명세서

발명의 명칭: 수용체-매개 제거가 감소된, 생리활성 폴리펩타이드 단량체-면역글로불린 Fc 단편 결합체 및 이의 제조방법

기술분야

[1] 본 발명은 생리활성 폴리펩타이드가 면역글로불린 Fc 단편에 연결된 결합체를 함유하는 조성물로서, 상기 조성물은 하나의 면역글로불린 Fc 단편에 대하여 한 분자의 생리활성 폴리펩타이드가 연결되어 있는 단량체 결합체를 함유하고, 선택적으로 하나의 면역글로불린 Fc 단편에 대하여 동일한 생리활성 폴리펩타이드가 두 분자 이상 연결된 다량체 결합체를 함유하되, 상기 조성물 내 상기 단량체 결합체의 다량체 결합체에 대한 몰비는 19 이상인 지속성 약제 조성물; 생리활성 폴리펩타이드 단량체 및 면역글로불린 Fc 단편이 비펩타이드성 링커로 연결된, 생리활성 폴리펩타이드 단량체-면역글로불린 Fc 단편 결합체로서, 상기 생리활성 폴리펩타이드는 단량체 형태로 하나의 면역글로불린 Fc 단편에 비펩타이드성 링커로 연결되어, 생리활성 폴리펩타이드 두 분자가 하나의 면역글로불린 Fc 단편에 비펩타이드성 중합체를 통하여 연결된 이량체 결합체 또는 생리활성 폴리펩타이드-면역글로불린 Fc 단편 인프레임 결합체에 비하여 낮은 수용체-매개 내재화 또는 수용체-매개 제거를 나타내는 것을 특징으로 하는 결합체; 및 상기 지속성 약제 조성물의 제조 방법에 관한 것이다.

[2]

배경기술

[3] 생체 내 단백질들은 혈중 단백질 분해효소에 의해 분해되거나 신장을 통해 배설 혹은 수용체에 의한 제거되는 등 여러 경로를 거쳐 제거되는 것이 알려져 있다. 이에, 상기와 같은 단백질 제거 기전을 회피하여 생리활성 단백질의 반감기를 증가시켜 치료학적 효능을 높이려는 여러 시도가 진행되고 있다. 특히, 단백질의 혈중 반감기를 증가시키기 위해서 폴리에틸렌글리콜 고분자(PEG), 알부민, 지방산, 또는 항체 Fc 단편(constant region)을 결합시킨 단백질 결합체에 대한 연구가 진행되고 있다. 이러한 연구들은, 생리활성 단백질에 상기 물질을 공유결합시킴으로써 생리활성 단백질의 혈중 반감기를 증가시키고, 약물 투여 간격을 줄여 환자의 편의성을 증대시키는 것에 목적을 두고 있다. 그 중 단백질을 안정화시키고 단백질 가수분해효소와의 접촉 및 신장 소실을 억제하기 위한 방법으로, 폴리에틸렌 글리콜과 같이 용해도가 높은 고분자를 단백질 약물 표면에 화학적으로 부가시키는 방법이 사용되고 있다. 이 방법의 경우, 목적 단백질의 특정 부위 또는 다양한 부위에 비특이적으로 결합하여 용해도를 높임으로써 단백질을 안정화시키고, 단백질의 가수분해를 방지하는 효과를 나타내며, 나아가 특별한 부작용도 일으키지 않는 것으로 알려져

있다(Sada *et al.*, J. Fermentation Bioengineering 71: 137-139, 1991). 그러나, 이 방법의 경우, PEG 결합에 의해 단백질의 안정성은 증가할 수 있지만 생리활성 단백질의 역가가 현저히 낮아지고, PEG의 분자량이 증가할수록 단백질과의 반응성이 낮아져 수율이 감소하는 문제가 있다. 또한 단백질의 특정 아미노산에 지방산을 수식하는 경우 수식된 지방산이 혈중 알부민에 가역적으로 결합하여 반감기가 증가하나 그 효과는 하루에서 일주일 정도로 반감기 증가 효과가 그리 크지 않으며 가역적으로 알부민으로부터 분리된 생리활성 단백질은 쉽게 신장을 통해 배설되는 단점이 있다.

[4]

[5] 이에, 단백질을 비롯한 생리활성 물질의 반감기를 증가시키기 위해 면역글로불린 단편을 이용하려는 노력이 경주되고 있다. 특히, 이러한 Fc 단편과 치료용 단백질과의 융합을 통하여 치료용 단백질의 안정성을 증가시키고자 하는 연구가 활발하게 진행되었다. 유전자 재조합 방법에 의해 인터페론(대한민국 특허공개 제2003-9464호), 및 인터루킨-4 수용체, 인터루킨-7 수용체 또는 적혈구 생성인자 수용체(대한민국 특허등록 제249572호)를 면역글로불린의 Fc 단편과 융합된 형태로 포유 동물에서 발현시키는 것이 알려져 있으며, 국제특허공개 제WO 01/03737호에는 사이토카인 또는 성장인자를 올리고펩타이드 링커(linker)를 통해 면역글로불린의 Fc 단편에 결합시킨 융합단백질이 개시되어 있다. 또한, 미국특허 제5,116,964호는 LHR(lymphocyte cell surface glycoprotein) 또는 CD4 단백질을 면역글로불린 Fc 단편의 아미노 말단 또는 카르복시 말단에 유전자 재조합 방법에 의해 융합시킨 단백질을 개시하고 있고, 미국특허 제5,349,053호는 IL-2를 면역글로불린 Fc 단편에 융합시킨 융합 단백질을 개시하고 있다. 그 외에도, 유전자 재조합에 의해 제조된 Fc 융합 단백질의 예로서 인터페론-베타 또는 그의 유도체와 면역글로불린 Fc 단편의 융합 단백질(국제특허공개 제WO 00/23472호), IL-5 수용체와 면역글로불린 Fc 단편의 융합 단백질(미국특허 제5,712,121호), 인터페론 알파와 면역글로불린 G4의 Fc 단편의 융합 단백질(미국특허 제5,723,125호) 및 CD4 단백질과 면역글로불린 G2의 Fc 단편의 융합 단백질(미국특허 제6,451,313호)이 개시되었다. 또한, 면역글로불린 Fc 단편의 아미노산을 변형시킨 미국특허 제5,605,690호에는 면역글로불린 Fc 단편에서 특히 보체 결합부위나 수용체 결합부위의 아미노산을 변형시킨 Fc를 이용하여 유전자 재조합 방법에 의해 제조된 TNFR-IgG1 Fc 융합단백질을 개시되어 있다. 이와 같이 변형된 면역글로불린의 Fc영역을 이용한 유전자 재조합 방식의 융합단백질의 제조방법은 미국특허 제6,277,375호, 제6,410,008호 및 제6,444,792호에도 개시되어 있다. 그러나 면역글로불린 Fc 단편이 융합된 바이오 의약품들은 Fc 단편의 고유 기능인 이펙터 기능에 의한 세포독성 문제를 극복해야 하는 단점이 있다.

[6]

발명의 상세한 설명

기술적 과제

[7] 본 발명자들은 생리활성 폴리펩타이드에 면역글로불린 Fc 단편을 결합시켜 혈중 반감기가 증대된 결합체를 제조하기 위하여 예의 노력한 결과, 생리활성 폴리펩타이드를 단량체(monomer) 형태로 면역글로불린 Fc 단편에 연결하는 경우, 생리활성 폴리펩타이드가 다량체인 경우에 비하여 수용체에 의해 매개되는 제거(receptor-mediated clearance)가 현저하게 감소하며, 랫트 동물모델에서도 우수한 반감기를 나타냄을 확인하고, 본 발명을 완성하였다.

