



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2020-0044909
(43) 공개일자 2020년04월29일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 47/54 (2017.01) A61K 38/08 (2019.01)
A61K 38/31 (2006.01) A61K 38/38 (2006.01)
C07K 14/655 (2006.01) C07K 14/76 (2006.01)
C07K 7/06 (2006.01)
- (52) CPC특허분류
A61K 47/542 (2017.08)
A61K 38/08 (2019.01)
- (21) 출원번호 10-2020-7008776
- (22) 출원일자(국제) 2020년09월19일
심사청구일자 2020년03월26일
- (85) 번역문제출일자 2020년03월26일
- (86) 국제출원번호 PCT/CN2018/106515
- (87) 국제공개번호 WO 2019/057087
국제공개일자 2019년03월28일
- (30) 우선권주장
PCT/CN2017/102242 2017년09월19일 중국(CN)

- (71) 출원인
임문위크 아이엔씨
중국 타이완 타이페이 시티 115 난강 디스트릭트
파크 스트리트 넘버3 18층
- (72) 발명자
추 싱-마오
중국 타이완 115 타이페이 시티 난강 디스트릭트
파크 스트리트 넘버3 18층
린 치엔-젠
중국 타이완 115 타이페이 시티 난강 디스트릭트
파크 스트리트 넘버3 18층
창 츠-웬
중국 타이완 115 타이페이 시티 난강 디스트릭트
아카데미아 로드 섹션2 라인98 엘리21 넘버2 13층
- (74) 대리인
김경희

전체 청구항 수 : 총 15 항

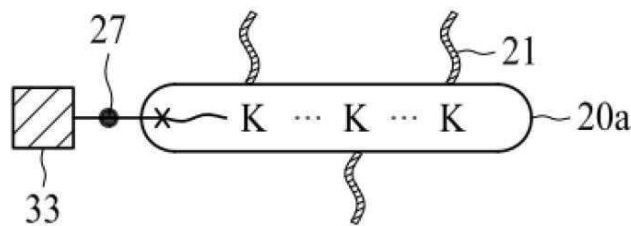
(54) 발명의 명칭 알부민과의 결합 친화성이 증대된 약학 구조물

(57) 요약

본 개시는 다수의 지방산 및 기능성 요소를 갖는 다양한 분자 구조물을 제공한다. 이러한 분자 구조물을 사용하여 다양한 질환을 치료하는 방법이 또한 개시된다.

대표도 - 도3a

30A



3A

(52) CPC특허분류

A61K 38/31 (2013.01)

A61K 38/38 (2013.01)

C07K 14/655 (2013.01)

C07K 14/76 (2013.01)

C07K 7/06 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

중심 코어 및 2 내지 5개의 제1 요소를 포함하는 링커 유닛으로서,

여기에서 각각의 제1 요소는 독립적으로 C₈₋₂₈ 지방산 유도체 또는 C₈₋₂₈ 이산 지방산 유도체이고,

중심 코어는

ε-아미노기가 하나의 제1 요소로 아실화된 2 내지 5개의 라이신 (K) 잔기;

임의로, 하나 이상의 필러 - 여기서, 임의의 두 K 잔기는 서로 인접하거나 필러에 의해 분리됨;

임의로, 제1 K 잔기의 N-말단에 연결된 N-말단 스페이서 또는 마지막 K 잔기의 C-말단에 연결된 C-말단 스페이서인 말단 스페이서 - 각각의 필러 및 말단 스페이서는 독립적으로 (1) 1 내지 12개의 비-K 아미노산 잔기, 또는 (2) 1 내지 12개의 에틸렌 글리콜 (EG) 유닛 반복체를 갖는 폐쇄화된 아미노산을 포함함; 및

아미드 결합을 형성함으로써 말단 K 잔기, 또는 말단 스페이서가 존재하는 경우 말단 스페이서의 말단 아미노산 잔기에 연결되며 아지드, 알킨, 테트라진, 사이클로옥텐 및 사이클로옥틴기로부터 선택된 접합 모이어티를 포함하는;

링커 유닛.

청구항 2

제1항에 있어서, 지방산 유도체가 옥탄산, 펠라르곤산, 데칸산, 운데칸산, 라우르산, 트리데칸산, 미리스트산, 펜타데칸산, 팔미트산, 마가르산, 스테아르산, 노나데칸산, 아라키드산, 헤네이코산산, 베헨산, 트리코사노산, 리그노세르산, 팔미톨레산, 올레산, 리놀레산, 리시놀레산, 박센산, 에이코사펜타엔산 (EPA), 도코사헥사엔산 (DHA)으로부터 유도된 것인, 링커 유닛.

청구항 3

제2항에 있어서, 지방산이 미리스트산 또는 팔미트산으로부터 유도된 것인, 링커 유닛.

청구항 4

제1항에 있어서, 이산 지방산 유도체가 수베르산, 아젤라인산, 세바신산, 운데칸디오산, 도데칸디오산, 브라실산, 테트라데칸디오산, 펜타데칸디오산, 탐신산, 헵타데칸디오산 또는 옥타데칸디오산으로부터 유도된 것인, 링커 유닛.

청구항 5

제4항에 있어서, 유도된 이산 지방산이 테트라데칸디오산 또는 탐신산으로부터 유도 가능한 것인, 링커 유닛.

청구항 6

제1항에 있어서, 지방산 유도체 또는 이산 지방산 유도체가 글루타메이트 잔기로 변형된 것인, 링커 유닛.

청구항 7

제1항에 있어서, 구리 촉매화 아지드-알킨 사이클로부가 (CuAAC) 반응, 변형 촉진 아지드-알킨 클릭 화학 (SPAAC) 반응, 또는 역 전자 요구 딜스-알더 (iEDDA) 반응을 통해 접합기에 연결된 제2 요소를 추가로 포함하는 링커 유닛.

청구항 8

제7항에 있어서, 제2 요소가 인슐린, 인슐린 유사 성장 인자, 글루카곤 유사 펩티드-1 작용제, 소마토스타틴 및

소마토스타틴 유사체, 칼시토닌, 성장 호르몬, 에리트로포이에틴, 성선 자극 호르몬 방출 인자, 과립구 집락 자극 인자, 아데노신 데아미나제, 아르기닌 데아미나제, 아스파라기나제, 인터페론- α , 인터페론- β , 가용성 TNF- α 수용체, 가용성 IL-1 수용체, 가용성 EGF 수용체, 아갈시다제 β , 아갈시다제 α , 라로니다제, 이더설펜제, 알글루코시다제 α , 및 갈설펜제, 또는 이들의 유도체 또는 변형체로 이루어진 군으로부터 선택된 것인, 링커 유닛.

청구항 9

제8항에 있어서, 소마토스타틴 유사체가 옥트레오티드인 것인, 링커 유닛.

청구항 10

제7항에 있어서, 제2 요소가 다수의 약물 분자를 포함하는 약물 번들인 것인, 링커 유닛.

청구항 11

제1항에 있어서, 사이클로옥텐기가 노보르넨 또는 트랜스-사이클로옥텐 (TCO)이고; 사이클로옥텐기는 디벤조사이클로옥텐 (DBCO 또는 DIBO), 이불소화 사이클로옥텐 (DIFO), 비사이클로노닌 (BCN) 또는 디벤조아자사이클로옥텐 (DIBAC)인 것인, 링커 유닛.

청구항 12

제1항에 있어서, 테트라진기가 1,2,3,4-테트라진, 1,2,3,5-테트라진 또는 1,2,4,5-테트라진 또는 이의 유도체인 것인, 링커 유닛.

청구항 13

제1항에 있어서, 아지드기가 피콜릴 아지드인 것인, 링커 유닛.

청구항 14

제1항에 있어서, 중심 코어가 N-말단 스페이서 및 C-말단 스페이서를 모두 포함하고,
 N-말단 스페이서의 접합기가 아지드, 알킨 또는 사이클로옥텐기인 경우, C-말단 스페이서의 접합기는 테트라진 또는 사이클로옥텐기이거나; 또는
 N-말단 스페이서의 접합기가 테트라진 또는 사이클로옥텐기인 경우, C-말단 스페이서의 접합기는 아지드, 알킨 또는 사이클로옥텐기인 것인,
 링커 유닛.

청구항 15

제14항에 있어서, 제2 요소 및 제3 요소를 추가로 포함하고, 여기서
 제2 요소는 CuAAC 반응 또는 SPAAC 반응을 통해 N-말단 스페이서의 접합기에 연결되고, 제3 요소는 iEDDA 반응을 통해 C-말단 스페이서의 접합기에 연결되거나; 또는
 제2 요소는 iEDDA 반응을 통해 N-말단 스페이서의 접합기에 연결되고, 제3 요소는 CuAAC 반응 또는 SPAAC 반응을 통해 C-말단 스페이서의 접합기에 연결된,
 링커 유닛.

발명의 설명

기술 분야

1. 발명의 분야

본 발명은 신규한 약학 구조물, 구체적으로, 2 이상의 지방산 또는 이산 지방산 분자로 개질됨으로써 알부민에 대한 결합 친화성이 증가되고 혈청 수명이 향상된 약학 구조물에 관한 것이다.

[0001]

[0002]

배경 기술

- [0003] 2. 관련 기술의 설명
- [0004] 다중 기능을 갖는 약제의 개발은 수요가 높은 연구 분야가 되었다. 예를 들어, 국제 특허 공개 제W02016112870 (A1)호에 개시된 바와 같은 다중-팔 링커 유닛 및 이의 관련 응용은 2 이상의 기능성 부분을 갖는 분자의 구성을 위한 주요 화학 물질을 나타낸다. 그러나, W02016112870 공개에서는 클릭 화학 반응을 위해 테트라진, 사이클로옥텐 및 사이클로옥틴과 같은 삽입 작용기를 가지는 아미노산을 이용하는데; 이들 아미노산은 고상 펩티드 합성 동안 펩티드 코어에 혼입하는 것이 가능하지 않다. 또한, W02016112870 공개에 따르면, 테트라진, 사이클로옥텐 또는 사이클로옥틴기를 가지는 커플링 팔은 시스테인 잔기의 티올기와 하나의 말단에 말레이미드기를, 다른 말단에 테트라진, 사이클로옥텐 또는 사이클로옥틴기를 포함하는 이중기능성 링커의 말레이미드기와의 반응을 통해 삽입된다. 티올과 말레이미드 반응의 생성물은 불안정하고, 인접한 티올기 함유 분자와의 가역 반응 또는 교환 반응을 거쳐 저장시에 접합 링커의 안정성에 영향을 줄 수 있는 것으로 알려져 있다. 또한, W02016112870 공개에 교시된 바와 같이, 펩티드 코어가 시스테인 잔기를 함유하는 경우, 펩티드 코어상의 티올기와 반응할 수 있는 작용기를 가지는 연결 팔의 연속적인 고상 합성 (펩티드의 분기)을 수행하는 것은 불가능하다. 또한, 펩티드 코어의 N-말단에 있는 알파-아미노기는 추가적인 차단 단계를 필요로 하여 펩티드 코어 또는 링커 유닛의 수율 및 순도를 감소시킨다.
- [0005] 더욱이, 특정 임상 조건에서 약물의 반감기를 연장시켜 약물의 덜 빈번한 투여를 요하고 혈액에서 약물 농도의 변동성이 작아 비용 감소와 약물에 대한 준수성 증대로 이어지는 것이 바람직하다.
- [0006] 약물의 반감기를 증가시키기 위해 몇가지 방법론이 사용되어 왔다. 이는 다른 화학적 모이어티와의 특별한 조합 또는 접합에 의지하지 않고 펩티드 또는 단백질 약물 분자의 아미노산 잔기 돌연변이와 같은 구조적 변경에 의해 달성될 수 있다. 예를 들어, 프로테아제에 대한 감수성을 감소시키고 등전점을 변화시키며 지질 용해도를 증가시키기 위해 아미노산을 치환시키는 것은 특정 약물의 반감기를 증가시킬 수 있다. 유전자 변형된 조직 플라즈미노겐 활성화제인 테베크플라제는 여러 부위-특이적 돌연변이를 가지며 플라즈미노겐 활성화제 억제제에 내성이 있어 야생형 액티바제 (activase)보다 반감기가 길다. 글리신 대체된 아스파라긴 잔기를 갖고 중성 pH에서 용해도가 감소된 인간 인슐린 (인슐린 글라르긴)의 시판 형태는 환자에게 피하 주사되는 경우 응집된다. 응집된 인슐린은 서서히 용해되어 혈액 순환으로 확산되고 따라서 일반 (야생형) 인슐린보다 더 긴 반감기를 달성한다.
- [0007] 일부 약물은 폴리락티드-코-글리콜라이드와 같은 매트릭스-형성 물질과 혼합되거나, 리포솜 또는 다른 유형의 미세구/나노입자로 패키징된다. 제형화된 약물이 환자에게 투여되는 경우, 이들은 서방형 동역학을 달성한다. 탁술 및 독소루비신과 같은 몇몇 화학요법 약물, 및 소마토스타틴 유사체, (옥토레오티드 아세테이트) 및 성선 자극 호르몬 방출 호르몬 유사체 (류프로렐린)와 같은 호르몬은 장기간의 서방출을 위한 저장소로서 미세구로 제형화된다.
- [0008] 인터페론- α , 인터페론- β , 에리스로포이에틴, 인간 성장 호르몬, 과립구 콜로니 자극 인자, 아데노신 데아미나제 및 아스파라기나제와 같은 많은 단백질 약물은 약동학적 활성 및 안정성을 향상시키고 면역원성을 감소시키기 위해 폴리에틸렌 글리콜 (PEG)로 변형된다. 변형을 위해 PEG를 사용할 때의 한 가지 단점은 접합 산물의 이질성이다. 장쇄 PEG가 또한 단백질 분자를 감싸서 단백질 약물의 활성을 억제할 수 있다. 장쇄 PEG는 또한 내분해성이고 환자에 축적된다.
- [0009] 단백질 약물의 약동학적 특성을 개선시키는 다른 방법론은 단백질을 IgG의 Fc 부분의 CH2-CH3 도메인과 융합시키는 것이다. 단백질 약물 및 CH2-CH3 세그먼트는 인접 재조합 펩티드로서 발현되고, 여기서 두 펩티드가 이량체 구조를 형성한다. 세포 독성 T-세포 단백질 4 (CTLA-4)에 대한 벨라타셉트, 종양 괴사 인자- α (TNF- α)에 대한 에타너셉트, 혈관 내피 성장 인자 (VEGF)에 대한 아플리버셉트 및 인터루킨 1 (IL-1)에 대한 릴로나셉트와 같은 몇몇 사이토카인 및 세포 표면 단백질의 수용체의 Fc 융합 단백질이 개발되어 임상적으로 광범위하게 사용되고 있다. 많은 사이토카인 및 사이토카인 수용체는 1일 미만의 혈청 반감기를 갖는다. IgG의 Fc와의 접합은 반감기를 1주일 이상 연장할 수 있다.
- [0010] 알부민과의 융합은 펩티드 또는 단백질 치료제의 반감기를 연장시키는 또 다른 길을 제공한다. 알부민은 혈액 순환에서 반감기가 19일이다. 알부민은 단일 폴리펩티드 단백질이기 때문에, 펩티드 또는 단백질을 갖는 알부민 융합 단백질은 재조합 펩티드로서 생성될 수 있다. 예를 들어, 알비글루타이드는 디펩티데일 펩티데제-4-저항성 글루카곤-유사 펩티드 1 (GLP-1) 이량체를 갖는 알부민 융합 단백질로서, 제2형 당뇨병의 치료 용도로 승인되었다. 알비글루타이드는 1-2시간의 표준 GLP-1과 비교하여 4-7일의 혈청 반감기를 갖는다. 이텔비운은 응고 인

자 IX를 갖는 알부민 융합 단백질이다. 혈우병 B를 가진 아동 및 성인에서 출혈 에피소드를 통제하고 예방하기 위해 14일에 한 번씩 투여될 수 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0011] 그럼에도 불구하고, 치료 약물의 혈청 반감기를 증가시키기 위한 통상적인 수단은 상당히 유연하지는 않다. 즉, 이들은 종종 상이한 약동학적 프로파일을 필요로 하는 약물에 대한 적응성이 부족하다. 따라서, 약동학적 특성이 개선되거나 조절 가능한 약물의 추구는 중요한 연구 개발 방향으로 남아 있다.

과제의 해결 수단

[0012] **요약**

[0013] 제1 측면에서, 본 개시는 치료 약물의 혈청 반감기를 증가시키기 위한 링커 유닛과 관련된 플랫폼 기술에 관한 것이다. 특히, 링커 유닛은 클릭 반응을 통해 치료 약물과 (단독으로 또는 약물 번들 형태로) 접합될 수 있는 2 이상의 지방산 유도체 또는 이산 지방산 유도체를 포함한다. 이러한 방식으로, 링커 유닛의 지방산 쇠는 단일 인간 혈청 알부민 (HSA)의 상이한 소수성 공동 또는 상이한 HAS의 소수성 공동에 적합화되어, 링커 유닛과 HSA (들) 사이 (따라서, 전체적으로 링커 유닛-약물 접합체)의 결합 강도를 증가시킬 수 있다. 또한, 본 플랫폼 기술을 사용함으로써, 지방산 쇠의 수 및 2개의 지방산 쇠 사이의 거리를 쉽게 조절할 수 있다. 이렇게, 지방산 쇠의 길이 및 수와 두 지방산 쇠 사이의 거리를 변화시킴으로써 필요하거나 원하는 바에 따라 치료 약물의 약동학적 프로파일을 변경할 수 있다.

[0014] 본 개시의 특정 실시양태에 따라, 링커 유닛은 중심 코어 및 2 내지 5개의 제1 요소를 포함한다. 본 개시의 실시양태에 따라, 중심 코어는,

[0015] (1) 2 내지 5개의 라이신 (K) 잔기;

[0016] (2) 임의로, 하나 이상의 필러 (여기서, 임의의 두 K 잔기는 서로 인접하거나 필러에 의해 분리됨);

[0017] (3) 임의로, 제1 K 잔기의 N-말단에 연결된 N-말단 스페이서 또는 마지막 K 잔기의 C-말단에 연결된 C-말단 스페이서인 말단 스페이서; 및

[0018] (4) 아미드 결합을 형성함으로써 말단 K 잔기, 또는 말단 스페이서가 존재하는 경우에 말단 스페이서의 말단 아미노산 잔기에 연결되고 아지드, 알킨, 테트라진, 사이클로옥텐 및 사이클로옥틴기로 이루어진 군으로부터 선택되는 접합 모이어티를 포함한다.

[0019] 일반적으로, 코어에는 2, 3, 4 또는 5개의 K 잔기가 존재한다. 다양한 실시양태에서, 임의의 두 K 잔기는 서로 인접해 있거나 (즉, 사이에 필러가 없다), 필러에 의해 분리된다. 다수의 필러가 존재하는 경우, 각 필러의 조성은 서로 상이할 수 있다.

[0020] 구조적으로, 복수의 필러 및 말단 스페이서는 각각 독립적으로 (i) K 잔기 이외의 아미노산 잔기로부터 독립적으로 선택된 1 내지 12개의 아미노산 잔기, 또는 (ii) 1 내지 12개의 에틸렌 글리콜 (EG) 유닛 반복체를 가지는 폐쇄화 아미노산을 포함한다. 일부 예시적인 실시양태에 따라, 필러 또는 말단 스페이서는 하나 이상의 글리신 (G) 및/또는 세린 (S) 잔기를 포함할 수 있다. 일부 예에서, 필러 또는 말단 스페이서는 2 내지 10개의 아미노산 잔기; 바람직하게는 2 내지 5개의 아미노산 잔기로 이루어진다. 일부 실시양태에서, 필러 또는 말단 스페이서는 2 내지 5개의 EG 반복체를 포함한다.

[0021] 본 개시의 일부 실시양태에 따라, 코어는 N-말단으로부터 시작하는 제1 연결 아미노산 잔기의 N-말단에 연결된 N-말단 스페이서를 포함한다. 추가적으로 또는 대안적으로, 코어는 N-말단으로부터 시작하는 마지막 연결 아미노산 잔기의 C-말단에 연결된 C-말단 스페이서를 포함한다.

[0022] 본 개시의 일부 임의적인 실시양태에 따라, 링커 유닛은 2개의 접합 모이어티 (예컨대, 제1 접합 모이어티 및 제2 접합 모이어티)를 포함한다.

[0023] 일부 임의적인 실시양태에서, 접합 모이어티는 말단 아미노산 잔기 (즉, 제1 연결 아미노산 잔기 또는 N-말단 스페이서의 N-말단 아미노산 잔기)의 α-아미노기 (-NH₂) 또는 말단 아미노산 잔기의 카복실기 (-COOH) (즉, 마지막 연결 아미노산 잔기 또는 C-말단 스페이서의 C-말단 아미노산 잔기)와 공유결합을 형성하여 접합 모이어티

가 이에 연결되도록 할 수 있는 작용기를 가질 수 있다. 특정 실시양태에서, 코어는 N- 및 C-말단 스페이서 중 하나만을 가질 수 있고, 두 말단 아미노산 잔기 (말단 연결 아미노산 잔기 또는 말단 스페이서의 말단 아미노산 잔기일 수 있음)에 각각 연결된 제1 및 제2 접합 모이어티를 모두 갖는다. 코어가 N-말단 및 C-말단 스페이서 둘 다를 포함하고, 두 접합 모이어티가 각각 두 말단 스페이서의 말단 아미노산 잔기에 연결된 실시양태도 있다. 바람직한 실시양태에서, 접합 모이어티와 말단 아미노산 잔기 사이에 형성된 공유결합은 아미드 결합이다. 이해될 수 있는 바와 같이, 생성된 링커 유닛의 균질성을 보장하기 위해, 하나의 접합 모이어티만이 α -아미노기 또는 카복실기와 반응할 수 있는 하나의 작용기를 가지는 것이 중요하다.

[0024] 두 접합기를 선택할 때, 두 접합기가 클릭 화학 반응을 거치지 않을 수 있는 것이 바람직하다. 일부 실시양태에 따라, 제1 접합기가 아지드, 알킨 또는 사이클로옥텐기인 경우, 제2 접합기는 두 접합기 사이의 반응을 피하기 위해 아지드, 알킨 또는 사이클로옥텐기 중 어느 것도 될 수 없으며; 대신 연결기는 테트라진 또는 사이클로옥텐기일 수 있다. 일부 다른 실시양태에서, 제1 접합기가 테트라진 또는 사이클로옥텐기인 경우, 제2 접합기는 테트라진 또는 사이클로옥텐기일 수 없으며; 대신에, 제2 접합기는 아지드, 알킨 또는 사이클로옥텐기일 수 있다. 이해될 수 있는 바와 같이, 두 접합 모이어티가 단일 종의 기능성 요소와 접합되도록 의도된 상황에서, 두 접합 모이어티의 접합기는 동일할 수 있거나, 동일한 클릭 화학 반응을 거칠 수 있다.

[0025] 제1 요소는 각각 독립적으로 C_{8-28} 지방산 유도체 또는 C_{8-28} 이산 지방산 유도체이고, K 잔기의 ϵ -아미노산기를 통해 K 잔기 중 하나와 연결된다. 본 개시의 다양한 실시양태에 따라, 제1 요소는 옥탄산, 펠라르곤산, 데칸산, 운데칸산, 라우르산, 트리데칸산, 미리스트산, 펜타데칸산, 팔미트산, 마가르산, 스테아르산, 노나데칸산, 아라키드산, 헤네이코산산, 베헨산, 트리코사노산, 리그노세르산, 팔미톨레산, 올레산, 리놀레산, 리시놀레산 또는 박센산, 에이코사펜타엔산 (EPA), 도코사헥사엔산 (DHA)으로부터 유도된 지방산 유도체이다. 본 개시의 특정 실시양태에 따라, 제1 요소는 수베르산, 아젤라인산, 세바신산, 운데칸디오산, 도데칸디오산, 브라실산, 테트라데칸디오산, 펜타데칸디오산, 탐신산, 헵타데칸디오산 또는 옥타데칸디오산으로부터 유도된 이산 지방산 유도체이다. 일부 실시양태에서, 본 발명의 제1 요소는 미리스트산 또는 팔미트산으로부터 유도된다. 다른 실시양태에서, 본 발명의 제1 요소는 테트라데칸디오산 또는 탐신산으로부터 유도된다.

[0026] 특정 실시양태에서, 지방산 (또는 이산 지방산) 유도체는 화학적으로 변형된 지방산 분자 (또는 이산 지방산)이다. 예를 들어, 지방산 분자의 카복실기 (또는 이산 지방산 분자의 카복실기 중 하나)는 2개의 작용기를 가지는 화학 모이어티와 반응하며, 여기서 하나의 작용기는 카복실 반응성이고 (따라서, (이산) 지방산 분자와 공유결합을 형성함), 반면에 다른 하나는 라이신 잔기의 측쇄 아미노기와 반응성인 작용기이다. 본 개시의 임의적인 실시양태에 따라, (이산) 지방산 분자를 변형시키는 화학 물질은 글루타메이트 잔기, 아스파테이트 잔기, 아미노-EG2-산, 감마-아미노부티르산 등이나; 본 발명은 이에 한정되지 않는다.

[0027] 본 개시의 실시양태에 따라, 코어와 연결된 2 이상의 제1 요소는 동일하거나 상이할 수 있다. 이해될 수 있는 바와 같이, 펩티드 코어의 고상 합성 동안, 코어 합성 후 제1 요소를 코어에 부착시키는 대신에, 특정 제1 요소로 변형된 K 아미노산 잔기를 펩티드 쇠에 도입시키는 것도 가능하다. 따라서, 다양한 실시양태에 따라, 상이한 제1 요소로 변형된 K 잔기가 고상 합성 동안 순차적으로 첨가되어 균질한 링커 유닛의 배치를 제공할 수 있으며, 여기서 각각의 링커 유닛은 그에 연결된 2 이상의 상이한 제1 요소를 가질 수 있다.

[0028] 본 개시의 일부 실시양태에 따라, 본 링커 유닛은 구리 촉매화 아지드-알킨 사이클로부가 (CuAAC) 반응, 변형 촉진 아지드-알킨 클릭 화학 (SPAAC) 반응, 또는 역 전자 요구 디스-알더 (iEDDA) 반응을 통해 접합기에 연결된 제2 요소를 추가로 포함한다. 제2 요소는 질환 또는 상태의 치료에 치료적 이점을 제공하는 임의의 분자일 수 있다. 바람직하게는, 제2 요소는 펩티드 기반 약물, 예를 들어 인슐린, 인슐린 유사 성장 인자, 글루카곤 유사 펩티드-1 작용제, 소마토스타틴 및 소마토스타틴 유사체, 칼시토닌, 성장 호르몬, 에리스로포이에틴, 성선 자극 호르몬 방출 인자, 과립구 집락 자극 인자, 아데노신 데아미나제, 아스파라기나제, 인터페론- α , 인터페론- β , TNF- α 수용체, IL-1 수용체, EGF 수용체, 아갈시다제 β , 아갈시다제 α , 라로니다제, 이더설과제, 알글루코시다제 α , 및 갈설과제, 또는 이들의 유도체 또는 변형체이다.

