



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2024-0163717
(43) 공개일자 2024년11월19일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 47/65 (2017.01) A61K 38/26 (2006.01)
A61K 47/54 (2017.01) A61P 1/00 (2006.01)
A61P 25/28 (2006.01) A61P 3/04 (2006.01)
A61P 3/10 (2006.01) C07K 14/605 (2006.01)

(52) CPC특허분류

A61K 47/65 (2017.08)
A61K 38/26 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2024-7034921

(22) 출원일자(국제) 2023년03월30일

심사청구일자 없음

(85) 번역문제출일자 2024년10월18일

(86) 국제출원번호 PCT/CN2023/085045

(87) 국제공개번호 WO 2023/186003

국제공개일자 2023년10월05일

(30) 우선권주장

PCT/CN2022/083923 2022년03월30일 중국(CN)

PCT/CN2023/084208 2023년03월27일 중국(CN)

(71) 출원인

베이징 큐엘 바이오파마슈티컬 컴퍼니 리미티드

중국 102206 베이징 창펑 디스트릭트 라이프 사이언스 파크 로드 20 빌딩 7 #101

(72) 발명자

장 유안유안

중국 102206 베이징 창펑 디스트릭트 라이프 사이언스 파크 로드 20 빌딩 7 # 101

첸 텡

중국 102206 베이징 창펑 디스트릭트 라이프 사이언스 파크 로드 20 빌딩 7 # 101

우 보

중국 102206 베이징 창펑 디스트릭트 라이프 사이언스 파크 로드 20 빌딩 7 # 101

(74) 대리인

김진희, 김태홍

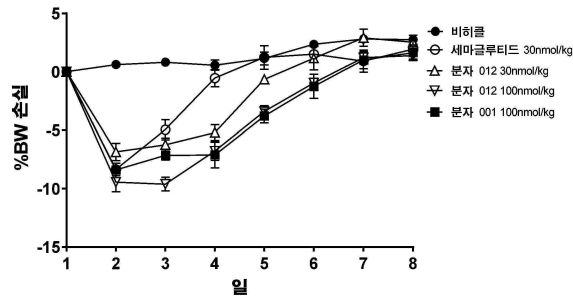
전체 청구항 수 : 총 90 항

(54) 발명의 명칭 폴리펩티드 접합체의 액체 약학 조성물 및 그의 사용 방법

(57) 요약

본 개시내용은 GLP-1 수용체 효능제 및 펩티드 링커를 포함하는 폴리펩티드 접합체, 및 상기를 포함하는 액체 약학 조성물을 제공한다. 질환을 치료하기 위해 상기를 사용하는 방법 또한 제공한다.

대표도



(52) CPC특허분류

A61K 47/542 (2017.08)

A61K 47/543 (2017.08)

A61P 1/00 (2018.01)

A61P 25/28 (2018.01)

A61P 3/04 (2018.01)

A61P 3/10 (2018.01)

C07K 14/605 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

폴리펩티드 집합체 및 약학적으로 허용되는 부형제를 포함하는 액체 약학 조성물로서,

폴리펩티드 부분은 단일 생물학적 활성 펩티드 및 펩티드 링커를 포함하고, 여기서 생물학적 활성 펩티드는 펩티드 링커의 N-말단에 부착되고 GLP-1 수용체 효능제를 포함하고;

집합체 부분은 펩티드 링커 중 제1 클리어런스 감소 모이어티(CRM) 잔기에 접합된 제1 CRM을 포함하고, 여기서 제1 CRM 잔기는 GLP-1 수용체 효능제의 C-말단 아미노산 잔기로부터 적어도 5개의 아미노산 잔기 떨어져 있는 것인 액체 약학 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, GLP-1 수용체 효능제가 GLP-1을 포함하는 것인 약학 조성물.

청구항 3

제2항에 있어서, GLP-1이, 서열 번호 1의 실질적인 생물학적 활성을 보유하면서 서열 번호 1과 적어도 70%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 것인 약학 조성물.

청구항 4

제2항 또는 제3항에 있어서, GLP-1이 $X_7X_8EGTFTSDVSSYLEX_{22}X_{23}AAX_{26}X_{27}FIX_{30}WLVX_{34}GX_{36}G$ (서열 번호 2)의 아미노산 서열을 포함하고, 여기서 X_7 은 H, 이미다졸-4-아세트이트(IA), 또는 이미다졸프로피온산(IPA)이고; X_8 은 A, G, S, V, Aib, T, I, 또는 L이고; X_{22} 은 G, 또는 E이고; X_{23} 은 Q, C 또는 K이고; X_{26} 은 K, R, 또는 C이고; X_{27} 은 E, K, 또는 C이고; X_{30} 은 A, C 또는 K이고; X_{34} 은 R, K, 또는 C이고; X_{36} 은 R 또는 G인 약학 조성물.

청구항 5

제4항에 있어서, X_7 이 H이고; X_8 이 G 또는 Aib인 약학 조성물.

청구항 6

제4항에 있어서, GLP-1이 서열 번호 3-9로 구성된 군으로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함하는 것인 약학 조성물.

청구항 7

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서, 펩티드 링커가 적어도 10개의 아미노산 잔기(예컨대, 적어도 12, 24, 32, 40, 48, 60, 또는 80개의 아미노산 잔기) 길이를 갖는 것인 약학 조성물.

청구항 8

제7항에 있어서, 펩티드 링커가 제1 CRM 잔기를 제외한, G, Q, A, E, P, S, 및 T로 구성된 군으로부터 선택되는 아미노산 잔기로 구성되는 것인 약학 조성물.

청구항 9

제7항 또는 제8항에 있어서, 펩티드 링커가 제1 서열 및 제2 서열을 포함하고, 여기서,

제1 서열은 반복 서열의 하나 이상의 반복부로 이루어지고;

제1 서열은 제2 서열의 N-말단에 연결되고;

제1 CRM 잔기는 제2 서열 중에 존재하고, 리신 잔기 또는 시스테인 잔기로부터 선택되는 것인 약학 조성물.

청구항 10

제10항에 있어서, 반복 서열이 서열 번호 10(GQEPGAQP), 서열 번호 11(GAQPGAQP), 서열 번호 12(GQEP), 서열 번호 13(GAQP), 서열 번호 14(GAQPGQEPGAQP), 서열 번호 15(GAQPGQEP), 서열 번호 16(GEQP), 서열 번호 17(GPQE), 서열 번호 18(GPEQ), 서열 번호 19(GSEP), 서열 번호 20(GESP), 서열 번호 21(GPSE), 서열 번호 22(GPES), 서열 번호 23(GQAP), 서열 번호 24(GPAQ), 서열 번호 25(GPQA), 서열 번호 26(GSQP), 서열 번호 27(GASP), 서열 번호 28(GPAS), 서열 번호 29(GPSA), 서열 번호 30(GGGS), 서열 번호 31(GSGS), 서열 번호 32(GGGGS), 서열 번호 33(GQEPGQAP), 서열 번호 34(GQAPGQEP), 서열 번호 35(SEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEG), 서열 번호 36(SEPATS), 서열 번호 37(GSETPG), 서열 번호 38(TSESAT), 서열 번호 39(PESGPG), 서열 번호 40(TSTEPS) 및 GS로 구성된 군으로부터 선택되는 서열을 갖는 것인 약학 조성물.

청구항 11

제10항에 있어서, 반복 서열이 서열 번호 13(GAQP)의 서열을 갖는 것인 약학 조성물.

청구항 12

제11항에 있어서, 반복 서열의 하나 이상의 반복부의 수가 1 내지 30의 정수(예컨대, 5, 7, 9 및 11)인 약학 조성물.

청구항 13

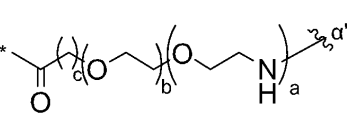
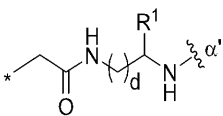
제9항 내지 제12항 중 어느 한 항에 있어서, 펩티드 링커의 제2 서열이 서열 번호 41(GQKP) 또는 서열 번호 42(GQCP)의 서열을 갖는 것인 약학 조성물.

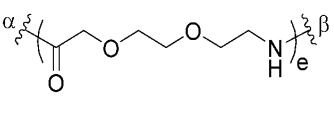
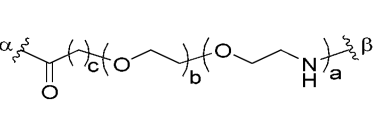
청구항 14

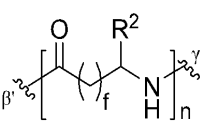
제1항 내지 제13항 중 어느 한 항에 있어서, 폴리펩티드 링커가 서열 번호 43-50, 및 82-84로 구성된 군으로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함하는 것인 약학 조성물.

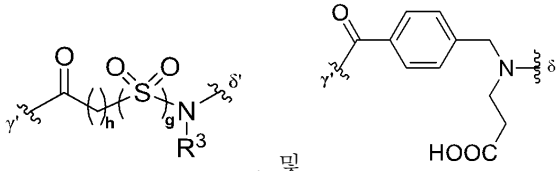
청구항 15

제1항 내지 제14항 중 어느 한 항에 있어서, 제1 CRM이 알부민 결합 모이어티를 포함하고, 상기 알부민 결합 모이어티는 *-A-B-C-D-E의 구조를 포함하고, 여기서 A, B, C, D 및 E는 아미드 결합을 통해 상호연결되고, A의 * 단부는 폴리펩티드 복합체 상의 접합가능한 잔기의 반응성 기에 연결되고,

A는 결합,  및 로부터 선택되고, a, b, c 및 d는 독립적으로 0 내지 4의 정수이고, R¹은 수소 또는 -COOH이고;

B는 결합,  , 및 로부터 선택되고, e는 1 내지 4의 정수이고, 위치 a'는 위치 β'에 연결되고,

C는 결합 또는  이고, R²는 -CH₂SO₃H 또는 -COOH이고, f는 1 내지 4의 정수이고, n은 1 내지 25의 정수이고, B가 결합이 아닌 경우 위치 β'는 위치 β에 연결되거나, 또는 B가 결합인 경우 위치 β'는 위치 α'에 연결되고;

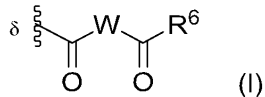


D는 결합, , 및 로부터 선택되고, g 및 h는 독립적으로 0 또는 1이고, R³은 H 또는 -CH₂COOH이고,

B가 결합이 아니고 C가 결합인 경우, 위치 γ'는 위치 β에 연결되고;

C가 결합이 아닌 경우, 위치 γ'는 위치 γ에 연결되고;

B가 결합이고 C가 결합인 경우, 위치 γ'는 위치 α'에 연결되고;

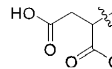


E는 화학식: (I) 을 갖는 산성 기이고,

여기서 W는 -(CR⁴R⁵)₁-을 나타내고,

R⁴ 및 R⁵는 독립적으로 수소, 할로젠, 시아노, 하이드록실, 알킬, 알케닐, 알키닐, 사이클로알킬, 헤테로사이클릴, 아릴, 헤테로아릴, 하이드록시알킬, 아미노, 아미노알킬, 카복실, 카복실알킬, 알콕시, 아릴옥시, 및 카복사미드로 구성된 군으로부터 선택되고,

R⁶은 하이드록실 또는 NR⁷R⁸로부터 선택되고;



R⁷ 및 R⁸은 독립적으로 수소, 알킬, 하이드록실, 및 로 구성된 군으로부터 선택되고, 1은 10 내지 20의 정수이고,

D가 결합이 아닌 경우, 위치 δ는 위치 δ'에 연결되고,

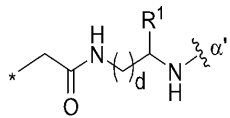
C가 결합이 아니고 D가 결합인 경우, 위치 δ는 위치 γ에 연결되고,

B가 결합이 아니고 C가 결합이고 D가 결합인 경우, 위치 δ는 위치 β에 연결되고,

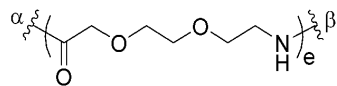
A가 결합이 아니고 B, C, 및 D 모두 결합인 경우, 위치 δ는 위치 α'에 연결되는 것인 약학 조성물.

청구항 16

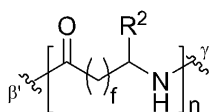
제15항에 있어서,



A가 결합 또는 이고, d가 1 내지 4의 정수이고, R¹이 수소이고;



B가 결합 또는 이고, e가 1 내지 4의 정수이고, 위치 α는 위치 α'에 연결되고;



C가 이고, R²가 -COOH이고, f가 1 내지 4의 정수이고, n이 1 내지 25의 정수이고, B가 결합이 아닌 경우, 위치 β'는 위치 β에 연결되거나, 또는 B가 결합인 경우, 위치 β'는 위치 α'에 연결되고;

D가 결합이고;

E와 관련하여, R^4 및 R^5 가 각각 수소이고, R^6 이 하이드록실이고, l이 10 내지 20의 정수이고, 위치 δ 가 위치 γ 에 연결되는 것인 약학 조성물.

청구항 17

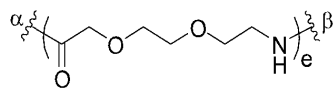
제16항에 있어서, d가 1이고, e가 2이고, f가 1이고, n이 1이고, l이 14 내지 20의 정수인 약학 조성물.

청구항 18

제17항에 있어서, l이 16인 약학 조성물.

청구항 19

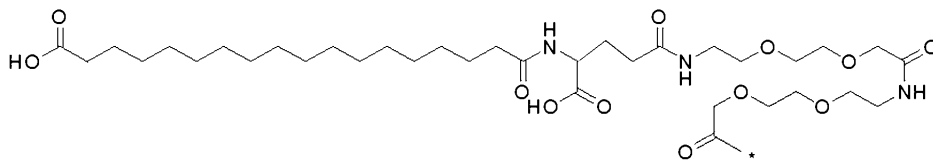
제15항 내지 제18항 중 어느 한 항에 있어서, 제1 CRM 잔기가 리신 잔기이고, 여기서 A는 결합이고, B는



인 약학 조성물.

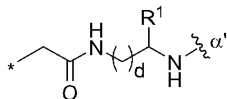
청구항 20

제19항에 있어서, 제1 CRM이 하기 화학식의 구조를 갖는, 모이어티 A (HOOC-(CH₂)₁₆-CO-gGlu-2XADO)를 포함하는 것인 약학 조성물:

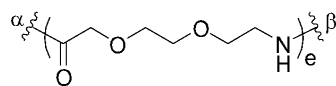


청구항 21

제15항 내지 제18항 중 어느 한 항에 있어서, 제1 CRM 잔기가 시스테인 잔기이고, 여기서 A는



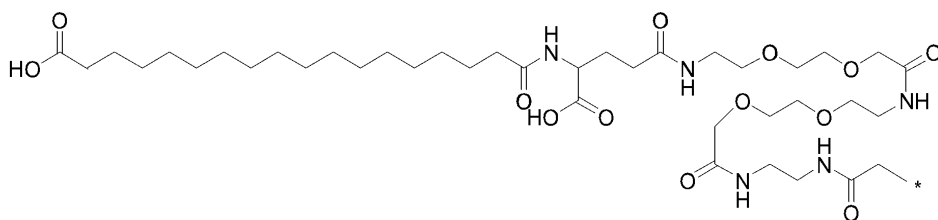
이고, B는



인 약학 조성물.

청구항 22

제21항에 있어서, 제1 CRM이 하기 화학식의 구조를 갖는, 모이어티 B (HOOC-(CH₂)₁₆-CO-gGlu-2XADO-EDA-CO-CH₂)를 포함하는 것인 약학 조성물:



청구항 23

제1항 내지 제22항 중 어느 한 항에 있어서, 제1 CRM 잔기가 리신 잔기이고, 폴리펩티드 접합체가 단 하나의 리신 잔기를 포함하는 것인 약학 조성물.

청구항 24

제1항 내지 제22항 중 어느 한 항에 있어서, 제1 CRM 잔기가 시스테인 잔기이고, 폴리펩티드 접합체가 단 하나의 시스테인 잔기를 포함하는 것인 약학 조성물.

청구항 25

제23항 또는 제24항에 있어서, GLP-1이 서열 번호 3, 5, 6, 8, 및 9로 구성된 군으로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함하는 것인 약학 조성물.

청구항 26

제25항에 있어서, 폴리펩티드 부분이 서열 번호 52, 55, 56, 60-62, 66-71, 및 75-80으로 구성된 군으로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함하고;

제1 CRM 잔기가 60, 68, 및 76으로 구성된 군으로부터 선택되는 위치의 리신 잔기 또는 시스테인 잔기인 약학 조성물.

청구항 27

제26항에 있어서,

폴리펩티드 부분이 서열 번호 52의 아미노산 서열을 포함하고, 76K에서 제1 CRM과 접합되거나;

폴리펩티드 부분이 서열 번호 55의 아미노산 서열을 포함하고, 68K에서 제1 CRM과 접합되거나;

폴리펩티드 부분이 서열 번호 56의 아미노산 서열을 포함하고, 60K에서 제1 CRM과 접합되거나;

폴리펩티드 부분이 서열 번호 60의 아미노산 서열을 포함하고, 76K에서 제1 CRM과 접합되거나;

폴리펩티드 부분이 서열 번호 61의 아미노산 서열을 포함하고, 68K에서 제1 CRM과 접합되거나;

폴리펩티드 부분이 서열 번호 62의 아미노산 서열을 포함하고, 60K에서 제1 CRM과 접합되거나;

폴리펩티드 부분이 서열 번호 66의 아미노산 서열을 포함하고, 76C에서 제1 CRM과 접합되거나;

폴리펩티드 부분이 서열 번호 67의 아미노산 서열을 포함하고, 68C에서 제1 CRM과 접합되거나;

폴리펩티드 부분이 서열 번호 68의 아미노산 서열을 포함하고, 60C에서 제1 CRM과 접합되거나;

폴리펩티드 부분이 서열 번호 69의 아미노산 서열을 포함하고, 76C에서 제1 CRM과 접합되거나;

폴리펩티드 부분이 서열 번호 70의 아미노산 서열을 포함하고, 68C에서 제1 CRM과 접합되거나;

폴리펩티드 부분이 서열 번호 71의 아미노산 서열을 포함하고, 60C에서 제1 CRM과 접합되거나;

폴리펩티드 부분이 서열 번호 75의 아미노산 서열을 포함하고, 76C에서 제1 CRM과 접합되거나;

폴리펩티드 부분이 서열 번호 76의 아미노산 서열을 포함하고, 68C에서 제1 CRM과 접합되거나;

폴리펩티드 부분이 서열 번호 77의 아미노산 서열을 포함하고, 60C에서 제1 CRM과 접합되거나;

폴리펩티드 부분이 서열 번호 78의 아미노산 서열을 포함하고, 76C에서 제1 CRM과 접합되거나;

폴리펩티드 부분이 서열 번호 79의 아미노산 서열을 포함하고, 68C에서 제1 CRM과 접합되거나; 또는

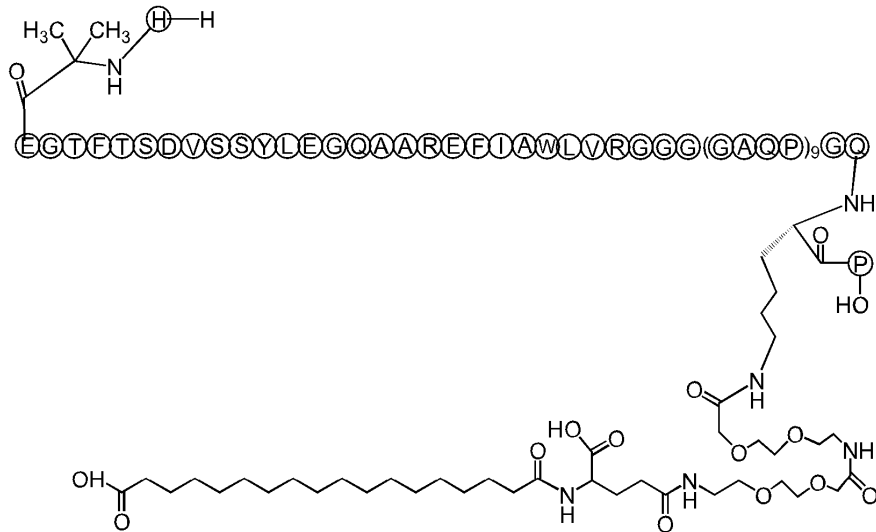
폴리펩티드 부분이 서열 번호 80의 아미노산 서열을 포함하고, 60C에서 제1 CRM과 접합되는 것인 약학 조성물.

청구항 28

제27항에 있어서, 폴리펩티드 부분이 서열 번호 52의 아미노산 서열을 포함하고, 제1 CRM 잔기가 76K인 약학 조성물.

청구항 29

제28항에 있어서, 하기 제시된 구조를 갖는 약학 조성물:

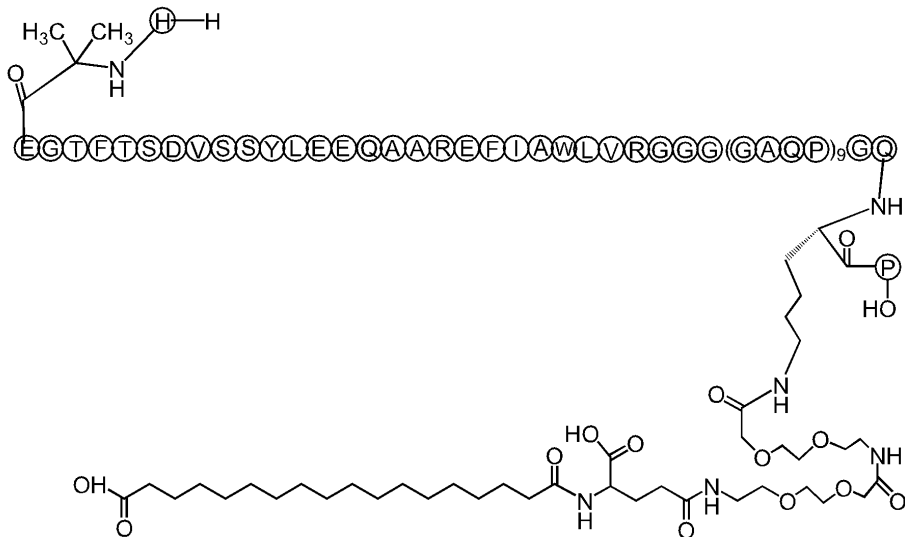


청구항 30

제27항에 있어서, 폴리펩티드 부분이 서열 번호 60의 아미노산 서열을 포함하고, 제1 CRM 잔기가 76K인 약학 조성물.

청구항 31

제30항에 있어서, 하기 제시된 구조를 갖는 약학 조성물:



청구항 32

제1항 내지 제22항 중 어느 한 항에 있어서, 접합체 부분이 폴리펩티드 부분 중 제2 CRM 잔기에 접합된 제2 CRM을 추가로 포함하는 것인 약학 조성물.

청구항 33

제32항에 있어서, 제1 CRM 잔기 및 제2 CRM 잔기가 둘 다 리신 잔기이고, 폴리펩티드 접합체가 단 2개의 리신 잔기를 포함하는 것인 약학 조성물.

청구항 34

제33항에 있어서, 제2 CRM 잔기가 GLP-1 중에 존재하고, 임의적으로 K23, K26, K27, K30 및 K34로 구성된 군으로부터 선택되는 것인 약학 조성물.

청구항 35

제34항에 있어서, 제2 CRM 잔기가 K26인 약학 조성물.

청구항 36

제32항에 있어서, 제1 CRM 잔기 및 제2 CRM 잔기가 둘 다 시스테인 잔기이고, 폴리펩티드 접합체가 단 2개의 시스테인 잔기를 포함하는 것인 약학 조성물.

청구항 37

제36항에 있어서, 제2 CRM 잔기가 GLP-1 중에 존재하고, 임의적으로 C23, C26, C27, C30 및 C34로 구성된 군으로부터 선택되는 것인 약학 조성물.

청구항 38

제37항에 있어서, 제2 CRM 잔기가 C26인 약학 조성물.

청구항 39

제32항 내지 제38항 중 어느 한 항에 있어서, 제2 CRM 잔기 및 제1 CRM 잔기가 둘 다 리신 잔기이거나, 또는 둘 다 시스테인 잔기인 약학 조성물.

청구항 40

제32항 내지 제39항 중 어느 한 항에 있어서, GLP-1이 서열 번호 3, 4, 6 및 7로 구성된 군으로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함하는 것인 약학 조성물.

청구항 41

제40항에 있어서,

폴리펩티드 부분이 서열 번호 51, 53, 54, 57-59, 63-65, 72-74, 85, 및 86으로 구성된 군으로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함하고;

제1 CRM 잔기 및 제2 CRM 잔기가 둘 다 리신 잔기 또는 시스테인 잔기이고,

제1 CRM 잔기가 68, 76, 및 84로 구성된 군으로부터 선택되는 위치에 있고;

제2 CRM 잔기가 위치 26에 있는 것인 약학 조성물.

청구항 42

제41항에 있어서,

폴리펩티드 부분이 서열 번호 51의 아미노산 서열을 포함하고, 각각 26K 및 76K에서 제1 CRM 및 제2 CRM과 접합되거나;

폴리펩티드 부분이 서열 번호 53의 아미노산 서열을 포함하고, 각각 26K 및 84K에서 제1 CRM 및 제2 CRM과 접합되거나;

폴리펩티드 부분이 서열 번호 54의 아미노산 서열을 포함하고, 각각 26K 및 68K에서 제1 CRM 및 제2 CRM과 접합되거나;

폴리펩티드 부분이 서열 번호 57의 아미노산 서열을 포함하고, 각각 26K 및 76K에서 제1 CRM 및 제2 CRM과 접합되거나;

폴리펩티드 부분이 서열 번호 58의 아미노산 서열을 포함하고, 각각 26K 및 84K에서 제1 CRM 및 제2 CRM과 접합되거나;

폴리펩티드 부분이 서열 번호 59의 아미노산 서열을 포함하고, 각각 26K 및 68K에서 제1 CRM 및 제2 CRM과 접합되거나;

폴리펩티드 부분이 서열 번호 85의 아미노산 서열을 포함하고, 각각 26K 및 96K에서 제1 CRM 및 제2 CRM과 접합되거나;

폴리펩티드 부분이 서열 번호 86의 아미노산 서열을 포함하고, 각각 26K 및 60K에서 제1 CRM 및 제2 CRM과 접합되거나;

폴리펩티드 부분이 서열 번호 63의 아미노산 서열을 포함하고, 각각 26C 및 84C에서 제1 CRM 및 제2 CRM과 접합되거나;

폴리펩티드 부분이 서열 번호 64의 아미노산 서열을 포함하고, 각각 26C 및 76C에서 제1 CRM 및 제2 CRM과 접합되거나;

폴리펩티드 부분이 서열 번호 65의 아미노산 서열을 포함하고, 각각 26C 및 68C에서 제1 CRM 및 제2 CRM과 접합되거나;

폴리펩티드 부분이 서열 번호 72의 아미노산 서열을 포함하고, 각각 26C 및 84C에서 제1 CRM 및 제2 CRM과 접합되거나;

폴리펩티드 부분이 서열 번호 73의 아미노산 서열을 포함하고, 각각 26C 및 76C에서 제1 CRM 및 제2 CRM과 접합되거나; 또는

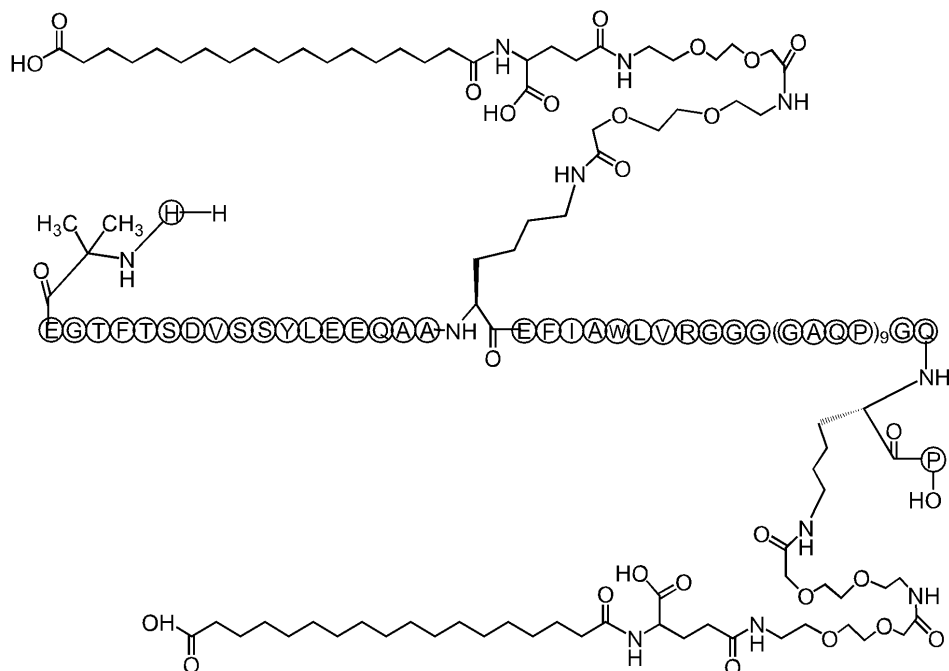
폴리펩티드 부분이 서열 번호 74의 아미노산 서열을 포함하고, 각각 26C 및 68C에서 제1 CRM 및 제2 CRM과 접합되는 것인 약학 조성물.

청구항 43

제42항에 있어서, 폴리펩티드 부분이 서열 번호 57의 아미노산 서열을 포함하고, 각각 26K 및 76K에서 제1 CRM 및 제2 CRM과 접합되는 것인 약학 조성물.

청구항 44

제43항에 있어서, 폴리펩티드 접합체가 하기 제시된 구조를 갖는 것인 약학 조성물:



청구항 45

제1항 내지 제44항 중 어느 한 항에 있어서, 약학적으로 허용되는 부형제가 완충제 및 등장화제를 포함하는 것인 약학 조성물.

청구항 46

제45항에 있어서, 완충제가 포스페이트 완충제, 시트레이트 완충제, 아세테이트 완충제, 히스티딘 완충제, 글리신 완충제, 카보네이트 완충제, 보레이트 완충제, 글루타메이트 완충제, 글리실글리신 완충제, 리신 완충제, 및 아르기닌 완충제로 구성된 군으로부터 선택되는 것인 약학 조성물.

청구항 47

제45항에 있어서, 완충제가 포스페이트 완충제인 약학 조성물.

청구항 48

제46항에 있어서, 포스페이트 완충제가 약학 조성물의 0.01-50 mM, 임의적으로 5-20 mM 또는 5-10 mM, 임의적으로 8 mM의 농도로 존재하는 것인 약학 조성물.

청구항 49

제46항 내지 제48항 중 어느 한 항에 있어서, 포스페이트 완충제가 인산이수소나트륨, 인산수소이나트륨, 인산나트륨, 또는 그의 수화물로 구성된 군으로부터 선택되는 것인 약학 조성물.

청구항 50

제49항에 있어서, 포스페이트 완충제가 인산수소이나트륨 12수화물 또는 인산이나트륨 탈수화물인 약학 조성물.

청구항 51

제50항에 있어서, 인산수소이나트륨 12수화물이 약학 조성물의 약 0.01-15 mg/mL(예컨대, 약 0.5-15 mg/mL, 약 0.5-12 mg/mL, 약 0.5-10 mg/mL, 약 0.5-5 mg/mL, 또는 약 2.87 mg/mL)의 농도로 존재하는 것인 약학 조성물.

청구항 52

제50항에 있어서, 인산이나트륨 2수화물이 약 0.1-15 mg/mL(예컨대, 약 0.5-15 mg/mL, 약 0.5-12 mg/mL, 약 0.5-10 mg/mL, 약 0.5-5 mg/mL, 또는 약 1.42 mg/mL)의 농도로 존재하는 것인 약학 조성물.

청구항 53

제45항에 있어서, 완충제가 시트레이트 완충제인 약학 조성물.

청구항 54

제53항에 있어서, 시트레이트 완충제가 약 1-50 mM의 농도로 존재하는 것인 약학 조성물.

청구항 55

제46항에 있어서, 완충제가 히스티딘 완충제인 약학 조성물.

청구항 56

제55항에 있어서, 히스티딘 완충제가 1-70 mM, 임의적으로 5-50 mM, 5-20 mM 또는 5-10 mM, 또는 임의적으로 8 mM의 농도로 존재하는 것인 약학 조성물.

청구항 57

제55항에 있어서, 히스티딘 완충제가 약 0.5-10 mg/mL(예컨대, 약 0.5-5 mg/mL, 약 1-5 mg/mL, 약 1-3 mg/mL, 또는 약 1.24 mg/mL)의 농도로 존재하는 것인 약학 조성물.

청구항 58

제45항 내지 제57항 중 어느 한 항에 있어서, 등장화제가 염화나트륨, 프로필렌 글리콜, 소르비톨, 수크로스, 글리신, 만니톨, 락토스 1수화물, 아르기닌, 미오이노시톨 및 디메틸술포스로 구성된 군으로부터 선택되는 것인 약학 조성물.

청구항 59

제58항에 있어서, 등장화제가 염화나트륨이고, 임의적으로, 염화나트륨이 약 5-15 mg/mL인 약학 조성물.

청구항 60

제58항에 있어서, 등장화제가 프로필렌 글리콜이고, 임의적으로, 프로필렌 글리콜이 약 1 mg/mL 내지 약 50 mg/mL(예컨대, 약 5 mg/mL 내지 약 25 mg/mL, 약 8 mg/mL 내지 약 16 mg/mL)인 약학 조성물.

청구항 61

제58항에 있어서, 등장화제가 만니톨이고, 임의적으로, 만니톨이 약 30 mg/mL 내지 약 50 mg/mL인 약학 조성물.

청구항 62

제45항 내지 제61항 중 어느 한 항에 있어서, 약학적 부형제가 보존제, 킬레이트화제, 및/또는 안정제를 추가로 포함하는 것인 약학 조성물.

청구항 63

제45항 내지 제62항 중 어느 한 항에 있어서, 약학 조성물의 pH가 약 6.5 내지 약 8.3(예컨대, 약 6.5 내지 7.4, 또는 7.4 내지 8.3)인 약학 조성물.

청구항 64

제63항에 있어서, 약학 조성물의 pH가 약 7.4인 약학 조성물.

청구항 65

제32항 내지 제64항 중 어느 한 항에 있어서, 약학 조성물이 약 1-80 mg/ml, 1-100 mg/ml, 또는 1-120 mg/ml, 또는 임의적으로, 5-40 mg/ml, 5-80 mg/mL, 5-100 mg/ml, 또는 5-120 mg/ml의 폴리펩티드 접합체(예컨대, 약 5-90 mg/mL, 약 5-70 mg/mL, 약 5-60 mg/mL, 약 5-50 mg/mL, 약 5-30 mg/mL, 약 5-20 mg/mL, 약 5-10 mg/mL)를 갖는 것인 약학 조성물.

청구항 66

제23항 내지 제31항, 및 제45항 내지 제64항 중 어느 한 항에 있어서, 약학 조성물이 약 0.5-20 mg/ml, 0.5-50 mg/ml 또는 0.5-80 mg/ml의 폴리펩티드 접합체를 갖는 것인 약학 조성물.

청구항 67

제1항 내지 제66항 중 어느 한 항에 있어서,

폴리펩티드 접합체;

포스페이트 완충제, 시트레이트 완충제, 아세테이트 완충제, 히스티딘 완충제, 글리신 완충제, 카보네이트 완충제, 보레이트 완충제, 글루타메이트 완충제, 글리실글리신 완충제, 리신 완충제, 및 아르기닌 완충제로 구성된 군으로부터 선택되는 완충제;

염화나트륨, 글리세롤, 소르비톨, 수크로스, 프로필렌 글리콜, 만니톨, 글리신, 락토스 1수화물, 아르기닌, 미오이노시톨 및 디메틸술포로 구성된 군으로부터 선택되는 등장화제를 포함하고;

pH가 약 6.5 내지 약 8.3인 약학 조성물.

청구항 68

제32항 내지 제65항 중 어느 한 항에 있어서,

약 1-80 mg/mL, 1-100 mg/ml 또는 1-120 mg/mL의 폴리펩티드 접합체로서, 폴리펩티드 접합체의 폴리펩티드 부분이 서열 번호 57의 아미노산 서열을 포함하고, 각각 26K 및 76K에서 제1 CRM 및 제2 CRM과 접합되는 폴리펩티드 접합체;

포스페이트 완충제, 시트레이트 완충제, 및 히스티딘 완충제로 구성된 군으로부터 선택되는 완충제;

염화나트륨, 프로필렌 글리콜, 만니톨로 구성된 군으로부터 선택되는 등장화제를 포함하고;

pH가 약 6.5 내지 약 8.3인 약학 조성물.

청구항 69

제32항 내지 제65항 중 어느 한 항에 있어서,

약 1-80 mg/mL, 1-100 mg/ml 또는 1-120 mg/mL의 폴리펩티드 접합체로서, 폴리펩티드 접합체의 폴리펩티드 부분이 서열 번호 57의 아미노산 서열을 포함하고, 각각 26K 및 76K에서 제1 CRM 및 제2 CRM과 접합되는 폴리펩티드 접합체;

포스페이트 완충제, 시트레이트 완충제, 및 히스티딘 완충제로 구성된 군으로부터 선택되는 완충제;

5-15 mg/ml 염화나트륨, 1-50 mg/mL 프로필렌 글리콜, 및 30-50 mg/mL 만니톨로 구성된 군으로부터 선택되는 등장화제를 포함하고;

pH가 약 6.5 내지 약 8.3인 약학 조성물.

청구항 70

제32항 내지 제65항 중 어느 한 항에 있어서,

약 1-80 mg/mL, 1-100 mg/ml 또는 1-120 mg/mL의 폴리펩티드 접합체로서, 폴리펩티드 접합체의 폴리펩티드 부분이 서열 번호 57의 아미노산 서열을 포함하고, 각각 26K 및 76K에서 제1 CRM 및 제2 CRM과 접합되는 폴리펩티드 접합체;

약 0.5-5 mg/mL 포스페이트 완충제, 약 1-50 mM 시트레이트 완충제, 또는 약 0.5-10 mg/mL 히스티딘 완충제;

염화나트륨, 프로필렌 글리콜, 만니톨로 구성된 군으로부터 선택되는 등장화제를 포함하고; pH가 약 6.5 내지 약 8.3인 약학 조성물.

청구항 71

제32항 내지 제65항 중 어느 한 항에 있어서,

약 1-80 mg/mL, 1-100 mg/ml 또는 1-120 mg/mL의 폴리펩티드 접합체로서, 폴리펩티드 접합체의 폴리펩티드 부분이 서열 번호 57의 아미노산 서열을 포함하고, 각각 26K 및 76K에서 제1 CRM 및 제2 CRM과 접합되는 폴리펩티드 접합체;

약 0.5-5 mg/mL 포스페이트 완충제, 약 1-50 mM 시트레이트 완충제, 또는 약 0.5-10 mg/mL 히스티딘 완충제;

5-15 mg/ml 염화나트륨, 1-50 mg/mL 프로필렌 글리콜, 및 30-50 mg/mL 만니톨로 구성된 군으로부터 선택되는 등장화제를 포함하고;

pH가 약 6.5 내지 약 8.3인 약학 조성물.

청구항 72

제32항 내지 제65항 중 어느 한 항에 있어서,

약 5-80 mg/mL, 5-100 mg/ml 또는 5-120 mg/mL의 폴리펩티드 접합체로서, 폴리펩티드 접합체의 폴리펩티드 부분이 서열 번호 57의 아미노산 서열을 포함하고, 각각 26K 및 76K에서 제1 CRM 및 제2 CRM과 접합되는 폴리펩티드 접합체;

약 0.5-5 mg/mL 포스페이트 완충제, 약 1-50 mM 시트레이트 완충제, 또는 약 0.5-10 mg/mL 히스티딘 완충제;

5-15 mg/ml 염화나트륨, 1-50 mg/mL 프로필렌 글리콜, 및 30-50 mg/mL 만니톨로 구성된 군으로부터 선택되는 등장화제를 포함하고;

pH가 약 6.5 내지 약 8.3인 약학 조성물.

청구항 73

제23항 내지 제31항, 제45항 내지 제64항 및 제66항 중 어느 한 항에 있어서,

약 0.5-20 mg/mL, 0.5-50 mg/ml 또는 0.5-80 mg/ml의 폴리펩티드 접합체로서, 폴리펩티드 접합체의 폴리펩티드 부분이 서열 번호 60 또는 서열 번호 52의 아미노산 서열을 포함하고, 76K에서 제1 CRM과 접합되는 폴리펩티드 접합체;

포스페이트 완충제, 시트레이트 완충제, 및 히스티딘 완충제로 구성된 군으로부터 선택되는 완충제;

염화나트륨, 프로필렌 글리콜, 만니톨로 구성된 군으로부터 선택되는 등장화제를 포함하고;

pH가 약 6.5 내지 약 8.3인 약학 조성물.

청구항 74

제23항 내지 제31항, 제45항 내지 제64항 및 제66항 중 어느 한 항에 있어서,

약 0.5-20 mg/mL, 0.5-50 mg/ml 또는 0.5-80 mg/ml의 폴리펩티드 접합체로서, 폴리펩티드 접합체의 폴리펩티드 부분이 서열 번호 60 또는 서열 번호 52의 아미노산 서열을 포함하고, 76K에서 제1 CRM과 접합되는 폴리펩티드 접합체;

약 0.5-5 mg/mL 포스페이트 완충제, 약 1-50 mM 시트레이트 완충제, 또는 약 0.5-10 mg/mL 히스티딘 완충제;

염화나트륨, 프로필렌 글리콜, 만니톨로 구성된 군으로부터 선택되는 등장화제를 포함하고;

pH가 약 6.5 내지 약 8.3인 약학 조성물.

청구항 75

제23항 내지 제31항, 제45항 내지 제64항 및 제66항 중 어느 한 항에 있어서,

약 0.5-20 mg/mL, 0.5-50 mg/ml 또는 0.5-80 mg/ml의 폴리펩티드 접합체로서, 폴리펩티드 접합체의 폴리펩티드 부분이 서열 번호 60 또는 서열 번호 52의 아미노산 서열을 포함하고, 76K에서 제1 CRM과 접합되는 폴리펩티드 접합체;

포스페이트 완충제, 시트레이트 완충제, 및 히스티딘 완충제로 구성된 군으로부터 선택되는 완충제;

5-15 mg/ml 염화나트륨, 1-50 mg/mL 프로필렌 글리콜, 및 30-50 mg/mL 만니톨로 구성된 군으로부터 선택되는 등장화제를 포함하고;

pH가 약 6.5 내지 약 8.3인 약학 조성물.

