

	(19) 대한민국특허청(KR) (12) 공개특허공보(A)	(11) 공개번호 10-2012-0099862 (43) 공개일자 2012년09월12일
(51) 국제특허분류(Int. Cl.) A61K 39/395 (2006.01) A61P 27/02 (2006.01) A61P 27/00 (2006.01)		(71) 출원인 서강대학교산학협력단 서울특별시 마포구 백범로 35 (신수동, 서강대학교)
(21) 출원번호 10-2011-0018337	(22) 출원일자 2011년03월02일 심사청구일자 2011년03월02일	(72) 발명자 김현철 서울특별시 영등포구 63로 45, 시범아파트 6동 9호 (여의도동)
		(74) 대리인 이준혁

전체 청구항 수 : 총 14 항

(54) 발명의 명칭 FcRn 결합 저해제를 포함하는 약학적 조성물

(57) 요약

본 발명은 FcRn(신생아 Fc 수용체) 결합 저해제를 포함하는 망막질환 치료제의 약효 증진용 약학적 조성물, 및 망막질환 치료제 및 FcRn의 결합 저해제를 포함하는 망막질환 치료용 약학적 조성물에 관한 것으로서, 본 발명을 통해 망막질환 치료제의 약동학적 효율을 향상시킴으로써 망막질환 치료제의 약효를 증진시킬 수 있고, 잦은 투여로 인한 부작용 또는 복약불이행의 문제를 감소시킬 수 있다.

대표도 - 도10



특허청구의 범위

청구항 1

FcRn(신생아 Fc 수용체) 결합 저해제를 포함하는 망막질환 치료제의 약효 증진용 약학적 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 망막질환 치료제는 항체약인 것을 특징으로 하는 약학적 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서, 망막질환 치료제는 IgG 기반 항체약인 것을 특징으로 하는 약학적 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서, 망막질환 치료제는 아바스틴인 것을 특징으로 하는 약학적 조성물.

청구항 5

제1항에 있어서, FcRn 결합 저해제는 IgG의 Fc 부분과 FcRn의 결합을 억제할 수 있는 펩티드인 것을 특징으로 하는 약학적 조성물.

청구항 6

제1항에 있어서, FcRn 결합 저해제는 Fc-III 펩티드인 것을 특징으로 하는 약학적 조성물.

청구항 7

제1항에 있어서, FcRn 결합 저해제는 총 조성물 중량의 0.0001 내지 50중량%의 비율로 포함되는 것을 특징으로 하는 약학적 조성물.

청구항 8

망막질환 치료제 및 FcRn(신생아 Fc 수용체) 결합 저해제를 포함하는 망막질환 치료용 약학적 조성물.

청구항 9

제8항에 있어서, 망막질환 치료제는 항체약인 것을 특징으로 하는 망막질환 치료용 약학적 조성물.

청구항 10

제8항에 있어서, 망막질환 치료제는 IgG 기반 항체약인 것을 특징으로 하는 망막질환 치료용 약학적 조성물.

청구항 11

제8항에 있어서, 망막질환 치료제는 아바스틴인 것을 특징으로 하는 망막질환 치료용 약학적 조성물.

청구항 12

제8항에 있어서, FcRn 결합 저해제는 IgG의 Fc 부분과 FcRn의 결합을 억제할 수 있는 펩티드인 것을 특징으로 하는 망막질환 치료용 약학적 조성물.

청구항 13

제8항에 있어서, FcRn 결합 저해제는 Fc-III 펩티드인 것을 특징으로 하는 망막질환 치료용 약학적 조성물.

청구항 14

제8항에 있어서, 망막질환 치료제 및 FcRn 결합 저해제는 조성물 중에 1: 0.1 내지 100의 중량비로 포함되는 것을 특징으로 하는 망막질환 치료용 약학적 조성물.

명세서

기술분야

- [0001] 본 발명은 FcRn(신생아 Fc 수용체) 결합 저해제를 포함하는 망막질환 치료제의 약효 증진용 약학적 조성물, 및 망막질환 치료제 및 FcRn의 결합 저해제를 포함하는 망막질환 치료용 약학적 조성물에 관한 것이다.

배경기술

- [0002] 일반적으로, 단백질 약물(폴리펩티드, 펩티드 약물 등 포함)의 경우 안정성이 낮아 쉽게 변성되고 혈액 내 단백질 가수분해효소에 의해 분해되어 신장이나 간을 통해 쉽게 제거되기 때문에, 단백질 약물의 혈중 농도 및 역가를 유지하기 위해서는 단백질 약물을 환자에게 자주 투여할 필요가 있다. 그러나 단백질 약물의 경우, 활성 단백질의 혈중 농도를 유지하기 위해 자주 투여하는 것은 환자에게 고통 또는 불편함을 야기하게 되며, 이는 복약 불이행(non-compliance)을 야기하여 충분한 치료효과를 발현하지 못할 우려가 크다. 이러한 문제점을 해결하기 위해, 단백질 약물의 혈중 안정성을 증가시키고, 혈중 약물 농도를 오랫동안 높게 지속시켜 약효를 극대화하며, 결과적으로 복약순응도(compliance)를 높이기 위한 노력이 계속되어 왔다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0003] 단백질 약물(폴리펩티드, 펩티드 약물 등 포함)의 지속성 제제는 단백질 약물의 안정성을 높이는 동시에 약물 자체의 역가가 충분히 높게 유지되어야 하고 환자에게 면역반응을 유발하지 않아야 한다. 망막질환과 관련해서도 단백질 약물의 한 범주으로써 다수의 항체약이 개발되고 있기는 하나, 유리체강 내에 주입된 항체약은 빠르게 안구로부터 배출되는 문제점을 가지고 있다. 유리체강 내에 주입된 항체약(antibody drug)은 (i) 망막을 통한 배출, (ii) 트라베큘라 및 실렘스 캐널(Trabecular and Schlemm's canal)을 통한 배출 및 (iii) 홍채와 모양체 혈관을 통한 배출과 같은 3가지의 배출경로를 통해 안구 내에서 혈류로 배출되는데 이러한 빈번한 배출로 인하여 반감기는 짧아지고, 약효 유지를 위해서 더욱 자주 항체약을 유리체강 내에 주입하여야 하는 바, 이러한 빈번한 배출 및 주입으로 망막 박리(Retinal Detachment) 등이 일어나 이로 인한 시력 상실이 자주 보고되고 있는 실정이다. 또한 이러한 빈번한 배출 및 주입은 환자에게 상당한 불편함과 경제적 부담으로 작용하고 있다.
- [0004] 이러한 배경 하에, 본 발명자들은 망막질환 치료제, 특히 IgG 기반 항체약을 포함하는 다양한 약물에 있어 투여한 약물의 배출을 최소화하기 위한 방법을 연구하던 중, 본 발명을 완성하게 되었다.
- [0005] 본 명세서 전체에 걸쳐 다수의 논문 및 특허문헌이 참조되고 그 인용이 표시되어 있다. 인용된 논문 및 특허문헌의 개시 내용은 그 전체로서 본 명세서에 참조로 삽입되어 본 발명이 속하는 기술 분야의 수준 및 본 발명의 내용이 보다 명확하게 설명된다.

과제의 해결 수단

- [0006] 본 발명자는 유리체강내 주입된 항체약이 안구로부터 배출되는 모든 경로에 FcRn(신생아 Fc 수용체)가 발현되고 있음을 발견하였고(Kim H, Fariss RN, Zhang C, Robinson SB, Thill M, Csaky KG, Mapping of the neonatal Fc 수용체 in the rodent eye, Invest Ophthalmol Vis Sci. 2008 May;49(5):2025-2029), FcRn(신생아 Fc 수용체)의 결합 저해제를 처리하는 경우 망막질환 치료제의 배출을 줄여 약동학적 효율을 향상시킬 수 있다는 것을 규명하여 본 발명의 완성에 이르게 되었다.
- [0007] 따라서, 본 발명의 목적은 망막 질환 치료제의 약동학적 효율을 향상시켜 그 치료 효과를 증진시키기 위한 FcRn(신생아 Fc 수용체) 결합 저해제를 포함하는 약학적 조성물을 제공함에 있다.
- [0008] 본 발명의 또 다른 목적은 망막질환 치료제 및 FcRn(신생아 Fc 수용체)의 결합 저해제를 포함하는 망막질환 치

료용 약학적 조성물을 제공함에 있다.