[0029] 이해될 수 있는 바와 같이, 제2 분자는 접합기에 대응하는 반응성 기를 갖도록 변형될 수 있어서, 제2 요소는 코어의 접합기와 연결된다. 일부 실시양태에서, 펩티드 기반 약물은 단 하나의 라이신 또는 하나의 비쌍 시스템인 잔기를 가질 수 있으며, 이러한 라이신 또는 시스템인 잔기는 펩티드 기반 약물의 생물학적 활성 또는 치료 기능에 중요하지 않다; 이러한 경우에, 라이신 또는 비쌍 시스템인 잔기는 반응성 기로 변형된다. 예를 들어, 반응성 기를 갖는 화학 잔기는 라이신 잔기의 ϵ -아미노기 또는 시스템인 잔기의 SH 기와 반응한다. 일부 실시양태에서, 반응성 기를 갖는 화학적 모이어티는 이작용성 가교제일 수 있고, 이의 말단에 있는 작용기는 ϵ -아

미노기 또는 SH 기와 반응성이고, 다른 말단에는 반응성 기가 있다. 또한, 라이신 또는 시스테인 잔기가 없는 펩티드 기반 약물의 경우, 단백질의 생물학적 활성에 필요하지 않은 단백질 분자 표면상의 용매 접근성 잔기가 라이신 또는 시스테인 잔기로 돌연변이화될 수 있다. 특정 실시양태에서, 펩티드 기반 약물은 약물의 생물학적 활성에 중요한 라이신 또는 시스테인 잔기를 가질 수 있거나, 펩티드 기반 약물은 복수의 라이신 잔기 또는 다수의 쌍을 이룬 시스테인 잔기를 가질 수 있다. 이 경우, 단백질의 생물학적 활성에 필요하지 않은 단백질 분자 표면상의 용매 접근성 잔기는 시스테인 잔기로 돌연변이화될 수 있다. 다른 예로서, 펩티드 기반 약물의 N-말단 아미노산 잔기의 알파-아미노기는 반응성 기로 변형될 수 있으며; 이러한 예는 고상 합성을 사용하여 제조된 펩티드에 특히 적합하다. 이해될 수 있는 바와 같이, 상기 언급된 전략은 코어의 접합기와 클릭 반응을 거칠 수 있는 반응성 기를 갖도록 펩티드 기반 약물을 변형시키기 위한 예시적인 예일 뿐이며, 본 발명은 이에 제한되지 않는다.

[0030] 일부 임의적인 실시양태에서, 제2 요소는 복수의 제2 요소를 포함하는 약물 번들 형태로 존재할 수 있다. 예를 들어, 약물 번들은 국제 특허 출원 공개 제WO 2016/112870호; WO 2016/184426호, WO 2017/036255호 및 WO 2017/036407호에 기재된 구조를 가질 수 있으며, 이들 공개 전체는 본원에 참고로 인용된다. 대안적으로, 약물 번들은 제1 요소 (즉, 지방산 또는 이산 지방산 유도체)가 상기 식별된 제2 요소로 대체되는 것을 제외하고는 본 개시의 링커 유닛의 구조와 유사한 구조를 포함할 수 있다. 간단히 말해서, 약물 번들은 제2 코어, 제2 접합 모이어티, 다수의 임의적인 제2 연결 팔, 하나 이상의 임의적인 필러, 및 1 또는 2개의 임의적인 말단 스페이서를 포함하고, 제2 요소는 제2 코어에서의 라이신 잔기의 측쇄 아미노기 또는 제2 연결 팔을 통해 코어에 연결된다.

[0031] 바람직하게는, 링커 유닛이 2개의 접합기 (즉, 제1 및 제2 접합기)를 포함하는 경우, 접합기 중 하나는 아지드, 피콜릴 아지드, 알킨 또는 사이클로옥텐기이고, 다른 접합기는 테트라진 또는 사이클로옥텐기이다.

[0032] 임의로, 링커 유닛은 접합기 (즉, 제1 및 제2 접합기)에 각각 연결된 제2 및 제3 요소를 더 포함할 수 있으며, 여기서 제2 요소는 CuAAC 반응, SPAAC 반응 또는 iEDDA 반응을 통해 제1 접합기에 연결되고; 제3 요소는 CuAAC 반응, SPAAC 반응 또는 iEDDA 반응을 통해 제2 접합기와 연결되는데, 이때 반응은 제2 요소와 제1 접합기 간의 반응과 상이하다.

[0033] 일반적으로, 사이클로옥텐기는 노보르넨 또는 트랜스-사이클로옥텐 (TCO)이고; 사이클로옥텐기는 디벤조사이클로옥텐 (DBCO 또는 DIBO), 이불소화 사이클로옥텐 (DIFO), 비사이클로노닌 (BCN) 또는 디벤조아자사이클로옥텐 (DIBAC)이다. 테트라진은 1,2,3,4-테트라진, 1,2,3,5-테트라진 또는 1,2,4,5-테트라진 또는 이의 유도체이다. 아지드기는 피콜릴 아지드 또는 $-N_3$ 기일 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0034] 본원 설명은 아래에서 간략하게 논의되는 첨부 도면을 참조하여 다음의 상세한 설명을 읽음으로써 더 잘 이해될 것이다.

도 1A 내지 1H는 본 개시의 특정 실시양태에 따른 중심 코어를 도시한 개략도이다.

도 2A 내지 2C는 본 개시의 특정 실시양태에 따른 링커 유닛을 도시한 개략도이다.

도 3A 내지 3C는 본 개시의 일부 실시양태에 따른 T-E 링커 유닛을 도시한 개략도이다.

도 4A 및 4B는 각각 본 개시의 일례에 따른, 아지드-함유 GLP-1 작용제의 역상 분석 HPLC 프로파일 및 MALDI-TOF 결과를 나타낸다.

도 5는 본 개시의 일례에 따른, 2개의 팔미토일 쇠를 가지는 알킨-함유 링커 유닛의 MALDI-TOF 결과를 나타낸다.

도 6A 및 6B는 각각 본 개시의 일례에 따른, 3개의 소마토스타틴 유사체와 접합된 DBCO-함유 다중-팔 링커 유닛의 역상 분석 HPLC 프로파일 및 MALDI-TOF 결과를 나타낸다.

도 7은 본 개시의 일례에 따른, 2개의 팔미틸 쇠를 가지는 알킨-함유 링커 유닛의 MALDI-TOF 분석을 나타낸다.

도 8A 및 도 8B는 각각 본 개시의 일례에 따른, GLP-1-A1a⁸-EG₄-2FA-C16 작용제의 역상 분석 HPLC 프로파일 및 MALDI-TOF 결과를 나타낸다.

도 9A 및 도 9B는 각각 본 개시의 일례에 따른, GLP-1-A1a⁸-EG₄-2E-2FA-C16의 역상 분석 HPLC 프로파일 및 MALDI-TOF 결과를 나타낸다.

도 10A 및 도 10B는 각각 본 개시의 일례에 따른, GLP-1-Aib⁸-EG₄-2E-2FA-C16 작용제의 역상 분석 HPLC 프로파일 및 MALDI-TOF를 나타낸다.

도 11A 및 도 11B는 각각 본 개시의 일례에 따른, GLP-1-Aib⁸-EG₄-2E-2FA-C16-산 작용제의 역상 분석 HPLC 프로파일 및 MALDI-TOF를 나타낸다.

도 12A 및 도 12B는 각각 본 개시의 일례에 따른, GLP-1-Aib⁸-EG₂-2E-2FA-C16-산 작용제의 역상 분석 HPLC 프로파일 및 MALDI-TOF를 나타낸다.

도 13A 및 도 13B는 각각 본 개시의 일례에 따른, GLP-1-Aib⁸-EG₂-2E-2FA-C18-산 작용제의 역상 분석 HPLC 프로파일 및 MALDI-TOF를 나타낸다.

도 14는 본 개시의 일례에 따른, GLP-1 수용체에 대한 2FA-GLP-1 작용제의 결합 친화도를 도시한 ELISA 분석의 결과이며, 여기서 GLP-1R-IgG.Fc 융합 단백질은 아지드-함유 GLP-1 작용제 (GLP-1-아지드), 2FA-GLP-1 작용제 (2FA-GLP-1), 리라글루타이드 및 대조 펩티드 (P1-P2 펩티드, GLAGGSAQSQRAPDRVLCHSGQQGLPRAAGGSVPHPR, 서열 번호 3)를 1 또는 10 µg/ml의 최종 농도로 첨가한 후 마이크로타이터 플레이트 상에 코팅된다.

도 15는 본 개시의 일례에 따른, 인간 혈청 알부민 (HSA)에 대한 2FA-GLP-1 작용제의 결합 친화도를 나타내는 ELISA 분석의 결과이며, 여기서 HSA는 아지드-함유 GLP-1 작용제 (GLP-1-아지드), 리라글루타이드, 2FA-GLP-1 작용제 (2FA-GLP-1) 및 알킨-함유 2FA (알킨-2FA)를 첨가한 후 마이크로타이터 플레이트 상에 코팅된다.

도 16A 및 16B는 각각 투석 평형 분석을 사용한 2FA-GLP-1 작용제의 HSA에 대한 결합 친화도와, HSA에 결합된 2FA-GLP-1 작용제 및 리라글루타이드의 백분율을 도시한다.

도 17은 본 개시의 일례에 따른, 합성된 GLP-1 유사체와 함께 인큐베이션된 INS-1 세포의 cAMP 측정을 나타낸다.

도 18A 및 18B는 본 개시의 일례에 따른, INS-1 세포에서 활성화된 카스파 제-3의 발현에 대한 합성된 GLP-1 유사체의 억제 분석 결과를 보여준다.

도 19는 본 개시의 일례에 따른, 합성된 GLP-1 유사체와 함께 인큐베이션된 INS-1 세포의 증식 분석 결과를 보여준다.

일반적인 관례에 따라, 다양한 설명된 특징/요소는 비율대로 도시된 것이 아니라 본 발명과 관련된 특정 특징/요소를 가장 잘 설명하기 위해 도시되었다. 또한, 가능하다면 다양한 도면에서의 유사한 참조 번호 및 명칭은 유사한 요소/부분을 나타내기 위해 사용된다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

설명

- [0035] **설명**
- [0036] 첨부된 도면과 관련하여 아래에 제공되는 상세한 설명은 본 실시예의 설명으로서 의도된 것이며 본 실시예가 구성되거나 이용될 수 있는 유일한 형태를 나타내도록 의도된 것은 아니다. 본 설명은 실시예의 기능과 실시예를 구성하고 동작시키기 위한 단계들의 과정을 설명한다. 그러나, 동일하거나 동등한 기능 및 순서가 다른 실시예로 달성될 수도 있다.
- [0037] 편의상, 명세서, 실시예 및 첨부된 청구범위에 사용된 특정 용어를 여기에 모아 놓았다. 본원에서 달리 정의되지 않는 한, 본 개시에 사용된 과학 및 기술 용어는 당업자가 일반적으로 이해하고 사용하는 의미를 가진 것이다.
- [0038] 문맥상 달리 요구되지 않는 한, 단수 용어는 동일한 의미의 복수 형태를 포함하고 복수 용어는 단수를 포함하는 것이 이해될 것이다. 구체적으로, 본원 및 청구범위에 사용된 단수 형태는 문맥상 명백하게 다르게 지시되지 않는 한 복수 참조를 포함한다. 또한, 본원 및 청구범위에 사용된 용어 "적어도 하나" 및 "하나 이상"은 동일한

의미를 가지며, 1, 2, 3 또는 그 이상을 포함한다. 또한, 본 명세서 및 청구범위 전반에 걸쳐 사용되는 어구 "A, B 및 C 중 적어도 하나", "A, B 또는 C 중 적어도 하나" 및 "A, B 및/또는 C 중 적어도 하나"는 A 단독, B 단독, C 단독, A 및 B 함께, B 및 C 함께, A 및 C 함께 뿐만 아니라 A, B 및 C를 함께 포함하도록 의도된다.

[0039] 본 발명의 넓은 범위를 나타내는 수치 범위 및 파라미터는 근사치이지만, 특정 실시양태에서 제시된 수치는 가능한 정확하게 보고되었다. 그러나, 임의의 수치값은 필히 각각의 시험 측정에서 발견된 표준 편차에 기인하는 특정 오차를 포함한다. 또한, 본원에 사용된 용어 "약"은 일반적으로 주어진 값 또는 범위의 10%, 5%, 1% 또는 0.5% 이내를 의미한다. 대안적으로, 용어 "약"은 당업자에 의해 고려될 때 평균의 허용 가능한 표준 오차 내를 의미한다. 작동/작업 실시예에서 제외하고, 또는 달리 명시적으로 언급되지 않는 한, 본 명세서에 개시된 모든 수치 범위, 양, 값 및 백분율, 예컨대 물질의 양, 지속 시간, 온도, 작동 조건, 양의 비율 등은 모든 경우에 "약"이라는 용어에 의해 수식된 것으로 이해되어야 한다. 따라서, 달리 지시되지 않는 한, 본 개시 및 첨부된 청구범위에 제시된 수치 파라미터는 필요에 따라 변할 수 있는 근사치이다. 적어도, 각각의 수치 파라미터는 보고된 유효 자릿수의 수에 비추어, 그리고 통상적인 반올림 기술을 적용하여 해석되어야 한다. 본원에서 범위는 하나의 중점에서 다른 중점까지, 또는 두 중점 사이로 표현될 수 있다. 달리 명시되지 않는 한, 본원에 개시된 모든 범위는 중점을 포함한다.

[0040] 본 개시는 일반적으로 링커 유닛에 관한 것으로, 여기서 각각의 링커 유닛은 치료 약물의 혈청 반감기를 증가시키거나 변경할 수 있는 2 내지 5개의 소수성쇄 (지방산 번들)을 포함한다. 링커 유닛은 또한 이펙터 요소 또는 다수의 이펙터 요소를 포함하는 약물 번들을 포함한다. 이펙터 요소 또는 약물 번들은 클릭 반응을 통해 지방산 번들과 연결된다. 링커 유닛은 또한 링커 유닛을 대상체 내의 질환 부위로 또는 주변으로 안내할 수 있는 표적화 요소를 포함할 수 있다.

[0041] 본원에 사용된 용어 "표적화 요소"는 관심 표적 (예를 들어, 세포 표면상의 수용체 또는 조직 내 단백질)에 직접 또는 간접적으로 결합하여 본 링커 유닛의 관심있는 표적 내로의 수송을 용이하게 하는 링커 유닛의 일부를 지칭한다. 일부 예에서, 표적화 요소는 링커 유닛을 표적 세포에 근접하게 향하도록 할 수 있다. 다른 경우에, 표적화 요소는 표적 세포 표면 상에 존재하는 분자 또는 세포 표면 상에 존재하는 분자에 특이적으로 결합하는 제2 분자에 특이적으로 결합한다. 일부 경우에, 표적화 요소는 관심있는 표적에 결합하면 본 링커 유닛과 함께 내재화될 수 있으며, 따라서 표적 세포의 시토플라زم으로 이동된다. 표적화 요소는 세포 표면 수용체에 대한 항체 또는 리간드일 수 있거나, 또는 이러한 항체 또는 리간드에 결합하여 본 링커 유닛을 표적 부위 (예를 들어, 선택된 세포의 표면)에 간접적으로 표적화하는 분자일 수 있다. 질환 부위에서 이펙터 (치료제)의 국소화는 표적화 기능이 없는 치료제와 비교하여 본 링커 유닛으로 향상되거나 선호될 것이다. 국소화는 정도 또는 상대적인 비율의 문제이다; 이펙터가 질환 부위에 절대적이거나 완전히 국소화되는 것은 아니라는 것이다.

[0042] 본 발명에 따라, 용어 "이펙터 요소"는 일단 링커 유닛이 이의 표적 부위로 지정되면 생물학적 활성 (예를 들어, 면역 활성을 유도 또는 억제하거나, 세포 독성 효과를 발휘하거나, 효소를 억제하는 등) 또는 기타 기능적 활성 (예를 들어, 면역 세포 또는 다른 합텐 태그 치료 분자 동원)을 유발하는 링커 유닛의 일부를 지칭한다. "효과"는 치료적 또는 진단적일 수 있다. 이펙터 요소는 세포 및/또는 세포 외 면역조절 인자에 결합하는 것을 포함한다. 이펙터 요소는 단백질, 핵산, 지질, 탄수화물, 글리코펩티드, 약물 모이어티 (소분자 약물 및 생물 제제 둘 다), 화합물, 요소 및 동위 요소, 및 이들의 단편과 같은 작용제를 포함한다.

[0043] 본원에서 제1, 제2, 제3 등의 용어가 다양한 요소, 구성 요소, 영역 및/또는 섹션을 설명하기 위해 사용될 수 있지만, 이들 요소 (및 구성 요소, 영역 및/또는 섹션)는 이들 용어로 제한되지 않는다. 또한, 그러한 서수의 사용은 문맥상 명확하게 표시되지 않는 한 과정이나 순서를 의미하지는 않는다. 대신, 이 용어들은 단순히 하나의 요소를 다른 요소와 구별하기 위해 사용된다. 따라서, 이하에서 논의되는 제1 요소는 예시적인 실시예의 교시를 벗어나지 않으면서 제2 구성 요소로 지칭될 수 있다.

[0044] 여기서, 용어 "연결", "커플링" 및 "접합"은 두 구성 요소 사이의 직접 연결 또는 간접 연결을 통해 두 구성 요소를 연결하는 임의의 수단을 상호호환적으로 지칭한다.

[0045] 본원에서 사용된 용어 "폴리펩티드"는 적어도 2개의 아미노산 잔기를 갖는 중합체를 지칭한다. 전형적으로, 폴리펩티드는 길이가 2 내지 약 200 잔기; 바람직하게는 2 내지 50 잔기 범위의 아미노산 잔기를 포함한다. 본원에서 아미노산 서열이 제공되는 경우, 서열의 L-, D- 또는 베타 아미노산 버전이 또한 고려된다. 폴리펩티드는 또한 자연 발생 아미노산 중합체뿐만 아니라 하나 이상의 아미노산 잔기가 상응하는 자연 발생 아미노산의 인공 화학 유사체인 아미노산 중합체를 포함한다. 또한, 상기 용어는 펩티드 결합 또는 다른 "변형된 결합"에 의해 연결된 아미노산에 적용되며, 예를 들어 여기서 펩티드 결합은 α -에스테르, β -에스테르, 티오아미드, 포스포

르아미드, 카보메이트, 하이드록실레이트 등으로 대체된다. 본 개시에서, 용어 "펩티드-기반 치료제" 또는 "펩티드-기반 약물"은 치료 효과를 갖는 임의의 분자를 포함하는 넓은 의미로 사용되고 주로 면역글로불린, 항체, 항체 단편, 효소, 성장 인자, 수용체, 사이토카인 등과 같은 아미노산 잔기들을 포함한다.

[0046] 특정 실시양태에서, 본원에 기재된 임의의 서열을 포함하는 아미노산의 보존적 치환이 고려된다. 다양한 실시양태에서, 1, 2, 3, 4 또는 5개의 상이한 잔기가 치환된다. 용어 "보존적 치환"은 분자의 활성 (예를 들어, 생물학적 또는 기능적 활성 및/또는 특이성)을 실질적으로 변경시키지 않는 아미노산 치환을 반영하기 위해 사용된다. 전형적으로, 보존적 아미노산 치환은 하나의 아미노산을 유사한 화학적 특성 (예를 들어, 전하 또는 소수성)을 갖는 다른 아미노산으로 치환하는 것을 포함한다. 특정 보존적 치환은 표준 아미노산이 모 잔기와 최소로 상이한 비표준 (예를 들어, 희귀, 합성 등) 아미노산으로 대체되는 "유사 치환"을 포함한다. 아미노산 유사체는 모체의 구조에 대한 충분한 변화없이 표준 아미노산으로부터 합성적으로 유도되거나, 이성체이거나, 대사물 전구체인 것으로 간주된다. 본 출원에서는 아미노산 잔기로서, (1) 측쇄에 NH₂기를 함유하는 라이신, (2) 측쇄에 SH기를 함유하는 시스테인, (3) 측쇄에 OH기를 함유하는 세린 및 트레오닌, 및 (4) 측쇄에 CO₂H기를 함유하는 아스파르트산 및 글루탐산이 4개의 상이한 아미노산기로 간주된다. 이들 4개의 아미노산기는 각각 측쇄에 다양한 화학 성분과의 접합에 적용될 수 있는 특유의 화학기를 함유한다. 측쇄에 동일한 작용기를 함유하는 비천연 아미노산이 유사한 목적으로 치환될 수 있다. 아스파르트산 또는 글루탐산 잔기의 CO₂H기가 요소의 NH₂기와 아미드 결합 형성 반응을 거칠 수 있다는 것을 밝혀낸 것이 중요하다. 이러한 반응 화학은 라이신 잔기의 NH₂기와 CO₂H기를 갖는 요소 사이의 아미드 결합 형성과 유사하다. 따라서, 중심 코어에서 라이신 잔기 대신에 아스파르트산 또는 글루탐산 잔기가 사용될 수 있고, 제1 요소의 접합은 아미드 결합 형성을 위해 동일한 반응 화학을 사용할 수 있다.

[0047] 특정 실시양태에서, 본원에 기재된 임의의 서열과 적어도 80%, 바람직하게는 적어도 85% 또는 90%, 더욱 바람직하게는 적어도 95% 또는 98%의 서열 동일성을 포함하는 폴리펩티드가 또한 고려된다.

[0048] 본원에서 확인된 폴리펩티드 서열에 대한 "백분율 (%)의 아미노산 서열 동일성"은 필요에 따라 최대 서열 동일성 퍼센트를 달성하기 위해 서열 정렬 및 갭 도입 후, 서열 동일성의 일부로서 보존적 치환을 고려하지 않은 특정 폴리펩티드 서열의 아미노산 잔기와 동일한 후보 서열에서의 폴리펩티드 잔기의 백분율로 정의된다. 백분율 서열 동일성을 결정하기 위한 정렬은 예를 들어 BLAST, BLAST-2, ALIGN 또는 Megalign (DNASTAR) 소프트웨어와 같은 공개적으로 이용 가능한 컴퓨터 소프트웨어를 사용하여 당업자에 의해 다양한 방식으로 달성될 수 있다. 당업자는 비교되는 서열의 전장에 걸쳐 최대 정렬을 달성하는데 필요한 임의의 알고리즘을 포함하여 정렬을 측정하기 위한 적절한 파라미터를 결정할 수 있다. 본원의 목적을 위해, 2개의 폴리펩티드 서열 사이의 서열 비교는 NBI (National Center for Biotechnology Information)에 의해 온라인으로 제공되는 컴퓨터 프로그램 Blastp (단백질-단백질 BLAST)에 의해 수행되었다. 주어진 폴리펩티드 서열 A 대 주어진 폴리펩티드 서열 B의 아미노산 서열 동일성 백분율 (선택적으로, 주어진 폴리펩티드 서열 B에 대해 특정% 아미노산 서열 동일성을 갖는 주어진 폴리펩티드 서열 A로 표현될 수 있음)은 다음과 같은 공식으로 계산될 수 있다:

$$\frac{X}{Y} \times 100\%$$

[0049] 식중, X는 프로그램의 A 및 B 정렬에서 서열 정렬 프로그램 BLAST에 의해 동일한 일치로 기록된 아미노산 잔기의 수이고, Y는 A 또는 B에서 더 짧은 아미노산 잔기의 총 수이다.

[0051] 본원에 사용된 용어 "폐길화된 아미노산"은 하나의 아미노기 및 하나의 카복실기를 갖는 폴리에틸렌 글리콜 (PEG) 쇄를 지칭한다. 일반적으로, 폐길화된 아미노산은 NH₂-(CH₂CH₂O)_n-CO₂H의 화학식을 갖는다. 본 개시에서, n의 값은 1 내지 20의 범위이고; 바람직하게는 2 내지 12의 범위이다.

[0052] 본원에 사용된 폴리펩티드에 대한 용어 "말단"은 폴리펩티드의 N-말단 또는 C-말단에서의 아미노산 잔기를 지칭한다. 중합체와 관련하여, 용어 "말단"은 중합체 골격의 말단에 위치한 중합체의 구성 유닛 (예를 들어, 본 개시의 폴리에틸렌 글리콜)를 지칭한다. 본 명세서 및 청구범위에서, 용어 "자유 말단"은 말단 아미노산 잔기 또는 구성 유닛이 임의의 다른 분자에 화학적으로 결합되지 않음을 의미하기 위해 사용된다.

[0053] 본원에 사용된 용어 "치료"는 방지 (예를 들어, 예방), 치유 또는 완화적 치료를 포함하고; 본원에 사용된 "치료하는 것"은 또한 방지 (예를 들어, 예방), 치유 또는 완화적 치료를 포함한다. 특히, 본원에 사용된 용어 "치

료하는 것"은 의학적 상태를 가지거나 의학적 상태와 관련된 증상, 의학적 상태에 이차적인 질환 또는 장애, 또는 의학적 상태에 대한 소인을 가지는 대상체에게 상기 특정 질환, 장애 및/또는 상태의 하나 이상의 증상 또는 특징을 부분적으로 또는 완전히 경감, 개선, 완화, 발병 지연, 진행 억제, 중증도 감소 및/또는 발생률을 감소 시킬 목적으로 본 링커 유닛 또는 이를 포함하는 약학 조성물을 적용 또는 투여하는 것을 포함하는, 본 링커 유닛 또는 이를 포함하는 약학 조성물의 적용 또는 투여를 지칭한다. 치료제는 질환, 장애 및/또는 상태의 징후를 나타내지 않는 대상체 및/또는 질환, 장애 및/또는 상태의 초기 징후만을 나타내는 대상체에게 질환, 장애 및/또는 상태와 관련된 병태의 발생 위험을 낮출 목적으로 투여될 수 있다.

[0054] 본원에 사용된 용어 "유효량"은 원하는 치료 반응을 산출하기에 충분한 본 링커 유닛의 양을 지칭한다. 유효량의 약제는 질환 또는 상태를 치유하는데 필요하지 않지만, 질환 또는 상태의 발병이 지연, 방해 또는 예방되거나 질환 또는 상태 증상이 개선되도록 질환 또는 상태에 대한 치료를 제공할 것이다. 유효량은 지정된 기간 동안 1회, 2회 또는 그 이상 투여되도록 적합한 형태로 1, 2 또는 그 이상의 용량으로 분할될 수 있다. 특정 유효량 또는 충분량은 치료되는 특정 상태, 환자의 신체 상태 (예를 들어, 환자의 체질량, 연령 또는 성별), 치료되는 대상체의 타입, 치료 기간, 동반 요법의 특성 (존재하는 경우), 사용된 특정 체형 및 화합물 또는 그 유도체의 구조와 같은 인자에 따라 달라질 것이다. 유효량은 예를 들어 활성 성분의 총 질량 (예를 들어, 그램, 밀리그램 또는 마이크로그램) 또는 활성 성분의 질량 대 체질량의 비율, 예를 들어 킬로그램 당 밀리그램 (mg/kg)으로 표현될 수 있다.

[0055] 용어 "적용" 및 "투여"는 치료가 필요한 대상체에 대한 본 발명의 링커 유닛 또는 약학 조성물의 적용을 의미하도록 본원에서 상호호환적으로 사용된다.

