두 서열 중 더 짧은 것에서의 기호의 전체 수로, 유사한 배열된 기호(즉, 아미노산)의 수를 나눈 값으로 정의한다. GAP 프로그램을 위한 디폴트 파라미터는 (1) 일진법 비교 매트릭스(동일성을 위해 1 그리고 비-동일성을 위해 0의 값을 함유함) 및 Schwartz and Dayhoff, eds., Atlas Of Protein Sequence And Structure, National Biomedical Research Foundation, pp. 353-358 (1979)에 의해 개시된 대로, Gribskov et al(1986) Nucl. Acids Res. 14: 6745의 가중된 비교 매트릭스 (또는 EDNAFULL(NCBI NUC4.4의 EMBOSS 버전) 치환 매트릭스); (2) 각 갭을 위한 3.0의 페널티 및 각 갭에서 각 기호를 위한 추가의 0.10 페널티 (또는 갭 개방 패널티 10, 갭 연장 패널티 0.5); 및 (3) 말단 갭을 위한 무 페널티를 포함할 수 있다. 따라서, 본 발명에서 사용된 것으로서, 용어 "상동성" 또는 "동일성"은 서열들간의 관련성(relevance)를 나타낸다.

[115] 상기 치료학적 효소 또는 이의 유도체의 서열 및 이를 코딩하는 염기서열의 정보는 NCBI 등 공지의 데이터베이스에서 얻을 수 있다.

[116]

[117] 본 발명의 치료학적 효소는 천연형 효소일 수 있으며, 상기 천연형 효소의 일부로 구성된 단편, 혹은 일부 아미노산의 치환(substitution), 추가(addition), 제거(deletion), 수식(modification) 및 이들의 조합으로 이루어지는 군에서 선택된 변형이 일어난, 치료학적 효소의 아날로그 (analog) 역시 천연형 치료학적 효소와 동등한 활성을 갖는 한, 본 발명에 제한 없이 포함된다.

[118] 본 발명의 용어, "단편"은 천연형 치료학적 효소 또는 천연형 치료학적 효소의 아날로그의 아미노 말단 혹은 카르복시 말단에 하나 또는 그 이상의 아미노산이 제거된 형태를 말한다. 치료학적 효소의 활성을 갖는 한, 단편의 크기나 제거되는 아미노산의 종류에 관계없이 본 발명의 범주에 포함된다.

[119] 또한, 상기 치료학적 효소의 아날로그는 천연형 치료학적 효소의 아미노 및/또는 카르복시 말단에 하나 또는 그 이상의 아미노산이 추가된 것을 모두 포함한다.

[120] 또한, 상기 치료학적 효소의 아날로그는 천연형 치료학적 효소의 서열에서 하나 이상의 아미노산 잔기가 치환되거나 추가된 것일 수 있으며, 상기

치환되거나 추가되는 아미노산은 인간 단백질에서 통상적으로 관찰되는 20개의 아미노산뿐만 아니라 비정형 또는 비-자연적 발생 아미노산을 사용할 수 있다. 비정형 아미노산의 상업적 출처에는 Sigma-Aldrich, ChemPep과 Genzyme pharmaceuticals가 포함된다. 이러한 아미노산이 포함된 펩타이드와 정형적인 펩타이드 서열은 상업화된 펩타이드 합성 회사, 예를 들어 미국의 American peptide company나 Bachem, 또는 한국의 Anygen을 통해 합성 및 구매 가능하나, 특별히 이에 제한되지 않는다.

[121] 상기 치료학적 효소 아날로그는 해당 치료학적 효소의 바이오시밀러와 바이오베터 형태를 포함하는데, 바이오시밀러의 예를 들자면 공지 치료학적 효소와 발현 숙주의 차이, 당화의 양상과 정도의 차이, 특정 위치의 잔기가 해당 효소의 기준 서열에 비추어 볼 때 100% 치환이 아닌 경우, 그 치환 정도의 차이도 본 발명의 효소 융합단백질에서 사용할 수 있는 바이오시밀러 효소에 해당한다. 상기 치료학적 효소는 당업계에서 알려진 방법으로 준비 또는 제조할 수 있으며, 구체적으로, 유전자 재조합을 통해 동물세포, 대장균, 효모, 곤충세포, 식물세포, 살아있는 동물 등에서 생산할 수 있으며 생산 방법은 이에 한정되지 않으며, 상업적으로 이용 가능한 치료학적 효소를 구입하여 사용할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[122]

[123] 상기 치료학적 효소는 당업계에서 알려진 방법으로 준비 또는 제조할 수 있으며, 구체적으로, 동물세포 발현 벡터를 삽입한 동물세포를 배양하여, 배양물로부터 정제할 수 있고, 또는 상업적으로 이용 가능한 효소를 구입하여 사용할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[124]

[125] 본 발명의 효소 융합단백질은 치료학적 효소와 면역글로불린 Fc 영역이 펩타이드 링커를 통해 융합된 것일 수 있다. 즉, 상기 화학식 1의 L 또는 L'은 펩타이드 링커일 수 있으나, 면역글로불린 Fc 영역과 치료학적 효소를 융합할 수 있는 한, 특별히 제한되는 것은 아니다.

[126]

[127] 상기 펩타이드 링커는 1개 이상의 아미노산을 포함할 수 있으며, 예컨대 1개부터 1000개, 1개 내지 500개, 1개 내지 100개, 또는 1개 내지 50개의 아미노산을 포함할 수 있으며, 당업계에 알려진 임의의 펩타이드 링커, 그 예로 [GS]x 링커, [GGGS]x 링커 및 [GGGGS]x 링커 등을 포함하며, 여기서 x는 1 이상의 자연수(예를 들어, 1, 2, 3, 4, 5, 또는 그 이상)일 수 있고, 구체적인 예로, 상기 x는 자연수 1 내지 20 중 하나일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 구체적으로, 본 발명의 펩타이드 링커는 10 내지 50개, 보다 구체적으로, 20 내지 40개 아미노산 서열로 구성될 수 있으며, 서열번호 11의 아미노산 서열로 구성되는 것일 수 있다.

[128]

[129] 본 발명의 목적상 치료학적 효소의 활성을 유지하면서 치료학적 효소와 면역글로불린 Fc 영역을 연결할 수 있는 한, 펩타이드 링커가 치료학적 효소 및 면역글로불린 Fc에 융합되는 위치는 제한되지 않는다. 구체적으로, 치료학적 효소 및 면역글로불린 Fc 영역의 양 말단, 보다 구체적으로, 치료학적 효소의 C-말단, 면역글로불린 Fc 영역의 N-말단일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[130] 본 발명의 용어, "N-말단" 또는 "C-말단"은, 각각 단백질의 아미노 말단 및 카르복실 말단을 의미하는 것으로, 그 예로, 이에 제한되지는 않으나, N-말단 또는 C-말단의 최말단 아미노산 잔기뿐만 아니라 N-말단 또는 C-말단 주위의 아미노산 잔기를 모두 포함할 수 있으며, 구체적으로는 최말단으로부터 첫 번째 내지 20 번째의 아미노산 잔기를 포함할 수 있다.

[131] 본 발명의 일 실시예에서는, 치료학적 효소인 알파 갈락토시다제와 링커-IgG4를 유전자 수준에서 융합되도록 합성하여, 치료학적 효소의 C-말단에 IgG4 Fc 영역의 N-말단이 융합된 융합단백질 (서열번호 13)을 제조하고, 상기 융합단백질이 형질도입된 형질전환체에서 발현되는 것을 확인하였다 (실시예 1).

[132] 본 발명의 효소 융합단백질의 구체적인 한 예로서, 알파 갈락토시다제가 면역글로불린 Fc 영역이 공유 결합으로 펩타이드 링커를 통해 연결되어 형성된 단량체를 포함하고, 2개 단량체의 면역글로불린 Fc 영역 간에 공유 결합, 치료학적 효소 간에 공유 또는 비공유 결합으로 인해 이량체를 형성한 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[133]

[134] 다른 구체예로서, 본 발명의 효소 융합단백질은 서열번호 13의 아미노산 서열을 포함하거나, (필수적으로) 구성된 단량체를 포함하는 것일 수 있고, 또는, 상기 단량체가 형성한 이량체의 구조를 갖는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[135]

[136] 본 발명에서, 상기 펩타이드 링커는 단량체의 면역글로불린 Fc 영역이 형성하는 이량체 면역글로불린 Fc 영역에 각각 연결되는 것일 수 있으며, 각 면역글로불린 Fc 영역에 연결되는 링커는 서로 동일하거나, 다른 종류일 수 있다.

