명세서

발명의 명칭: 면역글로불린 FC 단편 결합을 이용한 단백질 및 펩타이드의 용해도를 개선시키는 방법

기술분야

[1] 본 발명은 생리활성 단백질 또는 펩타이드를 면역글로불린 Fc 단편과 결합시키는 단계를 포함하는, 면역글로불린 Fc 단편이 결합되지 않은 생리활성 단백질 또는 펩타이드에 비하여 생리활성 단백질 또는 펩타이드의 용해도를 개선시키는 방법; 및 면역글로불린 Fc 단편을 포함하는, 면역글로불린 Fc 단편 비포함 조성물에 비하여 개선된 용해도를 나타내는 것을 특징으로 하는, 생리활성 단백질 또는 펩타이드의 용해도 개선용 조성물에 관한 것이다.

[2]

배경기술

[3] 약물은 용해되어 있는 상태에서만 약리작용을 나타낼 수 있으므로, 약물의 용해도는 약효와 밀접한 관계를 가진다. 물에 잘 녹는 약물의 경우에는 주사제로도 용이하게 제조되고 정제하여 복용하면 위장관에서 용해되나, 난용성 약물의 경우에는 이를 가용화하지 않은 상태에서 복용하면 위장관에서 펠렛과 같은 집합체 상태로 존재하고 단일 분자로 용해되지 않아 흡수되지 않을 수 있다. 또한, 난용성 약물을 가용화하지 않은 상태에서 주사제로 사용하는 경우, 혈관이 막혀 혈전이 생겨 주사제로 사용할 수 없으므로, 약물 용해도는 약물의 제형화에 있어 중요한 문제이다.

[4]

[5] 약물의 용해에 있어 잘 알려진 방법 중 하나는, 가용화제로서 계면활성제를 사용하는 방법이다. 계면활성제는 분자 내에 친유성기와 친수성기를 모두 가지므로, 물속에서 소수성 탄화수소 사슬이 가운데로 모이고, 친수성 그룹이 물과 만나도록 둥근 공 모양의 마이셀(micelle)을 형성하므로, 마이셀 내에 약물을 봉입시킴으로써 약물을 녹일 수 있다. 다만, 계면활성제를 사용하는 이와 같은 방법은 계면활성제를 고농도로 사용하였을 때, 정맥 내 투여에 적합하지 않을 수 있다. 또한, 마이셀 형성에 대한 임계 농도 이하로 마이크로에멀젼(microemulsion)의 농도가 희석되는 경우에는 마이셀 내에 포함된 약물의 응집이 유도될 수도 있다(Journal of Advanced Pharmacy Education & Research 2 (1) 32-67 (2012) ISSN 2249-3379). 따라서, 계면활성제를 사용하지 않으면서도 제제의 농도 변화와 관계없이 약물의 용해도를 지속적으로 증가시키는 방법의 개발이 요구되어 왔다.

[6]

발명의 상세한 설명

기술적 과제

[7] 이러한 배경 하에 본 발명자들은, 생리활성 단백질 또는 펩타이드와 같은 약물의 용해도를 향상시킬 수 있는 방법을 개발하고자 예의 노력한 결과, 생리활성 단백질 또는 펩타이드에 면역글로불린 Fc 단편을 결합(conjugation)시키는 경우, 생리활성 단백질 또는 펩타이드의 용해도를 효과적으로 증가시켜 생리활성 단백질 또는 펩타이드를 포함하는, 약리학적으로 유효한 농도의 제제를 용이하게 제조할 수 있음을 확인하고, 본 발명을 완성하였다.

[8]

과제 해결 수단

[9] 본 발명의 목적은 생리활성 단백질 또는 펩타이드를 면역글로불린 Fc 단편과 결합시키는 단계를 포함하는, 면역글로불린 Fc 단편이 결합되지 않은 생리활성 단백질 또는 펩타이드에 비하여 생리활성 단백질 또는 펩타이드의 용해도를 개선시키는 방법을 제공하는 것이다.

[10] 본 발명의 다른 목적은 면역글로불린 Fc 단편을 포함하는, 면역글로불린 Fc 단편 비포함 조성물에 비하여 개선된 용해도를 나타내는 것을 특징으로 하는, 생리활성 단백질 또는 펩타이드의 용해도 개선용 조성물을 제공하는 것이다.

[11]

발명의 효과

[12] 본 발명에 따라 생리활성 단백질 및 펩타이드에 면역글로블린 Fc 단편을 결합시키면, 생리활성 단백질 및 펩타이드의 용해도를 효과적으로 개선시킬 수 있으므로, 다양한 약물의 제형화에 효과적일 수 있다.

[13]

도면의 간단한 설명

[14] 도 1은, 인슐린 및 지속형 인슐린 결합체의 표준검량곡선을 나타낸 것이다.

[15] 도 2는, 표 1의 조성에 따른 인슐린 및 지속형 인슐린 결합체의 용해도를 확인한 결과를 나타낸 것으로, 인슐린은 0.628 mg/mL의 용해도를, 지속형 인슐린 결합체는 인슐린 기준 15 mg/mL을 나타낸다.

[16] 도 3은, 서열번호 27의 옥신토모듈린 유도체 및 상기 유도체-PEG-면역글로불린 Fc 단편 결합체의 표준검량곡선을 나타낸 것이다.

[17] 도 4는, 표 4의 조성에 따른 서열번호 27의 옥신토모듈린 유도체 및 상기 유도체-PEG-면역글로불린 Fc 단편 결합체의 용해도를 확인한 결과를 나타낸 것으로, 옥신토모듈린 유도체는 0.188 mg/mL의 용해도를, 상기 결합체는 옥신토모듈린 기준 11 mg/mL을 나타낸다.

발명의 실시를 위한 최선의 형태

[18] 하나의 양태로서, 본 발명은 생리활성 단백질 또는 펩타이드를 면역글로불린 Fc 단편과 결합시키는 단계를 포함하는, 면역글로불린 Fc 단편이 결합되지 않은 생리활성 단백질 또는 펩타이드에 비하여 생리활성 단백질 또는 펩타이드의

용해도를 개선시키는 방법을 제공한다.

[19] 하나의 구체예로서, 본 발명에 따른 방법에 적용되는 면역글로불린 Fc 단편은 IgG, IgA, IgD, IgE 또는 IgM에서 유래된 Fc 단편인 것을 특징으로 한다.

[20] 또 하나의 구체예로서, 본 발명에 따른 방법에 적용되는 면역글로불린 Fc 단편은 각각의 도메인이 IgG, IgA, IgD, IgE 및 IgM으로 이루어진 군에서 선택되는 면역글로불린에서 유래되고, 상이한 기원을 가진 도메인의 하이브리드인 것을 특징으로 한다.

[21] 또 하나의 구체예로서, 본 발명에 따른 방법에 적용되는 면역글로불린 Fc 단편은 동일한 기원의 도메인으로 이루어진 단쇄 면역글로불린으로 구성된 이량체 또는 다량체인 것을 특징으로 한다.

[22] 또 하나의 구체예로서, 본 발명에 따른 방법에 적용되는 면역글로불린 Fc 단편은 인간 비당쇄화 IgG4 Fc 단편인 것을 특징으로 한다.

[23] 또 하나의 구체예로서, 본 발명에 따른 방법은 생리활성 단백질 또는 펩타이드에 연결된 비펩타이드성 중합체에 면역글로불린 Fc 단편을 결합시키는 단계를 포함하는 것을 특징으로 한다.

[24] 또 하나의 구체예로서, 본 발명에 따른 방법으로 제조한, 생리활성 단백질 또는 펩타이드와 면역글로불린 Fc 단편이 결합된 물질은 융합 단백질 형태인 것을 특징으로 한다.

[25] 또 하나의 구체예로서, 본 발명에 따른 방법에 적용되는 비펩타이드성 중합체는 폴리에틸렌 글리콜인 것을 특징으로 한다.

[26] 또 하나의 구체예로서, 본 발명에 따른 방법에 적용되는 비펩타이드성 중합체는 폴리프로필렌 글리콜, 에틸렌 글리콜과 프로필렌 글리콜의 공중합체, 폴리옥시 에틸화 폴리올, 폴리비닐 알콜, 폴리사카라이드, 덱스트란, 폴리비닐 에틸에테르, PLA(폴리락트산, polylactic acid) 및 PLGA(폴리락틱-글리콜산, polylactic-glycolic acid)와 같은 생분해성 고분자, 지질 중합체, 키틴, 히아루론산 및 이들의 조합으로 구성된 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 한다.

[27] 또 하나의 구체예로서, 본 발명에 따른 방법은 수용액에서 생리활성 단백질 또는 펩타이드의 용해도를 개선시키는 것임을 특징으로 한다.

[28] 또 하나의 구체예로서, 본 발명에 따른 방법에 적용되는 수용액은 구연산 또는 아세트산 완충용액, 비이온성 계면활성제로서 폴리소르베이트, 당알코올로서 만니톨, 등장화제로서 염화나트륨 또는 메티오닌을 포함하는 것을 특징으로 한다.

[29] 또 하나의 구체예로서, 본 발명에 따른 방법에 적용되는 수용액은 pH 5.0 내지 7.0인 것을 특징으로 한다.

[30] 또 하나의 구체예로서, 본 발명에 따른 방법에서 상기 생리활성 단백질 또는 펩타이드는 엑센딘-4, 글루카곤, 글루카곤 유사 펩타이드-1(GLP-1), 글루카곤 유사 펩타이드-2(GLP-2), 부갑상샘 호르몬(PTH), 칼시토닌, 인슐린 또는 옥신토모듈린인 것을 특징으로 한다.

[31] 또 하나의 구체예로서, 본 발명에 따른 방법에 적용되는 수용액은 추가로 계면활성제를 포함하는 것을 특징으로 한다.

[32] 또 하나의 양태로서, 본 발명은 면역글로불린 Fc 단편을 포함하는, 면역글로불린 Fc 단편 비포함 조성물에 비하여 개선된 용해도를 나타내는 것을 특징으로 하는, 생리활성 단백질 또는 펩타이드의 용해도 개선용 조성물을 제공한다.

[33] 하나의 구체예로서, 상기 조성물은 생리활성 단백질 또는 펩타이드가 면역글로불린 Fc 단편에 펩타이드성 링커 또는 비펩타이드성 링커를 통하여 연결된, 생리활성 단백질 또는 펩타이드 및 면역글로불린 Fc 단편의 결합체를 유효성분으로 포함하는 것을 특징으로 한다.

[34]

발명의 실시를 위한 형태

[35] 본 발명은 생리활성 단백질 또는 펩타이드를 면역글로불린 Fc 단편과 결합시키는 단계를 포함하는, 면역글로불린 Fc 단편이 결합되지 않은 생리활성 단백질 또는 펩타이드에 비하여 생리활성 단백질 또는 펩타이드의 용해도를 개선시키는 방법에 관한 것이다. 본 발명의 방법은 용매에 계면활성제를 추가하지 않는 경우에도 생리활성 단백질 또는 펩타이드의 용해도를 효과적으로 개선시키는 효과를 지닌다. 기존 단백질 의약품의 구성 성분인 생리활성 단백질 또는 펩타이드, 구체적으로 인슐린, 옥신토모듈린 등의 경우, 체내 투여용 제제의 일반적인 pH 범위인 pH 5 내지 7에서 낮은 용해도를 나타내어 원하는 농도의 제제로의 제조에 어려움이 있었으며, 또한 주사용 제제의 경우에는 생체 내에서 침전을 유발하여 의도하지 않은 부작용을 야기할 수 있는 문제점이 있었다. 그러나 놀랍게도, 상기 생리활성 단백질 또는 펩타이드에 면역글로불린 Fc 단편을 결합시키는 경우, 상기 pH 범위 내에서 용해도가 증가함을 본 발명에서 확인하였다. 즉, 본 발명의 방법은 pH 5 내지 7의 약산성 구간에서 낮은 용해도를 나타내는 인슐린, 옥신토모듈린과 같은, 펩타이드 또는 단백질의 용해도를 향상시킬 수 있다는 효과를 가진다.