[0056] 본원에 사용된 용어 "연속적"은, 본 개시의 K 잔기와 관련하여 사용되는 경우 서로 인접하는 (즉, 이들 사이에 배치된 다른 아미노산 잔기가 없는) 폴리펩티드의 2개의 K 잔기를 지칭한다. 본 개시의 특정 예에서, 중심 코어에서의 2개의 연속적인 K 잔기는 본 개시의 적어도 하나의 필러에 의해 분리되고, 예를 들어, 중심 코어에서의 2개의 연속적인 K 잔기는 GS, GGS 또는 GSG에 의해 분리될 수 있다.

[0057] 용어 "대상체" 및 "환자"는 본원에서 상호호환적으로 사용되며 본 발명의 링커 유닛, 약학 조성물 및/또는 방법에 의해 치료될 수 있는 인간 종을 포함하는 동물을 의미하는 것으로 의도된다. "대상체" 또는 "환자"라는 용어는 하나의 성별이 구체적으로 지시되지 않는 한 남성 및 여성 성별을 모두 지칭하는 것으로 의도된다. 따라서, 용어 "대상체" 또는 "환자"는 본 개시의 치료 방법으로부터 이익을 얻을 수 있는 임의의 포유동물을 포함한다. "대상체" 또는 "환자"의 예는 인간, 랫트, 마우스, 기니피그, 원숭이, 돼지, 염소, 소, 말, 개, 고양이, 조류 및 가금류를 포함하지만 이에 제한되지는 않는다. 예시적인 실시양태에서, 환자는 인간이다. "포유동물"이라는 용어는 인간, 영장류, 가축 및 농장 동물, 예컨대 토끼, 돼지, 양 및 소; 동물원, 스포츠 또는 애완 동물; 및 마우스 및 랫트와 같은 설치류를 포함하는 포유동물류의 모든 구성원들을 지칭한다. "비인간 포유동물"이라는 용어는 인간을 제외한 포유동물류의 모든 구성원들을 지칭한다.

[0058] 알부민은 35-50 g/L를 차지하는 혈청 중의 주요 단백질이다. 알부민은 일부 지방산, 대사 산물, 약물 분자 등을 비롯해 많은 물질에 대한 수송체 및 저장소로서 작용할 수 있다. 각각의 알부민 분자는 적어도 7개의 포켓 (또는 소수성 공동)을 함유하고, 지방산 쉘은 그 포켓에 꼭 맞을 수 있다. 따라서, 알부민과의 회합은 약제의 약동학적 특성을 변경시킬 수 있다. 몇몇 약제는 장쇄 지방산으로 변형되어 비공유 방식으로 알부민과 결합하는 능력을 달성하고 훨씬 증가된 반감기를 가지게 된다.

[0059] 상업적 형태의 인슐린 (인슐린 데테미르)은 라이신 잔기 (B 쇄상의 29 번째 아미노산 잔기)의 아미노기에 접합된 지방산 미리스트산을 갖는다. GLP-1 작용제 (리라글루타이드)의 형태는 글루탐산 잔기에 접합된 지방산 (팔미토일기)을 가지며, 이어서 라이신 잔기 (25 번째 아미노산 잔기)의 아미노기에 접합되고; 33 번째 위치의 다른 라이신 잔기는 아르기닌으로 돌연변이되었다. 변형된 인슐린 및 GLP-1 수용체 작용제는 알부민에 결합할 수 있고 따라서 장기적으로 작용하는 약동학을 달성한다.

[0060] 약제를 위한 저장소로서 알부민을 사용하는 개념은 더 많은 약제를 위해 보다 일반적이면서 광범위하게 적용될 수 있다. 많은 기존 약물 및 개발 중인 새로운 약물의 경우, 알부민에 결합 친화성을 갖는 약제를 변형시키는 방법이 증가될 수 있다면, 다양한 임상 적응증에 대한 새로운 유용성이 확립될 수 있다.

[0061] 효소 대체 요법이 다수의 희귀 유전자 질환에 사용되어 왔다. 치료 효소는 전형적으로 재조합 단백질로서 생성된다. 예를 들어, 파브리병 (Fabry's disease)에 대한 아갈시다제 β 및 아갈시다제 α ; 헐러-슈바이 (Hurler-Scheie) 증후군에 대한 라로니다제 (뮤코다당증 1형, MPS-1로도 알려짐); 헌터병 (Hunter's disease)에 대한

이더설펜제 (MPS-II로도 알려짐); 폼페병 (Pompe's disease)에 대한 알글루코시다제 α; 마로토-라미 (Maroteaux-Lamy) 증후군에 대한 갈설펜제가 있다. 이들 효소는 장기 작용용으로 제조되지 않았으며 빈번하게 투여되어야 한다. 이러한 효소를 사용하는 환자는 심각한 임상 상태에 의해 영향을 받기 때문에 환자를 돕고 효소 사용 비용을 줄이기 위해 약물 투여 횟수를 줄여야 한다. 이것이 반감기가 더 긴 새로운 형태의 효소를 제조해야 하는 이유이다.

[0062] 본 개시는 치료 약물 (즉, 이펙터)에 접합되어 이펙터 요소의 약동학적 특성 (예컨대 혈청 반감기)을 변경, 또는 바람직하게는 증가시킬 수 있는 지방산 번들을 작제하기 위한 유연하고 용이한 수단을 허용하도록 하는 새로운 플랫폼을 기반으로 한다. 본 플랫폼은 코어의 K 잔기의 수를 변경함으로써 지방산 (및 이산; 달리 명시되지 않는 한, 용어 지방산은 또한 이산 지방산을 포함함) 쇠의 수가 조정될 수 있다는 점에서 유리하다. 또한, 2개의 K 잔기 사이의 거리는 코어의 K 잔기 사이에 필러의 길이를 변경시킴으로써 변화시킬 수 있다. 이해될 수 있는 바와 같이, 본 링커 유닛에 의해 운반되는 지방산 쇠가 많을수록, 링커 유닛이 단일 HSA의 더 많은 포켓 또는 상이한 HSA의 포켓과 비공유적으로 회합될 가능성이 더 높아진다. 또한, 2개의 지방산 쇠 사이의 거리는 지방산 쇠와 동일하거나 상이한 HSA 사이의 회합 동역학에 영향을 미칠 수 있다.

[0063] **파트 I 특정 질환을 치료하기 위한 다중-팔 링커**

[0064] *I-(i) 다중-팔 링커에 사용하기 위한 펩티드 코어*

[0065] 성인에서 혈액 내 최고 농도를 담당하는 단백질은 알부민 (35-50 g/L), 면역글로불린 (Ig) G (7-18 g/L), IgA (0.8-6 g/L), IgM (0.4-4 g/L) 및 피브리노겐 (2-4.5 g/L)을 포함한다. 이들 단백질은 다른 단백질에 비해 반감기가 긴 것으로 알려져 있다. 예를 들어, 알부민의 순환 반감기는 19일이고, IgG (IgG1, IgG2 및 IgG4)는 20일 이상의 반감기를 갖는다. 약동학적 특성에 기초하여, 이들 단백질은 약학 분자의 일시적인 간헐적 안착을 위한 장소로서 작용하여 이의 반감기를 연장시킬 수 있다.

[0066] 따라서, 본 개시의 제1 측면은 (1) 2-5개의 라이신 (K) 잔기를 포함하는 중심 코어 및 (2) 각각 중심 코어의 K 잔기에 연결된 2-5개의 제1 요소를 포함하는 링커 유닛에 관한 것이다. 본 중심 코어는 N- 또는/및 C-말단에 결합된 1 또는 2개의 접합기를 갖는 것을 특징으로 한다. 본 개시의 실시양태에 따라, 접합기는 기능성 요소 (예를 들어, 이펙터 요소)를 중심 코어에 효율적으로 커플링하는데 유용한 반면, 각각의 제1 요소는 알부민에 대해 결합 친화성을 나타내는 지방산 (또는 이산) 또는 알부민, IgG, IgA 또는 IgM에 특이적인 단쇄 가변 단편 (scFv)이다. 본 링커 유닛은 기능성 요소의 반감기를 연장시켜 치료 효과를 향상시키는 수단을 제공한다.

[0067] 본 개시의 일부 실시양태에 따라, 2 내지 5개의 제1 요소는 각각 지방산 또는 이산 또는 이의 유도체이다. 본 링커 유닛의 제조에서, 제1 요소는 지방산 (또는 이산)의 CO₂H 기와 K 잔기의 아민기 사이에 아마이드 결합을 형성함으로써 K 잔기의 측쇄에 연결된다. 일부 실시양태에서, 지방산 또는 이산은 화학 물질로 변형되고, 상기 지방산 또는 이산 유도체는 화학 물질의 작용기를 통해 K 잔기의 측쇄 아미노기에 연결된다. 예를 들어, 지방산 또는 이산은 본 개시의 일부 실시양태에 따라 글루타메이트로 변형된다.

[0068] 본 개시의 다양한 실시양태에 따라, 제1 요소는 옥탄산, 펠라르곤산, 데칸산, 운데칸산, 라우르산, 트리데칸산, 미리스트산, 펜타데칸산, 팔미트산, 마가르산, 스테아르산, 노나데칸산, 아라키드산, 헤네이코산산, 베헨산, 트리코사노산, 리그노세르산, 팔미톨레산, 올레산, 리놀레산, 리시놀레산 또는 박센산, 에이코사펜타엔산 (EPA), 도코사헥사엔산 (DHA)으로부터 유도된 지방산 유도체이다. 본 개시의 특정 실시양태에 따라, 제1 요소는 수베르산, 아젤라인산, 세바신산, 운데칸디오산, 도데칸디오산, 브라실산, 테트라데칸디오산, 펜타데칸디오산, 탐신산, 헵타데칸디오산 또는 옥타데칸디오산으로부터 유도된 이산 지방산 유도체이다. 일부 실시양태에서, 본 발명의 제1 요소는 미리스트산 또는 팔미트산으로부터 유도된다. 다른 실시양태에서, 본 발명의 제1 요소는 테트라데칸디오산 또는 탐신산으로부터 유도된다.

[0069] 본 개시의 실시양태에 따라, 중심 코어는 5 내지 120개의 아미노산 잔기 길이를 갖고 2 내지 5개의 K 잔기를 포함하는 폴리펩티드이고, 여기서 각각의 K 잔기 및 그 다음의 K 잔기 (즉, 2개의 연속적인 K 잔기)는 서로 인접하거나 필러로 분리되어 있다.

[0070] 이해될 수 있는 바와 같이, 중심 코어에 연결된 제1 요소의 수는 주로 중심 코어에 포함된 K 잔기의 수에 의해 결정된다. 본 중심 코어에는 적어도 2개의 K 잔기가 포함되어 있기 때문에, 본 링커 유닛은 복수의 제1 요소를 포함할 수 있다.

[0071] 중심 코어에 포함된 K 잔기에 따라, 필러의 아미노산 잔기는 각각 글리신 (G), 세린 (S), 아르기닌 (R), 히스티

딘 (H), 트레오닌 (T), 아스파라긴 (N), 글루타민 (Q), 프롤린 (P), 알라닌 (A), 발린 (V), 이소류신 (I), 류신 (L), 메티오닌 (M), 페닐알라닌 (F), 티로신 (Y) 및 트립토판 (W) 잔기로 이루어진 군으로부터 선택된다.

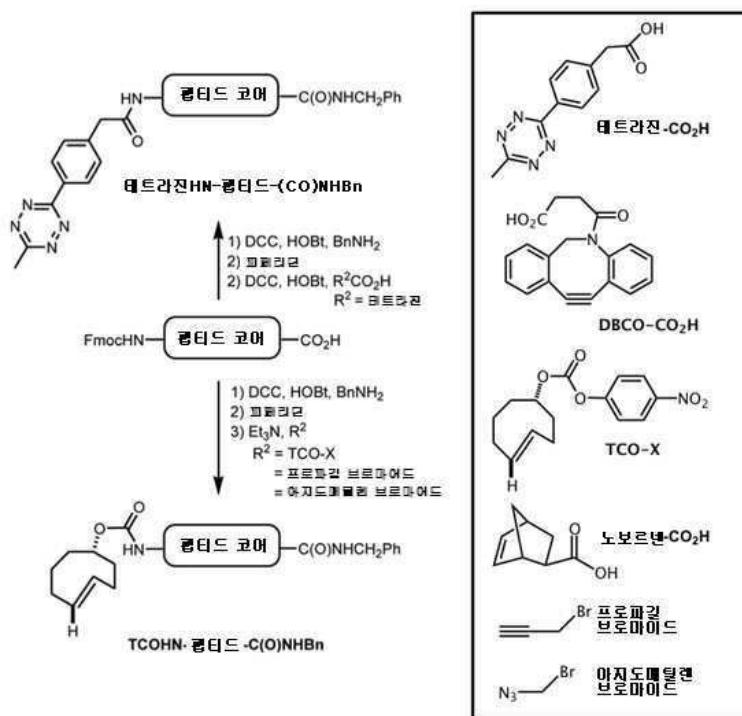
- [0072] 본 개시의 일부 실시양태에 따라, 필러의 아미노산 잔기는 G, S, R 및 H 잔기로 이루어진 군으로부터 독립적으로 선택된다. 대안적인 예에서, 필러의 아미노산 잔기는 각각 R 또는 H 잔기이다.
- [0073] K 잔기 사이에 위치한 필러는 다소 랜덤한 서열 및/또는 길이로 변형된 특정 아미노산 잔기일 수 있다. 더 긴 필러는 더 적은 K 잔기를 갖는 폴리펩티드에 사용되고, 더 짧은 필러가 더 많은 K 잔기를 가지는 폴리펩티드에 사용될 수 있다. N, Q, R 및 H와 같은 친수성 아미노산 잔기가 G 및 S와 함께 필러에 삽입될 수 있다. G 및 S 잔기로 구성된 필러에 대한 대안으로서, 필러는 또한 알부민 및 면역글로불린과 같은 일반적인 인간 혈청 단백질 중에 유연하고 가용성인 루프로부터 채택될 수 있다.
- [0074] 대안적으로, 필러는 2 내지 12의 에틸렌 글리콜 (EG) 유닛 반복체를 가지는 폐길화된 아미노산일 수 있다.
- [0075] 일반적으로, 중심 코어 중의 필러는 동일하거나 상이할 수 있다. 구체적으로, 각각의 필러는 동일하거나 상이한 아미노산 잔기/EG 유닛을 포함할 수 있다. 대안적으로, 중심 코어의 일부 필러는 3 반복체의 EG 유닛을 갖는 폐길화된 아미노산일 수 있는 반면, 중심 코어의 다른 필러는 5-7 반복체의 EG 유닛을 갖는 폐길화된 아미노산일 수 있다.
- [0076] 필러 이외에, 본 중심 코어는 접합기가 결합된 1 또는 2개의 임의적인 말단 스페이서를 추가로 포함한다. 말단 스페이서는 (i) K 잔기 이외의 아미노산 잔기로부터 독립적으로 선택된 2 이상의 아미노산 잔기, 또는 (ii) 2 내지 12 반복체의 EG 유닛을 가지는 폐길화된 아미노산을 포함한다. 본 개시의 실시양태에 따라, 접합기는 말단 스페이서의 알파-NH₂기 (즉, 말단 스페이서의 N-말단에 위치한 아미노산 잔기/폐길화 아미노산의 알파-NH₂기)에 결합되거나, 또는 말단 스페이서의 CO₂H기 (즉, 말단 스페이서의 C-말단에 위치한 아미노산 잔기/폐길화 아미노산의 CO₂H기)에 결합된다.
- [0077] 본 개시의 일 실시양태에 따라, 중심 코어는 N-말단 K 잔기의 상류에 위치한 하나의 말단 스페이서를 포함하고; 이 실시양태에서, 접합기는 말단 스페이서의 알파-NH₂기에 결합된다. 본 개시의 다른 실시양태에 따라, 중심 코어는 C-말단 K 잔기의 하류에 위치한 하나의 말단 스페이서를 포함하고; 이 실시양태에서, 접합기는 말단 스페이서의 CO₂H기에 결합된다. 본 개시의 또 다른 실시양태에 따라, 중심 코어는 2개의 말단 스페이서를 포함하고, 여기서 말단 스페이서 중 하나는 N-말단 K 잔기의 상류에 위치하고 그의 알파-NH₂기에 결합된 제1 접합기를 갖고; 말단 스페이서 중 다른 하나는 C-말단 K 잔기의 하류에 위치하고 그의 CO₂H기에 결합된 제2 접합기를 갖는다.
- [0078] 접합기는 아지드, 피콜릴 아지드, 알킨, 테트라진, 사이클로옥텐, 사이클로옥틴, 말레이미드, 비닐 설편, 모노-설편, 메틸설편, 벤조티아졸, 및 요오도 및 요오도아세트아미드기로 이루어진 군으로부터 선택된다. 본 개시의 바람직한 예에 따르면, 접합기는 아지드, 피콜릴 아지드, 알킨, 테트라진, 사이클로옥텐 또는 사이클로옥틴이다. 이해될 수 있는 바와 같이, 중심 코어에 2개의 접합기가 결합된 경우, 2개의 접합기는 동일하거나 상이할 수 있다. 바람직하게는, 2개의 접합기는 상이하다; 예를 들어, 접합기 중 하나는 아지드, 알킨 또는 사이클로옥텐기일 수 있고, 접합기 중 다른 하나는 테트라진 또는 사이클로옥텐기일 수 있다.
- [0079] 일반적으로, 사이클로옥텐기는 노보르넨 또는 TCO 기일 수 있고; 사이클로옥틴기는 DBCO/DIBO, DIFO, BCN 또는 DIBAC 기일 수 있다. 테트라진기의 경우는 1,2,3,4-테트라진, 1,2,3,5-테트라진 또는 1,2,4,5-테트라진 또는 이의 유도체일 수 있다. 본 개시의 일 실시양태에 따르면, 테트라진기는 6-메틸-테트라진이다.
- [0080] 이제 각각의 중심 코어 (10a, 10b, 10c, 10d 및 10e)가 이에 결합된 접합기를 갖는 도 1A 내지 도 1E를 참조한다. 도 1A 내지 1D에서, 테트라진기, TCO기, 아지드기 및 알킨기는 각각 중심 코어 (10a, 10b, 10c 및 10d)의 말단 스페이서의 알파-NH₂기에 결합된다. 도 1E는 보호기로서 작용하는 아세틸기가 펩티드 코어 (10e)의 N-말단 스페이서의 알파-NH₂ 기와 결합되는 반면, 접합기로서 작용하는 DBCO 기가 중심 코어 (10e)의 C-말단 아미노산 잔기의 CO₂H기와 결합된 대안적인 예를 제공한다.
- [0081] 본 개시의 일부 실시양태에서, 중심 코어는 2개의 접합기를 포함한다. 도 1F는 테트라진기 및 DBCO기가 펩티드 코어 (10f)의 N-말단 스페이서의 알파-NH₂기 및 C-말단 스페이서의 CO₂H기에 각각 결합된 이러한 예를 도시한다.

도 1G는 TCO 기 및 DBCO 기가 펩티드 코어 (10g)의 N-말단 스페이서의 알파-NH₂ 기 및 C-말단 스페이서의 CO₂H 기에 각각 결합된 다른 예를 제공한다. 대안적인 예에서, 펩티드 코어 (10h)의 N-말단 스페이서의 알파-NH₂ 기 및 C-말단 스페이서의 CO₂H기는 각각 알킨기 및 DBCO기에 결합된다 (도 1H).

[0082] 반응식 1 내지 3은 1 또는 2개의 특정 접합기가 결합된 중심 코어를 생성하는 예를 제공한다.

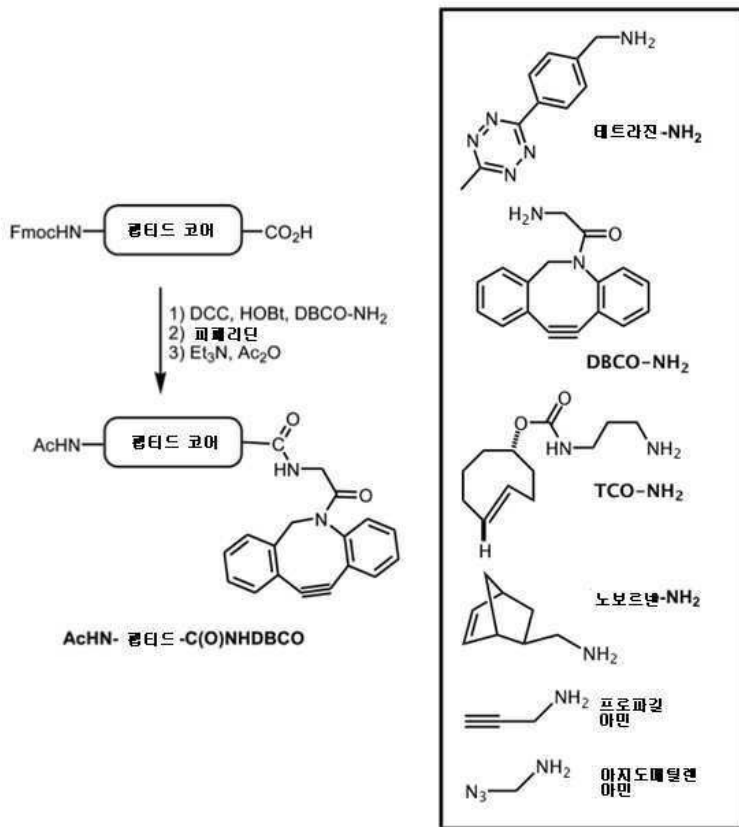
[0083] 폐길화된 아미노산을 사용한 폴리펩티드의 합성은 G 및 S와 같은 표준 아미노산을 사용한 것보다 적은 단계를 포함한다. 또한, 용해성 및 K 잔기의 인접한 아미노기 사이의 간격에 대한 유연성을 제공하는 다양한 길이 (즉, 반복된 에틸렌 글리콜 유닛의 수)를 갖는 폐길화된 아미노산이 사용될 수 있다. 폐길화된 아미노산 이외에, 중심 코어는 또한 인공 아미노산, 예컨대 D-형 아미노산, 호모-아미노산, N-메틸 아미노산 등을 포함하도록 구성될 수 있다. 바람직하게는, 아미노산 분자에 함유된 PEG 모이어티가 형태적 가요성 및 접합기 사이의 적절한 간격을 제공하고, 수용성을 향상시키며, 일반적으로 약한 면역원성이기 때문에, 다양한 길이의 폴리에틸렌 글리콜 (PEG)을 가지는 폐길화된 아미노산이 중심 코어를 구성하는데 사용된다. 폐길화된 아미노산-함유 중심 코어의 합성은 표준 폴리펩티드의 합성 절차와 유사하다.

[0084] <<반응식 1: N 말단에 테트라진 또는 TCO 기가 결합된 중심 코어의 생성>>



[0085] 10

[0086] <<반응식 2: C-말단에 DBCO 기가 결합된 중심 코어의 생성>>

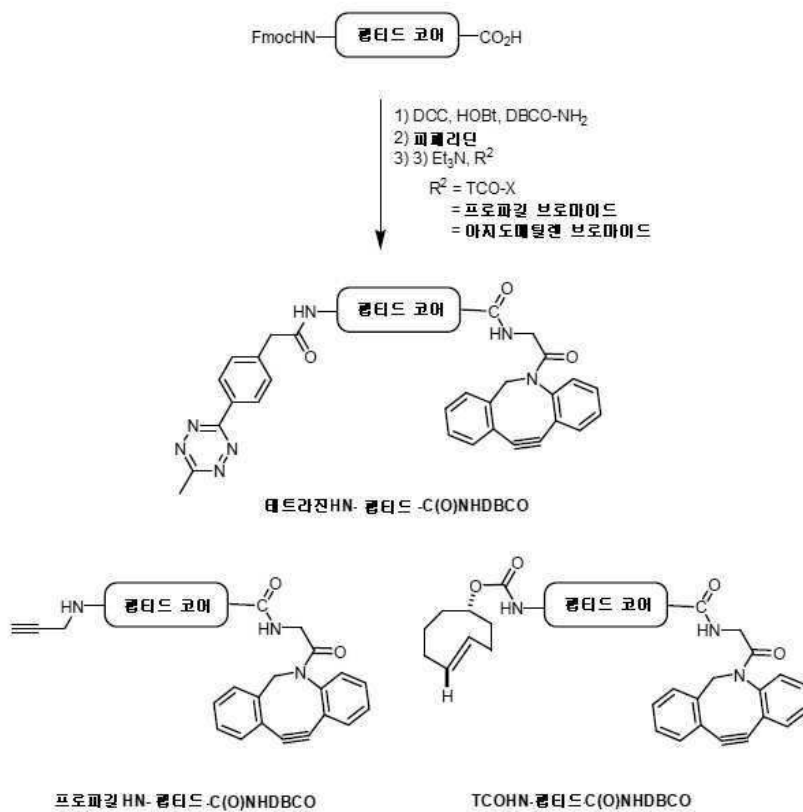


[0087] .

[0088] 안정성을 위해, 중심 코어의 N-말단이 접합기와 결합되지 않은 경우, 이는 아세틸 기와 결합되는 것이 바람직하다.

[0089] 본 개시에서, 중심 코어의 알파-NH₂ 기와 접합기 사이, 또는 중심 코어의 CO₂H 기와 접합기 사이의 반응은 도면 전체에서 기호 "x"로 표시된다.

[0090] <<반응식 3: 각각 N- 및 C-말단에 결합된 2개의 접합기를 갖는 중심 코어의 생성>>



[0091]

[0092] 이제 도 2A를 참조한다. 도시된 바와 같이, 링커 유닛 (20A)은 필러 (도면 전체에서 도트로 표시됨)에 의해 각각 분리된 3개의 K 잔기를 포함하는 중심 코어 (20a)를 포함한다. 말단 스페이서 (도면 전체에 걸쳐 기호 "~"로 표시됨)는 제1 K 잔기의 상류에 위치하고, 그의 알파-NH₂기에 결합된 테트라진기 (25)를 갖는다. 이 예에서, 3개의 제1 요소 (21a-21c)는 각각 K 잔기에 연결된다.

[0093] 도 2B는 본 개시의 다른 실시양태에 따른 2개의 접합기를 포함하는 링커 유닛을 제공한다. 중심 코어 (20b)는 4개의 K 잔기를 포함한다. 제1 및 제2 말단 스페이서는 각각 중심 코어의 N-말단 및 C-말단에 위치하며, 여기서 DBCO기 (28)는 제1 말단 스페이서의 알파-NH₂기에 결합되고 TCO기 (26)는 제2 말단 스페이서의 CO₂H기에 결합된다. 이 예에서, K 잔기는 각각 제1 요소 (21a-21d)에 연결된다.

