명세서

발명의 명칭: IGE FC 수용체의 알파 서브유닛의 세포외 도메인을 포함하는 시알산 함량이 높은 폴리펩티드 이량체 및 이를 포함하는 약학적 조성물

기술분야

[1] 본 발명은 IgE Fc 수용체를 포함하고 시알산 함량이 높은 폴리펩티드 이량체 및 이를 포함하는 약학적 조성물에 관한 것이다.

배경기술

[2] 현대사회가 산업화되고 식습관이 서구화되면서 천식을 비롯한 알러지성 비염, 아토피 피부염, 식품 알러지 등 알러지 질환의 발병률이 증가하고 있다. 중증 알러지 질환인 아나필락시스(anaphylaxis)의 발병률도 증가하고 있다. 이러한 알러지 질환은 개인 삶의 질을 떨어트리며, 경제적 비용도 증가시키고 있어, 이를 극복하기 위한 대책이 절실한 실정이다.

[3] 대부분의 알러지 질환은 면역글로불린 E(IgE)의 과잉 면역반응에 의해 유발된다. IgE는 정상적인 상태에서는 혈액 내 아주 낮은 농도로 존재하는 항체이다. IgE는 일반적으로 무해한 항원에 의해서 생성되기도 하며, 특별한 자극 없이도 IgE가 증가되는 경우가 있다. 이러한 경우 알러지 질환이 야기될 수 있다. 비정상적으로 증가된 IgE는 비만세포(mast cell)와 호염기성 과립구(basophils) 등의 표면에 발현되는 고친화성 IgE 수용체(high-affinity IgE receptor, 이하, FcεRI)에 결합할 수 있다. 이러한 결합에 의해 비만세포나 호염기성 과립구는 히스타민, 류코트리엔, 프로스타글란딘, 브라디키닌 및 혈소판-활성화 인자 등 화학 매개자를 방출한다. 방출된 화학 매개자에 의해 알러지 증상이 나타나게 된다. 즉, 알러지 질환은 IgE와 FcεRI의 결합으로 인해 증상이 악화될 수 있다. 또한, 알러지 환자에서 FcεRI을 발현하는 세포가 증가된다고 알려져 있다.

[4] 현재, 알러지 질환을 치료하기 위해 알레르겐 회피, 항알러지 약물 투여, 체내 IgE 합성 조절, 항-IgE 항체 등의 방법이 제안되었다. 그러나, 약제의 효능이 불충분하거나 심각한 부작용이 발생하는 등의 문제점이 남아있다. 최근, IgE 및 FcγRIIb에 고친화성으로 결합하며, 막에 고정된 IgE를 발현하는 세포를 억제할 수 있는 조성물이 연구된 바 있다. 이러한 조성물은 알러지 및 천식을 포함하여 IgE가 매개된 질환을 치료하는데 유용하다고 보고된 바 있다(KR10-1783272B).

[5] 특히, IgE의 Fc부분을 표적으로 하는 오말리주맙(Omalizumab, 상품명: 졸레어(Xolair))이 개발되어 난치성 중증 천식과 난치성 두드러기 치료제로 사용되고 있다. 하지만, 효과를 유지하기 위해서는 오말리주맙을 고용량으로 투여하여야 하기 때문에 비용부담이 크고, 혈관부종, 아나필락시스 반응 등의 부작용이 있다는 것이 보고되었다(The Journal of Clinical Investigation Volume 99,

Number 5, March 1997, 915-925). 그뿐 아니라, 시판 후 알러지성 육아종 혈관염, 특발성 중증 혈소판감소증 등의 심각한 이상반응이 보고되었다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

[6] 이에 본 발명자들은 안전하고 효과적인 알러지 질환 치료제를 개발하기 위해 연구하였다. 그 결과, IgE Fc 수용체의 알파 서브유닛의 세포외 도메인을 포함하는 단량체(FcεRIα-ECD) 두 개를 포함하는 폴리펩티드 이량체의 시알산 함량이 높을 경우, 상기 폴리펩티드 이량체가 IgE와의 결합능이 우수할 뿐 아니라, 혈중 농도가 높게 유지되는 것을 발견하였다. 특히, 상기 시알산 함량이 높은 폴리펩티드 이량체를 피하로 투여할 경우에도 체내로 효과적인 전달이 가능함을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.

과제 해결 수단

[7] 본 발명의 일 측면은, 시알산/폴리펩티드 이량체의 몰 비율이 적어도 8인, IgE Fc 수용체의 알파 서브유닛의 세포외 도메인(FcεRIα-ECD)을 포함하는 단량체 두 개를 포함하는 폴리펩티드 이량체를 제공한다.

[8] 본 발명의 다른 측면은, 상기 시알산 함량이 높은 폴리펩티드 이량체를 포함하는 알러지 질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[9] 본 발명의 또 다른 측면은, 상기 약학적 조성물을 포함하는 경피 패치를 제공한다.

[10] 본 발명의 또 다른 측면은, 상기 약학적 조성물을 포함하는 국소 패치를 제공한다.

[11] 본 발명의 또 다른 측면은, 상기 시알산 함량이 높은 폴리펩티드 이량체를 포함하는 알러지 증상 개선 또는 완화용 식품 조성물을 제공한다.

[12] 본 발명의 또 다른 측면은, 알러지 질환 예방 또는 치료를 위한 상기 시알산 함량이 높은 폴리펩티드 이량체의 용도를 제공한다.

발명의 효과

[13] 본 발명에 따른 시알산 함량이 높은 폴리펩티드 이량체는 기존에 사용되는 항-IgE 항체에 비하여 체내 지속성 및 안전성이 우수할 뿐만 아니라, IgE와 강하게 결합하므로, 투여 주기를 늘릴 수 있는 장점이 있다. 또한, 본 발명에 따른 시알산 함량이 높은 폴리펩티드 이량체는 IgE 단일표적 물질로서, IgG1의 Fc가 적용된 기존의 항-IgE 항체와는 다르게 Fc gamma 수용체와는 결합하지 않는다. 이로 인해 비만세포 표면의 Fc gamma 수용체와의 결합에 의한 매개자 방출을 억제할 수 있어, IgG1과 비만세포의 Fc gamma 수용체 III와의 결합에 의해 유발될 수 있는 아나필락시스 등의 부작용을 최소화할 수 있다. 뿐만 아니라, 시알산 함량이 높은 폴리펩티드 이량체는 피하 투여의 경우에도 높은 혈중 농도를 유지할 수 있다. 따라서, 본 발명에 따른 시알산 함량이 높은 폴리펩티드 이량체는 알러지 질환의 예방 또는 치료에 유용하게 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[14] 도 1은 각 세포주에서 생산된 폴리펩티드 이량체를 SDS-PAGE로 확인한 결과를 나타낸 도면이다.

[15] 도 2는 일 구체예에 따른 폴리펩티드 이량체의 비환원된 형태 및 환원된 형태의 SDS-PAGE 결과를 나타낸 도면이다.

[16] 도 3은 오말리주맙의 IgE에 대한 결합능을 나타내는 도면이다.

[17] 도 4는 일 구체예에 따른 폴리펩티드 이량체(IgE_{TRAP})의 IgE에 대한 결합능을 나타낸 도면이다.

[18] 도 5a는 일 구체예인 폴리펩티드 이량체(IgE_{TRAP}) 또는 오말리주맙과 IgG Fc gamma 수용체I(FcγRI)의 결합능을 나타낸 도면이다.

[19] 도 5b는 일 구체예인 폴리펩티드 이량체(IgE_{TRAP}) 또는 오말리주맙과 IgG Fc gamma 수용체IIA(FcγRIIA)의 결합능을 나타낸 도면이다.

[20] 도 5c는 일 구체예인 폴리펩티드 이량체(IgE_{TRAP}) 또는 오말리주맙과 IgG Fc gamma 수용체IIB(FcγRIIB)의 결합능을 나타낸 도면이다.

[21] 도 5d는 일 구체예인 폴리펩티드 이량체(IgE_{TRAP}) 또는 오말리주맙과 IgG Fc gamma 수용체IIIA(FcγRIIIA)의 결합능을 나타낸 도면이다.

[22] 도 5e는 일 구체예인 폴리펩티드 이량체(IgE_{TRAP}) 또는 오말리주맙과 IgG의 Fc gamma 수용체IIIB(FcγRIIIB)의 결합능을 나타낸 도면이다.

[23] 도 6은 일 구체예인 폴리펩티드 이량체(IgE_{TRAP}) 또는 오말리주맙과 IgG의 Fc gamma 수용체들의 결합력을 수치화한 그래프이다.

[24] 도 7은 일 구체예에 따른 폴리펩티드 이량체의 농도에 따른 IgE와 결합 정도를 나타낸 도면이다.

[25] 도 8은 일 구체예에 따른 폴리펩티드 이량체 단백질(IgE_{TRAP}) 및 졸레어(오말리주맙)의 농도에 따른 인간 FcεRI 발현 마우스 유래 비만세포의 활성 억제력을 비교한 도면이다.

[26] 도 9는 식품 알러지 모델에서 설사 발생 빈도 측정을 통해 일 구체예에 따른 폴리펩티드 이량체의 항알러지 효과를 확인한 도면이다.

[27] 도 10은 일 구체예에 따른 폴리펩티드 이량체(SA^{low}, SA^{medi} 및 SA^{high})의 비환원된 형태 및 환원된 형태의 SDS-PAGE 결과를 나타낸 도면이다.

[28] 도 11은 일 구체예에 따른 폴리펩티드 이량체(SA^{low}, SA^{medi} 및 SA^{high})의 등전점을 확인한 도면이다.

[29] 도 12는 식품 알러지 모델에서 설사 발생 빈도 측정을 통해 일 구체예의 폴리펩티드 이량체(SA^{low} 및 SA^{high})의 피하 주사에 따른 항알러지 효과를 확인한 도면이다.

[30] 도 13은 식품 알러지 모델에서 혈중 IgE 농도 측정을 통해 일 구체예에 따른 폴리펩티드 이량체(SA^{low} 및 SA^{high})의 항알러지 효과를 확인한 도면이다.

[31] 도 14는 식품 알러지 모델에서 혈중 MCPT-1 농도 측정을 통해 일 구체예에

따른 폴리펩티드 이량체(SA^{low} 및 SA^{high})의 항알러지 효과를 확인한 도면이다.

[32] 도 15는 마우스 모델에서 시알산 함량에 따른 일 구체예인 폴리펩티드 이량체의 약동학 프로파일 분석 결과를 나타낸 도면이다.

[33] 도 16은 수동성 전신적 아나필락시스 마우스 모델에서 체온 측정을 통해 일 구체예인 폴리펩티드 이량체의 시알산 함량에 따른 항알러지 효과를 확인한 도면이다.