[36]

[37] 본 발명에서 용어, "용해도"는, 생리활성 단백질 또는 펩타이드가 인체에 투여하기 적합한 용매에 용해될 수 있는 정도를 의미한다. 구체적으로, 특정 온도에서 주어진 용매에 대하여 용질이 포화된 정도를 나타내는 것일 수 있다. 용해도는 용질의 포화 농도를 결정함으로써 측정할 수 있으며, 예컨대 용매에 용질을 과량으로 첨가하고 이를 교반하고 여과한 다음, 농도를 UV 분광기 또는 HPLC 등을 사용하여 측정할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 생리활성 단백질 또는 펩타이드가 치료용으로 사용되기 위해서는 약리학적으로 유효한 양으로 용매에 용해되는 것이 중요하며, 이는 동결건조 제제의 재구축 시의 농도, 또는 액상 제제의 활성 물질의 농도 등을 결정하는데 중요한 고려 사항이

된다.

[38]

[39] 본 발명은, 생리활성 단백질 또는 펩타이드에 면역글로불린 Fc 단편을 결합시키는 경우, 상기 단편이 결합되지 않은 생리활성 단백질 또는 펩타이드에 비하여 용해도가 현저히 증가될 수 있음을 확인한 것을 기초로 하며, 이를 통하여 수용액에서 생리활성 단백질 또는 펩타이드의 용해도를 개선시킨 것을 하나의 특징으로 한다.

[40] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 대표적인 생리활성 펩타이드로서 인슐린 및 옥신토모듈린을 사용하여 이에 면역글로불린 Fc를 각각 붙이는 경우, 인슐린 및 옥신토모듈린의 용해도가 현저히 증가되는 결과를 나타내었다(도 2 및 4).

[41]

[42] 본 발명에서 용어, "수용액"은 생리활성 단백질 또는 펩타이드를 용해시키고자 하는 용액을 의미한다. 상기 수용액은 생리활성 단백질 또는 펩타이드가 인체에 투여되기 적합한 용액이다. 본 발명의 한 구체적인 실시 형태에서 수용액의 pH는 중성 또는 약산성, 예를 들어 pH 5.0 내지 7.0일 수 있다. 본 발명의 방법이 적용될 수 있는 수용액은 그 종류가 특별히 제한되지는 않으나, 구연산 또는 아세트산 완충용액으로 비이온성 계면활성제로서 폴리소르베이트, 당 알코올로서 만니톨, 등장화제로서 염화나트륨 또는 메티오닌을 포함하는 조성을 가질 수 있다.

[43]

[44] 본 발명에 따른 방법에서 상기 면역글로불린 Fc 단편은 생리활성 단백질 또는 펩타이드에 비펩타이드성 중합체를 통하여 결합된 것일 수 있다. 구체적으로, 상기 면역글로불린 Fc 단편은 생리활성 단백질 또는 펩타이드에 연결된 비펩타이드성 중합체에 결합되거나, 면역글로불린 Fc 단편-비펩타이드성 중합체가 생리활성 단백질 또는 펩타이드에 연결될 수 있다.

[45]

[46] 본 발명에서 용어, "비펩타이드성 중합체"는, 반복 단위가 1개 이상 결합된 생체 적합성 중합체를 의미하며, 상기 반복 단위들은 펩타이드 결합이 아닌 임의의 공유결합을 통해 서로 연결된다.

[47] 본 발명에 사용 가능한 비펩타이드성 중합체는 폴리에틸렌글리콜, 폴리프로필렌글리콜, 에틸렌글리콜과 프로필렌글리콜의 공중합체, 폴리옥시에틸화폴리올, 폴리비닐알콜, 폴리사카라이드, 덱스트란, 폴리비닐에틸에테르, 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 폴리에틸렌글리콜이나 이에 제한되지 않는다. 당해 분야에 이미 알려진 이들의 유도체 및 당해 분야의 기술 수준에서 용이하게 제조할 수 있는 유도체들도 본 발명의 범위에 포함된다.

[48] 상기 비펩타이드성 중합체는 면역글로불린 Fc 단편이 캐리어로서의 역할을 충분히 수행할 수 있도록 생체 내 단백질분해효소에 의해 쉽게 절단되지 않는, 생체 내 단백질분해효소에 저항성 있는 중합체를 사용하는 것이 바람직하며, 이러한 중합체라면 제한 없이 사용될 수 있다. 이러한 비펩타이드성 중합체의 분자량은 1 내지 100 kDa 범위, 더 구체적으로는 1 내지 20 kDa 범위이다. 또한, 상기 면역글로불린 Fc 단편과 결합되는 본 발명의 비펩타이드성 중합체는 한 종류의 중합체뿐만 아니라 상이한 종류의 중합체들의 조합이 사용될 수도 있다.

[49] 비펩타이드성 중합체는 면역글로불린 Fc 단편, 및 단백질 또는 펩타이드 약물과 결합될 수 있는 반응기를 가져, 면역글로불린 Fc 단편과 단백질 또는 펩타이드 약물을 서로 연결시키는 링커 역할을 수행할 수 있다.

[50]

[51] 비펩타이드성 중합체를 링커로서 사용하여 생리활성 단백질 또는 펩타이드를 면역글로불린 Fc 단편과 결합시키는 것은, (1) 비펩타이드성 중합체를 생리활성 단백질 또는 펩타이드; 또는 면역글로불린 Fc 단편 중 어느 하나와 반응을 시키는 단계; 및 (2) 상기 단계 (1)의 반응 혼합물을 생리활성 단백질 또는 펩타이드, 또는 면역글로불린 Fc 단편 중 다른 하나와 반응시키는 단계를 순차적으로 수행함으로써 달성할 수 있다.

[52]

[53] 다만, 단계 (1)에서 양 말단 반응기를 가지는 비펩타이드성 중합체에 면역글로불린 Fc 단편을 반응시키는 경우, 구체적인 반응 조건에 따라서는 (1) 단계의 생성물 중 일부는 면역글로불린 Fc 단편의 2개의 N-말단이 비펩타이드성 중합체 양 말단에 모두 결합하는 다리(bridge) 형태로 나올 수 있다. 이러한 다리 형태의 단계 (1)의 생성물들은 생리활성 단백질 또는 펩타이드를 연결시키는 2차 커플링 반응은 불가능하게 하거나 커플링 수율을 크게 떨어뜨릴 수 있다. 따라서, 한 실시 형태에서는 면역글로불린 Fc 단편과 비펩타이드성 중합체 간에 다리 형태의 반응이 일어나는 것을 방지하기 위해서는 비펩타이드성 중합체와 생리활성 단백질 또는 펩타이드를 먼저 반응시킨 후, 비펩타이드성 중합체가 연결된 생리활성 단백질 또는 펩타이드를 면역글로불린 Fc 단편과 반응시키는 순서로 수행할 수 있다. 그러나, 본 발명의 용해도 개선 방법을 반드시 이러한 순서로 진행하여야 하는 것은 아니다.

[54]

[55] 상기 단계 (1)에서 비펩타이드성 중합체를 생리활성 단백질 또는 펩타이드에, 또는 면역글로불린 Fc 단편과 결합시키기 위해 사용하는 화학 반응은 공지의 방법을 이용할 수 있으며, 예를 들어, 양 말단에 반응기를 지니는 비펩타이드성 중합체와 생리활성 단백질 또는 펩타이드, 또는 면역글로불린 Fc 단편을 0 내지 25℃에서 1 내지 16시간 동안 반응시킬 수 있다. 이러한 반응을 통하여 생리활성 단백질 또는 펩타이드, 또는 면역글로불린 Fc 단편에 하나의 비펩타이드성 중합체가 반응기를 통하여 공유결합될 수 있다.

[56]

[57] 상기 단계 (1)에서 생리활성 단백질 또는 펩타이드와 비펩타이드성 중합체를 서로 연결시키는 반응은 유기용매를 포함하는 반응용액에서 수행될 수 있다. 이때, 상기 유기용매는 당업계에서 통상적으로 사용하는 유기용매를 모두 사용할 수 있으며, 이에 제한되지는 않으나 바람직하게는 1차, 2차, 3차 알코올을 모두 사용할 수 있고, 탄소수 1 내지 10의 알코올을 사용할 수 있으며, 보다 바람직하게 상기 알코올은 이소프로판올, 에탄올 또는 메탄올일 수 있다. 상기 유기용매는 생리활성 단백질 또는 펩타이드의 종류에 따라 적합한 유기용매를 자유롭게 선택할 수 있다. 또한, 상기 유기용매는 생리활성 단백질 또는 펩타이드와 비펩타이드성 중합체 간의 연결을 위한 것으로서, 이에 제한되지는 않으나 바람직하게는 반응용액 총량 기준 10 내지 60%로 포함될 수 있으며, 보다 바람직하게는 30 내지 55%, 보다 더 바람직하게는 45 내지 55%로 포함될 수 있다. 또한, 상기 반응용액의 pH는 이에 제한되지는 않으나, 바람직하게는 4.5 내지 7.0일 수 있으며, 보다 바람직하게는 5.0 내지 6.5일 수 있다.

[58]

[59] 또한, 반응에 참여하는 반응기의 종류에 따라 환원제를 추가로 포함하여 상기 단계들을 수행할 수 있다.

[60]

[61] 구체적으로, 본 발명에서 환원제는 비펩타이드성 중합체의 반응기인 알데히드와 폴리펩타이드(생리활성 단백질 또는 펩타이드, 면역글로불린 Fc 단편)의 아민기가 결합하여 생성되는 가역적 이민 이중결합을 환원시킴으로써 공유결합을 생성시킬 수 있는 당해 분야에 알려진 모든 환원제를 의미하며, 본 발명의 목적상 비펩타이드성 중합체가 생리활성 단백질 또는 펩타이드, 또는 면역글로불린 Fc 단편과 공유결합될 수 있도록 하기 위하여 반응용액에 포함될 수 있다. 상기 환원제는 당업계에서 통상적으로 사용하는 환원제를 모두 사용할 수 있으며, 이에 제한되지는 않으나 바람직하게는 시안화수소화붕소산나트륨(Sodium cyanoborohydride), 보란 피리딘 콤플렉스(Borane pyridine complex), 수소화 붕소 나트륨(Sodium borohydride), 보란 디메틸아민 콤플렉스(Borane dimethylamine complex), 보란 트리메틸아민 콤플렉스(Borane trimethylamine complex) 또는 트리아세톡시보로하이드라이드 나트륨(Sodium triacetoxyborohydride) 일 수 있다. 상기 환원제는 생리활성 단백질 또는 펩타이드, 또는 면역글로불린 Fc 단편의 종류와 반응 용매에 따라 적합한 환원제로 자유롭게 선택할 수 있다.

[62]

[63] 또한, 상기 환원제는 생리활성 단백질 또는 펩타이드와 비펩타이드성 중합체 또는 면역글로불린 Fc 단편과 비펩타이드성 중합체 간의 연결 반응(단계 (1)의 반응)시 최종 농도 1~20 mM, 커플링 반응(단계 (2)의 반응)시 최종 농도 1~100 mM로 포함될 수 있다.

