명세서

발명의 명칭: 신규 치료학적 효소 융합단백질 및 이의 용도

기술분야

[1] 본 발명은 생체 치료학적 효소 류의 생체 내 반감기 증가를 목적으로 효소 류에 면역글로불린 Fc 영역이 융합된 치료학적 효소 융합단백질, 이의 제조 방법과 이를 포함하는 조성물에 관한 것이다.

[2]

배경기술

[3] 리소좀은 단백질, 폴리뉴클레오타이드, 다당류 및 지질과 같은 거대분자를 분해하는 기능을 하는 세포질 소기관이다. 리소좀의 내부는 산성 분위기이며 생물학적 거대분자들의 가수분해를 촉진하는 가수분해 효소(hydrolase enzymes)를 함유한다. 리소좀은 또한 세포 내 이입(endocytosis)을 통한 분자의 흡수에 있어서 어떠한 역할을 하는 것으로 밝혀져 있다.

[4] 리소좀 축적 질환 (Lysosomal Storage Disorders, LSDs)은 유전적 대사 질환의 일종으로 리소좀의 기능이 상실되어 나타난다. 리소좀 축적 질환은 지질, 단백질, 다당류 등의 물질을 분해하는 효소의 결핍으로 인해 나타나는데, 보통 100,000명중 1명꼴로 나타나며 열성 질환으로 유전된다. 리소좀 축적 질환은 이렇게 분해 작용을 하는 특정 효소가 결핍되었거나 그 양이 매우 적을 때 나타나며, 이렇게 분해 효소가 결핍되었을 때 과량의 물질이 분해되지 않고 축적되어 결국 세포의 기능에도 문제를 일으키게 되는 것이다. 다른 많은 유전 질환들과 마찬가지로 리소좀 축적 질환은 부모로부터 유전된다. 또한 각각의 질환은 각기 다른 효소를 번역하는 서로 다른 유전자의 변이에 의해 발생한다. 이러한 질병의 원인이 되는 효소들은 대개 비슷한 생화학적 특성을 가지며, 모든 리소좀 축적 질환들은 리소좀 내 비정상적인 물질 축적에 의해 발생한다. 현재 알려져 있는 대표적인 리소좀 축적 질환으로는 니만-피크병 (Niemann-Pick disease), 파브리병 (Fabry's disease), 고셰병 (Gaucher disease), 헌터증후군 (Hunter syndrome), 마로토 라미 증후군 (Maroteaux-Lamy syndrome) 등과 같은 약 50여종의 질환이 알려져 있으며, 이러한 리소좀 축적 질환을 치료하기 위한 방법으로 대표적으로는 효소-대체 요법 (ERT: enzyme-replacement therapy)이 있으며 관련된 많은 연구가 진행되고 있다 (Frances M. Platt et al., J Cell Biol. 2012 Nov 26;199(5):723-34).

[5] 대표적인 리소좀 축적 질환인 헌터 증후군은 이두로네이트-2-설파타제 (Iduronate-2-sulfatase, IDS)의 결핍으로 인해 글리코사미노글리칸 (glycosaminoglycan, GAG)이 분해되지 못하고 리소좀 내에 축적되어 나타나는 질환으로, 두드러진 얼굴 모습, 큰 머리, 간이나 비장의 비대로 인한 복부 팽만 등이 포함되며, 청력 상실, 심장 판막 질환, 폐쇄성 호흡기질환, 수면 무 호흡

등도 동반된다. 헌터 증후군은 162,000명당 1명꼴로 발생하는 것으로 알려져 있으며, X 염색체와 연관된 열성 (X-linked recessive) 양식으로 유전된다. 현재 헌터 증후군 치료를 위한 효소-대체 요법 약물로는 Elaprase (recombinant IDS, Shire)가 사용되고 있다.

[6] 이러한 치료학적 효소 류와 같은 단백질은 일반적으로 안정성이 낮아 쉽게 변성되고 혈액 내 단백질 가수분해효소에 의해 분해되어 혈중 농도 및 활성을 유지하기 위해서는 환자에게 자주 투여할 필요가 있다. 그러나 대부분 주사제 형태로 환자에게 투여되는 단백질 의약품의 경우, 활성 폴리펩타이드의 혈중 농도를 유지하기 위해 자주 주사를 놓는 것은 환자에게 엄청난 고통을 야기하게 된다. 이러한 문제점을 해결하기 위해, 치료학적 효소 류의 혈중 안정성을 증가시키고 혈중 약물 농도를 오랫동안 높게 지속시켜 약효를 극대화하려는 노력이 계속되어 왔다. 이러한 치료학적 효소 류의 지속성 제제는 치료학적 효소 류의 안정성을 높이는 동시에 약물 자체의 활성이 충분히 높게 유지되어야 하고 환자에게 면역반응을 유발하지 않아야 한다.

[7] 특히 리소좀 축적 질환은 특정 효소의 유전적 결함으로 인해 생기는 병으로 사망에 까지 이르는 치명적인 병이며, 결함이 있는 효소의 보충치료가 필수적이다. 효소 보충 치료는 리소좀 축적 질환에서 표준이 되는 치료로 부족한 효소를 보충하는 것을 통해 기존의 증상이 완화되거나 질환의 진행을 늦추는 효과를 볼 수 있다. 그러나 지속적으로 1-2주마다 2-6시간 동안 약물을 정맥으로 투여해야 된다는 점에서 환자 및 가족의 일상 생활이 제한 받을 수 있다.

[8] 리소좀 축적 질환의 치료에 사용되는 재조합 효소의 사람에서의 반감기는 짧게는 10분에서 3시간 미만으로 그 지속시간이 매우 짧아 평생 효소를 투여해야 하는 환자의 불편함을 야기 하고 있어 그 반감기의 연장이 매우 필요하다.

[9] 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.

[10] 그러나 면역글로불린 Fc 영역은 의도되지 않은 면역반응을 일으킬 수 있는 단점이 있다. 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.

[11] 따라서, 목적하는 융합 단백질이 생체 내에서 안정하게 지속성이 증가하는 동시에 융합된 단백질의 활성이 유지되지 않는 단점이 있다.

[12]

발명의 상세한 설명

기술적 과제

[13] 본 발명의 하나의 목적은 치료학적 효소에 면역글로불린 Fc 영역이 융합되어 Fc 영역이 융합되지 않은 치료학적 효소에 비해 생체내 지속성이 증가된 효소 융합단백질을 제공하는 것이다.

[14] 본 발명의 다른 목적은 상기 치료학적 효소 융합단백질을 포함하는 약학적 조성물을 제공하는 것이다. 본 발명의 또 다른 목적은 상기 치료학적 효소 융합단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드, 상기 폴리뉴클레오티드를 포함하는 발현 벡터, 및 상기 발현 벡터가 도입된 형질전환체를 제공하는 것이다. 본 발명의 또 다른 목적은 상기 형질전환체를 배양하는 단계를 포함하는 효소 융합단백질을 제조하는 방법을 제공하는 것이다.

[15]

과제 해결 수단

[16] 본 발명을 구현하는 하나의 양태는 치료학적 효소와 면역글로불린 Fc 영역이 융합된 효소 융합단백질이다.

[17]

[18] 하나의 구체예에서, 본 발명은 치료학적 효소에 면역글로불린 Fc 영역이 융합되어 Fc 영역이 융합되지 않은 치료학적 효소에 비해 생체 내 지속성이 증가된 효소 융합단백질에 관한 것이다.

[19]

[20] 하기는 본 발명의 추가 구체예에 해당한다.

[21]

[22] 구체적으로, 앞선 구체예에 따른 효소 융합단백질로서, 상기 효소는 베타글루코시다제 (beta-glucosidase), 알파갈락토시다제 (alpha-galactosidase), 베타갈락토시다제 (beta-galactosidase), 이두로니다제 (iduronidase), 이두로네이트 2-설파타제 (iduronate-2-sulfatase), 갈락토스-6-설파타제 (Galactose-6-sulfatase), 산성 알파-글루코시다제 (acid alpha-glucosidase), 산성 세라미다제 (acid ceramidase), 산성 스핑고미엘리나제 (acid sphingomyelinsase), 갈락토세레브로시다제 (galactocerebrosidsase), 아릴설파타제 (arylsulfatase) A, B, 베타-헥소사미니다제 (beta-hexosaminidase) A, B, 헤파린-N-설파타제 (heparin N-sulfatase), 알파-D-마노시다제 (alpha-D-mannosidase), 베타-글루쿠로니다제 (beta-glucuronidase), N-아세틸갈락토사민-6-설파타제 (N-acetylgalactosamine-6 sulfatase), 리소좀 산성 리파제 (lysosomal acid lipase),

알파-N-아세틸-글루코사미니다제 (alpha-N-acetyl-glucosaminidase), 글루코세레브로시다제 (glucocerebrosidase), 부티릴콜린에스터라제 (butyrylcholinesterase), 키티나제 (Chitinase), 글루타메이트 디카르복실라제 (glutamate decarboxylase), 이미글루세라제 (imiglucerase), 리파아제 (lipase), 우리카제 (Uricase), 혈소판활성인자 아세틸하이드로라제 (Platelet-Activating Factor Acetylhydrolase), 뉴트럴 엔도펩티다제 (neutral endopeptidase), 및 미엘로퍼옥시다제 (myeloperoxidase) 로 이루어진 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 한다.

[23]

[24] 앞선 구체예 중 어느 하나에 따른 효소 융합단백질로서, 상기 효소 융합단백질은 치료학적 효소 및 면역글로불린 Fc 영역이 펩타이드 링커로 융합된 것을 특징으로 한다.

[25]

[26] 앞선 구체예 중 어느 하나에 따른 효소 융합단백질로서, 상기 효소 융합단백질은 하나의 면역글로불린 Fc 영역 분자와 이량체의 치료학적 효소가 융합된 것을 특징으로 한다.

[27]

[28] 앞선 구체예 중 어느 하나에 따른 효소 융합단백질로서, 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 것을 특징으로 한다.

[29]

[30] 앞선 구체예 중 어느 하나에 따른 효소 융합단백질로서, 상기 면역글로불린 Fc 영역은, 서열번호 8의 면역글로불린 Fc 영역의 2번째 아미노산이 프롤린으로 치환되거나; 71번째 아미노산이 글루타민으로 치환되거나; 또는 2번째 아미노산은 프롤린으로, 71번째 아미노산은 글루타민으로 치환된 것을 특징으로 한다.

[31]

[32] 앞선 구체예 중 어느 하나에 따른 효소 융합단백질로서, 상기 면역글로불린 Fc 영역은 사슬 교환 기능이 일어나지 않는 것을 특징으로 한다.

[33]

[34] 앞선 구체예 중 어느 하나에 따른 효소 융합단백질로서, 상기 효소 융합단백질은 Fc 영역이 융합되지 않은 치료학적 효소에 비해 안정성이 증가되고, 리소좀 수용체에 대한 결합력이 감소되어 조직 분포도가 높은 것을 특징으로 한다.

[35]

[36] 앞선 구체예 중 어느 하나에 따른 효소 융합단백질로서, 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; (e) CH1 도메인, CH2 도메인, CH3 도메인 및 CH4 도메인 중 1개 또는 2개 이상의 도메인과 면역글로불린 힌지 영역 또는 힌지 영역의 일부와의 조합; 및 (f) 중쇄 불변영역 각 도메인과 경쇄 불변영역의 이량체로 구성된 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 한다.

[37]

[38] 앞선 구체예 중 어느 하나에 따른 효소 융합단백질로서, 상기 면역글로불린 Fc 영역은 (a) 이황화 결합을 형성할 수 있는 부위가 제거되거나, (b) 천연형 Fc에서 N-말단의 일부 아미노산이 제거되거나, (c) 천연형 Fc의 N-말단에 메티오닌 잔기가 부가되거나, (d) 보체결합부위가 제거되거나 또는 (e) ADCC(antibody dependent cell mediated cytotoxicity) 부위가 제거된 것 중에서 선택된 하나 이상의 특징을 갖는 것을 특징으로 한다.

[39]

[40] 앞선 구체예 중 어느 하나에 따른 효소 융합단백질로서, 상기 면역글로불린 Fc 영역이 비당쇄화됨을 특징으로 한다.