[8]

과제 해결 수단

[9] 본 발명의 하나의 목적은 생리활성 폴리펩타이드가 면역글로불린 Fc 단편에 연결된 결합체를 함유하는 조성물로서, 상기 조성물은 하나의 면역글로불린 Fc 단편에 대하여 한 분자의 생리활성 폴리펩타이드가 연결되어 있는 단량체 결합체를 함유하고, 선택적으로 하나의 면역글로불린 Fc 단편에 대하여 동일한 생리활성 폴리펩타이드가 두 분자 이상 연결된 다량체 결합체를 함유하되, 상기 조성물 내 상기 단량체 결합체의 다량체 결합체에 대한 몰비는 19 이상인 지속성 약제 조성물을 제공하는 것이다.

[10]

[11] 본 발명의 다른 목적은 생리활성 폴리펩타이드 단량체 및 면역글로불린 Fc 단편이 비펩타이드성 링커로 연결된, 생리활성 폴리펩타이드 단량체-면역글로불린 Fc 단편 결합체로서, 상기 생리활성 폴리펩타이드는 단량체 형태로 면역글로불린 Fc 단편에 비펩타이드성 링커로 연결되어, 생리활성 폴리펩타이드-면역글로불린 Fc 단편 인프레임 결합체에 비하여 낮은 수용체-매개 내재화(receptor-mediated internalization) 또는 수용체-매개 제거(receptor-mediated clearance)를 나타내는 것을 특징으로 하는 결합체를 제공하는 것이다.

[12]

[13] 본 발명의 또 다른 목적은 (a) 생리활성 폴리펩타이드 및 면역글로불린 Fc 단편을 서로 연결시켜, 생리활성 폴리펩타이드-면역글로불린 Fc 단편 결합체의 혼합물을 제조하는 단계; 및 (b) 상기 혼합물로부터 생리활성 폴리펩타이드 단량체 및 면역글로불린 Fc 단편이 서로 연결된, 생리활성 폴리펩타이드 단량체와 면역글로불린 Fc 단편이 연결된 결합체를 분리하는 단계를 포함하는, 상기 지속성 약제 조성물의 제조 방법을 제공하는 것이다.

[14]

발명의 효과

[15] 본 발명의 결합체는 생리활성 폴리펩타이드 단량체가 면역글로불린 Fc 단편에 결합하여, 수용체-매개 내재화 또는 수용체 매개 제거(receptor-mediated

clearance)가 현저히 감소하여 증가된 혈중 반감기를 가지므로, 본 발명의 결합체는 혈중 반감기가 증대된 약물에 있어 치료학적 우월성을 제공할 수 있다.

[16]

도면의 간단한 설명

[17] 도 1은, (A) 생리활성 폴리펩타이드 단량체 결합체의 대표적인 구조 및 (B) 생리활성 폴리펩타이드 이량체 결합체의 가장 주요한 형태를 모식도로 나타낸 것이다.

[18] 도 2는, 본 발명의, GLP-1 아고니스트 단량체 및 면역글로불린 Fc 단편의 결합체(실시예); 및 GLP-1 아고니스트가 이량체로 존재하는, GLP-1 아고니스트 및 면역글로불린 Fc 단편의 융합 단백질(비교예)의 수용체 내재화(receptor internalization) 정도를 서로 비교한 도이다.

[19] 도 3은, 본 발명의 GLP-1 아고니스트 결합체 및 비교예의 GLP-1 아고니스트 결합체의 인 비보 약물 동태를 서로 비교한 도이다.

[20]

발명의 실시를 위한 최선의 형태

[21] 본 발명의 하나의 양태는 생리활성 폴리펩타이드가 면역글로불린 Fc 단편에 연결된 결합체를 함유하는 조성물로서, 상기 조성물은 하나의 면역글로불린 Fc 단편에 대하여 한 분자의 생리활성 폴리펩타이드가 연결되어 있는 단량체 결합체를 함유하고, 선택적으로 하나의 면역글로불린 Fc 단편에 대하여 동일한 생리활성 폴리펩타이드가 두 분자 이상 연결된 다량체 결합체를 함유하되, 상기 조성물 내 상기 단량체 결합체의 다량체 결합체에 대한 몰비는 19 이상인 지속성 약제 조성물이다.

[22] 하나의 구체예로서, 상기 지속성 약제 조성물에 포함되는 결합체는 생리활성 폴리펩타이드와 면역글로불린 Fc 단편 사이에 개재하는 비펩타이드성 링커로 연결된 것을 특징으로 한다.

[23] 다른 구체예로서, 상기 단량체 결합체는 하나의 면역글로불린 Fc 단편에대하여 생리활성 폴리펩타이드 두 분자가 비펩타이드성 중합체를 통하여 연결된, 이량체 결합체 또는 생리활성 폴리펩타이드 이량체와 면역글로불린 Fc 단편의 인프레임 결합체에 비하여 낮은 수용체-매개 내재화(receptor-mediated internalization) 또는 수용체-매개 제거(receptor-mediated clearance)를 나타내는 것을 특징으로 한다.

[24] 다른 구체예로서, 상기 생리활성 폴리펩타이드는 글루카곤 유사 펩타이드-1(GLP-1), 호중구 증가 인자(G-CSF), 인간 성장 호르몬(hGH), 에리스로포이에틴(EPO), 글루카곤, 옥신토모듈린, 인슐린, 성장 호르몬 방출 호르몬, 성장 호르몬 방출 펩타이드, 인터페론, 인터페론 수용체, 지프로테인 관련수용체(G protein-coupled receptor), 인터루킨, 인터루킨 수용체, 효소류, 인터루킨 결합 단백질, 사이토카인 결합 단백질, 마크로파지 활성인자,

마크로파지 펩타이드, B 세포인자, T 세포인자, 단백질 A, 알러지 억제인자, 세포 괴사 당단백질, 면역독소, 림포독소, 종양 괴사인자, 종양 억제인자, 전이 성장인자, 알파-1 안티트립신, 알부민, α-락트알부민, 아포리포단백질-E, 고 당쇄화 적혈구 생성인자, 안지오포에이틴류, 헤모글로빈, 트롬빈, 트롬빈 수용체 활성 펩타이드, 트롬보모듈린, 혈액인자 VII, VIIa, VIII, IX, 및 XIII, 플라즈미노젠 활성인자, 피브린-결합 펩타이드, 유로키나제, 스트렙토키나제, 히루딘, 단백질 C, C-반응성 단백질, 레닌 억제제, 콜라게나제 억제제, 수퍼옥사이드 디스뮤타제, 렙틴, 혈소판 유래 성장인자, 상피세포 성장인자, 표피세포 성장인자, 안지오스타틴, 안지오텐신, 골 형성 성장인자, 골 형성 촉진 단백질, 칼시토닌, 아트리오펩틴, 연골 유도인자, 엘카토닌, 결합조직 활성인자, 조직인자 경로 억제제, 여포 자극 호르몬, 황체 형성 호르몬, 황체 형성 호르몬 방출 호르몬, 신경 성장인자, 부갑상선 호르몬, 릴랙신, 씨크레틴, 소마토메딘, 인슐린 유사 성장인자, 부신피질 호르몬, 콜레시스토키닌, 췌장 폴리펩타이드, 가스트린 방출 펩타이드, 코티코트로핀 방출인자, 갑상선 자극호르몬, 오토탁신, 락토페린, 미오스타틴, 세포표면항원, 바이러스 유래 백신 항원, 단일클론 항체, 다중클론 항체 및 항체 단편으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 한다.

[25] 다른 구체예로서, 상기 생리활성 폴리펩타이드는 글루카곤 유사 펩타이드-1(GLP-1), 호중구 증가 인자(G-CSF), 인간 성장 호르몬(hGH), 에리스로포이에틴(EPO), 글루카곤, 옥신토모듈린, 인슐린 및 이들의 유도체로 이루어진 군으로부터 선택된 것을 특징으로 한다.

[26] 다른 구체예로서, 상기 비펩타이드성 링커는 폴리에틸렌글리콜, 폴리프로필렌 글리콜, 에틸렌 글리콜-프로필렌 글리콜 공중합체, 폴리옥시에틸화폴리올, 폴리비닐알콜, 폴리사카라이드, 덱스트란, 폴리비닐에틸에테르, 생분해성 고분자, 지질 중합체, 키틴, 히아루론산 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 한다.

