



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2016년07월18일
(11) 등록번호 10-1640697
(24) 등록일자 2016년07월12일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 38/26 (2006.01) *A61K 38/18* (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01) *A61K 47/48* (2006.01)
A61P 3/10 (2006.01)
- (21) 출원번호 10-2014-7020397
- (22) 출원일자(국제) 2012년12월12일
심사청구일자 2014년07월21일
- (85) 번역문제출일자 2014년07월21일
- (65) 공개번호 10-2014-0105594
- (43) 공개일자 2014년09월01일
- (86) 국제출원번호 PCT/IB2012/057227
- (87) 국제공개번호 WO 2013/093720
국제공개일자 2013년06월27일
- (30) 우선권주장
 61/579,609 2011년12월22일 미국(US)
 61/644,831 2012년05월09일 미국(US)
- (56) 선행기술조사문헌
 EP2292248 A2
 WO2009020802 A2
 WO2011020319 A1
 WO2011024110 A2

(73) 특허권자
화이자 인코포레이티드
 미국 뉴욕주 10017 뉴욕 이스트 42번 스트리트
 235
씨오브이엑스 테크놀로지스 아일랜드 리미티드
 아일랜드 코 코크 링가스키디 오퍼레이션 서포트
 그룹
(72) 발명자
아나서 고피나스 베다차람
 인도 방갈로어 560100 엘렉트로닉스 시티 페이즈
 1 널아드리 나가르 도다토구르 90/1 아즈메라 인
 피니티 아파트먼츠 블록 비 비-1301
발루 팔라니
 미국 캘리포니아주 95014 쿠퍼티노 돌로레스 애비
 뉴 21856
(뒷면에 계속)

(74) 대리인
제일특허법인

전체 청구항 수 : 총 16 항

심사관 : 김윤경

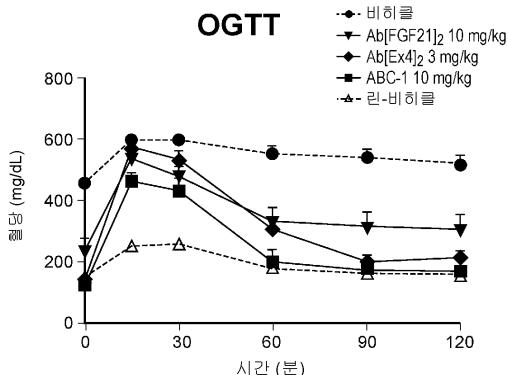
(54) 발명의 명칭 **항당뇨병 화합물****(57) 요약**

본 발명은 하기 화학식 1의 조성물을 제공한다:

[화학식 1]

[FGF21-제 1 연결기]-[Ab]-[제 2 연결기]-Ex4]

(뒷면에 계속)

대 표 도 - 도8

상기 식에서,

FGF21은 FGF21 동족체이고;

Ex4는 엑센딘 4 동족체이고;

Ab는 알돌라아제 촉매 항체 또는 이의 항원 결합 부분이고;

제 1 연결기는 FGF21에서 단백질 연결 잔기의 측쇄 및 항체의 결합 부위에 공유적으로 부착되고;

제 2 연결기는 Ex4에서 펩티드 연결 잔기의 측쇄 및 항체의 결합 부위에 공유적으로 부착되고,

상기 제 1 및 제 2 연결기는 동일하거나 상이하다.

당뇨병 또는 당뇨병 관련된 증상의 예방 또는 치료 방법을 포함하는 화합물의 다양한 용도가 제공된다.

(72) 발명자

핀 로리 프란시스

미국 미주리주 63021 맨체스터 선버스트 코트 976

후양 지에

미국 캘리포니아주 92130 샌디에고 라이딩 럿지 로드 4819

로랑 올리비에 알렉산드르

미국 캘리포니아주 92122 샌디에고 콘돈 드라이브 6820

레빈 낸시 제인

미국 캘리포니아주 92024 엔시니타스 비아 몬타노사 325

루크샤 니콜라스 개리

미국 매사추세츠주 01845 노쓰 앤드오버 마크 로드 30

마틴 조셉 페트릭 주니어

미국 미주리주 63038 와일드우드 바블러 럿지 레인 2118

모스코워츠 하임

미국 캘리포니아주 92130 샌디에고 블루 다운 트레일 6159

팔란키 무시 시타라마이아 수리야나라야나

미국 캘리포니아주 92024 엔시니타스 크레스트 드라이브 602

포조 마크 존

미국 미주리주 63017 체스터필드 그린힐 벨리 드라이브 14739

와스자크 그레고리 알란

미국 미주리주 63366 오펠론 미드포인트 드라이브 909

시에 진

미국 미주리주 63021 볼원 캐슬 파인즈 코트 423

명세서

청구범위

청구항 1

하기 단계 (i) 내지 (vii)을 포함하는 h38C2 항체 또는 이의 변이체의 샘플의 정제 방법으로서, 항원 결합 부위 둘다가 샘플에서 85% 이상의 항체에 항원 결합하는데 완전히 이용가능하고, 상기 h38C2 항체 또는 이의 변이체가 서열번호 27에 나타낸 경쇄 가변 영역(V_L) 서열의 V_L CDR1, V_L CDR2 및 V_L CDR3을 포함하는 V_L , 및 서열번호 28에 나타낸 중쇄 가변 영역(V_H) 서열의 V_H CDR1, V_H CDR2 및 V_H CDR3을 포함하는 V_H 를 포함하는, 정제 방법:

- (i) 소수성 상호작용 크로마토그래피(HIC) 컬럼을, pH 6.5 내지 7.5인 15 mM 내지 100 mM의 나트륨 포스페이트, 칼륨 포스페이트 또는 암모늄 포스페이트, HEPES, 트리스 및 비스-트리스를 포함하는 염기 완충액을 포함하고, 0.5 M 내지 1.5 M의 제 1 농도의, NaCl, KCl 및 모노나트륨 시트레이트로 이루어진 군으로부터 선택된 염을 추가로 포함하는 예비-로딩 평형 세척액으로 평형시키되, 상기 HIC 컬럼이 50 μ m 미만의 직경의 페닐 접합된 수지 비드를 포함하고 500 Å 이상의 공극을 포함하는 단계;
- (ii) 상기 컬럼을, 염기 완충액을 포함하고 제 1 농도의 염을 추가로 포함하는 로딩 완충액 중 4 내지 80 g/L의 h38C2 항체의 샘플로 로딩하는 단계;
- (iii) 상기 컬럼을, 염기 완충액 및 제 1 농도의 염을 포함하는 로딩-후 평형 세척액으로 세척하는 단계;
- (iv) 상기 컬럼을, 염기 완충액을 포함하고 1.5 M로부터 0.25 M까지의 염의 선형 농도 구배를 추가로 포함하는 염 구배로 세척하고, 이때 염 농도가 1 컬럼 부피(CV)당 90 mM 내지 100 mM만큼 감소되는 단계;
- (v) 상기 컬럼을, 염기 완충액 중 0.25 M 내지 0.4 M의 염을 4 CV 내지 8 CV로 포함하는 염 플래토 세척액으로 세척하는 단계;
- (vi) 상기 컬럼을, 염기 완충액을 포함하는 완충 세척액으로 세척하는 단계; 및
- (vii) 상기 h38C2 항체를, 0.5 CV 내지 3 CV가 되도록 또는 용리 풀이 수집될 때까지, 염기 완충액, 및 0 내지 1%의 1,6-헥산다이올의 농도에서 시작하고 13%, 14%, 15%, 16%, 17%, 18%, 19%, 20%, 21% 및 22%로 이루어진 군으로부터 선택된 1,6-헥산다이올의 상한치에서 종료하는 1,6-헥산다이올의 선형 농도 구배를 포함하는 용리 완충액으로 용리하는 단계.

청구항 2

제 1 항에 있어서,

항체가 서열번호 78, 79, 80 및 81 중 하나 이상과 95% 이상 동일한 경쇄 불변 영역, 및 서열번호 82와 95% 이상 동일한 중쇄 불변 영역을 추가로 포함하는, 정제 방법.

청구항 3

제 1 항에 있어서,

항체가 IgG1이고 서열번호 25 및 26을 포함할 수 있는, 정제 방법.

청구항 4

제 1 항에 있어서,

HIC 컬럼이 750 Å의 공극을 포함하는 35 μ M의 페닐 접합된 수지 비드를 포함하는, 정제 방법.

청구항 5

제 1 항에 있어서,

단계 (i)의 예비-로딩 평형 세척액이 pH 7인 20 mM 나트륨 포스페이트 및 1 M NaCl을 포함하는, 정제 방법.

청구항 6

제 1 항에 있어서,

단계 (ii)에서, 컬럼이 pH 7인 20 mM 나트륨 포스페이트 중 15 내지 18 g/L의 h38C2 항체의 샘플로 로딩되는, 정제 방법.

청구항 7

제 1 항에 있어서,

단계 (iii)에서, 로딩-후 평형 세척액이 pH 7인 20 mM 나트륨 포스페이트 중 1 M NaCl을 1 CV로 포함하는, 정제 방법.

청구항 8

제 1 항에 있어서,

단계 (iv)에서, NaCl 구배가 pH 7인 20 mM 나트륨 포스페이트를 포함하고, 이때 선형 농도 구배가 1 M로부터 0.33 M까지의 NaCl이고, 염 농도가 1 CV당 90 mM 내지 100 mM만큼 감소되는, 정제 방법.

청구항 9

제 1 항에 있어서,

단계 (iv)에서, 선형 염 구배가 4 CV 이상을 포함하는, 정제 방법.

청구항 10

제 1 항에 있어서,

단계 (v)의 염 플래토 세척액이 pH 7인 20 mM 나트륨 포스페이트 중 0.33 M의 NaCl을 5 CV로 포함하는, 정제 방법.

청구항 11

제 1 항에 있어서,

단계 (vi)에서, 염기 완충액이 pH 7인 20 mM 나트륨 포스페이트를 2 CV로 포함하는, 정제 방법.

청구항 12

제 1 항에 있어서,

단계 (vii)의 용리 완충액이 pH 7인 20 mM 나트륨 포스페이트를 포함하는, 정제 방법.

청구항 13

제 1 항에 있어서,

단계 (vii)의 선형 농도 구배가, 1 CV가 되도록, 0 내지 1%의 1,6-헥산다이올의 농도에서 시작하고 14%, 15% 및 16%로 이루어진 군으로부터 선택된 1,6-헥산다이올의 상한치에서 종료하는 1,6-헥산다이올의 선형 농도 구배를 포함하는, 정제 방법.

청구항 14

제 1 항에 있어서,

(viii) 5 CV 이하가 되도록 또는 용리 풀이 수집될 때까지, 염기 완충액, 및 13%, 14%, 15%, 16%, 17%, 18%, 19%, 20%, 21% 및 22%로 이루어진 군으로부터 선택된 농도의 1,6-헥산다이올을 포함하는 추가 용리 단계를 실행하는 단계를 추가로 포함하는 정제 방법.

청구항 15

제 1 항 내지 제 14 항 중 어느 한 항에 따라 제조된 h38C2 항체를 포함하는 조성물.

청구항 16

제 14 항에 있어서,

추가 용리 단계가, 2 내지 5 CV가 되도록 또는 용리 풀이 수집될 때까지, pH 7인 20 mM 나트륨 포스페이트, 및 14%, 15% 및 16%로 이루어진 군으로부터 선택된 농도의 1,6-헥산다이올을 포함하는, 정제 방법.

청구항 17

삭제

청구항 18

삭제

청구항 19

삭제

청구항 20

삭제

청구항 21

삭제

청구항 22

삭제

청구항 23

삭제

청구항 24

삭제

청구항 25

삭제

청구항 26

삭제

청구항 27

삭제

청구항 28

삭제

청구항 29

삭제

청구항 30

삭제

청구항 31

삭제

청구항 32

삭제

청구항 33

삭제

청구항 34

삭제

청구항 35

삭제

발명의 설명

기술 분야

[0001]

본 발명은 인슐린 분비 및 더 낮은 혈당 수준을 촉진시키는 신규 화합물, 및 이를 화합물의 제조 방법 및 사용 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002]

2형 당뇨병은 가장 널리 알려진 형태의 당뇨병이다. 상기 질환은 인슐린 저항성 및 췌장 β 세포 기능상실에 의해 초래되며, 이로 인해 감소된 글루코스-자극된 인슐린 분비를 초래한다. 섬유아세포 성장 인자(FGF) 패밀리의 일원인 FGF21은 대사 조절체로서 확인되었고, 간 및 지방 조직에서 우선적으로 발현되고 표적 세포, 예컨대 간 및 지방 조직에서 FGFR1c 및 β -클로토로 구성된 세포 표면 수용체 복합체를 통해 이의 생물학적 활성을 발휘한다(국제특허출원공개 제 0136640 호 및 국제특허출원공개 제 0118172 호). 수용체 복합체는 세포질의 신호화를 유발하고 Ras/MAP 키나아제 경로를 통해 GLUT1 발현을 상향조절하는 것으로 생각되었다. 전임상 환경에서 어떠한 명백한 부작용을 야기하지 않고, 지속된 글루코스 및 지질 제어를 제공하고 인슐린 민감성 및 β 세포 작용을 개선하기 위한 이의 능력은 2형 당뇨병 및 관련된 물질대사 장애에 대한 매력적인 치료제인 FGF21을 제조하였다.

[0003]

FGF21에 기초한 치료법을 개발하려는 많은 노력이 진행되고 있다. 국제특허출원공개 제 2006065582 호, 제 2006028714 호, 제 2006028595 호 및 제 2005061712 호는 개별적인 아미노산 치환을 포함하는 FGF21의 돌연변이 단백질에 관한 것이다. 국제특허출원공개 제 2006078463 호는 FGF21을 사용하는 심장혈관계 질환의 치료 방법에 관한 것이다. 국제특허출원공개 제 2005072769 호는 FGF21 및 티아졸리딘아이온의 조합을 사용하는 당뇨병의 치료 방법에 관한 것이다. 국제특허출원공개 제 03059270 호는 FGF21을 투여함을 포함하는 중증 환자의 사망률의 감소 방법에 관한 것이다. 국제특허출원공개 제 03011213 호는 FGF21을 투여함을 포함하는 당뇨병 및 비만의 치료 방법에 관한 것이다.

[0004]

그러나, 이렇게 제안된 많은 치료법은 FGF21이 인간에서 1.5 내지 2시간의 생체내 반감기를 갖는다는 문제로 시달리고 있다. 상기 문제를 극복하기 위해 여러 시도가 행해졌다. 국제특허출원공개 제 2005091944 호, 제 2006050247 호 및 제 2008121563 호는 FGF21 분자가 각각 리신 또는 시스테인 잔기, 글리코실 기 및 비자연적 아미노산 잔기를 통해 PEG에 연결됨을 개시한다. 국제특허출원공개 제 2005113606 호는 FGF21 분자가 이의 C-말단을 통해 폴리글리신 연결기를 사용하는 알부민 및 면역글로불린 분자에 제조합적으로 융합됨을 기재한다.

[0005]

그러나, 유용하고 비용-효과적인 약제로의 단백질 접합체의 개발은 다수의 유의하고 종종 경쟁적인 도전을 나타낸다: 생체내 효능, 생체내 반감기, 생체외 저장에 대한 안정성과 접합 효율 및 특이성을 포함하는 제조의 용이성 및 효율 사이에 균형이 잡혀야 한다. 일반적으로, 접합 방법은 당해 단백질의 목적한 생물학적 작용을 제거

하거나 유의하게 감소하지 않아야 한다. 기능에 요구되는 단백질-단백질 상호작용은 협력하여 작용하기 위한 단백질의 다중 영역을 필요로 할 수 있고, 인근에 존재하는 접합물과 이들의 임의의 교란은 활성 부위를 방해하거나, 활성 부위 기능을 감소시키도록 3차 구조에 대하여 충분한 변화를 야기할 수 있다. 접합이 N' 또는 C' 말단을 통하지 않는 한, 연결을 용이하게 하는 내부 돌연변이를 필요로 할 수 있다. 이러한 돌연변이는 단백질 구조 및 기능에 예측할 수 없는 영향을 끼칠 수 있다. 따라서, 대안적인 FGF21계 치료에 대한 요구가 계속되고 있다.

[0006] 인크레틴은 글루코스-의존 인슐린 분비를 촉진하고 글루카곤 분비를 억제하는 화합물이고, 2형 당뇨병의 치료를 위한 매력적인 후보자로서 등장하였다. 글루카곤-유사 펩티드(7-36) 아미드(GLP1)는 인크레틴 패밀리 일원 중 하나이며, 이는 인슐린 분비를 증가시키고, 글루카곤 분비를 감소시키고, 프로-인슐린 유전자 전사를 자극시키고, 위내 정체 시간을 둔화시키고, 음식 섭취를 감소시키는 것으로 나타났다(국제특허출원공개 제 98019698 호). GLP1은 잠정 7-막관통 도메인 수용체인 글루카곤-유사 펩티드 1 수용체(GLP1R)에 결합함으로써 이의 생리적 효과를 발휘한다.

[0007] GLP1의 치료적 사용에 대한 결점은 이의 생체내 반감기가 짧다는 것이다(1 내지 2 분). 이 짧은 반감기는 다이펩티딜 펩티다아제 4(DPP-IV)에 의한 펩티드의 신속한 분해의 결과이다. 이는 GLP1R 활성을 작동시키려는 능력을 유지하면서 증가된 반감기를 나타내는 GLP1 동족체의 동정을 야기하였다. 이러한 동족체의 예는 엑센딘(exendin) 4 및 GLP1-Gly8을 포함한다.

[0008] 국제특허출원공개 제 2009020802 호는 FGF21 화합물을 GLP1 화합물과 조합하여 투여함을 포함하는 체중 감소 방법을 개시한다.

[0009] 본 명세서에서 임의의 기술에 대한 참조는 참조된 기술이 통상의 일반 지식의 일부를 형성하는 임의의 형태의 지식 또는 제안이 아니고, 그것으로서 취급되어서는 안된다.

발명의 내용

[0010] 일부 양태에서 본 발명은 하기 화학식 1의 조성물 또는 이의 입체이성질체, 호변이성질체, 용매화물, 전구약물, 및 약학적으로 허용되는 염을 제공한다:

[0011] [화학식 1]

[0012] [FGF21-제 1 연결기]-[Ab]-[제 2 연결기-Ex4]

[0013] 상기 식에서,

[0014] FGF21은 FGF21 동족체이고;

[0015] Ex4는 엑센딘(Exendin) 4 동족체이고;

[0016] Ab는 알돌라아제 촉매 항체 또는 이의 항원 결합 부분이고;

[0017] 제 1 연결기는 FGF21에서 단백질 연결 잔기의 측쇄 및 항체의 결합 부위에 공유적으로 부착되고,

[0018] 제 2 연결기는 Ex4에서 펩티드 연결 잔기의 측쇄 및 항체의 결합 부위에 공유적으로 부착되고,

[0019] 상기 제 1 및 제 2 연결기는 동일하거나 상이하다.

[0020] 일부 양태에서, 본 발명은 제 1 연결기를 통해 항체의 제 1 결합 부위 또는 이의 항원 결합 부분에 공유적으로 부착된 FGF21 분자를 포함하고, 제 2 연결기를 통해 항체의 제 2 결합 부위에 공유적으로 부착된 엑센딘 4 동족체를 추가로 포함하는 조성물, 또는 이의 입체이성질체, 호변이성질체, 용매화물, 전구약물, 및 약학적으로 허용되는 염에 관한 것이고, 상기 제 1 연결기는 FGF21 내에 단백질 연결 잔기의 측쇄에 공유적으로 부착되고, 상기 제 2 연결기는 엑센딘 4 동족체 내에 펩티드 연결 잔기의 측쇄에 공유적으로 부착된다.

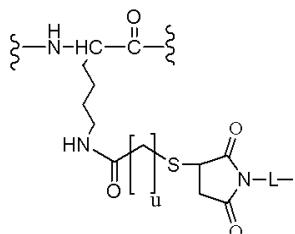
[0021] 일부 양태에서, 본 발명은 하기 화학식 1을 포함한다:

[0022] [화학식 1]

[0023] [FGF21-제 1 연결기]-[항체]-[제 2 연결기-Ex4]

- [0024] 상기 식에서,
- [0025] FGF21은 FGF21 동족체이고, 서열번호 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23 및 24로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있고;
- [0026] Ex4는 엑센딘 4 동족체이고, 서열번호 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71 및 72로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있고;
- [0027] 항체는 알돌라아제 측매 항체 또는 이의 항원 결합 부분이고;
- [0028] 제 1 연결기는 FGF21에서 단백질 연결 잔기의 측쇄 및 항체의 결합 부위에 공유적으로 부착되고;
- [0029] 제 2 연결기는 Ex4에서 펩티드 연결 잔기의 측쇄 및 항체의 결합 부위에 공유적으로 부착되고,
- [0030] 상기 제 1 및 제 2 연결기는 동일하거나 상이하다.
- 제 1 및 제 2 연결기는 각각 독립적으로 L1, L2, L3, L4, L5, L6, L7, L8, L9 및 L10으로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있다.
- [0031] 단백질 연결 잔기는 시스테인 또는 리신일 수 있다. 단백질 연결 잔기는 서열번호 1의 넘버링에 따라 아미노산 잔기 수 56, 59, 69, 79, 86, 122, 125 및 129로 이루어진 군으로부터 선택된 위치에 위치될 수 있다. 단백질 연결 잔기는 서열번호 1의 넘버링에 따라 아미노산 잔기 수 56, 59, 86 및 122로 이루어진 군으로부터 선택된 위치에 위치될 수 있다. 단백질 연결 잔기는 서열번호 1의 넘버링에 따라 잔기 79, 125 및 129로 이루어진 군으로부터 선택된 위치에 위치될 수 있다. 단백질 연결 잔기는 서열번호 1의 넘버링에 따라 잔기 125 및 129로 이루어진 군으로부터 선택된 위치에 위치될 수 있다.
- [0032] 단백질 연결 잔기의 측쇄는 티올 기를 포함할 수 있다. 단백질 연결 잔기는 시스테인일 수 있다.
- [0033] FGF21 분자는 서열번호 3을 포함할 수 있다. FGF21 분자는 서열번호 4를 포함할 수 있다. FGF21 분자는 서열 번호 3, 서열번호 4, 서열번호 5, 서열번호 6, 서열번호 7, 서열번호 8, 서열번호 9, 서열번호 10, 서열번호 11, 서열번호 12 및 서열번호 13으로 이루어진 군으로부터 선택된 서열을 포함할 수 있다.
- [0034] 단백질 연결 잔기는 서열번호 1의 넘버링에 따라 위치 125에 위치될 수 있다. FGF21 분자는 서열번호 3, 서열 번호 4, 서열번호 5, 서열번호 6 및 서열번호 7로 이루어진 군으로부터 선택된 서열을 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, FGF21 서열은 서열번호 7이다.
- [0035] 단백질 연결 잔기는 서열번호 1의 넘버링에 따라 위치 129에서 위치될 수 있다. FGF21 분자는 서열번호 3, 서 열번호 4, 서열번호 8, 서열번호 9 및 서열번호 10으로 이루어진 군으로부터 선택된 서열을 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, FGF21 서열은 서열번호 10이다. FGF21 분자는 서열번호 8, 서열번호 9 또는 서열번호 10을 포함할 수 있다.
- [0036] 단백질 연결 잔기는 서열번호 1의 넘버링에 따라 위치 79에 위치될 수 있다. FGF21 분자는 서열번호 3, 서열번 호 4, 서열번호 11, 서열번호 12 및 서열번호 13으로 이루어진 군으로부터 선택된 서열을 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, FGF21 서열은 서열번호 13이다.
- [0037] 일부 실시양태에서, 단백질 연결 잔기는 서열번호 1의 넘버링에 따라 1, 2, 56, 59, 69 및 122로 이루어진 군으로부터 선택된 위치에 위치될 수 있다. 일부 실시양태에서, 단백질 연결 잔기는 서열번호 1의 넘버링에 따라 1, 2, 56, 59 및 122로 이루어진 군으로부터 선택된 위치에 위치될 수 있다. 단백질 연결 잔기는 리신일 수 있다. FGF21 분자는 서열번호 17을 포함할 수 있다. FGF21 분자는 서열번호 18, 서열번호 19, 서열번호 20, 서열번호 21 및 서열번호 23으로 이루어진 군으로부터 선택된 서열을 포함할 수 있다.
- [0038] 일부 양태에서, 엑센딘 4 동족체는 하기를 포함할 수 있다:
- [0039] $Hx^2EGTFTSDL SKQ MEEAVRL FIE WLKNGGPSSGAPPSx^{40}$ (서열번호 38)
- [0040] 상기에서,
- [0041] x^2 는 Aib \circ 고;

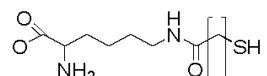
- [0042] x^{40} 은 임의의 아미노산을 포함하는 펩티드 연결 잔기이거나 존재하지 않고;
- [0043] 펩티드 연결기가 제 2 연결기를 통해 항체의 제 2 결합 부위에 공유적으로 연결된 친핵성 측쇄 또는 C-말단 카복실 기를 포함하도록 L^{10} , S^{11} , K^{12} , Q^{13} , M^{14} , E^{16} , E^{17} , V^{19} , R^{20} , L^{21} , E^{24} , L^{26} , K^{27} , N^{28} , S^{32} , S^{33} , G^{34} , A^{35} , P^{36} , P^{37} , P^{38} , S^{39} 또는 X^{40} 중 하나는 포함되거나 펩티드 연결 잔기 [LR]로 치환되고, 친핵성 측쇄를 통해 연결가능한 경우 펩티드 연결 잔기는 K, K(SH), K(S-MAL), R, Y, C, T, S, 호모시스테인, 호모세린, Dap 및 Dab로 이루어진 군으로부터 선택된다.
- [0044] 펩티드 연결 잔기는 서열번호 38의 넘버링에 따라 아미노산 잔기 수 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 19, 20, 21, 24, 27, 28, 39 및 40으로 이루어진 군으로부터 선택된 위치에 위치될 수 있다. 일부 실시양태에서, 펩티드 연결 잔기는 서열번호 38의 넘버링에 따라 12, 13, 14, 16, 17, 19, 20, 21 또는 24의 위치 중 하나에 위치될 수 있다. 일부 실시양태에서, 엑센딘 4 동족체는 서열번호 46, 서열번호 48, 서열번호 49, 서열번호 50, 서열번호 51, 서열번호 52, 서열번호 53, 서열번호 54 및 서열번호 55로 이루어진 군으로부터 선택된 서열을 포함한다.
- [0045] 일부 실시양태에서, 펩티드 연결 잔기는 서열번호 38의 넘버링에 따라 13, 14, 16, 17, 19, 20, 21 또는 24의 위치 중 하나에 위치된다. 일부 실시양태에서, 엑센딘 4 동족체는 서열번호 46, 서열번호 48, 서열번호 49, 서열번호 50, 서열번호 51, 서열번호 52, 서열번호 53 및 서열번호 54로 이루어진 군으로부터 선택된 서열을 포함한다.
- [0046] 일부 실시양태에서, 펩티드 연결 잔기는 서열번호 38의 넘버링에 따라 12, 14, 17, 19, 20 또는 21의 위치 중 하나에 위치된다. 일부 실시양태에서, 엑센딘 4 동족체는 서열번호 48, 서열번호 49, 서열번호 50, 서열번호 51, 서열번호 53 및 서열번호 55로 이루어진 군으로부터 선택된 서열을 포함한다.
- [0047] 일부 실시양태에서, 펩티드 연결 잔기는 서열번호 38의 넘버링에 따라 12, 14, 19, 20, 21 또는 40의 위치 중 하나에 위치된다.
- [0048] 엑센딘 4 동족체는 서열번호 60을 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 엑센딘 4 동족체는 서열번호 48, 서열번호 49, 서열번호 50, 서열번호 53, 서열번호 55, 서열번호 60, 서열번호 61, 서열번호 62, 서열번호 63, 서열번호 64, 서열번호 65, 서열번호 66, 서열번호 67, 서열번호 68, 서열번호 69, 서열번호 70, 서열번호 71 및 서열번호 72로 이루어진 군으로부터 선택된 서열을 포함한다.
- [0049] 엑센딘 4 동족체는 x^{40} 이 존재하지 않는 경우 서열번호 60을 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 엑센딘 4 동족체는 서열번호 48, 서열번호 49, 서열번호 50, 서열번호 53, 서열번호 55, 서열번호 60, 서열번호 61, 서열번호 62, 서열번호 63, 서열번호 64, 서열번호 65, 서열번호 66, 서열번호 67, 서열번호 68, 서열번호 69 및 서열번호 70으로 이루어진 군으로부터 선택된 서열을 포함한다.
- [0050] 일부 실시양태에서, 펩티드 연결 잔기는 서열번호 60의 넘버링에 따라 14, 19, 20 또는 21의 위치 중 하나에 위치된다. 일부 실시양태에서, 엑센딘 4 동족체는 서열번호 48, 서열번호 49, 서열번호 50, 서열번호 53, 서열번호 63, 서열번호 64, 서열번호 65, 서열번호 66, 서열번호 67, 서열번호 68, 서열번호 69 및 서열번호 70으로 이루어진 군으로부터 선택된 서열을 포함한다.
- [0051] 일부 실시양태에서, 펩티드 연결 잔기는 서열번호 60의 넘버링에 따라 위치 14에 위치된다. 일부 실시양태에서, 엑센딘 4 동족체는 서열번호 53, 서열번호 63, 서열번호 64 및 서열번호 77로 이루어진 군으로부터 선택된 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 엑센딘 4 동족체는 서열번호 53을 포함한다. 일부 실시양태에서, 엑센딘 4 동족체는 서열번호 63을 포함한다. 일부 실시양태에서, 엑센딘 4 동족체는 서열번호 64를 포함한다. 일부 실시양태에서, 엑센딘 4 동족체는 서열번호 77을 포함한다.
- [0052] 펩티드 연결 잔기는 제 2 연결기에 공유적으로 연결된 친핵성 측쇄를 포함할 수 있다. 펩티드 연결 잔기는 K, Y, C, Dap, Dab, K(SH) 및 K(S-MAL)로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있다. 펩티드 연결 잔기의 측쇄는 티올기를 포함할 수 있다.



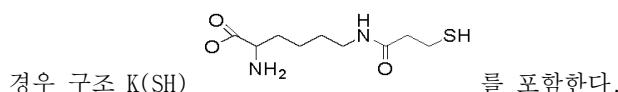
[0053] 펩티드 연결 잔기 [LR]은 구조 K(S-MAL)

를 포함할 수 있고, 이때 u는 1, 2 또는 3

이고, L은 제 2 연결기이다. 일부 실시양태에서 u는 1이다. 일부 실시양태에서, u는 2이다. 일부 실시양태에서, u는 3이다. 달리 언급하지 않는 한, K(S-MAL)가 실시예에 사용된 경우 u는 2이다.



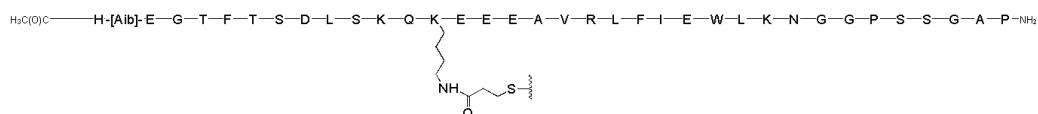
[0054] 일부 실시양태에서, 펩티드 연결 잔기는 u가 1, 2 또는 3인 경우 구조 K(SH)



달리 언급하지 않는 한, K(SH)가 실시예 및 서열 목록에 사용된 경우 u는 2이다.

[0056] 일부 양태에서, 엑센딘 4 동족체는 CH_3 , $\text{C}(\text{O})\text{CH}_3$, $\text{C}(\text{O})\text{CH}_2\text{CH}_3$, $\text{C}(\text{O})\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$ 및 $\text{C}(\text{O})\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CH}_3$ 으로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노-말단 캡핑 기 R^1 을 추가로 포함한다. 일부 양태에서, 엑센딘 4 동족체는 OH , NH_2 , $\text{NH}(\text{CH}_3)$, NHCH_2CH_3 , $\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$, $\text{NHCH}(\text{CH}_3)\text{CH}_3$, $\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$, $\text{NHCH}(\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{CH}_3$, NHC_6H_5 , $\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{OCH}_3$, NHOCH_3 , $\text{NHOCH}_2\text{CH}_3$, 카복시 보호기, 지질 지방산 기 및 카보하이드레이트로 이루어진 군으로부터 선택된 카복시-말단 캡핑 기 R^2 를 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, R^1 은 $\text{C}(\text{O})\text{CH}_3$ 이다. 일부 실시양태에서, R^2 는 NH_2 이다. 일부 실시양태에서 Ex4 펩티드가 서열번호 64를 포함하고 R^1 이 $\text{C}(\text{O})\text{CH}_3$ 이고 R^2 가 NH_2 인 경우, Ex4 펩티드는 서열번호 77로서 나타낼 수 있다.

[0057] 일부 양태에서, 엑센딘 4 동족체는 하기를 포함한다:



[0058]

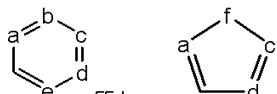
[0059] 제 1 및 제 2 연결기는 둘다 각각 단백질 및 펩티드 제시에 중요한 역할을 한다. 조성물 및 연결기의 길이를 이의 각각의 동족과 상호작용하도록 각각의 능력을 극대화하기 위해 단백질 및 펩티드를 모두 최적화하는 것이 필수적이다. 비대칭 이작용성 분자(즉, 하나는 2개의 암 중 각각에 상이한 단백질/펩티드를 나타냄)를 갖는 추가 문제점은 하나의 암의 연결기-단백질 배열 또는 작용성이 다른 암의 연결기-단백질 배열 또는 작용성을 방해하지 않는(및 그 반대) 중요성이다. 일부 실시양태에서, 더 긴 연결기 길이는 상이한 암 사이의 간섭을 줄이는 경향을 갖는다. 그러나, 이에 대한 균형은 단백질분해효소에 대한 더 적은 보호를 제공하기 위해 더 긴 연결기에 대한 경향이다. 게다가, 일부 환경에서 짧은 연결기는 동족 상호작용에 대하여 최적으로 나타낼 펩티드 또는 단백질을 허용할 수 있다: 연결기 길이의 증가는 유연성을 증가시킬 수 있고, 따라서 이 장점을 상실할 수 있다. 반대로, 개별적인 표적과 상호작용하는 일부 단백질 또는 펩티드는 연결기에서 특정한 양의 유연성에 의해 개선된다. 따라서, 각각의 활성 단백질/펩티드에 대한 최적 연결기 길이 및 조성물의 발견, 및 전체 집합된 분자를 전체론적으로 가로지르는 각각의 균형은 단백질 및 펩티드 둘다의 반감기와 활성 사이에 올바른 균형에 영향을 미치기 위해 중요하다. 이어서, 이 모든 것은 추가적인 제조 비용 및 각각의 단백질/펩티드에 상이한 연결기를 갖는 고유의 복잡성에 대하여 상쇄되어야 한다. 각각의 활성 분자를 위한 동일한 연결기의 사용은 투명한 비용 및 제조 효율성을 갖는다.

[0060]

일부 적합한 연결기는 미국특허 제 2009098130 호에 시작되어 있고, 이의 내용은 참조로서 본원에 혼입되었다. 특히, 연결기, 특이적 연결기 구조, 연결기의 합성 및 특이적으로 및 통상적으로 기재된 바와 같은 X, Y(이는 또한 yy로서 쓰일 수도 있음) 및 Z 기의 상이한 원조의 조합을 기재하는 일반적인 화학식에 관한 미국특허 제

2009098130 호의 양상은 본원에 포함된다. 제 1 및/또는 제 2 연결기는 선형 또는 분지형일 수 있고, 임의적으로 하나 이상의 탄소환형 또는 헤테로환형 기를 포함한다. 연결기 길이는 환형 잔기, 예컨대 방향족 고리 등과 함께 고리 주변의 가장 짧은 경로를 취함으로써 계수되는 다수의 선형 원자에 관한 관점일 수 있다. 일부 실시양태에서, 제 1 및/또는 제 2 연결기는 5 내지 15개의 원자, 다른 실시양태에서 15 내지 30개의 원자, 또 다른 실시양태에서 30 내지 50개의 원자, 또 다른 실시양태에서 50 내지 100개의 원자, 및 또 다른 실시양태에서 100 내지 200개의 원자의 선형 신장을 갖는다. 다른 연결기의 고려는 생성되는 화합물의 물리적 또는 약동학적 특성, 예컨대 가용성, 친유성, 친수성, 소수성, 안정성(다소 안정된 및 계획된 분해), 강성, 유연성, 면역원성, 및 항체 결합의 조절, 미셀(micelle) 또는 리포솜 등에 흡입될 능력에 대한 효과를 포함한다.

[0061] 제 1 및/또는 제 2 연결기는 화학식 X-Y-Z를 포함할 수 있고, 이때 X는 C, H, N, O, P, S, F, Cl, Br 및 I로 이루어진 군으로부터 선택된 임의의 원자를 포함하는 생물학적 호환가능한 연결 쇄이고, 중합체 또는 블록 공중합체를 포함할 수 있고, 연결기가 선형인 경우 단백질 연결 잔기 및/또는 펩티드 연결 잔기에 공유적으로 연결되고; Y는 하나 이상의 고리 구조를 포함하는 임의적으로 존재하는 인식 기이고; Z는 항체의 결합 부위에서 아미노산 측쇄에 공유 결합을 포함하는 부착 잔기이다.

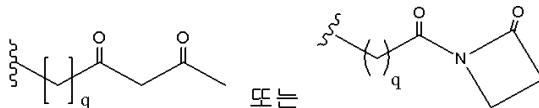


[0062] 존재하는 경우, Y는 임의적으로 치환된 구조 또는 를 가질 수 있고, 이때 a, b, c, d 및 e는 독립적으로 탄소 또는 질소이고; f는 탄소, 질소, 산소 또는 황이고; Y는 충분한 원자가의 임의의 2개 고리 위치에서 독립적으로 X 및 Z에 부착되고; a, b, c, d, e 또는 f 중 4개 미만은 동시에 질소이고, 바람직하게는 고리 구조에서 a, b, c, d 및 e는 각각 탄소이다. 일부 양태에서, Y는 폐널일 수 있다. 비록 어떠한 이론에 구속되고자 하지 않을지라도, Z 기가 반응성 아미노산 측쇄와 반응할 수 있도록 Y 기가 항체 결합 부위 내에 반응성 기의 위치결정을 도울 수 있는 것으로 간주된다.

[0063] 제 1 및/또는 제 2 연결기는 매크로분자, 예컨대 항체, 단백질 또는 이의 단편과의 결합을 공유적으로 또는 비공유적으로 형성할 수 있는 반응성 기를 함유하도록 고안될 수 있다. 반응성 기는 특정한 결합 부위에서 반응성 잔기와 사용하기 위해 선택된다. 예를 들어, 알돌라아제 항체에 의해 개질하기 위한 화학 잔기는 케톤, 디아케톤, β -락탐, 활성 에스터, 할로케톤, 락톤, 무수물, 말레이미드, α -할로아세트아미드, 사이클로헥실 디아케톤, 에폭사이드, 알데하이드, 아미딘, 구아이딘, 이민, 엔아민, 포스페이트, 포스포네이트, 에폭사이드, 아지리딘, 티오에폭사이드, 차폐되거나 보호된 디아케톤(예를 들어, 케탈), 락탐, 할로케톤 또는 알데하이드 등일 수 있다. 본 발명의 펩티드와 연결기를 연결하는 본 발명의 실시양태에서, Z는 반응성 기이다.

[0064] 일부 실시양태에서, 항체의 결합 부위에서 잔기의 측쇄와 접합하기 전에 Z는 아지티딘온, 디아케톤, 아실 β -락탐, 활성 에스터, 할로케톤, 사이클로헥실 디아케톤 기, 알데하이드, 말레이미드, 활성화된 알켄, 활성화된 알린, 또는 일반적으로 친핵성 또는 친전자성 대체에 민감한 이탈기를 포함하는 분자를 형성하도록 배열된 하나 이상의 C=O 기를 포함한다. 다른 기는 락톤, 무수물, α -할로아세트아미드, 이민, 하이드라지드 또는 에폭사이드를 포함할 수 있다. 항체의 결합 부위에서 반응성 친핵성 기(예컨대, 리신 또는 시스테인 측쇄)에 공유적으로 결합할 수 있는 연결기 친전자성 반응성 기의 예는 아실 β -락탐, 단순 디아케톤, 숙신이미드 활성 에스터, 말레이미드, 연결기를 갖는 할로아세트아미드, 할로케톤, 사이클로헥실 디아케톤, 알데하이드, 아미딘, 구아이딘, 이민, 엔아민, 포스페이트, 포스포네이트, 에폭사이드, 아지리딘, 티오에폭사이드, 차폐되거나 보호된 디아케톤(예컨대, 케탈), 락탐, 설포네이트 등, 차폐된 C=O 기, 예컨대 이민, 케탈, 아세탈, 및 임의의 다른 공지된 친전자성 기를 포함한다. 특정 실시양태에서, 반응성 기는 아실 β -락탐, 단순 디아케톤, 숙신이미드 활성 에스터, 말레이미드, 연결기를 갖는 할로아세트아미드, 할로케톤, 사이클로헥실 디아케톤 또는 알데하이드를 형성하도록 배열된 하나 이상의 C=O 기를 포함한다. Z는 치환된 알킬, 치환된 사이클로알킬, 치환된 아릴, 치환된 아릴알킬, 치환된 헤테로사이클 또는 치환된 헤테로사이클로알킬일 수 있고, 이때 하나 이상의 치환기는 1,3-다이케톤 잔기, 아실 β -락탐, 활성 에스터, α -할로케톤, 알데하이드, 말레이미드, 락톤, 무수물, α -할로아세트아미드, 아민, 하이드라지드 또는 에폭사이드이다. 일부 양태에서, Z 기는 본 발명의 펩티드에 증가된 반감기를 제공할 수 있는 매크로분자 지지체에 공유적으로 연결된다. 일부 양태에서, Z 기는 존재하는 경우 항체의 결합 부위에 공유적으로 연결된다.

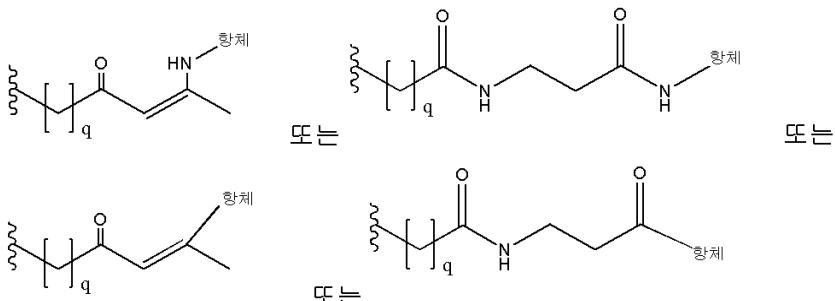
[0065] 일부 양태에서, (예컨대, 항체의 결합 부위와) 공액 결합 전에, Z는 하기 구조를 갖는다:



[0066]

상기 구조에서, q는 0 내지 5이다. q는 1 또는 2일 수 있다. q는 1일 수 있다. 다른 양상에서, q는 2일 수 있다.

[0068] 일부 양태에서, 항체 결합 부위와 접합 후, Z는 하기 구조를 갖는다:

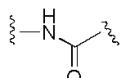


[0069]

상기 구조에서, q는 0 내지 5이고, 항체-N은 항체의 결합 부위에서 측쇄에 대한 공유 결합이다(이때, NH는 항체 결합 부위에서 리신 측쇄의 ε-아미노 기임). q는 1 또는 2일 수 있다. q는 1일 수 있다. 다른 양상에서, q는 2일 수 있다.

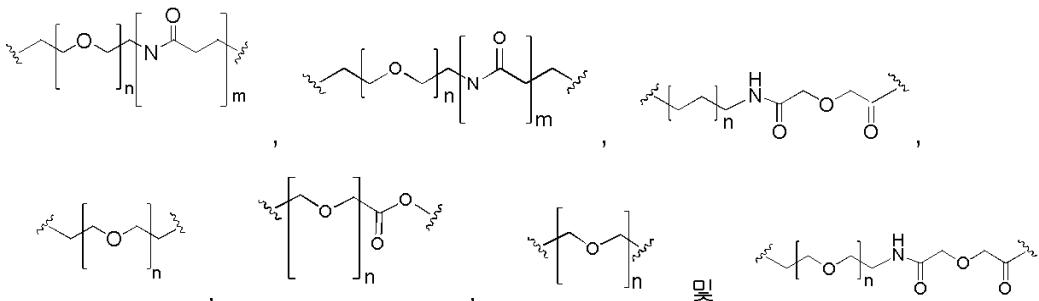
[0070]

X는 3개의 성분을 포함하는 기, 즉, $X_p-X_s-X_y$ 일 수 있고, 이때 X_p 는 FGF21 단백질의 단백질 연결 잔기 및/또는 엑센틴 4 동족체의 웨티드 연결 잔기의 측쇄와 조합가능하도록 특이적으로 채택된 기이고; X_s 는 X 기의 스페이서 영역이고; X_y 는 Y 기에 결합하도록 채택된 기이다. 일부 양태에서, X_y 는 아미드 결합, 엔아민 결합, 또는 구아니디늄 결합으로부터 선택된다. X_y 는 Y 기에 (2개의 원자 내에) 인접한 수소 분자를 제공하도록 선택될 수 있다. 이론에 얹매이려는 것은 아니지만, H 원자가 H-결합 상호작용을 통해, 특히 촉매 항체, 예컨대 h38C2의 결합 틈의 소수성 포켓에 대하여 소수성 포켓의 Y기의 인지를 도울 수 있음이 알려졌다. 따라서, 아미드 결합은 예를 들어, NH 기가 Y 기에 직접 결합하여 수소 결합을 위한 NH 기의 H를 제공하도록 지향될 수 있다. 다른 계는, 아미드의 C=O 기는 Y 기에 인접한 2개의 원자일 수 있는 NH 기의 H를 갖는 Y 기에 결합될 수 있지만, 여전히 H-결합에 이용가능하다. 일부 실시양태에서, X_y 는 존재하지 않는다. 일부 실시양태에서, X_y 기는 하기를 갖는다:



[0072]

일부 양태에서, X_s 는 X_s 가 임의의 과잉 반응성 기를 제공하지 않도록 선택된다. X_s 는 2 내지 15개 원자의 X 기의 전체 길이를 제공하도록 선택될 수 있다. X_s 는 X 기의 전체 길이가 2 내지 10개 원자이도록 선택될 수 있다. X_s 는 X 기의 전체 길이가 4 내지 8개 원자이도록 선택될 수 있다. X_s 는 X 기의 전체 길이가 5개 원자이도록 선택될 수 있다. X_s 는 X 기의 전체 길이가 6개 원자이도록 선택될 수 있다. 일부 양태에서, X_s 는 하기 화학식 중 하나를 포함할 수 있다:

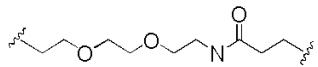


[0074]

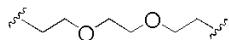
상기 식에서,

[0076] n은 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10이고; m은 존재하거나 부재하고; n은 1, 2, 3, 4, 5 또는 6일 수 있고; n은 1, 2, 3 또는 4일 수 있고; n은 1일 수 있고; n은 2일 수 있고; n은 3일 수 있고; n은 4일 수 있다.

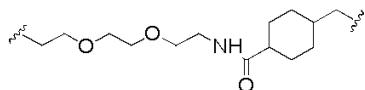
[0077] 일부 양태에서, Xs는 하기 화학식 중 하나를 포함한다:



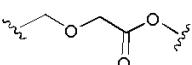
(L1 및 L2에 예시됨)



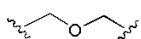
(L3 및 L7에 예시됨)



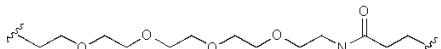
(L4에 예시됨)



(L5에 예시됨)



(L6에 예시됨)



(L8에 예시됨)

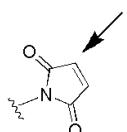
[0078]

[0079] Xp는 이상적으로 FGF21 단백질의 단백질 연결 잔기 및/또는 엑센틴 4 동족체의 웨티드 연결 잔기에 특이적 지향성 공유 결합 전략을 가능하게 하도록 선택된다. 예를 들어, 연결 잔기가 친핵성 기를 포함하는 경우, Xp는 친전자성 기일 수 있고 반대일 수 있다. 예를 들어, 연결 잔기 측쇄가 아민 기, 예컨대 K, H, Y, 오르니틴, Dap 또는 Dab를 포함하는 경우, Xp는 COOH, 또는 다른 유사한 반응성 친전자체일 수 있다. 연결 잔기가 D 또는 E인 경우, Xp는 친핵성 기, 예컨대 아민 기를 포함할 수 있다. 이러한 전략 중 어떤 것은 아미드 결합 형성 전략에 의해 Xp 기와 연결 잔기 사이에 형성될 수 있는 공유 결합을 가능하게 한다. 연결 잔기가 아민 기를 포함하는 경우, Xp는 하기를 포함할 수 있다:



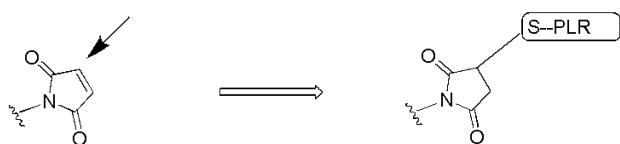
[0080]

[0081] 연결 잔기가 C, C의 동족체, 또는 다른 티올-기 함유 잔기, 예컨대 K(SH)인 경우, Xp는 연결 잔기에 Xp 기를 공유적으로 연결하기 위한 티올-말레이미드 첨가 반응 전략을 가능하게 하는 말레이미드 기(또는 유사한 것)를 포함할 수 있다. 일부 양태에서, Xp는 또한 연결 잔기와 Xp 기 사이에 형성될 수 있는 이황화 가교를 허용하는 티올 기를 포함할 수 있다. 일부 양태에서, Xp는 말레이미드일 수 있다:



[0082]

[0083] 상기에서, 화살표는 연결 잔기에 부착점을 나타내고 평행선은 연결기의 Y 기에 부착을 나타낸다. 연결 잔기가 시스테인 잔기 또는 다른 티올 함유 측쇄인 경우, 접합의 메카니즘은 하기와 같을 수 있다:

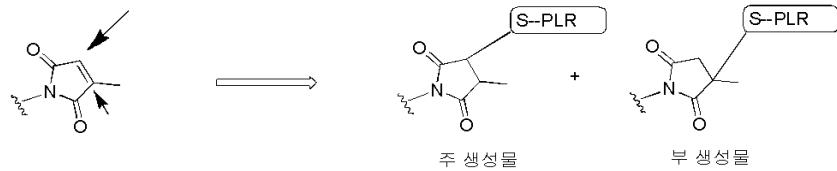


[0084]

[0085] 상기에서, PLR은 단백질 연결 잔기 또는 웨티드 연결 잔기이고, S는 시스테인 또는 다른 티올 함유 아미노산의 티올 기의 황 원자, 예컨대 K(SH)이다.

[0086]

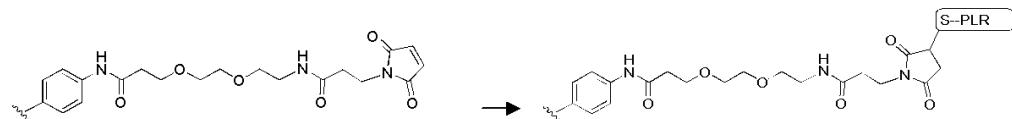
일부 양태에서, Xp 기는 치환된 말레이미드를 포함한다:



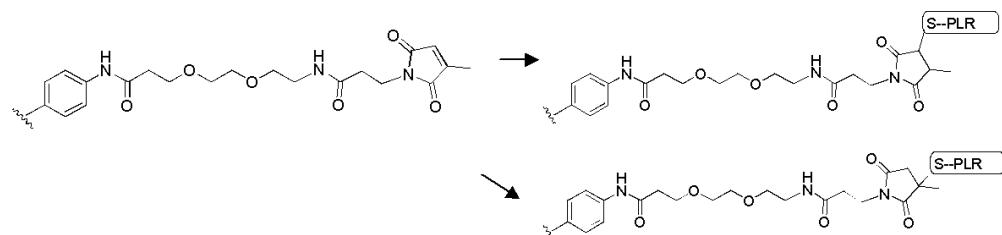
[0087]

일부 양태에서, 접합 전 및 접합 후 연결기의 XY 성분은 하기로부터 선택될 수 있다:

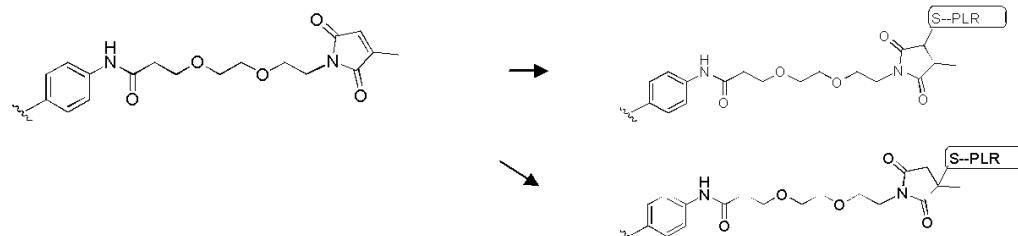
XY-1



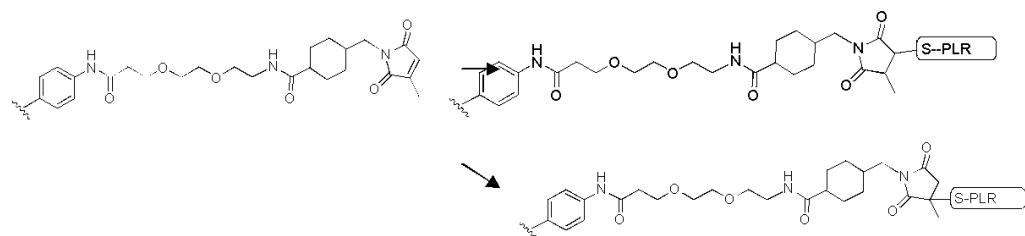
XY-2



XY-3



XY-4

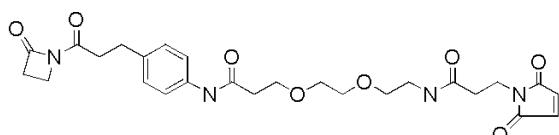


[0089]

성분 XY-1, XY-2, XY-3 및 XY-4는 연결 잔기에서 티올-기 함유 측쇄에 접합하는 실시양태에 특히 유용하다.

[0090]

일부 실시양태에서, 연결기는 연결기-1(L1)일 수 있다:

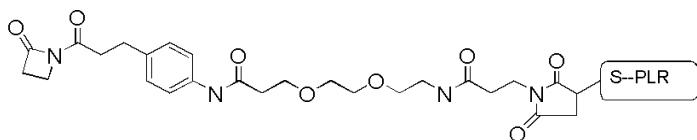


L1

[0092]

[0093]

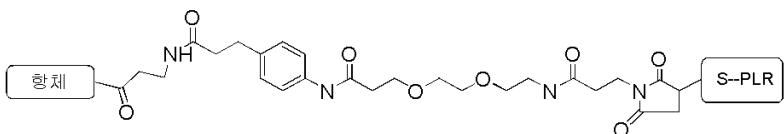
L1이 PLR에 접합된 경우, L1-PLR 복합체는 하기 화학식을 포함할 수 있다:



L1-PLR

[0094]

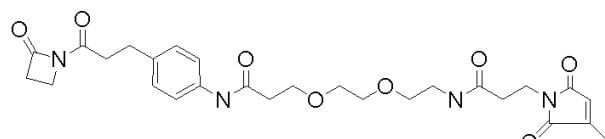
L1이 항체 및 PLR에 접합된 경우, 항체-L1-PLR 복합체는 하기 화학식을 포함할 수 있다:



Ab-L1- PLR

[0096]

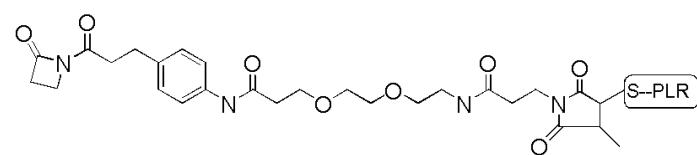
일부 실시양태에서, 연결기는 연결기-2(L2)일 수 있다:



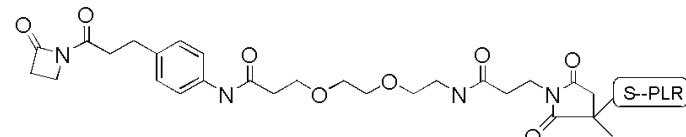
L2

[0098]

L2가 PLR에 접합된 경우, L2-PLR 복합체는 하기 화학식 중 하나를 포함할 수 있다:



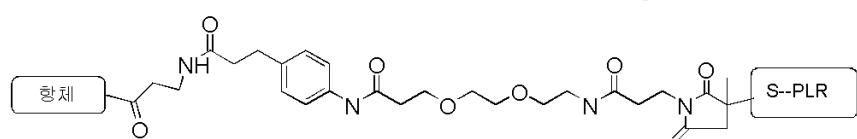
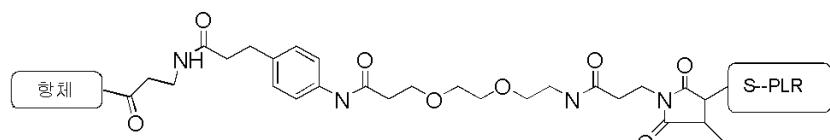
L2- PLR



L2- PLR

[0100]

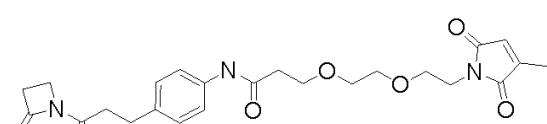
L2가 항체 및 PLR에 접합된 경우, 항체-L2-PLR 복합체는 하기 화학식 중 하나를 포함할 수 있다:



Ab-L2- PLR

[0102]

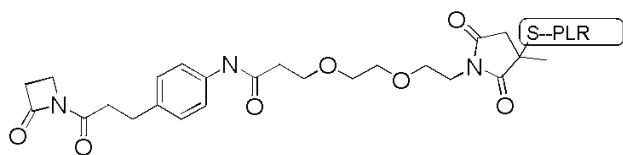
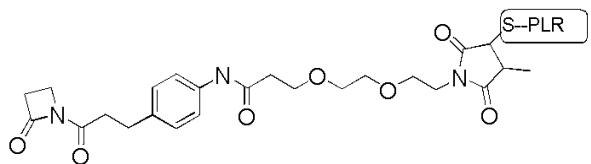
일부 실시양태에서, 연결기는 연결기-3(L3)일 수 있다:



L3

[0104]

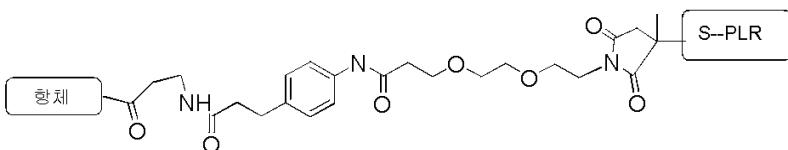
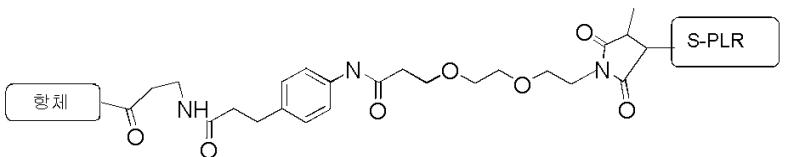
[0105] L3이 PLR에 접합된 경우, L3-PLR 복합체는 하기 화학식 중 하나를 포함할 수 있다:



L3- PLR

[0106]

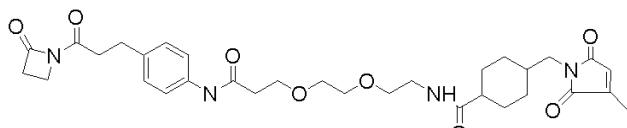
[0107] L3의 항체 및 PLR에 접합된 경우, 항체-L3-PLR 복합체는 하기 화학식을 포함할 수 있다:



Ab-L3- PLR

[0108]

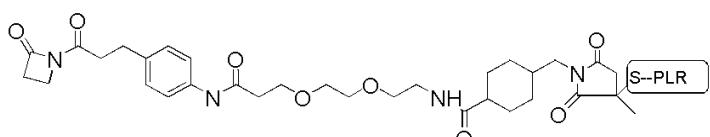
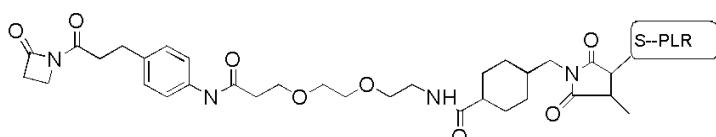
[0109] 일부 실시양태에서, 연결기는 연결기-4(L4)일 수 있다:



L4

[0110]

[0111] PLR에 접합된 경우, L4-PLR 복합체는 하기 화학식을 포함할 수 있다:

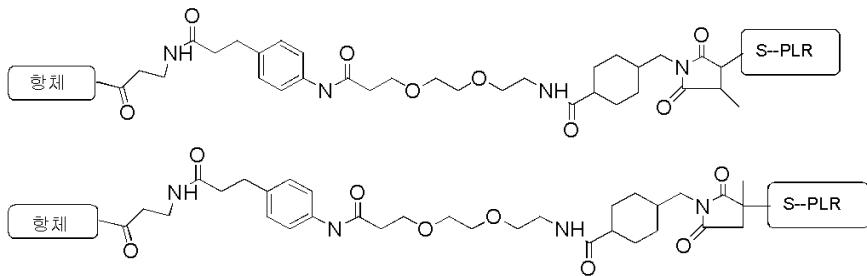


L4- PLR

[0112]

[0113]

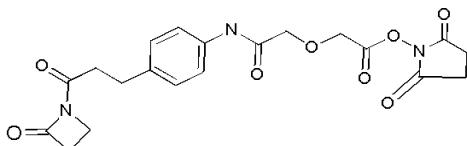
L4가 항체 및 PLR에 접합된 경우, 항체-L4-PLR 복합체는 하기 화학식을 포함할 수 있다:



Ab-L4- PLR

[0114]

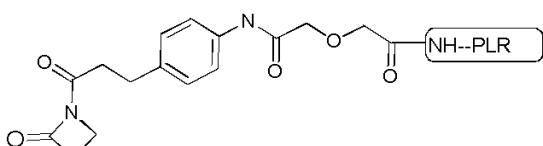
일부 실시양태에서, 연결기는 연결기-5(L5)일 수 있다:



L5

[0116]

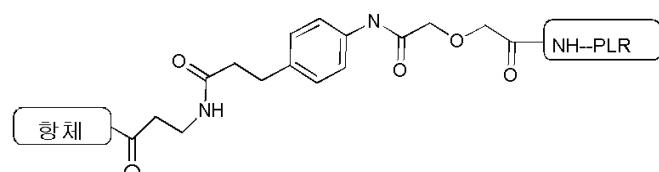
L5가 PLR에 접합된 경우, L5-PLR 복합체는 하기 화학식을 포함할 수 있다:



L5-PLR

[0118]

L5가 항체 및 PLR 분자에 접합된 경우, 항체-L5-PLR 복합체는 하기 화학식을 포함할 수 있다:



Ab-L5-PLR

[0120]

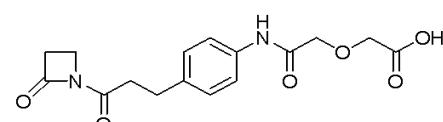
상기 식에서,

[0121]

NH는 LR의 측쇄의 말단에서의 아미노 기, 예컨대 리신이다.

[0123]

일부 양태에서, 연결기는 연결기-6(L6)일 수 있다.



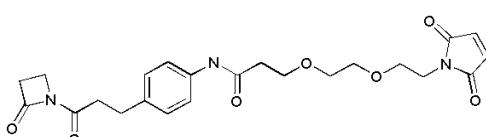
L6

[0124]

L6이 PLR에 접합된 경우, L6-PLR 복합체는 L5-PLR에 대한 것과 동일한 화학식을 포함할 수 있다. 유사하게, L6이 항체 및 PLR에 접합된 경우, 항체-L6-PLR 복합체는 Ab-L5-PLR에 대한 것과 동일한 화학식을 포함할 수 있다.

[0126]

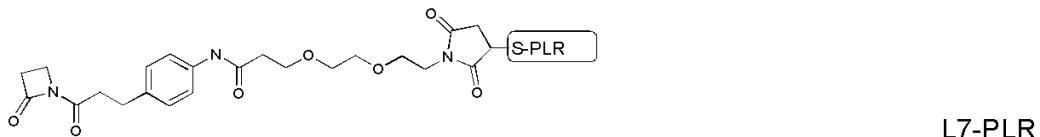
일부 실시양태에서, 연결기는 연결기-7(L7)일 수 있다:



L7

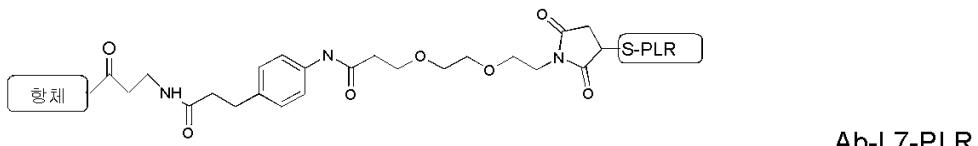
[0127]

[0128] PLR에 접합된 경우, L7-PLR 복합체는 하기 화학식을 포함할 수 있다:



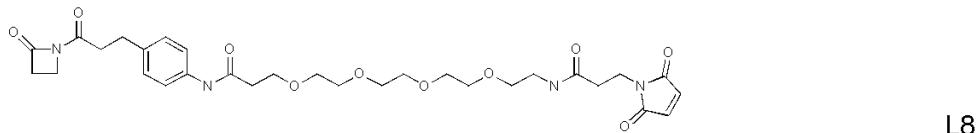
[0129]

[0130] 항체 및 PLR에 접합된 경우, 항체-L7-PLR 복합체는 하기 화학식을 포함할 수 있다:



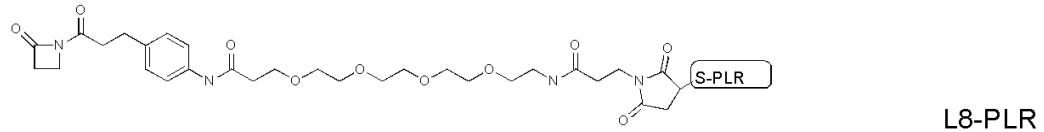
[0131]

[0132] 일부 실시양태에서, 연결기는 연결기-8(L8)일 수 있다:



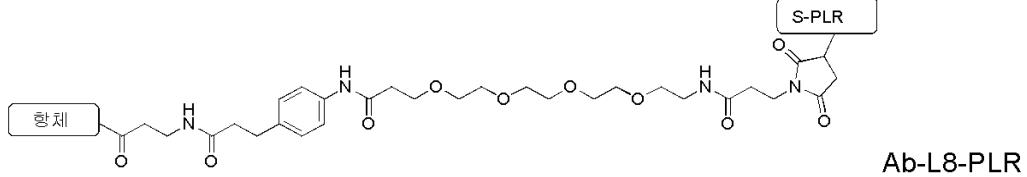
[0133]

[0134] L8^o PLR에 접합된 경우, L8-PLR 복합체는 하기 화학식을 포함할 수 있다:



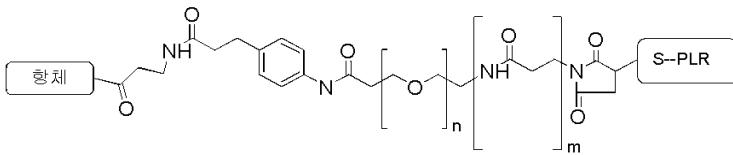
[0135]

[0136] L8^o 항체 및 PLR에 접합된 경우, 항체-L8-PLR 복합체는 하기 화학식을 포함할 수 있다:



[0137]

[0138] 일부 실시양태에서, 연결기는 하기 화학식일 수 있다:



[0139]

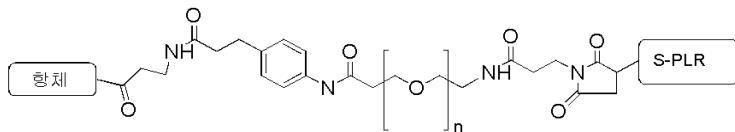
[0140] 상기 식에서,

[0141] 항체는 항체의 결합 부위에 공유 결합하고;

[0142] S-PLR은 단백질 연결 잔기 및/또는 웨티드 연결 잔기 상의 티올-함유 측쇄에 공유 결합하고;

[0143] n은 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10이고; n은 1, 2, 3, 4, 5 또는 6일 수 있고; n은 1일 수 있고; n은 2일 수 있고; n은 3일 수 있고; n은 4일 수 있고; m은 존재하지 않을 수 있고; m은 존재할 수 있다.

[0144] 일부 실시양태에서, 항체 및 PLR에 접합된 경우, 제 1 및/또는 제 2 연결기는 하기 화학식일 수 있다:



[0145]

[0146] 상기 식에서,

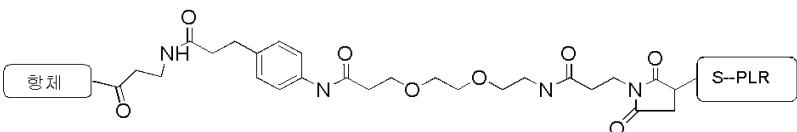
[0147] 항체는 항체의 결합 부위에 공유 결합하고;

[0148] S-PLR은 단백질 연결 잔기 및/또는 웨티드 연결 잔기 상의 티올-함유 측쇄에 공유 결합하고;

[0149] n은 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10이고; n은 1, 2, 3, 4, 5 또는 6일 수 있고; n은 1일 수 있고; n은 2일 수 있고; n은 3일 수 있고; n은 4일 수 있다.

[0150]

일부 실시양태에서, 조성물은 하기 화학식을 포함한다:



[0151]

[0152] 상기 식에서,

[0153] 항체는 항체의 결합 부위에 공유 결합하고;

[0154] S-PLR은 단백질 연결 잔기 및/또는 웨티드 연결 잔기 상의 티올-함유 측쇄에 공유 결합한다.

[0155] 일부 실시양태에서, 단백질 연결 잔기는 아미노 또는 티올 함유 측쇄를 포함한다. 일부 실시양태에서, 단백질 연결 잔기는 리신 또는 시스테인을 포함한다. 일부 실시양태에서, 단백질 연결 잔기는 시스테인을 포함한다.

[0156]

일부 실시양태에서, 단백질 연결 잔기는 서열번호 1의 넘버링에 따라 잔기 수 56, 59, 69, 79, 86, 122, 125 및 129 중 하나에 위치된다. 일부 실시양태에서, FGF21 분자는 서열번호 10을 포함한다. 일부 실시양태에서, FGF21 분자는 서열번호 7을 포함한다.

[0157]

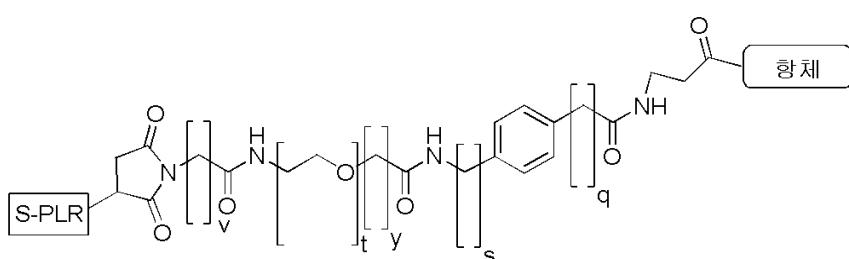
일부 실시양태에서, 웨티드 연결 잔기는 서열번호 60의 넘버링에 따라 10, 11, 12, 13, 14, 16, 17, 19, 20, 21, 24, 26, 27, 28, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39 또는 40의 위치 중 하나에 위치된다.

[0158]

일부 실시양태에서, 제 1 및 제 2 연결기는 동일하다. 일부 실시양태에서, 제 1 및 제 2 연결기는 둘다 L1을 포함한다.

[0159]

일부 양태에서, 항체에 부착된 경우, 단백질 연결 잔기 [S-PLR] 및/또는 웨티드 연결 잔기 [S-PLR]의 구조는 하기 화학식이다:



[0160]

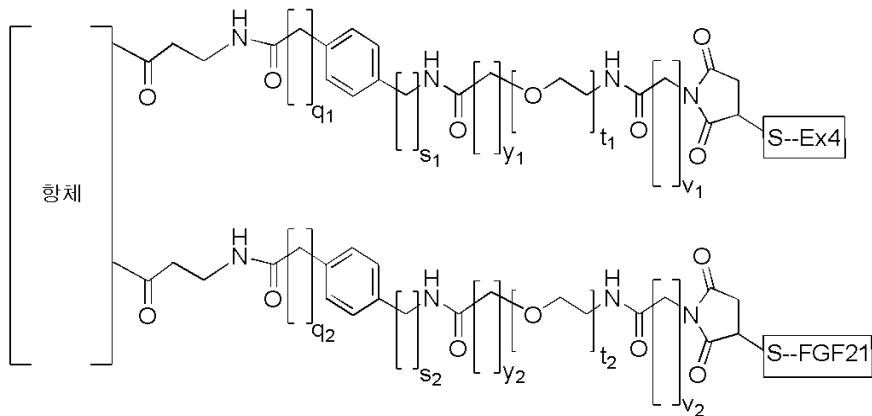
[0161] 상기 식에서,

[0162] v는 1 또는 2이고; t는 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10이고; y는 0, 1 또는 2이고; s는 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10이고; q는 1, 2, 3, 4 또는 5이다. 일부 양태에서, v는 2이고; t는 2이고; y는 1이고; s는 0이고; q는 2이다.

[0163] 일부 양태에서, 본 발명은 하기 화학식 2의 화합물을 제공한다:

[0164]

[화학식 2]



[0165]

[0166]

상기 식에서,

[0167]

v₁ 및 v₂는 각각 독립적으로 1 또는 2이고;

[0168]

t₁ 및 t₂는 각각 독립적으로 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10이고;

[0169]

y₁ 및 y₂는 각각 독립적으로 0, 1 또는 2이고;

[0170]

s₁ 및 s₂는 각각 독립적으로 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10이고;

[0171]

q₁ 및 q₂는 각각 독립적으로 1, 2, 3, 4 또는 5이다.

[0172]

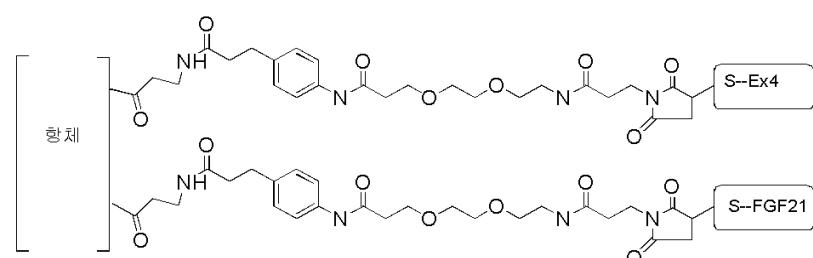
일부 양태에서 v₁ 및 v₂는 둘다 2이다. 일부 양태에서 t₁ 및 t₂는 둘다 2이다. 일부 양태에서 y₁ 및 y₂는 둘다 1이다. 일부 양태에서 s₁ 및 s₂는 둘다 0이다. 일부 양태에서 q₁ 및 q₂는 둘다 2이다.

[0173]

일부 양태에서, 본 발명은 하기 화학식 3의 조성물을 제공한다:

[0174]

[화학식 3]



[0175]

상기 식에서,

[0176]

제 1 및 제 2 연결기는 2개의 항체 결합 부위 중 하나에 각각 공유적으로 연결되고;

[0177]

항체는 서열번호 25 및 서열번호 26을 포함하고;

[0178]

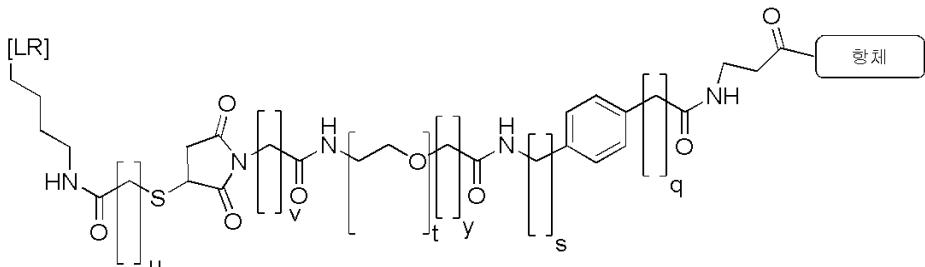
S-Ex4는 티올 기를 통해 서열번호 64의 K(SH)로의 공유 결합을 나타내고;

[0179]

S-FGF21은 티올 기를 통해 서열번호 10의 C¹²⁹로의 공유 결합을 나타낸다.

[0180]

일부 양태에서, 항체의 제 2 연결기 및 제 2 결합 부위에 부착된 경우, 펩티드 연결 잔기 [LR]의 구조는 하기 화학식이다:



[0182]

상기 식에서,

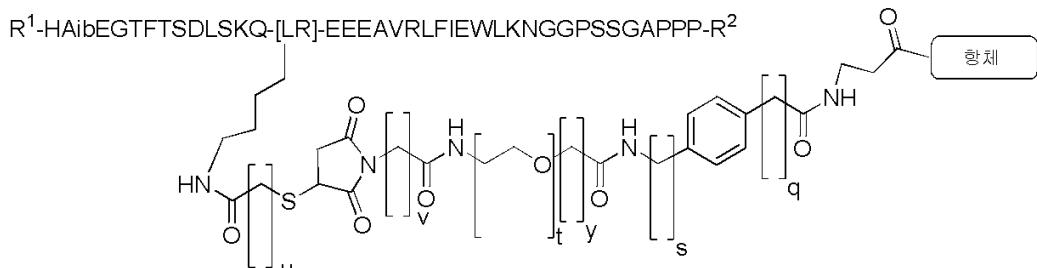
u는 1, 2 또는 3이고;

v는 1 또는 2, t는 1, 2 또는 3이고, y는 1 또는 2이고;

s는 0, 1 또는 2이고, q는 1 또는 2이다.

일부 양태에서, u는 2이고, v는 2이고, t는 2이고, y는 1이고, s는 0이고 q는 2이다.

본 발명의 일부 양태에서, 엑센딘 4 동족체 및 제 2 연결기는 하기 화학식을 포함한다:



[0189]

상기 식에서,

u는 1, 2 또는 3이고;

v는 1 또는 2이고, t는 1, 2 또는 3이고, y는 1 또는 2이고;

s는 0, 1 또는 2이고, q는 1 또는 2이고;

[LR]은 펩티드 연결 잔기이다.

일부 양태에서, u는 2이고, v는 2이고, t는 2이고, y는 1이고, s는 0이고, q는 2이다. 일부 양태에서, [LR]은 K, K(S-MAL) 또는 K(SH)이다.

일부 실시양태에서, 본 발명은 하기 화학식 1-1의 조성물에 관한 것이다:

[화학식 1-1]

[FGF21-제 1 연결기]₁-[Ab]-[제 2 연결기]-Ex4]₁

상기 식에서,

FGF21은 FGF21 동족체이고;

Ex4는 엑센딘 4 동족체이고;

Ab는 알돌라아제 촉매 항체이고;

제 1 연결기는 FGF21에서 단백질 연결 잔기의 측쇄 및 항체의 결합 부위에 공유적으로 부착되고;

제 2 연결기는 Ex4에서 펩티드 연결 잔기의 측쇄 및 항체의 결합 부위에 공유적으로 부착되고, 이때 접합된 단백질-항체 복합체의 피하 반감기가 뮤린 모델에서 약 20시간 이상이도록 제 1 및 제 2 연결기는 동일하거나 상이하다.

일부 실시양태에서, SC 반감기는 약 25시간 이상이다. 일부 실시양태에서, SC 반감기는 약 30시간 이상이다.

일부 실시양태에서, SC 반감기는 약 33시간 이상이다. 일부 실시양태에서, SC 반감기는 영장류 모델에서 약 40시간 이상이다. 일부 실시양태에서, SC 반감기는 영장류 모델에서 약 4 내지 5시간 이상이다. 일부 실시양태에서, SC 반감기는 영장류 모델에서 48시간 이상이다. 일부 실시양태에서, 본 발명은 뮤린 모델에서 약 28시간 이상의 IV 반감기를 갖는 접합된 단백질-항체 복합체를 제공한다. 일부 실시양태에서, 본 발명은 뮤린 모델에서 약 30시간 이상의 IV 반감기를 갖는 접합된 단백질-항체 복합체를 제공한다. 일부 실시양태에서, 본 발명은 뮤린 모델에서 약 34시간 이상의 IV 반감기를 갖는 접합된 단백질-항체 복합체를 제공한다. 일부 실시양태에서, 본 발명은 뮤린 모델에서 약 40시간 이상의 IV 반감기를 갖는 접합된 단백질-항체 복합체를 제공한다. 일부 실시양태에서, 본 발명은 영장류 모델에서 약 50시간 이상의 IV 반감기를 갖는 접합된 단백질-항체 복합체를 제공한다. 일부 실시양태에서, 본 발명은 영장류 모델에서 약 55시간 이상의 IV 반감기를 갖는 접합된 단백질-항체 복합체를 제공한다. 일부 실시양태에서, 본 발명은 영장류 모델에서 약 60시간 이상의 IV 반감기를 갖는 접합된 단백질-항체 복합체를 제공한다.

[0201] 일부 실시양태에서, 본 발명은 하기 화학식 1의 조성물에 관한 것이다:

[화학식 1]

[FGF21-제 1 연결기]-[항체]-[제 2 연결기]-Ex4]

[0204] 상기 식에서,

[0205] FGF21은 FGF21 동족체이고;

Ex4는 엑센딘 4 동족체이고;

항체는 알돌라아제 촉매 항체이고;

제 1 연결기는 FGF21에서 단백질 연결 잔기의 측쇄 및 항체의 결합 부위에 공유적으로 부착되고;

제 2 연결기는 Ex4에서 웨პ티드 연결 잔기의 측쇄 및 항체의 결합 부위에 공유적으로 부착되고, 이때 접합된 단백질-항체 복합체의 피하 생물학적 이용가능성이 뮤린 모델에서 약 80% 이상이도록 제 1 및 제 2 연결기는 동일하거나 상이하다.

일부 실시양태에서, SC 생물학적 이용가능성은 약 85% 이상이다. 일부 실시양태에서, SC 생물학적 이용가능성은 약 90% 이상이다. 일부 실시양태에서, SC 생물학적 이용가능성은 영장류 모델에서 약 50% 이상이다. 일부 실시양태에서, SC 생물학적 이용가능성은 영장류 모델에서 약 55% 이상이다. 일부 실시양태에서, SC 생물학적 이용가능성은 영장류 모델에서 약 60% 이상이다.

[0206] 일부 실시양태에서, 본 발명은 하기 화학식 1의 조성물에 관한 것이다:

[화학식 1]

[FGF21-제 1 연결기]-[항체]-[제 2 연결기]-Ex4]

[0209] 상기 식에서,

[0210] FGF21은 FGF21 동족체이고;

Ex4는 엑센딘 4 동족체이고;

항체는 알돌라아제 촉매 항체이고;

제 1 연결기는 FGF21에서 단백질 연결 잔기의 측쇄 및 항체의 결합 부위에 공유적으로 부착되고;

제 2 연결기는 Ex4에서 웨პ티드 연결 잔기의 측쇄 및 항체의 결합 부위에 공유적으로 부착되고, 이때 접합된 단백질-항체 복합체의 피하 생물학적 이용가능성이 약 1 nM 미만의 hGLP1R(iAMP) 어세이에서 EC₅₀ 효능을 갖도록 제 1 및 제 2 연결기는 동일하거나 상이하다.

