



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2008-0098216
(43) 공개일자 2008년11월07일

(51) Int. Cl.

A61K 47/48 (2006.01) A61K 38/01 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2007-0043625

(22) 출원일자 2007년05월04일

심사청구일자 없음

(71) 출원인

한미약품 주식회사

경기 화성시 팔탄면 하저리 893-5

(72) 발명자

송대해

서울 관악구 신림10동 삼성산아파트 307동 2403호

김영민

경기 용인시 기흥구 지곡동 740 씨니밸리아파트
113동 1602호

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

손민

전체 청구항 수 : 총 22 항

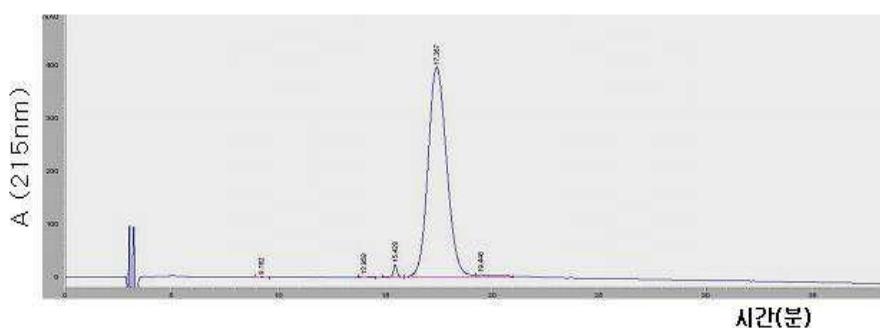
(54) 캐리어 물질을 이용한 나트륨 배설 펩타이드 약물 결합체

(57) 요약

본 발명은 나트륨 배설 펩타이드(Natriuretic Peptide), 비펩타이드성 중합체 및 면역글로불린 Fc 영역이 상호 공유결합에 의해 연결되어 있어 생체 내 지속성 및 안정성이 향상된 나트륨 배설 펩타이드 결합체 및 그 이용에 관한 것이다. 본 발명의 펩타이드 결합체는 펩타이드의 생체 내 활성이 비교적 높게 유지되고, 혈중 반감기가 현저히 증가되어 다양한 펩타이드 약물의 지속형 제형 개발에 유용하게 이용될 수 있다.

대 표 도 - 도1

BNP(N)-면역글로불린 Fc (역상컬럼 순도분석 97.2%)



(72) 발명자
임창기
경기 수원시 영통구 영통동 청명마을 삼익아파트
325동 1706호
김영훈
서울 영등포구 영등포동 대우드림타운 103동 902호

권세창
서울시 광진구 광장동 극동아파트 10동 1204호
이관순
서울 송파구 오금동 우창아파트 3동 404호

특허청구의 범위

청구항 1

나트륨 배설 웨타이드(Natriuretic peptide) 및 면역글로불린 Fc 영역이 폴리에틸렌글리콜, 폴리프로필렌글리콜, 에틸렌 글리콜-프로필렌 글리콜 공중합체, 폴리옥시에틸화폴리올, 폴리비닐알콜, 폴리사카라이드, 텍스트란, 폴리비닐에틸에테르, 생분해성 고분자, 지질 중합체, 키틴류, 히아루론산 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 비웨타이드성 중합체를 통해 연결된 나트륨 배설 웨타이드(Natriuretic peptide) 결합체.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 나트륨 배설 웨타이드(Natriuretic peptide)는 Atrial Natriuretic Peptide(ANP), Brain Natriuretic Peptide(BNP), C-type Natriuretic Peptide(CNP), Dendroaspis Natriuretic Peptide(DNP) 및 이들의 유도체(derivative), 단편(fragment), 변이체(variant)를 포함하는 군으로부터 선택되는 것인 Natriuretic peptide 결합체.

청구항 3

제2항에 있어서, 상기 결합체는 천연형 BNP인 나트륨 배설 웨타이드(Natriuretic peptide) 결합체.

청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 비웨타이드성 중합체의 양 말단이 각각 면역글로불린 Fc 영역 및 천연형 BNP의 아민 그룹 또는 티올 그룹(Thiol group)에 결합된 나트륨 배설 웨타이드(Natriuretic peptide) 결합체.

청구항 5

제4항에 있어서, 비웨타이드성 중합체의 양 말단이 각각 면역글로불린 Fc 영역 및 천연형 BNP의 아미노 말단에 결합된 나트륨 배설 웨타이드(Natriuretic peptide) 결합체.

청구항 6

제1항에 있어서, 상기 면역글로불린 Fc 영역은 비당쇄화된 것을 특징으로 하는 나트륨 배설 웨타이드(Natriuretic peptide) 결합체.

청구항 7

제1항에 있어서, 면역글로불린 Fc 영역이 CH1, CH2, CH3 및 CH4 도메인으로 이루어진 군으로부터 1개 내지 4개 선택되는 도메인으로 이루어진 나트륨 배설 웨타이드(Natriuretic peptide) 결합체.

청구항 8

제7항에 있어서, 면역글로불린 Fc 영역이 힌지영역을 추가로 포함하는 나트륨 배설 웨타이드(Natriuretic peptide) 결합체.

청구항 9

제1항에 있어서, 면역글로불린 Fc 영역이 IgG, IgA, IgD, IgE 또는 IgM에서 유래된 Fc 영역인 나트륨 배설 웨타이드(Natriuretic peptide) 결합체.

청구항 10

제9항에 있어서, 면역글로불린 Fc 영역의 각각의 도메인이 IgG, IgA, IgD, IgE, IgM로 이루어진 군에서 선택되는 면역글로불린에서 유래된 상이한 기원을 가진 도메인의 하이브리드인 나트륨 배설 웨타이드(Natriuretic peptide) 결합체.

청구항 11

제9항에 있어서, 면역글로불린 Fc 영역이 동일한 기원의 도메인으로 이루어진 단체 면역글로불린으로 구성된 이량체 또는 다량체(면역글로불린 Fc의 조합)인 나트륨 배설 웨타이드(Natriuretic peptide) 결합체.

청구항 12

제9항에 있어서, 면역글로불린 Fc 영역이 IgG4 Fc 영역인 나트륨 배설 웨타이드(Natriuretic peptide) 결합체.

청구항 13

제12항에 있어서, 면역글로불린 Fc 영역이 인간 비당쇄화 IgG4 Fc 영역인 나트륨 배설 웨타이드(Natriuretic peptide) 결합체.