[27] 다른 구체예로서, 상기 비펩타이드성 링커는 분자량이 1 내지 100 kDa 범위인 것을 특징으로 한다.

[28] 다른 구체예로서, 상기 면역글로불린 Fc 단편은 CH1, CH2, CH3 및 CH4 도메인으로 이루어진 군으로부터 선택된 1개 내지 4개 도메인으로 이루어진 것을 특징으로 한다.

[29] 다른 구체예로서, 상기 면역글로불린 Fc 단편은 힌지(hinge) 영역을 추가로 포함하는 것을 특징으로 한다.

[30] 다른 구체예로서, 상기 면역글로불린 Fc 단편은 IgG, IgA, IgD, IgE, IgM, 이들의 조합(combination) 및 이들의 하이브리드(hybrid)로 이루어진 군으로부터 선택되는 것임을 특징으로 한다.

[31] 다른 구체예로서, 상기 면역글로불린 Fc 단편은 IgG4 Fc 단편인 것을 특징으로 한다.

[32] 다른 구체예로서, 상기 면역글로불린 Fc 단편은 비당쇄화된 것을 특징으로

한다.

[33] 본 발명의 다른 양태는 생리활성 폴리펩타이드 단량체 및 면역글로불린 Fc 단편이 비펩타이드성 링커로 연결된, 생리활성 폴리펩타이드 단량체-면역글로불린 Fc 단편 결합체로서, 상기 생리활성 폴리펩타이드는 단량체 형태로 하나의 면역글로불린 Fc 단편에 비펩타이드성 링커로 연결되어, 생리활성 폴리펩타이드 두 분자가 하나의 면역글로불린 Fc 단편에 비펩타이드성 중합체를 통하여 연결된 이량체 결합체 또는 생리활성 폴리펩타이드 이량체와 면역글로불린 Fc 단편의 인프레임 결합체에 비하여 낮은 수용체-매개 내재화 또는 수용체-매개 제거를 나타내는 것을 특징으로 하는 결합체이다.

[34] 본 발명의 다른 양태는 (a) 생리활성 폴리펩타이드 및 면역글로불린 Fc 단편을 서로 연결시켜, 생리활성 폴리펩타이드-면역글로불린 Fc 단편 결합체의 혼합물을 제조하는 단계; 및 (b) 상기 혼합물로부터 생리활성 폴리펩타이드 단량체 및 면역글로불린 Fc 단편이 서로 연결된, 한 분자의 생리활성 폴리펩타이드가 하나의 면역글로불린 Fc 단편에 연결된 결합체를 분리하는 단계를 포함하는, 상기 지속성 약제 조성물의 제조 방법이다.

[35] 하나의 구체예로서, 상기 방법의 결합체는 상기 생리활성 폴리펩타이드 및 면역글로불린 Fc 단편이 비펩타이드성 링커로 서로 연결된 것을 특징으로 한다.

[36] 다른 구체예로서, 상기 방법의 한 분자의 생리활성 폴리펩타이드가 하나의 면역글로불린 Fc 단편에 연결된 결합체는 두 분자의 생리활성 폴리펩타이드가 하나의 면역글로불린 Fc 단편에 비펩타이드성 중합체를 통하여 연결된, 이량체 결합체 또는 생리활성 폴리펩타이드 이량체와 면역글로불린 Fc 단편의 인프레임 결합체에 비하여 낮은 수용체-매개 내재화 또는 수용체-매개 제거(receptor-mediated clearance)를 나타내는 것을 특징으로 한다.

[37]

발명의 실시를 위한 형태

[38] 본 발명은 하나의 양태로서, 생리활성 폴리펩타이드가 면역글로불린 Fc 단편에 연결된 결합체를 함유하는 조성물로서, 상기 조성물은 하나의 면역글로불린 Fc 단편에 대하여 한 분자의 생리활성 폴리펩타이드가 연결되어 있는 단량체 결합체를 함유하고, 선택적으로 하나의 면역글로불린 Fc 단편에 대하여 동일한 생리활성 폴리펩타이드가 두 분자 이상 연결된 다량체 결합체를 함유하되, 상기 조성물 내 상기 단량체 결합체의 다량체 결합체에 대한 몰비는 19 이상인 지속성 약제 조성물을 제공한다.

[39]

[40] 본 발명의 일 구현예에서는 생리활성 폴리펩타이드 단량체를 면역글로불린 Fc 단편에 결합한 결합체가, 다량체, 구체적으로 이량체 형태의 생리활성 폴리펩타이드가 면역글로불린 Fc 단편에 결합된 결합체에 비하여 수용체에

의해 매개되는 내재화(receptor-mediated internalization) 및 제거(receptor-mediated clearance) 정도가 낮아, 혈중 반감기를 증대시킬 수 있음을 확인하였다. 이에, 생리활성 폴리펩타이드 단량체가 면역글로불린 Fc 단편에 결합되어, 수용체에 의해 매개되는 제거 정도가 낮은 결합체를 포함하는 약제의 경우, 수용체에 의해 매개되는 내재화 및 제거가 적어 혈중 반감기를 증대시킬 수 있는 지속성 약제로 사용할 수 있음을 확인하였다. 즉, 본 발명은 생리활성 폴리펩타이드 단량체 결합체가 다량체 결합체, 구체적으로 이량체 결합체보다 수용체에 의해 매개되는 내재화 및 제거가 적은 것을 규명한 것에 기초한다.

[41]

[42] 본 발명에서 용어, "지속성 약제 조성물"은 생리활성 폴리펩타이드 자체 또는 생리활성 폴리펩타이드 다량체 및 면역글로불린 Fc 단편의 결합체에 비하여 수용체-매개 내재화 및 제거가 감소하여 혈중 반감기가 증대된, 생리활성 폴리펩타이드 단량체와 면역글로불린 Fc 단편이 연결된 결합체를 포함하는 약제 조성물을 말한다. 즉, 하나의 면역글로불린 Fc 단편에 대하여 한 분자의 생리활성 폴리펩타이드가 연결되어 있는 단량체 결합체를 함유하는 약제 조성물을 말한다. 또한, 상기 용어 "약제 조성물"은 "제제"와 혼용될 수 있다.

[43] 본 발명의 약제 조성물에서, 하나의 면역글로불린 Fc 단편에 대하여 한 분자의 생리활성 폴리펩타이드가 연결되어 있는 단량체 결합체는 면역글로불린 Fc 단편에 대하여 동일한 생리활성 폴리펩타이드 두 분자 이상이 연결되어 있는 다량체 결합체에 대하여 19:1 또는 그 이상, 바람직하게는 99:1 이상, 보다 바람직하게는 500:1 이상일 수 있다. 즉, 본 발명의 상기 지속성 약제 조성물은 상기 단량체 결합체의 상기 다량체 결합체에 대한 몰비([단량체 결합체]/[다량체 결합체])가 19 이상인 것을 특징으로 한다.

[44] 본 발명의 일 구현예에 따르면 생리활성 폴리펩타이드가 단량체로 존재하는, 생리활성 폴리펩타이드-비펩타이드성 중합체-면역글로불린 Fc 단편 결합체의 경우, 생리활성 폴리펩타이드가 이량체인 결합체에 비하여 체내 지속성이 우수하다. 따라서, 다량체 결합체는 존재하지 않고 단량체 결합체 만이 결합체로서 존재하거나, 상기 단량체 결합체의 다량체 결합체, 특히 이량체 결합체에 대한 몰비가 19 이상인 조성물의 경우, 그렇지 않은 조성물과 비교하였을 때, 혈중 반감기를 증대시킬 수 있는 효과가 우수하다.

