

명세서

발명의 명칭: 글루카곤, GLP-1 및 GIP 수용체 모두에 활성을 갖는 삼중 활성체 또는 이의 결합체를 포함하는 고지혈증 예방 또는 치료용 약학적 조성물 및 예방 또는 치료 방법

기술분야

- [1] 본 발명은 글루카곤, GLP-1 및 GIP 수용체 모두에 활성을 갖는 삼중 활성체 또는 이의 결합체의 고지혈증에 대한 치료적 용도에 관한 것이다.

[2]

배경기술

- [3] 지방질에는 대표적으로 콜레스테롤과 중성지방이 있고, 이 중 콜레스테롤은 저밀도지단백(LDL) 콜레스테롤과 고밀도지단백(HDL) 콜레스테롤로 나누어진다. 관련하여, 혈액 내에 콜레스테롤과 중성지방 수치가 정상범위에서 벗어나 있는(증가 및 감소 모두 포함) 상태인 이상지질혈증과 혈액 내에 총 콜레스테롤이 높은 상태인 고콜레스테롤혈증과 달리, 고지혈증(hyperlipidemia)은 혈액 내에 저밀도지단백 콜레스테롤이나 중성지방 중 한가지가 높거나 둘 다 높은 경우를 총칭하는 질환으로서 이상지질혈증 및 고콜레스테롤혈증과 구분되는 질환이다. 이에 따라, 이들 질환에 있어서 발병 기전 및 환자의 상태가 서로 상이하여 서로 다른 치료 및 식이조절 방법이 요구된다. 예컨대, 체내 지질 수준 조절 이상으로 발병되는 질환으로서 이상지질혈증의 경우 비정상적으로 낮은 콜레스테롤 수치가 문제가 될 수 있는데, 고지혈증과 달리 건강보조식품 섭취와 같은 식이요법을 통해 생체활동에 필수적인 콜레스테롤의 수치를 증가시키는 것이 중요하다.
- [4] 혈액 내에 저밀도지단백 콜레스테롤 및/또는 중성지방이 비정상적으로 높은 경우, 혈관벽에 쌓여 염증을 일으키고, 그 결과 심혈관계질환 (cardiovascular disease), 뇌혈관질환 (Cerebrovascular diseases), 말초동맥질환 (peripheral arterial disease)을 일으킬 수 있는 원인이 된다. 이중 심혈관계질환 및 뇌혈관질환은 암과 함께 우리나라 3대 사망원인이다. 고지혈증은 서구식 식습관으로 인한 비만 인구가 증가함에 따라 증가하고 있는 추세이며, 국내에서도 고지혈증 환자가 해마다 약 10%씩 증가하는 추세이다. 이러한 고지혈증의 병인으로는 비만, 음주 등이 기인한다고 알려져 있다. 그 중 가장 큰 병인으로는 비만을 꼽는다.
- [5] 이와 같은 고지혈증을 예방 및/또는 치료하기 위해 혈중 지질을 개선시키는데 많은 노력을 하고 있다. 예를 들어, HMGCR (HMG-CoA reductase) 억제제로 작용하며 콜레스테롤의 합성을 저해하는 효과를 가진 statin과 소장에서 NPC1L1 (Niemann-Pick C1-Like 1)를 억제하여 콜레스테롤의 재흡수를 억제하는 효과를 가진 ezetimibe, 그리고 LDL 흡수를 방해하는 PCSK9 (Proprotein convertase

subtilisin/kexin type 9)을 억제하는 evolocumab이 개발이 완료되어 치료제로 사용되고 있다. (US Endocrinology, 2011;7(1):23-9, Am J Pharm Benefits. 2010;2(4):267-274, N Engl J Med 2014; 370:1809-1819)

- [6] 그러나 statin계열의 약물을 이용한 치료의 경우, 충분히 콜레스테롤을 조절해주지 못할 때가 많을 뿐만 아니라 고용량 또는 장기간 사용할 경우, 간 독성 및 근육 병증을 유발 할 수 있다는 단점이 있다. ezetimibe는 임상에서 혈중 지질 개선에 대한 효력이 기존 약물에 비해 현저히 낮다는 단점을 가지고 있다. Evolocumab의 경우 LDLR (LDL receptor) 유전적 변이가 있는 환자에게는 효력이 미비하다 보고가 있다. 위에서 언급한 바와 같이 현재 상용화된 약물들의 경우 단일 표적에만 작용하기 때문에 유전적 변이를 가진 환자나, 초위험군 고지혈증 환자에서의 혈중 지질 제거에는 효과적이지 못하다. 따라서, 폭 넓은 고지혈증 환자에게 효능을 보일 수 있는, 다중 표적을 가진 약물의 개발이 여전히 요구되고 있다.
- [7]
- [8] 한편, GLP-1 (Glucagon-like peptide-1) 및 GIP (Glucose-dependent insulintropic polypeptide)는 대표적인 위장 호르몬이자 신경 호르몬으로서 음식물 섭취에 따른 혈중 당 농도 조절에 관여하는 물질이다. 글루카곤 (Glucagon)은 췌장에서 분비되는 펩타이드 호르몬으로 전술한 두 물질과 함께 혈중 당 농도 조절작용 및 지질 대사에 관여한다.
- [9] 상세하게는 GLP-1은 음식물 섭취에 자극을 받아 소장에서 분비되는 호르몬으로 혈당 농도 의존적으로 췌장에서의 인슐린 분비를 촉진하고, 혈당 농도를 낮추는 작용을 돕는다. 또한, 포만 인자로 작용하여 위장의 소화작용을 늦추고 음식 소화물의 위장 통과시간을 지연시켜 음식물 섭취를 줄이는 역할을 지닌다. 더욱이 쥐에 투여 시 음식 섭취억제와 체중 감소효과가 있음이 보고되었으며, 이러한 효과는 정상과 비만상태 모두에서 동일하게 나타남이 확인되어 비만 치료제로서의 가능성을 보여주었다.
- [10] GLP-1과 더불어 음식섭취에 자극을 받아 분비되는 위장 호르몬의 하나인 GIP는 소장의 K 세포로부터 분비되는 42개 아미노산으로 구성된 호르몬으로서 소장에서 흡수 된 지질을 소장세포(enterocyte)에서 ApoB48 (Apolipoprotein B 48)을 억제 함으로써 모세혈관으로의 지질 방출을 낮추는데 도움을 주는 기능을 수행하며 GLP-1의 활성 증가 효과, 항 염증 효과 등이 보고되었다.
- [11] 글루카곤은 약물 치료 또는 질병, 호르몬이나 효소 결핍 등의 원인으로 혈당이 떨어지기 시작하면 췌장에서 생산된다. 글루카곤은 간에 신호하여 글리코젠을 분해하여 글루코오스를 방출하도록 유도하고, 혈당 수준을 정상 수준까지 높이는 역할을 한다. 또한 글루카곤은 혈당 상승효과 이외에 동물과 사람에서 식욕억제, 지방세포 갈색화 및 에너지대사 (energy expenditure) 촉진할 수 있음이 보고 되었다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [12] 본 발명의 하나의 목적은 글루카곤 수용체, GLP-1 (Glucagon-like peptide-1) 수용체, 및 GIP (Glucose-dependent insulintropic polypeptide) 수용체에 대해 활성을 갖는 펩타이드 또는 결합체를 포함하는 고지혈증의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공하는 것이다.
- [13] 본 발명의 다른 목적은 상기 펩타이드, 결합체 또는 이를 포함하는 조성물을 이를 필요로 하는 개체에 투여하는 단계를 포함하는, 고지혈증의 예방 또는 치료 방법을 제공하는 것이다.
- [14] 본 발명의 다른 목적은 고지혈증의 예방 또는 치료를 위한 약제의 제조에 있어서 상기 펩타이드, 결합체 또는 이를 포함하는 조성물의 용도를 제공하는 것이다.

과제 해결 수단

- [15] 본 발명을 구현하는 하나의 양태는 글루카곤 수용체, GLP-1 (Glucagon-like peptide-1) 수용체, 및 GIP (Glucose-dependent insulintropic polypeptide) 수용체에 대해 활성을 갖는 펩타이드를 포함하는 고지혈증의 예방 또는 치료용 약학적 조성물이다.
- [16] 하나의 구체예로서, 상기 펩타이드에서 추가되는 아미노산 서열은 천연형 GLP-1, 천연형 GIP, 또는 천연형 엑센딘-4 아미노산 서열에서 유래된 것을 특징으로 한다.
- [17] 다른 구체예로서, 상기 펩타이드는 하기 일반식 1로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 펩타이드인 것을 특징으로 한다:
- [18] Xaa1-Xaa2-Xaa3-Gly-Thr-Phe-Xaa7-Ser-Asp-Xaa10-Ser-Xaa12-Xaa13-Xaa14-Xaa15-Xaa16-Xaa17-Xaa18-Xaa19-Xaa20-Xaa21-Phe-Xaa23-Xaa24-Trp-Leu-Xaa27-Xaa28-Xaa29-Xaa30-R1 (일반식 1, 서열번호 103)
- [19] 상기 일반식 1에서, Xaa1은 히스티딘 (His, H), 4-이미다조아세틸 (CA), 또는 티로신 (Tyr, Y)이고, Xaa2는 글리신 (Gly, G), 알파-메틸-글루탐산, 또는 Aib (aminoisobutyric acid)이며, Xaa3은 글루탐산 (Glu, E) 또는 글루타민 (Gln, Q)이고, Xaa7은 트레오닌 (Thr, T) 또는 이소류신 (Ile, I)이며, Xaa10은 류신 (Leu, L), 티로신 (Tyr, Y), 리신 (Lys, K), 시스테인 (Cys, C), 또는 발린 (Val, V)이고, Xaa12는 리신 (Lys, K), 세린 (Ser, S), 또는 이소류신 (Ile, I)이며, Xaa13은 글루타민 (Gln, Q), 티로신 (Tyr, Y), 알라닌 (Ala, A), 또는 시스테인 (Cys, C)이고, Xaa14는 류신 (Leu, L), 메티오닌 (Met, M), 또는 티로신 (Tyr, Y)이며, Xaa15는 시스테인 (Cys, C), 아스파르트산 (Asp, D), 글루탐산 (Glu, E), 또는 류신 (Leu, L)이며, Xaa16은 글리신 (Gly, G), 글루탐산 (Glu, E), 또는 세린 (Ser, S)이고, Xaa17은 글루타민 (Gln, Q), 아르기닌 (Arg, R), 이소류신 (Ile, I), 글루탐산 (Glu, E), 시스테인 (Cys, C), 또는 리신 (Lys, K)이며, Xaa18은 알라닌 (Ala, A), 글루타민

- (Gln, Q), 아르기닌 (Arg, R), 또는 히스티딘 (His, H)이고, Xaa19는 알라닌 (Ala, A), 글루타민 (Gln, Q), 시스테인 (Cys, C), 또는 발린 (Val, V)이며, Xaa20은 리신 (Lys, K), 글루타민 (Gln, Q), 또는 아르기닌 (Arg, R)이고, Xaa21은 글루탐산 (Glu, E), 글루타민 (Gln, Q), 류신 (Leu, L), 시스테인 (Cys, C), 또는 아스파르트산 (Asp, D)이며, Xaa23은 이소류신 (Ile, I) 또는 발린 (Val, V)이고, Xaa24는 알라닌 (Ala, A), 글루타민 (Gln, Q), 시스테인 (Cys, C), 아스파라긴 (Asn, N), 아스파르트산 (Asp, D), 또는 글루탐산 (Glu, E)이며, Xaa27은 발린 (Val, V), 류신 (Leu, L), 리신 (Lys, K), 또는 메티오닌 (Met, M)이고, Xaa28은 시스테인 (Cys, C), 리신 (Lys, K), 알라닌 (Ala, A), 아스파라긴 (Asn, N), 또는 아스파르트산 (Asp, D)이며, Xaa29는 시스테인 (Cys, C), 글리신 (Gly, G), 글루타민 (Gln, Q), 트레오닌 (Thr, T), 글루탐산 (Glu, E), 또는 히스티딘 (His, H)이고, Xaa30은 시스테인 (Cys, C), 글리신 (Gly, G), 리신 (Lys, K), 또는 히스티딘 (His, H)이거나, 부존재하며,
- [20] R1은 시스테인 (Cys, C), GKKNWVWKNIT (서열번호 106), m-SSGAPPPS-n (서열번호 107), 또는 m-SSGQPPPS-n (서열번호 108)이거나, 부존재하며, 여기서, m은 -Cys-, -Pro-, 또는 -Gly-Pro-이고, n은 -Cys-, -Gly-, -Ser-, 또는 -His-Gly-이거나, 부존재하는 것을 특징으로 한다.
- [21] 앞선 구체예 중 어느 하나에 따른 조성물로서, 상기 펩타이드는 상기 일반식 1에서 Xaa14는 류신 또는 메티오닌이며, Xaa15는 시스테인, 아스파르트산, 또는 류신인 것을 특징으로 한다.
- [22] 앞선 구체예 중 어느 하나에 따른 조성물로서, 상기 펩타이드는 상기 일반식 1에서, Xaa2는 글리신, 알파-메틸-글루탐산, 또는 Aib이고, Xaa7은 트레오닌이며, Xaa10은 티로신, 시스테인, 또는 발린이고, Xaa12는 리신 또는 이소류신이며, Xaa13은 티로신, 알라닌, 글루타민, 또는 시스테인이고, Xaa14는 류신, 시스테인, 또는 메티오닌이며, Xaa15는 시스테인, 류신, 글루탐산, 또는 아스파르트산이고, Xaa17은 글루타민, 아르기닌, 이소류신, 시스테인, 글루탐산, 또는 리신이며, Xaa18은 알라닌, 글루타민, 아르기닌, 또는 히스티딘이고, Xaa19는 알라닌, 글루타민, 발린, 또는 시스테인이며, Xaa20은 리신, 아르기닌, 또는 글루타민이고, Xaa21은 글루탐산, 글루타민, 류신, 시스테인, 또는 아스파르트산이며, Xaa23은 이소류신 또는 발린이고, Xaa24는 시스테인, 알라닌, 글루타민, 아스파라긴, 글루탐산, 또는 아스파르트산이며, Xaa27은 류신 또는 리신인 것을 특징으로 한다.
- [23]
- [24] 앞선 구체예 중 어느 하나에 따른 조성물로서, 상기 펩타이드는 하기 일반식 2로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 펩타이드인 것을 특징으로 한다.
- [25] Xaa1-Xaa2-Gln-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Xaa10-Ser-Lys-Xaa13-Xaa14-Xaa15-Xaa16-Xaa17-Xaa18-Xaa19-Xaa20-Xaa21-Phe-Xaa23-Xaa24-Trp-Leu-Leu-Xaa28-Xaa29-Xaa30-Xaa31-Ser-Ser-Gly-Gln-Pro-Pro-Pro-Ser-Xaa40 (일반식 2, 서열번호 104)
- [26] 상기 일반식 2에서, Xaa1은 4-이미다조아세틸, 히스티딘, 또는 티로신이고,

Xaa2는 글리신, 알파-메틸-글루탐산, 또는 Aib이며, Xaa10은 티로신, 또는 시스테인이고, Xaa13은 알라닌, 글루타민, 티로신, 또는 시스테인이며, Xaa14는 류신, 메티오닌, 또는 티로신이고, Xaa15는 아스파르트산, 글루탐산, 또는 류신이며, Xaa16은 글리신, 글루탐산, 또는 세린이고, Xaa17은 글루타민, 아르기닌, 이소류신, 글루탐산, 시스테인, 또는 리신이며, Xaa18은 알라닌, 글루타민, 아르기닌, 또는 히스티딘이고, Xaa19는 알라닌, 글루타민, 시스테인, 또는 발린이며, Xaa20은 리신, 글루타민, 또는 아르기닌이고, Xaa21은 시스테인, 글루탐산, 글루타민, 류신, 또는 아스파르트산이며, Xaa23은 이소류신 또는 발린이고, Xaa24는 시스테인, 알라닌, 글루타민, 아스파라긴, 또는 글루탐산이며, Xaa28은 리신, 시스테인, 아스파라긴, 또는 아스파르트산이고, Xaa29는 글리신, 글루타민, 시스테인, 또는 히스티딘이며, Xaa30은 시스테인, 글리신, 리신, 또는 히스티딘이고, Xaa31은 프롤린 또는 시스테인이며, Xaa40은 시스테인이거나, 부존재하는 것을 특징으로 한다.

