



- (51) 국제특허분류:
A61K 38/16 (2006.01) A61K 47/48 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2016/003254
- (22) 국제출원일: 2016년 3월 30일 (30.03.2016)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보:
10-2015-0045684 2015년 3월 31일 (31.03.2015) KR
- (71) 출원인: 일동제약주식회사 (ILDONG PHARM CO., LTD.) [KR/KR]; 06752 서울특별시 서초구 바우피로 27길 2 (양재동), Seoul (KR).
- (72) 발명자: 김성범 (KIM, Seong Beom); 16840 경기도 용인시 수지구 풍덕천로 75 706 동 1906 호 (풍덕천동, 신정마을상록아파트), Gyeonggi-do (KR). 정혜윤 (JUNG, Hyei Yoon); 06204 서울특별시 강남구 도곡로 77길 27, 302 호 (대치동, 대치 심스 빌), Seoul (KR). 양석우 (YANG, Seok Woo); 16688 경기도 수원시 영통구 태장로 45 201 동 601 호 (망포동, 망포마을현대 2 차아파트), Gyeonggi-do (KR). 권혁상 (KWON, Hyuk Sang); 05504 서울특별시 송파구 올림픽로 35길 104 26 동 1303 호 (신천동, 장미아파트), Seoul (KR). 강제훈

(KANG, Jae-Hoon); 06616 서울특별시 서초구 강남대로 61길 23, 407 호 (서초동, 현대성우주상복합아파트), Seoul (KR).

(74) 대리인: 이희숙 (LEE, Hee Sook); 06161 서울특별시 강남구 테헤란로 33길 11, 9층 (역삼동, JS빌딩) 시원국제특허법률사무소, Seoul (KR).

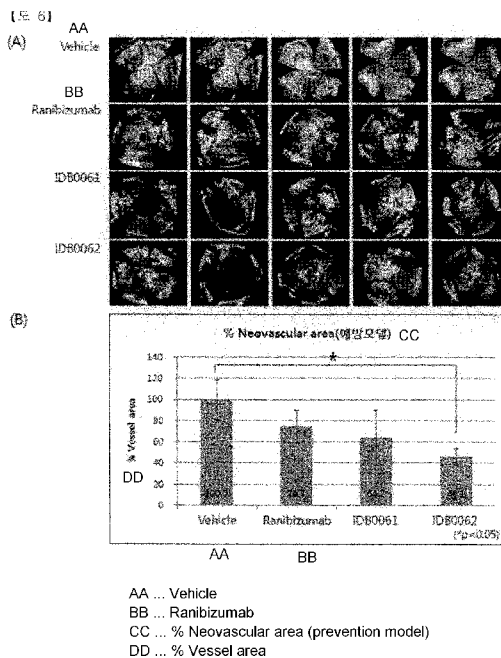
(81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR),

[다음 쪽 계속]

(54) Title: PHARMACEUTICAL COMPOSITION FOR PREVENTING AND TREATING EYE DISEASES, CONTAINING, AS ACTIVE INGREDIENT, FUSION PROTEIN IN WHICH TISSUE-PENETRATING PEPTIDE AND ANTI-VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR PREPARATION ARE FUSED

(54) 발명의 명칭: 조직투과성 펩타이드와 항-혈관 내피세포 성장인자 제제가 융합된 융합단백질을 유효성분으로 포함하는 안질환 예방 및 치료용 약학적 조성물



(57) Abstract: The present invention relates to a pharmaceutical composition for preventing and treating eye diseases, containing, as an active ingredient, a fusion protein in which a tissue-penetrating peptide and an anti-vascular endothelial growth factor (anti-VEGF) preparation are fused. More particularly, the present invention relates to: a pharmaceutical composition for preventing and treating eye diseases, containing, as an active ingredient, a fusion protein in which a tissue-penetrating peptide and an anti-VEGF preparation are fused, to a method for producing an anti-VEGF preparation, which overcomes resistance and has improved efficacy, the method comprising the steps of transforming a host cell with a recombinant vector containing a nucleic acid sequence coding for a fusion protein in which a tissue-penetrating peptide and an anti-VEGF preparation are fused, culturing the cell, and recovering a fusion protein from the cell; a method for treating eye diseases, comprising administering an effective dose of the fusion protein, according to the present invention, to a subject in need thereof; and a use for producing a preparation for treating eye diseases, containing the fusion protein, according to the present invention, as an active ingredient. Compared to conventional anti-VEGF preparations, the composition according to the present invention is considered to have improved efficacy and be able to be used for treating patients having drug resistance, by inhibiting various growth factors related to new blood vessels, besides VEGF, and by decreasing pericyte coverage. In addition, since drug delivery ability into the choroid tissue is improved when performing an intraocular injection, the composition can be developed into eye drops by reducing an administered dosage or extending an administration cycle, and by improving ocular penetrability.

(57) 요약서:

[다음 쪽 계속]



OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, — 명세서의 서열목록 부분과 함께 (규칙 5.2(a))
ML, MR, NE, SN, TD, TG).

공개:

— 국제조사보고서와 함께 (조약 제 21 조(3))

본 발명은 조직투과성 펩타이드와 항-혈관 내피세포 성장인자 제제가 융합된 융합단백질을 유효성분으로 포함하는 안질환 예방 및 치료용 약학적 조성물에 관한 발명에 대한 것으로, 보다 구체적으로는 조직투과성 펩타이드와 항-혈관 내피세포 성장인자(anti-VEGF) 제제가 융합된 융합단백질을 유효성분으로 포함하는 안질환 예방 및 치료용 약학적 조성물, 조직투과성 펩타이드와 항-혈관 내피세포 성장인자(anti-VEGF) 제제가 융합된 융합단백질을 코딩하는 핵산 서열을 포함하는 제조용 벡터를 숙주세포로 전환시키는 단계; 상기 세포를 배양하는 단계; 및 상기 세포로부터 융합단백질을 회수하는 단계를 포함하는 내성 극복 및 효능이 향상된 항-혈관 내피세포 성장인자 제제를 생산하는 방법, 본 발명에 따른 융합단백질의 유효량을 이를 필요로 하는 개체에 투여하는 것을 포함하는 안질환 치료 방법, 그리고 본 발명에 따른 융합단백질을 유효성분으로 포함하는 안질환 치료용 제제를 제조하기 위한 용도에 대한 것이다. 본 발명에 따른 조성물은 기존의 항-혈관 내피세포 성장인자 제제와 비교하여 혈관 내피세포 성장인자 이외의 신생혈관과 관련된 다양한 성장인자를 저해할 뿐만 아니라 pericyte coverage를 감소시켜 효능이 증대되고 약물 내성환자까지 치료할 수 있을 것으로 생각된다. 또한 안구 내 주사 시 맥락막 조직으로의 약물 전달력이 개선되어 투여용량 감소 또는 투여주기 증대 및 안구 투과도 개선을 통해 점안제로 개발될 수 있다.

【명세서】**【발명의 명칭】**

조직투과성 펩타이드와 항-혈관 내피세포 성장인자 제제가 융합된 융합단백질을 유효성분으로 포함하는 안질환 예방 및 치료용 약학적 조성물

【기술분야】

본 출원은 2015년 3월 31일에 출원된 대한민국 특허출원 제 10-2015-0045684호를 우선권으로 주장하고, 상기 명세서 전체는 본 출원의 참고문헌이다.

본 발명은 조직투과성 펩타이드와 항-혈관 내피세포 성장인자 제제가 융합된 융합단백질을 유효성분으로 포함하는 안질환 예방 및 치료용 약학적 조성물에 관한 발명으로, 보다 구체적으로는 조직투과성 펩타이드와 항-혈관 내피세포 성장인자(anti-VEGF) 제제가 융합된 융합단백질을 유효성분으로 포함하는 안질환 예방 및 치료용 약학적 조성물, 그리고 조직투과성 펩타이드와 항-혈관 내피세포 성장인자(anti-VEGF) 제제가 융합된 융합단백질을 코딩하는 핵산 서열을 포함하는 재조합 벡터를 숙주세포로 전환시키는 단계; 상기 세포를 배양하는 단계; 및 상기 세포로부터 융합단백질을 회수하는 단계를 포함하는 내성 극복 및 효능이 향상된 항-혈관 내피세포 성장인자 제제를 생산하는 방법, 본 발명에 따른 융합단백질의 유효량을 이를 필요로 하는 개체에 투여하는 것을 포함하는 안질환 치료 방법, 그리고 본 발명에 따른 융합단백질을 유효성분으로 포함하는 안질환 치료용 제제를 제조하기 위한 용도에 대한 것이다.

【배경기술】

황반(macula lutea)은 눈의 망막에서 시세포가 밀집되어 있어 빛을 가장 선명하고 정확하게 받아들이는 부분이며, 여러 가지 원인에 의해 이 황반부에 변성이 일어나 시력 장애를 일으키는 질환을 황반 변성(macular degeneration)이라고 한다. 상기 황반 변성은 녹내장, 당뇨병망막증과 함께 실명의 3대 원인 중의 하나이다. 황반 변성을 야기하는 가장 큰 원인은 연령증가이며, 그 외 가족력, 인종, 흡연 등도 원인으로 알려져 있으며, 황반이 손상되면 작은 활자체, 얼굴 생김새 또는 작은 물체와 같은 세부적인 것을 알아보는 능력을 상실하게 된다. 이러한 황반 변성은 비삼출성(건성) 황반 변성과 삼출성(습성) 황반 변성의 두 유형이 있으며, 황반 변성을 갖는 사람 중 90%는 건성 형태의 증상을 갖는다. 건성 황반 변성에서, 노폐물이 드루젠(drusen)이라고 불리는 황색 침전물을 형성하여 황반 아래 조직에 축적될

수 있다. 드루젠의 존재는 망막, 특히 황반으로의 혈류를 방해하게 되고, 혈류가 감소되면 황반으로의 영양분 공급을 감소시켜, 감광성 세포의 효율적 작용을 중지시키거나 위축시킨다. 습성 황반 변성의 경우, 새로운 약한 혈관이 망막 안 또는 그 아래에서 성장하여 액체 및 혈액이 황반 아래의 공간으로 새어나오게 된다. 습성 황반 변성은 때때로 맥락막 신생혈관이라고 기술되기도 하는데, 맥락막은 망막 아래쪽 혈관 영역이고 신생혈관은 조직 내 새로운 혈관 성장을 말하는 것으로, 맥락막 신생혈관이라는 명칭에서 유추할 수 있는 바와 같이 습성 황반 변성의 경우 맥락막으로부터 황반으로 혈관이 신생되어 성장하게 된다. 이러한 황반 변성은 노인에게 잘 생기는 질환으로 여겨졌으나 최근 들어 4, 50대 환자가 급증하고 있다고 알려져 있으며, 이러한 황반 변성 발병 연령층이 낮아진 주요 원인으로는 지방 섭취의 증가 등 식생활의 서구화 및 흡연, 음주, 자외선 노출 등 좋지 않은 생활습관이 지적되고 있다.

당뇨병성 황반부종(Diabetic Macular Edema, DME)은 망막 중심의 1원반 직경 내의 망막 및/또는 경성백반의 두꺼워짐으로써 설명된다. DME 및 당뇨망막병증(Diabetic Retinopathy, DR)은 당뇨병이 있는 환자에서의 미세혈관 합병증이며, 시력을 약하게 만들며, 결국 실명을 유발한다. DR이 있는 환자는 DME가 진행할 수 있고, 팽창된 고투과성 모세혈관 및 미세동맥류의 누출 때문에 혈액-망막 장벽의 파괴 후 DME가 생길 수 있다. DR과 마찬가지로, DME는 손상된 또는 조직 파괴된 브루크 막을 침투하는 맥락막 신혈관형성과 관련되어 있다.

한편, 상기한 황반 변성, 당뇨병성 황반부종을 비롯한 안구에서의 신생혈관과 관련된 여러 안질환의 예방 또는 치료를 위해 사용되고 있는 대표적인 치료제로는 라니비주맙(ranibizumab), 베바시주맙(bevacizumab), 아플리버셉트(aflibercept), 컨버셉트(conbercept) 등을 들 수 있다. 상기한 약물을 포함하여 현재 개발된 황반 변성 및 당뇨병성 망막부종 등 주요 안질환 치료용 바이오의약품은 주로 안구 내 주사제 형태로 망막을 포함한 안구 후방의 질환을 치료하기 위하여 사용되고 있다. 최근 주사제의 환자 편의성 감소, 부작용 증가, 심리적 두려움과 같은 문제를 해결하고자 라니비주맙, 아플리버셉트 등을 점안제형으로 개발하려는 연구가 시도되고 있지만, 라니비주맙은 토끼에서 임상 절반 용량($250 \mu\text{g}$)으로 2시간 간격으로 6회 점안 시 3-7일 후에 망막 조직에 도달한다는 실험 결과(Chen et al., 2011. Eye) 등에서 보는 바와 같이 안구 투과도가 좋지 못해 병변이 있는 안

구 후방까지 도달하기 힘들며, 점안 시 눈 깜박임에 의한 방수유출로 소실되는 약물이 많아 점안으로 약리효과를 발휘하기가 어렵다는 문제점이 있다. 또한, 중국에서 황반 변성 치료제로 2013년 승인된 컨버셉트(Conbercept, Chengdu Kanghong pharm.)는 아플리버셉트와 유사하게 혈관 내피세포 성장 인자 수용체 1(VEGFR-1)의 두 번째 도메인과 VEGFR-2의 세 번째, 네 번째 도메인을 Fc로 연결한 융합단백질로 현재 점안제형으로도 개발 중이지만 보고된 바에 의하면 점안 시 생체이용율은 약 5% 미만으로 알려져 있다(Wang et al., 2013. PLOS ONE).

또한, 루센티스(Lucentis)라는 상표명으로 판매되고 있는 라니비주맙은 개발 당시 황반 변성 환자들로부터 90% 정도의 반응성을 보여 획기적 치료제로 주목받았으나 반응환자의 30%만이 시력개선 등의 치료 효과를 보이고 있고 지속적인 약물투여 시 내성이 유발되는 문제가 발생하고 있다(Syed et al., 2012. Nature Rev. Drug Discov.). 이를 개선하기 위해 VEGF-A에 대한 결합력이 100배 이상 증대되고 VEGF-B, PlGF 까지도 저해할 수 있도록 고안된 Fc 융합항체인 아플리버셉트가 2011년 출시되어 급격한 성장세를 보이고 있으나 실제 두 제품간 임상적 효능 차이는 없는 것으로 확인되고 있다.

황반 변성 환자의 약 10%는 anti-VEGF 제제에 대해 무반응 환자로 치료효과를 기대할 수 없으며, 이는 상대적으로 VEGF-A 이외의 다른 성장인자 의존적인신생혈관 우회경로에 의한 원인으로 생각되고 있다. 또한 반복 투여 시 약 45%의 환자에서 내성이 유발되어 투여횟수가 늘어날수록 약물 반응성이 떨어지는 것으로 확인되고 있으며(Lux et al., 2007. Br. J. Ophthalmol.), 이러한 내성의 원인은 반복적인 anti-VEGF 제제 투여 시 내피세포의 안정화에 기여하는 pericyte의 coverage 증가에서 비롯된 혈관 강화 및 pericyte 의존적 VEGF 생성에 의한 결과로 알려지고 있다.

이에 따라, 최근 안질환치료제 개발동향은 anti-VEGF 제제들의 내성 극복 및 효능 증대의 방법으로 pericyte disassociation을 유도하는 PDGF 저해제를 병용요법제로 개발하는 추세이다. 따라서, (i) VEGF-A 뿐만 아니라 또 다른 신생혈관 관련 리간드를 차단하는 기능이 추가, (ii) 항-혈관 내피세포 성장인자 제제에 대한 내성 극복, (iii) 약물의 효능 증대를 위한 pericyte의 coverage 와해, (iv) 투여주기의 개선 및 (v) 점안제로의 개발이 가능한 안질환 치료제의 개발이 요구되고

있는 실정이다.

【발명의 상세한 설명】

【기술적 과제】

본 발명의 발명자들은 항-혈관 내피세포 성장인자(anti-VEGF) 제제에 조직투과성 펩타이드를 융합할 경우, 약물의 조직투과성이 증대되고, pericyte의 coverage가 와해되어 약물에 대해 내성을 나타내는 환자에 대해서도 그 효과가 발휘될 수 있으며, 투여용량 감소 또는 투여주기가 개선되고 점안제로의 개발이 가능하다는 것을 발견하고 본 발명을 완성하게 되었다.

따라서, 본 발명의 목적은 조직투과성 펩타이드와 항-혈관 내피세포 성장인자(anti-VEGF) 제제가 융합된 융합단백질을 유효성분으로 포함하는 안질환 예방 및 치료용 약학적 조성물을 제공하는 것이다.

본 발명의 다른 목적은 (a) 조직투과성 펩타이드와 항-혈관 내피세포 성장인자(anti-VEGF) 제제가 융합된 융합단백질을 코딩하는 핵산 서열을 포함하는 재조합 벡터를 숙주세포로 전환시키는 단계; (b) 상기 세포를 배양하는 단계; 및 (c) 상기 세포로부터 융합단백질을 회수하는 단계를 포함하는 내성 극복 및 효능이 향상된 항-혈관 내피세포 성장인자 제제를 생산하는 방법을 제공하는 것이다.

본 발명의 또 다른 목적은 조직투과성 펩타이드와 항-혈관 내피세포 성장인자(anti-VEGF) 제제가 융합된 융합단백질의 유효량을 이를 필요로 하는 개체에 투여하는 것을 포함하는 안질환 치료 방법을 제공하는 것이다.

본 발명의 또 다른 목적은 조직투과성 펩타이드와 항-혈관 내피세포 성장인자(anti-VEGF) 제제가 융합된 융합단백질을 유효성분으로 포함하는 안질환 치료용 제제를 제조하기 위한 용도를 제공하는 것이다.

【기술적 해결방법】

상기의 목적을 달성하기 위해 본 발명은 조직투과성 펩타이드와 항-혈관 내피세포 성장인자(anti-VEGF) 제제가 융합된 융합단백질을 유효성분으로 포함하는 안질환 예방 및 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

본 발명의 다른 목적을 달성하기 위해 본 발명은 (a) 조직투과성 펩타이드와 항-혈관 내피세포 성장인자(anti-VEGF) 제제가 융합된 융합단백질을 코딩하는 핵산 서열을 포함하는 재조합 벡터를 숙주세포로 전환시키는 단계; (b) 상기 세포를 배양하는 단계; 및 (c) 상기 세포로부터 융합단백질을 회수하는 단계를 포함하는 내성 극복 및 효능이 향상된 항-혈관 내피세포 성장인자 제제를 생산하는 방법을 제공한다.

본 발명의 또 다른 목적을 달성하기 위해 본 발명은 조직투과성 펩타이드와 항-혈관 내피세포 성장인자(anti-VEGF) 제제가 융합된 융합단백질의 유효량을 이를 필요로 하는 개체에 투여하는 것을 포함하는 안질환 치료 방법을 제공한다.

본 발명의 또 다른 목적을 달성하기 위해 본 발명은 조직투과성 펩타이드와 항-혈관 내피세포 성장인자(anti-VEGF) 제제가 융합된 융합단백질을 유효성분으로 포함하는 안질환 치료용 제제를 제조하기 위한 용도를 제공한다.

이하 본 발명을 상세히 설명한다.

본 발명의 목적을 달성하기 위해 본 발명은 조직투과성 펩타이드와 항-혈관 내피세포 성장인자(anti-VEGF) 제제가 융합된 융합단백질을 유효성분으로 포함하는 안질환 예방 및 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

자연계에 존재하는 단백질들 중에서 혈관내피세포 성장인자-A(VEGF-A)는 혈액의 분출(일혈, extravasation)을 유도하는 것으로 잘 알려져 있다. 이는 다른 이름으로 혈관투과성인자(vascular permeability factor)로도 불린다. 이 작용은 혈관내피세포 성장인자 수용체(VEGFR2)와 결합으로 인한 현상으로 알려져 있는데, 흥미롭게도 혈관 내피세포 성장인자-A의 돌연변이 실험에서 혈관내피세포 성장인자 수용체에 결합하지 못하더라도, 혈관투과성이 증진되는 사례를 보여주었다. 이는 혈관내피세포 성장인자-A의 또 다른 수용체가 존재함을 제시하였다(Stacker et al., 1999. J. Biol. Chem.). 동 시대에 다른 연구진에서 이 수용체가 뉴로필린(neuropilin, NRP)임을 밝혀내었다(Makinen et al., 1999. J. Biol. Chem.).

뉴로필린은 처음으로 *Xenopus* nervous system에서 발견되었다. 뉴로필린은 막투과성 당단백질(transmembrane glycoprotein)로서, NRP1 및 NRP2의 두 가지 형태가 있다. 뉴로필린은 VEGF 패밀리 리간드 결합에 의해 VEGFRs(VEGF receptors)들의 공수용체(coreceptor)로 작용한다. 특히 NRP1은 VEGFR1, VEGFR2, VEGFR3의 공수용체로 작용하여 다양한 VEGF 리간드와 결합한다. 반면 NRP2는 VEGFR2, VEGFR3의 공수용체로 작용하여 림프관 형성(lymphangiogenesis) 및 세포부착(adhesion)에 기여한다. 또한 NRP1/NRP2(NRP1/2)는 Plexin family receptors의 공수용체로 작용하여 분비된 세마포린 3계열 리간드(class 3 semaphorins : Sema3A, Sema3B, Sema3C, Sema3D, Sema3E, Sema3F, Sema3G)와 결합한다.

상기 조직투과성이란 뉴로필린을 과발현하는 조직을 특이적으로 인식하여 축적되거나, 혈관내피세포의 세포간극을 넓혀 약물의 혈관 밖 유출을 촉진시키고, 수용성 분자에 대한 장벽(barrier) 역할을 하는 조직인 각막세포간극을 조절하여 안구 내 약물의 분포를 촉진하는 특성 중 어느 하나의 특성을 갖는 것을 의미한다.