일부 양태에서, hGLP1R(iAMP) 어세이에서 EC₅₀ 효능은 약 500 pm 미만이다. 일부 양태에서, hGLP1R(iAMP) 어세이에서 EC₅₀ 효능은 약 100 pm 미만이다. 일부 양태에서, hGLP1R(iAMP) 어세이에서 EC₅₀ 효능은 약 50 pm 미만이다. 일부 양태에서, hGLP1R(iAMP) 어세이에서 EC₅₀ 효능은 약 10 내지 50 pm이다.

[0211] 일부 실시양태에서, 본 발명은 하기 화학식 1의 조성물에 관한 것이다:

[0212] [화학식 1]

[0213] [FGF21-제 1 연결기]-[항체]-[제 2 연결기]-Ex4]

[0214] 상기 식에서,

[0215] FGF21은 FGF21 동족체이고;

Ex4는 엑센던 4 동족체이고;

항체는 알돌라아제 촉매 항체이고;

제 1 연결기는 FGF21에서 단백질 연결 잔기의 측쇄 및 항체의 결합 부위에 공유적으로 부착되고;

제 2 연결기는 Ex4에서 웨პ티드 연결 잔기의 측쇄 및 항체의 결합 부위에 공유적으로 부착되고, 이때 접합된 단백질-항체 복합체가 약 5 nM 미만의 Glut1 택멘 어세이에서 EC₅₀ 효능을 갖도록 제 1 및 제 2 연결기는 동일하거나 상이하다.

일부 실시양태에서, Glut1 택멘 어세이에서 EC₅₀ 효능은 약 4 nM 미만이다. 일부 실시양태에서, Glut1 택멘 어세이에서 EC₅₀ 효능은 약 3 nM 미만이다. 일부 실시양태에서, Glut1 택멘 어세이에서 EC₅₀ 효능은 약 2 nM 미만이다. 일부 실시양태에서, Glut1 택멘 어세이에서 EC₅₀ 효능은 약 1 nM 미만이다.

[0216] 일부 실시양태에서, 접합된 단백질-항체 복합체는 2개 이상의 유리한 장점, 예컨대 SC 반감기, IV 반감기, 글루코스 흡수, 효능, 생물학적 이용가능성, 제조의 용이성, 접합 효율, 생체내 안정성, 생체외 안정성, 가수분해에 대한 내성, 및 항체, 연결기 및 단백질 사이의 호환성을 혼합한다.

[0217] 일부 양태에서, 본 발명은 서열번호 1의 넘버링에 따라 잔기 수 171에 위치된 연결 잔기에서 하나 이상의 반감기-증가 잔기에 공유적으로 연결된 FGF21 분자를 포함하는 조성물을 제공한다. 일부 양태에서, FGF21 분자는 하나의 반감기-증가 잔기에 공유적으로 연결된다. 일부 양태에서, FGF21 분자는 하나 초과의 반감기-증가 잔기에 공유적으로 연결된다. 일부 양태에서, 연결 잔기는 잔기 수 79, 129 및 171로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일부 양태에서, 연결 잔기는 위치 171이다. FGF21 분자는 서열번호 73을 포함할 수 있다. FGF21 분자는 서열번호 74를 포함할 수 있다. FGF21 분자는 서열번호 75를 포함할 수 있다. 용어 "반감기-증가 잔기"는 FGF21 분자에 연결된 경우, FGF21 분자의 순환 반감기를 증가시키고/시키거나 FGF21 분자의 신장 청정(renal clearance)을 억제시키거나 감소시키는 임의의 분자를 지칭한다. 반감기-증가 잔기의 예는 PEG, mPEG, 포스포릴클로린 함유 중합체, Fc 도메인, Fab, Fab', F(ab')₂, F_v, dsF_v, scF_v, V_H, V_L, 다이아바디, 미니바디, 항체, 촉매 항체(하기 기재됨), 단백질(예컨대, 알부민), 및 당해 분야에 공지된 다른 매크로분자를 포함한다.

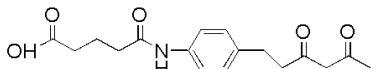
항체

[0218] 측정가능한 수치 변수와 관련하여 사용된 경우, "약" 또는 "대략"은 지시된 값의 실험적인 오차 이내(예컨대, 평균에 대하여 95% 신뢰 구간 이내) 또는 지시된 값의 10% 이내인, 더 큰쪽의, 변수의 지시된 값 및 모든 값을 지칭한다.

[0219] "항체"는 면역글로불린 분자의 가변 영역에 위치된 하나 이상의 항원 인식 부위를 통해 표적, 예컨대 카보하이드레이트, 폴리뉴클레오티드, 지질, 폴리펩티드 등에 특이적으로 결합할 수 있는 면역글로불린 분자이다. 본원에 사용된 용어 "항체"는 온전한 다클론 또는 단클론 항체뿐만 아니라, 임의의 항원 결합 단편(즉, "항원 결합 부분") 또는 이의 단일 쇄, 항체를 포함하는 융합 단백질, 및 예를 들어, 비제한적으로 scFv, 단일 도메인 항체(예컨대, 샤크 및 카멜리드 항체), 맥시바디, 미니바디, 인트라바디, 다이아바디, 트라이아바디, 테트라바디, vNAR 및 비스scFv를 포함하는 항원 인식 부위를 포함하는 면역글로불린 분자의 임의의 다른 개질된 배치를 포괄한다(예컨대, 문헌[Hollinger and Hudson, 2005, Nature Biotechnology 23(9): 1126-1136] 참조). 항체는 임의의 유형의 항체, 예컨대 IgG, IgA, 또는 IgM (또는 이의 하위부류), 및 임의의 특정한 부류일 필요없는 항체를 포함한다. 이의 중쇄의 불변 영역의 항체 아미노산 서열에 따라, 면역글로불린은 상이한 유형으로 할당될 수 있다. 5개의 주요 부류의 면역글로불린, 즉, IgA, IgD, IgE, IgG 및 IgM이 있고, 이를 중 다수는 하위유형(이소타입), 예를 들어 IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 및 IgA2로 추가로 나눌 수 있다. 면역글로불린의 상이한 부류에 상응하는 중쇄 불변 영역은 각각 α , δ , ϵ , γ 및 μ 로 불린다. 면역글로불린의 상이한 부류의 하위단위 구조 및 3차원 배치는 널리 공지되어 있다.

- [0221] 2가지 유형의 인간 경쇄 불변 영역이 공지되어 있다: 람다(CL-λ) 및 카파(CL-κ). 위치 46에서 다형체 V/A 및 위치 84에서 A/L(서열번호 78에 따른 넘버링)에 근거하여 3개의 CL-κ 변이체가 공지되어 있다. 3개의 확인된 CL-κ 다형체는 Km(1):V⁴⁶/L⁸⁴, Km(1,2):A⁴⁶/L⁸⁴ 및 Km(3):A⁴⁶/V⁸⁴이다. 따라서, 본 발명의 항체는 5, 4, 3, 2 또는 1개 이하의 아미노산 삽입, 치환 또는 결실을 포함하는 서열번호 78, 79, 80 또는 81, 또는 이의 변이체 중 임의의 하나에 따라 불변 κ 도메인을 포함할 수 있다. 일부 카운팅 방법에 의해 서열번호 78, 79, 80 및 81의 잔기 R¹이 가변 도메인에 포함될 수 있고, 따라서 불변 도메인이 또한 상기 서열의 잔기 T²로부터 시작하는 것으로서 간주될 수 있음이 당업자에 의해 이해된다.
- [0222] 본원에 사용된 용어 항체의 "항원 결합 부분"은 주어진 항원(예컨대, 표적 X)에 특이적으로 결합하는 능력을 보유하는 온전한 항체의 하나 이상의 단편을 지칭한다. 항체의 항원 결합 작용은 온전한 항체의 단편에 의해 수행될 수 있다. 용어 항체의 "항원 결합 부분"에 포함된 결합 단편의 예는 Fab; Fab'; F(ab')₂; VH 및 CH1 도메인으로 이루어진 Fd 단편; 항체의 단일 암의 VL 및 VH 도메인으로 이루어진 Fv 단편; 단일 도메인 항체(dAb) 단편(문헌[Ward et al., 1989 Nature 341:544-546]), 및 단리된 상보성 결정 영역(CDR)을 포함한다.
- [0223] 항체의 "가변 영역"은 단독으로 또는 조합으로 항체 경쇄의 가변 영역 또는 항체 중쇄의 가변 영역을 지칭한다. 당해 분야에 공지된 바와 같이, 중쇄 및 경쇄의 가변 영역은 각각 항체의 항원 결합 부위의 형성에 기여하는, 초가변 영역으로서도 공지된 3개의 상보성 결정 영역(CDR)에 의해 연결된 4개의 구조형성 영역(FR)으로 이루어진다. 개체 가변 영역의 변이체가 CDR 영역의 외부 아미노산 잔기에서(즉, 구조형성 영역에서) 치환되는 것이 특히 바람직한 경우, 적절한 아미노산 치환, 바람직하게는 보존적인 아미노산 치환은 개체 가변 영역을 개체 가변 영역으로서 동일한 표준 부류에서 CDR1 및 CDR2 서열을 함유하는 다른 항체의 가변 영역과 비교함으로써 확인될 수 있다(문헌[Chotia and Lesk, J Mol Biol 196(4): 901-917, 1987]). 개체 CDR 측면, 예를 들어 인간화 또는 최적화된 항체에 FR을 선택하는 경우, 동일한 표준 부류에서 CDR1 및 CDR2 서열을 함유하는 항체로부터의 FR이 바람직하다.
- [0224] 가변 도메인의 "CDR"은 카밧(Kabat), 초티아(Chothia)의 정의, 카밧 및 초티아 둘다의 자극, AbM, 접촉 및/또는 형태 정의 또는 당해 분야에 널리 공지된 임의의 CDR 측정 방법에 따라 확인된 가변 영역 내의 아미노산 잔기이다. 항체 CDR은 카밧 등에 의해 정의된 원래의 초가변 영역으로서 확인될 수 있다. 예를 들어, 문헌[Kabat et al., 1992, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th ed., Public Health Service, NIH, Washington D.C]을 참조한다. 또한, CDR의 위치는 초티아 등에 의해 기재된 원래의 구조적 루프 구조로서 확인될 수 있다. 예를 들어, 문헌[Chothia et al., 1989, Nature 342:877-883]을 참조한다.
- [0225] CDR을 확인하기 위한 다른 접근법은 "AbM 정의"를 포함하고, 이는 카밧과 초티아 사이의 중간물이고, 옥스포드 몰레큘라(Oxford Molecular) AbM 항체 모델링 소프트웨어(현재 아셀리스(Accelrys: 등록상표))를 사용하여 유도되거나, CDR의 "접촉 정의"는 문헌[MacCallum et al., 1996, J. Mol. Biol., 262:732-745]에 제시된 관찰된 항원 접촉에 근거한다. 또 다른 접근법에서, CDR의 "형태 정의"로서 본원에 언급된 CDR의 위치는 항원 결합에 엔탈피 기여를 만드는 잔기로서 확인될 수 있다. 예를 들어, 문헌[Makabe et al., 2008, Journal of Biological Chemistry, 283:1156-1166]을 참조한다. 여전히 또 다른 CDR 경계 정의는 상기 접근법 중 하나를 엄격하게 따르지 않지만, 특정한 잔기 또는 잔기의 군 또는 심지어 항원 결합에 유의한 영향을 주지 않는 전체 CDR을 발견하는 예전 또는 실험에 비추어 단축되거나 연장될 수 있을지라도, 카밧 CDR의 적어도 일부와 중첩될 수 있다. 본원에 사용된 바와 같이, CDR은 접근법의 조합을 포함하여 당해 분야에 공지된 임의의 접근법에 의해 정의된 CDR을 지칭할 수 있다. 본원에 사용된 방법은 임의의 이러한 접근법에 따라 정의된 CDR을 이용할 수 있다. 하나 초과의 CDR을 함유하는 임의의 주어진 실시양태에 대하여, CDR은 임의의 카밧, 초티아, 연장된 정의, AbM, 접촉, 및/또는 형태 정의에 따라 정의될 수 있다.
- [0226] 미국특허 제 2006205670 호의 내용은 참고로서 본원에 흔입되었다. 미국특허 제 2006205670 호는 본원에 직접적으로 적용가능한 다수의 조성물 및 기법을 기재하고, 특히 문단 [0153] 내지 [0233]에 항체, 유용한 단편 및 변이체 및 이의 변형, 결합 부위 및 CDR, 항체 제조, 발현, 인간화, 아미노산 개질, 글리코실화, ADCC, CDC, 항체의 혈청 반감기의 증가, 발현 벡터, 포유류 숙주 시스템, 및 항체 기법의 다른 요소 사이의 풀딩을 기술한다.
- [0227] 본원에 사용된 "결합 부위"(또한 항체 결합 부위로서 공지됨)는 적절한 항원(또는 구조적으로 유사한 단백질)의 결정인자와 결합하는(또는 결합할 수 있는) 면역글로불린 또는 Ig 도메인의 영역을 지칭한다. 용어는 통상적으로 CDR 및 항원 결합에 수반되는 인접한 프레임워크 잔기를 포함한다.

[0228] 본원에 사용된 "알돌라아제 항체"는 (예를 들어 접합에 의해) 방해 없는 경우 지방족 케톤 공여체와 알데하이드 수용체 사이의 알돌 첨가 반응을 촉매화하는 결합 부위 일부를 함유하는 항체를 지칭한다. 알돌라아제 항체는 하기 화학식의 1,3-다이케톤 헵텐을 담체 단백질과 커플링시키는 단계를 포함하는 면역-반응성 동물을 면역원으로 면역함으로써 생성될 수 있고:



[0229]

[0230] 또한, 항체의 결합 부위에 반응성 ϵ -아미노 기를 갖는 리신을 갖는 것을 특징으로 한다. 또한, 알돌라아제 항체는 1,3-다이케톤 헵텐과 촉매 항체의 리신의 ϵ -아미노 기 사이에 복합체를 형성함으로써 대상체를 1,3-다이케톤 헵텐으로 억제하는 이의 촉매 활성을 특징으로 한다.

[0231]

논의된 바와 같이, 특정 실시양태에서, 본 발명의 화합물과 함께 사용될 수 있는 특정 항체는 항체 결합 부위에 반응성 측쇄를 필요로 할 수 있다. 반응성 측쇄는 천연적으로 존재할 수 있거나, 돌연변이에 의해 항체에 발생할 수 있다. 항체 결합 부위의 반응성 잔기는, 예컨대 잔기가 항체를 제조하는 것으로 먼저 확인된 럼프 세포에 존재하는 핵산에 의해 암호화되는 경우, 항체와 회합될 수 있다. 다르게는, 아미노산 잔기는 특정한 잔기를 암호화하도록 DNA를 고의로 돌연변이화하여 발생할 수 있다(예컨대, 국제특허출원공개 제 01/22922 호). 반응성 잔기는 예를 들어, 본원에 논의된 바와 같은 독특한 코돈, tRNA 및 아미노아실-tRNA를 사용하여 생합성적 혼입에 대하여 일어나는 비자연적 잔기일 수 있다. 또 다른 접근법에서, 아미노산 잔기 또는 이의 반응성 작용기(예컨대, 친핵성 아미노 기 또는 설프하이드릴 기)는 항체 결합 부위에서 아미노산 잔기에 부착될 수 있다. 따라서, 본원에 사용된 "항체의 결합 부위에서 아미노산 잔기를 통해" 발생하는 항체와의 공유 결합은 항체 결합 부위의 아미노산 잔기에 직접적일 수 있거나 항체 결합 부위의 아미노산 잔기의 측쇄에 연결된 화학 잔기를 통해서 할 수 있는 연결을 의미한다. 일부 실시양태에서, 아미노산은 시스테인이고, 측쇄의 반응성 기는 설프하이드릴 기이다. 다른 실시양태에서, 아미노산 잔기는 리신이고, 측쇄의 반응성 기는 ϵ -아미노 기이다. 일부 실시양태에서, 아미노산은 카밧 넘버링에 따라 중쇄 상의 Lys93이다. 일부 실시양태에서, 아미노산은 HC h38C2 상의 Lys99이다(서열번호 26).

[0232]

촉매 항체는 하나 이상의 반응성 아미노산 측쇄를 포함하는 적합한 결합 부위를 갖는 항체의 하나의 공급원이다. 상기 항체는 알돌라아제 항체, β -락타마아제 항체, 에스테라아제 항체 및 아미다아제 항체를 포함한다.

[0233]

일 실시양태는 알돌라아제 항체, 예컨대 마우스 단클론 항체 mAb 33F12 및 mAb 38C2, 뿐만 아니라 상기 항체의 적합한 키메릭 버전 및 인간화된 버전(예컨대, h38C2, 서열번호 25 및 26)을 포함한다. 마우스 mAb 38C2 (및 h38C2)는 반응성 리신 근처에 있지만 HCDR3 외부에 있고, 반응성 면역 및 기계적인 모방 천연 알돌라아제 효소에 의해 생성된 신규한 부류의 촉매 항체의 원형이다. 문헌[C.F. Barbas 3rd et al., Science 278:2085-2092(1997)]을 참조한다. 사용될 수 있는 다른 알돌라아제 촉매 항체는 ATCC 수탁 번호 PTA-1015를 갖는 하이브리도마 85A2; ATCC 수탁 번호 PTA-1014를 갖는 하이브리도마 85C7; ATCC 수탁 번호 PTA-1017를 갖는 하이브리도마 92F9; ATCC 수탁 번호 PTA823을 갖는 하이브리도마 93F3; ATCC 수탁 번호 PTA824를 갖는 하이브리도마 84G3; ATCC 수탁 번호 PTA-1018을 갖는 하이브리도마 84G11; ATCC 수탁 번호 PTA-1019를 갖는 하이브리도마 84H9; ATCC 수탁 번호 PTA825를 갖는 하이브리도마 85H6; 또는 ATCC 수탁 번호 PTA-1016을 갖는 하이브리도마 90G8에 의해 생성된 항체를 포함한다. 반응성 리신을 통해, 이들 항체는 천연 알돌라아제의 엔아민 메카니즘을 사용하여 알돌 및 레트로-알돌 반응을 촉진한다. 알돌라아제 항체 및 알돌라아제 항체의 생성 방법은 미국특허 제 6,210,938 호, 제 6,368,839 호, 제 6,326,176 호, 제 6,589,766 호, 제 5,985,626 호 및 제 5,733,75 호에 시작되어 있고, 이는 참고로서 본원에 혼입되었다.

[0234]

또한, 본 발명의 화합물은 본 발명의 화합물을 반응성 시스테인에 연결함으로써, 예컨대 티오에스테라아제 및 에스테라아제 촉매 항체의 결합 부위에서 발견된 것에 의해 형성될 수 있다. 적합한 티오에스테라아제 촉매 항체는 문헌[K.D. Janda et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 91:2532-2536(1994)]에 기재되어 있다. 적합한 에스테라아제 항체는 문헌[P. Wirsching et al., Science 270:1775-1782(1995)]에 기재되어 있다. 반응성 아미노산-함유 항체는 당해 분야에 널리 공지된 방식, 예컨대 반응성 아미노산에 대하여 암호화하기 위해 항체 결합 부위 잔기를 돌연변이시키거나, 항체 결합 부위에서 아미노산 측쇄를 반응성 기를 함유하는 연결기로 화학적으로 유도체화함으로써 제조될 수 있다.

[0235]

항체는 인간화된 항체일 수 있다. 본 발명의 화합물이 항체의 결합 부위에 공유적으로 연결되고, 상기 항체가

인간화된 경우, 상기 항체가 Z기에 대한 높은 연결 친화성을 보유하여 인간화되는 것은 중요하다. 다양한 형태의 인간화된 뮤린 알돌라아제 항체가 고려된다. 일 실시양태는 인간 불변 도메인 C_k 및 C_{y11}을 갖는 인간화된 알돌라아제 촉매 항체 h38c2 IgG1 또는 h38c2 Fab를 사용한다. 문현[C. Rader *et al.*, *J. Mol. Bio.* 332:889-899(2003)]은 h38c2 Fab 및 h38c2 IgG1을 생성하기 위해 사용될 수 있는 유전자 서열 및 백터를 시작한다. 인간 생식계열 V_k 유전자 DPK-9 및 인간 J_k 유전자 JK4는 m38c2의 κ 경쇄 가변 도메인의 인간화를 위한 프레임워크로서 사용되었고, 인간 생식계열 유전자 DP-47 및 인간 J_H 유전자 JH4는 m38c2의 중쇄 가변 도메인의 인간화를 위한 프레임워크로서 사용되었다. 도 1은 m38c2, h38c2 및 인간 생식계열에서 가변 경쇄와 중쇄 사이의 서열 정렬을 예시한다. h38c2는 이의 임의의 동종이인자형을 포함하는 IgG1, IgG2, IgG3 또는 IgG4 불변 도메인을 이용할 수 있다. 항체가 G1m(f) 동종이인자형을 갖는 h38c2 IgG1인 본 발명의 화합물의 특정 실시양태에서, Z는 중쇄의 위치 99에서 리신 잔기의 측쇄에 결합한다. 또 다른 실시양태는 h38c2의 가변 도메인(V_L 및 V_H)(서열번호 27 및 28), 및 IgG1, IgG2, IgG3 또는 IgG4로부터의 불변 도메인을 포함하는 키메릭 항체를 사용한다. 항체는 전장 항체, Fab, Fab', F(ab')₂, F_v, dsF_v, scF_v, V_H, V_L, 다이아바디 또는 미니바디일 수 있다. 항체는 전장 항체일 수 있고, IgG1, IgG2, IgG_{2Δa}, IgG3, IgG4, IgG_{4Δb}, IgG_{4Δc}, IgG₄ S228P, IgG_{4Δb} S228P 및 IgG_{4Δc} S228P로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있다. 항체 또는 이의 항원 결합 부분은 h38c2로부터의 V_H 및 V_L 도메인을 포함할 수 있다. 항체는 h38c2로부터의 V_L 및 V_H 도메인, 및 IgG1, IgG2, IgG_{2Δa}, IgG3, IgG4, IgG_{4Δb}, IgG_{4Δc}, IgG₄ S228P, IgG_{4Δb} S228P 및 IgG_{4Δc} S228P로 이루어진 군으로부터 선택된 불변 도메인을 포함하는 항체일 수 있다. 항체는 h38C2 IgG1(서열번호 25 및 26)일 수 있다. 항체는 h38C2 IgG2(서열번호 25 및 76)일 수 있다. 항체는 인간 IgG, IgA, IgM, IgD 또는 IgE 항체로부터의 불변 영역을 포함하는 뮤린 알돌라아제 항체의 인간화된 버전일 수 있다. 또 다른 실시양태에서, 항체는 뮤린 알돌라아제 항체로부터의 V_L 및 V_H 영역, 및 인간 IgG, IgA, IgM, IgD 또는 IgE 항체로부터의 불변 영역을 포함하는 키메릭 항체일 수 있다. 일부 실시양태에서, 항체는 m38C2로부터의 V_L 및 V_H 영역(서열번호 29 및 30)을 포함한다. 추가 실시양태에서, 항체는 천연 또는 네이티브 인간 IgG, IgA, IgM, IgD 또는 IgE 항체로부터의 폴리펩티드 서열을 포함하는 뮤린 알돌라아제 항체의 완전 인간 버전이다. 일부 양태에서, 항체는 서열번호 27에 나타낸 V_L 서열의 V_L CDR1, V_L CDR2 및 V_L CDR3을 포함하는 경쇄 가변 영역(V_L); 및 서열번호 28에 나타낸 V_H 서열의 V_H CDR1, V_H CDR2 및 V_H CDR3을 포함하는 중쇄 가변 영역(V_H)을 포함할 수 있다. 상기 요약된 바와 같이, CDR은 당해 분야에 공지된 다수의 방법에 의해 결정될 수 있다.

[0236]

일부 양태에서, 항체는 서열번호 25와 95% 이상 동일한 경쇄 및 서열번호 26과 95% 이상 동일한 중쇄를 포함한다. 경쇄는 서열번호 25와 96% 이상 동일할 수 있다. 경쇄는 서열번호 25와 97% 이상 동일할 수 있다. 경쇄는 서열번호 25와 98% 이상 동일할 수 있다. 경쇄는 서열번호 25와 99% 이상 동일할 수 있다. 중쇄는 서열번호 26과 96% 이상 동일할 수 있다. 중쇄는 서열번호 26과 97% 동일할 수 있다. 중쇄는 서열번호 26과 98% 동일할 수 있다. 중쇄는 서열번호 26과 99% 동일할 수 있다. 일부 양태에서, 경쇄는 하나의 아미노산에 의해 서열번호 25와 상이할 수 있다. 일부 양태에서, 중쇄는 하나의 아미노산에 의해 서열번호 26과 상이할 수 있다. 일부 양태에서, 경쇄와 서열번호 25 사이의 차이는 단지 불변 영역에서 위치될 수 있다. 일부 양태에서, 중쇄와 서열번호 26 사이의 차이는 단지 불변 영역에서 위치될 수 있다.

[0237]

또한, 다양한 형태의 인간화된 알돌라아제 항체 단편이 고려된다. 일 실시양태는 h38c2 F(ab')₂를 사용한다. h38c2 F(ab')₂는 h38c2 IgG1의 단백질 가수분해 소화작용에 의해 생성될 수 있다. 또 다른 실시양태는 간접 연결기(Gly₄Ser)₃(서열번호 31)에 의해 임의적으로 연결된 h38c2로부터의 V_L 및 V_H 도메인을 포함하는 h38c2 scFv를 사용한다. 인간화에 대안으로서, 인간 항체를 생성할 수 있다. 예를 들어, 내인성 면역글로불린 생성이 없을 때에 인간 항체의 전체 레퍼토리를 생성하도록 면역시 (또는 촉매 항체의 경우 반응성 면역시), 가능한 유전자 이식 동물(예컨대, 마우스)을 생성할 수 있다.

[0238]

다르게는, 파지 디스플레이 기술이 비면역된 기증자로부터 면역글로불린 가변(V) 도메인 유전자 레퍼토리를 사용하여 생체외 인간 항체 및 항체 단편을 생성하도록 사용될 수 있다. 상기 나타낸 바와 같이, 인간 항체는 또한 생체외 활성화된 B 세포에 의해 생성될 수 있고, 예를 들어, 미국특허 제 5,567,610 호 및 제 5,229,275 호를 참조한다.

- [0239] 본원에 기재된 항체의 아미노산 서열 개질이 고려된다. 예를 들어, 이는 항체의 결합 친화성 및/또는 다른 생물학적 특성을 개선하기 위해 바람직할 수 있다. 항체의 아미노산 서열 변이체는 항체 핵산내에 적절한 뉴클레오티드 변화를 도입하거나, 웨티드 합성에 의해 제조된다. 상기 개질은 예를 들어, 항체의 아미노산 서열 내의 잔기로부터의 결실 및/또는 잔기 내로의 삽입 및/또는 잔기의 치환을 포함한다. 결실, 삽입 및 치환의 임의의 조합은 최종 구성물에 도달하기 위해 제조되고, 최종 구성물은 목적한 특징을 가지고 제공된다. 또한, 아미노산 변화는 항체의 번역 후 공정, 예컨대 글리코실화 부위의 수 또는 위치를 변경할 수 있다.
- [0240] 본 발명의 항체 또는 항체 부분은 또 다른 문자(예컨대, 또 다른 웨티드 또는 단백질)에 유도체화되거나 연결될 수 있다. 일반적으로, 항체 또는 이의 부분은 항체 조합에 공유적으로 접합하기 위한 연결기의 능력이 유도체화 또는 표지화에 의해 부정적인 영향을 받지 않도록 유도체화된다. 따라서, 본 발명의 항체 및 항체 부분은 본원에 기재된 항체의 온전한 형태 및 개질된 형태 둘다를 포함하도록 의도된다. 예를 들어, 본 발명의 항체 또는 항체 부분은 하나 이상의 다른 문자 개체, 예컨대 또 다른 항체(예컨대, 이중특이성 항체 또는 다이아바디), 검출제, 세포독성제, 약제, 및/또는 항체 또는 항체 부분과 또 다른 문자(예컨대 스트렙타비딘 코어 영역 또는 폴리히스티딘 태그)의 회합을 매개할 수 있는 단백질 또는 웨티드에 (화학적 커플링, 유전적 융합, 비공유결합 회합 또는 그 반대에 의해) 작용적으로 연결될 수 있다.
- [0241] 다른 실시양태에서, 본 발명의 항체 또는 이의 항원 결합 부분은 융합 항체 또는 또 다른 폴리웨티드에 연결된 항체일 수 있다. 일부 양태에서, 항체의 가변 영역만이 폴리웨티드에 연결된다. 일부 양태에서, 항체는 결합 부위의 결합능을 방해하지 않는 그러한 방식으로 웨티드에 공유적으로 접합된다.
- [0242] 폴리웨티드는 치료제, 예컨대 표적제, 웨티드, 단백질 작용제, 단백질 길항제, 대사 조절제, 호르몬, 독소, 성장 인자 또는 다른 조절 단백질일 수 있거나, 진단 시약, 예컨대 용이하게 시각화할 수 있는 효소, 예컨대 겨자무 과산화효소일 수 있다. 게다가, 융합 항체는 2개(또는 이상)의 단일-쇄 항체가 서로에게 연결되게 생성될 수 있다. 이는 하나가 단일 폴리웨티드 쇄 상에 2가 또는 다가 항체를 생성하길 원하는 경우, 또는 하나가 이중특이성 항체를 생성하길 원하는 경우 유용하다.
- [0243] 한가지 유형의 유도체화된 항체는 (예컨대, 이중특이성 항체를 생성하기 위한 동일한 유형 또는 상이한 유형의) 2개 이상의 항체를 교차결합하여 제조된다. 적합한 교차연결기는 적절한 스페이서(예컨대, m-말레이이미도벤조일-N-하이드록시숙신이미드 에스터) 또는 동일이작용성(예컨대, 다이숙신이미딜 수버레이트)에 의해 분리된 2개의 별개의 반응성 기를 갖는 헤테로이작용성인 것을 포함한다.
- [0244] 또 다른 유형의 유도체화된 항체는 표지된 항체이다. 본 발명의 항체 및 항체 일부가 유도체화될 수 있는 유용한 검출제는 형광 화합물, 예컨대 플루오레세인, 플루오레세인 이소티오시아네이트, 로다민, 5-다이메틸아민-1-나프탈렌설폰일 클로라이드, 피코에리트린, 란탄계 인광체 등을 포함한다. 또한, 항체는 검출에 유용한 효소, 예컨대 겨자무 과산화효소, 갈락토시다아제, 루시페라아제, 알칼리 포스파타아제, 글루코스 옥시다아제 등으로 표지될 수 있다. 항체가 검출가능한 효소로 표지된 경우, 효소가 식별될 수 있는 반응 생성물을 생성하기 위해 사용하는 추가 시약을 첨가하여 검출된다. 예를 들어, 겨자무 과산화효소 시약이 존재하는 경우, 과산화수소 및 다이아미노벤자린의 첨가는 검출가능한 유색 반응 생성물을 야기한다. 또한, 항체는 바이오틴으로 표지될 수 있고, 아비딘 또는 스트렙타비딘 결합의 간접적인 측정을 통해 검출될 수 있다. 항체는 자기 작용제, 예컨대 가돌리늄으로 표지될 수 있다. 또한, 항체는 2차 리포터(예컨대, 류신 지퍼 쌍 서열, 2차 항체에 대한 결합 부위, 금속 결합 도메인, 에피토프 태그)에 의해 인지된 예정된 폴리웨티드 에피토프로 표지될 수 있다. 일부 실시양태에서, 표지는 다양한 길이의 스페이서 암에 부착되어 잠재적인 입체 장애를 감소시킨다.
- [0245] 또한, 항체는 화학 기, 예컨대 폴리에틸렌 글리콜(PEG), 메틸 또는 에틸 기, 또는 카보하이드레이트 기로 유도체화될 수 있다. 이러한 기는 항체의 생물학적 특성의 개선, 예를 들어 혈청 반감기를 증가시키거나 조직 결합을 증가시키는데 유용할 수 있다.
- [0246] **접합 방법**
- [0247] 본 발명은 하기 화학식 1-1의 화합물의 제조 방법을 제공한다:
- [화학식 1-1]
- [FGF21-제 1 연결기]₁-[Ab]-[제 2 연결기]-Ex4]₁
- [0250] 상기 식에서,

- [0251] FGF21은 FGF21 동족체이고;
- [0252] Ex4는 엑센딘 4 동족체이고;
- [0253] Ab는 알돌라아제 촉매 항체 또는 이의 항원 결합 부분이고;
- [0254] 제 1 연결기는 FGF21에서 단백질 연결 잔기의 측쇄 및 항체의 결합 부위에 공유적으로 부착되고;
- [0255] 제 2 연결기 Ex4에서 펩티드 연결 잔기의 측쇄 및 항체의 결합 부위에 공유적으로 부착되고,
- [0256] 상기 제 1 및 제 2 연결기는 동일하거나 상이하다.
- [0257] 일 실시양태에 따라, 본 발명은 하기 단계를 포함하는 방법을 제공한다:
- [0258] (i) 약 1:4 내지 약 1:1의 비로 FGF21 및 제 1 연결기를 함께 혼합하여 복합체 [FGF21-제 1 연결기]를 형성하는 단계;
- [0259] (ii) 약 1.1:1 내지 약 1:5의 비로 [FGF21-제 1 연결기] 및 Ab를 함께 혼합하여, [Ab], [Ab]-[FGF21-제 1 연결기]₁ 및 [Ab]-[FGF21-제 1 연결기]₂를 함유하는 혼합물을 형성하는 단계;
- [0260] (iii) 상기 단계 (ii)에서 형성된 혼합물로부터 [Ab]-[FGF21-제 1 연결기]₁ 분자를 추출하는 단계;
- [0261] (iv) 약 2:1 내지 약 1:2의 비로 Ex4 및 제 2 연결기를 함께 혼합하여 복합체 [제 2 연결기-Ex4]를 형성하는 단계; 및
- [0262] (v) 약 2:1 내지 약 1:2의 비로 [Ab]-[FGF21-제 1 연결기]₁과 [제 2 연결기-Ex4]를 혼합하여, [FGF21-제 1 연결기]₁-[Ab]-[제 2 연결기-Ex4]₁을 함유하는 혼합물을 형성하는 단계.
- [0263] **FGF21과 제 1 연결기의 접합**
- [0264] 일부 실시양태에서, FGF21 동족체는 pH 약 7에서 약 20 mM 트리스, 약 50 mM NaCl에서 제공된다. 일부 실시양태에서, FGF21 동족체는 pH 약 6.5에서 약 25 mM MES에서 제공된다. 일부 실시양태에서, 트리스(2-카복시에틸)포스핀(TCEP)은 FGF21과 비교하여 최종 농도 0.1X 내지 10X 배로 첨가될 수 있다(0.5X 및 0.75X는 특히 잘 작용하는 것으로 보여짐). 이는 대략 75% 이상의 단백질이 단량체 형태로 존재하도록 FGF21 Δ H-A129C를 이량체화하는 경향을 최소화하는 장점을 갖는다. 단백질이 이량체화된 경우, TCEP는 이를 단량체로 다시 갤 것이다. TCEP를 제외하고, 0.1X 내지 10X 농도에서 머캅토에탄올(β-ME) 또는 디아티오토레이톨(DTT)은 이량체를 단량체로 깨기 위해 사용될 수 있다. 또한, 시약, 예컨대 β-머캅토에탄올(β-ME) 또는 디아티오토레이톨(DTT)은 FGF21과 반응하여 티올 황과 공유 결합을 형성하고, TCEP는 FGF21과 공유 결합을 형성하지 않는다. 다른 시약, 예컨대 테트라키스-하이드록시메틸 포스포늄 클로라이드 및 트리스다이에틸아미노메틸 포스핀은 이황화를 용이하게 환원시킬 수 있고 이량체를 단량체로 환원시키기에 유용할 수 있다. 일부 실시양태에서, 제 1 연결기는 약 10 mM의 농도에서 약 100% DMSO에 제공된다.
- [0265] 일부 양태에서, FGF21 및 제 1 연결기는 약 실온에서 약 30분 동안 온화하게 스월링(swirling)하면서 항온처리함으로써 함께 접합될 수 있다. [FGF21-제 1 연결기] 복합체는, 과량의 연결기가 제바(Zeba) 컬럼 수지에 남도록 미리 평형시킨 제바 컬럼을 통해 혼합물을 용리함으로써 수득될 수 있다.
- [0266] FGF21과 제 1 연결기의 접합은 약 1:1 내지 약 1:4의 비로 수행될 수 있다. 일부 실시양태에서, FGF21과 제 1 연결기 사이의 접합은, 하한치가 약 1:1, 약 1:1.25, 약 1:1.5, 약 1.75 및 약 1:2로 이루어진 군으로부터 선택되고, 상한치가 약 1:2, 약 1:2.25, 약 1:2.5, 약 1:2.75, 약 1:3, 약 1:3.5 및 약 1:4로 이루어진 군으로부터 선택된 비의 범위에서 수행될 수 있다. 일부 양태에서, 연결기의 양은 FGF21과 비교하여 기초 당량을 초과하여 약 2 내지 약 4배 증가될 수 있다. 제 1 연결기의 증가된 양은 접합시간을 더 신속히 처리하도록 도울 수 있다. 그러나, 약 4배 초과의 과잉 연결기를 첨가하는 것은 생성물 형성 또는 반응 시간에 임의의 추가 증가를 생성하지 않는다. 제 1 연결기의 약 2배 과잉으로 FGF21-연결기 물질을 제공하는 것이 바람직하다. 제 1 연결기의 양이 1 당량 미만으로 감소하는 것은 생성물 형성의 감소된 양을 야기한다. 연결기의 양은 약 0.9 당량, 약 0.8 당량 및 0.7 당량 등까지 떨어짐으로써, 형성된 생성물의 양은 감소한다. FGF21 및 제 1 연결기의 비가 약 1:1 내지 약 1:2인 경우 가장 많은 양의 생성물이 형성된다.
- [0267] **항체와 [FGF21-제 1 연결기]의 접합**

- [0268] 일부 양태에서, [FGF21-제 1 연결기]는 약 0°C 내지 37°C, 바람직하게는 약 4°C 내지 약 실온의 온도에서 약 5.5 내지 약 7.5, 또는 약 6.0 내지 약 7.0의 pH 범위를 갖는 약 25 mM 내지 약 150 mM 농도의 MES 또는 포스페이트 완충액에서 항체에 접합된다. 일부 양태에서, [FGF21-제 1 연결기]는 실온에서 약 6.0 내지 약 6.5의 pH 범위를 갖는 100 mM 포스페이트 완충액에서 항체에 접합된다. [FGF21-제 1 연결기]는 30분 이상, 약 60분 이상, 약 90분 이상, 약 2시간 이상, 약 3시간 이상, 약 4시간 이상, 약 6시간 이상, 약 12시간 이상, 약 18시간 이상 및 약 24시간 이상으로 이루어진 군으로부터 선택된 시간 동안 수행된 반응에서 항체에 접합될 수 있다.
- [0269] **Ab-[FGF21-제 1 연결기] 추출**
- [0270] 일부 양태에서, 역상 크로마토그래피에 의해 상기 단계 (ii)에서 형성된 혼합물로부터 Ab-[FGF21-제 1 연결기]₁ 분자를 추출하는 것이 유리하다. 부분적으로, 본 발명은 역상 크로마토그래피의 놀라운 적용에 기초하여 높은 순도에서 Ab-[FGF21-제 1 연결기]₁을 단리한다.
- [0271] 일부 양태에서, 역상 크로마토그래피는 소수성 상호작용 크로마토그래피(hydrophobic interaction chromatography; HIC) 부틸 컬럼 상에서 수행된다. HIC 수지는 전형적으로 부틸 리간드(-OCH₂CH₂CH₂CH₃)에 공유적으로 부착된 (예를 들어 하이드록실화된 메틸아크릴화된 중합체의) 비드를 포함한다. 일부 양태에서, 본 발명은 부틸 컬럼 상에서 역상 크로마토그래피에 의해 비접합된 항체, 비접합된 [FGF21-제 1 연결기], Ab-[FGF21-제 1 연결기]₁, 및 Ab-[FGF21-제 1 연결기]₂의 혼합물로부터 Ab-[FGF21-제 1 연결기]₁을 추출하기 위한 방법을 제공한다.
- [0272] 컬럼 비드의 입자 크기는 약 50 μM 미만일 수 있다. 컬럼 비드의 입자 크기는 약 40 μM 미만일 수 있다. 컬럼 비드의 입자 크기는 약 50 μM 내지 약 20 μM 일 수 있다. 컬럼 비드의 입자 크기는 약 40 μM 내지 약 30 μM 일 수 있다. 컬럼 비드의 입자 크기는 약 35 μM 일 수 있다. 일부 양태에서, "S" 등급의 부틸 컬럼이 사용될 수 있다.
- [0273] 일부 양태에서, 비드는 약 500 Å 이상의 공극을 포함할 수 있다. 일부 양태에서, 비드는 약 750 Å 이상의 공극을 포함할 수 있다. 일부 양태에서, 비드는 약 1000 Å 이상의 공극을 포함할 수 있다. 일부 양태에서, 비드는 약 450 Å 내지 1050 Å의 공극을 포함할 수 있다. 일부 양태에서, 비드는 약 950 Å 내지 1050 Å의 공극을 포함할 수 있다.
- [0274] 일부 양태에서, HIC 컬럼은 약 1000 Å 사이의 공극을 포함하는 약 35 μM 의 부틸 접합된 수지 비드를 포함할 수 있다. 일부 양태에서, 컬럼은 부틸 650 S 컬럼일 수 있다.
- [0275] 이는 약 0°C 내지 37°C의 온도일 수 있다. 이는 실온(약 15°C 내지 약 25°C)일 수 있다. 이는 약 15°C 내지 약 20°C일 수 있다. 이는 약 16°C 내지 약 18°C일 수 있다. 본 발명의 일부 양태에서, 너무 높은 온도는 과잉 Ab-[FGF21-제 1 연결기]₂ 종을 야기할 수 있는 반면, 너무 낮은 온도에서는 컬럼에 의해 포획된 목적한 Ab-[FGF21-제 1 연결기]₁ 종이 충분하지 않다.
- [0276] 일부 양태에서, 부틸 컬럼은 약 2% 내지 약 3%, 바람직하게는 약 2.2% 내지 약 2.6%, 가장 바람직하게는 약 2.4%의 농도에서 1,6-헥산다이올을 포함하는 등용매 세척 단계에 이용될 수 있다. 세척 완충액은 pH 약 6.5 내지 pH 약 7.5일 수 있고, pH 약 7.0일 수 있다. 세척 완충액은 50 mM 나트륨 포스페이트를 포함할 수 있다. 일부 양태에서, 1,6-헥산다이올은 대안적인 유기 다이올, 예컨대 프로필렌 글리콜 또는 우녹솔로 치환될 수 있다. 알코올, 예컨대 이소프로판올은 만족스러운 결과를 제공하지 않았다.
- [0277] HIC 컬럼은 전형적으로 꾸준히 감소하는 염 농도 상에서 작동한다: 본 발명은 접합 반응으로부터 Ab-[FGF21-제 1 연결기]₁ 종의 단리 시 다이올 농도를 증가시키는 비교적 낮은 염 농도 용리 완충액으로 작동하는 것과 관련된 특정한 장점의 놀라운 발견에 부분적으로 근거한다.
- [0278] 일부 양태에서, 부틸 컬럼 상에서 용리는 1,6-헥산다이올을 포함하는 완충액으로 선형 구배를 사용하여 수행될 수 있다. 용리 선형 구배는 약 2% 내지 약 3%, 바람직하게는 약 2.2% 내지 약 2.6%, 가장 바람직하게는 약 2.4%의 초기 농도로부터 진행할 수 있다.
- [0279] 다이올 용리는 20 이상, 바람직하게는 25 이상의 컬럼 부피(column volume; CV)의 큰 컬럼 상에서 작동될 수 있다. 이러한 실시양태에서, 초기 다이올 농도는 상기 기재된 바와 같을 수 있는 반면, 선형 구배의 최종 농도는

20% 이상일 수 있고 대략 25%일 수 있다. 일부 실시양태에서, 용리 단계는 5 내지 15 CV, 바람직하게는 8 내지 13 CV, 더욱 바람직하게는 10 내지 12 CV, 가장 바람직하게는 11 CV 상에서 작동된다. 이러한 실시양태에서, 약 6% 내지 약 10%, 바람직하게는 약 7% 내지 약 9%, 더욱 바람직하게는 약 7.5% 내지 약 8.5%, 가장 바람직하게는 약 8%까지 선형 구배의 최종 농도를 제한하는 것이 유리할 수 있다. 용리 완충액은 pH 약 6.5 내지 pH 약 7.5일 수 있고, pH 약 7.0일 수 있다. 용리 완충액은 약 10 내지 약 100 mM 나트륨 포스페이트를 포함할 수 있다. 용리 완충액은 약 20 mM 내지 약 80 mM 나트륨 포스페이트를 포함할 수 있다. 용리 완충액은 약 40 mM 내지 약 60 mM 나트륨 포스페이트를 포함할 수 있다. 용리 완충액은 50 mM 나트륨 포스페이트를 포함할 수 있다.

[0280] 이어서, 이 물질은 적합한 완충액(예컨대, pH 4.8에서 30 mM 나트륨 락테이트 또는 pH 4.5에서 20 mM 나트륨 글루타메이트) 내에 정용여과될 수 있다.

[제 2 연결기-Ex4]의 생성

[0282] 일부 양태에서, 엑센딘 4 동족체 및 제 2 연결기를 약 2:1 내지 약 1:2의 비로 함께 혼합하여 복합체 [제 2 연결기-Ex4]를 형성할 수 있다. 일부 양태에서, 엑센딘 4 동족체 및 제 2 연결기를 약 1.5:1의 비로 함께 혼합하여 복합체 [제 2 연결기-Ex4]를 형성할 수 있다. 일부 양태에서, 엑센딘 4 동족체 및 제 2 연결기를 약 1:1의 비로 함께 혼합하여 복합체 [제 2 연결기-Ex4]를 형성할 수 있다. 일부 양태에서, 엑센딘 4 동족체 및 제 2 연결기를 1:1.5의 비로 함께 혼합하여 복합체 [제 2 연결기-Ex4]를 형성할 수 있다. 일부 양태에서, 엑센딘 4 동족체 및 제 2 연결기를 약 1:2의 비로 함께 혼합하여 복합체 [제 2 연결기-Ex4]를 형성할 수 있다.

[0283] 본 발명의 일부 양태에서, 본 발명의 엑센딘 4 동족체는 측쇄가 티올 기를 포함하는 웨티드 연결 잔기를 포함한다. 일부 실시양태에서, 이 티올 기는 이어서 본원에 기재된 특정 연결기의 말레이비드 고리에 마이클 반응 또는 접합 첨가를 진행한다.

[0284] 적합한 엑센딘 4 동족체와 제 2 연결기 사이의 접합 첨가는 다이메틸 셀록사이드, 다이메틸 포름아마이드, 다이클로로메탄, 물, 에탄올, 아세토니트릴 아세톤, 프로필렌 글리콜, 및 상기 용매의 임의의 조합을 포함하는 용매의 광범위한 범위에서 수행될 수 있다. 일부 양태에서, 엑센딘 4/제 2 연결기 반응을 위한 용매는 다이메틸 셀록사이드, 다이메틸 포름아마이드 및 물로 이루어진 군으로부터 선택된다. 또한, 접합 반응은 혼합된 용매 시스템, 예컨대 아세토니트릴-물, 다이메틸 셀록사이드-물 및 다이메틸 포름아마이드-물에서 수행될 수 있다. 다이메틸 셀록사이드, 다이메틸 포름아마이드 및 물-아세토니트릴 용매의 사용은 엑센딘 4 웨티드 및 제 2 연결기의 용이한 가용성, 접합 반응의 효율 및 이후의 생성물의 정제의 용이성으로 인해 바람직한 선택이다. 주요 기준은 최소의 부산물과의 접합에 적합하고 접합의 효율적일 수 있는 농도에서 엑센딘 4 동족체의 가용성이다. 엑센딘 4 웨티드 및 제 2 연결기가 드물게 가용성(예컨대, 약 0.1 M 미만)인 경우, 접합 효율이 감소될 것이다.

[0285] 유기 염기 또는 무기 염기의 존재는 엑센딘 4 웨티드에서 티올레이트 음이온의 형성 후 제 2 연결기에 접합을 매우 용이하게 한다. 1차 아민 및 2차 아민은 통상적으로 연결기를 갖는 그들의 반응성 때문에 바람직하지 않다. 그러나, 1차 아민 또는 2차 아민은 이들이 연결기와 불량하게 반응하도록 제공된 특정 실시양태에서 사용될 수 있고, 3차 아민, 예컨대 트라이메틸아민, 트라이에틸아민, 다이에틸메틸아민, 다이이소프로필메틸아민, 다이에틸이소프로필아민, 트라이이소프로필아민, 트라이부틸아민, N-메틸모폴린 및 N-메틸피페리딘은 접합 반응에 사용될 수 있다. 상기 열거된 대부분의 아민 염기는 접합 반응에 적합하다. 그러나, 반응의 효율은 상이한 염기 사이에서 상이하다. 일부 염기는 다른 것보다 연결기와의 반응에 더욱 내성이다. 일반적으로 부피가 더 큰 염기가 바람직하고, 이러한 염기는 연결기와 용이하게 반응하지 않는다. 염기, 예컨대 다이이소프로필에틸아민, 트라이이소프로필아민 및 다이에틸이소프로필아민은 이들이 연결기와 반응성이 거의 없고 생성물 형성에 효과적인 우수한 균형을 제공함으로써 바람직하다.

[0286] 또한, 반응은 무기 염기, 예컨대 나트륨 바이카보네이트, 나트륨 카보네이트, 칼륨 바이카보네이트, 칼륨 카보네이트, 리튬 바이카보네이트, 리튬 카보네이트를 사용하는 수성 시스템에서 수행될 수 있고, 이러한 염기는 연결기 또는 웨티드와 반응하지 않는다. 또한, 반응은 유기 공용매를 갖거나 갖지 않는 수성 완충 시스템에서 수행될 수 있다. 이중 결합에 티올의 첨가는 pH가 약 7 이상인 경우 더욱 용이하게 달성된다. 접합 반응은 pH 약 7 미만에서 더 느린다. Ex4와 연결기 사이의 접합 반응은 통상적으로 pH 약 5 내지 약 8에서 발생할 수 있다. 그러나, 더욱 염기성 조건하에 연결기는 덜 안정된다. 중성 수준에 가까운 pH가 효율 및 안정성 둘다를 제공한다. 광범위한 범위의 완충액은 반응을 용이하게 하기 위해 사용될 수 있다. 비제한적으로 포스페이트 완충액, 시트레이트 완충액, 글리신/히스티딘 완충액, 2-아미노-2-하이드록시메틸-프로판-1,3-다이올 완충액, 4-2-하이드록시에틸-1-피페라진에탄설폰산 및 3-(N-모폴리노)프로판설폰산을 포함하는 많은 완충액이 접합 반응에 적합하다.

[0287] [제 2 연결기-Ex4]와 Ab-[FGF21-연결기]₁의 접합

일부 양태에서, Ab-[FGF21-제 1 연결기]₁ 및 [제 2 연결기-Ex4]는 약 0.7:1 내지 약 2:1의 Ab-[FGF21-연결기]₁:[제 2 연결기-Ex4]의 비로 혼합될 수 있다. 일부 양태에서, 상기 비는 약 1.1:1 내지 약 1.7:1이다. 일부 양태에서, 상기 비는 약 1:3:1 내지 약 1.5:1이다. 상기 비는 약 1.4:1일 수 있다.

일부 양태에서, Ab-[FGF21-제 1 연결기]₁ 및 [제 2 연결기-Ex4]는 약 5.5 내지 약 6.5의 pH에서 혼합될 수 있다. 일부 양태에서, Ab-[FGF21-제 1 연결기]₁ 및 [제 2 연결기-Ex4]는 약 6 내지 약 6.5의 pH에서 혼합될 수 있다. 일부 양태에서, Ab-[FGF21-제 1 연결기]₁ 및 [제 2 연결기-Ex4]는 약 6.3의 pH에서 혼합될 수 있다.

일부 양태에서, Ab-[FGF21-제 1 연결기]₁ 및 [제 2 연결기-Ex4]는 실온에서 혼합될 수 있다. 일부 양태에서, Ab-[FGF21-제 1 연결기]₁ 및 [제 2 연결기-Ex4]는 약 17°C 내지 약 22°C에서 혼합될 수 있다. 일부 양태에서, Ab-[FGF21-제 1 연결기]₁ 및 [제 2 연결기-Ex4]는 약 19°C에서 혼합될 수 있다.

일부 양태에서, Ab-[FGF21-제 1 연결기]₁ 및 [제 2 연결기-Ex4]는 6시간 이상의 반응 후 혼합될 수 있다. 일부 양태에서, Ab-[FGF21-제 1 연결기]₁ 및 [제 2 연결기-Ex4]는 8시간 이상의 반응 후 혼합될 수 있다. 일부 양태에서, Ab-[FGF21-제 1 연결기]₁ 및 [제 2 연결기-Ex4]는 12시간 이상의 반응 후 혼합될 수 있다. 본 발명의 화합물을 생성하기 위한 방법의 또 다른 실시양태에 따라, 방법은 하기 단계를 포함한다:

(i) 약 2:1 내지 약 1:2의 비로 Ex4 및 제 2 연결기를 함께 혼합하여 복합체 [제 2 연결기-Ex4]를 형성하는 단계;

(ii) 약 1:1 내지 약 1:3의 비로 [제 2 연결기-Ex4] 및 Ab를 함께 혼합하여, [Ab], [Ab]-[제 2 연결기-Ex4]₁ 및 [Ab]-[제 2 연결기-Ex4]₂를 함유하는 혼합물을 형성하는 단계;

(iii) 상기 단계 (ii)에서 형성된 혼합물로부터 [Ab]-[제 2 연결기-Ex4]₁ 분자를 추출하는 단계;

(iv) 약 1:4 내지 약 1:1의 비로 FGF21 및 제 1 연결기를 함께 혼합하여 복합체 [FGF21-제 1 연결기]를 형성하는 단계; 및

(v) 약 2:1 내지 약 1:2의 비로 [FGF21-제 1 연결기]와 [Ab]-[제 2 연결기-Ex4]₁을 혼합하여, [FGF21-제 1 연결기]₁-[Ab]-[제 2 연결기-Ex4]₁을 함유하는 혼합물을 형성하는 단계.

[FGF21-제 1 연결기] 및 [Ex4-제 2 연결기]는 상기 기재된 바와 같이 제조될 수 있다.

[Ex4-제 2 연결기]₁-Ab의 생성

일부 실시양태에서, [제 2 연결기-Ex4] 및 Ab는 약 0.5:1 내지 약 1:3의 비로 함께 접합되어 [Ab]-[제 2 연결기-Ex4]₁을 형성할 수 있다. 일부 실시양태에서, 비는 약 0.6:1일 수 있다. 일부 실시양태에서, 비는 약 0.7:1일 수 있다. 일부 실시양태에서, 비는 약 0.75:1일 수 있다. 일부 실시양태에서, 비는 약 0.8:1일 수 있다. 일부 실시양태에서, 비는 약 0.9:1일 수 있다. 일부 실시양태에서, 비는 약 1:1일 수 있다. 일부 실시양태에서, 비는 약 1.1:1일 수 있다. 일부 실시양태에서, 비는 약 1.2:1일 수 있다. 일부 실시양태에서, 비는 약 1:1 내지 약 0.5:1일 수 있다. 일부 실시양태에서, 비는 약 0.7:1일 수 있다.

일부 실시양태에서, [제 2 연결기-Ex4] 및 Ab의 비가 약 1:1인 경우, 이는 비접합된 Ab 및 [Ab]-[제 2 연결기-Ex4]₂와 비교하여 최대 양의 [Ab]-[제 2 연결기-Ex4]₁ 종을 제공한다. 비가 약 1:1인 경우, 약 40 내지 50%의 [Ab]-[제 2 연결기-Ex4]₁의 유리한 분포가 약 25%의 비접합된 Ab, 및 약 25%의 Ab-[제 2 연결기-Ex4]₂와 함께 관찰된다.

그러나, 혼합물로부터 [Ab]-[제 2 연결기-Ex4]₁을 정제하기 위해, 상기 종이 Ab-[제 2 연결기-Ex4]₁의 추출을 방해할 수 있도록 [Ab]-[제 2 연결기-Ex4]₂의 양을 최소화하기 위해 노력하는 것이 유리하다. 더욱이, [Ab]-[제 2 연결기-Ex4]₂는 재생될 수 없는 물질을 나타낸다. 따라서, Ab-[제 2 연결기-Ex4]₂의 형성을 최소화하는

것이 또한 유리하다. 이를 수행하기 위해, [제 2 연결기-Ex4]의 양은 (항체와 비교하여) 약 1 당량 내지 약 0.7 당량, 또는 심지어 0.5 당량 이하로 낮아질 수 있다. Ab와 비교하여 [제 2 연결기-Ex4]의 양을 감소시킴으로써, [Ab]-[제 2 연결기-Ex4]₂ 종의 형성은 최소화될 수 있다.

[0302] Ab에 대한 [제 2 연결기-Ex4]의 비의 감소가 [Ab]-[제 2 연결기-Ex4]₂와 비교하여 Ab-[제 2 연결기-Ex4]₁을 선호하기 위해 형성된 생성물의 균형을 개선하는데 도울 수 있는 반면, 이는 가능한 수율을 제공하고, 비접합된 양을 최소화하도록 반응하기 위한 필요에 대하여 상쇄될 필요가 있고, 따라서 반응의 끝에서 항체는 엄격하게 불필요하다. 따라서, [제 2 연결기-Ex4]:[Ab]의 비를 약 0.5:1 미만으로 낮추는 것은 Ab-[제 2 연결기-Ex4]₁의 전체 수율을 감소시킬 수 있다. 놀랍게도 [제 2 연결기-Ex4]:[Ab]의 최적비는 약 0.5:1 내지 약 1:1로 밝혀졌다. 일부 실시양태에서, 반응 비는 약 0.5:1, 약 0.6:1, 약 0.7:1, 약 0.8:1 및 약 0.9:1로 이루어진 군으로부터 선택된 하한치 및 약 0.6:1, 약 0.7:1, 약 0.8:1, 약 0.9:1 및 약 1:1로 이루어진 군으로부터 선택된 상한치에 의해 정의된 2개의 비의 범위 이내일 수 있다. 일부 양태에서, 상기 비는 약 0.6:1 내지 약 0.8:1이다. 일부 양태에서, 상기 비는 약 0.7:1이다.

[0303] 본 발명의 [제 2 연결기-Ex4]:[Ab]의 유리한 비는 [Ab]-[제 2 연결기-Ex4]₁의 형성의 양을 유지하면서 [Ab]-[제 2 연결기-Ex4]₂의 형성을 최소화하도록 돋는다. [제 2 연결기-Ex4]의 양을 낮춤으로써, 웨티드는 여전히 수율을 유지하면서 보존될 수 있다. 1 당량을 초과하는 [제 2 연결기-Ex4]의 양을 증가시킴으로써(예컨대, [제 2 연결기-Ex4]:[Ab] = 약 1.25:1 내지 약 2:1), Ab-[제 2 연결기-Ex4]₂ 종의 형성은 극적으로 증가하고 목적한 생성물인 Ab-[제 2 연결기-Ex4]₁의 양은 감소한다. Ab와 비교하여 더 많은 양의 [제 2 연결기-Ex4]는 Ab-[제 2 연결기-Ex4]₁의 형성의 양에서 극적인 하락을 야기한다(단위: 당량 기준).

[0304] Ex4 웨티드와 항체 사이의 [Ab]-[제 2 연결기-Ex4]₁의 형성은 pH 약 4 내지 약 8에서 발생할 수 있다. 일부 실시양태에서, 특히 제 2 연결기가 L1인 경우, Ex4에 연결된 연결기는 염기성 조건 보다 산성 조건하에 비교적 더욱 안정된다. 그러나, 산성 조건하에 접합 반응은 더 느려진다. 염기성 조건(pH 약 7 미만)하에 접합 반응은 더 빨라지지만, Ex4에 부착된 연결기는 가수분해를 진행할 수 있다. 따라서, 타당한 안정성 및 효율적인 접합을 나타내는 조건을 확인하는 것이 중요하다.

[0305] 중성 pH(약 6.5 내지 7.5)에 근접한 조건은 연결기와 수반되는 반응 효율에 대한 최고의 안정성을 나타낸다. 접합이 pH 약 7에서 작동하는 동안, 연결기의 안정성 및 접합의 효율은 pH 약 6.5에서 좋게 나타난다.

[0306] 반응을 담수에서 실행하는 동안, pH가 접합 효율을 개선하도록 유지될 수 있는 완충 시스템을 갖는 것이 훨씬 더 바람직하다. 여러 완충액 시스템은 제형 완충액(글리신, 히스티딘 및 수크로스로 제조됨), (4-(2-하이드록시에틸)-1-페페라진에탄설폰산) 완충액, N-사이클로헥실-3-아미노프로판설폰산 완충액, 3-(N-모폴리노)프로판설폰산 완충액, 2-(N-모폴리노)에탄설폰산 완충액 또는 3-[4-(2-하이드록시에틸)-1-페페라진일]프로판설폰산 완충액을 포함한다.

[0307] 일부 예에서 항체 응집을 촉진할 수 있을지라도 포스페이트 완충액이 사용될 수 있다. 다른 완충액은 pH 약 6 내지 약 8을 유지하기 위해 사용될 수 있다. 적절한 pH는 적절한 완충액과 함께 Ex4 및 항체 부가물의 최대량을 형성하는 중요한 역할을 한다. 항체 응합 완충액(히스티딘, 수크로스 및 글리신 포함, pH 6.5 내지 7.5, 바람직하게는 pH 약 7)은 접합 반응에 대하여 완충액에서 기대된 모든 양을 갖는 것으로 나타난다. 완충액에 따라, 항체에 Ex4가 접합하기 위한 반응 시간은 약 2시간 내지 약 24시간 사이에 어디서든 바뀔 수 있다. 가장 적합한 완충액에서, 반응 시간은 약 6 내지 약 14시간이다. 항체 응합 완충액에서, 반응은 약 12 내지 약 15시간에서 완료된다. Ab에 [제 2 연결기-Ex4]가 접합하기 위한 반응 시간은 두가지 시점 사이일 수 있고; 가장 낮은 시점은 약 1, 약 2, 약 4, 약 6, 약 8, 약 12시간 또는 밤새일 수 있고, 상한 시점은 약 2, 약 4, 약 6, 약 8, 약 12, 약 14, 약 15, 약 16, 약 17, 약 18, 약 19, 약 20, 약 21, 약 22, 약 23, 약 24, 약 36, 및 약 48시간일 수 있다.

[0308] 일부 실시양태에서, [제 2 연결기-Ex4]와 Ab 사이의 접합 반응은 약 5°C 내지 약 40°C에서 발생할 수 있다. 더 높은 온도에서, 접합 반응은 더 빠르다. 그러나, 웨티드 및 연결기의 안정성은 오랜시간 동안 더 높은 온도에서 웨티드 및 연결기를 유지함으로써 위태로울 수 있다. 온도가 낮아지면 항체, 웨티드 및 연결기의 안정성은 개선되지만, 접합 효율은 온도 변화를 이용한다. 약 15°C 내지 약 25°C의 온도가 가장 바람직하다. 약 20°C 내지 약 25°C의 온도는 시약 및 생성물의 효율적인 접합 및 안정성을 제공한다. Ab에 접합하는 [제 2 연결기-

Ex4]의 온도는 하한치 및 상한치에 의해 한정된 범위 이내일 수 있고; 이의 하한치는 약 10°C, 약 12°C, 약 13°C, 약 14°C, 약 15°C, 약 16°C, 약 17°C, 약 18°C, 약 19°C, 약 20°C 및 약 21°C일 수 있고, 이의 상한치는 약 11°C, 약 15°C, 약 16°C, 약 18°C, 약 20°C, 약 22°C, 약 23°C, 약 24°C, 약 25°C, 약 26°C, 약 27°C, 약 28°C, 약 29°C, 약 30°C, 약 31°C, 약 32°C, 약 33°C 및 약 34°C일 수 있다.

[0309] [제 2 연결기-Ex4]₁-Ab의 추출

접합 혼합물은 자유 [제 2 연결기-Ex4] 접합물 외에, 자유 항체([Ab]), 1개의 접합된 Ex4 웨티드를 갖는 항체([Ab]-[제 2 연결기-Ex4]₁) 및 2개의 접합된 Ex4 웨티드를 갖는 항체([Ab]-[제 2 연결기-Ex4]₂)를 함유한다. 다음 단계는 물질의 나머지로부터 [Ab]-[제 2 연결기-Ex4]₁의 정제를 수반한다. 일부 양태에서, 물질은 크로마토그래피 컬럼, 예컨대 부틸 컬럼, 카복시메틸 컬럼 및 이온교환 컬럼, 예컨대 강 양이온 교환 컬럼을 사용하여 정제될 수 있다. 항체 접합물을 용리하는데 적합한 용매는 완충된 용액을 포함한다. 완충액의 pH는 약 6 내지 약 8일 수 있다. 수성 완충액은 유기 공용매, 예컨대 이소프로판올, 프로판올, 부탄올 또는 에틸 알코올의 존재 또는 부재하에, 암모늄 살레이트, 나트륨 포스레이트, 칼륨 포스레이트, 나트륨 클로라이드, 나트륨 아세테이트, 암모늄 하이드록사이드, 또는 2-아미노-2-하이드록시메틸-프로판-1,3-다이올 2-[4-(2-하이드록시에틸)페라진-1-일]에탄설휠산 중 하나 또는 이들의 조합으로 제조될 수 있다.

Ab-[제 2 연결기-Ex4]₁과 [FGF21-제 1 연결기]의 접합

약 3:1 내지 약 1:1의 비로 [제 1 연결기-FGF21] 및 [Ab]-[제 2 연결기-Ex4]₁의 혼합은 [FGF21-제 1 연결기]₁-[Ab]-[제 2 연결기-Ex4]₁ 분자의 형성을 야기한다. 약 1:1의 비가 타당한 양의 생성물을 제공하지만, [FGF21-제 1 연결기]의 양의 증가는 [FGF21-제 1 연결기]₁-[Ab]-[제 2 연결기-Ex4]₁ 분자의 형성을 약 2배 개선하고, 약 3배까지 [FGF21-제 1 연결기]₁-[Ab]-[제 2 연결기-Ex4]₁의 형성을 추가로 개선한다. 그러나, 약 3 배 초과의 [FGF21-제 1 연결기]의 양의 증가는 [FGF21-제 1 연결기]₁-[Ab]-[제 2 연결기-Ex4]₁ 분자의 형성 효율을 개선하지 않는다.

일부 실시양태에서, 0.7:1의 비로 [제 2 연결기-Ex4]와 [Ab]의 접합을 기재된 바와 같은 본 발명의 방법을 사용하여 상기 단계(ii)에서 약 35% 비접합된 항체; 약 48% [Ab]-[제 2 연결기-Ex4]₁; 및 약 17% [Ab]-[제 2 연결기-Ex4]₂를 수득한. 일부 실시양태에서, 비접합된 항체, [Ab]-[제 2 연결기-Ex4]₁; 및 [Ab]-[제 2 연결기-Ex4]₂를 로딩 완충액(pH 6.5 내지 7.5에서 암모늄 살레이트 0.6 M 내지 0.9 M, 나트륨 포스레이트 25 mM 내지 75 mM)을 사용하고 용리 완충액(pH 6.5 내지 7.5에서 25 mM 내지 75 mM 나트륨 포스레이트 중 15 내지 25% 이소프로필 알코올)으로 용리된 CM 세파로스(Sephadex) 컬럼이 장착된 HPLC를 사용하여 분리하였다. 또한, NaCl을 로딩 완충액 중의 성분으로서 암모늄 살레이트 대신에 분석하였다. 암모늄 살레이트를 사용하는 비접합된 항체, [Ab]-[제 2 연결기-Ex4]₁; 및 [Ab]-[제 2 연결기-Ex4]₂의 분리는 NaCl에 필적하였다. HPLC 컬럼을 정지상으로서 CM 세파로스 수지로 충전하였다. 컬럼을 상기 언급된 로딩 완충액으로 평형시켰다. [Ab]-[제 2 연결기-Ex4]₁을 단리하는 동안 작동할 수 있는 완충액 농도 및 pH의 범위를 상기 언급하였다. 로딩 완충액(pH 7에서 암모늄 살레이트 0.75 M, 나트륨 포스레이트 50 mM) 및 용리 완충액(pH 7에서 50 mM 나트륨 포스레이트 중 20% 이소프로필 알코올)을 사용한 분리가 지속적으로 더 나은 수율을 제공함을 발견하였다. 분획 함유 [Ab]-[제 2 연결기-Ex4]₁을 합하고, 히스티딘(5 mM 내지 25 mM), 글리신(5 mM 내지 25 mM), 및 수크로스(0.5 내지 5%) 및 pH 6 내지 8을 포함하는 항체 용합 완충액 내에 UF/DF에 의하여 추출하였다. pH 약 6.5에서 10 mM 히스티딘, 10 mM 글리신, 2% 수크로스를 함유하는 완충액은 지속적으로 더 나은 수율을 제공하였다. 상기 완충액 조건을 사용하여 [Ab]-[제 2 연결기-Ex4]₁로부터 분리된 비접합된 항체를 약 70%의 추출률을 달성하도록 3회 반복할 수 있다.

약학 조성물

본 발명의 또 다른 양상은 본 발명의 화합물 및/또는 조성물을 포함하는 약학 조성물을 제공한다. 본 발명의 조성물을 포함하는 시약을 제형화할 수 있고 전신에 투여할 수 있다. 제형 및 투여를 위한 기법은 문헌 [Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th Ed., 1990, Mack Publishing Co., Easton, PA]에서 발견될 수 있다.

- [0316] 주사를 위해, 본 발명의 조성물은 무균성 주사가능한 용액 또는 분산제로 재구성하기에 적합한 수용액(유화액 또는 혼탁액) 또는 비수용액(현탁제, 유화제, 분산제 또는 무균성 분말 또는 동결건조물)으로 제형화될 수 있다. 적합한 수성 및 비수성 희석제, 용매, 및 담체의 예는 물, 에탄올, 폴리올(예컨대 프로필렌 글리콜, 폴리에틸렌 글리콜, 글리세롤 등), 이의 적합한 혼합물, 및 오일을 포함한다. 유동성은 예를 들어, 코팅제, 예컨대 레시틴의 사용에 의해, 분산제의 경우에 요구된 입자 크기의 유지에 의해, 및 계면활성제의 사용에 의해 유지되거나 개선될 수 있다.
- [0317] 본 발명의 조성물은 생리적으로 호환가능한 완충액, 예컨대 시트레이트, 아세테이트, 히스티딘 또는 포스페이트를 함유하는 수용액으로 제형화될 수 있다. 필요한 경우, 상기 제형은 또한 다양한 긴장성 조절제, 용해제 및/ 또는 안정화제(예컨대, 염, 예컨대 나트륨 클로라이드, 당, 예컨대 수크로스, 만니톨 및 트레할로스, 단백질, 예컨대 알부민, 아미노산, 예컨대 글리신 및 히스티딘, 계면활성제, 예컨대 폴리소르베이트(트윈, Tween), 또는 공용매, 예컨대 에탄올, 폴리에틸렌 글리콜 및 프로필렌 글리콜)를 함유할 수 있다. 또한, 본 발명의 조성물은 어쥬번트, 예컨대 습윤제, 유화제 및 혼탁제, 분산제 및 보존제를 포함할 수 있다. 또한, 본 발명의 조성물은 혼탁제, 예컨대 우뭇가사리, 알루미늄 메타하이드록사이드, 벤토나이트, 에톡실화된 이소스테아릴 알코올, 미세 결정질 셀룰로스, 폴리옥시에틸렌 소르비톨 및 소르비탄 에스터, 및 트라가칸트, 또는 이들의 혼합물을 포함할 수 있다.
- [0318] 또한, 본 발명의 조성물은 다양한 항세균제 및 항진균제, 예를 들어, 파라벤, 클로로부탄올, 페놀, 소르브산 등을 포함할 수 있다. 이는 또한 등장제, 예를 들어, 당, 나트륨 클로라이드 등을 포함하기에 바람직할 수 있다. 본 발명의 주사가능한 조성물의 장시간 흡수는 흡수를 자연가능하게 하는 시약, 예를 들어, 알루미늄 모노스테아레이트 및 젤라틴의 사용에 의해 수행될 수 있다.
- [0319] 본 발명의 조성물은 예를 들어, 조성물의 pH, 삼투성, 점성, 투명성, 색상, 등장성, 냄새, 멸균성, 안정성, 용해율 또는 배출률, 흡착률, 또는 침투율을 개질하거나, 유지하거나, 보존하기 위한 제형 물질을 함유할 수 있다. 적합한 제형 물질은 비제한적으로 아미노산(예컨대 글리신, 글루타민, 아스파라긴, 아르기닌 또는 리신), 항균제, 산화방지제(예컨대 L-메티오닌 아스코르브산, 나트륨 설파이트 또는 나트륨 수소-설파이트), 완충액(예컨대 나트륨 아세테이트, 락테이트, 보레이트, 바이카보네이트, 트리스-HCl, 시트레이트, 포스페이트, 또는 다른 유기산), 중량제(예컨대 만니톨 또는 글리신), 킬레이팅제(예컨대 에틸렌다이아민 테트라아세트산(EDTA), DPTA), 착화제(예컨대 카페인, 폴리비닐피롤리돈, β -사이클로덱스트린, 또는 하이드록시프로필- β -사이클로덱스트린), 충전제, 단당류, 이당류, 및 다른 카보하이드레이트(예컨대 글루코스, 만노스, 또는 덱스트린), 단백질(예컨대 혈청 알부민, 젤라틴, 또는 면역글로불린), 착색제, 향료 및 희석제, 유화제, 친수성 중합체(예컨대 폴리비닐피롤리돈), 저분자량 폴리펩티드, 염-형성 반대이온(예컨대 나트륨), 방부제(예컨대 벤즈알코늄 클로라이드, 벤조산, 살리실산, 티메로살, 펜에틸 알코올, 메틸파라벤, 프로필파라벤, 클로르헥시딘, 소르브산, 또는 과산화수소), 용매(예컨대 글리세린, 프로필렌 글리콜, 또는 폴리에틸렌 글리콜), 당 알코올(예컨대 만니톨 또는 소르비톨), 혼탁제, 계면활성제 또는 습윤제(예컨대 플루로닉; PEG; 소르비탄 에스터; 폴리소르베이트, 예컨대 폴리소르베이트 20 또는 폴리소르베이트 80; 트라이톤; 트로메타민; 레시틴; 콜레스테롤 또는 티록사팔), 안정성 강화제(예컨대 수크로스 또는 소르비톨), 긴장성 강화제(예컨대 알칼리 금속 할라이드, 바람직하게는 나트륨 또는 칼륨 클로라이드- 또는 만니톨 소르비톨), 전달 비히클, 희석제, 부형제 및/또는 약학 어쥬번트를 포함한다.
- [0320] 제형 성분은 투여 부위에 수용가능한 농도로 존재할 수 있다. 완충액은 생리적인 pH에서 또는 약간 더 낮은 pH에서, 전형적으로 약 5 내지 약 8의 pH 범위 내에서 조성물을 유지하는데 사용될 수 있다.
- [0321] 일부 양태에서, 본 발명의 약학 조성물은 본 발명의 화합물이 화합물의 지효성 또는 서방성을 위해 제형화되도록 제조될 수 있다. 예는 히알루론산 등, 중합체 젤, 비드, 입자, 주사가능한 미립구, 리포솜, 필름, 미세캡슐, 서방성 매트릭스, 및 이식형 약물 전달 장치를 포함한다.
- [0322] 일부 양태에서, 본 발명의 약학 조성물은 단일- 또는 다중-챔버 예비 충전된 주사기로 제공된다.
- [0323] 일부 양태에서, 본 발명은 본 발명의 하나 이상의 화합물 또는 조성물과 함께 약학 조성물에서 사용하기에 적합한 하나 이상의 추가 성분을 포함하는 키트를 제공한다. 일부 양태에서, 본 발명은 본 발명의 하나 이상의 화합물 또는 조성물과 함께 상기 조성물을 환자에게 전달하기 위한 하나 이상의 방식을 포함하는 키트를 제공한다.
- [0324] 또한, 본 발명의 조성물은 [FGF21-제 1 연결기]-[Ab]-[제 2 연결기-Ex4]를 포함하고, 이때 FGF21은 FGF21 동족

체이고; Ex4는 엑센딘 4 동족체이고; Ab는 알돌라아제 촉매 항체 또는 이의 항원 결합 부분이고; 제 1 연결기는 FGF21에서 단백질 연결 잔기의 측쇄 및 항체의 결합 부위에 공유적으로 부착되고, 제 2 연결기는 Ex4에서 웹티드 연결 잔기의 측쇄 및 항체의 결합 부위에 공유적으로 부착되고, 이때 제 1 및 제 2 연결기는 본원에 기재된 바와 같은 하나 이상의 요법에 사용하기 위해 동일하거나 상이하다. 또한, 본원에 기재된 바와 같은 하나 이상의 증상의 치료에 본 발명의 조성물의 용도가 제공된다. 또한, 본원에 기재된 바와 같은 하나 이상의 질환 또는 장애의 치료용 약제의 제조를 위한 본 발명의 조성물의 용도가 제공된다.

[0325] 사용 방법

[0326] 인간의 치료 용도를 위해, 인간, 인간화된, 또는 인간 키메릭 항체 또는 이의 항원 결합 부분은 본 발명의 화합물 또는 조성물의 항체 일부를 형성하는 바람직한 항체이다.

[0327] 본 발명의 일 양상은 본 발명의 조성물의 치료 효과량을 당뇨병 또는 당뇨병 연관된 질환을 앓고 있는 개체에 투여함을 포함하는, 당뇨병 또는 당뇨병 연관된 질환을 치료하는 방법이다.

[0328] 본 발명의 또 다른 양상은 본 발명의 조성물 또는 이의 약학적 유도체의 치료 효과량을 개체에 투여함을 포함하는, 개체에서 인슐린 분비를 증가시키는 방법이다.

[0329] 본 발명의 또 다른 양상은 본 발명의 조성물 또는 이의 약학적 유도체의 치료 효과량을 개체에 투여함을 포함하는, 개체에서 혈당 수준을 감소시키는 방법이다.

[0330] 본 발명의 또 다른 양상은 본 발명의 조성물 또는 이의 약학적 유도체의 치료 효과량을 개체에 투여함을 포함하는, 개체에서 비만을 치료하는 방법이다.

[0331] 본 발명의 또 다른 양상은 본 발명의 조성물 또는 이의 약학적 유도체의 치료 효과량을 개체에 투여함을 포함하는, 개체에서 체중 수준을 제어하거나 감소시키는 방법이다.

[0332] 본 발명의 또 다른 양상은 본 발명의 조성물 또는 이의 약학적 유도체의 치료 효과량을 개체에 투여함을 포함하는, 개체에서 이상지혈증을 치료하는 방법이다.

[0333] 본 발명의 또 다른 양상은 본 발명의 조성물 또는 이의 약학적 유도체의 치료 효과량을 개체에 투여함을 포함하는, 개체에서 고혈압을 치료하는 방법이다.

[0334] 본 발명의 또 다른 양상은 본 발명의 조성물 또는 이의 약학적 유도체의 치료 효과량을 개체에 투여함을 포함하는, 개체에서 지방간을 치료하는 방법이다.

[0335] 본 발명의 또 다른 양상은 본 발명의 조성물 또는 이의 약학적 유도체의 치료 효과량을 개체에 투여함을 포함하는, 개체에서 심장혈관계 질환을 치료하는 방법이다.

[0336] 본 발명의 또 다른 양상은 본 발명의 조성물 또는 이의 약학적 유도체의 치료 효과량을 개체에 투여함을 포함하는, 개체에서 글루카곤 수준을 감소시키는 방법이다.

[0337] 본 발명의 또 다른 양상은 본 발명의 조성물 또는 이의 약학적 유도체의 치료 효과량을 개체에 투여함을 포함하는, 개체에서 트리글리세리드 수준을 감소시키는 방법이다.

[0338] 본 발명의 또 다른 양상은 본 발명의 조성물 또는 이의 약학적 유도체의 치료 효과량을 개체에 투여함을 포함하는, 개체에서 비에스터화된 유리 지방산 수준을 증가시키는 방법이다.

[0339] 본 발명의 또 다른 양상은 본 발명의 조성물 또는 이의 약학적 유도체의 치료 효과량을 개체에 투여함을 포함하는, 개체에서 저밀도 콜레스테롤 수준을 감소시키는 방법이다.

[0340] 본 발명의 또 다른 양상은 본 발명의 조성물 또는 이의 약학적 유도체의 치료 효과량을 개체에 투여함을 포함하는, 개체에서 C-반응성 단백질 수준을 감소시키는 방법이다.

[0341] 본 발명의 또 다른 양상은 본 발명의 조성물 또는 이의 약학적 유도체의 치료 효과량을 개체에 투여함을 포함하는, 개체에서 프력토사민 수준을 감소시키는 방법이다.

[0342] 본 발명의 또 다른 양상은 본 발명의 조성물 또는 이의 약학적 유도체의 치료 효과량을 개체에 투여함을 포함하는, 개체에서 혈당 조절을 제어하는 방법이다.

[0343] 본 발명의 또 다른 양상은 본 발명의 조성물 또는 이의 약학적 유도체의 치료 효과량을 개체에 투여함을 포함하는, 개체에서 아디프신의 수준을 증가시키는 방법이다.