[137]

[138] 본 발명의 용어, "면역글로불린 Fc 영역"은, 면역글로불린의 중쇄와 경쇄 가변영역을 제외한, 중쇄 불변영역 2(CH2) 및/또는 중쇄 불변영역 3(CH3)부분을 포함하는 부위를 의미한다. 본 발명의 목적상 이와 같은 Fc 영역은 변이된 힌지영역을 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 구체적으로, 상기 면역글로불린 Fc 영역은, 천연형 면역글로불린 Fc 영역에서 적어도 하나 이상의 아미노산에 치환(substitution), 추가(addition), 제거(deletion), 수식(modification) 및 이들의 조합으로 이루어지는 군에서 선택된 변형이 일어난 것일 수 있으나, 이에

제한되지 않는다.

[139]

[140] 또한, 본 발명에서, 상기 화학식 1의 효소 융합단백질의 F는 IgG, 구체적으로는 IgG4 Fc 영역에서 유래한 면역글로불린 Fc 영역일 수 있고, 비당쇄화된 것일 수도 있으나, 이에 제한되지 않는다. 또한, 인간 IgG4 Fc 영역에서 하나 이상의 아미노산이 치환된 면역글로불린 Fc 영역일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[141] 상기 화학식 1의 효소 융합단백질에서, 상기 F는 면역글로불린 Fc 영역의 하나의 폴리펩티드 사슬일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[142] 상기 화학식 1의 F의 구체적인 예로, 서열번호 8의 아미노산 서열을 갖는 면역글로불린 Fc 영역의 2번째 아미노산이 프롤린으로 치환되거나; 71번째 아미노산이 글루타민으로 치환되거나; 또는 2번째 아미노산은 프롤린으로, 71번째 아미노산은 글루타민으로 치환된 단량체를 포함하는 것; 또는 서열번호 9의 단량체를 포함하는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[143]

[144] 면역글로불린 Fc 영역은 약물을 제조하는데 있어서 캐리어로 이용되는 물질로, 단백질을 안정화하고 신장에서 제거되는 것을 방지하기 위하여, 최근에는 면역글로불린 Fc 영역을 이용한 융합단백질 연구가 활발히 진행되고 있다. 면역글로불린은 혈액의 주요 구성성분으로 IgG, IgM, IgA, IgD, IgE와 같이 5가지 종류가 있는데 융합단백질 연구에 자주 사용되는 종류는 IgG로 이는 IgG1~4의 4가지 subtype으로 분류된다. 면역글로불린 Fc 영역을 이용한 융합단백질은 단백질의 크기를 증가시켜 신장에서 제거되는 것을 방지하고, FcRn 수용체와 결합하여 세포 내로 endocytosis 및 recycling을 통해 혈중 반감기를 증가시키는 역할을 하게 된다.

[145]

[146] 본 명세서에서 Fc 영역이라고 하면 면역글로불린의 파파인 소화에서 얻는 천연형 서열뿐 아니라 그 유도체, 예컨대 천연 서열 중의 하나 이상의 아미노산 잔기가 결실, 삽입, 비보전적 또는 보전적 치환 또는 이들의 조합에 의하여 변환되어 천연형과 상이하게 된 서열등 변형체까지 망라하여 포함된다. 상기 유도체, 치환체, 변형체는 FcRn에 결합하는 능력을 보유하는 것을 전제로 한다. 본 발명에서, F는 사람 면역글로불린 영역일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.본 발명에 따른 화학식 1의 효소 융합단백질에서, F는 하나의 폴리펩타이드 사슬을 포함하는 단량체의 면역글로불린 Fc 영역이고, 상기 폴리펩타이드 사슬은 이황화결합으로 인해 2개 폴리펩타이드 사슬의 이량체를 형성하여, 본 발명의 효소 융합단백질은 이량체의 면역글로불린 Fc 영역을 포함하는 구조일 수 있다. 특히, 상기 두 사슬 중 한 사슬의 질소 원자를 통해서만 연결되어 있는 구조일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 상기 질소 원자를 통한 연결은 리신의 입실론 아미노 원자나 N-말단 아미노기에 환원적 아민화를 통하여 연결될 수 있다.

[147] 환원적 아민화 반응이란 반응물의 아민기 또는 아미노기가 다른 반응물의

알데히드 (즉, 환원적 아민화가 가능한 작용기)와 반응하여 아민을 생성한 다음, 환원 반응에 의해 아민 결합을 형성시키는 반응을 의미하여, 당해 기술 분야에 널리 알려져 있는 유기합성 반응이다.

[148] 하나의 구체예로, 상기 면역글로불린 Fc 영역은 N-말단 프롤린의 질소 원자를 통하여 서로 연결된 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[149]

[150] 또한 본 발명의 면역글로불린 Fc 영역은 천연형과 실질적으로 동등하거나 향상된 효과를 갖는 한, 면역 글로불린의 중쇄와 경쇄 가변영역만을 제외하고, 일부 또는 전체 중쇄 불변영역 1(CH1) 및/또는 경쇄불변영역 1(CL1)을 포함하는 확장된 Fc 영역일 수 있다. 또한, CH2 및/또는 CH3에 해당하는 상당히 긴 일부 아미노산 서열이 제거된 영역일 수도 있다.

[151] 본 발명의 면역글로불린 Fc 영역은 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, 및 5) CH1 도메인, CH2 도메인, CH3 도메인 및 CH4 도메인 중 1개 또는 2개의 이상의 도메인과 면역글로불린 힌지 영역(또는 힌지 영역의 일부)와의 조합일 수 있다. 그러나, 이에 제한되는 것은 아니다. 보다 구체적으로, 상기 면역글로불린 Fc 영역은 힌지 영역, CH2 도메인 및 CH3 도메인으로 이루어진 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[152]

[153] 본 발명에서, 상기 화학식 1의 F(면역글로불린 Fc 영역)는 단량체(monomer)의 형태일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 구체적으로, 상기 면역글로불린 Fc 영역은 동일한 기원의 도메인으로 이루어진 단쇄 면역글로불린을 포함하는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[154]

[155] 본 발명에서, 상기 화학식 1에서 F인 면역글로불린 Fc 영역은 단량체의 형태로 펩타이드 링커를 통해 단량체의 치료학적 효소와 융합 발현되는 것일 수 있다. 상기 단량체의 면역글로불린 Fc 영역이 이량체를 형성함에 따라 상기 면역글로불린 Fc 영역에 융합된 치료학적 효소 역시 비공유 결합에 의해 이량체를 형성할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[156] 이러한 면역글로불린 Fc 영역은 중쇄 불변영역에 힌지(hinge) 영역을 포함할 수 있으며, 상기 힌지 영역으로 인하여 단량체인 면역글로불린 Fc 영역이 이량체를 형성할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[157] 본 발명에서, 면역글로불린 Fc 영역은 N-말단에 특정 힌지 서열을 포함할 수 있다.

[158] 본 발명의 용어, "힌지 서열"은 중쇄에 위치하여 이황화결합(inter disulfide bond)를 통하여 면역글로불린 Fc 영역의 이량체를 형성하는 부위를 의미한다.

[159]

[160] 하나의 예로, 상기 힌지 영역은 하기의 아미노산 서열을 갖는 힌지 서열 중

일부가 결실 또는 변이된 것일 수 있다.