발명의 실시를 위한 최선의 형태

[34] 본 발명의 일 측면은, IgE Fc 수용체의 알파 서브유닛의 세포외 도메인(FcεRIa-ECD)을 포함하는 단량체 두 개를 포함하는 폴리펩티드 이량체로서, 상기 단량체는 Fc 영역을 포함하며, 상기 Fc 영역과 FcεRIa-ECD는 힌지를 통해 결합되고, 상기 폴리펩티드 이량체는 시알산/폴리펩티드 이량체의 몰 비율이 적어도 8인 것을 특징으로 하는 시알산 함량이 높은 폴리펩티드 이량체를 제공한다.

[35] 본 발명에서 사용하는 용어 "IgE"란, 면역글로불린 E로 알려진 항체를 의미한다. IgE는 비만세포나 호염기구 등에 친화성을 가진다. 또한, IgE와 그것에 대응하는 항원(알레르겐)이 반응하면 염증반응을 일으킨다. 또한, IgE는 아나필락시스(anaphylaxis)를 일으키는 주된 원인으로 알려져 있다.

[36] 본 발명에서 사용하는 용어 "IgE Fc 수용체"란, Fcε수용체라고도 불리며, IgE의 Fc 부분과 결합하는 수용체를 의미한다. 상기 수용체는 2개의 종류가 존재한다. IgE의 Fc에 대해 고친화성인 수용체는 Fcε수용체I(FcεRI)라고 한다. IgE의 Fc에 대해 저친화성인 수용체는 Fcε수용체II(FcεRII)라고 한다. FcεRI은 비만세포와 호염기구에서 발현된다. FcεRI에 결합한 IgE 항체가 다가 항원에 의해 가교되면, 비만세포 또는 호염기구에서 탈과립이 생겨 히스타민 등의 여러 화학물질을 방출한다. 이러한 방출에 의해 즉시형 알러지 반응이 일어난다.

[37] 상기 FcεRI는 하나의 α사슬과 한 개의 β사슬 및 2황화 결합한 2개의 γ사슬로 구성된 막단백질이다. 이 중에서 IgE가 결합하는 부분은 α사슬(FcεRIα)로서, FcεRIα는 60 kDa 정도의 크기를 가지며, 세포막 안에 존재하는 소수성 도메인과 세포막 외부에 존재하는 친수성 도메인으로 구성된다. 특히, α사슬의 세포외 도메인에 IgE가 결합하게 된다. 상기 FcεRIα는 IgE Fc 수용체의 알파 서브유닛으로 혼용되어 사용될 수 있다.

[38] 구체적으로, 상기 IgE Fc 수용체의 알파 서브유닛은 NP_001992.1에 기재된 아미노산 서열로 이루어진 것일 수 있다. 또한, IgE Fc 수용체의 알파 서브유닛의 세포외 도메인(FcεRIa-ECD)은 서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어진 것일 수 있다. 상기 FcεRIa-ECD는 IgE와 결합할 수 있는 한, FcεRIa-ECD의 단편 또는 이의 변이체일 수 있다. 또한, 서열번호 1의 FcεRIa-ECD는 서열번호 5로 표시되는 폴리뉴클레오티드에 의해 암호화되는 것일 수 있다.

[39] 상기 변이체는 FcεRIa-ECD의 기능을 변형시키지 않는 한, 야생형

FcεRIa-ECD에서 하나 이상의 아미노산을 치환, 결실 또는 추가하는 방법을 통하여 수행될 수 있다. 상기 변이체는 서열번호 1의 아미노산 서열과 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 이상의 상동성을 갖는 것일 수 있다.

[40] 이때, 상기 Fc 영역은 야생형 Fc 영역 또는 변형된 Fc 영역일 수 있다. 또한, 본 발명에서 사용하는 용어 "변형된 Fc 영역"이란, 항체의 Fc 부분 중 일부가 변형된 영역을 의미한다. 이때, 상기 Fc 영역은 면역글로불린의 중쇄 불변 영역 2(CH2) 및 중쇄 불변 영역 3(CH3)을 포함하며, 면역글로불린의 중쇄 및 경쇄의 가변 영역 및 경쇄 불변 영역 1(CH1)은 포함하지 않는 단백질을 말한다. 특히, 변형된 Fc 영역은 Fc 영역 중 일부 아미노산이 치환되거나, 서로 다른 종류의 Fc 영역을 조합하여 제조된 것일 수 있다. 구체적으로, 상기 변형된 Fc 영역은 서열번호 2의 아미노산 서열로 이루어진 것일 수 있다. 또한, 서열번호 2의 변형된 Fc 영역은 서열번호 6으로 표시되는 폴리뉴클레오티드에 의해 암호화되는 것일 수 있다.

[41] 또한, 상기 변형된 Fc 영역은 천연형 당쇄 또는 천연형에 비해 증가된 당쇄 일 수 있다. 화학적 방법, 효소적 방법 및 미생물을 사용한 유전공학적 엔지니어링 방법 등과 같이 통상적인 방법으로 면역글로불린 Fc 당쇄를 변형시킬 수 있다. 또한, 상기 변형된 Fc 영역은 Fc gamma 수용체(FcγR) 또는 C1q(complement component 1q)에 대한 결합 부위를 갖지 않음으로 ADCC(antibody dependent Cellular Cytotoxicity) 및 CDC(Complement dependent Cytotoxicity) 기능이 결여된 것일 수 있다.

[42] 일 구체예로, 상기 변형된 Fc 영역은 FcεRIα-ECD와 IgD의 힌지를 통해 결합될 수 있다. 상기 힌지는 면역글로불린 IgD에서 유래한 힌지 영역 또는 이의 변이체일 수 있다. 천연형 IgD의 힌지 영역은 64개 아미노산으로 이루어져 있다. 상기 면역글로불린 IgD에서 유래한 힌지 영역 또는 이의 변이체는 20 내지 60개의 연속된 아미노산, 25 내지 50개의 연속된 아미노산 또는 30 내지 40개의 아미노산으로 이루어진 것일 수 있다. 이때, 상기 힌지 변이체는 단백질 생산 과정에서 절단형 발생을 최소화하기 위해 IgD의 힌지 영역의 아미노산 서열의 일부를 변형한 것일 수 있다.

[43] 일 구체예로, 상기 면역글로불린 IgD에서 유래한 힌지 영역 또는 이의 변이체는 30개 또는 49개의 아미노산으로 이루어진 것일 수 있다. 상기 면역글로불린 IgD에서 유래한 힌지 영역 또는 이의 변이체는 적어도 하나의 시스테인을 포함할 수 있다.

[44] 일 실시예로, 상기 면역글로불린 IgD에서 유래한 힌지 영역 또는 이의 변이체는 다음과 같은 서열을 포함할 수 있다:

[45] Arg Asn Thr Gly Arg Gly Gly Glu Glu Lys Lys Xaa1 Xaa2 Lys Glu Lys Glu Glu Gln Glu Glu Arg Glu Thr Lys Thr Pro Glu Cys Pro (서열번호 17), 이때, Xaa1은 Lys 또는 Gly일 수 있으며, Xaa2는 Glu, Gly 또는 Ser일 수 있다. 구체적으로, 상기 면역글로불린 IgD에서 유래한 힌지 영역 또는 이의 변이체는 서열번호 3 및

서열번호 19의 아미노산 서열을 가질 수 있고, 이를 통해 단백질 생산 과정에서 절단형 발생을 최소화할 수 있다.

[46] 또한, 다른 실시예로, 상기 면역글로불린 IgD에서 유래한 힌지 영역 또는 이의 변이체는 다음과 같은 서열을 포함할 수 있다:

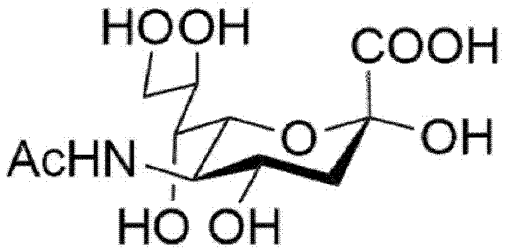
[47] Ala Gln Pro Gln Ala Glu Gly Ser Leu Ala Lys Ala Thr Thr Ala Pro Ala Thr Thr Arg Asn Thr Gly Arg Gly Gly Glu Glu Lys Lys Xaa3 Xaa4 Lys Glu Lys Glu Glu Gln Glu Glu Arg Glu Thr Lys Thr Pro Glu Cys Pro (서열번호 18)이며, 이때, Xaa3은 Lys 또는 Gly이며, Xaa4는 Glu, Gly 또는 Ser일 수 있다. 구체적으로, 상기 면역글로불린 IgD에서 유래한 힌지 영역 또는 이의 변이체는 서열번호 4의 아미노산 서열을 가질 수 있고, 이를 통해 단백질 생산 과정에서 절단형 발생을 최소화할 수 있다.

[48] 특히, 서열번호 4로 표시되는 아미노산으로 이루어진 면역글로불린 IgD에서 유래한 힌지 영역 또는 이의 변이체에 있어서, 트레오닌(Thr) 중 적어도 하나는 당화(glycosylation)될 수 있다. 구체적으로, 서열번호 18로 표시되는 아미노산 서열 중, 13번째, 14번째, 18번째 및 19번째의 트레오닌이 당화될 수 있다. 바람직하게, 상기 4개의 트레오닌이 모두 당화될 수 있다. 이때, 상기 당화는 O-당화(O-glycosylation)일 수 있다.

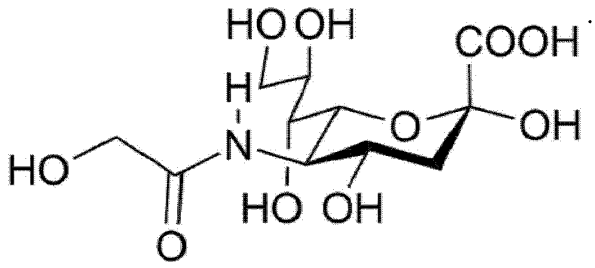
[49] 당단백질 의약품에 부착되어 있는 당사슬은 치료 효능, 체내 지속성, 타겟팅 및 면역반응 등에 있어서 중요한 역할을 수행하기에 품질을 결정하는 주요 인자 중 하나이다. 당사슬의 말단이 시알산으로 끝나지 않은 폴리펩티드 이량체는 체내에서 빠르게 제거됨을 확인하였다.

[50] 본 발명에서 사용하는 용어 "시알산"은 하기 화학식 1의 N-아세틸뉴라민산(Neu5Ac) 및 화학식 2의 N-글리코릴뉴라민산(Neu5Gc)을 포함할 수 있다:

[51] [화학식 1]

[52] 

[53] [화학식 2]

[54] 

[55] 이때, 일 구체예로, 시알산 함량이 높은 폴리펩티드 이량체는 N-아세틸뉴라민산의 함량이 높은 것일 수 있다.

[56] 또한, 폴리펩티드 이량체의 시알산 함량은 정제 방법을 통하여 높일 수 있다. 또한, 시알산 전이효소 유전자가 도입된 세포에서 폴리펩티드 이량체를 생산함으로써, 상기 폴리펩티드 이량체의 시알산 함량을 높일 수 있다.

