

명세서

발명의 명칭: 글루카곤 유도체를 포함하는 만성 신장 질환 예방 또는 치료용 약학 조성물

기술분야

- [1] 본 발명은 글루카곤 유도체를 포함하는 조성물, 및 이의 용도에 관한 것이다.
[2]

배경기술

- [3] 글루카곤은 약물 치료, 질병, 호르몬 또는 효소 결핍 등과 같은 다양한 원인에 의해 혈당이 저하되면 이자에서 생산되어 분비된다. 분비된 글루카곤은 간에 작용하여 글리코젠을 분해하여 포도당을 방출하도록 유도하고, 결국 혈당 수준을 정상 수준까지 높이는 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 그리고 간에서 지방의 합성을 억제함은 물론, 지방산 연소를 촉진함으로써 혈중 지질 수치를 강하할 수 있다고 알려져 있다. 또한 글루카곤은 백색지방에도 직간접적으로 작용하여 지방의 연소 및 지방갈색화를 유도하여 효과적인 체중감량 효과를 보인다고 알려져 있다 (Nat Rev Endocrinol. 11, 329-38 (2015); Physiol Rev. 97, 721-66 (2017)). 이러한 글루카곤은 글루카곤 수용체에 작용함으로써 활성을 나타낸다.
- [4] 최근 효능 증대나 부작용 개선 등을 위해 글루카곤 수용체에 작용하면서도 물성이 개선된 글루카곤 유도체의 필요성이 대두되면서, 본 발명자들은 글루카곤 수용체에 작용할 수 있는 글루카곤 유도체 및 이의 결합체를 개발한 바 있다(WO 2018/004283).
- [5]
- [6] 신장(콩팥, kidney)은 횡격막의 아래쪽, 배의 뒤에 위치하며, 체내 노폐물을 제거하고 수분과 염분의 양, 전해질 및 산-염기 균형을 조절하는 장기이다. 이러한 신장의 손상 또는 기능 이상으로 인한 질환 중 하나로, 만성 신장 질환이 있다.
- [7] 만성 콩팥병으로도 불리는 만성 신장 질환은 지속적으로 소변으로 단백질이 배출되거나(단백뇨), 콩팥의 기능이 저하된 상태를 의미하는 질환으로, 특히 당뇨병, 고혈압 환자에게 만성 신장 질환 발병 위험이 높은 것으로 알려져 있다. 만성 신장 질환 환자는 신장 기능 저하로 인해 노폐물이 몸에 쌓이게 되어, 혈압이 올라가고, 빈혈이 생기며, 뼈가 약해지고, 신경 손상 등이 일어날 수 있고, 심혈관 질환의 위험이 높아진다.
- [8] 이와 같은 만성 신장 질환은 진행성 질환으로 초기 단계에서는 자각하기 어려워 검사를 통한 조기 진단이 중요하며, 치료 시기가 늦어지면 만성 신부전으로 진행하게 되어 투석이나 신장 이식이 요구된다.
- [9] 만성 신장 질환의 치료는 위험 인자를 감소시키고, 신장 기능의 유지 또는

회복을 통해 이루어진다. 특히, 만성 신장 질환 환자의 60%에서 고혈압이 동반된다고 알려져 있을 만큼 고혈압은 만성 신장 질환과 밀접한 관련이 있어, 항고혈압제를 이용한 만성 신장 질환의 치료가 연구되고 있으며, 안지오텐신 전환효소 억제제(angiotensin converting enzyme inhibitor), 안지오텐신 수용체 차단제(angiotensin receptor blocker) 등을 이용한 치료 방법이 연구되고 있다. 그러나, 기존에 알려진 항고혈압제의 투여시 신기능 이상, 고칼륨혈증, 허혈성 신손상 등의 부작용 역시 보고되어 있다.

[10]

[11] 이에, 새로운 혈압 강하 및 신장 기능 회복을 통한 만성 신장 질환 치료제 및 치료 요법을 개발하려는 노력이 계속되고 있다.

[12]

발명의 상세한 설명

기술적 과제

[13] 새로운 혈압 강하 및 신장 기능 회복을 통한 만성 신장 질환 치료제 및 치료 요법을 개발하는 것이 요구된다.

[14]

과제 해결 수단

[15] 본 발명의 하나의 목적은 글루카곤 유도체 또는 이의 결합체를 포함하는 만성 신장 질환(chronic kidney disease) 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공하는 것이다. 본 발명의 다른 하나의 목적은 글루카곤 유도체 또는 이의 결합체; 또는 이를 포함하는 조성물을 투여하는 단계를 포함하는 만성 신장 질환 예방 또는 치료 방법을 제공하는 것이다.

[16] 본 발명의 또 다른 하나의 목적은 글루카곤 유도체 또는 이의 결합체, 또는 이를 포함하는 조성물의 만성 신장 질환 예방 또는 치료 용도를 제공하는 것이다.

[17] 본 발명의 또 다른 하나의 목적은 글루카곤 유도체 또는 이의 결합체, 또는 이를 포함하는 조성물의 만성 신장 질환 예방 또는 치료 용도를 갖는 약제의 제조를 위한 용도를 제공하는 것이다.

[18] 본 발명의 또 다른 하나의 목적은 글루카곤 유도체 또는 이의 결합체; 및 GLP-1 수용체 아고니스트 또는 이의 결합체를 포함하는 만성 신장 질환(chronic kidney disease) 예방 또는 치료용 약학 조성물에 관한 것이다.

[19] 본 발명의 또 다른 하나의 목적은 글루카곤 유도체 또는 이의 결합체; 및 GLP-1 수용체 아고니스트 또는 이의 결합체를 병용하는 치료학적 용도이다.

[20]

발명의 효과

[21] 본 발명의 글루카곤 유도체는 혈압 강하 및 신장 기능 회복 효과를 나타내므로, 만성 신장 질환 환자의 치료 약물로서 이용될 수 있고, GLP-1 수용체 아고니스트와 병용 사용함으로써 추가적인 효과를 기대할 수 있다.

[22]

도면의 간단한 설명

[23]

도 1은 본태성 고혈압(SHR) 모델에서 본 발명의 서열번호 37의 글루카곤 유도체의 지속형 결합체에 의한 소변 알부민 배출량 감소 효과를 확인한 도이다.

[24]

도 2는 본태성 고혈압(SHR) 모델에서 본 발명의 서열번호 37의 글루카곤 유도체의 지속형 결합체에 의한 수축기(좌) 및 이완기(우)의 혈압 강하 효과를 확인한 도이다.

[25]

도 3은 본태성 고혈압(SHR) 모델에서 본 발명의 서열번호 37의 글루카곤 유도체의 지속형 결합체 및 CA 엑센딘-4의 지속형 결합체의 병용 투여에 따른 소변 ACR (albumin to creatinine ratio) 변화를 확인한 도이다.

[26]

발명의 실시를 위한 최선의 형태

[27]

본 발명을 구현하는 하나의 양태는 글루카곤 유도체 또는 이의 결합체를 포함하는 조성물이다. 상기 결합체는 글루카곤 유도체에 대해 활성을 갖는 펩타이드가 면역글로불린 Fc 영역에 링커에 의해 공유결합되어 있는 물질을 의미한다.

[28]

하나의 구체예에 따른 조성물로서, 글루카곤 유도체, 또는 이의 결합체를 포함하는 만성 신장 질환(chronic kidney disease) 예방 또는 치료용 약학 조성물이다.

[29]

다른 구체예에 따른 조성물로서, 상기 글루카곤 유도체는 하기 일반식 1의 아미노산 서열을 포함하는 펩타이드인 것을 특징으로 한다:

[30]

X1-X2-QGTF-X7-SD-X10-S-X12-X13-X14-X15-X16-X17-X18-X19-X20-X21-F-X23-X24-W-L-X27-X28-X29-X30 (일반식 1, 서열번호 46)

[31]

상기 식에서,

[32]

X1은 티로신(Y)이고;

[33]

X2는 알파-메틸-글루탐산(α -methyl-glutamic acid), Aib(aminoisobutyric acid), D-알라닌, 글리신(G), Sar(N-methylglycine), 세린(S) 또는 D-세린이며;

[34]

X7은 트레오닌(T), 발린(V) 또는 시스테인(C)이고;

[35]

X10은 티로신(Y) 또는 시스테인(C)이고;

[36]

X12는 리신(K) 또는 시스테인(C)이고;

[37]

X13은 티로신(Y) 또는 시스테인(C)이고;

[38]

X14는 류신(L) 또는 시스테인(C)이고;

[39]

X15는 아스파르트산(D), 글루탐산(E) 또는 시스테인(C)이고;

[40]

X16은 글루탐산(E), 아스파르트산(D), 세린(S), 알파-메틸-글루탐산, 또는 시스테인(C)이거나, 부존재하며;

[41]

X17은 아스파르트산(D), 글루타민(Q), 글루탐산(E), 리신(K), 아르기닌(R), 세린(S), 시스테인(C), 또는 발린(V)이거나, 부존재하며;

- [42] X18은 알라닌(A), 아스파르트산(D), 글루탐산(E), 아르기닌(R), 발린(V), 또는 시스테인(C)이거나, 부존재하며;
- [43] X19는 알라닌(A), 아르기닌(R), 세린(S), 발린(V), 또는 시스테인(C)이거나, 부존재하며;
- [44] X20은 리신(K), 히스티딘(H), 글루타민(Q), 아스파르트산(D), 아르기닌(R), 알파-메틸-글루탐산, 또는 시스테인(C)이거나, 부존재하며;
- [45] X21은 아스파르트산(D), 글루탐산(E), 류신(L), 발린(V), 또는 시스테인(C)이거나, 부존재하며;
- [46] X23은 이소류신(I), 발린(V), 또는 아르기닌(R)이거나, 부존재하며;
- [47] X24는 발린(V), 아르기닌(R), 알라닌(A), 시스테인(C), 글루탐산(E), 리신(K), 글루타민(Q), 알파-메틸-글루탐산, 또는 류신(L)이거나, 부존재하며;
- [48] X27은 이소류신(I), 발린(V), 알라닌(A), 리신(K), 메티오닌(M), 글루타민(Q), 또는 아르기닌(R)이거나, 부존재하며;
- [49] X28은 글루타민(Q), 리신(K), 아스파라긴(N), 또는 아르기닌(R)이거나, 부존재하며;
- [50] X29는 트레오닌(T)이며;
- [51] X30은 시스테인(C)이거나, 부존재함
- [52] (단, 상기 일반식 1의 아미노산 서열이 서열번호 1 또는 서열번호 12와 동일한 경우는 제외함).
- [53] 다른 구체예에 따른 조성물로서, 상기 글루카곤 유도체는 서열번호 2 내지 11, 및 13 내지 45로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하는 것을 특징으로 한다.
- [54] 앞선 구체예 중 어느 하나에 따른 조성물로서, 상기 펩타이드는 지속형 결합체의 형태이고, 상기 지속형 결합체는 하기 화학식 1로 표시되는 것을 특징으로 한다:
- [55] [화학식 1]
- [56] X - L - F
- [57] 단 이 때 X는 상기 일반식 1의 아미노산 서열을 포함하는 펩타이드이고;
- [58] L은 에틸렌글리콜 반복 단위를 함유하는 링커이며,
- [59] F는 면역글로불린 Fc 영역이고,
- [60] -는 X와 L 사이, L과 F 사이의 공유결합 연결을 나타낸다.
- [61] 앞선 구체예 중 어느 하나에 따른 조성물로서,
- [62] 상기 일반식 1에서,
- [63] X2가 Aib(aminoisobutyric acid)이며;
- [64] X7은 트레오닌(T), 발린(V) 또는 시스테인(C)이고;
- [65] X10은 티로신(Y)이고;
- [66] X12는 리신(K)이고;
- [67] X13은 티로신(Y)이고;

- [68] X14는 류신(L) 또는 시스테인(C)이고;
- [69] X15는 아스파르트산(D) 이고;
- [70] X16은 글루탐산(E), 또는 세린(S) 이며;
- [71] X17은 리신(K), 아르기닌(R), 또는 시스테인(C) 이고;
- [72] X18은 아르기닌(R) 이며;
- [73] X19는 알라닌(A), 또는 시스테인(C)이고;
- [74] X20은 글루타민(Q), 또는 리신(K) 이며;
- [75] X21은 아스파르트산(D), 또는 글루탐산(E) 이고;
- [76] X23은 발린(V) 이며;
- [77] X24는 글루타민(Q) 이고;
- [78] X27는 메티오닌(M) 이며;
- [79] X28은 아스파라긴(N) 이고;
- [80] X29는 트레오닌(T)이며;
- [81] X30은 시스테인(C)이거나, 부존재하는 것을 특징으로 한다.
- [82] 앞선 구체에 중 어느 하나에 따른 조성물로서, 상기 펩타이드는 서열번호 7 내지 11, 및 13 내지 25, 27, 29, 31, 33, 35 내지 45로 이루어진 군에서 선택된 아미노산 서열을 포함하는 것을 특징으로 한다.
- [83] 앞선 구체에 중 어느 하나에 따른 조성물로서, 상기 펩타이드는 서열번호 20, 22, 23, 27, 33, 35, 37, 38, 40, 41, 42, 및 44로 이루어진 군에서 선택되는 아미노산 서열을 포함하는 것을 특징으로 한다.
- [84] 앞선 구체에 중 어느 하나에 따른 조성물로서, 상기 조성물은 하기 특성 중 하나 이상을 나타내는 것을 특징으로 한다:
 - [85] (a) 부형제 투여 대조군 대비 혈압 강하;
 - [86] (b) 부형제 투여 대조군 대비 알부민 배출량 감소;
 - [87] (c) 부형제 투여 대조군 대비 단백뇨 감소; 및
 - [88] (d) 부형제 투여 대조군 대비 신장 기능 회복.
- [89] 앞선 구체에 중 어느 하나에 따른 조성물로서, 상기 조성물은 개체에 투여되었을 때 개체의 혈압 강하 및/또는 신장 기능 회복 효과를 나타내는 것을 특징으로 한다.
- [90] 앞선 구체에 중 어느 하나에 따른 조성물로서, 상기 글루카곤 유도체는 C-말단이 변형되지 않거나, 아미드화 된 것을 특징으로 한다.
- [91] 앞선 구체에 중 어느 하나에 따른 조성물로서, 상기 글루카곤 유도체는 아미노산 잔기 사이에 고리가 형성된 것을 특징으로 한다.
- [92] 앞선 구체에 중 어느 하나에 따른 조성물로서, 상기 면역글로불린 Fc 영역은 비당쇄화된 것을 특징으로 한다.
- [93] 앞선 구체에 중 어느 하나에 따른 조성물로서, 상기 면역글로불린 Fc 영역은 (a) CH1 도메인, CH2 도메인, CH3 도메인 및 CH4 도메인; (b) CH1 도메인 및 CH2 도메인; (c) CH1 도메인 및 CH3 도메인; (d) CH2 도메인 및 CH3 도메인; (e) CH1

도메인, CH2 도메인, CH3 도메인 및 CH4 도메인 중 1개 또는 2개 이상의 도메인과 면역글로불린 힌지 영역 또는 힌지 영역의 일부와의 조합; 및 (f) 중쇄 불변영역 각 도메인과 경쇄 불변영역의 이량체로 구성된 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 한다.

- [94] 앞선 구체에 중 어느 하나에 따른 조성물로서, 상기 면역글로불린 Fc 영역은 이황화 결합을 형성할 수 있는 부위가 제거되거나, 천연형 Fc에서 N-말단의 일부 아미노산이 제거되거나, 천연형 Fc의 N-말단에 메티오닌 잔기가 부가되거나, 보체결합부위가 제거되거나 또는 ADCC(antibody dependent cell mediated cytotoxicity) 부위가 제거된 것을 특징으로 한다.
- [95] 앞선 구체에 중 어느 하나에 따른 조성물로서, 상기 면역글로불린 Fc 영역은 IgG, IgA, IgD, IgE 또는 IgM에서 유래된 것을 특징으로 한다.
- [96] 앞선 구체에 중 어느 하나에 따른 조성물로서, 상기 면역글로불린 Fc 영역은 IgG, IgA, IgD, IgE, IgM으로 이루어진 군에서 선택되는 면역글로불린에서 유래된 상이한 기원을 가진 도메인의 하이브리드인 것을 특징으로 한다.
- [97] 앞선 구체에 중 어느 하나에 따른 조성물로서, 상기 면역글로불린 Fc 영역은 이량체 형태(dimeric form)인 것을 특징으로 한다.
- [98] 앞선 구체에 중 어느 하나에 따른 조성물로서, 상기 면역글로불린 Fc 영역은 두 개의 폴리펩타이드 사슬로 이루어진 이량체이며, L의 한 말단이 상기 두 폴리펩타이드 사슬 중 하나의 폴리펩타이드 사슬에만 연결되어 있는 것을 특징으로 한다.
- [99] 앞선 구체에 중 어느 하나에 따른 조성물로서, 상기 면역글로불린 Fc 영역은 IgG4 Fc 영역인 것을 특징으로 한다.
- [100] 앞선 구체에 중 어느 하나에 따른 조성물로서, 상기 면역글로불린 Fc 영역은 인간 IgG4 유래의 비-당쇄화된 Fc 영역인 것을 특징으로 한다.
- [101]
- [102] 앞선 구체에 중 어느 하나에 따른 조성물로서, 상기 면역글로불린 Fc 영역은 2개의 폴리펩타이드 사슬이 이황화결합으로 연결되어 있는 구조이며, 상기 두 사슬 중 한 사슬의 질소 원자를 통해서만 연결된 것을 특징으로 한다.
- [103] 앞선 구체에 중 어느 하나에 따른 조성물로서, 상기 면역글로불린 Fc 영역은 서열번호 67의 아미노산 서열을 갖는 단량체를 포함하는 것을 특징으로 한다.
- [104] 앞선 구체에 중 어느 하나에 따른 조성물로서, 상기 면역글로불린 Fc 영역은 서열번호 67의 아미노산 서열의 단량체의 동종이량체인 것을 특징으로 한다.
- [105] 앞선 구체에 중 어느 하나에 따른 조성물로서, 상기 면역글로불린 Fc 영역은 그 N-말단 프롤린의 질소 원자를 통하여 연결된 것을 특징으로 한다.
- [106] 앞선 구체에 중 어느 하나에 따른 조성물로서, 상기 결합체는 L의 한쪽 말단이 F의 아민기 또는 티올기와, L의 다른 말단이 X의 아민기 또는 티올기에 각각 반응하여 형성된 공유결합으로 F 및 X에 각각 연결되어 있는 것을 특징으로 한다.

- [107] 앞선 구체예 중 어느 하나에 따른 조성물로서, 상기 L은 폴리에틸렌 글리콜인 것을 특징으로 한다.
- [108] 앞선 구체예 중 어느 하나에 따른 조성물로서, 상기 L 내의 에틸렌글리콜 반복 단위 부분의 화학식량은 1 내지 100 kDa 범위에 있는 것을 특징으로 한다.
- [109] 앞선 구체예 중 어느 하나에 따른 조성물로서, 상기 에틸렌글리콜 반복 단위는 $[\text{OCH}_2\text{CH}_2]_n$ 로서, n은 자연수로, 상기 결합체 내 $[\text{OCH}_2\text{CH}_2]_n$ 부위의 평균 분자량, 예컨대 수평균 분자량이 1 내지 100 kDa이 되도록 정해지는 것을 특징으로 한다.
- [110] 앞선 구체예 중 어느 하나에 따른 조성물로서, 상기 이량체 형태 면역글로불린 Fc 영역 중 하나의 Fc 영역 사슬에 X 한 분자가 상기 에틸렌글리콜 반복 단위를 함유하는 링커를 통하여 서로 공유결합적으로 연결된 것을 특징으로 한다.
- [111] 앞선 구체예 중 어느 하나에 따른 조성물로서, 상기 링커의 한 말단이 상기 이량체 형태 면역글로불린 Fc 영역의 두 Fc 영역 사슬 중 하나의 Fc 영역 사슬에만 연결되어 있는 것을 특징으로 한다.
- [112] 앞선 구체예 중 어느 하나에 따른 조성물로서, 상기 조성물은 GLP-1 수용체 아고니스트(glucagon like peptide 1 receptor agonist)를 추가로 포함하는 것을 특징으로 한다.
- [113] 앞선 구체예 중 어느 하나에 따른 조성물로서, 상기 GLP-1 수용체 아고니스트는 GLP-1, 엑센딘-3, 엑센딘-4, 이들의 아고니스트(agonist), 유도체(derivative), 단편(fragment), 변이체(variant) 및 이들의 조합으로부터 구성되는 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 한다.
- [114] 앞선 구체예 중 어느 하나에 따른 조성물로서, 상기 GLP-1 수용체 아고니스트는 N-말단 히스티딘 잔기가 데스-아미노-히스티딘, 디메틸-히스티딘, 베타-히드록시 이미다조프로피오닐, 4-이미다조아세틸 및 베타-카르복시 이미다조프로피오닐로 구성되는 군으로부터 선택되는 물질로 치환된 GLP-1 수용체 아고니스트 유도체인 것을 특징으로 한다.
- [115] 앞선 구체예 중 어느 하나에 따른 조성물로서, 상기 GLP-1 수용체 아고니스트는 천연형 엑센딘-4, 엑센딘-4의 N-말단 아민 그룹이 제거된 엑센딘-4 유도체, 엑센딘-4의 N-말단 아민 그룹이 하이드록실 그룹으로 치환된 엑센딘-4 유도체, 엑센딘-4의 N-말단 아민 그룹이 디메틸기로 수식된 엑센딘-4 유도체, 엑센딘-4의 첫 번째 아미노산(히스티딘)의 알파 탄소를 제거 (deletion)한 엑센딘-4 유도체로 구성된 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 한다.
- [116] 앞선 구체예 중 어느 하나에 따른 조성물로서, 상기 GLP-1 수용체 아고니스트는 이미다조-아세틸 엑센딘-4(CA 엑센딘-4)인 것을 특징으로 한다.
- [117] 앞선 구체예 중 어느 하나에 따른 조성물로서, 상기 GLP-1 수용체 아고니스트는 GLP-1 수용체 아고니스트가 면역글로불린 Fc 영역과 연결된 지속형 결합체 형태인 것을 특징으로 한다.
- [118] 앞선 구체예 중 어느 하나에 따른 조성물로서, 상기 GLP-1 수용체

아고니스트는 이미다조-아세틸 엑센딘-4(CA 엑센딘-4)이 에틸렌글리콜 반복 단위를 함유하는 링커를 통해 면역글로불린 Fc 영역과 연결된 것을 특징으로 한다.