[161]

[162] Glu-Ser-Lys-Tyr-Gly-Pro-Pro-Cys-Pro-Ser-Cys-Pro (서열번호 14)

[163]

[164] 구체적으로, 상기 힌지 영역의 일부가 결실되어, 하나의 시스테인 (Cys) 잔기만을 포함하도록 변이된 것일 수 있고, 사슬 교환 (chain exchange)에 관여하는 세린 (Ser) 잔기를 프롤린 (Pro) 잔기로 치환된 것일 수 있다. 보다 구체적으로, 상기 힌지 서열의 2번째 세린 잔기가 프롤린 잔기로 치환된 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[165] 한 예로, 본 발명의 힌지 영역은 Pro-Pro-Cys-Pro(서열번호 15)의 서열을 포함하거나, (필수적으로) 구성된 것일 수 있으며, 면역글로불린 Fc 영역은 상기 서열번호 15의 힌지 영역 서열을 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[166]

[167] 본 발명의 면역글로불린 Fc 영역은 천연형 힌지 영역 또는 변이된 힌지 영역을 포함함으로써, 한 분자의 면역글로불린 Fc 영역이 공유 결합을 통해 이량체를 형성할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[168]

[169] 약물의 캐리어로서 이용되는 면역글로불린 Fc 영역은 의도하지 않은 면역반응을 일으킬 수 있는 단점이 있는 것으로 알려져 있다. 예를 들어, 항체 의존적 세포 독성 (ADCC, antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity) 또는 보체-의존적 세포 독성 (CDC, complement-dependent cytotoxicity)과 같은 효력 기능 (effector function)을 갖게 된다. 이러한 기능은 면역글로불린 Fc 영역의 Fc 수용체와의 결합, 보체 결합, 또는 Fc 영역의 당화 (glycosylation)을 통하여 일어나게 된다. 또한, Fc 그 자체의 생체 내 불안정성이 발생하기 쉽다.

[170]

[171] 본 발명자들은 면역글로불린 Fc 영역 내 힌지 영역의 서열을 치환함으로써, 이러한 문제점을 해결하고자 하였다. 구체적으로, 본 발명의 면역글로불린 Fc 영역은 당화를 조절하기 위해 잠재적 당화 서열이 치환된 것이거나, 또는, 사슬 교환에 관여하는 서열이 치환된 것일 수 있고, 또는, 두 경우 모두에 해당할 수 있다. 보다 구체적으로, 본 발명의 효소 융합단백질의 면역글로불린 Fc 영역은 사슬 교환이 일어나지 않는 것일 수 있다.

[172]

[173] 구체적으로, 본 발명의 면역글로불린 Fc 영역은, 사슬 교환 및 N-글리코실화를 방지하기 위해, 서열번호 8의 면역글로불린 Fc 영역의 2번째 아미노산 및/또는 71번째 아미노산이 다른 아미노산으로 치환된 것일 수 있다. 보다 구체적으로, 서열번호 8의 면역글로불린 Fc 영역의 1) 2번째 아미노산 (세린)이 프롤린으로 치환되거나, 2) 71번째 아미노산 (아스파라긴)이 글루타민으로 치환되거나, 또는 3) 2번째 아미노산은 프롤린으로, 71번째 아미노산은 글루타민으로 치환된 것일

수 있고, 구체적으로는 서열번호 9의 아미노산 서열로 표현되는 면역글로불린 Fc 영역일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 상기 언급된 변이 외에도 치료학적 효소의 안정성을 증대키시는, 약물의 캐리어로서 적합한 변이를 함유할 수 있다.

[174] 구체적으로, 상기 면역글로불린 Fc 영역은, 면역글로불린 IgG4 Fc의 힌지 영역이 IgG1 힌지 영역으로 치환된 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[175] 본 발명의 일 실시예에서는, 면역글로불린 Fc의 2번째 아미노산은 프롤린으로, 71번째 아미노산은 글루타민으로 치환하여, 사슬 교환 및 N-글리코실화가 감소되도록 하였다 (실시예 1).

[176]

[177] 본 발명의 용어, "사슬 교환 (chain exchange)"은 IgG4 Fc를 단백질 융합체의 캐리어로 사용시, 생체내에 존재하는 IgG4와 하이브리드를 형성하거나 단량체로 존재하여 원래의 구조를 변경시켜 치료학적으로 낮은 활성을 갖는 구조를 갖게 되는 문제를 의미하는 것으로, 단백질이 융합된 융합단백질인, 단백질 융합체를 치료용 목적으로 사용시 큰 어려움이 있는 것으로 보고되었다 (van der Neut Kolfschoten, et at., Science, 317:1554-1557. 2007).

[178]

[179] 또한, 다른 구체적인 양태에서, 본 발명의 면역글로불린 Fc 영역은 천연형 아미노산 서열뿐만 아니라 이의 서열 유도체를 포함한다. 아미노산 서열 유도체란 천연 아미노산 서열 중의 하나 이상의 아미노산 잔기가 치환(substitution), 추가(addition), 제거(deletion), 수식(modification) 및 이들의 조합으로 이루어지는 군에서 선택된 변이가 일어난 것을 의미한다.

[180] 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.

[181] 또한, 이황화 결합을 형성할 수 있는 부위가 제거되거나, 천연형 Fc에서 N-말단의 몇몇 아미노산이 제거되거나 또는 천연형 Fc의 N-말단에 메티오닌 잔기가 부가될 수도 있는 등 다양한 종류의 유도체가 가능하다. 또한, 이펙터 기능을 없애기 위해 보체결합부위, 예로 C1q 결합부위가 제거될 수도 있고, ADCC(antibody dependent cell mediated cytotoxicity) 부위가 제거될 수도 있다. 이러한 면역글로불린 Fc 영역의 서열 유도체를 제조하는 기술은 국제특허공개 제WO 97/34631호, 국제특허공개 제96/32478호 등에 개시되어 있다.

[182] 분자의 활성을 전체적으로 변경시키지 않는 단백질 및 펩타이드에서의 아미노산 교환은 당해 분야에 공지되어 있다(H.Neurath, R.L.Hill, The Proteins, Academic Press, New York, 1979). 가장 통상적으로 일어나는 교환은 아미노산 잔기 Ala/Ser, Val/Ile, Asp/Glu, Thr/Ser, Ala/Gly, Ala/Thr, Ser/Asn, Ala/Val, Ser/Gly, Thy/Phe, Ala/Pro, Lys/Arg, Asp/Asn, Leu/Ile, Leu/Val, Ala/Glu, Asp/Gly 간의 교환이다. 경우에 따라서는 인산화(phosphorylation), 황산화(sulfation), 아크릴화(acrylation), 당화(glycosylation), 메틸화(methylation),

파네실화(farnesylation), 아세틸화(acetylation) 및 아미드화(amidation) 등으로 수식(modification)될 수도 있다.

[183]

[184] 또한, 상기 기술한 Fc 유도체는 본 발명의 Fc 영역과 동등한 생물학적 활성을 나타내며 Fc 영역의 열, pH 등에 대한 구조적 안정성을 증대시킨 것일 수 있다.

[185]

[186] 또한, 이러한 Fc 영역은 인간, 소, 염소, 돼지, 마우스, 래빗, 햄스터, 랫트 또는 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 획득하는 방법일 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. 더 구체적인 실시 형태에서는 인간 유래의 Fc 영역을 미생물로부터 수득한 재조합형 면역글로불린 Fc 영역이다.

[187]

[188] 또한, 면역글로불린 Fc 영역은 천연형 당쇄, 천연형에 비해 증가된 당쇄, 천연형에 비해 감소한 당쇄 또는 당쇄가 제거, 또는 비당쇄화된 된 형태일 수 있다. 이러한 면역글로불린 Fc 당쇄의 증감 또는 제거에는 화학적 방법, 효소학적 방법 및 미생물을 이용한 유전 공학적 방법과 같은 통상적인 방법이 이용될 수 있다. 여기서, Fc에서 당쇄가 제거된 면역글로불린 Fc 영역은 보체(c1q)와의 결합력이 현저히 저하되고, 항체-의존성 세포독성 또는 보체-의존성 세포 독성이 감소 또는 제거되므로, 생체 내에서 불필요한 면역 반응을 유발하지 않는다. 이런 점에서 약물의 캐리어로서의 본래의 목적에 보다 부합하는 형태는 당쇄가 제거되거나 비당쇄화된 면역글로불린 Fc 영역이라 할 것이다.

[189] 본 발명의 용어, "당쇄의 제거(Deglycosylation)"는 효소로 당을 제거한 Fc 영역을 말하며, 비당쇄화(Aglycosylation)는 원핵동물, 더 구체적인 실시 형태에서는 대장균에서 생산하여 당쇄화되지 않은 Fc 영역을 의미한다.

[190]

[191] 한편, 면역글로불린 Fc 영역은 인간 또는 소, 염소, 돼지, 마우스, 래빗, 햄스터, 랫트, 기니아 픽 등의 동물기원일 수 있으며, 더 구체적인 실시 형태에서는 인간기원이다.