[45] 특히, 생리활성 폴리펩타이드가 두 개 이상 연결된 다량체 결합체에 비해 본 발명에 따른 단량체 결합체는 해당 생리활성 폴리펩타이드의 수용체에 의한 수용체-매개 내재화가 낮아서 체내 지속성이 우수하다. 특히, 생체 내에서 반감기를 좌우하는 또 하나의 주요 경로인 신장 제거의 경우, 분자량에 좌우되는 것으로 알려져 있다. 따라서, 신장 제거가 반감기를 결정하는 중요한 변수였다면 분자 크기가 더 큰 다량체 결합체 비율이 높을수록 반감기가 더 길어질 수 있으나, 본 발명에 따른 결과에서는 단량체 결합체에서 체내 지속성이 우수한 결과를 보였다. 이러한 점에서, 수용체-매개 내재화가 본 발명에 따른 결합체의

체내 반감기 증대에 중요한 요소임을 알 수 있다. 이러한 결과는 단량체 결합제의 경우, 다량체 결합체에는 찾을 수 없는 유리한 효과(예를 들어, 입체 장애 감소)에서 기인하는 것일 수 있다.

[46] 따라서, 본 발명의 지속성 약제 조성물은 생리활성 폴리펩타이드 다량체-면역글로불린 Fc 단편 결합체 또는 생리활성 폴리펩타이드 이량체-면역글로불린 Fc 단편 인프레임 결합체를 포함하는 약제에 비하여 우수한 체내 지속성 효과를 제공할 수 있다. 특히, 본 발명의 약제 조성물에서, 하나의 면역글로불린 Fc 단편에 대하여 한 분자의 생리활성 폴리펩타이드가 연결되어 있는 단량체 결합체가 면역글로불린 Fc 단편에 대하여 동일한 생리활성 폴리펩타이드 두 분자 이상이 연결되어 있는 다량체 결합체에 대하여 19:1 또는 그 이상, 구체적으로 99:1 이상, 보다 구체적으로 500:1 이상의 몰비로 존재하는 경우, 이를 포함하는 조성물의 우수한 체내 반감기 지속 효과가 감소되지 않아 지속성 제제로서 우수하다.

[47] 본 발명에서 용어, "생리활성 폴리펩타이드와 면역글로불린 Fc 단편이 결합된 결합체"는 생리활성 폴리펩타이드 및 면역글로불린 Fc 단편이 연결된 결합체를 의미한다. 바람직하게는, 상기 결합체는 생리활성 폴리펩타이드와 면역글로불린 Fc 단편 사이에 개재하는 비펩타이드성 링커로 연결된 형태일 수 있다.

[48] 본 발명에서 용어, "생리활성 폴리펩타이드 단량체와 면역글로불린 Fc 단편이 연결된 결합체"는, 생리활성 폴리펩타이드 단량체가 면역글로불린 Fc 단편에 연결된 결합체를 말한다. 상기 결합체는 하나의 생리활성 폴리펩타이드가 하나의 면역글로불린 Fc 단편에 결합된 형태를 포함한다. 여기서, 하나의 면역글로불린 Fc 단편은 이황화 결합 등의 결합에 의해 Fc 사슬 두 개가 연결된 형태임이 바람직하나 이에 제한되지 않는다. 이러한 생리활성 폴리펩타이드 단량체와 면역글로불린 Fc 단편이 연결된 결합체의 구조의 예시를 도 1에 나타내었으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 또한, 상기 생리활성 폴리펩타이드 단량체와 면역글로불린 Fc 단편이 연결된 결합체는 본 발명에서 단량체 결합체와 혼용된다.

[49] 상기 생리활성 폴리펩타이드 단량체와 면역글로불린 Fc 단편이 연결된 결합체는, 두 분자 이상의 생리활성 폴리펩타이드가 하나의 면역글로불린 Fc 단편에 비펩타이드성 중합체를 통하여 연결된 다량체 결합체, 또는 생리활성 폴리펩타이드 다량체와 면역글로불린 Fc 단편의 인프레임 결합체에 비하여 낮은 수용체-매개 내재화 또는 수용체-매개 제거(receptor-mediated clearance)를 나타내는 것을 특징으로 한다. 따라서, 상기 생리활성 폴리펩타이드 단량체와 면역글로불린 Fc 단편이 연결된 결합체만을, 또는 이를 고비율로 포함하는 약제는, 체내 지속성이 우수하여 치료학적 효능이 우수하다.

[50] 한편, 상기 면역글로불린 Fc 단편에 대하여 생리활성 폴리펩타이드가 두 분자 이상 연결된 다량체 결합체는, 하나의 면역글로불린 Fc 단편(예, 이황화 결합

등의 결합에 의해 Fc 사슬 두 개가 연결된 형태)에 두 분자 이상의 생리활성 폴리펩타이드가 연결된 형태를 포함한다.

[51]

[52] 특히, 상기 생리활성 폴리펩타이드 이량체-면역글로불린 Fc 단편 결합체는 하나의 면역글로불린 Fc 단편(예, 이황화 결합 등의 결합에 의해 Fc 사슬 두 개가 연결된 형태)에 두 분자의 생리활성 폴리펩타이드가 연결된 형태를 포함한다. 여기서 상기 생리활성 폴리펩타이드는 면역글로불린 Fc 단편을 구성하는 두 개의 Fc 사슬 각각에 비펩타이드성 중합체를 통해 연결된 형태일 수 있으나, 이에 제한되지 않으며, 이의 형태에 대하여 도 1 (B)에 나타내었다.

[53] 또한, 상기 인프레임 결합체는 생리활성 폴리펩타이드 다량체, 구체적으로이량체와 하나의 면역글로불린 Fc 단편이 서로 연결된 형태와 한 개의 생리활성 폴리펩타이드와 하나의 면역글로불린 Fc 단편이 융합된, 융합 단백질 2개 이상이 다량체를 형성한 경우 역시 모두 포함한다.

[54]

[55] 한편, 본 발명에 따른 상기 생리활성 폴리펩타이드 단량체와 면역글로불린 Fc 단편이 연결된 결합체는 비펩타이드성 링커를 통하여 공유결합적으로 연결한 형태인 것이 바람직하다.

[56] 본 발명에서 비펩타이드성 링커는 반복 단위가 2개 이상 결합된 생체 적합성 중합체를 의미하며, 상기 반복 단위들은 펩타이드 결합이 아닌 임의의 공유결합을 통해 서로 연결된다. 이와 같은 비펩타이드성 링커는 양 말단 또는 세 말단을 가질 수 있다.

[57] 본 발명에 사용가능한 비펩타이드성 링커는 폴리에틸렌 글리콜, 폴리프로필렌 글리콜, 에틸렌 글리콜과 프로필렌 글리콜의 공중합체, 폴리옥시 에틸화 폴리올, 폴리비닐 알콜, 폴리사카라이드, 덱스트란, 폴리비닐 에틸 에테르, PLA(폴리락트산, polylactic acid) 및 PLGA(폴리락틱-글리콜산, polylactic-glycolic acid)와 같은 생분해성 고분자, 지질 중합체, 키틴류, 히아루론산 및 이들의 조합으로 구성 된 군으로부터 선택될 수 있으며, 이에 제한되지는 않으나, 바람직하게는 폴리에틸렌글리콜이다. 당해 분야에 이미 알려진 이들의 유도체 및 당해 분야의 기술 수준에서 용이하게 제조할 수 있는 유도체들도 본 발명의 범위에 포함된다.

[58] 기존 인프레임 퓨전(inframe fusion) 방법으로 제조된 융합 단백질에서 사용된 펩타이드성 링커의 경우, 생체 내에서 단백질분해효소에 의해 쉽게 절단되어 캐리어에 의한 활성 약물의 혈중반감기 증가 효과를 기대만큼 얻을 수 없을 수도 있으므로, 본 발명에서는 펩타이드 링커뿐 아니라 비펩타이드 링커를 이용하여 결합체를 제조할 수 있다. 비펩타이드 링커는 단백질분해효소에 저항성 있는 중합체를 사용하여 캐리어와 유사하게 펩타이드의 혈중반감기를 유지할 수 있다. 그러므로, 본 발명에서 사용될 수 있는 비펩타이드성 링커는 상기와 같은 역할, 즉 생체 내 단백질분해효소에 저항성 있는 중합체이면 제한없이 사용될 수

있다. 비펩타이드성 링커의 분자량은 1 내지 100 kDa 범위, 바람직하게는 1 내지 20 kDa 범위이나, 이에 제한되지 않는다.

