



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2024년08월21일

(11) 등록번호 10-2696518

(24) 등록일자 2024년08월14일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 14/605 (2006.01) A61K 38/26 (2006.01)
A61P 3/04 (2006.01) A61P 3/10 (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01) C12N 15/62 (2006.01)

(52) CPC특허분류
C07K 14/605 (2013.01)
A61K 38/26 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2020-7011414

(22) 출원일자(국제) 2018년09월21일

심사청구일자 2021년09월17일

(85) 번역문제출일자 2020년04월20일

(65) 공개번호 10-2020-0054303

(43) 공개일자 2020년05월19일

(86) 국제출원번호 PCT/US2018/052110

(87) 국제공개번호 WO 2019/060653

국제공개일자 2019년03월28일

(30) 우선권주장

62/562,283 2017년09월22일 미국(US)

(56) 선행기술조사문헌

KR101229610 B1*

Hye-Shin Chung, et. al., Regulatory Peptides,
2011, vol. 170, pp. 1-3(2011.05.27.) 1부.*

*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자

리제너론 파아마슈티컬스, 인크.

미국 뉴욕 10591-6707 테리타운 올드 소오 밀 리
버 로드 777

(72) 발명자

웨이 양

미국 뉴욕 10591 테리타운 올드 소오 밀 리버 로
드 777 리제너론 파마슈티컬스, 인크. 내

오카모토 하루카

미국 뉴욕 10591 테리타운 올드 소오 밀 리버 로
드 777 리제너론 파마슈티컬스, 인크. 내

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

장훈

전체 청구항 수 : 총 16 항

심사관 : 강덕희

(54) 발명의 명칭 글루카곤 유사 펩타이드 1 수용체 작용제 및 이의 용도

(57) 요약

본 발명은 변형 글루카곤 유사 펩타이드 1 (GLP1) 폴리펩타이드, 변형 GLP1 폴리펩타이드를 포함하는 융합 단백
질, 및 이의 사용 방법을 제공한다. 본 발명의 다양한 실시형태에서, 상기 융합 단백질은 안정화 도메인에 융합
된 변형 GLP1을 포함하는 GLP1 수용체 작용제이다. 일부 실시형태에서, 상기 변형 GLP1을 포함하는 융합 단백
질은 비만 및 당뇨병과 같은 장애의 증상 또는 징후를 치료 또는 개선하는데 유용하다.

(52) CPC특허분류

A61P 3/04 (2018.01)

A61P 3/10 (2018.01)

C07K 16/2869 (2013.01)

C12N 15/62 (2013.01)

C07K 2319/00 (2013.01)

(72) 발명자

그로마다 에스퍼

미국 뉴욕 10591 태리타운 올드 소우 밀 리버 로드
777 리제너론 파마슈티칼스, 인크. 내

데이비스 사무엘

미국 뉴욕 10591 태리타운 올드 소우 밀 리버 로드
777 리제너론 파마슈티칼스, 인크. 내

머피 앤드류 제이.

미국 뉴욕 10591 태리타운 올드 소우 밀 리버 로드
777 리제너론 파마슈티칼스, 인크. 내

명세서

청구범위

청구항 1

글루카곤 유사 펩타이드 1 (Glucagon-like peptide 1: GLP1) 변이체 및 안정화 도메인을 포함하는 융합 단백질로서, 여기서, 상기 GLP1 변이체가 서열 번호 6으로 이루어지고; 상기 안정화 도메인이 GLP1 수용체에 특이적으로 결합하고 중쇄 가변 영역 (heavy chain variable region: HCVR) 및 경쇄 가변 영역 (light chain variable region: LCVR)을 포함하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편이고; 상기 융합 단백질이 단백질 가수분해 절단 (proteolytic cleavage)에 대한 증진된 내성 및/또는 증진된 혈당 저하 능력을 갖는, 융합 단백질.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 GLP1 변이체가 상기 항체 또는 이의 항원 결합 단편의 HCVR의 N-말단 또는 C-말단에 융합되는, 융합 단백질.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 GLP1 변이체가 상기 항체 또는 이의 항원 결합 단편의 LCVR의 N-말단 또는 C-말단에 융합되는, 융합 단백질.

청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 제시된 융합 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드 서열을 포함하는 단리된 폴리뉴클레오타이드 분자.

청구항 5

제4항의 폴리뉴클레오타이드 분자를 포함하는 벡터.

청구항 6

제5항의 벡터 내의 폴리뉴클레오타이드 분자에 의해 암호화되는 융합 단백질을 발현하는 세포.

청구항 7

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항의 융합 단백질을 포함하는, 대상체에서 혈당 수준을 저하시키는 데 사용하기 위한 약제학적 조성물.

청구항 8

제7항에 있어서, 상기 대상체가 당뇨병, 비만증, 인슐린 저항성, 고혈압, 이상지질혈증, 2형 당뇨병, 1형 당뇨병, 당뇨병 전증, 심혈관 질환, 죽상 동맥 경화증, 울혈성 심부전, 관상동맥 심장 질환, 동맥 경화, 말초 동맥 질환, 뇌졸중, 호흡기 기능 장애, 신장 질환, 지방간 질환, 비알코올성 지방간염 (non-alcoholic steatohepatitis: NASH) 및 대사 증후군으로 이루어진 그룹으로부터 선택된 질환 또는 장애를 갖는, 약제학적 조성물.

청구항 9

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항의 융합 단백질을 포함하는, 대상체에서 2형 당뇨병의 적어도 하나의 증상, 징후 또는 합병증을 예방, 치료 또는 개선하는 데 사용하기 위한 약제학적 조성물.

청구항 10

제9항에 있어서, 상기 적어도 하나의 증상, 징후 또는 합병증이 고혈당 수준, 과도한 갈증, 배뇨 증가, 소변 중 케톤의 존재, 피로, 체중 변동, 흐린 시야, 치유가 느린 상처 (slow healing sores), 빈번한 감염, 붓거나 허약한 잇몸, 비만, 심장병, 뇌졸중, 신장병, 안 질환, 신경 손상 및 고혈압으로 이루어진 그룹으로부터 선택되는, 약제학적 조성물.

청구항 11

제7항에 있어서, 상기 약제학적 조성물이 제2 치료제 또는 요법과 조합하여 투여하기 위한 것인, 약제학적 조성물.

청구항 12

제11항에 있어서, 상기 제2 치료제 또는 요법이 인슐린 또는 인슐린 유사체, 메트포르민, 티아졸리딘디온, 설포닐우레아, 비구아니드, 클로르프로파마이드, 글리니드, 알파 글루코시다아제 억제제, 나테글리니드, DPP4 억제제, 프람린타이드, 시타글립틴, 브로모크립틴, SGLT2 억제제, 카나글리플로진, 항고혈압 약물, 스타틴, 아스피린, 식이 조정, 운동 및 식이 보충제로 이루어진 그룹으로부터 선택되는, 약제학적 조성물.

청구항 13

제7항에 있어서, 상기 약제학적 조성물이 피하, 정맥내, 진피내, 복강내, 경구 또는 근육내 투여를 위한 것인, 약제학적 조성물.

청구항 14

제9항에 있어서, 상기 약제학적 조성물이 제2 치료제 또는 요법과 조합하여 투여하기 위한 것인, 약제학적 조성물.

청구항 15

제14항에 있어서, 상기 제2 치료제 또는 요법이 인슐린 또는 인슐린 유사체, 메트포르민, 티아졸리딘디온, 설포닐우레아, 비구아니드, 클로르프로파마이드, 글리니드, 알파 글루코시다아제 억제제, 나테글리니드, DPP4 억제제, 프람린타이드, 시타글립틴, 브로모크립틴, SGLT2 억제제, 카나글리플로진, 항고혈압 약물, 스타틴, 아스피린, 식이 조정, 운동 및 식이 보충제로 이루어진 그룹으로부터 선택되는, 약제학적 조성물.

청구항 16

제9항에 있어서, 상기 약제학적 조성물이 피하, 정맥내, 진피내, 복강내, 경구 또는 근육내 투여되는, 약제학적 조성물.

청구항 17

삭제

청구항 18

삭제

청구항 19

삭제

청구항 20

삭제

청구항 21

삭제

청구항 22

삭제

청구항 23

삭제

청구항 24

삭제

청구항 25

삭제

청구항 26

삭제

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 사람 글루카곤 유사 펩타이드 1 수용체 작용제 및 상기 작용제를 사용하는 치료 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 비만은 미국에서 주요 건강 문제가 되어 왔으며, 미국인 3명 중 2명은 과체중 또는 비만인 것으로 간주되었다. 비만은 심장병, 뇌졸중 및 당뇨병과 같은 다른 질병을 발생시키는데 중요한 근본적인 위험 요소이다. 체중이 약간 감소하더라도 (초기 체중의 5~10%), 심장병 및 당뇨병과 같은 비만 관련 질환의 발생 위험은 저하된다.

[0003] 진성 당뇨병은 고혈당 수준과 인슐린 저항성을 특징으로 하는 만성 병태이다. 치료하지 않고 방치하면, 고혈당 수준은 심장병, 뇌졸중, 당뇨 망막병증 및 하지 절단을 비롯한 장기 합병증을 초래할 수 있다. 당뇨병의 치료는 혈당 수준의 조절 및 감소를 포함하며, 인슐린 및 메트포르민과 같은 약물과 함께 운동 및 식이 조절을 포함한다.

[0004] 비만 치료 및 혈당 조절에 사용되는 접근법 중 하나는 인크레틴 경로를 표적화하는 글루카곤 유사 펩타이드 (glucagon-like peptide: GLP)-1 수용체 작용제를 포함한다. 글루카곤 유사 펩타이드 (GLP)-1은 장의 장내분비 세포에 의해 분비되는 펩타이드 호르몬이다. 경구 포도당 투여시, GLP1은 수용체에 결합하여 인슐린 분비 및 혈당 수준의 감소 (인크레틴 효과)를 초래한다. 그러나, GLP1은 디펩티딜 펩티다아제 4 (dipeptidyl peptidase 4: DPP4) 효소에 의해 신속하게 불활성화되고 분해되며, 1.5분의 매우 짧은 반감기를 갖는다. 따라서, GLP1을 포함하는 융합 단백질을 비롯한 GLP1 수용체 작용제 뿐만 아니라 GLP1의 장기간 작용하는 유도체가 당뇨병 조절을 위해 연구되어 왔다. GLP1 유사체, 융합 단백질 및 GLP1 수용체 작용제는, 예를 들어, 미국 특허 US 7452966, US 8389689, US 8497240, US 8557769, US 8883447, US 8895694, US 9409966, 미국 출원공개 US 2016/0194371, US 2014/0024586, US 2014/0073563, US 2012/0148586, US 2017/0114115, US 2017/0112904, US 2016/0361390, US 2015/0313908, US 2015/0259416, 국제공개공보 WO 2017/074715, WO 2016/127887, WO 2015/021871, WO 2014/113357, 유럽 특허 EP 3034514, EP 2470198 및 EP2373681에 개시되어 있다.

[0005] 그러나, DPP4에 의한 분해에 대해 저항성이 있고 개선된 약동학적 특성을 갖고 혈당 조절에서 증가된 효능 및 지속된 생체내 활성을 갖는 신규한 GLP1 펩타이드 변이체 및 GLP1 수용체 작용제에 대한 필요성이 존재한다. 이러한 GLP1 변이체 및 GLP1 수용체 작용제는 비만 및 당뇨병을 치료하는데 사용될 수 있다.

발명의 내용

[0006] 발명의 간단한 요약

[0007] 하나의 양태에 따르면, 본 발명은 (i) N-말단에 대한 아미노산의 첨가; 및 (ii) 펩타이드 서열로부터 아미노산의 결실로 이루어진 그룹으로부터 선택된 성숙한 GLP1 (7-37) (서열 번호 4)로부터의 적어도 하나의 아미노산 변형을 포함하는 글루카곤 유사 펩타이드 1 (GLP1) 변이체를 제공한다. 특정 실시형태에서, 상기 변형은 N-말단에 대한 알라닌 또는 글루타민의 첨가를 포함한다.

[0008] 하나의 양태에 따르면, 본 발명은 GLP1 수용체 작용제를 제공하며, 여기서, 상기 GLP1 수용체 작용제는 GLP1 또는 이의 변이체를 포함하는 융합 단백질을 포함한다. 특정 실시형태에서, 상기 GLP1 수용체 작용제는 안정화 도메인에 융합된 GLP1 펩타이드 또는 GLP1 펩타이드 변이체를 포함한다. 하나의 실시형태에서, 상기 안정화 도메인은 GLP1 수용체에 결합하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편이다.

- [0009] 본 발명의 GLP1 수용체 작용제는 특히 GLP1의 결합 및/또는 활성을 증가시키는데 유용하다. 일부 실시형태에서, 본 발명의 GLP1 수용체 작용제는 GLP1을 활성화시키고 혈당 수준을 감소시킴으로써 기능한다. 일부 실시형태에서, 본 발명의 GLP1 펩타이드 변이체 및/또는 GLP1 수용체 작용제는 디펩티딜 펩티다아제 4 (DPP4)에 의한 불활성화에 대해 더욱 저항성이 있고 생체내에서 개선된 반감기를 나타낸다. 본 발명의 개선된 GLP1 작용제는 단일 용량으로도 10일 초과 동안 지속되는 혈당 수준의 현저한 감소를 초래한다. 일부 실시형태에서, 상기 GLP1 수용체 작용제는 췌장 베타 세포로부터 인슐린의 포도당-유도된 분비를 강화시키고, 인슐린 발현을 증가시키고, 베타 세포 아포토시스를 억제하고, 베타 세포 신생을 촉진시키고, 글루카곤 분비를 감소시키고, 위 배출을 지연시키고, 포만감을 촉진시키고, 주변 포도당 처리 (peripheral glucose disposal)를 증가시킴으로써 기능한다. 특정 실시형태에서, 상기 GLP1 수용체 작용제는 대상체에서 고혈당증 관련 질환 또는 장애 (예를 들어, 당뇨병)의 적어도 하나의 증상을 예방, 치료 또는 개선하는데 유용하다. 특정 실시형태에서, 상기 GLP1 수용체 작용제는 당뇨병이 있거나 당뇨병에 걸릴 위험이 있는 대상체에게 예방학적으로 또는 치료학적으로 투여될 수 있다. 특정 실시형태에서, 상기 GLP1 수용체 작용제는 대상체에서 비만의 적어도 하나의 증상 또는 징후를 예방, 치료 또는 개선하는데, 예를 들어, 체중 감소에 유용하다.
- [0010] 특정 실시형태에서, 상기 GLP1 수용체 작용제는 GLP1 변이체 및 안정화 도메인을 포함하는 융합 단백질이며, 여기서, 상기 안정화 도메인은 면역글로불린 또는 이의 단편을 포함한다. 특정 실시형태에서, 상기 면역글로불린은 중쇄 가변 영역 및 경쇄 가변 영역을 포함하며, GLP1 수용체에 특이적으로 결합한다. 특정 실시형태에서, 상기 GLP1 수용체 작용제는 GLP1 수용체에 결합하여 GLP1 수용체 활성화를 초래한다. 특정 실시형태에서, 상기 GLP1 수용체 작용제는 GLP1 수용체를 활성화시켜 혈당 조절, 즉, 혈당 수준의 감소를 초래함으로써 기능한다.
- [0011] 하나의 실시형태에서, 본 발명은 다음 특성들 중 하나 이상을 갖는 융합 단백질을 제공한다: (a) GLP1 변이체 도메인 및 안정화 도메인을 포함하고; (b) GLP1 수용체 작용제이고; (c) 상기 GLP1 변이체 도메인은 서열 번호 5, 6, 7 또는 8의 아미노산 서열을 포함하고; (d) GLP1 수용체에 결합하고; (e) 상기 안정화 도메인은 면역글로불린 또는 이의 단편을 포함하고; (f) 상기 안정화 도메인은 면역글로불린 Fc 단편을 포함하고; (g) 상기 안정화 도메인은 항-GLP1 수용체 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 포함하고; (h) 적어도 72 시간 동안 혈청 프로테아제에 의한 분해에 대해 저항성이 있으며; (i) 단일 용량의 투여로 10일 초과 동안 지속되는 혈청 포도당 수준의 현저한 감소를 초래한다.
- [0012] 하나의 양태에서, 본 발명은 항-GLP1 항체 또는 이의 부분을 암호화하는 핵산 분자를 제공한다. 예를 들어, 본 발명은 서열 번호 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 및 13으로 이루어진 그룹으로부터 선택된 임의의 아미노산 서열 또는 이와 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 98% 또는 적어도 99%의 서열 동일성을 갖는 이의 실질적으로 유사한 서열을 암호화하는 핵산 분자를 제공한다.
- [0013] 본 발명은 또한 GLP1 변이체를 포함하는 임의의 융합 단백질을 암호화하는 핵산 분자를 제공한다.
- [0014] 관련 양태에서, 본 발명은 GLP1 변이체를 포함하는 폴리펩타이드 또는 본 출원에서 기재된 바와 같은 GLP1 변이체를 포함하는 융합 단백질을 발현할 수 있는 재조합 발현 벡터를 제공한다. 예를 들어, 본 발명은 상기 언급된 임의의 핵산 분자, 즉, 임의의 GLP1 변이체 또는 GLP1 변이체를 포함하는 융합 단백질을 암호화하는 핵산 분자를 포함하는 재조합 발현 벡터를 포함한다. 이러한 벡터가 도입된 숙주 세포 뿐만 아니라, 단백질 또는 이의 단편의 생산을 가능하게 하는 조건하에 상기 숙주 세포를 배양하고 이렇게 생산된 단백질 및 이의 단편을 회수함으로써 단백질 또는 이의 단편을 제조하는 방법도 또한 본 발명의 범위 내에 포함된다.
- [0015] 하나의 양태에서, 본 발명은 GLP1 수용체에 특이적으로 결합하는 치료학적 유효량의 적어도 하나의 재조합 단백질 또는 이의 단편 및 약제학적으로 허용되는 담체를 포함하는 약제학적 조성물을 제공한다. 관련 양태에서, 본 발명은 GLP1 수용체 작용제 단백질과 제2 치료제의 조합인 조성물을 특징으로 한다. 하나의 실시형태에서, 상기 제2 치료제는 GLP1 수용체 작용제와 유리하게 조합되는 임의의 제제이다. GLP1 수용체 작용제와 유리하게 조합될 수 있는 예시적인 제제로는, GLP1 수용체 활성을 활성화시키는 기타 제제 (다른 단백질 또는 대사 산물 등 포함) 및/또는 GLP1 수용체에 직접적으로는 결합하지 않지만 GLP1 수용체 관련 질환 또는 장애 (예를 들어, 당뇨병)를 완화 또는 개선 또는 치료하는 제제가 포함되지만, 이들에 한정되는 것은 아니다. 본 발명의 GLP1 수용체 작용제 단백질을 포함하는 추가의 조합 요법 및 통합 제제는 본 출원의 다른 곳에서 개시되어 있다.
- [0016] 또 다른 양태에서, 본 발명은 본 발명의 GLP1 수용체 작용제를 사용하여 대상체에서 GLP1과 관련된 질환 또는 장애, 예를 들어, 당뇨병을 치료하는 치료 방법을 제공하며, 여기서, 상기 치료 방법은 본 발명의 GLP1 수용체 작용제를 포함하는 치료학적 유효량의 약제학적 조성물을 이를 필요로 하는 대상체에게 투여하는 단계를 포함한다. 특정 실시형태에서, 상기 GLP1 수용체 작용제는 GLP1 변이체 또는 GLP1 변이체를 포함하는 융합 단백질을