[0094] 대안적으로, 제1 요소는 알부민, IgG, IgA 또는 IgM에 특이적인 scFv일 수 있다. 이 경우, 제1 요소는 연결 팔을 통해 중심 코어에 연결된다. 구체적으로, 하나의 말단에 NH₂-반응성 기 (예를 들어, N-하이드록시숙신이미딜 (NHS) 기)를 갖고 다른 말단에 작용기를 갖는 PEG 쇠는 PEG 쇠의 NH₂-반응성 기와 K 잔기의 아민기 사이에 아마이드 결합을 형성함으로써 중심 코어의 임의의 K 잔기에 연결될 수 있다. 본 개시에서, K 잔기에 연결된 PEG 쇠는 그의 자유 말단에 작용기를 갖는 연결 팔로 지칭된다. 일반적으로, 작용기는 하이드록실, *tert*-부틸디메틸실릴 (TBDMS), NHS, 말레이미드, 비닐 설폰, 모노-설폰, 메틸설폰일 벤조티아졸, 요오도, 요오도아세트아미드, 아지드, 피콜릴 아지드, 알킨, 사이클로옥탄, 테트라진 및 사이클로옥텐기로 이루어진 군으로부터 선택된다. 원하는 목적에 따라, 말레이미드기는 치환된 말레이미드, 예를 들어 아릴-말레이미드, 3-브로모-말레이미드 및 3,4-디브로모-말레이미드일 수 있다. 바람직하게는, 접합기가 아지드, 피콜릴 아지드, 알킨 또는 사이클로옥텐기인 경우, 작용기는 아지드, 피콜릴 아지드, 알킨 또는 사이클로옥텐기 중 어느 것도 아니다. 대안적으로, 중심 코어의 접합기가 테트라진 또는 사이클로옥텐기인 경우, 작용기는 테트라진기 또는 사이클로옥텐기가 아니다.

[0095] 따라서, 상응하는 작용기를 갖는 제1 요소는 하기 임의의 화학 반응을 통해 연결 팔의 자유 말단에 연결될 수 있다:

[0096] (1) 그들 사이에 아마이드 결합을 형성: 이 경우, 연결 팔은 자유 말단에 NHS기를 갖고, 제1 요소는 아민기를 가

집;

[0097] (2) 그들 사이에 에스테르 결합을 형성: 이 경우, 연결 팔은 자유 말단에 하이드록실 또는 TBDMS기를 갖고, 제1 요소는 하이드록실-반응성 기 (예를 들어, 토실 -O 기)를 가짐;

[0098] (3) 티올-말레이미드 (또는 비닐 설폰) 반응: 이 경우, 연결 팔은 자유 말단에 말레이미드, 비닐 설폰, 모노-설폰 또는 메틸설폰 벤조티아졸기를 가지며, 제1 요소는 티올을 가짐;

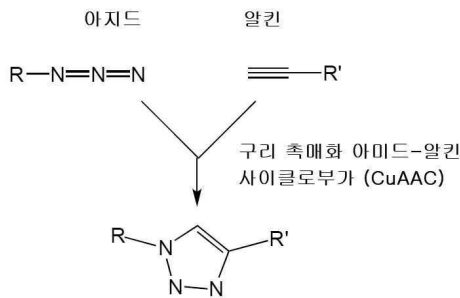
[0099] (4) SN2 반응: 이 경우, 연결 팔은 자유 말단에 요오도 또는 요오도아세트아미드기를 갖고, 제1 요소는 티올기를 가짐;

[0100] (5) 구리(I)-촉매화 알킨-아지드 사이클로부가 반응 (CuAAC 반응, 또는 "클릭" 반응으로 약칭): 연결 팔의 자유 말단 중 하나와 제1 요소는 아지드 또는 피콜릴 아지드기를 가지는 반면, 다른 하나는 알킨기를 가짐; CuAAC 반응은 반응식 4 및 5에 예시됨;

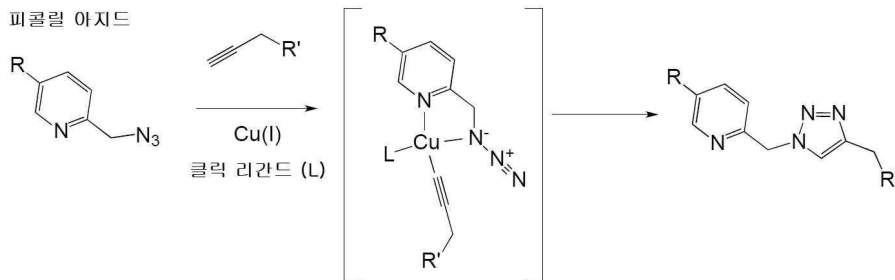
[0101] (6) 역 전자 요구 딜스-알더 (Diels-Alder) (iEDDA) 반응: 연결 팔의 자유 말단 중 하나와 제1 요소는 테트라진을 갖고, 다른 하나는 TCO 또는 노보르넨기를 가짐; iEDDA 반응은 반응식 6 및 7에 예시됨; 또는

[0102] (7) 변형-축진 아지드-알킨 클릭 화학 (SPAAC) 반응: 연결 팔의 자유 말단 중 하나 및 제1 요소는 아지드기를 갖는 반면, 다른 하나는 사이클로옥틴기를 가짐; SPAAC 반응은 반응식 8에 예시됨.

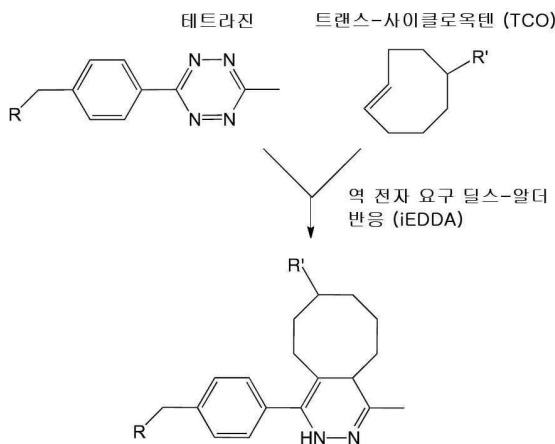
[0103] <<반응식 4: CuAAC 반응이 아지드와 알킨기 사이에서 일어남>>



[0104] .
 [0105] <<반응식 5: CuAAC 반응이 피콜릴 아지드와 알킨기 사이에서 일어남>>

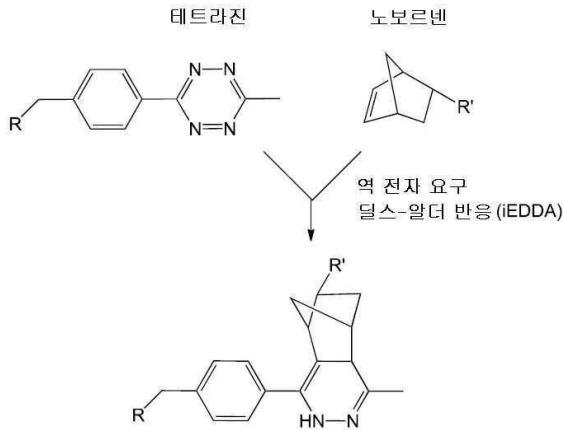


[0106] .
 [0107] <<반응식 6: iEDDA 반응이 TCO와 테트라진기 사이에 일어남>>



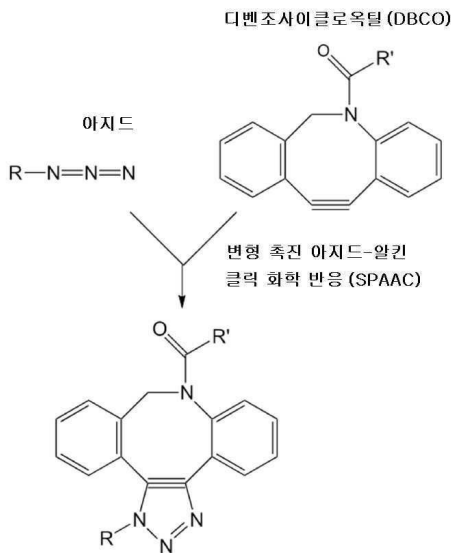
[0108] .

[0109] <<반응식 7: iEDDA 반응이 노보르넨과 테트라진기 사이에 일어남>>



[0110]

[0111] <<반응식 8: SPAAC 반응이 아지드와 DBCO기 사이에 일어남>>



[0112]

[0113] 이제 링커 유닛 (20C)이 3개의 제1 요소 (23a, 23b 및 23c)가 각각 3개의 연결 암 (22a, 22b 및 22c)의 연결을 통해 K 잔기에 연결되는 것을 제외하고 링커 유닛 (20A)과 유사한 구조를 갖는 도 2C를 참조한다.

[0114] 본 개시의 특정 실시양태에 따라, 중심 코어는 N-말단 스페이서의 알파-NH₂ 기와 중심 코어의 C-말단 스페이서의 CO₂H기에 각각 결합된 2개의 접합기를 포함한다. 이들 실시양태에서, 접합기 중 하나는 아지드, 피콜릴 아지드, 알킨 또는 사이클로옥텐기이고, 접합기 중 다른 하나는 테트라진 또는 사이클로옥텐기이며; 바람직하게는, 연결 팔의 작용기는 하이드록실, TBDMS, NHS, 말레이미드, 비닐 설편, 모노-설편, 메틸설포닐 벤조티아졸, 요오도 또는 요오도아세트아미드기이다.

[0115] 연결 팔은 바람직하게는 2-20 반복체의 EG 유닛을 갖는 PEG 쇠이다. 대안적으로, 연결 팔은 연결 팔과 연결되지 않은 말단에서 디설파이드 연결을 갖는 2-20 반복체의 EG 유닛을 갖는 PEG 쇠일 수 있다. 이해되는 바와 같이, 적용 가능한 연결 팔은 PEG 쇠로만 제한되지 않는다. 글리신, 세린 및 기타 아미노산 친수성 잔기를 포함하는 펩티드, 및 다당류, 및 작용기 (예를 들어, NHS, 말레이미드, 아지드, 알킨, 테트라진 또는 변형 알킨)를 가지도록 변형된 기타 생체적합성 선형 중합체가 사용될 수 있다.

[0116] 이해될 수 있는 바와 같이, 링커 유닛 (20A-20C) 또는 임의의 다른 후속 링커 유닛과 관련하여 위에서 논의된 특정 특징은 본원에 개시된 다른 링커 유닛에 공통적이고, 따라서 특정 실시양태의 내용에 반하지 않는 한, 이들 특징 중 일부 또는 전부는 다음 예들에 적용될 수 있다. 그러나 간결성을 위해 이러한 공통 특징은 아래에서 명시적으로 반복되지 않을 수 있다.

[0117] 본 링커 유닛은 중심 코어의 접합기 (예를 들어, 아지드, 피콜릴 아지드, 알킨, 테트라진, 사이클로옥텐 또는

사이클로옥텐기)에 연결된 1 또는 2개의 기능성 요소를 추가로 포함할 수 있다. 구체적으로, 기능성 요소는 임의로 짧은 PEG 쇠 (바람직하게는 2-12 반복체의 EG 유닛을 가짐)와 접합된 후 접합기에 연결될 수 있다.

[0118] 본 개시의 일부 실시양태에 따라, 중심 코어는 하나의 접합기 (즉, 아지드, 피콜릴 아지드, 알킨, 테트라진, 사이클로옥텐 또는 사이클로옥텐기); 따라서, 아지드-반응성 기 (예를 들어, 알킨 또는 DBCO기), 알킨-반응성 기 (예를 들어, 아지드 또는 피콜릴 아지드기), 테트라진-반응성 기 (예를 들어, TCO 또는 노보르넨기), 사이클로옥텐 반응성 기 (예를 들어, 아지드기) 또는 사이클로옥텐 반응성 기 (예를 들어, 테트라진기)를 갖는 기능성 요소 (즉, 제2 요소)가 CuAAC 반응, iEDDA 반응 또는 SPAAC 반응을 통해 중심 코어의 접합기에 연결될 수 있다.

[0119] 이제 링커 유닛 (30A)이 제2 요소 (33)가 말단 스페이서에 결합된 테트라진기에 연결된 것을 제외하고, 링커 유닛 (20A)과 유사한 구조를 갖는 도 3A를 참조한다. 도 3A에 도시된 검은 도트 (27)는 테트라진기와 제2 요소 사이에서 일어난 iEDDA 반응으로 인한 화학 결합을 나타낸다.

[0120] 본 개시의 다른 실시양태에 따라, 중심 코어는 2개의 접합기를 포함한다. 상기 언급한 바와 같이, 제1 접합기가 아지드, 피콜릴 아지드, 알킨 또는 사이클로옥텐기인 경우, 제2 접합기는 바람직하게는 테트라진 또는 사이클로옥텐기이다. 따라서, 2개의 기능성 요소 (즉, 제2 및 제3 요소)는 SPAAC 및 iEDDA 반응, 또는 CuAAC 및 iEDDA 반응을 통해 중심 코어에 각각 연결될 수 있다. 예를 들어, 사이클로옥텐 반응성 기 (예를 들어, 아지드기)를 갖는 제2 요소는 SPAAC 반응을 통해 제1 접합기에 연결될 수 있고; 반면에 알킨-반응성 기 (예를 들어, 아지드 또는 피콜릴 아지드기), 테트라진-반응성 기 (예를 들어, TCO 또는 노보르넨기), 또는 사이클로옥텐-반응성 기 (예를 들어, 테트라진기)를 갖는 제3 요소는 CuAAC 또는 iEDDA 반응을 통해 제2 접합기에 연결될 수 있다. 대안적으로, 테트라진-반응성 기 (예를 들어, TCO 또는 노보르넨기) 또는 사이클로옥텐-반응성 기 (예를 들어, 테트라진기)를 갖는 제2 요소는 iEDDA 반응을 통해 제1 접합기에 연결될 수 있고; 아지드-반응성 기 (예를 들어, 알킨 또는 DBCO 기), 알킨-반응성 (예를 들어, 아지드 또는 피콜릴 아지드기) 또는 사이클로옥텐-반응성 기 (예를 들어, 아지드기)를 갖는 제3 요소는 CuAAC 또는 SPAAC 반응을 통해 제2 접합기에 연결될 수 있다.

[0121] 도 3B는 제2 및 제3 요소에 각각 연결된 2개의 접합기를 포함하는 본 링커 유닛 (30B)의 일례를 제공한다. 링커 유닛 (30B)은 제2 요소 (33)가 DBCO기에 연결되고 제3 요소 (35)가 TCO기에 연결된 것을 제외하고 링커 유닛 (20B)과 유사한 구조를 갖는다. 도 3B에 도시된 검은 삼각형 (29)은 DBCO기와 제2 요소 사이에서 일어난 SPAAC 반응으로 인한 화학 결합을 나타내고; 도 3B에 도시된 검은 도트 (27)는 TCO 기와 제3 요소 사이에서 일어난 iEDDA 반응으로 인한 화학 결합을 나타낸다.

[0122] 도 3C는 본 링커 유닛의 대안적인 예를 제공한다. 링커 유닛 (30C)은 제2 요소 (33)가 중심 코어 (20a)의 N-말단 스페이서에 결합된 테트라진기에 연결되고, 제3 요소 (35)가 중심 코어 (20a)의 C-말단 스페이서에 결합된 아지드기에 연결된 2개의 기능성 요소 (즉, 제2 및 제3 요소)를 포함한다. 도 3C에 도시된 검은 도트 (27)는 테트라진기와 제2 요소 사이에서 일어난 iEDDA 반응으로 인한 화학 결합을 나타내고; 도 3C에 도시된 다이아몬드 (30)는 아지드기와 제3 요소 사이에서 일어난 CuAAC 반응으로 인한 화학 결합을 나타낸다.

[0123] 원하는 목적에 따라, 중심 코어의 접합기에 연결된 기능성 요소는 질환 또는 상태의 치료에 치료적 이점을 제공하는 임의의 분자일 수 있다. 예시적인 기능성 요소는 인슐린, 인슐린-유사 성장 인자, 글루카곤-유사 펩티드-1 작용제, 소마토스타틴 및 소마토스타틴 유사체, 칼시토닌, 성장 호르몬, 에리스로포이에틴, 성선 자극 호르몬 방출 인자, 과립구 콜로니 자극 인자, 아데노신 데아미나제, 아스파라기나제, 인터페론- α , 인터페론- β , TNF- α 수용체, IL-1 수용체, EGF 수용체, 아갈시다제 β , 아갈시다제 α , 라로니다제, 이더실과제, 알글루코시다제 α 및 갈실과제, 또는 이들의 유도체 또는 변형체를 포함하지만, 이들에 제한되지는 않는다.

[0124] ***I-(ii) 다중-팔 링커의 용도***

[0125] 본 개시는 또한 적합한 링커 유닛을 사용하여 다양한 질환을 치료하는 방법에 관한 것이다. 일반적으로, 본 방법은 이러한 치료를 필요로 하는 대상체에게 유효량의 본 발명의 실시양태에 따른 링커 유닛을 투여하는 단계를 포함한다.

[0126] 이전에 알려진 치료 구조물과 비교하여, 파트 I에서 논의된 본 링커 유닛은 다음 세 가지 점에서 유리하다:

[0127] (1) 제1 요소 (즉, 지방산 또는 알부민, IgG, IgA 또는 IgM에 특이적인 scFv)의 수가 필요 및/또는 적용에 따라 조정될 수 있다. 본 링커 유닛은 적용 요구 (예를 들어, 치료되는 질환, 본 링커 유닛의 투여 경로, 및 본 링커 유닛에 의해 운반되는 항체의 결합 친화력 및/또는 친화도)에 따라 하나의 기능성 요소 (즉, 제2 요소) 또는 2개의 기능성 요소 (즉, 제2 및 제3 요소)를 포함할 수 있다. 예를 들어, 본 링커 유닛이 조직/기관으로 직접 전달되는 경우 (예를 들어, 눈의 치료), 이펙터 요소로서 작용하는 제2 요소가 충분할 수 있고, 따라서 표적화 요

소로서 작용하는 제3 요소가 필요하지 않을 것이다. 그러나, 본 링커 유닛이 말초적으로 (예를 들어, 경구, 장, 비강, 국소, 경점막, 근육 내, 정맥 내 또는 복강 내 주사) 전달되는 경우, 본 링커 유닛이 본 링커 유닛을 병변 부위로 특이적으로 표적화하는 표적화 요소; 및 병변 부위에 치료 효과를 나타내는 이펙터 요소를 동시에 포함하는 것이 필요할 수 있다. 본 링커 유닛의 표적화 또는 치료 효능을 증가시키거나 안정성을 증가시키기 위해, 제3 요소 (예를 들어, 제2 표적화 요소, 제2 이펙터 요소 또는 PEG 쇄)가 본 링커 유닛에 추가로 포함될 수 있다.

[0128] (2) 제1 요소는 변형 형태로 제공된다. 전술한 바와 같이, 제1 요소 (즉, 지방산)의 수는 중심 코어에 포함된 K 잔기의 수에 따라 변할 수 있다. 중심 코어에서 K 잔기의 수가 2 내지 5의 범위인 경우, 기능성 요소 (즉, 제2 및/또는 제3 요소)의 반감기 및 치료 효과를 효율적으로 개선시키는 적어도 2개의 제1 요소가 각각의 링커 유닛에 포함될 수 있다.

[0129] (3) 링커 유닛은 그에 결합된 접합기를 통해 기능성 요소 또는 다른 분자 구조물에 효과적으로 연결될 수 있다 (아래의 파트 II 참조). 본 중심 코어는 상업적으로 합성될 수 있다. 그렇지 않으면, 반응식 4 내지 8에 예시된 절차와 같이, 본 중심 코어는 α -아민기를 보호하기 위한 보호기로서 작용하는 N-말단 9-플루오레닐메톡시카보닐 (Fmoc)이 접합기 (즉, 아지드, 피콜릴 아지드, 알킨, 테트라진, 사이클로옥텐 또는 사이클로옥탄기)로 대체된 합성 폴리펩티드로부터 용이하게 제조될 수 있다. 추가적으로 또는 대안적으로, 접합기는 폴리펩티드의 CO₂H기와 반응하여 폴리펩티드에 결합될 수 있다. 이와 같이 생성된 중심 코어는 1 또는 2개의 접합기를 포함하며, 이는 추가적인 처리 단계의 필요없이 기능성 요소 (예를 들어, 본 제2 및/또는 제3 요소)와 중심 코어를 연결하기 위한 커넥터 역할을 한다.

[0130] **파트 II 특정 질환 치료를 위한 조인트-링커 분자 구조물**

[0131] 본 개시의 다른 측면은 하나의 링커 유닛이 다수의 지방산 (예를 들어, 지방산 변형)을 가지는 반면, 다른 하나의 링커 유닛은 다수의 이펙터 요소 (예를 들어, 약물 변형)을 가지는 적어도 2개의 링커 유닛을 포함하는 분자 구조물에 관한 것이다. 본 개시에서, 2 이상의 링커 유닛을 포함하는 분자 구조물은 조인트-링커 분자 구조물로 지칭된다. 본 개시의 다양한 실시양태에 따라, 조인트-링커 분자 구조물은 파트 I에서 논의된 바와 같이 2개의 링커 유닛을 포함한다.

[0132] **II-(i) 조인트-링커 분자 구조물의 구조**

[0133] 본 개시의 일부 실시양태에 따라, 분자 구조물은 2개의 링커 유닛을 포함하고, 이 링커 유닛은 CuAAC 반응, SPAAC 반응 또는 iEDDA 반응을 통해 서로 연결된다. 실시양태에서, 제1 링커 유닛은 (1) 중심 코어, (2) 중심 코어의 K 잔기에 각각 연결된 다수의 제1 요소, 및 (3) 아지드, 피콜릴 아지드, 알킨, 테트라진, 사이클로옥텐 및 사이클로옥탄기로 이루어진 군으로부터 선택된, 중심 코어의 N- 또는 C-말단에 결합된 접합기를 포함한다. 유사하게, 제2 링커 유닛은 (1) 중심 코어, (2) 중심 코어의 K 잔기에 각각 연결된 다수의 제2 요소, 및 (3) 아지드, 피콜릴 아지드, 알킨, 테트라진, 사이클로옥텐 및 사이클로옥탄기로 이루어진 군으로부터 선택된, 중심 코어의 N- 또는 C-말단에 결합된 접합기를 포함한다. 제1 및 제2 링커 유닛은 접합기 사이에서 일어난 CuAAC 반응, SPAAC 반응, 또는 iEDDA 반응을 통해 서로 커플링될 수 있다.

[0134] 일부 실시양태에 따라, 각각의 제1 요소는 지방산, 또는 알부민, IgG, IgA 또는 IgM에 특이적인 scFv이고; 각각의 제2 요소는 질환 또는 상태의 치료에 치료적 이점을 제공하는 기능성 요소; 예를 들어, 인슐린, 인슐린 유사 성장 인자, 글루카곤 유사 펩티드-1 작용제, 소마토스타틴 및 소마토스타틴 유사체, 칼시토닌, 성장 호르몬, 에리스로포이에틴, 성선 자극 호르몬 방출 인자, 과립구 집락 자극 인자, 아데노신 데아미나제, 아스파라기나제, 인터페론- α , 인터페론- β , TNF- α 수용체, IL-1 수용체, EGF 수용체, 아갈시다제 β , 아갈시다제 α , 라로니다제, 이더설파제, 알글루코시다제 α , 및 갈설파제, 또는 이들의 유도체 또는 변형체이다. 펩티드 또는 단백질의 생물학적 활성에 필수적이지 않은 하나의 라이신 잔기만을 가지는 펩티드 또는 작은 단백질의 경우, 라이신 잔기의 ϵ -아미노기는 아미노 반응성 기를 갖는 이중작용성 가교제와 반응하기 위한 작용기, 예컨대 한쪽 말단에 N-하이드록시숙신이미드 (NHS) 및 다른 쪽 말단에 화학 작용기를 제공한다. 모든 단백질은 다수의 라이신 잔기를 갖고 이들 시스테인 잔기는 디설파이드 결합을 형성하는 쌍으로 존재하기 때문에, 라이신 및 시스테인 잔기는 클릭 화학 작용기를 부착하기 위한 부위로서 이상적이지 않다. 이러한 단백질의 경우, 단백질의 생물학적 활성에 필요하지 않은 단백질 표면상의 용매 접근성 잔기는 시스테인 잔기로 돌연변이될 수 있다. 따라서, 이 시스테인 잔기는 한쪽 말단에 SH-반응성 작용기, 예컨대 말레이미드기와 다른 쪽 말단에 클릭 화학을 위한 작용기를 가지는 이중작용성 가교제와 반응할 수 있는 설피하이드릴기를 제공한다.

[0135] 대안적으로, 제1 링커 유닛은 이의 N- 및 C-말단에 각각 결합된 2개의 접합기를 포함하고, 이 접합기 중 하나는 기능성 요소에 연결되고, 다른 접합기는 아지드, 피콜릴 아지드, 알킨, 테트라진, 사이클로옥텐 또는 사이클로옥틴기이다.

[0136] 또한 대안적으로, 제1 및 제2 링커 유닛은 둘 다 N- 및 C-말단에 각각 결합된 2개의 접합기를 포함하며, 이 접합기 중 하나는 기능성 요소에 연결되고 다른 접합기는 아지드, 피콜릴 아지드, 알킨, 테트라진, 사이클로옥텐 또는 사이클로옥틴기이다. 이 경우, 제1 및 제2 링커 유닛의 기능성 요소는 동일하거나 상이할 수 있다.

[0137] **II-(iii) 조인트-링커 분자 구조물의 용도**

[0138] 본 개시는 또한 적합한 조인트-링커 분자 구조물을 사용하여 다양한 질환을 치료하는 방법에 관한 것이다. 일반적으로, 본 방법은 이러한 치료를 필요로 하는 대상체에게 유효량의 본 개시의 실시양태에 따른 조인트-링커 분자 구조물을 투여하는 단계를 포함한다.

[0139] **실험예**

[0140] **실시예 1: 아지드-함유 글루타콘-유사 펩티드-1 (GLP-1) 작용제의 합성**

[0141] 인간 활성 GLP-1은 프로글루타콘 펩티드 (1-37)의 처리에서 유래되는 펩티드 호르몬이다. 인간 GLP-1 (7-36) 아미드 및 GLP-1 (7-37)은 절단된 동등 효력의 두 생물학적 활성 형태이다.

[0142] 본 실시예에서, 아지드기가 글루타메이트 잔기의 연결을 통해 GLP-1 작용제 분자에 연결된 아지드-함유 GLP-1 작용제 (서열 번호 1)를 제조하였다. 구체적으로, 글루타메이트 잔기의 γ 카복실기는 GLP-1 작용제 분자 (서열 번호 1)의 라이신 잔기의 ϵ -아미노기에 연결되어 있고, 글루타메이트 잔기의 α -아미노기는 아지도아세틸기로 변형되었다 (하기 예시).