[192] 또한, 면역글로불린 Fc 영역은 IgG, IgA, IgD, IgE, IgM 유래 또는 이들의 조합(combination) 또는 이들의 혼성(hybrid)에 의한 Fc 영역일 수 있다. 더 구체적인 실시 형태에서는 인간 혈액에 가장 풍부한 IgG 또는 IgM 유래이며 보다 더 구체적인 실시 형태에서는 리간드 결합 단백질의 반감기를 향상시키는

것으로 공지된 IgG 유래이다. 더욱 구체적인 실시 형태에서 상기 면역글로불린 Fc 영역은 IgG4 Fc 영역이며, 더욱 더 구체적인 실시 형태에서 상기 면역글로불린 Fc 영역은 인간 IgG4 유래의 비-당쇄화된 Fc 영역이며, 가장 구체적인 실시 형태에서 상기 면역글로불린 Fc 영역의 아미노산 서열은 서열번호 9이고, 이를 코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열은 서열번호 7일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[193]

[194] 한편, 본 발명에서 "조합(combination)"이란 이량체 또는 다량체를 형성할 때, 동일 기원 단쇄 면역글로불린 Fc 영역을 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.

[195]

[196] 또한, 본 발명의 치료학적 효소 또는 효소 융합단백질은 N-말단 및/또는 C-말단이 변형되지 않은 것일 수 있으나, 생체 내의 단백질 절단 치료학적 효소들로부터 보호하고 안정성을 증가시키기 위하여 이의 N-말단 및/또는 C-말단 등이 화학적으로 수식되거나 유기단으로 보호되거나, 또는 펩타이드 말단 등에 아미노산이 추가되어 변형된 형태 역시 본 발명에 따른 치료학적 효소 또는 효소 융합단백질의 범주에 포함된다. C-말단이 변형되지 않은 경우, 본 발명에 따른 치료학적 효소 또는 효소 융합단백질의 말단은 카르복실기를 가지나, 특별히 이에 제한되는 것은 아니다.

[197] 특히, 화학적으로 합성한 단백질의 경우, N- 및 C-말단이 전하를 띠고 있기 때문에, 이러한 전하를 제거하기 위하여 N-말단을 아세틸화 (acetylation) 및/또는 C-말단을 아미드화 (amidation)할 수 있으나, 특별히 이에 제한되지는 않는다.

[198] 본 발명의 용어, "N-말단"은 단백질 또는 폴리펩티드의 아미노 말단을 의미하는 것으로, 아미노 말단의 최말단, 또는 최말단으로부터 1개, 2개, 3개, 4개, 5개, 6개, 7개, 8개, 9개, 또는 10개 이상의 아미노산까지 포함하는 것일 수 있다. 본 발명의 면역글로불린 Fc 영역은 힌지 서열을 N-말단에 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[199]

[200] 본 명세서에서 따로 가리키는 바가 없으면, 본 발명에 따른 "효소" 또는 "융합단백질"에 대한 명세서 상세한 설명이나 청구 범위의 기술은 해당 효소 또는 융합단백질은 물론이고, 해당 효소 또는 융합단백질의 염(예컨대, 상기 융합단백질의 약학적으로 허용 가능한 염), 또는 이의 용매화물의 형태를 모두 포함하는 범주에도 적용된다. 따라서 명세서에 "효소" 또는 "융합단백질"이라고만 기재되어 있더라도 해당 기재 내용은 그 특정 염, 그 특정 용매화물, 그 특정 염의 특정 용매화물에도 마찬가지로 적용된다. 이러한 염 형태는 예를 들어 약학적으로 허용되는 임의의 염을 사용한 형태일 수 있다. 상기 염의 종류는

특별히 제한되지는 않는다. 다만, 개체, 예컨대 포유류에게 안전하고 효과적인 형태인 것이 바람직하나, 특별히 이에 제한되는 것은 아니다.

[201] 상기 용어, "약학적으로 허용되는"은 의약학적 판단의 범위 내에서, 과도한 독성, 자극, 또는 알레르기 반응 등을 유발하지 않고 원하는 용도에 효과적으로 사용 가능한 물질을 의미한다.

[202] 본 발명의 용어, "약학적으로 허용되는 염" 이란 약학적으로 허용되는 무기산, 유기산, 또는 염기로부터 유도된 염을 포함한다. 적합한 산의 예로는 염산, 브롬산, 황산, 질산, 과염소산, 푸마르산, 말레산, 인산, 글리콜산, 락트산, 살리실산, 숙신산, 톨루엔-p-설폰산, 타르타르산, 아세트산, 시트르산, 메탄설폰산, 포름산, 벤조산, 말론산, 나프탈렌-2-설폰산, 벤젠설폰산 등을 들 수 있다. 적합한 염기로부터 유도된 염은 나트륨, 칼륨 등의 알칼리 금속, 마그네슘 등의 알칼리 토금속, 및 암모늄 등을 포함할 수 있다.

[203] 또한, 본 발명의 용어, "용매화물"은 본 발명에 따른 효소, 융합단백질 또는 이의 염이 용매 분자와 복합체를 형성한 것을 말한다.

[204]

[205] 본 발명의 효소 융합단백질은 당업계의 공지된 방법으로 제조될 수 있다.

[206] 본 발명의 효소 융합단백질을 제조하는 하나의 예로는, 치료학적 효소인 알파 갈락토시다제 (alpha-galactosidase)를 펩타이드 링커-면역글로불린 Fc와 융합된 형태로 발현하는 재조합 벡터를 제조하고 이를 세포주에서 발현시키는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않으며, 본 명세서에서 기술된 방법 외에도, 공지된 다른 방법에 의해 제조될 수 있다. 본 발명의 효소 융합단백질은 서열번호 13의 아미노산 서열을 포함할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[207]

[208] 본 발명에 따른 효소 융합단백질은 치료학적 효소와 면역글로불린 Fc 영역을 융합시켜, 치료학적 효소의 활성을 유지하면서, 체내 안정성을 높임으로써 치료학적 효소의 반감기를 증가시킬 수 있다. 특히, 변이된 면역글로불린 Fc 영역과 융합된 치료학적 효소는, 사슬 교환 및 당화가 약화되어, Fc 영역과 융합되지 않은 치료학적 효소에 비해 리소좀 수용체에 대한 결합력이 낮아, 높은 지속성을 가질 수 있고, 이는 목적하는 질환의 치료에 있어, 유용한 효과를 나타내는 것이다.

[209]

[210] 이상의 내용은 본 발명의 다른 구체예 혹은 다른 양태에도 적용될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[211]

[212] 본 발명의 약학적 조성물은 상기 효소 융합단백질을 약리학적 유효량으로 포함하고, 선택적으로, 약학적으로 허용되는 부형제를 추가로 포함하는, 파브리병에 기인하거나 동반되는 신경병증의 예방 또는 치료용 약학적 조성물일 수 있다. 본 발명에 따른 조성물은 치료학적 효소의 생체 내 지속성 및

안정성이 증가된 것을 특징으로 한다.

[213] 본 발명의 알파 갈락토시다제를 포함하는 효소 융합단백질은 알파 갈락토시다제의 결함으로 인해 신장 조직에서 축적되는 Lyso-Gb3 수준을 감소시키고, 이를 통해 Lyso-Gb3 축적에 따른 질병(예를 들어, 신경병증) 치료에 이용될 수 있다.

[214] Lyso-Gb3(Globotriaosylsphingosin)는 Gb3(globotriaosylceramide)의 탈아실화된 형태로, Lyso-Gb3 또는 Gb3가 말초 통각 수용 뉴런에서 직접적인 역할을 하는 것으로 알려져 있으며, 이의 수준을 감소시킴으로써 신경병증 치료 효과를 얻을 수 있다.

[215]

[216] 본 발명의 약학적 조성물은 상기 효소 융합단백질을 포함하여 신경병증의 예방 또는 치료 효과를 나타내는 것일 수 있다.

