



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2009년04월09일
 (11) 등록번호 10-0892545
 (24) 등록일자 2009년04월01일

(51) Int. Cl.
A61K 38/16 (2006.01) **C07K 14/00** (2006.01)
A61P 3/04 (2006.01)
 (21) 출원번호 10-2007-7017974
 (22) 출원일자 2007년08월03일
 심사청구일자 2007년08월03일
 번역문제출일자 2007년08월03일
 (65) 공개번호 10-2007-0094829
 (43) 공개일자 2007년09월21일
 (86) 국제출원번호 PCT/IB2006/000270
 국제출원일자 2006년01월30일
 (87) 국제공개번호 WO 2006/082517
 국제공개일자 2006년08월10일
 (30) 우선권주장
 60/650,366 2005년02월04일 미국(US)
 60/733,656 2005년11월04일 미국(US)
 (56) 선행기술조사문헌
 WO2003026591 A1
 WO2004089279 A1
 전체 청구항 수 : 총 24 항

(73) 특허권자
화이자 프로덕츠 인크.
 미국 06340 코네티컷주 그로톤 이스턴 포인트 로드
 (72) 발명자
핀, 로리, 프란시스
 미국 63017-1732 미주리주 체스터필드 체스터필드
 파크웨이웨스트 700 화이자 글로벌 리서치 앤드
 디벨롭먼트
시겔, 네드, 로저
 미국 63017-1732 미주리주 체스터필드 체스터필드
 파크웨이웨스트 700 화이자 글로벌 리서치 앤드
 디벨롭먼트
 (뒷면에 계속)
 (74) 대리인
김영, 양영준

심사관 : 강제환

(54) P Y Y 효능제 및 이의 용도

(57) 요약

본 발명은 PYY₃₋₃₆ 변이체 및 이의 PEG화 유도체, 및 NPY Y2 수용체 효능제에 의해 조정되는 용태의 치료에서 유용한 조성물 및 방법을 제공한다.

(72) 발명자

섬머스, 니나, 린

미국 63304-2423 미주리주 세인트 찰스 새틀메이커
드라이브 1203

나르돈, 낸시, 앤

미국 06340 코넥티컷주 그로톤 이스턴 포인트 로
드 화이자글로벌 리서치 앤드 디벨롭먼트

특허청구의 범위

청구항 1

아미노산 서열 IKPEAPGCDASPEELNRYASLRHYLNLVTRQRY-NH₂ [서열 3]의 폴리펩티드 (E10C)hPYY₃₋₃₆ 또는 이의 제약 상 허용가능한 염.

청구항 2

아미노산 서열 IKPEAPGECASPEELNRYASLRHYLNLVTRQRY-NH₂ [서열 4]의 폴리펩티드 (D11C)hPYY₃₋₃₆ 또는 이의 제약 상 허용가능한 염.

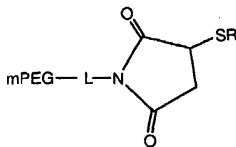
청구항 3

폴리에틸렌 글리콜 (PEG) 및 폴리펩티드 (E10C)hPYY₃₋₃₆ 또는 (D11C)hPYY₃₋₃₆을 포함하는 콘주게이트.

청구항 4

제3항에 있어서, 하기 화학식 3의 콘주게이트:

<화학식 3>



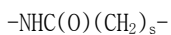
[식 중, mPEG는 메톡시 PEG이고, 선형 또는 분지형이며, 중량 평균 분자량이 1 kD 내지 50 kD 범위이고,

L은 하기 화학식의 기이거나:



(식 중 p 및 r은 독립적으로 1 내지 6의 정수이다),

또는 L은 하기 화학식의 기이고:



(식 중 s는 1 내지 6의 정수이다),

-SR은 폴리펩티드 (E10C)hPYY₃₋₃₆ 또는 (D11C)hPYY₃₋₃₆이며, 여기서 S는 시스테인 티올 기의 황 원자이다].

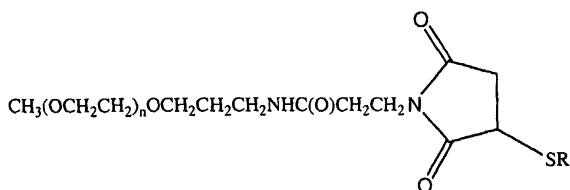
청구항 5

제4항에 있어서, mPEG가 선형인 콘주게이트.

청구항 6

제5항에 있어서, 하기 화학식 4의 콘주게이트:

<화학식 4>



[식 중, n은 600 내지 750 범위의 정수이고, -SR은 폴리펩티드 (E10C)hPYY₃₋₃₆이며, 여기서 S는 시스테인 티올

기의 황 원자이다].

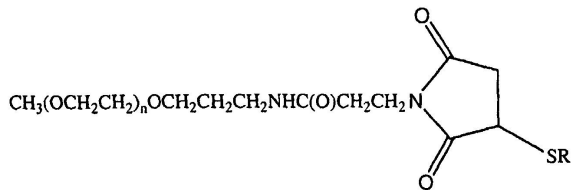
청구항 7

제6항에 있어서, $(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n$ 잔기(moiety)의 중량 평균 분자량이 30 kD인 콘쥬게이트.

청구항 8

제5항에 있어서, 하기 화학식 4의 콘쥬게이트:

<화학식 4>



[식 중, n은 375 내지 525 범위의 정수이고, -SR은 폴리펩티드 (E10C)hPYY₃₋₃₆이며, 여기서 S는 시스테인 티올
기의 황 원자이다].

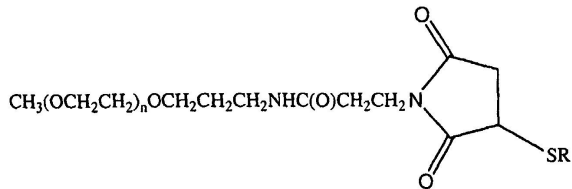
청구항 9

제8항에 있어서, $(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n$ 잔기의 중량 평균 분자량이 20 kD인 콘쥬게이트.

청구항 10

제5항에 있어서, 하기 화학식 4의 콘쥬게이트:

<화학식 4>



[식 중, n은 600 내지 750 범위의 정수이고, -SR은 폴리펩티드 (D11C)hPYY₃₋₃₆이며, 여기서 S는 시스테인 티올
기의 황 원자이다].

청구항 11

제10항에 있어서, $(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n$ 잔기의 중량 평균 분자량이 30 kD인 콘쥬게이트.

청구항 12

제4항에 있어서, mPEG가 분지형인 콘쥬게이트.

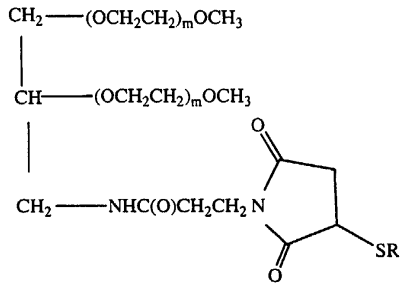
청구항 13

제12항에 있어서, mPEG가 글리세롤-분지형인 콘쥬게이트.

청구항 14

제13항에 있어서, 하기 화학식 5의 콘쥬게이트:

<화학식 5>



[식 중, 각각의 m은 동일하며, 450 내지 500 범위의 정수이고, -SR은 (E10C)hPYY₃₋₃₆ 폴리펩티드이며, 여기서 S는 시스테인 티올 기의 황 원자이다].

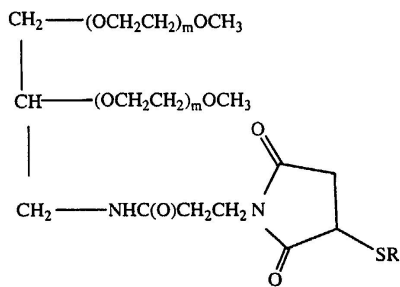
청구항 15

제14항에 있어서, 각각의 (OCH₂CH₂)_m 잔기의 중량 평균 분자량이 20 kD 내지 22 kD인 콘쥬게이트.

청구항 16

제13항에 있어서, 하기 화학식 5의 콘쥬게이트:

<화학식 5>



[식 중, 각각의 m은 동일하며, 450 내지 500 범위의 정수이고, -SR은 (D11C)hPYY₃₋₃₆ 폴리펩티드이며, 여기서 S는 시스테인 티올 기의 황 원자이다].

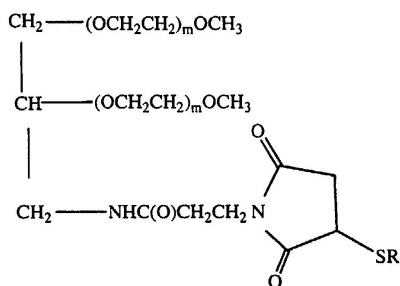
청구항 17

제16항에 있어서, 각각의 (OCH₂CH₂)_m 잔기의 중량 평균 분자량이 20 kD 내지 22 kD인 콘쥬게이트.

청구항 18

하기 화학식 5의 글리세롤-분지형 43k mPEG 말레이미드 (E10C)hPYY₃₋₃₆ 콘쥬게이트, 또는 이의 제약상 허용가능한 염:

<화학식 5>

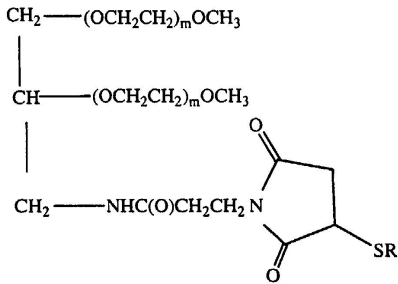


[식 중, 각각의 m은 동일하고, -SR은 (E10C)hPYY₃₋₃₆ 폴리펩티드이며, 여기서 S는 시스테인 티올 기의 황 원자이다].

청구항 19

하기 화학식 5의 글리세롤-분지형 43k mPEG 말레이미드 (D11C)hPYY₃₋₃₆ 콘쥬게이트, 또는 이의 제약상 허용가능한 염:

<화학식 5>



[식 중, 각각의 m은 동일하고, -SR은 (D11C)hPYY₃₋₃₆ 폴리펩티드이며, 여기서 S는 시스테인 티올 기의 황 원자이다].

청구항 20

삭제

청구항 21

삭제

청구항 22

제1항 또는 제2항의 폴리펩티드 또는 제3항 내지 제19항 중 어느 한 항의 콘쥬게이트 또는 이의 제약상 허용가능한 염, 및 제약상 허용가능한 담체를 포함하는, 비만 또는 과체중 상태를 치료하기 위한 제약 조성물.

청구항 23

삭제

청구항 24

제22항에 있어서, 상기 폴리펩티드, 콘쥬게이트 또는 염이 항비만제인 제2 약제와 조합된 것인 제약 조성물.

청구항 25

삭제

청구항 26

제1항 또는 제2항의 폴리펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드.

청구항 27

서열 3 또는 서열 4에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드에 특이적으로 결합하는 모노클로날 항체.

청구항 28

제27항에 있어서, 상기 폴리펩티드가 시스테인 잔기에서 PEG화된 것인 모노클로날 항체.

명세서

기술분야

<1> 본 발명은 PYY 효능제, 특히 PYY₃₋₃₆ 변이체, 및 PYY₃₋₃₆ 및 PYY₃₋₃₆ 변이체의 PEG화 유도체, 이같은 효능제를 함유하는 조성물, 이같은 PYY 효능제를 코딩하는 단리된 핵산, 및 비만 및 이의 동반이환의 치료에서의 또는 포유동물에서 식욕, 음식 섭취 또는 칼로리 섭취를 감소시키기 위한 이의 용도에 관한 것이다.

배경기술

<2> 비만은 이의 증가하는 유병률 및 관련된 건강 위협으로 인해 주요 공중 보건 문제이다. 또한, 비만은 제한된 이동성 및 감소된 신체적 지구력, 뿐만 아니라 사회적, 학업적 및 직업적 차별을 통해 개인의 삶의 질에 영향을 미칠 수 있다.

<3> 비만 및 과체중은 일반적으로 체질량 지수 (BMI)에 의해 규정되는데, 이 지수는 총 체지방과 상호관련되고, 특정 질환 위험도의 척도로서 기능한다. BMI는 kg 단위의 체중을 m² 단위의 신장으로 나눔으로써 계산된다 (kg/m²). 과체중은 대개 25-29.9 kg/m²의 BMI로 규정되고, 비만은 대개 30 kg/m² 이상의 BMI로 규정된다. 예를 들어, 문헌 [National Heart, Lung, and Blood Institute, Clinical Guidelines on the Identification, Evaluation, and Treatment of Overweight and Obesity in Adults, The Evidence Report, Washington, DC: U.S. Department of Health and Human Services, NIH publication no. 98-4083 (1998)] 참조.

<4> 최근의 연구에서 비만 및 이와 관련된 건강 위협이 성인에게 제한되지 않고, 아동 및 청소년에게 놀라운 정도로 영향을 미친다는 것이 발견되었다. 질환 제어 센터(Center for Disease Control)에 따르면, 과체중으로 규정되는 아동 및 청소년의 백분율이 1970년대 초반 이후로 2배 이상 증가하였고, 현재 약 15%의 아동 및 청소년이 과체중이다. 심장 질환에 대한 위험 인자, 예컨대 높은 콜레스테롤 및 높은 혈압이 유사한 연령의 정상 체중인 대상에 비하여 과체중인 아동 및 청소년에서 증가된 빈도로 발생한다. 또한, 기존에 성인 질환으로 여겨졌던 제2형 당뇨병이 아동 및 청소년에서 현저하게 증가하였다. 과체중 상태 및 비만은 제2형 당뇨병과 밀접하게 연관된다. 과체중 청소년은 과체중 또는 비만 성인이 될 가능성이 70%인 것으로 최근에 추정되었다. 부모 중 한명 이상이 과체중 또는 비만인 경우 가능성이 약 80%로 증가한다. 아동 자신이 지각하는 과체중인 것의 가장 즉각적인 결과는 사회적 차별이다.

<5> 과체중 또는 비만인 개인은 고혈압, 제2형 (비-인슐린 의존성) 당뇨병, 인슐린 저항성, 글루코스 불내성, 고인슐린혈증, 관상동맥 심질환, 협심증, 울혈성 심부전, 뇌졸중, 담석, 쓸개염, 담석증, 통풍, 골관절염, 폐쇄성 수면 무호흡 및 호흡 문제, 담낭 질환, 특정 형태의 암 (예를 들어, 자궁내막암, 유방암, 전립선암 및 결장암) 및 심리학 적 장애 (예컨대 우울증, 식이 장애, 왜곡된 신체 이미지 및 낮은 자존심)와 같은 병의 위험이 증가된다. 건강에 대한 비만의 부정적인 영향은 이를 미국에서 예방가능한 사망의 두번째로 높은 원인으로 만들고, 상당한 경제적 및 심리사회적인 효과를 사회에 부여한다. [McGinnis M, Foege WH., "Actual Causes of Death in the United States," JAMA 270:2207-12, 1993] 참조.

<6> 현재 비만은 이의 관련된 건강 위협을 감소시키기 위해 치료를 필요로 하는 만성 질환으로 인식된다. 체중 감소가 중요한 치료 결과이지만, 비만 관리의 주요 목표 중 하나는 심혈관 및 대사 수치를 개선시켜 비만 관련 이환율 및 사망률을 감소시키는 것이다. 체중의 5-10% 감량이 대사 수치, 예컨대 혈중 글루코스, 혈압, 및 지질 농도를 실질적으로 개선시킬 수 있는 것으로 나타났다. 따라서, 체중의 5-10% 감소가 이환율 및 사망률을 감소시킬 수 있을 것으로 여겨진다.

<7> 일반적으로 비만 관리를 위한 현재 이용가능한 처방 약물은 올리스타트(orlistat)과 같이 식이 지방 흡수를 감소 시킴으로써, 또는 시부트라민과 같이 음식 섭취를 감소시키고/시키거나 에너지 소비를 증가시켜 에너지 결핍을 생성시킴으로써 체중을 감소시킨다. 현재 이용가능한 항비만제의 대안에 대한 연구가 여러가지 경로를 통해 취해졌고, 그중 하나는 펩티드 YY (PYY)와 같이 포만감을 조정하는데 관련된 특정 장 펩티드에 초점을 맞추었다.

<8> PYY는 체장 폴리펩티드 (PP) 족의 호르몬의 구성원이다 (PP 및 뉴로펩티드 Y (NPY)와 함께). 다른 족 구성원과 같이, PYY는 C-말단 아미드화된, 아미노산 36개의 펩티드이다. 이는 돼지 소장에서 최초로 단리되고 ([Tatemoto and Mutt, Nature 285:417-418, 1980]), 이어서 말초 투여 후 래트에서 고지방 음식 섭취를 감소시키고 ([Okada et al., Endocrinology Supplement 180, 1993]), 말초 투여 후 마우스에서 체중 감소를 야기하는 ([Morley and Flood, Life Sciences 41:2157-2165, 1987]) 것으로 보고된 장 내분비 펩티드이다. 여러 저장형 및 순환형 분자 형태의 PYY가 존재하는 것으로 공지되어 있다 ([Chen et al., Gastroenterology 87:1332-1338, 1984]; 및 [Roddy, et al., Regul Pept 18:201-212, 1987]). 이같은 형태 중 하나인 PYY₃₋₃₆은 인간 결장 점막

추출물에서 단리되었고 ([Eberlein et al., Peptides 10:797-803, 1989]), 인간의 식후 혈장 내에서 우세한 형태의 PYY인 것으로 밝혀졌다 ([Grandt et al., Regul. Pept. 51 :151-159, 1994]). PYY₃₋₃₆은 고친화력의 NPY Y2 수용체 (Y2R) 선택적 효능제인 것으로 보고되었다 ([Keire et al., Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol. 279:G126-G131, 2000]). PYY₃₋₃₆의 말초 투여는 래트에서 음식 섭취 및 체중 증가를 현저하게 감소시키고, 인간에서 식욕 및 음식 섭취를 감소시키고, 마우스에서 음식 섭취를 감소시키지만, Y2R-무효화(null) 마우스에서는 음식 섭취를 감소시키지 않는 것으로 보고되었고, 이는 음식 섭취 효과가 Y2R을 필요로 한다는 것을 시사하는 것으로 언급되었다. 인간 연구에서, PYY₃₋₃₆의 주입은 식욕을 감소시키고 24시간에 걸쳐 음식 섭취를 33% 감소시키는 것으로 밝혀졌다. 펩티드의 정상적인 식후 순환 농도에 도달하도록 PYY₃₋₃₆을 주입하면 15분 이내에 PYY₃₋₃₆의 피크(peak) 혈청 수준에 이른 후, 30분 이내에 기저 수준으로 급속하게 감소하였다. PYY₃₋₃₆ 주입 후 12시간 동안 음식 섭취가 상당히 억제되었지만, 12-24시간 기간에는 음식 섭취에 대해 본질적으로 효과가 없는 것으로 보고되었다. 래트 연구에서, PYY₃₋₃₆의 반복된 복강내 투여 (7일 동안 1일 2회 주사)는 누적 음식 섭취를 감소시켰다 ([Batterham, et al., Nature 418:650-654, 2002]).

<9> 폴리펩티드계 약물은 이의 생체내 반감기를 연장시키기 위해 폴리에틸렌 글리콜과 같은 중합체에 종종 공유결합으로 부착된다. 그러나, 이는 종종 생물학적 또는 약리학적 활성의 급격한 손실에 이른다 ([Shechter et al., FEBS Letters 579:2439-2444, 2005]; [Fuerteges and Abuchowski, J. Control Release 11:139-148, 1990]; [Katre, Adv. Drug Del. Sys. 10:91-114, 1993]; [Bailon and Berthold, Pharm. Sci. Technol. Today 1:352-356, 1996]; [Nucci et al., Adv. Drug Delivery Rev. 6, 1991]; [Delgado et al., Critical Rev. Ther. Drug Carrier Syst. 9:249-304, 1992]; [Fung et al., Polym. Preprints 38:565-566, 1997]; [Reddy, Ann. Pharmacother. 34:915-923, 2000]; [Veronese, Biomaterials 22:405-417, 2001]). 예를 들어, [Shechter et al., 상기 문헌]에서는 마우스를 사용한 음식 섭취 연구 (피하 주사)에서 안정적인 결합의 형성을 통한 표준 화학반응에 의한 PYY₃₋₃₆의 40 kD PEG화 (40 kD PEG-PYY₃₋₃₆) 결과 PYY₃₋₃₆이 완전히 불활성화되었다는 것이 보고되었다. 그러나, PYY₃₋₃₆의 가역적인 PEG화 (40 kD PEG-FMS-PYY₃₋₃₆) 결과는 기능적인 반감기가 8배 (24시간 대 3시간) 증가하였다는 것이 또한 [Shechter et al., 상기 문헌]에서 보고되었다. 또한 PCT 특허 출원 WO 2004/089279 및 WO 03/026591 참조.

<10> **발명의 개요**

<11> 본 발명은 PYY₃₋₃₆의 변이체인 PYY 효능제에 관한 것이다.

<12> 본 발명의 한 양상에서, PYY 효능제는 폴리에틸렌 글리콜 (PEG)과 같은 친수성 중합체와 콘주게이트 가능한 관능기, 예를 들어, 케토, 티올, 히드록실, 카르복실, 또는 유리 아미노 관능기를 갖는, 시스테인, 라이신, 세린, 트레오닌, 타이로신, 및 비천연 아미노산으로 구성되는 군으로부터 선택된 아미노산 "X"로 잔기 10 (글루탐산) 또는 잔기 11 (아스파르트산)이 치환된 포유류 PYY₃₋₃₆의 변이체이고, 이같은 변이체는 각각 (E10X)PYY₃₋₃₆ 또는 (D11X)PYY₃₋₃₆으로 명명된다.

<13> 잔기 "X"는 바람직하게는 시스테인이고, 따라서 상응하는 변이체는 (E10C)PYY₃₋₃₆ 및 (D11C)PYY₃₋₃₆이다

<14> 본 발명의 바람직한 실시양태에서, PYY 효능제는 인간 PYY₃₋₃₆ (hPYY₃₋₃₆), 소 PYY₃₋₃₆, 고양이 PYY₃₋₃₆ 또는 말 PYY₃₋₃₆, 더욱 바람직하게는 hPYY₃₋₃₆의 변이체이다.

<15> 본 발명의 바람직한 실시양태에서, PYY 효능제는 아미노산 서열 IKPEAPGCDASPEELNRYASLRHYLNLVTRQRY-NH₂ [서열 3]의 폴리펩티드 (E10C)hPYY₃₋₃₆, 또는 이의 제약상 허용가능한 염이다.

<16> 추가적인 바람직한 실시양태에서, PYY 효능제는 아미노산 서열 IKPEAPGECASPEELNRYASLRHYLNLVTRQRY-NH₂ [서열 4]의 폴리펩티드 (D11C)hPYY₃₋₃₆, 또는 이의 제약상 허용가능한 염이다.

<17> 가장 바람직하게는, 효능제는 (E10C)hPYY₃₋₃₆이다.

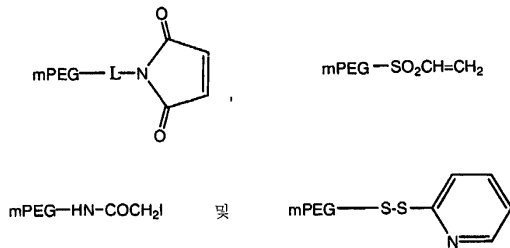
<18> 바람직하게는 본 발명의 PYY 효능제는 친수성 중합체, 바람직하게는 PEG에 콘주게이트된다. 효능제는 모노-PEG 화되는 것이 바람직하고, 즉 효능제 대 PEG의 비율이 약 1:1이고, PEG는 (E10X)PYY₃₋₃₆ 및 (D11X)PYY₃₋₃₆ 내의

"X"의 콘쥬게이트 가능한 관능기, 예컨대 케토, 티올, 히드록실, 카르복실, 또는 유리 아미노 관능기에서 부착된다. PEG는 선형, 분지형, 또는 펜던트(pendant)형일 수 있고; 더욱 바람직하게는, 선형 또는 분지형이고; 가장 바람직하게는 선형이다.

<19> 선형 PEG에서, PEG의 한 말단은 PEG를 효능제에 커플링시키는 조건 하에 불활성인 기, 예를 들어, 에테르 기, 바람직하게는 메톡시 기로 캡핑(capping)된다. 이러한 방식으로 (메톡시 기로) 종결된 PEG는 통상적으로 mPEG로 지칭된다. 또다른 말단은 PYY 효능제와의 커플링에 대해 활성화된다. 유사하게, 본 발명에서 유용한 분지형 PEG로는, 1개를 제외한 모든 말단이 에테르-캡핑되고, 에테르 캡핑되지 않은 말단이 커플링에 대해 활성화된다. 한 실시양태에서, PEG의 에테르-캡핑되지 않은 말단이 (E10X)PYY₃₋₃₆ 또는 (D11X)PYY₃₋₃₆ 내의 아미노산 "X"의 콘쥬게이트 가능한 관능기와 반응성인 관능기에 PEG를 연결시키는 링커(linker) 잔기(moiety) ("L")로 캡핑되어, X의 콘쥬게이트 가능한 관능기에 PEG가 공유결합으로 부착된 콘쥬게이트가 제조된다. 추가적인 실시양태에서, PEG는 링커 잔기를 포함하지 않으면서 반응성 기에 직접적으로 부착된다. 이같은 PEG는 종종 "링커가 없는" PEG로 칭해진다.

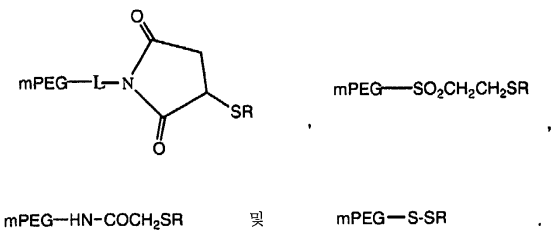
<20> (E10C)PYY₃₋₃₆ 및 (D11C)PYY₃₋₃₆ 폴리펩티드에 대해, PEG가 시스테인 티올 기에 공유결합으로 부착된 콘쥬게이트가 제조되도록 시스테인 잔기의 티올과 반응할 말레이미드 또는 또다른 기에 PEG를 연결시키는 링커에 PEG의 에테르-캡핑되지 않은 말단이 부착되는 것이 바람직하다.

<21> (E10C)PYY₃₋₃₆ 또는 (D11C)PYY₃₋₃₆과 함께 사용하기에 적절한 반응성 PEG에는 하기 화학식의 PEG가 포함된다:



<22> 바람직하게는, PEG는 링커 잔기 -L-을 포함하는 상기 도시된 mPEG 말레이미드이다. 링커가 없는 PEG 말레이미드 또한 본 발명에서, 특히 (E10C)PYY₃₋₃₆ 또는 (D11C)PYY₃₋₃₆과 함께 사용하기에 적절하다. 이같은 링커가 없는 PEG 말레이미드는 [Goodson and Katre, Bio/Technology 8:343-346, 1990]에 기술된 바와 같이 제조할 수 있다.

<24> (E10C)PYY₃₋₃₆ 또는 (D11C)PYY₃₋₃₆ 폴리펩티드를 상기 제시된 mPEG와 커플링시키는 것으로부터 제조된 콘쥬게이트는 하기 화학식으로 도시되며, 식 중 -SR은 (E10C)PYY₃₋₃₆ 또는 (D11C)PYY₃₋₃₆ 폴리펩티드이고, 여기서 S는 시스테인 티올 기의 황 원자이다:



<25> mPEG-HN-COCH₂SR 및 mPEG-S-SR

<26> 링커 -L-은 단지 PEG를 반응성 관능기에 연결시키는 기능을 하고, 따라서 특별히 한정되지 않지만, 바람직하게는 2차 아미노 기, 에스테르 결합, 우레탄 결합, 아마이드 결합, 에테르 결합, 또는 카르보네이트 결합을 함유하는 알킬렌 기를 포함한다.

<27> 바람직한 실시양태에서, 특히 선형 PEG에 대해, 링커는 하기 화학식의 기이다:

<28> -O(CH₂)_pNHC(O)(CH₂)_r-

<29> [식 중, p는 1 내지 6의 정수, 바람직하게는 1 내지 3, 더욱 바람직하게는 2 또는 3, 가장 바람직하게는 3이고, r은 1 내지 6의 정수, 바람직하게는 1 내지 3, 더욱 바람직하게는 2 또는 3, 가장 바람직하게는 2이다]. 바람

직한 링커는 $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHCOCH}_2\text{CH}_2-$ 기이다.

<30> 또다른 바람직한 실시양태에서, 특히 분지형 PEG에 대해, 링커는 하기 화학식의 기이다:

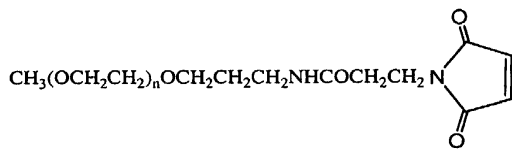
<31> $-\text{NHC}(\text{O})(\text{CH}_2)_s-$

<32> [식 중, s는 1 내지 6의 정수, 바람직하게는 1 내지 3, 더욱 바람직하게는 2 또는 3, 가장 바람직하게는 2이다]. 바람직한 링커는 $-\text{NHC}(\text{O})\text{CH}_2\text{CH}_2-$ 기이다.