- [0344] 본 발명의 또 다른 양상은 본 발명의 조성물 또는 이의 약학적 유도체의 치료 효과량을 개체에 투여함을 포함하는, 개체에서 HDL 수준을 증가시키는 방법이다.
- [0345] 일부 양태에서, 본 발명은 본 발명의 화합물 또는 약학 조성물의 치료 효과량을 개체에 투여함을 포함하는, 당뇨병 관련된 증상, 비만, 이상지혈증, 고혈압, 지방간, 또는 심장혈관계 질환의 치료; 체중 수준의 제어 또는 감소; 혈당 조절의 제어; 또는 인슐린 분비, 또는 비에스터화된 유리 지방산, HDL 또는 아디프신 수준의 증가; 혈당, 글루카곤, 트리글리세리드, 프로토사민, 저밀도 콜레스테롤, 또는 C-반응성 단백질의 감소 방법을 제공한다.
- [0346] 일부 양태에서, 본 발명은 당뇨병 관련된 증상, 비만, 이상지혈증, 고혈압, 지방간, 또는 심장혈관계 질환의 치료용; 체중 수준의 제어용 또는 감소용; 혈당 조절의 제어용; 또는 인슐린 분비, HDL, 또는 비에스터화된 유리 지방산 수준의 증가용; 혈당, 글루카곤, 트리글리세리드, 프로토사민, 저밀도 콜레스테롤, 또는 C-반응성 단백질의 감소용 약제의 제조에서 본 발명의 조성물 또는 약학 조성물의 용도를 제공한다.
- [0347] 본원에 사용된 용어 "치료 효과적인 투여량"은 치료할 질환 또는 장애의 증상의 완화를 포함하는 연구자, 의사, 또는 다른 임상의에 의해 추구되는 조직계, 동물 또는 인간에서 생물학적 또는 의학적 반응을 이끌어내는 본 발명의 화합물, 조성물 또는 약학 조성물의 양을 의미한다.
- [0348] **투여 방법 및 복용량**
- [0349] 본 발명의 조성물의 투여 경로는 비경구 전달, 예컨대 근육내, SC, 또는 골수내 주사, 뿐만 아니라 척추강내, 직접 심실내, IV, 및 복강내 전달을 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 정맥내 투여이다. 본 발명의 조성물은 제형의 직접 주사에 의해 또는 주입 매트릭스, 예컨대 생리식염수, D5W, 락테이트된 릴거 용액 또는 기타 통상적으로 사용된 주입 매질로 본 발명의 조성물의 제형 혼합물의 주입에 의해 임의의 비경구 경로를 통해 투여될 수 있다.
- [0350] 당뇨병 또는 당뇨병 연관된 질환(또는 일부 양태에서, 다음 질환 중 하나 이상: 당뇨병, 비만, 이상지혈증, 고혈압, 지방간, 심장혈관계 질환, 고혈당, 낮은 인슐린 수준, 또는 본원에 기재된 임의의 증상 또는 본원에 기재된 증상과 연관된 증상)을 갖는 인간을 포함하는 포유동물의 치료에서, 본 발명의 조성물 또는 약학적으로 허용되는 유도체의 치료 효과량이 투여된다. 예를 들어, 본 발명의 조성물은 약 0.1 mg/kg 체중으로부터 약 15 mg/kg 체중까지 매일 IV 주입으로 투여될 수 있다. 따라서, 일부 실시양태는 약 0.5 mg/kg 체중의 투여량을 제공한다. 다른 실시양태는 약 0.75 mg/kg 체중의 투여량을 제공한다. 다른 실시양태는 약 1.0 mg/kg 체중의 투여량을 제공한다. 다른 실시양태는 약 2.5 mg/kg 체중의 투여량을 제공한다. 다른 실시양태는 약 5 mg/kg 체중의 투여량을 제공한다. 다른 실시양태는 약 10.0 mg/kg 체중의 투여량을 제공한다. 다른 실시양태는 약 15.0 mg/kg 체중의 투여량을 제공한다. 본 발명의 조성물 또는 약학적으로 허용되는 유도체의 투여량은 하루에 약 1회로부터 1주에 2회까지, 또는 다르게는, 약 매주 1회로부터 1개월에 1회 간격으로 투여되어야 한다. 일부 실시양태에서, 투여량은 약 0.002 mg/mL 내지 30 mg/mL의 본 발명에 따른 조성물 또는 이의 약학적으로 허용되는 유도체의 혈장 농도 피크를 달성하도록 투여된다. 이는 적절한 제형(화학 분야의 숙련자에게 공지된 임의의 적합한 제형 용액이 사용될 수 있음)에서 투여된 성분의 용액의 무균성 주사에 의해 수행될 수 있다. 바람직한 혈액 수준은 유효 분석 방법론에 의해 측정된 혈장 수준에 의해 확인된 바와 같이 본 발명에 따른 조성물의 연속 주입에 의해 유지될 수 있다.
- [0351] 개인에게 본 발명의 조성물을 투여하기 위한 하나의 방법은 개인에게 FGF21-연결기 접합물을 투여하는 단계 및 생체내 적절한 항체의 결합 부위를 갖는 공유 화합물을 형성하도록 허용하는 단계를 포함한다. 생체내 형성하는 본 발명의 조성물의 항체 일부는 FGF21-연결기 접합물의 투여 전, 동시 또는 후에 개인에게 투여될 수 있다. 다르게는, 또는 덧붙여, 항체는 적절한 면역원으로 면역 후 개인의 순환에 존재할 수 있다. 예를 들어, 촉매 항체는 전달 단백질에 접합된 기질의 반응성 중간체로 면역됨으로써 생성될 수 있다. 특히, 알돌라아제 촉매 항체는 다이케톤 잔기에 연결된 키홀 림펫 헤모시아닌(keyhole limpet hemocyanin; KLH)으로 투여함으로써 생성될 수 있다.
- [0352] 따라서, 조성물은 단일 복용으로서, 시간에 걸쳐 2종 이상의 투여량으로서(목적한 분자의 동일한 양을 함유하거나 함유하지 않을 수 있음), 또는 이식 장치 또는 카테터를 통한 연속 주입으로서 투여될 수 있다. 적절한 복용량의 추가 개선은 통상적으로 당업자에 의해 만들어지고, 당업자에 의해 통상적으로 수행된 업무의 범위 이내이다. 적절한 복용량은 적절한 용량-반응 데이터의 사용을 통해 확인될 수 있다.
- [0353] 약학 조성물의 투여 경로는 공지된 방법, 예를 들어, 경구, SC, IV, 복강내, 대뇌내(실질내), 뇌실내, 근육내,

안구내, 동맥내, 내문의 주사를 통해, 또는 병소내 경로; 서방성 시스템에 의해; 또는 이식 장치에 따른다. 필요한 경우, 조성물은 볼루스 주사, 연속적인 주입 또는 이식 장치에 의해 투여될 수 있다.

[0354] 다르게는 또는 추가적으로, 조성물은 국소적으로 막, 스폰지, 또는 목적한 문자가 흡수되거나 캡슐화되는 다른 적절한 물질의 이식을 통해 투여될 수 있다. 이식 장치가 사용되는 경우, 상기 장치는 임의의 적합한 조직 또는 기관에 이식될 수 있고, 목적한 문자가 확산, 지효성 볼루스, 또는 연속 투여를 통해 전달될 수 있다.

조합 요법

[0356] 본 발명의 또 다른 양상에서, 본 발명의 조성물은 당뇨병 또는 당뇨병 관련된 증상을 치료하기 위해, 인슐린 분비를 증가시키거나 혈당 수준을 감소시키기 위해, 또는 본원에 기재된 임의의 증상을 치료하기 위해 사용된 다른 치료제와 조합하여 사용될 수 있다. 일 실시양태에서, 본 발명의 조성물은 인슐린, 예를 들어 빠른 작용, 단시간 작용, 중간 작용, 또는 긴시간 작용 인슐린을 포함하는 합성 인간 인슐린과 조합하여 투여될 수 있다. 다른 실시양태에서, 본 발명의 조성물은 α -글루코시다아제 억제제, 설폰일우레아, 메글리티나이드, 바이구아나이드, 또는 티아졸리딘다이온(TZD) 패밀리에 속하는 화합물과 조합하여 투여될 수 있다. 또한, 본 발명의 조성물은 대사물질-개질 단백질 또는 웨პ티드, 예컨대 글루코키나아제(GK), 글루코키나아제 조절 단백질(GKRP), 비커플링 단백질 2 및 3(UCP2 및 UCP3), 글루카곤, 글루카곤 유사 웨პ티드 1 및 2(Glp1 및 Glp2), 액센딘(예컨대 액센딘 4), 위 억제 폴리웨პ티드(GIP), Glp2페록시좀 증식체-활성화된 수용체 α (PPAR α), 렙틴 수용체(OB-Rb), DPP-IV 억제제, 설폰일우레아, 또는 다른 인크레틴 웨პ티드와 조합하여 투여될 수 있다. 당뇨자는 당뇨병 또는 당뇨병 관련된 증상의 치료에 현재 사용되는 광범위하게 다양한 시약을 인지할 것이다.

[0357] 본 발명의 조성물 또는 이의 약학적으로 허용되는 유도체와 당뇨병 또는 당뇨병 관련된 증상을 치료하기 위해, 인슐린 분비를 증가시키기 위해, 또는 혈당 수준을 감소시키기 위해 사용된 다른 치료제의 조합의 잠재적인 치료 효능을 평가하기 위해, 이러한 조합을 당해 분야에 공지된 방법을 사용하여 시험할 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 조성물과 인슐린 분비를 증가시키는 또 다른 치료제의 조합의 능력을 생체외 글루코스-자극된 인슐린 분비 어세이를 사용하여 측정할 수 있다. 상기 어세이에서, 췌장의 β -세포를 설정 시간 동안 다양한 농도의 글루코스로 처리하고, 인슐린 수준을 당해 분야에 공지된 방법, 예를 들어 방사선 면역어세이를 사용하여 측정한다. 또한, 인슐린 분비 시 본 발명의 조성물 및 다른 치료제의 효과를, 개체에 직접 시약을 투여하고 다양한 시점에서 체액 샘플 중 인슐린 수준을 측정함으로써 생체내에서 측정할 수 있다. 조합 치료에서 사용하기 위해 개체에 공지된 치료제를 투여하기 위한 방법은 임상 건강 관리 제공자에게 널리 공지될 수 있다.

[0358] 투여될 본 발명의 조성물의 효과적인 복용량은 생물학적 반감기, 생물학적 이용가능성, 및 독성과 같은 상기 파라미터를 설명하는 당해 분야에 널리 공지된 과정을 통해 결정될 수 있다. 본 발명의 조성물 또는 이의 약학적으로 허용되는 유도체와 조합하여 사용될 치료제의 효과량은 이러한 시약에 대한 당해 분야의 숙련자에게 공지된 권장 복용량에 기초한다. 이러한 권장된 또는 공지된 수준은 바람직하게는 본 발명의 조성물 또는 이의 약학적으로 허용되는 유도체와 조합하여 이러한 복용량의 유효성 시험 후 언급된 복용량의 10% 내지 50%까지 낮춰질 수 있다. 이는 주치의가 독성, 골수, 간 또는 신장 기능장애 또는 해로운 약물-약물 상호작용으로 인해 낮은 복용량으로 언제 어떻게 치료를 종료하거나, 중단하거나 조정할 수 있는지에 주목하여야 한다. 또한, 주치의는 임상 반응이 불충분한 경우(독성을 배제하고) 더 높은 수준까지 치료를 조정하기 위해 공지할 것이다.

[0359] 치료 효과적인 투여량은 환자의 증상을 완화시키거나 생존을 연장시키기에 충분한 화합물의 양을 지칭한다. 본 발명의 조성물의 효과적인 생체외 농도는 EC_{50} 을 측정함으로써 결정될 수 있다. 상기 시약의 생체내 독성 및 치료 효능은 세포 배양 또는 동물 실험에서 표준 약학적 방법, 예를 들어 LD_{50} (50%의 인구에게 치명적인 투여량) 및 ED_{50} (50%의 인구에게 치료 효과적인 투여량)을 측정함으로써 결정될 수 있다. 독성과 치료 효과 사이의 투여량 비는 치료 지수이고 이는 비 LD_{50}/ED_{50} 으로서 나타낼 수 있다. 큰 치료 지수를 나타내는 화합물이 바람직하다. 이러한 세포 배양 어세이 및 동물 연구로부터 수득된 데이터는 인간에 사용하기 위한 투여량의 범위를 나타내기 위해 사용될 수 있다. 상기 화합물의 복용량은 바람직하게는 독성이 거의 없거나 전혀 없는 ED_{50} 을 포함하는 순환 농도의 범위 이내이다. 투여량은 사용된 투여 형태 및 이용될 투여 경로에 따라 상기 범위 이내에서 달라질 수 있다. 임의의 화합물에 대하여, 치료 효과적인 투여량은 세포 배양 어세이로부터 초기에 추측될 수 있다. 투여량은 IC_{50} (즉, 세포 배양 시 결정된 미처리된 대조군과 비교하여 감염된 세포로부터 RT 생성의 최대 1/2 억제를 달성하는 시험 화합물의 농도)을 포함하는 순환 혈장 농도 범위를 달성하기 위해 동물 모델에서 나타낼 수 있다. 상기 정보는 인간에 유용한 투여량을 더욱 정확하게 결정하기 위해 사용될 수 있다.

혈장의 수준은 예를 들어 고성능 액체 크로마토그래피(HPLC)에 의해 측정될 수 있다.

[0360] 본 발명의 조성물이 다른 치료제와 조합하여 투여되는 이러한 실시양태에서, 시약의 합한 효과는 하기 수학식 1을 사용하는 초우(Chou) 및 탈라레이(Talalay)(문헌[T.C. Chou and P. Talalay, Adv. Enzyme Regul. 22:2755(1984)])의 다중 약물 분석 방법에 의해 계산될 수 있다:

수학식 1

$$CI = \frac{D_1}{(Dx)_1} + \frac{D_2}{(Dx)_2} + \frac{\alpha D_1 D_2}{(Dx)_1 (Dx)_2}$$

[0362] 상기 식에서,

[0363] CI는 조합 지수이고;

$(Dx)_1$ 은 단독으로 x% 효과를 생성하기 위해 요구되는 약물 1의 투여량이고;

D_1 은 D_2 와 조합하여 동일한 x% 효과를 생성하기 위해 요구되는 약물 1의 투여량이다.

$(Dx)_2$ 및 $(D)_2$ 의 값은 약물 2로부터 유사하게 유도된다. α 의 값은 하기 수학식 2(중간 효과)를 사용하여 용량 효과 곡선의 플롯으로부터 결정된다:

수학식 2

$$\frac{fa}{fu} = \left(\frac{D}{Dm} \right)^m$$

[0364] 상기 식에서,

[0366] fa 는 투여량 D 에 의해 수행된 분획이고;

fu 는 감염되지 않은 분획이고;

Dm 은 50% 효과를 위해 요구된 투여량이고;

m 은 용량 효과 곡선의 기울기이다.

상호 배타적인 약물(즉, 유사한 작용 방식)을 위해, 중간 효과 플롯에서 약물 단독 및 이들의 평행선 둘다를 제공한다. 상호 비배타적인 약물(즉, 비의존 작용 방식)은 중간 효과 플롯에서 평행선을 제공할 수 있지만, 혼합물에서는 위쪽이 오목한 곡선을 제공할 수 있다. 시약이 상호 배타적인 경우 α 는 0이고, 시약이 상호 비배타적인 경우 α 는 1이다. 상호 비배타적으로 추정하여 수득된 값은 항상 상호 배타적인 약물 보다 약간 더 클 수 있다. 1 미만의 CI 값은 상승작용을 나타내고, 1 이상의 값은 길항작용을 나타내고, 1과 동일한 값은 부가적인 효과를 나타낸다. 또한 합해진 약물 효과는 바이오소프트(Biosoft, 영국 캠브리지 소재)로부터의 CalcuSyn 소프트웨어 패키지를 사용하여 계산될 수 있다.

[0367] 본 발명에 따른 화합물은 용매화, 특히 수화될 수 있다. 수화는 화합물 또는 화합물을 포함하는 조성물의 제조 동안 발생할 수 있거나, 수화는 화합물의 흡습 특성으로 인해 시간에 따라 발생할 수 있다. 본 발명의 화합물은 동결건조될 수 있다.

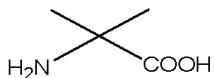
[0368] 또한, 본 발명은 본 발명의 입체이성질체, 호변이성질체, 용매화물, 전구약물 및 약학적으로 허용되는 염을 제공한다. 또한, 본 발명은 본원에 시작된 임의의 순서에 따라 화합물을 제공한다.

정의

[0370] 측정가능한 수치 변수와 관련하여 사용된 "약" 또는 "대략"은 어느 쪽이 더 크던지 간에 지시된 값의 실험적 오차 이내(예컨대, 평균에 대한 95% 신뢰 구간 이내) 또는 지시된 값의 10% 이내에 있는 변수의 모든 값 및 지시

된 값을 나타낸다.

[0371] Aib는 2-아미노-이소부티르산이고 하기 구조를 갖는다:



[0373] "액센딘 4 동족체"는 야생형 액센딘 4(서열번호 35)와 80% 이상, 바람직하게는 85% 이상, 더욱 바람직하게는 90% 이상, 가장 바람직하게는 95% 이상의 동일성을 갖는 분자를 의미하고, 야생형 액센딘 4와 동일하거나 더욱 큰 친화성을 갖는 글루카곤-유사 웨티드 1 수용체(GLP1R)에 결합하거나 적어도 2 로그 미만 이내이다. 액센딘 4 동족체는 변이체(천연 아미노산 결실, 첨가 및 치환 포함) 및 유도체(비자연적 아미노산 첨가 및 치환 및/또는 추가 화학 변형 포함)를 포함한다. 일부 양태에서, 액센딘 4 동족체는 본원에 제공된 Ex4 서열 중 하나로부터 선택될 수 있다.

[0374] "FGF21 동족체"는 야생형 인간 FGF21(서열번호 2)과 80% 이상, 바람직하게는 85% 이상, 더욱 바람직하게는 90% 이상, 가장 바람직하게는 95% 이상의 동일성을 갖는 분자를 의미하고, 야생형 FGF21과 동일하거나 더욱 큰 친화성을 갖는 FGFR1c 및 β -클로토 각각에 결합하거나, 적어도 2 로그 미만 이내이다. FGF21 동족체는 변이체(천연 아미노산 결실, 첨가 및 치환 포함) 및 유도체(비자연적 아미노산 첨가 및 치환 및 추가 화학 변형 포함)를 포함한다. 또한, 공지된 다형체(예컨대 P/L¹⁴⁶)가 포함된다. 일부 양태에서, FGF21 동족체는 본원에 제공된 FGF21 서열 중 하나로부터 선택될 수 있다.

서열

서열 번호	설명	서열				
1	FGF21 속 x1= H 또는 부재, x146= L 또는 P.	xPIPDSPLL VGGAAADQSPE ALYGSLHFDP NKSPHRDPAP GSSDPLSMVG	QFGGQVRQRY SLLQLKALKP EACSFRELLL RGPARFLPLP PSQGRSPSYAS	LYTDDAAQQTE GV1QILGVKT EDGYNVYQSE GLPPAXPEPP GILAPQPPDV	AHLEIREDT SRFLCQRPDG AHGLPLHLPG GILAPQPPDV	
2	FGF21AH H1 부재, L146.	-PIPDSPLL VGGAAADQSPE ALYGSLHFDP NKSPHRDPAP GSSDPLSMVG	QFGGQVRQRY SLLQLKALKP EACSFRELLL RGPARFLPLP PSQGRSPSYAS	LYTDDAAQQTE GV1QILGVKT EDGYNVYQSE GLPPALPEPP GILAPQPPDV	AHLEIREDT SRFLCQRPDG AHGLPLHLPG GILAPQPPDV	
3	FGF21 Cys 돌연변이체 속 1 x1= H 또는 부재, x79 = D 또는 C, x125 = H 또는 C, x129 = A 또는 C, x146= P 또는 L	xPIPDSPLL VGGAAADQSPE ALYGSLHFDP NKSPxRDPxP GSSDPLSMVG	QFGGQVRQRY SLLQLKALKP EACSFRELLL RGPARFLPLP PSQGRSPSYAS	LYTDDAAQQTE GV1QILGVKT EDGYNVYQSE GLPPAxPEPP GILAPQPPDV	AHLEIREDT SRFLCQRPxG AHGLPLHLPG GILAPQPPDV	
4	FGF21 Cys 돌연변이체 속 2 x1 = H 또는 부재, x125 = C 또는 H, x129 = A 또는 C, x146 = L 또는 P	xPIPDSPLL VGGAAADQSPE ALYGSLHFDP NKSPxRDPxP GSSDPLSMVG	QFGGQVRQRY SLLQLKALKP EACSFRELLL RGPARFLPLP PSQGRSPSYAS	LYTDDAAQQTE GV1QILGVKT EDGYNVYQSE GLPPAxPEPP GILAPQPPDV	AHLEIREDT SRFLCQRPDG AHGLPLHLPG GILAPQPPDV	
5	FGF21 H125C 속 x1 = H 또는 부재, H125C, x146 = L 또는 P	xPIPDSPLL VGGAAADQSPE ALYGSLHFDP NKSPCRDPAP GSSDPLSMVG	QFGGQVRQRY SLLQLKALKP EACSFRELLL RGPARFLPLP PSQGRSPSYAS	LYTDDAAQQTE GV1QILGVKT EDGYNVYQSE GLPPAxPEPP GILAPQPPDV	AHLEIREDT SRFLCQRPDG AHGLPLHLPG GILAPQPPDV	
6	FGF21AH-H125C-L146 H1 부재 H125C P146	-PIPDSPLL VGGAAADQSPE ALYGSLHFDP NKSPCRDPAP GSSDPLSMVG	QFGGQVRQRY SLLQLKALKP EACSFRELLL RGPARFLPLP PSQGRSPSYAS	LYTDDAAQQTE GV1QILGVKT EDGYNVYQSE GLPPAPPEPP GILAPQPPDV	AHLEIREDT SRFLCQRPDG AHGLPLHLPG GILAPQPPDV	
7	FGF21AH-H125C H1 부재 H125C L146	-PIPDSPLL VGGAAADQSPE ALYGSLHFDP NKSPCRDPAP GSSDPLSMVG	QFGGQVRQRY SLLQLKALKP EACSFRELLL RGPARFLPLP PSQGRSPSYAS	LYTDDAAQQTE GV1QILGVKT EDGYNVYQSE GLPPALPEPP GILAPQPPDV	AHLEIREDT SRFLCQRPDG AHGLPLHLPG GILAPQPPDV	
8	FGF21 A129C 속 x1 = H 또는 부재, A129C, x146 = L 또는 P	xPIPDSPLL VGGAAADQSPE ALYGSLHFDP NKSPHRDPAP GSSDPLSMVG	QFGGQVRQRY SLLQLKALKP EACSFRELLL RGPARFLPLP PSQGRSPSYAS	LYTDDAAQQTE GV1QILGVKT EDGYNVYQSE GLPPAxPEPP GILAPQPPDV	AHLEIREDT SRFLCQRPDG AHGLPLHLPG GILAPQPPDV	
9	FGF21AH-A129C-L146 H1 부재, A129C, P146	-PIPDSPLL VGGAAADQSPE ALYGSLHFDP NKSPHRDPAP GSSDPLSMVG	QFGGQVRQRY SLLQLKALKP EACSFRELLL RGPARFLPLP PSQGRSPSYAS	LYTDDAAQQTE GV1QILGVKT EDGYNVYQSE GLPPAPPEPP GILAPQPPDV	AHLEIREDT SRFLCQRPDG AHGLPLHLPG GILAPQPPDV	
10	FGF21AH-A129C H1 부재, A129C, L146	-PIPDSPLL VGGAAADQSPE ALYGSLHFDP NKSPHRDPAP GSSDPLSMVG	QFGGQVRQRY SLLQLKALKP EACSFRELLL RGPARFLPLP PSQGRSPSYAS	LYTDDAAQQTE GV1QILGVKT EDGYNVYQSE GLPPALPEPP GILAPQPPDV	AHLEIREDT SRFLCQRPDG AHGLPLHLPG GILAPQPPDV	

		GSSDPLSMVG	PSQGRSPSYAS	
11	FGF21 D79C 속 x1 = H 또는 부채, D79C, x146 = P 또는 L	xPIPDSPLLL VGGAADQSPPE ALYGSLHFDP NKSPhRDpAp GSSDPLSMVG	QFGGQVRQRY SLLQLKALKP EACSFRELL RGPARFLPLP PSQGRSPSYAS	LYTDDAAQQTE GV1QILGVKT EDGYNVYQSE GLPPAxPEPP AHLEIREDT
12	FGF21AH-D79C H1 부채, D79C, L146	-PIPDSPLLL VGGAADQSPPE ALYGSLHFDP NKSPhRDpAp GSSDPLSMVG	QFGGQVRQRY SLLQLKALKP EACSFRELL RGPARFLPLP PSQGRSPSYAS	LYTDDAAQQTE GV1QILGVKT EDGYNVYQSE GLPPALPEPP SRFLCQRPCG AHGLPLHLPG GILAPQPPDV
13	FGF21AH-D79C-L146 H1 부채, D79C, P146	-PIPDSPLLL VGGAADQSPPE ALYGSLHFDP NKSPhRDpAp GSSDPLSMVG	QFGGQVRQRY SLLQLKALKP EACSFRELL RGPARFLPLP PSQGRSPSYAS	LYTDDAAQQTE GV1QILGVKT EDGYNVYQSE GLPPAPPEPP SRFLCQRPCG AHGLPLHLPG GILAPQPPDV
14	FGF21AH-L86C H1 부채, L86C, L146	-PIPDSPLLL VGGAADQSPPE ALYGSCHFDP NKSPhRDpAp GSSDPLSMVG	QFGGQVRQRY SLLQLKALKP EACSFRELL RGPARFLPLP PSQGRSPSYAS	LYTDDAAQQTE GV1QILGVKT EDGYNVYQSE GLPPALPEPP SRFLCQRPDG AHGLPLHLPG GILAPQPPDV
15	FGF21AH-T40C H1 부채, T40C, L146	-PIPDSPLLL VGGAADQSPPE ALYGSLHFDP NKSPhRDpAp GSSDPLSMVG	QFGGQVRQRY SLLQLKALKP EACSFRELL RGPARFLPLP PSQGRSPSYAS	LYTDDAAQQTE GV1QILGVKT EDGYNVYQSE GLPPALPEPP SRFLCQRPDG AHGLPLHLPG GILAPQPPDV
16	FGF21AH-H1C H1C, L146	CPIPDSPLLL VGGAADQSPPE ALYGSLHFDP NKSPhRDpAp GSSDPLSMVG	QFGGQVRQRY SLLQLKALKP EACSFRELL RGPARFLPLP PSQGRSPSYAS	LYTDDAAQQTE GV1QILGVKT EDGYNVYQSE GLPPALPEPP SRFLCQRPDG AHGLPLHLPG GILAPQPPDV
17	FGF21 Lys 돌연변이체 속 x1 = 부채 또는 H, x56, x59, x69, x122= K 또는 R, R69, x146=L 또는 P	xPIPDSPLLL VGGAADQSPPE ALYGSLHFDP NKSPhRDpAp GSSDPLSMVG	QFGGQVRQRY SLLQLxALxP EACSFRELL RGPARFLPLP PSQGRSPSYAS	LYTDDAAQQTE GV1QILGVxT EDGYNVYQSE GLPPAxPEPP SRFLCQRPDG AHGLPLHLPG GILAPQPPDV
18	FGF21AH-K56-K59R-K69R-K122R-L146	-PIPDSPLLL VGGAADQSPPE ALYGSLHFDP NRSPhRDpAp GSSDPLSMVG	QFGGQVRQRY SLLQLKALRP EACSFRELL RGPARFLPLP PSQGRSPSYAS	LYTDDAAQQTE GV1QILGVRT EDGYNVYQSE GLPPALPEPP SRFLCQRPDG AHGLPLHLPG GILAPQPPDV
19	FGF21AH-K59 K56R-K69R-K122R-L146	-PIPDSPLLL VGGAADQSPPE ALYGSLHFDP NRSPhRDpAp GSSDPLSMVG	QFGGQVRQRY SLLQLRALKP EACSFRELL RGPARFLPLP PSQGRSPSYAS	LYTDDAAQQTE GV1QILGVRT EDGYNVYQSE GLPPALPEPP SRFLCQRPDG AHGLPLHLPG GILAPQPPDV
20	FGF21AH-K69 K56R-K59R-K122R-L146	-PIPDSPLLL VGGAADQSPPE ALYGSLHFDP NRSPhRDpAp GSSDPLSMVG	QFGGQVRQRY SLLQLRALRP EACSFRELL RGPARFLPLP PSQGRSPSYAS	LYTDDAAQQTE GV1QILGVKT EDGYNVYQSE GLPPALPEPP SRFLCQRPDG AHGLPLHLPG GILAPQPPDV
21	FGF21AH-K122	-PIPDSPLLL	QFGGQVRQRY	LYTDDAAQQTE AHLEIREDT

	K56R-K59R-K69R-L146	VGGAADQSPE ALYGSLHFDP NKSPIRDPAP GSSDPLSMVG	SLLQLRALRP EACSFRELL RGPARFLPLP PSQGRSPSYAS	GVIQILGVRT EDGYNVYQSE GLPPALPEPP GILAPQPPDV	SRFLCQRPDG AHGLPLHLPG GILAPQPPDV
22	FGF21AH-Knu11-P2 K56R-K59R-K69R-K122R-L146	-PIPDSPLL VGGAADQSPE ALYGSLHFDP NRSPIRDPAP GSSDPLSMVG	QFGQQVRQRY SLLQLRALRP EACSFRELL RGPARFLPLP PSQGRSPSYAS	LYTDDAQQT GVIQILGVRT EDGYNVYQSE GLPPALPEPP GILAPQPPDV	AHLEIREDT SRFLCQRPDG AHGLPLHLPG GILAPQPPDV
23	FGF21AH-Knu11-H1K H1K-K56R-K59R-K69R-K122R-L146	KPIPDSSPLL VGGAADQSPE ALYGSLHFDP NRSPIRDPAP GSSDPLSMVG	QFGQQVRQRY SLLQLRALRP EACSFRELL RGPARFLPLP PSQGRSPSYAS	LYTDDAQQT GVIQILGVRT EDGYNVYQSE GLPPALPEPP GILAPQPPDV	AHLEIREDT SRFLCQRPDG AHGLPLHLPG GILAPQPPDV
24	FGF21AH-Knu11-S181K K56R-K59R-K69R-K122R-L146-S181K-	-PIPDSPLL VGGAADQSPE ALYGSLHFDP NRSPIRDPAP GSSDPLSMVG	QFGQQVRQRY SLLQLRALRP EACSFRELL RGPARFLPLP PSQGRSPSYAK	LYTDDAQQT GVIQILGVRT EDGYNVYQSE GLPPALPEPP GILAPQPPDV	AHLEIREDT SRFLCQRPDG AHGLPLHLPG GILAPQPPDV
25	h38C2 경쇄	ELQMTQSPSS YLQKPGQSPK SSLQPEDFAV F1FPPSDEQL SGNSQESVTE VTHQQLSSPV	LSASVGDRV LLIYKVSNRF YFCSGQTHLP KSGTASVCL QDSKDSTYSL TKSPNRGEC	ITCRSSQSLL SGVPSRFSGS YTFGGGTKE LNNFYPREAK SSTLTLISKAD	HTYGPSYLNW GSGTDFILTI IKRTVAAPSV VQWKVDNALQ YEKHKVYACE
26	h38C2 중쇄	EVQLVESGG PEKGLEWVSE LYLQMNLSRA TKGPSVFPLA SGALTSGVHT CNVNHKPSNT VFLFPPPKPD DGVEVHNAKT KCKVSNKALP KNQVSLTCLV SDGSFFLYSK SLSLSPGK	LVQPGGSLRL IRLRSNDNYAT EDTG1YYCKT PSSKSTSGGT FPAVLQSSGL YSLSSVVTVP CDKTHTCPPC TLMISRTPEV YRVSVLTVL KQGPREPQVY EWESENQOPEN GNWFSCSVMH EALHNHYTQK	SCAASGFTFS HYAEVKGRF YFYSFSYWGQ AALGCLVKDY FPEPVTVSN SSSLGTQTYI PAPELLGGPS TCVVVDVSHE DPEVKFNWYV HQDWLNGKEY TLPPSREEMT NYKTPPPVLD EALHNHYTQK	NYWMSWVRQS T1SRDNSKNT GT1LTVSSAS FPEPVTVSN PAPELLGGPS DPEVKFNWYV HQDWLNGKEY TLPPSREEMT NYKTPPPVLD EALHNHYTQK
27	VL h38C2	ELQMTQSPSS YLQKPGQSPK SSLQPEDFAV	LSASVGDRV LLIYKVSNRF YFCSGQTHLP	ITCRSSQSLL SGVPSRFSGS YTFGGGTKE	HTYGPSYLNW GSGTDFILTI IK
28	VH h38C2	EVQLVESGG PEKGLEWVSE LYLQMNLSRA	LVQPGGSLRL IRLRSNDNYAT EDTG1YYCKT	SCAASGFTFS HYAEVKGRF YFYSFSYWGQ	NYWMSWVRQS T1SRDNSKNT GT1LTVSS
29	VL m38C2	DVVMQTPLS YLQKPGQSPK SRVEAEDLGV	LPVRLGDQAS LLIYKVSNRF YFCSGQTHLP	ITCRSSQSLL SGVPSRFSGS YTFGGGTKE	HTYGPSYLNW GSGTDFILTI IK
30	VH m38C2	EVKLVESGG PEKGLEWVAE LYLQMNLSRT	LVQPGGTMKL IRLRSNDNYAT EDTG1YYCKY	SCEISGLTFR HYAEVKGRF YFYSFSYWGQ	NYWMSWVRQS T1SRDDSKSR GT1LTVSA
31	(G1y ₄ Ser) ₃	GGGGSGGGG SGGGGS			
32	FGF21 카페	MNSNETGFEH	SGLWVSVLAG	LLLGACQA	

33	FGF21 209 잔기 서열, L174(L146) 이소폼	MNSNETGFEH SGLWVSVLAG LLLGACQAHIP IPDSSPLLQF GGQVRQRYLY TDDAQQTTEAH LEIREDGTVG GAADQSPESL LQLKALKPGV IQILGVKTSR FLCQRPDGAL YGSLHFDPEA CSFRELLLED GYNVYQSEAH GLPLHLPGNK SPHRDPAPRG PARFLPLPGL PPALPEPPGI LAPQPPDVGS SDPLSMVGPS QGRSPSYAS
34	G1p-1(1227)	HxEGTFTSDL SSYLEBGQAAK EFLIAWLVRGR
35	액센틴 4	HxEGTFTSDL SKQMEEEAVR LFIEWLKNGG PSSGAPPPS
36	Ex4 동족체 x2 = Aib	HxEGTFTSDL SKQMEEEAVR LFIEWLKNGG PSSGAPPPS
37	Ex4 동족체 x40 (PLR) = K, KSH, KSMAL, Dap, Dab, R, Y, C, T, S 호모시스테인, 호모세린,	HxEGTFTSDL SKQMEEEAVR LFIEWLKNGG PSSGAPPPSx
38	Ex4 동족체 x2 는 Aib x40 = K, KSH, KSMAL, Dap, Dab, R, Y, C, T, S 호모시스테인, 호모세린, 또는 부재	HxEGTFTSDL SKQMEEEAVR LFIEWLKNGG PSSGAPPPSx
39	Ex4 동족체 x2 는 Aib PLR@x38 = K, KSH, KSMAL, Dap, Dab, R, Y, C, T, S 호모시스테인, 호모세린,	HxEGTFTSDL SKQMEEEAVR LFIEWLKNGG PSSGAPPxS
40	Ex4 동족체 x2 는 Aib PLR@x36 = K, KSH, KSMAL, Dap, Dab, R, Y, C, T, S 호모시스테인, 호모세린,	HxEGTFTSDL SKQMEEEAVR LFIEWLKNGG PSSGAxPPS
41	Ex4 동족체 x2 는 Aib PLR@x34 = K, KSH, KSMAL, Dap, Dab, R, Y, C, T, S 호모시스테인, 호모세린,	HxEGTFTSDL SKQMEEEAVR LFIEWLKNGG PSSxAPPPS
42	Ex4 동족체 x2 는 Aib PLR@x32 = K, KSH, KSMAL, Dap, Dab, R, Y, C, T, S 호모시스테인, 호모세린,	HxEGTFTSDL SKQMEEEAVR LFIEWLKNGG PxSGAPPPS
43	Ex4 동족체 x2 는 Aib PLR@x28 = K, KSH, KSMAL, Dap, Dab, R, Y, C, T, S 호모시스테인, 호모세린,	HxEGTFTSDL SKQMEEEAVR LFIEWLKxGG PSSGAPPPS
44	Ex4 동족체 x2 는 Aib PLR@x27 = K, KSH, KSMAL, Dap, Dab, R, Y, C, T, S 호모시스테인, 호모세린,	HxEGTFTSDL SKQMEEEAVR LFIEWLxNGG PSSGAPPPS
45	Ex4 동족체 x2 는 Aib PLR@x26 = K, KSH, KSMAL, Dap, Dab, R, Y, C, T, S 호모시스테인, 호모세린,	HxEGTFTSDL SKQMEEEAVR LFIEWxKNGG PSSGAPPPS
46	Ex4 동족체 x2 는 Aib PLR@x24 = K, KSH, KSMAL, Dap, Dab, R, Y, C, T, S 호모시스테인, 호모세린,	HxEGTFTSDL SKQMEEEAVR LFIxWLKNGG PSSGAPPPS
47	Ex4 동족체 x2 는 Aib PLR@x23 = K, KSH, KSMAL, Dap, Dab, R, Y, C, T, S 호모시스테인, 호모세린,	HxEGTFTSDL SKQMEEEAVR LFxEWLKNGG PSSGAPPPS
48	Ex4 동족체 x2 는 Aib PLR@x21 = K, KSH, KSMAL, Dap, Dab, R, Y, C, T, S 호모시스테인, 호모세린,	HxEGTFTSDL SKQMEEEAVR xFIEWLKNGG PSSGAPPPS
49	Ex4 동족체 x2 는 Aib PLR@x20 = K, KSH, KSMAL, Dap, Dab, R, Y, C, T, S 호모시스테인, 호모세린,	HxEGTFTSDL SKQMEEEAVx LFIEWLKNGG PSSGAPPPS
50	Ex4 동족체 x2 는 Aib PLR@x19 = K, KSH, KSMAL, Dap, Dab, R, Y, C, T,	HxEGTFTSDL SKQMEEEAxR LFIEWLKNGG PSSGAPPPS

	S 호모시스테인, 호모세린,	
51	Ex4 동족체 x2 는 Aib PLR@x17 = K, KSH, KSMAL, Dap, Dab, R, Y, C, T, S 호모시스테인, 호모세린,	HxEGTFTSDL SKQMEE <u>x</u> AVR LFIEWLKNGG PSSGAPPS
52	Ex4 동족체 x2 는 Aib PLR@x16 = K, KSH, KSMAL, Dap, Dab, R, Y, C, T, S 호모시스테인, 호모세린,	HxEGTFTSDL SKQMExAVR LFIEWLKNGG PSSGAPPS
53	Ex4 동족체 x2 는 Aib PLR@x14 = K, KSH, KSMAL, Dap, Dab, R, Y, C, T, S 호모시스테인, 호모세린,	HxEGTFTSDL SKQ <u>x</u> EEAVR LFIEWLKNGG PSSGAPPS
54	Ex4 동족체 x2 는 Aib PLR@x13 = K, KSH, KSMAL, Dap, Dab, R, Y, C, T, S 호모시스테인, 호모세린,	HxEGTFTSDL SK <u>x</u> MEEAVR LFIEWLKNGG PSSGAPPS
55	Ex4 동족체 x2 는 Aib PLRx@12 = K, KSH, KSMAL, Dap, Dab, R, Y, C, T, S 호모시스테인, 호모세린,	HxEGTFTSDL S <u>x</u> QMEEAVR LFIEWLKNGG PSSGAPPS
56	Ex4 동족체 x2 는 Aib PLRx@11 = K, KSH, KSMAL, Dap, Dab, R, Y, C, T, S 호모시스테인, 호모세린,	HxEGTFTSDL <u>x</u> KQMEEAVR LFIEWLKNGG PSSGAPPS
57	Ex4 동족체 x2 는 Aib PLR@x31 = K, KSH, KSMAL, Dap, Dab, R, Y, C, T, S 호모시스테인, 호모세린,	HxEGTFTSDL SKQMEEAVR LFIEWLKNGG <u>x</u>
58	Ex4 동족체 x2 는 Aib PLR@x21 = K, KSH, KSMAL, Dap, Dab, R, Y, C, T, S 호모시스테인, 호모세린,	HxEGTFTSDL SKQMEEAVR <u>x</u> FIEWLKNGG PSS
59	Ex4 동족체 x1 은 d-His, x2 는 Aib PLR@x14 = K, KSH, KSMAL, Dap, Dab, R, Y, C, T, S 호모시스테인, 호모세린,	xxEGTFTSDL SKQ <u>x</u> EEAVR LFIEWLKNGG PSSGAPPS
60	Ex4 동족체 x2 는 Aib x40 카복시 말단 또는 측쇄를 통해 연결기에 연결된 임의의 아미노산이 존재하는 경우, 및 x40 은 부제, x12, x14, x19, x20, x21 중 하나는 기 K, KSH, KSMAL, Dap, Dab, R, Y, C, T, S 호모시스테인, 또는 호모세린으로부터 선택된 PLR 인 경우, 및 PLR 이 아닌 경우, x12=K, x14=M, x19=V, x20=R, x21=L	HxEGTFTSDL S <u>x</u> Q <u>x</u> EEA <u>xx</u> <u>x</u> FIEWLKNGG PSSGAPPS <u>x</u>
61	Ex4 동족체 x2 는 Aib PLR@12=K	HxEGTFTSDL SKQMEEAVR LFIEWLKNGG PSSGAPPS
62	Ex4 동족체 x2 는 Aib PLR@x12=KSH; [u=2].	HxEGTFTSDL S <u>x</u> QMEEAVR LFIEWLKNGG PSSGAPPS
63	Ex4 동족체 x2 는 Aib PLR@14=K; [u=2].	HxEGTFTSDL SK <u>Q</u> EEAVR LFIEWLKNGG PSSGAPPS
64	Ex4 동족체 x2 는 Aib PLR@14=KSH; [u=2].	HxEGTFTSDL SKQ <u>x</u> EEAVR LFIEWLKNGG PSSGAPPS
65	Ex4 동족체 x2 는 Aib PLR@19=K; [u=2].	HxEGTFTSDL SKQMEEEA <u>K</u> R LFIEWLKNGG PSSGAPPS
66	Ex4 동족체 x2 는 Aib PLR@19=KSH; [u=2].	HxEGTFTSDL SKQMEEEA <u>x</u> R LFIEWLKNGG PSSGAPPS

67	Ex4 동족체 x2 는 Aib PLR@20-K; [u=2].	HxEGTFTSDL SKQMEEEAV <u>K</u> LFIEWLKNGG PSSGAPPPS
68	Ex4 동족체 x2 는 Aib PLR@20-KSH; [u=2].	HxEGTFTSDL SKQMEEEAV <u>x</u> LFIEWLKNGG PSSGAPPPS
69	Ex4 동족체 x2 는 Aib PLR@21-K; [u=2].	HxEGTFTSDL SKQMEEEAVR <u>K</u> FIEWLKNGG PSSGAPPPS
70	Ex4 동족체 x2 는 Aib PLR@21-KSH; [u=2].	HxEGTFTSDL SKQMEEEAVR <u>x</u> FIEWLKNGG PSSGAPPPS
71	Ex4 동족체 x2 는 Aib PLR@40-K; [u=2].	HxEGTFTSDL SKQMEEEAVR LFIEWLKNGG PSSGAPPPS <u>K</u>
72	Ex4 동족체 x2 는 Aib PLR@40-KSH; [u=2].	HxEGTFTSDL SKQMEEEAVR LFIEWLKNGG PSSGAPPPS <u>x</u>
73	FGF21 P171C 속 x1= H 또는 부재, x146= L 또는 P.	xPIPDSPLQ QFGQQVRQRY LYTDAAQQTE AHLEIREDTG VGGAADQSPE SLLQLKALKP GVIQILGVKT SRFLCQRPDG ALYGSLSHFDP EACSFRELL EDGYNVYQSE AHGLPLHLPG NKSPIRDPAP RGPARFLPLP GLPPAxPEPP GILAPQPPDV GSSDPLSMVG CSQGRSPSYA S
74	FGF21AH-P171C X1= H 또는 부재, L146, P171C	xPIPDSPLQ QFGQQVRQRY LYTDAAQQTE AHLEIREDTG VGGAADQSPE SLLQLKALKP GVIQILGVKT SRFLCQRPDG ALYGSLSHFDP EACSFRELL EDGYNVYQSE AHGLPLHLPG NKSPIRDPAP RGPARFLPLP GLPPALPEPP GILAPQPPDV GSSDPLSMVG CSQGRSPSYA S
75	FGF21AH-P171C X1=H 또는 부재, P146, P171C,	xPIPDSPLQ QFGQQVRQRY LYTDAAQQTE AHLEIREDTG VGGAADQSPE SLLQLKALKP GVIQILGVKT SRFLCQRPDG ALYGSLSHFDP EACSFRELL EDGYNVYQSE AHGLPLHLPG NKSPIRDPAP RGPARFLPLP GLPPAPPEPP GILAPQPPDV GSSDPLSMVG CSQGRSPSYA S
76	h38C2-IgG2 HC:	EVQLVESGG LVQPGSRLR SCAASGFTFS NYWMSWRQSV PEKGLEWVSE IRLRSNDNYAT HYAESVKGRF TISRDNSKNT LYLQMNLSRA EDTGIVYCKT YFYSFSYWGQ GTLVTVSSAS TKGPSVFPLA PCSRSTSEST AALGCLVKDY FPEPVTVSWN SGALTSGVHT FPAVLQSSGL YSLSSVVTVP SSNFGTQTYT CNVDEHKPSNT KVDKTVERKC CVECPPCPAP PVAGPSVFLF PPKPKDTLMI SRTPEVTCVV VDVSHEDEPV QFNWYVDGVE VHNAKTKPRE EQFNSTFRVV SVLTVVHQDW LNGKEYKCKV SNKGLPSSIE KTI SKTKGQP REPQVYTLPP SREEMTKNQV SLTCLVKGFY PSDIAVEWES NGQPENNYKT TPPMLDSDGS FFFLYSKLTVD KSRWQQGNVF SCSVMHEALH NYHTQKSLSL SPGK
77	Ex4 동족체 X1 은 C(O)CH ₃ x3 은 Aib x15 = PLR@15=KSH; [u=2]. X41=NH ₂	xHxEGTFTSD LSKQ <u>x</u> EEEAV RLFIEWLKNG GPSSGAPPPS <u>x</u>
78	h38C2-IgG1 LC 불변 영역 속 x46-V 또는 A, x84-V 또는 L	RTVAAPSVFI FPPSDEQLKS GTASVVCLLN NFYPREAKVQ WKVDN <u>x</u> LQSG NSQESVTEQD SKDSTYSLSS TLTLSKADYE KHKLYACEVT HQGLSSPVTK SFNRGEC
79	h38C2-IgG1 LC 불변 영역 Km(1)	RTVAAPSVFI FPPSDEQLKS GTASVVCLLN NFYPREAKVQ WKVDN <u>V</u> LQSG NSQESVTEQD SKDSTYSLSS TLTLSKADYE KHKLYACEVT HQGLSSPVTK SFNRGEC
80	h38C2-IgG1 LC 불변 영역 Km(1,2)	RTVAAPSVFI FPPSDEQLKS GTASVVCLLN NFYPREAKVQ WKVDN <u>AL</u> LQSG NSQESVTEQD SKDSTYSLSS TLTLSKADYE KHKLYACEVT HQGLSSPVTK SFNRGEC

81	h38C2-IgG1 LC 불변 영역 Km(3)	RTVAAPSVFI FPPSDEQLKS GTASVVCLLN NFYPREAKVQ WKVDN <u>AL</u> LQSG NSQESVTEQD SKDSTYSLSS TLTLSKADYE KHKLYACEVT HQGLSSPVTK SFNRGEC
82	H38C2 IgG1 HC 불변 영역	AS TRGPSVFPLA PSSKSTSGGT AALGCLVKDY FPEPVTVSWN SGALTSGVHT FPAVLQSSGL YSLSSVVTVP SSSLGTQTYI CNVNHKPSNT KVDKRVEPKS CDKTHTCP PAPELLGGPS VFLFPKPKD TLMI SRTPEV TCVVVDVSHE DPEVKFNWYV DGVEVHNAKT KPREEQYNST YRVVSVLTVL HQDWLNGKEY KCKVSNKALP APIEKTISKA KGQPREPQVY TLPSSREEMT KNQVSLTCLV KGFYPSDIAV EWESNGQPE NYKTTPPVLD SDGSFFLYSK LTVDKSRWQQ GNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSLSPGK

[0380] 서열번호 1은 181개 잔기가 발현된 단백질을 나타내고, 이때 H¹은 임의적이고 잔기 146은 L 또는 P일 수 있다. 접합을 위해 시험된 잔기 위치는 밑줄 및 굵은 글씨이다. 서열번호 1에 대한 넘버링을 전체에 걸쳐 사용하였다.

[0383]

또한, 인간화된 38c2 IgG1의 하나의 실시양태의 경쇄 및 중쇄(각각 서열번호 25 및 26)의 아미노산 서열을 나타내었다. 가변 영역(VC 및 VH)은 밀줄을 치고 상보성 결정 영역(CDR)은 굵은 글씨로 나타내었다. 본원에 기재된 연결기와 공유적으로 합한 측쇄를 갖는 리신 99는 HC CDR3에 인접한다.

도면의 간단한 설명

[0384]

도 1은 m38c2, h38c2 및 인간 생식계열 가변 도메인의 아미노산 서열 정렬이다. 구조형성 영역(FR) 및 CDR은 카밧 등의 문헌에 따라 정의된다. 별표 표시는 m38c2와 h38c2, 또는 h38c2와 인간 생식계열의 차이이다.

도 2a, 2b 및 2c는 L2, L3 또는 L4와 비교하여 연결기-1(L1)에 접합된 Ab-FGF21ΔH-A129C의 단일 투여량 마우스 약동학적 연구이다. 성숙 수컷 스위스 웨스터(Swiss-Webster) 마우스 새끼를 3 mg/kg IV 또는 SC로 투여하였다. 모든 경우에, L1과의 접합물은 반감기(L1 접합물에 대하여 약 33시간 SC 및 IV; L2, L3 및 L4 접합물에 대하여 13 내지 23시간 SC 및 22 내지 37시간 IV) 및/또는 SC 생물학적 이용가능성(L1 접합물에 대하여 약 100%; L2, L3 또는 L4 접합물에 대하여 48 내지 53%)이 더 잘 수행되었다.

도 3a는 L2와 비교하여 L1과 접합된 Ab-FGF21ΔH-A129C의 단일 투여량 래트의 약동학적 연구이다. 성숙 수컷 스프래그 다우리(Sprague Dawley) 래트를 3 mg/kg IV 또는 SC로 투여하였다. 2가지 투여 경로를 위해, L1과 접합은 반감기(L1 접합물에 대하여 약 39시간 SC 내지 약 60시간 IV; L2 접합물에 대하여 약 33시간 SC 내지 약 52시간 IV) 및 SC 생물학적 이용가능성(L1 접합물에 대하여 약 52%; L2 접합물에 대하여 36%)에 대하여 L2 접합물 보다 더 잘 수행되었다.

도 3b는 Ab-L1-FGF21ΔH-D79C, Ab-L7-FGF21ΔH-D79C 및 Ab-L8-FGF21ΔH-D79C의 PK의 비교이다.

도 4a 및 4b는 단일 SC 투여량이 주어진 ob/ob 마우스에 경구 당내성 시험(OGTT) 동안 곡선하 글루코스 면적 (AUC)이다(꺾쇠 팔호는 평균 글루코스 AUC(비히를 대조군의 %)): 비히를 [100], FGF21ΔH(1 mg/kg [74]), FGF21ΔH(0.6 mg/kg [103])(투명성에 대하여 도 4b에서 나타내지 않음), Ab-FGF21ΔH-H125C(3 mg/kg [66] 및 1mg/kg [87])(L1과 접합됨), Ab-FGF21ΔH-K59(3 mg/kg [105])(L5와 접합됨), Ab-FGF21ΔH-Knul1-H1K(3 mg/kg [100])(L5와 접합됨), 린 대조군(Lean control) [56]. 일방향 아노바(ANOVA)에 의한 *P<0.05, **P<0.01 대 PBS.

도 5a 및 5b는 단일 SC 투여량이 주어진 ob/ob 마우스에 OGTT 동안 누적 체중(A) 및 간 중량(B) 변화이다(꺾쇠 팔호는 평균 체중(g), 중 팔호는 평균 간 중량(g)): 비히를 [2.6] {2.4}, FGF21ΔH(1 mg/kg [2.5] {2.2}), FGF21ΔH(0.6 mg/kg [3.2] {2.4}), Ab-FGF21ΔH-A129C(3 mg/kg [1.7] {2.0})(L1과 접합됨), Ab-FGF21ΔH-K59(3 mg/kg [2.7] {2.4})(L5와 접합됨), Ab-FGF21ΔH-Knul1-H1K(3 mg/kg [2.6] {2.4})(L5와 접합됨), 린 대조군 [0.6] {1.0}. 이방향 아노바(A) 및 일방향 아노바(B)에 의한 *P<0.05, **P<0.01 대 PBS.

도 6a는 단일 투여량이 주어진 ob/ob 마우스에서 누적 체중 변화이다(꺾쇠 팔호는 평균 체중(g)): 비히를 [1.7], FGF21ΔH [1.9], FGF21ΔH-D79C(2mg/kg [2.1]), Ab-FGF21ΔH-D79C(10 mg/kg [1.4]), Ab-FGF21ΔH-H125C(10 mg/kg [0.8]), 및 Ab-FGF21ΔH-A129C(10 mg/kg [0.9]), 린 비히를 [0.6]. d0: 0일. 모든 Ab 접합물은 L1을 사용하였다. 이방향 아노바에 의한 **P<0.01 대 PBS.

도 6b는 단일 투여량이 주어진 ob/ob 마우스에서 OGTT 동안 글루코스 AUC이다(꺾쇠 팔호는 평균 글루코스 AUC%): 비히를 [100], FGF21ΔH [63], Ab-FGF21ΔHD79C(2 mg/kg [86]), FGF21ΔH-D79C(10 mg/mL [54]), Ab-FGF21ΔH-H125C(10 mg/mL [51]), 및 Ab-FGF21ΔH-A129C(10 mg/kg [54]), 린 대조군 [48]. 모든 Ab 접합물은 L1을 사용하였다. 일방향 아노바에 의한 **P<0.01 대 비히를.

도 6c는 FGF21ΔH 및 Ab-FGF21ΔH-D79C(10 mg/kg)로 투여된 ob/ob 마우스에서 OGTT 동안 글루코스 AUC이다. Ab-FGF21ΔH-D79C를 연결기-1과 접합하였다. **P<0.01 대 비히를.

도 6d는 6일째 FGF21ΔH 및 Ab-FGF21ΔH-D79C(10 mg/kg)로 투여된 ob/ob 마우스에서 OGTT 동안 글루코스 AUC이다. Ab-FGF21ΔH-D79C를 L1과 접합하였다. **P<0.01 대 ob/ob-PBS.

도 6e는 0, 1, 2 또는 3일째(3 mg/kg) Ab-FGF21ΔH-A129C의 단일 투여량이 주어진 ob/ob 마우스에서 6일째 수행된 OGTT 동안 글루코스 AUC이다. Ab-FGF21ΔH-A129C를 L1과 접합하였다. 일방향 아노바에 의한 *P<0.05, ***P<0.001 대 PBS.

도 6f는 Ab-FGF21ΔH-A129C의 단일 투여량이 ob/ob 마우스(10 mg/kg)에서 백색 지방 조직의 Ucp1 발현을 증가시킴을 나타낸다. Ab-FGF21ΔH-A129C를 L1과 접합하였다.

도 6g는 Ab-FGF21ΔH-A129C의 단일 투여량이 ob/ob 마우스(10 mg/kg)에서 간 트리글리세라이드를 감소시킴을 나타낸다. Ab-FGF21ΔH-A129C를 L1과 접합하였다. 일방향 아노바에 의한 *P<0.05, ***P<0.001 대비하를.

도 6h는 0, 1, 2 또는 3일째(10 mg/kg) Ab-FGF21ΔH-A129C의 단일 투여량이 주어진 ob/ob 마우스에서 누적 체중 변화이다. Ab-FGF21ΔH-A129C를 L1과 접합하였다.

도 7a는 Ab-FGF21ΔH-A129C의 반복 투여량(0 및 7일째 10 mg/kg)이 DIO 마우스에서 당내성을 개선함을 나타낸다. OGTT를 10일째 수행하였다. Ab-FGF21ΔH-A129C를 L1과 접합하였다. 일방향 아노바에 의한 *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001 대비하를.

도 7b는 0 및 7일째(10 mg/kg) Ab-FGF21ΔH-A129C의 2종 투여량이 주어진 DIO 마우스에서 누적 체중 변화이다. Ab-FGF21ΔH-A129C를 L1과 접합하였다. 이방향 아노바에 의한 *P<0.05 대비하를.

도 7c는 Ab-FGF21ΔH-A129C의 반복 투여량이 DIO 마우스(10 mg/kg)에서 백색 지방 조직의 Ucp1 발현을 증가시킴을 나타낸다. Ab-FGF21ΔH-A129C를 L1과 접합하였다. 일방향 아노바에 의한 **P<0.01 대비하를.

도 7d는 Ab-FGF21ΔH-A129C가 DIO 마우스(10 mg/kg)에서 혈청 트리글리세리드를 낮춤을 나타낸다.

도 7e는 Ab-FGF21ΔH-A129C가 DIO 마우스(10 mg/kg)에서 혈청 비에스터화된 지방산을 낮춤을 나타낸다.

도 7f는 Ab-FGF21ΔH-A129C 간 중량이다. Ab-FGF21ΔH-A129C를 L1과 접합하였다. 일방향 아노바에 의한 *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001 대비하를(A, B) 및 PBC(C).

도 7g, 7h 및 7i는 ob/ob 마우스에서 간의 유전자 발현 상의 Ab-FGF21ΔH-A129C의 효과를 나타낸다. (7g) SCDF1: 스테아로일-CoA 불포화효소 1, (7h) MOGAT2: 모노아실글리세롤 아실전이효소 2, (7i) FoxA2: 포크헤드 (forkhead) 전사 인자 A2. Ab-FGF21ΔH-A129C를 L1과 접합하였다. 일방향 아노바에 의한 0.01 대비하를.

도 8은 ob/ob 마우스에서 화합물의 반복 SC 주사 후 OGTT 3일 동안의 혈당이다. Ab[FGF21]₂ = h38C2(IgG2)[서열번호 10-L1]₂. Ab[Ex4]₂ = h38C2(IgG1)-[서열번호 64-L1]₂. ABC-1 = [서열번호 10-L1]₁-[h38C2-IgG1]-[L1-서열번호 64]₁.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0385]

실시예

[0386]

본 발명의 다양성은 본 발명의 전형적인 실시양태를 예시하고 어떠한 방식으로도 특허청구범위 및 명세서를 제한하지 않는, 하기 실시예에 의해 예시된다.

[0387]

실시예 1: FGF21 상에서 쇠적 테더(tether) 부위 확인

[0388]

연결기를 통해 FGF21을 촉매 항체 결합 부위에 접합하기 위한 쇠적 부위를 확인하기 위해 연구를 수행하였다. 2개의 접합 전략을 고려하였다: 표면 리신 측쇄를 통한 접합, 및 표면 시스테인 측쇄를 통한 접합. 통상적으로, 구형 단백질은 이의 표면상에 짹이 없는 시스테인 잔기를 갖지 않고, 따라서 단백질 표면에서 단일 시스테인의 혼입은 특이적 접합을 위해 단일 부위에서 조작되도록 사용될 수 있다. 그러나, 시스테인을 갖는 표면 잔기의 돌연변이는 종종 분자간 이량체, 네이티브 이황화 결합의 짹짓기 오류, 및 수용체 결합에 간섭 등의 문제를 야기할 수 있다. 이러한 이유로 인해, 단백질 접합은 리신 잔기를 통해 가장 통상적으로 수행된다.

[0389]

FGF21 수용체의 상동 모델링 및 이의 활성 메카니즘

[0390]

FGF21은 FGFR1c 및 FGFR4 둘다에 결합하지만, 수용체 복합체는 FGFR1c를 통해서만 활성화될 수 있다. 비록 FGFR1b 및 FGFR1c가 87% 동일성을 공유할지라도(FGFR1b는 IIIb/c 대안적인 스플라이싱(splicing) 영역을 제외하고 FGFR1c와 동일함), FGF21은 FGFR1c만 특이적으로 인지한다. 본 발명은 주형으로서 FGFR2-FGFR1c 결정 구조를 사용하여 FGF21-FGFR1c의 복합체 구조의 상동 모델링을 수행하였다. 상동 모델링 및 구조적 분석을 위해 MOE 소프트웨어를 사용하였다. 수용체의 활성화는 또 다른 세포 표면 수용체인 β -클로토를 필요로 한다. β -클로토는 인간 사이토졸 β -글루코시다아제와 매우 유사한(약 35% 동일함) 2개의 도메인을 갖는다. 인간 β -클로토 구조를 인간 사이토졸 β -글루코시다아제를 사용하여 모델링하고, FGF21-FGFR1c의 모델링된 구조 내의 구

조를 정렬하였다. 이 모델링된 복합체 구조는 FGF21에 최적 리신 접합 부위 및 최적 시스테인 잔기 혼입을 위한 합리적인 지침을 제공하였고, 이는 FGF21과 FGFR1c 사이 및 FGF21과 β -클로토 사이의 결합 접점을 차단하지 않아야 한다.

[0391] 접합 부위 선택을 위해 하기 기준을 사용하였다:

(1) 잔기는 가능한 한 많은 구조에서 용매에 노출되어야 한다;

(2) 잔기는 이황화 결합으로부터 멀리 떨어져야 한다;

(3) 잔기는 수용체 및 β -클로토 결합 표면으로부터 멀리 떨어져야 한다.

[0395] 용매에 노출은 접근가능 표면 지역(ASA)에 근거하여 추정될 수 있다. FGF21의 모델링된 구조로부터 ASA의 계산은 CCP4 소프트웨어(문헌[The CCP4 Suite: Programs for Protein crystallography''. (1994) Acta Cryst. D50, 760-763]) 및 내부 프로그램을 사용하여 수행하였다. 간단히, CCP4의 프로그램은 이의 로그 파일 중 잔기 당 평방 옴스트롬의 값을 계산한다. ASA의 분획(fASA)을 계산하기 위해, 내부 프로그램을 사용하여 잔기 당 ASA를 정규화하였다. 표 1은 ASA의 잔기 뿐만 아니라 fASA를 나타낸다. 측쇄가 표면을 가릴 것으로 예상되는 잔기는 포함되지 않았다. 컬럼 1은 아미노산 명칭이고, 2는 잔기 수이고, 3은 ASA(평방 옴스트롬)이고, 4는 노출된 분획이다. fASA 값은 주어진 폴리펩티드 내의 아미노산 잔기에 대한 용매의 접근성을 정의한다. 0에 가까운 fASA 값은 잔기가 용매에 접근불가능할 수 있는 것으로 예견되어, 접합을 위해 연결기에 접근가능하기가 더욱 어려운 것으로 제안됨을 나타낸다. 0.3의 절대 최소 fASA 값, 특히 접합 부위의 예상 후보를 시사하는 1.00 초과의 표면 지역 값이 사용되었다.

[0396] ASA 분석에 기초하여, K122(표면 지역 164.4) 및 K59(표면 지역 117.2)는 접합을 위한 가장 유망한 후보 부위로 간주되었다. 또한, K69(표면 지역 91) 및 K56(표면 지역 73)은 비교 목적을 위해 접합되었다.

표 1

FGF21의 표면 잔기의 비교

아미노산	잔기 수	표면적	노출된 분획	아미노산	잔기 수	표면적	노출된 분획
GLY	14	105.2	1.25387	PHE	88	123	0.55083
GLN	15	158.5	0.83774	ASP	89	50.7	0.32626
VAL	16	81.5	0.50216	PRO	90	107.5	0.7424
ARG	17	91.6	0.36743	GLU	91	121.5	0.64904
ARG	19	78.6	0.31528	ARG	96	92.6	0.37144
ALA	26	93.9	0.8067	LEU	98	114	0.57576
GLN	27	126.5	0.66861	LEU	99	113.2	0.57172
GLN	28	169.4	0.89535	GLU	101	182.1	0.97276
THR	29	64.2	0.43349	ASP	102	94.6	0.60875
GLU	30	103.9	0.55502	GLY	103	56.1	0.66865
GLU	37	117.1	0.62553	GLN	108	72.6	0.33372
ASP	38	90.5	0.58237	GLU	110	132.4	0.70727
THR	40	49.8	0.33626	ALA	111	62.7	0.53866
GLY	43	38.1	0.45411	GLY	113	56.8	0.677
ALA	45	93.6	0.80412	LYS	122	164.4	0.79229
ASP	46	95	0.61133	PRO	124	67.4	0.46547
PRO	49	82.4	0.56906	HIS	125	168.4	0.84836
GLN	54	66.8	0.35307	ARG	126	131.4	0.52708
LYS	56	73	0.35181	PRO	128	91.3	0.63053
ALA	57	46.6	0.40034	ALA	129	78.8	0.67698
LEU	58	82.7	0.41768	ARG	131	225.5	0.90453
LYS	59	117.2	0.56482	GLY	132	65.8	0.78427
PRO	60	153.8	1.06215	PRO	133	84.9	0.58633
GLY	61	27.9	0.33254	ARG	135	106.2	0.42599
VAL	68	58.8	0.36229	GLY	141	30.4	0.36234
LYS	69	91	0.43855	LEU	142	69.1	0.34899
SER	71	69	0.54893	PRO	143	71.4	0.49309
ARG	77	129.4	0.51905	ALA	145	86.4	0.74227
PRO	78	98.9	0.68301	LEU	146	123.3	0.62273
ASP	79	109.8	0.70656	PRO	147	131.1	0.90539
TYR	83	84.4	0.35418	GLU	148	67.3	0.35951
LEU	86	119.4	0.60303	PRO	149	170	1.17403
HIS	87	104.8	0.52796				

[0397]

실시예 2: FGF21 단백질 및 돌연변이체의 생성

[0399]

FGF21 cDNA를 ATCC로부터 구입하였다. 포유류 및 세균 발현 벡터를 각각 pcDNA3.1(인비트로겐(Invitrogen: 등록상표) 및 pET21b(이엠디(EMD))를 사용하여 구성하였다. FGF21의 돌연변이 변이체를 위해, 돌연변이를 콕체인지(QuikChange: 등록상표) 부위-지정 돌연변이유발 키트(스트라타진(Stratagene: 등록상표))를 사용하여 발현 벡터 내에 도입하였다. 목적한 돌연변이의 존재는 DNA 시퀀싱으로 확인하였다.

[0400]

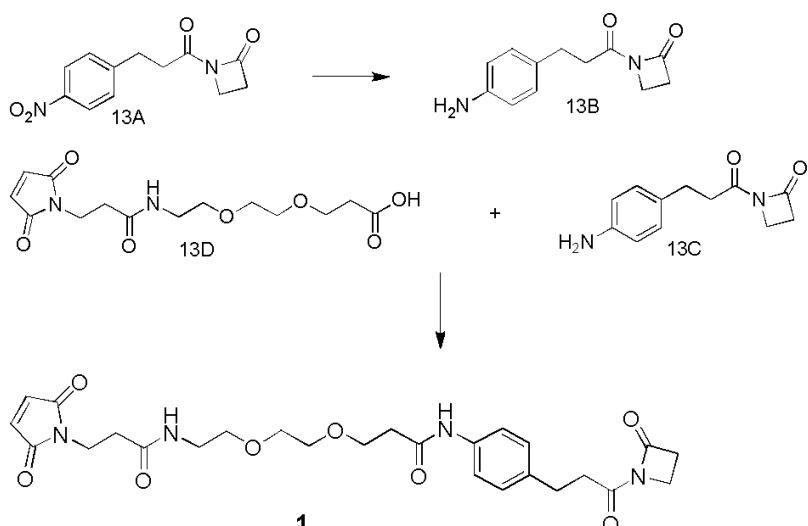
포유류 발현을 위해, HEK293F 세포(인비트로겐(등록상표))를 293팩틴제(인비트로겐(등록상표))를 사용하여 FGF21의 포유류 발현 벡터로 형질감염시키고 무혈청 배지에서 키웠다. 무균-여과하고, 조건부 매질을 완충액 A(pH 7.5에서 20 mM 트리스-HCl)에 대하여 희석하고 완충액 A로 미리 평형시킨 하이트랩(HiTrap) Q 컬럼(지이 헬쓰케어(GE healthcare: 등록상표)) 위에 로딩하였다. FGF21 단백질을 완충액 A로부터 완충액 B까지의 선형 구배(pH 7.5에서 20 mM 트리스-HCl 및 100 mM NaCl)로 용리하였다. 모아진 분획을 농축하고 포스페이트 완충 염수(PBS, pH 7.4)로 세파텍스(Sephadex) 300 위에 로딩하였다. 생성된 단백질 용액을 농축하고 80°C 이하로 저장하였다. SDS-PAGE 및 RP-HPLC로 순도를 확인하였다.

[0401]

에스케리키아 콜라이(*Escherichia coli*)로부터 FGF21ΔH의 생성을 위해, 세균 발현 벡터를 숙주 균주 BL21-(DE3)-RIL(스트라타진: 등록상표)에 형질전환시켰다. 형질전환 세포를 LB 배지(1 L)에서 37°C로 키우고, 발현

을 1 mM 이소프로필 β -D-티오갈락토파이어노시드를 첨가하여 시작하였다. 4시간 후, 세포를 수화하고 -20°C에서 냉동시켰다. 냉동된 세포 페이스트를 용해 완충액(50 mM 트리스, 10 mM EDTA, pH 7.5)에 혼탁하고, 미세유동화기를 통해 4회 통과시켰다. 17,000 X g, 4°C에서 30분 원심분리 후, 봉입체(IB) 함유 펠렛을 pH 7.5에서 50 mM 트리스에 재현탁하였다. 세척된 IB 슬러리를 원심분리하였다(30분, 17,000 X g, 4°C). IB 펠렛을 -80°C에서 저장하였다. 냉동된 IB 펠렛을 1 내지 10 mg/mL FGF21에서 pH 10.5에서 7 M 우레아, 5 mM DTT 및 50 mM 비스-트리스 프로판으로 용해하고 1시간 동안 교반하여 단백질을 용해하고 감소시켰다. 이어서, 용해된 IB를 pH 8.0에서 50 mM 비스-트리스 프로판에 10회 희석하였다. 최종 단백질 농도는 0.1 내지 1 mg/mL이었다. 용액을 약 2일 동안 교반하고 pH 7.5에서 20 mM 트리스 HC1(4 L)로 투석하였다. 단백질 용액을 30분 동안 14,000 X g에서 원심분리하였다. 상청액을 하이트랩 Q HP(지이 헬쓰케어)에 로딩하고 완충액 A로 평형시켰다(상기 참조). 비결합된 세균 단백질을 완충액 A로 세척하고 FGF21 단백질을 완충액 B의 선형 구배로 용리하였다. 이어서, FGF21 분획을 PBS 완충액으로 미리 평형시킨 하이트랩 퀄레이팅 HP 컬럼(지이 헬쓰케어) 위에 로딩하였다. FGF21 단백질을 PBS로부터 PBS 완충액 + 100 mM 이미다졸(pH는 7.4로 조정됨)로의 선형 구배로 용리하였다. 분획을 수집하고 농축하고(50 mg/mL 까지) 단백질 용액을 PBS(깁코(Gibco: 등록상표), pH 7.4)로 평형시킨 크기 배제 컬럼(하이로드 26/60, 슈퍼텍스 300)에 적용하였다. 정제된 단백질을 0.22 μ m 필터로 멸균하고 -80°C에서 저장하였다. 배양 배지(8 L)로부터의 FGF21 Δ H의 전형적인 수율은 600 내지 700 mg이었다. 전형적인 순도는 95% 초과이었다. 전형적인 내독소 수준은 약 1 EU/mg이었다. FGF21의 시스테인 및 리신-대-아르기닌 돌연변이체를 생성하고 FGF21 Δ H와 유사한 방식으로 정제하였다. 정제된 단백질의 전형적인 수율은 350 내지 400 mg이었다. 엘만(Elman) 시약을 사용하여 자유 시스테인을 확인하였다.

실시예 3: 연결기 1의 합성



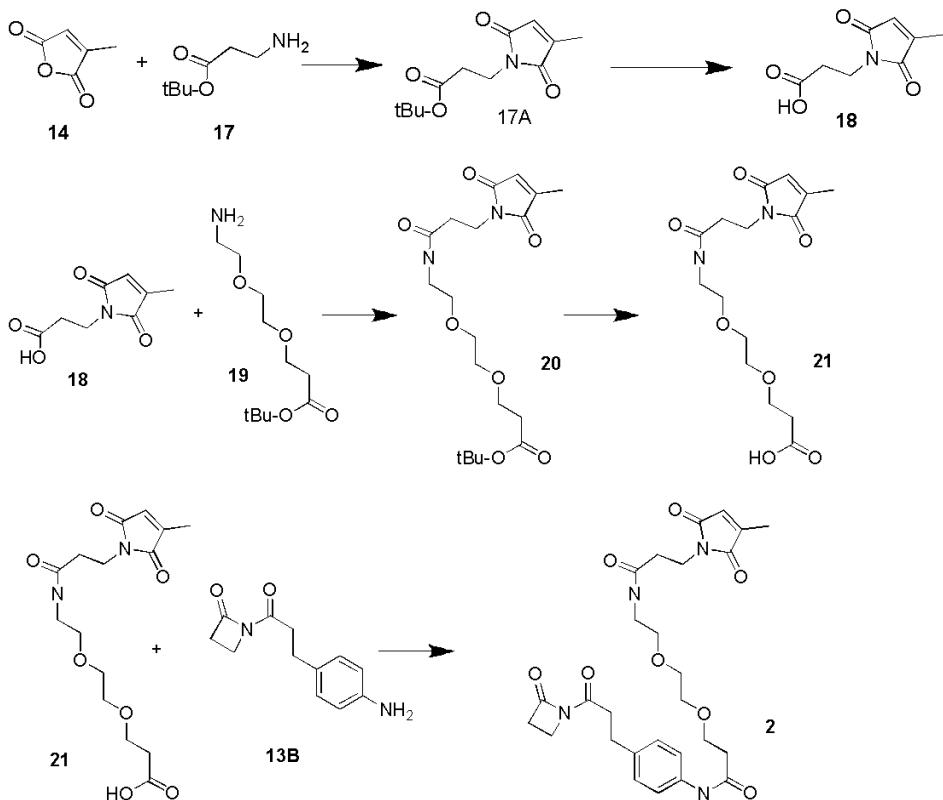
[0403]

[0404]

연결기 1의 합성: 탄소 상 팔라듐(예컨대, 약 1.0 g, 약 0.47 mmol)을 염산(예컨대, 약 2.5 mL, 약 30.2 mmol)에 일부 적가한 후 메탄올(예컨대, 약 200 mL) 중 화합물 13A(예컨대, 약 5 g, 약 20.1 mmol)의 혼탁액에 약 35°C에서 질소의 대기하에 적가하였다. 수소를 상기 용액에 약 35°C에서 천천히 발포하고 용액을 약 2시간 동안 상기 온도에서 교반하였다. 고체를 셀라이트의 베드를 통해 여과하고, 수집하였다. 여액을 감압하에 농축하고 고체를 진공하에 건조시켜 하이드로클로라이드 염으로서 화합물 13B를 수득하였다. 화합물 13B를 다이클로로메탄(예컨대, 약 200 mL) 및 나트륨 바이카보네이트의 포화 용액(예컨대, 약 250 mL)과 혼합하고, 다이클로로메탄 층을 분리하였다. 다이클로로메탄 층을 포화 나트륨 클로라이드(예컨대, 약 250 mL)로 세척하고 나트륨 셀페이트 상에서 건조시켰다. 유기 층을 여과하고, 감압하에 농축하고 플래시 크로마토그래피(SiO₂, 헥산 중 약 60% 에틸 아세테이트)를 사용하여 정제하여 화합물 13C(예컨대, 약 2.94 g, 약 68%)를 수득하였다. 다이클로로메탄(예컨대, 약 200 mL) 중 화합물 13C(예컨대, 약 4.65 g, 약 21.3 mmol), 화합물 13D(예컨대, 약 7.00 g, 약 21.3 mmol), N-(3-다이메틸아미노프로필)-N'-에틸카보다이이미드 하이드로클로라이드(예컨대, 약 3.3 g, 약 21.3 mmol) 및 N,N-다이이소프로필에틸아민(예컨대, 약 2.75 g, 약 21.3 mmol)의 용액을 약 0°C에서 질소하에 5 분 동안 교반하고 실온에서 약 4시간 동안 교반하였다. 유기 층을 나트륨 바이카보네이트 용액 및 포화 나트륨 클로라이드 용액으로 희석하면서 세척하고, 진공하에 농축하고, 플래시 크로마토그래피(SiO₂, 아세토니트릴)를 사용하여 정제하여 연결기 1(예컨대, 약 8.25 g, 약 73%의 수율)을 수득하였다.

[0405]

실시예 4: 연결기 2의 합성



[0406]

[0407]

DMF(예컨대, 약 10 mL) 중 무수 시트라콘산 14(예컨대, 약 2.0 mg, 약 16.7 mmol) 및 β -알라닌 17(예컨대, 약 1.5 g, 약 16.7 mmol)의 용액을 실온에서 약 5시간 동안 교반하였다. 이어서, 반응 용액을 약 0°C까지 냉각하고 다이이소프로필카보다이이미드(예컨대, 약 2.6 mL, 약 16.7 mmol) 및 HOBT(예컨대, 약 1.9 g, 약 16.7 mmol)를 함유하는 DMF(예컨대, 약 10 mL) 용액을 첨가하였다. 다이이소프로필에틸아민(예컨대, 약 5 당량, 약 83.5 mmol)을 첨가하고 반응 혼합물을 실온까지 가온하고 또 다른 약 16시간 동안 교반하였다. 반응 생성물을 물에 붂고, 1 N HCl로 산성화하고, 에틸 아세테이트(예컨대, 약 3 x 30 mL)로 추출하였다. 유기 층을 물(예컨대, 약 2 x 30 mL) 및 염수(예컨대, 약 30 mL)로 세척한 후, 나트륨 설페이트 상에서 건조시켰다. 용매를 진공하에 제거하고 조절 혼합물을 컬럼 크로마토그래피로 정제하였다. 목적한 분획물을 모으고 감압하에 농축하여 화합물 17A를 수득하였다.

[0408]

화합물 17A(예컨대, 약 0.5 g, 약 2.09 mmol)를 다이클로로메탄 중 약 15% 트라이플루오로아세트산에서 실온에서 약 2시간 동안 교반하고 감압하에 건조 농축하였다. 자유산 18을 테트라하이드로푸란(예컨대, 약 20 mL) 중 N-하이드록시숙신이미드(예컨대, 약 0.25 g, 약 2.09 mmol)에 첨가한 후, 다이이소프로필카보다이이미드(예컨대, 약 0.33 mL, 약 2.09 mmol)를 첨가하고 약 4시간 동안 실온에서 교반하였다. 다이이소프로필 우레아를 여과제거하였다. 여액을 건조 증발시켰다. 석유 에터(예컨대, 약 30 mL)를 잔기에 첨가하고, 마쇄하고, 진탕하고, 석유 에터 층을 디肯팅(decant)하였다. 상기 과정을 석유 에터로 1회 이상 반복하고 생성물 18을 진공하에 건조시켰다.

[0409]

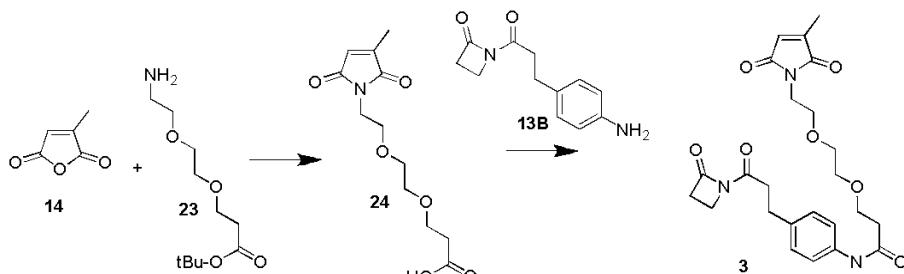
아민-peg2-3급-부틸 에스터 19(예컨대, 약 0.5 g, 약 2.09 mmol)를 활성화된 화합물 18의 THF 용액에 첨가한 후 과량의 DIPEA(예컨대, 약 3 당량)를 첨가하였다. 용액을 실온에서 최소 1시간 동안 교반하고 343 및 399의 HPLC-MS 수집 매스로 정제하였다. 목적한 분획물을 모으고 동결건조시켜 화합물 20을 수집하였다. 잔기를 다이클로로메탄 및 몇 방울의 물 중 약 15% 트라이플루오로아세트산에 용해하고 실온에서 약 2시간 교반하였다. 반응 생성물을 대략 1 mL까지 농축하고 물로 처리하여 생성물을 침전시켰다. 조절 물질을 HPLC-MS를 사용하여 정제하여 화합물 21(M+343)을 수득하였다.

[0410]

DMF(예컨대, 약 2 mL) 중 산 21(예컨대, 약 60 mg, 약 0.18 mmol), HBTU(예컨대, 약 137 mg, 약 0.36 mmol), 아닐린 하이드로클로라이드 13B(예컨대, 약 45 mg, 약 0.18 mmol) 및 다이이소프로필에틸아민(예컨대, 약 0.14 mL, 약 0.90 mmol)의 용액을 실온에서 약 30분 동안 교반하고 HPLC-MS로 정제하였다. 목적한 분획을 모으고 농

축하여 화합물 L2(예컨대, 약 16 mg, 약 0.03 mmol)를 수집하였다.

[0411] 실시예 5: 연결기 3의 합성



[0412]

[0413]

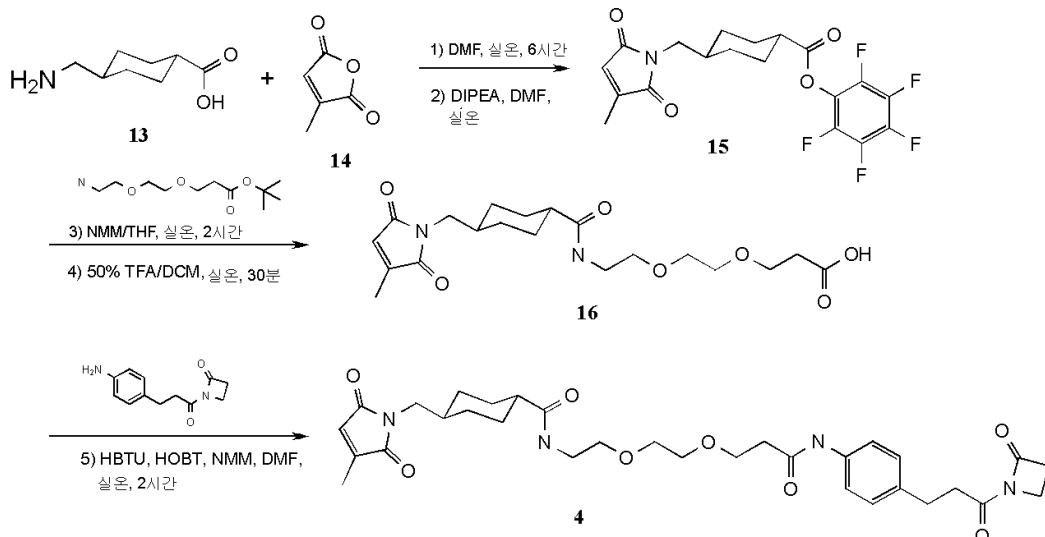
DMF(예컨대, 약 10 mL) 중 무수 시트라콘산 14(예컨대, 약 0.5 g, 약 16.4 mmol) 및 아민-peg2-3급-부틸 에스터 23(예컨대, 약 1.0 g, 약 4.2 mmol)의 용액을 실온에서 약 2시간 동안 교반하였다. 다이이소프로필카보아이이미드(예컨대, 약 0.8 mL, 약 5.2 mmol) 및 HOBT(예컨대, 약 0.7 g, 약 6.1 mmol)를 첨가하고 반응 생성물을 약 80°C에서 약 2시간 동안 가열하였다. 반응 생성물을 실온까지 냉각시키고 우레아를 여과하였다. 여액을 물에 끓고 DCM으로 추출하였다. 유기 층을 염수로 세척하고 오일로 농축하였다. 조절 생성물을 아세토니트릴 중 약 50% 6 N HCl에 용해하여 산을 보호하였다. 생성물을 DMF에 용해하고, 여과하고, HPLC-MS를 사용하여 정제하여 화합물 24(예컨대, 약 208 mg, 약 0.7 mmol)를 수집하였다.

[0414]

DMF 중 말레이미드 24(예컨대, 약 0.16 g, 약 0.6 mmol) 및 아닐린 하이드로클로라이드 13B(예컨대, 약 150 mg, 약 0.6 mmol)의 용액을 과량의 HBTU 및 DIEA(예컨대, 각각 약 3 당량 이상)에 첨가하였다. 조절 물질을 HPLC-MS 상에 약 2회 주사를 통해 정제하였다. 가장 순수한 물질을 함유하는 목적한 분획을 모으고 동결건조시켜 화합물 L3(예컨대, 약 17.3 mg, 약 36.7 mmol)을 수집하였다.