[41]

[42] 앞선 구체예 중 어느 하나에 따른 효소 융합단백질로서, 상기 면역글로불린 Fc 영역이 IgG, IgA, IgD, IgE 또는 IgM에서 유래된 것을 특징으로 한다.

[43]

[44] 앞선 구체예 중 어느 하나에 따른 효소 융합단백질로서, 상기 면역글로불린 Fc 영역이 IgG, IgA, IgD, IgE, IgM으로 이루어진 군에서 선택되는 면역글로불린에서 유래된 상이한 기원을 가진 도메인의 하이브리드인 것을 특징으로 한다.

[45]

[46] 앞선 구체예 중 어느 하나에 따른 효소 융합단백질로서, 상기 면역글로불린 Fc 영역은 IgG4 Fc 영역인 것을 특징으로 한다.

[47]

[48] 앞선 구체예 중 어느 하나에 따른 효소 융합단백질로서, 상기 면역글로불린 IgG4 Fc 영역의 힌지 영역이 IgG1 힌지 영역으로 치환된 것을 특징으로 한다.

[49]

[50] 본 발명을 구현하는 다른 양태는 리소좀 축적 질환 (lysosomal storage disorder, LSD) 의 예방 또는 치료용 약학적 조성물이다.

[51]

[52] 하나의 구체예에서, 본 발명은 상기 효소 융합단백질을 포함하는 리소좀 축적 질환 (lysosomal storage disorder, LSD) 의 예방 또는 치료용 약학적 조성물에 관한 것이다.

[53]

[54] 앞선 구체예에 따른 조성물로서, 상기 리소좀 축적 질환은 뮤코다당체침작증

(mucopolysaccharidosis, MPS), 글리코겐 축적병(Glycogen storage disease), 스핑고지질증 (sphingolipidosis), 니만-피크병 (Niemann-Pick disease), 파브리병 (Fabry's disease), 고셰병 (Gaucher disease), 헌터증후군 (Hunter syndrome), 및 마로토 라미 증후군 (Maroteaux-Lamy syndrome)으로 이루어진 군에서 선택되는 것을 특징으로 한다.

[55]

[56] 앞선 구체예 중 어느 하나에 따른 조성물로서, 상기 효소는 이두로네이트-2-설파타제 (Iduronate-2-sulfatase, IDS), 또는 아릴설파타제 B (Arylsulfatase B, ARSB)인 것을 특징으로 한다.

[57]

[58] 앞선 구체예 중 어느 하나에 따른 조성물로서, 상기 조성물은 치료학적 효소의 리소좀 수용체에 대한 결합력을 감소시키는 것을 특징으로 한다.

[59]

[60] 본 발명을 구현하는 다른 양태는 효소 융합단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드이다.

[61]

[62] 본 발명을 구현하는 다른 양태는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 발현 벡터이다.

[63]

[64] 본 발명을 구현하는 다른 양태는 발현 벡터가 도입된 형질전환체이다.

[65]

[66] 본 발명을 구현하는 다른 양태는 효소 융합단백질을 제조하는 방법이다.

[67]

[68] 하나의 구체예에서, 상기 형질전환체를 배양하여 배양물을 수득하는 단계, 및 상기 배양물로부터 효소 융합단백질을 회수하는 단계를 포함하는 효소 융합단백질을 제조하는 방법에 관한 것이다.

[69]

발명의 효과

[70] 본 발명은 지속형 치료학적 효소 융합단백질에 관한 것으로, 구체적으로 면역글로불린 Fc 영역이 융합되어 치료학적 효소의 안정성이 높아지고, 신장에 의한 효소 제거 메커니즘이 감소된, 효소 융합단백질에 관한 것이다. 본 발명의 효소 융합단백질은 증가된 지속시간에 의해 환자에게 유용하게 이용될 수 있다.

[71]

도면의 간단한 설명

[72] 도 1은 IDS-Fc 융합단백질의 발현을 확인한 도이다.

[73] 도 2는 ARSB-Fc 융합단백질의 발현을 확인한 도이다.

[74] 도 3은 본 발명의 IDS-Fc 융합단백질의 약물 동력학 실험 결과를 나타낸 도이다.

[75] 도 4는 본 발명의 ARSB-Fc 융합단백질의 약물 동력학 실험 결과를 나타낸 도이다.

[76] 도 5는 본 발명의 IDS-Fc 융합단백질의 *in vitro* 효소 활성을 확인한 도이다.

[77] 도 6은 본 발명의 ARSB-Fc 융합단백질의 *in vitro* 효소 활성을 확인한 도이다.

[78] 도 7은 본 발명의 IDS-Fc 융합단백질을 IDS-넉아웃 마우스에 정맥 또는 피하 투여 후 소변 내 글리코사미노글리칸(GAG) 함량을 측정한 결과이다.

[79] 도 8은 본 발명의 IDS-Fc 융합단백질을 IDS-넉아웃 마우스에 정맥 또는 피하 투여 후 조직 내 글리코사미노글리칸(GAG) 함량을 측정한 결과이다.

[80] 도 9는 본 발명의 ARSB-Fc 융합단백질의 조직 분포도를 확인한 결과이다.

[81]

발명의 실시를 위한 최선의 형태

[82] 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.

[83] 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.

[84] 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.

[85]

[86] 알라닌 A 아르기닌 R

[87] 아스파라긴 N 아스파르트산 D

[88] 시스테인 C 글루탐산 E

[89] 글루타민 Q 글리신 G

[90] 히스티딘 H 이소류신 I

[91] 류신 L 리신 K

[92] 메티오닌 M 페닐알라닌 F

[93] 프롤린 P 세린 S

[94] 트레오닌 T 트립토판 W

[95] 티로신 Y 발린 V

[96]

[97] 본 발명을 구현하는 하나의 양태는 치료학적 효소에 면역글로불린 Fc 영역이

융합되어 Fc 영역이 융합되지 않은 치료학적 효소에 비해 생체 내 지속성이 증가된 효소 융합단백질을 제공한다.

[98] 본 발명에서, 효소 융합단백질은 치료학적 효소에 면역글로불린 Fc 영역이 융합된 것으로, 면역글로불린 Fc 영역의 융합으로, 면역글로불린 Fc 영역과 융합되지 않은 치료학적 효소에 비하여, 치료학적 효소의 활성은 유지되면서도 리소좀 수용체에 대한 결합력이 감소되어, 혈중 반감기가 증가되는 것일 수 있다.

[99] 본 발명자들은 치료학적 효소 류의 혈중 반감기를 증가시키기 위해 면역글로불린 Fc 영역과의 융합단백질을 제작하였다. 여기서 Fc 영역은 당화를 억제하기 위해 잠재적인 당화 서열을 치환시키고, 추가적으로 IgG4 Fc의 hinge 서열을 치환시켜 사슬 교환 (chain exchange)이 억제된 IgG4 Fc 유도체 (analog)를 사용한 결과, 면역 글로불린 Fc 영역과 융합된 치료학적 효소 융합단백질이 혈중 반감기가 획기적으로 증가되고, 공지의 효소와 비교해 유사한 활성을 유지함을 확인하여, 새로운 형태의 치료학적 효소 및 면역글로불린 Fc 영역이 융합된 융합단백질 구조를 제공하게 되었다.

[100]

[101] 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 상기 효소 융합단백질은 치료학적 효소의 융합단백질이다.

[102] 또한, 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.

[103]

[104] 하나의 구체적인 양태로서, 상기 치료학적 효소는 베타글루코시다제 (beta-glucosidase), 알파갈락토시다제 (alpha-galactosidase), 베타갈락토시다제 (beta-galactosidase), 이두로니다제 (iduronidase), 이두로네이트 2-설파타제 (iduronate-2-sulfatase), 갈락토스-6-설파타제 (Galactose-6-sulfatase), 산성 알파-글루코시다제 (acid alpha-glucosidase), 산성 세라미다제 (acid ceramidase), 산성 스핑고미엘리나제 (acid sphingomyelinsase), 갈락토세레브로시다제 (galactocerebrosidsase), 아릴설파타제 (arylsulfatase) A, B, 베타-헥소사미니다제 (beta-hexosaminidase) A, B, 헤파린-N-설파타제 (heparin N-sulfatase), 알파-D-마노시다제 (alpha-D-mannosidase), 베타-글루쿠로니다제 (beta-glucuronidase), N-아세틸갈락토사민-6-설파타제 (N-acetylgalactosamine-6 sulfatase), 리소좀 산성 리파제 (lysosomal acid lipase), 알파-N-아세틸-글루코사미니다제 (alpha-N-acetyl-glucosaminidase),

글루코세레브로시다제 (glucocerebrosidase), 부티릴콜린에스터라제 (butyrylcholinesterase), 키티나제 (Chitinase), 글루타메이트 디카르복실라제 (glutamate decarboxylase), 이미글루세라제 (imiglucerase), 리파아제 (lipase), 우리카제 (Uricase), 혈소판활성인자 아세틸하이드로라제 (Platelet-Activating Factor Acetylhydrolase), 뉴트럴 엔도펩티다제 (neutral endopeptidase), 미엘로퍼옥시다제 (myeloperoxidase)로 이루어진 군으로부터 선택되는 치료학적 효소일 수 있으나, 질환에 대한 치료 효과를 가지는 치료학적 효소라면, 효소의 유래나 종류의 제한 없이 본 발명에 포함될 수 있다.

[105] 본 발명에서 용어 "효소 융합단백질"은 "효소 지속형 융합단백질"과 혼용될 수 있다.

[106] 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. 구체적으로, 리소좀 효소의 부족 또는 결핍 등으로 인해 발병하는 리소좀 축적 질환의 치료를 위한 효소일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[107] 구체적으로, 본 발명의 치료학적 효소는 아릴설파타제 B (arylsulfatase B, ARSB) 또는 이두로네이트 2-설파타제(iduronate-2-sulfatase)일 수 있으나, 목적하는 질환에 대한 치료 효과를 나타내는 효소인 이상, 이에 제한되지 않는다.

[108] 본 발명의 용어, "아릴설파타제 B (arylsulfatase B, ARSB)"는, 간, 췌장, 신장의 리소좀에 존재하는 아릴설파타제 효소로서, 글리코사미노글리칸을 분해함으로써, 설페이트를 가수 분해하는 역할을 한다. 상기 아릴설파타제 B는 뮤코다당체침작증 VI ((mucopolysaccharidosis VI, Maroteaux-Lamy syndrome)에 연관된 것으로 알려져 있다. 아릴설파타제 B는 갈설파제(galsulfase)와 혼용되어 사용될 수 있다. 구체적으로, 상기 아릴설파타제 B는 서열번호 4의 아미노산 서열을 포함하고, 이는 서열번호 3의 폴리뉴클레오티드 서열에 의해 코딩될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[109] 본 발명의 용어, "이두로네이트 2-설파타제(iduronate-2-sulfatase)"는, 헌터 증후군 (Hunter syndrome, MPS-II)에 관계된 설파타제 효소로서, 헤파란 설페이트 (heparin sulfate) 및 데르마탄 설페이트 (dermatan sulfate)의 리소좀 분해에 필요한 효소이다. 본 발명에서 상기 "이두로네이트 2-설파타제(iduronate-2-sulfatase)"는 "이두설파제(idursulfase)"와 혼용되어 사용될 수 있다. 상기 이두설파제는 이두설파제 알파 또는 이두설파제 베타일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 구체적으로, 상기 이두로네이트 2-설파타제는 서열번호 2의 아미노산 서열을 포함하고, 이는 서열번호 1의 폴리뉴클레오티드 서열에 의해 코딩될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[110]

[111] 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.

[112]

[113] 본 발명의 효소 융합단백질은 두 개 사슬로 이루어진 이량체 형태인 Fc 영역 한 분자의 Fc 영역에 하나 또는 두 개의 효소가 결합한 형태일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 구체적으로, 단량체의 Fc 영역과 효소가 융합되어 발현되고, 이후 두 개의 단량체 Fc 영역이 서로 이황화 결합을 통해 한 분자의 이량체 Fc 영역을 형성하고, 두 개의 효소는 두 개의 Fc 영역과 각각 연결된 형태일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 상기 효소는 공유 또는 비공유 결합을 통해 서로 연결된 것일 수 있고, 또는 서로 독립적일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[114] 구체적으로, 본 발명의 일 실시예에서는 이두로네이트-2-설파타제 또는 아릴설파타제 B의 이량체와 하나의 Fc 영역이 융합된 지속형 효소 융합단백질이 Fc 영역이 융합되지 않은 효소에 비해 높은 in vitro 효소 활성을 나타내는 것을 확인하였으며, 이는 치료학적 효소의 이량체를 포함하는 효소 융합단백질의 구조적 특징에 기인하는 것을 확인하였다 (실시예 5).