본 발명에서의 용어 “뉴로필린(neuropilin, NRP)”은 막투과성 당단백질(transmembrane glycoprotein)로서, NRP1 및 NRP2의 두 가지 형태를 갖는다. 뉴로필린은 크게 5가지 도메인으로 구성되어 있는데, N-말단에서부터 a1/a2 도메인은 CUB 도메인으로 분류되며, 세마포린의 Ig-like C2 type 부분이 결합하는 부분이다. 특히 이 부위는 plexin과 복합체를 형성하여 세마포린-플렉신(plexin)과의 결합력을 증가시키는 역할을 한다. 뉴로필린의 b1, b2 도메인은 FV/VIII 도메인으로 분류되며, VEGF 패밀리 리간드나 분비된 세마포린 3 계열의 리간드들의(secreted Sema3s) C-말단 부위가 결합한다. VEGF 리간드 및 세마포린 3계열 리간드는 푸린 단백질 가수분해 효소의 인식 부위를(RXRR, Arg-X-Arg-Arg) 가지고 있어, 푸린 작용(Furin processing)에 의해 공통적으로 C-말단에 아르지닌(Arg) 아미노산 잔기로 끝난다(Adams et al., 1997. EMBO J.). 이러한 VEGF, Sema3s 리간드의 C-말단 Arg 잔기는 뉴로필린 b1b2 도메인간의 상호작용에서 매우 중요하다고 보고되어 있다(Teesalu et al., 2009. Proc. Natl. Acad. Sci. USA). VEGF 리간드와 뉴로필린 b1b2 도메인 간의 결합체 3차 구조가 밝혀져 있어(Parker et al., 2012. J. Biol. Chem.), 뉴로필린의 b1b2 도메인과 결합에 중요한 VEGF의 아미노산 서열은 알 수가 있다. 하지만, NRP1에 결합하는 Sema3A의 C-말단 어느 부위가 구체적으로 NRP에 결합하는지는 아직 규명되지 않았다.

항-혈관 내피세포 성장인자 제제는 VEGF와 천연 VEGF 수용체 사이의 상호작용을 방해하는 분자, 예를 들면, VEGF 또는 VEGF 수용체에 결합하여 VEGF와 VEGF 수용체 사이의 상호작용을 방지하거나 그렇지 않으면 저지하는 분자를 포함한다. VEGF 길항제로는 항-VEGF 항체, 항-VEGF 수용체 항체 및 VEGF 수용체-기반 키메라 분자가 포함된다.

본 발명에 있어서 “융합”은 기능 또는 구조가 다르거나 같은 두 분자를 일체화하는 것으로, 항-혈관 내피세포 성장인자 제제에 조직투과성 펩타이드가 결합할 수 있는 모든 물리, 화학적 또는 생물학적 방법에 의한 융합일 수 있다. 상기 융합은 바람직하게는 링커 펩타이드에 의할 수 있으며, 이 링커 펩타이드는 예를 들면 항체의 Fab(항원결합절편) 또는 Fc 단편의 C-말단에 결합할 수 있다.

본 발명의 안질환은 바람직하게는 혈관 신생에 의한 안질환을 의미한다. 본원에 사용된 바와 같은 표현 “혈관 신생에 의한 안질환”은 혈관의 성장 또는 증식에 의해 또는 혈관 누출에 의해 또는 이들과 관련된 눈의 임의의 질환을 의미한다.

본 발명에 따른 융합단백질에 의하면, 뉴로필린 수용체와의 결합에 의해 약물의 조직투과성이 증대되고, pericyte의 coverage가 와해되어 약물에 대해 내성을 나타내는 환자에 대해서도 그 효과가 발휘될 수 있으며, 투여주기가 개선되고 점안제로의 개발이 가능하다.

구체적으로, 본 발명의 일실시예에 따르면, 본 발명자들이 라니비주맙의 아미노산 서열에서 시스테인(C)을 세린(S)으로 치환하는 점돌연변이를 도입한 라니비주맙의 변이체는 생산성이 크게 증대되며, 라니비주맙의 변이체에 조직투과성 펩타이드(TPP)를 융합시킨 개량체에서도 생산성 증대의 효과는 그대로 유지되었다(<실시예 1>).

본 발명의 다른 일실시예에서 라니비주맙 변이체의 C-말단에 조직투과성 펩타이드가 융합된 융합단백질의 뉴로필린 수용체에 대한 친화도와 내피세포 사이의 밀착연접(tight junction) 와해능을 비교한 결과, 상기 융합단백질은 뉴로필린 수용체 NRP 1과 Sema3A ligand와 유사한 수준으로 매우 우수하게 결합함을 확인하였

으며, VE-cadherin을 현저히 억제하는 것으로 보아 내피세포 사이의 밀착 연결 와 해능이 매우 우수한 것으로 확인되었다(실시예 <1-3>).

본 발명의 다른 일실시예에 따르면, 라니비주맙 변이체의 C-말단에 조직투과성 펩타이드가 융합된 융합단백질이 안구 내피세포에 많이 분포하는 뉴로필린 수용체와의 결합을 통해 투과도를 개선시킬 수 있는지를 확인하기 위하여 적출한 안구를 상기 융합단백질이 함유된 용액 및 라니비주맙이 함유된 용액에 담근 후 시간별 투과도 정도를 비교하였다(<실시예 4>). 실험 결과 상기 조직투과성 펩타이드가 결합된 항-혈관 내피세포 성장인자 제제는 실험 1시간부터 각막 상피조직으로부터 투과가 시작되어 2시간에는 라니비주맙에 비해 안구 내 약물 분포가 현저히 높음을 확인하여, 투과도 개선을 통한 용량 조절 및 투여간격 증대 가능성을 확인하였다.

즉, 라니비주맙의 안구 투과도가 극히 미약하다는 선행 연구 결과와 비교하여, 본 발명에 따른 융합단백질은 수용성 분자에 대한 barrier 역할을 하는 조직인 각막을 라니비주맙에 비해 신속히 투과하여 안구 안쪽까지 도달함을 확인하였으므로 향후 제형 개선을 통해 점안제로의 개발 가능성도 확인할 수 있었다. Fab 형태의 라니비주맙 개량체 뿐 아니라, 분자량이 크고 단백질의 구조가 복잡한 전체 항체(whole antibody) 형태에서도 조직투과성 펩타이드의 융합에 의한 안구 조직의 투과도 증가의 효과가 유사하게 관찰되었다. 면역글로불린G(IgG) 형태의 베바시주맙의 FC-말단에 조직투과성 펩타이드를 융합한 융합단백질도 베바시주맙과 비교하여 현저하게 증가한 안구투과능을 나타내어, 본 발명에 따른 베바시주맙의 개량체도 치료 효과가 증진된 약물로 개발될 수 있음을 알 수 있다.

본 실시예의 결과를 통해 VEGF 수용체들(VEGFR1, VEGFR2)을 Fc 단편에 융합한 융합단백질 형태의 아플리버셉트, 컨버셉트 등에서도 베바시주맙과 동일하게 FC-말단에 조직투과성 펩타이드를 융합할 경우 기존의 Fc 융합단백질에 비해 치료 효과가 현저하게 증진된 약물로 개발될 수 있음을 예측할 수 있다.

본 발명의 다른 일실시예에서는 다양한 동물 질환 모델을 이용하여 본 발명의 융합단백질과 라니비주맙의 혈관신생 저해효과 및 약물 내성 모델에서의 신생혈관 저해효과를 비교 평가하였다. 각막 신생 혈관 모델을 이용하여 실험한 결과, 본 발명의 융합단백질은 대조군 대비 50% 이상의 유의적인 신생혈관 저해효과를 나타

냈으며, 라니비주맵과 동등한 정도의 효과를 나타내어 C-말단에 융합된 조직투과성 펩타이드에 의한 효능 증대가 가능함을 확인하였다(실시예 <5-1>). 또한, 약물 내성 모델에서의 신생혈관 저해효과에 있어서 본 발명의 융합단백질은 라니비주맵 대비 2배 이상의 우수한 효능을 나타내었으며, 이는 anti-VEGF aptamer와 anti-PDGF antibody 제제를 병용투여한 문헌의 결과(Jo et al., 2006. Am. J. Pathol. 168)와 유사한 정도의 수치로써, 라니비주맵 투약 환자 중 시력 개선 없이 유지만 되는 약 70%의 환자들에서 시력 개선 가능성이 있을 것으로 예측할 수 있다(실시예 <5-2>). 본 발명에 따른 융합단백질의 안질환에서 혈관신생을 억제하는 우수한 효과는 실제 황반 변성 효능 모델로 사용하는 맥락막 신생혈관(CNV)과 망막병증 효능 모델로 사용하는 산소유도 신생혈관(OIR)의 모델에서도 동일하게 관찰되어 라니비주맵과 비교하여 임상적으로 치료 효과가 현저하게 증진될 것임을 예측할 수 있다(<실시예 6>, <실시예 7>).

본 발명에서 사용되는 용어 “예방”은 본 발명의 조성물의 투여로 안질환을 억제시키거나 진행을 지연시키는 모든 행위를 의미한다.

본 발명에서 사용되는 용어 “치료”는 본 발명의 조성물의 투여로 안질환의 증상이 호전 또는 이롭게 변경되는 모든 행위를 의미한다. 보다 구체적으로 상기 ‘치료’는 안질환의 증상을 개선시키는 것을 포괄적으로 지칭하고, 이는 안질환을 치유하거나, 실질적으로 예방하거나, 또는 상태를 개선시키는 것을 포함할 수 있으며, 안질환으로부터 비롯된 한 가지 증상 또는 대부분의 증상을 완화시키거나, 치유하거나 예방하는 것을 포함하며, 이에 제한되는 것은 아니다.

본 발명을 실시함에 있어서, 해당 분야의 통상적인 지식을 가진 기술자는 안질환의 예방 또는 치료의 효과를 내기 위하여 대상 안질환의 유형 및 중증도, 투여가 필요한 개체의 연령, 체중, 건강 상태, 성별, 식이 및 배설물 등의 다양한 요인을 적절하게 고려하여 본 발명에 따른 조성물의 유효 투여량(유효량), 투여 횟수, 투여 경로를 결정할 수 있다. 상기 ‘유효량’이란 개체에게 투여하였을 때, 안질환의 증상을 개선시키는 양을 포괄적으로 지칭하며, 이는 안질환을 치유하거나 실질적으로 예방하거나, 또는 상태를 개선시키는 양을 포함한다. 상기 ‘개체’란 동물, 바람직하게는 포유동물, 특히 인간을 포함하는 동물일 수 있으며, 동물에서 유래한 세포, 조직, 기관 등일 수도 있다. 상기 개체는 치료가 필요한 환자일 수 있

다. 본 발명에 따른 조성물은 인간을 비롯한 포유동물에 어떠한 방법으로도 투여할 수 있다. 예를 들면, 경구 또는 비경구적으로 투여할 수 있다. 비경구적인 투여방법으로는 이에 한정되지는 않으나, 정맥내, 근육내, 동맥내, 골수내, 경막내, 심장내, 경피, 피하, 복강내, 비강내, 장관, 국소, 설하 또는 직장내 투여될 수 있다. 또한 본 발명에 따른 면역원성 복합 단백질은 단독으로 투여하거나, 대상 질환을 예방 및 치료하는 효과를 가지는 공지의 화합물과 병행하여 투여할 수 있다.

예를 들어, 본 발명의 약학적 조성물의 인체에 대한 투여량은 환자의 나이, 몸무게, 성별, 투여형태, 건강상태 및 질환 정도에 따라 달라질 수 있으며, 일반적으로 안구 주사의 경우, 안구 당 0.001~10mg/day이며, 바람직하게는 안구 당 0.1~2mg/day일 수 있다. 점안제의 경우, 투여량의 범위는 점안액 1ml 당 0.001~100mg이며, 바람직하게는 0.01~10mg/day일 수 있다. 또한 의사 또는 약사의 판단에 따라 일정 간격으로 분할 투여할 수도 있다.

본 발명의 조성물은 약학적으로 허용가능한 첨가제를 더 포함할 수 있으며, 약제학적으로 허용 가능한 첨가제로는 전분, 젤라틴화 전분, 미결정셀룰로오스, 유당, 포비돈, 콜로이드실리콘디옥사이드, 인산수소칼슘, 락토스, 만니톨, 엷, 아라비아고무, 전호화전분, 옥수수전분, 분말셀룰로오스, 히드록시프로필셀룰로오스, 오파드라이, 전분글리콜산나트륨, 카르나우바 납, 합성규산알루미늄, 스테아린산, 스테아린산마그네슘, 스테아린산알루미늄, 스테아린산칼슘, 백당, 덱스트로스, 소르비톨, 트레할로즈 및 탈크 등이 사용될 수 있다. 본 발명에 따른 약제학적으로 허용 가능한 첨가제는 상기 조성물에 대해 0.1~90 중량부로 포함되는 것이 바람직하나 이에 제한되는 것은 아니다.

또한, 상기 약학적 조성물은 주사제, 점안제, 안연고제, 안구 삽입제형을 포함하나 이에 한정되지 않는 어떤 투여 경로에 적합한 여러 형태일 수 있고 이를 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충전제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제될 수 있다. 주사제의 경우 유리체강내 주사, 결막주사를 포함한 안구 내 국소적으로 주사하는 방법을 모두 포함하나 이에 한정되지 않는다. 주사제에는 용해제, 등장화제, 현탁화제, 유화제, 안정화제, 방부제 등과 같은 종래의 첨가제가 포함될 수 있다.

본 발명의 주사제에 적절한 담체는 생리 염수, 세균 발육 저지수, 크레모포

어 EL(미국 뉴저지주 퍼시패니에 소재하는 바스프) 또는 인산염 완충 염수(PBS)를 포함한다. 모든 경우에 조성물은 멸균되어야 하며, 쉽게 주사를 놓을 수 있을 정도의 유체여야 한다. 조성물은 제조 및 보관 조건 하에서 안정해야 하며, 세균 및 진균과 같은 미생물의 오염 작용에 대해 보존되어야 한다. 담체는 용매 또는, 예컨대 물, 에탄올, 폴리에올(예: 글리세롤, 프로필렌 글리콜 및 액체 폴리에틸렌 글리콜 등), 및 이의 적절한 혼합물을 함유하는 분산매일 수 있다. 적당한 유동성은, 예컨대 레시틴과 같은 코팅을 이용하고, 분산액의 경우 필요한 입자 크기를 유지하며, 계면활성제를 사용하여 유지할 수 있다. 미생물 작용은 각종 항균제 및 항진균제, 예컨대 파라벤, 클로로부탄올, 페놀, 아스코르브산, 치메로살 등을 사용하여 예방할 수 있다. 많은 경우에, 조성물 중에 등장제, 예를 들어 당, 폴리알콜, 예컨대 만니톨, 소르비톨, 트레할로즈, 염화나트륨을 포함하는 것이 바람직할 것이다. 주사가 가능한 조성물의 흡수는, 흡수를 지연하는 제제, 예를 들어 모노스테아르산알루미늄, 히알루론산 및 젤라틴을 조성물 중에 함유시킴으로써 높일 수 있다.

점안제의 경우 수용성 안과용액, 비수용성 안과용액 또는 안과 에멀전일 수 있다. 본 발명의 점안제에는, 상기 필수성분인 조직투과성 펩타이드와 항-혈관 내피세포 성장인자(anti-VEGF) 제제가 융합된 융합단백질 이외에, 점안제에서의 종래 공지의 임의성분, 예를 들어, 완충제, 점조제, 안정화제, 등장화제, 방부제 등을 배합할 수 있다. 이 중, 완충제로서는 구연산염, 인산염, 초산염, 아미노산염 등 공지의 완충제를 들 수 있다. 또한, 점조제로서는 폴리비닐알콜, 히드록시프로필셀룰로오스, 메틸셀룰로오스, 포비돈, 히드록시프로필메틸셀룰로오스, 에틸셀룰로오스, 히드록시에틸셀룰로오스, 카르멜로스, 폴리에틸렌글리콜, 콘드로이틴 또는 이들의 염을 들 수 있다. 또한, 안정화제로서는 아질산나트륨, 아황산수소나트륨, 메타아황산수소나트륨 등의 산화방지제; 에데트산나트륨, 시클로텍스트린, 구연산, 구연산염 등의 킬레이트제 등을 들 수 있다. 또한, 등장화제로서는 염화나트륨, 염화칼륨 등의 염류; 글리세린, 프로필렌글리콜 등의 다가알콜; 포도당, 자당, 트레할로즈 등의 당류; 자일리톨, 솔비톨 등의 당알콜; 폴리에틸렌글리콜 등의 폴리에테르; 타우린 등의 아미드술폰산 등을 들 수 있다. 또한, 방부제로서는 염화벤잘코늄(benzalkonium chloride), 염화벤제토늄(benzethonium chloride), 클로로부탄올, 파라옥시안식향산 에스테르, 티메로살(thimerosal), 소르빈산, 소르빈산염, 글루콘산클로로헥시딘(chlorohexidinegluconate) 등을 들 수 있다. 본 발명의 점안제에 있어서, 실온에서의 pH는 4.5~8.5가 바람직하고, 보다 바람직하게는 5.5~8, 특히

바람직하게는 6~8이다. pH의 측정은 실온 하에서 pH 미터(예를 들어, Fisher Scientific사 제품 Accumet model 25 pH/Ion meter 등)를 이용하여 측정된다.

일부 안과 약물은 안구 장벽을 통한 침투성이 불량하여, 점안제로 투여할 수 없다. 따라서, 연고를 사용하여 접촉시간을 연장하고 흡수되는 약물의 양을 늘릴 수 있다. 점안제에 사용할 수 있는 담체성분으로서 비수용성 고분자로는 에틸셀룰로스, 에틸렌초산비닐 공중합체, 폴리메탈메타아크릴레이트, 아크릴산에틸·메타크릴산메틸·메타크릴산염화트리메탈암모늄에틸·코폴리머, 메타크릴산메탈·메카크릴산부틸·메타크릴산디메탈아미노에틸·코폴리머 등을 들 수 있다. 생체 내분해성 고분자로는, 예컨대 폴리유산, 폴리유산·글루콘산 공중합체, 폴리시아노아크릴레이트, 폴리알킬시아노아크릴레이트, 폴리· ϵ ·카프로락톤 등을 들 수 있다. 수용성고분자로는, 히드록시프로판메탈셀룰로스후다레이트, 카르복시메틸에틸셀룰로스, 히드록시프로필셀룰로스 등의 셀룰로스 유도체, 알킨산칼슘, 키토산, 알부민, 젤라틴, 메타크릴산·메타크릴산메탈·코폴리머 등을 들 수 있다. 유지성 성분으로는 트리팔미틴, 세틸알콜, 콜레스테롤, 각종 인지질류, 팔미틴산세틸, 팔미틴산콜레스테롤 등을 들 수 있다. 이런 담체성분은 통상 안과용 치료 활성물질을 함유한 약효성분의 서방기능(서서히 방출하는 기능)을 갖는다. 또, 비중조정제를 참가하지 않고 사용가능한 비중이 높은 담체성분으로는, 예컨대 히드록시프로필메틸셀룰로스프탈레이트 200731(비중 1.65), 히드록시프로필메틸셀룰로스프탈레이트 220824(비중 1.82), 카르복시메틸에틸셀룰로스(비중 1.59) 등을 들 수 있다. 그러나, 이런 담체성분을 이용할 경우에도 역시 비중조정제를 첨가해 비중값을 높이는 것이 바람직하다. 본 발명에 있어서, 담체입자의 비중조정에 사용되는 비중조정제로는, 예컨대 산화티탄(4.17)과 같은 불용성 성분, 인산삼칼륨(비중 3.14), 무수인산수소칼륨(비중 2.89), 인산수소칼륨·이수화물(비중 2.30)과 같은 난용성 성분, 염화나트륨(비중 2.17), 염화칼륨(비중 1.98), 염화칼슘(비중 2.0), 염화마그네슘(비중 2.41), 탄산나트륨(비중 2.53), 인산이수소나트륨(비중 1.95), 인산일수소나트륨(비중 1.7), 인산이수소칼륨(비중 2.34)과 같은 수용성 성분 등을 들 수 있다.

삽입체는 일반적으로 열린 각막에 부착되기 보다는 상부 맹관에 배치되거나 또는 덜 빈번하게는 하부 결막 낭에 배치된다는 점 이외에는 각막에 배치되는 소프트 콘택트렌즈와 유사하다. 삽입체는 일반적으로 약물을 방출하면서 누액중에 용해되거나 봉해되는 생물학적 가용 물질로 제조된다.

경구투여를 위한 고형제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제제는 Tyrosol에 적어도 하나 이상의 부형제 예를 들면, 전분, 칼슘 카보네이트, 수크로오스, 락토오스 또는 젤라틴 등을 섞어 조제될 수 있다. 또한 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스티레이트 탈크 같은 윤활제들도 사용될 수 있다. 경구를 위한 액상 제제로는 현탁제, 내용액제, 유제 및 시럽제 등이 해당되는데 흔히 사용되는 단순희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다.

또한, 본 발명의 치료용 조성물은 임의의 생리화적으로 허용가능한 담체, 부형제 또는 안정화제(Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 19th Edition, Alfonso, R., ed, Mack Publishing Co.(Easton, PA: 1995))를 추가로 포함할 수 있다. 허용가능한 담체, 부형제 또는 안정화제는 사용된 투여량 및 농도에서 수용자에게 비독성이고, 완충용액, 예를 들어 인산, 시트르산 및 다른 유기산; 아스코르브산을 비롯한 항산화제; 저분자량(약 10개 미만의 잔기) 폴리펩티드; 단백질, 예를 들어 혈청 알부민, 젤라틴 또는 면역글로불린; 친수성 중합체, 예를 들어 폴리비닐피롤리돈; 아미노산, 예를 들어 글리신, 글루타민, 아스파라긴, 아르기닌 또는 리신; 단당류, 이당류, 및 글루코스, 만노스, 트레할로즈, 또는 텍스트린을 비롯한 다른 탄수화물; 킬레이트제, 예를 들어 EDTA; 당 알콜, 예를 들어 만니톨 또는 소르비톨; 염-형성 반대이온, 예를 들어 나트륨; 및(또는) 비이온성 계면활성제, 예를 들어 트윈, 플루로닉스 또는 폴리에틸렌 글리콜(PEG)이 포함된다.

본 발명의 다른 목적을 달성하기 위해 본 발명은 상기 조직투과성 펩타이드는 서열번호 1 내지 7로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 약학적 조성물을 제공한다.

상기 서열번호 1 내지 7로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산 서열로 표시된 조직투과성 펩타이드는, 뉴로필린의 b1b2 도메인에 결합하는 VEGF_A 리간드의 결합부위 아미노산 서열 및 길이를 분석하고, 뉴로필린에 결합한다고 알려진 세마포린 3A 및 세마포린 3F의 푸린 C-말단 서열의 염기서열을 분석하여 이들의 C-말단의 서열이 유사함을 바탕으로 설계된 펩타이드이다.

본 발명의 다른 목적을 달성하기 위해 본 발명은 상기 항-혈관 내피세포 성장인자 제제는 베바시주맙(bevacizumab), 라니비주맙(ranibizumab), r84(PLoS One. 2010 Aug 6;5(8)), 아플리버셉트(afibercept), 컨버셉트(conbercept), CT01(WO2005056764A2), DOM15-10-11(WO2008149147A2), DOM15-26-593(WO2008149143A2), PRS-050(Mross et al., 2013. PLoS One), CT-322(Dineen et al., 2008. BMC Cancer), ESBA903(Asmus et al., 2015. Eur J Pharm Biopharm.) 및 EPI-0030(WO2011023130A1)로 구성된 군으로부터 선택된, 안구 질환을 예방하거나 치료하는데 사용되는 제제, 이들의 동등생물의약품(biosimilar) 및 변이체를 포함하는 약학적 조성물을 제공하며, 보다 바람직하게는 라니비주맙, 베바시주맙, 아플리버셉트, 컨버셉트일 수 있으나 이에 제한되는 것은 아니다.