- [27] 앞선 구체예 중 어느 하나에 따른 조성물로서, 상기 펩타이드는 상기 일반식 1에서, Xaa2는 글리신, 알파-메틸-글루탐산, 또는 Aib이고, Xaa7은 트레오닌이며, Xaa10은 티로신, 시스테인, 또는 발린이고, Xaa12는 리신 또는 이소류신이며, Xaa13은 티로신, 알라닌, 또는 시스테인이고, Xaa14는 류신 또는 메티오닌이며, Xaa15는 시스테인 또는 아스파르트산이고, Xaa17은 글루타민, 아르기닌, 이소류신, 시스테인, 또는 리신이며, Xaa18은 알라닌, 아르기닌, 또는 히스티딘이고, Xaa19는 알라닌, 글루타민, 또는 시스테인이며, Xaa20은 리신 또는 글루타민이고, Xaa21은 글루탐산, 시스테인, 또는 아스파르트산이며, Xaa23은 발린이고, Xaa24는 알라닌, 글루타민, 시스테인, 아스파라긴, 또는 아스파르트산이며, Xaa27은 류신 또는 리신인 것을 특징으로 한다.
- [28] 앞선 구체예 중 어느 하나에 따른 조성물로서, 상기 펩타이드는 상기 일반식 2에서, Xaa13은 알라닌, 티로신, 또는 시스테인이고, Xaa15는 아스파르트산 또는 글루탐산이며, Xaa17은 글루타민, 아르기닌, 시스테인, 또는 리신이고, Xaa18은 알라닌, 아르기닌, 또는 히스티딘이며, Xaa21은 시스테인, 글루탐산, 글루타민, 또는 아스파르트산이고, Xaa23은 이소류신 또는 발린이며, Xaa24는 시스테인, 글루타민, 또는 아스파라긴이고, Xaa28은 시스테인, 아스파라긴, 또는 아스파르트산이며, Xaa29는 글루타민, 시스테인, 또는 히스티딘이고, Xaa30은 시스테인, 리신, 또는 히스티딘인 것을 특징으로 한다.
- [29] 앞선 구체예 중 어느 하나에 따른 조성물로서, 상기 펩타이드는 상기 일반식 1에서, Xaa2는 알파-메틸-글루탐산 또는 Aib이고, Xaa7은 트레오닌이며, Xaa10은 티로신 또는 시스테인이고, Xaa12는 리신 또는 이소류신이며, Xaa13은 티로신, 알라닌, 또는 시스테인이고, Xaa14는 류신 또는 메티오닌이며, Xaa15는 시스테인 또는 아스파르트산이고, Xaa16은 글루탐산이며, Xaa17은 아르기닌, 이소류신, 시스테인, 또는 리신이고, Xaa18은 알라닌, 아르기닌, 또는 히스티딘이며, Xaa19는 알라닌, 글루타민, 또는 시스테인이고, Xaa20은 리신

또는 글루타민이며, Xaa21은 글루탐산 또는 아스파르트산이고, Xaa23은 발린이며, Xaa24는 글루타민, 아스파라긴, 또는 아스파르트산이고, Xaa27은 류신이며, Xaa28은 시스테인, 알라닌, 아스파라긴, 또는 아스파르트산인 것을 특징으로 한다.

- [30] 앞선 구체예 중 어느 하나에 따른 조성물로서, 상기 펩타이드는 상기 일반식 1에서, Xaa1은 히스티딘 또는 4-이미다조아세틸이고, Xaa2는 알파-메틸-글루탐산 또는 Aib이며, Xaa3은 글루타민이고, Xaa7은 트레오닌이며, Xaa10은 티로신이고, Xaa12는 이소류신이며, Xaa13은 알라닌 또는 시스테인이고, Xaa14는 메티오닌이며, Xaa15는 아스파르트산이고, Xaa16은 글루탐산이며, Xaa17은 이소류신 또는 리신이고, Xaa18은 알라닌 또는 히스티딘이며, Xaa19는 글루타민 또는 시스테인이고, Xaa20은 리신이며, Xaa21은 아스파르트산이고, Xaa23은 발린이며, Xaa24는 아스파라긴이고, Xaa27은 류신이며, Xaa28은 알라닌 또는 아스파라긴이고, Xaa29는 글루타민 또는 트레오닌이며, Xaa30은 시스테인 또는 리신이거나, 부존재하는 것을 특징으로 한다.
- [31] 앞선 구체예 중 어느 하나에 따른 조성물로서, 상기 펩타이드는 하기 일반식 3의 아미노산 서열을 포함하는 펩타이드인 것을 특징으로 한다.
- [32] Xaa1-Xaa2-Gln-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Lys-Xaa13-Leu-Asp-Glu-Xaa17-Xaa18-Xaa19-Lys-Xaa21-Phe-Val-Xaa24-Trp-Leu-Leu-Xaa28-Xaa29-Xaa30-Xaa31-Ser-Ser-Gly-Gln-Pro-Pro-Ser-Xaa40 (일반식 3, 서열번호 105),
- [33] 상기 일반식 3에서, Xaa1은 히스티딘 또는 티로신이고, Xaa2는 알파-메틸-글루탐산 또는 Aib이며, Xaa13은 알라닌, 티로신 또는 시스테인이고, Xaa17은 아르기닌, 시스테인, 또는 리신이며, Xaa18은 알라닌 또는 아르기닌이고, Xaa19는 알라닌 또는 시스테인이며, Xaa21은 글루탐산 또는 아스파르트산이고, Xaa24는 글루타민 또는 아스파라긴이며, Xaa28은 시스테인 또는 아스파르트산이고, Xaa29는 시스테인, 히스티딘, 또는 글루타민이며, Xaa30은 시스테인 또는 히스티딘이고, Xaa31은 프롤린 또는 시스테인이며, Xaa40은 시스테인 또는 부존재하는 것을 특징으로 한다.
- [34] 앞선 구체예 중 어느 하나에 따른 조성물로서, 상기 펩타이드는 상기 R1은 시스테인, GKNDWKHNIT (서열번호 106), CSSGQPPPS (서열번호 109), GPSSGAPPPS (서열번호 110), GPSSGAPPPSC (서열번호 111), PSSGAPPPS (서열번호 112), PSSGAPPPSG (서열번호 113), PSSGAPPPSHG (서열번호 114), PSSGAPPPSS (서열번호 115), PSSGQPPPS (서열번호 116), 또는 PSSGQPPPS (서열번호 117)이거나, 부존재하는 것을 특징으로 한다.
- [35] 앞선 구체예 중 어느 하나에 따른 조성물로서, 상기 펩타이드는 서열번호: 1 내지 102로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하는 것을 특징으로 한다.
- [36] 앞선 구체예 중 어느 하나에 따른 조성물로서, 상기 일반식에서

- N-말단으로부터 16번 아미노산과 20번 아미노산은 서로 고리를 형성하는 것을 특징으로 한다.
- [37] 앞선 구체예 중 어느 하나에 따른 조성물로서, 상기 펩타이드는 이의 C-말단이 아미드화된 것을 특징으로 한다.
- [38] 앞선 구체예 중 어느 하나에 따른 조성물로서, 상기 약학적 조성물은 LDL 흡수 증가, 3-Hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase (HMGCR) 활성 억제, 및 지방산 분해 촉진 효과 중 어느 하나 이상의 효과를 갖는 것을 특징으로 한다.
- [39] 앞선 구체예 중 어느 하나에 따른 조성물로서, 상기 약학적 조성물 투여 후 24시간 내지 48시간 후의 3-Hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase (HMGCR)의 활성이 50% 미만인 것을 특징으로 한다.
- [40] 앞선 구체예 중 어느 하나에 따른 조성물로서, 상기 약학적 조성물은 혈중 LDL 농도 및 중성지방 농도를 감소시키는 것을 특징으로 한다.
- [41] 본 발명을 구현하는 다른 하나의 양태는 상기 펩타이드를 포함하는 결합체를 포함하는 고지혈증의 예방 또는 치료를 위한 약학적 조성물이다.
- [42] 하나의 구체예로서, 상기 결합체는 하기 화학식 1로 표시되는 것을 특징으로 할 수 있다:
- [43] [화학식 1]
- [44] X - La - F
- [45] 여기서,
- [46] X는, 상기 글루카곤 수용체, GLP-1 수용체, 및 GIP 수용체에 대해 활성을 갖는, 펩타이드이고,
- [47] L은, 폴리에틸렌 글리콜이며,
- [48] a는, 0 또는 자연수이며, 다만 a가 2 이상일 때, 각각의 L은 서로 독립적이고,
- [49] F는, 면역글로불린 Fc 영역임.
- [50] 다른 구체예로서, 상기 펩타이드는 하기 일반식 1로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 펩타이드인 것을 특징으로 한다:
- [51] Xaa1-Xaa2-Xaa3-Gly-Thr-Phe-Xaa7-Ser-Asp-Xaa10-Ser-Xaa12-Xaa13-Xaa14-Xaa15-Xaa16-Xaa17-Xaa18-Xaa19-Xaa20-Xaa21-Phe-Xaa23-Xaa24-Trp-Leu-Xaa27-Xaa28-Xaa29-Xaa30-R1 (일반식 1, 서열번호 103)
- [52] 상기 일반식 1에서,
- [53] Xaa1은 히스티딘 (His, H), 4-이미다조아세틸 (CA), 또는 티로신 (Tyr, Y)이고,
- [54] Xaa2는 글리신 (Gly, G), 알파-메틸-글루탐산, 또는 Aib (aminoisobutyric acid)이며,
- [55] Xaa3은 글루탐산 (Glu, E) 또는 글루타민 (Gln, Q)이고,
- [56] Xaa7은 트레오닌 (Thr, T) 또는 이소류신 (Ile, I)이며,
- [57] Xaa10은 류신 (Leu, L), 티로신 (Tyr, Y), 리신 (Lys, K), 시스테인 (Cys, C), 또는 발린 (Val, V)이고,
- [58] Xaa12는 리신 (Lys, K), 세린 (Ser, S), 또는 이소류신 (Ile, I)이며,

- [59] Xaa13은 글루타민 (Gln, Q), 티로신 (Tyr, Y), 알라닌 (Ala, A), 또는 시스테인 (Cys, C)이고,
- [60] Xaa14는 류신 (Leu, L), 메티오닌 (Met, M), 또는 티로신 (Tyr, Y)이며,
- [61] Xaa15는 시스테인 (Cys, C), 아스파르트산 (Asp, D), 글루탐산 (Glu, E), 또는 류신 (Leu, L)이며,
- [62] Xaa16은 글리신 (Gly, G), 글루탐산 (Glu, E), 또는 세린 (Ser, S)이고,
- [63] Xaa17은 글루타민 (Gln, Q), 아르기닌 (Arg, R), 이소류신 (Ile, I), 글루탐산 (Glu, E), 시스테인 (Cys, C), 또는 리신 (Lys, K)이며,
- [64] Xaa18은 알라닌 (Ala, A), 글루타민 (Gln, Q), 아르기닌 (Arg, R), 또는 히스티딘 (His, H)이고,
- [65] Xaa19는 알라닌 (Ala, A), 글루타민 (Gln, Q), 시스테인 (Cys, C), 또는 발린 (Val, V)이며,
- [66] Xaa20은 리신 (Lys, K), 글루타민 (Gln, Q), 또는 아르기닌 (Arg, R)이고,
- [67] Xaa21은 글루탐산 (Glu, E), 글루타민 (Gln, Q), 류신 (Leu, L), 시스테인 (Cys, C), 또는 아스파르트산 (Asp, D)이며,
- [68] Xaa23은 이소류신 (Ile, I) 또는 발린 (Val, V)이고,
- [69] Xaa24는 알라닌 (Ala, A), 글루타민 (Gln, Q), 시스테인 (Cys, C), 아스파라긴 (Asn, N), 아스파르트산 (Asp, D), 또는 글루탐산 (Glu, E)이며,
- [70] Xaa27은 발린 (Val, V), 류신 (Leu, L), 리신 (Lys, K), 또는 메티오닌 (Met, M)이고,
- [71] Xaa28은 시스테인 (Cys, C), 리신 (Lys, K), 알라닌 (Ala, A), 아스파라긴 (Asn, N), 또는 아스파르트산 (Asp, D)이며,
- [72] Xaa29는 시스테인 (Cys, C), 글리신 (Gly, G), 글루타민 (Gln, Q), 트레오닌 (Thr, T), 글루탐산 (Glu, E), 또는 히스티딘 (His, H)이고,
- [73] Xaa30은 시스테인 (Cys, C), 글리신 (Gly, G), 리신 (Lys, K), 또는 히스티딘 (His, H)이거나, 부존재하며,
- [74] R1은 시스테인 (Cys, C), GKKNDWKHNIT (서열번호 106), m-SSGAPPPS-n (서열번호 107), 또는 m-SSGQPPPS-n (서열번호 108)이거나, 부존재하며,
- [75] 여기서,
- [76] m은 -Cys-, -Pro-, 또는 -Gly-Pro-이고,
- [77] n은 -Cys-, -Gly-, -Ser-, 또는 -His-Gly-이거나, 부존재함.
- [78] 앞선 구체에 중 어느 하나에 따른 조성물로서, 상기 약학적 조성물은 상기 일반식 1로 표현되는 펩타이드가 폴리에틸렌 글리콜을 통해 면역글로불린 Fc 영역과 결합한 결합체를 포함하는 것을 특징으로 한다.
- [79] 앞선 구체에 중 어느 하나에 따른 조성물로서, 상기 약학적 조성물은 LDL 흡수 증가, 3-Hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase (HMGCR) 활성 억제, 및 지방산 분해 촉진 효과 중 어느 하나 이상의 효과를 갖는 것을 특징으로 한다.
- [80] 앞선 구체에 중 어느 하나에 따른 조성물로서, 상기 약학적 조성물 투여 후

24시간 내지 48시간 후의 3-Hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase (HMGCR)의 활성이 50% 미만인 것을 특징으로 한다.

[81] 앞선 구체예 중 어느 하나에 따른 조성물로서, 상기 약학적 조성물은 혈중 LDL 농도 및 중성지방 농도를 감소시키는 것을 특징으로 한다.

[82] 본 발명을 구현하는 다른 하나의 양태는 상기 펩타이드, 결합체 또는 이를 포함하는 조성물을 이를 필요로 하는 개체에 투여하는 단계를 포함하는, 고지혈증의 예방 또는 치료 방법이다.