[115]

[116] 또한, 다른 하나의 구체적인 양태로서, 본 발명의 효소 융합단백질은 면역글로불린 Fc 영역을 펩타이드 링커를 통해 치료학적 효소와 융합된 것일 수 있다.

[117] 상기 펩타이드 링커는 1개 이상의 아미노산을 포함할 수 있으며, 예컨대 1개부터 1000개의 아미노산을 포함할 수 있으나, 특별히 이에 제한되는 것은 아니다. 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 있다. 보다 구체적으로, 서열번호 6의 아미노산 서열일 수 있으나, 상기 예에 제한되는 것은 아니다.

[118]

[119] 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.

[120] 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.

[121] 본 발명의 일 실시예에서는, 치료학적 효소와 링커(서열번호 6)-IgG4를

오버래핑 (overlapping) PCR을 이용하여, 치료학적 효소의 C-말단에 IgG4의 N-말단이 융합된 융합단백질 (서열번호 23 또는 25)을 제조하고, 형질전환체에서 발현하는 것을 확인하였다 (실시예 1 내지 3).

[122]

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

[124]

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

[126] 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.

[127] 본 발명의 용어, "단편"은 천연형 치료학적 효소 또는 천연형 치료학적 효소의 유도체의 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.

[128]

[129] 상기 치료학적 효소 유도체는 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.

[130] 또한, 상기 치료학적 효소 또는 이의 유도체와 80% 이상, 구체적으로 90% 이상, 보다 구체적으로 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 이상의 상동성을 갖는 아미노산 서열을 포함할 수 있고, 상기 치료학적 효소는 재조합 기술에 의해 미생물로부터 수득하거나, 상업적으로 이용가능 한 것일 수 있으나,

이에 제한되지 않는다.

[131] 본 발명의 용어 "상동성"이란 야생형(wild type) 아미노산 서열 및 야생형 핵산 서열과의 유사한 정도를 나타내기 위한 것으로서, 상동성의 비교는 육안으로나 구입이 용이한 비교 프로그램을 이용하여 수행한다. 시판되는 컴퓨터 프로그램은 2개 이상의 서열간의 상동성을 백분율(%)로 계산할 수 있다. 상동성(%)은 인접한 서열에 대해 계산될 수 있다.

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

[133]

[134] 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.

[135]

[136] 이러한 면역글로불린 Fc 영역은 중쇄 불변영역에 힌지(hinge) 영역을 포함할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 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, CH2 및/또는 CH3에 해당하는 상당히 긴 일부 아미노산 서열이 제거된 영역일 수도 있다.

[137] 다른 구체적인 양태로서, 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) CH1 도메인, CH2 도메인, CH3 도메인 및 CH4 도메인 중 1개 또는 2개의 이상의 도메인과 면역글로불린 힌지 영역(또는 힌지 영역의 일부)와의 조합, 6) 중쇄 불변 영역 각 도메인과 경쇄 불변영역의 이량체일 수 있다. 그러나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[138]

[139] 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).

[140]

[141] 본 발명에서, 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.

[142] 일 구체적인 양태에서, 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 있으나, 이에 제한되지 않는다. 상기 언급된 변이 외에도 치료학적 효소의 안정성을 증대키시는, 약물의 캐리어로서 적합한 변이를 함유할 수 있다.

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

[144] 본 발명의 일 실시예에서는, 서열번호 8로 표시되는 면역글로불린 Fc의 2번째 아미노산은 프롤린으로, 71번째 아미노산은 글루타민으로 치환하여, 사슬 교환 및 N-글리코실화가 감소되도록 하였다. 제조된 면역글로불린 Fc의 서열은 서열번호 9의 아미노산 서열을 가진다 (실시예 1).

[145] 하나의 예로, 상기 힌지 영역은 하기의 아미노산 서열을 갖는 힌지 서열 중 일부가 결실 또는 변이된 것일 수 있다.

[146]

[147] Glu-Ser-Lys-Tyr-Gly-Pro-Pro-Cys-Pro-Ser-Cys-Pro (서열번호 26)

[148]

[149] 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.

[150]

[151] 본 발명에서, 면역글로불린 Fc 영역은 천연형 힌지 영역 또는 변이된 힌지 영역을 포함함으로써, Fc 영역에서의 사슬 교환 및 단량체 형성이 일어나지 않을 뿐만 아니라, 융합된 치료학적 효소의 안정성을 높일 수 있다.

[152]

[153] 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.

[154] 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.

[155] 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.

[156] 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.

[157]

[158] 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.

[159]

[160] 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.

[161]

[162] 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)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.

[163] 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.

[164]

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

[166] 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 영역은 서열번호 8의 아미노산 서열을 갖는 면역글로불린 Fc 영역의 2번째 아미노산이 프롤린으로 치환 및/또는 71번째 아미노산이 글루타민으로 치환되는 변이를 포함하거나, 상기 면역글로불린 Fc 영역의 아미노산 서열이 서열번호 9이고, 이를 코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열은 서열번호 7일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[167]

[168] 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.

[169]

[170] 또한, 본 발명의 단백질은 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 단백질의 범주에 포함된다. C-말단이 변형되지 않은 경우, 본 발명에 따른 단백질의 말단은 카르복실기를 가지나, 특별히 이에 제한되는 것은 아니다.

[171] 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.

[172]

[173] 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.

[174] 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.

[175] 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.

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

[177]

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

[179] 본 발명의 일 실시예에서는, 치료학적 효소인 이두로네이트-2-설파타제 (Iduronate-2-sulfatase, IDS), 및 아릴설파타제 B (Arylsulfatase B, ARSB)를 각각 펩타이드 링커-면역글로불린 Fc와 융합된 형태로 발현하는 재조합 벡터를 제조하여, 이를 CHO 세포주에서 발현시켜 제조하였다 (실시예 1 내지 3).

[180] 그러나, 본 발명의 효소 융합단백질은 상기 실시예에서 기술된 방법 외에도, 공지된 다른 방법에 의해 제조될 수 있다. 본 발명의 효소 융합단백질은 서열번호 23 또는 25의 아미노산 서열을 포함할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[181]

[182] 본 발명에 따른 효소 융합단백질은 리소좀 축적 질환에 대한 치료 효과를

나타내는 치료학적 효소와 면역글로불린 Fc 영역을 융합시켜, 치료학적 효소의 활성을 유지하면서 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 리소좀 축적 질환의 치료에 있어, 유용한 효과를 나타내는 것이다.

[183]

[184] 본 발명의 일 실시예에서는 본 발명에 따른 효소 융합단백질이 Fc 영역과 융합되지 않은 천연형 효소에 비해 반감기 ($T_{1/2}$), 혈중 최고 약물 농도 (C_{max}), 생체 내 이용률 (AUC)이 현저히 우수 (실시예 4) 하면서도, *in vitro* 효소 활성을 유지하는 것을 확인 (실시예 5) 하였으며, 이로 인해 기존의 약물과 비교해서 낮은 투여 빈도에서도 치료 효과를 나타낼 수 있음을 확인하였다 (실시예 6).

[185]

[186] 본 발명을 구현하는 다른 하나의 양태는 상기 효소 융합단백질 또는 상기 효소 융합단백질 제조방법에 따라 제조된 효소 융합단백질을 유효성분으로 포함하는 리소좀 축적 질환 (lysosomal storage disorder, LSD) 의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[187] 본 발명에 따른 조성물은 치료학적 효소의 생체 내 지속성 및 안정성이 증가된 것을 특징으로 한다.

[188] 구체적인 일 양태에서 본 발명의 약학적 조성물의 효소 융합단백질은 이두로네이트-2-설파타제 (Iduronate-2-sulfatase, IDS), 또는 아릴설파타제 B (Arylsulfatase B, ARSB)이 면역글로불린 Fc 영역과 융합된 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[189]

[190] 본 발명의 용어, "리소좀 (lysosome)은 세포질에 존재하는 소기관 중 하나로서, 가수 분해 효소를 많이 포함하고 있어서, 체내에서 거대 분자, 세균 등의 이물질을 분해하여, 상기 분해된 산물이 세포의 다른 부분에서 재활용되도록 돕는 소기관이다. 상기 리소좀의 기능은 다수의 효소에 의해 수행되는데, 변이나 부족 등으로 인하여 특정 효소가 기능을 상실하게 되면, 리소좀의 분해 기능이 상실되는 결과를 낳게 되어, 결국 분해되어야 할 거대 분자 등이 세포 내에 축적되어 세포의 손상 등을 유발하며, 이로 인하여 질병이 발병하게 된다.

[191] 본 발명의 용어, "리소좀 축적 질환 (lysosomal storage disease, LSD)"은, 상기와 같은 리소좀 기능의 상실로 인한 희귀 유전병을 의미하며, 결함이 있는 효소를 이용한 효소 대체 요법 (enzymatic replacement therapy)가 필수적이다. 상기 리소좀 축적 질환은 결핍된 효소에 따라, 뮤코다당체침작증 (mucopolysaccharidosis, MPS), 글리코겐 축적병 (glycogen storage disease), 스핑고지질증 (sphingolipidosis), 니만-피크병 (Niemann-Pick disease), 파브리병 (Fabry's disease), 고셰병 (Gaucher disease), 헌터증후군 (Hunter syndrome), 및

마로토 라미 증후군 (Maroteaux-Lamy syndrome) 등이 포함될 수 있다.

[192]

[193] 하기에서는 리소좀 축적 질환을 그 분류에 따라 상세히 설명한다.

[194]

[195] 본 발명의 용어, “마로트-라미증후군(Maroteaux-Lamy syndrome)”은 MPS(mucopolysaccharidosis) VI형 질병으로서, 글리코사미노글리칸(glycosaminoglycan)의 분해에 필요한 아릴설파타제 B(Arylsulfatase B, N-acetylgalactosamine -4-sulfatase)의 부족으로 발생하는 상염색체 열성 유전병이다. 뼈, 심장판막, 비장, 간, 및 각막 등에 상기 효소의 부족으로 분해되지 못한 데르마탄 설페이트(dermatan sulfate)가 침착되어 나타나는 질병이다.

[196] 본 발명의 용어, “아릴설파타제 B (arylsulfatase B, ARSB)”는, 간, 췌장, 신장의 리소좀에 존재하는 아릴설파타제 효소로서, 글리코사미노글리칸을 분해함으로써, 설페이트를 가수 분해하는 역할을 한다. 상기 아릴설파타제 B는 뮤코다당체침작증 VI ((mucopolysaccharidosis VI, Maroteaux-Lamy syndrome)에 연관된 것으로 알려져 있다. 아릴설파타제 B는 갈설파제(galsulfase)와 혼용되어 사용될 수 있다.

[197]

[198] 본 발명의 용어, "헌터 증후군(Hunter syndrome, Hunter disease)"은 성염색체 열성 유전병으로서, 이두로네이트 2-설파타제 (Iduronate 2-sulfatase, IDS)의 결핍에 의해 발병하며, 상기 효소의 결핍으로 헤파란 설페이트(heparan sulfate), 및 데르마탄 설페이트(dermatan sulfate)가 축적되는 것으로 알려져 있다. 기능 저하, 점진적 청력 소실, 색소성 망막변성, 울혈유두(papilledema) 및 뇌수종 등의 증상을 나타낸다. 본 발명에서 "뮤코다당체침작증 II"와 "헌터 증후군"은 혼용될 수 있다.