<33> PEG는 선형 또는 비선형, 예를 들어, 분지형 또는 펜던트일 수 있다. 바람직하게는, PEG는 선형 또는 분지형이고, 바람직하게는, 선형 또는 분지형 mPEG 말레이미드이다. 글리세롤-분지형 mPEG 말레이미드가 바람직한 분지형 PEG이다. 바람직하게는, PEG는 선형 mPEG 말레이미드이다. PEG는 중량 평균 분자량이 약 1 kD 내지 약 50 kD 범위 내여야 한다. 바람직하게는, 평균 분자량은 약 5 kD 내지 약 45 kD 범위; 더욱 바람직하게는, 약 10-12 kD 내지 약 40-45 kD, 또는 약 20 kD 내지 약 40-45 kD이다. 중량 평균 분자량이 약 20 또는 약 30 kD인 선형 mPEG, 예컨대 화학식 1에 제시된 것이 특히 주목된다. 화학식 2의 글리세롤-분지형 mPEG 또한 주목되고, 이의 중량 평균 분자량은 바람직하게는 약 20 kD 또는 약 43 kD이다.

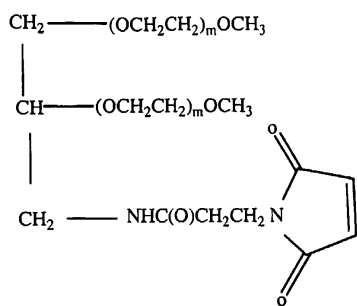
<34> (E10C)hPYY₃₋₃₆ 또는 (D11C)PYY₃₋₃₆의 시스테인 티올 기와의 콘주게이션에 대해 적합하게 활성화된 바람직한 PEG는 화학식 1 및 2의 화합물이다. 화학식 1의 선형 mPEG에서, n은 약 175 내지 800; 바람직하게는 약 375 내지 525 또는 약 600 내지 750, 또는 약 425 내지 475 또는 약 650 내지 700, 또는 약 437 내지 463 또는 675 내지 700이다. 화학식 2의 글리세롤-분지형 mPEG에서, 각각의 m은 대략 동일하고, 약 150 내지 500 범위의 정수; 바람직하게는 약 160 내지 285 또는 약 400 내지 525, 또는 약 200 내지 250 또는 450 내지 500이다.

화학식 1



<35>

화학식 2



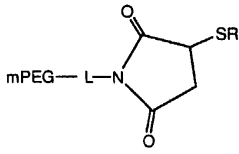
<36>

<37> 펩티드 아미노산의 측쇄 내의 표적 관능기, 예를 들어, 케토, 티올, 히드록실, 카르복실 또는 유리 아미노 관능기와의 콘주게이션에 대해 적합하게 활성화된 광범위한 PEG가 다수의 공급업자, 예를 들어, NOF Corporation (Tokyo, Japan), 또는 Nektar Therapeutics Corporation (Huntsville, AL)으로부터 시판된다.

<38> 본 발명의 또다른 양상은 본 발명의 PYY₃₋₃₆ 변이체와 폴리에틸렌 글리콜의 콘주게이트에 관한 것이다.

<39> 한 실시양태에서, 콘주게이트는 하기 화학식 3의 화합물이다:

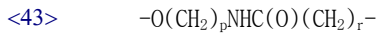
화학식 3



<40>

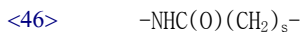
<41> [식 중, mPEG 잔기는 선형 또는 분지형이고, 중량 평균 분자량이 약 1 kD 내지 50 kD, 바람직하게는 5 kD 내지 약 45 kD, 더욱 바람직하게는 약 10 kD 또는 12 kD 내지 약 40 또는 45 kD, 또는 약 20 kD 내지 약 40 kD 또는 45 kD 범위이고,

<42> L은 하기 화학식의 기이거나:



<44> (식 중 p는 1 내지 6의 정수, 바람직하게는 1 내지 3, 더욱 바람직하게는 2 또는 3, 가장 바람직하게는 3이고 (하기 화학식 4에 도시된 바와 같음); r은 1 내지 6의 정수, 바람직하게는 1 내지 3, 더욱 바람직하게는 2 또는 3, 가장 바람직하게는 2이다),

<45> 또는 L은 하기 화학식의 기이고:

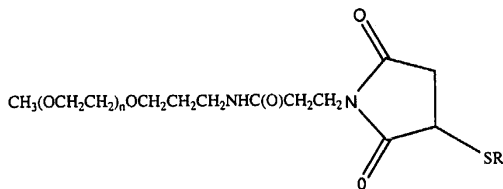


<47> (식 중 s는 1 내지 6의 정수, 바람직하게는 1 내지 3, 더욱 바람직하게는 2 또는 3, 가장 바람직하게는 2이다),

<48> -SR은 폴리펩티드 (E10C)hPYY₃₋₃₆ 또는 (D11C)hPYY₃₋₃₆이고, 여기서 S는 시스테인 티올 기의 황 원자이다].

<49> 본 발명의 바람직한 실시양태는 하기 화학식 4의 선형 mPEG-PYY₃₋₃₆ 변이체 콘쥬게이트, 또는 이의 제약상 허용 가능한 염이다:

화학식 4

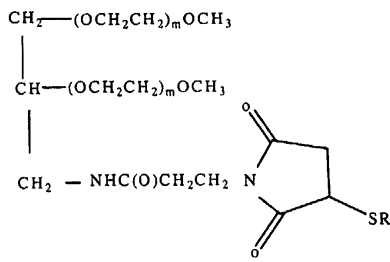


<50>

<51> [식 중, n은 약 175 내지 800 범위의 정수; 바람직하게는 약 375 내지 525 또는 약 600 내지 750, 또는 약 437 내지 463 또는 약 675 내지 700이고; -SR은 폴리펩티드 (E10C)hPYY₃₋₃₆ 또는 (D11C)hPYY₃₋₃₆이고, 여기서 S는 시스테인 티올 기의 황 원자이다]. 바람직하게는, (CH₂CH₂O)_n 잔기의 중량 평균 분자량은 약 20 kD 또는 30 kD이다. -SR이 폴리펩티드 (E10C)hPYY₃₋₃₆인 콘쥬게이트가 특히 주목된다.

<52> 본 발명의 추가적인 양상은 PEG 잔기가 분지형인 콘쥬게이트에 관한 것이다. 이러한 카테고리의 바람직한 콘쥬게이트는 글리세롤-분지형 PEG 잔기를 포함한다. 하기 화학식 5의 콘쥬게이트, 또는 이의 제약상 허용가능한 염이 특히 주목된다:

화학식 5



<53>

<54>

[식 중, 각각의 m은 대략 동일하고, 약 150 내지 500 범위의 정수; 바람직하게는 약 160 내지 285 또는 약 400 내지 525, 또는 약 200 내지 250 또는 450 내지 500이고, -SR은 (E10C)hPYY₃₋₃₆ 또는 (D11C)hPYY₃₋₃₆ 폴리펩티드 이고, 여기서 S는 시스테인 티올 기의 황 원자이다]. 바람직하게는, 각각의 (CH₂CH₂O)_m 잔기의 중량 평균 분자량은 약 9-11 kD 또는 약 20-22 kD 범위이다. 바람직하게는, (CH₂CH₂O)_m 잔기들의 합계 중량 평균 분자량은 약 20 kD 또는 약 43 kD이다. -SR이 폴리펩티드 (E10C)hPYY₃₋₃₆인 콘주게이트가 특히 주목된다.

<55>

본 발명은 서열 3 또는 서열 4에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드에 특이적으로 결합하는 모노클로날 항체를 또한 제공한다. 본 발명의 이러한 양상의 한 실시양태에서, 폴리펩티드는 시스테인 잔기에서 PEG화된다.

<56>

또한, 본 발명은 본 발명의 폴리펩티드 서열을 코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열을 제공하고, 바람직하게는 이는 서열 3 및 서열 4를 코딩한다.

<57>

본 발명의 또다른 실시양태에서, 본 발명의 PYY 효능제 및 제약상 허용가능한 담체를 포함하는 제약 조성물이 제공된다. 추가적인 실시양태에서, 조성물은 조성물의 1차 적응증 또는 1차 적응증의 동반이환의 치료에 유용한 작용제일 수 있는 1가지 이상의 추가적인 약제를 또한 포함한다. 추가적인 약제는 바람직하게는 항비만제이다. 바람직하게는 조성물은 치료 유효량의 본 발명의 PYY 효능제 또는 치료 유효량의 본 발명의 PYY 효능제 및 추가적인 약제의 배합물을 포함한다.

<58>

Y2R 효능제에 의해 조정되는 질환, 용태 또는 장애의 치료를 필요로 하는 포유동물에게 치료 유효량의 본 발명의 PYY 효능제를 말초 투여하는 것을 포함하는, 포유동물에서 Y2R 효능제에 의해 조정되는 질환, 용태 또는 장애를 치료하는 방법이 또한 제공된다. 본 발명의 PYY 효능제는 단독으로, 또는 질환, 용태 또는 장애 또는 질환, 용태 또는 장애의 동반이환의 치료에 유용한 1가지 이상의 추가적인 약제와 조합되어 사용될 수 있다. 포유동물에서 Y2R 효능제에 의해 조정되는 질환, 용태 또는 장애에는 비만 및 과체중이 포함된다. 이같은 질환, 용태 또는 장애의 동반이환이 이같은 질환, 용태 또는 장애의 치료에 의해 부수적으로 개선될 것이다. 치료 유효량의 본 발명의 PYY 효능제를 포유동물에게 말초 투여하는 것을 포함하는, 비만의 치료를 필요로 하는 포유동물에서 비만을 치료하는 방법이 또한 제공된다.

<59>

체중을 제어하는 양 또는 체중을 감소시키는 양의 본 발명의 PYY 효능제를 포유동물에게 말초 투여하는 것을 포함하는, 포유동물에서 체중을 감소시키거나 체중 감소를 촉진하는 방법 (체중 증가를 방지 또는 억제하는 것 포함)이 또한 제공된다.

<60>

음식 섭취를 감소시키는 양의 본 발명의 PYY 효능제를 포유동물에게 말초 투여하는 것을 포함하는, 포유동물에서 음식 섭취를 감소시키는 방법이 또한 제공된다.

<61>

포만감을 유도하는 양의 본 발명의 PYY 효능제를 포유동물에게 말초 투여하는 것을 포함하는, 포유동물에서 포만감을 유도하는 방법이 또한 제공된다.

<62>

열량 섭취를 감소시키는 양의 PYY 효능제를 포유동물에게 말초 투여하는 것을 포함하는, 포유동물에서 열량 섭취를 감소시키는 방법이 또한 제공된다. PYY 효능제는 단독으로, 또는 1가지 이상의 추가적인 약제, 바람직하게는 항비만제와 조합되어 투여될 수 있다.

<63>

본 명세서 및 첨부된 청구항에서 기술된 각각의 방법에서, PYY 효능제는 단독으로, 또는 1가지 이상의 추가적인 약제, 바람직하게는 항비만제와 조합되어 투여될 수 있다.

<64>

본 발명의 PYY 효능제 및 이를 함유하는 조성물은 본원에서 언급된 치료 용도를 위한 약제의 제조에서 또한 유

용하다.

<65> 정의 및 약어

<66> 구절 "제약상 허용가능한"은 물질 또는 조성물이 제형을 이루는 다른 성분들 및/또는 이러한 물질 또는 조성물로 치료되는 포유동물과 화학적 및/또는 독성학적으로 상용성이어야 한다는 것을 의미한다.

<67> 용어 "PYY 효능제"는 생체 내에서 또는 시험관 내에서 PYY, 바람직하게는 PYY₃₋₃₆에 의해 도출되는 1가지 이상의 효과를 도출하는 임의의 화합물을 의미한다.

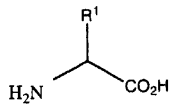
<68> 구절 "치료 유효량"은 처치 전에 또는 비히클(vehicle)로 처치된 군에서 측정된 적합한 대조군 값과 비교하여 열량 섭취를 감소시키고/시키거나, 체중을 감소시키고/시키거나 체지방을 감소시키는 본 발명의 PYY 효능제의 양을 의미한다.

<69> 용어 "포유동물"은 인간, 뿐만 아니라 포유류 강 내의 항상성 메커니즘을 지닌 동물계의 모든 기타 온혈 구성원, 예를 들어, 반려 포유동물, 동물원 포유동물 및 식품 공급원 포유동물을 의미한다. 반려 포유동물의 일부 예는 개과 동물 (예를 들어, 개), 고양이과 동물 (예를 들어, 고양이) 및 말이 포함된다; 식품-공급원 포유동물의 일부 예는 돼지, 소, 양 등이다. 바람직하게는, 포유동물은 인간 또는반려 포유동물이다. 가장 바람직하게는, 포유동물은 남성 또는 여성 인간이다.

<70> 용어 "처치함", "처치하다", 또는 "처치"는 방지적, 즉 예방적 처치 및 치료적 처치 모두를 포함한다.

<71> 용어 "말초 투여"는 중추 신경계 외부에서의 투여를 의미한다. 말초 투여는 뇌의 직접적인 투여를 포함하지 않는다. 말초 투여는 정맥내, 근육내, 피하, 흡입, 경구, 설하, 장내, 직장, 경피, 또는 비강내 투여를 포함하지만, 이에 한정되지는 않는다.

<72> 본 발명에서 사용하기에 적절한 비천연 아미노산은 전형적으로 20개의 천연 발생 아미노산 이외의 임의의 하기 화학식의 아미노산이고 ([Cantor and Shimmel, Biophysical Chemistry, Part 1, WH Freeman & Sons, San Fransisco, 42-43, 1980]), 예컨대 거명에 의해 전체적으로 본원에 포함된 미국 특허 출원 공보 2005/0208536 에 개시된 것들이다:



<73>

<74> [식 중, R¹은 케토, 티올, 카르복실, 히드록실 또는 유리 아미노 관능기를 포함하는 임의의 치환체이다].

<75> 이같은 비천연 아미노산에는, 예를 들어, 티오타이로신, 오르니틴 3-메르캅토펜알라닌, 3- 또는 4-아미노페닐알라닌, 3- 또는 4-아세틸페닐알라닌, 2- 또는 3-히드록시페닐알라닌 (o- 또는 m-타이로신), 히드록시메틸글리신, 아미노에틸글리신, 1-메틸-1-메르캅토펜알라닌, 아미노에틸티오에틸글리신 및 메르캅토펜알라닌이 포함된다. 본 발명에서 유용한 다수의 비천연 아미노산이 시판된다. 또다른 것들은 당업계에 공지된 방법에 의해 제조할 수 있다. 예를 들어, 티오타이로신을 거명에 의해 본원에 포함된 [Lu et al., J. Am. Chem. Soc. 119:7173-7180, 1997]에 기술된 방법에 의해 제조할 수 있다

<76> 용어 "인간 PYY" 또는 "hPYY"는 하기의 아미노산 서열을 갖는, 아미노산 36개의 C-말단 아미드화된 폴리펩티드를 의미한다:

<77> YPIKPEAPGEDASPEELNRYASLRHYLNLVTRQRY-NH₂ [서열 1].

<78> 용어 "hPYY₃₋₃₆"은 하기의 아미노산 서열을 갖는 C-말단의 34량체 hPYY를 의미한다:

<79> IKPEAPGEDASPEELNRYASLRHYLNLVTRQRY-NH₂ [서열 2].

<80> 용어 "(E10C)hPYY₃₋₃₆"은 하기의 아미노산 서열을 갖는, hPYY의 글루탐산 잔기 10이 시스테인 잔기로 치환된 C-말단 34량체 hPYY를 의미한다:

<81> IKPEAPGCDASPEELNRYASLRHYLNLVTRQRY-NH₂ [서열 3].

<82> 용어 "(D11C)hPYY₃₋₃₆"은 하기의 아미노산 서열을 갖는, hPYY의 아스파르트산 잔기 11이 시스테인 잔기로 치환된 C-말단 34량체 hPYY를 의미한다:

<83> IKPEAPGECASPEELNRYRYASLRHYLNLVTRQRY-NH₂ [서열 4].

발명의 상세한 설명

<100> 본 발명은 감소된 소거율, 증가된 혈장 잔류 기간, 연장된 생체내 활성, 증가된 효능, 증가된 안정성, 개선된 용해도 및 감소된 항원성으로부터 선택되지만 이에 한정되지 않는 1가지 이상의 개선된 화학적 또는 생리학적 성질을 가질 수 있는, PYY₃₋₃₆의 변이체인 PYY 효능제, 및 이의 PEG화 콘쥬게이트에 관한 것이다.

<101> 바람직한 본 발명의 PYY₃₋₃₆ 변이체는 (E10C)hPYY₃₋₃₆이다. 또다른 바람직한 변이체는 (D11C)hPYY₃₋₃₆이다. 이러한 본 발명의 변이체 및 또다른 본 발명의 변이체는 합성적으로, 그리고 하기 및 본원의 실시예에 기술된 바와 같이 제조 및 기타 수단에 의해, 또는 유사한 방법에 의해 제조할 수 있다.

<102> 상기 열거된 치환 (예를 들어, E10C 및 D11C)에 더하여, 본 발명의 PYY 효능제는 또다른 아미노산 위치에서 1개 이상의 보존성 아미노산 치환을 또한 포함할 수 있다. 보존성 치환은, 예를 들어, 하기 표에 따라 이루어질 수 있다. 지방족의 비극성 아미노산, 전하를 띠지 않는 극성 아미노산 및 전하를 띠는 극성 아미노산이 각각 비극성 아미노산, 전하를 띠지 않는 극성 아미노산 또는 전하를 띠는 극성 아미노산인 또다른 지방족 아미노산으로 치환될 수 있다. 바람직하게는, 이같은 치환은 하기 표의 세번째 열의 동일한 행 내의 아미노산들 사이에서 일어난다. 하기 표에 열거된 바와 같은 방향족 아미노산들 사이에서 보존성 아미노산 치환이 또한 이루어질 수 있다.

<103>

| | | |
|-----|--------------|----------------|
| 지방족 | 비극성 | G A P I L V |
| | 전하를 띠지 않는 극성 | C S T M N Q |
| | 전하를 띠는 극성 | D E K R |
| 방향족 | | H F W Y |

<104> 합성 제조

<105> 본 발명의 PYY₃₋₃₆ 변이체, 예를 들어, (E10C)hPYY₃₋₃₆ 및 (D11C)hPYY₃₋₃₆을 당업계에 공지된 표준 펩티드 합성 기술을 사용하여, 예를 들어, tBoc 또는 Fmoc 화학을 사용하여 자동 펩티드 합성기 (예를 들어, 모델 433A; Applied Biosystems, Foster City, CA)로 수행되는 고체상 펩티드 합성에 의해 제조할 수 있다. 이용가능한 많은 펩티드 합성 기술의 개요를 [Solid Phase Peptide Synthesis 2nd ed. (Stewart, J. M. and Young, J. D., Pierce Chemical Company, Rockford, IL, 1984)]에서 확인할 수 있다. 또한 도서 [Solid-phase Organic Synthesis (Burgess, K., John Wiley & Sons, New York, NY, 2000)] 및 논문 [Engels et al., Angew. Chem. Intl. Ed. 28:716-34, 1989] 참조. 모든 상기 참조문헌들은 거명에 의해 본원에 포함된다.

<106> 바람직하게는 본 발명의 PYY₃₋₃₆ 변이체는 PEG와 콘쥬게이트된다. PEG화 반응으로 지칭되는 콘쥬게이션 반응은 역사적으로 몰 과량의 중합체와 함께, 그리고 중합체가 어느 곳에서 단백질에 부착되는지와 상관없이, 용액 내에서 수행되었다. 그러나, 이같은 일반적인 기술은 충분한 생활성(bioactivity)을 유지하면서 생활성 단백질을 비항원성 중합체에 콘쥬게이트시키는데 부적절한 것으로 전형적으로 입증되었다. PEG화 후 PYY₃₋₃₆ 효능제 변이체의 생활성을 유지시키는 한 방법은, 커플링 공정에서, 효능제가 표적 수용체에 결합하는 것에 관련된 변이체의 임의의 반응성 기의 콘쥬게이션을 실질적으로 피하는 것이다. 본 발명의 한 양상은 높은 수준의 활성을 유지시키기 위해 수용체 결합 부위(들)을 실질적으로 방해하지 않는 특정 반응성 부위에서 본 발명의 PYY₃₋₃₆ 변이체 효능제에 폴리에틸렌 글리콜을 콘쥬게이트시키는 방법을 제공하는 것이다. 본 발명의 또다른 양상은 반응성 잔기를 PYY₃₋₃₆ 내로 삽입하여 제한적인 활성 변경과 함께 폴리에틸렌 글리콜을 콘쥬게이트시키기 위한 이의 효능제 변이체를 제공하는 것이다.

<107> 생물학적으로 활성인 물질과 활성화된 PEG의 콘쥬게이션 반응에 일반적으로 채택되는 임의의 적절한 조건 하에

공유 결합을 통한 화학적 변형이 수행될 수 있다. 콘주게이션 반응은 PYY₃₋₃₆ 변이체 효능제의 불활성화를 막기 위해 비교적 온화한 조건 하에 수행된다. 온화한 조건은 반응 용액의 pH를 약 3 내지 10의 범위로 유지하고, 반응 온도를 약 0 °C 내지 40 °C의 범위로 유지하는 것을 포함한다. PEG화 조건 하에 활성화된 PEG와 반응성인 PYY₃₋₃₆ 변이체의 표적이 아닌 관능기가 표적 관능기의 PEG화 후 제거될 수 있는 적합한 보호기로 보호되는 것이 바람직하다. PEG 알데히드 또는 PEG 숙신이미드와 같은 시약으로의 유리 아미노기의 PEG화에서, 약 3 내지 10, 바람직하게는 약 4 내지 7.5 범위의 pH가 전형적으로 유지된다. 바람직하게는 커플링 반응은 적절한 완충제 (pH 3 내지 10), 예를 들어, 포스페이트, MES, 시트레이트, 아세테이트, 숙시네이트 또는 HEPES 내에서, 약 1 내지 48 시간 동안 약 4 °C 내지 40 °C의 온도에서 수행된다. PEG 말레이미드, PEG 비닐 술폰 또는 PEG 오르토 피리딜 디술포이드와 같은 시약을 사용하는 티올 기의 PEG화에서, 약 4 내지 8 범위의 pH가 유지되는 것이 바람직하다. PEG 아민이 케토 기의 PEG화에서, 예를 들어, p-아세틸페닐알라닌에서 유용하고, [Pillai et al., J. Org. Chem. 45:5364-5370, 1980]에 기술된 바와 같이 제조될 수 있다.

<108> 전형적으로 본 발명의 콘주게이션 반응은 원하는 모노-PEG화 PYY₃₋₃₆ 변이체, 뿐만 아니라 미반응 PYY₃₋₃₆ 변이체 펩티드, 미반응 PEG, 및 일반적으로 약 20% 미만의, 1개를 초과하는 PEG 스트랜드를 함유하는 콘주게이트 및/또는 응집된 종을 포함할 수 있는 고분자량 종을 함유하는 반응 혼합물 또는 풀(pool)을 제공한다. 미반응 종 및 고분자량 종이 제거된 후, 모노-PEG화 PYY₃₋₃₆ 변이체를 주로 함유하는 조성물이 회수된다. 콘주게이트가 대개 단일 중합체 스트랜드를 포함한다고 하면, 콘주게이트는 실질적으로 균질하다.

<109> 단백질의 정제에 전형적으로 사용되는 통상적인 방법, 예컨대 투석, 염석, 초여과, 이온-교환 크로마토그래피, 소수성 상호작용 크로마토그래피 (HIC), 젤 크로마토그래피 및 전기영동에 의해 원하는 PEG-PYY₃₋₃₆ 변이체 콘주게이트를 반응 혼합물로부터 정제할 수 있다. 이온-교환 크로마토그래피가 임의의 미반응 PEG 또는 미반응 PYY₃₋₃₆ 변이체를 제거하는데 특히 효과적이다. 탈아미드화를 막기 위해 pH가 약 4 내지 약 10, 바람직하게는 8 미만인 완충액 내에 혼합된 종들을 함유하는 반응 혼합물을 농음으로써 원하는 PEG-변이체 콘주게이트를 분리할 수 있다. 바람직하게는 완충액은 KCl, NaCl, K₂HPO₄, KH₂PO₄, Na₂HPO₄, NaH₂PO₄, NaHCO₃, NaBO₄ 및 CH₃CO₂Na로부터 선택되지만 이에 한정되지 않는 1가지 이상의 완충제 염을 함유한다.

<110> PEG화 반응에서 사용된 완충액 시스템이 분리 공정에서 사용된 것과 상이한 경우, PEG화 반응 혼합물을 완충액 교환/투석여과시키거나, 또는 충분한 양의 최초 분리 완충제로 희석한다.

<111> 이온 교환 크로마토그래피 매체를 사용하여 원하는 종을 함유하는 풀로 콘주게이트를 분획화하는 것이 바람직하게 수행된다. 이같은 매체는 다소 예측가능한 방식으로 변하는 전하 차이를 통해 PEG-PYY₃₋₃₆ 변이체 콘주게이트에 선택적으로 결합할 수 있다. 예를 들어, PYY₃₋₃₆ 변이체의 표면 전하는 PEG의 존재에 의해 손상되지 않은 컬럼 지지체와의 상호작용에 이용가능한 펩티드 표면 상의 이용가능한 전하를 띤 기의 숫자에 의해 결정된다. 이러한 전하를 띤 기들은 잠재적인 PEG 중합체 부착점으로 기능한다. 따라서, PEG-PYY₃₋₃₆ 변이체 콘주게이트는 선택적인 단리를 허용하도록 존재하는 다른 종과 상이한 전하를 가질 것이다.

<112> 이온 교환 수지가 본 발명의 PEG-PYY₃₋₃₆ 변이체 콘주게이트의 정제에 특히 바람직하다. 양이온 교환 수지 예컨대 술포프로필 수지가 본 발명의 정제 방법에서 사용된다. 본 발명에서 사용하기에 적절한 양이온 교환 수지의 비제한적인 목록에는 SP-hitrap®, SP Sepharose HP® 및 SP Sepharose® 패스트 플로우(fast flow)가 포함된다. 또다른 적절한 양이온 교환 수지, 예를 들어 S 및 CM 수지를 또한 사용할 수 있다.

<113> 바람직하게는 양이온 교환 수지가 통상적인 수단에 의해 컬럼에 팩킹(packaging)되고 평형화된다. PEG가 콘주게이트된 PYY₃₋₃₆ 변이체의 용액과 동일한 pH 및 삼투압의 완충액이 사용된다. 바람직하게는 용출 완충제는 CH₃CO₂Na, HEPES, KCl, NaCl, K₂HPO₄, KH₂PO₄, Na₂HPO₄, NaH₂PO₄, NaHCO₃, NaBO₄, 및 (NH₄)₂CO₃로부터 선택되지만 이에 한정되지 않는 1가지 이상의 염을 함유한다. 그 후, 콘주게이트-함유 용액이 컬럼 상에 흡착되고, 미반응 PEG 및 일부 고분자량 종은 유지되지 않는다. 로딩 완료 시, 염의 농도가 증가하는 용출 완충액의 구배 흐름이 컬럼에 적용되어, PEG가 콘주게이트된 PYY₃₋₃₆ 변이체의 원하는 분획이 용출된다. 용출된, 풀링된 분획이 양이온 교환 분리 단계 후 균일한 중합체 콘주게이트로 한정되는 것이 바람직하다. 그 후, 임의의 콘주게이트되지 않은 PYY₃₋₃₆ 변이체 종을 통상적인 기술에 의해 컬럼으로부터 세정할 수 있다. 원한다면, 모노 및 다중 PEG화 PYY₃₋₃₆ 변이체 종 및 분자량이 더 높은 종을 추가적인 이온 교환 크로마토그래피 또는 크기 배제 크로마토그래

피를 통해 각각으로부터 추가로 분리할 수 있다.

<114> 농도가 증가하는 다중 동용매(isocratic) 단계를 사용하는 기술을 선형 구배 대신 사용할 수 있다. 농도가 증가하는 다중 동용매 용출 단계로는 다중-PEG화/응집물에 이어서 모노-PEG화 PYY₃₋₃₆ 변이체 콘주게이트가 연속적으로 용출될 것이다. pH 구배를 기초로 하는 용출 기술을 또한 사용할 수 있다. 용출을 위한 온도 범위는 일반적으로 약 4°C 내지 약 25°C이다. PEG-PYY₃₋₃₆ 변이체의 용출을 280 nm에서의 UV 흡광도에 의해 모니터링한다. 단순한 시간 용출 프로파일을 통해 분획 수집을 달성할 수 있다.

<115> 제조합 발현

<116> 핵산 분자

<117> (E10C)hPYY₃₋₃₆ 폴리펩티드를 코딩하는 핵산 분자는 하기의 핵산 서열 중 하나를 포함할 수 있다 (E10C 치환에 대한 코돈 돌연변이에 밀출):

<118> atcaaacccgaggetcccggctgtgacgcctcgccggaggagctgaaccgctactacgcctccctgcccactacctcaacctggtcacccggcagcggatat (서열 5); 또는

<119> atcaaacccgaggetcccggctgcgacgcctcgccggaggagctgaaccgctactacgcctccctgcccactacctcaacctggtcacccggcagcggatat (서열 6).

