

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2017년 7월 6일 (06.07.2017)



(10) 국제공개번호
WO 2017/116207 A1

- (51) 국제특허분류:
C07K 14/50 (2006.01) C07K 19/00 (2006.01)
A61K 38/18 (2006.01) A61K 47/50 (2017.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2016/015561
- (22) 국제출원일: 2016년 12월 30일 (30.12.2016)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보:
10-2015-0190678 2015년 12월 31일 (31.12.2015) KR
10-2015-0190938 2015년 12월 31일 (31.12.2015) KR
10-2015-0190972 2015년 12월 31일 (31.12.2015) KR
10-2016-0038317 2016년 3월 30일 (30.03.2016) KR
10-2016-0082760 2016년 6월 30일 (30.06.2016) KR
10-2016-0082764 2016년 6월 30일 (30.06.2016) KR
- (71) 출원인: 한미약품 주식회사 (HANMI PHARM. CO., LTD.) [KR/KR]; 18536 경기도 화성시 팔탄면 무하로 214, Gyeonggi-do (KR).
- (72) 발명자: 허용호 (HEO, Yong Ho); 18469 경기도 화성시 동탄기흥로 550, Gyeonggi-do (KR). 최승호 (CHOI, Seong Ho); 18469 경기도 화성시 동탄기흥로 550, Gyeonggi-do (KR). 정성엽 (JUNG, Sung Youb); 18469 경기도 화성시 동탄기흥로 550, Gyeonggi-do (KR). 권세창 (KWON, Se Chang); 18469 경기도 화성시 동탄기흥로 550, Gyeonggi-do (KR).
- (74) 대리인: 손민 (SON, Min); 06302 서울시 강남구 양재천로 163 6층 한얼국제특허사무소, Seoul (KR).

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

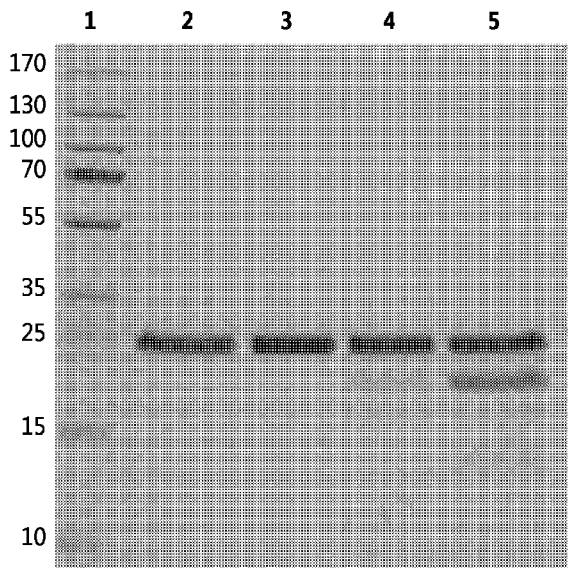
(84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

공개:

- 국제조사보고서와 함께 (조약 제 21 조(3))
- 청구범위 보정 기한 만료 전의 공개이며, 보정서를 접수하는 경우 그에 관하여 별도 공개함 (규칙 48.2(h))
- 명세서의 서열목록 부분과 함께 (규칙 5.2(a))

(54) Title: FGF21 ANALOG, FGF21 CONJUGATE, AND USE THEREOF

(54) 발명의 명칭 : FGF21 아날로그, FGF21 결합체, 및 이의 용도



(57) Abstract: The present invention relates to an FGF21 analog, an FGF21 conjugate, and a use thereof.

(57) 요약서: 본 발명은 FGF21 아날로그, FGF21 결합체, 및 이의 용도에 관한 것이다.

WO 2017/116207 A1

명세서

발명의 명칭: FGF21 아날로그, FGF21 결합체, 및 이의 용도 기술분야

- [1] 본 발명은 FGF21 아날로그, FGF21 결합체, 및 이의 용도에 관한 것이다.

배경기술

- [2] FGF21(Fibroblast growth factor 21)은 FGF19, FGF21 및 FGF23을 포함하는 섬유아세포 성장 인자(FGF)의 서브 패밀리에 속하는 분비형 폴리펩티드이다. FGF21은 혈관신생, 유사분열생식, 패턴 형성, 세포 분화, 대사 조절 및 조직 손상 복구를 비롯한 여러 생리학적 기능에서 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 또한, FGF21은 주로 간에서 발현되는 것으로 보고되어 왔으며, 허혈성 혈관 질환, 상처 치유, 폐, 기관지 또는 폐포 세포 기능의 손상과 관련된 질환, 및 수많은 다른 장애들에 대한 치료제로서 기술되어 왔다. 또한, FGF21은 인슐린의 존재 및 부재 하에 마우스 3T3-L1 지방세포에 장시간 처리하는 경우(72 시간), 상기 세포에서 글루코스 수용을 자극하였으며, ob/ob 및 db/db 마우스 및 8 주령의 ZDF 랫트에서 공복 및 식후 혈중 글루코스, 트리글리세리드, 및 글루카곤 수준을 투여량 의존적인(dose-dependent) 방식으로 감소시키는 것으로 밝혀진 바 있다. 이와 같이 당뇨 및 비만의 치료를 위한 요법으로서 FGF21의 사용에 대한 효력은 증명되었다(WO2003/011213).
- [3]
- [4] 한편, 인간 FGF21은 생체 내 반감기가 짧은 것으로 알려져 있다. 마우스 생체 내에서 인간 FGF21의 반감기는 1시간 내지 2시간에 불과하고, 필리핀 원숭이(Cynomogus monkey)에서의 반감기는 2.5시간 내지 3시간 정도이다. 이에 따라, 2형 당뇨병의 치료에서 FGF21 단백질을 치료제로써 사용하기 위해, FGF21 단백질의 생체 내 반감기 증가가 필요한 실정이다. 반감기가 향상된 FGF21 단백질을 개발하는 것을 통해 환자의 단백질 주사제 투여 빈도를 낮추어 편의성을 증대시킬 수 있다.
- [5]
- [6] 한편, FGF19는 지방세포 및 간세포 양쪽을 표적으로 하여 이들에 대해 효과를 갖는다. 예를 들어, 재조합 인간 FGF19 (rhFGF19)로 처리된 마우스는, 고지방식이 중임에도 불구하고, 증가된 대사율, 증가된 지질 산화, 더 낮은 호흡 지수 및 체중 감소를 나타낸다. 또한, 이 같은 마우스는 식욕 감소 없이 고지방 식이에도 불구하고 더 낮은 혈청 수준의 렙틴, 인슐린, 콜레스테롤 및 트리글리세리드, 및 정상 수준의 혈당을 나타냈다. 또한, 렙틴이 없지만 FGF19 트랜스진(transgene)을 포함한 비만 마우스에서 FGF19는 체중 감소, 저하된 콜레스테롤 및 트리글리세리드를 나타냈고, 당뇨병이 발달되지 않았다. db/db 마우스에서는 rhFGF19가 주사되었을 때, 체중 감소 및 저하된 혈당의 형태로 이의 대사 특성의

반전을 나타낸 바 있다.

- [7] 이와 같은 FGF19 및 FGF21의 대사 효과는 FGFR1c, FGFR2c 및 FGFR3c 수용체에 대한 이들의 결합을 통해 달성되고, 이 중에서 FGFR1c 및 FGFR2c에 대한 결합이 가장 유의하다. 또한, 이러한 수용체들에 대한 FGF19 및 FGF21의 결합은 공동-수용체 베타-클로토(beta-klotho)를 요구한다. 또한, 이러한 FGFR 수용체들이 만연함에도 불구하고, 조직-특이적으로 국소화되어 있는 베타-클로토 공동 수용체로 인하여 FGF19 및 FGF21의 대사 효과는 지방세포 특이적이다.
- [8]
- [9] FGF19는 FGF21과 구별되게 간-특이적 효과를 통해 간에 의한 담즙 생산을 조절하는 것으로 알려져 있다. 구체적으로, 식후 담즙-생산에 반응하여, 담즙산 합성에서의 속도 제한 효소인 콜레스테롤 7-알파-히드록실라제 유전자 (CYP7A1)의 전사를 억제하고, 이로써 FGF19는 담즙 생산을 음성적으로 조절한다. 또한, FGF19는 FGF21에 대해서는 관찰되지 않는 간 분열촉진 효과가 있는 것으로 보인다. 예를 들어, FGF19 트랜스제닉 마우스에서 간세포의 증가된 증식 및 형성이상으로 인해 간 선암종이 발달되고, rhFGF19로 처리된 마우스는 간세포들의 간세포 증식을 나타낸 바 있다(Nicholes, K. et al., Am J Pathol 160, 2295-2307 (2000)).
- [10] 따라서, FGF21에 FGF19의 활성을 보유하도록 하는 경우, FGF19의 유용한 활성, 예컨대 간에서의 담즙 조절 기능을 보유하도록 할 수 있다.
- [11]
- [12] 또한, 엑센딘-4는 힐라 몬스터(*Gila monster, Heloderma suspectum*)의 침샘에 의해 생성되는 39개 아미노산 펩타이드이다. 엑센딘-4는 글루카곤 유사 펩타이드-1(glucagonlike peptide-1, GLP-1) 수용체의 활성화 인자이나, 글루카곤 수용체를 의미있게 활성화하지는 않는다.
- [13] 엑센딘-4는 GLP-1에서 관찰되는 혈당조절 작용의 대부분을 공유한다. 임상연구와 비임상연구는 엑센딘-4가 글루코오스 의존성 인슐린 합성 및 분비의 증진, 글루코오스 의존성 글루카곤 분비의 억제, 위 배출의 둔화, 식품섭취 및 체중 감량 및 베타 세포 질량의 증가 및 베타 세포 기능을 나타내는 마커들의 증가를 포함하는 여러 가지 유의한 항당뇨 성질을 나타낸다는 점을 보여준 바 있다.
- [14] 이러한 효과는 당뇨뿐만 아니라 비만으로 고통 받는 환자들에게도 유의하다. 비만 환자들은 당뇨병, 고혈압, 고지혈증, 심혈관 질환 및 근골격 질환에 걸릴 위험이 더 높다.
- [15] 한편, GLP-1에 비해 엑센딘-4는 디펩티딜 펩티다아제(DPP4)에 의한 분할에 대해 저항성을 나타내, 생체 내에서 더 긴 반감기와 작용시간을 나타낸다.
- [16]
- [17] 엑센딘-4의 N-말단의 아민 그룹을 제거한 데스-아미노-히스티딜 엑센딘-4,

엑센딘-4의 N-말단 아민 그룹을 하이드록실 그룹으로 치환한 베타-히드록시-이미다조-프로피오닐 엑센딘-4, 엑센딘-4의 N-말단 아민 그룹을 두 개의 메틸 그룹으로 수식한 디메틸-히스티딜 엑센딘-4, 및 엑센딘-4의 첫 번째 아미노산인 히스티딘의 알파 탄소 및 알파 탄소에 결합된 N-말단 아민 그룹을 제거한 이미다조-아세틸-엑센딘-4등의 결합체의 생체 내 효력 지속효과가 획기적으로 증가되는 것으로 보고되었다(대한민국 공개특허 제10-2011-0092253호).

[18]

[19] 이러한 배경 하에 본 발명자들은 천연형 FGF21에 비해 반감기가 증대되거나, FGF21의 활성을 보유하면서도 새로운 활성을 보유하는 FGF21 아날로그를 개발하고자 하였고, 새로운 수 종의 FGF21 아날로그로서, FGF21 관련 질환에 있어 치료적 유용성을 가지는 펩타이드를 새롭게 개발하였다.

[20]

발명의 상세한 설명

기술적 과제

[21] 본 발명의 하나의 목적은 천연형 FGF21 (fibroblast growth factor 21)에서 하나 이상의 아미노산이 제거, 부가, 치환, 수식, 또는 이들의 조합으로 변이된, FGF21 아날로그를 제공하는 것이다.

[22] 본 발명의 다른 목적은 상기 FGF21 아날로그를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 제공하는 것이다.

[23] 본 발명의 다른 목적은 상기 폴리뉴클레오티드를 포함하는, 벡터를 제공하는 것이다.

[24] 본 발명의 다른 목적은 상기 폴리뉴클레오티드 또는 상기 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터를 함유하는, 형질전환체를 제공하는 것이다.

[25] 본 발명의 다른 목적은 (i) 천연형 FGF21 또는 상기 FGF21 아날로그; 및 (ii) FcRn 결합물질, 지방산, 폴리에틸렌 글리콜, 아미노산 단편, 및 알부민으로 이루어진 군에서 선택된 캐리어가 결합된, FGF21 결합체를 제공하는 것이다.

[26] 본 발명의 다른 목적은 상기 FGF21 아날로그; 또는 상기 FGF21 아날로그 또는 천연형 FGF21에 FcRn 결합물질, 지방산, 폴리에틸렌 글리콜, 아미노산 단편, 및 알부민으로 이루어진 군에서 선택된 캐리어가 결합된, FGF21 결합체를 유효성분으로 포함하는, 대사증후군의 예방 또는 치료를 위한 약학적 조성물을 제공하는 것이다.

[27] 본 발명의 다른 목적은 상기 형질전환체를 배양하여 FGF21 아날로그를 발현하는 단계; 및 형질전환체 혹은 이의 배양물로부터 상기 발현된 FGF21 아날로그를 회수하는 단계를 포함하는, FGF21 아날로그의 제조방법을 제공하는 것이다.

[28] 본 발명의 다른 목적은 천연형 FGF21 또는 상기 FGF21 아날로그를 FcRn

결합물질, 지방산, 폴리에틸렌 글리콜, 아미노산 단편, 및 알부민으로 이루어진 군에서 선택된 캐리어와 결합시키는 단계를 포함하는, FGF21 결합체의 제조 방법을 제공하는 것이다.

[29]

과제 해결 수단

[30] 본 발명을 구현하는 하나의 양태는 천연형 FGF21 (fibroblast growth factor 21)에서 하나 이상의 아미노산이 제거, 부가, 치환, 수식, 또는 이들의 조합으로 변이된, FGF21 아날로그이다.

[31]

[32] 하나의 구체예로서,

[33] 상기 FGF21 아날로그는 하기 (i) 내지 (iii) 중 하나 이상의 변이를 가지는, FGF21 아날로그인 것을 특징으로 한다.

[34] (i) 천연형 성숙 FGF21의 1번부터 4번까지의 아미노산 서열 중 적어도 하나 이상의 아미노산이 제거됨;

[35] (ii) 천연형 성숙 FGF21의 167번 아미노산인 세린이 세린 외 다른 아미노산으로 치환됨; 및

[36] (iii) 천연형 성숙 FGF21의 168번 아미노산인 메티오닌이 메티오닌 외 다른 아미노산으로 치환됨.

[37]

[38] 다른 구체예로서,

[39] 상기 FGF21 아날로그는 추가로 하기 (iv), (v) 또는 둘 다의 변이를 가지는, FGF21 아날로그인 것을 특징으로 한다:

[40] (iv) 천연형 성숙 FGF21의 170번 아미노산인 글리신이 글리신 외 다른 아미노산으로 치환됨; 및

[41] (v) 천연형 성숙 FGF21의 172번 아미노산인 세린이 세린 외 다른 아미노산으로 치환됨.

[42]

[43] 다른 구체예로서,

[44] 상기 FGF21 아날로그는 하기 (a) 및 (b)의 변이를 가지는, FGF21 아날로그인 것을 특징으로 한다:

[45] (a) 천연형 성숙 FGF21의 1번 아미노산, 1번 및 2번 아미노산, 또는 1번부터 4번까지의 아미노산이 제거됨; 및

[46] (b) 천연형 성숙 FGF21의 167번 아미노산인 세린의 트레오닌으로의 치환, 168번 아미노산인 메티오닌의 알라닌, 페닐알라닌, 또는 이소류신으로의 치환, 또는 167번 아미노산인 세린의 트레오닌으로의 치환 및 168번 아미노산인 메티오닌의 알라닌, 페닐알라닌, 또는 이소류신으로의 치환.

[47]

- [48] 다른 구체예로서,
[49] 상기 FGF21 아날로그는 추가로 천연형 성숙 FGF21의 170번 아미노산인 글리신의 글루탐산으로의 치환; 172번 아미노산인 세린의 류신으로의 치환; 또는 둘 다를 포함하는, FGF21 아날로그인 것을 특징으로 한다.
- [50]
[51] 다른 구체예로서,
[52] 상기 FGF21 아날로그는 서열번호: 18, 20, 22, 24, 26, 및 86으로 이루어진 군에서 선택된, 아미노산 서열을 가지는 FGF21 아날로그인 것을 특징으로 한다.
- [53]
[54] 다른 구체예로서,
[55] 상기 FGF21 아날로그는
[56] 천연형 성숙 FGF21의 5번째 아미노산, 6번째 아미노산, 7번째 아미노산, 8번째 아미노산, 9번째 아미노산, 172번째 아미노산, 176번째 아미노산, 177번째 아미노산, 및 178번째 아미노산으로 이루어진 군에서 선택된 하나 또는 그 이상의 아미노산이 다른 아미노산으로 치환;
[57] 천연형 성숙 FGF19의 N-말단으로부터 16번부터 20번까지의 아미노산 서열을 포함하는, 아미노산 서열의 부가; 또는
[58] 상기 두 가지 변이를 모두 포함하는 아날로그인 것을 특징으로 한다.
- [59]
[60] 다른 구체예로서,
[61] 상기 다른 아미노산은 알라닌인, FGF21 아날로그인 것을 특징으로 한다.
- [62]
[63] 다른 구체예로서,
[64] 상기 천연형 성숙 FGF19의 N-말단으로부터 16번부터 20번까지의 아미노산 서열은 WGDPI (서열번호: 122)인, FGF21 아날로그인 것을 특징으로 한다.
- [65]
[66] 다른 구체예로서,
[67] 상기 천연형 성숙 FGF19의 N-말단으로부터 16번 아미노산부터 20번까지의 아미노산 서열을 포함하는 아미노산 서열은 5개 내지 20개의 아미노산으로 이루어진, FGF21 아날로그인 것을 특징으로 한다.
- [68]
[69] 다른 구체예로서,
[70] 상기 천연형 성숙 FGF19의 N-말단으로부터 16번부터 20번까지의 아미노산 서열을 포함하는 아미노산 서열은, 천연형의 성숙 FGF19의 N-말단으로부터 14번부터 20번까지의 아미노산 서열 혹은 15번부터 20번까지의 아미노산 서열인, FGF21 아날로그인 것을 특징으로 한다.
- [71]
[72] 다른 구체예로서,

- [73] 천연형 성숙 FGF19의 N-말단으로부터 16번부터 20번까지의 아미노산 서열을 포함하는, 아미노산 서열이 부가된 FGF21 아날로그는, 천연형 성숙 FGF19의 N-말단으로부터 16번부터 20번까지의 아미노산 서열을 포함하는, 아미노산 서열이 성숙 FGF21의 전장 서열 혹은 이의 활성 단편에 부가된, FGF21 아날로그인 것을 특징으로 한다.
- [74]
- [75] 다른 구체예로서,
- [76] 상기 천연형 성숙 FGF19의 N-말단으로부터 16번부터 20번까지의 아미노산 서열을 포함하는, 아미노산 서열은 이의 C-말단이 성숙 FGF21의 전장 서열 혹은 이의 활성 단편의 N-말단에 부가된 형태인, FGF21 아날로그인 것을 특징으로 한다.
- [77]
- [78] 다른 구체예로서,
- [79] 상기 천연형 성숙 FGF19의 N-말단으로부터 16번부터 20번까지의 아미노산 서열을 포함하는, 아미노산 서열은 성숙 FGF21의 전장 서열 혹은 이의 활성 단편에 직접적으로 또는 링커를 통하여 연결된, FGF21 아날로그인 것을 특징으로 한다.
- [80]
- [81] 다른 구체예로서,
- [82] 상기 FGF21 아날로그는 서열번호: 46, 48, 50, 52, 54, 56, 58, 60, 62, 64, 66, 68, 70, 72, 74, 76, 78, 80, 119, 및 121로 이루어진 군에서 선택된, 아미노산 서열을 가지는 FGF21 아날로그인 것을 특징으로 한다.
- [83]
- [84] 다른 구체예로서,
- [85] 상기 FGF21 아날로그는
- [86] (i) 성숙 FGF21의 N-말단의 아미노산 서열에 (ii) 성숙 FGF21 또는 FGF19의 C-말단의 아미노산 서열이 부가된, FGF21 아날로그인 것을 특징으로 한다.
- [87]
- [88] 다른 구체예로서,
- [89] 상기 FGF21 아날로그는 상기 성숙 FGF21의 N-말단의 아미노산 서열은,
- [90] 성숙 FGF21의 아미노산 서열에서 N-말단 1번 내지 4번 아미노산은 모두 제외된 FGF21의 N-말단 아미노산 서열인 아날로그인 것을 특징으로 한다.
- [91]
- [92]
- [93] 다른 구체예로서,
- [94] 상기 성숙 FGF21의 N-말단의 아미노산 서열은 성숙 FGF21의 아미노산 서열에서 N-말단으로부터 5번째, 6번째 또는 9번째 아미노산으로부터 C-말단 방향에 위치하는 임의의 아미노산까지의 연속되는 아미노산 서열인,

- [95] FGF21 아날로그인 것을 특징으로 한다.
- [96]
- [97] 다른 구체예로서,
- [98] 상기 연속되는 아미노산 서열은 2개 내지 30개의 아미노산을 가지는,
- [99] FGF21 아날로그인 것을 특징으로 한다.
- [100]
- [101] 다른 구체예로서,
- [102] 상기 성숙 FGF21의 C-말단 아미노산 서열은 성숙 FGF21의 임의의 아미노산으로부터 C-말단으로부터 1번째, 4번째, 또는 11번째 아미노산까지의 연속되는 아미노산 서열인 아날로그인 것을 특징으로 한다.
- [103]
- [104]
- [105] 다른 구체예로서,
- [106] 상기 연속되는 아미노산 서열은 2개 내지 30개의 아미노산을 가지는,
- [107] FGF21 아날로그인 것을 특징으로 한다.
- [108]
- [109] 다른 구체예로서,
- [110] 상기 FGF19의 C-말단 아미노산 서열은 FGF19의 임의의 아미노산으로부터 C-말단으로부터 1번째 아미노산까지의 연속되는 아미노산 서열인,
- [111] FGF21 아날로그인 것을 특징으로 한다.
- [112]
- [113] 다른 구체예로서,
- [114] 상기 연속되는 아미노산 서열은 2개 내지 30개의 아미노산을 가지는,
- [115] FGF21 아날로그인 것을 특징으로 한다.
- [116]
- [117] 다른 구체예로서,
- [118] 성숙 FGF21의 N-말단의 아미노산 서열과 성숙 FGF21 또는 FGF19의 C-말단의 아미노산 서열은 서로 링커를 통해 연결된,
- [119] FGF21 아날로그인 것을 특징으로 한다.
- [120]
- [121] 다른 구체예로서,
- [122] 상기 (i) 성숙 FGF21의 N-말단의 아미노산 서열 및 (ii) 성숙 FGF21 또는 FGF19의 C-말단의 아미노산 서열이 N-말단에서 C-말단 방향으로 순차적으로 배열되거나,
- [123] 상기 (ii) 성숙 FGF21 또는 FGF19의 C-말단의 아미노산 서열 및 (i) 성숙 FGF21의 N-말단의 아미노산 서열이 N-말단에서 C-말단 방향으로 순차적으로 배열된 아날로그인 것을 특징으로 한다.
- [124]

- [125] 다른 구체예로서,
[126] 상기 성숙 FGF21의 N-말단의 아미노산 서열은 서열번호 123 내지 130으로 이루어진 군에서 선택되고,
[127] 상기 성숙 FGF21의 C-말단의 아미노산 서열은 서열번호 131 내지 136으로 이루어진 군에서 선택되고,
[128] 상기 FGF19의 C-말단의 아미노산 서열은 서열번호 137 또는 138인 아날로그인 것을 특징으로 한다.
- [129]
[130] 다른 구체예로서,
[131] 상기 FGF21 아날로그는 서열번호: 90 내지 101로 이루어진 군으로부터 선택된, 아미노산 서열을 가지는, FGF21 아날로그인 것을 특징으로 한다.
- [132]
[133] 다른 구체예로서,
[134] (i) 성숙 FGF21의 N-말단의 아미노산 서열에 (ii) 성숙 FGF21 또는 FGF19의 C-말단의 아미노산 서열이 부가되고, 추가로 (iii) 엑센딘-4(exendin-4) 서열이 부가된, FGF21 아날로그인 것을 특징으로 한다.
- [135]
[136] 다른 구체예로서,
[137] 상기 엑센딘-4 서열은 천연형 엑센딘-4 서열에서 첫 번째 아미노산인 히스티딘의 알파 카본이 제거되고, 32번째부터 39번째 아미노산 서열이 제외된 서열이고,
[138] 상기 성숙 FGF21의 N-말단 아미노산 서열은 성숙 FGF21의 아미노산 서열에서 N-말단 1번 내지 4번 아미노산은 모두 제외된 FGF21의 N-말단 아미노산 서열인, FGF21 아날로그인 것을 특징으로 한다.
- [139]
[140] 다른 구체예로서,
[141] 상기 성숙 FGF21의 N-말단의 아미노산 서열은 성숙 FGF21의 아미노산 서열에서 N-말단으로부터 5번째 아미노산으로부터 C-말단 방향에 위치하는 임의의 아미노산까지의 연속되는 아미노산 서열이고, 상기 성숙 FGF21의 C-말단 아미노산 서열은 성숙 FGF21의 임의의 아미노산으로부터 C-말단으로부터 1번째 또는 4번째 아미노산까지의 연속되는 아미노산 서열이고, 상기 FGF19의 C-말단 아미노산 서열은 FGF19의 임의의 아미노산으로부터 C-말단으로부터 1번째 아미노산까지의 연속되는 아미노산 서열인, FGF21 아날로그인 것을 특징으로 한다.
- [142]
[143] 다른 구체예로서, 상기 연속되는 아미노산 서열은 2개 내지 30개의 아미노산을 가지는, FGF21 아날로그인 것을 특징으로 한다.
- [144]

- [145] 다른 구체예로서, 상기 성숙 FGF21의 N-말단의 아미노산 서열과 성숙 FGF21 또는 FGF19의 C-말단의 아미노산 서열 사이, 또는 성숙 FGF21의 N-말단의 아미노산 서열과 엑센딘-4(exendin-4) 서열은 직접적으로 연결되거나, 링커를 통해 연결된, FGF21 아날로그인 것을 특징으로 한다.
- [146]
- [147] 다른 구체예로서,
- [148] 상기 FGF21 아날로그는 엑센딘-4(exendin-4) 서열, 성숙 FGF21의 N-말단의 아미노산 서열, 및 성숙 FGF21 또는 FGF19의 C-말단의 아미노산 서열이 N-말단에서 C-말단 방향으로 순차적으로 연결된 것인, FGF21 아날로그인 것을 특징으로 한다.
- [149]
- [150] 다른 구체예로서,
- [151] 상기 성숙 FGF21의 N-말단의 아미노산 서열은 서열번호: 139 내지 142로 이루어진 군에서 선택되고, 성숙 FGF21의 C-말단의 아미노산 서열은, 서열번호: 143 내지 147로 이루어진 군에서 선택되고, 성숙 FGF19의 C-말단의 아미노산 서열은, 서열번호: 148 내지 150으로 이루어진 군에서 선택되는,
- [152] FGF21 아날로그인 것을 특징으로 한다.
- [153]
- [154] 다른 구체예로서,
- [155] 상기 FGF21 아날로그는 서열번호: 103 내지 113으로 이루어진 군에서 선택되는, FGF21 아날로그인 것을 특징으로 한다.
- [156]
- [157] 본 발명을 구현하는 다른 양태는 상기 FGF21 아날로그를 코딩하는 폴리뉴클레오티드이다.
- [158]
- [159] 본 발명의 구현하는 다른 양태는 상기 폴리뉴클레오티드를 포함하는, 벡터이다.
- [160]
- [161] 본 발명의 구현하는 다른 양태는 상기 폴리뉴클레오티드 또는 상기 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터를 함유하는, 형질전환체이다.
- [162]
- [163] 본 발명의 구현하는 다른 양태는
- [164] (i) 천연형 FGF21 또는 상기 FGF21 아날로그; 및 (ii) FcRn 결합물질, 지방산, 폴리에틸렌 글리콜, 아미노산 단편, 및 알부민으로 이루어진 군에서 선택된 캐리어가 결합된, FGF21 결합체이다.
- [165] 하나의 구체예로서,
- [166] 상기 FcRn 결합물질은 면역글로불린 Fc 영역인, FGF21 결합체인 것을 특징으로 한다.

[167]

[168] 다른 구체예로서,

[169] (i) 천연형 FGF21 또는 상기 FGF21 아날로그와 (ii) 캐리어가 (iii) 펩타이드 링커, 또는 폴리에틸렌글리콜, 폴리프로필렌 글리콜, 에틸렌 글리콜-프로필렌 글리콜 공중합체, 폴리옥시에틸화폴리올, 폴리비닐알콜, 폴리사카라이드, 텍스트란, 폴리비닐에틸에테르, 생분해성 고분자, 지질 중합체, 키틴류, 히아루론산 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 비펩타이드성 링커를 통해 연결되는 것을 특징으로 한다.

[170]

[171] 본 발명의 구현하는 다른 양태는

[172] 상기 FGF21 아날로그; 또는 상기 FGF21 아날로그 또는 천연형 FGF21에 FcRn 결합물질, 지방산, 폴리에틸렌 글리콜, 아미노산 단편, 및 알부민으로 이루어진 군에서 선택된 캐리어가 결합된, FGF21 결합체를 유효성분으로 포함하는,

[173] 대사증후군의 예방 또는 치료를 위한 약학적 조성물이다.

[174]

[175] 하나의 구체예로서,

[176] 상기 대사증후군은 내당증 장애, 고콜레스테롤혈증, 이상지혈증, 비만, 당뇨, 고혈압, 비알코올지방간염 (nonalcoholic steatohepatitis, NASH), 이상지혈증에 의한 동맥경화, 죽상동맥경화증, 동맥경화증, 관상동맥 심질환(관동맥성 심장병), 혹은 간 대사 질환을 포함하는, 대사증후군의 예방 또는 치료를 위한 약학적 조성물인 것을 특징으로 한다.

[177]

[178] 본 발명의 구현하는 다른 양태는 상기 형질전환체를 배양하여 FGF21 아날로그를 발현하는 단계; 및 형질전환체 혹은 이의 배양물로부터 상기 발현된 FGF21 아날로그를 회수하는 단계를 포함하는, FGF21 아날로그의 제조방법인 것을 특징으로 한다.

[179]

[180] 본 발명의 구현하는 다른 양태는 천연형 FGF21 또는 상기 FGF21 아날로그를 FcRn 결합물질, 지방산, 폴리에틸렌 글리콜, 아미노산 단편, 및 알부민으로 이루어진 군에서 선택된 캐리어와 결합시키는 단계를 포함하는, FGF21 결합체의 제조 방법이다.

발명의 효과

[181] 본 발명에 따른 FGF21 아날로그는 FGF21 관련 질환에 있어 치료적으로 유용하게 적용될 수 있다.

[182]

도면의 간단한 설명

[183] 도 1은, 제조합 FGF21 순도를 단백질 전기영동으로 분석한 결과이다; 1번 레인:

- size marker, 2, 3번 라인: 정제된 FGF21, 4, 5번 라인: 불순물이 포함된 FGF21.
- [184] 도 2는, FGF21 순도를 고압 크로마토그래피로 분석한 결과이다.
- [185] 도 3는, FGF21 아날로그 단백질의 베타-클로토(beta-klotho)에 대한 결합력 및 *in vitro* 글루코스 수용 활성을 확인한 결과이다.
- [186] 도 4a 내지 4c는 각각 FGF21 아날로그 정제 후 순도를 확인하기 위해 HPLC를 사용하여 RPC(Reverse phase chromatography), IEX(Ion exchange chromatography), 그리고 SEC(size exclusion chromatography)를 확인한 결과를 나타낸 도이다.
- [187] 도 5는, FGF19-FGF21 단백질 순도를 고압 크로마토그래피로 분석한 결과이다.
- [188] 도 6a 및 6b는 FGF19-FGF21 단백질의 베타-클로토(beta-klotho)에 대한 결합력 및 *in vitro* 글루코스 수용 활성을 확인한 결과이다.
- [189] 도 7은, FGF19-FGF21 단백질의 FGFR4와의 결합력을 확인한 결과이다.
- [190] 도 8은, FGF21-면역글로불린 Fc 결합체 (LAPS-FGF21로 표기)의 농도별 체중 감소 및 음식 섭취에 미치는 영향을 확인한 결과이다.
- [191] 도 9은, FGF21-면역글로불린 Fc 결합체 (LAPS-FGF21로 표기)의 농도별 혈당 강하 효과를 확인한 결과이다.
- [192] 도 10는, FGF21-면역글로불린 Fc 결합체 (LAPS-FGF21로 표기)의 농도별 콜레스테롤 및 지방산(Triglyceride) 감소 효과를 확인한 결과이다.

[193]

발명의 실시를 위한 최선의 형태

- [194] 본 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용을 설명하면 다음과 같다. 한편, 본원에서 개시된 각각의 설명 및 실시형태는 각각의 다른 설명 및 실시 형태에도 적용될 수 있다. 즉, 본원에서 개시된 다양한 요소들의 모든 조합이 본 발명의 범주에 속한다. 또한, 하기 기술되는 구체적인 서술에 의하여 본 발명의 범주가 제한된다고 할 수 없다.
- [195]
- [196] 또한, 본 명세서 전반을 통하여, 아미노산에 대한 통상의 1문자 및 3문자 코드가 사용된다.
- [197]
- [198] 또한 본 명세서에서 언급된 아미노산은 IUPAC-IUB 명명법에 따라 다음과 같이 약어로 기재하였다.
- [199]
- [200] 알라닌 A 아르기닌 R
- [201] 아스파라긴 N 아스파르트산 D
- [202] 시스테인 C 글루탐산 E
- [203] 글루타민 Q 글리신 G
- [204] 히스티딘 H 이소류신 I
- [205] 류신 L 리신 K

[206] 메티오닌 M 페닐알라닌 F

[207] 프롤린 P 세린 S

[208] 트레오닌 T 트립토판 W

[209] 티로신 Y 발린 V

[210]

[211] 이러한 내용을 바탕으로 하기에서 본 발명을 보다 자세히 설명한다.

[212]

[213] 본 발명을 구현하는 하나의 양태는 천연형 FGF21 (fibroblast growth factor 21)에서 하나 이상의 아미노산이 제거, 부가, 치환, 수식, 또는 이들의 조합으로 변이된, FGF21 아날로그를 제공한다.

[214]

[215] 본 발명에서 용어, "FGF21 아날로그"란 천연형 FGF21의 아미노산 서열에서 하나 이상의 아미노산이 변형된 것을 말한다.

[216] 상기 FGF21 아날로그는 비자연적으로 발생된 (non-naturally occurring) 것일 수 있다.

[217]

[218] 천연형 성숙 FGF21은 지방세포 특이적으로 글루코스 수용을 촉진할 수 있다. 상기 천연형 FGF21 단백질에 대한 정보는 NCBI GenBank 혹은 UnitProt과 같은 공지의 데이터베이스로부터 용이하게 얻을 수 있다.

[219] 예컨대, 천연형 FGF21은 총 209개의 아미노산의 단백질로 미성숙한 형태(immature form)로 발현될 수 있다. 여기서, 상기 단백질의 N-말단으로부터 1 내지 28번 아미노산은 신호 서열에 해당하고, 29번 내지 209번의 아미노산이 성숙 FGF21 단백질의 서열에 해당한다.

[220] 상기 209개의 아미노산을 가지는 천연형 FGF21에서 174번 위치에 류신(L)을 갖는 "FGF-21의 209 아미노산 L형" 및 프롤린(P)을 갖는 "FGF-21의 209 아미노산 P형"이 존재한다. 그러나, 상기 종류에 제한되는 것은 아니다.