[57] 상기 시알산 함량이 높은 폴리펩티드 이량체는 시알산/폴리펩티드 이량체의 몰 비율이 8 이상인 것을 특징으로 하는 것일 수 있다. 예를 들어, 상기 시알산 함량이 높은 폴리펩티드 이량체는 시알산/폴리펩티드 이량체의 몰 비율(mol/mol)이 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 또는 30인 것일 수 있다. 바람직하게는, 상기 시알산 함량이 높은 폴리펩티드 이량체는 시알산/폴리펩티드 이량체의 몰 비율이 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 또는 25인 것일 수 있다.

[58] 일 구체예로, 상기 시알산 함량이 높은 폴리펩티드 이량체는 시알산/폴리펩티드 이량체의 몰 비율이 적어도 8, 적어도 9, 적어도 10, 적어도 11, 적어도 12, 적어도 13, 적어도 14, 적어도 15, 적어도 16, 적어도 17, 적어도 18, 적어도 19, 적어도 20, 또는 적어도 21일 수 있다. 또한, 상기 시알산 함량이 높은 폴리펩티드 이량체의 시알산/폴리펩티드 이량체의 몰 비율은 8 내지 30, 또는 12 내지 25일 수 있다. 또한, 상기 시알산 함량이 높은 폴리펩티드 이량체는 시알산/폴리펩티드 이량체의 몰 비율은 10 내지 25, 11 내지 24, 12 내지 23 일 수 있다. 또한, 상기 시알산 함량이 높은 폴리펩티드 이량체의 시알산/폴리펩티드 이량체의 몰 비율은 13 내지 22, 14 내지 22, 15 내지 22, 16 내지 22, 17 내지 22, 18 내지 22 또는 19 내지 22일 수 있다. 이때, 상기 시알산은 N-아세틸뉴라민산일 수 있다.

[59] 또한, 상기 시알산은 IgE Fc 수용체의 알파 서브유닛의 세포외 도메인(FcεRIa-ECD) 및 Fc 영역을 포함하는 단량체에서 8개의 위치에 결합할 수 있다. 이때, 시알산은 상기 위치 중 적어도 4개 이상의 위치에 결합할 수 있다. 구체적으로, 상기 시알산은 단량체에 4개, 5개, 6개, 7개 또는 8개의 위치에 결합할 수 있다.

[60] 본 발명에서 제공하는 시알산 함량이 높은 폴리펩티드 이량체는 상술한 바와 같이, IgE Fc 수용체의 알파 서브유닛의 세포외 도메인과 변형된 Fc 영역이 결합된 단량체 두 개가 결합된 형태일 수 있다. 상기 시알산 함량이 높은

폴리펩티드 이량체는 동일한 두 개의 단량체가 힌지 부위에 위치한 시스테인에 의해 결합된 형태일 수 있다. 또한, 상기 시알산 함량이 높은 폴리펩티드 이량체는 서로 상이한 단량체 두 개가 결합된 형태일 수 있다.

[61] 이때, 각각의 폴리펩티드 단량체는 동일한 위치에 시알산을 포함할 수 있으나, 서로 다른 위치에 시알산을 포함할 수 있다. 또한, 시알산/폴리펩티드 이량체의 몰 비율이 8 이상일 경우라면, 이량체를 구성하는 각각의 단량체는 서로 상이한 시알산/폴리펩티드의 몰 비율을 가질 수 있다.

[62] 또한, 상기 폴리펩티드 이량체는 서로 상이한 두 개의 단량체를 포함할 수 있다. 구체적으로, 하나의 단량체는 IgE Fc 수용체의 알파 서브유닛의 세포외 도메인을 포함하고, 다른 단량체는 IgE Fc 수용체의 알파 서브유닛의 세포외 도메인의 단편을 포함한 형태일 수 있다. 이때, 상기 단량체의 일 구체예는 서열번호 20, 서열번호 21 또는 서열번호 22로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진 것일 수 있다.

[63] 또한, 본 발명에서 제공하는 시알산 함량이 높은 폴리펩티드 이량체는 항-IgE 항체인 오말리주맙 대비 10 내지 100배, 20 내지 90배, 20 내지 70배, 30 내지 70배 또는 40 내지 70배 높은 IgE 결합력을 나타내며, 바람직하게는 오말리주맙 대비 약 70배 높은 IgE 결합력을 나타낼 수 있다.

[64] 본 발명의 다른 측면은, 상기 시알산 함량이 높은 폴리펩티드 이량체를 포함하는 알러지 질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[65] 상기 폴리펩티드 이량체는 상술한 바와 동일하다. 특히, 상기 약학적 조성물은 피하 주사제용인 것을 특징으로 할 수 있다. 시알산 함량이 높은 폴리펩티드 이량체의 경우에는 피하 주사시에 시알산 함량이 낮은 폴리펩티드 이량체에 비해 알러지 질환의 치료 및/또는 예방에 효과가 있음을 확인하였다.

[66] 본 발명에서 사용하는 용어 "알러지 질환"이란, 비만세포의 탈과립 등 비만세포의 활성화가 매개된 알러지 반응으로 인하여 초래되는 병리적 증상을 의미한다. 예를 들어, 상기 알러지 질환은 식품 알러지, 아토피 피부염(atopic dermatitis), 천식(asthma), 알러지성 비염(allergic rhinitis), 알러지성 결막염(allergic conjunctivitis), 알러지성 피부염(allergic dermatitis), 만성 특발성 두드러기(chronic idiopathic urticarial) 및 알러지성 접촉성 피부염(allergic contact dermatitis)으로 구성된 군에서 선택된 하나일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 특히, 상기 알러지 질환은 IgE에 의해 매개되는 질환일 수 있다.

[67] 상기 약학적 조성물 내에서 폴리펩티드 이량체는 항알러지 활성을 나타낼 수 있는 한, 용도, 제형, 배합 목적 등에 따라 임의의 양(유효량)으로 포함될 수 있는데, 통상적인 유효량은 조성물 전체 중량을 기준으로 할 때 0.001 중량% 내지 20.0 중량% 범위에서 결정될 수 있다. 상기 유효량은 항알러지 효과를 유도할 수 있는 양을 의미한다. 이러한 유효량은 당업자에 의해 결정될 수 있다.

[68] 상기 약학적 조성물은 약학적으로 허용 가능한 담체를 추가적으로 포함할 수 있다. 구체적으로, 상기 약학적 조성물은 약제학적으로 허용되는 담체를

포함하여 당업계에 공지된 통상의 방법으로 투여 경로에 따라 경구용 제형 또는 비경구용 제형으로 제조될 수 있다.

[69] 상기 약학적 조성물이 경구용 제형으로 제조될 경우, 적합한 담체와 함께 당업계에 공지된 방법에 따라 분말, 과립, 정제, 환제, 당의정제, 캡슐제, 액제, 겔제, 시럽제, 현탁액, 웨이퍼 등의 제형으로 제조될 수 있다. 이때, 약제학적으로 허용되는 적합한 담체의 예로서는 락토스, 글루코스, 슈크로스, 덱스트로스, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨 등의 당류, 옥수수 전분, 감자 전분, 밀 전분 등의 전분류, 셀룰로오스, 메틸셀룰로오스, 에틸셀룰로오스, 나트륨 카르복시메틸셀룰로오스, 하이드록시프로필메틸셀룰로오스 등의 셀룰로오스류, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 마그네슘 스테아레이트, 광물유, 맥아, 젤라틴, 탈크, 폴리올, 식물성유 등을 들 수 있다. 제제화할 경우 필요에 따라 충진제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 및/또는 부형제를 포함하여 제제화할 수 있다.

[70] 상기 약학적 조성물이 비경구용 제형으로 제조될 경우, 적합한 담체와 함께 당업계에 공지된 방법에 따라 주사제, 경피 투여제, 국소 투여제, 비강 흡입제 및 좌제의 형태로 제제화될 수 있다. 주사제로 제제화할 경우 적합한 담체로서는 멸균수, 에탄올, 글리세롤이나 프로필렌 글리콜 등의 폴리올 또는 이들의 혼합물을 사용할 수 있으며, 바람직하게는 링거 용액, 트리에탄올 아민이 함유된 PBS(phosphate buffered saline)나 주사용 멸균수, 5% 덱스트로스 같은 등장 용액 등을 사용할 수 있다.

[71] 상기 약학적 조성물의 제제화와 관련하여서는 당업계에 공지되어 있으며, 구체적으로 문헌[Remington's Pharmaceutical Sciences(19th ed., 1995)] 등을 참조할 수 있다.

[72] 상기 약학적 조성물의 바람직한 투여량은 환자의 상태, 체중, 성별, 연령, 환자의 중증도, 투여 경로에 따라 1일 0.01 ㎍/㎏ 내지 10 g/㎏ 범위, 바람직하게는 0.01 ㎎/㎏ 내지 1 g/㎏ 범위일 수 있다. 상기 약학적 조성물은 1일 1회 또는 투여량이 많은 경우에는 하루에 수회에 걸쳐 투여될 수 있다.

[73] 상기 약학적 조성물이 적용(처방)될 수 있는 대상은 포유동물이며, 예를 들어, 사람, 개 및 고양이일 수 있고, 특히 사람인 경우가 바람직하나 이에 한정되는 것은 아니다. 상기 약학적 조성물은 항알러지 활성의 상승 또는 보강을 위해, 이미 안전성이 검증되고 항알러지 활성을 갖는 공지된 임의의 화합물이나 천연 추출물을 추가로 포함할 수 있다.

[74] 본 발명자들은 안전하고 효과적인 알러지 질환 치료제를 개발하기 위해 연구한 결과, 시알산 함량이 높은 폴리펩티드 이량체가 시알산 함량이 낮은 폴리펩티드 이량체보다 IgE와의 결합능이 우수한 것을 확인하였다(표 3). 또한, 시알산 함량이 높은 폴리펩티드 이량체를 알러지 질환을 앓고 있는 개체에게 피하 투여하는 경우, 시알산 함량이 낮은 폴리펩티드 이량체보다 혈액 내 IgE 및

MCPT-1 농도를 효과적으로 감소시키며, 소정의 시간이 지난 후에도 그 효과가 지속되는 것을 확인하였다(도 13 및 도 14).

[75] 이에 본 발명의 또 다른 측면은, 상기 약학적 조성물을 포함하는 경피 패치(transdermal patch)를 제공한다. 또한, 본 발명의 또 다른 측면은, 약학적 조성물을 포함하는 국소 패치(topical patch)를 제공한다.

[76] 본 발명의 또 다른 측면은, 상기 시알산 함량이 높은 폴리펩티드 이량체를 포함하는 알러지 증상 개선 또는 완화용 식품 조성물을 제공한다.

[77] 상기 시알산 함량이 높은 폴리펩티드 이량체는 상술한 바와 동일하다. 또한, 상기 시알산 함량이 높은 폴리펩티드 이량체는 장내로 효율적인 전달을 위해 적절한 전달 수단과 결합될 수 있다.