[59] 또한, 상기 면역글로불린 Fc 영역과 결합되는 본 발명의 비펩타이드성 링커는 한 종류의 중합체뿐만 아니라 상이한 종류의 중합체들의 조합이 사용될 수도 있다.

[60] 본 발명에 사용되는 비펩타이드성 링커는 면역글로불린 Fc 영역 및 단백질 약물과 결합될 수 있는 반응기를 가진다.

[61] 상기 비펩타이드성 중합체의 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 프로피오네이트, 히드록시 석시니미딜, 석시니미딜 카르복시메틸 또는 석시니미딜 카보네이트가 이용될 수 있다. 특히, 상기 비펩타이드성 링커가 양 말단에 반응 알데히드 그룹의 반응기를 갖는 경우, 비특이적 반응을 최소화하고, 비펩타이드성 링커의 양 말단에서 생리활성 폴리펩타이드 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 라이신 잔기와 공유결합을 형성할 수 있다.

[62] 상기 비펩타이드성 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 폴리에틸렌 글리콜을 비펩타이드성 링커로 이용하는 경우에는 공지의 화학반응에 의해 상기 히드록시기를 상기 다양한 반응기로 활성화하거나, 상업적으로 입수 가능한 변형된 반응기를 갖는 폴리에틸렌 글리콜을 이용하여 본 발명의 결합체를 제조할 수 있다.

[63]

[64] 본 발명에서 용어, "생리활성 폴리펩타이드"는 생체 내에서 어떤 생리작용을 가지는 폴리펩타이드를 총칭하는 개념으로서, 폴리펩타이드 구조를 가진다는 공통점을 가지며, 다양한 생리활성을 가진다. 상기 생리활성 폴리펩타이드는 유전표현과 생리기능을 조정하여 생체 내에서 기능조절에 관여하는 물질의 결핍이나 과도한 분비에 의해 비정상적인 병태를 보일 때 이를 바로잡아 주는 역할을 하는 것으로서, 일반적인 단백질 치료제를 포함할 수 있다.

[65] 본 발명의 결합체에서, 생리활성 폴리펩타이드는 단량체 형태로 면역글로불린 Fc 단편에 결합되어, 다량체 형태로 면역글로불린 Fc 단편에 결합된 경우와 비교하였을 때, 낮은 수용체-매개 내재화(receptor-mediated internalization) 또는 수용체-매개 제거(receptor-mediated clearance)를 나타낼 수 있다면 특별히 그 종류 및 크기에 제한되지 않는다. 또한, 수용체-매개 내재화 또는 수용체-매개

제거가 생체 내 단백질 제거의 주요 메커니즘으로 작용하는 생리활성 폴리펩타이드임이 보다 바람직하다.

[66] 상기 생리활성 폴리펩타이드는 글루카곤 유사 펩타이드-1(GLP-1), 호중구 증가 인자(G-CSF), 인간 성장 호르몬(hGH), 에리스로포이에틴(EPO), 글루카곤, 옥신토모듈린, 인슐린, 성장 호르몬 방출 호르몬, 성장 호르몬 방출 펩타이드, 인터페론, 인터페론 수용체, 글루카콘-유사 펩타이드, 지프로테인 관련수용체(G protein-coupled receptor), 인터루킨, 인터루킨 수용체, 효소류, 인터루킨 결합 단백질, 사이토카인 결합 단백질, 마크로파지 활성인자, 마크로파지 펩타이드, B 세포인자, T 세포인자, 단백질 A, 알러지 억제인자, 세포 괴사 당단백질, 면역독소, 림포독소, 종양 괴사인자, 종양 억제인자, 전이 성장인자, 알파-1 안티트립신, 알부민, α-락트알부민, 아포리포단백질-E, 고 당쇄화 적혈구 생성인자, 안지오포에이틴류, 헤모글로빈, 트롬빈, 트롬빈 수용체 활성 펩타이드, 트롬보모듈린, 혈액인자 VII, VIIa, VIII, IX, 및 XIII, 플라즈미노젠 활성인자, 피브린-결합 펩타이드, 유로키나제, 스트렙토키나제, 히루딘, 단백질 C, C-반응성 단백질, 레닌 억제제, 콜라게나제 억제제, 수퍼옥사이드 디스뮤타제, 렙틴, 혈소판 유래 성장인자, 상피세포 성장인자, 표피세포 성장인자, 안지오스타틴, 안지오텐신, 골 형성 성장인자, 골 형성 촉진 단백질, 칼시토닌, 아트리오펩틴, 연골 유도인자, 엘카토닌, 결합조직 활성인자, 조직인자 경로 억제제, 여포 자극 호르몬, 황체 형성 호르몬, 황체 형성 호르몬 방출 호르몬, 신경 성장인자, 부갑상선 호르몬, 릴랙신, 씨크레틴, 소마토메딘, 인슐린 유사 성장인자, 부신피질 호르몬, 콜레시스토키닌, 췌장 폴리펩타이드, 가스트린 방출 펩타이드, 코티코트로핀 방출인자, 갑상선 자극호르몬, 오토탁신, 락토페린, 미오스타틴, 세포표면항원, 바이러스 유래 백신 항원, 단일클론 항체, 다중클론 항체 및 항체 단편으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것일 수 있다. 또한, 상기 생리활성 폴리펩타이드는 바람직하게는, 수용체-매개 제거가 주요한 생체 내 단백질 제거 기전인, 글루카곤 유사 펩타이드-1(GLP-1), 호중구 증가 인자(G-CSF), 인간 성장 호르몬(hGH), 에리스로포이에틴(EPO), 글루카곤, 옥신토모듈린, 인슐린 또는 이들의 유도체이나, 이에 제한되지 않는다.

[67] 또한, 본 발명에서 상기 생리활성 폴리펩타이드는 천연형 형태의 생리활성 폴리펩타이드 뿐만 아니라, 각 폴리펩타이드의 아고니스트, 전구물질, 유도체, 단편 또는 변이체를 모두 포괄하는 개념이다.

[68] 본 발명에 사용되는 상기 생리활성 폴리펩타이드는 GLP-1 아고니스트일 수 있으며, 특별히 이에 제한되지 않으나, 그 예로 [(1H-Imidazol-4-yl)-acetyl1]GEGTFTSDL SKQMEEEAVR LFIEWLKNGGPSSGAPPPS(서열번호 1) (Bachem 사) 또는 HGEGTFTSDV SSYLEEQAAK EFIAWLVKG(서열번호 2) (Bachem 사)일 수 있다. 상기 아미노산 서열은 N-말단에서 C-말단으로의 방향으로 기재된 것이다.

[69] 그 중 [(1H-Imidazol-4-yl)-acetyl1]GEGTFTSDL SKQMEEEAVR

LFIEWLKNGGPSSGAPPPS (Bachem 사)가 본 발명에 따른 GLP-1 아고니스트 및 면역글로불린 Fc 단편 결합체(실시예)의 제조에 사용되었다.

[70] 여기서, 옥신토모듈린 유도체의 예는 한국공개특허 제10-2012-0137271호에 개시된 것을 모두 포함하며, 인슐린 분비 펩타이드 유도체의 예에 대해서는 한국공개특허 제10-2009-0008151호에 개시된 것 역시 모두 포함하나, 이에 제한되지 않는다.

[71]

[72] 면역글로불린 Fc 영역은 생체 내에서 대사되는 생분해성의 폴리펩타이드이기 때문에, 약물의 캐리어로 사용하기에 안전하다. 또한, 면역글로불린 Fc 영역은 면역글로불린 전체 분자에 비해 상대적으로 분자량이 적기 때문에 결합체의 제조, 정제 및 수율 면에서 유리할 뿐만 아니라, 아미노산 서열이 항체마다 다르기 때문에 높은 비균질성을 나타내는 Fab 부분이 제거되기 때문에 물질의 동질성이 크게 증가되고 혈중 항원성의 유발 가능성도 낮아지게 되는 효과도 기대할 수 있다

[73] 본 발명에서, "면역글로불린 Fc 영역"은, 면역글로불린의 중쇄와 경쇄 가변영역, 중쇄 불변영역 1(CH1)과 경쇄 불변영역(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 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 Fc영역일 수 있다. 또한, CH2및/또는 CH3에 해당하는 상당히 긴 일부 아미노산 서열이 제거된 영역일 수도 있다.

