명세서

발명의 명칭: 변이된 힌지 영역을 포함하는 IGG4 FC 단편

기술분야

[1] 본 발명은 약물의 캐리어로서 유용한 IgG4 Fc 단편에 관한 것이며, 구체적으로는 Fc에 의한 이펙터 기능이 최소화되고 생체내 면역글로불린과의 사슬 교환이 일어나지 않으며, 결합된 약물의 생체내 반감기를 증대시킬 수 있는 IgG4 Fc 단편에 관한 것이다.

[2]

배경기술

[3] 유전공학 기술의 발전과 함께 많은 종류의 단백질 의약품이 제조되어 이용되고 있다. 그러나 단백질 의약품의 경우, 쉽게 변성되거나 생체내 프로테아제 등에 의해 쉽게 분해되어 생체내 농도 및 역가를 오랫동안 지속시킬 수 없다는 치명적인 단점을 가지고 있다. 그러므로 단백질의 안정성을 증가시켜, 단백질 의약품의 혈중, 생체내 농도를 적정 수준으로 유지시키는 것은 효과적인 치료 뿐만 아니라 주사 등으로 자주 단백질을 공급받아야 하는 환자의 불편 경감 및 경제적인 이유에도 매우 중요한 문제다.

[4]

[5] 따라서 단백질 의약품의 생체내 안정성을 증가시키기 위하여, 단백질의 제형을 변화시키거나, 다른 단백질을 융합시키거나, 혹은 단백질 표면에 적당한 고분자를 화학적 또는 생물학적 방법으로 부착시키는 등의 다양한 방법들이 오래전부터 시도되었다.

[6] 다른 단백질과의 융합으로 단백질의 안정성을 증가시키기 위한 시도중의 하나가, 면역글로불린 Fc와 단백질과의 융합이다.

[7] Fc 영역은 면역글로불린의 고유 기능인 항원 결합능 외의 보체-의존적 독성(CDC, complement-depentent cytotoxicity), 항체-의존적 세포독성(ADCC, antibody-dependent cell cytotoxicity)과 같은 이펙터 기능(effector function)을 담당한다. 또한, Fc 영역에 존재하는 FcRn 서열은 생체내 FcRn 수용체와 결합하여 지속적인 recycling을 통해 생체내 반감기를 증가시켜 혈청내 IgG의 수준을 조절하는 역할을 한다. 이러한 Fc 영역과 치료용 단백질과의 융합을 통하여 치료용 단백질의 안정성을 증가시키고자 하는 연구가 활발하게 진행되었다.

[8] 그러나 유전자 재조합 방법에 의해 생산된 Fc 융합 단백질은 면역글로불린 Fc 영역의 특정 부위, 즉 아미노 말단 또는 카르복시 말단에서만 단백질 융합이 가능하며, 동일한 세포에서 생산되기 때문에 당쇄화 단백질 간의 또는 비당쇄화 간의 융합만이 가능하며 당쇄화 단백질과 비당쇄화 단백질의 융합은 불가능한 단점이 있다. 또한, 융합에 의해 새로 생긴 아미노산 서열로 인하여 면역반응이

유발될 수 있을 뿐만 아니라 링커 부위에 대한 단백질 가수분해효소의 민감성이 증가될 수 있다는 문제점을 가지고 있다.

[9] 또한 상기의 Fc와의 융합단백질은 목적 단백질의 혈중 반감기가 증가하지만, 동시에 Fc 영역이 갖고 있는 이펙터 기능이 발휘된다는 문제점이 있다(미국특허 제5,349,053). Fc 영역의 이펙터 기능에 의하여 보체를 고정시키거나 FcRs을 발현하는 세포에 결합하여 특정 세포를 파괴시키고 염증을 유발하는 여러 사이토카인의 생성 및 분비를 유도하여 원하지 않는 염증을 유발시킨다. 또한, 융합된 부위의 단백질 서열은 인체에 존재하지 않는 새로운 단백질 서열이므로 장기 투여시 면역반응 유발 가능성도 있는 등 여러 가지 단점을 가지고 있다.

[10] 이에 긴 혈중 반감기를 유지하지만 이펙터 기능이 결실된 면역글로불린 혹은 면역글로불린 단편을 이용하고자 하는 연구가 이루어져 왔다. Cole 등은 Fc 수용체에 대한 친화력이 감소된 Fc 유도체를 생산하기 위해 CH2 영역 중 Fc 수용체와의 결합에 중요한 역할을 하는 것으로 알려진 234, 235 및 237번째 잔기를 알라닌으로 치환하여 ADCC의 활성이 억제됨을 보고하였다(Cole et al., *J. Immunol.* 159: 3613-3621, 1997). 그러나, 이들 모두는 천연형 인간 Fc 영역과 다른 부적절한 아미노산의 존재로 인해 Fc는 더 큰 면역성 또는 항원성을 가질 수 있으며 바람직한 Fc 기능들을 잃을 수도 있다.

[11] 면역글로불린의 높은 혈중 농도를 유지하면서 원하지 않는 이펙터 기능을 제거 혹은 감소시키기 위한 방법 중 하나로 면역글로불린의 당을 제거하는 방법이 연구되었다. 미국특허 제5,585,097호는 CD3 항체의 제조시 항체의 당쇄화 잔기인 CH2 도메인의 297번째 아스파라긴 잔기를 다른 아미노산으로 치환하여 비당쇄화된 항체 유도체를 제조하였고, 이 경우 유도체가 FcRn 수용체와의 결합력은 혈중 반감기의 변화없이 유지하면서 감소된 이펙터 기능을 나타냈다. 그러나, 이 방법 역시 비정상적인 서열을 갖는 새로운 재조합 구조물의 생성으로 면역계에서 외부물질로 인식되고 거부될 수 있다는 문제점이 있다.

[12] 천연형 IgG Fc 서열을 이용한 단백질 융합체를 생산시 Fc에 의한 이펙터 기능을 최소화 하기 위한 노력 중 선택될 수 있는 것은 IgG4 Fc이다. IgG4는 IgG1과 유사한 생체내 반감기를 보이면서 아미노산 서열의 차이로 인해 이펙터 기능이 상대적으로 작은 것으로 알려져 있다. 그러나 IgG4는 감소된 이펙터 기능이 있다는 장점에도 불구하고, 독특한 힌지서열에 의해 생체내에서 IgG4 간의 사슬교환이 일어나 단백질 융합체를 치료용 목적으로 사용시 큰 어려움이 있는 것으로 보고되었다 (van der Neut Kolfschoten, et at., Science, 317:1554-1557. 2007). 즉, IgG4 Fc를 단백질 융합체의 캐리어로 사용시 생체내에 존재하는 IgG4와 사슬교환이 일어나 천연형 IgG4와 하이브리드를 형성하거나 단량체로 존재하여 원래의 구조를 변경시켜 치료학적으로 낮은 활성을 갖는 구조를 갖게 되는 문제가 발생한다. 이는 IgG4 Fc 단편과 생리활성 물질 융합체를 유전공학 방법으로 생산하든, in vitro에서 생산하든 공통의 문제점으로 작용한다.

[13]

발명의 상세한 설명

기술적 과제

[14] 이러한 배경 하에, 본 발명자들은 상기 유전자 재조합 융합 기술의 단점을 극복하면서 생체내 IgG와의 Fab arm 교환 반응과 이펙터 기능 유발 위험이 낮으며 약물의 캐리어로서 작용할 수 있는 IgG Fc 단편을 연구한 결과, IgG4 Fc 단편의 힌지서열을 변이시켜 하나의 시스테인 잔기만을 갖도록 한 IgG4 Fc 단편 서열을 대장균에서 생산하여 약물과 결합시킬 경우, 생체내에서의 IgG와의 Fab arm 교환 반응과 이펙터 기능 유발 위험이 없이 지속성이 증가된 약물결합체를 형성할 수 있음을 발견하여 본 발명을 완성하였다.

[15]

과제 해결 수단

[16] 본 발명의 목적은 생체내 IgG와의 사슬교환 반응과 이펙터 기능 유발 위험이 낮으며 약물의 캐리어로서 작용할 수 있는 IgG4 Fc 단편을 제공하는 것이다. 보다 구체적으로, 본 발명의 목적은 힌지 서열 중 일부가 결실되어 하나의 시스테인 잔기만을 갖도록 변이된 힌지 영역을 포함하는, 변이된 IgG4 Fc 단편을 제공하는 것이다.

[17] 본 발명의 다른 목적은 힌지 서열 중 일부가 결실되어 하나의 시스테인 잔기만을 갖도록 변이된 힌지 영역을 포함하는, 변이된 IgG4 Fc 단편을 인코딩하는 핵산을 제공하는 것이다.

