

명세서

발명의 명칭: 면역글로불린의 Fc 영역 및 GDF15를 포함하는 융합 폴리펩타이드

기술분야

- [1] GDF15 (Growth/differentiation factor 15) 및 면역글로불린의 Fc 영역을 포함하는 융합 폴리펩타이드, 상기 융합 폴리펩타이드를 포함하는 약학적 조성물, 및 면역글로불린의 Fc 영역을 융합시키는 단계를 포함하는 GDF15의 생체 지속 기간을 증가시키는 방법에 관한 것이다.

[2]

배경기술

- [3] 단백질 또는 펩타이드 약물은 대부분 체내에서 활성이 유지되는 기간이 짧고, 정맥 투여 이외의 방법으로 투여시에는 흡수율이 낮아서, 장기간 약물을 투여하는 치료가 필요한 경우에 이들 약물을 반복해서 짧은 투여 간격으로 계속적으로 주사하여야 하는 불편한 점이 있다. 이와 같은 불편을 해소하기 위하여 1 회 투여로 약물을 지속적으로 방출시키는 기술의 개발이 요구된다. 이러한 요구에 부응하기 위한 일환으로 지속적 방출을 위한 서방성 제형이 개발되고 있다.

- [4] 예컨대, 단백질 또는 펩타이드 약물을 생분해성 고분자 매트릭스로 둘러싼 형태의 미세 입자를 제조하여, 이의 투여시 매트릭스 물질이 체내에서 서서히 분해되어 제거되면서 약물이 서서히 방출되도록 하는 서방성 제형에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다.

- [5] 한편, GDF15 (Growth/differentiation factor 15)는 TGF-베타 패밀리의 일원으로, 25kDa 동종이량체이며, 혈장 중에서 순환되는 분비 단백질이다. GDF15의 혈장 내 수준은 BMI(체질량지수)와 관련이 있으며, GDF15가 에너지 항상성의 장기 조절인자(long-term regulator)로서의 역할을 한다. GDF15는 또한 심혈관 질환, 심근 비대, 허혈성 손상 등의 병적 상태에서 보호 작용을 한다. 또한, GDF15는 제1형 당뇨병 및 제2형 당뇨병 모델에서 신세뇨관 및 신간질성 손상으로부터의 보호 역할을 한다. 또한, GDF15는 연령-관련 감각 및 운동 신경 손실에 대해 보호 효과를 가지며, 말초 신경 손상 회복에 기여할 수 있다. 또한, GDF15는 체중 감소 및 체지방 감소 및 글루코스 내성 효과를 가지며, 전신 에너지 소비 및 산화적 대사를 증가시키는 효과를 갖는다. GDF15는 체중-의존적 및 비의존적 기작을 통하여 혈당 조절 효과를 나타낸다.

- [6] 이와 같은 다양한 약리적 효과를 나타내는 GDF15 단백질의 체내 지속성을 개선하기 위한 기술의 개발이 요구된다.

[7]

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [8] 본 명세서에서, GDF15 (Growth/differentiation factor 15) 또는 이의 기능적 변이체를 면역글로불린의 Fc 영역과 연결시켜 융합 폴리펩타이드를 형성함으로써, Fc 영역과 융합되지 않은 경우와 비교하여, GDF15의 체내 반감기를 증가시켜 체내 지속 기간을 증진시키고, 이를 통하여 GDF15의 약리효과를 증진시키거나 및/또는 투여 간격을 증가시키는 기술이 제공된다.
- [9] 일 예는 GDF15 또는 이의 기능적 변이체와 면역글로불린의 Fc 영역을 포함하는 융합 폴리펩타이드를 제공한다.
- [10] 상기 융합 폴리펩타이드에 있어서, 상기 면역글로불린의 Fc 영역은 상기 GDF15 또는 이의 기능적 변이체의 N-말단에 포함(연결)될 수 있다. 예컨대, 상기 융합 폴리펩타이드는 N-말단에서 C-말단 방향으로 (1) 면역글로불린의 Fc 영역 및 (2) GDF15 또는 이의 기능적 변이체를 포함하는 것일 수 있다.
- [11] 상기 융합 폴리펩타이드에 포함된 면역글로불린의 Fc 영역은 GDF15 또는 이의 변이체의 안정성을 증진시키는 역할을 하는 것으로, 예컨대, 반감기 (e.g., 체내 반감기)를 연장시키는 효과를 갖는 것일 수 있다. 일 예에서, 상기 면역글로불린의 Fc 영역은 IgG1의 Fc 영역 및 IgG4의 Fc 영역으로 이루어진 군에서 선택될 수 있다. 상기 IgG1의 Fc 영역은 IgG1의 CH2 도메인, CH3 도메인, 또는 CH2+CH3 도메인을 포함하고, N-말단에 IgG1의 힌지 영역을 포함하거나 포함하지 않는 것일 수 있다. IgG4의 Fc 영역은 IgG4의 CH2 도메인, CH3 도메인, 또는 CH2+CH3 도메인을 포함하고, N-말단에 IgG4의 힌지 영역을 포함하거나 포함하지 않는 것일 수 있다.
- [12] 상기 융합 폴리펩타이드는 면역글로불린의 Fc 영역과 GDF15 또는 이의 기능적 변이체 사이에 펩타이드 링커를 추가로 포함할 수 있다. 일 예에서, 상기 펩타이드 링커는 양 쪽에 융합된 Fc 영역과 GDF15가 각각 자유롭게 기능을 발휘하도록 하기 위하여 유연성 링커(flexible linker)인 것이 좋다. 일 예에서, 상기 펩타이드 링커는 강직성 링커(rigid linker)가 아닐 수 있다. 예컨대, 상기 펩타이드 링커는 하나 이상의 Gly(G)와 하나 이상의 Ser(S)을 반복적으로 포함하는 GS 링커일 수 있으며, 예컨대, (GGGS)_n (n은 GGGS(서열번호 13)의 반복 회수로서 1 내지 10의 정수 또는 1 내지 5의 정수 (1, 2, 3, 4, 또는 5)임)일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [13] 상기 융합 폴리펩타이드에서, 면역글로불린의 Fc 영역과 융합된 GDF15 또는 이의 기능적 변이체는, 면역글로불린의 Fc 영역이 융합되지 않은 GDF15 또는 이의 기능적 변이체와 비교하여, 체내 (또는 혈중) 안정성(지속기간)이 증가된 것을 특징으로 한다 (예컨대, 체내 또는 혈중 반감기 증가). 또한, 상기 면역글로불린의 Fc 영역과 융합된 GDF15 또는 이의 기능적 변이체는, 면역글로불린의 Fc 영역이 융합되지 않은 GDF15 또는 이의 기능적 변이체와 비교하여, 약리 효과 (예컨대, 체중 감소 효과)가 개선된 것을 특징으로 한다.

- [14] 다른 예는 상기 융합 폴리펩타이드를 2개 포함하는 융합 폴리펩타이드 이량체를 제공한다. 상기 융합 폴리펩타이드 이량체는 상기 2 개의 융합 폴리펩타이드의 GDF15 또는 이의 기능적 변이체 간 연결(결합)된 것일 수 있다.
- [15] 다른 예는 상기 융합 폴리펩타이드를 암호화하는 핵산 분자를 제공한다.
- [16] 다른 예는 상기 핵산 분자를 포함하는 재조합 벡터를 제공한다.
- [17] 다른 예는 상기 재조합 벡터를 포함하는 재조합 세포를 제공한다.
- [18] 다른 예는 상기 융합 폴리펩타이드, 융합 폴리펩타이드 이량체, 융합 폴리펩타이드 암호화 핵산 분자, 상기 핵산 분자를 포함하는 재조합 벡터, 및 상기 재조합 벡터를 포함하는 재조합 세포로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상을 포함하는, 체중 감소, 식이 조절 (식사량 감소), 또는 대사성 질병의 예방, 개선, 경감, 및/또는 치료용 조성물 (약학 조성물 또는 건강기능성 식품 조성물)을 제공한다. 다른 예는 상기 융합 폴리펩타이드, 융합 폴리펩타이드 이량체, 융합 폴리펩타이드 암호화 핵산 분자, 상기 핵산 분자를 포함하는 재조합 벡터, 및 상기 재조합 벡터를 포함하는 재조합 세포로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 약학적 유효량을 대사성 질병의 예방, 개선, 경감, 및/또는 치료를 필요로 하는 대상에게 투여하는 단계를 포함하는, 체중 감소 방법, 식이 조절(식사량 감소) 방법, 또는 대사성 질병의 예방, 개선, 경감, 및/또는 치료 방법을 제공한다. 상기 대사성 질병은 대사 장애로 인하여 유발되는 모든 질병을 의미하는 것으로, 비만, 당뇨 (예컨대, 제 2형 당뇨), 비알코올성 지방간 질환 (예컨대, 비알코올성 지방간염 (Nonalcoholic steatohepatitis; NASH) 등) 등으로 이루어진 군에서 선택된 것일 수 있다.
- [19] 다른 예는 상기 재조합 벡터를 세포에서 발현시키는 단계를 포함하는, 체내 (또는 혈중) 반감기가 증가된 GDF15 또는 이의 기능적 변이체의 제조 방법, 또는 상기 체내 (또는 혈중) 반감기가 증가된 GDF15 또는 이의 기능적 변이체를 포함하는 융합 폴리펩타이드 또는 융합 폴리펩타이드 포함하는 동종 이량체의 제조 방법을 제공한다.
- [20] 다른 예는 GDF15 또는 이의 기능적 변이체와 면역글로불린의 Fc 영역을 융합(또는 연결 또는 결합)시키는 단계를 포함하는, GDF15 또는 이의 기능적 변이체의 생체 지속 기간을 증가시키는 방법을 제공한다. 일 구체예에서, 상기 융합시키는 단계는 GDF15 또는 이의 기능적 변이체의 N 말단에 면역글로불린의 Fc 영역을 링커를 통하거나 통하지 않고 융합(또는 연결 또는 결합)시키는 단계를 포함할 수 있다. 다른 예는 GDF15 또는 이의 기능적 변이체와 면역글로불린의 Fc 영역을 유연성 링커 (예컨대, GS 링커)를 통하여 융합(또는 연결 또는 결합)시키는 단계를 포함하는, GDF15, 면역글로불린의 Fc 영역, 또는 이들을 포함하는 융합 폴리펩타이드의 면역원성을 감소시키는 방법을 제공한다. 상기 융합(또는 연결 또는 결합)시키는 단계는 생체 외(in vitro)에서 진행되는 것일 수 있다.
- [21]

과제 해결 수단

- [22] 이하, 본 발명을 보다 상세히 설명한다:
- [23]
- [24] GDF15
- [25] GDF15는 전체 308개 아미노산(UniProt Q99988)중에서 signal peptide와 propeptide를 제외한, 197번째(A)부터 308번째(I)까지의 아미노산 (서열번호 1; 도 2 참조; mature form)으로 구성되어 있다:
- [26] 본 명세서에서, GDF15는, 다른 언급이 없는 한, 전장 단백질(UniProt Q99988)의 197번째(A)부터 308번째(I)까지의 아미노산 서열 (서열번호 1, 도 2 참조; ARNG DHCPLGPGRC CRLHTVRASL EDLGWADWVL SPREVQVTMC IGACPSQFRA ANMHAQIKTS LHRLKPDTVP APCCVPASYN PMVLIQKTDG GVSLQTYDDL LAKDCHCI) 또는 GDF15의 고유 활성 및 구조를 유지하는 범위에서 상기 아미노산 서열과 80% 이상, 85% 이상, 90 이상, 95% 이상, 96% 이상, 97% 이상, 98% 이상, 또는 99% 이상의 서열 상동성을 갖는 아미노산 서열을 필수적으로 포함하는 폴리펩타이드를 의미한다.
- [27] 본 명세서에서, GDF15의 기능적 변이체는 GDF15가 고유 활성 및 구조를 유지하면서, 이량체 구조 형성에 보다 유리하도록 변이된 변이체일 수 있다. 일 예에서, 상기 GDF15의 기능적 변이체는 서열번호 1의 GDF15의 아미노산 서열의 N-말단의 14개 아미노산 잔기(즉, 서열번호 1에서 첫 번째부터 14번째까지 총 14개의 아미노산 잔기) 중 하나 이상 (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 또는 14개) (예컨대, N 말단부터 순서대로 하나 이상), 예컨대 14개 아미노산 잔기가 모두 결실된 N-말단 결실 변이체 (이하, 'ΔN14GDF15' 또는 'GDF(CRL)'로 표시될 수 있음)일 수 있다. 일 구체예에서, 상기 GDF15의 기능적 변이체는 서열번호 2 (CRLHTVRASL EDLGWADWVL SPREVQVTMC IGACPSQFRA ANMHAQIKTS LHRLKPDTVP APCCVPASYN PMVLIQKTDG GVSLQTYDDL LAKDCHCI)의 아미노산 서열 또는 GDF15의 고유 활성 및 구조를 유지하는 범위에서 상기 아미노산 서열과 80% 이상, 85% 이상, 90 이상, 95% 이상, 96% 이상, 97% 이상, 98% 이상, 또는 99% 이상의 서열 상동성을 갖는 아미노산 서열을 필수적으로 포함하는 폴리펩타이드일 수 있다.
- [28]
- [29] 면역글로불린의 Fc
- [30] GDF15 또는 이의 기능적 변이체와 융합되는 면역글로불린의 Fc는 상기 GDF15 또는 이의 기능적 변이체의 안정성을 증진시키는 역할을 하는 것으로, 예컨대, 반감기 (e.g., 체내 반감기)를 연장, 및/또는 renal filtration 감소 등의 효과를 갖는 것일 수 있다. 일 예에서, 상기 면역글로불린의 Fc 영역은 IgG1의 Fc 및 IgG4의 Fc 중에서 선택된 것일 수 있다. 상기 IgG1의 Fc 영역은 IgG1의 CH2 도메인, CH3 도메인, 또는 CH2+CH3 도메인을 포함하고, N-말단에 IgG1의 힌지 영역을

포함하거나 포함하지 않는 것일 수 있다. IgG4의 Fc 영역은 IgG4의 CH2 도메인, CH3 도메인, 또는 CH2+CH3 도메인을 포함하고, N-말단에 IgG4의 힌지 영역을 포함하거나 포함하지 않는 것일 수 있다.