[217]

[218] 본 발명에서 용어, "신경병증(neuropathy)"은 신경계에 기능적 장애 또는 병적 변화가 일어나는 질병을 의미한다. 그 원인에 따라 비소성 신경병증(arsenical neuropathy), 당뇨병성 신경병증(diabetic neuropathy), 허혈성 신경병증(ischemic neuropathy), 또는 외상성 신경병증(traumatic neuropathy)으로 구별될 수 있다. 또는, 유전병, 예를 들어, 샤르코-마리-투스(Charcot-Marie-Tooth, CMT), 가족성 아밀로드이증(Familial amyloidosis), 파브리병, 및 변색성 백혈구이영양증(metachromatic leukodystrophy) 등도 신경병증의 원인이 될 수 있다. 본 발명에서, 신경병증은 파브리병에 기인하거나 파브리병에 수반되어 나타나는 신경병증일 수 있다.

[219] 파브리병 환자에서는 알파 갈락토시다제의 결함으로 인해 Lyso-Gb3가 분해되지 않고 축적되며, 축적된 Lyso-Gb3가 신경계에 영향을 미쳐 다양한 말초신경증상들이 나타나는 것으로 알려져 있다.

[220] 본 발명의 효소 융합단백질은 효소-대체 요법의 치료에 이용될 수 있는 바, 알파 갈락토시다제의 결합으로 인한 파브리병에 기인하거나, 또는 동반되는 신경병증, 또는 파브리병에 기인하여 발병하고 파브리병에 동반되는 신경병증에 예방 또는 치료적 효과를 나타낼 수 있다.

[221]

[222] 본 발명의 목적상, 본 발명에 따른 파브리병에 기인하거나 동반되는 신경병증 예방 또는 치료용 약학적 조성물은 말초신경병증(polyneuropathy) 또는 소섬유 신경병증(small fiber neuropathy)에 대한 예방 또는 치료적 효과를 나타내는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 또한, 본 발명의 신경병증은 신경병증성 통증을 수반하는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[223]

[224] 본 발명의 효소 융합단백질 또는 이를 포함하는 약학적 조성물은 말초 감각 신경에 대한 보호 효과를 갖고, 또한, 배근 신경절(dorsal root ganglion, DRG)

세포의 공포화(vacuolation)를 억제하는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[225] 배근신경절 세포의 구조적 및 기능적 변형(예를 들어, 공포화)은 신경병증을 유발하는 것으로 알려져 있지만, 본 발명의 효소 융합단백질은 이와 같은 변형을 억제하고 신경 세포를 보호함으로써 감각 및 감각운동성 장애를 방지하고 개선할 수 있는 효과를 갖는다.

[226] 즉, 본 발명의 효소 융합단백질 및 이를 포함하는 조성물은 말초 감각 신경의 기능을 보호하고, 신경병증을 유발하는 세포의 변형을 억제함으로써, 파브리병에 기인하거나 동반되는 신경병증에 대한 예방 또는 치료 효과를 나타낼 수 있다.

[227]

[228] 본 발명에서 용어 "예방"은 상기 효소 융합단백질 또는 이를 포함하는 조성물의 투여로 파브리병에 기인하거나 동반되는 신경병증을 억제 또는 지연시키는 모든 행위를 의미하며, "치료"는 상기 효소 융합단백질 또는 이를 포함하는 조성물의 투여로 파브리병에 기인하거나 동반되는 신경병증의 증세가 호전되거나 이롭게 되는 모든 행위를 의미한다.

[229]

[230] 본 발명에서 용어 "투여"는 어떠한 적절한 방법으로 환자에게 소정의 물질을 도입하는 것을 의미하며, 상기 조성물의 투여 경로는 특별히 이에 제한되지 않으나, 상기 조성물이 생체 내 표적에 도달할 수 있는 어떠한 일반적인 경로를 통하여 투여될 수 있으며, 예를 들어 복강 내 투여, 정맥 내 투여, 근육 내 투여, 피하 투여, 피내 투여, 경구 투여, 국소 투여, 비 내 투여, 폐 내 투여, 직장 내 투여 등이 될 수 있다. 그러나 경구 투여 시 펩티드는 소화가 되기 때문에 경구용 조성물은 활성 약제를 코팅하거나 위에서의 분해로부터 보호되도록 제형화하는 것이 바람직하다. 구체적으로는, 주사제 형태로 투여될 수 있다. 또한, 약학적 조성물은 유효성분이 표적 세포로 이동할 수 있는 임의의 장치에 의해 투여될 수 있다.

[231]

[232] 본 발명의 조성물의 총 유효량은 단일 투여량 (single dose)으로 환자에게 투여될 수 있으며, 다중 투여량 (multiple dose)으로 장기간 투여되는 분할 치료 방법 (fractionated treatment protocol)에 의해 투여될 수 있다. 본 발명의 약학적 조성물은 질환의 정도에 따라 유효성분의 함량을 달리할 수 있다. 구체적으로, 본 발명의 융합단백질의 바람직한 전체 용량은 하루에 환자 체중 1 kg당 약 0.0001 mg 내지 500 mg일 수 있다. 그러나 상기 융합단백질의 용량은 약학적 조성물의 투여 경로 및 치료 횟수뿐만 아니라 환자의 연령, 체중, 건강 상태, 성별, 질환의 중증도, 식이 및 배설율 등 다양한 요인들을 고려하여 환자에 대한 유효 투여량이 결정되는 것이므로, 이러한 점을 고려할 때 당분야의 통상적인 지식을 가진 자라면 상기 본 발명의 조성물의 특정한 용도에 따른 적절한 유효 투여량을 결정할 수 있을 것이다. 본 발명에 따른 약학적 조성물은 본 발명의

효과를 보이는 한 그 제형, 투여 경로 및 투여 방법에 특별히 제한되지 아니한다.

[233] 본 발명의 효소 융합단백질의 실제 투여량은 치료할 질환, 투여 경로, 환자의 연령, 성별 및 체중, 및 질환의 중증도 등의 여러 관련 인자와 함께, 활성 성분인 치료학적 효소의 종류에 따라 결정된다. 본 발명의 효소 융합단백질은 혈중 지속성과 생체 내 활성이 매우 우수하므로, 본 발명의 효소 융합단백질을 포함하는 약학적 조성물의 투여 량, 투여 횟수 및 빈도를 현저하게 감소시킬 수 있다.

[234]

[235] 구체적으로, 본 발명의 효소 융합단백질은 안정성이 높아 지속성이 증가한 것으로, 융합단백질의 형태가 아닌 효소에 비해 오랜 시간 효소 활성을 유지할 수 있고, 따라서, 치료를 위해 목표하는 표적 조직에서 지속적인 노출을 통해 우수한 약리 효과를 나타낼 수 있다.

[236]

[237] 본 발명의 일 실시예에서도 투여 횟수를 줄여 알파 갈락토시다제 유전자 결손 마우스에 효소 융합단백질을 투여한 경우에 융합단백질이 아닌 효소와 동등하거나, 또는 더 우수한 치료 효과를 나타내는 것을 확인하였다. 이에, 상기 효소 융합단백질은 이를 필요로 하는 개체에 투여되는 횟수가 융합단백질이 아닌 효소에 비해 감소된 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[238]

[239] 상기 융합단백질의 형태가 아닌 효소는, 본 발명의 효소 융합단백질과 달리, 캐리어 (예를 들어, 면역글로불린 Fc 영역)가 결합되지 않은 효소 그 자체를 의미할 수 있으며, 그 예로는 Fabrazyme®(아갈시다제 베타)을 들 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[240]

[241] 구체적으로, 본 발명에 따른 효소 융합단백질은 환자 체중 1 kg당 약 0.0001 μg 내지 500 mg, 구체적으로 환자 체중 1 kg 당, 약 0.001 mg 내지 100 mg, 구체적으로 0.01 mg 내지 50 mg, 더욱 구체적으로 0.1 mg 내지 10 mg 으로 1주에 한 번, 2주에 한 번, 4주에 한 번, 또는 1개월에 한 번 투여되는 것일 수 있으며, 투여 간격이 늘어나더라도 체내에서 효소 융합단백질의 약리 활성이 유지되므로 환자의 편의성을 높일 수 있다.

[242]

[243] 본 발명에 따른 약학적 조성물은 약학적으로 허용가능한 담체, 부형제 또는 희석제를 추가로 포함할 수 있다. 이러한 담체는 비자연적으로 존재하는 것일 수 있다.