상기 ‘동등생물의약품(biosimilar)’이란, 유전자재조합 및 세포배양기술 등 생명공학기술을 활용하여 이미 개발/판매되고 있는 특허 만료된 오리지널 바이오 의약품을 모방하여 품질, 효능 및 안전성의 측면에서 동등성을 입증한 복제 의약품을 의미한다.

본 발명의 다른 목적을 달성하기 위해, 본 발명의 상기 변이체는 중쇄 불변 1 도메인 및 경쇄 불변 도메인의 아미노산인 시스테인은 결실되거나, 시스테인을 제외하고 세린을 포함하는 다른 아미노산 잔기로 치환된 것을 특징으로 하는 약학적 조성물을 제공한다.

본 발명의 일실시예에서는 라니비주맙의 아미노산 서열을 변환하는 단백질 엔지니어링 방법으로, 라니비주맙의 뉴클레오타이드 서열 중 마지막 시스테인이 세린으로 변경된 라니비주맙 변이체를 제작하였다(실시예 <1-1>).

본 발명의 다른 목적을 달성하기 위해, 본 발명은 상기 변이체는 서열번호 8로 표시되는 아미노산 서열을 갖는 경쇄 및 서열번호 10으로 표시되는 아미노산 서열을 갖는 중쇄로 이루어진 라니비주맙(ranibizumab) 변이체인 것을 특징으로 하는 약학적 조성물을 제공한다.

상기 일 양상의 조직투과성 펩타이드는 링커 펩타이드를 추가로 포함할 수 있다. 상기 링커 펩타이드는 1 내지 50개의 아미노산으로 이루어질 수 있으며, 바

람직하게는 4 내지 20개, 더욱 바람직하게는 4 내지 15개의 아미노산으로 이루어질 수 있다. 또한, 상기 링커 펩타이드는 글라이신(glycine, G), 세린(serine, S) 또는 알라닌(alanine, A)으로 구성될 수 있으며, 바람직하게는 상기 링커 펩타이드의 서열은 $(GA)_n$ 또는 $(GGGS)_m$ 의 아미노산 서열로 이루어진 것(단, 상기 n 및 m은 각각 독립적으로, 정수 1 내지 20이며, 괄호 안의 서열이 반복되는 횟수를 의미한다.)일 수 있고, 더욱 바람직하게는 GAGA 또는 $(GGGS)_3$ 의 아미노산 서열로 이루어질 수 있다.

본 발명의 일실시예에서는 조직투과성 펩타이드(TPP)가 상기 링커를 통해 라니비주맙 변이체에 융합된 융합단백질을 제작하여 그 효과를 확인하였다. 상기 융합단백질은 본 발명에 따른 라니비주맙 변이체(IDB0061)에 TPP#2가 링커($(GGGS)_3$)로 연결된 형태로서, 서열번호 12 및 서열번호 14로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진 융합단백질(IDB0062); 본 발명에 따른 라니비주맙 변이체(IDB0061)에 TPP#5가 링커($(GGGS)_3$)로 연결된 형태로서, 서열번호 16 및 서열번호 18로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진 융합단백질(IDB0064); 베바시주맙에서 중쇄에 TPP#2가 링커($(GGGS)_3$)로 연결된 형태로서, 서열번호 20 및 서열번호 22로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진 융합단백질(IDB0072) 등이다.

본 발명의 약학적 조성물을 이용하여 임의의 신생혈관에 따른 안질환을 치료할 수 있다. 본원에 사용된 바와 같은 표현 ‘신생혈관에 따른 안질환’은 혈관의 성장 또는 증식에 의해 또는 혈관 누출에 의해 또는 이들과 관련된 눈의 임의의 질환을 의미한다.

혈관 신생에 따른 상기 안질환은 증식 유리체 망막병증, 황반 변성, 색소성 망막증, 당뇨병성 망막증, 맥락막 신생혈관, 신생혈관성 녹내장, 허혈성 시신경 장애, 조숙아 망막증, 미숙아 망막증, 유행성 각결막염, 신생혈관성 홍채질환, 후수정체 섬유증식증, 아토피성 각막염, 상각막윤부 각막염, 위상편 건선 각막염, 플릭텐성 각결막염, 공막염 및 당뇨병성 황반 부종으로 이루어진 군에서 선택될 수 있으며, 보다 바람직하게는 황반 변성 및 당뇨병성 황반 부종일 수 있으나 이에 제한되는 것은 아니다.

본 발명의 다른 목적을 달성하기 위해, 본 발명은 (a) 조직투과성 펩타이드와 항-혈관 내피세포 성장인자(anti-VEGF) 제제가 융합된 융합단백질을 코딩하는 핵산 서열을 포함하는 재조합 벡터를 숙주세포로 전환시키는 단계; (b) 상기 세포를 배양하는 단계; 및 (c) 상기 세포로부터 융합단백질을 회수하는 단계를 포함하는 내성 극복 및 효능이 향상된 항-혈관 내피세포 성장인자 제제를 생산하는 방법을 제공한다.

상기 융합단백질을 코딩하는 핵산 서열은 서열번호 13, 서열번호 15, 서열번호 17, 서열번호 19, 서열번호 21 및 서열번호 23으로 이루어진 군에서 선택된 것일 수 있다. 구체적으로, 본 발명에 따른 라니비주맙 개량체인 IDB0062의 경쇄와 중쇄를 인코딩하는 핵산은 각각 서열번호 13과 서열번호 15의 염기서열에, IDB0064의 경쇄와 중쇄를 인코딩하는 핵산은 각각 서열번호 17과 서열번호 19의 염기서열에, 그리고 베바시주맙 개량체인 IDB0072의 경쇄와 중쇄를 인코딩하는 핵산은 각각 서열번호 21과 서열번호 23의 염기서열에 기재되어 있는 바와 같다.

또한 상기 벡터는 당업자들이 당업계에 알려진 어떠한 방법에 따라 본 발명의 폴리뉴클레오티드를 벡터내로 삽입하여 적절한 전사/해독 조절서열을 이용하여 본 발명의 융합단백질을 발현하도록 제조된 발현벡터를 말한다.

본 발명에 따라 클로닝된 상기 폴리뉴클레오타이드 서열은 적절한 발현 조절 서열에 작동 가능하게 연결될 수 있으며, 상기 작동 가능하게 연결된 유전자 서열과 발현 조절서열은 선택 마커 및 복제 개시점(replication origin)을 같이 포함하고 있는 하나의 발현 벡터 내에 포함될 수 있다. ‘작동가능하게 연결(operably linked)’ 된다는 것은 상기 폴리뉴클레오타이드(핵산) 서열이 발현 조절 서열의 유전자 발현을 가능하게 하는 방식으로 연결된 것을 의미한다. 상기 ‘발현 조절 서열(expression control sequence)’ 이란 특정한 숙주세포에서 작동 가능하게 연결된 폴리뉴클레오티드 서열의 발현을 조절하는 DNA 서열을 의미한다. 그러한 조절 서열은 전사를 실시하기 위한 프로모터, 전사를 조절하기 위한 임의의 오퍼레이터 서열, 적합한 mRNA 리포좀 결합 부위를 코딩하는 서열, 및 전사 및 해독의 종결을 조절하는 서열 등으로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상을 포함할 수 있다.

상기 발현 벡터의 모벡터로 사용되는 벡터는 특별한 제한이 없으며, 이 발명

이 속하는 기술분야에서 숙주세포로 사용되는 미생물에서의 발현을 위하여 통상적으로 사용되는 모든 플라스미드, 바이러스 또는 기타 매개체 등이 사용 가능하다. 예컨대, 상기 플라스미드에는 대장균 유래 플라스미드(pBR322, pBR325, pUC118 및 pUC119, pET-22b(+)), 바실러스 서브틸리스 유래 플라스미드(pUB110 및 pTP5) 및 효모 유래 플라스미드(YEp13, YEp24 및 YCp50) 등이 있으며, 상기 바이러스는 레트로바이러스, 아데노바이러스 또는 백시니아 바이러스와 같은 동물바이러스, 배큘로 바이러스와 같은 곤충 바이러스 등이 사용될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

상기 숙주 세포는 삽입된 서열의 발현을 조절하거나 또는 바람직한 특정 방식으로 유전자로부터 목적 생성물을 생산할 수 있는 것을 선택할 수 있다. 상이한 숙주 세포는 단백질의 해독 및 해독 후 프로세싱과 변형에 대한 특징적이고 특이적인 기작을 갖고 있다. 적합한 세포주 또는 숙주 시스템으로는 발현된 이중 단백질의 바람직한 변형 및 프로세싱을 제공하는 것을 선택할 수 있다. 효모에서의 발현은 생물학적 활성 생성물을 생산할 수 있다. 진핵 세포에서의 발현은 '천연' 폴딩의 가능성을 증가시킬 수 있다.

본 발명의 벡터를 안정되면서 연속적으로 클로닝 및 발현시킬 수 있는 숙주 세포는 당업계에 공지되어 있는 어떠한 숙주 세포도 이용할 수 있으며, 예컨대, *E. coli* JM109, *E. coli* BL21DE, *E. coli* DH5, *E. coli* RR1, *E. coli* LE392, *E. coli* B, *E. coli* X 1776, *E. coli* W3110 등이 사용될 수 있으며, 또한 아그로박테리움 A4와 같은 아그로박테리움 속 균주, 바실루스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*)와 같은 바실리(bacilli), 살모넬라 티피뮤리움(*Salmonella typhimurium*) 또는 세라티아 마르게센스(*Serratia marcescens*)와 같은 또 다른 장내세균 및 다양한 슈도모나스(*Pseudomonas*) 속 균주가 숙주세포로서 이용될 수 있다.

또한, 본 발명의 벡터를 진핵 세포에 형질전환시키는 경우에는 숙주 세포로서, 이스트(*Saccharomyces cerevisiae*), 곤충 세포 및 사람 세포(예컨대, CHO 세포주(*Chinese hamster ovary*), W138, BHK, COS-7, 293, HepG2, 3T3, RIN 및 MDCK 세포주) 등이 이용될 수 있다.

벡터를 숙주세포 내로 전달하여 숙주세포를 형질전환 시키는 방법은 공지의

방법이면 어떠한 것이든 가능하며 특별히 제한되지 아니한다. 예를 들어, 대장균을 이용할 경우 열충격(heat shock)이나 electroporation 방법을 통해 형질전환할 수 있으며 동물세포를 이용한 생산세포주 구축 시 인산칼슘침전법(calcium phosphate precipitation), DEAE-dextran법, 전기천공법(electroporation), 직접 미세주입법(direct microinjection), DNA-로딩 리포솜(DNA-loaded liposome)법, 리포펙타민-DNA 복합체(lipofectamine-DNA complex)법, 세포 음파분쇄법(cell sonication), 고속미세분사(high velocity microprojectile)를 이용한 유전자 폭격법(gene bombardment), 다양이온(polycation)법 및 수용체 매개 형질전이법(receptor-mediated transfection)에 의하여 형질전환할 수 있다. 이 기술들 중 일부는 생체 내 또는 생체 외 사용을 위해 개량될 수 있다.

형질전환 세포의 배양은 융합단백질의 발현을 가능하게 하는 적절한 조건하에서 수행하며, 이러한 조건은 당업자에게 익히 공지된 방법에 따라 수행할 수 있다. 형질전환 세포는 통상적인 배양방법에 의해 대량으로 배양할 수 있다. 배양배지로는 탄소원, 질소원, 비타민 및 미네랄로 구성된 배지를 사용할 수 있으며, 예를 들어, 2X YT배지를 사용할 수 있다. 세포의 배양은 통상의 세포 배양 조건상에서 가능하며 예를 들어, 온도범위 15℃ 내지 45℃에서 10시간 내지 40시간 동안 배양할 수 있다. 배양액 중의 세포를 제거하고 배양배지만을 회수하기 위해 원심분리(centrifugation) 또는 여과(filtration) 과정을 거칠 수 있으며 이러한 단계는 당업자가 필요에 따라 수행할 수 있다. 균체를 제거한 배양배지(여액)는 통상적인 방법에 따라 냉장하여 그 활성을 잃지 않도록 단기 보존할 수 있다.

형질전환 세포(또는 형질전환체)에서 발현시킨 융합단백질은 통상의 방식으로 정제될 수 있으며, 예를 들어, 염석(예를 들어 황산암모늄 침전, 인산나트륨 침전), 용매 침전(아세톤, 에탄올 등을 이용한 단백질 분획 침전), 투석, 겔 여과, 이온 교환, 역상 칼럼 크로마토그래피, 친화 크로마토그래피와 같은 칼럼 크로마토그래피 및 한외여과 등의 기법을 단독 또는 조합으로 적용시켜 본 발명의 융합단백질을 정제할 수 있다(Maniatis et al, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.(1982); Sambrook et al, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2d Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press(1989); Deutscher, M., Guide to Protein Purification Methods Enzymology, vol. 182. Academic Press. Inc., San Diego, CA(1990)).

【유리한 효과】

본 발명의 조직투과성 펩타이드와 항-혈관 내피세포 성장인자(anti-VEGF) 제제가 융합된 융합단백질을 유효성분으로 포함하는 약학적 조성물은 항-혈관 내피세포 성장인자 제제의 조직투과성이 개선되고 안구 내 주사 시 맥락막 조직으로의 약물 전달력이 개선되어 약물 내성환자의 치료, 투여용량 감소 또는 투여주기 증대의 효과를 나타낼 뿐만 아니라 점안제로 개발할 수 있다.

【도면의 간단한 설명】

도 1A는 조직투과성 펩타이드와 항-혈관 내피세포 성장인자 항원결합절편(Fab)이 융합된 융합단백질의 모식도이다. 도 1B는 조직투과성 펩타이드와 항-혈관 내피세포 성장인자가 융합된 융합단백질이 VEGF 및 뉴로필린 수용체-1 과 결합하는 양상을 나타낸 모식도이다. 도 1C는 다양한 혈관 내피세포 성장인자 억제제 형태들(Fab, 전 항체(whole IgG), Fc 융합단백질)에 조직투과성 펩타이드가 결합된 개량체들의 모식도이다.

도 2는 라니비주맙과 본 발명의 융합단백질의 생산에 따른 주요 산물을 HPLC로 분석한 결과이다(IDB0062: 라니비주맙 변이체와 조직투과성 펩타이드 TPP#2가 융합된 Fab 융합단백질). AU는 임의의 단위(arbitrary unit)를 의미한다.

도 3은 본 발명에 따른 융합단백질들의 1차 정제물을 12% non-reducing SDS-PAGE gel에서 분석한 결과이다(IDB0062, 라니비주맙 변이체와 조직투과성 펩타이드 TPP#2가 융합된 Fab 융합단백질; IDB0064, 라니비주맙 변이체와 조직투과성 펩타이드 TPP#5가 융합된 Fab 융합단백질).

도 4A는 라니비주맙, 라니비주맙 변이체 및 본 발명에 따른 융합단백질의 VEGF에 대한 결합친화도 분석 결과이다. 도 4B는 조직투과성 펩타이드와 본 발명에 따른 융합단백질의 뉴로필린 수용체-1에 대한 결합능을 평가한 결과이다(IDB0061, 라니비주맙 변이체; IDB0062, 라니비주맙 변이체와 조직투과성 펩타이드 TPP#2가 융합된 Fab 융합단백질; Fc-TPP#2, IgG1의 FC-말단에 조직투과성 펩타이드 TPP#2가 융합된 Fc 융합단백질).

도 5A는 본 발명에 따른 융합단백질의 보관 조건별 안정성을 평가한 결과이다. 도 5B는 반복적인 냉/해동에 따른 융합단백질의 안정성을 평가한 결과이다.

도 6A는 라니비주맙, 라니비주맙 변이체 및 본 발명에 따른 융합단백질의 신생혈관 예방 모델에서 혈관 신생 억제효과를 각막신생혈관 예방 모델에서 평가한 결과이다. 도 6B는 도 6A에서의 결과를 수치화하여 그래프로 나타낸 결과이다.

도 7A는 라니비주맙 및 본 발명에 따른 융합단백질의 신생혈관 내성 모델에서 혈관 신생 억제효과를 각막신생혈관 내성 모델에서 평가한 결과이다. 도 7B는 도 7A에서의 결과를 수치화하여 그래프로 나타낸 결과이다. 도 7C는 라니비주맙 및 본 발명에 따른 융합단백질의 pericyte coverage 감소 효과를 평가한 결과이다.

도 8A는 본 발명에 따른 융합단백질인 라니비주맙 개량체 IDB0062의 안구투과성을 현광현미경을 통해 평가한 결과이다. 도 8B는 도 8A에서의 결과를 수치화하여 그래프로 나타낸 결과이다. 도 8C는 2시간 반응시킨 안구 조직 단면에서 FITC conjugation된 단백질의 분포를 DAPI 염색과 함께 현광현미경을 통해 분석한 결과이다. 도 8D는 도 8C에서의 결과를 수치화하여 그래프로 나타낸 결과이다. 도 8E는 망막 조직의 단편을 공초점현미경으로 분석한 결과로 IDB0062의 망막 투과능에 따른 분포를 분석한 결과이다.

도 9A는 본 발명에 따른 융합단백질인 베바시주맙 개량체 IDB0072의 안구투과능을 현광현미경을 통해 평가한 결과이다. 도 9B는 9A에서의 결과를 수치화하여 그래프로 나타낸 결과이다.

도 10A는 라니비주맙 및 본 발명에 따른 융합단백질의 맥락막 신생혈관(CNV) 모델에서 약물 처리에 따라 맥락막 신생혈관의 증식의 억제되는 양상을 보여주는 그림이다. 도 10B는 도 10A의 결과를 수치화하여 그래프로 나타낸 결과이다.

도 11A는 라니비주맙 및 본 발명에 따른 융합단백질의 산소유도 망막병증(OIR) 모델에서 약물 처리에 의해 혈관 말단에서 누수 현상이 억제되는 것을 현광현미경을 통해 분석한 결과이다. 도 11B는 도 11A의 결과를 수치화하여 그래프로 나타낸 결과이다.

도 12A는 라니비주맙 및 본 발명에 따른 융합단백질의 산소유도 망막병증(OIR) 모델에서 약물 처리에 의해 신생혈관 및 혈관 다발(tufts)의 형성이 억제되는 것을 isolectin B4 염색 후 형광현미경을 통해 분석한 결과이다. 도 12B는 도 12A의 결과를 수치화하여 그래프로 나타낸 결과이다.

도 13은 IDB0062와 라니비주맙을 rat에 안구 내 주사한 뒤 시간별 망막 조직에 존재하는 약물의 양을 western blot assay를 통해 분석한 결과이다.

【발명의 실시를 위한 형태】

이하 본 발명을 상세히 설명한다.

단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다.

<실시예 1>

조직투과성 펩티드가 융합된 라니비주맙 개량체 제작

<1-1> 생산성이 증가된 라니비주맙 변이체 IDB0061의 제작

라니비주맙의 낮은 생산 수율 문제는 Fab fragment의 낮은 배양 생산성과 periplasmic expression을 통한 생산 단백질의 다형성으로 복잡한 후처리 공정이 필요하기 때문이다. 이를 극복하기 위하여 점돌연변이 도입 등 단백질 엔지니어링을 통해 라니비주맙의 특정 아미노산 서열을 변환시킴으로써, 생산된 단백질이 대부분 세포 외부로 배출되도록 하여 발현율을 높이고 균일한 형태의 단백질만 생산되도록 생산 세포주를 최적화하여 라니비주맙 변이체인 IDB0061를 생산하였다. 이를 통해 배양 생산성을 높이고 정제 공정을 단순화하여 생산수율이 획기적으로 개선됨을 확인하였다.

구체적으로, 라니비주맙의 아미노산 서열을 변환하는 단백질 엔지니어링 방법은 라니비주맙 nucleotide sequence 중 마지막 cysteine을 serine으로 변경하여 유전자를 합성한다. 이후 SUPLEX5(KCTC 12657BP) 생산세포주에 transformation한 후 발현 테스트를 진행하였다.

라니비주맵 변이체 IDB0061의 경쇄 부분의 제작 과정은 다음과 같다. 라니비주맵의 핵산서열을 관련 특허로부터 입수하고 코돈 최적화 작업을 진행한 뒤 이를 바탕으로 signal sequence가 포함되어 있는 Fab 경쇄 가변부(VL)의 핵산을 합성하였으며, Fab의 CL 영역은 anti-albumin Fab인 SL335의 벡터를 주형으로 primer(서열번호 24, 25)를 이용해 PCR하여 제작하였다. 라니비주맵 변이체 IDB0061의 중쇄 부분의 제작 과정은 다음과 같다. 라니비주맵의 핵산서열을 관련 특허로부터 입수하고 코돈 최적화 작업을 진행한 뒤 이를 바탕으로 signal sequence(gIII)가 포함되어 있는 Fab 중쇄 가변부(VH)의 핵산을 합성하였으며, Fab의 CH1 영역은 anti-albumin Fab인 SL335의 벡터를 주형으로 primer(서열번호 32, 33)를 이용해 PCR하여 제작하였다.

【표 1】

클로닝에 사용한 프라이머(primer) 서열

클로닝에 사용한 primer 서열(방향: 5' → 3')	
서열번호 24	tgtgctgcaccatctgtcttcac
서열번호 25	agactctccctgttgaagctctttgtg
서열번호 26	cacaaagagcttcaacagggagagt
서열번호 27	ttaacgacgcggacgacctttttgtttt
서열번호 28	atgaaaaaactgcgattgcgattcggt
서열번호 29	gatgaaagacagatggtgcagccaca
서열번호 30	ggggatccatgaaaaaactgcgattgcgattcggt
서열번호 31	gggctcgagttaacgacgcggacgacctttttgtttt
서열번호 32	gcctccaccaaggcccatc
서열번호 33	agaagatttggctcaactttctgtccac
서열번호 34	gtggacaagaaagttgagcccaaatctt
서열번호 35	ttaacgacgcggacgacctttttgtttt
서열번호 36	atgaaaaaactgctgttcgcgattccgc
서열번호 37	cgatggcccttggtggagg
서열번호 38	ggggatccatgaaaaaactgctgttcgcgattccac
서열번호 39	gggaagcttttaacgacgcggacgacctttttgtttt
서열번호 40	cccgatccatgaaaaaactgcgattgcgattcggt
서열번호 41	cccgatccatgaaaaaactgctgttcgcgattccgc
서열번호 42	ggctctcacacccgggttaactctaaaccaacgcacaccaaggcgtaactcgagg

단백질 엔지니어링 분야에서 통상적으로 사용되는 방법을 이용하여 라니비주맵의 아미노산 서열에 점돌연변이(point mutation)를 일으켰다. 구체적으로, 라니비주맵의 경쇄 아미노산 서열 중 214번째 아미노산인 시스테인(cysteine)이 세린

(serine)으로 치환되었으며, 라니비주맙의 중쇄 아미노산 서열 중 226번째 아미노산인 시스테인(cysteine)이 세린(serine)으로 치환되었다. 상기 점 돌연변이가 일어난 라니비주맙 변이체 IDB0061의 경쇄 및 중쇄 아미노산 서열을 서열번호 8 및 서열번호 10으로 각각 표시하였으며, 이를 인코딩하는 핵산 서열을 서열번호 9 및 서열번호 11로 각각 표시하였다.