청구항 76

제23항 내지 제31항, 제45항 내지 제64항 및 제66항 중 어느 한 항에 있어서,

약 0.5-20 mg/mL, 0.5-50 mg/ml 또는 0.5-80 mg/ml의 폴리펩티드 접합체로서, 폴리펩티드 접합체의 폴리펩티드 부분이 서열 번호 60 또는 서열 번호 52의 아미노산 서열을 포함하고, 76K에서 제1 CRM과 접합되는 폴리펩티드 접합체;

약 0.5-5 mg/mL 포스페이트 완충제, 약 1-50 mM 시트레이트 완충제, 또는 약 0.5-10 mg/mL 히스티딘 완충제;

5-15 mg/ml 염화나트륨, 1-50 mg/mL 프로필렌 글리콜, 및 30-50 mg/mL 만니톨로 구성된 군으로부터 선택되는 등장화제를 포함하고;

pH가 약 6.5 내지 약 8.3인 약학 조성물.

청구항 77

제1항 내지 제76항 중 어느 한 항의 약학 조성물을 투여하는 단계를 포함하는, 대사 장애 예방 또는 치료를 필요로 하는 피험체에서 대사 장애를 예방 또는 치료하는 방법.

청구항 78

제77항에 있어서, 대사 장애가 당뇨병, 비만, 과체중, 비알콜성 지방간염(NASH), 심혈관의 질환 예컨대 이상지

질혈증, 동맥경화증, 알콜성 지방간염(ASH), 당뇨병성 신장병증, 임신성 당뇨병, 대사 증후군, 예컨대 대사 증후군 X, 비알콜성 지방간 질환(NAFLD), 말기 간 질환, 간 지방증(지방간), 간경변, 원발성 담즙성 간경변증(PBC), 또는 알츠하이머병인 방법.

청구항 79

제78항에 있어서, 당뇨병이 고혈당증, 2형 당뇨병, 내당능 장애, 1형 당뇨병, 비인슐린 의존성 당뇨병, MODY(저연령대 성숙기 발병 당뇨병), 임신성 당뇨병, 및 HbA1C 수준 상승으로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 이상의 병태를 포함하는 것인 방법.

청구항 80

제1항 내지 제76항 중 어느 한 항의 약학 조성물을 투여하는 단계를 포함하는, 체중 관리를 필요로 하는 피험체에서 체중을 관리하는 방법

청구항 81

제1항 내지 제76항 중 어느 한 항의 약학 조성물을 투여하는 단계를 포함하는, 음식 섭취 감소를 필요로 하는 피험체에서 음식 섭취를 감소시키는 방법.

청구항 82

제1항 내지 제76항 중 어느 한 항의 약학 조성물을 투여하는 단계를 포함하는, 체중 감소를 필요로 하는 피험체에서 체중을 감소시키는 방법.

청구항 83

제77항 내지 제82항 중 어느 한 항에 있어서, 피험체가 인간인 방법.

청구항 84

제83항에 있어서, 피험체의 공복 혈당 수준이 125 mg/dL 이상인 방법.

청구항 85

제83항 또는 제84항에 있어서, 피험체의 체질량 지수(BMI)가 적어도 25 이상인 방법.

청구항 86

제77항 내지 제85항 중 어느 한 항에 있어서, 약학 조성물이 1일 1회, 매 3일마다 1회, 또는 주 1회, 매 2주마다 1회, 매 3주마다 1회, 또는 월 1회보다 더 빈번하지 않은 투여 요법으로 투여되는 것인 방법.

청구항 87

제77항 내지 제85항 중 어느 한 항에 있어서, 약학 조성물이 주 2회, 주 1회, 격주로 1회, 매 3주마다 1회, 월 1회, 또는 매 2개월마다 1회 투여되는 것인 방법.

청구항 88

제77항 내지 제85항 중 어느 한 항에 있어서, 투여 요법이 약 매 3일마다 1회 내지 약 월 1회, 또는 약 주 1회 내지 약 월 1회 범위의 투여 간격을 갖는 것인 방법.

청구항 89

제77항 내지 제85항 중 어느 한 항에 있어서, 약학 조성물이 비경구적 투여를 통해 투여되는 것인 방법.

청구항 90

제77항 내지 제85항 중 어느 한 항에 있어서, 약학 조성물이 피하로, 정맥내로 또는 근육내로 투여되는 것인 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 개시내용은 일반적으로 치료용 펩티드 분야에 관한 것이며, 더욱 구체적으로 폴리펩티드 접합체, 즉, 글루카곤 유사 펩티드 1(GLP-1: glucagon-like peptide 1) 화합물, 그의 약학 조성물, 및 상기를 이용하여 대사 장애, 예컨대, 당뇨병을 예방 및/또는 치료하는 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 대사 장애 또는 대사 질환은 신체가 음식을 에너지로 적절히 전환하고, 에너지를 활용 및/또는 저장할 수 없는 것을 특징으로 하는 병태 군이며, 가장 두드러진 대사 장애는 당뇨병이다. 대사 장애는 일반적으로 인슐린 저항성, 내장 지방증, 동맥경화성 이상지질혈증 등과 연관이 있으며, 이는 전 세계적으로 증가하고 있는 주요 공중 보건 및 임상 과제를 제기한다.

[0003] 글루카곤 유사 펩티드-1(GLP-1)은 영양소 섭취에 반응하여 장내 L 세포로부터 분비되는 프로글루카곤 유래 펩티드이다. GLP-1은 주로 인크레틴, 즉, 내분비 호르몬으로 작용하여 일반적으로 글루카곤 농도를 조절하고, 위 배출을 저속화시키고, (프로-)인슐린 생합성을 자극하고, 인슐린에 대한 감수성을 증가시키고, 글리코겐의 인슐린 비의존적 생합성을 자극하는 등의 방식으로 음식을 경구 섭취한 후 인슐린 반응을 증가시킨다. GLP-1은 정상 피험체 및 당뇨병 피험체, 둘 다에서 글루코스 수준을 빠르게 저하시킬 수 있기 때문에, 2형 당뇨병을 예방 및/또는 치료하기 위한 GLP-1 기반 약학적 제제(즉, 이하 GLP-1 화합물로 지칭) 개발에 상당한 관심이 있었다.

[0004] 현재, (37개 아미노산 잔기를 갖는) 천연 형태의 인간 GLP-1은 활성이 낮고, 자연적으로 발생되고, 생물학적으로 활성인, 천연 GLP-1의 2가지 주요 말단절단된 버전은 30- 및 31-아미노산 펩티드 단편, 즉, GLP-1(7-36) 또는 GLP-1(7-37)을 포함하고, 이는 프로글루카곤 펩티드의 번역 후 프로세싱으로부터 유래하며, 주로 디펩티딜 펩티다제 DPP-IV에 의한 N-말단 절단 및 불활성화로 인해 매우 짧은 생체 내 반감기를 갖는다. 더 유리한 투여 요법을 갖춘 더 새롭고, 더 우수한 GLP-1 화합물을 개발하기 위해 엄청난 노력을 투자해 왔지만, 기존 GLP-1 화합물 및 그의 약학 조성물은 여전히 이상적인 반감기, 효능 및/또는 투여 빈도와는 거리가 멀다.

[0005] 따라서, GLP-1 화합물에 대한 개선된 디자인 및 그의 개선된 약학 조성물이 요구되고 있다.

발명의 내용

[0006] 본 발명의 개요

[0007] 본원에 제공된 것은 대사 장애를 치료/예방하기 위한 약학 조성물 및 그의 사용 방법을 포함한다.

[0008] 제1 측면에서, 본 개시내용은 폴리펩티드 접합체 및 약학적으로 허용되는 부형제를 포함하는 약학 조성물을 제공한다.

[0009] 폴리펩티드 접합체는 실질적으로 폴리펩티드 부분 및 접합체 부분을 포함한다. 폴리펩티드 부분은 단일 생물학적 활성 펩티드 및 펩티드 링커를 포함한다. 생물학적 활성 펩티드는 펩티드 링커의 N-말단에 부착되고, GLP-1 수용체 효능제를 포함한다. 접합체 부분은 펩티드 링커 중 제1 클리어런스 감소 모이어티(CRM: clearance-reducing moiety) 잔기에 접합된 제1 CRM을 포함한다.

[0010] 일부 실시양태에서, 제1 CRM 잔기는 생물학적 활성 펩티드(예컨대, GLP-1 수용체 효능제)의 C-말단 아미노산 잔기로부터 적어도 5개의 아미노산 잔기(CRM 잔기 제외), 예컨대, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 33, 35, 38, 40, 43, 45, 48, 50, 53, 55, 58, 60, 63, 65, 68, 70, 73, 75, 또는 78개의 아미노산 잔기 떨어져 있다.

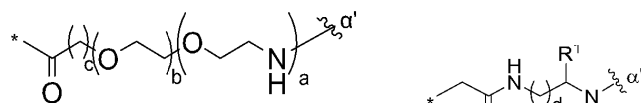
[0011] 일부 실시양태에서, GLP-1은 수용체 효능제는 GLP-1을 포함한다. 본원에서 사용되는 바, 용어 "GLP-1"은 하기 특징을 갖는 분자를 지칭한다: 분자는 실질적으로 야생형 인간 GLP-1(서열 번호 1)의 생물학적 활성을 갖고, 분자는 야생형 인간 GLP-1과 적어도 50%의 동일성의 아미노산 서열을 갖는 폴리펩티드 단편을 포함한다.

[0012] 일부 실시양태에서, GLP-1은 서열 번호 1의 실질적인 생물학적 활성을 보유하면서, 서열 번호 1과 적어도 70%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다.

[0013] 일부 실시양태에서, GLP-1은 $X_7X_8EGTFTSDVSSYLEX_{22}X_{23}AAX_{26}X_{27}FIX_{30}WLX_{34}GX_{36}G$ (서열 번호 2)의 아미노산 서열을 포

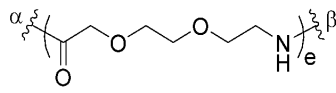
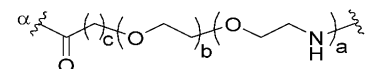
함하고, 여기서, X_7 은 H, 이미다졸-4-아세테이트(IA: imidazole-4-acetate), 또는 이미다졸프로피온산(IPA: imidazolepropionic acid)이고; X_8 은 A, G, S, V, Aib, T, I, 또는 L이고; X_{22} 는 G, 또는 E이고; X_{23} 은 Q, C 또는 K이고; X_{26} 은 K, R, 또는 C이고; X_{27} 은 E, K, 또는 C이고; X_{30} 은 A, C 또는 K이고; X_{34} 는 R, K, 또는 C이고; X_{36} 은 R 또는 G이다.

- [0014] GLP-1의 일부 실시양태에서, X_7 은 H이고; X_8 은 G 또는 Aib이다.
- [0015] 일부 실시양태에서, GLP-1은 서열 번호 1과 비교하여 A8, G22, K26, K34, 및 R36, 또는 그의 임의의 조합으로 구성된 군으로부터 선택되는 위치에 하나 이상의 돌연변이를 포함하거나, 또는 그로 구성된다.
- [0016] 일부 실시양태에서, GLP-1은 A8Aib, G22E, K26R, K34R 및 R36G, 또는 그의 임의의 조합으로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 이상의 치환을 포함하거나, 또는 그로 구성된다.
- [0017] 일부 실시양태에서, GLP-1은 서열 번호 3-9로 구성된 군으로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함한다.
- [0018] 상기 언급된 바와 같은 폴리펩티드 접합체의 임의의 실시양태에서, 펩티드 링커의 길이는 적어도 10개의 아미노산 잔기, 적어도 12, 24, 32, 40, 48, 50, 60, 70, 또는 80개의 아미노산 잔기 길이일 수 있다.
- [0019] 일부 실시양태에서, 펩티드 링커는 제1 CRM 잔기를 제외한, G, Q, A, E, P, S, 및 T로 구성된 군으로부터 선택되는 아미노산 잔기로 구성된다.
- [0020] 일부 실시양태에서, 펩티드 링커는 제1 서열 및 제2 서열을 포함한다. 제1 서열은 반복 서열로 이루어진 하나 이상의 반복부로 구성되고, 제2 서열의 N-말단에 연결된다. 제1 CRM 잔기는 제2 서열 중에 존재하고, 리신 잔기 또는 시스테인 잔기이다.
- [0021] 일부 실시양태에서, 펩티드 링커의 제1 서열 중의 반복 서열은 서열 번호 10(GQEPGAQP), 서열 번호 11(GAQPGAQP), 서열 번호 12(GQEP), 서열 번호 13(GAQP), 서열 번호 14(GAQPGQEPGAQP), 서열 번호 15(GAQPGQEP), 서열 번호 16(GEQP), 서열 번호 17(GPQE), 서열 번호 18(GPEQ), 서열 번호 19(GSEP), 서열 번호 20(GESP), 서열 번호 21(GPSE), 서열 번호 22(GPES), 서열 번호 23(GQAP), 서열 번호 24(GPAQ), 서열 번호 25(GPQA), 서열 번호 26(GSQP), 서열 번호 27(GASP), 서열 번호 28(GPAS), 서열 번호 29(GPSA), 서열 번호 30(GGGS), 서열 번호 31(GSGS), 서열 번호 32(GGGGS), 서열 번호 33(GQEPGQAP), 서열 번호 34(GQAPGQEP), 서열 번호 35(SEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEG), 서열 번호 36(SEPATS), 서열 번호 37(GSETPG), 서열 번호 38(TSESAT), 서열 번호 39(PESGPG), 서열 번호 40(STEPS) 및 GS로 구성된 군으로부터 선택되는 아미노산 서열을 갖는다.
- [0022] 일부 실시양태에서, 펩티드 링커의 제1 서열 중 반복 서열은 서열 번호 13(GAQP)의 서열을 갖는다. 본원에서 임의적으로, 반복 서열로 이루어진 하나 이상의 반복부의 개수는 1 내지 30의 정수이다. 특정 실시양태에서, 반복 서열로 이루어진 하나 이상의 반복부의 개수는 5, 7, 9 및 11로 구성된 군으로부터 선택된다.
- [0023] 특정 실시양태에서, 펩티드 링커의 제2 서열은 서열 번호 41(GQKP) 또는 서열 번호 42(GQCP)의 서열을 갖는다.
- [0024] 특정 실시양태에서, 폴리펩티드 링커는 서열 번호 43-50, 및 82-84로 구성된 군으로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함한다.
- [0025] 상기 언급된 바와 같은 폴리펩티드 접합체의 임의의 실시양태에서, 제1 CRM은 혈장 단백질 결합 모이어티, 중합체, Fc, HSA(알부민), Xten 서열, 또는 PAS 서열을 포함할 수 있다.
- [0026] 일부 실시양태에서, 제1 CRM은 알부민 결합 모이어티를 포함한다.
- [0027] 일부 실시양태에서, 알부민 결합 모이어티는 *-A-B-C-D-E의 구조를 포함하고, 여기서, A, B, C, D 및 E는 아미드 결합을 통해 상호연결되고, A의 * 단부는 폴리펩티드 복합체 상의 접합가능한 잔기의 반응성 기에 연결된다.

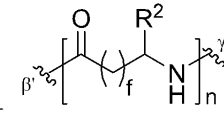


- [0028] 본원에서, A는 결합, 및 로부터 선택되고, 여기서, a, b, c 및 d는 독립적으로 0 내지 4의 정수이고, R^1 은 수소 또는 $-COOH$ 이다.

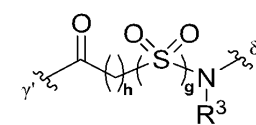
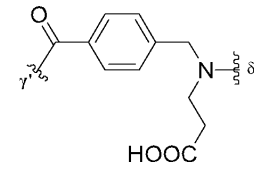
[0029]

본원에서, B는 결합,  , 및  로부터 선택되고, 여기서, e는 1 내지 4의 정수이고, 여기서, 위치 α는 위치 α'에 연결된다.

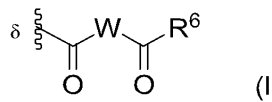
[0030]

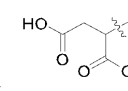
본원에서, C는 결합 또는  이고, 여기서, R²는 -CH₂SO₃H 또는 -COOH이고, f는 1 내지 4의 정수이고, n은 1 내지 25의 정수이고, 여기서, B가 결합이 아닌 경우, 이때 위치 β'는 위치 β에 연결되거나, 또는 B가 결합인 경우, 이때 위치 β'는 위치 α'에 연결된다.

[0031]

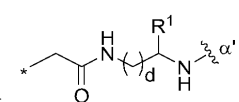
본원에서, D는 결합,  , 및  로부터 선택되고, 여기서, g 및 h는 독립적으로 0 또는 1이고, R³은 H 또는 -CH₂COOH이다. 본원에서, B가 결합이 아니고, C가 결합인 경우, 이때 위치 γ'는 위치 β에 연결되고; C가 결합이 아닌 경우, 이때 위치 γ'는 위치 γ에 연결되고; B가 결합이고, C가 결합인 경우, 이때 위치 γ'는 위치 α'에 연결된다.

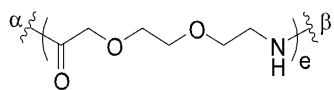
[0032]

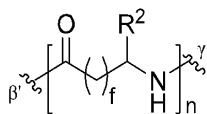
본원에서, E는 화학식:  (I) 을 갖는 산성 기이고, 여기서, W는 -(CR⁴R⁵)_l-을 나타내고, 여기서, R⁴ 및 R⁵는 독립적으로 수소, 할로젠, 시아노, 하이드록실, 알킬, 알케닐, 알키닐, 사이클로알킬, 헤테로사이클릴, 아릴, 헤테로아릴, 하이드록시알킬, 아미노, 아미노알킬, 카복실, 카복실알킬, 알콕시, 아릴옥시, 및 카복사미드로 구성된 군으로부터 선택되고, R⁶은 하이드록실 또는 NR⁷R⁸로부터 선택되고, 여기서, R⁷ 및 R⁸은 독

립적으로 수소, 알킬, 하이드록실, 및  로 구성된 군으로부터 선택되고, l은 10 내지 20의 정수이다. 본원에서, D가 결합이 아닌 경우, 이때 위치 δ는 위치 δ'에 연결되고, C가 결합이 아니고, D가 결합인 경우, 이때 위치 δ는 위치 γ에 연결되고, B가 결합이 아니고, C가 결합이고, D가 결합인 경우, 이때 위치 δ는 위치 β에 연결되고, A가 결합이 아니고, B, C, 및 D 모두 결합인 경우, 이때 위치 δ는 위치 α'에 연결된다.

[0033]

제1 CRM의 일부 실시양태에서, A는 결합 또는  이고, 여기서, d는 1 내지 4의 정수이고, R¹

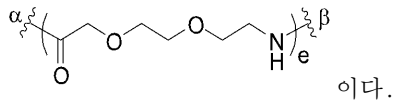
은 수소이고; B는 결합 또는  이고, 여기서, e는 1 내지 4의 정수이고, 여기서, 위

치 α는 위치 α'에 연결되고; C는  이고, 여기서, R²는 -COOH이고, f는 1 내지 4의 정수이고, n은 1 내지 25의 정수이고, B가 결합이 아닌 경우, 이때 위치 β'는 위치 β에 연결되거나, 또는 B가 결합인 경우, 이때 위치 β'는 위치 α'에 연결되고; D는 결합이고; E와 관련하여, R⁴ 및 R⁵는 각각 수소이고, R⁶은 하이드록실이고, l은 10 내지 20의 정수이고, 위치 δ는 위치 γ에 연결된다.

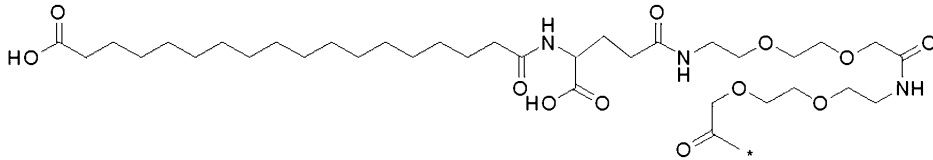
[0034] 제1 CRM의 일부 실시양태에서, d는 1이고, e는 2이고, f는 1이고, n은 1이고, l은 14 내지 20의 정수이다.

[0035] 제1 CRM의 일부 실시양태에서, l은 16이다.

[0036] 폴리펩티드 접합체의 일부 실시양태에서, 제1 CRM 잔기는 리신 잔기이고, 여기서, A는 결합이고 B는

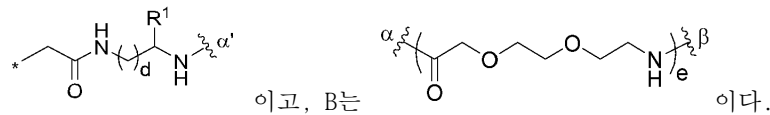


[0037] 일부 실시양태에서, 제1 CRM은 모이어티 A가 하기 화학식의 구조를 갖는, 모이어티 A (HOOC-(CH₂)₁₆-CO-gGlu-2XADO)를 포함한다:

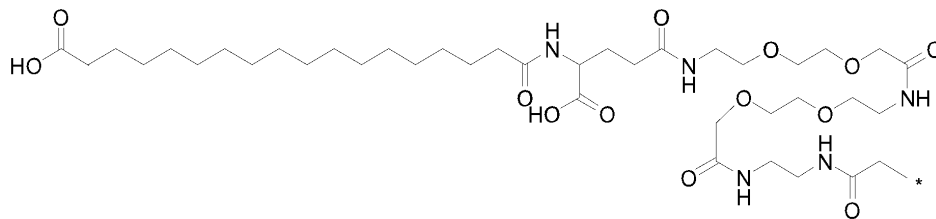


[0038]

[0039] 폴리펩티드 접합체의 일부 실시양태에서, 제1 CRM 잔기는 시스테인 잔기이고, 여기서, A는



[0040] 일부 실시양태에서, 제1 CRM은 모이어티 B가 하기 화학식의 구조를 갖는, 모이어티 B (HOOC-(CH₂)₁₆-CO-gGlu-2XADO-EDA-CO-CH₂)를 포함한다:



[0041]

[0042] 특정 실시양태에서, 본원에 제공된 폴리펩티드 접합체는 단일 접합되고, 펩티드 링커에 접합되지만, 생물학적 활성 펩티드(예컨대, GLP-1)에는 접합되지 않은 CRM을 갖는다.

[0043] 단일 접합된 폴리펩티드 접합체의 일부 실시양태에서, 제1 CRM 잔기는 리신 잔기이고, 폴리펩티드 접합체는 단 하나의 리신 잔기를 포함한다.

[0044] 단일 접합된 폴리펩티드 접합체의 일부 실시양태에서, 제1 CRM 잔기는 시스테인 잔기이고, 폴리펩티드 접합체는 단 하나의 시스테인 잔기를 포함한다.

[0045] 일부 실시양태에서, GLP-1은 서열 번호 3, 5, 6, 8, 및 9로 구성된 군으로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함한다.

[0046] 본원에서, 일부 실시양태에서, 폴리펩티드 부분은 서열 번호 52, 55, 56, 60-62, 66-71, 및 75-80으로 구성된 군으로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함하고; 제1 CRM 잔기는 60, 68, 및 76으로 구성된 군으로부터 선택되는 위치의 리신 잔기 또는 시스테인 잔기이다.

[0047] 하기는 본원에 개시된 단일 접합된 폴리펩티드 접합체의 특정 실시양태를 열거한다:

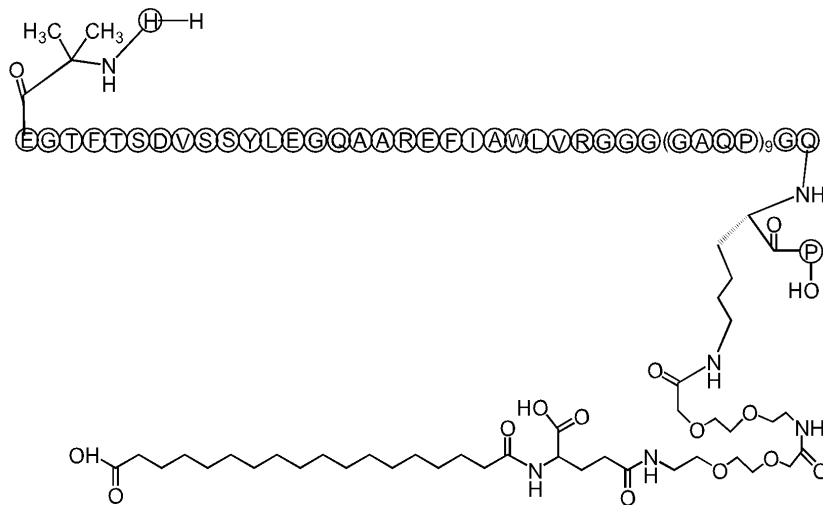
[0048] 폴리펩티드 부분은 서열 번호 52의 아미노산 서열을 포함하고, 76K에서 제1 CRM과 접합되거나;

[0049] 폴리펩티드 부분은 서열 번호 55의 아미노산 서열을 포함하고, 68K에서 제1 CRM과 접합되거나;

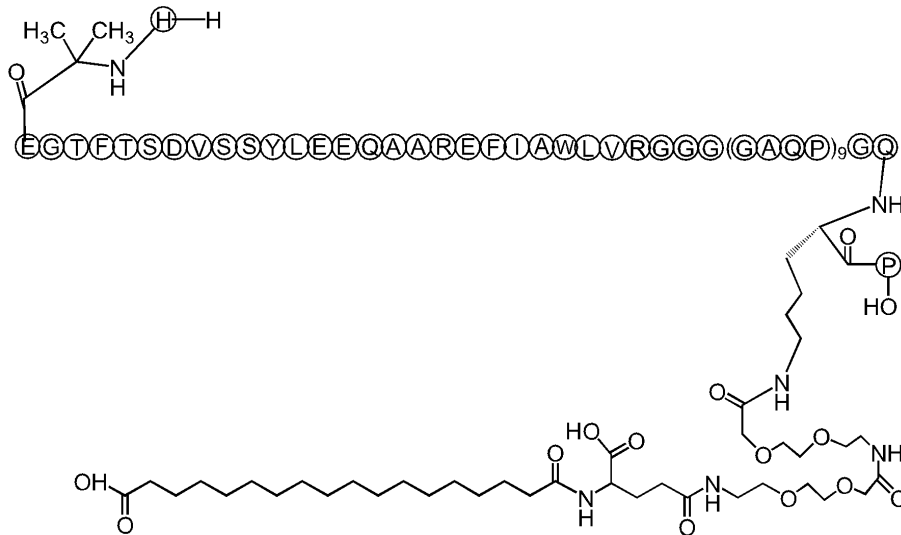
[0050] 폴리펩티드 부분은 서열 번호 56의 아미노산 서열을 포함하고, 60K에서 제1 CRM과 접합되거나;

[0051] 폴리펩티드 부분은 서열 번호 60의 아미노산 서열을 포함하고, 76K에서 제1 CRM과 접합되거나;

- [0052] 폴리펩티드 부분은 서열 번호 61의 아미노산 서열을 포함하고, 68K에서 제1 CRM과 접합되거나;
- [0053] 폴리펩티드 부분은 서열 번호 62의 아미노산 서열을 포함하고, 60K에서 제1 CRM과 접합되거나;
- [0054] 폴리펩티드 부분은 서열 번호 66의 아미노산 서열을 포함하고, 76C에서 제1 CRM과 접합되거나;
- [0055] 폴리펩티드 부분은 서열 번호 67의 아미노산 서열을 포함하고, 68C에서 제1 CRM과 접합되거나;
- [0056] 폴리펩티드 부분은 서열 번호 68의 아미노산 서열을 포함하고, 60C에서 제1 CRM과 접합되거나;
- [0057] 폴리펩티드 부분은 서열 번호 69의 아미노산 서열을 포함하고, 76C에서 제1 CRM과 접합되거나;
- [0058] 폴리펩티드 부분은 서열 번호 70의 아미노산 서열을 포함하고, 68C에서 제1 CRM과 접합되거나;
- [0059] 폴리펩티드 부분은 서열 번호 71의 아미노산 서열을 포함하고, 제1 CRM이 60C에서 제1 CRM과 접합되거나;
- [0060] 폴리펩티드 부분은 서열 번호 75의 아미노산 서열을 포함하고, 76C에서 제1 CRM과 접합되거나;
- [0061] 폴리펩티드 부분은 서열 번호 76의 아미노산 서열을 포함하고, 68C에서 제1 CRM과 접합되거나;
- [0062] 폴리펩티드 부분은 서열 번호 77의 아미노산 서열을 포함하고, 60C에서 제1 CRM과 접합되거나;
- [0063] 폴리펩티드 부분은 서열 번호 78의 아미노산 서열을 포함하고, 76C에서 제1 CRM과 접합되거나;
- [0064] 폴리펩티드 부분은 서열 번호 79의 아미노산 서열을 포함하고, 68C에서 제1 CRM과 접합되거나; 또는
- [0065] 폴리펩티드 부분은 서열 번호 80의 아미노산 서열을 포함하고, 60C에서 제1 CRM과 접합된다.
- [0066] 폴리펩티드 접합체의 특정 실시양태에서, 폴리펩티드 부분은 서열 번호 52의 아미노산 서열을 포함하고, 제1 CRM 잔기는 76K이다. 더욱 구체적으로, 폴리펩티드 접합체의 특정 실시양태는 하기 제시된 구조를 갖는다:



- [0067]
- [0068] 폴리펩티드 접합체의 특정 실시양태에서, 폴리펩티드 부분은 서열 번호 60의 아미노산 서열을 포함하고, 제1 CRM 잔기는 76K이다. 더욱 구체적으로, 폴리펩티드 접합체의 특정 실시양태는 하기 제시된 구조를 갖는다:



[0069]

[0070] 일부 실시양태에서, 폴리펩티드 접합체는 이중 접합된 폴리펩티드 접합체이고, 제2 CRM 잔기에 접합된 제2 CRM 을 추가로 포함한다.

[0071] 이중 접합된 폴리펩티드 접합체의 일부 실시양태에서, 제1 CRM 잔기 및 제2 CRM 잔기, 둘 다 리신 잔기이고, 폴리펩티드 접합체는 단 2개의 리신 잔기를 포함한다.

[0072] 본원에서 임의적으로, 제2 CRM 잔기는 GLP-1 중에 존재하고, 임의적으로 K23, K26, K27, K30 및 K34로 구성된 군으로부터 선택된다.

[0073] 일부 실시양태에서, 제2 CRM 잔기는 K26이다.

[0074] 이중 접합된 폴리펩티드 접합체의 일부 실시양태에서, 제1 CRM 잔기 및 제2 CRM 잔기, 둘 다 시스테인 잔기이고, 폴리펩티드 접합체는 단 2개의 시스테인 잔기를 포함한다.

[0075] 본원에서 임의적으로, 제2 CRM 잔기는 GLP-1 중에 존재하고, 임의적으로 C23, C26, C27, C30 및 C34로 구성된 군으로부터 선택된다.

[0076] 일부 실시양태에서, 제2 CRM 잔기는 C26이다.

[0077] 본원에서, 상기 기술된 위치(즉, K 또는 C로서 23, 26, 27, 30 및 34)는 야생형 인간 GLP-1(서열 번호 1)을 기준으로 참조되고, 그의 N-말단으로부터 시작한다.

[0078] 본원에서, 일부 실시양태에 따라, 제2 CRM은 제1 CRM과 동일하다. 일부 실시양태에서, 제2 CRM 잔기 및 제1 CRM 잔기, 둘 다 리신 잔기이거나, 또는 둘 다 시스테인 잔기이다.

[0079] 이중 접합된 폴리펩티드 접합체의 일부 실시양태에서, GLP-1은 서열 번호 3, 4, 6 및 7로 구성된 군으로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함한다.

[0080] 일부 실시양태에서, 폴리펩티드 부분은 서열 번호 51, 53, 54, 57-59, 63-65, 및 72-74, 85 및 86으로 구성된 군으로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함하고; 제1 CRM 잔기는 68, 76, 및 84로 구성된 군으로부터 선택되는 위치의 리신 잔기 또는 시스테인 잔기이고; 제2 CRM 잔기는 위치 26의 리신 잔기 또는 시스테인 잔기이다.

[0081] 하기는 본원에 개시된 이중 접합된 폴리펩티드 접합체의 특정 실시양태를 열거한다:

[0082] 폴리펩티드 부분은 서열 번호 51의 아미노산 서열을 포함하고, 각각 26K 및 76K에서 제1 CRM 및 제2 CRM과 접합되거나;

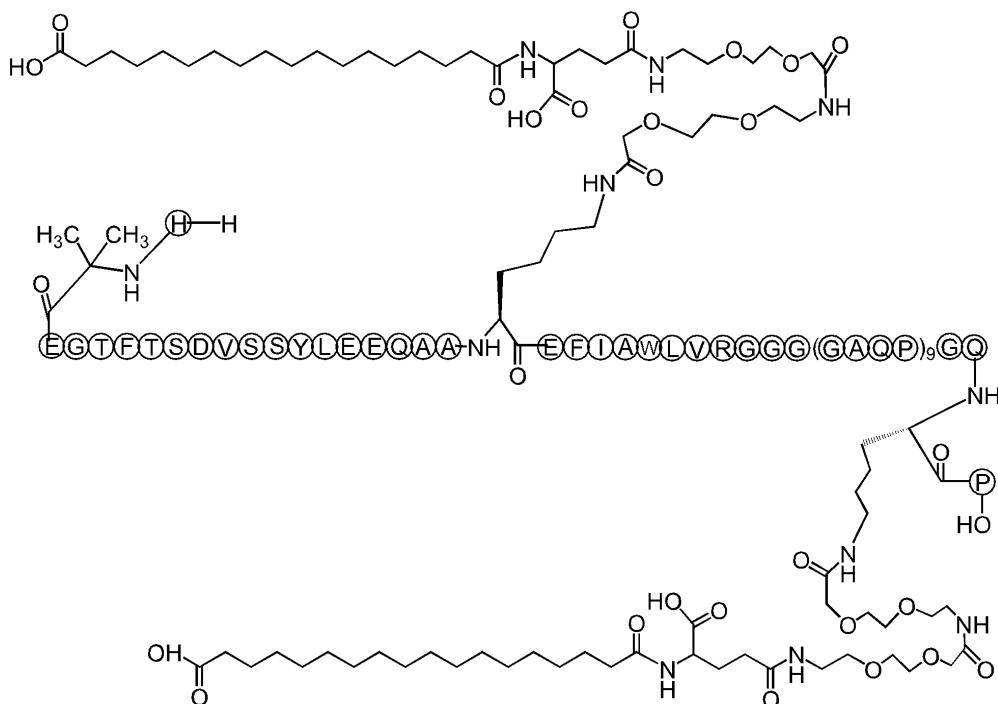
[0083] 폴리펩티드 부분은 서열 번호 53의 아미노산 서열을 포함하고, 각각 26K 및 84K에서 제1 CRM 및 제2 CRM과 접합되거나;

[0084] 폴리펩티드 부분은 서열 번호 54의 아미노산 서열을 포함하고, 각각 26K 및 68K에서 제1 CRM 및 제2 CRM과 접합되거나;

[0085] 폴리펩티드 부분은 서열 번호 57의 아미노산 서열을 포함하고, 각각 26K 및 76K에서 제1 CRM 및 제2 CRM과 접합

되거나;

- [0086] 폴리펩티드 부분은 서열 번호 58의 아미노산 서열을 포함하고, 각각 26K 및 84K에서 제1 CRM 및 제2 CRM과 접합되거나;
- [0087] 폴리펩티드 부분은 서열 번호 59의 아미노산 서열을 포함하고, 각각 26K 및 68K에서 제1 CRM 및 제2 CRM과 접합되거나;
- [0088] 폴리펩티드 부분은 서열 번호 85의 아미노산 서열을 포함하고, 각각 26K 및 96K에서 제1 CRM 및 제2 CRM과 접합되거나;
- [0089] 폴리펩티드 부분은 서열 번호 86의 아미노산 서열을 포함하고, 각각 26K 및 60K에서 제1 CRM 및 제2 CRM과 접합되거나;
- [0090] 폴리펩티드 부분은 서열 번호 63의 아미노산 서열을 포함하고, 각각 26C 및 84C에서 제1 CRM 및 제2 CRM과 접합되거나;
- [0091] 폴리펩티드 부분은 서열 번호 64의 아미노산 서열을 포함하고, 각각 26C 및 76C에서 제1 CRM 및 제2 CRM과 접합되거나;
- [0092] 폴리펩티드 부분은 서열 번호 65의 아미노산 서열을 포함하고, 각각 26C 및 68C에서 제1 CRM 및 제2 CRM과 접합되거나;
- [0093] 폴리펩티드 부분은 서열 번호 72의 아미노산 서열을 포함하고, 각각 26C 및 84C에서 제1 CRM 및 제2 CRM과 접합되거나;
- [0094] 폴리펩티드 부분은 서열 번호 73의 아미노산 서열을 포함하고, 각각 26C 및 76C에서 제1 CRM 및 제2 CRM과 접합되거나; 또는
- [0095] 폴리펩티드 부분은 서열 번호 74의 아미노산 서열을 포함하고, 각각 26C 및 68C에서 제1 CRM 및 제2 CRM과 접합된다.
- [0096] 특정 실시양태에서, 폴리펩티드 부분은 서열 번호 57의 아미노산 서열을 포함하고, 각각 26K 및 76K에서 제1 CRM 및 제2 CRM과 접합된다. 더욱 구체적으로, 폴리펩티드 접합체의 특정 실시양태는 하기 제시된 구조를 갖는다:



- [0097]
- [0098] 제1 측면에서 제공된 약학 조성물 중 폴리펩티드 접합체를 수득하기 위해, 폴리펩티드 접합체의 폴리펩티드 부

분(또는 그의 단편)을 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 디자인할 수 있으며, 이는 벡터에 작동가능하게 배열될 수 있다. 벡터는 숙주 세포, 예컨대, 원핵 세포 또는 진핵 세포에 전달될 수 있으며, 숙주 세포는 폴리뉴클레오티드의 발현을 허용하는 조건하에서 배양될 수 있고, 이로써, 폴리펩티드 접합체의 폴리펩티드 부분을 수득할 수 있다. 본원에서 임의적으로, 폴리펩티드 부분은 가용성 단백질로 발현된다. 폴리펩티드 부분을 수득한 후, CRM을 폴리펩티드 부분에 추가로 접합시켜 단일 접합 또는 이중 접합된 폴리펩티드 접합체를 수득할 수 있다.

- [0099] 또 다른 측면에서, 본원에 제공된 약학 조성물은 액체 제제이다.
- [0100] 특정 실시양태에서, 약학적으로 허용되는 부형제는 완충제 및 등장화제를 포함한다.
- [0101] 특정 실시양태에서, 완충제는 포스페이트 완충제, 시트레이트 완충제, 아세테이트 완충제, 히스티딘 완충제, 글리신 완충제, 카보네이트 완충제, 보레이트 완충제, 글루타메이트 완충제, 글리실글리신 완충제, 리신 완충제, 및 아르기닌 완충제로 구성된 군으로부터 선택된다.
- [0102] 특정 실시양태에서, 완충제는 포스페이트 완충제이다.
- [0103] 특정 실시양태에서, 포스페이트 완충제는 약학 조성물의 0.01-50 mM의 농도로 존재한다.
- [0104] 특정 실시양태에서, 포스페이트 완충제는 약학 조성물의 5-20 mM 또는 5-10 mM, 임의적으로 약 10 mM, 9 mM, 8 mM, 7 mM, 6 mM 또는 5 mM의 농도로 존재한다.
- [0105] 특정 실시양태에서, 포스페이트 완충제는 인산이수소나트륨, 인산수소이소나트륨, 인산나트륨, 또는 그의 수화물로 구성된 군으로부터 선택된다.
- [0106] 특정 실시양태에서, 수화물은 12수화물 또는 2수화물이다.
- [0107] 특정 실시양태에서, 포스페이트 완충제는 인산수소이소나트륨 12수화물 또는 인산이소나트륨 탈수화물이다.
- [0108] 특정 실시양태에서, 인산수소이소나트륨 12수화물은 약학 조성물의 약 0.1 내지 15 mg/mL, 0.5 내지 15 mg/mL, 1 내지 15 mg/mL, 0.5 내지 12 mg/mL, 0.5 내지 10 mg/mL, 0.5 내지 8 mg/mL, 0.5 내지 7 mg/mL, 또는 0.5 내지 5 mg/mL의 농도로 존재한다.
- [0109] 특정 실시양태에서, 인산수소이소나트륨 12수화물은 약학 조성물의 약 2.87 mg/mL의 농도로 존재한다.
- [0110] 특정 실시양태에서, 인산이소나트륨 2수화물은 약학 조성물의 약 0.1 내지 15 mg/mL, 0.5 내지 15 mg/mL, 1 내지 15 mg/mL, 0.5 내지 12 mg/mL, 0.5 내지 10 mg/mL, 0.5 내지 8 mg/mL, 0.5 내지 7 mg/mL, 또는 0.5 내지 5 mg/mL의 농도로 존재한다.
- [0111] 특정 실시양태에서, 인산이소나트륨 2수화물은 약 1.42 mg/mL의 농도로 존재한다.
- [0112] 특정 실시양태에서, 완충제는 시트레이트 완충제이다.
- [0113] 특정 실시양태에서, 시트레이트 완충제는 약 1-50 mM의 농도로 존재한다.
- [0114] 특정 실시양태에서, 시트레이트 완충제는 무수 시트르산 및 시트르산삼나트륨(또는 그의 수화물, 예컨대, 시트르산삼나트륨 2수화물)의 혼합물을 포함한다.
- [0115] 특정 실시양태에서, 시트레이트 완충제는 0.14 mg/mL 무수 시트르산 및 2.74 mg/mL 시트르산삼나트륨 2수화물의 혼합물을 포함한다.
- [0116] 특정 실시양태에서, 완충제는 히스티딘 완충제이다.
- [0117] 특정 실시양태에서, 히스티딘 완충제는 약학 조성물의 약 1-70 mM, 임의적으로 약 5-50 mM, 5-20 mM 또는 5-10 mM, 또는 임의적으로 약 10 mM, 9 mM, 8 mM, 7 mM, 6 mM 또는 5 mM의 농도로 존재한다.
- [0118] 특정 실시양태에서, 히스티딘 완충제는 약학 조성물의 약 0.5-10 mg/mL, 0.5-5 mg/mL, 1-5 mg/mL, 또는 1-3 mg/mL의 농도로 존재한다.
- [0119] 특정 실시양태에서, 히스티딘 완충제는 약학 조성물의 약 1.24 mg/mL의 농도로 존재한다.
- [0120] 특정 실시양태에서, 등장화제는 염화나트륨, 프로필렌 글리콜, 소르비톨, 수크로스, 글리신, 만니톨, 락토스 1수화물, 아르기닌, 미오이노시톨 및 디메틸술포로 구성된 군으로부터 선택된다.
- [0121] 특정 실시양태에서, 등장화제는 염화나트륨이다.