[64]

[65] 한편, 상기 비펩타이드성 중합체는 양쪽 말단에 각각 면역글로불린 Fc 단편 및 생리활성 단백질 또는 펩타이드 약물과 결합될 수 있는 반응기, 구체적으로는 생리활성 단백질 또는 펩타이드; 또는 면역글로불린 Fc 단편의 N-말단 또는 라이신에 위치한 아민 그룹, 또는 시스테인의 티올 그룹과 결합될 수 있는 반응기를 포함한다. 이러한 양 말단 반응기는 반응 알데히드 그룹, 프로피온 알데히드 그룹, 부틸 알데히드 그룹, 말레이미드(maleimide) 그룹 및 석시니미드(succinimide) 유도체로 이루어진 군으로부터 선택되는 것이 바람직하다. 상기에서, 석시니미드 유도체로는 석시니미딜 카르복시메틸, 석시니미딜 발레르에이트, 석시니미딜 메틸부타노에이트, 석시니미딜 메틸프로피온에이트, 석시니미딜 부타노에이트, 석시니미딜 프로피온에이트, N-하이드록시석시니미드인 또는 석시니미딜 카보네이트가 이용될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니며, 면역글로불린 Fc 단편과 생리활성 단백질 또는 펩타이드의 아미노산 잔기의 아민 그룹 또는 티올 그룹과 연결될 수 있는 반응기라면 제한없이 포함된다.

[66]

[67] 특히, 상기 비펩타이드성 중합체가 양 말단에 반응 알데히드 그룹의 반응기를 갖는 경우, 비특이적 반응을 최소화하고, 비펩타이드성 중합체의 양 말단에서 생리활성 단백질 또는 펩타이드 및 면역글로불린과 각각 결합하는데 효과적이다. 알데히드 결합에 의한 환원성 알킬화로 생성된 최종 산물은 아미드 결합으로 연결된 것보다 훨씬 안정적이다. 알데히드 반응기는 낮은 pH에서 N-말단에 선택적으로 반응하며, 높은 pH, 예를 들어 pH 9.0 조건에서는 리신(lysine, Lys) 잔기와 공유결합을 형성할 수 있다.

[68]

[69] 상기 비펩타이드성 중합체인 링커의 양 말단 반응기는 서로 같거나 다를 수 있다. 예를 들어, 한쪽 말단에는 말레이미드 그룹을, 다른 쪽 말단에는 알데히드 그룹, 프로피온 알데히드 그룹, 또는 부틸 알데히드 그룹을 가질 수 있다. 양쪽 말단에 히드록시 반응기를 갖는 폴리에틸렌글리콜을 비펩타이드성 중합체로 이용하는 경우에는 공지의 화학반응에 의해 상기 히드록시 그룹을 상기 다양한 반응기로 활성화하거나, 상업적으로 입수 가능한 변형된 반응기를 갖는 폴리에틸렌글리콜을 이용하여 본 발명의 지속형 단백질 결합체를 제조할 수 있다.

[70]

[71] 또한, 특별히 이에 제한되지 않으나, 상기 비펩타이드성 중합체의 반응기는 각 생리활성 단백질 또는 펩타이드 및 면역글로불린 Fc 단편의 N-말단 아민기 또는 리신 잔기 측쇄의 아민기에 결합할 수 있다. 이때, 생리활성 단백질 또는 펩타이드 및 면역글로불린 Fc 단편 상에서 리신 잔기의 위치는 특정 자리에 제한되지 않으며, 상기 리신 잔기 역시 천연형 리신 뿐만 아니라, 비펩타이드성

중합체의 반응기와 연결될 수 있는 아민기를 포함하는 한 비천연형 아미노산 및 Lys 유도체를 비제한적으로 포함한다.

[72]

[73] 한편, 상기 (1) 단계에서 생리활성 단백질 또는 펩타이드를 비펩타이드성 중합체와 먼저 반응시키는 경우, 생리활성 단백질 또는 펩타이드와 비펩타이드성 중합체를 1:1 내지 1:20의 몰비로 반응시키고, (2) 단계에서는 (1) 단계 생성물인 생리활성 단백질 또는 펩타이드와 비펩타이드성 중합체의 연결체와 면역글로불린 Fc 단편을 1:0.5 내지 1:10의 몰비로 반응시키는 것이 바람직하나, 이에 제한되지 않는다.

[74]

[75] 또한, 상기 (1) 단계 수행 후 (2) 단계를 진행하기 앞서, (1) 단계의 생성물에서 생리활성 폴리펩타이드-비펩타이드성 중합체의 연결체 또는 면역글로불린 Fc 단편-비펩타이드성 중합체의 연결체를 분리 정제하는 과정을 포함할 수 있다. 본 과정은 당업계에 알려진 크로마토그래피와 같은 다양한 물질의 분리 방법을 이용하여 수행할 수 있다.

[76]

[77] 상기 (2) 단계에서 생리활성 폴리펩타이드-비펩타이드성 연결체를 면역글로불린 Fc 단편과 연결시키는 경우, pH 조건은 특별히 이에 제한되지 않으나, pH 4.0 내지 9.0의 조건 하에서 수행할 수 있다.

[78]

[79] 한편, 상기 생리활성 단백질 또는 펩타이드와 면역글로불린 Fc 단편은 융합 단백질 형태로 결합된 형태일 수 있다.

[80] 본 발명에서 용어, "융합 단백질"은, 서로 별개로 코딩되던 두 개 이상의 유전자를 결합(joining)시켜 제조한 단백질을 의미한다. 상기 융합 단백질은 재조합 DNA 기술을 통하여 인공적으로 제조할 수 있다. 또한, 상기 융합 단백질은 생리활성 단백질 또는 펩타이드와 면역글로불린 Fc 단편이 링커없이 연결된 형태, 또는 펩타이드성 링커를 통하여 연결된 형태일 수 있다.

[81]

[82] 여기서, 펩타이드성 링커란, 융합 단백질을 구성하는 두 종류의 단백질을 서로 연결하는 펩타이드를 의미한다. 상기 펩타이드성 링커는 융합 단백질의 구성요소인 두 단백질이 융합 단백질 형태에서도 독립적으로 접히거나(folding), 각각의 기능을 유지할 수 있도록 포함되는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[83]

[84] 본 발명에서 "면역글로불린 Fc 단편"은 면역글로불린의 중쇄와 경쇄 가변영역, 중쇄 불변영역 1(CH1)과 경쇄 불변영역 1(CL1)을 제외한, 중쇄 불변영역 2(CH2) 및 중쇄 불변영역 3(CH3) 부분을 의미하며, 중쇄 불변영역에 힌지(hinge) 부분을 포함하기도 한다. 또한, 본 발명의 면역글로불린 Fc 단편은 천연형과 실질적으로

동등하거나 향상된 효과를 갖는 한, 면역글로불린의 중쇄와 경쇄 가변영역만을 제외하고, 일부 또는 전체 중쇄 불변영역 1(CH1) 및/또는 경쇄 불변영역 1(CL1)을 포함하는 확장된 Fc 단편일 수 있다. 또한, CH2 및/또는 CH3에 해당하는 상당히 긴 일부 아미노산 서열이 제거된 영역일 수도 있다. 즉, 본 발명의 면역글로불린 Fc 단편은 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) 1종 또는 2종 이상의 도메인과 면역글로불린 힌지 영역(또는 힌지 영역의 일부)과의 조합, 6) 중쇄 불변영역 각 도메인과 경쇄 불변영역의 이량체일 수 있다.

[85]

[86] 본 발명의 목적상 상기 면역글로불린 Fc 단편은 이와 결합하는 약물, 즉 생리활성 단백질 또는 펩타이드의 용해도를 증가시키는 효과를 가지고 오는 물질을 의미하며, 또한 약물의 캐리어로서의 의미도 추가로 가질 수 있다.

[87] 본 발명에서 용어, "캐리어"란 용어는 약물과 함께 결합되는 물질을 의미하며, 일반적으로 약물에 결합되어 약물의 생리활성을 증감시키거나 제거하게 된다. 그러나, 본 발명의 목적상 본 발명에서의 상기 캐리어는 결합하는 약물의 생리활성의 감소를 최소화하면서 동시에 약물의 생체 내 안정성 및 피하투여 시 투여 부위로부터 혈중으로의 이동을 지연시켜 효력의 지속성을 증가시킴과 동시에 단백질과 펩타이드의 용해도를 개선시키기 위한 것을 의미한다. 이러한 약물의 캐리어로 기존에 지질(lipid), 중합체(polymer) 등 다양한 물질들이 연구되어 왔으나, 본 발명은 결합되는 약물의 생체 내 지속성 증진과 생체 내 활성 감소의 최소화하고, 또한 용해도를 최대한 증가시키기 위한 캐리어로서 면역글로불린 Fc 단편을 제공하는 것을 특징으로 한다. 또한, 상기 면역글로불린 Fc 단편은 생체 내에서 대사되는 생분해성의 폴리펩타이드이기 때문에 약물의 캐리어로서 안전하게 사용될 수 있는 효과 역시 지닌다. 이와 같은 특성으로, 생리활성 단백질 또는 펩타이드에 면역글로불린 Fc 단편이 결합된 결합체는, 본 발명에서 지속형 결합체로 명명될 수 있다.

[88]

[89] 또한, 본 발명에서 생리활성 단백질 또는 펩타이드의 용해도 개선을 위하여 사용되는 면역글로불린 Fc 단편은 링커를 통하거나, 또는 생리활성 단백질 또는 펩타이드에 직접적으로 부착될 수 있다. 이때, 면역글로불린 Fc 단편이 부착되는 생리활성 단백질 또는 펩타이드의 위치는 특별히 제한되지 않으며, 단백질 또는 펩타이드 내, 또는 N-말단 또는 C-말단 어느 부위든 가능하다. 다만, 본 발명의 방법으로 제조된 생리활성 단백질 또는 펩타이드와 면역글로불린 Fc 단편의 결합체가 인체에 투여되어 약리활성을 나타낼 수 있도록, 적용하는 생리활성 단백질 또는 펩타이드의 종류에 따라 그 생리활성을 저해시키지 않는 부위를 선택하는 것이 바람직하나, 특별히 이에 제한되는 것은 아니다.

[90]

[91] 또한, 면역글로불린 Fc 단편은 면역글로불린 전체 분자에 비해 상대적으로 분자량이 작아 결합체의 제조, 정제 및 수율 면에서 유리할 뿐만 아니라, 아미노산 서열이 항체마다 달라 높은 비균질성을 나타내는 Fab 부분이 제거되기 때문에 물질의 동질성이 크게 증가되고 혈중 항원성의 유발 가능성도 낮아지는 효과를 기대할 수 있다.

[92] 또한, 본 발명의 면역글로불린 Fc 단편은 천연형 아미노산 서열뿐만 아니라 이의 서열 유도체(derivatives)를 포함한다. 아미노산 서열 유도체란 천연의 아미노산 서열과 하나 이상의 아미노산 잔기가 상이한 서열을 가지는 것을 의미하고 자연적으로 발생하거나 인위적으로 발생시킬 수 있다. 면역글로불린의 Fc 단편은 결실, 삽입, 비상보적 또는 상보적 치환 또는 이들의 조합에 의한 유도체를 포함한다. 삽입은 통상적으로 약 1개 내지 20개 아미노산의 연속 서열로 이루어지나, 보다 큰 삽입도 가능하다. 결실은 통상적으로 약 1개 내지 30개의 잔기로 이루어진다. 이러한 면역글로불린 Fc 단편의 서열 유도체를 제조하는 기술은, 본 명세서에 참고로서 포함되는, 국제특허 공개 WO97/34631호, 국제특허 공개 WO96/32478호 등에 개시되어 있다. 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 사이의 교환이다. 경우에 따라서는 인산화, 황산화(sulfation), 아크릴화(acrylation), 당화(glycosylation), 메틸화, 파네실화(farnesylation), 아세틸화, 아미드화(amidation) 등으로 수식(modification)될 수도 있다.