[18] 본 발명의 또 다른 목적은 힌지 서열 중 일부가 결실되어 하나의 시스테인 잔기만을 갖도록 변이된 힌지 영역을 포함하는, 변이된 IgG4 Fc 단편을 인코딩하는 핵산을 포함하는 벡터를 제공하는 것이다.

[19] 본 발명의 또 다른 목적은 힌지 서열 중 일부가 결실되어 하나의 시스테인 잔기만을 갖도록 변이된 힌지 영역을 포함하는, 변이된 IgG4 Fc 단편을 인코딩하는 핵산을 포함하는 벡터가 도입된 미생물을 제공하는 것이다.

[20] 본 발명의 또 다른 목적은 변이된 IgG4 Fc 단편을 인코딩하는 핵산을 포함하는 벡터가 도입된 미생물을 배양하는 단계를 포함하는, 변이된 IgG4 Fc 단편을 제조하는 방법을 제공하는 것이다.

[21] 본 발명의 또 다른 목적은 약물, 및 변이된 IgG4 Fc 단편이 링커를 통해 결합된 약물 결합체를 제공하는 것이다.

[22] 본 발명의 또 다른 목적은 약물, 및 변이된 IgG4 Fc 단편이 링커를 통해 결합된 약물 결합체를 포함하는 약학 조성물을 제공하는 것이다.

[23]

발명의 효과

[24] 본 발명은 아미노산 치환 혹은 첨가 없이 그리고 당쇄의 부가 없이 이펙터 기능이 최소화 되어 있으며 생체내 IgG4와 사슬교환 반응이 없는 변이된 IgG4 Fc 단편을 제공하며, 본 발명의 변이된 IgG4 Fc 단편은 유전공학적 방법 혹은

인비트로(in vitro) 공유결합 방법등의 약물과 결합시키는 방법에 상관없이 약물에 결합시 결합된 약물의 생체내에서의 사슬교환반응을 억제하여 천연형 IgG4 Fc 단편에 비해 훨씬 치료학적 우월성을 제공할 수 있다.

[25]

도면의 간단한 설명

[26] 도 1은 랫트 혈액에서 비오틴화된(Biotinylated) hIgG4와 인간 과립구 콜로니자극인자-PEG-IgG4 Fc 단편 결합체와 인간 IgG4 사슬교환 여부를 보여주는 도면이다.

[27] 도 2는 사람 혈액에서 비오틴화된 hIgG4와 인간 과립구 콜로니자극인자-PEG-IgG4 Fc 단편 결합체와 인간 IgG4 사슬교환 여부를 보여주는 도면이다.

[28]

발명의 실시를 위한 최선의 형태

[29] 상기와 같은 본 발명의 목적을 달성하기 위한 하나의 양태로서, 본 발명은 약물의 캐리어로서 유용한 변이된 IgG4 Fc 단편을 제공한다. 보다 구체적으로, 본 발명은 힌지 서열 중 일부가 결실되어 하나의 시스테인 잔기만을 갖도록 변이된 힌지 영역을 포함하는, 변이된 IgG4 Fc 단편을 제공한다.

[30]

[31] 본 발명의 변이된 IgG4 Fc 단편은 하기의 아미노산 서열을 갖는 힌지 영역에서 일부 아미노산이 결실되어 하나의 시스테인 잔기만을 갖도록 변이된 힌지 영역을 포함한다.

[32] Glu-Ser-Lys-Tyr-Gly-Pro-Pro-Cys-Pro-Ser-Cys-Pro (서열번호 1)

[33]

[34] 본 발명자들은 IgG4 Fc 단편이 약물의 반감기를 증가시키기 위한 캐리어로서 유용함에도 불구하고 생체내의 IgG4와의 사슬교환 반응에 의해 유용성이 떨어지는 문제점을 해결하기 위한 연구 결과, IgG4 Fc 단편의 힌지 영역에 존재하는 2개의 시스테인 잔기 중 하나를 비롯하여 힌지 영역의 일부를 결실에 의해 제거함으로써 얻어진 변이된 힌지 영역을 포함하는 IgG4 Fc 단편의 경우, 생체내 사슬교환 반응 및 단량체 형성이 일어나지 않아 약물의 캐리어로서 유용하게 사용될 수 있음을 확인하였다.

[35]

[36] 본 발명의 IgG4 Fc 단편은 상기 서열번호 1의 아미노산 서열의 힌지 영역에서 8번째 시스테인 잔기를 포함하는 1 내지 8개의 아미노산 잔기가 결실되어 변이된 힌지 영역을 포함할 수 있다.

[37] 또한 본 발명의 IgG4 Fc 단편은 상기 서열번호 1의 아미노산 서열의 힌지 영역에서 11번째 시스테인 잔기를 포함하는 1 내지 8개의 아미노산 잔기가 결실되어 변이된 힌지 영역을 포함할 수 있다.

[38] 또는 본 발명의 IgG4 Fc 단편은 상기 서열번호 1의 아미노산 서열의 힌지 영역에서 8번째 시스테인 잔기를 포함하는 1 내지 5개의 아미노산 잔기 또는 11번째 시스테인 잔기를 포함하는 1 내지 5개의 아미노산 잔기가 결실되어 변이된 힌지 영역을 포함할 수 있다.

[39] 또는 본 발명의 IgG4 Fc 단편은 상기 서열번호 1의 아미노산 서열의 힌지 영역에서 8번째 시스테인 잔기를 포함하는 1 내지 3개의 아미노산 잔기 또는 11번째 시스테인 잔기를 포함하는 1 내지 3개의 아미노산 잔기가 결실되어 변이된 힌지 영역을 포함할 수 있다.

[40] 상기 결실되는 아미노산 잔기는 연속적이거나 불연속적일 수 있다.

[41] 본 발명의 IgG4 Fc 단편의 힌지 영역은 서열번호 1의 아미노산 서열의 8번과 11번 위치의 시스테인 잔기 중 하나의 시스테인 잔기만을 포함하도록 변이되며, 2개의 시스테인 잔기가 모두 제거되지는 않는 것을 특징으로 한다.

[42] 이와 같은 힌지 영역 내의 2개의 시스테인 잔기 중 1개의 시스테인만을 갖도록 변이된 힌지 영역이 생체내 사슬 교환, 단량체 형성 등이 없는 효과를 변이된 IgG4 Fc 단편에 부여한다.

[43]

[44] 본 발명에 있어서, 캐리어란 약물과 함께 결합되는 물질을 의미하며 일반적으로 약물에 결합되어 약물의 생리활성을 증감시키거나 제거하게 된다. 그러나 본 발명에서의 캐리어는 본 발명의 목적상 결합되는 약물의 생리활성의 감소를 최소화 하면서 동시에 약물의 생체내 안정성은 증가시키며, 캐리어에 결합된 약물의 치료학적 활성을 방해하는 기타의 약리작용 즉, 세포사멸 혹은 보체 활성화 그리고 특정 단백질과의 결합이 없음을 특징으로 한다.

[45]

[46] 본 발명에서 IgG4 Fc 단편은 IgG4의 중쇄와 경쇄 가변영역, 중쇄 불변영역 1(CH1)과 경쇄 불변영역 1(CL1)을 제외한, 중쇄 불변영역 2(CH2) 및 중쇄 불변영역 3(CH3)부분을 의미하며, 중쇄 불변영역에 변이된 힌지(hinge) 부분을 포함한다. 또한 본 발명의 IgG4 Fc 단편은 천연형과 실질적으로 동등하거나 향상된 효과를 갖는 한, 면역글로불린의 중쇄와 경쇄 가변영역만을 제외하고, 일부 또는 전체 중쇄 불변영역 1(CH1) 및/또는 경쇄 불변영역 1(CL1)을 포함한 확장된 Fc 영역일 수 있다. 또한, CH2 및/또는 CH3에 해당하는 상당히 긴 일부 아미노산 서열이 제거된 영역일 수도 있다.

[47]

[48] 또한, 본 발명의 IgG4 Fc 단편은 천연형 아미노산 서열뿐만 아니라 이의 서열 유도체(mutein)를 포함한다. 본 발명에 있어서 IgG4 Fc 단편의 서열 유도체란 힌지 영역을 제외한 나머지 부분의 천연 아미노산 서열중의 하나 이상의 아미노산 잔기가 결실, 삽입, 비보전적 또는 보전적 치환 또는 이들의 조합에 의하여 상이한 서열을 가지는 것을 의미한다. 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 부위가 제거될 수도 있다. 이러한 Fc 영역의 서열 유도체를 제조하는 기술은 국제특허공개 제97/34631호, 국제특허공개 제96/32478호 등에 개시되어 있다.

[49] 분자의 활성을 전체적으로 변경시키지 않는 단백질 및 펩티드에서의 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.

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

[51]

[52] 한편, 본 발명의 IgG4 Fc 단편은 인간 또는 소, 염소, 돼지, 마우스, 래빗, 햄스터, 랫트, 기니아 픽 등의 동물기원일 수 있으며, 바람직하게는 인간 기원이다.