[0009] 본 발명의 다른 목적 및 이점은 하기의 발명의 상세한 설명, 청구범위 및 도면에 의해 보다 명확하게 된다.

발명의 효과

[0010] FcRn 결합 저해제를 망막질환 치료제와 함께 투여함으로써, 망막질환 치료제의 배출을 최소화하여 자주 투여하는 데에 따른 불편함, 고통과 부작용을 경감시킬 수 있으며, 따라서 투여대상의 복약순응도(compliance)를 높일 수 있고, 망막질환 치료제의 치료효과를 극대화 할 수 있다는 장점이 있다.

도면의 간단한 설명

[0011] 도 1은 정상 랫트 안구에서 FcRn mRNA의 발현을 보여주는 RT-PCR 결과이다.
 도 2는 결막 조직의 동결 절편에 대하여 랫트의 FcRn 수용체를 면역조직화학적 염색한 결과를 도시한 것이다.
 도 3은 모양체, 홍채 및 망막 조직의 동결 절편에 대하여 랫트의 FcRn 수용체를 면역조직화학적 염색한 결과를 도시한 것이다.
 도 4는 수정체, 각막 및 시신경 조직의 동결 절편에 대하여 랫트의 FcRn 수용체를 면역조직화학적 염색한 결과를 도시한 것이다.
 도 5는 랫트의 안구내 투여된 형광 염료 라벨링된 전장 IgG(붉은 색으로 보이는 부분)의 안구내 분포를 나타낸 것이다.
 도 6은 랫트의 안구내 투여된 형광 염료 라벨링된 전장 IgG(붉은 색으로 보이는 부분)의 안구내 분포를 나타낸 것이다.
 도 7은 FcRn 수용체의 발현 및 안구내 투여된 베바시주맙(bevacizumab)의 혈청중 농도 사이의 관계를 나타낸 것이다.
 도 8은 FcRn 녹아웃 및 와일드-타입 마우스에 있어서 안구내 주사된 베바시주맙의 분포를 나타낸 것이다.
 도 9는 랫트에 있어서, 안구내 주사된 베바시주맙 및 치킨 IgY의 약동학 실험결과를 나타낸 것이다.
 도 10은 (아바스틴)과 (아바스틴 + Fc-III 펩티드)를 랫트의 유리체강 내에 투여한 후 6시간 뒤 아바스틴의 농도를 ELISA 기법을 이용하여 분석한 결과를 나타내는 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0012] 본 발명의 일 양태에 따르면, 망막질환 치료제의 약동학적 효율을 향상시켜 그 치료 효과를 증진시키기 위한 FcRn (신생아 Fc 수용체) 결합 저해제를 포함하는 약학적 조성물을 제공한다.

[0013] 본 발명의 일 양태에서, 상기 망막질환 치료제는 항체약일 수 있으며, 구체적으로 면역글로불린 G(IgG) 기반 항체약, 보다 구체적으로 아바스틴일 수 있다.

[0014] 본 발명의 일 양태에서, 상기 FcRn 결합 저해제는 구체적으로 IgG의 Fc 부분과 FcRn의 결합을 억제할 수 있는 펩티드일 수 있으며, 보다 구체적으로 Fc-III 펩티드일 수 있다.

[0015] 본 발명의 일 양태에서, FcRn 결합 저해제는 총 조성물 중량의 0.0001 내지 50중량%의 비율로 포함될 수 있으나, 이 기술분야에서 통상의 지식을 가진 기술자라면 필요에 따라 적당한 비율로 조정하여 약학적 조성물을 제조할 수 있다.

[0016] 본 발명의 일 양태에 따르면, 망막질환 치료제 및 FcRn(신생아 Fc 수용체) 결합 저해제를 포함하는 망막질환 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[0017] 본 발명의 일 양태에서, 상기 망막질환 치료제는 항체약일 수 있으며, 구체적으로 IgG 기반 항체약, 보다 구체적으로 아바스틴일 수 있다.

[0018] 본 발명의 일 양태에서, 상기 FcRn 결합 저해제는 구체적으로 IgG의 Fc 부분과 FcRn의 결합을 억제할 수 있는 펩티드일 수 있으며, 보다 구체적으로 Fc-III 펩티드(DeLano WL, Ultsch MH, de Vos AM, Wells JA, Convergent

solutions to binding at a protein-protein interface, Science. 2000 Feb18;287(5456):1279-1283)일 수 있다.

[0019] 본 발명의 일 양태에서, 망막질환 치료제 및 FcRn 결합 저해제는 조성물 중에 1: 0.1 내지 100의 중량비로 포함될 수 있으나, 이 기술분야에서 통상의 지식을 가진 기술자라면 필요에 따라 적당한 중량비로 조정하여 약학적 조성물을 제조할 수 있다.

[0020] 본 발명에서 용어 “망막질환”이란 망막의 기능손상 또는 장애로 인하여 발생하는 모든 질환을 포괄하는 의미이며, 망막혈관 폐쇄증, 노인성 황반부변성, 당뇨병성 망막증, 망막박리 등을 포함하나 이에 제한되는 것은 아니다. 본 발명의 경우, 망막을 통해 투여되는 모든 약물에 적용될 수 있다.

[0021] 본 발명에서 용어 “약동학적 효율 향상”이란 약물을 투여한 후 체내 흡수, 분포, 대사 및 배출되는 단계 중 어느 하나 이상의 단계를 조절하여 약물의 치료효과를 높이는 것을 의미하나 본 발명의 특성상 본 명세서에서는 약물의 배출을 억제하여 약효를 높이는 것을 의미한다.

[0022] 본 발명에서 용어 “FcRn (신생아 Fc 수용체)의 결합 저해제”란 항체와 FcRn (신생아 Fc 수용체)의 결합을 저해하는 화학제제 및 단백질, 펩티드 등의 생물학적 제제를 말한다. IgG의 Fc 부분과 FcRn (신생아 Fc 수용체)의 결합을 억제할 수 있는 화학제제, 단백질 또는 펩티드라면 어떤 것이든지 본 발명에 적용될 수 있으며, 보다 구체적으로는 Fc-III 펩티드이다.

[0023] 본원에서 용어 “항체” 및 “면역글로불린(Immunoglobulin)”은, 폴리클론 항체 및 모노클론 항체를 포함하여, 모든 면역성 결합 제제를 광범위하게 의미한다. 중쇄의 불변 도메인의 형태에 따라, 항체는 5가지의 주요 클래스(IgA, IgD, IgE, IgG 및 IgM)중 하나에 속한다. 이들 중 몇몇은, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 등과 같이 서브클래스 또는 이소타입(isotype)로 더 분류된다. 상이한 클래스의 면역 글로불린에 상응하는 중쇄 불변 도메인은 각각 α , δ , ϵ , γ 및 μ 이다. 상이한 클래스의 면역 글로불린의 서브유닛 구조 및 3차원 형태는 이미 잘 알려져 있다.

[0024] 본 발명에서 용어 “IgG 기반 항체”는 상기 항체 중 IgG 클래스에 속하는 항체를 의미한다.

[0025] 본 발명에서 “약학적 조성물”이란 인간이나 동물에게 투여될 경우 치료적 활성을 나타내는 물질을 의미하며, 폴리펩티드, 화합물, 추출물, 핵산 등을 포함하는 개념이나, 바람직하게는 본 발명의 특성상 항체를 포함하는 약학적 조성물을 의미한다.

[0026] 이하 본 발명을 다음의 실시예 및 실험예에 의해 설명하고자 한다. 그러나 이들은 본 발명을 보다 쉽게 이해하기 위하여 제공되는 것일 뿐 본 발명의 권리범위가 이들에 의해 한정되는 것은 아니다.