[221] 이러한 미성숙 형태의 FGF21의 아미노산 서열을 서열번호 87 및 88 (각각 L형 및 P형)에 각각 기술하였으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[222] 이러한 천연형 성숙 FGF21의 아미노산 서열의 예로, 서열번호 4 (L형) 및 151 (P형)로 표시되는 단백질을 들 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[223]

[224] 본 발명에 따른 FGF21 아날로그는 다음 중 어느 하나 이상의 특성을 가지는 것일 수 있다:

[225] 1) 천연형 FGF21에 비해 FGF21 수용체 및/또는 보조 수용체에 대한 결합력이 감소됨;

[226] 2) 천연형 FGF21에 비해 생체 내 지속성 및/또는 안정성이 증대됨;

[227] 3) 천연형 GLP-1 또는 FGF21에 비해 역가가 감소되고, GLP-1과 FGF21의 이중 작용제로서 작용함;

- [228] 4) FGF19 및 FGF19의 활성을 모두 보유함;
- [229] 5) 생체 내 및 발현 시의 절단 부위가 제거됨.
- [230]
- [231] 상기 천연형 서열에서 하나 이상의 아미노산이 변형된 것이란 천연형 FGF21에서 적어도 하나 이상의 아미노산이 치환(substitution), 부가(addition), 제거(deletion), 수식(modification) 및 이들의 조합으로 이루어지는 군에서 선택된 변형일 수 있다.
- [232] 상기 천연형 FGF21 서열에서 변형되는 아미노산 수는 특별히 이에 제한되지 않으나, 1 이상, 2 이상, 3 이상, 4 이상, 5 이상, 6 이상, 7 이상, 8 이상, 9 이상, 10 이상, 11 이상, 12 이상, 13 이상, 14 이상, 15 이상, 16 이상, 17 이상, 18 이상, 19 이상, 20 이상, 21 이상, 22 이상, 23 이상, 24 이상, 25 이상, 26 이상, 27 이상, 28 이상, 29 이상, 30 이상, 31 이상, 32 이상, 33 이상, 34 이상, 35 이상, 36 이상, 37 이상, 38 이상, 39 이상, 40 이상, 41 이상, 42 이상, 43 이상, 44 이상, 45 이상, 46 이상, 47 이상, 48 이상, 49 이상, 50 이상, 51 이상, 52 이상, 53 이상, 54 이상, 55 이상, 56 이상, 57 이상, 58 이상, 59 이상, 60 이상, 61 이상, 62 이상, 63 이상, 64 이상, 65 이상, 66 이상, 67 이상, 68 이상, 69 이상, 70 이상, 71 이상, 72 이상, 73 이상, 74 이상, 75 이상, 76 이상, 77 이상, 78 이상, 79 이상, 80 이상, 81 이상, 82 이상, 83 이상, 84 이상, 85 이상, 86 이상, 87 이상, 88 이상, 89 이상, 90 이상, 91 이상, 92 이상, 93 이상, 94 이상, 95 이상, 96 이상, 97 이상, 98 이상, 99 이상, 100 이상의 아미노산이 변형된 것일 수 있다.
- [233]
- [234] 상기 아미노산의 치환 또는 부가 시에는 인간 단백질에서 통상적으로 관찰되는 20개의 아미노산뿐만 아니라 비정형 또는 비자연적 발생 아미노산 및 아미노산 유도체를 사용할 수 있다. 비정형 아미노산의 상업적 출처에는 Sigma-Aldrich, ChemPep, Genzyme Pharmaceuticals 등이 포함된다. 이러한 아미노산이 포함된 펩타이드와 정형적인 펩타이드 서열은 상업화된 펩타이드 합성 회사, 예를 들어 미국의 American Peptide Company나 Bachem, 또는 한국의 Anygen을 통해 합성 및 구매 가능하다.
- [235] 아미노산 유도체도 마찬가지로 방식으로 입수할 수 있는데, 그 예를 일부만 들자면 데스아미노-히스티딘(desamino-histidine), 베타-히드록시 이미다조프로피온산(beta-hydroxyimidazopropionic acid), 4-이미다조아세트산(4-imidazoacetic acid), 베타-카르복시 이미다조프로피온산(beta-carboxyimidazopropionic acid) 등을 사용할 수 있다.
- [236]
- [237] 또한, 상기 아미노산의 부가는 FGF21이 아닌 다른 펩타이드, 예컨대 FGF19 및/또는 인슐린 분비 펩타이드 (예, 엑센딘-3, 엑센딘-4)로부터 유래한 아미노산 서열이 부가된 것일 수 있다. 또한, 이러한 아미노산의 부가는 폴리펩타이드 또는 단백질 등과 같이 많은 수의 아미노산이 부가된 것을 포괄한다.

[238]

[239] 한편, FGF21 아날로그는 천연형 FGF21과 동일한 종류의 생체 내의 대사 조절기능을 보유한 펩타이드일 수 있다.

[240]

[241] 또한, 본 발명의 실시예에서 사용된 FGF21은 유전자 재조합 기술로 만든 FGF21 아날로그이지만, 본 발명은 이것에만 국한되는 것이 아니라 상술한 특징적인 활성을 보유하는 다양한 FGF21 아날로그를 포괄한다.

[242] 또한, 상기 FGF21 아날로그는 그 형태에 따라 유전자 재조합 방법으로 제조할 수도 있고, 고체상(solid phase) 방법으로도 제조할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[243]

[244] 본 발명의 FGF21 아날로그는 천연형 FGF21의 유도체, 천연형 FGF21의 단편 등을 포함한다.

[245] 본 발명에서 용어, "천연형 FGF21의 유도체"는 천연형 FGF21과 비교하여 아미노산 서열에 하나 이상의 차이가 있는 펩타이드, 천연형 FGF21 서열을 개질(modification)을 통하여 변형시킨 펩타이드, 천연형 FGF21과 동일한 종류의 생리활성을 보유하는 천연형 FGF21의 모방체를 포함한다.

[246] 구체적으로, 천연형 FGF21과 80% 이상 아미노산 서열에서 상동성을 보이는 것일 수 있고/있거나 FGF21의 아미노산 한 잔기의 일부 그룹이 화학적으로 치환(예; alpha-methylation, alpha-hydroxylation), 제거(예; deamination) 또는 수식(예; N-methylation) 된 형태일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[247] 유도체 제조를 위한 여러 방법들의 조합으로 본 발명에 적용되는 천연형 FGF21의 유도체를 제조할 수 있다.

[248] 또한, 천연형 FGF21의 유도체의 제조를 위한 이러한 변형은 L-형 혹은 D-형 아미노산, 및/또는 비-천연형 아미노산을 이용한 변형; 및/또는 천연형 서열을 개질 혹은 번역 후 변형 (예, 메틸화, 아실화, 유비퀴틴화, 분자 내 공유결합 등) 함으로써 변형하는 것을 모두 포함한다.

[249] 또한, 천연형 FGF21의 아미노 및/또는 카르복시 말단에 하나 또는 그 이상의 아미노산이 추가된 것을 모두 포함한다.

[250] 상기 치환되거나 추가되는 아미노산은 인간 단백질에서 통상적으로 관찰되는 20개의 아미노산뿐만 아니라 비정형 또는 비-자연적 발생 아미노산을 사용할 수 있다. 비정형 아미노산의 상업적 출처에는 Sigma-Aldrich, ChemPep과 Genzyme pharmaceuticals가 포함된다. 이러한 아미노산이 포함된 펩타이드와 정형적인 펩타이드 서열은 상업화된 펩타이드 합성 회사, 예를 들어 미국의 American peptide company나 Bachem, 또는 한국의 Anygen을 통해 합성 및 구매 가능하다.

[251] 본 발명에서 용어, "천연형 FGF21 혹은 천연형 FGF21의 유도체의 단편"은 천연형 FGF21 혹은 천연형 FGF21의 유도체의 아미노 말단 혹은 카르복시 말단에 하나 또는 그 이상의 아미노산이 제거된 형태를 말한다. 이러한 단편은

천연형 FGF21와 동일한 종류의 생리활성을 보유할 수 있다.

- [252] 본 발명의 FGF21 유도체 및 단편에서 각각 사용된 제조방법은 독립적으로 사용될 수 있고 조합도 가능하다. 예를 들어 아미노산 서열이 하나 이상 다르고 N 말단의 아미노 잔기에 탈아미노화(deamination)된 체내에서 혈당 조절 기능을 보유한 펩타이드도 포함된다.
- [253]
- [254] 구체적으로, FGF21 아날로그는 하기 (i) 내지 (iii) 중 하나 이상 또는 둘 이상, 또는 세 가지의 변이를 가질 수 있다:
- [255] (i) 천연형 성숙 FGF21의 1번부터 4번까지의 아미노산 서열 중 적어도 하나 이상의 아미노산이 제거됨;
- [256] (ii) 천연형 성숙 FGF21의 167번 아미노산인 세린이 세린 외 다른 아미노산으로 치환됨; 및
- [257] (iii) 천연형 성숙 FGF21의 168번 아미노산인 메티오닌이 메티오닌 외 다른 아미노산으로 치환됨.
- [258]
- [259] 또한, 상기 (i) 내지 (iii) 중 하나 이상의 변이와 함께, 또는 독립적으로 하기 (iv), (v) 또는 둘 다의 변이를 가질 수 있다:
- [260] (iv) 천연형 성숙 FGF21의 170번 아미노산인 글리신이 글리신 외 다른 아미노산으로 치환됨; 및 (v) 천연형 성숙 FGF21의 172번 아미노산인 세린이 세린 외 다른 아미노산으로 치환됨.
- [261]
- [262] 구체적으로, 상기 (i)에서 천연형 성숙 FGF21의 1번부터 4번까지의 아미노산 서열 중 하나 이상의 아미노산의 제거는, 천연형 성숙 FGF21의 N-말단으로부터 1번 아미노산의 제거, 2번 아미노산의 제거, 3번 아미노산의 제거, 또는 4번 아미노산의 제거, 혹은 이들의 조합을 의미할 수 있으며, 보다 더 구체적으로 천연형 성숙 FGF21의 N-말단으로부터 순차적으로 1개, 2개, 3개 또는 4개의 아미노산 제거를 의미할 수 있다. 구체적으로, 천연형 성숙 FGF21의 1번 아미노산의 제거, 1번 및 2번 아미노산의 제거, 또는 1번부터 4번까지의 아미노산이 제거될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [263] 또한, 상기 (ii) 및 (iii)에서 해당 변이는, 167번째 아미노산인 세린 및/또는 168번째 아미노산인 메티오닌이 트레오닌, 알라닌, 페닐알라닌, 또는 이소류신으로 치환된 것일 수 있고, 보다 구체적으로 각각 천연형 성숙 FGF21의 167번 아미노산인 세린의 트레오닌으로의 치환 및 168번 아미노산인 메티오닌의 알라닌, 페닐알라닌, 또는 이소류신으로의 치환에 해당할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [264] 상기 (iv) 및 (v)에서 기술된 해당 변이는 각각 천연형 성숙 FGF21의 170번 아미노산인 글리신의 글루탐산으로의 치환; 및 172번 아미노산인 세린의 류신으로의 치환에 해당할 수 있다.

[265]

[266] 상술한 변이를 포함하는 FGF21 아날로그의 보다 구체적인 예는 다음과 같다:

[267] (1) 천연형 성숙 FGF21의 1번 아미노산인 히스티딘의 제거, 및 168번 아미노산인 메티오닌의 알라닌으로의 치환을 가지는 FGF21 아날로그 (Δ H, M168A);

[268] (2) 천연형 성숙 FGF21의 1번 아미노산인 히스티딘 및 2번 아미노산인 프롤린의 제거, 및 167번 아미노산인 세린의 트레오닌으로의 치환을 가지는 FGF21 아날로그 (Δ HP, S167T);

[269] (3) 천연형 성숙 FGF21의 1번 아미노산인 히스티딘 및 2번 아미노산인 프롤린의 제거, 및 168번 아미노산인 메티오닌의 알라닌으로의 치환을 가지는 FGF21 아날로그 (Δ HP, M168A);

[270] (4) 천연형 성숙 FGF21의 1번 아미노산인 히스티딘 및 2번 아미노산인 프롤린의 제거, 및 168번 아미노산인 메티오닌의 페닐알라닌으로의 치환을 가지는 FGF21 아날로그 (Δ HP, M168F);

[271] (5) 천연형 성숙 FGF21의 1번 아미노산인 히스티딘 및 2번 아미노산인 프롤린의 제거, 및 168번 아미노산인 메티오닌의 이소류신으로의 치환을 가지는 FGF21 아날로그 (Δ HP, M168I);

[272] (6) 천연형 성숙 FGF21의 1번부터 4번까지의 아미노산 서열의 제거, 167번 아미노산인 세린의 트레오닌으로의 치환, 168번 아미노산인 메티오닌의 이소류신으로의 치환, 170번 아미노산인 글리신의 글루탐산으로의 치환, 및 172번 아미노산인 세린의 류신으로의 치환 [FGF21 (del-HPIP, S167T, M168I, G170E, S172L)].

[273]

[274] 상술한 변이를 가지는 FGF21 아날로그는 1) 상기 아날로그의 발현 시 절단되는 부위가 제거된 것일 수 있고/있거나, 2) 생체 내에서 절단되는 부위, 예컨대 DPPIV(Dipeptidyl peptidase-4)에 의해 절단되는 부위 및/또는 FAP(fibroblast activating protein)에 의해 절단되는 부위가 제거된 것일 수 있고/있거나, 3) 천연형 성숙 FGF21에 비해 수용체 및/또는 보조 수용체에 대한 결합력이 감소된 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[275] 상기 2)와 관련하여, DPPIV에 의해 제거되는 천연형 성숙 FGF21의 N-말단에 위치한 1번부터 4번까지의 아미노산 (예, HPIP)가 제거되고/되거나 FAP에 의해 절단되는 부위 혹은 그 주변에 위치한 아미노산이 다른 아미노산으로 치환된 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[276] 본 발명에 따른 FGF21 아날로그는 발현 시 및/또는 생체 내에서 절단되는 부위가 제거되어 천연형 성숙 FGF21에 비해 긴 반감기를 가지면서, 해리상수 증가에 의해 수용체에 의해 매겨되는 제거가 현저하게 감소하여 혈중 반감기가 증가된 것을 특징으로 한다.

[277]

- [278] 또한, 상기 FGF21 아날로그는 서열번호: 18, 20, 22, 24, 26, 및 86으로 이루어진 군에서 선택된, 아미노산 서열을 가지는 FGF21 아날로그일 수 있으나, 특별히 이에 제한되지 않는다.
- [279]
- [280] 본 발명에 따른 FGF21 아날로그는 상술한 변이와 함께, 또는 독립적으로 하기와 같은 변이를 포함할 수 있다.
- [281]
- [282] 본 발명에 따른 FGF21 아날로그는 천연형 성숙 FGF21의 5번째 아미노산, 6번째 아미노산, 7번째 아미노산, 8번째 아미노산, 9번째 아미노산, 168번째 아미노산, 172번째 아미노산, 176번째 아미노산, 177번째 아미노산, 및 178번째 아미노산으로 이루어진 군에서 선택된 하나 또는 그 이상의 아미노산이 다른 아미노산으로 치환되고/되거나,
- [283] 천연형 성숙 FGF19의 N-말단으로부터 16번부터 20번까지의 아미노산 서열을 포함하는 아미노산 서열이 부가된 특징을 포함하는 아날로그일 수 있다.
- [284]
- [285] 여기서, 상기 다른 아미노산은 알라닌일 수 있으나, 특별히 이에 제한되지 않는다. 또한, 비치환된 FGF21에 비해 FGF21 수용체 및/또는 보조 수용체에 대한 결합력을 감소시킬 수 있는 아미노산이라면 상기 다른 아미노산의 범주에 제한 없이 포함된다.
- [286]
- [287] 상술한 변이를 포함하는 FGF21 아날로그의 보다 구체적인 예는 다음과 같다:
- [288] (1) 천연형 성숙 FGF21의 1번 아미노산인 히스티딘의 제거, 5번 아미노산인 아스파르트산의 알라닌으로의 치환, 및 168번 아미노산인 메티오닌의 알라닌으로의 치환을 가지는 FGF21 아날로그 (Δ H,D5A, M168A);
- [289] (2) 천연형 성숙 FGF21의 1번 아미노산인 히스티딘의 제거, 6번 아미노산인 세린의 알라닌으로의 치환, 및 168번 아미노산인 메티오닌의 알라닌으로의 치환을 가지는 FGF21 아날로그 (Δ H,S6A, M168A);
- [290] (3) 천연형 성숙 FGF21의 1번 아미노산인 히스티딘의 제거, 7번 아미노산인 세린의 알라닌으로의 치환, 및 168번 아미노산인 메티오닌의 알라닌으로의 치환을 가지는 FGF21 아날로그 (Δ H, S7A, M168A);
- [291] (4) 천연형 성숙 FGF21의 1번 아미노산인 히스티딘의 제거, 8번 아미노산인 프롤린의 알라닌으로의 치환, 및 168번 아미노산인 메티오닌의 알라닌으로의 치환을 가지는 FGF21 아날로그 (Δ H, P8A, M168A);
- [292] (5) 천연형 성숙 FGF21의 1번 아미노산인 히스티딘의 제거, 9번 아미노산인 류신의 알라닌으로의 치환, 및 168번 아미노산인 메티오닌의 알라닌으로의 치환을 가지는 FGF21 아날로그 (Δ H, L9A, M168A);
- [293] (6) 천연형 성숙 FGF21의 1번 아미노산인 히스티딘의 제거, 172번째 아미노산인 세린의 알라닌으로의 치환, 및 168번 아미노산인 메티오닌의 알라닌으로의

- 치환을 가지는 FGF21 아날로그 (Δ H, S172A, M168A);
- [294] (7) 천연형 성숙 FGF21의 1번 아미노산인 히스티딘의 제거, 176번 아미노산인 세린의 알라닌으로의 치환, 및 168번 아미노산인 메티오닌의 알라닌으로의 치환을 가지는 FGF21 아날로그 (Δ H, S176A, M168A);
- [295] (8) 천연형 성숙 FGF21의 1번 아미노산인 히스티딘의 제거, 177번 아미노산인 프롤린의 알라닌으로의 치환, 및 168번 아미노산인 메티오닌의 알라닌으로의 치환을 가지는 FGF21 아날로그 (Δ H, P177A, M168A);
- [296] (9) 천연형 성숙 FGF21의 1번 아미노산인 히스티딘의 제거, 178번 아미노산인 세린의 알라닌으로의 치환, 및 168번 아미노산인 메티오닌의 알라닌으로의 치환을 가지는 FGF21 아날로그 (Δ H, S178A, M168A);
- [297] (10) 천연형 성숙 FGF21의 1번 아미노산인 히스티딘 및 2번 아미노산인 프롤린의 제거, 5번 아미노산인 아스파르트산의 알라닌으로의 치환, 및 168번 아미노산인 메티오닌의 알라닌으로의 치환을 가지는 FGF21 아날로그 (Δ HP, D5A, M168A);
- [298] (11) 천연형 성숙 FGF21의 1번 아미노산인 히스티딘 및 2번 아미노산인 프롤린의 제거, 6번 아미노산인 세린의 알라닌으로의 치환, 및 168번 아미노산인 메티오닌의 알라닌으로의 치환을 가지는 FGF21 아날로그 (Δ HP, S6A, M168A);
- [299] (12) 천연형 성숙 FGF21의 1번 아미노산인 히스티딘 및 2번 아미노산인 프롤린의 제거, 7번 아미노산인 세린의 알라닌으로의 치환, 및 168번 아미노산인 메티오닌의 알라닌으로의 치환을 가지는 FGF21 아날로그 (Δ HP, S7A, M168A);
- [300] (13) 천연형 성숙 FGF21의 1번 아미노산인 히스티딘 및 2번 아미노산인 프롤린의 제거, 8번 아미노산인 프롤린의 알라닌으로의 치환, 및 168번 아미노산인 메티오닌의 알라닌으로의 치환을 가지는 FGF21 아날로그 (Δ HP, P8A, M168A);
- [301] (14) 천연형 성숙 FGF21의 1번 아미노산인 히스티딘 및 2번 아미노산인 프롤린의 제거, 9번 아미노산인 류신의 알라닌으로의 치환, 및 168번 아미노산인 메티오닌의 알라닌으로의 치환을 가지는 FGF21 아날로그 (Δ HP, L9A, M168A);
- [302] (15) 천연형 성숙 FGF21의 1번 아미노산인 히스티딘 및 2번 아미노산인 프롤린의 제거, 172번 아미노산인 세린의 알라닌으로의 치환, 및 168번 아미노산인 메티오닌의 알라닌으로의 치환을 가지는 FGF21 아날로그 (Δ HP, S172A, M168A);
- [303] (16) 천연형 성숙 FGF21의 1번 아미노산인 히스티딘 및 2번 아미노산인 프롤린의 제거, 176번 아미노산인 세린의 알라닌으로의 치환, 및 168번 아미노산인 메티오닌의 알라닌으로의 치환을 가지는 FGF21 아날로그 (Δ HP, S176A, M168A);
- [304] (17) 천연형 성숙 FGF21의 1번 아미노산인 히스티딘 및 2번 아미노산인 프롤린의 제거, 177번 아미노산인 프롤린의 알라닌으로의 치환, 및 168번 아미노산인 메티오닌의 알라닌으로의 치환을 가지는 FGF21 아날로그 (Δ HP,

P177A, M168A);

- [305] (18) 천연형 성숙 FGF21의 1번 아미노산인 히스티딘 및 2번 아미노산인 프롤린의 제거, 178번 아미노산인 세린의 알라닌으로의 치환, 및 168번 아미노산인 메티오닌의 알라닌으로의 치환을 가지는 FGF21 아날로그 (Δ HP, S178A, M168A).

[306]

- [307] 상술한 FGF21 아날로그는 절단 부위가 제거되고/되거나, FGF21 수용체 및/또는 보조 수용체 (beta-klotho)와의 결합력이 천연형 FGF21에 비하여 감소되고/되거나, 천연형 FGF21에 비해 감소된 수용체 매개 제거(receptor-mediated clearance, RMC)를 나타내는 것일 수 있다.

[308]

- [309] 또한, 상기 FGF21 아날로그는 서열번호: 46, 48, 50, 52, 54, 56, 58, 60, 62, 64, 66, 68, 70, 72, 74, 76, 78, 및 80으로 이루어진 군에서 선택된, 아미노산 서열을 가지는 FGF21 아날로그일 수 있으나, 특별히 이에 제한되지 않는다.

[310]

- [311] 특별히 이에 제한되지 않으나, 본 발명에 따른 FGF21 아날로그는 FGF19 유래 아미노산 서열이 천연형 FGF21 또는 이의 단편; 또는 천연형 FGF21의 유도체 또는 이의 단편에 부가된 것을 포함한다.

[312]

- [313] 구체적으로, 천연형 성숙 FGF19의 N-말단으로부터 16번부터 20번까지의 아미노산 서열을 포함하는 아미노산 서열이 부가된 특징을 독립적으로 혹은 상술한 변이(들)과 함께 포함할 수 있다.

[314]

- [315] 본 발명에서 기술되는 상기 "FGF19"는 지방세포 및 간세포 모두를 표적으로 하여 대사적 활성을 나타낼 수 있는 물질을 포함한다. 특히 상기 FGF19는 FGFR4에 결합하여 이의 대사 활성, 특히 간에 대한 대사 활성을 나타내는 것일 수 있다. 그 예로, 담즙산 조절 능력을 들 수 있다.

[316]

본 발명에서 상기 FGF19는 천연형 성숙 FGF19 단백질뿐만 아니라, 천연형 FGF19의 유도체, 및 단편을 모두 포함하는 개념으로, 유도체 및 단편에 대한 구체적인 설명은 상기한 FGF21에 기술된 내용이 여기에도 적용된다.

[317]

상기 천연형 성숙 FGF19는 지방세포 및/또는 간 세포에 대해 대사 활성을 나타낼 수 있다. 상기 천연형 FGF19 단백질에 대한 정보는 NCBI GenBank 혹은 UnitProt과 같은 공지의 데이터베이스로부터 용이하게 얻을 수 있다. 예컨대, 상기 천연형 FGF19는 NCBI 접근번호 NP_005108에 해당하는 아미노산 서열을 가질 수 있다. 즉, 천연형 FGF19는 총 216개의 아미노산의 단백질로 발현될 수 있다. 이때, 상기 단백질의 N-말단으로부터 1 내지 22번 아미노산은 신호 서열에 해당하고, 23번 내지 216번의 아미노산이 성숙 FGF19 단백질의 서열에 해당한다.

- [318] 이러한 미성숙 형태(immature form)의 천연형 FGF19의 아미노산 서열의 예로, 서열번호: 89로 표시되는 단백질을 들 수 있으나, 이에 제한되지 않으며, 해당 서열에서 23번 내지 216번 아미노산 서열이 성숙 FGF19의 서열에 해당된다.
- [319]
- [320] 구체적으로, 상기 천연형 성숙 FGF19의 N-말단으로부터 16번부터 20번까지의 아미노산 서열은 WGDPI (서열번호: 122)일 수 있다.
- [321] 구체적으로, 상기 천연형 성숙 FGF19의 N-말단으로부터 16번 아미노산부터 20번까지의 아미노산 서열을 포함하는 아미노산 서열은 5개 내지 20개의 아미노산으로 이루어진 것일 수 있다.
- [322] 보다 구체적으로, 상기 천연형 성숙 FGF19의 N-말단으로부터 16번부터 20번까지의 아미노산 서열을 포함하는 아미노산 서열은, 천연형의 성숙 FGF19의 N-말단으로부터 14번부터 20번까지의 아미노산 서열 (서열번호: 152) 혹은 15번부터 20번까지의 아미노산 서열 (서열번호: 153)일 수 있다.
- [323]
- [324] 또한, 천연형 성숙 FGF19의 N-말단으로부터 16번부터 20번까지의 아미노산 서열을 포함하는, 아미노산 서열이 부가된 FGF21 아날로그는, 천연형 성숙 FGF19의 N-말단으로부터 16번부터 20번까지의 아미노산 서열을 포함하는, 아미노산 서열이 성숙 FGF21의 전장 서열 혹은 이의 활성 단편에 부가된 것일 수 있다.
- [325] 구체적으로, 상기 천연형 성숙 FGF19의 N-말단으로부터 16번부터 20번까지의 아미노산 서열을 포함하는, 아미노산 서열은 이의 C-말단이 성숙 FGF21의 전장 서열 혹은 이의 활성 단편의 N-말단에 부가된 형태인, FGF21 아날로그일 수 있다.
- [326] 또한, 상기 천연형 성숙 FGF19의 N-말단으로부터 16번부터 20번까지의 아미노산 서열을 포함하는, 아미노산 서열은 성숙 FGF21의 전장 서열 혹은 이의 활성 단편에 직접적으로 또는 링커를 통하여 연결된 것일 수 있다.
- [327] 상기 링커는 유연 링커(flexible linker)일 수 있고, 구체적으로 펩타이드 링커 또는 비펩타이드 링커일 수 있다.
- [328] 여기서, "비펩타이드 링커"는 반복 단위가 2개 이상 결합된 생체적합성 링커를 의미하며, 상기 반복 단위들은 펩타이드 결합이 아닌 임의의 공유결합을 통해 서로 연결된다.
- [329] 이러한 비펩타이드 링커의 비제한적인 예로는, 폴리에틸렌 글리콜(polyethylene glycol; PEG) 단독 중합체, 폴리프로필렌 글리콜 단독 중합체, 에틸렌 글리콜-프로필렌 글리콜 공중합체, 폴리옥시 에틸화 폴리올, 폴리비닐 알콜, 폴리사카라이드, 덱스트란, 폴리비닐 에틸 에테르, 생분해성 고분자, 지질 중합체, 키틴류, 히아루론산 또는 이들의 조합을 들 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [330] 또한, 구체적으로 상기 결합체는 FGF19 및 FGF21을 포함하는 융합 단백질의

형태일 수 있다.

[331] 상기 융합 단백질의 예로, 서열번호 119 또는 121의 아미노산 서열로 표시되는 융합 단백질을 들 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 이때, 융합 단백질의 제조에 있어서 각각의 융합 파트너의 재조합적 연결을 위하여 해당 융합 파트너의 본래의 아미노산 서열뿐만 아니라, 융합을 위한 부가적인 아미노산 서열이 존재할 수 있다는 것은 당업자에게 자명하다. 이러한 경우에 있어서까지 기술된 서열번호에 한정되어 융합 단백질의 범위가 해석되어서는 안된다.

[332]

[333] 본 발명에 따른 FGF21 아날로그는 상술한 변이와 함께, 또는 독립적으로 하기와 같은 변이를 포함하는 것일 수 있으나, 특별히 이에 제한되는 것은 아니다.

[334] 구체적으로, (i) 성숙 FGF21의 N-말단의 아미노산 서열에 (ii) 성숙 FGF21 또는 FGF19의 C-말단의 아미노산 서열이 부가된 것일 수 있다.

[335]

[336] 보다 구체적으로, (i) 성숙 FGF21의 N-말단의 아미노산 서열 및 (ii) 성숙 FGF21 또는 FGF19의 C-말단의 아미노산 서열을 포함하는 것일 수 있으며, 상기 (i) 및 (ii)가 직접적으로 또는 간접적으로 연결된, FGF21 모조 펩타이드 유도체 형태일 수 있다.

[337]

[338] 이러한 본 발명의 FGF21 아날로그는 천연형 성숙 FGF21의 N-말단 부위에 위치한 30개 이하의 아미노산 서열과 C-말단 부위에 위치한 30개 이하의 아미노산 서열이 결합된 구조를 가질 수 있다. 또한, 여기서 아미노산 한 잔기의 일부 그룹이 화학적으로 치환(예; α -methylation, α -hydroxylation), 제거(예; deamination) 또는 수식(예; N-methylation) 된 형태일 수 있고, 체내에서 대사를 조절하는 기능을 보유할 수 있다.

[339]

[340] 또한, 상기 FGF21 아날로그는 신호서열이 제외된 성숙 FGF21 서열에서 FGF21 수용체의 결합에 중요한 N-말단의 일부분과 FGF21 공동수용체인 베타-클로소와 직접적으로 결합하는 FGF21 또는 FGF19의 C-말단의 일부분이 결합된 것일 수 있다.

[341]

[342] 또한, 이러한 FGF21 아날로그는 FGF21 수용체에 대한 결합력이 천연형 FGF21 보다 감소한 것일 수 있으며, 해리 상수 증가에 의해 수용체에 의해 매개되는 제거(receptor-mediated clearance)가 현저하게 감소하여 혈중 반감기가 증가된 것일 수 있다.

[343]

[344] 특별히 이에 제한되지는 않으나, 상기 FGF21 아날로그는 신호서열을 포함하지 않는 성숙 FGF21의 아미노산 서열에서 N-말단 1번 내지 4번 아미노산은 모두

제외된, FGF21의 N-말단 아미노산 서열을 포함하는 것일 수 있다.

[345]

[346] 특별히 이에 제한되지는 않으나, 본 발명의 FGF21 아날로그에 포함되는 성숙 FGF21의 N-말단의 아미노산 서열은 성숙 FGF21의 아미노산 서열에서 N-말단으로부터 5번째, 6번째 또는 9번째 아미노산으로부터 C-말단 방향에 위치하는 임의의 아미노산까지의 연속되는 아미노산 서열일 수 있다.

[347] 상기 연속되는 아미노산은 2개, 3개, 4개, 5개, 6개, 7개, 8개, 9개, 10개, 11개, 12개, 13개, 14개, 15개, 16개, 17개, 18개, 19개, 20개, 21개, 22개, 23개, 24개, 25개, 26개, 27개, 28개, 29개, 또는 30개의 아미노산을 가질 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[348] 보다 구체적으로, 상기 성숙 FGF21의 N-말단의 아미노산 서열은 서열번호 123 내지 130으로 이루어진 군에서 선택될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 또한, 본 발명에 따른 천연형 FGF21에 비하여 낮은 역가를 나타내는 FGF21 모조 펩타이드 유도체에 포함되어 작용할 수 있다면 상기 서열에 제한되는 것은 아니며, 상기 서열과 70% 이상, 구체적으로는 80% 이상, 81% 이상, 82% 이상, 83% 이상, 84% 이상, 85% 이상, 86% 이상, 87% 이상, 88% 이상, 89% 이상, 보다 구체적으로는 90% 이상, 91% 이상, 92% 이상, 93% 이상, 94% 이상, 95% 이상, 96% 이상, 97% 이상, 98% 이상, 또는 99% 이상의 유사성을 나타내는 아미노산 서열도 본 발명의 범주에 포함된다. 또한, 이러한 유사성을 가지는 서열로서, 일부 서열이 결실, 변형, 치환 또는 부가된 아미노산 서열을 갖는 경우도 본 발명의 범위 내에 포함됨은 자명하다. 이러한 내용은 이하 후술될 FGF21의 C-말단 아미노산 서열 및 FGF19의 C-말단 아미노산 서열, FGF21 모조 펩타이드 유도체의 구체적인 서열에 대한 설명에도 동일하게 적용된다.

[349] 여기서 "유사성"이란 야생형(wild type) 아미노산 서열 혹은 핵산 서열과의 유사한 정도를 나타내기 위한 것으로서, 이러한 상동성의 비교는 육안으로나 구입이 용이한 당업계에 알려진 비교 프로그램을 이용하여 수행될 수 있다. 시판되는 컴퓨터 프로그램은 2개 이상의 서열간의 유사성을 백분율(%)로 계산할 수 있다. 또한, 유사성(%)은 인접한 서열에 대해 계산될 수 있다.

[350]

[351] 특별히 이에 제한되지는 않으나, 본 발명의 FGF21 모조 펩타이드 유도체에 포함되는 상기 성숙 FGF21의 C-말단 아미노산 서열은 성숙 FGF21의 임의의 아미노산으로부터 C-말단으로부터 1번째, 4번째, 또는 11번째 아미노산까지의 연속되는 아미노산 서열일 수 있다.

[352] 상기 연속되는 아미노산은 2개, 3개, 4개, 5개, 6개, 7개, 8개, 9개, 10개, 11개, 12개, 13개, 14개, 15개, 16개, 17개, 18개, 19개, 20개, 21개, 22개, 23개, 24개, 25개, 26개, 27개, 28개, 29개, 또는 30개의 아미노산을 가질 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[353] 보다 구체적으로, 상기 성숙 FGF21의 C-말단의 아미노산 서열은 서열번호: 131

내지 136으로 이루어진 군에서 선택되는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[354]

[355] 특별히 이에 제한되지는 않으나, 본 발명의 FGF21 아날로그에 포함되는 상기 FGF19의 C-말단 아미노산 서열은 FGF19의 임의의 아미노산으로부터 C-말단으로부터 1번째 아미노산까지의 연속되는 아미노산 서열일 수 있다.

[356] 상기 연속되는 아미노산은 2개, 3개, 4개, 5개, 6개, 7개, 8개, 9개, 10개, 11개, 12개, 13개, 14개, 15개, 16개, 17개, 18개, 19개, 20개, 21개, 22개, 23개, 24개, 25개, 26개, 27개, 28개, 29개, 또는 30개의 아미노산을 가질 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[357] FGF19의 아미노산 서열의 예를 서열번호: 89에 나타내었다. 여기서, 1번부터 24번까지는 신호서열이고 25번부터 216번까지는 성숙 FGF19 아미노산 서열에 해당된다.

[358] 보다 구체적으로, 상기 성숙 FGF19의 C-말단의 아미노산 서열은 서열번호: 137 또는 138일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[359]

[360] 앞서 기술한 바와 같이, 상술한 성숙 FGF21의 N-말단의 아미노산 서열과 성숙 FGF21의 C-말단 아미노산 서열, 또는 성숙 FGF21의 N-말단의 아미노산 서열과 성숙 FGF19의 C-말단 아미노산 서열의 다양한 조합이 본 발명의 범주에 포함된다. 구체적으로, 천연형 성숙 FGF21의 N-말단 4번째, 5번째, 9번째 아미노산부터 시작되는 서열과 C-말단 1번째, 4번째, 11번째 아미노산부터 시작되는 서열의 여러 조합으로 FGF21 모조 펩타이드 유도체가 구성될 수 있다. 그러나, 이에 제한되는 것은 아니며, FGF21 수용체에 대한 결합력이 감소된 FGF21 아날로그는 모두 본 발명의 범주에 속한다.

[361]

[362] 예시적으로 성숙 FGF21의 N-말단의 아미노산 서열은 서열번호 123 내지 130으로 이루어진 군에서 선택되고, 상기 성숙 FGF21의 C-말단의 아미노산 서열은 서열번호 131 내지 136으로 이루어진 군에서 선택되고, 상기 FGF19의 C-말단의 아미노산 서열은 서열번호 137 또는 138인, FGF21 아날로그일 수 있다. 이들의 다양한 조합이 본 발명의 범주에 포함된다.

[363]

[364] 보다 구체적으로, 상기 FGF21 아날로그는 서열번호: 90 내지 101로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함할 수 있다. 그러나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[365]

[366] 상기 FGF21 아날로그는 FGF21 수용체 및/또는 공동 수용체 (즉, 베타-클로소)를 활성화시킬 수 있지만 하면 그 길이는 특별히 제한되지 않으나, 그 예로 4개 내지 100개의 아미노산을 가질 수 있다. 그러나, 상기 기술한 바에 제한되는 것은 아니다.

[367]

[368] 또한, 상기 (i) 성숙 FGF21의 N-말단의 아미노산 서열 및 (ii) 성숙 FGF21 또는 FGF19의 C-말단의 아미노산 서열은 서로 링커를 통해 연결된 것일 수 있다.

[369] 여기서, 상기 링커는 상기 (i)과 (ii)를 연결하고, 해당 FGF21 모조 펩타이드 유도체의 FGF21 수용체에 대한 결합을 가지고 온다면 그 종류는 특별히 제한되지 않는다.

[370] 특별히 이에 제한되지 않으나, 상기 링커는 유연 링커(flexible linker)일 수 있다.