[244] 본 발명에서 용어 "약학적으로 허용가능한"이란 치료효과를 나타낼 수 있을 정도의 충분한 양과 부작용을 일으키지 않는 것을 의미하며, 질환의 종류, 환자의 연령, 체중, 건강, 성별, 환자의 약물에 대한 민감도, 투여 경로, 투여 방법, 투여횟수, 치료 기간, 배합 또는 동시 사용되는 약물 등 의학 분야에 잘 알려진

요소에 따라 당업자에 의해 용이하게 결정될 수 있다.

[245] 약학적으로 허용되는 담체는 경구 투여 시에는 결합제, 활택제, 붕해제, 부형제, 가용화제, 분산제, 안정화제, 현탁화제, 색소 및 향료 등을 사용할 수 있으며, 주사제의 경우에는 완충제, 보존제, 무통화제, 가용화제, 등장화제 및 안정화제 등을 혼합하여 사용할 수 있으며, 국소 투여용의 경우에는 기제, 부형제, 윤활제 및 보존제 등을 사용할 수 있다.

[246] 본 발명의 약학적 조성물의 제형은 상술한 바와 같은 약학적으로 허용되는 담체와 혼합하여 다양하게 제조될 수 있다. 예를 들어, 경구 투여 시에는 정제, 트로키, 캡슐, 엘릭서, 서스펜션, 시럽 및 웨이퍼 등의 형태로 제조할 수 있으며, 주사제의 경우에는 단위 투약 앰플 또는 다수회 투약 형태로 제조할 수 있다. 그 외에도 용액, 현탁액, 정제, 환약, 캡슐 및 서방형 제제 등으로 제형화할 수 있다.

[247] 한편, 제제화에 적합한 담체, 부형제 및 희석제의 예로는 락토즈, 덱스트로즈, 수크로즈, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 미정질 셀룰로즈, 폴리비닐피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 또는 광물유 등이 사용될 수 있다. 또한, 충진제, 항응집제, 윤활제, 습윤제, 향료, 유화제 및 방부제 등을 추가로 포함할 수 있다.

[248]

[249] 또한, 상기 효소 융합단백질은 생리식염수 또는 유기용매와 같이 약제로 허용된 여러 전달체(carrier)와 혼합하여 사용될 수 있고, 안정성이나 흡수성을 증가시키기 위하여 글루코스, 수크로스 또는 덱스트란과 같은 탄수화물, 아스코르브산(ascorbic acid) 또는 글루타티온과 같은 항산화제(antioxidants), 킬레이트제, 저분자 단백질 또는 다른 안정화제(stabilizers) 등이 약제로 사용될 수 있다.

[250] 이에 제한되지 않으나, 본 발명의 상기 약학적 조성물은 상기 성분 (유효성분)을 0.01 내지 99% 중량 대 부피로 함유할 수 있다.

[251]

[252] 본 발명을 구현하는 다른 하나의 양태는 상기 효소 융합단백질 또는 이를 포함하는 조성물을 개체에 투여하는 단계를 포함하는 파브리병에 기인하거나 동반되는 신경병증의 예방 또는 치료 방법을 제공한다.

[253] 상기 효소 융합단백질, 조성물, 신경병증, 예방 및 치료에 대해서는 앞서 설명한 바와 같다.

[254] 본 발명의 효소 융합단백질은 파브리병에 기인하거나 동반되는 신경병증을 예방 또는 치료할 수 있는 치료학적 효소를 포함하므로, 효소 융합단백질, 또는 상기 효소 융합단백질을 함유하는 약학적 조성물의 투여로, 파브리병에 기인하거나 동반되는 신경병증이 의심되는 개체에서 예방 또는 치료할 수 있다.

[255] 본 발명의 용어, "개체"는 신경병증이 의심되는 개체로서, 상기 신경병증 의심

개체는 해당 질환이 발병하였거나 발병할 수 있는 인간을 포함한 쥐, 가축 등을 포함하는 포유 동물을 의미하나, 본 발명의 효소 융합단백질 또는 이를 포함하는 상기 조성물로 치료 가능한 개체는 제한 없이 포함된다. 특히, 상기 개체는 파브리병이 발병하였거나, 파브리병의 발병 위험이 높은 개체일 수 있으나, 파브리병과 연관되어 신경병증이 발병하였거나 발병할 수 있는 개체라면 제한 없이 본 발명의 범주에 포함된다.

[256]

[257] 본 발명의 방법은 효소 융합단백질을 포함하는 약학적 조성물을 약학적 유효량으로 투여하는 것을 포함할 수 있다. 적합한 총 1일 사용량은 올바른 의학적 판단범위 내에서 처치의에 의해 결정될 수 있으며, 1회 또는 수회로 나누어 투여할 수 있다. 그러나 본 발명의 목적상, 특정 환자에 대한 구체적인 치료적 유효량은 달성하고자 하는 반응의 종류와 정도, 경우에 따라 다른 제제가 사용되는지의 여부를 비롯한 구체적 조성물, 환자의 연령, 체중, 일반 건강 상태, 성별 및 식이, 투여 시간, 투여 경로 및 조성물의 분비율, 치료기간, 구체적 조성물과 함께 사용되거나 동시 사용되는 약물을 비롯한 다양한 인자와 의약 분야에 잘 알려진 유사 인자에 따라 다르게 적용하는 것이 바람직하다.

[258] 투여 경로, 투여 용량 및 용법에 대해서는 앞서 설명한 바와 같다.

[259] 한편, 이에 제한되지 않으나, 상기 신경병증의 예방 또는 치료 방법은 하나 이상의 신경병증에 대한 치료적 활성을 가지는 화합물 또는 물질을 투여하는 것을 더 포함하는 병용요법일 수 있다.

[260] 본 발명의 용어, "병용"은 동시, 개별 또는 순차 투여를 나타내는 것으로 이해되어야 한다. 상기 투여가 순차 또는 개별적인 경우, 2차 성분 투여의 간격은 상기 병용의 이로운 효과를 잃지 않도록 하는 것이어야 한다.

[261]

[262] 본 발명을 구현하는 또 다른 양태는 상기 효소 융합단백질, 또는 이를 포함하는 조성물의 파브리병에 기인하거나 동반되는 신경병증 예방 또는 치료 용도를 제공한다.

[263] 상기 효소 융합단백질, 조성물, 신경병증, 예방 및 치료에 대해서는 앞서 설명한 바와 같다.

[264]

[265] 본 발명을 구현하는 또 다른 양태는 상기 효소 융합단백질, 또는 이를 포함하는 조성물의 파브리병에 기인하거나 동반되는 신경병증에 대한 예방 또는 치료용 약제 (혹은 약학적 조성물)를 제조하기 위한 용도를 제공한다.

[266] 상기 효소 융합단백질, 조성물, 신경병증, 예방 및 치료에 대해서는 앞서 설명한 바와 같다.

[267]

[268] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시 예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 범위가

이들 실시 예에 의해 제한되는 것은 아니다.

[269]

[270] **실시예 1: 알파 갈락토시다제-Fc 융합단백질 (α-galactosidase-Fc)의 제작**

[271]

[272] 본 발명자들은 반평행(anti-parallel) 이량체의 치료학적 효소를 포함하는 알파 갈락토시다제-Fc 융합단백질 (이하, 효소 융합단백질과 혼용되어 사용된다)을 생산하기 위해, 천연형 알파-갈락토시다제 (alpha-galactosidase) 와 링커 (서열번호 10), Fc 면역글로불린 영역(서열번호 7)을 유전자 수준에서 융합하고 발현 벡터에 합성하였다.

[273]

[274] 구축된 효소 융합단백질의 서열 중 Fc 영역에서 사슬 교환과 N-글리코실화 부위(N-glycosylation site)를 제거하기 위하여 부위 특이적 변이 PCR기법을 이용하였다.

[275]

[276] 구체적으로, 서열번호 1,2 의 프라이머를 이용하여 사슬 교환에 관여하는 Fc 영역 (서열번호 8)의 2번째 아미노산인 세린을 프롤린으로 대체하였고, 서열번호 3, 4의 프라이머를 이용하여 N-글리코실화가 이루어지는 Fc 영역의 71번째 아미노산인 아스파라긴을 글루타민으로 치환하였다.