[78] 또한, 상기 식품 조성물은 어떠한 형태로도 제조될 수 있으며, 예컨대 차, 쥬스, 탄산음료, 이온음료 등의 음료류, 우유, 요구루트 등의 가공 유류, 정제, 캡슐, 환, 과립, 액상, 분말, 편상, 페이스트상, 시럽, 겔, 젤리, 바 등의 건강기능식품 제제류 등으로 제조될 수 있다.

[79] 상기 식품 조성물은 법률상·기능상의 구분에 있어서 제조·유통 시점의 시행 법규에 부합하는 한 임의의 제품으로 구분될 수 있다. 예컨대 건강기능식품에 관한 법률에 따른 건강기능식품이거나, 식품위생법의 식품공전(식약처 고시, 식품의 기준 및 규격)상 각 식품유형에 따른 과자류, 두류, 다류, 음료류, 특수용도식품 등일 수 있다. 상기 식품 조성물에 포함될 수 있는 기타의 식품 첨가물과 관련해서는 식품위생법에 따른 식품공전이나 식품첨가물 공전을 참조할 수 있다.

[80] 본 발명의 또 다른 측면은, 상기 시알산 함량이 높은 폴리펩티드 이량체를 개체에 투여하는 단계를 포함하는 알러지 질환을 치료 또는 예방하는 방법을 제공한다. 상기 시알산 함량이 높은 폴리펩티드 이량체는 상술한 바와 동일하다.

[81] 상기 개체는 포유동물일 수 있으며, 바람직하게는 인간, 개 또는 고양이일 수 있다. 이때, 투여는 경구 또는 비경구를 통하여 투여할 수 있다. 이때, 비경구는 피하 투여, 정맥 투여, 점막 투여, 근육 투여 등의 방법으로 수행될 수 있다.

[82] 상기 알러지 질환은 식품 알러지, 아토피 피부염(atopic dermatitis), 천식(asthma), 알러지성 비염(allergic rhinitis), 알러지성 결막염(allergic conjunctivitis), 알러지성 피부염(allergic dermatitis), 만성 특발성 두드러기(chronic idiopathic urticarial) 및 알러지성 접촉성 피부염(allergic contact dermatitis)으로 구성된 군에서 선택된 하나일 수 있다.

[83] 본 발명의 또 다른 측면은 알러지 질환을 예방하거나 치료하기 위한 상기 시알산 함량이 높은 폴리펩티드 이량체의 용도를 제공한다.

발명의 실시를 위한 형태

[84] 이하, 본 발명을 하기 실시예에 의하여 더욱 상세하게 설명한다. 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하기 위한 것일 뿐, 본 발명의 범위가 이들만으로

한정되는 것은 아니다.

[85] **실시예 1. FcεRIα-ECD과 Fc 영역을 포함하는 폴리펩티드의 제조**

[86] IgE Fc 수용체의 알파 서브유닛의 세포외 도메인(FcεRIα ECD)의 C-말단이 변형된 폴리펩티드는 미국 특허 7,867,491에 개시된 방법에 따라 제조하였다.

[87] 먼저, 서열번호 1의 아미노산 서열을 갖는 FcεRI의 α사슬의 세포외 도메인과 서열번호 2의 변형된 면역글로불린 Fc가 각각, 서열번호 19의 링커로 연결된 단백질(FcεRIαECD-Fc1), 서열번호 3의 링커로 연결된 단백질(FcεRIαECD-Fc2) 및 서열번호 4의 링커로 연결된 단백질(FcεR1αECD-Fc3)을 발현시키기 위하여, 각각의 단백질을 코딩하는 유전자를 연결한 카세트를 pAD15 벡터(제넥신)에 클로닝하여, FcεRIαECD-Fc 단백질 발현 벡터를 제작하였다. 그 후, 상기 발현 벡터를 각각 CHO DG44(from Dr. Chasin, Columbia University, USA) 세포에 형질주입하였다.

[88] 이때, 세포주에 형질 주입시 pCI Hygro 벡터(Invitrogen)에 α-2,6-시알산 전이효소 유전자가 클로닝된 발현 벡터를 동시에 형질주입하여, 시알산이 부가된 FcεRIαECD-Fc2ST 및 FcεRIαECD-Fc3ST 단백질을 발현할 수 있는 세포주를 별도로 제조하였다.

[89] 1차 스크리닝 과정으로 HT(5-hydroxytrypamine)가 없는 10% dFBS(Gibco, USA, 30067-334), MEMα(Gibco, 12561, USA, Cat No. 12561-049), HT+(Gibco, USA, 11067-030)) 배지를 사용하여 HT 선별을 수행하였다. 이후, DHFR(dihydrofolate reductase)-시스템을 이용하여 생산성을 증폭시키기 위해, HT 선별된 클론들을 이용하여 메토트렉사트(MTX) 증폭을 수행하였다.

[90] MTX 증폭이 완료된 후 생산성 평가를 위한 세포 안정화를 위해 1회 내지 5회 정도 계대 배양을 진행하였다. 그 후, MTX 증폭이 된 세포의 단위 생산성 평가를 수행하였고, 그 결과는 하기 표 1에 나타내었다.

[91] [표1]

Version	Media	MTX conc.	Productivity		
			3-day culture		Batch culture(㎎/㎖)
			㎍/㎖	㎍/10^6 cells	
FcεRIαECD-Fc2	Ex-cell DHFR	500nM	37.23	20.9	225
FcεRIαECD-Fc2+a2,6-ST		100nM	45.4	25.1	338.2
FcεRIαECD-Fc3		2uM	27.0	16.9	180.4
FcεRIαECD-Fc3+a2,6-ST		1uM	17.5	10.2	101.7

[92] 상기 표 1에 기재된 바와 같이, FcεRIαECD-Fc3 세포주는 2 μM 메토트렉사트

증폭한 후 16.9 $\mu g/10^6$ cells 생산성을 나타내었다. 반면, 2,6-시알산 전이효소가 공동 형질주입된 FcεRIαECD-Fc3 세포주(FcεRIαECD-Fc3ST)는 1 μM 메토트렉사트 증폭 후 10.2 $\mu g/10^6$ cells 생산성을 나타내었다. 또한, FcεRIαECD-Fc2 세포주는 0.5 μM 메토트렉사트 증폭 조건에서 20.9 $\mu g/10^6$ cells 생산성을 나타내었다. 또한, 2,6-시알산 전이효소가 공동 형질주입된 FcεRIαECD-Fc2 세포주(FcεRIαECD-Fc2ST)는 0.1 μM 메토트렉사트 증폭후 25.1 $\mu g/10^6$ cells 생산성을 나타내었다. 즉, 0.1 μM 메토트렉사트 증폭 조건에서 선별된 2,6-시알산 전이효소가 공동 형질주입된 FcεRIαECD-Fc2ST 세포주가 생산성이 가장 우수한 것을 확인하였다.

[93] 상기 FcεRIαECD-Fc2 세포주로부터 생산된 폴리펩티드(FcεRIαECD-Fc)를 "FcεRIαECD-Fc2"로 명명하였으며, FcεRIαECD-Fc2+a2,6-ST 세포주로부터 생산된 폴리펩티드를 "FcεRIαECD-Fc2ST"로 명명하였다. 또한, 상기 FcεRIαECD-Fc3 세포주로부터 생산된 폴리펩티드를 "FcεRIαECD-Fc3"으로 명명하였으며, FcεRIαECD-Fc3+a2,6-ST 세포주로부터 생산된 폴리펩티드를 "FcεRIαECD-Fc3ST"로 명명하였다.

[94] **실시예 2. 폴리펩티드(FcεRIα ECD-Fc)의 정제 및 순도 확인**

[95] 상기 실시예 1에서 선별된 세포주 중 i) FcεRIαECD-Fc3 세포주, ii) FcεRIαECD-Fc3+a2,6-ST 세포주, iii) FcεRIαECD-Fc2+a2,6-ST 세포주를 60 ㎖ 용량의 배지에서 배치배양(batch culture)하였다. 상기 배양액을 Protein-A affinity column을 이용하여 FcεRIα ECD-Fc를 정제한 후, 상기 정제된 FcεRIα ECD-Fc를 SE-HPLC(Size-Exclusion High performance liquid chromatography) 및 SDS-PAGE를 수행하여 폴리펩티드의 순도를 확인하였다.

[96] 구체적으로, SDS-PAGE는 비환원(non-reducing) 조건으로 진행하였다. 상기 비환원 조건은 각각의 정제된 폴리펩티드를 비환원 샘플 버퍼(Non-Reducing sample buffer)와 혼합한 후, Mini-Protean TGX™ gels(Bio-Rad)에서 TGS(Tris Glycine SDS) 버퍼, 200V 조건에서 30분 동안 전기영동하였다. 전기영동 후, 단백질은 쿠마시 브릴리언트블루(Coomassie Brilliant Blue) 용액으로 염색하였다. 그 결과를 표 2 및 도 1에 나타내었다.

[97] [표2]

Lane #	Sample	Purification	Purity(SE-HPLC)	Sample condition	
M	Protein standard	One-step(Protein-A affinity column)Purification	-	-	-
1	FcεRIαECD-Fc3		94.5%	-	Non-reducing
2	FcεRIαECD-Fc3ST		93.7%		
3	FcεRIαECD-Fc2ST		93.2%		
4	FcεRIαECD-Fc3		94.5%	Freezing/Thawingtest	
5	FcεRIαECD-Fc3ST		93.7%		
6	FcεRIαECD-Fc2ST		93.2%		

[98] 상기 표 2에서 나타난 바와 같이, SE-HPLC 방법으로 정제된 각각의 폴리펩티드의 순도는 모두 93% 이상인 것을 확인하였다. 비환원 조건(Non-reducing condition)에서 절단된 형태 등의 불순물이 나타나지 않았으며, 특히, 해동(thawing)/냉동(freezing)의 과정을 거친 후에도 모두 순도가 93% 이상이었고 불순물이 없는 것을 확인하였다.

[99] **실험예 1. 폴리펩티드(FcεRIα ECD-Fc)의 이량체 형성 확인**

[100] 상기 실시예 1에서 선별된 세포주 중 i) FcεRIαECD-Fc3 세포주, ii) FcεRIαECD-Fc3+a2,6-ST 세포주, iii) FcεRIαECD-Fc2+a2,6-ST 세포주를 60 ㎖ 용량의 배지에서 배치배양하였다. 그 후, 배양 상등액과 Protein-A affinity column을 이용하여 폴리펩티드를 정제한 정제물을 SE-HPLC 및 SDS-PAGE를 수행하였다. 이때, 배양 상등액 및 정제물을 비환원 조건 및 환원 조건에서 각각 수행하였다.

[101] 상기 비환원 조건은 실시예 2와 동일하게 진행하였다. 한편, 환원(reducing) 조건은 각각의 정제된 폴리펩티드를 2-메르캅토에탄올(Mercaptoethanol)을 포함하는 환원 샘플 버퍼(reducing sample buffer)와 혼합한 후, 100℃ 온도에서 5분 동안 변성(denature)시켰다. 그 후 Mini-Protean TGX™ gels(Bio-Rad)에서 TGS 버퍼를 사용하여 200V 조건에서 30분 동안 전기영동하였다. 전기영동 후, 단백질은 쿠마시 브릴리언트블루(Coomassie Brilliant Blue) 용액으로 염색하였다.