<120> (D11C)hPYY₃₋₃₆ 폴리펩티드를 코딩하는 핵산 분자는 하기의 핵산 서열 중 하나를 포함할 수 있다 (D11C 치환에 대한 코돈 돌연변이에 밀출):

<121> atcaaacccgaggetcccggcgaatgtgcctcgccggaggagctgaaccgctactacgcctccctgcccactacctcaacctggtcacccggcagcggatat (서열 7); 또는

<122> atcaaacccgaggetcccggcgaatgcgctcgccggaggagctgaaccgctactacgcctccctgcccactacctcaacctggtcacccggcagcggatat (서열 8).

<123> 이러한 서열들은 C-말단에 종결 코돈 (예를 들어, tga, taa, tag)을 또한 포함할 수 있고, 화학적 합성, cDNA 또는 게놈 라이브러리(library) 스크리닝으로부터 수득된 야생형 hPYY 폴리뉴클레오티드 서열의 유전자 돌연변이, 발현 라이브러리 스크리닝, 및/또는 cDNA의 중합효소 연쇄 반응 (PCR) 증폭이 비제한적으로 포함되는 다양한 방식으로 쉽게 수득할 수 있다. (E10C)hPYY₃₋₃₆ 및 (D11C)hPYY₃₋₃₆ 변이체를 코딩하는 핵산 분자를 부위 지정 돌연변이유발, PCR 증폭, 또는 기타 적합한 방법을 사용하여 제조할 수 있고, 이때 프라이머(들)은 원하는 점 돌연변이를 갖는다. 본원에 기술된 제조합 DNA 방법 및 돌연변이유발 방법은 일반적으로 [Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989)] 및 [Current Protocols in Molecular Biology (Ausubel et al., eds., Green Publishers Inc. and Wiley and Sons 1994)] 에 기재된 것들이다. 또다른 비천연 발생 아미노산이 E10 또는 D11을 치환하는 것을 원하는 경우, 예를 들어, 거명에 의해 본원에 포함된 미국 특허 출원 공보 2005/0208536에 기술된 바와 같은 방법을 사용하여, 이같은 펩티드를 제조합적으로 발현시킬 수 있다.

<124> hPYY의 아미노산 서열을 코딩하는 핵산 폴리뉴클레오티드는 발현된 단백질의 성질을 기초로 하는 양성 클론의 검출을 사용하는 발현 클로닝에 의해 확인할 수 있다. 전형적으로, 발현되어 숙주 세포 상에 제시된 클로닝된 단백질에 대한 항체 또는 기타 결합 파트너 (예를 들어, 수용체 또 리간드)의 결합에 의해 핵산 라이브러리를 스크리닝한다. 원하는 클론을 발현하는 세포들이 확인되도록 항체 또는 결합 파트너는 검출가능한 표지로 변형된다.

<125> 하기 기재된 설명에 따라 수행되는 제조합 발현 기술을 따라서 (E10C)hPYY₃₋₃₆ 및 (D11C)hPYY₃₋₃₆을 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 제조하고, 코딩되는 폴리펩티드를 발현시킬 수 있다. 예를 들어, (E10C)hPYY₃₋₃₆ 또는 (D11C)hPYY₃₋₃₆ 변이체의 아미노산 서열을 코딩하는 핵산 서열을 적합한 벡터 내로 삽입함으로써, 당업자는 대량의 원하는 뉴클레오티드 서열을 쉽게 생산할 수 있다. 그 후, 이러한 서열을 사용하여 검출 프로브(probe) 또는 증폭 프라이머를 생성시킬 수 있다. 별법적으로, (E10C)hPYY₃₋₃₆ 또는 (D11C)hPYY₃₋₃₆ 폴리펩티드의 아미노산 서열을 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 발현 벡터 내로 삽입할 수 있다. 발현 벡터를 적합한 숙주 내로 도입함으로써, 코딩된 (E10C)hPYY₃₋₃₆ 또는 (D11C)hPYY₃₋₃₆ 변이체가 대량으로 제조될 수 있다.

- <126> 적절한 핵산 서열을 수득하는 또다른 방법은 중합효소 연쇄 반응 (PCR)이다. 이러한 방법에서는, 역전사효소를 사용하여 폴리(A)+RNA 또는 전체 RNA로부터 cDNA를 제조한다. 그 후, 전형적으로 (E10C)hPYY₃₋₃₆ 또는 (D11C)hPYY₃₋₃₆ 변이체의 아미노산 서열을 코딩하는 cDNA의 2개의 별도의 영역에 상보적인 2개의 프라이머를 Taq 중합효소와 같은 중합효소와 함께 cDNA에 첨가하고, 중합효소가 2개의 프라이머 사이의 cDNA 영역을 증폭시킨다.
- <127> (E10C)hPYY₃₋₃₆ 또는 (D11C)hPYY₃₋₃₆ 변이체의 아미노산 서열을 코딩하는 핵산 분자를 제조하는 또다른 방법은 당업자에게 주지된 방법, 예컨대 [Engels et al., *Angew. Chem. Intl. Ed.* 28:716-34, 1989]에 기술된 것들을 사용하는 화학적 합성이다. 이러한 방법에는 핵산 합성용 포스포트리에스테르, 포스포르아미다이트, 및 H-포스포네이트 방법이 포함된다. 이같은 화학적 합성을 위한 바람직한 방법은 표준 포스포르아미다이트 화학을 사용하는 중합체-지지 합성이다. 전형적으로, (E10C)hPYY₃₋₃₆의 아미노산 서열을 코딩하는 DNA의 길이는 약 100개의 뉴클레오티드이다. 뉴클레오티드 약 100개를 초과하는 핵산은 이러한 방법을 사용하여 여러개의 단편으로 합성할 수 있다. 그 후, 단편들을 함께 결합시켜, (E10C)hPYY₃₋₃₆ 유전자의 전장 뉴클레오티드 서열을 형성시킨다.
- <128> 폴리펩티드의 아미노-말단을 코딩하는 DNA 단편은 메티오닌 잔기를 코딩하는 ATG를 가질 수 있다. 이러한 메티오닌은, 숙주 세포에서 생산된 폴리펩티드가 세포로부터 분비되도록 디자인되었는지 여부에 따라, 성숙형 (E10C)hPYY₃₋₃₆ 또는 (D11C) LP443-36 상에 존재하거나 또는 존재하지 않을 수 있다. 이소류신을 코딩하는 코돈이 또한 출발 부위로 사용될 수 있다. 당업자에게 공지된 또다른 방법을 또한 사용할 수 있다. 특정 실시양태에서, 핵산 변이체는 주어진 숙주 세포에서의 (E10C)hPYY₃₋₃₆ 또는 (D11C)hPYY₃₋₃₆의 최적의 발현을 위해 변경된 코돈을 함유한다. 특정 코돈 변경은 (E10C)hPYY₃₋₃₆ 또는 (D11C)hPYY₃₋₃₆ 및 발현용으로 선택된 숙주 세포에 좌우될 것이다. 이같은 "코돈 최적화"는 다양한 방법에 의해 수행될 수 있고, 예를 들어, 주어진 숙주 세포에서의 고도로 발현된 유전자에서의 사용에 대해 선호되는 코돈을 선택함으로써 수행될 수 있다. 고도로 발현되는 박테리아 유전자의 코돈 선호도에 대한 "Eco_high.Cod"와 같은 코돈 빈도 표가 혼입된 컴퓨터 알고리즘을 사용할 수 있고, 이는 [University of Wisconsin Package Version 9.0 (Genetics Computer Group, Madison, Wis.)]에 의해 제공된다. 또다른 유용한 코돈 빈도 표에는 "Celegans_high.cod," "Celegans_low.cod," "Drosophila_high.cod," "Human_high.cod," "Maize_high.cod," 및 "Yeast_high.cod"가 포함된다.
- <129> *벡터 및 숙주 세포*
- <130> (E10C)hPYY₃₋₃₆ 또는 (D11C)hPYY₃₋₃₆의 아미노산 서열을 코딩하는 핵산 분자를 표준 결합 기술을 사용하여 적합한 발현 벡터 내로 삽입한다. 전형적으로 벡터는 사용된 특정 숙주 세포에서 기능성하도록 선택된다 (즉, 벡터는 유전자의 증폭 및/또는 유전자의 발현이 발생할 수 있도록 숙주 세포 장치와 상용성이다). (E10C)hPYY₃₋₃₆ 또는 (D11C)hPYY₃₋₃₆의 아미노산 서열을 코딩하는 핵산 분자는 원핵생물, 효모, 곤충 (배큘로바이러스(baculovirus) 시스템) 및/또는 진핵생물 숙주 세포에서 증폭/발현될 수 있다. 발현 벡터의 개관에 대해서, [Meth. Enz., vol. 185 (D. V. Goeddel, ed., Academic Press, 1990)] 참조.
- <131> 전형적으로, 임의의 숙주 세포에서 사용되는 발현 벡터는 플라스미드 유지 및 외인성 뉴클레오티드 서열의 클로닝 및 발현을 위한 서열을 함유할 것이다. 특정 실시양태에서 "플랭킹(flanking) 서열"로 총괄적으로 지칭되는 이같은 서열은 1가지 이상의 하기 뉴클레오티드 서열을 전형적으로 포함할 것이다: 프로모터, 1개 이상의 인핸서(enhancer) 서열, 복제 기원, 전사 종결 서열, 도너(donor) 및 어셉터(acceptor) 스플라이스(splice) 부위를 함유하는 완전한 인트론(intron) 서열, 폴리펩티드 분비용 리더(leader) 서열을 코딩하는 서열, 리보솜 결합 부위, 폴리아데닐화 서열, 발현될 폴리펩티드를 코딩하는 서열의 삽입을 위한 폴리링커(polylinker) 영역, 및 선택가능한 마커 요소. 각각의 이러한 서열들이 하기에 논의된다.
- <132> 임의로, 벡터는 "태그(tag)"-코딩 서열, 즉 (E10C)hPYY₃₋₃₆ 또는 (D11C)hPYY₃₋₃₆ 코딩 서열의 5' 또는 3' 말단에 위치한 올리고뉴클레오티드 분자를 함유할 수 있다; 올리고뉴클레오티드 서열은 폴리His (예컨대 핵산His), 또는 또다른 "태그" 예컨대 FLAG, HA (헤마글루틴 인플루엔자 바이러스), 또는 이에 대해 시판되는 항체가 존재하는 myc를 코딩한다. 전형적으로 이러한 태그는 폴리펩티드의 발현 시에 이러한 폴리펩티드에 융합되고, (E10C)hPYY₃₋₃₆ 또는 (D11C)hPYY₃₋₃₆의 친화력 정제를 위한 수단으로서 기능할 수 있다. 친화력 정제는, 예를 들어, 친화력 매트릭스로서 태그에 대한 항체를 사용하는 컬럼 크로마토그래피에 의해 달성될 수 있다. 임의로, 특정한 절단용 펩티드분해효소를 사용하는 것과 같은 다양한 수단, 예를 들어, 서열 3-4에 제시된 아미노산 서

열 중 하나의 상류에 있는 FLAG 태그 서열의 3'의 엔테로키나제(enterokinase) 소화에 의해 태그가 정제된 (E10C)hPYY₃₋₃₆ 또는 (D11C)hPYY₃₋₃₆으로부터 그 후에 제거될 수 있다.

- <133> 플랭킹 서열은 동종형 (즉, 숙주 세포와 동일한 종 및/또는 균주로부터 유래됨), 이종형 (즉, 숙주 세포 종 또는 균주 이외의 종으로부터 유래됨), 하이브리드 (즉, 1개를 초과하는 공급원으로부터의 플랭킹 서열의 조합), 또는 합성일 수 있거나, 또는 플랭킹 서열은 hPYY₃₋₃₆ 발현을 조절하도록 정상적으로 기능하는 천연 서열일 수 있다. 플랭킹 서열의 공급원은 임의의 원핵생물 또는 진핵생물, 임의의 척추동물 또는 무척추동물 생물, 또는 임의의 식물일 수 있고, 단 플랭킹 서열은 숙주 세포 장치에서 기능성이고, 숙주 세포 장치에 의해 활성화될 수 있다.
- <134> 유용한 플랭킹 서열은 당업계에 주지된 여러 방법들 중 임의의 것에 의해 획득할 수 있다. 전형적으로, PYY 유전자 플랭킹 서열 이외에 본원에서 유용한 플랭킹 서열은 지도화(mapping)에 의해 및/또는 제한효소 소화에 의해 기존에 확인되었을 것이고, 따라서 적합한 제한효소를 사용하여 적절한 조직원으로부터 단리할 수 있다. 일부 경우에, 플랭킹 서열의 전체 뉴클레오티드 서열이 공지될 수 있다. 이때, 핵산 합성 또는 클로닝을 위해 본원에 기술된 방법을 사용하여 플랭킹 서열을 합성할 수 있다.
- <135> 플랭킹 서열의 전부 또는 일부만이 공지된 경우, PCR을 사용하고/하거나 동일한 또는 또다른 종으로부터의 적절한 올리고뉴클레오티드 및/또는 플랭킹 서열 단편으로 게놈 라이브러리를 스크리닝함으로써 이를 획득할 수 있다. 플랭킹 서열이 공지되어 있지 않은 경우, 플랭킹 서열을 함유하는 DNA의 단편을 코딩 서열 또는 심지어 또 다른 유전자(들)을 예를 들어 함유할 수 있는 대형 조각의 DNA로부터 단리할 수 있다. 제한 효소 소화에 의해 적합한 DNA 단편을 생산한 후, 아가로스 젤 정제, Qiagen® 컬럼 크로마토그래피 (Chatsworth, CA), 또는 당업자에게 공지된 기타 방법을 사용하여 단리함으로써 단리를 달성할 수 있다. 이러한 목적을 달성하기 위한 적절한 효소의 선택은 당업자에게 쉽게 명백할 것이다.
- <136> 전형적으로 복제 기원은 시판되는 원핵생물 발현 벡터의 일부이고, 숙주 세포에서의 벡터의 증폭을 보조한다. 특정 카피수로의 벡터의 증폭은, 일부 경우에, (E10C)hPYY₃₋₃₆ 또는 (D11C)hPYY₃₋₃₆의 최적의 발현에 중요할 수 있다. 선택된 벡터가 복제 기원 부위를 함유하지 않는다면, 공지된 서열을 기초로 합성하여 벡터 내로 결합시킬 수 있다. 예를 들어, 플라스미드 pBR322 (New England Biolabs, Beverly, MA)로부터의 복제 기원이 대부분의 그람-음성 박테리아에 적절하고, 다양한 복제 기원 (예를 들어, SV40, 폴리오마(polyoma), 아데노바이러스, 소포성(小包性) 구내염 바이러스 (VSV), 또는 파필로마바이러스(papillomavirus) 예컨대 HPV 또는 BPV)이 포유류 세포에서 벡터를 클로닝하는데 유용하다. 일반적으로, 복제 기원 성분은 포유류 발현 벡터에 대해 요구되지 않는다 (예를 들어, SV40 기원은 단지 초기 프로모터를 함유하기 때문에 종종 사용된다).
- <137> 전사 종결 서열은 폴리펩티드 코딩 영역의 3' 말단에 전형적으로 위치하고, 전사를 종결시키는 기능을 한다. 일반적으로, 원핵생물 세포에서의 전사 종결 서열은 폴리-T 서열이 이어지는 G-C 풍부 단편이다. 이러한 서열은 라이브러리로부터 용이하게 클로닝되거나 심지어 벡터의 일부로서 상업적으로 구입되지만, 본원에 기술된 것들과 같은 핵산 합성 방법을 사용하여 또한 쉽게 합성할 수 있다.
- <138> 선별가능 마커 유전자 요소는 선별 배양 배지에서 성장된 숙주 세포의 생존 및 성장에 필요한 단백질을 코딩한다. 전형적인 선별 마커 유전자는 (a) 원핵생물 숙주 세포에 항생제 또는 기타 독소, 예를 들어, 앰피실린, 테트라사이클린, 또는 카나마이신에 대한 저항성을 부여하거나; (b) 세포의 영양요구성 결핍을 보완하거나; 또는 (c) 복합 배지로부터 입수가가능하지 않은 결정적인 영양소를 공급한다. 바람직한 선별가능 마커는 카나마이신 저항성 유전자, 앰피실린 저항성 유전자, 및 테트라사이클린 저항성 유전자이다. 네오마이신 저항성 유전자 또한 원핵생물 및 진핵생물 숙주 세포에서의 선별에 사용될 수 있다.
- <139> 발현될 유전자를 증폭시키기 위해 기타 선별 유전자를 사용할 수 있다. 증폭은 성장에 결정적인 단백질의 생산을 위해 더 많이 요구되는 유전자가 재조합 세포의 연속적인 세대의 염색체 내에서 직렬로 반복되는 프로세스이다. 포유류 세포에 대한 적절한 선별가능 마커의 예로는 디히드로폴레이트 환원효소 (DHFR) 및 티미딘 키나제가 포함된다. 포유류 세포 형질전환체는 형질전환체만이 벡터 내에 존재하는 선별 유전자에 의해 생존하도록 특유한 방식으로 개조된 선별 압력 하에 놓인다. 선별 압력은 형질전환된 세포를 배지 내의 선별 작용제의 농도가 연속적으로 변함으로써 선별 유전자 및 (E10C)hPYY₃₋₃₆ 또는 (D11C)hPYY₃₋₃₆를 코딩하는 DNA 모두의 증폭에 이르는 조건 하에서 배양함으로써 부여된다. 그 결과, 증폭된 DNA로부터 증가된 양의 (E10C)hPYY₃₋₃₆ 또는 (D11C)hPYY₃₋₃₆이 합성된다.

- <140> 리보솜 결합 부위는 mRNA의 번역 개시를 위해 일반적으로 필요하고, 샤인-달가노(Shine-Dalgarno) 서열 (원핵생물) 또는 코작(Kozak) 서열 (진핵생물)을 특징으로 한다. 전형적으로 이러한 요소는 프로모터의 3' 및 발현될 (E10C)hPYY₃₋₃₆ 또는 (D11C)hPYY₃₋₃₆의 5'에 위치한다. 샤인-달가노 서열은 다양하지만, 전형적으로 폴리퓨린이다 (즉, A-G 함량이 높다). 다수의 샤인-달가노 서열이 확인되었고, 본원에 기술되고 원핵생물 벡터에서 사용되는 방법을 사용하여 각각 쉽게 합성할 수 있다.
- <141> 리더, 또는 신호 서열을 사용하여 (E10C)hPYY₃₋₃₆ 또는 (D11C)hPYY₃₋₃₆을 숙주 세포 외부로 지시할 수 있다. 전형적으로, 신호 서열을 코딩하는 뉴클레오티드 서열은 (E10C)hPYY₃₋₃₆ 또는 (D11C)hPYY₃₋₃₆ 핵산 분자의 코딩 영역 내에, 또는 (E10C)hPYY₃₋₃₆ 또는 (D11C)hPYY₃₋₃₆ 코딩 영역의 5' 말단에 직접적으로 위치한다. 다수의 신호 서열이 확인되었고, 이들 중 선택된 숙주 세포에서 기능성인 임의의 것을 (E10C)hPYY₃₋₃₆ 또는 (D11C)hPYY₃₋₃₆ 핵산 분자와 함께 사용할 수 있다. 따라서, 신호 서열은 (E10C)hPYY₃₋₃₆ 또는 (D11C)hPYY₃₋₃₆과 동종형 (천연 발생)이거나, 또는 이종형일 수 있다. 추가적으로, 본원에 기술된 방법을 사용하여 신호 서열을 화학적으로 합성할 수 있다. 대부분의 경우에, 신호 펩티드의 존재를 통해 숙주 세포로부터 (E10C)hPYY₃₋₃₆ 또는 (D11C)hPYY₃₋₃₆이 분비된 결과로, 신호 펩티드가 분비된 (E10C)hPYY₃₋₃₆ 또는 (D11C)hPYY₃₋₃₆으로부터 제거될 것이다. 신호 서열은 벡터의 성분일 수 있거나, 또는 벡터 내로 삽입되는 (E10C)hPYY₃₋₃₆ 또는 (D11C)hPYY₃₋₃₆ 핵산 분자의 일부일 수 있다.
- <142> 천연 hPYY₃₋₃₆ 신호 서열을 코딩하는 뉴클레오티드 서열이 (E10C)hPYY₃₋₃₆ 또는 (D11C)hPYY₃₋₃₆ 코딩 영역에 연결될 수 있거나, 또는 이종형 신호 서열을 코딩하는 뉴클레오티드 서열이 (E10C)hPYY₃₋₃₆ 또는 (D11C)hPYY₃₋₃₆ 코딩 영역에 연결될 수 있다. 선택된 이종형 신호 서열은 숙주 세포에 의해 인식 및 프로세싱되는 것, 즉 신호 펩티드 분해효소에 의해 절단되는 것이어야 한다. 천연 hPYY 신호 서열을 인식 및 프로세싱하지 않는 원핵생물 숙주 세포에 대해, 신호 서열이 알칼리성 포스파타제, 페니실리나제, 또는 열-안정성 장독소 II 리더의 균으로부터 예를 들어 선택되는 원핵생물 신호 서열로 치환된다. 효모 분비를 위해, 천연 hPYY 신호 서열이 효모 역전효소, 알파 인자, 또는 산 포스파타제 리더로 치환될 수 있다. 포유류 세포 발현에서, 천연 신호 서열이 만족스럽지만, 또다른 포유류 신호 서열이 적절할 수 있다.
- <143> 많은 경우에, 핵산 분자의 전사는 벡터 내의 1개 이상의 인트론의 존재에 의해 증가된다; 이는 폴리펩티드가 진핵생물 숙주 세포, 특히 포유류 숙주 세포에서 생산되는 경우에 특히 사실이다. 사용되는 인트론은, 특히 사용된 유전자가 전장 계놈 서열 또는 이의 단편인 경우에, hPYY 유전자 내에서 천연적으로 발생할 수 있다. 인트론이 유전자 내에서 천연적으로 발생하지 않는 경우 (대부분의 cDNA와 같이), 인트론은 또다른 공급원으로부터 취득될 수 있다. 플랭킹 서열 및 hPYY 유전자와 관련하여 인트론의 위치가 일반적으로 중요한데, 효과적이기 위해서 인트론이 전사되어야 하기 때문이다. 따라서, (E10C)hPYY₃₋₃₆ 또는 (D11C)hPYY₃₋₃₆을 코딩하는 cDNA 분자가 전사될 때, 인트론의 바람직한 위치는 전사 개시 부위에 대해 3'이고, 폴리-A 전사 종결 서열에 대해 5'이다. 바람직하게는, 인트론(들)은 코딩 서열을 중단시키지 않도록 cDNA의 한쪽 측면 또는 다른쪽 측면 (즉, 5' 또는 3')에 위치할 것이다. 바이러스, 원핵생물 및 진핵생물 (식물 또는 동물)을 포함하여 임의의 공급원으로부터의 임의의 인트론을 사용할 수 있고, 단 이것이 삽입되는 숙주 세포와 상용성이어야 한다. 합성 인트론이 본원에서 또한 포함된다. 임의로, 1개를 초과하는 인트론이 벡터에서 사용될 수 있다.
- <144> 발현 및 클로닝 벡터는 숙주 생물에 의해 인식되고 (E10C)hPYY₃₋₃₆ 또는 (D11C)hPYY₃₋₃₆을 코딩하는 분자에 작동가능하게 연결된 프로모터를 전형적으로 함유할 것이다. 프로모터는 구조 유전자의 전사를 제어하는, 구조 유전자의 개시 코돈에 대해 상류 (즉 5') (일반적으로 약 100 내지 1000 bp 이내)에 위치한 전사되지 않는 서열이다. 프로모터는 통상적으로 2개의 부류 중 하나로 분류된다: 유도성 프로모터 및 구성 프로모터. 유도성 프로모터는 배양 조건에서의 약간의 변화, 예컨대 영양소의 존재 또는 부재 또는 온도 변화에 응답하여 이의 제어 하에 놓인 DNA로부터의 증가된 수준의 전사를 개시시킨다. 반면에, 구성 프로모터는 지속적인 유전자 생성물 생산을 개시시킨다; 즉, 유전자 발현에 대한 제어가 거의 없거나 없다. 다양한 가능한 숙주 세포에 의해 인식되는 다수의 프로모터가 주지되어 있다. 제한 효소 소화에 의해 공급원 DNA로부터 프로모터를 제거하고 원하는 프로모터 서열을 벡터 내로 삽입함으로써 적절한 프로모터가 (E10C)hPYY₃₋₃₆ 또는 (D11C)hPYY₃₋₃₆을 코딩하는 DNA에 작동가능하게 연결된다. 천연 hPYY₃₋₃₆ 프로모터 서열을 사용하여 (E10C)hPYY₃₋₃₆ 또는 (D11C)hPYY₃₋₃₆ 핵산 분자의 증폭 및/또는 발현을 지시할 수 있다. 그러나, 천연 프로모터와 비교하여 발현 단백질의 더 많은 전사 및 더 높은 수율을 허용한다면, 그리고 사용에 선택된 숙주 세포 시스템과 상용성이면, 이종형 프로모터가 선호

된다.

- <145> 원핵생물 숙주와 사용하기에 적절한 프로모터에는 베타-락타마제 및 락토스 프로모터 시스템; 대장균 T7 유도성 RNA 중합효소; 알칼리성 포스포타제; 트립토판 (trp) 프로모터 시스템; 및 하이브리드 프로모터 예컨대 tac 프로모터가 포함된다. 기타 공지된 박테리아 프로모터가 또한 적절하다. 이들의 서열은 공개되어 있고, 따라서 당업자가, 임의의 유용한 제한 부위를 공급하는데 필요하다면 링커 또는 어댑터(adapter)를 사용하여, 이들을 원하는 DNA 서열에 결합시킬 수 있다
- <146> 효모 숙주와 사용하기에 적절한 프로모터가 또한 당업계에 주지되어 있다. 효모 인헨서가 효모 프로모터와 함께 유리하게 사용된다. 포유류 숙주 세포와 사용하기에 적절한 프로모터가 주지되어 있고, 폴리오마 바이러스, 계두 바이러스, 아데노바이러스 (예컨대 아데노바이러스 2), 소 파필로마(papilloma) 바이러스, 조류 육종 바이러스, 사이토메갈로바이러스, 레트로바이러스, B형 간염 바이러스, 및 가장 바람직하게는 원숭이(Simian) 바이러스 40 (SV40)과 같은 바이러스의 계놈으로부터 수득된 것들이 포함되지만, 이에 한정되지는 않는다. 기타 적절한 포유류 프로모터에는 이중형 포유류 프로모터, 예를 들어, 열-충격 프로모터 및 액틴 프로모터가 포함된다.
- <147> (E10C)hPYY₃₋₃₆ 또는 (D11C)hPYY₃₋₃₆의 발현을 제어하는 데 주목될 수 있는 추가적인 프로모터에는 하기의 것들이 포함되지만, 이에 한정되지는 않는다: SV40 초기 프로모터 영역 ([Bemoist and Chambon, Nature 290:304-10, 1981]); CMV 프로모터; 라우스(Rous) 육종 바이러스의 3' 긴 말단 반복부에 함유된 프로모터 ([Yamamoto et al., Cell 22:787-97, 1980]); 헤르페스 티미딘 키나제 프로모터 ([Wagner et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 78:1444-45, 1981]); 메탈로티오닌 유전자의 조절 서열 ([Brinster et al., Nature 296:39-42, 1982]); 원핵생물 발현 벡터 예컨대 베타-락타마제 프로모터 ([Villa-Kamaroff et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 75:3727-31, 1978]); 또는 tac 프로모터 ([DeBoer et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 80:21-25, 1983]).
- <148> 인헨서 서열이 벡터 내로 삽입되어, (E10C)hPYY₃₋₃₆ 또는 (D11C)hPYY₃₋₃₆을 코딩하는 DNA의 고급 진핵생물에서의 전사를 증가시킬 수 있다. 인헨서는 프로모터 상에 작용하여 전사를 증가시키는, 길이가 약 10-300 bp인 DNA의 시스-작용 요소이다. 인헨서는 비교적 배향 및 위치에 대해 비의존적이다. 이는 전사 단위에 대해 5' 및 3'에서 발견되었다. 포유류 유전자로부터의 이용가능한 여러 인헨서 서열이 공지되어 있다 (예를 들어, 글로빈, 엘라스타제, 알부민, 알파-태아단백질 및 인슐린). 그러나, 전형적으로, 바이러스로부터의 인헨서가 사용될 것이다. SV40 인헨서, 사이토메갈로바이러스 초기 프로모터 인헨서, 폴리오마 인헨서, 및 아데노바이러스 인헨서가 진핵생물 프로모터의 활성화를 위한 대표적인 인헨서 요소이다. (E10C)hPYY₃₋₃₆ 또는 (D11C)hPYY₃₋₃₆을 코딩하는 핵산 분자에 대해 5' 또는 3' 위치에서 인헨서가 벡터 내로 스플라이싱될 수 있지만, 전형적으로는 프로모터에 대해 5' 부위에 위치한다.
- <149> 시판 벡터와 같은 출발 벡터로부터 발현 벡터를 구축할 수 있다. 이같은 벡터는 원하는 플랭킹 서열 모두를 함유하거나 함유하지 않을 수 있다. 본원에 기술된 플랭킹 서열 중 1가지 이상이 벡터 내에 이미 존재하지 않는 경우, 이를 개별적으로 수득하여 벡터 내로 결합시킬 수 있다. 각각의 플랭킹 서열을 수득하는데 사용되는 방법은 당업자에게 주지되어 있다.
- <150> 바람직한 벡터는 박테리아, 곤충 및 포유류 숙주 세포와 상용성인 것들이다. 이같은 벡터에는 pCRII, pCR3, 및 pcDNA3.1 (Invitrogen, Carlsbad, CA), pBSII (Stratagene, La Jolla, CA), pET15 (Novagen, Madison, WI), pGEX (Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ), pEGFP-N2 (Clontech, Palo Alto, CA), pETL (BlueBacII, Invitrogen), pDSR-알파 (PCT 출원 공보 WO 90/14363) 및 pFastBacDual (Gibco-BRL, Grand Island, NY)이 특히 포함된다.
- <151> 추가적인 적절한 벡터에는 코스미드, 플라스미드, 또는 변형된 바이러스가 포함되지만 이에 한정되지 않고, 벡터 시스템이 선택된 숙주 세포와 상용성이어야 한다는 것이 이해될 것이다. 이같은 벡터에는 플라스미드 예컨대 Bluescript® 플라스미드 유도체 (카피수가 높은 ColE1계 과지미드, Stratagene), Taq-증폭 PCR 생성물의 클로닝을 위해 디자인된 PCR 클로닝 플라스미드 (예를 들어, TOPO® TA Cloning® 키트, PCR2.1® 플라스미드 유도체, Invitrogen), 및 포유류, 효모 또는 바이러스 벡터 예컨대 배칼로바이러스 발현 시스템 (pBacPAK 플라스미드 유도체, Clontech)이 포함되지만, 이에 한정되지는 않는다.
- <152> 벡터가 구축되고, (E10C)hPYY₃₋₃₆ 또는 (D11C)hPYY₃₋₃₆ 폴리펩티드를 코딩하는 핵산 분자가 벡터의 적절한 부위 내

로 삽입된 후, 완성된 벡터를 증폭 및/또는 폴리펩티드 발현에 적절한 숙주 세포 내로 삽입할 수 있다. 선택된 숙주 세포 내로의 (E10C)hPYY₃₋₃₆ 또는 (D11C)hPYY₃₋₃₆ 폴리펩티드용 발현 벡터의 형질전환은 형질감염, 감염, 전기천공, 미세주입, 리포솜-매개 형질감염(lipofection), DEAE-덱스트란 방법, 또는 기타 공지된 기술이 포함되는 주지된 방법에 의해 달성될 수 있다. 선택된 방법은 사용될 숙주 세포의 유형과 어느 정도 상관관계일 것이다. 이러한 방법들 및 기타 적절한 방법은 당업자에게 주지되어 있고, 예를 들어, [Sambrook et al., 상기 문헌]에 기재되어 있다.