청구항 14

제1항에 있어서, 비웨타이드성 중합체의 반응기가 알데히드 그룹, 프로피온 알데히드 그룹, 부틸 알데히드 그룹, 말레이미드 그룹 및 석시니미드 유도체로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 나트륨 배설 웨타이드(Natriuretic peptide) 결합체.

청구항 15

제14항에 있어서, 석시니미드 유도체가 석시니미딜 프로피오네이트, 석시니미딜 카르복시메틸, 하이드록시 석시니미딜 또는 석시니미딜 카보네이트인 나트륨 배설 웨타이드(Natriuretic peptide) 결합체.

청구항 16

제14항에 있어서, 비웨타이드성 중합체가 양 말단에 반응 알데히드 그룹의 반응기를 갖는 나트륨 배설 웨타이드(Natriuretic peptide) 결합체.

청구항 17

제1항에 있어서, 비웨타이드성 중합체가 폴리에틸렌글리콜인 나트륨 배설 웨타이드(Natriuretic peptide) 결합체.

청구항 18

(1) 양 말단에 알데히드, 말레이미드, 또는 석시니미드 유도체 반응기를 갖는 비웨타이드성 중합체를 나트륨 배설 웨타이드(Natriuretic peptide)의 아민 그룹 또는 티올 그룹에 공유결합시키는 단계;

(2) 상기 (1)의 반응 혼합물로부터 아미노말단에 비웨타이드성 중합체가 공유결합된 나트륨 배설 웨타이드(Natriuretic peptide)를 포함하는 연결체를 분리하는 단계; 및

(3) 분리된 연결체의 비웨타이드성 중합체의 다른 쪽 말단에 면역글로불린 Fc 영역을 공유결합으로 연결하여 비웨타이드성 중합체의 양쪽 말단이 각각 면역글로불린 Fc 영역 및 나트륨 배설 웨타이드(Natriuretic peptide)와 결합된 웨타이드 결합체를 생성하는 단계를 포함하는 나트륨 배설 웨타이드(Natriuretic peptide) 결합체의 제조방법.

청구항 19

제18항에 있어서, 상기 비웨타이드성 중합체는 폴리에틸렌글리콜인 나트륨 배설 웨타이드(Natriuretic peptide) 결합체의 제조방법.

청구항 20

제18항에 있어서, 상기 나트륨 배설 웨타이드(Natriuretic peptide)는 천연형 BNP인 나트륨 배설 웨타이드(Natriuretic peptide) 결합체의 제조방법.

청구항 21

제1항 내지 제17항 중 어느 한 항의 단백질 결합체를 포함하는 약제학적 조성물.

청구항 22

제1항 내지 제17항 중 어느 한 항의 단백질 결합체 또는 제21항의 약제학적 조성물을 투여하는 단계를 포함하는 급성 및 만성 울혈성 심부전(CHF), 고혈압, 천식, 염증관련 질환, 고지혈증, 또는 발기부전의 치료방법.

명세서

발명의 상세한 설명

발명의 목적

발명이 속하는 기술 및 그 분야의 종래기술

- <4> 본 발명은 나트륨 배설 웨타이드(Natriuretic peptide)의 지속형 제형을 위한 BNP 결합체에 관한 발명으로서, 구체적으로 본 발명은 BNP, 비웨타이드성 중합체 및 면역글로불린 Fc 영역이 공유 결합에 의해 상호 연결되어 혈중 반감기를 현저히 증가시키고 특정 아미노산 잔기에 대한 부위 선택적 결합방법으로 생체 내 효력지속효과를 보다 획기적으로 증가시킨 BNP 결합체 및 이의 제조방법에 관한 것이다.
- <5> 웨타이드는 일반적으로 안정성이 낮아 쉽게 변성되고 체내 단백질 가수 분해 효소에 의해 분해되어 그 활성을 잃으며, 또한 상대적으로 크기가 작아 신장을 통해 쉽게 제거되기 때문에 약리 성분으로 웨타이드를 포함하는 의약품의 혈중 농도 및 역가를 유지하기 위해서는 웨타이드 약물을 환자에게 자주 투여할 필요가 있다. 그러나 웨타이드 약물은 대부분 주사제 형태로 환자에게 투여되며, 따라서 생리활성 웨타이드의 혈중 농도를 유지하기 위해 자주 주사하게 되는데, 이는 환자의 염청난 고통을 야기하게 된다. 이러한 문제점을 극복하기 위해 다양한 시도가 있어왔으며, 그 중 하나로 웨타이드의 약물의 생체막 투과도를 증가시켜 구강 또는 비강을 통한 흡입으로 웨타이드의 약물을 체내로 전달하는 시도가 있었다. 그러나 이러한 방법은 주사제에 비해 웨타이드의 체내 전달 효율이 현저히 낮으며 따라서 웨타이드 약물의 체내 활성을, 요구되는 조건으로 유지하는데에는 아직까지는 어려움이 많다.
- <6> 나트륨 배설 웨타이드(Natriuretic peptide, NP) 군은 구조적으로 유사한 4가지 폴리웨타이드로 구성되며, Atrial Natriuretic Peptide(ANP), Brain Natriuretic Peptide(BNP), C-type Natriuretic Peptide(CNP), Dendroaspis Natriuretic Peptide(DNP)를 포함한다.
- <7> BNP(상품명 Natrecor, J&J)는 32개 아미노산으로 구성된 3,464 dalton 분자량의 웨타이드로서, 1개의 intra-disulfide 결합을 유지하고 있다. NPR-A에 결합하여 cGMP의 생산을 활성화하여 동맥 내 혈압을 감소시키며 따라서 울혈성 심부전증(Congestive heart failure, CHF) 치료제로 사용되고 있다. 혈중반감기는 Rat에서 약 1분 정도로 매우 짧기 때문에 약 48시간동안 infusion 시키는 매우 번거로운 투여방법을 사용하고 있다 (J.Pharmaceutical Sciences, 95;2499~2506(2006)).
- <8> 이러한 웨타이드 약물의 혈중 안정성을 증가시키고 혈중 약물 농도를 오랫동안 높게 지속시켜 약효를 극대화하려는 노력이 계속되어 왔는데, 웨타이드 약물의 지속형 제제는 웨타이드 약물의 안정성을 높이는 동시에 약물 자체의 역가가 충분히 높게 유지되어야 하고 환자에게 면역반응을 유발하지 않아야 한다. 이러한 웨타이드의 문제점은 웨타이드의 크기가 작아 신장에서 회수되지 못하고 체외로 소실되는 것에 기인하는 바가 크며 따라서 신장 소실을 억제하기 위해 폴리에틸렌글리콜(PEG)과 같은 용해도가 높은 고분자 물질을 웨타이드 표면에 화학적으로 부가시키는 방법이 사용되어왔다. PEG는 목적 웨타이드의 특정 부위 또는 다양한 부위에 비특이적으로 결합하여 웨타이드의 분자량을 증가시켜 신장에 의한 소실을 억제하고 가수분해를 방지하는데 효과가 있으며 특별한 부작용도 일으키지 않는다. 예를 들어, WO2006/076471은 BNP에 PEG를 결합하여 생리 활성을 지속시키는 것에 대해 기술하고 있으며, WO05116655은 폐길화된 BNP를 제조하여 경구투여용 약물의 가능성을 제시하고 있다. 그러나, PEG 분자량을 증가시켜 웨타이드 약물의 생체 내 지속시간을 연장할 경우, 분자량이 증가할수록 웨타이드 약물의 역가가 현저히 낮아지고, 경구투여시에도 낮은 생체이용율을 극복하지 못하였다.
- <9> 재조합 유전자 기술을 사용한 일부민 용합 BNP 가 보고되었는데(Pharmaceutical Research, 21(11):2105-2111(2004)), 동물세포에서 생산된 일부민 용합 BNP는 마우스에서 혈중반감기가 약 12~19 시간으로 어느정도 증가되었지만 in vitro 활성이 천연형 BNP 대비 약 1.6 % 정도로 급격히 감소하여 일부민 용합에 의한 낮은 효력을 극복하지 못하였다. 또한 BNP와 같이 디설파이드 결합(disulfide bond)을 가지고 있는 웨타이드를 이용할 경우 미스폴딩(misfolding)의 확률이 높아 적용이 어렵다는 문제점이 있다.
- <10> WO 04011498에서 보면, 재조합 일부민과 화학적 링커에 의해 공유결합으로 연결된 BNP 결합체를 제조하였지만, Rat에서 약 14~16시간 정도의 혈중반감기를 보여, 현저한 혈중안정성 효과를 볼 수 없었고, 결과적으로, 일부민