[93] 상기에 기술된 면역글로불린 Fc 유도체는 본 발명의 Fc 단편과 동일한 생물학적 활성을 나타내나 Fc 단편의 열, pH 등에 대한 구조적 안정성을 증대시킨 유도체다.

[94] 또한, 이러한 면역글로불린 Fc 단편은 인간, 소, 염소, 돼지, 마우스, 토끼, 햄스터, 랫트, 기니아 피그 등의 동물의 생체 내에서 분리한 천연형으로부터 얻어질 수도 있고, 형질전환된 동물세포 또는 미생물로부터 얻어진 재조합형 또는 이의 유도체 일 수 있다. 여기서, 천연형으로부터 획득하는 방법은 전체 면역글로불린을 인간 또는 동물의 생체로부터 분리한 후, 단백질 분해효소를 처리하여 얻을 수 있다. 파파인(papain)을 처리할 경우에는 Fab 및 Fc로 절단되고, 펩신(pepsin)을 처리할 경우에는 pF'c 및 $F(ab')_2$로 절단된다. 이를 크기 배제 크로마토그래피(size-exclusion chromatography) 등을 이용하여 Fc 또는 pF'c를 분리할 수 있다. 바람직하게는 본 발명에 따른 면역글로불린 Fc 단편은 인간 유래의 면역글로불린 Fc 단편을 미생물로부터 수득한 재조합형 면역글로불린 Fc 단편이다.

[95] 또한, 면역글로불린 Fc 단편은 천연형 당쇄, 천연형에 비해 증가된 당쇄,

천연형에 비해 감소한 당쇄 또는 당쇄가 제거된 형태일 수 있다. 이러한 면역글로불린 Fc 당쇄의 증감 또는 제거에는 화학적 방법, 효소학적 방법 및 미생물을 이용한 유전공학적 방법과 같은 통상적인 방법이 이용될 수 있다. 여기서, Fc에서 당쇄가 제거된 면역글로불린 Fc 단편은 보체(c1q)의 결합력이 현저히 저하되고, 항체-의존성 세포독성 또는 보체-의존성 세포독성이 감소 또는 제거되므로, 생체내에서 불필요한 면역반응을 유발하지 않는다. 이런 점에서 약물의 캐리어로서의 본 발명의 목적에 보다 부합하는 형태는 당쇄가 제거되거나 비당쇄화된 면역글로불린 Fc 단편이다.

[96] 본 발명에서 "당쇄의 제거(deglycosylation)"는 효소로 당을 제거한 면역글로불린 Fc 단편을 말하며, "비당쇄화(aglycosylation)"는 원핵세포, 바람직하게는 대장균에서 생산하여 당쇄화가 되지 않은 면역글로불린 Fc 단편을 의미한다.

[97] 한편, 면역글로불린 Fc 단편은 인간, 소, 염소, 돼지, 마우스, 토끼, 햄스터, 랫트, 기니아 피그 등의 동물 기원일 수 있으며, 바람직하게는 인간 기원이다. 또한, 면역글로불린 Fc 단편은 IgG, IgA, IgD, IgE, IgM 유래 또는 이들의 조합(combination) 또는 이들의 하이브리드(hybrid)에 의한 Fc 단편일 수 있다. 바람직하게는 인간 혈액에 가장 풍부한 IgG 또는 IgM 유래이며, 가장 바람직하게는 리간드 결합 단백질의 반감기를 향상시키는 것으로 공지된 IgG 유래이다.

[98] 한편, 본 발명에서 "조합(combination)"이란 이량체 또는 다량체를 형성할 때, 동일 기원 단쇄 면역글로불린 Fc 단편을 암호화하는 폴리펩타이드가 상이한 기원의 단쇄 폴리펩타이드와 결합을 형성하는 것을 의미한다. 즉, IgG Fc, IgA Fc, IgM Fc, IgD Fc 및 IgE의 Fc 단편으로 이루어진 군으로부터 선택된 2종 이상의 단편으로부터 이량체 또는 다량체의 제조가 가능하다.

[99] 본 발명에서 "하이브리드(hybrid)"란 단쇄의 면역글로불린 Fc 단편 내에 2종 이상의 상이한 기원의 면역글로불린 Fc 단편에 해당하는 서열이 존재함을 의미한다. 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 군으로부터 1개 내지 4개 도메인으로 이루어진 도메인의 하이브리드가 가능하며, 힌지영역을 포함할 수 있다.

[100] 한편, IgG 역시 IgG1, IgG2, IgG3 및 IgG4의 서브클래스로 나눌 수 있으며, 본 발명에서는 이들의 조합 및 이들의 하이브리드를 포함한다. 바람직하게는 IgG2 및 IgG4 서브클래스이며, 가장 바람직하게는 보체 의존적 독성(complement-dependent cytotoxicity, CDC)과 같은 효과기 기능이 거의 없는 IgG4의 Fc 단편이다.

[101] 한편, 본 발명의 면역글로불린 Fc 단편은 그의 N-말단에 힌지 영역이 연결된 재조합 형태일 수 있는데, 이 경우 응집체 형태로 발현된 면역글로불린 Fc 단편은 활성 손실을 유발하지 않으면서 개시 코돈에 의해 코딩되는 개시

메티오닌 잔기가 제거된 활성형의 이합체 또는 단량체 형태의 Fc 단편으로 수용화(solublization) 및 재중첩(refolding) 되는 장점이 있다.

[102] 상기한 바와 같이 본 발명에 적합한 면역글로불린 Fc 단편에 대한 설명은, 본 명세서에 참고로서 포함되는, 대한민국 특허등록 제755315호, 제775343호 및 제824505호에 자세히 기술되어 있다.

[103] 즉, 약물의 캐리어로서 본 발명에 따른 인슐린 및 옥신토모듈린과의 융합 단백질에 사용하기에 가장 바람직한 면역글로불린 Fc 단편은 인간 IgG4 유래의 비-당쇄화된 Fc 단편이다. 인간 유래의 Fc 단편은 인간 생체에서 항원으로 작용하여 이에 대한 새로운 항체를 생성하는 등의 바람직하지 않은 면역반응을 유발할 수 있는 비-인간 유래의 Fc 단편에 비하여 바람직하다.

[104]

[105] 본 발명에서 용어, "생리활성 단백질 또는 펩타이드"는 유전표현 또는 생리기능을 조절하는 단백질 또는 펩타이드를 의미한다. 본 발명의 목적상 상기 생리활성 단백질 또는 펩타이드는, 용해도를 증가시키고자 하는 단백질 또는 펩타이드라면 제한없이 포함한다.

[106]

[107] 한편, 본 명세서에서 언급된 아미노산은 IUPAC-IUB 명명법에 따라 다음과 같이 약어로 기재하였다.

[108]

[109] 알라닌: Ala 또는 A

[110] 아르기닌: Arg 또는 R

[111] 아스파라긴: Asn 또는 N

[112] 아스파르트산: Asp 또는 D

[113] 시스테인: Cys 또는 C

[114] 글루탐산: Glu 또는 E

[115] 글루타민: Gln 또는 Q

[116] 글리신: Gly 또는 G

[117] 히스티딘: His 또는 H

[118] 이소류신: Ile 또는 I

[119] 류신: Leu 또는 L

[120] 리신: Lys 또는 K

[121] 메티오닌: Met 또는 M

[122] 페닐알라닌: Phe 또는 F

[123] 프롤린: Pro 또는 P

[124] 세린: Ser 또는 S

[125] 트레오닌: Thr 또는 T

[126] 트립토판: Trp 또는 W

[127] 티로신: Tyr 또는 Y

[128] 발린: Val 또는 V

[129]

[130] 또한, 본 명세서 전반을 통하여 아미노산에 대한 통상의 1문자 및 3문자 코드가 모두 사용될 수 있다.

[131]

[132] 또한, 상기 생리활성 단백질 또는 펩타이드는 천연형 생리활성 단백질 또는 펩타이드 외에도 이의 유도체, 변이체, 또는 이의 단편 등을 모두 포함하는 개념이다.

[133] 본 발명에서 용어, "유도체"는, 천연형 생리활성 단백질 또는 펩타이드의 아미노산 서열에서, 아미노산 잔기의 일부 그룹이 화학적으로 치환(예; alpha-methylation, alpha-hydroxylation), 제거(예; deamination) 또는 수식(예; N-methylation)된 형태를 의미한다. 상기 유도체는 천연형 생리활성 펩타이드와 서열 상동성 없이도 상기 천연형 생리활성 펩타이드의 활성을 보유하는 펩타이드 모방체의 형태도 포함한다.

[134] 본 발명에서 용어, "펩타이드 모방체"는 펩타이드를 모방하도록 고안된 단백질-유사 사슬을 말한다. 상기 펩타이드 모방체의 예로는, D-아미노산을 포함하는 D-펩타이드 모방체 등을 들 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 상기 펩타이드 모방체는 펩타이드 모방체 제조에 대한 당업계에 알려진 기술을 사용하여 용이하게 제조할 수 있다.

[135] 본 발명에서 용어, "변이체"는, 천연형 단백질 또는 펩타이드와 아미노산 서열이 하나 이상 다른 단백질 또는 펩타이드로서, 천연형 단백질의 활성을 나타내는 것을 의미한다. 상기 변이체는 천연형 단백질 또는 펩타이드에서 일부 아미노산이 치환(substitution), 추가(addition), 제거(deleteion) 및 수식(modification) 중에서 어느 하나의 방법 또는 이들 방법의 조합을 통해 제조될 수 있다. 여기서, 추가된 아미노산은 천연에 존재하지 않는 아미노산(예; D형 아미노산)도 가능할 수 있다.

[136] 본 발명에서 용어, "단편"은, 천연형 단백질 또는 펩타이드의 아미노 말단 또는 카르복시 말단에 하나 또는 그 이상의 아미노산이 삭제된 형태를 의미하며, 바람직하게는 천연형 단백질의 활성을 보유하는 것일 수 있다.

[137] 이러한 생리활성 단백질 또는 펩타이드는 천연 또는 재조합 기원 중 어떠한 방법으로 제조된 것이나 모두 가능하며, 그 예로 대장균과 같은 원핵세포를 숙주 세포로 이용하여 제조한 재조합 단백질일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[138]

[139]

[140] 한편, 상기 생리활성 단백질 또는 펩타이드는, 옥신토모듈린, 엑센딘-4(exendin-4), 글루카곤 유사 펩타이드-1(GLP-1), GLP-2, 글루코스-의존성 인슐린 분비 펩타이드(glucose-dependent insulinotropic peptide, GIP)와 같은

인슐린 분비 펩타이드, 인슐린, 글루카곤, 부갑상샘호르몬(parathyroid hormone, PTH), 또는 칼시토닌(Calcitonin)일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 또한, 앞서 기술한 바와 같이, 상기 기술된 생리활성 단백질 또는 펩타이드는 천연형 생리활성 단백질 또는 펩타이드 외에도 이의 유도체, 변이체, 또는 이의 단편 등을 모두 포함하는 개념이다.

[141]

[142] 본 발명에서 용어, "인슐린"은 체내의 혈당이 높을 때 췌장에서 분비되어 간, 근육, 지방 조직에서 당을 흡수하여 글리코겐으로 저장하며, 지방을 분해하여 에너지원으로 사용되는 것을 억제하여 혈당을 조절하는 기능을 가지는 펩타이드를 의미한다. 상기 펩타이드는 천연형 인슐린, 기초 인슐린(basal insulin), 인슐린 아고니스트(agonist), 전구물질(precursor), 유도체(derivatives), 단편(fragments) 및 변이체(variants) 등을 포함한다.