<153> 숙주 세포는 원핵생물 숙주 세포 (예컨대 대장균) 또는 진핵생물 숙주 세포 (예컨대 효모, 곤충, 또는 척추동물 세포)일 수 있다. 적절한 조건 하에 배양될 때, 숙주 세포는 (E10C)hPYY₃₋₃₆ 또는 (D11C)hPYY₃₋₃₆ 폴리펩티드를 합성하고, 이어서 배양 배지로부터 (숙주 세포가 폴리펩티드를 배지 내로 분비하는 경우), 또는 폴리펩티드를 생산하는 숙주세포로부터 직접적으로 (폴리펩티드가 분비되지 않는 경우), 폴리펩티드를 수집할 수 있다. 적절한 숙주 세포의 선택은 다양한 인자, 예컨대 원하는 발현 수준, 활성에 바람직한 또는 필요한 폴리펩티드 변형 (예컨대 글리코실화 또는 인산화) 및 생물학적으로 활성인 분자로의 폴딩(folding)의 용이성에 좌우될 것이다.

<154> 수많은 적절한 숙주 세포가 당업계에 공지되어 있고, 다수의 세포를 아메리칸 타입 컬처 컬렉션 (ATCC: American Type Culture Collection (Manassas, Va))으로부터 입수할 수 있다. 예로는 포유류 세포, 예컨대 차이니즈 햄스터 난소 세포 (CHO), CHO DHFR(-) 세포 ([Urlaub et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 97:4216-20, 1980]), 인간 배아 신장 (HEK) 293 또는 293T 세포, 또는 3T3 세포가 포함되지만, 이에 한정되지는 않는다. 적절한 포유류 숙주 세포의 선택, 및 형질전환, 배양, 증폭, 스크리닝, 생성물 제조 및 정제 방법은 당업계에 공지되어 있다. 또다른 적절한 포유류 세포주는 원숭이 COS-1 및 COS-7 세포주, 및 CV-1 세포주이다. 추가적인 대표적인 포유류 숙주 세포에는 형질전환된 세포주를 포함하여 영양류 세포주 및 설치류 세포주가 포함된다. 정상적인 이배체 세포, 1차 조직, 뿐만 아니라 1차 체외이식편의 시험관내 배양으로부터 유래된 세포 군주가 또한 적절하다. 후보 세포는 선별 유전자가 유전형적으로 걸땀될 수 있거나, 또는 우세하게 작용하는 선별 유전자를 함유할 수 있다. 기타 적절한 포유류 세포주에는 마우스 신경모세포종 N2A 세포, HeLa, 마우스 L-929 세포, 스위스(Swiss), Balb-c 또는 NIH 마우스로부터 유래된 3T3 세포주, BHK 또는 HaK 햄스터 세포주가 포함되지만, 이에 한정되지는 않는다. 각각의 이러한 세포주들은 단백질 발현 분야의 당업자에게 공지되어 있고 입수가 가능하다.

<155> 박테리아 세포가 적절한 숙주 세포로서 유사하게 유용하다. 예를 들어, 다양한 계통의 대장균 (예를 들어, HB101, DH5 α , DH10, 및 MC1061)이 생물공학 분야에서 숙주 세포로 주지되어 있다. 다양한 계통의 바실루스 서브틸리스(*B. subtilis*), 슈도모나스(*Pseudomonas*) 중, 기타 바실루스(*Bacillus*) 중, 및 스트렙토마이세스(*Streptomyces*) 종을 또한 이러한 방법에서 사용할 수 있다.

<156> 당업자에게 공지된 여러 계통의 효모 세포가 (E10C)hPYY₃₋₃₆ 및 (D11C)hPYY₃₋₃₆ 폴리펩티드의 발현에서 숙주 세포로 또한 이용가능하다. 바람직한 효모 세포에는, 예를 들어, 사카로마이세스 세리비지아에(*Saccharomyces cerevisiae*) 및 피치아 파스토리스(*Pichia pastoris*)가 포함된다.

<157> 추가적으로, 원하는 경우, 곤충 세포 시스템을 (E10C)hPYY₃₋₃₆ 및 (D11C)hPYY₃₋₃₆의 발현에 사용할 수 있다. 이같은 시스템은, 예를 들어, [Kitts et al., 1993, Biotechniques 14:810-17]; [Lucklow, Curr. Opin. Biotechnol. 4:564-72, 1993]; 및 [Lucklow et al., J. Virol., 67:4566-79, 1993]에 기술되어 있다. 바람직한 곤충 세포는 Sf-9 및 Hi5 (Invitrogen)이다.

<158> (E10C)hPYY₃₋₃₆ 및 (D11C)hPYY₃₋₃₆ 폴리펩티드 생산

<159> (E10C)hPYY₃₋₃₆ 또는 (D11C)hPYY₃₋₃₆ 발현 벡터를 포함하는 숙주 세포주를 당업자에게 주지된 표준 배지를 사용하여 배양할 수 있다. 일반적으로 배지는 세포의 성장 및 생존에 필요한 모든 영양소를 함유할 것이다. 대장균 세포의 배양에 적절한 배지에는, 예를 들어, 루리아 브로쓰 (LB: Luria Broth) 및/또는 터리픽 브로쓰 (TB: Terrific Broth)가 포함된다. 진핵생물 세포의 배양에 적절한 배지에는 로스웰 파크 메모리얼 인스티튜트 (Roswell Park Memorial Institute) 배지 1640 (RPMI 1640), 최소 필수 배지 (MEM: Minimal Essential Medium) 및/또는 돌베코 변형 이글 배지 (DMEM: Dulbecco's Modified Eagle Medium)가 포함되고, 이들 모두에는 배양될 특정 세포주에 필요하다면 혈청 및/또는 성장 인자가 보충될 수 있다. 곤충 배양물에 적절한 배지는 필요하다면 이스톨레이트(yeastolate), 락트알부민 가수분해물, 및/또는 소 태아 혈청이 보충된 그레이스 (Grace's) 배지이다.

- <160> 전형적으로, 형질감염 또는 형질전환된 세포의 선별 성장에 유용한 항생제 또는 기타 화합물이 보충물로서 배지에 첨가된다. 사용될 화합물은 숙주 세포를 형질전환시키는 플라스미드 상에 존재하는 선별가능한 마커 요소에 의해 지시될 것이다. 예를 들어, 선별가능 마커 요소가 카나마이신 저항성인 경우, 배양 배지에 첨가되는 화합물은 카나마이신일 것이다. 선별 성장용의 또다른 화합물에는 앰피실린, 테트라사이클린, 및 네오마이신이 포함된다.
- <161> 숙주 세포에 의해 생산되는 (E10C)hPYY₃₋₃₆ 또는 (D11C)hPYY₃₋₃₆ 폴리펩티드의 양을 당업계에 공지된 표준 방법을 사용하여 평가할 수 있다. 이같은 방법에는 웨스턴 블랏(Western blot) 분석법, SDS-폴리아크릴아미드 젤 전기영동, 비변성 젤 전기영동, 고성능 액체 크로마토그래피 (HPLC) 분리, 면역침전, 및/또는 활성 분석법 예컨대 DNA 결합 젤 이동 분석법이 비제한적으로 포함된다.
- <162> (E10C)hPYY₃₋₃₆ 또는 (D11C)hPYY₃₋₃₆이 숙주 세포주로부터 분비되도록 디자인된 경우, 대다수의 폴리펩티드는 세포 배양 배지에서 발견될 수 있다. 그러나, 폴리펩티드가 숙주 세포로부터 분비되지 않는 경우, 이는 세포질 및/또는 핵 (진핵생물 숙주 세포의 경우) 내에 또는 세포질액(cytosol) (그람-음성 박테리아 숙주 세포의 경우) 내에 존재할 것이다.
- <163> 숙주 세포 세포질 및/또는 핵 (진핵생물 숙주 세포의 경우) 내에 또는 세포질액 (박테리아 숙주 세포의 경우) 내에 위치하는 (E10C)hPYY₃₋₃₆ 또는 (D11C)hPYY₃₋₃₆에 대해, 세포내 물질 (그람-음성 박테리아에 대한 봉입체 포함)을 당업자에게 공지된 임의의 표준 기술을 사용하여 숙주 세포로부터 추출할 수 있다. 예를 들어, 프렌치 프레스(French press), 균질화, 및/또는 초음파처리에 의해 원형질/세포질의 내용물을 방출하도록 숙주 세포를 용해시킨 후, 원심분리할 수 있다.
- <164> (E10C)hPYY₃₋₃₆ 또는 (D11C)hPYY₃₋₃₆이 세포질액 내에 봉입체를 형성한 경우, 봉입체는 내부 및/또는 외부 세포 막에 종종 결합할 수 있고, 따라서 원심분리 후 펠렛 물질에서 주로 발견될 것이다. 그 후, 펠렛 물질을 환원제 예컨대 알칼리성 pH의 디티오프레이톨 또는 산성 pH의 트리스 카르복시에틸 포스핀의 존재 하에 무질서유발제 예컨대 세제, 구아니딘, 구아니딘 유도체, 요소, 또는 요소 유도체로 또는 극단적인 pH에서 처리하여, 봉입체를 방출시키고, 파괴시키고, 가용화시킬 수 있다. 그 후, 가용화된 (E10C)hPYY₃₋₃₆ 또는 (D11C)hPYY₃₋₃₆을 젤 전기영동, 면역침전 등을 사용하여 분석할 수 있다. 폴리펩티드를 단리하기를 원하는 경우, 본원 및 [Marston et al., Meth. Enz. 182:264-75, 1990]에 기술된 것들과 같은 표준 방법을 사용하여 단리를 완성할 수 있다.
- <165> (E10C)hPYY₃₋₃₆ 또는 (D11C)hPYY₃₋₃₆의 발현 시 봉입체가 현저한 정도로 형성되지 않는 경우, 폴리펩티드는 세포 균질화물의 원심분리 후 상청액에서 주로 발견될 것이다. 본원에 기술된 것들과 같은 방법을 사용하여 상청액으로부터 폴리펩티드를 추가로 단리할 수 있다.
- <166> 용액으로부터의 (E10C)hPYY₃₋₃₆ 또는 (D11C)hPYY₃₋₃₆의 정제는 다양한 기술을 사용하여 달성할 수 있다. 카르복실 또는 아미노-말단에서 태그 예컨대 헥사히스티딘 9 또는 기타 소형 펩티드 예컨대 FLAG (Eastman Kodak Co., New Haven, CT) 또는 myc (Invitrogen)을 함유하도록 폴리펩티드가 합성되는 경우, 컬럼 매트릭스가 태그에 대해 친화력이 높은 친화력 컬럼에 용액을 통과시킴으로써 단일-단계 공정으로 폴리펩티드를 정제할 수 있다.
- <167> 예를 들어, 폴리히스티딘은 높은 친화력 및 특이성으로 니켈에 결합한다. 따라서, 니켈의 친화력 컬럼 (예컨대 Qiagen® 니켈 컬럼)을 정제에 사용할 수 있다. 예를 들어, [Current Protocols in Molecular Biology § 10.11.8 (Ausubel et al., eds., Green Publishers Inc. and Wiley and Sons, 1993)] 참조.
- <168> 추가적으로, (E10C)hPYY₃₋₃₆ 또는 (D11C)hPYY₃₋₃₆ 폴리펩티드를 특이적으로 인식하여 이에 결합할 수 있는 모노클로날 항체를 사용하여 (E10C)hPYY₃₋₃₆ 또는 (D11C)hPYY₃₋₃₆ 폴리펩티드를 정제할 수 있다.
- <169> 오염물이 부분적으로 또는 실질적으로 없도록 (E10C)hPYY₃₋₃₆ 또는 (D11C)hPYY₃₋₃₆ 폴리펩티드를 부분적으로 또는 완전히 정제하는 것이 바람직한 경우에, 당업자에게 공지된 표준 방법을 사용할 수 있다. 이같은 방법에는 전기영동에 이은 전기용출에 의한 분리, 다양한 유형의 크로마토그래피 (친화력, 면역친화력, 분자 체, 및 이온 교환), HPLC, 및 정제용 등전 포커싱 ("Isoprime" 기기/기술, Hoefer Scientific, San Francisco, CA)이 비제한적으로 포함된다. 일부 경우에, 2가지 이상의 정제 기술을 조합하여 증가된 순도를 달성할 수 있다.
- <170> 다수의 추가적인 폴리펩티드 제조 방법이 당업계에 공지되어 있고, 이를 사용하여 (E10C)hPYY₃₋₃₆ 및

(D11C)hPYY₃₋₃₆ 폴리펩티드를 제조할 수 있다. 예를 들어, mRNA와 이의 코딩 펩티드 간의 융합 단백질의 제조가 기술된 [Roberts et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 94:12297-303, 1997] 참조. 또한, [Roberts, Curr. Opin. Chem. Biol. 3:268-73, 1999] 참조.

<171> 펩티드 또는 폴리펩티드의 제조 방법이 미국 특허 5,763,192; 5,814,476; 5,723,323; 및 5,817,483에 또한 기술되어 있다. 이러한 방법에는 확실적인 유전자 또는 이의 단편을 제조한 후, 이러한 유전자를 숙주 세포 내로 도입하고, 숙주 세포가 확실적인 유전자에 의해 코딩되는 1가지 이상의 단백질을 생산하는 것이 수반된다. 그 후, 숙주 세포를 스크리닝하여, 원하는 활성을 갖는 펩티드 또는 폴리펩티드를 생산하는 클론을 확인한다. 재조합 펩티드 발현을 위한 또다른 방법이 미국 특허 6,103,495, 6,210,925, 6,627,438, 및 6,737,250에 개시되어 있다. 이러한 방법은 대장균 및 대장균의 일반적인 분비 경로를 이용한다. 펩티드가 신호 펩티드에 융합된다; 따라서, 펩티드가 분비용으로 표적화된다.

<172> 또다른 펩티드 또는 폴리펩티드 제조 방법이 PCT 특허 출원 공보 WO 99/15650에 기술되어 있다. 유전자 발현을 위한 유전자 발현의 무작위 활성화로 명명된 공개된 방법에는 원위치 재조합 방법에 의한 내인성 유전자 발현 또는 유전자의 과발현의 활성화가 수반된다. 예를 들어, 비상동성 또는 변칙 재조합에 의해 유전자의 발현을 활성화시킬 수 있는 조절 서열을 표적 세포 내로 통합시킴으로써 내인성 유전자의 발현이 활성화되거나 증가된다. 먼저 표적 DNA에 방사선이 조사된 후, 유전자 프로모터가 삽입된다. 결국 프로모터가 유전자의 앞에 절단 부를 위치시켜, 유전자의 전사를 개시시킨다. 그 결과, 원하는 펩티드 또는 폴리펩티드가 발현된다.

<173> 아미드화

<174> 합성적으로 또는 재조합적으로 생산된 펩티드의 아미드화는 펩티딜-글리신 알파-아미드화 모노옥시제나제 (PAM)로 칭해지는 효소에 의해 달성된다. 박테리아 발현 시스템을 사용하여 재조합적으로 (E10C)hPYY₃₋₃₆ 또는 (D11C)hPYY₃₋₃₆ 펩티드를 생산하는 경우, 재조합 PAM 효소를 사용하는 시험관내 반응에 의해 펩티드가 C-말단 아미드화될 수 있다. PAM 효소 공급원, 이의 제조 및 정제 방법, 및 (E10C)hPYY₃₋₃₆ 또는 (D11C)hPYY₃₋₃₆ 펩티드를 아미드화시키는데 사용될 수 있는 방법이, 예를 들어, 미국 특허 4,708,934, 5,789,234, 및 6,319,685에 기술되어 있다.

<175> 선택적인 (E10C)hPYY₃₋₃₆ 및 (D11C)hPYY₃₋₃₆ 항체

<176> 시스템인 치환 부위에서 PEG화 (본원에 기술된 바와 같음)되거나 PEG화되지 않은 (E10C)hPYY₃₋₃₆ 또는 (D11C)hPYY₃₋₃₆ 폴리펩티드에 특이적으로 결합하지만, 천연 hPYY₃₋₃₆에는 선택적으로 결합하지 않는 항체 및 항체 단편은 본 발명의 범주 내에 속한다. 항체는 폴리클로날 항체 (단일특이적 폴리클로날 항체 포함); 모노클로날 항체; 재조합 항체; 키메라 항체; 인간화 항체, 예컨대 CDR-그래프트(grafted) 항체; 인간 항체; 단일쇄 항체; 및/또는 이중특이적 항체; 뿐만 아니라 이의 단편; 변이체 또는 유도체일 수 있다. 항체 단편은 (E10C)hPYY₃₋₃₆ 또는 (D11C)hPYY₃₋₃₆ 폴리펩티드 상의 에피토프에 결합하는 항체의 부분을 포함한다. 이같은 단편의 예로는 전장 항체의 효소 절단에 의해 생성된 Fab 및 F(ab') 단편이 포함된다. 기타 결합 단편에는 재조합 DNA 기술, 예컨대 항체 가변 영역을 코딩하는 핵산 서열을 함유하는 재조합 플라스미드의 발현에 의해 생성된 것들이 포함된다.

<177> (E10C)hPYY₃₋₃₆ 또는 (D11C)hPYY₃₋₃₆ 폴리펩티드에 대해 지시된 폴리클로날 항체는 (E10C)hPYY₃₋₃₆ 또는 (D11C)hPYY₃₋₃₆ 폴리펩티드 및 보강제의 다중 SC 또는 IP 주사에 의해 동물 (예를 들어, 토끼 또는 마우스)에서 일반적으로 제조된다. 면역화될 중에서 면역원성인 담체 단백질, 예컨대 키홀 림펫(keyhole limpet) 헤모시아닌, 혈청 알부민, 소 티로글로불린, 또는 대두 트립신 억제제에 (E10C)hPYY₃₋₃₆ 또는 (D11C)hPYY₃₋₃₆ 폴리펩티드를 콘주게이트시키는 것이 유용할 수 있다. 또한, 백반과 같은 응집제를 사용하여 면역 응답을 증강시킨다. 면역화 후, 동물을 출혈시키고, 혈청을 항-(E10C)hPYY₃₋₃₆ 또는 항-(D11C)hPYY₃₋₃₆ 항체 역가에 대해 분석하였다.

<178> (E10C)hPYY₃₋₃₆ 또는 (D11C)hPYY₃₋₃₆ 폴리펩티드에 대해 지시된 모노클로날 항체는 연속적인 세포주 배양에 의해 항체 분자의 제조를 제공하는 임의의 방법을 사용하여 제조된다. 모노클로날 항체의 적절한 제조 방법의 예로는 [Kohler et al., Nature 256:495-97, 1975]의 하이브리도마 방법, 및 인간 B-세포 하이브리도마 방법 ([Kozbor, J. Immunol. 133:3001, 1984]; [Brodeur et al., Monoclonal Antibody Production Techniques and

Applications, 51-63 (Marcel Dekker, Inc., 1987)]이 포함된다. (E10C)hPYY₃₋₃₆ 또는 (D11C)hPYY₃₋₃₆ 폴리펩티드와 반응성인 모노클로날 항체를 생산하는 하이브리도마 세포주가 또한 본 발명에 의해 제공된다.

- <179> 경쟁적 억제에 의해 모노클로날 항체 특이성 및 친화력을 결정하는 바람직한 방법은 [Harlow and Lane, Antibodies: A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Laboratories, 1989)]; [Current Protocols in Immunology (Colligan et al., eds., Greene Publishing Assoc, and Wiley Interscience, 1993)]; 및 [Muller, Meth. Enzymol. 92:589-601, 1988]에서 확인할 수 있다.
- <180> 본 발명의 키메라 항체는 개별적인 H 및/또는 L 면역글로불린 사슬을 포함할 수 있다. 바람직한 키메라 H 사슬은 CH₁ 또는 CH₂와 같은 인간 H 사슬 C 영역 (C_H)의 적어도 일부에 연결된 (E10C)hPYY₃₋₃₆ 또는 (D11C)hPYY₃₋₃₆ 폴리펩티드에 특이적인 비인간 항체의 H 사슬로부터 유래된 항원-결합 영역을 포함한다. 바람직한 키메라 L 사슬은 인간 L 사슬 C 영역 (C_L)의 적어도 일부에 연결된 (E10C)hPYY₃₋₃₆ 또는 (D11C)hPYY₃₋₃₆ 폴리펩티드에 특이적인 비인간 항체의 L 사슬로부터 유래된 항원-결합 영역을 포함한다. 키메라 항체 및 이의 제조 방법은 당업계에 공지되어 있다. [Cabilly et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 81:3273-77, 1984]; [Morrison et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 81:6851-55, 1984]; [Boulianne et al., Nature 312:643-46, 1984]; [Neuberger et al., Nature 314:268-70, 1985]; [Liu et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 84:3439-43, 1987]; 및 [Harlow and Lane, 상기 문헌] 참조.
- <181> 동일한 또는 상이한 가변 영역 결합 특이성의 키메라 H 사슬 및 L 사슬을 갖는 선택적인 결합체가 당업계에 공지된 방법에 따라 개별적인 폴리펩티드 사슬들의 적합한 회합에 의해 또한 제조될 수 있다. 예를 들어, [Current Protocols in Molecular Biology (Ausubel et al., eds., Green Publishers Inc. and Wiley and Sons, 1994)] 및 [Harlow and Lane, 상기 문헌] 참조. 이러한 접근법을 사용하여, 키메라 H 사슬 (또는 이의 유도체)을 발현하는 숙주 세포를 키메라 L 사슬 (또는 이의 유도체)를 발현하는 숙주 세포와 별도로 배양하고, 면역글로불린 사슬들을 별도로 회수한 후, 회합시킨다. 별법적으로, 숙주 세포들을 동시-배양하여, 사슬들이 배양 배지에서 자발적으로 회합되도록 한 후, 어셈블링(assembly)된 면역글로불린을 회수할 수 있다.
- <182> 또다른 실시양태에서, 본 발명의 모노클로날 항체는 "인간화된" 항체이다. 비인간 항체를 인간화시키는 방법은 당업계에 주지되어 있다. 미국 특허 5,585,089 및 5,693,762 참조. 일반적으로, 인간화된 항체는 인간이 아닌 공급원으로부터 항체 내로 도입된 1개 이상의 아미노산 서열을 갖는다. 인간화는, 예를 들어, 당업계에 기술된 방법들을 사용하여 ([Jones et al., 1986, Nature 321:522-25]; [Riechmann et al., 1998, Nature 332:323-27]; [Verhoeyen et al., 1988, Science 239:1534-36]), 설치류 상보성 결정 영역 (CDR)의 적어도 일부로 인간 항체의 상응하는 영역을 치환함으로써 수행될 수 있다.
- <183> 모노클로날 항체의 생성을 우회하는 항체 분자의 항원-결합 영역 (즉, Fab 또는 가변 영역 단편)의 재조합 DNA 버전을 생성시키는 기술이 본 발명의 범주 내에 포함된다. 이러한 기술에서, 항체-특이적 메신저 RNA 분자가 면역화된 동물로부터 취해진 면역계 세포로부터 추출되어 cDNA로 전사된다. 그 후, cDNA를 박테리아 발현 시스템 내로 클로닝한다. 본 발명의 실행에 적절한 이같은 기술의 한 예에서는 발현된 Fab 단백질이 원형질막주위 공간 (박테리아 세포막과 세포벽 사이)으로 이동하거나 분비되도록 하는 리더 서열을 갖는 박테리오파지 램다 벡터 시스템이 사용된다. 항원이 결합하는 많은 갯수의 기능성 Fab 단편을 신속하게 생성시키고 스크리닝할 수 있다. 이같은 (E10C)hPYY₃₋₃₆- 또는 (D11C)hPYY₃₋₃₆-결합 분자 ((E10C)hPYY₃₋₃₆ 또는 (D11C)hPYY₃₋₃₆ 폴리펩티드에 대한 특이성이 있는 Fab 단편)은 본원에서 사용된 용어 "항체"에 명시적으로 포함된다.
- <184> 적합한 항원-특이성의 마우스 항체 분자로부터의 유전자를 적합한 생물학적 활성 (예컨대 인간 보체를 활성화시키고 항체-의존적 세포성 세포독성 (ADCC)을 매개하는 능력)의 인간 항체 분자와 함께 스플라이싱시킴으로써 키메라 항체의 제조를 위해 개발된 기술 또한 본 발명의 범주 내이다. [Morrison et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 81:6851-55, 1984]; [Neuberger et al., Nature, 312:604-08, 1984]. 이러한 기술에 의해 생산된 항체와 같은 선택적인 결합체는 본 발명의 범주 내이다.
- <185> 본 발명이 마우스 또는 래트 모노클로날 항체에 한정되지 않는다는 것이 이해될 것이다; 실제로, 인간 항체가 사용될 수 있다. 이같은 항체는 인간 하이브리도마를 사용함으로써 수득될 수 있다. (E10C)hPYY₃₋₃₆ 또는 (D11C)hPYY₃₋₃₆ 폴리펩티드에 결합하는 완전히 인간형인 항체가 따라서 본 발명에 포함된다. 이같은 항체는 (E10C)hPYY₃₋₃₆ 또는 (D11C)hPYY₃₋₃₆ 항원 (임의로 담체에 콘주게이트됨)으로 내인성 면역글로불린 생산의 부재 하에 인간 항체의 레퍼토리를 생산할 수 있는 트랜스제닉(transgenic) 동물 (예를 들어, 마우스)을 면역화시킴으

로써 제조된다. 예를 들어, [Jakobovits et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 90:2551-55, 1993]; [Jakobovits et al., Nature 362:255-58, 1993]; [Bruggemann et al., Year in Immuno. 7:33-40, 1993] 참조.