[0415]

실시예 6: 연결기 4의 합성



[0416]

[0417]

질소하에 다이메틸포름아마이드(예컨대, 약 DMF, 약 5 mL) 중 무수 시트라콘산 14(예를 들어, 약 510 mg, 약 4.55 mmol) 및 트랜스-4-아미노메틸 사이클로헥산 카복실산 13(예를 들어, 약 716 mg, 약 4.55 mmol)의 용액을 실온에서 약 6시간 동안 교반하였다. 반응 용액을 약 0°C로 냉각하고, DIPEA(예컨대, 약 1.98 mL, 약 11.4 mmol), 이어서 DMF(예컨대, 약 3 mL) 중 펜타플루오로페닐 트라이플루오로아세테이트(예컨대, 약 1.96 mL, 약 11.4 mmol)를 첨가하였다. 반응 혼합물을 실온까지 가온하고 또 다른 약 16시간 N₂하에 교반하였다. 고체를 여과하고, 여액을 물(약 30 mL)에 끓고, 다이클로로메탄(예컨대, 약 2 x 30 mL)으로 추출하고 다이클로로메탄 층을 Na₂SO₄ 상에서 건조시켰다. 용매를 진공하에 제거하고 조절 혼합물을 컬럼 크로마토그래피로 정제하여 펜타플루오로페닐 에스터 중간체 15(예를 들어, 약 550 mg, 약 29% 수율)를 수득하였다.

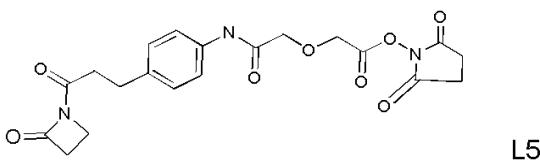
[0418]

N-메틸 모폴린(예컨대, 약 290, 약 2.64 mmol)을 테트라하이드로푸란(THF, 예를 들어, 약 5 mL) 중 펜타플루오로페닐 에스터 중간체 15(예를 들어, 약 550 mg, 약 1.32 mmol) 및 3-[2-(2-아미노-에톡시)-에톡시]프로피온산

3-급-부틸 에스터(예컨대, 약 295 mg, 약 1.32 mmol)의 용액에 첨가하고 실온에서 약 2시간 동안 교반하였다. 용매를 진공하에 제거하고 잔기를 DMF에 용해하고 제조용 HPLC로 정제하였다. 수득된 3-급-부틸 에스터 중간체를 다이클로로메탄(예컨대, 약 4 mL) 중 약 50% 트라이플루오로아세트산으로 약 30분 동안 처리하였다. 용매를 진공하에 제거하고 잔기를 제조용 HPLC로 정제하여 백색 고체로서 산 중간체 16(약 300 mg)(예컨대, 약 55% 수율; MS: 411.2(M+H⁺))을 수득하였다.

[0419] DMF(예컨대, 약 1 mL) 중 상기 산 중간체 16(예를 들어, 약 33 mg, 약 0.08 mmol), 1-[3-(4-아미노페닐)프로페온-일]아제티딘-2-온 13B(예를 들어, 약 18 mg, 약 0.08 mmol), HOBT(예컨대, 약 25 mg, 약 0.16 mmol), HBTU(예컨대, 약 61 mg, 약 0.16 mmol) 및 N-메틸 모폴린(예컨대, 약 44 mg, 약 0.4 mmol)의 용액을 실온에서 약 2시간 동안 교반하였다. 조질 혼합물을 제조용 HPLC로 정제하여 무색 오일로서 화합물 L4(예컨대, 약 22 mg, 45% 수율; MS: 611.4(MH⁺))를 수득하였다.

실시예 7: 연결기 5의 합성

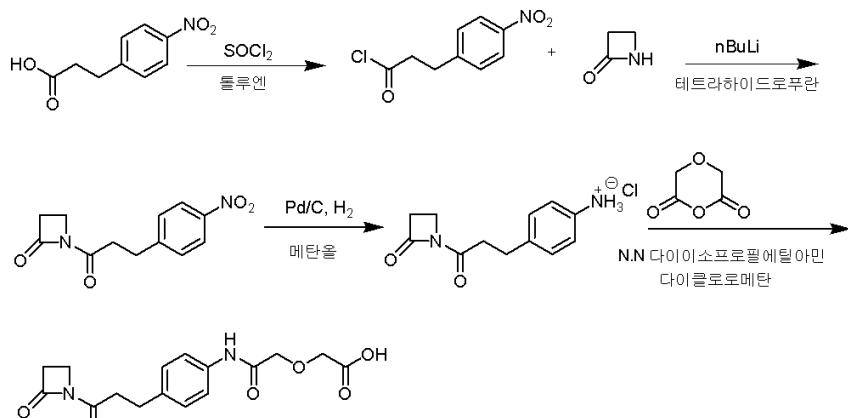


[0421]

[0422] 다이이소프로필 카보다이이미드(예컨대, 약 3.11 mL, 약 19.86 mmol, 약 2.95 당량)를 무수 테트라하이드로푸란(예컨대, 약 500 mL) 중 연결기 6(예를 들어, 약 6.63 g, 약 20.69 mmol, 약 3.07 당량) 및 N-하이드록시숙신이미드(예컨대, 약 2.29 g, 약 19.86 mmol, 약 2.95 당량)의 용액에 약 0°C에서 첨가하였다. 혼합물을 약 0°C에서 약 1시간 동안 교반한 후 실온에서 밤새 교반하였다. 용매를 진공에서 제거하고 잔사를 석유에터(예컨대, 약 2 x 약 200 mL)로 세척하고 분말을 진공하에 약 2시간 동안 건조시키고, 후속 단계에서 사용하였다.

[0423]

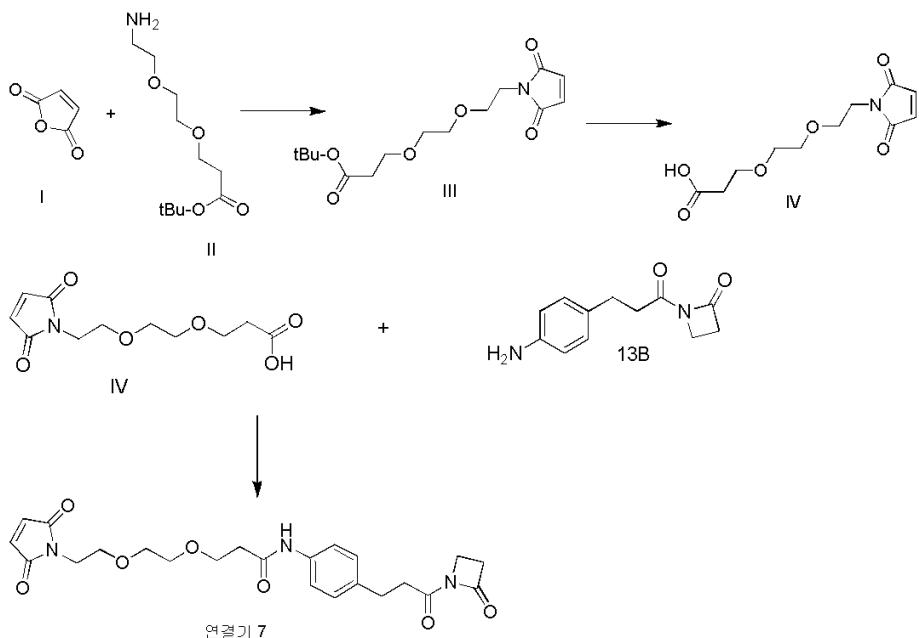
실시예 8: 연결기 6의 합성



[0424]

[0425]

실시예 9: 연결기 7의 합성



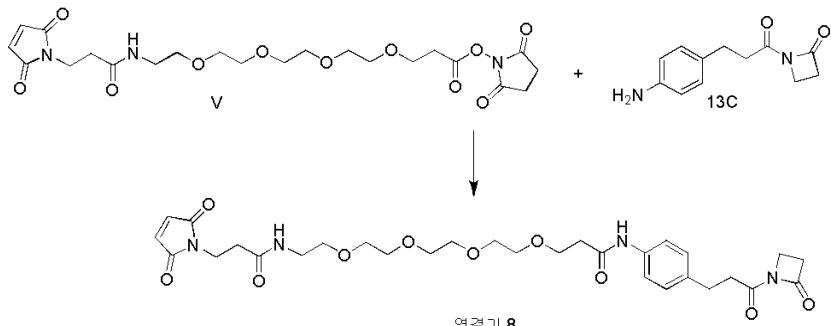
[0426]

[0427]

다이메틸 포름아마이드(예컨대, 약 25 mL) 중 화합물 I(예컨대, 약 438 mg, 약 4.47 mmol) 및 화합물 II(예컨대, 약 1.04 g, 약 4.47 mmol)의 용액을 질소의 대기하에 약 2.5시간 동안 교반하였다. 반응 생성물을 냉온을 사용하여 약 0°C로 냉각하였다. 1-하이드록시페롤리딘-2,5-다이온(예컨대, 약 647 mg, 약 5.62 mmol) 및 N-(3-다이메틸아미노프로필)-N'-에틸카보다이이미드 하이드로클로라이드(예컨대, 약 1.71 g, 약 8.92 mmol)를 첨가하고 실온에서 밤새 교반하였다. 유기 층을 다이클로로메탄으로 희석하고, 물로 세척하고, 감압하에 농축하고 플래시 크로마토그래피(SiO₂, 헥산 중 약 75% 에틸 아세테이트 내지 다이클로로메탄 중 약 5% 메탄올)를 사용하여 정제하여 화합물 III(예컨대, 약 767 mg)을 수득하였다. 다이클로로메탄(예컨대, 약 15 mL) 및 트라이플루오로아세트산(예컨대, 약 1.16 mL) 중 화합물 III(예컨대, 약 573 mg, 약 1.83 mmol)의 용액을 약 9.5시간 동안 실온에서 교반하였다. 물질을 감압하에 농축하고 진공 펌프에서 밤새 건조시켜 화합물 IV를 수득하였다. 조절 화합물 IV를 다이클로로메탄(예컨대, 약 15 mL) 및 다이메틸 포름아마이드(약 2 방울)에 용해하고 옥살릴 클로라이드(예컨대, 약 465 mg, 약 3.66 mmol)로 약 2시간 동안 교반하였다. 용매를 감압하에 제거하고 오일을 진공하에 1시간 동안 건조시켰다. 오일을 다이클로로메탄(예컨대, 약 15 mL)에 용해하고 화합물 13B(예컨대, 약 464 mg, 약 1.83 mmol) 및 다이이소프로필 에틸아민(예컨대, 약 2.9 mL, 약 16.5 mmol)으로 질소하에 약 30분 동안 교반하였다. 유기 층을 포화 나트륨 바이카보네이트 용액 및 포화 나트륨 클로라이드 용액으로 세척하고 감압하에 농축하고 플래시 크로마토그래피(SiO₂, 헥산 중 약 85% 에틸 아세테이트 내지 약 100% 에틸 아세테이트)를 사용하여 정제하여 연결기 7(예컨대, 약 323 mg, 약 39%)을 수득하였다.

[0428]

실시예 10: 연결기 8의 합성



[0429]

[0430]

다이클로로메탄 중 화합물 V(예컨대, 약 980 mg, 약 1.91 mmol), 화합물 13C(예컨대, 약 484 mg, 약 1.91 mmol) 및 다이이소프로필에틸아민(예컨대, 약 2 mL, 약 11.5 mmol)의 용액을 약 6시간 실온에서 교반하였다. 또 다른 약 1 당량의 화합물 13C(예컨대, 약 484 mg, 약 1.91 mmol) 및 약 3 당량의 다이이소프로필에틸아민(예

컨대, 약 1 mL, 약 5.73 mmol)을 첨가하고 실온에서 밤새 교반하였다. 반응 혼합물을 포화 나트륨 바이카보네이트 용액 및 포화 나트륨 클로라이드 용액으로 세척하고, 나트륨 설페이트 상에서 건조하고, 여과하고, 감압하여 농축하고 플래시 크로마토그래피(에틸 아세테이트 중 약 100% 에틸 아세테이트 내지 약 5% 메탄올 내지 에틸 아세테이트 중 약 10% 메탄올)를 사용하여 정제하여 연결기 8(예컨대, 약 285 mg, 약 24%)을 수득하였다.

[0431] **실시예 11: 단백질와 연결기의 접합**

[0432] FGF21 돌연변이체 단백질을 적절한 연결기와 1:10 몰비에서 실온으로 2시간 동안 반응시켰다. 이어서, 모든 연결기-부착된 FGF21 단백질을 PD-10 컬럼을 사용하여 정제하고 완충액을 pH 7.0에서 20 mM 트리스-HCl, 20 mM NaCl로 교환하였다.

[0433] **실시예 12: 단백질-연결기 복합체와 항체의 접합**

[0434] 모든 연결기-부착된 FGF21 단백질을 h38C2 IgG1(서열번호 25 및 26)(pH 7.0에서 20 mM 트리스-HCl, 20 mM NaCl)과 6:1 몰비에서 실온으로 밤새도록 융합하였다. 단백질-연결기-항체 복합체를 SEC로 정제하였다. 접합 효율을 LC-MS 분석으로 확인하였다.

[0435] **실시예 13: 단백질 생성 어세이**

[0436] 모든 FGF21 단백질을 에스케리키아 콜라이에서 발현시켰다. 세균에 의해 발현된 FGF21 단백질을 봉입체에서 발견하였다. 세포를 용해하고 상청액을 제거한 후, 펠렛을 pH 10.5에서 7 M 우레아, 50 mM 비스-트리스 프로판에서 4°C로 용해하였다. 가용화된 봉입체를 50 mM 비스-트리스 프로판, 10 mM 산화된 글루타티온, pH 9.0에 희석하고 2시간 동안 교반한 후, pH 7.5에서 20 mM 트리스-HCl로 4°C에서 밤새 투석하였다. 가용성 분획을 하이트 랩 Q 컬럼으로 정제하였다. 단백질을 SDS-PAGE 분석으로 특징화하였다. 리신 돌연변이체의 발현 수준은 10 내지 50 mg/L이었다.

[0437] **실시예 14: Glut1 택맨(Taqman) 어세이**

[0438] 분화된 3T3-L1 지방세포를 사용하여 qPCR 방법에 의해 Glut1 mRNA 발현을 측정하였다. 밤새 혈청 결핍된 10 내지 14일에 분화된 3T3-L1 지방세포를 화합물로 6시간 동안 처리하였다. 총 RNA를 이러한 세포로부터 추출하고, Glut1 및 GAPDH mRNA 발현을 콴티택트 프로브(Quantitect Probe) RT-PCR 키트를 사용하고 택맨 기기(어플라이드 바이오시스템즈(Applied Biosystems: 등록상표))에서 정량적 실시간 PCR 반응을 실행하여 측정하였다. 화합물의 생활성을 각각의 샘플로부터 GAPDH mRNA 수준에 의해 정규화된 Glut1 mRNA 수준의 배수 변화로 측정하였다. 화합물의 효능의 측정치로서의 EC₅₀ 값을 어세이 중 용량 반응 곡선으로부터 수득하였다.

[0439] **실시예 15: 글루코스 흡수 어세이**

[0440] 분화된 3T3-L1 지방세포를 화합물로 혈청의 부재하에 24시간 동안 처리하였다. 이어서, 세포를 ¹⁴C-2-데옥시글루코스로 1시간 동안 항온처리하고 세포 내 글루코스 흡수를 활락(Wallac) 1450 마이크로베타(MicroBeta)(트릴룩스, Trilux) 기기로 정량하였다. 글루코스 흡수를 분당 계수(CPM)로 나타내었다. 화합물의 효능의 측정치로서의 EC₅₀ 값을 어세이 중 용량 반응 곡선으로부터 수득하였다.

[0441] **실시예 16: 마우스 약물 동력학**

[0442] FGF21 항체 접합물의 PK를 IV 또는 SC 투여 후 마우스에 입증하였다. 항체 접합물을 성숙 수컷 스위스 웨스터 마우스 새끼(20 내지 25 g)에 주입하고, 혈액 샘플을 투여 후 5 분 내지 120시간 시점에서 수득하였다. 혈청 중 항체 접합물 농도를 96-웰 플레이트에 결합하는 단클론 항-hFGF21 항체를 통해 항체 접합물의 FGF21 일부를 포획한 ELISA를 사용하여 측정하였다. 플레이트에 결합하는 FGF21 항체 접합물을 항-hFc 단클론 항체를 통해 검출하고, 농도를 혈청-함유 어세이 완충액 내에 희석된 PK 투입 용액의 표준 곡선을 사용하여 측정하였다. SC 생물학적 이용가능성을 IV 혈청 농도 프로파일의 AUC로 나눈 전달된 SC 혈청 농도 프로파일의 AUC의 비로서 계산하였다.

[0443] **실시예 17: 마우스 효능**

[0444] FGF21 항체 접합물의 효능을 2종의 뮤린 비만 인슐린 내성 모델, 즉, ob/ob 마우스 및 고지방 식이-유도된 비만 마우스에서 평가하였다. 모든 모델을 위해, 수컷 마우스(ob/ob에 대하여 6 내지 8 주령, 6 주령에서 시작된 고지방 식이를 갖는 DIO에 대하여 12 내지 14 주령)를 2 내지 4/우리에서 수용하고 FGF21 항체 접합물을 SC 주사로 투여하였다. 체중을 매일 아침 측정하였다. 당내성을 경구 당내성 시험으로 추정하였다. 간단히, 마우스

를 시험 날 아침에 4 내지 5시간 동안 금식시켰다. 기저 혈액 샘플을 수득하고 혈당 수준을 휴대용 혈당계를 사용하여 측정하였다. 기저 샘플에 따라, 글루코스를 경구 투브식으로 투여하고, 이후 혈액 샘플을 15 내지 120분 동안 뽑았다. 당내성을 기저로부터 120분 시점에서 AUC로서 계산하였다.

[0445] **실시예 18: K56 Ab-L5-FGF21ΔH-K56 활성**

FGF21ΔH-K56-K59R-K69R-K122R(서열번호 18)을 상기 기재된 바와 같이 제조하고 정제하였다. FGF21ΔH-K56-K59R-K69R-K122R은 Glut1 택맨 어세이($EC_{50} = 0.9$ nM; $n = 2$)에서 강력하게 발견되었다. 글루코스 흡수는 5.5 nM로 나타냈다. FGF21ΔH-K56-K59R-K69R-K122R을 K56에서 L5와 합하고 기재된 바와 같이 h38C2와 접합하여 Ab-L5-FGF21ΔH-K56을 형성하였다. Ab-L5-FGF21ΔH-K56은 Glut1 택맨 어세이($EC_{50} = 1.9$ nM; $n = 1$)에서 효능을 보유하고, 17시간의 IV 반감기 및 13시간의 SC 반감기를 나타내었다. 생물학적 이용가능성은 66%이었다.

[0447] **실시예 19: K59 Ab-L5-FGF21ΔH-K59 활성**

FGF21ΔH-K56R-K59-K69R-K122R(서열번호 19)을 기재된 바와 같이 제조하고 정제하였다. FGF21ΔH-K56R-K59-K69R-K122R은 Glut1 택맨 어세이($EC_{50} = 0.6$ nM; $n = 1$)에서 강력하였다. 글루코스 흡수는 0.9 nM이었다. FGF21ΔH-K56R-K59-K69R-K122R을 K59에서 L5와 합하고 h38C2와 접합하여 Ab-L5-FGF21ΔH-K59를 형성하였다. Ab-L5-FGF21ΔH-K59는 Glut1 택맨 어세이($EC_{50} = 6.5$ nM; $n = 2$)에서 생체외 효능을 보유하고 13시간의 IV 반감기를 나타내었다.

[0449] **실시예 20: K69 Ab-L5-FGF21ΔH-K69 활성**

FGF21ΔH-K56R-K59R-K69-K122R(서열번호 20)을 기재된 바와 같이 제조하고 정제하였다. FGF21ΔH-K56R-K59R-K69-K122R은 Glut1 택맨 어세이($EC_{50} = 1.3$ nM; $n = 1$) 및 글루코스 흡수 어세이($EC_{50} = 5.2$ nM) 둘다에서 강력하게 발견되었다. FGF21ΔH-K56R-K59R-K69-K122R을 K69에서 L5와 합하고, h38C2와 접합하여 Ab-L5-FGF21ΔH-K69를 형성하였다.

[0451] **실시예 21: K122 Ab-L5-FGF21ΔH-K122 활성**

FGF21ΔH-K56-K59R-K69R-K122(서열번호 21)를 기재된 바와 같이 제조하고 정제하였다. FGF21ΔH-K56-K59R-K69R-K122는 Glut1 택맨 어세이($EC_{50} = 2.6$ nM; $n = 2$) 및 글루코스 흡수 어세이($EC_{50} = 1.7$ nM) 둘다에서 강력하였다. FGF21ΔH-K56-K59R-K69R-K122를 K122에서 L5와 합하고, h38C2와 접합하여 Ab-L5-FGF21ΔH-K122를 형성하였다. Ab-L5-FGF21ΔH-K122는 생체외 효능(Glut1 택맨 어세이에서 $EC_{50} = 1.6$ nM; $n = 2$)을 보유하고, 16시간의 IV 반감기 및 14시간의 SC 반감기를 나타내었다. 생물학적 이용가능성은 40%이었다.

[0453] **실시예 22: Knull-P2 Ab-L5-FGF21ΔH-Knull-P2 활성**

FGF21ΔH-Knull-P2(서열번호 22)를 기재된 바와 같이 제조하고 정제하였다. FGF21ΔH-Knull-P2는 Glut1 택맨 어세이($EC_{50} = 1.2$ nM; $n = 2$)에서 강력하였다. FGF21ΔH-Knull-P2를 P^2 의 N'말단에서 L5와 합하고, h38C2와 접합하여 Ab-L5-FGF21ΔH-Knull-P2를 형성하였다. Ab-L5-FGF21ΔH-Knull-P2는 감소된 생체외 효능(Glut1 택맨 어세이에서 $EC_{50} = 16.6$ nM; $n = 1$) 및 17시간의 IV 반감기를 나타내었다.

[0455] **실시예 23: Knull-H1K Ab-L5-FGF21ΔH-Knull-H1K 활성**

FGF21ΔH-Knull-H1K(서열번호 23)를 기재된 바와 같이 제조하고 정제하였다. FGF21ΔH-Knull-H1K는 Glut1 택맨 어세이($EC_{50} = 6.4$ nM; $n = 2$)에서 강력하였다. FGF21ΔH-Knull-H1K를 H1K에서 L5와 합하고 h38C2와 접합하여 Ab-L5-FGF21ΔH-Knull-H1K를 형성하였다. FGF21ΔH-Knull-H1K는 생체외 효능(Glut1 택맨 어세이에서 $EC_{50} = 4.3$ nM; $n = 2$)을 보유하고, 16시간의 IV 반감기, 11시간의 SC 반감기 및 51%의 SC 생물학적 이용가능성을 나타내었다.

[0457] **실시예 24: Knull-S181K Ab-L5-FGF21ΔH-Knull-S181K 활성**

FGF21ΔH-Knull-S181K(서열번호 24)를 기재된 바와 같이 제조하고 정제하였다. FGF21ΔH-Knull-S181K는 Glut1 택맨 어세이($EC_{50} = 7.5$ nM; $n = 2$)에서 강력하였다. FGF21ΔH-Knull-S181K를 S181K에서 L5와 합하고 h38C2와 접합하여 Ab-L5-FGF21ΔH-Knull-S181K를 형성하였다. Ab-L5-FGF21ΔH-Knull-S181K는 생체외 효능의 손실

(Glut1 택맨 어세이에서 $EC_{50} = 500$ nM 초파; $n = 2$)을 나타내었다.

[0459] 실시예 25: 리신 돌연변이체의 활성의 결과 요약

모든 리신 돌연변이체 단백질은 Glut1 택맨 어세이에서 활성되었다. 접합된 경우, 대부분의 접합물(K56, K59, K122, Knull-H1K)은 네이티브 FGF21 단백질과 유사한 EC_{50} 값을 갖는 택맨 어세이에서 활성을 보유하였다. Knull-P2 접합물은 초기 효능에서 일부 감소를 나타냈고, Knull-S181K 접합물은 택맨 어세이에서 활성의 손실을 나타내었다.

[0461] 실시예 26: 시스테인-말레이미드 접합을 사용하여 FGF21에서 최적 테더 부위 확인

연결 잔기로서 시스테인 치환 돌연변이의 도입하는 경우 하나의 도전은 시스테인 잔기가 그 자체가 다른 잔기와 접촉하여 발견되고/되거나 염 가교 또는 수소 결합을 형성할 수 있는 것이다. 비록 모델링된 구조를 사용하여 원자-수준 거리를 예견하는 것이 어려울 수 있을지라도, 다수의 잔기는 FGFR1c 및 β -클로토 결합 부위: His1, Thr40, Asp79, Leu86, His125 및 Ala129로부터 말단으로 위치되기 위한 가능성에 근거하여 선택되었다.

모든 6개의 잔기는 구조적 요소(회전 및 루프), 접근 가능한 표면 지역(ASA) 및 환경의 형태(볼록형 및 오목형)에서 서로 구별되고, 모두 FGFR1c 상호작용에 대한 단백질의 반대면에서 모델링되었다(표 2). 특히, His1, Asp79, Leu86 및 His125는 이러한 부위와 연관된 높은 ASA 값으로 인해 잠재적으로 매력적인 접합 부위로서 확인되었다.

표 2

시스테인 치환에 대한 후보 잔기의 비교

잔기	구조	외형	%ASA	ASA	β 케토 부위
His1	무질서	N/A	N/A		
Thr40	β -가닥	오목형	34	49.8	덜 멀다
Asp79	β -회전	볼록형	71	109.8	멀다
Leu86	β -가닥	볼록형	60	119.4	덜 멀다
His125	무질서	볼록형	85	169.4	멀다
Ala129	무질서	오목형	68	78.8	멀다

[0464] 실시예 27: H1C FGF21 ΔH -H1C

FGF21 ΔH -H1C(서열번호 16)를 제조하고 발현시켰다. 그러나, FGF21 ΔH -H1C 돌연변이체는 N' 시스테인 기가 결핍되었고, 따라서 이 돌연변이체의 조사를 중단하였다.

[0467] 실시예 28: T40C FGF21 ΔH -T40C

FGF21 ΔH -T40C(서열번호 15)의 제조는 유의한 도전을 나타내었다. 위치 40에서 트레오닌의 시스테인 돌연변이는 리풀딩 후 RO-HPLC에서 FGF21 ΔH -T40C의 다중 종을 야기하였다. 추가 시도는 글루타티온의 첨가의 유무에 따라 단백질의 농도 및 pH를 변화시킴으로써 리풀딩 방법을 개선하도록 만들었다. 리풀딩 방법을 RP-HPLC로 모니터링하였다. 글루타티온의 첨가는 T40C의 효율적인 리풀딩을 야기하였지만; 글루타티온이 아마도 위치 40에서 도입된 시스테인을 통해 FGF21에 부착됨을 발견하였다. 글루타티온 부가물은 야생형 FGF21 ΔH 와 동일한 생물학적 활성을 나타내었고, 위치 40은 FGF21에 의해 수용체 활성화에 수반되지 않음을 나타낸다.

[0469] 실시예 29: D79C Ab-L1-FGF21 ΔH -D79C 활성

FGF21 ΔH -D79C(서열번호 12)를 기재된 바와 같이 제조하고 정제하였다. FGF21 ΔH -D79C는 Glut 1 택맨 어세이 ($EC_{50} = 2.1$ nM; $n = 4$)에서 강력하였다. FGF21 ΔH -D79C를 D79C에서 L1과 합하고 h38C2와 접합하여 Ab-L1-FGF21 ΔH -D79C를 형성하였다. Ab-L1-FGF21 ΔH -D79C는 생체외 효능(Glut1 택맨 어세이에서 $EC_{50} = 3.7$ nM; $n = 3$)을 보유하였고, 17 및 19시간의 IV 반감기($n = 2$), 20 및 20시간의 SC 반감기($n = 2$), 및 55% 및 70%의 SC 생물학적 이용가능성($n = 2$)을 나타내었다.

[0471] 실시예 30: FGF21 ΔH -D79C의 안정성 어세이

FGF21 ΔH -D79C 돌연변이체 단백질을 상기 기재된 바와 같이 에스케리키아 콜라이에서 생성하고 정제하였다.

FGF21 ΔH -D79C를 배양액(1 L)으로부터 발현시켰다. 봉입체(150 mg)를 수득하고 정제된 단백질(85 mg)을 수득하였고, 60% 수율을 나타내었다. FGF21 ΔH -D79C 및 FGF21 ΔH (서열번호 2)의 안정성 시험을 위해, 신선하게 녹인 샘플을 7일에 걸쳐서 4°C에서 유지하고, 0, 3 및 7일째에 RP-HPLC, SEC_HPLC, 엘만(Elman) 어세이 및 SDS-PAGE로 이들의 무결성을 시험하였다. 시험 결과, FGF21 ΔH -D79C는 중성 pH 7.4에서 안정되고, 단지 소량의 FGF21 ΔH -D79C가 산화되고 심지어 4°C에서 7일 항온처리 후 이량체화됨을 나타내는 반면, FGF21 ΔH -D79C의 절반이상이 4°C에서 3일 항온처리 후 pH 6.0으로 더 낮게 산화됨을 발견하였다. PBS(pH 7.4) 및 20 mM 트리스-HCl, 50 mM NaCl(pH 7.5)은 FGF21 ΔH -D79C의 안정성의 유의한 차이를 만들지 않았다.

[0473] FGF21 ΔH -D79C의 자유 시스테인이 pH 6.0에서보다 pH 7.4에서 더욱 안정된 이유는 명백하지 않다. WT FGF21의 계산된 등전점(pI)은 5.43이었고(예컨대, FGF21-H1-P146); FGF21 ΔH 의 pI는 5.27이었고; FGF21 ΔH -D79C의 pI는 5.47이었다. FGF21 ΔH -D79C의 가용성이 pH 6.0에서 감소될 수 있음이 가능하다. FGF21 ΔH -D79C의 안정성은 다중 동결/해동 주기시 입증하였다. 단백질의 냉동(-80°C) 및 해동(4°C)을 9회 반복하였다. RP-HPLC, SEC 및 엘만 어세이에서 1주기와 9주기 사이에 어떠한 차이점도 샘플에 나타나지 않았다. 결론적으로, FGF21 ΔH -D79C는 -80°C에서 보다 4°C에서 유의하게 덜 안정되게 나타냈다.

실시예 31: L86C FGF21 ΔH -L86C

[0475] FGF21 ΔH -L86C(서열번호 14)를 기재된 바와 같이 제조하고 정제하였다. 비록 대부분의 소수성 잔기가 단백질 코어에 매몰될지라도, 일부 잔기는 단백질의 불가용성을 야기할 수 있는 용매에 노출된다. Leu86은 소수성 잔기이고, FGF21의 모델링된 구조에 노출된 용매를 나타낸다. 이는 돌연변이 L86C가 가용성 이점을 제공할 수 있음을 상정하였다.

[0476] L86C 돌연변이는 비효율적인 리폴딩 및 낮은 단백질 수율을 야기하였다. 글루타티온의 첨가는 L86C의 효율적인 리폴딩을 야기하지만; 이는 하나 이상의 글루타티온이 도입된 C86 뿐만 아니라 네이티브 시스테인 잔기를 통해 아마도 하나의 FGF21 분자에 부착됨을 발견하였다. 글루타티온 부가물은 생물학적 활성의 대략 10배 감소를 나타내었고, 따라서 FGF21 ΔH -L86C의 조사를 중단하였다.

실시예 32: H125C Ab-L1-FGF21 ΔH -H125C 활성

[0478] FGF21 ΔH -H125C(서열번호 7)를 기재된 바와 같이 제조하고 정제하였다. FGF21 ΔH -H125C는 Glut 1 택맨 어세이 ($EC_{50} = 1.2$ nM; n = 3)에서 강력하였다. FGF21 ΔH -H125C를 L1과 합하고 H125C에서 h38C2와 접합하여 Ab-L1-FGF21 ΔH -H125C를 형성하였다. 접합된 경우, Ab-L1-FGF21 ΔH -H125C는 생체외 효능(Glut1 택맨 어세이에서 $EC_{50} = 3.2$ nM; n = 4)을 보유하였고, 37시간의 IV 반감기, 32시간의 SC 반감기 및 67%의 SC 생물학적 이용가능성을 나타내었다.

실시예 33: A129C Ab-L1-FGF21 ΔH -A129C 활성

[0480] FGF21 ΔH -A129C(서열번호 10)를 기재된 바와 같이 제조하고 정제하였다. FGF21 ΔH -A129C는 Glut 1 택맨 어세이($EC_{50} = 1.4$ nM; n = 6)에서 강력하였다. FGF21 ΔH -A129C를 A129C에서 L1과 합하고 h38C2와 접합하여 Ab-L1-FGF21 ΔH -A129C를 형성하였다. Ab-L1-FGF21 ΔH -A129C는 생체외 효능(Glut1 택맨 어세이 중 $EC_{50} = 2.7$ nM; n = 7)을 보유하고, (마우스에서) 33시간의 IV 반감기, 37시간의 SC 반감기 및 69%의 SC 생물학적 이용가능성을 나타내었다. Ab-L1-FGF21 ΔH -A129C는 래트에서 60시간의 IV 반감기, 래트에서 39시간의 SC 반감기, 및 래트에서 52%의 SC 생물학적 이용가능성을 나타내었다. 원숭이의 경우, IV 반감기는 65시간이었고, SC 반감기는 48시간이었고, SC 생물학적 이용가능성은 68%이었다.

실시예 34: 내독소 순도의 개선

[0482] FGF21 ΔH -H125C 및 FGF21 ΔH -A129C 단백질을 에스케리키아 콜라이 발효 배양으로 제조하였다. 내독소 수준을 줄이기 위해, 10 EU/mL로부터 > 0.1 EU/mL까지 내독소 수준을 감소하는 제 1 Q 후 추가 Q 단계를 이용하였다. 정제 프로토콜을 다음과 같이 수정하였다. IB(대략 10 g)를 배양 배지(1 L)로부터 수득하고 pH 10.5에서 7 M 우레아, 5 mM DTT, 50 mM BTP(비스-트리스 프로판)(40 mL, 1 내지 2시간)로 용해하였다. FGF21 단백질의 감소를 RP-HPLC로 모니터링하였다. 용해된 단백질을 pH 8.0에서 50 mM BTP(400 mL, 24 내지 36시간)에 희석하여 리폴딩하였다. FGF21의 네이티브 이황화 결합의 산화를 RP-HPLC로 모니터링하였다. 리폴딩이 거의 완료되면, 용액을 20 mM 트리스-HCl(4 L, pH 7.5)로 2회 투석하였다. 비용해된 단백질을 20,000 X g에서 60분 동안 4°C로 원심분리하여 침전물을 제거하였다. 상청액을 하이트랩 Q FF 위에 로딩하고 FGF21 단백질을 0 내지 200 mM NaCl 구배(20 CV, pH 7.5에서 20 mM 트리스-HCl, 0.01 mM TCEP)로 용리하였다. 수집된 분획을 0 내지 100 mM

이미다졸 구배(10 CV, pH 7.4에서 0.01 mM TCEP, PBS)로 용리하는 하이트랩 Ni-NTA FF 위에 로딩하여 잔여 DNA를 효율적으로 제거하였다. 목적한 분획물을 pH 7.5에서 20 mM 트리스-HCl, 0.01 mM TCEP(4 L)로 2회 투석하고 0 내지 100 mM NaCl 구배(20 CV, pH 7.5에서 20 mM 트리스-HCl)로 용리하는 하이트랩 Q HP 컬럼 위에 로딩하였다. 정제된 단백질 분획을 수집하고, 0.22 mm 필터로 멸균하고 -80°C에서 저장하였다.

[0483] 배양 배지(1 L)로부터의 전형적인 수율은 약 350 내지 약 400 mg이었다. 정제된 단백질로부터의 전형적인 수율은 약 220 내지 약 280 mg이었다. 이 정제 기법으로 95%의 초과 순도 및 약 1 EU/mg의 전형적인 내독소 수준을 갖는 단백질을 수득하였다. 진동 플라스크 대신에 발효기를 사용하여 약 4 내지 약 5 회 수율을 개선하였다.

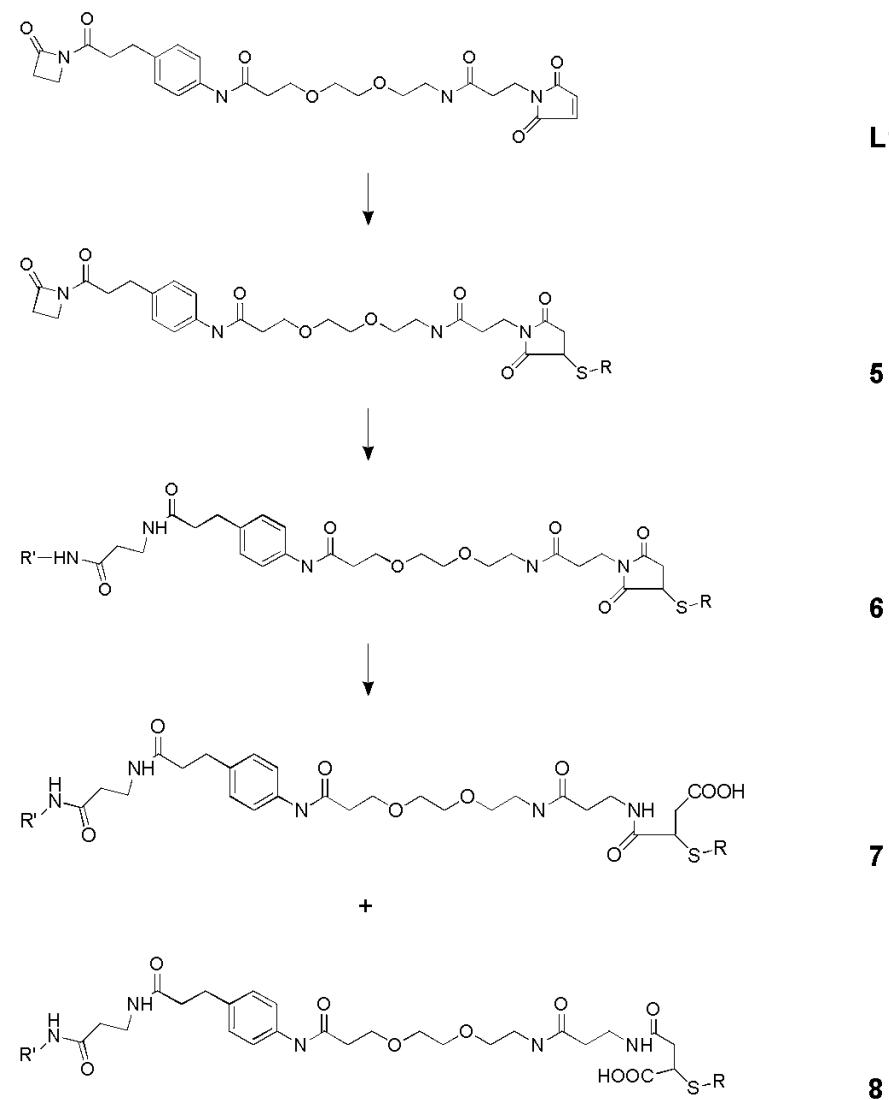
0484] 실시예 35: 연결기 선택

[0485] 하기 L1의 말레이미드 고리가 시작 및 이후 시간에 걸쳐서 생성물 분해에 민감할 수 있음이 공지되었다(문헌 [Woodnutt, G; IBC Conference "Beyond Antibody/Protein Engineering Design", San Diego, 21-23rd September 2009]).

[0486] 말레이미드 연결기, 예컨대 L1을 티올과 반응시켜 반응식 1에 나타낸 바와 같이 말레이미드 부분을 갖는 티올 부가물을 형성할 수 있다. 티올을 말레이미드에 첨가하는 이 반응은 마이클(Michael) 반응이라 지칭된다. 이어서, 아민(예컨대 항체 h38C2)을 함유하는 기를 반응식 1에 나타낸 바와 같은 AZD(β -락탐)와 반응시켜 화합물 6을 수득할 수 있다. 생성된 티올-숙신이미드 부가물은 안정된다. 그러나, 숙신이미드 고리는 시간에 걸쳐서 느린 가수분해 절단을 진행하여 화합물 7 및/또는 화합물 8을 생성할 수 있다. 따라서 가수분해 절단에 대하여 개선된 안정성을 갖는 말레이미드 고리를 가지면서, 마이클 반응을 진행하기 위해 이의 능력을 보존하는 것이 바람직하다.

[0487]

[반응식 1]



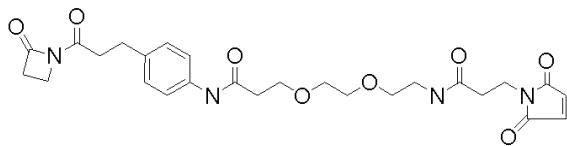
[0488]

[0489]

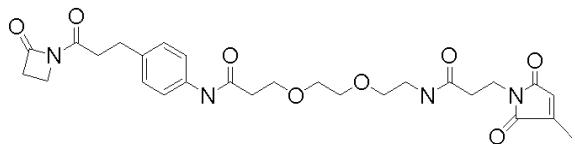
실시예 36: 말레이미드 개질

[0490]

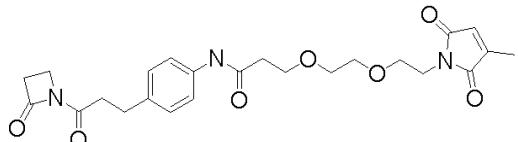
따라서, L1에서 말레이미드 고리의 안정성은 더욱 안정된 연결기가 말레이미드 고리를 개질함으로써 생성될 수 있는 기대를 갖고 설명되었다. 물에 의해 말레이미드 고리의 잠재적인 가수분해 절단을 늦추기 위해, 3개의 상이한 접근법(L2 내지 L4)이 고리를 개질하고 안정성을 개선하도록 수행되었다.



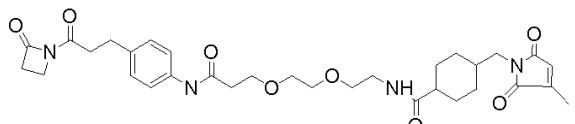
L1



L2



L3



L4

[0491]

[0492] 먼저, 고리에 부착된 작은 알킬 기는 숙신이미드 고리의 가수분해 절단을 늦출 수 있도록 구상되었다. 숙신이미드 고리 상에 메틸 기를 갖는 연결기 2를 제조하였다. 고리가 가수분해 절단을 진행하기 위해서, 물 분자를 카본일 기에 첨가하고 전이 상태로서 4면체의 중간체를 형성하였다. 메틸 기의 존재는 입체적으로 및 전자적으로 4면체의 중간체의 형성을 제한할 수 있고, 가수분해 속도를 상당히 늦춘다.

[0493]

2번째 개질은 말레이이미드 고리의 카본일 기의 가까운 주변에 있는 프로피온아미드 카본일 기에 초점을 맞췄다. 카본일 기는 일반적으로 물을 끌어당긴다. 말레이이미드 고리에 근접하게 카본일 기를 갖는 것은 물을 끌어당기는 것을 돋고 말레이이미드 고리의 카본일 기 상에서 끌어당김을 용이하게 한다. 프로피온아미드 카본일 기를 제거함으로써, 가수분해 고리 개환 반응은 느려진다. 이러한 개질을 L3에서 보여졌다.

[0494]

3번째 개질은 L4에 보여진 바와 같이 프로피온아미드 기 대신에 사이클로헥실메틸렌 기를 도입하였다. 사이클로헥실 고리의 별기한 소수성 특징은 개환된 가수분해 절단을 위해 요구되는 고리의 카본일 기에 물을 첨가함으로써 4면체 중간체의 형성에 대하여 전자적으로 및 입체적으로 둘다 간섭할 수 있다. 이는 가수분해 절단을 늦출 수 있도록 예상되었다.

안정성 연구

[0496]

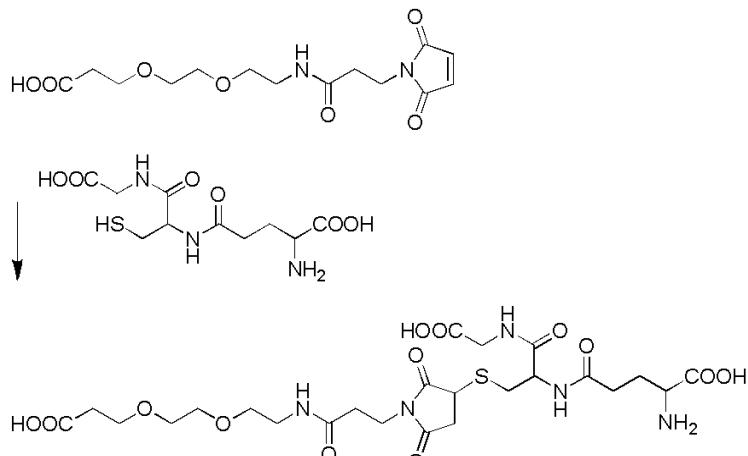
안정성 연구를 위해, 연결기 L1 내지 L4로부터 1-(3-(4-아미노페닐)프로판오일)아제티딘-2-온 일부를 제거하였다. 말레이이미드를 3개의 아미노산 펩티드인 글루타티온과 접합시킨 경우, 4개의 시험 화합물을 제조하였다(화합물 30 내지 33).

[0497]

실시예 37: 화합물 30의 합성

[0498]

다이메틸설폐사이드(5 mL) 중 3-(2-(2-(3-(2,5-다이옥소-2,5-다이하이드로-1H-페롤-1-일)-프로판아미도)에톡시)에톡시)프로피온산(164 mg, 0.5 mmol) 및 환원된 글루타티온(154 mg, 0.5 mmol)의 용액을 실온에서 17시간 동안 교반하였다. 에틸 아세테이트(25 mL)를 반응 혼합물에 첨가하고 고체를 여과하였다. 고체를 추가 에틸 아세테이트(25 mL)로 세척하고, 건조시켜 화합물 30(252 mg)을 수득하였다.

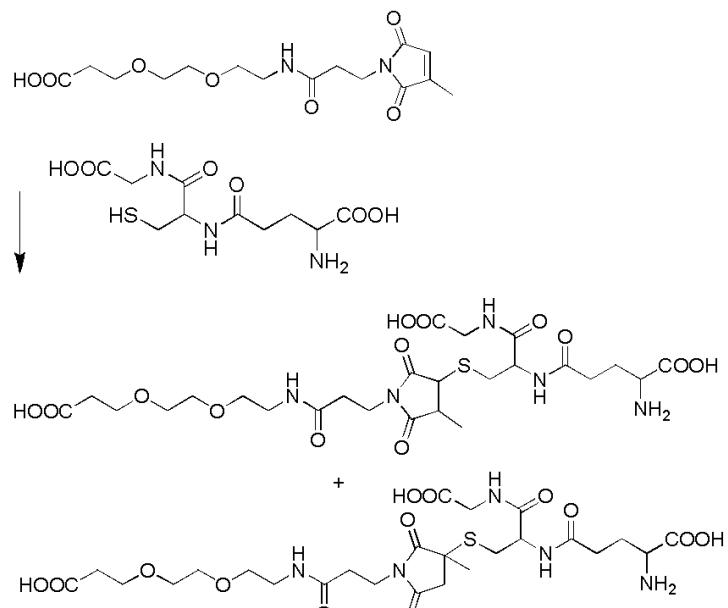


[0499]

실시예 38: 화합물 31의 합성

[0501]

다이메틸설폐사이드(1.2 mL) 중 3-(2-(2-(3-(3-메틸-2,5-다이옥소-2,5-다이하이드로-1H-피롤-1-일)프로판아미도)에톡시)에톡시)프로피온산(42 mg, 0.12 mmol) 및 환원된 글루타티온(37 mg, 0.12 mmol)의 용액을 실온에서 22시간 동안 교반하였다. 에터(10 mL) 중 50% 에틸 아세테이트를 반응 혼합물에 첨가하고 고체를 여과하였다. 고체를 추가 에틸 아세테이트(25 mL)로 세척하고, 건조시켜 화합물 31(67 mg)을 수득하였다.

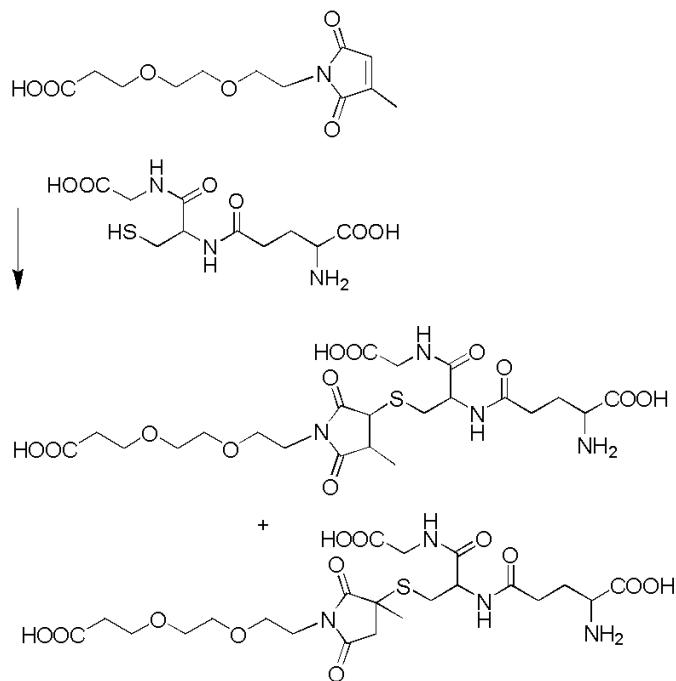


[0502]

실시예 39: 화합물 32의 합성

[0504]

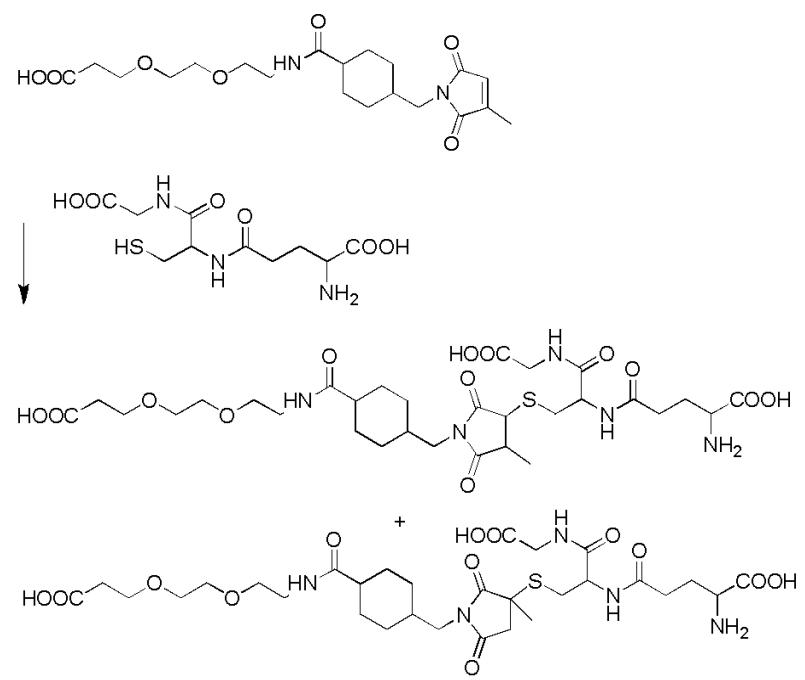
다이메틸설폐사이드(2 mL) 중 3-(2-(2-(3-메틸-2,5-다이옥소-2,5-다이하이드로-1H-피롤-1-일)에톡시)에톡시)프로피온산(50 mg, 0.2 mmol) 및 환원된 글루타티온(61 mg, 0.2 mmol)의 용액을 실온에서 25시간 동안 교반하였다. 에터(30 mL) 중 65% 에틸 아세테이트를 반응 혼합물에 첨가하고 고체를 여과하였다. 고체를 추가 에틸 아세테이트(25 mL)로 세척하고, 건조시켜 화합물 32(92 mg)를 수득하였다.



[0505]

실시예 40: 화합물 33의 합성

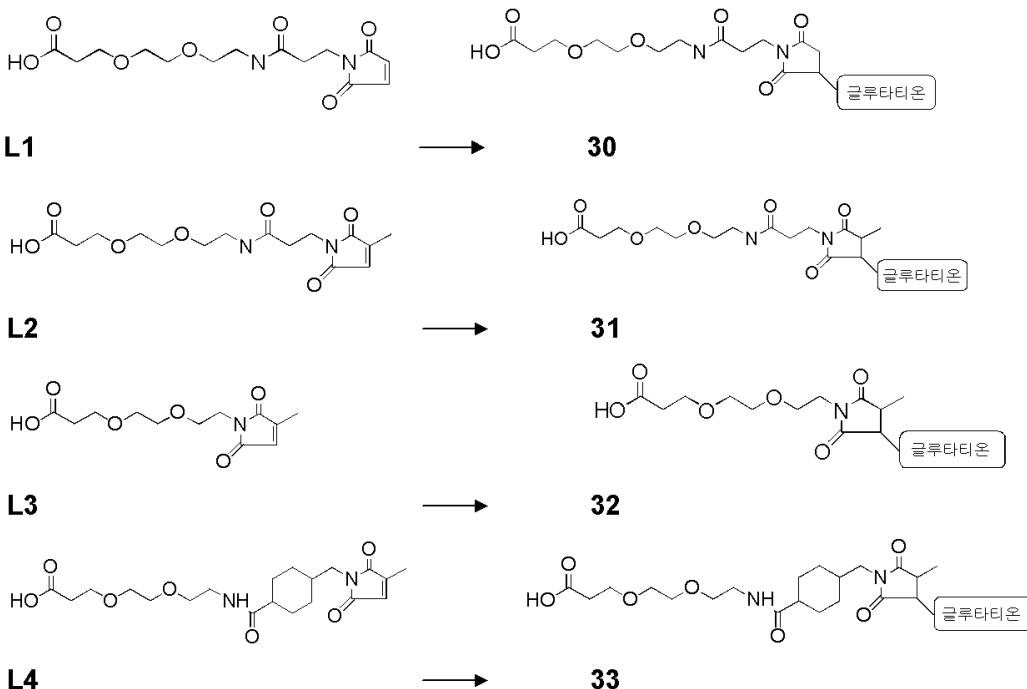
다이메틸설품사이드(1.2 mL) 중 3-(2-(2-(4-((3-메틸-2,5-다이옥소-2,5-다이하이드로-1H-페롤-1-일)메틸)사이클로헥산카복스아미도)에톡시)에톡시)프로피온산(50 mg, 0.12 mmol) 및 활원된 글루타티온(37 mg, 0.12 mmol)의 용액을 실온에서 22시간 동안 교반하였다. 에터(10 mL) 중 50% 에틸 아세테이트를 반응 혼합물에 첨가하고 고체를 여과하였다. 고체를 추가 에틸 아세테이트(25 mL)로 세척하고, 건조시켜 화합물 33(75 mg)을 수득하였다.



[0508]

[0509]

실시예 41: 화합물 30 내지 33의 안정성 연구



[0510]

[0511]

화합물 30, 31, 32 및 33을 개환된 생성물의 형성 뿐만 아니라 글루타티온 절단에 대하여 LC-MS로 모니터링하였다. 이러한 신규 동족체는 2주 기간 전체에 걸쳐서 40°C에서 pH 6.5 완충액, 40°C에서 pH 7.5 완충액, 및 4°C에서 pH 7.5에서 이의 안정성을 입증하였다(표 3a 내지 3c).

[0512]

화합물 30, 31, 32 및 33을 실온에서 완충액에 용해하였다. 샘플을 40°C에서 항온처리하고 완충액을 간격 설정에서 분석하였다. 한정된 간격에서, 완충액(10 μ L)을 아질런트(Agilent) 고성능 액체 크로마토그래피 및 분석 용 질량 분석계에 주입하였다. 컬럼으로부터 용리액을 210 및 254 nm에서 UV 분광계를 사용하고 또한 질량 분석계를 사용하여 모니터링하였다. 가수분해 부산물을 질량 분석계를 사용하여 모니터링하고 가수분해율(%)을 특정한 질량의 총 이온 전류에 기초하여 계산하였다.

[0513]

하기 표 3a 내지 3c에서 가수분해 %를 나타내는 LC-MS 데이터는 L2, L3 및 L4(화합물 31 내지 33)의 개질된 말레이미드 고리가 L1(30) 중 말레이미드 고리와 비교하여 40°C 및 pH 6.5에서 5 내지 10회 더욱 안정되고, 40°C 및 pH 7.5 완충액에서 4 내지 15회 더욱 안정되고, 40°C 및 pH 7.5 완충액에서 20회 이상 더욱 안정됨을 분명히하였다. 글루타티온 접합의 결과(표 3a, 3b 및 3c의 데이터 포함)를 IBC 학회["Beyond Antibody/Protein Engineering Design", San Diego, 212 3rd September 2009]에서 논의하였다.

[0514]

[표 3a]

40°C 및 pH 6.5(10 mM His, 130 mM Gly, 130 mM Suc 완충액)에서의 안정성

연구

	화합 불 번호	0 시간 %	1 시간 %	5 시간 %	24 시간 %	48 시간 %	72 시간 %	96 시간 %	120 시간 %	168 시간 %	192 시간 %
L1	30	0.0	0.4	0.6	4.9	11.6	14.8	18.3	17.0	25.0	25.9
L2	31	0.1	0.1	0.3	0.8	1.8	2.6	3.0	3.1	5.0	5.1
L3	32	0.0	0.1	0.3	0.9	1.7	2.4	2.8	4.2	4.6	4.9
L4	33	0.1	0.1	0.1	0.3	0.4	0.6	0.6	0.3	1.1	1.1

[0515]

[0516]

[표 3b]

40°C 및 pH 7.5(100 mM His, 200 mM Gly, 200 mM Suc)에서의 안정성 연구

	화합물 번호	0 시간 %	1 시간 %	5 시간 %	24 시간 %	48 시간 %	72 시간 %	96 시간 %	120 시간 %	144 시간 %	168 시간 %	264 시간 %	336 시간 %
L1	30	0.1	0.3	2.0	10.0	15.0	29.0						
L2	31	0.1	0.2	0.6	3.2	4.6	7.1	8.2	9.4	12.6	12.2	13.1	15.0
L3	32	0.1	0.1	0.1	1.0	1.1	2.2	2.8	3.3	3.3	3.9	4.4	5.0
L4	33	0.1	0.2	0.3	0.6	1.8	2.8	3.0	4.3	4.1	4.7	6.5	8.8

[0517]

[표 3c]

4°C 및 pH 7.5(100 mM His, 200 mM Gly, 200 mM Suc)에서의 안정성 연구

	화합물 번호	0 시간 %	1 시간 %	5 시간 %	24 시간 %	48 시간 %	72 시간 %	96 시간 %	120 시간 %	144 시간 %	168 시간 %	264 시간 %	336 시간 %
L1	30	0.1	0.1	0.1	0.7	2.0	2.2	4.4	5.5	6.9	7.5	8.7	12.2
L2	31	0.1	0.1	0.1	0.1	0.2	0.2	0.2	0.1	0.4	0.3	0.6	0.7
L3	32	0.1	0.1	0.0	0.2	0.3	0.3	0.4	0.6	0.6	0.7	1.1	1.3
L4	33	0.1	0.1	0.1	0.2	0.2	0.2	0.1	0.3	0.3	0.2	0.5	0.6

[0519]

실시예 42: FGF21에 접합된 연결기 L1 내지 L4의 안정성

[0520]

FGF21에 접합시 4개 연결기의 2주에 걸친 화학적 안정성을 조사하기 위해 하기 실험을 수행하였다: 각각의 연결기를 FGF21에 접합하고, +4°C 저장 조건에서 방지하고, 분취액을 제거하고 특정 시점에서 냉동으로 급랭하고, 연결기 안정성을 LC-MS 분석으로 모니터링하였다.

[0521]

4개 연결기를 동결건조된 스톡 물질로부터 DMSO에 용해하였다. FGF21 Δ H-A129C 단백질을 0.1 mM TCEP로 30분 동안 부분적으로 감소시킨 후 1:1 연결기:단백질 비로 연결기 스톡을 첨가하였고; 접합 반응 중 FGF21 Δ H-A129C 단백질 농도는 5 mg/mL이었다. L1을 단백질과 30분 동안 반응시키고; L2, L3 및 L4를 2시간 동안 반응시켰다. 접합 반응을 크기-배제 수지를 통해 과량의 연결기를 제거함으로써 급랭하였다. 접합된 FGF21 Δ H-A129C 단백질을 안정성 저장을 위해 +4°C에서 방지하였다. 분취액을 $t=0$ (안정성 저장 전) 및 $t=1, 3, 8$ 및 14일에 제거하였다. 연결기 안정성의 분석을 LC-MS 분석으로 수행하여 비접합된 단백질, 단백질 + 연결기 접합, 및 접합된 단백질 + 연결기의 단일 및 이중 가수분해 사건의 상대적인 양을 결정하였다.

[0522]

연결기 가수분해는 이 실험에서 중요한 분석 변수이다. 가수분해를 FGF21-연결기 복합체에 H₂O를 첨가한 이후 관찰하여 모니터링하였다. H₂O의 단일 첨가[+(1) H₂O]는 모든 4개 연결기 상에 존재하는 활성 AZD 기의 가수분해를 나타낼 수 있다. 두번째 H₂O 분자의 첨가[+(2) H₂O]는 연결기에서 가수분해(예를 들어 화학적 불안정성)의 강력한 지표이다. L1은 말레이미드 작용 기의 존재로 인해 특히 민감할 수 있다.

[0523]

하기 표 4의 실험 결과는 L1이 +(2) H₂O에서 가장 큰 증가를 진행함을 설명한다. $t=0$ 에서, 각각의 L1 내지 L4는 총 측정된 단백질의 6 내지 8%의 +(2) H₂O의 측정된 값을 갖는다. 2주 동안 상기 샘플을 모니터링하고, L1에서 관찰된 +(2) H₂O는 18% 증가된 반면, 잔여 연결기 L2 내지 L4 각각에 대한 값은 6 내지 8%에서 불변하였다. 이 데이터는 L1이 L2 내지 L4에 비해 비교적 덜 안정됨을 제시한다.

표 4

FGF21과 접합된 L1 내지 L4의 가수분해 분석

연결기	시간	0 연결기	1 연결기	+ (1) H ₂ O	+ (2) H ₂ O
L1	0	13	49	30	8
L1	24	14	41	34	11
L1	72	14	40	35	11

L1	168	10	33	40	18
L1	336	12	28	41	18
L2	0	22	45	27	6
L2	24	23	43	26	8
L2	72	24	37	32	8
L2	168	24	40	29	7
L2	336	26	38	28	8
L3	0	19	45	30	6
L3	24	18	47	27	8
L3	72	19	43	30	8
L3	168	19	43	29	8
L3	336	20	43	29	8
L4	0	20	46	28	6
L4	24	20	46	27	7
L4	72	21	42	30	7
L4	168	21	41	32	6
L4	336	22	41	31	6

[0526] **실시예 43: L1 내지 L4와 접합된 Ab-FGF21ΔH-A129C**

[0527] L2 내지 L4는 이전에 다양한 조건(표 3a 내지 3c 참조) 및 FGF21(표 4)하에 글루타티온과 접합된 L1 보다 더 안정될 수 있음을 나타내었다. 개질된 말레이미드 연결기 L2 내지 L4를 FGF21ΔH-A129C(표 5에 나타낸 접합 효율성)와 융합하였고, Glut1 택맨 어세이에서 활성을 나타내었다(표 5: EC₅₀ 값을 FGF21ΔH에 대한 상대적인 값에 대하여 표준화하였다).

표 5

L1 내지 L4의 접합 효율성

연결기	화합물	FGF21-연결기 접합	FGF21-연결기-Ab 접합	FGF21ΔH에 상대적인 Glut1 택맨 활성을 EC ₅₀ (nM)
L1	30	95%	95%	1.68
L2	31	67%	95%	1.00
L3	32	87%	89%	0.35
L4	33	90%	94%	2.71

[0529] 그러나, 상기에도 불구하고, Ab-L2-FGF21ΔH-A129C, Ab-L3-FGF21ΔH-A129C, Ab-L4-FGF21ΔH-A129C는 각각 Ab-L1-FGF21ΔH-A129C 보다 생체내 더 안정되었다. 이는 IV 투여 후 순환에서 낮은 지효성 수준 및 SC 투여 후 순환에서 낮은 피크 및 지효성 수준의 증거이다(도 2a 내지 2c, 표 6). 놀랍게도, 이러한 결과는 완충 시스템에서 적은 펩티드에 융합된 연결기로 수행된 안정성 연구의 결과에 반대로 실행된다.

표 6

3 mg/kg IV 및 SC 투여 후 L1, L2, L3 및 L4로 접합한 FGF21의 마우스 PK 파라미터

화합물	T1/2(시간)		AUC(시간* μ g/ml)		SC 생물학적 이용가능성(%)
	IV	SC	IV	SC	
Ab-L1-FGF21ΔH-129C	33	33	491	511	약 100
Ab-L2-FGF21ΔH-129C	37	23	314	165	53
Ab-L3-FGF21ΔH-129C	32	13	254	129	51
Ab-L4-FGF21ΔH-129C	22	14	219	106	48

[0531] 이러한 결과를 마우스 혈청에서 추가 연구로 증명하였다. FGF21ΔH-A129C를 각각의 L1, L2, L3 및 L4를 사용하여 h38C2에 접합하였다. 각각의 샘플을 0.3 mg/mL로 마우스 혈청에서 희석하고 냉동하기 전 37°C에서 항온처리한 후 이후 2DLC/MS에 의해 분석하였다. 기준 표준과 비교하여, Ab-L1-FGF21ΔH-A129C를 5 분 후 149%에서,

34시간 후 66%에서, 72시간 후 81%에서 검출하였고, 120시간까지는 검출 불가하였다. 반대로, Ab-L2-FGF21ΔH-A129C, Ab-L3-FGF21ΔH-A129C, Ab-L4-FGF21ΔH-A129C는 모든 샘플에서 검출 불가하였다.

[0532] **실시예 44: L1 및 L2와 접합된 Ab-FGF21ΔH-A129C의 래트 연구**

[0533] 항체 지지체에 FGF21 단백질을 접합하기 위해 사용된 연결기에 의해 다른 Ab-FGF21ΔH-A129C의 2가지 버전의 단일 투여 약동학(PK)을 수컷 스프래그 다우리 래트에서 측정하였다. 래트를 Ab-L1-FGF21ΔH-A129C(말레이미드 연결기) 또는 Ab-L2-FGF21ΔH-A129C(메틸 말레이미드 연결기)와 함께 IV 또는 SC(3 mg/kg) 투여하고, 혈액 샘플을 투여 후 5분 내지 14일의 간격에 뽑았다. 혈청 Ab-FGF21ΔH-A129C 수준을 ELISA로 측정하였고, 이때 FGF21 접합물을 FGF21에 대하여 특이적인 단클론 항체를 통해 포획하고 항인간 Fc로 검출하였다. 생성된 PK 데이터는 Ab-L1-FGF21ΔH-A129C 접합물이 Ab-L2-FGF21ΔH-A129C 접합물($T_{1/2}$: IV = 52시간, SC = 33시간; SC 생물학적 이용가능성 = 36%)과 비교하여 뛰어난 PK 특징($T_{1/2}$: IV = 60시간, SC = 38시간; SC 생물학적 이용가능성 = 52%)을 가짐을 입증하였다(도 3a 및 표 7). 이러한 결과는 작은 펩티드에 융합된 이러한 연결기를 갖는 완충 시스템에서 수행된 안정성 연구의 주어진 결과를 예상하지 않았다.

표 7

[0534] 3 mg/kg IV 및 SC 투여 후 L1 및 L2로 접합한 FGF21의 래트 PK 파라미트(도 3a)

화합물	T1/2(시간)		AUC(시간* μ g/ml)		SC 생물학적 이용가능성(%)
	IV	SC	IV	SC	
Ab-L1-FGF21ΔH-A129C	60	38	1382	717	52
Ab-L2-FGF21ΔH-A129C	52	33	419	152	36

[0535] **실시예 45: Glut1 RNA에서 L1 및 L2를 갖는 Ab-FGF21ΔH-A129C의 효과**

[0536] 3T3-L1 지방세포를 24-웰 조직 배양 플레이트(팔콘(Falcon: 등록번호 353047)에서 8일 시딩하고, DMEM 완전 배지(10% FBS, 2 mM L글루타민, 1% P/S)에서 37°C 및 5% CO₂로 항온처리하였다. 세포를 0.2% BSA가 첨가된 무혈청 DMEM 배지에서 밤새 굽기고(12일), 0.2% BSA를 함유하는 무혈청 DMEM 중 Ab-L1-FGF21ΔH-A129C 및 Ab-L2-FGF21ΔH-A129C로 37°C에서 6시간 동안 처리하였다. 배지를 흡입한 후, RNeasy 미니 키트를 제조사의 지시에 따라 사용하여 세포로부터 RNA를 추출하였다. RNA를 스펙트라맥스(Spectramax: 등록상표) 플러스(Plus) 분광 광도계를 사용하여 A260 nm에서 측정하였다.

표 8

[0537] 택맨 정량적 실시간 PCR(RT-PCR)

화합물	Glut1 RNA 발현 EC ₅₀ (nM)
FGF21ΔH	3.39
FGF21ΔH-A129C	16.03
Ab-L1-FGF21ΔH-A129C	1.72
Ab-L2-FGF21ΔH-A129C	9.33

[0538] FGF21ΔH, FGF21ΔH-A129C, Ab-L1-FGF21ΔH-A129C 및 Ab-L2-FGF21ΔH-A129C에 의한 3T3-L1 지방세포의 자극은 투여-의존 Glut1 유도를 야기하였다. Ab-L1-FGF21ΔH-A129C는 Ab-L2-FGF21ΔH-A129C보다 더 강력하게 나타났다(표 8).

[0539] **실시예 46: 연결기 길이 연구**

[0540] Ab-L1-FGF21ΔH-D79C, Ab-L7-FGF21ΔH-D79C 및 Ab-L8-FGF21ΔH-D79C를 연결기 길이의 내성을 평가하기 위해 서로에 대하여 시험하였다. 세포계 어세이에서 유사한 PK(도 3B 및 표 9) 및 비교가능한 효능(데이터는 나타내지 않음)을 모두 나타내었다.

표 9

[0541]

3 mg/kg IV 투여 후 L1, L7 및 L8 연결기로 접합한 FGF21의 마우스 PK 파라미터(도 3b)

화합물	IV T _{1/2} (시간)	IV AUC(시간* μ g/ml)
Ab-L1-FGF21 Δ H-D79C	19	176
Ab-L7-FGF21 Δ H-D79C	27	183
Ab-L8-FGF21 Δ H-D79C	15	248

[0542]

실시예 47: 잔기 위치 및 연결기 선택의 요약

[0543]

H1C, T40C, D79C, L86C, H125C 및 A129C를 티올-말레이미드 접합 전략을 사용하여 잠재적인 접합 부위로서 시험하였다. 물론, H1C, T40C 및 L86C는 발현 및 리풀딩 문제를 나타내었다. D79C, H125C 및 A129C를 단백질 생성의 모든 수용가능한 수준을 나타냄으로써 추가로 조사하였고 비접합된 돌연변이체 단백질이 잠재적으로 보유됨을 입증하였다. Ab-FGF21 Δ H-D79C, Ab-FGF21 Δ H-H125C 및 Ab-FGF21 Δ H-A129C는 FGF21 Δ H로서 유사한 생활성을 나타내었고, 이러한 위치에서 항체를 접합하는 것이 수용체 결합을 방해하지 않음을 확인하였다. D79C, H125C 및 A129C는 FGF21 Δ H로서 유사한 안정성 및 생활성을 가졌다.

[0544]

시험된 모든 리신 돌연변이체 항체 접합물은 13 내지 17시간의 IV 반감기를 갖는 H125C 및 A129C 항체 접합물에 대하여 열등 마우스 PK를 나타내었다(표 10).

표 10

[0545]

FGF21에서 접합 부위의 요약

	발효의 단백질 수율 (mg/L)	글루코스 섭취 EC ₅₀ (nM)	Glut1 택맨 비접합된 EC ₅₀ (nM)	Glut1 택맨 접합 EC ₅₀ (nM)	IV T _{1/2} (hr)	SC T _{1/2} (hr)	% SC 생물학적 이용 가능성	GTT* (Ctrl의 %AUC)
FGF21 Δ H**		12(12)	2.3(7)	N/A	0.4	0.5	96	67
K56	10-50	5.5	0.9(2)	1.9(1)	17	13	66	100
K59	10-50	0.9	0.6(1)	6.5(2)	13	ND	N/A	100
K69	10-50	5.2	1.3(1)	ND	ND	ND	ND	ND
K122	10-50	1.7	2.6(2)	1.6(2)	16	14	40	100
Knull-P2	10-50	ND	1.2(2)	16.6(1)	17	ND	N/A	100
Knull-H1K	10-50	ND	6.4(2)	4.3(2)	16	11	51	99
Knull-S181K	10-50	ND	7.5(2)	>500(2)	ND	ND	ND	ND
D79C		9.9	2.1(4)	3.7(3)	17, 19	20, 17	55, 70	54
L86C		62	ND	ND	ND	ND	ND	ND
H125C		0.65	1.2(3)	3.2(4)	37	32	67	48, 66
A129C		5.7	1.4(6)	2.7(7)	28, 33	37, 33	69, 100	64, 67, 72

*10 mg/kg의 D79C 및 1 mg/kg Qd의 FGF21dH를 제외하고, 3 mg/kg의 단일 SC 투여 후 3일.

**단백질; ND: 측정되지 않음.

[0546]

비록 Ala129가 용매에 많이 노출되지 않고, D79 또는 H125 보다 적을지라도, FGF21 Δ H-A129C는 놀랍게도 가장 안정된 돌연변이체 중 하나이고 항체 접합에 대해 시험된 최고의 위치이다. 이는 돌연변이가 비보존적인 것으로서 기대되지 않았다. 비록 이론에 의해 구속되고자 하지 않을지라도, A129C에서 접합의 독특한 적합성에 대한 여러 가능한 이유가 있다. 첫째; Ala129 및 His125는 둘다 FGF21의 모델링된 구조에서 유연할 수 있는 루프 영역에 위치된다. 이러한 영역은 다른 혼합 결합 FGF 일원에 대한 일반적인 혼합 결합 부위이다. FGF19, FGF21 및 FGF23은 혼합에 결합하지 않음으로써, 이 영역의 서열 충실도를 유지하는 것은 이들의 생물학적 작용을 위해 중요하지 않을 수 있다. 위치의 유연성은 수용체 결합의 간섭을 피하기 위한 항체-접합에 유리할 수 있다. 둘째; Ala129는 양성 전하 잔기, 즉 His125, Arg126, Arg131 및 Arg135에 의해 둘러싸인다. 이 양성 전하 패치는 강력한 전하 반발로 인해 FGF21 Δ H-A129C의 SS-이량체를 피할 수 있다. 셋째; 이러한 전하 잔기는 이의 부재 시 말레이미드의 개화 후 카복실레이트를 생성할 수 있는 말레이미드 연결기 L1의 안정화를 선호할 수 있다. 따라서, 말레이미드 연결 전략을 사용하여 FGF21을 접합할 경우, A129의 특이적 잔기 위치에서 연결은 특히 유리하도록 나타난다.

[0547]

Ab-L1-FGF21 Δ H-A129C 및 Ab-L1-FGF21 Δ H-H125C는 둘다 뮤린 모델에서 30시간 이상의 높은 IV 반감기 및 SC 반감기 뿐만 아니라 우수한 생물학적 이용가능성을 나타낸다. 2개 접합물은 Glut1 택맨 어세이에서 4 nM 미만의

효능을 설명한다. 일반적으로, Ab-L1-FGF21 Δ H-A129C는 Ab-L1-FGF21 Δ H-H125C와 비교하여 약간 개선된 반감기 및 효능을 나타낸다. 또한, Ab-L1-FGF21 Δ H-A129C 중 L1의 사용은 제안된 생체외 시험에 대한 놀라운 장점을 나타내고, 시험된 것과 비교하여 가장 유리한 연결기 전체를 나타낸다.

[0548] Ab-L1-FGF21 Δ H-A129C의 성분의 특이적 조합(항체, 연결기, 연결 잔기 위치, 연결 잔기, 단백질)은 다중 대안과 비교하여 최적 반감기, 생물학적 이용가능성, 효능, 활성, 생성의 용이성, 및 가수분해에 대한 저항을 제공하도록 나타난다.

실시예 48: 화합물의 효능

[0550] 당내성을 화합물 Ab-FGF21 Δ H-K56 및 Ab-FGF21 Δ H-Knull-H1K로 처리된 ob/ob 마우스에 시험하였다. 2개 화합물을 Ab-FGF21 Δ H-H125C(도 4a 및 4b) 및 Ab-FGF21 Δ H-A129C(도 5a 및 5b)에 대하여 불량하게 비교하였다. 반대로, Ab-FGF21 Δ H-D79C 및 Ab-FGF21 Δ H-H125C는 당내성을 개선시키고 체중 증가를 감소시키는 것으로 나타났다(도 4a, 4b, 6a, 6b, 6c, 6d 및 표 11).

표 11

[0551] ob/ob 마우스에 지정된 시간에서 10 mg/kg의 Ab-FGF21 Δ H-D79C의 SC 주사 후 6일째 수행된 OGTT 동안 글루코스 AUC(도 6c 및 6d 참조).

처리	평균 글루코스 AUC(비히클 대조군의 %)
비히클	100
FGF21 Δ H, 1 mg/kg QD	61**
Ab-FGF21 Δ H-D79C, 0 및 3일	53**
Ab-FGF21 Δ H-D79C, 3일	53**
Ab-FGF21 Δ H-D79C, 5일	87
Ab-FGF21 Δ H-D79C, 6일	67**
린 대조군(비히클)	41**

듀넷(Dunnett)의 시험 후 일방향 아노바에 의한 **p<0.01 대 비히클(글루코스 AUC)

[0552] Ab-FGF21 Δ H-A129C는 백색 지방 조직(WAT)에서 *Ucp1* 발현을 증가시키고, ob/ob 마우스에 간 지방증을 역전시킴으로써 입증된 증가된 에너지 지출로 인해, 당내성을 개선하고 체중 증가를 감소시킴이 발견되었다(도 6e, 6f, 6g, 6h 및 표 12). *Ucp1* 발현을 위해, 생체내 효능 연구로부터 수집된 냉동된 내장 WAT 샘플을 균질화하였다. 총 RNA를 조직 균질액으로부터 추출하였고, Glut1 및 GAPDH mRNA 발현을 판티택트 프로브 RT-PCR 키트를 사용하고 택멘 기기(어플라이드 바이오시스템스)에서 정량적 실시간 PCR 반응을 작동하여 측정하였다. 처리 효과를 각각의 샘플로부터의 GAPDH mRNA 수준에 의해 정규화된 Glut1 mRNA 수준에서 배수 변화로 측정하였다. Ab-FGF21 Δ H-A129C는 WAT에서 증가된 *Ucp1* 발현에 의해 제안된 바와 같이 증가된 에너지 지출로 인한 체중 손실, DIO 마우스에 감소된 혈청 트리글리세리드 및 지방산 수준, 및 감소된 간 중량을 야기하였다(도 7a, 7b, 7c, 7d, 7e 및 표 13). 간 중량의 감소는 또한 ob/ob 마우스에서 관찰되었다(도 7f 및 표 14). ob/ob 마우스에서의 추가 실험은 스테아로일-공효소 A 불포화효소-1(SCD1) 및 모노아실글리세롤 0-아실전이효소(MOGAT2)의 RNA 수준의 감소, 및 포크헤드 복스 A2(FoxA2)의 RNA 수준의 증가를 입증하였다(도 7g, 7h, 7i 및 표 15).

표 12

[0553] ob/ob 마우스에 6일째 Ab-FGF21 Δ H-A129C의 SC 단일 주사 후 결과(도 6E, 6F, 6G 및 6H 참조)

처리	OGTT 3 mg/kg 동안 글루코스 AUC(비히클 대조군의 %)	10 mg/kg에서 WATU CP1 mRNA 발현(SEM)	10 mg/kg에서 간 트리글리세리드의 함량(SEM)	1일로부터 6일째에 체중 변화 10 mg/kg(SEM)
비히클	100	1.0(0.1)	35.7(4.2)	6.2(0.2)
FGF21 Δ H, 1 mg/kg QD	67**	2.6(0.4)	370.0(2.3)	4.7(0.3)
Ab-FGF21 Δ H-A129C, 0일	80*	2.4(0.3)	22.2(2.1)*	4.2(0.4)**
Ab-FGF21 Δ H-A129C, 1일	68***	2.6(0.7)	22.1(5.6)*	3.8(0.3)***
Ab-FGF21 Δ H-A129C, 2일	68***	2.1(0.6)	22.2(2.4)*	3.8(0.4)***

Ab-FGF21 ΔH-A129C, 3일	57***	2.5(0.5)	27.7(4.3)	4.0(0.4)**
린 대조군 (비히클)	57***	--	9.3(1.4)***	1.1(0.6)***
듀넷 시험 후 일방향 아노바에 의한 *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001 대 비히클. SEM 값은 팔호에 제공된다.				

표 13

[0554] DIO 마우스에 0 및 7일째 10 mg/kg으로 Ab-FGF21ΔH-A129C의 반복 SC 주사 후 10일째 결과(도 7a, 7b, 7c, 7d 및 7e 참조).

처리	OGTT 동안 글루코스 AUC(비히클 대조군의 %)	-1일로부터 10일째 체중 변화(g) (SEM)	WAT에서 UCP1 mRNA 발현(SEM)	혈청 지질의 평균 값	
				TG(mg/dL)(SEM)	NEFA(mM)(SEM)
비히클	100	-0.2(0.9)	1.2(0.3)	133(7.0)	0.61(0.06)
FGF21ΔH, 1 mg/kg QD	75***	-1.6(0.8)	1.6(0.2)	92(9.6)**	0.40(0.04)
Ab-FGF21 ΔH-A129C, 0 및 7 일	83*	-2.4(0.7)	4.8(1.1)**	69(6.4)**	0.36(0.04)*
음식 공급 대조군(비히클)	78**	+1.2(0.4)	0.5(0.1)	104(9.2)*	0.52(0.10)
듀넷 시험 후 일방향 아노바에 의한 *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001 대 비히클. SEM 값은 팔호에 제공된다.					

표 14

[0555] ob/ob 마우스에 지정된 시간에 10 mg/kg으로 Ab-FGF21ΔH-A129C의 단일 SC 주사 후 6일째 간 중량(도 7f).

처리	간 중량(g)(SEM)
비히클	2.3(0.1)
FGF21ΔH, 1 mg/kg QD	1.8(0.1)**
Ab-FGF21ΔH-A129C, 0일	1.4(0.1)***
Ab-FGF21ΔH-A129C, 1일	1.4(0.1)***
Ab-FGF21ΔH-A129C, 2일	1.4(0.1)***
Ab-FGF21ΔH-A129C, 3일	1.5(0.1)***
린 대조군(비히클)	0.8(0.0)***
듀넷 시험 후 일방향 아노바에 의한 **p<0.01, ***p<0.001 대 비히클. SEM 값은 팔호에 제공된다.	

표 15

[0556] ob/ob 마우스에 지정된 시간에 10 mg/kg으로 Ab-FGF21ΔH-A129C의 단일 SC 주사 후 6일째 수집된 간 조직 샘플로부터 qPCR을 사용하여 mRNA 발현의 평균 배수 변화(도 7g, 7h 및 7i).