[143] 본 발명에서 용어, "천연형 인슐린"은 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 아래와 같다:

[144]

[145] A 사슬:

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

[147] B 사슬:

[148] 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)

[149]

[150] 본 발명에서 용어, "기초 인슐린(basal insulin)"은 하루 동안의 혈중 농도(daily blood glucose level)를 정상적인 수준으로 조절하는 펩타이드로서, 그 예로 레버미어(levemir), 란투스(lantus) 및 디글루드(deglude) 등이 있다.

[151] 본 발명에서 용어, "인슐린 아고니스트"는 인슐린의 구조와 상관없이 인슐린의 생체 내 수용체에 결합하여 인슐린과 동일한 생물학적 활성을 나타내는 물질을 의미한다.

[152] 상기 인슐린 변이체는, 인슐린과 아미노산 서열이 하나 이상 다른 펩타이드로서, 체내에서 혈당조절 기능을 보유한 펩타이드이다.

[153] 또한, 인슐린 유도체는 천연형 인슐린과 비교 시 아미노산 서열에서 최소한 80% 이상 상동성을 보이며, 아미노산 잔기의 일부 그룹이 화학적으로 치환, 제거 또는 수식된 형태로, 체내에서 혈당을 조절하는 기능을 보유한 펩타이드를 의미한다. 또한, 인슐린 단편은 인슐린의 아미노 말단 또는 카르복시 말단에 하나 또는 그 이상 아미노산이 삭제된 형태로, 체내에서 혈당조절 기능을

보유한다.

[154] 인슐린 아고니스트, 유도체, 단편 및 변이체에서 각각 사용된 제조방법은 독립적으로 사용될 수 있고 조합도 가능하다. 예를 들어 아미노산 서열이 하나 이상 다르고, N-말단 아미노산 잔기에 탈아미노화(deamination)된 체내에서 혈당조절 기능을 보유한 펩타이드도 포함된다. 본 발명에서 사용한 인슐린은 재조합 방법을 통하여 생산될 수 있으며, Solid phase 합성법을 통하여 합성하는 방법으로도 생산 가능하다.

[155] 또한, 본 발명에서 사용된 인슐린은 비펩타이드성 중합체가 결합될 수 있고 이와 같은 비펩타이드성 중합체는 본 발명에서 링커로 사용될 수도 있다. 상기 비펩타이드성 중합체를 링커로 사용하여 면역글로불린 Fc 단편을 연결함으로써 인슐린의 활성을 유지시키면서, 용해도를 향상시키고, 이에 더하여 안정성까지 향상시킬 수 있다. 유전자 재조합 기술을 이용한 펩타이드 링커도 적용이 가능하다.

[156] 또한, 본 발명은 생리활성 단백질 또는 펩타이드에 면역글로불린 Fc 단편을 접합시켜서 상기 단백질 또는 펩타이드의 용해도를 향상시키는 것을 특징으로 하는 것으로, 특별히 결합 위치에 제한되지는 않으나, 인슐린의 경우 A 사슬 수식시 활성이 감소하고 안정성이 떨어질 수 있으므로, B 사슬에 면역글로불린 Fc 단편이 링커를 통하거나 통하지 않는 형태로 연결될 수 있다. 특히, 인슐린 B 사슬의 N-말단에 비펩타이드성 링커를 통하거나 통하지 않는 형태로 면역글로불린 Fc 단편이 연결될 수 있으나, 특별히 이에 제한되는 것은 아니다.

[157]

[158] 본 발명에서 용어, "옥신토모듈린"이란 글루카곤의 전구체인 프리-글루카곤(pre-glucagon)으로부터 만들어지는 펩타이드를 의미하며, 천연형 옥신토모듈린, 전구물질(precursor), 유도체(derivatives), 단편(fragments) 및 변이체(variants) 등을 포함한다.

[159] 상기 옥신토모듈린은 바람직하게는 HSQGTFTSDYSKYLDSRRAQDFVQWLMNTKRNRNNIA의 아미노산 서열(서열번호 3)을 갖는다.

[160] 상기 옥신토모듈린 유도체는 상기 옥신토모듈린의 서열의 일부 아미노산을 부가, 결실 또는 치환의 형태로 변형시켜서, GLP-1 수용체와 글루카곤 수용체를 모두 활성화시킬 수 있고, 원래의 옥신토모듈린에 비하여 상기 각 수용체를 높은 수준으로 활성화시킬 수 있는 펩타이드, 펩타이드 유도체 또는 펩타이드 모방체 등을 포함한다. 본 발명에서 옥신토모듈린 유도체는 그 예로 서열번호 4 내지 36 중 어느 하나의 아미노산 서열을 가질 수 있다.

[161] 또한, 상기 옥신토모듈린 단편은 체내에서 혈당조절 기능을 보유한다.

[162] 또한, 상기 옥신토모듈린 변이체는, 천연형 옥신토모듈린과 아미노산 서열이 하나 이상 다른 펩타이드로서, GLP-1과 글루카곤 수용체 활성화 기능을 보유한다. 옥신토모듈린 변이체, 유도체, 및 단편에서 각각 사용된 제조방법은

독립적으로 사용될 수 있고 조합도 가능하다. 예를 들어 아미노산 서열이 하나 이상 다르고, N-말단 아미노산 잔기에 탈아미노화 (deamination)된 GLP-1 수용체와 글루카곤 수용체 둘 다에 대한 활성화 기능을 보유한 펩타이드도 포함된다.

[163]

[164] 본 발명에서 옥신토모듈린 유도체는 상기 서열번호 3의 아미노산 서열에서 아미노산의 치환, 부가 결실 또는 번역 후 변형(예를 들어, 메틸화, 아실화, 유비퀴틴화, 분자내 공유결합)되어, 글루카곤과 GLP-1 수용체를 동시에 활성화시킬 수 있는 임의의 펩타이드를 포괄한다. 상기 아미노산의 치환 또는 부가시에는 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 구매가능하다.

[165]

[166] 구체적인 일 양태에서, 본 발명의 옥신토모듈린 유도체는 하기 일반식 1의 아미노산을 포함하는 신규한 펩타이드이다.

[167]

[168] R1-X1-X2-GTFTSD-X3-X4-X5-X6-X7-X8-X9-X10-X11-X12-X13-X14-X15-X16-X17-X18-X19-X20-X21-X22-X23-X24-R2 (일반식 1)

[169]

[170] 상기 식에서,

[171] R1은 히스티딘, 데스아미노-히스티딜 (desamino-histidyl), 디메틸-히스티딜 (N-dimethyl-histidyl), 베타-히드록시 이미다조프로피오닐 (beta-hydroxyimidazopropionyl), 4-이미다조아세틸(4-imidazoacetyl), 베타-카르복시 이미다조프로피오닐 (beta-carboxy imidazopropionyl) 또는 티로신이며;

[172] X1은 Aib(aminoisobutyric acid), D-알라닌, 글리신, Sar(N-methylglycine), 세린 또는 D-세린이고;

[173] X2는 글루탐산 또는 글루타민이며;

[174] X3은 류신 또는 티로신이고;

[175] X4는 세린 또는 알라닌이며;

[176] X5는 리신 또는 아르기닌이며;

[177] X6는 글루타민 또는 티로신이고;

[178] X7은 류신 또는 메티오닌이며;

[179] X8은 아스파르트산 또는 글루탐산이고;

[180] X9은 글루탐산, 세린, 알파-메틸-글루탐산 또는 결실된 서열이며;

[181] X10는 글루타민, 글루탐산, 리신, 아르기닌, 세린 또는 결실된 서열이고;

[182] X11은 알라닌, 아르기닌, 발린 또는 결실된 서열이며;

[183] X12은 알라닌, 아르기닌, 세린, 발린 또는 결실된 서열이고;

[184] X13는 리신, 글루타민, 아르기닌, 알파-메틸-글루탐산 또는 결실된 서열이며;

[185] X14은 아스파르트산, 글루탐산, 류신 또는 결실된 서열이고;

[186] X15는 페닐알라닌 또는 결실된 서열이며;

[187] X16는 이소류신, 발린 또는 결실된 서열이며;

[188] X17는 알라닌, 시스테인, 글루탐산, 리신, 글루타민, 알파-메틸-글루탐산 또는 결실된 서열이고;

[189] X18는 트립토판 또는 결실된 서열이며;

[190] X19은 알라닌, 이소류신, 류신, 세린, 발린 또는 결실된 서열이며;

[191] X20는 알라닌, 리신, 메티오닌, 글루타민, 아르기닌 또는 결실된 서열이고;

[192] X21은 아스파라긴 또는 결실된 서열이며;

[193] X22은 알라닌, 글리신, 트레오닌 또는 결실된 서열이며;

[194] X23는 시스테인, 리신 또는 결실된 서열이고;

[195] X24은 알라닌, 글리신 및 세린의 조합으로 구성된 2 내지 10개의 아미노산을 가지는 펩타이드 또는 결실된 서열이며; 및,

[196] R2는 KRNRNNIA(서열번호 37), GPSSGAPPPS(서열번호 38), GPSSGAPPPSK(서열번호 39), HSQGTFTSDYSKYLD(서열번호 40), HSQGTFTSDYSRYLDK(서열번호 41), HGEGTFTSDLSKQMEEEAVK(서열번호 42) 또는 결실된 서열이다(단, 상기 일반식 1의 아미노산 서열이 서열번호 3과 동일한 경우는 제외한다).

[197] 본 발명의 옥신토모듈린 유도체는 야생형의 옥신토모듈린의 글루카곤 수용체 및 GLP-1 수용체에 대한 활성을 높이기 위해 서열번호 3으로 표시되는 아미노산 서열의 1번 아미노산인 히스티딘의 알파 탄소가 결실된 4-이미다조아세틸(4-imidazoacetyl), N-말단 아미노기가 결실된 데스아미노-히스티딜(desamino-histidyl), N-말단 아미노기를 2개의 메틸기로 수식한 디메틸-히스티딜(N-dimethyl-histidyl), N-말단 아미노기를 히드록시기로 치환한 베타-히드록시 이미다조프로피온일(beta-hydroxyimidazopropionyl), 또는 N-말단 아미노기를 카르복시기로 치환한 베타-카르복시 이미다조프로피온일(beta-carboxy imidazopropionyl)로 치환할 수 있다. 또한, GLP-1 수용체와 결합하는 부위를 소수성 결합과 이온 결합을 강화시키는 아미노산으로 치환시키거나 또는 이들을 조합할 수 있다. 또한, 옥신토모듈린 서열의 일부 서열을 GLP-1의 아미노산 서열 또는 엑센딘-4(Exendin-4)의 아미노산 서열로 치환하여 GLP-1 수용체의 활성을 높일 수 있다.

[198] 또한, 옥신토모듈린 서열의 일부 서열을 알파 나선을 강화시키는 서열로 치환시킬 수 있다. 예를 들어 상기 일반식 1의 아미노산 서열의 10, 14, 16, 20, 24 및 28번 아미노산이 알파 나선에 도움을 주는 것으로 알려진 Tyr(4-Me), Phe,

Phe(4-Me), Phe(4-Cl), Phe(4-CN), Phe(4-NO_2),Phe(4-NH_2), Phg, Pal, Nal, Ala(2-thienyl) 또는 Ala(benzothienyl)로 구성되는 아미노산 혹은 아미노산 유도체로 치환될 수 있다.