- [31] IgG1는 인간 등의 영장류 또는 마우스, 래트 등의 설치류 유래의 것일 수 있으며, 예컨대, 인간 IgG1 (UniProtKB P01857) 일 수 있다. IgG4는 인간 등의 영장류 또는 마우스, 래트 등의 설치류 유래의 것일 수 있으며, 예컨대, 인간 IgG4 (UniprotKB P01861) 일 수 있다.
- [32] 상기 IgG1의 Fc 영역은 IgG1의 CH2 도메인, CH3 도메인, 또는 CH2+CH3 도메인을 포함하고, N-말단에 IgG1의 힌지 영역을 포함하거나 포함하지 않는 것일 수 있다. IgG4의 Fc 영역은 IgG4의 CH2 도메인, CH3 도메인, 또는 CH2+CH3 도메인을 포함하고, N-말단에 IgG4의 힌지 영역을 포함하거나 포함하지 않는 것일 수 있다.
- [33] 일 구체예에서, IgG1의 Fc는 인간 IgG1의 CH2 도메인과 CH3도메인을 포함하는 폴리펩타이드 (서열번호 3), 또는 상기 서열번호 3의 아미노산 서열의 N-말단에 인간 IgG1의 힌지 영역 (서열번호 4)을 추가로 포함하는 폴리펩타이드일 수 있다. 본 명세서에 기재된 바로서, IgG1의 Fc 영역은 IgG1의 Fc의 고유 활성 및 구조를 유지하는 범위에서 상기 서열번호 3 또는 'N말단-(서열번호 4)-(서열번호 3)-C말단'의 아미노산 서열과 80% 이상, 85% 이상, 90 이상, 95% 이상, 96% 이상, 97% 이상, 98% 이상, 또는 99% 이상의 서열 상동성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 것으로 해석될 수 있다.
- [34] IgG4의 Fc는 인간 IgG4의 CH2 도메인과 CH3도메인을 포함하는 폴리펩타이드 (서열번호 5) 또는 상기 서열번호 5의 아미노산 서열의 N-말단에 인간 IgG4의 힌지 영역 (서열번호 10)을 추가로 포함하는 폴리펩타이드일 수 있다. 본 명세서에 사용된 바로서, IgG4의 Fc 영역은 IgG4의 Fc의 고유 활성 및 구조를 유지하는 범위에서 상기 서열번호 5 또는 'N말단-(서열번호 10)-(서열번호 5)-C말단'의 아미노산 서열 (또는 하기 설명되는 IgG4의 변이형 Fc의 아미노산 서열)과 80% 이상, 85% 이상, 90 이상, 95% 이상, 96% 이상, 97% 이상, 98% 이상, 또는 99% 이상의 서열 상동성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 것으로 해석될 수 있다.
- [35] 면역글로불린의 Fc 영역이 이의 N-말단 또는 C-말단에 연결된 단백질의 (체내) 반감기를 연장시킬 목적으로 사용되는 경우, 면역글로불린 Fc영역에 의한 부작용을 줄이기 위하여, Fc가 갖는 임의의 효과기(effector) 기능을 최소화시키는 것이 중요하다. 이러한 측면에서, 인간 IgG4 Fc 영역은 다른 IgG 서브-타입과 비교하여 FcγR과 보체 인자와의 결합력이 낮아서 유리하다. 이에 추가하여, 인간 IgG4 Fc 영역은 아미노산 치환을 포함함으로써 효과기 기능이 보다 감소된 것일 수 있다. 상기 효과기 기능을 감소시키기 위한 인간 IgG4 Fc 영역의 아미노산 치환은 인간 IgG4(UniprotKB P01861)의 234번째 잔기인 페닐알라닌의 알라닌으로의 치환 및 235번째 잔기 류신의 알라닌으로의 치환

(IgG4 Fc의 CH2-CH3 도메인 부위에 포함됨; 상기 아미노산 잔기 번호는 EU 번호매김에 따름 [Kabat, E.A. 등(1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5판, U.S. Dept. of Health and Human Services, Bethesda, MD, NIH Publication no. 91-3242]) 중 하나 이상을 함유할 수 있다. 추가로, 상기 IgG4의 Fc 영역은 중쇄 이합체 형성을 안정화하고 반(half)-IgG4 Fc 쇄의 형성을 방지하는 아미노산 치환을 포함할 수 있다. 이러한 아미노산 치환은 인간IgG4(UniprotKB P01861)의 Fc 영역의 228번째 아미노산 잔기 세린 (EU 번호 매김에 따름; 힌지 영역에 포함됨)의 프롤린으로의 치환을 포함할 수 있다.

- [36] 일 구체예에서, 면역원성(Immunogenicity)을 감소시키기 위하여, Fc 영역은 상기한 변이 이외의 변이를 포함하지 않는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [37] 일 구체예에서, 상기 면역글로불린의 Fc 영역은 인간 IgG4 Fc의 CH2-CH3 도메인 (서열번호 5 (일반식); 서열번호 6 (야생형), 또는 서열번호 7, 8, 또는 9 (변이형)를 포함하거나, 상기 CH2-CH3 도메인의 N 말단에 인간 IgG4의 힌지 영역 (서열번호 10 (일반식); 서열번호 11 (야생형), 또는 서열번호 12 (변이형))을 추가로 포함하는 것일 수 있다.
- [38] 본 명세서에서 사용 가능한 면역글로불린의 Fc 영역을 하기 표 1에 정리하였다:

[39] [Table 1]

	영역	아미노산 서열	서열 번호
인간 IgG1-Fc (UniProtKB P01857)	Core Hinge	DKTHT CPPCP	4
	CH2-CH3	APELLGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED PEVKFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQYNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALPA PIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSRDELTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTPPVLDL DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG NVFSCSVME ALHNHYTQKS LSLSPGX (X는 없거나 K 임)	3
인간 IgG4-Fc (UniProtKB P01861)	Hinge (일반식)	ESKYGPPCPX CP (X는 S 또는 P)	10
	Hinge (아생형)	ESKYGPPCPS CP (서열번호 10에서, X는 S)	11
	Hinge (변이형)	ESKYGPPCPP CP (서열번호 10에서, X는 P)	12
	CH2-CH3 (일반식)	APEX 1 2 GGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSDQED PEVQFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQFNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKGLPS SIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSQEEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTPPVLDL DGSFFLYSRL TVDKSRWQEG NVFSCSVME ALHNHYTQKS LSLSL G 3 (X1은 F 또는 A, X2는 L 또는 A, X3는 없거나 K)	5
	CH2-CH3 (아생형)	APEFLGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSDQED PEVQFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQFNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKGLPS SIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSQEEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTPPVLDL DGSFFLYSRL TVDKSRWQEG NVFSCSVME ALHNHYTQKS LSLSLG (서열번호 5에서, X1은 F, X2는 L, X3는 K)	6
	CH2-CH3 (변이형)	APE A A GGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSDQED PEVQFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQFNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKGLPS SIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSQEEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTPPVLDL DGSFFLYSRL TVDKSRWQEG NVFSCSVME ALHNHYTQKS LSLSLG (서열번호 5에서, X1은 A, X2는 A, X3는 없음)	7
	CH2-CH3 (변이형)	APE A LGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSDQED PEVQFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQFNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKGLPS SIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSQEEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTPPVLDL DGSFFLYSRL TVDKSRWQEG NVFSCSVME ALHNHYTQKS LSLSLG (서열번호 5에서, X1은 A, X2는 L, X3는 없음)	8
	CH2-CH3 (변이형)	APEF A GGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSDQED PEVQFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQFNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKGLPS SIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSQEEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTPPVLDL DGSFFLYSRL TVDKSRWQEG NVFSCSVME ALHNHYTQKS LSLSLG (서열번호 5에서, X1은 F, X2는 A, X3는 없음)	9

[40]

[41] 융합 폴리펩타이드

[42] 본 명세서에서 제공되는 융합 폴리펩타이드는 면역글로불린의 Fc 영역 및 상기 면역글로불린의 Fc 영역의 C-말단에 연결된 GDF15 또는 이의 기능적 변이체를 포함한다. 상기 면역글로불린의 Fc 영역 및 GDF15 또는 이의 기능적 변이체는

앞서 설명한 바와 같다.

- [43] 상기 융합 폴리펩타이드에서, 면역글로불린의 Fc 영역과 GDF15 또는 이의 기능적 변이체는 공유적 또는 비공유적으로 연결되거나, 적절한 링커 (예컨대, 펩타이드 링커)를 통하거나, 링커 없이 직접 연결된 것일 수 있다. 일 예에서, 상기 펩타이드 링커는 1 내지 20 개, 1 내지 15 개, 1 내지 10 개, 2 내지 20개, 2 내지 15 개, 또는 2 내지 10 개의 임의의 아미노산으로 이루어진 폴리펩타이드일 수 있으며, 그 포함된 아미노산 종류는 제한이 없다. 본 명세서에서, 펩타이드 링커는 양쪽에 융합된 Fc 영역(반감기 증가, renal filtration 감소 등의 안정화 활성)과 GDF15가 각각 자유롭게 기능을 발휘하도록 하기 위하여 유연성 링커(flexible linker)인 것이 좋다. 일 예에서, 상기 펩타이드 링커는 강직성 링커(rigid linker)가 아닐 수 있다. 예컨대, 상기 펩타이드 링커는, 예컨대, Gly, Asn, Ser, Glu, 및 Lys로 이루어진 군에서 선택된 1 이상의 아미노산 잔기를 포함할 수 있으며, Thr 및/또는 Ala과 같은 중성 아미노산들도 포함할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니며, 펩타이드 링커에 적합한 아미노산 서열은 당 업계에 공지되어 있다.
- [44] 일 예에서, 상기 펩타이드 링커는 하나 이상의 Gly(G)와 하나 이상의 Ser(S)을 반복적으로 포함하는 GS 링커일 수 있으며, 예컨대, (GGGGS) n (n 은 GGGGS(서열번호 13)의 반복 회수로서 1 내지 10의 정수 또는 1 내지 5의 정수 (1, 2, 3, 4, 또는 5)임)일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 상기 GS 링커에 있어서, Gly (글라이신)은 R group이 -H인 아미노산으로 비극성이지만 자유도(phi, psi angle)가 커서 mobility가 우수하고, Ser(세린)은 R group이 -CH₂-OH인 아미노산으로, 크기가 작으면서도 극성이어서 물과 수소 결합을 형성하여 링커의 안정성 유지에 유리하여, GS 링커와, GDF15 또는 Fc 영역과의 가능한 non-specific interaction을 줄이는데 기여할 수 있다. 또한, 상기 GS 링커는 유연성 구조이기 때문에 면역원성이 낮은 장점이 있다. 또한, 상기 GS 링커는 GDF15와 Fc 영역이 각각의 기능을 방해하지 않도록 공간적으로 분리시키는 역할을 하는 것일 수 있으며, 이를 위하여, GS 링커의 아미노산 길이는 15 내지 25개 아미노산 ($n=3$ 내지 5), 15 내지 20개 아미노산 ($n=3$ 또는 4), 15 내지 25개 아미노산 ($n=4$ 또는 5), 또는 20개 아미노산 ($n=4$)일 수 있다. 일 예에서, 본 명세서에서 제안되는 융합 폴리펩타이드에 포함되는 펩타이드 링커는 상기한 GS 링커 [(GGGGS) n (n 은 1 내지 10의 정수 또는 1 내지 5의 정수)] 이외의 아미노산 잔기는 포함하지 않는 것일 수 있다.
- [45] 따라서, 일 예에서, 상기 융합 폴리펩타이드는 면역글로불린의 Fc 영역과 GDF15 또는 이의 기능적 변이체 사이에 펩타이드 링커를 추가로 포함할 수 있다. 일 예에서, 상기 펩타이드 링커는 하나 이상의 Gly(G)와 하나 이상의 Ser(S)을 반복적으로 포함하는 GS 링커일 수 있으며, 예컨대, (GGGGS) n (n 은 GGGGS(서열번호 13)의 반복 회수로서 1 내지 10의 정수 또는 1 내지 5의 정수 (1, 2, 3, 4, 또는 5)임)일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

- [46] 상기 융합 폴리펩타이드는 재조합적으로 생산되거나 화학적으로 합성될 수 있다. 재조합적으로 생산되는 경우, 상기 융합 폴리펩타이드는 하나의 전사개시조절인자 (예컨대, 프로모터 등)에 의하여 발현이 조절되는 하나의 해독틀 (reading frame)에 의하여 암호화되는 것 ("단일가닥"으로 표현)일 수 있다.
- [47] 상기 융합 폴리펩타이드에서, 면역글로불린의 Fc 영역과 융합된 GDF15 또는 이의 기능적 변이체는, 면역글로불린의 Fc 영역이 융합되지 않은 GDF15 또는 이의 기능적 변이체, 및/또는 Fc 영역과 GDF15이 상기한 GS 링커 이외의 링커를 통하여 융합된 경우와 비교하여, 체내 (또는 혈중) 안정성(지속기간)이 증가(예컨대, 체내 또는 혈중 반감기 증가), 및/또는 면역원성이 감소된 것을 특징으로 한다. 또한, 상기 면역글로불린의 Fc 영역과 융합된 GDF15 또는 이의 기능적 변이체는, 면역글로불린의 Fc 영역이 융합되지 않은 GDF15 또는 이의 기능적 변이체와 비교하여, 약리 효과 (예컨대, 체중 감소 효과)가 개선된 것을 특징으로 한다.
- [48]
- [49] 융합 폴리펩타이드 이량체
- [50] GDF15의 기능적으로 활성이 있는 형태는 동종이량체 (homo dimer) 형태이다.
- [51] 따라서, 본 발명의 다른 예는 2개의 융합 폴리펩타이드 (제1 융합 폴리펩타이드 및 제2 융합 폴리펩타이드)가 결합된 융합 폴리펩타이드 이량체를 제공한다. 상기 제1 융합 폴리펩타이드는 제1 면역글로불린의 Fc 영역 및 제1 GDF15 또는 이의 기능적 변이체를 포함하고, 제2 융합 폴리펩타이드는 제2 면역글로불린의 Fc 영역 및 제2 GDF15 또는 이의 기능적 변이체를 포함한다. 상기 이량체에 있어서, 제1 융합 폴리펩타이드와 제2 융합 폴리펩타이드는, 제1 GDF15 또는 이의 기능적 변이체와 제2 GDF15 또는 이의 기능적 변이체가 공유결합 (예컨대, 이황화결합 등)을 통하여 연결된 것일 수 있다. 또한, 상기 이량체에 있어서, 임의로, 제1 면역글로불린의 Fc 영역과 제2 제1 면역글로불린의 Fc 영역은 공유결합 (예컨대, 이황화결합 등) 또는 비공유결합 (예컨대, knob & hole, 정전기적 상호작용, 소수성 상호작용 등)을 통하여 서로 연결된 것일 수 있다 (도 1 참조). 상기 면역글로불린의 Fc 영역 및 GDF15 또는 이의 기능적 변이체는 앞서 설명한 바와 같으며, 제1 면역글로불린의 Fc 영역과 제2 면역글로불린의 Fc 영역, 및 제1 GDF15 또는 이의 기능적 변이체와 제2 GDF15 또는 이의 기능적 변이체는 각각 서로 같거나 다를 수 있다.
- [52] 일 예에서, 상기 융합 폴리펩타이드 이량체에 포함된 상기 제1 면역글로불린의 Fc 영역과 제2 면역글로불린의 Fc 영역, 및 제1 GDF15 또는 이의 기능적 변이체와 제2 GDF15 또는 이의 기능적 변이체, 및 이들이 연결되어 형성된 제1 융합 폴리펩타이드 및 제2 융합 폴리펩타이드는 각각 단일가닥(chain; 예컨대, 하나의 reading frame에 의하여 암호화되는 폴리펩타이드) 형태이고, 제1 면역글로불린의 Fc 영역과 제2 면역글로불린의 Fc 영역, 및 제1 GDF15 또는

이의 기능적 변이체와 제2 GDF15 또는 이의 기능적 변이체, 및 이들이 연결되어 형성된 제1 융합 폴리펩타이드 및 제2 융합 폴리펩타이드 중 하나 이상이 이량체 형태인 구조 (예컨대, 제1 또는 제2 융합 폴리펩타이드에 포함된 제1 또는 제2 면역글로불린의 Fc 영역이 2 가닥 (2 분자)가 이황화결합 등에 의하여 연결된 형태인 경우)는 배제된다.