- [119] 본 발명을 구현하는 다른 하나의 양태는 글루카곤 유도체, 이의 결합체, 또는 이를 포함하는 조성물을 개체에 투여하는 단계를 포함하는 만성 신장 질환의 예방 또는 치료 방법이다.
- [120] 본 발명을 구현하는 다른 하나의 양태는 글루카곤 유도체 또는 이의 결합체, 및 GLP-1 수용체 아고니스트 또는 이의 결합체; 또는 이들을 포함하는 조성물을 개체에 투여하는 단계를 포함하는 만성 신장 질환의 예방 또는 치료 방법이다.
- [121] 본 발명을 구현하는 또 다른 하나의 양태는 글루카곤 유도체 또는 이의 결합체, 또는 이를 포함하는 조성물의 만성 신장 질환의 예방 또는 치료 용도이다.
- [122] 본 발명을 구현하는 또 다른 하나의 양태는 글루카곤 유도체 또는 이의 결합체, 및 GLP-1 수용체 아고니스트 또는 이의 결합체; 또는 이들을 포함하는 조성물의 만성 신장 질환의 예방 또는 치료 용도이다.
- [123] 본 발명을 구현하는 또 다른 하나의 양태는 글루카곤 유도체 또는 이의 결합체, 또는 이를 포함하는 조성물의 만성 신장 질환의 예방 또는 치료 용도를 갖는 약제의 제조를 위한 용도이다.
- [124] 본 발명을 구현하는 또 다른 하나의 양태는 글루카곤 유도체 또는 이의 결합체, 및 GLP-1 수용체 아고니스트 또는 이의 결합체; 또는 이를 포함하는 조성물의 만성 신장 질환의 예방 또는 치료 용도를 갖는 약제의 제조를 위한 용도이다.
- [125]

발명의 실시를 위한 형태

- [126] 이하에서는, 본 발명을 더욱 상세히 설명한다.
- [127] 한편, 본원에서 개시되는 각각의 설명 및 실시형태는 각각의 다른 설명 및 실시 형태에도 적용될 수 있다. 즉, 본원에서 개시된 다양한 요소들의 모든 조합이 본 발명의 범주에 속한다. 또한, 하기 기술되는 구체적인 서술에 의하여 본 발명의 범주가 제한된다고 할 수 없다. 또한, 본 명세서 전체에 걸쳐 다수의 논문 및 특허문헌이 참조되고 그 인용이 표시되어 있다. 인용된 논문 및 특허문헌의 개시 내용은 그 전체로서 본 명세서에 참조로 삽입되어 본 발명이 속하는 기술 분야의 수준 및 본 발명의 내용이 보다 명확하게 설명된다.
- [128]
- [129] 본 명세서 전반을 통하여, 천연적으로 존재하는 아미노산에 대한 통상의 1문자 및 3문자 코드가 사용될 뿐만 아니라 Aib (α -아미노이소부티르산), Sar (N-methylglycine), 알파-메틸-글루탐산 (α -methyl-glutamic acid) 등과 같은 다른 아미노산에 대해 일반적으로 허용되는 3문자 코드가 사용된다. 또한 본 명세서에서 약어로 언급된 아미노산은 IUPAC-IUB 명명법에 따라 기재되었다.
- [130]

- [131] 알라닌 Ala, A 아르기닌 Arg, R
- [132] 아스파라긴 Asn, N 아스파르트산 Asp, D
- [133] 시스테인 Cys, C 글루탐산 Glu, E
- [134] 글루타민 Gln, Q 글리신 Gly, G
- [135] 히스티딘 His, H 이소류신 Ile, I
- [136] 류신 Leu, L 리신 Lys, K
- [137] 메티오닌 Met, M 페닐알라닌 Phe, F
- [138] 프롤린 Pro, P 세린 Ser, S
- [139] 트레오닌 Thr, T 트립토판 Trp, W
- [140] 티로신 Tyr, Y 발린 Val, V
- [141]
- [142] 본 명세서에서 “Aib”는 “2-아미노이소부티르산(2-aminoisobutyric acid)” 또는 “아미노이소부티르산 (aminoisobutyric acid)”으로 혼용될 수 있으며, 2-아미노이소부티르산(2-aminoisobutyric acid)과 아미노이소부티르산 (aminoisobutyric acid)은 혼용되어 사용될 수 있다.
- [143]
- [144] 본 발명을 구현하는 하나의 양태는 글루카곤 유도체 또는 이의 결합체를 포함하는 조성물이다. 구체적으로, 상기 조성물은 글루카곤 유도체 또는 이의 결합체를 포함하는 만성 신장 질환(chronic kidney disease) 예방 또는 치료용 약학 조성물이다.
- [145] 하나의 구현예로, 상기 만성 신장 질환 예방 또는 치료용 약학 조성물은 약학적으로 허용되는 부형제와 글루카곤 유도체 또는 이의 결합체를 약학적 유효량으로 포함하는 약학 조성물일 수 있다.
- [146]
- [147] 본 발명에 따른 글루카곤 유도체 또는 이의 결합체를 유효 성분으로 포함하는 조성물은 글루카곤 수용체에 대한 작용을 통해 혈압을 낮추고, 신장 기능을 회복시켜 만성 신장 질환의 예방 또는 치료 효과를 가질 수 있다.
- [148]
- [149] 본 발명의 조성물은 만성 신장 질환의 예방 또는 치료 효과를 나타낼 수 있다.
- [150] 본 발명에서 용어, “만성 신장 질환(chronic kidney disease, CKD)”은 만성 콩팥병과 혼용되어 사용될 수 있으며, 3개월 이상 신장의 구조적 또는 기능적 이상이 존재하거나 신장의 손상여부와 관계없이 사구체여과율이 3개월 이상 60 mL/분/1.73 m² 이하로 감소하였을 때로 정의되는 독립된 질환명이다. 만성 신장 질환은 진행에 따라 5단계로 나누어 임상에 적용된다. 높은 혈당으로 인한 신장에 손상이 있거나, 혈압이 높은 상태가 오래 유지될 경우 만성 신장 질환의 발병 위험이 높으며, 이 외에도, 사구체 신장염, 다낭성 신장 질환, 자가 면역 질환(예를 들어, 루푸스병) 등도 만성 신장 질환의 원인으로 알려져 있다.
- [151] 상기 만성 신장 질환 환자는 사구체 여과율이 감소되어 소변으로 단백질이

배출되거나 (단백뇨), 신장의 기능이 저하된 상태를 나타내고, 특히, 고혈압은 만성 신장 질환의 원인이기도 하지만 만성 신장 질환에 의한 합병증으로도 이해되고 있다. 만성 신장 질환 환자는 사구체 고혈압 및 단백뇨를 동반하는 경우가 많아서, 혈압을 낮추고 단백뇨를 감소시키는 것이 중요한 만성 신장 질환의 치료에 필요한 것으로 알려져 있다.

[152]

[153] 상기 만성 신장 질환은 신염 증후군(nephrotic syndrome), 세관 장애(renal tubular dysfunction), 신성 고혈압(renal hypertension), 요독증(uremia), 신부전(renal failure), 및 만성 신부전(chronic renal failure)으로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나 이상의 질환을 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[154]

[155] 본 발명에 따른 글루카곤 유도체 또는 이의 결합체, 또는 이를 포함하는 조성물은 혈압을 낮추고, 및/또는 신장 기능의 회복 효과를 가질 수 있다.

[156] 상기 혈압 강하는 수축기 혈압(systolic blood pressure, SBP)과 이완기 혈압(diastolic blood pressure, DBP)의 감소를 의미할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[157] 상기 신장 기능 회복은 혈액 내 노폐물을 걸러내는 신장 고유의 기능을 회복하는 것을 의미하며, 다양한 방법으로 측정될 수 있다. 측정 방법의 제한되지 않는 예로, 알부민 배출량, 사구체여과율, 단백뇨, 크레아틴 농도 등을 측정할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[158] 본 발명에서, 단백뇨(proteinuria)는 사구체여과율이 낮아진 만성 신장 질환 환자의 소변에 정상치보다 높은 단백질(예를 들어, 알부민, 글로불린 등)이 포함되는 증상을 의미한다. 알부민은 요단백에서 약 40%를 차지하는 단백질로, 소변 내 알부민 수준을 측정함으로써 단백뇨 수준을 확인할 수 있다. 본 발명에 따른 글루카곤 유도체 또는 이의 결합체, 또는 이를 포함하는 조성물은 신장 기능을 회복시켜 체외로 배출되는 단백질(예를 들어, 알부민)의 양을 감소시키는 것일 수 있고, 따라서, 본 발명에서 단백뇨 감소는 신장 기능 회복과 같은 의미로 사용될 수 있다.

[159]

[160] 본 발명에 따른 글루카곤 유도체 또는 이의 결합체, 또는 이를 포함하는 조성물은 개체에 투여되었을 때 개체의 혈압 강하 효과를 나타내는 것일 수 있다. 또한, 글루카곤 유도체 또는 이의 결합체, 또는 이를 포함하는 조성물은 개체에 투여되었을 때 개체의 신장 기능을 회복시키는 것일 수 있다. 상기 혈압 강하 및 신장 기능 회복은 서로 독립적으로 본 발명에 따른 글루카곤 유도체 또는 이의 결합체, 또는 이를 포함하는 조성물에 의해 일어날 수 있으며, 또는, 함께 일어날 수도 있다.

[161]

[162] 본 발명에서, “개체”는 신장 손상, 신장 기능 이상, 및/또는 만성 신장 질환을

갖는 인간을 포함한 쥐, 가축 등을 포함하는 포유 동물을 의미할 수 있고, 혈압 강하 및/또는 신장 기능 회복으로 인해 이로온 효과를 얻을 수 있다면 특별히 제한되지 않는다.

[163]

[164] 본 발명의 실시예에서 이용된, 본태성고혈압 모델(spontaneously hypertensive rat, SHR)은 선천성 고혈압에 의한 신장 손상 등이 유도되어 만성 신장 질환 관련 모델로 알려져 있으며, 혈압 강하 치료제의 효능 평가에 이용된다. 본 발명의 실시예에서는 본 발명에 따른 펩타이드 글루카곤 유도체 또는 이의 지속형 결합체의 혈압 강하 및 신장 기능 회복 효과를 상기 모델에서 확인하였는 바, 이는 만성 신장 질환의 예방 또는 치료에 유용함을 시사하는 것이다.

[165]

[166] 본 발명에 따른 글루카곤 유도체 또는 이의 결합체, 또는 이를 포함하는 조성물은 투여된 개체에서 하기 특성 중 하나 이상을 나타내는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다:

[167] (a) 부형제 투여 대조군 대비 혈압 강하;

[168] (b) 부형제 투여 대조군 대비 알부민 배출량 감소;

[169] (c) 부형제 투여 대조군 대비 단백뇨 감소; 및

[170] (d) 부형제 투여 대조군 대비 신장 기능 회복.

[171] 본 발명에 따른 글루카곤 유도체 또는 이의 결합체, 또는 이를 포함하는 조성물은 상기 특성을 가져 만성 신장 질환에 대한 예방 또는 치료 효과를 가질 수 있다.

[172]

[173] 본 발명에서, "글루카곤"은 이자의 알파세포에서 분비되는 호르몬의 한 종류로, 글리코젠의 분해를 촉진함으로써 포도당의 농도를 상승시켜 체내의 혈당을 높이는 역할을 한다. 천연형 글루카곤은 다음의 아미노산 서열을 가질 수 있다:

[174] His-Ser-Gln-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Lys-Tyr-Leu-Asp-Ser-Arg-Arg-Ala-Gln-Asp-Phe-Val-Gln-Trp-Leu-Met-Asn-Thr(서열번호 1)

[175]

[176] 본 발명의 글루카곤의 유도체는 천연형 글루카곤과 비교하여 아미노산 서열에 하나 이상의 차이가 있는 펩타이드, 천연형 글루카곤 서열을 개질(modification)을 통하여 변형시킨 펩타이드, 천연형 글루카곤과 같이 글루카곤 수용체를 활성화시킬 수 있는 천연형 글루카곤의 모방체를 포함한다. 이러한 천연형 글루카곤의 유도체는 생체 내 혈압 강하 및/또는 신장 기능 회복 효과를 가지는 것일 수 있다.

[177] 또한, 상기 글루카곤 유도체는 천연적으로 존재하지 않는(non-naturally occurring) 것일 수 있다.

[178]

- [179] 본 발명에서, 상기 글루카곤 유도체는 천연형 글루카곤 대비 유의한 수준으로 글루카곤 수용체에 작용할 수 있는 펩타이드를 의미한다. 본 발명에서, 상기 글루카곤 유도체는 “글루카곤 수용체에 활성을 갖는 펩타이드”, “글루카곤 아날로그” 또는 “펩타이드”와 혼용되어 사용될 수 있다.
- [180] 본 발명의 글루카곤 유도체는, 글루카곤 수용체에 대한 활성을 갖는 펩타이드로서, 여기서, 수용체에 대한 활성은, 천연형 대비 수용체에 대한 *in vitro* 활성이 0.1% 이상, 0.2% 이상, 1% 이상, 2% 이상, 3% 이상, 4% 이상, 5% 이상, 6% 이상, 7% 이상, 8% 이상, 9% 이상, 10% 이상, 20% 이상, 30% 이상, 40% 이상, 50% 이상, 60% 이상, 70% 이상, 80% 이상, 90% 이상, 100% 이상, 또는 200% 이상을 나타내는 경우를 예로 들 수 있다. 그러나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [181] 구체적으로, 본 발명의 글루카곤 유도체는 글루카곤 수용체에 대해 *in vitro* 활성이 해당 수용체의 천연형 리간드 (천연형 글루카곤) 대비 약 0.001% 이상, 약 0.01% 이상, 약 0.1% 이상, 0.2% 이상, 약 1% 이상, 약 2% 이상, 약 3% 이상, 약 4% 이상, 약 5% 이상, 약 6% 이상, 약 7% 이상, 약 8% 이상, 약 9% 이상, 약 10% 이상, 약 20% 이상, 약 30% 이상, 약 40% 이상, 약 50% 이상, 약 60% 이상, 약 70% 이상, 약 80% 이상, 약 90% 이상, 약 100%, 약 200% 이상을 나타낼 수 있으나, 유의적으로 증가한 범위는 제한 없이 포함된다. 구체적으로, 본 발명의 글루카곤 수용체에 활성을 갖는 펩타이드는 천연형 글루카곤 대비 글루카곤 수용체에 대한 상대적 활성이 5% 이상, 10% 이상, 20% 이상, 또는 30% 이상인 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [182] 본 발명에서 용어, "약"은 ± 0.5 , ± 0.4 , ± 0.3 , ± 0.2 , ± 0.1 등을 모두 포함하는 범위로, 약 이란 용어 뒤에 나오는 수치와 동등하거나 유사한 범위의 수치를 모두 포함하나, 이에 제한되지 않는다.
- [183] 이러한 펩타이드의 *in vitro* 활성을 측정하는 방법은 당업계에 공지된 다양한 방법(예를 들어, WO 2016/108586, WO2017/003191, WO 2018/004283)을 이용할 수 있으나, 특별히 이에 제한되는 것은 아니다.
- [184]
- [185] 본 발명의 목적상, 상기 글루카곤의 유도체는 글루카곤 수용체의 아고니스트(agonist), 또는 천연형 글루카곤에서 하나 이상의 아미노산에 치환, 추가, 제거, 수식 및 이들의 조합으로 이루어지는 군에서 선택되는 변이가 일어난 아날로그, 또는 단편을 포함할 수 있다.
- [186] 본 발명에서, “글루카곤 수용체의 아고니스트”는 “작용제” 또는 “효능제”와 같은 의미로, 글루카곤 수용체와 결합하여 실제 생체 내에서 글루카곤과 같은 기능을 할 수 있는 물질을 의미한다.
- [187] 본 발명에서, “글루카곤 아날로그(glucagon analog)”란 천연형 글루카곤과 상이한 비천연형 글루카곤을 의미한다. 이러한 글루카곤 아날로그는 천연형 글루카곤의 일부 아미노산을 부가, 결실 또는 치환의 형태로 변형시킨 아날로그를 포함한다.

- [188] 본 발명에서, "단편"은 체내에서 만성 신장 질환 예방 또는 치료 효과를 가지면서, 천연형 글루카곤, 혹은 글루카곤의 유도체의 아미노 말단 혹은 카르복시 말단에 하나 또는 그 이상의 아미노산이 제거된 형태를 말한다.
- [189]
- [190] 본 발명의 글루카곤의 유도체는 천연형 글루카곤에서 일부 아미노산이 치환(substitution), 추가(addition), 제거(deletion) 및 수식(modification) 중 어느 하나의 방법 또는 이러한 방법들의 조합을 통하여 변형시킬 수 있다. 상기 아미노산의 치환은 일반적으로 잔기의 극성, 전하, 용해도, 소수성, 친수성 및/또는 양친매성(amphipathic nature)에서의 유사성에 근거하여 발생할 수 있고, 이와 같은 유사한 성질을 갖는 아미노산으로의 보존적 치환은 동일 또는 유사한 활성을 나타낼 것으로 기대할 수 있다.
- [191]
- [192] 이러한 방법들의 조합으로 제조되는 글루카곤의 유도체의 예로, 천연형 글루카곤과 아미노산 서열이 하나 이상 다르고, N-말단 아미노산 잔기에 탈아미노화 (deamination)된, 글루카곤 수용체에 대한 활성화 기능을 보유한 펩타이드 등이 있으나, 이에 제한되지 않으며, 유도체 제조를 위한 여러 방법들의 조합으로 본 발명에 적용되는 천연형 글루카곤의 유도체를 제조할 수 있다.
- [193]
- [194] 또한, 본 발명에서는 펩타이드 제조를 위한 L-형 혹은 D-형 아미노산, 및/또는 비-천연형 아미노산을 이용한 변형; 및/또는 천연형 서열을 개질, 예를 들어 측쇄 작용기의 변형, 분자 내 공유결합, 에킨대, 측쇄 간 고리 형성, 메틸화, 아실화, 유비퀴틴화, 인산화, 아미노핵산화, 바이오틴화 등과 같이 개질함으로써 변형하는 것을 모두 포함한다. 또한, 상기 변형은 비 천연형 화합물로의 치환을 모두 포함한다.
- [195] 또한, 아미노 및/또는 카르복시 말단에 하나 또는 그 이상의 아미노산이 추가된 것을 모두 포함한다.
- [196] 상기 치환되거나 추가되는 아미노산은 인간 단백질에서 통상적으로 관찰되는 20개의 아미노산뿐만 아니라 비정형 또는 비-자연적 발생 아미노산을 사용할 수 있다. 비정형 아미노산의 상업적 출처에는 Sigma-Aldrich, ChemPep과 Genzyme pharmaceuticals가 포함된다. 이러한 아미노산이 포함된 펩타이드와 정형적인 펩타이드 서열은 상업화된 펩타이드 합성 회사, 예를 들어 미국의 American peptide company나 Bachem, 또는 한국의 Anygen을 통해 합성 및 구매 가능하다.
- [197] 아미노산 유도체도 마찬가지로 방식으로 입수할 수 있는데, 그 예를 일부만 들자면 4-이미다조아세트산 (4-imidazoacetic acid) 등을 사용할 수 있다.
- [198]
- [199] 또한, 본 발명의 글루카곤 유도체는 상기 제조 방법이 독립적으로 사용되거나, 조합되어 사용되어 제조된 것일 수 있다.