[0027] 실험예 1. 여러 안구 조직에서 FcRn mRNA 검출을 위한 RT-PCR 분석

[0028] 두 마리의 랫트의 안구를 적출하여, 무균상태에서 안구 조직을 나누어 즉시 액화질소로 냉동시켰다. 각 막, 망막, 결막, 모양체 및 홍채, 망막 색소상피, 맥락막 및 수정체로부터 총 (t)RNA를 분리 정제하였다[(TRizol Plus RNA 정제 키트; Invitrogen, Carlsbad, CA), manufacturer's protocol에 따라 실험을 진행함]. 각 조직 총 RNA 2 μ g으로 퍼스트-스트랜드 cDNA(first strand cDNA)를 합성하였다(SuperScript III first-strand synthesis system for RT-PCR; Invitrogen). 역전사효소를 제거한 것을 대조군으로 하였다. 수득된 퍼스트-스트랜드 cDNA는 사용 전에 -80℃에서 보관하였다. cDNA의 부분표본(aliquot)에 대하여 PCR 반응을 시켰다(FcRn 서열에 대한 하기 증폭 프라이머 사용: 5'-CTGTGGATGAAGCAACCTG-3' 및 5'-TCCACGTTTGACCTCTAGC-3', Integrated DNA Technologies, Coralville, IA). PCR 반응은 94℃에서 5분간 변성시키고, 95℃에서 30초간, 60℃에서 45초간, 72℃에서 42초간, 총 40 사이클을 돌려 증폭시키는 과정을 거쳤다. 각 PCR 샘플 생성물을 2% 아가로스 겔에서 전기영동시키고, UV 하에서 관찰하기 위하여 겔을 에티디움 브로마이드로 염색하였다.

[0029] 그 실험 결과는 도 1과 같으며, 랫트의 안구 조직의 여러 포션으로부터의 총 RNA에서 FcRn mRNA의 존재 여부를 실험해 본 결과, 망막색소상피, 맥락막을 제외하고 모양체 및 홍채, 망막, 결막, 각막, 수정체 및 시신경다발에서 FcRn 트랜스크립트가 존재하는 것으로 나타났다.

[0030] 실험예 2. 랫트의 여러 안구 조직에서 FcRn의 면역조직화학적 국소화(Immunohistochemical Localization)

[0031] (1) 항-rFcRn 모노클로날 항체 1G3

[0032] 뇌 미세혈관 내피(brain microvascular endothelium), 맥락층 상피세포(choroid plexus epithelium) 및 랫트의 폐포상피(alveolar epithelium)에 FcRn의 존재여부를 항-FcRn 마우스 모노클로날 항체, 1G3(랫트의 FcRn 중쇄에서 발견)를 사용하여 증명하였다. 이 모노클로날 1G3 항체는 마우스 미엘로마 하이브리도마 세포 라인 CRL-2434에서 획득되었다. 세포를 4 mM L-글루타민(Invitrogen), 1mM 소듐 피루베이트(Invitrogen), 페니실린-스트렙토마이신(Invitrogen) 및 1% 우태아혈청 공급 하에, HL-1 배지(Cambrex, Walkersville, MD)에서 배양하였다. 혈청-프리 배지에서 3일간 배양한 후, 세포 배지를 원심분리하여 세포를 제거하고, 세포-프리 배지 상등액(1G3 항체 함유)을 수확하였다. 수확된 배지 상등액을 원심여과기(MWCO 50 kDa; Millipore, Bedford, MA)로 농축하였다. 1G3을 함유하는 농축된 상등액 용액을 20° C에서 보관하였다.

[0033] (2) FcRn 수용체의 면역조직화학(Immunohistochemistry for FcRn Receptors)

[0034] 랫트의 안구를 적출하여 즉시 OCT 화합물 중에서 냉동시키고, 6 또는 20 μm-두께의 슬라이스로 잘랐다. 냉동된 섹션을 실온에서 1시간 동안 건조시키고, 4% 파라포름알데히드로 30분간 고정된 후, 1 X 인산완충식염수(PBS)로 세척하였다. 섹션을 1 X PBS로 희석된 5% 고우트 혈청(goat serum)으로 5시간 동안 블락하고, 1G3-함유 상등액 배지가 농축된 2% 고우트 혈청에서 4°C 조건 하에 하룻밤 동안 배양하였다. 섹션을 알렉사 플루오르 555 고우트 안티 마우스 IgG (희석: 1:150; Invitrogen) 및 DAPI (4,6-diamino-2-phenylindole; 희석: 1:1000; Invitrogen)중에서 4°C 조건 하 5시간 동안 배양하고, 안티페이드 마운팅 배지(antifade mounting media)에 올렸다. 1G3-함유 상등액 세포 배지에서 배양하지 않은 것을 음성 대조군으로 하였다.

[0035] (3) FcRn 수용체를 갖는 림프관 또는 혈관의 면역조직화학

[0036] 래빗 항-마우스 림프관 내피 수용체 (LYVE)-1 폴리클로날 항체(Cell Sciences, Inc., Canton, MA) 및 래빗 항-인간 본 빌레브란트 인자(von Willebrand factor, VWF) 폴리클로날 항체(DAKO, Carpinteria, CA)를 사용하여 림프관 및 혈관에 대하여 각각 면역조직화학적 염색을 실시하였다. 래빗 항-마우스 LYVE-1 폴리클로날 항체(희석: 1:150) 또는 래빗 항-인간 VWF 폴리클로날 항체(희석: 1:150)을 사용하여, 1G3-함유 상등액 세포 배지가 농축된 2% 고우트 혈청 중에서 더블 염색을 하였다. 1차 항체, 항-FcRn 및 항-LYVE-1 또는 항-VWF를 DAPI (희석 1:1000)과 함께 알렉사 플루오르 555 고우트 항-마우스 IgG (희석 1:150) 및 알렉사 플루오르 488 고우트 항-래빗 IgG (희석 1:150)으로 각각 검출하였다.

[0037] (4) 영상화

[0038] 결막, 수정체 및 각막으로부터의 6 μm-두께 동결절편(cryosection)에 대하여 면역조직화학적 염색을 실시하였으며, 형광현미경(epifluorescence microscopy, DM5000B; Leica Microsystems Inc., Bannockburn, IL)으로 사진을 얻었다. 20 μm-두께 동결절편이 망막, 모양체, 홍채 및 시신경다발의 면역조직화학적 연구에 사용되었으며, 이는 혈관 구조를 검출하기 위한 것이다. 영상을 레이저 스캐닝 공초점 현미경(model SP2; Leica Microsystems, Exton, PA)으로 캡처하였다.

[0039] 실험 결과

[0040] 도 2를 보면, FcRn 수용체가 결막 조직에 발현되어 있음을 볼 수 있다. 결막 상피 세포에는 FcRn 수용체가 발현되어 있다. LYVE-1 및 VWF 마커를 포함한다는 것은 수용체가 림프관에 국소화되어 있는 반면 (도2C-E 참조), 혈관 내피세포에는 그러하지 않음을 의미한다 (도2F-H 참조).

[0041] 모양체, 특히 비색소성 모양체 상피세포(nonpigmented ciliary epithelial cell, 도 3A, 3B) 및 모양체 혈관 구조(도 3C-e)에 FcRn 수용체가 발현되는 것으로 나타났다.

[0042] 홍채 내의 혈관 구조에는 수용체가 발현되었으나, 홍채 색소성 층에는 그렇지 않았다 (도 3F-H 참조).

[0043] 망막에서는, 안쪽 망막 혈관 구조에 FcRn 수용체가 발현되는 것으로 나타났으나 (도 3I-K 참조), RPE의 경우 대조군과 실험군에서 모두 전형적인 자발형광이 나타났다.

[0044] 홍미록계도, 수정체 상피층 (도 4A, 4B 참조) 및 각막의 내피세포층 및 상피세포층(도 4C-I 참조)에서 수용체가 발현되는 것으로 나타났다.