[102] 그 결과, 비환원 조건에서 약 150 kDa 크기의 폴리펩티드가 검출되었고, 환원 조건에서 약 75 kDa 크기의 폴리펩티드가 검출되었다. 이를 통해 폴리펩티드가 이량체를 형성하고 있음을 확인하였다(도 2). 특히, 인풋(Input)에 해당하는 배양 상등액에서도 폴리펩티드 이량체의 순도가 높은 것을 알 수 있고, 이 배양 상등액을 친화성 컬럼(affinity column)을 통과시켜 얻은 샘플(FT; Flow Through)에는 폴리펩티드가 전혀 검출되지 않지만 용출된 샘플에서는

검출되었다. 또한, 용출된 샘플이 pH가 낮아 1 M Tris buffer(pH 9.0)로 금방 중화를 시킨 샘플(Elute_N)과 그렇지 않은 샘플(Elute)을 비교했을 경우에도 큰 차이는 관찰되지 않았다(도 2).

[103] 또한, 정제물에서 매우 높은 순도(98% 이상)의 폴리펩티드가 정제되었을 뿐 아니라, 배양 상등액에서도 매우 높은 순도로 폴리펩티드가 발현되어 있는 것을 확인하였다. 이는 상기 세포주들에서 발현된 폴리펩티드를 의약품으로 개발하는데 있어, 공정 개발 단계가 간소화될 수 있고 결과적으로 의약품으로의 개발 비용이 현저한 절감될 수 있는 가능성이 매우 높음을 의미한다.

[104] **실험예 2. 폴리펩티드 이량체의 IgE 결합능 확인**

[105] 실시예 1에서 생산된 i) FcεRIαECD-Fc2, ii) FcεRIαECD-Fc2ST, iii) FcεRIαECD-Fc3 및 iv) FcεRIαECD-Fc3ST의 폴리펩티드들을 상기 실시예 2와 동일한 방법으로 정제한 정제물과 시중에 판매되고 있는 항-IgE 항체인 오말리주맙(Omalizumab, 상품명: 졸레어(Xolair))에 대하여 IgE 결합력을 비교 측정하였다.

[106] 구체적으로, IgE 결합력은 Protein GLC sensor chip(Bio-Rad, Cat #. 176-5011)의 채널에 IgE를 코팅하고, 오말리주맙 또는 각각의 FceR1αECD-Fc 단백질을 여러 농도로 30 ㎕/min의 속도로 흘려주었다. 이때, 재생버퍼인 25 mM 농도의 수산화나트륨 용액을 이용하여 제로-베이스(zero-base)를 확인한 후, 상기 단계를 반복하여 측정하였다. 그 후, 단백질 결합 분석기기(Proteon XPR36, BIO-RAD, USA)를 이용하여 결합곡선을 확인하였으며, 그 결과를 표 3에 나타내었다.

[107] [표3]

SamplesItems		FcεRIa ECD-Fc		오말리주맙	비고
Drug type		Fc 융합 단백질		Anti-IgE Ab	
Bindingaffinity	ka (Association rate)	Fc2	2.14×10^{5}	4.05×10^{5}	오말리주맙 대비 1.9배 약함
		Fc2ST	2.64×10^{5}		오말리주맙 대비 1.5배 약함
		Fc3	1.98×10^{5}		오말리주맙 대비 2.0배 약함
		Fc3ST	2.40×10^{5}		오말리주맙 대비 1.7배 약함
	kd (Dissociation rate)	Fc2	8.29×10^{-5}	6.02×10^{-3}	오말리주맙 대비 73배 좋음
		Fc2ST	5.69×10^{-5}		오말리주맙 대비 106배 좋음
		Fc3	1.33×10^{-4}		오말리주맙 대비 45배 좋음
		Fc3ST	1.49×10^{-4}		오말리주맙 대비 40배 좋음
	KD (kd/ka)	Fc2	3.88×10^{-10}	1.49×10^{-8}	오말리주맙 대비 38배 좋음
		Fc2ST	2.16×10^{-10}		오말리주맙 대비 69배 좋음
		Fc3	6.72×10^{-10}		오말리주맙 대비 22배 좋음
		Fc3ST	6.21×10^{-10}		오말리주맙 대비 24배 좋음

[108] 상기 표 3에 나타난 바와 같이, 본 발명의 일 구체예에 따른 폴리펩티드 이량체와 IgE의 결합상수(Association rate, ka) 값은 오말리주맙과 비교하여 1.5 내지 2.0배 작은 것으로 측정되었다. 즉, IgE 외의 물질과의 결합력이 오말리주맙에 비해 1.5 내지 2.0배 정도 낮은 것을 알 수 있었다. 또한, 본 발명의 일 구체예에 따른 폴리펩티드 이량체의 해리상수(Dissociation rate, kd) 값은

오말리주맙과 비교하여 40 내지 106배 큰 것으로 측정되었다. 결과적으로, 본 발명의 일 구체예에 따른 폴리펩티드 이량체의 평형상수(Equilibrium dissociation constant, KD <kd/ka>) 값은 오말리주맙과 비교하여 22 내지 69배 높은 것을 알 수 있다. 이를 통해, 본 발명의 일 구체예에 따른 폴리펩티드 이량체는 오말리주맙과 비교하여 IgE에 대한 결합능이 현저히 증가한 것을 알 수 있다. 특히, 시알산이 부가된 폴리펩티드 이량체(FcεRIαECD-Fc2ST)가 오말리주맙 대비 69배로 IgE 결합력이 가장 우수한 것을 확인하였다.

[109] 또한, 도 3 및 도 4에서 나타난 바와 같이, 오말리주맙은 IgE와 결합한 후 일정 시간이 지나면 결합이 떨어지는 반면, 본 발명의 일 구체예에 따른 폴리펩티드 이량체(FcεRIαECD-Fc2ST, IgE_{TRAP})는 일단 IgE와 결합한 후에는 IgE와 떨어지지 않는 것을 확인할 수 있었다. 즉, 본 발명의 일 구체예에 따른 폴리펩티드 이량체는 IgE와 쉽게 분리되지 않고, 결합된 상태로 유지되는 능력이 오말리주맙에 비해 월등히 좋은 것을 확인하였다.

[110] **실험예 3. 폴리펩티드 이량체와 IgG 수용체의 결합능 확인**

[111] 본 발명의 일 실시예에 따른 폴리펩티드 이량체(FcεRIαECD-Fc2ST, IgE_{TRAP}) 또는 오말리주맙(omalizumab, Xolair)의 IgG의 Fc gamma 수용체와의 결합능을 Octet RED384 시스템(Pall ForteBio, CA, USA)을 이용하여 확인하였다.

[112] 구체적으로, 활성화된 AR2G 바이오 센서에 Fc gamma 수용체인 FcγRI, FcγRIIA, FcγRIIB, FcγRIIIA 또는 FcγRIIIB 재조합 단백질(R & D 시스템, 5 ㎍/㎖)을 300 mM 아세테이트 완충액(pH 5)에 고정화 하였다. 이때, 0.1% Tween-20 및 1% BS(bovine serum)가 포함된 PBS를 러닝버퍼(Running buffer)로 사용하였다. 모든 측정은 샘플 플레이트 쉐이커 1,000 rpm 속도로 30℃ 온도에서 진행하였다. 상기 측정 결과를 도 5a 내지 도 5e에 나타내었고, 오말리주맙과 폴리펩티드 이량체의 IgG Fc gamma 수용체와의 결합능을 수치화하여 도 6에 나타내었다.

[113] 그 결과, 오말리주맙은 IgG의 Fc gamma 수용체와 높은 결합능을 나타낸 반면, 폴리펩티드 이량체는 IgG의 Fc gamma 수용체와의 결합능이 현저히 낮은 것을 확인하였다. 이를 통해, 폴리펩티드 이량체가 IgG의 Fc gamma 수용체와 결합하지 않는 것을 확인하였다.

[114] **실험예 4. 마우스 골수 유래 비만세포에서 베타-헥소사미니다제 어세이를 통한 폴리펩티드 이량체의 활성 확인**

[115] 본 발명의 일 실시예에 따른 폴리펩티드 이량체들의 *in vitro* 활성을 분석하기 위하여 베타-헥소사미니다제 분석을 수행하였다.

[116] 구체적으로, 본 발명의 일 구체예에 폴리펩티드 이량체(FcεRIαECD-Fc2)를 농도별로 IgE(1 ㎍/㎖)와 혼합하여, 20℃ 온도에서 30분간 인큐베이션(incubation)시켜 시료를 준비하였다. 또한, 비만세포 활성화를 위해 배양중인 마우스 골수 유래 비만세포(mast cell)를 HBSS(Hank's balanced salt solution) 버퍼로 세척하여 배지를 제거하였으며, 세포수를 측정한 후, $5x10^5$ 개의

세포들을 40 ㎕의 HBSS 버퍼에 재부유시켰다.

[117] 상기 준비한 시료 50 ㎕를 활성화된 비만세포에 첨가하였다. 그 후, 37℃ 온도에서 30분간 5% CO_2 배양기에서 30분 동안 배양하였다. 이후, 외래 항원(DNP(2,4-dinitrophenol), 100 ng/㎖)을 10 ㎕씩 첨가한 후, 다시 37℃ 온도에서 30분간 5% CO_2 배양시킨 다음 상층액을 30 ㎕ 분리하였다.

[118] 분리된 상층액 30 ㎕와 기질(4-Nitrophenyl N-acetyl-β-D-glucosaminide, 5.84 mM) 30 ㎕를 잘 혼합한 후, 37℃ 온도에서 20분간, 5% CO_2조건에서 배양하였다. 그 후, 정지용액(Stop solution)인 0.1 M 소디움 카보네이트 버퍼(sodium carbonate buffer, pH 10) 140 ㎕를 넣고 반응을 종결시켰다. 이후, 405 nm 파장에서 흡광도를 측정하여 활성화된 비만세포에서 외래 항원에 의해 분비되는 베타-헥소사미니다제(β-hexosaminidase)의 분비량을 확인하였고, 그 결과를 도 7에 나타내었다.

[119] 도 7에 나타난 바와 같이, IgE와 본 발명의 폴리펩티드 이량체의 농도가 1:1인 경우부터 IgE의 활성이 크게 억제되는 것을 확인하였다. 즉, 본 발명의 일 구체예의 폴리펩티드 이량체가 IgE와 동일한 농도가 있을 때에도 반응하는 것을 확인하였다.

[120] **실험예 5. 인간 FcεRI 발현 마우스 골수 유래 비만세포에서 베타-헥소사미니다제 어세이를 이용한 폴리펩티드 이량체 및 인간 항-IgE 항체의 활성 비교**

[121] 본 발명의 일 실시예에 따른 폴리펩티드 이량체(FcεRIαECD-Fc2ST, IgE_{TRAP})와 인간 항-IgE 항체인 졸레어(Xolair, omalizumab)의 활성을 비교하기 위해, 베타-헥소사미니다제 분석을 진행하였다.