[53] 본 발명의 IgG4 Fc 단편은 인간 및 소, 염소, 돼지, 마우스, 래빗, 햄스터, 랫트, 기니아 픽 등의 동물 유래의 Fc 영역을 미생물로부터 수득한 재조합형 IgG4 Fc 단편일 수 있다.

[54] 또한, IgG4 Fc 단편은 천연형 당쇄, 천연형에 비해 증가된 당쇄, 천연형에 비해 감소한 당쇄 또는 당쇄가 제거된 형태일 수 있다. 이러한 면역글로불린 Fc 당쇄의 증감 또는 제거에는 화학적 방법, 효소학적 방법 및 미생물을 이용한 유전공학적 방법과 같은 통상적인 방법이 이용될 수 있다. 여기서, Fc에서 당쇄가 제거된 면역글로불린 Fc 영역은 보체(c1q)의 결합력이 현저히 저하되고, 항체-의존성 세포독성 또는 보체-의존성 세포독성이 감소 또는 제거되므로, 생체내에서 불필요한 면역반응을 유발하지 않는다. 이런 점에서 약물의 캐리어로서의 본래의 목적에 보다 부합하는 형태는 당쇄가 제거되거나 비당쇄화된 IgG4 Fc 단편이라 할 것이다.

[55] 본 발명에서 당쇄의 제거(Deglycosylation)는 효소로 당을 제거한 Fc 영역을 말하며, 비당쇄화(Aglycosylation)"는 원핵세포, 바람직하게는 대장균에서 생산하여 당쇄화가 되지 않은 Fc 단편을 의미한다.

[56]

[57] 또한, 본 발명의 IgG4 Fc 단편은 비펩타이드성 중합체에 의해 개질된 것일 수 있다. 바람직하게는, 본 발명의 IgG4 Fc 단편은 폴리에틸렌글리콜에 의해 개질된 것일 수 있다. 폴리에틸렌 글리콜에 의해 개질된 IgG4 Fc 단편은 Fc 단편을 pH 7 이상, 바람직하게는 pH 7.5 내지 pH 9, 보다 바람직하게는 pH 8.0에서 폴리에틸렌 글리콜과 반응시킴으로써 제조될 수 있다.

[58]

[59] 본 발명에 있어서, 변이된 힌지 영역 천연의 IgG4 Fc 단편의 힌지 영역의 서열인 서열번호 1의 아미노산 서열에서 8번째 및 11번째의 시스테인 잔기 중 어느 하나가 결실되고 이에 더하여 추가의 일부 아미노산이 결실된 힌지 영역을 말한다.

[60] 본 발명에서, 힌지 영역에서 결실되는 아미노산 잔기의 수는 1 내지 8개일 수 있으며, 이때 결실되는 아미노산 잔기는 연속적이거나 불연속적일 수 있다. 구체적으로, 예를 들어, 본 발명의 변이된 힌지 영역은 8번째 시스테인 잔기 또는 11번째 시스테인 잔기만이 결실된 것일 수 있으며, 또는 8번째 시스테인 잔기를 포함하여 이와 연속하거나 불연속하는 2개 내지 8개의 아미노산이 결실된 것일 수 있으며, 또는 11번째 시스테인 잔기를 포함하여 이와 연속하거나 불연속하는 2개 내지 8개의 아미노산이 결실된 것일 수 있다.

[61] 본 발명의 변이된 힌지 영역은 예를 들어, 하기의 아미노산 서열 중 하나의 아미노산 서열을 가질 수 있다:

[62] Glu-Ser-Lys-Tyr-Gly-Pro-Pro-Pro-Ser-Cys-Pro,
Glu-Ser-Lys-Tyr-Gly-Pro-Pro-Cys-Pro-Ser-Pro,
Glu-Ser-Lys-Tyr-Gly-Pro-Pro-Cys-Pro-Ser,
Glu-Ser-Lys-Tyr-Gly-Pro-Pro-Cys-Pro-Pro, Lys-Tyr-Gly-Pro-Pro-Cys-Pro-Ser,
Glu-Ser-Lys-Tyr-Gly-Pro-Pro-Cys, Glu-Lys-Tyr-Gly-Pro-Pro-Cys,
Glu-Ser-Pro-Ser-Cys-Pro, Glu-Pro-Ser-Cys-Pro, Pro-Ser-Cys-Pro,
Glu-Ser-Lys-Tyr-Gly-Pro-Pro-Ser-Cys-Pro, Lys-Tyr-Gly-Pro-Pro-Pro-Ser-Cys-Pro,
Glu-Ser-Lys-Tyr-Gly-Pro-Ser-Cys-Pro, Glu-Ser-Lys-Tyr-Gly-Pro-Pro-Cys,
Lys-Tyr-Gly-Pro-Pro-Cys-Pro, Glu-Ser-Lys-Pro-Ser-Cys-Pro,
Glu-Ser-Pro-Ser-Cys-Pro, Glu-Pro-Ser-Cys.

[63]

[64] 본 발명의 구체적인 실시예에서, 랫트 혈액과 인간 혈액 내에 존재하는 IgG4와 본 발명에 따른 변이된 IgG4 Fc 단편과 생리활성단백질 결합체의 사슬교환 기전 여부를 확인하고자, 랫트 혈액과 인간 혈액에 IgG4 Fc와 생리활성단백질 결합체를 혼합하고 시간 별로 취하여 생리활성단백질 항체를 이용한 Western blot 분석법으로 분석한 결과, 랫트와 인간 IgG4와의 사슬교환에 의해 생성될 수 있는 분자는 생성되지 않음을 확인할 수 있었다.

[65] 따라서 본 발명에 따른 변이된 IgG4 Fc 단편은 약물을 위한 캐리어로서 사용될 경우, 생체내에서 천연형 면역글로불린과의 사슬교환없이 약물의 혈중 반감기를 증가시키고 생리활성을 개선시키는데 유용하게 사용될 수 있음을 알 수 있다.

[66]

[67] 본 발명의 다른 양태에 따라, 본 발명은 힌지 영역에서 일부 아미노산이 결실되어 하나의 시스테인 잔기만을 갖도록 변이된 힌지 영역을 포함하는 변이된 IgG4 Fc 단편을 인코딩하는 핵산 및 이를 포함하는 벡터를 제공한다.

[68]

[69] 본 발명의 변이된 IgG4 Fc 단편을 인코딩하는 핵산은 서열번호 2의 아미노산 서열(Pro-Ser-Cys-Pro-Ala-Pro-Glu-Phe-Leu-Gly-
Gly-Pro-Ser-Val-Phe-Leu-Phe-Pro-Pro-Lys-
Pro-Lys-Asp-Thr-Leu-Met-Ile-Ser-Arg-Thr-
Pro-Glu-Val-Thr-Cys-Val-Val-Val-Asp-Val-
Ser-Gln-Glu-Asp-Pro-Glu-Val-Gln-Phe-Asn-
Trp-Tyr-Val-Asp-Gly-Val-Glu-Val-His-Asn-
Ala-Lys-Thr-Lys-Pro-Arg-Glu-Glu-Gln-Phe-
Asn-Ser-Thr-Tyr-Arg-Val-Val-Ser-Val-Leu-
Thr-Val-Leu-His-Gln-Asp-Trp-Leu-Asn-Gly-
Lys-Glu-Tyr-Lys-Cys-Lys-Val-Ser-Asn-Lys-
Gly-Leu-Pro-Ser-Ser-Ile-Glu-Lys-Thr-Ile-
Ser-Lys-Ala-Lys-Gly-Gln-Pro-Arg-Glu-Pro-
Gln-Val-Tyr-Thr-Leu-Pro-Pro-Ser-Gln-Glu-
Glu-Met-Thr-Lys-Asn-Gln-Val-Ser-Leu-Thr-
Cys-Leu-Val-Lys-Gly-Phe-Tyr-Pro-Ser-Asp-
Ile-Ala-Val-Glu-Trp-Glu-Ser-Asn-Gly-Gln-
Pro-Glu-Asn-Asn-Tyr-Lys-Thr-Thr-Pro-Pro-
Val-Leu-Asp-Ser-Asp-Gly-Ser-Phe-Phe-Leu-
Tyr-Ser-Arg-Leu-Thr-Val-Asp-Lys-Ser-Arg-
Trp-Gln-Glu-Gly-Asn-Val-Phe-Ser-Cys-Ser-
Val-Met-His-Glu-Ala-Leu-His-Asn-His-Tyr-
Thr-Gln-Lys-Ser-Leu-Ser-Leu-Ser-Leu-Gly-Lys)을 포함하는 변이된 IgG4 Fc 단편을 인코딩하는 핵산을 포함한다. 예를 들어, 본 발명의 핵산은 서열번호 3의 뉴클레오티드
서열(CCATCATGCCCAGCACCTGAGTTCCTGGGGGGACCATCAGTCTTCCTG
TTCCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTC
ACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCAGGAAGACCCTGAGGTCCAGTTCAA
CTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGG
AGGAGCAGTTCAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGC
ACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAA
GGCCTCCCATCCTCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCC
CGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCAGGAGGAGATGACCAA
GAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACAT
CGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCA
CGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCTACAGCAGGCTAAC
CGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGGAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGA

TGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACACAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTC TGGGTAAA)을 가질 수 있다.