[199]

[200] 여기서, Tyr(4-Me)는 티로신의 유도체로서, 티로신의 히드록실기의 수소가 메틸기로 치환된 형태이며; Phe(4-Me)는 페닐알라닌의 유도체로서, 페닐알라닌의 파라-위치가 메틸기로 치환된 형태의 유도체를 의미하며; Phe(4-Cl)은, 페닐 알라닌의 유도체로서, 페닐기의 파라-위치가 염소로 치환된 형태의 유도체를 의미하며; Phe(4-CN)은, 페닐 알라닌의 유도체로서, 페닐기의 파라-위치가 시아노기(cyanide)로 치환된 형태의 유도체를 의미하며; Phe(4-NO_2)은, 페닐 알라닌의 유도체로서, 페닐기의 파라-위치가 니트로기로 치환된 형태의 유도체를 의미하며; Phe(4-NH_2)는 페닐 알라닌의 유도체로서, 페닐기의 파라-위치가 아민으로 치환된 형태의 유도체를 의미한다.

[201]

[202] 또한, 상기 Phg는 페닐글리신을 의미하며; Pal은 알라닌의 유도체로서, 알라닌의 베타-메틸기가 피리딜기로 치환된 형태의 유도체를 의미하며; Nal은 알라닌의 유도체로서, 알라닌의 베타-메틸기가 나프틸기로 치환된 형태의 유도체를 의미하며; Ala(2-thienyl)은 알라닌의 유도체로서, 알라닌의 베타-메틸기가 2-티에닐기(2-thienyl group)으로 치환된 형태의 유도체를 의미하며; Ala(benzothienyl)은, 알라닌의 유도체로서, 알라닌의 베타-메틸기가 벤조티에닐기로 치환된 형태의 유도체를 의미한다.

[203]

[204] 알파 나선 구조를 강화시키는 삽입할 수 있는 아미노산 혹은 아미노산 유도체의 종류 및 개수는 제한되지 않는다. 또한, 한 구체적인 실시 형태에서는 아미노산 잔기들 사이에 분자내 고리를 형성할 수 있다. 예를 들어 10과 14번, 12와 16번, 16과 20번, 20과 24번 및 24와 28번의 위치에 분자내 고리를 형성할 수 있으며, 이 때 쓰일 수 있는 잔기로는 예를 들어 글루탐산과 리신의 쌍을 해당 위치에 치환하여 사용할 수 있다. 본 발명의 방법으로 용해도를 개선할 수 있는 옥신토모듈린 유도체에서 그 안에 형성될 수 있는 분자 내 고리의 개수는 특별히 제한되지 않는다.

[205]

[206] 한 실시 형태에서 본 발명의 방법으로 용해도를 개선할 수 있는 옥신토모듈린 또는 그 유도체는 하기의 일반식 2 내지 6으로부터 선택되는 아미노산 서열을 가지는 옥신토모듈린 유도체일 수 있다. 구체적인 일 양태에서, 본 발명의 옥신토모듈린 유도체는 옥신토모듈린의 아미노산 서열에 엑센딘 혹은 GLP-1의 서열로 치환한 하기 일반식 2의 아미노산을 포함하는 펩타이드이다.

[207]

[208] R1-A'-R3(일반식 2)

[209]

[210] 다른 구체적인 일 양태에서, 본 발명의 옥신토모듈린 유도체는 옥신토모듈린의 아미노산 서열 일부와 엑센딘 또는 GLP-1의 서열 일부를 적당한 아미노산 링커로 연결한 하기 일반식 3의 아미노산을 포함하는 펩타이드이다.

[211]

[212] R1-B'-C'-R4(일반식 3)

[213]

[214] 다른 구체적인 일 양태에서, 본 발명의 옥신토모듈린 유도체는 옥신토모듈린의 아미노산 서열의 일부를 GLP-1 수용체와의 결합력을 높이는 아미노산으로 치환한 것을 사용할 수 있다. 예컨대 천연형 옥신토모듈린에서 26번째 류신은 GLP-1 수용체와 소수성 결합을 하는바, 이를 소수성을 증가시키는 아미노산인 Ile 혹은 Val으로 치환하여 GLP-1 수용체에 대한 결합력을 향상시킬 수 있다. 더욱 구체적으로, 하기 일반식 4는 이렇게 수용체 결합력이 향상(D6 치환)된 옥신토모듈린 펩타이드들을 포함하는 펩타이드이다.

[215]

[216] R1-SQGTFTSDYSKYLD-D1-D2-D3-D4-D5-LFVQW-D6-D7-N-D8-R3 (일반식 4)

[217]

[218] 다른 구체적인 일 양태에서, 본 발명의 옥신토모듈린 유도체는 고유 옥신토모듈린의 GLP-1 수용체와 글루카곤 수용체의 활성을 높이기 위해 아미노산 서열 일부를 삭제하거나 아미노산 일부를 삽입하거나 아미노산 일부를 다른 아미노산으로 치환한 하기 일반식 5를 포함하는 펩타이드이다.

[219]

[220] R1-E1-QGTFTSDYSKYLD-E2-E3-RA-E4-E5-FV-E6-WLMNT-E7-R5 (일반식 5)

[221]

[222] 상기 일반식 2 내지 5에 있어서,

[223] R1은 상기 일반식 1에서 설명된 구성과 동일하고;

[224] A'는 SQGTFTSDYSKYLDSRRAQDFVQWLMNT(서열번호 43), SQGTFTSDYSKYLDEEAVRLFIEWLMNT(서열번호 44), SQGTFTSDYSKYLDERRAQDFVAWLKNT(서열번호 45), GQGTFTSDYSRYLEEEAVRLFIEWLKNG(서열번호 46), GQGTFTSDYSRQMEEEAVRLFIEWLKNG(서열번호 47), GEGTFTSDLSRQMEEEAVRLFIEWAA(서열번호 48) 및 SQGTFTSDYSRQMEEEAVRLFIEWLMNG(서열번호 49)로 구성되는 군으로부터 선택되고;

[225] B'는 SQGTFTSDYSKYLDSRRAQDFVQWLMNT(서열번호 43), SQGTFTSDYSKYLDEEAVRLFIEWLMNT(서열번호 44), SQGTFTSDYSKYLDERRAQDFVAWLKNT(서열번호 45), GQGTFTSDYSRYLEEEAVRLFIEWLKNG(서열번호 46),

GQGTFTSDYSRQMEEEAVRLFIEWLKNG(서열번호 47),
GEGTFTSDLSRQMEEEAVRLFIEWAA(서열번호 48),
SQGTFTSDYSRQMEEEAVRLFIEWLMNG(서열번호 49),
GEGTFTSDLSRQMEEEAVRLFIEW(서열번호 50), 및
SQGTFTSDYSRYLD(서열번호 51)로 구성되는 군으로부터 선택되며;

[226] C'는 알라닌, 글리신 및 세린의 조합으로 구성된 2 내지 10개의 아미노산을 가지는 펩타이드이고;

[227] D1은 세린, 글루탐산 또는 아르기닌이며;

[228] D2는 아르기닌, 글루탐산 또는 세린이고;

[229] D3은 아르기닌, 알라닌 또는 발린이며;

[230] D4는 아르기닌, 발린 또는 세린이고;

[231] D5는 글루타민, 아르기닌 또는 리신이며;

[232] D6은 이소류신, 발린 또는 세린이고;

[233] D7은 메티오닌, 아르기닌 또는 글루타민이며;

[234] D8은 트레오닌, 글리신 또는 알라닌이고;

[235] E1은 세린, Aib, Sar, D-알라닌 또는 D-세린이며;

[236] E2는 세린 또는 글루탐산이고;

[237] E3은 아르기닌 또는 리신이며;

[238] E4는 글루타민 또는 리신이고;

[239] E5는 아스파르트산 또는 글루탐산이며;

[240] E6는 글루타민, 시스테인 또는 리신이고;

[241] E7은 시스테인, 리신 또는 결실된 서열이며;

[242] R3은 KRNRNNIA(서열번호 37), GPSSGAPPPS(서열번호 38) 또는 GPSSGAPPPSK(서열번호 39)이며;

[243] R4는 HSQGTFTSDYSKYLD(서열번호 40), HSQGTFTSDYSRYLDK(서열번호 41) 또는 HGEGTFTSDLSKQMEEEAVK(서열번호 42)이고; 및,

[244] R5는 KRNRNNIA(서열번호 37), GPSSGAPPPS(서열번호 38), GPSSGAPPPSK(서열번호 39) 또는 결실된 서열이다(단, 상기 일반식 2 내지 5의 아미노산 서열이 서열번호 3과 동일한 경우는 제외한다).

[245]

[246] 바람직하게는, 본 발명의 옥신토모듈린 유도체는 하기 일반식 6의 펩타이드일 수 있다.

[247] R1-X1-X2-GTFTSD-X3-X4-X5-X6-X7-X8-X9-X10-X11-X12-X13-X14-X15-X16-X17-X18-X19-X20-X21-X22-X23-X24-R2 (일반식 6)

[248] 상기 일반식 6에 있어서,

[249] R1은 히스티딘, 데스아미노-히스티딜(desamino-histidyl), 4-이미다조아세틸(4-imidazoacetyl) 또는 티로신이며;

[250] X1은 Aib(aminoisobutyric acid), 글리신, 세린 또는 D-세린이고;

[251] X2는 글루탐산 또는 글루타민이며;

[252] X3은 류신 또는 티로신이고;

[253] X4는 세린 또는 알라닌이며;

[254] X5는 리신 또는 아르기닌이며;

[255] X6는 글루타민 또는 티로신이고;

[256] X7은 류신 또는 메티오닌이며;

[257] X8은 아스파르트산 또는 글루탐산이고;

[258] X9은 글루탐산, 알파-메틸-글루탐산 또는 결실된 서열이며;

[259] X10는 글루타민, 글루탐산, 리신, 아르기닌 또는 결실된 서열이고;

[260] X11은 알라닌, 아르기닌 또는 결실된 서열이며;

[261] X12은 알라닌, 발린 또는 결실된 서열이고;

[262] X13는 리신, 글루타민, 아르기닌, 알파-메틸-글루탐산 또는 결실된 서열이며;

[263] X14은 아스파르트산, 글루탐산, 류신 또는 결실된 서열이고;

[264] X15는 페닐알라닌 또는 결실된 서열이며;

[265] X16는 이소류신, 발린 또는 결실된 서열이며;

[266] X17는 알라닌, 시스테인, 글루탐산, 글루타민, 알파-메틸-글루탐산 또는 결실된 서열이고;

[267] X18는 트립토판 또는 결실된 서열이며;

[268] X19은 알라닌, 이소류신, 류신, 발린 또는 결실된 서열이며;

[269] X20는 알라닌, 리신, 메티오닌, 아르기닌 또는 결실된 서열이고;

[270] X21은 아스파라긴 또는 결실된 서열이며;

[271] X22은 트레오닌 또는 결실된 서열이며;

[272] X23는 시스테인, 리신 또는 결실된 서열이고;

[273] X24은 글리신으로 구성된 2 내지 10개의 아미노산을 가지는 펩타이드 또는 결실된 서열이며; 및,

[274] R2는 KRNRNNIA(서열번호 37), GPSSGAPPPS(서열번호 38), GPSSGAPPPSK(서열번호 39), HSQGTFTSDYSKYLD(서열번호 40), HSQGTFTSDYSRYLDK(서열번호 41), HGEGTFTSDLSKQMEEEAVK(서열번호 42) 또는 결실된 서열이다(단, 상기 일반식 6의 아미노산 서열이 서열번호 3과 동일한 경우는 제외한다).

[275]

[276] 보다 바람직하게는 본 발명의 옥신토모듈린 유도체는 서열번호 4 내지 36의 펩타이드로 구성된 그룹으로부터 선택된 것일 수 있다.