[0045] 시신경 혈관구조에서 또한 FcRn 수용체가 높은 레벨로 발현되는 것으로 나타났다 (도 3E 참조).

[0046] 하기 표 1은 다양한 조직에서의 면역조직화학적 실험결과를 요약하여 도시한 것이다.

표 1

랫트 안구에서의 FcRn 수용체의 분포

구분	안구 조직	8-12주령 랫트 안구에서의 반응
각막	상피층	+
	스트로마	-
	케라토사이트	-
	내피층	+
결막	상피층	+
	스트로마	+(특정 세포에서만)
	립프관	+
	혈관	-
공막	피브로블라스트	+
	스트로마	-
모양체	비색소성 상피층	+
	근육섬유	-
	혈관	+
홍채	근육섬유	-
	스트로마	-
	혈관	+
수정체	캡슐	-
	상피층	+
	피질	-
	핵	-
망막	뮐러세포	-
	신경섬유층	-
	광수용체층	-
	망막색소성상피층	-
	혈관	+
	망막세포층	-
시신경 다발	혈관	+
	스트로마	-
	번들 윌	+

실험예 3. 안구에서의 FcRn 수용체-매개 약동학 실험

(1) 실험 동물

[0050] 수컷(250g) 브라운 노르웨이 랫트(Charles River Laboratories, Raleigh, NC)를 사용하였다. 모든 동물은 12시간 명-암 사이클 조건에서 표준식이 및 풍부한 물 공급 하에 사육되었다. (동물실험은 Guidelines from the Association for Research in Vision and Ophthalmology for the Use of Animals in Research에 따름)

(2) 형광 라벨링된 항체의 랫트 안내 주사

[0052]

2 mL의 알렉사 555 컨쥬게이트된 고우트 항-레빗 IgG (GAR555; H+L; Invitrogen, Carlsbad, CA)를 1 X 인산완충식염수((PBS, 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 1.8 mM KH₂PO₄, pH 7.4) 1000mL에서 투석 카세트(MWCO=10 kDa; Pierce, Rockford, IL)로 하룻밤 동안 2회 투석하여, 용해된 소듐 아자이드의 제거를 촉진하였다. 그 다음, 투석된 항체 용액을 16,873× g 로 4℃에서 5분간 원심분리하여 항체 응집체를 제거하였다. 동공을 10% 트로피카미드(Mydracil; Alcon, Fort Worth, TX)로 확장시키기 전에, 8 내지 12주령 랫트에 70 mg/kg의 케타민 및 30 mg/kg의 자일라진(xylazine)을 근육내 주사하여 마취하였다. 그 다음, 5 μL의 상기 항체 용액(2 mg/mL)을 32-게이지 주사기로 오른쪽 안구내로 주사하였다. 이산화탄소로 안락사 시킨 후, 30분, 6시간 또는 15시간 시점에 각각 사후주사 후 주사된 안구를 적출하였다. 적출된 안구를 즉시 4% 파라포름알데히드(PFA) 용액에 담그고 4℃에서 하룻밤 동안 방치하였다. 고정된 안구를 1 X PBS에 4℃ 조건하에 다음 실험 전까지 방치해 두었다. 안구내 주사된 항체의 사후 안구내 분포도를 관찰하기 위하여 이산화탄소로 안락사 시킨 후, 즉시 5 μL의 GAR555 (2mg/mL)를 주사하였다. 안구를 적출하였고, 4℃ 조건 하에 1 X PBS 중에 6시간 동안 방치하고, 그 후 이를 4℃ 조건 하에 4% PFA 용액으로 하룻밤 동안 고정하였다. 상기 언급한 바와 같이 다음 실험을 진행할 때까지 안구를 4℃ 조건 하에 1 X PBS 중에 저장하였다.

[0053]

(3) 망막 레이저 광응고 모델(retinal laser photocoagulation model)

[0054]

안구 내 주사된 항체의 레이저 광응고된 망막내 분포를 관찰하기 위하여, 레이저-광응고된 망막을 제조하였다. 실험동물을 전술한 바와 같이 마취하였다. 오른쪽 안구를 1% 트로피카마이드로 확장시켰다. 하이드록시프로필 메틸셀룰로오즈(Hydroxypropyl methylcellulose, DECA Pharmaceuticals, LLC, Bowling Green, KY)를 각 안구에 적용하고, 현미경 슬라이스 커버 글래스를 콘택트 렌즈로 사용하였다. 오른쪽 안구 각각의 경우, 망막혈관 사이에 루메니스 울티마 아르곤 레이저(Lumenis Ultima Argon Laser, Lumenis Inc., New York, NY)의 블루-그린 세팅을 사용하여 나인 레이저 (3×3 grid pattern)를 쪼였다. 레이저 파워는 180 mW로 하였고 0.1초간 50 μm 스팟 직경으로 하였다. 망막에서 출혈이 없는 것을 확인하였다. 2주 후, 5 μL의 GAR555 (2mg/mL)를 전술한 바와 같이 주사하였다. 4℃ 조건 하, 4% PFA 용액에 하룻밤 동안 즉시 고정하기 전에 1시간 또는 3시간 췌사후 주사 후 안구를 적출하였다. 고정된 안구를 다음 실험 전까지 4℃ 조건 하 1× PBS에 저장하였다. 공막 위의 시신경 및 결막 조직을 조심스럽게 제거하고 고정된 안구를 외과적 각막윤부(surgical limbus)에서 주변 절단(circumferential incision)법으로 열었다. 앞쪽 절편 및 수정체를 제거하고, 망막을 조심스럽게 공막 조직으로부터 분리해냈다. 망막을 7% 아가로즈 타입 XI 겔(Sigma, St. Louis, MO)에 넣고, 진동 블레이드 박편제작기(vibrating blade microtome, Leica, Bannockburn, IL)를 사용하여 100 μm-두께 슬라이스로 나누었다. 안구 절편을 하룻밤 동안 ICC 완충액(PBS containing 0.5% BSA, 0.2% Triton X-100, and 0.05% sodium azide, pH 7.4)으로 희석된 1:1000 DAPI 용액 중에서 배양하고, 그 후 ICC 완충액으로 3시간 동안 3회 세척하였다. 마지막으로 레이카 레이저 스캐닝 공초점 현미경으로 보기 전에 안구 절편을 마운팅 배지(Vectashield, Vector Laboratories, Inc., Burlingame, CA)에 넣고 현미경 커버 글래스 슬라이드 밑에 봉인하였다.

[0055]

(4) 랫트의 레이저-광응고된 망막에서의 FcRn 수용체의 발현

[0056]

하기 실험과정을 거쳐 레이저 광응고된 망막에서의 FcRn 수용체 레벨을 정상 망막에서의 레벨과 비교하였다. 실험동물의 각 안구에 20회의 레이저를 쪼였다. 이산화탄소를 사용하여 안락사시킨 실험동물로부터 적출된 안구로부터 즉시 망막 조직(각 그룹 n=4)을 조심스럽게 분리하였다. 망막조직으로부터 총 RNA를 분리 정제하였다 (Trizol + RNA 정제 키트, Invitrogen, 사용, 제조자 프로토콜에 따름). 2 μg의 총 RNA로부터 퍼스트-스트랜드 cDNA를 합성하였다 (RT-CR용 SuperScript III 퍼스트-스트랜드 합성 시스템 사용, Invitrogen, 제조자 프로토콜에 따름). 사용전에 수득된 퍼스트-스트랜드 cDNA를 -80℃에 보관하였다. cDNA의 부분표본을 하기 증폭 프라이머 5' - CTG TGG ATG AAG CAA CCT G-3' 및 5' -TCC ACG TTT GAC CTC TAG C-3' (Integrated DNA Technologies, Coralville, IA)를 사용하여 PCR 반응을 실시하였다.