[70]

[71] 본 발명에서 벡터란 적당한 숙주 세포에서 목적 단백질을 발현할 수 있는 재조합 벡터를 말하며, 유전자 삽입체가 발현되도록 작동가능하게 연결된 조절 요소를 포함하는 유전자 작제물을 말한다.

[72]

[73] 본 발명에서 작동가능하게 연결된 (operably linked)"는 일반적 기능을 수행하도록 핵산 발현조절 서열과 목적하는 단백질을 코딩하는 핵산 서열이 기능적으로 연결되어 있는 것을 말한다. 벡터와의 작동적 연결은 당해 기술분야에서 잘 알려진 유전자 재조합 기술을 이용하여 제조할 수 있으며, 부위-특이적 DNA 절단 및 연결은 당해 기술 분야에서 일반적으로 알려진 효소 등을 사용하여 용이하게 할 수 있다. 적합한 발현벡터는 프로모터, 개시코돈, 종결코돈, 폴리아데닐화 시그널 및 인핸서 같은 발현 조절 엘리먼트 서열을 포함할 수 있다. 개시 코돈 및 종결 코돈은 유전자 작제물이 투여되었을 때 개체에서 반드시 작용을 나타내야 하며 코딩 서열과 인프레임(in frame)에 있어야 한다. 일반 프로모터는 구성적 또는 유도성일 수 있다. 발현벡터는 또한 벡터를 함유하는 숙주 세포를 선택하기 위한 선택성 마커를 포함하고, 복제 가능한 발현벡터인 경우 복제 기원을 포함할 수 있다.

[74]

[75] 또 다른 양태에 따라, 본 발명은 변이된 IgG4 Fc 단편을 생산할 수 있는, 상기 벡터가 도입된 미생물을 제공한다.

[76]

[77] 본 발명의 목적상, 상기 미생물은 당쇄화가 일어나지 않는 원핵세포가 바람직하다. 이러한 원핵세포에는 대장균 (Escherichia coli), 바실러스 서브틸리스 (Bacillus subtilis), 스트렙토마이세스 (Streptomyces), 슈도모나스 (Pseudomonas), 프로테우스 미라빌리스 (Proteus mirabilis) 또는 스타필로코쿠스 (Staphylococcus)등이 있으나, 바람직하게는 대장균이다. 대장균은 대장균 XL-1 블루, 대장균 BL21(DE3), 대장균 JM109, 대장균 DH 시리즈, 대장균 TOP10 및 대장균 HB101이고, 보다 바람직하게는 대장균 BL21(DE3)이나, 이로 제한되는 것은 아니다. 대장균을 숙주세포로 이용하는 경우에는 대장균이 당쇄를 단백질에 연결하는 체계가 없기 때문에 천연형 면역글로불린의 CH2 도메인에 존재하는 당이 원천적으로 결실된 형태로 면역글로불린의 Fc 영역을 생산할 수 있다. 면역글로불린의 CH2 도메인의 당은 면역글로불린의 구조적 안정성에는 영향을 미치지 않지만, 면역글로불린이 Fc 수용체를 발현하는 세포와 결합하여 항체-의존적 세포독성을 일으키고, 면역세포들이 사이토카인들을 분비시켜 염증반응을 일으키도록 하며, 보체의 C1q 요소와 결합하여 보체 고정반응을 유발하는 것으로 알려져 있다. 따라서, 비당쇄화된 면역글로불린의 Fc 영역을

생산하여 치료용 단백질과 결합시키면 바람직하지 않은 면역글로불린의 이펙터 기능은 유발하지 않으면서 치료용 단백질의 혈중 농도를 오래 유지시킬 수 있다.

[78] 상기 벡터의 원핵세포로의 형질전환 방법은 핵산을 세포내로 도입하는 어떤 방법도 포함되며, 당 분야에서 공지된 바와 같이 숙주 세포에 따라 적합한 표준 기술을 선택하여 수행할 수 있다. 이런 방법에는 전기충격유전자전달법(electroporation), 원형질 융합, 인산칼슘 (CaPO4) 침전, 염화칼슘(CaCl2) 침전, 실리콘 카바이드 섬유 이용한 교반, PEG, 덱스트란 설페이트, 리포펙타민 등이 포함되나 이로 제한되지 않는다.

[79] 상기 재조합 발현벡터가 도입된 미생물은 통상의 방법으로 배양된다.

[80] 이러한 배양과정은 당업자라면 선택되는 균주에 따라 용이하게 조정하여 사용할 수 있다. 배양에 사용되는 배지는 일반적으로 세포의 성장과 생존에 필수적인 모든 영양소를 함유해야 한다. 상기 배지는 다양한 탄소원, 질소원 및 미량원소 성분을 포함한다. 사용될 수 있는 탄소원의 예에는, 포도당, 자당, 유당, 과당(fructose), 말토즈, 전분, 셀룰로즈와 같은 탄수화물, 대두유, 해바라기유, 피마자유, 코코넛유와 같은 지방, 팔미트산, 스테아린산, 리놀레산과 같은 지방산, 글리셀롤 및 에탄올과 같은 알코올, 아세트산과 같은 유기산이 포함된다. 이들 탄소원은 단독 또는 조합되어 사용될 수 있다. 사용될 수 있는 질소원의 예에는, 펩톤, 효모 추출물, 육즙, 맥아 추출물, 옥수수 침지액(CSL), 및 대두밀과 같은 유기 질소원 및 요소, 황산암모늄, 염화암모늄, 인산암모늄, 탄산암모늄 및 질산암모늄과 같은 무기 질소원이 포함된다. 이들 질소원은 단독 또는 조합되어 사용될 수 있다. 상기 배지에는 인원으로서, 인산이수소칼륨, 인산수소이칼륨 및 대응되는 소듐-함유 염이 포함될 수 있다. 또한, 황산마그네슘 또는 황산철과 같은 금속염을 포함할 수 있다. 그외에, 아미노산, 비타민, 및 적절한 전구체 등이 포함될 수 있다. 배양 중에 수산화암모늄, 수산화칼륨, 암모니아, 인산 및 황산과 같은 화합물을 배양물에 적절한 방식으로 첨가하여, 배양물의 pH를 조정할 수 있다. 또한, 배양 중에는 지방산 폴리글리콜 에스테르와 같은 소포제를 사용하여 기포 생성을 억제할 수 있다. 또한, 배양물의 호기상태를 유지하기 위하여, 배양물내로 산소 또는 산소-함유 기체 (예, 공기)를 주입한다. 배양물의 온도는 보통 20 내지 45 , 바람직하게는 25 내지 40 이다. 또한, 발효기를 이용할 수 있다. 발효기를 이용하여 단백질을 생산할 때는 숙주세포의 성장속도와 발현산물의 양 등 여러 인자를 고려해야 한다. 적절한 배양조건에서 IPTG 등을 투여하여 단백질의 발현을 유도할 수도 있다. 본 발명의 변이된 IgG4 Fc 단편은 숙주 세포내에서 응집체 형태로 과다 발현될 수 있으며 수용체 형태로 발현될 수 있다. 발현 형태는 상관없이 통상의 단백질 정제방법을 통해 정제될 수 있다.

[81]

[82] 따라서, 본 발명의 다른 양태에 따라, 본 발명은 변이된 IgG4 Fc 단편의 제조 방법을 제공하며, 이 방법은 변이된 IgG4 Fc 단편을 코딩하는 핵산을 포함하는

벡터가 도입된 미생물을 배양하는 단계를 포함하다.

[83]

[84] 상기 방법에 따라 대장균 등의 원핵세포에서 생산된 상기 IgG4 Fc 단편의 산업적 적용은 특별히 제한되지 않는다. 한 가지 예시적 적용은 임의의 약물과 결합체 형성을 위한 캐리어로 사용하는 것이다.

[85] 따라서, 본 발명의 다른 양태에 따라, 본 발명은 약물, 및 상기한 변이된 IgG4 Fc 단편이 링커를 통해 결합된 약물 결합체를 제공한다.

[86] 본 발명에서 약물 결합체 또는 결합체는 하나 이상의 약물이 하나 이상의 상기 변이된 IgG4 Fc 단편과 상호 연결되어 있는 것을 의미한다.