처리	SCD1(SEM)	MOGAT2(SEM)	FOxA2(SEM)
비히클	1.01(0.06)	1.05(0.17)	1.00(0.04)
FGF21ΔH, 1 mg/kg QD	0.95(0.06)	0.37(0.05)**	1.23(0.08)
Ab-FGF21ΔH-A129C, 0일	0.83(0.08)	0.38(0.10)**	1.14(0.06)
Ab-FGF21ΔH-A129C, 3일	0.61(0.08)**	0.31(0.08)**	1.81(0.20)**
듀넷 시험 후 일방향 아노바에 의한 **p<0.01 대 비히클. SEM 값은 팔호에 제공된다.			

[0557] **실시예 49: 엑센딘 4 화합물에서 GSIS 어세이**

[0558] 생체외 췌장의 β -세포로부터 인슐린 분비를 자극하기 위한 특정한 엑센딘 4 동족체의 능력을 글루코스-자극된 인슐린 분비(GSIS) 어세이를 사용하여 시험하였다. 간단히, 관련 엑센딘 4 동족체를 h38C2의 두 결합 부위에 접합하고, 이 접합된 분자를 다양한 농도에서 글루코스와 함께 췌장의 β -세포 배양에 적용하였다. 인슐린 분비를 시간에 걸쳐 인슐린 수준을 측정함으로써 검출하였다. EC₅₀을 각각의 화합물에 대하여 계산하였다. 이 어세이의 결과를 하기 표 16에 나타내었다.

[0559] **실시예 50: 엑센딘 4 화합물에서 당내성 시험(GTT), 체중 변화 및 음식 섭취**

[0560] 예시적인 엑센딘 4 동족체의 생체내 효능을 단일 또는 반복 투여 당내성 시험 패러다임을 사용하여 추정하였다. 성숙 수컷 ob/ob 마우스 새끼(잭슨 래보래토리스(Jackson Laboratories), 미국 메인주 바 하버 소재)를 0.2 내지 0.3 ml의 주사 용량으로 간단한 설명서 제한을 사용하여 견갑골 중앙 영역에 본 발명의 시험 화합물 0.3 mg/kg을 피하(SC) 투여하였다. 린 한배새끼 대조군 마우스(n = 8마리/군, 잭슨 래보래토리스, 미국 메인주 바 하버 소재)를 비히클로 유사하게 투여하였다. 음식 섭취 및 누적 체중 변화를 매일 아침(8시 내지 9시; 6시에 광 시작 및 18시에 광 제거) 모니터링하였다. 모니터링 결과 0 내지 9일에 걸친 평균 값 및 9일째 값을 나타내었다. 각각의 화합물을 8 내지 10 마리 동물로 시험하였다.

[0561] 마우스는 기준 프로토콜에 따라 경구 당내성 시험(OGTT)를 진행하였다. 간단히, 마우스를 콜로니에서 광시작 단계의 초기에 4 내지 5시간 동안 금식시켰다. 이 기간의 끝에(이른 오후), 마우스를 경구 글루코스 도전(1.5 g/kg) 직전 및 경구 글루코스 도전 후 15 내지 120분의 정규 간격에서 꼬리-채혈하였다. 음식을 120분 시점의 수집에 따라 우리에 돌려주었다. 글루코스 수준을 자가 시험 혈당 측정기를 사용하여 측정하였고, 경구 글루코스 도전 후 시간의 작용으로서 글루코스에 대한 AUC를 선형 사다리꼴 식을 사용하여 계산하였다. 상기 결과, 비히클 대조군의 %로서 계산되었고, 48 및 72시간 시험에 대하여 나타내었다(표 16).

표 16

제 4 페인트 디전의 예

서열 번호	연결 부위	EC ₅₀ 펩티드	EC ₅₀ 펩티드-Ab 접합	SC T _{1/2}	SC 생물학적 이용가능 성	비히클의 음식 섭취%	9일에서 비히클의 음식 섭취	비히클의 체중%	9일에서 비히클의 체중%	비히클 대조군의 GTT 48 시간%	비히클 대조군의 GTT 72 시간%
38	C-20	0.03, 0.078,	2.63	26.8	85	78	86	61	84	88	
39	K38			24.9	39	82	100	52	69		106
43	K28			33.9	46						
44	K27			39.1	72						
45	K26	0.01		66.0	100	105	88	121	122	74.86	
46	K24	0.14,		36.0	57	78	91	45	54		108
47	K23	0.03		84.9	82	92	90	102	102		97
48	K21	0.010, 0.047	2.12	52.0	72	72	88	55	58		66
49	K20			53.4	78	75	92	60	76		69
50	K19	맞지 않음		88.6	100	69	76	67	70		94
51	K17	0.22,		51.7	48	81	94	45	59		65
52	K16	0.01		57.6	88						
53	K14	0.027, 0.040		90.5	100	72	93	62	73	72	76
54	K13	0.031		55.9	80						
55	K12	0.091	1.76	49.5	94	84	91	67	91		
56	K11	0.08		60.9	100					75	

[0562]

위치 23(서열번호 47)에서 연결은 체중 및 섭식을 감소시키지 않았고 48시간에서 당내성을 개선시키지 않았다. 위치 17, 24, 38 및 C-말단(서열번호 51, 46, 39 및 38)에서 연결은 체중 및 섭식을 감소시키지만 72시간에서 당내성을 개선시키지 않았다. 위치 26(서열번호 45)에서 연결은 체중 또는 섭식을 감소시키지 않았지만 48시간에서 당내성을 개선시켰다. 분명한 장점은 위치 12, 14, 19, 20 및 21에서 나타냈다. 위치 14에서 연결은 가장 큰 전체 평균을 제공하는 것으로서 보여졌다. 모든 실시예는 연결 잔기로서 K 또는 K(SH) 잔기를 사용하였다.

[0564]

실시예 51: 비대칭 이작용성 항체 접합을 생성하기 위한 파라미터 평가

[0565]

제형 완충액(pH 7에서 10 mM 히스티딘, 10 mM 글리신, 2% 수크로스) 중 [제 2 연결기]-Ex4]와 Ab의 상이한 융합

비를 실온에서 입증하였다. [제 2 연결기]-Ex4]의 양이 증가됨으로써, [Ab]-[제 2 연결기]-Ex4]₁의 형성 또한 증가되고, 약 45%를 유지하였다(표 17). [제 2 연결기]-Ex4]에서 추가 증가는 [Ab]-[제 2 연결기]-Ex4]₂의 증가된 양을 야기하였다.

표 17

h38C2에 대한 [L1-서열번호 64]의 접합 효율

[제 2 연결기]-Ex4] ₁ :항체	%비접합된 항체	%항체-[제 2 연결기]-Ex4] ₁	%항체-[제 2 연결기]-Ex4] ₂
0.25:1	61	26	13
0.5:1	50	35	15
0.75:1	40	41	19
1:1	32	45	23
1.25:1	23	45	33
1.5:1	19	45	36
1.75:1	17	45	39
2:1	11	39	49

[0566] [제 2 연결기]-Ex4] 및 [Ab](20 mg/mL, 0.6:1 비)를 접합하여 Ab-[제 2 연결기]-Ex4]₁을 형성하는 것은 상이한 공용매 시스템을 사용하여 입증하였다. 이러한 상이한 공용매(표 18에 나타냄)를 Ab-[제 2 연결기]-Ex4]₁의 형성이 개선될 수 있는 경우를 보기 위해 첨가되었다. 공용매, 예컨대 에탄올, 이소프로필 알코올(IPA), 다이메틸 포름아마이드(DMF) 및 다이메틸 셀록사이드(DMSO)의 농도를 5%부터 10%까지 내지 15%로 증가시키는 것은 Ab-[제 2 연결기]-Ex4]₁의 형성에 영향을 끼치지 않지만, Ab-[제 2 연결기]-Ex4]₂의 형성 및 비접합된 항체의 회복에 영향을 끼친다. 이는 유기 공용매의 양이 비접합되어 보유된 항체의 더 많은 양이 증가됨을 나타낸다. 유사하게, 공용매 농도는 증가되어, Ab-[제 2 연결기]-Ex4]₂의 형성을 감소시킨다. 공용매, 예컨대 에탄올, DMF 및 DMSO는 Ab-[제 2 연결기]-Ex4]₂의 형성을 억제하는 반면, 프로필렌 글리콜은 Ab-[제 2 연결기]-Ex4]₁ 또는 Ab-[제 2 연결기]-Ex4]₂의 형성에서 어떠한 영향을 끼치지 않는다. HPLC를 사용하여 분석을 수행하였다.

표 18

h38C2에 대한 [L1-서열번호 64]의 접합 효율

유기 공용매	%비접합된 항체	%Ab-[제 2 연결기]-Ex4] ₁	%Ab-[제 2 연결기]-Ex4] ₂
공용매 없음	26	48	24
에탄올 5%	27	49	23
에탄올 10%	30	49	20
에탄올 15%	30	48	20
IPA 5%	29	49	21
IPA 10%	26	49	24
IPA 15%	25	49	25
DMF 5%	28	49	21
DMF 10%	32	49	18
DMF 15%	38	46	14
DMSO 10%	24	49	25
DMSO 20%	31	49	19
DMSO 30%	36	47	16
프로필렌 글리콜 10%	25	49	25
프로필렌 글리콜 20%	27	49	23
프로필렌 글리콜 30%	26	49	24

[0569] Ab-[제 2 연결기]-Ex4]₁의 형성시 우레아(0.5, 1.0 및 2 M) 및 EDTA(5, 10 및 15 mM)의 영향을 조사하였다. 우

레아 또는 EDAT는 Ab-[제 2 연결기-Ex4]₁ 또는 Ab-[제 2 연결기-Ex4]₂의 형성 시 어떠한 뚜렷한 영향을 끼치지 않는다.

[0570] 또한, [제 2 연결기-Ex4] 및 [Ab](20 mg/mL)로부터 Ab-[제 2 연결기-Ex4]₁의 형성 시 구아니딘 하이드로클로라이드의 영향은 구아니딘 하이드로클로라이드(0, 0.2, 0.4 및 0.5 M)의 상이한 농도 및 [제 2 연결기-Ex4]₁: Ab의 비(0.85:1 및 1:1)에서 설명되었다. 두 비에서, 구아니딘 하이드로클로라이드의 농도의 증가는 Ab-[제 2 연결기-Ex4]₂의 형성을 감소시키지만, Ab-[제 2 연결기-Ex4]₁의 수율에서 유의한 개선을 아직 제공하지 못했다.

[0571] 0.5:1, 0.75:1 및 1:1 비로 [제 2 연결기-Ex4]와 항체(20 mg/mL) 사이의 접합 반응에서 NaCl 농도(0, 100, 250 및 500 mM)의 영향은 제형 완충액(pH 7에서 10 mM 히스티딘, 10 mM 글리신 및 2% 수크로스)을 사용하여 조사하였다. 시험된 NaCl 농도에 대한 Ab-[제 2 연결기-Ex4]₁의 형성에서 유의한 차이가 관찰되지 않았다.

[0572] [제 2 연결기-Ex4]₁과 항체(20 mg/mL) 사이의 접합 반응에서 pH의 영향은 제형 완충액(10 mM 히스티딘, 10 mM 글리신 및 2% 수크로스)을 사용하여 연구하였다. 연구 결과를 표 19에 나타내었다. [제 2 연결기-Ex4]₁의 형성은 pH 6.5 및 7에서 가장 높았다.

표 19

h38C2에 대한 [L1-서열번호 64]의 접합 효율

[제 2 연결기-Ex4] ₁ : 항체	pH	%비접합된 항체	%Ab-[제 2 연결기-Ex4] ₁	%Ab-[제 2 연결기-Ex4] ₂
1 : 1	5	44	43	12
1 : 1	5.5	38	45	16
1 : 1	6	26	45	29
1 : 1	6.5	40	47	22
1 : 1	7	29	47	23

[0574] [제 1 연결기-FGF21]:[Ab]-[제 2 연결기-Ex4]₁의 비의 체계적 조사를 [FGF21-제 1 연결기]₁-[Ab]-[제 2 연결기-Ex4]₁의 형성을 평가하기 위해 연구하였다. 표 20은 [Ab]-[제 2 연결기-Ex4]₁ 및 [제 1 연결기-FGF21]의 농도 및 [FGF21-제 1 연결기]₁-[Ab]-[제 2 연결기-Ex4]₁의 형성을 나타내었다. 비는 HIC 컬럼이 장착된 HPLC를 사용하여 달성하였다. [Ab]-[제 2 연결기-Ex4]₁의 농도는 다양한 [제 1 연결기-FGF21]의 양이 첨가된 경우 달라질 수 있다. 이러한 결과에 근거하여, [FGF21-제 1 연결기]₁-[Ab]-[제 2 연결기-Ex4]₁ 형성의 최대 효율은 [Ab]-[제 2 연결기-Ex4]₁의 농도가 약 2 내지 약 5 mg이고, [제 1 연결기-FGF21]의 양이 [Ab]-[제 2 연결기-Ex4]₁과 비교하여 약 3 내지 약 6 배를 초과하는 경우 달성되는 것으로 나타난다.

표 20

[FGF21ΔH-A129C-L1]에 대한 h38C2-[L1-서열번호 64]의 접합 효율

[Ab]-[제 2 연결기-Ex4] ₁ 농도(mg/mL)	[제 1 연결기-FGF21]:[Ab]-[제 2 연결기-Ex4] ₁ 비	%[FGF21-제 1 연결기] ₁ -[Ab]-[제 2 연결기-Ex4] ₁
5.85	2 : 1	54
4.85	3 : 1	65
3.20	6 : 1	65
2.42	6 : 1	68
1.63	6 : 1	66
0.99	6 : 1	63
0.55	6 : 1	51
0.30	6 : 1	39

[0576] FGF21ΔH-A129C 내에 내부 이황화 결합에 영향을 끼치지 않고 FGF21ΔH-A129C 이랑체 사이에 중간 이황화 결합

을 깨기 위해 요구되는 TCEP의 농도를 연구하였다. 상기 결과를 표 21에 나타내었다. pH 7에서 20 mM 트리스, 50 mM NaCl(약 2 mg/mL) 중 FGF21 Δ H-A129C를 함유하는 샘플을 다양한 농도의 TCEP로 30분 동안 처리하였다. 샘플을 LC-MS로 분석하였다. 데이터에 근거하여, 0.3 mM의 TCEP가 내부 이황화 결합에 영향에 끼치지 않고 FGF21 Δ H-A129C 단백질 사이의 중간 이황화 결합을 깨기 위한 최적 농도이다.

표 21

FGF21 Δ H-A129C 이량체 형태 분석

TCEP(mM)	%FGF21 Δ H-A129C 단량체	%FGF21 Δ H-A129C 감소된 내부 이황화 단량체	%FGF21 Δ H-A129C 이량체
0.00	34.5	0.0	61.5
0.04	75.8	0.0	24.2
0.06	90.2	0.0	9.8
0.08	94.8	0.0	5.2
0.10	95.9	0.0	4.1
0.12	96.4	0.0	3.6
0.15	96.4	0.0	3.6
0.20	96.4	0.0	3.6
0.30	95.5	0.0	3.5
0.50	92.9	3.6	3.5
0.75	91.3	3.3	5.4
1.00	87.8	3.3	8.9

[0577] 중간 이황화 결합의 감소는 3개의 상이한 TCEP 농도를 사용하여 140분에 걸쳐서 HPLC를 사용하여 따랐다. 모든 중간 이황화 결합을 30 내지 40분 내에 TCEP를 사용하여 절단하였다. 이러한 실험은 중간 이황화 결합이 30분 내에 0.3 mM TCEP를 사용하여 절단될 수 있음을 제안한다(표 22).

표 22

TCEP의 상이한 몰비의 효과

TCEP 몰비	시간(분)		%FGF21		%감소된 FGF21 불순물	%FGF21 이량체	
FGF21(mg/mL)	6.8	7.3	6.8	7.3	6.8	7.3	7.3
TCEP:rFGF21의 몰비 0.1	0	0	28.9	33.4	0.0	0.0	69.8
TCEP(0.03 mg/mL)	0	0	27.1	31.1	0.0	0.0	71.5
	4	6.5	36.1	43.4	0.0	0.0	63.9
	27	29.5	63.5	70.3	0.0	0.3	36.5
	50	52.5	68.0	76.5	0.0	0.3	32.0
	73	75.5	70.2	79.8	0.0	0.4	29.8
	96	98.5	72.2	82.9	0.0	0.3	27.8
	119	121.5	72.9	82.6	0.0	0.3	27.1
	142	144.5	73.8	81.8	0.0	0.0	26.2
TCEP:rFGF21의 몰비 0.3	0	0	28.9	33.4	0.0	0.0	69.8
TCEP(0.09 mg/mL)	0	0	27.1	31.1	0.0	0.0	71.5
	4	8	45.9	59.3	0.0	0.0	54.1
	27	31	94.2	93.7	1.0	1.0	4.8
	50	54	96.5	94.4	1.4	1.3	2.2
	73	77	96.6	95.1	1.4	1.4	3.5
	96	100	96.6	94.7	1.6	1.6	1.7
	119	123	96.3	94.3	1.9	2.0	1.8
	142	146	96.0	94.9	2.1	2.3	1.8

TCEP:rFGF21의 몰비 0.5 TCEP(0.14 mg/mL)	0	0	28.9	33.4	0.0	0.0	69.8	65.4
	0	0	27.1	31.1	0.0	0.0	71.5	67.7
	4	11	55.7	69.5	0.0	0.0	44.3	30.5
	27	34	96.4	95.2	1.4	1.3	2.3	3.5
	50	57	96.4	95.2	1.8	1.7	1.8	3.1
	73	80	96.1	94.2	2.1	2.0	1.8	3.8
	96	103	95.5	94.9	2.4	2.2	2.1	2.9
	119	126	95.4	94.2	3.0	3.0	1.6	2.8
	142	149	94.9	93.6	3.5	3.6	1.6	2.8

[0580] 실시예 52: 비대칭 이작용성 접합물 생성(전략 1)

h38C2 + 엑센딘 4 반응: h38C2(서열번호 25 및 서열번호 26)(pH 6.5에서 10 mM 히스티딘, 10 mM 글리신, 2% 수크로스, 136 mL 중 2.76 mg)를 Ex4 웨티드(웨티드 연결 잔기로서 K(SH)를 갖는 서열번호 64, 62.3 mg)로 처리하여 탈이온수의 연결기 L1(1.29 mL, 농도 10 mM)에 접합하고 실온에서 밤새 방치하였다. 소량의 물질을 HIC-부틸 컬럼 및 질량 분석계가 장착된 고성능 액체 크로마토그래피를 사용하여 분석하여 Ab-[L1-서열번호 64]₁의 형성을 모니터링하였다.

Ab-엑센딘 4 1FA 종의 추출: 항체, Ab-[L1-서열번호 64]₁ 및 Ab-[L1-서열번호 64]₂(pH 6.5에서 10 mM 히스티딘, 10 mM 글리신, 2% 수크로스로 제조된 완충액 136 mL 중 2.7 mg)의 혼합물을 함유하는 조질 반응 혼합물을 완충액(409 mL; pH 7.0에서 50 mM 나트륨 포스페이트, 1 M 나트륨 클로라이드)으로 희석하고 CM 세파로스 수지(681 mL)로 포장된 컬럼 위에 로딩하였다. 생성물을 용매 A(pH 7.0에서 0.75 M 암모늄 살레이트 및 50 mM 나트륨 포스페이트) 중 용매 B(50 mM 나트륨 포스페이트, pH 7.0 + 20% 이소프로판올)의 구배를 사용하여 분획식으로 용리하였다. 분획 함유 Ab-[L1-서열번호 64]₁을 합하였다(1100 mL). 50 KD 막이 장착된 한외여과-정용여과 장치를 1 N 나트륨 하이드록사이드로 살균하고 20 mM 2-아미노-2-하이드록시메틸-프로판-1,3-다이올, 50 mM 나트륨 클로라이드, pH 7.0을 함유하는 완충액으로 평형시켰다. 상기 모아진 분획 함유 Ab-[L1-서열번호 64]₁을 20 mM 트리스(하이드록시메틸)아미노메탄, 50 mM 나트륨 클로라이드, pH 7.0을 사용하여 완충액을 교환하고 62 mL까지 농축하고 0.2 μ m 필터를 통해 여과하여 pH 7.0에서 20 mM 트리스(하이드록시메틸)아미노메탄 + 50 mM 나트륨 클로라이드 중 Ab-[L1-서열번호 64]₁(1.02 g)을 수득하였다.

소수성 상호작용 크로마토그래피(HIC) 분리는 분자의 정지상 및 소수성 특징 사이의 상호작용에 기초한다. 항체 h38C2는 Ab-[L1-서열번호 64]₁보다 덜 소수성이고, 이는 Ab-[L1-서열번호 64]₂보다 덜 소수성이다. 용리 동안, 미반응된 항체를 미리 용리한 후, Ab-[L1-서열번호 64]₁을 용리하였다. Ab-[L1-서열번호 64]₂를 끝에 용리하였다. 웨티드에 대한 항체의 비를 조정함으로써, 상기 언급된 3개의 상이한 화합물%는 달라질 수 있다.

미반응된 항체를 단리하고 UF/DF에 이용하고 pH 6.5에서 10 mM 히스티딘, 10 mM 글리신, 2% 수크로스 완충액으로 취하였다. 이 단리된 항체를 다시 Ex4 웨티드(웨티드 연결 잔기로서 K(SH)를 갖는 서열번호 64)와 융합하고 정제하였다. 본 발명의 일부 양태에서, 이는 3배 순환하여 약 70% Ab-[L1-서열번호 64]₁을 수득할 수 있다.

FGF21 + 연결기: FGF21 Δ H-A129C(pH 7.0에서 105 mL의 20 mM 트리스(하이드록시메틸)아미노메탄 + 50 mM 나트륨 클로라이드 중 715 mg)를 트리스(2-카복시에틸)포스핀(TCEP)(0.3 mM 용액)으로 40분 동안 처리하였다. FGF21 Δ H-A129C는 위치 129에서 비반응된 티올로 인해 이량체 형성에 문제를 가질 수 있고, 이는 미반응된 단백질이 생성 및 이후 연결기에 부착하는 사이에 저장되는 경우 특히 단점일 수 있다. 이 문제는 약 0.1 mM의 최종 농도로 TCEP를 첨가함으로써 극복할 수 있다.

L1(3-(2,5-다이옥소-2,5-다이하이드로-1H-페롤-1-일)-N-(2-(2-(3-옥소-3-(4-3-옥소-3-(2-옥소아제티딘-1-일)프로필)페닐아미노)프로폭시)에톡시)에틸)프로판아미드(2.57 mL 다이메틸 살포사이드 중 27.2 mg)를 FGF21 Δ H-A129C 용액(대략 연결기:단백질의 2:1 몰비에서)에 첨가하고 간헐적으로 스월링하면서 실온에서 30분 동안 방치하였다. 비록 다른 용매, 예컨대 다이메틸 포름아마이드, 메탄올, 에탄올, 물, 프로필렌 글리콜 및 이들의 혼합물이 또한 적합할지라도 L1을 통상적으로 100% DMSO에서 10 mM(48.28 mg/mL)로 유지하였다. L1은 메탄올 및 에탄올 모두에서 가수분해를 진행하는 잠재성을 갖는다. L1의 가용성은 다이메틸 살포사이드 및 다이메틸 포름아마이드 둘다에서 높다. 다이메틸 살포사이드가 연결기-단백질 접합에 사용된 완충 시스템에 용이하게 혼

합되므로, 다이메틸 셀록사이드는 L1 스톡 용액을 제조하는데 바람직하다.

[0587] UFDF 막을 1 N 나트륨 하이드록사이드로 30분 동안 살균하고 pH 7.0에서 20 mM 트리스(하이드록시메틸)아미노메탄 + 50 mM 나트륨 클로라이드로 평형시켰다. 상기 FGF21 Δ H-A129C 항온처리 혼합물을 UFDF를 사용하여 농축하여 완충액(81 mL) 중 [L1-FGF21 Δ H-A129C](613 mg)를 수득하였다.

[0588] [L1-FGF21 Δ H-A129C] 용액을 pH 7.0에서 20 mM 트리스(하이드록시메틸)아미노메탄 + 50 mM 나트륨 클로라이드(42 mL)로 희석하고 Ab-[L1-서열번호 64]₁(pH 7.0에서 61 mL의 20 mM 트리스(하이드록시메틸)아미노메탄 + 50 mM 나트륨 클로라이드 중 1.02 g)에 첨가하고 반응 혼합물을 밤새 방치하였다. 이어서, 이 항온처리 혼합물(184 mL)을 완충액 A(366 mL)(pH 7.0에서 0.75 M 암모늄 살레이트 + 50 mM 나트륨 포스페이트)로 희석하고 완충액 A 중 완충액 B(pH 7에서 50 mM 나트륨 포스페이트 + 20% 이소프로판올)를 사용하는 HIC-부틸 컬럼 상에서 정제하였다. HIC-부틸 컬럼은 상업적 제조에 적합한 양까지 적합하게 확대하는 장점을 가짐이 발견되었다. 분획 함유 [FGF21 Δ H-A129C-L1]₁-Ab-[L1-서열번호 64]₁ 분자를 수집하여 화합물(970 mL)을 수득하였다.

[0589] UF/DF 50 kD 50 cm² 카세트를 1 N 나트륨 하이드록사이드로 살균하고, UF/DF 막을 pH 7.0에서 20 mM 2-아미노-2-하이드록시메틸-프로판-1,3-다이올, 50 mM 나트륨 클로라이드를 함유하는 완충액으로 평형시켰다. 상기 합한 분획을 UF/DF 막 및, pH 7에서 20 mM 트리스, 50 mM 나트륨 클로라이드를 사용하여 농축하여 완충액(67 mL) 중 [FGF21 Δ H-A129C-L1]₁-Ab-[L1-서열번호 64]₁(594 mg)을 수득하고, 이를 0.2 μ m 필터를 통해 여과하였다.

[0590] 농축 후, 샘플을 0.2 μ m 막을 통해 여과하고, 4°C에서 저장하였다. 최종 샘플을 내독소에 대하여 분석하고, 순도 및 구조적 동일성을 부틸 HIC HPLC 및 질량 분석계에 의해 달성하였다. HIC-부틸 컬럼이 장착된 HPLC를 사용하는 샘플의 분석은 대략 78% [FGF21 Δ H-A129C-L1]₁-Ab-[L1-서열번호 64]₁ 및 약 22% 미반응된 Ab-[L1-서열번호 64]₁의 수율을 나타내었다.

실시예 53: ABC 분자를 개발하기 위한 다른 전략

[0592] 본 발명은 Ab-[Ex4-제 2 연결기]₁이 [FGF21-제 1 연결기]에 접합된 접합 방법에 대한 제 1 전략(전략 1)을 제공한다. 이 방법은 유리한 반면, 최종 이중특이성 항체 ABC-1에 대한 2개의 높은 분해 크로마토그래피 단계를 요구한다: Ab-[Ex4-제 2 연결기]₁에 대한 하나의 HIC 및 ABC-1 정제 생성물에 대한 다른 하나. 일부 유리한 양상에서, 방법은 14% 미반응된 Ab-[Ex4-제 2 연결기]₁ 중간체를 갖는 74% 순도의 최종 생성물 ABC-1 및 불리한 수율 중 다른 불순물을 갖는다.

[0593] 또한, 본 발명은 전략 2에 따라 비대칭 이작용성 항체 접합물을 생성하는 다른 방법을 제공한다. 전략 2는 전략 1에 대하여 유의한 장점을 제공한다: FGF21 화학량론을 극적으로 개선(전략 2에서 약 1.25x 몰비 대 전략 1에서 3x) 및 유의한 비용 절감을 야기하는 요구된 FGF21의 양의 감소.

[0594] 또한, 전략 2는 Ab-[서열번호 10-L1]₁ 중간체 정제 방법에 대한 단지 하나의 HIC 크로마토그래피로 크로마토그래피 단계를 감소시켰다. ABC-1을 형성하기 위한 [L1-서열번호 64]와 Ab-[서열번호 10-L1]₁ 중간체의 접합 효율은 전략 2에서 널리 정의된 출발 물질 [L1-서열번호 64]를 사용하여 거의 완료되었다.

[0595] A 부틸 650 S 역상 크로마토그래피 단계를 개발하여 중간체 방법으로서 Ab-[서열번호 10-L1]₁을 생성하였다. 단일 접합된 Ab-[서열번호 10-L1]₁ 종을 선택적으로 용리 단계 중 90% 초과의 고수율 및 90% 초과의 고순도에서 회복하고, 자유 [서열번호 10-L1], 이량체 [서열번호 10-L1]₂, 이중 접합된 Ab-[서열번호 10-L1]₂, 응축물 및 자유 h38C2 종을 포함하는 다른 접합 종으로부터 잘 용해하였다. 방법 확대는 19 L 규모로 성공적으로 입증되었다.

[0596] 제 2 접합으로부터 과량 [L1-서열번호 64]를 Capto-Q 크로마토그래피를 통과액으로 빠르게 제거하여 이중특이성 항체 ABC-1을 정제하였다. 전략 2는 ABC-1 내에 완전 반응성 h38C2로부터 계산된 약 40%의 전례없는 수율 및 SEC에 의한 약 91%의 ABC-1의 훌륭한 순도를 입증하였다. 전체 방법 효율은 값비싼 물질 FGF21 이용을 줄이고 크로마토그래피 단계를 최소화함으로써 극적으로 증가하였다.

실시예 54: ABC에 대한 접합 파라미터의 개선

[0598] Ab-[FGF21-연결기]₁ 수율에 대한 [FGF21-연결기]:Ab의 몰비의 효과

[0599] Ab-[서열번호 10-L1]₁ 공정 중간체에 대한 수율을 최대화하기 위한 [FGF21-제 1 연결기]:Ab의 상이한 비의 초기 계산을 수행하였다. [FGF21-제 1 연결기]:Ab의 최적 몰비는 약 1.5:1 내지 약 1:1의 수용가능한 범위를 갖는 약 1.25:1이었다(표 23 참조). 약 1.25:1의 비는 적어도 응축물의 %를 갖는 목적한 중간체에 대하여 약 42% 수율을 가졌다.

표 23

[0600] Ab-[서열번호 10-L1]₁의 수율에 대한 [서열번호 10-L1]:항체 몰비의 효과

FGF21- 연결기]:Ab 비	%큰 응축물	%응축물	%Ab-[FGF21 Δ H- -A129C-L1] ₂	%Ab-[FGF21 Δ H- -A129C-L1] ₁	%Ab	%[FGF21 Δ H- -A129C-L1] ₂	%[FGF21 Δ H- -A129C-L1] ₁
4.7:1	1.5	16.4	52.6	10.7	0.3	1.7	16.8
1.5:1	0.8	7.5	20.0	42.9	25.0	0.2	3.7
1.25:1	1.1	5.7	14.3	41.8	34.4	0.0	2.7
1:1	0.7	5.1	9.9	38.7	43.8	0.0	1.9
0.75:1	0.6	3.5	5.7	32.0	56.6	0.0	1.5

[0601] Ab-[FGF21-연결기]₁에 대한 완충액, pH 및 접합 온도의 스크리닝

[0602] 접합 효율을 개선하기 위한 상이한 파라미터를 완충액 MES(2-(N-모폴리노)에탄설휘산) 및 포스페이트, pH(6 및 7), 및 온도(실온 대 4°C)를 포함하여 스크리닝하였다. 결과(표 24)는 MES 및 포스페이트 완충액 모두에 대한 안정된 pH, 온도 및 상이한 온도 범위를 보유하는 응축물의 %를 나타내었다. pH 6.0에서 100 mM 포스페이트 완충액은 실온에서 다른 조건과 비교하여 유의하게 많은 Ab-[FGF21]₁을 가졌다. 4°C에서 접합은 h38C2-[서열번호 10-L1]₁에 대하여 더 낮은 수율을 갖지만 유사한 생성물 프로파일을 나타내었다. h38C2-[서열번호 10-L1]₁에 대한 접합을 위해 수용가능한 작동 조건을 약 0°C 내지 37°C, 바람직하게는 약 4°C 내지 약 실온에서, 약 5.5 내지 약 7.5, 또는 약 6.0 내지 약 7.0의 pH 범위를 갖는 약 25 mM 내지 약 150 mM의 농도에서 MES 또는 포스페이트 완충액을 사용하여 확인하였다. h38C2-[서열번호 10-L1]₁에 대한 최적 접합 조건은 실온에서 약 6.0 내지 약 6.5의 pH 범위를 갖는 약 100 mM 포스페이트 완충액을 포함하였다.

표 24

0°C 실온 0°C 실온

	% _{0°C} 결합물	% _{0°C} 결합물	%Ab-[FGF21-ΔH-Al29C-L1] ₂	%Ab-[FGF21-ΔH-Al29C-L1] ₁	%Ab-[FGF21-ΔH-Al29C-L1] ₁	%Ab	%[FGF21-ΔH-Al29C-L1] ₁
100 mM MES, pH 7.0	0.6	0.5	3.7	4.1	6.6	6.5	34.2
100 mM MES, pH 6.0	0.3	0.6	1.4	2.8	2.2	6.6	21.7
100 mM 포스페이트, pH 7.0	0.5	0.6	3.1	3.8	5.1	5.7	32.2
100 mM 포스페이트, pH 6.0	0.3	0.7	3.1	6.6	8.5	19.9	37.9
25 mM MES, pH 7.0	0.8	0.7	4.4	4.6	8.0	7.9	36.6
25 mM MES, pH 6.0	0.4	0.7	2.7	3.9	5.9	8.1	34.3
25 mM 포스페이트, pH 7.0	0.7	0.7	4.2	4.2	7.0	7.5	36.2
25 mM 포스페이트, pH 6.0	0.7	0.8	3.6	4.2	6.8	7.8	36.5

결합 조건: 총 용량 = 0.5 ml; h38C2 = 4.9 mg/ml; [서열번호 10-L1]:h38C2의 농도 = 0.81; 4°C, 26시간; 실온에서 발재

[0603]

[0604]

Ab-[FGF21-연결기]₁에 대한 시간 경과 연구: 시간 경과 연구를 [FGF21-제 1 연결기]와 h38C2를 접합하는 모델링을 사용하여 수행하였다. 18시간 후 실온에서, h38C2-[서열번호 10-L1]₁ 중간체에 대한 접합 효율은 표 25에 나타낸 바와 같이 최대로 도달하였다. 따라서, 접합 반응은 30분 이상, 약 60분 이상, 약 90분 이상, 약 2시간 이상, 약 3시간 이상, 약 4시간 이상, 약 6시간 이상, 약 12시간 이상, 약 18시간 이상 및 약 24시간 이상으로 이루어진 군으로부터 선택된 시간 동안 수행될 수 있다.

표 25

[0605]

SEC에 의한 실온에서 h38C2-[서열번호 10-L1]₁에 대한 동역학 데이터

	%큰 응축물	%응축물	%Ab-[FGF21 ΔH-A129C-L1] ₂	%Ab-[FGF21 ΔH-A129C-L1] ₁	%Ab
30분	2.0	2.0	0.0	12.5	83.1
60분	0.4	3.3	1.7	19.4	77.0
90분	0.4	4.2	2.8	24.0	71.4
120분	0.3	4.8	3.4	27.4	67.5
180분	0.4	6	4.2	31.0	62.6
1080분	0.4	8.6	5.1	33.6	57.3

접합 조건: 총 부피 = 0.5 ml; h38C2 = 4.0 mg/mL; 몰비: [FGF21-제 1 연결기]:항체 = 0.8:1; 실온; 25 mM MES, pH 6.0.

[0606]

FGF21-연결기에 대한 접합 조건의 미세 조정: 실험실 규모 확대를 다양하게 최적화된 완충액 및 pH를 사용하여 상이한 규모에서 수행하였다. h38C2-[서열번호 10-L1]₁에 대한 접합 효율은 약 40% 내지 약 45%의 범위에서 비교가능하게 유지되었다(표 26). 서열번호 10-L1의 반응성 기의 가수분해가 시간에 따라 발생함으로(표 27), 서열번호 10-L1의 활성화 후 정용여과는 약 2 내지 약 10°C에서 작동되어야 한다. 활성화 후 정용여과 후 서열번호 10-L1의 양은 상이한 실험에서 다르고, 차이는 h38C2-[서열번호 10-L1]₁에 대한 접합 효율의 편차에 기여할 수 있다. pH 약 6.3에서 약 100 mM 포스페이트는 순환 목적을 위해 남아있는 적어도 응축물 및 가장 높은 %의 h38C2를 갖는다.

표 26

[0607]

SEC에 의한 접합 효율의 비교

	규모(g)	%응축물	%Ab-[FGF21 ΔH-A129C-L1] ₂	%Ab-[FGF21 ΔH-A129C-L1] ₁	%Ab
25 mM 포스페이트, pH 6	50	8.4	28	43.4	20.2
50 mM 포스페이트, pH 6.5	150	6.3	19.5	43.1	31.1
100 mM 포스페이트, pH 6	50	5.6	19.9	45.3	29.3
25 mM MES, pH 6	50	6.3	24.4	44.9	23.7
50 mM 포스페이트, pH 6.5	4	6.6	17.2	42.3	30.3
100 mM 포스페이트, pH 6.3	0.5	4.7	15.3	41.3	36.1

표 27

[0608]

FGF21 RP 크로마토그래피에 의한 4°C에서 [서열번호 10-L1]의 반응성 기에 대한 가수분해의 시간 경과 연구

	%FGF21	%가수분해된 반응성 FGF21 ΔH-A129C-L1	%반응성 FGF21 ΔH-A129C-L1	%FGF21 이량체	% 기타
0시간	13.4	6.5	76.7	1.8	1.6
1시간	13.2	8.8	73.6	2.8	1.6
2시간	14.4	10.6	69.1	4.0	1.9
3시간	13.3	13.6	67.1	4.1	1.9
4시간	13.9	14.9	64.9	4.5	1.8
5시간	14.3	16.9	61.9	5.0	1.9
6시간	13.9	18.8	60.3	5.2	1.8
8시간	14.5	22.3	55.8	5.7	1.7
10시간	15.0	25.0	52.3	5.9	1.8

활성화 조건: 총 부피 = 1.0 ml; [서열번호 10-L1] = 1.8 mg/mL; TCEP:[서열번호 10-L1]의 몰비 = 0.5:1, TCEP 처리 60분; 이어서 서열번호 64:[서열번호 10-L1]의 몰비 = 1.4:1; 연결기 활성화 30분; 실온; 25 mM 트리스, pH 7.5 및 200 mM Na₂SO₄

[0609]

[제 2 연결기-Ex4] 및 Ab-[FGF21-연결기]₁의 접합을 위한 완충액 및 pH의 스크리닝: 활성화된 [서열번호 10-L1] 및 h38C2를 포함하는 제 1 접합 단계로부터의 접합 반응 용액을 부틸 650 S 역상 크로마토그래피 단계 상에서 정제하여 h38C2-[서열번호 10-L1]₁을 생성하였다. 이어서, 이 물질을 적합한 완충액(pH 4.8에서 30 mM 나트륨 락테이트 또는 pH 4.5에서 20 mM 나트륨 글루타메이트)에 정용여과하였다. 연결기의 AZD 고리, 예컨대 서열번호 26의 L1 및 K⁹⁹ 사이의 자생적인 선택적 융합 반응은 정상적으로 pH 6.5에서 발생하지만, pH 4.5에서는 발생하지 않는다. h38C2-[서열번호 10-L1]₁과 [L1-서열번호 64]의 접합에 대한 최적 pH 파라미터를 조사하였다. pH 7.0에서 100 mM MES 완충액을 사용하여 h38C2-[서열번호 10-L1]₁ 용액의 pH를 조정하였다. 상기 결과(표 28 및 29)는 pH 약 6.0 내지 pH 약 6.5의 최적 범위를 나타내었다. 더 높은 접합 효율을 MES/락테이트 완충액에서 달성하였다. ABC-1([서열번호 10-L1]₁-h38C2 (IgG1)-[L1-서열번호 64]₁에 대한 훌륭한 융합 효율을 [제 2 연결기-Ex4]:Ab-[FGF21-제 1 연결기]의 가장 높은 몰비인 약 1.3:1을 사용하여 수행하였다.

표 28

[0610]

HIC에 의한 상이한 pH에서 MES/글루타메이트 용액 중 제 2 접합 효율의 결과

pH	%Ab	%Ab-[Ex4-L1] ₁	Ab-[FGF21 ΔH-A129C] ₁	ABC-1
6.5	0.9	3.4	10.3	82.5
6.0	1.0	3.3	10.9	81.9
5.9	1.0	3.2	12.3	80.2
5.65	1.1	3.1	13.7	79.2
5.4	1.2	3.0	15.4	77.7
5.1	1.6	2.9	23.7	68.3
4.75	2.2	2.9	33.8	54.2

접합 조건: 총 부피 = 0.5 mL; h38C2-[서열번호 10-L1]₁ = 10.0 mg/mL; [L1-서열번호 64]:h38C2-[서열번호 10-L1]₁의 몰비 = 1:1; 실온; MES/글루타메이트 용액 중.

표 29

[0611]

HIC에 의한 상이한 pH에서 MES/락테이트 용액 중 제 2 접합 효율의 결과

pH	%Ab	%Ab-[Ex4-L1] ₁ 및 h38C2-[FGF21 ΔH-A129C] ₁	ABC-1([FGF21-A129C-L1] ₁ -h38C2-(IgG1)-[L1-서열번호 64] ₁
6.5	0.2	9.0	90.8
6.38	0.1	9.6	90.3
pH 6.13	0.1	9.1	90.8
pH 5.8	0.1	11.0	88.8
pH 5.5	0.1	10.6	89.3
pH 5.1	0.2	15.8	84.0
pH 4.8	0.9	60.9	38.3

접합 조건: 총 부피 = 0.2 mL; h38C2-[서열번호 10-L1]₁ = 6.0 mg/mL; [L1-서열번호 64]:h38C2-[서열번호 10-L1]₁의 몰비 = 1.3:1; 실온; MES/글루타메이트 용액 중.

[0612]

[제 2 연결기-Ex4]₁-Ab-[FGF21-연결기]₁에 대한 시간 경과 연구: 시간 경과 연구를 h38C2-[서열번호 10-L1]₁과 [L1-서열번호 64]를 접합하는 모델링을 사용하여 생성하였다. 18시간 후 실온에서, h38C2-[서열번호 10-L1]₁에 대한 접합 효율은 표 30에 나타낸 바와 같이 최대에 도달하였다.

표 30

[0613]

HIC에 의한 실온에서 ABC-1에 대한 동역한 테이타

	%Ab	%Ab +1 CVX2025	h38C2-[FGF21 Δ H- A129C] ₁	ABC-1([FGF21-A129C-L1] ₁ -h38C2-(IgG1)- [L1-서열번호 64] ₁
2시간	2.0	2.2	29.6	58.4
4시간	1.6	2.6	23.1	67.5
6시간	1.3	2.6	18.0	73.9
8시간	1.2	2.8	15.5	77.0
10.5시간	0.8	3.5	11.4	81.8
18시간	0.8	3.5	8.4	85.3

접합 조건: 총 부피 = 1.0 mL; h38C2-[서열번호 10-L1]₁ = 6.0 mg/mL; [L1-서열번호 64]:h38C2-[서열번호 10-L1]₁의 몰비 = 1.3:1; 실온; MES/글루타메이트 용액, pH 5.8 중.

[0614]

실시예 55: FGF21과 연결기의 접합

[0615]

FGF21에 대한 단량체 및 이량체 비를 실험 전 확인하였다. FGF21 RHPLC 분석 결과, 단량체:이량체 비는 27%:73%를 나타내었다. 0.207 mM의 서열번호 10(pH 7.0에서 20 mM 트리스, 50 mM NaCl, 2.346 L 중 17.1 g)을 pH 7.0에서 100 mM MES 완충액(1.920 L)으로 먼저 희석하여 흡광도 280 nm에서 측정하여 농도 4 g/L로 표적하였다. TCEP 스톡 용액(7.631 mL, 50 g/L)을 첨가하였다. 혼합물을 5 분 동안 완전히 혼합한 후 혼합을 주변 조건에서 감소시켰다. 반응을 90분 동안 지속하였다. TCEP로 감소시킨 후, 비방법 대조군으로 단량체:이량체 비가 89%:6.3%로 나타나는 FGF21 RF에 의해 분석하였다.

[0616]

90분 후, L1(656.7 mg)을 DMSO(8.76 mL; L1의 최종 농도는 0.29 mM, 또는 약 0.15 mg/mL임)에 용해하고, 상기 용액을 서열번호 10 용액에 첨가하였다. L1의 용기를 완충액으로 플러싱하고 확보하여 모든 L1을 첨가하였다. 모든 L1이 [서열번호 10] 풀에 첨가된 후 활성화를 시작하였다. 반응 생성물을 5분 동안 완전히 혼합한 후 혼합을 실온에서 감소시켰다. 이 혼합물을 실온에서 30분 동안 스월링하면서 방치하여 서열번호 10과 연결기 L1 사이의 반응을 완료하였다. 필요한 경우 활성화 온도를 낮출 수 있다. FGF21 역상 HPLC(RP)에 의한 추가 분석 결과 [서열번호 10-L1]의 73% 형성을 나타내었다.

[0617]

상기 샘플을 UFDF를 통해 추가로 통과시켜 과량의 연결기 및 TCEP를 제거하였다. 막을 1 N NaOH로 30분 동안 제거하고, 빼고, pH 7.0에서 100 mM MES로 평형시켰다. pH 7.0에서 완충액 100 mM MES를 정용여과를 위해 사용하였다(7 X 정용여과). 정용여과를 4 g/L 농축물 농도에서 수행하였다. 발포 및 텁(splashing)을 UF/DF 동안 피할 수 있다. [서열번호 10-L1]의 반응성 기의 기수분해는 정용여과 방법 동안 발생하였다. 활성화 후 DF 풀에 대한 보유 시간은 최소화되어야 한다. UF는 10K 사르토리우스 하이드로사르트(Sartorius hydrosart) 막을 사용하여 2 내지 10°C에서 작동할 수 있다. FGF21 RP에 의해 확인된 [서열번호 10-L1]의 합한 종은 UF/DF 후 73%에서 64%로 떨어졌다.

[0618]

농도를 서열번호 10(여과된 Q Seph 풀) 및 [서열번호 10-L1](활성화 UF/DF 풀 후) 둘다에 대하여 1 mg과 동일한 0.47 OD의 공효율적인 소광을 사용하여 UV 280 nm로 추정하였다. 이 반응 메카니즘 및 이의 변형은 또한 전략 1, 뿐만 아니라 다른 FGF21 변이체 및 연결기와 사용하기에 적합하다.

[0619]

실시예 56: [FGF21-연결기]와 Ab의 접합

[0620]

h38C2(95.0 g)(서열번호 25 및 서열번호 26: pH 6.5에서 17.05 g/L, 10 mM 히스티딘, 10 mM 글리신 중 5.6 L)를 100 mM 포스페이트 완충액(14.4 L, pH 6.2)으로 희석하였다. 이어서, pH 7.0에서 100 MES 완충액(4.4 g/L, 3.8 L, 1.35 mol [서열번호 10-L1]:1 몰 h38C2) 중 [서열번호 10-L1](17.72 mg)을 h38C2 혼합물에 첨가하였다. 최종 반응 혼합물은 실온에서 약 4 g/L의 h38C2일 수 있다. [서열번호 10-L1] 성분이 첨가될 시 반응을 시작하였다. 반응 생성물을 약 5 분 동안 완전히 혼합한 후 혼합을 실온에서 감소시켰다. 이 혼합물을 약 15 내지 약 20시간 동안 온화하게 교반하면서 밤새 실온에서 방치하였다. 소량의 물질을 SEC 크로마토그래피로 분석하기 위해 취하여 혼합물에 h38C2-[서열번호 10-L1]₁ 접합을 형성함을 확인하였다. SEC 분석은 표 33에 나타낸 바와 같이 40%까지 h38C2-[서열번호 10-L1]₁의 접합 단계 수율을 나타내었다. 접합 단계 수율을 SEC(%)에 의해 h38C2-[서열번호 10-L1]₁ 원자가의 순도로서 계산하였다.

[0621]

실시예 57: 반응성 Ab-[FGF21 연결기]₁ 중간체 방법의 강화

[0622]

h38C2-[서열번호 10-L1]₁을 20 cm의 베드 높이까지 포장된 35 cm 직경 XK 컬럼을 사용하는 토소(Tosoh: 상표) 부틸 650 S 수지로 포장된 19 L 규모 컬럼을 사용하여 강화하였다. 컬럼을 미리 평형시키고 pH 7.0에서 3 CV(컬럼 부피)의 WFI 및 5 CV의 50 mM 나트륨 포스페이트로 세척하였다. h38C2-[서열번호 10-L1]₁의 여과된 접합 풀을 17°C에서 부틸 650 S 컬럼 상에 5 mg/mL로 로딩하였다. 이어서, 부틸 650 S 로딩을 17 내지 18°C에서 자동화된 크로마토그래피 스키드 상에서 프로그래밍된 유니콘(Unicorn) 방법을 사용하여 토소 부틸 650 S 수지를 통해 가공하였다. 용리를 선형 구배를 사용하여 수행하였다: 먼저 7 CV를 사용하여 2.4% 1,6-헥산다이올 등용 매 세척(88% 완충액 A(pH 7.0에서 50 mM 나트륨 포스페이트) 및 12% 완충액 B(pH 7.0에서 50 mM 나트륨 포스페이트, 20% 헥산다이올); 이어서 11 CV를 사용하여 88% A + 12% B 내지 60% A + 40% B의 용리 구배; 5 CV를 사용하여 60% A + 40% B에서 구배 보유. 분획을 수집하고 순도에 대한 SEC 어세이로 분석하여 모아질 수 있는 분획을 결정하였다. 최종 풀에 대한 SEC 분석 결과를 표 31에 나타내었다. h38C2-[서열번호 10-L1]₁은 컬럼 상에 로딩된 h38C2-[서열번호 10-L1]₁ 종의 약 90% 회복에 상응하는 고수율에서 선택적으로 회복되고, 또한 용리 단계에서 90% 초과의 고순도를 갖고, 자유 [서열번호 10-L1]₁, [서열번호 10-L1]₂ 이량체, h38C2-[서열번호 10-L1]₂, 응축물 및 자유 h38C2(+0 FGF21) 종을 포함하는 다른 접합 반응 종으로부터 잘 용해되었다. 부틸 650 S 크로마토그래피로부터의 분획을 함께 모으고 추가 농축하고 정용여과하였다. 농도를 1 mg의 단백질과 동일한 1.47 밸륨을 사용하여 UV 280 nm로 추정하였다.

표 31

[0623]

h38C2-[서열번호 10-L1]₁에 대한 접합 효율

	%큰 응축물	%응축물	%Ab-[FGF21 ΔH-A129C-L1] ₂	%Ab-[FGF21 ΔH-A129C-L1] ₁	%Ab
접합 혼합물(E Tox)	0.0	3.8	12.3	40.2	43.6
부틸 650 S 역상 풀	0.0	1.0	4.5	91.9	2.6

[0624] 실시예 58: [제 2 연결기-Ex4]와 Ab-[FGF21-연결기]₁의 접합

[0625]

pH 4.8에서 330 mM 나트륨 락테이트 완충액(9.7 g/L, 3.569 L) 중 h38C2-[서열번호 10-L1]₁(34.6 g)을 pH 7.0에서 25 mM MES 완충액(2.1 L)으로 처리하여 pH 6.3까지 조정하였다. 이어서, WFI(주사용 물, 90.2 mL)([L1-서열번호 64]의 최종 농도는 0.065 mM, 또는 약 0.31 mg/mL임)에 용해된 [L1-서열번호 64](1.81 g)를 h38C2-[서열번호 10-L1]₁ 용액에 첨가하였다. 모든 웨티드의 첨가를 보증하기 위해 [서열번호 10-L1]₁의 용액을 완충액으로 플러싱하였다. 최종 반응 혼합물은 h38C2-[서열번호 10-L1]₁에 대하여 6.0 g/L일 수 있다. 반응 생성물을 약 5분 동안 완전히 혼합한 후 혼합을 실온에서 감소시켰다. 이 혼합물을 실온에서 밤새, 약 15 내지 약 20시간 동안 완만하게 교반하면서 방치하였다. 소량의 물질을 HIC 크로마토그래피로 분석하기 위해 취하여 [서열번호 10-L1]₁-[서열번호 25 및 26]-[L1-서열번호 64]₁(ABC-1)의 형성을 확인하였다. HIC 분석은 90% 수율의 ABC-1을 나타내었다. 접합 단계 수율을 HIC(%)에 의해 [서열번호 10-L1]₁-[서열번호 25 및 26]-[L1-서열번호 64]₁(ABC-1) +2 원자가의 순도로서 계산하였다.

[0626]

과량의 [L1-서열번호 64]를 음이온 교환 크로마토그래피 Capto-Q를 사용하여 제거하고, Capto-Q 크로마토그래피로부터의 분획을 함께 모으고 추가로 농축하고 정용여과하여 최종 약물 물질을 수득하였다.

[0627] 실시예 59: 페닐 650 S 컬럼을 사용하여 완전 반응성 Ab의 농축

[0628]

완전 반응성 Ab(h38C2)를 14 cm의 베드 높이로 포장된 30 cm 직경 컬럼을 사용하는 토소 페닐 650 S 수지로 포장된 9.5 L 규모 컬럼을 사용하여 농축하였다. 컬럼을 미리 평형시키고 pH 7.0에서 2 CV(컬럼 부피)의 WFI 및 5 CV의 20 mM 나트륨 포스페이트, 1 M NaCl로 세척하였다. h38C2 풀(153 g)을 페닐 650 S 컬럼 상에 실온에서 15 mg/mL로 로딩하였다. 이어서, h38C2 로딩을 자동화된 크로마토그래피 스키드의 프로그래밍된 유니콘 방법을 사용하여 토소 페닐 650 S 수지를 통해 진행하였다. 용리를 pH 7.0에서 20 mM 나트륨 포스페이트, 1 M NaCl을 사용하여 1 CV 세척액으로 먼저 수행한 후; 7 CV에서 100% A(20 mM 나트륨 포스페이트, 1 M NaCl, pH 7.0) 내지 67% B(20 mM 나트륨 포스페이트, pH 7.0)까지 염 감소, 6 CV 동안 67% B에서 보유, 이어서 3 CV에서 100% B

까지 보유 후, 1 CV에서 100% B 내지 70% C(20 mM 나트륨 포스페이트, 20% 헥산다이올, pH 7.0)로 용리 후, 구배를 5 CV 동안 70% C에서 구배를 보유하였다. 분획을 수집하고 모아질 수 있는 분획을 결정하기 위해 순도에 대하여 HIC 어세이로 분석하였다. 완전 접합가능한 h38C2는 목적한 최종 생성물을 야기하는 후속 생접합 단계를 위한 물질을 공급하는 것을 도울 수 있다.

[0629] 결론: ABC-1 생접합 이중특이성 항체 약물 물질에 대한 생성 방법의 부분으로써 3개 접합 단계를 개발하였다. 2개의 상이한 전략을 접합물에 이용하여 최종 약물 물질의 생성을 야기할 수 있는 공정 중간체를 정제하였다. 전략 2를 실험실에서 성공적으로 확대하고 반복된 시행으로 지속적으로 수행하였다.

[0630] 실시예 60: Ab-[서열번호 10-L1]₁ 정제를 위한 부틸 RP의 최적화

[0631] 실험 프로토콜:

[0632] 하기 나타낸 프로토콜 및 작동 조건을 사용하여 4 mL 및 103 mL 규모에서 크로마토그래피 실험을 수행하였다:

[0633] 주변 조건하에 작동된 0.5 cm 직경 x 20 cm 높이의 4 mL 컬럼

[0634] 완충액 A: 50 mM 포스페이트, pH 7.0

[0635] 완충액 B: 50 mM 포스페이트, pH 7.0, 20% 1,6-헥산다이올

[0636] 완충액 C: 50 mM 포스페이트, pH 6.5

[0637] 유속: 125 cm/시간

[0638] 세척 및 구배에 걸쳐 2 mL 분획을 VWR로부터의 깊은 웰 마이크로티터 플레이트가 장착된 Frac 950을 사용하여 수집하였다.

표 32

각각의 실행을 위한 상세한 실험 및 구배

실행 번호	118	128	132	134	138	148	152	156
온도 (°C)	22	22	22	22	22	17	17	17
평형	100% A	100% A	100% A	100% A	100% A	100% A	100% C	100% A
로딩	5 mL	10 mL	5 mL	5 mL	5 mL	5 mL	5 mL	5 mL
세척 용리 액 %	100% A: 3 CV	100% A: 5 CV	100% A: 5 CV	25% B, 75% A: 10 CV	12% B, 88% A: 10 CV	12% B, 88% A: 10 CV	12% B, 88% C: 10 CV	12% B, 88% A: 10 CV
구배	0-90% B 100-10% A 10 CV	0-90% B, 100-10% A 10 CV	0-90% B, 100-10% A 20 CV	25-90% B 75-10% A 30 CV	12-90% B 88-10% A 30 CV	12-90% B 88-10% A 30 CV	12-90% B 88-10% C 30 CV	12-40% B 88-60% A 11 CV

[0640] 각 컬럼 실행을 3 컬럼 부피(CV)를 갖는 WFI로 미리 평형시켰다. 평형을 5 CV로 수행한 후, 컬럼을 4 mg/mL에서 FGF21 접합 풀로 로딩하였다. 구배 용리 단계 동안, 임의의 주어진 단계에서 컬럼을 경험하는 이동상 조성물은 특정한 비로 혼합된 완충액 A 및 완충액 B의 혼합물로서 발현되었다. 예를 들어, 12% B 내지 40% B의 구배 단계는 12% B + 88% A 선형 혼합물의 출발 조성물이 11 길이의 컬럼 부피를 가로질러 40% B + 60% A의 최종 조성물로 변하는 시간을 의미한다. 구배 용리 단계 후, 각 컬럼 실행을 5 CV의 100% 완충액 B로 플러싱하였다. 이 후, 각 컬럼 작동을 상향 방향으로 5 CV의 0.5 N NaOH로 세척한 후 5 CV의 0.1 N NaOH로 플러싱하였다. 모든 예비 평가를 토소 부틸 650 S 수지로 포장된 4 mL 컬럼(0.5 cm 직경 x 20 cm 높이)을 사용하여 수행하였다.

[0641] 실행 번호 118: 제 1 부틸 650 S 컬럼 실행 번호 118을 h38C2-[서열번호 10-L1]₁ 접합 반응 용액을 사용하여 5 mg/mL에서 컬럼에서 수행하였다. 컬럼을 임의의 첨가된 이액성 염없이 로딩하고 상온 조건하에 작동시켰다. 컬럼을 미리 평형시키고 3 CV(컬럼 부피)의 WFI 및 5 CV의 100% 완충액 A(50 mM 나트륨 포스페이트, pH 7.0)로 세척하였다. h38C2-[서열번호 10-L1]₁의 여과된 접합 풀을 부틸 650 S 컬럼 위에 5 mg/mL로 로딩한 후 프로그래밍된 유니콘 방법을 사용하여 부틸 650 S 수지를 통해 진행하였다. 컬럼을 5 CV의 100% 완충액 A으로 세척한

후, 선형 구배를 10 CV 중 100% A + 0% B(50 mM 나이트륨 포스페이트, 20% 헥산다이올, pH 7.0) 내지 10% A + 90% B로 실행하고; 구배를 5 CV로 100% B에서 보유하였다. 분획을 수집하고 SEC 어세이로 분석하였다. SEC 분석 결과를 표 33에 나타내었다.

[0642] 상기 결과는 Ab-[서열번호 10-L1]₂로부터의 Ab-[서열번호 10-L1]₁과 자유 FGF21 사이의 우수한 분리를 나타낸다. 비록 일부 자유 mAb(+0) 종이 Ab-[서열번호 10-L1]₁ 생성물 피크의 전위에서 공용리 됨이 발견되었을지라도, 대부분의 mAb(+0) 종은 1,6-헥산다이올 구배에서 나중에 용리된다.

표 33

실행 번호 118에 대한 로딩 및 컬럼 분획의 SEC 결과

	농도 (mg/mL)	%큰 응축 물	%응축물	%Ab-[FGF21 ΔH-A129C-L1] ₂	%Ab-[FGF21 ΔH-A129C-L1] ₁	%Ab	%[FGF21 ΔH-A129C-L1] ₁
조절 로딩	4	0.7	3.3	8.9	37.3	48.9	1.0
B5	0.27	0.0	1.0	98.2	0.7	0.0	0.2
B3	0.11	0.0	2.2	65.0	25.4	7.1	0.3
B2	0.26	0.0	2.2	9.9	47.9	39.8	0.2
B1	1.02	0.0	1.1	1.8	85.2	11.8	0.0
C2	0.90	0.1	2.8	1.9	82.6	12.5	0.0
C4	0.73	0.0	0.9	0.0	1.7	97.4	0.0
C5	1.43	0.0	1.1	0.0	0.7	98.3	0.0

[0644] 실행 번호 128: 10 mg/mL까지 단백질 로딩의 증가 효과가 컬럼 실행 번호 128에서 추정되는 반면, 구배는 컬럼 실행 번호 118과 동일하게 유지되었다. 이 실험을 위해 상이한 접합 반응이 로딩 물질로서 사용되었다. 이 반응은 Ab-[서열번호 10-L1]₁의 상대적으로 높은 농도(즉 44.7%)를 극대화할 뿐만 아니라 Ab-[서열번호 10-L1]₂의 상대적으로 높은 농도(즉, 24.4%)를 갖고, 컬럼 실행 번호 118에서 사용된 로딩 용액과 비교하여 SEC 어세이에 의해 24.7% 종의 낮은 농도를 갖는다. 높은 수준의 Ab-[서열번호 10-L1]₂ 종 및 높은 단백질 로딩은 컬럼 성능 및 용리 풀 생성 조성물에 영향을 미치는 것으로 기대된다. 표 34와 같이, 증가된 로딩은 Ab-[서열번호 10-L1]₁로부터 Ab-[서열번호 10-L1]₂ 종의 감소된 분해능을 야기한다.

표 34

실행 번호 128에 대한 로딩 및 컬럼 분획의 SEC 결과

	농도 (mg/mL)	%큰 응축 물	%응축물	%Ab-[FGF21 ΔH-A129C-L1] ₂	%Ab-[FGF21 ΔH-A129C-L1] ₁	%Ab	%[FGF21 ΔH-A129C-L1] ₁
조절 로딩	4.0	0.7	3.3	24.4	44.7	24.7	1.0
B5	1.11	0.0	2.3	81.9	14.1	1.4	0.2
B4	0.89	0.0	2.9	64.9	23.1	8.8	0.3
B3	1.02	0.0	3.5	34.7	22.9	38.7	0.1
B2	1.47	0.0	3.3	9.5	59.9	27.4	0.2
B1	2.00	0.0	2.5	3.6	86.7	7.3	0.0
C1	1.59	0.0	3.3	3.2	86.7	6.9	0.0
C2	0.97	0.0	7.0	6.3	69.9	16.8	0.0
C3	0.72	0.9	10.6	4.9	42.8	40.8	0.0
C4	0.94	0.0	6.5	1.2	10.5	81.7	0.0

[0646] 실행 번호 132: Ab-[서열번호 10-L1]₁ 종의 분해능을 개선하기 위해, 얇은 구배 용리(20 CV 중 100% A + 0% B 내지 10% A + 90% B)를 컬럼 실행 번호 128에 사용된 동일한 로딩 물질을 사용하여 5 mg/mL 컬럼에서 컬럼 실행 번호 132로 수행하였다. 표 35는 용리 분획을 위해 SEC에 의해 측정된 다양한 접합된 종의 용리 프로파일 및

상대 순도를 나타내었다. $Ab-[서열번호 10-L1]_2$ 종과 $Ab-[서열번호 10-L1]_1$ 종 사이의 개선된 분리는 얇은 1,6-헥산다이올로 수득되고, 이는 1,6-헥산다이올의 특정한 낮은 농도로 $Ab-[서열번호 10-L1]_2$ 종의 대부분을 용리하기 위해 고안된 용리 단계가 유의함을 제안한다. 5 mg/mL로딩 후 5% 헥산다이올 세척 컬럼 실행 번호 134는 결합된 종의 모든 용리를 야기하였다(데이터는 나타내지 않음).

표 35

[0647]

실행 번호 132에 대한 로딩 및 컬럼 분획의 SEC 결과

	농도 (mg/mL)	%큰 응축물	%응축물	% $Ab-[FGF21\Delta H-A129C-L1]_2$	% $Ab-[FGF21\Delta H-A129C-L1]_1$	% Ab
B3	0.19	0.0	1.4	83.3	13.0	2.2
B2	0.32	0.1	0.8	85.6	11.2	1.8
B1	0.20	0.0	0.9	80.9	15.8	2.5
C1	0.22	0.0	2.0	79.1	16.9	3.1
C5	0.27	0.0	2.1	10.2	37.2	50.6
C6	0.36	0.0	1.6	5.6	71.1	21.2
C8	0.58	0.0	2.7	3.5	89.8	5.1
C10	0.29	0.0	4.7	3.9	83.1	10.3
C11	0.20	0.0	5.8	5.3	64.4	25.5
C12	0.18	0.0	8.2	5.6	52.6	35.9
D12	0.15	0.0	5.6	4.9	39.2	47.7
D9	0.21	0.0	3.4	1.1	8.1	85.1
D8	0.28	0.0	1.4	0.6	2.8	93.2

[0648]

실행 번호 138: 이 후 2.4% 1,6-헥산다이올 등용매 세척액(즉 컬럼 실행 번호 138)으로 실험한 후 30 CV에서 2.4% 내지 18%의 용리 구배를 5 mg/mL의 로딩 밀도에서 수행하였다. 표 36은 분획의 SEC 분획으로 이 실행으로 부터의 용리 프로파일을 나타낸다. 강화된 분리는 이 용리 프로파일에 나타낸 바와 같은 용리 구배 전에 2.4% 세척 단계를 사용하여 수득되었다. 이를 근거로 하여, 12% 완충액 B 및 88% 완충액 A를 측정하여 30 CV에 걸쳐 선형 구배 용리에 대한 1,6-헥산다이올의 적합한 초기 농도를 수득하는 반면, 컬럼 실행 번호 134는 약간 높은 초기 1,6-헥산다이올 농도로 인해 너무 많은 $Ab-[서열번호 10-L1]_1$ 초기에 세척 제거됨을 나타내었다.

표 36

[0649]

실행 번호 138에 대한 로딩 및 컬럼 분획의 SEC 결과

	농도 (mg/mL)	%큰 응축물	%응축물	% $Ab-[FGF21\Delta H-A129C-L1]_2$	% $Ab-[FGF21\Delta H-A129C-L1]_1$	% Ab
A5	0.20	0.0	0.7	9.6	84.6	5.1
A10	0.15	0.0	1.0	83.6	11.5	3.8
A12	0.17	0.1	0.8	87.9	9.4	1.8
C8	0.10	0.2	0.7	9.9	11.1	78.2
C11	0.11	0.2	1.7	11.9	34.0	52.1
C12	0.12	0.2	2.0	10.0	53.1	34.8
D1	0.15	0.1	2.0	7.1	72.4	18.3
D5	0.39	0.1	0.9	1.5	93.3	4.2
D8	0.27	0.0	1.5	2.3	89.7	6.4
D9	0.24	0.1	2.2	3.0	86.0	8.7
E2	0.13	0.2	5.6	3.2	34.1	56.9
E4	0.10	0.2	7.9	1.4	21.9	68.5
E9	0.28	0.0	0.3	0.0	0.0	99.7

[0650]

온도 및 pH의 효과

[0651]

실행 번호 148: 온도 및 pH는 다양하게 접합된 종의 컬럼 성능 및 분해능에 영향을 끼치는 중요한 방법 파라미

터인 것으로 나타냈다. 이 연구에서 낮은 온도의 영향을 다른 종으로부터 Ab-[서열번호 10-L1]₁ 종의 분리를 위하여 컬럼 실행 번호 148에서 평가하였다. 이 실험을 위해 컬럼 및 완충액을 저장하고 온도 제어된 냉장고에서 17°C로 작동시켰다. 컬럼을 5 mg/mL 이하로 로딩하고 세척하고 컬럼 실행 번호 138과 유사한 프로토콜을 사용하여 용리하였다. 22°C에서부터 17°C까지의 온도 감소는 Ab-[서열번호 10-L1]₂ 종에 대하여 크게 감소된 결합능을 야기하였다. 감소된 온도(즉, 약 17°C)에서 컬럼을 작동시키는 것은 세척 단계에서 Ab-[서열번호 10-L1]₂ 종의 분해를 강화하는 것으로 발견되었고, 프로파일에 보여진 바와 같이 생성물 Ab-[서열번호 10-L1]₁의 개선된 분해능을 표 37에 나타내었다.

표 37

17°C에서 실행 번호 148에 대한 로딩 및 컬럼 분획의 SEC 결과

	농도 (mg/mL)	%큰 응축물	%응축물	%Ab-[FGF21 ΔH-A129C-L1] ₂	%Ab-[FGF21 ΔH-A129C-L1] ₁	%Ab
컬럼 로딩	4.00	1.1	6.7	24.0	43.8	24.4
A3	0.24	0.0	0.0	8.2	17.3	74.5
A5	0.50	0.0	3.6	46.3	45.5	4.6
A7	0.38	0.0	3.1	81.5	10.6	4.8
A9	0.16	0.0	2.9	70.0	17.3	9.8
B11	0.05	0.0	0.0	30.0	32.9	37.1
C3	0.07	0.0	3.6	11.4	18.1	66.9
C7	0.12	0.0	3.6	3.5	27.0	65.9
C11	0.24	0.0	2.7	3.2	68.1	26.0
D3	0.32	0.0	1.2	1.8	91.6	5.4
D7	0.19	0.0	2.2	2.7	89.3	5.8
D11	0.12	0.0	7.0	4.6	74.3	14.1
E5	0.12	0.0	3.5	0.0	12.9	83.6
E9	0.10	0.0	6.1	0.0	2.2	91.8
F1	0.25	0.0	0.0	0.0	0.0	100.0
F5	0.14	0.0	0.0	0.0	0.0	100.0

실행 번호 152: 6.5의 낮은 pH에서 컬럼을 평형시키지만 7.0의 높은 pH에서 용리를 수행하는 것은 152에서 분리 성능에 유해한 것으로 발견되었다. Ab-[서열번호 10-L1]₂ 종은 낮은 pH에서 컬럼에 강하게 결합하는 것으로 관찰되었고, 오른쪽으로 용리 프로파일의 이동은 Ab-[서열번호 10-L1]₂ 종과 Ab-[서열번호 10-L1]₁ 종 사이의 불량한 분리를 야기하는 것으로 나타냈다(표 38).

표 38

실행 번호 152에 대한 로딩 및 컬럼 분획의 SEC 결과

	농도 (mg/mL)	%큰 응축물	%응축물	%Ab-[FGF21 ΔH-A129C-L1] ₂	%Ab-[FGF21 ΔH-A129C-L1] ₁	%Ab
A3	0.15	0.0	0.0	0.0	0.0	5.7
A9	0.09	0.0	0.0	8.6	87.4	3.2
B9	0.05	0.0	0.6	74.7	15.5	8.8
C1	0.06	0.0	0.4	81.1	14.4	3.9
C5	0.12	0.0	0.6	86.6	10.5	2.1
C9	0.11	0.0	0.6	73.7	22.4	3.1
D1	0.11	0.0	1.2	29.2	49.5	20.0
D5	0.13	0.0	1.8	13.1	25.7	59.5
D9	0.29	0.0	1.6	3.4	84.0	11.0
E1	0.31	0.0	1.3	2.0	93.7	2.9
E5	0.12	0.2	6.7	4.1	74.1	14.8
E8	0.13	0.0	5.9	2.0	24.5	67.5
E9	0.13	0.0	6.1	1.9	19.5	72.6

F1	0.13	0.0	4.1	0.6	1.5	93.8
F5	0.20	0.0	0.4	0.0	0.1	99.5
F9	0.08	0.0	0.9	0.0	0.0	99.1

최종 조건의 개발 및 방법 일관성의 설명

실행 번호 156: 컬럼 실행 번호 148에 사용된 작동 조건의 선택된 조합, 즉, pH, 온도, 세척액 및 선형 구배 용리 조건은 Ab-[서열번호 10-L1]₂ 종으로부터 Ab-[서열번호 10-L1]₁ 종의 충분한 분해능을 제공하였다. mAb 종으로부터 Ab-[서열번호 10-L1]₁ 종의 분해능을 달성하기 위한 분리의 추가 개선을 구배 용리 동안 8% 1,6-헥산다이올에서 등용매 보유 단계를 사용하는 컬럼 실행 번호 156에서 조사하였다. 8% 1,6-헥산다이올에서 대부분의 Ab-[서열번호 10-L1]₁ 종은 컬럼에 여전히 결합된 mAb 종에 큰 비중을 두는 컬럼으로부터 용리되었다. 이어서, mAb 종을 100% 1,6-헥산다이올 등용매 세척액으로 재생 단계 이후 용리하였다. 5 mg/mL 컬럼 로딩 밀도에서 수행된 컬럼 실행 번호 156으로부터의 분획의 SEC 결과를 표 39에 나타내었다. 구배 단계의 중간에서 관찰된 용리 피크는 매우 낮은 수준의 Ab-[서열번호 10-L1]₂ 종 및 일부 mAb 종을 갖는 Ab-[서열번호 10-L1]₁ 종에서 풍부하였다. 대표적인 풀을 0.225 mg/mL의 풀 단백질 농도에서 야기하는 분획 번호 C8 내지 D6으로부터 제조하여 24%의 상응하는 컬럼 단백질을 수득하였다.

표 39

실행 번호 156에 대한 로딩 및 컬럼 분획의 SEC 결과

	농도 (mg/mL)	%큰 응축물	%응축물	%Ab-[FGF21 ΔH-A129C-L1] ₂	%Ab-[FGF21 ΔH-A129C-L1] ₁	%Ab
A3	0.22	0.0	1.6	32.5	63.0	2.9
A4	0.44	0.0	2.9	62.9	33.3	0.8
A5	0.13	0.1	3.0	83.5	12.8	0.6
C6	0.13	0.0	3.5	3.0	58.9	34.6
C8	0.21	0.0	2.0	2.1	82.1	13.8
C10	0.30	0.0	1.2	1.7	92.3	4.9
D3	0.22	0.0	1.2	1.4	94.7	2.7
D5	0.13	0.0	2.4	2.2	91.9	3.5
D6	0.10	0.0	3.7	3.0	88.2	5.1
E9	1.32	0.9	9.0	0.0	3.3	86.8
E10	0.80	0.8	4.7	2.0	2.1	90.4

실행 번호 160: 규모 확대 성능을 20 cm의 베드 높이로 포장된 2.6 cm 직경 XK 컬럼을 사용하여 포장된 103 mL 컬럼을 사용하여 컬럼 실행 번호 160에서 평가하였다. 컬럼을 5 mg/mL 이하로 로딩하고 세척하고 컬럼 실행 번호 156과 유사한 프로토콜을 사용하여 용리하였다. 5 mg/mL 컬럼 로딩 밀도에서 수행된 컬럼 실행 번호 160으로부터의 분획의 SEC 결과를 표 40에 나타내었다. 선형 구배 단계의 용리 피크는 Ab-[서열번호 10-L1]₁ 종에서 농축된 매우 고순도 분획을 함유하였다. 용리 풀을 컬럼 상에 로딩된 +1 종의 85% 이상의 회복에 상응하는 36.4%의 총 단백질이 함유된 D2 내지 F1 분획을 모음으로써 제조하였다.

표 40

실행 번호 160에 대한 로딩 및 컬럼 분획의 SEC 결과

	농도 (mg/mL)	%큰 응축물	%응축물	%Ab-[FGF21 ΔH-A129C-L1] ₂	%Ab-[FGF21 ΔH-A129C-L1] ₁	%Ab
C7	0.13	0.0	2.4	5.1	56.1	36.4
D1	0.16	0.0	2.2	4.4	68.6	24.9
D2	0.22	0.0	1.8	3.4	81.6	13.1
D3	0.33	0.0	1.4	2.6	89.9	6.0
D5	0.49	0.0	0.9	1.7	95.5	1.8
D7	0.54	0.0	0.8	1.3	96.1	1.8

E3	0.39	0.0	0.8	1.5	95.9	1.8
E5	0.27	0.0	1.1	1.4	95.4	2.1
E7	0.11	0.0	1.9	2.2	93.0	2.8
F1	0.11	0.0	2.6	2.5	90.6	4.2
F2	0.11	0.0	2.0	82.9	14.6	0.5
F3	0.11	0.7	6.4	0.0	4.0	88.8

[0660] 여러 규모 확대 컬럼 실행(번호 178, 180 및 182)을 동일한 조건하에 수행하여 5 mg/mL 로딩에서 성능의 재생력을 시험하였다. 용리 풀을 각각의 실행에 대하여 제조하고, 동일한 작동 조건하에 수행된 3개의 실행으로부터 용리 풀 프로파일을 표 41에 나타내었고, 일관성 있는 결과가 나타났다.

표 41

여러 규모 확대 실행의 재생력

	%큰 응축물	%응축물	%Ab-[FGF21 ΔH-A129C-L1] ₂	%Ab-[FGF21 ΔH-A129C-L1] ₁	%Ab
#156 최종 풀	0.0	0	7.2	84.9	7.9
#160 최종 풀	0.0	1.3	1.7	94.3	2.7
#178 최종 풀	0	1.5	2.9	92.7	2.9
#180 최종 풀	0	1.5	1.6	93.4	3.4
#182 최종 풀	0	1.4	2.1	92.2	4.3

[0662] 결론: 접합 방법이 FGF21 단백질로 수행된 경우의 정제 단계를 위해 바람직한 후보 수지로서 선택된 부틸 650 S 를 mAb와 먼저 커플링시킨 후 엑센던 4 웨티드와 커플링시켰다. 수지는 이액성 염의 부재 시 5 mg/mL의 우수한 결합능을 제공하였다. 결합된 생성물의 용리를 pH 7.0에서 1,6-헥산다이올의 구배를 사용하여 수행하였다. 단일 접합된 Ab-[서열번호 10-L1]₁ 종을 농축하고 일련의 용리 전략, 즉, 2.4% 헥산다이올 후 2.4% 내지 8% 헥산다이올 선형 구배 용리를 사용하는 등용매 세척 단계를 사용하여 선택적으로 용리하였다. 컬럼 상에 로딩된 mAb +1 FGF 21 종에 대하여 85% 초과 수율을 수득하였다.

[0663] 세척 단계 동안 헥산다이올의 농도, 컬럼의 로딩 밀도, pH 및 온도는 결합능, 분해능 및 컬럼 성능에 영향을 주는 중요한 파라미터임이 발견되었다. 정제 단계를 실험실에서 100 mL 규모까지 성공적으로 규모 확대하고 반복된 실험을 지속적으로 수행하였다.

실시예 61: ABC 분자의 생체외 어세이

[0665] Glut1 택맨 어세이에서, 분화된 3T3-L1 지방세포를 사용하여 하기 기재된 실시간 정량적 PCR(qPCR) 방법으로 Glut1 mRNA 발현을 측정하였다. 밤새 혈청 결핍된 10 내지 14일 분화된 3T3-L1 지방세포를 화합물로 6시간 동안 처리하였다. 총 RNA를 이러한 세포로부터 추출하고, Glut1 및 GAPDH mRNA 발현을 콜리텍트 프로브 RT-PCR 키트를 사용하고 택맨 기기에서 실시간 정량적 PCR 반응을 실행하여 측정하였다. 화합물의 생활성을 각각의 샘플로부터의 GAPDH mRNA 수준에 의해 규정화된 Glut1 mRNA 수준의 배수 변화로 측정하였다. cAMP 어세이에서, 중국 햄스터 난소(CHO) 세포 과발현 인간 GLP1R(CHO-hGLP1R)을 300 μM IBMX가 첨가된 무혈청 배지의 96-웰 플레이트에 시팅하였다. 세포를 화합물과 실온에서 1시간 동안 항온 처리하였다. cAMP 수준을 제조사의 지시에 따라 시스바이오(CisBio) cAMP 키트를 사용하여 측정하였다. 화합물의 생활성을 어세이로부터 수득된 EC₅₀ 값에 의해 측정하였다(표 42 참고).

표 42

Glut1 택맨 및 cAMP 어세이에서 화합물의 생체외 효능

화합물	FGF21(Glut1)(N) EC ₅₀ (nM)	hGLP1R(cAMP)(N) EC ₅₀ (pM)
FGF21	2.1(2)	--
Ab[FGF21] ₂	1.1	--
Ab[Ex4] ₂	--	2.4(2)

ABC-1	0.8(7)	25.7(4)
-------	--------	---------

[0667] 실시예 62: 뮤린 모델에서 ABC 생체내 어세이

약물 동력학: [서열번호 10-L1]₁-h38C2-(IgG1)-[L1-서열번호 64]₁의 약물 동력학(또한 비대칭 이작용성 접합물-1(ABC-1)로서 지칭됨)을 수컷 스위스 웨스터 마우스(22 내지 24 g)에서 추정하였다. 마우스에 3 mg/kg의 화합물 IV 및 SC를 투여하고, 혈액 샘플을 120시간 이하의 상이한 시점에서 시점당 3마리의 마우스로부터 취하였다. 혈청 샘플을 제조하고 2개의 ELISA 어세이로 분석하였다. GLP1 어세이에서, 접합물은 엑센딘 4 C-말단 특이적 항체에 의해 포획되고 GLP1 N-말단 특이적 mAb에 의해 검출되었다. FGF21 어세이에서, 접합물은 항-Id 항체로 포획되고 FGF21 mAb에 의해 검출되었다. PK 파라미터 추정치를 표 43에 요약하였다.

표 43

스위스 웨스터 마우스에 3 mg/kg IV 및 SC 투여 후 ABC-1의 PK 파라미터 추

정

어세이	T _{1/2} (시간)		AUC(시간*μg/mL)		C _{max} (μg/mL)		CL(mL/시간/kg)		SC 생물학적 이용가능성(%)
	IV	SC	IV	SC	IV	SC	IV	SC	
GLP1	94	80	1108	1028	21.7	6.9	2.7	2.9	93
FGF21	34	34	872	489	35.0	10.3	3.4	3.8	56

[0669]

체중 및 글루코스 AUC: ABC-1의 생체내 효능을 ob/ob 마우스의 단일 투여량 연구에서 추정하였다. 화합물을 1 또는 3 mg/kg으로 0일에 SC 투여하고 OGTT를 3일째 수행하였다. ABC-1은 1 및 3 mg/kg에서 유의하게 체중이 감소하였고, 단일 투여 후 3일째 3 mg/kg에서 유의하게 당내성이 개선되었다(표 44).

표 44

0일로부터 3일째 측정된 체중 변화, 및 ob/ob 마우스에 ABC-1의 단일 주사 후 3일째 측정된 OGTT 동안의 글루코스 AUC

처리(mg/kg)	평균 체중 변화(g)(SEM)	평균 글루코스 AUC (비히클 대조군의 %)
비히클	+1.42(0.32)	100
ABC-1(1)	+0.47(0.30)*	74
ABC-1(3)	-1.97(0.29)***	40***
린 대조군(비히클)	+0.95(0.16)	62*

듀넷 시험 후 일방향 아노바에 의한 *p<0.05, ***p<0.001 대 비히클.
SEM 값은 팔호에 제공된다.

생체내 상이한 ABC 분자의 비교: 2개의 비대칭 이작용성 분자(ABC)인 ABC 분자를 비교하였다: ABC-1 및 ABC-2. 2개의 ABC는 화학식 [서열번호 10-L1]₁-[Ab]-[L1-서열번호 64]₁을 포함한다. 2개의 ABC는 항체로서 h38C2의 버전을 포함한다(ABC-1은 38C2(서열번호 25 및 26)의 IgG1 버전을 포함하고, ABC-2는 h38C2(서열번호 25 및 76)의 IgG2 버전을 포함한다). ABC-1 및 ABC-2의 생체내 효능의 비교를 세포계 어세이(FGF21 암에 대한 Glut1 어세이 및 GLP1 암에 대한 cAMP 어세이)에서 추정하였고, 이들은 유사한 활성을 나타내었다.