을 지속형 제형의 캐리어로 사용하는 방법이 적합하지 않음을 확인하였다.

<11> 이에, 본 발명자들은 BNP 의 혈중반감기 증가 및 생체 내 활성유지를 동시에 극대화할 수 있는 방법으로 면역글로불린 Fc 영역, 비펩타이드성 중합체 및 BNP 를 공유결합에 의해 부위 선택적으로 상호 연결시키는 제조방법을 사용하였고, 결합체의 생체 내 효력 지속효과가 획기적으로 증가됨을 확인하고 본 발명을 완성하였다.

발명이 이루고자 하는 기술적 과제

<12> 본 발명의 목적은 나트륨 배설 웨بت아이드(Natriuretic peptide)의 생체 내 활성을 유지하면서 혈중 반감기를 연장시켜 월등히 우수한 나트륨 배설 웨بت아이드(Natriuretic peptide) 지속형 제제를 제공하는 것이다.

발명의 구성 및 작용

<13> 상기 목적을 달성하기 위한 본 발명의 한 양태는 BNP, 양 말단에 반응기를 갖는 비펩타이드성 중합체 및 면역글로불린 Fc 영역이 상호 공유결합에 의해 연결되어 있는 지속형 BNP 결합체에 관한 것이다.

<14> 본 발명의 BNP 는, 혈관확장 기능을 보유한 웨بت아이드로서 동맥내 혈압을 낮추는 기능을 한다. 이러한 BNP는, 전구물질(precursors), 유도체(derivatives), 단편(fragments), 변이체(variants) 등을 포함하며, 바람직하게는 95% 이상 아미노산 서열 유사성을 보이는 서열을 포함한다. 본 발명의 BNP 는, 1개의 NPR-A 결합 motif, 1개이상 pegylation 부위를 포함하고 있고, human BNP, rat BNP, canine BNP, human ANP 를 포함한다.

<15> BNP(1-32) 아미노산 서열은 아래와 같다.

<16> BNP(1-32)

<17> Ser-Pro-Lys-Met-Val-Gln-Gly-Ser-Gly-Cys-

<18> Phe-Gly-Arg-Lys-Met-Asp-Arg-Ile-Ser-Ser-

<19> Ser-Ser-Gly-Leu-Gly-Cys-Lys-Val-Leu-Arg-

<20> Arg-His

<21> BNP 유도체는, 천연형 BNP 와 비교 시 최소한 80% 이상 아미노산 서열에서 상동성을 보이며, 화학적으로 수식된 형태일 수도 있다. 아미노산 잔기의 일부 그룹이 화학적으로 치환(예; alpha-methylation, alpha-hydroxylation), 제거(예; deamination), 수식(예; N-methylation)된 형태일수 있다.

<22> BNP 단편은, 천연형 BNP 의 아미노말단 또는 카르복시말단에 하나 또는 그 이상 아미노산이 추가 또는 삭제된 형태를 의미하며 추가된 아미노산은 천연에 존재하지 않는 아미노산(예; D형 아미노산) 도 가능하다.

<23> BNP 변이체는, 천연형 BNP 와 아미노산서열이 하나 이상 다른 웨بت아이드를 의미한다.

<24> BNP 유도체, 단편, 변이체에서 각각 사용된 제조방법은 독립적으로 사용될 수 있고 조합도 가능하다.

<25> 본 발명에서 사용되는 천연형 BNP 와 변형된 BNP 는 Solid phase 합성법을 통하여 합성될 수 있으며, 천연형 BNP 를 포함한 대부분의 천연형 BNP 는 재조합 방법으로도 생산 가능하다.

<26> 또한, 본 발명에서 사용되는 BNP 는 다양한 부위에서 비펩타이드성 중합체와 결합될 수 있다.

<27> 본 발명에서 제조한 결합체는 BNP 의 결합 부위에 따라 활성 차이가 있을 수 있다.

<28> 예를 들어, 아미노 말단과 카르복시 말단을 포함한 아미노 말단 이외 부위들에 각각 커플링 하여 in vitro 활성의 차이를 확인할 수 있다. 알데히드 반응기는 낮은 pH에서 아미노 말단에 선택적으로 반응하며, 높은 pH, 예를 들어 pH 9.0 조건에서는 라이신 잔기와도 공유결합을 형성할 수 있다. 반응 pH를 달리하며 페길화(pegylation) 반응을 진행한 후, 이온교환 컬럼을 사용하여 반응 혼합물로부터 위치이성질체를 분리할 수 있다.