- [53] GDF15의 이량체 구조에서 단량체의 N-말단은 다른 단백질과 융합(fusion)할 수 있도록 노출되어 있고, C-말단은 다른 단백질과 융합할 수 없는 위치에 있다. 따라서, GDF15 이량체 형태를 유지하면서 융합 폴리펩타이드를 형성하기 위하여, 융합 파트너 (즉, 면역글로불린의 Fc 영역)는 GDF15의 N-말단에 연결되는 것이 좋다.
- [54] GDF15는 이의 수용체인 GFRAL (GDNF family receptor alpha-like; 예컨대, GenBank Accession no. NP_997293.2)와 결합하여 GDF15-GFRAL 복합체 구조를 형성한다. 상기 복합체 구조에서, GDF15 단량체와 GFRAL 단량체가 각각 결합하고 있으며, GDF15의 N-말단은 GDF15 이량체의 중간 부분에 위치한다. GDF15에 융합할 수 있는 N-말단의 4개 아미노산 잔기는 X-ray 구조에서 관찰되지 않으므로, 특정한 구조를 하지 않는 것으로 예측된다. GDF15의 N-말단 14개 아미노산 잔기는 Cys7-Cys14 disulfide bond로 고정되어 있으며, GDF15 이량체 내의 단량체들 사이의 상호 작용(interaction)에 관여하지 않는다. 또한, GDF15의 N-말단의 14개 아미노산 잔기는 구조적으로 GFRAL 수용체와 상호 작용(결합)할 수 없는 거리에 위치하므로, GDF15의 N-말단 14개 아미노산 잔기가 결실되어도 GDF15가 GFRAL 수용체에 결합하는데 영향이 없을 것으로 예상된다.
- [55] GDF15 단량체는 분자 내 4개의 disulfide bonds와 이량체 분자 사이에 1개의 disulfide bond를 가지고 있다. 분자 내 disulfide bonds는 구조를 안정화하는 역할을 할 것으로 추정되며, Cys7-Cys14을 연결하는 disulfide bond는 단량체 구조의 가장 자리에 위치하고 N-말단의 loop 구조를 고정하는 역할을 한다. N-말단 14개 아미노산 잔기는 GFRAL 수용체 결합에 직접적인 역할을 하지 않으므로 이들 중 하나 이상을 제거하여도 GDF15의 기능 및 구조에 영향을 주지 않지만, Cys15는 Cys88와 disulfide bond를 형성하므로, Cys15를 제거할 경우 GDF15의 3차원 구조에 영향을 줄 수 있다. 따라서, GDF15의 기능 및 구조를 유지하면서 제거 가능한 부위는 N-말단의 14개 아미노산까지 (즉, 서열번호 1에서, Ala1부터 Cys14까지의 14개 아미노산 중 하나 이상, 예컨대, N-말단부터 순서대로 하나 이상 (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 또는 14개))일 수 있다. 일 예에서, GDF15 단량체는 야생형 (서열번호 1) 또는 야생형에서 N 말단의 14개 아미노산 결실된 형태 (Δ N14GDF15; 서열번호 2)일 수 있다.
- [56] wtGDF15 (서열번호 1) 또는 Δ N14GDF15 (서열번호 1에서 N 말단의 14개 아미노산 결실된 형태)와 이의 수용체인 GFRAL이 결합된 복합체 구조에서, wt(wild type)GDF15 N-말단(1-14번 아미노산 잔기) 부분은 Cys7-Cys14 disulfide

bond에 의해 고정되어 있으며, N-말단이 각각 왼쪽 아래 및 오른쪽 아래 방향으로 노출되어 있다. wtGDF15에서 N-말단 14개 아미노산을 제거한 경우 N-말단이 각각 왼쪽 위 및 오른쪽 위 방향으로 노출되어 있다.

- [57] 이러한 구조로 인하여 면역글로불린의 Fc 단백질을 GDF15와 융합시켜 융합 단백질을 형성하고자 할 때, N-말단의 14개 아미노산 잔기를 제거한 Δ N14GDF15과 Fc 단백질의 C-말단이 형태적으로 자연스럽게 연결될 수 있다 (도 3a 참고). 한편, wtGDF15의 경우 N-말단이 Fc 단백질과 연결하기에 다소 어려운 방향에 위치할 수 있다 (도 3b 참고).
- [58] Fc- Δ N14GDF15 또는 Fc-wtGDF15와 GFRAL가 결합한 복합체 구조에서, GDF15와 Fc는 기능적으로 dimer 형태이며, Fc- Δ N14GDF15의 경우 각각 Fc dimer 형성과 Δ N14GDF15 dimer 형성이 용이한 구조적 배열을 하고 있다. 따라서, Fc- Δ N14GDF15가 Fc-wtGDF15 보다 GFRAL과의 복합체 형성에 방해 받지 않으면서 이합체 형성 측면에서 유리할 수 있다.
- [59] 본 명세서에서 제공되는 융합 폴리펩타이드 또는 융합 폴리펩타이드 이량체에 포함된 GDF15 또는 이의 기능적 변이체의 포유류에서의 체내(혈중) 반감기는, 면역글로불린의 Fc 영역이 융합되지 않은 GDF15 또는 이의 기능적 변이체와 비교하여, 약 1.5배 이상, 약 2배 이상, 약 2.5배 이상, 약 3배 이상, 약 3.5배 이상, 약 4배 이상, 약 4.5배 이상, 약 5배 이상, 약 5.5배 이상, 약 6배 이상, 약 7배 이상, 약 8배 이상, 약 9배 이상, 또는 약 10배 이상 증가된 것일 수 있다.
- [60] 이와 같이, 증가된 GDF15 또는 이의 기능적 변이체 반감기에 의하여, 면역글로불린의 Fc 영역이 결합된 융합 폴리펩타이드 형태의 GDF15 또는 이의 기능적 변이체는, 면역글로불린의 Fc 영역이 연결되지 않은 형태의 GDF15 또는 이의 기능적 변이체와 비교하여, 투여 간격을 길게 가져갈 수 있다는 이점이 있다.
- [61]
- [62] 융합 폴리펩타이드의 생산
- [63] GDF15 또는 이의 기능적 변이체와 면역글로불린의 Fc 영역을 포함하는 융합 폴리펩타이드는 통상적인 화학적 합성 방법 또는 재조합적 방법에 의하여 생산된 것일 수 있으며, 천연 유래(naturally occurring)의 것이 아닐 수 있다.
- [64] 본 명세서에서, 용어 "벡터(vector)"는 숙주 세포에서 목적 유전자를 발현시키기 위한 발현 수단을 의미하는 것으로, 예컨대, 플라스미드 벡터, 코즈미드 벡터, 및 박테리오파아지 벡터, 아데노바이러스 벡터, 레트로바이러스 벡터 및 아데노-연관 바이러스 벡터와 같은 바이러스 벡터 등으로 이루어진 군에서 선택될 수 있다. 일 예에서, 상기 재조합 벡터에 사용될 수 있는 벡터는 플라스미드 (예컨대, pcDNA 시리즈, pSC101, pGV1106, pACYC177, ColE1, pKT230, pME290, pBR322, pUC8/9, pUC6, pBD9, pHC79, pIJ61, pLAFR1, pHV14, pGEX 시리즈, pET 시리즈, pUC19 등), 파지 (예컨대, λ gt4 λ B, λ -Charon, λ Δz1, M13 등) 또는 바이러스 (예컨대, SV40 등)를 기본으로 하여 제작될 수 있으나, 이에

제한되는 것은 아니다.

- [65] 상기 재조합 벡터에서 상기 융합 폴리펩타이드를 암호화하는 핵산 분자는 프로모터에 작동적으로 연결될 수 있다. 용어 "작동 가능하게 연결된(operatively linked)"은 핵산 발현 조절 서열(예를 들어, 프로모터 서열)과 다른 핵산 서열 사이의 기능적인 결합을 의미한다. 상기 조절 서열은 "작동 가능하게 연결(operatively linked)"됨으로써 다른 핵산 서열의 전사 및/또는 해독을 조절할 수 있다.
- [66] 상기 재조합 벡터는, 전형적으로 클로닝을 위한 벡터 또는 발현을 위한 발현 벡터로서 구축될 수 있다. 상기 발현 벡터는 당업계에서 식물, 동물 또는 미생물에서 외래의 단백질을 발현하는 데 사용되는 통상의 것을 사용할 수 있다. 상기 재조합 벡터는 당업계에 공지된 다양한 방법을 통해 구축될 수 있다.
- [67] 상기 재조합 벡터는 진핵 세포를 숙주로 하여 발현될 수 있다. 진핵 세포를 숙주로 발현시키고자 하는 경우에는, 재조합 벡터는, 발현시키고자 하는 핵산 분자 및 앞서 설명한 프로모터, 라이보솜 결합 자리, 분비 신호 서열(공개특허 제2015-0125402호 참조) 및/또는 전사/해독 종결 서열 이외에, 진핵 세포에서 작동하는 복제원점은 f1 복제원점, SV40 복제원점, pMB1 복제원점, 아테노 복제원점, AAV 복제원점, 및/또는 BBV 복제원점 등을 포함할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 또한, 포유동물 세포의 게놈으로부터 유래된 프로모터(예를 들어, 메탈로티오닌 프로모터) 또는 포유동물 바이러스로부터 유래된 프로모터(예를 들어, 아테노바이러스 후기 프로모터, 백시니아 바이러스 7.5K 프로모터, SV40 프로모터, 사이토메갈로바이러스 프로모터, 융합 프로모터 (KR 10-1038126 또는 KR 10-1868139), 또는 HSV의 tk 프로모터)가 이용될 수 있으며, 분비 신호 서열로서 통상적으로 사용 가능한 모든 분비 신호 서열을 사용할 수 있으며 예컨대, 공개특허 제2015-0125402호에 기재된 분비 신호 서열을 사용할 수 있으나 이에 제한되는 것은 아니며, 전사 종결 서열로서 폴리아데닐화 서열을 포함할 수 있다.
- [68] 상기 재조합 세포는 상기 재조합 벡터를 적절한 숙주 세포에 도입(형질전환 또는 형질감염)시킴으로써 얻어진 것일 수 있다. 상기 숙주세포는 상기 재조합 벡터를 안정적이면서 연속적으로 클로닝 또는 발현시킬 수 있는 모든 진핵 세포 중에서 선택될 수 있다. 숙주로 사용 가능한 진핵 세포로는, 효모(*Saccharomyces cerevisiae*), 곤충 세포, 식물 세포, 및 동물 세포 등이 있으며, 예를 들어, 마우스 (예컨대, COP, L, C127, Sp2/0, NS-0, NS-1, At20, 또는 NIH3T3), 래트 (예컨대, PC12, PC12h, GH3, 또는 MtT), 햄스터 (예컨대, BHK, CHO, GS 유전자 결함 CHO, 또는 DHFR 유전자 결함 CHO), 원숭이 (예컨대, COS (COS1, COS3, COS7 등), CV1 또는 Vero), 인간 (예컨대, HeLa, HEK-293, 망막-유래 PER-C6, 이배체 섬유모세포로부터 유래된 세포, 골수종 세포 또는 HepG2), 그 외 동물 세포 (예컨대, MDCK 등), 곤충세포 (예컨대, Sf9 세포, Sf21 세포, Tn-368 세포, BTI-TN-5B1-4 세포 등), 하이브리도마 등이 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

- [69] 본원 명세서에 제공되는 융합 폴리펩타이드를 암호화하는 핵산 분자를 앞서 설명한 적절한 숙주 세포에서 발현시킴으로써, 융합되지 않은 형태와 비교하여, 체내 안정성이 증진된 GDF15 또는 이의 기능적 변이체 또는 이를 포함하는 융합 폴리펩타이드 또는 융합 폴리펩타이드 이량체를 제조할 수 있다. 상기 융합 폴리펩타이드 또는 융합 폴리펩타이드 이량체의 제조 방법은 상기 핵산 분자를 포함하는 재조합 세포를 배양하는 단계를 포함할 수 있다. 상기 배양하는 단계는 통상적인 배양 조건에서 수행될 수 있다. 또한, 상기 제조 방법은 상기 배양하는 단계 이후에, 배양물로부터 융합 폴리펩타이드 또는 융합 폴리펩타이드 이량체를 분리 및/또는 정제하는 단계를 추가로 포함할 수 있다.
- [70] 상기 핵산 분자 또는 이를 포함하는 재조합 벡터의 숙주 세포 내로의 운반(도입)은, 당업계에 널리 알려진 운반 방법을 사용할 수 있다. 상기 운반 방법은 예를 들어, 숙주 세포가 진핵 세포인 경우에는, 미세 주입법, 칼슘 포스페이트 침전법, 전기 천공법, 리포좀-매개 형질감염법 및 유전자 밤바드먼트 등을 사용할 수 있으나, 이에 한정하지는 않는다.
- [71] 상기 형질 전환(재조합 벡터 도입)된 숙주 세포를 선별하는 방법은 선택 표지에 의해 발현되는 표현형을 이용하여, 당업계에 널리 알려진 방법에 따라 용이하게 실시할 수 있다. 예를 들어, 상기 선택 표지가 특정 항생제 내성 유전자인 경우에는, 상기 항생제가 함유된 배지에서 배양함으로써 재조합 벡터가 도입된 재조합 세포를 용이하게 선별할 수 있다.
- [72]
- [73] 의약 용도
- [74] 융합 폴리펩타이드, 융합 폴리펩타이드 이량체, 융합 폴리펩타이드 암호화 핵산 분자, 상기 핵산 분자를 포함하는 재조합 벡터, 및 상기 재조합 벡터를 포함하는 재조합 세포로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상을 포함하는, 체중 감소, 식이 조절 (식사량 감소), 또는 대사성 질병의 예방, 개선, 경감, 및/또는 치료용 조성물 (약학 조성물 또는 건강기능성 식품 조성물); 및/또는
- [75] 상기 융합 폴리펩타이드, 융합 폴리펩타이드 이량체, 융합 폴리펩타이드 암호화 핵산 분자, 상기 핵산 분자를 포함하는 재조합 벡터, 및 상기 재조합 벡터를 포함하는 재조합 세포로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 약학적 유효량을 대사성 질병의 예방, 개선, 경감, 및/또는 치료를 필요로 하는 대상에게 투여하는 단계를 포함하는, 체중 감소 방법, 식이 조절(식사량 감소) 방법, 또는 대사성 질병의 예방, 개선, 경감, 및/또는 치료 방법이 제공된다.
- [76] 상기 대사성 질병은 대사 장애로 인하여 유발되는 모든 질병을 의미하는 것으로, 비만, 당뇨병 (예컨대, 제 2형 당뇨병), 비알코올성 지방간 질환 (예컨대, 비알코올성 지방간염 (Nonalcoholic steatohepatitis; NASH) 등) 등으로 이루어진 군에서 선택된 것일 수 있다.
- [77] 본 명세서에서 사용된 바로서, 약학적 유효량은 소망하는 효과를 얻을 수 있는 유효성분의 함유량 또는 투여량을 의미한다. 상기 약학 조성물 내의 유효