PCR을 통해 최종 완성된 라니비주맙 변이체 IDB0061의 서열은 pHEKA vector에 cloning하고, SUPEX5 strain에 transformation하였다. 구체적으로, 1mm 큐벳에 competent cell 100 μ l를 넣고 여기에 상기 DNA를 3 μ l 첨가한 뒤 1800V로 electric shock을 주어 유전자를 도입하여 생산세포주를 완성하였다.

라니비주맙과 IDB0061 각각의 생산세포주를 2× YT media(100mM potassium phosphate buffer, pH 7.2, 50 μ g/ml kanamycin) 50ml에 1%(v/v) 접종하여 28℃에서 220rpm으로 18시간 배양하여 전배양을 진행하였다. 2× YT media를 1L baffled flask에 180ml씩 넣고 멸균한 본배양 배지에 미리 제공한 1M potassium phosphate(pH 7.2) 20ml과 50 μ g/ml kanamycin을 첨가한 뒤 OD₆₀₀이 약 0.15가 되도록 전배양액을 접종한다. 이후 28℃, 220rpm에서 OD₆₀₀이 0.5~0.7 사이가 될 때까지 배양한 뒤 0.1mM IPTG를 첨가하고 온도를 20℃로 낮춰 발현을 유도한다. 발현 유도 21시간 후 배양액은 원심분리를 통해 상등여액을 회수하고 depth filter와 membrane sterile filter를 이용해 여과한 뒤 protein L column에 loading하여 목적 단백질을 정제하였다.

본 발명에 따른 라니비주맙 변이체 IDB0061과 원래의 라니비주맙의 생산성을 비교한 결과, 표 2에서 보이는 바와 같이, IDB0061은 기본 배지를 사용한 batch culture만으로도 라니비주맙에 비해 높은 생산성을 가지는 것을 확인하였으며, 세포 파쇄 없이 배양액에서 흡착 컬럼을 사용한 one-step 공정으로 95% 이상의 순도로 정제가 가능하여 공정의 단순화가 가능하였다.

【표 2】

라니비주맵과 본 발명에 따른 라니비주맵 변이체와 개량체의 생산성 비교

Drug name	cultivation	Productivity (ng/L)	Purification	Purity
Novartis 라니비주맵	Flask batch culture	<1 ¹	Cell extraction & protein G	>98%
IDB0061		6~7	Affinity column(protein L)	>95% ²
IDB0062		4~5		>95% ²
IDB0064		3~4		>95% ²

¹: Anti-VEGF antibody 특허(PCT/US1998/006604, Genentech) 참고

²: Novartis 라니비주맵 는 최종 정제물의 순도를 표시한 것에 비해 IDB0061, IDB0062는 Protein L 컬럼을 통한 1차 정제물의 순도를 의미함

<1-2> 라니비주맵 변이체와 조직투과성 펩티드의 융합

본 발명자들은 항-VEGF 제제인 라니비주맵의 효능 증대 및 내성 극복을 위해 라니비주맵의 C-말단에 뉴로필린 1(NRP1) 및 2에 모두 결합하거나 뉴로필린 1에만 특이적으로 결합할 수 있는 조직투과성 펩타이드(tissue penetrating peptide, TPP)를 융합하고자 하였으며, TPP의 아미노산 서열은 하기 표 3에 나타내었다. 표 3의 서열목록 중 서열번호 1 내지 4의 아미노산 서열을 갖는 TPP는 뉴로필린 1 및 2에 모두 결합이 가능하며, 서열번호 5 내지 7의 아미노산 서열을 갖는 TPP는 뉴로필린 1에만 특이적으로 결합이 가능하다. 라니비주맵에 TPP가 융합된 융합단백질의 모식도를 도 1에 나타내었다. 구체적으로, 에이프릴바이오에 의뢰하여 상기 실시예 <1-1>에서 제작한 라니비주맵 변이체 IDB0061의 C-말단에 하기 표 3에 기재된 다양한 TPP(뉴로필린 수용체에 특이적으로 결합하는 펩타이드)들이 융합된 융합단백질 및 이를 생산하는 세포주를 제작하였다.

한편, 표 3에 나타낸 TPP 중, 서열번호 2의 아미노산 서열을 갖는 TPP#2는 뉴로필린의 intrinsic ligand인 VEGF₁₆₅ 및 세마포린 3계열 리간드들의 C-말단 부위를 변형한 것이고, TPP#5는 뉴로필린1의 b1b2 도메인 단백질과 동시에 뉴로필린2의 b1b2 도메인 단백질을 경쟁자(competitor)로 이용하여 뉴로필린1의 b1 도메인에 선택적으로 결합하는 클론으로부터 도출된 펩타이드를 분리 동정한 것으로서, 여기에 링커로 Avastin을 융합하여 뉴로필린 수용체에 bivalent로 작용할 수 있도록 함으로써 VEGF와 Sema3A 리간드와 비슷한 친화력을 갖으면서도 조직투과성을 가질 수 있게 design하였다.

【표 3】

Tissue penetrating peptide(TPP) 서열정보

TPP#1 (서열번호 1)	HTPGNSNKVKHLQENKKGR M RR
TPP#2 (서열번호 2)	HTPGNSNKVKHLQENKKGR P RR
TPP#3 (서열번호 3)	REAPGAPRSPEPQDQKKPR M RR
TPP#4 (서열번호 4)	REAPGAPRSPEPQDQKKPR P RR
TPP#5 (서열번호 5)	HTPGNSKPTRT P RR
TPP#6 (서열번호 6)	HTPGNSNQFVLTS T RPPR
TPP#7 (서열번호 7)	HTPGIATRT P R

TPP가 결합되어 있지 않는 라니비주맵 변이체 IDB0061(라니비주맵에 점돌연 변이만 도입한 형태)에 TPP#2 펩타이드가 링커에 의해 연결되어 있는 형태인 IDB0062의 제작 과정은 다음과 같다.

구체적으로, TPP가 융합된 라니비주맵 변이체 IDB0062의 경쇄 부분의 제작은 라니비주맵의 핵산서열을 관련 특허로부터 입수하고 코돈 최적화 작업을 진행한 뒤 이를 바탕으로 signal sequence가 포함되어 있는 경쇄 가변부(VL)의 핵산을 합성하였으며, 경쇄 불변부(CL) C-말단의 cysteine이 serine으로 치환된 일부 서열에 linker와 TPP#2 서열을 포함한 핵산(CL'-linker-TPP#2)을 합성하였다. Fab의 CL 영역은 anti-albumin Fab인 SL335의 벡터를 주형으로 primer(서열번호 24, 25)를 이용하여 PCR하여 제작하였고, 합성한 CL'-linker-TPP#2 핵산을 주형으로 primer(서열번호 26, 27)를 이용하여 PCR하여 CL'-linker-TPP#2를 제작하였다. 이 두 product는 linking PCR을 통해 연결하여 CL-linker-TPP#2 올리고뉴클레오타이드를 제작하였다. 합성한 VL 핵산을 주형으로 primer(서열번호 28, 29)를 이용하여 VL을 제작한 뒤 CL-linker-TPP#2와 함께 primer(서열번호 30, 31, BamHI과 XhoI 서열 포함)를 이용하여 assembly PCR을 수행하여 최종 VL-CL-linker-TPP#2 서열을 완성하였다.

TPP#2가 융합된 라니비주맵 변이체 IDB0062의 중쇄 부분의 제작은 라니비주맵의 핵산서열을 관련 특허로부터 입수하고 코돈 최적화 작업을 진행한 뒤 이를 바탕으로 signal sequence(gIII)가 포함되어있는 중쇄 가변부(VH)의 핵산을 합성하였으며 중쇄 불변부(CH1) C-말단의 cysteine이 serine으로 치환된 일부 서열에 linker와 TPP#2 서열을 포함한 핵산(CH1'-linker-TPP#2)을 합성하였다. Fab의 CH1 영역은 anti-albumin Fab인 SL335의 벡터를 주형으로 primer(서열번호 32, 33)를

이용해 PCR하여 제작하였고, 합성한 CH1'-linker-TPP 핵산을 주형으로 primer(서열번호 34, 35)를 이용해 PCR하여 CH1'-linker-TPP#2를 제작하였다. 이 두 product는 linking PCR을 통해 연결하여 CH1-linker-TPP#2 올리고뉴클레오타이드를 제작하였다. 합성한 VH 핵산을 주형으로 primer(서열번호 36, 37)를 이용해 VH를 제작한 뒤 CL-linker-TPP#2와 함께 primer(서열번호 38, 39, EcoRI과 HindIII 서열 포함)를 이용해 assembly PCR을 수행하여 최종 VH-CH1-linker-TPP#2 서열을 완성하였다. PCR을 통해 최종 완성된 fragment 중 경쇄는 BamHI과 XhoI으로, 중쇄는 EcoRI과 HindIII로 절단한 뒤 동일 제한효소로 절단된 pHEKA vector에 cloning하였다. 상기 방법으로 완성된 IDB0062 서열을 포함하는 pHEKA vector는 SUPEX5 strain에 transformation하였다. 구체적으로, 1mm 큐벳에 competent cell 100 μ l를 넣고 여기에 상기 DNA를 3 μ l 첨가한 뒤 1800V로 electric shock을 주어 유전자를 도입하여 생산세포주를 완성하였다.

이와 같이 제작된 IDB0062의 경쇄 및 중쇄 아미노산 서열을 서열번호 12 및 서열번호 14로 각각 표시하였으며, 이를 인코딩하는 핵산 서열을 서열번호 13 및 서열번호 15로 각각 표시하였다.

<1-3> 라니비주맵 개량체 IDB0062의 선별

상기 실시예 <1-2>에서 제조한 다양한 라니비주맵 개량체 후보 단백질들에 대하여, 뉴로필린 수용체에 대한 친화도와 내피세포 사이의 밀착연접(tight junction) 와해능을 비교하였다.

먼저 뉴로필린 수용체에 대한 친화도는 NRP 1(neuropilin 1)에 대하여 수행되었다. 구체적으로, TPP의 뉴로필린 1 도메인에 대한 결합력을 확인하기 위하여 Biacore2000(GE Healthcare)을 이용하여 SPR(surface plasmon resonance)을 수행하였다. 구체적으로, 뉴로필린 1 도메인 각각을 10mM Na-아세트이트 완충액(pH 4.0)에 희석하여 CM5 센서칩(GE Healthcare, USA)에 약 1,000 response units(RU)으로 고정화하였다. HBS-EP 완충액(10mM HEPES, 2mM ethylenediaminetetraacetic acid, and 0.005% surfactant P20, pH 7.4, GE Healthcare)을 30 μ l/min 유속으로 분석하였으며, VEGF165는 80nM에서 5nM, 세마포린3A를 1 μ M에서 62.5nM, TPP는 25 μ M에서 1.5625 μ M의 농도로 분석하였다. 결합/해리 분석 후 CM5칩의 재생(regeneration)은 완충액(20mM NaOH, 1M NaCl, pH 10.0)을 30 μ l/min 유속으로 1분간 흘려주어 시행

되었다. 결합 3분, 해리 3분으로 얻어진 각 센서그램(sensorgram)은 blank cell과 비교하여 정상화(normalization) 및 절감(subtraction)하여 친화도를 계산하였다.

또한 상기 내피세포 사이의 밀착연접 와해능은, 상기 단백질들의 VE-cadherin 및 E-cadherin 저해정도를 측정하여 평가하였다. 내피세포에서 VE-cadherin 및 E-cadherin의 발현이 저해되면 내피세포 사이의 밀착연접(tight junction)이 와해되는 것으로 알려져 있으며, 이를 통해 약물의 안구 내 투여시 맥락막 조직으로의 전달력(또는 조직투과력)이 높아진다. 구체적으로, TPP의 혈관 투과성 증진을 간접적으로 확인할 수 있는 실험방법으로, 웨스턴 블롯을 통한 VE-cadherin의 변화를 확인하였다. 구체적으로, 혈관 투과성 증진은 6-well 플레이트에 HUVEC 세포를 웰 당 3×10^5 개로 시딩(seeding)한 후 24시간 배양한 뒤 TPP를 1 μ M로 10분간 처리하여 웨스턴 블롯을 수행하였다. SDS-PAGE를 수행한 겔은 PVDF 막에 옮기고 VE-cadherin 및 β -actin을 인지하는 1차 항체(SantaCruz)와 HRP가 결합된 2차 항체(SantaCurz)를 이용하여 검출하였으며, 분석은 ImageQuant LAS4000 mini(GE Healthcare)를 이용하였다.

실험 결과, 하기 표 4에서 보이는 바와 같이 TPP#2가 융합된 Fc(Fc-TPP#2)가 뉴로필린 수용체(NRP 1)와 높은 수준(Sema3A ligand와 유사한 수준)으로 결합함을 확인하였으며, VE-cadherin을 현저히 억제함을 나타내었다. TPP#5가 융합된 Fc(Fc-TPP#5)의 경우에는 NRP 1과의 결합력은 Sema3A보다 높았으며 VE-cadherin에 대한 저해 효과도 더욱 뛰어난 것으로 나타났다. IDB0062 역시 뉴로필린 수용체(NRP 1)와 높은 수준으로 결합하는 것을 확인했으며, VE-cadherin 저해 정도 역시 Fc-TPP#2와 유사하게 저해되는 것으로 확인된다.

【표 4】

TPP 후보 선별

클론	링커/TPP 길이 (아미노산 개수)	수용체 (뉴로필린)	친화도, K_D (M)	VE-cadherin 저해 정도
VEGF ₁₆₅	-	NRP 1	$3.51 \pm 0.36 \times 10^{-9}$	++
Sema3A	-	NRP 1	$2.79 \pm 0.14 \times 10^{-8}$	+
Fc-TPP#2	15/22	NRP 1	$6.3 \pm 0.21 \times 10^{-9}$	++
Fc-TPP#5	15/14	NRP 1	$1.7 \pm 0.2 \times 10^{-9}$	+++
IDB0062	15/22	NRP 1	$1.0 \pm 0.11 \times 10^{-8}$	++

<1-4> 라니비주맵 개량체 IDB0062의 생산성 확인

상기 실시예 <1-1>과 동일한 방법으로 IDB0062의 생산성을 확인하였다. 그 결과, 상기 표 1에서 보이는 바와 같이, IDB0061에 TPP#2를 융합한 IDB0062 역시 라니비주맵 대비 5배 가량 높은 생산성을 나타내는 것을 확인하였다.

또한 흡착컬럼을 이용한 1차 정제물에 대한 순도를 HPLC로 분석하였다. HPLC 분석 실험은 다음과 같은 방법으로 진행하였다. 흡착컬럼을 이용해 1차 정제한 정제물은 amicon(Milipore, 10K)을 이용해 농축한 후 formulation buffer(10mM histidine, 0.1% tween20, 10% trehalose)로 교환하여 최종 농도가 0.5mg/ml이 되도록 희석하였다. 분석기기는 Waters Alliance e2695를 사용하였으며 column은 BioSuite 250 UHR SEC(4.6×300mm, 4um, Waters)을 사용하였고 이동상은 20mM potassium phosphate buffer(250mM KCl, pH 6.2)를 이용하였다. 분석 방법은 상기 농축 시료를 20 µl injection하여 0.35ml/min 유속으로 20분 동안 분석하였고 단백질 peak는 UV 280nm 파장에서 분석하였다.

실험 결과, 라니비주맵은 세 개의 주요 성분이 혼합되어 있고 이 중 3번째 성분만이 활성 성분임에 반해 IDB0062는 단일한 형태로 생산됨을 확인하였다(도 2).

<1-5> 라니비주맵 개량체 IDB0064의 제작과 생산성의 확인

라니비주맵 개량체 IDB0062에 이어, 실시예 <1-3>에서 VE-cadherin 저해 효과가 확인된 TPP#5가 링커에 의해 연결되어 융합된 라니비주맵 개량체 IDB0064를 제작하고 생산성을 확인하였다.

IDB0064의 구체적인 제작 과정은 다음과 같다. IDB0061에 새로운 TPP인 TPP#5를 결합시키기 위하여 유전자 클로닝을 수행하였다. IDB0062를 주형으로 C-말단의 TPP를 TPP#2에서 TPP#5로 교체하기 위해 특정 primer(서열번호 40, 41, 42)를 이용하였는데, TPP#2와 TPP#5가 공유하는 앞부분 서열에 annealing region을 잡고 그 뒤로 TPP#5의 서열을 연장하여 primer를 제작하였고 이를 이용해 클로닝을 진행하였다. PCR은 denaturation(95℃, 40sec), annealing(65℃, 40sec), extension(72℃, 1min)의 순서로 30 사이클을 수행하여 Fab 경쇄(light chain)-TPP#5와 Fab 중

쇄(heavy chain)-TPP#5의 유전자를 얻었다. PCR 산물 중 경쇄 부분은 BamHI과 XhoI을, 중쇄 부분은 EcoRI과 HindIII를 처리한 후 pHEKA vector에 ligation하여 삽입하고 생산세포주인 SUPEX5에 transformation하였다.

이와 같이 제작된 IDB0064의 경쇄 및 중쇄 아미노산 서열을 서열번호 16 및 서열번호 18로 각각 표시하였으며, 이를 인코딩하는 핵산 서열을 서열번호 17 및 서열번호 19로 각각 표시하였다.

상기 제작된 IDB0064의 생산세포주의 생산성을 확인하였다. IDB0064 생산세포주를 $2 \times$ YT media(100mM potassium phosphate buffer, pH 7.2, 50 μ g/ml kanamycin) 50ml에 1%(v/v) 접종하여 28°C에서 220rpm으로 18시간 배양하여 전배양을 진행하였다. $2 \times$ YT media를 1L baffled flask에 180ml씩 넣고 멸균한 본배양 배지에 미리 제공한 1M potassium phosphate(pH 6.4) 20ml과 50 μ g/ml kanamycin을 첨가한 뒤 OD₆₀₀이 약 0.15가 되도록 전배양액을 접종한다. 이후 28°C, 220rpm에서 OD₆₀₀이 0.5~0.7 사이가 될 때까지 배양한 뒤 0.05mM IPTG를 첨가하고 온도를 20°C로 낮춰 발현을 유도한다. 발현 유도 21시간 후 배양액은 원심분리를 통해 상등여액을 회수하고 depth filter와 membrane sterile filter를 이용해 여과한 뒤 protein L column에 loading하여 목적 단백질을 정제하였다. 정제 결과, 표 2와 도 3에서 보이는 바와 같이, 인위적인 염기서열로 제작한 TPP#5 sequence를 IDB0061Fab에 연결시켰을 때에도 발현이 잘 유도되어 1차 정제만으로 비교적 순도 높은 목적 단백질을 약 3~4mg/L의 생산성으로 얻을 수 있음을 확인하였다.

<실시예 2>

라니비주맙 개량체 IDB0062의 2가(bivalent) 특성 확인

라니비주맙 개량체 IDB0062의 VEGF-A 및 뉴로필린 1 수용체에 대한 결합력을 확인하였다.

<2-1> 뉴로필린 1 수용체에 대한 결합력 SPR(Biacore2000) assay

IDB0062와 IDB0072의 NRP1에 대한 결합능을 확인하기 위하여 SPR assay를 실시하였다. EDC/NHS mixture로 Biacore CM5 chip을 활성화시킨 후 타겟 단백질인 NRP1을 고정화버퍼(10mM sodium acetate, pH5.5)에 희석하여 Rmax:200으로 계산하여 최종 79Ru로 고정하였다. 그 후 IDB0062, IDB0072 시료를 12.5nM~400nM까지

HBSEP buffer에 희석하여 분석을 수행하였다. 분석 유속은 30 μ l/min으로 수행하였고 결과 그래프를 토대로 센서그램을 얻어 Kd값을 산출하였다.

표 4에서 보이는 바와 같이, 뉴로필린 1 수용체에 대한 IDB0062의 결합력은 대조약물(Fc-TPP#2)과 유사한 결합활성을 유지함을 확인하였다. 이는 라니비주맙의 C-말단에 융합된 TPP#2 펩타이드가 뉴로필린 1 수용체에 잘 결합함을 의미한다.

<2-2> 뉴로필린 1 수용체에 대한 결합력 ELISA assay

ELISA plate(SPL, Immunoplate Maxi binding)에 NRP1(자체 생산)을 carbonate coating buffer(0.1M NaHCO₃, pH 9.6)에 희석하여 10 μ g/ml의 최종 농도로 만들어 웰당 100 μ l씩 넣고 37°C에서 2시간 코팅하였다. 이후 plate를 3회 세척한 뒤 37°C에서 1시간 동안 blocking(4% smim milk, pH 7.4)을 진행하고 3회 세척 후 각각의 시료를 적절 배수로 희석하여 웰당 100 μ l씩 처리하여 37°C에서 1시간 반응시켰다. 시료 반응이 종료되면 plate를 3회 세척한 뒤 Goat anti-human kappa light chain Ab-HRP(Sigma Aldrich, A7164)를 blocking buffer에 5,000배 희석하여 웰당 100 μ l씩 처리하고 37°C에서 1시간 반응시켰다. Plate를 5회 세척 후 TMB substrate(Bethyl, E102)를 웰당 100 μ l씩 처리하고 2~3분 반응 후 stop solution(1N HCl)를 웰당 100 μ l 처리하여 반응을 종료하고 ELISA plate reader를 이용하여 450nm에서 값을 측정하였다.

ELISA assay에서도 뉴로필린 1 수용체에 대한 IDB0062의 결합력은 대조약물(Fc-TPP#2)과 동등 정도임을 확인하였다(도 4B). 따라서 TPP#2 펩타이드는 라니비주맙의 C-말단에 융합되었을 때 그 특성이 유지됨을 재확인하였다.

<2-3> VEGF에 대한 결합력 ELISA assay

ELISA plate(SPL, Immunoplate Maxi binding)에 VEGF(R&D system, 293-VE-500/CF)을 carbonate coating buffer(0.1M NaHCO₃, pH 9.6)에 희석하여 최종 3 μ g/ml의 농도로 만들어 웰당 100 μ l씩 넣고 37°C에서 2시간 코팅하였다. 이후 plate를 3회 세척한 뒤 37°C에서 1시간 동안 blocking(4% smim milk, pH 7.4)을 진행하고 3회 세척 후 각각의 시료를 적절 배수로 희석하여 웰당 100 μ l씩 처리하여 37°C에서 1시간 반응시킨다. 시료 반응이 종료되면 plate를 3회 세척한 뒤 Goat anti-human kappa light chain Ab-HRP(Sigma Aldrich, A7164)를 blocking buffer에

5,000배 희석하여 웰당 100 μ l씩 처리하고 37°C에서 30분간 반응시켰다. Plate를 7회 세척 후 TMB substrate(Bethyl, E102)를 웰당 100 μ l씩 처리하고 2~3분 반응 후 stop solution(1N HCl)를 웰당 100 μ l 처리하여 반응을 종료하고 ELISA plate reader를 이용하여 450nm에서 값을 측정하였다.