포함한다. 치료되는 장애는 GLP1 수용체 활성의 활성화에 의해 향상, 개선, 억제 또는 예방되는 임의의 질환 또는 병태이다. 특정 실시형태에서, 본 발명은 GLP1 수용체 관련 질환 또는 장애의 적어도 하나의 증상을 예방, 치료 또는 개선하는 방법을 제공하며, 여기서, 상기 방법은 치료학적 유효량의 본 발명의 GLP1 수용체 작용제를 이를 필요로 하는 대상체에게 투여하는 단계를 포함한다. 일부 실시형태에서, 본 발명은 치료학적 유효량의 본 발명의 GLP1 수용체 작용제 단백질을 투여함으로써 대상체에서 GLP1 수용체 관련 질환 또는 장애의 적어도 하나의 증상 또는 징후의 증증도를 개선 또는 감소시키는 방법을 제공하며, 여기서, 상기 적어도 하나의 증상 또는 징후는 고혈당 수준, 과도한 갈증, 배뇨 증가, 소변 중 케톤의 존재, 피로, 체중 변동, 흐린 시력, 치유가 느린 통증 (slow healing sores), 빈번한 감염, 붓거나 허약한 잇몸, 비만, 심장병, 뇌졸중, 신장병, 안 질환, 신경 손상 및 고혈압으로 이루어진 그룹으로부터 선택된다. 특정 실시형태에서, 본 발명은 과체중 또는 비만 대상체에서 체중을 감소시키는 방법을 제공하며, 여기서, 상기 방법은 GLP1 수용체에 결합하여 GLP1 수용체 활성을 활성화시키는 치료학적 유효량의 본 발명의 GLP1 수용체 작용제를 상기 대상체에게 투여하는 단계를 포함한다. 일부 실시형태에서, 상기 GLP1 수용체 작용제는 고혈당증이 있거나 고혈당증에 걸릴 위험이 있는 대상체에게 예방학적으로 또는 치료학적으로 투여될 수 있다. 상기 위험이 있는 대상체로는 고령의 대상체, 임산부, 높은 HbA1c 수준을 갖는 대상체, 및 비만, 높은 혈중 콜레스테롤, 흡연, 과도한 알코올 소비 및/또는 운동 부족을 비롯한 하나 이상의 위험 인자를 갖는 대상체가 포함되지만, 이들에 한정되는 것은 아니다. 특정 실시형태에서, 본 발명은 인슐린 및/또는 메트포르민에 의한 치료로 조절되지 않는 2형 당뇨병을 치료하는 방법을 제공하며, 여기서, 상기 방법은 치료학적 유효량의 본 발명의 GLP1 수용체 작용제를 이를 필요로 하는 대상체에게 투여하는 단계를 포함한다. 특정 실시형태에서, 본 발명의 GLP1 수용체 작용제는 이를 필요로 하는 대상체에게 제2 치료제와 조합하여 투여된다. 상기 제2 치료제는 인슐린 또는 인슐린 유사체, 비구아니드 (예를 들어, 메트포르민), 티아졸리딘디온, 설폰닐우레아 (예를 들어, 클로르프로파마이드), 글리니드 (예를 들어, 나테글리니드), 알파 글루코시다아제 억제제, DPP4 억제제 (예를 들어, 시타글립틴), 프람린타이드, 브로모크립틴, SGLT2 억제제 (예를 들어, 카나글리플로진), 항고혈압 약물, 스타틴, 아스피린, 식이 조정, 운동 및 식이 보충제로 이루어진 그룹으로부터 선택될 수 있다. 본 발명의 GLP1 수용체 작용제 용합 단백질과 조합하여 사용될 수 있는 추가의 치료제는 본 출원의 다른 곳에 기재되어 있다. 특정 실시형태에서, 상기 제2 치료제는 본 발명의 GLP1 수용체 작용제와 관련하여 가능한 임의의 부작용(들) (이러한 부작용(들)이 발생하는 경우)을 제거 또는 감소시키는데 도움이 되는 제제일 수 있다. 상기 GLP1 수용체 작용제는 피하, 정맥내, 진피내, 복강내, 경구, 근육내 또는 두개내로 투여될 수 있다. 상기 GLP1 수용체 작용제는 대상체의 체중 1 kg 당 약 0.1 mg 내지 약 100 mg의 용량으로 투여될 수 있다. 특정 실시형태에서, 본 발명의 GLP1 수용체 작용제는 0.1 mg 내지 600 mg을 포함하는 1회 이상의 용량으로 투여될 수 있다.

- [0017] 본 발명은 또한 GLP1 수용체 결합 및/또는 활성의 자극으로부터 유익할 수 있는 질환 또는 장애 (예를 들어, 2형 당뇨병을 비롯한 당뇨병)의 치료를 위한 약제의 제조에서 본 발명의 GLP1 수용체 작용제의 용도를 포함한다.
- [0018] 다른 실시형태들은 하기의 상세한 설명의 검토로부터 자명해질 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0019] 본 발명을 설명하기 전에, 본 발명은 설명된 특정 방법들과 실험 조건들에 한정되지 않는데, 이는 이러한 방법들과 조건들이 다양할 수 있기 때문이다는 것을 이해해야 한다. 본 출원에서 사용된 용어는 단지 특정 실시형태들을 설명하기 위한 목적일 뿐이며, 본 발명의 범위가 첨부된 청구범위에 의해서만 한정될 것이기 때문에 한정적인 것으로 의도되지 않는다는 것을 또한 이해해야 한다.
- [0020] 달리 정의되지 않는다면, 본 출원에서 사용된 모든 기술 용어 및 과학 용어는 본 발명이 속하는 기술 분야의 통상적인 기술자에 의해 통상적으로 이해되는 바와 동일한 의미를 갖는다. 본 출원에서 기재된 것들과 유사하거나 동등한 임의의 방법들 및 물질들이 본 발명의 실시 또는 시험에서 사용될 수 있지만, 바람직한 방법들 및 재료들은 이하에 기재되어 있다. 본 출원에서 언급된 모든 간행물들은 전문이 본 출원에 참조로 포함된다.
- [0021] 정의
- [0022] "글루카곤 유사 펩타이드 1"로도 또한 호칭되는 "GLP1"이라는 용어는 영양소 소비 후에 장의 L 세포로부터 방출된 31개 아미노산 펩타이드 호르몬을 지칭한다. GLP1은 GLP1 수용체에 결합하여, 췌장 베타 세포로부터 인슐린의 포도당-유도된 분비를 강화시키고, 인슐린 발현을 증가시키고, 베타 세포 아포토시스를 억제하고, 베타 세포 신생을 촉진시키고, 글루카곤 분비를 감소시키고, 위 배출을 지연시키고, 포만감을 촉진시키고, 주변 포도당 처

리를 증가시킨다. 특정 실시형태에서, "GLP1"이라는 용어는 전장 GLP1 펩타이드 (서열 번호 3)의 아미노산 7 내지 37번을 포함하는 성숙한 31개 아미노산 펩타이드 호르몬 (서열 번호 4)을 지칭한다. 상기 용어는 또한 1, 2, 3, 4, 5 또는 6 개의 아미노산 치환, 부가 또는 결실을 포함하는 GLP1의 변이체를 포함한다. 예를 들어, 상기 용어는 서열 번호 5, 6, 7 또는 8의 아미노산 서열을 포함하는 변이체를 포함한다.

[0023] 본 출원에서 사용되는 "안정화 도메인"은 펩타이드에 융합될 때 상기 펩타이드의 생체내 활성 및/또는 안정성을 증가시키는 임의의 거대 분자이다. 예를 들어, 안정화 도메인은 면역글로불린 C_H3 도메인을 포함하는 폴리펩타이드일 수 있다. 특정 실시형태에서, 상기 안정화 도메인은 상기 펩타이드의 혈청 반감기를 증가시킨다. 특정 실시형태에서, 상기 안정화 펩타이드는 상기 펩타이드의 생체내 효능을 증가시킨다. 안정화 도메인의 비제한적인 예로는 면역글로불린의 Fc 부분, 예를 들어, 이소타입 IgG1, IgG2, IgG3 및 IgG4 뿐만 아니라 각 이소타입 그룹 내의 임의의 알로타입으로부터 선택된 IgG의 Fc 도메인이 있다. 특정 실시형태에서, 상기 안정화 도메인은 하나 이상의 시스테인 잔기를 함유하는 1 내지 약 200개의 아미노산 길이의 Fc 단편 또는 아미노산 서열이다. 또 다른 예로서, 안정화 도메인은 면역글로불린 또는 이의 항원 결합 단편일 수 있다. 특정 실시형태에서, 상기 안정화 도메인은 중쇄 가변 영역 및 경쇄 가변 영역을 포함하는 면역글로불린이며, 여기서, 상기 면역글로불린은 특정 항원에 결합한다. 특정 실시형태에서, 상기 안정화 도메인은 항원 결합 도메인 및 Fc 도메인 (예를 들어, IgG1 또는 IgG4 항체의 것들)일 수 있거나 항원 결합 부분 (예를 들어, Fab, F(ab')₂ 또는 scFv 단편)만을 포함할 수 있으며, 기능성에 영향을 주도록 변형될 수 있다. 특정 실시형태에서, 상기 안정화 도메인은 중쇄 가변 영역 및 경쇄 가변 영역을 포함하는 면역글로불린이며, 여기서, 상기 면역글로불린은 GLP1 수용체에 결합한다. 다른 실시형태에서, 상기 안정화 도메인은 시스테인 잔기 또는 짧은 시스테인 함유 펩타이드이다. 다른 안정화 도메인으로는 류신 지퍼, 나선형 루프 (helix-loop) 모티프 또는 코일형 코일 (coiled-coil) 모티프를 포함하거나 이들로 이루어진 펩타이드 또는 폴리펩타이드가 포함된다.

[0024] 본 출원에서 사용되는 "GLP1 수용체 작용제"라는 용어는 GLP1 수용체에 결합하는 단백질을 지칭한다. 본 발명의 맥락에서, 상기 용어는 안정화 도메인에 융합된 GLP1 변이체 또는 GLP1을 포함하는 융합 단백질을 지칭한다. 특정 실시형태에서, 상기 용어는 면역글로불린 또는 이의 단편에 융합된 GLP1 변이체를 포함하는 융합 단백질을 포함한다. 특정 실시형태에서, 상기 용어는 면역글로불린의 경쇄 가변 영역 (VL)의 N-말단에 융합된 GLP1 변이체 또는 GLP1를 포함하는 융합 단백질을 포함한다. 하나의 특정 실시형태에서, 상기 용어는 GLP1 수용체에 결합하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편의 VL의 N-말단에 융합된 GLP1 변이체 또는 GLP1을 포함한다.

[0025] 본 출원에서 사용되는 "항체"라는 용어는 이화물 결합에 의해 서로 연결된 2개의 중쇄 (H) 및 2개의 경쇄 (L)인 4개의 폴리펩타이드 쇄로 이루어진 면역글로불린 분자 뿐만 아니라 이의 다량체 (예를 들어, IgM) 또는 이의 항원 결합 단편을 지칭하는 것으로 의도된다. 각 중쇄는 중쇄 불변 영역 (도메인 C_H1, C_H2 및 C_H3으로 구성됨)과, 중쇄 가변 영역 ("HCV" 또는 "V_H") 또는 경쇄 가변 영역 ("LCV" 또는 "V_L")일 수 있는 Ig 가변 영역으로 구성된다. 각 경쇄는 경쇄 가변 영역 ("LCV" 또는 "V_L") 및 경쇄 불변 영역 (C_L)으로 구성된다. 상기 V_H 및 V_L 영역은 프레임워크 영역 (framework region: FR)이라 불리는 보다 보존된 영역과 함께 배치된, 상보성 결정 영역 (complementarity determining region: CDR)이라 불리는 초가변 영역으로 추가로 세분될 수 있다. 각 V_H 및 V_L은 아미노-말단으로부터 카복시-말단으로 하기의 순서로 배열된 3개의 CDR 및 4개의 FR로 구성된다: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. 본 발명의 특정 실시형태에서, 상기 항체 (또는 이의 항원 결합 단편)의 FR은 사람 생식 세포 서열과 동일할 수 있거나, 자연적으로 또는 인공적으로 변형될 수 있다. 아미노산 공통 서열은 2개 이상의 CDR의 병렬 분석 (side-by-side analysis)을 기반으로 정의될 수 있다. 본 출원에서 사용되는 "항원 결합 단백질"이라는 용어는 또한 항체를 포함한다.

[0026] 하나 이상의 CDR 잔기의 치환 또는 하나 이상의 CDR의 생략도 또한 가능하다. 1개 또는 2개의 CDR을 결합을 위해 제거할 수 있는 항체가 과학 문헌에 기재되어 있다. 패들란 등 (문헌 [Padlan *et al.*, 1995 FASEB J. 9: 133-139])은 공개된 결정 구조를 기반으로 항체와 이의 항원 사이의 접촉 영역을 분석하여 CDR 잔기의 약 1/5 내지 1/3만이 실제로 항원과 접촉하고 있는 것으로 결론을 내렸다. 패들란은 1개 또는 2개의 CDR이 항원과 접촉하고 있는 아미노산을 갖고 있지 않은 다수의 항체도 또한 밝혀냈다 (또한 문헌 [Vajdos *et al.*, 2002 J Mol Biol 320: 415-428] 참조).

[0027] VR 아미노산 서열 내의 CDR을 확인하기 위한 방법 및 기술은 당해 분야에 널리 공지되어 있으며, 본 출원에서 개시된 특정 VR 아미노산 서열 내의 CDR을 확인하는데 사용될 수 있다. CDR의 경계를 확인하는데 사용될 수 있는 예시적인 방법으로는, 예를 들어, 카바트 (Kabat) 정의, 초티아 (Chothia) 정의 및 AbM 정의가 포함된다.