성분(GDF15 또는 이의 기능적 변이체와 면역글로불린의 Fc 영역을 포함하는 융합 폴리펩타이드, 융합 폴리펩타이드 이량체, 융합 폴리펩타이드 암호화 핵산 분자, 상기 핵산 분자를 포함하는 재조합 벡터, 및 상기 재조합 벡터를 포함하는 재조합 세포로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상)의 함유량 또는 투여량은 제제화 방법, 투여 방식, 환자의 연령, 체중, 성, 병적 상태, 음식, 투여 시간, 투여 간격, 투여 경로, 배설 속도 및 반응 감응성과 같은 요인들에 의해 다양하게 처방될 수 있다. 예컨대, 상기 유효성분의 1회 투여량은 0.001 내지 1000 mg/kg, 0.01 내지 100 mg/kg, 0.01 내지 50 mg/kg, 0.01 내지 20 mg/kg, 0.01 내지 10mg/kg, 0.01 내지 5mg/kg, 0.1 내지 100 mg/kg, 0.1 내지 50 mg/kg, 0.1 내지 20 mg/kg, 0.1 내지 10mg/kg, 0.1 내지 5mg/kg, 1 내지 100 mg/kg, 1 내지 50 mg/kg, 1 내지 20 mg/kg, 1 내지 10mg/kg, 또는 1 내지 5mg/kg 범위일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 다른 예에서, 약학 조성물 내 유효 성분의 함량은, 전체 약학 조성물 중량 기준으로, 0.01중량% 내지 99.9중량%, 0.01중량% 내지 90중량%, 0.01중량% 내지 80중량%, 0.01중량% 내지 70중량%, 0.01중량% 내지 60중량%, 0.01중량% 내지 50중량%, 0.01중량% 내지 40중량%, 0.01중량% 내지 30중량%, 1중량% 내지 99.9중량%, 1중량% 내지 90중량%, 1중량% 내지 80중량%, 1중량% 내지 70중량%, 1중량% 내지 60중량%, 1중량% 내지 50중량%, 1중량% 내지 40중량%, 1중량% 내지 30중량%, 5중량% 내지 99.9중량%, 5중량% 내지 90중량%, 5중량% 내지 80중량%, 5중량% 내지 70중량%, 5중량% 내지 60중량%, 5중량% 내지 50중량%, 5중량% 내지 40중량%, 5중량% 내지 30중량%, 10중량% 내지 99.9중량%, 10중량% 내지 90중량%, 10중량% 내지 80중량%, 10중량% 내지 70중량%, 10중량% 내지 60중량%, 10중량% 내지 50중량%, 10중량% 내지 40중량%, 또는 10중량% 내지 30중량%일 수 있다.

[78] 본 명세서에서 제공되는 유효 성분 또는 이를 포함하는 약학 조성물의 투여 간격 (인접한 2회 투여간 시간적 간격)은 유효성분의 농도 또는 상태 (변이 여부 등), 또는 환자의 상태 또는 증세 등에 따라서 조절 가능하며, 예컨대, 2일 이상, 3일 이상, 4일 이상, 5일 이상, 6일 이상, 7일 이상, 8일 이상, 9일 이상, 10일 이상, 2주 이상, 3주 이상, 4주 이상, 6주 이상, 8주 이상, 10주 이상, 또는 12주 이상일 수 있다. 최대 투여 간격은 약 2주, 약 3주, 약 4주, 약 1개월, 약 2개월, 또는 약 3개월일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니며, 유효성분의 농도 또는 상태 (변이 여부 등), 또는 환자의 상태 또는 증세 등에 따라서 증감 가능하다. 일 구체예에서, 상기 투여 간격을 약 1주일 내지 약 3개월 내에서 적절하게 처방할 수 있다.

[79] 또한, 상기 약학 조성물은, 상기 유효 성분 이외에, 약학적으로 허용 가능한 담체를 추가로 포함할 수 있다. 상기 담체는 단백질, 핵산, 또는 세포를 포함하는 약물의 제제화에 통상적으로 이용되는 것으로서, 락토스, 텍스트로스, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 전분, 아카시아 고무, 인산 칼슘, 알기네이트, 젤라틴, 규산 칼슘, 미세결정성 셀룰로스, 폴리비닐피롤리돈, 셀룰로스, 물, 시럽, 메틸 셀룰로스,

메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 활석, 스테아르산 마그네슘, 미네랄 오일 등으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 상기 약학 조성물은 또한 약학 조성물 제조에 통상적으로 사용되는 희석제, 부형제, 율활제, 습윤제, 감미제, 향미제, 유화제, 현탁제, 보존제 등으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상을 추가로 포함할 수 있다.

- [80] 상기 약학 조성물의 투여 대상은 인간, 원숭이 등을 포함하는 영장류, 마우스, 래트 등을 포함하는 설치류 등을 포함하는 포유류, 또는 이들로부터 유래하는 세포, 조직, 세포 배양물 또는 조직 배양물일 수 있다.
- [81] 상기 약학 조성물은 경구 투여 또는 비경구적 투여에 의하여 투여되거나, 세포, 조직, 또는 체액에 접촉시킴으로써 투여되는 것일 수 있다. 구체적으로, 비경구 투여인 경우에는 피하 주입, 근육 주입, 정맥내 주입, 복강 주입, 내피 투여, 국소 투여, 비내 투여, 폐내 투여 및 직장내 투여 등으로 투여할 수 있다. 경구 투여시, 단백질 또는 펩타이드는 소화되기 때문에 경구용 조성물은 활성 약제를 코팅하거나 위에서의 분해로부터 보호되도록 제형화 되어야 한다.
- [82] 또한 상기 약학 조성물은 오일 또는 수성 매질중의 용액, 현탁액, 시럽제 또는 유화액 형태이거나 엑스제, 산제, 과립제, 정제 또는 캡슐제 등의 형태로 제형화될 수 있으며, 제형화를 위하여 분산제 또는 안정화제를 추가적으로 포함할 수 있다.
- [83] 다른 예는 GDF15 또는 이의 기능적 변이체와 면역글로불린의 Fc 영역을 융합(또는 연결 또는 결합)시키는 단계를 포함하는, GDF15 또는 이의 기능적 변이체의 생체 지속 기간을 증가시키는 방법을 제공한다. 일 구체예에서, 상기 융합시키는 단계는 GDF15 또는 이의 기능적 변이체의 N 말단에 면역글로불린의 Fc 영역을 링커를 통하거나 통하지 않고 융합(또는 연결 또는 결합)시키는 단계를 포함할 수 있다. 다른 예는 GDF15 또는 이의 기능적 변이체와 면역글로불린의 Fc 영역을 유연성 링커를 통하여 융합(또는 연결 또는 결합)시키는 단계를 포함하는, GDF15, 면역글로불린의 Fc 영역, 또는 이들을 포함하는 융합 폴리펩타이드의 면역원성을 감소시키는 방법을 제공한다. 상기 유연성 링커는 앞서 설명한 바와 같다. 상기 융합(또는 연결 또는 결합)시키는 단계는 생체 외(in vitro)에서 진행되는 것일 수 있다.

[84]

발명의 효과

- [85] 본 명세서에서 제공되는 면역글로불린의 Fc 영역과 융합된 GDF15 또는 이의 기능적 변이체는, 면역글로불린의 Fc 영역과 융합되지 않은 경우와 비교하여, 체내 투여시 지속 기간이 길어서 투여 간격을 늘릴 수 있고 이를 통하여 투여 용량을 줄일 수 있으므로, 투여 편의성 및/또는 경제적 측면에서 유리한 효과를 가지며, 약리 효과도 우수하므로, GDF15 또는 이의 기능적 변이체 치료가

필요한 분야에 유용하게 적용될 수 있다.

[86]

도면의 간단한 설명

[87] 도 1은 일 실시예에 따른 융합 폴리펩타이드의 모식도이다.

[88] 도 2는 GDF15 (야생형; mature form; 서열번호 1)의 아미노산 서열을 보여준다 (N-말단에서 C-말단 방향).

[89] 도 3a 및 3b는 Fc-ΔN14GDF15 (3a) 또는 Fc-wtGDF15 (3b)와 GFRAL가 결합한 복합체 구조를 보여준다.

[90] 도 4는 실시예에 따른 융합 폴리펩타이드 유전자를 개략적으로 보여주는 모식도이다.

[91] 도 5는 IgG1-GDF (CRL) 투여군과 HIgG1-GDF (CRL) 투여군의 체중 변화를 보여주는 그래프이다.

[92] 도 6은 IgG1-GDF (CRL) 투여군과 HIgG1-GDF (CRL) 투여군의 투여 후 7일째의 체중변화율을 보여주는 그래프이다.

[93] 도 7은 IgG4-GDF15 투여군과 IgG4-GDF(CRL) 투여군의 체중 변화를 보여주는 그래프이다.

[94] 도 8은 IgG4-GDF15 투여군과 IgG4-GDF(CRL) 투여군의 7일째 (파란 막대)와 14일째(붉은 막대)의 체중변화율을 보여주는 그래프이다.

[95] 도 9는 IgG1-GDF (CRL) 투여군과 HIgG1-GDF (CRL) 투여군의 투여 후 7일째까지의 누적 사료 섭취량을 보여주는 그래프이다.

[96] 도 10은 IgG4-GDF15 투여군과 IgG4-GDF(CRL) 투여군의 투여 후 7일째까지, 14일째, 및 19일째까지의 누적 사료 섭취량을 보여주는 그래프이다.

[97] 도 11은 융합 폴리펩타이드 투여 후, 경과 시간에 따른 혈중(혈청 내) 융합 폴리펩타이드 농도 변화를 보여주는 그래프이다.

[98]

발명의 실시를 위한 형태

[99] 이하 본 발명을 다음의 실시예에 의하여 보다 구체적으로 설명하고자 한다. 그러나 이들은 본 발명을 예시하기 위한 것일 뿐이며, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의하여 제한되는 것은 아니다.

[100]

[101] 실시예 1: 융합 폴리펩타이드의 제조

[102] 1.1. 융합 폴리펩타이드를 암호화하는 유전자의 클로닝 및 배양

[103] Hinge가 포함되거나 포함되지 않은 면역글로불린 Fc (IgG1-Fc (хин지 불포함: 서열번호 3; HIgG1-Fc (хин지 포함; [서열번호 4]-[서열번호 3]), Mutated IgG4-Fc (хин지 불포함; 서열번호 7) 또는 Mutated HIgG4-Fc (хин지 포함; [서열번호 12]-[서열번호 7])가 목적 폴리펩타이드인 Mature GDF15 (GDF 또는 GDF15로 표시; 서열번호 1), 또는 GDF15 변이체 (GDF(CRL)로 표시; N 말단 14개

아미노산 결실: 서열번호 2)와 융합된 융합 폴리펩타이드 IgG1-GDF(CRL), HIgG1-GDF(CRL), IgG4-GDF, HIgG4-GDF, IgG4-GDF(CRL), 및 HIgG4-GDF(CRL) (도 1 참조)를 제조하였다. 상기 융합 폴리펩타이드에 포함된 각 부분의 아미노산 서열을 아래의 표 2, 표 3 및 표 4에 정리하였다.

[104] [Table 2]

IgG1-GDF(CRL) (힌지 불포함) & HIgG1-GDF(CRL) (힌지 포함) (N-말단에서 C-말단 방향)

		아미노산 서열	서열 번호
Signal Peptide		MHRPEAMLLL LTLALLGGPT WA	17
IgG1 Fc	Hinge	DKTHTCPPCP	4
	CH2-CH 3	APELLGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED PEVKFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQYNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALPA PIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSRDELTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTTTPVLDS DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG NVFSCSV MHE ALHNHYTQKS LSLSPG	3
Linker		GGGGSGGGGS GGGSGGGGS	18
GDF(CRL)		CRLHTVRASL EDLGWADWVL SPREVQVTMC IGACPSQFRA ANMHAQIKTS LHRLKPDTVP APCCVPASYN PMVLIQKTDG GVS LQTYDDL LAKDCHCI	2

[105] [Table 3]

IgG4-GDF15 (힌지 불포함) & HIgG4-GDF15 (힌지 포함) (N-말단에서 C-말단
방향)

		아미노산 서열	서열번호
Signal Peptide		MHRPEAMLLL LTLALLGGPT WA	17
Mutated IgG4 Fc	Hinge	ESKYGPPCPP CP	12
	CH2-CH 3	APEAAGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSQED PEVQFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQFNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKGLPS SIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSQEEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTTTPVLDS DGSFFLYSRL TVDKSRWQEG NVFSCSVMHE ALHNHYTQKS LSLSLG	7
Linker		GGGGSGGGGS GGGGSGGGGS	18
GDF15		ARNGDHCPLG PGRCCRLHTV RASLEDLGWA DWVLSPREVQ VTMCIACPS QFRAANMHAQ IKTSLHRLKP DTVPAPCCVP ASYNPMVLIQ KTDGTGVSQT YDDLAKDCH CI	1

[106] [Table 4]

IgG4-GDF(CRL) (힌지 불포함) & HIgG4-GDF(CRL) (힌지 포함) (N-말단에서 C-말단 방향)

		아미노산 서열	서열 번호
Signal Peptide		MHRPEAMLLL LTLALLGGPT WA	17
Mutated IgG4 Fc	Hinge	ESKYGPPCPP CP	12
	CH2-CH 3	APEAAGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSQED PEVQFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQFNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKGLPS SIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSQEEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTTTPVLDS DGSFFLYSRL TVDKSRWQEG NVFSCSVMHE ALHNHYTQKS LSLSLG	7
Linker		GGGSGGGGS GGGSGGGGS	18
GDF15(CRL)		CRLHTVRASL EDLGWADWVL SPREVQVTMC IGACPSQFRA ANMHAQIKTS LHRLKPDTVP APCCVPASYN PMVLIQKTDG GVS LQTYDDL LAKDCHCI	2

[107]

[108] **1.1.1 재조합 발현 벡터의 제조**[109] **1.1.1.1. Mature GDF15**

[110] Mature GDF15를 Encoding하는 유전자를 얻기 위해 UniprotKB Q99968의 아미노산을 참고하여 Mature GDF15를 암호화 하는 유전자 (서열번호 14)를 바이오니아에서 합성 하였다.

[111] 서열번호 14 (339bp)

[112] 1 GCCCGGAACG GCGACCACTG CCCCCTGGGG CCCGGACGGT GC
TGCCGGCT

[113] 51 GCACACCGTG CGGGCCTCCC TGGAGGACCT GGGCTGGGCC
GA CTGGGTGC

[114] 101 TGTCCCAAG GGAGGTGCAA GTGACCATGT GCATCGGCGC
CTGCCCATCT

[115] 151 CAGTTCCGGG CCGCCAACAT GCACGCTCAG ATCAAGACCA
GCCTGCACCG

[116] 201 GCTGAAGCCC GACACCGTGC CCGCCCCCTG CTGCGTGCCC

GCCTCCTACA

[117] 251 ACCCCATGGT GCTGATTCAG AAGACCGACA CCGGCGTGAG
CCTGCAGACC

[118] 301 TACGACGACC TGCTGGCCAA GGACTGCCAC TGCATCTAA

[119] (*밑줄친 부분이 GDF (CRL)임)

[120]

[121] **1.1.1.2. IgG1-Fc**

[122] Hinge를 포함한 인간 IgG1 Fc를 Coding하는 유전자 또는 Hinge를 포함하지 않은 인간 IgG1 Fc를 Coding하는 유전자는 인간 IgG1의 core Hinge와 IgG1 Fc를 Coding하는 유전자를 포함하고 있는 플라스미드를 이용하여 PCR을 통해 얻었다.