- [200]
- [201] 하나의 구체적인 양태로서, 상기 글루카곤 유도체는 하기 일반식 1의 아미노산 서열을 포함하는 펩타이드일 수 있다.
- [202]
- [203] X1-X2-QGTF-X7-SD-X10-S-X12-X13-X14-X15-X16-X17-X18-X19-X20-X21-F-X23-X24-W-L-X27-X28-X29-X30 (일반식 1, 서열번호 46)
- [204]
- [205] 상기 식에서,
- [206] X1은 티로신이고;
- [207] X2는 알파-메틸-글루탐산(α -methyl-glutamic acid), Aib(aminoisobutyric acid), D-알라닌, 글리신, Sar(N-methylglycine), 세린 또는 D-세린이며;
- [208] X7은 트레오닌, 발린 또는 시스테인이고;
- [209] X10은 티로신 또는 시스테인이고;
- [210] X12는 리신 또는 시스테인이고;
- [211] X13은 티로신 또는 시스테인이고;
- [212] X14는 류신 또는 시스테인이고;
- [213] X15는 아스파르트산, 글루탐산 또는 시스테인이고;
- [214] X16은 글루탐산, 아스파르트산, 세린, 알파-메틸-글루탐산, 또는 시스테인이거나, 부존재하며;
- [215] X17은 아스파르트산, 글루타민, 글루탐산, 리신, 아르기닌, 세린, 시스테인, 또는 발린이거나, 부존재하며;
- [216] X18은 알라닌, 아스파르트산, 글루탐산, 아르기닌, 발린, 또는 시스테인이거나, 부존재하며;
- [217] X19는 알라닌, 아르기닌, 세린, 발린, 또는 시스테인이거나, 부존재하며;
- [218] X20은 리신, 히스티딘, 글루타민, 아스파르트산, 아르기닌, 알파-메틸-글루탐산, 또는 시스테인이거나, 부존재하며;
- [219] X21은 아스파르트산, 글루탐산, 류신, 발린, 또는 시스테인이거나, 부존재하며;
- [220] X23은 이소류신, 발린, 또는 아르기닌이거나, 부존재하며;
- [221] X24는 발린, 아르기닌, 알라닌, 시스테인, 글루탐산, 리신, 글루타민, 알파-메틸-글루탐산, 또는 류신이거나, 부존재하며;
- [222] X27은 이소류신, 발린, 알라닌, 리신, 메티오닌, 글루타민, 또는 아르기닌이거나, 부존재하며;
- [223] X28은 글루타민, 리신, 아스파라긴, 또는 아르기닌이거나, 부존재하며;
- [224] X29는 트레오닌(T)이고;
- [225] X30은 시스테인이거나, 부존재할 수 있다
- [226] (단, 상기 일반식 1의 아미노산 서열이 서열번호 1 또는 12와 동일한 경우는 제외함).
- [227]

- [228] 보다 더 구체적으로는,
- [229] 상기 일반식 1에서,
- [230] X2가 Aib(aminoisobutyric acid)이며;
- [231] X7은 트레오닌(T), 발린(V) 또는 시스테인(C)이고;
- [232] X10은 티로신(Y)이고;
- [233] X12는 리신(K)이고;
- [234] X13은 티로신(Y)이고;
- [235] X14는 류신(L) 또는 시스테인(C)이고;
- [236] X15는 아스파르트산(D) 이고;
- [237] X16은 글루탐산(E), 또는 세린(S) 이며;
- [238] X17은 리신(K), 아르기닌(R), 또는 시스테인(C) 이고;
- [239] X18은 아르기닌(R) 이며;
- [240] X19는 알라닌(A), 또는 시스테인(C)이고;
- [241] X20은 글루타민(Q), 또는 리신(K) 이며;
- [242] X21은 아스파르트산(D), 또는 글루탐산(E) 이고;
- [243] X23은 발린(V) 이며;
- [244] X24는 글루타민(Q) 이고;
- [245] X27는 메티오닌(M) 이며;
- [246] X28은 아스파라긴(N) 이고;
- [247] X29는 트레오닌(T)이며;
- [248] X30은 시스테인(C)이거나, 부존재할 수 있다.
- [249]
- [250] 본 발명의 다른 구체예로서, 상기 글루카곤 유도체는 서열번호 2 내지 45로 이루어진 군에서 선택된 아미노산 서열을 포함하는 것, 구체적으로 서열번호 2 내지 45로 이루어진 군에서 선택된 아미노산 서열로 (필수적으로) 구성된 것 일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 구체적으로, 상기 글루카곤 유도체는 서열번호 2 내지 11, 13 내지 45로 이루어진 군에서 선택된 아미노산 서열을 포함하는 것, 구체적으로 서열번호 2 내지 11, 13 내지 45로 이루어진 군에서 선택된 아미노산 서열로 (필수적으로) 구성된 것 일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [251] 다른 구체예로서, 상기 글루카곤 유도체는 서열번호 7 내지 11, 및 13 내지 25, 27, 29, 31, 33, 35 내지 45로 이루어진 군에서 선택된 아미노산 서열을 포함하거나, (필수적으로) 구성된 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [252] 또는, 상기 글루카곤 유도체는 서열번호 20, 22, 23, 27, 33, 35, 37, 38, 40, 41, 42, 및 44로 이루어진 군에서 선택되는 아미노산 서열을 포함하거나, (필수적으로) 구성된 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [253] 본원에서 '특정 서열번호로 구성되는'이라고 기재되어 있다 하더라도, 해당 서열번호의 아미노산 서열로 이루어진 펩타이드와 동일 혹은 상응하는 활성을

가지는 경우라면 해당 서열번호의 아미노산 서열 앞뒤의 무의미한 서열 추가 또는 자연적으로 발생할 수 있는 돌연변이, 혹은 이의 잠재성 돌연변이 (silent mutation)를 제외하는 것이 아니며, 이러한 서열 추가 혹은 돌연변이를 가지는 경우에도 본원의 범위 내에 속하는 것이 자명하다. 즉, 일부 서열의 차이가 있더라도 일정 수준 이상의 상동성을 나타내며 글루카곤 수용체에 대한 활성을 나타낸다면 본 발명의 범위에 속할 수 있다.

- [254] 예를 들어, 본 발명의 글루카곤 유도체는 천연형 글루카곤과 서열 동일성을 비교하였을 때, 적어도 60% 이상, 65% 이상, 70% 이상, 75% 이상, 80% 이상, 85% 이상, 90% 이상, 91% 이상, 92% 이상, 93% 이상, 94% 이상, 또는 95% 이상의 서열 동일성을 가지는 경우를 들 수 있으며, 만성 신장 질환의 예방 또는 치료 효과를 갖는 이상, 특정 서열로 제한되지 않는다. 본 발명의 글루카곤 유도체에 대해서는 WO 2016/108586, WO2017/003191, WO 2018/004283를 참조할 수 있다.
- [255] 또한, 본 발명의 글루카곤 유도체는 서열번호 2 내지 45 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하거나, 서열번호 2 내지 45 중 어느 하나의 아미노산 서열로 (필수적으로) 구성되거나, 또는 서열번호 2 내지 45 중 어느 하나의 아미노산 서열과 적어도 60% 이상, 65% 이상, 70% 이상, 75% 이상, 80% 이상, 85% 이상, 90% 이상, 91% 이상, 92% 이상, 93% 이상, 94% 이상, 또는 95% 이상의 서열 동일성을 가지는 펩타이드도 포함할 수 있으며, 만성 신장 질환의 예방 또는 치료 효과를 갖는 이상, 특정 서열로 제한되지 않는다.
- [256]
- [257] 본 발명에서 용어, '상동성(homology)' 또는 '동일성(identity)'은 두 개의 주어진 아미노산 서열 또는 염기 서열과 서로 관련된 정도를 의미하며 백분율로 표시될 수 있다.
- [258] 용어 상동성 및 동일성은 종종 상호교환적으로 이용될 수 있다.
- [259] 임의의 두 펩타이드 서열이 상동성, 유사성 또는 동일성을 갖는지 여부는 예를 들어, Pearson et al (1988)[Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85]: 2444에서와 같은 디폴트 파라미터를 이용하여 "FASTA" 프로그램과 같은 공지의 컴퓨터 알고리즘을 이용하여 결정될 수 있다. 또는, EMBOSS 패키지의 니들만 프로그램(EMBOSS: The European Molecular Biology Open Software Suite, Rice et al., 2000, Trends Genet. 16: 276-277)(버전 5.0.0 또는 이후 버전)에서 수행되는 바와 같은, 니들만-운치(Needleman-Wunsch) 알고리즘(Needleman and Wunsch, 1970, J. Mol. Biol. 48: 443-453)이 사용되어 결정될 수 있다. (GCG 프로그램 패키지 (Devereux, J., et al, Nucleic Acids Research 12: 387 (1984)), BLASTP, BLASTN, FASTA (Atschul, [S.] [F.,] [ET AL, J MOLEC BIOL 215]: 403 (1990); Guide to Huge Computers, Martin J. Bishop, [ED.,] Academic Press, San Diego, 1994, 및 [CARILLO ETA/.(1988) SIAM J Applied Math 48: 1073을 포함한다). 예를 들어, 국립 생물공학 정보 데이터베이스 센터의 BLAST, 또는 ClustalW를 이용하여 상동성, 유사성 또는 동일성을 결정할 수 있다.

- [260] 펩타이드의 상동성, 유사성 또는 동일성은 예를 들어, Smith and Waterman, Adv. Appl. Math (1981) 2:482에 공지된 대로, 예를 들면, Needleman et al. (1970), J Mol Biol. 48: 443과 같은 GAP 컴퓨터 프로그램을 이용하여 서열 정보를 비교함으로써 결정될 수 있다. 요약하면, GAP 프로그램은 두 서열 중 더 짧은 것에서의 기호의 전체 수로, 유사한 배열된 기호(즉, 아미노산)의 수를 나눈 값으로 정의한다. GAP 프로그램을 위한 디폴트 파라미터는 (1) 일진법 비교 매트릭스(동일성을 위해 1 그리고 비-동일성을 위해 0의 값을 함유함) 및 Schwartz and Dayhoff, eds., Atlas Of Protein Sequence And Structure, National Biomedical Research Foundation, pp. 353-358 (1979)에 의해 개시된 대로, Gribskov et al (1986) Nucl. Acids Res. 14: 6745의 가중된 비교 매트릭스 (또는 EDNAFULL(NCBI NUC4.4의 EMBOSS 버전) 치환 매트릭스); (2) 각 갭을 위한 3.0의 페널티 및 각 갭에서 각 기호를 위한 추가의 0.10 페널티 (또는 갭 개방 페널티 10, 갭 연장 페널티 0.5); 및 (3) 말단 갭을 위한 무 페널티를 포함할 수 있다. 따라서, 본 발명에서 사용된 것으로서, 용어 "상동성" 또는 "동일성"은 서열들간의 관련성(relevance)를 나타낸다.
- [261]
- [262] 상술한 본 발명의 글루카곤 유도체는 분자 내 가교 (intramolecular bridge)를 포함할 수 있으며 (예컨대, 공유결합적 가교 또는 비공유결합적 가교), 구체적으로 아미노산 잔기 사이에 고리를 포함하는 형태일 수 있다. 예컨대 펩타이드의 12번 및 16번, 또는 16번 및 20번 아미노산 사이에 고리가 형성된 형태일 수 있으나, 특별히 이에 제한되는 것은 아니다.
- [263] 상기 고리의 비제한적인 예로 락탐 가교 (또는 락탐 고리)를 포함할 수 있다.
- [264] 또한, 상기 글루카곤 유도체는 고리를 포함하도록, 목적하는 위치에 고리를 형성할 수 있는 아미노산을 포함하도록 변형된 것을 모두 포함한다.
- [265] 이러한 고리는 상기 글루카곤 유도체 내의 아미노산 결 사슬 간에 형성될 수 있으며, 그 예로 리신의 결 사슬과 글루탐산의 결 사슬 간에 락탐 고리가 형성되는 형태일 수 있으나, 특별히 이에 제한되는 것은 아니다.
- [266] 예컨대, 상기 일반식 1의 아미노산 서열을 포함하는 펩타이드는 일반식 1의 X10과 X14, X12와 X16, X16과 X20, X17과 X21, X20과 X24, 및 X24와 X28의 아미노산 쌍에서, 각 아미노산 쌍의 아미노산이 각각 글루탐산 또는 리신으로 치환된 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 상기, X_n (n은 자연수)에서 n은 제시된 아미노산 서열의 N-말단으로부터의 아미노산 위치를 나타낸다.
- [267] 또한, 상기 일반식 1의 아미노산 서열을 포함하는 펩타이드는 X12와 X16의 아미노산 쌍, X16과 X20의 아미노산 쌍, 또는 X17과 X21의 아미노산 쌍의 아미노산 각각이 고리를 형성할 수 있는 글루탐산 또는 리신으로 치환된 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [268] 또한, 상기 일반식 1에서, X10과 X14, X12와 X16, X16과 X20, X17과 X21, X20과 X24, 및 X24와 X28의 아미노산 쌍 중 적어도 하나의 아미노산 쌍에서 각

아미노산 쌍의 각각의 아미노산 간에 고리 (예컨대, 락탐 고리)를 형성한 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[269] 또한, 상기 일반식 1에서, X16이 글루탐산이고, X20은 리신이며, X16과 X20의 측쇄가 락탐 고리를 형성하고 있는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[270]

[271] 한편, 본 발명의 글루카곤 유도체는 N-말단 및/또는 C-말단이 변형되지 않은 것일 수 있으나, 생체 내의 단백질 절단 효소들로부터 보호하고 안정성을 증가시키기 위하여 이의 N-말단 및/또는 C-말단 등이 화학적으로 수식되거나 유기단으로 보호되거나, 또는 글루카곤 유도체 말단 등에 아미노산이 추가되어 변형된 형태 역시 본 발명에 따른 글루카곤 유도체의 범주에 포함된다. C-말단이 변형되지 않은 경우, 본 발명에 따른 글루카곤 유도체의 말단은 카르복실기를 가지나, 특별히 이에 제한되는 것은 아니다.

[272] 특히, 화학적으로 합성한 글루카곤 유도체의 경우, N- 및 C-말단이 전하를 띠고 있기 때문에, 이러한 전하를 제거하기 위하여 N-말단을 아세틸화 (acetylation) 및/또는 C-말단을 아미드화 (amidation)할 수 있으나, 특별히 이에 제한되지는 않는다.

[273] 구체적으로, 본 발명의 글루카곤 유도체의 N-말단 또는 C-말단은 아민기(-NH₂) 또는 카르복실기(-COOH)를 가질 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[274]

[275] 본 발명에서, 상기 글루카곤 유도체는 이의 생체 내 반감기를 증가시킬 수 있는 생체적합성 물질부가 결합되어 있는 결합체 형태일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[276]

[277] 본 발명의 용어, “지속형 결합체” 또는 “결합체”는 상기 글루카곤 유도체와 생체적합성물질이 결합된 구조를 가지며, 상기 생체적합성물질이 결합되지 않은 글루카곤 유도체에 비해 증가된 효력의 지속성을 나타낼 수 있다. 상기 지속형 결합체에서 생체적합성물질은 글루카곤 유도체에 공유결합으로 연결된 것일 수 있으나, 특별히 이에 제한되지 않는다. 본 발명에서, 상기 결합체의 일 구성 요소인 글루카곤 유도체는 천연형 글루카곤 서열에서 하나 이상의 아미노산에 치환, 추가, 제거, 수식, 또는 이들의 조합의 변이가 일어난 펩타이드 또는 단편일 수 있으며, 생체적합성물질의 결합에 의해 활성을 상실하지 않는 것일 수 있으나, 만성 신장 질환의 예방 또는 치료 효과를 갖는 한, 제한 없이 본 발명의 결합체의 일 구성 요소로 사용될 수 있다.

[278] 예를 들어, 상기 결합체에 포함되는 글루카곤 유도체는 상술한 일반식 1의 아미노산 서열을 포함하는 펩타이드일 수 있다. 또는, 상기 결합체에 포함되는 글루카곤 유도체는 서열번호 2 내지 45 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하는 펩타이드일 수 있다. 또는, 상기 결합체에 포함되는 글루카곤 유도체는 서열번호 2 내지 11, 및 13 내지 45 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하는

펩타이드일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[279]

[280] 본 발명에서 용어, "생체적합성물질"은 생리활성물질인 본 발명의 글루카곤 유도체에 결합되어 생체적합성 물질부 또는 캐리어와 결합되지 않은 생리활성물질에 비하여 생리활성물질의 효력의 지속성을 증가시켜줄 수 있는 물질을 지칭한다. 상기 생체적합성물질은 생리활성물질에 공유결합으로 연결된 것일 수 있으나, 특별히 이에 제한되지 않는다.

[281]

[282] 상기 생체적합성 물질은 고분자 중합체, 지방산, 콜레스테롤, 알부민 및 이의 단편, 알부민 결합물질, 특정 아미노산 서열의 반복단위의 중합체, 항체, 항체 단편, FcRn 결합물질, 생체 내 결합조직, 뉴클레오타이드, 파이브로넥틴, 트랜스페린(Transferrin), 다당류(saccharide), 헤파린, 및 엘라스틴으로 이루어진 군에서 선택되는 것일 수 있으나, 특별히 이에 제한되지 않는다.

[283] 한 예로, 상기 FcRn 결합물질은 면역글로불린 Fc 영역일 수 있으며, 보다 구체적으로 IgG Fc 영역일 수 있으나, 특별히 이에 제한되지 않는다.

[284] 본 발명의 펩타이드 내의 하나 이상의 아미노산 측쇄는 생체 내에서 가용성 및/또는 반감기를 증가시키고/시키거나 생체이용율을 증가시키기 위해 이러한 생체적합성 물질에 접합될 수 있다. 이러한 변형은 또한 치료학적 단백질 및 펩타이드의 소거 (clearance)를 감소시킬 수 있다.

[285] 상술한 생체적합성 물질은 수용성 (양친매성 또는 친수성) 및/또는 무독성 및/또는 약학적으로 허용가능한 것일 수 있다.

[286]

[287] 하기에서는 본 발명의 조성물 포함되는 유효성분인 글루카곤 유도체의 지속형 결합체에 대해 보다 구체적으로 설명한다.

[288] 본 발명의 글루카곤 유도체의 지속형 결합체는 글루카곤 유도체에 면역글로불린 Fc 영역이 서로 연결된 형태를 지칭한다. 구체적으로, 상기 결합체는 글루카곤 유도체에 면역글로불린 Fc 영역이 링커를 통하여 공유결합적으로 연결된 것일 수 있으나, 특별히 이에 제한되지 않는다.

[289] 상기 글루카곤 유도체의 지속형 결합체는 면역글로불린 Fc 영역이 결합되지 않은 글루카곤 유도체에 비하여 증가된 효력의 지속성을 나타낼 수 있으며, 본 발명에서는 상기 일반식 1 펩타이드의 화학식 1에 따른 결합체는 "지속형 결합체"로 하며, "글루카곤 유도체의 지속형 결합체"와 혼용될 수 있다.

[290]

[291] 구체적으로, 상기 글루카곤 유도체 또는 펩타이드는 지속형 결합체의 형태이고, 상기 지속형 결합체는 하기 화학식 1로 표시되는 결합체 일 수 있다:

[292] [화학식 1]

[293] X - L - F

[294] 단 이 때 X는 상기 일반식 1의 아미노산 서열을 포함하는 펩타이드(글루카곤

유도체)이고;

- [295] L은 에틸렌글리콜 반복 단위를 함유하는 링커이며,
- [296] F는 면역글로불린 Fc 영역이고,
- [297] -는 X와 L 사이, L과 F 사이의 공유결합 연결을 나타낸다.
- [298] 본 발명의 지속형 결합체는 일반식 1의 아미노산 서열을 포함하는 펩타이드(글루카곤 유도체)를 결합체의 일부로서 포함하는 것을 특징으로 한다.
- [299]
- [300] 본 발명의 결합체는 결합체의 형태에서도 글루카곤 유도체와 마찬가지로 글루카곤 수용체에 대해 유의적인 활성을 나타낼 수 있고, 따라서, 혈압 강하 및 신장 기능 회복을 통한 만성 신장 질환의 예방 또는 치료 효능을 발휘할 수 있다.
- [301] 구체적으로, 본 발명의 결합체는 천연형 글루카곤 대비 글루카곤 수용체에 대한 *in vitro* 활성이 약 0.01% 이상, 0.1% 이상, 0.2% 이상, 0.5% 이상, 0.7% 이상, 1% 이상, 2% 이상, 3% 이상, 4% 이상, 5% 이상, 6% 이상, 7% 이상, 8% 이상, 9% 이상, 10% 이상, 20% 이상, 30% 이상, 40% 이상, 50% 이상, 60% 이상, 70% 이상, 80% 이상, 90% 이상, 100% 이상일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [302] 본 발명의 목적상, 상기 펩타이드(글루카곤 유도체) 또는 이의 결합체는 천연형 글루카곤 대비 글루카곤 수용체에 대한 활성이 약 0.01% 이상, 약 0.1% 이상, 1% 이상, 2% 이상, 3% 이상, 4% 이상, 5% 이상, 10% 이상, 20% 이상, 30% 이상, 40% 이상, 50% 이상, 60% 이상, 70% 이상, 80% 이상, 90% 이상, 100% 이상, 200% 이상일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [303]
- [304] 본 발명의 조성물은 (i) 글루카곤 수용체에 대해 활성을 갖는 글루카곤 유도체 또는 (ii) 상기 글루카곤 유도체의 지속형 결합체를 포함하는 것일 수 있으며, 상기 지속형 결합체는 증가된 체내 지속성을 바탕으로, 우수한 만성 신장 질환의 예방 또는 치료 효과를 나타낼 수 있다.
- [305]
- [306] 상기 결합체에서 F는 반감기를 증가시키는 생체적합성물질, 구체적으로는 X, 즉 본 발명의 글루카곤 유도체의 반감기를 증가시킬 수 있는 물질로서, 본 발명의 상기 결합체를 구성하는 모이어티의 일 구성에 해당한다.
- [307] 상기 F는 X와 공유 화학결합 또는 비공유 화학결합으로 서로 결합되는 것일 수 있으며, 공유 화학결합, 비공유 화학결합 또는 이들의 조합으로 L을 통하여 F와 X가 서로 결합되는 것일 수 있다.
- [308] 보다 구체적으로, X와 L, 및 L과 F는 공유결합으로 서로 연결되는 것일 수 있으며, 이때 상기 결합체는 화학식 1의 순서로, X, L, 및 F가 공유결합을 통하여 각각 연결된 결합체이다.
- [309]
- [310] 본 발명에서, 상기 F는 면역글로불린 Fc 영역일 수 있다.
- [311] 상기 "면역글로불린 Fc 영역"은, 면역글로불린의 중쇄와 경쇄 가변영역을

제외한, 중쇄 불변영역 2(CH2) 및/또는 중쇄 불변영역 3(CH3)부분을 포함하는 부위를 의미한다. 상기 면역글로불린 Fc 영역은 본 발명의 결합체의 모이어티를 이루는 일 구성일 수 있다. 구체적으로, 상기 화학식 1에서 F에 해당한다.