[0057]

(4) FcRn 넉아웃 및 와일드 타입 마우스에 안구내 주사된 베바시주맙(bevacizumab)의 분포

[0058]

1 μL의 베바시주맙(25 mg/mL)을 FcRn 넉아웃 마우스(B6.129X1-Fcgrttm1Dcr/Dcr) 및 와일드-타입 마우스(C57BL/6J)에 주사하였다 (Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME)로부터 구입). 모든 실험동물을 무균조건시설 (specific pathogen-free facilities, SPF 시설)에서 사육하였다 (물 및 먹이는 자유롭게 공급). 주사후 5

시간 뒤 안구를 적출하고 즉시 4% PFA 용액에 고정하였다. 고정된 안구를 각막윤부에서 주변 절단(circumferential incision)을 통해 열었다. 안구의 안쪽 절편 및 수정체를 제거한 후, 망막을 조심스럽게 공막 조직으로부터 분리하였다. 망막을 7% 아가로즈 타입 XI 겔 (Sigma)에 넣고 진동 블레이드 절단제조기(Leica)를 사용하여 100 μ m-두께의 슬라이드로 잘랐다. 망막 중 베바시주맙 (재조합 인간화한 IgG1)을 알렉사 488 컨쥬게이트드 고우트 항-인간 IgG를 사용하여 검출하였다. 분리된 망막을 하룻밤 동안 ICC 완충액으로 희석된 1:1,000 DAPI 및 1:200 알렉사 488 컨쥬게이트드 고우트 항-휴먼 IgG 중에서 배양하였다. 그 후 망막을 3시간 동안 3회 ICC 완충액으로 세척하였다. 안구 절편을 마운팅 배지(Vectashield)에 넣고, 현미경 커버 글래스 슬라이드 밑에 봉인하였다. 안구 절편을 레이저 스캐닝 공초점 현미경으로 관찰하고, 망막 모세혈관을 가로질러 형광도를 영상 J를 사용하여 보았다(version 1.49 g; National Institutes of Health, Bethesda, MD). 마지막으로, 망막 모세혈관의 내강벽(abluminal) 쪽에서의 형광도값을 최대값으로 하여 보정하였다.

[0059] (5) 안구내 주사된 베바시주맙의 약동학 실험

[0060] 레이저를 쏘인 후 2주 후에, 랫트에 대하여 레이저 처리된 그룹 및 레이저 처리되지 않은 연령-매칭된 대조군 그룹을 전술한 바와 같은 동일한 마취법을 사용하여 마취하였다. 또한, 좌측 안구에 대하여 0.5% 프로파라카인 하이드로클로라이드(Alcon, Barrio Palmas, Puerto Rico) 1방울 및 2.5% 페닐에프린 하이드로클로라이드(Akron, Inc., Decatur, IL) 1방울로 각각 통각상실증(analgesia) 및 동공확대를 야기시켰다. 좌측 안구에 대하여 레이저 광응고된 실험동물의 망막내 CNV를 확인하기 위하여 메틸셀룰로오스 및 현미경 슬라이드 커버슬립을 사용하여 실험하였다. 레이저 광응고된 그룹과 레이저 미처리 대조군 그룹 모두, 좌측 망막에 대하여 슈퍼로템포럴 사분면(superotemporal quadrant)의 각막윤부 뒤 1 mm에 2 μ L의 베바시주맙이 25 mg/ml (50 μ g)용량으로 추후 리프하게 안구내 주사되었다(30게이지 주사기 사용, Hamilton, Reno, NV). 5시간 후 실험동물의 심장으로부터 혈액샘플을 채취하고, 이산화탄소를 사용하여 안락사시켰다. 혈청 샘플을 즉시 혈액 샘플로부터 모았다.

[0061] (6) 베바시주맙 효소-링크된 면역흡착 어세이

[0062] 혈청 샘플 중 베바시주맙의 농도를 ELISA(enzyme-linked immunosorbent assay)로 정량하였다. 모든 과정은 실온 하에서 수행하였다. 코팅 완충액(0.05 M carbonate-bicarbonate, pH 9.6)중에서 10 μ g/mL로 희석된 고우트 항-휴먼 IgG 친화성 정제된 항체(Bethyl Laboratories, Montgomery, TX)를 마이크로라이트2+고-결합성 96-웰 플레이트(Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA)에 코팅하였다. 1시간 동안 배양한 후, 각 웰을 200 μ L의 세척용액(50 mM Tris, 0.14 M NaCl, 및 0.05% Tween-20 함유, pH 8.0)으로 3회 세척하였다. 샘플을 200 μ L의 블라킹 용액(0 mM Tris, 0.14 M NaCl, 및 1% BSA 함유, pH 8.0)으로 30분 동안 블라킹하였다. 각 웰을 그 후 200 μ L의 세척용액으로 3회 세척하였다. 샘플을 샘플 희석액(50 mM Tris, 0.14 M NaCl, 1% BSA, 및 0.05% Tween-20, pH 8.0)중에서 1:100으로 희석하였다. 약 100 μ L의 희석된 샘플을 각 웰에 균등배분하고, 샘플을 1시간 동안 배양하였다. 배양 후, 각 웰을 200 μ L의 세척용액으로 5회 세척하였다. 그 다음, 마우스 IgG(eBioScience, San Diego, CA)에 대하여 최소 반응성을 가진 100 μ L의 비오틴-라벨링된 Fc 절편 특이적 고우트 항-휴먼 IgG를 전술한 샘플 희석액으로 20 μ g/mL로 희석하고, 각 웰에 첨가하였으며, 샘플을 세척 용액으로 세척하기 전에 1시간 동안 배양하였다. 그 후, 100 μ L 알렉사 플루오르 488 컨쥬게이트드 스트렙타비딘 (샘플 희석액으로 10 μ g/mL로 희석된 것)을 각 웰에 첨가하고, 샘플을 세척 용액으로 세척하기 전에 1시간 동안 배양하였다. 마지막으로, 100 μ g/mL의 PBS를 각 웰에 첨가한 후, 플레이트에 대하여 485nm에서의 여기, 525nm에서의 방출 정도를 측정하였다. 25mg/mL 베바시주맙(Genentech Inc., San Francisco, CA)을 순차적으로 희석하여 표준곡선을 얻었다. 각 희석된 혈청 샘플 중의 베바시주맙의 농도를 직선회귀법을 사용하여 표준곡선을 도출해냈다. 상기 희석된 샘플 중의 베바시주맙 농도는 그 후 혈청 중 오리지널, 희석되지 않은 베바시주맙 농도를 계산하는 데 사용하였다.

[0063] (7) 랫트에서 안구 내 주사된 베바시주맙 및 치킨 IgY의 약동학 실험

[0064] 랫트에 각각 5.7 mg/mL 용량의 베바시주맙 또는 5.7 mg/mL 용량의 치킨 IgY (Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc., West Grove, PA)를 안구내 주사하였다. 주사 후 5시간 뒤, 이산화탄소로 안락사시킨 실험 동물로부터 안구를 적출하고 즉시 4% PFA로 고정하였다. 그 다음 베바시주맙 또는 치킨 IgY-주사된 안구의 10 μ m-두께의 냉동절편을 전술한 바와 같이 제조하였다. 알렉사 염료 컨쥬게이트된 고우트 항-휴먼 IgG 또는 알렉

사 염료 컨쥬게이트된 고우트 항치킨 IgG를 사용하여 냉동 절편중 베바시주맵 또는 치킨 IgY의 분포를 각각 관찰하였다.