[371] 특별히 이에 제한되지 않으나, 상기 유연 링커는 FGF21의 N-말단 아미노산 서열이 FGF21 수용체와 결합하고 FGF21 또는 FGF19의 C-말단 아미노산 서열이 FGF21 공동수용체와 결합하는 것에 있어 유연성을 증대시킬 수 있다.

[372] 상기 링커는 펩타이드성 링커 또는 비펩타이드성 링커일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 상기 링커에 대해서는 앞서 설명한 바와 같다.

[373]

[374] 특별히 이에 제한되는 것은 아니나, 상기 (i) 성숙 FGF21의 N-말단의 아미노산 서열 및 (ii) 성숙 FGF21 또는 FGF19의 C-말단의 아미노산 서열은 N-말단에서 C-말단 방향으로 순차적으로 배열된 것일 수 있다. 또한, 이에 제한되는 것은 아니며, (ii) 성숙 FGF21 또는 FGF19의 C-말단의 아미노산 서열 및 (i) 성숙 FGF21의 N-말단의 아미노산 서열이 N-말단에서 C-말단 방향으로 순차적으로 배열된 것일 수 있다.

[375] 이때 앞서 설명한 바와 같이 (i)과 (ii)는 링커를 매개로 하여 배열된 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[376]

[377] 본 발명에 따른 FGF21 아날로그는 상술한 변이와 함께, 또는 독립적으로 하기와 같은 변이를 포함하는 것일 수 있으나, 특별히 이에 제한되는 것은 아니다.

[378]

[379] 구체적으로, (i) 성숙 FGF21의 N-말단의 아미노산 서열에 (ii) 성숙 FGF21 또는 FGF19의 C-말단의 아미노산 서열이 부가되고, 추가로 (iii) 엑센딘-4(exendin-4) 서열이 부가된, FGF21 아날로그일 수 있다.

[380]

[381] 보다 구체적으로, 엑센딘-4 (Exendin-4) 서열, 성숙 FGF21 N-말단 영역과 성숙 FGF21 또는 FGF19 C-말단 영역이 포함되어 결합된, 이중 GLP-1/FGF21 작용제인 FGF21 아날로그일 수 있다.

[382] 상기 FGF21 아날로그는 천연형 GLP-1 (Glucagon-like peptide-1) 또는 FGF21에 비해 GLP-1 또는 FGF21 역가가 감소된 것일 수 있다.

[383]

[384] 이와 같은 이중 GLP-1/FGF21 작용제인 FGF21 아날로그는 GLP-1 수용체, FGF21 수용체, 및/또는 FGF21 공동수용체에 대한 결합력이 천연형 GLP-1과

FGF21 보다 감소한 것으로 해리 상수 증가에 의해 수용체에 의해 매개되는 제거가 현저하게 감소하여 혈중 반감기가 증가된 것일 수 있다.

[385]

[386] 상기 "이중 GLP-1/FGF21 작용제"는 엑센딘-4 펩타이드 유래 서열, 성숙 FGF21 N-말단 서열과, 성숙 FGF21 또는 FGF19의 C-말단 서열을 포함하는 것일 수 있다. 또한, 이와 같은 구조적 특성으로 GLP-1 및/또는 FGF21 역가가 감소된 것일 수 있으며, 이러한 특성을 보유하는 이중 GLP-1/FGF21 작용제라면 제한없이 본 발명의 범주에 포함된다.

[387]

[388] 구체적으로, 상기 이중 GLP-1/FGF21 작용제에 포함되는 엑센딘-4 펩타이드 유래 서열은, 엑센딘-4 서열에서 첫 번째 아미노산인 히스티딘의 알파 탄소이 제거된 엑센딘-4, 즉 이미다조아세틸-Exendin-4 (imidazoacetyl-exendin-4, CA-엑센딘-4) 유래 서열일 수 있다.

[389]

구체적으로, 천연형 엑센딘-4 서열에서 첫 번째 아미노산인 히스티딘의 알파 카본이 제거되고, 32번째부터 39번째 아미노산 서열이 제외된 서열일 수 있다. 그러나, 이에 제한되지 않으며, 상기 엑센딘-4 서열은 GLP-1 역가가 감소된 모든 CA-엑세딘-4 서열을 포함한다.

[390]

[391] 또한, 상기 이중 GLP-1/FGF21 작용제에 적용되는 상기 FGF21 서열은 신호서열을 제외한 성숙 FGF21 서열에서 FGF21 수용체의 결합에 중요한 N-말단의 일부분과 FGF21 공동수용체인 베타클로소와 직접적으로 결합하는 C-말단의 일부분이 결합되어 구성된 서열일 수 있다.

[392]

[393] 본 발명에서 용어 "N-말단" 또는 "C-말단"은 상기 이중 GLP-1/FGF21 작용제를 구성할 수 있는 FGF21 또는 FGF19의 N-말단 영역 또는 C-말단 영역을 의미할 수 있다.

[394]

[395] 본 발명의 이중 GLP-1/FGF21 작용제는 엑센딘-4 펩타이드와 성숙 FGF21 아미노산 서열의 N-말단 서열, 그리고 성숙 FGF21 또는 FGF19 아미노산 서열의 C-말단이 포함된 이중 작용제이지만 본 발명은 이것에만 국한되는 것이 아니라 *in-vitro* 역가가 감소된 모든 이중 GLP-1/FGF21 작용제를 포함한다.

[396]

한편, FGF19는 FGF21과 같이 FGF 수용체에 결합할 때 FGF 공동수용체인 베타클로소와의 결합이 선행되는데 FGF19의 C-말단이 베타클로소와 결합하고 그 결합력이 FGF21의 C-말단보다 강한 것으로 알려져 있다. 이러한 이중 GLP-1/FGF21 작용제에서 성숙 FGF21 N-말단과 FGF19 C-말단의 결합으로 이루어진 서열도 포함한다.

[397]

본 발명에 사용되는 FGF21 N-말단 아미노산 서열은 신호서열을 포함하지 않는 성숙 FGF21 아미노산 서열에서 활성화에 영향을 미치지 않는 N-말단 1번째

아미노산(Histidine)부터 4번째 아미노산(Proline)까지 제외한 N-말단 부위의 아미노산 서열을 사용할 수 있고, 구체적으로 성숙 FGF21의 아미노산 서열에서 N-말단으로부터 5번째 아미노산으로부터 C-말단 방향에 위치하는 임의의 아미노산까지의 연속되는 아미노산 서열을 사용할 수 있다.

[398] 또한, 상기 성숙 FGF21의 C-말단 아미노산 서열은 성숙 FGF21의 임의의 아미노산으로부터 C-말단으로부터 1번째 또는 4번째 아미노산까지의 연속되는 아미노산 서열이고, 상기 FGF19의 C-말단 아미노산 서열은 FGF19의 임의의 아미노산으로부터 C-말단으로부터 1번째 아미노산까지의 연속되는 아미노산 서열일 수 있다.

[399] 상기 연속되는 아미노산 서열은 2개 내지 30개의 아미노산 서열로 구성되는 것일 수 있다.

[400] 이러한 (i) 엑센딘-4 서열, (ii) FGF21 N-말단 아미노산 서열, 및 (iii) FGF21 C-말단 아미노산 서열 또는 FGF19 C-말단 아미노산 서열이 서로 결합된, FGF21 아날로그일 수 있다.

[401] 또한, 상기 성숙 FGF21의 N-말단의 아미노산 서열과 성숙 FGF21 또는 FGF19의 C-말단의 아미노산 서열 사이, 또는 성숙 FGF21의 N-말단의 아미노산 서열과 엑센딘-4(exendin-4) 서열은 직접적으로 연결되거나, 링커를 통해 연결된 것일 수 있으며, 상기 링커에 대해서는 앞서 설명한 바와 같다.

[402] 상기 링커는 GLP-1 아날로그인 엑센딘-4가 GLP-1 수용체에 결합하는 것에 있어 유연성을 증대시킬 수 있다. 또한 FGF21의 N-말단이 FGF21 수용체와 결합하고 FGF21 또는 FGF19의 C-말단이 FGF21 공동수용체와 결합하는데 유연성을 증대시킬 수 있다.

[403]

[404] 또한, 상기 FGF21 아날로그는 엑센딘-4 서열, 성숙 FGF21의 N-말단의 아미노산 서열, 및 성숙 FGF21 또는 FGF19의 C-말단의 아미노산 서열이 N-말단에서 C-말단 방향으로 순차적으로 연결된 것일 수 있다.

[405]

[406] 보다 구체적으로, 상기 성숙 FGF21의 N-말단의 아미노산 서열은 서열번호: 139 내지 142로 이루어진 군에서 선택되고, 성숙 FGF21의 C-말단의 아미노산 서열은, 서열번호: 143 내지 147로 이루어진 군에서 선택되고, 성숙 FGF19의 C-말단의 아미노산 서열은, 서열번호: 148 내지 150으로 이루어진 군에서 선택되는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[407]

[408] 보다 구체적인 예로서, 상기 FGF21 아날로그는 서열번호: 103 내지 113으로 이루어진 군에서 선택되는 것일 수 있다.

[409]

[410] 한편, 본 발명의 FGF21 아날로그는 표준 합성 방법, 제조합 발현 시스템, 또는 임의의 다른 당해 분야의 방법에 의해 제조될 수 있다.

- [411] 따라서, 본 발명에 따른 FGF21 아날로그는, 예를 들어 하기를 포함하는 방법을 포함하는 다수의 방법으로 합성될 수 있다:
- [412] (a) 펩타이드를 고체상 또는 액체상 방법의 수단으로 단계적으로 또는 단편 조립에 의해 합성하고, 최종 펩타이드 생성물을 분리 및 정제하는 방법; 또는
- [413] (b) 펩타이드를 인코딩하는 핵산 작제물을 숙주세포 내에서 발현시키고, 발현 생성물을 숙주 세포 배양물로부터 회수하는 방법; 또는
- [414] (c) 펩타이드를 인코딩하는 핵산 작제물의 무세포 시험관 내 발현을 수행하고, 발현 생성물을 회수하는 방법; 또는
- [415] (d) (a), (b) 및 (c)의 임의의 조합으로 펩타이드의 단편을 수득하고, 이어서 단편을 연결시켜 펩타이드를 수득하고, 당해 펩타이드를 회수하는 방법.
- [416]
- [417] 본 발명을 구현하는 다른 양태는 상기 FGF21 아날로그를 코딩하는 폴리뉴클레오티드, 상기 폴리뉴클레오티드를 포함하는, 벡터, 또는 상기 폴리뉴클레오티드 또는 상기 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터를 함유하는, 형질전환체를 제공한다.
- [418] 상기 FGF21 아날로그에 대해서는 앞서 설명한 바와 같다.
- [419]
- [420] 본 발명에서 용어 "벡터"는 적합한 숙주 내에서 목적 단백질을, 예컨대 상기 FGF21 아날로그를 발현시킬 수 있도록 적합한 조절 서열에 작동 가능하게 연결된 상기 FGF21 아날로그를 코딩하는 폴리뉴클레오티드의 염기서열을 함유하는 DNA 제조물을 의미한다.
- [421] 상기 조절 서열은 전사를 개시할 수 있는 프로모터, 그러한 전사를 조절하기 위한 임의의 오퍼레이터 서열, 적합한 mRNA 리보솜 결합부위를 코딩하는 서열, 및 전사 및 해독의 종결을 조절하는 서열을 포함한다. 재조합 벡터는 적당한 숙주세포 내로 형질전환된 후, 숙주 세포와 무관하게 복제되거나 기능할 수 있으며, 세포 그 자체에 통합될 수 있다.
- [422] 본 발명에서 사용되는 재조합 벡터는 숙주세포 내에서 복제 가능한 것이면 특별히 한정되지 않으며, 당업계에 알려진 임의의 벡터를 이용하여 제작될 수 있다. 통상 사용되는 벡터의 예로는 천연 상태이거나 재조합된 상태의 플라스미드, 코스미드, 바이러스 및 박테리오파지를 들 수 있다. 예를 들어, 파지 벡터 또는 코스미드 벡터로서 pWE15, M13, MBL3, MBL4, IXII, ASHII, APII, t10, t11, Charon4A, 및 Charon21A 등을 사용할 수 있으며, 플라스미드 벡터로서 OmpA계, pBR계, pUC계, pBluescriptII계, pGEM계, pTZ계, pCL계 및 pET계 등을 사용할 수 있다. 본 발명에서 사용 가능한 벡터는 특별히 제한되는 것이 아니며 공지된 발현 벡터를 사용할 수 있다.
- [423] 상기 재조합 벡터는 본 발명의 FGF21 아날로그를 생산하기 위해 숙주세포를 형질전환시키는데 사용될 수 있다. 또한 본 발명의 일부인, 이러한 형질전환 세포는 본 발명의 핵산 단편 및 벡터의 증식에 사용되거나, 본 발명의 결합체의

제조합 생산에 사용된 배양된 세포 또는 세포주일 수 있다.

- [424] 본 발명에서 용어 "형질전환"은 표적 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 제조합 벡터를 숙주세포 내에 도입하여 숙주세포 내에서 상기 폴리뉴클레오티드가 코딩하는 단백질이 발현할 수 있도록 하는 것을 의미한다. 형질전환된 폴리뉴클레오티드가 숙주세포 내에서 발현될 수 있기만 한다면, 숙주세포의 염색체 내에 삽입되어 위치하거나 염색체 외에 위치하거나 상관없이 이들 모두를 포함한다.
- [425] 또한, 상기 폴리뉴클레오티드는 표적 단백질을 코딩하는 DNA 및 RNA를 포함한다. 상기 폴리뉴클레오티드는 숙주세포 내로 도입되어 발현될 수 있는 것이면, 어떠한 형태로 도입되는 것이든 상관없다. 예를 들면, 상기 폴리뉴클레오티드는 자체적으로 발현되는데 필요한 모든 요소를 포함하는 유전자 구조체인 발현 카세트(expression cassette)의 형태로 숙주세포에 도입될 수 있다. 상기 발현 카세트는 통상 상기 폴리뉴클레오티드에 작동 가능하게 연결되어 있는 프로모터(promoter), 전사 종결신호, 리보솜 결합부위 및 번역 종결신호를 포함할 수 있다. 상기 발현 카세트는 자체 복제가 가능한 발현벡터 형태일 수 있다. 또한, 상기 폴리뉴클레오티드는 그 자체의 형태로 숙주세포에 도입되어, 숙주세포에서 발현에 필요한 서열과 작동 가능하게 연결되어 있는 것일 수도 있으며, 이에 한정되지 않는다.
- [426] 또한, 상기에서 용어 "작동 가능하게 연결"된 것이란 본 발명의 목적 FGF21 아날로그를 코딩하는 폴리뉴클레오티드의 전사를 개시 및 매개하도록 하는 프로모터 서열과 상기 유전자 서열이 기능적으로 연결되어 있는 것을 의미한다.
- [427] 본 발명에 적합한 숙주는 본 발명의 폴리뉴클레오티드를 발현하도록 하는 한 특별히 제한되지 않는다. 본 발명에 사용될 수 있는 숙주의 특정한 예로는 대장균(*E. coli*)과 같은 에스케리키아(*Escherichia*) 속 세균; 바실러스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*)와 같은 바실러스(*Bacillus*) 속 세균; 슈도모나스 푸티다(*Pseudomonas putida*)와 같은 슈도모나스(*Pseudomonas*) 속 세균; 피키아 파스토리스(*Pichia pastoris*), 사카로마이세스 세레비지애(*Saccharomyces cerevisiae*), 스킨조사카로마이세스 폼베(*Schizosaccharomyces pombe*)와 같은 효모; 스포도프테라 프루기페르다(Sf9)와 같은 곤충세포; 및 CHO, COS, BSC 등과 같은 동물세포가 있다.
- [428]
- [429] 본 발명의 구현하는 다른 양태는
- [430] (i) 천연형 FGF21 또는 상기 FGF21 아날로그; 및 (ii) FcRn 결합물질, 지방산, 폴리에틸렌 글리콜, 아미노산 단편, 및 알부민으로 이루어진 군에서 선택된 캐리어가 결합된, FGF21 결합체를 제공한다.
- [431] 상기 FGF21 및 FGF21 아날로그에 대해서는 앞서 설명한 바와 같다.
- [432] 상기 FcRn 결합물질은 면역글로불린 Fc 영역일 수 있다.
- [433] 또한, 상기 FGF21 결합체는 (i) 천연형 FGF21 또는 상기 FGF21 아날로그와 (ii)

캐리어가 (iii) 펩타이드 링커, 또는 폴리에틸렌글리콜, 폴리프로필렌 글리콜, 에틸렌 글리콜-프로필렌 글리콜 공중합체, 폴리옥시에틸화폴리올, 폴리비닐알콜, 폴리사카라이드, 덱스트란, 폴리비닐에틸에테르, 생분해성 고분자, 지질 중합체, 키틴류, 히아루론산 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 비펩타이드성 링커를 통해 연결되는 것을 특징으로 한다.

[434] 예컨대, 상기 비펩타이드성 중합체의 각 말단이 각각 면역글로불린 Fc 영역과 FGF21의 아민 그룹 또는 티올 그룹(Thiol group)에 결합된 형태일 수 있다.

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

[436] 본 발명에서 "면역글로불린 Fc 영역" 또는 "면역글로불린 불변영역"은 면역글로불린의 중쇄와 경쇄 가변영역을 제외한, 중쇄 불변영역 2(CH2) 및/또는 중쇄 불변영역 3(CH3)부분을 포함하는 부위를 의미한다. 상기 면역글로불린 Fc 영역은 본 발명의 FGF21 결합체의 모이어티를 이루는 일 구성일 수 있다.

[437] 이러한 면역글로불린 Fc 영역은 중쇄 불변영역에 힌지(hinge) 부분을 포함할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 또한 본 발명의 면역글로불린 Fc 영역은 천연형과 실질적으로 동등하거나 향상된 효과를 갖는 한, 면역 글로불린의 중쇄와 경쇄 가변영역만을 제외하고, 일부 또는 전체 중쇄 불변영역 1(CH1) 및/또는 경쇄불변영역 1(CL1)을 포함하는 확장된 Fc영역일 수 있다. 또한, CH2 및/또는 CH3에 해당하는 상당히 긴 일부 아미노산 서열이 제거된 영역일 수도 있다.

[438] 예컨대, 본 발명의 면역글로불린 Fc 영역은 1) CH1 도메인, CH2 도메인, CH3 도메인 및 CH4 도메인, 2) CH1 도메인 및 CH2 도메인, 3) CH1 도메인 및 CH3 도메인, 4) CH2 도메인 및 CH3 도메인, 5) CH1 도메인, CH2 도메인, CH3 도메인 및 CH4 도메인 중 1개 또는 2개의 이상의 도메인과 면역글로불린 힌지 영역(또는 힌지 영역의 일부)와의 조합, 6) 중쇄 불변 영역 각 도메인과 경쇄 불변영역의 이량체일 수 있다. 그러나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[439] 또한, 하나의 구체예로서, 상기 면역글로불린 Fc 영역은 이합체 형태(dimeric form)일 수 있으며, 이합체 형태의 하나의 Fc 영역에 FGF21 또는 이의 아날로그 한 분자가 공유결합적으로 연결될 수 있으며, 이때 상기 면역글로불린 Fc와 FGF21 또는 이의 아날로그는 비펩타이드성 중합체에 의해 서로 연결될 수 있다. 한편, 이합체 형태의 하나의 Fc 영역에 FGF21 또는 이의 아날로그 두 분자가 대칭적으로 결합하는 것 역시 가능하다. 이때 상기 면역글로불린 Fc와 FGF21 또는 이의 아날로그는 비펩타이드성 중합체에 의해 서로 연결될 수 있다.

그러나, 상기 기술된 예에 제한되는 것은 아니다.

- [440] 또한, 본 발명의 면역글로불린 Fc 영역은 천연형 아미노산 서열뿐만 아니라 이의 서열 유도체를 포함한다. 아미노산 서열 유도체란 천연 아미노산 서열 중의 하나 이상의 아미노산 잔기가 결실, 삽입, 비보전적 또는 보전적 치환 또는 이들의 조합에 의하여 상이한 서열을 가지는 것을 의미한다.
- [441] 예를 들면, IgG Fc의 경우 결합에 중요하다고 알려진 214 내지 238, 297 내지 299, 318 내지 322 또는 327 내지 331번 아미노산 잔기들이 변형을 위해 적당한 부위로서 이용될 수 있다.
- [442] 또한, 이황화 결합을 형성할 수 있는 부위가 제거되거나, 천연형 Fc에서 N-말단의 몇몇 아미노산이 제거되거나 또는 천연형 Fc의 N-말단에 메티오닌 잔기가 부가될 수도 있는 등 다양한 종류의 유도체가 가능하다. 또한, 이펙터 기능을 없애기 위해 보체결합부위, 예로 C1q 결합부위가 제거될 수도 있고, ADCC (antibody dependent cell mediated cytotoxicity) 부위가 제거될 수도 있다. 이러한 면역글로불린 Fc 영역의 서열 유도체를 제조하는 기술은 국제특허공개 제WO 97/34631호, 국제특허공개 제96/32478호 등에 개시되어 있다.
- [443] 분자의 활성을 전체적으로 변경시키지 않는 단백질 및 펩타이드에서의 아미노산 교환은 당해 분야에 공지되어 있다(H.Neurath, R.L.Hill, The Proteins, Academic Press, New York, 1979). 가장 통상적으로 일어나는 교환은 아미노산 잔기 Ala/Ser, Val/Ile, Asp/Glu, Thr/Ser, Ala/Gly, Ala/Thr, Ser/Asn, Ala/Val, Ser/Gly, Thy/Phe, Ala/Pro, Lys/Arg, Asp/Asn, Leu/Ile, Leu/Val, Ala/Glu, Asp/Gly 간의 교환이다. 경우에 따라서는 인산화(phosphorylation), 황화(sulfation), 아크릴화(acrylation), 당화(glycosylation), 메틸화(methylation), 파네실화(farnesylation), 아세틸화(acetylation) 및 아미드화(amidation) 등으로 수식(modification)될 수도 있다.
- [444] 상기 기술한 Fc 유도체는 본 발명의 Fc 영역과 동등한 생물학적 활성을 나타내며 Fc 영역의 열, pH 등에 대한 구조적 안정성을 증대시킨 것일 수 있다.
- [445]
- [446] 또한, 이러한 Fc 영역은 인간, 소, 염소, 돼지, 마우스, 래빗, 햄스터, 랫트 또는 기니아 피그 등의 동물의 생체 내에서 분리한 천연형으로부터 얻어질 수도 있고, 형질전환된 동물세포 또는 미생물로부터 얻어진 재조합형 또는 이의 유도체일 수 있다. 여기서, 천연형으로부터 획득하는 방법은 전체 면역글로불린을 인간 또는 동물의 생체로부터 분리한 후, 단백질 분해효소를 처리하여 획득하는 방법일 수 있다. 파파인으로 처리할 경우에는 Fab 및 Fc로 절단되고, 펩신으로 처리할 경우에는 pF'c 및 F(ab)₂로 절단된다. 크기 배제 크로마토그래피(size-exclusion chromatography) 등을 이용하여 Fc 또는 pF'c를 분리할 수 있다. 더 구체적인 실시 형태에서는 인간 유래의 Fc 영역을 미생물로부터 수득한 재조합형 면역글로불린 Fc 영역이다.
- [447] 또한, 면역글로불린 Fc 영역은 천연형 당쇄, 천연형에 비해 증가된 당쇄,

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

[448] 본 발명에서 "당쇄의 제거(Deglycosylation)"는 효소로 당을 제거한 Fc 영역을 말하며, 비당쇄화(Aglycosylation)는 원핵동물, 더 구체적인 실시 형태에서는 대장균에서 생산하여 당쇄화되지 않은 Fc 영역을 의미한다.

[449] 한편, 면역글로불린 Fc 영역은 인간 또는 소, 염소, 돼지, 마우스, 래빗, 햄스터, 랫트, 기니아 피그 등의 동물기원일 수 있으며, 더 구체적인 실시 형태에서는 인간기원이다.

[450] 또한, 면역글로불린 Fc 영역은 IgG, IgA, IgD, IgE, IgM 유래 또는 이들의 조합(combination) 또는 이들의 혼성(hybrid)에 의한 Fc 영역일 수 있다. 더 구체적인 실시 형태에서는 인간 혈액에 가장 풍부한 IgG 또는 IgM 유래이며 보다 더 구체적인 실시 형태에서는 리간드 결합 단백질의 반감기를 향상시키는 것으로 공지된 IgG 유래이다. 더욱 더 구체적인 실시 형태에서 상기 면역글로불린 Fc 영역은 IgG4 Fc 영역이며, 가장 구체적인 실시 형태에서 상기 면역글로불린 Fc 영역은 인간 IgG4 유래의 비-당쇄화된 Fc 영역이나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[451]

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

[453]

[454] 본 발명에서 용어, "비펩타이드성 중합체"는, 반복 단위가 2개 이상 결합된 생체 적합성 중합체를 의미하는 것으로, 본 발명의 FGF21 결합체의 모이어티를 이루는 일 구성일 수 있다. 상기 반복 단위들은 펩타이드 결합이 아닌 임의의 공유결합을 통해 서로 연결된다. 상기 비펩타이드성 중합체는 비펩타이드성 링커와 혼용되어 사용될 수 있다.

[455] 본 발명에 사용가능한 비펩타이드성 중합체는 폴리에틸렌 글리콜, 폴리프로필렌 글리콜, 에틸렌 글리콜과 프로필렌 글리콜의 공중합체, 폴리옥시 에틸화 폴리올, 폴리비닐 알콜, 폴리사카라이드, 덱스트란, 폴리비닐 에틸 에테르, PLA(폴리락트산, polylactic acid) 및 PLGA(폴리락틱-글리콜산,

polylactic-glycolic acid)와 같은 생분해성 고분자, 지질 중합체, 키틴류, 히아루론산 및 이들의 조합으로 구성된 군으로부터 선택될 수 있으며, 구체적으로는 폴리에틸렌 글리콜(PEG)일 수 있다. 당해 분야에 알려진 이들의 아날로그 및 당해 분야의 기술 수준에서 용이하게 제조할 수 있는 아날로그들도 본 발명의 범위에 포함된다.

[456] 한편, 상기한 바와 같이 본 발명의 비펩타이드성 중합체는 본 발명의 캐리어, 예를 들어 면역글로불린 Fc 영역과 FGF21에 결합될 수 있는 반응기를 가질 수 있다. 즉, 상기 비펩타이드성 중합체의 반응기를 통해 캐리어, 예컨대 면역글로불린 Fc 영역과 FGF21 또는 이들 아날로그에 연결될 수 있다.

[457] 상기 비펩타이드성 중합체의 양 말단 반응기는 반응 알데히드 그룹, 프로피온 알데하이드 그룹, 부틸 알데하이드 그룹, 말레이미드(maleimide) 그룹 및 석시니미드(succinimide) 아날로그로 이루어진 군으로부터 선택되는 것이 바람직하다.

[458]

[459] 상기 알데하이드기를 포함하는 작용기는 프로피온 알데하이드, 부틸 알데하이드 등의 알킬알데하이드일 수 있다. 따라서, 구체적으로 상기 비펩타이드성 중합체는 양말단에 프로피온 알데하이드기가 치환된 PEG일 수 있다. 석시니미드 아날로그로는 석시니미딜 프로피오네이트, 히드록시 석시니미딜, 석시니미딜 카르복시메틸 또는 석시니미딜 카보네이트가 이용될 수 있다.

[460] 특히, 상기 비펩타이드성 중합체가 양 말단에 반응 알데히드 그룹의 반응기를 갖는 경우, 비특이적 반응을 최소화하고, 비펩타이드성 중합체의 양 말단에서 FGF21 및 면역글로불린과 각각 결합하는데 효과적이다. 알데히드 결합에 의한 환원성 알킬화로 생성된 최종 산물인 결합체는 아미드 결합으로 연결된 것보다 훨씬 안정적이다. 알데히드 반응기는 낮은 pH에서 N-말단에 선택적으로 반응하며, 높은 pH, 예를 들어 pH9.0 조건에서는 라이신 잔기와 공유결합을 형성할 수 있다.

[461]

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

[463] 본 발명의 비펩타이드성 중합체는 양 말단에 각각 독립적으로 알데하이드, 말레이미드, 비닐술폰, 티올, 이황화 오르토퍼리딘, 요오드화 아세트아미드, 석시니미드 및 각각의 유도체로 이루어진 군으로부터 선택되는 반응기를 갖는

것일 수 있으며, 상기 양 말단의 반응기를 통해 FGF21 및 캐리어, 예를 들어 면역글로불린 Fc 영역과 각각 공유결합으로 연결되는 것일 수 있다.

[464] 특히, 본 발명의 결합체는 비펩타이드성 중합체의 양 말단의 반응기가 각각 캐리어와 FGF21의 아민그룹 또는 티올 그룹(Thiol group)에 결합하는 것, 또는 비펩타이드성 중합체의 양 말단의 반응기가 각각 FGF21 및 캐리어의 N-말단 아민기 또는 Lys 잔기 측쇄의 아민기에 결합되는 것 등이 될 수 있다.

[465] 한편, 본 발명에서 상기 비펩타이드성 중합체는 양쪽 말단에 캐리어, 예를 들어, 면역글로불린 Fc 영역과 FGF21에 결합될 수 있는 반응기를 포함하고, 상기 반응기는 특별히 이에 제한되지 않으나, 알데히드 그룹, 프로피온 알데히드 그룹, 부틸 알데히드 그룹, 말레이미드(maleimide) 그룹, 비닐술포(vinylsulfone) 그룹, 티올(thiol) 그룹, 이황화 오르토피리딘(orthopyridyl disulfide) 그룹, 요오드화아세트아미드(iodoacetamide) 그룹, 석시니미드 그룹, 석시니미드(succinimide) 아날로그(석시니미딜 프로피오네이트, 히드록시 석시니미딜, 석시니미딜 카르복시메틸 또는 석시니미딜 카보네이트) 그룹 및 각각의 유도체로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있다.

[466] 본 발명에서 사용될 수 있는 비펩타이드성 중합체는 생체 내 단백질분해 효소에 저항성 있는 중합체이면 제한없이 사용될 수 있다. 비펩타이드성 중합체는 분자량이 1 내지 100 kDa 범위, 구체적으로는 1 내지 20 kDa 범위인 것이 바람직하다. 또한, FGF21 또는 캐리어와 결합되는 본 발명의 비펩타이드성 중합체는 한 종류의 중합체뿐만 아니라 상이한 종류의 중합체들의 조합이 사용될 수도 있다. 또한, 본 발명에 사용되는 비펩타이드성 중합체는 FGF21 및 캐리어와 결합될 수 있는 양 말단 또는 세 말단의 반응기를 가질 수 있다. 구체적으로 상기 반응기는 알데하이드기(reactive aldehyde group)일 수 있다.

[467]

[468] 또 하나의 양태로서, 본 발명은 상기 FGF21 아날로그 또는 FGF21 결합체를 포함하는 조성물을 제공한다.

[469] 상기 FGF21 결합체에 대해서는 앞서 설명한 바와 같다.

[470] 하나의 양태로서, FGF21 아날로그 또는 FGF21 결합체를 포함하는, FGF21에 대한 지속성 제제를 제공한다.

[471] 상기 지속성 제제는 천연형 FGF21에 비해 생체 내 지속성 및 안정성이 증가된 FGF21 결합체 지속성 제제 또는 FGF21 아날로그 지속성 제제일 수 있다. 상기 지속성 제제는 후술할 대사중후군의 예방 또는 치료용 약학적 조성물일 수 있다.

[472] 또한 본 발명의 지속성 제제 또는 약학적 조성물은 약학적으로 허용 가능한 담체를 포함할 수 있다.

[473] 본 발명에서 용어, "약학적으로 허용 가능한 담체"란 생물체를 자극하지 않고 투여 화합물의 생물학적 활성 및 특성을 저해하지 않는 담체 또는 희석제를 말한다. 상기 담체는 비자연적 담체(non-naturally occurring carrier)의 종류를 포함할 수 있다. 경구투여 시에는 부형제, 가용화제, 분산제, 안정화제, 현탁화제,

색소 및 향료 등을 사용할 수 있으며, 주사제의 경우에는 완충제, 보존제, 무통화제, 가용화제, 등장화제 및 안정화제 등을 혼합하여 사용할 수 있으며, 국소투여용의 경우에는 기제, 부형제, 윤활제 및 보존제 등을 사용할 수 있다. 본 발명의 지속성 제제 또는 약학적 조성물의 제형은 상술한 바와 같은 약학적으로 허용되는 담체와 혼합하여 다양하게 제조될 수 있다.

- [474] 다른 양태는 상기 FGF21 아날로그; 또는 상기 FGF21 아날로그 또는 천연형 FGF21에 FcRn 결합물질, 지방산, 폴리에틸렌 글리콜, 아미노산 단편, 및 알부민으로 이루어진 군에서 선택된 캐리어가 결합된, FGF21 결합체를 유효성분으로 포함하는, 대사증후군의 예방 또는 치료를 위한 약학적 조성물을 제공한다.
- [475] 본 발명에서 용어 "예방"은 상기 FGF21 아날로그, FGF21 결합체, 또는 이를 포함하는 조성물의 투여로 대사 증후군 질환의 발병을 억제 또는 지연시키는 모든 행위를 의미하며, "치료"는 상기 FGF21 아날로그, FGF21 결합체, 또는 이를 포함하는 조성물의 투여로 대사 증후군 질환의 증세가 호전되거나 이롭게 되는 모든 행위를 의미한다.
- [476] 상기 대사증후군은 내당증 장애, 고콜레스테롤혈증, 이상지혈증, 비만, 당뇨, 고혈압, 비알코올지방간염 (nonalcoholic steatohepatitis, NASH), 이상지혈증에 의한 동맥경화, 죽상동맥경화증, 동맥경화증, 및 관상동맥 심질환(관동맥성 심장병)으로 이루어진 군에서 선택되는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [477] 본 발명에서 용어 "투여"는 어떠한 적절한 방법으로 환자에게 소정의 물질을 도입하는 것을 의미하며, 상기 조성물의 투여 경로는 특별히 이에 제한되지 않으나, 상기 조성물이 생체 내 표적에 도달할 수 있는 어떠한 일반적인 경로를 통하여 투여될 수 있으며, 예를 들어 복강 내 투여, 정맥 내 투여, 근육 내 투여, 피하 투여, 피 내 투여, 경구 투여, 국소 투여, 비 내 투여, 폐 내 투여, 직장 내 투여 등이 될 수 있다. 그러나 경구 투여시, 펩타이드는 소화가 되기 때문에 경구용 조성물은 활성 약제를 코팅하거나 위에서의 분해로부터 보호되도록 제형화 하는 것이 바람직하다. 바람직하게는 주사제 형태로 투여될 수 있다. 또한, 약제학적 조성물은 활성 물질이 표적 세포로 이동할 수 있는 임의의 장치에 의해 투여될 수 있다.
- [478] 본 발명의 약학적 조성물은 약학적으로 허용가능한 담체 뿐 아니라, 부형제 또는 희석제를 포함할 수 있다. 본 발명에서 용어 "약학적으로 허용가능한"이란 치료효과를 나타낼 수 있을 정도의 충분한 양과 부작용을 일으키지 않는 것을 의미하며, 질환의 종류, 환자의 연령, 체중, 건강, 성별, 환자의 약물에 대한 민감도, 투여 경로, 투여 방법, 투여횟수, 치료 기간, 배합 또는 동시 사용되는 약물 등 의학 분야에 잘 알려진 요소에 따라 당업자에 의해 용이하게 결정될 수 있다.
- [479] 본 발명의 약학적 조성물은 약학적으로 허용가능한 담체를 포함할 수 있다.

약학적으로 허용되는 담체는 경구투여시에는 결합제, 활택제, 붕해제, 부형제, 가용화제, 분산제, 안정화제, 현탁화제, 색소 및 향료 등을 사용할 수 있으며, 주사제의 경우에는 완충제, 보존제, 무통화제, 가용화제, 등장화제 및 안정화제 등을 혼합하여 사용할 수 있으며, 국소투여용의 경우에는 기제, 부형제, 유허제 및 보존제 등을 사용할 수 있다. 본 발명의 약학적 조성물의 제형은 상술한 바와 같은 약학적으로 허용되는 담체와 혼합하여 다양하게 제조될 수 있다. 예를 들어, 경구 투여시에는 정제, 트로키, 캡슐, 엘릭서, 서스펜션, 시럽 및 웨이퍼 등의 형태로 제조할 수 있으며, 주사제의 경우에는 단위 투약 앰플 또는 다수회 투약 형태로 제조할 수 있다. 기타, 용액, 현탁액, 정제, 환약, 캡슐 및 서방형 제제 등으로 제형화 할 수 있다.