일반적으로, 카바트 정의는 서열 가변성을 기반으로 하고, 초티아 정의는 구조적 루프 영역의 위치를 기반으로 하며, AbM 정의는 카바트와 초티아 접근법을 절충한 것이다. 예를 들어, 문헌 [Kabat, "Sequences of Proteins of Immunological Interest," National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991)]; [Al-Lazikani *et al.*, *J. Mol. Biol.* 273: 927-948 (1997)]; 및 [Martin *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 9268-9272 (1989)]를 참조한다. 공개 데이터베이스도 또한 항원 결합 단백질 또는 항체의 항원 결합 도메인 내의 CDR 서열을 확인하는데 사용될 수 있다.

[0028] 항원과 접촉하고 있지 않은 CDR 잔기는 이전 연구들 (예를 들어, CDRH2 중의 잔기 H60-H65는 필요하지 않은 경우가 많음)을 기초로 하여 분자 모델링에 의해 및/또는 실험적으로 초티아 CDR의 외측에 존재하는 카바트 CDR의 영역으로부터 확인될 수 있다. CDR 또는 이의 잔기(들)이 생략되는 경우, 이것은 통상적으로 또 다른 사람 항체 서열 또는 이러한 서열의 공통 서열 중의 해당 위치를 차지하고 있는 아미노산으로 치환된다. 치환할 CDR 및 아미노산 내의 치환 위치는 또한 실험적으로 선택될 수 있다. 실험적 치환은 보존적 또는 비보존적 치환일 수 있다.

[0029] 본 출원에서 사용되는 항원 결합 단백질의 "항원 결합 부분", 항원 결합 단백질의 "항원 결합 단편" 등의 용어는, 항원에 특이적으로 결합하여 복합체를 형성하는 임의의 자연 발생하거나 효소에 의해 수득할 수 있거나 합성 또는 유전자 공학에 의해 생성된 폴리펩타이드 또는 당단백질을 포함한다. 본 출원에서 사용되는 항원 결합 단백질의 "항원 결합 단편" 또는 "항원 결합 단백질 단편"이라는 용어는, GLP1 수용체에 특이적으로 결합하는 능력을 보유하는 항원 결합 단백질의 하나 이상의 단편을 지칭한다. 항원 결합 단백질 단편으로는 Fab 단편, F(ab')₂ 단편, Fv 단편, dAb 단편, CDR을 포함하는 단편, 또는 분리된 CDR이 포함될 수 있다. 특정 실시형태에서, "항원 결합 단편"이라는 용어는 다중 특이적 항원 결합 분자의 폴리펩타이드 단편을 지칭한다. 항원 결합 단백질 또는 항체의 항원 결합 단편은, 예를 들어, 단백질 가수분해와 같은 임의의 적합한 표준 기술 또는 DNA 암호화 항원 결합 단백질 가변 및 (임의로) 불변 도메인의 조작 및 발현을 수반하는 재조합 유전자 공학 기술을 사용하여 완전한 단백질 분자로부터 유래될 수 있다. 이러한 DNA는 공지되어 있고/있거나, 예를 들어, 상업적 공급원, DNA 라이브러리 (예를 들어, 파지-항체 라이브러리 포함)로부터 용이하게 이용 가능하거나 합성될 수 있다. 상기 DNA는, 예를 들어, 하나 이상의 가변 및/또는 불변 도메인을 적합한 구성으로 배열하기 위해, 또는 코돈을 도입하거나, 시스테인 잔기를 생성하거나, 아미노산을 변형시키거나, 추가하거나 결실시키는 등을 위해, 화학적으로 또는 분자 생물학 기술을 사용하여 서열 분석 및 조작될 수 있다.

[0030] 항원 결합 단편의 비제한적인 예로는 다음이 포함된다: (i) Fab 단편; (ii) F(ab')₂ 단편; (iii) Fd 단편; (iv) Fv 단편; (v) 단쇄 Fv (scFv) 분자; (vi) dAb 단편; 및 (vii) 제한된 (constrained) FR3-CDR3-FR4 펩타이드 또는 항체의 초가변 영역 (예를 들어, CDR3 펩타이드와 같은 단리된 상보성 결정 영역 (CDR))을 모방하는 아미노산 잔기로 이루어진 최소 인지 단위. 도메인-특이적 항체, 단일 도메인 항체, 도메인-결실된 항체, 키메라 항체, CDR-이식된 항체, 디아바디 (diabody), 트리아바디 (triabody), 테트라바디 (tetrabody), 미니바디 (minibody), 나노바디 (nanobody) (예를 들어, 1가 나노바디, 2가 나노바디 등), 소형 모듈식 면역 약물 (small modular immunopharmaceutical: SMIP) 및 샹크 가변 IgNAR 도메인과 같은 기타 조작된 분자들도 또한 본 출원에서 사용되는 "항원 결합 단편"이라는 표현에 포함된다.

[0031] 본 발명의 항원 결합 단백질 또는 항체의 항원 결합 단편은 전형적으로는 적어도 하나의 면역글로불린 (Ig) 가변 도메인을 포함할 것이다. 상기 가변 도메인은 임의의 크기 또는 아미노산 조성을 가질 수 있으며, 일반적으로 하나 이상의 프레임워크 서열에 인접하거나 이와 함께 프레임을 이루는 적어도 하나의 CDR을 포함할 것이다. V_L 도메인과 결합된 V_H 도메인을 갖는 항원 결합 단편에서, 상기 V_H 및 V_L 도메인은 서로에 대해 임의의 적합한 배열로 위치할 수 있다. 예를 들어, 상기 가변 영역은 이량체이며, V_H - V_H, V_H - V_L 또는 V_L - V_L 이량체를 포함할 수 있다. 대안으로, 항원 결합 단백질의 항원 결합 단편은 단량체성 V_H 또는 V_L 도메인을 포함할 수 있다.

[0032] 특정 실시형태에서, 항원 결합 단편은 적어도 하나의 불변 도메인에 공유적으로 결합된 적어도 하나의 가변 도메인을 포함할 수 있다. 본 발명의 항체의 항원 결합 단편 내에서 발견될 수 있는 가변 및 불변 도메인의 비제한적인 예시적 구성으로는 다음이 포함된다: (i) V_H -C_H1; (ii) V_H -C_H2; (iii) V_H -C_H3; (iv) V_H -C_H1-C_H2; (v) V_H -C_H1-C_H2-C_H3; (vi) V_H -C_H2-C_H3; (vii) V_H -C_L; (viii) V_L -C_H1; (ix) V_L -C_H2; (x) V_L -C_H3; (xi) V_L -C_H1-C_H2; (xii) V_L -C_H1-C_H2-C_H3; (xiii) V_L -C_H2-C_H3; 및 (xiv) V_L -C_L. 상기에서 열거된 임의의 예시적인 구성을 비롯한 가변 및 불변 도메인의 임의의 구성에서, 상기 가변 및 불변 도메인은 서로 직접적으로 결합될 수 있거나, 전체 또는 부분 힌지 또는 링커 영역에 의해 결합될 수 있다. 힌지 영역은 적어도 2개 (예를 들어, 5, 10, 15, 20,

40, 60개 또는 그 이상)의 아미노산으로 이루어질 수 있으며, 이러한 아미노산은 단일 폴리펩타이드 분자에서 인접한 가변 및/또는 불변 도메인들 사이에서 가요성 또는 반가요성 결합을 초래한다. 더욱이, 본 발명의 항원 결합 단백질의 항원 결합 단편은 서로 및/또는 하나 이상의 단량체성 V_H 또는 V_L 도메인과의 비공유 결합으로 (예를 들어, 이황화 결합(들)에 의해) 상기에서 열거된 임의의 가변 및 불변 도메인 구성의 동종 이량체 또는 이종 이량체 (또는 기타 다량체)를 포함할 수 있다.

[0033] 전체 단백질 분자에서와 같이, 항원 결합 단편은 단일 특이적 또는 다중 특이적 (예를 들어, 이종 특이적)일 수 있다. 항원 결합 단백질의 다중 특이적 항원 결합 단편은 전형적으로는 적어도 2개의 상이한 가변 도메인을 포함할 것이며, 여기서, 각 가변 도메인은 별개의 항원 또는 동일한 항원 상의 상이한 에피토프에 특이적으로 결합할 수 있다. 본 출원에서 개시된 예시적인 이종 특이적 항원 결합 단백질 형식을 비롯한 임의의 다중 특이적 항원 결합 단백질 형식은, 당해 분야에서 이용 가능한 일상적인 기술을 사용하여 본 발명의 항원 결합 단백질의 항원 결합 단편의 맥락에서 사용하기 위해 조정될 수 있다.

[0034] 본 출원에서 사용되는 "완전한 사람 항체", "사람 항체", "완전한 사람 항원 결합 단백질" 또는 "사람 항원 결합 단백질"이라는 용어는, 사람 생식 세포 면역글로불린 서열로부터 유래된 가변 및 불변 영역을 갖는 항원 결합 단백질 포함하도록 의도된다. 본 발명의 사람 항원 결합 단백질은, 예를 들어, CDR, 특히, CDR3에서 사람 생식 세포 면역글로불린 서열에 의해 암호화되지 않은 아미노산 잔기 (예를 들어, 시험관내의 무작위 또는 부위-특이적 돌연변이 유발에 의해 또는 생체내의 체세포 돌연변이에 의해 도입된 돌연변이)를 포함할 수 있다. 그러나, 본 출원에서 사용되는 "사람 항원 결합 단백질"이라는 용어는, 또 다른 포유 동물 중 (예를 들어, 마우스)의 생식 세포로부터 유래된 CDR 서열이 사람 FR 서열에 이식된 항원 결합 단백질을 포함하도록 의도되지 않는다. 상기 용어는 사람을 제외한 포유 동물에서 또는 사람을 제외한 포유 동물의 세포에서 재조합에 의해 생성된 항원 결합 단백질 또는 항체를 포함한다. 상기 용어는 사람 대상체로부터 단리되거나 사람 대상체에서 생성된 항원 결합 단백질 또는 항체를 포함하도록 의도되지 않는다.

[0035] 본 출원에서 사용되는 "재조합"이라는 용어는, 예를 들어, DNA 스플라이싱 및 유전자이식 (transgenic) 발현을 비롯한 재조합 DNA 기술로서 당해 분야에 공지된 기술들 또는 방법들에 의해 생성, 발현, 단리 또는 수득된 본 발명의 융합 단백질 또는 이의 단편을 지칭한다. 상기 용어는 사람을 제외한 포유 동물 (사람을 제외한 유전자 이식 포유 동물, 예를 들어, 유전자이식 마우스 포함) 또는 세포 (예를 들어, CHO 세포) 발현 시스템에서 발현되거나 재조합 조합형 사람 항체 라이브러리로부터 단리된 융합 단백질을 지칭한다.

[0036] "특이적으로 결합한다" 또는 "...에 특이적으로 결합한다" 등의 용어는, 항체 또는 이의 항원 결합 단편이 생리학적 조건하에 비교적 안정한 항원과 복합체를 형성한다는 것을 의미한다. 특이적 결합은 적어도 약 1×10^{-8} M 이하의 평형 해리 상수 (예를 들어, 더 작은 K_D 는 더 단단한 결합을 나타냄)를 특징으로 할 수 있다. 2개의 분자가 특이적으로 결합하는지 여부를 측정하는 방법은 당해 분야에 널리 공지되어 있으며, 예를 들어, 평형 투석, 표면 플라즈몬 공명 등을 포함한다.

[0037] 본 출원에서 사용되는, 항체의 "항원 결합 부분", 항체의 "항원 결합 단편" 등의 용어는, 항원에 특이적으로 결합하여 복합체를 형성하는 임의의 자연 발생하거나 효소에 의해 수득할 수 있거나 합성 또는 유전자 공학에 의해 생성된 폴리펩타이드 또는 당단백질을 포함한다. 본 출원에서 사용되는, 항원 결합 단백질 또는 항체의 "항원 결합 단편" 또는 "항체 단편"이라는 용어는, GLP1 수용체에 결합하는 능력을 보유하는 면역글로불린 단백질의 하나 이상의 단편을 지칭한다.

[0038] 본 출원에서 사용되는 " K_D "라는 용어는, 특정 단백질-항원 상호작용의 평형 해리 상수를 지칭하도록 의도된다.

[0039] 핵산 또는 이의 단편을 지칭할 때의 "실질적인 동일성" 또는 "실질적으로 동일한"이라는 용어는, 적절한 뉴클레오타이드 삽입 또는 결실에 의해 또 다른 핵산 (또는 이의 상보성 가닥)과 최적으로 정렬될 때, 하기에서 논의되는 바와 같이 FASTA, BLAST 또는 GAP와 같은 널리 공지된 서열 동일성에 대한 임의의 알고리즘에 의한 측정시, 뉴클레오타이드 염기 중 적어도 약 90%, 보다 바람직하게는 적어도 약 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99%에서 뉴클레오타이드 서열 동일성이 있다는 것을 나타낸다. 기준 핵산 분자에 대해 실질적인 동일성을 갖는 핵산 분자는, 특정한 경우에는, 기준 핵산 분자에 의해 암호화된 폴리펩타이드와 동일하거나 실질적으로 유사한 아미노산 서열을 갖는 폴리펩타이드를 암호화할 수 있다.

[0040] 폴리펩타이드에 적용되는 바와 같이, "실질적인 유사성" 또는 "실질적으로 유사한"이라는 용어는, 예를 들어, 디폴트 갭 가중치를 사용하는 GAP 또는 BESTFIT 프로그램에 의해 최적으로 정렬될 때의 2개의 펩타이드 서열이

적어도 90%의 서열 동일성, 보다 더 바람직하게는 적어도 95%, 98% 또는 99%의 서열 동일성을 공유한다는 것을 의미한다. 바람직하게는, 동일하지 않은 잔기 위치들은 보존적 아미노산 치환에 의해 달라진다. "보존적 아미노산 치환"은 한 아미노산 잔기가 유사한 화학적 특성 (예를 들어, 전하 또는 소수성)을 보유하는 측쇄 (R 기)를 갖는 또 다른 아미노산 잔기에 의해 치환되는 것이다. 일반적으로, 보존적 아미노산 치환은 단백질의 기능적 성질을 실질적으로 변화시키지 않을 것이다. 2 이상의 아미노산 서열이 서로 보존적 치환이 다른 경우, 유사성의 % 또는 정도는 치환의 보존적 성질을 보정하기 위해 상향 조정될 수도 있다. 이러한 조정을 수행하는 방법은 당해 분야의 통상의 기술자에게 널리 공지되어 있다. 예를 들어, 본 출원에서 참조로 포함되는 문헌 [Pearson (1994) *Methods Mol. Biol.* 24: 307-331]을 참조한다. 유사한 화학적 특성을 보유하는 측쇄를 갖는 아미노산의 거의 예로는 1) 지방족 측쇄: 글리신, 알라닌, 발린, 류신 및 이소류신; 2) 지방족-하이드록실 측쇄: 세린 및 트레오닌; 3) 아미드 함유 측쇄: 아스파라긴 및 글루타민; 4) 방향족 측쇄: 페닐알라닌, 타이로신 및 트립토판; 5) 염기성 측쇄: 라이신, 아르기닌 및 히스티딘; 6) 산성 측쇄: 아스파르테이트 및 글루타메이트, 및 7) 황 함유 측쇄: 시스테인 및 메티오닌이 포함된다. 바람직한 보존적 아미노산 치환기로는 발린-류신-이소류신, 페닐알라닌-타이로신, 라이신-아르기닌, 알라닌-발린, 글루타메이트-아스파르테이트 및 아스파라긴-글루타민이 있다. 대안으로, 보존적 치환은 본 출원에서 참조로 포함되는 문헌 [Gonnet *et al.* (1992) *Science* 256: 1443-45]에 개시된 PAM250 로그-유사성 매트릭스 (log-likelihood matrix)에서 양의 수치를 갖는 임의의 변화이다. "적당한 보존적 (moderately conservative)" 치환은 PAM250 로그-유사성 매트릭스에서 음이 아닌 수치를 갖는 임의의 변화이다.

[0041] 폴리펩타이드에 대한 서열 유사성은 전형적으로는 서열 분석 소프트웨어를 사용하여 측정된다. 단백질 분석 소프트웨어는 보존적 아미노산 치환을 비롯한 다양한 치환, 결실 및 기타 변형에 대해 배정된 유사성의 측정치를 사용하여 유사한 서열을 일치시킨다. 예를 들어, GCG 소프트웨어는, 디폴트 파라미터로 사용되어 상이한 유기체 중 유래의 상동성 폴리펩타이드와 같은 밀접하게 관련된 폴리펩타이드들 사이 또는 야생형 단백질과 이의 돌연변이 단백질 사이의 서열 상동성 또는 서열 동일성을 결정할 수 있는 GAP 및 BESTFIT와 같은 프로그램을 포함한다. 예를 들어, GCG 버전 6.1을 참조한다. 폴리펩타이드 서열들은 또한 GCG 버전 6.1 내의 프로그램인 디폴트 또는 권장 파라미터들로 FASTA를 사용하여 비교될 수 있다. FASTA (예를 들어, FASTA2 및 FASTA3)은 질의 서열과 검색 서열 사이의 최상의 중첩 영역의 정렬 및 % 서열 동일성을 제공한다 (문헌 [Pearson (2000) 상기]). 본 발명의 서열을 상이한 유기체 유래의 다수의 서열들을 포함하는 데이터베이스와 비교할 때의 또 다른 바람직한 알고리즘은 디폴트 파라미터를 사용하는 BLAST, 특히, BLASTP 또는 TBLASTN 컴퓨터 프로그램이다. 예를 들어, 문헌 [Altschul *et al.*, (1990) *J. Mol. Biol.* 215: 403-410] 및 [Altschul *et al.*, (1997) *Nucleic Acids Res.* 25: 3389-3402]을 참조하며, 이들 각각은 본 출원에 참조로 포함된다.