(8) 실험 결과

1) 랫트 망막에서의 안구내 투여된 전장(full-length) 항체의 분포

안구내 투여된 전장 항체의 경우, 레이저 광응고된 랫트 망막과 레이저 미처리된 랫트 망막 모두에서 내경계막(inner limiting membrane) 장벽을 통과하여 더 깊은 망막 구조내로 확산된 것으로 나타났다 (도 5A-C 참조). 레이저 미처리된 망막에서, 항체는 외경계막을 통과하지 못하였으나, 대신 외경계막을 따라 축적되는 것으로 나타났다 (도 5C 참조). 반면, 레이저 광응고된 망막에서는 망막하층 및 브루크막(Bruch's membrane) 부위 내로 항체가 망막을 쉽게 투과되는 것으로 나타났다 (도 5D-E 참조). 도 5는 정상 및 레이저-광응고된 망막에서 망막 모세혈관과 연관된 IgG의 출현을 증명해 준다. 도 6A, B는 전장 IgG 항체를 생존시 망막 및 사후시 망막에 안구내 주사한 경우 생존시 안구 및 사후시 안구에 각각 다르게 분포하는 것을 보여준다. 생존시 망막에 비해 사후시 망막에서 좀 더 많은 항체가 발견되었으며, 이는 생존시 망막에서 IgG가 보다 더 활발하게 제거되는 메커니즘을 갖고 있다는 것을 의미한다.

2) 레이저-광응고된 랫트 안구에서, 안구내 주사된 전장 IgG의 약동학

레이저-미처리된 연령-매칭된 대조군의 망막에 비하여 레이저-광응고된 망막에서 FcRn 수용체가 1.82배 업레귤레이션 된다는 점을 실시간 RT-PCR로 밝혔다 ($p < 0.05$) (도 7A 참조). 또한, (5시간 포스트 안구내 주사된) 베바시주맵의 혈청 중 농도는 대조군에서 279ng/mL, 레이저-광응고된 그룹에서 832ng/mL인 것으로 각각 나타났다($p < 0.05$; 도 7B 참조). 따라서, 망막의 레이저-광응고로 인하여 FcRn 발현이 업레귤레이션됨을 알 수 있고, 안구로부터 IgG가 전신순환계로 더욱 급속히 제거된다는 것을 의미한다.

3) FcRn 너아웃 및 와일드-타입 마우스 그룹에서 안구내 투여된 전장 IgG의 분포

도 8은 안구내 투여된 베바시주맵, 전장 IgG의 망막 혈관 주사부위에서의 분포를 나타낸다. 흥미롭게도, FcRn 너아웃 마우스의 경우 베바시주맵은 오직 망막 혈관의 에브루미널(루멘에서 먼 부위) 쪽에서 발견되었다 (도 8A 참조). 그러나, 와일드-타입 마우스의 망막에서는 베바시주맵이 에브루미널 뿐만 아니라 망막 혈관의 루멘에서도 발견되었다 (도 8B 참조). 또한, 와일드 타입 마우스의 망막 혈관의 혈관내피세포 내에서도 발견되었다. 도 8C는 망막 내피층을 가로질러, 보정된 형광도 프로파일 변화도를 보여주며, 베바시주맵이 망막 혈관내피층을 통과하여 와일드-타입 마우스의 순환계로 이행하였음을 증명해준다.

4) 랫트 안구에 안구내 주사된 베바시주맵(IgG) 및 치킨 IgY의 약동학

도 9는 IgG 및 치킨 IgY(구조적으로 IgG와 유사하나 FcRn 수용체와 결합하지 않음)의 망막내 분포를 비교한 것이다. 안구내 투여된 베바시주맵(IgG) 및 치킨 IgY는 모두 내경계막 장벽을 통과하여 더 깊은 망막 구조내로 확산된다 (도 9A, D 참조). 도 9E는 망막 베바시주맵이 혈액-망막 장벽을 통과하여 확산된 후 전신순환계로 누수됨을 증명하며, 따라서 왜 베바시주맵이 맥락막 맥관구조(choroidal vasculature)내에서 발견되는지를 설명해준다(도 9F 참조). 망막내 치킨 IgY는 오직 혈액-망막 장벽의 에브루미널 쪽을 따라 국소화된다 (도 9B 참조). 또한 맥락막의 혈관은 치킨 IgY의 존재에 대해 음성이다 (도 9C 참조).

5) 실험결과 종합

망막을 통한 항체약의 배출경로에서 FcRn (신생아 Fc 수용체)가 발현됨을 증명하였다. 즉, 망막을 통한 항체약의 배출은 FcRn (신생아 Fc 수용체)에 기인한다는 것을 규명하였다(Kim H, Robinson SB, Csaky KG, FcRn (신생아 Fc 수용체)-mediated pharmacokinetics of therapeutic IgG in the eye, Mol Vis. 2009Dec;15:2803-2812 참조). 또한, 트라베큘러 및 쉘렘스 캐널(Trabecular and Schlemm's canal)에서 다른 Fc 수용체는 발현되지 않는 반면, FcRn (신생아 Fc 수용체)는 상당한 정도로 발현되고 있음을 규명하였다. 세 번째 배출 경로인 홍

채와 모양체에서의 FcRn (신생아 Fc 수용체) 발현과 항체약의 배출 경로가 일치한다는 것을 규명하였다.

[0076] 실험예 4. 아바스틴 (250 ug/ml)과 아바스틴 (250 ug/ml) 및 Fc-III 혼합제의 비교

[0077] (1) Fc-III 용액의 제조

[0078] 100 uL의 증류수를 10 mg 넣고(6.53×10^{-6} mole), Fc-III의 최종 농도가 6.53×10^{-8} mole/uL이 되도록 하였다.

[0079] (2) 아바스틴의 제조(250 uL/ml)

[0080] 10 uL의 아바스틴 (25 mg/ml)을 990 uL의 증류수에 넣었다.

[0081] (3) 아바스틴 및 Fc-III 혼합제의 제조

[0082] 5 uL 의 Fc-III 용액을 100 uL의 아바스틴(250 ug/ml)에 넣었다.

[0083] (4) 대조군 아바스틴의 제조

[0084] 5 uL의 증류수를 100 uL의 아바스틴(250 ug/ml)에 넣었다.

[0085] (5) 동물실험

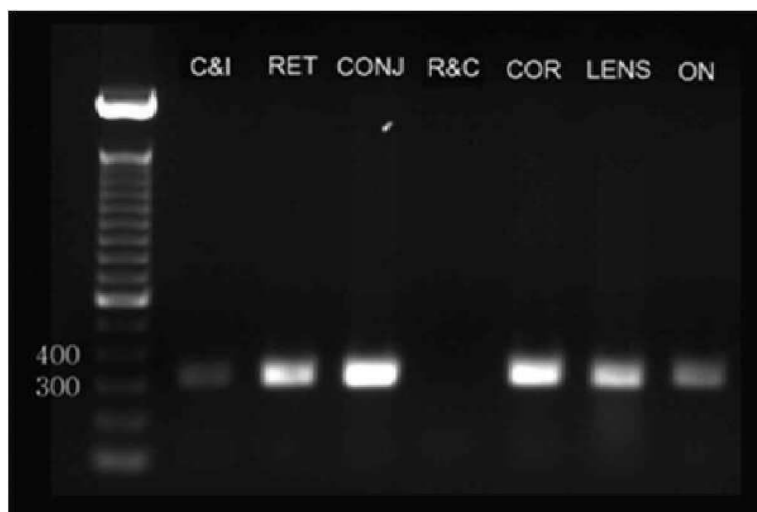
[0086] 2uL의 두가지 의약품을 세 마리 쥐의 눈의 유리체강 내에 주입하였다. (각 그룹별) 주입 후 6시간이 경과한 후에 눈을 적출하여 아바스틴의 농도를 ELISA 기법을 이용하여 분석하였다.