도 4A에서 보이는 바와 같이, IDB0062의 ELISA assay를 통해 VEGF-A 결합력이 라니비주맙에 비해 다소 떨어짐을 확인하였으며, 이는 특정 아미노산의 서열 변경에 의해 IDB0062의 3차 구조가 변화되면서 VEGF-A가 결합하는 CDR(Complementary-Determining Region)이 부분적으로 변화되었기 때문으로 예상되었다. 하지만 라니비주맙의 결합력은 일반적인 항체에 비해 상당히 높으므로, 이 정도의 결합력 약화가 실질적인 임상적 효능 저하를 가져오지는 않을 것으로 판단된다.

<실시예 3>

라니비주맙 개량체 IDB0062의 안정성 평가

IDB0062의 특정 아미노산 서열이 변경됨으로써 구조적 변형을 일으켜 VEGF-A 결합력이 라니비주맙에 비해 다소 감소하는 결과를 확인하였으므로, 이러한 변경이 IDB0062의 안정성에 어떠한 영향을 미치는 지를 확인하기 위하여 보관 조건별, 반복 냉/해동 안정성 분석을 실시하였다.

1차 정제된 정제물을 formulation buffer로 변경한 후 동물실험에서 사용하는 농도(5mg/ml)로 농축한 뒤 안정성 실험을 진행하였다. 보관 조건별 안정성 실험은 상기 시료를 10 μ l씩 분주하여 4°C, -80°C에서 5주 동안 보관하면서 1주일 단위로 꺼내 ice에서 해동시킨 후 VEGF binding ELISA assay를 통해 분석하였으며, 반복 냉/해동 안정성은 상기 시료를 -80°C에서 얼리고 ice에서 해동하기를 5회 반복하면서 일부 시료를 취해 VEGF binding ELISA assay 통해 평가하였다.

그 결과, 도 5에서 보이는 바와 같이, IDB0062는 4°C와 -80°C에서 보관 5주까지 VEGF-A 결합능이 안정적으로 유지되었으며, 5회 반복 냉/해동을 통한 물리적 충격을 가해도 활성에는 영향을 미치지 않아 아미노산 서열 변경에 따른 물질의 안정성 약화는 없을 것으로 판단되었다.

<실시예 4>

Anti-VEGF 제제 개량체의 안구 조직 투과도 평가

라니비주맙 개량체의 안구투과도를 분석하기 위해 ex-vivo ocular penetration 모델을 구축하여 그 효능을 평가하였다. 이와 더불어, 조직투과성 펩타이드의 융합에 의한 조직투과도 개선 여부를 분자량이 크고 3차 구조가 더 복잡한 항체(Fc 융합단백질 포함)에서 평가하기 위해 베바시주맙과 그의 개량체 IDB0072에 대한 안구투과도 분석을 동시에 진행하였다.

<4-1> 라니비주맙 개량체 IDB0062의 조직투과도 평가

IDB0062의 C-말단에 융합된 TPP가 안구 내피세포에 많이 분포하는 뉴로필린 수용체와의 결합을 통해 실제로 조직 투과도를 개선시킬 수 있는 지를 확인하기 위하여, 적출한 안구를 FITC conjugation된 라니비주맙 및 IDB0062 용액에 담근 후 시간별 투과도 정도를 비교하였다.

단백질과 FITC의 conjugation 효율을 높이기 위해 단백질 시료를 100mM sodium carbonate buffer(pH 9.0)로 교환한 뒤 1mg/ml로 농도를 보정한 후 FITC(1mg/ml in DMSO)와 섞어 상온에서 2시간 반응하였다. TPP#2 펩타이드에는 FITC가 결합할 수 있는 free amine group이 많기 때문에 단백질당 FITC의 반응 몰수를 달리 적용하여 반응시켰다. 이후 PD-10 desalting column을 이용해 conjugation 되지 않은 FITC를 제거하면서 PBS로 buffer change한 후 정제물을 정량하여 효능 평가용 시료로 사용하였다. Conjugation 결과, 라니비주맙과 IDB0062의 F/P ratio는 1.127과 1.133으로 단백질 한 분자당 거의 동일한 몰수의 FITC가 결합되어 있음을 확인하였다. FITC가 conjugation된 라니비주맙과 IDB0062 용액을 PBS를 이용해 0.3mg/ml로 희석한 후 C57BL/6 마우스 안구를 적출하여 37℃에서 1시간, 2시간 동안 담근 뒤 PBS로 10분씩 2회 세척한 후 파라핀 슬라이드를 제작하였다. Davidson's solution(빙초산:에틸알코올:중화포르말린:증류수=1:3:2:3)을 이용해 안구를 4℃에서 4시간 동안 고정한 후 결막 앞쪽 부위 조직을 가위로 일부 절단하여 파라핀 슬라이드 제작 단계에서 망막조직의 변형을 최소화하였다. 이후 10%(v/v) formalin solution을 이용해 4℃에서 overnight 고정 작업을 거친 후 자동침투기를 이용하여 알코올을 저농도에서 고농도로 높여 조직 내 수분을 제거하고 xylene으로 투명과정을 거친 후 파라핀 침투를 진행하였다. 파라핀 침투가 완료된 조직은 base mold에 넣어 파라핀 블록을 만들었고 박절기를 이용하여 4탕 절편을

만들었다. 파라핀 절편은 부유향온수조에서 펠쳐 미리 알부민, poly-L-lysine, saline을 코팅한 슬라이드에 부착하였다. 조직 슬라이드는 탈파라핀 과정을 거친 후 바로 mounting하여 공초점현미경으로 FITC를 관찰하여 안구 조직투과성 및 분포를 확인하였다.

도 8A와 도 8B에서 보이는 바와 같이, IDB0062는 실험 1시간부터 각막과 안구 후방을 통해 빠르게 안구 안쪽으로 투과되기 시작했으며 2시간에 이르러 대조약물인 라니비주맵에 비해 안구 조직 및 vitreous 내 분포량이 4배 가량 유의적으로 증가하였음을 확인할 수 있다. DAPI 염색을 통해 안조직을 명확하게 구별하여 분석할 수 있는데, 라니비주맵과는 달리 IDB0062의 경우 각막 안쪽에도 단백질이 과량 분포하고 있는 것을 확인할 수 있으며(도 8C, 흰색 화살표) 안구 내 약물 분포도 라니비주맵 대비 약 10배 가량 증가되어 있는 것을 확인할 수 있다(도 8D). 도 8E 데이터는 안구의 망막 조직의 단면을 보여주고 있는데, 대조약물인 라니비주맵은 대부분 공막(sclera)근처에 존재하는 반면, IDB0062는 retina pigment epithelial cell(RPE) layer를 지나 망막까지 약물이 도달해 있음을 확인할 수 있다. 결론적으로, 안구 내 조직투과율이 좋지 못한 라니비주맵에 조직투과성 펩타이드를 연결함으로써 대조약물 대비 안구 투과율을 약 4배 가량 증가시킬 수 있었고, 이를 통해 약물의 투과도 개선을 통한 투여용량 조절 및 투여간격 증대 가능성, 제형 개선을 통한 점안제 개발 가능성을 확인할 수 있다.

<4-2> 베바시주맵 개량체 IDB0072의 조직 투과도 평가

항체 단편(Fab)에 비해 베바시주맵(bevacizumab)과 같은 전체 항체(whole antibody) 단백질은 분자량도 크고 단백질의 3차 구조도 복잡하여 조직 투과에 불리한 특성을 갖는다. 그럼에도 불구하고 베바시주맵의 C-말단에 조직투과성 펩타이드를 융합함으로써 이러한 물리적인 한계를 극복하고 대조약물인 베바시주맵에 비해 투과도가 개선되는지 여부를 확인하기 위해 동일한 실험을 진행하였다.

베바시주맵 개량체 IDB0072의 제작 과정은 다음과 같다. IDB0072는 베바시주맵의 C-말단에 TPP를 링커에 의해 융합한 항체융합단백질의 한 형태로서, TPP의 아미노산 서열은 상기 표 3에 나타난 바와 같다. 표 3의 서열목록 중, 서열번호 1 내지 4의 아미노산 서열을 갖는 TPP는 뉴로필린 1 및 2에 모두 결합이 가능하며, 서열번호 5 내지 7의 아미노산 서열을 갖는 TPP는 뉴로필린 1에만 특이적으로 결합이

가능하다. 한편, 상기 표 3에 나타난 TPP중 TPP#2는 뉴로필린의 intrinsic ligand 인 VEGF₁₆₅ 및 세마포린 3계열 리간드들의 C-말단 부위를 변형한 것이고 TPP#5는 뉴로필린1의 b1b2 도메인에 선택적으로 결합하는 클론으로부터 도출된 인공 펩타이드를 분리 동정한 것으로서, 이 중 TPP#2를 링커를 이용해 베바시주맙과 융합하여 뉴로필린 수용체에 bivalent로 작용할 수 있도록 함으로써 VEGF와 Sema3A 리간드와 비슷한 친화력을 갖으면서도 조직투과성을 갖는 IDB0072를 design하였다.

구체적으로, 베바시주맙의 C-말단에 상기 서열번호 2의 아미노산 서열을 갖는 TPP#2가 융합된 IDB0072를 생산하는 세포주를 제작하였다. pcDNA3.4 벡터에 IDB0072를 클로닝하였다. IDB0072의 경쇄 및 중쇄 아미노산 서열은 서열번호 20 및 서열번호 22로 각각 기재하였으며, 이를 인코딩하는 핵산 서열은 서열번호 21 및 서열번호 23에 각각 기재된 바와 같다. CHO DG44 세포에 상기 구축된 항체 중쇄불변부위와 NRP1에 결합하는 펩타이드가 융합된 단백질을 인코딩하는 플라스미드와 경쇄사슬 단백질을 인코딩하는 플라스미드를 NeonTM eletroporesis를 이용하여 트랜스펙션(transfection)시킨 후, T25 flask에 3×10^6 cells로 접종한 후 37°C에서 배양하였다. 선별 마커를 이용하여 stable cell을 확보한 뒤 바이오리액터에서 무혈청 SFM4CHO (Hyclone)를 이용하여 부유상태로 7일간 100rpm, 37°C, pH 7.2, 50% DO₂ 조건에서 배양하였다. 상등액은 원심분리를 이용하여 세포와 분리하고 0.22µm 필터를 이용하여 제공하였다.

IDB0072의 배양액을 회수하여 표준 프로토콜을 참조하여 각각의 단백질을 정제하였다. 단백질 A 컬럼(MabselectSure resin, GE healthcare)에 배양액을 적용하고 PBS(pH 7.4)로 세척하였다. 0.1M 글라이신 완충액을 이용하여 pH 3.0에서 항체를 용리한 후 1 M Tris 완충액을 이용하여 샘플을 pH 7.0으로 중화하였다. 용리한 항체 분획은 MILLIPORE Amicon Ultra(30 MWCO)원심분리 농축기를 사용하여 농축하고 PBS(pH 7.4) 완충액으로 교환하였다. 정제된 항체 중쇄불변부위와 선별된 NRP1에 특이적으로 결합하는 펩타이드가 융합된 단백질은 보정된 280nm 파장에서 흡광도와 흡광계수를 이용하여 정량하였다.

단백질과 FITC의 conjugation 효율을 높이기 위해 베바시주맙과 IDB0072를 100mM sodium carbonate buffer(pH 9.0)로 교환한 뒤 3mg/ml로 농도를 보정한 후

FITC(1mg/ml in DMSO)와 섞어 상온에서 2시간 반응하였다. IDB0072는 TPP#2 용합에 의한 conjugation 차이를 줄이기 위해 단백질을 FITC의 반응 물수를 대조약물인 베바시주맙과 달리 적용하여 반응시켰다. 이후 PD-10 desalting column을 이용해 conjugation 되지 않은 FITC를 제거하면서 PBS로 buffer change한 후 정제물을 정량하여 효능 평가용 시료로 사용하였다. Conjugation 결과 베바시주맙과 IDB0072의 F/P ratio는 2.18과 1.98으로 단백질 한 분자당 거의 동일한 물수의 FITC가 결합되어 있음을 확인하였다. FITC가 conjugation된 베바시주맙과 IDB0072 용액을 PBS를 이용해 0.9mg/ml로 희석한 후 C57BL/6 마우스 안구를 적출하여 37℃에서 1시간, 2시간 동안 담근 뒤 PBS로 10분씩 5회 세척한 후 파라핀 슬라이드를 제작하였다. 이후 과정은 실시예 <4-1>과 동일하게 진행하였다.

생산된 베바시주맙 개량체 IDB0072의 활성을 평가하기 위하여 뉴로필린 1 수용체에 대한 결합력을 SPR assay를 통해 확인하였다. 표 5에서 보는 바와 같이, 뉴로필린 1 수용체에 대한 IDB0062의 결합력은 대조약물(Fc-TPP#2) 및 라니비주맙 개량체 IDB0062와 유사한 결합활성을 나타내었다. 이는 베바시주맙의 C-말단에 용합된 TPP#2 펩타이드 역시 IDB0062처럼 뉴로필린 1 수용체에 잘 결합함을 의미한다.

【표 5】

TPP 융합체 NRP1 활성 평가

클론	링커/TPP 길이 (아미노산 개수)	수용체 (뉴로필린)	친화도, K_D (M)	VE-cadherin 저해 정도
Fc-TPP#2	15/22	NRP1	$6.3 \pm 0.2 \times 10^{-8}$	++
IDB0062	15/22	NRP1	$1.0 \pm 0.1 \times 10^{-8}$	++
IDB0072	15/22	NRP1	$3.1 \pm 0.15 \times 10^{-8}$	++

도 9A에서 보이는 바와 같이, IDB0072 역시 대조약물인 베바시주맙에 비해 안구 투과능을 개선한다는 사실을 확인할 수 있었다. 1시간과 2시간에서 IDB0072는 베바시주맙에 비해 유의적으로 약 1.5배가량 안구 내 분포를 증가시키는 결과를 확인할 수 있다(도 9B). 또한 큰 분자량과 구조를 지님에도 불구하고 베바시주맙에 비해 IDB0072는 결막을 통해 각막으로 확산되어 분포하는 것도 확인할 수 있었다. 이로써 분자량이 크고 구조가 복잡한 항체에서도 Fc C-말단에 조직투과성 펩타이드를 연결함으로써 조직 투과도를 유의적으로 증가시킬 수 있음을 확인할 수 있었다.

이러한 결과는 항체 단백질을 포함해 다양한 Fc 융합단백질에도 조직투과성 펩타이드를 연결함으로써 안구 조직 투과도를 개선할 수 있다는 가능성을 보여준다.

<실시예 5>

각막 신생혈관 모델을 이용한 라니비주맙 개량체의 효능 평가

IDB0062의 효능 평가를 위해 각막 신생혈관 모델을 구축하였고 예방 모델과 내성 모델로 나누어 혈관 신생 억제 여부와 신생된 혈관을 감소시키는 효능을 라니비주맙과 비교하였다.

<5-1> 예방 모델

IDB0062와 라니비주맙의 신생혈관 저해효과를 비교하기 위해 알칼리 화상으로 유도한 각막 신생혈관 모델을 다음과 같이 제작하였다. 셀룰로오스 필터페이퍼를 직경 2mm 원으로 잘라 준비한 후 1M NaOH 용액에 담가두었다. 마우스는 6주령 암컷 C57BL/6를 사용하였으며 마취(Zoletil 40mg/kg+Rompun 5mg/kg, IP) 후 좌안 각막에 NaOH 필터페이퍼를 올려 30초 동안 알칼리 화상을 유도한 후 40ml PBS로 충분히 세척하여 각막신생혈관 동물 모델을 구축하였다. 예방 모델의 경우 알칼리 화상을 유도한 당일부터 약물을 처리하였는데, 각 약물은 5mg/ml의 농도로 1회 5 μ l 씩 하루 4회 점안 투여를 진행하였으며 총 5일 동안 투여를 진행하였다. 투여가 종료된 후 안구를 적출한 뒤 4% 파라포름알데히드 용액에 한 시간 담가두어 고정하였고, PBS로 세척한 후 해부현미경을 이용해 각막을 분리하였다. 분리된 각막은 다시 4% 파라포름알데히드 용액에 12시간 추가 고정하였다. 고정된 각막은 PBS로 세척한 후 상온에서 blocking buffer(PBS, 0.3% BSA, 0.1% Triton X100)로 2시간 동안 반응시킨다. 혈관 내피세포 마커인 PECAM-1(CD31)에 특이적인 1차 항체(BD pharmingen)와 pericyte 마커인 NG-2에 특이적인 1차 항체(Millipore)를 냉장에서 overnight 반응시키고 2차 형광 항체(Alexa Fluor488, Alexa Fluor594, Life Technologies)는 상온에서 4시간 반응하여 조직을 염색하였다. 염색 과정이 종료된 각막은 슬라이드에 옮긴 후, 해부현미경을 이용하여 각막의 중심부를 향해 네 방향으로 절개선을 넣어 mounting하였다. Mounting이 완료된 각막 슬라이드는 형광현미경/공초점현미경을 이용하여 혈관과 pericyte의 양상을 확인하였다.

예방 모델 실험 결과, 도 6에서 보이는 바와 같이 IDB0062는 라니비주맙 대비 25~30% 정도 더 신생혈관을 저해하여 vehicle 대비 50% 이상의 유의적인 예방효

과를 나타냈으며, IDB0061도 라니비주맙과 동등한 효능을 나타내어 라니비주맙 구조변화에 따른 VEGF 결합력 저하가 실제 신생혈관 억제 효능에 영향을 미치지 않으면서 C-말단에 융합된 TPP에 의한 효능 증대가 가능함을 확인하였다.

<5-2> 내성 모델

내성 모델은 예방 모델과 동일한 방법으로 알칼리 화상을 유도하였고 각막 신생혈관이 충분히 올라올 수 있도록 10일 동안 방치하였다. 투여 농도와 주기는 예방 모델과 동일하며 투여는 알칼리 화상 10일 후부터 10일 동안 진행하여 생성된 신생혈관을 감소시키는 정도를 라니비주맙과 비교하였다(이후 각막 슬라이드를 제작하는 과정은 예방 모델과 동일함).

도 7A에서 보이는 바와 같이, vehicle과 라니비주맙 처리군에서는 각막까지 혈관이 발달해 있지만 IDB0062 처리군은 혈관이 안구 바깥쪽(limbus)에만 국소적으로 분포하여 신생혈관이 줄어들었음을 확인하였다. 결과적으로 IDB0062는 vehicle 대비 30% 이상의 유의적인 신생혈관 감소 효능을 나타내었고 유의적 효능을 나타내지 못한 라니비주맙 대비 2배 이상 효능이 증가되었으며(도 7B), 이러한 결과는 anti-VEGF aptamer와 anti-PDGF antibody 제제를 병용투여한 문헌의 결과와 유사하다(Jo et al., 2006. Am. J. Pathol.). 따라서 본 발명의 IDB0062는 라니비주맙 투약 환자 중 시력 개선 없이 유지만 되는 약 70%의 환자들에서 시력개선 가능성이 있는 것으로 예측되었다.

또한 도 7C에서 보이는 바와 같이, IDB0062 처리군에서는 vehicle 처리군과 비교하여 유의적으로 40%에 가까운 pericyte coverage 감소를 확인할 수 있었으며, 이는 기존 약물에 내성을 나타내는 환자를 치료하기 위한 목적으로 병용투여제제로 개발 중인 PDGF 저해제와 유사한 결과이다. 따라서 IDB0062는 anti-VEGF 저해제 투여 환자의 45%에서 발생하는 것으로 알려진 내성 치료용 단일요법제로 사용 가능할 것으로 예상되었다.

<실시예 6>

맥락막 신생 혈관 모델을 이용한 라니비주맙 개량체의 효능 평가

황반 변성(age-related macular degeneration)의 모델인 맥락막 신생 혈관(choroidal neovascularization, CNV)은 laser-induced choroidal

neovascularization 방법으로 유도하고 라니비주맙 개량체 IDB0062의 치료 효과를 확인하였다.

7주령 male Brown Norway(BN) rat(SLC Japan, Tokyo, Japan)을 1주일동안 순화시킨 후, pentobarbital sodium(한림제약, 25mg/kg)을 복강 주사하여 마취하였다. 이후 1% tropicamide eye drop으로 동공을 확장시킨 후, diode laser(파장, 532nm; 지름, 100 μ m; 파워, 150mW; 기간, 0.1sec)를 이용하여 optic nerve head 주위로 6군데 광응고(photocoagulation) spot을 만들었다. Bruch's membrane의 파괴는 특징적인 bubble의 형성으로 검증하였다. bubble이 형성되지 않거나, 출혈이 발생한 안구는 이후 실험에서 제외하였다. 광응고 처리 후 rat들은 표 6에 기재된 바와 같이 무작위로 군당 10마리씩 5군으로 나누었다. 약물은 hamilton syringe(hamilton, USA)를 이용하여 각 그룹에 맞는 농도를 안구내 투여하였다. CNV 그룹에는 동량의 vehicle을 투여하였으며, 대조약물로는 라니비주맙 100 μ g/eye를 투여하였다. 약물투여로 인한 외과적인 손상이 발생한 개체나, 수정체 혼탁 등이 발생한 개체는 이후 실험 과정에서 제외하였다.

【표 6】

맥락막 신생 혈관 모델(CNV) 실험군

Group	dose
Vehicle	Buffer only
Ranibizumab	100 μ g/eye
IDB0062	10 μ g/eye
	50 μ g/eye
	100 μ g/eye

약물 투여 10일 후, choroidal neovascularization이 발생한 정도를 평가하였다. 랫의 안구를 적출하여 현미경 하에서 cornea와 sclea 인접 부위에서 안구를 절개한 후 안구의 뒷부분 조직을 이용하여 retina 떼어낸 후 subretina 부위가 포함된 결막 조직을 분리하였다. 분리한 조직은 4% paraformaldehyde에 1시간 고정 후, PBS로 세척하여 5% Triton X-100 과 1% BSA를 포함한 PBS에 3시간 동안 교반하였다. 다시 세척 후 PBS에 1mg/ml로 녹인 endothelial cell marker인 isolectin B4(sigma)를 1:50으로 희석하여 4°C에서 overnight 반응시켰다. 0.05% Tween20이 포함된 PBS로 2시간 동안 세척한 후 streptavidin TRITC를 1:500으로 희석하여 37

℃에서 4시간 반응시킨 후 PBS로 30분 세척하여 형광형미경(BX51, Olympus, Japan) 하에서 관찰하였다. Subretina neovascularization 부위의 크기는 Image J software(NIH, USA)를 이용하여 분석하였다.