[199] 본 발명의 용어, "이두로네이트 2-설파타제(iduronate-2-sulfatase)"는, 헌터 증후군 (Hunter syndrome, MPS-II)에 관계된 설파타제 효소로서, 헤파란 설페이트 (heparin sulfate) 및 데르마탄 설페이트 (dermatan sulfate)의 리소좀 분해에 필요한 효소이다. 본 발명에서 상기 "이두로네이트 2-설파타제(iduronate-2-sulfatase)"는 "이두설파제(idursulfase)"와 혼용되어 사용될 수 있다. 상기 이두설파제는 이두설파제 알파 또는 이두설파제 베타일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[200] 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 치료학적 효소를 구입하여 사용할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[201]

[202] 본 발명의 조성물에 포함되는 효소 융합단백질은 리소좀 축적 질환에 대한 치료 효과를 나타내는 치료학적 효소와 면역글로불린 Fc 영역을 융합시켜,

치료학적 효소의 활성을 유지하면서 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 리소좀 축적 질환의 치료에 있어, 유용한 효과를 나타내는 것이다.

[203]

[204] 본 발명의 일 실시예에서는 본 발명의 효소 융합단백질이 Fc 영역과 융합되지 않은 효소에 비해 낮은 투여 빈도에도 불구하고, IDS-넉아웃 마우스에서 글리코사미노글리칸 (GAG)의 수치를 감소시키는 것을 확인하였으며 (실시예 6), 또한, 본 발명의 다른 일 실시예에서는 본 발명의 효소 융합단백질이 Fc 영역과 융합되지 않은 천연형 효소에 비해 골수 및 비장에서 높은 분포도를 나타낼 뿐만 아니라, 폐, 신장, 심장 등에서는 천연형 효소의 분포가 확인되지 않은 반면, 효소 융합단백질은 해당 조직에서 분포하는 것을 확인하였다 (실시예 7).

[205] 이는, 본 발명의 효소 융합단백질이 높은 안정성을 바탕으로 약물 투여 시에, 투여 빈도를 낮추어 환자의 편의성을 높일 뿐만 아니라, 높은 조직 분포도를 나타냄으로써 피하 투여도 가능한 것을 시사한다.

[206]

[207] 본 발명에서 용어 "예방"은 상기 효소 융합단백질 또는 이를 포함하는 조성물의 투여로 목적하는 질환, 리소좀 축적 질환을 억제 또는 지연시키는 모든 행위를 의미하며, "치료"는 상기 효소 융합단백질 또는 이를 포함하는 조성물의 투여로 목적하는 질환, 예컨대 리소좀 축적 질환의 증세가 호전되거나 이롭게 되는 모든 행위를 의미한다.

[208]

[209] 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.

[210]

[211] 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 결합체의 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.

[212] 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.

[213]

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

[215] 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.

[216] 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.

[217] 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.

[218] 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.

[219]

[220] 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.

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

[222]

[223] 본 발명을 구현하는 다른 양태는 본 발명에 따른 효소 융합단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 제공한다.

[224]

[225] 본 발명의 효소 융합단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드는 이에 제한되는 것은 아니나, 치료학적 효소를 코딩하는 부분과 펩타이드 링커-면역글로불린 Fc 영역을 코딩하는 부분이 연결된 형태의 폴리뉴클레오티드가 될 수 있고, 구체적으로, 치료학적 효소의 C-말단에 면역글로불린 Fc 영역의 N-말단이 GGGGS 링커를 통해 연결된 융합단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 보다 구체적으로, 본 발명의 폴리뉴클레오티드는 서열번호 1 또는 3의 서열을 포함할 수 있으나, 치료학적 효소와 면역글로불린 Fc 영역의 융합단백질을 코딩할 수 있는 이상, 이에 제한되지 않는다.

[226]

[227] 본 발명을 구현하는 다른 양태는 상기 폴리뉴클레오티드를 포함하는 재조합 발현 벡터를 제공한다.

[228]

[229] 본 발명에서 용어 "재조합 벡터"는 적합한 숙주 내에서 목적 펩티드, 가령 효소 융합단백질을 발현시킬 수 있도록 목적 펩티드, 가령 효소 융합단백질이 적합한 조절 서열에 작동 가능하게 연결된 DNA 제조물을 의미한다. 본 발명에 따른 재조합 벡터는 전형적으로 클로닝을 위한 벡터 또는 발현을 위한 벡터로서 구축될 수 있고, 원핵세포 또는 진핵세포를 숙주세포로 하여 구축될 수 있다.

[230] 상기 조절 서열은 전사를 개시할 수 있는 프로모터, 그러한 전사를 조절하기 위한 임의의 오퍼레이터 서열, 적합한 mRNA 리보좀 결합부위를 코딩하는 서열, 및 전사 및 해독의 종결을 조절하는 서열을 포함한다. 재조합 벡터는 적당한 숙주세포 내로 형질전환된 후, 숙주 게놈과 무관하게 복제되거나 기능할 수

있으며, 게놈 그 자체에 통합될 수 있다.

[231]

[232] 본 발명에서 사용되는 재조합 벡터는 숙주세포 내에서 복제 가능한 것이면 특별히 한정되지 않으며, 당업계에 알려진 임의의 벡터를 이용하여 제작될 수 있다. 통상 사용되는 벡터의 예로는 천연 상태이거나 재조합된 상태의 플라스미드, 코스미드, 바이러스 및 박테리오파지를 들 수 있다. 본 발명에서 사용 가능한 벡터는 특별히 제한되는 것이 아니며 공지된 발현 벡터를 사용할 수 있다.

[233] 상기 재조합 벡터는 본 발명의 효소 융합단백질을 생산하기 위해 숙주세포를 형질전환시키는데 사용된다. 또한 본 발명의 일부인, 이러한 형질전환 세포는 본 발명의 핵산 단편 및 벡터의 증식에 사용되거나, 본 발명의 효소 융합단백질의 재조합 생산에 사용된 배양된 세포 또는 세포주일 수 있다.

[234]

[235] 본 발명의 용어, "형질전환"은 표적 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 재조합 벡터를 숙주세포 내에 도입하여 숙주세포 내에서 상기 폴리뉴클레오티드가 코딩하는 단백질이 발현할 수 있도록 하는 것을 의미한다. 형질전환된 폴리뉴클레오티드가 숙주세포 내에서 발현될 수 있기만 한다면, 숙주세포의 염색체 내에 삽입되어 위치하거나 염색체 외에 위치하거나 상관없이 이들 모두를 포함한다.

[236] 또한, 상기 폴리뉴클레오티드는 표적 단백질을 코딩하는 DNA 및 RNA를 포함한다. 상기 폴리뉴클레오티드는 숙주세포 내로 도입되어 발현될 수 있는 것이면, 어떠한 형태로 도입되는 것이든 상관없다. 예를 들면, 상기 폴리뉴클레오티드는 자체적으로 발현되는데 필요한 모든 요소를 포함하는 유전자 구조체인 발현 카세트(expression cassette)의 형태로 숙주세포에 도입될 수 있다. 상기 발현 카세트는 통상 상기 폴리뉴클레오티드에 작동 가능하게 연결되어 있는 프로모터(promoter), 전사 종결신호, 리보좀 결합부위 및 번역 종결신호를 포함할 수 있다. 상기 발현 카세트는 자체 복제가 가능한 발현벡터 형태일 수 있다. 또한, 상기 폴리뉴클레오티드는 그 자체의 형태로 숙주세포에 도입되어, 숙주세포에서 발현에 필요한 서열과 작동 가능하게 연결되어 있는 것일 수도 있으며, 이에 한정되지 않는다.

[237] 또한, 상기에서 용어 "작동 가능하게 연결"된 것이란 본 발명에서 목적하는 펩타이드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드의 전사를 개시 및 매개하도록 하는 프로모터 서열과 상기 유전자 서열이 기능적으로 연결되어 있는 것을 의미한다.

[238]

[239] 본 발명에 적합한 숙주는 본 발명의 폴리뉴클레오티드를 발현하도록 하는 한 특별히 제한되지 않는다. 본 발명에 사용될 수 있는 숙주의 특정한 예로는 대장균(*E. coli*)과 같은 에스케리키아(*Escherichia*) 속 세균; 바실러스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*)와 같은 바실러스(*Bacillus*) 속 세균; 슈도모나스 푸티다(

Pseudomonas putida)와 같은 슈도모나스(*Pseudomonas*) 속 세균; 피키아 파스토리스(*Pichia pastoris*), 사카로마이세스 세레비지애(*Saccharomyces cerevisiae*), 스키조사카로마이세스 폼베(*Schizosaccharomyces pombe*)와 같은 효모; 스포도프테라 프루기페르다(Sf9)와 같은 곤충세포; 및 CHO, COS, BSC 등과 같은 동물세포가 있다.

[240]

[241] 본 발명을 구현하는 다른 양태는 상기 발현 벡터가 도입된 형질전환체를 제공한다.

[242] 본 발명의 발현 벡터가 도입된 형질전환체는 본 발명의 목적상, 효소 융합단백질을 발현 및 생산할 수 있는 한, 제한되지 않으나, 대장균(E. coli)과 같은 에스케리키아(Escherichia) 속 세균; 바실러스 서브틸리스(Bacillus subtilis)와 같은 바실러스(Bacillus) 속 세균; 슈도모나스 푸티다(Pseudomonas putida)와 같은 슈도모나스(Pseudomonas) 속 세균; 피키아 파스토리스(Pichia pastoris), 사카로마이세스 세레비지애(Saccharomyces cerevisiae), 스키조사카로마이세스 폼베(Schizosaccharomyces pombe)와 같은 효모; 스포도프테라 프루기페르다(SF9)와 같은 곤충세포; 및 CHO, COS, BSC 등과 같은 동물세포일 수 있다.

[243]

[244] 본 발명을 구현하는 다른 양태는 본 발명에 따른 효소 융합단백질을 제조하는 방법을 제공한다.

[245]

[246] 구체적으로, 상기 제조방법은 (a)형질전환체를 배양하여 배양물을 수득하는 단계; 및 (b) 배양물로부터 효소 융합단백질을 회수하는 단계를 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[247]

[248] 본 발명에서 형질전환체의 배양에 사용되는 배지는 적절한 방식으로 숙주세포 배양의 요건을 충족해야 한다. 숙주세포의 생장을 위하여 배지 중에 포함될 수 있는 탄소원은 제조된 형질전환체의 종류에 따라 당업자의 판단에 의해 적절하게 선택될 수 있고, 배양 시기 및 양을 조절하기 위해 적당한 배양 조건을 채택할 수 있다.

[249] 사용될 수 있는 당원으로는 글루코스, 사카로스, 락토스, 프룩토스, 말토스, 전분, 셀룰로스와 같은 당 및 탄수화물, 대두유, 해바라기유, 피마자유, 코코넛유 등과 같은 오일 및 지방, 팔미트산, 스테아린산, 리놀레산과 같은 지방산, 글리세롤, 에탄올과 같은 알코올, 아세트산과 같은 유기산이 포함된다. 이들 물질은 개별적으로 또는 혼합물로서 사용될 수 있다.

[250] 사용될 수 있는 질소원으로는 펩톤, 효모 추출물, 육즙, 맥아 추출물, 옥수수 침지액, 대두밀 및 요소 또는 무기 화합물, 예를 들면 황산암모늄, 염화암모늄, 인산암모늄, 탄산암모늄 및 질산암모늄이 포함된다. 질소원 또한 개별적으로

또는 혼합물로서 사용될 수 있다.

[251] 사용될 수 있는 인원으로는 인산이수소칼륨 또는 인산수소이칼륨 또는 상응하는 나트륨-함유 염이 포함된다. 또한, 배양 배지는 성장에 필요한 황산마그네슘 또는 황산철과 같은 금속염을 함유할 수 있다.

[252] 마지막으로, 상기 물질에 더하여 아미노산 및 비타민과 같은 필수 성장물질이 사용될 수 있다. 또한, 배양 배지에 적절한 전구체들이 사용될 수 있다. 상기된 원료들은 배양 도중에 배양물에 적절한 방식에 의해 회분식으로 또는 연속식으로 첨가될 수 있다. 수산화나트륨, 수산화칼륨, 암모니아와 같은 염기성 화합물 또는 인산 또는 황산과 같은 산 화합물을 적절한 방식으로 사용하여 배양물의 pH를 조절할 수 있다. 또한, 지방산 폴리글리콜 에스테르와 같은 소포제를 사용하여 기포 생성을 억제할 수 있다. 호기 상태를 유지하기 위해 배양물 내로 산소 또는 산소-함유 기체(예: 공기)를 주입한다.