[123] 서열번호 15 (678bp)

[124] 1 GACAAACTC ACACATGCCC ACCGTGCCCCA GCACCTGAAC
TCCTGGGGGG

[125] 51 ACCGTCAGTC TTCCTCTTCC CCCCAAACC CAAGGACACC
CTCATGATCT

[126] 101 CCCGGACCCC TGAGGTCACA TGCGTGGTGG TGGACGTGAG
CCACGAAGAC

[127] 151 CCTGAGGTCA AGTTCAACTG GTACGTGGAC GGC GTGGAGG
TGCATAATGC

[128] 201 CAAGACAAAG CCGCGGGAGG AGCAGTACAA CAGCACGTAC
CGTGTGGTCA

[129] 251 GCGTCCTCAC CGTCCTGCAC CAGGACTGGC TGAATGGCAA
GGAGTACAAG

[130] 301 TGCAAGGTCT CCAACAAAGC CCTCCCAGCC CCCATCGAGA
AAACCATCTC

[131] 351 CAAAGCCAAA GGGCAGCCCC GAGAACCACA GGTGTATACC
CTGCCCCCAT

[132] 401 CCCGGGATGA GCTGACCAAG AACCAGGTCA GCCTGACCTG
CCTGGTCAAA

[133] 451 GGCTTCTATC CCAGCGACAT CGCCGTGGAG TGGGAGAGCA
ATGGGCAGCC

[134] 501 GGAGAACAAC TACAAGACCA CGCCTCCCGT GCTGGACTCC
GACGGCTCCT

[135] 551 TCTCCTCTA CAGCAAGCTC ACCGTGGACA AGAGCAGGTG
GCAGCAGGGG

[136] 601 AACGTCTTCT CATGCTCCGT GATGCATGAG GCTCTGCACA
ACCACTACAC

- [137] 651 GCAGAAGAGC CTCTCCCTGT CTCCGGGT
[138] (*밑줄친 부분이 IgG1 Core Hinge를 coding하는 유전자임)
[139]
[140] **1.1.1.3. IgG4-Fc**
[141] Hinge를 포함한 인간 IgG4 Fc를 Coding하는 유전자 또는 Hinge를 포함하지 않은 인간 IgG4 Fc를 Coding하는 유전자는 인간 IgG4의 Hinge와 IgG4 Fc를 Coding하는 유전자를 포함하고 있는 플라스미드를 이용하여 PCR을 통해 얻었다.
[142] 서열번호 16 (684bp)
[143] 1 GAGTCCAAAT ATGGTCCCC ATGCCACCC TGCCCAGCAC
CTGAGGCCGC
[144] 51 CGGGGGACCG TCAGTCTTCC TCTTCCCCC AAAACCCAAG
GACACCCTCA
[145] 101 TGATCTCCCG GACCCCTGAG GTCACGTGCG TGGTGGTGGA
CGTGTCCAG
[146] 151 GAGGACCCCG AGGTGCAGTT CAACTGGTAC GTGGACGGCG
TGGAGGTGCA
[147] 201 CAACGCCAAG ACCAAGCCCC GGGAGGAGCA GTTCAACTCC
ACCTACCGGG
[148] 251 TGGTGTCCGT GCTGACCGTG CTGCACCAGG ACTGGCTGAA
CGGCAAGGAG
[149] 301 TACAAGTGCA AGGTGTCCAA CAAGGGCCTG CCCTCCTCCA
TCGAGAAGAC
[150] 351 CATCTCCAAG GCCAAGGGCC AGCCCCGGGA GCCCCAGGTG
TACACCCTGC
[151] 401 CCCCTCCCA GGAGGAGATG ACCAAGAACC AGGTGTCCCT
GACCTGCCTG
[152] 451 GTGAAGGGCT TCTACCCCTC CGACATCGCC GTGGAGTGGG
AGTCCAACGG
[153] 501 CCAGCCCGAG AACAACTACA AGACCACCCC CCCCCTGCTG
GACTCCGACG
[154] 551 GCTCCTTCTT CCTGTACTCC CGGCTGACCG TGGACAAGTC
CCGGTGGCAG
[155] 601 GAGGGCAACG TGTTCTCCTG CTCCGTGATG CACGAGGCCC
TGCACAACCA
[156] 651 CTACACCCAG AAGTCCCTGT CCCTGTCCCT GGGC
[157] (*밑줄친 부분이 IgG4 Hinge를 coding하는 유전자임)
[158]

- [159] **1.1.1.4. 발현벡터의 제조**
- [160] pcDNA3.1(+) (Invitrogen, Cat. No. V790-20)의 변형체인 pDHDD-D1G1 (KR10-1868139B1의 Promoter를 포함하고 있음)을 BamHI과 NotI으로 자르고 여기에 상기의 유전자들 (mature GDF15, IgG1-Fc, IgG4-Fc)을 조합하여 하기의 구조 (도 4 참조)를 가진 유전자를 삽입하여 각각의 재조합 벡터를 준비하였다.
- [161] pHIgG1-GDF(CRL)
- [162] '(N-말단)-[BamHI 제한 부위-시그널 펩타이드 (서열번호 17)-IgG1 Core Hinge (서열번호 4)-IgG1 CH2-CH3 (서열번호 3)-GS Linker (서열번호 18)-GDF (CRL) (서열번호 2)- NotI 제한 부위]-(C-말단)'
- [163] pIgG1-GDF(CRL)
- [164] '(N-말단)-[BamHI 제한 부위-시그널 펩타이드 (서열번호 17)-IgG1 CH2-CH3 (서열번호 3)-GS Linker (서열번호 18)-GDF (CRL) (서열번호 2)- NotI 제한 부위]-(C-말단)'
- [165] pHIgG4-GDF15
- [166] '(N-말단)-[BamHI 제한 부위-시그널 펩타이드 (서열번호 17)-IgG4 Hinge (서열번호 12)-IgG4 CH2-CH3 (서열번호 7)-GS Linker (서열번호 18)-GDF15 (서열번호 1)- NotI 제한 부위]-(C-말단)'
- [167] pIgG4-GDF15
- [168] '(N-말단)-[BamHI 제한 부위-시그널 펩타이드 (서열번호 17)-IgG4 CH2-CH3 (서열번호 7)-GS Linker (서열번호 18)-GDF15 (서열번호 1)- NotI 제한 부위]-(C-말단)'
- [169] pHIgG4-GDF(CRL)
- [170] '(N-말단)-[BamHI 제한 부위-시그널 펩타이드 (서열번호 17)-IgG4 Hinge (서열번호 12)-IgG4 CH2-CH3 (서열번호 7)-GS Linker (서열번호 18)-GDF(CRL) (서열번호 2)- NotI 제한 부위]-(C-말단)'
- [171] pIgG4-GDF(CRL)
- [172] '(N-말단)-[BamHI 제한 부위-시그널 펩타이드 (서열번호 17)- IgG4 CH2-CH3 (서열번호 7)-GS Linker (서열번호 18)-GDF(CRL) (서열번호 2)- NotI 제한 부위]-(C-말단)'
- [173]
- [174] **1.1.2. 융합 폴리펩타이드를 암호화하는 유전자의 배양**
- [175] 상기 준비된 재조합 발현 벡터 pHIgG1-GDF(CRL), pIgG1-GDF(CRL), pHIgG4-GDF(CRL), pIgG4-GDF(CRL), pHIgG4-GDF 및 pIgG4-GDF를 ExpiCHO-STM 세포 (Thermo Fisher Scientific)에 도입하고 ExpiCHO Expression Medium (Thermo Fisher Scientific; 400 mL)에서 12일 동안 배양(Fed-Batch Culture; Day 1 & Day 5 Feeding)하여, 상기 융합 폴리펩타이드 HIgG1-GDF(CRL), IgG1-GDF(CRL), HIgG4-GDF(CRL), IgG4-GDF(CRL), HIgG4-GDF 및 IgG4-GDF를 발현시켰다.
- [176]

- [177] **1.2. 융합 폴리펩타이드의 정제**
- [178] 단백질 A 친화 크로마토그래피(Protein A Affinity Chromatography)를 이용하여 상기 실시예 1.1에서 준비된 세포 배양물로부터 융합 폴리펩타이드를 정제하였다.
- [179] 우선, 세포가 제거된 융합 폴리펩타이드의 배양액을 0.22 μ m 필터로 여과하였다. MabSelect SuRe™ pcc (GE Healthcare Life Sciences) 레진이 패킹되어 있는 컬럼을 AKTA™ Pure (GE Healthcare Life Sciences)에 장착하고, Phosphate Buffered Saline(PBS, 10 mM Sodium Phosphate, 150 mM NaCl, pH 7.4)을 흘려주어 컬럼을 평형화였다. 0.22 μ m 필터로 여과된 배양액을 상기 평형화된 컬럼에 주입한 후, 다시 PBS를 흘려주어 컬럼을 세척하였다. 컬럼의 세척 작업이 끝난 후 용출 버퍼 (0.1 M Sodium Citrate pH 3.5)를 컬럼에 흘려주어 목적 융합 폴리펩타이드를 용출시켰다. 용출액은 즉시 1 M Tris pH 8.5를 부가하여 중성 pH가 되도록 하였다. 용출 분획 중 융합 폴리펩타이드의 농도가 높고 순도가 높은 분획을 모아서 냉동 보관하였다.
- [180] 동물실험을 위하여, Amicon Ultra Filter Device (MWCO 10K, Merck)와 원심분리기를 이용하여, 상기 융합 폴리펩타이드를 포함하는 용출 분획 시료를 PBS 또는 20 mM Tris pH 8.0, 150 mM NaCl로 농축 및 버퍼교환을 실시하였다.
- [181] 융합 폴리펩타이드의 정량 분석은 UV Spectrophotometer (G113A, Agilent Technologies)에서 280 nm와 340 nm의 흡광도를 측정하고, 아래의 계산식을 통해 단백질 농도를 산정하여 수행하였다. 각 물질의 흡광계수는 아미노산 서열을 이용하여 이론적으로 계산된 값 (표 5)을 사용하였다.
- [182]
$$\text{단백질농도 (mg / mL)} = \frac{\text{Absorbance (A}_{280\text{ nm}} - \text{A}_{340\text{ nm}})}{\text{*Extinction Coefficient}} \times \text{Dilution Factor}$$
- [183] * Extinction coefficient (0.1%): 단백질의 농도가 0.1% (1g/L)이고, Primary Sequence상의 모든 Cysteine이 산화되어 Disulfide bond를 형성한다고 가정할 때, 280nm에서의 이론적인 흡광도로서, ProtParam tool (<https://web.expasy.org/protparam/>)을 통해 계산됨.
- [184] [Table 5]
융합 폴리펩타이드의 흡광 계수

시료명	흡광계수 (0.1%, 1 mg/mL)
IgG1-GDF (CRL)	1.317
HIgG1-GDF (CRL)	1.22
IgG4-GDF (CRL)	1.334
IgG4-GDF	1.287

- [185] 실시예 2. 융합 폴리펩타이드의 약리 효과 (in vivo)
- [186] **2.1. 시험 과정**

- [187] 상기 실시예 1에서 생산 및 정제된 융합 폴리펩타이드의 약리 효과를 mouse (C57BL/6J, 6주령, 수컷, 100마리; 라온바이오㈜)에서 시험하였다.
- [188] 본 실시예에서는 상기 C57BL/6J 마우스에 high-fat diet를 8주간 급여하여 비만을 유도한 DIO 마우스 모델 (Mouse, C57BL/6J -DIO, 수컷, 100마리, 14주령 (비만사료 8주간 급여))을 사용하였다. 상기 DIO 마우스 모델은 고지혈, 인슐린 저항성, 고혈당 등 제2형 당뇨병의 임상적 특징을 보이기 때문에 당뇨병 및 인슐린 저항성 개선 효능 평가에 널리 사용되는 동물 모델이며, 비만, 당뇨 및 고지혈증 등과 같은 대사성 질환 연구를 위해 비교할만한 기초자료가 많이 축적되어 있어서, 본 실시예의 약리 효과 시험에 적절하여, 이 모델을 선택하였다.
- [189] 상기 8주간 비만사료를 급여한 마우스 모델에 대하여 2주간의 검역 및 순화기간을 거치며, 이 기간 중 매일 1회 일반증상을 관찰하여 건강하고 실험의 실시예 적합성 여부를 확인하여 건강한 동물을 선별하였다. 순화기간 중에는 입수 시에 동물의 꼬리에 적색 유성펜을 이용하여 개체표시 (tail marking)를 하고, 사육상자에는 검역 순화기간 중 입시 개체식별카드 (시험명, 개체번호, 입고시기)를 부착하였다. 군 분리 시에 동물의 꼬리에 검정색 유성펜을 이용하여 개체표시를 하고 각 케이지상에 개체식별카드 (시험명, 군정보, 개체번호, 성별, 입고시기, 투여기간)를 부착하였다.
- [190] 시험물질(융합 폴리펩타이드)의 피하 투여로 실험동물이 받는 스트레스를 최소화하기 위하여, 시험물질 투여 3일전부터 1 mL 주사기를 이용하여 모든 동물에 멸균 증류생리식염수를 200 uL/head로 피하 투여하여, 피하 투여에 대한 사전 적응 훈련을 실시하였다.
- [191] 검역 및 순화 기간 중 이상이 발견되지 않은 건강한 동물들은 순화기간 종료 후 전 개체를 대상으로 체중 및 사료 섭취량을 측정하였다.
- [192] 체중 및 사료 섭취량을 측정하고 체중을 기준으로 그룹간 두 가지 측정값의 평균이 유사하도록 군 분리를 실시하였다. 시험물질 투여는 군 분리 다음날부터 개시하였다. 선택되지 않은 잔여동물은 군 분리 종료 후 시험계로부터 제외시켰다.
- [193] 상기 C57BL/6J -DIO에 급여되는 고지방 사료 (비만사료; High fat diet (HFD))의 정보는 다음과 같다:
- [194] 5.24 kcal/g, 지방 60 중량%, 단백질 20 중량%, 및 carbohydrate-derived calories 20 중량%; Research Diet Inc., U.S.A.; Product No. High fat diet (Fat 60 kcal%, D12492).
- [195] 상기 사료는 자유 급여 (순화 및 시험기간 동안 급여) 방식으로 급여하였다.
- [196] 음수 방식은, 상수도수를 필터유수살균기로 여과 후 자외선을 조사하고, 폴리카보네이트 재질의 음수병 (250 mL)을 이용하여 자유 섭취시켰다.
- [197]
- [198] **2.1.1. HIgG1-GDF (CRL) and IgG1-GDF(CRL)**
- [199] 시험 물질 (HIgG1-GDF(CRL)과 IgG1-GDF(CRL))과 대조물질 GDF15 (R&D

Systems) 투여는 군 분리한 후 다음날부터 실시하고 투여시간은 매일 오전 9시에 실시하였다. 대조물질 및 시험 물질 모두 피하투여를 실시하였다. 상기 대조 물질 및 시험물질의 투여 경로는 임상 예정 투여 경로에 따라서 피하 경로를 선택하였다.