[277] 옥신토모듈린은 GLP-1과 글루카곤 두 개의 펩타이드 활성을 가지고 있으며 GLP-1은 인슐린 분비에 의한 혈당 강하효력이 있으나 글루카곤은 혈당증가 효력이 있으며, GLP-1은 음식물섭취억제와 위 배출지연, 글루카곤은 지방분해 및 에너지 대사량 증가에 의한 체중감소 효력 등 서로 다른 생물학적 효능이 있어 하나의 펩타이드에 상기 두 펩타이드가 존재할 경우 어느 한 쪽의 효력이

클 경우 원치 않는 효력, 예를 들어 글루카곤의 효력이 GLP-1의 효력보다 클 경우 혈당이 올라갈 수 있으며, GLP-1의 효력이 클 경우 메스꺼움과 구토와 같은 부작용이 클 수도 있다. 또한 두 펩타이드의 활성 비에 따라 전체 효력은 달라질 수 있다.

[278]

[279] 본 발명에서 용어, "인슐린 분비 펩타이드"는 인슐린 분비 기능을 보유한 펩타이드를 말한다. 상기 인슐린 분비 펩타이드는 췌장 베타 세포에서 인슐린의 합성 및 발현을 자극할 수 있다. 이러한 인슐린 분비 펩타이드의 예로, 글루카곤 유사 펩타이드-1 (GLP-1), 글루카곤 유사 펩타이드-2 (GLP-2), 엑센딘-3 (exendin-3), 엑센딘-4 (exendin-4), 이미다조-아세틸 엑센딘-4 (Imidazoacetyl (CA) exendin-4), 또는 글루코스-의존성 인슐린 분비 펩타이드(glucose-dependent insulinotropic peptide, GIP)를 들 수 있으나. 인슐린 분비 기능을 보유하는 펩타이드라면 모두 포함되며, 상기 예에 의해 제한되는 것은 아니다. 본 발명에서 사용될 수 있는 인슐린 분비 펩타이드는 천연형 인슐린 분비 펩타이드 외에 이의 유도체, 변이체, 또는 이의 단편 형태를 모두 포함하며, 이의 일반적인 내용에 대해서는 앞서 기술한 바와 같다.

[280] 이러한 GLP-1, 엑센딘-3 또는 엑센딘-4, 및 이의 유도체에 대해서는 옥신토모듈린 유도체의 예에 대하여 기술하고 있는 한국공개특허 제10-2012-0137271호(또는 WO2012-169798) 및 인슐린 분비 펩타이드 유도체의 예에 대하여 기술하고 있는 한국공개특허 제10-2009-0008151호(또는 WO2009-011544)에 개시된 내용이 모두 포함되며, 상기 특허의 전체 명세서가 본원의 참고자료로서 포함되나, 이에 제한되지 않는다.

[281]

[282] 본 발명에서 용어, "글루카곤"은 혈당을 올려주는 펩타이드 호르몬을 말한다. 상기 글루카곤은 간에서 글리코젠을 포도당으로 분해하여 혈당량을 증가시키는 작용을 할 수 있다.

[283]

[284] 한편, 천연형 글루카곤은 하기의 서열을 가질 수 있다.

[285]

[286] His-Ser-Gln-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Lys-Tyr-Leu-Asp-Ser-Arg-Arg-Ala-Gln-Asp-Phe-Val-Gln-Trp-Leu-Met-Asn-Thr (서열번호 52)

[287]

[288] 또한, 본 발명에서 사용될 수 있는 글루카곤은 천연형 글루카곤 외에 이의 유도체, 변이체, 또는 이의 단편 형태를 모두 포함하며, 이의 일반적인 내용에 대해서는 앞서 기술한 바와 같다.

[289]

[290] 본 발명에서 용어 "부갑상샘호르몬(parathyroid hormone, PTH)"은 부갑상샘이 분비하는 호르몬으로서, 혈중 내 칼슘의 농도를 증가시키는 활성을 가진다. 상기

부갑상샘호르몬의 아미노산 서열과 같은 정보에 대해서는 미국 국립보건원 GenBank와 같은 공지의 데이터 베이스로부터 얻을 수 있다. 또한, 상기 부갑상샘호르몬은 천연형 부갑상샘호르몬 외에 이의 유도체, 변이체, 또는 단편의 형태를 모두 포함한다.

[291] 본 발명에서 용어, "칼시토닌(Calcitonin)"은 혈액 속의 칼슘 농도를 조절하는 갑상성 호르몬으로, 혈중 내 칼슘의 농도를 감소시키는 활성을 가진다. 상기 칼시토닌의 아미노산 서열과 같은 정보에 대해서는 미국 국립보건원 GenBank와 같은 공지의 데이터 베이스로부터 얻을 수 있다. 또한, 상기 칼시토닌은 천연형 칼시토닌 외에 이의 유도체, 변이체, 또는 단편의 형태를 모두 포함한다.

[292]

[293] 한편, 본 발명에 따른 방법은 계면활성제를 포함하지 않아도 생리활성 단백질 또는 펩타이드의 용해도를 효과적으로 증가시킬 수 있지만, 용해도를 보다 증가시키기 위하여 계면활성제를 함께 사용할 수 있다.

[294] 즉, 수용액에 계면활성제를 함께 포함하여 생리활성 단백질 또는 펩타이드에 면역글로불린 Fc 단편이 결합된 지속형 결합체를 봉입한 마이셀(micelle)을 형성시켜 상기 결합체의 용해도를 보다 증가시킬 수 있다.

[295]

[296] 또한, 본 발명의 다른 측면은 면역글로불린 Fc 단편을 포함하는, 면역글로불린 Fc 단편 비포함 조성물에 비하여 개선된 용해도를 나타내는 것을 특징으로 하는, 생리활성 단백질 또는 펩타이드의 용해도 개선용 조성물에 관한 것이다.

[297] 여기서, 상기 조성물은 생리활성 단백질 또는 펩타이드가 면역글로불린 Fc 단편이 펩타이드성 링커 또는 비펩타이드성 링커로 연결된, 생리활성 단백질 또는 펩타이드 및 면역글로불린 Fc 단편의 결합체를 유효성분으로 포함하는 것을 특징으로 한다.

[298]

[299] 본 발명의 일 실시예에서는, 대표적인 생리활성 펩타이드로서, 인슐린 및 옥신토모듈린을 사용하여 이에 면역글로불린 Fc를 각각 붙이는 경우, 약산성인 pH에서 인슐린 및 옥신토모듈린의 용해도를 증가시킬 수 있는지를 확인하였다. 그 결과, 면역글로불린 Fc 단편을 부착시키는 경우, 그렇지 않은 경우에 비하여 인슐린 및 옥신토모듈린의 용해도가 현저히 증가되는 결과를 나타내었다(표 2 및 3, 도 2; 및 표 5 및 6; 도 4). 이러한 결과는 본 발명의 방법이 단백질 또는 펩타이드의 용해도를 향상시킬 수 있음, 특히 중성이나 약산성 조건에서 용해도가 매우 나빠 약리학적으로 유효한 농도로 제조하기 힘든 단백질 또는 펩타이드의 용해도를 획기적으로 향상시킬 수 있음을 나타내는 것이다.

[300]

[301] 이하 본 발명을 하기 예에 의해 상세히 설명한다. 그러나 이들 예는 본 발명을 예시적으로 설명하기 위한 것으로 본 발명의 범위가 이들 예에 의해 한정되는 것은 아니다.

[302]

[303] **실시예 1: 인슐린 및 지속형 인슐린 결합체의 용해도 평가**

[304]

[305] **(1) 지속형 인슐린 결합체의 제조**

[306]

[307] 인슐린 분말을 10 mM HCl 에 용해시킨 후, 3.4K propion-ALD2 PEG (프로피온알데히드기를 2개 가지고 있는 PEG, 일본 NOF사)를 인슐린 B 사슬의 N-말단에 페길화(PEGylation)시키기 위하여, 인슐린 : PEG의 몰 비를 1 : 2로, 인슐린 농도를 5 mg/ml로 4℃에서 약 2시간 반응시켰다. 이때 반응은 50 mM 시트르산나트륨(pH 5.0), 45% 이소프로판올에서 이루어졌으며, 2~20 mM 농도의 시안화수소화붕소산나트륨 환원제를 첨가하여 반응시켰다. 반응액은 시트르산나트륨(pH 3.0) 버퍼와 KCl 농도 구배를 이용한 SP-HP (GE Healthcare) 컬럼을 사용하여 정제하였다. 인슐린-PEG-면역글로불린 Fc 단편 결합체를 제조하기 위하여, 모노 페길화된(mono-PEGylated) 인슐린과 면역글로불린 Fc 단편의 몰비가 1 : 1.2가 되도록 하고 전체 단백질 농도를 20 mg/ml로 하여 상온에서 13시간 반응시켰다. 이때 반응액은 100 mM HEPES, 22 mM 인산칼륨, pH 8.2이며, 환원제로서 20 mM 시안화수소화붕소산나트륨을 첨가하였다.

[308] 반응이 종결된 후 반응액은 1차로 Tris-HCl (pH 7.5) 버퍼와 NaCl 농도 구배를 이용하여 Q sepharode HP(GE Healthcare) 컬럼, 2차로 Tris-HCl (pH 7.5) 버퍼와 황산암모늄의 농도 구배를 이용한 Source 15 ISO(GE Healthcare)를 사용하여 인슐린-PEG-면역글로불린 Fc 결합체를 최종 정제하였다.

[309]

[310] **(2) 인슐린 및 지속형 인슐린 결합체의 용해도 평가 실험**

[311]

[312] 인슐린 및 지속형 인슐린 결합체의 용해도를 확인하기 위해 하기 표 1과 같은 조성으로 각각 인슐린 및 지속형 인슐린 결합체의 표준품 및 시험물질을 제조하였다.

[313] 상기 인슐린 및 지속형 인슐린 결합체 시험물질은 pH 6.0으로 아세트산 완충용액, 비이온성 계면활성제로서 폴리솔베이트, 당알코올로서 만니톨, 등장화제로서 염화나트륨을 포함하는 조성을 가진다. 그리고 표 2 및 3의 정량값에 따라 상온에서 용해하였으며, 완전히 용해되지 않은 인슐린 시험물질은 원심분리 후 그 상등액만 회수하여 용해도 시험에 사용하였다.

[314] 이때 인슐린 시험물질의 이론 정량값 중 최대 정량값은 지속형 인슐린 결합체 100 mg/mL을 인슐린 기준으로 환산 시 정량값이 약 10 mg/mL인데 이 값을 최대 정량값으로 선정하였으며, 최대 정량값으로 용해된 인슐린 시험물질을 연속적으로 희석 시 이물 또는 펠렛 없이 완전히 용해되는 시점의 인슐린량(0.008 mg/mL)을 최소 정량값으로 선정하였다.

[315]

[316] 역상 크로마토그래피법(Reverse Phase-High Performance Liquid Chromatography, RP-HPLC)을 이용해 도 1과 같이 인슐린 및 지속형 인슐린 결합체의 표준검량곡선(Standard curve)을 먼저 확인하였다. 역상 크로마토그래피법으로 확인된 인슐린 및 지속형 인슐린 결합체 시험 물질의 피크 면적을 표준검량곡선에 대입해 인슐린 및 지속형 인슐린 결합체의 정량값을 계산하였다. 그 결과를 표 2 및 3, 및 도 2에 나타내었다.