[83] 본 발명을 구현하는 다른 하나의 양태는 고지혈증의 예방 또는 치료를 위한 약제의 제조에 있어서 상기 펩타이드, 결합체 또는 이를 포함하는 조성물의 용도이다.

[84]

발명의 효과

[85] 본 발명에 따른 삼중 활성체 지속형 결합체는 글루카곤 수용체, GLP-1 (Glucagon-like peptide-1) 수용체, 및 GIP (Glucose-dependent insulintropic polypeptide) 수용체에 대해 활성을 가져, 고지혈증 치료에 적용될 수 있다.

[86]

도면의 간단한 설명

[87] 도 1은 본 발명의 삼중 활성체 지속형 결합체의 고지혈증 치료 효과를 in vivo에서 확인한 도이다.

[88] 도 2는 본 발명의 삼중 활성체 지속형 결합체에 의해 LDL 흡수가 증가한 것을 확인한 도이다.

[89] 도 3은 본 발명의 삼중 활성체 지속형 결합체에 의해 3-Hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase (HMGCR) 활성이 억제된 것을 확인한 도이다.

[90] 도 4는 본 발명의 삼중 활성체 지속형 결합체의 지방산 분해 촉진 효과를 확인한 도이다.

[91]

발명의 실시를 위한 최선의 형태

[92] 이하에서는, 본 발명을 더욱 상세히 설명한다.

[93] 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.

[94] 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.

- [95]
- [96] 알라닌 Ala, A 아르기닌 Arg, R
- [97] 아스파라긴 Asn, N 아스파르트산 Asp, D
- [98] 시스테인 Cys, C 글루탐산 Glu, E
- [99] 글루타민 Gln, Q 글리신 Gly, G
- [100] 히스티딘 His, H 이소류신 Ile, I
- [101] 류신 Leu, L 리신 Lys, K
- [102] 메티오닌 Met, M 페닐알라닌 Phe, F
- [103] 프롤린 Pro, P 세린 Ser, S
- [104] 트레오닌 Thr, T 트립토판 Trp, W
- [105] 티로신 Tyr, Y 발린 Val, V
- [106]
- [107] 본 발명을 구현하기 위한 하나의 양태는 글루카곤 수용체, GLP-1 (Glucagon-like peptide-1) 수용체, 및 GIP (Glucose-dependent insulintropic polypeptide) 수용체에 대해 활성을 갖는, 펩타이드를 포함하는, 고지혈증의 예방 또는 치료용 약학적 조성물이다.
- [108] 본 발명의 삼중활성체는 고지혈증에 대한 치료 또는 예방 효과가 있는 것을 특징으로 한다. 본 발명에서, 혈액 내에 콜레스테롤(저밀도지단백 콜레스테롤 및 고밀도지단백 콜레스테롤)과 중성지방(콜레스테롤이 아닌 지질의 한 종류) 수치가 정상범위에서 벗어나 있는(증가 및 감소 모두 포함) 상태인 이상지질혈증과 혈액 내에 총 콜레스테롤이 높은 상태인 고콜레스테롤혈증과 달리, 고지혈증은 혈액 내에 저밀도지단백 콜레스테롤이나 중성지방 중 한가지가 높거나 둘 다 높은 경우를 총칭하는 질환으로서 이상지질혈증 및 고콜레스테롤증과 구분되는 질환이다. 예컨대, 저밀도지단백 콜레스테롤이 130mg/dL을 초과 및/또는 중성지방이 200mg/dL를 초과하는 경우 고지혈증에 해당될 수 있다.
- [109]

[110] [표1]

구분	콜레스테롤		중성지방
	저밀도지단백 콜레스테롤	고밀도지단백 콜레스테롤	
고지혈증	정상범위 초과	-	정상범위 초과
고콜레스테롤혈증	정상범위 초과		-
이상지질혈증	정상범위 초과 또는 미만		

[111]

[112] 사람의 경우, 저밀도지단백 콜레스테롤의 정상범위는 130mg/dL 이하, 고밀도지단백 콜레스테롤의 정상범위는 60mg/dL 이상, 구체적으로, 남성에서 40mg/dL 이상, 여성에서 50mg/dL 이상, 중성지방의 정상범위는 200 mg/dL 이하이며, 이를 벗어날 경우 상기 표 1에 기재된 바와 같은 질병을 갖는 것으로 이해될 수 있다.

[113] 상기 표 1에서와 같이, 효과적인 고지혈증의 치료를 위해서는 정상범위를 벗어난 저밀도지단백 콜레스테롤과 중성지방에 대한 감소 효과가 현저히 우수할 것이 요구되는 점에서, 고콜레스테롤혈증 및 이상지질혈증의 치료를 위해 요구되는 조건과 구별된다.

[114] 이러한 측면에서, 본 발명의 삼중활성체는 혈액 내 저밀도지단백 콜레스테롤 및/또는 중성지방을 감소시킬 수 있는 것에 특징이 있다.

[115] 상기 "글루카곤 수용체, GLP-1 수용체, 및 GIP 수용체에 대해 활성을 갖는, 펩타이드"는 본 발명에서 삼중 활성체로 혼용되어 사용될 수 있다.

[116] 이러한 펩타이드는 글루카곤, GLP-1, 및 GIP 수용체에 대해 유의한 수준의 활성을 가지는 다양한 물질, 예컨대 다양한 펩타이드를 포함한다.

[117] 특별히 이에 제한되는 것은 아니나, 상기 글루카곤, GLP-1, 및 GIP 수용체에 대해 유의한 수준의 활성을 가지는 삼중 활성체는 글루카곤, GLP-1, 및 GIP 수용체 중 하나 또는 그 이상의 수용체, 구체적으로 둘 또는 그 이상의 수용체, 보다 구체적으로 세 개의 수용체 모두에 대해 *in vitro* 활성이 해당 수용체의 천연형 리간드 (천연형 글루카곤, 천연형 GLP-1, 및 천연형 GIP) 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, 또는 100% 이상을 나타낼 수 있다.

[118] 이러한 삼중 활성체의 *in vitro* 활성을 측정하는 방법은 본원 명세서의 실험예 1을 참조할 수 있으나, 특별히 이에 제한되는 것은 아니다.

[119] 한편, 상기 펩타이드는 하기 i) 내지 iii) 중 하나 이상, 둘 이상, 구체적으로 세

개의 활성을 보유하는 것, 구체적으로 유의한 활성을 보유하는 것을 특징으로 한다:

[120] i) GLP-1 수용체의 활성화; ii) 글루카곤 수용체의 활성화; 및 iii) GIP 수용체의 활성화.

[121] 여기서, 수용체를 활성화시킨다는 것은, 천연형 대비 수용체에 대한 *in vitro* 활성이 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, 또는 100% 이상을 나타내는 경우를 예로 들 수 있다. 그러나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[122]

[123] 본 발명에 따른 조성물은 글루카곤 수용체, GLP-1 (Glucagon-like peptide-1) 수용체, 및 GIP (Glucose-dependent insulintropic polypeptide) 수용체에 대해 활성을 갖는 분리된 펩타이드를 포함함으로써, LDL 흡수 증가, 콜레스테롤 합성 억제, 및 지방산 분해 촉진 효과 중 어느 하나 이상의 효과를 나타낼 수 있고, 그에 따라 고지혈증에 대해 우수한 치료 효과를 나타낼 수 있다. 예컨대, 상기 조성물 투여 후 24시간 내지 48시간 후의 3-Hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase (HMGCR)의 활성은 50% 미만일 수 있다.

[124] 구체적으로, 상기 조성물이 투여된 개체에서 24시간 이상의 시간(예를 들어, 24시간 내지 48시간)이 경과한 후, 3-Hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase (HMGCR)의 활성은 50%, 40%, 또는 30% 미만을 나타낼 수 있으며, 이는 개체에서 체내 콜레스테롤 합성이 본 발명에 따른 조성물에 의해 억제될 수 있으며, 그에 따라 고지혈증에 대한 효과를 가짐을 시사한다.

[125] 또한, 본 발명에 따른 조성물은 혈중 LDL 농도 및 중성지방 농도를 감소시켜 고지혈증에 대해 특히 우수한 치료 효과를 제공할 수 있다.

[126] 또한, 상기 펩타이드는 천연형 GLP-1, 천연형 글루카곤 및 천연형 GIP 중 어느 하나 대비 체내 반감기가 증가된 것일 수 있으나, 특별히 이에 제한되는 것은 아니다.

[127] 특별히 이에 제한되는 것은 아니나, 이러한 상기 펩타이드는 비자연적으로 발생된 (non-naturally occurring) 것일 수 있다.

[128] 구체적으로, 상기 분리된 펩타이드는 천연형 글루카곤의 아날로그일 수 있으나, 특별히 이에 제한되는 것은 아니다.

[129] 본 발명에 따른 천연형 글루카곤 아날로그는 천연형 글루카곤과 비교하여 아미노산 서열에 하나 이상의 차이가 있는 펩타이드, 천연형 글루카곤 서열의 개질 (modification)을 통하여 변형시킨 펩타이드, 천연형 글루카곤의 모방체를 포함한다.

[130] 한편, 특별히 이에 제한되는 것은 아니나, 천연형 글루카곤은 다음의 아미노산 서열을 가질 수 있다:

[131] 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: 118)

- [132] 구체적으로, 상기 펩타이드는 천연형 글루카곤 서열에서 적어도 하나 이상의 아미노산에 치환 (substitution), 추가 (addition), 제거 (deletion), 수식 (modification) 및 이들의 조합으로 이루어지는 군에서 선택된 변형이 일어난, 천연형 글루카곤의 아날로그일 수 있으나, 특별히 이에 제한되는 것은 아니다.
- [133] 또한, 상기 아미노산의 치환은 아미노산으로의 치환이나 비 천연형 화합물로의 치환을 모두 포함한다.
- [134] 또한, 추가는 펩타이드의 N-말단 및/또는 C-말단에 이루어질 수 있다. 한편, 추가되는 아미노산의 길이는 특별히 이에 제한되지 않으며, 1 이상, 2 이상, 3 이상, 4 이상, 5 이상, 6 이상, 7 이상, 8 이상, 9 이상, 10 이상, 또는 11 이상의 아미노산이 추가될 수 있으며, 넓게는 폴리펩타이드의 추가를 포함하나, 특별히 이에 제한되는 것은 아니다.
- [135] 보다 구체적으로, 상기 글루카곤 아날로그는 천연형 글루카곤 아미노산 서열에서 1번, 2번, 3번, 7번, 10번, 12번, 13번, 14번, 15번, 16번, 17번, 18번, 19번, 20번, 21번, 23번, 24번, 27번, 28번 및 29번으로 이루어진 군에서 선택된, 1 이상, 2 이상, 3 이상, 4 이상, 5 이상, 6 이상, 7 이상, 8 이상, 9 이상, 10 이상, 11 이상, 12 이상, 13 이상, 14 이상, 15 이상, 16 이상, 17 이상, 18 이상, 19 이상, 또는 20개의 아미노산이 다른 아미노산이 치환된 것일 수 있으며, 또한 독립적으로 또는 추가적으로 이의 C-말단에 1 이상, 2 이상, 3 이상, 4 이상, 5 이상, 6 이상, 7 이상, 8 이상, 9 이상, 10 이상, 또는 11개 이상의 아미노산이 추가된 것일 수 있으나, 특별히 이에 제한되는 것은 아니다.
- [136] 보다 더 구체적으로 상기 글루카곤 아날로그는 천연형 글루카곤 아미노산 서열에서 1번, 2번, 3번, 10번, 12번, 13번, 14번, 15번, 16번, 17번, 18번, 19번, 20번, 21번, 23번, 24번, 27번, 28번 및 29번으로 이루어진 군에서 선택된, 1 이상, 2 이상, 3 이상, 4 이상, 5 이상, 6 이상, 7 이상, 8 이상, 9 이상, 10 이상, 11 이상, 12 이상, 13 이상, 14 이상, 15 이상, 16 이상, 17 이상, 18 이상, 또는 19개의 아미노산이 다른 아미노산이 치환된 것일 수 있으며, 또한 독립적으로 또는 추가적으로 이의 C-말단에 1 이상, 2 이상, 3 이상, 4 이상, 5 이상, 6 이상, 7 이상, 8 이상, 9 이상, 10 이상, 또는 11개 이상의 아미노산이 추가된 것일 수 있으나, 특별히 이에 제한되는 것은 아니다.
- [137] 보다 더 구체적으로 상기 글루카곤 아날로그는 천연형 글루카곤 아미노산 서열에서 1번, 2번, 3번, 10번, 13번, 14번, 15번, 16번, 17번, 18번, 19번, 20번, 21번, 23번, 24번, 28번 및 29번으로 이루어진 군에서 선택된, 1 이상, 2 이상, 3 이상, 4 이상, 5 이상, 6 이상, 7 이상, 8 이상, 9 이상, 10 이상, 11 이상, 12 이상, 13 이상, 14 이상, 15 이상, 16 이상, 또는 17개의 아미노산이 다른 아미노산이 치환된 것일 수 있으며, 또한 독립적으로 또는 추가적으로 이의 C-말단에 1 이상, 2 이상, 3 이상, 4 이상, 5 이상, 6 이상, 7 이상, 8 이상, 9 이상, 10 이상, 또는 11개 이상의 아미노산이 추가된 것일 수 있으나, 특별히 이에 제한되는 것은 아니다.

- [138] 보다 더 구체적으로 상기 글루카곤 아날로그는 천연형 글루카곤 아미노산 서열에서 1번, 2번, 13번, 16번, 17번, 18번, 19번, 20번, 21번, 23번, 24번, 27번, 28번 및 29번으로 이루어진 군에서 선택된, 1 이상, 2 이상, 3 이상, 4 이상, 5 이상, 6 이상, 7 이상, 8 이상, 9 이상, 10 이상, 11 이상, 12이상, 13이상, 또는 14개의 아미노산이 다른 아미노산이 치환된 것일 수 있으며, 또한 독립적으로 또는 추가적으로 이의 C-말단에 1 이상, 2 이상, 3 이상, 4 이상, 5 이상, 6 이상, 7 이상, 8 이상, 9 이상, 10 이상, 또는 11개 이상의 아미노산이 추가된 것일 수 있으나, 특별히 이에 제한되는 것은 아니다.
- [139] 상기 천연형 글루카곤에서 도입되는 아미노산은 티로신, 알파-메틸-글루탐산, Aib, 메티오닌, 글루탐산, 히스티딘, 리신, 류신, 이소류신, 글루타민, 발린, 글리신, 알라닌, 시스테인, 세린, 알라닌, 아스파르트산, 및 아르기닌으로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있으나, 특별히 이에 제한되는 것은 아니다.
- [140] 예컨대, 상기 추가되는 아미노산 서열은 천연형 GLP-1, 천연형 GIP, 또는 천연형 엑센딘-4 아미노산 서열에서 유래되는 1개 이상의 아미노산 서열일 수 있다.
- [141] 이러한 글루카곤 아날로그 또는 삼중 활성체는 분자 내 가교 (intramolecular bridge)를 포함할 수 있으며 (예컨대, 공유결합적 가교 또는 비공유결합적 가교), 구체적으로 고리를 포함하는 형태일 수 있으며, 예컨대 글루카곤 아날로그 또는 삼중 활성체의 16번 및 20번 아미노산 사이에 고리가 형성된 형태일 수 있으나, 특별히 이에 제한되는 것은 아니다.
- [142] 상기 고리의 비제한적인 예로 락탐 가교 (또는 락탐 고리)를 포함할 수 있다.
- [143] 또한, 상기 글루카곤 아날로그 또는 삼중 활성체는 고리를 포함하도록, 목적하는 위치에 고리를 형성할 수 있는 아미노산을 포함하도록 변형된 것을 모두 포함한다.
- [144] 예컨대, 글루카곤 아날로그 또는 삼중 활성체의 16번 및 20번 아미노산 쌍이 각각 고리를 형성할 수 있는 글루탐산 또는 리신으로 치환된 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [145] 이러한 고리는 상기 글루카곤 아날로그 또는 삼중 활성체 내의 아미노산 결사슬 간에 형성될 수 있으며, 그 예로 리신의 결사슬과 글루탐산의 결사슬 간에 락탐 고리가 형성되는 형태일 수 있으나, 특별히 이에 제한되는 것은 아니다.
- [146] 이러한 방법들의 조합으로 제조되는 글루카곤의 아날로그의 예로, 천연형 글루카곤과 아미노산 서열이 하나 이상 다르고, N-말단의 아미노산 잔기의 알파-탄소가 제거된, 글루카곤 수용체, GLP-1 수용체, 및 GIP 수용체에 대해 활성을 보유한 펩타이드 등이 있으나, 이에 제한되지 않으며, 아날로그 제조를 위한 여러 방법들의 조합으로 본 발명에 적용되는 천연형 글루카곤의 아날로그를 제조할 수 있다.
- [147] 또한, 특별히 이에 제한되지 않으나, 본 발명의 펩타이드는 체내 반감기의 증가를 위해 활성체 분해 효소의 인식작용을 회피하기 위하여 일부 아미노산을

타 아미노산 혹은 비 천연형 화합물로 치환할 수 있다.