[277]

[278] [표1]

변이 (Mutagenesis) 프라이머

프라이머	서열	서열 번호
Fc(S2P)_F	5'- CTGGCGGTGGCGGATCGCCACCATGCCCAGCACCTGAGTTCCT-3'	1
Fc(S2P)_R	5'- AGGAACTCAGGTGCTGGGCATGGTGGCGATCCGCCACCGCCAG-3'	2
Fc(N71Q)_F	5'- AGCCGCGGGAGGAGCAGTTCCAAAGCACGTACCGTGTGGTCAG-3'	3
Fc(N71Q)_R	5'- CTGACCACACGGTACGTGCTTTGGAACTGCTCCTCCCGCGGCT-3'	4

[279]

[280] 합성된 알파 갈락토시다제-Fc 융합단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드는 발현벡터인 XOGC벡터에 제한효소를 이용하여 삽입하였다. BamHI과 XhoI의 제한효소는 알파 갈락토시다제와 Fc 면역글로불린 영역을 모두 자르지 않는 제한효소이다. 상기 제한효소로 잘려진 알파 갈락토시다제-Fc를 동일한 제한효소로 잘려진 X0GC벡터에 삽입하여 알파 갈락토시다제-Fc 융합단백질을 발현하는 벡터를 완성하였다. 알파 갈락토시다제는 면역글로불린 Fc영역이 이량체를 형성할 때 반평행 이량체를 형성하게 된다.

[281]

[282] 알파 갈락토시다제-Fc의 DNA 및 단백질 서열은 하기 표 2와 같다. 하기 표 2의

단백질 서열에서 밑줄은 신호서열을, 볼드는 아미노산이 치환된 부분을, 그리고 이탤릭체는 링커를 나타낸다.

[283]

[284] [표2]

Name	서열		서열번호
알파 갈락토시다제 -Fc	DNA	ATGCAGCTGA GGAACCCAGA ACTACATCTG GGCTGCGCGC TTGCGCTTCG CTTCCTGGCC CTCGTTTCCT GGGACATCCC TGGGGCTAGA GCACTGGACA ATGGATTGGC AAGGACGCCT ACCATGGGCT GGCTGCACTG GGAGCGCTTC ATGTGCAACC TTGACTGCCA GGAAGAGCCA GATTCCTGCA TCAGTGAGAA GCTCTTCATG GAGATGGCAG AGCTCATGGT CTCAGAAGGC TGGAAGGATG CAGGTTATGA GTACCTCTGC ATTGATGACT GTTGGATGGC TCCCCAAAGA GATTCAGAAG GCAGACTTCA GGCAGACCCT CAGCGCTTTC CTCATGGGAT TCGCCAGCTA GCTAATTATG TTCACAGCAA AGGACTGAAG CTAGGGATTT ATGCAGATGT TGGAAATAAA ACCTGCGCAG GCTTCCCTGG GAGTTTTGGA TACTACGACA TTGATGCCCA GACCTTTGCT GACTGGGGAG TAGATCTGCT AAAATTTGAT GGTTGTTACT GTGACAGTTT GGAAAATTTG GCAGATGGTT ATAAGCACAT GTCCTTGGCC CTGAATAGGA CTGGCAGAAG CATTGTGTAC TCCTGTGAGT GGCCTCTTTA TATGTGGCCC TTTCAAAAGC CCAATTATAC AGAAATCCGA CAGTACTGCA ATCACTGGCG AAATTTTGCT GACATTGATG ATTCCTGGAA AAGTATAAAG AGTATCTTGG ACTGGACATC TTTTAACCAG GAGAGAATTG TTGATGTTGC TGGACCAGGG GGTTGGAATG ACCCAGATAT GTTAGTGATT GGCAACTTTG GCCTCAGCTG GAATCAGCAA GTAACTCAGA TGGCCCTCTG GGCTATCATG GCTGCTCCTT TATTCATGTC TAATGACCTC CGACACATCA GCCCTCAAGC CAAAGCTCTC CTTCAGGATA AGGACGTAAT TGCCATCAAT CAGGACCCCT TGGGCAAGCA AGGGTACCAG CTTAGACAGG GAGACAACTT TGAAGTGTGG GAACGACCTC TCTCAGGCTT AGCCTGGGCT	12

[285]

		GTAGCTATGA TAAACCGGCA GGAGATTGGT GGACCTCGCT CTTATACCAT CGCAGTTGCT TCCCTGGGTA AAGGAGTGGC CTGTAATCCT GCCTGCTTCA TCACACAGCT CCTCCCTGTG AAAAGGAAGC TAGGGTTCTA TGAATGGACT TCAAGGTTAA GAAGTCACAT AAATCCCACA GGCACTGTTT TGCTTCAGCT AGAAAATACA ATGCAGATGT CATTAAAAGA CTTACTT*GGC GGCGGAGGTT* *CAGGTGGTGG TGGCTCTGGC GGTGGAGGGT CGGGGGGAGG CGGCTCTGGA* *GGAGGGGGCT CCGGTGGGGG AGGTAGC*CCA **CCA**TGCCCAG CACCTGAGTT CCTGGGGGGA CCATCAGTCT TCCTGTTCCC CCCAAAACCC AAGGACACCC TCATGATCTC CCGGACCCCT GAGGTCACAT GCGTGGTGGT GGACGTGAGC CAGGAAGACC CTGAGGTCCA GTTCAACTGG TACGTGGACG GCGTGGAGGT GCATAATGCC AAGACAAAGC CGCGGGAGGA GCAGTTC**CAA** AGCACGTACC GTGTGGTCAG CGTCCTCACC GTCCTGCACC AGGACTGGCT GAATGGCAAG GAGTACAAGT GCAAGGTCTC CAACAAAGGC CTCCCATCCT CCATCGAGAA AACCATCTCC AAAGCCAAAG GGCAGCCCCG AGAACCACAG GTGTACACCC TGCCCCCATC CCAGGAGGAG ATGACCAAGA ACCAGGTCAG CCTGACCTGC CTGGTCAAAG GCTTCTATCC CAGCGACATC GCCGTGGAGT GGGAGAGCAA TGGGCAGCCG GAGAACAACT ACAAGACCAC GCCTCCCGTG CTGGACTCCG ACGGCTCCTT CTTCCTCTAC AGCAGGCTAA CCGTGGACAA GAGCAGGTGG CAGGAGGGGA ACGTCTTCTC ATGCTCCGTG ATGCATGAGG CTCTGCACAA CCACTACACG CAGAAGAGCC TCTCCCTGTC TCTGGGTAAA TGA	
	단백질	MQLRNPELHL GCALALRFLA LVSWDIPGAR ALDNGLARTP TMGWLHWERF MCNLDCQEEP DSCISEKLFM EMAELMVSEG WKDAGYEYLC IDDCWMAPQR DSEGRLQADP QRFPHGIRQL ANYVHSKGLK LGIYADVGNK TCAGFPGSFG YYDIDAQTFA DWGVDLLKFD GCYCDSLENL ADGYKHMSLA LNRTGRSIVY	13

[286]

		SCEWPLYMWP FQKPNYTEIR QYCNHWRNFA DIDDSWKSIK SILDWTSFNQ ERIVDVAGPG GWNDPDMLVI GNFGLSWNQQ VTQMALWAIM AAPLFMSNDL RHISPQAKAL LQDKDVIAIN QDPLGKQGYQ LRQGDNFEVW ERPLSGLAWA VAMINRQEIG GPRSYTIAVA SLGKGVACNP ACFITQLLPV KRKLGFYEWT SRLRSHINPT GTVLLQLENT MQMSLKDLLG GGGSGGGGSG GGGSGGGGSG GGGSGGGGSP PCPAPEFLGG PSVFLFPPKP KDTLMISRTP EVTCVVVDVS QEDPEVQFNW YVDGVEVHNA KTKPREEQFQ STYRVVSVLT VLHQDWLNGK EYKCKVSNKG LPSSIEKTIS KAKGQPREPQ VYTLPPSQEE MTKNQVSLTC LVKGFYPSDI AVEWESNGQP ENNYKTTPPV LDSDGSFFLY SRLTVDKSRW QEGNVFSCSV MHEALHNHYT QKSLSLSLGK	

[287]

[288] 상기 실시예에서 제조된 효소 융합단백질 발현 벡터를 알파 갈락토시다제-Fc로 명명하였다.