- [0122] 특정 실시양태에서, 염화나트륨은 약 5-15 mg/mL이다.
- [0123] 특정 실시양태에서, 등장화제는 프로필렌 글리콜이다.
- [0124] 특정 실시양태에서, 프로필렌 글리콜은 약 1 mg/mL 내지 약 50 mg/mL(예컨대, 약 5 mg/mL 내지 약 25 mg/mL, 약 8 mg/mL 내지 약 16 mg/mL)이다.
- [0125] 특정 실시양태에서, 등장화제는 만니톨이다.
- [0126] 특정 실시양태에서, 만니톨은 약 20 mg/mL 내지 약 60 mg/mL(예컨대, 약 25 mg/mL 내지 약 50 mg/mL, 약 30 mg/mL 내지 약 50 mg/mL, 약 35 mg/mL 내지 약 50 mg/mL)이다.
- [0127] 특정 실시양태에서, 약학적 부형제는 보존제, 킬레이트화제, 및/또는 안정제를 추가로 포함한다.
- [0128] 특정 실시양태에서, 약학 조성물의 pH는 약 6.5 내지 약 8.3(예컨대, 약 6.5 내지 7.4, 또는 7.4 내지 8.3)이다.
- [0129] 특정 실시양태에서, 약학 조성물의 pH는 약 7.4이다.
- [0130] 특정 실시양태에서, 폴리펩티드 접합체는 본원에 제공된 바와 같은 이중 접합된 폴리펩티드 접합체이다. 특정 실시양태에서, 약학 조성물은 약 1-80 mg/ml, 1-100 mg/ml, 또는 1-120 mg/ml, 또는 임의적으로, 5-40 mg/ml, 5-80 mg/mL, 5-100 mg/ml, 또는 5-120 mg/ml의 폴리펩티드 접합체(예컨대, 약 5-90 mg/mL, 약 5-70 mg/mL, 약 5-60 mg/mL, 약 5-50 mg/mL, 약 5-30 mg/mL, 약 5-20 mg/mL, 약 5-10 mg/mL)를 갖는다. 약학 조성물의 일부 실시양태에서, 폴리펩티드 접합체의 폴리펩티드 부분은 서열 번호 57의 아미노산 서열을 포함하고, 각각 26K 및 76K에서 제1 CRM 및 제2 CRM과 접합된다.
- [0131] 특정 실시양태에서, 약학 조성물은
- [0132] (a) 약 1-80 mg/mL, 1-100 mg/ml 또는 1-120 mg/mL의 폴리펩티드 접합체(여기서, 폴리펩티드 접합체의 폴리펩티드 부분은 서열 번호 57의 아미노산 서열을 포함하고, 각각 26K 및 76K에서 제1 CRM 및 제2 CRM과 접합된다);
- [0133] (b) 포스페이트 완충제, 시트레이트 완충제, 및 히스티딘 완충제로 구성된 군으로부터 선택되는 완충제;
- [0134] (c) 염화나트륨, 프로필렌 글리콜, 만니톨로 구성된 군으로부터 선택되는 등장화제를 포함하고;
- [0135] (d) pH는 약 6.5 내지 약 8.3이다.
- [0136] 특정 실시양태에서, 약학 조성물은
- [0137] (a) 약 1-80 mg/mL, 1-100 mg/ml 또는 1-120 mg/mL의 폴리펩티드 접합체(여기서, 폴리펩티드 접합체의 폴리펩티드 부분은 서열 번호 57의 아미노산 서열을 포함하고, 각각 26K 및 76K에서 제1 CRM 및 제2 CRM과 접합된다);
- [0138] (b) 포스페이트 완충제, 시트레이트 완충제, 및 히스티딘 완충제로 구성된 군으로부터 선택되는 완충제;
- [0139] (c) 5-15 mg/ml 염화나트륨, 1-50 mg/mL 프로필렌 글리콜, 및 30-50 mg/mL 만니톨로 구성된 군으로부터 선택되는 등장화제를 포함하고;
- [0140] (d) pH는 약 6.5 내지 약 8.3이다.
- [0141] 특정 실시양태에서, 약학 조성물은
- [0142] (a) 약 1-80 mg/mL, 1-100 mg/ml 또는 1-120 mg/mL의 폴리펩티드 접합체(여기서, 폴리펩티드 접합체의 폴리펩티드 부분은 서열 번호 57의 아미노산 서열을 포함하고, 각각 26K 및 76K에서 제1 CRM 및 제2 CRM과 접합된다);
- [0143] (b) 약 0.5-5 mg/mL 포스페이트 완충제, 약 1-50 mM 시트레이트 완충제, 또는 약 0.5-10 mg/mL 히스티딘 완충제;
- [0144] (c) 염화나트륨, 프로필렌 글리콜, 만니톨로 구성된 군으로부터 선택되는 등장화제를 포함하고;
- [0145] (d) pH는 약 6.5 내지 약 8.3이다.
- [0146] 특정 실시양태에서, 약학 조성물은
- [0147] (a) 약 1-80 mg/mL, 1-100 mg/ml 또는 1-120 mg/mL의 폴리펩티드 접합체(여기서, 폴리펩티드 접합체의 폴리펩티드 부분은 서열 번호 57의 아미노산 서열을 포함하고, 각각 26K 및 76K에서 제1 CRM 및 제2 CRM과 접합된다);

- [0148] (b) 약 0.5-5 mg/mL 포스페이트 완충제, 약 1-50 mM 시트레이트 완충제, 또는 약 0.5-10 mg/mL 히스티딘 완충제;
- [0149] (c) 5-15 mg/ml 염화나트륨, 1-50 mg/mL 프로필렌 글리콜, 및 30-50 mg/mL 만니톨로 구성된 군으로부터 선택되는 등장화제를 포함하고;
- [0150] (d) pH는 약 6.5 내지 약 8.3이다.
- [0151] 특정 실시양태에서, 약학 조성물은
- [0152] (a) 약 5-80 mg/mL, 5-100 mg/ml, 또는 5-120 mg/mL의 폴리펩티드 접합체(여기서, 폴리펩티드 접합체의 폴리펩티드 부분은 서열 번호 57의 아미노산 서열을 포함하고, 각각 26K 및 76K에서 제1 CRM 및 제2 CRM과 접합된다);
- [0153] (b) 약 0.5-5 mg/mL 포스페이트 완충제, 약 1-50 mM 시트레이트 완충제, 또는 약 0.5-10 mg/mL 히스티딘 완충제;
- [0154] (c) 5-15 mg/ml 염화나트륨, 1-50 mg/mL 프로필렌 글리콜, 및 30- 50 mg/mL 만니톨로 구성된 군으로부터 선택되는 등장화제를 포함하고;
- [0155] (d) pH는 약 6.5 내지 약 8.3이다.
- [0156] 특정 실시양태에서, 폴리펩티드 접합체는 본원에 제공된 바와 같은 단일 접합된 폴리펩티드 접합체이다. 특정 실시양태에서, 약학 조성물은 약 0.5-20 mg/ml, 0.5-50 mg/ml 또는 0.5-80 mg/ml의 폴리펩티드 접합체를 갖는다. 약학 조성물의 특정 실시양태에서, 폴리펩티드 접합체의 폴리펩티드 부분은 서열 번호 60의 아미노산 서열을 포함하고, 76K에서 제1 CRM과 접합된다. 약학 조성물의 특정 실시양태에서, 폴리펩티드 접합체의 폴리펩티드 부분은 서열 번호 52의 아미노산 서열을 포함하고, 76K에서 제1 CRM과 접합된다.
- [0157] 특정 실시양태에서, 약학 조성물은
- [0158] (a) 약 0.5-20 mg/mL, 0.5-50 mg/ml 또는 0.5-80 mg/ml의 폴리펩티드 접합체(여기서, 폴리펩티드 접합체의 폴리펩티드 부분은 서열 번호 60 또는 서열 번호 52의 아미노산 서열을 포함하고, 76K에서 제1 CRM과 접합된다);
- [0159] (b) 포스페이트 완충제, 시트레이트 완충제, 및 히스티딘 완충제로 구성된 군으로부터 선택되는 완충제;
- [0160] (c) 염화나트륨, 프로필렌 글리콜, 만니톨로 구성된 군으로부터 선택되는 등장화제를 포함하고;
- [0161] (d) pH는 약 6.5 내지 약 8.3이다.
- [0162] 특정 실시양태에서, 약학 조성물은
- [0163] (a) 약 0.5-20 mg/mL, 0.5-50 mg/ml 또는 0.5-80 mg/ml의 폴리펩티드 접합체(여기서, 폴리펩티드 접합체의 폴리펩티드 부분은 서열 번호 60 또는 서열 번호 52의 아미노산 서열을 포함하고, 76K에서 제1 CRM과 접합된다);
- [0164] (b) 약 0.5-5 mg/mL 포스페이트 완충제, 약 1-50 mM 시트레이트 완충제, 또는 약 0.5-10 mg/mL 히스티딘 완충제;
- [0165] (c) 염화나트륨, 프로필렌 글리콜, 만니톨로 구성된 군으로부터 선택되는 등장화제를 포함하고;
- [0166] (d) pH는 약 6.5 내지 약 8.3이다.
- [0167] 특정 실시양태에서, 약학 조성물은
- [0168] (a) 약 0.5-20 mg/mL, 0.5-50 mg/ml 또는 0.5-80 mg/ml의 폴리펩티드 접합체(여기서, 폴리펩티드 접합체의 폴리펩티드 부분은 서열 번호 60 또는 서열 번호 52의 아미노산 서열을 포함하고, 76K에서 제1 CRM과 접합된다);
- [0169] (b) 포스페이트 완충제, 시트레이트 완충제, 및 히스티딘 완충제로 구성된 군으로부터 선택되는 완충제;
- [0170] (c) 5-15 mg/ml 염화나트륨, 1-50 mg/mL 프로필렌 글리콜, 및 30-50 mg/mL 만니톨로 구성된 군으로부터 선택되는 등장화제를 포함하고;
- [0171] (d) pH는 약 6.5 내지 약 8.3이다.
- [0172] 특정 실시양태에서, 약학 조성물은
- [0173] (a) 약 0.5-20 mg/mL, 0.5-50 mg/ml 또는 0.5-80 mg/ml의 폴리펩티드 접합체(여기서, 폴리펩티드 접합체의 폴

리펩티드 부분은 서열 번호 60 또는 서열 번호 52의 아미노산 서열을 포함하고, 76K에서 제1 CRM과 접합된다);

[0174] (b) 약 0.5-5 mg/mL 포스페이트 완충제, 약 1-50 mM 시트레이트 완충제, 또는 약 0.5-10 mg/mL 히스티딘 완충제;

[0175] (c) 5-15 mg/ml 염화나트륨, 1-50 mg/mL 프로필렌 글리콜, 및 30-50 mg/mL 만니톨로 구성된 군으로부터 선택되는 등장화제를 포함하고;

[0176] (d) pH는 약 6.5 내지 약 8.3이다.

[0177] 제2 측면에서, 본 개시내용은 치료 유효량의 제1 측면의 폴리펩티드 접합체를 투여하는 단계를 포함하는, 대사 장애 예방 또는 치료를 필요로 하는 피험체에서 대사 장애를 예방 또는 치료하는 방법을 제공한다.

[0178] 특정 실시양태에서, 대사 장애는 당뇨병, 비만, 과체중, 비알콜성 지방간염(NASH: non-alcoholic steatohepatitis), 심혈관의 질환 예컨대 이상지질혈증, 동맥경화증, 알콜성 지방간염(ASH: alcoholic steatohepatitis), 당뇨병성 신장병증, 임신성 당뇨병, 대사 증후군, 예컨대, 대사 증후군 X, 비알콜성 지방간 질환(NAFLD: nonalcoholic fatty liver disease), 말기 간 질환, 간 지방증(지방간), 간경변, 또는 원발성 담즙성 간경변증(PBC: primary biliary cirrhosis), 또는 알츠하이머병이다.

[0179] 특정 실시양태에서, 당뇨병은 제한 없이, 고혈당증, 2형 당뇨병, 내당능 장애, 1형 당뇨병, 비인슐린 의존성 당뇨병, MODY(저연령대 성숙기 발병 당뇨병: maturity onset diabetes of the young), 임신성 당뇨병, 및 HbA1C 수준 상승을 포함하는, 임의 형태의 당뇨병일 수 있다.

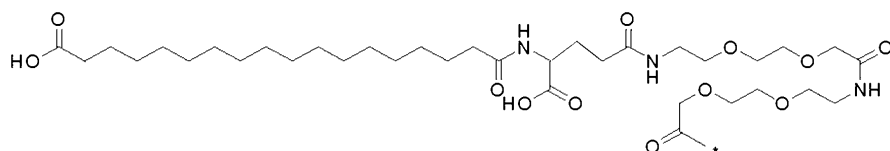
[0180] 특정 실시양태에서, 대사 장애는 알츠하이머병이다. 특정 실시양태에서, 본 개시내용은 치료 유효량의, 본원에 제공된 폴리펩티드 접합체 또는 약학 조성물을 투여하는 단계를 포함하는, 알츠하이머병 예방 또는 치료를 필요로 하는 피험체에서 알츠하이머병을 예방 또는 치료하는 방법을 제공한다.

[0181] 특정 실시양태에서, 본 개시내용은 본원에 제공된 폴리펩티드 접합체를 포함하는 본원에 제공된 약학 조성물을 투여하는 단계를 포함하고, 여기서, 약학 조성물은 액체 제제인 것인, 알츠하이머병 예방 또는 치료를 필요로 하는 피험체에서 알츠하이머병을 예방 또는 치료하는 방법을 제공한다.

[0182] 특정 실시양태에서, 폴리펩티드 접합체는 폴리펩티드 부분 및 접합체 부분을 포함하고, 여기서, 폴리펩티드 부분은 단일 생물학적 활성 펩티드 및 펩티드 링커를 포함하고, 접합체 부분은 펩티드 링커 중 제1 CRM 잔기에 접합된 제1 클리어런스 감소 모이어티(CRM)를 포함한다. 특정 실시양태에서, 폴리펩티드 부분은 서열 번호 52, 55, 56, 60-62, 66-71, 및 75-80으로 구성된 군으로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함하고; 제1 CRM 잔기는 60, 68, 및 76으로 구성된 군으로부터 선택되는 위치의 리신 잔기 또는 시스테인 잔기이다.

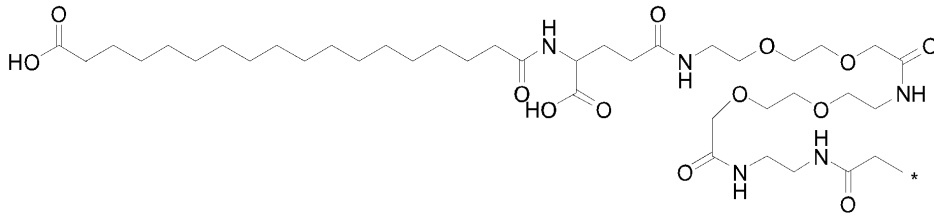
[0183] 일부 실시양태에서, 폴리펩티드 접합체는 이중 접합된 폴리펩티드 접합체이고, 제2 CRM 잔기에 접합된 제2 CRM을 추가로 포함한다. 이중 접합된 폴리펩티드 접합체의 일부 실시양태에서, 제1 CRM 잔기 및 제2 CRM 잔기, 둘 다 리신 잔기이고, 폴리펩티드 접합체는 단 2개의 리신 잔기를 포함한다. 일부 실시양태에서, 폴리펩티드 부분은 서열 번호 51, 53, 54, 57-59, 63-65, 및 72-74, 85 및 86으로 구성된 군으로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함하고; 제1 CRM 잔기는 68, 76, 및 84로 구성된 군으로부터 선택되는 위치의 리신 잔기 또는 시스테인 잔기이고; 제2 CRM 잔기는 위치 26의 리신 잔기 또는 시스테인 잔기이다. 일부 실시양태에서, 폴리펩티드 부분은 서열 번호 57의 아미노산 서열을 포함하고, 각각 26K 및 76K에서 제1 CRM 및 제2 CRM과 접합된다

[0184] 일부 실시양태에서, CRM 잔기는 리신 잔기이고, CRM은 모이어티 A가 하기 화학식의 구조를 갖는, 모이어티 A (HOOC-(CH₂)₁₆-CO-gGlu-2XADO)를 포함한다:



[0185]

[0186] 일부 실시양태에서, CRM 잔기는 시스테인 잔기이고, CRM은 모이어티 B가 하기 화학식의 구조를 갖는, 모이어티 B (HOOC-(CH₂)₁₆-CO-gGlu-2XADO-EDA-CO-CH₂)를 포함한다:



- [0187]
- [0188] 제3 측면에서, 본 개시내용은 치료 유효량의 본원에 제공된 폴리펩티드 접합체를 투여하여 체중 관리를 필요로 하는 피험체의 체중을 관리하는 단계를 포함하는, 체중 관리를 필요로 하는 피험체에서 체중을 관리하는 방법을 제공한다.
- [0189] 제4 측면에서, 본 개시내용은 치료 유효량의 본원에 제공된 폴리펩티드 접합체를 투여하여 음식 섭취 감소를 필요로 하는 피험체의 음식 섭취를 감소시키는 단계를 포함하는, 음식 섭취 감소를 필요로 하는 피험체에서 음식 섭취를 감소시키는 방법을 제공한다.
- [0190] 제5 측면에서, 본 개시내용은 치료 유효량의 본원에 제공된 폴리펩티드 접합체를 투여하여 체중 감소를 필요로 하는 피험체의 체중을 감소시키는 단계를 포함하는, 체중 감소를 필요로 하는 피험체에서 체중을 감소시키는 방법을 제공한다.
- [0191] 상기 제2 내지 제5 측면에서 언급된 바와 같은 방법 중 임의의 것에서, 피험체는 인간일 수 있다.
- [0192] 특정 실시양태에서, 피험체의 공복 혈당 수준은 125 mg/dL 이상이다.
- [0193] 특정 실시양태에서, 피험체의 체질량 지수(BMI: body mass index)는 적어도 25 이상이다.
- [0194] 특정 실시양태에서, 약학 조성물은 1일 2회, 1일 1회, 매 3일마다 1회, 또는 주 1회, 매 2주마다 1회, 매 3주마다 1회, 또는 월 1회보다 더 빈번하지 않은 투여 요법으로 투여된다.
- [0195] 특정 실시양태에서, 약학 조성물은 주 2회, 주 1회, 격주로 1회, 매 3주마다 1회, 월 1회, 또는 매 2개월마다 1회 투여된다.
- [0196] 특정 실시양태에서, 투여 요법은 약 매 3일마다 1회 내지 약 월 1회, 또는 약 주 1회 내지 약 월 1회 범위의 투여 간격을 갖는다.
- [0197] 특정 실시양태에서, 약학 조성물은 경구적으로 투여된다.
- [0198] 본 개시내용 전역에 걸쳐, "하나"("a", "an") 및 "그"("the")라는 관사는 관사의 하나 또는 1 초과 (즉, 적어도 하나)의 문법적 목적어를 지칭하는 데 사용된다. 예로서, "융합 폴리펩티드"는 하나의 융합 폴리펩티드 또는 1 초과 (즉, 적어도 하나)의 융합 폴리펩티드를 의미한다.
- [0199] 본 출원에서 일련의 언급된 수치 값이 있는 경우에는 모두 언급된 수치 값 중 어느 것이든 수치 범위의 상한 또는 하한일 수 있다는 것을 이해하여야 한다. 본 발명은 이러한 모든 수치 범위, 즉, 상한 수치 한계와 하한 수치 한계의 조합을 갖는 범위를 포괄하며, 여기서, 상한 및 하한 각각에 대한 수치 값은 본원에 언급된 임의의 수치 값일 수 있다는 것을 추가로 이해하여야 한다. 본원에 제공된 범위는 범위 내의 모든 값을 포함하는 것으로 이해하여야 한다. 예를 들어, 1-10은 값 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 및 10 및 적절한 분수 값 모두를 포함하는 것으로 이해된다. 유사하게, "적어도"로 구분된 범위는 제공된 더 낮은 값과 모든 더 높은 숫자를 포함하는 것으로 이해된다.
- [0200] 본원에서 사용되는 바, "약" 또는 "대략"은 평균의 3 표준 편차 이내 또는 특정 기술 분야에서 허용오차의 표준 범위 내에 있는 것으로 이해된다. 특정 실시양태에서, 약은 0.5 이하의 변동으로 이해된다.
- [0201] "하나"("a" 및 "an")라는 관사는 본원에서 관사의 하나 또는 1 초과 (즉, 적어도 하나)의 문법적 목적어를 지칭하는 데 사용된다. 예로서, "한 요소"는 하나의 요소 또는 1 초과 (즉, 적어도 하나)의 요소를 의미한다.
- [0202] "~을 포함하는"이라는 용어는 본원에서 "~을 포함하나, 이에 제한되지 않는"이라는 어구의 의미를 갖고, 그와 상호교환적으로 사용된다. 유사하게, "예컨대"는 본원에서 "예컨대, 그러나, 제한 없이"라는 어구의 의미를 갖고, 그와 상호교환적으로 사용된다.
- [0203] "또는"이라는 용어는 본원에서 포괄적으로 본원에서 맥락상 명확히 달리 명시되지 않는 한, "및/또는"이라는 용

어의 의미를 갖고, 그와 상호교환적으로 사용된다.

도면의 간단한 설명

[0204]

도 1a 내지 1b는 C57BL/6 마우스에서 시험 분자의 생체내 활성을 보여주는 것이다. 체중을 평가하기 위해, 10주령된 수컷 C57BL/6 마우스에 시험 약물 물질을 1회 피하 투여하였다. **도 1a**는 1일째부터 8일째까지의 분자 012 또는 분자 001로 처리한 후의 체중 손실을 보여주는 것이다. **도 1b**는 1일째부터 8일째까지의 분자 007, 008, 012 및 016으로 처리한 후의 체중 손실을 보여주는 것이다. 데이터는 평균값 및 표준 오차(SEM: standard error)로 표시된다. 세마글루티드는 비교 대조군으로 병행하여 시험하였다.

도 2a, 2b, 2c, 2d 및 2e는 db/db 마우스에서의 분자 001, 002, 012 및 019의 생체내 활성을 보여주는 것이다. **도 2a**는 분자 001 단일 투여 처리 후의 공복 글루코스를 보여주는 것이다. **도 2b**는 분자 002 단일 투여 처리 후의 공복 글루코스를 보여주는 것이다. 데이터는 평균값 및 표준 오차(SEM)로 표시된다. **도 2c**는 분자 012 단일 투여 처리 후의 비공복 글루코스를 보여주는 것이다. **도 2d**는 분자 019 단일 투여 처리 후의 비공복 글루코스를 보여주는 것이고, **도 2e**는 분자 019 단일 투여 처리 후 비공복 글루코스에 대한 0-48시간에 대한 곡선하 면적을 보여주는 것이다. 글루코스를 평가하기 위해, 10주령된 수컷 db/db 마우스에 지정된 GLP-1 폴리펩티드 접합체를 명시된 투여량으로 피하 투여하였다. 공복 글루코스(**도 2a 및 2b**) 또는 비공복 글루코스(**도 2c 및 2d**)를 상이한 시점에 측정하였고, 각 군에 대해 동물 5마리를 사용하였다. 델타 혈당은 기준선 수준이 차감된 글루코스이다. 데이터는 평균값 및 표준 오차(SEM)로 표시된다.

도 3a 및 3b는식이 유도 비만(DIO: Diet Induced Obese) 마우스에서의 생체내 효능을 보여주는 것이다. 각각의 GLP-1 폴리펩티드 접합체가 체중, 음식 섭취 및 글루코스 수준에 미치는 영향을 평가하기 위해, 22주령된 DIO 마우스(13주 동안 고지방 식이를 섭취한 C57BL/6 마우스)에 25일 동안 상이한 농도의 지정된 GLP-1 폴리펩티드 접합체를 격일로 피하 투여하였다. **도 3a**는 10, 30 및 100 nmol/kg의 분자 012의 용량 적정에 따른 체중 변화를 보여주는 것이다. **도 3b**는 처리시 공복 글루코스 변화를 보여주는 것이다. 데이터는 평균값 및 표준 오차(SEM)로 표시된다.

도 4a-4e는 (APP/PS1, APPswe/PSEN1dE9) 마우스에서의 생체내 효능을 보여주는 것이다. 각각의 GLP-1 폴리펩티드 접합체가 인지 기능(모리스(Morris) 수중 미로 및 Y-미로), 뇌 A β 플라크 침착 및 해마 피라미드 뉴런수에 미치는 영향을 평가하기 위해, 6개월된 APP/PS1 수컷 마우스에 상이한 농도의 지정된 GLP-1 폴리펩티드 접합체(분자 012)를 10주 동안 1일 1회(QD) 또는 격일로 1회(Q2D) 피하 투여하였다. **도 4a**는 각각 30 및 100 nmol/kg의 분자 012를 사용하였을 때의 사분면 점유율 변화를 보여주는 것이다. **도 4b**는 각각 30 및 100 nmol/kg의 분자 012를 사용하였을 때의 교대율(%) 변화를 보여주는 것이다. **도 4c**는 각각 30 및 100 nmol/kg의 분자 012를 사용하였을 때의 피질 중 A β 플라크 침착 변화를 보여주는 것이다. **도 4d**는 각각 30 및 100 nmol/kg의 분자 012를 사용하였을 때의 해마 중 A β 플라크 침착 변화를 보여주는 것이다. **도 4e**는 각각 30 및 100 nmol/kg의 분자 012를 사용하였을 때의 해마 중 뉴런수 변화를 보여주는 것이다. 데이터는 평균값 및 표준 오차(SEM)로 표시된다. 비히클로 처리된 야생형 마우스를 대조군으로 사용하였다. 비히클로 처리된 알츠하이머병(APP/PS1) 마우스를 대조군으로 사용하였다. 세마글루티드로 처리된 알츠하이머병(APP/PS1) 마우스 또한 대조군으로 사용하였다.

도 5a-5e는 본 개시내용에 개시된 모든 서열(서열 번호 81 제외)을 보여주는 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0205]

상세한 설명

[0206]

본 발명의 하기 설명은 단지 본 발명의 다양한 실시양태를 예시하기 위한 것이다. 따라서, 논의된 특정 변형은 본 발명의 범주에 대한 제한으로서 해석되지 않아야 한다. 다양한 등가물, 변화, 및 변형이 본 발명의 범주를 벗어나지 않고 이루어질 수 있음이 당업자에게 자명할 것이며, 상기 등가한 실시양태가 본원에 포함되어야 하는 것으로 이해된다. 간행물, 특허 및 특허 출원을 포함한 본원에 인용된 모든 참고문헌은 그 전문이 본원에 참조로 포함된다.

[0207]

정의

[0208]

본원에서 사용되는 바, 용어 "아미노산"은 각 아미노산에 특이적인 측쇄와 함께 아민(-NH₂) 및 카복실(-COOH) 작용기를 함유하는 유기 화합물을 지칭한다.

- [0209] 본원에서 사용되는 바, "자연적으로 발생된"이라는 용어는 아미노산 잔기는 천연 단백질 또는 펩티드에서 발견되는 아미노산 잔기를 지칭하며, 이들의 구조가 이러한 입체이성질체 형태를 허용하는 경우 모두 D 및 L 입체이성질체이다. 자연적으로 발생된 아미노산 잔기의 예로는 글리신(Gly 또는 G), 알라닌(Ala 또는 A), 발린(Val 또는 V), 류신(Leu 또는 L), 이소류신(Ile 또는 I), 세린(Ser 또는 S), 시스테인(Cys 또는 C), 트레오닌(Thr 또는 T), 메티오닌(Met 또는 M), 프롤린(Pro 또는 P), 페닐알라닌(Phe 또는 F), 티로신(Tyr 또는 Y), 트립토판(Trp 또는 W), 히스티딘(His 또는 H), 리신(Lys 또는 K), 아르기닌(Arg 또는 R), 아스파르테이트(Asp 또는 D), 글루타메이트(Glu 또는 E), 아스파라긴(Asn 또는 N), 및 글루타민(Gln 또는 Q)을 포함하는 20개의 표준 아미노산, 및 그의 천연 유사체, 예컨대, 카나바닌, 피롤리신(PYL), 셀레노시스테인, 피롤린-카복시-리신(PCL: pyrroline-carboxy-lysine), 사르코신, 베타-알라닌, 포스포세린, γ -카복시글루타메이트, 및 오르니틴을 포함하나, 이에 제한되지 않는다. 그의 D 입체이성질체 내의 자연적으로 발생된 아미노산 잔기의 예로는 예를 들어, D-아스파르테이트, D-세린, D-시스테인, D-알라닌, D-글루타메이트 등을 포함한다.
- [0210] "아미노산 유사체"는 자연적으로 발생된 아미노산과 동일한 기본 화학 구조, 즉, 수소, 카복실 기, 아미노 기, 및 R 기에 결합된 탄소를 갖는 화합물, 예컨대, 호모세린, 노르류신, 메티오닌 술폰시드, 메티오닌 메틸 술폰시드이다. 상기 유사체는 변형된 R 기(예컨대, 노르류신) 또는 변형된 펩티드 백본을 가질 수 있지만, 자연적으로 발생된 아미노산과 동일한 기본 화학 구조를 보유할 것이다.
- [0211] 본원에서 사용되는 바, "비천연" 아미노산 잔기는 제한 없이, 변형된 아미노산 잔기, 및/또는 아미노산 모방체를 포함하는 자연에서 발견되지 않는 임의의 아미노산 잔기로서, 공지된 자연적으로 발생된 아미노산 중 하나는 아니지만, 자연적으로 발생된 아미노산과 유사한 방식으로 작용하는 것을 지칭하다. 변형된 아미노산 또는 모방체는 예컨대, 탄수화물 기, 포스페이트 기, 파네실 기, 이소파네실 기, 지방산 기, 접합, 관능화 또는 다른 변형을 위한 링커 등과 같은 화학적 엔티티의 부가에 의해 생성될 수 있다. 비천연 아미노산은 또한 화학적 합성에 의해 제조된 아미노산을 지칭할 수 있다. 예시적인 비천연 아미노산은 2-아미노이소부티르산(Aib), 이미다졸-4-아세테이트(IA), 이미다졸프로피온산(IPA), α -아미노부티르산(ABU), tert-부틸글리신(Tle), b-알라닌, 3-아미노메틸 벤조산, 안트라닐산, 데스-아미노-히스티딘(약칭 데사미노His, 대안적인 명칭 이미다조프로피온산, 약칭 Impr), 아미노산의 베타 유사체, 예컨대, β -알라닌, 2-아미노-히스티딘, β -하이드록시-히스티딘, 호모히스티딘, N α -아세틸-히스티딘, α -플루오로-메틸-히스티딘, α -메틸-히스티딘, α , α -디메틸-글루탐산, m-CF₃-페닐알라닌, α , β -디아미노프로피온산(약칭 Dap), 3-피리딜알라닌, 2-피리딜알라닌 또는 4-피리딜알라닌, (1-아미노사이클로프로필)카복실산, (1-아미노사이클로부틸)-카복실산, (1-아미노사이클로헥틸)카복실산, (1-아미노사이클로헥실)카복실산, (1-아미노사이클로헵틸)카복실산, 및 (1-아미노사이클로옥틸)카복실산을 포함하나, 이에 제한되지 않는다.
- [0212] 폴리펩티드 내로의 비천연 아미노산의 도입은 문헌 [Wang et al., Science 292:498-500, 2001]; [Deiters et al., J Am Chem Soc 125:1 1782-1 1783, 2003]; [Wang and Schultz, Science 301 :964-967, 2003]; [Zhang et al., Science 303:371-373, 2004] 또는 미국 특허 제7,083,970호에 기술된 기술에 의해 실현될 수 있다. 간략하면, 이들 발현 시스템 중 일부는 본 개시내용의 융합 폴리펩티드를 코딩하는 오픈 리딩 프레임 내로 정지 코돈, 예컨대, 옴버(UAG), 오키(UAA), 및 오펜(UGA) 코돈)을 도입하기 위해 부위 지정 돌연변이유발을 포함한다. 다른 코돈, 예컨대, 4-염기 코돈(예컨대, AGGA, AGGU, CGGU, CGCU, CGAU, CCCU, CUCU, CUAU, 및 GGGU), 5-염기 코돈, 6-염기 코돈 등 또한 비천연 아미노산에 대한 발현 시스템 내로 도입될 수 있다. 이어서, 상기 발현 벡터는 도입된 정지 코돈 또는 다른 코돈에 특이적인 tRNA를 이용할 수 있는 숙주 내로 도입되고, 선택되는 비천연 아미노산과 함께 운반된다. 또 다른 예로, 비천연 아미노산은 화학적으로 합성되고, 예컨대, 아실화와 같은 화학 반응에 의해 폴리펩티드 내로 삽입되거나 또는 이에 부착될 수 있다.
- [0213] "서열 동일성(%)"은 서열을 정렬하고, 필요한 경우, 동일한 아미노산(또는 핵산)의 최대 개수를 달성하기 위해 갭을 도입한 후, 참조 서열 내의 아미노산(또는 핵산) 잔기와 동일한 후보 서열 내의 아미노산(또는 핵산) 잔기의 백분율로서 정의된다. 즉, 아미노산 서열(또는 핵산 서열)의 서열 동일성(%)은 어떤 것이 더 짧은 간에, 비교되는 참조 서열에 대해 동일한 아미노산 잔기(또는 염기)의 개수를 후보 서열 또는 참조 서열 내의 아미노산 잔기(또는 염기)의 총 개수로 나눔으로써 계산될 수 있다. 아미노산 잔기의 보존적 치환은 동일한 잔기로 간주되지 않는다. 아미노산(또는 핵산) 서열 동일성(%)을 결정하기 위한 목적의 정렬은 예를 들어, 공개적으로 이용가능한 도구, 예컨대, BLASTN, BLASTP(미국 국립 생물 공학 정보 센터(NCBI: National Center for Biotechnology Information)의 웹사이트에서 이용가능, 또한 문헌 [Altschul S.F. et al, J. Mol. Biol., 215:403-410 (1990)]; [Stephen F. et al, Nucleic Acids Res., 25:3389-3402 (1997)] 참조), ClustalW2(유럽 생물 정보학 연구소(European Bioinformatics Institute)의 웹사이트에서 이용가능, 또한 문헌 [Higgins D.G.

et al, Methods in Enzymology, 266:383-402 (1996)]; [Larkin M.A. et al, Bioinformatics (Oxford, England), 23(21): 2947-8 (2007)] 참조), 및 ALIGN 또는 Megalign(DNASTAR) 소프트웨어를 사용하여 달성될 수 있다. 당업자는 도구에 의해 제공되는 디폴트 파라미터를 사용할 수 있거나, 또는 예컨대, 예를 들어, 적합한 알고리즘을 선택함으로써 정렬에 대해 적절하게 파라미터를 맞춤화할 수 있다.

[0214] 아미노산 서열과 관련된 "보존적 치환"은 아미노산 잔기를 유사한 물리화학적 특성을 갖는 측쇄를 갖는 상이한 아미노산 잔기로 대체하는 것을 지칭한다. 예를 들어, 보존적 치환은 소수성 측쇄를 갖는 아미노산 잔기(예컨대, Met, Ala, Val, Leu 및 Ile) 사이에서, 중성 친수성 측쇄를 갖는 잔기(예컨대, Cys, Ser, Thr, Asn 및 Gln) 사이에서, 산성 측쇄를 갖는 잔기(예컨대, Asp, Glu) 사이에서, 염기성 측쇄를 갖는 아미노산(예컨대, His, Lys, 및 Arg) 사이에서, 또는 방향족 측쇄를 갖는 잔기(예컨대, Trp, Tyr 및 Phe) 사이에서 이루어질 수 있다. 당업계에 공지된 바와 같이, 보존적 치환은 일반적으로 단백질 입체 구조에 유의적인 변화를 야기하지 않으며, 따라서, 단백질의 생물학적 활성을 보유할 수 있다.

[0215] 본원에서 사용되는 바, 용어 "기능적 형태"는 아미노산 서열 또는 화학 구조에서 차이를 갖지만, 여전히 모체 분자의 실질적인 생물학적 활성을 보유하는 모체 분자의 상이한 형태(예컨대, 변이체, 단편, 융합체, 유도체 및 모방체)를 지칭한다. 본원에서 사용되는 바, "실질적인 생물학적 활성을 보유하는"이라는 표현은 모체 분자의 생물학적 활성의 적어도 일부(예를 들어, 약 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 또는 90% 이상) 또는 그 모두를 나타내는 것을 의미한다. 모체 폴리펩티드의 기능적 형태는 자연적으로 발생된 변이체 형태 및 비자연적으로 발생된 형태, 예컨대, 재조합 방법 또는 화학적 합성에 의해 수득된 것, 둘 다를 포함할 수 있다. 기능적 형태는 비천연 아미노산 잔기를 함유할 수 있다.

[0216] 본원에서 사용되는 바, 용어 "변이체"는 모체 폴리펩티드와 적어도 70%의 서열 동일성을 갖는 폴리펩티드를 지칭한다. 변이체는 하나 이상의 아미노산 잔기에 의해 모체 펩티드와 상이할 수 있다. 예를 들어, 변이체는 모체 폴리펩티드의 하나 이상의 아미노산 잔기의 치환, 부가, 결실, 삽입 또는 말단절단을 가질 수 있다.

[0217] 본원에서 사용되는 바, 용어 "단편"은 임의의 길이의 모체 폴리펩티드의 부분적 서열을 지칭한다. 단편은 여전히 모체 폴리펩티드의 적어도 부분적인 기능을 보유할 수 있다.

[0218] 본원에서 사용되는 바, 용어 "유도체"는 하나 이상의 잘 정의된 수의 치환기가 폴리펩티드 또는 융합 폴리펩티드의 하나 이상의 특정 아미노산 잔기에 공유적으로 부착된 화학적으로 변형된 폴리펩티드 또는 융합 폴리펩티드를 지칭한다. 예시적인 화학적 변형은, 예컨대, 알킬화, 아실화, 에스테르화, 아미드화, 인산화, 글리코실화, 표지화, 하나 이상의 아미노산의 메틸화, 또는 하나 이상의 모이어티와의 접합일 수 있다.

[0219] 본원에서 사용되는 바, 용어 "모방체"는 아미노산, 펩티드, 폴리펩티드, 또는 융합 폴리펩티드의 대체물로서 작용하는 분자 구조를 지칭한다. 예를 들어, 본원에서 사용되는 바, 아미노산 모방체는 합성 구조(공지되어 있거나, 또는 아직 공지되지 않은 것)일 수 있으며, 이는 아미노산일 수도 있거나, 또는 아닐 수도 있지만, 모체 아미노산의 기능적 특징을 보유할 수 있는 반면, 아미노산 모방체의 구조는 모체 아미노산의 구조와 상이하다. 예로는 아미드, β -, γ -, δ -이미노산(예컨대, 피페리딘-4-카복실산) 등의 메타크릴로일 또는 아크릴로일 유도체를 포함한다.

[0220] 본원에서 사용되는 바, 병태를 "치료하는" 또는 병태의 "치료"는 병태를 예방 또는 완화시키는 것, 병태의 발병 또는 발생 속도를 저속화시키는 것, 병태 발생 위험을 감소시키는 것, 병태와 연관된 증상의 발생을 예방 또는 지연시키는 것, 병태와 연관된 증상을 감소 또는 종료시키는 것, 병태의 완전한 또는 부분적 퇴행을 발생시키는 것, 병태를 치유하는 것, 또는 그의 일부의 조합을 포함한다.

[0221] 본원에서 사용되는 바, 용어 "벡터"는 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드가 상기 단백질의 발현을 유발하도록 작동가능하게 삽입될 수 있는 비히클을 지칭한다. 벡터는 숙주 세포 내에서 그가 운반하는 유전 요소를 발현하도록 숙주 세포를 형질전환, 형질도입 또는 형질감염시키는 데 사용될 수 있다. 벡터의 예로는 플라스미드, 파지미드, 코스미드, 인공 염색체, 예컨대, 효모 인공 염색체(YAC: yeast artificial chromosome), 박테리아 인공 염색체(BAC: bacterial artificial chromosome), 또는 P1 유래 인공 염색체(PAC: P1-derived artificial chromosome), 박테리오파지, 예컨대, 람다 파지 또는 M13 파지, 및 동물 바이러스를 포함한다. 벡터로서 사용되는 동물 바이러스의 카테고리는 레트로바이러스(렌티바이러스 포함), 아데노바이러스, 아데노 연관 바이러스, 헤르페스바이러스(예컨대, 헤르페스 심플렉스 바이러스), 포크스바이러스, 바쿨로바이러스, 파필로마바이러스, 및 파포바이러스(예컨대, SV40)를 포함한다. 벡터는 프로모터 서열, 전사 개시 서열, 인핸서 서열, 선별가능한 요소, 및 리포터 유전자를 포함하는, 발현을 제어하기 위한 다양한 요소를 함유할 수 있다. 추가로, 벡터는 복

제 기점을 함유할 수 있다. 벡터는 또한 바이러스 입자, 리포솜, 또는 단백질 코팅을 포함하나, 이에 제한되지 않는, 세포 내로의 그의 진입을 보조하는 물질을 포함할 수 있다. 벡터는 발현 벡터 또는 클로닝 벡터일 수 있다. 본 개시내용은 융합 폴리펩티드를 코딩하는 본원에 제공된 핵산 서열, 핵산 서열에 작동가능하게 연결된 적어도 하나의 프로모터(예컨대, SV40, CMV, EF-1 α), 및 적어도 하나의 선별 마커를 함유하는 벡터(예컨대, 발현 벡터)를 제공한다. 벡터의 예로는 레트로바이러스(렌티바이러스 포함), 아데노바이러스, 아데노 연관 바이러스, 헤르페스바이러스(예컨대, 헤르페스 심플렉스 바이러스), 포크바이러스, 바쿨로바이러스, 파필로마바이러스, 파포바이러스(예컨대, SV40), 람다 파지, 및 M13 파지, 플라스미드 pcDNA3.3, pMD18-T, pOptivec, pCMV, pEGFP, pIRES, pQD-Hyg-Gseu, pALTER, pBAD, pcDNA, pCa1, pL, pET, pGEMEX, pGEX, pCI, pEGFT, pSV2, pFUSE, pVITRO, pVIVO, pMAL, pMONO, pSELECT, pUNO, pDUO, Psg5L, pBABE, pWPXL, pBI, p15TV-L, pPro18, pTD, pRS10, pLexA, pACT2.2, pCMV-SCRIPT.RTM., pCDM8, pCDNA1.1/amp, pcDNA3.1, pRc/RSV, PCR 2.1, pEF-1, pFB, pSG5, pXT1, pCDEF3, pSVSPORT, pEF-Bos 등을 포함하나, 이에 제한되지 않는다.