- [148] 구체적으로, 상기 삼중 활성체의 아미노산 서열 중 두 번째 아미노산 서열의 치환을 통해 분해효소의 인식 작용을 회피하여 체내 반감기를 증가시킨 펩타이드일 수 있으나, 체내 분해 효소의 인식 작용을 회피하기 위한 아미노산 치환 또는 변경은 제한 없이 포함된다.
- [149] 또한, 천연형 글루카곤의 아날로그의 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, 에컨대, 측쇄 간 고리 형성, 메틸화, 아실화, 유비퀴틴화, 인산화, 아미노핵산화, 바이오틴화 등과 같이 개질함으로써 변형하는 것을 모두 포함한다.
- [150] 또한, 천연형 글루카곤의 아미노 및/또는 카르복시 말단에 하나 또는 그 이상의 아미노산이 추가된 것을 모두 포함한다.
- [151] 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.
- [152] 아미노산 유도체도 마찬가지로 방식으로 입수할 수 있는데, 그 예를 일부만 들자면 4-이미다조아세트산 (4-imidazoacetic acid) 등을 사용할 수 있다.
- [153] 또한, 본 발명에 따른 펩타이드는 생체 내의 단백질 절단 효소들로부터 보호하고 안정성을 증가시키기 위하여 이의 N-말단 및/또는 C-말단 등이 화학적으로 수식되거나 유기단으로 보호되거나, 또는 펩타이드 말단 등에 아미노산이 추가되어 변형된 형태일 수 있다.
- [154] 특히, 화학적으로 합성한 펩타이드의 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.
- [155] 또한, 본 발명에 따른 펩타이드는 펩타이드 그 자체, 이의 염 (예컨대, 상기 펩타이드의 약학적으로 허용가능한 염), 또는 이의 용매화물의 형태를 모두 포함한다. 또한, 펩타이드는 약학적으로 허용되는 임의의 형태일 수 있다.
- [156] 상기 염의 종류는 특별히 제한되지는 않는다. 다만, 개체, 예컨대 포유류에게 안전하고 효과적인 형태인 것이 바람직하나, 특별히 이에 제한되는 것은 아니다.
- [157] 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.
- [158] 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-설펜산, 타르타르산, 아세트산, 시트르산, 메탄설펜산, 포름산, 벤조산, 말론산, 나프탈렌-2-설펜산, 벤젠설펜산 등을 들 수 있다. 적합한 염기로부터 유도된 염은 나트륨, 칼륨 등의 알칼리 금속, 마그네슘 등의 알칼리 토금속, 및 암모늄 등을 포함할 수 있다.

- [159] 또한, 본 발명에서 사용된 용어 "용매화물"은 본 발명에 따른 펩타이드 또는 이의 염이 용매 분자와 복합체를 형성한 것을 말한다.
- [160] 다른 하나의 구체적인 양태로서, 상기 펩타이드는 하기 일반식 1로 표시된 아미노산 서열을 포함할 수 있다.
- [161] Xaa1-Xaa2-Xaa3-Gly-Thr-Phe-Xaa7-Ser-Asp-Xaa10-Ser-Xaa12-Xaa13-Xaa14-Xaa15-Xaa16-Xaa17-Xaa18-Xaa19-Xaa20-Xaa21-Phe-Xaa23-Xaa24-Trp-Leu-Xaa27-Xaa28-Xaa29-Xaa30-R1 (일반식 1, 서열번호 103)
- [162] 상기 일반식 1에서, Xaa1은 히스티딘, 4-이미다조아세틸, 또는 티로신이고, Xaa2는 글리신, 알파-메틸-글루탐산, 또는 Aib이며, Xaa3은 글루탐산 또는 글루타민이고, Xaa7은 트레오닌 또는 이소류신이며, Xaa10은 류신, 티로신, 리신, 시스테인, 또는 발린이고, Xaa12는 리신, 세린, 또는 이소류신이며, Xaa13은 글루타민, 티로신, 알라닌, 또는 시스테인이고, Xaa14는 류신, 메티오닌, 또는 티로신이며, Xaa15는 시스테인, 아스파르트산, 글루탐산, 또는 류신이며, Xaa16은 글리신, 글루탐산, 또는 세린이고, Xaa17은 글루타민, 아르기닌, 이소류신, 글루탐산, 시스테인, 또는 리신이며, Xaa18은 알라닌, 글루타민, 아르기닌, 또는 히스티딘이고, Xaa19는 알라닌, 글루타민, 시스테인, 또는 발린이며, Xaa20은 리신, 글루타민, 또는 아르기닌이고, Xaa21은 글루탐산, 글루타민, 류신, 시스테인, 또는 아스파르트산이며, Xaa23은 이소류신 또는 발린이고, Xaa24는 알라닌, 글루타민, 시스테인, 아스파라긴, 아스파르트산, 또는 글루탐산이며, Xaa27은 발린, 류신, 리신, 또는 메티오닌이고, Xaa28은 시스테인, 리신, 알라닌, 아스파라긴, 또는 아스파르트산이며, Xaa29는 시스테인, 글리신, 글루타민, 트레오닌, 글루탐산, 또는 히스티딘이고, Xaa30은 시스테인, 글리신, 리신, 또는 히스티딘이거나, 부존재하며,
- [163] R1은 시스테인, GKKNWVKNIT (서열번호 106), m-SSGAPPPS-n (서열번호 107), 또는 m-SSGQPPPS-n (서열번호 108)이거나, 부존재하며,
- [164] 여기서, m은 -Cys-, -Pro-, 또는 -Gly-Pro-이고, n은 -Cys-, -Gly-, -Ser-, 또는 -His-Gly-이거나, 부존재할 수 있다.
- [165] 상기 삼중 활성체의 예로, 서열번호: 1 내지 102로 이루어진 군에서 선택된 아미노산 서열을 포함하는 것, 서열번호: 1 내지 102로 이루어진 군에서 선택된 아미노산 서열로 (필수적으로) 구성된 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [166]
- [167] 또한, 본원에서 '특정 서열번호로 구성되는 펩타이드'라고 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.

- [168] 이상의 내용은 본 발명의 다른 구체에 혹은 다른 양태에도 적용될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [169] 구체적으로, 상기 일반식 1에서 Xaa14는 류신 또는 메티오닌이며, Xaa15는 시스테인, 아스파르트산, 또는 류신일 수 있다.
- [170] 이러한 펩타이드의 예로, 서열번호: 1 내지 12, 14 내지 17, 및 21 내지 102로 이루어진 군에서 선택된 아미노산 서열을 포함하거나, 이로 (필수적으로) 구성된 펩타이드를 들 수 있으나, 특별히 이에 제한되는 것은 아니다.
- [171] 이러한 펩타이드는 글루카곤 수용체, GLP-1 수용체, 및 GIP 수용체 중 하나 이상을 유의하게 활성화시킬 수 있으나, 특별히 이에 제한되는 것은 아니다. 구체적으로, GLP-1을 유의하게 활성화시키거나, 추가로 글루카곤 수용체 및/또는 GIP 수용체를 유의하게 활성화시키는 것일 수 있으나, 특별히 이에 제한되지 않는다.
- [172] 보다 더 구체적으로, 상기 일반식 1에서, Xaa2는 글리신, 알파-메틸-글루탐산, 또는 Aib이고, Xaa7은 트레오닌이며, Xaa10은 티로신, 시스테인, 또는 발린이고, Xaa12는 리신 또는 이소류신이며, Xaa13은 티로신, 알라닌, 글루타민, 또는 시스테인이고, Xaa14는 류신, 시스테인, 또는 메티오닌이며, Xaa15는 시스테인, 류신, 글루탐산, 또는 아스파르트산이고, Xaa17은 글루타민, 아르기닌, 이소류신, 시스테인, 글루탐산, 또는 리신이며, Xaa18은 알라닌, 글루타민, 아르기닌, 또는 히스티딘이고, Xaa19는 알라닌, 글루타민, 발린, 또는 시스테인이며, Xaa20은 리신, 아르기닌, 또는 글루타민이고, Xaa21은 글루탐산, 글루타민, 류신, 시스테인, 또는 아스파르트산이며, Xaa23은 이소류신 또는 발린이고, Xaa24는 시스테인, 알라닌, 글루타민, 아스파라긴, 글루탐산, 또는 아스파르트산이며, Xaa27은 류신 또는 리신인, 펩타이드일 수 있으나, 특별히 이에 제한되는 것은 아니다.
- [173] 보다 더 구체적으로, 상기 일반식 1에서, Xaa2는 글리신, 알파-메틸-글루탐산, 또는 Aib이고, Xaa7은 트레오닌이며, Xaa10은 티로신, 시스테인, 또는 발린이고, Xaa12는 리신 또는 이소류신이며, Xaa13은 티로신, 알라닌, 또는 시스테인이고, Xaa14는 류신 또는 메티오닌이며, Xaa15는 시스테인 또는 아스파르트산이고, Xaa17은 글루타민, 아르기닌, 이소류신, 시스테인, 또는 리신이며, Xaa18은 알라닌, 아르기닌, 또는 히스티딘이고, Xaa19는 알라닌, 글루타민, 또는 시스테인이며, Xaa20은 리신 또는 글루타민이고, Xaa21은 글루탐산, 시스테인, 또는 아스파르트산이며, Xaa23은 발린이고, Xaa24는 알라닌, 글루타민, 시스테인, 아스파라긴, 또는 아스파르트산이며, Xaa27은 류신 또는 리신일 수 있으나, 특별히 이에 제한되지는 않는다.

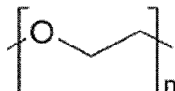
- [174] 보다 더 구체적으로, 상기 일반식 1에서, Xaa2는 알파-메틸-글루탐산 또는 Aib이고, Xaa7은 트레오닌이며, Xaa10은 티로신 또는 시스테인이고, Xaa12는 리신 또는 이소류신이며, Xaa13은 티로신, 알라닌, 또는 시스테인이고, Xaa14는 류신 또는 메티오닌이며, Xaa15는 시스테인 또는 아스파르트산이고, Xaa16은 글루탐산이며, Xaa17은 아르기닌, 이소류신, 시스테인, 또는 리신이고, Xaa18은 알라닌, 아르기닌, 또는 히스티딘이며, Xaa19는 알라닌, 글루타민, 또는 시스테인이고, Xaa20은 리신 또는 글루타민이며, Xaa21은 글루탐산 또는 아스파르트산이고, Xaa23은 발린이며, Xaa24는 글루타민, 아스파라긴, 또는 아스파르트산이고, Xaa27은 류신이며, Xaa28은 시스테인, 알라닌, 아스파라긴, 또는 아스파르트산일 수 있다.
- [175] 구체적으로, 상기 일반식 1에서, Xaa1은 히스티딘 또는 4-이미다조아세틸이고, Xaa2는 알파-메틸-글루탐산 또는 Aib이며, Xaa3은 글루타민이고, Xaa7은 트레오닌이며, Xaa10은 티로신이고, Xaa12는 이소류신이며, Xaa13은 알라닌 또는 시스테인이고, Xaa14는 메티오닌이며, Xaa15는 아스파르트산이고, Xaa16은 글루탐산이며, Xaa17은 이소류신 또는 리신이고, Xaa18은 알라닌 또는 히스티딘이며, Xaa19는 글루타민 또는 시스테인이고, Xaa20은 리신이며, Xaa21은 아스파르트산이고, Xaa23은 발린이며, Xaa24는 아스파라긴이고, Xaa27은 류신이며, Xaa28은 알라닌 또는 아스파라긴이고, Xaa29는 글루타민 또는 트레오닌이며, Xaa30은 시스테인 또는 리신이거나, 부존재할 수 있다.
- [176] 보다 구체적으로, 상기 일반식 1에서, Xaa2는 글리신, 알파-메틸-글루탐산, 또는 Aib이며, Xaa3은 글루타민이고, Xaa7은 트레오닌이며, Xaa10은 티로신, 시스테인, 또는 발린이고, Xaa12는 리신이며, Xaa13은 티로신이고, Xaa14는 류신이며, Xaa15는 아스파르트산이며, Xaa16은 글리신, 글루탐산, 또는 세린이고, Xaa17은 글루타민, 아르기닌, 시스테인, 또는 리신이며, Xaa18은 알라닌, 아르기닌, 또는 히스티딘이고, Xaa19는 알라닌 또는 글루타민이며, Xaa20은 리신 또는 글루타민이고, Xaa21은 글루탐산, 시스테인, 또는 아스파르트산이며, Xaa23은 발린이고, Xaa24는 알라닌, 글루타민, 또는 시스테인이며, Xaa27은 류신 또는 리신이고, Xaa29는 글리신, 글루타민, 트레오닌, 또는 히스티딘일 수 있으나, 특별히 이에 제한되는 것은 아니다.
- [177] 이러한 펩타이드는 GLP-1 수용체 및 글루카곤 수용체의 활성화 정도가 유의하고, GIP 수용체의 활성화 정도에 비해 높거나; GLP-1 수용체, 글루카곤 수용체 및 GIP 수용체의 활성화 정도가 모두 유의하거나; GLP-1 수용체 및 GIP 수용체의 활성화 정도가 유의하고, 글루카곤 수용체의 활성화에 비해 높은 경우에 해당할 수 있으나, 특별히 이에 제한되지 않는다.
- [178] 이러한 펩타이드의 예로, 서열번호: 8, 9, 21 내지 37, 39, 42, 43, 49 내지 61, 64 내지 83, 85, 86, 88, 89, 91 내지 93, 95 내지 102로 이루어진 군에서 선택된 아미노산 서열을 포함하거나, 이로 (필수적으로) 구성된 펩타이드를 들 수 있으나, 특별히 이에 제한되는 것은 아니다.