[0042] "치료학적 유효량"이라는 문구는 목적하는 효과를 나타내기 위해 투여되는 양을 의미한다. 정확한 양은 치료의 목적에 따라 달라질 것이며, 공지된 기술을 사용하여 통상의 기술자에 의해 확인될 수 있을 것이다 (예를 들어, 문헌 [Lloyd (1999) *The Art, Science and Technology of Pharmaceutical Compounding*] 참조).

[0043] 본 출원에서 사용되는 "대상체"라는 용어는 GLP1과 관련된 질환 또는 장애의 개선, 예방 및/또는 치료를 필요로 하는 동물, 바람직하게는 포유 동물, 보다 바람직하게는 사람을 지칭한다. 상기 용어는 GLP1과 관련된 질환 또는 병태가 있거나 이에 걸릴 위험이 있는 사람 대상체를 포함한다. 예를 들어, 상기 용어는 당뇨병 (예를 들어, 2형 당뇨병)이 있거나 이의 발병 위험이 있는 대상체를 포함한다. 특정 실시형태에서, 상기 용어는 비만, 뇌졸중 또는 심근 경색이 있거나 이의 발병 위험이 있는 대상체를 포함한다. 상기 용어는 또한 고혈당 수준 및/또는 당뇨병에 대한 하나 이상의 바이오 마커, 예를 들어, HbA1c의 증가된 수준을 갖는 대상체를 포함한다. 상기 용어는 표준 치료 요법 (예를 들어, 메트포르민)이 금지되거나 내약성을 갖지 않는 당뇨병을 갖거나, (예를 들어, 메트포르민에 의한) 치료에도 불구하고 제어되지 않는 질환을 갖는 대상체를 또한 포함한다.

[0044] 본 출원에서 사용되는 "치료하다", "치료하는" 또는 "치료"라는 용어는, GLP1과 관련된 질환 또는 장애의 적어도 하나의 증상 또는 징후의 중증도의 감소 또는 개선을 필요로 하는 대상체에게 본 발명의 GLP1 수용체 작용제와 같은 치료제의 투여로 인한 이러한 감소 또는 개선을 지칭한다. 상기 용어는 질환의 진행 또는 증상의 악화에 대한 억제제를 포함한다. 상기 용어는 또한 질환의 긍정적인 후유를 포함하는데, 즉, 대상체는 본 발명의 GLP1 수용체 작용제와 같은 치료제의 투여시 증상 또는 징후로부터 해방될 수 있거나, 증상 또는 징후의 감소된 세기를 가질 수 있다. 예를 들어, 당뇨병이 있는 대상체는 본 발명의 GLP1 수용체 작용제의 투여시 혈당 수준의 감소를 가질 수 있다. 상기 치료제는 치료학적 용량으로 대상체에게 투여될 수 있다.

[0045] "예방하다", "예방하는" 또는 "예방"이라는 용어는, 본 발명의 GLP1 수용체 작용제의 투여시 고혈당증과 관련된 질환 또는 장애의 임의의 증상 또는 징후의 발현에 대한 억제제를 지칭한다. 상기 용어는 GLP1 수용체 관련 질환

또는 장애의 발생 위험이 있는 대상체에서 이러한 질환 또는 장애의 증상 또는 징후의 발현에 대한 억제를 포함한다.

[0046] GLP1 (7-37) (서열 번호 4)은 디펩티딜 펩티다아제 4 (DPP4) 효소에 의한 급속한 불활성화로 인해 매우 짧은 순환 반감기 (1~2분)를 갖는다. 이전 연구는 GLP1 (7-37)의 8번 위치에서의 다양한 아미노산 치환이 DPP4에 대해 더욱 저항성을 만들어 보다 긴 반감기를 부여한다는 것을 보여 주었다. 그러나, DPP4 절단에 대한 이들 분자의 잔류 감수성이 존재한다 (문헌 [Deacon et al., 1998, Diabetologia 41: 271-278]). 따라서, DPP4에 의한 분해에 대해 증가된 저항성을 갖는 새로운 분자를 개발할 필요성이 존재한다.

[0047] 본 발명자들은, DPP4에 대한 보다 우수한 저항성을 부여하기 위해, 제1 단계가 N-말단에 대한 아미노산 (즉, Ala, Gln)의 부가 또는 펩타이드 서열 내의 His 또는 Ala의 결실에 의해 GLP1의 아미노 말단을 연장 또는 단축시키는 돌연변이를 도입하여 DPP4 절단에 대해 보다 우수한 저항성을 제공하는 것이라고 가설을 세웠다. 본 발명자들은 이들 신규한 GLP1 변이체가 실제로 DPP4에 의한 분해에 대해 고도로 저항성이 있다는 것을 본 출원에서 증명하였다. 제2 단계는 GLP1을 항-GLP1 수용체 항체에 융합시켜

[0048] 임의의 약화되거나 감소된 GLP1 활성을 보상하는 것이었으며, 이는 약화된 GLP1을 GLP1 수용체에 연결함으로써 이의 효능을 증가시킨다. 또한, 본 발명자들은 이들 융합 단백질이 Fc 도메인을 함유하기 때문에 증가된 혈청 반감기를 나타내며 10일 초과 동안 지속되는 혈당 수준의 증가된 감소를 초래한다는 것을 밝혀냈다. 본 출원에서 개시된 신규한 GLP1 변이체 및 융합 단백질은 시험관내 및 생체내에서 DPP4에 의한 분해에 대해 유의하게 개선된 저항성을 나타내며 본 출원에서 도시된 바와 같이 혈당 조절에서 크게 개선된 효능을 나타낸다. DPP4에 의한 분해에 대한 저항성의 맥락에서 본 출원에서 사용되는 "유의하게 개선된" 또는 "증진된" 또는 "증가된"이라는 용어는, 본 출원에서 기재된 검정법에 의해 측정될 때, 4 시간 초과, 8 시간 초과, 16 시간 초과, 24 시간 초과, 36 시간 초과 또는 70 시간 초과 동안 DPP4와의 인큐베이션 처리시 분해에 대한 증가된 저항성을 지칭한다. 혈당 수준의 감소의 맥락에서 본 출원에서 사용되는 "유의하게 개선된" 또는 "증진된" 또는 "증가된"이라는 용어는, 본 발명의 GLP1 수용체 작용제의 투여시, 대상체에서 1일 초과, 2일 초과, 3일 초과, 4일 초과, 5일 초과, 6일 초과, 7일 초과, 8일 초과, 9일 초과 또는 10일 초과 동안 혈당 수준의 지속적인 저하를 지칭한다.

[0049] 본 발명의 GLP1 수용체 작용제는 GLP1 수용체에 높은 친화성으로 결합하여 GLP1 수용체 활성화를 초래한다. 일부 실시형태에서, 상기 단백질은 당뇨병을 앓고 있는 대상체를 치료하는데 유용하다. 상기 단백질은 이를 필요로 하는 대상에게 투여될 때 대상체에서 혈당 수준을 감소시킬 수 있다. 이들은 단독으로 또는 고혈당증을 치료하기 위해 당해 분야에 공지된 다른 치료학적 모이어티 또는 양식과 함께 보조 요법으로서 사용될 수 있다.

[0050] 본 발명의 특정 GLP1 수용체 작용제 단백질은 시험관내 또는 생체내 검정법에 의해 결정될 때 GLP1 수용체에 결합하여 이의 활성을 자극할 수 있다. GLP1 수용체에 결합하여 이의 활성을 증진시키는 본 발명의 단백질의 능력은, 본 출원에서 기재된 바와 같은 결합 검정법 또는 활성 검정법을 비롯한 당해 분야의 통상의 기술자에게 공지된 임의의 표준 방법을 사용하여 측정될 수 있다.

[0051] GLP1 수용체에 대해 특이적인 항원 결합 단백질들은 추가의 라벨 또는 모이어티를 함유하지 않을 수 있거나, 이들은 N-말단 또는 C-말단 라벨 또는 모이어티를 함유할 수 있다. 하나의 실시형태에서, 상기 라벨 또는 모이어티는 비오틴이다. 결합 검정에서, 라벨 (존재하는 경우)의 위치는 펩타이드가 결합되는 표면에 대하여 펩타이드의 배향을 결정할 수 있다. 예를 들어, 표면이 아비딘으로 코팅되는 경우, N-말단 비오틴을 함유하는 펩타이드는 펩타이드의 C-말단 부분이 상기 표면에서 멀어지도록 배향될 것이다. 하나의 실시형태에서, 상기 라벨은 방사성 핵종, 형광 염료 또는 MRI-검출 가능한 라벨일 수 있다. 특정 실시형태에서, 이러한 라벨된 항원 결합 단백질은 이미징 검정을 비롯한 진단 검정에 사용될 수 있다.

[0052] 생물학적 동등성

[0053] 본 발명의 GLP1 수용체 작용제는, 본 출원에 기재된 GLP1 수용체 작용제와는 다르지만 GLP1 수용체에 결합할 수 있는 능력을 보유하는 아미노산 서열을 갖는 단백질을 포함한다. 이러한 변이체 GLP1 수용체 작용제는 모 서열 (parent sequence)과 비교할 때 아미노산의 하나 이상의 부가, 결실 또는 치환을 포함하지만, 본 출원에서 기재된 GLP1 수용체 작용제와 본질적으로 동등한 생물학적 활성을 나타낸다. 마찬가지로, 본 발명의 GLP1 수용체 작용제-암호화 DNA 서열은, 개시된 서열과 비교할 때 뉴클레오타이드의 하나 이상의 부가, 결실 또는 치환을 포함하지만 본 발명의 GLP1 수용체 작용제와 본질적으로 생물학적으로 동등한 GLP1 수용체 작용제를 암호화하는 서열을 포함한다.

[0054] 2개의 단백질은, 예를 들어, 이들이 유사한 실험 조건하에 단일 용량으로 또는 다중 용량으로 동일한 물 용량으

로 투여될 때 흡수율 및 흡수 정도가 유의차를 나타내지 않는 약제학적 동등물 또는 약제학적 대체물이라면 생물학적으로 동등한 것으로 간주된다. 일부 단백질들은, 이들이 흡수 정도에서는 동등하지만 흡수율에서 동등하지 않다면 동등물 또는 약제학적 대체물로 간주될 것이고, 여전히 생물학적으로 동등한 것으로 간주될 수 있는데, 이는 흡수율의 이러한 차이가 의도적이고 라벨링에 반영되며, 예를 들어, 만성 사용시 유효한 체내 약물 농도의 달성에 필수적이지 않고 연구되는 특정 약물 제품에 대해 의학적으로 무의미한 것으로 간주되기 때문이다.

[0055] 하나의 실시형태에서, 2개의 GLP1 수용체 작용제 단백질들은, 이들의 안전성, 순도 및 효능에서 임상적으로 유의미한 차이가 없다면, 생물학적으로 동등하다.

[0056] 하나의 실시형태에서, 2개의 GLP1 수용체 작용제 단백질들은, 환자가 기준 제품과 생물학적 제품 사이에 1회 이상 스위칭될 수 있으며 이러한 스위칭이 없는 연속 요법과 비교하여 면역원성의 임상적으로 유의한 변화 또는 감소된 효능을 비롯한 부작용의 위험 증가가 예상되지 않는다면, 생물학적으로 동등하다.

[0057] 하나의 실시형태에서, 2개의 GLP1 수용체 작용제 단백질들은, 이들 둘 다 사용 조건(들)에 대한 공통의 작용 메커니즘(들)에 의해 이러한 메커니즘들이 공지되어 있는 정도로 작용한다면, 생물학적으로 동등하다.

[0058] 생물학적 동등성은 생체내 및/또는 시험관내 방법에 의해 입증될 수 있다. 생물학적 동등성의 측정 방법으로는, 예를 들어, (a) 단백질 또는 이의 대사 산물의 농도를 시간의 함수로서 혈액, 혈장, 혈청 또는 기타 생물학적 체액 내에서 측정하는 사람 또는 기타 포유 동물의 생체내 시험; (b) 사람 생체내 생체 이용률 데이터와의 상관 관계를 나타내고 이러한 데이터를 합리적으로 예측하는 시험관내 시험; (c) 단백질 (또는 이의 표적)의 적절한 급성 약리학적 효과를 시간의 함수로서 측정하는 사람 또는 다른 포유 동물의 생체내 시험; 및 (d) 항원 결합 단백질의 안전성, 효능, 또는 생체 이용률 또는 생물학적 동등성을 확립하는 잘 조절된 임상 시험이 포함된다.

[0059] 본 발명의 GLP1 수용체 작용제 단백질의 생물학적으로 동등한 변이체는, 예를 들어, 잔기 또는 서열의 다양한 치환을 수행하거나, 생물학적 활성에 요구되지 않는 말단 또는 내부 잔기 또는 서열을 결실시킴으로써, 삭제될 수 있다. 예를 들어, 생물학적 활성에 필수적이지 않은 시스테인 잔기는 복원시 불필요하거나 부정확한 분자내 이황화 결합의 형성을 방지하기 위해 결실되거나 다른 아미노산으로 대체될 수 있다. 다른 맥락에서, 생물학적으로 동등한 단백질들은 단백질의 글리코실화 특성을 변형시키는 아미노산 변화, 예를 들어, 글리코실화를 없애거나 제거하는 돌연변이를 포함하는 변이체를 포함할 수 있다.

[0060] GLP1 수용체 작용제의 생물학적 특성

[0061] 일반적으로, 본 발명의 GLP1 수용체 작용제는 GLP1 수용체에 결합함으로써 기능하며, 결합시 GLP1 수용체의 활성화를 용이하게 한다. 특정 실시형태에서, 본 발명의 단백질은 GLP1 수용체에 높은 친화성으로 결합한다. 예를 들어, 본 발명은 루시퍼라아제 검정으로, 예를 들어, 본 출원의 실시예 2에서 정의된 바와 같은 검정 형식을 사용하여 측정될 때, (예를 들어, 25°C에서 또는 37°C에서) GLP1 수용체의 활성화를 초래하는 GLP1 수용체 작용제를 포함한다. 특정 실시형태에서, 상기 GLP1 수용체 작용제는 루시퍼라아제 검정으로, 예를 들어, 본 출원의 실시예 2에서 정의된 바와 같은 검정 형식 또는 실질적으로 유사한 검정을 사용하여 측정될 때, 10 nM 미만, 500 pM 미만 또는 약 250 pM 미만의 EC50으로 GLP1 수용체를 활성화시킨다.

[0062] 본 발명은, 예를 들어, 실시예 3 또는 실질적으로 유사한 검정에서 나타낸 바와 같이 이를 필요로 하는 대상체에 대한 투여시 생체내 혈당 수준을 감소시키는 GLP1 수용체 작용제를 또한 포함한다. 상기 GLP1 수용체 작용제는 투여시 증진된 혈당 조절에 영향을 미쳐 혈당 수준의 감소를 초래한다. 특정 실시형태에서, 심지어 단일 치료학적 유효 용량의 본 발명의 GLP1 수용체 작용제는 10일 초과 동안 지속되는 유의한 혈당 감소를 초래한다.

[0063] 본 발명은 질량 분광법으로, 예를 들어, 본 출원의 실시예 4에서 나타낸 바와 같이 또는 실질적으로 유사한 방법으로 측정될 때, 혈청 프로테아제/펩티다아제에 의한 분해에 대한 증진된 저항성을 나타내는 GLP1 수용체 작용제를 또한 포함한다. 특정 실시형태에서, 상기 GLP1 수용체 작용제는 본 출원의 실시예 4에서 기재된 검정으로 측정될 때 4 시간 초과, 6 시간 초과, 12 시간 초과, 24 시간 초과, 48 시간 초과 또는 70 시간 초과 동안 디펩티딜 펩티다아제 4 (DPP4)에 의한 분해에 대해 저항성이 있다.

[0064] 본 발명의 GLP1 수용체 작용제는 상기에서 언급된 생물학적 특성들 중 하나 이상 또는 이들의 임의의 조합을 보유할 수 있다. 본 발명의 단백질의 다른 생물학적 특성들은 본 출원의 실시예를 비롯한 본 개시 내용의 검토로부터 당해 분야의 통상의 기술자에게 분명해질 것이다.