<29> 아미노 말단 이외의 위치에 커플링 할 경우, 천연형 아미노산 서열에서 수식하고자 하는 아미노산 잔기 위치에 반응성 티올 그룹을 도입하고, 비펩타이드성 중합체의 말레이미드 링커를 사용하여 공유결합을 형성할 수 있다.

<30> 또한, 천연형 아미노산 서열에서 수식하고자 하는 아미노산 잔기 위치에 반응성 있는 아민 그룹을 도입하고 비펩타이드성 중합체의 알데히드 링커를 사용하여 공유결합을 형성할 수도 있다.

<31> 구체적인 일 실시예로서, 본 발명자는 BNP 의 아미노 말단에 선택적으로 커플링하기 위한 방법으로, 천연형 BNP

에 PEG를 결합시킬 때 pH 6.0으로 반응시켜 아미노 말단으로의 폐길화 반응을 유도하였으며, 커플링 후 *in vitro* 활성이 약 29 % 정도 유지됨을 확인할 수 있다(표1). 또한 BNP 결합체의 혈중반감기는 약 21 시간으로 확인되었고 반면 천연형 BNP의 경우 매우 짧은 혈중반감기 때문에 정량할 수 없었다(표1).

<32> 따라서, 본 발명에서 제조한 BNP-PEG-면역글로불린 Fc 결합체의 혈중반감기는 21시간 이상 획기적으로 증가하였고, 활성감소를 최소화한 아미노 말단에 커플링시켜 역가감소도 최소화하였고, 결과적으로 생체내 효력 유지 면에서 획기적으로 개선된 새로운 지속형 BNP 제형을 제조할 수 있었다.

<33> 본 발명에서 사용되는 Natriuretic peptide는 캐리어 물질과 비펩타이드성 중합체로 연결된다.

<34> 본 발명에 사용가능한 캐리어 물질은 면역글로불린 Fc 영역, 알부민, 트랜스페린, PEG로 구성된 군에서 선택될 수 있으며, 바람직하게는 면역글로불린 Fc 영역이다.

<35> 면역글로불린 Fc 영역은 생체 내에서 대사되는 생분해성의 폴리펩타이드이기 때문에, 약물의 캐리어로 사용하기에 안전하다. 또한, 면역글로불린 Fc 영역은 면역글로불린 전체 분자에 비해 상대적으로 분자량이 적기 때문에 결합체의 제조, 정제 및 수율 면에서 유리할 뿐만 아니라, 아미노산 서열이 항체마다 다르기 때문에 높은 비균질성을 나타내는 Fab 부분이 제거되기 때문에 물질의 동질성이 크게 증가되고 혈중 항원성의 유발 가능성도 낮아지게 되는 효과도 기대할 수 있다.

<36> 본 발명에서, "면역글로불린 Fc 영역"은, 면역글로불린의 중쇄와 경쇄 가변영역, 중쇄 불변영역 1(CH1)과 경쇄 불변영역(CL1)을 제외한, 중쇄 불변영역 2(CH2) 및 중쇄 불변영역 3(CH3)부분을 의미하며, 중쇄 불변영역에 힌지(hinge)부분을 포함하기도 한다. 또한 본 발명의 면역글로불린 Fc 영역은 천연형과 실질적으로 동등하거나 향상된 효과를 갖는 한, 면역 글로불린의 중쇄와 경쇄 가변영역만을 제외하고, 일부 또는 전체 중쇄 불변영역 1(CH1) 및/또는 경쇄불변영역 1(CL1)을 포함하는 확장된 Fc영역일 수 있다. 또한, CH2 및/또는 CH 3에 해당하는 상당히 긴 일부 아미노산 서열이 제거된 영역일 수 도 있다. 즉, 본 발명의 면역글로불린 Fc 영역은 1)CH1 도메인, CH2 도메인, CH3 도메인 및 CH4 도메인, 2)CH1 도메인 및 CH2 도메인, 3)CH1 도메인 및 CH3 도메인, 4)CH2 도메인 및 CH3 도메인, 5)1개 또는 2개의 이상의 도메인과 면역글로불린 힌지 영역(또는 힌지 영역의 일부)와의 조합, 6)중쇄 불변영역 각 도메인과 경쇄 불변영역의 이량체일 수 있다.

<37> 또한, 본 발명의 면역글로불린 Fc 영역은 천연형 아미노산 서열뿐만 아니라 이의 서열유도체(mutant)를 포함한다. 아미노산 서열 유도체란 천연 아미노산 서열중의 하나 이상의 아미노산 잔기가 결실, 삽입, 비보전적 또는 보전적 치환 또는 이들의 조합에 의하여 상이한 서열을 가지는 것을 의미한다. 예를 들면, IgG Fc의 경우 결합에 중요하다고 알려진 214 내지 238, 297 내지 299, 318 내지 322 또는 327 내지 331번 아미노산 잔기들이 변형을 위해 적당한 부위로서 이용될 수 있다. 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, 이팩터 기능을 없애기 위해 보체결합부위, 예로 C1q 결합부위가 제거될 수도 있고, ADCC(antibody dependent cell mediated cytotoxicity) 부위가 제거될 수도 있다. 이러한 면역 글로불린 Fc 영역의 서열 유도체를 제조하는 기술은 국제특허공개 제WO 97/34631호, 국제특허공개 제96/32478호 등에 개시되어 있다.

<38> 분자의 활성을 전체적으로 변경시키지 않는 단백질 및 펩타이드에서의 아미노산 교환은 당해 분야에 공지되어 있다(H.Neurath, R.L.Hill, The Proteins, Academic Press, New York, 1979). 가장 통상적으로 일어나는 교환은 아미노산 잔기 Ala/Ser, Val/Ile, Asp/Glu, Thr/Ser, Ala/Gly, Ala/Thr, Ser/Asn, Ala/Val, Ser/Gly, Thy/Phe, Ala/Pro, Lys/Arg, Asp/Asn, Leu/Ile, Leu/Val, Ala/Glu, Asp/Gly 간의 교환이다.

<39> 경우에 따라서는 인산화(phosphorylation), 황화(sulfation), 아크릴화(acrylation), 당화(glycosylation), 메틸화(methylation), 파네실화(farnesylation), 아세틸화(acetylation), 아밀화(amidation) 등으로 수식(modification)될 수도 있다.