도 10A에서 보이는 바와 같이, vehicle군은 레이저로 상처를 준 부위 안쪽(맥락막)에서 바깥쪽(망막)으로 검은색으로 표지된 신생혈관이 많이 뻗어 나오는 것을 확인할 수 있다. 대조약물인 라니비주맙을 100 µg 투여한 군에서는 vehicle군에 비해 신생혈관의 형성이 다소 억제되어 있는 경향을 보이지만 일부 개체에서는 여전히 뻗어 나오는 혈관이 관찰되고 있다. 반면 IDB0062의 경우, 농도의존적으로 신생혈관의 형성을 억제하는 경향을 확인할 수 있다. IDB0062 50 µg 투여군에서 대조약물인 라니비주맙 100 µg 투여군과 비슷한 정도의 신생혈관 억제효능을 확인할 수 있으며 IDB0062 100 µg 투여군에서는 망막에 laser에 의한 상흔만 남아있을 뿐 신생혈관은 대부분 억제되어 있는 것을 확인할 수 있다. 도 10B에서 같이 상기 결과를 수치화하면, 라니비주맙 100 µg 투여군과 IDB0062 50 µg 투여군에서는 vehicle군과 비교하여 혈관형성을 약 31%가량 억제되었으며, IDB0062 100 µg 투여군에서는 혈관형성이 약 36% 억제된 것으로 확인되었다. 결과적으로, IDB0062는 라니비주맙 대비 절반 용량으로 라니비주맙과 동일한 신생혈관 억제효능을 나타낸다는 사실을 확인하였다.

<실시예 7>

산소유도 망막병증 모델을 이용한 라니비주맙 개량체의 효능 평가

미숙아 망막병증(retinopathy of prematurity)의 모델로 산소유도 망막병증(oxygen-induced retinopathy, OIR)을 유발하고 라니비주맙 개량체 IDB0062의 효과를 확인하였다.

실험 동물은 코아텍에서 구입한 7-8주령 C57BL/6를 교배시켜 태어난 mouse를 사용하였다. 생후 7일째에 mouse(postnatal day 7, P7)를 oxygen chamber에 넣고 5일 동안(P7-P11) chamber 내 산소 농도가 75%(hyperoxia)가 유지되도록 조절하였다. 실험실 내의 조명은 12시간 간격으로 등화 되도록 하였으며, 온도는 24±2℃를 유지하였고 사료와 음용수는 자유 급식하였다. 5일 후 chamber 밖 실내 대기(normoxia)에서 5일간(P12-P17) 노출시켜 retinal angiogenesis를 유도하였다. 약물 투여를 위해 P12일에 normoxia에 노출시킨 직후 무작위로 표 7에 기재된 바와 같이 군당 10마리씩 5군으로 나누었다. 약물은 hamilton syringe(Hamilton, USA)를

이용하여 각 그룹에 맞는 농도를 안구 내 투여하였다. OIR 그룹에는 동량의 vehicle을 투여하였으며, 대조약물로는 라니비주맙 10 μ g/eye를 투여하였다. 약물 투여로 인한 외과적인 손상이 발생한 개체나, 수정체 혼탁 등이 발생한 개체는 이후 실험 과정에서는 제외하였다.

【표 7】

산소유도 망막병증(OIR) 모델 실험군

Group	dose
Vehicle	Buffer only
Ranibizumab	10 μ g/eye
IDB0062	5 μ g/eye
	10 μ g/eye
	15 μ g/eye

생후 17일에 망막 부종의 정도를 평가하였다. pentobarbital sodium(한림제약, 25mg/kg)을 복강 주사하여 마취하였다. 개복 후 심장에 dextran(FD40S-1G, sigma; 50mg/ml in PBS) 10 μ l 주사한 후 10분 후 안구를 적출하여 4% paraformaldehyde 에 10분간 고정 후 retina 분리 후 flat-mounted 망막 슬라이드를 제작하여 형광형미경(BX51, Olympus, Japan) 하에서 관찰하였다. 혈관 밖으로 유출된 형광의 양은 Image J를 이용하여 형광 intensity를 정량분석하였다.

도 11A에서 보이는 바와 같이, 약물을 처리하지 않은 vehicle군에서는 중심 부인 optic nerve distc 부위와 망막 바깥쪽 혈관 말단 부위에서 leakage에 의한 형광유출이 증가되어 있는 것을 확인할 수 있었다. 대조약물인 라니비주맙 10 μ g 처리군에서는 vehicle군에 비해 혈관 누수를 어느 정도 감소시켜주었지만 혈관 말단 부위에는 여전히 누수된 혈관에 의한 형광유출이 다소 존재하는 것을 확인할 수 있다. 반면 IDB0062 처리군은 농도의존적으로 혈관의 누수를 억제시키는 경향을 보이며 라니비주맙과 동일용량인 10 μ g 이상 투여군에서는 통계적으로 유의적이지 않지만, 라니비주맙 대비 혈관 누수를 보다 더 효과적으로 억제시킬 수 있다는 가능성을 확인할 수 있었다(도 11B). 특히 IDB0062 15 μ g 투여군에서는 혈관의 모양이 조밀하고 안정적인 구조를 취하고 있으며, 누수된 부분이 전혀 보이지 않는 특징을

보인다.

또한 망막에서의 혈관 생성 정도를 평가하였다. 분리한 망막을 4% paraformaldehyde에 3시간 고정 후 PBS로 세척하여 5% Triton X-100 과 1% BSA를 포함한 PBS에서 3시간 동안 교반하였다. 다시 세척 후 PBS에 1mg/ml로 녹인 isolectin B4(L2140, sigma)를 1:50으로 희석하여 4℃에서 overnight 반응시켰다. 0.05% Tween 20이 포함된 PBS로 2시간 동안 세척한 후 streptavidin TRITC를 1:500으로 희석하여 37℃에서 4시간 반응시킨 후, PBS로 30분 세척하여 형광형미경 (BX51, Olympus, Japan) 하에서 관찰하였다.

P7 mouse가 5일 동안 hyperoxia 조건에 있다가 normoxia로 옮겨지면 상대적인 ischemia 상태에 놓이게 된다. 이 때 망막에서는 과도한 신생혈관이 자라게 되는데 이 때 형성된 신생혈관의 특징은 망막으로부터 avascular area인 vitreous 쪽으로 혈관이 자라나온다는 점과 누수되기 쉬운 불규칙한 혈관 형태인 tufts라는 특이적인 구조를 형성한다는 사실이다. 이러한 tufts의 형성은 neovascularization을 정량하는 척도로 사용될 수 있다. 도 12A에서 확인할 수 있듯이, vehicle군에서 염색된 혈관들은 혈관끼리의 경계가 명확히 구분되고 비교적 가늘고 안정적인 구조의 정상적인 망막 혈관의 특징을 보이고 있는 데 반하여, 대체로 불규칙하고 굵은 혈관들이 한데 뭉쳐 tufts를 형성하고 있는 신생혈관이 많이 관찰되었다. 대조약물인 라니비주맙 10 µg 처리군에서도 vehicle군과 마찬가지로 tufts의 형태를 띠고 있는 신생혈관이 많이 분포하고 있는 것을 확인할 수 있다. 반면 IDB0062의 경우, 농도의존적으로 신생혈관으로 규정되는 tufts의 분포를 많이 줄여주었는데, 10 µg 이상 투여군에서는 대부분의 혈관 구조가 명확히 구분되며 tufts의 형태 보다는 조밀하고 단단한 정상 혈관 형태를 확인할 수 있었다. 이를 수치화하여 그래프로 나타내면 vehicle군, 라니비주맙 10 µg 처리군, IDB0062 5 µg 투여군에서는 모두 동일한 신생혈관 형성 정도를 보이는데 반해, IDB0062 10 µg 투여군에서는 이들 대비 약 40% 가량 신생혈관을 저해한다는 사실을 확인할 수 있다(도 12B). 결론적으로 OIR 모델에서 라니비주맙을 처리함으로써 망막 신생혈관 억제효능은 확인할 수 없었지만 IDB0062는 라니비주맙과 동일 용량에서 OIR로 유도되는 신생혈관의 형성을 유의적으로 억제시킬 수 있음을 확인하였다.

<실시예 8>

안구 내 주사 후 약물의 분포 분석

라니비주맵과 IDB0062를 안구 내 주사했을 때 조직 내 약물 분포를 확인하기 위하여 망막조직으로부터 단백질을 추출하고 western blot assay를 실시하였다.

안구 내 주사 후 4시간, 72시간이 지난 후 랫의 안구를 적출한 후 망막을 분리하였다. 분리한 망막은 PBS를 이용해 3회 세척한 후 lysis buffer(20mM Tris-Cl, 150mM NaCl, 1mM EDTA, 0.1% triton X-100)로 옮겨 homogenizer를 이용해 조직을 파쇄하였다. 이후 원심분리(14,000rpm, 4°C, 10min)를 이용해 상등액을 회수하였고 bradford 정량법을 통해 lysate의 단백질 함량을 측정하였다. Western blot assay를 위해 12% non-reducing SDS-PAGE gel을 이용하였다. 단백질 시료는 웰당 40 µg씩 loading하였고 25mA에서 1시간 동안 running하였다. 이후 PVDF membrane에 transfer한 후 anti-kappa antibody-HRP(sigma, F3761)를 이용하여 단백질을 detection하였고 Bio-Rad사의 chemidoc system을 이용하여 각각의 단백질 밴드를 정량하였다.

라니비주맵은 중쇄와 경쇄가 이황화결합에 의해 연결되어 있기 때문에 non-reducing SDS-PAGE 분석에서 약 48kDa 부위에 하나의 밴드로 확인된다. 반면 IDB0062는 중쇄와 경쇄 사이에 이황화결합이 없기 때문에 같은 조건에서 SDS-PAGE 분석을 하게 되면 28kDa 부위에서 두 개의 밴드(중쇄와 경쇄)로 나뉘어 확인된다. 도 13에서 보이는 바와 같이, 안구 내 주사 4시간 후 망막에 존재하는 약물의 양은 IDB0062가 라니비주맵에 비해 약 3.6배 가량 높은 것을 확인할 수 있다. 이는 IDB0062가 TPP에 의해 NRP1을 발현하는 조직에 특이적으로 결합한다는 사실을 보여주는 결과로서, 망막의 신생혈관으로 인한 다양한 질병에 대해 질환부위인 망막 조직에 타겟팅이 가능할 수 있다는 가능성을 보여준다. 약물을 안구 내 주사했을 때 vitreous 내에 퍼져서 존재할 때 보다 병변조직에 결합하게 되면 VEGF를 제거할 수 있는 기회가 증가하여 더 적은 용량으로 동일한 약효를 발휘할 수 있는 가능성이 있고 이러한 결과는 맥락막 신생혈관 모델과 망막병증 모델을 이용한 효능평가에서 IDB0062의 우월한 효능을 뒷받침하는 결과라고 판단된다.

【산업상 이용가능성】

본 발명의 조직투과성 펩타이드와 항-혈관 내피세포 성장인자(anti-VEGF) 제제가 융합된 융합단백질을 유효성분으로 포함하는 약학적 조성물은 기존의 항-혈관 내피세포 성장인자 제제와 비교하여 혈관 내피세포 성장인자 이외의 신생혈관과 관련된 다양한 성장인자를 저해할 뿐만 아니라 pericyte coverage를 감소시켜 효능이

증대되고 약물 내성환자까지 치료할 수 있을 것으로 생각된다. 또한 안구 내 주사 시 맥락막 조직으로의 약물 전달력이 개선되어 투여용량 감소 또는 투여주기 증대 및 안구 투과도 개선을 통해 점안제로 개발될 가능성이 높다는 점에서 산업상 이용 가능성이 우수하다.

【청구의 범위】**【청구항 1】**

조직투과성 펩타이드와 항-혈관 내피세포 성장인자(anti-VEGF) 제제가 융합된 융합단백질을 유효성분으로 포함하는 안질환 예방 및 치료용 약학적 조성물.

【청구항 2】

제1항에 있어서, 상기 조직투과성 펩타이드는 서열번호 1 내지 7로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 약학적 조성물.

【청구항 3】

제1항에 있어서, 상기 항-혈관 내피세포 성장인자(anti-VEGF) 제제는 라니비주맙(ranibizumab), 베바시주맙(bevacizumab), 아플리버셉트(aflibercept), 컨버셉트(Conbercept), 이들의 동등생물의약품(biosimilar) 및 변이체로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나인 것을 특징으로 하는 약학적 조성물.

【청구항 4】

제3항에 있어서, 상기 변이체는 중쇄 불변 1 도메인 및 경쇄 불변 도메인의 아미노산인 시스테인은 결실되거나, 시스테인을 제외하고 세린을 포함하는 다른 아미노산 잔기로 치환된 것을 특징으로 하는 약학적 조성물.

【청구항 5】

제3항에 있어서, 상기 변이체는 서열번호 8로 표시되는 경쇄 및 서열번호 10으로 표시되는 중쇄로 이루어진 라니비주맙(ranibizumab) 변이체인 것을 특징으로 하는 약학적 조성물.

【청구항 6】

제1항에 있어서, 상기 융합단백질은 서열번호 12 또는 서열번호 16으로 표시되는 아미노산 서열; 및 서열번호 14 또는 서열번호 18로 표시되는 아미노산 서열로 이루어지는 것을 특징으로 하는 약학적 조성물.

【청구항 7】

제1항에 있어서, 상기 융합단백질은 서열번호 20으로 표시되는 아미노산 서열 및 서열번호 22로 표시되는 아미노산 서열로 이루어지는 것을 특징으로 하는 약학적 조성물.

【청구항 8】

제1항에 있어서, 상기 융합은 링커 펩타이드에 의한 것임을 특징으로 하는 약학적 조성물.

【청구항 9】

제1항 내지 제8항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 안질환은 증식 유리체 망막병증, 황반 변성, 색소성 망막증, 당뇨병성 망막증, 맥락막 신생혈관, 신생혈관성 녹내장, 허혈성 시신경 장애, 조숙아 망막증, 미숙아 망막증, 유행성 각결막염, 신생혈관성 홍채질환, 후수정체 섬유증식증, 아토피성 각막염, 상각막윤부 각막염, 위상편 건선 각막염, 플릭텐성 각결막염, 공막염 및 당뇨병성 황반 부종으로 이루어진 군에서 선택되는 것을 특징으로 하는 약학적 조성물.

【청구항 10】

(a) 조직투과성 펩타이드와 항-혈관 내피세포 성장인자(anti-VEGF) 제제가 융합된 융합단백질을 코딩하는 핵산 서열을 포함하는 재조합 벡터를 숙주세포로 전환시키는 단계;

(b) 상기 세포를 배양하는 단계; 및

(c) 상기 세포로부터 융합단백질을 회수하는 단계를 포함하는 내성 극복 및 효능이 향상된 항-혈관 내피세포 성장인자 제제를 생산하는 방법.

【청구항 11】

제10항에 있어서, 상기 항-혈관 내피세포 성장인자(anti-VEGF) 제제는 라니비주맙(ranibizumab), 베바시주맙(bevacizumab), 아플리버셉트(aflibercept), 컨버셉트(conbercept), 이들의 동등생물의약품(biosimilar) 및 변이체로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나인 것을 특징으로 하는 방법.

【청구항 12】

제10항에 있어서, 상기 융합은 링커 펩타이드에 의한 것임을 특징으로 하는

방법.

【청구항 13】

조직투과성 펩타이드와 항-혈관 내피세포 성장인자(anti-VEGF) 제제가 융합된 융합단백질의 유효량을 이를 필요로 하는 개체에 투여하는 것을 포함하는 안질환 치료 방법.

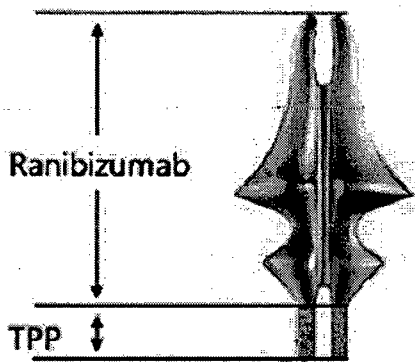
【청구항 14】

조직투과성 펩타이드와 항-혈관 내피세포 성장인자(anti-VEGF) 제제가 융합된 융합단백질을 유효성분으로 포함하는 안질환 치료용 제제를 제조하기 위한 용도.

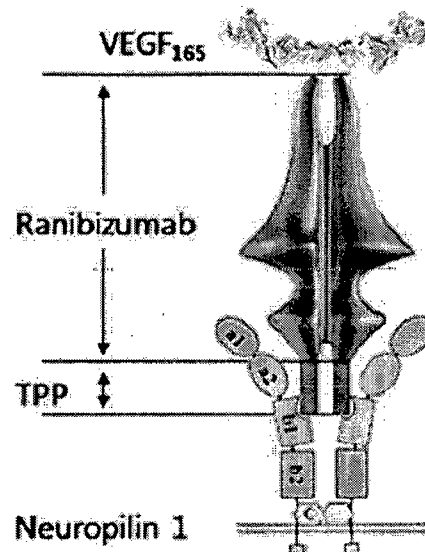
【도면】

【도 1】

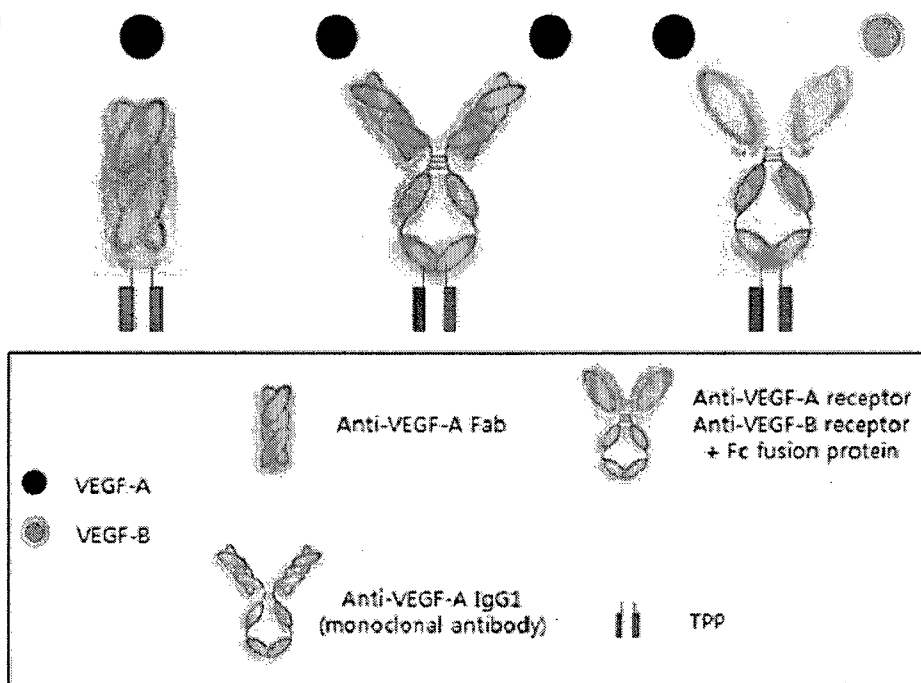
(A)



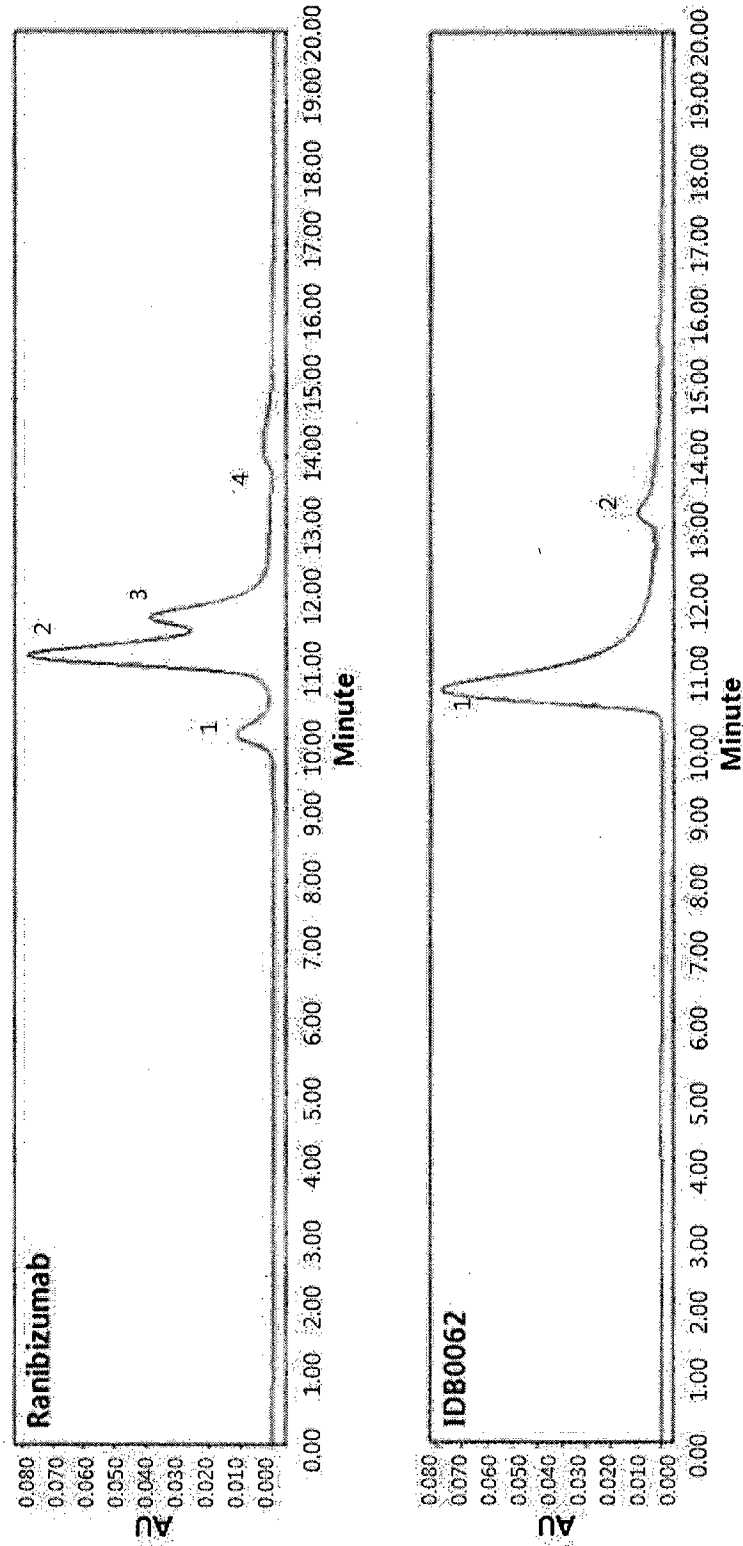
(B)