[0065] 치료학적 투여 및 제형

- [0066] 본 발명은 본 발명의 GLP1 수용체 작용제를 포함하는 치료학적 조성물을 제공한다. 본 발명에 따른 치료학적 조성물은 개선된 수송, 전달, 내약성 등을 제공하도록 제형 내에 포함되는 적절한 담체, 부형제 및 기타 제제와 함께 투여될 것이다. 다수의 적절한 제형들은 모든 약사들에게 공지된 다음 처방집 (formulary)에서 발견될 수 있다: 문헌 [Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company, Easton, PA]. 이러한 제형으로는, 예를 들어, 분말, 페이스트, 연고, 젤리, 왁스, 오일, 지질, 지질 (양이온성 또는 음이온성) 함유 소포 (예를 들어, LIPOFECTIN™), DNA 컨쥬게이트, 무수 흡수 페이스트, 수중유 및 유중수 에멀전, 에멀전 카보왁스 (다양한 분자량의 폴리에틸렌 글리콜), 반고체 겔, 및 카보왁스 함유 반고체 혼합물이 포함된다. 문헌 [Powell *et al.*, "Compendium of excipients for parenteral formulations" PDA (1998) J Pharm Sci Technol 52: 238-311]을 또한 참조한다.
- [0067] GLP1 수용체 작용제의 용량은 투여되는 대상체의 연령 및 신장, 표적 질환, 병태, 투여 경로 등에 따라 달라질 수 있다. 본 발명의 항원 결합 단백질이 성인 환자에서 질환 또는 장애를 치료하거나 이러한 질환을 예방하기 위해 사용될 때, 본 발명의 항원 결합 단백질을 통상적으로는 체중 1 kg 당 약 0.001 내지 약 100 mg, 보다 바람직하게는 체중 1 kg 당 약 0.001 내지 약 60, 약 0.01 내지 약 10, 또는 약 0.01 내지 약 1 mg의 단일 용량으로 투여하는 것이 유리하다. 병태의 중증도에 따라, 치료의 빈도 및 지속 시간을 조정할 수 있다. 특정 실시형태에서, 본 발명의 항원 결합 단백질 또는 이의 항원 결합 단편은 적어도 약 0.001 mg 내지 약 100 mg, 약 0.001 내지 약 50 mg, 약 0.005 내지 약 50 mg, 약 0.01 내지 약 40 mg, 약 30 mg 또는 약 10 mg의 초기 용량으로 투여될 수 있다. 특정 실시형태에서, 상기 초기 용량에 이어서, 상기 GLP1 수용체 작용제의 제2 용량 또는 복수의 후속 용량을 상기 초기 용량 이하의 양으로 투여할 수 있으며, 여기서, 상기 후속 용량은 적어도 1일 내지 3일; 적어도 1주, 적어도 2주; 적어도 3주; 적어도 4주; 적어도 5주; 적어도 6주; 적어도 7주; 적어도 8주; 적어도 9주; 적어도 10주; 적어도 12주; 또는 적어도 14주 분리된다.
- [0068] 다양한 전달 시스템, 예를 들어, 리포솜내 캡슐화, 마이크로입자, 마이크로캡슐, 돌연변이 바이러스를 발현할 수 있는 재조합 세포, 수용체 매개된 엔도사이토시스가 공지되어 있으며, 본 발명의 약제학적 조성물을 투여하는데 사용될 수 있다 (예를 들어, 문헌 [Wu *et al.* (1987) J. Biol. Chem. 262: 4429-4432] 참조). 도입 방법으로는 진피내, 경피, 근육내, 복강내, 정맥내, 피하, 비강내, 경막의 및 경구 경로가 포함되지만, 이들에 한정되는 것은 아니다. 상기 조성물은 임의의 통상적인 경로에 의해, 예를 들어, 주입 또는 볼루스 주사에 의해, 상피 또는 점막피부 내막 (예를 들어, 구강 점막, 직장 점막 및 장 점막 등)을 통한 흡수에 의해 투여될 수 있으며, 다른 생물학적 활성제들과 함께 투여될 수 있다. 투여는 전신 또는 국소적일 수 있다. 약제학적 조성물은 또한 소포, 특히, 리포솜으로 전달될 수 있다 (예를 들어, 문헌 [Langer (1990) Science 249: 1527-1533] 참조).
- [0069] 본 발명의 GLP1 수용체 작용제를 전달하기 위한 나노입자의 사용도 또한 본 출원에서 고려된다. 단백질-컨쥬게이트된 나노입자는 치료 및 진단 용도로 모두 사용될 수 있다. 세포를 표적화하기 위해 나노입자를 개발하여 약제학적 조성물에 함유된 항원 결합 단백질에 컨쥬게이트화시킬 수 있다. 약물 전달을 위한 나노입자는 또한, 예를 들어, US 8257740 또는 US 8246995에 기재되어 있으며, 이들의 전문은 각각 본 출원에 포함된다.
- [0070] 특정한 상황에서, 약제학적 조성물은 제어 방출 시스템으로 전달될 수 있다. 하나의 실시형태에서, 펌프가 사용될 수 있다. 또 다른 실시형태에서, 중합체 물질이 사용될 수 있다. 추가의 또 다른 실시형태에서, 제어 방출 시스템은 조성물의 표적의 부근에 배치될 수 있으므로, 전신 용량의 일부만을 필요로 한다.
- [0071] 주사 가능한 제제들은 정맥내, 피하, 피내, 두개내, 복강내 및 근육내 주사, 점적 주입 등을 위한 투여 형태 (dosage form)를 포함할 수 있다. 이러한 주사 가능한 제제들은 공개적으로 공지된 방법들에 의해 제조될 수 있다. 예를 들어, 상기 주사 가능한 제제들은, 예를 들어, 주사제에 통상적으로 사용되는 멸균 수성 배지 또는 유성 배지 중에 상기에서 기재된 항원 결합 단백질 또는 이의 염을 용해, 현탁 또는 유화시켜 제조될 수 있다. 주사제용 수성 배지로서, 예를 들어, 생리 식염수, 포도당 및 기타 보조제를 함유하는 등장액 등이 있으며, 이들은 적절한 가용화제, 예를 들어, 알코올 (예를 들어, 에탄올), 다가 알코올 (예를 들어, 프로필렌 글리콜, 폴리에틸렌 글리콜), 비이온성 계면활성제 [예를 들어, 폴리소르베이트 80, HCO-50 (수소 첨가 피마자유의 폴리옥시에틸렌 (50 mol) 부가물)] 등과 조합하여 사용될 수 있다. 유성 배지로서, 예를 들어, 참기름, 대두유 등이 사용되며, 이들은 벤질 벤조에이트, 벤질 알코올 등과 같은 가용화제와 조합하여 사용될 수 있다. 이렇게 제조된 주사제는 바람직하게는 적절한 애플에 충전된다.
- [0072] 본 발명의 약제학적 조성물은 표준 바늘 및 주사기에 의해 피하 또는 정맥내로 전달될 수 있다. 또한, 피하 전달과 관련하여, 펜 전달 장치 (pen delivery device)는 본 발명의 약제학적 조성물을 전달하는데 있어서 용도를

용이하게 갖는다. 이러한 펜 전달 장치는 재사용 가능하거나 일회용일 수 있다. 재사용 가능한 펜 전달 장치는 일반적으로 약제학적 조성물을 함유하는 교체 가능한 카트리지를 이용한다. 일단 카트리지 내의 모든 약제학적 조성물이 투여되어 카트리지가 비게 되면, 빈 카트리지는 용이하게 폐기되고 약제학적 조성물을 함유하는 새로운 카트리지로 교체될 수 있다. 이어서, 상기 펜 전달 장치는 재사용될 수 있다. 일회용 펜 전달 장치에서, 교체 가능한 카트리지는 없다. 오히려, 상기 일회용 펜 전달 장치는 해당 장치 내의 저장소에 보유된 약제학적 조성물로 미리 채워진다. 일단 저장소가 약제학적 조성물을 비우면, 전체 장치는 폐기된다.

[0073] 다수의 재사용 가능한 펜 및 오토인젝터 전달 장치는 본 발명의 약제학적 조성물의 피하 전달에서 용도를 갖는다. 그 예로는, 몇 가지만 예를 들면, AUTOPEN™ (Owen Mumford, Inc., Woodstock, UK), DISETRONIC™ 펜 (Disetronic Medical Systems, Burghdorf, Switzerland), HUMALOG MIX 75/25™ 펜, HUMALOG™ 펜, HUMALIN 70/30™ 펜 (Eli Lilly and Co., Indianapolis, IN), NOVOPEN™ I, II 및 III (Novo Nordisk, Copenhagen, Denmark), NOVOPEN JUNIOR™ (Novo Nordisk, Copenhagen, Denmark), BD™ 펜 (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ), OPTIPEN™, OPTIPEN PRO™, OPTIPEN STARLET™ 및 OPTICLIK™ (Sanofi-Aventis, Frankfurt, Germany)이 포함되지만, 이들에 한정되는 것은 아니다. 본 발명의 약제학적 조성물의 피하 전달에서 용도를 갖는 일회용 펜 전달 장치의 예로는, 몇 가지만 예를 들면, SOLOSTAR™ 펜 (Sanofi-Aventis), FLEXPEN™ (Novo Nordisk) 및 KWIKPEN™ (Eli Lilly), SURECLICK™ 오토인젝터 (Amgen, Thousand Oaks, CA), PENLET™ (Haselmeier, Stuttgart, Germany), EPIPEN (Dey, L.P.) 및 HUMIRA™ 펜 (Abbott Labs, Abbott Park, IL)이 포함되지만, 이들에 한정되는 것은 아니다.

[0074] 유리하게는, 상기에서 기재된 경구 또는 비경구 사용을 위한 약제학적 조성물은 활성 성분의 용량에 맞도록 조정된 단위 용량의 투여 형태로 제조된다. 이러한 단위 용량의 투여 형태로는, 예를 들어, 정제, 환제, 캡슐, 주사제 (앰플), 좌제 등이 포함된다. 함유된 GLP1 수용체 작용제의 양은 일반적으로는 단위 용량의 투여 형태 당 약 0.001 내지 약 100 mg이고; 특히 주사제의 형태에서는 약 0.001 내지 약 100 mg으로, 다른 투여 형태에서는 약 0.01 내지 약 100 mg으로 GLP1 수용체 작용제를 함유하는 것이 바람직하다.

[0075] GLP1 수용체 작용제의 치료학적 용도

[0076] 본 발명의 GLP1 수용체 작용제는 고혈당증과 관련된 질환 또는 장애 또는 병태, 예를 들어, 당뇨병의 치료 및/또는 예방하고/하거나, 이러한 질환, 장애 또는 병태와 관련된 적어도 하나의 증상을 개선하는데 유용하다. 하나의 실시형태에서, 본 발명의 GLP1 수용체 작용제는 당뇨병 (예를 들어, 2형 당뇨병)이 있는 환자에게 치료학적 용량으로 투여될 수 있다.

[0077] 특정 실시형태에서, 본 발명의 GLP1 수용체 작용제는 진성 당뇨병, 비만증, 인슐린 저항성, 고혈압, 이상지질혈증, 2형 당뇨병, 1형 당뇨병, 당뇨병 전증, 심혈관 질환, 죽상 동맥 경화증, 울혈성 심부전, 관상동맥 심장 질환, 동맥 경화증, 말초 동맥 질환, 뇌졸중, 호흡기 기능 장애, 신장 질환, 지방간 질환, 비알코올성 지방간염 (non-alcoholic steatohepatitis: NASH) 및 대사 증후군으로 이루어진 그룹으로부터 선택된 질환 또는 장애를 앓고 있는 대상체를 치료하는데 유용하다.

[0078] 특정 실시형태에서, 본 발명의 GLP1 수용체 작용제는 과체중 또는 비만인 대상체를 치료하고/하거나 심장병, 뇌졸중 및 당뇨병과 같은 하나 이상의 비만 관련 장애를 예방 또는 치료하는데 유용하다.

[0079] 특정 실시형태에서, 본 발명의 GLP1 수용체 작용제는 당뇨병을 앓고 있는 대상체를 치료하고/하거나 심장병, 뇌졸중, 신장 질환, 망막병증, 실명 및 신경 손상과 같은 당뇨병의 하나 이상의 합병증을 예방하는데 유용하다.

[0080] 본 발명의 하나 이상의 GLP1 수용체 작용제 단백질을 당뇨병 (예를 들어, 2형 당뇨병)의 발병 위험이 있는 대상체에게 예방학적으로 사용하는 것도 또한 본 출원에서 고려된다. 상기 위험이 있는 대상체로는 고령의 대상체, 임산부, 및 비만, 높은 혈중 콜레스테롤, 흡연, 과도한 알코올 소비 및/또는 운동 부족의 가족력을 비롯한 하나 이상의 위험 인자를 갖는 대상체가 포함되지만, 이들에 한정되는 것은 아니다.

[0081] 추가의 실시형태에서, 본 발명의 단백질은 당뇨병 및 비만과 같은 질환 또는 장애를 앓고 있는 환자를 치료하기 위한 약제학적 조성물 또는 약제의 제조에 사용된다. 본 발명의 또 다른 실시형태에서, 본 발명의 GLP1 수용체 작용제는 당뇨병 (예를 들어, 2형 당뇨병)과 같은 고혈당증과 관련된 질환 또는 장애를 치료 또는 개선하는데 유용한 당해 분야의 숙련자에게 공지된 임의의 다른 제제 또는 임의의 다른 요법과 함께 보조 요법으로 사용된다.