[253] 본 발명에 따른 형질전환체의 배양은 보통 20℃ 내지 45℃, 구체적으로는 25℃ 내지 40℃의 온도에서 수행된다. 또한 배양은 원하는 인슐린 아날로그의 생성량이 최대로 얻어질 때까지 지속되는데, 이러한 목적으로 배양은 보통 10 내지 160시간 동안 지속될 수 있다.

[254] 전술한 바와 같이 숙주세포에 따라 적절한 배양 조건을 조성해주면 본 발명에 따른 형질전환체는 인슐린 아날로그를 생산하게 되며, 벡터의 구성 및 숙주세포의 특징에 따라 생산된 인슐린 아날로그는 숙주세포의 세포질 내, 원형질막 공간(periplasmic space) 또는 세포 외로 분비될 수 있다.

[255] 숙주세포 내 또는 외에서 발현된 단백질은 통상의 방식으로 정제될 수 있다. 정제 방법의 예로는 염석(예: 황산암모늄 침전, 인산나트륨 침전 등), 용매 침전(예: 아세톤, 에탄올 등을 이용한 단백질 분획 침전 등), 투석, 겔 여과, 이온 교환, 역상 칼럼 크로마토그래피와 같은 크로마토그래피 및 한외여과 등의 기법을 단독 또는 조합하여 적용할 수 있다.

[256]

[257] 본 발명을 구현하는 다른 하나의 양태는 상기 효소 융합단백질 또는 이를 포함하는 조성물을 개체에 투여하는 단계를 포함하는 리소좀 축적 질환의 예방 또는 치료 방법을 제공한다.

[258]

[259] 본 발명의 효소 융합단백질은 리소좀 축적 질환을 예방 또는 치료할 수 있는 치료학적 효소를 포함하므로, 이를 포함하는 효소 융합단백질, 또는 상기 효소 융합단백질을 함유하는 약학적 조성물의 투여로, 리소좀 축적 질환이 의심되는 개체에서 예방 또는 치료할 수 있다.

[260] 본 발명의 용어, "개체"는 리소좀 축적 질환 (lysosomal storage disorder, LSD)이 의심되는 개체로서, 상기 리소좀 축적 질환 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.

[261]

[262] 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.

[263] 한편, 이에 제한되지 않으나, 상기 리소좀 축적 질환의 예방 또는 치료 방법은 하나 이상의 리소좀 축적 질환에 대한 치료적 활성을 가지는 화합물 또는 물질을 투여하는 것을 더 포함하는 병용요법일 수 있다.

[264] 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.

[265]

[266] 상기 리소좀 축적 질환에 대한 치료적 활성을 가지는 효소 융합단백질의 투여 용량은 환자 체중 1 kg당 약 0.0001 μg 내지 500 mg일 수 있으나, 특별히 이에 제한되지 않는다.

[267]

[268] 본 발명을 구현하는 또 다른 양태는 상기 효소 융합단백질, 또는 이를 포함하는 조성물을 리소좀 축적 질환에 대한 예방 또는 치료용 약제 (혹은 약학적 조성물)의 제조에 사용하는 용도를 제공한다.

[269]

[270] 이하, 실시 예를 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.

[271]

[272] **실시예 1: 융합단백질 발현 벡터의 제작**

[273]

[274] 효소 융합단백질을 생산하기 위해 천연형 이두로네이트-2-설파타제 (Iduronate-2-sulfatase, IDS, 서열번호 1) 및 아릴설파타제 B (Arylsulfatase B, ARSB, 서열번호 3)가 각각 삽입되어 있는 발현 벡터 (IDS cDNA, Cat No. EX-C0003-M02, Gencopoeia; ARSB cDNA, Cat No. EX-C0073-M02, Genecopoeia)와 합성된 링커(linker, 서열번호 5)와 IgG4 Fc 영역(서열번호 7)을 오버래핑 (overlap) PCR을 이용하여 융합단백질 발현 벡터를 제작하였다.

Overlapping PCR 기법은 각 효소와 링커-Fc를 각각 PCR 증폭 할 때, 프라이머에 서로 overlapping되는 서열을 포함하므로, 생산되는 PCR 산물은 overlapping 되는 서열을 포함하게 된다. 상기 융합단백질 증폭을 위한 PCR 조건은 1차는 95℃ 1분, 57℃ 30초, 68℃ 3분에서 이 과정을 25회 반복하였으며, 2차는 95℃ 1분, 57℃ 30초, 68℃ 4분으로 25회 반복하여 증폭하였다.

[275]

[276] 구체적으로, IDS는 서열번호 10, 11의 프라이머를 이용하여 PCR을 하고, Linker-Fc는 서열번호 12, 13의 프라이머를 이용하여 PCR을 함으로써, IDS PCR산물은 3'쪽에 linker-Fc 서열을 포함하게 되고, Linker-Fc PCR산물은 5'쪽에 IDS의 서열을 포함하게 된다.

[277]

[278] 상기 1차 PCR에서 수득된 두 개의 PCR산물을 주형으로 하여 서열번호 10, 13의 프라이머를 사용하여 2차 PCR을 진행하여, IDS-Fc의 서열을 가진 PCR산물을 얻은 뒤 KpnI, XhoI 제한효소로 오버래핑 서열을 절단하고, 상기 수득된 PCR 산물을 X0GC vector에 삽입하여 IDS-Fc 융합단백질을 발현 벡터를 구축하였다 (pX0GC-Enzyme-Fc).

[279]

[280] 동일한 방법을 이용하여 서열번호 14, 15, 16, 17의 프라이머를 사용하여 ARSB-Fc 서열을 가진 PCR 산물을 얻은 뒤 KpnI, XhoI 제한효소로 절단하고 동일한 제한효소로 절단된 X0GC vector에 삽입하여 융합단백질 발현 벡터를 구축하였다.

[281]

[282] [표1]

Overlap PCR 프라이머

	서열	서열 번호
IDS-F (KpnI)	5'-CAGGTACCATGCCGCCACCCCGGACC-3'	10
IDS-R (overlap)	5'-TGAACCGCCTCCACCAGGCATCAACAACTGGAAAAGATCTCCAC-3'	11
L15Fc(IDS)-F	5'-CAGTTGTTGATGCCTGGTGGAGGCGGTTCAGGCG-3'	12
L15Fc-R (XhoI)	5'-GACTCGAGTCATTTACCCAGAGACAGGGAGAGG-3'	13
ARSB-F (KpnI)	5'-CAGGTACCATGGGTCCGCGCGGCGCG-3'	14
ARSB-R (overlap)	5'-TGAACCGCCTCCACCCATCCAAGGGCCCCACACCC-3'	15
L15Fc(ARSB)-F	5'-TGGGGCCCTTGGATGGGTGGAGGCGGTTCAGGCG-3'	16
L15Fc-R (XhoI)	5'-GACTCGAGTCATTTACCCAGAGACAGGGAGAGG-3'	17

[283] 구축된 융합단백질의 서열 중 Fc 영역에서 사슬 교환 (chain exchange)과 N-글리코실화 부위 (N-glycosylation site)를 제거하기 위하여 부위 특이적 변이 (site-directed mutagenesis) PCR기법을 이용하였다.

[284]

[285] 구체적으로, 서열번호 18, 19의 프라이머를 이용하여 사슬 교환에 관여하는 Fc 영역 (서열번호 8)의 2번째 아미노산인 세린 (Serine)을 프롤린 (Proline)으로 대체하였고, 서열번호 20, 21의 프라이머를 이용하여 N-글리코실화가 이루어지는 Fc 영역의 71번째 아미노산인 아스파라긴 (Asparagine)을 글루타민 (Glutamine)으로 치환하였다. 하기 표 3의 단백질 서열에서 볼드는 아미노산이 치환된 부분을, 이텔릭체는 링커를 나타낸다.

[286]

[287] [표2]

변이 (Mutagenesis) 프라이머

프라이머	서열	서열 번호
Fc(S2P)_F	5'-CTGGCGGTGGCGGATCGCCACCATGCCCAGCACCTGAGTTCCT-3'	18
Fc(S2P)_R	5'-AGGAACTCAGGTGCTGGGCATGGTGGCGATCCGCCACCGCCAG-3'	19
Fc(N71Q)_F	5'-AGCCGCGGGAGGAGCAGTTCCAAAGCACGTACCGTGTGGTCAG-3'	20
Fc(N71Q)_R	5'-CTGACCACACGGTACGTGCTTTGGAACTGCTCCTCCCGCGGCT-3'	21

[288]

[289] 상기 실시예에서 제조된 효소 융합단백질 발현 벡터를 IDS-Fc 벡터, ARSB-Fc 벡터라 명명하였다. 또는 상기 벡터는, pX0GC-Enzyme-Fc과 혼용되어 사용될 수 있다.

[290]

[291] [표3]

효소 융합단백질 DNA 서열 및 단백질 서열

Name	서열		서열번호
IDS-Fc	DNA	ATGCC GCCACCCCGG ACCGGCCGAG GCCTTCTCTG GCTGGGTCTG GTTCTGAGCT CCGTCTGCGT CGCCCTCGGA TCCGAAACGC AGGCCAACTC GACCACAGAT GCTCTGAACG TTCTTCTCAT CATCGTGGAT GACCTGCGCC CCTCCCTGGG CTGTTATGGG GATAAGCTGG TGAGGTCCCC AAATATTGAC CAACTGGCAT CCCACAGCCT CCTCTTCCAG AATGCCTTTG CGCAGCAAGC AGTGTGCGCC CCGAGCCGCG TTTCTTTCCT CACTGGCAGG AGACCTGACA CCACCCGCCT GTACGACTTC AACTCCTACT GGAGGGTGCA CGCTGGAAAC TTCTCCACCA TCCCCCAGTA CTTCAAGGAG AATGGCTATG TGACCATGTC GGTGGGAAAA GTCTTTCACC CTGGGATATC TTCTAACCAT ACCGATGATT CTCCGTATAG CTGGTCTTTT CCACCTTATC ATCCTTCCTC TGAGAAGTAT GAAAACACTA AGACATGTCG AGGGCCAGAT GGAGAACTCC ATGCCAACCT GCTTTGCCCT GTGGATGTGC TGGATGTTCC CGAGGGCACC TTGCCTGACA AACAGAGCAC TGAGCAAGCC ATACAGTTGT TGGAAAAGAT GAAAACGTCA GCCAGTCCTT TCTTCCTGGC CGTTGGGTAT CATAAGCCAC ACATCCCCTT CAGATACCCC AAGGAATTTC AGAAGTTGTA TCCCTTGGAG AACATCACCC TGGCCCCCGA TCCCGAGGTC CCTGATGGCC TACCCCCTGT GGCCTACAAC CCCTGGATGG ACATCAGGCA ACGGGAAGAC GTCCAAGCCT TAAACATCAG TGTGCCGTAT GGTCCAATTC CTGTGGACTT TCAGCGGAAA ATCCGCCAGA GCTACTTTGC CTCTGTGTCA TATTTGGATA CACAGGTCGG CCGCCTCTTG AGTGCTTTGG ACGATCTTCA GCTGGCCAAC AGCACCATCA	22