[87] 본 발명에서 약물이란 인간이나 동물에게 투여될 경우 치료적 활성을 나타내는 물질을 의미하며, 폴리펩타이드, 화합물, 추출물, 핵산 등을 포함하나 이에 제한되지 않는다. 약물은 바람직하게는, 폴리펩타이드 약물이다.

[88] 본 발명에서, 생리활성 폴리펩타이드 약물, 폴리펩타이드 약물 및 단백질 약물은 동일한 의미로 사용되며, 생체내에서 다양한 생리적 현상에 길항작용을 나타내는 생리활성형인 것을 특징으로 한다.

[89] 상기 IgG4 Fc 단편과 약물이 결합된 결합체의 형태는 특별히 제한되지 않으며, 상기 IgG4 Fc 단편과 약물은 다양한 비율로 결합가능하다.

[90]

[91] 본 발명에 있어서, 링커는 펩타이드성 링커 또는 비펩타이드성 링커 모두를 포함할 수 있으나, 바람직하게는 비펩타이드성 링커이며, 보다 바람직하게는 비펩타이드성 중합체이다.

[92] 비펩타이드성 중합체는 반복 단위가 2개 이상 결합된 생체 적합성 중합체를 의미하며, 상기 반복 단위들은 펩타이드 결합이 아닌 임의의 공유결합을 통해 서로 연결된다. 비펩타이드성 중합체는 폴리에틸렌 글리콜, 폴리프로필렌 글리콜, 에틸렌 글리콜과 프로필렌 글리콜의 공중합체, 폴리옥시 에틸화 폴리올, 폴리비닐 알콜, 폴리사카라이드, 덱스트란, 폴리비닐 에틸 에테르, PLA(폴리락트산, polylactic acid) 및 PLGA(폴리락틱-글리콜산, polylactic-glycolic acid)와 같은 생분해성 고분자, 지질 중합체, 키틴류, 히아루론산 및 이들의 조합으로 구성된 군으로부터 선택될 수 있으며, 바람직하게는 폴리에틸렌 글리콜이다. 당해 분야에 이미 알려진 이들의 유도체 및 당해 분야의 기술 수준에서 용이하게 제조할 수 있는 유도체들도 본 발명의 범위에 포함된다.

[93] 본 발명에 있어서, 비펩타이드성 중합체는 양 말단 또는 세 말단을 가질 수 있으며, 상기 비 펩타이드성 중합체의 말단 반응기는 반응 알데히드 그룹, 프로피온 알데히드 그룹, 부틸 알데히드 그룹, 말레이미드(maleimide) 그룹 및 석시니미드(succinimide) 유도체로 이루어진 군으로부터 선택되는 것이 바람직하다. 상기에서, 석시니미드 유도체로는 석시니미딜 프로피오네이트, 히드록시 석시니미딜, 석시니미딜 카르복시메틸 또는 석시니미딜 카보네이트가 이용될 수 있다. 특히, 상기 비펩타이드성 중합체가 말단에 반응 알데히드

그룹의 반응기를 갖는 경우, 비특이적 반응을 최소화하고, 비펩타이드성 중합체의 말단에서 생리활성 폴리펩타이드 및 면역글로불린 Fc 단편과 각각 결합하는데 효과적이다. 알데히드 결합에 의한 환원성 알킬화로 생성된 최종 산물은 아미드 결합으로 연결된 것보다 훨씬 안정적이다. 알데히드 반응기는 낮은 pH에서 N-말단에 선택적으로 반응하며, 높은 pH, 예를 들어 pH9.0 조건에서는 라이신 잔기와 공유결합을 형성할 수 있다.

[94]

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

[96]

[97] 본 발명의 변이된 IgG4 Fc 단편과 결합되어 사용될 수 있는 생리활성 폴리펩타이드로는 혈중 반감기를 증가시킬 필요가 있는 것이면 어느 것이나 특별한 제한이 없이 사용할 수 있다. 예를 들어, 인간의 질병을 치료 또는 예방할 목적으로 사용되는 싸이토카인, 인터루킨, 인터루킨 결합 단백질, 효소, 항체, 성장인자, 전사조절인자, 혈액인자, 백신, 구조단백질, 리간드 단백질 또는 수용체, 세포표면항원, 수용체 길항물질과 같은 다양한 생리활성 폴리펩타이드, 이들의 유도체 및 유사체들을 예시할 수 있다.

[98] 구체적으로, 생리활성 폴리펩타이드는 인간 성장호르몬, 성장호르몬 방출 호르몬, 성장호르몬 방출 펩타이드, 인터페론류와 인터페론 수용체류(예: 인터페론-알파, -베타 및 -감마, 수용성 타입 I 인터페론 수용체 등), 콜로니 자극인자, 인터루킨류(예: 인터루킨-1, -2, -3, -4, -5, -6, -7, -8, -9, -10, -11, -12, -13, -14, -15, -16, -17, -18, -19, -20, -21, -22, -23, -24, -25, -26, -27, -28, -29, -30 등)와 인터루킨 수용체류(예: IL-1 수용체, IL-4 수용체 등), 효소류(예: 글루코세레브로시다제(glucocerebrosidase), 이두로네이트-2-설파타제(iduronate-2-sulfatase), 알파-갈락토시다제-A, 아갈시다제 알파(agalsidase alpha), 베타, 알파-L-이두로니다제(alpha-L-iduronidase), 뷰티릴콜린에스터라제(butyrylcholinesterase), 키티나제(chitinase), 글루타메이트 디카르복실라제(glutamate decarboxylase), 이미글루세라제(imiglucerase), 리파제(lipase), 유리케이즈(uricase), 혈소판-활성인자 아세틸하이드롤라제(platelet-activating factor acetylhydrolase), 중성 엔도펩티다제(neutral endopeptidase), 마이엘로퍼옥시다제(myeloperoxidase) 등), 인터루킨 및 사이토카인 결합 단백질류(예: IL-18bp, TNF-결합 단백질 등),

마크로파지 활성인자, 마크로파지 펩타이드, B 세포인자, T 세포인자, 단백질 A, 알러지 억제인자, 세포 괴사 당단백질, 면역독소, 림포독소, 종양 괴사인자, 종양 억제인자, 전이 성장인자, 알파-1 안티트립신, 알부민, 알파-락트알부민(alpha-lactalbumin), 아포리포단백질-E, 적혈구 생성인자, 고당쇄화 적혈구 생성인자, 안지오포이에틴류(angiopoietin), 헤모글로빈, 트롬빈(thrombin), 트롬빈 수용체 활성 펩타이드, 트롬보모듈린(thrombomodulin), 혈액인자 , 혈액인자 a, 혈액인자 , 혈액인자 , 혈액인자 XIII, 플라즈미노겐 활성인자, 피브린-결합 펩타이드, 유로키나제, 스트렙토키나제, 히루딘(hirudin), 단백질 C, C-반응성 단백질, 레닌 억제제, 콜라게나제 억제제, 수퍼옥사이드 디스뮤타제, 렙틴, 혈소판 유래 성장인자, 상피세포 성장인자, 표피세포 성장인자, 안지오스타틴(angiostatin), 안지오텐신(angiotensin), 골 형성 성장인자, 골 형성 촉진 단백질, 칼시토닌, 인슐린 및 인슐린 유도체, 아트리오펩틴, 연골 유도인자, 엘카토닌(elcatonin), 결합조직 활성인자, 조직인자 경로 억제제(tissue factor pathway inhibitor), 여포 자극 호르몬, 황체 형성 호르몬, 황체 형성 호르몬 방출 호르몬, 신경 성장인자류(예: 신경 성장인자, 모양체 신경영양인자(cilliary neurotrophic factor), 악소제네시스 인자-1(axogenesis factor-1), 뇌-나트륨 이뇨 펩타이드(brain-natriuretic peptide), 신경교 유래 신경영양인자(glial derived neurotrophic factor), 네트린(netrin), 중성구 억제인자(neurophil inhibitor factor), 신경영양인자, 뉴트린(neuturin) 등), 부갑상선 호르몬, 릴랙신, 시크레틴, 소마토메딘, 인슐린 유사 성장인자, 부신피질 호르몬, 글루카곤, Glucagon-like Peptide-1 혹은 엑센딘-4 (Exendin4)와 같은 인슐린 분비 펩타이드, 장에서 분비된는 incretin류, metabolic syndrome에 효과가 있는것으로 알려진 leptin과 같은 adipocyte류 및 neuro-cytokine류, 콜레시스토키닌, 췌장 폴리펩타이드, 가스트린 방출 펩타이드, 코티코트로핀 방출인자, 갑상선 자극호르몬, 오토탁신(autotaxin), 락토페린(lactoferrin), 미오스타틴(myostatin), 수용체류(예: TNFR(P75), TNFR(P55), IL-1 수용체, VEGF 수용체, B 세포 활성인자 수용체 등), 수용체 길항물질(예: IL1-Ra 등), 세포표면항원(예: CD 2, 3, 4, 5, 7, 11a, 11b, 18, 19, 20, 23, 25, 33, 38, 40, 45, 69 등), 단일클론 항체, 다중클론 항체, 항체 단편류(예: scFv, Fab, Fab', F(ab')2 및 Fd), 바이러스 유래 백신 항원 등을 예시할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 본 발명에서 적용가능한 생리활성 폴리펩타이드는 천연형이거나, 대장균과 같은 원핵세포나 효모세포, 곤충세포 또는 동물세포와 같은 진핵세포에서 유전자 재조합에 의해 생산된 것일 수 있으며, 또한 천연형과 동등한 활성을 가지고 하나 이상의 아미노산 위치에서 돌연변이가 일어난 유도체일 수 있다.