- [480] 한편, 제제화에 적합한 담체, 부형제 및 희석제의 예로는 락토즈, 덱스트로즈, 수크로즈, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 미정질 셀룰로즈, 폴리비닐피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 또는 광물유 등이 사용될 수 있다.
- [481] 또한, 충전제, 항응집제, 유허제, 습윤제, 향료 및 방부제 등을 추가로 포함할 수 있다.
- [482]
- [483] 또 하나의 양태로서, 본 발명은 본 발명의 FGF21 아날로그, FGF21 결합체, 이들의 지속성 제제, 이들의 약학적 조성물 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된 것을 이를 필요로 하는 개체에 투여하는 단계를 포함하는 FGF21 관련 질환 치료 방법을 제공한다.
- [484] 상기 FGF21 아날로그, FGF21 결합체, 이들의 지속성 제제, 이들의 약학적 조성물에 대해서는 앞서 설명한 바와 같다.
- [485] 또한, 상기 FGF21 관련 질환은 대사증후군일 수 있으며, 이에 대해서는 상술한 바와 같다.
- [486] 또한, 본 발명의 FGF21 아날로그, FGF21 결합체 등의 투여량은 투여 경로, 환자의 연령, 성별 및 체중 및 질환의 중등도 등의 여러 관련 인자와 함께, 활성성분인 FGF21 아날로그, FGF21 결합체 등의 종류에 따라 결정된다. 본 발명의 FGF21 아날로그, FGF21 결합체 등은 생체 내 지속성 및 역가가 우수하므로, 본 발명의 FGF21 아날로그, FGF21 결합체, 이들의 지속성 제제, 또는 이들의 약학적 조성물의 투여 횟수 및 빈도를 현저하게 감소시킬 수 있다.
- [487]
- [488] 본 발명의 구현하는 다른 양태는 상기 형질전환체를 배양하여 FGF21 아날로그를 발현하는 단계; 및 형질전환체 혹은 이의 배양물로부터 상기 발현된 FGF21 아날로그를 회수하는 단계를 포함하는, FGF21 아날로그의 제조방법을 제공한다.

- [489] 상기 FGF21 아날로그, 형질전환체에 대해서는 앞서 설명한 바와 같다.
- [490] 하나의 일례로서, 다음과 같은 단계를 포함하는 FGF21 아날로그의 제조방법일 수 있다:
- [491] (a) FGF21 아날로그를 대장균의 페리플라즘에 발현시키는 단계;
- [492] (b) 페리플라즘으로부터 FGF21 아날로그를 추출하여 침전시키는 단계;
- [493] (c) 상기 (b) 단계의 침전물로부터 FGF21 아날로그가 포함된 상등액을 수득하고, 이를 음이온 결합 크로마토그래피에 적용하고, FGF21 아날로그를 포함하는 용출액을 수득하는 단계; 및
- [494] (d) 상기 용출액을 소수성 결합 크로마토그래피에 적용하여 FGF21 아날로그를 포함하는 용출액을 수득하는 단계.
- [495]
- [496] 본 발명의 구현하는 다른 양태는 천연형 FGF21 또는 상기 FGF21 아날로그를 FcRn 결합물질, 지방산, 폴리에틸렌 글리콜, 아미노산 단편, 및 알부민으로 이루어진 군에서 선택된 캐리어와 결합시키는 단계를 포함하는, FGF21 결합체의 제조 방법을 제공한다.
- [497] 상기 FGF21, 이의 아날로그, FGF21 결합체, 형질전환체에 대해서는 앞서 설명한 바와 같다.
- [498]
- [499] 또 하나의 양태로서, 본 발명은 상기 FGF21 및 아날로그 또는 FGF21, 아날로그 및 캐리어가 결합된, FGF21 아날로그 결합체를 이용하여 생체 내 반감기를 증가시키는 방법을 제공한다.
- [500] 상기 FGF21, 이의 아날로그, FGF21 결합체, 캐리어에 대해서는 앞서 설명한 바와 같다.
- [501]
- [502] 이하, 하기 실시예에 의하여 본 발명을 보다 상세하게 설명한다. 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하기 위한 것일 뿐 본 발명의 범위가 이들로 한정되는 것은 아니다.
- [503]
- [504] **실시예 1: FGF21 아날로그의 제작 (1)**
- [505]
- [506] **(1) FGF21 및 아날로그 발현 벡터의 제작**
- [507]
- [508] FGF21 발현 벡터를 제작하기 위해 FGF21 cDNA (OriGene, RC204538)로부터 FGF21 유전자를 증폭하였다. *E.coli* 페리플라즘(periplasm)으로 발현시키기 위하여 OmpA signal 서열이 포함되어 있는 pFlag-CTS 벡터에 삽입하기 위하여 하기 프라이머(서열번호 1, 2)를 제작하여 PCR을 진행하였다.
- [509]

[510] [표1]

FGF21 증폭 프라이머

	서열	서열번호
FGF21	5'-GTCAAGCTCACCCCATCCCTGACTCCAGTC-3'	1
	5'-GACTCGAGTCAGGAAGCGTAGCTGGGGCTTC-3'	2

[511]

[512] PCR 증폭 조건은 95 °C 30초, 55 °C에서 30초, 68 °C에서 45초로 이 과정을 30회 반복하였으며 증폭된 유전자와 벡터를 *HindIII*, *XhoI* 제한효소로 절단한 후 T4 리가아제로 접합하여 FGF-21 발현 벡터를 제작하였다. 서열 분석을 통하여 정확한 서열을 확인하였으며 뉴클레오타이드 및 단백질 서열은 다음과 같다. 하기 FGF21 서열은 성숙 FGF21 서열에 해당한다.

[513]

[514] [표2]

	서열	서열번호
FGF2 1	DNA CACCCCATCCCTGACTCCAGTCCTCTCCTGCAA TTCGGGGGGCCAAGTCCGGCAGCGGTACCTCTAC ACAGATGATGCCCAGCAGACAGAAGCCCACCT GGAGATCAGGGAGGATGGGACGGTGGGGGGCG CTGCTGACCAGAGCCCCGAAAGTCTCCTGCAGC TGAAAGCCTTGAAGCCGGGAGTTATTCAAATCT TGGGAGTCAAGACATCCAGGTTCTGTGCCAGC GGCCAGATGGGGCCCTGTATGGATCGCTCCACT TTGACCCTGAGGCCTGCAGCTTCCGGGAGCTGC TTCTTGAGGACGGATACAATGTTTACCAGTCCG AAGCCCACGGCCTCCCGCTGCACCTGCCAGGGA ACAAGTCCCCACACCGGGACCCTGCACCCCGA GGACCAGCTCGCTTCCTGCCACTACCAGGCCTG CCCCCCGCACTCCCGGAGCCACCCGGAATCCTG GCCCCCAGCCCCCGATGTGGGCTCCTCGGAC CCTCTGAGCATGGTGGGACCTTCCCAGGGCCGA AGCCCCAGCTACGCTTCCTGA	3
	단백질 HPIPDSSPLL QFGGQVRQRY LYTDDAQQTE AHLEIREDGT VGGAADQSPE SLLQLKALKP GVIQILGVKT SRFLCQRPDG ALYGSLHFDP EACSFRELLL EDGYNVYQSE AHGLPLHLPGNKSPHRDPAP RGPAPFLPLP GLPPALPEPP GILAPQPPDV GSSDPLSMVG PSQGRSPSYA S	4

[515]

[516] 보유 중인 천연형 FGF21 발현 벡터를 주형으로 하여 FGF21 아날로그를 제작하고자 FGF21 아날로그의 백본 벡터를 제작하였다. 천연형 성숙 FGF21은 단백질 발현 과정 중 N 말단의 첫 번째 아미노산인 히스티딘 (Histidine)이 자연적으로 제거되는 형태가 약 20% 정도 발견되고, C 말단 부근에 167번 아미노산과 168번 아미노산 사이가 잘린 형태가 형성되는데 이를 방지하기 위하여 N 말단 첫 번째 히스티딘 (Histidine) 또는 두 번째 프롤린 (Proline)을 제거하고 167번째 아미노산인 세린(Serine)을 트레오닌(Threonine), 그리고 168번째 아미노산인 메티오닌(Methionine)을 알라닌(Alanine),

페닐알라닌(Phenylalanine), 아이소류신(Isoleucine)으로 치환한 FGF21 뮤테인을 제작해 이를 상기에서 서술한 FGF21 아날로그 제작에 백본 벡터로 사용하였다.

[517]

[518] 백본 벡터를 제작하기 위해 사용한 올리고 뉴클레오타이드를 합성한 후(표 3), 위치선택적 돌연변이(site-directed mutagenesis) PCR을 진행하여 백본 벡터의 FGF21 유전자를 증폭하였다.

[519]

[520] 서열번호 5 및 서열번호 6를 이용하여 히스티딘 제거 형태를 먼저 제작한 후, FGF21 M168A 치환 FGF21 아날로그 백본 벡터를 완성하였다.

[521]

[522] [표3]
FGF21 아날로그 백본 벡터 제작 프라이머

	서열	서열번호
Δ His	5'-GTTGCGCAAGCTCCCATCCCTG-3'	5
	5'-CAGGGATGGGAGCTTGCGCAAC-3'	6
Δ Pro	5'-GTTGCGCAAGCTATCCCTGACT-3	7
	5'-AGTCAGGGATAGCTTGCGCAAC-3'	8
S167T	5'-GGCTCCTCGGACCCTCTGACCATGGTGGGACCTTCCCA G-3	9
	5'-CTGGGAAGGTCCCACCATGGTCAGAGGGTCCGAGGAG CC-3'	10
M168A	5'-CCTCGGACCCTCTGAGCGCGGTGGGACCTTCCC-3'	11
	5'-GGGAAGGTCCCACCGCGCTCAGAGGGTCCGAGG-3'	12
M168F	5'-CTCCTCGGACCCTCTGAGCTTCGTGGGACCTTCCCAGG GC-3'	13
	5'-GCCCTGGGAAGGTCCCACGAAGCTCAGAGGGTCCGAG GAG-3'	14
M168I	5'-CTCCTCGGACCCTCTGAGCATCGTGGGACCTTCCCAGG GC-3'	15
	5'-GCCCTGGGAAGGTCCCACGATGCTCAGAGGGTCCGAGG AG-3'	16

[523]

[524] FGF21 아날로그 증폭을 위한 PCR 조건은 95 °C 30초, 55 °C에서 60초, 68

°C에서 6분으로 이 과정을 18회 반복하였다. 하기 표 4에 FGF21 아날로그 백본 벡터의 FGF21 아날로그 DNA 서열 및 단백질 서열을 나타냈다.

[525]

[526] [표4]

FGF21 아날로그 백본 벡터 DNA, 단백질 서열

	서열		서열번호
ΔH,M 168A	DNA	ATGAAAAAGA CAGCTATCGC GATTGCAGTG GCACTGGCTG GTTTCGCTAC CGTTGCGCAA GCTCCCATCC CTGACTCCAG TCCTCTCCTG CAATTCGGGG GCCAAGTCCG GCAGCGGTAC CTCTACACAG ATGATGCCCA GCAGACAGAA GCCCACCTGG AGATCAGGGA GGATGGGACG GTGGGGGGCG CTGCTGACCA GAGCCCCGAA AGTCTCCTGC AGCTGAAAGC CTTGAAGCCG GGAGTTATTC AAATCTTGGG AGTCAAGACA TCCAGGTTCC TGTGCCAGCG GCCAGATGGG GCCCTGTATG GATCGCTCCA CTTTGACCCT GAGGCCTGCA GCTTCCGGGA GCTGCTTCTT GAGGACGGAT ACAATGTTTA CCAGTCCGAA GCCCACGGCC TCCCGCTGCA CCTGCCAGGG AACAAGTCCC CACACCGGGA CCCTGCACCC CGAGGACCAG CTCGCTTCCT GCCACTACCA GGCCTGCCCC CCGCACTCCC GGAGCCACCC GGAATCCTGG CCCCCAGCC CCCCAGATGTG GGCTCCTCGG ACCCTCTGAG CGCGGTGGGA CCTTCCCAGG GCCGAAGCCC CAGCTACGCT TCCTGA	17
	단백질	PIPDSSPLL QFGGQVRQRY LYTDDAQQTE AHLEIREDGT VGGAADQSPE SLLQLKALKP GVIQILGVKT SRFLCQRPDG ALYGLHFDLP EACSFRELLL EDGYNVYQSE AHGLPLHLPG NKSPHRDPAP RGPAPFLPLP GLPPALPEPP GILAPQPPDV GSSDPLS <u>A</u> VG PSQGRSPSYA S	18
ΔHP,S 167T	DNA	ATGAAAAAGA CAGCTATCGC GATTGCAGTG GCACTGGCTG GTTTCGCTAC CGTTGCGCAA GCTATCC CTGACTCCAG TCCTCTCCTG CAATTCGGGG GCCAAGTCCG GCAGCGGTAC CTCTACACAG ATGATGCCCA GCAGACAGAA GCCCACCTGG AGATCAGGGA GGATGGGACG	19

		GTGGGGGGCG CTGCTGACCA GAGCCCCGAA AGTCTCCTGC AGCTGAAAGC CTTGAAGCCG GGAGTTATTC AAATCTTGGG AGTCAAGACA TCCAGGTTCC TGTGCCAGCG GCCAGATGGG GCCCTGTATG GATCGCTCCA CTTTGACCTT GAGGCCTGCA GCTTCCGGGA GCTGCTTCTT GAGGACGGAT ACAATGTTTA CCAGTCCGAA GCCCACGGCC TCCCGCTGCA CCTGCCAGGG AACAAGTCCC CACACCGGGA CCCTGCACCC CGAGGACCAG CTCGCTTCCT GCCACTACCA GGCCTGCCCC CCGCACTCCC GGAGCCACCC GGAATCCTGG CCCCCAGCC CCCCAGATGTG GGCTCCTCGG ACCCTCTGAC CATGGTGGGA CCTTCCCAGG GCCGAAGCCC CAGCTACGCT TCCTGA	
	단백질	IPDSSPLL QFGGQVRQRY LYTDDAQQTE AHLEIREDGT VGGAADQSPE SLLQLKALKP GVIQILGVKT SRFLCQRPDG ALYGSLHFDP EACSFRELL EDGYNVYQSE AHGLPLHLPG NKSPHRDPAP RGPAPFLPLP GLPPALPEPP GILAPQPPDV GSSDPLTMVG PSQGRSPSYA S	20
ΔHP, M168 A	DNA	ATGAAAAAGA CAGCTATCGC GATTGCAGTG GCACTGGCTG GTTTCGCTAC CGTTGCGCAA GCTATCC CTGACTCCAG TCCTCTCCTG CAATTCGGGG GCCAAGTCCG GCAGCGGTAC CTCTACACAG ATGATGCCCA GCAGACAGAA GCCCACCTGG AGATCAGGGA GGATGGGACG GTGGGGGGCG CTGCTGACCA GAGCCCCGAA AGTCTCCTGC AGCTGAAAGC CTTGAAGCCG GGAGTTATTC AAATCTTGGG AGTCAAGACA TCCAGGTTCC TGTGCCAGCG GCCAGATGGG GCCCTGTATG GATCGCTCCA CTTTGACCTT GAGGCCTGCA GCTTCCGGGA GCTGCTTCTT GAGGACGGAT ACAATGTTTA CCAGTCCGAA GCCCACGGCC TCCCGCTGCA CCTGCCAGGG AACAAGTCCC CACACCGGGA CCCTGCACCC CGAGGACCAG CTCGCTTCCT GCCACTACCA	21

		GGCCTGCCCC CCGCACTCCC GGAGCCACCC GGAATCCTGG CCCCCCAGCC CCCCAGATGTG GGCTCCTCGG ACCCTCTGAG CGCGGTGGGA CCTTCCCAGG GCCGAAGCCC CAGCTACGCT TCCTGA	
	단백질	IPDSSPLL QFGGQVRQRY LYTDDAQQTE AHLEIREDGT VGGAADQSPE SLLQLKALKP GVIQILGVKT SRFLCQRPDG ALYGSLHFDP EACSFRELL EDGYNVYQSE AHGLPLHLPG NKSPHRDPAP RGPARGFLPL GLPPALPEPP GILAPQPPDV GSSDPLS <u>A</u> VG PSQGRSPSYA S	22

ΔHP, M168 F	DNA	ATGAAAAAGA CAGCTATCGC GATTGCAGTG GCACTGGCTG GTTTCGCTAC CGTTGCGCAA GCTATCC CTGACTCCAG TCCTCTCCTG CAATTCGGGG GCCAAGTCCG GCAGCGGTAC CTCTACACAG ATGATGCCCCA GCAGACAGAA GCCCACCTGG AGATCAGGGA GGATGGGACG GTGGGGGGCG CTGCTGACCA GAGCCCCGAA AGTCTCCTGC AGCTGAAAGC CTTGAAGCCG GGAGTTATTC AAATCTTGGG AGTCAAGACA TCCAGGTTCC TGTGCCAGCG GCCAGATGGG GCCCTGTATG GATCGCTCCA CTTTGACCCT GAGGCCTGCA GCTTCCGGGA GCTGCTTCTT GAGGACGGAT ACAATGTTTA CCAGTCCGAA GCCCACGGCC TCCCGCTGCA CCTGCCAGGG AACAAGTCCC CACACCGGGA CCCTGCACCC CGAGGACCAG CTCGCTTCCT GCCACTACCA GGCCTGCCCC CCGCACTCCC GGAGCCACCC GGAATCCTGG CCCCCCAGCC CCCCAGATGTG GGCTCCTCGG ACCCTCTGAG CTTCGTGGGA CCTTCCCAGG GCCGAAGCCC CAGCTACGCT TCCTGA	23
	단백질	IPDSSPLL QFGGQVRQRY LYTDDAQQTE AHLEIREDGT VGGAADQSPE SLLQLKALKP GVIQILGVKT SRFLCQRPDG ALYGSLHFDP EACSFRELL EDGYNVYQSE AHGLPLHLPG NKSPHRDPAP RGPAPFLPLP GLPPALPEPP GILAPQPPDV GSSDPLSEFVG PSQGRSPSYA S	24
ΔHP, M168I	DNA	ATGAAAAAGA CAGCTATCGC GATTGCAGTG GCACTGGCTG GTTTCGCTAC CGTTGCGCAA GCTATCC CTGACTCCAG TCCTCTCCTG CAATTCGGGG GCCAAGTCCG GCAGCGGTAC CTCTACACAG ATGATGCCCCA GCAGACAGAA GCCCACCTGG AGATCAGGGA GGATGGGACG GTGGGGGGCG CTGCTGACCA GAGCCCCGAA AGTCTCCTGC AGCTGAAAGC CTTGAAGCCG GGAGTTATTC AAATCTTGGG AGTCAAGACA TCCAGGTTCC TGTGCCAGCG GCCAGATGGG	25

		GCCCTGTATG GATCGCTCCA CTTTGACCCT GAGGCCTGCA GCTTCCGGGA GCTGCTTCTT GAGGACGGAT ACAATGTTTA CCAGTCCGAA GCCCACGGCC TCCCGCTGCA CCTGCCAGGG AACAAGTCCC CACACCGGGA CCCTGCACCC CGAGGACCAG CTCGCTTCCT GCCACTACCA GGCCTGCCCC CCGCACTCCC GGAGCCACCC GGAATCCTGG CCCCCAGCC CCCCAGATGTG GGCTCCTCGG ACCCTCTGAG CATCGTGGGA CCTTCCCAGG GCCGAAGCCC CAGCTACGCT TCCTGA	
	단백질	IPDSSPLL QFGGQVRQRY LYTDDAQQTE AHLEIREDGT VGGAADQSPE SLLQLKALKP GVIQILGVKT SRFLCQRPDG ALYGSLHFDP EACSFRELL EDGYNVYQSE AHGLPLHLPG NKSPHRDPAP RGPAPFLPLP GLPPALPEPP GILAPQPPDV GSSDPLSIVG PSQGRSPSYA S	26

[527]

[528] (2) 저 친화성 (Low affinity) FGF21 아날로그 발현 벡터 제작

[529]

[530] 상기 실시예 1 (1)에서 제작된 백본 벡터를 주형으로 하여 FGF21의 N 말단과 C 말단의 아미노산을 하나씩 변형시킨 FGF21 아날로그들을 제작하였다. 이들 FGF21 아날로그들을 제작하기 위해 순방향 및 역방향 올리고뉴클레오타이드를 합성한 후 (표 5), PCR을 진행하여 각각의 아날로그 유전자를 증폭하였다.

[531]

[532] [표5]

FGF21 아날로그 증폭을 위한 프라이머

돌연변이 정보	서열	서열 번호
D5A	5'-CAAGCTCCCATCCCTGCATCCAGTCCTCTCCTG-3'	27
	5'-CAGGAGAGGACTGGATGCAGGGATGGGAGCTTG-3'	28
S6A	5'-AAGCTCCCATCCCTGACGCCAGTCCTCTCCTGC-3'	29
	5'-GCAGGAGAGGACTGGCGTCAGGGATGGGAGCTT-3'	30
S7A	5'-TCCCATCCCTGACTCCGCTCCTCTCCTGCAATTC-3'	31
	5'-GAATTGCAGGAGAGGAGCGGAGTCAGGGATGGGA-3'	32
P8A	5'-CCATCCCTGACTCCAGTGCTCTCCTGCAATTCG-3'	33
	5'-CGAATTGCAGGAGAGCACTGGAGTCAGGGATGG-3'	34
L9A	5'-CCCTGACTCCAGTCCTGCTCTGCAATTCGGGGG-3'	35
	5'-CCCCCGAATTGCAGAGCAGGACTGGAGTCAGGG-3'	36
S172A	5'-GAGCGCGGTGGGACCTGCCCAGGGCCGAAGCCC-3'	37
	5'-GGGCTTCGGCCCTGGGCAGGTCCCACCGCGCTC-3'	38
S176A	5'-ACCTTCCCAGGGCCGAGCACCCAGCTACGCTTCCT-3'	39
	5'-AGGAAGCGTAGCTGGGTGCTCGGCCCTGGGAAGGT-3'	40
P177A	5'-CTTCCCAGGGCCGAAGCGCCAGCTACGCTTCCTG-3'	41
	5'-CAGGAAGCGTAGCTGGCGCTTCGGCCCTGGGAAG-3'	42
S178A	5'-CCAGGGCCGAAGCCCCGCATACGCTTCCTGAGGATC-3'	43
	5'-GATCCTCAGGAAGCGTATGCGGGGCTTCGGCCCTGG-3'	44

[533]

[534] FGF21 아날로그 증폭을 위한 PCR 조건은 95 °C에서 30초, 55 °C에서 60초, 68 °C에서 6분으로 이 과정을 18회 반복하였다. 이와 같은 조건에서 얻어진 돌연변이(mutagenesis) 산물은 원하는 부위의 아미노산이 정상적으로 바뀌어 있는지 서열 분석을 통해 확인하였고, 이렇게 얻어진 발현 벡터를 OmpA-FGF21 아날로그라 명명하였다.

[535]

[536] 상기 과정을 통해 제조한 FGF21 아날로그의 DNA 서열 및 단백질 서열을 하기 표 6 및 7에 정리하였다.

[537]

[538] 하기 아날로그 명칭에 표시된 아미노산 번호는 천연형 성숙 FGF21의 서열을 기준으로 번호를 매긴 것에 해당하고, ΔH 는 천연형 성숙 FGF21 서열에서 첫 번째 아미노산인 히스티딘이 결실된 것을, ΔHP 는 천연형 성숙 FGF21 서열에서 첫 번째 및 두 번째 아미노산인 히스티딘과 프롤린이 결실된 것을 나타낸다.

[539]

[540] [표6]

아날로그	변화 서열
아날로그 1	ΔH , D5A, M168A
아날로그 2	ΔH , S6A, M168A
아날로그 3	ΔH , S7A, M168A
아날로그 4	ΔH , P8A, M168A
아날로그 5	ΔH , L9A, M168A
아날로그 6	ΔH , S172A, M168A
아날로그 7	ΔH , S176A, M168A
아날로그 8	ΔH , P177A, M168A
아날로그 9	ΔH , S178A, M168A
아날로그 10	ΔHP , D5A, M168A
아날로그 11	ΔHP , S6A, M168A
아날로그 12	ΔHP , S7A, M168A
아날로그 13	ΔHP , P8A, M168A
아날로그 14	ΔHP , L9A, M168A
아날로그 15	ΔHP , S172A, M168A
아날로그 16	ΔHP , S176A, M168A
아날로그 17	ΔHP , P177A, M168A
아날로그 18	ΔHP , S178A, M168A

[541]

[542] [표7]

FGF21 아날로그 백본 벡터 DNA, 단백질 서열

아날로그	서열		서열 번호
ΔH,D5A, M168A	DNA	ATGAAAAAGA CAGCTATCGC GATTGCAGTG GCACTGGCTG GTTTCGCTAC CGTTGCGCAA GCTCCCATCC CTGCATCCAG TCCTCTCCTG CAATTCGGGG GCCAAGTCCG GCAGCGGTAC CTCTACACAG ATGATGCCCA GCAGACAGAA GCCCACCTGG AGATCAGGGA GGATGGGACG GTGGGGGGCG CTGCTGACCA GAGCCCCGAA AGTCTCCTGC AGCTGAAAGC CTTGAAGCCG GGAGTTATTC AAATCTTGGG AGTCAAGACA TCCAGGTTC TGTGCCAGCG GCCAGATGGG GCCCTGTATG GATCGCTCCA CTTTGACCCT GAGGCCTGCA GCTTCCGGGA GCTGCTTCTT GAGGACGGAT ACAATGTTTA CCAGTCCGAA GCCCACGGCC TCCCGCTGCA CCTGCCAGGG AACAAGTCCC CACACCGGGA CCCTGCACCC CGAGGACCAG CTCGCTTCCT GCCACTACCA GGCCTGCCCC CCGCACTCCC GGAGCCACCC GGAATCCTGG CCCCCAGCC CCCCAGTGTG GGCTCCTCGG ACCCTCTGAG CGCGGTGGGA CCTTCCCAGG GCCGAAGCCC CAGCTACGCT TCCTGA	45
	단백 질	PIPA ^A SSPLL QFGGQVRQRY LYTDDAQQTE AHLEIREDGT VGGAADQSPE SLLQLKALKP GVIQILGVKT SRFLCQRPDG ALYGSLHFDP EACSFRELL EDGYNVYQSE AHGLPLHLPG NKSPHRDPAP RGPAPFLPLP GLPPALPEPP GILAPQPPDV GSSDPLS ^A VG PSQGRSPSYA S	46
ΔH,S6A, M168A	DNA	ATGAAAAAGA CAGCTATCGC GATTGCAGTG GCACTGGCTG GTTTCGCTAC CGTTGCGCAA GCTCCCATCC CTGACGCCAG TCCTCTCCTG CAATTCGGGG GCCAAGTCCG GCAGCGGTAC CTCTACACAG ATGATGCCCA GCAGACAGAA GCCCACCTGG AGATCAGGGA GGATGGGACG	47

		GTGGGGGGCG CTGCTGACCA GAGCCCCGAA AGTCTCCTGC AGCTGAAAGC CTTGAAGCCG GGAGTTATTC AAATCTTGGG AGTCAAGACA TCCAGGTTCC TGTGCCAGCG GCCAGATGGG GCCCTGTATG GATCGCTCCA CTTTGACCCT GAGGCCTGCA GCTTCCGGGA GCTGCTTCTT GAGGACGGAT ACAATGTTTA CCAGTCCGAA GCCCACGGCC TCCCGCTGCA CCTGCCAGGG AACAAGTCCC CACACCGGGA CCCTGCACCC CGAGGACCAG CTCGCTTCCT GCCACTACCA GGCCTGCCCC CCGCACTCCC GGAGCCACCC GGAATCCTGG CCCCCAGCC CCCCAGTGTG GGCTCCTCGG ACCCTCTGAG CGCGGTGGGA CCTTCCCAGG GCCGAAGCCC CAGCTACGCT TCCTGA	
	단백 질	PIPD <u>A</u> SPLL QFGGQVRQRY LYTDDAQQTE AHLEIREDGT VGGAADQSPE SLLQLKALKP GVIQILGVKT SRFLCQRPDG ALYGSLHFD EACSFRELLL EDGYNVYQSE AHGLPLHLPG NKSPHRDPAP RGPAPFLPLP GLPPALPEPP GILAPQPPDV GSSDPLS <u>A</u> VG PSQGRSPSYA S	48
Δ H,S7A, M168A	DNA	ATGAAAAAGA CAGCTATCGC GATTGCAGTG GCACTGGCTG GTTTCGCTAC CGTTGCGCAA GCTCCCATCC CTGACTCCGC TCCTCTCCTG CAATTCGGGG GCCAAGTCCG GCAGCGGTAC CTCTACACAG ATGATGCCCA GCAGACAGAA GCCCACCTGG AGATCAGGGA GGATGGGACG GTGGGGGGCG CTGCTGACCA GAGCCCCGAA AGTCTCCTGC AGCTGAAAGC CTTGAAGCCG GGAGTTATTC AAATCTTGGG AGTCAAGACA TCCAGGTTCC TGTGCCAGCG GCCAGATGGG GCCCTGTATG GATCGCTCCA CTTTGACCCT GAGGCCTGCA GCTTCCGGGA GCTGCTTCTT GAGGACGGAT ACAATGTTTA CCAGTCCGAA GCCCACGGCC TCCCGCTGCA CCTGCCAGGG AACAAGTCCC CACACCGGGA CCCTGCACCC CGAGGACCAG CTCGCTTCCT GCCACTACCA	49

		GGCCTGCCCC CCGCACTCCC GGAGCCACCC GGAATCCTGG CCCCCCAGCC CCCC GGCTCCTCGG ACCCTCTGAG CGCGGTGGGA CCTTCCCAGG GCCGAAGCCC CAGCTACGCT TCCTGA	
	단백 질	PIPDS <u>A</u> PLL QFGGQVRQRY LYTDDAQQTE AHLEIREDGT VGGAADQSPE SLLQLKALKP GVIQILGVKT SRFLCQRPDG ALYGSLHFDP EACSFRELLL EDGYNVYQSE AHGLPLHLPG NKSPHRDPAP RGPAPFLPLP GLPPALPEPP GILAPQPPDV GSSDPLS <u>A</u> VG PSQGRSPSYA S	50

ΔH,P8A, M168A	DNA	ATGAAAAAGA CAGCTATCGC GATTGCAGTG GCACTGGCTG GTTTCGCTAC CGTTGCGCAA GCTCCCATCC CTGACTCCAG TGCTCTCCTG CAATTCGGGG GCCAAGTCCG GCAGCGGTAC CTCTACACAG ATGATGCCCA GCAGACAGAA GCCCACCTGG AGATCAGGGA GGATGGGACG GTGGGGGGCG CTGCTGACCA GAGCCCCGAA AGTCTCCTGC AGCTGAAAGC CTTGAAGCCG GGAGTTATTC AAATCTTGGG AGTCAAGACA TCCAGGTTCC TGTGCCAGCG GCCAGATGGG GCCCTGTATG GATCGCTCCA CTTTGACCCT GAGGCCTGCA GCTTCCGGGA GCTGCTTCTT GAGGACGGAT ACAATGTTTA CCAGTCCGAA GCCCACGGCC TCCCGCTGCA CCTGCCAGGG AACAAGTCCC CACACCGGGA CCCTGCACCC CGAGGACCAG CTCGCTTCCT GCCACTACCA GGCTTGCCCC CCGCACTCCC GGAGCCACCC GGAATCCTGG CCCCCAGCC CCCCAGTGTG GGCTCCTCGG ACCCTCTGAG CGCGGTGGGA CCTTCCCAGG GCCGAAGCCC CAGCTACGCT TCCTGA	51
	단백 질	PIPDSSALL QFGGQVRQRY LYTDDAQQTE AHLEIREDGT VGGAADQSPE SLLQLKALKP GVIQILGVKT SRFLCQRPDG ALYGSLHFD EACSFRELLL EDGYNVYQSE AHGLPLHLPG NKSPHRDPAP RGPAPFLPLP GLPPALPEPP GILAPQPPDV GSSDPLS _A VG PSQGRSPSYA S	52
ΔH,L9A, M168A	DNA	ATGAAAAAGA CAGCTATCGC GATTGCAGTG GCACTGGCTG GTTTCGCTAC CGTTGCGCAA GCTCCCATCC CTGACTCCAG TCCTGCTCTG CAATTCGGGG GCCAAGTCCG GCAGCGGTAC CTCTACACAG ATGATGCCCA GCAGACAGAA GCCCACCTGG AGATCAGGGA GGATGGGACG GTGGGGGGCG CTGCTGACCA GAGCCCCGAA AGTCTCCTGC AGCTGAAAGC CTTGAAGCCG GGAGTTATTC AAATCTTGGG AGTCAAGACA TCCAGGTTCC TGTGCCAGCG GCCAGATGGG	53

		GCCCTGTATG GATCGCTCCA CTTTGACCCT GAGGCCTGCA GCTTCCGGGA GCTGCTTCTT GAGGACGGAT ACAATGTTTA CCAGTCCGAA GCCCACGGCC TCCCGCTGCA CCTGCCAGGG AACAAGTCCC CACACCGGGA CCCTGCACCC CGAGGACCAG CTCGCTTCCT GCCACTACCA GGCCTGCCCC CCGCACTCCC GGAGCCACCC GGAATCCTGG CCCCCCAGCC CCCCAGATGTG GGCTCCTCGG ACCCTCTGAG CGCGGTGGGA CCTTCCCAGG GCCGAAGCCC CAGCTACGCT TCCTGA	
	단백 질	PIPDSSP <u>A</u> L QFGGQVRQRY LYTDDAQQTE AHLEIREDGT VGGAADQSPE SLLQLKALKP GVIQILGVKT SRFLCQRPDG ALYGSLHFD EACSFRELLL EDGYNVYQSE AHGLPLHLPG NKSPHRDPAP RGPAPFLPLP GLPPALPEPP GILAPQPPDV GSSDPLS <u>A</u> VG PSQGRSPSYA S	54
ΔH,S172 A, M168A	DNA	ATGAAAAAGA CAGCTATCGC GATTGCAGTG GCACTGGCTG GTTTCGCTAC CGTTGCGCAA GCTCCCATCC CTGACTCCAG TCCTCTCCTG CAATTCGGGG GCCAAGTCCG GCAGCGGTAC CTCTACACAG ATGATGCCCA GCAGACAGAA GCCCACCTGG AGATCAGGGA GGATGGGACG GTGGGGGGCG CTGCTGACCA GAGCCCCGAA AGTCTCCTGC AGCTGAAAGC CTTGAAGCCG GGAGTTATTC AAATCTTGGG AGTCAAGACA TCCAGGTTCC TGTGCCAGCG GCCAGATGGG GCCCTGTATG GATCGCTCCA CTTTGACCCT GAGGCCTGCA GCTTCCGGGA GCTGCTTCTT GAGGACGGAT ACAATGTTTA CCAGTCCGAA GCCCACGGCC TCCCGCTGCA CCTGCCAGGG AACAAGTCCC CACACCGGGA CCCTGCACCC CGAGGACCAG CTCGCTTCCT GCCACTACCA GGCCTGCCCC CCGCACTCCC GGAGCCACCC GGAATCCTGG CCCCCCAGCC CCCCAGATGTG GGCTCCTCGG ACCCTCTGAG CGCGGTGGGA CCTGCCCAGG GCCGAAGCCC CAGCTACGCT	55

		TCCTGA	
	단백 질	PIPDSSPLL QFGGQVRQRY LYTDDAQQTE AHLEIREDGT VGGAADQSPE SLLQLKALKP GVIQILGVKT SRFLCQRPDG ALYGSLHFDP EACSFRELLL EDGYNVYQSE AHGLPLHLPG NKSPHRDPAP RGPAPFLPLP GLPPALPEPP GILAPQPPDV GSSDPLS <u>A</u> VG P <u>A</u> QGRSPSYA S	56
ΔH,S176 A, M168A	DNA	ATGAAAAAGA CAGCTATCGC GATTGCAGTG GCACTGGCTG GTTTCGCTAC CGTTGCGCAA GCTCCCATCC CTGACTCCAG TCCTCTCCTG CAATTCGGGG GCCAAGTCCG GCAGCGGTAC CTCTACACAG ATGATGCCCA GCAGACAGAA GCCCACCTGG AGATCAGGGA GGATGGGACG GTGGGGGGCG CTGCTGACCA GAGCCCCGAA AGTCTCCTGC AGCTGAAAGC CTTGAAGCCG GGAGTTATTC AAATCTTGGG AGTCAAGACA TCCAGGTTCC TGTGCCAGCG GCCAGATGGG GCCCTGTATG GATCGCTCCA CTTTGACCCT GAGGCCTGCA GCTTCCGGGA GCTGCTTCTT GAGGACGGAT ACAATGTTTA CCAGTCCGAA GCCCACGGCC TCCCGCTGCA CCTGCCAGGG AACAAGTCCC CACACCGGGA CCCTGCACCC CGAGGACCAG CTCGCTTCCT GCCACTACCA GGCTGCCCC CCGCACTCCC GGAGCCACCC GGAATCCTGG CCCCCAGCC CCCCAGTGTG GGCTCCTCGG ACCCTCTGAG CGCGGTGGGA CCTTCCCAGG GCCGAGCACC CAGCTACGCT TCCTGA	57
	단백 질	PIPDSSPLL QFGGQVRQRY LYTDDAQQTE AHLEIREDGT VGGAADQSPE SLLQLKALKP GVIQILGVKT SRFLCQRPDG ALYGSLHFDP EACSFRELLL EDGYNVYQSE AHGLPLHLPG NKSPHRDPAP RGPAPFLPLP GLPPALPEPP GILAPQPPDV GSSDPLS <u>A</u> VG PSQGR <u>A</u> PSYA S	58
ΔH,P177 A, M168A	DNA	ATGAAAAAGA CAGCTATCGC GATTGCAGTG GCACTGGCTG GTTTCGCTAC CGTTGCGCAA GCTCCCATCC CTGACTCCAG TCCTCTCCTG	59