<186> (E10C)hPYY₃₋₃₆ 또는 (D11C)hPYY₃₋₃₆ 폴리펩티드에 결합하는 인간 항체가 또한 본 발명에 포함된다. 내인성 면역 글로불린 생산의 부재 하에 인간 항체의 레퍼토리를 생산할 수 있는 트랜스제닉 동물 (예를 들어, 마우스)를 사용하여, 담체에 임의로 콘주게이트된 (E10C)hPYY₃₋₃₆ 또는 (D11C)hPYY₃₋₃₆ 폴리펩티드 항원 (즉, 6개 이상의 인접 아미노산 포함)으로 면역화시킴으로써 이같은 항체가 제조된다. 예를 들어, [Jakobovits et al., 1993 상기 문헌]; [Jakobovits et al., Nature 362:255-58, 1993]; [Bruggemann et al., 1993, 상기 문헌] 참조. 한 방법에서, 이같은 트랜스제닉 동물은 중쇄 및 경쇄 면역글로불린을 코딩하는 내인성 유전자좌를 불능화시키고 인간 중쇄 및 경쇄 단백질을 코딩하는 유전자좌를 게놈 내로 삽입함으로써 제조된다. 그 후, 부분적으로 변형된 동물, 즉 전체보다 적은 변형된 보체를 갖는 것들을 이종 교배하여, 모든 원하는 면역계 변형을 갖는 동물을 수득한다. 면역원을 투여했을 때, 이러한 트랜스제닉 동물들은 이러한 항원에 대해 면역특이적인 가변 영역을 포함하는, 인간 (예를 들어, 마우스가 아닌) 아미노산 서열을 갖는 항체를 생산한다. PCT 특허 출원 공보 WO 96/33735 및 WO 94/02602 참조. 추가적인 방법들이 미국 특허 5,545,807, PCT 특허 출원 공보 WO 91/10741 및 WO 90/04036, 및 EP 특허 0 546 073 B1 및 PCT 특허 출원 공보 WO 92/03918에 기술되어 있다. 숙주 세포 내에서의 재조합 DNA의 발현에 의해 또는 본원에 기술된 바와 같은 하이브리도마 세포에서의 발현에 의해 인간 항체를 또한 제조할 수 있다.

<187> 별법적인 실시양태에서, 파지-디스플레이 라이브러리로부터 인간 항체를 또한 제조할 수 있다 ([Hoogenboom et al., J. Mol. Biol. 227:381, 1991]; [Marks et al., J. Mol. Biol. 222:581, 1991]). 이러한 프로세스는 실 모양 박테리오파지의 표면 상에 항체 레퍼토리를 디스플레이하고, 이어서 선택된 항원에 대한 결합에 의해 파지를 선별하는 것을 통해 면역 선택을 모사한다. 한 이같은 기술이 이같은 접근법을 사용하는 MPL- 및 msk-수용체에 대한 친화력이 높고 기능성인 효능제성 항체의 단리가 기술된 PCT 특허 출원 공보 WO 99/10494에 기술되어 있다.

<188> 키메라, CDR 그래프트, 및 인간화 항체는 재조합 방법에 의해 전형적으로 제조된다. 항체를 코딩하는 핵산을 숙주 세포 내로 도입하고, 본원에 기술되고 당업계에 공지된 재료 및 절차를 사용하여 발현시킨다. 바람직한 실시양태에서, 항체는 포유류 숙주 세포, 예컨대 CHO 세포 세포 내에서 생산된다. 모노클로날 (예를 들어, 인간) 항체가 숙주 세포 내에서의 재조합 DNA의 발현에 의해 또는 본원에 기술된 바와 같은 하이브리도마 세포에서의 발현에 의해 생산될 수 있다.

<189> 본 발명의 항-(E10C)hPYY₃₋₃₆ 및 항-(D11C)hPYY₃₋₃₆ 항체는 (E10C)hPYY₃₋₃₆ 및 (D11C)hPYY₃₋₃₆ 폴리펩티드의 검출 및 정량, 뿐만 아니라 폴리펩티드 정제를 위한 임의의 공지된 분석법, 예컨대 경쟁적 결합 분석법, 직접 및 간접 샌드위치 분석법, 및 면역침전 분석법에서 사용될 수 있다 ([Sola, Monoclonal Antibodies: A Manual of Techniques, 147-158 (CRC Press, Inc., 1987)]). 항체는 사용되는 분석법에 적합한 친화력으로 (E10C)hPYY₃₋₃₆ 또는 (D11C)hPYY₃₋₃₆ 폴리펩티드에 결합할 것이다.

<190> 본 발명의 PYY 효능제는 본 발명의 방법 양상에서 사용하기 위해 제약상 허용가능한 산 부가염의 형태로 제공될 수 있다. 본 발명의 화합물의 대표적인 제약상 허용가능한 산 부가염에는 히드로클로라이드, 히드로브로마이드, 히드로요오다이드, 니트레이트, 술페이트, 비술페이트, 포스페이트, 산 포스페이트, 이소니코티네이트, 아세테이트, 락테이트, 살리실레이트, 시트레이트, 산 시트레이트, 타르트레이트, 판토테네이트, 비타르트레이트, 아스코르베이트, 숙시네이트, 말레이트, 젠티시네이트, 푸마레이트, 글루코네이트, 글루쿠로네이트, 사카레이트, 포르메이트, 벤조에이트, 글루타메이트, 메탄술포네이트, 에탄술포네이트, 벤젠술포네이트, p-톨루엔술포네이트, 파모에이트, 팔미테이트, 말로네이트, 스테아레이트, 라우레이트, 말레이트, 보레이트, 핵사플루오로포스페이트, 나프틸레이트, 글루코헵토네이트, 락토비오네이트 및 라우릴술포네이트 염 등이 포함된다. 비-PEG화 변이체가 PEG-PYY₃₋₃₆ 변이체 콘주게이트 제조에서 중간체로 사용되는 경우 비-PEG화 변이체의 염은 제약상 허용가능할 필요가 없다.

<191> 본 발명의 PYY 효능제는 제약 조성물의 형태로 일반적으로 투여될 것이다. 제약 조성물은, 예를 들어, 경구 투여 (예를 들어, 정제, 캡슐, 환제, 분말, 용액, 현탁액), 비경구 주사 (예를 들어, 멸균 용액, 현탁액 또는 에멀션), 비강내 투여 (예를 들어, 에어로졸, 점적제 등), 직장 투여 (예를 들어, 좌약) 또는 경피 투여 (예를 들어, 패치)에 적절한 형태일 수 있다. 제약 조성물은 정확한 투여량의 단일 투여에 적절한 단위 투여량 형태일 수 있다. 제약 조성물은 통상적인 제약 담체 및 유효 성분으로서의 본 발명의 PYY 효능제를 포함할 것이다.

또한, 또다른 약제, 보조제 등을 포함할 수 있다.

- <192> 생활성 펩티드의 다양한 제약 조성물의 제조 방법은 제약 과학 분야에 주지되어 있다. 예를 들어, 미국 특허 출원 공보 2005/0009748 (경구 투여); 및 2004/0157777, 2005/0002927 및 2005/0215475 (경점막 투여, 예를 들어, 비강내 또는 볼 투여) 참조. 또한 [Remington: The Practice of Pharmacy, Lippincott Williams and Wilkins, Baltimore, MD, 20th ed. 2000] 참조.
- <193> 본 발명의 PYY 효능제는 본원에 기술된 질환 상태 또는 용태의 치료를 위한 또다른 약제와 함께 사용될 수 있다. 따라서, 본 발명의 화합물을 또다른 약제와 조합하여 투여하는 것을 포함하는 치료 방법이 본 발명에 의해 또한 제공된다.
- <194> 본 발명의 PYY 효능제와 조합되어 사용될 수 있는 적절한 약제에는 또다른 항비만제 예컨대 카나비노이드-1 (CB-1) 길항제 (예컨대 리모나반트), 11 β -히드록시 스테로이드 탈수소효소-1 (11 β -HSD 유형 1) 억제제, MCR-4 효능제, 콜레시스토키닌-A (CCK-A) 효능제, 모노아민 재흡수 억제제 (예컨대 시부트라민), 교감신경유사 작용제, β_3 아드레날린성 수용체 효능제, 도파민 수용체 효능제 (예컨대 브로모크립틴), 멜라닌세포-자극 호르몬 수용체 유사체, 5HT_{2c} 수용체 효능제, 멜라닌 농축 호르몬 길항제, 렙틴, 렙틴 유사체, 렙틴 수용체 효능제, 갈라닌 길항제, 지질분해효소 억제제 (예컨대 테트라히드로립스타틴, 즉 올리스탯), 식욕억제제 (예컨대 붐베신 효능제), 뉴로펩티드-Y 수용체 길항제 (예를 들어, NPY Y5 수용체 길항제), 갑상선유사 작용제, 데히드로에피안드로스테론 또는 이의 유사체, 글루코코르티코이드 수용체 효능제 또는 길항제, 오렉신 수용체 길항제, 글루카곤-유사 펩티드-1 수용체 효능제, 섬모 신경영양 인자 (예컨대 Regeneron Pharmaceuticals, Inc. (Tarrytown, NY) 및 Procter & Gamble Company (Cincinnati, OH)로부터 입수가능한 Axokine™), 인간 아구티(agouti)-관련 단백질 (AGRP) 억제제, 그렐린 수용체 길항제, 히스타민 3 수용체 길항제 또는 역 효능제, 뉴로메딘 U 수용체 효능제, MTP/ApoB 억제제 (예를 들어, 장-선택적 MTP 억제제, 예컨대 디플로타피드) 등이 포함된다.
- <195> 본 발명의 PYY 효능제와 조합하여 사용하기에 바람직한 항비만제에는 CB-1 수용체 길항제, 장-선택적 MTP 억제제, CCKa 효능제, 5HT_{2c} 수용체 효능제, NPY Y5 수용체 길항제, 올리스탯, 및 시부트라민이 포함된다. 본 발명의 방법에서 사용하기에 바람직한 CB-1 수용체 길항제에는 하기의 것들이 포함된다: Sanofi-Synthelabo로부터 입수가능하거나, 또는 미국 특허 5,624,941에 기술된 바와 같이 제조할 수 있는 리모나반트 (상표명 Acomplia™) 으로 또한 공지된 SR141716A); Tocris™ (Ellisville, MO)로부터 입수가능한 N-(피페리딘-1-일)-1-(2,4-디클로로페닐)-5-(4-요오도페닐)-4-메틸-1H-피라졸-3-카르복사미드 (AM251); 미국 특허 6,645,985에 기술된 바와 같이 제조할 수 있는 [5-(4-브로모페닐)-1-(2,4-디클로로-페닐)-4-에틸-N-(1-피페리디닐)-1H-피라졸-3-카르복사미드] (SR147778); PCT 특허 출원 공보 WO 03/075660에 기술된 바와 같이 제조할 수 있는 N-(피페리딘-1-일)-4,5-디페닐-1-메틸이미다졸-2-카르복사미드, N-(피페리딘-1-일)-4-(2,4-디클로로페닐)-5-(4-클로로페닐)-1-메틸이미다졸-2-카르복사미드, N-(피페리딘-1-일)-4,5-디-(4-메틸페닐)-1-메틸이미다졸-2-카르복사미드, N-시클로헥실-4,5-디-(4-메틸페닐)-1-메틸이미다졸-2-카르복사미드, N-(시클로헥실)-4-(2,4-디클로로페닐)-5-(4-클로로페닐)-1-메틸이미다졸-2-카르복사미드, 및 N-(페닐)-4-(2,4-디클로로페닐)-5-(4-클로로페닐)-1-메틸이미다졸-2-카르복사미드; 미국 특허 출원 공보 2004/0092520에 기술된 바와 같이 제조할 수 있는 1-[9-(4-클로로-페닐)-8-(2-클로로-페닐)-9H-푸린-6-일]-4-에틸아미노-피페리딘-4-카르복실산 아미드의 히드로클로라이드, 메실레이트 및 베실레이트 염; 미국 특허 출원 공보 2004/0157839에 기술된 바와 같이 제조할 수 있는 1-[7-(2-클로로-페닐)-8-(4-클로로-페닐)-2-메틸-피라졸로[1,5-a][1,3,5]트리아진-4-일]-3-에틸아미노-아제티딘-3-카르복실산 아미드 및 1-[7-(2-클로로-페닐)-8-(4-클로로-페닐)-2-메틸-피라졸로[1,5-a][1,3,5]트리아진-4-일]-3-메틸아미노-아제티딘-3-카르복실산 아미드; 미국 특허 출원 공보 2004/0214855에 기술된 바와 같이 제조할 수 있는 3-(4-클로로-페닐)-2-(2-클로로-페닐)-6-(2,2-디플루오로-프로필)-2,4,5,6-테트라히드로-피라졸로[3,4-c]피리딘-7-온; 미국 특허 출원 공보 2005/0101592에 기술된 바와 같이 제조할 수 있는 3-(4-클로로-페닐)-2-(2-클로로-페닐)-7-(2,2-디플루오로-프로필)-6,7-디히드로-2H,5H-4-옥사-1,2,7-트리아자-아주렌-8-온; 미국 특허 출원 공보 2004/0214838에 기술된 바와 같이 제조할 수 있는 2-(2-클로로-페닐)-6-(2,2,2-트리플루오로-에틸)-3-(4-트리플루오로메틸-페닐)-2,6-디히드로-피라졸로[4,3-d]피리미딘-7-온; PCT 특허 출원 공보 WO 02/076949에 기술된 바와 같이 제조할 수 있는 (S)-4-클로로-N-([3-(4-클로로-페닐)-4-페닐-4,5-디히드로-피라졸-1-일]-메틸아미노-메틸렌)-벤젠술폰아미드 (SLV-319) 및 (S)-N-([3-(4-클로로-페닐)-4-페닐-4,5-디히드로-피라졸-1-일]-메틸아미노-메틸렌)-4-트리플루오로메틸-벤젠술폰아미드 (SLV-326); 미국 특허 6,432,984에 기술된 바와 같이 제조할 수 있는 N-피페리디노-5-(4-브로모페닐)-1-(2,4-디클로로페닐)-4-에틸피라졸-3-카르복사미드; 미국 특허 6,518,264에 기술된 바와 같이 제조할 수 있는 1-[비스-(4-클로로-페닐)-메틸]-3-[(3,5-디플루오로-페닐)-메탄술폰닐-메틸렌]-아제티딘; PCT 특허 출원 공보

WO 04/048317에 기술된 바와 같이 제조할 수 있는 2-(5-(트리플루오로메틸)피리딘-2-일옥시)-N-(4-(4-클로로페닐)-3-(3-시아노페닐)부탄-2-일)-2-메틸프로판아미드; 미국 특허 5,747,524에 기술된 바와 같이 제조할 수 있는 4-([6-메톡시-2-(4-메톡시페닐)-1-벤조푸란-3-일]카르보닐)벤조니트릴 (LY-320135); WO 04/013120에 기술된 바와 같이 제조할 수 있는 1-[2-(2,4-디클로로페닐)-2-(4-플루오로페닐)-벤조[1,3]디옥솔-5-술포닐]-피페리딘; 및 PCT 특허 출원 공보 WO 04/012671에 기술된 바와 같이 제조할 수 있는 [3-아미노-5-(4-클로로페닐)-6-(2,4-디클로로페닐)-푸로[2,3-b]피리딘-2-일]-페닐-메타논.

<196> 본 발명의 배합물, 제약 조성물 및 방법에서 사용하기에 바람직한 장-작용성 MTP 억제제에는 하기의 것들이 포함된다: 디를로타피드 ((S)-N-(2-[벤질(메틸)아미노]-2-옥소-1-페닐에틸)-1-메틸-5-[4'-(트리플루오로메틸)[1,1'-비페닐]-2-카르복사미도]-1H-인돌-2-카르복사미드) 및 1-메틸-5-[(4'-트리플루오로메틸-비페닐-2-카르보닐)-아미노]-1H-인돌-2-카르복실산 (카르바모일-페닐-메틸)-아미드 (모두 미국 특허 6,720,351에 기술된 방법을 사용하여 제조할 수 있음); (S)-2-[(4'-트리플루오로메틸-비페닐-2-카르보닐)-아미노]-퀴놀린-6-카르복실산 (펜틸카르바모일-페닐-메틸)-아미드, (S)-2-[(4'-tert-부틸-비페닐-2-카르보닐)-아미노]-퀴놀린-6-카르복실산 {[4-플루오로-벤질)-메틸-카르바모일]-페닐-메틸}-아미드, 및 (S)-2-[(4'-tert-부틸-비페닐-2-카르보닐)-아미노]-퀴놀린-6-카르복실산 [(4-플루오로-벤질카르바모일)-페닐-메틸]-아미드 (모두 미국 특허 출원 공보 2005/0234099A1에 기술된 바와 같이 제조할 수 있음), (-)-4-[4-[4-[4-[(2S,4R)-2-(4-클로로페닐)-2-[(4-메틸-4H-1,2,4-트리아졸-3-일)술포닐]메틸-1,3-디옥솔란-4-일]메톡시]페닐]피페라진-1-일]페닐]-2-(1R)-1-메틸프로필]-2,4-디히드로-3H-1,2,4-트리아졸-3-온 (미트라타피드(Mitratapide) 또는 R103757로 또한 공지됨) (미국 특허 5,521,186 및 5,929,075에 기술된 바와 같이 제조할 수 있음); 및 임플리타미드(implitapide) (BAY 13-9952) (미국 특허 6,265,431에 기술된 바와 같이 제조할 수 있음). 디를로타피드, 미트라타피드, (S)-2-[(4'-트리플루오로메틸-비페닐-2-카르보닐)-아미노]-퀴놀린-6-카르복실산 (펜틸카르바모일-페닐-메틸)-아미드, (S)-2-[(4'-tert-부틸-비페닐-2-카르보닐)-아미노]-퀴놀린-6-카르복실산 {[4-플루오로-벤질)-메틸-카르바모일]-페닐-메틸}-아미드, 또는 (S)-2-[(4'-tert-부틸-비페닐-2-카르보닐)-아미노]-퀴놀린-6-카르복실산 [(4-플루오로-벤질카르바모일)-페닐-메틸]-아미드가 가장 바람직하다. 바람직한 NPY Y5 수용체 길항제에는 하기의 것들이 포함된다: 2-옥소-N-(5-페닐피라지닐)스피로[이소벤조푸란-1(3H),4'-피페리딘]-1'-카르복사미드 (미국 특허 출원 공보 2002/0151456에 기술된 바와 같이 제조할 수 있음); 및 3-옥소-N-(5-페닐-2-피라지닐)-스피로[이소벤조푸란-1(3H),4'-피페리딘]-1'-카르복사미드; 3-옥소-N-(7-트리플루오로메틸피리도[3,2-b]피리딘-2-일)-스피로[이소벤조푸란-1(3H),4'-피페리딘]-1'-카르복사미드; N-[5-(3-플루오로페닐)-2-피리미디닐]-3-옥소스피로[이소벤조푸란-1(3H),[4'-피페리딘]-1'-카르복사미드; 트랜스-3'-옥소-N-(5-페닐-2-피리미디닐) 스피로[시클로헥산-1,1'(3'H)-이소벤조푸란]-4-카르복사미드; 트랜스-3'-옥소-N-[1-(3-퀴놀릴)-4-이미다졸릴]스피로[시클로헥산-1,1'(3'H)-이소벤조푸란]-4-카르복사미드; 트랜스-3-옥소-N-(5-페닐-2-피라지닐)스피로[4-아자이소-벤조푸란-1(3H),1'-시클로헥산]-4'-카르복사미드; 트랜스-N-[5-(3-플루오로페닐)-2-피리미디닐]-3-옥소스피로[5-아자이소벤조푸란-1(3H),1'-시클로헥산]-4'-카르복사미드; 트랜스-N-[5-(2-플루오로페닐)-2-피리미디닐]-3-옥소스피로[5-아자이소벤조푸란-1(3H),1'-시클로헥산]-4'-카르복사미드; 트랜스-N-[1-(3,5-디플루오로페닐)-4-이미다졸릴]-3-옥소스피로[7-아자이소벤조푸란-1(3H),1'-시클로헥산]-4'-카르복사미드; 트랜스-3-옥소-N-(1-페닐-4-피라졸릴)스피로[4-아자이소벤조푸란-1(3H),1'-시클로헥산]-4'-카르복사미드; 트랜스-N-[1-(2-플루오로페닐)-3-피라졸릴]3-옥소스피로[6-아자이소벤조푸란-1(3H),1'-시클로헥산]-4'-카르복사미드; 트랜스-3-옥소-N-(1-페닐-3-피라졸릴)스피로[6-아자이소벤조푸란-1(3H),1'-시클로헥산]-4'-카르복사미드; 및 트랜스-3-옥소-N-(2-페닐-1,2,3-트리아졸-4-일)스피로[6-아자이소벤조푸란-1(3H),1'-시클로헥산]-4'-카르복사미드 (모두 PCT 특허 출원 공보 WO 03/082190에 기술된 바와 같이 제조할 수 있음); 및 이들의 제약상 허용가능한 염 및 에스테르. 모든 상기 인용된 미국 특허 및 공보는 거명에 의해 본원에 포함된다.

<197> 본 발명의 방법 양상에서, 본 발명의 PYY 효능제는, 단독으로 또는 1가지 이상의 또다른 약제와 조합되어, 당업계에 공지된 임의의 통상적인 말초 투여 방법으로 따로따로 또는 함께 대상에게 말초 투여된다. 따라서, PYY 효능제 또는 조합물은 대상에게 비경구적으로 (예를 들어, 정맥내, 복강내, 근육내 또는 피하), 비강내에, 경구적으로, 설하에, 볼에, 흡입에 의해 (예를 들어, 에어로졸에 의해), 직장내 (예를 들어, 좌약에 의해) 또는 경피적으로 투여될 수 있다. 비경구 투여가 바람직한 투여 방법이고, 피하 투여가 바람직한 비경구 투여 방법이다.

<198> 비경구 주사에 적절한 조성물은 제약상 허용가능한 멸균 수성 또는 비수성 용액, 분산액, 현탁액, 또는 에멀션, 및 멸균 주사 용액 또는 분산액으로의 재구성을 위한 멸균 분말을 일반적으로 포함한다. 적절한 수성 및 비수성 담체 또는 희석제 (용매 및 비히클 포함)의 예로는 물, 에탄올, 폴리에틸렌 글리콜, 폴리에틸렌 글리콜, 글리세롤 등), 이들의 적절한 혼합물, 올리브 오일과 같은 식물성 오일이 포함되는 트리글리세리드, 및 주

사용 유기 에스테르 예컨대 에틸 올레레이트가 포함된다.

- <199> 이러한 비경구 주사용 조성물은 방부제, 습윤화제, 가용화제, 유화제 및 분산제와 같은 부형제를 또한 함유할 수 있다. 다양한 항균 및 항진균 작용제, 예를 들어, 파라벤, 클로로부탄올, 페놀, 소르브산 등으로 조성물의 미생물 오염을 방지할 수 있다. 등장화제, 예를 들어, 당, 염화나트륨 등을 포함하는 것이 또한 바람직할 수 있다. 흡수를 지연시킬 수 있는 작용제, 예를 들어, 알루미늄 모노스테아레이트 및 젤라틴을 사용하여 주사용 제약 조성물이 장기간 흡수되도록 할 수 있다.
- <200> 본 발명의 PYY 효능제는 투여 모드, 대상의 연령 및 체중, 치료될 질환, 용태 또는 장애의 중증도, 및 투여될 PYY 효능제의 약리학적 활성이 포함되는 다수의 인자에 따라 변하는 투여량으로 대상에게 투여될 것이다. 특정 환자에 대한 투여량 범위 및 최적 투여량의 결정은 당업자의 기술 내에 속한다.
- <201> 비경구 투여를 위해, 본 발명의 PYY 효능제는 비-PEG화 변이체를 기초로 하는 투여 요법으로 1회 용량 당 약 0.01 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 내지 약 10 mg/kg 의 투여량 수준으로 인간 대상에게 투여될 수 있다. 예를 들어, 30K mPEG 말레이미드(E10C)hPYY₃₋₃₆에 대해, 비경구 투여 수준은 (E10C)hPYY₃₋₃₆을 기초로 하는 투여 요법으로 1회 용량 당 약 0.01 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 내지 약 10 mg/kg 범위, 바람직하게는 1회 용량 당 약 0.05 mg/kg 내지 약 1.0 mg/kg 범위, 또는 1회 용량 당 약 0.05 또는 0.1 mg/kg 내지 약 1.0 mg/kg 범위, 또는 1회 용량 당 약 0.05 또는 0.1 mg/kg 내지 약 0.3 또는 0.5 mg/kg 범위일 것이다. 예를 들어, 분자량이 약 34024 Da (30 k Da PEG + 비-PEG화 펩티드의 분자량인 4024)인 30K mPEG 말레이미드(E10C)hPYY₃₋₃₆의 85 mg 용량은 비-PEG화 (E10C)hPYY₃₋₃₆을 기초로 10 mg과 등가이다. 투여 요법은, 바람직하게는 식사 전에, 1일 1회 이상의 투여이거나, 또는 특히 30K mPEG 말레이미드(E10C)hPYY₃₋₃₆ 또는 20K mPEG 말레이미드(E10C)hPYY₃₋₃₆의 경우, 1주일에 2 또는 3회 또는 1주일에 1회 또는 10-14일에 1회의 투여 요법이 바람직하다.
- <202> 본 발명의 실시양태들이 하기에 설명된다. 그러나, 본 발명의 또다른 변형이 당업자에게 공지되거나, 또는 본 명세서 및 첨부된 청구항의 견지에서 명백할 바와 같이, 본 발명의 실시양태들이 이러한 실시예의 특정한 상세 사항에 한정되지 않는다는 것을 이해하여야 한다. 본원에 인용된 모든 참조문헌은 거명에 의해 본원에 포함된다.

실시예

- <203> 실시예 1
- <204> 선형 30K 및 20K mPEG 및 20K 말레이미드 (E10C)hPYY₃₋₃₆
- <205> 본 실시예는 mPEG (30K 또는 20K)가 잔기 10에 부착된, 실질적으로 균질한 모노-PEG화 (E10C)hPYY₃₋₃₆의 제조를 제공한다.
- <206> (a) (E10C)hPYY₃₋₃₆의 제조
- <207> 자동 펩티드 합성기 (모델 433A; Applied Biosystems, Foster City, CA)를 사용하여 2-(1H-벤조트리아졸-1-일)-1,1,3,3-테트라메틸 우로늄 헥사플루오로포스페이트 (HBTU) 활성화로의 Fmoc 전략 (Fastmoc, 0.15 mmol 사이클)을 사용하는 고체-상 방법에 의해 (E10C)PYY₃₋₃₆을 합성하였다. 사용된 측쇄 보호기는 하기와 같았다: Asn, Gln, Cys 및 His에 대해서 Trt; Ser, Thr, 및 Tyr에 대해서 tBu; Lys에 대해서 Boc; Asp 및 Glu에 대해서 OtBu; 및 Arg에 대해서 Pbf. 펩티드-수지의 절단이 실온에서 4시간 동안 9 ml의 트리플루오로아세트산 (TFA), 0.5 g의 페놀, 0.5 ml의 H₂O, 0.5 ml의 티오아니솔 및 0.25 ml의 1,2 에탄디티올의 혼합물로 완료되었다. 펩티드를 빙냉 에틸 에테르에서 침전시키고, 에틸 에테르로 세정하고, DMSO에 용해시키고, 80 ml/분의 유속으로 30분 동안의 100% 용매 A:0% 용매 B에서 70% 용매 A:30% 용매 B로의 선형 구배를 사용하여 Waters Deltapak C18, 15 μm , 100 Å, 50×300mmID 컬럼 (카탈로그# WAT011801, Waters, Milford, MA) 상에서의 역상 HPLC에 의해 정제하였다. 용매 A는 수성 0.1% TFA (트리플루오로아세트산) 용액이었다. 용매 B는 아세트니트릴 내의 0.1% TFA 용액이었다. 정제된 펩티드의 분자량을 ESI-MS에 의해 확인하였고 ($M_{\text{평균}}=4024$), 순도를 역상 HPLC에 의해 평가하였다 (도 1).
- <208> (b) 선형 30K mPEG 말레이미드 (E10C)hPYY₃₋₃₆의 제조
- <209> 약 30,000 MW의 선형 mPEG 말레이미드 시약 (Sunbright ME-300MA, NOF Corporation, Tokyo, Japan)을 잔기 10

의 시스테인의 술프히드릴 기 상에서 (E10C)hPYY₃₋₃₆에 선택적으로 커플링시켰다. 20 mM HEPES (Sigma Chemical, St. Louis, MO) pH 7.0, 또는, 별법적으로, 20 mM 아세트산 나트륨 (Sigma Chemical, St. Louis, MO) pH 4.5에 용해된 선형 30K mPEG 말레이미드를 펩티드의 직접적인 첨가에 의해 (E10C)hPYY₃₋₃₆ 펩티드와 즉시 반응시켜, 1 mg/ml 펩티드 농도 및 약 1:1의 mPEG:(E10C)hPYY₃₋₃₆ 상대 몰비를 산출시켰다. 암실에서 실온에서 0.5-24 시간 동안 반응을 수행하였다. 양이온 교환 크로마토그래피 상에서의 즉각적인 정제를 위해 20 mM 아세트산 나트륨 pH 4.5 내로의 희석에 의해 HEPES pH 7.0 내에서의 반응을 정지시켰다. 20 mM 아세트산 나트륨, pH 4.5 내의 반응물은 양이온 교환 크로마토그래피 상에 직접 로딩하였다. 반응 생성물을 SEC-HPLC에 의해 평가하였다 (도 2).