- [312] 본 명세서에서 Fc 영역이라고 하면 면역글로불린의 과파인 소화에서 얻는 천연형 서열뿐 아니라 그 유도체, 예컨대 천연 서열 중의 하나 이상의 아미노산 잔기가 결실, 삽입, 비보전적 또는 보전적 치환 또는 이들의 조합에 의하여 변환되어 천연형과 상이하게 된 서열등 변형체까지 망라하여 포함된다. 상기 유도체, 치환체, 변형체는 FcR_n 에 결합하는 능력을 보유하는 것을 전제로 한다. 본 발명에서, F는 사람 면역글로불린 영역일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 상기 F는, 2개의 폴리펩타이드 사슬이 이황화결합으로 연결되어 있는 구조이며, 상기 두 사슬 중 한 사슬의 질소 원자를 통해서만 연결되어 있는 구조일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 상기 질소 원자를 통한 연결은 리신의 입실론 아미노 원자나 N-말단 아미노기에 환원적 아민화를 통하여 연결될 수 있다.
- [313] 환원적 아민화 반응이란 반응물의 아민기 또는 아미노기가 다른 반응물의 알데히드 (즉, 환원적 아민화가 가능한 작용기)와 반응하여 아민을 생성한 다음, 환원 반응에 의해 아민 결합을 형성시키는 반응을 의미하여, 당해 기술 분야에 널리 알려져 있는 유기합성 반응이다.
- [314] 하나의 구체예로, 상기 F는 그 N-말단 프롤린의 질소 원자를 통하여 연결된 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [315] 상기 면역글로불린 Fc 영역은 본 발명의 화학식 1의 결합체의 모이어티를 이루는 일 구성으로, 구체적으로, 상기 화학식 1에서 F에 해당할 수 있다.
- [316] 이러한 면역글로불린 Fc 영역은 중쇄 불변영역에 힌지(hinge) 부분을 포함할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [317] 본 발명의 용어, "힌지 서열"은 중쇄에 위치하여 이황화결합(inter disulfide bond)를 통하여 면역글로불린 Fc 영역의 이량체를 형성하는 부위를 의미한다.
- [318] 본 발명에서, 상기 힌지 서열은 하기의 아미노산 서열을 갖는 힌지 서열 중 일부가 결실되어 하나의 시스테인 잔기만을 갖도록 변이된 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다:
- [319] Glu-Ser-Lys-Tyr-Gly-Pro-Pro-Cys-Pro(서열번호 47).
- [320] 상기 힌지 서열은 서열번호 47의 힌지 서열 중 8번째 또는 11번째 시스테인 잔기가 결실되어 하나의 시스테인 잔기만을 포함하는 것일 수 있다. 본 발명의 힌지 서열은 하나의 시스테인 잔기만을 포함하는, 3 내지 12개의 아미노산으로 구성된 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 보다 구체적으로, 본 발명의 힌지 서열은 다음과 같은 서열을 가질 수 있다:
- Glu-Ser-Lys-Tyr-Gly-Pro-Pro-Pro-Ser-Cys-Pro(서열번호 48),
 Glu-Ser-Lys-Tyr-Gly-Pro-Pro-Cys-Pro-Ser-Pro(서열번호 49),
 Glu-Ser-Lys-Tyr-Gly-Pro-Pro-Cys-Pro-Ser(서열번호 50),

Glu-Ser-Lys-Tyr-Gly-Pro-Pro-Cys-Pro-Pro(서열번호 51),
 Lys-Tyr-Gly-Pro-Pro-Cys-Pro-Ser(서열번호 52),
 Glu-Ser-Lys-Tyr-Gly-Pro-Pro-Cys(서열번호 53),
 Glu-Lys-Tyr-Gly-Pro-Pro-Cys(서열번호 54), Glu-Ser-Pro-Ser-Cys-Pro(서열번호 55),
 Glu-Pro-Ser-Cys-Pro(서열번호 56), Pro-Ser-Cys-Pro(서열번호 57),
 Glu-Ser-Lys-Tyr-Gly-Pro-Pro-Ser-Cys-Pro(서열번호 58),
 Lys-Tyr-Gly-Pro-Pro-Pro-Ser-Cys-Pro(서열번호 59),
 Glu-Ser-Lys-Tyr-Gly-Pro-Ser-Cys-Pro(서열번호 60),
 Glu-Ser-Lys-Tyr-Gly-Pro-Pro-Cys(서열번호 61),
 Lys-Tyr-Gly-Pro-Pro-Cys-Pro(서열번호 62), Glu-Ser-Lys-Pro-Ser-Cys-Pro(서열번호 63),
 Glu-Ser-Pro-Ser-Cys-Pro(서열번호 64), Glu-Pro-Ser-Cys(서열번호 65),
 Ser-Cys-Pro(서열번호 66).

- [321] 더욱 구체적으로는 상기 힌지 서열은 서열번호 57(Pro-Ser-Cys-Pro)또는 서열번호 66(Ser-Cys-Pro)의 아미노산 서열을 포함하는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [322] 본 발명의 면역글로불린 Fc 영역은 힌지 서열의 존재로 면역글로불린 Fc 사슬 두 분자가 이량체를 형성한 형태일 수 있고, 또한, 본 발명의 화학식 1의 결합체는 링커의 일 말단이 이량체의 면역글로불린 Fc 영역의 한 사슬에 연결된 형태일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [323] 본 발명의 용어, "N-말단"은 단백질 또는 폴리펩티드의 아미노 말단을 의미하는 것으로, 아미노 말단의 최말단, 또는 최말단으로부터 1개, 2개, 3개, 4개, 5개, 6개, 7개, 8개, 9개, 또는 10개 이상의 아미노산까지 포함하는 것일 수 있다. 본 발명의 면역글로불린 Fc 영역은 힌지 서열을 N-말단에 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [324] 또한 본 발명의 면역글로불린 Fc 영역은 천연형과 실질적으로 동등하거나 향상된 효과를 갖는 한, 면역 글로불린의 중쇄와 경쇄 가변영역만을 제외하고, 일부 또는 전체 중쇄 불변영역 1(CH1) 및/또는 경쇄불변영역 1(CL1)을 포함하는 확장된 Fc 영역일 수 있다. 또한, CH2 및/또는 CH3에 해당하는 상당히 긴 일부 아미노산 서열이 제거된 영역일 수도 있다.
- [325] 예컨대, 본 발명의 면역글로불린 Fc 영역은 1) CH1 도메인, CH2 도메인, CH3 도메인 및 CH4 도메인, 2) CH1 도메인 및 CH2 도메인, 3) CH1 도메인 및 CH3 도메인, 4) CH2 도메인 및 CH3 도메인, 5) CH1 도메인, CH2 도메인, CH3 도메인 및 CH4 도메인 중 1개 또는 2개의 이상의 도메인과 면역글로불린 힌지 영역(또는 힌지 영역의 일부)와의 조합, 6) 중쇄 불변 영역 각 도메인과 경쇄 불변영역의 이량체일 수 있다. 그러나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [326] 본 발명에서, 상기 면역글로불린 Fc 영역은 동일한 기원의 도메인으로 이루어진 단쇄 면역글로불린들로 구성된, 이량체 또는 다량체 형태일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[327]

[328] 또한, 상기 면역글로불린 Fc 영역 F는 두 개의 폴리펩타이드 사슬로 이루어진 이량체(이합체 dimer)이며, 이 때 상기 Fc 영역 이량체 F와 X는 에틸렌글리콜 반복 단위를 함유하는 하나의 동일한 링커 L을 통하여 공유결합적으로 연결되어 있다. 이 실시 형태의 한 구체예에서, X는 이러한 Fc 영역 이량체 F의 두 폴리펩타이드 사슬 중 하나의 폴리펩타이드 사슬에만 링커 L을 통하여 공유결합으로 연결되어 있다. 이 실시 형태의 더욱 구체적인 예시에서, 이러한 Fc 영역 이량체 F의 두 폴리펩타이드 사슬 중 X가 연결된 하나의 폴리펩타이드 사슬에는 한 분자의 X만이 L을 통하여 공유결합적으로 연결되어 있다. 이 실시 형태의 가장 구체적인 예시에서 상기 F는 동종이량체(homodimer)이다.

[329]

다른 구체예에서, 상기 면역글로불린 Fc 영역 F는 두 개의 폴리펩타이드 사슬로 이루어진 이량체이며, L의 한 말단이 상기 두 폴리펩타이드 사슬 중 하나의 폴리펩타이드 사슬에만 연결되어 있는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[330]

본 발명의 지속형 결합체의 다른 실시 형태에서는, 이량체 형태의 하나의 Fc 영역에 X 두 분자가 대칭적으로 결합하는 것 역시 가능하다. 이때 상기 면역글로불린 Fc 영역과 X는 비펩타이드성 링커에 의해 서로 연결될 수 있다. 그러나, 상기 기술된 예에 제한되는 것은 아니다.

[331]

또한, 본 발명의 면역글로불린 Fc 영역은 천연형 아미노산 서열뿐만 아니라 이의 서열 유도체를 포함한다. 아미노산 서열 유도체란 천연 아미노산 서열 중의 하나 이상의 아미노산 잔기가 결실, 삽입, 비보전적 또는 보전적 치환 또는 이들의 조합에 의하여 상이한 서열을 가지는 것을 의미한다.

[332]

예를 들면, IgG Fc의 경우 결합에 중요하다고 알려진 214 내지 238, 297 내지 299, 318 내지 322 또는 327 내지 331번 아미노산 잔기들이 변형을 위해 적당한 부위로서 이용될 수 있다.

[333]

또한, 이황화 결합을 형성할 수 있는 부위가 제거되거나, 천연형 Fc에서 N-말단의 몇몇 아미노산이 제거되거나 또는 천연형 Fc의 N-말단에 메티오닌 잔기가 부가될 수도 있는 등 다양한 종류의 유도체가 가능하다. 또한, 이펙터 기능을 없애기 위해 보체결합부위, 예로 C1q 결합부위가 제거될 수도 있고, ADCC (antibody dependent cell mediated cytotoxicity) 부위가 제거될 수도 있다. 이러한 면역글로불린 Fc 영역의 서열 유도체를 제조하는 기술은 국제특허공개 제WO 97/34631호, 국제특허공개 제96/32478호 등에 개시되어 있다.

[334]

분자의 활성을 전체적으로 변경시키지 않는 단백질 및 펩타이드에서의 아미노산 교환은 당해 분야에 공지되어 있다 (H.Neurath, R.L.Hill, The Proteins, Academic Press, New York, 1979). 가장 통상적으로 일어나는 교환은 아미노산 잔기 Ala/Ser, Val/Ile, Asp/Glu, Thr/Ser, Ala/Gly, Ala/Thr, Ser/Asn, Ala/Val, Ser/Gly, Thy/Phe, Ala/Pro, Lys/Arg, Asp/Asn, Leu/Ile, Leu/Val, Ala/Glu, Asp/Gly 간의 교환이다. 경우에 따라서는 인산화(phosphorylation), 황화(sulfation),

아크릴화(acrylation), 당화(glycosylation), 메틸화(methylation), 파네실화(farnesylation), 아세틸화(acetylation) 및 아미드화(amidation) 등으로 수식(modification)될 수도 있다.

- [335] 상기 기술한 Fc 유도체는 본 발명의 Fc 영역과 동등한 생물학적 활성을 나타내며 Fc 영역의 열, pH 등에 대한 구조적 안정성을 증대시킨 것일 수 있다.
- [336] 또한, 이러한 Fc 영역은 인간, 소, 염소, 돼지, 마우스, 래빗, 햄스터, 랫트 또는 기니아 피그 등의 동물의 생체 내에서 분리한 천연형으로부터 얻어질 수도 있고, 형질전환된 동물세포 또는 미생물로부터 얻어진 재조합형 또는 이의 유도체일 수 있다. 여기서, 천연형으로부터 획득하는 방법은 전체 면역글로불린을 인간 또는 동물의 생체로부터 분리한 후, 단백질을 분해효소를 처리하여 획득하는 방법일 수 있다. 파파인을 처리할 경우에는 Fab 및 Fc로 절단되고, 펩신을 처리할 경우에는 pF'c 및 F(ab)₂로 절단된다. 이를 크기 배제 크로마토그래피(size-exclusion chromatography) 등을 이용하여 Fc 또는 pF'c를 분리할 수 있다. 더 구체적인 실시 형태에서는 인간 유래의 Fc 영역을 미생물로부터 수득한 재조합형 면역글로불린 Fc 영역이다.
- [337] 또한, 면역글로불린 Fc 영역은 천연형 당쇄, 천연형에 비해 증가된 당쇄, 천연형에 비해 감소한 당쇄 또는 당쇄가 제거된 형태일 수 있다. 이러한 면역글로불린 Fc 당쇄의 증감 또는 제거에는 화학적 방법, 효소학적 방법 및 미생물을 이용한 유전 공학적 방법과 같은 통상적인 방법이 이용될 수 있다. 여기서, Fc에서 당쇄가 제거된 면역글로불린 Fc 영역은 보체(c1q)와의 결합력이 현저히 저하되고, 항체-의존성 세포독성 또는 보체-의존성 세포 독성이 감소 또는 제거되므로, 생체 내에서 불필요한 면역 반응을 유발하지 않는다. 이런 점에서 약물의 캐리어로서의 본래의 목적에 보다 부합하는 형태는 당쇄가 제거되거나 비당쇄화된 면역글로불린 Fc 영역이라 할 것이다.
- [338] 본 발명에서 "당쇄의 제거(Deglycosylation)"는 효소로 당을 제거한 Fc 영역을 말하며, 비당쇄화(Aglycosylation)는 원핵동물, 더 구체적인 실시 형태에서는 대장균에서 생산하여 당쇄화되지 않은 Fc 영역을 의미한다.
- [339] 한편, 면역글로불린 Fc 영역은 인간 또는 소, 염소, 돼지, 마우스, 래빗, 햄스터, 랫트, 기니아 피그 등의 동물기원일 수 있으며, 더 구체적인 실시 형태에서는 인간기원이다.
- [340] 또한, 면역글로불린 Fc 영역은 IgG, IgA, IgD, IgE, IgM 유래 또는 이들의 조합(combination) 또는 이들의 혼성(hybrid)에 의한 Fc 영역일 수 있다. 더 구체적인 실시 형태에서는 인간 혈액에 가장 풍부한 IgG 또는 IgM 유래이며, 보다 더 구체적인 실시 형태에서는 리간드 결합 단백질의 반감기를 향상시키는 것으로 공지된 IgG 유래이다. 더욱 더 구체적인 실시 형태에서 상기 면역글로불린 Fc 영역은 IgG4 Fc 영역이며, 가장 구체적인 실시 형태에서 상기 면역글로불린 Fc 영역은 인간 IgG4 유래의 비-당쇄화된 Fc 영역이나, 이에 제한되는 것은 아니다.

- [341] 또한, 하나의 구체적인 실시 형태에서, 면역글로불린 Fc 영역은 인간 IgG4 Fc의 영역으로서, 각 단량체(monomer)의 3번 아미노산인 시스테인 사이의 이황화 결합(inter-chain 형태)을 통해 2개의 단량체가 연결된 동종이량체(homodimer) 형태일 수 있으며, 이 때 동종이량체의 각 단량체는 독립적으로 35번 및 95번의 시스테인 간의 내부의 이황화 결합 및 141번 및 199번의 시스테인 간의 내부의 이황화 결합, 즉 2개의 내부의 이황화 결합(intra-chain 형태)을 가지거나/가질 수 있다.
- [342] 각 단량체의 아미노산 수는 221개의 아미노산으로 구성될 수 있으며, 동종이량체를 형성하는 아미노산은 전체 442개의 아미노산으로 이루어질 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 구체적으로 면역글로불린 Fc 영역은 서열번호 67의 아미노산 서열 (221개의 아미노산으로 구성됨)을 갖는 단량체 2개가 각 단량체의 3번 아미노산인 시스테인 사이에 이황화 결합을 통해 동종이량체를 형성하고, 상기 동종이량체의 단량체는 각각 독립적으로 35번 및 95번의 시스테인 간의 내부의 이황화 결합 및 141번 및 199번의 시스테인 간의 내부의 이황화 결합을 형성하는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [343] 상기 화학식 1의 F는 서열번호 67의 아미노산 서열인 단량체를 포함하는 것일 수 있으며, 상기 F는 서열번호 67의 아미노산 서열의 단량체의 동종이량체일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [344] 하나의 예로, 면역글로불린 Fc 영역은 서열번호 68의 아미노산 서열 (442개의 아미노산으로 구성됨)을 포함하는 동종이량체일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [345] 하나의 구체예로, 상기 면역글로불린 Fc 영역과 X는 당쇄화되어 있지 않을 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [346]
- [347] 한편, 본 발명에서 "조합(combination)"이란 이량체 또는 다량체를 형성할 때, 동일 기원 단쇄 면역글로불린 Fc 영역을 암호화하는 폴리펩타이드가 상이한 기원의 단쇄 폴리펩타이드와 결합을 형성하는 것을 의미한다. 즉, IgG Fc, IgA Fc, IgM Fc, IgD Fc 및 IgE의 Fc 영역으로 이루어진 그룹으로부터 선택된 2개 이상의 영역으로부터 이량체 또는 다량체의 제조가 가능하다.
- [348] 본 발명에서 "하이브리드(hybrid)"란 단쇄의 면역글로불린 불변영역 내에 2개 이상의 상이한 기원의 면역글로불린 Fc 영역에 해당하는 서열이 존재함을 의미하는 용어이다. 본 발명의 경우 여러 형태의 하이브리드가 가능하다. 즉, IgG Fc, IgM Fc, IgA Fc, IgE Fc 및 IgD Fc의 CH1, CH2, CH3 및 CH4로 이루어진 그룹으로부터 1개 내지 4개 도메인으로 이루어진 도메인의 하이브리드가 가능하며, 힌지를 포함할 수 있다.
- [349] 한편, IgG 역시 IgG1, IgG2, IgG3 및 IgG4의 서브클래스로 나눌 수 있고 본 발명에서는 이들의 조합 또는 이들의 혼성화도 가능하다. 구체적으로는 IgG2 및 IgG4 서브클래스이며, 가장 구체적으로는 보체 의존적 독성(CDC, Complement

dependent cytotoxicity)과 같은 이펙터 기능(effector function)이 거의 없는 IgG4의 Fc 영역이다.

[350]

[351] 또한, 상술한 결합체는 효력의 지속성이 천연형 글루카곤에 비해, 또는 F가 수식되지 않은 X에 비해 증가된 것일 수 있으며, 이러한 결합체는 상술한 형태뿐만 아니라, 생분해성 나노파티클에 봉입된 형태 등을 모두 포함한다.

[352]

[353] 한편, 상기 화학식 1에서, 상기 L은 비펩타이드성 링커, 예를 들어 에틸렌글리콜 반복 단위를 함유하는 링커일 수 있다.

[354] 본 발명에서 "비펩타이드성 링커"는 반복 단위가 2개 이상 결합된 생체 적합성 중합체를 포함한다. 상기 반복 단위들은 펩타이드 결합이 아닌 임의의 공유결합을 통해 서로 연결된다. 상기 비펩타이드성 링커는 본 발명의 결합체의 모이어티를 이루는 일 구성일 수 있으며, 상기 화학식 1에서 L에 해당된다.

[355] 본 발명에서 사용될 수 있는 비펩타이드성 링커는 생체 내 단백질 분해 효소에 저항성 있는 중합체이면 제한 없이 사용될 수 있다. 본 발명에서 상기 비펩타이드성 링커는 비펩타이드성 중합체와 혼용되어 사용될 수 있다.

[356] 본 발명에서 비펩타이드성 링커는 말단에 반응기를 포함하여, 결합체를 구성하는 다른 구성 요소와 반응을 통해 결합체를 형성할 수 있다. 양 말단에 반응성 작용기를 갖는 비펩타이드성 링커가 각 반응기를 통해 상기 화학식 1의 X 및 F와 결합하여 결합체를 형성할 경우, 상기 비펩타이드성 링커 또는 비펩타이드성 중합체는 비펩타이드성 중합체 연결부(linker moiety) 또는 비펩타이드성 링커 연결부로 명명할 수 있다.

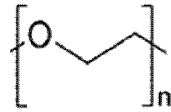
[357] 특별히 이에 제한되지 않으나, 상기 비펩타이드성 링커는 에틸렌글리콜 반복 단위를 함유하는 링커, 예를 들어, 폴리에틸렌 글리콜일 수 있고, 또한, 당해 분야에 이미 알려진 이들의 유도체 및 당해 분야의 기술 수준에서 용이하게 제조할 수 있는 유도체들도 본 발명의 범위에 포함된다.

[358] 상기 비펩타이드성 링커의 반복 단위는 에틸렌글리콜 반복 단위일 수 있고, 구체적으로, 상기 비펩타이드성 링커는 에틸렌글리콜 반복 단위를 포함하면서, 결합체로 구성되기 이전에는 결합체의 제조에 이용되는 작용기를 말단에 포함하는 것일 수 있다. 본 발명에 따른 지속형 결합체는 상기 작용기를 통해 X와 F가 연결된 형태일 수 있으나 이에 제한되지 않는다. 본 발명에서, 상기 비펩타이드성 링커는 2개, 또는 3개 이상의 작용기를 포함할 수 있고, 각 작용기는 동일하거나, 서로 상이할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[359] 구체적으로, 상기 링커는 하기 화학식 2로 표시되는 폴리에틸렌글리콜(PEG)일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다:

[360] [화학식 2]

[361]



[362]

[363] 여기서, $n = 10$ 내지 2400, $n = 10$ 내지 480, 또는 $n = 50$ 내지 250이나, 이에 제한되지 않는다.