- [179] 구체적인 양태로서, 상기 펩타이드는 하기 일반식 2로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 것일 수 있다.
- [180] Xaa1-Xaa2-Gln-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Xaa10-Ser-Lys-Xaa13-Xaa14-Xaa15-Xaa16-Xaa17-Xaa18-Xaa19-Xaa20-Xaa21-Phe-Xaa23-Xaa24-Trp-Leu-Leu-Xaa28-Xaa29-Xaa30-Xaa31-Ser-Ser-Gly-Gln-Pro-Pro-Pro-Ser-Xaa40 (일반식 2, 서열번호 104)
- [181] 상기 식에서, Xaa1은 4-이미다조아세틸, 히스티딘, 또는 티로신이고; Xaa2는 글리신, 알파-메틸-글루탐산, 또는 Aib이며; Xaa10은 티로신, 또는 시스테인이며; Xaa13은 알라닌, 글루타민, 티로신, 또는 시스테인이며; Xaa14는 류신, 메티오닌, 또는 티로신이고; Xaa15는 아스파르트산, 글루탐산, 또는 류신이며; Xaa16은 글리신, 글루탐산, 또는 세린이고; Xaa17은 글루타민, 아르기닌, 이소류신, 글루탐산, 시스테인, 또는 리신이며; Xaa18은 알라닌, 글루타민, 아르기닌, 또는 히스티딘이고; Xaa19는 알라닌, 글루타민, 시스테인, 또는 발린이며; Xaa20은 리신, 글루타민, 또는 아르기닌이고; Xaa21은 시스테인, 글루탐산, 글루타민, 류신, 또는 아스파르트산이며; Xaa23은 이소류신 또는 발린이고; Xaa24는 시스테인, 알라닌, 글루타민, 아스파라긴, 또는 글루탐산이며; Xaa28은 리신, 시스테인, 아스파라긴, 또는 아스파르트산이며; Xaa29는 글리신, 글루타민, 시스테인, 또는 히스티딘이고; Xaa30은 시스테인, 글리신, 리신, 또는 히스티딘이며; Xaa31은 프롤린 또는 시스테인이며; Xaa40은 시스테인이거나, 부존재할 수 있다.
- [182] 보다 구체적으로, 상기 일반식 2에서, Xaa13은 알라닌, 티로신, 또는 시스테인이며; Xaa15는 아스파르트산 또는 글루탐산이고; Xaa17은 글루타민, 아르기닌, 시스테인, 또는 리신이며; Xaa18은 알라닌, 아르기닌, 또는 히스티딘이고; Xaa21은 시스테인, 글루탐산, 글루타민, 또는 아스파르트산이며; Xaa23은 이소류신 또는 발린이고; Xaa24는 시스테인, 글루타민, 또는 아스파라긴이고; Xaa28은 시스테인, 아스파라긴, 또는 아스파르트산이며; Xaa29는 글루타민, 시스테인, 또는 히스티딘이고; Xaa30은 시스테인, 리신, 또는 히스티딘일 수 있다.
- [183] 이러한 펩타이드의 예로, 서열번호: 21, 22, 42, 43, 50, 64 내지 77, 및 95 내지 102로 이루어진 군에서 선택된 아미노산 서열, 보다 구체적으로 서열번호: 21, 22, 42, 43, 50, 64 내지 77, 및 96 내지 102로 이루어진 군에서 선택된 아미노산 서열을 포함하거나, 이로 (필수적으로) 구성된 펩타이드를 들 수 있으나, 특별히 이에 제한되는 것은 아니다.
- [184] 구체적인 양태로서, 상기 펩타이드는 하기 일반식 3의 아미노산 서열을 포함할 수 있다.
- [185] Xaa1-Xaa2-Gln-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Lys-Xaa13-Leu-Asp-Glu-Xaa17-Xaa18-Xaa19-Lys-Xaa21-Phe-Val-Xaa24-Trp-Leu-Leu-Xaa28-Xaa29-Xaa30-Xaa31-Ser-Ser-Gly-Gln-Pro-Pro-Pro-Ser-Xaa40 (일반식 3, 서열번호 105),
- [186] 상기 일반식 3에서, Xaa1은 히스티딘 또는 티로신이고; Xaa2는

알파-메틸-글루탐산 또는 Aib이며; Xaa13은 알라닌, 티로신 또는 시스테인이고; Xaa17은 아르기닌, 시스테인, 또는 리신이며; Xaa18은 알라닌 또는 아르기닌이고; Xaa19는 알라닌 또는 시스테인이며; Xaa21은 글루탐산 또는 아스파르트산이고; Xaa24는 글루타민 또는 아스파라긴이며; Xaa28은 시스테인 또는 아스파르트산이며; Xaa29는 시스테인, 히스티딘, 또는 글루타민이고; Xaa30은 시스테인 또는 히스티딘이며; Xaa31은 프롤린 또는 시스테인이며; Xaa40은 시스테인 또는 부존재할 수 있다.

- [187] 이러한 펩타이드의 예로, 서열번호: 21, 22, 42, 43, 50, 64 내지 71, 75 내지 77, 및 96 내지 102로 이루어진 군에서 선택된 아미노산 서열을 포함하거나, 이로 (필수적으로) 구성된 펩타이드를 들 수 있으나, 특별히 이에 제한되는 것은 아니다.
- [188] 또한, 상기 일반식 1에서 R1은 시스테인, GKKNWVKHNT(서열번호 106), CSSGQPPPS(서열번호 109), GPSSGAPPPS(서열번호 110), GPSSGAPPPSC(서열번호 111), PSSGAPPPS(서열번호 112), PSSGAPPPSG(서열번호 113), PSSGAPPPSHG(서열번호 114), PSSGAPPPSS(서열번호 115), PSSGQPPPS(서열번호 116), 또는 PSSGQPPPS(서열번호 117)이거나, 부존재할 수 있으나, 특별히 이에 제한되는 것은 아니다.
- [189]
- [190] 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.
- [191] 구체적으로, 본 발명의 펩타이드는 표준 합성 방법, 제조합 발현 시스템, 또는 임의의 다른 당해 분야의 방법에 의해 제조될 수 있다. 따라서, 본 발명에 따른 펩타이드는, 예를 들어 하기를 포함하는 방법을 포함하는 다수의 방법으로 합성될 수 있다:
- [192] (a) 펩타이드를 고체상 또는 액체상 방법의 수단으로 단계적으로 또는 단편 조립에 의해 합성하고, 최종 펩타이드 생성물을 분리 및 정제하는 방법; 또는
- [193] (b) 펩타이드를 인코딩하는 핵산 작제물을 숙주세포 내에서 발현시키고, 발현 생성물을 숙주 세포 배양물로부터 회수하는 방법; 또는
- [194] (c) 펩타이드를 인코딩하는 핵산 작제물의 무세포 시험관 내 발현을 수행하고, 발현 생성물을 회수하는 방법; 또는
- [195] (a), (b) 및 (c)의 임의의 조합으로 펩타이드의 단편을 수득하고, 이어서 단편을 연결시켜 펩타이드를 수득하고, 당해 펩타이드를 회수하는 방법.
- [196] 또한, 상기 글루카곤 수용체, GLP-1 수용체, 및 GIP 수용체에 대해 활성을 갖는 펩타이드는, 글루카곤 수용체, GLP-1 수용체, 및 GIP 수용체에 대해 활성을 갖는 펩타이드에 이의 생체 내 반감기를 증가시키기 위한 생체적합성 물질이 결합된, 결합체 형태일 수 있다. 본 명세서에서 상기 생체적합성 물질은 캐리어와 혼용될 수 있다.

- [197] 본 발명에서 상기 펩타이드의 결합체는 캐리어가 결합되지 않은 상기 펩타이드에 비하여 증가된 효력의 지속성을 나타낼 수 있으며, 본 발명에서는 이러한 결합체를 "지속형 결합체"로 지칭한다.
- [198] 한편, 이러한 결합체는 비자연적인 (non-naturally occurring) 것일 수 있다.
- [199] 본 발명을 구현하기 위한 다른 하나의 양태는 글루카곤 수용체, GLP-1 (Glucagon-like peptide-1) 수용체, 및 GIP (Glucose-dependent insulintropic polypeptide) 수용체에 대해 활성을 갖는 펩타이드를 포함하는 결합체를 포함하는, 고지혈증의 예방 또는 치료용 약학적 조성물이다.
- [200]
- [201] 본 발명의 하나의 구체예에서, 상기 결합체는 하기 화학식 1로 표시되는, 결합체이다:
- [202] [화학식 1]
- [203] X - La - F
- [204] 여기서, X는, 상기 글루카곤 수용체, GLP-1 수용체, 및 GIP 수용체에 대해 활성을 갖는, 펩타이드이고; L은, 폴리에틸렌 글리콜이며; a는, 0 또는 자연수이며, 다만 a가 2 이상일 때, 각각의 L은 서로 독립적이고; F는, 면역글로불린 Fc 영역이다.
- [205] 상기 결합체에서 X, 즉 글루카곤 수용체, GLP-1 수용체, 및 GIP 수용체에 대해 활성을 갖는 펩타이드에 대해서는 앞서 설명한 바와 같다.
- [206]
- [207] 상기 결합체에서 F는 X, 즉 글루카곤 수용체, GLP-1 수용체, 및 GIP 수용체에 대해 활성을 갖는, 펩타이드의 반감기를 증가시킬 수 있는 물질로서, 본 발명의 상기 결합체를 구성하는 모이어티의 일 구성에 해당한다.
- [208] 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.
- [209] 상기 면역글로불린 Fc 영역은 구체적으로 IgG Fc 영역일 수 있으나, 특별히 이에 제한되지 않는다.
- [210] 본 발명의 구체적인 한 예로, 상기 F(면역글로불린 Fc 영역)는 두 개의 폴리펩타이드 사슬로 이루어진 이합체이며, L의 한 말단이 상기 두 폴리펩타이드 사슬 중 하나의 폴리펩타이드 사슬에만 연결되어 있는 구조를 가질 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [211] 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.
- [212] 상술한 생체적합성 물질은 수용성 (양친매성 또는 친수성) 및/또는 무독성 및/또는 약학적으로 허용가능한 것일 수 있다.

- [213] 상기 F는 X와 직접적으로 연결되거나 (즉, 상기 화학식 1에서 a가 0이거나), 또는 링커 (L)를 통해 연결된 것일 수 있다.
- [214] 구체적으로, 상기 L은 비펩타이드성 링커인 폴리에틸렌 글리콜 링커일 수 있다. 본 발명에서 "폴리에틸렌 글리콜 링커"는 에틸렌글리콜 반복 단위가 2개 이상 결합된 생체 적합성 중합체를 포함한다. 상기 반복 단위들은 펩타이드 결합이 아닌 임의의 공유결합을 통해 서로 연결된다. 상기 폴리에틸렌 글리콜 링커는 본 발명의 결합체의 모이어티를 이루는 일 구성일 수 있으며, 상기 화학식 1에서 L에 해당된다.
- [215] 상기 La에서 a는 1 이상일 수 있으며, a가 2 이상일 때 각각의 L은 독립적일 수 있다.
- [216] 또한, 하나의 구체적인 실시 형태에서 상기 결합체는 양쪽 말단에 F, 구체적으로 면역글로불린 Fc 영역 및 X, 구체적으로 펩타이드 약물과 결합될 수 있는 반응기를 포함하는 비펩타이드성 링커를 통하여 F와 X가 서로 공유결합적으로 연결된 것일 수 있다.
- [217] 구체적으로, 상기 L(폴리에틸렌 글리콜 링커)은 에틸렌글리콜 반복 단위를 함유하는 링커, 예를 들어, 폴리에틸렌글리콜일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 본 명세서에서 상기 폴리에틸렌글리콜은 에틸렌글리콜 동종 중합체, PEG 공중합체, 또는 모노메틸-치환된 PEG 중합체(mPEG)의 형태를 모두 포괄하는 용어이나, 특별히 이에 제한되는 것은 아니다. 또한, 당해 분야에 이미 알려진 이의 유도체 및 당해 분야의 기술 수준에서 용이하게 제조할 수 있는 유도체들도 본 발명의 범위에 포함된다.
- [218] 상기 폴리에틸렌 글리콜 링커는 에틸렌글리콜 반복 단위를 포함하면서, 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.
- [219] 구체적으로, 상기 링커는 하기 화학식 2로 표시되는 폴리에틸렌글리콜(PEG)일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다:
- [220] [화학식 2]
- [221] 
- [222]
- [223] 여기서, n= 10 내지 2400, n= 10 내지 480, 또는 n = 50 내지 250이나, 이에 제한되지 않는다.
- [224] 상기 지속형 결합체에서 PEG 모이어티는, $-(CH_2CH_2O)_n-$ 구조 뿐만 아니라 연결 요소와 이 $-(CH_2CH_2O)_n-$ 사이에 개재하는 산소 원자도 포함할 수 있으나, 이에

제한되는 것은 아니다.

- [225] 또한, 하나의 구체적인 실시 형태에서 상기 지속형 결합체는 본 발명의 펩타이드(X)와 면역글로불린 Fc 영역(F)이 에틸렌글리콜 반복 단위를 함유하는 링커(L)를 통해 공유 결합으로 연결된 구조 일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [226] 본 발명에서 사용될 수 있는 에틸렌글리콜 반복 단위의 분자량은 0 초과 200 kDa 범위, 구체적으로, 약 1 내지 100 kDa 범위, 약 1 내지 50 kDa 범위, 약 1 내지 30 kDa 범위, 약 2 내지 30 kDa 범위, 약 1 내지 20kDa 범위, 보다 더 구체적으로 약 3.4kDa 내지 10 kDa, 범위, 보다 더 구체적으로 약 3.4kDa일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [227] 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.
- [228]
- [229] 상기 폴리에틸렌글리콜 뿐만 아니라, 당해 분야에 이미 알려진 이들의 유도체 및 당해 분야의 기술 수준에서 용이하게 제조할 수 있는 유도체들도 본 발명의 범위에 포함된다.
- [230] 또한, 상기 F에 해당하는 폴리펩타이드와 결합되는 본 발명의 비펩타이드성 링커는 한 종류의 중합체뿐만 아니라 상이한 종류의 중합체들의 조합이 사용될 수도 있다.
- [231] 하나의 구체적인 실시 형태에서 상기 비펩타이드성 링커의 양 말단은 각각 F, 예컨대 면역글로불린 Fc 영역의 아민기 또는 티올기 및 X의 아민기 또는 티올기에 결합할 수 있다.
- [232] 구체적으로, 상기 비펩타이드성 중합체는 양쪽 말단에 각각 F (예컨대, 면역글로불린 Fc 영역) 및 X와 결합될 수 있는 반응기, 구체적으로는 X, 혹은 F (예컨대, 면역글로불린 Fc 영역)의 N-말단 또는 리신에 위치한 아민기, 또는 시스테인의 티올기와 결합될 수 있는 반응기를 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [233] 또한, F, 예컨대 면역글로불린 Fc 영역 및 X와 결합될 수 있는, 상기 비펩타이드성 중합체의 반응기는 알데히드기, 말레이미드기 및 석시니미드 유도체로 구성된 군으로부터 선택될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [234] 상기에서, 알데히드기로 프로피온 알데히드기 또는 부틸 알데히드기를 예로서 들 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [235] 상기에서, 석시니미드 유도체로는 석시니미딜 발레르에이트, 석시니미딜 메틸부타노에이트, 석시니미딜 메틸프로피온에이트, 석시니미딜 부타노에이트, 석시니미딜 프로피오네이트, N-하이드록시석시니미드, 히드록시 석시니미드, 석시니미딜 카르복시메틸 또는 석시니미딜 카보네이트가 이용될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

- [236] 비펩타이드성 링커는 이러한 반응기를 통하여 X와 F에 연결될 수 있으나, 특별히 이에 제한되는 것은 아니다.
- [237] 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.
- [238] 또한, 상기 비펩타이드성 링커의 양쪽 말단의 반응기는 서로 동일하거나 또는 서로 상이할 수 있으며, 예를 들어, 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.
- [239] 예를 들어, 상기 비펩타이드성 링커의 한쪽 말단에는 반응기로서 말레이미드기를 포함하고, 다른 쪽 말단에는 알데히드기, 프로피온 알데히드기 또는 부틸 알데히드기 등을 포함할 수 있다.
- [240] 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.
- [241] 하나의 구체적인 실시 형태에서 상기 비펩타이드성 중합체는 X의 시스테인 잔기, 보다 구체적으로 시스테인의 -SH 기에 연결되는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [242] 예컨대, 상기 X에 해당하는 펩타이드에서 10번 시스테인 잔기, 13번 시스테인 잔기, 15번 시스테인 잔기, 17번 시스테인 잔기, 19번 시스테인 잔기, 21번 시스테인 잔기, 24번 시스테인 잔기, 28번 시스테인 잔기, 29번 시스테인 잔기, 30번 시스테인 잔기, 31번 시스테인 잔기, 40번 시스테인 잔기, 또는 41번 시스테인 잔기에 상기 비펩타이드성 중합체가 연결된 것일 수 있으나, 특별히 이에 제한되지 않는다.
- [243] 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.
- [244] 또한, 상기 결합체에서, 비펩타이드성 중합체의 반응기가 면역글로불린 Fc 영역의 N-말단에 위치한 -NH₂와 연결된 것일 수 있으나, 이는 하나의 일례에 해당한다.
- [245] 본 발명에서, "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.