[0087] (6) 실험결과

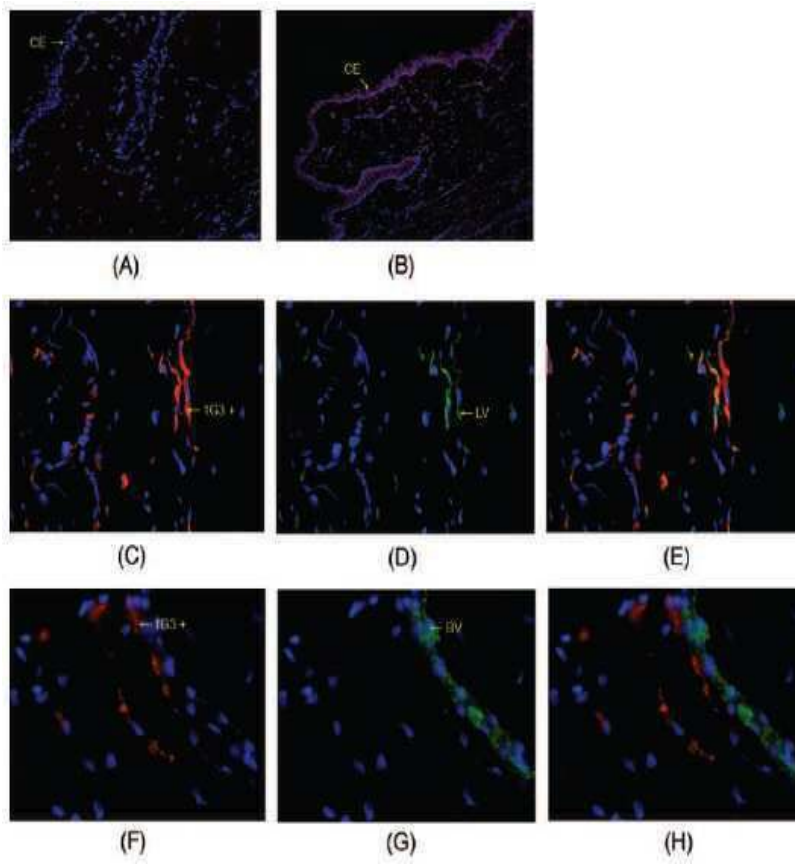
[0088] 이 실험에서 Fc-III을 함께 주입함으로써 기존의 아바스틴 약제의 약동학을 향상시킬 수 있다는 것을 규명하였다(도 10 참조).