[0143] 아지드-함유 GLP-1 작용제는 본 발명자들에 의해 설계되었고, 합성은 Shanghai WuXi AppTech Co., Ltd. (중국 상하이 소재)에 위탁하였다. 절차는 O-벤조트리아졸-N,N,N',N'-테트라메틸-우로늄-헥사플루오로-포스페이트 (HBTU)/N,N-디이소-프로필에틸아민 (DIEA)/N,N-디메틸포름아미드 (DMF) 커플링 화학을 사용하는 단계적 Fmoc SPPS (고상 펩티드 합성) 절차를 이용하였으며, 여기서 HBTU는 Fmoc 보호된 아미노산에 대한 계내 활성화 시약으로서 작용하고 DIEA는 커플링 동안 유기 염기로서 사용되었다. N^a-Fmoc, 측쇄 보호 아미노산 및 2-클로로트리틸 클로라이드 수지 (CTC 수지)를 합성에 사용하였다. Arg (Pbf), Trp (Boc), Thr (OtBu), Lys (N-Dde), Tyr (OtBu), Glu (OtBu), Gln (Trt), Ser (OtBu), His (Trt)와 같은 측쇄 보호 전략을 사용하였다. 제1 사이클을 제외한 각 커플링 사이클에, 3 mmole N^a-Fmoc-아미노산, 6 mmole DIEA 및 2.85 mmole 당량의 HBTU를 사용하였다. α -아민상의 Fmoc 보호기는 DMF 중 20% 피페리딘 용액 (펩티드 수지의 3 배 부피)으로 제거하였다.

[0145] 단계 (i)에서, 제1 아미노산을 수지에 공유적으로 연결시키는 것으로 펩티드 합성을 시작하였다: 아미노산 Fmoc-Gly-OH (1.0 mmol, 297.5 mg) 및 CTC 수지 (1.0 mmole, 치환 = 1.0 mmole/g, 1.0 g)을 디클로로메탄 (DCM)에 용해시킨 다음, DIEA (4.0 mmole)를 첨가하고 생성된 혼합물을 질소 기체 버블링하에서 팽윤시켰다. 다음으로, 캡핑 시약으로서 메탄올 (MeOH, 1.0 mL)을 Fmoc-보호된 펩티드 수지에 첨가하고 0.5 시간 동안 혼합하여 CTC 수지상의 미반응 탄소 양이온과 공유결합시켰다.

[0146] 단계 (ii)에서, 메탄올 함유 캡핑 용액을 배출시킨 후 DMF로 3회 세척하였다. 단계 (iii)에서, 수지의 세척 후, DMF 중 20% 피페리딘 용액을 30분 동안 첨가하여 CTC 수지상의 Fmoc 보호기를 제거하였다. 단계 (iv)에서, 생성된 용액을 배출시키고 DMF로 5회 세척하였다. 단계 (v)에서, 약 1시간 동안 질소 기체 버블링하에 Fmoc-Arg(Pbf)-OH (3 당량) 및 활성화제 (HBTU)를 수지 상에 첨가하여 제2 아미노산의 수동 커플링을 수행하였다. 이어서, 펩티드 서열에 따라 매회 다른 아미노산으로 단계 (ii) 내지 (v)를 반복하였다. 커플링 단계의 각 사이클

에 대해, 커플링 반응을 닌히드린 시험으로 모니터링하였다.

[0147] CTC 수지로부터 측쇄 보호 펩티드의 절단을 위해, 40.0 mL 절단 완충액 (5% TIS/5% H₂O/90% TFA)를 제조하고 2 시간 동안 교반하면서 수지를 함유하는 플라스크에 첨가하였다. 조 펩티드를 냉 *tert*-부틸 메틸 에테르에서 침전시키고 6000 rpm에서 3분 동안 원심분리하였다. 조 펩티드를 추가로 2회 (총 400.0 mL) *tert*-부틸 메틸 에테르로 세척하고 진공하에 2시간 동안 건조시켰다.

[0148] 아지드 함유 GLP-1 작용제를, 25 °C의 컬럼 온도에서 아세토니트릴 및 0.075% 트리플루오로아세트산의 이동상을 60분에 걸쳐 0% 내지 60% 아세토니트릴의 선형 구배로 20 mL/분의 유속으로 사용하여 Agilent SB-페닐 분취용 HT 컬럼 (250 mm × 30 mm; 7 μm) 상에서 역상 HPLC에 의해 정제하였다.

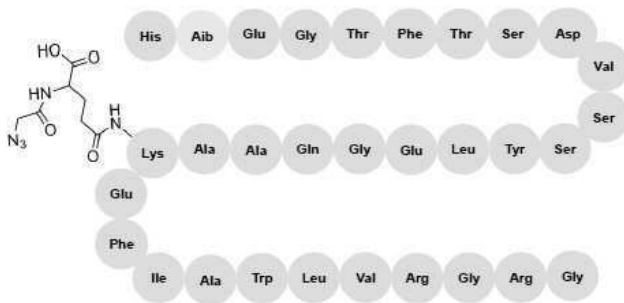
[0149] 정제된 아지드-함유 GLP-1 작용제의 샘플을, 25 °C의 컬럼 온도에서 아세토니트릴 및 0.1% 트리플루오로아세트산의 이동상을 30분에 걸쳐 0% 내지 100% 아세토니트릴의 선형 구배로 1.0 mL/분의 유속으로 사용하여 Supelco C18 컬럼 (250 mm × 4.6 mm; 5 μm) 상에서 역상 분석 HPLC에 의해 분석하였다. 도 4A는 23.153 분의 체류 시간으로 OD254 nm에서 아지드-함유 GLP-1 작용제의 피크를 갖는 아지드-함유 GLP-1 작용제의 역상 분석 HPLC 프로파일을 보여준다.

[0150] 샘플 식별은 MALDI-TOF 질량 분석법으로 수행하였다. 질량 분석은 대만 타이페이 아카데미아 시니카 (Academia Sinica)의 분자생물학 연구소 (Institute of Molecular Biology: IMB)의 질량 코어 시설에서 수행되었다. Bruker Autoflex III MALDI-TOF/TOF 질량 분석기 (독일 브레멘에 소재한 Bruker Daltonics)에서 측정을 수행하였다.

[0151] 이와 같이 합성된 아지드-함유 GLP-1 작용제의 질량 분광 분석은 도 4B에 제공된 바와 같이 분자 구조물의 m.w가 3,595.037 달톤임을 나타냈다. 약어: Pbf, 2,2,4,6,7-펜타메틸디하이드로벤조푸란-5-설포닐 클로라이드; Boc, *tert*-부틸옥시카보닐; tBu, *tert*-부틸 에테르; Dde, 1-(4,4-디메틸-2,6-디옥소사이클로헥스-1-일리덴)에틸; Trt, 트리페닐메틸; TIS, 트리이소프로필실란; TFA, 트리플루오로아세트산.

[0152] **실시예 2: 아지드기를 갖는 ε-아미노이소부티르산 (Aib)-치환된 글루카곤 유사 펩티드-1 (GLP-1) 작용제의 합성**

[0153] 본 실시예에서는, 서열 번호 1의 위치 8 잔기의 알라닌 잔기가 디펩티딜 펩티다제 IV (DPP 4) 분해에 대한 높은 저항성을 위해 Aib 잔기 (1 문자 코드: U)로 대체된, 아지드기를 갖는 Aib-치환된 GLP-1 작용제를 제조하였다 (서열 번호 2) (하기 예시). 본 실시예에서, 글루타메이트 잔기의 γ 카복실기는 GLP-1 작용제 분자 (서열 번호 2)의 라이신 잔기의 ε-아미노기에 연결되어 있고, 글루타메이트 잔기의 α-아미노기는 아지도 아세틸기로 변형되었다 (하기 예시).



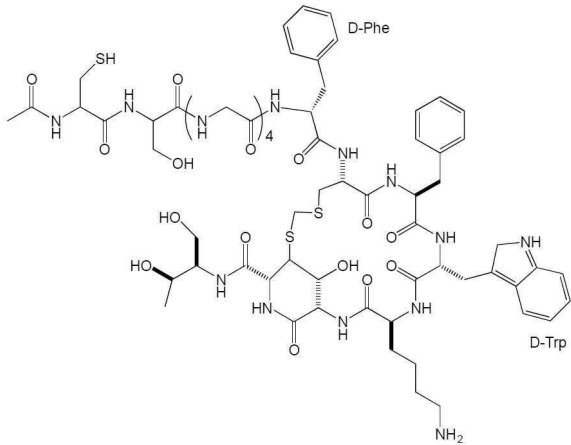
[0154]

[0155] 실시예 1과 유사하게, 아지드기를 갖는 Aib-치환된 GLP-1 작용제는 본 발명자들에 의해 설계되었고, 합성은 Shanghai WuXi AppTech Co., Ltd. (중국 상하이 소재)에 위탁하였다. 합성 절차는 이전 실시예에서 기술된 바와 같이 수행되었다.

[0156] 아지드기를 갖는 Aib-치환된 GLP-1 작용제의 정제된 샘플을, 25 °C의 컬럼 온도에서 아세토니트릴 및 0.1% 트리플루오로아세트산의 이동상을 30분에 걸쳐 0% 내지 100% 아세토니트릴의 선형 구배로 1.0 mL/분의 유속으로 사용하여 Supelco C18 컬럼 (250 mm × 4.6 mm; 5 μm) 상에서 역상 분석 HPLC에 의해 분석하였다. 샘플 식별은 MALDI-TOF 질량 분석법으로 수행하였다 (데이터 미도시).

[0157] **실시예 3: 커플링 반응을 위한 시스테인 잔기를 갖는 소마토스타틴 유사체의 합성**

[0158] 하기 예시된 바와 같이, 다중-팔 링커의 연결 암의 말레이미드기에 커플링하기 위한 자유 시스테인 잔기를 함유하는 소마토스타틴 유사체 (서열 번호 3)를 설계하였다. 소마토스타틴 유사체는 Ontores Biotechnologies Co., Ltd. (중국 항저우에 소재)에 위탁하여 표준 고상법에 의해 합성되었다. 소마토스타틴 유사체는 95% 이상의 순도를 가졌다.

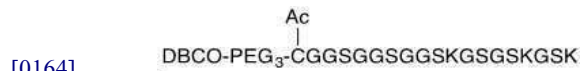


[0159] .
 [0160] 합성된 펩티드 식별은 질량 분석 MALDI-TOF에 의해 수행되었다. 도 5는 질량 분석 MALDI-TOF의 결과 본 분자 구조물의 m.w.가 1,493.587 달톤임을 보여준다.

[0161] **실시예 4: 3개의 소마토스타틴 유사체와 접합된 DBCO-함유 다중-팔 링커 유닛의 합성**

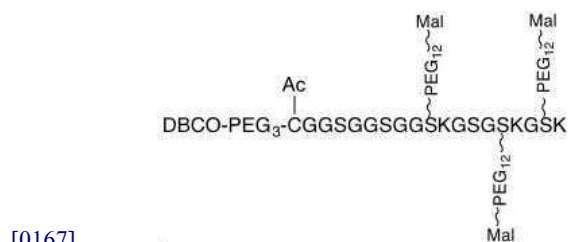
[0162] DBCO-함유 다중-팔 링커의 합성 절차는 다음과 같다; 단계 (i)에서, 합성된 펩티드 2 (서열 번호 4) (중국 상하이에 소재한 Chinapeptide Inc.)를 10 mM의 최종 농도로 100% 무수 DMSO에 용해시켰다. 시스테인 잔기의 SH기를 말레이미드-PEG₃-DBCO (미국 샌디에고에 소재한 Conju-probe Inc.)와 접합시켜 기능성 연결기 DBCO를 생성하기 위해, 펩티드 및 말레이미드-PEG₃-DBCO를 1/1 비로 혼합하고, 실온에서 16시간 동안 인큐베이션하였다.

[0163] 합성된 DBCO-함유 펩티드 2 (하기 예시됨) 식별은 MALDI-TOF 질량 분석법에 의해 수행되었다.



[0165] 단계 (ii)에서, 상기 합성된 DBCO-함유 펩티드 2를 최종 농도 10 mM로 100% DMSO에 용해시켰다. DBCO 함유 펩티드 2 및 유기 염기 DABCO를 100% DMSO에서 1/5 몰비로 혼합하였다. 이어서, NHS-PEG₁₂-Mal 가교제를 100% 무수 DMSO 중 1/6 (DBCO-함유 펩티드 2: NHS-PEG₁₂-Mal)의 최종 몰비로 DBCO-함유 펩티드 2 용액에 첨가하였다. 반응 혼합물을 실온에서 밤새 추가 인큐베이션하였다.

[0166] 3개의 PEG₁₂-Mal 연결 팔과 접합된 DBCO 함유 펩티드 2 (하기 예시됨)를, 25 °C의 컬럼 온도에서 아세토니트릴 및 0.1% 트리플루오로아세트산의 이동상을 30분에 걸쳐 0% 내지 100% 아세토니트릴의 선형 구배로 3.0 mL/분의 유속으로 사용하여 Supelco C18 컬럼 (250 mm × 10 mm; 5 μm) 상에서 역상 HPLC에 의해 정제하였다.



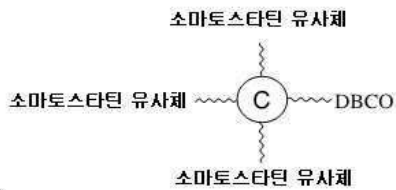
[0168] 3개의 PEG₁₂-Mal 연결 팔과 접합된 합성된 DBCO 함유 펩티드 2의 질량 분광 분석은 분자 구조물의 m.w.가 4,480.89 달톤임을 나타내었다.

[0169] 단계 (iii)에서, 실시예 3의 소마토스타틴 유사체의 티올기를 3개의 PEG₁₂-Mal 연결 팔과 접합된 DBCO-함유 펩티드

드 2와 반응시켰다. 소마토스타틴 유사체는 25 mM의 최종 농도에서 100% DMSO에 용해되는 반면, 3개의 연결 팔과 접합된 DBCO 함유 펩티드 2는 1 mM 최종 농도에서 100% DMSO에 용해되었다. 3개의 PEG₁₂-Mal 연결 팔과 접합된 DBCO-함유 펩티드 2를 소마토스타틴 용액에 3.6 mM의 최종 농도 (1 mM DBCO-함유 펩티드 2 다중-팔 링커 용액에 비해 3.6배 몰 과량)로 첨가하였다. 반응 혼합물을 실온에서 밤새 인큐베이션하였다.

[0170] 3개의 소마토스타틴 유사체와 접합된 DBCO-함유 다중-팔 링커 유닛 (3-소마토스타틴 DBCO 약물 번들)을, 25 °C의 컬럼 온도에서 아세트니트릴 및 0.1% 트리플루오로아세트산의 이동상을 30분에 걸쳐 0% 내지 100% 아세트니트릴의 선형 구배로 3.0 mL/분의 유속으로 사용하여 Supelco C18 컬럼 (250 mm × 10 mm; 5 μm) 상에서 고정능 역상 액체 크로마토그래피 (RP-HPLC)에 의해 정제하였다. 3-소마토스타틴 DBCO 약물 번들의 역상 HPLC의 용출 프로파일은 도 6A에 도시된 바와 같이, UV 흡광도의 검출에 의해 OD254 nm에서 모니터링하여 그의 용출 피크가 22.38 분의 체류 시간을 가짐을 보여 주었다.

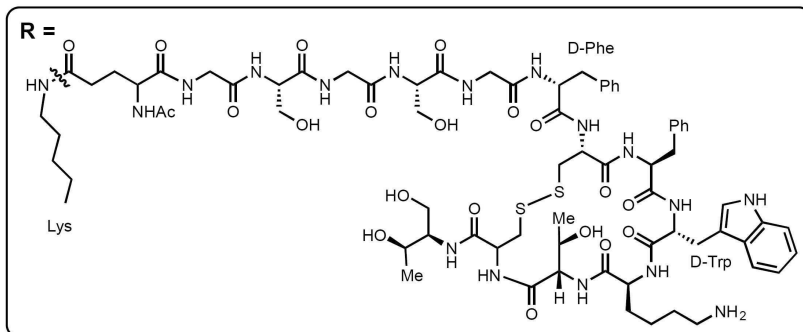
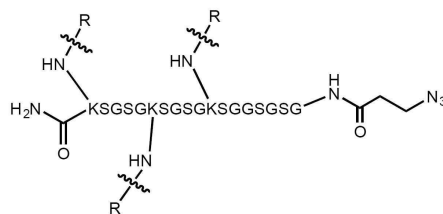
[0171] 도 6B는 상기 합성된 3-소마토스타틴 DBCO 약물 번들 (하기 예시)의 질량 분광 분석 결과 분자 구조물의 m.w.가 9,005 달톤임을 나타낸다.



[0172] 실시예 5: 옥트레오티드 펩티드 (서열 번호 6)와 공유결합된 연결 암을 갖는 펩티드 코어 (서열 번호 5)로서 펩티드 3을 갖는 아지드-함유 다중-팔 링커 유닛의 합성

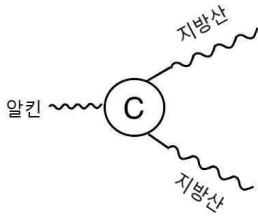
[0174] 본 실시예에서, 3-옥트레오티드 아지드-약물 번들을 수동 합성에 의해 표준 Fmoc 화학을 사용하여 제조하였다. 약물 번들은 펩티드 코어로서 펩티드 3 (서열 번호 5) 및 각각 옥트레오티드 펩티드 (서열 번호 6)와 공유결합된 3개의 연결 팔을 사용한 아지드-함유 링커 유닛이다. 본 발명자들이 링커 유닛을 설계하고 3-옥트레오티드 아지드-약물 번들의 생산은 Shanghai WuXi AppTech Co., Ltd. (중국 상하이 소재)에 위탁하였다.

[0175] 이와 같이 합성된 분자는, 하기 나타낸 바와 같이, 3개의 옥트레오티드 및 하나의 유리 아지드기와 공유결합된 다중-팔 링커 유닛으로 구성되었다. 샘플 식별은 MALDI-TOF 질량 분석법에 의해 수행되었다.



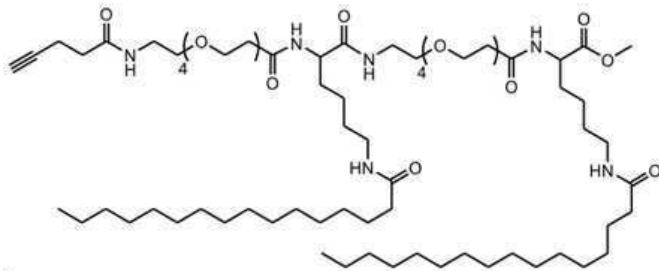
[0176] 실시예 6: 지방산 번들로서 2개의 팔미토일 쇄를 가지는 알킨 함유 링커 유닛의 합성

[0178] 본 실시예에서는, 2개의 팔미토일 쇠를 가지는 알킨-함유 지방산 번들 (하기 예시됨)을 제조하였다.



[0179]

[0180] 펩티드 코어 (알킨-에틸-Xaa₄-K-Xaa₄-K-OMe, 서열 번호 7)는 2개의 K 잔기 및 그의 N-말단에 위치한 알킬닐 프로피오닐기를 갖는다. 2개의 K 잔기 사이의 필러 및 알킨기와 제1 K 잔기 사이의 N-말단 스페이서는 4개의 EG 반복체를 가지는 페길화된 아미노산이다. 팔미트산의 CO₂H기와 K 잔기의 아민기 사이에 아미드 결합을 형성함으로써 두 팔미토일 쇠가 펩티드 중심 코어의 K 잔기에 각각 연결되었다 (하기 예시됨). 이 새로운 분자 - "알킨-EG₄-2FA-C16" (알킨-2FA로 약칭)의 합성은 Shanghai WuXi AppTech Co., Ltd.에 의해 수행되었다.



[0181]

[0182] 단계 (i)에서, 제1 아미노산이 수지에 공유적으로 연결되는 것으로 펩티드 합성이 시작되었다: 아미노산 Fmoc-Lys(Dde)-OH (6.0 mmol) 및 CTC 수지 (3.0 mmol)를 디클로로메탄 (DCM)에 용해시킨 후, DIEA (12.0 mmole)를 첨가하고, 생성된 혼합물을 질소 기체 버블링하에 2시간 동안 팽윤시켰다.

[0183] 단계 (ii)에서, 펩티드-수지 혼합 용액을 배출시키고 DMF로 3회 세척하였다. 단계 (iii)에서, 수지 세척 후, DMF 중 20% 피페리딘 용액을 30분 동안 첨가하여 CTC 수지상의 Fmoc 보호기를 제거하였다. 단계 (iv)에서, 처리된 용액을 배출하고 DMF로 5회 세척하였다. 단계 (v)에서, 질소 기체 버블링하에 약 1시간 동안 Fmoc-PEG₄-OH (2 당량) 및 활성화제 (HBTU)를 수지에 첨가하여 제2 아미노산의 수동 커플링을 수행하였다. 다음으로, 단계 (ii) 내지 (v)를 펩티드 서열에 따라 매회 다른 아미노산으로 반복하였다. 펩티드 수지 용액에 3% N₂H₄/DMF 용액을 첨가하고, 20분 동안 인큐베이션하여 두 라이신 잔기의 Dde 보호기를 제거하였다. 합성의 마지막 사이클에서, 팔미트산 (1.0 당량) 및 활성화제 (HBTU)를 질소 기체 버블링하에 약 1시간 동안 수지 상에 첨가하였다.

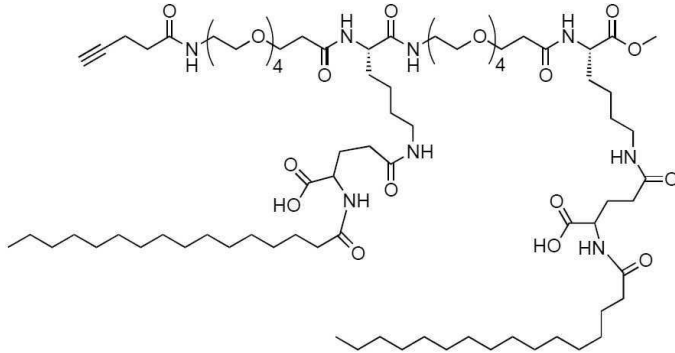
[0184] CTC 수지로부터 측쇄 보호된 펩티드의 절단을 위해, 절단 완충액 (95% TFA/2.5% TIPS/2.5% H₂O)을 제조하여 펩티드-수지 용액을 함유하는 플라스크에 첨가하고 실온에서 1시간 동안 교반하였다. 조 펩티드를 냉 *tert*-부틸 메틸 에테르에서 침전시키고 5000 rpm에서 2분 동안 원심분리하였다. 조 펩티드를 *tert*-부틸 메틸 에테르로 2회 추가 세척하고 2시간 동안 진공하에 건조시켰다. C-말단의 메틸 에스테르를 제조하기 위해, 조 펩티드를 MeOH 중 4N HCl 용액에 용해시켰다. 용액을 약 2시간 동안 반응시키고 액체 크로마토그래피-질량 분석법 (LCMS)에 의해 모니터링하였다. 반응이 완료된 후, 반응을 DIEA로 켄칭하고 pH 값을 7.0으로 조정하였다. 생성된 용액을 진공하에 건조시켰다.

[0185] 2개의 팔미토일 쇠를 가지는 알킨-함유 링커 유닛을, 25 °C의 컬럼 온도에서 아세트니트릴 및 0.075% 트리플루오로아세트산의 이동상을 60분에 걸쳐 55% 내지 90% 아세트니트릴의 선형 구배로 20 mL/분의 유속으로 사용하여 Luna 분취용 C4 컬럼 (250 mm × 25 mm; 10 μm) 상에서 역상 HPLC에 의해 정제하였다. 도 7에 제공된 바와 같이, 2개의 지방족 쇠를 가지는 이렇게 합성된 알킨-함유 링커 유닛의 질량 분광 분석은 분자 구조물의 m.w.가 1,340.104 달톤임을 나타내었다. 약어: TIPS, 트리아소프로필실란.

[0186] 실시예 7: 펩티드 중심 코어에 Lys 잔기와 지방족 쇠 사이의 스페이서로서 추가의 글루타메이트 잔기가 삽입된 4개의 알킨-함유 지방산 번들의 합성

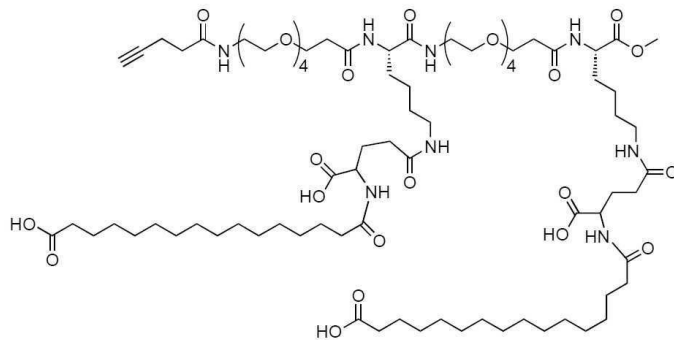
[0187] 본 실시예에서, 5개의 추가의 알킨-함유 지방산 번들을 제조하였다.

[0188] 하기에 나타난 바와 같이, 2개의 팔미토일 쇠를 가지는 "알킨-EG₄-2E-2FA-C16"으로 칭해지는 하나의 지방산 번들을 제조하였다. 펩티드 중심 코어 (알킨-에틸-Xaa₄-K-Xaa₄-K-OMe, 서열 번호 7)는 2개의 라이신 잔기 및 그의 N-말단에 위치한 알킨기를 갖는다. 2개의 라이신 잔기 사이 및 알킨-에틸기와 그의 인접 라이신 잔기 사이의 스페이서는 4개의 EG 반복체를 가지는 폐길화된 아미노산이다. 2개의 팔미토일 쇠는 글루타메이트 잔기의 감마-CO₂H기와 라이신 잔기의 아민기 사이 및 글루타메이트 잔기의 알파-아민기와 팔미트산의 CO₂H기 사이에 아마이드 결합을 형성하는 추가의 글루타메이트 스페이서를 통해 펩티드 중심 코어의 라이신 잔기에 각각 연결된다.



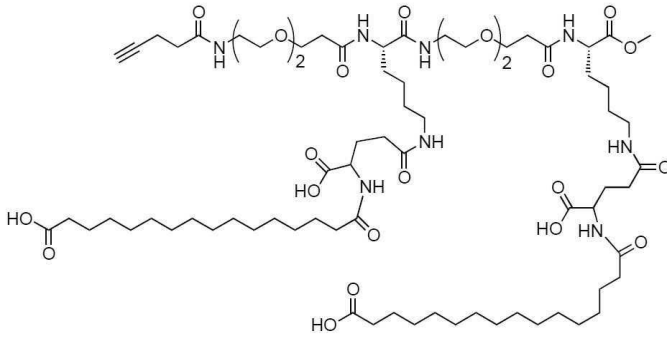
[0189]

[0190] 알킨-EG₄-2E-2FA-C16-산 지방산 번들 (하기 예시됨)을 제조하였다. 펩티드 중심 코어 (알킨-에틸-Xaa₄-K-Xaa₄-K-OMe, 서열 번호 7)는 2개의 라이신 잔기 및 그의 N-말단에 위치한 알킨기를 갖는다. 2개의 라이신 잔기 사이 및 알킨기와 그의 인접 라이신 잔기 사이의 스페이서는 4개의 EG 반복체를 가지는 폐길화된 아미노산이다. 이산기 (즉, 헥사데칸디오산 또는 탐신산)를 갖는 2개의 팔미토일 쇠는 글루타메이트 잔기의 감마-CO₂H기와 라이신 잔기의 아민기 사이 및 글루타메이트 잔기의 알파-아민기와 팔미트 이산의 두 CO₂H기 중 하나 사이에 아마이드 결합을 형성하는 추가의 글루타메이트 스페이서를 통해 펩티드 중심 코어의 라이신 잔기에 각각 연결된다.