- [246] 본 명세서에서 Fc 영역이라고 하면 거기에는 전장 면역글로불린을 파파인으로 소화하여 얻는 Fc 절편의 천연형 서열뿐 아니라 Fc 절편 천연형 서열의 유도체들, 예컨대 천연 서열 중의 하나 이상의 아미노산 잔기가 결실(예컨대 힌지 부위의 일부 잔기가 결실), 삽입, 비보전적 또는 보전적 치환 또는 이들의 조합에 의하여 변환되어 천연형과 상이하게 된 서열까지 망라하여 포함된다. 본 명세서에서 “생체적합성 물질” 또는 “캐리어”는 상기 Fc 영역을 의미할 수 있다.
- [247] 상기 F(면역글로불린 Fc 영역)는, 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 라이신의 입실론 아미노 원자나 N-말단 아미노기에 환원적 아민화를 통하여 연결될 수 있다.
- [248] 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.
- [249] 본 발명의 지속형 결합체의 하나의 구체예로서, 상기 지속형 결합체는 상기 면역글로불린 Fc 영역이 그 N-말단 질소 원자를 통하여 링커에 연결된 것일 수 있다.
- [250]
- [251] 이러한 면역글로불린 Fc 영역은 중쇄 불변영역에 힌지(hinge) 부분을 포함할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [252] 본 발명에서, 면역글로불린 Fc 영역은 N-말단에 특정 힌지 서열을 포함할 수 있다.
- [253] 본 발명의 용어, “힌지 서열”은 중쇄에 위치하여 이황화결합(inter disulfide bond)를 통하여 면역글로불린 Fc 영역의 이량체를 형성하는 부위를 의미한다.
- [254] 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:
- [255] Glu-Ser-Lys-Tyr-Gly-Pro-Pro-Cys-Pro-Ser-Cys-Pro(서열번호 119).
- [256] 상기 힌지 서열은 서열번호 119의 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 120),

- Glu-Ser-Lys-Tyr-Gly-Pro-Pro-Cys-Pro-Ser-Pro(서열번호 121),
 Glu-Ser-Lys-Tyr-Gly-Pro-Pro-Cys-Pro-Ser(서열번호 122),
 Glu-Ser-Lys-Tyr-Gly-Pro-Pro-Cys-Pro-Pro(서열번호 123),
 Lys-Tyr-Gly-Pro-Pro-Cys-Pro-Ser(서열번호 124),
 Glu-Ser-Lys-Tyr-Gly-Pro-Pro-Cys(서열번호 125),
 Glu-Lys-Tyr-Gly-Pro-Pro-Cys(서열번호 126), Glu-Ser-Pro-Ser-Cys-Pro(서열번호 127), Glu-Pro-Ser-Cys-Pro(서열번호 128), Pro-Ser-Cys-Pro(서열번호 129),
 Glu-Ser-Lys-Tyr-Gly-Pro-Pro-Ser-Cys-Pro(서열번호 130),
 Lys-Tyr-Gly-Pro-Pro-Pro-Ser-Cys-Pro(서열번호 131),
 Glu-Ser-Lys-Tyr-Gly-Pro-Ser-Cys-Pro(서열번호 132),
 Glu-Ser-Lys-Tyr-Gly-Pro-Pro-Cys(서열번호 133),
 Lys-Tyr-Gly-Pro-Pro-Cys-Pro(서열번호 134),
 Glu-Ser-Lys-Pro-Ser-Cys-Pro(서열번호 135), Glu-Ser-Pro-Ser-Cys-Pro(서열번호 136), Glu-Pro-Ser-Cys(서열번호 137), Ser-Cys-Pro(서열번호 138).
- [257] 더욱 구체적으로는 상기 힌지 서열은 서열번호 129(Pro-Ser-Cys-Pro)또는 서열번호 138(Ser-Cys-Pro)의 아미노산 서열을 포함하는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [258] 본 발명의 지속형 결합체의 한 더욱 구체적인 형태에서, 상기 결합체내 상기 면역글로불린 Fc 영역의 N-말단은 프롤린이고, 이 결합체는 상기 프롤린의 질소 원자를 통하여 Fc 영역이 링커에 연결된 것이다.
- [259] 본 발명의 지속형 결합체의 한 실시 형태에서 상기 면역글로불린 Fc 영역은 힌지 서열이 존재함으로써 면역글로불린 Fc 영역의 사슬 두 개가 동중이합체(homodimer)나 이종이합체(heterodimer)를 형성한 이합체 형태일 수 있다. 본 발명의 화학식 1의 결합체는 링커의 일 말단이 이합체의 면역글로불린 Fc 영역의 한 사슬에 연결된 형태일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [260] 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.
- [261] 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.
- [262] 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.

- [263] 또한, 본 발명의 지속형 결합체의 하나의 실시 형태로서, 상기 면역글로불린 Fc 영역 F는 두 개의 폴리펩타이드 사슬로 이루어진 이합체(이량체 dimer)이며, 이때 상기 Fc 영역 이합체 F와 X는 에틸렌글리콜 반복 단위를 함유하는 하나의 동일한 링커 L을 통하여 공유결합적으로 연결되어 있다. 이 실시 형태의 한 구체예에서, X는 이러한 Fc 영역 이합체 F의 두 폴리펩타이드 사슬 중 하나의 폴리펩타이드 사슬에만 링커 L을 통하여 공유결합으로 연결되어 있다. 이 실시 형태의 더욱 구체적인 예시에서, 이러한 Fc 영역 이합체 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 동종이합체이다.
- [264] 본 발명의 지속형 결합체의 다른 실시 형태에서는, 이합체 형태의 하나의 Fc 영역에 X 두 분자가 대칭적으로 결합하는 것 역시 가능하다. 이때 상기 면역글로불린 Fc 영역과 X는 L에 의해 서로 연결될 수 있다. 그러나, 상기 기술된 예에 제한되는 것은 아니다.
- [265] 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.
- [266] 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.
- [267] 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.
- [268] 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.

- [269] 상기 기술한 Fc 유도체는 본 발명의 Fc 영역과 동등한 생물학적 활성을 나타내며 Fc 영역의 열, pH 등에 대한 구조적 안정성을 증대시킨 것일 수 있다.
- [270] 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.
- [271] 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.
- [272] 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.
- [273] 한편, 면역글로불린 Fc 영역은 인간 또는 소, 염소, 돼지, 마우스, 래빗, 햄스터, 랫트, 기니아 피그 등의 동물기원일 수 있으며, 더 구체적인 실시 형태에서는 인간기원이다.
- [274] 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.
- [275] 또한, 하나의 구체예로서, 면역글로불린 Fc 영역은 인간 IgG4 Fc의 단편으로서,

각 단량체의 3번 아미노산인 시스테인 사이의 이황화 결합(inter-chain 형태)을 통해 2개의 단량체가 연결된 동종이합체 형태일 수 있으며, 이 때 동종이합체는 각 단량체에서 35번 및 95번의 시스테인 사이 및 141번 및 199번의 시스테인 사이에 이황화 결합, 즉 2개의 이황화 결합(intra-chain 형태)을 가지거나/가질 수 있다.

- [276] 각 단량체의 아미노산 수는 221개의 아미노산으로 구성될 수 있으며, 동종이합체를 형성하는 아미노산은 전체 442개의 아미노산으로 이루어질 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 구체적으로 면역글로불린 Fc 절편은 서열번호 139의 아미노산 서열(221개의 아미노산으로 구성됨)을 갖는 단량체 2개가 각 단량체의 3번 아미노산인 시스테인 사이에 이황화 결합을 통해 동종이합체를 형성하고, 상기 동종이합체의 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.
- [277]
- [278] 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 단편으로 이루어진 그룹으로부터 선택된 2개 이상의 단편으로부터 이량체 또는 다량체의 제조가 가능하다.
- [279] 또한, 상술한 결합체는 효력의 지속성이 천연형 GLP-1, GIP, 혹은 글루카곤에 비해, 또는 F가 수식되지 않은 X에 비해 증가된 것일 수 있으며, 이러한 결합체는 상술한 형태뿐만 아니라, 생분해성 나노파티클에 봉입된 형태 등을 모두 포함한다.
- [280] 상기 펩타이드 (예컨대 상기 펩타이드 자체 또는 이에 생체적합성 물질이 결합된 형태)를 포함하는 조성물은 고지혈증의 예방 또는 치료용일 수 있다.
- [281] 본 발명에서 용어 "예방"은 상기 펩타이드 또는 이를 포함하는 조성물의 투여로 고지혈증의 발병을 억제 또는 지연시키는 모든 행위를 의미하며, "치료"는 상기 펩타이드 또는 이를 포함하는 조성물의 투여로 고지혈증의 증세가 호전되거나 이롭게 되는 모든 행위를 의미한다.
- [282] 본 발명에서 용어 "투여"는 어떠한 적절한 방법으로 환자에게 소정의 물질을 도입하는 것을 의미하며, 상기 조성물의 투여 경로는 특별히 이에 제한되지 않으나, 상기 조성물이 생체 내 표적에 도달할 수 있는 어떠한 일반적인 경로를 통하여 투여될 수 있으며, 예를 들어 복강 내 투여, 정맥 내 투여, 근육 내 투여, 피하 투여, 피 내 투여, 경구 투여, 국소 투여, 비 내 투여, 폐 내 투여, 또는 직장 내 투여 등이 될 수 있다.
- [283] 본 발명의 약학적 조성물은 약학적으로 허용가능한 담체, 부형제 또는 희석제를 추가로 포함할 수 있다. 이러한 약학적으로 허용가능한 담체, 부형제, 또는 희석제는 비자연적으로 발생된 것일 수 있다.

- [284] 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.
- [285] 본 발명의 펩타이드, 또는 결합체를 포함한 약학적 조성물은 약학적으로 허용가능한 담체를 추가로 포함할 수 있다. 상기 담체는 특별히 이에 제한되지는 않으나, 경구 투여 시에는 결합제, 활택제, 붕해제, 부형제, 가용화제, 분산제, 안정화제, 현탁화제, 색소, 향료 등을 사용할 수 있고, 주사제의 경우에는 완충제, 보존제, 무통화제, 가용화제, 등장화제, 안정화제 등을 혼합하여 사용할 수 있으며, 국소투여용의 경우에는 기제, 부형제, 윤활제, 보존제 등을 사용할 수 있다.
- [286] 본 발명의 조성물의 제형은 상술한 바와 같은 약학적으로 허용가능한 담체와 혼합하여 다양하게 제조될 수 있다. 예를 들어, 경구 투여 시에는 정제, 트로키, 캡슐, 엘릭서, 서스펜션, 시럽, 웨이퍼 등의 형태로 제조할 수 있으며, 주사제의 경우에는 단위 투약 앰플 또는 다수회 투약 형태로 제조할 수 있다. 기타, 용액, 현탁액, 정제, 환약, 캡슐, 서방형 제제 등으로 제형화할 수 있다.
- [287] 한편, 제제화에 적합한 담체, 부형제 및 희석제의 예로는 락토스, 텍스트로스, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로스, 메틸 셀룰로스, 미정질 셀룰로스, 폴리비닐피롤리돈, 물, 메틸하이드록시벤조에이트, 프로필하이드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 또는 광물유 등이 사용될 수 있다. 또한, 충전제, 항응집제, 윤활제, 습윤제, 향료, 방부제 등을 추가로 포함할 수 있다.
- [288] 또한, 본 발명의 약학적 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.
- [289] 또한, 상기 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.
- [290] 또한, 상기 펩타이드 또는 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.

- [291] 본 발명의 약학적 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.
- [292] 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 약학적 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.
- [293] 본 발명의 약학적 조성물은 생체 내 지속성 및 역가가 우수하여, 본 발명의 약학적 제제의 투여 횟수 및 빈도를 현저하게 감소시킬 수 있다.
- [294] 본 발명을 구현하는 다른 하나의 양태는 상기 펩타이드, 결합체 또는 이를 포함하는 조성물을 이를 필요로 하는 개체에 투여하는 단계를 포함하는, 고지혈증의 예방 또는 치료 방법을 제공한다.
- [295] 상기 펩타이드, 결합체 또는 이를 포함하는 조성물, 고지혈증, 예방 및 치료에 대해서는 앞서 설명한 바와 같다.
- [296] 본 발명에서 상기 개체는 고지혈증이 의심되는 개체로서, 상기 고지혈증 의심 개체는 해당 질환이 발병하였거나 발병할 수 있는 인간을 포함한 쥐, 가축 등을 포함하는 포유동물을 의미하나, 본 발명의 결합체 혹은 이를 포함하는 상기 조성물로 치료 가능한 개체는 제한 없이 포함된다.
- [297] 본 발명의 방법은 상기 펩타이드 또는 결합체를 포함하는 약학적 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 구체적인 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 의학 분야에 잘 알려진 유사 인자에 따라 다르게 적용하는 것이 바람직하다.