		CAATTCGGGG GCCAAGTCCG GCAGCGGTAC CTCTACACAG ATGATGCCCA GCAGACAGAA GCCCACCTGG AGATCAGGGA GGATGGGACG GTGGGGGGCG CTGCTGACCA GAGCCCCGAA AGTCTCCTGC AGCTGAAAGC CTTGAAGCCG GGAGTTATTC AAATCTTGGG AGTCAAGACA TCCAGGTTC TGTGCCAGCG GCCAGATGGG GCCCTGTATG GATCGCTCCA CTTTGACCCT GAGGCCTGCA GCTTCCGGGA GCTGCTTCTT GAGGACGGAT ACAATGTTTA CCAGTCCGAA GCCCACGGCC TCCCCTGCA CCTGCCAGGG AACAAGTCCC CACACCGGGA CCCTGCACCC CGAGGACCAG CTCGCTTCCT GCCACTACCA GGCCTGCCCC CCGCACTCCC GGAGCCACCC GGAATCCTGG CCCCCAGCC CCCCGATGTG GGCTCCTCGG ACCCTCTGAG CGCGGTGGGA CCTTCCCAGG GCCGAAGCGC CAGCTACGCT TCCTGA	
	단백 질	PIPDSSPLL QFGGQVRQRY LYTDDAQQTE AHLEIREDGT VGGAADQSPE SLLQLKALKP GVIQILGVKT SRFLCQRPDG ALYGSLHFD EACSFRELLL EDGYNVYQSE AHGLPLHLPG NKSPHRDPAP RGPAPFLPLP GLPPALPEPP GILAPQPPDV GSSDPLS <u>A</u> VG PSQGRS <u>A</u> SYA S	60
ΔH,S178 A, M168A	DNA	ATGAAAAAGA CAGCTATCGC GATTGCAGTG GCACTGGCTG GTTTCGCTAC CGTTGCGCAA GCTCCCATCC CTGACTCCAG TCCTCTCCTG CAATTCGGGG GCCAAGTCCG GCAGCGGTAC CTCTACACAG ATGATGCCCA GCAGACAGAA GCCCACCTGG AGATCAGGGA GGATGGGACG GTGGGGGGCG CTGCTGACCA GAGCCCCGAA AGTCTCCTGC AGCTGAAAGC CTTGAAGCCG GGAGTTATTC AAATCTTGGG AGTCAAGACA TCCAGGTTC TGTGCCAGCG GCCAGATGGG GCCCTGTATG GATCGCTCCA CTTTGACCCT GAGGCCTGCA GCTTCCGGGA GCTGCTTCTT GAGGACGGAT ACAATGTTTA CCAGTCCGAA	61

		GCCCACGGCC TCCCGCTGCA CCTGCCAGGG AACAAAGTCCC CACACCGGGA CCCTGCACCC CGAGGACCAG CTCGCTTCCT GCCACTACCA GGCCTGCCCC CCGCACTCCC GGAGCCACCC GGAATCCTGG CCCCCCAGCC CCCCATGTG GGCTCCTCGG ACCCTCTGAG CGCGGTGGGA CCTTCCCAGG GCCGAAGCCC CGCATACGCT TCCTGA	
	단백 질	PIPDSSPLL QFGGQVRQRY LYTDDAQQTE AHLEIREDGT VGGAADQSPE SLLQLKALKP GVIQILGVKT SRFLCQRPDG ALYGSLHFDP EACSFRELLL EDGYNVYQSE AHGLPLHLPG NKSPHRDPAP RGPAPFLPLP GLPPALPEPP GILAPQPPDV GSSDPLS <u>A</u> VG PSQGRSP <u>A</u> YA S	62

ΔHP,D5A , M168A	DNA	ATGAAAAAGA CAGCTATCGC GATTGCAGTG GCACTGGCTG GTTTCGCTAC CGTTGCGCAA GCTATCC CTGCATCCAG TCCTCTCCTG CAATTCGGGG GCCAAGTCCG GCAGCGGTAC CTCTACACAG ATGATGCCCA GCAGACAGAA GCCCACCTGG AGATCAGGGA GGATGGGACG GTGGGGGGCG CTGCTGACCA GAGCCCCGAA AGTCTCCTGC AGCTGAAAGC CTTGAAGCCG GGAGTTATTC AAATCTTGGG AGTCAAGACA TCCAGGTTCC TGTGCCAGCG GCCAGATGGG GCCCTGTATG GATCGCTCCA CTTTGACCCT GAGGCCTGCA GCTTCCGGGA GCTGCTTCTT GAGGACGGAT ACAATGTTTA CCAGTCCGAA GCCCACGGCC TCCCGCTGCA CCTGCCAGGG AACAAGTCCC CACACCGGGA CCCTGCACCC CGAGGACCAG CTCGCTTCCT GCCACTACCA GGCTGCCCC CCGCACTCCC GGAGCCACCC GGAATCCTGG CCCCCAGCC CCCCAGTGTG GGCTCCTCGG ACCCTCTGAG CGCGGTGGGA CCTTCCCAGG GCCGAAGCCC CAGCTACGCT TCCTGA	63
	단백 질	IPASSPLL QFGGQVRQRY LYTDDAQQTE AHLEIREDGT VGGAADQSPE SLLQLKALKP GVIQILGVKT SRFLCQRPDG ALYGSLHFD EACSFRELLL EDGYNVYQSE AHGLPLHLPG NKSPHRDPAP RGPAPFLPLP GLPPALPEPP GILAPQPPDV GSSDPLS _A VG PSQGRSPSYA S	64
ΔHP,S6A, M168A	DNA	ATGAAAAAGA CAGCTATCGC GATTGCAGTG GCACTGGCTG GTTTCGCTAC CGTTGCGCAA GCTATCC CTGACGCCAG TCCTCTCCTG CAATTCGGGG GCCAAGTCCG GCAGCGGTAC CTCTACACAG ATGATGCCCA GCAGACAGAA GCCCACCTGG AGATCAGGGA GGATGGGACG GTGGGGGGCG CTGCTGACCA GAGCCCCGAA AGTCTCCTGC AGCTGAAAGC CTTGAAGCCG GGAGTTATTC AAATCTTGGG AGTCAAGACA TCCAGGTTCC TGTGCCAGCG GCCAGATGGG	65

		GCCCTGTATG GATCGCTCCA CTTTGACCCT GAGGCCTGCA GCTTCCGGGA GCTGCTTCTT GAGGACGGAT ACAATGTTTA CCAGTCCGAA GCCCACGGCC TCCCGCTGCA CCTGCCAGGG AACAAGTCCC CACACCGGGA CCCTGCACCC CGAGGACCAG CTCGCTTCCT GCCACTACCA GGCCTGCCCC CCGCACTCCC GGAGCCACCC GGAATCCTGG CCCCCAGCC CCCCAGATGTG GGCTCCTCGG ACCCTCTGAG CGCGGTGGGA CCTTCCCAGG GCCGAAGCCC CAGCTACGCT TCCTGA	
	단백 질	IPD <u>A</u> SPLL QFGGQVRQRY LYTDDAQQTE AHLEIREDGT VGGAADQSPE SLLQLKALKP GVIQILGVKT SRFLCQRPDG ALYGSLHFD EACSFRELLL EDGYNVYQSE AHGLPLHLPG NKSPHRDPAP RGPAPFLPLP GLPPALPEPP GILAPQPPDV GSSDPLS <u>A</u> VG PSQGRSPSYA S	66
ΔHP,S7A, M168A	DNA	ATGAAAAAGA CAGCTATCGC GATTGCAGTG GCACTGGCTG GTTTCGCTAC CGTTGCGCAA GCTATCC CTGACTCCGC TCCTCTCCTG CAATTCGGGG GCCAAGTCCG GCAGCGGTAC CTCTACACAG ATGATGCCCA GCAGACAGAA GCCCACCTGG AGATCAGGGA GGATGGGACG GTGGGGGGCG CTGCTGACCA GAGCCCCGAA AGTCTCCTGC AGCTGAAAGC CTTGAAGCCG GGAGTTATTC AAATCTTGGG AGTCAAGACA TCCAGGTTCC TGTGCCAGCG GCCAGATGGG GCCCTGTATG GATCGCTCCA CTTTGACCCT GAGGCCTGCA GCTTCCGGGA GCTGCTTCTT GAGGACGGAT ACAATGTTTA CCAGTCCGAA GCCCACGGCC TCCCGCTGCA CCTGCCAGGG AACAAGTCCC CACACCGGGA CCCTGCACCC CGAGGACCAG CTCGCTTCCT GCCACTACCA GGCCTGCCCC CCGCACTCCC GGAGCCACCC GGAATCCTGG CCCCCAGCC CCCCAGATGTG GGCTCCTCGG ACCCTCTGAG CGCGGTGGGA CCTTCCCAGG GCCGAAGCCC CAGCTACGCT	67

		TCCTGA	
	단백 질	IPDS <u>A</u> PLL QFGGQVRQRY LYTDDAQQTE AHLEIREDDGT VGGAADQSPE SLLQLKALKP GVIQILGVKT SRFLCQRPDG ALYGSLHFDP EACSFRELLL EDGYNVYQSE AHGLPLHLPG NKSPHRDPAP RGPAPFLPLP GLPPALPEPP GILAPQPPDV GSSDPLS <u>A</u> VG PSQGRSPSYA S	68
ΔHP,P8A, M168A	DNA	ATGAAAAAGA CAGCTATCGC GATTGCAGTG GCACTGGCTG GTTTCGCTAC CGTTGCGCAA GCTATCC CTGACTCCAG TGCTCTCCTG CAATTCGGGG GCCAAGTCCG GCAGCGGTAC CTCTACACAG ATGATGCCCA GCAGACAGAA GCCCACCTGG AGATCAGGGA GGATGGGACG GTGGGGGGCG CTGCTGACCA GAGCCCCGAA AGTCTCCTGC AGCTGAAAGC CTTGAAGCCG GGAGTTATTC AAATCTTGGG AGTCAAGACA TCCAGGTTCC TGTGCCAGCG GCCAGATGGG GCCCTGTATG GATCGCTCCA CTTTGACCCT GAGGCCTGCA GCTTCCGGGA GCTGCTTCTT GAGGACGGAT ACAATGTTTA CCAGTCCGAA GCCCACGGCC TCCCGCTGCA CCTGCCAGGG AACAAGTCCC CACACCGGGA CCCTGCACCC CGAGGACCAG CTCGCTTCCT GCCACTACCA GGCCTGCCCC CCGCACTCCC GGAGCCACCC GGAATCCTGG CCCCCAGCC CCCCAGTGTG GGCTCCTCGG ACCCTCTGAG CGCGGTGGGA CCTTCCCAGG GCCGAAGCCC CAGCTACGCT TCCTGA	69
	단백 질	IPDSS <u>A</u> LL QFGGQVRQRY LYTDDAQQTE AHLEIREDDGT VGGAADQSPE SLLQLKALKP GVIQILGVKT SRFLCQRPDG ALYGSLHFDP EACSFRELLL EDGYNVYQSE AHGLPLHLPG NKSPHRDPAP RGPAPFLPLP GLPPALPEPP GILAPQPPDV GSSDPLS <u>A</u> VG PSQGRSPSYA S	70
ΔHP,L9A, M168A	DNA	ATGAAAAAGA CAGCTATCGC GATTGCAGTG GCACTGGCTG GTTTCGCTAC CGTTGCGCAA GCTATCC CTGACTCCAG TCCTGCTCTG	71

		CAATTCGGGG GCCAAGTCCG GCAGCGGTAC CTCTACACAG ATGATGCCCA GCAGACAGAA GCCCACCTGG AGATCAGGGA GGATGGGACG GTGGGGGGCG CTGCTGACCA GAGCCCCGAA AGTCTCCTGC AGCTGAAAGC CTTGAAGCCG GGAGTTATTC AAATCTTGGG AGTCAAGACA TCCAGGTTC TGTGCCAGCG GCCAGATGGG GCCCTGTATG GATCGCTCCA CTTTGACCCT GAGGCCTGCA GCTTCCGGGA GCTGCTTCTT GAGGACGGAT ACAATGTTTA CCAGTCCGAA GCCCACGGCC TCCCCTGCA CCTGCCAGGG AACAAGTCCC CACACCGGGA CCCTGCACCC CGAGGACCAG CTCGCTTCCT GCCACTACCA GGCCTGCCCC CCGCACTCCC GGAGCCACCC GGAATCCTGG CCCCCAGCC CCCCGATGTG GGCTCCTCGG ACCCTCTGAG CGCGGTGGGA CCTTCCCAGG GCCGAAGCCC CAGCTACGCT TCCTGA	
	단백 질	IPDSSP <u>A</u> L QFGGQVRQRY LYTDDAQQTE AHLEIREDGT VGGAADQSPE SLLQLKALKP GVIQILGVKT SRFLCQRPDG ALYGSLHFDP EACSFRELLL EDGYNVYQSE AHGLPLHLPG NKSPHRDPAP RGPAPFLPLP GLPPALPEPP GILAPQPPDV GSSDPLS <u>A</u> VG PSQGRSPSYA S	72
ΔHP,S172 A, M168A	DNA	ATGAAAAAGA CAGCTATCGC GATTGCAGTG GCACTGGCTG GTTTCGCTAC CGTTGCGCAA GCTATCC CTGACTCCAG TCCTCTCCTG CAATTCGGGG GCCAAGTCCG GCAGCGGTAC CTCTACACAG ATGATGCCCA GCAGACAGAA GCCCACCTGG AGATCAGGGA GGATGGGACG GTGGGGGGCG CTGCTGACCA GAGCCCCGAA AGTCTCCTGC AGCTGAAAGC CTTGAAGCCG GGAGTTATTC AAATCTTGGG AGTCAAGACA TCCAGGTTC TGTGCCAGCG GCCAGATGGG GCCCTGTATG GATCGCTCCA CTTTGACCCT GAGGCCTGCA GCTTCCGGGA GCTGCTTCTT GAGGACGGAT ACAATGTTTA CCAGTCCGAA	73

		GCCCACGGCC TCCCGCTGCA CCTGCCAGGG AACAAGTCCC CACACCGGGA CCCTGCACCC CGAGGACCAG CTCGCTTCCT GCCACTACCA GGCCTGCCCC CCGCACTCCC GGAGCCACCC GGAATCCTGG CCCCCCAGCC CCCCATGTG GGCTCCTCGG ACCCTCTGAG CGCGGTGGGA CCTGCCCAGG GCCGAAGCCC CAGCTACGCT TCCTGA	
	단백 질	IPDSSPLL QFGGQVRQRY LYTDDAQQTE AHLEIREDGT VGGAADQSPE SLLQLKALKP GVIQILGVKT SRFLCQRPDG ALYGSLHFDP EACSFRELLL EDGYNVYQSE AHGLPLHLPG NKSPHRDPAP RGPAPFLPLP GLPPALPEPP GILAPQPPDV GSSDPLS <u>A</u> VG P <u>A</u> QGRSPSYA S	74

ΔHP,S176 A, M168A	DNA	ATGAAAAAGA CAGCTATCGC GATTGCAGTG GCACTGGCTG GTTTCGCTAC CGTTGCGCAA GCTATCC CTGACTCCAG TCCTCTCCTG CAATTCGGGG GCCAAGTCCG GCAGCGGTAC CTCTACACAG ATGATGCCCA GCAGACAGAA GCCCACCTGG AGATCAGGGA GGATGGGACG GTGGGGGGCG CTGCTGACCA GAGCCCCGAA AGTCTCCTGC AGCTGAAAGC CTTGAAGCCG GGAGTTATTC AAATCTTGGG AGTCAAGACA TCCAGGTTCC TGTGCCAGCG GCCAGATGGG GCCCTGTATG GATCGCTCCA CTTTGACCCT GAGGCCTGCA GCTTCCGGGA GCTGCTTCTT GAGGACGGAT ACAATGTTTA CCAGTCCGAA GCCCACGGCC TCCCGCTGCA CCTGCCAGGG AACAAGTCCC CACACCGGGA CCCTGCACCC CGAGGACCAG CTCGCTTCCT GCCACTACCA GGCTGCCCC CCGACTCCC GGAGCCACCC GGAATCCTGG CCCCCAGCC CCCCAGTGTG GGCTCCTCGG ACCCTCTGAG CGCGGTGGGA CCTTCCCAGG GCCGAGCACC CAGCTACGCT TCCTGA	75
	단백 질	IPDSSPLL QFGGQVRQRY LYTDDAQQTE AHLEIREDGT VGGAADQSPE SLLQLKALKP GVIQILGVKT SRFLCQRPDG ALYGSLHFD EACSFRELLL EDGYNVYQSE AHGLPLHLPG NKSPHRDPAP RGPAPFLPL GLPPALPEPP GILAPQPPDV GSSDPLS <u>A</u> VG PSQGR <u>A</u> PSYA S	76
ΔHP,P177 A, M168A	DNA	ATGAAAAAGA CAGCTATCGC GATTGCAGTG GCACTGGCTG GTTTCGCTAC CGTTGCGCAA GCTATCC CTGACTCCAG TCCTCTCCTG CAATTCGGGG GCCAAGTCCG GCAGCGGTAC CTCTACACAG ATGATGCCCA GCAGACAGAA GCCCACCTGG AGATCAGGGA GGATGGGACG GTGGGGGGCG CTGCTGACCA GAGCCCCGAA AGTCTCCTGC AGCTGAAAGC CTTGAAGCCG GGAGTTATTC AAATCTTGGG AGTCAAGACA TCCAGGTTCC TGTGCCAGCG GCCAGATGGG	77

		GCCCTGTATG GATCGCTCCA CTTTGACCCT GAGGCCTGCA GCTTCCGGGA GCTGCTTCTT GAGGACGGAT ACAATGTTTA CCAGTCCGAA GCCCACGGCC TCCCGCTGCA CCTGCCAGGG AACAAGTCCC CACACCGGGA CCCTGCACCC CGAGGACCAG CTCGCTTCCT GCCACTACCA GGCCTGCCCC CCGCACTCCC GGAGCCACCC GGAATCCTGG CCCCCCAGCC CCCCAGATGTG GGCTCCTCGG ACCCTCTGAG CGCGGTGGGA CCTTCCCAGG GCCGAAGCGC CAGCTACGCT TCCTGA	
	단백 질	IPDSSPLL QFGGQVRQRY LYTDDAQQTE AHLEIREDGT VGGAADQSPE SLLQLKALKP GVIQILGVKT SRFLCQRPDG ALYGSLHFD EACSFRELLL EDGYNVYQSE AHGLPLHLPG NKSPHRDPAP RGPAPFLPLP GLPPALPEPP GILAPQPPDV GSSDPLS <u>A</u> VG PSQGRS <u>A</u> SYA S	78
ΔHP,S178 A, M168A	DNA	ATGAAAAAGA CAGCTATCGC GATTGCAGTG GCACTGGCTG GTTTCGCTAC CGTTGCGCAA GCTATCC CTGACTCCAG TCCTCTCCTG CAATTCGGGG GCCAAGTCCG GCAGCGGTAC CTCTACACAG ATGATGCCCA GCAGACAGAA GCCCACCTGG AGATCAGGGA GGATGGGACG GTGGGGGGCG CTGCTGACCA GAGCCCCGAA AGTCTCCTGC AGCTGAAAGC CTTGAAGCCG GGAGTTATTC AAATCTTGGG AGTCAAGACA TCCAGGTTCC TGTGCCAGCG GCCAGATGGG GCCCTGTATG GATCGCTCCA CTTTGACCCT GAGGCCTGCA GCTTCCGGGA GCTGCTTCTT GAGGACGGAT ACAATGTTTA CCAGTCCGAA GCCCACGGCC TCCCGCTGCA CCTGCCAGGG AACAAGTCCC CACACCGGGA CCCTGCACCC CGAGGACCAG CTCGCTTCCT GCCACTACCA GGCCTGCCCC CCGCACTCCC GGAGCCACCC GGAATCCTGG CCCCCCAGCC CCCCAGATGTG GGCTCCTCGG ACCCTCTGAG CGCGGTGGGA CCTTCCCAGG GCCGAAGCCC CGCATACGCT	79

		TCCTGA	
	단백 질	IPDSSPLL QFGGQVRQRY LYTDDAQQTE AHLEIREDDGT VGGAADQSPE SLLQLKALKP GVIQILGVKT SRFLCQRPDG ALYGSLHFDP EACSFRELLL EDGYNVYQSE AHGLPLHLPG NKSPHRDPAP RGPAPFLPLP GLPPALPEPP GILAPQPPDV GSSDPLS <u>A</u> VG PSQGRSP <u>A</u> YA S	80

[543]

[544] 상기 표 7의 아미노산 서열의 볼드체 및 밑줄로 표시된 부분은 천연형 성숙 FGF21의 서열에서 다른 아미노산 서열로 치환된 부분을 표시한 것이다.

[545]

[546] (3) 재조합 FGF21 아날로그의 발현

[547]

[548] OmpA 신호 (signal) 서열의 유도 하에 *E.coli*의 페리플라즘으로 재조합 FGF21 아날로그의 발현을 수행하였다. 재조합 FGF21 발현 벡터를 이용하여 *E.coli* BL21 (*E.coli* B F- dcm ompT hsdS(rB-mB-) gal, Agilent)을 형질 전환하였다.

[549] 형질 전환 방법은 Agilent사에서 권고하는 방법을 따랐다. 재조합 FGF-21 발현 벡터가 형질 전환된 단일 콜로니를 취하여 암피실린 ($50 \mu\text{g/mL}$)이 포함된 1X 루리아 브로스(Luria Broth, LB) 배지에 접종하고, 37°C 에서 15시간 배양하였다. 재조합 FGF21 균주 배양액과 30 % 글리세롤이 포함된 1X LB 배지를 1:1 (v/v)의 비율로 혼합하여 각 1 mL씩 크라이오-튜브 (cyro-tube)에 분주하고, -140°C 에 보관하였다. 이를 재조합 융합 단백질의 생산을 위한 세포 스탁 (cell stock)으로 사용하였다.

[550]

[551] 재조합 FGF21 아날로그의 발현을 위하여, 각 세포 스탁 1 바이알을 녹여 1L의 1X 루리아 브로스에 접종하고 37°C 에서 14 내지 15시간 동안 진탕 배양하였다. OD_{600} 의 값이 1.0 이상을 나타내면 배양을 종료하고, 이를 종 배양액으로 사용하였다. 30 L 발효기 (BIOSTAT C-plus 30 L, Sartorius, 독일)를 이용하여 종 배양액을 9.2 L의 발효 배지에 접종하고 초기 배스 (bath) 발효를 시작하였다. 배양조건은 온도 30°C , 공기량 13 L/분 (1 vvm), 교반 속도 500 rpm 그리고 30 % 암모니아수를 사용하여 pH 6.7로 유지시켰다. 발효 진행은 배양액 내의 영양소가 제한되었을 때, 추가배지 (feeding solution)를 첨가하여 유가 배양을 진행하였다. 균주의 성장은 OD 값에 의해 모니터링하며, OD 값이 80 이상에서 최종 농도 0.5 mM의 IPTG를 도입하였다. 도입 후 약 23~25 시간까지 배양을 더 진행하며, 배양 종료 후, 원심 분리기를 사용하여 재조합 균주를 수확하여 사용 시까지 -80°C 에 보관하였다.

[552]

[553] **(4) 페리플라즘 재조합 FGF21 아날로그의 추출**

[554]

[555] 상기 실시예에서 얻은 대장균 균체 200 g을 상온의 완충용액 (20 % 수크로즈, 1 mM EDTA, 30 mM Tris pH 7.5) 3 L에 용해시킨 후 2 시간 동안 교반한 후 7,000 rpm으로 원심분리하여 펠렛을 수거하였다. 이 펠렛을 다시 4 °C의 증류수 3 L에 용해시켜 4 °C에서 2시간 동안 교반한 후 7,000 rpm으로 원심분리하여 펠렛을 제거하고 페리플라즘 단백질이 포함된 상등액을 수거하였다.

[556]

[557] **(5) 재조합 FGF21 아날로그의 침전**

[558]

[559] 상기 실시예에서 얻은 상등액에 15 mM이 되도록 Histidine을 첨가한다. 그리고 60 % HCl을 pH를 5.2가 되도록 서서히 첨가시킨 후 7,000 rpm으로 원심분리하여 펠렛을 제거하고 재조합 FGF21 아날로그가 포함된 상등액을 수거하였다.

[560]

[561] **(6) 음이온 결합 크로마토그래피 정제**

[562]

[563] 상기 실시예에서 얻은 상등액에 1M 트리스 (Tris) pH 8.0 완충액을 pH가 6 이상이 되도록 넣어준 후 전도도(conductivity)가 5 이하가 되도록 10 mM 트리스 (Tris) 8.0 완충액으로 희석시켜 주었다. 10 mM 트리스 (Tris) pH 8.0 완충액으로 평형화된 DEAE (GE, 미국) 컬럼에 단백질을 접합시킨 후 염화나트륨 (Sodium Chloride) 0.5 M이 포함된 10 mM 트리스 (Tris) pH 8.0 완충액을 사용하여 농도가 0 %에서 100 %가 되도록 10 컬럼 용량의 선형 농도 구배로 재조합 FGF21 아날로그를 용출하였다.

[564]

[565] **(7) 소수성 결합 크로마토그래피 정제**

[566]

[567] 상기 실시예에서 얻은 용출액을 10 mM 트리스 (Tris) pH 8.0 완충액으로 10 배 희석시켜준 후 3 M 황산암모늄 (Ammonium Sulfate) 완충액을 1.2 M이 되도록 서서히 넣어주었다. 1.2 M 황산암모늄 (Ammonium Sulfate)가 포함된 10 mM 트리스 (Tris) pH 8.0 완충액으로 평형이 잡힌 Source Iso (GE, 미국) 컬럼에 결합시킨 후 10 mM 트리스 (Tris) pH 8.0 완충액을 사용하여 농도가 0 %에서 100 %가 되도록 10 컬럼 용량의 선형 농도구배로 재조합 FGF21 단백질을 용출하였다.

[568]

[569] 정제된 FGF21 아날로그의 순도는 전기영동 (SDS-PAGE, 도 1) 및 고압크로마토그래피 (HPLC)를 사용하여 분석하였다 (도 2).

[570]

[571] **(8) FGF21 아날로그 단백질의 수용체 결합력 및 활성 확인**

[572]

[573] 상기 실시예에서 얻은 FGF21 아날로그의 FGF21의 보조 수용체인 베타-클로토와의 결합력 및 활성을 확인하기 위하여 SPR(surface plasmon resonance) 및 in vitro 글루코스 수용(glucose uptake) 시험을 진행하였다. 베타-클로토와의 SPR 시험 결과, 본 발명에 따른 FGF21 아날로그 단백질은 천연형 FGF21과 비교하여 현저하게 낮은 결합력과 in vitro 활성을 보이는 것을 확인하였다 (도 3). 이와 같은 결과는 FGF21의 N 말단 및 C 말단 부위가 수용체와의 결합 및 활성에 중요한 부위라는 것을 시사하는 것이다..

[574]

[575] 실시예 2: FGF21 아날로그의 제작 (2)

[576]

[577] (1) FGF21 아날로그 백본 벡터의 제작

[578]

[579] 본 발명자들은 천연형 FGF21을 대장균에 발현시키는 과정에서 FGF21의 약 50%의 절단 형태 (cleavage form)가 발현되는 것을 확인하였고, 전체 서열분석 (full sequencing) 결과에서 절단된 FGF21은 167번에 위치한 세린 (167S)과 168번에 위치한 메티오닌 (168M) 사이가 알 수 없는 경로에 의해 절단되는 것을 확인하였다.

[580]

[581] 이에, 보유 중인 천연형 FGF21 발현 벡터를 주형으로 하여 FGF21 아날로그를 제작하였다. 천연형 FGF21은 단백질 발현 중에 C-말단 부근에 167, 168번 아미노산 사이가 잘린 형태가 형성되는데 이를 방지하기 위하여 167번째 아미노산인 Ser을 Thr으로, 168번째 아미노산인 Met을 Ile으로 치환하였다. 또한 생체 내에서 DPPIV (Dipeptidyl peptidase-4)에 의해 N-말단 1~4번의 아미노산이 잘린 형태가 형성되는 것을 방지하기 위해 1~4번 아미노산이 유전자 수준에서 제거되도록 하였다. 또한 생체 내에서 FAP (fibroblast activating protein)에 의해 171번째 아미노산과 172번째 아미노산 사이가 절단되는 형태로 형성되는 것을 방지하기 위해 170번째 아미노산인 Gly을 Glu으로, 172번째 아미노산인 Ser를 Leu으로 치환하였다.

[582]

[583] 상기의 FGF21 아날로그를 제작하기 위해 사용한 올리고 뉴클레오티드를 하기 표 8과 같이 합성한 후, 부위 특이적 돌연변이 유도(site-directed mutagenesis) PCR을 진행하여 FGF21 아날로그 유전자를 증폭하였다.

[584]

[585] 구체적으로, 서열번호 81 및 82의 올리고뉴클레오티드를 이용하여 1~4번의 아미노산 (HPIP)이 제거된 형태를 먼저 제작한 후, 서열번호 83 및 84의 올리고뉴클레오티드를 이용하여 167, 168, 170 그리고 172번째 아미노산을 치환하여 FGF21 아날로그 벡터를 완성하였다.

[586]

[587] [표8]

FGF21 아날로그 제작 프라이머

	서열	서열번호
HPIP	5'-CGCTACCGTTGCGCAAGCTGACTCCAGTCCTCTCCTGCA-3'	81
	5'-TGCAGGAGAGGACTGGAGTCAGCTTGCGCAACGGTAGCGA-3'	82
S167T, M168I, G170ES172L	5'-GGCTCCTCGGACCCTCTGACCATCGTGGAACCTCTCCAGGG-3'	83
	5'-CCCTGGAGAGGTTCCACGATGGTCAGAGGGTCGAGGAGCC-3'	84

[588]

[589] FGF21 아날로그 증폭을 위한 PCR 조건은 95°C 30초, 55°C에서 60초, 68°C에서 6분으로 이 과정을 18회 반복하였다. 하기 표 9에 FGF21 아날로그 백본 벡터의 DNA 서열 및 단백질 서열을 나타냈다.

[590]

[591] [표9]

FGF21 아날로그 백본 벡터 DNA, 단백질 서열

	서열		서열 번호
FGF21(del-H PIP, S167T, M168I, G170E, S172L)	DNA	GACTCCAGTC CTCTCCTGCA ATTCGGGGGC CAAGTCCGGC AGCGGTACCT CTACACAGATGATGCCCAGC AGACAGAAGC CCACCTGGAGATCAGGGAGG ATGGGACGGT GGGGGGCGCTGCTGACCAGA GCCCCGAAAG TCTCCTGCAGCTGAAAGCCT TGAAGCCGGG AGTTATTCAAATCTTGGGAG TCAAGACATC CAGGTTCCTG TGCCAGCGGC CAGATGGGGC CCTGTATGGATCGCTCCACT TTGACCCTGA GGCCTGCAGCTTCCGGGAGC TGCTTCTTGA GGACGGATACAATGTTTACC AGTCCGAAGC CCACGGCCTCCCGCTGCACC TGCCAGGGAA CAAGTCCCCACACCGGGACC CTGCACCCCG AGGACCAGCTCGCTTCCTGC CACTACCAGG CCTGCCCCCGCACTCCCGG AGCCACCCGG AATCCTGGCCCCCAGCCCC CCGATGTGGG CTCCTCGGAC CCTCTGACCA TCGTGGAACC TCTCCAGGGCCGAAGCCCCA GCTACGCTTC CTGA	85
	단백질	DSSPLLQFGG QVRQRYLYTD DAQQTEAHLEIREDGTVGGA ADQSPESLLQ LKALKPGVIQILGVKTSRFL CQRPDGALYG SLHFDPEACSFRELLLEDGY NVYQSEAHGL PLHLPGNKSPHRDPAPRGPA RFLPLPGLPP ALPEPPGILAPQPPDVGSSD PLTIVEPLQG RSPSYAS	86

[592]

[593] (2) 재조합 FGF21 아날로그의 발현

[594]

[595] OmpA 신호 서열의 유도 하에 *E.coli*의 주변 세포질(periplasm)로의 발현을 수행하였다. 재조합 FGF21 아날로그 발현 벡터를 이용하여 *E.coli* BL21 (*E.coli* B F dcm ompT hsdS(_{r_B-m_B-}) gal, Agilent)을 형질전환 하였다. 형질전환 방법은

Agilent사에서 추천하는 방법을 따랐다. 재조합 FGF-21 아날로그 발현 벡터가 형질 전환된 단일 콜로니를 취하여 암피실린($50 \mu\text{g/ml}$)이 포함된 1X 루리아 브로스(Luria Broth, LB) 배지에 접종하고, 37°C 에서 15시간 배양하였다. 재조합 FGF21 균주 배양액과 30% 글리세롤이 포함된 1X LB 배지를 1:1(v/v)의 비율로 혼합하여 각 1 ml씩 크라이오-튜브에 분주하고, -140°C 에 보관하였다. 이를 재조합 융합 단백질의 생산을 위한 세포 스톡(cell stock)으로 사용하였다.

[596]

[597] 재조합 FGF21 아날로그의 발현을 위하여, 각 세포 스톡 1 바이알을 녹여 1L의 1X 루리아 브로스에 접종하고 37°C 에서 14~15시간 동안 진탕 배양하였다. OD_{600} 의 값이 1.0 이상을 나타내면 배양을 종료하고, 이를 종 배양액으로 사용하였다. 5 L 발효기(B.E Marubishi, MDL-501, 일본)를 이용하여 종 배양액을 1.7 L의 발효 배지에 접종하고 초기 배스(bath) 발효를 시작하였다. 배양조건은 온도 30°C , 공기량 2 L/분(1 vvm), 교반 속도 500 rpm 그리고 18% 암모니아수를 사용하여 pH 6.70으로 유지시켰다. 발효 진행은 배양액 내의 영양소가 제한되었을 때, 추가배지(feeding solution)를 첨가하여 유가배양을 진행하였다. 균주의 성장은 OD 값에 의해 모니터링하며, OD 값이 80이상에서 최종 농도 0.5mM의 IPTG를 도입하였다. 도입 후 약 23~25시간까지 배양을 더 진행하며, 배양 종료 후, 원심분리기를 사용하여 재조합 균주를 수확하여 사용 시까지 -80°C 에 보관하였다.

[598]

[599] (3) 주변 세포질에 존재하는 재조합 FGF21 아날로그의 추출

[600]

[601] 상기 실시예 2 (2)에서 얻은 대장균 균체 200g을 상온의 완충용액(20 % 수크로스, 1mM EDTA, 30mM Tris pH 7.5) 3L에 용해 시킨 후 2 시간 동안 교반한 후 7,000 rpm으로 원심분리하여 펠렛을 수거하였다. 이 펠렛을 다시 4°C 의 증류수 3L에 용해시켜 4°C 에서 2시간 동안 교반한 후 7,000 rpm으로 원심분리하여 펠렛을 제거하고 주변 세포질 단백질이 포함된 상등액을 수거하였다.

[602]

[603] (4) 재조합 FGF21 단백질의 침전

[604]

[605] 상기 실시예 2 (3)에서 얻은 상등액에 15Mm의 최종 농도가 되도록 히스티딘을 첨가하였다. 그리고 pH가 5.2가 되도록 60% HCl을 서서히 첨가시킨 후 7,000 rpm으로 원심분리하여 펠렛을 제거하고 재조합 FGF21 아날로그 단백질이 포함된 상등액을 수거하였다.

[606]

[607] (5) 음이온 결합 크로마토그래피 정제

[608]

[609] 상기 실시예 2 (4)에서 얻은 상등액에 1M 트리스 pH 8.0 완충액을 pH가 6

이상이 되도록 넣어준 후 전도도가 5이하가 되도록 10mM 트리스 8.0 완충액으로 희석시켰다. 10mM 트리스 pH 8.0 완충액으로 평형화된 DEAE (GE, 미국) 컬럼에 단백질을 접합시킨 후 염화나트륨 0.5 M이 포함된 10mM 트리스 (Tris) pH 8.0 완충액을 사용하여 농도가 0% 에서 100% 가 되도록 10 컬럼 용량의 선형 농도구배로 재조합 FGF21 아날로그 단백질을 용출하였다.