[99]

[100] 본 발명의 변이된 IgG4 Fc 단편은 직접 유전자 재조합 방법을 이용하여 생리활성 폴리펩타이드와 하나의 유전자서열로 연결된 후 하나의 세포로부터 생산하거나, 독립적으로 IgG4 Fc 단편만을 생산한 후 생리활성 폴리펩타이드를

비롯한 약물에 세포외에서 결합시킬 수 있다.

[101]

[102] 본 발명의 또 다른 양태로서, 본 발명은 상기한 본 발명의 약물 결합체를 유효성분으로 포함하는 약학 조성물을 제공한다.

[103] 본 발명의 결합체를 포함한 약학 조성물은 약제적으로 허용가능한 담체를 포함할 수 있다. 약학적으로 허용되는 담체는 경구투여시에는 결합제, 활탁제, 붕해제, 부형제, 가용화제, 분산제, 안정화제, 현탁화제, 색소, 향료 등을 사용할 수 있으며, 주사제의 경우에는 완충제, 보존제, 무통화제, 가용화제, 등장제, 안정화제 등을 혼합하여 사용할 수 있으며, 국소 투여용의 경우에는 기제, 부형제, 윤활제, 보존제 등을 사용할 수 있다.

[104] 본 발명의 약학 조성물의 제형은 상술한 바와 같은 약제학적으로 허용되는 담체와 혼합하여 다양하게 제조될 수 있다. 예를 들어, 경구 투여시에는 정제, 트로키, 캡슐, 엘릭서(elixir), 서스펜션, 시럽, 웨이퍼 등의 형태로 제조할 수 있으며, 주사제의 경우에는 단위 투약 앰플 또는 다수회 투약 형태로 제조할 수 있다. 기타, 용액, 현탁액, 정제, 캡슐, 서방형 제제 등으로 제형할 수 있다.

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

[106] 본 발명에 있어서, IgG4 Fc 단편이 캐리어로 사용된 약물의 실제 투여량은 치료할 질환, 투여 경로, 환자의 연령, 성별 및 체중, 및 질환의 중증도 등의 여러 관련 인자와 함께, 활성성분인 약물의 종류에 따라 결정된다. 본 발명의 약학 조성물은 생체내 지속성이 매우 우수하므로, 본 발명의 약학적 제제의 투여 횟수 및 빈도를 현저하게 감소시킬 수 있다.

[107] 본 발명의 약학 조성물은 여러 경로를 통해 투여될 수 있다.

[108] 본 발명에서 투여는 어떠한 적절한 방법으로 환자에게 소정의 물질을 도입하는 것을 의미하며 상기 결합체의 투여 경로는 약물이 목적 조직에 도달할 수 있는 한 어떠한 일반적인 경로를 통하여 투여될 수 있다. 복강내 투여, 정맥내 투여, 근육내 투여, 피하 투여, 피내 투여, 경구 투여, 국소 투여, 비내 투여, 폐내 투여, 직장내 투여 될 수 있으나, 이에 제한되지는 않는다. 그러나 경구 투여시, 펩타이드는 소화가 되기 때문에 경구용 조성물은 활성 약제를 코팅하거나 위에서의 분해로부터 보호되도록 제형화하는 것이 바람직하다. 바람직하게는 주사제 형태로 투여될 수 있다. 또한, 약학 조성물은 활성 물질이 표적 세포로 이동할 수 있는 임의의 장치에 의해 투여될 수 있다.

[109]

발명의 실시를 위한 형태

[110] 이하, 하기 실시예에 의하여 본 발명을 더욱 상세하게 설명하고자 한다. 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하기 위한 것일 뿐 본 발명의 범위가 이들만으로 한정되는 것은 아니다.

[111]

[112] **실시예 1. 인간 과립구 콜로니자극인자-PEG-면역글로불린 결합체의 제조**

[113]

[114] <1-1> IgG4 Fc 영역 발현벡터의 제작

[115] IgG4의 힌지영역을 포함한 중쇄 Fc 영역을 클로닝하기 위해 인간의 혈액에서 수득한 혈구 세포의 RNA를 주형으로 하여 다음과 같이 RT-PCR을 수행하였다. 먼저, Qiamp RNA 혈액 키트(Qiagen사)를 사용하여 약 6 의 혈액에서 전체 RNA를 분리한 후, 이 RNA를 주형으로 하고 One-Step RT-PCR 키트(Qiagen사)를 사용하여 유전자를 증폭하였다. 이때, 프라이머로는 서열번호 4(gggcatatgc catcatgccc agcacctgag ttcctgggg)와 5 (gggggatccc tatttaccca gagacaggga ga)쌍을 사용하였다. 이 후의 클로닝 과정을 용이하게 하기 위해 프라이머에는 NdeI 제한효소 인식부위와 단백질 발현을 위해 필요한 개시코돈인 ATG를 삽입하였고, 서열번호 5의 3-프라이머에는 종결 코돈을 포함하는 BamHI 제한효소 인식부위를 삽입하였다. 이로부터 증폭된 Fc 영역 산물을 각각 NdeI과 BamHI으로 절단한 후 동일한 제한효소로 처리된 플라스미드 pET22b(Novagen사)에 삽입하여 플라스미드를 제조하였다. 플라스미드는 IgG4 Fc 단편이 IgG4 Fc 힌지의 전체 아미노산 서열인 Glu-Ser-Lys-Tyr-Gly-Pro-Pro-Cys-Pro-Ser-Cys-Pro중에서 1번째 내지 8번째 아미노산 잔기가 결실된 힌지 서열을 포함하도록 고안되었다.

[116] 본 실시예의 플라스미드를 pmHMC001로 명명하였으며, 염기서열 분석 결과 IgG4 Fc 단편을 코딩하는 핵산은 서열번호 3의 염기서열을 가지며, 발현시 IgG4 Fc 단편은 서열번호 2의 아미노산 서열을 갖는다.

[117] 상기 제작된 발현벡터를 대장균 BL21(DE3)에 형질전환시켜 대장균 형질전환체 BL21/pmHMC001(HMC001)를 제조하였다.

[118]

[119] <1-2> IgG4 Fc 영역의 발현 및 정제

[120] 상기 실시예 <1-1>에서 수득한 미생물 형질전환체를 발효기(Marubishi사)에 접종하여 발효시킨 후 IgG4 Fc 단편의 발현유무를 확인하였다.

[121] 먼저, LB 배지 100 에 상기 형질전환체들을 각각 밤새 진탕 배양한 후 발효기에 접종하여 본 배양을 진행하였다. 발효기의 온도는 35 혹은 28를 유지하였으며, 혐기성 상태로 가는 것을 방지하기 위해 공기를 20 vvm으로 투입하면서 500 rpm으로 교반하였다. 발효가 진행됨에 따라 미생물의 성장을 위해 부족한 에너지원은 포도당(glucose)과 효모 추출액(yeast extract)을 미생물의 발효 상태에

따라 투여하였고, 흡광도 600 에서 OD값이 80이 되는 시기에 유도물질(inducer)인 IPTG를 투여하여 발현을 유도하였다. 이를 40 내지 45시간 동안 배양하여 흡광도 600 에서 OD값이 100 내지 120이 되도록 고농도로 배양하였다.

[122] 상기에서 대장균 형질전환체로부터 IgG4 Fc의 발현 유무를 확인하기 위하여 아래와 같은 시험을 실시하였다.