[364] 상기 지속형 결합체에서 PEG 모이어티는, $-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n$ -구조 뿐만 아니라 연결 요소와 이 $-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n$ - 사이에 개재하는 산소 원자도 포함할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[365] 하나의 구체예로, 상기 에틸렌글리콜 반복단위는 그 예로, $[\text{OCH}_2\text{CH}_2]_n$ 로 표시될 수 있으며, n 값은 자연수로 상기 지속형 결합체 내의 $[\text{OCH}_2\text{CH}_2]_n$ 부위의 평균 분자량, 예컨대 수평균 분자량이 0 초과 내지 약 100 kDa이 되도록 정해질 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 또 하나의 예로, 상기 n 값은 자연수로 상기 지속형 결합체 내의 $[\text{OCH}_2\text{CH}_2]_n$ 부위의 평균 분자량, 예컨대 수평균 분자량이 약 1 내지 약 100 kDa, 약 1 내지 약 80 kDa, 약 1 내지 약 50 kDa, 약 1 내지 약 30 kDa, 약 1 내지 약 25 kDa, 약 1 내지 약 20 kDa, 약 1 내지 약 15 kDa, 약 1 내지 약 13 kDa, 약 1 내지 약 11 kDa, 약 1 내지 약 10 kDa, 약 1 내지 약 8 kDa, 약 1 내지 약 5 kDa, 약 1 내지 약 3.4 kDa, 약 3 내지 약 30 kDa, 약 3 내지 약 27 kDa, 약 3 내지 약 25 kDa, 약 3 내지 약 22 kDa, 약 3 내지 약 20 kDa, 약 3 내지 약 18 kDa, 약 3 내지 약 16 kDa, 약 3 내지 약 15 kDa, 약 3 내지 약 13 kDa, 약 3 내지 약 11 kDa, 약 3 내지 약 10 kDa, 약 3 내지 약 8 kDa, 약 3 내지 약 5 kDa, 약 3 내지 약 3.4 kDa, 약 8 내지 약 30 kDa, 약 8 내지 약 27 kDa, 약 8 내지 약 25 kDa, 약 8 내지 약 22 kDa, 약 8 내지 약 20 kDa, 약 8 내지 약 18 kDa, 약 8 내지 약 16 kDa, 약 8 내지 약 15 kDa, 약 8 내지 약 13 kDa, 약 8 내지 약 11 kDa, 약 8 내지 약 10 kDa, 약 9 내지 약 15 kDa, 약 9 내지 약 14 kDa, 약 9 내지 약 13 kDa, 약 9 내지 약 12 kDa, 약 9 내지 약 11 kDa, 약 9.5 내지 약 10.5 kDa, 또는 약 10 kDa일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[366]

[367] 또한, 하나의 구체적인 실시 형태에서 상기 결합체는 글루카곤 유도체(X)와 면역글로불린 Fc 영역(F)이 에틸렌글리콜 반복 단위를 함유하는 링커를 통해 공유 결합으로 연결된 구조일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[368] 다른 하나의 구체적인 실시 형태에서, 상기 지속형 결합체에서, 상기 L은 에틸렌글리콜 반복 단위를 함유하는 링커이며, F는 이량체 형태의 면역글로불린 Fc 영역일 수 있다. 보다 구체적으로는, 상기 이량체 형태 면역글로불린 Fc 영역 중 하나의 Fc 영역에 X 한 분자가 상기 에틸렌글리콜 반복 단위를 함유하는 링커를 통하여 서로 공유결합적으로 연결된 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 또한, 다른 구체적인 실시 형태에서는 상기 에틸렌글리콜 반복 단위를

함유하는 링커의 한 말단이 상기 이량체 형태 면역글로불린 Fc 영역의 두 Fc 영역 사슬 중 하나의 Fc 영역 사슬에만 연결되어 있을 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

- [369] 상기 폴리에틸렌 글리콜은, 에틸렌 글리콜 동중 중합체, PEG 공중합체, 또는 모노메틸-치환된 PEG 중합체(mPEG)의 형태를 모두 포괄하는 용어이나, 특별히 이에 제한되는 것은 아니다.
- [370] 상기 L 내의 에틸렌글리콜 반복 단위 부분의 화학식량은 1 내지 100 kDa 범위에 있는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 또한, 하나의 구체적인 실시 형태에서 상기 결합체는 양쪽 말단에 F, 구체적으로 면역글로불린 Fc 영역 및 X, 구체적으로 글루카곤 유도체와 결합될 수 있는 반응기를 포함하는 비펩타이드성 링커를 통하여 F와 X가 서로 공유결합적으로 연결된 것일 수 있다.
- [371] 본 발명에서 사용될 수 있는 비펩타이드성 링커는 생체 내 단백질 분해 효소에 저항성 있는 에틸렌글리콜 반복단위를 포함하는 중합체이면 제한 없이 사용될 수 있다. 상기 비펩타이드성 중합체의 분자량은 0 초과 약 100 kDa 범위, 약 1 내지 약 100 kDa 범위, 구체적으로 약 1 내지 약 20 kDa 범위, 또는 약 1 내지 약 10 kDa 범위이나, 이에 제한되지 않는다. 또한, 상기 F에 해당하는 폴리펩타이드와 결합되는 본 발명의 비펩타이드성 링커는 한 종류의 중합체뿐만 아니라 상이한 종류의 중합체들의 조합이 사용될 수도 있다.
- [372] 본 발명에서 용어, "약"은 ± 0.5 , ± 0.4 , ± 0.3 , ± 0.2 , ± 0.1 등을 모두 포함하는 범위로, 약 이란 용어 뒤에 나오는 수치와 동등하거나 유사한 범위의 수치를 모두 포함하나, 이에 제한되지 않는다.
- [373]
- [374] 구체적으로, 상기 비펩타이드성 링커는 F 및 X와 결합하지 않은 상태에서 양 말단에 반응기를 갖고, 상기 반응기를 통해 F 및 X와 결합하는 것일 수 있다.
- [375] 하나의 구체예로, 상기 링커의 양 말단은 면역글로불린 Fc 영역의 티올기, 아미노기, 하이드록실기 및 글루카곤 유도체(X)의 티올기, 아미노기, 아지드기, 하이드록실기에 결합할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [376] 구체적으로, 상기 링커는 양쪽 말단에 각각 면역글로불린 Fc 영역 및 글루카곤 유도체 (X)와 결합될 수 있는 반응기, 구체적으로는 면역글로불린 Fc 영역의 시스테인의 티올기; N-말단, 리신, 아르기닌, 글루타민 및/또는 히스티딘에 위치한 아미노기; 및/또는 C-말단에 위치한 하이드록실기와 결합되고, 글루카곤 유도체(X)의 시스테인의 티올기; 리신, 아르기닌, 글루타민 및/또는 히스티딘의 아미노기; 아지도리신의 아지드기; 및/또는 하이드록실기와 결합될 수 있는 반응기를 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [377] 보다 구체적으로, 상기 링커의 반응기는 알데히드 그룹, 말레이미드 그룹 및 석시니미드 유도체로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[378]

[379] 상기에서, 알데히드기로 프로피온 알데히드기 또는 부틸 알데히드기를 예로서 들 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[380] 상기에서, 석시니미드 유도체로는 석시니미딜 발레르에이트, 석시니미딜 메틸부타노에이트, 석시니미딜 메틸프로피온에이트, 석시니미딜 부타노에이트, 석시니미딜 프로피오네이트, N-하이드록시석시니미드, 히드록시 석시니미딜, 석시니미딜 카르복시메틸 또는 석시니미딜 카보네이트가 이용될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[381] 상기 링커는 상기와 같은 반응기를 통해 면역글로불린 Fc 영역인 F 및 글루카곤 유도체인 X에 연결되어, 링커 연결부로 전환될 수 있다.

[382] 또한, 알데히드 결합에 의한 환원성 아민화로 생성된 최종 산물은 아미드 결합으로 연결된 것보다 훨씬 안정적이다. 알데히드 반응기는 낮은 pH에서 N-말단에 선택적으로 반응하며, 높은 pH, 예를 들어 pH 9.0 조건에서는 리신 잔기와 공유결합을 형성할 수 있다.

[383] 또한, 상기 비펩타이드성 링커의 양쪽 말단의 반응기는 서로 동일하거나 또는 서로 상이할 수 있으며, 예를 들어, 양 말단에 알데히드기를 갖거나, 또는, 한쪽 말단에는 말레이미드기를, 다른 쪽 말단에는 알데히드기, 프로피온 알데히드기, 또는 부틸 알데히드기를 가질 수 있다. 그러나, 비펩타이드성 링커의 각 말단에 F, 구체적으로 면역글로불린 Fc 영역과 X가 결합될 수 있다면, 특별히 이에 제한되지 않는다.

[384] 예를 들어, 상기 비펩타이드성 링커의 한쪽 말단에는 반응기로서 말레이미드기를 포함하고, 다른 쪽 말단에는 알데히드기, 프로피온 알데히드기 또는 부틸 알데히드기 등을 포함할 수 있다.

[385] 양쪽 말단에 히드록시 반응기를 갖는 폴리에틸렌 글리콜을 비펩타이드성 중합체로 이용하는 경우에는 공지의 화학반응에 의해 상기 히드록시기를 상기 다양한 반응기로 활성화하거나, 상업적으로 입수 가능한 변형된 반응기를 갖는 폴리에틸렌 글리콜을 이용하여 본 발명의 지속형 단백질 결합체를 제조할 수 있다.

[386]

[387] 하나의 구체적인 실시 형태에서 상기 비펩타이드성 중합체는 X의 시스테인 잔기, 보다 구체적으로 시스테인의 -SH 기에 연결되는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

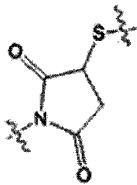
[388]

[389] 예컨대, 상기 X에 해당하는 펩타이드에서 7번 시스테인 잔기, 10번 시스테인 잔기, 12번 시스테인 잔기, 13번 시스테인 잔기, 14번 시스테인 잔기, 15번 시스테인 잔기, 16번 시스테인 잔기, 17번 시스테인 잔기, 18번 시스테인 잔기, 19번 시스테인 잔기, 20번 시스테인 잔기, 21번 시스테인 잔기, 또는 30번 시스테인 잔기에 상기 비펩타이드성 중합체가 연결된 것일 수 있으나, 특별히

이에 제한되지 않는다.

[390] 구체적으로, 상기 시스테인 잔기의 -SH 기에 비펩타이드성 중합체의 반응기가 연결될 수 있으며, 반응기에 대해서는 앞서 기술한 내용이 모두 적용된다. 만약, 말레이미드-PEG-알데히드를 사용하는 경우, 말레이미드 기는 X의 -SH 기와 티오에테르(thioether) 결합으로 연결하고, 알데히드기는 F, 구체적으로 면역글로불린 Fc의 -NH₂기와 환원적 아민화 반응을 통해 연결할 수 있으나, 이에 제한되지 않으며, 이는 하나의 일례에 해당한다.

[391] 이와 같은 환원적 알킬화를 통하여 PEG의 한쪽 말단에 위치한 산소 원자에 면역글로불린 Fc 절편의 N-말단 아미노기가 -CH₂CH₂CH₂-의 구조를 가지는 링커 작용기를 통해 서로 연결되어, -PEG-O-CH₂CH₂CH₂NH-면역글로불린 Fc와 같은 구조를 형성할 수 있고, 티오에테르 결합을 통하여 PEG의 한쪽 말단이 일반식 1의 펩타이드의 시스테인에 위치한 황 원자에 연결된 구조를 형성할 수 있다. 상술한 티오에테르 결합은



[392] 그러나, 상술한 예에 특별히 제한되는 것은 아니며, 이는 하나의 일례에 해당한다.

[393]

[394] 다른 구체적인 실시 형태에서 상기 비펩타이드성 중합체는 X의 라이신 잔기, 보다 구체적으로, 라이신의 아미노기에 연결되는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[395] 또한, 상기 결합체에서, 비펩타이드성 중합체의 반응기가 면역글로불린 Fc 영역의 N-말단에 위치한 -NH₂와 연결된 것일 수 있으나, 이는 하나의 일례에 해당한다.

[396]

[397] 또한, 상기 결합체에서, 본 발명에 따른 글루카곤 유도체는 반응기를 갖는 링커와 C-말단을 통해 연결될 수 있으나, 이는 하나의 일례에 해당한다.

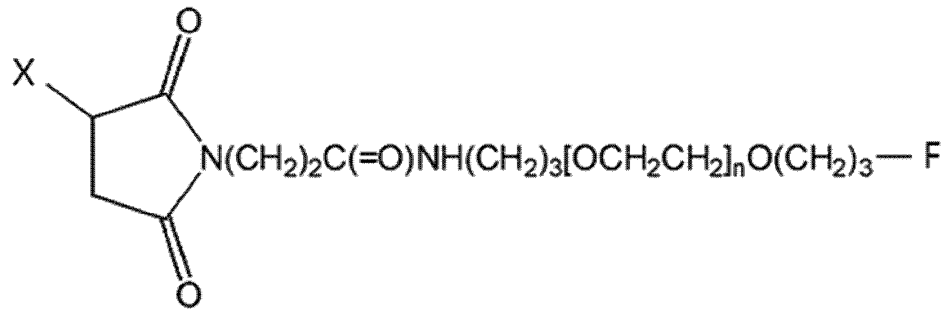
[398] 본 발명에서 "C-말단"은, 펩타이드의 카르복시 말단을 의미하는 것으로, 본 발명의 목적상 링커와 결합할 수 있는 위치를 말한다. 그 예로, 이에 제한되지는 않으나, C-말단의 최말단 아미노산 잔기뿐만 아니라 C-말단 주위의 아미노산 잔기를 모두 포함할 수 있으며, 구체적으로는 최말단으로부터 첫 번째 내지 20 번째의 아미노산 잔기를 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[399]

[400] 하나의 구체예로, 상기 화학식 1의 결합체는 하기 화학식 3의 구조를 가질 수 있다.

[401] [화학식 3]

[402]



[403] 상기 화학식 3에서 X는 상기에서 설명한 일반식 1의 펩타이드이고;

[404] F는 사람 면역글로불린 Fc 영역이며;

[405] n은 자연수일 수 있다. 이때, n에 대한 설명은 상기에서 설명한 바와 같다.

[406]

[407] 하나의 구체예로, 상기 화학식 3의 지속형 결합체는 서열번호 46의 일반식 1의 펩타이드 X와 사람 면역글로불린 Fc 영역 F가 에틸렌글리콜 반복부를 개재하여 공유결합으로 연결된 구조로서, 각각 X는 화학식 3의 숙신이미드 고리에, F는 화학식 3의 옥시프로필렌기에 연결되는 형태일 수 있다.

[408] 상기 화학식 3에서, 상기 n의 값은 상기 펩타이드 결합체 내 $[\text{OCH}_2\text{CH}_2]_n$ 부위의 평균 분자량, 예컨대 수평균 분자량이 1 내지 100 kDa, 또는 1 내지 20 kDa 또는 10 kDa이 되도록 정해지는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[409] 상기 결합체의 X는 글루카곤 수용체에 대해 활성을 갖는 펩타이드일 수 있다.

[410] 한 실시 형태에서 화학식 3의 숙신이미드 고리에 X가 연결되는 부위는 X의 C-말단 시스테인의 황 원자일 수 있다.

[411]

[412] 상기 화학식 3에서 F는 사람 면역글로불린 Fc 영역으로서, F 내에서 상기 옥시프로필렌기에 연결되는 부위는 특별히 한정되지 않는다. 본 발명의 한 실시 형태에서 상기 옥시프로필렌기에 연결되는 F의 부위는 N-말단 질소 또는 F 내부 잔기의 질소 원자(예컨대 리신의 입실론 질소)일 수 있다. 본 발명의 한 구체적인 실시 형태에서, F가 화학식 3의 옥시프로필렌기에 연결되는 부위는 F의 N-말단 프롤린일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[413] 하나의 구체예로, 상기 F는 그 N-말단 프롤린의 질소 원자를 통하여 연결된 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[414]

[415] 상기 글루카곤 유도체의 종류로서, 국제공개특허 WO 2016/108586 및 국제공개특허 WO 2017/003191에 기재된 종류를 들 수 있으며, 상기 국제공개특허의 명세서 전체는 본원에 참고자료로서 모두 포함된다. 또한, 상기 글루카곤 유도체의 지속형 결합체의 제조 방법은 WO 2017/003191에 기재되어

있으며, 상기 국제공개특허의 명세서 전체 역시 본원에 참고자료로서 포함되는 것은 분명하다.

[416]

[417] 또한, 상술한 결합체는 효력의 지속성이 F가 수식되지 않은 X에 비해 증가된 것일 수 있으며, 이러한 결합체는 상술한 형태뿐만 아니라, 생분해성 나노파티클에 봉입된 형태 등을 모두 포함한다.

[418]

[419] 본 명세서에서 따로 가리키는 바가 없으면, 본 발명에 따른 "펩타이드" 또는 이러한 펩타이드가 생체적합성 물질에 공유결합으로 연결된 "결합체"에 대한 명세서 상세한 설명이나 청구 범위의 기술은 해당 펩타이드 또는 결합체는 물론이고, 해당 펩타이드 또는 결합체의 염(예컨대, 상기 펩타이드의 약학적으로 허용가능한 염), 또는 이의 용매화물의 형태를 모두 포함하는 범주에도 적용된다. 따라서 명세서에 "펩타이드" 또는 "결합체"라고만 기재되어 있더라도 해당 기재 내용은 그 특정 염, 그 특정 용매화물, 그 특정 염의 특정 용매화물에도 마찬가지로 적용된다. 이러한 염 형태는 예를 들어 약학적으로 허용되는 임의의 염을 사용한 형태일 수 있다. 상기 염의 종류는 특별히 제한되지는 않는다. 다만, 개체, 예컨대 포유류에게 안전하고 효과적인 형태인 것이 바람직하나, 특별히 이에 제한되는 것은 아니다.

[420] 상기 용어, "약학적으로 허용되는"은 의약학적 판단의 범위 내에서, 과도한 독성, 자극, 또는 알레르기 반응 등을 유발하지 않고 원하는 용도에 효과적으로 사용 가능한 물질을 의미한다.

[421] 본 발명에서 용어, "약학적으로 허용되는 염"이란 약학적으로 허용되는 무기산, 유기산, 또는 염기로부터 유도된 염을 포함한다. 적합한 산의 예로는 염산, 브롬산, 황산, 질산, 과염소산, 푸마르산, 말레산, 인산, 글리콜산, 락트산, 살리실산, 숙신산, 톨루엔-p-설폰산, 타르타르산, 아세트산, 시트르산, 메탄설폰산, 포름산, 벤조산, 말론산, 나프탈렌-2-설폰산, 벤젠설폰산 등을 들 수 있다. 적합한 염기로부터 유도된 염은 나트륨, 칼륨 등의 알칼리 금속, 마그네슘 등의 알칼리 토금속, 및 암모늄 등을 포함할 수 있다.

[422] 또한, 본 발명에서 사용된 용어 "용매화물"은 본 발명에 따른 펩타이드, 결합체, 또는 이의 염이 용매 분자와 복합체를 형성한 것을 말한다.

[423]

[424] 또한, 본 발명의 펩타이드는 그 길이에 따라 이 분야에서 잘 알려진 방법, 예를 들어 자동 펩타이드 합성기에 의해 합성할 수 있으며, 유전자 조작 기술에 의하여 생산할 수도 있다.

[425] 구체적으로, 본 발명의 펩타이드는 표준 합성 방법, 제조합 발현 시스템, 또는 임의의 다른 당해 분야의 방법에 의해 제조될 수 있다. 따라서, 본 발명에 따른 글루카곤 유도체는, 예를 들어 하기를 포함하는 방법을 포함하는 다수의 방법으로 합성될 수 있다:

- [426] (a) 펩타이드를 고체상 또는 액체상 방법의 수단으로 단계적으로 또는 단편 조립에 의해 합성하고, 최종 펩타이드 생성물을 분리 및 정제하는 방법; 또는
- [427] (b) 펩타이드를 인코딩하는 핵산 작제물을 숙주세포 내에서 발현시키고, 발현 생성물을 숙주 세포 배양물로부터 회수하는 방법; 또는
- [428] (c) 펩타이드를 인코딩하는 핵산 작제물의 무세포 시험관 내 발현을 수행하고, 발현 생성물을 회수하는 방법; 또는
- [429] (a), (b) 및 (c)의 임의의 조합으로 펩타이드의 단편을 수득하고, 이어서 단편을 연결시켜 펩타이드를 수득하고, 당해 펩타이드를 회수하는 방법.
- [430]
- [431] 본 발명에 따른 조성물은 글루카곤 유도체 또는 이의 결합체를 포함하는 것일 수 있고, 구체적으로 약리학적 유효량의 글루카곤 유도체 또는 이의 결합체를 포함하는 것일 수 있다. 또한, 약학적으로 허용가능한 담체를 추가로 포함할 수 있다. 본 발명의 조성물은 만성 신장 질환 예방 또는 치료 용도를 갖는 것일 수 있으며, 혈압 강하 및/또는 신장 기능 회복 효과를 갖는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [432] 본 발명에서 용어 "약학적으로 허용가능한"이란 치료효과를 나타낼 수 있을 정도의 충분한 양과 부작용을 일으키지 않는 것을 의미하며, 질환의 종류, 환자의 연령, 체중, 건강, 성별, 환자의 약물에 대한 민감도, 투여 경로, 투여 방법, 투여횟수, 치료 기간, 배합 또는 동시 사용되는 약물 등 의학 분야에 잘 알려진 요소에 따라 당업자에 의해 용이하게 결정될 수 있다.
- [433] 약학적으로 허용되는 담체는 경구 투여 시에는 결합제, 활택제, 붕해제, 부형제, 가용화제, 분산제, 안정화제, 현탁화제, 색소 및 향료 등을 사용할 수 있으며, 주사제의 경우에는 완충제, 보존제, 무통화제, 가용화제, 등장화제 및 안정화제 등을 혼합하여 사용할 수 있으며, 국소 투여용의 경우에는 기제, 부형제, 유허제 및 보존제 등을 사용할 수 있다. 본 발명의 약학적 조성물의 제형은 상술한 바와 같은 약학적으로 허용되는 담체와 혼합하여 다양하게 제조될 수 있다. 예를 들어, 경구 투여 시에는 정제, 트로키, 캡슐, 엘릭서, 서스펜션, 시럽 및 웨이퍼 등의 형태로 제조할 수 있으며, 주사제의 경우에는 단위 투약 앰플 또는 다수회 투약 형태로 제조할 수 있다. 그 외에도 용액, 현탁액, 정제, 환약, 캡슐 및 서방형 제제 등으로 제형화할 수 있다.
- [434] 한편, 제제화에 적합한 담체, 부형제 및 희석제의 예로는 락토즈, 텍스트로즈, 수크로즈, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 미정질 셀룰로즈, 폴리비닐피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 또는 광물유 등이 사용될 수 있다. 또한, 충전제, 항응집제, 유허제, 습윤제, 향료, 유화제 및 방부제 등을 추가로 포함할 수 있다.
- [435] 또한, 본 발명의 조성물은 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제, 현탁제, 내용액제,

유제, 시럽제, 멸균된 수용액, 비수성용제, 동결건조제제 및 좌제로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나의 제형을 가질 수 있다.