(C)

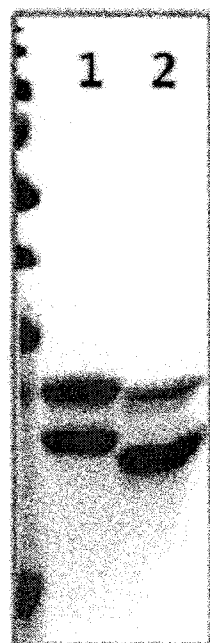


【도 2】



【도 3】

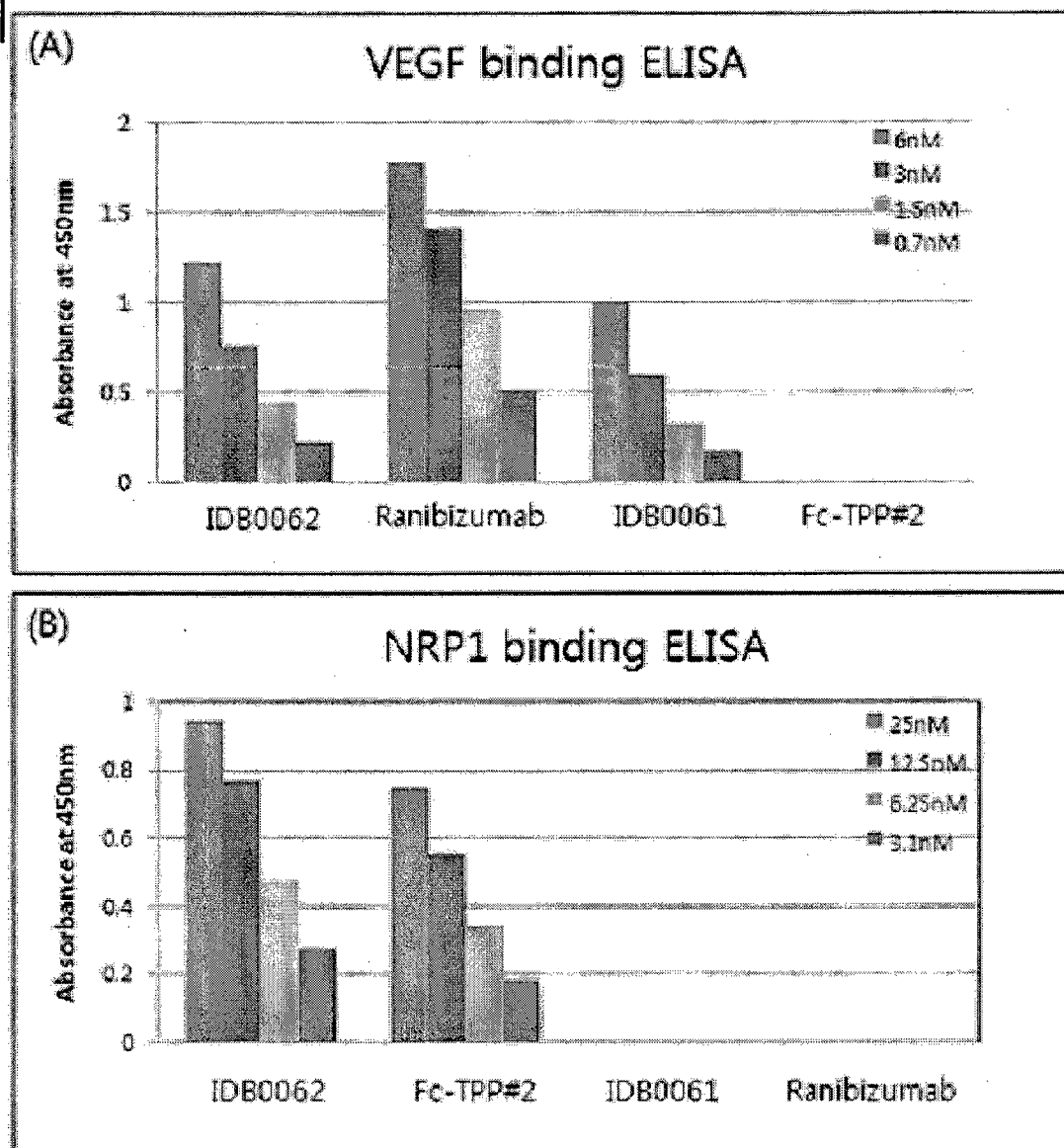
Non-reducing SDS-PAGE(12%, 3ug)



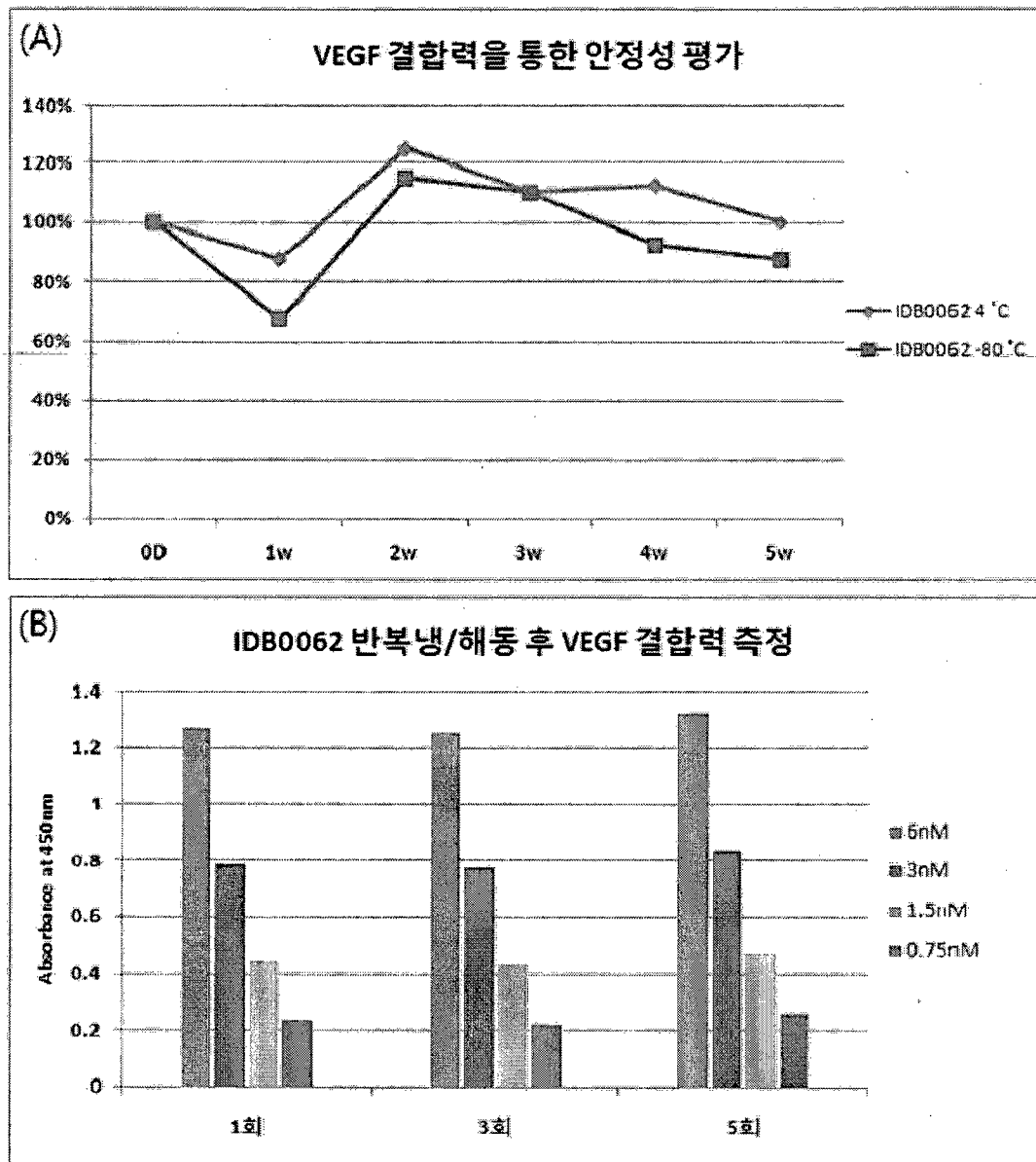
1: IDB0062

2: IDB0064

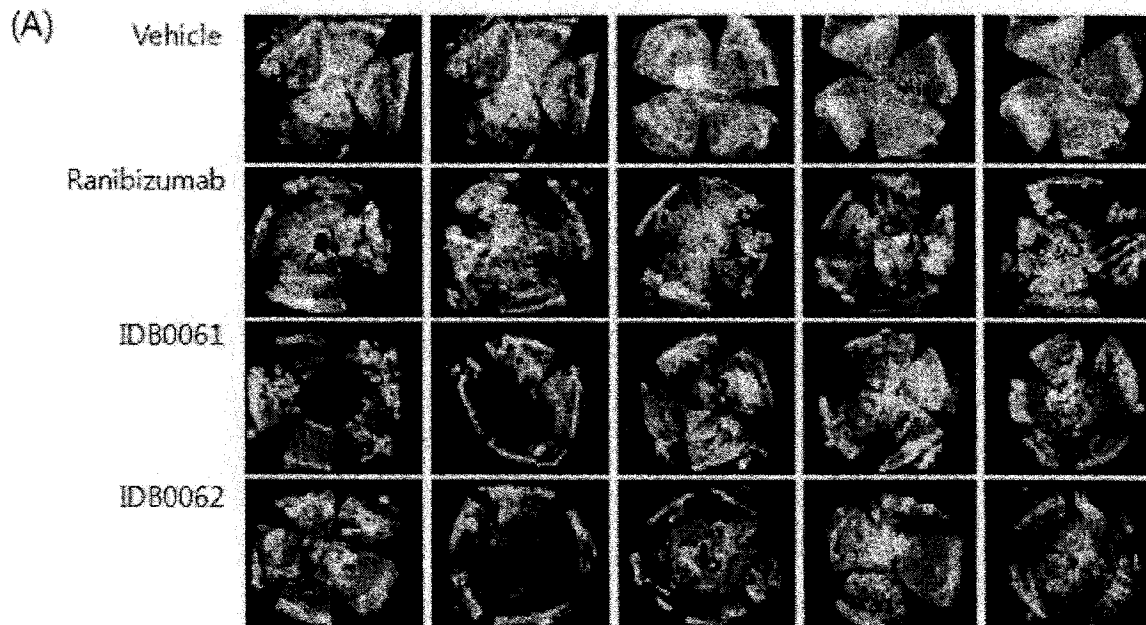
【도 4】



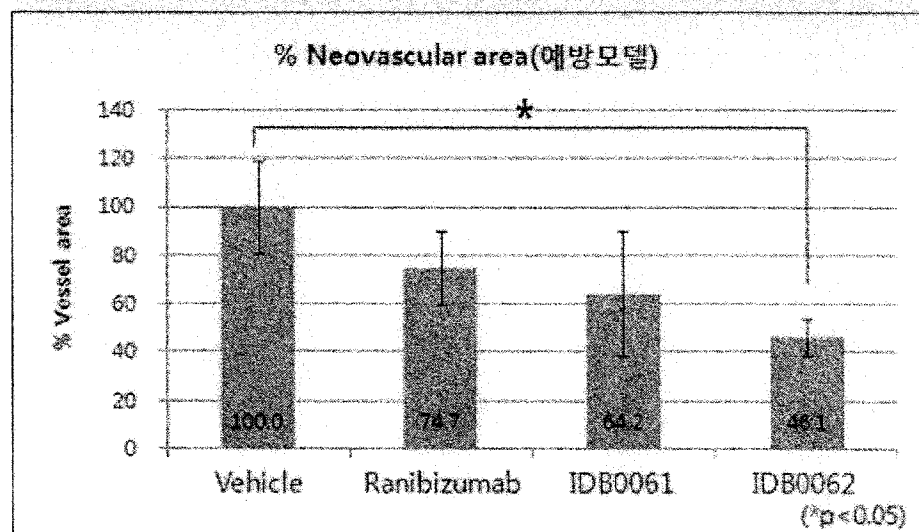
【도 5】



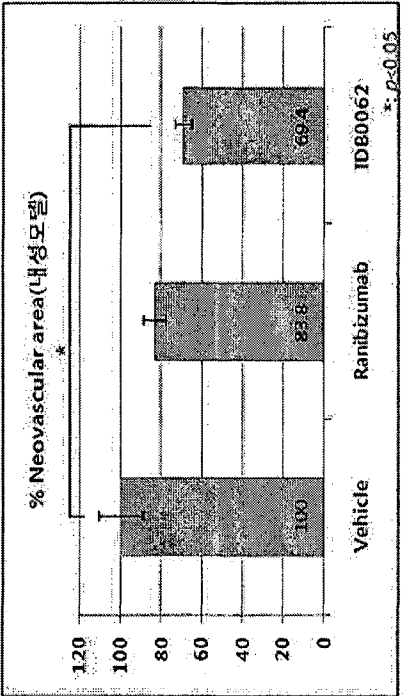
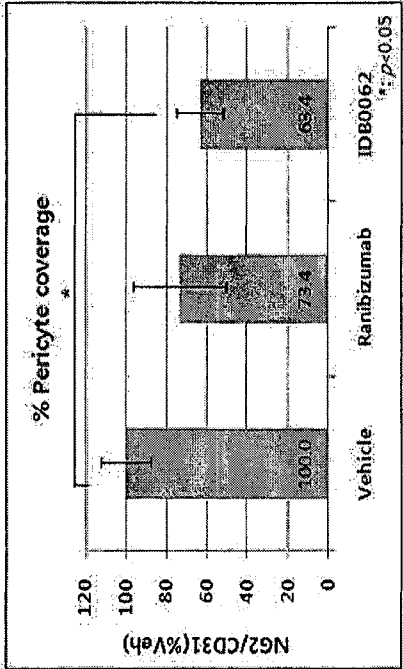
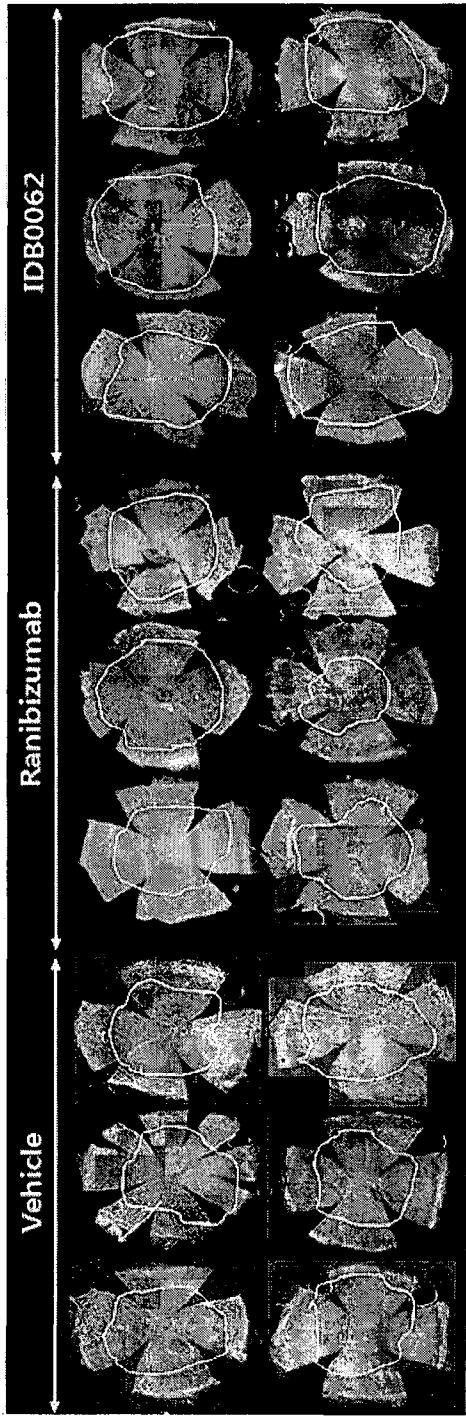
【도 6】



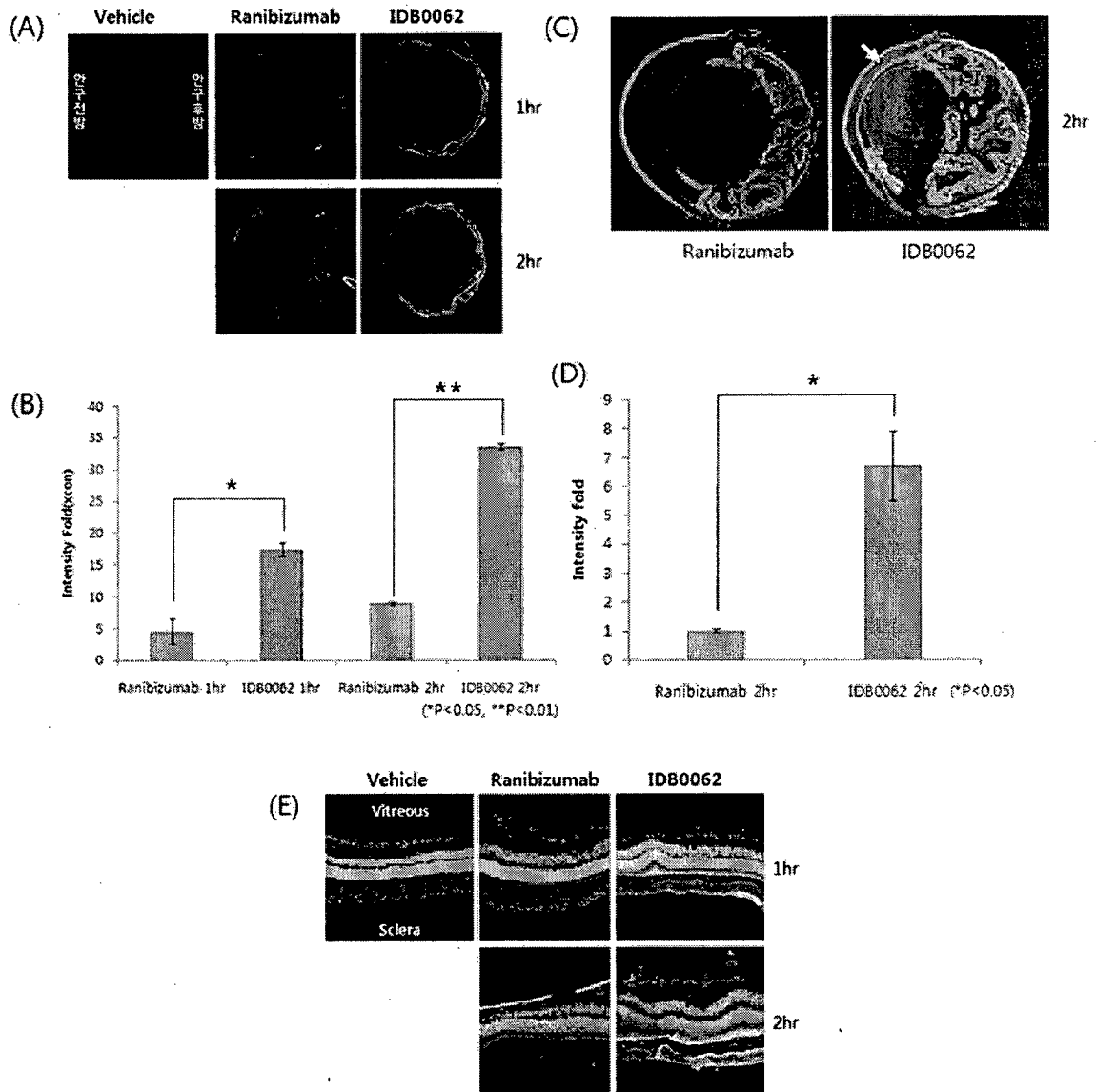
(B)