[610]

[611] **(6) 소수성 결합 크로마토그래피 정제**

[612]

[613] 상기 실시예 2 (5)에서 얻은 용출액을 10mM 트리스 (Tris) pH 8.0 완충액으로 10배 희석시켜준 후 3M 황산암모늄 (Ammonium Sulfate) 완충액을 1.2M이 되도록 서서히 넣어주었다. 1.2M 황산암모늄 (Ammonium Sulfate)가 포함된 10mM 트리스 (Tris) pH 8.0 완충액으로 평형화된 Source Iso (GE, 미국) 컬럼에 단백질을 결합시킨 후 10mM 트리스 (Tris) pH 8.0 완충액을 사용하여 농도가 0% 에서 100% 가 되도록 10 컬럼 용량의 선형 농도구배로 재조합 FGF21 아날로그를 용출하였다.

[614]

[615] 정제된 FGF21 아날로그 단백질의 순도는 전기영동(SDS-PAGE) 및 고압크로마토그래피(HPLC)를 사용하여 분석하였고, 그 결과를 도 4a 내지 4c에 나타내었다 (도 4a 내지 4c).

[616]

[617] **실시예 3: FGF21 아날로그의 제작 (3)**

[618]

[619] 다음과 같은 서열을 가지는, FGF21 모조펩타이드인 FGF21 아날로그를 합성하였다 (표 10).

[620]

[621] [표10]

설명	서열	서열번호
천연형 FGF21 L형 (Immature)	Met-Asp-Ser-Asp-Glu-Thr-Gly-Phe-Glu-His-Ser-Gly-Leu-Trp-Val-Ser-Val-Leu-Ala-Gly-Leu-Leu-Leu-Gly-Ala-Cys-Gln-Ala-His-Pro-Ile-Pro-Asp-Ser-Ser-Pro-Leu-Leu-Gln-Phe-Gly-Gly-Gln-Val-Arg-Gln-Arg-Tyr-Leu-Tyr-Thr-Asp-Asp-Ala-Gln-Gln-Thr-Glu-Ala-His-Leu-Glu-Ile-Arg-Glu-Asp-Gly-Thr-Val-Gly-Gly-Ala-Ala-Asp-Gln-Ser-Pro-Glu-Ser-Leu-Leu-Gln-Leu-Lys-Ala-Leu-Lys-Pro-Gly-Val-Ile-Gln-Ile-Leu-Gly-Val-Lys-Thr-Ser-Arg-Phe-Leu-Cys-Gln-Arg-Pro-Asp-Gly-Ala-Leu-Tyr-Gly-Ser-Leu-His-Phe-Asp-Pro-Glu-Ala-Cys-Ser-Phe-Arg-Glu-Leu-Leu-Leu-Glu-Asp-Gly-Tyr-Asn-Val-Tyr-Gln-Ser-Glu-Ala-His-Gly-Leu-Pro-Leu-His-Leu-Pro-Gly-Asn-Lys-Ser-Pro-His-Arg-Asp-Pro-Ala-Pro-Arg-Gly-Pro-Ala-Arg-Phe-Leu-Pro-Leu-Pro-Gly-Leu-Pro-Pro-Ala-Leu-Pro-Glu-Pro-Pro-Gly-Ile-Leu-Ala-Pro-Gln-Pro-Pro-Asp-Val-Gly-Ser-Ser-Asp-Pro-Leu-Ser-Met-Val-Gly-Pro-Ser-Gln-Gly-Arg-Ser-Pro-Ser-Tyr-Ala-Ser	87
천연형 FGF21 P형 (Immature)	Met-Asp-Ser-Asp-Glu-Thr-Gly-Phe-Glu-His-Ser-Gly-Leu-Trp-Val-Ser-Val-Leu-Ala-Gly-Leu-Leu-Leu-Gly-Ala-Cys-Gln-Ala-His-Pro-Ile-Pro-Asp-Ser-Ser-Pro-Leu-Leu-Gln-Phe-Gly-Gly-Gln-Val-Arg-Gln-Arg-Tyr-Leu-Tyr-Thr-Asp-Asp-Ala-Gln-Gln-Thr-Glu-Ala-His-Leu-Glu-Ile-Arg-Glu-Asp-Gly-Thr-Val-Gly-Gly-Ala-Ala-Asp-Gln-Ser-Pro-Glu-Ser-Leu-Leu-Gln-Leu-Lys-Ala-Leu-Lys-Pro-Gly-Val-Ile-Gln-Ile-Leu-Gly-Val-Lys-Thr-Ser-Arg-Phe-Leu-Cys-Gln-Arg-Pro-Asp-Gly-Ala-Leu-Tyr-Gly-Ser-Leu-His-Phe-Asp-Pro-Glu-Ala-Cys-Ser-Phe-Arg-Glu-Leu-Leu-Leu-Glu-Asp-Gly-Tyr-Asn-Val-Tyr-Gln-Ser-Glu-Ala-His-Gly-Leu-Pro-Leu-His-Leu-Pro-Gly-Asn-Lys-Ser-Pro-His-Arg-Asp-Pro-Ala-Pro-Arg-Gly-Pro-Ala-Arg-Phe-Leu-Pro-Leu-Pro-Gly-Leu-Pro-Pro-Ala-Pro-Pro-Glu-Pro-Pro-Gly-Ile-Leu-Ala-Pro-Gln-Pro-Pro-Asp-Val-Gly-Ser-Ser-Asp-Pro-Leu-Ser-Met-Val-Gly-Pro-Ser-Gln-Gly-Arg-Ser-Pro-Ser-Tyr-Ala-Ser	88
천연형 FGF19	Met-Arg-Ser-Gly-Cys-Val-Val-Val-His-Val-Trp-Ile-Leu	89

(Immature)	-Ala-Gly-Leu-Trp-Leu-Ala-Val-Ala-Gly-Arg-Pro-Leu-Ala-Phe-Ser-Asp-Ala-Gly-Pro-His-Val-His-Tyr-Gly-Trp-Gly-Asp-Pro-Ile-Arg-Leu-Arg-His-Leu-Tyr-Thr-Ser-Gly-Pro-His-Gly-Leu-Ser-Ser-Cys-Phe-Leu-Arg-Ile-Arg-Ala-Asp-Gly-Val-Val-Asp-Cys-Ala-Arg-Gly-Gln-Ser-Ala-His-Ser-Leu-Leu-Glu-Ile-Lys-Ala-Val-Ala-Leu-Arg-Thr-Val-Ala-Ile-Lys-Gly-Val-His-Ser-Val-Arg-Tyr-Leu-Cys-Met-Gly-Ala-Asp-Gly-Lys-Met-Gln-Gly-Leu-Leu-Gln-Tyr-Ser-Glu-Glu-Asp-Cys-Ala-Phe-Glu-Glu-Glu-Ile-Arg-Pro-Asp-Gly-Tyr-Asn-Val-Tyr-Arg-Ser-Glu-Lys-His-Arg-Leu-Pro-Val-Ser-Leu-Ser-Ser-Ala-Lys-Gln-Arg-Gln-Leu-Tyr-Lys-Asn-Arg-Gly-Phe-Leu-Pro-Leu-Ser-His-Phe-Leu-Pro-Met-Leu-Pro-Met-Val-Pro-Glu-Glu-Pro-Glu-Asp-Leu-Arg-Gly-His-Leu-Glu-Ser-Asp-Met-Phe-Ser-Ser-Pro-Leu-Glu-Thr-Asp-Ser-Met-Asp-Pro-Phe-Gly-Leu-Val-Thr-Gly-Leu-Glu-Ala-Val-Arg-Ser-Pro-Ser-Phe-Glu-Lys	
FGF21 모조펩타이드 1	Asp-Ser-Ser-Pro-Leu-Leu-Gln-Phe-Gly-Gly-Gln-Val-Arg-Gln-Arg-Tyr-Leu-Tyr-Thr-Cys-Ser-Ser-Asp-Pro-Leu-Ser-Met-Val-Gly-Pro-Ser-Gln-Gly-Arg-Ser-Pro-Ser-Tyr-Ala-Ser	90
FGF21 모조펩타이드 2	Asp-Ser-Ser-Pro-Leu-Leu-Gln-Phe-Gly-Gly-Gln-Val-Arg-Gln-Arg-Tyr-Leu-Tyr-Thr-Cys-Met-Val-Gly-Pro-Ser-Gln-Gly-Arg-Ser-Pro-Ser-Tyr-Ala-Ser	91
FGF21 모조펩타이드 3	Asp-Ser-Ser-Pro-Leu-Leu-Gln-Phe-Gly-Gly-Gln-Val-Arg-Gln-Arg-Tyr-Leu-Tyr-Thr-Asp-Asp-Ala-Gln-Gln-Thr-Cys-Met-Val-Gly-Pro-Ser-Gln-Gly-Arg-Ser-Pro-Ser-Tyr-Ala-Ser	92
FGF21 모조펩타이드 4	Ser-Ser-Pro-Leu-Leu-Gln-Phe-Gly-Gly-Gln-Val-Arg-Gln-Arg-Tyr-Leu-Tyr-Thr-Asp-Cys-Asp-Val-Gly-Ser-Ser-Asp-Pro-Leu-Ser-Met-Val-Gly-Pro-Ser-Gln-Gly-Arg-Ser-Pro-Ser	93
FGF21 모조펩타이드 5	Leu-Leu-Gln-Phe-Gly-Gly-Gln-Val-Arg-Gln-Arg-Tyr-Leu-Tyr-Thr-Cys-Pro-Asp-Val-Gly-Ser-Ser-Asp-Pro-Leu-Ser-Met-Val-Gly-Pro	94
FGF21	Asp-Ser-Ser-Pro-Leu-Leu-Gln-Phe-Gly-Gly-Gln-Val-Arg	95

모조펩타이드 6	g-Gln-Arg-Tyr-Leu-Tyr-Thr-Asp-Cys-Asp-Pro-Phe-Gly-Leu-Val-Thr-Gly-Leu-Glu-Ala-Val-Arg-Ser-Pro-Ser-Phe-Glu-Lys	
FGF21 모조펩타이드 7	Asp-Ser-Ser-Pro-Leu-Leu-Gln-Phe-Gly-Gly-Gln-Val-Arg-Gln-Arg-Tyr-Leu-Tyr-Thr-Asp-Cys-Gly-Ser-Gly-Met-Val-Gly-Pro-Ser-Gln-Gly-Arg-Ser-Pro-Ser-Tyr-Ala-Ser	96
FGF21 모조펩타이드 8	Asp-Ser-Ser-Pro-Leu-Leu-Gln-Phe-Gly-Gly-Gln-Val-Arg-Gln-Arg-Tyr-Cys-Gly-Ser-Gly-Gly-Gly-Ser-Gly-Met-Val-Gly-Pro-Ser-Gln-Gly-Arg-Ser-Pro-Ser-Tyr-Ala-Ser	97
FGF21 모조펩타이드 9	Ser-Ser-Pro-Leu-Leu-Gln-Phe-Gly-Gly-Gln-Val-Arg-Gln-Arg-Tyr-Gly-Gly-Ser-Gly-Cys-Gly-Ser-Gly-Asp-Pro-Leu-Ser-Met-Val-Gly-Pro-Ser-Gln-Gly-Arg-Ser-Pro-Ser	98
FGF21 모조펩타이드 10	Leu-Leu-Gln-Phe-Gly-Gly-Gln-Val-Arg-Gln-Arg-Tyr-Leu-Tyr-Thr-Gly-Gly-Ser-Gly-Cys-Gly-Ser-Gly-Pro-Pro-Asp-Val-Gly-Ser-Ser-Asp-Pro-Leu-Ser-Met-Val-Gly-Pro	99
FGF21 모조펩타이드 11	Asp-Ser-Ser-Pro-Leu-Leu-Gln-Phe-Gly-Gly-Gln-Val-Arg-Gln-Arg-Tyr-Leu-Tyr-Thr-Asp-Cys-Gly-Ser-Gly-Gly-Leu-Val-Thr-Gly-Leu-Glu-Ala-Val-Arg-Ser-Pro-Ser-Phe-Glu-Lys	100
FGF21 모조펩타이드 12	Asp-Ser-Ser-Pro-Leu-Leu-Gln-Phe-Gly-Gly-Gln-Val-Arg-Gln-Arg-Tyr-Gly-Gly-Ser-Gly-Cys-Gly-Ser-Gly-Gly-Leu-Val-Thr-Gly-Leu-Glu-Ala-Val-Arg-Ser-Pro-Ser-Phe-Glu-Lys	101

[622]

[623] 상기의 FGF21 아날로그는 천연형 FGF21과 비교하여 대량 생산 시 생산 효율이 높을 수 있으며, 천연형 FGF21에 비하여 역가가 감소된 것일 수 있다.

[624]

[625] **실시예 4: FGF21 아날로그의 합성 (4)**

[626]

[627] GLP-1 수용체 및 FGF21 수용체에 동시에 작용할 수 있는, 이중 GLP-1/FGF21 작용제인 FGF21 아날로그를 제조하여, 하기 표 11에 이의 서열을 나타냈다.

[628]

[629] [표11]

명칭	서열	서열번호
엑센딘-4	His-Gly-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Leu-Ser-Lys-Gln-Met-Glu-Glu-Glu-Ala-Val-Arg-Leu-Phe-Ile-Glu-Trp-Leu-Lys-Asn-Gly-Gly-Pro-Ser-Ser-Gly-Ala-Pro-Pro-Pro-Ser	102
이중 GLP-1/FGF21 작용제1	Xaa -Gly-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Leu-Ser-Lys-Gln-Met-Glu-Glu-Glu-Ala-Val-Arg-Leu-Phe-Ile-Glu-Trp-Leu-Lys-Asn-Gly-Gly-Pro-Asp-Ser-Ser-Pro-Leu-Leu-Gln-Phe-Val-Gly-Pro-Ser-Gln-Gly-Arg-Ser-Pro-Ser	103
이중 GLP-1/FGF21 작용제2	Xaa -Gly-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Leu-Ser-Lys-Gln-Met-Glu-Glu-Glu-Ala-Val-Arg-Leu-Phe-Ile-Glu-Trp-Leu-Lys-Asn-Gly-Gly-Pro-Gly-Gly-Ser-Gly-Asp-Ser-Ser-Pro-Leu-Leu-Gln-Pro-Ser-Gln-Gly-Arg-Ser-Pro-Ser	104
이중 GLP-1/FGF21 작용제3	Xaa -Gly-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Leu-Ser-Lys-Gln-Met-Glu-Glu-Glu-Ala-Val-Arg-Leu-Phe-Ile-Glu-Trp-Leu-Lys-Asn-Gly-Gly-Pro-Gly-Gly-Ser-Gly-Asp-Ser-Ser-Pro-Leu-Gly-Gly-Ser-Ser-Gln-Gly-Arg-Ser-Pro-Ser	105
이중 GLP-1/FGF21 작용제4	Xaa -Gly-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Leu-Ser-Lys-Gln-Met-Glu-Glu-Glu-Ala-Val-Arg-Leu-Phe-Ile-Glu-Trp-Leu-Lys-Asn-Gly-Gly-Pro-Asp-Ser-Ser-Pro-Leu-Leu-Gln-Phe-Gly-Gly-Ser-Gly-Ser-Gln-Gly-Arg-Ser-Pro-Ser	106
이중 GLP-1/FGF21 작용제5	Xaa -Gly-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Leu-Ser-Lys-Gln-Met-Glu-Glu-Glu-Ala-Val-Arg-Leu-Phe-Ile-Glu-Trp-Leu-Lys-Asn-Gly-Gly-Pro-Gly-Gly-Ser-Gly-Asp-Ser-Ser-Pro-Leu-Leu-Gln-Gly-Arg-Ser-Pro-Ser-Tyr-Ala-Ser	107
이중 GLP-1/FGF21 작용제6	Xaa -Gly-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Leu-Ser-Lys-Gln-Met-Glu-Glu-Glu-Ala-Val-Arg-Leu-Phe-Ile-Glu-Trp-Leu-Lys-Asn-Gly-Gly-Pro-Gly-Gly-Ser-Gly-Asp-Ser-Ser-Pro-Leu-Gly-Gly-Ser-Arg-Ser-Pro-Ser-Tyr-Ala-Ser	108

	a-Ser	
이 중 GLP-1/FGF21 작용제7	Xaa -Gly-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Leu-Ser-Lys- Gln-Met-Glu-Glu-Glu-Ala-Val-Arg-Leu-Phe-Ile-Glu- Trp-Leu-Lys-Asn-Gly-Gly-Pro-Asp-Ser-Ser-Pro-Leu- Leu-Gln-Phe-Gly-Gly-Ser-Gly-Arg-Ser-Pro-Ser-Tyr-A la-Ser	109
이 중 GLP-1/FGF21 작용제8	Xaa -Gly-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Leu-Ser-Lys- Gln-Met-Glu-Glu-Glu-Ala-Val-Arg-Leu-Phe-Ile-Glu- Trp-Leu-Lys-Asn-Gly-Gly-Pro-Asp-Ser-Ser-Pro-Leu- Leu-Gln-Phe-Glu-Ala-Val-Arg-Ser-Pro-Ser-Phe-Glu-L ys	110
이 중 GLP-1/FGF21 작용제9	Xaa -Gly-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Leu-Ser-Lys- Gln-Met-Glu-Glu-Glu-Ala-Val-Arg-Leu-Phe-Ile-Glu- Trp-Leu-Lys-Asn-Gly-Gly-Pro-Gly-Gly-Ser-Gly-Asp- Ser-Ser-Pro-Leu-Leu-Gln-Val-Arg-Ser-Pro-Ser-Phe-G lu-Lys	111
이 중 GLP-1/FGF21 작용제10	Xaa -Gly-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Leu-Ser-Lys- Gln-Met-Glu-Glu-Glu-Ala-Val-Arg-Leu-Phe-Ile-Glu- Trp-Leu-Lys-Asn-Gly-Gly-Pro-Gly-Gly-Ser-Gly-Asp- Ser-Ser-Pro-Leu-Gly-Gly-Ser-Arg-Ser-Pro-Ser-Phe-Gl u-Lys	112
이 중 GLP-1/FGF21 작용제11	Xaa -Gly-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Leu-Ser-Lys- Gln-Met-Glu-Glu-Glu-Ala-Val-Arg-Leu-Phe-Ile-Glu- Trp-Leu-Lys-Asn-Gly-Gly-Pro-Asp-Ser-Ser-Pro-Leu- Leu-Gln-Phe-Gly-Gly-Ser-Gly-Arg-Ser-Pro-Ser-Phe- Glu-Lys	113

[630]

[631] 상기 표에서 첫 번째 아미노산 (Xaa)는 히스티딘에서 알파 탄소가 제거된 것, 즉 이미다조아세틸을 의미한다.

[632] 상기에서 제조한 신규한 이 중 GLP-1/FGF21 작용제는 GLP-1 수용체, FGF21 수용체, FGF21 공동 수용체에 결합력을 가지며, 이의 결합력은 천연형에 비해 감소되어 역가가 감소된 기능을 가지는 바, 당뇨병, 비만 또는 비알콜성 지방간염 환자의 치료제 물질로 이용될 수 있다.

[633]

[634] 실시예 5: FGF21 아날로그의 제작 (5)

[635]

[636] (1) FGF19(14~20)-FGF21 발현 벡터의 제작

[637]

[638] 천연형 FGF21가 삽입되어 있는 pET22b 벡터에 FGF19(15~20)를 삽입하기 위해 하기의 프라이머 (서열번호 1 및 2)를 제작하여 상기 벡터를 주형으로 하여 PCR을 진행하였다.

[639] FGF19의 15번 내지 20번 아미노산은 천연형 미성숙 FGF19 서열에서 신호서열인 1번 내지 22번 아미노산을 제외한 성숙 FGF19 서열을 기준으로 15번 내지 20번에 위치하는 아미노산을 말한다.

[640]

[641] [표12]

FGF19(15~20)삽입 프라이머

	서열	서열번호
FGF-19(15~20)	5'-GAAGGAGATATACATATGGGCTGGGGTGATCCGATT CACCCCATCCCTGACTCCAG-3'	114
	5'-CTGGAGTCAGGGATGGGGTGAATCGGATCACCCAG CCCATATGTATATCTCCTTC-3'	115

[642]

[643] FGFR4 결합 위치인 FGF19(15~20) 서열을 pET22b 벡터의 시작코돈과 FGF21 N-말단 사이에 삽입하기 위하여 부위 특이적 돌연변이 유도(site-directed mutagenesis) 방법을 이용하였다. PCR 증폭 조건은 95°C 30초, 55°C에서 30초, 68°C에서 6분으로 이 과정을 18회 반복하였으며 서열 분석을 통하여 정확한 서열을 확인하였다.

[644]

[645] pET22b에 존재하는 FGF19(15~20)-FGF21 서열을 숙주 세포의 주변 세포질에서 발현시키기 위해 pFlage-CTS 벡터에 삽입하고자 하였고, 이를 위하여 하기의 프라이머(서열번호 116 및 117)를 제작하여 PCR을 진행하였다.

[646]

[647] [표13]

FGF19(14~20) 삽입 프라이머

	서열	서열번호
FGF-19(14~20)	5'-GTAAGCTTATGGCTGGGGTGATCCGATTC-3'	116
	5'-CACTCGAGTCAGGAAGCGTAGCTGGGGCTTC-3'	117

[648]

- [649] PCR 증폭 조건은 95°C 30초, 55°C에서 30초, 68°C에서 40초로 이 과정을 25회 반복하였으며 증폭된 유전자와 벡터를 *HindIII*, *XhoI* 제한효소로 절단한 후 T4 리가아제로 pFlag-CTS 벡터에 삽입하여 발현 벡터를 제작하였다. 서열 분석을 통하여 정확한 서열을 확인하였다.
- [650]
- [651] 이러한 FGF21, FGF19(15~20)-FGF21 재조합 융합 단백질, 및 FGF19(14~20)-FGF21 재조합 융합 단백질의 뉴클레오타이드 및 단백질 서열은 다음과 같다.
- [652]

[653] [표14]

	서열	서열 번호
NativeFGF2 1	DNA CACCCCATCCCTGACTCCAGTCCTCTCCTGCAATT CGGGGGCCAAGTCCGGCAGCGGTACCTCTACACA GATGATGCCCAGCAGACAGAAGCCCACCTGGAG ATCAGGGAGGATGGGACGGTGGGGGGCGCTGCT GACCAGAGCCCCGAAAGTCTCCTGCAGCTGAAAG CCTTGAAGCCGGGAGTTATTCAAATCTTGGGAGT CAAGACATCCAGGTTCTGTGCCAGCGGCCAGAT GGGGCCCTGTATGGATCGCTCCACTTTGACCCTG AGGCCTGCAGCTTCCGGGAGCTGCTTCTTGAGGA CGGATACAATGTTTACCAGTCCGAAGCCCACGGC CTCCCGCTGCACCTGCCAGGGAACAAGTCCCCAC ACCGGGACCCTGCACCCCGAGGACCAGCTCGCTT CCTGCCACTACCAGGCCTGCCCCCGCACTCCCG GAGCCACCCGGAATCCTGGCCCCCAGCCCCCG ATGTGGGCTCCTCGGACCCTCTGAGCATGGTGGG ACCTTCCCAGGGCCGAAGCCCCAGCTACGCTTCC TGA	3
	단백 질 HPIPDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTEAHLEIR EDGTVGGAADQSPESLLQLKALKPGVIQILGVKTSR FLCQRPDGALYGSLHFDPEACSFRELLLEDGYNVY QSEAHGLPLHLPGNKSPHRDPAPRGPAPRFLPLPLP PALPEPPGILAPQPPDVGS SDPLSMVGPSQGRSPSYAS	4
FGF19(15~20)-FGF21	DNA ATGggctggggcgaccccatCACCCCATCCCTGACTCCA GTCCTCTCCTGCAATTCGGGGGCCAAGTCCGGCA GCGGTACCTCTACACAGATGATGCCCAGCAGACA GAAGCCCACCTGGAGATCAGGGAGGATGGGACG GTGGGGGGCGCTGCTGACCAGAGCCCCGAAAGTC TCCTGCAGCTGAAAGCCTTGAAGCCGGGAGTTAT TCAAATCTTGGGAGTCAAGACATCCAGGTTCTGT TGCCAGCGGCCAGATGGGGCCCTGTATGGATCGC TCCACTTTGACCCTGAGGCCTGCAGCTTCCGGGA GCTGCTTCTTGAGGACGGATACAATGTTTACCAG TCCGAAGCCCACGGCCTCCCGCTGCACCTGCCAG	118

		GGAACAAGTCCCCACACCGGGACCCTGCACCCCG AGGACCAGCTCGCTTCCTGCCACTACCAGGCCTG CCCCCGCACTCCC GGAGCCACCCGGAATCCTGGCCCCCAGCCCCC GATGTGGGCTCCTCGGACCCTCTGAGCATGGTGG GACCTTCCCAGGGCCGAAGCCCCAGCTACGCTTC CTGA	
	단백 질	MGWGDPIHIPDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQ TEAHLEIREDGTVGGAADQSPESLLQLKALKPGVIQ ILGVKTSRFLCQRPDGALYGSLHFDPEACSFRELLLE DGYNVYQSEAHGLPLHLPGNKSPHRDPAPRG PARFLPLPGLPPALPEPPGILAPQPPDVGSSDPLSMV GPSQGRSPSYAS	119
FGF19(14~20)-FGF21	DNA	TATGGCTGGGGTGATCCGATTCACCCCATCCCTG ACTCCAGTCCTCTCCTGCAATTCGGGGGCAAGT CCGGCAGCGGTACCTCTACACAGATGATGCCAG CAGACAGAAGCCACCTGGAGATCAGGGAGGAT GGGACGGTGGGGGGCGCTGCTGACCAGAGCCCC GAAAGTCTCCTGCAGCTGAAAGCCTTGAAGCCGG GAGTTATTCAAATCTTGGGAGTCAAGACATCCAG GTTCTGTGCCAGCGGCCAGATGGGGCCCTGTAT GGATCGCTCCACTTTGACCCTGAGGCCTGCAGCT TCCGGGAGCTGCTTCTTGAGGACGGATACAATGT TTACCAGTCCGAAGCCACGGCCTCCCGCTGCAC CTGCCAGGGAACAAGTCCCCACACCGGGACCCTG CACCCCGAGGACCAGCTCGCTTCCTGCCACTACC AGGCCTGCCCCCGCACTCCC GGAGCCACCCGGAATCCTGGCCCCCAGCCCCC GATGTGGGCTCCTCGGACCCTCTGAGCATGTGGG ACCTTCCCAGGGCCGAAGCCCCAGCTACGCT TCCTGA	120
	단백 질	YGWGDPIHIPDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQ TEAHLEIREDGTVGGAADQSPESLLQLKALKPGVIQ ILGVKTSRFLCQRPDGALYGSLHFDPEACSFRELLLE DGYNVYQSEAHGLPLHLPGNKSPHRDPAPRG PARFLPLPGLPPALPEPPGILAPQPPDVGSSDPLSMV GPSQGRSPSYAS	121

[654]

[655] (2) 재조합 FGF19(14~20)-FGF21 단백질의 발현

[656]

[657] OmpA 신호 서열의 유도 하에 *E.coli*의 주변 세포질로의 발현을 수행하였다. 재조합 FGF21 발현 벡터를 이용하여 *E.coli* BL21 (*E.coli* B F dcm ompT hsdS(r_B - m_B)-gal, Agilent)을 형질전환 하였다. 형질 전환 방법은 Agilent사에서 추천하는 방법을 따랐다. 재조합 FGF19-FGF21 발현 벡터가 형질 전환된 단일 콜로니를 취하여 암피실린($50 \mu\text{g/ml}$)이 포함된 1X 루리아 브로스(Luria Broth, LB) 배지에 접종하고, 37°C 에서 15시간 배양하였다. 재조합 FGF19-FGF21 균주 배양액과 30% 글리세롤이 포함된 1X LB 배지를 1:1(v/v)의 비율로 혼합하여 각 1 ml씩 크라이오-튜브에 분주하고, -140°C 에 보관하였다. 이를 재조합 융합 단백질의 생산을 위한 세포 스톡(cell stock)으로 사용하였다.

[658]

[659] 재조합 FGF19-FGF21의 발현을 위하여, 각 세포 스톡 1 바이알을 녹여 1L의 1X 루리아 브로스에 접종하고 37°C 에서 14~15시간 동안 진탕 배양하였다. OD600의 값이 1.0 이상을 나타내면 배양을 종료하고, 이를 종 배양액으로 사용하였다. 30 L 발효기(BIOSTAT C-plsu 30L, Sartorius, 독일)를 이용하여 종 배양액을 9.2 L의 발효 배지에 접종하고 초기 배스(bath) 발효를 시작하였다. 배양조건은 온도 30°C , 공기량 13 L/분(1 vvm), 교반 속도 500 rpm 그리고 30% 암모니아수를 사용하여 pH 6.70으로 유지시켰다. 발효 진행은 배양액 내의 영양소가 제한되었을 때, 추가배지(feeding solution)를 첨가하여 유가배양을 진행하였다. 균주의 성장은 OD 값에 의해 모니터링하며, OD 값이 80이상에서 최종 농도 0.5mM의 IPTG로 도입하였다. 배양은 도입 후 약 23~25시간까지 더 진행하며, 배양 종료 후, 원심 분리기를 사용하여 재조합 균주를 수확하여 사용 시까지 -80°C 에 보관하였다.

[660]

[661] (3) 주변 세포질에 존재하는 재조합 FGF19(14~20)-FGF21 단백질의 추출

[662]

[663] 상기 (2)에서 얻은 대장균 균체 200g을 상온의 완충용액(20 % sucrose, 1mM EDTA, 30mM Tris pH 7.5) 3L에 용해 시킨 후 2 시간 동안 교반하고, 7,000 rpm으로 원심분리하여 펠렛을 수거하였다. 이 펠렛을 다시 4°C 의 증류수 3L에 용해시켜 4°C 에서 2시간 동안 교반한 후 7,000 rpm으로 원심분리하여 펠렛을 제거하고 주변 세포질 단백질이 포함된 상등액을 수거하였다.

[664]

[665] (4) 재조합 FGF19(14~20)-FGF21 단백질의 침전

[666]

[667] 상기 (3)에서 얻은 상등액에 15mM이 되도록 히스티딘을 첨가하였다. 그리고 60% HCL을 pH가 5.2가 되도록 서서히 첨가시킨 후 7,000 rpm으로 원심분리하여

펠렛을 제거하고 재조합 FGF19-FGF21 단백질이 포함된 상등액을 수거하였다.

[668]

[669] (5) 음이온 결합 크로마토그래피 정제

[670]

[671] 상기 (4)에서 얻은 상등액에 1M 트리스 pH 8.0 완충액을 pH가 6 이상이 되도록 넣어준 후 전도도가 5이하가 되도록 10mM 트리스 8.0 완충액으로 희석시켰다. 10mM 트리스 pH 8.0 완충액으로 평형화된 DEAE (GE, 미국) 컬럼에 단백질을 접합 시킨 후 염화나트륨 0.5 M이 포함된 10mM 트리스 pH 8.0 완충액을 사용하여 농도가 0% 에서 100% 가 되도록 10 컬럼 용량의 선형 농도구배로 재조합 FGF19-FGF21 단백질을 용출하였다.

[672]

[673] (6) 소수성 결합 크로마토그래피 정제

[674]

[675] 상기 (5)에서 얻은 용출액을 10mM 트리스 pH 8.0 완충액으로 10배 희석 시켜준 후 3M 황산암모늄 완충액을 1.2M이 되도록 서서히 넣어주었다. 1.2M 황산암모늄 이 포함된 10mM 트리스 (Tris) pH 8.0 완충액으로 평형화된 Source Iso (GE, 미국) 컬럼에 단백질을 결합시킨 후 10mM 트리스 (Tris) pH 8.0 완충액을 사용하여 농도가 0% 에서 100% 가 되도록 10 컬럼 용량의 선형 농도구배로 재조합 FGF19-FGF21 단백질을 용출하였다.

[676] 정제된 FGF19-FGF21 단백질의 순도는 전기영동 및 고압크로마토그래피(HPLC)를 사용하여 분석하였고, 도 5에 나타내었다.

[677]

[678]

[679] 실시예 6: 천연형 FGF21과 면역글로불린 Fc를 비펩타이드성 중합체에 의해 연결된 결합체의 제조

[680]

[681] 3.4 K PropionALD(2) PEG (프로피온 알데히드기를 2개 가지고 있는 PEG, NOF, 일본)를 천연형 FGF21의 B 쇠의 N 말단에 폐길화시키기 위하여, 천연형 FGF21과 3.4 K PropionALD(2) PEG의 몰비를 1:3, 단백질의 농도를 5 mg/mL로 하여 4 °C에서 2시간 동안 반응시켰다. 이때, 반응은 100 mM 인산 칼륨 (Potassium phosphate) pH 6.0 완충액에 환원제인 20 mM 소듐 시아노보로하이드라이드 (Sodium Cyanoborohydride; NaCHBH₃)가 첨가된 환경 하에서 수행되었다. 반응이 종료된 후, 상기 반응액은 10 mM 트리스 (Tris) pH 7.0이 포함된 완충액과 0.25 M 염화나트륨 (Sorium Chloride) 농도 구배를 이용하여 Source15Q (GE, 미국)에 적용하여 모노-폐길화된 (Monopegylated) 천연형 FGF21을 정제하였다.

[682]

[683] 다음으로, 상기 정제된 모노-폐길화된 천연형 FGF21과 면역글로불린 Fc 의

물비가 1:3, 단백질의 농도를 50 mg/mL로 하여 4 °C에서 16시간 동안 반응시켰다. 반응액은 100 mM 인산 칼륨 (Potassium Phosphate) pH 6.0 완충액에 환원제인 20 mM 소듐 시아노보로하이드라이드 (Sodium Cyanoborohydride; NaCHBH₃)가 첨가된 환경 하에서 수행되었다. 반응이 종료된 후, 상기 반응액은 20 mM 비스 트리스(Bis Tris) pH 6.0과 0.25 M 염화나트륨 (Sodium Chloride) 농도 구배를 이용하여 Source15Q (GE, 미국)에 적용하고, 1.2 M 황산암모늄 (Ammonium Sulfate)과 20 mM 트리스 (Tris) pH 7.5의 농도 구배를 이용하여 Source ISO (GE, 미국)에 적용하여 면역글로불린 Fc에 천연형 FGF21이 PEG에 의해 공유결합으로 연결된 결합체를 정제하였다.

[684]

[685] 정제된 결합체는 2 % D-만니톨 (D-mannitol), 100 mM 염화나트륨 (Sodium Chloride), 0.02 % 폴리솔베이트 20 (polysorbate 20), 10 mM 소듐 아세테이트 (Sodium Acetate) pH 6.0 완충액으로 버퍼 교환하였다.

[686]

[687] **실험예 1: 천연형 FGF21 및 FGF21 아날로그의 수용체 결합력 비교**

[688]

[689] 본 발명의 대표적인 FGF21 아날로그들의 수용체 및 보조 수용체와의 결합력을 측정한다.

[690]

그 결과 본 발명의 FGF21 아날로그는 FGF21 수용체 및 보조 수용체(beta-klotho)와의 결합력이 천연형 FGF21에 비하여 감소하는 것을 확인한다.

[691]

[692] **실험예 2: 천연형 FGF21 및 FGF21 아날로그의 수용체 매개 제거 (Receptor-mediated clearance) 비교**

[693]

[694] FGF21 아날로그의 수용체 매개 제거(receptor-mediated clearance, RMC)를 측정한다.

[695]

그 결과 본 발명의 FGF21 아날로그는 천연형 FGF21 보다 수용체 매개 제거가 감소하는 것을 확인한다.

[696]

[697] **실험예 3: FGF19(14~20)-FGF21 단백질의 수용체 결합력 및 활성 확인**

[698]

[699] 상기 실시예 5에서 얻은 FGF21 아날로그의 FGF21의 보조 수용체인 베타-클로토와의 결합력 및 FGF21의 활성을 확인하기 위하여 SPR(surface plasmon resonance) 및 *in vitro* 글루코스 수용(glucose uptake) 시험을 진행하였다. 베타-클로토와의 SPR 시험 결과, 본 발명에 따른 FGF21 아날로그인, FGF19-FGF21 단백질은 천연형 FGF21과 비교하여 동일한 결합력과 *in vitro* 활성을 보이는 것을 확인하였다 (도 6a 및 6b). 이와 같은 결과는 FGF19-FGF21

단백질이 FGF21의 활성을 그대로 유지하고 있음을 시사하는 것이다.

[700]

[701] **실험예 4: FGF19(14~20)-FGF21 단백질의 FGFR4 결합력 확인**

[702]

[703] 상기 실시예 5에서 얻은 FGF21 아날로그인 제조합 FGF19-FGF21 단백질이 FGFR4에 대한 결합력을 가지는 지 여부를 확인하기 위하여 SPR 시험을 진행하였다. 확인 결과 FGF19-FGF21 단백질은 천연형 FGF19에 비해 약 1.7%의 FGFR4에 대한 결합력을 가지는 것이 확인되었다 (도 7).