<210> (c) 선형 30K mPEG 말레이미드 (E10C)hPYY₃₋₃₆의 정제

<211> PEG화 (E10C)hPYY₃₋₃₆ 중을 단일 이온 교환 크로마토그래피 단계를 사용하여 반응 혼합물로부터 >95%로 정제하였다. 모노-PEG화 (E10C)hPYY₃₋₃₆을 변형되지 않은 (E10C)hPYY₃₋₃₆ 및 분자량이 더 큰 종들로부터 양이온 교환 크로마토그래피를 사용하여 정제하였다. 상기 기술된 바와 같은 전형적인 선형 30K mPEG 말레이미드 (E10C)hPYY₃₋₃₆ 반응 혼합물 (10 mg 단백질)을 20 mM 아세트산 나트륨, pH 4.5 (완충제 A)에서 평형화된 SP-Sepharose Hitrap 컬럼 (5 ml) (Amersham Pharmacia Biotech, GE Healthcare, Piscataway, NJ) 상에서 분획화하였다. 반응 혼합물을 완충제 A로 7× 희석하고, 컬럼 상에 2.5 ml/분의 유속으로 로딩하였다. 컬럼을 5-10 컬럼 부피의 완충제 A로 세정하였다. 이어서, 20 컬럼 부피의 0-100 mM의 선형 NaCl 구배로 다양한 (E10C)hPYY₃₋₃₆ 종들이 컬럼으로부터 용출되었다. 용리액을 280 nm에서의 흡광도 (A₂₈₀)에 의해 모니터링하고, 적합한 크기 분획을 수집하였다. 분획들을 @SDS-PAGE (도 3)에 의해 평가된 바와 같은 PEG화 정도에 관하여 풀링하였다. 그 후, 정제된 풀을 Centriprep 3 농축기 (Amicon Technology Corporation, Northborough, MA)에서, 또는, 별법적으로, Vivaspin 10K 농축기 (Vivascience Sartorius Group, Hannover, Germany)를 사용하여 0.5-5 mg/ml로 농축하였다. 정제된 풀의 단백질 농도를 RP HPLC 피크 면적을 PYY₃₋₃₆ 표준 곡선 (제시되지 않음)과 비교함으로써 결정하거나, 또는 별법적으로 정제된 풀의 농도를 실험적으로 유도된 흡광계수를 사용하여 280 nm에서의 흡광도에 의해 결정하였다. PEG화 (E10C)hPYY₃₋₃₆의 정제된 풀을 도 6에 제시된 바와 같이 SEC-HPLC를 사용하여 프로파일링하였다.

<212> (d) 선형 20K mPEG 말레이미드 (E10C)hPYY₃₋₃₆의 제조

<213> 약 20,000 MW의 선형 mPEG 말레이미드 시약 (Sunbright ME-200MA, NOF Corporation)을 잔기 10의 시스테인의 술프히드릴 기 상에서 (E10C)hPYY₃₋₃₆에 선택적으로 커플링시켰다. 20 mM 아세트산 나트륨 (Sigma Chemical, St. Louis, MO) pH 4.5에 용해된 선형 20K mPEG 말레이미드를 펩티드의 직접적인 첨가에 의해 (E10C)hPYY₃₋₃₆ 펩티드와 즉시 반응시켜, 1 mg/ml 펩티드 농도 및 약 1.3:1의 mPEG:(E10C)hPYY₃₋₃₆ 상대 몰비를 산출시켰다. 암실에서 실온에서 60분 동안, 이어서 4°C에서 16시간 동안 반응을 수행하였다. 20 mM 아세트산 나트륨, pH 4.5 내의 반응물을 양이온 교환 크로마토그래피 상에 직접 로딩하였다. 반응 생성물을 SEC-HPLC에 의해 평가하였다.

<214> (e) 선형 20K mPEG 말레이미드 (E10C)hPYY₃₋₃₆의 정제

<215> PEG화 (E10C)hPYY₃₋₃₆ 중을 단일 이온 교환 크로마토그래피 단계를 사용하여 반응 혼합물로부터 >95%로 정제하였다. 모노-PEG화 (E10C)hPYY₃₋₃₆을 유리 PEG, 변형되지 않은 (E10C)hPYY₃₋₃₆ 및 분자량이 더 큰 종들로부터 양이온 교환 크로마토그래피를 사용하여 분리하였다. 상기 기술된 바와 같은 전형적인 선형 20K mPEG 말레이미드 (E10C)hPYY₃₋₃₆ 반응 혼합물 (20 mg 단백질)을 20 mM 아세트산 나트륨, pH 4.5 (완충제 A)에서 평형화된 SP-Sepharose Hitrap 컬럼 (5 ml) (Amersham Pharmacia Biotech, GE Healthcare) 상에서 분획화하였다. 반응 혼합물을 컬럼 상에 1.0 ml/분의 유속으로 로딩하였다. 컬럼을 유속 2.5 ml/분의 4 컬럼 부피의 완충제 A로 세정하였다. 이어서, 유속 2.5 ml/분의 25 컬럼 부피의 0-200 mM의 선형 NaCl 구배로 다양한 (E10C)hPYY₃₋₃₆ 종들이 컬럼으로부터 용출되었다. 용리액을 280 nm에서의 흡광도 (A₂₈₀)에 의해 모니터링하고, 적합한 크기 분획을 수집하였다. 분획들을 SEC-HPLC에 의해 평가된 바와 같은 PEG화 정도에 관하여 풀링하였다. 그 후, 정제된 풀을 Vivaspin 10K 농축기 (Vivascience Sartorius Group)를 사용하여 0.5-5 mg/ml로 농축하였다. 정제된 풀의 단백질 농도를 실험적으로 유도된 흡광계수를 사용하여 280 nm에서의 흡광도에 의해 결정하였다. 정제된 모노

20K mPEG 말레이미드 (E10C)hPYY₃₋₃₆의 총 공정 수율은 38 %였다. SEC-HPLC를 사용하여 모노 20K mPEG 말레이미드 (E10C)hPYY₃₋₃₆의 정제된 풀이 96% 순수한 것으로 결정되었다.

<216>

실시예 2

<217>

선형 30K mPEG 말레이미드 (D11C)hPYY₃₋₃₆

<218>

본 실시예는 mPEG가 잔기 11에 부착된, 실질적으로 균질한 모노-PEG화 (D11C)hPYY₃₋₃₆의 제조를 설명한다.

<219>

(a) (D11C)hPYY₃₋₃₆의 제조

<220>

자동 펩티드 합성기 (모델 433A; Applied Biosystems, Foster City, CA)를 사용하여 2-(1H-벤조트리아졸-1-일)-1,1,3,3-테트라메틸 우로늄 헥사플루오로포스페이트 (HBTU) 활성화로의 Fmoc 전략 (Fastmoc, 0.15 mmol 사이클)을 사용하는 고체-상 방법에 의해 (D11C)PYY₃₋₃₆을 합성하였다. 사용된 측쇄 보호기는 하기와 같았다: Asn, Gln, Cys 및 His에 대해서 Trt; Ser, Thr, 및 Tyr에 대해서 tBu; Lys에 대해서 Boc; Asp 및 Glu에 대해서 OtBu; 및 Arg에 대해서 Pbf. 펩티드-수지의 절단이 실온에서 4시간 동안 9 ml의 트리플루오로아세트산 (TFA), 0.5 g의 페놀, 0.5 ml의 H₂O, 0.5 ml의 티오아니솔 및 0.25 ml의 1,2 에탄디티올의 혼합물로 완료되었다. 펩티드를 빙냉 에틸 에테르에서 침전시키고, 에틸 에테르로 세정하고, DMSO에 용해시키고, 80 ml/분의 유속으로 30분 동안의 100% 용매 A:0% 용매 B에서 70% 용매 A:30% 용매 B로의 선형 구배를 사용하여 Waters Deltapak C18, 15um, 100Å, 50×300mmID 컬럼 (카탈로그# WAT011801, Waters, Milford, MA) 상에서의 역상 HPLC에 의해 정제하였다. 용매 A는 수성 0.1% TFA (트리플루오로아세트산) 용액이었다. 용매 B는 아세트니트릴 내의 0.1% TFA 용액이었다. 정제된 펩티드의 분자량을 ESI-MS에 의해 확인하였고 (M_{평균}=4038), 순도를 역상 HPLC에 의해 평가하였다 (도 4).

<221>

(b) 선형 30K mPEG 말레이미드 (D11C)hPYY₃₋₃₆의 제조

<222>

약 30,000 MW의 선형 mPEG 말레이미드 시약 (Sunbright ME-300MA, NOF Corporation, Tokyo, Japan)을 잔기 11의 시스템의 술프히드릴 기 상에서 (D11C)hPYY₃₋₃₆에 선택적으로 커플링시켰다. 20 mM HEPES (Sigma Chemical, St. Louis, MO) pH 7.0에 용해된 선형 30K mPEG 말레이미드를 펩티드의 직접적인 첨가에 의해 (D11C)hPYY₃₋₃₆ 펩티드와 즉시 반응시켜, 1 mg/ml 펩티드 농도 및 약 1:1의 mPEG:(D11C)hPYY₃₋₃₆ 상대 몰비를 산출시켰다. 암실에서 실온에서 0.5-24 시간 동안 반응을 수행하였다. 양이온 교환 크로마토그래피 상에서의 즉각적인 정제를 위해 20 mM 아세트산 나트륨 pH 4.5 내로의 희석에 의해 반응을 정지시켰다. 반응 생성물을 SEC-HPLC에 의해 평가하였다 (도 5).

<223>

별법적으로, 선형 30K mPEG 말레이미드를 상기 기술된 바와 같이 HEPES에 용해시키는 것 대신에, 20 mM 아세트산 나트륨 (Sigma Chemical, St. Louis, MO), pH 4.5에 용해시키고, 펩티드의 직접적인 첨가에 의해 (D11C)hPYY₃₋₃₆ 펩티드와 즉시 반응시켜, 1 mg/ml 펩티드 농도 및 약 1:1의 mPEG:(D11C)hPYY₃₋₃₆ 상대 몰비를 산출시켰다. 암실에서 실온에서 0.5-24 시간 동안 반응을 수행하였다. 반응물을 양이온 교환 크로마토그래피 상에 직접 로딩하였다. 반응 생성물을 SEC-HPLC에 의해 평가하였다.

<224>

(c) 선형 30K mPEG 말레이미드 (D11C)hPYY₃₋₃₆의 정제

<225>

PEG화 (D11C)hPYY₃₋₃₆ 종을 단일 이온 교환 크로마토그래피 단계를 사용하여 반응 혼합물로부터 >95%로 정제하였다. 모노-PEG화 (D11C)hPYY₃₋₃₆을 변형되지 않은 (D11C)hPYY₃₋₃₆ 및 분자량이 더 큰 종들로부터 양이온 교환 크로마토그래피를 사용하여 정제하였다. 상기 기술된 바와 같은 전형적인 선형 30K mPEG 말레이미드 (D11C)hPYY₃₋₃₆ 반응 혼합물 (10 mg 단백질)을 20 mM 아세트산 나트륨, pH 4.5 (완충제 A)에서 평형화된 SP-Sepharose Hitrap 컬럼 (5 ml) (Amersham Pharmacia Biotech, GE Healthcare, Piscataway, NJ) 상에서 분획화하였다. pH 7.0의 반응 혼합물을 완충제 A로 7× 희석하고, 컬럼 상에 2.5 ml/분의 유속으로 로딩하였다. 컬럼을 5-10 컬럼 부피의 완충제 A로 세정하였다. 이어서, 20 컬럼 부피의 0-100 mM의 선형 NaCl 구배로 다양한 (D11C)hPYY₃₋₃₆ 종들이 컬럼으로부터 용출되었다. 용리액을 280 nm에서의 흡광도 (A₂₈₀)에 의해 모니터링하고, 적합한 크기 분획을 수집하였다. 분획들을 SEC HPLC에 의해 평가된 바와 같은 PEG화 정도에 관하여 풀링하였다. 그 후, 정제된 풀을 Vivaspin 10K 농축기 (Vivascience Sartorius Group)를 사용하여 0.5-5 mg/

mL로 농축하였다. 정제된 풀의 단백질 농도를 RP HPLC 피크 면적을 PYY₃₋₃₆ 표준 곡선 (제시되지 않음)과 비교함으로써 결정하였다. PEG화 (D11C)hPYY₃₋₃₆의 정제된 풀을 도 7에 제시된 바와 같이 SEC-HPLC를 사용하여 프로파일링하였다.

<226> 별법적으로, 상기 (b)로부터의 pH 4.5의 반응물을 2.5 mL/분의 유속으로 컬럼 상에 직접 로딩하고, 정제된 풀의 농도를 실험적으로 유도된 흡광계수를 사용하여 280 nm에서의 흡광도에 의해 결정하였다.

<227> **실시예 3**

<228> **분지형 43K mPEG 말레이미드 (E10C)hPYY₃₋₃₆**

<229> 본 실시예는 mPEG가 잔기 10에 부착된, 실질적으로 균질한 모노-PEG화 (E10C)hPYY₃₋₃₆의 제조를 설명한다.

<230> (a) 분지형 43K mPEG 말레이미드 (E10C)hPYY₃₋₃₆의 제조

<231> 약 43,000 MW의 분지형 mPEG 말레이미드 시약 (Sunbright GL2-400MA, NOF Corporation, Tokyo, Japan)을 잔기 10의 시스테인의 술폰히드릴 기 상에서 실시예 1(a)에서 기술된 바와 같이 제조된 (E10C)hPYY₃₋₃₆에 선택적으로 커플링시켰다.

<232> 20 mM HEPES (Sigma Chemical, St. Louis, MO) pH 7.0에 용해된 분지형 43K mPEG 말레이미드를 펩티드의 직접적인 첨가에 의해 (E10C)hPYY₃₋₃₆ 펩티드와 즉시 반응시켜, 1 mg/mL 펩티드 농도 및 약 1:1의 mPEG:(E10C)hPYY₃₋₃₆ 상대 물비를 산출시켰다. 암실에서 실온에서 0.5-24 시간 동안 반응을 수행하였다. 양이온 교환 크로마토그래피 상에서의 즉각적인 정제를 위해 20 mM 아세트산 나트륨 pH 4.5 내로의 희석에 의해 HEPES pH 7.0 내에서의 반응을 정지시켰다. 반응 생성물을 SEC-HPLC에 의해 평가하였다 (도 8).

<233> 별법적으로, 분지형 43K mPEG 말레이미드를 20 mM 아세트산 나트륨 (Sigma Chemical, St. Louis, MO), pH 4.5에 용해시키고, 펩티드의 직접적인 첨가에 의해 (E10C)hPYY₃₋₃₆ 펩티드와 즉시 반응시켜, 1 mg/mL 펩티드 농도 및 약 1:1의 mPEG:(E10C)hPYY₃₋₃₆ 상대 물비를 산출시켰다. 반응물을 양이온 교환 크로마토그래피 상에 직접 로딩하였다.

<234> (b) 모노 PEG화 분지형 43K mPEG 말레이미드 (E10C)hPYY₃₋₃₆의 정제

<235> 모노 PEG화 분지형 43K mPEG 말레이미드 (E10C)hPYY₃₋₃₆ 종을 단일 양이온 교환 크로마토그래피 단계를 사용하여 변형되지 않은 (E10C)hPYY₃₋₃₆ 및 분자량이 더 큰 종들로부터 분리하였다. 상기 기술된 바와 같은 전형적인 분지형 43K mPEG 말레이미드 (E10C)hPYY₃₋₃₆ 반응 혼합물 (10 mg 단백질)을 20 mM 아세트산 나트륨, pH 4.5 (완충제 A)에서 평형화된 SP-Sepharose Hitrap 컬럼 (5 mL) (Amersham Pharmacia Biotech, GE Healthcare) 상에서 분획화하였다. pH 7.0의 반응 혼합물을 완충제 A로 10× 희석하고, 컬럼 상에 2.5 mL/분의 유속으로 로딩하였다. 컬럼을 5-10 컬럼 부피의 완충제 A로 세정하였다. 이어서, 20 컬럼 부피의 0-100 mM의 선형 NaCl 구배로 다양한 (E10C)hPYY₃₋₃₆ 종들이 컬럼으로부터 용출되었다. 용리액을 280 nm에서의 흡광도 (A₂₈₀)에 의해 모니터링하고, 적합한 크기 분획을 수집하였다. 분획들을 SEC HPLC에 의해 평가된 바와 같은 PEG화 정도에 관하여 풀링하였다. 그 후, 정제된 풀을 Centriprep 3 농축기 (Amicon Technology Corporation)에서, 또는, 별법적으로, Vivaspin 10K 농축기 (Vivascience Sartorius Group)를 사용하여 0.5-5 mg/mL로 농축하였다. 정제된 풀의 단백질 농도를 아미노산 분석에 의해 정량하였다. 모노PEG화 분지형 43K mPEG 말레이미드 (E10C)hPYY₃₋₃₆의 정제된 풀을 도 9에 제시된 바와 같이 SEC-HPLC를 사용하여 프로파일링하였다.

<236> 별법적으로, RP HPLC 피크 면적을 PYY₃₋₃₆ 표준 곡선 (제시되지 않음)과 비교함으로써, 또는 실험적으로 유도된 흡광계수를 사용하여 280 nm에서의 흡광도에 의해 단백질 농도를 결정하였다.

<237> **실시예 4**

<238> 본 실시예에서는 선형 12 kD mPEG 또는 분지형 20 kD mPEG가 잔기 10에서 부착된, 실질적으로 균질한 모노PEG화 (E10C)hPYY₃₋₃₆의 제조가 구현되고, 선형 20 kD mPEG, 선형 12 kD mPEG, 또는 분지형 20 kD mPEG가 잔기 11에서 부착된, 실질적으로 균질한 모노PEG화 (D11C)hPYY₃₋₃₆의 제조가 구현된다.

<239>

(a) 선형 12K mPEG 말레이미드 (E10C)hPYY₃₋₃₆의 제조

<240>

약 12,000 MW의 선형 mPEG 말레이미드 시약 (Sunbright ME-120MA, NOF Corporation)을 잔기 10의 시스테인의 술프히드릴 기 상에서 (E10C)hPYY₃₋₃₆에 선택적으로 커플링시켰다. 20 mM 아세트산 나트륨 (Sigma Chemical) pH 4.5에 용해된 선형 12K mPEG 말레이미드를 펩티드의 직접적인 첨가에 의해 (E10C)hPYY₃₋₃₆ 펩티드와 즉시 반응시켜, 1 mg/ml 펩티드 농도 및 약 1:1의 mPEG:(E10C)hPYY₃₋₃₆ 상대 몰비를 산출시켰다. 암실에서 실온에서 0.5-24 시간 동안 반응을 수행하였다. 20 mM 아세트산 나트륨, pH 4.5 내의 반응물을 양이온 교환 크로마토그래피 상에 직접 로딩하였다. 반응 생성물을 SEC-HPLC 또는 SDS-PAGE에 의해 평가하였다.

<241>

(b) 선형 12K mPEG 말레이미드 (E10C)hPYY₃₋₃₆의 정제

<242>

PEG화 (E10C)hPYY₃₋₃₆ 중을 단일 이온 교환 크로마토그래피 단계를 사용하여 반응 혼합물로부터 >95%로 정제하였다. 모노-PEG화 (E10C)hPYY₃₋₃₆을 유리 PEG, 변형되지 않은 (E10C)hPYY₃₋₃₆ 및 분자량이 더 큰 종들로부터 양이온 교환 크로마토그래피를 사용하여 분리하였다. 상기 기술된 바와 같은 전형적인 선형 12K mPEG 말레이미드 (E10C)hPYY₃₋₃₆ 반응 혼합물 (10 mg 단백질)을 20 mM 아세트산 나트륨, pH 4.5 (완충제 A)에서 평형화된 SP-Sepharose Hitrap 컬럼 (5 ml) (Amersham Pharmacia Biotech, GE Healthcare) 상에서 분획화하였다. 반응 혼합물을 컬럼 상에 1.0 ml/분의 유속으로 로딩하였다. 컬럼을 유속 2.5 ml/분의 4 컬럼 부피의 완충제 A로 세정하였다. 이어서, 유속 2.5 ml/분의 25 컬럼 부피의 0-200 mM의 선형 NaCl 구배로 다양한 (E10C)hPYY₃₋₃₆ 종들이 컬럼으로부터 용출되었다. 용리액을 280 nm에서의 흡광도 (A₂₈₀)에 의해 모니터링하고, 적합한 크기 분획을 수집하였다. 분획들을 SEC-HPLC에 의해 평가된 바와 같은 PEG화 정도에 관하여 풀링하였다. 그 후, 정제된 풀을 Vivaspin 10K 농축기 (Vivascience Sartorius Group)를 사용하여 0.5-5 mg/ml로 농축하였다. 정제된 풀의 단백질 농도를 실험적으로 유도된 흡광계수를 사용하여 280 nm에서의 흡광도에 의해 결정하였다. 12K mPEG 말레이미드 (E10C)hPYY₃₋₃₆의 정제된 풀을 SEC-HPLC 또는 SDS-PAGE를 사용하여 프로파일링하였다.

<243>

(c) 분지형 20K mPEG 말레이미드 (E10C)hPYY₃₋₃₆의 제조

<244>

약 20,000 MW의 분지형 mPEG 말레이미드 시약 (Sunbright GL2-200MA, NOF Corporation)을 잔기 10의 시스테인의 술프히드릴 기 상에서 (E10C)hPYY₃₋₃₆에 선택적으로 커플링시켰다. 20 mM 아세트산 나트륨 (Sigma Chemical, St. Louis, MO) pH 4.5에 용해된 분지형 20K mPEG 말레이미드를 펩티드의 직접적인 첨가에 의해 (E10C)hPYY₃₋₃₆ 펩티드와 즉시 반응시켜, 1 mg/ml 펩티드 농도 및 약 1:1의 mPEG:(E10C)hPYY₃₋₃₆ 상대 몰비를 산출시켰다. 암실에서 실온에서 0.5-24 시간 동안 반응을 수행하였다. 20 mM 아세트산 나트륨, pH 4.5 내의 반응물을 양이온 교환 크로마토그래피 상에 직접 로딩하였다. 반응 생성물을 SEC-HPLC 또는 SDS-PAGE에 의해 평가하였다.

<245>

(d) 분지형 20K mPEG 말레이미드 (E10C)hPYY₃₋₃₆의 정제

<246>

PEG화 (E10C)hPYY₃₋₃₆ 중을 단일 이온 교환 크로마토그래피 단계를 사용하여 반응 혼합물로부터 >95%로 정제하였다. 모노-PEG화 (E10C)hPYY₃₋₃₆을 유리 PEG, 변형되지 않은 (E10C)hPYY₃₋₃₆ 및 분자량이 더 큰 종들로부터 양이온 교환 크로마토그래피를 사용하여 분리하였다. 상기 기술된 바와 같은 전형적인 분지형 20K mPEG 말레이미드 (E10C)hPYY₃₋₃₆ 반응 혼합물 (10 mg 단백질)을 20 mM 아세트산 나트륨, pH 4.5 (완충제 A)에서 평형화된 SP-Sepharose Hitrap 컬럼 (5 ml) (Amersham Pharmacia Biotech, GE Healthcare) 상에서 분획화하였다. 반응 혼합물을 컬럼 상에 1.0 ml/분의 유속으로 로딩하였다. 컬럼을 유속 2.5 ml/분의 4 컬럼 부피의 완충제 A로 세정하였다. 이어서, 유속 2.5 ml/분의 25 컬럼 부피의 0-200 mM의 선형 NaCl 구배로 다양한 (E10C)hPYY₃₋₃₆ 종들이 컬럼으로부터 용출되었다. 용리액을 280 nm에서의 흡광도 (A₂₈₀)에 의해 모니터링하고, 적합한 크기 분획을 수집하였다. 분획들을 SEC-HPLC에 의해 평가된 바와 같은 PEG화 정도에 관하여 풀링하였다. 그 후, 정제된 풀을 Vivaspin 10K 농축기 (Vivascience Sartorius Group)를 사용하여 0.5-5 mg/ml로 농축하였다. 정제된 풀의 단백질 농도를 실험적으로 유도된 흡광계수를 사용하여 280 nm에서의 흡광도에 의해 결정하였다. 분지형 20K mPEG 말레이미드 (E10C)hPYY₃₋₃₆의 정제된 풀을 SEC-HPLC 또는 SDS-PAGE를 사용하여 프로파일링하였다.

<247>

(e) 선형 20K mPEG 말레이미드 (D11C)hPYY₃₋₃₆의 제조

<248> 약 20,000 MW의 선형 mPEG 말레이미드 시약 (Sunbright ME-200MA, NOF Corporation)을 잔기 11의 시스테인의 술프히드릴 기 상에서 (D11C)hPYY₃₋₃₆에 선택적으로 커플링시켰다. 20 mM 아세트산 나트륨 (Sigma Chemical) pH 4.5에 용해된 선형 20K mPEG 말레이미드를 펩티드의 직접적인 첨가에 의해 (D11C)hPYY₃₋₃₆ 펩티드와 즉시 반응시켜, 1 mg/ml 펩티드 농도 및 약 1:1의 mPEG:(D11C)hPYY₃₋₃₆ 상대 몰비를 산출시켰다. 암실에서 실온에서 0.5-24 시간 동안 반응을 수행하였다. 20 mM 아세트산 나트륨, pH 4.5 내의 반응물을 양이온 교환 크로마토그래피 상에 직접 로딩하였다. 반응 생성물을 SEC-HPLC 또는 SDS-PAGE에 의해 평가하였다.

<249> (f) 선형 20K mPEG 말레이미드 (D11C)hPYY₃₋₃₆의 정제

<250> PEG화 (D11C)hPYY₃₋₃₆ 중을 단일 이온 교환 크로마토그래피 단계를 사용하여 반응 혼합물로부터 >95%로 정제하였다. 모노-PEG화 (D11C)hPYY₃₋₃₆을 유리 PEG, 변형되지 않은 (D11C)hPYY₃₋₃₆ 및 분자량이 더 큰 종들로부터 양이온 교환 크로마토그래피를 사용하여 분리하였다. 상기 기술된 바와 같은 전형적인 선형 20K mPEG 말레이미드 (D11C)hPYY₃₋₃₆ 반응 혼합물 (10 mg 단백질)을 20 mM 아세트산 나트륨, pH 4.5 (완충제 A)에서 평형화된 SP-Sepharose Hitrap 컬럼 (5 ml) (Amersham Pharmacia Biotech, GE Healthcare) 상에서 분획화하였다. 반응 혼합물을 컬럼 상에 1.0 ml/분의 유속으로 로딩하였다. 컬럼을 유속 2.5 ml/분의 4 컬럼 부피의 완충제 A로 세정하였다. 이어서, 유속 2.5 ml/분의 25 컬럼 부피의 0-200 mM의 선형 NaCl 구배로 다양한 (D11C)hPYY₃₋₃₆ 종들이 컬럼으로부터 용출되었다. 용리액을 280 nm에서의 흡광도 (A₂₈₀)에 의해 모니터링하고, 적합한 크기 분획을 수집하였다. 분획들을 SEC-HPLC에 의해 평가된 바와 같은 PEG화 정도에 관하여 풀링하였다. 그 후, 정제된 풀을 Vivaspin 10K 농축기 (Vivascience Sartorius Group)를 사용하여 0.5-5 mg/ml로 농축하였다. 정제된 풀의 단백질 농도를 실험적으로 유도된 흡광계수를 사용하여 280 nm에서의 흡광도에 의해 결정하였다. 20K mPEG 말레이미드 (D11C)hPYY₃₋₃₆의 정제된 풀을 SEC-HPLC 또는 SDS-PAGE를 사용하여 프로파일링하였다.

<251> (g) 선형 12K mPEG 말레이미드 (D11C)hPYY₃₋₃₆의 제조

<252> 약 12,000 MW의 선형 mPEG 말레이미드 시약 (Sunbright ME-120MA, NOF Corporation)을 잔기 11의 시스테인의 술프히드릴 기 상에서 (D11C)hPYY₃₋₃₆에 선택적으로 커플링시켰다. 20 mM 아세트산 나트륨 (Sigma Chemical, St. Louis, MO) pH 4.5에 용해된 선형 12K mPEG 말레이미드를 펩티드의 직접적인 첨가에 의해 (D11C)hPYY₃₋₃₆ 펩티드와 즉시 반응시켜, 1 mg/ml 펩티드 농도 및 약 1:1의 mPEG:(D11C)hPYY₃₋₃₆ 상대 몰비를 산출시켰다. 암실에서 실온에서 0.5-24 시간 동안 반응을 수행하였다. 20 mM 아세트산 나트륨, pH 4.5 내의 반응물을 양이온 교환 크로마토그래피 상에 직접 로딩하였다. 반응 생성물을 SEC-HPLC 또는 SDS-PAGE에 의해 평가하였다.