<40> 상기 기술한 Fc 유도체는 본 발명의 Fc 영역과 동일한 생물학적 활성을 나타내나 Fc 영역의 열, pH 등에 대한 구조적 안정성을 증대시킨 유도체다.

<41> 또한, 이러한 Fc 영역은 인간 및 소, 염소, 돼지, 마우스, 래빗, 햄스터, 랙트, 기니아 꿩 등의 동물의 생체 내에서 분리한 천연형으로부터 얻어질 수도 있고, 형질전환된 동물세포 또는 미생물로부터 얻어진 재조합형 또는 이의 유도체 일 수 있다. 여기서, 천연형으로부터 획득하는 방법은 전체 면역글로불린을 인간 또는 동물의 생체로부터 분리한 후, 단백질 분해효소를 처리하여 얻을 수 있다. 파파인을 처리할 경우에는 Fab 및 Fc로 절단되고, 펩신을 처리할 경우에는 pF'c 및 F(ab)2로 절단된다. 이를 크기 배제 크로마토그래피(size-exclusion

chromatography) 등을 이용하여 Fc 또는 pF'c를 분리할 수 있다.

<42> 바람직하게는 인간 유래의 Fc 영역을 미생물로부터 수득한 재조합형 면역글로불린 Fc 영역이다.

<43> 또한, 면역글로불린 Fc 영역은 천연형 당쇄, 천연형에 비해 증가된 당쇄, 천연형에 비해 감소한 당쇄 또는 당쇄가 제거된 형태일 수 있다. 이러한 면역글로불린 Fc 당쇄의 증감 또는 제거에는 화학적 방법, 효소학적 방법 및 미생물을 이용한 유전 공학적 방법과 같은 통상적인 방법이 이용될 수 있다. 여기서, Fc에서 당쇄가 제거된 면역글로불린 Fc 영역은 보체(c1q)의 결합력이 현저히 저하되고, 항체-의존성 세포독성 또는 보체-의존성 세포독성이 감소 또는 제거되므로, 생체 내에서 불필요한 면역반응을 유발하지 않는다. 이런 점에서 약물의 캐리어로서의 본래의 목적에 보다 부합하는 형태는 당쇄가 제거되거나 비당쇄화된 면역글로불린 Fc 영역이라 할 것이다.

<44> 본 발명에서 당쇄의 제거(Deglycosylation)는 효소로 당을 제거한 Fc 영역을 말하며, 비당쇄화(Aglycosylation)"는 원핵동물, 바람직하게는 대장균에서 생산하여 당쇄화되지 않은 Fc 영역을 의미한다.

<45> 한편, 면역글로불린 Fc 영역은 인간 또는 소, 염소, 돼지, 마우스, 래빗, 햄스터, 랫트, 기니아 꿩 등의 동물기원일 수 있으며, 바람직하게는 인간기원이다. 또한, 면역글로불린 Fc 영역은 IgG, IgA, IgD, IgE, IgM 유래 또는 이들의 조합(combination) 또는 이들의 혼성(hybrid)에 의한 Fc 영역일 수 있다. 바람직하게는 인간 혈액에 가장 풍부한 IgG 또는 IgM유래이며 가장 바람직하게는 리간드 결합 단백질의 반감기를 향상시키는 것으로 공지된 IgG 유래이다.

<46> 한편, 본 발명에서 조합(combination)이란 이량체 또는 다량체를 형성할 때, 동일 기원 단쇄 면역글로불린 Fc 영역을 암호화하는 폴리펩타이드가 상이한 기원의 단쇄 폴리펩타이드와 결합을 형성하는 것을 의미한다. 즉, IgG Fc, IgA Fc, IgM Fc, IgD Fc 및 IgE의 Fc 단편으로 이루어진 그룹으로부터 선택된 2개 이상의 단편으로부터 이량체 또는 다량체의 제조가 가능하다.

<47> 본 발명에서 "하이브리드(hybrid)"란 단쇄의 면역글로불린 Fc 영역 내에 2개 이상의 상이한 기원의 면역글로불린 Fc 단편에 해당하는 서열이 존재함을 의미하는 용어이다. 본 발명의 경우 여러 형태의 하이브리드가 가능하다. 즉, IgG Fc, IgM Fc, IgA Fc, IgE Fc 및 IgD Fc의 CH1, CH2, CH3 및 CH4로 이루어진 그룹으로부터 1개 내지 4개 도메인으로 이루어진 도메인의 하이브리드가 가능하며, 힌지를 포함할 수 있다.

<48> 한편, IgG 역시 IgG1, IgG2, IgG3 및 IgG4의 서브클래스로 나눌 수 있고 본 발명에서는 이들의 조합 또는 이들의 혼성화도 가능하다. 바람직하게는 IgG2 및 IgG4 서브클래스이며, 가장 바람직하게는 보체 의존적 독성(CDC, Complement-dependent cytotoxicity)과 같은 이펙터 기능(effectector function)이 거의 없는 IgG4의 Fc 영역이다.

<49> 즉, 가장 바람직한 본 발명의 약물의 캐리어용 면역글로불린 Fc 영역은, 인간 IgG4 유래의 비-당쇄화된 Fc 영역이다. 인간 유래의 Fc 영역은 인간 생체에서 항원으로 작용하여 이에 대한 새로운 항체를 생성하는 등의 바람직하지 않은 면역 반응을 일으킬 수 있는 비-인간 유래의 Fc 영역에 비하여 바람직하다.

<50> 본 발명에서 비펩타이드성 중합체는 반복 단위가 2개 이상 결합된 생체 적합성 중합체를 의미하며, 상기 반복 단위들은 펩타이드 결합이 아닌 임의의 공유결합을 통해 서로 연결된다.

<51> 본 발명에 사용가능한 비펩타이드성 중합체는 폴리에틸렌 글리콜, 폴리프로필렌 글리콜, 에틸렌 글리콜과 프로필렌 글리콜의 공중합체, 폴리옥시 에틸화 폴리올, 폴리비닐 알콜, 폴리사카라이드, 텍스트란, 폴리비닐 에틸에테르, PLA(폴리락트산, polylactic acid) 및 PLGA(폴리락틱-글리콜산, polylactic-glycolic acid)와 같은 생분해성 고분자, 지질 중합체, 키تون류, 히아루론산 및 이들의 조합으로 구성된 군으로부터 선택될 수 있으며, 바람직하게는 폴리에틸렌글리콜이다. 당해 분야에 이미 알려진 이들의 유도체 및 당해 분야의 기술 수준에서 용이하게 제조할 수 있는 유도체들도 본 발명의 범위에 포함된다.