[317] 표 1

[Table 1]

물 질	**용해 조건**
인슐린 표준품	HCl로 녹인 후, pH 5.0로 조정
인슐린 시험물질	pH 6.0
지속형 인슐린 결합체 표준품 및 시험물질	pH 6.0

[318] 표 2

[Table 2]

인슐린	
이론 정량값(mg/mL)	측정값(표준검량곡선에 의해 계산된 정량값) (mg/mL)
0.008	0.000
0.04	0.000
0.2	0.005
1	0.047
5	0.253
10	0.628

[319] 표 3

[Table 3]

지속형 인슐린 결합체 (인슐린 기준)	
이론 정량값(mg/mL)	측정값(표준검량곡선에 의해 계산된 정량값) (mg/mL)
61.1	61.2
89	86.7
110	103.4
146	133.5

[320]

[321]

[322]

[323] 상기 표 2 및 3에서 보듯이, 지속형 인슐린 결합체 제형 버퍼로 용해된 지속형 인슐린 결합체 시험물질의 정량값은 이론값과 실제 측정값 간에 유사한 반면, 지속형 인슐린 결합체 제형 버퍼로 용해된 인슐린 시험물질의 정량값은 이론값과 실제 측정값은 크게 차이가 확인되었다(최고 약 16배 차이). 또한 지속형 인슐린 결합체 제형 버퍼로 인슐린 시험물질을 용해 시, 0.008 mg/mL을 제외한 나머지 모두에서 용해 후 원심분리하면 펠릿이 확인되었다.

[324]

[325] 상기 결과에서 보듯이, 지속형 인슐린 결합체의 캐리어로 이용된 면역글로불린 Fc 단편에 의해 용해도가 개선되었다.

[326]

[327] **실시예 2: 옥신토모듈린 및 지속형 옥신토모듈린 결합체의 용해도 평가**

[328]

[329] **(1) 지속형 옥신토모듈린 유도체 결합체의 제조**

[330]

[331] MAL-10K-ALD PEG (NOF, 일본)를 서열번호 27의 옥신토모듈린 유도체의 아미노산 서열 30번 시스테인 잔기에 페길화 시키기 위하여, 상기 옥신토모듈린 유도체와 MAL-10K-ALD PEG의 몰비를 1 : 1, 옥신토모듈린 유도체의 농도를 3 mg/mL로 하여 4℃에서 1시간 동안 반응시켰다. 이때, 반응은 50 mM 트리스(Tris), pH 7.5에 60% 이소프로판올이 첨가된 환경하에서 수행되었다. 반응이 종료된 후, 상기 반응액을 시트르산나트륨(pH 3.0) 버퍼와 KCl 농도 구배를 이용한 SP HP(GE healthcare, Sweden)에 적용하여 시스테인에 모노-페길화된 옥신토모듈린 유도체를 정제하였다.

[332] 다음으로, 상기 정제된 모노-페길화된 옥신토모듈린 유도체와 면역글로블린 Fc을 몰비가 1 : 4, 단백질의 농도를 20 mg/mL로 하여 4℃에서 16시간 동안 반응시켰다. 반응액은 100mM Potassium phosphate, pH 6.0에 환원제인 20mM

SCB가 첨가된 환경하에서 수행되었다. 반응이 종료된 후, 상기 반응액을 1차로 비스트리스 버퍼와 NaCl 농도 구배를 이용한 Butyl sepharose FF 정제컬럼(GE healthcare, Sweden)), 2차로 시트르산나트륨 버퍼와 암모늄설페이트의 농도 구배를 이용한 Source ISO 정제컬럼(GE healthcare, Sweden)에 적용하여, 옥신토모듈린 유도체-PEG-면역글로블린 Fc를 포함하는 결합체를 정제하였다.

[333]

[334] **(2) 옥신토모듈린 및 지속형 옥신토모듈린 결합체의 용해도 평가 실험**

[335]

[336] 서열번호 27의 옥신토모듈린 유도체 및 지속형 옥신토모듈린 유도체 결합체의 용해도를 확인하기 위해 하기 표 4와 같은 조성으로 각각 옥신토모듈린 유도체 및 지속형 옥신토모듈린 유도체 결합체의 표준품 및 시험물질을 제조하였다.

[337] 상기 옥신토모듈린 유도체 및 지속형 옥신토모듈린 유도체 결합체 시험물질은 pH 5.6으로 구연산 완충 용액, 비이온성 계면활성제로서 폴리소르베이트, 당알코올로서 만니톨, 메티오닌을 포함하는 조성을 가진다. 그리고 표 5 및 6의 정량값에 따라 상온에서 용해하였으며, 완전히 용해되지 않은 옥신토모듈린 유도체 시험물질은 원심분리 후 그 상등액만 회수하여 용해도 시험에 사용하였다.

[338] 이때 옥신토모듈린 유도체 시험물질의 이론 정량값 중 최대 정량값은 지속형 옥신토모듈린 유도체 결합체 80 mg/mL을 옥신토모듈린 유도체 기준으로 환산 시 정량값이 약 5 mg/mL 인데 이 값을 최대 정량값으로 선정하였으며, 최대 정량값으로 용해된 옥신토모듈린 유도체 시험물질을 연속적으로 희석 시 이물 또는 펠렛 없이 완전히 용해되는 시점의 옥신토모듈린 유도체 량 (0.008 mg/mL)을 최소 정량값으로 선정하였다.

[339] 역상 크로마토그래피법을 이용해 도 3과 같이 옥신토모듈린 유도체 및 지속형 옥신토모듈린 유도체 결합체의 표준검량곡선(Standard curve)을 먼저 확인하였다. 역상 크로마토그래피법으로 확인된 옥신토모듈린 유도체 및 지속형 옥신토모듈린 유도체 결합체 시험물질의 피크 면적 값을 표준검량곡선에 대입해 옥신토모듈린 유도체 및 지속형 옥신토모듈린 유도체 결합체의 정량값을 계산하였다.

[340] 표 4

[Table 4]

물 질	용해 조건
옥신토모듈린 유도체 표준품	pH 7.5, 60% 이소프로판올
옥신토모듈린 유도체 시험물질	pH 5.6
지속형 옥신토모듈린 유도체 결합체표준품 및 시험물질	pH 5.6

[341]

[342] 표 5

[Table 5]

옥신토모듈린 유도체	
이론 정량값(mg/mL)	측정값(표준검량곡선에 의해 계산된 정량값) (mg/mL)
0.008	0.000
0.04	0.000
0.2	0.002
1	0.014
5	0.188

[343]

[344] 표 6

[Table 6]

지속형 옥신토모듈린 유도체 결합체	
이론 정량값(mg/mL)	측정값(표준검량곡선에 의해 계산된 정량값) (mg/mL)
10	9.6
40	40.5
90	88.0
160	145.8

[345] 상기 표 5 및 6; 및 도 4에서 보듯이, 지속형 옥신토모듈린 결합체 제형 버퍼로 용해된 지속형 옥신토모듈린 유도체 결합체 시험물질의 정량값은 이론값과

실제 측정값 간에 유사한 반면, 지속형 옥신토모듈린 결합체 제형 버퍼로 용해된 옥신토모듈린 유도체 시험물질의 정량값은 이론값과 실제 측정값은 크게 차이가 확인되었다(최고 약 27배 차이). 또한 지속형 옥신토모듈린 결합체 제형 버퍼로 옥신토모듈린 유도체 시험물질을 용해시, 0.008 mg/mL을 제외한 나머지 모두에서 용해 후 원심분리하면 펠릿이 확인되었다. 상기 결과에서 보듯이, 지속형 옥신토모듈린 유도체 결합체의 캐리어로 이용된 면역글로불린 Fc 단편에 의해 옥신토모듈린 유도체의 용해도가 개선되었다.

[346]

[347] 이와 같은 결과들은 본 발명의 생리활성 단백질 및 펩타이드의 캐리어로 이용되는 면역글로불린 Fc 단편이 단백질 및 펩타이드의 용해도를 효과적으로 개선시킬 수 있음을 나타내는 것이다.

[348]

[349] 이상의 설명으로부터, 본 발명이 속하는 기술분야의 당업자는 본 발명이 그 기술적 사상이나 필수적 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 실시될 수 있음을 이해할 수 있다. 이와 관련하여, 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 제한적인 것이 아닌 것으로 이해하여야 한다. 본 발명의 범위는 전술한 상세한 설명보다는 후술되는 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] 생리활성 단백질 또는 펩타이드를 면역글로불린 Fc 단편과 결합시키는 단계를 포함하는, 면역글로불린 Fc 단편이 결합되지 않은 생리활성 단백질 또는 펩타이드에 비하여 생리활성 단백질 또는 펩타이드의 용해도를 개선시키는 방법.

[청구항 2] 제1항에 있어서, 상기 면역글로불린 Fc 단편이 IgG, IgA, IgD, IgE 또는 IgM에서 유래된 Fc 단편인 것인 방법.

[청구항 3] 제2항에 있어서, 상기 면역글로불린 Fc 단편은 각각의 도메인이 IgG, IgA, IgD, IgE 및 IgM으로 이루어진 군에서 선택되는 면역글로불린에서 유래된 상이한 기원을 가진 도메인의 하이브리드인 방법.

[청구항 4] 제2항에 있어서, 상기 면역글로불린 Fc 단편은 동일한 기원의 도메인으로 이루어진 단쇄 면역글로불린으로 구성된 이량체 또는 다량체인 방법.

[청구항 5] 제4항에 있어서, 상기 면역글로불린 Fc 단편이 인간 비당쇄화 IgG4 Fc 단편인 방법.

[청구항 6] 제1항에 있어서, 상기 결합시키는 단계는 생리활성 단백질 또는 펩타이드 및 면역글로불린 Fc 단편을 비펩타이드성 중합체를 통하여 결합시키는 것인 방법.

[청구항 7] 제1항에 있어서, 상기 방법으로 제조한, 생리활성 단백질 또는 펩타이드와 면역글로불린 Fc 단편이 결합된 물질은 융합 단백질 형태인 것인 방법.

[청구항 8] 제6항에 있어서, 비펩타이드성 중합체는 폴리에틸렌 글리콜인 것인 방법.

[청구항 9] 제6항에 있어서, 상기 비펩타이드성 중합체가 폴리프로필렌 글리콜, 에틸렌 글리콜과 프로필렌 글리콜의 공중합체, 폴리옥시 에틸화 폴리올, 폴리비닐 알콜, 폴리사카라이드, 덱스트란, 폴리비닐 에틸에테르, PLA(폴리락트산, polylactic acid) 및 PLGA(폴리락틱-글리콜산, polylactic-glycolic acid)와 같은 생분해성 고분자, 지질 중합체, 키틴, 히아루론산 및 이들의 조합으로 구성된 군으로부터 선택되는 것인 방법.

[청구항 10] 제1항에 있어서, 상기 방법은 수용액에서 생리활성 단백질 또는 펩티드의 용해도를 개선시키는 것인 방법.

[청구항 11] 제10항에 있어서, 상기 수용액은 구연산 또는 아세트산 완충용액, 비이온성 계면활성제로서 폴리솔베이트, 당알코올로서 만니톨, 및 등장화제로서 염화나트륨 또는 메티오닌을 포함하는 것인 방법.

[청구항 12] 제10항에 있어서, 상기 수용액은 pH 5.0 내지 7.0을 가지는 것인

방법.

[청구항 13] 제1항에 있어서, 상기 생리활성 단백질 또는 펩타이드는 엑센딘-4, 글루카곤, 글루카곤 유사 펩타이드-1(GLP-1), 글루카곤 유사 펩타이드-2(GLP-2), 부갑상샘 호르몬(PTH), 칼시토닌, 인슐린 또는 옥신토모듈린인 것인 방법.

[청구항 14] 면역글로불린 Fc 단편을 포함하는, 면역글로불린 Fc 단편 비포함 조성물에 비하여 개선된 용해도를 나타내는 것을 특징으로 하는, 생리활성 단백질 또는 펩타이드의 용해도 개선용 조성물.

[청구항 15] 제14항에 있어서, 상기 조성물은 생리활성 단백질 또는 펩타이드가 면역글로불린 Fc 단편에 펩타이드성 링커 또는 비펩타이드성 링커를 통하여 연결된, 생리활성 단백질 또는 펩타이드 및 면역글로불린 Fc 단편의 결합체를 유효성분으로 포함하는 조성물.