[122] 각각의 폴리펩티드 이량체와 졸레어를 농도별로 준비한 후, 인간 IgE(1 ㎍/㎖)와 혼합한 후 상온에서 30분간 인큐베이션시켜 시료를 준비하였다. 또한, 인간 FcεRI 유전자가 도입되고, 마우스 FcεRI 유전자가 제거된 마우스의 골수로부터 유래 및 분화된 비만세포를 준비하였다. 준비한 비만세포들을 HBSS 버퍼로 세척해준 후, $5x10^5$ 개의 세포들을 60 ㎕의 HBSS 버퍼에 재부유시켰다.

[123] 그 후, 상기 준비한 시료 20 ㎕를 비만세포에 첨가한 후 37℃ 온도에서 30분간 5% CO_2 배양기에서 배양하였다. 이후 인간 항-IgE 항체(Biolegend, Cat No. 325502, 0.5 ㎍/㎖)를 20 ㎕ 첨가한 후, 다시 37℃ 온도에서 30분간 5% CO_2 배양기에서 배양하였다. 이후 1,500 rpm 및 4℃ 온도 조건에서 원심분리를 한 후, 상층액 30 ㎕를 분리하였다. 분리한 상층액 30 ㎕와 기질(4-Nitrophenyl N-acetyl-β-glucosaminide, 5.84 mM) 30 ㎕를 잘 혼합한 후, 37℃ 온도에서 25분간 5% CO_2 배양기에서 배양하였다. 그 후, 0.1 M 소디움 카보네이트 버퍼(sodium carbonate buffer, pH10) 140 ㎕를 넣고 반응을 종결시켰다. 이후, 405 nm 파장에서 흡광도를 측정하여, 분비된 베타-헥소사미니다제(β-hexosaminidase)의 상대량을 비교하여 각 시료의 농도에 따른 비만세포 억제효과를 확인하였다. 그 결과는 도 8에 나타내었다.

[124] 도 8에 나타난 바와 같이, 폴리펩티드 이량체의 IC_{50}은 대략 11.16 ng/㎖로 측정되었고, 졸레어의 IC_{50}은 대략 649.8 ng/㎖로 측정되었다. 따라서, 폴리펩티드 이량체가 졸레어에 비해 58배 정도 높은 비만세포 활성 억제력이 있음을 확인하였다.

[125] **실험예 6. 식품 알러지 모델에서 *in vivo* 에세이를 통한 폴리펩티드 이량체의 활성 확인**

[126] Balb/c 마우스(오리엔트바이오)들에 대하여 OVA(ovalbumin) 50 ㎍ 및 알럼(Alum) 1 ㎎을 14일 간격으로 2회 복강 투여하여 감작(sensitization)을 유발하였다. 이후, 28, 30, 32, 34, 36일째, 총 5회에 걸쳐 OVA 50 ㎎을 경구 투여하여 장에 음식물 알러지를 유발하였다.

[127] 상기 OVA를 2회 경구 투여한 후, 31일째에 상기 마우스를 7마리씩 3개의 그룹으로 분류하였다. 제1그룹인 폴리펩티드 이량체(FcεRIαECD-Fc2ST)를 고농도(200 ㎍)로 투여하는 군, 제2그룹인 저농도(20 ㎍)로 투여하는 군 및 제3그룹인 투여하지 않는 군으로 분류하였다.

[128] 상기 OVA를 경구 투여하면서 음식물 알러지 유발에 따라 설사 발생 여부를 확인하였다. 또한, 37일째 상기 마우스를 희생시켜 각 그룹에 속한 마우스에 대하여 소장 내 비만세포의 수, 혈중 IgE 농도 및 혈중 비만세포의 탈과립 효소 농도(MCPT-1, Mast cell protease-1)를 분석하였다.

[129] 그 결과, 도 9에 나타난 바와 같이, 제3그룹의 마우스는 2번째 OVA를 경구 투여한 후부터 설사가 발생하였다. 반면, 제1그룹 및 제2그룹의 마우스는 3번째 OVA를 경구 투여한 후부터 설사가 발생하였다. 특히, 제1그룹의 마우스는 제2그룹의 마우스보다 설사 발생 빈도가 낮았으며, 이를 통해, 폴리펩티드 이량체의 농도에 비례하여 식품 알러지 효과가 증가하는 것을 확인하였다.

[130] **실험예 7. 폴리펩티드 이량체의 시알산 함량 분석**

[131] 상기 실시예 1에서 제조한 FcεRIαECD-Fc2+a2,6-ST 세포주로부터 생산된 폴리펩티드의 생산율이 가장 높고, 실험예 4 내지 6에서 폴리펩티드 이량체(FcεRIαECD-Fc2ST)의 항알러지 효과가 우수하다는 점에서 착안하여, 시알산 함량에 따른 폴리펩티드 이량체의 항알러지 효능에 대해 알아보고자 폴리펩티드 이량체(FcεRIαECD-Fc2ST)의 시알산 함량을 분석하였다.

[132] 구체적으로, 상기 실시예 1에서 제조한 FcεRIαECD-Fc2+a2,6-ST 세포주로부터 생산된 폴리펩티드 이량체(FcεRIαECD-Fc2ST)의 글리칸(glycan) 구조에 포함된 시알산 함량을 측정하기 위해, 먼저 시알산 분해 효소인 시알리데이즈(sialidase)를 처리하여 시알산을 분리시켰다. 그 후, 분리된 시알산을 HPLC(waters, alliance e2659)를 이용하여 시알산을 분리, 검출 및 정량하였다.

[133] 상기 폴리펩티드 이량체를 pH 그래디언트(gradient)에 따라 3개의 샘플로 구분하여 분리 및 정제하였다. 3개의 시료를 AmiconUltra 10K(Millipore, UFC501096) 필터에 넣고, 13,000 rpm, 4℃ 온도의 조건으로 10분 동안

원심분리하였으며, 5회 반복하여 농축액을 탈이온수로 교환하고 농축하였다. 시료의 농도는 280 nm 파장에서 측정하였을 때, 10 ㎎/㎖ 이상이 되도록 하였다.

[134] 그 후, 각각의 시료들을 0.5 ㎎씩 취하여 EP 튜브에 넣고 시알리데이즈 (Roche, 10 269 611 001) 1 ㎕와 10 mM 농도의 인산 나트륨(sodium phosphate) 완충액(pH 7.0) 40 ㎕을 넣은 후, 최종 부피가 100 ㎕가 되도록 탈이온수를 넣었다. 각각의 시료를 2 ㎕씩 취하여 280 nm 파장에서 농도를 측정하여 확인된 농도 값을 최종 분석 농도로 사용하였다.

[135] 상기 시료를 37℃ 인큐베이터에서 18시간 동안 반응시킨 후, AmiconUltra 10K 필터에 넣고, 13,000 rpm, 4℃ 조건으로 15분간 원심분리하여 필터를 빠져나온 여과액을 분석에 사용하였다. HPLC 분석 조건은 하기 표 4에 나타내었다.

[136] [표4]

분석컬럼	RHM-monosaccharide H+ (8%) 300 X 7.8 mm (Rezex); 분석칼럼RHM-monosaccharide H+ (8%) 50 X 7.8 mm (Rezex); 가드칼럼
표준물질	NGNA: 2 ~ 40 μMNANA: 100 ~ 2000 μM
유량	0.55 ㎖/min
컬럼 온도	50℃
검출(Detection)	206 nm
주입량	5 ㎕
이동상	5 mN sulfuric acid in water
그래디언트/시간(Gradient / time)	등용매용리 / 45 분

[137] 시알산 함량 계산을 위한 표준물질은 N-아세틸뉴라민산(N-acetylneuraminic acid, 이하 NANA라 함)과 N-글리코릴뉴라민산(N-glycolylneuraminic acid, 이하 NGNA라 함) 혼합물로 표준 곡선에 대한 선형 회귀식을 구하여 분석시료의 NGNA와 NANA의 몰농도를 계산하였다. 사용된 혼합물은 하기 표 5에 나타내었다.

[138] [표5]

혼합물	1	2	3	4	5
NANA (μM)	2,000	1,000	500	300	200
NGNA (μM)	40	20	10	6	4

[139] NANA 함량을 이용하여 시료의 NANA 시알산 함량을 계산하였다. 시료의 시알산 함량은 시알산/시료 몰 비율(mol/mol)로 나타내었다.

[140] **[수학식 1]**

[141] 시료의 시알산 함량=(시료의 NANA 몰농도)/(시료의 몰농도)

[142] 또한, NGNA 함량을 이용하여 시료의 NGNA의 함량을 계산하였다. 시료의 NGNA의 함량은 NGNA/분석시료 몰 비율(mol/mol)로 나타내었다.

[143] **[수학식 2]**

[144] 시료의 NGNA의 함량=(분석시료의 NGNA 몰농도)/(분석시료의 몰농도)

[145] 그 결과를 하기 표 6에 나타내었다.

[146] [표6]

시료		NGNA/Protein(mol/mol)	NANA/Protein(mol/mol)
FcεRIαECD-Fc2ST	시료 1 (SA^{low})	0.13	7.7
	시료 2 (SA^{medi})	0.17	12.0
	시료 3 (SA^{high})	0.27	19.1

[147] 표 6에 나타난 바와 같이, pH 그래디언트에 따라 3개의 샘플로 구분하여 분리 및 정제한 시료들의 시알산 함량이 모두 다르게 측정되었다. 시알산 함량에 따른 항알러지 효능을 비교하기 위해, 시알산 함량 순으로 "SA^{low}", "SA^{medi}" 및 "SA^{high}"로 명명하였다.

[148] **실험예 8. 시알산 함량에 따른 폴리펩티드의 이량체 형성 변화 확인**

[149] 시알산 함량에 따라 폴리펩티드의 이량체 형성 변화가 있는지 확인하기 위해, 실시예 9에서 분리한 SA^{low}, SA^{medi} 및 SA^{high}를 실험예 1과 동일한 방법으로 비환원 조건 및 환원 조건에서 SDS-PAGE 분석을 수행하였다.

[150] 그 결과, SA^{low}, SA^{medi} 및 SA^{high} 모두 비환원 조건에서 약 150 kDa 크기의 폴리펩티드가 검출되었고, 환원 조건에서 약 75 kDa 크기의 폴리펩티드가 검출되었다. 이를 통해 폴리펩티드가 이량체를 형성하고 있음을 확인하였다(도 10).

[151] **실험예 9. 시알산 함량에 따른 폴리펩티드의 이량체 등전점 확인**

[152] 시알산 함량에 따라 폴리펩티드의 이량체 등전점이 변하는지 확인하기 위해, 실험예 7에서 분리한 SA^{low}, SA^{medi} 및 SA^{high}를 IEF 샘플 용액과 혼합시킨 후, pH 3-7 IEF gel(Invitrogen)에 로딩(loading)하여, 100V 조건에서 1시간, 200V 조건에서 1시간, 500V 조건에서 30분 동안 순차적으로 전기영동하였다. 전기영동이 끝난 후, 겔(gel)은 12% 트리클로로아세트산(Trichloroacetic acid)와 3.5% 설포살리실산 (Sulfosalicylic acid)를 포함하는 고정 용액에 30분간 반응시킨 후, 증류수로 세척하였다. 단백질은 쿠마시 브릴리언트블루(Coomassie Brilliant Blue) 용액으로 염색하였다.