<52> 기존 인프레임 퓨전(inframe fusion) 방법으로 제조된 융합단백질에서 사용된 펩타이드성 링커의 단점은 생체내에서 단백질분해효소에 의해 쉽게 절단되어 캐리어에 의한 활성약물의 혈중반감기 증가 효과를 기대만큼 얻을 수 없다는 것이다. 그러나, 본 발명에서는 단백질분해효소에 저항성 있는 중합체를 사용하여 캐리어와 유사하게 펩타이드의 혈중반감기를 유지할 수 있다. 그러므로, 본 발명에서 사용될 수 있는 비펩타이드성 중합체는 상기와 같은 역할, 즉 생체 내 단백질분해효소에 저항성 있는 중합체이면 제한없이 사용될 수 있다. 비펩타이드성 중합체의 분자량은 1 내지 100 kDa 범위, 바람직하게는 1 내지 20 kDa 범위이다. 또한, 상기 캐리어 물질과 결합되는 본 발명의 비펩타이드성 중합체는 한 종류의 중합체뿐만 아니라 상이한 종류의 중합체들의 조합이 사용될 수도 있다.

- <53> 본 발명에 사용되는 비펩타이드성 중합체는 캐리어 물질 및 단백질 약물과 결합될 수 있는 반응기를 가진다.
- <54> 상기 비펩타이드성 중합체의 양 말단 반응기는 반응 알데히드 그룹, 프로피온 알데히드 그룹, 부틸 알데히드 그룹, 말레이미드(maleimide) 그룹 및 석시니미드(succinimide) 유도체로 이루어진 군으로부터 선택되는 것이 바람직하다. 상기에서, 석시니미드 유도체로는 석시니미딜 프로피오네이트, 하이드록시 석시니미딜, 석시니미딜 카르복시메틸 또는 석시니미딜 카보네이트가 이용될 수 있다. 특히, 상기 비펩타이드성 중합체가 양 말단에 반응 알데히드 그룹의 반응기를 갖는 경우, 비특이적 반응을 최소화하고, 비펩타이드성 중합체의 양 말단에서 생리활성 폴리펩타이드 및 면역글로불린과 각각 결합하는데 효과적이다. 알데히드 결합에 의한 환원성 알킬화로 생성된 최종 산물은 아미드 결합으로 연결된 것보다 훨씬 안정적이다. 알데히드 반응기는 낮은 pH에서 아미노 말단에 선택적으로 반응하며, 높은 pH, 예를 들어 pH9.0 조건에서는 라이신 잔기와 공유결합을 형성할 수 있다.
- <55> 상기 비펩타이드성 중합체의 양 말단 반응기는 서로 같거나 다를 수 있다. 예를 들어, 한쪽 말단에는 말레이미드 그룹을, 다른 쪽 말단에는 알데히드 그룹, 프로피온 알데히드 그룹, 또는 부틸 알데히드 그룹을 가질 수 있다. 양쪽 말단에 하이드록시 반응기를 갖는 폴리에틸렌 글리콜을 비펩타이드성 중합체로 이용하는 경우에는 공자의 화학반응에 의해 상기 하이드록시기를 상기 다양한 반응기로 활성화하거나, 상업적으로 입수 가능한 변형된 반응기를 갖는 폴리에틸렌 글리콜을 이용하여 본 발명의 나트륨 배설 펩타이드(Natriuretic peptide) 결합체를 제조할 수 있다.
- <56> 이러한 본 발명의 나트륨 배설 펩타이드(Natriuretic peptide) 결합체는 혈관확장, 혈압조절 과 같은 기존BNP의 생체내 활성이 유지될 뿐만 아니라 혈중 반감기 증가 및 이로 인한 상기 펩타이드의 생체내 효력 지속 효과가 획기적으로 증가하게 하므로, 급성 및 만성 울혈성 심부전(CHF), 고혈압, 천식, 염증관련 질환, 고지혈증, 발기부전 등 치료에 유용하다.
- <57> 바람직한 일 양태로서, 본 발명은 (1) 양 말단에 알데히드 반응기를 갖는 비펩타이드성 중합체를 BNP의 아미노 말단에 공유결합으로 연결시키는 단계; (2) (1)의 반응 혼합물로부터 아미노 말단에 비펩타이드성 중합체가 공유결합된 BNP를 포함하는 연결체를 분리하는 단계; 및 (3) 분리된 연결체의 비펩타이드성 중합체의 다른 쪽 말단에 면역글로불린 Fc 영역을 공유결합으로 연결하여 비펩타이드성 중합체의 양쪽 말단이 각각 면역글로불린 Fc 영역 및 BNP 와 결합된 단백질 결합체를 생성하는 단계를 포함하는 제조방법에 관한 것이다.
- <58> 또 다른 양태로서, 본 발명은 상기 본 발명의 BNP 결합체를 포함하는 급성 및 만성 CHF 치료용 약제학적 조성물을 제공한다.
- <59> 본 발명의 결합체를 포함한 약제학적 조성물은 약제학적으로 허용가능한 담체를 포함할 수 있다. 약제학적으로 허용되는 담체는 경구투여시에는 결합제, 활택제, 봉해제, 부형제, 가용화제, 분산제, 안정화제, 혼탁화제, 색소, 향료 등을 사용할 수 있으며, 주사제의 경우에는 완충제, 보존제, 무통화제, 가용화제, 등장화제, 안정화제 등을 혼합하여 사용할 수 있으며, 국소투여용의 경우에는 기제, 부형제, 윤활제, 보존제 등을 사용할 수 있다. 본 발명의 약제학적 조성물의 제형은 상술한 바와 같은 약제학적으로 허용되는 담체와 혼합하여 다양하게 제조될 수 있다. 예를 들어, 경구 투여시에는 정제, 트로키, 캡슐, 엘럭서, 스스펜션, 시럽, 웨이퍼 등의 형태로 제조할 수 있으며, 주사제의 경우에는 단위 투약 앰플 또는 다수회 투약 형태로 제조할 수 있다. 기타, 용액, 혼탁액, 정제, 환약, 캡슐, 서방형 제제 등으로 제형화 할 수 있다.
- <60> 한편, 제제화에 적합한 담체, 부형제 및 희석제의 예로는 락토즈, 텍스트로즈, 수크로즈, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 미정질 셀룰로즈, 폴리비닐파리돈, 물, 메틸하이드록시벤조에이트, 프로필하이드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 또는 광물유 등이 사용될 수 있다. 또한, 충진제, 항응집제, 윤활제, 습윤제, 향료, 방부제 등을 추가로 포함할 수 있다.
- <61> 본 발명의 약제학적 조성물은 치료할 질환, 투여 경로, 환자의 연령, 성별 및 체중 및 질환의 중등도 등의 여러 관련 인자와 함께, 활성성분인 약물의 종류에 따라 투여량, 투여 횟수 및 빈도가 결정된다. 본 발명의 약제학적 조성물은 생체 내 지속성 및 역가가 우수하므로, 본 발명의 약제학적 제제의 투여 횟수 및 빈도를 현저하게 감소시킬 수 있다.
- <62> 본 발명에서 "투여"는, 어떠한 적절한 방법으로 환자에게 소정의 물질을 도입하는 것을 의미하며, 상기 결합체 또는 약제학적 조성물의 투여 경로는 약물이 목적 조직에 도달할 수 있는 한 어떠한 일반적인 경로를 통하여 투여될 수 있다. 복강 내 투여, 정맥내 투여, 근육내 투여, 피하 투여, 피내 투여, 경구 투여, 국소 투여, 비내 투여, 폐내 투여, 직장 내 투여 등이 될 수 있으나, 이에 제한되지는 않는다. 그러나 경구 투여시, 펩타이드는