[74] 즉, 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, 5)1개 또는 2개의 이상의 도메인과 면역글로불린 힌지 영역(또는 힌지 영역의 일부)와의 조합, 6)중쇄 불변영역 각 도메인과 경쇄 불변영역의 이량체일 수 있다.

[75] 또한, 본 발명의 면역글로불린 Fc 영역은 천연형 아미노산 서열뿐만 아니라 이의 서열 변이체(mutant)를 포함한다. 아미노산 서열 변이체란 천연 아미노산 서열 중의 하나 이상의 아미노산 잔기가 결실, 삽입, 비보전적 또는 보전적 치환 또는 이들의 조합에 의하여 상이한 서열을 가지는 것을 의미한다. 예를 들면, IgG Fc의 경우 결합에 중요하다고 알려진 214 내지 238, 297 내지 299, 318 내지 322 또는 327 내지 331번 아미노산 잔기들이 변형을 위해 적당한 부위로서 이용될 수 있다.

[76] 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 변이체가 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 제WO 96/32478호 등에 개시되어 있다.

[77] 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.

[78] 경우에 따라서는 인산화(phosphorylation), 황화(sulfation), 아크릴화 (acrylation), 당화(glycosylation), 메틸화(methylation), 파네실화(farnesylation), 아세틸화(acetylation) 및 아밀화(amidation) 등으로 수식(modification)될 수도 있다.

[79] 상기 기술한 Fc 변이체는 본 발명의 Fc 영역과 동일한 생물학적 활성을 나타내나 Fc 영역의 열, pH 등에 대한 구조적 안정성을 증대시킨 변이체다.

[80] 또한, 이러한 Fc 영역은 인간 및 소, 염소, 돼지, 마우스, 래빗, 햄스터, 랫트, 기니아 픽 등의 동물의 생체 내에서 분리한 천연형으로부터 얻어질 수도 있고, 형질전환된 동물세포 또는 미생물로부터 얻어진 재조합형 또는 이의 유도체 일 수 있다. 여기서, 천연형으로부터 획득하는 방법은 전체 면역글로불린을 인간 또는 동물의 생체로부터 분리한 후, 단백질 분해효소를 처리하여 얻을 수 있다. 파파인을 처리할 경우에는 Fab 및 Fc로 절단되고, 펩신을 처리할 경우에는 pF'c 및 F(ab)2로 절단된다. 이를 크기 배제 크로마토그래피(size-exclusion chromatography) 등을 이용하여 Fc 또는 pF'c를 분리할 수 있다.

[81] 바람직하게는 인간 유래의 Fc 영역을 미생물로부터 수득한 재조합형 면역글로불린 Fc 영역이다.

[82] 또한, 면역글로불린 Fc 영역은 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 유전 공학적 방법과 같은 통상적인 방법이 이용될 수 있다. 여기서, Fc에서 당쇄가 제거된 면역글로불린 Fc 영역은 보체(c1q)의 결합력이 현저히 저하되고, 항체-의존성 세포독성 또는 보체-의존성 세포독성이 감소 또는 제거되므로, 생체 내에서 불필요한 면역반응을 유발하지 않는다. 이런 점에서 약물의 캐리어로서의 본래의 목적에 보다 부합하는 형태는 당쇄가 제거되거나 비당쇄화된 면역글로불린 Fc 영역이라 할 것이다.

[83] 본 발명에서 "당쇄의 제거(Deglycosylation)"는 효소로 당을 제거한 Fc 영역을 말하며, "비당쇄화(Aglycosylation)"는 원핵동물, 바람직하게는 대장균에서 생산하여 당쇄화되지 않은 Fc 영역을 의미한다.

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

[85] 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.

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

[87] 한편, IgG 역시 IgG1, IgG2, IgG3 및 IgG4의 서브클래스로 나눌 수 있고 본 발명에서는 이들의 조합 또는 이들의 혼성화도 가능하다. 바람직하게는 IgG2 및 IgG4 서브클래스이며, 가장 바람직하게는 보체 의존적 독성(CDC, complementdependent cytotoxicity)과 같은 이펙터 기능(effector function)이 거의 없는 IgG4의 Fc 영역이다. 즉, 가장 바람직한 본 발명의 약물의 캐리어용 면역글로불린 Fc 영역은, 인간 IgG4 유래의 비-당쇄화된 Fc 영역이다. 인간 유래의 Fc 영역은 인간 생체에서 항원으로 작용하여 이에 대한 새로운 항체를 생성하는 등의 바람직하지 않은 면역 반응을 일으킬 수 있는 비-인간 유래의 Fc 영역에 비하여 바람직하다.

[88] 본 발명의 일 실시예에서는, 생리활성 폴리펩타이드 단량체 및 면역글로불린 Fc 단편을 비펩타이드성 중합체로 연결한, 결합체를 제조하였고(실시예), 상기 결합체의 경우, 생리활성 폴리펩타이드가 이량체인 결합체에 비하여 낮은 수용체에 의해 매개되는 내재화를 나타내며, 이에 따라 체내 반감기 역시 증대됨을 확인하였다(도 2 및 3).

[89]

[90] 또 하나의 양태로서, 본 발명은 생리활성 폴리펩타이드 단량체 및 면역글로불린 Fc 단편이 비펩타이드성 링커로 연결된, 생리활성 폴리펩타이드 단량체-면역글로불린 Fc 단편 결합체로서, 상기 생리활성 폴리펩타이드는 단량체 형태로 면역글로불린 Fc 단편에 비펩타이드성 링커로 연결되어, 생리활성 폴리펩타이드 이량체 및 면역글로불린 Fc 단편이 비펩타이드성

중합체를 통하여 연결된 이량체 결합체 또는 생리활성 폴리펩타이드 이량체와 면역글로불린 Fc 단편의 인프레임 결합체에 비하여 낮은 수용체-매개 내재화 또는 수용체-매개 제거를 나타내는 것을 특징으로 하는 결합체를 제공한다.

[91] 상기 생리활성 폴리펩타이드, 면역글로불린 Fc 단편, 비펩타이드성 링커 및 결합체에 대해서는 상기에서 설명한 바와 같다.

[92]

[93] 또 하나의 양태로서, 본 발명은 (a) 생리활성 폴리펩타이드 및 면역글로불린 Fc 단편을 서로 연결시켜, 생리활성 폴리펩타이드-면역글로불린 Fc 단편 결합체의 혼합물을 제조하는 단계; 및 (b) 상기 혼합물로부터 생리활성 폴리펩타이드 단량체 및 면역글로불린 Fc 단편이 서로 연결된, 생리활성 폴리펩타이드 단량체와 면역글로불린 Fc 단편이 연결된 결합체를 분리하는 단계를 포함하는, 상기 지속성 약제의 제조 방법을 제공한다.

[94] 상기 생리활성 폴리펩타이드, 면역글로불린 Fc 단편, 결합체 및 지속성 약제에 대해서는 상기에서 설명한 바와 같다.

[95] 상기 방법에서 (a) 단계는 생리활성 폴리펩타이드 단량체 및 면역글로불린 Fc 단편을 비펩타이드성 링커를 통하여 공유결합적으로 서로 연결하는 단계이다. (a) 단계는, (i) 생리활성 폴리펩타이드 단량체 또는 면역글로불린 Fc 단편 중 어느 하나를 먼저 비펩타이드성 링커의 한 말단의 반응기에 연결하는 단계 및 (ii) 비펩타이드성 링커의 다른 말단의 반응기에 나머지 하나를 연결하는 단계를 포함할 수 있으며, 여기서 (i) 및 (ii) 단계 사이에, 추가로 비펩타이드성 링커의 한 말단에 생리활성 폴리펩타이드 단량체 또는 면역글로불린 Fc 단편이 결합된 것을 분리하는 단계를 포함할 수 있다. 이러한 결합체 제조에 있어서, 대한민국 등록특허 제10-0725315호는 본 발명의 참고자료로서 포함될 수 있다.