- [436] 또한, 상기 결합체는 생리식염수 또는 유기용매와 같이 약제로 허용된 여러 전달체(carrier)와 혼합하여 사용될 수 있고, 안정성이나 흡수성을 증가시키기 위하여 글루코스, 수크로스 또는 텍스트란과 같은 탄수화물, 아스코르브산(ascorbic acid) 또는 글루타티온과 같은 항산화제(antioxidants), 킬레이트제, 저분자 단백질 또는 다른 안정화제(stabilizers) 등이 약제로 사용될 수 있다.
- [437] 본 발명의 조성물의 투여량과 횟수는 치료할 질환, 투여 경로, 환자의 연령, 성별 및 체중 및 질환의 중등도 등의 여러 관련 인자와 함께, 활성성분인 약물의 종류에 따라 결정된다. 구체적으로, 본 발명의 조성물은 상기 글루카곤 유도체 또는 이의 결합체를 약학적 유효량으로 포함하는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [438]
- [439] 상기 글루카곤 유도체 또는 이의 결합체를 약학적 유효량으로 포함하는 것은, 글루카곤 유도체 또는 이의 결합체로 인한 목적하는 약리 활성(예를 들어, 만성 신장 질환 예방 또는 치료)을 얻을 수 있는 정도를 의미하고, 또한 투여되는 개체에서 독성 또는 부작용이 일어나지 않거나 미미한 수준으로서 약학적으로 허용되는 수준을 의미할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 이와 같은 약학적 유효량은 투여 횟수, 환자, 제형 등을 종합적으로 고려하여 결정될 수 있다.
- [440]
- [441] 특별히 이에 제한되지 않으나, 본 발명의 상기 약학적 조성물은 상기 성분(유효성분)을 0.01 내지 99% 중량 대 부피로 함유할 수 있다.
- [442]
- [443] 본 발명의 조성물의 총 유효량은 단일 투여량(single dose)으로 환자에게 투여될 수 있으며, 다중 투여량(multiple dose)으로 장기간 투여되는 분할 치료 방법(fractionated treatment protocol)에 의해 투여될 수 있다. 본 발명의 조성물은 질환의 정도에 따라 유효성분의 함량을 달리할 수 있다. 구체적으로, 본 발명의 결합체의 바람직한 전체 용량은 하루에 환자 체중 1 kg당 약 0.0001 mg 내지 500 mg일 수 있다. 그러나 상기 결합체의 용량은 약학적 조성물의 투여 경로 및 치료 횟수뿐만 아니라 환자의 연령, 체중, 건강 상태, 성별, 질환의 중등도, 식이 및 배설을 등 다양한 요인들을 고려하여 환자에 대한 유효 투여량이 결정되는 것이므로, 이러한 점을 고려할 때 당분야의 통상적인 지식을 가진 자라면 상기 본 발명의 조성물의 특정한 용도에 따른 적절한 유효 투여량을 결정할 수 있을 것이다. 본 발명에 따른 약학적 조성물은 본 발명의 효과를 보이는 한 그 제형, 투여 경로 및 투여 방법에 특별히 제한되지 아니한다.
- [444] 예를 들어, 본 발명의 조성물은 1주에 1회, 2주에 1회, 4주에 1회, 또는 1개월에 1회 투여될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[445]

[446] 본 발명에 따른 조성물의 다른 구체적인 양태는 GLP-1 수용체 아고니스트(glucagon like peptide 1 receptor agonist)를 추가로 포함하는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[447]

[448] 구체적으로, 본 발명의 조성물은 글루카곤 유도체 및 GLP-1 수용체 아고니스트를 포함하는 만성 신장 질환 예방 또는 치료용 약학 조성물일 수 있으며, 더 구체적으로는 글루카곤 유도체, GLP-1 수용체 아고니스트, 및 약학적으로 허용되는 부형제를 포함하는 만성 신장 질환 예방 또는 치료용 약학 조성물일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[449]

[450] 본 발명의 (i) 글루카곤 유도체; 및 (ii) GLP-1 수용체 아고니스트를 포함하는 약학적 조성물은

[451] a) (i) 글루카곤 유도체; 및 (ii) GLP-1 수용체 아고니스트가 혼합된 하나의 혼합물(mixture)로 투여되거나; 또는

[452] b) (i) 글루카곤 유도체; 및 (ii) GLP-1 수용체 아고니스트가 분리된 형태로 투여될 수 있는 형태일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[453] 예를 들어, 글루카곤 유도체 및 GLP-1 수용체 아고니스트가 하나의 제제로 제제화된 것이거나, 또는 개별적으로 제제화된 것일 수 있다. 글루카곤 유도체; 및 GLP-1 수용체 아고니스트가 분리된 형태일 경우, 글루카곤 유도체 및 GLP-1 수용체 아고니스트가 별개의 제제로 제제화되어 동시, 개별, 순차, 또는 역순으로 투여될 수 있는 것일 수 있다.

[454] 본 발명에서, 병용 투여는 단지 동시의 투여를 의미하는 것뿐만이 아니라, 글루카곤 유도체 및 GLP-1 수용체 아고니스트가 개체에 함께 작용하여 각 물질이 본연의 기능과 동등하거나 그 이상의 수준을 수행할 수 있는 투여 형태로 이해되어야 한다. 따라서, 본원에서, "병용"이란 용어가 사용될 경우 이는 글루카곤 유도체 및 GLP-1 수용체 아고니스트의 동시, 개별, 순차, 또는 역순 투여를 나타내는 것으로 이해되어야 한다. 상기 투여가 순차, 역순 또는 개별적인 경우, 투여의 순서는 특별히 제한되지 않고 다만 2차 성분 투여의 간격은 상기 병용의 이로운 효과를 잃지 않도록 하는 것이어야 한다.

[455]

[456] 본 발명의 글루카곤 유도체 및 GLP-1 수용체 아고니스트, 또는 이를 포함하는 조성물은 키트 형태로 제공되는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 본 발명에서 용어 "키트"는 글루카곤 유도체 및 GLP-1 수용체 아고니스트를 병용 투여하기 위해, 본 발명에 따른 조성물을 포함하는 것일 수 있다. 구체적으로, 본 발명에 따른 키트에는 하나의 제제로 제제화된 글루카곤 유도체 및 GLP-1 수용체 아고니스트, 또는 글루카곤 유도체 및 GLP-1 수용체 아고니스트의 개별 제제를 포함하는 것일 수 있고, 두 물질의 병용 투여에 필요한 물질을

추가적으로 포함하는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[457]

[458] 한편, 상기 글루카곤 유도체 및 GLP-1 수용체 아고니스트는 면역글로불린 Fc 영역이 연결된 지속형 결합체의 형태일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[459]

[460] GLP-1(glucagon-like peptide-1)은 소장에서 분비되는 호르몬으로서 세포 내 글루코스 흡수를 촉진하는 것으로 알려져 있다. 소장에서 글루카곤 전구체는 3개의 펩타이드로 분해되는데, 글루카곤, GLP-1, GLP-2이다. 여기서 GLP-1은 GLP-1(1-37)을 의미하며 인슐린 분비기능이 없는 형태이고, GLP-1(7-37) 형태로 프로세싱되어 활성형 GLP-1(7-37)이 된다. GLP-1(7-37) 아미노산 서열은 아래와 같다:

[461] GLP-1(7-37):

[462] HAEGT FTSDV SSYLE GQAAK EFWAW LVKGR G (서열번호 69)

[463]

[464] GLP-1 수용체 아고니스트는 상기 GLP-1의 수용체에 작용할 수 있는 작용제를 의미하며, 다양한 물질, 예컨대 화합물 또는 펩타이드 형태의 물질을 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[465] 상기 GLP-1 수용체 아고니스트는 천연형 GLP-1 뿐만 아니라, GLP-1 수용체에 대해 *in vitro* 활성이 해당 수용체의 천연형 리간드 (천연형 GLP-1) 대비 0.1% 이상, 1% 이상, 2% 이상, 3% 이상, 4% 이상, 5% 이상, 6% 이상, 7% 이상, 8% 이상, 9% 이상, 10% 이상, 20% 이상, 30% 이상, 40% 이상, 50% 이상, 60% 이상, 70% 이상, 80% 이상, 90% 이상, 100% 이상을 나타내는 GLP-1 수용체에 대해 유의한 수준의 활성을 가지는 물질(예를 들어, 펩타이드)일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[466] 이러한 GLP-1 수용체 아고니스트의 *in vitro* 활성을 측정하는 방법은 당업계에 공지된 다양한 *in vitro* 활성을 측정을 이용하여 달성될 수 있다.

[467]

[468] 본 발명에 따른 GLP-1 수용체 아고니스트는 GLP-1 수용체에 대해 유의한 수준의 활성을 가지면서 천연형 GLP-1과 비교하여 아미노산 서열에 하나 이상의 차이가 있는 펩타이드, 천연형 GLP-1 서열을 개질(modification)을 통하여 변형시킨 펩타이드, 또는 천연형 GLP-1의 모방체 등을 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[469] 구체적으로, 본 발명에서 GLP-1 수용체 아고니스트는 GLP-1, 엑센딘-3, 엑센딘-4, 이들의 아고니스트(agonist), 유도체(derivative), 단편(fragment), 변이체(variant) 및 이들의 조합으로 구성된 군에서 선택되는 것을 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[470]

[471] 본 발명에서, “아고니스트”는 “작용제” 또는 “효능제”와 같은 의미로, 수용체와

결합하여 실제 생체 내에서 천연형 리간드와 동일한 기능을 할 수 있는 물질을 의미한다.

[472]

[473] 본 발명에서, “유도체”는 GLP-1 수용체에 대해 유의한 수준의 활성을 가지면서 천연형 GLP-1의 일부 서열이 변형되고 아미노산 잔기의 일부 그룹이 화학적으로 치환 (예; alpha-methylation, alpha-hydroxylation), 제거 (예; deamination) 또는 수식 (예; N-methylation)된 형태일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[474] 본 발명의 GLP-1 수용체 아고니스트는 N-말단 아미노 그룹이 제거된 유도체 (Desamino-histidyl 유도체), 아미노 그룹을 하이드록실 그룹으로 치환한 유도체 (beta-hydroxy imidazopropionyl-유도체), 아미노 그룹에 2개의 메틸 (methyl) 잔기로 수식된 유도체 (Dimethyl-histidyl-유도체), 아미노 말단의 아미노 그룹을 카복실 그룹으로 치환한 유도체 (beta-carboxyimidazopropionyl-유도체) 또는 아미노 말단 히스티딘 잔기의 알파 카본을 삭제하여 이미다졸아세틸(imidazoacetyl) 그룹만을 남겨두어 아미노 그룹의 양전하(positive charge)를 제거한 유도체(Imidazoacetyl-유도체) 등을 포함할 수 있으며, 또한 기타 다른 형태의 아미노-말단 아미노 그룹 변이 유도체가 본 발명의 범주에 속한다.

[475] 구체적인 예로, 본 발명에서 GLP-1 수용체 아고니스트는 엑센딘-4의 N-말단 아미노 그룹 또는 아미노산 잔기를 화학적으로 변이시킨 유도체이며, 더욱 구체적으로는 엑센딘-4의 아미노 말단의 첫 번째 아미노산인 히스티딘 잔기의 알파 카본에 존재하는 알파 아미노 그룹 또는 알파 카본을 치환 또는 제거한 엑센딘-4 유도체이며, 더욱 더 구체적으로는 N-말단 아미노 그룹을 제거한 데스아미노-히스티딜-엑센딘-4 (Desamino-histidylexendin-4, DA-엑센딘-4), 하이드록실 그룹 또는 카복실 그룹으로 치환한 베타-히드록시 이미다조프로피오닐-엑센딘-4(beta-hydroxy imidazopropionyl-exendin-4, HY-엑센딘-4), 베타-카르복시 이미다조프로필-엑센딘-4 (beta-carboxyimidazopropionyl-exendin-4, CX-엑센딘-4), 2개의 메틸 잔기로 수식한 디메틸-히스티딜-엑센딘-4 (Dimethyl-histidyl-exendin-4, DM-엑센딘-4), 또는 아미노 말단 히스티딘 잔기의 알파 탄소를 제거한 이미다조아세틸-엑센딘-4(Imidazoacetyl-exendin-4, CA-엑센딘-4)일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[476]

[477] 본 발명의 GLP-1 수용체 아고니스트의 제한되지 않는 예로는, N-말단 히스티딘 잔기가 데스-아미노-히스티딜, 디메틸-히스티딜, 베타-히드록시 이미다조프로피오닐, 4-이미다조아세틸 및 베타-카르복시 이미다조프로피오닐로 구성되는 군으로부터 선택되는 물질로 치환된 GLP-1 수용체 아고니스트 유도체를 들 수 있다.

[478]

[479] 본 발명에서, “GLP-1 단편”은 GLP-1 수용체에 대해 유의한 수준의 활성을 가지면서 천연형 GLP-1의 N-말단 또는 C-말단에 하나 또는 그 이상의 아미노산이 추가 또는 삭제된 형태를 의미하며 추가된 아미노산은 천연에 존재하지 않는 아미노산 (예; D형 아미노산)도 가능하다.

[480]

[481] 본 발명에서, “GLP-1 변이체”는 GLP-1 수용체에 대해 유의한 수준의 활성을 가지면서 천연형 GLP-1과 아미노산 서열이 하나 이상 다른 펩타이드를 의미하며, “아날로그”와 혼용되어 사용될 수 있다.

[482]

구체적으로, GLP-1 변이체는 천연형 GLP-1에서 일부 아미노산이 치환(substitution), 추가(addition), 제거(deletion) 및 수식(modification) 중 어느 하나의 방법 또는 이러한 방법들의 조합을 통하여 변형된 것일 수 있다.

[483]

이러한 방법들의 조합으로 제조되는 GLP-1 변이체의 예로, 천연형 GLP-1과 아미노산 서열이 하나 이상 다르고, N-말단 아미노산 잔기에 탈아미노화(deamination)된, GLP-1 수용체에 대한 활성화 기능을 보유한 펩타이드 등이 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[484]

또한, 천연형 GLP-1의 아미노 및/또는 카르복시 말단에 하나 또는 그 이상의 아미노산이 추가된 것을 모두 포함한다. 상기 치환되거나 추가되는 아미노산은 인간 단백질에서 통상적으로 관찰되는 20개의 아미노산뿐만 아니라 비정형 또는 비-자연적 발생 아미노산을 사용할 수 있다. 비정형 아미노산의 상업적 출처에는 Sigma-Aldrich, ChemPep과 Genzyme pharmaceuticals가 포함된다. 이러한 아미노산이 포함된 펩타이드와 정형적인 펩타이드 서열은 상업화된 펩타이드 합성 회사, 예를 들어 미국의 American peptide company나 Bachem, 또는 한국의 Anygen을 통해 합성 및 구매 가능하다. 아미노산 유도체도 마찬가지로 방식으로 입수할 수 있는데, 그 예를 일부만 들자면 4-이미다조아세트산(4-imidazoacetic acid) 등을 사용할 수 있다.

[485]

또한, 유도체 또는 변이체의 제조를 위한 이러한 변형은 L-형 혹은 D-형 아미노산, 및/또는 비-천연형 아미노산을 이용한 변형; 및/또는 천연형 서열을 개질, 예를 들어 측쇄 작용기의 변형, 분자 내 공유결합, 예컨대, 측쇄 간 고리형성, 메틸화, 아실화, 유비퀴틴화, 인산화, 아미노핵산화, 바이오틴화 등과 같이 개질함으로써 변형하는 것을 모두 포함한다. 또한, 상기 변형은 비 천연형 화합물로의 치환을 모두 포함한다.

[486]

[487] 본 발명의 엑센딘-3와 엑센딘-4는, GLP-1과 53%의 아미노산 서열 유사성을 보이는 39개 아미노산으로 이루어진 GLP-1 수용체 아고니스트이며, 엑센딘-3와 엑센딘-4의 아미노산서열은 아래와 같다.

[488]

[489] 엑센딘-3:

- [490] HSDGT FTSDL SKQME EEAVR LFIEW LKNGG PSSGA PPPS (서열번호 70)
- [491] 엑센딘-4:
- [492] HGEFT FTSDL SKQME EEAVR LFIEW LKNGG PSSGA PPPS (서열번호 71)
- [493]
- [494] 엑센딘 아고니스트는 엑센딘의 구조와 상관없이 엑센딘의 생체 내 수용체에 결합하여 엑센딘과 동일한 생물학적 활성을 나타내는 물질을 의미하며, 엑센딘 유도체는, 천연형 엑센딘과 비교시 최소한 80% 이상 아미노산 서열에서 상동성을 보이며, 아미노산 잔기의 일부 그룹이 화학적으로 치환 (예; α -methylation, α -hydroxylation), 제거 (예; deamination) 또는 수식 (예; N-methylation)된 형태일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [495] 엑센딘 유도체는, N-말단 아미노 그룹이 제거된 유도체 (Desamino-histidyl 유도체), 아미노 그룹을 하이드록실 그룹으로 치환한 유도체 (β -hydroxy imidazopropionyl-유도체), 아미노 그룹에 2개의 메틸 (methyl) 잔기로 수식된 유도체 (Dimethyl-histidyl-유도체), 아미노 말단의 아미노 그룹을 카복실 그룹으로 치환한 유도체 (β -carboxyimidazopropionyl-유도체) 또는 아미노 말단 히스티딘 잔기의 알파 카본을 삭제하여 이미다졸아세틸(imidazoacetyl) 그룹만을 남겨두어 아미노 그룹의 양전하(positive charge)를 제거한 유도체(Imidazoacetyl-유도체) 등을 포함할 수 있으며, 또한 기타 다른 형태의 아미노-말단 아미노 그룹 변이 유도체도 본 발명의 범주에 속한다.
- [496] 구체적인 예로, 본 발명에서 엑센딘 유도체는 엑센딘-4의 N-말단 아미노 그룹 또는 아미노산 잔기를 화학적으로 변이시킨 유도체, 더욱 구체적으로는 엑센딘-4의 아미노 말단의 첫 번째 아미노산인 히스티딘 잔기의 알파 카본에 존재하는 알파 아미노 그룹 또는 알파 카본을 치환 또는 제거한 엑센딘-4 유도체, 더욱 더 구체적으로는 N-말단 아미노 그룹을 제거한 데스아미노-히스티딜-엑센딘-4 (Desamino-histidylexendin-4, DA-엑센딘-4), 하이드록실 그룹 또는 카복실 그룹으로 치환한 베타-히드록시 이미다조프로피오닐-엑센딘-4(β -hydroxy imidazopropionyl-exendin-4, HY-엑센딘-4), 베타-카르복시 이미다조프로필-엑센딘-4 (β -carboxyimidazopropionyl-exendin-4, CX-엑센딘-4), 2개의 메틸 잔기로 수식한 디메틸-히스티딜-엑센딘-4 (Dimethyl-histidyl-exendin-4, DM-엑센딘-4), 또는 아미노 말단 히스티딘 잔기의 알파 탄소를 제거한 이미다조아세틸-엑센딘-4(Imidazoacetyl-exendin-4, CA-엑센딘-4)일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [497]
- [498] 본 발명의 엑센딘 유도체의 제한되지 않는 예로는 엑센딘-4의 N-말단 아민 그룹이 제거된 엑센딘-4 유도체, 엑센딘-4의 N-말단 아민 그룹이 하이드록실 그룹으로 치환된 엑센딘-4 유도체, 엑센딘-4의 N-말단 아민 그룹이 디메틸기로 수식된 엑센딘-4 유도체, 엑센딘-4의 첫 번째 아미노산(히스티딘)의 알파 탄소를

제거 (deletion)한 엑센딘-4 유도체 등을 들 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[499]

[500] 엑센딘 단편은, 천연형 엑센딘의 N-말단 또는 C-말단에 하나 또는 그 이상 아미노산이 추가 또는 삭제된 형태를 의미하며 천연에 존재하지 않는 아미노산(예: D-형 아미노산)의 추가도 가능하다.

[501] 엑센딘 변이체는, 천연형 엑센딘과 아미노산서열이 하나 이상 다른 펩타이드로서, 구체적으로, 천연형 엑센딘에서 일부 아미노산이 치환(substitution), 추가(addition), 제거(deletion) 및 수식(modification) 중 어느 하나의 방법 또는 이러한 방법들의 조합을 통하여 변형된 것일 수 있다.

[502]

[503] 상술한 아고니스트, 유도체, 단편 및 변이체에서 각각 사용된 제조방법은 독립적으로 사용될 수 있고 조합도 가능하다. 예를 들어 아미노산 서열이 하나 이상 다르고 N-말단 아미노산 잔기에 탈아미노화 (deamination)된 인슐린분비 펩타이드도 포함된다.

[504]

[505] 본 발명의 구체적인 GLP-1 수용체 아고니스트의 예로, [(1H-Imidazol-4-yl)-acetyl]GEGTFTSDL SKQMEEEEAVR LFIEWLKNGGPSSGAPPPS(서열번호 72) (Bachem 사) 또는 HEGTFTSDV SSYLEEQAAK EFWLWKVG(서열번호 73) (Bachem 사)를 들 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 상기 아미노산 서열은 N-말단에서 C-말단으로의 방향으로 기재된 것이다. 본 발명의 GLP-1 수용체 아고니스트는 국제공개 WO2015-005748 A1 명세서를 참조할 수 있다.