[200] 대조물질 및 시험물질 모두 투여액량을 5 mL/kg으로 하고 개체 별 투여액량은 최근에 측정한 체중을 기준으로 산출하고 일회용 주사기 (1 mL)을 이용하여 시험 시작일 1회 피하 내로 주사 투여하였다. 시험물질은 시험 시작일 1회만 투여하였다. 비교를 위하여, 대조물질 GDF15 를 투여한 대조군을 준비하였으며, GDF15를 투여한 비교군의 경우 1일 1회씩 5일간 총 5회 투여하였고, 모든 투여는 오전 9시부터 진행하였다.

[201] 시험군 구성 및 투여용량 등을 하기 표 6에 정리하였다:

[202] [Table 6]

IgG1-GDF (CRL) 융합 폴리펩타이드 투여군 구성

High Fat Diet	시험물질	투여 경로	투여용량 (nmol/kg)	투여볼륨 (mL/kg)	동물수
X	Vehicle	피하	-	5	5
O	Vehicle, qd	피하	-	5	5
O	Vehicle, qw	피하	-	5	5
O	GDF15	피하	2.86	5	3
O	IgG1-GDF (CRL)	피하	1	5	5
O	IgG1-GDF (CRL)	피하	10	5	5
O	HIgG1-GDF (CRL)	피하	1	5	5
O	HIgG1-GDF (CRL)	피하	10	5	5

[203] 상기 시험군에 대한 관찰, 측정 및 검사 일정은 투여개시일을 Day 0으로 하고, 투여 개시일부터 7일간을 투여 1주로 하였다.

[204] 상기 검사 일정을 표 7에 정리하였다:

- [205] [Table 7]
검사 일정

관찰항목	순화기간(week)		기간(day)							
	1	2	0	1	2	3	4	5	6	7
고지방 사료 급여	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
경구 및 피하 투여 적응		●								
투여			●							
체중측정		●	●	●	●	●	●	●	●	●
사료섭취량 측정			●	●	●	●	●	●	●	●

- [206] 모든 동물에 대하여 1 일 1 회 일반 임상 증상을 관찰하고, 1 일 2 회 빈사 및 사망동물의 유무를 확인하였으며, 이러한 관찰은 투여 1일부터 투여 종료 시까지 실시하였다. 관찰 시 이상증상이 있을 경우에만 기록지에 기록하였다.
- [207] 시험물질 투여 개시일(투여 전)에 각 마우스의 체중을 측정하고, 그 이후 매일 체중을 측정하였다(최대 9일까지 측정). 시험물질 투여액은 가장 최근에 측정한 체중을 기준으로 결정하였다.
- [208] 또한, 마우스에 시험물질 투여 후, 매일 사료섭취량을 측정하였으며, 사육상자 별로 전자저울을 이용하여 급여량을 측정한 후 잔량을 측정하여 1일 사료섭취량을 계산하였다. 사료를 심하게 갉아먹는 개체의 경우 측정에서 제외하였다.
- [209] 본 실시예에서 얻어진 모든 실험 결과는 평균치 $\pm$ 표준오차로 표시하고 Prism5 (version 5.01)를 사용하여 검정하였다. 모든 자료들에 대해 one-way analysis of variance(ANOVA)를 실시하여 유의성이 관찰되면 대조군과의 유의차가 있는 시험군을 알아내기 위하여 Dunnett's test를 실시하였다 (유의수준: 양측 5% 및 1%, 0.1%).
- [210]
- [211] **2.1.2. IgG4-GDF and IgG4-GDF (CRL)**
- [212] 시험 물질 (IgG4-GDF 와 IgG4-GDF(CRL))과 대조물질 Semaglutide (Bachem) 모두 피하투여를 실시하였다. 대조물질 및 시험물질 모두 투여액을 5 mL/kg으로 하고 개체 별 투여액은 최근에 측정한 체중을 기준으로 산출하고 일회용 주사기 (1 mL)을 이용하여 시험 시작일 1회 피하 내로 주사 투여하였다. 시험물질은 시험 시작일 1회만 투여하였고, 비교를 위하여, 대조물질 Semaglutide 를 투여한 대조군을 준비하였으며, Semaglutide 를 투여한 비교군의 경우 1일 1회씩 매일 투여하였으며, 모든 투여는 오전 9시부터 진행하였다.

[213] 시험군 구성 및 투여용량 등을 하기 표 8에 정리하였다:

[214] [Table 8]

IgG4-GDF15 융합 폴리펩타이드 투여군 구성

High Fat Diet	시험물질	투여경로	투여용량 (nmol/kg)	투여볼륨 (mL/kg)	동물수
O	Vehicle, qw	피하	-	5	5
O	Semaglutide, qd	피하	3	5	5
O	IgG4-GDF	피하	1	5	5
O	IgG4-GDF	피하	10	5	5
O	IgG4-GDF (CRL)	피하	1	5	5
O	IgG4-GDF (CRL)	피하	10	5	5

[215] 상기 시험군에 대한 관찰, 측정 및 검사 일정은 투여개시일을 Day 0으로 하고, 2.1.1항과 동일하게 실시하였다.

[216] 시험물질 투여 개시일(투여 전)에 각 마우스의 체중을 측정하고, 그 이후 매일 체중을 측정하였다(최대 19일까지 측정). 시험물질 투여액량은 가장 최근에 측정한 체중을 기준으로 결정하였다.

[217] 또한, 마우스에 시험물질 투여 후, 매일 사료섭취량을 측정하였으며, 사육상자 별로 전자저울을 이용하여 급이량을 측정한 후 잔량을 측정하여 1일 사료섭취량을 계산하였다. 사료를 심하게 갉아먹는 개체의 경우 측정에서 제외하였다.

[218]

[219] **2.2. 체중 감소 시험 결과**

[220] **2.2.1. HIgG1-GDF (CRL) and IgG1-GDF(CRL)**

[221] 상기 실시예 2.1.1 에서 측정된 체중 변화를 도 5 및 도 6, 및 표 9 (Body Weight (Group, % of initial)에 나타내었다.

[222] [Table 9]

Group	Day	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Lean Vehicle Control (Daily inj.)	Mean	100	102	101	101	101	101	101	101	101	102
	S.E.	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1
DIO Vehicle Control (Daily inj.)	Mean	100	100	100	100	100	100	101	101	101	101
	S.E.	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0
DIO Vehicle Control (Single Inj.)	Mean	100	100	99	100	100	100	101	101	102	102
	S.E.	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1
GDF15, 2.86 nmol/kg (Daily Inj.)	Mean	100	99	98	97	96	95	95	95	96	97
	S.E.	0	0	0	1	1	1	1	2	2	2
IgG1-GDF(CRL), 1 nmol/kg (Single Inj.)	Mean	100	99	98	96	96	96	95	95	95	95
	S.E.	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1
IgG1-GDF(CRL), 10 nmol/kg (Single Inj.)	Mean	100	98	97	95	94	93	91	90	90	90
	S.E.	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1
HIgG1-GDF(CRL), 1 nmol/kg (Single Inj.)	Mean	100	100	98	98	97	96	97	96	96	97
	S.E.	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
HIgG1-GDF(CRL), 10 nmol/kg (Single Inj.)	Mean	100	99	98	97	95	95	94	93	93	93
	S.E.	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1

[223] (상기 표 9에서, Day0: 대조물질 GDF15 첫 투여, IgG1-GDF (CRL) 융합 폴리펩타이드 1회 투여; Lean: 고지방 식이 적용하지 않은 군)도 5 및 표 9는 융합 단백질 IgG1-GDF (CRL) 1회 투여 시의 체중 변화를 음성대조군 (vehicle 투여군) 및 양성대조군 (GDF15 매일 투여군)과 비교하여 보여준다. 또한, 도 6은 상기 도 5의 결과 중에서 7일째의 결과를 추출하여 나타낸 그래프이다.

[224] 상기 결과에서 보여지는 바와 같이, 음성대조군 (vehicle 투여군)의 경우 체중 변화가 거의 없는 반면, GDF15 매일 투여군 (Day 5부터 투여 중단)의 경우에는

투여 중단 후 1일째인 Day6부터 체중 감소 효과가 사라지는 것을 확인할 수 있다. 반면, GDF15(CRL)이 IgG1 또는 Hinge가 포함된 Fc와 융합된 융합 폴리펩타이드의 경우에는 Day0에 1회 투여후 즉각적으로 체중 감소 효과가 나타났으며, 시험 기간 동안 (9일) 내내 체중 감소 효과가 감소하지 않고 지속적으로 나타나고, 시간이 지남에 따라서 농도 체중 감소 효과가 증가하며, 체중 감소 효과는 농도 의존적임을 확인할 수 있다. 이러한 융합 폴리펩타이드의 체중 감소 효과는 시험기간 내내 GDF15를 1일 1회 투여한 경우에 필적할만하다고 할 수 있다.

[225]

[226] **2.2.2. IgG4-GDF and IgG4-GDF(CRL)**

[227] 상기 실시예 2.1.2 에서 측정된 체중 변화를 도 7 및 표 10 (Body Weight (Group, % of initial)에 나타내었다.

IgG4-GDF(CRL) , 1 nmol/kg (Single Inj.)	Mean	91	91	91	91	91	91	91	92	92	92
	S.E.	1	1	1	1	1	1	1	2	2	2
IgG4-GDF(CRL) , 10 nmol/kg (Single Inj.)	Mean	85	85	84	83	83	82	83	84	84	85
	S.E.	1	1	1	1	2	2	2	2	3	2

- [229] (상기 표 10에서, Day0: 대조물질(Semaglutide) 및 시험 물질 첫 투여; 대조물질은 매일 투여; 시험물질은 1회 투여)도 7 및 8 및 표 10 은 융합 단백질 IgG4-GDF와 IgG4-GDF (CRL)의 1회 투여 시의 체중 변화를 음성대조군 (vehicle 투여군) 및 양성대조군 (Semaglutide 매일 투여군)과 비교하여 보여준다. 또한, 도 8은 상기 도 7의 결과 중에서 7일째와 14일째의 결과를 추출하여 나타낸 그래프이다.
- [230] 상기 결과에서 보여지는 바와 같이, 음성대조군 (vehicle 투여군)의 경우 체중이 약간 증가한 반면, 양성 대조군 (Semaglutide 매일 투여군)은 지속적으로 체중 감소가 되는 확인할 수 있다. IgG4-GDF15를 단회 투여한 경우 Dose에 상관없이 최대 9일까지 체중감소 효과가 지속되었다. 반면 IgG4-GDF(CRL)을 단회 1 nmol/kg 투여한 경우 최대 10일까지, 10 nmol/kg 단회 투여한 경우 최대 15일까지 내내 체중 감소 효과가 지속적으로 나타나고, 시간이 지남에 따라서 농도 체중 감소 효과가 증가하며, 체중 감소 효과는 농도 의존적임을 확인할 수 있다. 또한 Hinge가 포함되지 않은 IgG4의 Fc (Mutated)와의 GDF (CRL) 융합 폴리펩타이드의 경우가 Hinge가 포함된 IgG4의 Fc (Mutated)와의 GDF (CRL) 융합 폴리펩타이드에 비해 동일 용량에서 체중 감소 효과가 우수한 것으로 확인되었다. 이러한 IgG4 Fc 융합 폴리펩타이드의 체중 감소 효과는 시험기간 내내 Semaglutide를 1일 1회 투여한 경우에 필적할만하다고 할 수 있다.
- [231]
- [232] **2.3. 식이 섭취량 시험 결과**
- [233] **2.3.1. HIgG1-GDF (CRL) 및 IgG1-GDF(CRL)**
- [234] 상기 실시예 2.1.1에서 측정된 사료 섭취량 변화를 표 11과 도 9 (6일째까지의 누적 섭취량)에 각각 나타내었다.

[235] [Table 11]

Group	Day	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Lean Vehicle Control (Daily inj.)	Mean	4.5	4.6	4.6	4.3	4.4	4.6	4.2	4.5	3.9	4.7
	S.E.	0.2	0.2	0.1	0.2	0.1	0.3	0.2	0.2	0.1	0.3
DIO Vehicle Control (Daily inj.)	Mean	2.8	2.8	3.1	3.0	3.1	2.9	3.0	2.9	2.9	3.3
	S.E.	0.3	0.2	0.2	0.3	0.3	0.2	0.3	0.2	0.1	0.2
DIO Vehicle Control (Single Inj.)	Mean	3.1	2.9	3.1	3.2	3.3	3.2	3.3	3.2	3.0	3.5
	S.E.	0.1	0.2	0.2	0.2	0.2	0.1	0.1	0.1	0.1	0.2
GDF15, 2.86 nmol/kg (Daily Inj.)	Mean	2.8	2.4	2.7	2.4	2.5	2.6	2.7	3.0	3.3	3.5
	S.E.	0.4	0.3	0.2	0.4	0.2	0.3	0.2	0.3	0.2	0.3
IgG1-GDF(CRL), 1 nmol/kg (Single Inj.)	Mean	3.0	2.1	2.2	2.2	2.6	2.6	2.6	2.8	2.7	3.0
	S.E.	0.2	0.2	0.1	0.1	0.2	0.1	0.0	0.1	0.1	0.3
IgG1-GDF(CRL), 10 nmol/kg (Single Inj.)	Mean	2.7	2.0	2.5	2.0	1.9	1.9	2.1	2.1	2.3	2.8
	S.E.	0.3	0.1	0.1	0.3	0.2	0.2	0.2	0.1	0.1	0.3
HIgG1-GDF(CRL), 1 nmol/kg (Single Inj.)	Mean	3.0	2.4	2.4	2.5	2.7	2.6	2.9	2.7	2.9	3.0
	S.E.	0.2	0.1	0.1	0.0	0.1	0.0	0.1	0.1	0.1	0.1
HIgG1-GDF(CRL), 10 nmol/kg (Single Inj.)	Mean	3.8	2.2	2.2	2.3	2.4	2.4	2.3	2.4	2.9	3.3
	S.E.	0.5	0.1	0.1	0.1	0.2	0.1	0.1	0.1	0.3	0.3

[236] 상기 결과에서 보여지는 바와 같이, GDF (CRL) 이 Hinge가 포함된 IgG1 Fc 또는 포함되지 않은 IgG1의 Fc와 융합된 융합 폴리펩타이드 투여군의 경우, 음성 대조군 (Vehicle 투여군) 투여군과 비교하여 시험기간 동안 (9일) 사료 섭취량 감소 효과를 나타내며, 사료 섭취량 감소 효과는 농도 의존적임을 확인할 수 있다. 이러한 융합 폴리펩타이드의 사료 섭취량 감소 효과는 시험기간 내내 GDF15를 1일 1회 투여한 경우에 필적할만하다고 할 수 있다.

[237]

[238] **2.3.2. IgG4-GDF and IgG4-GDF(CRL)**

[239] 상기 실시예 2.1.2에서 측정된 사료 섭취량 변화를 표 12 와 도 10 (7일째까지, 14일째와 19일째의 누적 섭취량)을 나타내었다.