[0673] ABC-2의 약물 동력학을 수컷 스위스 웨스터 마우스(22 내지 24 g)에서 추정하였다. 마우스에 3 mg/kg의 화합물로 IV 및 SC 투여하고, 혈액 샘플을 120시간 이하의 상이한 시점에서 시점당 3 마리의 마우스로부터 취하였다. 혈청 샘플을 제조하고 2개의 ELISA 어세이에 의해 분석하였다. GLP1 어세이에서, 접합물은 항-Id 항체에 의해 포획되고 GLP1 N-말단 특이적 mAb에 의해 검출되었다. FGF21 어세이에서, 접합물은 항-Id 항체로 포획되고 FGF21 mAb에 의해 검출되었다. PK 파라미터 추정치를 표 45에 요약하였다.

표 45

[0674] 스위스 웨스터 마우스에 3 mg/kg IV 및 SC 투여 후 ABC-2의 PK 파라미터 추정

어세이	T _{1/2} (시간)		AUC(시간* μ g/mL)		SC 생물학적 이용가능성(%)
	IV	SC	IV	SC	
GLP1	137	67	5618	3835	68
FGF21	63	47	1454	1116	77

[0675] ABC-1 및 ABC-2의 생체내 효능을 ob/ob 마우스의 단일 투여량 연구에서 추정하였다. 화합물을 0.3 또는 3 mg/kg으로 0일째 SC 투여하였고, OGTT를 3일째 수행하였다. 2개의 화합물은 3 mg/kg에서 체중이 유의하게 감소하였고 단일 투여 후 3일째 당내성이 개선되었다(표 46).

표 46

[0676] 마우스에 ABC-1 및 ABC-2의 단일 SC 주사 후 0일로부터 3일째 체중 변화, 및 3일째 OGTT 동안 글루코스 AUC

처리(mg/kg)	평균 체중 변화(g)(SEM)	평균 글루코스 AUC (비히클 대조군의 %)
비히클	+2.2(0.13)	100
Ab[Ex4]2(0.3)	+1.03(0.52)	70*
Ab[FGF21]2(3)	+0.58(0.31)	74*
ABC-1(0.3)	+1.72(0.18)	83
ABC-1(3)	-1.97(0.21)***	45***
ABC-2(0.3)	+1.88(0.14)	77
ABC-2(3)	-2.42(1.01)***	50***
런 대조군(비히클)	+1.03(0.17)	61**

두넷 시험 후 일방향 아노바에 의한 *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001 대 비히클.

SEM 값을 팔호에 제공된다.

[0677] 실시예 63: 시노몰구스 원숭이에서 ABC 생체내 어세이

[0678] 또한, ABC-1의 약물 동력학을 수컷 시노몰구스 원숭이에 3 mg/kg의 투여량 수준에서 단일 IV 및 SC 볼루스 투여 후 조사하였다. 혈액 샘플을 21일 이하의 지정된 시점에서 동물로부터 수집하였다. 혈청 샘플을 제조하고 2개의 ELISA 어세이로 분석하였다. GLP1 어세이에서, 접합물은 엑센틴 4 C-말단 특이적 항체로 포획되고 GLP1 N-말단 특이적 mAb에 의해 검출되었다. FGF21 어세이에서, 접합물은 항-Id 항체로 포획되고 FGF21 mAb에 의해 검출되었다. PK 파라미터 추정치를 표 47에 요약하였다.

표 47

[0679] 시노몰구스 원숭이에 3 mg/kg의 단일 IV 및 SC 투여 후 ABC-1의 PK 파라미터 추정

어세이	T _{1/2} (시간)		AUC(시간* μ g/mL)		Cmax(μ g/mL)		CL(mL/시간/kg)		SC 생물학적 이용가능성(%)
	IV	SC	IV	SC	IV	SC	IV	SC	
GLP1	77	71	3088	2110	65.6	19.1	1.0	1.5	68
FGF21	60	48	2233	1339	77.3	17.7	1.4	2.3	60

[0680] 실시예 64: ABC-1의 투여량 효능

[0681] ABC-1의 반복 투여량 효능: ABC-1의 반복 투여량 효능을 db/db 마우스에서 Ab-[서열번호 10-L1]₂(Ab-[FGF21]₂로도 지칭됨) 및 Ab-[L1-서열번호 64]₂(Ab-[Ex4]₂로도 지칭됨)를 비교하여 추정하였다. 화합물을 0 및 7일째 투여하였다. 체중을 1주에 2회 측정하고, OGTT를 10일째 수행하였다. 11일째, 지질 및 면역조직화학(IHC) 분석을 위해 간, 췌장 및 혈청 샘플을 수집하였다. ABC-1(10 mg/kg)은 2번째 투여 후 3일에 비히클-처리된 군과 비교하여 체중 증가를 유의하게 감소시켰고, 또한 이들 마우스에서 두번째 투여 후 3일에 단일 약제 단독 보다 더 큰 정도까지 금식 혈당 수준을 정규화하고 당내성을 유의하게 개선시켰다(표 48). 일반적으로, ABC-1은 혈청

트리글리세리드 및 콜레스테롤 수준을 유의하게 낮췄고, 비히클-처리된 군과 비교하여 약 43%까지 간 트리글리세리드 함량을 감소시켰다(표 49). 췌장에서, IHC에 의해 분석된 β -세포 질량의 2.7배까지의 유의한 증가가 ABC-1 처리된 마우스에서 발견되었다(표 49).

표 48

[0682] db/db 마우스에 화합물의 반복 SC 주사 후 0일로부터 10일에 체중 변화, 및 3일에서 OGTT 동안 글루코스 AUC

처리(mg/kg)	평균 체중 변화(g) (SEM)	평균 글루코스 AUC (비히클 대조군의 %)
비히클	2.4(0.2)	100
Ab[Ex4] ₂ (3)	1.7(0.2)	60***
Ab[FGF21] ₂ (10)	3.6(0.2)	67***
ABC-1(10)	0.5(0.8)*	47***
린 대조군(비히클)	1.7(0.1)	35***

듀넷 시험 후 일방향 아노바에 의한 *p<0.05, ***p<0.001 대 비히클.
SEM 값은 팔호에 제공된다.

표 49

[0683] db/db 마우스에 화합물의 반복 SC 주사 후 11일째 혈청 지질, 간 트리글리세리드 수준, 및 췌장의 β -세포 질량

처리(mg/kg)	평균 혈청 트리글리세리드 (mg/dL)(SEM)	평균 혈청 콜레스테롤(mg/dL)(SEM)	평균 간 트리글리세리드 (mg/g 간)(SEM)	평균 β -세포 질량(mg)(SEM)
비히클	542(91)	177(8.3)	13.0(2.2)	0.67(0.09)
Ab[Ex4] ₂ (3)	302(21)*	167(4.9)	17.4(1.4)	1.39(0.23)
Ab[FGF21] ₂ (10)	356(35)	171(7.3)	9.6(2.2)	1.60(0.13)*
ABC-1(10)	234(42)**	120(8.3)***	7.4(1.8)	1.82(0.30)**
린 대조군 (비히클)	ND	ND	ND	1.23(0.21)

듀넷 시험 후 일방향 아노바에 의한 *p>0.05, **p<0.01, ***p<0.001 대 비히클.
SEM 값은 팔호에 제공된다.

[0684] db/db 마우스에서 단일 시약 Ab-[FGF21]₂ 및 Ab-[Ex4]₂와 비교하여 ABC-1을 갖는 추가 반복 투여 효능 데이터를 췌장의 기능에서 분자의 효과 및 β -세포 질량을 더 잘 정의하기 위해 수집하였다. 화합물을 0 및 7일째 투여하고, OGTT를 10일째 수행하였다. OGTT의 15분 시점에서, 혈액을 글루코스-자극된 혈장 인슐린 분비의 측정을 위해 수집하였다. 11일째, 췌장 샘플을 생화학적 및 면역조직화학적 분석을 위해 수집하였다. 모든 처리는 비히클-처리된 대조군과 비교하여 당내성을 유의하게 개선시켰다. 글루코스-유도된 인슐린 분비의 강화 작용 및 인슐린-면역반응성 세포(%PCNA 양성 β -세포)의 증가된 증식을 가장 높은 투여량의 ABC-1(10 mg/kg)을 제외하고, 비히클-처리된 대조군과 비교하여 모든 처리 군에서 관찰하였다. 따라서, ABC-1이 시험된 가장 낮은 투여량에서, 췌장에서 화합물의 효과는 단일 약제의 효과와 일치한다. 예상외로, 10 mg/kg 투여량의 ABC-1은 증가된 인슐린-면역반응성 염색(β -세포 질량) 및 β -세포 증식에서 또는 글루코스-자극된 인슐린 분비에서 유의한 증가 없이 췌장의 인슐린 함량과 연관되었다. 이러한 데이터는 ABC-1의 투여량은 더 큰 체중 손실(상기 표 48 및 하기 DIO 마우스의 연구 참조)과 연관되고, 인슐린-민감 효과는 β -세포 및 인슐린 분비의 증식을 위한 작동을 무시하여, 기존 β -세포에서 인슐린의 측정을 야기함을 제안한다.

표 50

[0685] db/db 마우스에 화합물의 반복 SC 주사 후 11일째 당내성, 글루코스-자극된 인슐린 분비, 및 췌장의 β -세포 상태

처리(mh/kg)	평균 글루코스 AUC(비히클 대조군의 %)	15분에서 평균 혈장 인슐린 (ng/ml)(SEM)	평균 β -세포 질량(mg)(SEM)	%PCNA 양성 β -세포(SEM)	평균 췌장 인슐린 함량(μ g/mg 총 단백질)(SEM)
비히클	100	4.2(0.6)	0.32(0.02)	1.1(0.4)	2.23(0.54)
Ab[Ex4] ₂ (3)	61***	7.8(1.0)	0.54(0.08)	3.3(0.4)*	2.25(0.42)
Ab[FGF21] ₂ (10)	73**	5.2(1.2)	0.49(0.05)	4.4(0.3)**	4.21(0.88)
ABC-1(1)	63***	7.1(1.3)	0.44(0.05)	3.6(0.7)*	2.72(0.61)
ABC-1(3)	39***	10.2(1.8)**	0.77(0.12)**	4.4(1.0)*	6.40(2.86)
ABC-1(10)	36***	3.7(0.8)	0.71(0.13)**	2.4(0.3)	15.98(3.57)**
*duo 시험 후 일방향 아노바에 의한 *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001 대 비히클.					
SEM 값은 팔호에 제공된다.					

[0686]

아-만성 투여량 효능: ABC-1의 아-만성 투여량 효능을 DIO 마우스에서 Ab-[FGF21]₂ 및 Ab-[EX4]₂와 비교하여 추정하였다(결과를 표 51에 나타냄). 모든 화합물을 1주에 1회 SC 투여시키고, 체중 및 음식 섭취를 1주에 2회 측정하고, OGTT를 17일째, 3주차 복용 후 3일째 수행하였다. 20일째, 간 및 혈청 샘플을 지질 분석을 위해 수집하였다. ABC-1은 유의하고 투여-의존적으로 체중을 감소시켰다. 3 mg/kg에서, ABC-1은 동일한 투여량에서 단일 약제 단독 보다 더 큰 체중 손실을 야기하였다. ABC-1은 ABC-1의 GLP1 효과를 나타내는 3 mg/kg의 Ab-[EX4]₂의 양까지 음식 섭취를 억제하였다. 그러나, 음식 섭취 억제량은 ABC-1에 의해 야기된 심각한 체중 손실을 설명할 수 없었고, FGF21 및 GLP1 암 둘다의 조합에 기인하여야 하는 것으로 제안되었다. 모든 ABC 처리 군은 유의하게 3주차 복용 후 3일에 금식 혈당 수준을 낮췄고 당내성을 개선시켰고, 또한 유의하게 3주차 복용 후 6일에 간 트리글리세리드 함량을 감소시켰다. db/db 마우스에서 관찰된 것과 유사하게, 1주 ABC-1 처리는 DIO 마우스에서 혈청 콜레스테롤 수준의 유의한 감소를 야기한 반면, 단일 약제 중 어떤 것도 큰 효과를 가지지 않았다.

표 51

[0687]

DIO 마우스에 화합물의 SC 주사 3주 후 17일째 OGTT 동안 체중 변화, 누적 식품 섭취, 기저 혈당 및 글루코스 AUC, 및 20일째 혈청 콜레스테롤 및 간 트리글리세리드 수준

처리(mg/kg)	평균 체중 변화(g)(SEM)	평균 누적 음식 섭취(g)	평균 기저 글루코스 (mg/dL)(SEM)	평균 글루코스 AUC (비히클 대조군의 %)	평균 혈청 콜레스테롤(mg/dL)(SEM)	평균 간 트리글리세리드(mg/g 간)(SEM)
비히클	+1.2(0.6)	41.8	161(15)	100	162(9)	13.8(2.9)
Ab[FGF21] ₂ (3)	-0.9(0.6)	45.0	164(6)	101	164(8)	6.3(1.6)*
Ab[Ex4] ₂ (3)	-3.6(0.3)***	34.6	107(8)***	66***	131(7)	3.5(1.7)**
ABC-1(1)	-3.6(0.5)***	39.2	113(6)**	63***	130(8)*	3.8(1.8)**
ABC-1(3)	-7.8(1.2)***	34.6	95(6)***	64***	112(6)***	3.0(0.9)***
ABC-1(10)	-10.1(1.1)***	36.9	91(5)***	57***	95(21)***	4.3(1.2)*
*duo 시험 후 일방향 아노바에 의한 *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001 대 비히클. SEM 값은 팔호에 제공된다.						

[0688]

지속 효과: 생체내 ABC-1의 지속 효과를 측정하기 위해, 단일 투여량 효능 연구를 DIO 마우스에서 수행하였다. 3 mg/kg ABC-1을 0일째 SC 투여하였고, 체중을 매일 측정하고, OGTT를 13일째 수행하였다. ABC-1은 DIO 마우스에 단일 투여 후 13일까지 체중 손실을 야기하고 유지하고 당내성을 개선하는 지효성 효능을 입증하였다.

표 52

[0689]

DIO 마우스에 3 mg/kg ABC-1의 단일 SC 주사 후 13일까지의 체중 변화

복용 후 일	평균 체중 변화(g)(SEM)	
	비히클	ABC-1(3 mg/kg)
2	-1.0(0.2)	-2.6(0.2)***
4	-1.0(0.3)	-3.2(0.2)***

6	-1.2(0.2)	-2.9(0.3)***
8	-1.4(0.2)	-3.1(0.3)***
10	-1.1(0.3)	-3.1(0.3)***
12	-0.9(0.3)	-2.8(0.3)***
13	-0.9(0.3)	-2.6(0.3)***

짝 없는 t-검정에 의한 ***p<0.001 대 비히클.
SEM 값은 팔호에 제공된다.

표 53

[0690]

DIO 마우스에 3 mg/kg ABC-1의 단일 SC 주사 후 13일에 OGTT 동안 글루코스 AUC

처리(mg/kg)	평균 글루코스 AUC(비히클 대조군의 %)
비히클	100
ABC-1(3)	76**

듀넷 시험 후 일방향 아노바에 의한 **p<0.01 대 비히클.

[0691]

Ab-[FGF21]₂ 및 Ab-[Ex4]₂ 단독과 비교하여 ABC-1의 지속 효과를 측정하기 위해, 2개의 생체내 물리적 조합 단일 투여량 효능 연구를 DIO 마우스에서 수행하였다. 모든 화합물을 0일째 SC 투여하고, 체중을 1주에 2회 측정하고, OGTT를 7, 13 및 21일째 수행하였다. 결과를 표 54에 나타내었다. ABC-1은 DIO 마우스에 단일 투여 후 21일까지 체중 손실을 야기하고 유지하고 당내성을 개선하는 지효성 효능을 입증하였다. ABC-1 유도된 체중 손실은 단일 약제 단독보다 더 크고, Ab-[FGF21]₂ 및 Ab-[Ex4]₂의 조합과 함께 비교가능하다. 그러나, 조합 군에서 OGTT 동안 글루코스 AUC는 비히클-처리된 기의 수준으로 돌아간 반면, ABC-1 처리된 기에서는 비히클-처리된 기 보다 여전히 유의하게 줄었다. 이러한 데이터는 단일 약제 단독뿐만 아니라, 2개의 물리적 조합에 대한 ABC-1의 뛰어난 지효성 효능을 나타낸다. 생체내 ABC-1의 지효성 효능은 화합물의 1주 투여를 지지한다.

표 54

[0692]

DIO 마우스에 화합물의 단일 SC 주사 후 7, 13 및 21일째 체중 변화, 및 OGTT 동안 글루코스 AUC

처리(mg/kg)	평균 체중 변화(g)(SEM)			평균 글루코스 AUC (비히클 대조군의 %)		
	7일	13일	21일	7일	13일	21일
비히클	+0.9(0.5)	+2.2(0.7)	+4.4(0.8)	100	100	100
ABC-1(3)	-2.9(0.2)***	-1.2(0.4)***	+0.7(0.4)***	64***	81	83*
Ab[Ex4] ₂ (0.3)	+0.6(0.3)	+2.3(0.6)	NA [#]	77***	103	NA [#]
Ab[Ex4] ₂ (1.5)	-1.3(0.4)***	+0.4(0.4)*	+2.4(0.5)	62***	75*	98
Ab[FGF21] ₂ (3)	+0.4(0.3)	NA	NA	101	NA	NA
FGF21(0.6)	+1.4(0.3)	NA	NA	99	NA	NA
Ab[Ex4] ₂ (0.3)+Ab[FGF21] ₂ (3)	-1.7(0.4)***	-1.4(0.5)***	0.0(0.7)***	79**	101	NA
Ab[Ex4] ₂ (0.3)+FGF21(0.6)	+0.1(0.2)	+0.8(0.2)	+3.2(0.4)	77***	98	NA

[#]군의 종료로 인해 이용 불가함.
듀넷 시험 후 일방향 아노바에 의한 *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001 대 비히클.
SEM 값은 팔호에 제공된다.

[0693]

아-만성 투여량 효능: ABC-1의 아-만성 투여량 효능을 또한 DIO 마우스에서 Ab-[FGF21]₂ 및 Ab-[Ex4]₂의 물리적 조합과 비교하여 측정하였다(표 55). 모든 화합물에 1주에 1회 SC 투여하였다. 체중을 1주에 2회 측정하고, OGTT를 3주째 투여 후 3일 수행하였다. ABC-1은 유의하게 복용량의 총량과 동일하거나 생체외 효능과 맞는 유사한 복용량의 군과 조합된 바와 유사한 정도까지 체중 손실을 감소시키고 당내성을 개선시켰다.

표 55

[0694] DIO 마우스에 SC 주사 3주 후, 17일째 체중 변화 및 OGTT 동안 글루코스 AUC, 및 18일째 혈청 콜레스테롤 수준

처리(mg/kg)	평균 체중 변화(g)(SEM)	평균 누적 음식 섭취(g)	평균 글루코스 AUC (비히클 대조군의 %)	평균 혈청 콜레스테롤 (mg/dL)(SEM)
비히클	-1.3(0.5)	44.0	100	163(11)
ABC-1(3)	-5.1(0.9)	46.9	67***	125(7)**
ABC-1(10)	-9.5(1.4)***	43.9	58***	102(5)***
Ab[Ex4] ₂ (0.3)+Ab[FGF21] ₂ (3)	-4.8(0.8)	50.8	62***	132(10)*
Ab[Ex4] ₂ (1)+Ab[FGF21] ₂ (10)	-9.3(1.3)***	49.0	52***	107(5)***
Ab[Ex4] ₂ (5)+Ab[FGF21] ₂ (5)	-11.4(1.2)***	39.2	52***	109(3)***

듀넷 시험 후 일방향 아노바에 의한 *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001 대 비히클.

SEM 값은 팔호에 제공된다.

[0695] ABC-1로 처리하여 유도된 체중 증가의 큰 규모 감소는 단일 약제 Ab-[FGF21]₂ 또는 Ab-[Ex4]₂로 유도된 것보다 음식 섭취에서 더 큰 감소의 부재가 관찰되었다(표 51 및 55 참조). 간접 열량측정 연구를 DIO 마우스에서 수행하고 단일 약제와 비교하여 ABC-1에 의해 유도된 경우 에너지 지출의 증가로 인한 ABC-1로 유도된 추가적인 체중 손실 여부를 측정하였다. 화합물에 0일 및 7일째 SC 주사하고, 파라미터를 두번째 투여 직후 처음 48시간 동안 연속적으로 추정하였다. Ab-[Ex4]₂(1 mg/kg)은 O₂ 소모, CO₂ 생성, 열 생성 또는 호흡률을 변경시키지 않았다. Ab-[FGF21]₂(10 mg/kg)는 O₂ 소모, CO₂ 생성 및 열 생성을 증가시켰지만, 호흡률에는 영향을 끼치지 않았다. 예상외로, O₂ 소모, CO₂ 생성 및 열 생성 중 ABC-1(10 mg/kg)의 효과는 Ab-[FGF21]₂(10 mg/kg)의 것과 비교가능하고 보다 크지 않았다. 따라서, ABC-1에 의해 유도된 체중 손실의 증가는 단일 약제의 효과 보다 더 큰 에너지 지출의 증가에 의해 입증될 수 없다.

[0696] 실시예 65: 유전자 어레이 분석

[0697] 유전자 어레이 분석을 수행하여 ABC-1에 의해 유발된 체중 손실의 증가를 위한 기작을 설명하기 위해 간 및 백색 지방 조직 중 많은 수의 후보자를 조사하였다. DIO 마우스에 ABC-1(10 mg/kg), Ab-[FGF21]₂(10 mg/kg), 또는 Ab-[Ex4]₂(3 mg/kg), 및 ABC-1 처리에 의해 상이하게 조절된 유전자를 3주 동안 1주 투여한 반면, Ab-[FGF21]₂ 또는 Ab-[Ex4]₂로 처리된 마우스에는 투여하지 않았다(표 56). 일부 확인된 유전자는 특히 예상치 않았고, Ab-[FGF21]₂ 또는 Ab-[Ex4]₂(예컨대, Acot3, Saa1/2)에 의해 기대되지 않은 ABC-1 처리에 대한 작용의 신규 기작을 제안하였다. 또한, 이러한 유전자는 유용한 예측 약력학적 표지자일 수 있다.

표 56

DIO 마우스에 화합물의 SC 주사 3주 후, 20일째 유전자 발현 변화

유전자		작용	배수 변화
Abcd2	ATP-결합 카세트 d2	지방산 운반	+4
Acot3	아실-CoA 티오에스터라아제 3	페록시솜 지방산 산화	+80
CIDEA	세포사-유도 DFFA-유사 효과기 A	세포자멸	-10
Cyp2b9	사이토크롬 P450, 패밀리 2, 서브패밀리 b	지방산 산화	+100
Cyp4a14	사이토크롬 P450, 패밀리 4, 서브패밀리 a, 폴리펩티드 14	지방산 대사	+22
Fmo2	플라빈-함유 모노옥시게나아제 2	약물 대사	+2.8
Gstm5	글루타티온 S-전이효소 mu 5	해독	+2.0
Hmgcr	3-하이드록시-3-메틸글루타릴-Coa 환원효소	콜레스테롤 생합성	+5
Klb	β-클로토	FGF21 공-수용체	+1.6
Lepr	렙틴 수용체	렙틴 신호화	+7.8
Saa1/2	혈청 아밀로이드 A 단백질 1/2	염증 표지자	-5.6
Scd1	스테아로일-공효소 A 불포화효소	지방산 합성	+2.9
Srebf2	스테로일 조절 요소 결합 단백질 2	콜레스테롤 대사	+1.9

[0699] 따라서, 일부 양태에서, 본 발명은 *Abcd2*, *Acot3*, *Cidea*, *Cyp2b9*, *Cyp4a14*, *Fmo2*, *Gstm5*, *Hmgcrk*, *Klb*, *Lepr*, *Saa1/2*, *Scd1* 및 *Srebf2*로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 유전자의 유전자 발현을 측정하고 유전자 발현 수준과 초기 처리 기간 후 각각의 유전자 발현 수준을 비교함을 포함하는 물질대사성 장애의 치료를 위한 환자의 적합성을 평가 또는 측정하는 방법을 제공한다. 일부 양태에서, 유전자는 *Acot3* 및 *Saa1/2*로 이루어진 군으로부터 선택된다. 유전자 발현은 생체외에서 측정될 수 있다. 유전자 발현은 체외에서 측정될 수 있다.

[0700] 일부 양태에서, 본 발명은 본 발명의 화합물, 또는 *FGF21* 수용체 작용제 및/또는 *GLP1* 수용체 작용제 중 하나 또는 둘다로 처리하기 전 및 후의 유전자 발현 수준을 측정함을 포함하는, *Acot3*, *Cidea*, *Cyp2b9*, *Cyp4a14*, *Fmo2*, *Gstm5*, *Hmgcrk*, *Klb*, *Lepr*, *Saa1/2*, *Scd1*, 및 *Srebf2*로 이루어진 군으로부터 선택된 유전자의 상대 발현 수준을 측정하는 방법을 제공한다. 이어서, 이러한 측정은 작용의 임상 경과의 추천에 사용된다.

[0701] 일부 양태에서, 방법은 간에서 상기 유전자의 발현을 측정함을 포함한다. 일부 양태에서, 방법은 본 발명의 화합물로 처리한 결과로서 환자의 체중 손실 가능성을 평가하는 방법에 관한 것이고; 상기 방법은 *Acot3* 발현에서의 증가 및/또는 *Saa1/2* 발현에서의 감소에 따라 환자가 본 발명의 화합물, 또는 *FGF21* 수용체 작용제 및/또는 *GLP1* 수용체 작용제로 처리한 결과로서 체중 손실을 경험할 가능성이 있음을 제안한다.

[0702] **실시예 66: *h38C2-[서열번호 7-L1]₂* 및 *h38C2-[서열번호 10-L1]₂*의 안정성**

[0703] *h38C2-[서열번호 7-L1]₂-(Ab-[*FGF21*ΔH-H125C-L1]₂)* 및 *h38C2-[서열번호 10-L1]₂-(Ab-[*FGF21*ΔH-A129C-L1]₂)*의 다양한 제형을 제조하고 스트레스 조건의 범위에 이용하였다(미국특허 제 2011/13289533 호, 제 61/579,609 호, 및 PCT/IB2011/054874 호의 실시예 72 내지 76 참조, 상기 각각의 특허 내용은 본원에 혼입됨). 여러 안정성 시험, 예컨대 외관 어세이, 크기 배제 크로마토그래피(SEC), 이미징 모세관 전기이동(iCE), 및 분석 초원심 분리의 데이터를 비교하여, *Ab-[L1-FGF21ΔH-A129C]₂*의 전체 안정성 프로파일은 *Ab-[L1-FGF21ΔH-H125C]₂*보다 뛰어난 것으로 나타냈다. 또한, 제형의 pH의 저하(예컨대, 아세테이트, pH 4)는 높은 pH(예컨대, pH 6 내지 8)와 비교하여 더욱 안정성을 제공하는 것이 분명하다.

[0704] **실시예 67: *[FGF21-L1]₁-[Ab]-[L1-Ex4]₁* 및 *Ab-[L1-FGF21ΔH-A129C]₂*의 제형**

[0705] 비록 액체 제형이 본 발명의 화합물과 사용될 수 있을지라도, 동결건조된 제형은 안정성의 더 큰 수명을 제공할 수 있다(미국특허 제 2011/13289533 호, 제 61/579,609 호 및 PCT/IB2011/054874 호의 실시예 72 내지 76 참조, 상기 각각의 특허 내용은 본원에 혼입됨). 따라서, 일부 양태에서 본 발명은 약 0.1 내지 약 200 mg/mL의 ABC 또는 *Ab-[L1-FGF21ΔH-A129C]₂* 및 약 1 내지 150 mM의 락트산 또는 나트륨 아세테이트, pH 약 4 내지 약 5.5, 및 하기 중 하나 이상을 포함하는 제형이 제공된다:

- [0706] (i) 약 10 내지 약 150 mg/mL 동해방지제;
- [0707] (ii) 약 0.001 내지 약 1.0 mg/mL 킬레이트제;
- [0708] (iii) 약 0.01 내지 약 10 mg/mL 산화방지제; 및
- [0709] (iv) 약 0.02 내지 2.0 mg/mL 계면활성제.

[0710] 일부 양태에서, 본 발명의 제형은 상기 (i) 내지 (iv) 중 2개 이상을 포함한다. 일부 양태에서 본 발명의 제형은 상기 (i) 내지 (iv) 중 3개 이상을 포함한다. 일부 양태에서, 본 발명의 제형은 상기 (i), (ii), (iii) 및 (iv)를 포함한다.

[0711] 일부 양태에서 본 발명은 하기 (i) 내지 (iv)를 포함하는 동결건조된 제형을 제공한다:

- [0712] (i) 약 0.1 내지 약 200 mg/mL ABC;
- [0713] (ii) 약 1 내지 150 mM 락트산, pH 약 4 내지 약 5.5;
- [0714] (iii) 약 10 내지 약 150 mg/mL 동해방지제; 및
- [0715] (iv) 약 0.02 내지 2.0 mg/mL 계면활성제.

[0716] 일부 양태에서, 동결건조된 제형은 약 0.001 내지 약 1.0 mg/mL 킬레이트제를 추가로 포함할 수 있다. 킬레이트제는 EDTA 또는 DTPA일 수 있고, 약 0.02 내지 약 0.5 mg/mL의 양으로 존재할 수 있다. 킬레이트제는 약

0.05 mg/mL의 양으로 존재할 수 있다.

[0717] 일부 양태에서, 동결건조된 제형은 약 0.01 내지 약 10 mg/mL 산화방지제를 추가로 포함할 수 있다. 일부 양태에서, 산화방지제는 L-메티오닌일 수 있다. 산화방지제는 약 0.02 내지 약 5 mg/mL의 양으로 존재할 수 있다. 산화방지제는 약 0.05 내지 약 0.2 mg/mL의 양으로 존재할 수 있다. 산화방지제는 약 0.1 mg/mL의 양으로 존재할 수 있다.

[0718] 일부 양태에서, ABC는 본원에 기재된 바와 같은 본 발명의 화합물이다. 일부 양태에서, ABC는 특이적 종 [서열 번호 56-L1]₁-h38C2-[서열번호 10-L1]₁이다. 일부 양태에서, ABC는 약 5 mg/mL 내지 약 200 mg/mL의 양으로 존재한다. 일부 양태에서, ABC는 약 5 mg/mL 내지 약 100 mg/mL의 양으로 존재한다. 일부 양태에서, ABC는 약 5 mg/mL 내지 약 50 mg/mL의 양으로 존재한다. 일부 양태에서, ABC는 약 10 mg/mL의 양으로 존재한다.

[0719] 일부 양태에서, 락트산은 약 1 내지 약 100 mM의 양으로 존재한다. 일부 양태에서, 락트산은 약 10 mM 내지 약 50 mM의 양으로 존재한다. 일부 양태에서, 락트산은 약 30 mM의 양으로 존재한다. pH는 약 4.3 내지 약 5.3일 수 있다. pH는 약 4.8 ± 0.5일 수 있다. pH는 약 4.8일 수 있다.

[0720] 일부 양태에서, 동해방지제는 트레할로스 이수화물, 수크로스 및 만니톨로 이루어진 군으로부터 선택된다. 동해방지제는 트레할로스 이수화물일 수 있다. 동해방지제는 약 50 내지 약 120 mg/mL의 양으로 존재할 수 있다. 동해방지제는 약 90 mg/mL의 양으로 존재할 수 있다.

[0721] 일부 양태에서, 계면활성제는 폴리소르베이트 80, 폴리소르베이트 20 및 폴록사미로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있다. 계면활성제는 폴리소르베이트 20일 수 있다. 일부 양태에서, 계면활성제는 약 0.05 내지 약 1.0 mg/mL의 양으로 존재한다. 일부 양태에서 계면활성제는 약 0.1 내지 약 0.5 mg/mL의 양으로 존재한다. 일부 양태에서, 계면활성제는 약 0.2 mg/mL의 양으로 존재한다.

[0722] 일부 양태에서, 본 발명은 하기를 포함하는 동결건조에 적합한 제형을 포함한다:

[0723] (i) 약 10 mg/mL ABC;

[0724] (ii) 약 30 mM 락트산, pH 4.8 ± 0.5;

[0725] (iii) 약 90 mg/mL 트레할로스 탈수화물;

[0726] (iv) 약 0.05 mg/mL 이나트륨 EDTA 이수화물;

[0727] (v) 약 0.1 mg/mL L-메티오닌; 및

[0728] (vi) 약 0.2 mg/mL 폴리소르베이트 20.

[0729] 또한, 상기 (실시예 66 내지 67 모두)는 Ab-[L1-FGF21ΔH-A129C]₂를 포함하는 제형에 관한 것이다. 따라서, 일부 양태에서 본 발명은 하기 (i) 내지 (iv)를 포함하는 동결건조된 제형에 대한 것이다:

[0730] (i) 약 0.1 내지 약 200 mg/mL Ab-[L1-FGF21ΔH-A129C]₂;

[0731] (ii) 약 1 내지 150 mM 락트산, pH 약 4 내지 약 5.5;

[0732] (iii) 약 10 내지 약 150 mg/mL 동해방지제; 및

[0733] (iv) 약 0.02 내지 2.0 mg/mL 계면활성제.

[0734] 또한, 본 발명은 뛰어난 재구성 시간(즉, 재구성을 위해 적은 시간이 소요됨) 및 환자-친화적 용량 제조 방법을 야기하는 동결건조된 분말 또는 케익의 더욱 바람직한 특징(예컨대, 흩어짐성, 다공성)을 수득하기 위해 목적한 양(예컨대, 2x, 3x)으로 출발하는 제형의 예비-희석 후 동결건조되는 동결건조된 제형을 제공한다. 또한, 본 발명은 적거나 많은 용량의 희석제(예컨대, 3x, 2x, 1x, 0.5x, 0.33x, 0.25x)를 각각 첨가함으로써, 예비-동결건조된(pre-lyo) 액체 제형의 조성물과 비교하여 높거나 낮은 농도의 성분(예컨대, 0.33x, 0.5x, 1x, 2x, 3x, 4x)에서 재구성될 수 있는 동결건조된 제형을 제공한다. 희석제의 예는 물, 염수, 포스페이트-완충된 염수, 텍스트로스 용액(예컨대, 5%), 또는 약제, 효소, 계면활성제, 당 등을 함유하는 수용액이다.

[0735] 일부 양태에서, 본 발명은 하기 제형을 포함한다:

[0736] (i) 약 10 내지 약 60 mg/mL Ab-[L1-FGF21ΔH-A129C]₂;

- [0737] (ii) 약 5 내지 약 30 mM 락트산, pH 4.8 ± 0.5;
- [0738] (iii) 약 10 내지 약 90 mg/mL 트레할로스 탈수화물;
- [0739] (iv) 약 0.01 내지 약 0.1 mg/mL 이나트륨 EDTA 이수화물;
- [0740] (v) 약 0.01 내지 0.1 mg/mL L-메티오닌; 및
- [0741] (vi) 약 0.04 내지 약 0.2 mg/mL 폴리소르베이트 20.
- [0742] 일부 양태에서, 본 발명은 하기 제형을 포함한다:
- [0743] (i) 약 10 내지 약 20 mg/mL Ab-[L1-FGF21ΔH-A129C]₂;
- [0744] (ii) 약 10 mM 락트산, pH 4.8 ± 0.5;
- [0745] (iii) 약 30 mg/mL 트레할로스 탈수화물;
- [0746] (iv) 약 0.017 mg/mL 이나트륨 EDTA 이수화물;
- [0747] (v) 약 0.033 mg/mL L-메티오닌; 및
- [0748] (vi) 약 0.067 mg/mL 폴리소르베이트 20.
- [0749] 일부 양태에서, 본 발명은 하기 제형을 포함한다:
- [0750] (i) 약 15 내지 약 30 mg/mL Ab-[L1-FGF21ΔH-A129C]₂;
- [0751] (ii) 약 15 mM 락트산, pH 4.8 ± 0.5;
- [0752] (iii) 약 45 mg/mL 트레할로스 탈수화물;
- [0753] (iv) 약 0.025 mg/mL 이나트륨 EDTA 이수화물;
- [0754] (v) 약 0.05 mg/mL L-메티오닌; 및
- [0755] (vi) 약 0.1 mg/mL 폴리소르베이트 20.
- [0756] 일부 양태에서, 본 발명은 하기 제형을 포함한다:
- [0757] (i) 약 10 내지 약 50 mg/mL Ab-[L1-FGF21ΔH-A129C]₂;
- [0758] (ii) 약 30 mM 락트산, pH 4.8 ± 0.5;
- [0759] (iii) 약 90 mg/mL 트레할로스 탈수화물;
- [0760] (iv) 약 0.05 mg/mL 이나트륨 EDTA 이수화물;
- [0761] (iv) 약 0.1 mg/mL L-메티오닌; 및
- [0762] (v) 약 0.2 mg/mL 폴리소르베이트 20.
- [0763] 일부 양태에서, 본 발명은 하기 제형을 포함한다:
- [0764] (i) 약 10 내지 약 30 mg/mL Ab-[L1-FGF21ΔH-A129C]₂;
- [0765] (ii) 약 15 mM 락트산, pH 4.8 ± 0.5;
- [0766] (iii) 약 45 mg/mL 트레할로스 탈수화물;
- [0767] (iv) 약 0.025 mg/mL 이나트륨 EDTA 이수화물;
- [0768] (v) 약 0.05 mg/mL L-메티오닌; 및
- [0769] (vi) 약 0.1 mg/mL 폴리소르베이트 20.
- [0770] 일부 양태에서, 본 발명은 하기 제형을 포함한다:
- [0771] (i) 약 20 내지 약 60 mg/mL Ab-[L1-FGF21ΔH-A129C]₂;

[0772] (ii) 약 30 mM 락트산, pH 4.8 ± 0.5;

[0773] (iii) 약 90 mg/mL 트레할로스 탈수화물;

[0774] (iv) 약 0.05 mg/mL 이나트륨 EDTA 이수화물;

[0775] (v) 약 0.1 mg/mL L-메티오닌; 및

[0776] (vi) 약 0.2 mg/mL 폴리소르베이트 20.

[0777] 일부 양태에서, 본 발명은 하기 제형을 포함한다:

[0778] (i) 약 10 내지 약 50 mg/mL Ab-[L1-FGF21ΔH-A129C]2;

[0779] (ii) 약 30 내지 60 mM 락트산, pH 4.8 ± 0.5;

[0780] (iii) 약 90 내지 180 mg/mL 트레할로스 탈수화물;

[0781] (iv) 약 0.05 내지 0.1 mg/mL 이나트륨 EDTA 이수화물;

[0782] (iv) 약 0.1 내지 0.2 mg/mL L-메티오닌; 및

[0783] (v) 약 0.2 내지 0.4 mg/mL 폴리소르베이트 20.

[0784] 일부 양태에서, 본 발명은 하기 제형을 포함한다:

[0785] (i) 약 5 내지 약 25 mg/mL Ab-[L1-FGF21ΔH-A129C]2;

[0786] (ii) 약 30 mM 락트산, pH 4.8 ± 0.5;

[0787] (iii) 약 90 mg/mL 트레할로스 탈수화물;

[0788] (iv) 약 0.05 mg/mL 이나트륨 EDTA 이수화물;

[0789] (iv) 약 0.1 mg/mL L-메티오닌; 및

[0790] (v) 약 0.2 mg/mL 폴리소르베이트 20.

[0791] 일부 양태에서, 본 발명은 하기 제형을 포함한다:

[0792] (i) 약 10 내지 약 50 mg/mL Ab-[L1-FGF21ΔH-A129C]2;

[0793] (ii) 약 30 mM 락트산, pH 4.8 ± 0.5;

[0794] (iii) 약 90 mg/mL 트레할로스 탈수화물;

[0795] (iv) 약 0.05 mg/mL 이나트륨 EDTA 이수화물;

[0796] (v) 약 0.1 mg/mL L-메티오닌; 및

[0797] (vi) 약 0.2 mg/mL 폴리소르베이트 20.

[0798] 일부 양태에서, 본 발명은 하기 제형을 포함한다:

[0799] (i) 약 5 내지 약 25 mg/mL Ab-[L1-FGF21ΔH-A129C]2;

[0800] (ii) 약 15 mM 락트산, pH 4.8 ± 0.5;

[0801] (iii) 약 45 mg/mL 트레할로스 탈수화물;

[0802] (iv) 약 0.025 mg/mL 이나트륨 EDTA 이수화물;

[0803] (v) 약 0.05 mg/mL L-메티오닌; 및

[0804] (vi) 약 0.1 mg/mL 폴리소르베이트 20.

[0805] 또한, 각각의 상기 제형은 본원에 기재된 바와 같은 추가 요소를 포함할 수 있다. 일반적으로, 각각의 상기 제형은 또한 적은 용량으로 후속 동결건조 및 재구성에 적합할 수 있다. 일부 양태에서, 제형은 약 2x 내지 약 3x로 농축될 수 있다.

[0806] **실시예 68: [FGF21]-[제 1 연결기]-[항체]-[제 2 연결기]-[Ex4]의 안정성**

[FGF21]-[제 1 연결기]-[항체]-[제 2 연결기]-[Ex4]의 다양한 제형을 10 kDa 문자량 컷오프 투석 카세트를 사용하여 완충액을 교환함으로써 제조하고, 이어서 무균 여과하였다(모든 실험은 ABC-1을 사용하였다). 제형을 스트레스 조건의 범위로 이용하였다(표 57 참고). 이어서, 샘플을 외관 어세이, UV(자외선 흡광도) 및 크기 배제 크로마토그래피(SEC)를 사용하여 분석하였다. 샘플을 다양한 시점(표 57)에서 분석하여 안정성 추세를 평가하였다.

[0808] 외관 어세이

[0809] 다양한 온도에서 저장시 탁도는 증가한다: pH 5.8에서 20 mM 락트산 및 20 mM 히스티딘 제형(제형 C 및 D)은 둘다 40°C에서 1주, 25°C에서 2주 또는 40°C에서 2주 저장 후 탁도가 증가함을 나타내었다. 이러한 데이터는 제형 C 및 D가 [FGF21]-[제 1 연결기]-[항체]-[제 2 연결기]-[Ex4]의 제형의 불안정성을 야기함을 제안하였다. 스트레스를 받은 경우, 나트륨 아세테이트(pH 4.0) 및 글루탐산(pH 4.0)은 둘다 저장 조건에 상관없이 탁도의 증가를 나타내지 않았다.

[0810] 특정한 형태가 표 57에 나열된 일부 제형에서 관찰된 경우에도 UV에서 유의한 변화를 나타내는 시간이 지남에도 관찰되지 않았고, 단백질의 네트 농도에서 시간에 따라 유의하게 영향을 받지 않았다.

[0811] 고분자량 종(HMW) 형성

[0812] SE-HPLC를 사용하여 표 57에 나열된 다양한 제형에 대한 HMW 형태를 측정하였다. SE-HPLC는 HMW를 확실하게 분리할 수 있고, [FGF21]-[제 1 연결기]-[항체]-[제 2 연결기]-[Ex4]에 대한 중요한 안정성-제시 어세이이다. SE-HPLC 어세이에서 HMW는 [FGF21]-[제 1 연결기]-[항체]-[제 2 연결기]-[Ex4] 피크 전에 용리하는 종으로서 정의된다. 20 mM 히스티딘(pH 5.8) 및 20 mM 포스페이트(pH 8.0)에서 제형은 HMW의 높은 시작뿐만 아니라 시간-의존 형태를 나타내었다. 시간에 걸쳐 단백질 제형의 비-선형 응집 경향은 문헌에 공지되어 있다. 20 mM 나트륨 아세테이트(pH 4.0) 및 20 mM 글루탐산(pH 4.0)에서 제형을 다른 제형과 비교한 경우, 최소량의 HMW를 나타내었다. 따라서, 20 mM 나트륨 아세테이트(pH 4.0) 및 글루탐산(pH 4.0)에서 제형은 HMW 형태에 대한 뛰어난 안정성을 제공하였다.

[0813] % HMW(고분자량 종)을 SE-HPLC로 측정하였다. SE-HPLC 조건은 다음을 포함한다: 토소 바이오셉(Toso Biosep) G3000SWXL 5 μ m, 7.8 x 300 mm SEC 컬럼, 이동상: 200 mM 나트륨 포스페이트, 100 mM 나트륨 클로라이드 완충액(pH 7.0), 컬럼 온도: 25°C, 유속: 0.3 mL/분(등용매), 검출: 214 nm에서 UV 흡광도, 실행 시간: 42 분.

[0814] **실시예 69: [FGF21]-[제 1 연결기]-[항체]-[제 2 연결기]-[Ex4]의 pH 완충액 스크린**

[0815] 다양한 수성 완충액에서 [FGF21]-[제 1 연결기]-[항체]-[제 2 연결기]-[Ex4]의 안정성을 동결건조될 수도 있는 적절한 안정화 배지를 발견하는 목적으로 조사하였다(모든 실험은 ABC-1을 사용함). 실시예 68은 본 발명의 화합물이 pH 4.0에서 나트륨 아세테이트 및 글루탐산에 가장 안정되는 놀라운 결과는 입증하였다. 그러나, 나트륨 아세테이트는 극단적이고, 따라서 동결건조된 완충액에 흔입하기에 어렵다. 따라서, 동결건조된 제형에서 장시간 최적 안정성을 제공하는 본 발명의 화합물에 대한 대체 완충액을 개발하려는 요구가 존재한다. 연결기의 불안정성 뿐만 아니라 어떠한 단백질 성분의 가수분해 클리핑(clipping)은 저분자량 종(LMW)의 생성을 야기한다. 추가적으로, 접합물이 시험된 제형에서 응축된 경우 고분자량 종이 형성될 수 있다. 제형을, 79 mg/mL의 범위에서 완충액을 표적 단백질 농도를 갖는 목적한 제형으로 교환하여 제조하였다. 제형을 0.2 μ m 필터를 사용하여 여과하고, 유리 바이알 내에 포장하고 목적한 온도에서 저장하였다. 나타낸 시점에서, 샘플을 어세이하였다.

[0816] 외관 어세이

[0817] 다양한 온도 및 조건에서 저장 시 탁도가 증가한다: 20 mM 시트르산(모든 pH) 및 20 mM 숙신산(pH 4.8 미만) 제형(제형 AC, K 및 L)은 둘다 25°C에서 2주 또는 30°C에서 2주 저장 후 증가함을 나타내었다. 스트레스를 받은 경우, 글루탐산 및 락트산 샘플은 둘다 저장 조건에 상관없이 최소의 탁도 증가를 나타내었다.

[0818] 시트르산 샘플을 제외하고, UV에서 유의한 변화는, 특정한 형태가 표 57에 나열된 일부 제형이 관찰됨에도 불구하고 시간에 걸쳐서 관찰되지 않았고, 단백질의 네트 농도는 시간에 따라 유의하게 영향을 끼치지 않았다.

[0819] SE-HPLC에 의한 HMW 측정 및 SDS-PAGE에 의한 LMW 모니터링

[0820] 완충액 및 pH의 확실한 효과를 2주에 걸쳐서 온도 스트레스 시 관찰하였다. 데이터를 표 59에 제시하였다. 초

기 시점에서, HMW의 증가하는 경향은 시트르산 제형 및 더 높은 pH 제형(4.8 초과)에서 나타났다. pH 4.2 및 4.5에서 글루탐산 제형은 %HMW에 대한 비교적 뛰어난 성능을 나타내었다.

[0821] LMW 경향은 pH에 정비례하였다. 30°C에서 1주 동안 저장시, 낮은 pH 제형은 단편화로 인해 아마도 %LMW에서 확실한 증가를 나타내었다. 글루탐산 제형 중, 제형의 pH의 균형은 연결기 불안정성 및 단백질 클리핑으로 인해 과도한 단편화를 방지할 필요가 있다. 예를 들어, 액체 상태에서 제형 D(pH 4.2)는 다른 글루탐산 제형과 비교하여 유의한 단편을 생성한다. pH-의존 %LMW의 경향은 pH 4.5 제형을 제안하는 것이 적합하다(SDS PAGE에 의해 증명되었고, 데이터는 나타내지 않음).

표 59

[0822] [FGF21]-[제 1 연결기]-[항체]-[제 2 연결기]-[Ex4]의 제형의 SEC 데이터

ID	제형	초기 %HMW	30°C에서 1주 후 %HMW	25°C에서 2주 후 %HMW	30°C에서 2주 후 %HMW
A	20 mM 시트르산, pH 4.2	3.4	4.8	4.7	4.8
B	20 mM 시트르산, pH 4.5	3.5	5.5	5.4	5.6
C	20 mM 시트르산, pH 4.8	3.2	5.2	5.2	5.6
D	20 mM 글루탐산, pH 4.2	2.5	2.2	2.2	2.0
E	20 mM 글루탐산, pH 4.5	2.6	2.4	2.3	2.3
F	20 mM 글루탐산, pH 4.8	2.7	2.7	2.6	2.7
G	20 mM 락트산, pH 4.2	2.6	3.1	2.6	2.8
H	20 mM 락트산, pH 4.5	2.6	3.0	2.5	2.6
I	20 mM 숙신산, pH 4.2	2.6	2.6	2.3	2.6
J	20 mM 숙신산, pH 4.5	2.7	3.1	2.8	3.2
K	20 mM 숙신산, pH 4.8	2.9	3.6	3.3	3.9
L	20 mM 숙신산, pH 5.3	3.1	4.0	3.8	4.4

[0823] 추가적으로, pH 4.5에서 글루탐산 제형은 또한 접합물이 고농도에서 수성 완충 용매에 용해될 수 있는 경우 평가되기 위해 및 고농도에서 안정성을 추정하기 위해 사용되었다. 저장시 %HMW에서 농도(A280)와 관련된 증가를 발견하였다. 결과를 표 60에 나타내었다.

표 60

[0824] [FGF21]-[제 1 연결기]-[항체]-[제 2 연결기]-[Ex4]의 고농도 데이터

샘플	A280	탁도 NTU	%HMW	2 내지 8°C에서 1주 후 %HMW
초기	8.9	-	2.4	2.4
17분	32.3	9.6	2.4	2.7
27분	48.9	11.2	2.5	2.8
42분	90	18.6	2.5	3.0

[0825] 실시예 70: [FGF21]-[제 1 연결기]-[항체]-[제 2 연결기]-[Ex4]의 동결건조된 제형

[0826] 비록 액체 제형이 본 발명의 화합물과 사용될 수 있을지라도, 동결건조된 제형은 더 긴 수명 안정성을 제공할 수 있다. 실시예 68 및 69는 비록 다른 완충액, 예컨대 히스티딘이 뛰어날지라도 단지 글루탐산을 갖는 [FGF21]-[제 1 연결기]-[항체]-[제 2 연결기]-[Ex4]의 제형이 목적하는 장기 사용에 대한 충분한 안정성을 제공할 수 없음을 나타낸다(모든 실험은 ABC-1을 사용함). 글루탐산 및 다양한 유형의 안정화제, 예컨대 동해방지제 및 동결보호제로서 작용하는 당 또는 폴리올(예컨대, 트레할로스, 수크로스, 만니톨), 및 교반 안정성을 위한 계면활성제(예컨대, 폴리소르베이트 80, 폴리소르베이트 20, 폴록사미), 및 퀼레이트제(예컨대, EDTA, DTPA)의 조합은 안정성 상승작용의 강화를 제공한다. 따라서, 조합은 [FGF21]-[제 1 연결기]-[항체]-[제 2 연결기]-[Ex4]의 안정성을 명백히 강화한다.

[0827] 제형을, 제형 사이에 달라진 표적 단백질 농도를 갖는 완충액 교환 및 부형제 첨가에 의해 제조하였다(모든 실험은 ABC-1을 사용함). 제조된 제형을 0.2 μm 필터를 사용하여 여과하고, 유리 바이알에 포장하였다. 동결건조된 제형을 제조하기 위해, 바이알을 동결건조하고, 동결건조를 멈추고 뚜껑을 닫았다. 나타낸 시점에서, 샘

풀을 SEC, iCE, 및 감소된 cGE를 포함하는 다양한 분석 방법으로 어세이하였다. 추가적으로, 액체 제형은 또한 액체 제형의 안정성 경향을 평가하기 위해 4주 동안 평가하였다. 동결건조된 제형의 물 함량을 동결건조 후 시험하였고, 모두 0.5% 미만이었다.

[0828] 동결건조된 제형을 다양한 온도 스트레스 하에 저장하고, 표 61은 나타낸 시점에서 SEC, iCE, 및 감소된 CGE(모세관 젤 전기영동법) 데이터를 나타낸다. CGE는 단백질 단편의 반-정량적인 설정을 생성한다. 동결건조된 제형은 모든 전선($\Delta\%HMW$, $\Delta\%산성$ 총 및 $\Delta\%Frag$)에서 이의 액체 대응물과 비교된 경우 더 나은 안정성을 나타내었다. 안정화 부형제(동해방지제/동결보호제의 존재에서)의 존재하에 글루탐산의 동결건조된 제형은 우수한 안정성을 나타내었다. 따라서, 동결건조된 글루탐산 제형은 장기간 저장 안정성에 대한 시험에 적절한 것으로 결론 내렸다. 최종적으로 금속 칼레이트제(예컨대, EDTA, DTPA)는 안정성을 달성하기 위해 유리하게 기대된다.

[0829] 또한, 상대적인 생활성을 위해 Lyo 제형 샘플을 시험하였다. 생활성을 측정하고 비-경쟁적 결합 ELISA(FGF21) 및 GLP1 엑센딘 효능 어세이(Ex4 웨티드) 둘다를 사용하여 언급된 물질에 대한 상대적%를 나타내었다. 생활성 데이터를 표 62에 제시하였다. 이러한 데이터는 안정성 중 추가 신뢰성 및 Lyo 제형의 성분에 의해 제공된 기능적 무결성을 제공한다.

[0830] 실시예 71: 교반에 대한 [FGF21]-[제 1 연결기]-[항체]-[제 2 연결기]-[Ex4]의 안정성

[0831] 글루탐산/트레할로스/EDTA/PS80 제형을, 완충액을 교환하고 15 mg/mL의 범위에서 표적 단백질 농도를 갖는 부형제를 첨가하여 제조하였다. 제조된 제형을 0.2 μm 필터를 사용하여 여과하고, 유리 바이알에 포장하였다. 교반을 300 rpm 속도에서 오비탈 진탕기를 사용하여 적용하였다. 이렇게 나타낸 시점에서 샘플을 어세이하였다. 표 63의 결과는 폴리소르베이트 80의 존재가 교반-유도된 불안정성(모든 실험은 ABC-1을 사용함)을 막도록 도움을 주는 것을 입증하였다.

표 63

[0832] 교반 스트레스에 대한 제형의 안정성

제형	초기 외형	24시간 교반 후 외형	24시간 교반 후 %HMW 변화
20 mM 글루탐산 85 mg/mL 트레할로즈 다이하이드레이트, pH 4.5	투명함	우유색 액체 및 침전물	0.1
20 mM 글루탐산, 85 mg/mL 트레할로즈 다이하이드레이트 0.2 mg/mL 폴리소르베이트 80 pH 4.5	투명함	약간의 입자를 갖는 투명 함	0.3

[0833] 따라서, 일부 양태에서 본 발명은 pH 약 4.0 내지 약 5.0에서 약 0.1 내지 약 200 mg/mL의 [FGF21]-[제 1 연결기]-[항체]-[제 2 연결기]-[Ex4] 및 약 1 내지 150 mM 글루탐산; 및 하기 중 하나 이상을 포함하는 제형을 제공한다:

[0834] (i) 약 10 내지 약 150 mg/mL 동해방지제;

[0835] (ii) 약 0.001 내지 약 1.0 mg/mL 칼레이트제; 및

[0836] (iii) 약 0.022.0 mg/mL 계면활성제.

[0837] 일부 양태에서, 본 발명의 제형은 하나 이상의 (i) 내지 (iv)를 포함한다. 일부 양태에서 본 발명의 제형은 2개 이상의 (i) 내지 (iv)를 포함한다. 일부 양태에서, 본 발명의 제형은 (i), (ii) 및 (iii)을 포함한다.

[0838] 일부 양태에서 본 발명은 하기를 포함하는 동결건조된 제형을 제공한다:

[0839] (i) 약 0.1 내지 약 200 mg/mL FGF21-접합물;

[0840] (ii) 약 1 내지 150 mM 글루탐산, pH 약 4.0 내지 약 5.0;

[0841] (iii) 약 10 내지 약 150 mg/mL 동해방지제; 및

[0842] (iv) 약 0.02 내지 2.0 mg/mL 계면활성제.

[0843] 일부 양태에서, 동결건조된 제형은 약 0.001 내지 약 1.0 mg/mL 칼레이트제를 추가로 포함할 수 있다. 칼레이

트제는 EDTA 또는 DTPA일 수 있고, 약 0.02 내지 약 0.5 mg/mL의 양으로 존재할 수 있다. 칼레이트제는 약 0.05 mg/mL의 양으로 존재할 수 있다.

[0844] 일부 양태에서, [FGF21]-[제 1 연결기]-[항체]-[제 2 연결기]-[Ex4]는 본원에 기재된 바와 같은 본 발명의 화합물이다. 일부 양태에서, FGF21-Ex4 융합은 [FGF21]-[제 1 연결기]-[항체]-[제 2 연결기]-[Ex4]이다. 일부 양태에서, FGF21-Ex4 접합은 약 5 mg/mL 내지 약 200 mg/mL의 양으로 존재한다. 일부 양태에서, FGF21-Ex4 접합은 약 5 mg/mL 내지 약 90 mg/mL의 양으로 존재한다. FGF21-Ex4 접합은 약 5 mg/mL 내지 약 50 mg/mL의 양으로 존재한다. FGF21 접합은 약 10 mg/mL의 양으로 존재한다.

[0845] 일부 양태에서, 글루탐산은 약 1 내지 약 100 mM의 양으로 존재한다. 일부 양태에서, 글루탐산은 약 10 mM 내지 약 50 mM의 양으로 존재한다. 일부 양태에서, 글루탐산은 약 20 mM의 양으로 존재한다. pH는 약 4.2 내지 약 5.3일 수 있다. pH는 약 4.5 ± 0.5일 수 있다. pH는 약 4.5일 수 있다.

[0846] 일부 양태에서, 동해방지제는 트레할로스 이수화물, 수크로스 및 만니톨로 이루어진 군으로부터 선택된다. 동해방지제는 트레할로스 이수화물일 수 있다. 동해방지제는 약 50 내지 약 120 mg/mL의 양으로 존재할 수 있다. 동해방지제는 약 85 mg/mL의 양으로 존재할 수 있다.

[0847] 일부 양태에서, 계면활성제는 폴리소르베이트 80, 폴리소르베이트 20 및 폴록사머로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있다. 계면활성제는 폴리소르베이트 20일 수 있다. 일부 양태에서, 계면활성제는 약 0.05 내지 약 1.0 mg/mL의 양으로 존재한다. 일부 양태에서, 계면활성제는 약 0.1 내지 약 0.5 mg/mL의 양으로 존재한다. 일부 양태에서, 계면활성제는 약 0.2 mg/mL의 양으로 존재한다.

[0848] 일부 양태에서, 본 발명은 하기 (i) 내지 (v)를 포함하는 동결건조에 적합한 제형을 포함한다:

[0849] (i) 약 30 내지 약 60 mg/mL [FGF21]-[제 1 연결기]-[항체]-[제 2 연결기]-[Ex4];

[0850] (ii) 약 10 내지 약 60 mM 글루탐산, pH 4.5 ± 0.5;

[0851] (iii) 약 50 내지 약 100 mg/mL 트레할로스 탈수화물;

[0852] (iv) 약 0.01 내지 약 0.0 mg/mL 이나트륨 EDTA 이수화물; 및

[0853] (v) 약 0.1 내지 약 0.3 mg/mL 폴리소르베이트 20.

[0854] 일부 양태에서, 본 발명은 하기 (i) 내지 (v)를 포함하는 동결건조에 적합한 제형을 포함한다:

[0855] (i) 약 30 mg/mL [FGF21]-[제 1 연결기]-[항체]-[제 2 연결기]-[Ex4];

[0856] (ii) 약 20 mM 글루탐산, pH 4.5 ± 0.5;

[0857] (iii) 약 85 mg/mL 트레할로스 탈수화물;

[0858] (iv) 약 0.05 mg/mL 이나트륨 EDTA 이수화물; 및

[0859] (v) 약 0.2 mg/mL 폴리소르베이트 20.

[0860] 일부 양태에서, 본 발명은 하기 (i) 내지 (v)를 포함하는 동결건조에 적합한 제형을 포함한다:

[0861] (i) 약 30 mg/mL [FGF21]-[제 1 연결기]-[항체]-[제 2 연결기]-[Ex4];

[0862] (ii) 약 20 mM 글루탐산, pH 4.5 ± 0.5;

[0863] (iii) 약 8.5% 트레할로스 탈수화물;

[0864] (iv) 약 0.005% 이나트륨 EDTA 이수화물; 및

[0865] (v) 약 0.02% 폴리소르베이트 80.

실시예 72: 항체 강화 방법

[0867] 일부 상황에서 h38C2가 접합을 위해 웨티드 또는 단백질과 항온처리되는 경우, 반응은 완료되지 않았고 일부 미반응된 항체가 남았다. 현상을 조사하기 위해 분석 HIC 어세이(하기 기재된 방법)는 2개의 초기 용리 피크(전형적으로 약 0.6 내지 1.8%의 단백질, 및 각각 16.9 및 19.4%의 단백질) 및 주요 피크(비록 73.5% 및 83.3%까지 단백질의 편차가 관찰되었을지라도 전형적으로 약 75.2 내지 79.5%의 단백질)를 분리하였다. 주 피크 단백질은 완전 반응성인 반면, 피크 1 및 2는 미반응성이었다. 따라서, 항체 h38C2의 정제에 대한 개선된 방법을

개발할 필요가 있다.

[0868] HIC 방법

[0869] 이 부분은 h38C2 항체 제조 과정 및 약물 물질 샘플에 존재하는 상이한 이소폼을 추정하기 위해 HIC 크로마토그래피의 사용을 기재한다. 이러한 종은 Lys99 위치(h38C2당 2개 Fab 중 하나씩)에서 0(피크 1), 1(피크 2) 또는 2개 펩티드(주 피크)를 접합할 수 있는 출발 물질 성분인 것으로 생각되었다. 분리 및 용리는 이 방법에서 구배에 따라 유기 용매(이소프로필 알코올)에서 동시에 증가하는 염 감소 구배에 의해 발생하고, 이는 역상 크로마토그래피에서처럼 이동상에 대한 더욱 소수성 단백질의 친화성을 증가시킨다. 피크 면적을 각각의 이소폼에 대한 상대적인 풍부함을 측정하기 위해 조사하였다.

[0870] TSK 겔 페닐-5PW 컬럼(7.5 mm x 75 mm, 10 μ m, 토소(TOSOH))을 사용한 HIC 분석 방법을 개발하여 h38C2 IgG₁ 항체로부터 미반응성(P1, P2) 및 반응성 mAb 주 피크를 분리하였다. 이동상은 다음과 같다: A: pH 7.0에서 0.75 M 암모늄 살레이트, 50 mM 칼륨 포스페이트 및 B: pH 7.0에서 50 mM 칼륨 포스페이트, 10% IPA. 컬럼은 214 nm에서 측정된 흡광도를 사용하여 35°C로 0.65 mL/분에서 작동한다. 100 μ g 샘플을 희석제(이동상 A: 물, 50:50)를 사용하여 1 mg/mL에 샘플 또는 표준물을 희석함으로써 주사를 위해 제조하였다.

표 64

[0871] HIC 분석 방법

시간(분)	%B	유속(mL/분)
0.0	0.0	0.65
6.8	50.0	0.65
42.8	81.0	0.65
43.0	95.0	0.65
48.0	95.0	0.65
48.1	0.0	0.65
53.0	0.0	0.65

이동상 A: 0.75 M 암모늄 살레이트, 50 mM 칼륨 포스페이트, pH 7.0
이동상 B: 50 mM 칼륨 포스페이트, pH 7.0, 10% IPA

[0872] 실시예 73: 미반응성 h38C2에서 증가하는 iCE, MetOx 데이터 상관관계

[0873] 보유 연구를 h38C2의 명시된 수확 브로쓰를 사용하여 25°C에서 수행하였다. 샘플을 지정된 시간에 냉동시켰다. 샘플을 녹이고 단백질 A 스플 컬럼으로 정제하고 어세이를 수행하였다. 산성 및 산화된 종에서의 증가와 mAb의 미반응성 형태에서의 증가 사이에 상관관계가 있었다(표 65). 이는 h38C2 미반응성을 만드는데 수반된 다른 인자일 수 있지만 산성 종 및 황 잔기의 산화는 수반된 2개의 인자를 나타낸다.

표 65

[0874] iCE, MetOx 및 미반응성 h38C2의 수준에 대한 브로쓰 홀드(Broth Hold) 연구 결과

25°C에서 항온처리 시간	HIC 미반응성 2000	산성 종	Met-Ox
0	16.48	31.1	3.2
3	16.54	31.7	3.2
24	22.10	36.1	6.8
27	22.09	37.3	5.9
48	26.48	40.9	8
56	28.40	43.3	9.2
72.5	32.22	45.7	10.4
95	34.97	49.8	12.6
140	37.71	51.6	13.8

[0875] 실시예 74: 컬럼 선택

[0876] 초기에, TSK 겔 페닐-5PW 컬럼(10 μ M 입자 크기)을 사용하여 미반응성 형태로부터 접합가능한 mAb를 분리하기 위해 HIC 어세이를 개발하였다. TSK 겔 페닐-5PW 컬럼(20 μ M 입자 크기)을 완전 반응성 h38C2를 생성하기 위

해 확대시켰다. 컬럼 부피는 45 g/L이었고 고압하에 실행하였다. 하기 방법은 접합 연구에 대한 물질을 제조하기 위해 사용되었다. 컬럼을 50 mM 나트륨 포스페이트(pH 7) 중 0.5 내지 1 M NaCl로 평형시키고 45 g/L 수지에 로딩하였다. 컬럼을 세척하지 않고 pH 7에서 50 mM 나트륨 포스페이트, 20% IPA를 포함하는 용리 완충액으로 이용하였다. 50 mM 나트륨 포스페이트(pH 7) 중 용리 완충액의 42 내지 60%의 선형 구배를 4.8 컬럼 부피(CV)에 걸쳐 개발하고, 이어서 농도를, 물질이 수집되고 흡광도가 기저 수준 근처로 돌아올 때까지 각각의 용리 완충액의 100%로 올렸다. 비록 이 방법이 실험실 규모 공급원에 대하여 충분할지라도, 더 많은 로딩 부피를 갖는 더 많은 처리량 방법이 요구되었다. 다양한 HIC 수지를 고려하거나 시험하였다(표 66).

표 66

h38C2의 분석 시험 및 정제에 사용된 HIC 수지

수지	적용	입자 크기	공극 크기	용량(g/L)
TSK 겔 페닐 5 PW	분석형	10 μ M	1000 Å	4
TSK 겔 페닐 5 PW	분석형	20 μ M	1000 Å	-4
페닐 650 S	화장형	35 μ M	750 Å	18
PPG 600 M	화장형	65 μ M	750 Å	약 15 내지 20
페닐 600 M	화장형	65 μ M	750 Å	약 50
페닐 세파로즈 HP	화장형	34 μ M	NA	NA
부틸 600 M	화장형	65 μ M	750 Å	20
부틸 세파로즈 HP	화장형	34 μ M	NA	NA
NA	사용할 수 없음.			

[0877] 페닐 5 PW, 페닐 600 M, 부틸 600 M, 및 페닐 650 S 크로마토그래피에 대하여, 평형 완충액은 pH 7.0에서 20 mM 나트륨 포스페이트, 1 M NaCl이었다. 로딩을 동일한 pH 및 전도성을 갖는 유사한 조성물에 이용하였다. 로딩은 페닐 600 M(5 내지 10 g/L, 및 20 g/L), TSK 겔 페닐 5 PW, 및 부틸 600 M 상에서 4 내지 50 g/L 수지 범위이었다. 페닐 650 S 컬럼 상에 로딩은 15 내지 22 g mAb/L 수지이었다. 컬럼을 5 CV의 평형 완충액으로 평형시키고(표 67), 이어서 컬럼을 로딩하고 12 CV의 평형 완충액으로 세척하고, 이어서 0 내지 2 CV의 염기 완충액으로 세척하였다. mAb를 pH 7.0에서 20 mM 나트륨 포스페이트, 20% IPA로 이루어진 40 내지 43% 용리 완충액의 12 CV 단계 구배로 용리하였다. 이후, 40 내지 63% 용리 완충액을 사용하는 5 내지 10 CV의 선형 구배로 용리하였다. 최종적으로, 컬럼을 3 내지 6 CV의 용리 완충액을 이용하여 잔여 mAb의 용리를 보장하였다. 단백질을, 얼마나 빠른 구배를 개발하느냐에 따라 3 내지 15 CV의 과정에 걸쳐 용리하였다. 0.5 내지 2 mg/mL의 농도에서 생성물을 갖는 페닐 5 PW, 페닐 600 M, 및 부틸 600 M 수지에 대한 수율은 0 내지 43%이었다. 질량 균형은 전형적으로 약 90 내지 100%이었다. 페닐 650 S에 대한 결과는 하기에 기재하였다.

표 67

초기 컬럼 스크리닝을 위해 사용된 HIC 방법

단계	% B	CV	용액
평형		5	20 mM 나트륨 포스페이트, 1 M NaCl, pH 7(완충액 A)
로딩		N/A	20 mM 나트륨 포스페이트, 1 M NaCl, pH 7
세척 1		2	20 mM 나트륨 포스페이트, 1 M NaCl, pH 7
세척 2	0 내지 2	20 mM 나트륨 포스페이트, 1 M NaCl, pH 7	
용리 1	40 내지 43	1 내지 2	20 mM 나트륨 포스페이트, 20% IPA, pH 7
용리 2	40 내지 60	5 내지 10	20 mM 나트륨 포스페이트, 20% IPA, pH 7
용리 3	100	5	20 mM 나트륨 포스페이트, 20% IPA, pH 7
완충액 B	= 20% IPA를 갖는 20 mM 나트륨 포스페이트, pH 7.		

[0880] 페닐 5 PW(20 μ M) 수지를 4 mL 컬럼에서 시험하였지만, 오직 90% 반응성 h38C2를 나타내는 주 피크를 강화하는데 효과적이지 않았다. 더욱이, 페닐 5 PW는 20 μ M 비드 크기를 사용하는 고압에서 작동하고 낮은 용량인 약 45 g/L 수지를 갖기 때문에 규모를 확대할 수 없었다. 부틸 600 M 컬럼이 23 g/L에서 로딩될 경우, 이는 어떠한 강화도 전달하지 않았다. 20 g/L에서 로딩된 페닐 600 M 컬럼은 91 내지 92%에서 주요 피크의 우수한 강화를 나타냈지만, 약 43%의 전체 수율은 약 50% 수율 내지 약 95% 주요 피크의 바람직한 최소 한도 보다 낮았다. 동일한 컬럼이 5 g/L의 수지에서 하중된 경우, 피크 분획은 더 높은 컬럼 로드와 더 높은 생성물 순도 사이에

관계를 입증하는 로딩 물질보다 적은 주요 피크를 갖는다. 이어서, 35 μM 비드를 갖는 폐널 650 S를 시험하였다. 더 작은 비드를 더 많은 표면 지역 및 결합 부위에 제공하고, 이는 우수한 분해능을 제공하였다. 염 농도 및 세척 단계의 기간을 미세조정함으로써, 대부분의 비활성 형태의 항체를 제거하였지만, 남아 있는 많은 완전 반응성(FR) h38C2는 수지에 결합하였다. 57 내지 58%까지의 수율 및 92 내지 95% 주요 피크를 함유하는 생성물 풀을 수득하였다.

[0881] 실시예 75: 염 감소, 플래토, 및 완충 세척 단계의 개발

[0882] 생성물 수율 및 순도를 최대화하기 위한 3단계의 세척 단계의 개발 동안 여러 파라미터를 평가하였다. 염 감소 선형 구배 단계 동안, 세척의 기울기, 기간 및 최종 농도를 시험하였다. 이에 따라, 플래토 세척의 최적 농도 및 기간, 및 완충 세척의 최적 기간이 확립될 필요가 있었다. 여러 중요한 실험 실행의 결과를 이러한 두 실험 실행으로부터의 HIC 어세이 데이터를 비교하여 표 68 및 표 69에 나타내었다.

표 68

폐널 650 S 컬럼에 대한 염 감소 세척 프로토콜의 정의

실행	염 구배 (NaCl)	CV	플래토	CV	완충액	CV	단계 4	CV	%수율	%평균 피크의 수율
140	1 M-0 M	10			0 M	2	-	-	46	61
143	0.75 M-0 M	8			0 M	5	-	-	11	15
152	1 M-0.3 M	7	0.30 M	3	*0.10 M	3	-	-	53	71
155	1 M-0.35 M	3	0.35 M	3	-	-	-	-	45	57
159	1 M-0.44 M	7	0.44 M	4	*0.3 M	4	0M	2	50	NA
167	1 M-0.3 M	7	0.30 M	8	0 M	2	-	-	47	65
171	1 M-0.33 M	7	0.33 M	6	0 M	2	-	-	57	75
**177	1 M-0.30 M	7	0.30 M	2	0 M	4	-	-	73	96
185	1 M-0.33 M	7	0.33 M	6	0 M	3	-	-	58	76
9.5 L 규모	1 M-0.33 M	7	0.33 M	6	0 M	3			72	93
33 L GLP	1 M-0.33 M	7	0.33 M	6	0 M	2			75	94

NA = 이용할 수 없음.

*이는 염기 완충 세척이 아니고, 이는 또한 나열된 바와 같이 NaCl을 함유하였다.

**이는 실행은 20 mM 나이트륨 포스페이트, 1,6-헥산다이올, pH 7.0을 사용하였고, 다른 실행은 염기 완충 액 중 20% IPA로 용리하였다.

표 69

HIC 어세이 데이터

실행-분획	피크 1	피크 2	주요 피크
기준 표준	1.2	19.4	*75.6
140 분획 6	3	86.8	10.2
140 분획 10	0	11.1	88.9
140 분획 12	0	11.2	88.8
140 분획 22	0	9.7	90.3
기준 표준	1.8	19.2	75.2
152 분획 10	2.3	66.2	31.5
152 분획 14	0	9.5	90.5
152 분획 20	0	5.9	94.1
152 분획 22	0	2.9	97.1
152 분획 24	0	8.1	91.9
기준 표준	0.6	17.9	77.1
9.5 L 규모 생성물 풀	ND	7.2	90.7
기준 표준	1.7	16.9	79.5
33 L 규모, 주기 A, GLP	0.16	9.73	88.7

피크 1 및 2는 미반응성/부분적으로 활성이다. 주요 피크는 접합 반응에서 완전 반응성이다.

*기준 표준을 상이한 날에 HIC 어세이에서 73.5 내지 83.3%에서 측정하였다.

- [0885] 페널 650 S 실행 140(표 68)은 실행의 세척 단계 및 용리 단계 둘다에서 유의한 양의 단백질을 나타내었다. 이러한 초기 실행에서, 10 CV에 걸쳐서 1 M 내지 0 M NaCl 선형 구배를 사용하였다. 구배는 20 mM 나트륨 포스페이트의 2 CV 염기 완충 세척으로 이어졌다. 이는 미반응성 성분을 제거하기 위한 가능성을 입증하는 첫번째 실행이었고 완전 반응성 h38C2의 더욱 수용가능한 수율을 수득하였다. 이를 표 69에 더욱 상세하게 나타내었고, 분획 6(세척)은 86.2% 미반응성 h38C2 뿐만 아니라 10.2% 주요 피크를 함유한다. 20% IPA로 용리하는 동안, 3 분획은 90% 반응성 mAb를 함유하였고, 미반응성 mAb의 양을 약 10%까지 감소시켰다.
- [0886] 페널 650 S 실행 143(표 68)은 8 CV에 걸쳐서 0.75 M 내지 0 M NaCl 선형 구배를 사용하였다. 구배는 11%의 수반되는 낮은 수율을 갖는 이전 실행보다 세척 단계에서 더욱 많은 단백질을 갖는 5 CV 염기 완충 세척으로 이어졌다. 놀랍게도 이 실행으로부터 수득된 불량한 수율에 기초하여, 수지가 딱 맞는 단백질 결합을 제공하기 위해 염 평형으로부터 유리할 수 있음이 가정되었다. 또한, 균형이 생성물 손실을 최소화하면서, 염기 완충액의 충분한 용량을 사용하여 염 및 미반응성 mAb를 제거하기 위해 사이를 과쇄하여야 함이 가정되었다.
- [0887] 많은 후속 실행은 5 CV 보다 오히려 2 내지 3 부피의 염기 완충액을 사용하였다. 페널 650 S 실행 152는 7 CV에 걸쳐서 1 M 내지 0.30 M NaCl 선형 구배를 사용하였다. 구배는 염기 완충액에서 0.30 M NaCl을 갖는 3 CV 플래토 세척, 및 이어서 53% 수율을 제공하고, 세척 시 단백질이 없고 용리 피크에서 수반되는 증가를 함유하는 염기 완충액 중 0.10 M NaCl을 갖는 3 CV 플래토 세척으로 이어졌다(표 68). 300 mM NaCl에서 염 감소 단계 중 플래토의 시작은 궁극적으로 획득된 개선을 야기하는 중요한 발견이었다. 94 및 97% 주요 피크가 함유된 실행 152로부터의 2개의 용리 분획(표 69)은 페널 650 S 생성물 풀에서 50% 초과 수율 및 90% 초과 주요 피크의 목적을 달성하기 위해 작동된 방법을 입증하였다. 세척 분획 10은 컬럼 상에서 많은 생성물을 보유할 수 있는 0.30 M NaCl 보다 많은 플래토 세척액을 나타내는 31.5% 주요 피크를 갖는다.
- [0888] 페널 650 S 실행 155는 3 CV에 걸쳐서 1 M 내지 0.35 M NaCl 선형 구배를 사용하였다(표 68). 구배는 이전에 실행보다 적은 43% 수율을 제공하는 염기 완충액 중 0.35 M NaCl을 사용하는 3 CV 플래토 세척으로 이어졌다. 이중 로딩된 하나의 인자(45 g/L)를 컬럼에 적용하였다. 대부분의 단백질은 통과액 및 세척액에서 컬럼에서 배출되고, 효과적으로 로딩(16 g/L)을 제조한다. 더 많은 주요 피크의 세척액을 제거하는 염 감소 구배의 가파른 기울기는 또한 수율을 감소시켰다.
- [0889] 페널 650 S 실행 159는 7 CV에 걸쳐서 1 M 내지 0.44 M NaCl 선형 구배를 사용하였다(표 68). 구배는 염기 완충액 중 0.44 M NaCl을 사용하는 4 CV 플래토 세척으로 이어진 후, 이전에 실행된 것보다 더 낮은 50% 수율을 제공하는, 염기 완충액 중 0.3 M NaCl을 사용하는 4 CV 플래토 세척, 염기 완충액을 사용하는 2 CV 플래토 세척으로 이어졌다. 그러나, 염기 완충 세척액의 최적화는 순도 및 수율 둘다를 최대화를 돋는 또 다른 주요 발견이었다.
- [0890] 페널 650 S 실행 167은 7 CV에 걸쳐서 1 M 내지 0.3 M NaCl 선형 구배를 사용하였다(표 68). 구배는 염기 완충액 중 0.3 M NaCl을 사용하는 8 CV 플래토 세척으로 이어진 후, 염기 완충액을 사용하는 2 CV 플래토 세척으로 이어졌다. 수율은 51%였다. 이는 수율이 0.3 M NaCl 세척의 농도가 클 수 있음을 가정하였다.
- [0891] 페널 650 S 실행 171은 7 CV에 걸쳐서 1 M 내지 0.33 M NaCl 선형 구배를 사용하였다(표 68). 구배는 염기 완충액 중 0.33 M NaCl을 사용하는 6 CV 플래토 세척으로 이어진 후, 57% 수율을 제공하는 염기 완충액을 사용하는 2 CV 세척으로 이어졌다.
- [0892] 최종 방법 개발 실행을 수행하여 20 mM 포스페이트 세척 동안 NaCl을 제거하기 위해 조건을 미세조정하였다. 세척 단계를 여러 실험 과정 동안 구축하였고, 세척 단계 중 최종 개선을 대부분의 미반응성 mAb의 용리가 제공된 실행 171 및 185에 나타낸 바와 같이 완료하였다(표 68). 컬럼에 로딩하고 1 M NaCl 완충액의 1 CV로 세척한 후, 7 CV에 걸쳐서 1 내지 0.33M NaCl 선형 구배가 효율적으로 미반응성 mAb를 제거하였다. 5 내지 6 CV에 대한 0.33 M NaCl의 플래토 세척액은 미반응성 물질을 컬럼으로부터 완전히 세척시켰다. 염기 완충액을 갖는 2 내지 3 CV 세척액은 용리에 대한 컬럼 조건을 위해 잔여 염을 제거하고, 선택 방법으로서 달성하였다. 이어서, 33 L 규모 파일럿 공장을 실행하기 위해, 0.33 M NaCl 세척액을 5 CV까지 감소시키고 20 mM 나트륨 포스페이트를 생성물 질의 손실 없이 2 CV 까지 감소시켰다.
- [0893] 용리 완충액을 14% IPA로부터 15% 1,6-헥산다이올로 변경하였다. 큰 규모에서 IPA의 잠재적인 가연성을 제거하는 것이 목적이었다. 고수율의 완전 반응성 h38C2를 실험실 규모에서 수집했기 때문에 용리 완충액에서 IPA 농도를 일반적으로 1.5 CV 이내에 14%에서 달성하였다. 헥산다이올 용리 완충액을 실행 177에서 소규모로 시험하

였다(표 68). 생성물 풀을 73% 수율 및 88% 주요 피크가 함유된 1.5 CV에서 수집하였다. 개별적인 분획을 실험실 규모 컬럼 실행을 위해 수집하였다. 모아진 분획을 통상적으로 상승 피크 상에서 200 mAU 및 하강 피크 상에서 200 내지 400 mAU에서 수집하였다. 솔더의 생성물 물질을 검토한 결과, 이들은 33 L 컬럼 실행에 대한 풀링 전략을 100 AU로부터 100 mAU까지 생성물 피크를 수집하도록 주요 피크의 %에 충분히 높았다.

[0894] 실시예 76: 수성 용리 스크리닝

또 다른 고려사항은 완전 반응성 h38C2를 여전히 강화하면서 용리 완충액 중 유기 성분 없이 용리될 수 있는 컬럼을 발견하는 것이다. 더욱 친수성 컬럼을, mAb가 수지에 단단하게 결합하지 않을 수 있도록 이 스크린을 위해 선택하였다. 단백질을 덜 단단하게 결합함으로써, mAb를 수성 완충액으로 용리할 가능성이 더 커졌다. 효과적인 접근 방법이 되도록 하기 위해, 상기 방법은 여전히 완전 반응성 및 미반응성 h38C2를 분리할 필요가 있다. PPG 600 M, 부틸 HP, 및 폐닐 HP 컬럼을 본원에 기재된 폐닐 650 S 컬럼으로 개발한 방법과 매우 유사한 방법론을 사용하여 시험하였다(표 70). PPG 600 M, 부틸 HP, 및 폐닐 HP 크로마토그래피(4 mL 규모)에 대하여, 평형 완충액은 pH 7.0에서 20 mM 나트륨 포스페이트, 2.5 M NaCl이었다. 로딩을 동일한 pH 및 전도성을 갖는 유사한 조성물로 조정하였다. 18 내지 19 g mAb/L 수지를 로딩한 후 5 CV 평형 완충액으로 세척하였다. 이어서, 13 내지 15 CV에 걸쳐서 2.5 M부터 0 M NaCl까지 염 감소 세척한 후, 20 mM 포스페이트 완충액의 3 CV로 세척하였다. 다르게는, 하나의 부틸 실행은 1 M로부터 0.3 M NaCl까지 염 감소 세척한 후, 20 mM 포스페이트 완충액의 3 CV로 세척하였다. 컬럼을 pH 7.0에서 5 CV 20 mM 나트륨 포스페이트, 20% IPA로 스트리핑하였다.