[123] 세포질 내에서의 전체 발현 유무를 확인하기 위해 상기 발효액 일부를 2x 단백질 점적 버퍼와 동량으로 섞은 후 15% SDS-PAGE (Criterion Gel, Bio-Rad)에 전기 영동한 결과 제조한 형질전환체에서 IgG Fc가 과발현됨을 확인하였다. 과발현된 상기 단백질은 응집체를 형성함을 확인하였으며 응집체로부터 같은 방법으로 리폴딩과 컬럼 작업을 수행하여 정제를 완료하였다. 먼저 세포 10g을 lysis 버퍼(10mM Tris, pH9.0, 1mM EDTA, 0.5% Triton X-100, 0.2M NaCl) 100mL에 녹여 울트라-소니케이션을 한다. 10,000rmp에서 20분간 원심분리하여 수용성 분획과 불용성 분획을 분리한 후 불용성 응집체 2g을 1M Tris(pH9.0) 20mL과 수용화 버퍼(solublization buffer, 6M Guanidine, 50mM Tris) 20mL에 녹인 후 4에서 30분간 가볍게 흔들면서 반응시킨다. 반응이 완료되면 4에서 리폴딩 버퍼(2M urea, 50mM Trsi, 0.25M Arginine, 3mM cysteine,pH9.0)를 10배 첨가하여 희석한 후 밤새 가볍게 섞어주며 반응시킨다. 반응이 완료된 시료는 Sephadex G25를 사용하여 10mM Tris-HCl (pH8.0) 으로 버퍼 교환을 하였다. 버퍼 교환된 시료는 DEAE-FF (GE healthcare)을 이용하여 10 mM Tris-HCl(pH8.0)와 NaCl의 농도 구배로 용출하였으며, 다량의 멀티머와 모노머를 제거하기 위해 Phenyl-FF (GE healthcare)를 Ammonium Sulfate 와 10 mM Tris-HCl (pH7.5)의 농도 구배로 용출하였다. 다음 컬럼 공정을 위해 Sephadex G25 (GE healthcare)를 사용하여 10mM Tris(pH7.5)로 탈염화하였으며, 최종적으로 고순도의 IgG4 Fc를 얻기 위해 Source 15Q (GE healthcare)를 10 mM Tris-HCl (pH7.5) 와 NaCl의 농도 구배로 용출하여 최종적으로 IgG4 Fc를 획득하였다.

[124] <1-3> 약물 결합체의 제조 I

[125] 1)과립구 콜로니 자극인자와 PEG 연결체의 제조

[126] 양쪽 말단에 알데히드 반응기를 가진 분자량 3.4 kDa의 폴리(에틸렌 글리콜)인 ALD-PEG-ALD(Shearwater Inc.미국)를 과립구 콜로니 자극인자가 5 mg/ml 농도로 용해된 100 mM 인산염 완충액에 과립구 콜로니 자극인자: PEG의 몰비가 1:5가 되도록 첨가하였다. 환원제인 나트륨 시아노 보로하이드라이드(NaCNBH3)를 최종 농도 20 mM이 되도록 첨가하고, 4에서 천천히 교반하면서 3시간동안 반응시켰다. 과립구 콜로니 자극인자의 아미노 말단 부위에 선택적으로 PEG가 연결되고, PEG와 과립구 콜로니 자극인자가 1:1로 결합된 연결체를 얻기 위하여 반응 혼합물을 가지고 슈퍼덱스(Superdex R , Pharmacia, 미국) 크기 배제(size exclusion) 크로마토그래피를 실시하였다. 용출액으로 10 mM 칼륨-포스페이트 완충액(pH 6.0)을 사용하여 과립구 콜로니

자극 인자-PEG 연결체를 정제하였고, PEG와 결합하지 않은 과립구 콜로니 자극 인자, 미반응 PEG 및 2개의 과립구 콜로니 자극 인자가 PEG와 연결된 이량체 부산물을 제거하였다. 정제된 과립구 콜로니 자극 인자-PEG 연결체를 5 mg/ml로 농축하였다.

[127]

[128] 2)과립구 콜로니 자극 인자-PEG 연결체와 IgG4 Fc 단편의 결합체 형성

[129] 본 발명의 IgG4 Fc 단편을 100 mM 인산염 완충액에 용해시켰다. 상기에서 정제된 과립구 콜로니 자극 인자-PEG 연결체의 알데히드 반응기에 IgG4 Fc 단편을 결합시키기 위해, 과립구 콜로니 자극 인자-PEG 연결체: IgG4 Fc 단편의 몰비가 1:5가 되도록 과립구 콜로니 자극 인자-PEG 연결체를 IgG4 Fc 단편-함유 완충액에 가하였다. 환원제로서 나트륨시아노보로하이드라이드(NaCNBH3)를 최종 농도가 20 mM이 되도록 첨가하였다. 반응 혼합물을 4에서 20 시간 동안 천천히 교반하면서 반응을 진행시켰다. 결합 반응 후 미반응 물질 및 부산물을 제거하고 생성된 과립구 콜로니 자극 인자-PEG-면역글로불린 단백질 결합체를 정제하기 위하여 음이온 교환 크로마토그래피를 수행하였다. 20 mM 트리스 완충액(pH 7.5)으로 평형화시킨 DEAE 컬럼(Pharmacia, 미국)에 상기 반응물을 넣고 1 M 염화나트륨(NaCl)을 포함한 동일 완충액을 직선 농도구배(염화나트륨 농도 0 M -> 0.5 M) 방법으로 흘려 과립구 콜로니 자극 인자-PEG-IgG4 Fc 단편 결합체를 정제하였다. 얻어진 과립구 콜로니 자극 인자-PEG-IgG4 Fc 단편 분획에 불순물로서 섞여 있는 소량의 미반응 면역글로불린 및 인간 성장호르몬을 제거하기 위해 추가로 양이온 교환 수지 크로마토그래피를 수행하였다. 과립구 콜로니 자극 인자-PEG-IgG4 Fc 단편 분획을 10 mM 아세트산 나트륨(pH 4.5)으로 평형화시킨 polyCAT 컬럼(PolyLC, 미국)에 넣고 1 M 염화나트륨(NaCl)을 포함한 10 mM 아세트산 나트륨(pH 4.5) 완충액을 직선 농도구배(염화나트륨 농도 0 M -> 0.5 M) 방법으로 흘려 추가 정제를 실시하여 과립구 콜로니 자극 인자-PEG-IgG4 Fc 단편 결합체(HM10460A)를 순수하게 획득하였다.

[130]

[131] **실시예 2. 랫트 혈액에서의 인간 과립구 콜로니자극인자-PEG-면역글로불린 결합체와 인간 IgG4 사슬교환 여부 확인**

[132]

[133] 인간 IgG4 2 mg을 20 mg/mL의 비오틴-7-NHL 용액과 1:10 분자 비율로 혼합하여 비오틴 표지시킨 후 비오틴 단백질 라벨링 키트(Biotin Protein Labelling Kit)(Roche)로 정제하였다. 정상 랫트로부터 채혈한 혈액을 헤파린으로 응고방지 처리한 후, 페니실린-스트렙토마이신 1% v/v를 첨가하였다. 비오틴 표지된 IgG4 1.5 mg과 HM10460A 1.32 mg을 3 mL의 혈액에 첨가하여 혼합한 후, 0.5 mL 씩 6개의 튜브에 분주하여, 37 배양기에서 배양하였다. 0, 4, 10, 24, 48 시간마다 튜브를 하나씩 취하여 혈장을 분리하여 -20에서 보관하였다. 각 혈장시료들과

표준물질들을 비환원 단백질 샘플 버퍼(protein sample buffer)와 혼합하고, 4-15% 농도구배 폴리아크릴아미드겔을 이용하여 SDS-PAGE를 실시하였다. 표준물질로는 비오틴 표지된 IgG4와 HM10460A을 사용하였다. 전기영동이 끝난 겔은 PVDF membrane (Immobilon-P, MILLIPORE) 으로 블로팅하여 항인간 GCSF 항체와 스트렙타비딘-HRP을 이용하여 분석하였다. 이들 항체 결합 조건은, 항인간 IgG Fc 항체(Anti-human IgG, Fc specific, Sigma)는 5% skim milk 블로킹 조건에서 1:150000 비율로 희석하여 사용하였으며, 항 인간 GCSF 항체 (Human G-CSF Assay Kit. IBL)는 1% skim milk 블로킹 조건에서 1:2000 희석비율로, 스트렙타비딘-HRP은 5% skim milk 블로킹 조건에서 1:5000 희석비율로 각각 사용하였다. HM10460A는 HM10460A 자체 간의 사슬교환 기전에 의해 IgG4 Fc 단편 한 분자에 두 개의 G-CSF를 갖는 이량체 (94 kDa)와 IgG4 Fc 단편(50 kDa)을 형성하는 것으로 확인되었다.

[134] 반면, HM10460A가 인간 IgG4와 상호 사슬교환 작용을 유발하였을 경우, 100 kDa, 122 kDa 크기의 분자가 새롭게 생성될 것으로 예상되나 Western blot 분석 결과, 이러한 분자는 관찰되지 않았다. 반면, 스트렙타비딘-HRP로 분석하였을 때, 인간 IgG4 lane에서 75 kDa 크기의 밴드가 나타났는데, 이것은 인간 IgG4의 본래의 특성으로 이량체인 인간 IgG4로부터 단량체가 형성되는 것이다 (도 1).