[0222] 본원에서 사용되는 바, 어구 "숙주 세포"는 외인성 폴리뉴클레오티드 및/또는 벡터가 도입된 세포를 지칭한다.

[0223] "약학적으로 허용되는"이라는 용어는 지정된 담체, 비히클, 희석제, 부형제(들), 및/또는 염이 일반적으로 제제를 구성하는 다른 성분과 화학적 및/또는 물리적으로 양립가능하고, 그의 수용자와 생리학적으로 양립가능하다는 것을 나타낸다.

[0224] 본원에서 사용되는 바, 용어 "피험체" 또는 "개체" 또는 "동물" 또는 "환자"는 질환 또는 장애의 진단, 예후, 호전, 예방 및/또는 치료를 필요로 하는 포유동물 또는 영장류를 포함하는 인간 또는 비인간 동물을 지칭한다. 포유동물 피험체는 인간, 가축, 농장 동물, 및 동물원, 스포츠 또는 애완용 동물, 예컨대, 개, 고양이, 기니아 피그, 토끼, 래트, 마우스, 말, 돼지, 소, 곰 등을 포함한다.

[0225] 폴리펩티드 접합체

[0226] 한 측면에서, 본 개시내용은 폴리펩티드 부분 및 접합체 부분을 포함하는 폴리펩티드 접합체를 제공한다. 폴리펩티드 부분은 단일 생물학적 활성 펩티드 및 펩티드 링커를 포함한다. 생물학적 활성 펩티드는 펩티드 링커의 N-말단에 부착되고, GLP-1 수용체 효능제를 포함한다. 접합체 부분은 펩티드 링커 중 제1 클리어런스 감소 모이어티(CRM) 잔기에 접합된 제1 CRM을 포함한다. 본원에서, 제1 CRM 잔기는 생물학적 활성 펩티드(예컨대, GLP-1 수용체 효능제)의 C-말단 아미노산 잔기로부터 적어도 5개의 아미노산 잔기(CRM 잔기 제외) 떨어져 있다.

[0227] 용어 "펩티드" 및 "폴리펩티드"는 본원에서 상호교환적으로 사용되고, 예컨대, 펩티드 결합과 같은 공유 결합에 의해 연결된 아미노산 잔기의 중합체를 지칭한다. 본원에 제공된 펩티드 또는 폴리펩티드는 자연적으로 발생된 또는 비천연 아미노산 잔기, 또는 둘 다를 포함할 수 있다. 본원에 제공된 폴리펩티드 및 펩티드는 임의의 적합한 길이의 아미노산 잔기, 예를 들어, 적어도 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000개 또는 그 초과 아미노산 잔기의 길이를 포함할 수 있다.

[0228] 폴리펩티드 접합체는 단일, 즉, 단 하나의 생물학적 활성 펩티드를 포함한다. 생물학적 활성 펩티드와 관련하여 "단일"은 폴리펩티드 접합체가 펩티드 링커에 각각 부착된 2개 이상의 상이한 생물학적 활성 펩티드를 함유하지 않는다는 것을 의미하는 것으로 의도된다. 그러나, 단일 생물학적 활성 펩티드는 이들 부분이 하나의 펩티드로서 통합되고, 링커에 각각 부착되지 않는 한, 예를 들어, 하이브리드 또는 키메라로서, 함께 융합된 상이한 생물학적 활성 펩티드로부터의 단편 또는 부분을 포함할 수 있다. 그러나, 2개의 상이한 생물학적 활성 펩티드가 링커의 N-말단 및 C-말단에 각각 부착되는 경우, 이때는 본 개시내용에서 사용되는 바와 같은 단일 생물학적 활성 펩티드가 아니다.

[0229] 본원에서 사용되는 바, 용어 "생물학적 활성 펩티드"는 생물학적 기능 또는 활성, 예를 들어, 생리학적 기능, 또는 치료적 기능을 갖는 펩티드를 의미한다. 특정 실시양태에서, 생물학적 활성 펩티드는 치료적으로 활성이다. 단독으로 있을 때 생물학적 기능을 갖지 않는 펩티드는 생물학적 활성 펩티드가 아니다. 예를 들어, 펩티드 링커는, 예를 들어, 단독으로 사용될 때, 그 자신의 생물학적 기능 또는 활성을 갖지 않는 한, 생물학적 활성 펩티드가 아니다.

[0230] 생물학적 활성 펩티드는 글루카곤 유사 펩티드-1(GLP-1) 수용체 효능제를 포함한다.

[0231] 용어 "글루카곤 유사 펩티드-1(GLP-1) 수용체"(GLPIR로도 지칭)는 하나의 세포외 도메인 및 하나의 막횡단 도메인을 포함하는, 췌장 상의 베타 세포 및 뇌의 뉴런 상에서 발견되는 수용체 단백질이다. 세포외 도메인은 GLP-1의 C-말단 나선에 결합할 수 있고, 막횡단 도메인은 GLP-1의 N-말단 영역에 결합할 수 있다. GLP-1 수용체는 인슐린 분비를 증진시킴으로써 혈당 수준의 제어에 관여한다. 뇌에서 발현될 때, GLP-1 수용체는 또한 식욕의 제

어에 관여할 수 있다.

- [0232] 본원에서 사용되는 바, 용어 "글루카곤 유사 펩티드-1(GLP-1) 수용체 효능제" 또는 "GLP-1 수용체 효능제"는 GLP-1 수용체에 결합하고, 이를 활성화시킬 수 있는 분자를 지칭한다. GLP-1 수용체 효능제는 천연 리간드 또는 그의 부분과 유사한 GLP-1 수용체 반응의 크기를 유도할 수 있다.
- [0233] 본원에서 사용되는 바, 용어 "클리어런스-개질 모이어티" 또는 "CRM"은 예를 들어, 생체내 반감기를 증가시키기 위해) 하나 이상의 약동학적(PK) 특성을 변경할 수 있는 모이어티를 의미한다. CRM의 예로는 제한 없이, 지방산, 폴리에틸렌 글리콜(PEG), 글루쿠론산 또는 다른 당 기반 링커, 숙신이미드 고리의 가수분해 속도를 증가시키고, 역 마이클 반응의 속도를 감소시키거나 또는 최소화하여 약물의 손실 속도를 감소시키거나 또는 최소화하는 극성, 양으로 하전 또는 음으로 하전된 기 및 생물학적 활성 펩티드로부터 다른 티올 함유 단백질 및 소분자로의 링커 기를 포함할 수 있다.
- [0234] 본원에서 사용되는 바, "CRM 잔기"는 CRM에 접합되는 아미노산 잔기를 지칭한다.
- [0235] 본원에서 사용되는 바, 용어 "접합체"는 하나의 물리적 엔티티를 형성하기 위해 함께 연결된 2개 이상의 분자의 결과로서의 화합물을 지칭한다. 예를 들어, 본 개시내용의 접합체는 폴리펩티드와 하나 이상의 클리어런스-개질 모이어티가 함께 연결된 결과로서의 화합물을 의미한다. 분자는 공유 결합, 비공유 결합, 링커, 화학적 변형, 또는 단백질 융합에 의해 또는 당업자에게 공지된 임의의 수단에 의해 함께 부착될 수 있다. 바람직하게, 분자는 공유 결합에 의해 함께 부착될 수 있다. 연결은 영구적이거나, 또는 가역적일 수 있다. 일부 실시양태에서, 특정한 절단가능한 또는 비절단가능한 연결이 포함될 수 있다.
- [0236] GLP-1 수용체 효능제에의 CRM의 접합은 GLP-1 수용체 효능제의 반감기를 연장시킬 수 있지만, 이는 또한 GLP-1 수용체 효능제의 생물학적 활성에 부정적으로 영향을 미침에 따라 비접합된 대응물보다 활성이 더 작아질 수 있다. 예를 들어, 접합된 GLP-1 유도체인 세마글루티드는 유의적으로 연장된 반감기를 갖지만, 인간 혈청 알부민(1)의 존재하에서 GLP-1 수용체 결합은 그의 비접합된 대응물 대비 939배 손실된다(문헌 [J. Med. Chem. 2015, 58, 7370-7380]).
- [0237] CRM이 그의 C-말단에 부착된 펩티드 링커 상에 GLP-1 수용체 효능제의 외부에 접합되는 경우, GLP-1 수용체 효능제를 포함하는 특정 CRM 접합된 폴리펩티드가 연장된 반감기 및 유지된 생물학적 활성, 둘 다를 가질 수 있다는 것을 본 발명자들은 예상 밖으로 발견하게 되었다. 흥미롭게도, GLP-1 수용체 효능제의 C-말단과 접합 부위 사이의 거리가 특히 중요하다는 것이 본 발명자들에 의해 밝혀졌다. 펩티드 링커 상의 CRM 접합이 GLP-1 수용체 효능제의 C-말단에 가까운 위치에 있는 경우, 이는 생물학적 활성을 유의적으로 감소시킬 것이며, 이는 GLP-1 수용체 효능제 자체 상의 접합보다 훨씬 더 낮을 수 있다. 그러나, 접합이 GLP-1 수용체 효능제의 C-말단으로부터 충분히 더 멀리 떨어진 위치에 있는 경우, 이때 CRM 접합된 GLP-1 수용체 효능제는 연장된 반감기 및 유지된 생물학적 활성, 둘 다를 가질 수 있다. 상기 예상치 못한 효과는 특정 GLP-1 수용체 효능제 및 특정 CRM을 통해 발견된다.
- [0238] 본원에서, 폴리펩티드 접합체의 일부 실시양태에 따라, 제1 CRM 잔기는 생물학적 활성 펩티드(예컨대, GLP-1 수용체 효능제)의 C-말단 아미노산 잔기로부터 적어도 5개의 아미노산 잔기(CRM 잔기 제외), 예컨대, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 33, 35, 38, 40, 43, 45, 48, 50, 53, 55, 58, 60, 63, 65, 68, 70, 73, 75, 또는 78개 등의 아미노산 잔기 떨어져 있다. 폴리펩티드 접합체의 일부 실시양태에서, 펩티드 링커의 길이는 적어도 10개의 아미노산 잔기, 예컨대, 적어도 12, 24, 32, 40, 48, 50, 60, 70, 또는 80개의 아미노산 잔기 길이일 수 있다.
- [0239] 특정 실시양태에서, 제1 CRM 잔기는 펩티드 링커 중, 생물학적 활성 펩티드(예컨대, GLP-1 수용체 효능제)의 C-말단 아미노산 잔기로부터 20 내지 50개의 아미노산 잔기 떨어져 있을 수 있는, 펩티드 링커의 C-말단에 가까운 위치에 배열된다. 더욱 상세한 사항은 하기에 제공할 것이다.
- [0240] 일부 실시양태에 따라, 폴리펩티드 접합체는 단일 접합된 폴리펩티드 접합체이고, 즉, 제1 CRM은 유일한 접합체이고, 폴리펩티드 접합체는 제1 CRM과 (펩티드 링커 중) 제1 CRM 잔기에서만 접합된다.
- [0241] 일부 다른 실시양태에 따라, 폴리펩티드 접합체는 이중 접합된 폴리펩티드 접합체이고, 즉, 폴리펩티드 접합체는 2개의 접합체와 접합된다. 상기의 한 접합체는 (펩티드 링커 중) 제1 CRM 잔기에서 폴리펩티드 접합체에 접합되는 제1 CRM이다. 상기의 나머지 다른 한 접합체는 생물학적 활성 펩티드(즉, GLP-1 수용체 효능제 예컨대, GLP)에 배열된, 제2 CRM 잔기에서 폴리펩티드 접합체에 접합되는 제2 CRM이다.

- [0242] GLP-1 수용체 효능제, CRM 및 CRM 잔기, 및 폴리펩티드 접합체에 대한 상세한 사항은 하기에서 제공한다.
- [0243] **GLP-1 수용체 효능제**
- [0244] [0039]특정 실시양태에서, GLP-1은 수용체 효능제는 GLP-1을 포함한다. 본원에서 사용되는 바, 용어 "글루카곤 유사 펩티드-1" 또는 "GLP-1"은 천연 GLP-1 펩티드 및 모든 그의 기능적 형태, 예컨대, 그의 기능적 변이체, 단편, 융합체, 유도체 및 모방체를 광범위하게 포함하는 것으로 의도된다.
- [0245] 본원에서 사용되는 바, 용어 "천연 GLP-1 펩티드"는 서열 번호 1에 기재된 서열을 갖는, 천연 인간 글루카곤 유사 펩티드-1(GLP-1(7-37))을 지칭한다. 본원에서 사용되는 바, 서열 번호 1(즉, GLP-1(7-37)) 중의 특정 아미노산 잔기를 지칭할 때, GLP-1(1-37)의 넘버링을 따라 이루어진다. 즉, 서열 번호 1은 GLP-1(7-37)에 상응하고, 따라서, 서열 번호 1 중 1번째 잔기(이는 히스티딘(H))은 7H로 지칭되며, 이는 GLP(1-37) 중 7번째 잔기에 상응한다는 것을 의미하고; 서열 번호 1 중 31번째 잔기(이는 글리신(G)이다)는 37G로 지칭되며, 이는 GLP(1-37) 37번째 잔기에 상응한다는 것을 의미한다.
- [0246] 천연 GLP-1 펩티드의 기능적 형태는 천연 GLP-1 펩티드와 유사하거나, 또는 그의 약 20% 이상(또는 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% 이상)의 수준으로 GLP-1 수용체를 활성화시킬 수 있다. GLP-1 수용체의 활성화는 전형적으로 당업계에 공지된 바와 같이 인슐린분비성 작용 또는 다른 생리학적 효과를 초래하는 신호 전달 경로를 개시한다. 천연 GLP-1 펩티드의 기능적 형태는 서열 번호 1과 비교하여 하나 이상의 치환, 부가, 또는 결실을 함유할 수 있다. 천연 GLP-1 펩티드의 많은 기능적 형태, 예를 들어, 제한 없이, 리라글루티드, 세마글루티드, 둘라글루티드, 알비글루티드, 및 WO2000055203A1, WO 98/08871, WO 2006/097537(상기 문헌의 개시내용은 그 전문이 본원에서 포함된다)에 개시된 것이 당업계에 공지되어 있다.
- [0247] 특정 실시양태에서, 본원에 제공된 GLP-1은 서열 번호 1의 실질적인 생물학적 활성을 보유하면서, 서열 번호 1과 적어도 70%(예컨대, 적어도 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 100%)의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다.
- [0248] 특정 실시양태에서, GLP-1은 서열 번호 1의 실질적인 생물학적 활성을 보유하면서, 서열 번호 1과 비교하여 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 또는 2개 이하의 돌연변이(예컨대, 부가, 결실, 치환)를 포함한다. 특정 실시양태에서, GLP-1은 서열 번호 1의 실질적인 생물학적 활성을 보유하면서, 서열 번호 1과 비교하여 적어도 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 또는 9개의 돌연변이(예컨대, 부가, 결실, 치환)를 포함한다.
- [0249] 당업자는 다양한 아미노산 치환, 예컨대, 보존적 아미노산 치환이 반드시 그의 활성을 감소시키는 것은 아니지만, 본원에 기술된 임의의 폴리펩티드 단편의 서열에서 이루어질 수 있다는 것을 이해할 것이다. 아미노산 치환의 예는 그의 상응하는 D-아미노산을 L-아미노산으로 치환하는 것, 호모시스테인 또는 티올 함유 측쇄를 갖는 다른 비천연 아미노산을 시스테인으로 치환하는 것, 호모리신, 디아미노부티르산, 디아미노프로피온산, 오르니틴 또는 아미노 함유 측쇄를 갖는 다른 비천연 아미노산을 리신으로 치환하는 것, 또는 노르발린을 알라닌으로 치환하는 것 등을 포함한다.
- [0250] 다양한 치환이 천연 GLP-1 펩티드에 도입되었고, 이는 그의 생물학적 활성을 유지하거나, 또는 심지어 개선시킬 수 있는 것으로 나타났다. 본원에 제공된 폴리펩티드 접합체의 일부 실시양태에서, GLP-1은 서열 번호 1과 비교하여 A8, G22, K26, K34, 및 R36, 또는 그의 임의의 조합으로 구성된 군으로부터 선택되는 위치에 하나 이상의 돌연변이를 포함하거나, 또는 그로 구성된다. 예를 들어, A8에서의 치환은 잔기에서 DPP4 효소 절단을 방지하는 데 유용하고, G22에서의 치환은 활성 및 용해도를 개선시키는 데 바람직하며, R36에서의 치환은 면역원성을 감소시키는 데 유용한 것으로 간주된다. 상기 위치에서의 치환의 예로는 제한 없이, A8G, A8Aib, A8T, G22E, K34R, R36G 뿐만 아니라, 미국 특허 제8,273,854호(이는 그 전문이 본원에서 참조로 포함된다)에 기술된 치환을 포함한다.
- [0251] 폴리펩티드 접합체의 일부 실시양태에서, GLP-1은 A8Aib, G22E, K26R, K34R 및 R36G, 또는 그의 임의의 조합으로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 이상의 치환을 포함하거나, 또는 그로 구성된다.
- [0252] 폴리펩티드 접합체의 일부 실시양태에서, GLP-1은 실질적으로 야생형 인간 GLP-1(서열 번호 1)의 생물학적 활성을 갖고, 야생형 인간 GLP-1과 적어도 50%(예컨대, 적어도 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90% 또는 95%)의 서열 동일성의 아미노산 서열을 갖는 폴리펩티드 단편을 포함하는 분자이다.
- [0253] 일부 실시양태에서, GLP-1은 서열 번호 1의 실질적인 생물학적 활성을 보유하면서, 서열 번호 1과 적어도 70%

(예컨대, 적어도 70%, 75%, 80%, 85%, 90% 또는 95%)의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다.

[0254] 일부 실시양태에서, GLP-1은 $X_7X_8EGTFTSDVSSYLEX_{22}X_{23}AAX_{26}X_{27}FIX_{30}WLVX_{34}GX_{36}G$ (서열 번호 2)의 아미노산 서열을 포함하고, 여기서, X_7 은 H, 이미다졸-4-아세테이트(IA), 또는 이미다졸프로피온산(IPA)이고; X_8 은 A, G, S, V, Aib, T, I, 또는 L이고; X_{22} 은 G, 또는 E이고; X_{23} 은 Q, C 또는 K이고; X_{26} 은 K, R, 또는 C이고; X_{27} 은 E, K, 또는 C이고; X_{30} 은 A, C 또는 K이고; X_{34} 은 R, K, 또는 C이고; X_{36} 은 R 또는 G이다.

[0255] GLP-1의 일부 실시양태에서, X_7 은 H이고; X_8 은 G 또는 Aib이다.

[0256] 특정 실시양태에서, GLP-1은 하기 열거되는 서열 번호 1, 및 3-9로 구성된 군으로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함한다(유전형은 서열 식별 번호 다음에 표시된다):

[0257] 서열 번호 1(WT GLP-1)

[0258] 서열 번호 3(8Aib, 34R, 36G),

[0259] 서열 번호 4(8Aib, 26C, 34R, 36G),

[0260] 서열 번호 5(8Aib, 26R, 34R, 36G),

[0261] 서열 번호 6(8Aib, 22E, 34R, 36G),

[0262] 서열 번호 7(8Aib, 22E, 26C, 34R, 36G),

[0263] 서열 번호 8(8Aib, 22E, 26R, 34R, 36G),

[0264] 서열 번호 9(8G, 22E, 26R, 34R, 36G).

[0265] 특정 실시양태에서, 폴리펩티드 접합체 중 GLP-1은 수용체 효능제는 본 개시내용에 제공된 바와 같은 GLP-1을 포함하거나, 또는 GLP-1이다. 일부 실시양태에서, 본원에 제공된 폴리펩티드 접합체 중 GLP-1은 서열 번호 3-9로 구성된 군으로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함한다.

[0266] 펩티드 링커

[0267] 본원에 개시된 폴리펩티드 접합체에서, 생물학적 활성 펩티드, 즉, GLP-1 수용체 효능제(예컨대, GLP-1)는 펩티드 링커의 N-말단에 부착된다.

[0268] 본원에서, GLP-1 수용체 효능제는 임의적으로 직접 연결(예컨대, 공유 결합, 예컨대, 펩티드 결합)을 통해 펩티드 링커에 부착될 수 있고, 펩티드 링커는 임의적으로 펩티드 결합에 의해 함께 연결된 아미노산 잔기로 구성될 수 있다. 임의적으로, 펩티드 링커는 하나 이상의 비천연 아미노산을 추가로 포함할 수 있다.

[0269] 폴리펩티드 접합체의 일부 실시양태에서, 펩티드 링커의 길이는 적어도 10개의 아미노산 잔기, 예컨대, 적어도 12, 24, 32, 40, 48, 50, 60, 70, 또는 80개의 아미노산 잔기 길이일 수 있다.

[0270] 임의의 적합한 폴리펩티드 링커가 사용될 수 있다. 예를 들어, 폴리펩티드 링커는 아미노산 글리신(G), 세린(S), 알라닌(A), 메티오닌(M), 아스파라긴(N), 글루타민(Q), 시스테인(C) 및 리신(K)으로부터 선택되는 아미노산 잔기를 포함하거나, 또는 그로 구성될 수 있다. 일부 실시양태에서, 폴리펩티드 링커는 입체적으로 방해받지 않는 대다수의 아미노산, 예컨대, 글리신 및 알라닌으로 구성될 수 있다. 일부 실시양태에서, 링커는 폴리글리신, 폴리알라닌, 글리신과 알라닌의 조합(예컨대, 폴리(Gly-Ala)), 또는 글리신과 세린의 조합(예컨대, 폴리(Gly-Ser))이다.

[0271] 일부 실시양태에서, 펩티드 링커는 제1 CRM 잔기를 제외한, G, Q, A, E, P, S, 및 T로 구성된 군으로부터 선택되는 아미노산 잔기로 구성된다.

[0272] 일부 실시양태에서, 펩티드 링커는 제1 서열 및 제2 서열을 포함한다. 제1 서열은 반복 서열로 이루어진 하나 이상의 반복부로 구성되고, 제2 서열의 N-말단에 연결된다. 제1 CRM 잔기는 제2 서열 중에 존재하고, 임의적으로 리신 잔기 또는 시스테인 잔기일 수 있다.

[0273] 특정 실시양태에서, 반복 서열은 서열 번호 10-40, 및 GS로 구성된 군으로부터 선택되는 서열을 포함하거나, 또는 그로 구성된다.

- [0274] 일부 실시양태에서, 반복 서열은 서열 번호 13의 서열(GAQP)을 갖는다.
- [0275] 본원에서 임의적으로, 반복 서열로 이루어진 하나 이상의 반복부의 개수는 1 내지 30의 정수이다. 특정 실시양태에서, 반복 서열로 이루어진 하나 이상의 반복부의 개수는 5, 7, 9 및 11로 구성된 군으로부터 선택된다.
- [0276] 특정 실시양태에서, 펩티드 링커의 제2 서열은 서열 번호 41(GQKP) 또는 서열 번호 42(GQCP)의 서열을 갖는다.
- [0277] 특정 실시양태에서, 폴리펩티드 링커는 서열 번호 43-50, 및 82-84로 구성된 군으로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함한다.
- [0278] 펩티드 링커가 제1 서열 및 제2 서열을 포함하고, 여기서, 제1 서열은 반복 서열로 이루어진 하나 이상의 반복부로 구성된 것인 상기 배열 이외에도 다른 배열도 존재할 수 있다는 점에 유의한다. 특정 경우에, 펩티드 링커는 1 초과와 반복 서열을 포함하거나, 또는 그로 구성될 수 있다. 예를 들어, 폴리펩티드 링커는 2, 3 또는 4개의 상이한 반복 서열을 포함하거나, 또는 그로 구성된다. 특정 실시양태에서, 폴리펩티드 링커는 상이한 반복 서열의 순차적 또는 탠덤 반복부를 포함하거나, 또는 그로 구성된다.
- [0279] **CRM 잔기**
- [0280] 임의의 이론에 얽매이기를 바라지 않으면서, GLP-1에의 CRM(또는 지방산) 접합은 I의 존재하에서 그의 활성을 감소시킬 수 있다고 간주된다. 예를 들어, GLP-1 활성의 감소가 GLP-1(8Aib, 36R)의 K26에 접합된 지방산을 갖는 세마글루티드에 대해 보고되었으며, I의 존재하에 그의 비접합된 대응물과 비교하여 활성의 유의적인 감소를 나타내었다. I는 인간 혈액에 존재하고, 생리학적 조건하에서 불가피하므로, I의 존재하에 GLP-1 수용체 효능제 활성의 감소는 단백질 접합체의 치료 활성을 손상시키는 것으로 간주된다. 그러나, 본원에 제공된 폴리펩티드 접합체 중 일부는 CRM 접합에도 불구하고, I의 존재하에 GLP-1 활성의 대부분을 보유할 수 있다. 상기 실시양태에서, 본원에 제공된 폴리펩티드 접합체는 단일 접합되고, 펩티드 링커에 접합되지만, 생물학적 활성 펩티드(예컨대, GLP-1)에는 접합되지 않은 CRM을 갖는다.
- [0281] 이들 실시양태 중 일부에서, 본원에 제공된 상기 단일 접합된 폴리펩티드 접합체는 펩티드 링커가 없고, GLP-1 상에 접합된 CRM을 갖는 비교 폴리펩티드 접합체와 비교하여, 인간 혈청 알부민(I)의 존재하에 증가된 GLP-1 수용체 효능제 활성을 갖는다. 특정 실시양태에서, I의 존재하에서의 GLP-1 수용체 효능제 활성은 당업계에 공지된 바와 같이, 예컨대, cAMP 검정법과 같은 무세포 검정법에서 또는 예컨대, 리포터 세포 검정법과 같은 세포 기반 검정법에서 GLP-1 수용체 활성화에 대한 시험관내 검정법에서 측정될 수 있다. 특정 실시양태에서, 비교 폴리펩티드 접합체는 세마글루티드이다. 특정 실시양태에서, 본원에 제공된 단일 접합된 폴리펩티드 접합체는 동일하거나, 또는 유사한 검정법에서 측정된 바와 같이, I의 존재하의 세마글루티드의 것보다 50% 이하(또는 40%, 30%, 20%, 10%, 5%, 또는 3% 이하)의 EC50으로 인간 혈청 알부민(I)의 존재하에 GLP-1 수용체를 활성화시킨다. 특정 실시양태에서, 본원에 제공된 단일 접합된 폴리펩티드 접합체는 동일하거나, 또는 유사한 검정법에서 측정된 바와 같이, I의 부재하의 세마글루티드의 것과 유사한(예컨대, 20% 내지 300%) EC50으로 I의 부재하에서 GLP-1 수용체를 활성화시킨다. 특정 실시양태에서, 인간 혈청 알부민(I)의 양은 GLP-1 수용체 활성화에의 I 결합의 영향의 평가를 허용한다. 특정 실시양태에서, GLP-1 수용체 활성화에 대한 시험관내 검정법은 적어도 0.5%, 1%, 1.2%, 1.5%, 1.8% 또는 2% I의 존재하에 수행된다.
- [0282] 특정 실시양태에서, 본원에 제공된 단일 접합된 폴리펩티드 접합체는 동일하거나, 또는 유사한 검정법에서 측정된 바와 같이, 세마글루티드의 것과 유사한(예컨대, 약 70% 내지 약 500%)의 결합 친화도(KD)로 I에 결합한다.
- [0283] 특정 실시양태에서, 본원에 제공된 단일 접합된 폴리펩티드 접합체는 유사한 생체내 연구 조건하에서 및 동일한 유형의 실험 동물에서 측정된 바와 같이, 펩티드 링커가 없고, GLP-1 상에 접합된 CRM을 갖는 비교 폴리펩티드 접합체, 예컨대, 세마글루티드와 비교하여 적어도 유사한 말단 반감기를 갖는다. 말단 반감기 측정에 적합한 동물로는 예를 들어, 마우스, 래트, 미니피그, 또는 원숭이를 포함한다. 특정 실시양태에서, 말단 반감기는 치료 효능을 제공하기에 적합한 용량으로 단일 용량 정맥내 투여 또는 피하 투여 또는 경구 투여 후에 적합한 동물에서 측정된다.
- [0284] 특정 실시양태에서, 폴리펩티드 접합체는 제2 CRM 잔기에 접합된 제2 CRM을 추가로 포함한다. 즉, 본 개시내용은 또한 이중 접합된 폴리펩티드 접합체를 제공한다. 제2 CRM 접합이 폴리펩티드 접합체의 반감기를 추가로 연장시킬 수 있다는 것이 본 발명자에 의해 예기치 않게 발견된다. 특정 실시양태에서, 제1 및 제2 CRM 접합, 둘 다를 갖는 이중 접합된 폴리펩티드 접합체는 단 하나의 CRM 접합만을 갖는 상응하는 폴리펩티드 접합체(예컨대, 세마글루티드)보다 적어도 1배, 2배, 3배, 4배, 5배, 6배 또는 그 초과로 더 긴 연장된 반감기를 가질 수 있다.

- [0285] 제2 CRM 잔기는 임의의 적합한 위치에 있을 수 있다. 특정 실시양태에서, 제2 CRM 잔기는 GLP-1 수용체 효능제 내에 있거나, 또는 펩티드 링커 내에 있다.
- [0286] 특정 실시양태에서, 제2 CRM 잔기는 GLP-1 펩티드의 K26에 있다. GLP-1 펩티드 상의 2개의 지방산 모이어티와의 접합은 활성을 유의적으로 감소시키거나, 또는 심지어 접합된 GLP-1 펩티드를 비효율적이게 만들 수 있는 것으로 보고되었다. 따라서, GLP-1 펩티드의 C-말단으로부터 충분히 떨어진 위치에서 GLP-1(예컨대, K26) 및 펩티드 링커 상의 접합이 I의 존재하에 GLP-1 폴리펩티드의 생물학적 활성에 대한 지방산 접합의 부정적인 영향을 최소화할 수 있다는 것이 본 발명자에 의해 예기치 않게 발견된다.
- [0287] 상기 실시양태 중 일부에서, 본원에 제공된 상기 이중 접합된 폴리펩티드 접합체는 펩티드 링커가 없고, GLP-1 상에 접합된 CRM을 갖는 비교 폴리펩티드 접합체와 비교하여 I의 존재하에 유사하거나, 또는 허용가능한 GLP-1 수용체 효능제 활성을 갖는다. 특정 실시양태에서, 본원에 제공된 이중 접합된 폴리펩티드 접합체는 동일하거나, 또는 유사한 검정법에서 측정된 바와 같이, I의 존재하에 펩티드 링커가 없고, GLP-1 상에 접합된 CRM을 갖는 비교 폴리펩티드 접합체, 예컨대 세마글루티드의 것보다 2000% 이하(또는 1500%, 1000%, 900%, 900%, 800%, 700%, 600%, 또는 500% 이하)의 EC50으로 I의 존재하에 GLP-1 수용체를 활성화시킨다. 특정 실시양태에서, 본원에 제공된 이중 접합된 폴리펩티드 접합체는 동일하거나, 또는 유사한 검정법에서 측정된 바와 같이, 펩티드 링커가 없고, GLP-1 상에 접합된 CRM을 갖는 비교 폴리펩티드, 예컨대 세마글루티드의 것과 유사한(예컨대, 500%, 400%, 300%, 또는 200% 이하, 또는 심지어 그 미만) EC50으로 I의 부재하에 GLP-1 수용체를 활성화시킨다. 특정 실시양태에서, 본원에 제공된 이중 접합된 폴리펩티드 접합체는 I의 존재하에 제1 EC50으로, 및 I의 부재하에 제2 EC50으로 GLP-1 수용체를 활성화시키고, 제1 EC50은 제2 EC50보다 높지만, 제2 EC50의 것의 1000배 이하이며, 예를 들어, (I의 존재하에) 제1 EC50은 (I의 부재하에) 제2 EC50의 900배, 800배, 700배, 600배 또는 500배 이하이다. 특정 실시양태에서, I는 GLP-1 수용체 활성화에 대한 I 결합의 영향의 평가를 허용하는 적합한 양으로 GLP-1 수용체 활성화에 대한 시험관내 검정법에 존재한다. 특정 실시양태에서, GLP-1 수용체 활성화에 대한 시험관내 검정법은 GLP-1 수용체 활성화에 대한 I 결합의 영향의 평가를 허용하는 적합한 양의 인간 혈청 알부민(I)의 존재하에 수행된다. 특정 실시양태에서, GLP-1 수용체 활성화에 대한 시험관내 검정법은 적어도 0.5%, 1%, 1.2%, 1.5%, 1.8% 또는 2% I의 존재하에 수행된다.
- [0288] 특정 실시양태에서, 본원에 제공된 이중 접합된 폴리펩티드 접합체는 동일하거나, 또는 유사한 검정법에서 측정된 바와 같이, 펩티드 링커가 없고, GLP-1 상에 접합된 CRM을 갖는 비교 폴리펩티드 접합체, 예컨대 세마글루티드의 것보다 유의적으로 더 낮은(예컨대, 50%, 40%, 30%, 또는 20% 이하의) KD 값으로 표시되는 더 높은 결합 친화도로 I에 결합한다.
- [0289] 특정 실시양태에서, 본원에 제공된 이중 접합된 폴리펩티드 접합체는 펩티드 링커가 없고, 생물학적 활성 펩티드(예컨대, GLP-1) 상에 접합된 CRM을 갖는 비교 폴리펩티드 접합체와 비교하여 증진된 약동학적 특성을 가지며, 여기서, 약동학적 특성은 치료 유효 용량을 피험체에게 투여한 후 폴리펩티드 접합체의 혈중 농도를 측정함으로써 결정된다.
- [0290] 특정 실시양태에서, 본원에 제공된 이중 접합된 폴리펩티드 접합체는 유사한 생체내 연구 조건하에서 및 동일한 유형의 실험 동물에서 측정된 바와 같이, 펩티드 링커가 없고, GLP-1 상에 접합된 CRM을 갖는 비교 폴리펩티드 접합체, 예컨대, 세마글루티드의 것보다 적어도 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 120%, 150%, 180%, 200%, 300%, 또는 400%만큼 말단 반감기 증가를 나타낸다. 말단 반감기 측정에 적합한 동물로는 예를 들어, 마우스, 래트, 미니피그, 또는 원숭이를 포함한다. 특정 실시양태에서, 말단 반감기는 치료 효능을 제공하기에 적합한 용량으로 단일 용량 정맥내 투여 또는 피하 투여 후에 적합한 동물에서 측정된다.
- [0291] 특정 실시양태에서, 본원에 제공된 이중 접합된 폴리펩티드 접합체는 유사한 생체내 연구 조건하에서 및 동일한 유형의 실험 동물에서 측정된 바와 같이, 펩티드 링커가 없고, GLP-1 상에 접합된 CRM을 갖는 비교 폴리펩티드 접합체, 예컨대, 세마글루티드의 것보다 적어도 약 50% 더 긴(60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 120%, 150%, 180%, 200%, 300%, 또는 400% 더 긴) 기간 동안 폴리펩티드 접합체에 대한 치료창 내에서 그대로 유지되는 혈액 또는 혈장 또는 혈청 농도를 갖는다. 본원에서 사용되는 바, 용어 "치료창"은 허용불가능한 독성 없이 치료하고자 하는 병태에 대해 치료 이익 또는 효능을 제공하는 혈액 또는 혈장 또는 혈청 내의 폴리펩티드 접합체의 농도 수준 범위를 의미한다. 농도 수준 범위는 치료 반응을 초래하는 최소 농도부터 허용할 수 없는 독성을 유도하지 않으면서 치료 반응을 제공하는 최대 농도까지일 수 있다.
- [0292] 특정 실시양태에서, 본원에 제공된 이중 접합된 폴리펩티드 접합체는 유사한 생체내 연구 조건하에서 및 동일한 유형의 실험 동물에서 측정된 바와 같이, 펩티드 링커가 없고, GLP-1 상에 접합된 CRM을 갖는 비교 폴리펩티드

접합체, 예컨대, 세마글루티드와 비교하여 치료 효능의 지속 기간을 연장시킨다. 이러한 확장된 치료 효능은 시간-반응 곡선에 대한 곡선하 면적(AUC: area under curve)을 특징으로 할 수 있으며, 이는 대사 병태를 앓는 피험체(예컨대, 질환 모델 동물)에서 의도된 치료 효과를 제공하기에 적합한 단일 투여 후 또는 반복 투여 후에 플롯팅될 수 있다. 연장된 치료 효능 지속 기간 또한 치료 반응의 지속 기간을 특징으로 할 수 있다.

[0293] 특정 실시양태에서, 특정 실시양태에서, 치료 반응은 체중 감소, 음식 섭취 감소, 또는 글루코스 수준(공복 글루코스 수준 또는 비공복 글루코스 수준) 감소를 포함한다. 특정 실시양태에서, 본원에 제공된 이중 접합된 폴리펩티드 접합체는 유사한 생체내 연구 조건하에서 및 동일한 유형의 실험 동물에서 측정된 바와 같이, 펩티드 링커가 없고, GLP-1 상에 접합된 CRM을 갖는 비교 폴리펩티드 접합체, 예컨대, 세마글루티드의 것보다 적어도 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 120%, 150%, 180%, 200%만큼 시간-반응 곡선에 대한 AUC의 증가를 나타낸다. 특정 실시양태에서, 본원에 제공된 이중 접합된 폴리펩티드 접합체는 유사한 생체내 연구 조건하에서 및 동일한 유형의 실험 동물에서 측정된 바와 같이, 펩티드 링커가 없고, GLP-1 상에 접합된 CRM을 갖는 비교 폴리펩티드 접합체, 예컨대, 세마글루티드의 것보다 적어도 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 120%, 150%, 180%, 200%, 300%, 또는 400%만큼 치료 반응의 지속 기간의 증가를 나타낸다. 특정 실시양태에서, 치료 반응을 위한 실험 동물은 질환 모델 동물, 예컨대, db/db 마우스, 또는 식이 유도 비만(DIO) 동물이다.

[0294] CRM 잔기

[0295] 본원에 제공된 본 개시내용의 범주 내에서, 사용된 상이한 CRM에 따라 폴리펩티드 접합체에서 상이한 CRM 잔기가 사용될 수 있으며, 폴리펩티드 접합체에서의 CRM의 접합을 매개하는 CRM 잔기가 폴리펩티드 접합체 중에 하나 또는 2개 존재할 수 있다.

[0296] 특정 실시양태에서, 폴리펩티드 접합체는 CRM과 단일 접합될 수 있다.

[0297] 특정 실시양태에서, 펩티드 링커-상주 제1 CRM 잔기는 리신 잔기이고, 폴리펩티드 접합체는 단 하나의 리신 잔기를 포함한다. 상기 실시양태에서, 펩티드 링커는 단 하나의 리신 잔기를 포함하고, GLP-1 수용체 효능제는 리신 잔기를 포함하지 않고, 따라서, 천연 GLP-1(1-37) 서열에서 발견되는 자연적으로 발생된 잔기, 즉, K26 및 K34는 임의적으로 비리신 잔기(예컨대, R, Q, A, G, H, S, 및 T 등)로 치환될 수 있다. 특정 실시양태에서, GLP-1은 K26R 및 K34R의 치환을 포함한다.

[0298] 명세서 전역에 걸쳐, CRM 잔기(예컨대, K 또는 C)가 GLP-1에 존재하는 경우, CRM 잔기의 위치는 GLP-1(1-37)의 아미노산 서열을 참조하여 식별된다는 점에 유의한다. 예를 들어, K26은 GLP-1(1-37)의 아미노산 서열을 참조하여 26번째 위치(GLP-1(7-37), 즉, 서열 번호 1의 아미노산 서열을 참조하여 20번째 위치에 상응한다)가 K라는 것을 나타낸다. 유사하게, K34는 GLP-1(1-37)의 아미노산 서열을 참조하여 34번째 위치(GLP-1(7-37), 즉, 서열 번호 1의 아미노산 서열을 참조하여 28번째 위치에 상응한다)가 K라는 것을 나타낸다.

[0299] 특정 실시양태에서, 펩티드 링커-상주 제1 CRM 잔기는 시스테인 잔기이고, 폴리펩티드 접합체는 단 하나의 시스테인 잔기를 포함한다. 상기 실시양태에서, 펩티드 링커는 단 하나의 시스테인 잔기를 포함하고, GLP-1 수용체 효능제는 시스테인 잔기를 포함하지 않는다. 특정 실시양태에서, 폴리펩티드 접합체 중 단일 생물학적 활성 펩티드 폴리펩티드는 GLP-1을 포함한다. 천연 GLP-1은 어떠한 시스테인 잔기도 함유하지 않으며, 따라서, 임의의 GLP-1 유도체(본원에 제공된 것 포함)가 시스테인 잔기를 함유하지 않는 한, 사용될 수 있다.

[0300] 특정 실시양태에서, 제1 CRM 잔기는 비천연 아미노산 잔기이고, 폴리펩티드 접합체는 CRM 잔기로서 단 하나의 비천연 아미노산 잔기를 포함한다. 비천연 아미노산은 추가적인 기능 및/또는 반응성을 제공할 수 있는 다양한 작용기 또는 반응성 기를 함유할 수 있다. 본 개시내용의 융합 폴리펩티드에 모이어티를 접합시키는 목적에 유익한 특정 비천연 아미노산은 아지드, 알킨, 알켄, 사이클로알킨 또는 할라이드를 갖는 측쇄를 갖는 것을 포함한다.