표 70

PPG 600M, 부틸 HP 및 폐닐 HP 컬럼에 대한 작동 조건

단계	선형 유속	부피	용액
예비-평형	200 cm/시간	5 CV	A: 2.5 M NaCl, 20 mM Na-포스페이트, pH 7.0
로딩	120 cm/시간	15 mL	2.5 M NaCl, 20 mM Na-포스페이트, pH 7.0 중 5 g/L h38C2
세척	100 cm/시간	5 CV	A: 2.5 M NaCl, 20 mM Na-포스페이트, pH 7.0
용리	100 cm/시간	13 내지 15 CV에 걸쳐서 0 내지 100%. 3 CV에 대하여 100%에서 보유	B: 20 mM Na-포스페이트, pH 7
스트립	200 cm/시간	5 CV	20 mM Na-포스페이트, pH 7 중 20% v/v IPA
세정	200 cm/시간	3 CV	0.5 N NaOH
저장	200 cm/시간	3 CV	0.1 N NaOH

A = 20 mM 나트륨 포스페이트, 1 M NaCl, pH 7.
B = 20 mM 나트륨 포스페이트, pH 7.

PPG 600 M 컬럼을 높은 염 세척 동안 약 5%의 mAb 통과액을 사용하여 18 g/L에서 약간 과로딩하였다. mAb를 전도성 드롭으로서 용리하였다. 그러나, 이는 반응성/비반응성 종의 분리를 나타내는 정의 없이 광범위한 피크이었다. 부틸 HP 컬럼은 사실 낮은 염 용리 동안 용리된 mAb의 유의한 양을 가장 많은 조짐을 보유하였다. 그러나, HIC 어세이 결과는 43% 피크 2 및 53% 주요 피크 종을 함유하는 풀을 나타내었다. h38C2는 폐닐 HP 컬럼으로부터 염 감소 세척 동안 수상에서 용리하지 않았다. 강화된 h38C2는 IPA 구배로만 용리하였다. mAb가 IPA로만 용리될 수 있으므로, 폐닐 HP 컬럼은 수성 용리 방법에 적합하지 않는다. 따라서, 이러한 컬럼 중 어떤 것도 650 S 수지로부터 전환하기 위한 대안적인 정제 전략 또는 이유를 제공할 수 없다.

[0898] 실시예 77: 제련된 폐닐 650 S 정제 방법

20 g/L mAb에서 h38C2를 녹이고 pH 7에서 40 mM 나트륨 포스페이트, 2 M NaCl로 1:1 희석하고, 0.45/0.2 μ M 필터를 통해 여과하고, pH 7.0에서 20 mM 나트륨 포스페이트, 1 M NaCl로 평형시킨 폐닐 650 S HIC 컬럼(토소) 상에 16 내지 18g/L에서 로딩하였다(표 71). 컬럼을 1 CV 평형 완충액으로 세척한 후 7 CV 구배를 20 mM 나트륨 포스페이트, pH 7.0에서 1로부터 0.33 M NaCl까지 개발하였다. 구배는 5 CV에 대하여 20 mM 나트륨 포스페이트(pH 7.0)에서 0.33 M NaCl을 보유한 후 pH 7에서 2 CV 염기 완충액, 20 mM 나트륨 포스페이트로 세척하였다. 덜 반응성 형태의 h38C2를 이러한 세척 단계의 적용 동안 용리하였다. 용리 상을 위해, 0 내지 15% 1,6-헥산다이올 구배를 1 CV 상에서 개발하였고 용리가 완료될 때까지 15%에서 보유하였다. 완전 반응성 h38C2 생성물을

약 1 내지 2 CV의 풀로서 수집하였다.

표 71

페닐 650 S HIC 컬럼 방법

단계	선형 유속 (cm/ 시간)	CV	% B	용액
플러쉬	60	3	-	밀리(Milli)-Q
평형	80	5	-	20 mM 나트륨 포스페이트, pH 7, 1 M NaCl
로딩	80	N/A	-	20 mM 나트륨 포스페이트, pH 7, 1 M NaCl 중 약 10 g/L
세척	80	1	-	20 mM 나트륨 포스페이트, pH 7, 1 M NaCl
염 구배	80	7	0 내지 67	20 mM 나트륨 포스페이트, pH 7, 1 M 내지 0.33 M NaCl
염 플래토	80	5	67	20 mM 나트륨 포스페이트, pH 7, 0.33 M NaCl
완충액 세척	80	2	100	20 mM 나트륨 포스페이트, pH 7
용리	60	1	0 내지 75	20 mM 나트륨 포스페이트, pH 7, 20% 1,6-헥산다이올
용리	60	5	75	20 mM 나트륨 포스페이트, pH 7, 20% 1,6-헥산다이올
플러쉬	60	3	-	정제된 H ₂ O(WFI: 주사용 물)
*세정	60	3	-	0.5 M 나트륨 하이드록사이드
플러쉬	60	3	-	WFI
저장	60	2	-	20 mM 나트륨 포스페이트, pH 7, 20% 에탄올

*유량의 방향은 아래쪽에서 위쪽이다. 모든 다른 단계는 위쪽에서 아래쪽 유량 방향을 갖는다. 공급률을 3 배의 최대 시스템 압력으로 제한하였다. 이러한 로딩 조건하에 단백질 결합은 100%이었다. 모든 작동을 실온에서(18 내지 22°C) 수행하였다. B: 20 mM 나트륨 포스페이트, pH 7.0.

[0901] 이어서, 90 내지 95% 완전 반응성 h38C2를 함유하는 페닐 650 S 생성물 풀을 막의 130 내지 280 g의 mAb/m²에서 30 kD 하이드로사르트 막(사르토리우스(Sartorius)에 의해 3 m²)을 사용하여 10 mM 히스티딘(8 정용부피) 내에 정용여과하였다. UF 농축물을 UF 완충액 중 적절한 양의 UF 세정액으로 25 g/L까지 조정하였다. 45x 양의 잔여 부형제를 함유하는 스톡 용액을 최종 별크 약물 물질 중간체 제형을 달성하기 위해 단백질 용액에서 정용여과 내로 스파이킹하였다. 최종 제형은 pH 6.5 ± 0.3에서 10 mM 히스티딘, 10 mM 글리신, 2% 수크로스이었다. 제형된 DS 중간체 용액을 0.45/0.2 최종 필터를 통해 통과시키고 28°C에서 6개월 이하까지 적절한 크기의 스테디움 백 또는 등가물을 저장하였다. 장기간 저장을 위해, DS 중간체를 1 L 또는 4 L PET-G 병에서 70 내지 80°C로 냉동시켰다.

[0902] 표 72 및 73은 제련된 페닐 650 S 방법을 사용하는 GLP 및 GMP 등급 방법 실행으로부터의 수율을 나타낸다.

표 72

[0903] 1.1 kg 규모에서 GLP(우수 실험실 운영기준, Good Laboratory Practice) 표준물에 대한 h38C2 완전 반응성(FR) 정제 표

단계	[mAb] (g/L)	부피(L)	질량(g)	총 mAb 수율(%)	주요 피크, h38C2(%)	h38C2 주요 피크의 수율(%)
P 650 S 로딩 주기 A, B	9.65	56 x 2	540	100	79.8	-
P 650 S 풀 주 기 A	11.08	37.25	413	76	88.7	92
P 650 S 풀 주 기 B	11.4	36	411	76	*77	91
UF 풀 1	25.4	15.9	403	98	-	-
UF 풀 2	25	16.4	411	100	-	-
h38C2 FR (제형화됨)	19.9	40	796	98	-	-

*샘플링 오차가 발생하고 실제 생성물 풀은 수득되지 않았다.

분석된 샘플은 11.4 g/L 대신에 2 g/L의 단백질 농도를 갖는다.

표 73

[0904] 1.2 kg 규모에서 GMP(우수 실험실 운영기준) 표준물에 대한 h38C2 완전 반응성(FR) 정제 표

단계	[mAb] (g/L)	부피(L)	질량(g)	총 mAb 수율(%)	주요 피크, h38C2(%)	h38C2 주요 피크의 수율(%)
P 650 S 로딩 주기 A, B	10.27	57.3	588.5	-	83.3	-
P 650 S 풀 주기 A	9.03	43.1	389.2	*66	94.3	79
P 650 S 풀 주기 B	8.41	53.68	451.4	77	91.5	92
UF 풀	25.4	32.6	828	99.5	-	-
h38C2 FR (제형화됨)	19.7	40.8	804	97	-	-

*염 감소 및 플래토 세척액 단계를 뛰어 넘는 프로그램 오류가 발생하여, 컬럼으로부터 일부 단백질을 대체하였다. 전체 세척 단계를 반복하였다.

분획에서 주요 피크는 94.3%이었고, 주기 B의 91.3% 보다 약간 더 높았다.

[0905] 실시예 78: Ex4 연결기를 갖는 완전 반응성 H38C2의 접합 효율

[0906] HIC 어세이 사이의 관계의 결과는 두 접합 부위를 하기(표 74)에 나타낸 기질과 반응시키는 능력 및 샘플에서 주요 피크를 나타내었다. 상이한 HIC 정제 실행에 따라, h38C2의 각각의 샘플을 [서열번호 53-L1]의 1:3 몰비로 항온처리한 후, 항체당 Ex4 연결기 접합물의 수를 크기 배제 크로마토그래피를 사용하여 계수하였다.

[0907] h38C2 FR 실행 171을 실시예 77의 제련된 방법에 따라 페닐 650 S 상에서 정제하였고 이는 염기 완충액 및 15% IPA의 용액에 함유되었다. h38C2 FR 실행 171로부터의 용리 분획 총 3 CV를 모았고, 풀은 HIC 어세이에 의해 92.4% 주요 피크를 나타내었다. h38C2를 Ex4 연결기의 1:3 몰비로 항온처리하였다. 접합 반응은 87.8% 완료되었고 11.8%의 mAb가 1개 웹티드와 반응하였다.

[0908] h38C2 FR 실행 177을 실시예 77의 제련된 방법에 따라 페닐 650 S 상에서 정제하였고, 염기 완충액 및 15% 1,6-헥산다이올의 용액에 함유한 후, 10 mM 글리신, 10 mM 히스티딘 pH 6.5 내에 정용여과하였다. h38C2 FR 실행 177로부터 총 1.5 CV의 용리 분획을 모으고 풀은 88% 주요 피크를 나타내었다. h38C2를 Ex4 연결기의 1:3 몰비로 항온처리하였다. 접합 반응은 96% 완료되었고 3.9%의 mAb가 1개 웹티드와 반응하였다.

[0909] 실행 171과 177을 비교하여, 실행 177이 IPA없이 더 높은 접합 효율을 갖고 다른 모든 것이 등가물인 IPA가 반응을 간섭함이 분명하였다.

[0910] h38C2 FR 실행 "에톡스(Etox)"를 실시예 77의 제련된 방법에 따라 페닐 650 S 상에서 정제하였고 이는 염기 완충액 및 15% IPA의 용액에 함유되었다. h38C2 FR 실행 "에톡스"로부터 5 CV 총 용리 분획을 모았고, 풀은 HIC 어세이에 의해 90.7% 주요 피크를 나타내었다. h38C2를 Ex4 연결기의 1:3 몰비로 항온처리하였다. 접합 반응은 93.2% 완료되었고 6.7%의 mAb를 1개 웹티드와 반응시켰다.

[0911] 표 74로부터 알 수 있는 바와 같이, 샘플에서 완전 반응성 항체의 양을 측정하는 크기 배제 분석은 주요 피크 분석과 매우 연관성이 있다.

표 74

[0912] Ex4 연결기를 갖는 완전 반응성 h38C2의 접합 효율

	TSK 젤 페닐 5 PW 컬럼을 갖는 HIC 어세이	접합 효율을 결정하기 위한 HIC-TSK 젤 부틸 NBR 컬럼 어세이		
Ex4-연결기와 h38C2 접합	h38C2 주요 피크(%)	h38C2(%)	h38C2 +1 Ex4-연결기(%)	h38C2 +2 Ex4-연결기(%)
15% IPA 중 h38C2 FR 171	92.4	0.4	11.8	87.8
UF/DF 182 후 h38C2 FR 177	88.0	0.1	3.9	96
124652-198: E-톡스 실행	90.7	0.1	6.7	93.2

[0913] 실시예 79: 중요한 폐널 650 S 개발 발견

폐널 650 S 컬럼을 토소(상표) 및 다른 판매원으로부터 여러 HIC 수지를 스크리닝한 후 선택하였다. 수지는 고로딩 용량(약 16 내지 약 18 g/L 범위) HIC 수지 용량을 갖는다. 35 μ M 입자 크기는 항체의 반응성 형태를 강화하면서 비접합가능한 mAb를 제거하기 위해 필요한 분해능을 제공한다. 대규모에서, 10, 13.5 및 20 cm 배드 높이를 갖는 컬럼이 사용되었다. 유속은 2개의 짧은 컬럼 보다 약 2 내지 약 4배 더 높고, 따라서, 본 발명은 낮은 압력에서 더욱 효율적인 가공을 가능하게 하는 약 10 cm 내지 약 20 cm, 바람직하게는 약 10 cm 내지 약 15 cm의 컬럼 배드 높이의 컬럼의 사용을 제공한다. 20 cm 컬럼 배드 높이는 처리 요건을 충족시키기 위해 사용될 수 있지만 긴 방법 시간을 요구할 수 있다. 상기 기재된 컬럼 로딩 범위 및 세척 전략은 완전 반응성 h38C2의 강화 및 수율 모두를 최적화되어 있었다. 이전 전략 및 다른 수지는 약 11 내지 약 55%의 단백질 회수를 전달하였고 완전 반응성 h38C2의 목적한 강화 수준을 달성하지 않았다. 소규모 개발 작업은 용리 완충액으로서 20 mM 나이트륨 포스페이트(pH 7.0) 중 20% IPA를 사용하였다. 본 발명은 대규모에서 가연성 문제를 피하기 위해 IPA를 사용하는 1,6-헥산다이올의 사용을 제공하였다.

폐널 650 S 컬럼은 튼튼하고 폐널 5 PW 컬럼 보다 4배 더 큰 로딩 용량을 갖고, 큰 입자 크기로 인해 폐널 5 PW 컬럼보다 더 큰 유속을 달성가능하고, 확장가능하고 재생가능하다.

[0915] 유사한 정제 방법과 함께 4 mL, 75 mL, 9.5 L 및 33 L 규모에서 폐널 650 S를 사용하여 개발된 방법의 결과 모두 훌륭한 수율을 달성하고 완전 반응성 h38C2를 생성하였다. 9.5 L 규모 작동은 72%의 총 단백질 수율을 나타내는 h38C2 FR(110 g)(80 내지 90 g의 표적에 대한 웰)을 전달하였다. HIC 어세이는 총 단백질의 93%가 포함된 주요 피크를 나타내었다.

[0916] 본 발명은 약 85% 이상, 바람직하게는 약 90% 이상, 더욱 바람직하게는 약 92% 이상, 더욱 바람직하게는 약 95% 이상의 주요 피크 수율에서 약 65% 이상, 더욱 바람직하게는 약 70% 이상, 가장 바람직하게는 약 72% 이상의 총 단백질 수율과 함께 완전 반응성 h38C2를 전달하기 위한 방법을 제공한다.

[0917] 정제 방법은 ABC-1을 제조하기 위하여 FGF21에 접합하기 위해 필요한 완전 반응성 h38C2를 전달한 후 Ex4 웨프트에 전달한다.

[0918] 폐널 650 S 컬럼을 갖는 큰 규모에서 총 단백질 수율은 약 55% 이상, 바람직하게는 약 60% 이상, 더욱 바람직하게는 약 65% 이상, 더욱 바람직하게는 약 68% 이상, 더욱 바람직하게는 약 70% 이상, 가장 바람직하게는 약 75% 이상을 달성하도록 최적화되었다. 또한, 본 발명은 약 85% 이상, 바람직하게는 약 88% 이상, 더욱 바람직하게는 약 90% 이상의 완전 반응성 h38C2를 전달하기 위한 방법을 제공한다.

[0919] 접합을 위한 완전 반응성 h38C2의 성공적인 강화는 폐널 650 S 수지로 달성되었다. 폐널 650 S 컬럼의 최대 로딩 용량은 대략 20 내지 22g/L였다.

[0920] 최대 로딩 용량은 완충액을 갖는 컬럼을 평형화한 후 흡광도 돌파구가 관찰될 때까지 단백질 로드를 적용함으로써 확인되었다. 돌파구의 수준은 통상적으로 5 내지 10%의 최대 흡광도에서 설정된다. 컬럼 로딩을 중단하고 파과(breakthrough)를 평형 완충액으로 컬럼을 세척하는 동안 수집하였다. 적용된 단백질의 질량 - 단백질 파과의 양의 차이는 최대 로딩 용량이다. 또 다른 컬럼 실행시, 계산된 최대 로딩은 컬럼에 결합할 수 있는 단백질의 양을 확인하기 위해 컬럼에 적용된다.

[0921] 650 S 컬럼은 2/3 이상의 용량으로 로딩된 경우 최적 성능을 갖는다. 컬럼 로딩은 통상적으로 약 15 내지 18 g/L이고, 이는 약 70 내지 80%의 최대 로딩 용량이다. 컬럼의 결합능 부근에 로딩하는 것이 유리하다는 것을 발견하였다. 컬럼이 로딩 후 너무 많은 이용가능한 결합 부위를 갖는 경우, 미반응성 mAb의 용리는 세척 단계 동안 지연될 수 있고 완전 접합가능한 형태의 용리 전에 제거되지 않을 수 있다. 따라서, 일부 양태에서, 컬럼은 약 50% 이상, 바람직하게는 약 60% 이상, 더욱 바람직하게는 약 70% 이상, 더욱 바람직하게는 약 80% 이상의 용량까지 로딩될 수 있다. 작동 155에서(표 67) 컬럼은 45 g/L으로 과로딩되고 대부분의 물질은 컬럼에 결합하지 않았다. 컬럼 작동을 계속하고 나머지 작동으로부터 단백질을 회수하였다. 파과에서 총 로딩량 - 단백질의 양의 계산은 16 g/L의 실제 로딩량을 가졌다. 컬럼을 과로딩하여 정상 파과 시점을 통과시켰고 많은 단백질은 예상보다 컬럼에서 세척 제거되었다. 폐널 650 S 컬럼의 결합능은 약 22 내지 30 g/L이고, 파과의 추구 없이 22 g/L 근처 또는 이상 시험하였다.

[0922] 정제의 중요한 부분은 미반응성 항체를 용리하는 3 단계 수성 염 감소 세척을 정의하는 것이다. 표적 염 농도,

염 감소 세척의 기울기, 및 세척 기간을 미세 조정함으로써, 대부분의 불활성 형태를 컬럼으로부터 용리하는 반면, 대부분의 완전 반응성 h38C2는 수지에 결합되어 남아 있다. 용리를 이소프로필 알코올(IPA) 또는 1,6-헥산다이올에 의한 역상 방식에서 수행하였다. 비록 추가적인 컬럼 시험이 수성 용리 조건을 확인하기 위해 수행되었을지라도, 적합한 방법은 확인되지 않았다.

[0923] 따라서, 일부 양태에서, 본 발명은 h38C2를 정제하기 위한 방법의 놀라운 개선을 제공한다. 일부 양태에서, h38C2는 서열번호 25 및 26을 포함한다. 일부 양태에서, 본 발명은 h38C2 및 이의 변이체의 개선을 위한 방법을 제공한다. 이 맥락에서, "이의 변이체"는 서열번호 27에 나타낸 V_L 서열의 V_L CDR1, V_L CDR2 및 V_L CDR3을 포함하는 경쇄 가변 영역(V_L); 및 서열번호 28에 나타낸 V_H 서열의 V_H CDR1, V_H CDR2 및 V_H CDR3을 포함하는 중쇄 가변 영역(V_H)을 포함하는 항체에 관한 것이다. 바람직하게는 h38C2는 IgG1 항체이다. 바람직하게는 h38C2 변이체는 서열번호 27에 나타낸 바와 같은 V_L 및 서열번호 28에 나타낸 바와 같은 V_H 를 포함하고, 서열번호 78, 79, 80 및 81 중 하나 이상과 95% 이상 동일한 경쇄 불변 영역, 및 서열번호 82와 95% 이상 동일한 중쇄 불변 영역을 추가로 포함한다. 일부 양태에서, 독립적으로 서열번호 27 또는 28 중 하나에 대한 각각의 불변 쇄의 동일성은 96% 이상, 97% 이상, 98% 이상 또는 99% 이상일 수 있다. 일부 양태에서, 경쇄 불변 영역은 서열번호 78, 79, 80 및 81 중 하나 이상으로부터 5개 이하의 아미노산 잔기와 상이하다. 일부 양태에서, 경쇄 불변 영역은 서열번호 81을 포함한다. 일부 양태에서, 경쇄 불변 영역은 서열번호 81의 5, 4, 3, 2 또는 1 이하의 아미노산과 상이하다.

[0924] 일부 양태에서, 본 발명은 샘플을 페닐 컬럼 상에서 역상 크로마토그래피에 이용하는 단계를 포함하는, 부분적으로 미반응성 h38C2 또는 이의 변이체 및 전체 미반응성 h38C2 또는 이의 변이체의 혼합물로부터 완전 반응성 h38C2 또는 이의 변이체를 추출하기 위한 방법을 제공한다.

[0925] 일부 양태에서, 본 발명은 완전 반응성 h38C2 또는 이의 변이체를 포함하는 조성물에 관한 것이다. h38C2 또는 이의 변이체의 반응성 샘플은 h38C2 또는 이의 변이체의 샘플로서 확인될 수 있고, 이때 모든 항원 결합 부위는 샘플에서 약 85% 이상, 약 88% 또는 90%의 항체에서 항원 결합하는데 완전히 이용가능하다.

[0926] 항체가 촉매 항체, 예컨대 h38C2 또는 이의 변이체인 경우, 반응성 항원 결합 부위는 각각의 반응을 촉매할 수 있고, h38C2 또는 이의 변이체의 경우, 본원에 기재된 바와 같이 화학식 X-Y-Z의 연결기에 공유 접합을 형성할 수 있다. 이론에 의해 제한되기를 바라지 않고, 샘플에서 부분적으로 및 전체적인 미반응성 항체의 존재에 대한 하나의 가설은 항체의 하나의 또는 모든 항원 결합 부위가 이전 생성 주기를 통해 동일한 지점에 천연적으로 존재하는 '점착성' 소 분자로 결합된다는 것이다.

[0927] 컬럼 비드의 입자 크기는 약 50 μM 직경 미만일 수 있다. 컬럼 비드의 입자 크기는 약 40 μM 미만일 수 있다. 컬럼 비드의 입자 크기는 약 50 μM 내지 약 20 μM 일 수 있다. 컬럼 비드의 입자 크기는 약 40 μM 내지 약 30 μM 일 수 있다. 컬럼 비드의 입자 크기는 약 35 μM 일 수 있다. 일부 양태에서, "S" 등급의 페닐 컬럼이 사용될 수 있다.

[0928] 일부 양태에서, 비드는 약 500 \AA 이상의 공극을 포함할 수 있다. 일부 양태에서, 비드는 약 650 \AA 이상의 공극을 포함할 수 있다. 일부 양태에서, 비드는 약 700 \AA 이상의 공극을 포함할 수 있다. 일부 양태에서, 비드는 약 500 \AA 내지 1000 \AA 의 공극을 포함할 수 있다. 일부 양태에서, 비드는 약 700 \AA 내지 800 \AA 의 공극을 포함할 수 있다.

[0929] 일부 양태에서, HIC 컬럼은 약 750 \AA 의 공극을 포함하는 약 35 μM 의 페닐 접합된 수지 비드를 포함할 수 있다. 일부 양태에서, 컬럼은 페닐 650 S 컬럼일 수 있다.

[0930] HIC는 약 0°C 내지 37°C로 수행될 수 있다. 이는 실온(약 15°C 내지 약 25°C)일 수 있다. 이는 약 16°C 내지 약 23°C의 온도일 수 있다.

[0931] 컬럼의 선형 유속은 약 10 내지 약 100 $\text{cm}/\text{시간}$ 일 수 있다. 바람직한 유속은 약 50 내지 약 90 $\text{cm}/\text{시간}$ 일 수 있다.

[0932] 염기 완충액은 약 15 mM 내지 약 100 mM, 바람직하게는 약 20 mM 내지 약 70 mM, 더욱 바람직하게는 약 20 mM 내지 약 50 mM, 가장 바람직하게는 약 20 mM의 농도로 나트륨 포스페이트, 칼륨 포스페이트, 암모늄 포스페이트, HEPES, 트리스 또는 비스-트리스, 바람직하게는 나트륨 포스페이트로 이루어진 군으로부터 선택된 완충제를 포함할 수 있다. 약 5 mM 미만의 농도는 너무 약해 염 농도에 의해 효과적으로 완충될 가능성이 있고, 약 100 mM 이상의 증가된 염 농도는 용액의 가용성에 부정적인 영향을 끼칠 수 있다. pH는 약 6.5 내지

약 7.5, 더욱 바람직하게는 약 6.8 내지 약 7.2, 가장 바람직하게는 약 7일 수 있다.

[0933] 일부 양태에서, 컬럼은 로딩 전 예비-로딩 평형 세척액을 이용할 수 있다. 예비-로딩 평형 세척액은 염기 완충액 및 약 0.5 M 내지 약 1.5 M 염을 포함할 수 있다.

[0934] 일부 양태에서, 컬럼은 로딩-후 평형 세척액을 이용할 수 있고, 이는 염기 완충액을 포함하고 약 0.5 M 내지 약 1.5 M 염을 추가로 포함할 수 있다.

[0935] 임의의 단계(예비-로딩, 로딩 및 로딩-후 평형 완충액 포함)를 위한 염은, 하한치가 약 0.5 M, 0.6 M, 0.7 M, 0.75 M 및 0.8 M로 이루어진 군으로부터 선택되고, 상한치가 약 0.8 M, 0.9 M, 1 M, 1.1 M, 1.2 M, 1.3 M, 1.4 M 및 1.5 M로 이루어진 군으로부터 선택된 농도 범위일 수 있다. 염 농도는 약 0.75 M일 수 있다. 염 농도는 약 0.5 M일 수 있다. 염 농도는 약 1 M일 수 있다. 염은 NaCl, KC1 및 모노나트륨 시트레이트로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있다. 염은 NaCl일 수 있다. 염은 약 1 M의 NaCl일 수 있다.

[0936] 일부 양태에서, 컬럼은 염기 완충액 중 선형 염 구배를 이용할 수 있고, 이때 출발 염 농도는 약 0.5 내지 약 1.5 M, 바람직하게는 약 1 M이고, 최종 농도는 약 0.25 내지 약 0.4 M, 바람직하게는 약 0.3 M 내지 약 0.35 M, 더욱 바람직하게는 약 0.33 M이다. 이는 1 CV당 90 내지 100 mM의 감소와 동일한 구배(예컨대, 약 10 내지 11 CV가 1.5 M 내지 0.5 M의 염 농도를 감소하기 위해 사용될 수 있다)에 걸쳐서 염(특히 NaCl)의 농도에서 감소된 경우, 특히 유리한 결과를 수득할 수 있음을 발견하였다. 따라서, 일부 양태에서, 선형 염 구배는 1 CV당 약 90 mM 내지 100 mM의 염 농도로 감소됨으로써 특징화된다. 따라서, NaCl 구배를 사용한 경우, 약 7 CV당 약 0.65 이상 내지 0.7 M NaCl, 일부 양태에서 약 7 CV당 약 0.67 M NaCl을 유지하는 것이 바람직함이 발견되었다. 선형 구배는 약 4 CV 이상, 바람직하게는 약 4.5 CV 이상, 더욱 바람직하게는 약 5 CV 이상을 포함할 수 있다. 너무 적은 부피의 선형 구배는 매우 급격하게 되는 구배의 곡선을 야기할 수 있고, 이는 미반응성 물질을 용리하기에 불충분한 시간이다. 일부 양태에서, 선형 염 구배는 약 4 내지 약 10 CV를 포함할 수 있다. 일부 양태에서, 선형 염 구배는 약 5 내지 약 7 CV를 포함할 수 있다. 일부 양태에서, 선형 염 구배는 약 7 CV를 포함할 수 있다. 염은 NaCl, KC1 및 모노나트륨 시트레이트로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있다. 염은 NaCl일 수 있다.

[0937] 바람직하게는 이어서, 컬럼은 약 4 CV 내지 약 7 CV, 바람직하게는 약 6 CV, 더욱 바람직하게는 약 5 CV에 대하여 약 0.25 M 내지 약 0.4 M 염(상기한 바와 같음), 바람직하게는 0.33 M 염을 포함하는 염기 완충액 중 플래토 세척액을 이용할 수 있다. 염은 NaCl일 수 있다. NaCl은 0.33 M일 수 있다.

[0938] 이어서, 일부 양태에서, 컬럼은 하한치가 약 1, 2, 3, 4 및 5로 이루어진 군으로부터 선택되고, 상한치가 약 5, 6, 7, 8, 9 및 10으로 이루어진 군으로부터 선택된 CV의 범위에서 염기 완충액을 추가 세척액으로 이용할 수 있고, 이때 범위는 약 1 내지 약 10, 약 2 내지 약 8, 약 3 내지 약 8, 또는 약 5 내지 약 6일 수 있다. 일부 양태에서, 염기 완충액 중 추가 세척액은 약 2 내지 약 3 CV의 염기 완충액이다.

[0939] 일부 양태에서, 컬럼 상 용리는 염기 완충액 및 1,6-헥산다이올의 선형 농도 구배를 사용하여 수행될 수 있다. 용리 선형 구배는 약 0 내지 약 1%, 바람직하게는 약 0%의 1,6-헥산다이올의 초기 농도로부터 약 13%, 약 14%, 약 15%, 약 16%, 약 17%, 약 18%, 약 19%, 약 20%, 약 21% 및 약 22%로 이루어진 군으로부터 선택된 상한치까지 진행될 수 있다. 헥산다이올 용리는 약 0.5 CV 내지 약 3 CV의 용리 완충액의 컬럼 부피에 걸쳐 또는 용리 풀이 수집될 때까지 증가될 수 있다. 일부 양태에서, 염기 완충액, 및 약 13%, 약 14%, 약 15%, 약 16%, 약 17%, 약 18%, 약 19%, 약 20%, 약 21%, 및 22%, 또는 0% 내지 약 22%로 이루어진 군으로부터 선택된 농도의 1,6-헥산다이올을 포함하는 추가 용리 단계는 5 CV 이하 동안, 또는 용리 풀이 수집될 때까지 실행될 수 있다. 일부 양태에서, 총 용리 CV는 약 7 CV이다. 일부 양태에서 총 용리 CV는 약 6 CV이다.

[0940] 비록 20% 헥산다이올이 잘 작동할지라도, 15%가 UF/DF에서 더 나은 유속을 허용함이 밝혀졌다.

[0941] 이어서, 용리된 h38C2는 적합한 완충액(예컨대, pH 6.5 ± 0.3에서 약 10 mM 히스티딘, 약 10 mM 글리신, 약 2% 수크로스)에 정용여과될 수 있다.

[0942] 일부 양태에서, 본 발명은 하기 단계를 포함하는 h38C2 또는 이의 변이체의 샘플의 정제 방법을 제공하고, 이때 2개의 항원 결합 부위는 샘플에서 약 85% 이상의 항체에 항원 결합하는데 완전히 이용가능하다:

[0943] (i) HIC 컬럼을, pH 약 6.5 내지 약 7.5인 약 15 mM 내지 약 100 mM 나트륨 포스페이트, 칼륨 포스페이트 또는 암모늄 포스페이트 HEPES, 트리스 및 비스-트리스를 포함하는 염기 완충액을 포함하고, 약 0.5 M 내지 1.5 M의 제 1 농도의, NaCl, KC1 및 모노나트륨 시트레이트로 이루어진 군으로부터 선택된 염을 추가로 포함하는 예비-

로딩 평형 세척액으로 평형시키되, 상기 HIC 컬럼이 약 50 μm 미만의 직경의 페닐 접합된 수지 비드를 포함하고 약 500 Å 이상의 공극을 포함하는 단계;

- [0944] (ii) 상기 컬럼을, 염기 완충액을 포함하고 제 1 농도의 염을 추가로 포함하는 로딩 완충액 중 약 4 내지 약 80 g/L의 h38C2의 샘플로 로딩하는 단계;
- [0945] (iii) 상기 컬럼을, 염기 완충액 및 제 1 농도의 염을 포함하는 로딩-후 평형 세척액으로 세척하는 단계;
- [0946] (iv) 상기 컬럼을, 염기 완충액을 포함하고 약 1.5 M 내지 약 0.25 M의 염의 선형 농도 구배를 추가로 포함하는 염 구배로 세척하고, 이때 염 농도가 1 CV당 약 90 mM 내지 100 mM만큼 감소되는 것을 특징으로 하는 단계;
- [0947] (v) 상기 컬럼을, 염기 완충액 중 약 0.25 M 내지 약 0.4 M의 염을 약 4 CV 내지 약 8 CV로 포함하는 염 플래토 세척액으로 세척하는 단계;
- [0948] (vi) 컬럼을, 염기 완충액을 포함하는 완충 세척액으로 세척하는 단계;
- [0949] (vii) h38C2를, 약 0.5 CV 내지 약 3 CV가 되도록 또는 용리 풀이 수집될 때까지, 염기 완충액, 및 약 0 내지 약 1%의 1,6-헥산다이올의 농도에서 시작하고 약 13%, 약 14%, 약 15%, 약 16%, 약 17%, 약 18%, 약 19%, 약 20%, 약 21% 및 22%, 약 0% 내지 약 22%로 이루어진 군으로부터 선택된 1,6-헥산다이올의 상한치에서 종료하는 1,6-헥산다이올의 선형 농도 구배를 포함하는 용리 완충액으로 용리하는 단계;
- [0950] (viii) 임의적으로, 5 CV 이하가 되도록 또는 용리 풀이 수집될 때까지, 염기 완충액, 및 약 13%, 약 14%, 약 15%, 약 16%, 약 17%, 약 18%, 약 19%, 약 20%, 약 21% 및 22%, 약 0% 내지 약 22%로 이루어진 군으로부터 선택된 농도의 1,6-헥산다이올을 포함하는 추가 용리 단계를 실행하는 단계.
- [0951] 일부 양태에서, 본 발명은 하기 단계를 포함하는 h38C2 또는 이의 변이체의 샘플의 정제 방법을 제공하고, 이때 2개의 항원 결합 부위는 샘플에서 약 85% 이상의 항체에 항원 결합하는데 완전히 이용가능하다:
- [0952] (i) 페닐 650 S HIC 컬럼을 pH 약 7인 약 20 mM 나트륨 포스페이트, 약 1 M NaCl을 포함하는 예비-로딩 평형 세척액으로 평형시키는 단계;
- [0953] (ii) 컬럼을, 약 20 mM 나트륨 포스페이트(pH 약 7) 중 약 5 내지 약 20 g/L의 h38C2의 샘플로 로딩하는 단계;
- [0954] (iii) 컬럼을, 약 20 mM 나트륨 포스페이트(pH 약 7) 중 약 1 CV의 1 M NaCl을 포함하는 로딩-후 평형 세척액으로 세척하는 단계;
- [0955] (iv) 컬럼을, 20 mM 나트륨 포스페이트(pH 7)를 포함하고 1 CV당 약 90 mM 내지 100 mM만큼 염 농도를 감소시키는 것을 특징으로 하는 약 1 M 내지 약 0.33 M의 NaCl의 선형 농도 구배를 추가로 포함하는 NaCl 구배로 세척하는 단계;
- [0956] (v) 컬럼을, 약 20 mM 나트륨 포스페이트(pH 약 7) 중 약 5 CV의 약 0.33 M의 NaCl을 포함하는 NaCl 플래토 세척액으로 세척하는 단계;
- [0957] (vi) 컬럼을, 약 2 CV의 20 mM 나트륨 포스페이트(pH 약 7)를 포함하는 완충 세척액으로 세척하는 단계;
- [0958] (vii) h38C2를, 약 1 CV가 되도록, 20 mM 나트륨 포스페이트(pH 7) 및 약 0 내지 약 1%의 1,6-헥산다이올의 농도에서 시작하고 약 14%, 약 15% 및 약 16%로 이루어진 군으로부터 선택된 1,6-헥산다이올의 상한치에서 종료하는 1,6-헥산다이올의 선형 농도 구배를 포함하는 용리 완충액으로 용리하는 단계; 및
- [0959] (viii) 약 2 내지 약 5 CV가 되도록 또는 용리 풀이 수집될 때까지, 20 mM 나트륨 포스페이트(pH 7) 및 약 14%, 약 15% 및 약 16%로 이루어진 군으로부터 선택된 농도의 1,6-헥산다이올을 포함하는 추가 용리 단계를 실행하는 단계.

실시예 80: ABC-1 처리 후 지방세포 분석

- [0961] 백색 지방 조직에서 어레이에 의한 유전자 발현 분석 외에, 조직화학적 평가를 ABC-1, Ab-[Ex4]₂ 또는 Ab-[FGF21]₂로 처리된 DIO 마우스의 백색 지방 조직에서 수행하였다. 화합물을 1주에 1회(0 및 7일) 투여하고, 체 중 및 음식 섭취를 1주에 2회 측정하였다. 종료일(10일)에, 1개의 생식선의 백색 지방 저장소를 절단하고, 칭량하고, 고정하고, 파라핀-포매하고, 세포 크기 및 세포사멸의 조직화학적 분석을 위해 절개하였다(터널(TUNEL) 염색). ABC-1은 감소된 지방세포 세포사멸에 대한 경향과 함께 체중 및 지방 조직 습 중량 뿐만 아니라 지방세

포 크기가 현저하게 감소하였다.

표 75

[0962] DIO 마우스에 화합물의 2주 SC 주사 후, 10일째 체중 변화, 음식 섭취, 지방세포 저장소 중량, 지방세포 크기 및 터널 염색

처리	평균 체중 변화(g)	평균 누적 음식 섭취(g)	평균 지방 조직 중량(g)	평균 지방세포 크기 (픽셀 면적)	터널 염색 (픽셀 면적)
비히클	+2.2	30.8	0.6	3336	43.6
ABC-1 10 mg/kg	-7.9	23.6	0.3	1652	32.0
ABC-1 3 mg/kg	-3.6	25.4	0.4	2111	30.8
Ab[Ex4] ₂ 0.3 mg/kg	-1.0	19.2	0.7	3148	48.2
Ab[FGF21] ₂ 10 mg/kg	-2.5	29.4	0.7	2990	41.0

실시예 81: 고지방 식이 후 원숭이에서 ABC-1 효과

[0964] 6 개월 동안 고지방 식이 섭식 후 시노몰구스 원숭이에서 ACB-1의 효능을 조사하기 위해 고안된 연구에서, 8마리의 성숙한 수컷을 1.0 mg/kg(1 및 2주), 3.0 mg/kg(3 및 4주) 및 10 mg/kg(5 및 6주)의 투여량 수준에서 2주 동안 1주에 2회 정맥내로 ABC-1을 투여하였다. 전신 DXA 스캔을 기저에서 및 6주 투여 기간의 끝에 밤새 금식 후 마취하에 수행하였다. 지방 질량, 무지방 신체 질량, 및 골 무기질 함량(BMC)으로 이루어진 3개의 신체 구획의 조성물을 분석하고 추정하였다. 기저 및 1.0 mg/kg 및 3.0 mg/kg 투여 기간 사이에 주목할만한 체중의 변화는 없었다. 그러나, 10.0 mg/kg 처리 끝에서 평균 체중에서 상당한 감소가 관찰되었다(9.0% ± 5.4%의 표준 오차). 평균 신체 질량 지수(BMI) 값은 평균 기저 값에 비교하여 투여 기간(6주)의 끝에서 12.09%까지 낮았다. DXA 신체 조성물 분석은 기저 값에 비해, 약물 복용 기간(6주)의 끝에서 기록된 몸통 및 전신을 수반하는 조직(34.9 ± 12.9%) 및 국지적(35.6 ± 12.9%) 지방% 및 지방 질량(42.1 ± 14.0%)에 대하여 낮은 평균 % 값을 나타내었다. 린 조직 질량, 골 무기질 함량(BMC), 및 총 질량에서 전체 관찰 기간 동안 주목할만한 변화를 나타내지 않았고, ABC-1에 의해 유도된 체중 손실은 지방 질량의 손실에 대하여 유일하게 표적됨을 제안하였다.

표 76

[0965] 6개월 고지방 식이 후 시노몰구스 원숭이에서 ABC-1의 효과

	체중(kg)	BMI(kg/m ²)	DXA에 의한 총 질량(g)	DXA에 의한 린 조직 질량(kg)	DXA에 의한 지방 질량(kg)	DXA에 의한 BMC(kg)
기저선	5.9±0.3	33.6±1.3	6.0±0.3	4.7±0.2	1.1±0.1	0.27±0.02
6주	5.2±0.2	29.6±0.9	5.3±0.3	4.5±0.2	0.58±0.07	0.27±0.02

[0966] 달리 언급하지 않는 한, 용어 "Ab-L1-FGF21 ΔH-A129C"가 특정 실시예의 맥락에서 사용된 경우, 이는 연결기-1(L1)에 서열번호 26의 K⁹⁹를 통해 공유적으로 연결된 항체의 각 암을 갖고, 각각의 L1 분자가 서열번호 10(서열 번호 1의 넘버링에 따라)의 Cys¹²⁹의 티올 기에 공유적을 접합된 h38C2 항체(서열번호 25 및 26)를 지칭한다. 또한, 화합물은 Ab(FGF21 ΔH-A129C-L1)₂, h38C2(FGF21 ΔH-A129C-L1)₂, 및 h38C2(서열번호 10-L1)₂로서 기재될 수 있다. 이는 항체, 특정 연결기 및 FGF21 분자의 서열, 특히 공지된 다형성 부위, L 또는 P일 수 있는 위치 146에서 가능할 수 있음이 명백할 것이다. IFGF21의 P146 및 L146 변이체가 어떠한 생물학적 차이를 나타내지 않음이 주목된다.

[0967] 비대칭 이작용성 접합(ABC) 분자, 및 이의 중간체 및 유도체가 특정 실시예의 맥락에서 기재된 경우, 첨자 1 또는 2는 항체당 접합된 웨티드 연결기 또는 웨티드 연결기 종의 번호를 나타낸다.

[0968] 문자가 연결기 군 또는 화학 변수(예컨대, 인식 기를 정의하기 위한 Y)를 기재하는 맥락에서 사용되는 경우, 화학식은 단일 문자에 의해 나타낸 화학식과 IUPAC 코드의 한 문자에 의해 나타낸 아미노산 또는 뉴클레오티드 사이의 임의의 가능한 혼돈을 방지하기 위해 문자의 대문자 및 소문자의 조합 또는 이중 소문자로 나타낼 수

있다. 따라서, 인식 기로서 Y는 또한 Yy 또는 yy로서 기재될 수 있다.

[0969] 따라서, 본 발명은 상기 기재된 대표적인 실시양태에 관하여 광범위하게 시작되고 예시되었다. 당업자는 다양한 개질이 본 발명의 사상 및 범주를 벗어나지 않고 만들어질 수 있음을 인지할 것이다. 모든 특허, 특히 출원 및 허여된 특허는 각각의 개별 간행물, 특히 출원 또는 허여된 특허가 특이적으로 및 개별적으로 이의 전체를 참고로서 혼입하여 나타내는 바와 동일한 정도까지 참고로 본원에 혼입되었다. 참고로 혼입된 텍스트에 함유된 정의는 본원에서의 정의와 모순되는 범위에서 배제된다.

[0970] 또한, 명확성을 위해 별개의 실시양태의 맥락에서 기재된 본 발명의 특정 특징이 단일 실시양태와 조합하여 제공될 수 있음을 이해해야 한다. 반대로, 간결성을 위해 단일 실시양태의 맥락에서 기재된 본 발명의 다양한 특징은 또한 별도로 또는 임의의 적합한 하위조합으로 제공될 수 있다.

[0971] 본 발명의 하나의 실시양태에 관해 논의된 임의의 제한은 본 발명의 임의의 다른 실시양태에 적용될 수 있음이 구체적으로 고려된다. 또한, 본 발명의 임의의 조성물이 본 발명의 임의의 방법에 사용될 수 있고, 본 발명의 임의의 방법은 본 발명의 임의의 조성물을 생성하거나 이용하기 위해 사용될 수 있다. 특히, 특허청구범위 단독으로 또는 하나 이상의 추가 특허청구범위와 조합하여 기재된 본 발명의 임의의 양상 및/또는 명세서의 양상은 특허청구범위 및/또는 명세서 어디서든지 나타낸 본 발명의 다른 양상과 회합가능한 것으로 이해되어야 한다.

[0972] 비록 시작내용이 대안적으로만 및 "및/또는"을 나타내는 정의를 지지할지라도, 특허청구범위에서 용어 "또는"의 사용은 대안적으로만 또는 대안이 상호 배타적으로 언급되도록 명시적으로 나타내지 않는 한 "및/또는"을 의미하기 위해 사용된다.

[0973] 명세서에 사용된 단수형은 달리 명백히 언급하지 않는 한 하나 이상을 의미할 수 있다. 특허청구범위에 사용된 단수형은 단어 "포함하는"과 함께 사용된 경우 하나 초과를 의미할 수 있다. 본원에 사용된 "또 하나"는 적어도 제 2 이상을 의미할 수 있다.

[0974] 본 발명에 대해 본원에서 사용된 어구 "포함하다/포함하는(comprises/comprising)" 및 어구 "갖는/포함하는(having/including)"은 지시된 특징, 정수, 단계 또는 성분의 존재를 규정하는데 사용되나, 하나 이상의 다른 특징, 정수, 단계, 성분 또는 이들의 군의 존재 또는 부가를 제외하지 않는다.

표 57

[FGF21]-[제 1 연결기]-[황체]-[제 2 연결기]-[Ex4](ABC-1)의 제조

제형	단백질 (mg/mL)	pH	외형 (NTU)								SE-HPLC (%HMW)							
			1주 5°C		2주 5°C		1주 25°C		2주 25°C		1주 40°C		2주 5°C		1주 25°C		2주 40°C	
			조기	5°C	조기	5°C	조기	25°C	조기	40°C	조기	5°C	조기	25°C	조기	25°C	조기	40°C
A 20 mM 나이트로 아세ти아트, pH 4.0	7-9	4.0	4	6	4	6	3	4	11	2.7	2.3	2.4	2.3	2.5	2.5	3.0	4.3	
B 20 mM 글루탐산, pH 4.0	7-9	4.0	6	7	4	4	3	3	6	2.5	2.2	2.3	2.2	2.1	2.0	2.0	2.0	
C 20 mM 라이트산, pH 4.8	7-9	4.8	4	6	6	11	28	75	40	2.7	2.5	2.6	2.6	2.7	3.8	5.2		
D 20 mM 히스티딘, pH 5.8	7-9	5.9	5	7	4	5	28	334	357	4.3	4.5	4.8	4.0	4.2	3.8	4.0		
E 20 mM 나이트로 포스페이트, pH 8.0	7-9	7.9	7	8	4	7	8	6	7	4.0	4.6	5.1	6.8	7.2	5.4	5.6		

[0975]

표 58

[FGF21]-[제 1 연결기]-[황체]-[제 2 연결기]-[Ex4](ABC-1)의 외관 및 UV
색상

제형	색상 (NTU)						노도 (mg/mL)	
	초기	1 주 30°C	2 주 25°C	2 주 30°C	초기	1 주 30°C	2 주 25°C	2 주 30°C
A 20 mM 시트르산, pH 4.2	12	530	296	362	8.1	5.5	5.9	5.5
B 20 mM 시트르산, pH 4.5	84	519	580	528	8.4	5.0	5.3	4.8
C 20 mM 시트르산, pH 4.8	55	498	522	530	8.0	4.8	5.3	4.4
D 20 mM 글루탐산, pH 4.2	7	6	5	3	8.4	8.3	8.6	8.5
E 20 mM 글루탐산, pH 4.5	7	7	6	6	8.3	8.3	8.5	8.5
F 20 mM 글루탐산, pH 4.8	6	58	17	34	8.3	8.4	8.7	8.6
G 20 mM 락트산, pH 4.2	6	5	6	5	8.3	8.4	8.7	8.6
H 20 mM 락트산, pH 4.5	8	9	7	9	8.4	8.4	8.7	8.6
I 20 mM 속신산, pH 4.2	6	4	7	7	8.3	8.4	8.6	8.5
J 20 mM 속신산, pH 4.5	7	13	9	13	8.3	8.5	8.6	8.7
K 20 mM 속신산, pH 4.8	6	315	39	291	8.3	8.2	8.6	8.2
L 20 mM 속신산, pH 5.3	6	390	12	368	8.2	8.1	8.5	8.1

표 61

[FGF21]-[제 1 연결기]-[황체]-[제 2 연결기]-[Ex4](ABC-1)의 동결

건조된 제형(Liq=액체, Lyo=동결건조)

ID	단백질 농도 (mg/mL)	완충액	pH	부형제	액체/동 결건조	5°C에서 4주 후		25°C에서 4주 후		25°C에서 4주 후		25°C에서 4주 후	
						% 초기에서 % 판정	W	% 초기에서 % 판정	W	% 초기에서 % 판정	W	% 초기에서 % 판정	W
A	15	20 mM 글루탐-산	4.5	트레할로스 이수화물, 0.05 mg/mL EMTA, 0.5 mg/mL PS80	액체	1.0	1.2	1.7	39.62	49.61	1.3	2.3	
B	30	20 mM 글루탐-산	4.5	트레할로스 이수화물, 0.05 mg/mL EMTA, 0.5 mg/mL PS80	동결 건조	1.4	1.5	1.6	42.19	41.63	1.5	1.5	

표 62

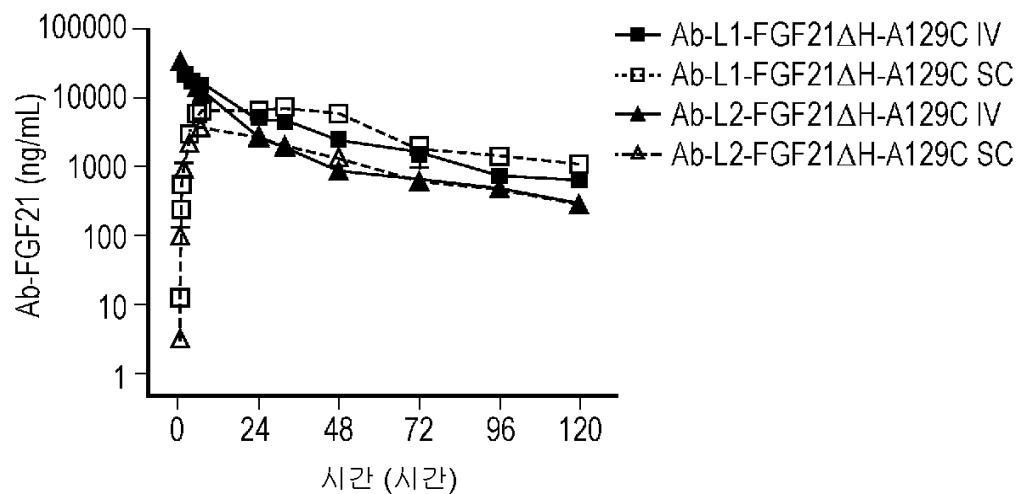
표 61에 나열된 [FGF21]-[제 1 연결기]-[항체]-[제 2 연결기]-[Ex4]의 선택
건조된 제형의 생활성(상대적인%) 데이터

시험	동결건조 후 생활성 t=0		5°C에서 1개월 후		25°C에서 1개월 후		5°C에서 3개월 후		25°C에서 3개월 후	
	생활성	생활성	생활성	생활성	생활성	생활성	생활성	생활성	생활성	생활성
FGF21	93.0	89	78	87	99					
Ex4	116.0	127	113	112	124					