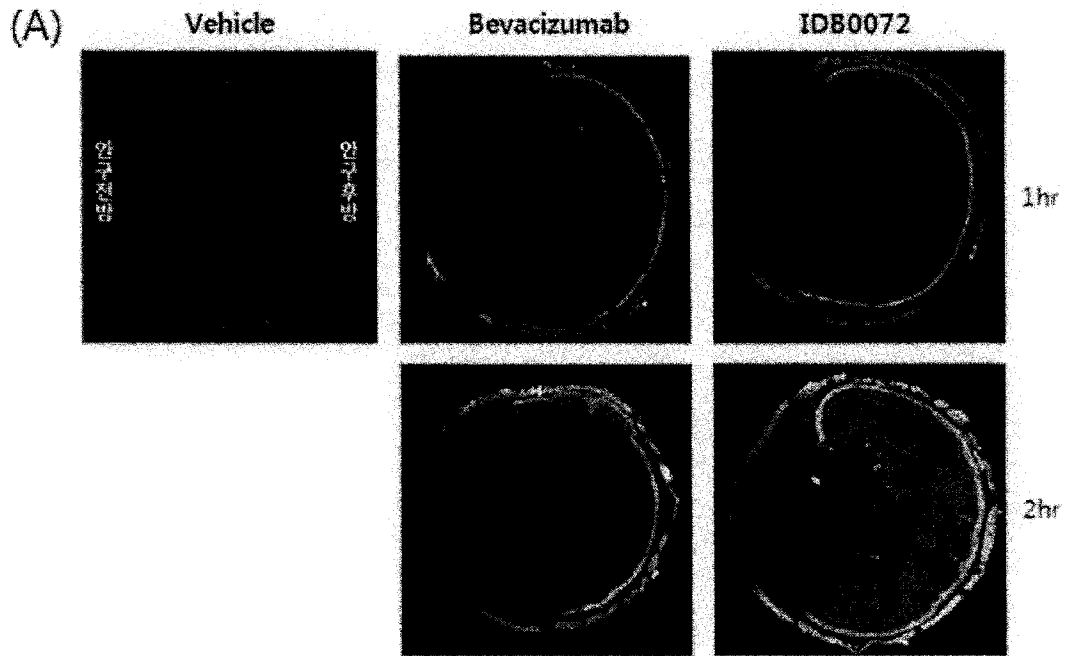
【도 7】



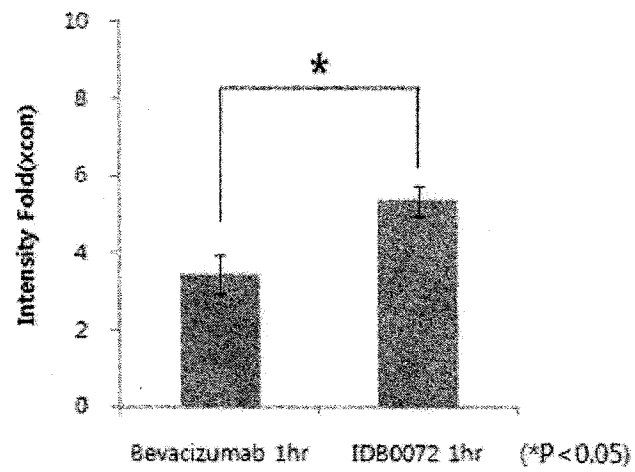
【도 8】



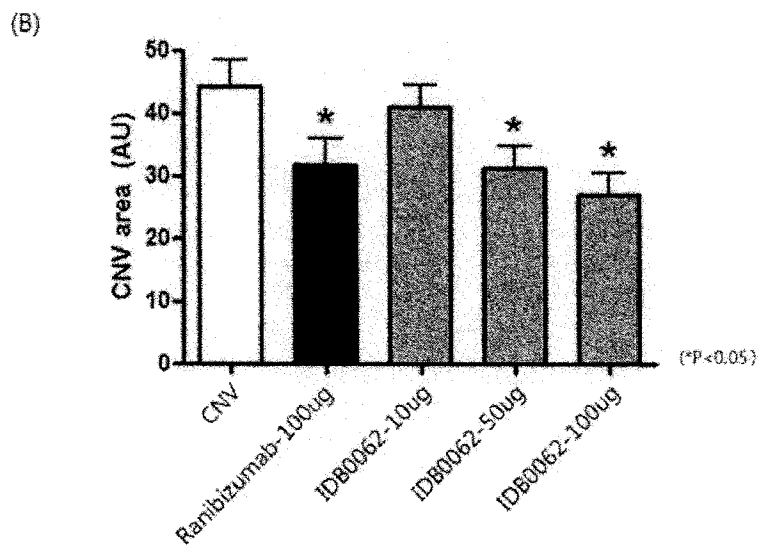
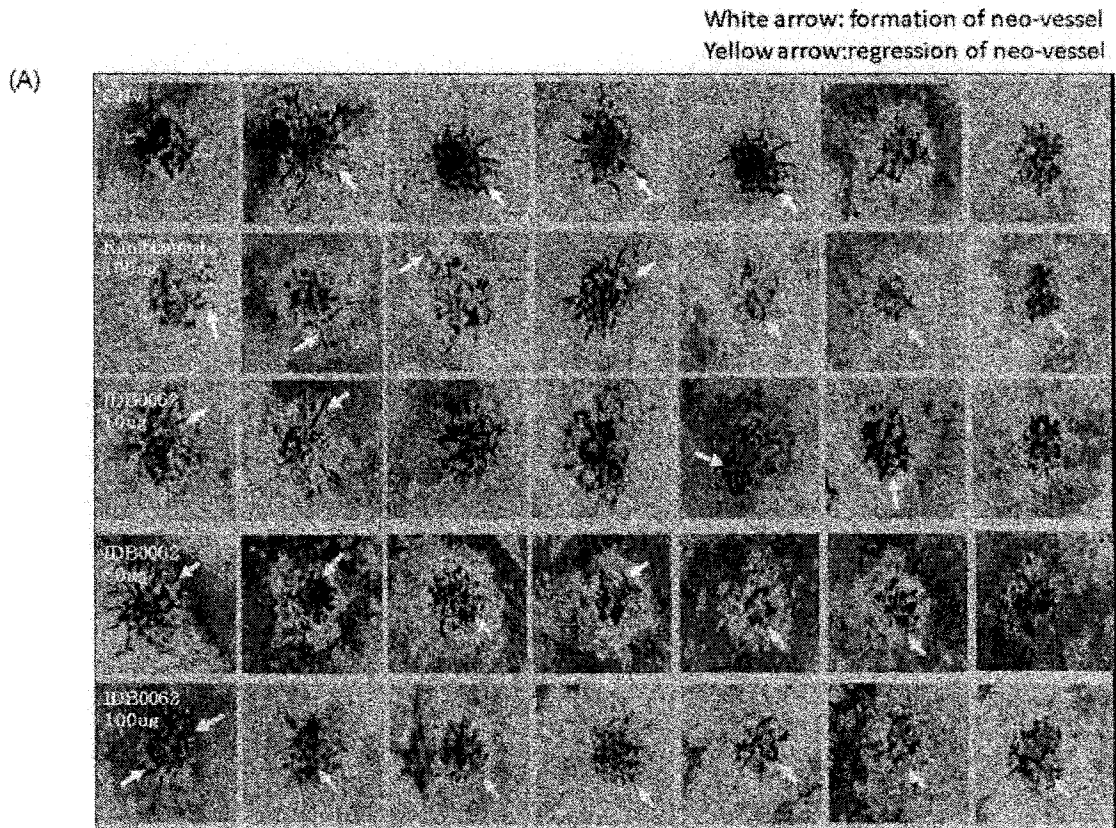
【도 9】



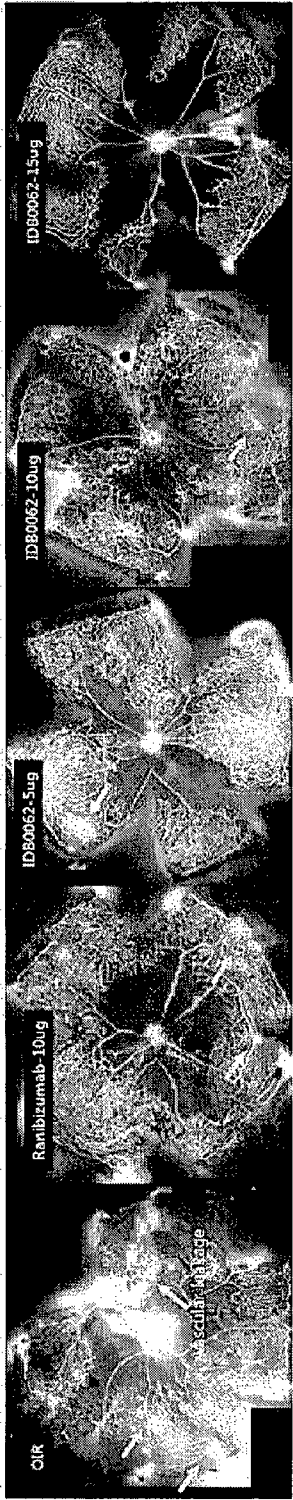
(B)



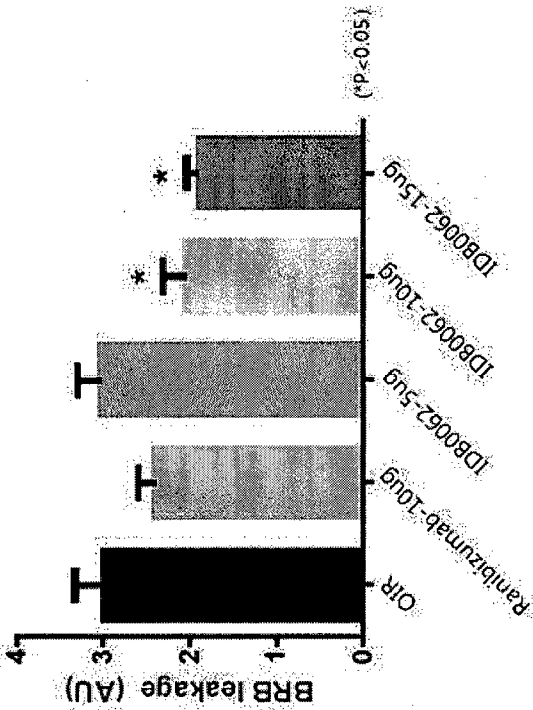
【도 10】



【도 11】

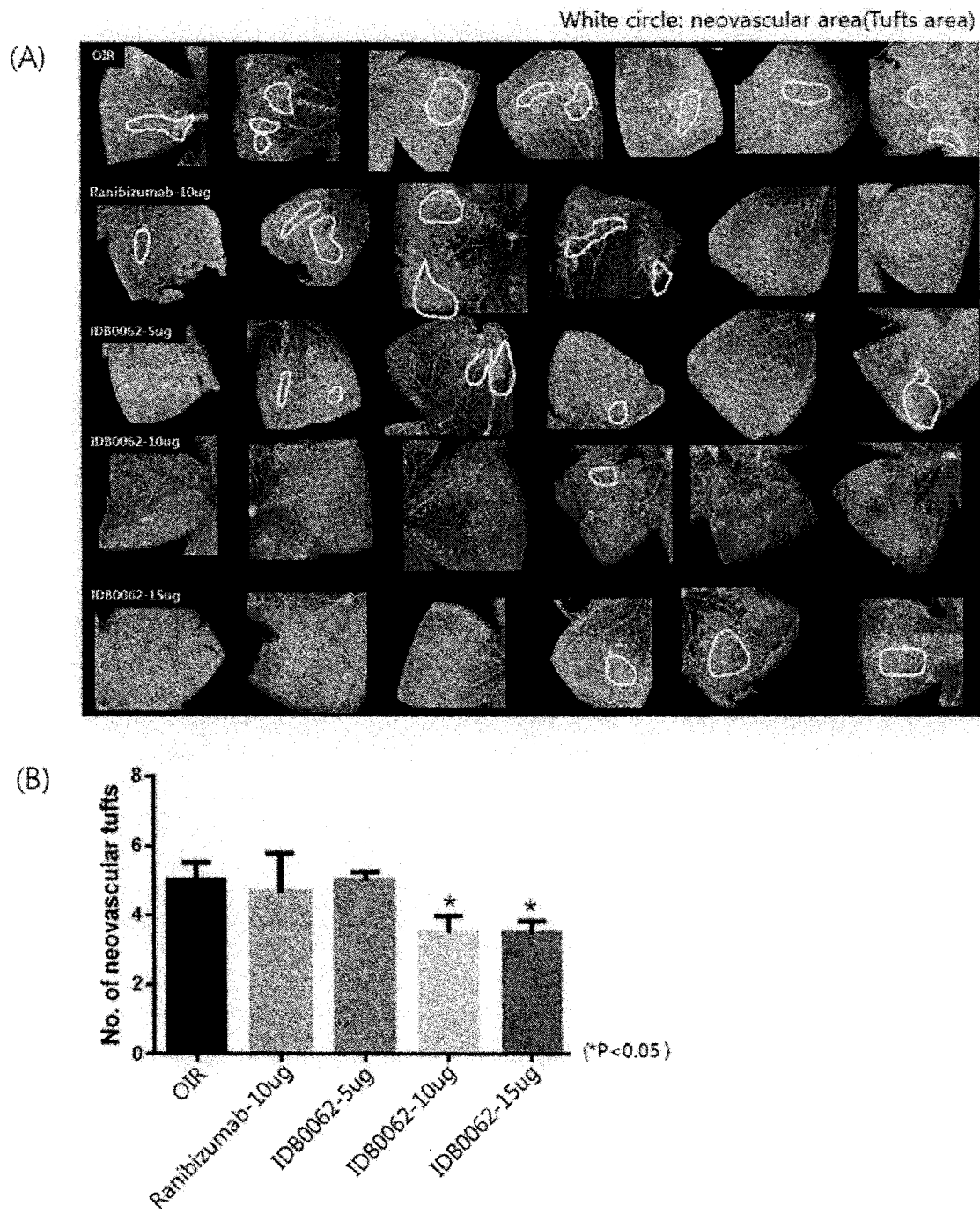


(A)



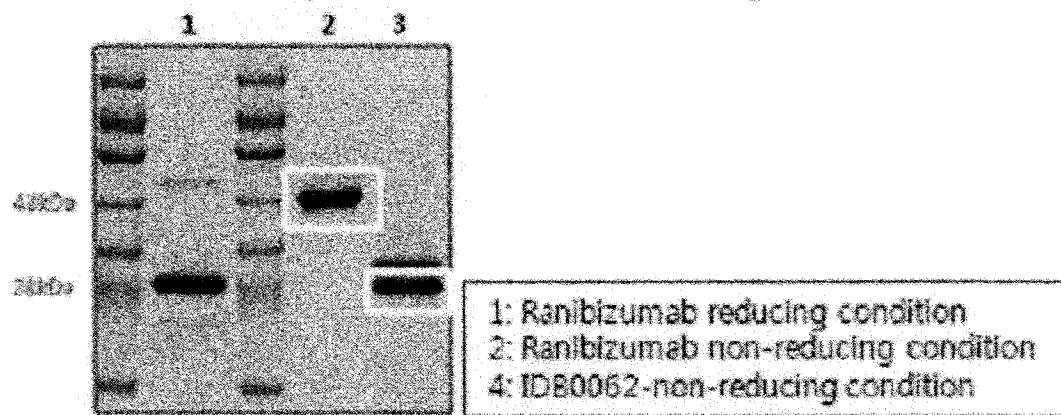
(B)

【도 12】

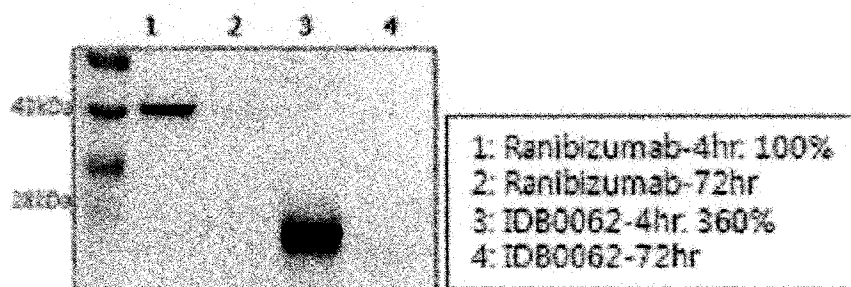


【도 13】

Non-reducing SDS-PAGE(12%, 3ug)



Western blot assay(12% non-reducing)



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2016/003254**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER*****A61K 38/16(2006.01)i, A61K 39/395(2006.01)i, A61K 47/48(2006.01)i***

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

A61K 38/16; A61K 39/395; C07K 7/08; A61K 38/08; C07K 7/06; C07K 14/435; A61K 31/56; A61K 48/00; A61K 38/10; A61K 47/48

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Korean Utility models and applications for Utility models: IPC as above

Japanese Utility models and applications for Utility models: IPC as above

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

eKOMPASS (KIPO internal) & Keywords: anti-vascular endothelial growth factor, tissue-penetrating peptides, fusion, eye disease

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	KR 10-2014-0138539 A (AJOU UNIVERSITY INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION) 04 December 2014 See abstract; paragraph [0080]; claims 1-25; and sequence numbers 1-4.	1-12,14
Y	US 2007-0071756 A1 (PEYMAN, Gholam A.) 29 March 2007 See abstract; paragraphs [0015], [0016]; and claims 1-4.	1-12,14
A	SHA et al., "Tumor-penetrating Peptide Fused EGFR Single-domain Antibody enhances Cancer Drug Penetration into 3D Multicellular Spheroids and Facilitates Effective Gastric Cancer Therapy" Journal of Controlled Release, Vol. 200, pp.188-200 (Published online 30 December 2014) See the entire document.	1-12,14
A	US 8772449 B2 (MORISHITA et al.) 08 July 2014 See the entire document.	1-12,14
A	WO 2009-136007 A1 (BURNHAM INSTITUTE FOR MEDICAL RESEARCH et al.) 12 November 2009 See the entire document.	1-12,14



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

08 JULY 2016 (08.07.2016)

Date of mailing of the international search report

08 JULY 2016 (08.07.2016)

Name and mailing address of the ISA/KR

Korean Intellectual Property Office
Government Complex-Daejeon, 189 Seonsa-ro, Daejeon 302-701,
Republic of Korea

Facsimile No. 82-42-472-7140

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2016/003254

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: **13**
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Claim 13 pertains to a method for treatment of the human body by therapy, and thus pertains to subject matter on which the International Searching Authority is not required to carry out an international search under the provisions of PCT Article 17 (2)(a)(i) and PCT Rule 39.1(iv).
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2016/003254

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
KR 10-2014-0138539 A	04/12/2014	WO 2014-189303 A1	27/11/2014
US 2007-0071756 A1	29/03/2007	US 2007-0071754 A1	29/03/2007
		US 2007-0072933 A1	29/03/2007
		US 2008-0003219 A1	03/01/2008
		US 2008-0167600 A1	10/07/2008
		WO 2007-038453 A2	05/04/2007
		WO 2007-038453 A3	29/11/2007
US 8772449 B2	08/07/2014	EP 2433953 A1	28/03/2012
		EP 2433953 A4	05/06/2013
		EP 2433953 B1	08/07/2015
		JP 5653214 B2	14/01/2015
		KR 10-2012-0064650 A	19/06/2012
		US 2012-0065124 A1	15/03/2012
		WO 2010-134537 A1	25/11/2010
WO 2009-136007 A1	12/11/2009	EP 2279199 A1	02/02/2011
		EP 2279199 A4	28/11/2012
		JP 2011-523632 A	18/08/2011
		US 2011-0130342 A1	02/06/2011
		US 8188221 B2	29/05/2012

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))

A61K 38/16(2006.01)i, A61K 39/395(2006.01)i, A61K 47/48(2006.01)i

B. 조사된 분야

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)

A61K 38/16; A61K 39/395; C07K 7/08; A61K 38/08; C07K 7/06; C07K 14/435; A61K 31/56; A61K 48/00; A61K 38/10; A61K 47/48

조사된 기술분야에 속하는 최소문헌 이외의 문헌

한국등록실용신안공보 및 한국공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC
일본등록실용신안공보 및 일본공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC

국제조사에 이용된 전산 데이터베이스(데이터베이스의 명칭 및 검색어(해당하는 경우))

eKOMPASS(특허청 내부 검색시스템) & 키워드: 항-혈관 내피세포 성장인자, 조직투과성 펩타이드, 융합, 안질환

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
Y	KR 10-2014-0138539 A (아주대학교산학협력단) 2014.12.04 요약; 단락 [0080]; 청구항 1-25; 및 서열번호 1-4 참조.	1-12, 14
Y	US 2007-0071756 A1 (PEYMAN, GHOLAM A.) 2007.03.29 요약; 단락 [0015], [0016]; 및 청구항 1-4 참조.	1-12, 14
A	SHA 등, 'Tumor-penetrating peptide fused EGFR single-domain antibody enhances cancer drug penetration into 3D multicellular spheroids and facilitates effective gastric cancer therapy' Journal of Controlled Release, Vol.200, pp.188-200 (온라인공개 2014.12.30.) 전체 문헌 참조.	1-12, 14
A	US 8772449 B2 (MORISHITA 등) 2014.07.08 전체 문헌 참조.	1-12, 14
A	WO 2009-136007 A1 (BURNHAM INSTITUTE FOR MEDICAL RESEARCH 등) 2009.11.12 전체 문헌 참조.	1-12, 14

☐ 추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다.

☒ 대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.

* 인용된 문헌의 특별 카테고리:

“A” 특별히 관련이 없는 것으로 보이는 일반적인 기술수준을 정의한 문헌

“T” 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌

“E” 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허 문헌

“X” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신규성 또는 진보성이 없는 것으로 본다.

“L” 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌

“Y” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다.

“O” 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌

“&” 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌

“P” 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌

국제조사의 실제 완료일

2016년 07월 08일 (08.07.2016)

국제조사보고서 발송일

2016년 07월 08일 (08.07.2016)

ISA/KR의 명칭 및 우편주소

대한민국 특허청
(35208) 대전광역시 서구 청사로 189,
4동 (둔산동, 정부대전청사)

팩스 번호 +82-42-481-8578

심사관

김승범

전화번호 +82-42-481-3371



제2기재란 일부 청구항을 조사할 수 없는 경우의 의견(첫 번째 용지의 2의 계속)

PCT 제17조(2)(a)의 규정에 따라 다음과 같은 이유로 일부 청구항에 대하여 본 국제조사보고서가 작성되지 아니하였습니다.

1. ☒ 청구항: 13
이 청구항은 본 기관이 조사할 필요가 없는 대상에 관련됩니다. 즉,
청구항 13은 치료에 의한 인체의 처치방법에 관한 것이므로 PCT 17(2)(a)(i) 및 규칙 39.1(iv)의 규정에 의하여 국제조사기관이 국제조사할 의무가 없는 대상에 해당됩니다.
2. ☐ 청구항:
이 청구항은 유효한 국제조사를 수행할 수 없을 정도로 소정의 요건을 충족하지 아니하는 국제출원의 부분과 관련됩니다. 구체적으로는,
3. ☐ 청구항:
이 청구항은 종속청구항이나 PCT규칙 6.4(a)의 두 번째 및 세 번째 문장의 규정에 따라 작성되어 있지 않습니다.

제3기재란 발명의 단일성이 결여된 경우의 의견(첫 번째 용지의 3의 계속)

본 국제조사기관은 본 국제출원에 다음과 같이 다수의 발명이 있다고 봅니다.

1. ☐ 출원인이 모든 추가수수료를 기간 내에 납부하였으므로, 본 국제조사보고서는 모든 조사 가능한 청구항을 대상으로 합니다.
2. ☐ 추가수수료 납부를 요구하지 않고도 모든 조사 가능한 청구항을 조사할 수 있었으므로, 본 기관은 추가수수료 납부를 요구하지 아니하였습니다.
3. ☐ 출원인이 추가수수료의 일부만을 기간 내에 납부하였으므로, 본 국제조사보고서는 수수료가 납부된 청구항만을 대상으로 합니다. 구체적인 청구항은 아래와 같습니다.
4. ☐ 출원인이 기간 내에 추가수수료를 납부하지 아니하였습니다. 따라서 본 국제조사보고서는 청구범위에 처음 기재된 발명에 한정되어 있으며, 해당 청구항은 아래와 같습니다.

이의신청에
관한 기재

- ☐ 출원인의 이의신청 및 이의신청료 납부(해당하는 경우)와 함께 추가수수료가 납부되었습니다.
- ☐ 출원인의 이의신청과 함께 추가수수료가 납부되었으나 이의신청료가 보정요구서에 명시된 기간 내에 납부되지 아니하였습니다.
- ☐ 이의신청 없이 추가수수료가 납부되었습니다.

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
KR 10-2014-0138539 A	2014/12/04	WO 2014-189303 A1	2014/11/27
US 2007-0071756 A1	2007/03/29	US 2007-0071754 A1	2007/03/29
		US 2007-0072933 A1	2007/03/29
		US 2008-0003219 A1	2008/01/03
		US 2008-0167600 A1	2008/07/10
		WO 2007-038453 A2	2007/04/05
		WO 2007-038453 A3	2007/11/29
US 8772449 B2	2014/07/08	EP 2433953 A1	2012/03/28
		EP 2433953 A4	2013/06/05
		EP 2433953 B1	2015/07/08
		JP 5653214 B2	2015/01/14
		KR 10-2012-0064650 A	2012/06/19
		US 2012-0065124 A1	2012/03/15
		WO 2010-134537 A1	2010/11/25
WO 2009-136007 A1	2009/11/12	EP 2279199 A1	2011/02/02
		EP 2279199 A4	2012/11/28
		JP 2011-523632 A	2011/08/18
		US 2011-0130342 A1	2011/06/02
		US 8188221 B2	2012/05/29