	TTGCATTTAC CTCGGATCAT GGGTGGGCTC TAGGTGAACA TGGAGAATGG GCCAAATACA GCAATTTTGA TGTTGCTACC CATGTTCCCC TGATATTCTA TGTTCCTGGA AGGACGGCTT CACTTCCGGA GGCAGGCGAG AAGCTTTTCC CTTACCTCGA CCCTTTTGAT TCCGCCTCAC AGTTGATGGA GCCAGGCAGG CAATCCATGG ACCTTGTGGA ACTTGTGTCT CTTTTTCCCA CGCTGGCTGG ACTTGCAGGA CTGCAGGTTC CACCTCGCTG CCCCGTTCCT TCATTTCACG TTGAGCTGTG CAGAGAAGGC AAGAACCTTC TGAAGCATTT TCGATTCCGT GACTTGGAAG AGGATCCGTA CCTCCCTGGT AATCCCCGTG AACTGATTGC CTATAGCCAG TATCCCCGGC CTTCAGACAT CCCTCAGTGG AATTCTGACA AGCCGAGTTT AAAAGATATA AAGATCATGG GCTATTCCAT ACGCACCATA GACTATAGGT ATACTGTGTG GGTTGGCTTC AATCCTGATG AATTTCTAGC TAACTTTTCT GACATCCATG CAGGGGAACT GTATTTTGTG GATTCTGACC CATTGCAGGA TCACAATATG TATAATGATT CCCAAGGTGG AGATCTTTTC CAGTTGTTGA TGCCT*GGTGG AGGCGGTTCA GGCGGAGGTG* *GCTCTGGCGG TGGCGGATCG* CCATCATGCC CAGCACCTGA GTTCCTGGGG GGACCATCAG TCTTCCTGTT CCCCCCAAAA CCCAAGGACA CCCTCATGAT CTCCCGGACC CCTGAGGTCA CATGCGTGGT GGTGGACGTG AGCCAGGAAG ACCCTGAGGT CCAGTTCAAC TGGTACGTGG ACGGCGTGGA GGTGCATAAT GCCAAGACAA AGCCGCGGGA GGAGCAGTTC AACAGCACGT ACCGTGTGGT CAGCGTCCTC ACCGTCCTGC ACCAGGACTG GCTGAATGGC AAGGAGTACA AGTGCAAGGT CTCCAACAAA GGCCTCCCAT CCTCCATCGA GAAAACCATC TCCAAAGCCA AAGGGCAGCC CCGAGAACCA CAGGTGTACA CCCTGCCCCC ATCCCAGGAG GAGATGACCA AGAACCAGGT CAGCCTGACC TGCCTGGTCA	

		AAGGCTTCTA TCCCAGCGAC ATCGCCGTGG AGTGGGAGAG CAATGGGCAG CCGGAGAACA ACTACAAGAC CACGCCTCCC GTGCTGGACT CCGACGGCTC CTTCTTCCTC TACAGCAGGC TAACCGTGGA CAAGAGCAGG TGGCAGGAGG GGAACGTCTT CTCATGCTCC GTGATGCATG AGGCTCTGCA CAACCACTAC ACGCAGAAGA GCCTCTCCCT GTCTCTGGGT AAATGA	
	단백질	MPPPR TGRGLLWLGL VLSSVCVALG SETQANSTTD ALNVLLIIVD DLRPSLGCYG DKLVRSPNID QLASHSLLFQ NAFAQQAVCA PSRVSFLTGR RPDTTRLYDF NSYWRVHAGN FSTIPQYFKE NGYVTMSVGK VFHPGISSNH TDDSPYSWSF PPYHPSSEKY ENTKTCRGPD GELHANLLCP VDVLDVPEGT LPDKQSTEQA IQLLEKMKTS ASPFFLAVGY HKPHIPFRYP KEFQKLYPLE NITLAPDPEV PDGLPPVAYN PWMDIRQRED VQALNISVPY GPIPVDFQRK IRQSYFASVS YLDTQVGRLL SALDDLQLAN STIIAFTSDH GWALGEHGEW AKYSNFDVAT HVPLIFYVPG RTASLPEAGE KLFPYLDPFD SASQLMEPGR QSMDLVELVS LFPTLAGLAG LQVPPRCPVP SFHVELCREG KNLLKHFRFR DLEEDPYLPG NPRELIAYSQ YPRPSDIPQW NSDKPSLKDI KIMGYSIRTI DYRYTVWVGF NPDEFLANFS DIHAGELYFV DSDPLQDHNM YNDSQGGDLF QLLMP*GGGGS GGGGSGGGGS* P**P** CPAPEFLG GPSVFLFPPK PKDTLMISRT PEVTCVVVDV SQEDPEVQFN WYVDGVEVHN AKTKPREEQF **Q**STYRVVSVL TVLHQDWLNG KEYKCKVSNK GLPSSIEKTI SKAKGQPREP QVYTLPPSQE EMTKNQVSLT CLVKGFYPSD IAVEWESNGQ PENNYKTTPP VLDSDGSFFL YSRLTVDKSR WQEGNVFSCS VMHEALHNHY TQKSLSLSLG K	23
ARSB-Fc	DNA	ATGGGTCC GCGCGGCGCG GCGAGCTTGC CCCGAGGCCC CGGTCCTCGG CGGCTGCTTC	24

	TCCCCGTCGT CCTCCCGCTG CTGCTGCTGC TGTTGTTGGC GCCGCCGGGC TCGGGCGCCG GGGCCAGCCG GCCGCCCCAC CTGGTCTTCT TGCTGGCAGA CGACCTAGGC TGGAACGACG TCGGCTTCCA CGGCTCCCGC ATCCGCACGC CGCACCTGGA CGCGCTGGCG GCCGGCGGGG TGCTCCTGGA CAACTACTAC ACGCAGCCGC TGTGCACGCC GTCGCGGAGC CAGCTGCTCA CTGGCCGCTA CCAGATCCGT ACAGGTTTAC AGCACCAAAT AATCTGGCCC TGTCAGCCCA GCTGTGTTCC TCTGGATGAA AAACTCCTGC CCCAGCTCCT AAAAGAAGCA GGTTATACTA CCCATATGGT CGGAAAATGG CACCTGGGAA TGTACCGGAA AGAATGCCTT CCAACCCGCC GAGGATTTGA TACCTACTTT GGATATCTCC TGGGTAGTGA AGATTATTAT TCCCATGAAC GCTGTACATT AATTGACGCT CTGAATGTCA CACGATGTGC TCTTGATTTT CGAGATGGCG AAGAAGTTGC AACAGGATAT AAAAATATGT ATTCAACAAA CATATTCACC AAAAGGGCTA TAGCCCTCAT AACTAACCAT CCACCAGAGA AGCCTCTGTT TCTCTACCTT GCTCTCCAGT CTGTGCATGA GCCCCTTCAG GTCCCTGAGG AATACTTGAA GCCATATGAC TTTATCCAAG ACAAGAACAG GCATCACTAT GCAGGAATGG TGTCCCTTAT GGATGAAGCA GTAGGAAATG TCACTGCAGC TTTAAAAAGC AGTGGGCTCT GGAACAACAC GGTGTTCATC TTTTCTACAG ATAACGGAGG GCAGACTTTG GCAGGGGGTA ATAACTGGCC CCTTCGAGGA AGAAAATGGA GCCTGTGGGA AGGAGGCGTC CGAGGGGTGG GCTTTGTGGC AAGCCCCTTG CTGAAGCAGA AGGGCGTGAA GAACCGGGAG CTCATCCACA TCTCTGACTG GCTGCCAACA CTCGTGAAGC TGGCCAGGGG ACACACCAAT GGCACAAAGC CTCTGGATGG CTTCGACGTG TGGAAAACCA TCAGTGAAGG AAGCCCATCC CCCAGAATTG AGCTACTGCA TAATATTGAC CCGAACTTCG	

	TGGACTCTTC ACCGTGTCCC AGGAACAGCA TGGCTCCAGC AAAGGATGAC TCTTCTCTTC CAGAATATTC AGCCTTTAAC ACATCTGTCC ATGCTGCAAT TAGACATGGA AATTGGAAAC TCCTCACGGG CTACCCAGGC TGTGGTTACT GGTTCCCTCC ACCGTCTCAA TACAATGTTT CTGAGATACC CTCATCAGAC CCACCAACCA AGACCCTCTG GCTCTTTGAT ATTGATCGGG ACCCTGAAGA AAGACATGAC CTGTCCAGAG AATATCCTCA CATCGTCACA AAGCTCCTGT CCCGCCTACA GTTCTACCAT AAACACTCAG TCCCCGTGTA CTTCCCTGCA CAGGACCCCC GCTGTGATCC CAAGGCCACT GGGGTGTGGG GCCCTTGGAT G*GGTGGAGGC GGTTCAGGCG* *GAGGTGGCTC TGGCGGTGGC GGATCG*CCAT CATGCCCAGC ACCTGAGTTC CTGGGGGGAC CATCAGTCTT CCTGTTCCCC CCAAAACCCA AGGACACCCT CATGATCTCC CGGACCCCTG AGGTCACATG CGTGGTGGTG GACGTGAGCC AGGAAGACCC TGAGGTCCAG TTCAACTGGT ACGTGGACGG CGTGGAGGTG CATAATGCCA AGACAAAGCC GCGGGAGGAG CAGTTCAACA GCACGTACCG TGTGGTCAGC GTCCTCACCG TCCTGCACCA GGACTGGCTG AATGGCAAGG AGTACAAGTG CAAGGTCTCC AACAAAGGCC TCCCATCCTC CATCGAGAAA ACCATCTCCA AAGCCAAAGG GCAGCCCCGA GAACCACAGG TGTACACCCT GCCCCCATCC CAGGAGGAGA TGACCAAGAA CCAGGTCAGC CTGACCTGCC TGGTCAAAGG CTTCTATCCC AGCGACATCG CCGTGGAGTG GGAGAGCAAT GGGCAGCCGG AGAACAACTA CAAGACCACG CCTCCCGTGC TGGACTCCGA CGGCTCCTTC TTCCTCTACA GCAGGCTAAC CGTGGACAAG AGCAGGTGGC AGGAGGGGAA CGTCTTCTCA TGCTCCGTGA TGCATGAGGC TCTGCACAAC CACTACACGC AGAAGAGCCT CTCCCTGTCT CTGGGTAAAT GA	

단백질	MGPRGA ASLPRGPGPR RLLLPVVLPL LLLLLLAPPG SGAGASRPPH LVFLLADDLG WNDVGFHGSR IRTPHLDALA AGGVLLDNYY TQPLCTPSRS QLLTGRYQIR TGLQHQIIWP CQPSCVPLDE KLLPQLLKEA GYTTHMVGKW HLGMYRKECL PTRRGFDTYF GYLLGSEDYY SHERCTLIDA LNVTRCALDF RDGEEVATGY KNMYSTNIFT KRAIALITNH PPEKPLFLYL ALQSVHEPLQ VPEEYLKPYD FIQDKNRHHY AGMVSLMDEA VGNVTAALKS SGLWNNTVFI FSTDNGGQTL AGGNNWPLRG RKWSLWEGGV RGVGFVASPL LKQKGVKNRE LIHISDWLPT LVKLARGHTN GTKPLDGFDV WKTISEGSPS PRIELLHNID PNFVDSSPCP RNSMAPAKDD SSLPEYSAFN TSVHAAIRHG NWKLLTGYPG CGYWFPPPSQ YNVSEIPSSD PPTKTLWLFD IDRDPEERHD LSREYPHIVT KLLSRLQFYH KHSVPVYFPA QDPRCDPKAT GVWGPWM*GGG GSGGGGSGGG GS*P**P**CPAPEF LGGPSVFLFP PKPKDTLMIS RTPEVTCVVV DVSQEDPEVQ FNWYVDGVEV HNAKTKPREE QF**Q**STYRVVS VLTVLHQDWL NGKEYKCKVS NKGLPSSIEK TISKAKGQPR EPQVYTLPPS QEEMTKNQVS LTCLVKGFYP SDIAVEWESN GQPENNYKTT PPVLDSDGSF FLYSRLTVDK SRWQEGNVFS CSVMHEALHN HYTQKSLSLS LGK	25

[292] **실시예 2: 융합단백질 발현 벡터를 이용한 CHO 세포주의 형질전환**

[293]

[294] 상기 실시예 1에서 제조한 재조합 발현벡터 pX0GC-Enzyme-Fc를 DHFR 유전자가 훼손되어 핵산 생합성 과정이 불완전한 DG44/CHO 세포주 (CHO/dhfr-) (Urlaub et al., Somat. Cell. Mol. Genet., 12, 555-566, 1986) 에 도입하여 형질전환체를 수득하고, 상기 형질전환체로부터 효소 융합단백질 (Enzyme-Fc)을 발현시켰다.

[295] 구체적으로, 상기 DG44/CHO 세포주를 배양 용기 바닥의 80 내지 90% 정도를 덮을 정도로 배양시킨 다음, 상기 세포를 Opti-MEM (Gibco사, cat. No. 51985034)으로 3회 세척하였다.