- [298] 본 발명을 구현하는 다른 하나의 양태는 고지혈증의 예방 또는 치료를 위한 약제의 제조에 있어서 상기 펩타이드, 결합체 또는 이를 포함하는 조성물의 용도이다.
- [299] 상기 펩타이드, 결합체 또는 이를 포함하는 조성물, 고지혈증, 예방 및 치료에 대해서는 앞서 설명한 바와 같다.
- [300]
- [301] 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.
- [302]
- [303] 실시예 1: 삼중 활성체의 제조
- [304] GLP-1, GIP 및 글루카곤 수용체에 모두 활성을 나타내는 삼중 활성체를 제조하여, 하기 표 2에 이의 서열을 나타냈다.
- [305]

[306] [표2]

서열번호	서열	정보
1	HXQGTFTSDVSSYLDGQAAKEFIAWLVKGC	
2	HXQGTFTSDVSSYLDGQAQKEFIAWLVKGC	
3	HXQGTFTSDVSSYLLGQAAKQFIAWLVKGGPSSGA PPPS C	
4	HXQGTFTSDVSSYLLGQQQKEFIAWLVKGC	
5	HXQGTFTSDVSSYLLGQQQKEFIAWLVKGGPSSGA PPPS C	
6	HXQGTFTSDVSSYLDGQAAKEFVAWLLKGC	
7	HXQGTFTSDVSKYLDGQAAKEFVAWLLKGC	
8	HXQGTFTSDVSKYLDGQAAQEFVAWLLKGC	
9	HXQGTFTSDVSKYLDGQAAQEFVAWLLAGC	
10	HXQGTFTSDVSKYLDGQAAQEFVAWLLAGGPSSGA PPPS C	
11	CAGEGTFTSDLSKYLD SRRQQLFVQWLKAGGPSSGA PPPSHG	
12	CAGEGTFISDLSKYMDEQAVQLFVEWLNAGGPSSGA PPPSHG	
13	CAGEGTFISDYSIQLDEIAVQDFVEWLLAQKPSSGA PPPSHG	
14	CAGQGTFTSDYSIQLDEIAVRDFVEWLKNGGPSSGA PPPSHG	
15	CAGQGTFTSDLSKQMD EEA VRLFIEWLKNNGPSSGA PPPSHG	
16	CAGQGTFTSDLSKQMDSEAQQLFIEWLKNNGPSSGA PPPSHG	
17	CAGQGTFTSDLSKQMD EERAREFIEWLLAQKPSSGA PPPSHG	
18	CAGQGTFTSDLSKQMD SERAREFIEWLKNTGPSSGA PPPSHG	
19	CAGQGTFTSDLSIQYDSEHQ R D F I E W L K D T G P S S G A PPPSHG	

[307]

20	CAGQGTFTSDLSIQYEEEAQQDFVEWLKDTGPSSGA PPPSHG	
21	YXQGTFTSDYSKYLD <u>E</u> CRA <u>K</u> EFVQWLLDHPSSGQP PPS	고리 형성
22	YXQGTFTSDYSKCLD <u>E</u> KRA <u>K</u> EFVQWLLDHPSSGQP PPS	고리 형성
23	YXQGTFTSDYSKYLD <u>E</u> CRA <u>K</u> EFVQWLLAQKGKKNDW KHNIT	고리 형성
24	YXQGTFTSDYSKYLD <u>E</u> CRA <u>K</u> EFVQWLKNGGPSSGAP PPS	고리 형성
25	HXQGTFTSDCSKYLDERAAQDFVQWLLDGGPSSGAP PPS	
26	HXQGTFTSDCSKYLD <u>S</u> RAAQDFVQWLLDGGPSSGAP PPS	
27	HXQGTFTSDYSKYLDERACQDFVQWLLDQGGPSSGA PPPS	
28	HXQGTFTSDYSKYLD <u>E</u> KRAQEFVCWLLAQKGKKNDW KHNIT	
29	HXQGTFTSDYSKYLD <u>E</u> KAA <u>K</u> EFVQWLLNTC	고리 형성
30	HXQGTFTSDYSKYLD <u>E</u> KAAQ <u>K</u> EFVQWLLDTC	고리 형성
31	HXQGTFTSDYSKYLD <u>E</u> KAC <u>K</u> EFVQWLLAQ	고리 형성
32	HXQGTFTSDYSKYLD <u>E</u> KAC <u>K</u> DFVQWLLDGGPSSGAP PPS	고리 형성
33	HXQGTFTSDYSIAMD <u>E</u> IHQ <u>K</u> DFVNWLLAQKC	고리 형성
34	HXQGTFTSDYSKYLD <u>E</u> KRQ <u>K</u> EFVNWLLAQKC	고리 형성
35	HXQGTFTSDYSIAMD <u>E</u> IHQ <u>K</u> DFVNWLLNTKC	고리 형성
36	HXQGTFTSDYSKYLC <u>E</u> KRQ <u>K</u> EFVQWLLNGGPSSGAP PPSG	고리 형성
37	HXQGTFTSDYSKYLD <u>E</u> CRQ <u>K</u> EFVQWLLNGGPSSGAP PPSG	고리 형성

[308]

38	CAXQGTFTSDKSSYLDERAAQDFVQWLLDGGPSSGA PPPS	
39	HXQGTFTSDYSKYLDGQHAQCFVAWLLAGGGPSSGA PPPS	
40	HXQGTFTSDKSKYLDERACQDFVQWLLDGGPSSGAP PPS	
41	HXQGTFTSDKSKYLDECAAQDFVQWLLDGGPSSGAP PPS	
42	YXQGTFTSDYSKYLD <u>E</u> KRA <u>K</u> EFVQWLLDHPSSGQP PPSC	고리 형성
43	YXQGTFTSDYSKYLD <u>E</u> KRA <u>K</u> EFVQWLLDHHCSSGQP PPS	고리 형성
44	HGQGTFTSDCSKQLDGQAAQEFVAWLLAGGPSSGAP PPS	
45	HGQGTFTSDCSKYMDGQAAQDFVAWLLAGGPSSGAP PPS	
46	HGQGTFTSDCSKYLD <u>E</u> QHAQEFVAWLLAGGPSSGAP PPS	
47	HGQGTFTSDCSKYLDGQRAQEFVAWLLAGGPSSGAP PPS	
48	HGQGTFTSDCSKYLDGQRAQDFVNWLLAGGPSSGAP PPS	
49	CAXQGTFTSDYSICMDE <u>I</u> HQ <u>K</u> DFVNWLLNTK	고리 형성
50	HXQGTFTSDYSKYLD <u>E</u> KRA <u>K</u> EFVQWLLDHPSSGQP PPSC	고리 형성
51	HXQGTFTSDYSKYLD <u>E</u> KRQ <u>K</u> EFVQWLLNTC	고리 형성
52	HXQGTFTSDYSKYLD <u>E</u> KRQ <u>K</u> EFVQWLLDTC	고리 형성
53	HXEGTFTSDYSIAMDE <u>I</u> HQ <u>K</u> DFVNWLLAQ	고리 형성
54	HXEGTFTSDYSIAMDE <u>I</u> HQ <u>K</u> DFVDWLLAEC	고리 형성
55	HXQGTFTSDYSIAMDE <u>I</u> HQ <u>K</u> DFVNWLLAQ	고리 형성

[309]

56	HXQGTFTSDYSKYLD <u>E</u> KRQ <u>K</u> EFVNWLLAQC	고리 형성
57	HXQGTFTSDYSIAMD <u>E</u> IHQ <u>K</u> DFVNWLLNTC	고리 형성
58	HXQGTFTSDYSKYLD <u>E</u> KRQ <u>K</u> EFVQWLLNTKC	고리 형성
59	CAXQGTFTSDYSICMDE <u>E</u> KHQ <u>K</u> DFVNWLLNTK	고리 형성
60	CAXQGTFTSDYSIAMDE <u>E</u> KHC <u>K</u> DFVNWLLNTK	고리 형성
61	CAXQGTFTSDYSIAMD <u>E</u> IAC <u>K</u> DFVNWLLNTK	고리 형성
62	CAXQGTFTSDKSKYLDERAAQDFVQWLLDGGPSSGA PPPS	
63	CAXQGTFTSDCSKYLDERAAQDFVQWLLDGGPSSGA PPPS	
64	YXQGTFTSDYSKYLD <u>E</u> CAAK <u>K</u> EFVQWLLDHPSSGQP PPS	고리 형성
65	HXQGTFTSDYSKCLD <u>E</u> KRA <u>K</u> EFVQWLLDHPSSGQP PPS	고리 형성
66	YXQGTFTSDYSKYLD <u>E</u> CRA <u>K</u> DFVQWLLDHPSSGQP PPS	고리 형성
67	YXQGTFTSDYSKYLD <u>E</u> CAAK <u>K</u> DFVQWLLDHPSSGQP PPS	고리 형성
68	YXQGTFTSDYSKCLD <u>E</u> KAA <u>K</u> EFVQWLLDHPSSGQP PPS	고리 형성
69	YXQGTFTSDYSKCLDERAA <u>K</u> EFVQWLLDHPSSGQP PPS	고리 형성
70	YXQGTFTSDYSKCLD <u>E</u> KRA <u>K</u> DFVQWLLDHPSSGQP PPS	고리 형성
71	YXQGTFTSDYSKYLD <u>E</u> RAC <u>K</u> DFVQWLLDHPSSGQP PPS	고리 형성
72	YXQGTFTSDCSKYLD <u>E</u> RAA <u>K</u> DFVQWLLDHPSSGQP PPS	고리 형성
73	CAXQGTFTSDYSKYLD <u>E</u> CRA <u>K</u> EFVQWLLDHPSSGQ	고리

[310]

	PPPS	형성
74	CAXQGTFTSDYSKCLDEKRAK ₁ EFVQWLLDHPSSGQ PPPS	고리 형성
75	YXQGTFTSDYSKYLD ₁ EKAAK ₁ EFVQWLLDHPSSGQP PPSC	고리 형성
76	YXQGTFTSDYSKYLD ₁ EKRAK ₁ DFVQWLLDHPSSGQP PPSC	고리 형성
77	YXQGTFTSDYSKYLD ₁ EKAAK ₁ DFVQWLLDHPSSGQP PPSC	고리 형성
78	HXQGTFTSDYSKYLD ₁ EKRQK ₁ EFVQWLLDTKC	고리 형성
79	HXEGTFTSDYSIAMDE ₁ IHQK ₁ DFVNWLLAQKC	고리 형성
80	HXEGTFTSDYSIAMDE ₁ IHQK ₁ DFVDWLLAEKC	고리 형성
81	CAXQGTFTSDYSKYLD ₁ EKRQK ₁ EFVQWLLNTC	고리 형성
82	CAXQGTFTSDYSKYLD ₁ EKRQK ₁ EFVQWLLDTC	고리 형성
83	CAXEGTFTSDYSIAMDE ₁ IHQK ₁ DFVNWLLAQC	고리 형성
84	CAXEGTFTSDYSIAMDE ₁ IHQK ₁ DFVDWLLAEC	고리 형성
85	CAXQGTFTSDYSIAMDE ₁ IHQK ₁ DFVNWLLAQC	고리 형성
86	CAXQGTFTSDYSKYLD ₁ EKRQK ₁ EFVNWLLAQC	고리 형성
87	CAXQGTFTSDYSIAMDE ₁ IHQK ₁ DFVNWLLNTC	고리 형성
88	CAXQGTFTSDYSKYLD ₁ EKRQK ₁ EFVQWLLNTKC	고리 형성
89	CAXQGTFTSDYSKYLD ₁ EKRQK ₁ EFVQWLLDTKC	고리 형성
90	CAXEGTFTSDYSIAMDE ₁ IHQK ₁ DFVNWLLAQKC	고리 형성
91	CAXEGTFTSDYSIAMDE ₁ IHQK ₁ DFVDWLLAEKC	고리

[311]

		형성
92	CA X Q G T F T S D Y S I A M D E I H Q K D F V N W L L A Q K C	고리 형성
93	CA X Q G T F T S D Y S K Y L D E K R Q K E F V N W L L A Q K C	고리 형성
94	CA X Q G T F T S D Y S I A M D E I H Q K D F V N W L L N T K C	고리 형성
95	Y X Q G T F T S D Y S K Y L D E K R A K E F V Q W L L C H H P S S G Q P P P S	고리 형성
96	Y X Q G T F T S D Y S K Y L D E K R A K E F V Q W L L D H C P S S G Q P P P S	고리 형성
97	Y X Q G T F T S D Y S K Y L D E K R A K E F V Q W L L D C H P S S G Q P P P S	고리 형성
98	Y X Q G T F T S D Y S K A L D E K A A K E F V N W L L D H H P S S G Q P P P S C	고리 형성
99	Y X Q G T F T S D Y S K A L D E K A A K D F V N W L L D H H P S S G Q P P P S C	고리 형성
100	Y X Q G T F T S D Y S K A L D E K A A K E F V Q W L L D Q H P S S G Q P P P S C	고리 형성
101	Y X Q G T F T S D Y S K A L D E K A A K E F V N W L L D Q H P S S G Q P P P S C	고리 형성
102	Y X Q G T F T S D Y S K A L D E K A A K D F V N W L L D Q H P S S G Q P P P S C	고리 형성

[312]

[313] 상기 표 2에 기재된 서열에서 X로 표기된 아미노산은 비천연형 아미노산인 Aib (aminoisobutyric acid)이며, 밑줄로 표시된 아미노산은 밑줄로 표시된 아미노산들이 서로 고리를 형성하는 것을 의미한다. 또한, 상기 표 2에서 CA는 4-이미다조아세틸(4-imidazoacetyl)을, Y는 티로신을 의미한다.

[314]

[315] **실시예 2: 삼중 활성체의 지속형 결합체 제조**

[316] 양 말단에 각각 말레이미드기 및 알데히드기를 가지는 10kDa의 PEG, 즉 말레이미드-PEG-알데히드 (10kDa, NOF, 일본)를 실시예 1의 삼중활성체 (서열번호 21, 22, 42, 43, 50, 77, 및 96)의 시스테인 잔기에 폐길화시키기 위하여, 삼중활성체와 말레이미드-PEG-알데히드의 물비를 1 : 1 내지 3, 단백질의 농도를 1 내지 5 mg/ml로 하여 저온에서 0.5 내지 3 시간 동안 반응시켰다. 이때, 반응은 50 mM Tris 완충액(pH 7.5)에 20 내지 60% 아이소프로판올이 첨가된 환경

하에서 수행되었다. 반응이 종료된 후, 상기 반응액을 SP 세파로스 HP (GE healthcare, 미국)에 적용하여 시스테인에 모노-폐길화된 삼중활성체를 정제하였다.