[0082] 조합 요법

- [0083] 조합 요법은 본 발명의 GLP1 수용체 작용제와, 본 발명의 GLP1 수용체 작용제 또는 본 발명의 생물학적 활성 단편과 유리하게 조합될 수 있는 임의의 추가의 치료제를 포함할 수 있다. 본 발명의 GLP1 수용체 작용제는 고혈당증과 관련된 임의의 질환 또는 장애 (예를 들어, 당뇨병)를 치료하는데 사용되는 하나 이상의 약물 또는 요법과 상승 작용하도록 조합될 수 있다. 일부 실시형태에서, 본 발명의 GLP1 수용체 작용제는 대상체에서 혈당 수준을 감소시키거나 당뇨병의 하나 이상의 증상을 개선하기 위해 제2 치료제와 조합될 수 있다.
- [0084] 본 발명의 GLP1 수용체 작용제는 인슐린 (인슐린 또는 인슐린 유사체), 인슐린 증감제, 예를 들어, 비구아니드 (예를 들어, 메트포르민) 및 티아졸리디온 (예를 들어, 로시글리타존), 인슐린 분비 촉진제, 예를 들어, 설폰닐우레아 (예를 들어, 클로르프로파마이드) 및 글리니드 (예를 들어, 나테글리니드), 알파-글루코시다아제 억제제 (예를 들어, 아카보스), 디펩티딜 펩티다아제 4 (DPP4) 억제제 (예를 들어, 시타글립틴), 프람린타이드, 브로모크립틴, 나트륨 포도당 공동 수송체 2 (sodium glucose cotransporter 2: SGLT-2) 억제제 (예를 들어, 카나글리플로진), 항고혈압 약물 (예를 들어, 안지오텐신 전환 효소 억제제, 안지오텐신 수용체 차단제, 이노제, 칼슘 채널 차단제, 알파-아드레날린 수용체 차단제, 엔도텔린-1 수용체 차단제, 유기 나이트레이트 및 단백질 키나아제 C 억제제), 스타틴, 아스피린, 상이한 GLP1 수용체 작용제, 식이 보충제, 또는 당뇨병을 치료 또는 관리하기 위한 임의의 다른 요법 (예를 들어, 운동)과 조합하여 사용될 수 있다. 특정 실시형태에서, 본 발명의 GLP1 수용체 작용제는 인슐린, 인슐린 유사체, 메트포르민, 로시글리타존, 피오글리타존, 클로르프로파마이드, 글리벤클라미드, 글리메피리드, 글리피지드, 톨라자마이드, 톨부타마이드, 나테글리니드, 레파글리니드, 아카보스, 미글리톨, 엑세나타이드, 리라글루티드, 알비글루타이드, 둘라글루타이드, 시타글립틴, 삭사글립틴, 리나글립틴, 알로글립틴, 프람린타이드, 브로모크립틴 퀵-릴리스, 카나글리플로진, 다파글리플로진, 엠파글리플로진, 식이 조정 및 운동으로 이루어진 그룹으로부터 선택된 제2 치료제 또는 요법과 조합하여 투여될 수 있다.
- [0085] 본 출원에서 사용되는 "...와 조합하여"라는 용어는, 추가의 치료학적 활성 성분(들)이 본 발명의 GLP1 수용체 작용제의 투여 전에, 이의 투여와 동시에 또는 이의 투여 후에 투여될 수 있다는 것을 의미한다. "...와 조합하여"라는 용어는 또한 GLP1 수용체 작용제 및 제2 치료제의 순차적 투여 또는 동시적 투여를 포함한다.
- [0086] 상기 추가의 치료학적 활성 성분(들)은 본 발명의 GLP1 수용체 작용제의 투여 전에 대상체에게 투여될 수 있다. 예를 들어, 제1 성분이 제2 성분의 투여 1주 전, 72 시간 전, 60 시간 전, 48 시간 전, 36 시간 전, 24 시간 전, 12 시간 전, 6 시간 전, 5 시간 전, 4 시간 전, 3 시간 전, 2 시간 전, 1 시간 전, 30분 전, 15분 전, 10분 전, 5분 전 또는 1분 미만 전에 투여된다면, 상기 제1 성분은 상기 제2 성분 "전에" 투여되는 것으로 간주될 수 있다. 다른 실시형태에서, 상기 추가의 치료학적 활성 성분(들)은 본 발명의 GLP1 수용체 작용제의 투여 후에 대상체에게 투여될 수 있다. 예를 들어, 제1 성분이 제2 성분의 투여 1분 후, 5분 후, 10분 후, 15분 후, 30분 후, 1 시간 후, 2 시간 후, 3 시간 후, 4 시간 후, 5 시간 후, 6 시간 후, 12 시간 후, 24 시간 후, 36 시간 후, 48 시간 후, 60 시간 후, 72 시간 후에 투여된다면, 상기 제1 성분은 상기 제2 성분 "후에" 투여되는 것으로 간주될 수 있다. 추가의 다른 실시형태에서, 상기 추가의 치료학적 활성 성분(들)은 본 발명의 GLP1 수용체 작용제의 투여와 동시에 대상체에게 투여될 수 있다. 본 발명의 목적상, "동시적" 투여는, 예를 들어, 단일 투여 형태로, 또는 서로 약 30분 이하 이내로 대상체에게 투여되는 개별 투여 형태로, 대상체에게 GLP1 수용체 작용제 및 추가의 치료학적 활성 성분을 투여하는 것을 포함한다. 개별 투여 형태로 투여되는 경우, 각각의 투여 형태는 동일한 경로를 통해 투여될 수 있으며 (예를 들어, GLP1 수용체 작용제와 추가의 치료학적 활성 성분 둘 다는 정맥내 등으로 투여될 수 있음); 대안으로, 각각의 투여 형태는 상이한 경로를 통해 투여될 수 있다 (예를 들어, GLP1 수용체 작용제는 정맥내로 투여될 수 있고, 추가의 치료학적 활성 성분은 경구로 투여될 수 있음). 임의의 경우에서, 단일 투여 형태로, 동일한 경로에 의한 개별 투여 형태로, 또는 상이한 경로에 의한 개별 투여 형태로 상기 성분들을 투여하는 것은 모두 본 개시 내용의 목적상 "동시적 투여"로 간주된다. 본 개시 내용의 목적상, 추가의 치료학적 활성 성분의 투여 "전에", 이의 투여와 "동시에" 또는 이의 투여 "후에" (이들 용어는 상기 본 출원에서 정의되는 바와 같음) GLP1 수용체 작용제를 투여하는 것은 추가의 치료학적 활성 성분 "과 조합하여" GLP1 수용체 작용제를 투여하는 것으로 간주된다.
- [0087] 본 발명은, 본 발명의 GLP1 수용체 작용제가 본 출원의 다른 부분에서 기재된 바와 같은 하나 이상의 추가의 치료학적 활성 성분(들)과 함께 제형화되는 약제학적 조성물을 포함한다.
- [0088] **투여 계획**
- [0089] 특정 실시형태에 따르면, 단일 용량의 본 발명의 GLP1 수용체 작용제 (또는 GLP1 수용체 작용제와 본 출원에서 언급된 임의의 추가의 치료학적 활성제의 조합을 포함하는 약제학적 조성물)는 이를 필요로 하는 대상체에게 투여될 수 있다. 본 발명의 특정 실시형태에 따르면, 다중 용량의 GLP1 수용체 작용제 (또는 GLP1 수용체 작용제

와 본 출원에서 언급된 임의의 추가의 치료학적 활성제의 조합을 포함하는 억제학적 조성물)는 정해진 시간 경과에 걸쳐 대상체에게 투여될 수 있다. 본 발명의 이러한 양태에 따른 방법은 다중 용량의 본 발명의 GLP1 수용체 작용제를 대상체에게 순차적으로 투여하는 단계를 포함한다. 본 출원에서 사용되는 "순차적으로 투여하는"은, 각각의 용량의 GLP1 수용체 작용제가 상이한 시점에서, 예를 들어, 소정의 간격 (예를 들어, 수시간, 수일, 수주 또는 수개월)으로 분리된 상이한 날에 대상체에게 투여된다는 것을 의미한다. 본 발명은 단일 초기 용량의 GLP1 수용체 작용제에 이어 하나 이상의 2차 용량의 GLP1 수용체 작용제 및 임의로 후속적인 하나 이상의 3차 용량의 GLP1 수용체 작용제를 환자에게 순차적으로 투여하는 단계를 포함하는 방법을 포함한다.

[0090] "초기 용량", "2차 용량" 및 "3차 용량"이라는 용어는 본 발명의 GLP1 수용체 작용제의 투여의 시간 순서를 지칭한다. 따라서, "초기 용량"은 치료 계획의 시작시 투여되는 용량 ("기준 용량"이라고도 또한 지칭함)이고; "2차 용량"은 초기 용량 이후에 투여되는 용량이며; "3차 용량"은 2차 용량 이후에 투여되는 용량이다. 상기 초기, 2차 및 3차 용량은 모두 동일한 양의 GLP1 수용체 작용제를 함유할 수 있으나, 일반적으로 투여 빈도의 관점에서는 서로 상이할 수 있다. 그러나, 특정 실시형태에서, 상기 초기, 2차 및/또는 3차 용량에 함유된 GLP1 수용체 작용제의 양은 치료 과정 동안 서로 다르다 (예를 들어, 적절하게 상향 또는 하향 조절됨). 특정 실시형태에서, 1회 이상 (예를 들어, 2, 3, 4 또는 5회)의 용량이 치료 계획의 시작시 "부하 용량"에 이어 보다 적은 빈도로 투여되는 후속 용량 (예를 들어, "유지 용량")으로 투여된다.

[0091] 본 발명의 예시적인 특정 실시형태에서, 각각의 2차 및/또는 3차 용량은 직전 용량 이후 1 내지 48 시간 (예를 들어, 1, 1½, 2, 2½, 3, 3½, 4, 4½, 5, 5½, 6, 6½, 7, 7½, 8, 8½, 9, 9½, 10, 10½, 11, 11½, 12, 12½, 13, 13½, 14, 14½, 15, 15½, 16, 16½, 17, 17½, 18, 18½, 19, 19½, 20, 20½, 21, 21½, 22, 22½, 23, 23½, 24, 24½, 25, 25½, 26, 26½ 시간 또는 그 이상)에 투여된다. 본 출원에서 사용되는 "직전 용량"이라는 문구는, 다중 투여의 순서에서, 개입 용량 (intervening dose) 없이 순서상 바로 다음 용량의 투여 전에 환자에게 투여되는 GLP1 수용체 작용제의 용량을 의미한다. 특정 실시형태에서, 각각의 2차 및/또는 3차 용량은 직전 용량 이후 매일, 2일, 3일, 4일, 5일, 6일 또는 7일 마다 투여된다. 특정 실시형태에서, 각각의 2차 및/또는 3차 용량은 직전 용량 이후 0.5주, 1주, 2주, 3주 또는 4주 마다 투여된다.

[0092] 본 발명의 이러한 양태에 따른 방법은 다수의 2차 및/또는 3차 용량의 GLP1 수용체 작용제를 환자에게 투여하는 단계를 포함할 수 있다. 예를 들어, 특정 실시형태에서는 단일 2차 용량만이 환자에게 투여된다. 다른 실시형태에서, 2회 이상 (예를 들어, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8회 또는 그 이상)의 2차 용량이 환자에게 투여된다. 마찬가지로, 예를 들어, 특정 실시형태에서는 단일 3차 용량만이 환자에게 투여된다. 다른 실시형태에서, 2회 이상 (예를 들어, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8회 또는 그 이상)의 3차 용량이 환자에게 투여된다.

[0093] 본 발명의 특정 실시형태에서, 2차 및/또는 3차 용량이 환자에게 투여되는 빈도는 치료 계획의 과정에 걸쳐 달라질 수 있다. 상기 투여 빈도는 또한 임상 검사 후 개별 환자의 필요에 따라 의사에 의해 치료 과정 동안 조정될 수 있다.

[0094] 투약량

[0095] 본 발명의 방법에 따라 대상체에게 투여되는 GLP1 수용체 작용제의 양은 일반적으로 치료학적 유효량이다. 본 출원에서 사용되는 "치료학적 유효량"이라는 용어는 다음 중 하나 이상을 초래하는 GLP1 수용체 작용제의 양을 의미한다: (a) 높은 당 수준의 정상 수준으로의 감소 (예를 들어, 80 - 130 mg/dL의 식전 혈당 수준); 및/또는 (b) 당뇨병의 하나 이상의 증상 또는 징후의 검출 가능한 개선.

[0096] GLP1 수용체 작용제의 경우, 치료학적 유효량은 약 0.001 mg 내지 약 100 mg, 예를 들어, 약 0.001 mg, 약 0.002 mg, 약 0.003 mg, 약 0.004 mg, 약 0.005 mg, 약 0.006 mg, 약 0.007 mg, 약 0.008 mg, 약 0.009 mg, 약 0.01 mg, 약 0.02 mg, 약 0.03 mg, 약 0.04 mg, 약 0.05 mg, 약 0.06 mg, 약 0.07 mg, 약 0.08 mg, 약 0.09 mg, 약 0.1 mg, 약 0.2 mg, 약 0.3 mg, 약 0.4 mg, 약 0.5 mg, 약 0.6 mg, 약 0.7 mg, 약 0.8 mg, 약 0.9 mg, 약 1 mg, 약 2 mg, 약 3 mg, 약 4 mg, 약 5 mg, 약 6 mg, 약 7 mg, 약 8 mg, 약 9 mg, 약 10 mg, 약 15 mg, 약 20 mg, 약 25 mg, 약 30 mg, 약 35 mg, 약 40 mg, 약 45 mg, 약 50 mg, 약 55 mg, 약 60 mg, 약 65 mg, 약 70 mg, 약 75 mg, 약 80 mg, 약 85 mg, 약 90 mg, 약 95 mg 또는 약 100 mg의 GLP1 수용체 작용제일 수 있다. 특정 실시형태에서, 0.005 mg 내지 50 mg, 0.005 mg 내지 30 mg, 0.005 mg 내지 10 mg, 0.1 mg 내지 10 mg, 또는 0.1 mg 내지 5 mg의 GLP1 수용체 작용제가 이를 필요로 하는 대상체에게 투여된다.

[0097] 개별 용량 내에 함유된 GLP1 수용체 작용제의 양은 대상체 체중 킬로그램 당 항체 밀리그램 (즉, mg/kg)으로 표현될 수 있다. 예를 들어, GLP1 수용체 작용제는 대상체 체중 kg 당 약 0.0001 내지 약 100 mg으로 투여될 수

있다.

[0098] 선택된 실시형태

- [0099] 실시형태 1에서, 본 발명은 (i) N-말단에 대한 아미노산의 첨가; 및 (ii) 펩타이드 서열로부터 아미노산의 결실로 이루어진 그룹으로부터 선택된 적어도 하나의 아미노산 변형을 갖는 성숙한 GLP1 (7-37) (서열 번호 4)을 포함하는 글루카곤 유사 펩타이드 1 (GLP1) 변이체를 제공하며, 여기서, 상기 GLP1 변이체는 단백질 가수분해 절단에 대한 증진된 저항성 및/또는 증진된 혈당 저하 능력을 갖는다.
- [0100] 실시형태 2에서, 본 발명은 실시형태 1에 있어서, 상기 아미노산 변형이 N-말단에 대한 알라닌 (Ala) 및 글루타민 (Gln)으로 이루어진 그룹으로부터 선택된 아미노산의 첨가를 포함하는, GLP1 변이체를 제공한다.
- [0101] 실시형태 3에서, 본 발명은 실시형태 1 또는 2에 있어서, 상기 아미노산 변형이 N-말단에 대한 Gln의 첨가를 포함하는, GLP1 변이체를 제공한다.
- [0102] 실시형태 4에서, 본 발명은 실시형태 1에 있어서, 상기 아미노산 변형이 서열 번호 4로부터 히스티딘 (His1) 또는 알라닌 (Ala2)의 결실을 포함하는, GLP1 변이체를 제공한다.
- [0103] 실시형태 5에서, 본 발명은 실시형태 1 내지 4 중 어느 한 실시형태에 있어서, 서열 번호 5, 6, 7 및 8로 이루어진 그룹으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하는, GLP1 변이체를 제공한다.
- [0104] 실시형태 6에서, 본 발명은 실시형태 5에 있어서, 서열 번호 6의 아미노산 서열을 포함하는, GLP1 변이체를 제공한다.
- [0105] 실시형태 7에서, 본 발명은 안정화 도메인에 융합된 실시형태 1 내지 6 중 어느 한 실시형태의 GLP1 변이체를 포함하는 융합 단백질을 제공하며, 여기서, 상기 안정화 도메인은 GLP1 수용체에 특이적으로 결합하고 중쇄 가변 영역 (heavy chain variable region: HCVR) 및 경쇄 가변 영역 (light chain variable region: LCVR)을 포함하는 항원 결합 단백질 또는 이의 항원 결합 단편이다.
- [0106] 실시형태 8에서, 본 발명은 실시형태 7에 있어서, 상기 GLP1 변이체가 상기 항원 결합 단백질 또는 이의 항원 결합 단편의 HCVR의 N-말단 또는 C-말단에 융합되는, 융합 단백질을 제공한다.
- [0107] 실시형태 9에서, 본 발명은 실시형태 7에 있어서, 상기 GLP1 변이체가 상기 항원 결합 단백질 또는 이의 항원 결합 단편의 LCVR의 N-말단 또는 C-말단에 융합되는, 융합 단백질을 제공한다.
- [0108] 실시형태 10에서, 본 발명은 안정화 도메인에 융합된 실시형태 1 내지 6 중 어느 한 실시형태의 GLP1 변이체를 포함하는 융합 단백질을 제공하며, 여기서, 상기 안정화 도메인은 면역글로불린 (Ig) 또는 이의 단편이다.
- [0109] 실시형태 11에서, 본 발명은 실시형태 11에 있어서, 서열 번호 9, 10, 11, 12 및 13으로 이루어진 그룹으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하는, 융합 단백질을 제공한다.
- [0110] 실시형태 12에서, 본 발명은 안정화 도메인에 융합된 GLP1 변이체를 포함하는 융합 단백질을 제공하며, 여기서, 상기 안정화 도메인은 항원 결합 단백질 또는 이의 항원 결합 단편이고, 상기 항원 결합 단백질 또는 이의 항원 결합 단편은 중쇄 가변 영역 (HCVR) 및 경쇄 가변 영역 (LCVR)을 포함한다.
- [0111] 실시형태 13에서, 본 발명은 실시형태 12에 있어서, 상기 GLP1 변이체가 상기 항원 결합 단백질 또는 이의 항원 결합 단편의 HCVR의 N-말단 또는 C-말단에 융합되는, 융합 단백질을 제공한다.
- [0112] 실시형태 14에서, 본 발명은 실시형태 12에 있어서, 상기 GLP1 변이체가 상기 항원 결합 단백질 또는 이의 항원 결합 단편의 LCVR의 N-말단 또는 C-말단에 융합되는, 융합 단백질을 제공한다.
- [0113] 실시형태 15에서, 본 발명은 실시형태 12 내지 14 중 어느 한 실시형태에 있어서, 상기 항원 결합 단백질 또는 이의 항원 결합 단편이 GLP1 수용체에 특이적으로 결합하는, 융합 단백질을 제공한다.
- [0114] 실시형태 16에서, 본 발명은 실시형태 12 내지 15 중 어느 한 실시형태에 있어서, 상기 실시형태 중 어느 한 실시형태의 GLP1 변이체를 포함하는, 융합 단백질을 제공한다.
- [0115] 실시형태 17에서, 본 발명은 실시형태 12 내지 16 중 어느 한 실시형태에 있어서, 상기 GLP1 변이체가 서열 번호 5, 6, 7 및 8로 이루어진 그룹으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하는, 융합 단백질을 제공한다.
- [0116] 실시형태 18에서, 본 발명은 실시형태 16 또는 17에 있어서, 상기 GLP1 변이체가 서열 번호 6의 아미노산 서열을 포함하는, 융합 단백질을 제공한다.