도면

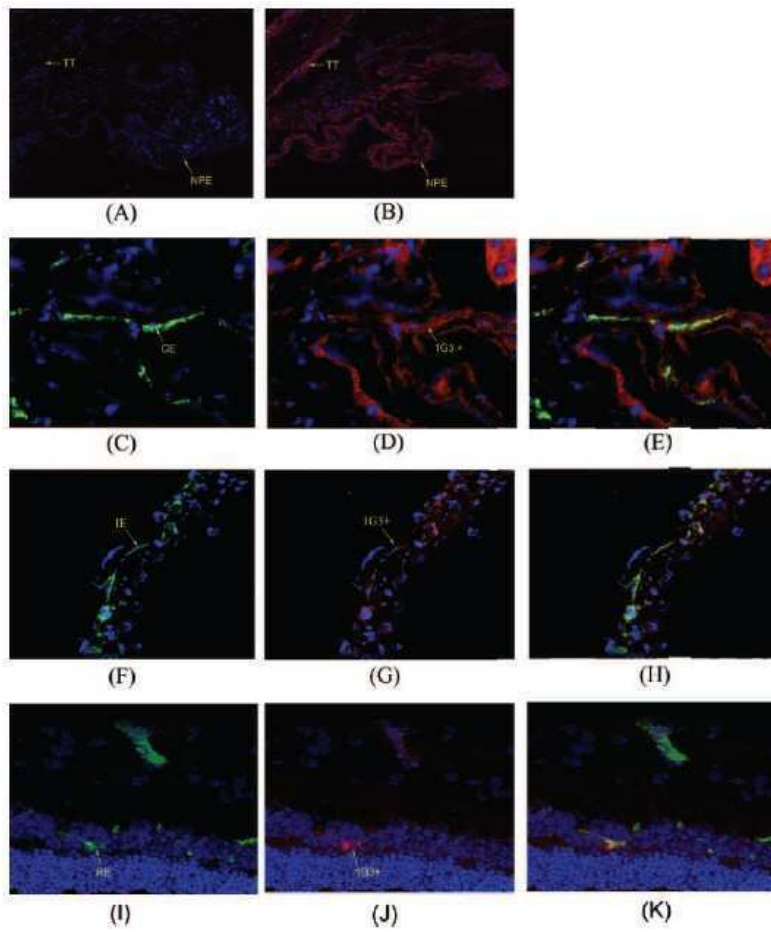
도면1



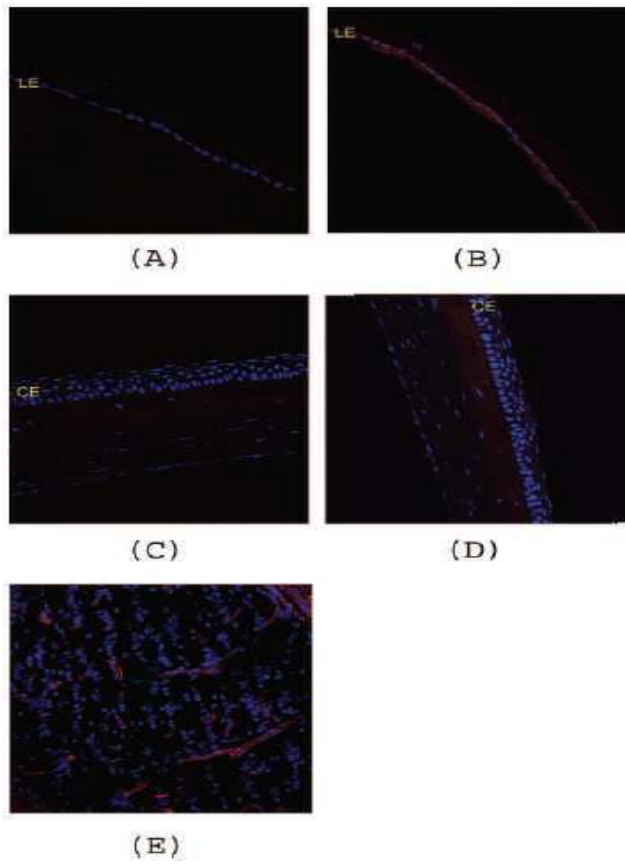
도면2



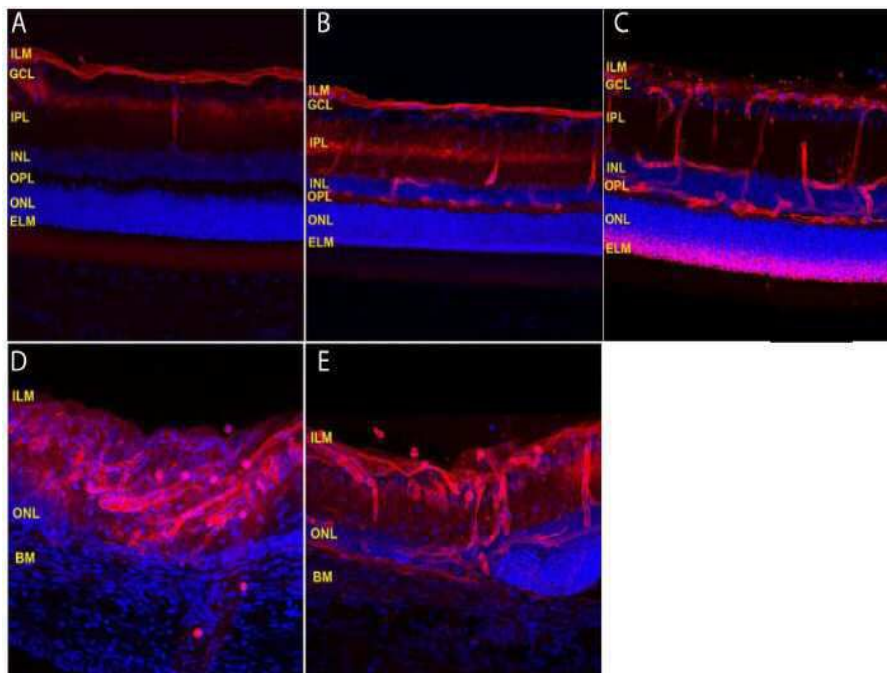
도면3



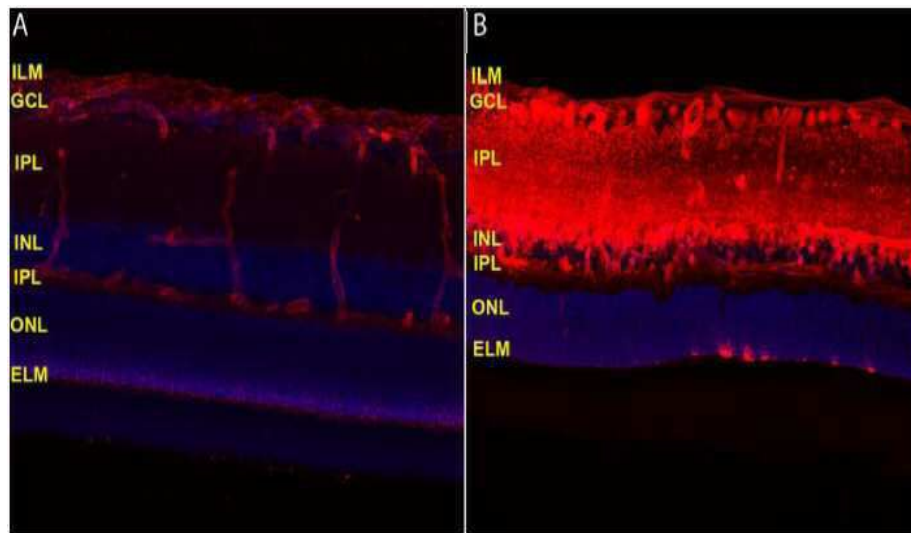
도면4



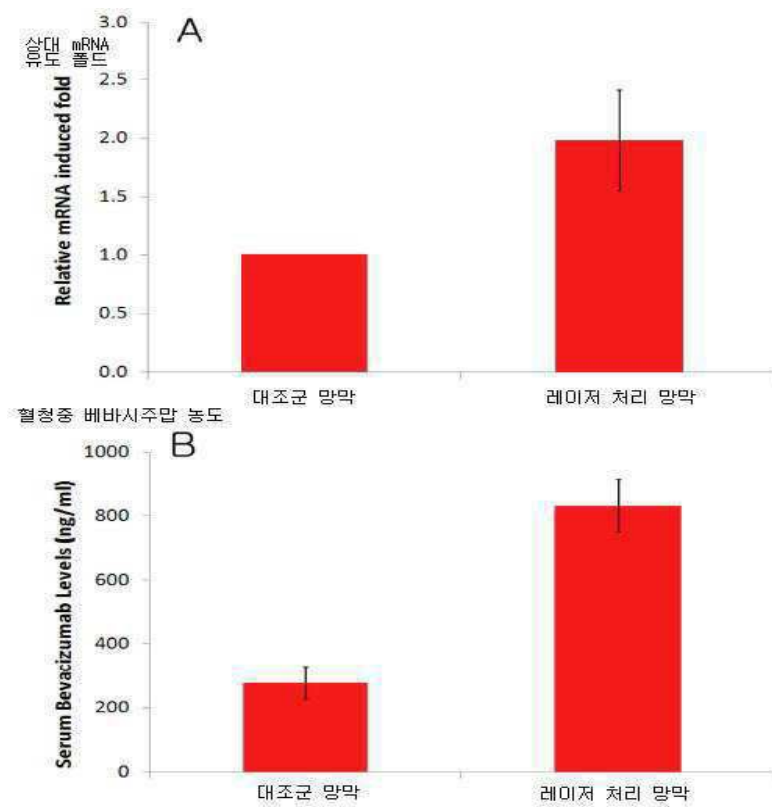
도면5



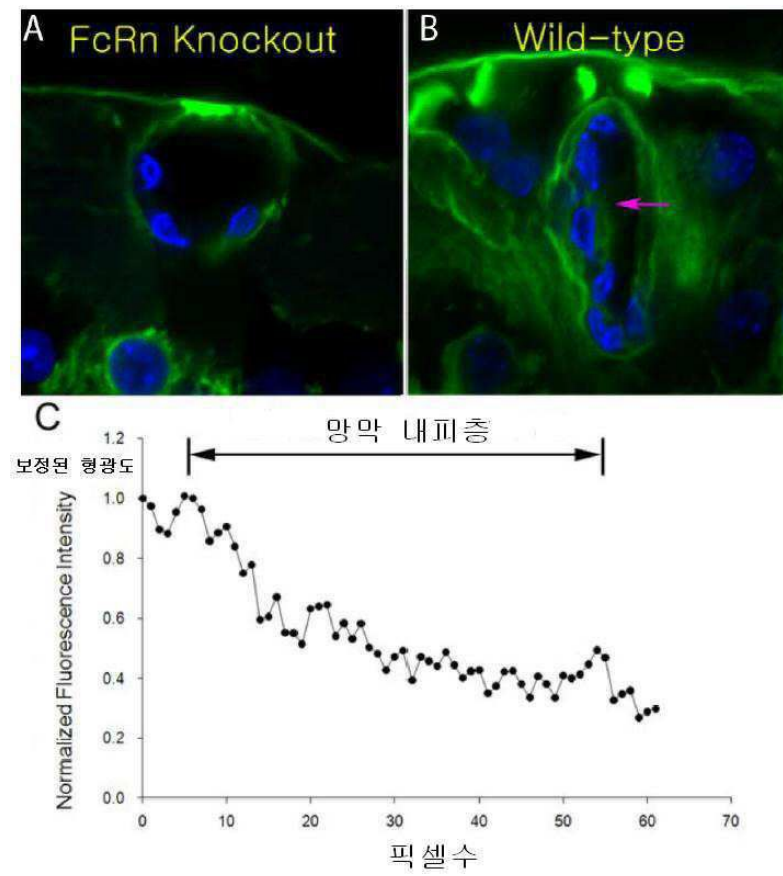
도면6



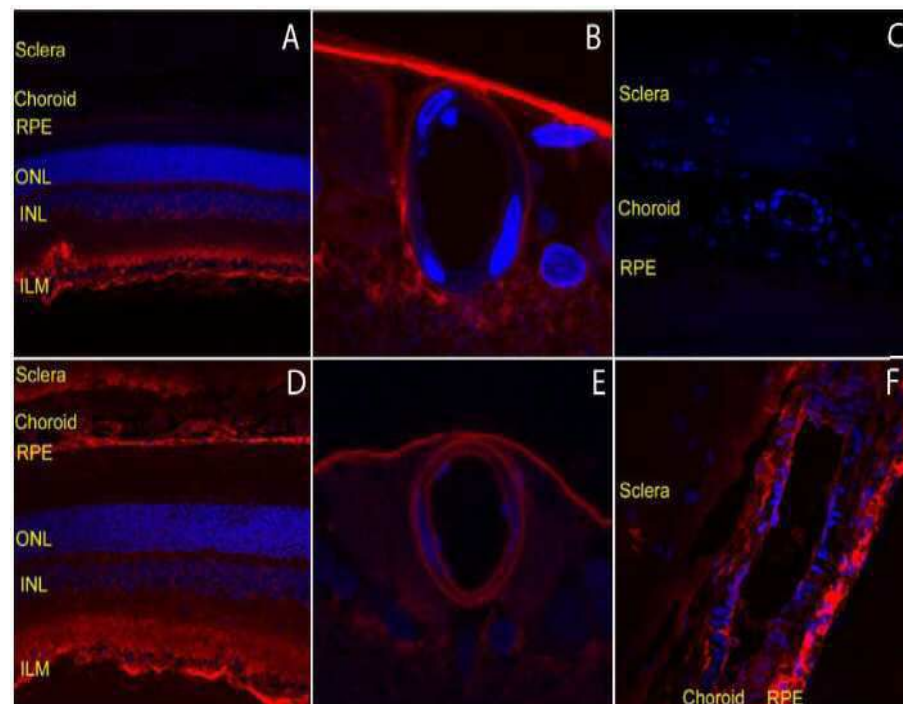
도면7



도면8



도면9



도면10