[0191]

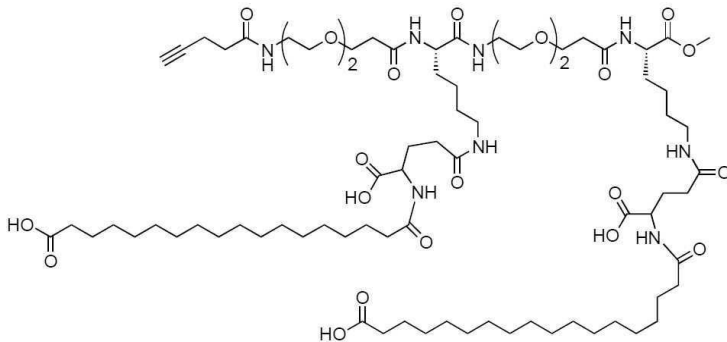
[0192] 알킨-EG₂-2E-2FA-C16-산 지방산 번들 (하기 예시됨)을 제조하였다. 펩티드 중심 코어 (알킨-에틸-Xaa₂-K-Xaa₂-K-OMe, 서열 번호 8)는 2개의 라이신 잔기 및 그의 N-말단에 위치한 알킨기를 갖는다. 2개의 라이신 잔기 사이 및 알킨기와 그의 인접 라이신 잔기 사이의 스페이서는 2개의 EG 반복체를 가지는 폐길화된 아미노산이다. 이산기를 갖는 2개의 팔미토일 쇠는 글루타메이트 잔기의 감마-CO₂H기와 라이신 잔기의 아민기 사이 및 글루타메이트 잔기의 알파-아민기와 팔미트 이산의 두 CO₂H기 중 하나 사이에 아마이드 결합을 형성하는 추가의 글루타메이트 스페이서를 통해 펩티드 중심 코어의 라이신 잔기에 각각 연결된다.



[0193]

[0194]

알킨-EG₂-2E-2FA-C18-산 지방산 번들 (하기 예시됨)을 제조하였다. 펩티드 중심 코어 (알킨-에틸-Xaa₂-K-Xaa₂-K-OMe, 서열 번호 8)는 2개의 라이신 잔기 및 그의 N-말단에 위치한 알킨기를 갖는다. 2개의 라이신 잔기 사이 및 알킨기와 그의 인접 라이신 잔기 사이의 스페이서는 2개의 EG 반복체를 가지는 폐결화된 아미노산이다. 이산기 (즉, 옥타데칸디오산)를 갖는 2개의 스테아로일 쇠는 글루타메이트 잔기의 감마-CO₂H기와 라이신 잔기의 아민기 사이 및 글루타메이트 잔기의 알파-아민기와 팔미트 이산의 두 CO₂H기 중 하나 사이에 아마이드 결합을 형성하는 추가의 글루타메이트 스페이서를 통해 펩티드 중심 코어의 라이신 잔기에 각각 연결된다.



[0195]

[0196]

실시예 6과 유사하게, 이들 4개의 지방산 번들 분자 - "알킨-EG₄-2E-2FA-C16, 알킨-EG₄-2E-2FA-C16-산, 알킨-EG₂-2E-2FA-C16-산 및 알킨-EG₂-2E-2FA-C18-산"의 합성은 Shanghai WuXi AppTech Co., Ltd.에 위탁하였다.

[0197]

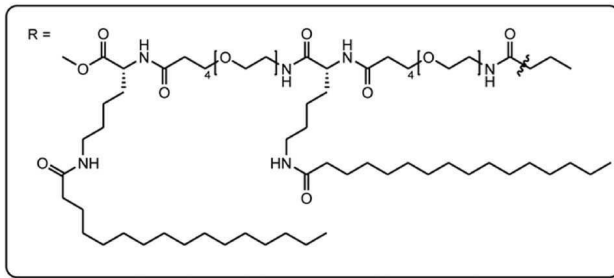
실시예 8: 하나의 GLP-1 작용제 및 2개의 지방족 쇠로 구성된 분자 구조물의 합성 (GLP-1-A1a⁸-EG₄-2FA-C16 작용제)

[0198]

본 실시예에서, 실시예 1의 아지드-함유 GLP-1 작용제 및 실시예 6의 2개의 팔미토일 쇠를 가지는 알킨-함유 링커 유닛을 아지드와 알킨기 사이에 CuAAC를 통해 커플링하여 하기에 예시된 "GLP-1-A1a⁸-EG₄-2FA-C16 작용제"를 생성하였다.

[0199]

합성은 Shanghai WuXi AppTech Co., Ltd.에 위탁하였다. 간략하게, DMSO (30.0 mL) 중 실시예 1의 아지드-함유 GLP-1 작용제 (850.0 mg, 236.4 μmol, 1.0 당량)와 실시예 6의 2개의 팔미토일 쇠를 가지는 알킨-함유 링커 유닛 (158.4 mg, 118.2 μmol, 0.5 당량)의 혼합물을 탈기시키고, 질소 기체로 3회 퍼징한 후, CuI (22.5 mg, 118.2 μmol, 0.5 당량) 및 DIEA (61.1 mg, 472.8 μmol, 82.4 μL, 2.0 당량)를 첨가하고, 혼합물을 질소 기체 분위기하에 25 °C에서 1시간 동안 교반하였다. 액체 크로마토그래피 질량 스펙트럼 (LC-MS)에 의해 반응 완료를 확인하였다.



[0200]

[0201]

GLP-1-2FA 작용제를, 25 °C의 컬럼 온도에서 아세토니트릴 및 0.075% 트리플루오로아세트산의 이동상을 60분 내에 40% 내지 70% 아세토니트릴의 선형 구배로 20 mL/분의 유속으로 사용하여 일련의 Luna C18 컬럼 (200 mm × 25 mm; 10 μm) 및 Gemini C18 (150 mm × 30 mm; 5 μm) 상에서 역상 HPLC에 의해 정제하였다. 생성물을 동결 건조시켜 목적 생성물 (33.2 mg, 2.85% 수율)을 백색 고체로서 수득하였다.

[0202]

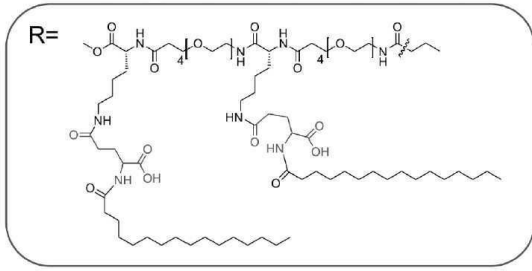
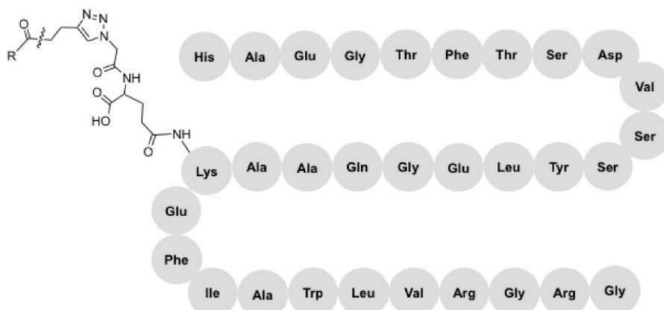
도 8A는 GLP-1-2FA 작용제의 정제를 위한 역상 HPLC 용출 프로파일을 도시한 것으로, GLP-1-2FA 작용제의 피크는 11.037 분의 체류 시간으로 OD 215 nm에서 나타났다. 이와 같이 합성된 GLP-1-A1a⁸-EG₄-2FA-C16 작용제의 질량 분광 분석은 도 8B에 제공된 바와 같이 GLP-1-A1a⁸-EG₄-2FA-C16 작용제의 분자 구조물의 m.w.가 4,937 달톤임을 나타내었다.

[0203]

실시예 9: 스페이서로서 추가 글루타메이트 잔기를 갖는 2개의 팔미토일 쇄 및 1개의 GLP-1 작용제로 구성된 분자 구조물의 합성 (GLP-1-A1a⁸-EG₄-2E-2FA-C16 작용제)

[0204]

본 실시예에서, 실시예 1의 아지드-함유 GLP-1 작용제 및 실시예 7의 알킨-함유 지방산 번들 (알킨-EG₄-2E-2FA-C16) 중 하나를 아지드와 알킨기 사이에 CuAAC를 통해 커플링하여 하기에 예시된 "GLP-1-A1a⁸-EG₄-2E-2FA-C16 작용제"를 생성하였다.



[0205]

[0206] 실시예 8과 유사하게, 합성은 Shanghai WuXi AppTech Co., Ltd.에 위탁하였다.

[0207] 도 9A는 GLP-1-Aib⁸-EG₄-2E-2FA-C16 작용제의 정제를 위한 역상 HPLC 용출 프로파일을 도시한 것으로, GLP-1-EG₄-2E-2FA-C16 작용제의 피크가 34.53 분의 체류 시간으로 OD 215 nm에서 나타났으며, 피크는 화살표로 표시되었다.

[0208] 이와 같이 합성된 GLP-1-EG₄-2E-2FA-C16 작용제의 질량 분광 분석은 도 9B에 제공된 바와 같이, GLP-1-Aib⁸-EG₄-2E-2FA-C16 작용제의 분자 구조물의 m.w.가 5,194 달톤임을 나타내었다.

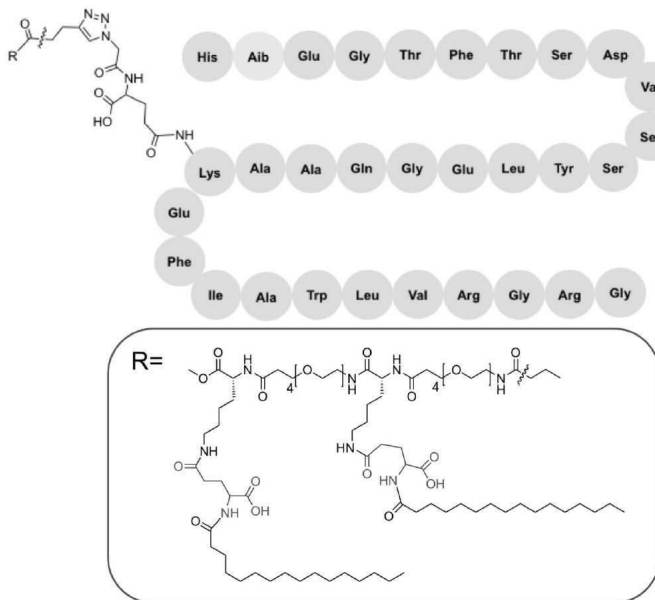
[0209] **실시예 10: 스페이서로서 추가 글루타메이트 잔기를 갖는 2개의 팔미토일쇄 및 하나의 Aib-치환된 GLP-1 작용제로 구성된 분자 구조물의 합성 (GLP-1-Aib⁸-EG₄-2E-2FA-C16 작용제)**

[0210] 본 실시예에서, 실시예 2의 아지드기 및 실시예 7의 알킨-함유 지방산 번들 (알킨-EG₄-2E-2FA-C16)을 갖는 Aib-치환된 GLP-1 작용제를 아지드와 알킨기 사이에 CuAAC를 통해 커플링하여 하기에 예시된 "GLP-1-Aib⁸-EG₄-2E-2FA-C16 작용제"를 생성하였다.

[0211] 실시예 8과 유사하게, 합성은 Shanghai WuXi AppTech Co., Ltd.에 위탁하였다.

[0212] 도 10A는 GLP-1-Aib⁸-EG₄-2E-2FA-C16 작용제의 정제를 위한 역상 HPLC 용출 프로파일을 도시한 것으로, GLP-1-Aib-EG₄-2E-2FA-C16 작용제의 피크가 34.635 분의 체류 시간으로 OD 215 nm에서 나타났으며, 피크는 화살표로 표시되었다.

[0213] 이와 같이 합성된 GLP-1-Aib⁸-EG₄-2E-2FA-C16 작용제의 질량 분광 분석은 도 10B에 제공된 바와 같이, GLP-1-Aib⁸-EG₄-2E-2FA-C16 작용제의 분자 구조물의 m.w.가 5,208 달톤임을 나타내었다.



[0214]

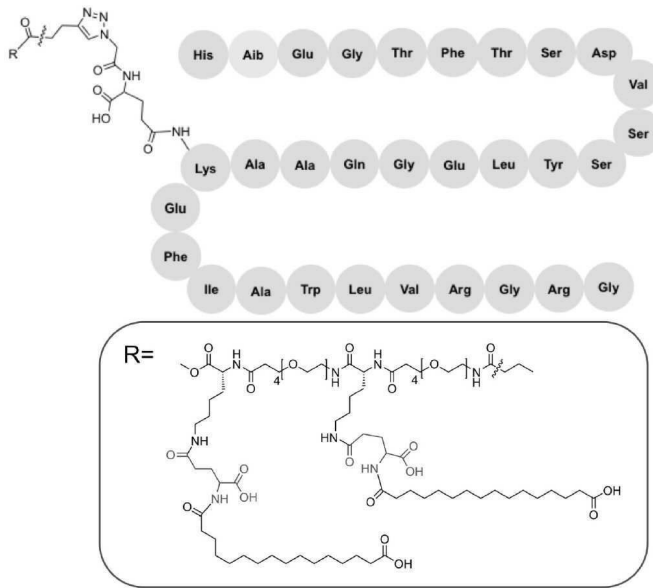
[0215] **실시예 11: 스페이서로서 추가 글루타메이트 잔기를 갖는 2개의 팔미토일 이산쇄 및 하나의 Aib-치환된 GLP-1 작용제로 구성된 분자 구조물의 합성 (GLP-1-Aib⁸-EG₄-2E-2FA-C16-산 작용제)**

[0216] 본 실시예에서, 실시예 2의 아지드기 및 실시예 7의 알킨-함유 지방산 번들 (알킨-EG₄-2E-2FA-C16-산)을 갖는 Aib-치환된 GLP-1 작용제를 아지드와 알킨기 사이에 CuAAC를 통해 커플링하여 하기에 예시된 "GLP-1-Aib⁸-EG₄-2E-2FA-C16-산 작용제"를 생성하였다.

[0217] 실시예 8과 유사하게, 합성은 Shanghai WuXi AppTech Co., Ltd.에 위탁하였다.

[0218] 도 11A는 GLP-1-Aib⁸-EG₄-2E-2FA-C16-산 작용제의 정제를 위한 역상 HPLC 용출 프로파일을 도시한 것으로, GLP-1-Aib⁸-EG₄-2E-2FA-C16-산 작용제의 피크가 25.988 분의 체류 시간으로 OD 215 nm에서 나타났으며, 피크는 화살표로 표시되었다.

[0219] 이와 같이 합성된 GLP-1-Aib⁸-EG₄-2E-2FA-C16 작용제의 질량 분광 분석은 도 11B에 제공된 바와 같이, GLP-1-Aib⁸-EG₄-2E-2FA-C16-산 작용제의 분자 구조물의 m.w.가 5,267 달톤임을 나타내었다.



[0220]

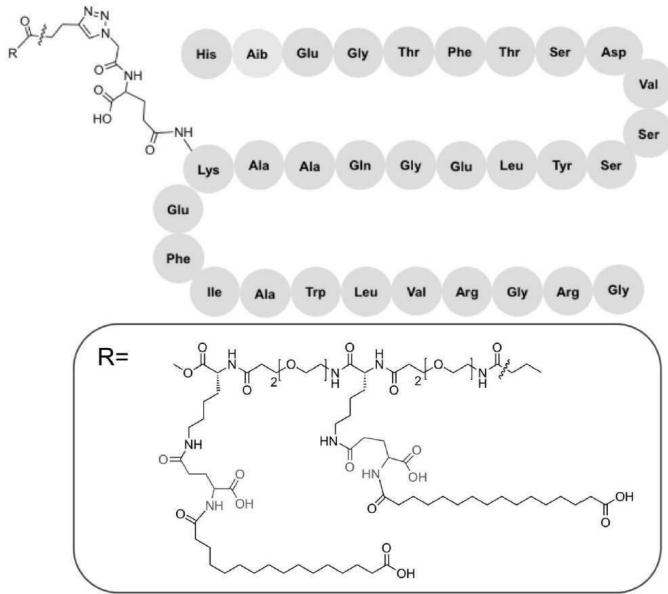
[0221] 실시예 12: 스페이서로서 추가 글루타메이트 잔기를 갖는 2개의 팔미토일 이산 쇠 및 하나의 Aib-치환된 GLP-1 작용제로 구성된 분자 구조물의 합성 (GLP-1-Aib⁸-EG₂-2E-2FA-C16-산 작용제)

[0222] 본 실시예에서, 실시예 2의 아지드기 및 실시예 7의 알킨-함유 지방산 번들 (알킨-EG₂-2E-2FA-C16-산)을 갖는 Aib-치환된 GLP-1 작용제를 아지드와 알킨기 사이에 CuAAC를 통해 커플링하여 하기에 예시된 "GLP-1-Aib⁸-EG₂-2E-2FA-C16-산 작용제"를 생성하였다.

[0223] 실시예 8과 유사하게, 합성은 Shanghai WuXi AppTech Co., Ltd.에 위탁하였다.

[0224] 도 12A는 GLP-1-Aib⁸-EG₂-2E-2FA-C16-산 작용제의 정제를 위한 역상 HPLC 용출 프로파일을 도시한 것으로, GLP-1-Aib⁸-EG₂-2E-2FA-C16-산 작용제의 피크가 26.0 분의 체류 시간으로 OD 215 nm에서 나타났으며, 피크는 화살표로 표시되었다.

[0225] 이와 같이 합성된 GLP-1-Aib⁸-EG₄-2E-2FA-C16-산 작용제의 질량 분광 분석은 도 12B에 제공된 바와 같이, GLP-1-Aib⁸-EG₂-2E-2FA-C16-산 작용제의 분자 구조물의 m.w.가 5,091 달톤임을 나타내었다.



[0226]

[0227]

실시예 13: 스페이서로서 추가 글루타메이트 잔기를 갖는 2개의 스테아로일 이산 쇠 및 하나의 Aib-치환된 GLP-1 작용제로 구성된 분자 구조물의 합성 (GLP-1-Aib⁸-EG₂-2E-2FA-C18-산 작용제)

[0228]

본 실시예에서, 실시예 2의 아지드기 및 실시예 7의 알킨-함유 지방산 번들 (알킨-EG₂-2E-2FA-C18-산)을 갖는 Aib-치환된 GLP-1 작용제를 아지드와 알킨기 사이에 CuAAC를 통해 커플링하여 하기에 예시된 "GLP-1-Aib⁸-EG₂-2E-2FA-C18-산 작용제"를 생성하였다.

[0229]

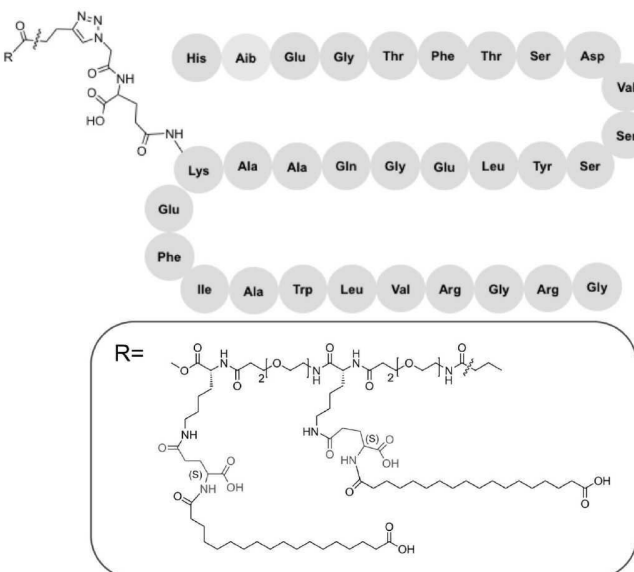
실시예 8과 유사하게, 합성은 Shanghai WuXi AppTech Co., Ltd.에 위탁하였다.

[0230]

도 13A는 GLP-1-Aib⁸-EG₂-2E-2FA-C18-산 작용제의 정제를 위한 역상 HPLC 용출 프로파일을 도시한 것으로, GLP-1-Aib⁸-EG₂-2E-2FA-C18-산 작용제의 피크가 27.815 분의 체류 시간으로 OD 215 nm에서 나타났으며, 피크는 화살표로 표시되었다.

[0231]

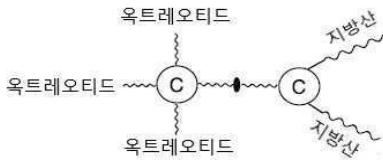
이와 같이 합성된 GLP-1-Aib⁸-EG₄-2E-2FA-C18-산 작용제의 질량 분광 분석은 도 13B에 제공된 바와 같이, GLP-1-Aib⁸-EG₂-2E-2FA-C16-산 작용제의 분자 구조물의 m.w.가 5,148 달톤임을 나타내었다.



[0232]

[0233] 실시예 14: 3개의 옥트레오티드 펩티드 및 2개의 지방족 쇄와 접합된 다중-팔 링커 유닛으로 구성된 분자 구조물의 합성

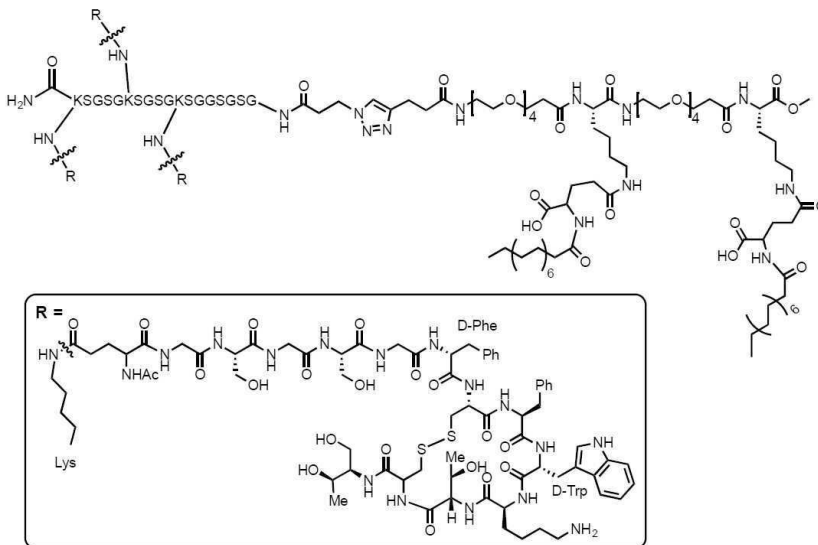
[0234] 본 실시예에서, 실시예 5의 3개의 옥트레오티드 펩티드 및 실시예 7의 알킨-함유 지방산 변들 (알킨-EG₄-2E-2FA-C16) 중 하나와 접합된 아지드-함유 다중-팔 링커 유닛을 아지드와 알킨기 사이의 CuAAC를 통해 커플링하여 하기 예시된, 3개의 옥트레오티드 펩티드 및 2개의 지방족 쇄와 접합된 다중-팔 링커 유닛으로 구성된 분자 구조물을 생성하였다:



[0235]

[0236] 합성 절차는 실시예 8에 기술된 절차와 유사하였다. 간략하게, DMSO (30.0 mL) 중 실시예 5의 3개의 옥트레오티드 펩티드와 접합된 아지드-함유 다중-팔 링커 유닛 (1.0 당량) 및 실시예 7의 2개의 팔미틸 쇄를 가지는 알킨-함유 링커 유닛 (알킨-EG₄-2E-2FA-C16) (0.5 당량)의 혼합물을 탈기시키고, 질소 기체로 3회 퍼징한 후, CuI (0.5 당량) 및 DIEA (2.0 당량)를 첨가하고, 혼합물을 질소 기체 분위기하에 25 °C에서 1시간 동안 교반하였다. LC-MS에 의해 반응 완료를 확인하였다.

[0237] 이와 같이 합성된 분자는, 하기에 나타낸 바와 같이, 3개의 옥트레오티드 펩티드 및 2개의 지방족 쇄와 접합된 다중 팔 링커 유닛으로 구성되었다.



[0238]

[0239] 실시예 15: GLP-1 수용체에 대한 GLP-1-EG₄-2FA-C16 작용제의 결합 특성화

[0240] 본 실시예에서, GLP-1 수용체에 대한 GLP-1-A1a⁸-EG₄-2FA-C16 작용제 (GLP-1-2FA로 약칭)의 결합 능력을 ELISA를 사용하여 조사하였다.

[0241] 간략하게, 96-웰 마이크로타이터 플레이트를 10 µg/ml 농도의 재조합 인간 GLP-1R-IgG.Fc 융합 단백질 (GLP-1R) (대만 타이페이에 소재한 Sino Biological Inc.에서 구입)로 웰당 50 µl로 코팅하였다. 과잉 재조합 GLP-1 수용체 단백질을 세척한 후, 웰을 1시간 동안 0.1% Na₂S₂O₈을 함유하는 pH 7.4, PBS 중 1% BSA로 차단하고, 웰당 50 µl의 GLP-1-EG₄-2FA-C16 작용제, 2개의 팔미토일 쇄를 가지는 알킨-함유 링커 유닛 (알킨-EG₄-2FA-C16, 알킬-2FA로 약칭), 아지드 함유 GLP-1 작용제 (GLP-1-아지드) 및 리라글루타이드 (Victoza, 대만 국립대 의학 유전체학 및 유전정보학 대학원 연구실 (Graduate Institute of Medical Genomics and Proteomics, National Taiwan University)의 장이청 (Yi-Cheng Chang) 박사에게서 받음)를 두 농도 (1 µg/ml 및 10 µg/ml)로 첨가하였다. PBS로 세척한 후, 최종 농도 2 µg/ml로 마우스 mAb IgG 항-hGLP-1 (영국 브리스틀에 소재한 Abcam)을

첨가하고, 37 °C에서 1시간 동안 인큐베이션하였다. PBS, pH7.4로 세척한 후, hGLP-1-결합 항체를 1:10,000에서 HRP-접합 염소 항-마우스 IgG (H+L) (Jackson ImmunoResearch)에 의해 검출하고 37 °C에서 30분 동안 인큐베이션한 다음, TMB 기질 (미국 맨스필드에 소재한 Clinical Science Products)과 인큐베이션하였다. 50 µl의 1M HCl을 첨가하여 반응을 중지시켰다. 플레이트 판독기로 450 nm에서의 흡광도를 측정하였다. 각 막대는 중복 샘플의 평균 OD450 값을 나타낸다. 데이터는 GLP-1-2FA 작용제가 재조합 GLP-1 수용체에 특이적으로 결합할 수 있음을 보여준다 (도 14 참조). 인간 막 결합된 IgE의 CεmX 도메인 유래 세그먼트인 P1-P2 펩티드가 음성 대조군으로 제공되었다.

[0242] **실시예 16: GLP-1-Ala⁸-EG₄-2FA-C16 작용제와 인간 혈청 알부민 (HSA)의 결합 특성화**

[0243] 본 실시예에서, HSA에 대한 GLP-1-Ala⁸-EG₄-2FA-C16 작용제 (GLP-1-2FA로 약칭)의 결합 능력을 ELISA를 사용하여 조사하였다.