- [0117] 실시형태 19에서, 본 발명은 GLP1 변이체를 포함하는 GLP1 수용체 작용제를 제공하며, 여기서, 상기 GLP1 변이체는 안정화 도메인에 융합되고, 상기 안정화 도메인은 항원 결합 단백질 또는 이의 항원 결합 단편이고, 상기 항원 결합 단백질 또는 이의 항원 결합 단편은 중쇄 가변 영역 (HCVR) 및 경쇄 가변 영역 (LCVR)을 포함한다.
- [0118] 실시형태 20에서, 본 발명은 실시형태 19에 있어서, 상기 GLP1 변이체가 상기 항원 결합 단백질 또는 이의 항원 결합 단편의 HCVR의 N-말단 또는 C-말단에 융합되는, GLP1 수용체 작용제를 제공한다.
- [0119] 실시형태 21에서, 본 발명은 실시형태 19에 있어서, 상기 GLP1 변이체가 상기 항원 결합 단백질 또는 이의 항원 결합 단편의 LCVR의 N-말단 또는 C-말단에 융합되는, GLP1 수용체 작용제를 제공한다.
- [0120] 실시형태 22에서, 본 발명은 실시형태 19 내지 21 중 어느 한 실시형태에 있어서, 상기 항원 결합 단백질 또는 이의 항원 결합 단편이 GLP1 수용체에 특이 적으로 결합하는, GLP1 수용체 작용제를 제공한다.
- [0121] 실시형태 23에서, 본 발명은 실시형태 19 내지 22 중 어느 한 실시형태에 있어서, 실시형태 1의 GLP1 변이체를 포함하는, GLP1 수용체 작용제를 제공한다.
- [0122] 실시형태 24에서, 본 발명은 실시형태 19 내지 23 중 어느 한 실시형태에 있어서, 상기 GLP1 변이체가 서열 번호 5, 6, 7 및 8로 이루어진 그룹으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하는, GLP1 수용체 작용제를 제공한다.
- [0123] 실시형태 25에서, 본 발명은 실시형태 23 또는 24에 있어서, 상기 GLP1 변이체가 서열 번호 6의 아미노산 서열을 포함하는, GLP1 수용체 작용제를 제공한다.
- [0124] 실시형태 26에서, 본 발명은 GLP1 변이체를 포함하는 GLP1 수용체 작용제를 제공하며, 여기서, 상기 GLP1 변이체는 안정화 도메인에 융합되고, 상기 안정화 도메인은 면역글로불린 (Ig) 또는 이의 단편이다.
- [0125] 실시형태 27에서, 본 발명은 실시형태 26에 있어서, 서열 번호 9, 10, 11, 12 및 13으로 이루어진 그룹으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하는, GLP1 수용체 작용제를 제공한다.
- [0126] 실시형태 28에서, 본 발명은 실시형태 1 내지 27 중 어느 한 실시형태의 단백질과 약제학적으로 허용되는 담체 또는 희석제를 포함하는 약제학적 조성물을 제공한다.
- [0127] 실시형태 29에서, 본 발명은 실시형태 1 내지 6 중 어느 한 실시형태에 제시된 GLP1 변이체를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드 서열을 포함하는 단리된 폴리뉴클레오타이드 분자를 제공한다.
- [0128] 실시형태 30에서, 본 발명은 실시형태 10 내지 11 중 어느 한 실시형태에 제시된 융합 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드 서열을 포함하는 단리된 폴리뉴클레오타이드 분자를 제공한다.
- [0129] 실시형태 31에서, 본 발명은 실시형태 26 내지 27 중 어느 한 실시형태에 제시된 GLP1 수용체 작용제를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드 서열을 포함하는 단리된 폴리뉴클레오타이드 분자를 제공한다.
- [0130] 실시형태 32에서, 본 발명은 실시형태 29 내지 31 중 어느 한 실시형태의 폴리뉴클레오타이드 서열을 포함하는 벡터를 제공한다.
- [0131] 실시형태 33에서, 본 발명은 실시형태 32의 벡터를 발현하는 세포를 제공한다.
- [0132] 실시형태 34에서, 본 발명은 치료학적 유효량의 실시형태 1 내지 27 중 어느 한 실시형태의 단백질을 포함하는 약제학적 조성물을 이를 필요로 하는 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는, 혈당 수준을 저하시키는 방법을 제공한다.
- [0133] 실시형태 35에서, 본 발명은 실시형태 34에 있어서, 상기 대상체가 진성 당뇨병, 비만증, 인슐린 저항성, 고혈압, 이상지질혈증, 2형 당뇨병, 1형 당뇨병, 당뇨병 전증, 심혈관 질환, 죽상 동맥 경화증, 울혈성 심부전, 관상동맥 심장 질환, 동맥 경화, 말초 동맥 질환, 뇌졸중, 호흡기 기능 장애, 신장 질환, 지방간 질환, 비알코올성 지방간염 (NASH) 및 대사 증후군으로 이루어진 그룹으로부터 선택된 질환 또는 장애를 갖는, 방법을 제공한다.
- [0134] 실시형태 36에서, 본 발명은 2형 당뇨병의 적어도 하나의 증상, 징후 또는 합병증을 예방, 치료 또는 개선하는 방법을 제공하며, 여기서, 상기 방법은 치료학적 유효량의 실시형태 1 내지 27 중 어느 한 실시형태의 단백질을 포함하는 약제학적 조성물을 이를 필요로 하는 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는, 방법을 제공한다.
- [0135] 실시형태 37에서, 본 발명은 실시형태 36에 있어서, 상기 적어도 하나의 증상, 징후 또는 합병증이 고혈당 수준, 과도한 갈증, 배뇨 증가, 소변 중 케톤의 존재, 피로, 체중 변동, 흐린 시력, 치유가 느린 통증, 빈번한

감염, 붓거나 허약한 잇몸, 비만, 심장병, 뇌졸중, 신장병, 안 질환, 신경 손상 및 고혈압으로 이루어진 그룹으로부터 선택되는, 방법을 제공한다.

[0136] 실시형태 38에서, 본 발명은 실시형태 34 내지 37 중 어느 한 실시형태에 있어서, 상기 억제학적 조성물이 제2 치료제 또는 요법과 조합하여 투여되는, 방법을 제공한다.

[0137] 실시형태 39에서, 본 발명은 실시형태 38에 있어서, 상기 제2 치료제 또는 요법이 인슐린 또는 인슐린 유사체, 비구아니드 (예를 들어, 메트포르민), 티아졸리딘디온, 설폰닐우레아 (예를 들어, 클로르프로파마이드), 글리니드 (예를 들어, 나테글리니드), 알파 글루코시다아제 억제제, DPP4 억제제 (예를 들어, 시타글립틴), 프람핀타이드, 브로모크립틴, SGLT2 억제제 (예를 들어, 카나글리플로진), 항고혈압 약물, 스타틴, 아스피린, 식이 조정, 운동 및 식이 보충제로 이루어진 그룹으로부터 선택되는, 방법을 제공한다.

[0138] 실시형태 40에서, 본 발명은 실시형태 34 내지 39 중 어느 한 실시형태에서, 상기 억제학적 조성물이 피하, 정맥내, 진피내, 복강내, 경구 또는 근육내 투여되는, 방법을 제공한다.

[0139] **실시예**

[0140] 하기 실시예들은, 본 발명의 방법 및 조성물을 제조하고 사용하는 방법에 대한 완전한 개시 내용 및 설명을 당해 분야의 통상의 기술자들에게 제공하기 위해 제시되는 것이며, 본 발명자들이 본 발명으로 간주하는 것의 범위를 한정하는 것으로 의도되지 않는다. 사용된 수치 (예를 들어, 양, 온도 등)에 관하여 정확성을 기하기 위해 노력하였으나, 일부 실험적 오차와 편차들을 설명하여야 한다. 달리 명시되지 않는다면, 부는 중량부이고, 분자량은 평균 분자량이고, 온도는 섭씨 온도이고, 실온은 약 25°C이고, 압력은 대기압 또는 대기압 부근이다.

[0141] **실시예 1: GLP1을 포함하는 예시적인 융합 단백질**

[0142] GLP1 (7-37)은 디펩티딜 펩티다아제 4 (DPP4) 효소에 의한 급속한 불활성화로 인해 매우 짧은 순환 반감기 (1~2 분)를 갖는다. 이전 연구는 GLP1 (7-37)의 8번 위치에서의 다양한 아미노산 치환이 DPP4에 대해 더욱 저항성을 만들어 보다 긴 반감기를 부여한다는 것을 보여 주었다 (문헌 [Deacon et al 1998, Diabetologia 41: 271-278]). 그러나, DPP4 절단에 대한 이들 분자의 잔류 감수성이 존재한다. 따라서, DPP4에 대해 여전히 보다 저항성이 있는 새로운 분자를 개발할 필요성이 존재한다.

[0143] DPP4에 대한 보다 우수한 저항성을 부여하기 위해, 기술의 제1 부분은 N-말단에 대한 아미노산 (즉, Ala, Gln)의 부가 또는 펩타이드 서열 내의 His7 또는 Ala8의 결실에 의해 GLP1의 아미노 말단을 연장 또는 단축시키는 돌연변이를 도입하여 DPP4 절단에 대해 보다 우수한 저항성을 제공하는 것이다. 이들 변형은 또한 GLP1 활성을 약화시키며, 기술의 제2 부분은 항-GLP1R 항체 경쇄 서열의 N-말단에 펩타이드를 융합시킴으로써 항-GLP1R 항체를 사용하여 약화된 작용제를 수용체에 연결하여 감소된 활성을 보상하는 것이다. 개념 증명으로서, 변형된 GLP1 (7-37) 리간드 서열을 GLP1R 항체의 경쇄의 N-말단에 하기에서 기재된 바와 같이 융합시켰다.

[0144] 성숙한 GLP1은 전장 GLP1 (서열 번호 3)의 아미노산 7 내지 37번을 포함하는 31개 아미노산 펩타이드 호르몬이며, HAEGTFTSDVSSYLEGQAQKEFIWLKGRG (서열 번호 4)의 아미노산 서열을 갖는다.

[0145] 성숙한 GLP1을 아미노산 말단에서 아미노산 결실 또는 부가에 의해 변형하여 GLP1 변이체를 생성하였다. 예시적인 GLP1 변이체는 하기와 같이 주어진다:

[0146] ● HEGTFTSDVSSYLEGQAQKEFIWLKGRG (서열 번호 5)의 아미노산 서열을 포함하는 Des-Ala-GLP1

[0147] ● QHAEGTFTSDVSSYLEGQAQKEFIWLKGRG (서열 번호 6)의 아미노산 서열을 포함하는 Q-GLP1

[0148] ● AHAEGTFTSDVSSYLEGQAQKEFIWLKGRG (서열 번호 7)의 아미노산 서열을 포함하는 A-GLP1

[0149] ● AEGTFTSDVSSYLEGQAQKEFIWLKGRG (서열 번호 8)의 아미노산 서열을 포함하는 desH-GLP1

[0150] 상기 GLP1 변이체의 가능한 감소된 활성을 보상하기 위해, 이들을 항-GLP1R 항체를 사용하여 GLP1 수용체 (GLP1R)에 또는 항체 Fc 단편에 연결하였다. 성숙한 GLP1 또는 GLP1 변이체를 포함하는 예시적인 융합 단백질은 서열 번호 2의 중쇄 가변 영역 및 서열 번호 1의 경쇄 가변 영역 (LCVR)을 포함하는 항-GLP1 수용체 항체 (이하, "mAb1"로서 지칭됨; 미국 출원공개 US 2006/0275288 [Abbott Laboratories])의 경쇄의 N-말단에 성숙한 GLP1 또는 GLP1 변이체를 융합시킴으로써 생성되었으며, 하기와 같이 열거된다:

[0151] ● Des-Ala-GLP1-mAb1: mAb1의 경쇄의 N-말단에 융합된 Des-Ala-GLP1 (서열 번호 5)

- [0152] ● Q-GLP1-mAb1: mAb1의 경쇄의 N-말단에 융합된 Q-GLP1 (서열 번호 6)
- [0153] ● A-GLP1-mAb1: mAb1의 경쇄의 N-말단에 융합된 A-GLP1 (서열 번호 7)
- [0154] 성숙 GLP1 또는 GLP1 변이체와 면역글로불린 Fc 단편을 포함하는 융합 단백질도 또한 생성되었으며 하기와 같이 열거된다:
- [0155] ● GLP1-hFc (서열 번호 9)
- [0156] ● A-GLP1-hFc (서열 번호 10)
- [0157] ● Q-GLP1-hFc (서열 번호 11)
- [0158] ● Des-Ala-GLP1-hFc (서열 번호 12)
- [0159] ● desH-GLP1-hFc (서열 번호 13)
- [0160] **대조군 작제물**
- [0161] **비교군:** 문헌 [Glaesner et al., 2010, Diabetes Metab. Res. Rev. 26: 287-296]에 개시된 바와 같이 hIgG4 Fc 도메인에 융합된 LY2189265의 아미노산 서열 특성을 갖는 GLP1 유사체 (둘라글루타이드; Eli Lilly)를 하기 실시예에서 비교군 (서열 번호 14)으로 사용하였다.
- [0162] **실시예 2: 루시퍼라아제 검정**
- [0163] cAMP에 반응하는 cre 프로모터의 제어하에 루시퍼라아제 암호화 서열과 함께 사람 GLP1 수용체를 안정적으로 발현하는 293/FSC11/Cre-Luc 리포터 세포주에서 cAMP 생성을 자극하는 능력에 대해 GLP1 융합 단백질을 시험하였다.
- [0164] 루시퍼라아제 생물학적 검정을 위해, 293/FSC11/Cre-Luc GLP1R 안정한 세포를 0.1% FBS로 보충된 OPTIMEM 중에서 웰 당 30,000개의 세포로 96-웰 검정 플레이트에 씨딩한 후, 5% CO₂하에 37° C에서 밤새 인큐베이션 처리하였다. 다음날, 시험 단백질의 용량 반응을 결정하기 위해, 사람 GLP1 (Phoenix # 028-13), des-Ala-GLP1-mAb1, Q-GLP1-mAb1 또는 A-GLP1-mAb1을 상기 검정에서 시험하였다. 변형된 항체를 암호화하는 벡터에 의한 CHO 세포의 일시적 형질 감염 후 배양 배지로부터 직접 사용된 A-GLP1-mAb1을 제외하고, 모든 시험 화합물은 정제된 단백질이었다. 배양 배지 중의 물질을 ELISA로 정량화하였다. 시험 샘플을 0.02 pM 내지 100 nM 범위의 농도로 세포에 첨가하였다.
- [0165] 5% CO₂하에 37° C에서 5.5 시간 또는 밤새 인큐베이션 처리 후, OneGlo 시약 (Promega, # E6051)을 샘플에 첨가한 다음, Victor X (Perkin Elmer) 플레이트 리더를 사용하여 루시퍼라아제 활성을 측정하였다. Prism 6 소프트웨어 (GraphPad)에 의한 비선형 회귀 (3개의 파라미터)를 사용하여 상기 결과들을 분석하여 EC₅₀ 값을 수득하였다.
- [0166] 표 1에서 나타낸 바와 같이, Q- 및 A-변형된 mAb1 항체 융합은 GLP1R 활성화에 대해 각각 204 pM 및 312 pM의 EC50 값을 나타낸다.

표 1

GLP1 융합 단백질에 대한 EC50

GLP1 융합 단백질	EC50
des-Ala-GLP1-mAb1	10 nM
Q-GLP1-mAb1	0.204 nM
A-GLP1-mAb1	0.312 nM
GLP1-hFc	0.147 nM
A-GLP1-hFc	120 nM
Q-GLP1-hFc	135 nM
Des-Ala-GLP1-hFc	검출 불가
Des-H-GLP1-hFc	2560 nM
비교군	0.59 nM

[0167]

[0168] des-Ala-GLP1-mAb1에 대한 EC50은 10 nM이었다. Q- 및 A-GLP1-hFc에 대한 EC50은 단지 135 nM 및 120 nM인 반면, Des A-GLP1-hFc에 대한 EC50은 검출 불가능하다.

[0169] 실시예 3: GLP1R 사람화 마우스에서 혈당 및 포도당 내성에 대한 GLP1R 항체에 융합된 Q-GLP1의 효과

[0170] 혈당 및 포도당 내성에 대한 항-GLP1R 항체 (Q-GLP1-mAb1)의 경쇄의 N-말단에 융합된 Q-GLP1의 효과를 사람 GLP1R 단백질을 발현하는 유전자 조작된 마우스 ("GLP1R 사람화 마우스")에서 결정하였다. 31 마리의 GLP1R 사람화 마우스를 7 내지 8 마리의 동물의 4개의 그룹으로 나누었다. 각 그룹은 194 nmol/kg으로 이소타입 대조군, Q-GLP1-hFc, mAb1 또는 Q-GLP1-mAb1의 단일 피하 주사를 받았다. 혈당 측정을 위해 0, 1, 4, 7, 11, 14, 16, 18 및 22일째에 공급 조건에서 마우스를 채혈하였다. 각 시점에서 혈당 수준의 평균 \pm SEM을 각 그룹에 대해 계산하고 표 2에 나타냈다.