<253> (h) 선형 12K mPEG 말레이미드 (D11C)hPYY₃₋₃₆의 정제

<254> PEG화 (D11C)hPYY₃₋₃₆ 중을 단일 이온 교환 크로마토그래피 단계를 사용하여 반응 혼합물로부터 >95%로 정제하였다. 모노-PEG화 (D11C)hPYY₃₋₃₆을 유리 PEG, 변형되지 않은 (D11C)hPYY₃₋₃₆ 및 분자량이 더 큰 종들로부터 양이온 교환 크로마토그래피를 사용하여 분리하였다. 상기 기술된 바와 같은 전형적인 선형 12K mPEG 말레이미드 (D11C)hPYY₃₋₃₆ 반응 혼합물 (10 mg 단백질)을 20 mM 아세트산 나트륨, pH 4.5 (완충제 A)에서 평형화된 SP-Sepharose Hitrap 컬럼 (5 ml) (Amersham Pharmacia Biotech, GE Healthcare) 상에서 분획화하였다. 반응 혼합물을 컬럼 상에 1.0 ml/분의 유속으로 로딩하였다. 컬럼을 유속 2.5 ml/분의 4 컬럼 부피의 완충제 A로 세정하였다. 이어서, 유속 2.5 ml/분의 25 컬럼 부피의 0-200 mM의 선형 NaCl 구배로 다양한 (D11C)hPYY₃₋₃₆ 종들이 컬럼으로부터 용출되었다. 용리액을 280 nm에서의 흡광도 (A₂₈₀)에 의해 모니터링하고, 적합한 크기 분획을 수집하였다. 분획들을 SEC-HPLC에 의해 평가된 바와 같은 PEG화 정도에 관하여 풀링하였다. 그 후, 정제된 풀을 Vivaspin 10K 농축기 (Vivascience Sartorius Group)를 사용하여 0.5-5 mg/ml로 농축하였다. 정제된 풀의 단백질 농도를 실험적으로 유도된 흡광계수를 사용하여 280 nm에서의 흡광도에 의해 결정하였다. 12K mPEG 말레이미드 (D11C)hPYY₃₋₃₆의 정제된 풀을 SEC-HPLC 또는 SDS-PAGE를 사용하여 프로파일링하였다.

<255> (i) 분지형 20K mPEG 말레이미드 (D11C)hPYY₃₋₃₆의 제조

<256> 약 20,000 MW의 분지형 mPEG 말레이미드 시약 (Sunbright GL2-200MA, NOF Corporation)을 잔기 11의 시스테인

의 숄프히드릴 기 상에서 (D11C)hPYY₃₋₃₆에 선택적으로 커플링시켰다. 20 mM 아세트산 나트륨 (Sigma Chemical, St. Louis, MO) pH 4.5에 용해된 분지형 20K mPEG 말레이미드를 펩티드의 직접적인 첨가에 의해 (D11C)hPYY₃₋₃₆ 펩티드와 즉시 반응시켜, 1 mg/ml 펩티드 농도 및 약 1:1의 mPEG:(D11C)hPYY₃₋₃₆ 상대 물비를 산출시켰다. 암실에서 실온에서 0.5-24 시간 동안 반응을 수행하였다. 20 mM 아세트산 나트륨, pH 4.5 내의 반응물을 양이온 교환 크로마토그래피 상에 직접 로딩하였다. 반응 생성물을 SEC-HPLC 또는 SDS-PAGE에 의해 평가하였다.

<257> (j) 분지형 20K mPEG 말레이미드 (D11C)hPYY₃₋₃₆의 정제

<258> PEG화 (D11C)hPYY₃₋₃₆ 종을 단일 이온 교환 크로마토그래피 단계를 사용하여 반응 혼합물로부터 >95%로 정제하였다. 모노-PEG화 (D11C)hPYY₃₋₃₆을 유리 PEG, 변형되지 않은 (D11C)hPYY₃₋₃₆ 및 분자량이 더 큰 종들로부터 양이온 교환 크로마토그래피를 사용하여 분리하였다. 상기 기술된 바와 같은 전형적인 분지형 20K mPEG 말레이미드 (D11C)hPYY₃₋₃₆ 반응 혼합물 (10 mg 단백질)을 20 mM 아세트산 나트륨, pH 4.5 (완충제 A)에서 평형화된 SP-Sepharose Hitrap 컬럼 (5 ml) (Amersham Pharmacia Biotech, GE Healthcare) 상에서 분획화하였다. 반응 혼합물을 컬럼 상에 1.0 ml/분의 유속으로 로딩하였다. 컬럼을 유속 2.5 ml/분의 4 컬럼 부피의 완충제 A로 세정하였다. 이어서, 유속 2.5 ml/분의 25 컬럼 부피의 0-200 mM의 선형 NaCl 구배로 다양한 (D11C)hPYY₃₋₃₆ 종들이 컬럼으로부터 용출되었다. 용리액을 280 nm에서의 흡광도 (A₂₈₀)에 의해 모니터링하고, 적합한 크기 분획을 수집하였다. 분획들을 SEC-HPLC에 의해 평가된 바와 같은 PEG화 정도에 관하여 풀링하였다. 그 후, 정제된 풀을 Vivaspin 10K 농축기 (Vivascience Sartorius Group)를 사용하여 0.5-5 mg/ml로 농축하였다. 정제된 풀의 단백질 농도를 실험적으로 유도된 흡광계수를 사용하여 280 nm에서의 흡광도에 의해 결정하였다. 분지형 20K mPEG 말레이미드 (D11C)hPYY₃₋₃₆의 정제된 풀을 SEC-HPLC 또는 SDS-PAGE를 사용하여 프로파일링하였다.

<259> **실시예 5**

<260> **생화학적 특징분석**

<261> 전자분무 질량 분광측정법 (ESI-MS), SDS-PAGE, 및 SEC HPLC 및 RP HPLC가 각각 포함되는 다양한 생화학적 방법에 의해 (E10C)hPYY₃₋₃₆, (D11C)hPYY₃₋₃₆, 및 PEG화 형태의 (E10C)hPYY₃₋₃₆ 및 (D11C)hPYY₃₋₃₆을 특징분석하였다.

<262> (A) 전자분무 이온화 질량 분광측정법 (ESI-MS)을 1100 시리즈 LC/MSD 전자분무 질량 분광측정계 (Agilent Technologies, Palo Alto, CA) 상에서 양성 모드로 수행하였다. (실시예 1(a), 2(a)).

<263> (B) 역상 크로마토그래피를 (E10C)hPYY₃₋₃₆ 펩티드의 분석 (도 1 및 4)을 위해 ZORBAX Eclipse XDB-C8, 4.6×150 mm, 5 mm 컬럼 (카탈로그# 993967-906, Agilent Technologies, Palo Alto, CA) 상에서 1.5 ml/분의 유속으로 3 분 동안 100 % 용매 A, 0 % 용매 B에서 95% 용매 A, 5% 용매 B로, 이어서 12분 동안 95 % 용매 A, 5 % 용매 B에서 50% 용매 A, 50% 용매 B로의 선형 구배를 사용하여 수행하였다 (실시예 1 (a)). 용매 A는 수성 0.1% TFA 용액이었다. 용매 B는 아세토니트릴 내의 0.1% TFA 용액이었다.

<264> PEG화 (E10C)hPYY₃₋₃₆ 및 (D11C)PYY₃₋₃₆의 정량을 위한 역상 크로마토그래피 (제시되지 않음)를 Vydac C18 (2.1×250 mm) 컬럼 (카탈로그# 218MS552, Vydac, Hesperia, CA) 상에서 0.2 ml/분의 유속으로 48분 동안 80% 용매 A, 20% 용매 B에서 40% 용매 A, 60% 용매 B로의 선형 구배를 사용하여 수행하였다 (실시예 1C, 2C). 용매 A는 수성 0.1% TFA 용액이었다. 용매 B는 아세토니트릴 내의 0.085% TFA 용액이었다.

<265> (C) 크기 배제 고성능 액체 크로마토그래피 (SEC-HPLC)

<266> 선형 30K 또는 분지형 43K mPEG와 (E10C)hPYY₃₋₃₆ 또는 (D11C)hPYY₃₋₃₆의 반응 혼합물, 이들의 양이온 교환 정제 풀, 및 최종 정제 생성물을 비변성 SEC-HPLC를 사용하여 평가하였다 (실시예 1(b) 및 (c), 2(b) 및 (c)). 분석용 비변성 SEC-HPLC를 1.0 ml/분의 유속으로 20 mM 포스페이트 pH 7.4, 150 mM NaCl에서 Shodex KW804 또는 TSK G4000PWL (Tosohaas)를 사용하여 수행하였다 (임의로 Superdex 200 7.8 mm × 30 cm, Amersham Bioscience, Piscataway, NJ). PEG화는 단백질의 유체역학적 부피를 크게 증가시켜, 결과적으로 더 빠른 체류 시간으로 이동된다. 30K mPEG 말레이미드 + (E10C)hPYY₃₋₃₆ 반응 혼합물에서, 변형되지 않은 잔류 (E10C)hPYY₃₋₃₆에 상응하는 작은 피크, 뿐만 아니라 PEG화 펩티드 중에 상응하는 새로운 피크가 관찰되었다 (도 2). 30K mPEG (D11C)hPYY₃₋₃₆ 및 분지형 43K mPEG (E10C)hPYY₃₋₃₆ 반응 혼합물에서 새로운 종이 관찰되었고, 매우 적은 변

형되지 않은 (D11C)hPYY₃₋₃₆ 또는 (E10C)hPYY₃₋₃₆이 남아있었다 (도 5 및 8). 이러한 PEG화 및 비-PEG화 종을 SP-Sepharose 크로마토그래피에 의해 분획화하였고, 이어서 생성된 정제된 모노 mPEG (E10C)hPYY₃₋₃₆ 및 mPEG (D11C)hPYY₃₋₃₆ 종은 >95% 순도로 비변성 SEC 상에서 단일 피크로 용출되는 것으로 나타났다 (도 6, 7 및 9). SP-Sepharose 크로마토그래피 단계로 유리 mPEG, (E10C)hPYY₃₋₃₆ 또는 (D11C)hPYY₃₋₃₆ 및 분자량이 더 큰 종들이 모노PEG화 선형 30K 및 분지형 43K mPEG(E10C)hPYY₃₋₃₆ 또는 mPEG (D11C)hPYY₃₋₃₆으로부터 효과적으로 제거되었다.

<267> (D) SDS PAGE

<268> SDS-PAGE (실시에 1 (c))를 또한 사용하여 반응물, 양이온 교환 정제 분획 (도 3), 및 최종 정제 생성물을 평가 하였다. SDS-PAGE를 1 mm 두께 10-NuPAGE 젤 (Invitrogen, Carlsbad, CA) 상에서 환원 및 비환원 조건 하에 수행하고, Novex Colloidal Coomassie™ G-250 염색 키트 (Invitrogen, Carlsbad, CA)를 사용하여 염색하였다.

<269> **생물학적 분석법**

<270> 포유동물 (특히, 인간)에서의 체중 증가의 감소 및 비만 치료에서의 제약상 활성인 작용제로서의 본 발명의 PYY 효능제의 유용성이 통상적인 분석법 및 하기에 기술된 시험관내 및 생체내 분석법에서의 효능제의 활성에 의해 증명될 수 있다. 이같은 분석법들은 본 발명의 PYY 효능제를 공지된 화합물의 활성과 비교할 수 있는 수단을 또한 제공한다.

<271> **음식 섭취 연구**

<272> **음식-유도 재섭식 분석:** C57BL/6J 수컷 마우스 (The Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME)를 우리 당 2마리씩 거주시켰다. 마우스들을 12:12 명암 사이클 (5:00 AM에 점등, 5:00 PM에 소등)에서 유지시켰고, 펠렛화된 RMH3000 퓨리나(Purina) 설치류 사료 (Research Diets, Inc., New Brunswick, NJ)를 섭취시켰고, 물에 자유롭게 접근하도록 하였다. 마우스들이 7-8주령에 도달하였고, 연구하기 최소 10일 전에 적응시켰다. 연구일에, 마우스들은 9-12 주령이었다. 연구 개시 전날에, 마우스들을 새로운 깔짚이 있고 음식이 없는 우리 내에 놓았고, 물에는 자유롭게 접근하도록 하였다. 마우스들을 하룻밤 동안 (20-24 시간) 금식시켰다. 연구일에, 마우스들에게 IP 주사 (용량 부피 = 5 ml/kg)를 투여하고, 우리로 돌려보내고, 미리 칭량된 음식을 즉시 우리 내에 놓았다. 사용된 투여 비히클은 20 mM 아세트산나트륨, pH 4.5, 50 mM NaCl이었고, 용량은 PEG화되지 않은 활성 PYY 본체에 대해 계산하였다. 비히클 대조군, 천연 PYY, 30K mPEG 말레이미드 (E10C)hPYY₃₋₃₆, 및 43K mPEG 말레이미드(E10C)hPYY₃₋₃₆을 3가지 용량 (0.1 mg/kg, 0.3 mg/kg, 및 1.0 mg/kg)으로 테스트하였다. 투여 2시간 후, 4시간 후, 6시간 후 및 24시간 후에 음식을 다시 칭량하였다. 흘린 양에 대해 깔짚을 점검하고, 흘린 양을 칭량하여 계산에 포함시켰다. 각각의 시점에서의 음식 중량을 출발 음식 중량으로부터 차감함으로써 누적 음식 섭취를 계산하였다. $(FI_{처치} - FI_{비히클})/FI_{비히클} \times 100$ 에 의해 백분율 (%) 억제를 계산하였다.

<273> 도 10은 3가지 용량의 천연 PYY₃₋₃₆ (도 10A) 및 30K mPEG 말레이미드(E10C)hPYY₃₋₃₆ (도 10B)의 IP 주사 후의 6-시간 누적 섭취를 나타낸다. 천연 PYY₃₋₃₆ 및 30K mPEG 말레이미드(E10C)hPYY₃₋₃₆ 모두 6시간에 걸쳐 누적 음식 섭취에서의 용량-의존적 감소를 나타냈다.

<274> 43K mPEG 말레이미드(E10C)hPYY₃₋₃₆ 또한 6 시간 (도 11A) 및 24 시간 (도 11 B) 누적 음식 섭취에서 용량 의존적 감소를 일으켰다. 그러나, 누적 음식 섭취를 감소시키는 43K mPEG 말레이미드(E10C)hPYY₃₋₃₆ 효과는 6시간 후 및 24시간 후 모두 동일한 용량 (0.1 mg/kg)의 30K mPEG 말레이미드(E10C)hPYY₃₋₃₆이 나타낸 것만큼 크지 않았다.

<275> 0.1 mg/kg (SC) 주사 후의 음식에 의해 유도된 재섭식에 대한 30K mPEG 말레이미드(E10C)hPYY₃₋₃₆의 효과를 또한 30K 말레이미드(D11C)hPYY₃₋₃₆의 효과와 비교하였다. 30K mPEG 말레이미드(D11C)hPYY₃₋₃₆ 폴리펩티드는 하기 표에 제시된 바와 같이 24시간에 걸쳐 감소된 누적 음식 섭취 (FI)를 야기하였지만, 효과는 30K 말레이미드 (E10C)hPYY₃₋₃₆에 대해 관찰된 것만큼 크지 않았다.

| 처치 | 2시간 FI | % 변화 | 4시간 FI | % 변화 | 6시간 FI | % 변화 | 24시간 FI | % 변화 | |
|------|--------|------|--------|------|--------|------|---------|-------|--------|
| 비히클 | 평균 | 2.03 | 0.00 | 2.93 | 0.00 | 4.06 | 0.00 | 10.79 | 0.00 |
| | SEM | 0.16 | 8.06 | 0.22 | 7.46 | 0.46 | 11.30 | 0.67 | 6.23 |
| E10C | 평균 | 1.89 | -6.99 | 2.16 | -26.21 | 2.45 | -39.62 | 8.04 | -25.48 |
| | SEM | 0.27 | 13.45 | 0.27 | 9.09 | 0.26 | 6.33 | 0.88 | 8.14 |
| D11C | 평균 | 2.14 | 5.22 | 2.56 | -12.56 | 3.09 | -24.02 | 9.08 | -15.88 |
| | SEM | 0.15 | 7.30 | 0.23 | 7.72 | 0.27 | 6.68 | 0.42 | 3.88 |

<276>

<277>

선형 20K mPEG 말레이미드(E10C)hPYY₃₋₃₆의 효과를 30K mPEG 말레이미드(E10C)hPYY₃₋₃₆과 비교하였다 (모두 실시 예 1의 것들). 0.1 mg/kg (IP)의 용량이 수컷 마우스에게 주사된 한 연구에서, 결과는 하기의 표와 같았다.

<278>

| 처치 | 2시간 FI | 4시간 FI | 6시간 FI | 24시간 FI | 48시간 FI |
|----------|--------|--------|--------|---------|---------|
| 30K E10C | -56 | -65 | -78 | -47 | -20 |
| 20K E10C | -65 | -73 | -79 | -30 | -17 |

<279>

유사하게, 선형 20K mPEG 말레이미드(E10C)hPYY₃₋₃₆의 섭취 효과를 30K mPEG 말레이미드(E10C)hPYY₃₋₃₆과 비교하는 제2의 연구에서, 0.1 mg/kg 투여 (SC) 후, 결과는 하기의 표와 같았다.

<280>

| 처치 | 2시간 FI | 4시간 FI | 6시간 FI | 24시간 FI | 48시간 FI | 72시간 FI |
|----------|--------|--------|--------|---------|---------|---------|
| 30K E10C | -13 | -24 | -29 | -20 | -12 | -2 |
| 20K E10C | -45 | -55 | -58 | -28 | -14 | -5 |

<281>

SC 주사 후 혈장 PYY 농도는 하기와 같았다.

<282>

| 처치 | 2시간 | 4시간 | 6시간 | 24시간 | 30시간 | 48시간 |
|----------|--------|--------|--------|--------|-------|------|
| 30K E10C | 151±58 | 204±48 | 308±29 | 139±27 | 79±14 | 40±6 |
| 20K E10C | 110±21 | 186±37 | 204±14 | 62±16 | 45±12 | 13±3 |

<283>

자발적 음식 섭취 분석: C57BL/6J 수컷 마우스 (The Jackson Laboratory)를 개별적으로 거주시키고, 연구 2주 전에 적응시켰다. 마우스를 12/12 명/암 사이클에서 유지시키고, 분말화 사료를 자유롭게 섭취시켰고, 물에 자유롭게 접근하도록 하였다. 투여 전날에, 마우스를 음식 섭취 챔버에 놓고, 1일 동안 적응시켰다. 다음날, 소등 직전 (4:00 PM)에 마우스에게 IP 또는 피하 (SC) 주사를 투여하였다. 전체 시간 과정 동안 음식 섭취를 10분 간격으로 자동으로 모니터링하였고, 체중을 매일 측정하였다. 천연 PYY₃₋₃₆ 및 30K mPEG 말레이미드(E10C)hPYY₃₋₃₆의 IP 주사 (도 12) 및 천연 PYY₃₋₃₆ 및 30K PEG 말레이미드(E10C)hPYY₃₋₃₆의 SC 주사 (도 13)에 대해 결과가 제시된다. 천연 PYY₃₋₃₆ 및 30K mPEG 말레이미드(E10C)hPYY₃₋₃₆ 모두 비히클로 처치된 마우스와 비교하여 누적 음식 섭취에서 즉각적인 감소를 일으켰지만, 30K mPEG 말레이미드(E10C)hPYY₃₋₃₆에 의해 야기된 감소된 음식 섭취 효과가 천연 PYY₃₋₃₆에 의해 야기된 효과보다 더 길게 지속되었다. 더욱 지속되는 음식 섭취 효과와 함께, 30K mPEG 말레이미드(E10C)hPYY₃₋₃₆은 단일 주사 (0.1 mg/kg, IP) 후 연장된 혈장 노출을 또한 나타냈다 (도 14). 천연 PYY₃₋₃₆의 소거율은 16 ml/분/kg이고 C_{30대}는 38 nM인 반면, 30K mPEG 말레이미드(E10C)hPYY₃₋₃₆의 소거율은 0.2 ml/분/kg이고 C_{30대}는 267 nM이었다. hPYY 방사선면역측정법 키트 (Linco Research, Inc., St. Louis, MO)를 사용하여 마우스에서 혈장 PYY 값을 측정하였다.

<284>

ob/ob 마우스로의 미니-펌프 분석: 8-9주령의 수컷 ob/ob 마우스 (The Jackson Laboratory) (n=26)를 정상적인 사료 상에서 유지시키고, 비히클 (염수), PYY₃₋₃₆ (0.1 mg/kg/일), 또는 30K PEG 말레이미드(E10C)hPYY₃₋₃₆ (0.03 mg/kg/일)을 투여하는 14-일 삼투압 미니-펌프 (Alza Corp., Mountain View, CA)를 이식하였다. 음식 중량 및 체중을 매일 측정하였다. 체지방 조성을 제0일 및 제13일에 결정하였다. 연구 말기에 혈액 샘플을 취하였다. 이러한 군들에 대해 음식 섭취, 체중, 또는 체지방 조성에서 현저한 차이가 없었다. 앞서 기술된 바와 같은 방사선면역측정법에 의해 연구 종료시에 혈장 PYY를 결정하였다. 천연 PYY₃₋₃₆으로 처치된 군에서는, 혈장 PYY 수

준이 15 ± 2 ng/ml에서 유지되었다; 30K mPEG 말레이미드(E10C)hPYY₃₋₃₆으로 처리된 군에서는, 혈장 PYY 수준이 132 ± 22 ng/ml였다.

<285> **시험관내 결합 연구**

<286> **리간드 결합을 위한 SPA:**

<287> 리간드 결합을 위한 SPA는 Y2 수용체로부터의 방사선표지된 PYY의 경쟁적 치환을 측정하고, Amersham Biosciences로부터 취득된 락틴 밀 배아 아글루티닌 (WGA)으로 코팅된 섬광체를 함유하는 미소구 (SPA 비드) (카탈로그# RPNQ 0085)를 사용한다. 표면 상에 Y2 수용체를 발현하는 KAN-TS 인간 신경모세포종 세포 ([Fuhlendorf et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87: 182-186, 1990])의 현탁액을 50 mM Hepes 완충제 (pH 7.4), 145 mM NaCl, 2.5 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂, 10 mM 글루코스, 0.1% BSA, 5% DMSO 및 로쉐(Roche) 프로테아제 억제제로 구성된 세포 수확 완충액을 사용하여 제조하였다. 50,000개의 세포/웰, ¹²⁵I-PYY (40,000 cpm/웰), 및 50 mM Hepes 완충제, pH 7.4, 1 mM MgCl₂, 2.5 mM CaCl₂, 0.1% (w/v) BSA, 0.025% (w/v) 바시트라신 및 0.025% 아지드화나트륨으로 구성된 분석 완충제 내의 SPA 비드 (0.5 mg/웰)를 사용하여 96-웰 포맷에서 3중으로 SPA 분석을 수행하였다. 다양한 농도 (0.032 내지 500 nM)의 테스트 리간드를 분석 혼합물에 첨가한 후, 이를 진탕시키면서 16-24시간 동안 실온에서 인큐베이션하였다. 플레이트를 1시간 동안 방치한 후, MicroBeta® Trilux 검출기 (Perkin Elmer, Boston, MA)를 사용하여 계수하였다. 실시예 1의 hPYY₃₋₃₆ 및 30K mPEG 말레이미드(E10C)hPYY₃₋₃₆에 대한 결과가 도 15에 제시된다.

<288> **NPY Y2R 수용체에서의 GTPγ [35S] 결합 분석**

<289> 기능성 분석은 NEN Flashplate (96-웰 포맷)에서 실행된 GTPγ [³⁵S] 결합 분석법이다. [Bass et al., Mol. Pharm. 50:709-715, 1990]에 기술된 바와 같이 KAN-TS 세포로부터 막을 제조하였다. GTPγ [³⁵S] 결합 분석을 50 mM 트리스 HCl, pH 7.4, 3 mM MgCl₂, pH 7.4, 10 mM MgCl₂, 20 mM EGTA, 100 mM NaCl, 5 μM GDP, 0.1 % 소 혈청 알부민 및 하기의 프로테아제 억제제로 구성된 분석 완충액 내에서 웰 당 100 pM GTPγ [³⁵S] 및 10 μg 막을 사용하여 96웰 FlashPlate™ 포맷에서 이중으로 수행하였다: 100 μg/ml 바시트라신, 100 μg/ml 벤즈아미딘, 5 μg/ml 아프로티닌, 5 μg/ml 류펩틴. 그 후, 분석 혼합물을 증가하는 농도의 테스트 화합물 (6점 농도 곡선; 10⁻¹² M 내지 10⁻⁵ M 범위의 로그 희석)과 함께 60분 동안 30°C에서 인큐베이션하였다. 그 후, FlashPlate™을 2000×g에서 10분 동안 원심분리하였다. 그 후, GTPγ [³⁵S] 결합의 자극을 Microbeta™ 검출기를 사용하여 정량하였다. Graphpad의 Prism을 사용하여 EC₅₀ 및 내재 활성을 계산하였다. 실시예 1의 hPYY₃₋₃₆ 및 30K mPEG 말레이미드(E10C)hPYY₃₋₃₆에 대한 결과가 도 16에 제시된다. 실시예 1의 30K mPEG 말레이미드 (E10C)hPYY₃₋₃₆ 및 20K mPEG 말레이미드(E10C)hPYY₃₋₃₆에 대한 EC₅₀ 값은 유사하였다 (예를 들어, 동일한 분석에서 측정했을 때 4.3 nM 및 4.6 nM).

도면의 간단한 설명

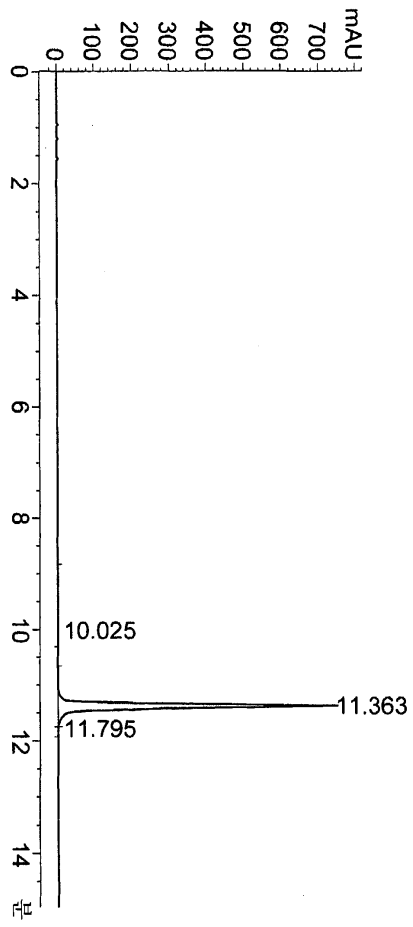
- <84> 도 1은 Zorbax Eclipse XDB-C8 컬럼 상에서의 정제된 (E10C)hPYY₃₋₃₆ 펩티드의 역상 HPLC 궤적이다.
- <85> 도 2는 Shodex 804 SEC 컬럼 상에서의 선형 30K mPEG 말레이미드 + (E10C)hPYY₃₋₃₆ 반응 혼합물의 크기 배제 HPLC 궤적이다.
- <86> 도 3은 선형 30K mPEG 말레이미드 (E10C)hPYY₃₋₃₆의 SP Hitrap 정제로부터의 분획들의 SDS PAGE의 사진이다. MW= 분자량 표준; L= 컬럼 로드; FT= 통과물(flow through); 4-23 = 용출 분획.
- <87> 도 4는 Zorbax Eclipse XDB-C8 컬럼 상에서의 정제된 (D11C)hPYY₃₋₃₆ 펩티드의 역상 HPLC 궤적이다.
- <88> 도 5는 Shodex 804 SEC 컬럼 상에서의 선형 30K mPEG 말레이미드 + (D11C)hPYY₃₋₃₆ 반응 혼합물의 크기 배제 HPLC 궤적이다.
- <89> 도 6은 Shodex 804 SEC 컬럼 상에서의 정제된 선형 30K mPEG 말레이미드 (E10C)hPYY₃₋₃₆ 생성물의 용출 프로파일

을 나타내는 크기 배제 HPLC 궤적이다.