[153] 그 결과, 시알산 함량에 따라 SA^{low}, SA^{medi} 및 SA^{high}의 등전점이 조금씩 상이하게 나타났으며, 각각 약 5.3, 4.9 및 4.7로 나타났다(도 11).

[154] **실험예 10. 식품 알러지 동물모델에서 시알산 함량에 따른 폴리펩티드**

이량체의 항알러지 활성 확인: 설사 빈도 측정

[155] 시알산 함량에 따라 폴리펩티드 이량체의 활성이 변하는지 확인하기 위해, Balb/c 마우스(오리엔트바이오)들에 대하여 OVA 50 ㎍ 및 알럼 1 ㎎을 14일 간격으로 2회 복강 투여하여 감작을 유발하였다. 이후, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40일째, 총 7회에 걸쳐 OVA 50 ㎎을 경구 투여하여 음식물 알러지를 유발하였다. 이때, OVA 경구 투여는 4시간 금식 후에 시행하였다.

[156] 상기 OVA를 2회 경구 투여한 후, 40일째에 상기 마우스를 7마리씩 3개의 그룹으로 분류하였다. 제1그룹인 시알산 함량이 높은 폴리펩티드 이량체(SA^{high})를 고농도(200 ㎍)로 피하 투여하는 군, 제2그룹인 시알산 함량이 낮은 폴리펩티드 이량체(SA^{low})를 고농도(200 ㎍)로 피하 투여하는 군 및 제3그룹인 PBS를 피하 투여한 군으로 분류하였다. 상기 OVA를 경구 투여하면서 음식물 알러지 유발에 따라 설사 발생 여부를 확인하였다.

[157] 그 결과, 제3그룹의 마우스는 4번째 OVA를 경구 투여한 후부터 설사가 발생하였다. 제2그룹의 마우스는 5번째 OVA를 경구 투여한 후부터 설사가 발생하였다. 특히, 제2그룹의 마우스는 6번째 OVA를 경구 투여한 후부터 설사 발생 빈도가 급격히 증가하였다. 반면, 제1그룹의 마우스는 6번째 OVA를 경구 투여한 후부터 설사가 발생하였으나, 7번째 OVA 경구 투여에도 설사 발생 빈도가 증가하지 않고 유지되었다(도 12). 이를 통해, 시알산 함량이 높은 폴리펩티드 이량체(SA^{high})가 시알산 함량이 낮은 폴리펩티드 이량체(SA^{low})보다 항알러지 효과가 우수한 것을 확인하였다.

[158] **실험예 11. 식품 알러지 동물 모델에서 시알산 함량에 따른 폴리펩티드 이량체의 항알러지 활성 확인: 혈중 IgE 농도 측정**

[159] 실험예 10의 7번의 OVA를 경구 투여한 각 그룹의 마우스에서 안와채혈법으로 혈액을 채취하였다. 상온에서 30분 동안 반응시킨 후, 4℃ 온도에서 13,000 rpm 조건으로 15분 동안 원심분리하여 혈청을 분리하였다. 혈중에서의 유리된 IgE(free IgE) 농도를 측정하기 위해 mouse total IgE ELISA kit(BioLegend)를 사용하였으며, 이때, 96-웰-플레이트에 코팅된 물질이 항-IgE 항체 대신 본 발명의 일 실시예인 폴리펩티드 이량체(SA^{low} 및 SA^{high}) 사용한 점을 제외하고는 제조사의 프로토콜에 따라 ELISA를 수행하였다.

[160] 구체적으로, 96-웰-플레이트에 PBS로 희석시킨 폴리펩티드 이량체(SA^{low} 및 SA^{high})로 코팅하고, 4℃ 온도에서 하룻밤 동안 반응시켰다. 다음날, 0.05% tween 20이 포함된 PBS(이하, 워싱버퍼)로 세척한 후, 블로킹 버퍼(blocking buffer, Assay diluent)를 넣어 1시간 동안 반응시켰다. 그 후, 워싱버퍼로 세척한 후, 표준용액으로 사용할 마우스 IgE와 마우스의 혈청 샘플을 1X Assay diluent에 희석하여 플레이트에 넣고 2시간 동안 반응시켰다.

[161] 다시 워싱버퍼로 세척한 후, 비오틴(biotin)이 표지된 마우스 항-IgE 항체를 넣고 1시간 동안 반응시켰다. 워싱버퍼로 세척한 후, HRP(horse radish peroxidase)가 표지된 아비딘(Avidin-HRP)을 넣고 30분 동안 반응시켰다.

워싱버퍼로 세척한 후, 기질용액(Substrate Solution)을 넣고 빛을 차단한 상태로 20분간 반응시킨 후, 정지용액(Stop solution, 1 M H_2SO_4)을 넣어 반응을 중단시켰다. 그 후, 마이크로 플레이트 리더(Epoch Microplate Spectrophotometer)로 450 nm 파장에서 흡광도 값을 측정하여 농도를 계산하였다.

[162] 그 결과, PBS를 피하 투여한 제3그룹의 마우스의 경우, 혈중 IgE 농도가 약 8,000 ng/㎖로 계산되었다. 또한, 시알산 함량이 낮은 폴리펩티드 이량체(SA^{low})를 피하 투여한 제2그룹의 마우스의 경우, 혈중 IgE 농도가 약 7,000 ng/㎖로 계산되었다. 반면, 시알산 함량이 높은 폴리펩티드 이량체(SA^{high})를 피하 투여한 제1그룹의 마우스의 경우, 약 4,900 ng/㎖ 계산되었으며, 제2그룹 및 제3그룹의 마우스의 혈중 IgE 농도값과 유의미한 차이를 나타내었다(도 13).

[163] 이러한 결과에서 시알산 함량이 높은 폴리펩티드 이량체를 피하 투여시에, 혈중 IgE 함량이 감소함을 알 수 있었다. 또한, 이러한 혈중 IgE의 감소로, 상기 시알산 함량이 높은 폴리펩티드 이량체가 알러지 치료에 효과가 있음을 예측할 수 있었다.

[164] **실험예 12. 식품 알러지 동물 모델에서 시알산 함량에 따른 폴리펩티드 이량체의 항알러지 활성 확인: 혈중 MCPT-1 농도 측정**

[165] 식품 알러지 실험이 끝나고, 2일 후에 각 그룹의 마우스에서 혈액을 채취하여 혈청을 준비하였다. 혈중 MCPT-1(Mast Cell Protease-1) 농도를 측정하기 위해, MCPT-1 ELISA kit(Invitrogen)를 사용하여 제조사의 프로토콜에 따라 진행하였다.

[166] 구체적으로, 96-웰-면역 플레이트에 마우스 항-MCPT-1 항체를 코팅하고 4℃ 온도에서 하룻밤 동안 반응시켰다. 다음날, 0.05% tween 20이 포함된 PBS(이하, 워싱버퍼)로 세척한 후, 1% BSA(Bovine serum albumin)가 포함된 PBS(이하, 블로킹 버퍼, Assay diluent)를 넣어 1시간 동안 반응시켰다. 그 후, 워싱버퍼로 세척한 후, 표준용액으로 사용할 MCPT-1와 마우스의 혈청 샘플을 1X Assay diluent에 희석하여 플레이트에 넣고 2시간 동안 반응시켰다.

[167] 2시간 후, 비오틴이 표지된 마우스 항-MCPT-1 항체를 넣고 1시간 동안 반응시켰다. 워싱버퍼로 세척한 후, HRP(horse radish peroxidase)가 표지된 아비딘(Avidin-HRP)을 넣고 30분 동안 반응시켰다. 워싱버퍼로 세척한 후, 기질용액(Substrate Solution)을 넣고 빛을 차단한 상태로 20분간 반응시킨 후, 정지용액(Stop solution, 1 M H_2SO_4)을 넣어 반응을 중단시켰다. 그 후, 마이크로 플레이트 리더(Epoch Microplate Spectrophotometer)로 450 nm 파장에서 570 nm 파장을 제외한 흡광도 값을 측정하여 농도를 계산하였다.

[168] 그 결과, PBS를 피하 투여한 제3그룹의 마우스의 경우, 혈중 MCPT-1 농도가 약 4,000 ng/㎖로 계산되었다. 또한, 시알산 함량이 낮은 폴리펩티드 이량체(SA^{low})를 피하 투여한 제2그룹의 마우스의 경우, 혈중 MCPT-1 농도가 약 4,200 ng/㎖로 계산되었다. 반면, 시알산 함량이 높은 폴리펩티드 이량체(SA^{high})를 피하 투여한 제1그룹의 마우스의 경우, 약 2,800 ng/㎖ 계산되었으며, 제2그룹 및 제3그룹의

마우스의 혈중 IgE 농도값과 유의미한 차이를 나타내었다(도 14).

[169] **실시예 3. 정제를 통한 시알산이 고함량 포함된 폴리펩티드 이량체 제조**

[170] 시알산 함량에 따른 폴리펩티드 이량체의 물성을 확인하기 위해, 다양한 범위의 시알산이 포함된 폴리펩티드 이량체를 수득하였다. 구체적으로, FcεRIαECD-Fc2+a2,6-ST 세포주에서 수득한 폴리펩티드 이량체를 친화성 크로마토그래피 및 음이온 교환 크로마토그래피를 이용하여 정제하였다.

[171] 먼저, 세포 배양액을 친화성 크로마토그래피(affinity chromatography)를 통해 배양액에서 나오는 1차 불순물 제거를 진행하였다. 친화성 크로마토그래피는 Amshpere™ A3 수지가 팩킹(packing)된 Amsphere™ A3 프리-팩킹 컬럼(Amsphere ™ A3 pre-packed column; 베드 높이(bed hight) 5 ㎝, 부피(volume) 5 ㎖)과 액체크로마토그래피 시스템인 AKTA Avant 25 장비를 이용하여 진행하였다. 이때, 용출 버퍼는 100 mM Glycine, pH 3.3를 이용하여 수행하였다.

[172] 이 후, 음이온 교환 크로마토그래피(Anion Exchange Chromatography)는 Q 세파로스 패스트 플로우 수지(Q Sepharose Fast Flow resin)가 팩킹된 Hiscreen QFF(베드 높이(bed hight) 10 ㎝, 부피(volume) 5 ㎖)와 액체크로마토그래피 시스템인 AKTA Avant 25 장비를 이용하여 진행하였다. 용출 버퍼는 20 mM Phospho-citrate, pH 3.5를 이용하였다. 이때, 세척 버퍼인 20 mM Phospho-citrate, pH 4.0의 농도를 조절하여 다양한 시알산 함량을 가지는 이량체를 수득하였다. 시알산 함량 분석은 실험예 7에서 분석한 방법으로 수행하였다. 이를 통해, 시알산 함량이 7.0 mol/mol, 10.3 mol/mol, 12.9 mol/mol, 14.9 mol/mol 및 21.4 mol/mol인 폴리펩티드 이량체를 수득하였다.