[0301] 단일 접합된 폴리펩티드 접합체에서, 펩티드 링커-상주 제1 CRM 잔기가 리신 잔기일 때, GLP-1은 서열 번호 5 또는 서열 번호 8의 아미노산 서열을 포함할 수 있다. 본원에서, 펩티드 링커는 임의적으로 서열 번호 43, 서열 번호 45, 및 서열 번호 46으로 구성된 군으로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함할 수 있다. 특정 실시양태에서, 폴리펩티드 접합체는 하기 열거되는 서열 번호 52, 55, 56, 및 60-62로 구성된 군으로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함한다(제1 CRM 잔기는 서열 식별 번호 다음에 표시된다):

[0302] 서열 번호 52(76K),

[0303] 서열 번호 55(68K),

- [0304] 서열 번호 56(60K),
- [0305] 서열 번호 60(76K),
- [0306] 서열 번호 61(68K), 또는
- [0307] 서열 번호 62(60K).
- [0308] 단일 접합된 폴리펩티드 접합체에서, 펩티드 링커-상주 제1 CRM 잔기가 시스테인 잔기잔기일 때, GLP-1은 서열 번호 3, 5, 6, 및 9로 구성된 군으로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함할 수 있다. 본원에서, 펩티드 링커는 임의적으로 서열 번호 47, 서열 번호 49, 및 서열 번호 50으로 구성된 군으로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함할 수 있다. 특정 실시양태에서, 폴리펩티드 접합체는 하기 열거되는 서열 번호 66-71, 및 75-80으로 구성된 군으로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함한다(제1 CRM 잔기는 서열 식별 번호 다음에 표시된다):
- [0309] 서열 번호 66(76C),
- [0310] 서열 번호 67(68C),
- [0311] 서열 번호 68(60C),
- [0312] 서열 번호 69(76C),
- [0313] 서열 번호 70(68C),
- [0314] 서열 번호 71(60C),
- [0315] 서열 번호 75(76C),
- [0316] 서열 번호 76(68C),
- [0317] 서열 번호 77(60C),
- [0318] 서열 번호 78(76C),
- [0319] 서열 번호 79(68C),
- [0320] 서열 번호 80(60C).
- [0321] 특정 실시양태에서, 폴리펩티드 접합체는 제2 CRM 잔기를 추가로 포함하고, 즉, 폴리펩티드 접합체는 2개의 CRM(즉, 제1 CRM 및 제2 CRM)이 각각 2개의 CRM 잔기(즉, 제1 CRM 잔기 및 제2 CRM 잔기)에 접합된 것인, **이중 접합된** 폴리펩티드 접합체이다.
- [0322] 특정 실시양태에서, 제2 CRM 잔기는 제1 CRM 잔기와 같이 펩티드 링커 내에 있다. 상기 실시양태에서, 제2 CRM 잔기는 두 CRM 잔기가 적절하게 접합될 수 있는 한, 제1 CRM 잔기로부터 임의의 적합한 거리에 있을 수 있다.
- [0323] 특정 실시양태에서, 제2 CRM 잔기는 GLP-1 수용체 효능제, 예를 들어, GLP-1 내에 있다. 특정 실시양태에서, 제2 CRM 잔기는 천연 GLP-1 서열에서 발견되는 자연적으로 발생된 잔기이거나, 또는 예를 들어, 예를 들어, 자연적으로 발생된 잔기의 치환에 의해, 또는 새로운 잔기의 삽입에 의해 도입된 잔기이다.
- [0324] 특정 실시양태에서, 제1 및 제2 CRM 잔기, 둘 다 리신 잔기이고, 폴리펩티드 접합체는 단 2개의 리신 잔기를 포함한다. 특정 실시양태에서, 제2 리신 잔기는 GLP-1 중에 존재하고, K23, K26, K27, K30, 및 K34로 구성된 군으로부터 선택된다. 특정 실시양태에서, 제2 CRM 잔기는 천연 GLP-1 서열에서 발견되는 자연적으로 발생된 잔기, 예를 들어, K26 또는 K34이다. 특정 실시양태에서, 제2 CRM 잔기는 도입된 잔기이다. CRM 잔기는, 예를 들어, 치환이 GLP-1의 GLP-1R 효능제 활성을 실질적으로 감소시키지 않는 한, 치환에 의해, 임의의 적합한 위치에서 GLP-1 서열 내로 도입될 수 있다. 제2 CRM 잔기는, 예를 들어, Q23K, E27K, 또는 A30K의 치환에 의해 도입될 수 있다. 특정 실시양태에서, GLP-1 내의 CRM 잔기(들) 이외의 다른 모든 리신 잔기(들)는 비리신 잔기로 치환되고, 이에 따라 폴리펩티드 접합체는 CRM 잔기를 제외한 추가의 리신 잔기를 포함하지 않는다. 예를 들어, K26이 제2 CRM 잔기인 경우, K34는 비리신 잔기로 치환되거나, 또는 그 반대의 경우도 마찬가지이다. 비리신 잔기는 당업자에 의해 선택될 수 있으며, 예로는 아르기닌 I, 글루타민(Q), 알라닌(A), 글리신(G), 히스티딘(H), 세린(S), 또는 트레오닌(T)을 포함한다.
- [0325] 이중 접합된 폴리펩티드 접합체에서, 제1 및 제2 CRM 잔기, 둘 다 리신 잔기인 경우, GLP-1은 서열 번호 3 또는 서열 번호 6의 아미노산 서열을 포함할 수 있다. 본원에서, 펩티드 링커는 임의적으로 서열 번호 43-45, 또는

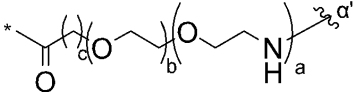
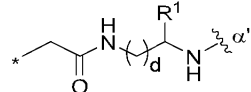
83으로 구성된 군으로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함할 수 있다. 특정 실시양태에서, 폴리펩티드 접합체는 하기 열거되는 서열 번호 51, 53, 54, 57-59, 85 및 86으로 구성된 군으로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함한다(제1 및 제2 CRM 잔기는 서열 식별 번호 다음에 표시된다):

- [0326] 서열 번호 51(26K, 76K),
- [0327] 서열 번호 53(26K, 84K),
- [0328] 서열 번호 54(26K, 68K),
- [0329] 서열 번호 57(26K, 76K),
- [0330] 서열 번호 58(26K, 84K),
- [0331] 서열 번호 59(26K, 68K),
- [0332] 서열 번호 85(26K, 96K) 또는
- [0333] 서열 번호 86(26K, 60K).
- [0334] 특정 실시양태에서, 제1 및 제2 CRM 잔기, 둘 다 시스테인 잔기이고, 폴리펩티드 접합체는 단 2개의 시스테인 잔기를 포함한다. 특정 실시양태에서, 제2 시스테인 잔기는 GLP-1 내에 있다. 특정 실시양태에서, 제2 시스테인 잔기는 펩티드 링커 내에 있다.
- [0335] 특정 실시양태에서, 제1 및 제2 CRM 잔기, 둘 다 비천연 아미노산 잔기이고, 폴리펩티드 접합체는 CRM 잔기로서 단 2개의 비천연 아미노산 잔기를 포함한다.
- [0336] 특정 실시양태에서, GLP-1 중 시스테인 잔기 또는 비천연 아미노산 잔기는 서열 번호 1과 비교하여 Q23, K26, E27, A30, 및 K34로 구성된 군으로부터 선택되는 위치에서 치환에 의해 도입된다. 특정 실시양태에서, GLP-1 중 시스테인 잔기 또는 NNAA는 서열 번호 1과 비교하여 K26 또는 E27의 위치에서 치환에 의해 도입된다. 특정 실시양태에서, GLP-1 중 제2 CRM 잔기는 시스테인이고, Q23C, K26C, E27C, A30C 및 K34C로 구성된 군으로부터 선택되는 위치에서 치환에 의해 도입된다.
- [0337] 이중 접합된 폴리펩티드 접합체에서, 제1 및 제2 CRM 잔기, 둘 다 시스테인 잔기인 경우, GLP-1은 서열 번호 4 또는 서열 번호 7의 아미노산 서열을 포함할 수 있다. 본원에서, 펩티드 링커는 임의적으로 서열 번호 47-49로 구성된 군으로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함할 수 있다. 특정 실시양태에서, 폴리펩티드 접합체는 하기 열거되는 서열 번호 63-65 및 72-74로 구성된 군으로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함한다(제1 및 제2 CRM 잔기는 서열 식별 번호 다음에 표시된다):
- [0338] 서열 번호 63(26C, 84C),
- [0339] 서열 번호 64(26C, 76C),
- [0340] 서열 번호 65(26C, 68C),
- [0341] 서열 번호 72(26C, 84C),
- [0342] 서열 번호 73(26C, 76C),
- [0343] 서열 번호 74(26C, 68C).
- [0344] **CRM**
- [0345] 특정 실시양태에서, 제1 CRM 및/또는 제2 CRM은 각각(또는 일반적으로 CRM)은 혈장 단백질 결합 모이어티, 중합체, Fc, 인간 혈청 알부민(HSA: human serum albumin) 및 그의 기능적 단편, Xten 서열, 또는 PAS 서열을 포함한다. 특정 실시양태에서, Xten 서열은 W02007103515, W02009023270, W02010091122, W02011123813, W02013130683, W02017146979, W02011084808, W02013040093, W02013122617, W02014011819, W02013184216, W02014164568, W02015023891, W02016077505 및 W02017040344(상기 문헌의 개시내용은 그 전문이 포함된다)에 기술된 아미노산 서열을 갖는 확장된 재조합 폴리펩티드 서열이다. 특정 실시양태에서, 용어 "APS"와 상호교환 가능하게 사용될 수도 있는 용어 "PAS"는 US8563521B2(상기 문헌의 개시내용은 그 전문이 포함된다)에 기술된 바와 같이, Ala, Ser, 및 Pro 잔기로 구성된 아미노산 반복을 지칭한다.
- [0346] 특정 실시양태에서, CRM은 알부민 결합 모이어티를 포함한다. 용어 "알부민 결합 모이어티"는 알부민(예컨대,

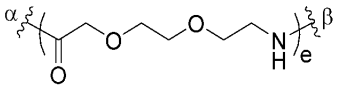
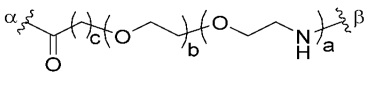
인간 혈청 알부민) 또는 그의 임의의 기능적 단편과 충분한 특이성, 바람직하게, 비공유적으로 결합할 수 있는 임의의 기능적 모이어티를 지칭한다. 치료 용량 폴리펩티드, 폴리펩티드, 또는 폴리펩티드 복합체에 부착된 알부민 결합 모이어티는 전형적으로 인간 혈청 알부민에 대해 10 μ M 미만, 바람직하게, 1 pM 미만의 친화도를 갖는다. 알부민 결합 모이어티는 제한 없이, 알부민 결합 도메인, 합성 펩티드로부터의 알부민 결합 서열, 및 알부민 결합 화학적 모이어티를 포함할 수 있다. 예를 들어, 알부민 결합 모이어티는 스트렙토코커스 (*streptococcal*) 단백질 G로부터의 알부민 결합 도메인, 펩토스트렙토코커스 매그너스(*Peptostreptococcus magnus*) 단백질 PAB로부터의 알부민 결합 도메인, 핵심 서열 DICLPRWGCLW(서열 번호 81) 갖는 알부민 결합 펩티드로부터 선택된다. 알부민 결합 모이어티인 다수의 작은 펩티드가 문헌 [J. Biol Chem. 277, 38 (2002) 35035-35043]에 기술되어 있다. 또 다른 예로서, 알부민 결합 모이어티는 4-40개의 탄소 원자를 함유하는 선형 및 분지형 친유성 모이어티, 사이클로펜타노페난트렌 골격을 갖는 화합물 등으로부터 선택된다. 예를 들어, 알부민 결합 모이어티는 화학식 $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_v\text{CO-NHCH}(\text{COOH})(\text{CH}_2)_2\text{CO-}$ 의 기이고, 여기서, v는 10 내지 24의 정수이다.

[0347]

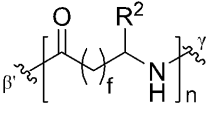
특정 실시양태에서, 알부민 결합 모이어티는 *-A-B-C-D-E의 구조를 포함하고, 여기서, A, B, C, D 및 E는 아미드 결합을 통해 상호연결되며, A의 * 단부는 폴리펩티드 복합체 상의 접합가능한 잔기의 반응성 기에 연결되고,

여기서, A는 결합,  및 로부터 선택되고, 여기서, a, b, c 및 d는 독립적으로 0 내지 4의 정수이고, R¹은 수소 또는 -COOH이고;

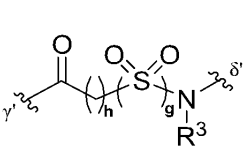
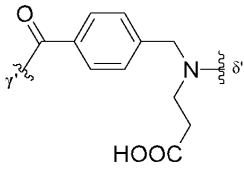
[0348]

B는 결합,  , 및 로부터 선택되고, 여기서, e는 1 내지 4의 정수이고, 여기서, 위치 a는 위치 a'에 연결되고;

[0349]

C는 결합 또는  이고, 여기서, R²는 -CH₂SO₃H 또는 -COOH이고, f는 1 내지 4의 정수이고, n은 1 내지 25의 정수이고, 여기서, B가 결합이 아닌 경우, 이때 위치 β '는 위치 β 에 연결되거나, 또는 B가 결합인 경우, 이때 위치 β '는 위치 a'에 연결되고;

[0350]

D는 결합,  , 및 로부터 선택되고, 여기서, g 및 h는 독립적으로 0 또는 1이고, R³은 H 또는 -CH₂COOH이고, 여기서,

[0351]

B가 결합이 아니고, C가 결합인 경우, 이때 위치 γ '는 위치 β 에 연결되고;

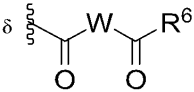
[0352]

C가 결합이 아닌 경우, 이때 위치 γ '는 위치 γ 에 연결되고;

[0353]

B가 결합이고, C가 결합인 경우, 이때 위치 γ '는 위치 a'에 연결되고;

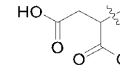
[0354]

E는 화학식:  (I) 을 갖는 산성 기이고,

[0355]

여기서, W는 -(CR⁴R⁵)₁-을 나타내고, 여기서, R⁴ 및 R⁵는 독립적으로 수소, 할로젠, 시아노, 하이드록실, 알킬, 알케닐, 알키닐, 사이클로알킬, 헤테로사이클릴, 아릴, 헤테로아릴, 하이드록시알킬, 아미노, 아미노알킬, 카복

실, 카복실알킬, 알콕시, 아릴옥시, 및 카복사미드로 구성된 군으로부터 선택되고, R^6 은 하이드록실 또는 NR^7R^8



로부터 선택되고, 여기서, R^7 및 R^8 은 독립적으로 수소, 알킬, 하이드록실, 및 선택되고, 1은 10 내지 20의 정수이고, 여기서,

[0356] D가 결합이 아닌 경우, 이때 위치 δ 는 위치 δ' 에 연결되고,

[0357] C가 결합이 아니고, D가 결합인 경우, 이때 위치 δ 는 위치 γ 에 연결되고,

[0358] B가 결합이 아니고, C가 결합이고, D가 결합인 경우, 이때 위치 δ 는 위치 β 에 연결되고,

[0359] A가 결합이 아니고, B, C, 및 D 모두 결합인 경우, 이때 위치 δ 는 위치 α' 에 연결된다.

[0360] 특정 실시양태에서,

[0361] A는 결합 또는 이고, 여기서, d는 1 내지 4의 정수이고, R^1 은 수소이고;

[0362] B는 결합 또는 이고, 여기서, e는 1 내지 4의 정수이고, 여기서, 위치 α 는 위치 α' 에 연결되고;

[0363] C는 이고, 여기서, R^2 는 $-COOH$ 이고, f는 1 내지 4의 정수이고, n은 1 내지 25의 정수이고, 여기서, B가 결합이 아닌 경우, 이때 위치 β' 는 위치 β 에 연결되거나, 또는 B가 결합인 경우, 이때 위치 β' 는 위치 α' 에 연결되고;

[0364] D는 결합이고;

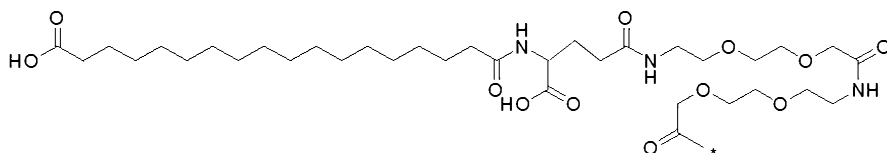
[0365] E와 관련하여, R^4 및 R^5 는 각각 수소이고, R^6 은 하이드록실이고, 1은 10 내지 20의 정수이고, 위치 δ 는 위치 γ 에 연결된다.

[0366] 추가로 임의적으로, d는 1이고, e는 2이고, f는 1이고, n은 1이고, 1은 14 내지 20의 정수이다.

[0367] 특정 실시양태에서, CRM은 리신 잔기에 접합되고, 임의적으로, 리신 잔기는 펩티드 링커 내 또는 GLP-1 내에 있

다. 본원에서, A는 결합일 수 있고, B는 일 수 있다.

[0368] 상기 실시양태에서, CRM은 하기 화학식($-HOOC-(CH_2)_{16}-CO-gGlu-2XADO$ 로도 지칭, 여기서 2XADO는 2개의 연속적인 ADO 모이어티를 의미하고, ADO는 8-아미노-3,6-디옥사옥타노산의 약어이다)의 구조를 포함한다:



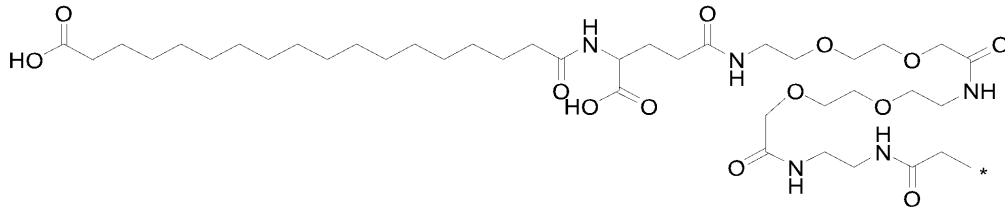
[0369]

[0370] 특정 실시양태에서, CRM은 시스테인 잔기에 접합되고, 임의적으로, 시스테인 잔기는 펩티드 링커 내 또는 GLP-1

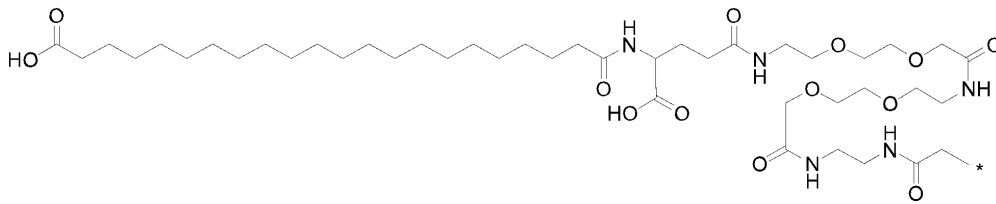
내에 있다. 본원에서, A는 일 수 있고, B는 일 수 있고,

여기서, 위치 α 는 위치 α' 에 연결된다.

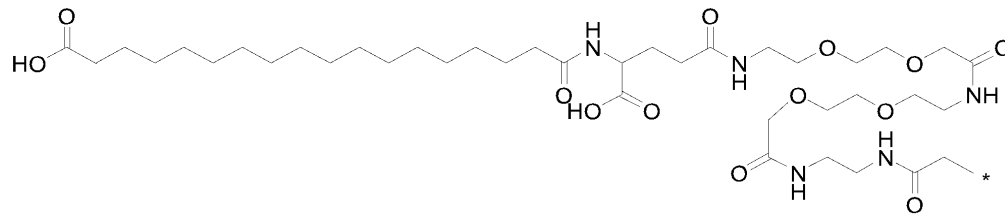
[0371] 상기 실시양태에서, CRM은 하기 화학식(HOOC-(CH₂)₁₆-CO-gGlu-2XADO-EDA-CO-CH₂) 또는 HOOC-(CH₂)₂₀-CO-gGlu-2XADO-EDA-CO-CH₂로도 지칭)의 구조를 포함한다:



또는



[0375] 추가로, 일부 실시양태에 따라, CRM은 하기 화학식(HOOC-(CH₂)₁₆-CO-gGlu-2XADO-EDA-CO-CH₂로도 지칭)의 구조를 포함한다:



폴리펩티드 접합체

[0378] 특정 실시양태에서, 본원에 제공된 폴리펩티드 접합체는 서열 번호 51-80, 및 85-88로 구성된 군으로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함하거나, 또는 그로 구성된다.

[0379] 특정 실시양태에서, 본원에 제공된 폴리펩티드 접합체는 단일 접합되고, 즉, 단일 CRM은 폴리펩티드 접합체의 폴리펩티드 부분 중 단일 CRM 잔기에 접합된다. 본원에서, GLP-1은 서열 번호 3, 5, 6, 8, 및 9로 구성된 군으로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함한다. 본원에서, 폴리펩티드 접합체의 폴리펩티드 부분은 서열 번호 52, 55, 56, 60-62, 66-71, 및 75-80로 구성된 군으로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함하거나, 또는 그로 구성될 수 있고, CRM 잔기는 60, 68, 및 76으로 구성된 군으로부터 선택되는 위치의 폴리펩티드 부분의 펩티드 링커 중의 리신 잔기 또는 시스테인 잔기일 수 있고, CRM은 리신 접합의 경우, 모이어티 A (HOOC-(CH₂)₁₆-CO-gGlu-2XADO), 또는 시스테인 접합의 경우, 모이어티 B (HOOC-(CH₂)₁₆-CO-gGlu-2XADO-EDA-CO-CH₂)의 구조를 포함할 수 있다.

[0380] CRM 잔기가 리신 잔기인 단일 접합된 폴리펩티드 접합체에서, 폴리펩티드 접합체의 다양한 실시양태가 하기 열거되어 있으며, 각 폴리펩티드 접합체는 폴리펩티드 부분에 대한 아미노산 서열 및 CRM 잔기에 대한 위치가 표시되어 있다: 서열 번호 52(76K); 서열 번호 55(68K); 서열 번호 56(60K); 서열 번호 60(76K); 서열 번호 61(68K); 및 서열 번호 62(60K). 특정 실시양태에서, 폴리펩티드 접합체는 서열 번호 52의 아미노산 서열을 포함하거나, 또는 그로 구성된 폴리펩티드 부분을 포함하고, 제1 CRM 잔기는 76K이다. 특정 실시양태에서, 폴리펩티드 접합체는 서열 번호 60의 아미노산 서열을 포함하거나, 또는 그로 구성된 폴리펩티드 부분을 포함하고, 제1 CRM 잔기는 76K이다. 각 폴리펩티드 접합체는 CRM으로서 모이어티 A (HOOC-(CH₂)₁₆-CO-gGlu-2XADO)를 갖는다.

[0381] CRM 잔기가 시스테인 잔기인 단일 접합된 폴리펩티드 접합체에서, 폴리펩티드 접합체의 다양한 실시양태가 하기 열거되어 있으며, 각 폴리펩티드 접합체는 폴리펩티드 부분에 대한 아미노산 서열 및 CRM 잔기에 대한 위치가

표시되어 있다: 서열 번호 66(76C); 서열 번호 67(68C); 서열 번호 68(60C); 서열 번호 69(76C); 서열 번호 70(68C); 서열 번호 71(60C); 서열 번호 75(76C); 서열 번호 76(68C); 서열 번호 77(60C); 서열 번호 78(76C); 서열 번호 79(68C); 및 서열 번호 80(60C). 특정 실시양태에서, 폴리펩티드 접합체는 서열 번호 57의 아미노산 서열을 포함하거나, 또는 그로 구성된 폴리펩티드 부분을 포함하고, 각각 26K 및 76K에서 제1 CRM 및 제2 CRM과 접합된다. 각 폴리펩티드 접합체는 CRM으로서 모이어티 B ($\text{HOOC}-(\text{CH}_2)_{16}-\text{CO-gGlu-2XADO-EDA-CO-CH}_2$)를 갖는다.

[0382] 특정 실시양태에서, 본원에 제공된 폴리펩티드 접합체는 이중 접합되고, 즉, 2개의 CRM은 각각 하나는 폴리펩티드 접합체의 폴리펩티드 부분의 GLP-1에 있고, 또 다른 하나는 폴리펩티드 접합체의 폴리펩티드 부분의 펩티드 링커에 있는 두 CRM 잔기에 접합된다. 본원에서, GLP-1은 서열 번호 3, 4, 6, 및 7로 구성된 군으로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함한다.

[0383] 본원에서, 폴리펩티드 접합체의 폴리펩티드 부분은 서열 번호 51, 53, 54, 57-59 및 63-65, 72-74, 85, 및 86으로 구성된 군으로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함하거나, 또는 그로 구성될 수 있다. 두 CRM 잔기는 리신 잔기 또는 시스테인 잔기일 수 있고, 여기서, 하나는 위치 26에 있고, 또 다른 하나는 68, 76, 및 84로 구성된 군으로부터 선택되는 위치에 있다. 두 CRM은 동일하며, 이는 리신 접합의 경우, 모이어티 A ($\text{HOOC}-(\text{CH}_2)_{16}-\text{CO-gGlu-2XADO}$), 또는 시스테인 접합의 경우, 모이어티 B ($\text{HOOC}-(\text{CH}_2)_{16}-\text{CO-gGlu-2XADO-EDA-CO-CH}_2$)를 포함한다.

[0384] 두 CRM 잔기, 둘 다 리신 잔기인 이중 접합된 폴리펩티드 접합체에서, 폴리펩티드 접합체의 다양한 실시양태가 하기 열거되어 있으며, 각 폴리펩티드 접합체는 폴리펩티드 부분에 대한 아미노산 서열 및 두 CRM 잔기에 대한 위치가 표시되어 있다: 서열 번호 51(26K, 76K); 서열 번호 53(26K, 84K); 서열 번호 54(26K, 68K); 서열 번호 57(26K, 76K); 서열 번호 58(26K, 84K); 서열 번호 59(26K, 68K); 서열 번호 85(26K, 96K); 및 서열 번호 86(26K, 60K). 각 폴리펩티드 접합체는 두 CRM으로서 모이어티 A ($\text{HOOC}-(\text{CH}_2)_{16}-\text{CO-gGlu-2XADO}$)를 갖는다.

[0385] 두 CRM 잔기, 둘 다 시스테인 잔기인 이중 접합된 폴리펩티드 접합체에서, 폴리펩티드 접합체의 다양한 실시양태가 하기 열거되어 있으며, 각 폴리펩티드 접합체는 폴리펩티드 부분에 대한 아미노산 서열 및 두 CRM 잔기에 대한 위치가 표시되어 있다: 서열 번호 63(26C, 84C); 서열 번호 64(26C, 76C); 서열 번호 65(26C, 68C); 서열 번호 72(26C, 84C); 서열 번호 73(26C, 76C); 및 서열 번호 74(26C, 68C). 각 폴리펩티드 접합체는 두 CRM으로서 모이어티 B ($\text{HOOC}-(\text{CH}_2)_{16}-\text{CO-gGlu-2XADO-EDA-CO-CH}_2$)를 갖는다.

[0386] 특정 실시양태에서, CRM은 융합 폴리펩티드 중 비천연 아미노산 잔기에 접합된다. 특정 실시양태에서, CRM은 폴리펩티드 중 비천연 아미노산 잔기에 접합된다.

[0387] 하기 표 1은 폴리펩티드 부분, GLP-1 및 펩티드 링커, 및 CRM 잔기의 서열 번호를 포함한 특정 예시적인 폴리펩티드 접합체의 상세한 정보를 보여준다. GLP-1의 돌연변이 뿐만 아니라, 펩티드 링커 서열의 반복 서열 및 반복 부 개수도 제시되어 있다.

표 1

표 1. 예시적인 폴리펩티드 집합체 서열

분자 코드 (MLC)	GLP-1의 돌연변이 ** (GLP-1의 서열 번호)	반복 서열 & 반복부 개수 (펩티드 링커의 서열 번호)	CRM 잔기(들) # (폴리펩티드 부분의 서열 번호)	CRM
002	8Aib,26R, 34R,36G (서열 번호 5)	(GAQP)9(GQKP) (서열 번호 43)	76K (서열 번호 52)	모이어티 A ^{&}
009	8Aib,26R,34R,36G (서열 번호 5)	(GAQP)7(GQKP) (서열 번호 45)	68K (서열 번호 55)	모이어티 A ^{&}
010	8Aib,26R,34R,36G (서열 번호 5)	(GAQP)5(GQKP) (서열 번호 46)	60K (서열 번호 56)	모이어티 A ^{&}
011	8Aib,26R,34R,36G (서열 번호 5)	(GAQP)2(GQKP) (서열 번호 84)	48K (서열 번호 88)	모이어티 A ^{&}
019	8Aib,22E,26R 34R,36G (서열 번호 8)	(GAQP)9(GQKP) (서열 번호 43)	76K (서열 번호 60)	모이어티 A ^{&}
020	8Aib,22E,26R,34R,36G (서열 번호 8)	(GAQP)7(GQKP) (서열 번호 45)	68K (서열 번호 61)	모이어티 A ^{&}
021	8Aib,22E,26R,34R,36G (서열 번호 8)	(GAQP)5(GQKP) (서열 번호 46)	60K (서열 번호 62)	모이어티 A ^{&}
041	8Aib,26R 34R,36G (서열 번호 5)	(GAQP)9(GQCP) (서열 번호 47)	76C (서열 번호 66)	모이어티 B ^{&&}
042	8Aib,26R,34R,36G (서열 번호 5)	(GAQP)7(GQCP) (서열 번호 49)	68C (서열 번호 67)	모이어티 B ^{&&}
043	8Aib,26R,34R,36G (서열 번호 5)	(GAQP)5(GQCP) (서열 번호 50)	60C (서열 번호 68)	모이어티 B ^{&&}

[0388]

052	8G,22E,26R,34R,36G (서열 번호 9)	(GAQP)9(GQCP) (서열 번호 47)	76C (서열 번호 69)	모이어티 B ^{&}
053	8G,22E,26R,34R,36G (서열 번호 9)	(GAQP)7(GQCP) (서열 번호 49)	68C (서열 번호 70)	모이어티 B ^{&}
054	8G,22E,26R,34R,36G (서열 번호 9)	(GAQP)5(GQCP) (서열 번호 50)	60C (서열 번호 71)	모이어티 B ^{&}
065	8Aib, 34R, 36G (서열 번호 3)	(GAQP)9(GQCP) (서열 번호 47)	76C (서열 번호 75)	모이어티 B ^{&}
066	8Aib, 34R, 36G (서열 번호 3)	(GAQP)7(GQCP) (서열 번호 49)	68C (서열 번호 76)	모이어티 B ^{&}
067	8Aib, 34R, 36G (서열 번호 3)	(GAQP)5(GQCP) (서열 번호 50)	60C (서열 번호 77)	모이어티 B ^{&}
068	8Aib, 22E, 34R, 36G (서열 번호 6)	(GAQP)9(GQCP) (서열 번호 47)	76C (서열 번호 78)	모이어티 B ^{&}
069	8Aib, 22E, 34R, 36G (서열 번호 6)	(GAQP)7(GQCP) (서열 번호 49)	68C (서열 번호 79)	모이어티 B ^{&}
070	8Aib, 22E, 34R, 36G (서열 번호 6)	(GAQP)5(GQCP) (서열 번호 50)	60C (서열 번호 80)	모이어티 B ^{&}
001	8Aib,34R,36G (서열 번호 3)	(GAQP)9(GQKP) (서열 번호 43)	26K, 76K (서열 번호 51)	모이어티 A ^{&}
004	8Aib,34R,36G (서열 번호 3)	(GAQP)14(GQKP) (서열 번호 82)	26K, 96K (서열 번호 85)	모이어티 A ^{&}
005	8Aib,34R,36G (서열 번호 3)	(GAQP)11(GQKP) (서열 번호 44)	26K, 84K (서열 번호 53)	모이어티 A ^{&}
006	8Aib,34R,36G (서열 번호 3)	(GAQP)7(GQKP) (서열 번호 45)	26K, 68K (서열 번호 54)	모이어티 A ^{&}
007	8Aib,34R,36G (서열 번호 3)	(GAQP)5(GQKP) (서열 번호 83)	26K, 60K (서열 번호 86)	모이어티 A ^{&}
008	8Aib,34R,36G (서열 번호 3)	(GAQP)2(GQKP) (서열 번호 : 84)	26K, 48K (서열 번호 87)	모이어티 A ^{&}
012	8Aib,22E,34R,36G (서열 번호 6)	(GAQP)9(GQKP) (서열 번호 43)	26K, 76K (서열 번호 57)	모이어티 A ^{&}
015	8Aib,22E,34R,36G (서열 번호 6)	(GAQP)11(GQKP) (서열 번호 : 44)	26K, 84K (서열 번호 58)	모이어티 A ^{&}
016	8Aib,22E,34R,36G (서열 번호 6)	(GAQP)7(GQKP) (서열 번호 45)	26K, 68K (서열 번호 59)	모이어티 A ^{&}

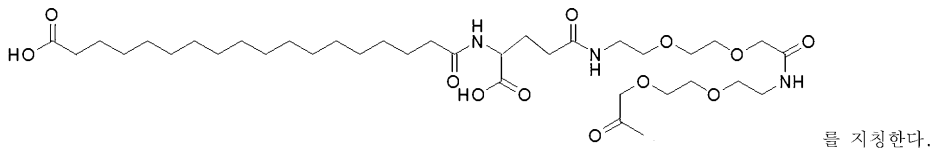
[0389]

036	8Aib,26C,34R,36G (서열 번호 4)	(GAQP)11(GQCP) (서열 번호 48)	26C, 84C (서열 번호 63)	모이어티 B ^{&&}
037	8Aib,26C,34R,36G (서열 번호 4)	(GAQP)9(GQCP) (서열 번호 47)	26C, 76C (서열 번호 64)	모이어티 B ^{&&}
038	8Aib,26C, 34R,36G (서열 번호 4)	(GAQP)7(GQCP) (서열 번호 49)	26C, 68C (서열 번호 65)	모이어티 B ^{&&}
060	8Aib,22E,26C,34R,36G (서열 번호 7)	(GAQP)11(GQCP) (서열 번호 48)	26C, 84C (서열 번호 72)	모이어티 B ^{&&}
061	8Aib,22E,26C,34R,36G (서열 번호 7)	(GAQP)9(GQCP) (서열 번호 47)	26C, 76C (서열 번호 73)	모이어티 B ^{&&}
062	8Aib,22E,26C,34R,36G (서열 번호 7)	(GAQP)7(GQCP) (서열 번호 49)	26C, 68C (서열 번호 74)	모이어티 B ^{&&}

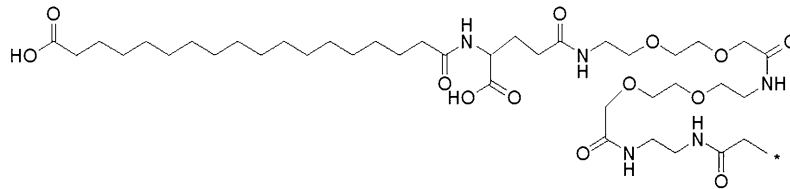
** : GLP-1의 돌연변이는 대비 돌연변이를 의미하고, 여기서, 제1 잔기는 7H이고, 마지막 잔기는 37G이고;

: CRM 잔기(들)는 C-말단이 펩티드 링커에 부착된 GLP-1(여기서, 제1 잔기는 7H)을 함유하는 폴리펩티드 서열에서 N부터 C까지 계수된 CRM 잔기의 위치를 의미한다.

& : 모이어티 A는 $\text{HOOC}-(\text{CH}_2)_{16}-\text{CO}-\text{gGlu}-2\text{XADO}$ 또는



&& : 모이어티 B는 $\text{HOOC}-(\text{CH}_2)_{16}-\text{CO}-\text{gGlu}-2\text{XADO}-\text{EDA}-\text{CO}-\text{CH}_2$, 또는 하기 구조를 지칭한다:



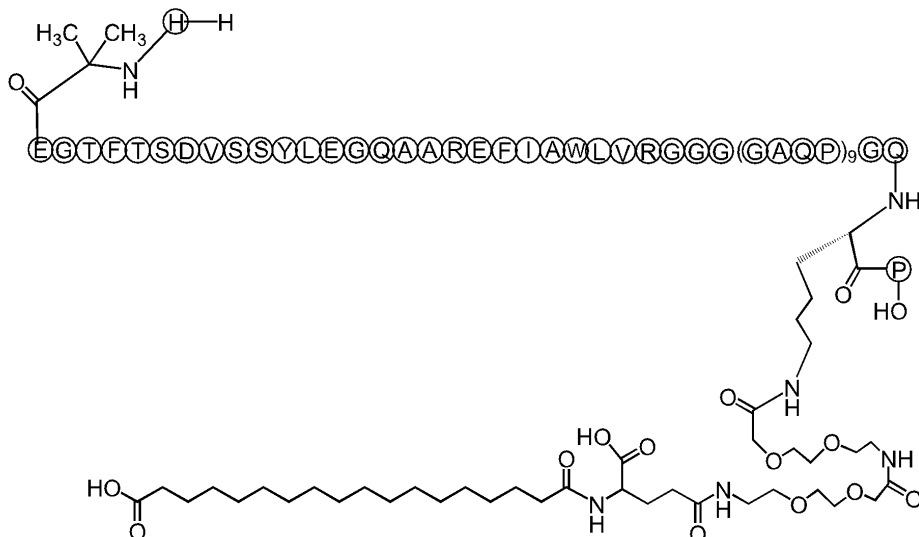
[0390]

[0391]

특정 실시양태에서, 폴리펩티드 접합체는 하기 제시된 구조를 포함하며(단일 접합된 분자 002 및 분자 019, 및 이중 접합된 분자 012 포함), 여기서, 아미노산 잔기는 동그라미 안의 1 문자 약어로 제시되어 있다:

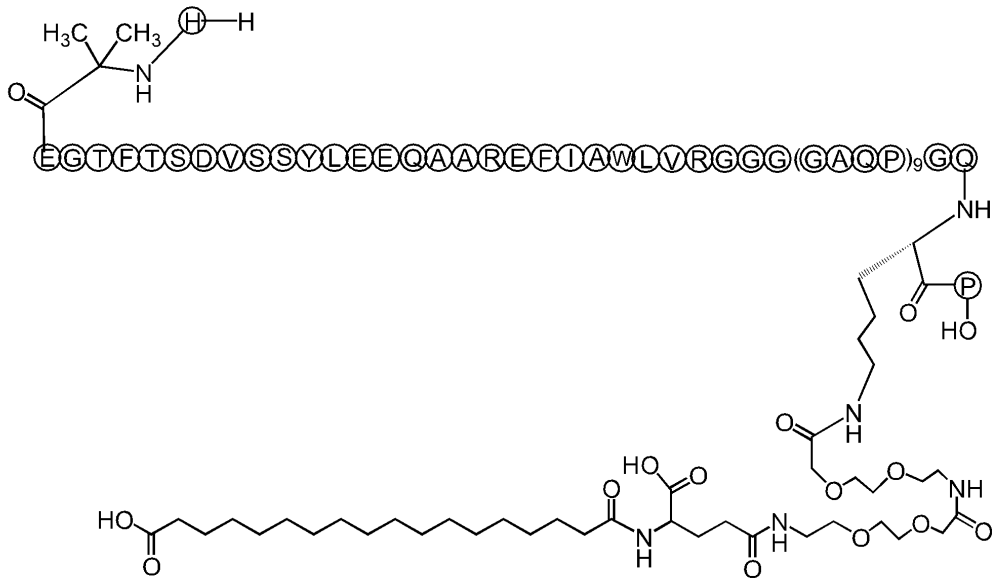
[0392]

분자 002:



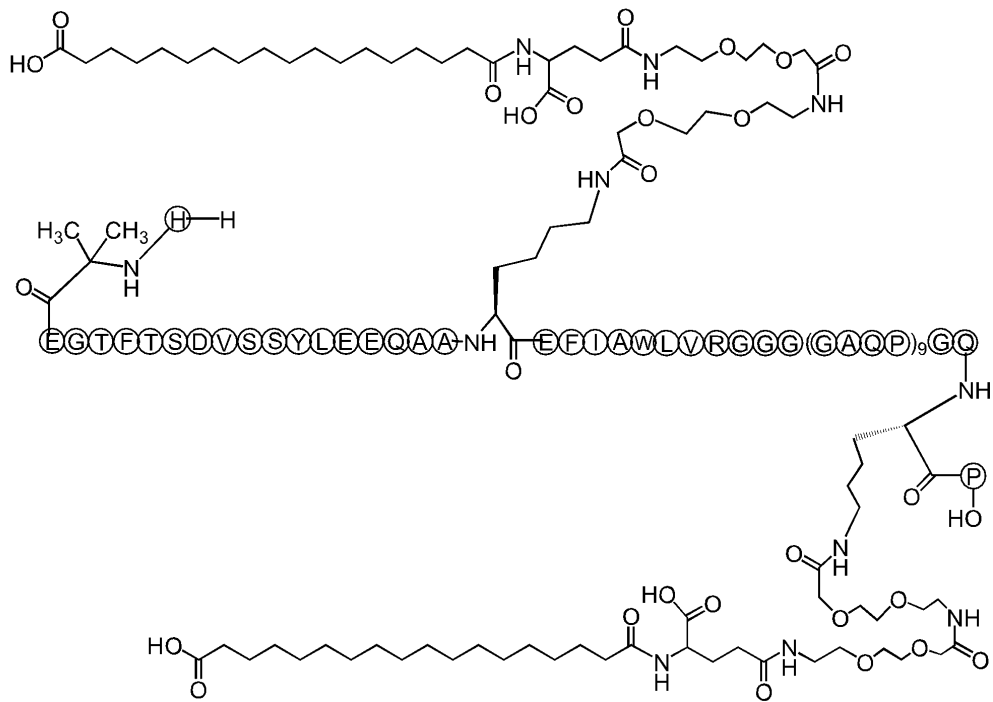
[0393]

[0394] 또는 분자 019:



[0395]

[0396] 또는 분자 012:



[0397]

[0398] 제조 방법

[0399] 본 개시내용은 본원에 제공된 폴리펩티드 접합체의 폴리펩티드 부분(또는 그의 단편)을 코딩하는 단리된 핵산 또는 폴리뉴클레오티드를 제공한다.