[0244] 간략하게, 96-웰 마이크로타이터 플레이트를 37 °C에서 1시간 동안 1×PBS, pH 7.4에서 10 µg/ml 농도의 HSA 단백질로 웰당 50 µl로 코팅하였다. 이어서, 웰을 1시간 동안 0.1% NaN₃을 함유하는 PBS, pH 7.4 중의 1% 카제인으로 차단하고, 아지드-함유 GLP-1 작용제 (GLP-1-아지드), 알킨-EG₄-2FA-C16 (알킨-2FA), 리라글루타이드 또는 GLP-1-2FA 작용제와 1 및 10 µg/ml의 최종 농도로 37 °C에서 1시간 동안 인큐베이션하였다. PBS, pH7.4로 세척한 후, 최종 농도 10 µg/ml의 마우스 항-hGLP-1 mAb (Abcam)를 첨가하고 37 °C에서 1시간 동안 인큐베이션하였다. PBS, pH7.4로 세척한 후, hGLP-1-결합 항체를 1:10,000에서 HRP-접합 염소 항-마우스 IgG (H+L) (Jackson ImmunoResearch)에 의해 검출하고 37 °C에서 30분 동안 인큐베이션한 다음, TMB 기질 (Clinical Science Products)과 인큐베이션하였다. 50 µl의 1M HCl을 첨가하여 반응을 중지시켰다. 플레이트 판독기로 450 nm에서의 흡광도를 측정하였다. 각 막대는 중복 샘플의 평균 OD450 값을 나타낸다. GLP-1-2FA는 리라글루타이드보다 HSA에 더 높은 결합 활성을 나타내는 것으로 관찰되었다 (도 15). GLP-1-아지드, 알킨-2FA 및 이차 항체 단독이 음성 대조군으로 제공되었다.

[0245] **실시예 17: 투석 평형 분석을 사용한 HSA에 대한 GLP-1-Ala⁸-EG₄-2FA-C16 작용제의 알부민-결합 활성의 특성화**

[0246] 수용액에서 HSA에 대한 GLP-1-Ala⁸-EG₄-2FA-C16 작용제 (GLP-1-2FA)의 결합 능력을 추가로 조사하기 위해, 30 µM의 리라글루타이드 또는 GLP-1-2FA 작용제와 함께 150 µM의 0.2 ml HSA 인큐베이션 용액을 함유한 Float-A-Lyzer G2 투석 장치 CE (네덜란드 브레다에 소재한 Spectrum Europe B.V.)를 사용하여 투석-평형 분석을 수행하였다. 투석 주머니의 직경은 5 mm, 내부 부피는 1 ml 및 m.w. 컷오프는 20 kDa로, 투석 주머니 내외로 리라글루타이드 (m.w. 3,751.2 달톤) 또는 GLP-1-2FA 작용제 (m.w. 4,937 달톤)의 통과를 허용하였다. 투석 장치를 4 ml 완충 인큐베이션 용액으로 채워진 챔버에 넣고 밤새 실온에서 진탕기에 놓아 두었다. 1/10 부피의 인큐베이션 용액 및 투석 전 대조군을 변형된 트리신 SDS-PAGE에 로딩하였다. 평형에서의 HSA-결합된 GLP-1-2FA 작용제 또는 리라글루타이드를 쿠마시-블루 염색에 의해 시각화하고 정량화하여, HSA에 대한 GLP-1-2FA 작용제 및 HSA에 대한 리라글루타이드의 상대 결합 능력을 비교하였다.

[0247] GLP-1-2FA 작용제는 수용액에서 리라글루타이드보다 HSA에 더 높은 결합 능력을 나타내는 것으로 관찰되었다 (도 16A). 화살표 #1은 HSA-결합된 리라글루타이드이고; 화살표 #2는 HSA-결합된 GLP-1-2FA 작용제이며; 화살표 #3은 HSA이다. SDS-PAGE 상의 평형에서 HSA-결합된 GLP-1-2FA 작용제 또는 리라글루타이드의 백분율이 도 16B에 도시되어 있다. 데이터는 삼중복 샘플의 평균±SEM으로 제시되었다.

[0248] **실시예 18: 래트 INS-1 세포에서 GLP-1R-매개-cAMP 생성에 대한 GLP-1 유사체의 기능 분석**

[0249] 음식 섭취에 반응하여 장에 의해 방출된 인크레틴에 대한 반응으로 사이클릭 AMP (cAMP)가 β 세포에서 생성되는 것은 잘 알려져 있다. 호르몬 펩티드 GLP-1은 특정 G 단백질에 커플링된 수용체인 GLP-1 수용체를 활성화시켜 cAMP 수준을 증가시킴으로써 G 단백질-반응성 막관통 아데닐릴 사이클라제 계열 중 하나의 자극으로 이어진다.

[0250] 본 실시예에서는, β 세포상에서 GLP-1 수용체에 대한 이들 GLP-1 유사체의 기능 활성을 평가하기 위해, INS-1 세포에서 cAMP 분석을 수행하였다.

[0251] cAMP ELISA 키트 (미국 앤아버에 소재한 Cayman Chemicals)를 사용하여 제조사의 지침에 따라 5개의 GLP-1 유

사체인 GLP-1-Ala⁸-EG₄-2E-2FA-C16, GLP-1-Aib⁸-EG₄-2E-2FA-C16, GLP-1-Aib⁸-EG₄-2E-2FA-C16-산, GLP-1-Aib⁸-EG₂-2E-2FA-C16-산, 및 GLP-1-Aib⁸-EG₂-2E-2FA-C18-산 작용제에 의해 유도된 세포 내 cAMP의 변화를 측정하였다. 간략하게, 1일에, 2×10⁵ INS-1 세포를 웰당 500 μL의 배양 배지를 사용하여 24-웰 플레이트 (미국 윌삼에 소재한 ThermoFisher Scientific)의 각 웰에 플레이팅하였다. 3일째에, 100 nM 농도의 본 GLP-1 유사체를 2.5 mM 글루코스와 함께 웰에 첨가하고, 37 °C에서 20분 동안 인큐베이션하였다. cAMP 생성에 대한 양성 대조군으로서 100 nM 리라글루타이드를 대조 웰에 첨가하고, 37 °C에서 20분 동안 인큐베이션하였다. 저농도 (2.5 mM)의 글루코스를 음성 대조군으로 사용하고, 더 높은 농도 (16 mM)의 글루코스를 글루코스 유도 cAMP 생성에 대한 대조군으로 사용하였다. 20분의 인큐베이션 후, 배지를 흡인하고, 200 μL 0.1N HCl을 각 웰에 첨가하였다. 세포를 세포 스크레이퍼로 표면에서 긁어 내고, 4 °C에서 10분 동안 1,000 × g으로 원심분리하였다. 상등액을 새 튜브로 옮기고 96-웰 플레이트에서의 실험에 사용하였다. 세포에서 사이클릭 AMP 수준을 SpectraMax M2 마이크로플레이트 판독기 (미국 산호세에 소재한 Molecular devices)를 사용하여 420 nm의 파장에서 측정하였다.

[0252] 도 17은 5개의 GLP-1 유사체인 GLP-1-Ala⁸-EG₄-2E-2FA-C16 (Ala⁸-EG₄-C16으로 약칭), GLP-1-Aib⁸-EG₄-2E-2FA-C16 (Aib⁸-EG₄-C16으로 약칭), GLP-1-Aib⁸-EG₄-2E-2FA-C16-산 (Aib⁸-EG₄-C16-산으로 약칭), GLP-1-Aib⁸-EG₂-2E-2FA-C16-산 (Aib⁸-EG₂-C16-산으로 약칭), 및 GLP-1-Aib⁸-EG₂-2E-2FA-C18-산 (Aib⁸-EG₂-C18-산으로 약칭) 작용제와 함께 인큐베이션한 경우에서 INS-1 세포의 cAMP 측정을 나타낸다. 결과는 이들 합성된 GLP-1 유사체 및 리라글루타이드를 INS-1 세포에 첨가하면 측정 시점 (20분)에서 관찰된 세포 cAMP 수준에서 예상된 상승이 유도되는 것으로 나타났다.

[0253] **실시예 19: INS-1 세포에서 활성화된 카스파제-3의 발현 검출을 위한 웨스턴 블롯 분석**

[0254] 절단된 카스파제-3은 아포토시스 과정에서 중요한 실행자이다. 본 실시예에서는, 웨스턴 블롯 분석을 이용하여 카스파제-3의 발현을 검출하였다.

[0255] GLP-1 유사체로 처리된 INS-1 세포를 웰당 xx mM 글루코스 및 500 μL 배양 배지로 배양하였다. 면역블롯 분석을 위해, 단백질을 SDS-PAGE를 사용하여 분리한 후, 폴리비닐리덴 플루오라이드 (PVDF) 막으로 옮겼다. 막을 카스파제-3에 대한 항체 (미국 덴버에 소재한 Cell Signaling Technology), 이어서 양고추냉이 피옥시다제-(HRP) 접합된 이차 항체 (미국 버링엄에 소재한 Epitomics)를 사용하여 프로브하였다. 막을 강화 화학발광 시스템 (미국 버킹엄셔에 소재한 GE Healthcare Life Sciences)을 사용하여 시각화하였다. 단백질 발현 수준을 β-액틴 발현에 대해 정규화하였다.

[0256] 도 18A에 요약된 결과는 GLP-1 유사체로 처리된 카스파제-3의 발현 수준을 보여준다. 도 18B는 GLP-1 유사체와의 인큐베이션시 INS-1 세포에서 카스파제-3의 감소된 발현 수준 정도를 보여준다. 도 18A 및 18B의 결과는 GLP-1-Aib⁸-EG₄-2E-2FA-C16 (Aib⁸-EG₄-C16) 및 GLP-1-Ala⁸-EG₄-2E-2FA-C16 (Ala⁸-EG₄-C16)를 포함한 일부 GLP-1 유사체가 INS-1 세포에서 카스파제-3의 발현 수준을 효과적으로 감소시킬 수 있음을 나타낸다.

[0257] **실시예 20: INS-1 세포의 세포 생존율의 측정을 위한 알라마르 블루 분석**

[0258] 배양된 INS-1 세포를 10% 소 태아 혈청을 함유하는 배양 배지에서 96-웰 플레이트에 웰 당 2×10⁴ 세포의 밀도로 시딩하였다. 48시간 후, 혈청 기아를 위해 세포를 추가 24시간 동안 더 인큐베이션하였다. 세포가 동기화 상태 (synchronization state)가 되면, 세포를 30 mM 글루코스를 함유한 배지에서 배양하고, 100 nM GLP-1 유사체 또는 리라글루타이드로 처리하였다. 정상 배지에서 배양된 세포를 대조군으로 사용하였다.

[0259] 24, 48 및 72시간 동안 인큐베이션한 후, 제조사의 지시에 따라 알라마르 블루 세포 생존 시약 키트 (Invitrogen)에 의해 세포 생존율을 결정하였다.

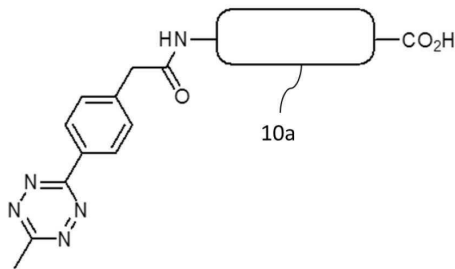
[0260] 세포 증식 비율 (도 19 참조)은 0시간과 비교한 다수 시점에서의 세포 생존율의 비율이다. 결과는 GLP-1-Aib⁸-EG₄-2E-2FA-C16-산 (Aib⁸-EG₄-C16-산), GLP-1-Aib⁸-EG₄-2E-2FA-C16 (Aib⁸-EG₄-C16) 및 GLP-1-Ala⁸-EG₄-2E-2FA-C16 (Ala⁸-EG₄-C16)을 포함한 일부 GLP-1 유사체에 의해 세포 생존율이 리라글루타이드에 비해 상당히 개선되었

다는 것을 보여주고 있다.

- [0261] 실시예 21: II형 당뇨병성 db/db 마우스에서 혈당 농도 감소에 대한 GLP-1 유사체의 생체 내 분석
- [0262] 8주령된 BKS.Cg-+ *Lepr^{db}/+ Lepr^{db}* (db/db)를 대만의 국립 실험실 동물 센터 (NARLabs)로부터 입수하였다. 모든 실험에 케이지 당 동물 4 마리씩을 제어된 주변 조건하에 수용하였다. 동물이 식수 및 통상적인 음식에 자유롭게 접근할 수 있도록 하였다.
- [0263] GLP-1 유사체로 처리된 db/db 마우스에서 혈당 측정의 예비 시험을 위해, 사전 시험 절차를 수행하였다. 마우스를 군 당 3 마리의 마우스로 그룹화하고, 각 샘플을 kg 당 100 nmole의 농도로 사용하였다. 마우스에게 GLP-1 유사체, 리라글루타이드 또는 비히클 (PBS)을 단일 피하 주사로 투여하였다.
- [0264] 혈당 측정을 위해, 꼬리 정맥으로부터 혈액 샘플을 수집하고, 즉시 상업적으로 입수 가능한 효소 전극 방법 (독일 로세에 소재한 ACCU-CHEK Active)을 사용하여 혈당을 측정하였다. 예비 시험 결과, GLP-1 유사체로 처리된 db/db 마우스에서의 혈당 수준은 96시간에 걸쳐 이들 GLP-1 유사체 중 일부에 의해 리라글루타이드로 처리된 마우스에 비해 상당히 감소될 수 있음을 보여주었다.
- [0265] 상기 실시양태들에 대한 설명은 단지 예로서 주어진 것이고 다양한 변형이 당업자에 의해 이루어질 수 있다는 것이 이해될 것이다. 상기 명세서, 실시예 및 데이터는 본 발명의 예시적인 실시양태의 구조 및 사용에 대한 완전한 설명을 제공한다. 본 발명의 다양한 실시양태가 어느 정도 특정하게, 또는 하나 이상의 개별 실시양태를 참조하여 위에서 설명되었지만, 당업자는 본 발명의 사상 또는 범위를 벗어나지 않고 개시된 실시양태를 상당히 변경시킬 수 있다.