[289]

[290] **실시예 2: 알파 갈락토시다제-Fc 융합단백질(α-galactosidase-Fc)의 생체내(in vivo) 신경병증 개선효과**

[291]

[292] Lyso-Gb_3의 축적으로 통증 및 온도 감각 상실을 포함하는 말초 신경계 감각/감각운동성 장애에 대한 본 발명의 효소 융합단백질의 효과를 확인하기 위해 다음과 같이 실험 하였다.

[293]

[294] 알파 갈락토시다제 유전자 결손 마우스(α-Gal A KO, Jackson laboratory Stock No. 003535)에서 알파 갈락토시다제-Fc 융합단백질(α-galactosidase-Fc)의 투여에 따른 신경병증(neuropathy) 치료효과를 평가하기 위하여 마우스를 5그룹으로 준비하였다. 첫번째 그룹 야생형 마우스(wild type, n=6)는 알파 갈락토시다제-Fc 융합단백질의 부형제를 투여하였고, 두번째 그룹부터는 알파 갈락토시다제 유전자 결손 마우스(n=7) 시험군으로, 그룹-2: 알파 갈락토시다제-Fc 융합단백질 부형제 투여, 그룹-3: 아갈시다제 베타 1.0 mg/kg (2주 1회, 정맥투여), 그룹-4: 알파 갈락토시다제-Fc 융합단백질 1.0 mg/kg (2주 1회, 피하투여), 그룹-5: 알파 갈락토시다제-Fc 융합단백질 2.0 mg/kg (4주 1회, 피하투여)이 있다.

[295]

[296] 말초 신경계 감각 평가를 위해, 마우스에서 투여 전 그리고 투여 후 12주와 투여 후 20주에 각각 열판 테스트(hot plate test)를 진행하여 온도감각의 개선정도를 평가하였다. 이들 동물은 55 ℃의 온도로 조정된 열판 상에서 유리 실린더(glass

cylinder) 내에 위치시켜 마우스의 행동을 관찰하고, 뒷발에 열판에서 떨어지기까지의 반응 시간(잠복 시간)을 측정했다.

[297]

[298] 그 결과, 알파 갈락토시다제 유전자 결손 마우스는 야생형 마우스에 비하여, 열판 테스트에서 훨씬 높은 잠복 역치(threshold latency)를 나타내었다. 알파 갈락토시다제-Fc 융합단백질 반복투여 시, 부형제 대조군 및 아갈시다제 베타 투여군 대비 낮은 잠복 역치를 나타내었다. 특히, 알파 갈락토시다제-Fc 융합단백질을 반복투여한 마우스에서는 잠복 역치가 야생형 쥐의 수준의 통계학적으로 필적하는 수준으로 유의하게 낮아지는 것을 확인하였다(도 1).

[299]

[300] 또한, 20주에 요추(lumbar spine)로부터 감각 신경 세포의 신경세포체가 위치하는 배근 신경절(dorsal root ganglion, DRG)을 toluidine blue로 염색하고 조직학적으로 분석하여 알파 갈락토시다제-Fc 융합단백질의 신경병증 개선효력을 세포단위에서 평가하였다.

[301]

[302] 두 실험의 통계 처리는 일원분산 분석(one-way ANOVA) (* ~ $^{***}p<0.05$ ~ 0.001) 및 독립표본 T 검정(unpaired T test) (††$p<0.01$) 사용하여 부형제 군(대조군) 및 시험군 사이의 통계적인 유의성을 비교하였다.

[303]

[304] 그 결과, 세포 수준의 조직학적 분석에서는 도 1의 열판 테스트의 결과와 일치하게 알파 갈락토시다제 유전자 결손 마우스에서 야생형 마우스에 비하여 월등한 수준으로 배근 신경절에서 공포화(vacuolation)된 신경세포의 증가가 확인되었다. 이러한 세포 병변은 20주간 알파 갈락토시다제-Fc 융합단백질을 투약한 마우스 그룹에서 통계적으로 유의한 수준으로 억제되는 것이 확인되었으며, 다만 아갈시다제 베타 투여군에서는 부형제 투약군에 비하여 의미있는 개선 효과가 나타나지 않았다(도 2).

[305]

[306] 이러한 실험 결과는 알파 갈락토시다제-Fc 융합단백질이 라이소좀 내에서 향상된 안정성을 갖고, 이를 바탕으로 말초 감각 신경 보호 및 신경 세포의 변형 억제를 통해 신경병증에서도 보호효과 또는 치료적 효력을 나타낼 수 있음을 암시한다.

[307]

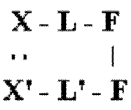
[308] 이상의 설명으로부터, 본 발명이 속하는 기술분야의 당 업자는 본 발명이 그 기술적 사상이나 필수적 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 실시될 수 있다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 이와 관련하여, 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적인 것이 아닌 것으로서 이해해야만 한다. 본 발명의 범위는 상기 상세한 설명보다는 후술하는 특허 청구범위의 의미 및 범위 그리고 그 등가 개념으로부터 도출되는 모든 변경 또는 변형된 형태가

본 발명의 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.

청구범위

[청구항 1] 하기 화학식 1로 표시되는, 효소 융합단백질을 포함하는 파브리병에 기인하거나 동반되는 신경병증(neuropathy)의 예방 또는 치료용 약학적 조성물:

[화학식 1]



여기서, X 및 X'은 알파 갈락토시다제이고;
L 및 L'은 링커로, 각각 독립적으로 동일하거나 다른 종류의 링커이며;
F는 면역글로불린 Fc 영역의 하나의 폴리펩티드 사슬이며;
|은 공유 결합이고;
:는 공유 또는 비공유 결합임.

[청구항 2] 제1항에 있어서, 상기 효소는 X와 X'이 서로 반평행(anti-parallel)으로 이량체를 형성한 것인, 약학적 조성물.

[청구항 3] 제1항에 있어서, 상기 면역글로불린 Fc 영역은 비당쇄화된 것인, 약학적 조성물.

[청구항 4] 제1항에 있어서, 상기 면역글로불린 Fc 영역은 서열번호 15의 아미노산 서열을 갖는 힌지 영역을 포함하는 것인, 약학적 조성물.

[청구항 5] 제1항에 있어서, 상기 면역글로불린 Fc 영역은 서열번호 8의 아미노산 서열에서 2번째 아미노산이 프롤린으로 치환되거나; 71번째 아미노산이 글루타민으로 치환되거나; 또는 2번째 아미노산은 프롤린으로, 71번째 아미노산은 글루타민으로 치환된 것인, 약학적 조성물.

[청구항 6] 제1항에 있어서, 상기 링커는 1개 내지 100개의 아미노산으로 이루어진 것을 특징으로 하는 펩타이드 링커인 것인, 약학적 조성물.

[청구항 7] 제6항에 있어서, 상기 펩타이드 링커는 [GS]x, [GGGS]x 또는 [GGGGS]x의 아미노산 서열로 이루어지고, 여기서 x는 자연수 1 내지 20 중 하나인 것을 특징으로 하는 것인, 약학적 조성물.

[청구항 8] 제7항에 있어서, 상기 펩타이드 링커는 서열번호 11의 아미노산 서열인 것을 특징으로 하는 것인, 약학적 조성물.

[청구항 9] 제1항에 있어서, 상기 신경병증은 말초신경병증, 또는 소섬유 신경병증인, 약학적 조성물.

[청구항 10] 제1항에 있어서, 상기 약학적 조성물은 말초 감각 신경에 대한 보호 효과를 갖는 것인, 약학적 조성물.

[청구항 11] 제1항에 있어서, 상기 약학적 조성물은 배근신경절(dorsal root ganglion, DRG) 세포의 공포화(vacuolation)를 억제하는 것인, 약학적 조성물.

[청구항 12] 제1항에 있어서, 상기 효소 융합단백질은 이를 필요로 하는 개체에

투여되는 횟수가 융합단백질이 아닌 효소에 비해 감소된 것인, 약학적 조성물.

[청구항 13] 제1항에 있어서, 상기 약학적 조성물은 2주에 1회 또는 1개월에 1회 개체에 투여되는 것인, 약학적 조성물.

[청구항 14] 제1항에 있어서, 상기 효소 융합단백질은 서열번호 13의 아미노산 서열을 포함하는 단량체를 포함하는 것인, 약학적 조성물.

[청구항 15] 제1항에 있어서, 상기 X 및 X'은 각각 동일하거나 다른 아미노산 서열을 포함하는 효소인, 약학적 조성물.