[0400] 본원에서 사용되는 바, 용어 "핵산" 또는 "폴리뉴클레오티드"는 단일 또는 이중 가닥 형태의 데옥시리보핵산(DNA: deoxyribonucleic acid) 또는 리보핵산(RNA: ribonucleic acid) 및 그의 중합체를 지칭한다. 구체적으로 제한되지 않는 한, 상기 용어는 참조 핵산과 유사한 결합 특성을 갖고, 자연적으로 발생된 뉴클레오티드와 유사한 방식으로 대사되는 천연 뉴클레오티드의 공지된 유사체를 함유하는 폴리뉴클레오티드를 포함한다. 달리 명시되지 않는 한, 특정 폴리뉴클레오티드 서열은 또한 명시적으로 나타낸 서열 뿐만 아니라 그의 보존적으로 변형된 변이체(예컨대, 축퇴성 코돈 치환), 대립유전자, 오르토로그, SNP 및 상보적 서열을 암시적으로 포함한다. 구체적으로, 축퇴성 코돈 치환은 하나 이상의 선택된(또는 모든) 코돈의 세 번째 위치가 혼합된 염기 및/또는

데옥시이노신 잔기로 치환된 서열을 생성함으로써 달성될 수 있다(문헌 [Batzer et al., Nucleic Acid Res. 19:5081(1991)]; [Ohtsuka et al., J. Biol. Chem. 260:2605-2608 (1985)]; 및 [Rossolini et al., Mol. Cell. Probes 8:91-98 (1994)] 참조).

[0401] 본원에 제공된 폴리펩티드(또는 그의 단편)를 코딩하는 핵산 또는 폴리뉴클레오티드는 재조합 기술을 사용하여 구성될 수 있다. 이를 위해, GLP-1 수용체 효능제(예컨대, GLP-1)를 코딩하는 DNA 및 펩티드 링커를 코딩하는 DNA가 수득되고, 숙주 세포에서 전사 및 발현을 허용하여 융합 폴리펩티드를 생산하도록 작동가능하게 연결될 수 있다. 필요한 경우, 하나 이상의 링커를 코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열은 또한 원하는 생성물의 발현을 허용하도록 작동가능하게 연결된다.

[0402] 융합 폴리펩티드 또는 폴리펩티드 복합체의 발현 또는 생산이 실현가능하고, 적절한 제어하에 있도록 코딩 폴리뉴클레오티드 서열은 임의적으로 발현 벡터에서 하나 이상의 조절 서열에 추가로 작동가능하게 연결될 수 있다.

[0403] 코딩 폴리뉴클레오티드 서열(들)은 당업계에 공지된 재조합 기술을 사용하여, 추가 클로닝(DNA의 증폭) 또는 발현을 위해 벡터 내로 삽입될 수 있다. 많은 벡터가 이용가능하다. 벡터 성분은 일반적으로 신호 서열, 복제 기점, 하나 이상의 마커 유전자, 인핸서 요소, 프로모터(예컨대, 원핵성 프로모터, 예컨대, T7, T7lac, Sp6, araBAD, trp, lac, tac, pLm, A3, lac, lpp, npr, pac, syn, trc 및 T3, 또는 진핵성 프로모터, 예컨대, SV40, CMV, 및 EF-1 α), 및 전사 종결 서열을 포함하나, 이에 제한되지 않는다.

[0404] 벡터 및 숙주 세포

[0405] 또 다른 측면에서, 본 개시내용은 본원에 제공된 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터를 제공한다.

[0406] 본원에 제공된 폴리뉴클레오티드 서열(들)을 포함하는 벡터는 클로닝 또는 유전자 발현을 위해 숙주 세포에 도입될 수 있다. 본원에서 사용되는 바, 어구 "숙주 세포"는 외인성 폴리뉴클레오티드 및/또는 벡터가 도입된 세포를 지칭한다. 다른 실시양태에서, 벡터는 염색체의 벡터이다. 숙주 세포는 원하는 경우 단리될 수 있다. 특정 실시양태에서, 숙주 세포는 원핵 세포 또는 진핵 세포이다.

[0407] 본원에서 벡터 내의 DNA를 클로닝 또는 발현하기에 적합한 숙주 세포는 주로 원핵생물이다. 상기 목적에 적합한 원핵생물은 진정세균, 예컨대, 그람 음성 또는 그람 양성 유기체, 예를 들어, 엔테로박테리아세아에(*Enterobacteriaceae*), 예컨대, 에스케리치아(*Escherichia*), 예컨대, E. 콜라이(*E. coli*), 엔테로박터(*Enterobacter*), 에르위니아(*Erwinia*), 클렙시엘라(*Klebsiella*), 프로테우스(*Proteus*), 살모넬라(*Salmonella*), 예컨대, 살모넬라 티피무리움(*Salmonella typhimurium*), 세라티아(*Serratia*), 예컨대, 세라티아 마르세스칸스(*Serratia marcescans*), 및 쉬겔라(*Shigella*) 뿐만 아니라, 바실리(*Bacilli*), 예컨대, B. 섭틸리스(*B. subtilis*) 및 B. 리케니포르미스(*B. licheniformis*), 슈도모나스(*Pseudomonas*), 예컨대, P. 에루지노사(*P. aeruginosa*), 및 스트렙토마이세스(*Streptomyces*)를 포함한다. 일부 실시양태에서, 숙주 세포는 진핵생물, 예컨대, 효모 및 포유동물 세포(예컨대, 불멸화된 포유동물 세포)이다.

[0408] 본원에 제공된 폴리뉴클레오티드 서열(들)을 포함하는 벡터는 당업자에게 공지된 임의의 적합한 방법, 예컨대, 형질전환, 형질감염 또는 형질도입을 사용하여 숙주 세포 내로 도입될 수 있다. 한 예에서, GLP-1 폴리펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열은 발현 벡터 내로 서브클로닝될 수 있고, 이는 숙주 세포에서 봉입체로서 발현된다. 벡터는 바이러스 벡터일 수 있고, 임의의 적합한 바이러스 벡터가 이러한 능력으로 사용될 수 있다.

[0409] 또 다른 측면에서, 본 개시내용은 본원에 제공된 벡터를 포함하는 숙주 세포를 제공한다. 숙주 세포는 원핵 세포 또는 진핵 세포이다. 상기 기술된 발현 또는 클로닝 벡터로 형질전환된 숙주 세포는 프로모터 유도, 형질전환체 선택, 또는 클로닝 벡터 증폭을 위해 적절하게 변형된 통상적인 영양 배지에서 배양될 수 있다.

[0410] 또 다른 측면에서, 본 개시내용은 본원에 제공된 폴리뉴클레오티드의 발현을 허용하는 조건하에서 본원에 제공된 숙주 세포를 배양하여 폴리펩티드 접합체의 폴리펩티드 부분을 수득하는 단계를 포함하는, 본원에 제공된 폴리펩티드 접합체를 제조하는 방법을 제공한다.

[0411] 본원에 제공된 폴리펩티드 부분의 제조를 위해, 발현 벡터로 형질전환된 숙주 세포는 다양한 배지에서 배양될 수 있다. 상업적으로 이용가능한 박테리아 성장 배지, 예컨대, 테리픽 브로쓰(테리픽 브로쓰), LB 브로쓰, LB 아가, M9 최소 배지, 매기아메디아 배지(MagiaMedia Medium) 및 임메디아 배지(ImMedia Medium)(ThermoFisher)가 박테리아 숙주 세포를 배양하는 데 적합하다. 상업적으로 이용가능한 배지, 예컨대, 햄스 F10(Ham's F10)(Sigma), 최소 필수 배지(MEM: Minimal Essential Medium)(Sigma), RPMI-1640(Sigma), 및 둘베코스 변형 이글 배지(DMEM: Dulbecco's Modified Eagle's Medium)(Sigma)가 진핵 숙주 세포를 배양하는 데 적합하다. 이

러한 배지 중 임의의 것은 필요에 따라 호르몬 및/또는 다른 성장 인자(예컨대, 인슐린, 트랜스페린, 또는 표피 성장 인자), 염(예컨대, 염화나트륨, 칼슘, 마그네슘, 및 포스페이트), 완충제(예컨대, HEPES), 뉴클레오티드(예컨대, 아데노신 및 티미딘), 항생제(예컨대, 젠타마이신(GENTAMYCIN)TM 약물), 미량 원소(일반적으로 마이크로물 범위의 최종 농도로 존재하는 무기 화합물로 정의), 및 글루코스 또는 당가의 에너지원으로 보충될 수 있다. 임의의 다른 필요한 보충제가 또한 당업자에게 공지된 적절한 농도로 포함될 수 있다. 예컨대, 온도, pH 등과 같은 배양 조건은 발현을 위해 선택되는 숙주 세포와 함께 이전에 사용된 것들이며, 이는 당업자에게 자명할 것이다.

[0412] 한 측면에서, 본 개시내용은 폴리펩티드 부분이 발현되는 조건하에서 본원에 제공된 숙주 세포를 배양하는 단계를 포함하는, 본원에 제공된 폴리펩티드 접합체의 폴리펩티드 부분을 발현시키는 방법을 제공한다. 특정 실시양태에서, 폴리펩티드 부분은 가용성 폴리펩티드로서 발현된다.

[0413] 제조합 기술을 사용하는 경우, 본원에 제공된 폴리펩티드는 세포내에서, 주변세포질 공간에서 생성될 수 있거나, 또는 배지 내로 직접 분비될 수 있다. 생성물이 세포내에서 생성되는 경우, 제1 단계로서, 숙주 세포 또는 용해된 단편 중 하나인 미립자 파편은, 예를 들어 원심분리 또는 한외여과에 의해 제거된다. 문헌 [Carter et al., Bio/Technology 10:163-167 (1992)]에는 E. 콜라이의 주변세포질 공간으로 분비되는 단백질을 단리하는 절차가 기술되어 있다. 간략하게, 세포 페이스트는 약 30 min에 걸쳐 아세트산나트륨(pH 3.5), EDTA, 및 페닐메틸설포닐플루오라이드(PMSF)의 존재하에 해동된다. 세포 파편은 원심분리에 의해 제거될 수 있다. 생성물이 배지 내로 분비되는 경우, 상기 발현 시스템으로부터의 상청액은 일반적으로 먼저 상업적으로 이용가능한 단백질 농축 필터, 예를 들어, 아미콘(Amicon) 또는 밀리포어 펠리콘(Millipore Pellicon) 한외여과 유닛을 사용하여 농축된다. 예컨대, PMSF와 같은 프로테아제 억제제는 단백질분해를 억제하기 위해 상기 단계 중 임의의 것에 포함될 수 있으며, 항생제는 우발적인 오염물질의 성장을 방지하기 위해 포함될 수 있다.

[0414] 특정 실시양태에서, 본 방법은 폴리펩티드를 단리시키는 단계를 추가로 포함한다.

[0415] 세포로부터 제조된 본원에서 제공된 폴리펩티드는, 예를 들어, 하이드록실아파타이트 크로마토그래피, 겔 전기영동, 투석, DEAE-셀룰로오스 이온 교환 크로마토그래피, 황산암모늄 침전, 염석, 및 친화성 크로마토그래피를 사용하여 정제될 수 있다.

[0416] 단백질 정제를 위한 다른 기술, 예컨대, 이온 교환 컬럼 상의 분별, 에탄올 침전, 역상 HPLC, 실리카 상의 크로마토그래피, 음이온 또는 양이온 교환 수지(예컨대, 폴리아스파르트산 컬럼) 상의 헤파린 세파로스(SEPHAROSE)TM 크로마토그래피 상의 크로마토그래피, 크로마토포커싱, SDS-PAGE, 및 황산암모늄 침전 또한 회수하고자 하는 항체에 따라 이용가능하다.

[0417] 특정 실시양태에서, 본 방법은 CRM을 폴리펩티드에 접합시키는 단계를 추가로 포함한다. 폴리펩티드는, 예를 들어, 적합한 접합 반응에 의해 리신 잔기, 시스테인 잔기, 또는 비천연 아미노산에서 접합될 수 있다.

[0418] 예를 들어, 예컨대, 리신과 같은 하나 이상의 CRM 잔기를 갖는 폴리펩티드는 아미노 반응제와 반응할 수 있다. 특정 실시양태에서, CRM은 아실화 반응에서 아실 기를 통해 리신 잔기에 접합된다. 아실화 반응의 예시적인 방법은, 예를 들어 WO2009083549 및 WO2010029159(그의 내용은 그 전문이 본원에 포함된다)에 기술되어 있다. 아실화 반응에서 접합되는 CRM은 그 중에서도 카복실산 기, α , ω -지방 이산 잔기, 활성화된 에스테르, 또는 활성화된 N-하이드록시 이미드 에스테르를 함유할 수 있다. 활성화된 에스테르의 예는 N-하이드록시숙신이미드(NHS) 또는 술포-NHS 에스테르와 같은 O-숙신이미드 시약 및 트라우트(Traut) 시약과 같은 이미도 에스테르 화합물을 포함하며, 이는 접합가능한 리신 잔기의 ϵ -아미노 기와 반응하여 아미드 또는 아미딘 결합을 형성할 수 있다. 적합한 아미노 반응제의 추가 예로는 O-아실이소우레아, N-하이드록시 트리야졸 에스테르, 무수물, 페닐 활성화 에스테르, P-하이드록사믹 활성화 에스테르, 아실이미다졸, 아실벤조트리아졸, 아실 아지드, 산 할라이드, 포스포늄 염, 암모늄/우로늄 염을 포함한다.

[0419] 또 다른 예의 경우, 예컨대, 시스테인과 같은 하나 이상의 CRM 잔기를 갖는 폴리펩티드는 티올 반응제에 연결될 수 있다. 특정 실시양태에서, CRM은 알킬화 반응에서 시스테인 잔기에 접합된다. 특정 실시양태에서, CRM은 말레이미드 또는 아이오도아세트아미드를 통해 접합가능한 시스테인 잔기에 접합되어 탄소-황 결합을 형성한다. 특정 실시양태에서, CRM은 디설피드를 통해 접합가능한 시스테인 잔기에 접합되어 디설피드 결합을 형성한다. 적합한 티올-반응성 기의 추가의 예는 디에닐 술폰, α -할로아실, 또는 다른 티올-반응성 접합 파트너를 포함한다. 세부사항에 대해서는 문헌 [Haugland, 2003, Molecular Probes Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals, Molecular Probes, Inc.]; [Brinkley, 1992, Bioconjugate Chem. 3:2]; [Garman, 1997,

Non-Radioactive Labelling: A Practical Approach, Academic Press, London]; [Means (1990) Bioconjugate Chem. 1:2]; [Hermanson, G. in Bioconjugate Techniques (1996) Academic Press, San Diego, pp. 40-55, 643-671]을 참조한다.

- [0420] 예를 들어, 예컨대, 비천연 아미노산 잔기(NNAA: 비천연 아미노 acid residue)와 같은 하나 이상의 CRM 잔기를 갖는 폴리펩티드는 CRM에 접합되어 융합 폴리펩티드의 NNAA와 CRM 사이에서 안정한 연결이 형성될 수 있다. 예를 들어, 케토 기 또는 알데히드 또는 β -디케토모이어티를 함유하는 NNAA는 히드라지드- 또는 O-알킬하이드록실아민-, 하이드록실아민-함유 작용제와 반응하여 히드라존 또는 O-알킬화된 옥심 연결을 형성할 수 있다. 또 다른 예를 들어, 아지드 기를 함유하는 NNAA는 알킨 유도체와 반응하여 구리(I) 촉매화된 [3+2] 고리첨가에 의해 안정한 트리아졸 링커를 형성할 수 있다(그 반대의 경우도 마찬가지이다). 또 다른 예를 들어, 아지드 기를 함유하는 NNAA는 적절한 수용성 포스핀 함유 작용제와 라이게이션되어 슈타우딩거(Staudinger) 라이게이션에 의해 아미드 연결을 형성할 수 있다. 추가로, NNAA 내의 티오에스테르 모이어티는 아민 함유 작용제와 반응하여 아미드 연결을 형성할 수 있다. NNAA와 함께 도입된 본원에 제공된 융합 폴리펩티드는 고리첨가 반응, 예컨대, 디엘과 디에노필 사이의 (4+2) 고리첨가(딜스-알더(Diels-Alder) 반응), 1,3-쌍극성 후이스겐(Huisgen) 고리첨가를 통한 (3+2) 고리첨가, 및 니트로네-올레핀(Nitrone-olefin) 고리첨가를 통한 (3+2) 고리첨가를 통해 작용제와 접합될 수 있다. 항체 접합에 적합한 고리첨가 방법은, 예를 들어, WO05003294, US20120004183, WO06009901, WO07130453 및 미국 특허 6,737,236에 기술되어 있다.
- [0421] 또 다른 예를 들어, 폴리펩티드는 비오틴에 접합된 후, 아비딘에 접합된 CRM에 간접적으로 접합될 수 있다. 또 다른 예를 들어, 융합 폴리펩티드 또는 폴리펩티드 복합체는 커플링제에 연결될 수 있고, 이는 CRM에 추가로 연결된다. 커플링제의 예로는 이작용성 모이어티, 예컨대, N-숙신이미딜-3-(2-피리딜디티오) 프로피오네이트(SPDP), 숙신이미딜-4-(N-말레이미도메틸) 사이클로헥산-1-카복실레이트(SMCC), 이미노티올란(IT), 이미도에스테르의 이작용성 유도체(예컨대, 디메틸 아디피미데이트 HCl), 활성 에스테르(예컨대, 디숙신이미딜 수혜레이트), 알데히드(예컨대, 글루타르알데히드), 비스-아지도 화합물(예컨대, 비스(p-아지도벤조일) 헥산디아민), 비스-디아조늄 유도체(예컨대, 비스-(p-디아조늄벤조일)-에틸렌디아민), 디이소시아네이트(예컨대, 톨루엔 2,6-디이소시아네이트) 및 his-활성 불소 화합물(예컨대, 1,5-디플루오로-2,4-디니트로벤젠)을 포함한다. 특히 바람직한 커플링제는 디술피드 연결을 제공하기 위해 N-숙신이미딜-3-(2-피리딜디티오) 프로피오네이트(SPDP)(문헌 [Carlsson et al., Biochem. J. 173:723-737 (1978)]) 및 N-숙신이미딜-4-(2-피리딜티오)펜타노에이트(SPP)를 포함한다.
- [0422] 폴리펩티드에 대한 CRM의 접합을 위한 추가의 방법은 예를 들어, 미국 특허 제5,208,020호; 미국 특허 제6,441,163호; WO2005037992; WO2005081711; 및 WO2006/034488(이들은 그 전문이 본원에서 참조로 포함된다)에서 살펴볼 수 있다. 본 개시내용의 접합체를 제조하는 방법의 구체적인 예는 또한 본 개시내용의 실험 부에 포함되어 있다.
- [0423] **약학 조성물**
- [0424] 또 다른 측면에서, 본 개시내용은 또한 본원에 제공된 폴리펩티드 접합체를 포함하는 약학 조성물을 제공한다. 특정 실시양태에서, 약학 조성물은 비경구 투여용 액체 조성물이다.
- [0425] 본원에서, 폴리펩티드 접합체는 실질적으로 약학 조성물에서 활성 약학적 성분(API: active pharmaceutical ingredient)으로 작용한다. 폴리펩티드 접합체 외에도, 약학 조성물은 하나 이상의 약학적으로 허용되는 부형제를 추가로 포함한다.
- [0426] "약학적으로 허용되는"이라는 용어는 지정된 부형제(들)가 일반적으로 제제를 구성하는 다른 성분과 화학적 및/또는 물리적으로 양립가능하고, 이의 수용자와 생리학적으로 양립가능하다는 것을 나타낸다.
- [0427] "약학적으로 허용되는 부형제"는 약학적 제제 중의 활성 성분 이외의 다른 성분을 지칭하며, 이는 생체활성 허용가능하고, 피험체에게 비독성이다.
- [0428] 액체 제제용 약학적 허용 부형제의 예로는 약학적으로 허용되는 액체, 겔, 고체 담체, 수성 비히클, 비수성 비히클, 향미생물제, 등장화제, 완충제, 항산화제, 마취제, 현탁화제/분산화제, 격리화제 또는 킬레이트화제, 희석제, 애주번트, 부형제, 또는 비독성 보조 물질, 당업계에 공지된 다른 성분, 또는 그의 다양한 조합을 포함할 수 있다.
- [0429] 액체 제제에 적합한 약학적으로 허용되는 부형제는 예를 들어, 수성 비히클, 예컨대, 염화나트륨 주사, 링거 주사, 등장성 텍스트로스 주사, 멸균수 주사, 또는 텍스트로스 및 락테이트 링거 주사, 비수성 비히클, 예컨대,

식물 기원의 고정유, 면실유, 옥수수유, 참깨유, 또는 땅콩유, 정균 또는 진균 농도의 항미생물제, 등장화제, 예컨대, 염화나트륨 또는 텍스트로스, 완충제, 예컨대, 포스페이트 또는 시트레이트 완충제, 항산화제, 예컨대, 중황산나트륨, 국소 마취제, 예컨대, 프로카인 하이드로클로라이드, 현탁화제 및 분산화제, 예컨대, 소듐 카복시메틸셀룰로스, 하이드록시프로필 메틸셀룰로스, 또는 폴리비닐피롤리돈, 유화제, 예컨대, 폴리소르베이트 80(TWEEN-80), 격리화제 또는 킬레이트화제, 예컨대, EDTA(에틸렌디아민테트라아세트산) 또는 EGTA(에틸렌 글리콜 테트라아세트산), 에틸 알콜, 폴리에틸렌 글리콜, 프로필렌 글리콜, 수산화나트륨, 염산, 시트르산, 또는 락트산을 포함한다. 담체로 사용되는 항미생물제는 페놀 또는 크레졸, 수은, 벤질 알콜, 클로로부탄올, 메틸 및 프로필 p-하이드록시벤조산 에스테르, 티메로살, 벤즈알코늄 클로라이드 및 벤제토늄 클로라이드를 포함하는 다중 투여 용기의 약학 조성물에 첨가될 수 있다. 적합한 부형제는 예를 들어, 물, 염수, 텍스트로스, 글리세롤 또는 에탄올을 포함할 수 있다. 적합한 비독성 보조 물질은 예를 들어, 습윤화제 또는 유화제, pH 완충화제, 안정제, 용해도 증진제 또는 작용제, 예컨대, 아세트산나트륨, 소르비탄 모노라우레이트, 트리에탄올아민 올레이트 또는 사이클로덱스트린을 포함할 수 있다.

[0430] 실시양태에서, 약학 조성물은 주사용 조성물로 제제화된다. 주사용 약학 조성물은 임의의 통상적인 형태, 예컨대, 예를 들어, 액체 용액, 현탁액, 에멀전, 또는 액체 용액, 현탁액 또는 에멀전을 생성하기에 적합한 고체 형태로 제조될 수 있다. 주사용 제제는 주사 준비가 된 멸균 및/또는 비발열성 용액, 피하주사 정제를 포함하여 사용 직전에 용매와 조합될 준비가 된 동결건조된 분말과 같은 멸균 건조 가용성 생성물, 주사 준비가 된 멸균 현탁액, 사용 직전에 비히클과 조합될 준비가 된 멸균 건조 불용성 생성물, 및 멸균 및/또는 비발열성 에멀전을 포함할 수 있다. 용액은 수성 또는 비수성일 수 있다.

[0431] 특정 실시양태에서, 단위 용량 비경구 제제는 앰플, 바이알 또는 니들이 있는 시린지에 포장된다. 비경구 투여를 위한 모든 제제는 당업계에 공지되어 있고, 실시되는 바와 같이 멸균이고, 비발열성이어야 한다.

[0432] 특정 실시양태에서, 멸균, 동결건조된 분말은 본원에 개시된 폴리펩티드 접합체를 적합한 용매에 용해시킴으로써 제조된다. 용매는 분말, 또는 분말로부터 제조된 재구성된 용액의 안정성 또는 다른 약리학적 성분을 개선하는 부형제를 함유할 수 있다. 사용될 수 있는 부형제는 물, 텍스트로스, 소르비톨, 프럭토스, 옥수수 시럽, 크실리톨, 글리세린, 글루코스, 수크로스 또는 다른 적합한 작용제를 포함하나, 이에 제한되지 않는다. 용매는 완충제, 예컨대, 시트레이트, 인산나트륨 또는 인산칼륨, 또는 한 실시양태에서, 대략 중성 pH인 당업자에게 공지된 상기와 같은 다른 완충제를 함유할 수 있다. 당업자에게 공지된 표준 조건하에서 용액의 후속 멸균 여과 후 동결건조는 바람직한 제제를 제공한다. 한 실시양태에서, 생성된 용액은 동결건조를 위해 바이알에 분배될 것이다. 각각의 바이알은 단일 투여량 또는 다중 투여량의 본원에 제공된 융합 폴리펩티드, 폴리펩티드 복합체, 또는 접합체 또는 그의 조성물을 함유할 수 있다. 정확한 샘플 채취 및 정확한 투여를 용이하게 하기 위해 하나의 용량 또는 용량 세트에 필요한 것을 초과하는 소량 (예컨대, 약 10%)을 갖는 과충전 바이알이 허용가능하다. 동결건조된 분말은 예컨대, 약 4°C 내지 실온과 같은 적절한 조건하에서 보관될 수 있다.

[0433] 동결건조된 분말을 주사용수로 재구성하는 것은 비경구 투여에 사용하기 위한 제제를 제공한다. 한 실시양태에서, 재구성을 위해 멸균 및/또는 비발열성 또는 다른 액체 적합한 담체가 동결건조된 분말에 첨가된다. 정확한 양은 주어지는 선택되는 요법에 의존하며, 경험적으로 결정될 수 있다.

[0434] 본원에 기술된 바와 같은 약학 조성물의 투여는 통상의 기술을 가진 의사에 의해 효과적인 것으로 알려진 임의의 경로를 통해 이루어질 수 있다. 한 예로는 멸균 시린지 또는 일부 다른 기계적 장치, 예컨대, 주입 펌프에 의한 말초 비경구 투여가 있다. 특정 실시양태에서, 말초 비경구 경로는 정맥내, 근육내, 피하, 또는 복강내 투여 경로이다.

[0435] 특정 실시양태에서, 본원에 기술된 폴리펩티드 접합체는 예컨대, 동결건조 또는 분무 건조와 같은 고체 제제로 제제화되고, 이어서, 투여 전에 적합한 희석제 용액에서 재구성된다.

[0436] 예컨대, 문헌 [Remington: The Science and Practice of Pharmacy (D.B. Troy, Editor, 21st Edition, Lippincott, Williams & Wilkins, 2006)]에 기술된 것과 같은 표준 약학적 제제 기술이 이용될 수 있다.

[0437] 액체 제제

[0438] 또 다른 측면에서, 본원에 제공된 약학 조성물은 액체 제제이다. 특정 실시양태에서, 액체 제제는 수용액이다. 수용액은 예를 들어, 적어도 70% w/w, 적어도 75% w/w, 적어도 80%, 적어도 85% w/w, 적어도 90% w/w, 또는 적어도 95% w/w 물을 함유할 수 있다.

[0439] 특정 실시양태에서, 본원에 제공된 약학 조성물은 폴리펩티드 접합체 및 약학적으로 허용되는 부형제를 포함한

다.

- [0440] 특정 실시양태에서, 약학적으로 허용되는 부형제는 완충제 및 등장화제를 포함한다.
- [0441] 특정 실시양태에서, 완충제는 포스페이트 완충제, 시트레이트 완충제, 아세테이트 완충제, 히스티딘 완충제, 글리신 완충제, 카보네이트 완충제, 보레이트 완충제, 글루타메이트 완충제, 글리실글리신 완충제, 리신 완충제, 및 아르기닌 완충제로 구성된 군으로부터 선택된다.
- [0442] 특정 실시양태에서, 완충제는 포스페이트 완충제이다.
- [0443] 특정 실시양태에서, 포스페이트 완충제는 약학 조성물의 0.01-50 mM의 농도로 존재한다. 예를 들어, 포스페이트 완충제는 약학 조성물의 0.01-45 mM, 0.01-40 mM, 0.01-35 mM, 0.01-30 mM, 0.01-25 mM, 0.01-20 mM, 0.01-15 mM, 0.1-30 mM, 1-25 mM, 1-20 mM, 1-15 mM, 5-30 mM, 5-25 mM, 5-20 mM, 또는 5-15 mM의 농도로 존재한다.
- [0444] 특정 실시양태에서, 포스페이트 완충제는 약학 조성물의 5-20 mM 또는 5-10 mM, 임의적으로, 약 10 mM, 9 mM, 8 mM, 7 mM, 6 mM 또는 5 mM의 농도로 존재한다.
- [0445] 특정 실시양태에서, 포스페이트 완충제는 인산이수소나트륨, 인산수소이나트륨, 인산나트륨, 또는 그의 수화물로 구성된 군으로부터 선택된다.
- [0446] 특정 실시양태에서, 수화물은 12수화물 또는 2수화물이다.
- [0447] 특정 실시양태에서, 포스페이트 완충제는 인산수소이나트륨 12수화물 또는 인산이나트륨 탈수화물이다.
- [0448] 특정 실시양태에서, 인산수소이나트륨 12수화물은 약학 조성물의 약 0.1 내지 15 mg/mL, 0.5 내지 15 mg/mL, 1 내지 15 mg/mL, 0.5 내지 12 mg/mL, 0.5 내지 10 mg/mL, 0.5 내지 8 mg/mL, 0.5 내지 7 mg/mL, 또는 0.5 내지 5 mg/mL의 농도로 존재한다. 특정 실시양태에서, 인산수소이나트륨 12수화물은 약학 조성물의 약 2.87 mg/mL의 농도로 존재한다.
- [0449] 특정 실시양태에서, 인산이나트륨 2수화물은 약학 조성물의 약 0.1 내지 15 mg/mL, 0.5 내지 15 mg/mL, 1 내지 15 mg/mL, 0.5 내지 12 mg/mL, 0.5 내지 10 mg/mL, 0.5 내지 8 mg/mL, 0.5 내지 7 mg/mL, 또는 0.5 내지 5 mg/mL의 농도로 존재한다. 특정 실시양태에서, 인산이나트륨 2수화물은 약 1.42 mg/mL의 농도로 존재한다.
- [0450] 특정 실시양태에서, 완충제는 시트레이트 완충제이다.
- [0451] 특정 실시양태에서, 시트레이트 완충제는 약 1-50 mM의 농도로 존재한다.
- [0452] 특정 실시양태에서, 시트레이트 완충제는 무수 시트르산 및 시트르산삼나트륨(또는 그의 수화물, 예컨대, 시트르산삼나트륨 2수화물)의 혼합물을 포함한다.
- [0453] 특정 실시양태에서, 시트레이트 완충제는 0.14 mg/mL 무수 시트르산 및 2.74 mg/mL 시트르산삼나트륨 2수화물의 혼합물을 포함한다.
- [0454] 특정 실시양태에서, 완충제는 히스티딘 완충제이다.
- [0455] 특정 실시양태에서, 히스티딘 완충제는 약학 조성물의 약 1-70 mM, 임의적으로, 약 5-50 mM, 5-20 mM 또는 5-10 mM, 또는 임의적으로 약 10 mM, 9 mM, 8 mM, 7 mM, 6 mM 또는 5 mM의 농도로 존재한다.
- [0456] 특정 실시양태에서, 히스티딘 완충제는 약학 조성물의 약 0.5-10 mg/mL, 0.5-5 mg/mL, 1-5 mg/mL, 또는 1-3 mg/mL의 농도로 존재한다.
- [0457] 특정 실시양태에서, 히스티딘 완충제는 약학 조성물의 약 1.24 mg/mL의 농도로 존재한다.
- [0458] 특정 실시양태에서, 등장화제는 염화나트륨, 프로필렌 글리콜, 소르비톨, 수크로스, 글리신, 만니톨, 락토스 1수화물, 아르기닌, 미오이노시톨 및 디메틸술포로 구성된 군으로부터 선택된다.
- [0459] 특정 실시양태에서, 등장화제는 염화나트륨이다.
- [0460] 특정 실시양태에서, 염화나트륨은 약 1-20 mg/mL, 1-18 mg/mL, 1-16 mg/mL, 1-15 mg/mL, 2-20 mg/mL, 3-20 mg/mL, 4-20 mg/mL, 또는 5-20 mg/mL이다. 특정 실시양태에서, 염화나트륨은 약 5-15 mg/mL이다.
- [0461] 특정 실시양태에서, 등장화제는 프로필렌 글리콜이다.
- [0462] 특정 실시양태에서, 프로필렌 글리콜은 약 1 mg/mL 내지 약 50 mg/mL(예컨대, 약 5 mg/mL 내지 약 25 mg/mL,

약 8 mg/mL 내지 약 16 mg/mL)이다.

[0463] 특정 실시양태에서, 등장화제는 만니톨이다.

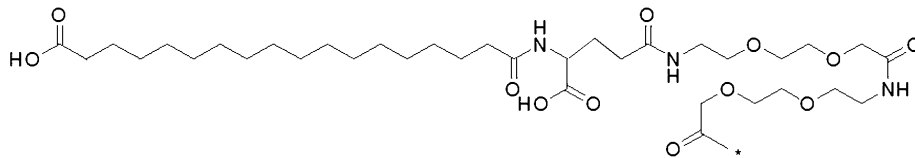
[0464] 특정 실시양태에서, 만니톨은 약 20 mg/mL 내지 약 60 mg/mL(예컨대, 약 25 mg/mL 내지 약 50 mg/mL, 약 30 mg/mL 내지 약 50 mg/mL, 약 35 mg/mL 내지 약 50 mg/mL)이다.

[0465] 특정 실시양태에서, 약학적 부형제는 보존제, 킬레이트화제, 및/또는 안정제를 추가로 포함한다.

[0466] 특정 실시양태에서, 약학 조성물의 pH는 약 6.5 내지 약 8.3(예컨대, 약 6.5 내지 7.4, 또는 7.4 내지 8.3)이다.

[0467] 특정 실시양태에서, 약학 조성물의 pH는 약 7.4이다.

[0468] 특정 실시양태에서, 폴리펩티드 접합체는 이중 접합된 폴리펩티드 접합체이다. 약학 조성물의 특정 실시양태에서, 폴리펩티드 접합체는 이중 접합된 폴리펩티드 접합체이고, 폴리펩티드 접합체의 접합체 부분은 폴리펩티드 부분 중 제2 CRM 잔기에 접합된 제2 CRM을 추가로 포함한다. 임의적으로, 제2 CRM 잔기는 리신 잔기이고, 추가로 임의적으로, 제1 CRM 및 제2 CRM은 각각 모이어티 A가 하기 화학식의 구조를 갖는, 모이어티 A (HOOC-(CH₂)₁₆-CO-gGlu-2XADO)를 포함한다:



[0469]

[0470] 약학 조성물의 일부 실시양태에서, 폴리펩티드 접합체의 폴리펩티드 부분은 서열 번호 57의 아미노산 서열을 포함하고, 각각 26K 및 76K에서 제1 CRM 및 제2 CRM과 접합된다. 특정 실시양태에서, 약학 조성물은 약 1-80 mg/ml, 1-100 mg/ml 또는 1-120 mg/ml, 또는 임의적으로, 5-40 mg/ml, 5-80 mg/mL, 5-100 mg/ml, 또는 5-120 mg/ml의 폴리펩티드 접합체(예컨대, 약 5-90 mg/mL, 약 5-70 mg/mL, 약 5-60 mg/mL, 약 5-50 mg/mL, 약 5-30 mg/mL, 약 5-20 mg/mL, 약 5-10 mg/mL)를 갖는다.

[0471] 특정 실시양태에서, 약학 조성물은

[0472] (a) 약 1-80 mg/mL, 1-100 mg/ml 또는 1-120 mg/mL의 폴리펩티드 접합체(여기서, 폴리펩티드 접합체의 폴리펩티드 부분은 서열 번호 57의 아미노산 서열을 포함하고, 각각 26K 및 76K에서 제1 CRM 및 제2 CRM과 접합된다);

[0473] (b) 포스페이트 완충제, 시트레이트 완충제, 및 히스티딘 완충제로 구성된 군으로부터 선택되는 완충제;

[0474] (c) 염화나트륨, 프로필렌 글리콜, 만니톨로 구성된 군으로부터 선택되는 등장화제를 포함하고;

[0475] (d) pH는 약 6.5 내지 약 8.3이다.

[0476] 특정 실시양태에서, 약학 조성물은

[0477] (a) 약 1-80 mg/mL, 1-100 mg/ml 또는 1-120 mg/mL의 폴리펩티드 접합체(여기서, 폴리펩티드 접합체의 폴리펩티드 부분은 서열 번호 57의 아미노산 서열을 포함하고, 각각 26K 및 76K에서 제1 CRM 및 제2 CRM과 접합된다);

[0478] (b) 포스페이트 완충제, 시트레이트 완충제, 및 히스티딘 완충제로 구성된 군으로부터 선택되는 완충제;

[0479] (c) 5-15 mg/ml 염화나트륨, 1-50 mg/mL 프로필렌 글리콜, 및 30-50 mg/mL 만니톨로 구성된 군으로부터 선택되는 등장화제를 포함하고;

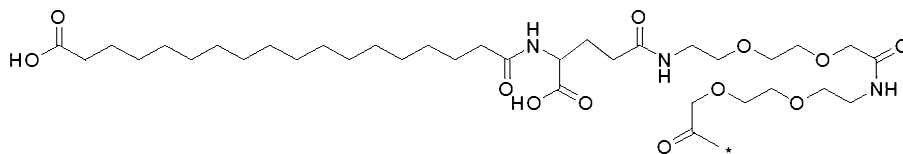
[0480] (d) pH는 약 6.5 내지 약 8.3이다.