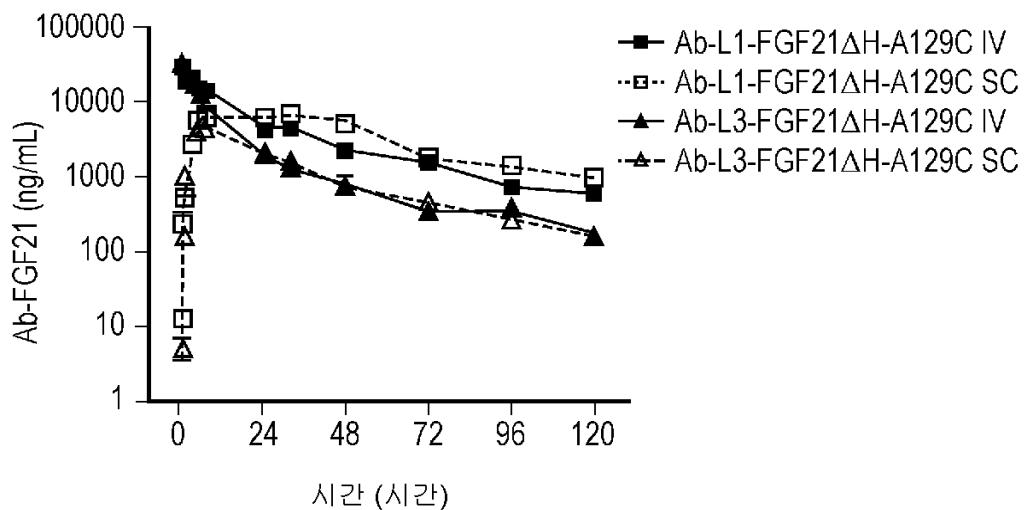
도면

도면1

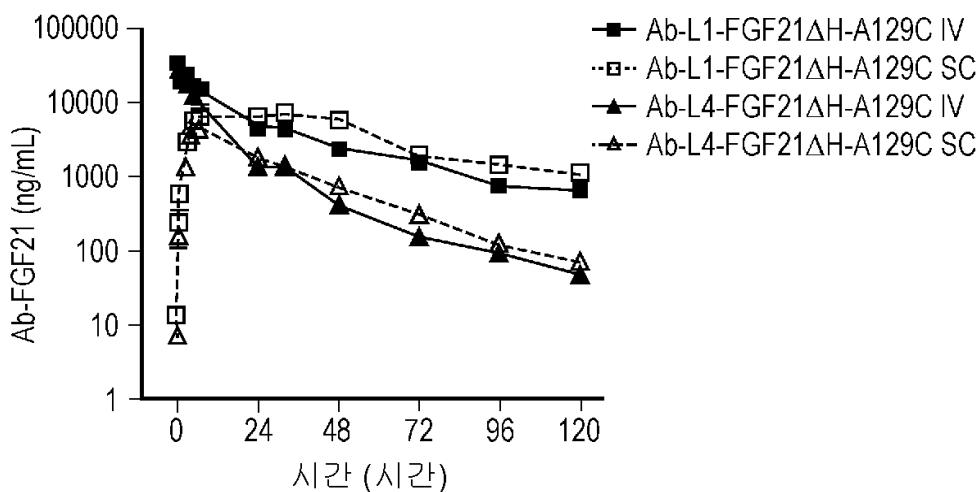
도면2a



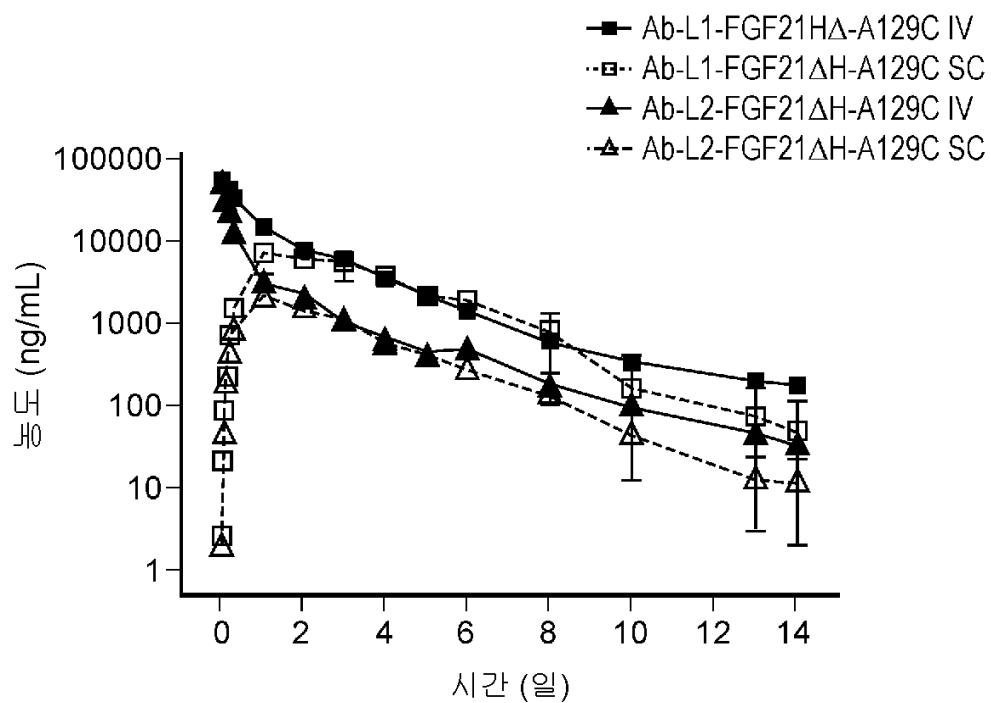
도면2b



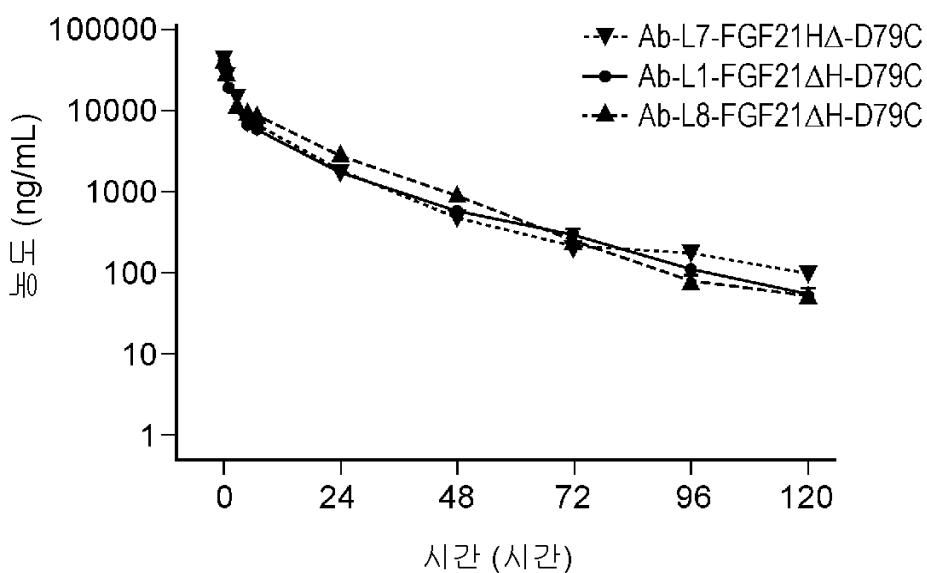
도면2c



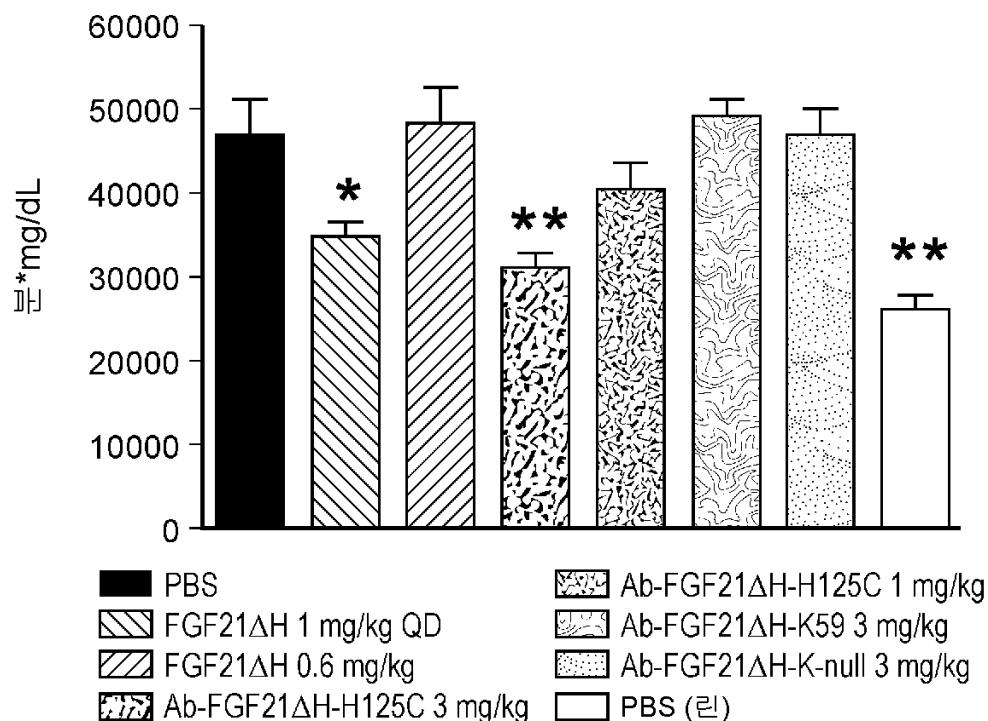
도면3a



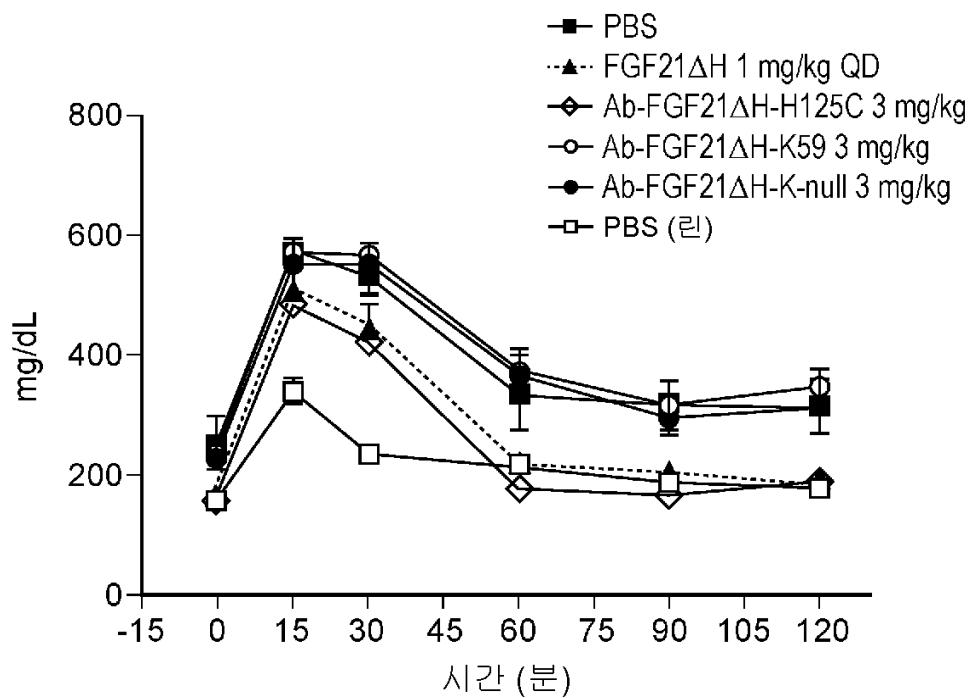
도면3b



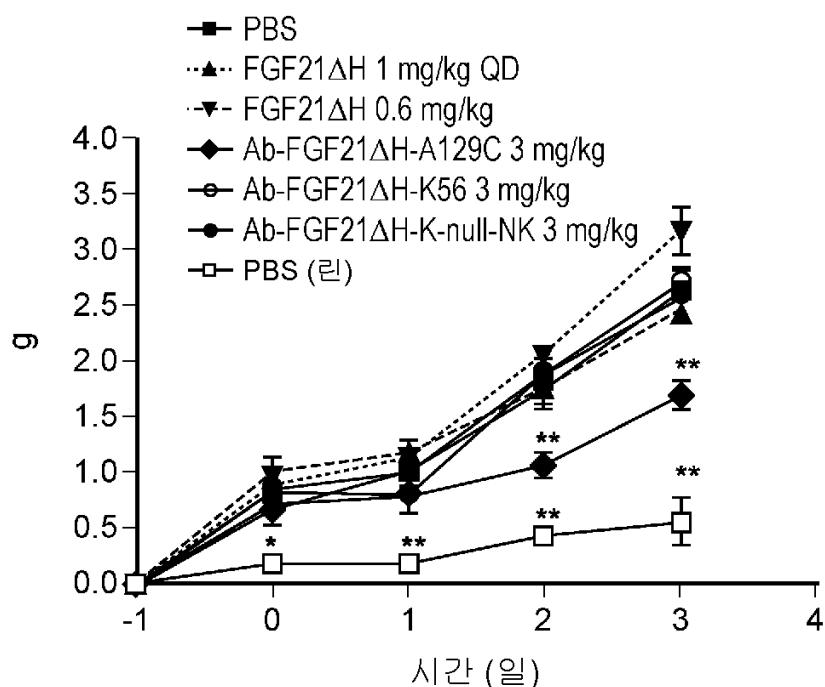
도면4a



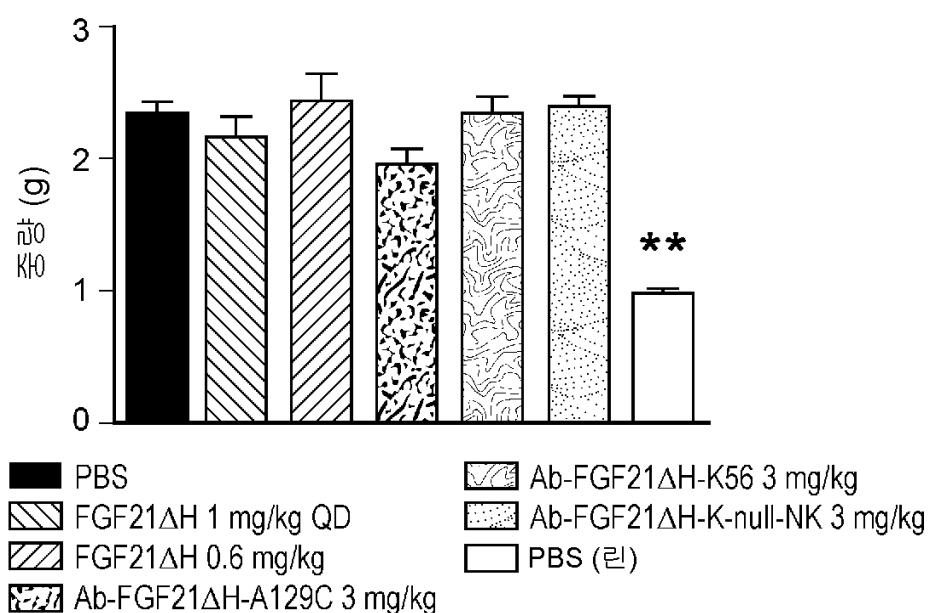
도면4b



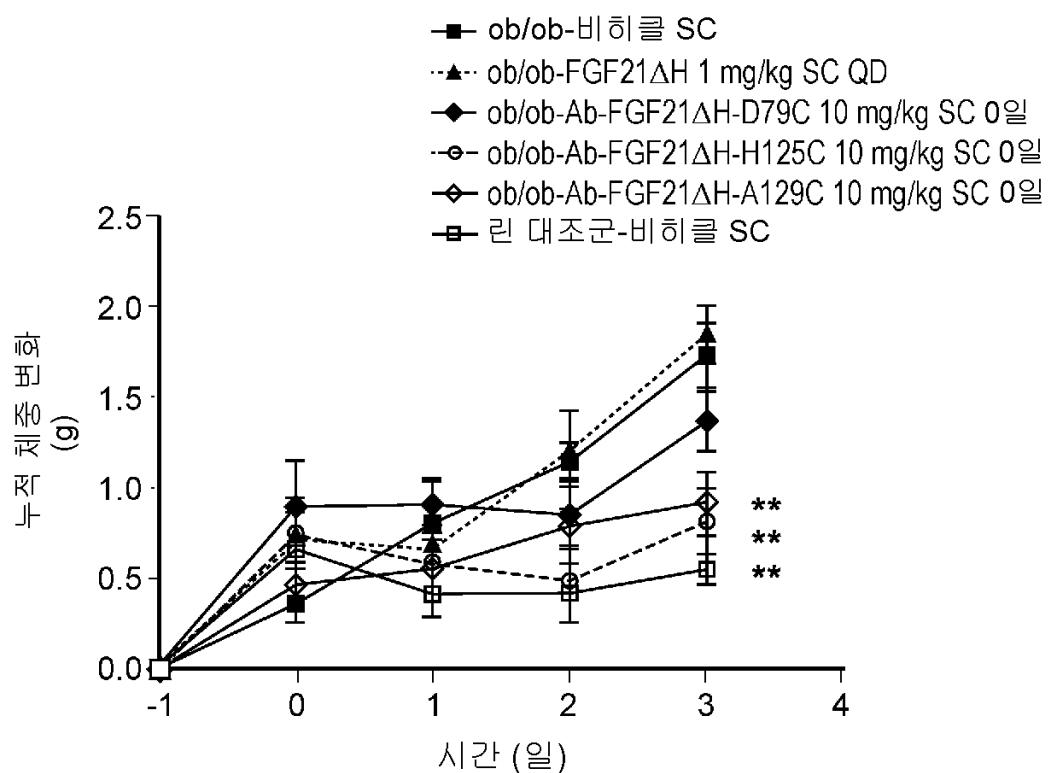
도면5a



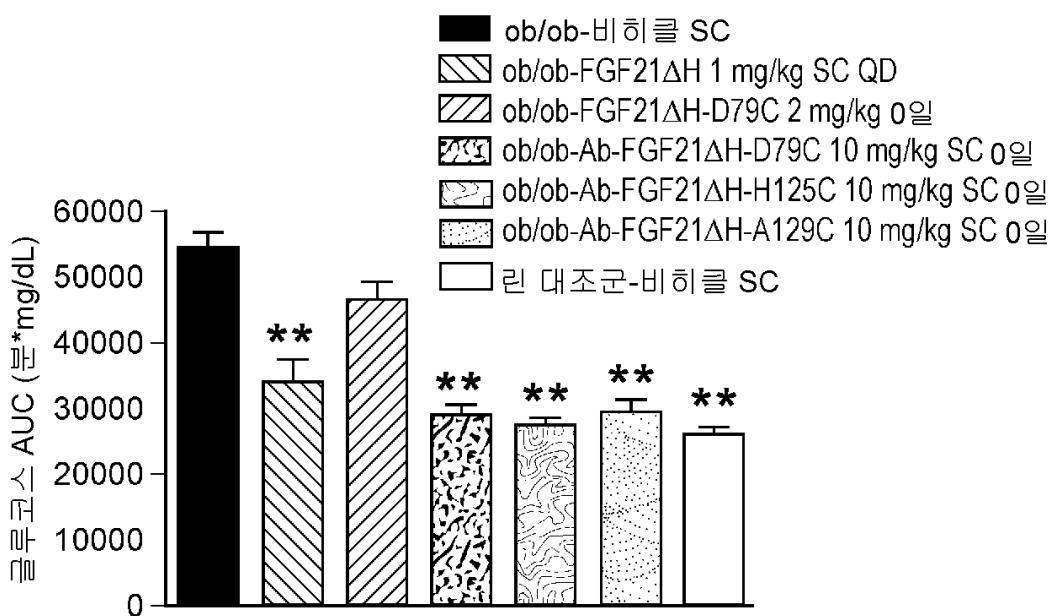
도면5b



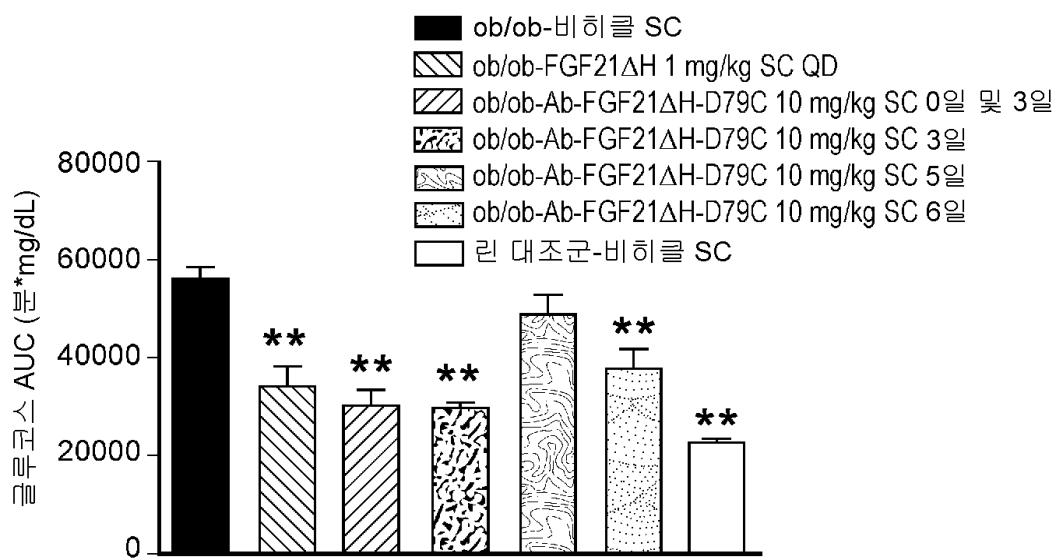
도면6a



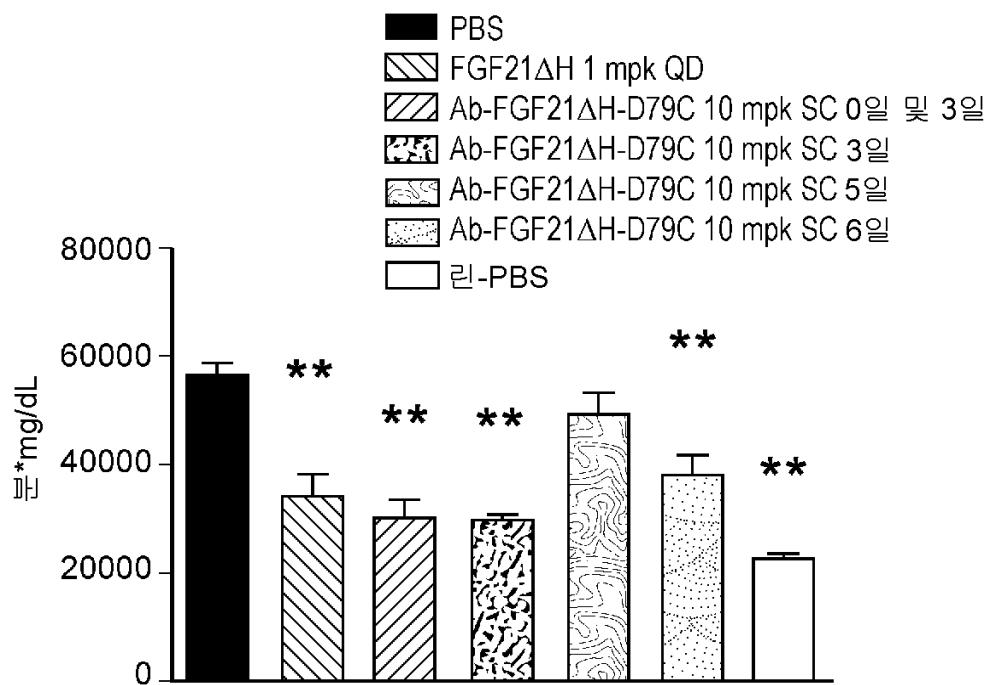
도면6b



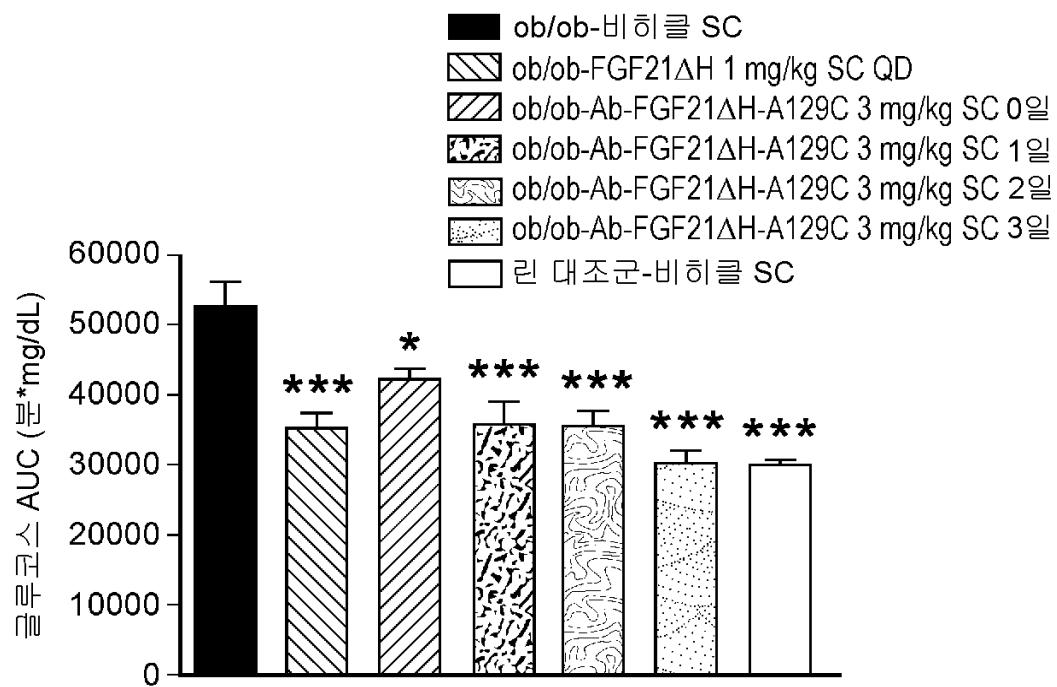
도면6c



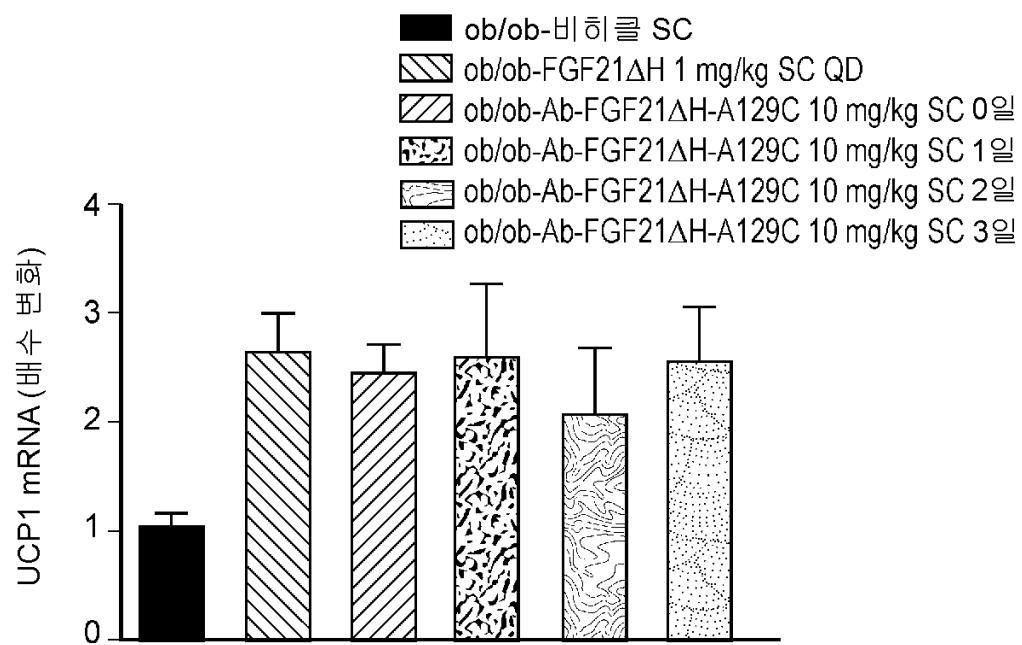
도면6d



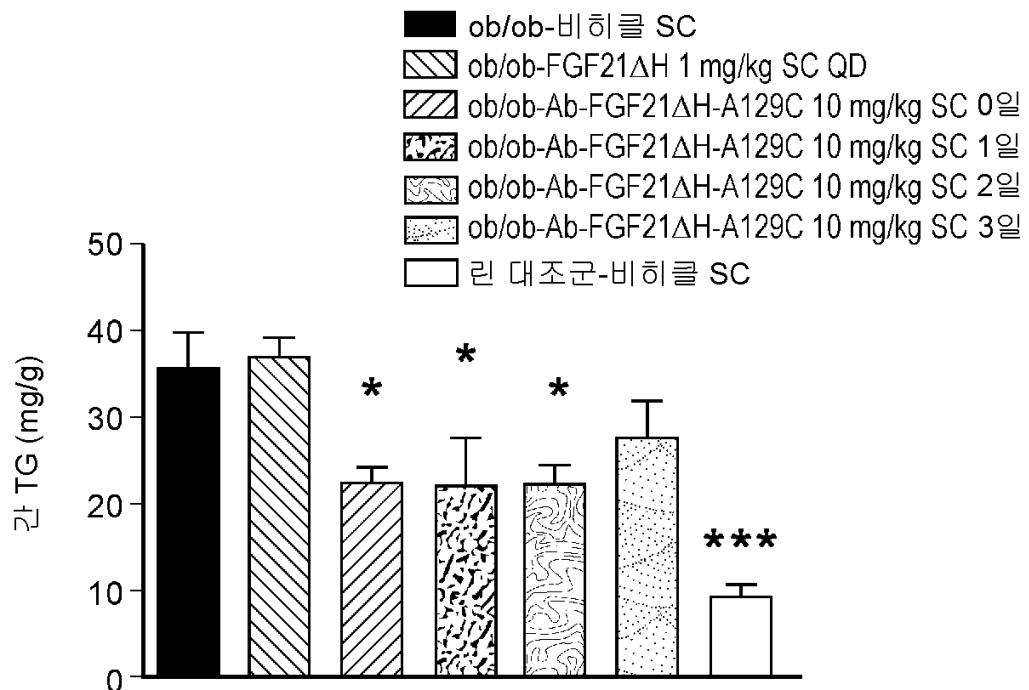
도면6e



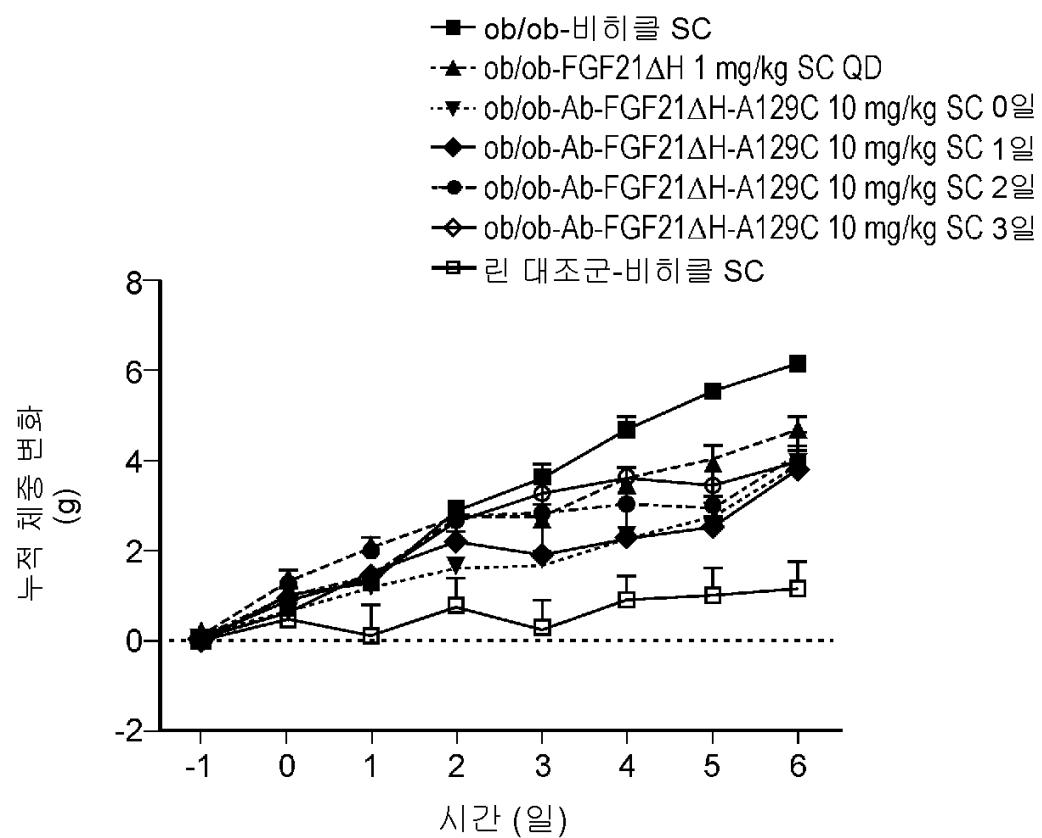
도면6f



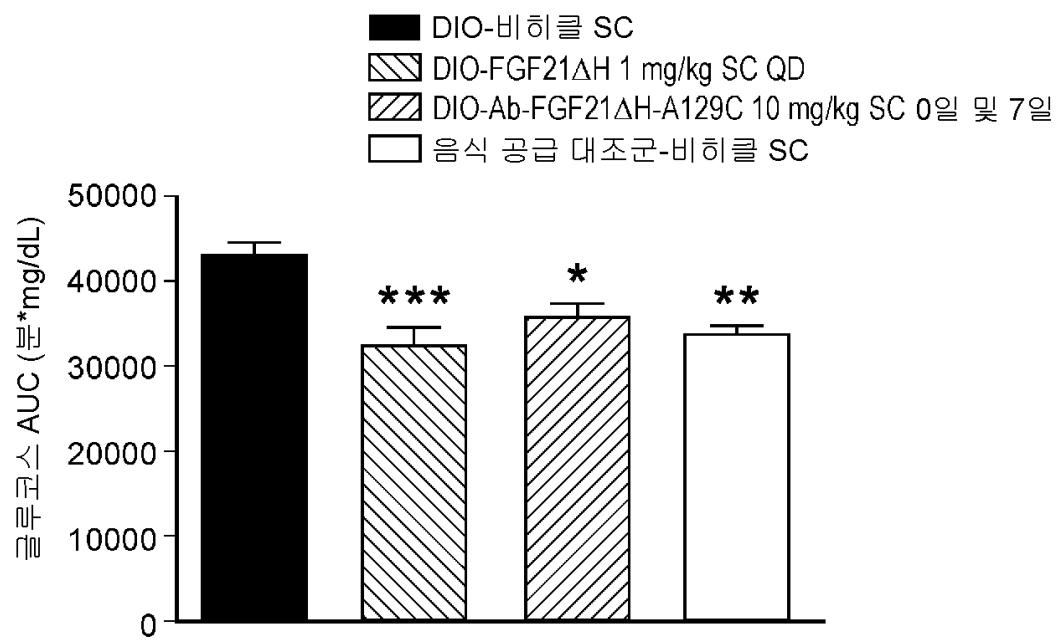
도면6g



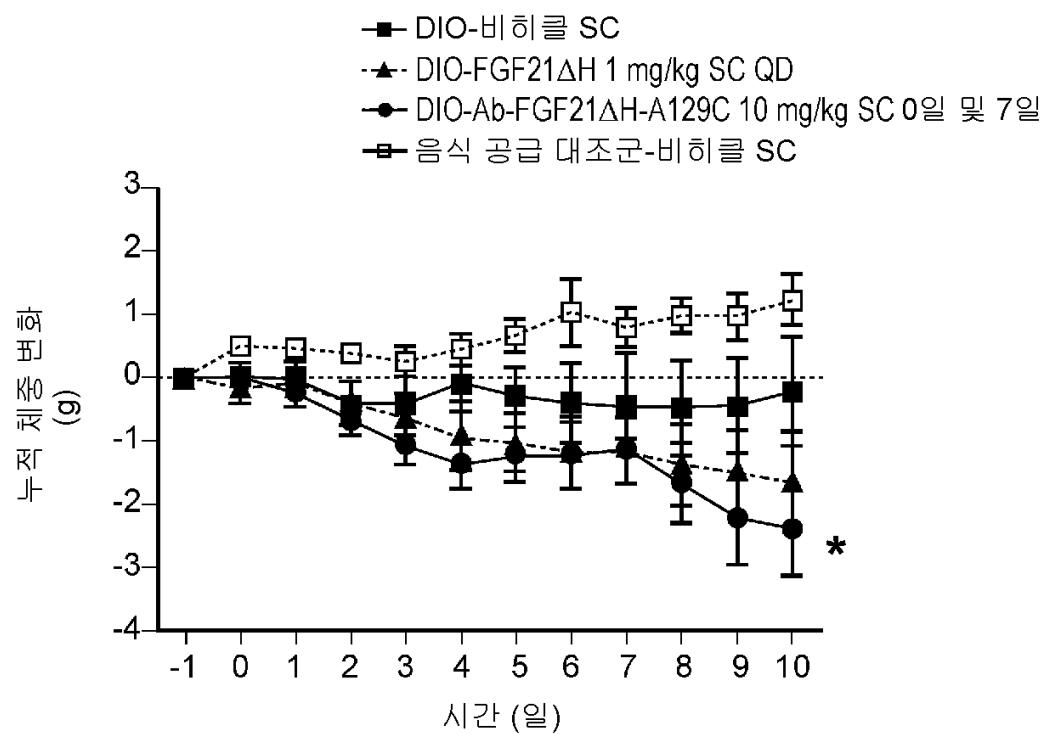
도면6h



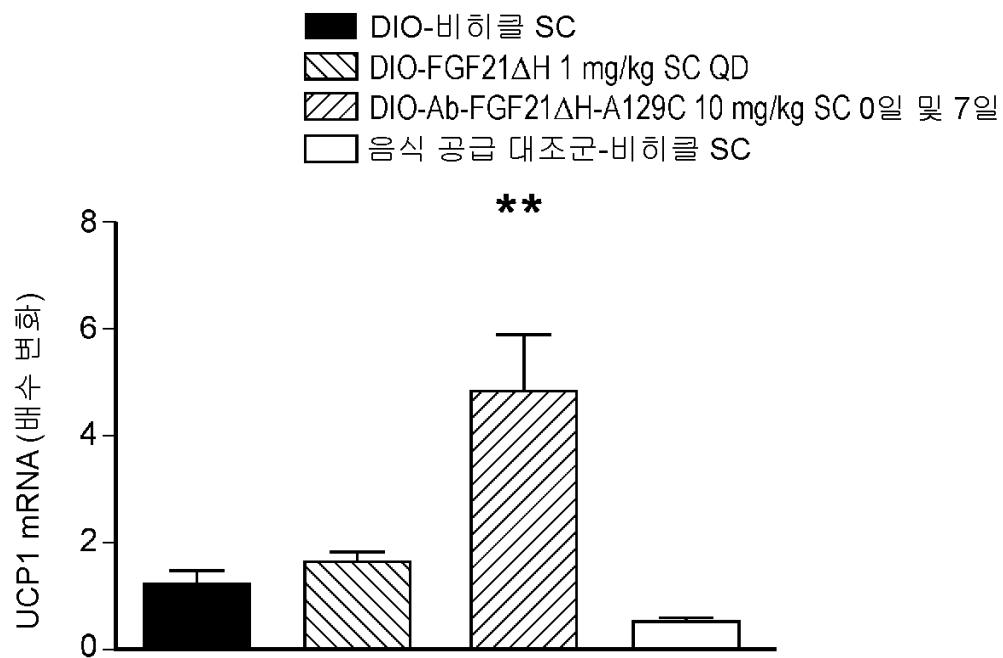
도면7a



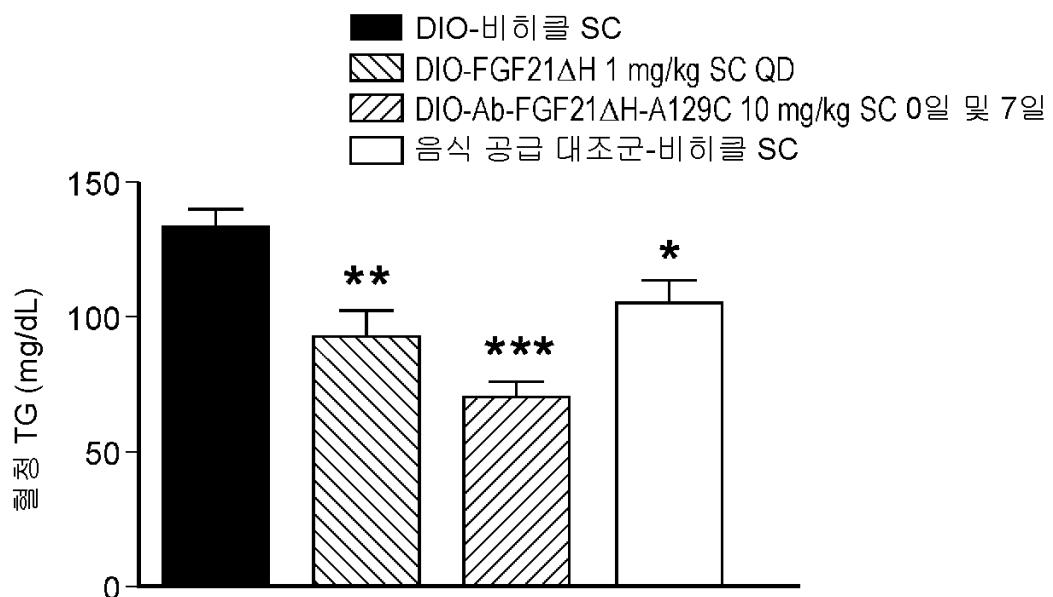
도면7b



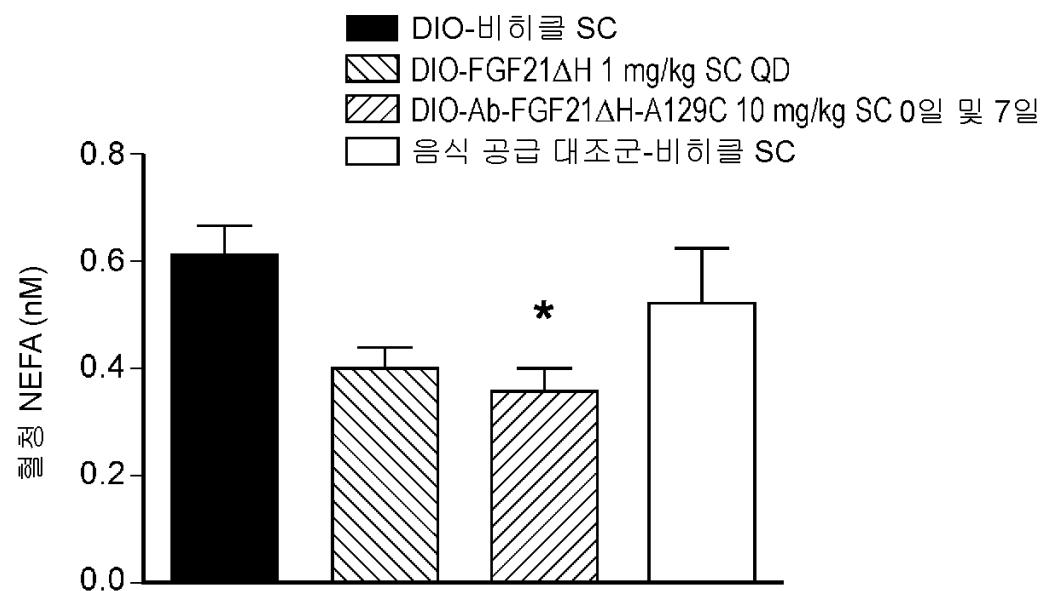
도면7c



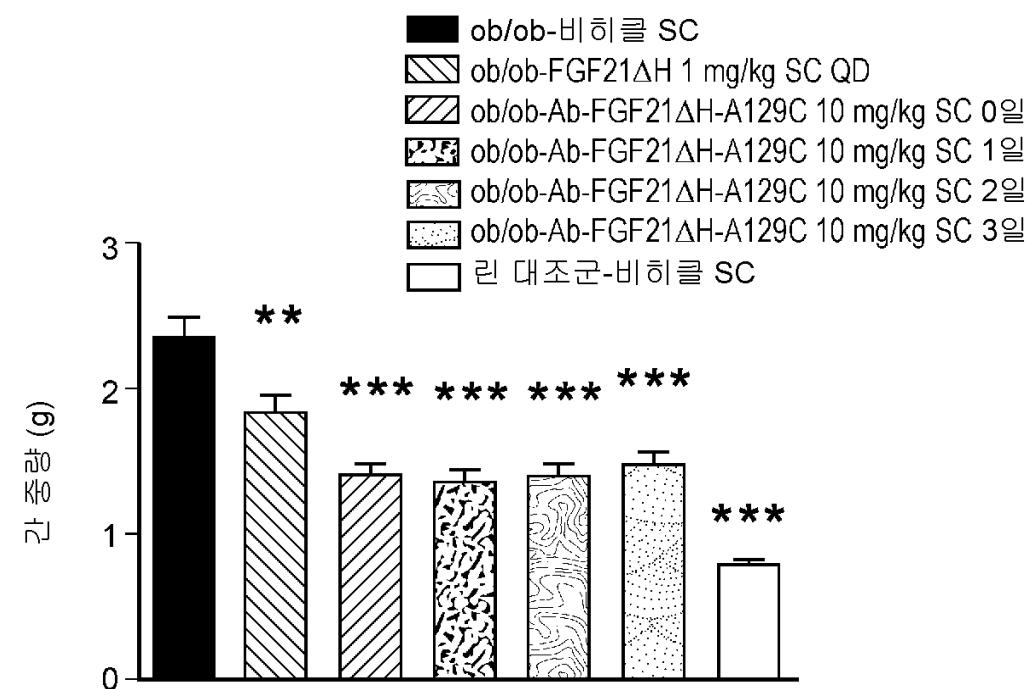
도면7d



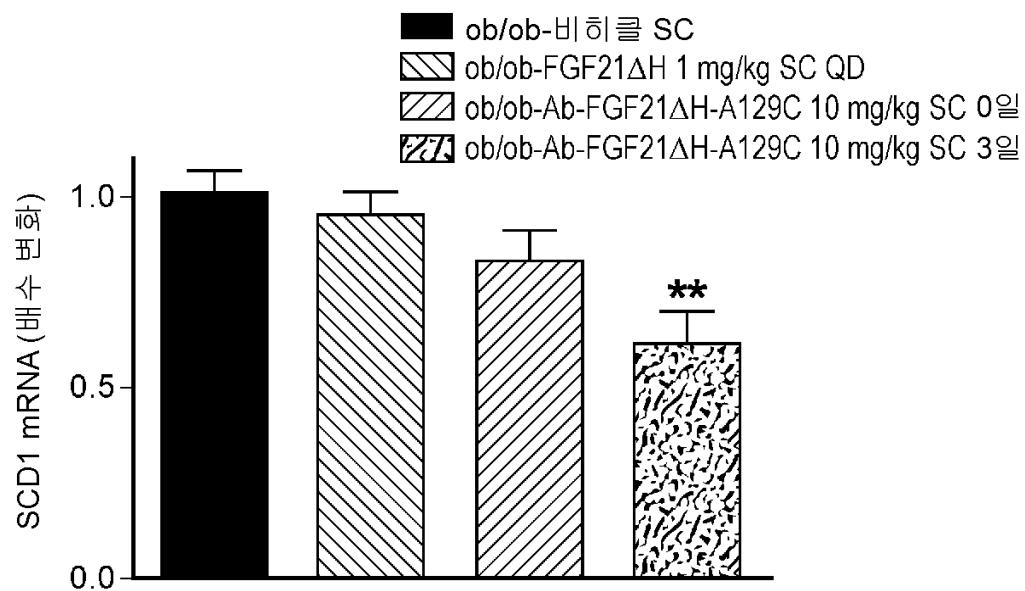
도면7e



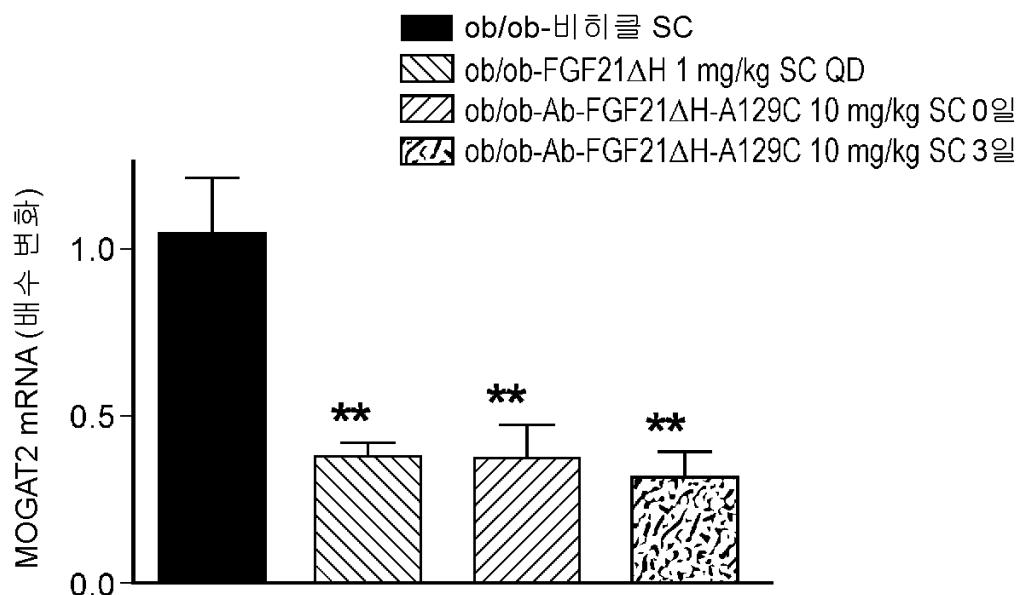
도면7f



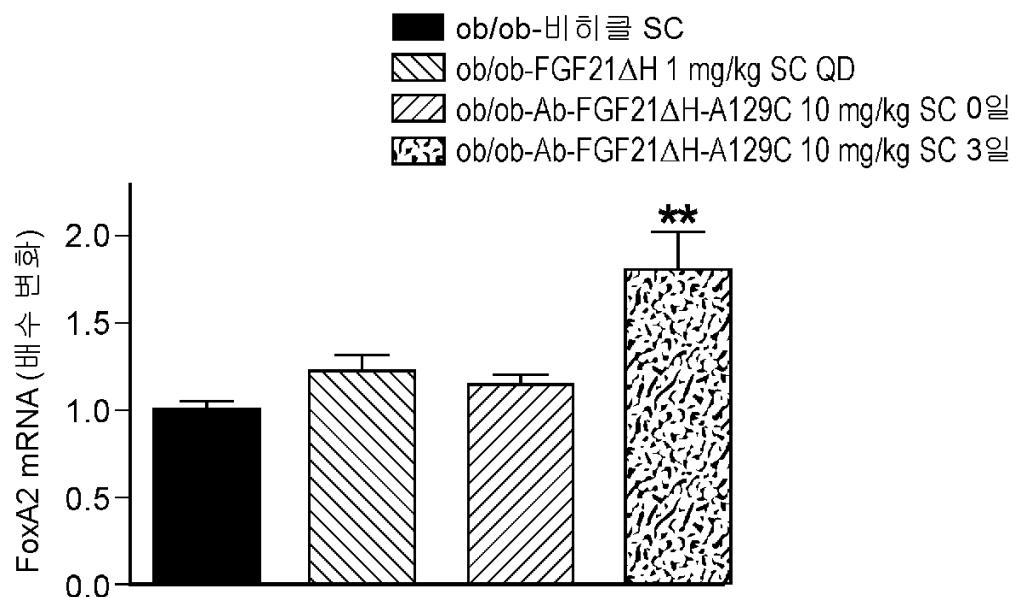
도면7g



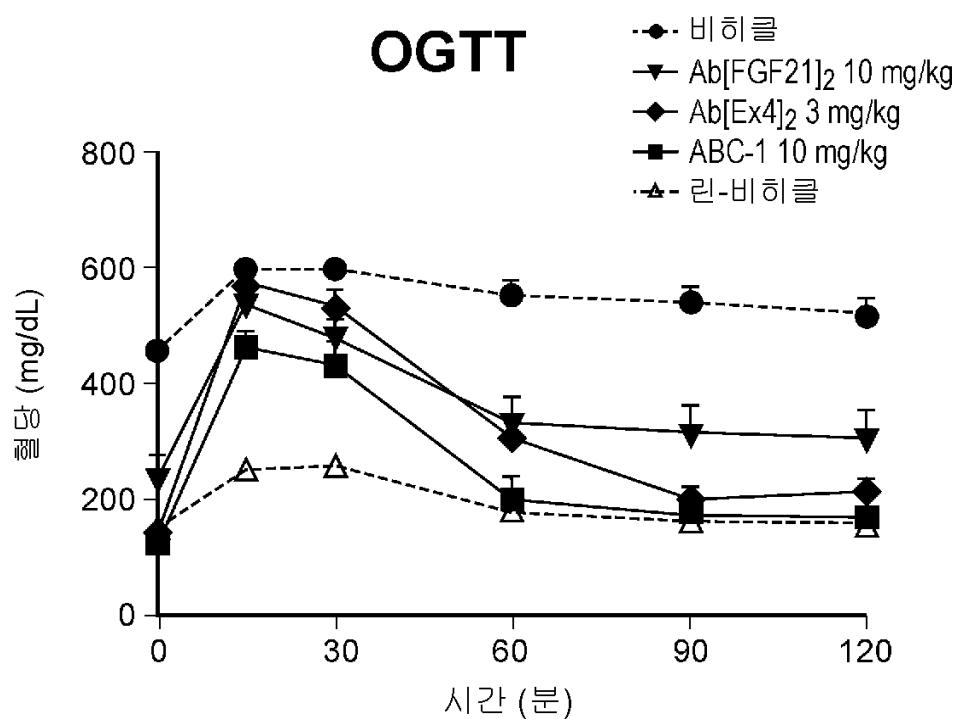
도면7h



도면7i



도면8



서 열 목 록

<110> Pfizer Inc.

CovX Technologies Ireland Limited

<120> Anti-Diabetic Compounds

<130> PC71861A

<140> PCT/IB2012/057227

<141> 2012-12-12

<150> US 61/579,609

<151> 2011-12-22

<150> US 61/644,831

<151> 2012-05-09

<160> 82

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 181

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(1)

<223> X = H or absent

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (146)..(146)

<223> X = L or P

<400> 1

Xaa Pro Ile Pro Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly Gly Gln Val

1 5 10 15

Arg Gln Arg Tyr Leu Tyr Thr Asp Asp Ala Gln Gln Thr Glu Ala His

20 25 30

Leu Glu Ile Arg Glu Asp Gly Thr Val Gly Ala Ala Asp Gln Ser

35 40 45

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

50 55 60

Ile Leu Gly Val Lys Thr Ser Arg Phe Leu Cys Gln Arg Pro Asp Gly

65 70 75 80

Ala Leu Tyr Gly Ser Leu His Phe Asp Pro Glu Ala Cys Ser Phe Arg

85 90 95

Glu Leu Leu Leu Glu Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser Glu Ala His
 100 105 110
 Gly Leu Pro Leu His Leu Pro Gly Asn Lys Ser Pro His Arg Asp Pro
 115 120 125

Ala Pro Arg Gly Pro Ala Arg Phe Leu Pro Leu Pro Gly Leu Pro Pro
 130 135 140
 Ala Xaa Pro Glu Pro Pro Gly Ile Leu Ala Pro Gln Pro Pro Asp Val
 145 150 155 160
 Gly Ser Ser Asp Pro Leu Ser Met Val Gly Pro Ser Gln Gly Arg Ser
 165 170 175
 Pro Ser Tyr Ala Ser
 180

<210> 2

<211> 180

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

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

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

115

120

125

Pro Arg Gly Pro Ala Arg Phe Leu Pro Leu Pro Gly Leu Pro Pro Ala

130

135

140

Leu Pro Glu Pro Pro Gly Ile Leu Ala Pro Gln Pro Pro Asp Val Gly

145 150 155 160

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

165

170

175

Ser Tyr Ala Ser

180

<210> 3

<211> 181

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(1)

<223> X = H or absent

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (79)..(79)

<223> X = D or C

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (125)..(125)

<223> X = H or C

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (129)..(129)

<223> X = A or C

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (146)..(146)

<223> X = P or L

<400> 3

Xaa Pro Ile Pro Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly Gly Gln Val

1 5 10 15

Arg Gln Arg Tyr Leu Tyr Thr Asp Asp Ala Gln Gln Thr Glu Ala His

20	25	30	
Leu Glu Ile Arg Glu Asp Gly Thr Val Gly Ala Ala Asp Gln Ser			
35	40	45	
Pro Glu Ser Leu Leu Gln Leu Lys Ala Leu Lys Pro Gly Val Ile Gln			
50	55	60	
Ile Leu Gly Val Lys Thr Ser Arg Phe Leu Cys Gln Arg Pro Xaa Gly			
65	70	75	80
Ala Leu Tyr Gly Ser Leu His Phe Asp Pro Glu Ala Cys Ser Phe Arg			
85	90	95	
Glu Leu Leu Leu Glu Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser Glu Ala His			
100	105	110	
Gly Leu Pro Leu His Leu Pro Gly Asn Lys Ser Pro Xaa Arg Asp Pro			
115	120	125	
Xaa Pro Arg Gly Pro Ala Arg Phe Leu Pro Leu Pro Gly Leu Pro Pro			
130	135	140	
Ala Xaa Pro Glu Pro Pro Gly Ile Leu Ala Pro Gln Pro Pro Asp Val			
145	150	155	160
Gly Ser Ser Asp Pro Leu Ser Met Val Gly Pro Ser Gln Gly Arg Ser			
165	170	175	
Pro Ser Tyr Ala Ser			
180			
<210> 4			
<211> 181			
<212> PRT			
<213> Homo sapiens			
<220><221> MISC_FEATURE			
<222> (1)..(1)			
<223> X = H or Absent			
<220><221> MISC_FEATURE			
<222> (125)..(125)			
<223> X = C or H			
<220><221> MISC_FEATURE			
<222> (129)..(129)			

<223> X = A or C

<220>

><221> MISC_FEATURE

<222> (146)..(146)

<223> X = L or P

<400> 4

Xaa Pro Ile Pro Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly Gly Gln Val

1 5 10 15

Arg Gln Arg Tyr Leu Tyr Thr Asp Asp Ala Gln Gln Thr Glu Ala His

20 25 30

Leu Glu Ile Arg Glu Asp Gly Thr Val Gly Ala Ala Asp Gln Ser

35 40 45

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

50 55 60

Ile Leu Gly Val Lys Thr Ser Arg Phe Leu Cys Gln Arg Pro Asp Gly

65 70 75 80

Ala Leu Tyr Gly Ser Leu His Phe Asp Pro Glu Ala Cys Ser Phe Arg

85 90 95

Glu Leu Leu Leu Glu Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser Glu Ala His

100 105 110

Gly Leu Pro Leu His Leu Pro Gly Asn Lys Ser Pro Xaa Arg Asp Pro

115 120 125

Xaa Pro Arg Gly Pro Ala Arg Phe Leu Pro Gly Leu Pro Pro

130 135 140

Ala Xaa Pro Glu Pro Pro Gly Ile Leu Ala Pro Gln Pro Pro Asp Val

145 150 155 160

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

165 170 175

Pro Ser Tyr Ala Ser

180

<210>

> 5

<211> 181

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(1)

<223> X = H or Absent

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (146)..(146)

<223> X = L or P

<400> 5

Xaa Pro Ile Pro Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly Gly Gln Val

1 5 10 15

Arg Gln Arg Tyr Leu Tyr Thr Asp Asp Ala Gln Gln Thr Glu Ala His

20 25 30

Leu Glu Ile Arg Glu Asp Gly Thr Val Gly Ala Ala Asp Gln Ser

35 40 45

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

50 55 60

Ile Leu Gly Val Lys Thr Ser Arg Phe Leu Cys Gln Arg Pro Asp Gly

65 70 75 80

Ala Leu Tyr Gly Ser Leu His Phe Asp Pro Glu Ala Cys Ser Phe Arg

85 90 95

Glu Leu Leu Leu Glu Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser Glu Ala His

100 105 110

Gly Leu Pro Leu His Leu Pro Gly Asn Lys Ser Pro Cys Arg Asp Pro

115 120 125

Ala Pro Arg Gly Pro Ala Arg Phe Leu Pro Leu Pro Gly Leu Pro Pro

130 135 140

Ala Xaa Pro Glu Pro Pro Gly Ile Leu Ala Pro Gln Pro Pro Asp Val

145 150 155 160

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

165 170 175

Pro Ser Tyr Ala Ser

180

<210> 6

<211> 180

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 6

Pro Ile Pro Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly Gly Gln Val Arg

1 5 10 15

Gln Arg Tyr Leu Tyr Thr Asp Asp Ala Gln Gln Thr Glu Ala His Leu

20 25 30

Glu Ile Arg Glu Asp Gly Thr Val Gly Gly Ala Ala Asp Gln Ser Pro

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

Leu Tyr Gly Ser Leu His Phe Asp Pro Glu Ala Cys Ser Phe Arg Glu

85 90 95

Leu Leu Leu Glu Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser Glu Ala His Gly

100 105 110

Leu Pro Leu His Leu Pro Gly Asn Lys Ser Pro Cys Arg Asp Pro Ala

115 120 125

Pro Arg Gly Pro Ala Arg Phe Leu Pro Leu Pro Gly Leu Pro Pro Ala

130 135 140

Pro Pro Glu Pro Pro Gly Ile Leu Ala Pro Gln Pro Pro Asp Val Gly

145 150 155 160

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

165 170 175

Ser Tyr Ala Ser

180

<210> 7

<211> 180

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 7

Pro Ile Pro Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly Gly Gln Val Arg

1 5 10 15

Gln Arg Tyr Leu Tyr Thr Asp Asp Ala Gln Gln Thr Glu Ala His Leu

20 25 30

Glu Ile Arg Glu Asp Gly Thr Val Gly Ala Ala Asp Gln Ser Pro

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

Leu Tyr Gly Ser Leu His Phe Asp Pro Glu Ala Cys Ser Phe Arg Glu

85 90 95

Leu Leu Leu Glu Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser Glu Ala His Gly

100 105 110

Leu Pro Leu His Leu Pro Gly Asn Lys Ser Pro Cys Arg Asp Pro Ala

115 120 125

Pro Arg Gly Pro Ala Arg Phe Leu Pro Leu Pro Gly Leu Pro Pro Ala

130 135 140

Leu Pro Glu Pro Pro Gly Ile Leu Ala Pro Gln Pro Pro Asp Val Gly

145 150 155 160

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

165 170 175

Ser Tyr Ala Ser

180

<210> 8

<211> 181

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(1)

<223> X = H or Absent

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (146)..(146)

<223> X = L or P

<400> 8

Xaa Pro Ile Pro Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly Gly Gln Val

1 5 10 15

Arg Gln Arg Tyr Leu Tyr Thr Asp Asp Ala Gln Gln Thr Glu Ala His

20 25 30

Leu Glu Ile Arg Glu Asp Gly Thr Val Gly Gly Ala Ala Asp Gln Ser

35 40 45

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

50 55 60

Ile Leu Gly Val Lys Thr Ser Arg Phe Leu Cys Gln Arg Pro Asp Gly

65 70 75 80

Ala Leu Tyr Gly Ser Leu His Phe Asp Pro Glu Ala Cys Ser Phe Arg

85 90 95

Glu Leu Leu Leu Glu Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser Glu Ala His

100 105 110

Gly Leu Pro Leu His Leu Pro Gly Asn Lys Ser Pro His Arg Asp Pro

115 120 125

Cys Pro Arg Gly Pro Ala Arg Phe Leu Pro Leu Pro Gly Leu Pro Pro

130 135 140

Ala Xaa Pro Glu Pro Pro Gly Ile Leu Ala Pro Gln Pro Pro Asp Val

145 150 155 160

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

165 170 175

Pro Ser Tyr Ala Ser

180

<210> 9

<211> 180

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 9

Pro Ile Pro Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly Gly Gln Val Arg

1 5 10 15

Gln Arg Tyr Leu Tyr Thr Asp Asp Ala Gln Gln Thr Glu Ala His Leu

20 25 30

Glu Ile Arg Glu Asp Gly Thr Val Gly Ala Ala Asp Gln Ser Pro

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

Leu Tyr Gly Ser Leu His Phe Asp Pro Glu Ala Cys Ser Phe Arg Glu

85 90 95

Leu Leu Leu Glu Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser Glu Ala His Gly

100 105 110

Leu Pro Leu His Leu Pro Gly Asn Lys Ser Pro His Arg Asp Pro Cys

115 120 125

Pro Arg Gly Pro Ala Arg Phe Leu Pro Leu Pro Gly Leu Pro Pro Ala

130 135 140

Pro Pro Glu Pro Pro Gly Ile Leu Ala Pro Gln Pro Pro Asp Val Gly

145 150 155 160

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

165 170 175

Ser Tyr Ala Ser

180

<210> 10

<211> 180

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 10

Pro Ile Pro Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly Gly Gln Val Arg

1 5 10 15

Gln Arg Tyr Leu Tyr Thr Asp Asp Ala Gln Gln Thr Glu Ala His Leu

20 25 30

Glu Ile Arg Glu Asp Gly Thr Val Gly Ala Ala Asp Gln Ser Pro

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

Leu Tyr Gly Ser Leu His Phe Asp Pro Glu Ala Cys Ser Phe Arg Glu

85 90 95

Leu Leu Leu Glu Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser Glu Ala His Gly

100 105 110

Leu Pro Leu His Leu Pro Gly Asn Lys Ser Pro His Arg Asp Pro Cys

115 120 125

Pro Arg Gly Pro Ala Arg Phe Leu Pro Leu Pro Gly Leu Pro Pro Ala

130 135 140

Leu Pro Glu Pro Pro Gly Ile Leu Ala Pro Gln Pro Pro Asp Val Gly

145 150 155 160

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

165 170 175

Ser Tyr Ala Ser

180

<210> 11

<211> 181

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(1)

<223> X = H or Absent

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (146)..(146)

<223> X = P or L

<400> 11

Xaa Pro Ile Pro Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly Gly Gln Val

1 5 10 15

Arg Gln Arg Tyr Leu Tyr Thr Asp Asp Ala Gln Gln Thr Glu Ala His

20 25 30

Leu Glu Ile Arg Glu Asp Gly Thr Val Gly Gly Ala Ala Asp Gln Ser

35 40 45

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

50 55 60

Ile Leu Gly Val Lys Thr Ser Arg Phe Leu Cys Gln Arg Pro Cys Gly

65 70 75 80

Ala Leu Tyr Gly Ser Leu His Phe Asp Pro Glu Ala Cys Ser Phe Arg

85 90 95

Glu Leu Leu Leu Glu Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser Glu Ala His

100 105 110

Gly Leu Pro Leu His Leu Pro Gly Asn Lys Ser Pro His Arg Asp Pro

115 120 125

Ala Pro Arg Gly Pro Ala Arg Phe Leu Pro Leu Pro Gly Leu Pro Pro

130 135 140

Ala Xaa Pro Glu Pro Pro Gly Ile Leu Ala Pro Gln Pro Pro Asp Val

145 150 155 160

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

165 170 175

Pro Ser Tyr Ala Ser

180

<210> 12

<211> 180

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 12

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

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

Leu Leu Leu Glu Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser Glu Ala His Gly
 100 105 110
 Leu Pro Leu His Leu Pro Gly Asn Lys Ser Pro His Arg Asp Pro Ala
 115 120 125
 Pro Arg Gly Pro Ala Arg Phe Leu Pro Leu Pro Gly Leu Pro Pro Ala
 130 135 140
 Leu Pro Glu Pro Pro Gly Ile Leu Ala Pro Gln Pro Pro Asp Val Gly
 145 150 155 160

Ser Ser Asp Pro Leu Ser Met Val Gly Pro Ser Gln Gly Arg Ser Pro
 165 170 175
 Ser Tyr Ala Ser
 180

<210> 13

<211> 180

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 13

Pro Ile Pro Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly Gly Gln Val Arg
 1 5 10 15
 Gln Arg Tyr Leu Tyr Thr Asp Asp Ala Gln Gln Thr Glu Ala His Leu

20	25	30
Glu Ile Arg Glu Asp Gly Thr Val Gly Ala Ala Asp Gln Ser Pro		
35	40	45
Glu Ser Leu Leu Gln Leu Lys Ala Leu Lys Pro Gly Val Ile Gln Ile		
50	55	60
Leu Gly Val Lys Thr Ser Arg Phe Leu Cys Gln Arg Pro Cys Gly Ala		
65	70	75
Leu Tyr Gly Ser Leu His Phe Asp Pro Glu Ala Cys Ser Phe Arg Glu		
85	90	95
Leu Leu Leu Glu Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser Glu Ala His Gly		
100	105	110
Leu Pro Leu His Leu Pro Gly Asn Lys Ser Pro His Arg Asp Pro Ala		
115	120	125
Pro Arg Gly Pro Ala Arg Phe Leu Pro Leu Pro Gly Leu Pro Pro Ala		
130	135	140
Pro Pro Glu Pro Pro Gly Ile Leu Ala Pro Gln Pro Pro Asp Val Gly		
145	150	155
Ser Ser Asp Pro Leu Ser Met Val Gly Pro Ser Gln Gly Arg Ser Pro		
165	170	175
Ser Tyr Ala Ser		
180		
<210> 14		
<211> 180		
<212> PRT		
<213> Homo sapiens		
<400> 14		
Pro Ile Pro Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly Gly Gln Val Arg		
1	5	10
Gln Arg Tyr Leu Tyr Thr Asp Asp Ala Gln Gln Thr Glu Ala His Leu		
20	25	30
Glu Ile Arg Glu Asp Gly Thr Val Gly Ala Ala Asp Gln Ser Pro		

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

Leu Tyr Gly Ser Cys His Phe Asp Pro Glu Ala Cys Ser Phe Arg Glu

85 90 95

Leu Leu Leu Glu Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser Glu Ala His Gly

100 105 110

Leu Pro Leu His Leu Pro Gly Asn Lys Ser Pro His Arg Asp Pro Ala

115 120 125

Pro Arg Gly Pro Ala Arg Phe Leu Pro Leu Pro Gly Leu Pro Pro Ala

130 135 140

Leu Pro Glu Pro Pro Gly Ile Leu Ala Pro Gln Pro Pro Asp Val Gly

145 150 155 160

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

165 170 175

Ser Tyr Ala Ser

180

<210> 15

<211> 180

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 15

Pro Ile Pro Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly Gly Gln Val Arg

1 5 10 15

Gln Arg Tyr Leu Tyr Thr Asp Asp Ala Gln Gln Thr Glu Ala His Leu

20 25 30

Glu Ile Arg Glu Asp Gly Cys Val Gly Ala Ala Asp Gln Ser Pro

35 40 45

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

50	55	60													
Leu	Gly	Val	Lys	Thr	Ser	Arg	Phe	Leu	Cys	Gln	Arg	Pro	Asp	Gly	Ala
65		70		75		80									
Leu	Tyr	Gly	Ser	Leu	His	Phe	Asp	Pro	Glu	Ala	Cys	Ser	Phe	Arg	Glu
85			90		95										
Leu	Leu	Leu	Glu	Asp	Gly	Tyr	Asn	Val	Tyr	Gln	Ser	Glu	Ala	His	Gly
100		105		110											
Leu	Pro	Leu	His	Leu	Pro	Gly	Asn	Lys	Ser	Pro	His	Arg	Asp	Pro	Ala

115	120	125													
Pro	Arg	Gly	Pro	Ala	Arg	Phe	Leu	Pro	Gly	Leu	Pro	Pro	Ala		
130		135		140											
Leu	Pro	Glu	Pro	Pro	Gly	Ile	Leu	Ala	Pro	Gln	Pro	Pro	Asp	Val	Gly
145		150		155		160									
Ser	Ser	Asp	Pro	Leu	Ser	Met	Val	Gly	Pro	Ser	Gln	Gly	Arg	Ser	Pro
165		170		175											
Ser	Tyr	Ala	Ser												
180															
<210>	16														

<211>	181														
<212>	PRT														
<213>	Homo sapiens														
<400>	16														
Cys	Pro	Ile	Pro	Asp	Ser	Ser	Pro	Leu	Leu	Gln	Phe	Gly	Gly	Gln	Val
1		5		10		15									
Arg	Gln	Arg	Tyr	Leu	Tyr	Thr	Asp	Asp	Ala	Gln	Gln	Thr	Glu	Ala	His
20		25		30											
Leu	Glu	Ile	Arg	Glu	Asp	Gly	Thr	Val	Gly	Gly	Ala	Ala	Asp	Gln	Ser
35		40		45											
Pro	Glu	Ser	Leu	Leu	Gln	Leu	Lys	Ala	Leu	Lys	Pro	Gly	Val	Ile	Gln

50	55	60													
Ile	Leu	Gly	Val	Lys	Thr	Ser	Arg	Phe	Leu	Cys	Gln	Arg	Pro	Asp	Gly
65		70		75		80									

Ala Leu Tyr Gly Ser Leu His Phe Asp Pro Glu Ala Cys Ser Phe Arg
 85 90 95
 Glu Leu Leu Leu Glu Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser Glu Ala His
 100 105 110
 Gly Leu Pro Leu His Leu Pro Gly Asn Lys Ser Pro His Arg Asp Pro
 115 120 125
 Ala Pro Arg Gly Pro Ala Arg Phe Leu Pro Leu Pro Gly Leu Pro Pro
 130 135 140
 Ala Leu Pro Glu Pro Pro Gly Ile Leu Ala Pro Gln Pro Pro Asp Val
 145 150 155 160
 Gly Ser Ser Asp Pro Leu Ser Met Val Gly Pro Ser Gln Gly Arg Ser
 165 170 175
 Pro Ser Tyr Ala Ser
 180
 <210
 > 17
 <211> 181
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <220><221> MISC_FEATURE
 <222> (1)..(1)
 <223> X = H or Absent
 <220><221> MISC_FEATURE
 <222> (56)..(56)
 <223> X = K or R
 <220><221> MISC_FEATURE
 <222> (59)..(59)
 <223> X = K or R
 <220><221> MISC_FEATURE
 <222> (69)..(69)
 <223> X = K or R
 <220><221> MISC_FEATURE
 <222> (122)..(122)
 <223> X = K or R

<220> <221> MISC_FEATURE

<222> (146)..(146)

<223> X = L or P

<400> 17

Xaa Pro Ile Pro Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly Gly Gln Val

1 5 10 15

Arg Gln Arg Tyr Leu Tyr Thr Asp Asp Ala Gln Gln Thr Glu Ala His

20 25 30

Leu Glu Ile Arg Glu Asp Gly Thr Val Gly Ala Ala Asp Gln Ser

35 40 45

Pro Glu Ser Leu Leu Gln Leu Xaa Ala Leu Xaa Pro Gly Val Ile Gln

50 55 60

Ile Leu Gly Val Xaa Thr Ser Arg Phe Leu Cys Gln Arg Pro Asp Gly

65 70 75 80

Ala Leu Tyr Gly Ser Leu His Phe Asp Pro Glu Ala Cys Ser Phe Arg

85 90 95

Glu Leu Leu Leu Glu Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser Glu Ala His

100 105 110

Gly Leu Pro Leu His Leu Pro Gly Asn Xaa Ser Pro His Arg Asp Pro

115 120 125

Ala Pro Arg Gly Pro Ala Arg Phe Leu Pro Leu Pro Gly Leu Pro Pro

130 135 140

Ala Xaa Pro Glu Pro Pro Gly Ile Leu Ala Pro Gln Pro Pro Asp Val

145 150 155 160

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

165 170 175

Pro Ser Tyr Ala Ser

180

<210> 18

<211> 180

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 18

Pro Ile Pro Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly Gly Gln Val Arg

1 5 10 15

Gln Arg Tyr Leu Tyr Thr Asp Asp Ala Gln Gln Thr Glu Ala His Leu

20 25 30

Glu Ile Arg Glu Asp Gly Thr Val Gly Ala Ala Asp Gln Ser Pro

35 40 45

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

50 55 60

Leu Gly Val Arg Thr Ser Arg Phe Leu Cys Gln Arg Pro Asp Gly Ala

65 70 75 80

Leu Tyr Gly Ser Leu His Phe Asp Pro Glu Ala Cys Ser Phe Arg Glu

85 90 95

Leu Leu Leu Glu Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser Glu Ala His Gly

100 105 110

Leu Pro Leu His Leu Pro Gly Asn Arg Ser Pro His Arg Asp Pro Ala

115 120 125

Pro Arg Gly Pro Ala Arg Phe Leu Pro Leu Pro Gly Leu Pro Pro Ala

130 135 140

Leu Pro Glu Pro Pro Gly Ile Leu Ala Pro Gln Pro Pro Asp Val Gly

145 150 155 160

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

165 170 175

Ser Tyr Ala Ser

180

<210> 19

<211> 180

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 19

Pro Ile Pro Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly Gly Gln Val Arg

1	5	10	15
---	---	----	----

Gln Arg Tyr Leu Tyr Thr Asp Asp Ala Gln Gln Thr Glu Ala His Leu

20	25	30
----	----	----

Glu Ile Arg Glu Asp Gly Thr Val Gly Gly Ala Ala Asp Gln Ser Pro

35	40	45
----	----	----

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

50	55	60
----	----	----

Leu Gly Val Arg Thr Ser Arg Phe Leu Cys Gln Arg Pro Asp Gly Ala

65	70	75	80
----	----	----	----

Leu Tyr Gly Ser Leu His Phe Asp Pro Glu Ala Cys Ser Phe Arg Glu

85	90	95
----	----	----

Leu Leu Leu Glu Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser Glu Ala His Gly

100	105	110
-----	-----	-----

Leu Pro Leu His Leu Pro Gly Asn Arg Ser Pro His Arg Asp Pro Ala

115	120	125
-----	-----	-----

Pro Arg Gly Pro Ala Arg Phe Leu Pro Leu Pro Gly Leu Pro Pro Ala

130	135	140
-----	-----	-----

Leu Pro Glu Pro Pro Gly Ile Leu Ala Pro Gln Pro Pro Asp Val Gly

145	150	155	160
-----	-----	-----	-----

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

165	170	175
-----	-----	-----

Ser Tyr Ala Ser

180

<210> 20

<211> 180

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 20

Pro Ile Pro Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly Gly Gln Val Arg

1	5	10	15
---	---	----	----

Gln Arg Tyr Leu Tyr Thr Asp Asp Ala Gln Gln Thr Glu Ala His Leu

20	25	30	
Glu Ile Arg Glu Asp Gly Thr Val Gly Gly Ala Ala Asp Gln Ser Pro			
35	40	45	
Glu Ser Leu Leu Gln Leu Arg Ala Leu Arg Pro Gly Val Ile Gln Ile			
50	55	60	
Leu Gly Val Lys Thr Ser Arg Phe Leu Cys Gln Arg Pro Asp Gly Ala			
65	70	75	80
Leu Tyr Gly Ser Leu His Phe Asp Pro Glu Ala Cys Ser Phe Arg Glu			
85	90	95	
Leu Leu Leu Glu Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser Glu Ala His Gly			
100	105	110	
Leu Pro Leu His Leu Pro Gly Asn Arg Ser Pro His Arg Asp Pro Ala			
115	120	125	
Pro Arg Gly Pro Ala Arg Phe Leu Pro Leu Pro Gly Leu Pro Pro Ala			
130	135	140	
Leu Pro Glu Pro Pro Gly Ile Leu Ala Pro Gln Pro Pro Asp Val Gly			
145	150	155	160
Ser Ser Asp Pro Leu Ser Met Val Gly Pro Ser Gln Gly Arg Ser Pro			
165	170	175	
Ser Tyr Ala Ser			
180			
<210> 21			
<211> 180			
<212> PRT			
<213> Homo sapiens			
<400> 21			
Pro Ile Pro Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly Gly Gln Val Arg			
1	5	10	15
Gln Arg Tyr Leu Tyr Thr Asp Asp Ala Gln Gln Thr Glu Ala His Leu			
20	25	30	
Glu Ile Arg Glu Asp Gly Thr Val Gly Gly Ala Ala Asp Gln Ser Pro			
35	40	45	

Glu Ser Leu Leu Gln Leu Arg Ala Leu Arg Pro Gly Val Ile Gln Ile
 50 55 60

Leu Gly Val Arg Thr Ser Arg Phe Leu Cys Gln Arg Pro Asp Gly Ala
 65 70 75 80

Leu Tyr Gly Ser Leu His Phe Asp Pro Glu Ala Cys Ser Phe Arg Glu
 85 90 95

Leu Leu Leu Glu Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser Glu Ala His Gly
 100 105 110

Leu Pro Leu His Leu Pro Gly Asn Lys Ser Pro His Arg Asp Pro Ala
 115 120 125

Pro Arg Gly Pro Ala Arg Phe Leu Pro Leu Pro Gly Leu Pro Pro Ala
 130 135 140

Leu Pro Glu Pro Pro Gly Ile Leu Ala Pro Gln Pro Pro Asp Val Gly
 145 150 155 160

Ser Ser Asp Pro Leu Ser Met Val Gly Pro Ser Gln Gly Arg Ser Pro
 165 170 175

Ser Tyr Ala Ser
 180

<210> 22

<211> 180

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 22

Pro Ile Pro Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly Gly Gln Val Arg
 1 5 10 15

Gln Arg Tyr Leu Tyr Thr Asp Asp Ala Gln Gln Thr Glu Ala His Leu
 20 25 30

Glu Ile Arg Glu Asp Gly Thr Val Gly Gly Ala Ala Asp Gln Ser Pro
 35 40 45

Glu Ser Leu Leu Gln Leu Arg Ala Leu Arg Pro Gly Val Ile Gln Ile
 50 55 60

Leu Gly Val Arg Thr Ser Arg Phe Leu Cys Gln Arg Pro Asp Gly Ala

65	70	75	80
Leu Tyr Gly Ser Leu His Phe Asp Pro Glu Ala Cys Ser Phe Arg Glu			
85	90	95	
Leu Leu Leu Glu Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser Glu Ala His Gly			
100	105	110	
Leu Pro Leu His Leu Pro Gly Asn Arg Ser Pro His Arg Asp Pro Ala			
115	120	125	
Pro Arg Gly Pro Ala Arg Phe Leu Pro Leu Pro Gly Leu Pro Pro Ala			
130	135	140	
Leu Pro Glu Pro Pro Gly Ile Leu Ala Pro Gln Pro Pro Asp Val Gly			
145	150	155	160
Ser Ser Asp Pro Leu Ser Met Val Gly Pro Ser Gln Gly Arg Ser Pro			
165	170	175	
Ser Tyr Ala Ser			
180			
<210> 23			
<211> 181			
<212> PRT			
<213> Homo sapiens			
<400> 23			
Lys Pro Ile Pro Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly Gly Gln Val			
1	5	10	15
Arg Gln Arg Tyr Leu Tyr Thr Asp Asp Ala Gln Gln Thr Glu Ala His			
20	25	30	
Leu Glu Ile Arg Glu Asp Gly Thr Val Gly Gly Ala Ala Asp Gln Ser			
35	40	45	
Pro Glu Ser Leu Leu Gln Leu Arg Ala Leu Arg Pro Gly Val Ile Gln			
50	55	60	
Ile Leu Gly Val Arg Thr Ser Arg Phe Leu Cys Gln Arg Pro Asp Gly			
65	70	75	80
Ala Leu Tyr Gly Ser Leu His Phe Asp Pro Glu Ala Cys Ser Phe Arg			
85	90	95	

Glu Leu Leu Leu Glu Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser Glu Ala His

100 105 110

Gly Leu Pro Leu His Leu Pro Gly Asn Arg Ser Pro His Arg Asp Pro

115 120 125

Ala Pro Arg Gly Pro Ala Arg Phe Leu Pro Leu Pro Gly Leu Pro Pro

130 135 140

Ala Leu Pro Glu Pro Pro Gly Ile Leu Ala Pro Gln Pro Pro Asp Val

145 150 155 160

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

165 170 175

Pro Ser Tyr Ala Ser

180

<210> 24

<211> 180

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 24

Pro Ile Pro Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly Gly Gln Val Arg

1 5 10 15

Gln Arg Tyr Leu Tyr Thr Asp Asp Ala Gln Gln Thr Glu Ala His Leu

20 25 30

Glu Ile Arg Glu Asp Gly Thr Val Gly Gly Ala Ala Asp Gln Ser Pro

35 40 45

Glu Ser Leu Leu Gln Leu Arg Ala Leu Arg Pro Gly Val Ile Gln Ile

50 55 60

Leu Gly Val Arg Thr Ser Arg Phe Leu Cys Gln Arg Pro Asp Gly Ala

65 70 75 80

Leu Tyr Gly Ser Leu His Phe Asp Pro Glu Ala Cys Ser Phe Arg Glu

85 90 95

Leu Leu Leu Glu Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser Glu Ala His Gly

100 105 110

Leu Pro Leu His Leu Pro Gly Asn Arg Ser Pro His Arg Asp Pro Ala
 115 120 125
 Pro Arg Gly Pro Ala Arg Phe Leu Pro Leu Pro Gly Leu Pro Pro Ala
 130 135 140
 Leu Pro Glu Pro Pro Gly Ile Leu Ala Pro Gln Pro Pro Asp Val Gly
 145 150 155 160
 Ser Ser Asp Pro Leu Ser Met Val Gly Pro Ser Gln Gly Arg Ser Pro
 165 170 175

Ser Tyr Ala Lys

180

<210> 25

<211> 219

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 25

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

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Thr

20 25 30

Tyr Gly Ser Pro Tyr Leu Asn Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser

35 40 45

Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro

50 55 60

Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile

65 70 75 80

Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Phe Cys Ser Gln Gly

85 90 95

Thr His Leu Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

100 105 110

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu

115 120 125

Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe

130	135	140	
Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln			
145	150	155	160
Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser			
165	170	175	
Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu			
180	185	190	
Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser			
195	200	205	
Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys			
210	215		
<210> 26			
<211> 448			
<212> PRT			
<213> Homo sapiens			
<400> 26			
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly			
1	5	10	15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr			
20	25	30	
Trp Met Ser Trp Val Arg Gln Ser Pro Glu Lys Gly Leu Glu Trp Val			
35	40	45	
Ser Glu Ile Arg Leu Arg Ser Asp Asn Tyr Ala Thr His Tyr Ala Glu			
50	55	60	
Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr			
65	70	75	80
Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Gly Ile Tyr			
85	90	95	
Tyr Cys Lys Thr Tyr Phe Tyr Ser Phe Ser Tyr Trp Gly Gln Gly Thr			
100	105	110	
Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro			
115	120	125	

Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly
 130 135 140
 Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn
 145 150 155 160
 Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln
 165 170 175
 Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser
 180 185 190
 Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser
 195 200 205
 Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr
 210 215 220
 His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser
 225 230 235 240
 Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
 245 250 255
 Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro
 260 265 270
 Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
 275 280 285
 Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val
 290 295 300
 Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Glu Tyr
 305 310 315 320
 Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr
 325 330 335
 Ile Ser Lys Ala Lys Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu
 340 345 350
 Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys
 355 360 365
 Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser

370	375	380	
Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp			
385	390	395	400
Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser			
405	410	415	
Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala			
420	425	430	
Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys			
435	440	445	
<210> 27			
<211> 112			
<212> PRT			
<213> Homo sapiens			
<400> 27			
Glu Leu Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly			
1	5	10	15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Thr			
20	25	30	
Tyr Gly Ser Pro Tyr Leu Asn Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser			
35	40	45	
Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro			
50	55	60	
Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile			
65	70	75	80
Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Phe Cys Ser Gln Gly			
85	90	95	
Thr His Leu Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys			
100	105	110	
<210> 28			
<211> 118			
<212> PRT			
<213> Homo sapiens			

<400> 28

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr

20 25 30

Trp Met Ser Trp Val Arg Gln Ser Pro Glu Lys Gly Leu Glu Trp Val

35 40 45

Ser Glu Ile Arg Leu Arg Ser Asp Asn Tyr Ala Thr His Tyr Ala Glu

50 55 60

Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr

65 70 75 80

Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Gly Ile Tyr

85 90 95

Tyr Cys Lys Thr Tyr Phe Tyr Ser Phe Ser Tyr Trp Gly Gln Gly Thr

100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 29

<211> 112

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 29

Asp Val Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Arg Leu Gly

1 5 10 15

Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Thr

20 25 30

Tyr Gly Ser Pro Tyr Leu Asn Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser

35 40 45

Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro

50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Arg Ile

65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Phe Cys Ser Gln Gly

85 90 95

Thr His Leu Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

100 105 110

<210> 30

<211> 118

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 30

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

1 5 10 15

Thr Met Lys Leu Ser Cys Glu Ile Ser Gly Leu Thr Phe Arg Asn Tyr

20 25 30

Trp Met Ser Trp Val Arg Gln Ser Pro Glu Lys Gly Leu Glu Trp Val

35 40 45

Ala Glu Ile Arg Leu Arg Ser Asp Asn Tyr Ala Thr His Tyr Ala Glu

50 55 60

Ser Val Lys Gly Lys Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Ser Arg

65 70 75 80

Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Thr Glu Asp Thr Gly Ile Tyr

85 90 95

Tyr Cys Lys Tyr Tyr Phe Tyr Ser Phe Ser Tyr Trp Gly Gln Gly Thr

100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ala

115

<210> 31

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Polypeptide Linker

<400> 31

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser

1 5 10 15
 <210> 32
 <211> 28
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 32

Met Asn Ser Asn Glu Thr Gly Phe Glu His Ser Gly Leu Trp Val Ser

1 5 10 15
 Val Leu Ala Gly Leu Leu Leu Gly Ala Cys Gln Ala
 20 25

<210> 33
 <211> 209
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 33

Met Asn Ser Asn Glu Thr Gly Phe Glu His Ser Gly Leu Trp Val Ser

1 5 10 15
 Val Leu Ala Gly Leu Leu Leu Gly Ala Cys Gln Ala His Pro Ile Pro
 20 25 30
 Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly Gly Gln Val Arg Gln Arg Tyr

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

100 105 110
 Ser Leu His Phe Asp Pro Glu Ala Cys Ser Phe Arg Glu Leu Leu Leu
 115 120 125
 Glu Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser Glu Ala His Gly Leu Pro Leu

130	135	140	
His Leu Pro Gly Asn Lys Ser Pro His Arg Asp Pro Ala Pro Arg Gly			
145	150	155	160
Pro Ala Arg Phe Leu Pro Leu Pro Gly Leu Pro Pro Ala Leu Pro Glu			

165	170	175	
Pro Pro Gly Ile Leu Ala Pro Gln Pro Pro Asp Val Gly Ser Ser Asp			
180	185	190	
Pro Leu Ser Met Val Gly Pro Ser Gln Gly Arg Ser Pro Ser Tyr Ala			
195	200	205	
Ser			

<210> 34			
<211> 30			
<212> PRT			
<213> Homo sapiens			
<400> 34			

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

Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly Arg			
20	25	30	
<210> 35			
<211> 39			
<212> PRT			
<213> Homo sapiens			
<400> 35			

His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Gln Met Glu Glu			
1	5	10	15
Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Leu Lys Asn Gly Gly Pro Ser			
20	25	30	
Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser			
35			

<210> 36			
----------	--	--	--

<211> 39

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Analogs of Human Exendin-4

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (2)..(2)

<223> X = Aib

<400> 36

His Xaa Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Gln Met Glu Glu

1 5 10 15

Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Leu Lys Asn Gly Gly Pro Ser

20 25 30

Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser

35

<210> 37

<211> 40

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Analogs of Human Exendin-4

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (40)..(40)

<223> X = K, KSH, KSMAL, Dap, Dab, R, Y, C, T, S homocysteine, or
homoserine

<400> 37

His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Gln Met Glu Glu

1 5 10 15

Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Leu Lys Asn Gly Gly Pro Ser

20 25 30

Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser Xaa

35 40

<210> 38

<211> 40

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Analogs of Human Exendin-4

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (2)..(2)

<223> X = Aib

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (40)..(40)

<223> X = K, KSH, KSMAL, Dap, Dab, R, Y, C, T, S homocysteine,
homoserine, or is absent

<400> 38

His Xaa Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Gln Met Glu Glu

1	5	10	15
---	---	----	----

Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Leu Lys Asn Gly Gly Pro Ser

20	25	30
----	----	----

Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser Xaa

35	40
----	----

<210> 39

<211> 39

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Analogs of Human Exendin-4

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (2)..(2)

<223> X = Aib

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (38)..(38)

<223> X = K, KSH, KSMAL, Dap, Dab, R, Y, C, T, S homocysteine, or
homoserine

<400> 39

His Xaa Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Gln Met Glu Glu

1	5	10	15
---	---	----	----

Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Leu Lys Asn Gly Gly Pro Ser

20	25	30
----	----	----

Ser Gly Ala Pro Pro Xaa Ser

35

<210> 40

<211> 39

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Analogs of Human Exendin-4

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (2)..(2)

<223> X = Aib

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (36)..(36)

<223> X = K, KSH, KSMAL, Dap, Dab, R, Y, C, T, S homocysteine, or
homoserine

<400> 40

His Xaa Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Gln Met Glu Glu

1	5	10	15
---	---	----	----

Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Leu Lys Asn Gly Gly Pro Ser

20	25	30
----	----	----

Ser Gly Ala Xaa Pro Pro Ser

35

<210> 41

<211> 39

<212> PRT

<

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Analogs of Human Exendin-4

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (2)..(2)

<223> X = Aib

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (34)..(34)

<223> X = K, KSH, KSMAL, Dap, Dab, R, Y, C, T, S homocysteine, or
homoserine

<400> 41

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

Ser Xaa Ala Pro Pro Pro Ser

35

<210> 42

<211> 39

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Analogs of Human Exendin-4

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (2)..(2)

<223> X = Aib

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (32)..(32)

<223> X = K, KSH, KSMAL, Dap, Dab, R, Y, C, T, S homocysteine, or
 homoserine

<400> 42

His Xaa Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Gln Met Glu Glu
 1 5 10 15

Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Leu Lys Asn Gly Pro Xaa

20 25 30

Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser

35

<210> 43

<211> 39

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Analogs of Human Exendin-4

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (2)..(2)

<223> X = Aib

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (28)..(28)

<223> X = K, KSH, KSMAL, Dap, Dab, R, Y, C, T, S homocysteine, or
homoserine

<400>

> 43

His Xaa Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Gln Met Glu Glu

1 5 10 15

Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Leu Lys Xaa Gly Gly Pro Ser
20 25 30

Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser

35

<210> 44

<211> 39

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Analogs of Human Exendin-4

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (2)..(2)

<223> X = Aib

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (27)..(27)

<223> X = K, KSH, KSMAL, Dap, Dab, R, Y, C, T, S homocysteine, or
homoserine

<400> 44

His Xaa Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Gln Met Glu Glu

1 5 10 15

Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Leu Xaa Asn Gly Gly Pro Ser
20 25 30

Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser

35

<210> 45

<211> 39

<212> PRT

<

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Analogs of Human Exendin-4

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (2)..(2)

<223> X = Aib

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (26)..(26)

<223> X = K, KSH, KSMAL, Dap, Dab, R, Y, C, T, S homocysteine, or
homoserine

<400> 45

His Xaa Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Gln Met Glu Glu

1	5	10	15												
Glu	Ala	Val	Arg	Leu	Phe	Ile	Glu	Trp	Xaa	Lys	Asn	Gly	Gly	Pro	Ser
20	25	30													

Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser

35

<210> 46

<211> 39

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Analogs of Human Exendin-4

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (2)..(2)

<223> X = Aib

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (24)..(24)

<223> X = K, KSH, KSMAL, Dap, Dab, R, Y, C, T, S homocysteine, or
homoserine

<400> 46

His Xaa Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Gln Met Glu Glu

1	5	10	15												
Glu	Ala	Val	Arg	Leu	Phe	Ile	Glu	Trp	Xaa	Lys	Asn	Gly	Gly	Pro	Ser
20	25	30													

Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Xaa Trp Leu Lys Asn Gly Gly Pro Ser

20 25 30

Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser

35

<210> 47

<211> 39

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Analogs of Human Exendin-4

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (2)..(2)

<223> X = Aib

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (23)..(23)

<223> X = K, KSH, KSMAL, Dap, Dab, R, Y, C, T, S homocysteine, or
homoserine

<400

> 47

His Xaa Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Gln Met Glu Glu

1 5 10 15

Glu Ala Val Arg Leu Phe Xaa Glu Trp Leu Lys Asn Gly Gly Pro Ser

20 25 30

Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser

35

<210> 48

<211> 39

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Analogs of Human Exendin-4

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (2)..(2)

<223> X = Aib

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (21)..(21)

<223> X = K, KSH, KSMAL, Dap, Dab, R, Y, C, T, S homocysteine, or homoserine

<400> 48

His Xaa Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Gln Met Glu Glu

1 5 10 15

Glu Ala Val Arg Xaa Phe Ile Glu Trp Leu Lys Asn Gly Gly Pro Ser

20 25 30

Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser

35

<210> 49

<211> 39

<212> PRT

<

213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Analogs of Human Exendin-4

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (2)..(2)

<223> X = Aib

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (20)..(20)

<223> X = K, KSH, KSMAL, Dap, Dab, R, Y, C, T, S homocysteine, or

homoserine

<400> 49

His Xaa Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Gln Met Glu Glu

1 5 10 15

Glu Ala Val Xaa Leu Phe Ile Glu Trp Leu Lys Asn Gly Gly Pro Ser

20 25 30

Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser

35

<210> 50

<211> 39

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Analogs of Human Exendin-4

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (2)..(2)

<223> X = Aib

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (19)..(19)

<223> X = K, KSH, KSMAL, Dap, Dab, R, Y, C, T, S homocysteine, or
homoserine

<400> 50

His Xaa Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Gln Met Glu Glu

1	5	10	15
---	---	----	----

Glu Ala Xaa Arg Leu Phe Ile Glu Trp Leu Lys Asn Gly Gly Pro Ser

20	25	30
----	----	----

Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser

35

<210> 51

<211> 39

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Analogs of Human Exendin-4

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (2)..(2)

<223> X = Aib

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (17)..(17)

<223> X = K, KSH, KSMAL, Dap, Dab, R, Y, C, T, S homocysteine, or
homoserine

<400

> 51

His Xaa Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Gln Met Glu Glu

1	5	10	15
---	---	----	----

Xaa Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Leu Lys Asn Gly Gly Pro Ser

20	25	30
----	----	----

Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser

35

<210> 52

<211> 39

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Analogs of Human Exendin-4

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (2)..(2)

<223> X = Aib

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (16)..(16)

<223> X = K, KSH, KSMAL, Dap, Dab, R, Y, C, T, S homocysteine, or
homoserine

<400> 52

His Xaa Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Gln Met Glu Xaa

1	5	10	15
---	---	----	----

Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Leu Lys Asn Gly Gly Pro Ser

20	25	30
----	----	----

Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser

35

<210> 53

<211> 39

<212> PRT

<

213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Analogs of Human Exendin-4

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (2)..(2)

<223> X = Aib

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (14)..(14)

<223> X = K, KSH, KSMAL, Dap, Dab, R, Y, C, T, S homocysteine, or
homoserine

<400> 53

His Xaa Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Gln Xaa Glu Glu

1 5 10 15
 Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Leu Lys Asn Gly Gly Pro Ser
 20 25 30

Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser

35

<210> 54

<211> 39

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Analogs of Human Exendin-4

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (2)..(2)

<223> X = Aib

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (13)..(13)

<223> X = K, KSH, KSMAL, Dap, Dab, R, Y, C, T, S homocysteine, or
 homoserine

<400> 54

His Xaa Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Xaa Met Glu Glu

1 5 10 15

Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Leu Lys Asn Gly Gly Pro Ser

20 25 30

Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser

35

<210> 55

<211> 39

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Analogs of Human Exendin-4

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (2)..(2)

<223> X = Aib

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (12)..(12)

<223> X = K, KSH, KSMAL, Dap, Dab, R, Y, C, T, S homocysteine, or
homoserine

<400>

> 55

His Xaa Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Xaa Gln Met Glu Glu

1 5 10 15

Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Leu Lys Asn Gly Gly Pro Ser

20 25 30

Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser

35

<210> 56

<211> 39

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Analogs of Human Exendin-4

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (2)..(2)

<223> X = Aib

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (11)..(11)

<223> X = K, KSH, KSMAL, Dap, Dab, R, Y, C, T, S homocysteine, or
homoserine

<400> 56

His Xaa Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Xaa Lys Gln Met Glu Glu

1 5 10 15

Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Leu Lys Asn Gly Gly Pro Ser

20 25 30

Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser

35

<210> 57

<211> 31

<212> PRT

<

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Analogs of Human Exendin-4

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (2)..(2)

<223> X = Aib

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (31)..(31)

<223> X = K, KSH, KSMAL, Dap, Dab, R, Y, C, T, S homocysteine, or
homoserine

<400> 57

His Xaa Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Gln Met Glu Glu

1	5	10	15
---	---	----	----

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

20	25	30
----	----	----

<210> 58

<211> 33

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Analogs of Human Exendin-4

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (2)..(2)

<223> X = Aib

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (21)..(21)

<223> X = K, KSH, KSMAL, Dap, Dab, R, Y, C, T, S homocysteine, or
homoserine

<400> 58

His Xaa Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Gln Met Glu Glu

1	5	10	15
---	---	----	----

Glu Ala Val Arg Xaa Phe Ile Glu Trp Leu Lys Asn Gly Pro Ser

20	25	30
----	----	----

Ser

<210> 59
 <211> 39
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Analogs of Human Exendin-4
 <220><221> MISC_FEATURE
 <222> (1)..(1)
 <223> X = d-His
 <220><221> MISC_FEATURE
 <222> (2)..(2)
 <223> X = Aib
 <220><221> MISC_FEATURE
 <222> (14)..(14)
 <223> X = K, KSH, KSMAL, Dap, Dab, R, Y, C, T, S homocysteine, or
 homoserine
 <400> 59

Xaa Xaa Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Gln Xaa Glu Glu

1	5	10	15
Glu	Ala	Val	Arg
Leu	Phe	Ile	Glu
Trp			Leu
Lys			Asn
			Gly
			Pro
			Ser

20	25	30
Ser	Gly	Ala
Pro	Pro	Pro
Pro		Ser

35

<210> 60
 <211> 40
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Analogs of Human Exendin-4
 <220><221> MISC_FEATURE
 <222> (2)..(2)
 <223> X = Aib
 <220><221> MISC_FEATURE
 <222> (12)..(12)
 <223> X = K, KSH, KSMAL, Dap, Dab, R, Y, C, T, S homocysteine, or

homoserine

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (14)..(14)

<223> X = M, K, KSH, KSMAL, Dap, Dab, R, Y, C, T, S homocysteine, or
homoserine

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (19)..(19)

<223> X = V, K, KSH, KSMAL, Dap, Dab, R, Y, C, T, S homocysteine, or
homoserine

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (20)..(20)

<223> X = R, K, KSH, KSMAL, Dap, Dab, R, Y, C, T, S homocysteine, or
homoserine

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (21)..(21)

<223> X = L, K, KSH, KSMAL, Dap, Dab, R, Y, C, T, S homocysteine, or

homoserine

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (40)..(40)

<223> X = Absent or any amino acid

<400> 60

His Xaa Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Xaa Gln Xaa Glu Glu

1 5 10 15

Glu Ala Xaa Xaa Xaa Phe Ile Glu Trp Leu Lys Asn Gly Gly Pro Ser

20 25 30

Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser Xaa

35 40

<210> 61

<211> 39

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Analogs of Human Exendin-4

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (2)..(2)

<223> X = Aib

<400> 61

His Xaa Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Gln Met Glu Glu

1 5 10 15

Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Leu Lys Asn Gly Gly Pro Ser

20 25 30

Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser

35

<210> 62

<211> 39

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Analogs of Human Exendin-4

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (2)..(2)

<223> X = Aib

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (12)..(12)

<223> X = KSH

<400> 62

His Xaa Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Xaa Gln Met Glu Glu

1 5 10 15

Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Leu Lys Asn Gly Gly Pro Ser

20 25 30

Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser

35

<210> 63

<211> 39

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Analogs of Human Exendin-4

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (2)..(2)

<223> X = Aib

<400> 63

His Xaa Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Gln Lys Glu Glu

1 5 10 15

Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Leu Lys Asn Gly Gly Pro Ser

20 25 30

Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser

35

<210> 64

<211> 39

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Analogs of Human Exendin-4

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (2)..(2)

<223> X = Aib

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (14)..(14)

<223> X = KSH

<400> 64

His Xaa Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Gln Xaa Glu Glu

1 5 10 15

Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Leu Lys Asn Gly Gly Pro Ser

20 25 30

Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser

35

<210> 65

<211> 39

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Analogs of Human Exendin-4

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (2)..(2)

<223> X = Aib

<400> 65

His Xaa Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Gln Met Glu Glu

1 5 10 15

Glu Ala Lys Arg Leu Phe Ile Glu Trp Leu Lys Asn Gly Gly Pro Ser

20 25 30

Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser

35

<210> 66

<211> 39

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Analogs of Human Exendin-4

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (2)..(2)

<223> X = Aib

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (19)..(19)

<223> X = KSH

<400> 66

His Xaa Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Gln Met Glu Glu

1 5 10 15

Glu Ala Xaa Arg Leu Phe Ile Glu Trp Leu Lys Asn Gly Gly Pro Ser

20 25 30

Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser

35

<210> 67

<211> 39

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Analogs of Human Exendin-4

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (2)..(2)

<223> X = Aib

<400> 67

His Xaa Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Gln Met Glu Glu

1 5 10 15

Glu Ala Val Lys Leu Phe Ile Glu Trp Leu Lys Asn Gly Gly Pro Ser

20 25 30

Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser

35

<210> 68

<211> 39

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Analogs of Human Exendin-4

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (2)..(2)

<223> X = Aib

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (20)..(20)

<223> X = KSH

<400> 68

His Xaa Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Gln Met Glu Glu

1 5 10 15

Glu Ala Val Xaa Leu Phe Ile Glu Trp Leu Lys Asn Gly Gly Pro Ser

20 25 30

Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser

35

<210> 69

<211> 39

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Analogs of Human Exendin-4

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (2)..(2)

<223> X = Aib

<400> 69

His Xaa Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Gln Met Glu Glu

1 5 10 15

Glu Ala Val Arg Lys Phe Ile Glu Trp Leu Lys Asn Gly Gly Pro Ser

20 25 30

Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser

35

<210> 70

<211> 39

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Analogs of Human Exendin-4

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (2)..(2)

<223> X = Aib

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (21)..(21)

<223> X = KSH

<400> 70

His Xaa Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Gln Met Glu Glu

1 5 10 15

Glu Ala Val Arg Xaa Phe Ile Glu Trp Leu Lys Asn Gly Gly Pro Ser

20 25 30

Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser

35

<210> 71

<211> 40

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Analogs of Human Exendin-4

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (2)..(2)

<223> X = Aib

<400> 71

His Xaa Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Gln Met Glu Glu

1 5 10 15

Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Leu Lys Asn Gly Gly Pro Ser

20 25 30

Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser Lys

35 40

<210> 72

<211> 40

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Analogs of Human Exendin-4

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (2)..(2)

<223> X = Aib

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (40)..(40)

<223> X = KSH

<

400> 72

His Xaa Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Gln Met Glu Glu

1 5 10 15

Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Leu Lys Asn Gly Gly Pro Ser

20 25 30

Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser Xaa

35 40

<210> 73

<211> 181

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(1)

<223> X = H or Absent

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (146)..(146)

<223> X = L or P

<400> 73

Xaa Pro Ile Pro Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly Gly Gln Val

1 5 10 15

Arg Gln Arg Tyr Leu Tyr Thr Asp Asp Ala Gln Gln Thr Glu Ala His

20 25 30

Leu Glu Ile Arg Glu Asp Gly Thr Val Gly Gly Ala Ala Asp Gln Ser

35 40 45

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

50 55 60

Ile Leu Gly Val Lys Thr Ser Arg Phe Leu Cys Gln Arg Pro Asp Gly

65 70 75 80

Ala Leu Tyr Gly Ser Leu His Phe Asp Pro Glu Ala Cys Ser Phe Arg

85 90 95

Glu Leu Leu Leu Glu Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser Glu Ala His

100 105 110

Gly Leu Pro Leu His Leu Pro Gly Asn Lys Ser Pro His Arg Asp Pro

115 120 125

Ala Pro Arg Gly Pro Ala Arg Phe Leu Pro Leu Pro Gly Leu Pro Pro

130 135 140

Ala Xaa Pro Glu Pro Pro Gly Ile Leu Ala Pro Gln Pro Pro Asp Val

145 150 155 160

Gly Ser Ser Asp Pro Leu Ser Met Val Gly Cys Ser Gln Gly Arg Ser

165 170 175

Pro Ser Tyr Ala Ser

180

<210> 74

<211> 181

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220><221>

MISC_FEATURE

<222> (1)..(1)

<223> X = H or absent

<400> 74

Xaa Pro Ile Pro Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly Gly Gln Val

1 5 10 15

Arg Gln Arg Tyr Leu Tyr Thr Asp Asp Ala Gln Gln Thr Glu Ala His

20 25 30

Leu Glu Ile Arg Glu Asp Gly Thr Val Gly Ala Ala Asp Gln Ser

35 40 45

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

50 55 60

Ile Leu Gly Val Lys Thr Ser Arg Phe Leu Cys Gln Arg Pro Asp Gly

65 70 75 80

Ala Leu Tyr Gly Ser Leu His Phe Asp Pro Glu Ala Cys Ser Phe Arg

85 90 95

Glu Leu Leu Leu Glu Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser Glu Ala His

100 105 110

Gly Leu Pro Leu His Leu Pro Gly Asn Lys Ser Pro His Arg Asp Pro

115 120 125

Ala Pro Arg Gly Pro Ala Arg Phe Leu Pro Leu Pro Gly Leu Pro Pro

130 135 140

Ala Leu Pro Glu Pro Pro Gly Ile Leu Ala Pro Gln Pro Pro Asp Val

145 150 155 160

Gly Ser Ser Asp Pro Leu Ser Met Val Gly Cys Ser Gln Gly Arg Ser

165 170 175

Pro Ser Tyr Ala Ser

180

<210

> 75

<211> 181

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(1)

<223> X = H or Absent

<400> 75

Xaa Pro Ile Pro Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly Gly Gln Val

1 5 10 15

Arg Gln Arg Tyr Leu Tyr Thr Asp Asp Ala Gln Gln Thr Glu Ala His

20 25 30

Leu Glu Ile Arg Glu Asp Gly Thr Val Gly Gly Ala Ala Asp Gln Ser

35 40 45

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

50 55 60

Ile Leu Gly Val Lys Thr Ser Arg Phe Leu Cys Gln Arg Pro Asp Gly

65 70 75 80

Ala Leu Tyr Gly Ser Leu His Phe Asp Pro Glu Ala Cys Ser Phe Arg

85 90 95

Glu Leu Leu Glu Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser Glu Ala His

100 105 110

Gly Leu Pro Leu His Leu Pro Gly Asn Lys Ser Pro His Arg Asp Pro

115 120 125

Ala Pro Arg Gly Pro Ala Arg Phe Leu Pro Leu Pro Gly Leu Pro Pro

130 135 140

Ala Pro Pro Glu Pro Pro Gly Ile Leu Ala Pro Gln Pro Pro Asp Val

145 150 155 160

Gly Ser Ser Asp Pro Leu Ser Met Val Gly Cys Ser Gln Gly Arg Ser

165 170 175

Pro Ser Tyr Ala Ser

180

<210> 76

<211> 444

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 76

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr

20 25 30

Trp Met Ser Trp Val Arg Gln Ser Pro Glu Lys Gly Leu Glu Trp Val

35 40 45

Ser Glu Ile Arg Leu Arg Ser Asp Asn Tyr Ala Thr His Tyr Ala Glu

50 55 60

Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr

65 70 75 80

Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Gly Ile Tyr

85 90 95

Tyr Cys Lys Thr Tyr Phe Ser Phe Tyr Trp Gly Gln Gly Thr

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn

145 150 155 160

Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln

165 170 175

Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser

180 185 190

Asn Phe Gly Thr Gln Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser

195 200 205

Asn Thr Lys Val Asp Lys Thr Val Glu Arg Lys Cys Cys Val Glu Cys

210 215 220

Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe

225	230	235	240
-----	-----	-----	-----

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

245	250	255
-----	-----	-----

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

260	265	270
-----	-----	-----

Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro

275	280	285
-----	-----	-----

Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr

290	295	300
-----	-----	-----

Val Val His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val

305	310	315	320
-----	-----	-----	-----

Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr

325	330	335
-----	-----	-----

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

340	345	350
-----	-----	-----

Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly

355	360	365
-----	-----	-----

Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro

370	375	380
-----	-----	-----

Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser

385	390	395	400
-----	-----	-----	-----

Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln

405	410	415
-----	-----	-----

Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His

420	425	430
-----	-----	-----

Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys

435	440
-----	-----

<210> 77

<211> 41

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Analogs of Human Exendin-4

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(1)

<223> X = C(0)CH3

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (3)..(3)

<223> X = Aib

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (15)..(15)

<223> X = KSH

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (41)..(41)

<223> X = NH2

<400> 77

Xaa His Xaa Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Gln Xaa Glu

1 5 10 15

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

20 25 30

Ser Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser Xaa

35 40

<210> 78

<211> 107

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (46)..(46)

<223> X = V or A

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (84)..(84)

<223> X = V or L

<400> 78

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu

1 5 10 15

Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
 20 25 30

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Xaa Leu Gln
 35 40 45

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
 50 55 60

Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu

65 70 75 80

Lys His Lys Xaa Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
 85 90 95

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 100 105

<210> 79

<211> 107

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 79

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
 1 5 10 15

Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe

20 25 30

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Val Leu Gln
 35 40 45

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
 50 55 60

Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
 65 70 75 80

Lys His Lys Leu Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser

85 90 95

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys

100 105

<210> 80

<211> 107

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 80

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu

1 5 10 15

Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe

20 25 30

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln

35 40 45

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser

50 55 60

Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu

65 70 75 80

Lys His Lys Leu Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser

85 90 95

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys

100 105

<210> 81

<211> 107

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 81

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu

1 5 10 15

Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe

20 25 30

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln

35 40 45

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser

50 55 60

Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu

65	70	75	80
Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser			
85	90	95	
Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys			
100	105		

<210> 82
<211> 330
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 82

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

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

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

130	135	140	
Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp			
145	150	155	160
Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu			
165	170	175	

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
 180 185 190
 His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
 195 200 205
 Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
 210 215 220
 Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu
 225 230 235 240
 Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
 245 250 255
 Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
 260 265 270
 Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
 275 280 285
 Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
 290 295 300
 Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
 305 310 315 320
 Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 325 330