[506]

[507] 본 발명에서, 상기 GLP-1 수용체 아고니스트는 GLP-1 수용체 아고니스트가 면역글로불린 Fc 영역과 연결된 지속형 결합체 형태일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 구체적으로, 상기 GLP-1 수용체 아고니스트는 이미다조-아세틸 엑센딘-4(CA 엑센딘-4)이 에틸렌글리콜 반복 단위를 함유하는 링커를 통해 면역글로불린 Fc 영역과 연결된 것일 수 있고, 더 구체적으로는 서열번호 72의 GLP-1 수용체 아고니스트의 라이신(lysine, Lys)에 폴리에틸렌 글리콜 링커의 일 말단을 연결하고, 상기 폴리에틸렌 글리콜 링커의 다른 일 말단에 면역글로불린 Fc 영역을 연결한 GLP-1 수용체 아고니스트의 지속형 결합체일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[508]

[509] 본 발명에서, 상기 GLP-1 수용체 아고니스트는 GLP-1 수용체 아고니스트 에페글레나타이드 (efpegleantide)일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[510]

[511] 여기에서, “지속형 결합체” 및 이와 관련된 “면역글로불린 Fc 영역”, “에틸렌글리콜 반복 단위를 함유하는 링커” 등은 앞서 설명한 바와 같다.

[512]

[513] 본 발명의 조성물은 하기 (i) 내지 (iv) 중 어느 하나를 포함하는 것일 수 있다:

[514] (i) 글루카곤 유도체 및 GLP-1 수용체 아고니스트;

[515] (ii) 글루카곤 유도체의 지속형 결합체 및 GLP-1 수용체 아고니스트;

[516] (iii) 글루카곤 유도체 및 GLP-1 수용체 아고니스트의 지속형 결합체; 및

[517] (iv) 글루카곤 유도체의 지속형 결합체 및 GLP-1 수용체 아고니스트의 지속형 결합체.

[518]

[519] 본 발명에 따른 글루카곤 유도체 또는 이의 결합체, 및 GLP-1 수용체 아고니스트 또는 이의 결합체; 또는 이를 포함하는 조성물은 개체에 투여되었을 때 개체의 혈압 강하 효과를 나타내고/내거나 신장 기능을 회복시키는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 구체적으로, 본 발명에 따른 글루카곤 유도체 또는 이의 결합체, 및 GLP-1 수용체 아고니스트 또는 이의 결합체의 병용 투여로 인해 부형제 대조군 대비 혈압 강하; 알부민 배출량 감소; 단백뇨 감소; 및/또는 신장기능 회복의 효과를 나타내는 것일 수 있다.

[520]

[521] 특별히 이에 제한되지 않으나, 본 발명의 상기 약학적 조성물은 상기 글루카곤 유도체 또는 이의 결합체, 및 GLP-1 수용체 아고니스트 또는 이의 결합체를 0.01 내지 99% 중량 대 부피로 함유할 수 있다.

[522] 구체적으로, 본 발명의 조성물은 글루카곤 유도체를 0.01 내지 5 nmol/kg, 0.05 내지 4 nmol/kg, 0.05 내지 3.5 nmol/kg, 또는 0.09 내지 2.99 nmol/kg으로, GLP-1 수용체 아고니스트를 0.01 내지 5 nmol/kg, 0.05 내지 4 nmol/kg, 0.05 내지 3.5 nmol/kg, 또는 0.09 내지 2.99 nmol/kg으로 포함하는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 또한, 본 발명의 조성물은 글루카곤 유도체: GLP-1 수용체 아고니스트를 0.01 내지 50, 0.02 내지 40, 또는 0.03 내지 33.22의 물비로 포함하는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[523] 본 발명의 약학적 조성물은 개체에 글루카곤 유도체 또는 이의 결합체, 및 GLP-1 수용체 아고니스트 또는 이의 결합체를 각각 0.1 내지 20 mg, 또는 0.5 내지 16 mg으로 개체에 투여하도록 하는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[524]

[525] 이상의 내용은 본 발명의 다른 구체에 혹은 다른 양태에도 적용될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[526]

[527] 본 발명을 구현하는 다른 하나의 양태는 글루카곤 유도체, 이의 결합체, 또는 이를 포함하는 조성물을 개체에 투여하는 단계를 포함하는 만성 신장 질환의 예방 또는 치료 방법이다.

[528] 본 발명에 따른 만성 신장 질환의 예방 또는 치료 방법은 GLP-1 수용체 아고니스트, 이의 결합체, 또는 이를 포함하는 조성물을 개체에 투여하는 단계를

추가로 포함할 수 있다.

- [529] 본 발명을 구현하는 다른 하나의 양태는 글루카곤 유도체, 이의 결합체; 및 GLP-1 수용체 아고니스트, 이의 결합체를 개체에 병용 투여하는 단계를 포함하는 만성 신장 질환의 예방 또는 치료 방법이다.
- [530] 상기 방법은 글루카곤 유도체 또는 이의 결합체, 및 GLP-1 수용체 아고니스트 또는 이의 결합체를 포함하는 조성물을 개체에 투여하는 것이거나, 또는 글루카곤 유도체 또는 이의 결합체; 및 GLP-1 수용체 아고니스트 또는 이의 결합체를 별개 제제로 병용 투여 하는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [531] 본 발명의 방법은 (i) 글루카곤 유도체 및 (ii) GLP-1 수용체 아고니스트를 하나의 제제로서 투여하거나, 또는 개별 제제를 동시, 개별, 순차 또는 역순으로 투여하는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [532] 상기 글루카곤 유도체, GLP-1 수용체 아고니스트, 이의 결합체, 조성물, 혈압 강하, 신장 기능 회복, 만성 신장 질환, 예방, 및 치료에 대해서는 앞서 설명한 바와 같다.
- [533]
- [534] 본 발명에서 상기 개체는 인간을 포함한 쥐, 가축 등을 포함하는 포유 동물을 의미하고, 만성 신장 질환을 갖거나, 발병 위험이 있는 개체일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [535]
- [536] 본 발명의 용어, "투여"는 어떠한 적절한 방법으로 환자(개체)에게 소정의 물질을 도입하는 것을 의미하며, 상기 글루카곤 유도체, GLP-1 수용체 아고니스트, 이의 결합체, 또는 조성물의 투여 경로는 특별히 이에 제한되지 않으나, 상기 글루카곤 유도체, GLP-1 수용체 아고니스트, 이의 결합체 또는 조성물이 생체 내 표적에 도달할 수 있는 어떠한 일반적인 경로를 통하여 투여될 수 있으며, 예를 들어 복강 내 투여, 정맥내 투여, 근육내 투여, 피하 투여, 피내 투여, 경구 투여, 국소 투여, 비내 투여, 폐내 투여, 직장 내 투여 등이 될 수 있다.
- [537]
- [538] 또한, 상기 글루카곤 유도체, GLP-1 수용체 아고니스트, 이의 결합체 또는 조성물은 약학적 분야에서 통상의 방법에 따라 환자의 신체 내 투여에 적합한 단위 투여형의 제제, 구체적으로는 단백질 의약품의 투여에 유용한 제제 형태로 제형화시켜 당업계에서 통상적으로 사용하는 투여 방법을 이용하여 경구, 또는 피부, 정맥 내, 근육 내, 동맥 내, 골수 내, 수막강 내, 심실 내, 폐, 경피, 피하, 복 내, 비강 내, 소화관 내, 국소, 설하, 질 내 또는 직장 경로를 포함하는 비경구 투여 경로에 의하여 투여될 수 있으나, 이들에 한정되는 것은 아니다.
- [539] 본 발명의 방법은 상기 글루카곤 유도체, GLP-1 수용체 아고니스트, 또는 이의 결합체를 포함하는 조성물을 약학적 유효량으로 투여하는 것을 포함할 수 있다. 적합한 총 1일 사용량은 올바른 의학적 판단범위 내에서 처치의에 의해 결정될 수 있으며, 1회 또는 수회로 나누어 투여할 수 있다. 그러나 본 발명의 목적상,

특정 환자에 대한 구체적인 치료적 유효량은 달성하고자 하는 반응의 종류와 정도, 경우에 따라 다른 제제가 사용되는지의 여부를 비롯한 구체적 조성물, 환자의 연령, 체중, 일반 건강 상태, 성별 및 식이, 투여 시간, 투여 경로 및 조성물의 분비율, 치료기간, 구체적 조성물과 함께 사용되거나 동시 사용되는 약물을 비롯한 다양한 인자와 의약 분야에 잘 알려진 유사 인자에 따라 다르게 적용하는 것이 바람직하다.

- [540] 이에 제한되지 않으나, 본 발명의 글루카곤 유도체, GLP-1 수용체 아고니스트, 이의 결합체, 또는 이를 포함하는 조성물은 1주에 1회, 2주에 1회, 4주에 1회, 또는 1개월에 1회 투여될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [541] 구체적으로, 글루카곤 유도체 및 GLP-1 수용체 아고니스트는 투여 시, 환자 체중 1 kg당 약 1 내지 200 μg , 3 내지 180 μg 또는 5 내지 160 μg 투여되는 것일 수 있고, 두 물질을 병용할 때에는 총량이 환자 체중 1 kg당 약 2 내지 400 μg , 약 6 내지 360 μg , 또는 10 ~ 320 μg 투여되는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 또한, 병용 투여되는 글루카곤 유도체 및 GLP-1 수용체 아고니스트는 0.01 내지 50, 0.02 내지 40, 또는 0.03 내지 33.22의 물비로 투여될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [542] 구체적으로, 글루카곤 유도체를 0.09 내지 2.99 nmol/kg으로, GLP-1 수용체 아고니스트를 0.09 내지 2.99 nmol/kg으로 투여하는 것고, 또는 글루카곤 유도체: GLP-1 수용체 아고니스트를 0.01 내지 50, 0.02 내지 40, 또는 0.03 내지 33.22의 물비로 투여하는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [543]
- [544] 본 발명을 구현하는 또 다른 하나의 양태는 글루카곤 유도체 또는 이의 결합체, 이를 포함하는 조성물의 만성 신장 질환 예방 또는 치료 용도이다.
- [545] 본 발명을 구현하는 또 다른 하나의 양태는 글루카곤 유도체 또는 이의 결합체 및 GLP-1 수용체 아고니스트 또는 이의 결합체를 포함하는 조성물의 만성 신장 질환 예방 또는 치료 용도이다.
- [546] 본 발명을 구현하는 또 다른 하나의 양태는 글루카곤 유도체 또는 이의 결합체 및 GLP-1 수용체 아고니스트 또는 이의 결합체의 만성 신장 질환 예방 또는 치료를 위한 병용 용도이다.
- [547] 상기 글루카곤 유도체, GLP-1 수용체 아고니스트, 이의 결합체, 조성물, 혈압 강하, 신장 기능 회복, 만성 신장 질환, 예방, 및 치료에 대해서는 앞서 설명한 바와 같다.
- [548]
- [549] 본 발명을 구현하는 또 다른 하나의 양태는 글루카곤 유도체 또는 이의 결합체, 이를 포함하는 조성물의 만성 신장 질환 예방 또는 치료 용도를 갖는 약제의 제조를 위한 용도이다.
- [550] 본 발명을 구현하는 또 다른 하나의 양태는 글루카곤 유도체 또는 이의 결합체 및 GLP-1 수용체 아고니스트 또는 이의 결합체를 포함하는 조성물의 만성 신장

질환 예방 또는 치료 용도를 갖는 약제의 제조를 위한 용도이다.

[551] 상기 글루카곤 유도체, GLP-1 수용체 아고니스트, 이의 결합체, 조성물, 혈압 강하, 신장 기능 회복, 만성 신장 질환, 예방, 및 치료에 대해서는 앞서 설명한 바와 같다.

[552]

[553] 또한, 본 발명의 또 다른 하나의 양태는 글루카곤 유도체 또는 이의 결합체, 이를 포함하는 조성물의 혈압 강하 및/또는 신장 기능 회복 용도이다.

[554] 본 발명을 구현하는 또 다른 하나의 양태는 글루카곤 유도체 또는 이의 결합체 및 GLP-1 수용체 아고니스트 또는 이의 결합체를 포함하는 조성물의 혈압 강하 및/또는 신장 기능 회복 용도이다.

[555] 본 발명을 구현하는 또 다른 하나의 양태는 글루카곤 유도체 또는 이의 결합체 및 GLP-1 수용체 아고니스트 또는 이의 결합체의 혈압 강하 및/또는 신장 기능 회복을 위한 병용 용도이다.

[556] 상기 글루카곤 유도체, GLP-1 수용체 아고니스트, 이의 결합체, 조성물, 혈압 강하, 신장 기능 회복, 만성 신장 질환, 예방, 및 치료에 대해서는 앞서 설명한 바와 같다.

[557]

[558] 본 발명을 구현하는 또 다른 하나의 양태는 글루카곤 유도체 또는 이의 결합체, 이를 포함하는 조성물의 혈압 강하 및/또는 신장 기능 회복 용도를 갖는 약제의 제조를 위한 용도이다.

[559] 본 발명을 구현하는 또 다른 하나의 양태는 글루카곤 유도체 또는 이의 결합체 및 GLP-1 수용체 아고니스트 또는 이의 결합체를 포함하는 조성물의 혈압 강하 및/또는 신장 기능 회복 용도를 갖는 약제의 제조를 위한 용도이다.

[560] 상기 글루카곤 유도체, GLP-1 수용체 아고니스트, 이의 결합체, 조성물, 혈압 강하, 신장 기능 회복, 만성 신장 질환, 예방, 및 치료에 대해서는 앞서 설명한 바와 같다.

[561]

[562] 이하, 하기 실시예에 의하여 본 발명을 보다 상세하게 설명한다. 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하기 위한 것일 뿐 본 발명의 범위가 이들로 한정되는 것은 아니다.

[563]

[564] **실시예 1: 글루카곤 유도체의 제조 및 활성 측정**

[565]

[566] 본 발명자들은 글루카곤 수용체에 대한 활성을 통해 혈압 강하 및 신장 기능 회복에 의한 만성 신장 질환 예방 또는 치료 효과를 얻을 수 있는지 확인하고자 하였다.

[567]

[568] 이에, 먼저, 하기의 표 1에 기재된 것과 같이, 천연형 글루카곤 및 이와 동등한

활성을 갖는 글루카곤 유도체를 제조하였다. WO 2016/108586, WO2017/003191, WO 2018/004283를 참조하여 글루카곤 유도체를 합성하고, 그의 pI 및 *in vitro* 활성을 측정하였다.

[569]

[570] [표1]

글루카곤 천연형 및 글루카곤 유도체 아미노산 서열

서열번호	펩타이드 서열	고리 형성 여부	pI	<i>In vitro</i> 활성(서열번호 1에 대한 상대적 활성,%)
서열번호 1	HSQGTFTSDYSKYLD ~~SRRA~~ QDFVQ WLMNT	-	6.8	100
서열번호 2	HSQGTFTSDYSKYLD ~~CDRA~~ QDFV QWLMNT	-	4.56	0.6
서열번호 3	HSQGTFTSDYSKYLD ~~CERA~~ QDFVQ WLMNT	-	4.66	6.1
서열번호 4	HSQGTFTSDYSKYLD ~~SCDA~~ QDFVQ WLMNT	-	4.13	< 0.1
서열번호 5	HSQGTFTSDYSKYLD ~~SCEA~~ QDFVQ WLMNT	-	4.22	0.3
서열번호 6	HSQGTFTSDYSKYLD ~~SCEAD~~ DFVQ WLMNT	-	4.03	< 0.1
서열번호 7	YSQGTFTSDYSKYLD ~~SCEAD~~ DFVQ WLMNT	-	3.71	< 0.1
서열번호 8	YXQGTFTSDYSKYLD ~~SCDA~~ QDFV QWLINT	-	3.77	< 0.1
서열번호 9	YXQGTFTSDYSKYLD ~~SCDA~~ QDFV VWLINT	-	3.77	< 0.1
서열번호 10	YXQGTFTSDYSKYLD ~~SCDAD~~ DFV VWLINT	-	3.66	< 0.1
서열번호 11	YXQGTFTSDYSKYLD ~~EKCAKE~~ FV QWLMNT	-	4.78	4.6
서열번호 12	YXQGTFTSDYSKYLD ~~EKRAKE~~ FV QWLMNTC	고리 형성	6.20	56.3
서열번호 13	YXQGTFTSDYSCYLD ~~SRRA~~ QDFV QWLMNT	-	4.43	5.2
서열번호	YXQGTFTSDYSKYLD ~~CKRAKE~~ FV	-	8.12	18.1

14	QWLMNT			
서열번호 15	YXQGTFTSDYSKYLCEKRAQDFV VWLMNT	-	6.11	1.1
서열번호 16	YXQGTFTSDYSKYLCRRRAQVFV QWLMRT	-	9.11	4.2
서열번호 17	YXQGTFTSDYSKYLCVRAQDFV QWLMRT	-	6.03	23.2
서열번호 18	YXQGTFTSDYSKYLD ~~S~~ RRACDFRL WLMNT	-	8.15	< 0.1
서열번호 19	YXQGTFTSDYSKYLCEKRAKEFV QWLMNT	고리 형성	8.12	12.1
서열번호 20	YXQGTFTSDYSKYLD ~~E~~ CRAKEFV QWLMNT	고리 형성	4.78	299.7
서열번호 21	YXQGTFTSDYSKYLD ~~E~~ KCAKEFV QWLMNT	고리 형성	4.78	57.8
서열번호 22	YXQGTFTSDYSKYLD ~~E~~ KRCKEFV QWLMNT	고리 형성	6.20	147.8
서열번호 23	YXQGTFTSDYSKYCDEKRAKEFV QWLMNT	고리 형성	6.20	76.8
서열번호 24	YXQGTFTSDYSKCLDEKRAKEFV QWLMNT	고리 형성	6.21	58.0
서열번호 25	YXQGTFTSDYSKYLD ~~E~~ KRAKCFV QWLMNT	고리 형성	8.12	46.9
서열번호 26	WXQGTFTSDYSKYLD ~~E~~ CRAKDFV QWLMNT	고리 형성	4.68	1.0
서열번호 27	YXQGTFTSDYSKYLD ~~E~~ CRAKDFV QWLMNT	고리 형성	4.68	93.6
서열번호 28	WXQGTFTSDYSKYLD ~~E~~ CRAKDFV QWLMNT	고리 형성	4.68	< 0.1
서열번호 29	YXQGTFTSDYSKCLDERRAKDFV QWLMNT	고리 형성	6.15	61.3
서열번호 30	WXQGTFTSDYSKCLDERRAKDFV QWLMNT	고리 형성	4.44	0.3
서열번호	YXQGTFTSDYSKYLDCKRAKEFV	고리	8.12	6.3

31	QWLMNT	형성		
서열번호 32	-SQGTFTSDYSKYLD <u>E</u> CRA <u>K</u> EFVQ WLMNT	고리 형성	4.78	0.7
서열번호 33	YXQGTFTSDYSKYLDSRRAQDFV QWLMNT	-	6.04	108.2
서열번호 34	WXQGTFTSDYSKYCD <u>E</u> RR <u>A</u> K <u>E</u> FEV QWLMNT	고리 형성	6.21	0.2
서열번호 35	YXQGTFTSDYSKYCD <u>E</u> RR <u>A</u> K <u>E</u> FEV QWLMNT	고리 형성	6.2	17.7
서열번호 36	YXQGTFTSDCSKYLD <u>E</u> RR <u>A</u> K <u>E</u> FEV QWLMNT	고리 형성	6.21	9.9
서열번호 37	YXQGTFTSDYSKYLD <u>E</u> RR <u>A</u> K <u>E</u> FEV QWLMNTC	고리 형성	6.21	225.5
서열번호 38	YXQGTFCSDYSKYLD <u>E</u> RR <u>A</u> K <u>E</u> FEV QWLMNT	고리 형성	6.15	167.3
서열번호 39	YXQGTFSVSDCSKYLD <u>E</u> RR <u>A</u> K <u>D</u> FEV QWLMNT	고리 형성	6.15	3.7
서열번호 40	YXQGTFSVSDYSKYLD <u>E</u> RR <u>A</u> K <u>D</u> FEV QWLMNTC	고리 형성	6.15	40.8
서열번호 41	YXQGTFCSDYSKYLD <u>E</u> RR <u>A</u> K <u>D</u> FEV QWLMNT	고리 형성	6.03	45.2
서열번호 42	YXQGTFCSDYSKYLDSRRAQDFV QWLMNT	-	6.03	37.9
서열번호 43	YXQGTFTSDCSKYLDSRRAQDFV QWLMNT	-	6.03	1.6
서열번호 44	YXQGTFTSDYSKYLDSRRAQDFV QWLMNTC	-	6.21	75.4
서열번호 45	YXQGTFTSDYSCYLDEKRAKEFV QWLMNT	-	4.78	5.2

[571] 상기 표 1에 기재된 서열에서 X로 표기된 아미노산은 비천연형 아미노산인 아미노이소부티르산(Aib)을, 아미노산 기호 아래 밑줄은 밑줄 및 볼드로 표시된 해당 아미노산 쌍의 측쇄들 사이에서 락탐 고리의 형성을, 그리고 "-"는 해당 위치에는 아미노산 잔기가 없음을 나타낸다. 또한, 고리형성 여부에 대한 열에서 "-"은 해당 서열에는 고리가 형성되어 있지 않음을 가리킨다.

[572]

[573] 실시예 2: 글루카곤 유도체 지속형 결합체 제조

[574]

[575] 상기 실시예에서 제조된 서열번호 37의 글루카곤 유도체와 면역글로불린 Fc 영역을 링커로서 폴리에틸렌글리콜을 이용하여 결합시켜, 글루카곤 유도체 지속형 결합체를 제조하였다.