[0481] 특정 실시양태에서, 약학 조성물은

[0482] (a) 약 1-80 mg/mL, 1-100 mg/ml 또는 1-120 mg/mL의 폴리펩티드 접합체(여기서, 폴리펩티드 접합체의 폴리펩티드 부분은 서열 번호 57의 아미노산 서열을 포함하고, 각각 26K 및 76K에서 제1 CRM 및 제2 CRM과 접합된다);

[0483] (b) 약 0.5-5 mg/mL 포스페이트 완충제, 약 1-50 mM 시트레이트 완충제, 또는 약 0.5-10 mg/mL 히스티딘 완충제;

- [0484] (c) 염화나트륨, 프로필렌 글리콜, 만니톨로 구성된 군으로부터 선택되는 등장화제를 포함하고;
- [0485] (d) pH는 약 6.5 내지 약 8.3이다.
- [0486] 특정 실시양태에서, 약학 조성물은
- [0487] (a) 약 1-80 mg/mL, 1-100 mg/ml 또는 1-120 mg/mL의 폴리펩티드 접합체(여기서, 폴리펩티드 접합체의 폴리펩티드 부분은 서열 번호 57의 아미노산 서열을 포함하고, 각각 26K 및 76K에서 제1 CRM 및 제2 CRM과 접합된다);
- [0488] (b) 약 0.5-5 mg/mL 포스페이트 완충제, 약 1-50 mM 시트레이트 완충제, 또는 약 0.5-10 mg/mL 히스티딘 완충제;
- [0489] (c) 5-15 mg/ml 염화나트륨, 1-50 mg/mL 프로필렌 글리콜, 및 30-50 mg/mL 만니톨로 구성된 군으로부터 선택되는 등장화제를 포함하고;
- [0490] (d) pH는 약 6.5 내지 약 8.3이다.
- [0491] 특정 실시양태에서, 약학 조성물은
- [0492] (a) 약 5-80 mg/mL, 5-100 mg/ml 또는 5-120 mg/mL의 폴리펩티드 접합체(여기서, 폴리펩티드 접합체의 폴리펩티드 부분은 서열 번호 57의 아미노산 서열을 포함하고, 각각 26K 및 76K에서 제1 CRM 및 제2 CRM과 접합된다);
- [0493] (b) 약 0.5-5 mg/mL 포스페이트 완충제, 약 1-50 mM 시트레이트 완충제, 또는 약 0.5-10 mg/mL 히스티딘 완충제;
- [0494] (c) 5-15 mg/ml 염화나트륨, 1-50 mg/mL 프로필렌 글리콜, 및 30- 50 mg/mL 만니톨로 구성된 군으로부터 선택되는 등장화제를 포함하고;
- [0495] (d) pH는 약 6.5 내지 약 8.3이다.
- [0496] 특정 실시양태에서, 폴리펩티드 접합체는 단일-접합된 폴리펩티드 접합체이고, 제1 CRM은 폴리펩티드 접합체의 접합체 부분 중 단 하나의 CRM이다. 임의적으로, 제1 CRM 잔기는 리신 잔기이고, 추가로 임의적으로, 제1 CRM은 모이어티 A가 하기 화학식의 구조를 갖는, 모이어티 A (HOOC-(CH₂)₁₆-CO-gGlu-2XAD0)를 포함한다:



- [0497]
- [0498] 약학 조성물의 특정 실시양태에서, 폴리펩티드 접합체의 폴리펩티드 부분은 서열 번호 60의 아미노산 서열을 포함하고, 76K에서 제1 CRM과 접합된다. 약학 조성물의 특정 실시양태에서, 폴리펩티드 접합체의 폴리펩티드 부분은 서열 번호 52의 아미노산 서열을 포함하고, 76K에서 제1 CRM과 접합된다. 특정 실시양태에서, 약학 조성물은 약 0.5-20 mg/ml, 0.5-50 mg/ml 또는 0.5-80 mg/ml의 폴리펩티드 접합체를 갖는다.
- [0499] 특정 실시양태에서, 약학 조성물은
- [0500] (a) 약 0.5-20 mg/mL, 0.5-50 mg/ml 또는 0.5-80 mg/ml의 폴리펩티드 접합체(여기서, 폴리펩티드 접합체의 폴리펩티드 부분은 서열 번호 60 또는 서열 번호 52의 아미노산 서열을 포함하고, 76K에서 제1 CRM과 접합된다);
- [0501] (b) 포스페이트 완충제, 시트레이트 완충제, 및 히스티딘 완충제로 구성된 군으로부터 선택되는 완충제;
- [0502] (c) 염화나트륨, 프로필렌 글리콜, 만니톨로 구성된 군으로부터 선택되는 등장화제를 포함하고;
- [0503] (d) pH는 약 6.5 내지 약 8.3이다.
- [0504] 특정 실시양태에서, 약학 조성물은
- [0505] (a) 약 0.5-20 mg/mL, 0.5-50 mg/ml 또는 0.5-80 mg/ml의 폴리펩티드 접합체(여기서, 폴리펩티드 접합체의 폴리펩티드 부분은 서열 번호 60 또는 서열 번호 52의 아미노산 서열을 포함하고, 76K에서 제1 CRM과 접합된다);
- [0506] (b) 약 0.5-5 mg/mL 포스페이트 완충제, 약 1-50 mM 시트레이트 완충제, 또는 약 0.5-10 mg/mL 히스티딘 완충제;

- [0507] (c) 염화나트륨, 프로필렌 글리콜, 만니톨로 구성된 군으로부터 선택되는 등장화제를 포함하고;
- [0508] (d) pH는 약 6.5 내지 약 8.3이다.
- [0509] 특정 실시양태에서, 약학 조성물은
- [0510] (a) 약 0.5-20 mg/mL, 0.5-50 mg/ml 또는 0.5-80 mg/ml의 폴리펩티드 접합체(여기서, 폴리펩티드 접합체의 폴리펩티드 부분은 서열 번호 60 또는 서열 번호 52의 아미노산 서열을 포함하고, 76K에서 제1 CRM과 접합된다);
- [0511] (b) 포스페이트 완충제, 시트레이트 완충제, 및 히스티딘 완충제로 구성된 군으로부터 선택되는 완충제;
- [0512] (c) 5-15 mg/ml 염화나트륨, 1-50 mg/mL 프로필렌 글리콜, 및 30-50 mg/mL 만니톨로 구성된 군으로부터 선택되는 등장화제를 포함하고;
- [0513] (d) pH는 약 6.5 내지 약 8.3이다.
- [0514] 특정 실시양태에서, 약학 조성물은
- [0515] (a) 약 0.5-20 mg/mL, 0.5-50 mg/ml 또는 0.5-80 mg/ml의 폴리펩티드 접합체(여기서, 폴리펩티드 접합체의 폴리펩티드 부분은 서열 번호 60 또는 서열 번호 52의 아미노산 서열을 포함하고, 76K에서 제1 CRM과 접합된다);
- [0516] (b) 약 0.5-5 mg/mL 포스페이트 완충제, 약 1-50 mM 시트레이트 완충제, 또는 약 0.5-10 mg/mL 히스티딘 완충제;
- [0517] (c) 5-15 mg/ml 염화나트륨, 1-50 mg/mL 프로필렌 글리콜, 및 30-50 mg/mL 만니톨로 구성된 군으로부터 선택되는 등장화제를 포함하고;
- [0518] (d) pH는 약 6.5 내지 약 8.3이다.
- [0519] **치료 방법**
- [0520] 또 다른 측면에서, 본 개시내용은 치료 유효량의 본원에 제공된 폴리펩티드 접합체 또는 약학 조성물을 투여하는 단계를 포함하는, 대사 장애 예방 또는 치료를 필요로 하는 피험체에서 대사 장애를 예방 또는 치료하는 방법을 제공한다.
- [0521] 치료를 필요로 하는 피험체에게 치료 유효량의 본원에 제공된 폴리펩티드 접합체를 투여하여 병태 또는 장애를 치료 또는 예방하는 단계를 포함하는, 치료 방법 또한 제공한다. 특정 실시양태에서, 피험체는 본원에 제공된 폴리펩티드 접합체에 반응할 가능성이 있는 장애 또는 병태를 앓는 것으로 확인된 피험체이다.
- [0522] 특정 실시양태에서, 대사 장애는 당뇨병, 비만, 과체중, 비알콜성 지방간염(NASH), 심혈관의 질환 예컨대 이상 지질혈증, 동맥경화증, 알콜성 지방간염(ASH), 당뇨병성 신장병증, 임신성 당뇨병, 대사 증후군, 예컨대, 대사 증후군 X, 비알콜성 지방간 질환(NAFLD), 말기 간 질환, 간 지방증(지방간), 간경변, 또는 원발성 담즙성 간경변증(PBC), 또는 알츠하이머병이다.
- [0523] 특정 실시양태에서, 병태 당뇨병은 모든 형태의 당뇨병, 예컨대, 고혈당증, 2형 당뇨병, 내당능 장애, 1형 당뇨병, 비인슐린 의존성 당뇨병, MODY (저연령대 성숙기 발병 당뇨병), 임신성 당뇨병, 및/또는 HbA1C 수준 상승을 포함한다.
- [0524] 특정 실시양태에서, 당뇨병 병태는 예컨대, 혈관병증과 같은 당뇨병 합병증을 포함한다.
- [0525] 특정 실시양태에서, 본 개시내용은 치료 유효량의 본원에 제공된 폴리펩티드 접합체 또는 약학 조성물을 투여하는 단계를 포함하는, 알츠하이머병 예방 또는 치료를 필요로 하는 피험체에서 알츠하이머병을 예방 또는 치료하는 방법을 제공한다. 본원에서 사용되는 바, 용어 "알츠하이머병"은 모든 형태 및 단계의 알츠하이머병을 포함하는 것으로 의도된다. 알츠하이머병은 기억, 인지 기능 및 거동을 점차적으로 손상시키는 진행성 퇴행성 뇌 장애이다. 알츠하이머병에는 5 단계가 존재하며, 이는 임상전 알츠하이머병, 알츠하이머병으로 인한 경미한 인지 장애, 알츠하이머병으로 인한 경미한 치매, 알츠하이머병과 연관된 중간 정도의 치매, 및 알츠하이머병과 연관된 중증 치매를 포함한다. 용어 "치매"는 지적 및 사회적 능력에 상당한 영향을 미쳐 일상 기능을 방해는 증상의 집합을 지칭하는 데 사용된다. 알츠하이머병에는 두 가지 주요 형태: 가족성 알츠하이머병과 산발성 또는 후기 발병 알츠하이머병이 존재한다. 가족성 알츠하이머병은 전형적으로 APP, PSEN1 또는 PSEN2의 세 유전자 중 하나에 돌연변이가 있는 것을 비롯한, 유전된 유전적 돌연변이로 인해 발생한다. 이러한 형태의 질환은 중년에 발병할 가능성이 있는 희귀하고 파괴적인 질병이다. 두 번째의 훨씬 더 흔한 형태의 질환은 산발성 또는 후기

발병 알츠하이머병으로, 가장 흔한 형태이며, 알려진 유전적 원인 없이 발생한다. 일부 실시양태에서, 피험체는 알츠하이머병을 앓고 있거나 또는 그로 인해 고생하고 있으며, 기억 장애, 언어 기능장애, 시공간적 기술을 포함한 인지적 결핍으로 이루어진 군으로부터 선택되는 증상을 가질 수 있고; 직업적 및 사회적 문제(예컨대, 일상 생활 활동)를 포괄할 수 있는 기능적 장애; 및 우울증, 불안, 공격성 및 정신병을 포함한 행동 증상도 질환이 심각해짐에 따라 나타날 수 있다.

[0526] 특정 실시양태에서, 피험체는 임상전 알츠하이머병, 알츠하이머병으로 인한 경미한 인지 장애, 알츠하이머병으로 인한 경미한 치매, 알츠하이머병과 연관된 중간 정도의 치매, 또는 알츠하이머병과 연관된 중증 치매를 앓는 피험체이다.

[0527] 특정 실시양태에서, 피험체는 가족성 알츠하이머병 또는 산발성 알츠하이머병을 앓는 피험체이다.

[0528] 접합된 GLP-1 효능제, 예를 들어, 세마글루티드가 알츠하이머병을 치료하는 데 유용할 수 있다고 보고된 바 있으며, 예를 들어, 공개된 미국 특허 출원 US2022/0280612A1(이는 그 전문이 본원에서 포함된다)을 참조한다. 알츠하이머병과 관련된 동물 연구에서 GLP-1 효능제 세마글루티드가 인지 및 기능에 영향을 미칠 수 있는 신경 염증 측정치를 감소시켰다고 보고되었다. 추가로, 실제 증거는 치매 위험 감소와 GLP-1 효능제를 이용한 치료 사이에 가능한 연관성을 시사한다. GLP-1 효능제 치료를 받은 피험체에서 치매 발생률이 유의적으로 더 낮았다.

[0529] 본 개시내용은 본원에 제공된 폴리펩티드 접합체 및 본원에 제공된 약학 조성물이 알츠하이머병을 치료하는 데 효과적이라는 것을 보여준다. 특정 실시양태에서, 본원에 제공된 폴리펩티드 접합체 및 본원에 제공된 약학 조성물은 인지 기능, 예컨대, 기억 및 주의를 개선시키고/거나, 알츠하이머병의 발병 또는 진행을 지연시키는 데 효과적이다. 특정 실시양태에서, 본원에 제공된 폴리펩티드 접합체가 알츠하이머병을 치료하는 데 세마글루티드보다 더 효과적이다.

[0530] 또 다른 측면에서, 본 개시내용은 치료 유효량의 본원에 제공된 폴리펩티드 접합체를 투여하는 단계를 포함하는, 체중 관리를 필요로 하는 피험체에서 체중을 관리하는 방법을 제공한다.

[0531] 또 다른 측면에서, 본 개시내용은 치료 유효량의 본원에 제공된 폴리펩티드 접합체를 투여하는 단계를 포함하는, 음식 섭취 감소를 필요로 하는 피험체에서 음식 섭취를 감소시키는 방법을 제공한다.

[0532] 또 다른 측면에서, 본 개시내용은 치료 유효량의 본원에 제공된 폴리펩티드 접합체를 투여하는 단계를 포함하는, 체중 감소를 필요로 하는 피험체에서 체중을 감소시키는 방법을 제공한다.

[0533] 특정 실시양태에서, 본원에 제공된 폴리펩티드 접합체를 사용하여 치료 또는 호전될 수 있는 병태 또는 대사 장애는 인간 피험체의 공복 혈당 수준이 125 mg/dL 이상, 예를 들어, 130, 135, 140, 145, 150, 155, 160, 165, 170, 175, 180, 185, 190, 195, 200 또는 200 mg/dL 초과인 병태를 포함한다. 혈당 수준은 섭식 또는 공복에서 또는 무작위로 결정할 수 있다. 대사 병태 또는 장애는 또한 피험체가 대사 병태가 발생할 증가되어 있는 병태를 포함할 수 있다. 인간 피험체의 경우, 상기 병태는 100 mg/dL의 공복 혈당 수준을 포함한다.

[0534] 특정 실시양태에서, 본원에 제공된 폴리펩티드 접합체를 사용하여 치료 또는 호전될 수 있는 병태 또는 대사 장애는 인간 피험체의 체질량 지수(BMI)가 적어도 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39 또는 40 이상인 병태를 포함한다. 특정 실시양태에서, 인간 피험체의 BMI는 25 내지 30, 26 내지 30, 27 내지 30, 28 내지 30, 25 내지 29, 또는 25 내지 28 범위이다.

[0535] 본원에 제공된 폴리펩티드 접합체의 치료 유효량은 예컨대, 예를 들어, 피험체의 체중, 연령, 과거 병력, 현재 약물 치료, 건강 상태 및 교차 반응의 가능성, 알레르기, 민감성 및 유해한 부작용 뿐만 아니라, 투여 경로 및 질환 발생 정도와 같은 당업계에서 공지된 다양한 인자에 따라 달라질 것이다. 투여량은 이들 및 다른 상황 또는 요건에 의해 지시된 바와 같이 당업자(예컨대, 의사 또는 수의사)에 의해 비례적으로 감량 또는 증량될 수 있다. 치료 유효량은 치료되는 질환 또는 장애의 증상의 완화 또는 호전을 포함하는, 연구자, 의사, 또는 다른 임상가가 추구하는 조직계, 동물, 또는 인간에서 생물학적 또는 의약 반응을 유도하는 본원에 제공되는 융합 폴리펩티드, 폴리펩티드 복합체 및 접합체의 양, 즉, 하나 이상의 원하는 생물학적 또는 의약 반응, 예를 들어, 혈당, 인슐린, 트리글리세리드, 또는 콜레스테롤 수준의 저하; 체중 감소; 또는 글루코스 내성, 에너지 소비, 또는 인슐린 감수성 개선의 관찰가능한 수준을 지지하는 양일 수 있다.

[0536] 특정 실시양태에서, 본원에 제공된 폴리펩티드 접합체는 약 0.01 mg/kg 내지 약 100 mg/kg(예컨대, 약 0.01 mg/kg, 약 0.5 mg/kg, 약 1 mg/kg, 약 2 mg/kg, 약 5 mg/kg, 약 10 mg/kg, 약 15 mg/kg, 약 20 mg/kg, 약 25 mg/kg, 약 30 mg/kg, 약 35 mg/kg, 약 40 mg/kg, 약 45 mg/kg, 약 50 mg/kg, 약 55 mg/kg, 약 60 mg/kg, 약

65 mg/kg, 약 70 mg/kg, 약 75 mg/kg, 약 80 mg/kg, 약 85 mg/kg, 약 90 mg/kg, 약 95 mg/kg, 또는 약 100 mg/kg)의 치료 유효 투여량으로 투여될 수 있다. 이들 실시양태 중 특정 실시양태에서, 본원에 제공된 폴리펩티드 접합체는 약 50 mg/kg 이하의 투여량으로 투여되고, 이들 실시양태 중 특정 실시양태에서, 투여량은 10 mg/kg 이하, 5 mg/kg 이하, 1 mg/kg 이하, 0.5 mg/kg 이하, 또는 0.1 mg/kg 이하이다. 특정 실시양태에서, 투여 투여량은 치료 과정 동안 변경될 수 있다. 예를 들어, 특정 실시양태에서, 초기 투여 투여량은 후속 투여 투여량보다 높을 수 있다. 특정 실시양태에서, 투여 투여량은 피험체의 반응에 따라 치료 과정 동안 달라질 수 있다.

[0537] 특정 실시양태에서, 본원에 제공된 폴리펩티드 접합체는 1일 1회, 매 3일마다 1회, 주 1회, 매 2주마다 1회, 매 3주마다 1회, 또는 월 1회보다 더 빈번하지 않은 투여 요법으로 피험체(예컨대, 인간)에게 투여된다. 특정 실시양태에서, 본원에 제공된 폴리펩티드 접합체는 주 2회, 주 1회, 매 2주마다 1회, 매 3주마다 1회, 월 1회, 또는 매 2개월마다 1회의 투여 간격으로 피험체(예컨대, 인간)에게 투여될 수 있다. 낮은 투여 빈도의 치료 효능은 환자의 순응도와 장기적인 치료 성공을 개선할 가능성이 있다. 현재 이용가능한 치료 세마글루티드는 주 1회 투여된다.

[0538] 임의의 이론에 얽매이지 않으면서, 본원에 제공된 특정 폴리펩티드 접합체는 유의적으로 연장된 반감기를 가지며, 대사 병태를 치료하기 위해 세마글루티드보다 덜 빈번한 투여, 예를 들어, 주 1회 투여보다 덜 빈번한 투여(예컨대, 매 8일마다 1회, 매 9일마다 1회, 매 10일마다 1회, 매 11일마다 1회, 매 12일마다 1회, 매 13일마다 1회, 매 14일마다 1회, 매 18일마다 1회, 매 3주마다 1회, 매 24일마다 1회, 매 4주마다 1회, 또는 매월 1회)에 적합한 것으로 여겨진다. 특정 실시양태에서, 투여 요법은 주 2회 투여, 주 1회 투여, 격주로 1회 투여, 매 3주마다 1회 투여, 월 1회 투여, 또는 매 2개월마다 1회 투여로부터 선택되는 연속 투여 요법이다. 특정 실시양태에서, 투여 요법은 약 매 3일마다 1회 내지 약 월 1회, 또는 약 주 1회 내지 약 월 1회 범위의 투여 간격을 갖는다.

[0539] 투여 요법은 최적의 원하는 반응(예컨대, 치료 반응)을 제공하기 위해 조정될 수 있다. 예를 들어, 단일 용량이 투여될 수 있거나, 또는 몇 개의 분할 용량이 시간이 지남에 따라 투여될 수 있다.

[0540] 본원에 제공된 약학 조성물은 경구적으로 투여된다.

[0541] 폴리펩티드 접합체는 단독으로 또는 하나 이상의 추가적인 치료 수단 또는 작용제와 조합하여 투여될 수 있다.

[0542] 특정 실시양태에서, 대사 질환을 치료하기 위해 사용될 때, 본원에 제공된 폴리펩티드 접합체는 대사 질환 또는 관련된 임의의 의학적 장애의 치료에 사용하기 위해 임의의 다른 치료제와 조합하여 투여될 수 있다. 본원에서 사용되는 바, "조합하여 투여"는 동일한 약학 조성물의 일부로서 동시에, 별개의 조성물로서 동시에, 또는 별개의 조성물로서 상이한 시간에 투여하는 것을 포함한다. 또 다른 작용제 이전 또는 이후에 투여된 조성물은 조성물 및 제2 작용제가 상이한 경로를 통해 투여되는 경우에도 어구가 본원에 사용되는 바와 같이 상기 작용제와 "조합하여" 투여되는 것으로 간주된다. 가능한 경우, 본원에 제공되는 융합 폴리펩티드, 폴리펩티드 복합체 또는 접합체와 조합하여 투여되는 추가 치료제는 추가 치료제의 제품 정보 시트에 열거된 스케줄에 따라, 또는 의 사용 탁상 편람(Physicians' Desk Reference, 70th Ed (2016)) 또는 당업계에 널리 공지된 프로토콜에 따라 투여된다. 본원에 제공된 폴리펩티드 접합체를 포함하는 약학 조성물과 조합하여 투여될 수 있는 화합물의 예의 비제한적인 목록은 로시글리티존, 피오글리티존, 레파글리니드, 나테글리티니드, 메트포르민, 액세나티드, 스티아글립틴, 프람린티드, 글리피지드, 글리메프리리데아카보스, 및 미글리톨을 포함한다.

[0543] **키트**

[0544] 개시된 방법을 실행하기 위한 키트 또한 제공한다. 상기 키트는 본원에 제공된 폴리펩티드 접합체를 코딩하는 핵산, 상기 핵산을 포함하는 벡터 및 세포, 및 상기 핵산 함유 화합물을 포함하는 약학 조성물을 포함하는 본원에 기술된 것과 같은 약학 조성물을 포함할 수 있으며, 이는 멸균 용기에 제공될 수 있다. 임의적으로, 대사 장애의 치료에서 상기 제공된 약학 조성물을 사용하는 방법에 대한 지침 또한 포함되거나, 또는 환자 또는 의료 서비스 제공자에게 이용가능해질 수 있다.

[0545] 한 측면에서, 키트는 (a) 치료 유효량의 본원에 제공된 폴리펩티드 접합체 또는 그의 돌연변이체 형태를 포함하는 약학 조성물; 및 (b) 약학 조성물을 위한 하나 이상의 용기를 포함한다. 상기 키트는 또한 그의 사용을 위한 지침을 포함할 수 있고; 지침은 치료 중인 정확한 대사 장애에 맞게 조정될 수 있다. 지침은 키트에 제공된 물질의 용도 및 성질을 기술할 수 있다. 특정 실시양태에서, 키트는 환자가 대사 장애, 예컨대, 글루코스 수준 상승, 인슐린 수준 상승, 당뇨병, 비만, 비알콜성 지방간염(NASH), 심혈관의 질환 예컨대 이상지질혈증, 동맥경화

증, 알콜성 지방간염(ASH), 당뇨병성 신장병증, 대사 증후군, 예컨대, 대사 증후군 X, 비알콜성 지방간 질환 (NAFLD), 말기 간 질환, 간 지방증(지방간), 간경변, 또는 원발성 담즙성 간경변증(PBC), 또는 알츠하이머병을 치료하기 위해 투여를 수행하기 위한 지침을 포함한다.

[0546] 지침은 예컨대, 종이 또는 플라스틱 등과 같은 기판 상에 인쇄될 수 있고, 패키지 삽입물로서 키트 내에, 키트 또는 그 구성요소(예컨대, 포장과 연관된 것)의 라벨링 등에 존재할 수 있다. 다른 실시양태에서, 지침은 적합한 컴퓨터 판독 가능한 저장 매체, 예컨대, CD-ROM, 디스켓 등에 존재하는 전자 저장 데이터 파일로서 존재한다. 또 다른 실시양태에서, 실제 지침은 키트에 존재하지 않지만, 원격 소스로부터, 예컨대, 인터넷을 통해, 지침을 획득하기 위한 수단이 제공된다. 이러한 실시양태의 한 예는 지침을 볼 수 있고/거나, 지침이 다운로드될 수 있는 웹 주소를 포함하는 키트이다. 종종 키트의 일부 또는 모든 구성요소가 멸균을 유지하기 위해 적합한 패키징에 포장되는 것이 바람직할 것이다. 키트의 구성요소는 키트 격납 요소에 포장되어 단일의 취급이 용이한 유닛을 만들 수 있으며, 여기서, 키트 격납 요소, 예컨대, 상자 또는 유사한 구조는 예컨대, 키트의 구성요소의 일부 또는 모두의 멸균을 추가로 보존하기 위해 밀폐 용기일 수도 있거나, 또는 아닐 수도 있다.

[0547] 실시예 1: GLP-1 단백질의 재조합 발현 및 정제

[0548] 표 1에 열거된 GLP-1 융합 폴리펩티드(즉, 서열 번호 51-80, 85-88)를 BL21(DE3) 유래 균주를 사용하여 박테리아 E. 콜라이 발현 시스템으로부터 생산하였다. 태그부착된 GLP-1 융합 폴리펩티드를 코딩하는 DNA를 E. 콜라이 발현을 위해 코돈 최적화하고, 드 노보 합성하고, PET 유도체 발현 벡터(Novagen) 내로 서브클로닝하였다. 상응하는 유전자 코드의 변형에 의해 아미노산 치환을 달성하였다. 세포 밀도가 테리픽 브로쓰(TB: Terrific Broth) 배지에서 OD600 = 2.0에 도달하였을 때, 0.5 mM 이소프로필 b-d-티오갈락토시드(IPTG)로 태그부착된 GLP-1 융합 폴리펩티드의 과다발현을 유도하였다. 37°C에서 20-22시간 동안 단백질 유도 후, 세포를 수확하였다. 세포를 수확하고, 세포 파쇄인자(900 bar, 2회)에 의해 20 mM Tris pH8.0, 0.15M NaCl 완충제중에서 용해시켰다. 태그부착된 GLP-1 융합 폴리펩티드를 함유하는 가용성 분획을 원심분리(8,000 X g, 30 min 동안)에 의해 수집하였다. 프로테아제에 의해 태그를 제거한 후, GLP-1 융합 폴리펩티드를 역상 크로마토그래피에 의해 정제하였다. 정확한 분자량을 확인하기 위해 각 단계에서 샘플을 LC/MS에 의해 특징화하였다.

[0549] 실시예 2: 재조합 단백질에서의 비단백질원성 아미노산의 도입

[0550] N-말단 His-Aib-Glu-Gly 테트라펩티드 또는 His-Aib 디펩티드를 유기 용매에 용해시키고, 유기 용매 중의 GLP-1 융합 폴리펩티드의 용액에 첨가하였다. 반응물을 실온에서 3 h 동안 교반하였다. 이어서, 피페리딘을 반응 용액에 첨가하여 Fmoc 보호기를 제거하였다.

[0551] 실시예 3: GLP-1 폴리펩티드 접합체 제조

[0552] NaOH 중 실시예 2에서 수득된 GLP-1 융합 폴리펩티드의 용액에 유기 용매 중의 CRM 시약 (예컨대, HOOC-(CH₂)₁₆-CO-gGlu-2XADO, HOOC-(CH₂)₁₆-CO-gGlu-2XADO-EDA-CO-CH₂ 등)을 첨가하였다. 반응물을 실온에서 1 h 동안 교반하였다. 이어서, 생성물을 역상 크로마토그래피에 적용하였다. 이는 상기 제시된 바와 같이 표 1에 열거된 바와 같은 GLP-1 폴리펩티드 접합체를 제공하였다.

[0553] GLP-1 폴리펩티드 접합체를 검출하고, 공급업체의 매뉴얼에 따라 상이한 접합체에 최적화된 조건을 사용하여 워터스 바이오어코드(Waters BioAccord) LC-MS 시스템을 사용한 LC-MS 방법에 의해, 또는 워터스 어큐티(Waters Acquity) UPLC 시스템을 사용한 UPLC에 의해 특징화하였다.

[0554] 실시예 4a: 시험관내 활성

[0555] 방법: 1% 인간 혈청 알부민(HSA)을 갖거나, 또는 갖지 않는 인간 GLP-1 수용체 및 CRE 루시페라제 리포터를 과다발현하는 BHK 세포주를 사용하여 시험관내 GLP-1 활성을 측정하였다. 시험된 GLP-1 폴리펩티드 접합체를 3배 연속 희석으로 1% HSA의 부재 또는 존재하에 있을 때 최고 농도로서 1 nM 또는 100 nM에서 측정하였다. 세포를 4시간 동안 분자로 처리한 후, 루시페라제 활성을 스테디라이트 플러스(Steadylite plus) 키트(Perkin Elmer, 6066751)에 의해 측정하였다.

[0556] 각 GLP-1 폴리펩티드 접합체의 활성을 비선형 회귀 분석으로부터 도출된 EC₅₀으로 나타내었다.

[0557] 결론: 거의 모든 분자(즉, GLP-1 폴리펩티드 접합체)는 HSA 보충제 부재하의 분석에서 세마글루티드와 유사하거나, 또는 그보다 훨씬 더 우수한 효능을 나타낸다. 그러나, 상이한 분자는 1% HSA의 존재하에서 상이한 정도의 GLP-1 활성 감소(즉, EC₅₀ 증가)를 보였다. 표 2a 및 2b의 데이터는 링커 길이, 지방산 위치 및 접합된 지방산

모이어티의 개수가 GLP-1 활성과 관련될 수 있다는 것을 시사하였다. 표 2에 제시된 바와 같이, 짧은 링커 길이(즉, 12개의 아미노산 잔기)를 갖는 분자(모노 아실화든 또는 이중 아실화이든 간에)는 더 긴 링커 길이를 갖는 분자와 비교하여 유의적으로 감소된 GLP1-활성을 보였다. GLP-1의 C-말단 잔기와 CRM 잔기(즉, 링커 중의 리신) 사이의 거리가 증가함에 따라, HSA의 존재하에 분자의 GLP-1 활성은 꾸준히 개선된 것으로 보였다.

표 2a에 제시된 바와 같이, 모노 아실화된 분자 002, 010 및 01은 1% HSA의 존재하에서 세마글루티드보다 훨씬 더 높은 활성을 나타내었다. 이중 아실화된 분자 012, 016, 004, 006, 007, 005, 001 및 061의 경우, 모두 1% HSA의 존재하에서 세마글루티드보다 상대적으로 더 낮은 GLP-1 활성을 보였지만, 여전히 허용가능한 범위에 있었다.

[표 2a]

표 2a. GLP-1 폴리펩티드 접합체의 시험관내 활성. 시험관내 GLP-1 활성을 측정하기 위해, 인간 GLP-1 수용체를 과다발현하는 BHK 세포주를 사용하였다.

분자 코드	링커 길이 (aa)	지방산 수	지방산 위치	GLP-1 활성 (EC ₅₀ , pM)	GLP-1 활성 (EC ₅₀ , pM, 1%HSA)
세마글루티드	0	단일	GLP-1	4.2	243.8
001	40	이중	GLP-1 및 링커	2.8	1036
002	40	단일	링커	1.1	8.6
005	48	이중	GLP-1 및 링커	5.0	1537
006	32	이중	GLP-1 및 링커	4.0	1387
007	24	이중	GLP-1 및 링커	4.7	3238
008	12	이중	GLP-1 및 링커	4.6	8732
004	60	이중	GLP-1 및 링커	3.0	984.4
012	40	이중	GLP-1 및 링커	2.1	1051
016	32	이중	GLP-1 및 링커	2.1	1459
010	24	단일	링커	1.7	22.9
011	12	단일	링커	3.7	43.9
061	40	이중	GLP-1 및 링커	4.4	2213

실시예 4b: 시험관내 활성

방법: 1% 인간 혈청 알부민(HSA)을 갖거나, 또는 갖지 않는 인간 GLP-1 수용체 및 CRE 루시페라제 리포터를 과다발현하는 CHO 세포주를 사용하여 시험관내 GLP-1 활성을 측정하였다. 시험된 GLP-1 폴리펩티드 접합체를 3배 연속 희석으로 1% HSA의 부재 또는 존재하에 있을 때 최고 농도로서 30 nM 또는 600 nM에서 측정하였다. 세포를 5시간 동안 분자로 처리한 후, 루시페라제 활성을 브라이트-글로 루시페라제 검정 시스템(Bright-Glo Luciferase Assay System)에 의해 측정하였다. 각 GLP-1 폴리펩티드 접합체의 활성을 비선형 회귀 분석으로부터 도출된 EC50으로 나타내었다.

결론: 표 2b에 제시된 바와 같이, 모노 아실화된 분자 002(1006) 및 019(1023)는 1% HSA의 존재하에서 세마글루티드보다 훨씬 더 높은 활성을 나타내었다.

[0564] [표 2b]

표 2b. GLP-1 폴리펩티드 접합체의 시험관내 활성. 시험관내 GLP-1 활성을 측정하기 위해, 인간 GLP-1 수용체를 과다발현하는 CHO 세포주를 사용하였다.

분자 코드	링크 길이 (aa)	지방산 수	지방산 위치	GLP-1 활성 (EC ₅₀ , nM)	GLP-1 활성 (EC ₅₀ , nM, 1%HSA)
세마글루티드	0	단일	GLP-1	0.33	23.8
002	40	단일	링크	0.12	3.47
019	40	단일	링크	0.07	2.16

[0565]

[0566] **실시예 5: C57 마른 마우스에서의 생체내 활성**

[0567] 방법: 10주령된 수컷 C57BL/6 마우스에게 1일째에 단백질을 1회 피하 주사하였다. 체중을 매일 측정하였고, 각 처리군에 대해 5마리의 동물을 사용하였다. 각 개별 동물에 대해 체중을 모니터링하였다. %BW 손실 = 100 * (n 일째의 BW - 1일째의 BW)/(1일째의 BW) 데이터는 평균값 및 표준 오차(SEM)로 표시된다. 0부터 8일째까지의 체중 손실(%)에 대한 곡선하 면적(AUC ΔBW 0-8d)을 계산하였다.

[0568] 결론: 분자 001 및 012는 체중 조절에 대해 용량 의존적 효능을 나타내었다(도 1a 및 표 3). 도 1d 및 표 3에 제시된 바와 같이, 분자 007 및 008은 012 및 016보다 효능이 더 낮고, 이는 시험관내 활성 데이터와 일치한다. 이중 지방산을 갖는 분자 001, 016 및 012는 세마글루티드보다 더 지속가능한 효능을 보였으며, 이는 분자 001, 016 및 012가 더 긴 반감기를 가질 수 있다는 것을 시사한다(도 1a 및 1b).

표 3

표 3: C57 마른 마우스 연구에서 0부터 8일째까지 체중 손실(%)에 대한 곡선하 면적(AUC ΔBW 0-8d).

연구	군	AUC ΔBW 0-8d (일*%)
연구 1 (도 1a)	세마글루티드 30nmol/kg	-9.3
	분자 012 30nmol/kg	-13.6
	분자 012 100nmol/kg	-28.3
	분자 001 100nmol/kg	-25.9
연구 2 (도 1b)	세마글루티드 30nmol/kg	-13.2
	분자 008 30nmol/kg	-1.85
	분자 007 30nmol/kg	-2.63
	분자 012 30nmol/kg	-21.6
	분자 016 30nmol/kg	-20.1

[0569]

[0570] **실시예 6a: db/db 마우스에서의 생체내 활성**

[0571] 방법: 10주령된 수컷 db/db 마우스에게 GLP-1 폴리펩티드 접합체를 1회 피하 주사하였다. 공복 글루코스를 상이한 시점에 측정하였고, 각 군에 대해 3마리의 동물을 사용하였다. 델타 혈당은 기저 수준이 차감된 글루코스이다. 데이터는 평균값 및 표준 오차(SEM)로 표시된다.

[0572] 결론: 분자 001 및 002, 둘 다 글루코스 조절에 대해 용량 의존적 효능을 보였다(도 2a 및 2b). 이중 지방산을

갖는 분자 001은 세마글루티드보다 더 지속가능한 효능을 나타내었고, 이는 분자 001이 더 긴 반감기를 가질 수 있다는 것을 시사한다.

[0573] 방법: 10주령된 수컷 db/db 마우스에게 GLP-1 폴리펩티드 접합체를 1회 피하 주사하였다. 비공복 글루코스를 상이한 시점에 측정하였고, 각 군에 대해 5마리의 동물을 사용하였다. 델타 혈당은 기저 수준이 차감된 글루코스이다. 데이터는 평균값 및 표준 오차(SEM)로 표시된다. 0부터 192시간째까지의 델타 혈당에 대한 곡선하 면적(AUC Δ BG 0-192h)을 계산하였다.

[0574] 결론: 분자 012는 글루코스 조절에 대해 용량 의존적 효능을 나타내었다(도 2C, 표 4). 이중 지방산을 갖는 분자 012는 세마글루티드보다 더 지속가능한 효능을 나타내었다.

표 4

표 4: 도 2c의 db/db 마우스에서 0부터 192시간째까지의 비공복 델타 혈당(%)에 대한 곡선하 면적(AUC Δ BG 0-192h).

군	AUC Δ BG 0-192h (hr*mmol/L)
세마글루티드 3 nmol/kg	-317.0
세마글루티드 10 nmol/kg	-583.4
세마글루티드 30 nmol/kg	-527.1
분자 012 3 nmol/kg	-424.5
분자 012 10 nmol/kg	-1004.5
분자 012 30 nmol/kg	-1447.0

[0575]

[0576] 실시예 6b: db/db 마우스에서의 생체내 활성

[0577] 방법: 10주령된 수컷 db/db 마우스에게 분자 019를 1회 피하 주사하였다. 무작위 혈당을 상이한 시점에 측정하였고, 각 군에 대해 5마리의 동물을 사용하였다. 델타 혈당은 기저 수준이 차감된 글루코스이다. 데이터는 평균값 및 표준 오차(SEM)로 표시된다.

[0578] 결론: 분자 019는 글루코스 조절에 대해 용량 의존적 효능을 보였고(도 2d 및 2e), 세마글루티드보다 유의적으로 더 높은 효력을 나타내었다.

[0579] 실시예 7: 약동학적 성질 측정

[0580] 방법: 6-8주령된 수컷 C57BL/6 마우스에게 30 nmol/kg 단백질을 단일 피하 용량으로 투여하였다(n=3/군). 혈장 샘플을 투여 전(-5 min), 주사 후 0.5 hr, 1 hr, 2 hr, 4 hr, 6 hr, 8 hr, 12 hr, 24 hr, 48 hr, 72 hr, 96 hr, 120 hr, 144 hr, 168 hr 및 192 hr에 수집하였다. 혈장 중 GLP-1 폴리펩티드 접합체의 농도를 ELISA 검정법에 의해 측정하였다. 각 GLP-1 폴리펩티드 접합체의 혈장 농도 대 피하 주사 후 경과시간을 나타내는 그래프에 기초하여, 약동학 파라미터를 WinNonlin에 의해 계산하였다.

[0581] 결론: 분자 001 및 012는 마우스에서 세마글루티드 및 분자 002보다 더 긴 반감기를 나타내었고(표 5), 이는 생체내 효능과 일치하였다.

표 5

표 5: 마우스에서 GLP-1 폴리펩티드 접합체의 약동학적 파라미터.
 약동학적 데이터를 WinNonlin 소프트웨어에 의해 분석하였다. 각 분자에 대해
 T_{max} , C_{max} , $T_{1/2}$, AUC를 계산하였다

PK 파라미터	단위	세마글루티드	분자 001	분자 002	분자 012
T_{max}	hr	6.7	32	4	24
C_{max}	nmol/L	43.1	172.0	86.5	134
말단 $t_{1/2}$	hr	7.4	30.1	7.2	28.2
AUC_{tau}	hr*nmol/L	614.7(Tau=24h)	12256(Tau=168h)	1507(Tau=48h)	7752 (tau=192h)

[0582]

[0583]

방법: 6-8주령된 수컷 SD 래트에게 각각 15 nmol/kg GLP-1 폴리펩티드 접합체를 단일 피하 용량으로(n=3/군) 및 15 nmol/kg GLP-1 폴리펩티드 접합체를 단일 정맥내 용량으로(n=3/군) 투여하였다. 혈장 샘플을 투여 전(-5 min), 피하 투여 후 0.5 hr, 1 hr, 2 hr, 4 hr, 6 hr, 8 hr, 24 hr, 32 hr, 48 hr, 72 hr, 96 hr, 120 hr, 144 hr, 168 hr, 192 hr, 216 hr 및 240 hr에 수집하였다. 혈장 샘플을 투여 전(-5 min), 정맥내 투여 후 0.083 hr, 0.25 hr, 0.5 hr, 1 hr, 2 hr, 4 hr, 6 hr, 8 hr, 24 hr, 32 hr, 48 hr, 72 hr, 96 hr 및 120 hr에 수집하였다. 혈장 중 폴리펩티드 접합체의 농도를 LC-MS/MS 방법에 의해 측정하였다. 각 폴리펩티드 접합체의 혈장 농도 대 피하 주사 후 경과시간을 나타내는 그래프에 기초하여, 약동학 파라미터를 WinNonlin에 의해 계산하였다.

[0584]

결론: 표 6에 제시된 바와 같이, 분자 001 및 012는 세마글루티드보다 더 긴 반감기를 나타내었고, 이는 래트에서 $T_{1/2}$ 가 12 hrs(sc 투여, FDA로부터의 비임상 검토에서 보고된 바와 같음)인 것으로 보고되었다.

표 6

표 6: 래트에서 GLP-1 폴리펩티드 접합체의 약동학적 파라미터.
 약동학적 데이터를 WinNonlin 소프트웨어에 의해 분석하였다. 각 분자에 대해
 T_{max} , C_{max} , $T_{1/2}$, AUC를 계산하였다.

PK 파라미터	단위	분자 001		분자 012	
		i.v.	s.c.	i.v.	s.c.
T_{max}	hr	NA	24	NA	26.7
C_{max} (iv의 경우, C0)	nmol/L	317	56.2	231	52.0
말단 $t_{1/2}$	hr	26.9	25.8	26.9	26.9
AUC_{tau}	hr*nmol/L	4485 (Tau=120h)	2887 (Tau=192h)	4140 (Tau=120h)	2954 (Tau=192h)
F	%	NA	64	NA	71

NA: 이용할 수 없음.

[0585]

[0586]

방법: 10개월령된 수컷 바마 미니피그에게 각각 5 nmol/kg GLP-1 폴리펩티드 접합체를 단일 피하 용량으로(n=2/군) 및 5 nmol/kg 단백질을 단일 정맥내 용량으로(n=2/군) 투여하였다. 분자 012 및 세마글루티드 군에 대한 혈장 샘플을 투여 전(-5 min), 피하 투여 후 0.5 hr, 1 hr, 3 hr, 8 hr, 24 hr, 48 hr, 72hr, 96 hr, 168 hr, 336 hr, 504 hr 및 672 hr에 수집하였다. 분자 012 및 세마글루티드 군에 대한 혈장 샘플을 투여 전(-5 min), 정맥내 투여 0.083 hr, 0.5 hr, 1 hr, 3 hr, 8 hr, 24 hr, 48 hr, 72 hr, 96 hr, 168 hr, 336 hr 및 504 hr에

수집하였다. 세마글루티드 군의 경우, 혈장 중 GLP-1 폴리펩티드 접합체의 농도를 ELISA 검정법에 의해 측정하였다. 분자 012 군의 경우, 혈장 중 단백질의 농도는 LC-MS/MS 방법에 의해 측정하였다. 각 GLP-1 폴리펩티드 접합체의 혈장 농도 대 투여 후 경과시간을 나타내는 그래프에 기초하여, 약동학적 파라미터를 WinNonlin에 의해 계산하였다.

[0587] 결론: 분자 012는 미니피그에서 세마글루티드보다 더 긴 반감기를 나타내었다(표 7).

표 7

표 7: 미니피그에서 GLP-1 폴리펩티드 접합체의 약동학적 파라미터.
약동학적 데이터를 WinNonlin 소프트웨어에 의해 분석하였다. 각 분자에 대해 Tmax, Cmax, T_{1/2}, AUC를 계산하였다.

PK 파라미터	단위	세마글루티드		분자 012	
		i.v.	s.c.	i.v.	s.c.
T _{max}	hr	NA	16	NA	60
C _{max} (iv의 경우, C ₀)	nmol/L	188	54.9	236	71.4
말단 t _{1/2}	hr	53.0	62.8	136	147
AUC _{tau}	hr*nmol/L	6643 (Tau=336h)	5658 (Tau=336h)	19617 (Tau=504h)	16830 (Tau=672h)
F	%	NA	85	NA	86

[0588]

[0589] 실시예 8a: 질환 모델에서의 효능 연구

[0590] 선택된 분자를 질환 동물 모델(예컨대, db/db 마우스)에서 평가하여 만성 연구에서 용량 반응을 이용하여 체중, 음식 섭취, 글루코스 효능을 결정하였다. 공복 인슐린, 혈장 트리글리세리드, 콜레스테롤, 간 트리글리세리드 및 염증성 바이오마커(ALT, AST 및 CRP)를 포함하는 일부 바이오마커를 또한 측정한다.

[0591] 방법: 22주령된 DIO 수컷 C57BL/6 마우스(~50 g)에게 25일 동안 격일로(Q2D) 지정된 GLP-1 폴리펩티드 접합체(즉, 분자 012)를 1회 피하 주사하였다. 음식 섭취 및 체중을 주 2회 측정하였고, 공복 혈당을 주 1회 측정하였다. 각 처리군에 대해 5마리의 동물을 사용하였다. 체중 및 공복 혈당을 각 개별 동물에 대해 모니터링하였지만, 각 군 동물에 대한 음식 섭취는 함께 측정하였다. 1일째 및 25일째는 분자 투여의 첫날 및 마지막 날이다. 데이터는 평균값 및 표준 오차(SEM) 또는 합동 값으로 표시된다. 통계 분석을 일원 ANOVA에 의해 수행하였다. 25일째의 체중 감소율은 -1*(%BW 손실 - 비히클 군의 %BW 손실)에 의해 계산되고; 누적 음식 섭취 감소율은 -100*(누적 음식 섭취-비히클의 누적 음식 섭취)/비히클의 누적 음식 섭취에 의해 계산된다.