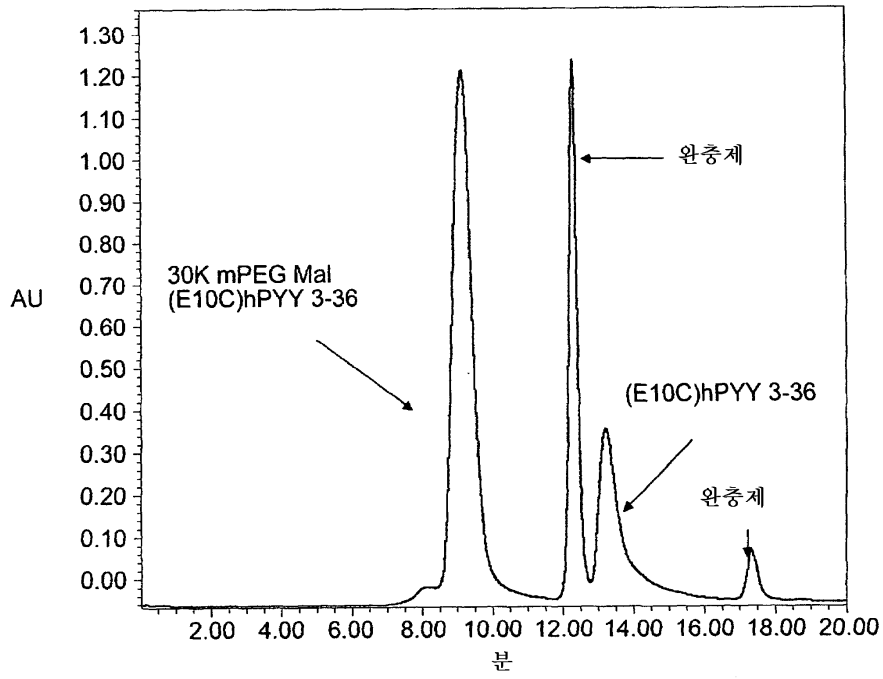
- <90> 도 7은 Shodex 804 SEC 컬럼 상에서의 정제된 선형 30K mPEG 말레이미드 (D11C)hPYY₃₋₃₆ 생성물의 용출 프로파일을 나타내는 크기 배제 HPLC 궤적이다.
- <91> 도 8은 Shodex 804 SEC 컬럼 상에서의 글리세롤-분지형 43K mPEG 말레이미드 + (E10C)hPYY₃₋₃₆ 반응 혼합물의 크기 배제 HPLC 궤적이다.
- <92> 도 9는 Shodex 804 SEC 컬럼 상에서의 정제된 글리세롤-분지형 43K mPEG 말레이미드 (E10C)hPYY₃₋₃₆ 생성물의 용출 프로파일을 나타내는 크기 배제 HPLC 궤적이다.
- <93> 도 10은 복강내 (IP) 주사 후의 금식시킨 마우스에서의 누적 음식 섭취 억제체의 그래프이다. 도 10A는 비히클 군과 비교하여 천연 PYY₃₋₃₆의 용량 효과를 나타낸다. 도 10B는 선형 30K mPEG 말레이미드 (E10C)hPYY₃₋₃₆의 용량 효과를 나타낸다.
- <94> 도 11은 비히클 및 선형 30K mPEG 말레이미드(E10C)PYY₃₋₃₆과 비교하여 글리세롤-분지형 43K mPEG 말레이미드 (E10C)PYY₃₋₃₆의 금식시킨 마우스에서의 IP 주사의 음식 섭취 효과를 나타낸다. 도 11A는 주사 후 6시간에 걸친 응답을 나타내는 직선 그래프이다. 도 11B는 주사 후 24시간에 걸친 효과를 비교하는 막대 그래프이다.
- <95> 도 12는 자발적으로 섭식시킨 마우스에 대한 비히클, PYY₃₋₃₆, 및 선형 30K mPEG 말레이미드(E10C)PYY₃₋₃₆의 IP 주사의 효과를 나타낸다. 도 12A는 음식 섭취에 대한 효과를 나타내고, 도 12B는 체중에 대한 효과를 나타낸다.
- <96> 도 13은 자발적으로 섭식시킨 마우스에 대한 비히클, PYY₃₋₃₆, 및 선형 30K mPEG 말레이미드(E10C)PYY₃₋₃₆의 피하 (SC) 주사의 효과를 나타낸다. 도 13A는 음식 섭취에 대한 효과를 나타내고, 도 13B는 체중에 대한 효과를 나타낸다.
- <97> 도 14는 0.1 mg/kg IP 주사 후 마우스에서의 PYY에 대한 혈장 노출을 나타낸다. 도 14A는 hPYY₃₋₃₆의 주사 후의 혈장 PYY 수준을 나타내고, 도 14B는 선형 30K mPEG 말레이미드(E10C)hPYY₃₋₃₆의 주사 후의 혈장 PYY 수준을 나타낸다.
- <98> 도 15는 섬광 근접 분석법 (SPA: Scintillation Proximity Assay)으로부터의 PYY₃₋₃₆ 또는 선형 30K mPEG 말레이미드 (E10C)PYY₃₋₃₆에 대한 농도 응답 곡선의 그래프이고, 이때 리간드는 KAN-TS 세포 상에서 발현된 Y2R에의 결합에 대해 ¹²⁵I-PYY₁₋₃₆과 경쟁한다.
- <99> 도 16은 KAN-TS 막 상에 발현된 Y2R을 사용한 GTP감마[³⁵S] 결합 분석법으로부터의 PYY₃₋₃₆ 또는 선형 30K mPEG 말레이미드 (E10C)PYY₃₋₃₆에 대한 농도 응답 곡선의 그래프이다.

도면

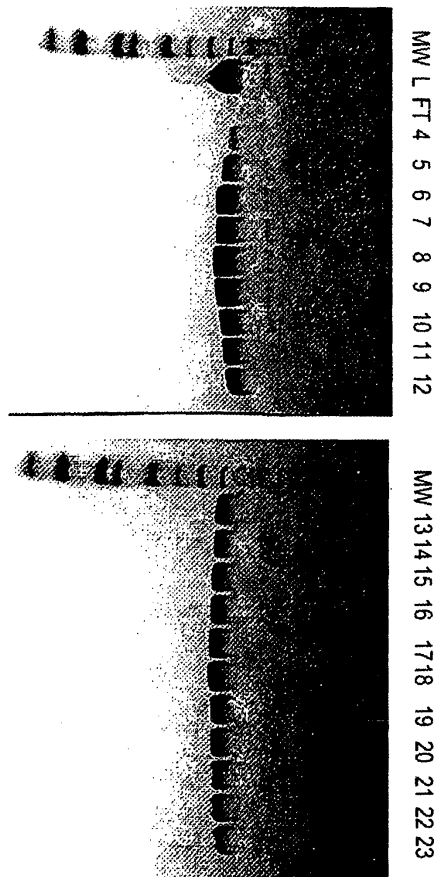
도면1



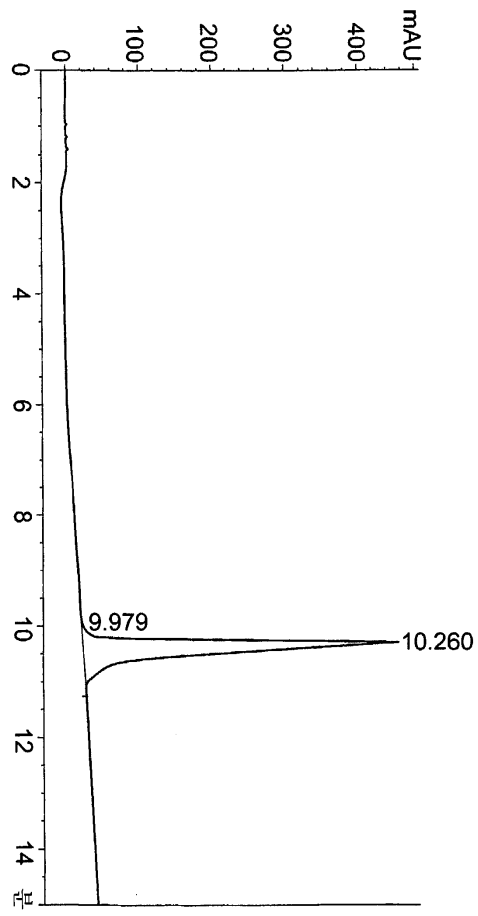
도면2



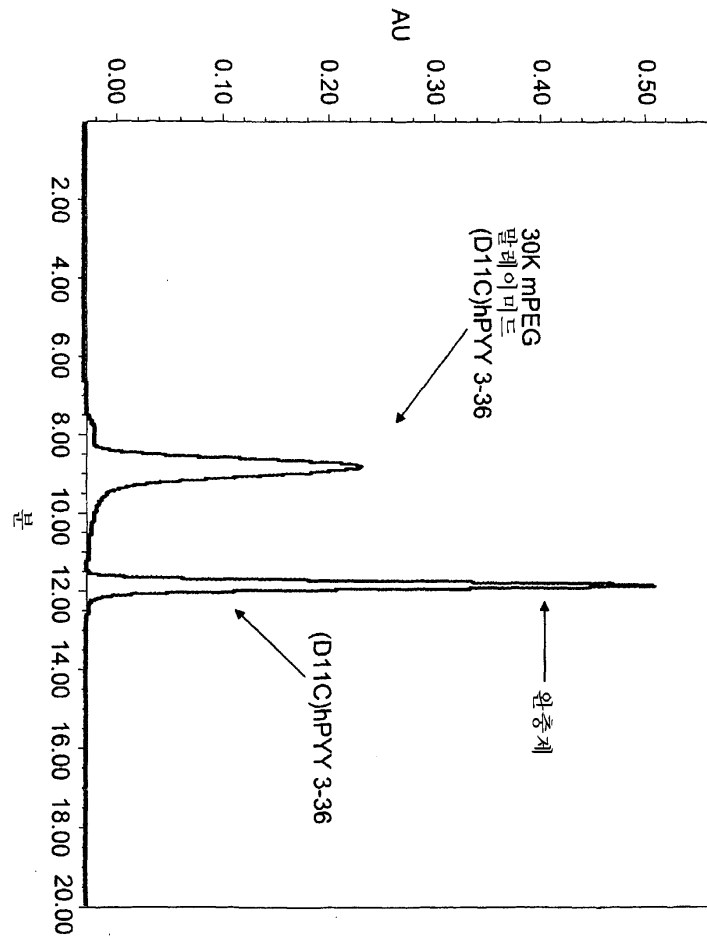
도면3



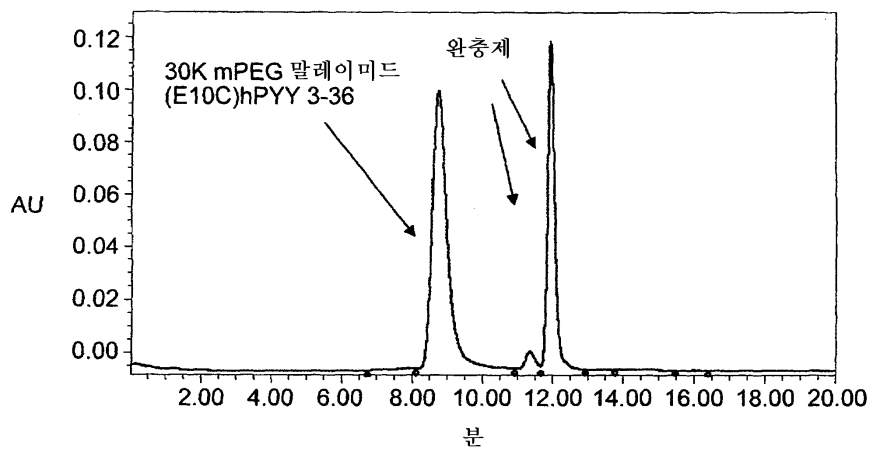
도면4



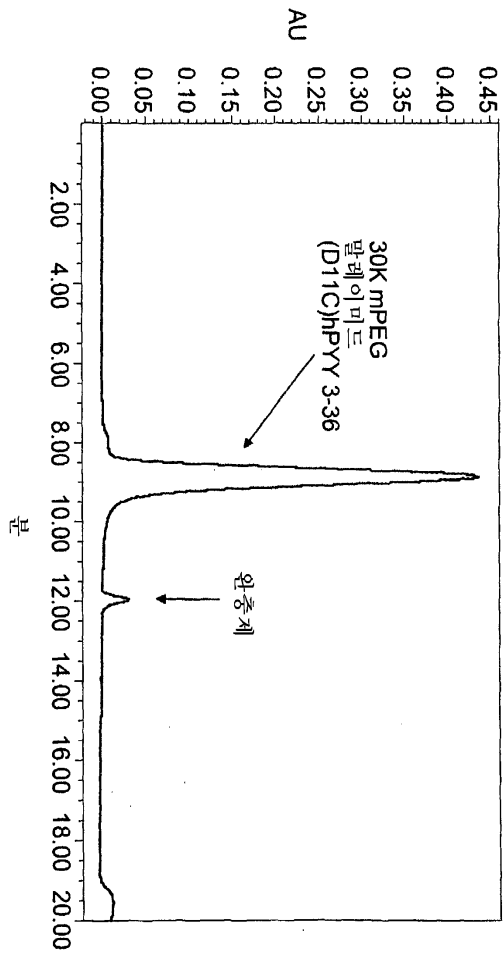
도면5



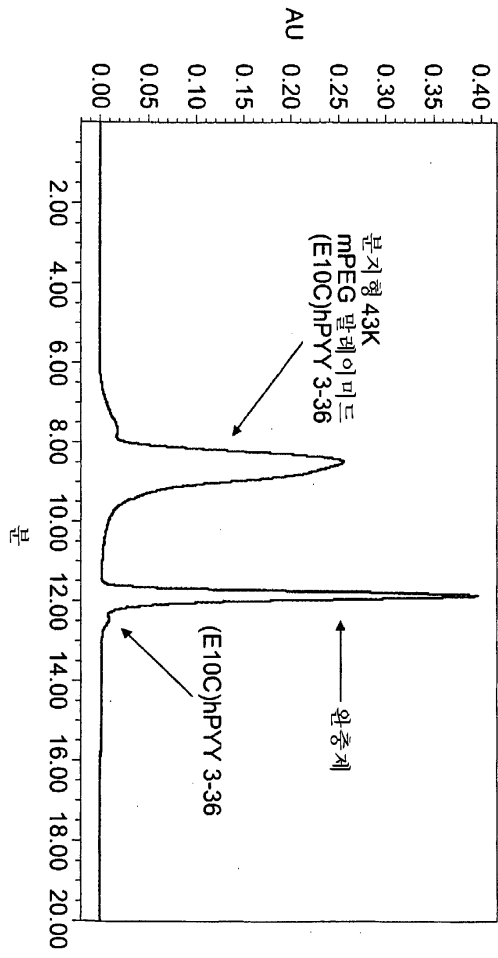
도면6



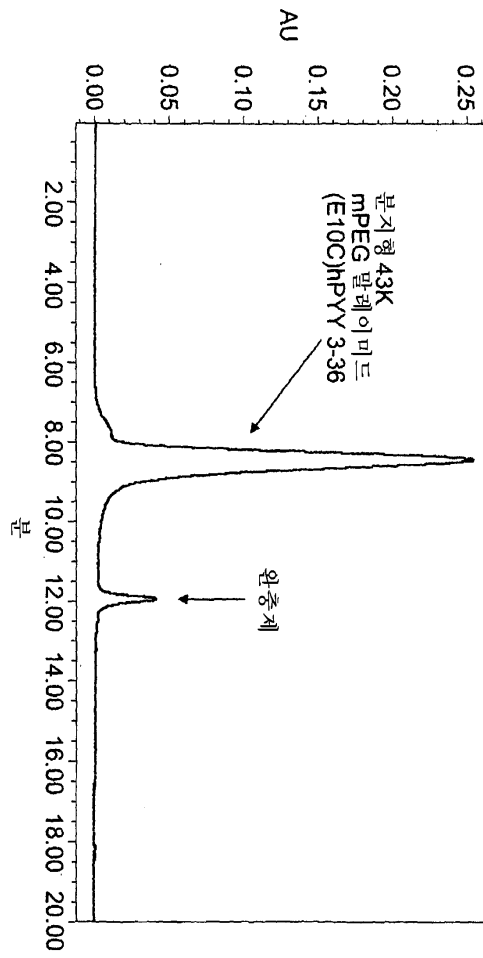
도면7



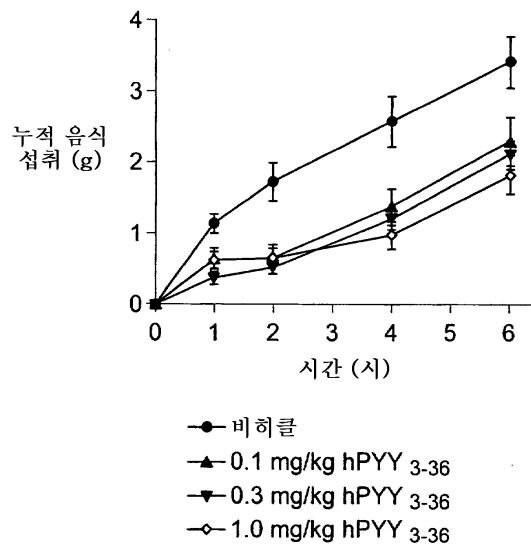
도면8



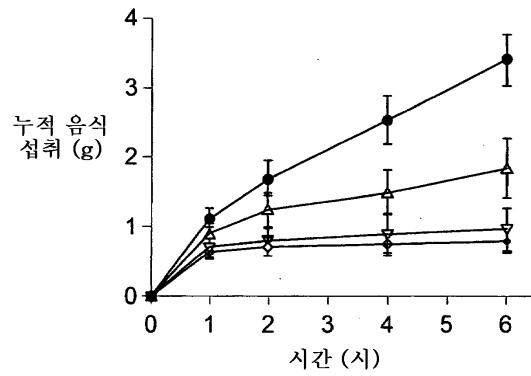
도면9



도면10A

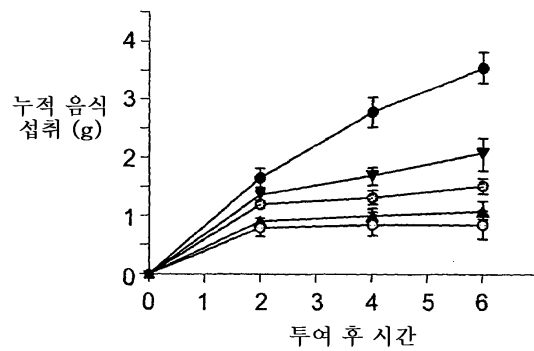


도면10B



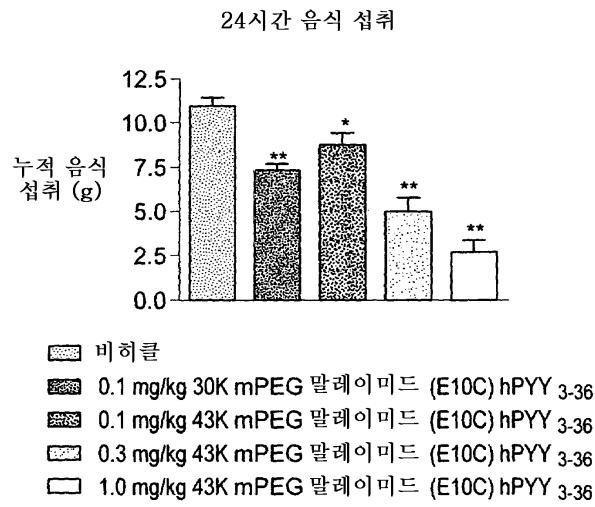
- 비히클
- ▲ 0.1 mg/kg 30K mPEG 말레이미드 (E10C) hPYY 3-36
- ▼ 0.3 mg/kg 30K mPEG 말레이미드 (E10C) hPYY 3-36
- ◇ 1.0 mg/kg 30K mPEG 말레이미드 (E10C) hPYY 3-36

도면11A

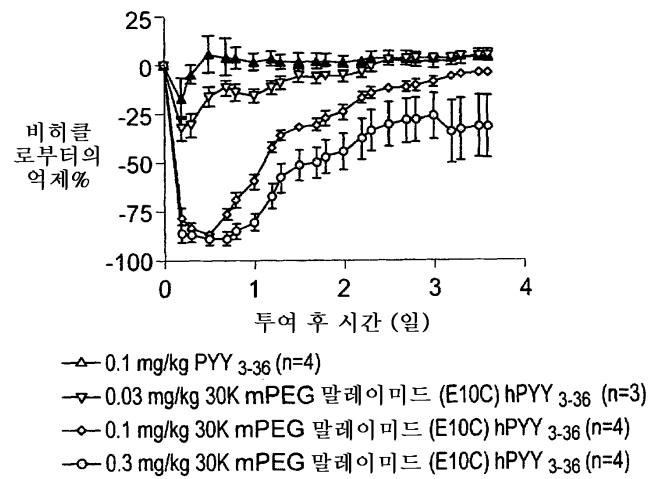


- 비히클
- 0.1 mg/kg 30K mPEG 말레이미드 (E10C) hPYY 3-36
- ▲ 0.1 mg/kg 43K mPEG 말레이미드 (E10C) hPYY 3-36
- ▼ 0.3 mg/kg 43K mPEG 말레이미드 (E10C) hPYY 3-36
- 1.0 mg/kg 43K mPEG 말레이미드 (E10C) hPYY 3-36

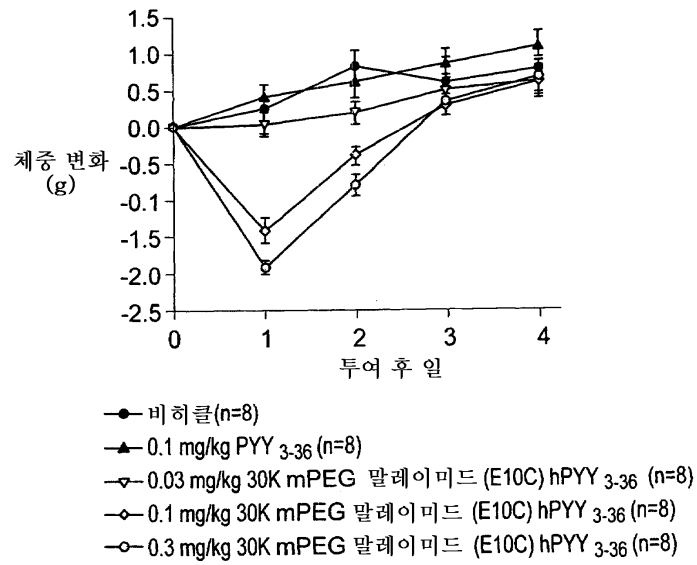
도면11B



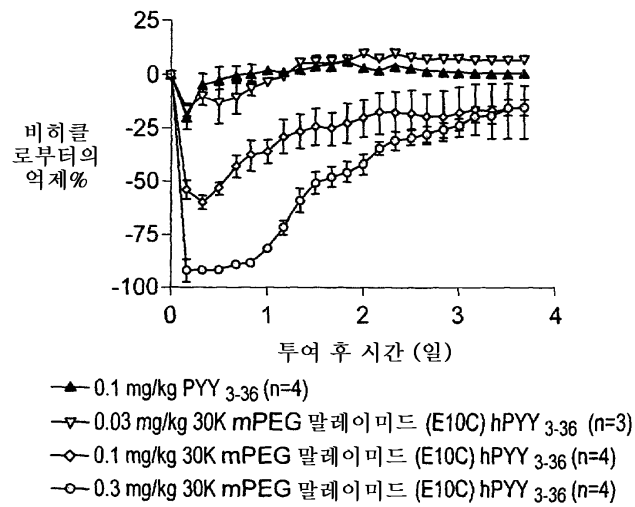
도면12A



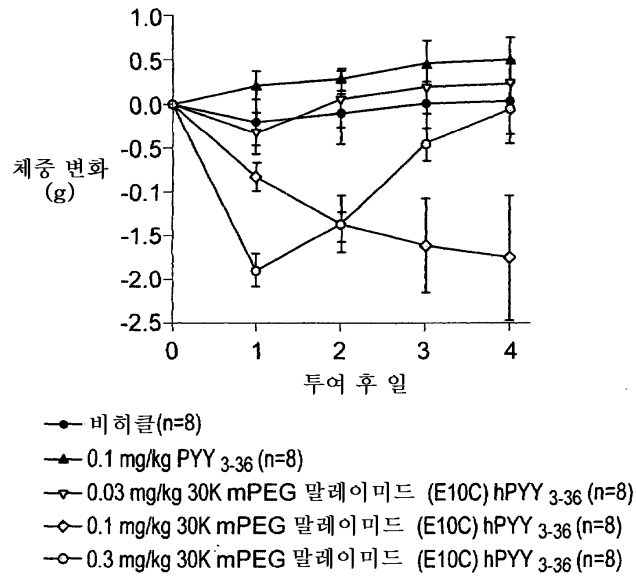
도면12B



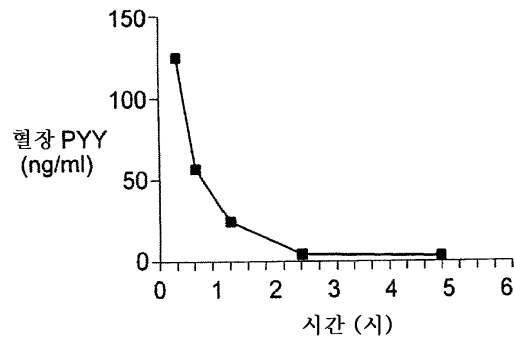
도면13A



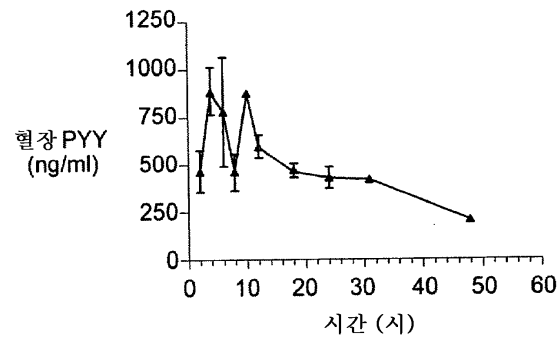
도면13B



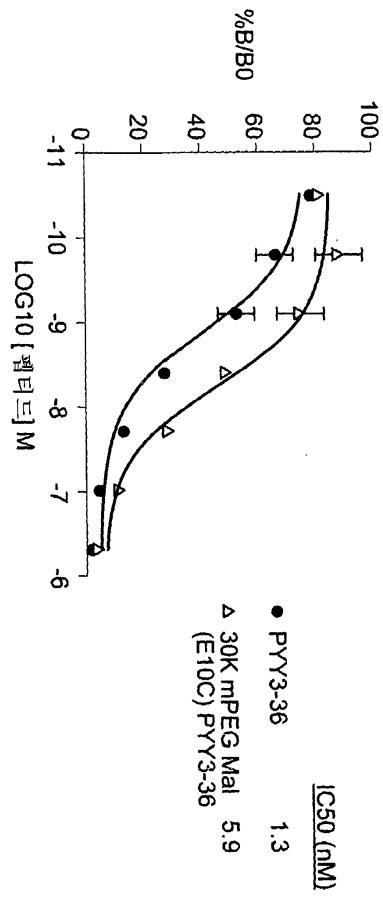
도면14A



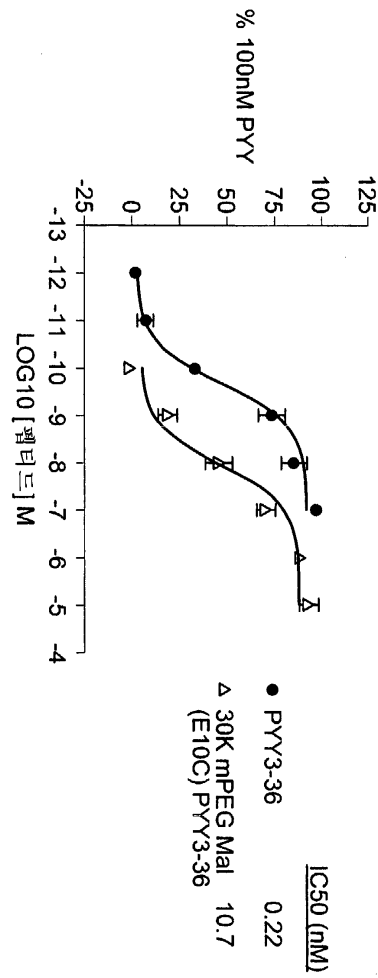
도면14B



도면15



도면16



서열목록

SEQUENCE LISTING

<110> PFIZER PRODUCTS INC
 Summers, Neena L.
 Finn, Rory F.
 Siegel, Ned R.

<120> PYY AGONISTS AND USES THEREOF

<130> PC32768A

<150> US 60/650,366

<151> 2005-02-04

<150> US 60/733,656

<151> 2005-11-04

<160> 8

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 36

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Tyr Pro Ile Lys Pro Glu Ala Pro Gly Glu Asp Ala Ser Pro Glu Glu
1 5 10 15

Leu Asn Arg Tyr Tyr Ala Ser Leu Arg His Tyr Leu Asn Leu Val Thr
 20 25 30

Arg Gln Arg Tyr
 35

<210> 2

<211> 34

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Ile Lys Pro Glu Ala Pro Gly Glu Asp Ala Ser Pro Glu Glu Leu Asn
1 5 10 15

Arg Tyr Tyr Ala Ser Leu Arg His Tyr Leu Asn Leu Val Thr Arg Gln
 20 25 30

Arg Tyr

<210> 3

<211> 34

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 3

Ile Lys Pro Glu Ala Pro Gly Cys Asp Ala Ser Pro Glu Glu Leu Asn
 1 5 10 15

Arg Tyr Tyr Ala Ser Leu Arg His Tyr Leu Asn Leu Val Thr Arg Gln
 20 25 30

Arg Tyr

<210> 4

<211> 34

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 4

Ile Lys Pro Glu Ala Pro Gly Glu Cys Ala Ser Pro Glu Glu Leu Asn
 1 5 10 15

Arg Tyr Tyr Ala Ser Leu Arg His Tyr Leu Asn Leu Val Thr Arg Gln
 20 25 30

Arg Tyr

<210> 5

<211> 102

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 5

atcaaaccgg aggtcccgg ctgtgacgcc tcgccgagg agctgaaccg ctactacgcc 60

tcctgcgcc actacctcaa cctggtcacc cggcagcggg at 102

<210> 6
 <211> 102
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 6
 atcaaaccg aggtcccgg ctgcgacgcc tcgccggagg agctgaaccg ctactacgcc 60

tcctcgcc actacctcaa cctggtcacc cggcagcgg at 102

<210> 7
 <211> 102
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 7
 atcaaaccg aggtcccgg cgaatgtgcc tcgccggagg agctgaaccg ctactacgcc 60

tcctcgcc actacctcaa cctggtcacc cggcagcgg at 102

<210> 8
 <211> 102
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 8
 atcaaaccg aggtcccgg cgaatgcgcc tcgccggagg agctgaaccg ctactacgcc 60

tcctcgcc actacctcaa cctggtcacc cggcagcgg at 102