[576] 양 말단의 수소가 각각 3-(3-말레이미도프로피온아미도)프로필 기 및 3-옥소프로필기(프로피온알데히드기)로 치환된 분자량 10 kDa의 선형 개질 폴리에틸렌글리콜인 말레이미드-PEG-알데히드(일본 NOF사)를 서열번호 37의 글루카곤 유도체에 반응시켜 이 글루카곤 유도체 펩타이드의 시스테인 잔기를 말레이미드-PEG-알데히드의 말레이미드쪽 말단에 폐길화시켰다. 구체적으로, 서열번호 37의 글루카곤 유도체 펩타이드와 말레이미드-PEG-알데히드의 물비를 1:1~5, 단백질의 농도를 3~10 mg/ml로 하여 저온에서 1~3 시간 동안 반응시켰다. 이때, 반응은 50 mM Tris 완충액(pH 7.5)에 20~60 % 아이소프로판올이 첨가된 환경하에서 수행되었다. 반응이 종료된 후, 상기 반응액을 SP sepharose HP(GE healthcare, 미국)에 적용하여 시스테인에 모노-폐길화된 글루카곤 유도체를 정제하였다.

[577] 한편, 면역글로불린 Fc 영역은 N-말단에 Pro-Ser-Cys-Pro 서열(서열번호 57)의 힌지 영역을 갖는 면역글로불린 Fc 영역(49.8kDa, 서열번호 67의 사슬 두 개가 이황화결합으로 연결된 동종이량체)를 사용하여 국제공개특허 WO2007/021129에 기재된 방법으로 제조하였다.

[578]

[579] 다음으로, 상기 정제된 모노-폐길화된 글루카곤 유도체와 면역글로불린 Fc 영역을 물비가 1:2~10, 단백질의 농도를 10~50mg/ml로 하여 4~8°C에서 12~18시간 동안 반응시켰다. 반응액은 100 mM 인산칼륨 완충액(pH 6.0)에 환원제인 10~50 mM 소디움시아노보로하이드라이드와 10~20% 아이소프로판올이 첨가된 환경하에서 수행되었다. 반응이 종료된 후, 상기 반응액을 Butyl sepharose FF 정제컬럼(GE healthcare, 미국)과 Source ISO 정제컬럼 (GE healthcare, 미국)에 적용하여,

[580] 상기 모노-폐길화된 글루카곤 유도체 펩타이드의 알데히드쪽 폴리에틸렌글리콜 말단이 면역글로불린 Fc 동종이량체의 두 사슬 중 한 사슬의 N-말단 프롤린 질소에 연결된 글루카곤 유도체 펩타이드의 지속형 결합체를 정제하였다. 정제된 상기 결합체는 분자 내에서 글루카곤 유도체, 폴리에틸렌글리콜(PEG) 링커와 이량체의 면역글로불린 Fc 영역이 1:1:1의 물 비로 공유결합 연결된 구조이며, PEG 링커는 면역글로불린 Fc 영역의 두 폴리펩타이드 사슬 중 한 사슬의 N-말단 프롤린 질소에 연결되어 있다.

[581] 제조 후 역상 크로마토그래피, 크기배제 크로마토그래피 및 이온교환 크로마토그래피로 분석한 순도는 95 % 이상이었다.

[582]

[583] 상기 면역글로불린 Fc 영역은 서열번호 67의 아미노산 서열 (221개의 아미노산으로 구성됨)을 갖는 단량체 2개가 각 단량체의 3번 아미노산인 시스테인 사이에 이황화 결합을 통해 동중이량체를 형성하고, 상기 동중이량체의 단량체는 각각 독립적으로 35번 및 95번의 시스테인 간의 내부의 이황화 결합 및 141번 및 199번의 시스테인 간의 내부의 이황화 결합이 형성된 것이다.

[584] 여기서, 글루카곤 유도체 펩타이드 및 면역글로불린 Fc 영역이 PEG를 통하여 연결된 결합체를, '글루카곤 유도체의 지속형 결합체'로 명명하였다.

[585]

[586] 실시예 3: 만성신장질환 랫드모델에서의 신장기능 개선효과

[587] 상기 실시예에서 제조된 글루카곤 유도체의 지속형 결합체의 만성신장질환 (CKD) 개선효능을 확인코자, 고혈압 및 CKD 질환 모델로 알려진 spontaneous hypertensive rat (SHR) 모델을 사용하였다. SHR은 고혈압에 따른 신장기능 이상이 발생하는 모델로, CKD의 병인학 (etiology) 측면에서 사람의 그것과 굉장히 유사하다고 알려져있다.

[588] 먼저, 혈압 상승에 의해 신장기능 이상이 생긴다고 알려진 16주령의 SHR을 부형제 대조군, 서열번호 37의 글루카곤 유도체의 지속형 결합체 (3.9 nmol/kg, Q3D, 피하) 투여군으로 나누었고, 6주 반복투여를 진행하였다. 음성대조군으로는 정상 랫드, 부형제 대조군을 사용하였다. 6주 반복투여 중 신장기능을 평가코자, day 0, day 13, day 28, 그리고 day 46 시점에서의 소변 알부민 배출량을 측정하였다. 통계 처리는 1원 ANOVA를 사용하였다 (* ~ ***p<0.05 ~ 0.001 vs. SHR 부형제 대조군).

[589] 그 결과, 글루카곤 유도체의 지속형 결합체 투여 13일 후부터 소변 알부민 배출량이 SHR 부형제 대조군 대비 감소하기 시작하였으며, 투약 28일 이후부터는 유의적 차이가 나타남을 확인할 수 있었다 (도 1).

[590]

[591] 실시예 4: 만성신장질환 랫드모델에서의 혈압강하 효과

[592]

[593] 상기 실시예 2에서 제조된 서열번호 37의 글루카곤 유도체의 지속형 결합체의 만성신장질환에서 혈압강하 효능을 확인코자, CKD 질환 모델로 알려진 spontaneous hypertensive rat (SHR) 모델을 사용하였다. SHR은 주령에 따라 점차적으로 혈압이 상승한다고 알려진 모델로, 다양한 혈압 강하 치료제의 효능평가에 사용되고 있다.

[594]

[595] 먼저, 고혈압 수준으로 혈압이 상승한 15주령의 SHR에 수술을 통하여 원격측정장치(telemetry)를 대동맥에 삽입한 후, 부형제 대조군 및 글루카곤 유도체의 지속형 결합체 (2 nmol/kg, Q3D, 피하) 투여군으로 나누었고, 1주

반복투여를 진행하였다. 1주 반복투여 중 수축기 (SBP) 및 이완기 (DBP) 혈압의 변화는 대동맥에 삽입한 원격측정장치를 통하여 매 2시간 간격으로 모니터링 하였다. 투여한 서열번호 37의 글루카곤 유도체의 지속형 결합체의 혈압강화 효능을 평가하고자, 투여 전 2일 동안의 평균혈압 대비 투여 기간 1주일 동안의 평균혈압의 변화량을 산출하였고, 통계 처리는 t-test를 사용하였다 (* $p < 0.05$ vs. SHR 부형제 대조군).

[596] 그 결과, 부형제 대조군에서는 투여전 대비 혈압이 상승한 반면, 서열번호 37의 글루카곤 유도체의 지속형 결합체 투여군에서는 수축기, 이완기 혈압이 모두 감소하였음을 확인하였다. 특히 수축기 혈압의 경우, 부형제 대조군 대비 유의적 차이가 나타남을 확인할 수 있었다 (도 2).

[597] 이를통해 본 발명의 글루카곤 유도체의 지속형 결합체가 만성신장질환 (CKD)에서의 혈압강화에도 치료효능이 있음을 확인할 수 있었다.

[598]

[599] 실시예 5: GLP-1 수용체 아고니스트와의 병용 투여에 따른 신장기능 개선효과 확인

[600]

[601] 본 발명의 글루카곤 유도체의 만성신장질환에 대한 치료 효과를 바탕으로, GLP-1 수용체 아고니스트를 본 발명의 글루카곤 유도체와 함께 병용 사용하였을 때의 만성신장질환의 치료 효과를 추가로 확인하고자 하였다.

[602]

[603] 실시예 5-1: GLP-1 수용체 아고니스트의 지속형 결합체 제조

[604] 양 말단에 프로피온 알데히드기를 갖는 3.4 kDa 프로피온(propion)-ALD2 PEG (IDB, 한국)를 서열번호 72의 GLP-1 수용체 아고니스트(이미다조-아세틸 엑센딘-4(CA 엑센딘-4))의 라이신 (Lysine)과 위치 특이적으로 반응시킨 후, PEG와 이미다조-아세틸 엑센딘-4(CA 엑센딘-4)가 1:1로 결합된 연결체를 얻기 위하여 상기 반응 혼합물을 양이온 교환 컬럼을 실시하여 모노페길화된(mono-PEGylated) 이미다조-아세틸 엑센딘-4(CA 엑센딘-4)를 정제하였다. 면역글로불린 Fc 영역의 N 말단과 특이적으로 모노페길화된 이미다조-아세틸 엑센딘-4(CA 엑센딘-4)가 연결된 이미다조-아세틸 엑센딘-4(CA 엑센딘-4)-면역글로불린 Fc 영역 결합체를 제조하기 위하여 pH 5.0~8.2 조건에서 반응하였다. 커플링 반응 후 소수성 컬럼과 음이온 교환 컬럼을 이용한 2단계 정제방법을 사용하였고, 최종적으로 위치특이적으로 결합된 GLP-1 수용체 아고니스트-면역글로불린 Fc 영역 결합체를 정제하였다.

[605] 여기서, 서열번호 72의 GLP-1 수용체 아고니스트(이미다조-아세틸 엑센딘-4(CA 엑센딘-4)) 및 면역글로불린 Fc 영역이 PEG를 통하여 연결된 결합체를, 'GLP-1 수용체 아고니스트의 지속형 결합체' 또는 'CA-Exd4 유도체의 지속형 결합체'으로 명명하였다.

[606] 한편, 상기 GLP-1 수용체 아고니스트의 지속형 결합체의 제조에 이용된

면역글로불린 Fc 영역은 상기 실시예 2에서 이용한 Fc 영역과 동일하다.

[607]

[608] 실시예 5-2: GLP-1 수용체 아고니스트와의 병용 투여 효과 확인

[609] 상기 실시예 2에서 제조된 서열번호 37의 글루카곤 유도체의 지속형 결합체와 상기 실시예 5-1에서 제조한 GLP-1 수용체 아고니스트(CA-Exd4 유도체의 지속형 결합체)의 지속형 결합체의 병용 투여에 따른 만성신장질환 (CKD) 개선효능을 확인코자, CKD 질환 모델인 spontaneous hypertensive rat (SHR) 모델을 사용하였다.

[610]

[611] 먼저, 혈압 상승에 의해 신장기능 이상이 생긴다고 알려진 16주령의 SHR을 부형제 대조군, 글루카곤 유도체의 지속형 결합체 (3.0 nmol/kg, Q3D, 피하) 투여군, 그리고 글루카곤 유도체의 지속형 결합체 (3.0 nmol/kg, Q3D, 피하) 및 GLP-1 수용체 아고니스트의 지속형 결합체 (6.9 nmol/kg, Q3D, 피하) 병용투여군으로 나누었고, 10주 반복투여를 진행하였다. 음성대조군으로는 정상 랫드, 및 부형제 대조군을 사용하였다. 10주 반복투여 중 신장기능 및 CKD 진행정도를 평가코자, day 0, day 14, day 28, day 42, day 56 그리고 day 70 시점의 소변에서 ACR (albumin to creatinine ratio)를 측정하였다. 통계 처리는 1원 ANOVA를 사용하였다 (* ~ *** $p < 0.05 \sim 0.001$ vs. SHR 부형제 대조군).

[612] 그 결과, 부형제 대조군에서는 ACR이 지속적으로 상승한 반면, 글루카곤 유도체의 지속형 결합체 투여군에서는 ACR 상승이 지연되는 효능을 확인하였다. 또한, 글루카곤 유도체의 지속형 결합체와 GLP-1 수용체 아고니스트의 지속형 결합체 병용 투여군에서는 부형제 대조군 대비, 유의적으로 ACR이 감소함을 확인하였다 (도 3).

[613]

[614] 이를통해 글루카곤 유도체의 지속형 결합체에 의한 만성신장질환 (CKD) 치료 효능이 GLP-1 수용체 아고니스트의 지속형 결합체와의 병용투여에 따라 추가적으로 개선될 수 있음을 확인하였다.

[615]

[616] 이상과 같은 실험 결과는 모두 본 발명의 글루카곤 유도체가 혈압 강하 및 신장기능 회복 효과를 가져 만성 신장 질환의 치료에 유효한 효과를 가지며, 또한, GLP-1 수용체 아고니스트와 병용 투여함으로써 추가적인 치료 효과를 기대할 수 있다는 것을 시사한다.

[617]

[618] 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.

청구범위

- [청구항 1] 글루카곤 유도체 및 약학적으로 허용되는 부형제를 포함하는 만성 신장 질환(chronic kidney disease) 예방 또는 치료용 약학 조성물로서, 상기 글루카곤 유도체는 하기 일반식 1의 아미노산 서열을 포함하는 펩타이드인 조성물:
- X1-X2-QGTF-X7-SD-X10-S-X12-X13-X14-X15-X16-X17-X18-X19-X20-X21-F-X23-X24-W-L-X27-X28-X29-X30 (일반식 1, 서열번호 46)
- 상기 식에서,
- X1은 티로신(Y)이고;
- X2는 알파-메틸-글루탐산(α -methyl-glutamic acid), Aib(aminoisobutyric acid), D-알라닌, 글리신(G), Sar(N-methylglycine), 세린(S) 또는 D-세린이며;
- X7은 트레오닌(T), 발린(V) 또는 시스테인(C)이고;
- X10은 티로신(Y) 또는 시스테인(C)이고;
- X12는 리신(K) 또는 시스테인(C)이고;
- X13은 티로신(Y) 또는 시스테인(C)이고;
- X14는 류신(L) 또는 시스테인(C)이고;
- X15는 아스파르트산(D), 글루탐산(E) 또는 시스테인(C)이고;
- X16은 글루탐산(E), 아스파르트산(D), 세린(S), 알파-메틸-글루탐산, 또는 시스테인(C)이거나, 부존재하며;
- X17은 아스파르트산(D), 글루타민(Q), 글루탐산(E), 리신(K), 아르기닌(R), 세린(S), 시스테인(C), 또는 발린(V)이거나, 부존재하며;
- X18은 알라닌(A), 아스파르트산(D), 글루탐산(E), 아르기닌(R), 발린(V), 또는 시스테인(C)이거나, 부존재하며;
- X19는 알라닌(A), 아르기닌(R), 세린(S), 발린(V), 또는 시스테인(C)이거나, 부존재하며;
- X20은 리신(K), 히스티딘(H), 글루타민(Q), 아스파르트산(D), 아르기닌(R), 알파-메틸-글루탐산, 또는 시스테인(C)이거나, 부존재하며;
- X21은 아스파르트산(D), 글루탐산(E), 류신(L), 발린(V), 또는 시스테인(C)이거나, 부존재하며;
- X23은 이소류신(I), 발린(V), 또는 아르기닌(R)이거나, 부존재하며;
- X24는 발린(V), 아르기닌(R), 알라닌(A), 시스테인(C), 글루탐산(E), 리신(K), 글루타민(Q), 알파-메틸-글루탐산, 또는 류신(L)이거나, 부존재하며;
- X27은 이소류신(I), 발린(V), 알라닌(A), 리신(K), 메티오닌(M), 글루타민(Q), 또는 아르기닌(R)이거나, 부존재하며;
- X28은 글루타민(Q), 리신(K), 아스파라긴(N), 또는 아르기닌(R)이거나,

부존재하며;

X29는 트레오닌(T)이며;

X30은 시스테인(C)이거나, 부존재함

(단, 상기 일반식 1의 아미노산 서열이 서열번호 1 또는 서열번호 12와 동일한 경우는 제외함).

[청구항 2] 제1항에 있어서, 상기 펩타이드는 지속형 결합체의 형태이고, 상기 지속형 결합체는 하기 화학식 1로 표시되는 조성물:

[화학식 1]

X - L - F

단 이 때 X는 상기 일반식 1의 아미노산 서열을 포함하는 펩타이드이고;

L은 에틸렌글리콜 반복 단위를 함유하는 링커이며,

F는 면역글로불린 Fc 영역이고,

-는 X와 L 사이, L과 F 사이의 공유결합 연결을 나타낸다.

[청구항 3] 제1항 또는 제2항에 있어서,

상기 일반식 1에서,

X2가 Aib(aminoisobutyric acid)이며;

X7은 트레오닌(T), 발린(V) 또는 시스테인(C)이고;

X10은 티로신(Y)이고;

X12는 리신(K)이고;

X13은 티로신(Y)이고;

X14는 류신(L) 또는 시스테인(C)이고;

X15는 아스파르트산(D) 이고;

X16은 글루탐산(E), 또는 세린(S) 이며;

X17은 리신(K), 아르기닌(R), 또는 시스테인(C) 이고;

X18은 아르기닌(R) 이며;

X19는 알라닌(A), 또는 시스테인(C)이고;

X20은 글루타민(Q), 또는 리신(K) 이며;

X21은 아스파르트산(D), 또는 글루탐산(E) 이고;

X23은 발린(V) 이며;

X24는 글루타민(Q) 이고;

X27는 메티오닌(M) 이며;

X28은 아스파라긴(N) 이고;

X29는 트레오닌(T)이며;

X30은 시스테인(C)이거나, 부존재하는 조성물.

[청구항 4] 제1항에 있어서, 상기 펩타이드는 서열번호 7 내지 11, 및 13 내지 25, 27, 29, 31, 33, 35 내지 45로 이루어진 군에서 선택된 아미노산 서열을 포함하는 것인 조성물.

[청구항 5] 제3항에 있어서, 상기 펩타이드는 서열번호 20, 22, 23, 27, 33, 35, 37, 38,

- 40, 41, 42, 및 44로 이루어진 군에서 선택되는 아미노산 서열을 포함하는 것인 조성물.
- [청구항 6] 제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 조성물은 하기 특성 중 하나 이상을 나타내는 것인 조성물:
- (a) 혈압 강하;
 - (b) 알부민 배출량 감소;
 - (c) 단백뇨 감소; 및
 - (d) 신장 기능 회복.
- [청구항 7] 제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 조성물은 개체에 투여되었을 때 개체의 혈압 강하 효과 및 신장 기능 회복 효과를 나타내는 것인 조성물.
- [청구항 8] 제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 펩타이드는 C-말단이 아미드화 된 것인 조성물.
- [청구항 9] 제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 펩타이드는 아미노산 잔기 사이에 고리가 형성된 것인 조성물.
- [청구항 10] 제2항에 있어서, 상기 면역글로불린 Fc 영역은 비당쇄화된 것인 조성물.
- [청구항 11] 제2항에 있어서, 상기 면역글로불린 Fc 영역은 IgG4 Fc 영역인 조성물.
- [청구항 12] 제2항에 있어서, 상기 면역글로불린 Fc 영역은 두 개의 폴리펩타이드 사슬로 이루어진 이량체며, L의 한 말단이 상기 두 폴리펩타이드 사슬 중 하나의 폴리펩타이드 사슬에만 연결되어 있는 조성물.
- [청구항 13] 제2항에 있어서, 상기 지속형 결합체는 L의 한쪽 말단이 F의 아민기 또는 티올기와, L의 다른 말단이 X의 아민기 또는 티올기에 각각 반응하여 형성된 공유결합으로 F 및 X에 각각 연결되어 있는 것인 조성물.
- [청구항 14] 제2항에 있어서, 상기 L은 폴리에틸렌 글리콜인 조성물.
- [청구항 15] 제2항에 있어서, 상기 L 내의 에틸렌글리콜 반복 단위 부분의 화학식량은 1 내지 100 kDa 범위에 있는 조성물.
- [청구항 16] 제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 조성물은 GLP-1 수용체 아고니스트(glucagon like peptide 1 receptor agonist)를 추가로 포함하는 조성물.
- [청구항 17] 제16항에 있어서, 상기 GLP-1 수용체 아고니스트는 GLP-1, 엑센딘-3, 엑센딘-4, 이들의 아고니스트(agonist), 유도체(derivative), 단편(fragment), 변이체(variant) 및 이들의 조합으로부터 구성되는 군으로부터 선택되는 것인 조성물.
- [청구항 18] 제16항에 있어서, 상기 GLP-1 수용체 아고니스트는 N-말단 히스티딘 잔기가 데스-아미노-히스티딜, 디메틸-히스티딜, 베타-히드록시 이미다조프로피오닐, 4-이미다조아세틸 및 베타-카르복시 이미다조프로피오닐로 구성되는 군으로부터 선택되는 물질로 치환된 GLP-1 수용체 아고니스트 유도체인 조성물.
- [청구항 19] 제16항에 있어서, 상기 GLP-1 수용체 아고니스트는 천연형 엑센딘-4,

엑센딘-4의 N-말단 아민 그룹이 제거된 엑센딘-4 유도체, 엑센딘-4의 N-말단 아민 그룹이 하이드록실 그룹으로 치환된 엑센딘-4 유도체, 엑센딘-4의 N-말단 아민 그룹이 디메틸기로 수식된 엑센딘-4 유도체, 엑센딘-4의 첫 번째 아미노산(히스티딘)의 알파 탄소를 제거 (deletion)한 엑센딘-4 유도체로 구성된 군으로부터 선택되는 것인 조성물.

[청구항 20] 제16항에 있어서, 상기 GLP-1 수용체 아고니스트는 GLP-1 수용체 아고니스트가 면역글로불린 Fc 영역과 연결된 지속형 결합체 형태인 조성물.

[청구항 21] 제20항에 있어서, 상기 GLP-1 수용체 아고니스트는 이미다조-아세틸 엑센딘-4(CA 엑센딘-4)이 에틸렌글리콜 반복 단위를 함유하는 링커를 통해 면역글로불린 Fc 영역과 연결된 것인 조성물.