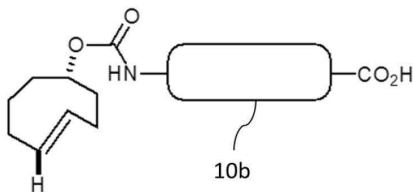
도면

도면1a



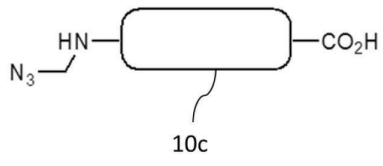
1A

도면1b



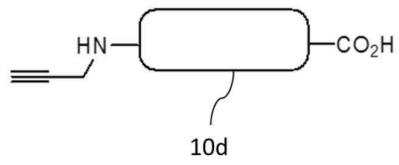
1B

도면1c



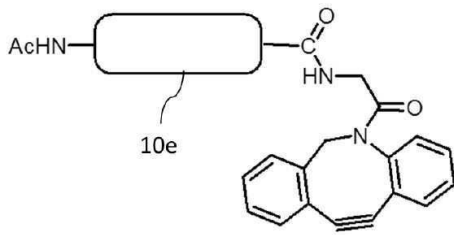
1C

도면1d



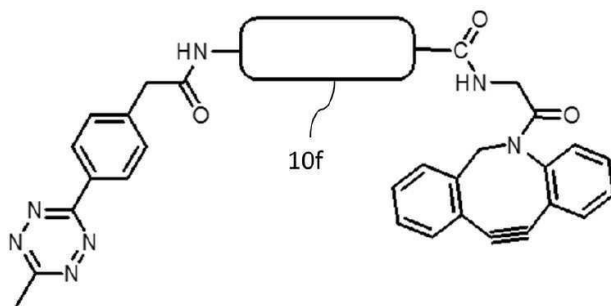
1D

도면1e



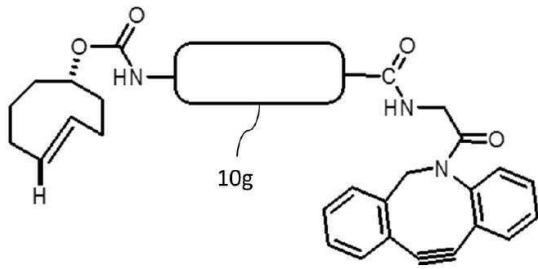
1E

도면1f



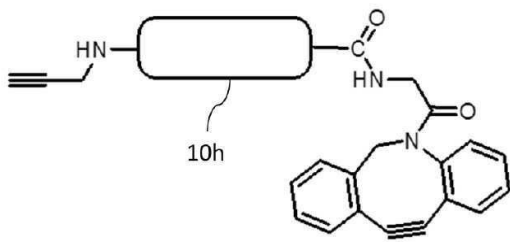
1F

도면1g



1G

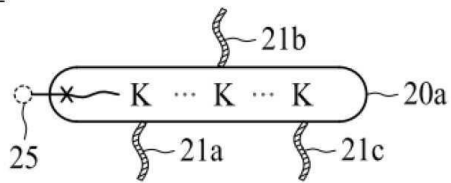
도면1h



1H

도면2a

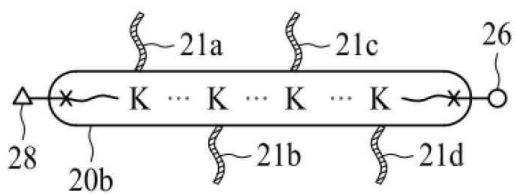
20A



2A

도면2b

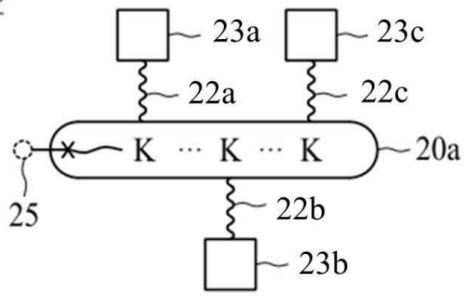
20B



2B

도면2c

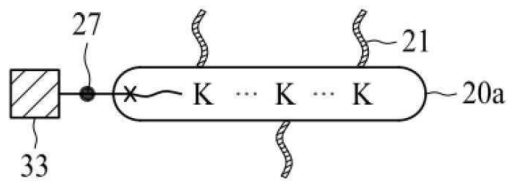
20C



2C

도면3a

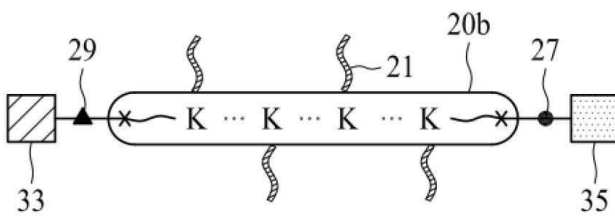
30A



3A

도면3b

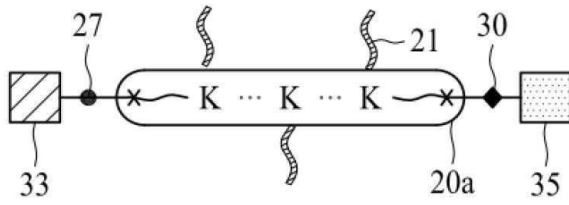
30B



3B

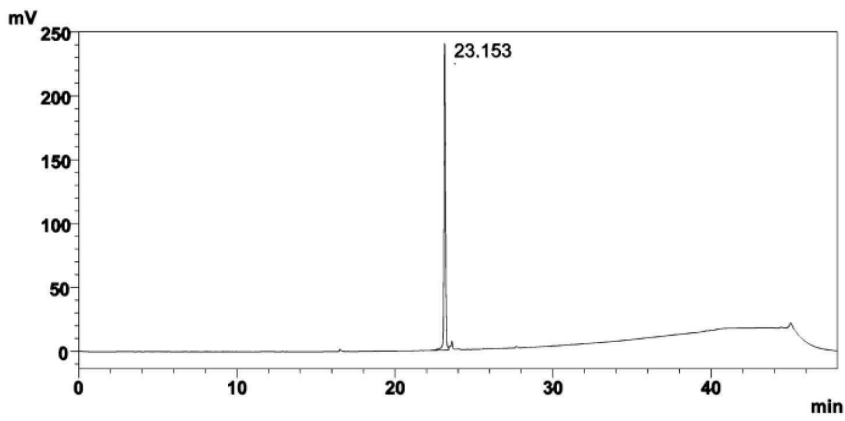
도면3c

30C

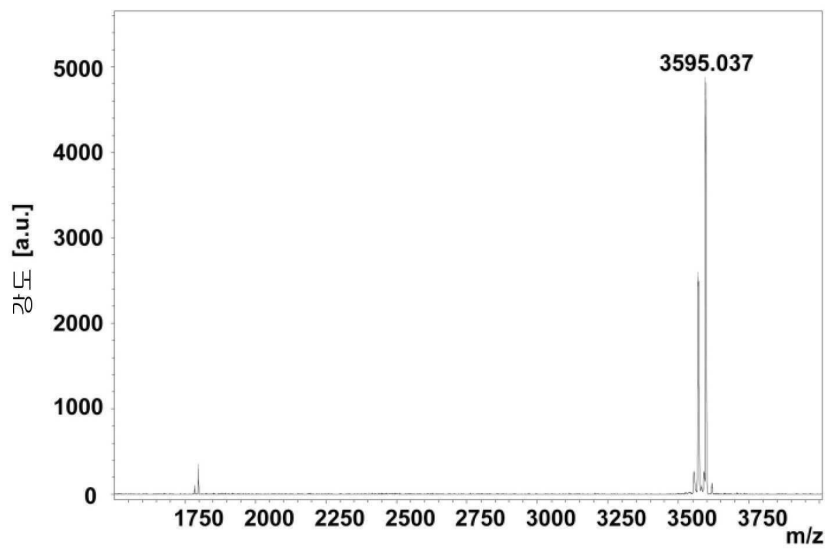


3C

도면4

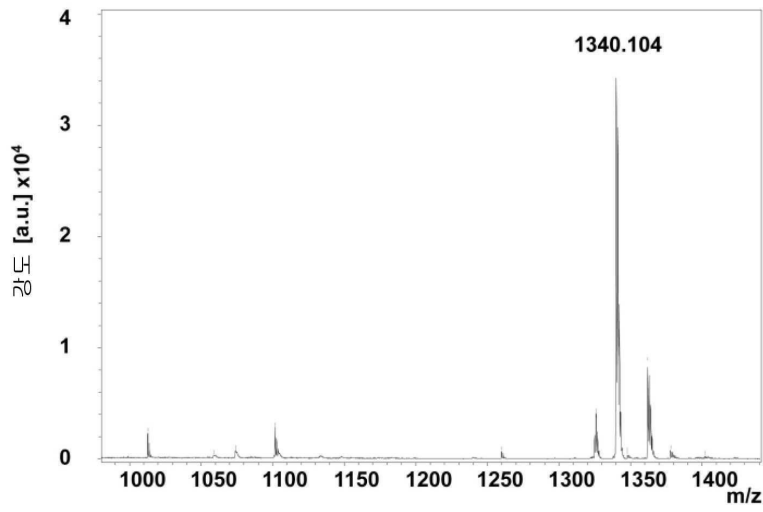


4A

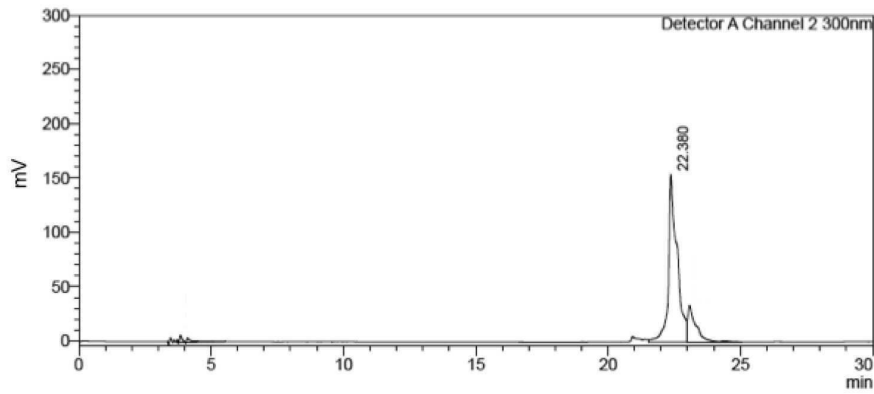


4B

도면5

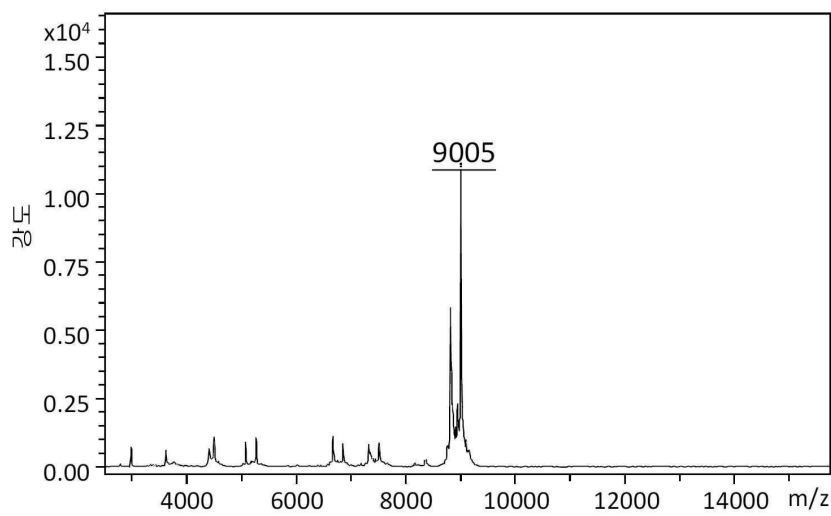


도면6a



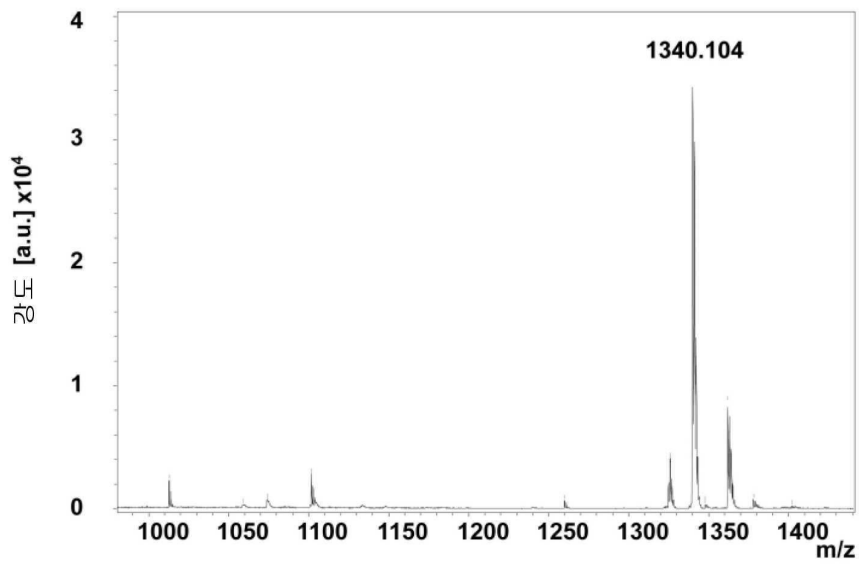
6A

도면6b

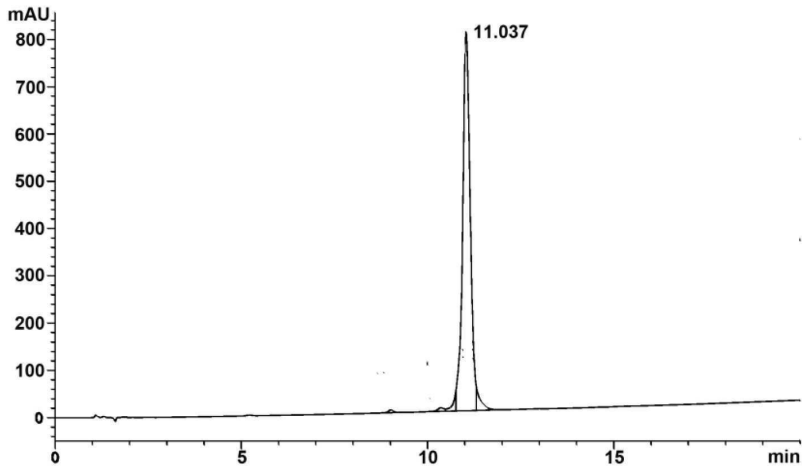


6B

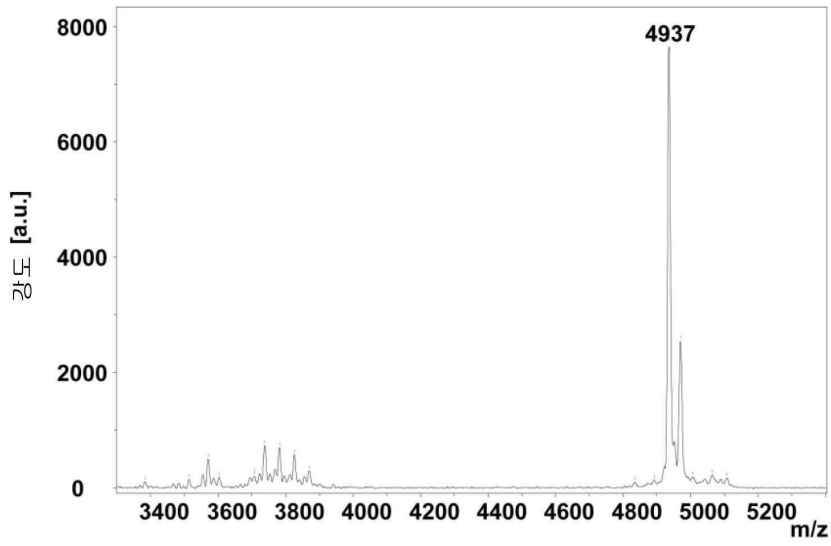
도면7



도면8

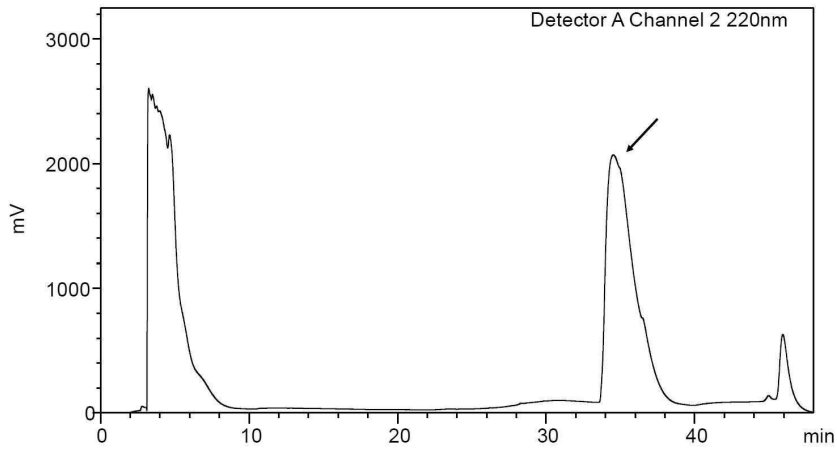


8A

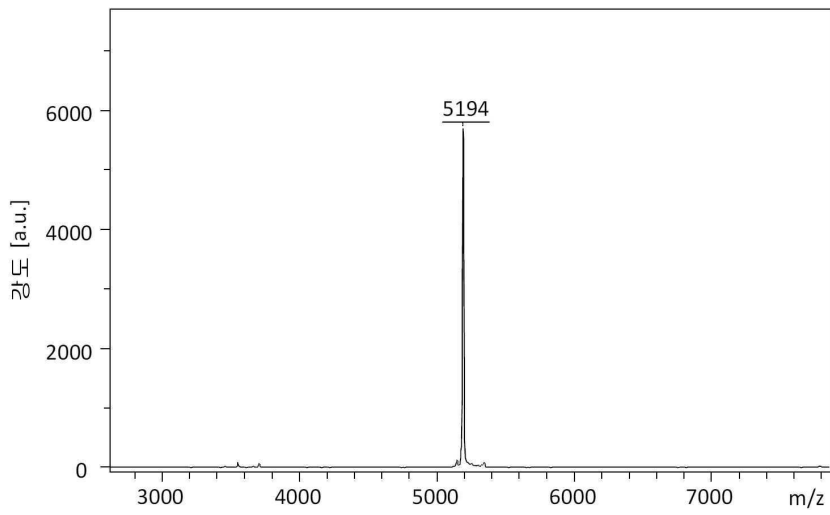


8B

도면9

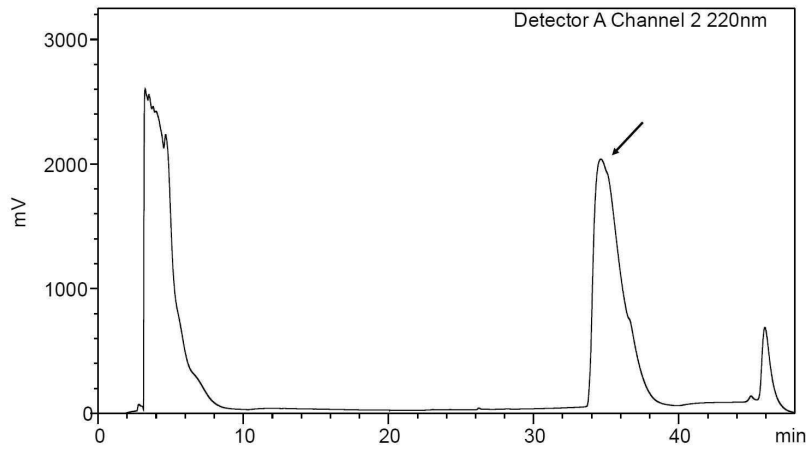


9A

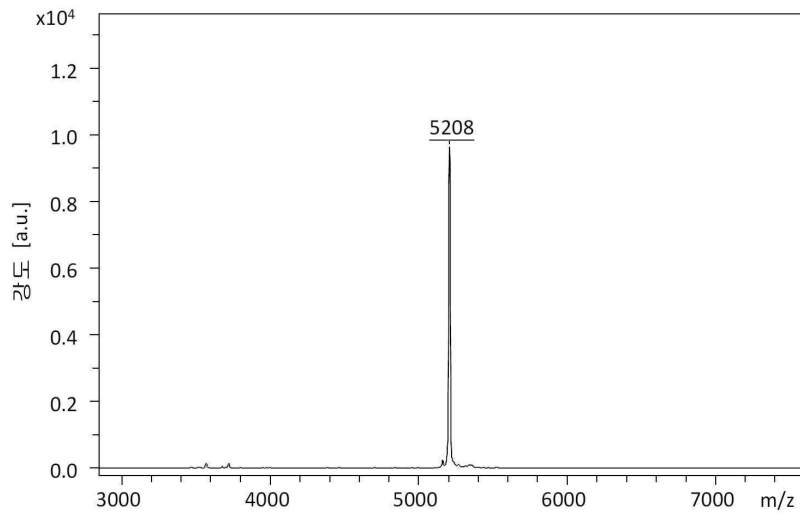


9B

도면10

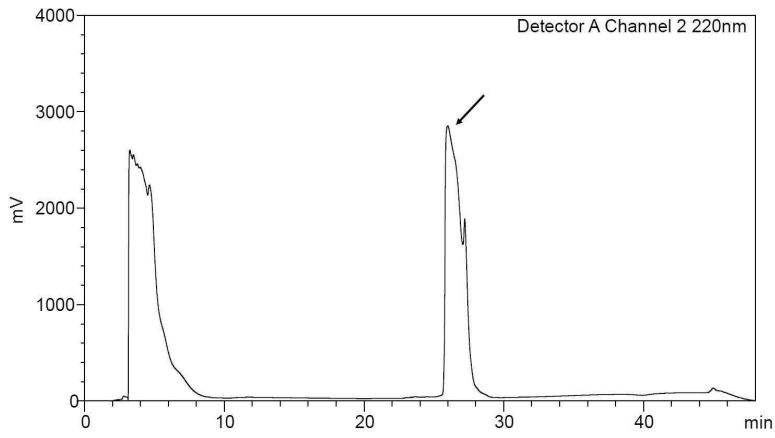


10A

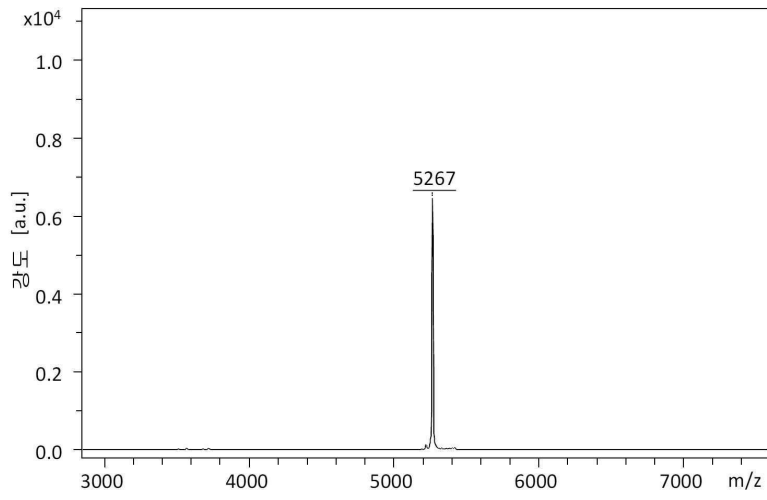


10B

도면11

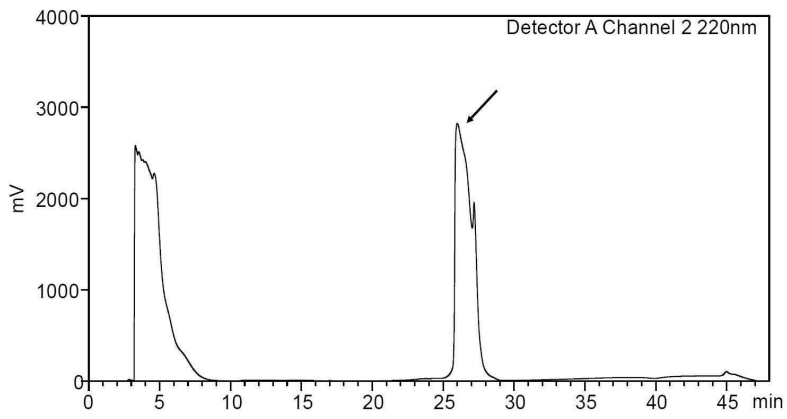


11A

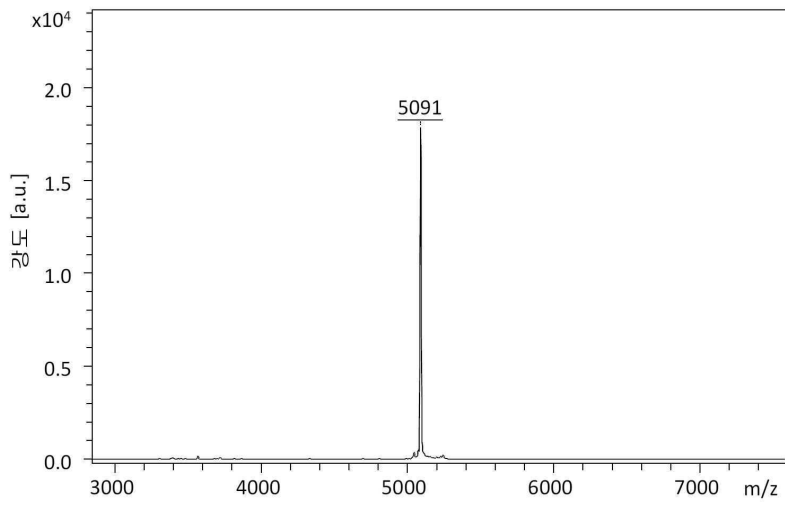


11B

도면12

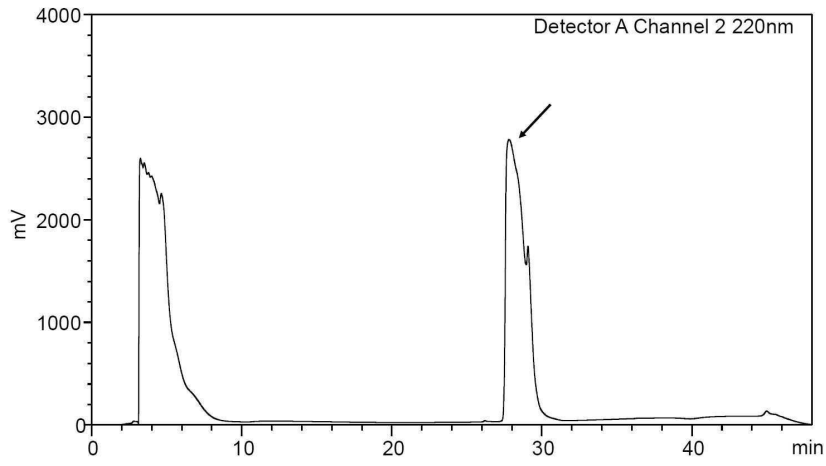


12A

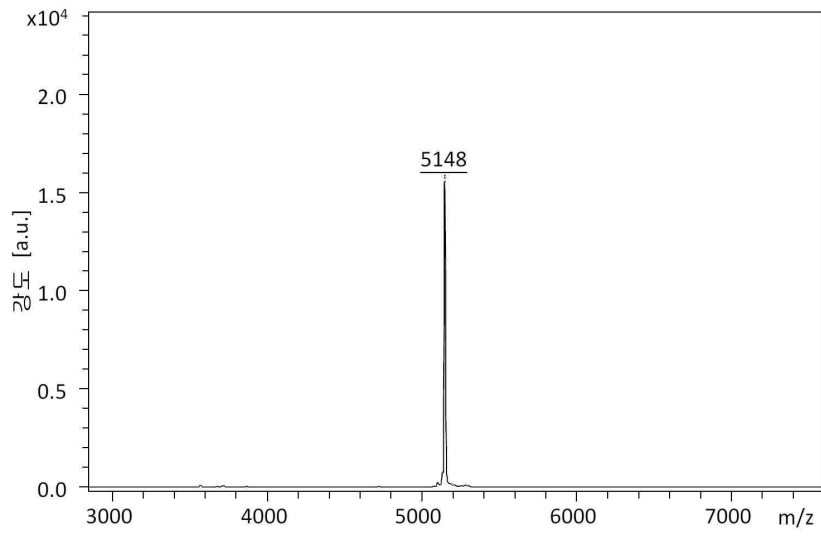


12B

도면13

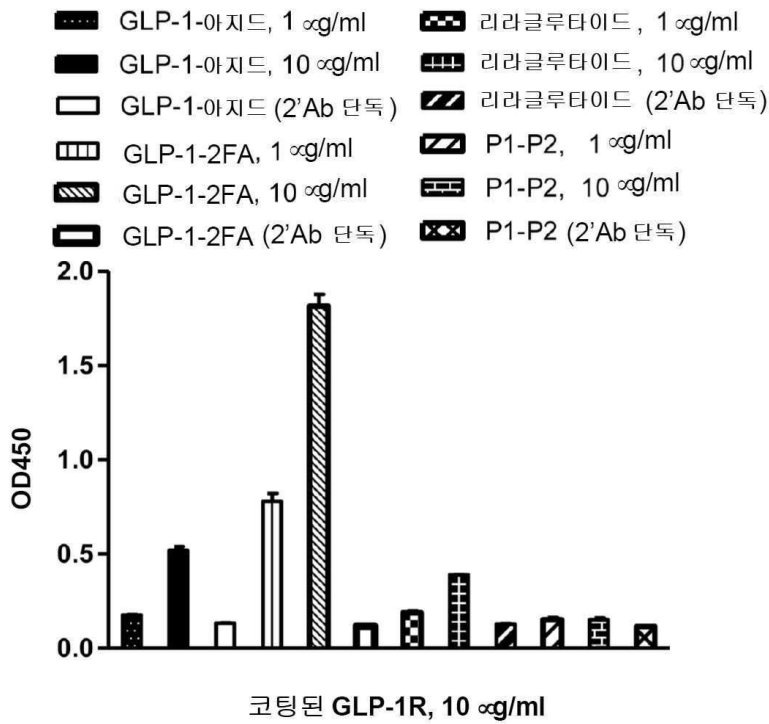


13A

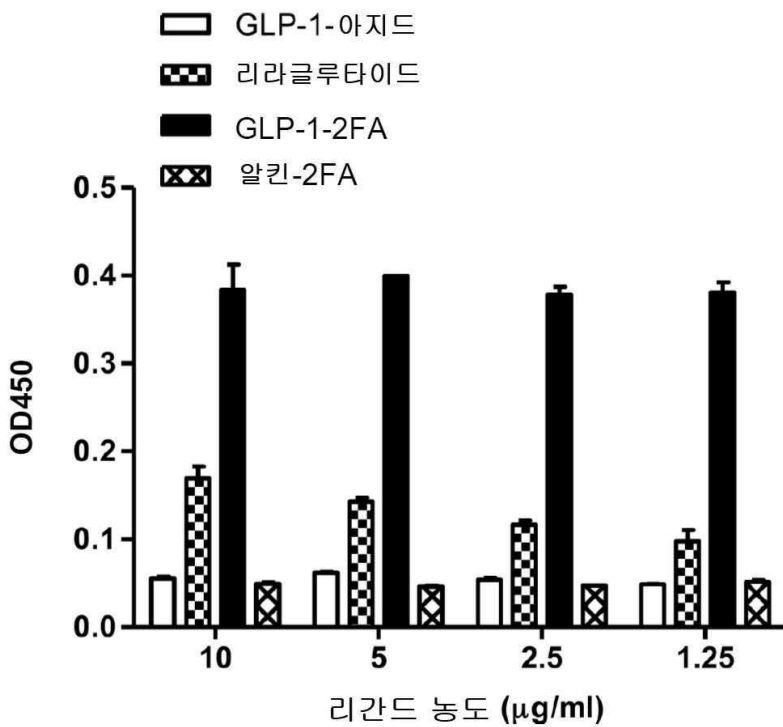


13B

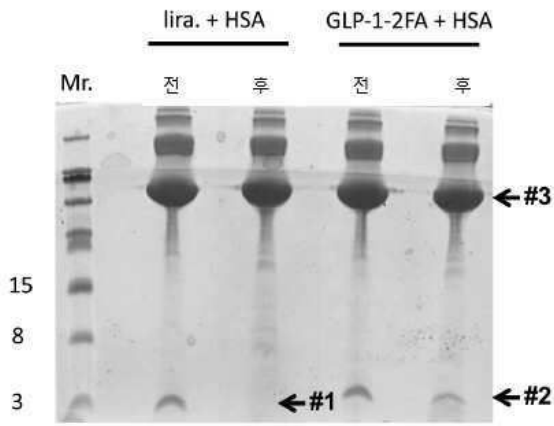
도면14



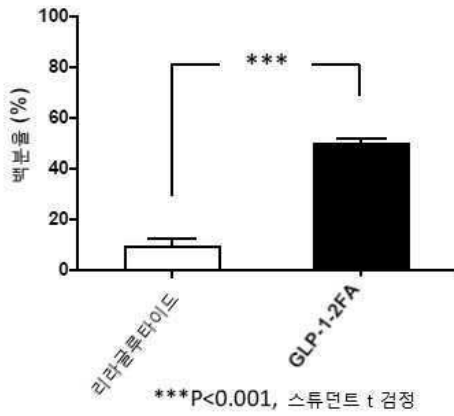
도면15



도면16

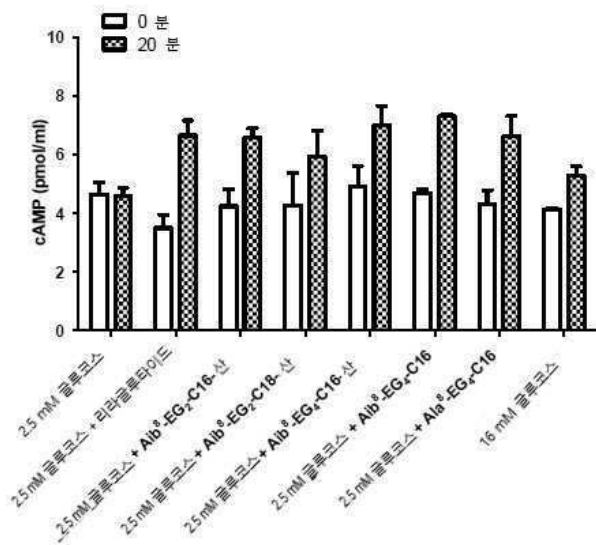


16A

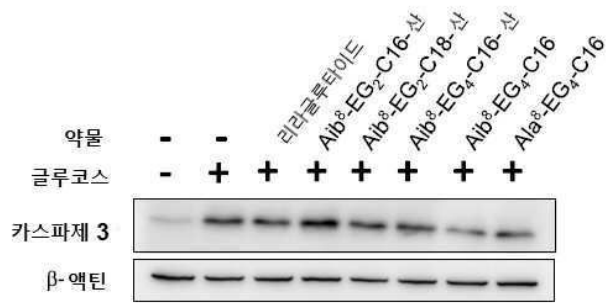


16B

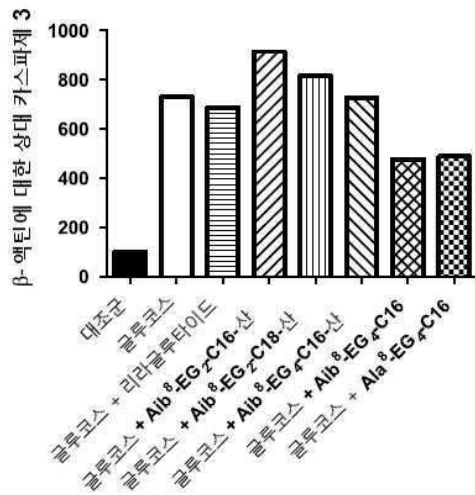
도면17



도면18

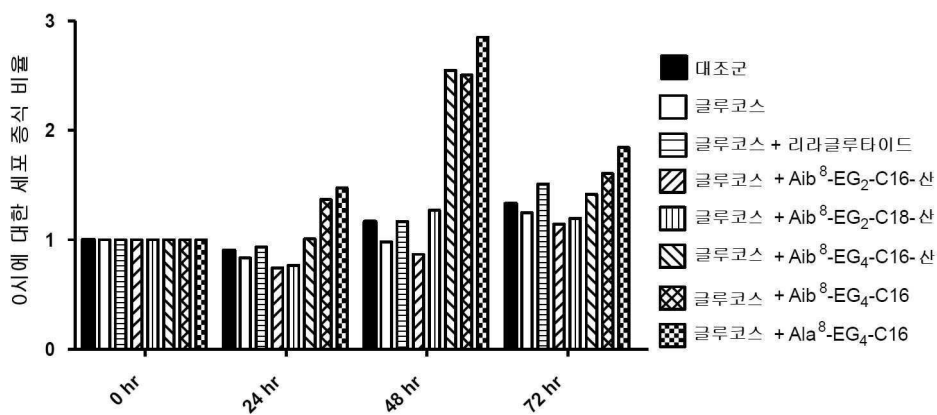


18A



18B

도면19



서열 목록

SEQUENCE LISTING

<110> Chang Tse-Wen

<120> PHARMACEUTICAL CONSTRUCTS WITH ENHANCED BINDING AFFINITY WITH ALBUMIN

<130> P3063-1-PCT

<150> PCT/CN2018/106515

<151> 2018-09-19

<150> PCT/CN2017/102242

<151> 2017-09-19

<160> 8

<170> BiSSAP 1.3.6

<210> 1

<211> 31

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthesized

<400> 1

His Ala Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Gly

1 5 10 15

Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Arg Gly Arg Gly

 20 25 30

<210> 2

<211> 32

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthesized

<220>

<221> MOD_RES

<222> 2

<223> Aib

<400> 2

His Xaa Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Gly

1 5 10 15

Gln Ala Ala Lys Leu Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Arg Gly Arg Gly

 20 25 30

<210> 3

<211> 14

<212> PRT

<213

> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthesized

<400> 3

Cys Ser Gly Gly Gly Gly Phe Cys Phe Trp Lys Thr Cys Thr

1 5 10

<210> 4

<211> 19

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthesized

<400> 4

Cys Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Lys Gly Ser Gly Ser Lys

1 5 10 15

Gly Ser Lys

<210> 5

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<

> 223> Synthesized

<400> 5

Gly Ser Gly Ser Gly Gly Ser Lys Gly Ser Gly Ser Lys Gly Ser Gly

1 5 10 15

Ser Lys

<210> 6

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthesized

<400> 6

Glu Gly Ser Gly Ser Gly Phe Cys Phe Trp Lys Thr Cys Thr

1 5 10

<210> 7

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> MOD_RES

<222> 1

<223> Xaa is a PEGylated amino acid with four EG units Xaa is coupled

with an alkynylpropionyl group

<220>

<223> Synthesized

<220>

<221> MOD_RES

<222> 3

<223> Xaa is a PEGylated amino acid with four EG units

<220>

<221> MOD_RES

<222> 4

<223> esterification

<400> 7

Xaa Lys Xaa Lys

1

<210> 8

<211> 38

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> MOD_RES

<222> 1

<223> Xaa is a PEGylated amino acid with two EG units Xaa is coupled
with an alkynylpropionyl group

<220>

<223> Synthesized

<220>

<221

> MOD_RES

<222> 3

<223> Xaa is a PEGylated amino acid with two EG units

<220>

<221> MOD_RES

<222> 4

<223> esterification

<400> 8

Gly Leu Ala Gly Gly Ser Ala Gln Ser Gln Arg Ala Pro Asp Arg Val

1 5 10 15

Leu Cys His Ser Gly Gln Gln Gln Gly Leu Pro Arg Ala Ala Gly Gly

20 25 30

Ser Val Pro His Pro Arg

35