[0592] 결론: DIO 연구에서, 도 3a, 3b 및 표 8에 제시된 바와 같이, 분자 012는 체중 감소, 음식 섭취 감소 및 혈당 조절에 대해 용량 의존적 효능을 나타내었다.

표 8

표 8 25일째 DIO 마우스에서의 음식 섭취 및 체중 감소

군	누적 음식 섭취 감소율 (비히클 대비 감소율(%)) (25일째)	체중 감소율 (비히클 대비 감소율(%)) (25일째)
분자 012 10 nmol/kg, Q2D	35	18.42
분자 012 30 nmol/kg, Q2D	37	23.0
분자 012 100 nmol/kg, Q2D	51	37.6

[0593]

[0594] **실시예 8b: 질환 모델에서의 효능 연구**

[0595] 선택된 분자를 알츠하이머병동물 모델(APP/PS1, APP^{swe}/PSEN1dE9 마우스)에서 평가하여 연구에서 용량 반응을 이용하여 인지 기능(모리스 수중 미로 및 Y-미로), 뇌 Aβ 플라크 침착, 및 해마 피라미드 뉴런수를 측정한다.

[0596] 동물의 인지 기능을 평가하기 위해, 모리스 수중 미로 및 Y-미로 테스트를 사용하였다. 알츠하이머병에서 이환된 뇌 영역인 피질 및 해마에서 베타 아밀로이드 플라크 침전에 대한 분자의 효과 또한 측정하였다. 추가로, 해마 중 피라미드 뉴런수는 약물의 잠재적인 신경보호 효과를 측정하는 척도로 평가하였다. 이러한 방법을 통해 전임상 환경에서 알츠하이머병과 연관된 병리학적 변화를 완화하는 데 있어 분자의 효능을 종합적으로 평가할 수 있었다.

[0597] 방법: 6개월령된 APP/PS1 수컷 마우스에게 10주 동안 1일 1회(QD) 또는 격일로 1회(Q2D) 지정된 GLP-1 폴리펩티드 접합체(분자 012, 20 mg/mL 분자 012, 2.87 mg/mL 인산수소이나트륨 12수화물 및 8.25 mg/ml 염화나트륨 pH 7.4로 제제화)를 피하 주사하였다. 각 처리군에 대해 15마리의 동물을 사용하였다. 체중 및 음식 섭취는 매주 모니터링하였다. 인지 기능 행동 실험은 모리스 수중 미로 및 Y-미로를 포함하여 투여 후 수행하였다. 뇌 조직을 채취하여 면역조직화학적으로 염색하여 피질 및 해마 중 Aβ 함량을 평가하였다. 해마 피라미드 뉴런수를 HE 염색에 의해 측정하였다. 데이터는 평균값 및 표준 오차(SEM)로 표시된다. 통계 분석을 일원 ANOVA에 의해 수행하였다. 세마글루티드를 양성 대조군으로 사용하였다.

[0598] 결론: APP/PS1 연구에서, 도 4a, 4b, 4c, 4d 및 4e에 제시된 바와 같이, 분자 012는 인지 기능 개선, 뇌 Aβ 플라크 침착 감소, 및 해마 피라미드 뉴런 보호에 대해 용량 의존적 효능을 나타내었다. 분자 012는 탐색 작업 중 표적 사분면에서 소요되는 시간의 백분율을 지칭하는 사분면 점유율을 증가시키고, 미로 작업 중 다른 위치를 번갈아 오가는 빈도를 지칭하는 교대율(%)을 증가시키는 데 효과적인 것으로 밝혀졌다. 추가로, 분자 012는 전형적으로 알츠하이머병에서 이환된 뇌의 피질 및 해마 영역, 둘 다에서 Aβ 플라크 축적을 감소시키는 것으로 관찰되었다. 기억에 중요한 영역인 해마 중 뉴런수 또한 분자 012에 의해 개선되었다. 이러한 결과는 분자 012가 인지 기능에 긍정적인 영향을 미치고, 알츠하이머병과 연관된 병리학적 변화를 감소시킨다는 것을 시사한다. 분자 012는 동물 연구에서 알츠하이머병 치료에 있어서 세마글루티드보다 유의적으로 더 우수한 효능을 보였다.

[0599] **실시예 8c: 질환 모델에서의 효능 연구**

[0600] 선택된 분자를 노화 촉진 마우스 경향 8(SAMP8: senescence-accelerated mouse prone 8) 모델인 산발성 알츠하이머 치매에 대한 알츠하이머병 동물 모델에서 평가한다. SAMP8 마우스는 베타 아밀로이드 플라크 축적 및 신경염증을 포함하여 인간 알츠하이머병에서 관찰되는 것과 유사한 연령 관련 인지 저하 및 신경병리학적 변화를 보인다. 또한 행동 이상 및 시냅스 가소성 감소를 보인다.

[0601] 7개월령된 SAMP8 마우스에게 각각 16주 동안 격일로(Q2D) 지정된 GLP-1 폴리펩티드 접합체(분자 012)를 30 nmol/kg, 100 nmol/kg 및 300 nmol/kg으로 1회 피하 주사하였다. 각 처리군에 대해 15마리의 동물을 사용하였다. 체중 및 음식 섭취는 매주 모니터링하였다. 인지 기능 행동 실험은 모리스 수중 미로 및 Y-미로를 포함하여 투여 후 수행하였다. 뇌 조직을 채취하여 면역조직화학적으로 염색하여 피질 및 해마 중 Aβ 함량을 평가하였다. 해마 피라미드 뉴런수를 HE 염색에 의해 측정하였다. 데이터는 평균값 및 표준 오차(SEM)로 표시된다. 통계 분석을 일원 ANOVA에 의해 수행하였다. 세마글루티드를 양성 대조군으로 사용하였다.

[0602] 분자 012는 SAMP8 마우스에서 인지 기능 개선, 뇌 Aβ 플라크 침착 감소, 및 해마 피라미드 뉴런 보호에 대해 용량 의존적 효능을 나타낸다. 분자 012는 또한 SAMP8 마우스에서 알츠하이머병을 치료하는 데 있어서 양성 대조군보다 유의적으로 더 우수한 효능을 나타낸다.

[0603] **실시예 9a: 비인간 영장류에서의 PK 연구**

[0604] 선택된 분자의 약동학적 성질을 원숭이에서 평가한다. 피하 및 정맥내 주사, 둘 다를 수행한다.

[0605] 방법: 3-5세의 수컷 시노물구스 원숭이에게 5 nmol/kg GLP-1 폴리펩티드 접합체를 단일 피하 용량으로 투여하였다(n=2/군). 세마글루티드 군에 대한 혈장 샘플을 투여 전(-5 min), 주사 후 2 hr, 4 hr, 6 hr, 8 hr, 24 hr, 48 hr, 72 hr, 96 hr, 120 hr, 144 hr, 216 hr, 288 hr, 360 hr, 432 hr 및 504 hr에 수집하였다. 분자 012 군에 대한 혈장 샘플을 투여 전(-5 min), 주사 후 0.5 hr, 1 hr, 2 hr, 4 hr, 6 hr, 8 hr, 24 hr, 48 hr, 96 hr, 120 hr, 144 hr, 168 hr, 192 hr, 216 hr, 288 hr, 432 hr 및 504 hr에 수집하였다. 세마글루티드 군의 경우, 혈장 중 단백질의 농도를 ELISA 검정법에 의해 측정하였다. 분자 012 군의 경우, 혈장 중 GLP-1 폴리펩티드

접합체의 농도는 LC-MS/MS 방법에 의해 측정하였다. 각 단백질의 혈장 농도 대 피하 주사 후 경과시간을 나타내는 그래프에 기초하여, 약동학적 파라미터를 WinNonlin에 의해 계산하였다.

결론: 분자 012는 원숭이에서 세마글루티드 및 분자 002보다 더 긴 반감기를 나타내었다(표 9a)

[표 9a]

표 9a: 시노물구스 원숭이에서 GLP-1 폴리펩티드 접합체의 약동학적 파라미터. 약동학적 데이터를 WinNonlin 소프트웨어에 의해 분석하였다. 각 분자에 대해 Tmax, Cmax, T1/2, AUC를 계산하였다.

PK 파라미터	단위	세마글루티드	분자 012
T _{max}	hr	7	24
C _{max}	nmol/L	48.1	58.0
말단 t _{1/2}	hr	65	122
AUC _{tau}	hr*nmol/L	2876(Tau=96h)	10989(Tau=504h)

실시예 9b: 비인간 영장류에서의 PK 연구

방법: 3-5세의 수컷 시노물구스 원숭이에게 각각 세마글루티드 및 분자 019를 4 nmol/kg 및 5 nmol/kg의 단일 정맥내 용량으로 투여하였다(n=2/군). 세마글루티드 군에 대한 혈장 샘플을 투여 전(-5 min), 주사 후 0.083 hr, 1 hr, 2 hr, 4 hr, 8 hr, 24 hr, 36 hr, 48 hr, 72hr, 96 hr, 120 hr, 144 hr, 및 168 hr에 수집하였다. 분자 012 군에 대한 혈장 샘플을 투여 전(-5 min), 주사 후 0.083 hr, 0.25 hr, 0.5 hr, 1 hr, 2 hr, 4 hr, 8 hr, 12 hr, 24 hr, 36 hr, 48 hr, 72 hr, 96 hr, 120 hr, 144 hr, 및 168 hr에 수집하였다. 혈장 중 단백질의 농도는 LC-MS/MS 방법에 의해 측정하였다. 각 단백질의 혈장 농도 대 정맥내 투여 후 경과시간을 나타내는 그래프에 기초하여, 약동학적 파라미터를 WinNonlin에 의해 계산하였다.

결론: 분자 019는 원숭이에서 세마글루티드와 유사한 반감기를 보였으며(표 9b), 이는 잠재적으로 인간에서의 주 1회 투여를 뒷받침한다. 추가로, 분자 019의 (세마글루티드보다 10배 높은) 강력한 GLP-1 활성을 고려할 때, 분자 019는 세마글루티드보다 더 우수한 효능을 제공할 뿐만 아니라, 바람직한 주 1회 투여 빈도(또는 잠재적으로 훨씬 덜 빈번한 빈도)를 뒷받침하는 유망한 후보라고 예상된다.

[표 9b]

표 9b: 시노물구스 원숭이에서 GLP-1 폴리펩티드 접합체의 약동학적 파라미터. 약동학적 데이터를 WinNonlin 소프트웨어에 의해 분석하였다. 각 분자에 대해 C₀, T1/2 및 AUC를 계산하였다.

PK 파라미터	단위	세마글루티드	분자 019
C ₀	nmol/L	85.1	176.5
Vz	L/kg	0.09	0.06
Cl	mL/min/kg	0.026	0.015
말단 t _{1/2}	hr	42.8	49.0
AUC _{tau}	hr*nmol/L	2402 (t=168 hr)	5302 (t=168 hr)

실시예 10: 면역원성 평가

선택된 GLP-1 폴리펩티드 접합체를 또한 인실리코(iTope 및 TCED 방법) 및 생체외(EpiScreen) 방법에 의해 면역원성에 대해 평가한다.

실시예 11: 인간 혈청 알부민 결합

방법: 비아코어(Biacore) 8K 기기에서 표면 플라즈몬 공명에 의해 혈청 알부민에의 분자 결합을 특징화하였다.

4000 RU에 도달할 때까지, 상이한 종으로부터의 혈청 알부민을 CM5 센서 칩 표면에 공유 결합시켰다. 칩을 420 s 동안 10 $\mu\text{l}/\text{min}$ 의 유속으로 1 M 에탄올아민에 의해 차단하였다. 각 분자 샘플을 희석하고, 30 $\mu\text{l}/\text{min}$ 의 유속으로 주입하여 120 s 동안 칩 결합된 알부민에 결합시키고, 300 s 동안 해리시켰다. 분자가 없는 결합 완충제를 20초의 유속으로 칩 위로 보내어 30초 동안 결합된 분자를 자발적인 해리시켰다.

결론: 분자 004, 001, 006 및 012는 세마글루티드, 분자 019 및 분자 002보다 인간 혈청 알부민의 더 높은 결합 친화도를 나타내었고(표 10 참조), 이는 PK 데이터와 일치한다.

표 10

표 10: 인간 혈청 알부민 결합 친화도

	KD (μM)	Rmax (RU)
세마글루티드	2.82	55.2
분자 004	0.716	546.0
분자 001	0.697	498.3
분자 006	0.746	398.6
분자 012	0.376	207.3
분자 002	9.11	307.8
분자 019	10.1	146.3

실시예 12: 액체 조성물 제조

달리 명시되지 않는 한, 분자 012는 완충제 작용제(예컨대, pH 7.4-8.3의 경우, 인산수소이나트륨 12수화물 또는 인산이나트륨 2수화물을 사용하고, pH 6.5의 경우, 무수 시트르산/시트르산삼나트륨 2수화물을 사용하였다) 및 등장화제(염화나트륨, 프로필렌 글리콜 또는 만니톨)로 구성된 제제 완충제에 분자 012를 희석하여 제조하였다. pH는 수산화나트륨 및/또는 염산으로 해당 값으로 조정하였다. 조성물을 0.22 μm 멸균 필터로 여과하였다.

본 실험에서는 분자 012를 포함하는 조성물을 시험하였다. 시험된 조성물은 표 11에 제시된 바와 같이 다양한 pH 및 단백질 농도로 조합된 프로필렌 글리콜(14 mg/ml), 염화나트륨(8.25 mg/ml) 또는 만니톨(46.4 mg/mL)을 등장화제로 사용하였다. 조성물 번호 1-6, 8-11, 13-16 및 18-23의 경우, 2.87 mg/mL 인산수소이나트륨 12수화물을 pH 완충제로 사용하였다. 조성물 번호 7, 12 및 17의 경우, 0.14 mg/mL의 무수 시트르산 및 2.74 mg/mL 시트르산삼나트륨 2수화물을 pH 완충제로 사용하였다. 조성물 번호 24의 경우, 1.24 mg/mL의 히스티딘을 pH 완충제로 사용하였다.

표 11

표 11				
실시예 12에서 시험된 조성물				
조성물 번호	분자 012 (mg/mL)	완충제	등장 화제	pH
1	1	포스페이트	염화나트륨	7.4
2	5	포스페이트	염화나트륨	7.4
3	10	포스페이트	염화나트륨	7.4
4	20	포스페이트	염화나트륨	7.4
5	40	포스페이트	염화나트륨	7.4
6	80	포스페이트	염화나트륨	7.4
7	20	시트레이트	염화나트륨	6.5
8	20	포스페이트	염화나트륨	8.3
9	20	포스페이트	염화나트륨	7.0
10	20	포스페이트	염화나트륨	7.8
11	20	포스페이트	프로필렌 글리콜	7.4
12	20	시트레이트	프로필렌 글리콜	6.5
13	20	포스페이트	프로필렌 글리콜	8.3
14	20	포스페이트	프로필렌 글리콜	7.0
15	20	포스페이트	프로필렌 글리콜	7.8
16	20	포스페이트	만니톨	7.4
17	20	시트레이트	만니톨	6.5
18	20	포스페이트	만니톨	8.3
19	20	포스페이트	만니톨	7.0
20	20	포스페이트	만니톨	7.8
21	60	포스페이트	염화나트륨	7.4
22	100	포스페이트	염화나트륨	7.4
23	120	포스페이트	염화나트륨	7.4
24	20	히스티딘	염화나트륨	6.5

[0623]

[0624]

실시예 13: 분자 012 조성물의 안정성 시험

[0625]

실시예 12에 열거된 24개 조성물을 제조하고, 25℃에서 6개월 동안 보관하였다. 불순물, 고분자량 생성물(HMWP: high molecular weight product) 및 상대적인 생물학적 활성은 0, 2 및 6개월째에 RP-UPLC, SEC-UPLC 및 hGLP1-R 발현 세포 검정법으로 조사하였다. RP-UPLC는 키넨텍스(Kinetex) C18 컬럼(Phenomenex) 및 UPLC H-클래스(Waters)로 수행하였다. SEC-UPLC는 TSKgel UP-SW2000(Tosoh) 및 UPLC H-클래스(Waters)로 수행하였다. 상대적인 생물학적 활성은 cAMP 활성을 검출하여 인간 GLP-1 수용체 발현 CHO 세포를 사용하여 결정하고, 공식 $(100 * (EC50_{표준} / EC50_{샘플}))\%$ 을 사용하여 계산하였다. 조성물 번호 1-8, 11 및 21-23에 대한 결과는 표 12 및 13에 제시되었고, 조성물 번호 9, 10, 12-20, 24에 대한 결과는 제시되어 있지 않다. 모든 조성물을 시험하고, 본 결과는 상기 조성물이 시험 기간 동안 안정적이라는 것을 보여준다. 표 12 및 13에 제시된 바와 같이, 모든 조성물은 25℃에서 적어도 2 또는 6개월 동안 안정적이었다.

표 12

표 12

조성물 번호	전체 불순물			HMWP			상대적인 생물학적 활성(%)		
	0 M	2 M	6 M	0 M	2 M	6 M	0 M	2 M	6 M
1	2.30	4.39	6.89	0.18	0.33	0.56	100	NA	74
2	2.42	3.78	6.48	0.13	0.33	0.56	100	NA	76
3	1.86	3.39	5.70	0.07	0.32	0.51	89	NA	103
4	1.97	3.26	5.82	0.07	0.28	0.65	89	NA	85
5	2.45	4.40	8.15	0.14	0.42	0.68	100	128	78
6	2.46	4.48	7.84	0.14	0.36	1.19	87	129	94
7	1.91	3.39	5.91	0.08	0.29	0.64	89	NA	97
8	2.46	4.44	8.36	0.15	0.42	0.69	100	NA	100
11	2.35	4.39	6.98	0.16	0.35	0.67	100	NA	129
21	2.43	4.33	NA	0.14	0.39	NA	100	129	NA
22	2.00	3.95	NA	0.06	0.48	NA	100	82	NA
23	1.99	4.13	NA	0.04	0.50	NA	100	101	NA

* 조성물 1, 2, 5, 8, 11, 21, 22 및 23은 분자 012 생산 배치 로트 202112001을 사용하여 농축/희석/투석하였다. 조성물 3, 4, 7은 분자 012 생산 배치 로트 202110001을 사용하여 희석/투석하였다. 조성물 6은 분자 012 생산 배치 로트 202112002를 사용하여 농축하였다. pH는 염산 또는 수산화나트륨으로 조정하였다. 조성물은 0.22 μ m 평균 필터로 여과하였다. NA=이용할 수 없음.

[0626]

표 13

표 13

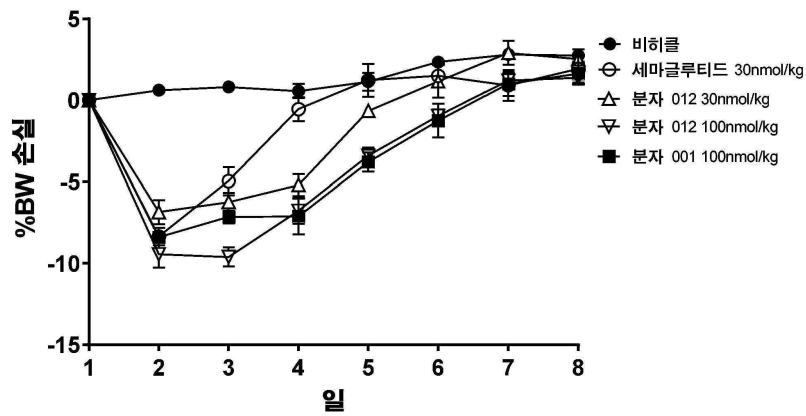
조성물 번호	전체 불순물 증가율(%)		HMWP 증가율(%)	
	2 M	6 M	2 M	6 M
1	2.09	4.59	0.15	0.38
2	1.36	4.06	0.20	0.43
3	1.53	3.84	0.25	0.44
4	1.29	3.85	0.21	0.58
5	1.95	5.61	0.28	0.42
6	2.02	5.86	0.21	0.97
7	1.48	4.00	0.21	0.56
8	1.98	5.90	0.27	0.54
11	2.04	4.63	0.19	0.51
21	1.90	NA	0.25	NA
22	1.95	NA	0.42	NA
23	2.14	NA	0.46	NA

* 조성물 1, 2, 5, 8, 11, 21, 22 및 23은 분자 012 생산 배치 로트 202112001을 사용하여 농축/희석/투석하였다. 조성물 3, 4, 7은 분자 012 생산 배치 로트 202110001을 사용하여 희석/투석하였다. 조성물 6은 분자 012 생산 배치 로트 202112002를 사용하여 농축하였다. pH는 염산 또는 수산화나트륨으로 조정하였다. 조성물은 0.22 μ m 평균 필터로 여과하였다. NA=이용할 수 없음.

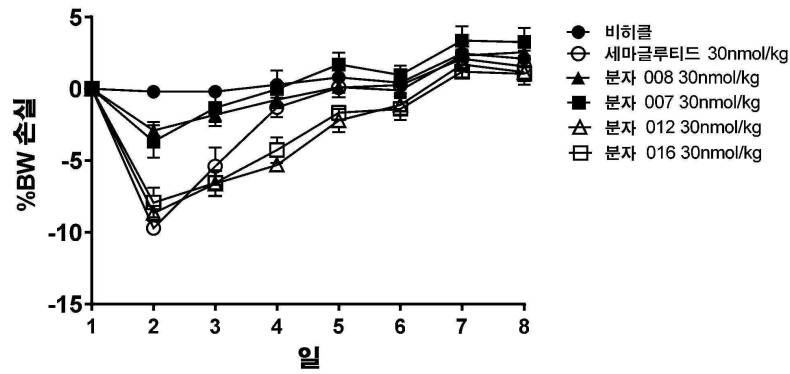
[0627]

도면

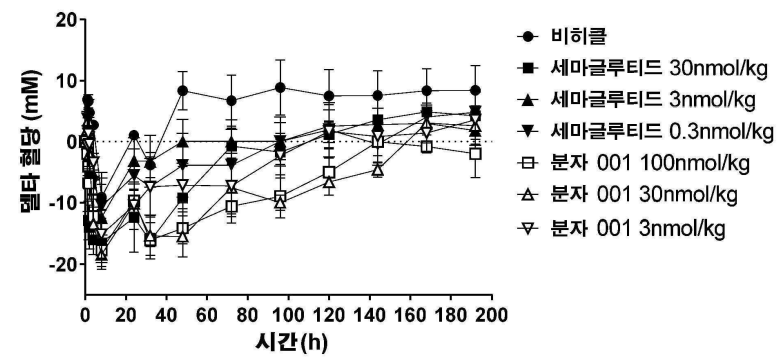
도면1a



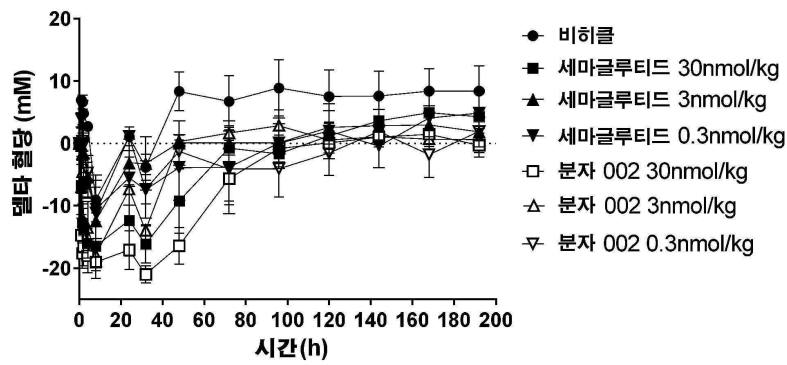
도면1b



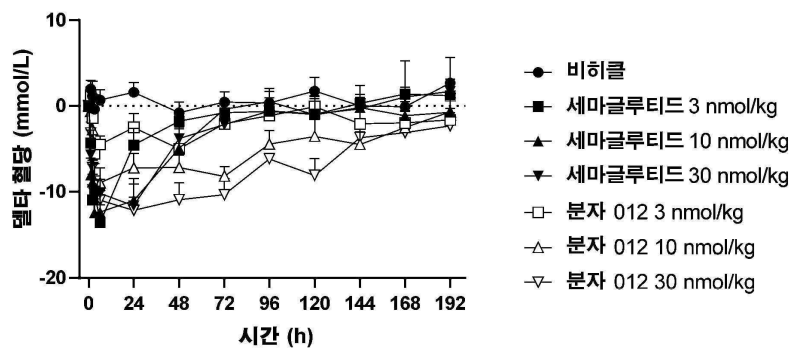
도면2a



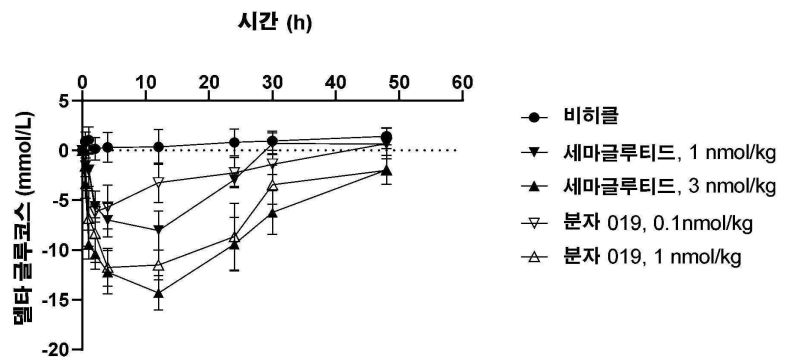
도면2b



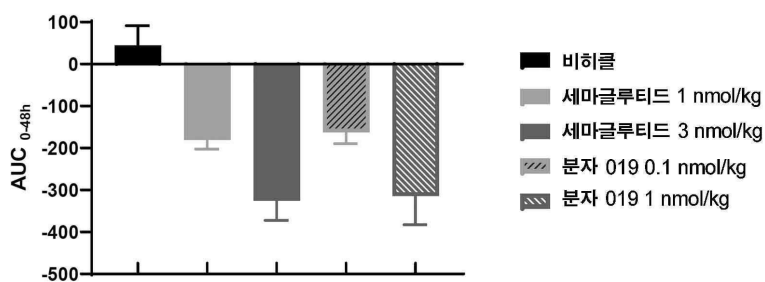
도면2c



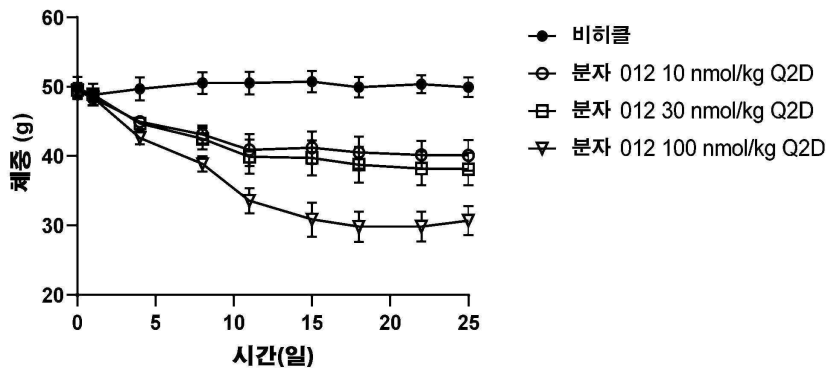
도면2d



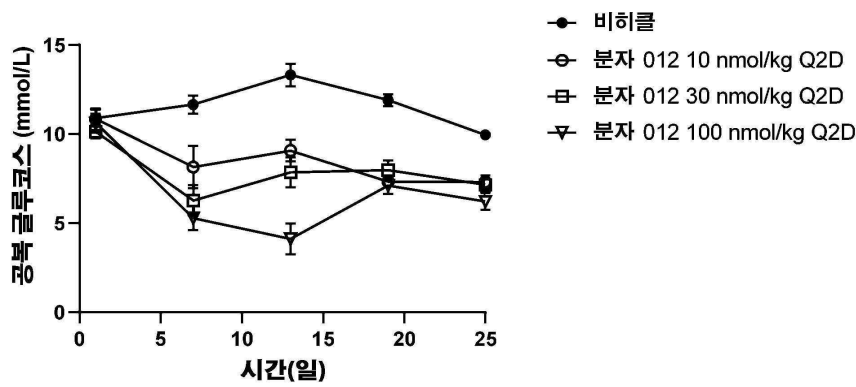
도면2e



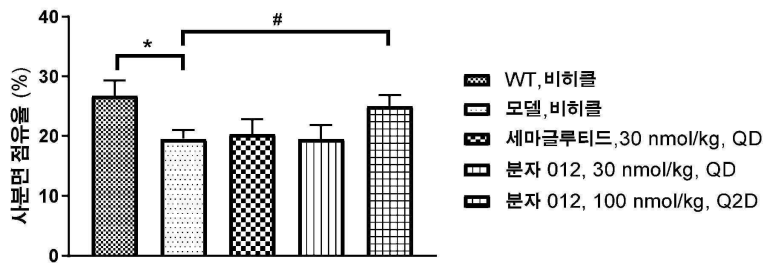
도면3a



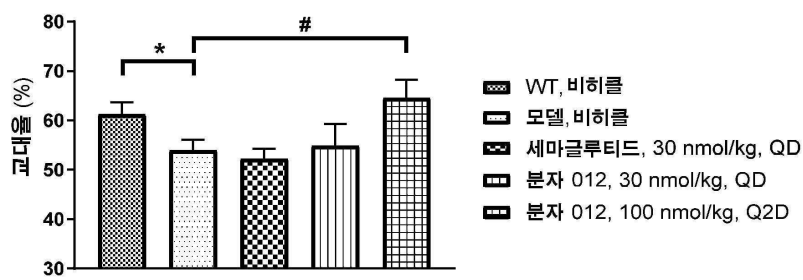
도면3b



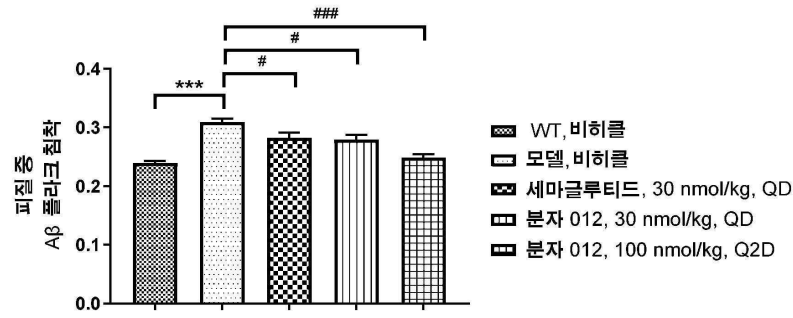
도면4a



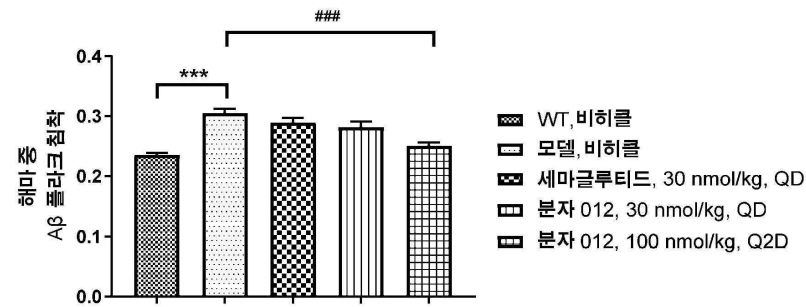
도면4b



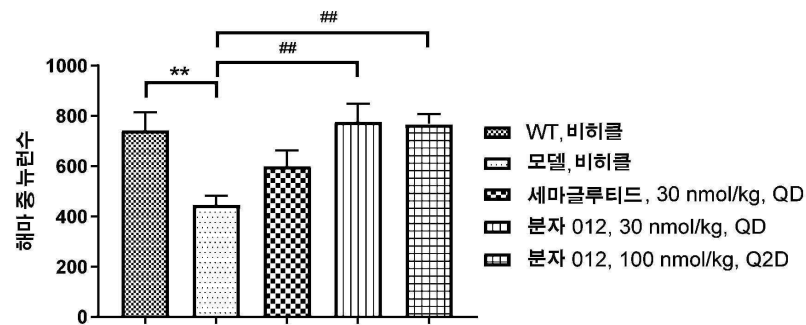
도면4c



도면4d



도면4e



도면5a

폴리펩티드 접합체의 폴리펩티드 부분 중 GLP-1 서열

서열 번호	GLP-1 서열
1	HAEGTFTSDVSSYLEGQAAKEFIAWLVKGRG
2	X ₇ X ₈ EGTFTSDVSSYLEX ₂₂ X ₂₃ AAX ₂₆ X ₂₇ FIX ₃₀ WLVX ₃₄ GX ₃₆ G
3	HAib-EGTFTSDVSSYLEGQAAKEFIAWLVRRGG
4	HAib-EGTFTSDVSSYLEGQAACEFIAWLVRRGG
5	HAib-EGTFTSDVSSYLEGQAAREFIAWLVRRGG
6	HAib-EGTFTSDVSSYLEEQAAKEFIAWLVRRGG
7	HAib-EGTFTSDVSSYLEEQAACEFIAWLVRRGG
8	HAib-EGTFTSDVSSYLEEQAAREFIAWLVRRGG
9	HGEGTFTSDVSSYLEEQAAREFIAWLVRRGG

도면5b

폴리펩티드 접합체의 폴리펩티드 부분 중의 펩티드 링커 중 반복 서열(즉, 링커 반복부)

서열 번호	링커 반복 서열
10	GQEPGAQP
11	GAQPGAQP
12	GQEP
13	GAQP
14	GAQPGQEPGAQP
15	GAQPGQEP
16	GEQP
17	GPQE
18	GPEQ
19	GSEP
20	GESP
21	GPSE
22	GPES
23	GQAP
24	GPAQ
25	GPQA
26	GSQP
27	GASP
28	GPAS
29	GPSA
30	GGGS
31	GSGS
32	GGGS
33	GQEPGQAP
34	GQAPGQEP
35	SEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEG
36	SEPATS
37	GSETPG
38	TSESAT
39	PESGPG
40	TSTEPS

도면5c

폴리펩티드 접합체의 폴리펩티드 부분 중의 펩티드 링커 중 다른 서열
(밑줄친 잔기는 CRM 잔기를 나타낸다)

서열 번호	서열
41	GQ <u>K</u> P
42	GQ <u>C</u> P

도면 5d

폴리펩티드 접합체의 폴리펩티드 부분 중 펩티드 링커 서열(즉, 링커 서열)

서열 번호	링커 서열
43	GAQPGAQPGAQPGAQPGAQPGAQPGAQPGAQPGQKP
44	GAQPGAQPGAQPGAQPGAQPGAQPGAQPGAQPGAQPGAQPGAQPGQKP
45	GAQPGAQPGAQPGAQPGAQPGAQPGAQPGAQPGQKP
46	GAQPGAQPGAQPGAQPGAQPGAQPGQKP
47	GAQPGAQPGAQPGAQPGAQPGAQPGAQPGAQPGAQPGAQPGQCP
48	GAQPGAQPGAQPGAQPGAQPGAQPGAQPGAQPGAQPGAQPGAQPGAQPGQCP
49	GAQPGAQPGAQPGAQPGAQPGAQPGAQPGAQPGQCP
50	GAQPGAQPGAQPGAQPGAQPGAQPGQCP
82	GAQPGAQPGAQPGAQPGAQPGAQPGAQPGAQPGAQPGAQPGAQPGAQPGAQPGAQPGAQPGAQPGAQPGAQPGQKP
83	GAQPGAQPGAQPGAQPGAQPGAQPGQKP
84	GAQPGAQPGAQPGAQPGAQPGAQPGQKP

도면5ea

폴리펩티드 접합체의 폴리펩티드 부분 서열(즉, 융합 폴리펩티드 서열)

서열 번호	융합 폴리펩티드 서열
51	HAib-EGTFTSDVSSYLEGQAAKEFIAWLVRGGGGAQPGAQPGAQPGAQPGAQPGAQPGAQPGAQPGAQPGQKP
52	HAib-EGTFTSDVSSYLEGQAAREFIAWLVRGGGGAQPGAQPGAQPGAQPGAQPGAQPGAQPGAQPGAQPGQKP
53	HAib-EGTFTSDVSSYLEGQAAKEFIAWLVRGGGGAQPGAQPGAQPGAQPGAQPGAQPGAQPGAQPGAQPGAQPGAQPGQKP
54	HAib-EGTFTSDVSSYLEGQAAKEFIAWLVRGGGGAQPGAQPGAQPGAQPGAQPGAQPGAQPGAQPGQKP
55	HAib-EGTFTSDVSSYLEGQAAREFIAWLVRGGGGAQPGAQPGAQPGAQPGAQPGAQPGAQPGAQPGQKP
56	HAib-EGTFTSDVSSYLEGQAAREFIAWLVRGGGGAQPGAQPGAQPGAQPGAQPGAQPGAQPGQKP
57	HAib-EGTFTSDVSSYLEEQAAKEFIAWLVRGGGGAQPGAQPGAQPGAQPGAQPGAQPGAQPGAQPGAQPGQKP
58	HAib-EGTFTSDVSSYLEEQAAKEFIAWLVRGGGGAQPGAQPGAQPGAQPGAQPGAQPGAQPGAQPGAQPGAQPGAQPGQKP
59	HAib-EGTFTSDVSSYLEEQAAKEFIAWLVRGGGGAQPGAQPGAQPGAQPGAQPGAQPGAQPGAQPGQKP

도면5b

60	HAib- EGTFTSDVSSYLEEQAAAREFIWLVRGGGGAQPGAQPGAQPGAQPGA QPGAQPGAQPGAQPGQKP
61	HAib- EGTFTSDVSSYLEEQAAAREFIWLVRGGGGAQPGAQPGAQPGAQPGA QPGAQPGQKP
62	HAib- EGTFTSDVSSYLEEQAAAREFIWLVRGGGGAQPGAQPGAQPGAQPGQ KP
63	HAib- EGTFTSDVSSYLEGQAACEFIWLVRGGGGAQPGAQPGAQPGAQPGA QPGAQPGAQPGAQPGAQPGQCP
64	HAib- EGTFTSDVSSYLEGQAACEFIWLVRGGGGAQPGAQPGAQPGAQPGA QPGAQPGAQPGAQPGQCP
65	HAib- EGTFTSDVSSYLEGQAACEFIWLVRGGGGAQPGAQPGAQPGAQPGA QPGAQPGQCP
66	HAib- EGTFTSDVSSYLEGQAAREFIWLVRGGGGAQPGAQPGAQPGAQPGA QPGAQPGAQPGAQPGQCP
67	HAib- EGTFTSDVSSYLEGQAAREFIWLVRGGGGAQPGAQPGAQPGAQPGA QPGAQPGQCP
68	HAib- EGTFTSDVSSYLEGQAAREFIWLVRGGGGAQPGAQPGAQPGAQPGQ CP
69	HGEGTFTSDVSSYLEEQAAAREFIWLVRGGGGAQPGAQPGAQPGAQP GAQPGAQPGAQPGAQPGQCP
70	HGEGTFTSDVSSYLEEQAAAREFIWLVRGGGGAQPGAQPGAQPGAQP GAQPGAQPGQCP
71	HGEGTFTSDVSSYLEEQAAAREFIWLVRGGGGAQPGAQPGAQPGAQP GQCP
72	HAib- EGTFTSDVSSYLEEQAAACEFIWLVRGGGGAQPGAQPGAQPGAQPGA QPGAQPGAQPGAQPGAQPGQCP
73	HAib- EGTFTSDVSSYLEEQAAACEFIWLVRGGGGAQPGAQPGAQPGAQPGA QPGAQPGAQPGAQPGQCP
74	HAib- EGTFTSDVSSYLEEQAAACEFIWLVRGGGGAQPGAQPGAQPGAQPGA QPGAQPGQCP

도면5ec

75	HAib-EGTFTSDVSSYLEGQAAKEFIAWLVRGGGGAQPGAQPGAQPGAQPGAQPGAQPGAQPGAQPGQCP
76	HAib-EGTFTSDVSSYLEGQAAKEFIAWLVRGGGGAQPGAQPGAQPGAQPGAQPGAQPGAQPGAQPGQCP
77	HAib-EGTFTSDVSSYLEGQAAKEFIAWLVRGGGGAQPGAQPGAQPGAQPGAQPGAQPGAQPGAQPGQCP
78	HAib-EGTFTSDVSSYLEEQAAKEFIAWLVRGGGGAQPGAQPGAQPGAQPGAQPGAQPGAQPGAQPGQCP
79	HAib-EGTFTSDVSSYLEEQAAKEFIAWLVRGGGGAQPGAQPGAQPGAQPGAQPGAQPGAQPGAQPGQCP
80	HAib-EGTFTSDVSSYLEEQAAKEFIAWLVRGGGGAQPGAQPGAQPGAQPGAQPGAQPGAQPGAQPGQCP
85	HAib-EGTFTSDVSSYLEGQAAKEFIAWLVRGGGGAQPGAQPGAQPGAQPGAQPGAQPGAQPGAQPGAQPGAQPGAQPGAQPGAQPGAQPGAQPGAQPGAQPGQKP
86	HAib-EGTFTSDVSSYLEGQAAKEFIAWLVRGGGGAQPGAQPGAQPGAQPGAQPGAQPGAQPGAQPGAQPGAQPGAQPGAQPGAQPGAQPGAQPGAQPGAQPGQKP
87	HAib-EGTFTSDVSSYLEGQAAKEFIAWLVRGGGGAQPGAQPGAQPGAQPGAQPGAQPGAQPGAQPGAQPGAQPGAQPGAQPGAQPGAQPGAQPGAQPGAQPGQKP
88	HAib-EGTFTSDVSSYLEGQAAREFIAWLVRGGGGAQPGAQPGAQPGAQPGAQPGAQPGAQPGAQPGAQPGAQPGAQPGAQPGAQPGAQPGAQPGAQPGAQPGQKP

서 열 목 록 (첨부)



아이콘을 클릭하시면 서열목록 파일이 열립니다.

본 공보 PDF는 첨부파일을 가지고 있습니다. Acrobat Reader PDF뷰어를 제공하지 않는 브라우저(크롬, 파이어폭스, 사파리 등)의 경우 첨부파일 열기가 제한되어 있으므로 Acrobat Reader PDF뷰어 설치 후 공보 PDF를 다운로드 받아 해당 뷰어에서 조회해주시기 바랍니다.