[96] 이러한 과정을 통해서 결합체를 제조하는 경우에는, 생리활성 폴리펩타이드 단량체 및 면역글로불린 Fc 단편이 결합된 결합체 외에도, 생리활성 폴리펩타이드가 이량체 이상으로 존재하는 결합체 등도 부산물로 발생할 수 있다.

[97] 따라서, (a) 과정을 통하여 결합체를 제조한 다음, (b) 상기 혼합물로부터 생리활성 폴리펩타이드 단량체 및 면역글로불린 Fc 단편이 서로 연결된, 생리활성 폴리펩타이드 단량체와 면역글로불린 Fc 단편이 연결된 결합체를 분리하는 단계를 추가로 포함할 수 있다.

[98] 이때, 사용되는 비펩타이드성 링커, 생리활성 폴리펩타이드 등의 종류에 따라 분리 조건은 달라질 수 있다.

[99]

[100] 이하, 하기 예에 의하여 본 발명을 보다 상세하게 설명한다. 단, 하기 예는 본 발명을 예시하기 위한 것일 뿐 본 발명의 범위가 이들로 한정되는 것은 아니다.

[101]

[102] **실시예 : GLP-1 아고니스트 및 면역글로불린 Fc 단편 결합체의 제조**

[103]

[104] 3.4 kDa 프로피온(propion)-ALD2 PEG (IDB. 한국)를 GLP-1 아고니스트의 라이신 (Lysine)과 위치 특이적으로 반응시킨 후, PEG와 GLP-1 아고니스트가 1:1로 결합된 연결체를 얻기 위하여 상기 반응 혼합물을 양이온 교환 컬럼을 실시하여 모노페길화된(mono-PEGylated) GLP-1 아고니스트를 정제하였다. 면역글로불린 Fc의 N 말단과 특이적으로 모노페길화된 GLP-1 아고니스트가 연결된 GLP-1 아고니스트-면역글로불린 Fc 단편 결합체를 제조하기 위하여 pH 5.0~8.2 조건에서 반응하였다. 커플링 반응 후 소수성 컬럼과 음이온 교환 컬럼을 이용한 2단계 정제방법을 사용하였고, 최종적으로 위치특이적으로 결합된 GLP-1 아고니스트-면역글로불린 Fc 단편 결합체를 정제하였다.

[105]

[106] 이와 같은 정제 과정으로 제조한 GLP-1 아고니스트 및 면역글로불린 Fc 결합체를 분석한 결과, GLP-1 아고니스트 단량체 및 면역글로불린 Fc 결합체만이 존재하거나, 미량의 GLP-1 아고니스트 이량체 및 면역글로불린 Fc 결합체, 구체적으로 결합체 총 농도에서 다량체 결합체가 5%(w/w) 이하의 비율로 존재하는 것을 확인하였다.

[107]

[108] **비교예: GLP-1 아고니스트 이량체-면역글로불린 Fc 단편 결합체의 제조**

[109]

[110] GLP-1 아고니스트와 면역글로불린 Fc 단편부위가 연결된 DNA 서열을 동물세포 발현벡터에 클로닝하였다. 이 재조합 단백질을 코딩하는 DNA를 형질주입 용액(FreeStyle MAX ReagentTM, Invitrogen)을 이용하여 동물세포주인 293-F (Freestyle 293-F cell, invtrogen)에 형질주입시킨 후 48시간 동안 배양하여 배양액을 수득하였다. 발현된 GLP-1 아고니스트 이량체-면역글로불린 Fc 단편 결합체는 친화성 컬럼을 사용하여 배양액으로부터 정제하였다.

[111]

[112] **실험예 1: 수용체 내재화(Receptor internalization) 평가**

[113]

[114] 수용체 내재화(receptor internalization)를 평가하기 위하여 PathHunter® eXpress Activated GPCR Internalization Assay를 이용하였다. 인간 GLP-1 수용체를 발현하는 U2OS 세포를 백색 96-웰 플레이트에 접종하고 24 내지 48시간 동안 배양하였다. 실시예의 GLP1 아고니스트 결합체는 3μM부터, 비교예의 인프레임 GLP1 아고니스트 결합체는 15μM부터 1/4씩 일련 희석(serial dilution)하여 첨가하였고, 37℃ CO_2배양기에서 3시간 동안 수용체 내재화를 유도하였다. 그 다음, 엔도사이토시스가 일어난 수용체를 검출하는 기질을 첨가하여 실온에서 60분간 반응시키고, 루미네선스 플레이트 리더(luminescence plate reader)로 발광도를 측정하였고, 그 결과를 도 2에 나타내었다.

[115]

[116] 그 결과, 도 2에 나타낸 바와 같이, 실시예의 결합체는 EC_{50} 377nM, 비교예의 결합체는 EC_{50} 14.59nM를 나타내어, 본 발명의 GLP1 아고니스트 결합체가 비교예의 GLP1 결합체 대비 월등히 낮은 수용체 내재화를 유발함을 확인하였다. 이러한 결과는, 생리활성 폴리펩타이드 단량체가 면역글로불린 Fc 단편에 연결된 결합체의 경우, 생리활성 폴리펩타이드가 이량체인 결합체에 비하여 낮은 수용체-매개 내재화 및 제거를 나타낼 수 있음을 시사하는 것이다.

[117]

[118] **실험예 2: GLP1 아고니스트 결합체의 인 비보 약물 동태 비교시험**

[119]

[120] 실시예의 GLP1 아고니스트 결합체와 비교예의 GLP1 아고니스트 결합체의 인 비보 약물동태를 비교하기 위하여 정상 SD 랫트를 이용하여 혈중 농도의 변화를 확인하였다.

[121] 구체적으로, 상기 동물에 실시예의 GLP1 아고니스트 결합체(400mcg/kg), 비교예의 GLP1 아고니스트 결합체(400 mcg/kg)를 2 mL/kg의 투여용량이 되도록 각 물질의 생리 식염수로 희석하여 피하 투여하였다. 그리고 상기 시험물질 투여 후 4, 8, 24, 48, 72, 96, 120, 144, 168, 192, 216, 240, 288, 312 및 336 시간에 랫트의 경정맥에서 채혈하여 혈청으로 분리하였다. 이후 혈청 시료를 효소 면역법을 이용하여 약물의 농도를 정량하였고, 그 결과를 도 3에 나타내었다.

[122]

[123] 그 결과, 실시예의 GLP1 아고니스트 결합체와 비교예의 GLP1 아고니스트 결합체의 혈중 반감기는 각각 40.9시간, 28시간이었고 최대 혈청 농도는 1758.6ng/mL과 742.7ng/mL을 나타내었다. 즉, 동일 용량의 약물을 정상 랫트에 피하 투여하였을 때, 본 발명의 GLP1 아고니스트 결합체가 비교예의 GLP1 아고니스트 결합체보다 체내 흡수 및 지속성 측면에서 우수한 결과를 나타내었다(도 3). 이러한 결과는, 생리활성 폴리펩타이드 단량체가 면역글로불린 Fc 단편에 연결된 결합체의 경우, 생리활성 폴리펩타이드가 이량체인 결합체에 비하여 높은 체내 지속성을 나타낼 수 있음을 시사하는 것이다.

[124]

[125] 이상의 설명으로부터, 본 발명이 속하는 기술분야의 당업자는 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] 생리활성 폴리펩타이드가 면역글로불린 Fc 단편에 연결된 결합체를 함유하는 조성물로서, 상기 조성물은 하나의 면역글로불린 Fc 단편에 대하여 한 분자의 생리활성 폴리펩타이드가 연결되어 있는 단량체 결합체를 함유하고, 선택적으로 하나의 면역글로불린 Fc 단편에 대하여 동일한 생리활성 폴리펩타이드가 두 분자 이상 연결된 다량체 결합체를 함유하되, 상기 조성물 내 상기 단량체 결합체의 다량체 결합체에 대한 몰비는 19 이상인 지속성 약제 조성물.