[173] **실험예 13. 마우스 모델에서 시알산 함량에 따른 폴리펩티드 이량체의 약동학 분석**

[174] 폴리펩티드 이량체 시알산 함량에 따른 약동학(pharmacokinetics) 분석을 수행하기 위해, 실시예 3에서 제조한 시알산 함량 7.0 mol/mol, 10.3 mol/mol, 12.9 mol/mol, 14.9 mol/mol 및 21.4 mol/mol의 폴리펩티드 이량체를 각각 10 mg/kg의 농도로 마우스에 피하 주사하였다. 폴리펩티드 이량체의 약동학 분석을 위해 물질 투여 후 0시간, 3시간, 10시간, 24시간, 72시간, 168시간, 240시간 째에 채혈하여 아래와 같은 방법으로 분석하였다.

[175] 1X PBS(Welgene)에 항-FcεRI 항체(Invitrogen)를 0.5 ㎍/㎖의 농도로 희석하여 immunoplate(Thermo)에 첨가하고 4℃ 조건에서 밤새 반응시켰다. 반응이 끝난 immunoplate는 1X PBST를 이용하여 세척하고 Blocking solution인 I-Block solution(invitrogen)을 well당 첨가하여 상온에서 1시간 동안 반응시켰다. Blocking 도중 standard와 분석용 샘플을 준비하였다. 폴리펩티드 이량체를 0.19 ng/㎖ 내지 200 ng/㎖의 농도로 마우스 blank serum이 포함된 1% BSA/PBS에 희석하여 Standard 물질로 준비하였고, 분석용 샘플 또한 blank serum이 포함된 1% BSA/PBS를 이용하여 1/20-1/300으로 희석하여 준비하였다.

[176] Blocking이 끝난 plate는 1X PBST를 이용하여 세척하고 준비된 standard와

분석용 샘플을 well당 첨가 후 상온에서 1시간 반응시켰다. 이후 1X PBST를 이용하여 세척하고 1:10,000으로 희석된 항-인간 IgG4-HRP(Southern biotech)를 첨가한 다음 상온에서 1시간 반응시켰다. 반응이 끝난 plate는 1X PBST를 이용하여 세척하고 TMB solution(Thermo)을 well에 넣고 반응시켰다. Microplate reader (Molecular devices)를 이용하여 650 nm 파장에서 흡광도 값이 0.8-1.0 범위에서 측정되면 stop solution(Sigma)을 well 당 첨가하여 반응을 종결시켰다. 반응이 종결된 plate는 5분 이내에 450 nm 파장에서 흡광도를 측정하고 수치를 분석하였다. 그 결과로 얻은 시알산 함량에 따른 폴리펩티드 이량체의 약동학 그래프와 약동학적 파라미터 결과는 도 15 및 표 7에 나타내었다.

[177] 그 결과, 표 7에 나타난 바와 같이, 마우스에 투여한 폴리펩티드 이량체의 시알산 함량이 높을수록 혈중 농도가 증가하는 것을 확인하였다.

[178] [표7]

시알산 함량 (mol/mol)	$T_{1/2}$ (hr)	Tmax (hr)	Cmax (㎍/㎖)	AUClast (hr*㎍/㎖)
7.0	51.3 ± 5.9	5.3 ± 3.3	1.3 ± 0.5	47.8 ± 3.2
10.3	44.5 ± 6.7	5.3 ± 3.3	1.6 ± 0.6	57.1 ± 9.6
12.9	40.0 ± 9.5	17 ± 9.9	2.0 ± 0.4	119.7 ± 5.2
14.9	35.4 ± 3.5	7.7 ± 3.3	2.6 ± 0.3	182.7 ± 7.0
21.4	38.5 ± 5.0	10.0 ± 0.0	12.1 ± 0.9	890.0 ± 64.4

[179] **실험예 14. 수동성 전신적 아나필락시스 마우스 모델에서 폴리펩티드 이량체의 시알산 함량에 따른 효능 확인**

[180] 폴리펩티드 이량체의 시알산 함량에 따른 생체 내(in vivo)에서의 항알러지 효과 차이를 확인하기 위해, 문헌에 개시된 방법을 응용하여 하기와 같은 방법으로 마우스에서 수동성 전신적 아나필락시스(passive systemic anaphylaxis, PSA)를 유도하였다(Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology, vol. 1032, DOI 10.1007/978-1-62703-496-8_10). 아나필락시스 유도에 의해 비만세포가 활성화되고 비만세포 증가에 의해 체온이 감소되는 것으로 알려져 있다. 이를 이용하여 마우스에서 PSA를 유도하면서 시알산 함량별 폴리펩티드 이량체를 투여한 다음 체온을 측정하여 항알러지 효과를 비교하고자 하였다.

[181] 트랜스폰더(transponder)가 삽입된 Balb/c 마우스(오리엔트바이오)에서 체온을 측정한 후 0.9% NaCl이 포함된 항-DNP IgE(Sigma) 20 ㎍을 복강 투여 후, 각기 다른 시알산 함량을 가진 폴리펩티드 이량체 10 mg/kg을 피하 주사하였다. 24시간 후 외래 항원 0.9% NaCl이 포함된 DNP-HAS(Sigma) 투여 전 마우스 체온을 측정하였다. 이후, 항원 1 mg을 정맥으로 투여하였다. 투여 후 10분 간격으로 1시간 동안 마우스 체온을 원격 체온측정기(Bio medic data systems)로 측정하였다. 실험 결과는 도 16에 나타내었다.

[182] 그 결과, 비히클(vehicle)과 시알산 함량 10.3 mol/mol 폴리펩티드 이량체 투여군에서는 마우스 체온이 감소하였으나 시알산 함량 14.9 mol/mol 이상 그룹에서는 마우스 체온이 감소하지 않음을 확인하였다. 이를 통해, 시알산 함량이 높은 폴리펩티드 이량체가 시알산 함량이 낮은 이량체 보다 수동성 전신적 아나필락시스 유발을 감소시키는 효과가 우수한 것을 확인하였다.

청구범위

[청구항 1] IgE Fc 수용체의 알파 서브유닛의 세포외 도메인(FcεRIa-ECD)을 포함하는 단량체 두 개를 포함하는 폴리펩티드 이량체로서,
상기 단량체는 Fc 영역을 포함하며,
상기 Fc 영역과 FcεRIa-ECD는 힌지를 통해 결합되고,
상기 폴리펩티드 이량체는 시알산/폴리펩티드 이량체의 몰 비율이 적어도 8인 것인, 시알산 함량이 높은 폴리펩티드 이량체.

[청구항 2] 제1항에 있어서,
상기 IgE Fc 수용체의 알파 서브유닛의 세포외 도메인은 서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어진 것인, 시알산 함량이 높은 폴리펩티드 이량체.

[청구항 3] 제1항에 있어서,
상기 Fc 영역은 서열번호 2로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진 것인, 시알산 함량이 높은 폴리펩티드 이량체.

[청구항 4] 제1항에 있어서,
상기 힌지는 면역글로불린 IgD에서 유래한 힌지 영역 또는 이의 변이체인 것인, 시알산 함량이 높은 폴리펩티드 이량체.

[청구항 5] 제1항에 있어서,
상기 시알산은 N-아세틸뉴라민산인 것인, 시알산 함량이 높은 폴리펩티드 이량체.

[청구항 6] 제1항에 있어서,
상기 폴리펩티드 이량체는 시알산/폴리펩티드 이량체의 몰 비율이 적어도 10인 것인, 시알산 함량이 높은 폴리펩티드 이량체.

[청구항 7] 제6항에 있어서,
상기 폴리펩티드 이량체는 시알산/폴리펩티드 이량체의 몰 비율이 12 내지 25인 것인, 시알산 함량이 높은 폴리펩티드 이량체.

[청구항 8] 제4항에 있어서,
상기 면역글로불린 IgD에서 유래한 힌지 영역 또는 이의 변이체는 적어도 하나의 시스테인을 포함하는 것인, 시알산 함량이 높은 폴리펩티드 이량체.

[청구항 9] 제4항에 있어서,
상기 면역글로불린 IgD에서 유래한 힌지 영역 또는 이의 변이체는
Arg Asn Thr Gly Arg Gly Gly Glu Glu Lys Lys Xaa1 Xaa2 Lys Glu Lys Glu Glu Gln Glu Glu Arg Glu Thr Lys Thr Pro Glu Cys Pro(서열번호 17),
이때, Xaa1은 Lys 또는 Gly이며, Xaa2는 Glu, Gly 또는 Ser인; 또는
Ala Gln Pro Gln Ala Glu Gly Ser Leu Ala Lys Ala Thr Thr Ala Pro Ala Thr Thr Arg Asn Thr Gly Arg Gly Gly Glu Glu Lys Lys Xaa3 Xaa4 Lys Glu Lys Glu Glu Gln Glu Glu Arg Glu Thr Lys Thr Pro Glu Cys Pro (서열번호 18),

이때, Xaa3은 Lys 또는 Gly이며, Xaa4는 Glu, Gly 또는 Ser인,
시알산 함량이 높은 폴리펩티드 이량체.

[청구항 10] 제4항에 있어서,
상기 면역글로불린 IgD에서 유래한 힌지 영역 또는 이의 변이체가 서열번호 3, 서열번호 4 및 서열번호 19로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나의 아미노산 서열로 이루어진 것인, 시알산 함량이 높은 폴리펩티드 이량체.

[청구항 11] 제1항 내지 제10항 중 어느 한 항에 따른 시알산 함량이 높은 폴리펩티드 이량체를 포함하는 알러지 질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

[청구항 12] 제11항에 있어서, 상기 약학적 조성물은 피하 주사제용인 것인, 알러지 질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

[청구항 13] 제11항에 있어서,
상기 알러지 질환은 식품 알러지, 아토피 피부염(atopic dermatitis), 천식(asthma), 알러지성 비염(allergic rhinitis), 알러지성 결막염(allergic conjunctivitis), 알러지성 피부염(allergic dermatitis), 만성 특발성 두드러기(Chronic idiopathic urticarial) 및 알러지성 접촉성 피부염(allergic contact dermatitis)으로 구성된 군에서 선택된 하나인 것인, 알러지 질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

[청구항 14] 제11항의 약학적 조성물을 포함하는 경피 패치(transdermal patch).

[청구항 15] 제11항의 약학적 조성물을 포함하는 국소 패치(topical patch).

[청구항 16] 제1항 내지 제10항 중 어느 한 항에 따른 시알산 함량이 높은 폴리펩티드 이량체를 포함하는 알러지 증상 개선 또는 완화용 식품 조성물.

[청구항 17] 알러지 질환 예방 또는 치료를 위한 제1항 내지 제10항 중 어느 한 항에 따른 시알산 함량이 높은 폴리펩티드 이량체의 용도.