[296]

[297] 한편, 3 ㎖의 Opti-MEM과 5 ㎍의 발현 벡터 pX0GC-Enzyme-Fc의 혼합물과, 3 ㎖의 Opti-MEM과 20 ㎕의 리포펙타민 2000 (Gibco사, cat no. 11668-019)의 혼합물을 각각 상온에서 30분 동안 정치시켰다. 이어, 상기 각 혼합물을 혼합하고 상기 배양된 DG44/CHO 세포주에 가한 다음, 37 ℃ 및 5% CO_2 조건으로 약 18시간 동안 배양함으로써, 상기 발현 벡터 pX0GC-Enzyme-Fc를 DG44/CHO 세포주에 도입하였다.

[298]

[299] 이어, 상기 배양된 세포를 10% FBS가 포함된 DMEM-F12 (Gibco사, cat no. 11330) 배지로 3회 세척한 다음, 상기 배지를 가하고 48시간 동안 다시 배양하였다. 배양된 세포에 트립신을 가하여 배양된 세포들을 각각 분리하고, 이들을 선별배지 (HT 보충제(Hypoxanthine-Thymidine)가 없고, 10% FBS 및 1 ㎎/㎖의 G418 (Cellgro사, cat no. 61-234-RG)를 포함하는 α-MEM 배지 (WELGENE사, cat no. LM008-02))에 접종하였다. 형질전환된 세포들만이 생존하여 콜로니를 형성할 때까지, 상기 선별배지를 2일 또는 3일 간격으로 교환하며 배양함으로써, 상기 분리된 세포들로부터 형질전환된 세포를 선발하였다. 이때, 상기 선발된 형질전환된 세포에서 효소 융합단백질의 발현수준을 향상시키기 위하여, 10 nM MTX (Sigma사, cat no. M8407)를 선별배지에 가하여 점차로 농도를 증가시켜서, 1 내지 2주 후에는 20 nM까지 MTX의 함량을 증가시켰다.

[300]

[301] **실시예 3: 효소 면역 측정법 (ELISA)을 이용한 IDS-Fc, ARSB-Fc 융합단백질의 발현 확인**

[302]

[303] 상기 실시예 2에서 형질 도입된 세포들의 일부를 175-T 세포배양 플라스크에 $1X10^7$ 세포수의 농도로 옮겨 배양 용기의 바닥을 거의 덮을 정도로 배양한 후, 1mM의 소디움부틸레이트 (Sigma사, cat no. B5887)가 첨가된 무혈청 배지 Ex-cell media (Sigma사로부터 주문제작, cat no. 14360C)를 15 mL씩 넣고 33℃, 5% CO_2 배양기에서 48시간 동안 배양하였다. 세포의 배양액을 50 mL 튜브로 옮긴 후 원심분리를 하여 상등액만 다시 모아서 IDS-Fc, 및 ARSB-Fc 융합단백질의 발현량을 측정하였다.

[304]

[305] 먼저 IDS-Fc 발현량 측정은 indirect ELISA 방법을 응용하여 수행하였다. 96 well ELISA 플레이트 (Nunk사, cat no. 44-2404-21)에 1 ㎍/mL로 PBS에 희석된 인간 α-IDS 항체(R&D systems사, cat no. AF2449)를 well 당 100 uL씩 넣어주고, 4℃ 냉장고에서 밤새도록 반응 시켰다. 다음날 PBS-T 버퍼로 5회 세척 한 뒤, 배양액 시료와 여러 농도로 희석된 IDS 표준품 (Shire사, Elaprase®, lot no. TEPE09A17)을 well 당 100 uL씩 각각 분주 하여 상온에서 한 시간 동안 반응 시켰다. 한 시간 뒤, 플레이트를 세척하고 biotin이 부착된 인간 α-IDS 항체 (R&D

systems사, cat no. BAF 2449)를 넣어준 뒤 한 시간 동안 상온에서 반응 시켰다. 마지막으로 스트렙트아비딘(streptavidin)-HRP (GE healthcare사, cat no. RPN440IV)를 1:30,000으로 희석하여 well 당 100 uL씩 넣어 준 뒤, 한 시간 동안 반응 하였고 세척 후 약 10 분간 기질액을 넣어 반응 시키고 반응 정지액으로 반응을 정지 시킨 뒤 450 nm의 흡광도로 측정하였다. 인간 IDS 표준품의 농도와 얻어진 흡광도 값을 이용하여 표준곡선 및 함수를 얻은 뒤에, 이를 이용하여 인간 IDS-Fc 융합단백질의 양을 정량화하였다. 그 결과, 형질도입되어 선별된 세포들로부터 일정량의 인간 IDS-Fc 융합단백질이 발현되는 것을 확인할 수 있었다 (도 1).

[306]

[307] 또한, ARSB-Fc 융합단백질의 발현량 측정은 인간 IgG를 정량화하는 효소면역 측정 방법 (Bethyl사, cat no. E80-104)으로 수행하였다. 96 well ELISA 플레이트 (Nunk사, cat no. 44-2404-21)에 10 ㎍/mL로 카보네이트 (carbonate) 버퍼 (0.05 M carbonate-bicarbonate, pH 9.6)에 희석된 인간 IgG-Fc 항체 (Bethyl사, cat no. A80-104A-9)를 well 당 100 ㎕씩 넣고, 상온에서 1시간 동안 반응 시켰다. 1 시간 뒤에 세척액으로 ELISA 플레이트를 5회 반복 세척 하였고, 배양액 시료와 인간 IgG 정량 키트에 포함되어 있는 인간 IgG 표준품 (Bethyl사, cat no. RS10-110-4)를 여러 농도로 희석하여 well 당 100 uL씩 각각 분주 하여 상온에서 한 시간 동안 반응 시켰다. 한 시간 뒤, 플레이트를 세척하고 HRP가 부착된 인간 IgG-Fc 항체 (Bethyl사, cat no. A80-104P-87)를 1:150,000배 희석하여 넣어준 뒤 한 시간 동안 상온에서 반응 시켰다. 마지막으로 스트렙트아비딘(streptavidin)-HRP (GE healthcare사, cat no. RPN440IV)를 1:30,000으로 희석하여 well 당 100 uL씩 넣어 준 뒤, 한 시간 동안 반응 하였고 세척 후 약 15 분간 기질액을 넣어 반응 시키고 반응정지액으로 반응을 정지 시킨 뒤 450 nm의 흡광도로 측정하였다.

[308]

[309] 인간 IgG 표준품의 농도와 얻어진 흡광도 값을 이용하여 표준곡선 및 함수를 얻은 뒤에, 이를 이용하여 인간 ARSB-Fc 융합단백질의 양을 정량화하였다. 그 결과, 형질도입되어 선별된 세포들로부터 일정량의 인간 ARSB-Fc 융합단백질이 발현되는 것을 확인할 수 있었다 (도 2).

[310]

[311] **실시예 4: 효소 지속형 융합단백질의 약물 동력학 확인**

[312]

[313] 상기에서 제조된 효소 지속형 융합단백질 및 Fc 영역과 융합되지 않은 효소의 약물 동력학을 조사하여 융합단백질 제조에 따른 효과를 비교하였다.

[314]

[315] 실시예 4-1: 이두로네이트-2-설파타제 지속형 융합단백질의 약물 동력학 실험

[316] 본 발명자들은 상기 실시예에서 제조된 이두로네이트-2-설파타제 지속형 융합단백질의 약물 동력학을 조사하여 본 발명의 융합단백질의 약효 지속성

효과를 확인하고자 하였다.

[317]

[318] 이를 위해, 3 마리의 ICR 마우스에 이두로네이트-2-설파타제 (Idursulfase, 대조군) 와 이두로네이트-2-설파타제 지속형 융합단백질 (IDS-Fc 융합단백질, 실험군)을 각각 투여하여 각 군 별 채혈 시점당 혈액 내 안정성 및 약물 동력학 계수를 비교하였다.

[319]

[320] 구체적으로, 대조군과 실험군을 이두로네이트-2-설파타제 기준으로 각 0.5 mg/kg, 1.0 mg/kg씩 정맥 내 및 피하 주사한 후 정맥 내 주사 투여군은 주사 후 0, 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 8, 24, 48, 72, 96, 120, 144 및 168시간후에 채혈하였고, 피하 주사 투여군은 주사 후 0, 1, 4, 8, 24, 48, 72, 96, 120, 144, 168, 192 및 216 시간 후에 채혈하였다. 혈청 내 단백질 양은 인간 특이적 항- 이두로네이트-2-설파타제 항체를 이용하여 ELISA 방법으로 측정하였고, 분석 결과를 도 3 및 표 4에 나타내었다.

[321]

[322] [표4]

PK 프로필	IDS	IDS-Fc 융합단백질	
투여농도	0.5 mg/kg, IV	1.0 mg/kg, IV	1.0 mg/kg, SC
체내 노출 정도 (ng/mL*hr)	6047.0	67766.8	43974.4
혈중 최고의 약물 농도 (ng/mL)	67670.8	28592.2	687.7
혈중 반감기 (hr)	4.4	NA	45.3
생체 내 이용률 (%)	-	-	**64.9**

[323] 상기 결과에서 알 수 있는 바와 같이, 본 발명에 따른 이두로네이트-2-설파타제 지속형 융합단백질은 대조군에 비해 유의적으로 뛰어난 약동학 특성을 나타내었다. 이러한 결과들은 실제 약물 투여 시 본 발명의 이두로네이트-2-설파타제 지속형 융합단백질이 융합단백질이 아닌 효소에 비해 지속적인 효능을 나타내는 효과를 통해 약물 투여 간격을 줄여 줄 수 있다는 장점을 시사 하는 바이다.

[324]

[325] 도 3 및 표 4의 약물 동력학 결과에서 알 수 있듯이, 이두로네이트-2-설파타제 지속형 융합단백질의 경우 융합단백질이 아닌 대조군에 대비하여 반감기 ($T_{1/2}$), 혈중 최고 약물 농도 (C_{max}), 생체 내 이용률 (AUC) 모두 증가하였다. 특히, 이두로네이트-2-설파타제 지속형 융합단백질의 생체 내 이용률은 64.9 %으로 융합단백질이 아닌 효소에 비해 우수한 생체이용률을 나타냄을 확인하였다.

[326]

[327] 실시예 4-2: 아릴설파타제 B 지속형 융합단백질의 약물 동력학 실험

[328] 본 발명자들은 상기 실시예에서 제조된 아릴설파타제 B 지속형 융합단백질 (ARSB-Fc 융합단백질)의 약물 동력학을 조사하고자 하였으며, 이에, 아릴설파타제 B 지속형 융합단백질의 약물 동력학을 측정하여 이를 아릴설파타제 B와 비교하였다.

[329]

[330] 구체적으로, 천연형 아릴설파타제 B (나글라자임, 바이오마린사)를 투여하는 대조군과 아릴설파타제 B 지속형 융합단백질을 투여하는 실험군을 아릴설파타제 B 기준으로 ICR 마우스에 5.0 mg/kg씩 정맥 내 및 피하 주사한 후, 대조군은 투여 방법에 상관 없이 주사 후 0, 0.25, 0.5, 0.75, 1, 1.5, 4, 8 및 24 시간후에 채혈하였다. 실험군 중 정맥 내 주사 투여군은 주사 후 0, 0.25, 0.5, 1, 1.5, 2, 4, 8, 24, 48, 96 및 168 시간 후에 채혈하였으며, 실험군 중 피하 주사 그룹은 주사 후 0, 0.5, 1, 2, 4, 8, 24, 48, 96 및 168 시간 후에 채혈하였다.

[331]

[332] 채혈된 각 군의 혈액은 원심분리하여 혈청으로 분리하였고, 효소 활성 측정 방법으로 혈중 아릴설파타제 B 지속형 융합단백질 및 천연형 아릴설파타제 B의 양을 정량화 하여 분석 결과를 도 4 내지 표 5에 나타내었다.