[240] [Table 12]

Group	Day	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
DIO Vehicle Control (Single Inj.)	Mean	3.3	2.7	3.0	3.0	3.1	3.5	3.0	3.5	3.3	3.4
	S.E.	0.1	0.1	0.2	0.1	0.1	0.2	0.2	0.1	0.1	0.2
Semaglutide, 3 nmol/kg (Daily Inj.)	Mean	3.7	2.1	3.3	2.8	2.3	2.9	2.7	3.2	2.4	3.7
	S.E.	0.3	0.7	1.4	0.6	0.4	0.9	0.6	0.3	0.4	0.1
IgG4-GDF15, 1 nmol/kg (Single Inj.)	Mean	3.0	1.9	1.9	2.1	2.0	2.0	2.1	2.4	2.4	2.5
	S.E.	0.1	0.1	0.1	0.2	0.2	0.1	0.1	0.2	0.2	0.2
IgG4-GDF15, 10 nmol/kg (Single Inj.)	Mean	3.0	1.7	2.0	2.0	2.1	2.2	2.4	2.4	2.2	2.7
	S.E.	0.1	0.1	0.3	0.2	0.2	0.3	0.2	0.2	0.2	0.2
IgG4-GDF(CRL), 1 nmol/kg (Single Inj.)	Mean	3.3	2.0	2.6	2.7	2.4	2.7	2.3	2.5	2.5	2.8
	S.E.	0.2	0.1	0.2	0.2	0.1	0.1	0.2	0.1	0.2	0.1
IgG4-GDF(CRL), 10 nmol/kg (Single Inj.)	Mean	3.1	1.5	2.3	2.4	2.4	2.3	2.3	2.0	2.3	2.4
	S.E.	0.2	0.3	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.1	0.2	0.3
Group	Day	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19
DIO Vehicle Control (Single Inj.)	Mean	3.0	3.4	3.2	3.5	3.1	3.3	3.1	3.2	3.3	3.3
	S.E.	0.2	0.1	0.2	0.1	0.1	0.2	0.1	0.1	0.1	0.1
Semaglutide, 3 nmol/kg (Daily Inj.)	Mean	2.7	2.5	2.4	3.0	2.5	2.1	2.5	2.0	2.2	3.7
	S.E.	0.4	0.4	0.3	0.4	0.3	0.3	0.2	0.2	0.2	0.3
IgG4-GDF15, 1 nmol/kg (Single Inj.)	Mean	2.7	3.1	3.2	3.7	3.0	3.1	3.1	3.1	3.1	3.0
	S.E.	0.1	0.0	0.0	0.1	0.1	0.3	0.2	0.3	0.1	0.1
IgG4-GDF15, 10 nmol/kg (Single Inj.)	Mean	3.1	3.8	3.3	3.7	3.4	3.6	3.1	3.5	3.3	3.0
	S.E.	0.3	0.7	0.5	0.5	0.4	0.6	0.2	0.1	0.1	0.1
IgG4-GDF(CRL), 1 nmol/kg (Single Inj.)	Mean	2.4	2.8	2.6	3.0	2.8	2.9	3.1	3.3	3.0	3.3
	S.E.	0.1	0.1	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
IgG4-GDF(CRL), 10 nmol/kg (Single Inj.)	Mean	2.1	2.5	2.3	2.5	2.6	2.6	3.0	3.4	3.3	3.1
	S.E.	0.1	0.2	0.3	0.2	0.4	0.2	0.3	0.3	0.3	0.2

[241] 상기 결과에서 보여지는 바와 같이, GDF15 또는 GDF (CRL) 이 Hinge가

포함되지 않은 IgG4 Fc (mutated)와 융합된 융합 폴리펩타이드 투여군의 경우, 음성 대조군 (Vehicle 투여군) 투여군과 비교하여 시험기간 동안 (19일) 사료 섭취량 감소 효과를 나타냄을 확인할 수 있다. 이러한 융합 폴리펩타이드의 사료 섭취량 감소 효과는 시험기간 내내 Semaglutide를 1일 1회 매일 투여한 경우에 필적할만하다고 할 수 있다. GDF15 또는 GDF (CRL) 이 Hinge가 포함되지 않은 IgG4 Fc (Mutated)와 융합된 융합 폴리펩타이드 10 nmol/kg 투여군끼리 비교할 때, 전장 GDF15가 융합된 융합 폴리펩타이드 투여군의 경우 식이 억제능은 약 10일 정도 지속 되었고, GDF(CRL)이 융합된 융합 폴리펩타이드 투여군의 경우 식이 억제능은 약 2주 정도 지속 되었다. 즉 전장 GDF15 융합 폴리펩타이드와 비교하여 GDF (CRL) 융합 폴리펩타이드의 경우가 10 nmol/kg 용량에서 체중 감소 효과가 약간 우수한 것으로 확인되었다.

[242]

[243] 실시예 3. 융합 폴리펩타이드 (IgG4-GDF 또는 IgG4-GDF(CRL))의 약동학적 시험

[244] 3.1. 시험군 및 대조군 혈청 준비

[245] 각 폴리펩타이드를 래트에 피하투여시의 약동학적 특성 평가를 위하여, 폴리펩타이드 IgG4-GDF 또는 IgG4-GDF(CRL)를 SD Rat (코아텍, 수컷, 7주령, 약 250g; 각 n=3; 시험군)에 각각 2 mg/kg의 양으로 피하 투여하여 정해진 시간에 미정맥을 통해 약 200 μ l 정도 채혈을 진행하였다. 채혈 시간은 융합 폴리펩타이드 투여 전, 투여 후 1, 2, 4, 8, 24, 48, 72, 96, 168, 240 및 336 시간에 진행하였다. 약동학적 특성 비교를 위한 대조군으로, 상기와 동일한 방법으로 GDF15 (R&D Systems)을 2 mg/kg의 양으로 피하 투여하여 GDF15 투여군을 준비하였다.

[246] 상기와 같이 SD Rat에 투여한 후, Time-point별로 채취한 혈액을 원심분리하여 Serum을 얻고, Human GDF15 Immunoassay(SGD150, R&D Systems)를 이용하여 ELISA를 수행하여, 각 폴리펩타이드의 시간에 따른 serum내 농도를 측정하였다. 이 자료를 이용하여 PK 분석용 소프트웨어 (WinNonlin (Certara L.P.) 등)를 이용하여 AUC (area under the curve)를 포함한 Parameter들의 값을 구하였다.

[247]

[248] 3.2 약동학 시험 결과

[249] 상기 얻어진 융합 폴리펩타이드의 약동학적 파라미터를 표 13에 나타내고, 시간에 따른 융합 폴리펩타이드의 농도 변화를 도 11에 나타내었다:

[250] [Table 13]

PK Parameter	Group 1	Group 2	Group 3
	GDF15	IgG4-GDF	IgG4-GDF(CRL)
$C_{\max}$ (ug/mL)	0.443	10.6	9.73
$T_{\max}$ (hr)	1	96	48
AUC_{last} (ug·hr/mL)	4.86	2144	2004
AUC_{inf} (ug·hr/mL)	4.88	2854	2593
$t_{1/2}$ (hr)	19.0	101	114
AUC_{exp} (%)	0.463	14.6	18.2

[251] ($C_{\max}$: 최고혈중농도, $T_{\max}$: 최고혈중농도 도달시간, AUC_{inf} : 측정 가능한 마지막 채혈시점에서 무한대 시간까지 외삽하여 계산한 혈중 농도-시간 곡선하 면적, AUC_{last} : 측정 가능한 마지막 채혈시점까지의 혈중농도-시간 곡선하 면적, $T_{1/2}$: 소실반감기, $AUC_{\text{Exp}}(\%)$: $[(AUC_{\text{inf}} - AUC_{\text{last}}) / AUC_{\text{inf}}] * 100$ 상기 결과에서 보여지는 바와 같이, GDF15 (반감기: 19시간)와 비교하여, IgG4-GDF15 (반감기: 101시간) 및 IgG4-GDF (CRL) (반감기: 114시간) 융합단백질의 경우 혈액 (혈청) 내 안전성이 현저하게 증가됨 (5배 이상)을 확인할 수 있다.

[252]

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

[254]

서열목록 Free Text

[255] <110> LG CHEM, LTD.

[256]

[257] <120> FUSION POLYPEPTIDE COMPRISING Fc REGION OF IMMUNOGLOBULIN AND

[258] GDF15

[259]

[260] <130> OPP20200894KR

[261]

[262] <150> KR 10-2019-0047558

[263] <151> 2019-04-23
[264]
[265] <160> 18
[266]
[267] <170> KopatentIn 3.0
[268]
[269] <210> 1
[270] <211> 112
[271] <212> PRT
[272] <213> Artificial Sequence
[273]
[274] <220>
[275] <223> mature GDF15 (wild type)
[276]
[277]
[278] <400> 1
[279] Ala Arg Asn Gly Asp His Cys Pro Leu Gly Pro Gly Arg Cys Cys Arg
[280] 1 5 10 15
[281]
[282] Leu His Thr Val Arg Ala Ser Leu Glu Asp Leu Gly Trp Ala Asp Trp
[283] 20 25 30
[284]
[285] Val Leu Ser Pro Arg Glu Val Gln Val Thr Met Cys Ile Gly Ala Cys
[286] 35 40 45
[287]
[288] Pro Ser Gln Phe Arg Ala Ala Asn Met His Ala Gln Ile Lys Thr Ser
[289] 50 55 60
[290]
[291] Leu His Arg Leu Lys Pro Asp Thr Val Pro Ala Pro Cys Cys Val Pro
[292] 65 70 75 80
[293]
[294] Ala Ser Tyr Asn Pro Met Val Leu Ile Gln Lys Thr Asp Thr Gly Val
[295] 85 90 95
[296]
[297] Ser Leu Gln Thr Tyr Asp Asp Leu Leu Ala Lys Asp Cys His Cys Ile
[298] 100 105 110
[299]
[300]

[301] <210> 2
[302] <211> 98
[303] <212> PRT
[304] <213> Artificial Sequence
[305]
[306] <220>
[307] <223> DeltaN14GDF15
[308]
[309]
[310] <400> 2
[311] Cys Arg Leu His Thr Val Arg Ala Ser Leu Glu Asp Leu Gly Trp Ala
[312] 1 5 10 15
[313]
[314] Asp Trp Val Leu Ser Pro Arg Glu Val Gln Val Thr Met Cys Ile Gly
[315] 20 25 30
[316]
[317] Ala Cys Pro Ser Gln Phe Arg Ala Ala Asn Met His Ala Gln Ile Lys
[318] 35 40 45
[319]
[320] Thr Ser Leu His Arg Leu Lys Pro Asp Thr Val Pro Ala Pro Cys Cys
[321] 50 55 60
[322]
[323] Val Pro Ala Ser Tyr Asn Pro Met Val Leu Ile Gln Lys Thr Asp Thr
[324] 65 70 75 80
[325]
[326] Gly Val Ser Leu Gln Thr Tyr Asp Asp Leu Leu Ala Lys Asp Cys His
[327] 85 90 95
[328]
[329] Cys Ile
[330]
[331]
[332] <210> 3
[333] <211> 217
[334] <212> PRT
[335] <213> Artificial Sequence
[336]
[337] <220>
[338] <223> human IgG1-Fc (UniProtKB P01857) CH2-CH3

[339]
[340]
[341] <400> 3
[342] Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys
[343] 1 5 10 15
[344]
[345] Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
[346] 20 25 30
[347]
[348] Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr
[349] 35 40 45
[350]
[351] Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
[352] 50 55 60
[353]
[354] Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
[355] 65 70 75 80
[356]
[357] Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
[358] 85 90 95
[359]
[360] Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln
[361] 100 105 110
[362]
[363] Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu
[364] 115 120 125
[365]
[366] Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro
[367] 130 135 140
[368]
[369] Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
[370] 145 150 155 160
[371]
[372] Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
[373] 165 170 175
[374]
[375] Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val
[376] 180 185 190

[377]
[378] Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln
[379] 195 200 205
[380]
[381] Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Xaa
[382] 210 215
[383]
[384]
[385] <210> 4
[386] <211> 10
[387] <212> PRT
[388] <213> Artificial Sequence
[389]
[390] <220>
[391] <223> human IgG1-Fc (UniProtKB P01857) Core Hinge
[392]
[393]
[394] <400> 4
[395] Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro
[396] 1 5 10
[397]
[398]
[399] <210> 5
[400] <211> 217
[401] <212> PRT
[402] <213> Artificial Sequence
[403]
[404] <220>
[405] <223> human IgG4-Fc (UniProtKB P01861) CH2-CH3 (general)
[406]
[407]
[408] <220>
[409] <221> MOD_RES
[410] <222> (4)
[411] <223> Xaa is Phe or Ala
[412]
[413]
[414] <220>

[415] <221> MOD_RES
[416] <222> (5)
[417] <223> Xaa is Leu or Ala
[418]
[419]
[420] <220>
[421] <221> MOD_RES
[422] <222> (217)
[423] <223> Xaa is absent or Lys
[424]
[425]
[426] <400> 5
[427] Ala Pro Glu Xaa Xaa Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys
[428] 1 5 10 15
[429]
[430] Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
[431] 20 25 30
[432]
[433] Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr
[434] 35 40 45
[435]
[436] Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
[437] 50 55 60
[438]
[439] Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
[440] 65 70 75 80
[441]
[442] Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
[443] 85 90 95
[444]
[445] Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln
[446] 100 105 110
[447]
[448] Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met
[449] 115 120 125
[450]
[451] Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro
[452] 130 135 140

[453]
[454] Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
[455] 145 150 155 160
[456]
[457] Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
[458] 165 170 175
[459]
[460] Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val
[461] 180 185 190
[462]
[463] Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln
[464] 195 200 205
[465]
[466] Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Xaa
[467] 210 215
[468]
[469]
[470] <210> 6
[471] <211> 217
[472] <212> PRT
[473] <213> Artificial Sequence
[474]
[475] <220>
[476] <223> human IgG4-Fc (UniProtKB P01861) CH2-CH3 (wild-type)
[477]
[478]
[479] <400> 6
[480] Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys
[481] 1 5 10 15
[482]
[483] Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
[484] 20 25 30
[485]
[486] Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr
[487] 35 40 45
[488]
[489] Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
[490] 50 55 60

[491]
[492] Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
[493] 65 70 75 80
[494]
[495] Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
[496] 85 90 95
[497]
[498] Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln
[499] 100 105 110
[500]
[501] Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met
[502] 115 120 125
[503]
[504] Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro
[505] 130 135 140
[506]
[507] Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
[508] 145 150 155 160
[509]
[510] Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
[511] 165 170 175
[512]
[513] Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val
[514] 180 185 190
[515]
[516] Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln
[517] 195 200 205
[518]
[519] Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
[520] 210 215
[521]
[522]
[523] <210> 7
[524] <211> 216
[525] <212> PRT
[526] <213> Artificial Sequence
[527]
[528] <220>

[529] <223> human IgG4-Fc (UniProtKB P01861) CH2-CH3 (mutated)
[530]
[531]
[532] <400> 7
[533] Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys
[534] 1 5 10 15
[535]
[536] Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
[537] 20 25 30
[538]
[539] Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr
[540] 35 40 45
[541]
[542] Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
[543] 50 55 60
[544]
[545] Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
[546] 65 70 75 80
[547]
[548] Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
[549] 85 90 95
[550]
[551] Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln
[552] 100 105 110
[553]
[554] Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met
[555] 115 120 125
[556]
[557] Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro
[558] 130 135 140
[559]
[560] Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
[561] 145 150 155 160
[562]
[563] Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
[564] 165 170 175
[565]
[566] Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val