소화가 되기 때문에 경구용 조성물은 활성 약제를 코팅하거나 위에서의 분해로부터 보호되도록 제형화 하는 것이 바람직하다. 바람직하게는 주사제 형태로 투여될 수 있다. 또한, 본 발명의 단백질 결합체 또는 약제학적 조성물은 활성 물질이 표적 세포로 이동할 수 있는 임의의 장치에 의해 투여될 수 있다.

<63> 이하, 하기 실시예에 의하여 본 발명을 보다 상세하게 설명한다. 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하기 위한 것일 뿐 본 발명의 범위가 이들로 한정되는 것은 아니다.

실시예 1. BNP Pegylation 과 위치이성질체 분리

<65> 3.4K ButyrALD(2) PEG(부틸알데히드기를 2개 가지고 있는 PEG)를 BNP(AP, 미국)의 N-말단에 폐길화시키기 위하여 펩타이드와 PEG의 몰비를 1 : 10, 펩타이드의 농도를 3mg/ml로 하여 4°C에서 60분간 반응하였다. 이 때 반응은 pH 4.0 인 100mM 농도의 NaOAc 완충액 내에서 이루어졌으며, 환원제인 20mM SCB(NaCNBH₃)를 첨가하여 반응시켰다. 3.4K ButyrALD(2) PEG를 BNP의 라이신(Lys) 잔기에 Pegylation시키기 위하여 펩타이드와 PEG의 몰비 1 : 30, peptide 농도 3mg/ml로 4°C에서 90분 동안 반응하였다. 이 때 반응은 pH 9.0 인 100mM 농도의 Na-Borate 완충액 내에서 이루어졌으며 환원제인 20mM SCB를 첨가하여 반응하였다. 각 반응액은 SOURCE S(XK 16ml, 아미 sham 바이오사이언스)를 통하여 Isomer를 분리하였다.

<66> Column : SOURCE S (XK 16ml, 아미 sham 바이오사이언스)

<67> 유속 : 2.0ml/분

<68> 구배 : A 0 → 30% 60분 B (A : 20mM Na-P(pH8.0), B : A + 1M NaCl)

실시예 2. BNP(N)-PEG-면역글로불린 Fc 결합체 제조

<70> 실시예 1의 방법을 이용하여 3.4K ButyrALD(2) PEG를 BNP의 N-term과 반응시킨 후 N-term Isomer만을 정제하여 면역글로불린 Fc 와 Coupling시켰다. Peptide와 면역글로불린 Fc 몰비를 1 : 6, 전체단백질농도를 50mg/ml로 하여 4°C에서 18시간 반응하였다. 반응액은 100mM K-P pH6.0이며 환원제인 20mM SCB를 첨가하였다. Coupling 반응액은 두 개의 정제 컬럼을 거쳐 정제된다. 먼저 Coupling 반응에 참여하지 않은 다양한 면역글로불린 Fc를 제거하기 위하여 SOURCE S(XK 16ml, 아미 sham 바이오사이언스)이용하였다. 20mM Na-P(pH8.0)에서 면역글로불린 Fc는 컬럼에 결합하지 않고 BNP-면역글로불린 Fc 만 결합하였다. Coupling 반응에 참여하지 않은 펩타이드를 제거하기 위해 1M NaCl을 사용하여 Salt gradient를 주면 고순도의 BNP-면역글로불린 Fc 를 정제할 수 있었다. HPLC 역상분석결과 순도 97.2%를 나타내었다. [도1]

<71> Column : SOURCE S(XK16ml, 아미 sham 바이오사이언스)

<72> 유속 : 2.0ml/분

<73> 구배 : A 0 → 30% 60분 B (A: 20mM Na-P(pH8.0), B: A + 1M NaCl)

실시예 3. BNP(Lys)-면역글로불린 Fc 결합체 제조

<75> 실시예 1의 방법을 이용하여 3.4K ButyrALD(2) PEG를 BNP 의 Lys과 반응시킨 후 Lys Isomer만을 정제하여 면역글로불린 Fc 와 Coupling시켰다. Peptide와 면역글로불린 Fc 몰비를 1 : 6, 전체단백질농도를 50mg/ml로 하여 4°C에서 18시간 반응하였다. 반응액은 100mM K-P pH6.0이며 환원제인 20mM SCB를 첨가하였다. Coupling 반응 후 SOURCE S 16ml 사용한 정제방법은 실시예 2와 동일하다. HPLC 역상분석결과 순도 98.2%를 나타내었다. [도1]

실시예 4. PropionALD 링커 PEG 사용한 결합체 제조

<77>

<78> 3.4K PropionALD(2) PEG (프로피온 알데히드기를 2개 가지고 있는 PEG)를 사용하여 실시예 1과 동일한 방법으로 3.4K-BNP를 제조하였다. 이후 실시예 2와 동일한 방법으로 BNP(N)-면역글로불린 Fc 결합체를 제조하였다.