- [317] 다음으로, 상기 정제된 모노-폐길화된 삼중활성체와 면역글로불린 Fc을 물비를 1:1 내지 5, 단백질의 농도를 10 내지 50mg/ml로 하여 4 내지 8°C에서 12 내지 18시간 동안 반응시켰다. 반응은 100 mM 인산칼륨 완충액 (pH 6.0)에 환원제인 10 내지 50 mM 소듐시아노보로하이드라이드와 10 내지 30 % 아이소프로판올이 첨가된 환경 하에서 수행되었다. 반응이 종료된 후, 상기 반응액을 부틸 세파로스 FF 정제컬럼 (GE healthcare, 미국)과 Source ISO 정제컬럼 (GE healthcare, 미국)에 적용하여, 삼중활성체와 면역글로불린 Fc를 포함하는 결합체를 정제하였다. 정제된 이 지속형 결합체는 분자 내에서 삼중 활성체 펩타이드, 폴리에틸렌 글리콜(PEG) 링커와 Fc 이합체가 1:1:1의 물 비로 공유결합 연결된 구조이며, PEG 링커는 Fc 이합체의 두 폴리펩타이드 사슬 중 한 사슬에만 연결되어 있다.
- [318] 한편, 상기 면역글로불린 Fc는 서열번호 139의 아미노산 서열 (221개의 아미노산으로 구성됨)을 갖는 단량체 2개가 각 단량체의 3번 아미노산인 시스테인 사이에 이황화 결합을 통해 동종이합체를 형성하고, 상기 동종이합체의 단량체는 각각 독립적으로 35번 및 95번의 시스테인 간의 내부의 이황화 결합 및 141번 및 199번의 시스테인 간의 내부의 이황화 결합이 형성된 것이다.
- [319]
- [320] 제조 후 역상 크로마토그래피, 크기배제 크로마토그래피 및 이온교환 크로마토그래피로 분석한 순도는 95 % 이상이였다.
- [321] 본 실시예에서 제조된 삼중활성체 및 면역글로불린 Fc가 PEG를 통하여 연결된 결합체는 삼중결합체 및 면역글로불린 Fc를 포함하는 결합체 또는 지속형 결합체로 명명하였다.
- [322] 예를 들어, 서열번호 42의 삼중활성체 및 면역글로불린 Fc가 PEG를 통하여 연결된 결합체를, '서열번호 42와 면역글로불린 Fc를 포함하는 결합체' 혹은 '서열번호 42의 지속형 결합체'로 명명하였고, 이들은 본원에서 혼용되어 사용될 수 있다.
- [323]
- [324] 실험예 1: 삼중 활성체 및 이의 지속형 결합체의 *in vitro* 활성 측정
- [325] 상기 실시예 1 및 2에서 제조된 삼중활성체와 이의 지속형 결합체의 활성을 측정하기 위해 GLP-1 수용체, 글루카곤(GCG) 수용체, 및 GIP 수용체가 각각 형질전환된 세포주를 이용하여 *in vitro*에서 세포 활성을 측정하는 방법을 이용하였다.
- [326] 상기 각 세포주는 CHO (chinese hamster ovary)에 인간 GLP-1 수용체, 인간 GCG 수용체 및 인간 GIP 수용체 유전자를 각각 발현하도록 형질 전환된 것으로서,

GLP-1, GCG 및 GIP의 활성을 측정하기에 적합하다. 따라서, 각 부분에 대한 활성을 각각의 형질 전환 세포주를 이용하여 측정하였다.

[327] 상기 실시예 1과 2에서 제조된 삼중활성체와 이의 지속형 결합체의 GLP-1 활성 측정을 위해 인간 GLP-1을 50nM 부터 4배씩 0.000048nM까지 연속적으로 희석하고, 상기 실시예 1과 2에서 제조된 삼중활성체와 이의 지속형 결합체를 400nM 부터 4배씩 0.00038nM까지 연속적으로 희석하였다. 상기 배양된 인간 GLP-1 수용체가 발현된 CHO 세포에서 배양액을 제거하고 연속적으로 희석된 각 물질들을 5 μ l씩 상기 세포에 첨가한 다음, cAMP 항체가 포함된 완충액을 5 μ l씩 추가 한 뒤 15분 동안 상온에서 배양하였다. 그런 다음 세포용해완충액 (cell lysis buffer)이 포함된 detection mix를 10 μ l씩 가하여 세포를 용해시키고, 90분 동안 상온에서 반응시켰다. 상기 반응이 완료된 세포용해물을 LANCE cAMP kit (PerkinElmer, USA)에 적용하여 측정된 cAMP를 통해 EC₅₀값을 산출한 후, 상호 비교하였다. 인간 GLP-1 대비 상대 역가는 하기 표 3과 표 4에 나타내었다.

[328] 상기 실시예 1과 2에서 제조된 삼중활성체와 이의 지속형 결합체의 GCG 활성 측정을 위해 인간 GCG을 50nM 부터 4배씩 0.000048nM까지 연속적으로 희석하고, 상기 실시예 1과 2에서 제조된 삼중활성체와 이의 지속형 결합체를 400nM 부터 4배씩 0.00038nM까지 연속적으로 희석하였다. 상기 배양된 인간 GCG 수용체가 발현된 CHO 세포에서 배양액을 제거하고 연속적으로 희석된 각 물질들을 5 μ l씩 상기 세포에 첨가한 다음, cAMP 항체가 포함된 완충액을 5 μ l씩 추가 한 뒤 15분 동안 상온에서 배양하였다. 그런 다음 세포용해완충액(cell lysis buffer)이 포함된 detection mix를 10 μ l씩 가하여 세포를 용해시키고, 90분 동안 상온에서 반응시켰다. 상기 반응이 완료된 세포용해물을 LANCE cAMP kit (PerkinElmer, USA)에 적용하여 측정된 cAMP를 통해 EC₅₀값을 산출한 후, 상호 비교하였다. 인간 GCG 대비 상대 역가는 하기 표 3과 표 4에 나타내었다.

[329] 상기 실시예 1과 2에서 제조된 삼중활성체와 이의 지속형 결합체의 GIP 활성 측정을 위해 인간 GIP을 50nM 부터 4배씩 0.000048nM까지 연속적으로 희석하고, 상기 실시예 1과 2에서 제조된 삼중활성체와 이의 지속형 결합체를 400nM 부터 4배씩 0.00038nM까지 연속적으로 희석하였다. 상기 배양된 인간 GIP 수용체가 발현된 CHO 세포에서 배양액을 제거하고 연속적으로 희석된 각 물질들을 5 μ l씩 상기 세포에 첨가한 다음, cAMP 항체가 포함된 완충액을 5 μ l씩 추가 한 뒤 15분 동안 상온에서 배양하였다. 그런 다음 세포용해완충액(cell lysis buffer)이 포함된 detection mix를 10 μ l씩 가하여 세포를 용해시키고, 90분 동안 상온에서 반응시켰다. 상기 반응이 완료된 세포용해물을 LANCE cAMP kit (PerkinElmer, USA)에 적용하여 측정된 cAMP를 통해 EC₅₀값을 산출한 후, 상호 비교하였다. 인간 GIP 대비 상대 역가는 하기 표 3과 표 4에 나타내었다.

[330]

[331] [표3]

삼중활성체의 상대적 역가 비율

	천연형 펩타이드 대비 <i>in vitro</i> 활성 (%)		
서열번호	vs GLP-1	vs Glucagon	vs GIP
1	3.2	<0.1	<0.1
2	5.9	<0.1	<0.1
3	1.8	<0.1	<0.1
4	8.5	<0.1	<0.1
5	42.1	<0.1	<0.1
6	17.0	<0.1	<0.1
7	13.7	<0.1	<0.1
8	14.2	0.10	<0.1
9	32.1	0.13	<0.1
10	46.0	<0.1	<0.1
11	1.4	<0.1	<0.1
12	0.4	<0.1	<0.1
13	< 0.1	< 0.1	< 0.1
14	28.0	< 0.1	< 0.1
15	79.2	<0.1	<0.1
16	2.1	< 0.1	< 0.1
17	0.2	< 0.1	< 0.1
18	<0.1	<0.1	<0.1
19	<0.1	<0.1	<0.1
20	<0.1	<0.1	<0.1
21	17.8	267	22.7
22	20.1	140	59.7
23	4.01	9.3	<0.1
24	41.2	9.3	< 0.1
25	82.6	0.1	<0.1
26	64.5	0.2	<0.1
27	83.1	0.8	0.9

[332]

28	17.2	1.6	<0.1
29	38.5	6.0	<0.1
30	142	0.7	0.8
31	135	2.2	2.4
32	151	1.7	8.8
33	24.5	<0.1	10.4
34	19.1	0.92	0.6
35	7.5	<0.1	1.3
36	37.4	0.39	0.2
37	236	6.21	2.2
38	2.3	-	-
39	13.9	0.53	<0.1
40	75.2	<0.1	<0.1
41	34.3	<0.1	<0.1
42	33.9	205.8	7.8
43	12.6	88.4	3.70
44	1.3	<0.1	<0.1
45	6.6	< 0.1	< 0.1
46	1.4	< 0.1	< 0.1
47	2.4	< 0.1	< 0.1
48	1.5	< 0.1	< 0.1
49	29.8	<0.1	3.3
50	67.4	50.5	2.7
51	14.4	2.0	0.1
52	44.1	7.5	0.3
53	161	8.4	1.3
54	30.6	1.4	0.1
55	27.1	0.7	2.4
56	57.9	4.9	0.8
57	11.7	<0.1	0.3
58	39.1	2.6	0.2
59	40.3	<0.1	4.0
60	106.2	<0.1	8.2
61	59.8	<0.1	2.8
62	5.2	<0.1	<0.1

[333]

63	15.3	<0.1	<0.1
64	64.6	60.1	92.9
65	95.4	25.2	11.6
66	15.8	172	17.2
67	28.5	46.2	39.8
68	27.9	8.8	107
69	24.3	9.6	62.8
70	15.1	71.3	64.4
71	90.1	12.7	94.7
72	11.5	1.0	1.6
73	22.6	5.4	3.0
74	12.9	0.9	1.0
75	35.1	8.5	18.0
76	10.3	47.6	11.7
77	38.7	12.2	35.5
78	51.0	14.0	0.12
79	41.5	4.9	1.4
80	8.1	0.0	0.1
81	7.8	0.3	<0.1
82	9.5	1.1	<0.1
83	47.3	1.3	0.4
84	4.2	<0.1	<0.1
85	4.3	<0.1	0.3
86	28.4	0.4	0.2
87	0.9	<0.1	<0.1
88	9.6	0.3	<0.1
89	7.1	0.7	<0.1
90	7.4	<0.1	<0.1
91	31.9	16.8	0.3
92	0.8	<0.1	0.4
93	5.7	0.3	0.7
94	0.5	<0.1	<0.1
95	2.1	0.4	<0.1
96	34.4	194.8	5.2
97	10.5	62.8	2.6

[334]

98	28.1	8.2	47.1
99	20.9	14.9	57.7
100	42.2	12.7	118.5
101	23.2	13.9	40.1
102	23.3	29.5	58.0

[335]

[336] [표4]

삼중활성체 지속형 결합체의 상대적 역가 비율

지속형 결합체	천연형 펩타이드 대비 <i>in vitro</i> 활성 (%)		
	vs GLP-1	vs Glucagon	vs GIP
21	0.1	1.6	0.2
22	0.1	0.9	0.5
42	3.1	23.1	1.2
43	2.1	13.5	0.6
50	15.4	6.9	0.7
77	6.7	1.7	6.6
96	0.3	4.0	0.3

[337]

[338] 상기 표 4는 삼중활성체 지속형 결합체의 상대적 역가 비율을 확인한 표이며, 상기에서 제조한 신규한 삼중활성체 지속형 결합체는 GLP-1 수용체, GIP 수용체 및 글루카곤 수용체를 모두 활성화시킬 수 있는 삼중 활성체로 기능을 가지는 것을 확인하였다.

[339]

[340] **실험예 2: 삼중활성체 지속형 결합체의 고지혈증 치료 효과 확인(In vivo)**

[341] Golden syrian hamster(이하 고지혈증 햄스터)에 2주간 Fructose 식이섭취를 진행하여 고지혈증 모델을 유도하였다. 실시예 1에서 제조된 삼중결합체 중 서열번호 42를 선정하여 서열번호 42의 지속형 결합체(1.6, 3.1 nmol/kg, Q2D)를 고지혈증을 유도한 햄스터에 3주간 피하를 통해 반복투여 하였다. 비교군으로는 시중의 고지혈증 치료제인 evolocumab (219.2 nmol/kg, QW)을 사용하여, 고지혈증 치료 효과를 확인하였다.

[342] 도 1에 나타난 바와 같이, 서열번호 42의 지속형 결합체를 3주간 반복 투여한 시 혈중 총 콜레스테롤(50~60% 감소) 및 LDL (70 ~85% 감소)이 유의적으로 감소한 것을 확인한 반면, evolocumab 투여군에서는 미비한 효능을 보였다.

[343]

[344] 실험예 3: 삼중활성체 지속형 결합체의 고지혈증 치료 효과 확인(In vitro)

[345] HepG2 cell을 이용하여 LDL 흡수 증가, 3-Hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase (HMGCR) 활성 억제, 및 지방산 분해 촉진 효과 확인 실험을 통해, 실시예 2의 삼중활성체 지속형 결합체의 우수한 고지혈증 치료효능 작용기전 (Mode of action)을 *in vitro*에서 확인하였다.

[346]

[347] (1) 삼중활성체 지속형 결합체에 의한 LDL 흡수 증가

[348] HepG2 cell에 서열번호 42의 지속형 결합체를 처리하지 않은 대조군(control)과 비교하여 서열번호 42의 지속형 결합체 (0.01, 0.1, 1, 10 μ M) 및 evolocumab (10 μ g/mL)을 48시간 처리한 후, BODIPY 표지된 LDL의 세포 내 흡수량을 확인하였으며, 그 결과를 도 2에 나타내었다.

[349] 도 2에 나타난 바와 같이, LDL-흡수량이 서열번호 42의 지속형 결합체에 의해 농도의존적 (control 대비 132.7~354%)으로 증가하는 것을 확인하였다.

[350]

[351] (2) 삼중활성체 지속형 결합체에 의한 3-Hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase (HMGCR) 활성 억제

[352] 콜레스테롤 합성 율속 효소(rate limiting enzyme)인 3-Hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase (이하 HMGCR)의 활성을 측정하기 위해, HepG2 cell에 서열번호 42의 지속형 결합체를 처리하지 않은 대조군(control)과 비교하여 서열번호 42의 지속형 결합체(10 μ M), 및 스타틴(1 μ M)을 처리한 후 HMG-CoA를 처리조건에서 NADPH의 감소정도를 측정하였고 (HMGCR은 NADPH를 이용하여 HMG-COA를 콜레스테롤 전구체인 mevalonate로 전환한다.), 그 결과를 도 3에 나타내었다.

[353] 도 3에 나타난 바와 같이, 서열번호 42의 지속형 결합체가 HMGCR의 활성을 지속적으로 억제함 (control 대비 약 80%감소)을 확인하였다.

[354]

[355] (3) 삼중활성체 지속형 결합체에 의한 지방산 분해 촉진

[356] 지방산 분해의 부산물인 케톤체(ketone body)를 측정하였다. 이를 위해 지방산 (palmitate)를 처리한 HepG2 cell에 서열번호 42의 지속형 결합체를 처리하지 않은 대조군(control)과 비교하여 서열번호 42의 지속형 결합체(0.01, 0.1, 1, 10 μ M) 및 글루카곤 (2.5 μ M)를 처리한 후, 구매가능한 케톤체 측정 kit (Sigma #MAK041)를 이용하여 생성된 케톤체 양을 측정하였다.

[357] 측정 결과, 도 4에 나타난 바와 같이, 케톤체 생성이 서열번호 42의 지속형 결합체 농도 의존적으로 증가한 것을 확인 하였다.

[358]

[359] 상기와 같은 실험으로부터 본 발명에 따른 삼중활성체 및 이의 지속형 결합체는 LDL 흡수 증가, HMGCR 활성 억제를 통한 콜레스테롤 합성 저해, 및 지방산 분해 촉진을 통해 혈중 중성지방 및 LDL을 감소시킴으로써, 고지혈증에

대한 치료 효과를 나타낼 수 있음을 확인하였다.

[360]

[361] 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.