[704] 이와 같은 결과는 FGF19-FGF21 단백질이 FGF19의 활성을 가지고 있음을 시사하는 것이다.

[705]

[706] **실험예 5: FGF21-면역글로불린 Fc 결합체의 체중 감소 및 음식 섭취 효과 확인**

[707]

[708] 상기 실시예 6에서 얻은 제조합 FGF21-면역글로불린 Fc 결합체의 체중감소 및 음식 섭취에 미치는 영향을 확인하기 위하여 식이 요법으로 비만을 유도한 마우스 (DIO mouse)에서 FGF21-면역글로불린 Fc 결합체를 농도 증가적으로 (0.9, 1.7, 3.4, 7.1, 14.3 nmol/kg/Q2D) 2일에 한번 피하 투여한 후 체중 변화량과 음식 섭취량을 2주 동안 측정하였다. 확인 결과 농도 의존적으로 비만 마우스의 체중이 유의적으로 감소하는 것을 확인하였고, 음식 섭취량은 유의적 변화가 없는 것으로 확인되었다 (도 8).

[709] 이와 같은 결과는 음식 섭취량을 줄이지 않고도 FGF21-면역글로불린 Fc 결합체가 체중 감소시킴으로써 비만 치료에 효과적으로 사용될 수 있음을 시사하는 것이다.

[710]

[711] **실험예 6: FGF21-면역글로불린 Fc 결합체의 혈당 감소 효과 확인**

[712]

[713] 제조합 FGF21-면역글로불린 Fc 결합체의 혈당 감소 효과를 확인하기 위하여 당뇨병 모델 마우스 (db/db mouse)에서 FGF21-면역글로불린 Fc 결합체를 농도 증가적으로 (1.2, 2.4, 4.8 nmol/kg/Q2D) 2일에 한번 피하 투여한 후 혈당을 4주동안 측정하였다. 확인 결과 농도 의존적으로 당뇨병 모델 마우스의 혈당이 유의적으로 감소하는 것을 확인하였다 (도 9).

[714] 이와 같은 결과는 FGF21-면역글로불린 Fc 결합체가 효과적으로 혈당을 감소시킴으로써 당뇨병 치료에 효과적으로 사용될 수 있음을 시사하는 것이다.

[715]

[716] **실험예 7: FGF21-면역글로불린 Fc 결합체의 지방 대사 개선 효과 확인**

[717]

[718] 제조합 FGF21-면역글로불린 Fc 결합체의 지방 대사 개선 효과를 확인하기 위하여 식이 요법으로 비만을 유도한 마우스 (DIO mouse)에서

FGF21-면역글로불린 Fc 결합체를 농도 증가적으로 (0.9, 1.7, 3.4, 7.1, 14.3 nmol/kg/Q2D) 2일에 한번 피하 투여한 후 체중 변화량과 음식 섭취량을 2주 동안 측정하였다. 확인 결과 농도 의존적으로 비만 마우스의 콜레스테롤과 지방산 (Triglyceride)이 유의적으로 감소하는 것을 확인하였다 (도 10). 이와 같은 결과는 FGF21-면역글로불린 Fc 결합체가 지방 대사 질환 치료에 효과적으로 사용될 수 있음을 시사하는 것이다.

[719]

[720] 이상의 설명으로부터, 본 발명이 속하는 기술분야의 당업자는 본 발명이 그 기술적 사상이나 필수적 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 실시될 수 있다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 이와 관련하여, 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적인 것이 아닌 것으로서 이해해야만 한다. 본 발명의 범위는 상기 상세한 설명보다는 후술하는 특허 청구범위의 의미 및 범위 그리고 그 등가 개념으로부터 도출되는 모든 변경 또는 변형된 형태가 본 발명의 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.

청구범위

- [청구항 1] 천연형 FGF21 (fibroblast growth factor 21)에서 하나 이상의 아미노산이 제거, 부가, 치환, 수식, 또는 이들의 조합으로 변이된, FGF21 아날로그.
- [청구항 2] 제1항에 있어서, 상기 FGF21 아날로그는 하기 (i) 내지 (iii) 중 하나 이상의 변이를 가지는, FGF21 아날로그:
 (i) 천연형 성숙 FGF21의 1번부터 4번까지의 아미노산 서열 중 적어도 하나 이상의 아미노산이 제거됨;
 (ii) 천연형 성숙 FGF21의 167번 아미노산인 세린이 세린 외 다른 아미노산으로 치환됨; 및
 (iii) 천연형 성숙 FGF21의 168번 아미노산인 메티오닌이 메티오닌 외 다른 아미노산으로 치환됨.
- [청구항 3] 제2항에 있어서, 상기 FGF21 아날로그는 추가로 하기 (iv), (v) 또는 둘 다의 변이를 가지는, FGF21 아날로그:
 (iv) 천연형 성숙 FGF21의 170번 아미노산인 글리신이 글리신 외 다른 아미노산으로 치환됨; 및
 (v) 천연형 성숙 FGF21의 172번 아미노산인 세린이 세린 외 다른 아미노산으로 치환됨.
- [청구항 4] 제2항에 있어서, 상기 FGF21 아날로그는 하기 (a) 및 (b)의 변이를 가지는, FGF21 아날로그:
 (a) 천연형 성숙 FGF21의 1번 아미노산, 1번 및 2번 아미노산, 또는 1번부터 4번까지의 아미노산이 제거됨; 및
 (b) 천연형 성숙 FGF21의 167번 아미노산인 세린의 트레오닌으로의 치환, 168번 아미노산인 메티오닌의 알라닌, 페닐알라닌, 또는 이소류신으로의 치환, 또는 167번 아미노산인 세린의 트레오닌으로의 치환 및 168번 아미노산인 메티오닌의 알라닌, 페닐알라닌, 또는 이소류신으로의 치환.
- [청구항 5] 제4항에 있어서,
 상기 FGF21 아날로그는 추가로 천연형 성숙 FGF21의 170번 아미노산인 글리신의 글루탐산으로의 치환; 172번 아미노산인 세린의 류신으로의 치환; 또는 둘 다를 포함하는, FGF21 아날로그.
- [청구항 6] 제2항에 있어서,
 상기 FGF21 아날로그는 서열번호: 18, 20, 22, 24, 26, 및 86으로 이루어진 군에서 선택된, 아미노산 서열을 가지는 FGF21 아날로그.
- [청구항 7] 제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서,
 상기 FGF21 아날로그는
 천연형 성숙 FGF21의 5번째 아미노산, 6번째 아미노산, 7번째 아미노산, 8번째 아미노산, 9번째 아미노산, 172번째 아미노산, 176번째 아미노산, 177번째 아미노산, 및 178번째 아미노산으로 이루어진 군에서 선택된

하나 또는 그 이상의 아미노산이 다른 아미노산으로 치환;
 천연형 성숙 FGF19의 N-말단으로부터 16번부터 20번까지의 아미노산
 서열을 포함하는, 아미노산 서열의 부가;
 또는 상기 두 가지 변이를 모두 포함하는,
 FGF21 아날로그.

- [청구항 8] 제7항에 있어서,
 상기 다른 아미노산은 알라닌인, FGF21 아날로그.
- [청구항 9] 제7항에 있어서, 상기 천연형 성숙 FGF19의 N-말단으로부터 16번부터
 20번까지의 아미노산 서열은 WGDPI (서열번호: 122)인, FGF21 아날로그.
- [청구항 10] 제7항에 있어서, 상기 천연형 성숙 FGF19의 N-말단으로부터 16번
 아미노산부터 20번까지의 아미노산 서열을 포함하는 아미노산 서열은
 5개 내지 20개의 아미노산으로 이루어진, FGF21 아날로그.
- [청구항 11] 제10항에 있어서,
 상기 천연형 성숙 FGF19의 N-말단으로부터 16번부터 20번까지의
 아미노산 서열을 포함하는 아미노산 서열은, 천연형의 성숙 FGF19의
 N-말단으로부터 14번부터 20번까지의 아미노산 서열 혹은 15번부터
 20번까지의 아미노산 서열인, FGF21 아날로그.
- [청구항 12] 제7항에 있어서, 천연형 성숙 FGF19의 N-말단으로부터 16번부터
 20번까지의 아미노산 서열을 포함하는, 아미노산 서열이 부가된 FGF21
 아날로그는, 천연형 성숙 FGF19의 N-말단으로부터 16번부터 20번까지의
 아미노산 서열을 포함하는, 아미노산 서열이 성숙 FGF21의 전장 서열
 혹은 이의 활성 단편에 부가된, FGF21 아날로그.
- [청구항 13] 제12항에 있어서, 상기 천연형 성숙 FGF19의 N-말단으로부터 16번부터
 20번까지의 아미노산 서열을 포함하는, 아미노산 서열은 이의 C-말단이
 성숙 FGF21의 전장 서열 혹은 이의 활성 단편의 N-말단에 부가된 형태인,
 FGF21 아날로그.
- [청구항 14] 제12항에 있어서, 상기 천연형 성숙 FGF19의 N-말단으로부터 16번부터
 20번까지의 아미노산 서열을 포함하는, 아미노산 서열은 성숙 FGF21의
 전장 서열 혹은 이의 활성 단편에 직접적으로 또는 링커를 통하여 연결된,
 FGF21 아날로그.
- [청구항 15] 제7항에 있어서,
 상기 FGF21 아날로그는 서열번호: 46, 48, 50, 52, 54, 56, 58, 60, 62, 64, 66,
 68, 70, 72, 74, 76, 78, 80, 119, 및 121로 이루어진 군에서 선택된, 아미노산
 서열을 가지는 FGF21 아날로그.
- [청구항 16] 제1항에 있어서, 상기 FGF21 아날로그는
 (i) 성숙 FGF21의 N-말단의 아미노산 서열에 (ii) 성숙 FGF21 또는
 FGF19의 C-말단의 아미노산 서열이 부가된, FGF21 아날로그.
- [청구항 17] 제16항에 있어서,

상기 FGF21 아날로그는 상기 성숙 FGF21의 N-말단의 아미노산 서열은, 성숙 FGF21의 아미노산 서열에서 N-말단 1번 내지 4번 아미노산은 모두 제외된 FGF21의 N-말단 아미노산 서열인, FGF21 아날로그.

[청구항 18] 제16항에 있어서, 상기 성숙 FGF21의 N-말단의 아미노산 서열은 성숙 FGF21의 아미노산 서열에서 N-말단으로부터 5번째, 6번째 또는 9번째 아미노산으로부터 C-말단 방향에 위치하는 임의의 아미노산까지의 연속되는 아미노산 서열인,

FGF21 아날로그.

[청구항 19] 제18항에 있어서, 상기 연속되는 아미노산 서열은 2개 내지 30개의 아미노산을 가지는, FGF21 아날로그.

[청구항 20] 제16항에 있어서, 상기 성숙 FGF21의 C-말단 아미노산 서열은 성숙 FGF21의 임의의 아미노산으로부터 C-말단으로부터 1번째, 4번째, 또는 11번째 아미노산까지의 연속되는 아미노산 서열인,

FGF21 아날로그.

[청구항 21] 제20항에 있어서, 상기 연속되는 아미노산 서열은 2개 내지 30개의 아미노산을 가지는, FGF21 아날로그.

[청구항 22] 제16항에 있어서, 상기 FGF19의 C-말단 아미노산 서열은 FGF19의 임의의 아미노산으로부터 C-말단으로부터 1번째 아미노산까지의 연속되는 아미노산 서열인,

FGF21 아날로그.

[청구항 23] 제22항에 있어서, 상기 연속되는 아미노산 서열은 2개 내지 30개의 아미노산을 가지는, FGF21 아날로그.

[청구항 24] 제16항에 있어서, 성숙 FGF21의 N-말단의 아미노산 서열과 성숙 FGF21 또는 FGF19의 C-말단의 아미노산 서열은 서로 링커를 통해 연결된,

FGF21 아날로그.

[청구항 25] 제16항에 있어서, 상기 (i) 성숙 FGF21의 N-말단의 아미노산 서열 및 (ii) 성숙 FGF21 또는 FGF19의 C-말단의 아미노산 서열이 N-말단에서 C-말단 방향으로 순차적으로 배열되거나,

상기 (ii) 성숙 FGF21 또는 FGF19의 C-말단의 아미노산 서열 및 (i) 성숙

FGF21의 N-말단의 아미노산 서열이 N-말단에서 C-말단 방향으로
순차적으로 배열된,
FGF21 아날로그.

[청구항 26] 제16항에 있어서,
상기 성숙 FGF21의 N-말단의 아미노산 서열은 서열번호 123 내지
130으로 이루어진 군에서 선택되고,
상기 성숙 FGF21의 C-말단의 아미노산 서열은 서열번호 131 내지
136으로 이루어진 군에서 선택되고,
상기 FGF19의 C-말단의 아미노산 서열은 서열번호 137 또는 138인,
FGF21 아날로그.

[청구항 27] 제26항에 있어서,
상기 FGF21 아날로그는 서열번호: 90 내지 101로 이루어진 군으로부터
선택된, 아미노산 서열을 가지는,
FGF21 아날로그.

[청구항 28] 제16항에 있어서,
(i) 성숙 FGF21의 N-말단의 아미노산 서열에 (ii) 성숙 FGF21 또는
FGF19의 C-말단의 아미노산 서열이 부가되고, 추가로 (iii)
엑센딘-4(exendin-4) 서열이 부가된,
FGF21 아날로그.

[청구항 29] 제28항에 있어서,
상기 엑센딘-4 서열은 천연형 엑센딘-4 서열에서 첫 번째 아미노산인
히스티딘의 알파 카본이 제거되고, 32번째부터 39번째 아미노산 서열이
제외된 서열이고,
상기 성숙 FGF21의 N-말단 아미노산 서열은 성숙 FGF21의 아미노산
서열에서 N-말단 1번 내지 4번 아미노산은 모두 제외된 FGF21의 N-말단
아미노산 서열인,
FGF21 아날로그.

[청구항 30] 제28항 또는 제29항에 있어서,
상기 성숙 FGF21의 N-말단의 아미노산 서열은 성숙 FGF21의 아미노산
서열에서 N-말단으로부터 5번째 아미노산으로부터 C-말단 방향에
위치하는 임의의 아미노산까지의 연속되는 아미노산 서열이고,
상기 성숙 FGF21의 C-말단 아미노산 서열은 성숙 FGF21의 임의의
아미노산으로부터 C-말단으로부터 1번째 또는 4번째 아미노산까지의
연속되는 아미노산 서열이고,
상기 FGF19의 C-말단 아미노산 서열은 FGF19의 임의의
아미노산으로부터 C-말단으로부터 1번째 아미노산까지의 연속되는
아미노산 서열인,
FGF21 아날로그.

- [청구항 31] 제30항에 있어서, 상기 연속되는 아미노산 서열은 2개 내지 30개의 아미노산을 가지는, FGF21 아날로그.
- [청구항 32] 제28항에 있어서,
상기 성숙 FGF21의 N-말단의 아미노산 서열과 성숙 FGF21 또는 FGF19의 C-말단의 아미노산 서열 사이, 또는 성숙 FGF21의 N-말단의 아미노산 서열과 엑센딘-4(exendin-4) 서열은 직접적으로 연결되거나, 링커를 통해 연결된,
FGF21 아날로그.
- [청구항 33] 제28항에 있어서,
상기 FGF21 아날로그는 엑센딘-4(exendin-4) 서열, 성숙 FGF21의 N-말단의 아미노산 서열, 및 성숙 FGF21 또는 FGF19의 C-말단의 아미노산 서열이 N-말단에서 C-말단 방향으로 순차적으로 연결된 것인,
FGF21 아날로그.
- [청구항 34] 제28항에 있어서,
상기 성숙 FGF21의 N-말단의 아미노산 서열은 서열번호: 139 내지 142로 이루어진 군에서 선택되고,
성숙 FGF21의 C-말단의 아미노산 서열은, 서열번호: 143 내지 147로 이루어진 군에서 선택되고,
성숙 FGF19의 C-말단의 아미노산 서열은, 서열번호: 148 내지 150으로 이루어진 군에서 선택되는,
FGF21 아날로그.
- [청구항 35] 제28항에 있어서,
상기 FGF21 아날로그는 서열번호: 103 내지 113으로 이루어진 군에서 선택되는, FGF21 아날로그.
- [청구항 36] 제1항 내지 제6항, 제16항 내지 제29항, 및 제32항 내지 제35항 중 어느 한 항에 따른 FGF21 아날로그를 코딩하는 폴리뉴클레오티드.
- [청구항 37] 제36항의 폴리뉴클레오티드를 포함하는, 벡터.
- [청구항 38] 제36항의 폴리뉴클레오티드 또는 상기 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터를 함유하는, 형질전환체.
- [청구항 39] (i) 천연형 FGF21 또는 제1항 내지 제6항, 제16항 내지 제29항, 및 제32항 내지 제35항 중 어느 한 항에 따른 FGF21 아날로그; 및 (ii) FcRn 결합물질, 지방산, 폴리에틸렌 글리콜, 아미노산 단편, 및 알부민으로 이루어진 군에서 선택된 캐리어가 결합된,
FGF21 결합체.
- [청구항 40] 제39항에 있어서, 상기 FcRn 결합물질은 면역글로불린 Fc 영역인, FGF21 결합체.
- [청구항 41] 제39항에 있어서,
(i) 천연형 FGF21 또는 상기 FGF21 아날로그와 (ii) 캐리어가 (iii) 펩타이드

링커, 또는 폴리에틸렌글리콜, 폴리프로필렌 글리콜, 에틸렌 글리콜-프로필렌 글리콜 공중합체, 폴리옥시에틸화폴리올, 폴리비닐알콜, 폴리사카라이드, 텍스트란, 폴리비닐에틸에테르, 생분해성 고분자, 지질 중합체, 키틴류, 히아루론산 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 비펩타이드성 링커를 통해 연결되는 것인, FGF21 결합체.

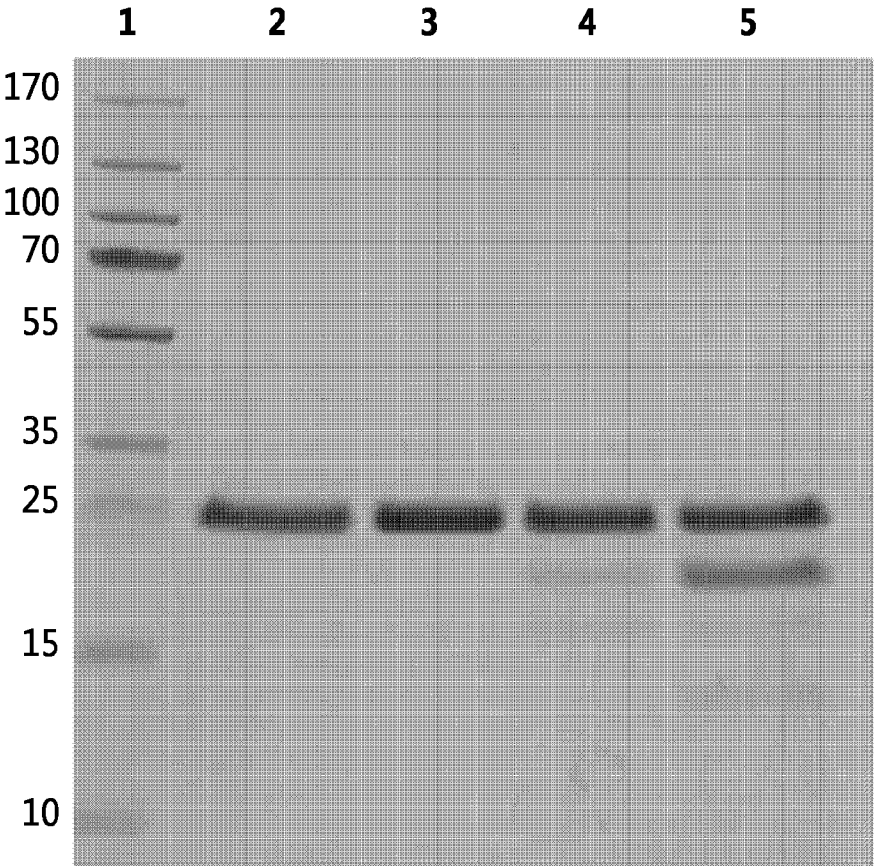
[청구항 42] 제1항 내지 제6항, 제16항 내지 제29항, 및 제32항 내지 제35항 중 어느 한 항의 FGF21 아날로그; 또는 상기 FGF21 아날로그 또는 천연형 FGF21에 FcRn 결합물질, 지방산, 폴리에틸렌 글리콜, 아미노산 단편, 및 알부민으로 이루어진 군에서 선택된 캐리어가 결합된, FGF21 결합체를 유효성분으로 포함하는, 대사증후군의 예방 또는 치료를 위한 약학적 조성물.

[청구항 43] 제42항에 있어서, 상기 대사증후군은 내당증 장애, 고콜레스테롤혈증, 이상지혈증, 비만, 당뇨, 고혈압, 비알코올지방간염 (nonalcoholic steatohepatitis, NASH), 이상지혈증에 의한 동맥경화, 죽상동맥경화증, 동맥경화증, 관상동맥 심질환(관동맥성 심장병), 혹은 간 대사 질환을 포함하는, 대사증후군의 예방 또는 치료를 위한 약학적 조성물.

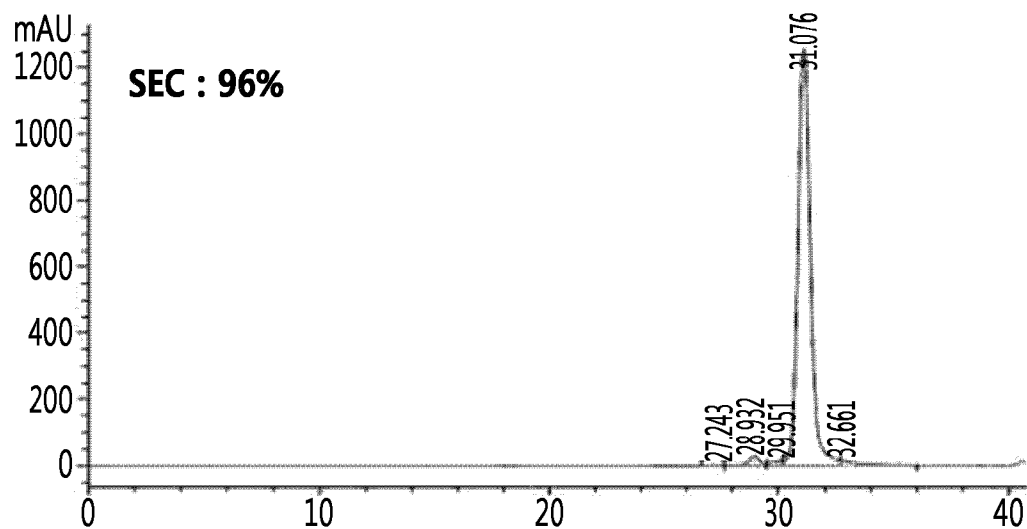
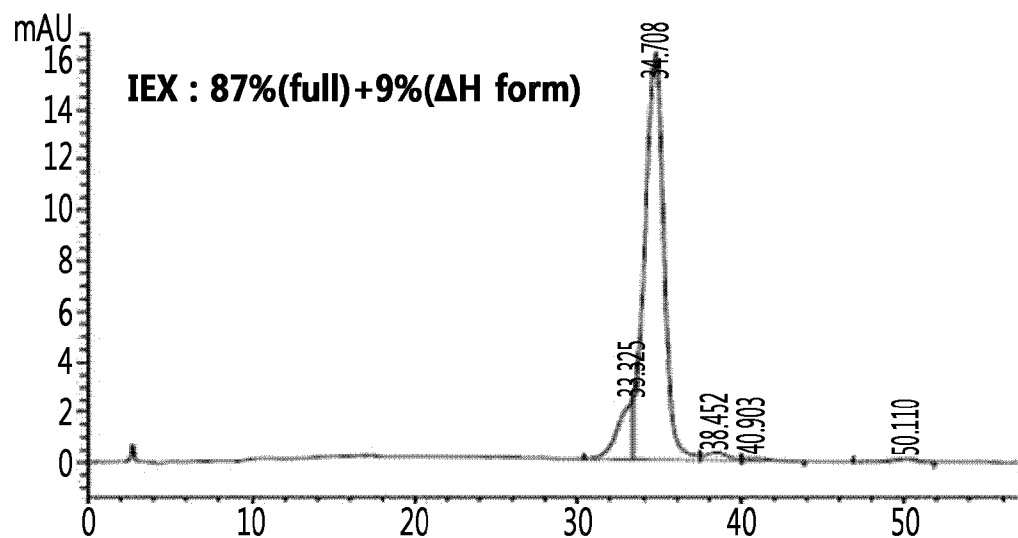
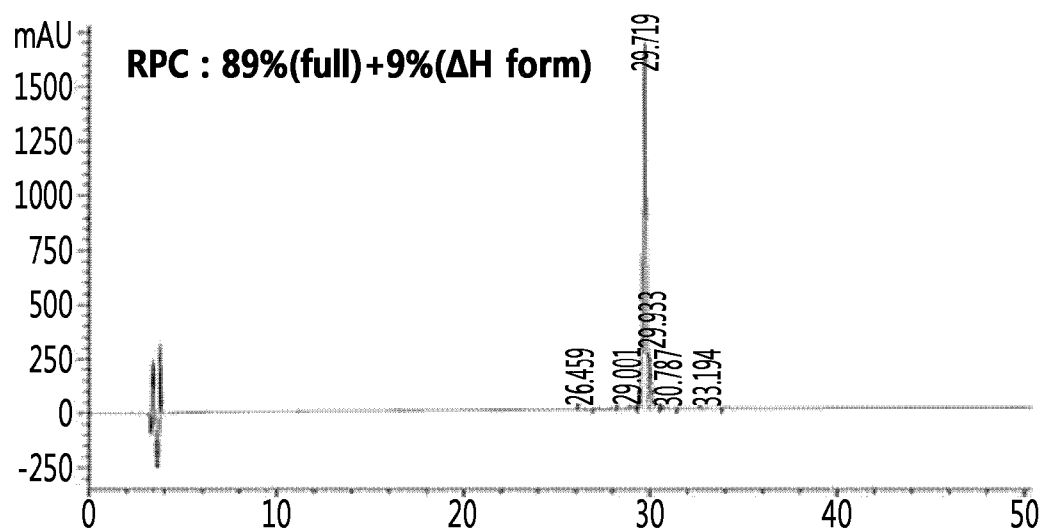
[청구항 44] 제38항의 형질전환체를 배양하여 FGF21 아날로그를 발현하는 단계; 및 형질전환체 혹은 이의 배양물로부터 상기 발현된 FGF21 아날로그를 회수하는 단계를 포함하는, FGF21 아날로그의 제조방법.

[청구항 45] 천연형 FGF21 또는 제1항 내지 제6항, 제16항 내지 제29항, 및 제32항 내지 제35항 중 어느 한 항에 따른 FGF21 아날로그를 FcRn 결합물질, 지방산, 폴리에틸렌 글리콜, 아미노산 단편, 및 알부민으로 이루어진 군에서 선택된 캐리어와 결합시키는 단계를 포함하는, FGF21 결합체의 제조 방법.

[도 1]



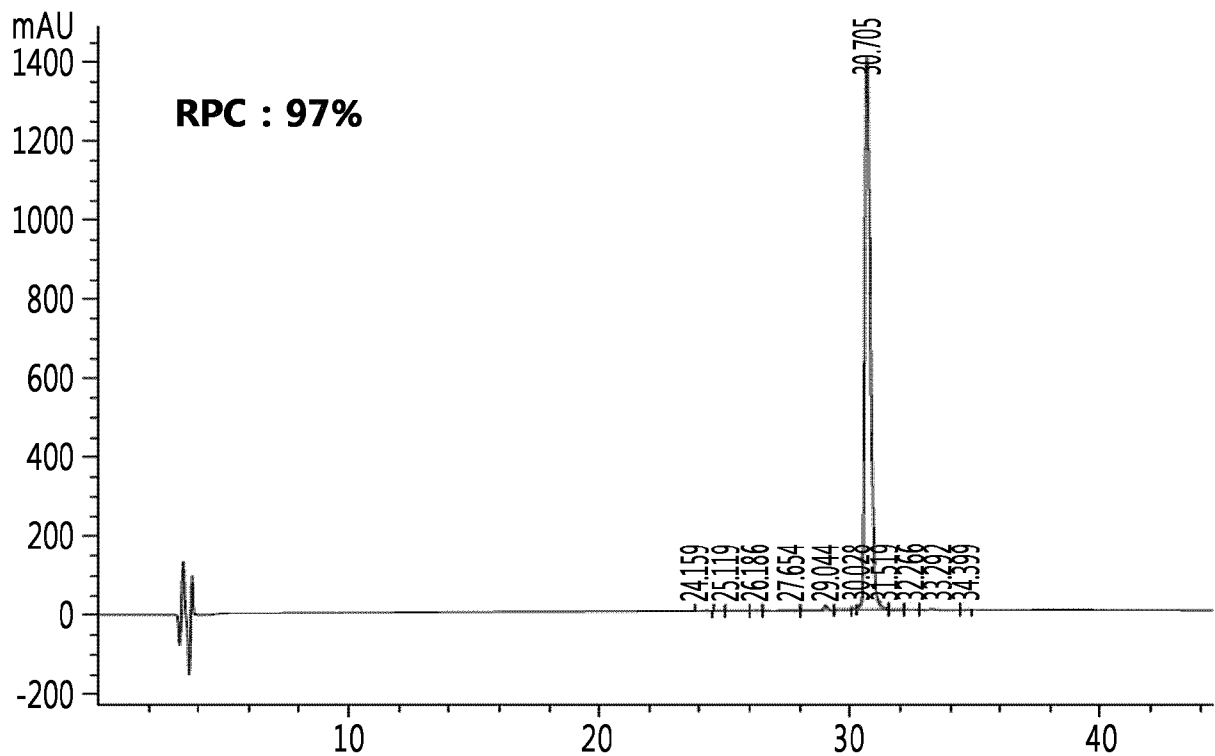
[도2]



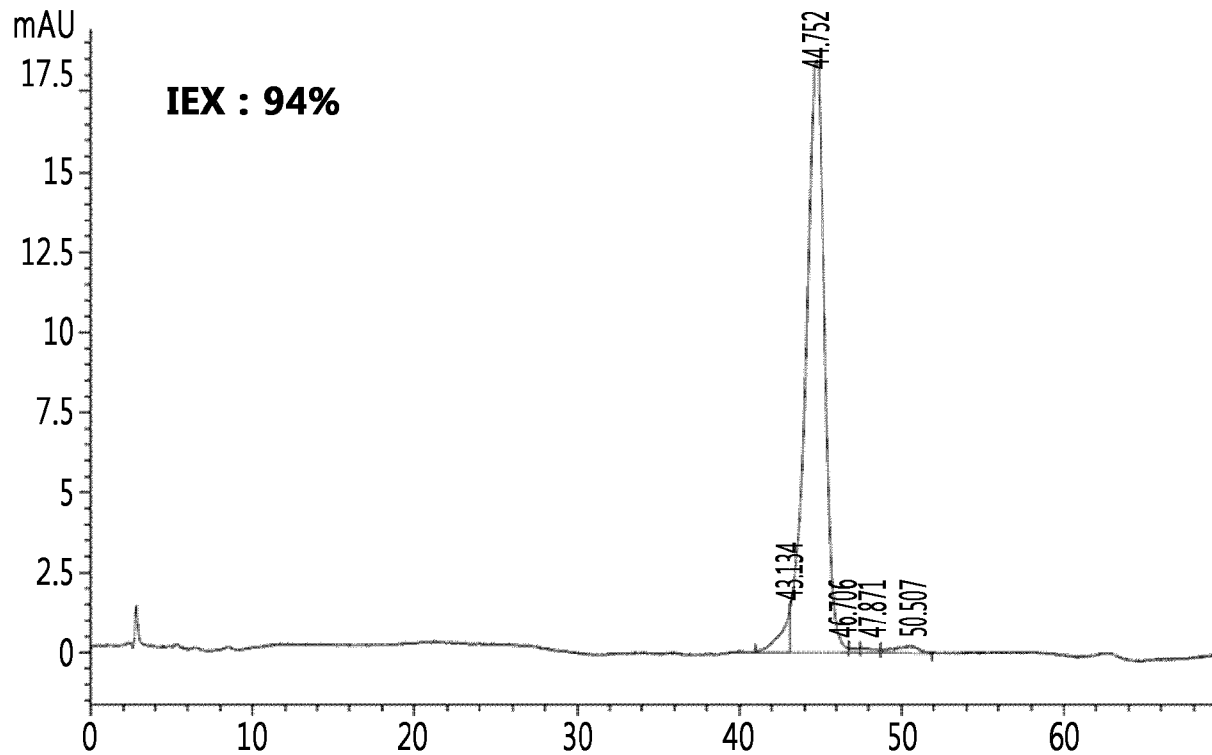
[도3]

		β Klotho binding		Glucose uptake	
		IC ₅₀ (nM)	% vs. FGF21	EC ₅₀ (nM)	% vs. FGF21
FGF21		14.8-36.1	100	0.22-0.77	100
FGF21 analog	#1	~6414	0.4	15.5	3.6
	#2	NT	NT	NT	NT
	#3	~3157	0.7	87.1	0.7
	#4	~6399	0.4	20.4	2.7
	#5	~2103	0.7	24.3	3.2
	#6	~2503	0.6	2.4	17.4
	#7	Low	n/a	184.2	0.4
	#8	Low	n/a	107.5	0.4
	#9	Low	n/a	56.6	0.7

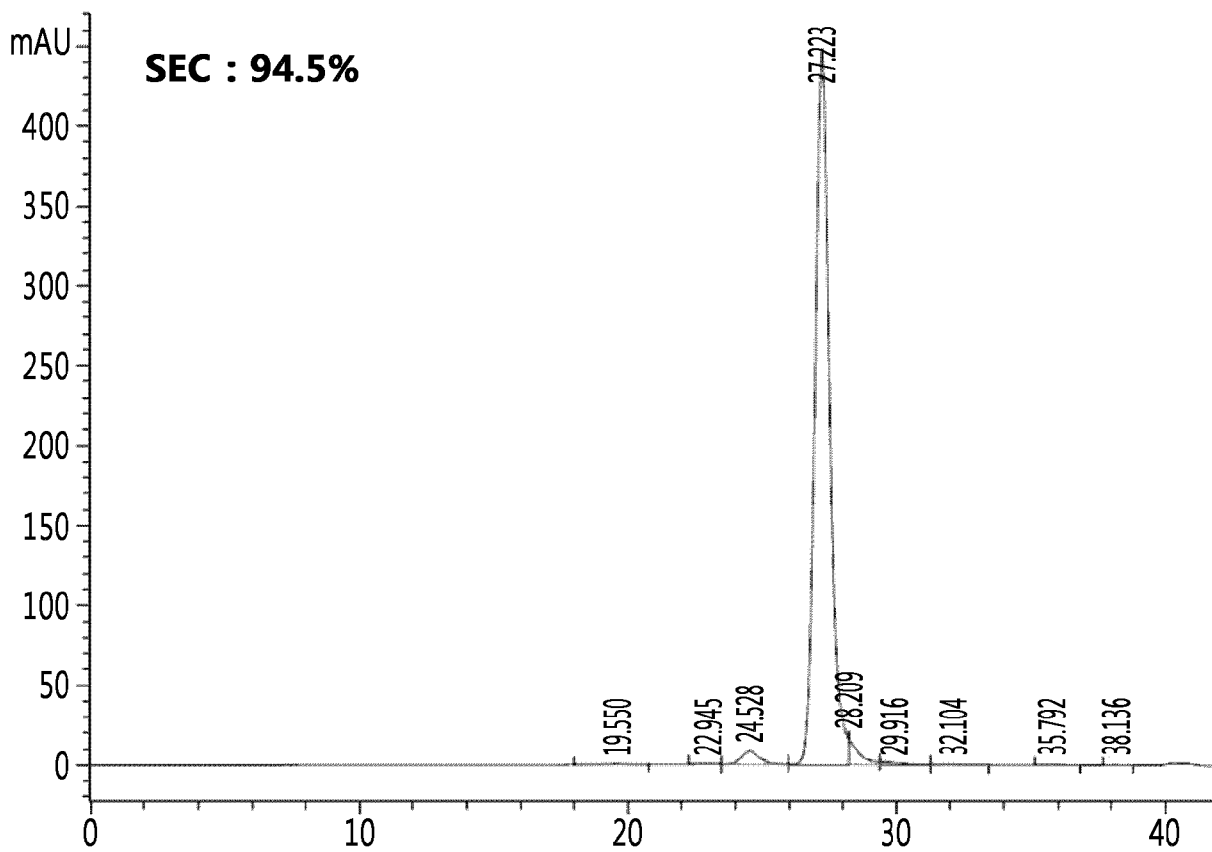
[도4a]