[청구항 2] 제1항에 있어서,
상기 결합체는 생리활성 폴리펩타이드와 면역글로불린 Fc 단편 사이에 개재하는 비펩타이드성 링커로 연결된 것인, 지속성 약제 조성물.

[청구항 3] 제1항에 있어서,
상기 단량체 결합체는, 하나의 면역글로불린 Fc 단편에 대하여 생리활성 폴리펩타이드 두 분자가 비펩타이드성 중합체를 통하여 연결된 이량체 결합체, 또는 생리활성 폴리펩타이드 이량체와 면역글로불린 Fc 단편의 인프레임 결합체에 비하여 낮은 수용체-매개 내재화(receptor-mediated internalization) 또는 수용체-매개 제거(receptor-mediated clearance)를 나타내는 것을 특징으로 하는, 지속성 약제 조성물.

[청구항 4] 제1항에 있어서,
상기 생리활성 폴리펩타이드는 글루카곤 유사 펩타이드-1(GLP-1), 호중구 증가 인자(G-CSF), 인간 성장 호르몬(hGH), 에리스로포이에틴(EPO), 글루카곤, 옥신토모듈린, 인슐린, 성장 호르몬 방출 호르몬, 성장 호르몬 방출 펩타이드, 인터페론, 인터페론 수용체, 지프로테인 관련수용체(G protein-coupled receptor), 인터루킨, 인터루킨 수용체, 효소류, 인터루킨 결합 단백질, 사이토카인 결합 단백질, 마크로파지 활성인자, 마크로파지 펩타이드, B 세포인자, T 세포인자, 단백질 A, 알러지 억제인자, 세포 괴사 당단백질, 면역독소, 림포독소, 종양 괴사인자, 종양 억제인자, 전이 성장인자, 알파-1 안티트립신, 알부민, α-락트알부민, 아포리포단백질-E, 고 당쇄화 적혈구 생성인자, 안지오포에이틴류, 헤모글로빈, 트롬빈, 트롬빈 수용체 활성 펩타이드, 트롬보모듈린, 혈액인자 VII, VIIa, VIII, IX, 및 XIII, 플라즈미노젠 활성인자, 피브린-결합 펩타이드, 유로키나제, 스트렙토키나제, 히루딘, 단백질 C, C-반응성 단백질, 레닌 억제제,

콜라게나제 억제제, 수퍼옥사이드 디스뮤타제, 렙틴, 혈소판 유래 성장인자, 상피세포 성장인자, 표피세포 성장인자, 안지오스타틴, 안지오텐신, 골 형성 성장인자, 골 형성 촉진 단백질, 칼시토닌, 아트리오펩틴, 연골 유도인자, 엘카토닌, 결합조직 활성인자, 조직인자 경로 억제제, 여포 자극 호르몬, 황체 형성 호르몬, 황체 형성 호르몬 방출 호르몬, 신경 성장인자, 부갑상선 호르몬, 릴랙신, 씨크레틴, 소마토메딘, 인슐린 유사 성장인자, 부신피질 호르몬, 콜레시스토키닌, 췌장 폴리펩타이드, 가스트린 방출 펩타이드, 코티코트로핀 방출인자, 갑상선 자극호르몬, 오토탁신, 락토페린, 미오스타틴, 세포표면항원, 바이러스 유래 백신 항원, 단일클론 항체, 다중클론 항체 및 항체 단편으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인, 지속성 약제 조성물.

[청구항 5] 제1항에 있어서,
상기 생리활성 폴리펩타이드는 글루카곤 유사 펩타이드-1(GLP-1), 호중구 증가 인자(G-CSF), 인간 성장 호르몬(hGH), 에리스로포이에틴(EPO), 글루카곤, 옥신토모듈린, 인슐린 및 이들의 유도체로 이루어진 군으로부터 선택된 것인, 지속성 약제 조성물.

[청구항 6] 제2항에 있어서,
상기 비펩타이드성 링커는 폴리에틸렌글리콜, 폴리프로필렌 글리콜, 에틸렌 글리콜-프로필렌 글리콜 공중합체, 폴리옥시에틸화폴리올, 폴리비닐알콜, 폴리사카라이드, 덱스트란, 폴리비닐에틸에테르, 생분해성 고분자, 지질 중합체, 키틴, 히아루론산 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인, 지속성 약제 조성물.

[청구항 7] 제2항에 있어서,
상기 비펩타이드성 링커는 분자량이 1 내지 100 kDa 범위인 것인, 지속성 약제 조성물.

[청구항 8] 제1항에 있어서,
상기 면역글로불린 Fc 단편이 CH1, CH2, CH3 및 CH4 도메인으로 이루어진 군으로부터 선택된 1개 내지 4개 도메인으로 이루어진 것인, 지속성 약제 조성물.

[청구항 9] 제1항에 있어서,
상기 면역글로불린 Fc 단편은 힌지(hinge) 영역을 추가로 포함하는 것인, 지속성 약제 조성물.

[청구항 10] 제1항에 있어서,
상기 면역글로불린 Fc 단편은 IgG, IgA, IgD, IgE, IgM, 이들의 조합(combination) 및 이들의 하이브리드(hybrid)로 이루어진

군으로부터 선택되는 것인, 지속성 약제 조성물.

[청구항 11] 제1항에 있어서,
상기 면역글로불린 Fc 단편은 IgG4 Fc 단편인, 지속성 약제 조성물.

[청구항 12] 제1항에 있어서,
상기 면역글로불린 Fc 단편은 비당쇄화된 것인, 지속성 약제 조성물.

[청구항 13] 생리활성 폴리펩타이드 단량체 및 면역글로불린 Fc 단편이 비펩타이드성 링커로 연결된, 생리활성 폴리펩타이드 단량체-면역글로불린 Fc 단편 결합체로서,
상기 생리활성 폴리펩타이드는 단량체 형태로 하나의 면역글로불린 Fc 단편에 비펩타이드성 링커로 연결되어, 생리활성 폴리펩타이드 두 분자가 하나의 면역글로불린 Fc 단편에 비펩타이드성 중합체를 통하여 연결된 이량체 결합체 또는 생리활성 폴리펩타이드 이량체와 면역글로불린 Fc 단편의 인프레임 결합체에 비하여 낮은 수용체-매개 내재화 또는 수용체-매개 제거를 나타내는 것을 특징으로 하는 결합체.

[청구항 14] (a) 생리활성 폴리펩타이드 및 면역글로불린 Fc 단편을 서로 연결시켜, 생리활성 폴리펩타이드-면역글로불린 Fc 단편 결합체의 혼합물을 제조하는 단계; 및
(b) 상기 혼합물로부터 생리활성 폴리펩타이드 단량체 및 면역글로불린 Fc 단편이 서로 연결된, 한 분자의 생리활성 폴리펩타이드가 하나의 면역글로불린 Fc 단편에 연결된 결합체를 분리하는 단계를 포함하는,
제1항의 지속성 약제 조성물의 제조 방법.

[청구항 15] 제14항에 있어서,
상기 생리활성 폴리펩타이드 및 면역글로불린 Fc 단편은 비펩타이드성 링커로 서로 연결된 것인 방법.

[청구항 16] 제14항에 있어서,
상기 지속성 약제 조성물의 한 분자의 생리활성 폴리펩타이드가한 개의 면역글로불린 Fc 단편에 연결된 결합체는 두 분자의 생리활성 폴리펩타이드가 하나의 면역글로불린 Fc 단편에 비펩타이드성 중합체를 통하여 연결된, 이량체 결합체 또는 생리활성 폴리펩타이드 이량체와 면역글로불린 Fc 단편의 인프레임 결합체에 비하여 낮은 수용체-매개 내재화 또는 수용체-매개 제거(receptor-mediated clearance)를 나타내는 것을 특징으로 하는, 방법.