[333]

[334] [표5]

PK 프로필	ARSB	ARSB-Fc 융합단백질	
투여농도	5.0 mg/kg, IV	5.0 mg/kg, IV	5.0 mg/kg, SC
체내 노출 정도 (ng/mL*hr)	30776.9	1230279.1	809176.0
혈중 최고의 약물 농도 (ng/mL)	241588.2	166838.7	11679.2
혈중 반감기 (hr)	산출불가*	74.2	33.4
생체 내 이용률 (%)	-	-	**65.8**
*산출불가: 너무 짧은 혈중 반감기로 인하여, $T_{1/2}$ 산출 불가함			

[335] 상기 결과에서 알 수 있는 바와 같이, 본 발명에 따른 아릴설파타제 B 지속형 융합단백질은 천연형 아릴설파타제 B인 나글라자임에 비해 유의적으로 뛰어난 약동학 특성을 나타내었다. 이러한 결과들은 실제 약물 투여 시 상기 아릴설파타제 B 지속형 융합단백질이 천연형 아릴설파타제 B에 비해 지속적인 효능을 나타내는 효과를 통해 약물 투여 간격을 줄여 줄 수 있다는 장점을 시사하는 바이다.

[336]

[337] 도 4 및 표 5의 약물 동력학 결과에서 알 수 있듯이, 아릴설파타제 B 지속형 융합단백질의 경우 융합단백질이 아닌 대조군에 대비하여 반감기 ($T_{1/2}$), 혈중 최고 약물 농도 (C_{max}), 생체 내 이용률 (AUC) 모두 증가하였다. 특히,

아릴설파타제 B 지속형 융합단백질의 생체 내 이용률은 65.8 %으로 융합단백질이 아닌 효소에 비해 우수한 생체이용률을 나타냄을 확인하였다.

[338]

[339] 상기 실시예 4-1 및 4-2에서 효소 융합단백질의 약물 동력학을 조사한 결과, 본 발명의 효소 융합단백질이 Fc 영역과 융합되지 않은 효소에 비하여, 반감기, 생체 내 이용률 등이 현저히 증가하여 지속적인 약물의 효능을 기대할 수 있음을 확인하였다.

[340]

[341] **실시예 5: 효소 지속형 융합단백질의 효소 활성 확인**

[342]

[343] 상기에서 제조된 효소 융합단백질에 포함된 효소의 활성을 Fc 영역과 융합되지 않은 효소와 비교하였다.

[344]

[345] 실시예 5-1: 이두로네이트-2-설파타제 지속형 융합단백질의 *in vitro* 효소 활성

[346] 본 발명자들은 상기 실시예에서 제조된 이두로네이트-2-설파타제의 지속형 융합단백질 제조에 따른 효소 활성 변화를 측정하고자 *in vitro* 시험관 효소 활성 측정을 진행하였다.

[347]

[348] 구체적으로, 효소 기질로 알려진 4MU-α-IdopyraA-2 (4-Methylumbelliferyl a-L-Idopyranosiduronic Acid-2-sulfate Sodium Salt)를 이두로네이트-2-설파타제 및 이두로네이트-2-설파타제 지속형 융합단백질과 37 ℃에서 4시간 반응 후, 이차반응 효소인 α-이두로나제(Iduronidase) 와 다시 37 ℃에서 24시간 반응시켰다. 이후, 최종적으로 생성되는 4MU (4-Methylumbelliferone) 에 대한 형광을 측정함으로써 해당 물질에 대한 효소 활성을 측정하였다.

[349]

[350] 그 결과, 이두로네이트-2-설파타제와 이두로네이트-2-설파타제 지속형 융합단백질의 효소 활성 (specific activity)이 각각 32.0±1.58, 87.3±6.49 nmol/min/mM 임을 확인하였다. 이두로네이트-2-설파타제 지속형 융합단백질은 두 개의 Fc 사슬의 이량체 형태인 하나의 Fc 분자에 두 개의 이두로네이트-2-설파타제로 구성된 구조이기 때문에 융합단백질이 아닌 이두로네이트-2-설파타제에 비하여 약 2.7배의 in vitro 효소 활성이 높게 측정되었다. 이는 두 개의 이두로네이트-2-설파타제를 갖는 이두로네이트-2-설파제의 지속형 융합단백질의 구조적인 특징이 효소 활성 측면에서 융합단백질을 이루지 않은 이두로네이트-2-설파타제보다 장점이 있음을 시사한다(도 5).

[351]

[352] 실시예 5-2: 아릴설파타제 B 지속형 융합단백질의 *in vitro* 효소 활성

[353] 본 발명자들은 상기 실시예에서 제조된 아릴설파타제 B 지속형 융합단백질의

효소 활성을 천연형 효소인 아릴설파타제 B (나글라자임, 바이오마린사)와 비교 측정하였다.

[354]

[355] 구체적으로, 상기 아릴설파타제 B 지속형 융합단백질 및 아릴설파타제 B를 4-methylumbelliferyl sulfate와 37 ℃에서 20분간 반응 시킨 뒤, 설페이트기가 절단되고 생성된 4-methylumbelliferyl의 형광을 측정하는 방법으로 아릴설파타제 B 지속형 융합단백질의 *in vitro* 효소 활성을 측정하였다.

[356]

[357] 그 결과, 아릴설파타제 B와 아릴설파타제 B 지속형 융합단백질의 효소 활성(specific activity)이 각각 438.5±29.4, 823.8±37.0 nmol/min/μM 임을 확인하였다. 두 개의 Fc 사슬의 이량체 형태인 하나의 Fc 분자에 두개의 아릴설파타제 B로 구성된 아릴설파타제 B 지속형 융합단백질은 천연형 아릴설파타제 B에 비하여 약 1.9배 높은 *in vitro* 효소 활성을 갖는 것을 확인하였다. 상기 결과에서 알 수 있는 바와 같이, 분자 단위에서의 천연형 아릴설파타제 B와 차별화된 아릴설파타제 B 지속형 융합단백질의 구조적인 특징으로 인해 우수한 효소 활성을 나타내었다(도 6).

[358]

[359] 상기 실시예 5-1 및 5-2에서 효소 융합단백질의 효소 활성을 확인한 결과, 본 발명의 효소 융합단백질이 Fc 영역과 융합되지 않은 효소에 비하여, 높은 *in vitro* 효소 활성을 갖는 것을 확인하였다.

[360]

[361] **실시예 6: 이두로네이트-2-설파타제 지속형 융합단백질의 투여 효능 확인**

[362]

[363] 이두로네이트-2-설파타제 (iduronate 2-sulfatase, IDS)-넉아웃 (knock-out) 마우스에 약물을 투여하고 조직 및 소변 내 글리코사미노글리칸 (glycosaminoglycan, GAG)의 함량 변화를 조사하여 본 발명의 효소 융합단백질의 투여 효능을 조사하였다.

[364]

[365] 구체적으로, 음성 대조군의 정상 마우스 그룹 이외에 7~14 주령의 IDS-넉아웃 마우스를 소변 내 GAG 함량을 기반으로 4마리당 1개의 그룹이 되도록 총 4개의 그룹으로 나누었다. 이두로네이트-2-설파타제 (엘라프라제, genzyme) 0.5 mg/kg를 총 4회(0일, 7일, 14일, 21일) 꼬리 정맥에 투여하였고 (대조군), 이두로네이트-2-설파타제 지속형 융합단백질은 2.0 mg/kg를 1회(0일)에 꼬리 정맥에 투여하는 그룹과 4.0 mg/kg를 1회(0일)에 피하 투여하는 그룹으로 각각 나누어 진행하였다.

[366]

[367] 각 그룹의 마우스는 약물 투여 전과 투여 후 7일, 14일, 21일, 그리고 28일차에 각각 소변을 회수하였으며 간, 비장, 심장, 골수는 약물 투여 후 28일차에 모두

회수하여 조직 무게의 5배(골수는 9배) 볼륨의 조직 파쇄 버퍼(1 ug/mL의 아프로티닌(aprotinin), 1mM PMSF, 그리고 2mM EDTA이 들어 있는 PBS)를 넣고 초음파 분쇄기로 분쇄한 다음, 원심분리하여 얻은 상층액을 이용하여 GAG 함량 분석에 사용하였다.

[368]

[369] 이후, 상기 회수된 소변 및 각 조직의 파쇄 후 수득된 상층액 50 uL 를 96 웰 플레이트에 넣고 디메틸메틸렌블루 (dimethylmethylene blue) 용액을 250 uL 첨가한 후 섞어주고 525 nm 파장에서 GAG 함량을 정량화 하였다. 소변 내의 GAG 함량의 경우, 소변 내의 크레아틴 함량으로 보정하여 값을 산출하였다. 산출된 값으로 일원분산 분석 (one-way ANOVA)을 사용하여 대조군과 시험군 사이에 통계 분석을 진행하였다. 측정된 소변 및 각 조직에서의 GAG 함량은 각각 도 7 및 8에 나타내었다.

[370]

[371] 도 7 및 8에서 보는 바와 같이, 이두로네이트-2-설파타제 지속형 융합단백질은 월 1회의 정맥 및 피하 투여 만으로도 Fc 영역과 융합하지 않은 효소 (엘라프라제)의 주 1회 정맥 투여 용법과 유사한 수준으로 IDS-넉아웃 마우스에 비해 소변 및 각 조직 내 GAG 수치를 유의적으로 감소시키는 것으로 나타났다.

[372]

[373] 본 실시예를 통해, 본 발명의 이두로네이트-2-설파타제 지속형 융합단백질은 연장된 혈중 반감기적 특징을 바탕으로 월 1회 투여 만으로도 주 1회 투여하는 기존의 약물 용법과 비등한 효력을 나타내는 것을 확인하였다. 또한 월 1회 피하 투여된 그룹에서도 GAG 수치를 감소시키는 효능을 갖는 결과를 통해서 본 발명의 융합단백질의 투여 경로로서 피하 주사의 가능성을 보여준다. 따라서, 본 발명에 따른 이두로네이트-2-설파타제 지속형 융합단백질은 헌터증후군 환자에게 월 1회 투약 및 피하 투약의 가능성을 시사한다.

[374]

[375] **실시예 7: 아릴설파타제 B 지속형 융합단백질의 조직 분포 확인**

[376]

[377] 본 발명자들은 상기 실시예에서 제조된 본 발명의 효소 융합단백질의 조직 분포도를 확인하고자 하였다.

[378]

[379] 이에, 3 마리의 ICR 마우스 (mouse)에서 아릴설파타제 B (대조군) 및 아릴설파타제 B 지속형 융합단백질 (실험군)의 각 군 별 채혈 시점당 조직 및 장기 내 분포를 비교하였다.

[380]

[381] 구체적으로, 대조군과 실험군을 아릴설파타제 B 기준으로 각 5.0 mg/kg씩 정맥 경로로 주사하였다. 대조군의 천연형 아릴설파타제 B (나글라자임)와 실험군의 아릴설파타제 B 지속형 융합단백질은 약물 투여 1, 4, 8, 24 시간 후에 마우스의

장기를 적출 한 후 효소 활성 측정법을 통해 조직 (골수, 간, 비장, 폐, 신장 및 심장)에서의 각 물질 농도를 측정 및 비교하였다.

[382]

[383] 그 결과, 대조군으로 사용 된 Fc 영역과 융합되지 않은 천연형 아릴설파타제 B와 비교하여, 동일 시간대에서 아릴설파타제 B 지속형 융합단백질은 모든 조직에서 많거나 혹은 더 오랜 시간 동안 조직 에서 분포되는 결과를 나타내었다.

[384]

[385] 특히, 아릴설파타제 B 지속형 융합단백질은 천연형 아릴설파타제 B와 비교하여 골수와 비장에서의 분포도가 현저히 높은 것을 확인하였으며, 폐, 신장, 심장에서는 아릴설파타제 B가 측정되지 않은데 반해 아릴설파타제 B 지속형 융합단백질은 해당 조직에서 분포하는 것을 확인하였다 (도 9).

[386]

[387] 상기 실험 결과를 통해, 본 발명에 따른 아릴설파타제 B 지속형 융합단백질은 천연형 아릴설파타제 B인 나글라자임에 비해 뛰어난 약동학 특성을 나타내었다. 특히 기존의 약물에서 사용되는 주 1회 정맥 투여 용법을 월 1회 투여뿐만 아니라, 피하 투여로의 전환 가능성을 통해 환자의 삶의 질 향상에 도움 줄 수 있음을 시사한다.

[388]

[389] 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.

[390]

[391]