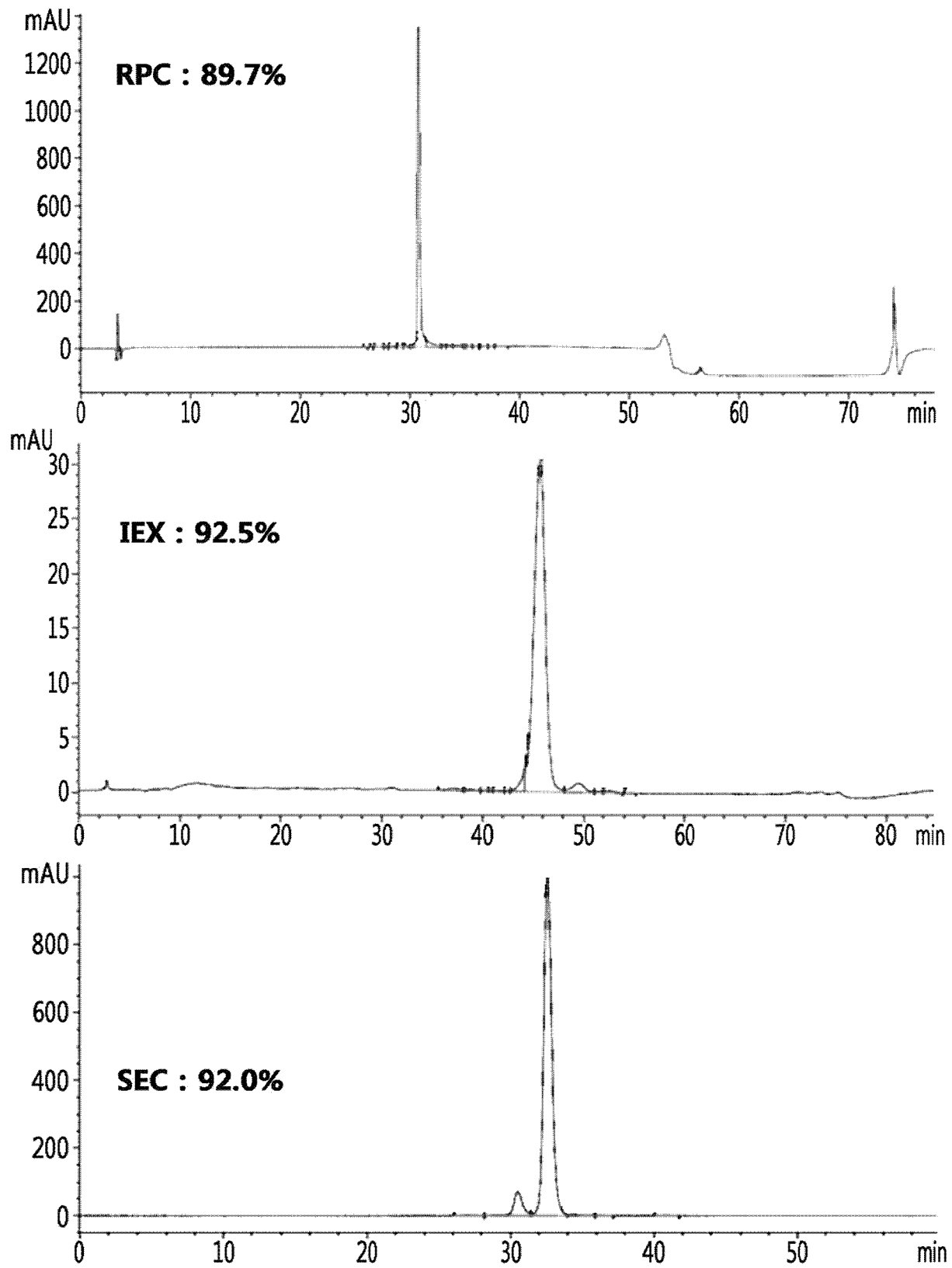
[도4b]



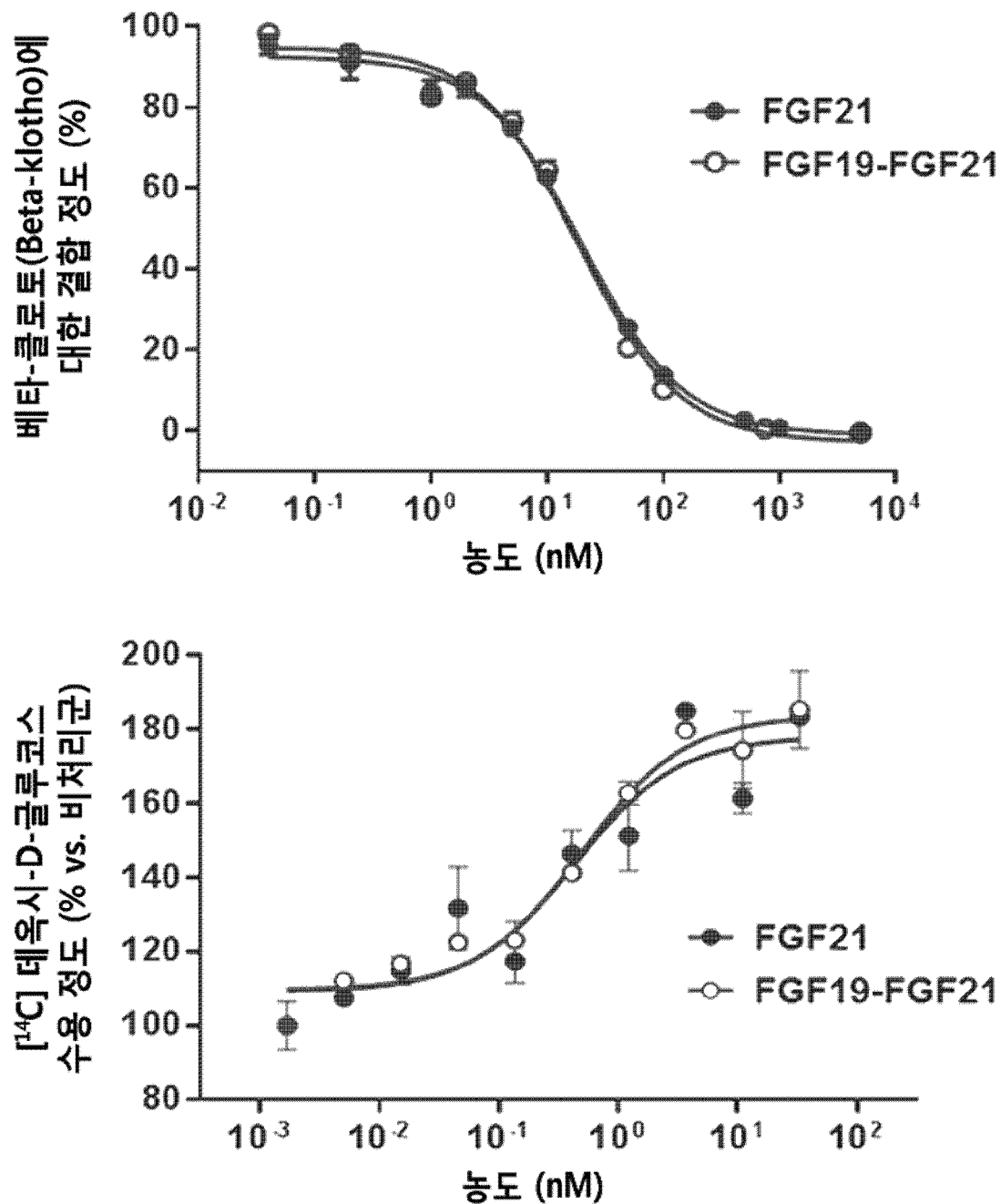
[도4c]



[도5]



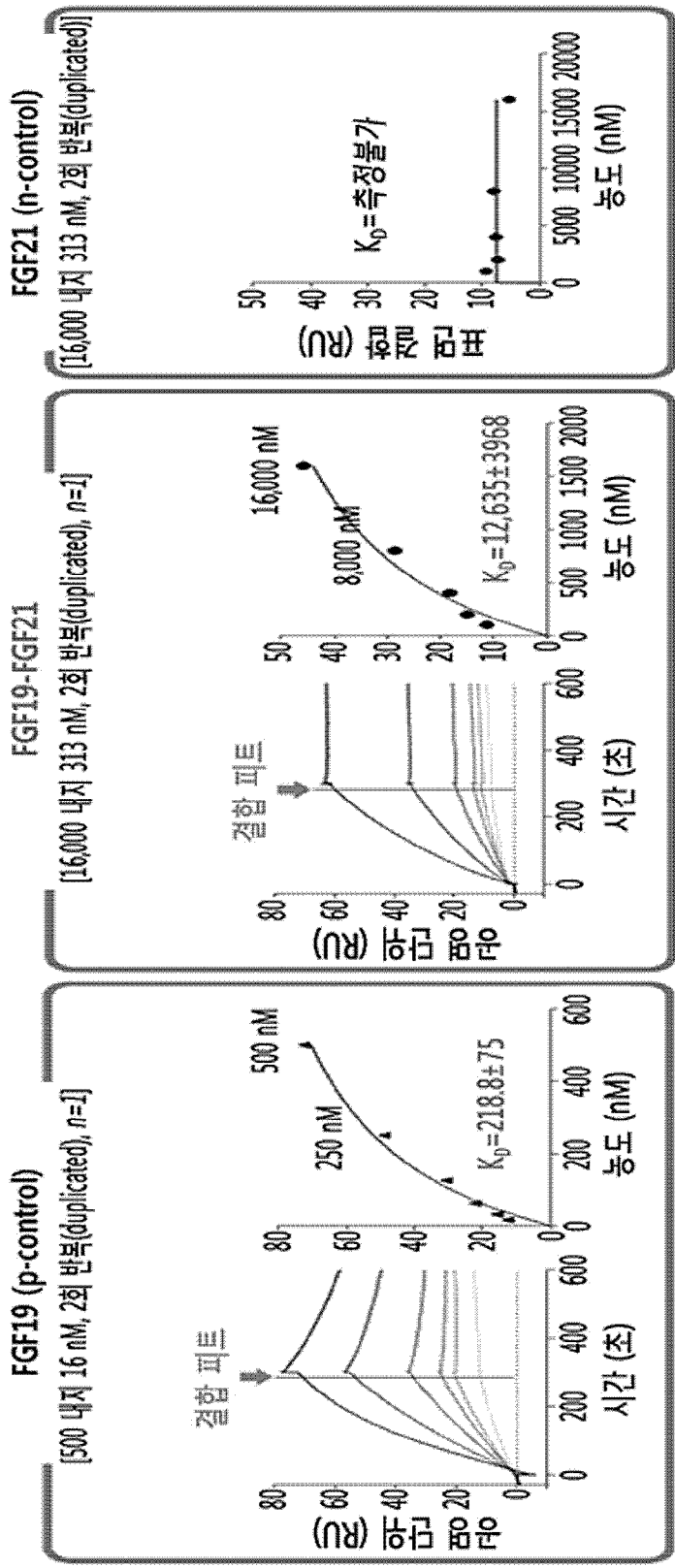
[도6a]



[도6b]

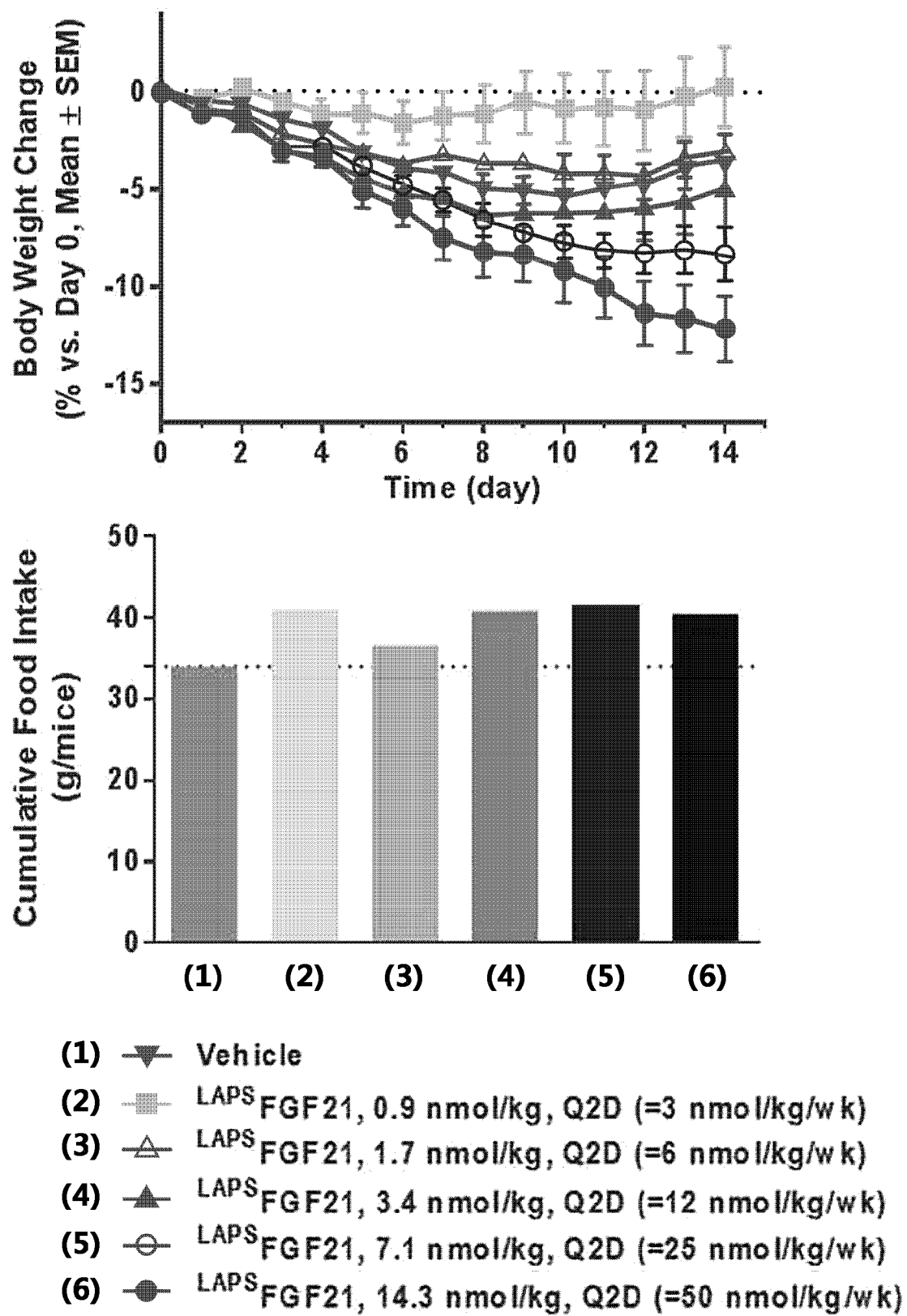
	베타-클로토 (Beta-klotho)에 대한 결합		글루코스 수용	
	IC ₅₀ (nM)	% vs. FGF21	EC ₅₀ (nM)	% vs. FGF21
FGF21	20.3	100	0.43	100
FGF19-FGF21	18.7	108	0.49	87.8

[도7]

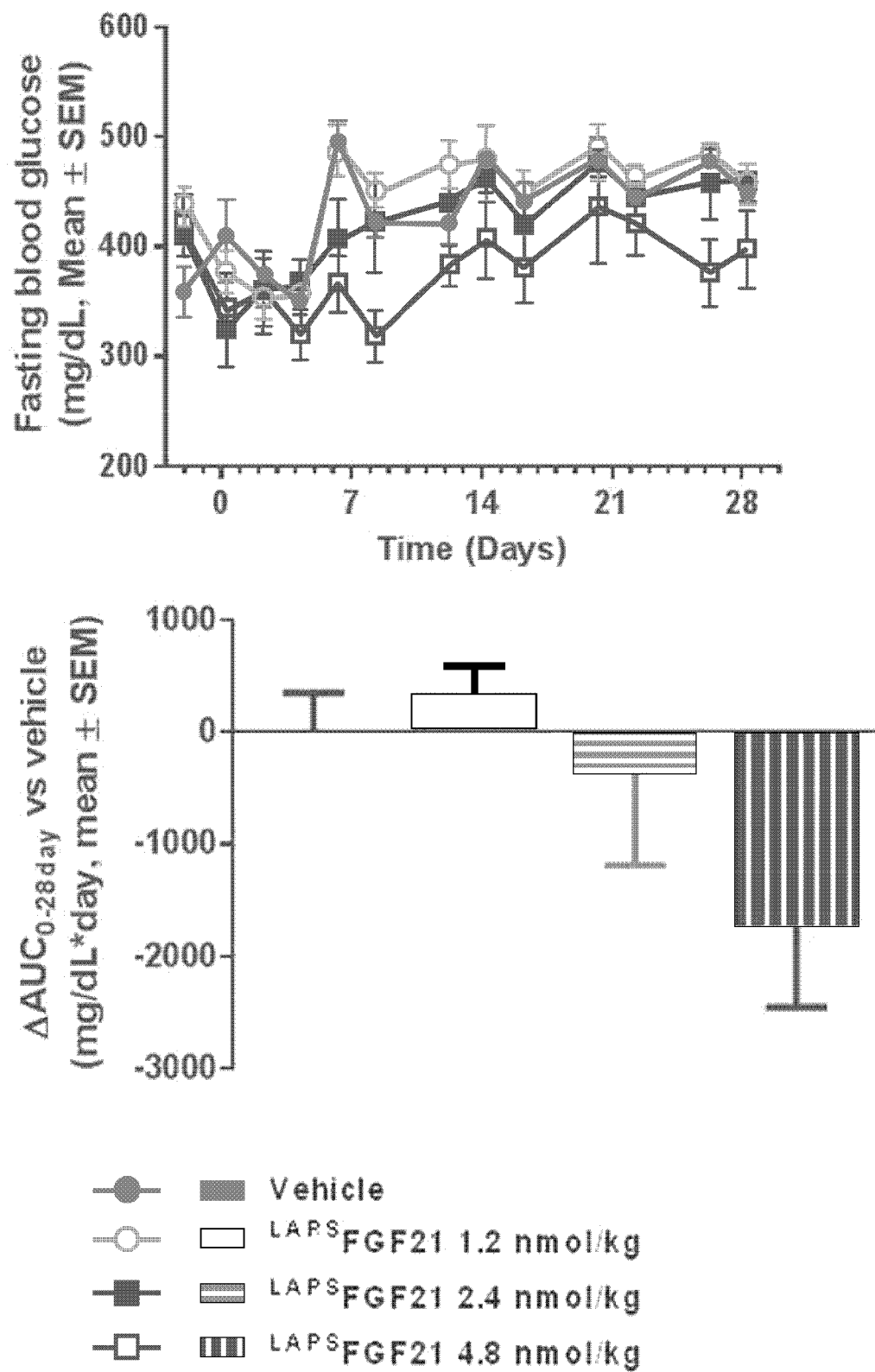


시험물질	FGF19	키메라 단백질	FGF21
K_D (nM)	218.8 ± 75	$12,635 \pm 3968$	NC
참고 자료	134 ± 47	-	-
FGF19에 대한 상대값	100%	1.7%	-

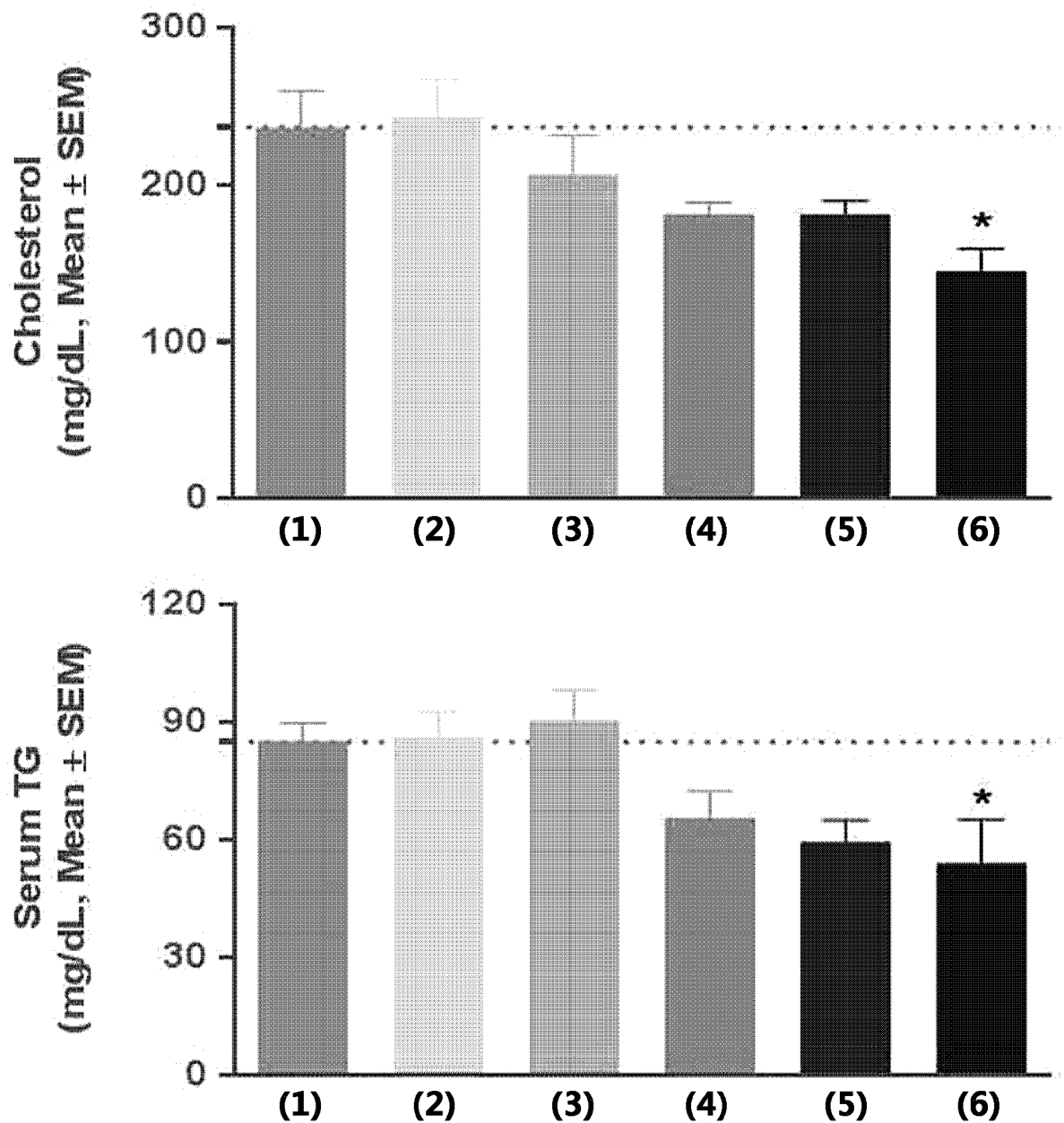
[도8]



[도9]



[도10]



(1) Vehicle

(2) LAPS FGF21, 0.9 nmol/kg, Q2D (=3 nmol/kg/wk)

(3) LAPS FGF21, 1.7 nmol/kg, Q2D (=6 nmol/kg/wk)

(4) LAPS FGF21, 3.4 nmol/kg, Q2D (=12 nmol/kg/wk)

(5) LAPS FGF21, 7.1 nmol/kg, Q2D (=25 nmol/kg/wk)

(6) LAPS FGF21, 14.3 nmol/kg, Q2D (=50 nmol/kg/wk)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2016/015561**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER*****C07K 14/50(2006.01)i, A61K 38/18(2006.01)i, C07K 19/00(2006.01)i, A61K 47/50(2017.01)i***

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C07K 14/50; C07K 16/22; C12N 15/12; C07K 16/18; C12N 1/21; A61K 38/18; C07K 19/00; A61K 47/50

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

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

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

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

eKOMPASS (KIPO internal) & Keywords: FGF21, mutation, FGF19, exendin, metabolic syndrome

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2010-065439 A1 (ELI LILLY AND COMPANY) 10 June 2010 See pages 10, 26, 40; and claims 1-2, 51, 72-73, 76-79.	1-4,6,36-45
Y		5,7-35
Y	US 2014-0243503 A1 (AMGEN INC.) 28 August 2014 See paragraphs [0008], [0256].	5
Y	WU et al., "Separating Mitogenic and Metabolic Activities of Fibroblast Growth Factor 19 (FGF19)", PNAS, 10 August 2010, vol. 107, no. 32, pages 14158-14163 See pages 14158, 14162-14163; and figure 2.	7-15
Y	US 2014-0148388 A1 (GENEETECH, INC.) 29 May 2014 See paragraphs [0081]-[0082]; and claims 1, 21, 32, 34.	16-35
Y	US 8809499 B2 (FAN et al.) 19 August 2014 See abstract; and column 4, lines 19-22.	28-35
X	US 2010-0216715 A1 (TAGMOSE et al.) 26 August 2010 See claims 1, 6.	1-3,36-45



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

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

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

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

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

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

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

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

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

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

28 APRIL 2017 (28.04.2017)

Date of mailing of the international search report

28 APRIL 2017 (28.04.2017)

Name and mailing address of the ISA/KR

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

Facsimile No. 82-42-472-7140

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2016/015561

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	KHARITONENKOV et al., "Rational Design of a Fibroblast Growth Factor 21-Based Clinical Aandidate, LY2405319", Plos One, 11 March 2013, vol. 8, article no. e58575, pages 1-10 See abstract; and page 5.	1-2,36-45

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2016/015561

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
WO 2010-065439 A1	10/06/2010	NONE	
US 2014-0243503 A1	28/08/2014	AR 072009 A1	28/07/2010
		AR 076541 A1	22/06/2011
		AU 2009-256232 A1	10/12/2009
		AU 2009-256232 B2	22/12/2011
		CA 2726589 A1	10/12/2009
		CN 102143758 A	03/08/2011
		CN 102143758 B	25/11/2015
		CO 6341566 A2	21/11/2011
		CR 11851 A	13/05/2011
		EA 017690 B1	28/02/2013
		EA 024751 B1	31/10/2016
		EA 201001883 A1	30/06/2011
		EA 201270758 A1	30/12/2013
		EP 2296690 A2	23/03/2011
		EP 2296690 B1	30/11/2016
		IL 209395 A	31/08/2014
		JP 2011-523561 A	18/08/2011
		JP 2016-128449 A	14/07/2016
		KR 10-1651697 B1	29/08/2016
		KR 10-2011-0025810 A	11/03/2011
		KR 10-2016-0046929 A	29/04/2016
		MA 33142 B1	01/03/2012
		MX 2010013333 A	05/04/2011
		MY 152721 A	28/11/2014
		NZ 590050 A	31/08/2012
		PE 02532010 A1	10/04/2010
		SG 193860 A1	30/10/2013
		TW 201010715 A	16/03/2010
		TW 201219052 A	16/05/2012
		TW 1403519 B	01/08/2013
		TW 1526220 B	21/03/2016
		US 2009-0305986 A1	10/12/2009
		US 2012-0003216 A1	05/01/2012
		US 2012-0087920 A1	12/04/2012
		US 2012-0093815 A1	19/04/2012
		US 2016-0168223 A1	16/06/2016
		US 8034770 B2	11/10/2011
		US 8361963 B2	29/01/2013
		US 8410051 B2	02/04/2013
		US 8642546 B2	04/02/2014
		US 9273106 B2	01/03/2016
		WO 2009-149171 A2	10/12/2009
		WO 2009-149171 A3	11/03/2010
		WO 2009-149171 A4	06/05/2010
US 2014-0148388 A1	29/05/2014	CA 2777717 A1	21/04/2011
		CN 102656266 A	05/09/2012

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2016/015561

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
		CN 102656266 B	03/08/2016
		EP 2488643 A1	22/08/2012
		EP 2488643 A4	03/07/2013
		JP 2013-507930 A	07/03/2013
		JP 6016636 B2	26/10/2016
		KR 10-2012-0095392 A	28/08/2012
		MX 2012004303 A	25/06/2012
		RU 2012119800 A	20/11/2013
		RU 2573896 C2	27/01/2016
		US 2011-0104152 A1	05/05/2011
		US 8535912 B2	17/09/2013
		WO 2011-047267 A1	21/04/2011
US 8809499 B2	19/08/2014	CN 101993485 A	30/03/2011
		CN 101993485 B	17/04/2013
		CN 101993496 A	30/03/2011
		CN 101993496 B	05/06/2013
		CN 102770538 A	07/11/2012
		EP 2468858 A1	27/06/2012
		EP 2468858 B1	11/05/2016
		EP 2479193 A1	25/07/2012
		EP 2479193 A4	25/09/2013
		EP 2479193 A9	02/01/2013
		EP 2479193 B1	18/02/2015
		US 2012-0238496 A1	20/09/2012
		US 2012-0277154 A1	01/11/2012
		US 8557771 B2	15/10/2013
		WO 2011-020319 A1	24/02/2011
		WO 2011-020319 A8	15/03/2012
		WO 2011-020320 A1	24/02/2011
US 2010-0216715 A1	26/08/2010	AU 2010-207721 A1	28/07/2011
		AU 2010-207721 B2	26/03/2015
		BR P11007313 A2	10/02/2016
		CA 2748593 A1	29/07/2010
		CN 102361647 A	22/02/2012
		CN 102791730 A	21/11/2012
		EP 2389190 A2	30/11/2011
		EP 2526117 A2	28/11/2012
		EP 2526117 B1	06/05/2015
		IL 213848 A	30/11/2015
		JP 2012-515747 A	12/07/2012
		JP 5599822 B2	01/10/2014
		KR 10-2011-0117666 A	27/10/2011
		MX 2011007544 A	12/08/2011
		RU 2011134454 A	27/02/2013
		RU 2525393 C2	10/08/2014
		TW 201032827 A	16/09/2010
		TW 1494127 B	01/08/2015
		US 2013-0005951 A1	03/01/2013

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2016/015561

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
		US 9120871 B2	01/09/2015
		US 9480753 B2	01/11/2016
		WO 2010-084169 A2	29/07/2010
		WO 2010-084169 A3	17/02/2011
		WO 2011-089170 A2	28/07/2011
		WO 2011-089170 A3	17/11/2011

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))

C07K 14/50(2006.01)i, A61K 38/18(2006.01)i, C07K 19/00(2006.01)i, A61K 47/50(2017.01)i

B. 조사된 분야

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)

C07K 14/50; C07K 16/22; C12N 15/12; C07K 16/18; C12N 1/21; A61K 38/18; C07K 19/00; A61K 47/50

조사된 기술분야에 속하는 최소문헌 이외의 문헌

한국등록실용신안공보 및 한국공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC

일본등록실용신안공보 및 일본공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC

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

eKOMPASS(특허청 내부 검색시스템) & 키워드: FGF21, 변이, FGF19, 엑센딘, 대사증후군

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
X	WO 2010-065439 A1 (ELI LILLY AND COMPANY) 2010.06.10 페이지 10, 26, 40; 및 청구항 1-2, 51, 72-73, 76-79 참조.	1-4, 6, 36-45
Y		5, 7-35
Y	US 2014-0243503 A1 (AMGEN INC.) 2014.08.28 단락 [0008], [0256] 참조.	5
Y	WU 등, 'Separating Mitogenic and Metabolic Activities of Fibroblast Growth Factor 19 (FGF19)', PNAS, 2010.08.10, 107권, 32호, 페이지 14158-14163 페이지 14158, 14162-14163; 및 도면 2 참조.	7-15
Y	US 2014-0148388 A1 (GENEETECH, INC.) 2014.05.29 단락 [0081]-[0082]; 및 청구항 1, 21, 32, 34 참조.	16-35
Y	US 8809499 B2 (FAN 등) 2014.08.19 요약; 및 컬럼 4, 라인 19-22 참조.	28-35
X	US 2010-0216715 A1 (TAGMOSE 등) 2010.08.26 청구항 1, 6 참조.	1-3, 36-45

☒ 추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다.

☒ 대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.

* 인용된 문헌의 특별 카테고리:

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

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

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

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

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

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

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

“&” 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌

“P” 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌

국제조사의 실제 완료일

2017년 04월 28일 (28.04.2017)

국제조사보고서 발송일

2017년 04월 28일 (28.04.2017)

ISA/KR의 명칭 및 우편주소



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

팩스 번호 +82-42-481-8578

심사관

김승범

전화번호 +82-42-481-3371



C(계속). 관련 문헌		
카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
X	KHARITONENKOV 등, ‘Rational Design of a Fibroblast Growth Factor 21-Based Clinical Aandidate, LY2405319`, Plos One, 2013.03.11, 8권, Article No. e58575, 페이지 1-10 요약; 및 페이지 5 참조.	1-2,36-45

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
WO 2010-065439 A1	2010/06/10	없음	
US 2014-0243503 A1	2014/08/28	AR 072009 A1 AR 076541 A1 AU 2009-256232 A1 AU 2009-256232 B2 CA 2726589 A1 CN 102143758 A CN 102143758 B CO 6341566 A2 CR 11851 A EA 017690 B1 EA 024751 B1 EA 201001883 A1 EA 201270758 A1 EP 2296690 A2 EP 2296690 B1 IL 209395 A JP 2011-523561 A JP 2016-128449 A KR 10-1651697 B1 KR 10-2011-0025810 A KR 10-2016-0046929 A MA 33142 B1 MX 2010013333 A MY 152721 A NZ 590050 A PE 02532010 A1 SG 193860 A1 TW 201010715 A TW 201219052 A TW 1403519 B TW 1526220 B US 2009-0305986 A1 US 2012-0003216 A1 US 2012-0087920 A1 US 2012-0093815 A1 US 2016-0168223 A1 US 8034770 B2 US 8361963 B2 US 8410051 B2 US 8642546 B2 US 9273106 B2 WO 2009-149171 A2 WO 2009-149171 A3 WO 2009-149171 A4	2010/07/28 2011/06/22 2009/12/10 2011/12/22 2009/12/10 2011/08/03 2015/11/25 2011/11/21 2011/05/13 2013/02/28 2016/10/31 2011/06/30 2013/12/30 2011/03/23 2016/11/30 2014/08/31 2011/08/18 2016/07/14 2016/08/29 2011/03/11 2016/04/29 2012/03/01 2011/04/05 2014/11/28 2012/08/31 2010/04/10 2013/10/30 2010/03/16 2012/05/16 2013/08/01 2016/03/21 2009/12/10 2012/01/05 2012/04/12 2012/04/19 2016/06/16 2011/10/11 2013/01/29 2013/04/02 2014/02/04 2016/03/01 2009/12/10 2010/03/11 2010/05/06
US 2014-0148388 A1	2014/05/29	CA 2777717 A1 CN 102656266 A	2011/04/21 2012/09/05

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
		CN 102656266 B	2016/08/03
		EP 2488643 A1	2012/08/22
		EP 2488643 A4	2013/07/03
		JP 2013-507930 A	2013/03/07
		JP 6016636 B2	2016/10/26
		KR 10-2012-0095392 A	2012/08/28
		MX 2012004303 A	2012/06/25
		RU 2012119800 A	2013/11/20
		RU 2573896 C2	2016/01/27
		US 2011-0104152 A1	2011/05/05
		US 8535912 B2	2013/09/17
		WO 2011-047267 A1	2011/04/21
US 8809499 B2	2014/08/19	CN 101993485 A	2011/03/30
		CN 101993485 B	2013/04/17
		CN 101993496 A	2011/03/30
		CN 101993496 B	2013/06/05
		CN 102770538 A	2012/11/07
		EP 2468858 A1	2012/06/27
		EP 2468858 B1	2016/05/11
		EP 2479193 A1	2012/07/25
		EP 2479193 A4	2013/09/25
		EP 2479193 A9	2013/01/02
		EP 2479193 B1	2015/02/18
		US 2012-0238496 A1	2012/09/20
		US 2012-0277154 A1	2012/11/01
		US 8557771 B2	2013/10/15
		WO 2011-020319 A1	2011/02/24
		WO 2011-020319 A8	2012/03/15
		WO 2011-020320 A1	2011/02/24
US 2010-0216715 A1	2010/08/26	AU 2010-207721 A1	2011/07/28
		AU 2010-207721 B2	2015/03/26
		BR PI1007313 A2	2016/02/10
		CA 2748593 A1	2010/07/29
		CN 102361647 A	2012/02/22
		CN 102791730 A	2012/11/21
		EP 2389190 A2	2011/11/30
		EP 2526117 A2	2012/11/28
		EP 2526117 B1	2015/05/06
		IL 213848 A	2015/11/30
		JP 2012-515747 A	2012/07/12
		JP 5599822 B2	2014/10/01
		KR 10-2011-0117666 A	2011/10/27
		MX 2011007544 A	2011/08/12
		RU 2011134454 A	2013/02/27
		RU 2525393 C2	2014/08/10
		TW 201032827 A	2010/09/16
		TW I494127 B	2015/08/01
		US 2013-0005951 A1	2013/01/03

국제조사보고서에서
인용된 특허문헌

공개일

대응특허문헌

공개일

US 9120871 B2	2015/09/01
US 9480753 B2	2016/11/01
WO 2010-084169 A2	2010/07/29
WO 2010-084169 A3	2011/02/17
WO 2011-089170 A2	2011/07/28
WO 2011-089170 A3	2011/11/17