[135]

[136] **실시예 3. 인간 혈액에서의 인간 과립구 콜로니자극인자-PEG-면역글로불린 결합체와 인간 IgG4 사슬교환 여부 확인**

[137]

[138] 공여자로부터 채혈한 인간혈액에 페니실린-스트렙토마이신 1% v/v을 첨가하였다. 상기 실시예 1에서 제조한 1.32 mg의 HM10460A를 혈액 3 mL과 혼합한 후 0.5 mL 씩 6개의 튜브에 분주하여, 37 배양기에서 배양하였다. 0, 4, 10, 24, 48 시간마다 1개 튜브씩 취하여 혈장을 분리하고 분석 전까지 -20에서 보관하였다. 각 혈장시료들과 대조물질로서 여러 농도의 HM10460A, IgG4 Fc 단편을 비환원 단백질 샘플 버퍼와 혼합하고, 4-15% 농도구배 폴리아크릴아미드겔에서 SDS-PAGE를 실시하였다. 전기영동이 완료된 겔은 PVDF membrane (Immobilon-P, MILLIPORE)으로 블로팅하여 항인간 GCSF 항체를 이용하여 분석하였다. 항인간 G-CSF 항체 (Human G-CSF Assay Kit. IBL)는 1% skim milk 블로킹 조건에서 1:2000 희석비율로 사용하였다. 랫트 혈액에서와 같이 인간 IgG4와의 사슬교환에 의해 생성될 수 있는 100 kDa, 122 kDa의 분자는 생성되지 않았다 (도 2).

[139]

청구범위

[청구항 1] 하기의 아미노산 서열을 갖는 힌지 서열 중 일부가 결실되어 하나의 시스테인 잔기만을 갖도록 변이된 힌지 영역을 포함하는, 변이된 IgG4 Fc 단편:
Glu-Ser-Lys-Tyr-Gly-Pro-Pro-Cys-Pro-Ser-Cys-Pro.

[청구항 2] 제1항에 있어서, 생체내 사슬교환 및 단량체 형성이 일어나지 않는 것인 변이된 IgG4 Fc 단편.

[청구항 3] 제1항에 있어서, 상기 힌지 영역은 8번째 위치의 Cys 잔기를 포함하는 1 내지 8개의 연속적이거나 불연속적인 아미노산이 결실되어 변이된 것인 변이된 IgG4 Fc 단편.

[청구항 4] 제1항에 있어서, 상기 힌지 영역은 11번째 위치의 Cys 잔기를 포함하는 1 내지 8개의 연속적이거나 불연속적인 아미노산이 결실되어 변이된 것인 변이된 IgG4 Fc 단편.

[청구항 5] 제1항에 있어서, 상기 힌지 영역은 8번째 위치의 Cys 잔기를 포함하는 1 내지 5개의 연속적이거나 불연속적인 아미노산이 결실되어 변이된 것인 변이된 IgG4 Fc 단편.

[청구항 6] 제1항에 있어서, 상기 힌지 영역은 11번째 위치의 Cys 잔기를 포함하는 1 내지 5개의 연속적이거나 불연속적인 아미노산이 결실되어 변이된 것인 변이된 IgG4 Fc 단편.

[청구항 7] 제1항에 있어서, 상기 힌지 영역은 8번째 위치의 Cys 잔기를 포함하는 1 내지 3개의 연속적이거나 불연속적인 아미노산이 결실되어 변이된 것인 변이된 IgG4 Fc 단편.

[청구항 8] 제1항에 있어서, 상기 힌지 영역은 11번째 위치의 Cys 잔기를 포함하는 1 내지 3개의 연속적이거나 불연속적인 아미노산이 결실되어 변이된 것인 변이된 IgG4 Fc 단편.

[청구항 9] 제1항에 있어서, 비당쇄화된 것인 IgG4 Fc 단편.

[청구항 10] 제1항에 있어서, 비펩타이드성 중합체로 개질된 것인 변이된 IgG4 Fc 단편.

[청구항 11] 제1항의 IgG4 Fc 단편을 인코딩하는 핵산.

[청구항 12] 제11항의 핵산을 포함하는 벡터.

[청구항 13] 제12항의 벡터가 도입된 미생물.

[청구항 14] 제13항의 미생물을 배양하는 단계를 포함하는, 제1항 내지 제10항 중 어느 한 항의 IgG4 Fc 단편을 제조하는 방법.

[청구항 15] 약물, 및 제1항 내지 제10항 중 어느 한 항의 변이된 IgG4 Fc 단편이 링커를 통해 결합된 약물 결합체.

[청구항 16] 제15항에 있어서, 약물은 인간 성장호르몬, 성장호르몬 방출 호르몬, 성장호르몬 방출 펩타이드, 인터페론류와 인터페론

수용체류, 콜로니 자극인자, 인터루킨류와 인터루킨 수용체류, 효소류, 인터루킨 및 사이토카인 결합 단백질류, 마크로파지 활성인자, 마크로파지 펩타이드, B 세포인자, T 세포인자, 단백질 A, 알러지 억제인자, 세포 괴사 당단백질, 면역독소, 림포독소, 종양 괴사인자, 종양 억제인자, 전이 성장인자, 알파-1 안티트립신, 알부민, 알파-락트알부민(alpha-lactalbumin), 아포리포단백질-E, 적혈구 생성인자, 고 당쇄화 적혈구 생성인자, 안지오포이에틴류(angiopoietin), 헤모글로빈, 트롬빈(thrombin), 트롬빈 수용체 활성 펩타이드, 트롬보모듈린(thrombomodulin), 혈액인자 , 혈액인자 a, 혈액인자 , 혈액인자 , 혈액인자 XIII, 플라즈미노겐 활성인자, 피브린-결합 펩타이드, 유로키나제, 스트렙토키나제, 히루딘(hirudin), 단백질 C, C-반응성 단백질, 레닌 억제제, 콜라게나제 억제제, 수퍼옥사이드 디스뮤타제, 렙틴, 혈소판 유래 성장인자, 상피세포 성장인자, 표피세포 성장인자, 안지오스타틴(angiostatin), 안지오텐신(angiotensin), 골 형성 성장인자, 골 형성 촉진 단백질, 칼시토닌, 인슐린 및 인슐린 유도체, 아트리오펩틴, 연골 유도인자, 엘카토닌(elcatonin), 결합조직 활성인자, 조직인자 경로 억제제(tissue factor pathway inhibitor), 여포 자극 호르몬, 황체 형성 호르몬, 황체 형성 호르몬 방출 호르몬, 신경 성장인자류(예: 신경 성장인자, 모양체 신경영양인자(cilliary neurotrophic factor), 악소제네시스 인자-1(axogenesis factor-1), 뇌-나트륨 이뇨 펩타이드(brain-natriuretic peptide), 신경교 유래 신경영양인자(glial derived neurotrophic factor), 네트린(netrin), 중성구 억제인자(neurophil inhibitor factor), 신경영양인자, 뉴트린(neuturin) 등), 부갑상선 호르몬, 릴랙신, 시크레틴, 소마토메딘, 인슐린 유사 성장인자, 부신피질 호르몬, 글루카곤, Glucagon-like Peptide-1 혹은 엑센딘-4 (Exendin4)와 같은 인슐린 분비 펩타이드, 장에서 분비된는 incretin류, metabolic syndrome에 효과가 있는것으로 알려진 leptin과 같은 adipocyte류 및 neuro-cytokine류, 콜레시스토키닌, 췌장 폴리펩타이드, 가스트린 방출 펩타이드, 코티코트로핀 방출인자, 갑상선 자극호르몬, 오토탁신(autotaxin), 락토페린(lactoferrin), 미오스타틴(myostatin), 수용체류, 수용체 길항물질, 세포표면항원, 단일클론 항체, 다중클론 항체, 항체 단편류, 바이러스 유래 백신 항원으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 결합체.

[청구항 17] 제15항에 있어서, 약물은 과립구 콜로니 자극인자인 것인 결합체.

[청구항 18] 제15항에 있어서, 링커는 비펩타이드성 중합체인 것인 결합체.

[청구항 19] 제18항에 있어서, 비펩타이드성 중합체는 양 말단 또는 세 말단을 갖는 것인 결합체.

[청구항 20] 제15항의 결합체를 포함하는 약학 조성물.

[청구항 21] 하기의 아미노산 서열을 갖는 힌지 서열 중 일부가 결실되어 하나의 시스테인 잔기만을 갖도록 변이된 힌지 영역을 포함하는 변이된 IgG4 Fc 단편을 포함하며, 생체내 사슬교환 및 단량체 형성이 일어나지 않는 것을 특징으로 하는 약물 캐리어:
Glu-Ser-Lys-Tyr-Gly-Pro-Pro-Cys-Pro-Ser-Cys-Pro.