실시예 5. BNP(3-32) 단편 제조 및 BNP(3-32)-면역글로불린 Fc 결합체 제조

<80> 천연형 BNP(1-32)에 Di-Peptidyl-Peptidase(DPP IV)(Simga, 미국) 처리하면, 아미노 말단부위 2개 아미노산 제거된 BNP(3-32)가 생성된다. 효소반응 종료후 SOURCE S 16ml 컬럼 사용한 정제방법으로 천연형 BNP(1-32)와 BNP(3-32) 를 분리하였다. 역상 순도분석결과 95% 이상 순도임을 확인하였고, MALDI TOF 사용한 분자량 측정결과 천연형 BNP(1-32) 보다 184 dalton 작은 3,280 Dalton 이었다. 정제된 BNP(3-32)를 사용하여 BNP(3-32)-면역글로불린 Fc 결합체를 실시예 1 및 2 와 동일한 방법으로 제조하였다. 링커는 실시예 4에서 사용된 3.4K

PropionALD(2) PEG를 사용하여 제조하였다. 제조된 BNP(3-32)-면역글로불린 Fc 결합체의 HPLC 역상분석결과 순도 97%를 나타내었다.

<81> **실시예 6. 지속형 BNP in-vitro 활성 측정**

BNP 지속형제제의 효력을 측정하는 방법으로 in-vitro 세포 활성을 측정하는 방법을 이용하였다. 보통 BNP의 in-vitro 활성의 측정방법으로는, human aortic smooth muscle cell 을 분리하여 BNP 처리에 따른 세포 내의 cGMP 증가 여부를 측정하는 시험으로 진행된다. Human aortic smooth muscle cell 에 BNP 와 시험물질을 농도 별로 처리하여 시험물질에 의한 세포 내 2차 신호전달 물질인 cGMP 발생 정도를 측정하여 EC50값을 측정하여 비교하는 시험으로 진행하였다.

<83> **실시예 7. 지속형 BNP 약물동력학 조사**

<84> 각 군당 3마리의 SD 랫트(Rat)에 BNP 및 시험물질을 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 씩 피하주사한 후 주사후 1, 6, 12, 24, 30, 48, 72, 96, 120, 및 216시간 후에 채혈하였다. 해파린 함유하는 튜브에 혈액시료를 모아 응고를 방비하였고, 에펜도르프 고속 마이크로 원심분리기에서 5분간 원심분리하여 세포를 제거하였다. 혈장내 웨타이드 농도는 항체를 이용하여 ELISA 방법으로 측정하였다.

표 1

시험 물질	혈중반감기 (시간)	In vitro 역가 (%)
BNP	0.5	100
BNP(N)-PEG-Fc	26	11.4
BNP(3-32)(N)-PEG-Fc	33	9.6

<86> BNP(N)-PEG-Fc : BNP의 N말단과 Fc 영역이 PEG로 연결된 결합체.

<87> BNP(3-32)-PEG-Fc : BNP(3-32)의 N말단과 Fc 영역이 PEG로 연결된 결합체.

<88> N.D. : not determined

발명의 효과

<89> 본 발명의 나트륨 배설 웨타이드(Natriuretic peptide) 결합체는 웨타이드의 생체 내 활성이 비교적 높게 유지되고, 혈중 반감기가 현저히 증가되어 다양한 웨타이드 약물의 지속형 제형 개발에 유용하게 이용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

<1> 도 1은 BNP(N)-PEG-면역글로불린 Fc 결합체 순도를 역상컬럼으로 분석한 결과이고,

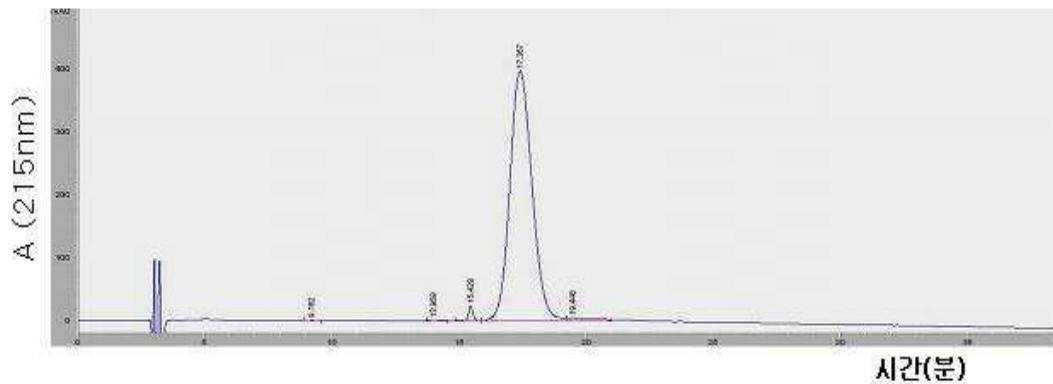
<2> 도 2는 BNP(Lys)-PEG-면역글로불린 Fc 결합체 순도를 역상컬럼으로 분석한 결과이며,

<3> 도 3은 BNP(N)-PEG-면역글로불린 Fc 결합체를 12% SDS-PAGE로 분석한 결과이다.

도면

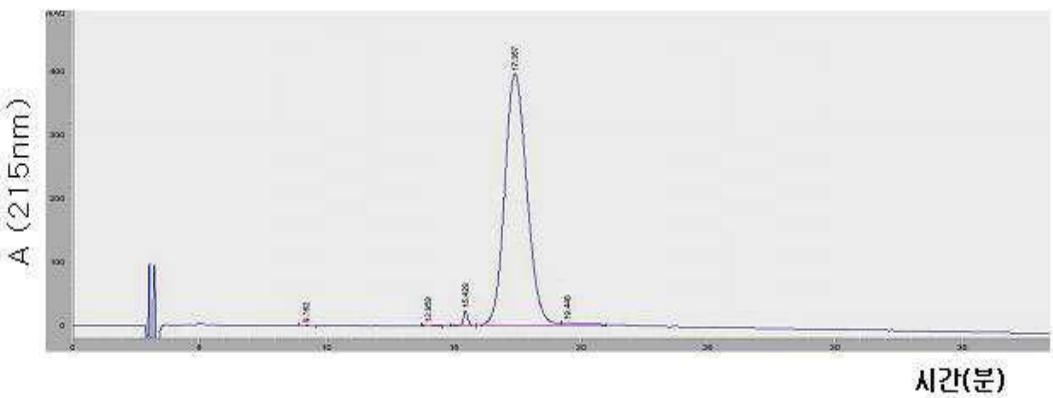
도면1

BNP(N)-면역글로불린 Fc (역상컬럼 순도분석 97.2%)



도면2

BNP(Lys)-면역글로불린 Fc (역상컬럼 순도분석 98.2%)



도면3