표 2

혈당 수준

	시간 (일)	이소타입 대조군	Q-GLP1-hFc	mAb1	Q-GLP1-mAb1
혈당 (mg/dL)	0	188 \pm 6	188 \pm 5	188 \pm 6	186 \pm 8
	1	185 \pm 3	184 \pm 8	193 \pm 8	133 \pm 4
	4	182 \pm 9	193 \pm 9	180 \pm 7	128 \pm 5
	7	187 \pm 6	199 \pm 9	178 \pm 7	132 \pm 4
	11	180 \pm 4	192 \pm 6	183 \pm 8	152 \pm 4
	14	174 \pm 6	185 \pm 8	184 \pm 7	145 \pm 4
	16	179 \pm 6	193 \pm 7	183 \pm 7	156 \pm 4
	18	172 \pm 7	184 \pm 8	161 \pm 7	154 \pm 6
	22	174 \pm 6	188 \pm 7	181 \pm 9	171 \pm 7

[0171]

[0172] 볼루스 포도당 위관 영양 후 0, 15, 30, 60 및 120분에서의 혈당 측정과 함께, 밤새 금식 후 3일 및 9일째에 경구 포도당 내성 시험 (oral glucose tolerance test: oGTT)을 수행하였다. 각 시점에서 혈당 수준의 평균 \pm SEM 및 곡선하 포도당 면적 (glucose area under curve: AUC)을 각 그룹에 대해 계산하고 표 3 및 4에 나타냈다.

표 3

3 일째 혈당 수준 및 혈당 AUC

	시간 (분)	이소타입 대조군	Q-GLP1-hFc	mAb1	Q-GLP1-mAb1
혈당 (mg/dL)	0	143 \pm 6	147 \pm 5	143 \pm 8	111 \pm 5
	15	242 \pm 13	252 \pm 19	233 \pm 16	193 \pm 11
	30	233 \pm 9	235 \pm 8	217 \pm 8	160 \pm 6
	60	187 \pm 8	195 \pm 7	200 \pm 12	129 \pm 4
	120	151 \pm 7	160 \pm 7	159 \pm 10	115 \pm 4
혈당 AUC (mg/dL*120 분)		22884 \pm 594	23756 \pm 681	23229 \pm 959	16556 \pm 386

[0173]

표 4

9 일째 혈당 수준 및 혈당 AUC

	시간 (분)	이소타입 대조군	Q-GLP1-hFc	m Ab1	Q-GLP1-mAb1
혈당 (mg/dL)	0	143 ± 4	151 ± 3	147 ± 5	116 ± 4
	15	281 ± 17	269 ± 15	253 ± 15	203 ± 13
	30	207 ± 5	228 ± 15	223 ± 14	167 ± 14
	60	200 ± 7	187 ± 5	207 ± 8	139 ± 10
	120	155 ± 5	173 ± 11	157 ± 6	131 ± 7
혈당 AUC (mg/dL*120 분)		23589 ± 610	23869 ± 795	23959 ± 696	17852 ± 920

[0174]

[0175]

정상 혈당성 GLP1R 사람화 마우스에서 Q-GLP1-mAb1의 단일 투여는 14일 동안 유의한 포도당 감소를 초래한 반면, Q-GLP1-hFc 또는 mAb1은 혈당 수준에 영향을 미치지 않았다 (표 2). Q-GLP1-mAb1은 마우스에서 공복 포도당 수준을 감소시키고 3일 및 9일째에 포도당 내성을 향상시켰지만, Q-GLP1-hFc 및 mAb1은 그렇지 않았다. 이들 데이터는 Q-GLP1 또는 mAb1 항체 단독이 혈당 조절을 변화시키지는 않지만, 이들 2개의 융합 분자가 정상 혈당 동물에서 단일 주사로 2주 동안 지속되는 포도당 저하 효과를 발휘할 수 있다는 것을 시사한다.

[0176]

실시예 4: GLP1 변이체의 안정성

[0177]

다양한 GLP1 변이체 및 융합 단백질을 혈청 프로테아제와 함께 인큐베이션 처리하고 절단 펩타이드를 질량 분석 방법으로 분석함으로써 이들의 안정성을 시험하였다.

[0178]

제1 실험에서, 각 GLP1 융합 단백질의 절반 μg 을 각각 50 μL 의 미경험 (naive) 마우스 혈청에 첨가하였다. 이어서, 상기 혼합물을 각각 37° C에서 6 시간 및 24 시간 동안 인큐베이션 처리하였다. 0분, 6 시간 및 24 시간에 1 μL 의 혈청 혼합물을 Tris-Glycine 겔에 로딩하였다.

[0179]

제2 실험에서, 안정성을 추가로 구별하기 위해, 2 μg 의 각 GLP1 융합 단백질을 각각 37° C에서 0분, 1 시간, 4 시간 및 72 시간 동안 PBS (pH 7.4) 중에서 500 ng의 재조합 사람 DPP4 (R & D system)과 함께 인큐베이션 처리하였다. 상기 혼합물의 1/5 (400 ng의 작제물에 상당)을 Tris-Glycine 겔에 로딩하였다.

[0180]

각 실험의 경우, 각 작제물의 분자량에 상응하는 겔 절편을 절제하여 겔내 트립신 분해를 실시하였다. 절제된 겔 조각을 50:50 아세트오니트릴: NH_4HCO_3 (50 mM) 중에서 탈염색하고, 37° C에서 30분 동안 65 mM 디티오프레이톨 (Sigma)로 감소시킨 후, 암실에서 30분 동안 실온에서 135 mM 요오도아세트아미드 (Sigma)로 알킬화시켰다. 이어서, 단백질을 37° C에서 서열 분석 등급 변형 돼지 트립신 (Promega)으로 밤새 분해하였다. 펩타이드를 추출 완충액 (50% ACN, H_2O 중의 5% 포름산)으로 2회 추출하였다. 각 밴드로부터 추출된 펩타이드를 SpeedVac에서 완전히 건조하여 nanoLC-MS/MS 분석 전에 0.1% 테트라플루오로아세트산 (TFA)으로 재구성하였다.

[0181]

재구성된 펩타이드 혼합물을 온라인 역상 (RP) 나노 규모 모세관 액체 크로마토그래피 (Easy-nLC1000, Thermo Fisher Scientific)로 분리하고, 전기 분무 직렬 질량 분광법 (Orbitrap Elite, Thermo Fisher Scientific)으로 분석하였다. 상기 펩타이드 혼합물을 250 nL/분의 유속으로 75 μm 내경의 "PepMap RSLC" 컬럼 (C18, 25 cm, 100 Å, 2 μm , Thermo Fisher Scientific)에 주입한 후, 0.1% 포름산 중의 2% 내지 35% ACN 중에서 60분 구배로 용출시켰다. MS와 MS/MS 획득 사이를 자동으로 스위칭하기 위해 질량 분광계를 데이터 종속 모드로 작동시켰다. 조사 풀 스캔 MS 스펙트럼 (survey full scan MS spectra; m/z 350 내지 2000)을 Orbitrap에서 120,000의 해상도로 획득하였다. 5000의 목표치에서 35%의 규격화된 충돌 에너지를 갖는 충돌 유도 분해 (collision induced dissociation: CID)를 사용하여 가장 강한 이온 (최대 10)을 하이브리드 이온 트랩에서 단편화를 위해 순차적으로 분리하였다. MS/MS에 대해 이미 선택된 표적 이온을 30초 동안 동적으로 배제하였다.

[0182]

ProteomeDiscoverer 1.4 (Thermo Fisher Scientific)를 사용하여 MS 및 MS/MS 피크 목록을 추출하고 사내 단백질 데이터베이스에 대해 검색하였다. 모든 검색은 트립신 분해를 가정하고, 고정 변형으로서 시스테인의 카르복시메틸화, 및 가변 변형으로서 메티오닌의 산화를 고려하였다. 10 ppm의 펩타이드 질량 허용치, 0.8 Da의 MS/MS 질량 허용치 및 최대 1개의 미스 절단 (miss cleavage)에 대한 허용량을 사용하였다. Thermo Xcaliber 소프트웨어 (Thermo Fisher Scientific)를 사용하여, 추출된 이온 영역을 추출된 이온 크로마토그램 (XIC)에 기

초하여 계산하였다.

결과

혈청 효소 절단에 대한 각 작제물의 감수성을 특성화하기 위해, 각 작제물에 대한 온전한 펩타이드 (N-말단 펩타이드), 절단 펩타이드 (절단 후의 N-말단 펩타이드) 및 하나의 내부 기준 펩타이드 (작제물에서의 임의의 변형에 대해 민감하지 못한 안정한 펩타이드)를 나노 LC-MS/MS에 의해 모니터링하였다. 온전한 펩타이드 대 기준 펩타이드의 감소 비율 및 수반되는 절단 펩타이드 대 기준 펩타이드의 증가 비율은 시간 경과에 따른 작제물의 효소 매개성 절단을 제안하였다. 절단 퍼센트를 다음 식을 사용하여 계산하였다: $100 \times \text{절단 펩타이드의 면적} / (\text{절단 펩타이드의 면적} + \text{비절단 펩타이드의 면적})$

GLP1-hFc 및 A-GLP1-hFc는 6 시간까지 완전히 절단된 반면, desH-GLP1-hFc는 6 시간까지 뚜렷한 절단 (2%)을 나타냈다. Q-GLP1-hFc 및 비교군은 24 시간 인큐베이션 처리 후 어떠한 절단도 나타내지 않았다 (표 5).

표 5

선택된 GLP1 수용체 작용제의 절단 %

	6 시간 내의 절단 %	24 시간 내의 절단 %
GLP1-hFc	100%	100%
desH-GLP1-hFc	2%	5%
Q-GLP1-hFc	0%	0%
A-GLP1-hFc	100%	100%
비교군	0%	0%

Q-GLP1-hFc와 비교군의 안정성을 추가로 구별하기 위해, 2개의 작제물을 재조합 사람 DPP4와 혼합하고, 임의의 작제물에 대한 온전한 펩타이드 (N-말단 펩타이드), 절단 펩타이드 (절단 후의 N-말단 펩타이드) 및 하나의 내부 기준 펩타이드 (작제물에서의 임의의 변형에 대해 민감하지 못한 안정한 펩타이드)를 나노 LC-MS/MS에 의해 모니터링하였다.

표 6

DPP4에 대한 선택된 GLP1 수용체 작용제의 안정성

	4 시간 후의 절단 %	72 시간 후의 절단 %
Q-GLP1-hFc	0%	0%
비교군	4%	41%

비교군은 4 시간까지 뚜렷한 절단 (4%) 및 72 시간까지 40% 초과 절단을 나타냈다 (표 6). 대조적으로, Q-GLP1-hFc는 37° C에서 DPP4와의 72 시간 인큐베이션 처리 후에도 어떠한 절단도 나타내지 않았다.

본 발명은 본 출원에서 기재된 특정 실시형태들에 의해 범위가 한정되지 않는다. 실제로, 본 출원에서 기재된 변형들을 비롯한 본 발명의 다양한 변형들은 상기 설명 및 첨부된 도면으로부터 당해 분야의 통상의 기술자들에게 명백해질 것이다. 이러한 변형들은 첨부된 청구범위내에 포함되는 것으로 의도된다.

서열 목록

<110> Regeneron Pharmaceuticals, Inc.

<120> Glucagon-Like Peptide 1 Receptor

Agonists and Uses Thereof

<130> 10377US01

<160> 14

<170> KoPatentIn 3.0

<210> 1

<211> 120

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> VH for Comparator

<400> 1

Gln Val Thr Leu Lys Glu Ser Gly Pro Gly Ile Leu Gln Pro Ser Gln

1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ser Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ser Thr Ser

20 25 30

Gly Thr Gly Val Gly Trp Ile Arg Gln Pro Ser Gly Lys Gly Leu Glu

35 40 45

Trp Leu Ser His Ile Trp Trp Asp Asp Val Lys Arg Tyr Asn Pro Ala

50 55 60

Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ser Arg Asp Thr Ser Tyr Ser Gln Val

65 70 75 80

Phe Leu Arg Ile Ala Ser Val Asp Thr Ala Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr

85 90 95

Cys Ala Arg Ile Leu Asp Gly Thr Gly Pro Met Asp Tyr Trp Gly Gln

100 105 110

Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 2

<211> 108

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> VL for Comparator

<400> 2

Gln Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser Ala Ser Pro Gly

1 5 10 15

Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Ser Ala Ser Ser Arg Val Thr Tyr Met

20 25 30

His Trp Tyr Gln Gln Arg Ser Gly Thr Ser Pro Lys Arg Trp Ile Tyr

35 40 45

Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser

50 55 60

Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Met Glu Ala Glu

65 70 75 80

Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Gly Asn Asn Pro Gln Tyr

85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys Arg

100 105

<210> 3

<211> 37

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> GLP1

<400> 3

His Asp Glu Phe Glu Arg His Ala Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val

1 5 10 15

Ser Ser Tyr Leu Glu Gly Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu

20 25 30

Val Lys Gly Arg Gly

35

<210> 4

<211> 31

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Mature GLP1

<400> 4

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

1 5 10 15

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

20 25 30

<210> 5

<211> 30

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Des-Ala-GLP1

<400> 5

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

1 5 10 15

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

20 25 30

<210> 6

<211> 32

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Q-GLP1

<400> 6

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

1 5 10 15

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

20 25 30

<210> 7

<211> 32

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> A-GLP1

<400> 7

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

1 5 10 15

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

20 25 30

<210> 8

<211> 30

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> des-H-GLP1

<400> 8

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

1 5 10 15

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

20 25 30

<210> 9

<211> 273

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> GLP1-3xG4S-hFc

<400> 9

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Lys

35 40 45

Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro
50 55 60

Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser
65 70 75 80

Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp
85 90 95

Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
100 105 110

Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val
115 120 125

Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
130 135 140

Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys
145 150 155 160

Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
165 170 175

Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
180 185 190

Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
195 200 205

Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
210 215 220

Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
225 230 235 240

Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
245 250 255

Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
260 265 270

Lys

<210> 10

<211> 274

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> A-GLP1-3xG4S-hFc

<400>

```

10
Ala His Ala Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu
 1           5           10           15
Gly Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly Arg Gly
      20           25           30
Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp
      35           40           45
Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly
      50           55           60

Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
65           70           75           80
Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
      85           90           95
Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
      100          105          110
Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg
      115          120          125

Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
      130          135          140
Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu
      145          150          155          160
Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
      165          170          175
Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
      180          185          190

Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
      195          200          205

```

Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
 210 215 220
 Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp
 225 230 235 240
 Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
 245 250 255

Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
 260 265 270
 Gly Lys

<210> 11

<211> 274

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Q-GLP1-3xG4S-hFc

<400> 11

Gln His Ala Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu
 1 5 10 15
 Gly Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly Arg Gly
 20 25 30

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp
 35 40 45
 Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly
 50 55 60
 Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
 65 70 75 80
 Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
 85 90 95

Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
 100 105 110
 Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg

115 120 125
Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
130 135 140
Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu
145 150 155 160

Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
165 170 175
Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
180 185 190
Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
195 200 205
Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
210 215 220

Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp
225 230 235 240
Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
245 250 255
Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
260 265 270
Gly Lys

<210> 12

<211> 272

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Des-Ala-GLP1-3xG4S-hFc

<400> 12

His Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Gly Gln
1 5 10 15
Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly Arg Gly Gly Gly
20 25 30

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Lys Thr
 35 40 45
 His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser
 50 55 60

 Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
 65 70 75 80
 Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro
 85 90 95
 Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
 100 105 110
 Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val
 115 120 125

 Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
 130 135 140
 Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr
 145 150 155 160
 Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu
 165 170 175
 Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys
 180 185 190

 Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
 195 200 205
 Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
 210 215 220
 Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser
 225 230 235 240
 Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
 245 250 255

 Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 260 265 270
 <210> 13

<211> 272

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Des-H-GLP1-3xG4S-hFc

<400> 13

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Lys Thr

35 40 45

His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser

50 55 60

Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg

65 70 75 80

Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro

85 90 95

Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala

100 105 110

Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val

115 120 125

Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr

130 135 140

Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr

145 150 155 160

Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu

165 170 175

Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys

180 185 190

Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser

195 200 205

Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
210 215 220

Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser

225 230 235 240

Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
245 250 255

Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
260 265 270

<210> 14

<211> 276

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Comparator

<400> 14

His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Glu
1 5 10 15

Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly Gly Gly Gly
20 25 30

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ala Glu
35 40 45

Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala
50 55 60

Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu
65 70 75 80

Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser
85 90 95

Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu
100 105 110

Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr
115 120 125

Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn

130

135

140

Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser

145 150 155 160

Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln

165 170 175

Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val

180 185 190

Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val

195 200 205

Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro

210 215 220

Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr

225 230 235 240

Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val

245 250 255

Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu

260 265 270

Ser Leu Gly Lys

275