[567] 180 185 190
[568]
[569] Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln
[570] 195 200 205
[571]
[572] Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly
[573] 210 215
[574]
[575]
[576] <210> 8
[577] <211> 216
[578] <212> PRT
[579] <213> Artificial Sequence
[580]
[581] <220>
[582] <223> human IgG4-Fc (UniProtKB P01861) CH2-CH3 (mutated)
[583]
[584]
[585] <400> 8
[586] Ala Pro Glu Ala Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys
[587] 1 5 10 15
[588]
[589] Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
[590] 20 25 30
[591]
[592] Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr
[593] 35 40 45
[594]
[595] Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
[596] 50 55 60
[597]
[598] Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
[599] 65 70 75 80
[600]
[601] Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
[602] 85 90 95
[603]
[604] Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln

[605] 100 105 110
[606]
[607] Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met
[608] 115 120 125
[609]
[610] Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro
[611] 130 135 140
[612]
[613] Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
[614] 145 150 155 160
[615]
[616] Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
[617] 165 170 175
[618]
[619] Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val
[620] 180 185 190
[621]
[622] Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln
[623] 195 200 205
[624]
[625] Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly
[626] 210 215
[627]
[628]
[629] <210> 9
[630] <211> 216
[631] <212> PRT
[632] <213> Artificial Sequence
[633]
[634] <220>
[635] <223> human IgG4-Fc (UniProtKB P01861) CH2-CH3 (mutated)
[636]
[637]
[638] <400> 9
[639] Ala Pro Glu Phe Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys
[640] 1 5 10 15
[641]
[642] Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val

[643] 20 25 30
[644]
[645] Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr
[646] 35 40 45
[647]
[648] Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
[649] 50 55 60
[650]
[651] Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
[652] 65 70 75 80
[653]
[654] Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
[655] 85 90 95
[656]
[657] Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln
[658] 100 105 110
[659]
[660] Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met
[661] 115 120 125
[662]
[663] Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro
[664] 130 135 140
[665]
[666] Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
[667] 145 150 155 160
[668]
[669] Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
[670] 165 170 175
[671]
[672] Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val
[673] 180 185 190
[674]
[675] Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln
[676] 195 200 205
[677]
[678] Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly
[679] 210 215
[680]

[681]
[682] <210> 10
[683] <211> 12
[684] <212> PRT
[685] <213> Artificial Sequence
[686]
[687] <220>
[688] <223> human IgG4-Fc (UniProtKB P01861) Hinge (general)
[689]
[690]
[691] <220>
[692] <221> MOD_RES
[693] <222> (10)
[694] <223> Xaa is Ser or Pro
[695]
[696]
[697] <400> 10
[698] Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Xaa Cys Pro
[699] 1 5 10
[700]
[701]
[702] <210> 11
[703] <211> 12
[704] <212> PRT
[705] <213> Artificial Sequence
[706]
[707] <220>
[708] <223> human IgG4-Fc (UniProtKB P01861) Hinge (wild-type)
[709]
[710]
[711] <400> 11
[712] Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Ser Cys Pro
[713] 1 5 10
[714]
[715]
[716] <210> 12
[717] <211> 12
[718] <212> PRT

[719] <213> Artificial Sequence
[720]
[721] <220>
[722] <223> human IgG4-Fc (UniProtKB P01861) Hinge (mutated)
[723]
[724]
[725] <400> 12
[726] Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro
[727] 1 5 10
[728]
[729]
[730] <210> 13
[731] <211> 5
[732] <212> PRT
[733] <213> Artificial Sequence
[734]
[735] <220>
[736] <223> peptide linker
[737]
[738]
[739] <400> 13
[740] Gly Gly Gly Gly Ser
[741] 1 5
[742]
[743]
[744] <210> 14
[745] <211> 339
[746] <212> DNA
[747] <213> Artificial Sequence
[748]
[749] <220>
[750] <223> GDF15 coding gene
[751]
[752]
[753] <400> 14
[754] gcccggaacg gcgaccactg cccctgggg cccggacggt gctgccggct gcacaccgtg 60
[755]
[756] cgggcctccc tggaggacct gggctgggcc gactgggtgc tgtccccaag ggaggtgcaa 120

[757]
[758] gtgaccatgt gcatcggcgc ctgcccattc cagttccggg ccgccaacat gcacgctcag 180
[759]
[760] atcaagacca gcctgcaccg gctgaagccc gacaccgtgc ccgccccctg ctgcgtgccc 240
[761]
[762] gcctcctaca accccatggt gctgattcag aagaccgaca ccggcgtgag cctgcagacc 300
[763]
[764] tacgacgacc tgctggccaa ggactgccac tgcattctaa 339
[765]
[766]
[767] <210> 15
[768] <211> 678
[769] <212> DNA
[770] <213> Artificial Sequence
[771]
[772] <220>
[773] <223> IgG1-Fc coding gene
[774]
[775]
[776] <400> 15
[777] gacaaaactc acacatgccc accgtgccca gcacctgaac tctggggggg accgtcagtc 60
[778]
[779] ttctcttcc ccccaaaacc caaggacacc ctcatgatct cccggacccc tgaggtcaca 120
[780]
[781] tgcgtggtgg tggacgtgag ccacgaagac cctgaggta agttcaactg gtacgtggac 180
[782]
[783] ggcggtggagg tgcataatgc caagacaaag ccgcgggagg agcagtacaa cagcacgtac 240
[784]
[785] cgtgtggtca gcgtcctcac cgtcctgcac caggactggc tgaatggcaa ggagtacaag 300
[786]
[787] tgcaaggctc ccaacaaagc cctcccagcc cccatcgaga aaaccatctc caaagccaaa 360
[788]
[789] gggcagcccc gagaaccaca ggtgtatacc ctgccccat ccgggatga gctgaccaag 420
[790]
[791] aaccaggta gcctgacctg cctggtaaaa ggcttctatc ccagcgacat cgccgtggag 480
[792]
[793] tgggagagca atgggcagcc ggagaacaac tacaagacca cgctcccggt gctggactcc 540
[794]

[795] gacggctcct tcttctcta cagcaagctc accgtggaca agagcagggtg gcagcagggg 600
[796]
[797] aacgtcttct catgtccgt gatgcatgag gctctgcaca accactacac gcagaagagc 660
[798]
[799] ctctccctgt ctccgggt 678
[800]
[801]
[802] <210> 16
[803] <211> 684
[804] <212> DNA
[805] <213> Artificial Sequence
[806]
[807] <220>
[808] <223> IgG4-Fc coding gene
[809]
[810]
[811] <400> 16
[812] gagtccaaat atgggtcccc atgccacccc tccccagcac ctgaggccgc cgggggaccg 60
[813]
[814] tcagtcttcc tcttcccc aaaaccaag gacacctca tgatctccc gacctctgag 120
[815]
[816] gtcacgtgcg tgggtgtgga cgtgtcccag gaggacccc aggtgcagtt caactgttac 180
[817]
[818] gtggacggcg tggaggtgca caacccaag accaagcccc gggaggagca gttaactcc 240
[819]
[820] acctaccggg tgggtgccgt gctgaccgtg ctgcaccagg actggctgaa cggcaaggag 300
[821]
[822] tacaagtgca aggtgtccaa caagggcctg cctctctcca tcgagaagac catctccaag 360
[823]
[824] gccaaaggcc agccccggga gccccagggtg tacacctgc cccctccca ggaggagatg 420
[825]
[826] accaagaacc aggtgtccct gacctgcctg gtgaagggt tctaccctc cgacatgcc 480
[827]
[828] gtggagtggg agtccaacgg ccagcccag aacaactaca agaccacccc cccgtgctg 540
[829]
[830] gactccgacg gctcttctt cctgtactcc cggtgaccg tggacaagtc ccgtggcag 600
[831]
[832] gagggaacg tgttctctg ctccgtgatg cagaggccc tgcacaacca ctacaccag 660

[833]
[834] aagtcctgt ccctgtccct ggc 684
[835]
[836]
[837] <210> 17
[838] <211> 22
[839] <212> PRT
[840] <213> Artificial Sequence
[841]
[842] <220>
[843] <223> Signal Peptide
[844]
[845]
[846] <400> 17
[847] Met His Arg Pro Glu Ala Met Leu Leu Leu Thr Leu Ala Leu Leu
[848] 1 5 10 15
[849]
[850] Gly Gly Pro Thr Trp Ala
[851] 20
[852]
[853]
[854] <210> 18
[855] <211> 20
[856] <212> PRT
[857] <213> Artificial Sequence
[858]
[859] <220>
[860] <223> peptide linker
[861]
[862]
[863] <400> 18
[864] Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
[865] 1 5 10 15
[866]
[867] Gly Gly Gly Ser
[868] 20

청구범위

- [청구항 1] GDF15 (Growth/differentiation factor 15) 또는 이의 기능적 변이체, 및
면역글로불린의 Fc 영역을 포함하고,
상기 면역글로불린의 Fc 영역은 단일 사슬의 IgG1 Fc 영역 또는 IgG4 Fc 영역이고, 상기 GDF15 또는 이의 기능적 변이체의 N-말단에 유연성(flexible) 펩타이드 링커를 통하여 연결되며,
상기 GDF15의 기능적 변이체는 서열번호 1의 아미노산 서열 중 1번째부터 14번째까지의 14개 아미노산 중 하나 이상이 결실된 결실 변이체이고,
상기 유연성 펩타이드 링커는 (GGGS)_n (n은 1, 2, 3, 4, 또는 5)로 표현되는 것인,
융합 폴리펩타이드.
- [청구항 2] 제1항에 있어서, 상기 면역글로불린의 Fc 영역은 인간 IgG4 Fc 영역인, 융합 폴리펩타이드.
- [청구항 3] 제2항에 있어서, 상기 인간 IgG4 Fc 영역은
(1) 서열번호 5의 아미노산 서열을 포함하거나,
(2) 서열번호 5의 아미노산 서열의 N 말단에 서열번호 10의 아미노산 서열을 추가로 포함하는 것인,
융합 폴리펩타이드.
- [청구항 4] 제3항에 있어서, 상기 인간 IgG4 Fc 영역은
(1) 서열번호 6 내지 9 중에서 선택된 아미노산 서열을 포함하거나,
(2) 서열번호 6 내지 9 중에서 선택된 아미노산 서열의 N 말단에 서열번호 11 또는 서열번호 12의 아미노산 서열을 추가로 포함하는 것인,
융합 폴리펩타이드.
- [청구항 5] 제1항에 있어서, 상기 GDF15의 기능적 변이체는 서열번호 2의 아미노산 서열을 포함하는 것인, 융합 폴리펩타이드.
- [청구항 6] 제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 융합 폴리펩타이드 내의 면역글로불린의 Fc 영역과 연결된 GDF15 또는 이의 기능적 변이체는, 면역글로불린의 Fc 영역과 결합되지 않은 GDF15 또는 이의 기능적 변이체와 비교하여, 체내 반감기가 1.5배 이상 증가한 것인, 융합 폴리펩타이드.
- [청구항 7] 제1항 내지 제5항 중 어느 한 항의 융합 폴리펩타이드를 2개 포함하는, 융합 폴리펩타이드 이량체.
- [청구항 8] 제1항 내지 제5항 중 어느 한 항의 융합 폴리펩타이드를 암호화하는 핵산 분자.

- [청구항 9] 제8항의 핵산 분자를 포함하는 재조합 벡터.
- [청구항 10] 제9항의 재조합 벡터를 포함하는 재조합 세포.
- [청구항 11] 제10항의 재조합 세포를 배양하는 단계를 포함하는, GDF15 또는 이의 기능적 변이체 및 면역글로불린의 Fc 영역을 포함하는, 제1항의 융합 폴리펩타이드의 제조 방법.
- [청구항 12] 단일 사슬의 IgG1 Fc 영역 또는 IgG4 Fc 영역을 GDF15 또는 이의 기능적 변이체의 N 말단에 유연성 펩타이드 링커를 통하여 연결시키는 단계를 포함하고,
상기 GDF15의 기능적 변이체는 서열번호 1의 아미노산 서열 중 1번째부터 14번째까지의 14개 아미노산 중 하나 이상이 결실된 결실 변이체이고,
상기 유연성 펩타이드 링커는 (GGGGS)_n [(서열번호 13)_n; n은 1, 2, 3, 4, 또는 5]로 표현되는 것인,
GDF15 또는 이의 기능적 변이체의 체내 안정성 증진 방법.
- [청구항 13] 제12항에 있어서, 상기 면역글로불린의 Fc 영역은 인간 IgG4 Fc 영역인, GDF15 또는 이의 기능적 변이체의 체내 안정성 증진 방법.
- [청구항 14] 제13항에 있어서, 상기 인간 IgG4 Fc 영역은
(1) 서열번호 5의 아미노산 서열을 포함하거나,
(2) 서열번호 5의 아미노산 서열의 N 말단에 서열번호 10의 아미노산 서열을 추가로 포함하는 것인,
GDF15 또는 이의 기능적 변이체의 체내 안정성 증진 방법.
- [청구항 15] 제14항에 있어서, 상기 인간 IgG4 Fc 영역은
(1) 서열번호 6 내지 9 중에서 선택된 아미노산 서열을 포함하거나,
(2) 서열번호 6 내지 9 중에서 선택된 아미노산 서열의 N 말단에 서열번호 11 또는 서열번호 12의 아미노산 서열을 추가로 포함하는 것인,
GDF15 또는 이의 기능적 변이체의 체내 안정성 증진 방법.
- [청구항 16] 제12항에 있어서, 상기 GDF15의 기능적 변이체는 서열번호 2의 아미노산 서열을 포함하는 것인, GDF15 또는 이의 기능적 변이체의 체내 안정성 증진 방법.
- [청구항 17] 제12항 내지 제16항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 면역글로불린의 Fc 영역과 연결된 GDF15 또는 이의 기능적 변이체는,
면역글로불린의 Fc 영역과 결합되지 않은 GDF15 또는 이의 기능적 변이체와 비교하여, 체내 반감기가 1.5배 이상 증가한 것인,
GDF15 또는 이의 기능적 변이체의 체내 안정성 증진 방법.
- [청구항 18] 제1항 내지 제5항 중 어느 한 항의 융합 폴리펩타이드, 상기 융합 폴리펩타이드를 2개 포함하는 융합 폴리펩타이드 이량체, 상기 융합 폴리펩타이드를 암호화하는 핵산 분자, 상기 핵산 분자를

- 포함하는 재조합 벡터, 및 상기 재조합 벡터를 포함하는 재조합 세포로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상을 포함하는, 체중 감소용 조성물.
- [청구항 19] 제1항 내지 제5항 중 어느 한 항의 융합 폴리펩타이드, 상기 융합 폴리펩타이드를 2개 포함하는 융합 폴리펩타이드 이량체, 상기 융합 폴리펩타이드를 암호화하는 핵산 분자, 상기 핵산 분자를 포함하는 재조합 벡터, 및 상기 재조합 벡터를 포함하는 재조합 세포로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상을 포함하는, 식이 조절용 조성물.
- [청구항 20] 제1항 내지 제5항 중 어느 한 항의 융합 폴리펩타이드, 상기 융합 폴리펩타이드를 2개 포함하는 융합 폴리펩타이드 이량체, 상기 융합 폴리펩타이드를 암호화하는 핵산 분자, 상기 핵산 분자를 포함하는 재조합 벡터, 및 상기 재조합 벡터를 포함하는 재조합 세포로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상을 포함하는, 대사성 질병의 예방 또는 치료용 약학 조성물.
- [청구항 21] 제20항에 있어서, 상기 대사성 질병은 비만, 당뇨, 또는 비알코올성 지방간 질환인, 약학 조성물.