명세서

발명의 명칭: 삼중 활성체 지속형 결합체를 유효성분으로 포함하는 약학 조성물

기술분야

[1] 삼중 활성체 지속형 결합체를 유효성분으로 포함하는 약학 조성물 및 이를 이용한 비만 및/또는 비알코올성 지방간 질환 치료방법에 관한 것이다.

배경기술

[2] 비만은 오랜 기간에 걸쳐 에너지 소비량에 비해 영양소를 과다하게 섭취할 경우 에너지 불균형에 의해 유발되며, 신체 전체에 영향을 미치는 대사질환이다. 비만은 대사증후군의 대표적인 질환으로, 비만 자체도 하나의 질환이 되지만, 비만으로 인해 여러 질환(예를 들어, 당뇨, 고지혈증, 고혈압, 지방간 등)의 발병 위험을 높이는 것으로 알려져 있다.

[3] 비알코올성 지방간질환 (NAFLD, nonalcoholic steatohepatitis disease)은 알코올 섭취와 관련 없음에도 알코올 간염과 유사한 조직소견을 보이는 질환의 일종으로, 비알코올성 지방간 (non-alcoholic fatty liver, NAFL)으로부터 비알코올성지방간염 (non-acoholic steatohepatitis, NASH), 간섬유증(liver fibrosis), 및 간암 (hepatocellular carcinomas)까지를 아우르는 질환이다. 비알코올성 지방간 질환은 비만 및 당뇨인구가 증가함에 따라 함께 증가하고 있는 추세이며, 우리나라에서도 연간 발병률이 약 16%에 이르고 있다. 이러한 비알코올성 지방간질환의 병인으로는 인슐린 저항성, 비만, 지질독성 (lipotoxicity), 염증 반응 등과 같은 다양한 병인에 기인하다고 알려져 있다. 그 중 가장 큰 병인으로는 인슐린 저항성을 꼽는다.

[4] 이와 같은 비알코올성 지방간 질환을 예방 및/또는 치료하기 위해 인슐린 저항성을 개선시키는데 많은 노력을 하고 있다. 예를 들어, 인슐린 반응개선제 (insulin sensitizer)의 일종인 TZD (thiazolidnedinones)나 메포민에 대한 임상시험은 현재에도 활발하게 이루어지고 있으며(Hepatology(2003) 38:1008-17, J Clin Invest. (2001) 108:1167-74), 빅토자 (Victoza), 바이에타 (Byetta), 또는 오젬픽과 같은 GLP-1 수용체 아고니스트를 이용한 비알코올성 지방간질환에 대한 적용 임상실험도 활발히 이루어지고 있다. 그러나, 여전히 환자 편의성 확보 및 부작용 없이 비만 및 비알코올성 지방간 질환을 치료할 수 있는 약물의 개발이 요구되고 있다.

[5] 이와 같이 반감기를 증가시켜 환자의 투약 편의성을 제고하면서도 부작용 없이 비만을 비롯한 대사증후군을 치료할 수 있는 약물로서 GLP-1(Glucagon-like peptide-1), GIP (Glucose-dependent insuliontropic polypeptide), 및 글루카곤 수용체에 작용할 수 있는 삼중 활성체가 제시된 바 있다 (WO2017116204A; WO 2017/116205A).

[6] 그러나, 시험관 실험을 기초로 약물의 효과가 확인되었다 하더라도 이를 개체(특히, 인간)에 투여할 때에는 임상 실험을 통해 안전성을 가지면서도 효능을 발휘할 수 있는 용법과 용량을 결정하는 것이 필요하며 이러한 점 때문에 실제 임상을 통과하여 상용화 가능한 약물의 개발에 어려움을 겪고 있다.

[7] 실험동물로부터 임상시험의 용량 전환(dose translation from animal to human study)은 매우 복잡하고 어렵기 때문에 신약개발에 마주하는 대표적인 난관 중 하나로 제시되고 있다(Reagan-Shaw S et al., Dose translation from animal to human studies revisited. Fed Am Soc Exp Biol J 2008). 즉, 이는 인체에서의 약리작용, 부작용, 내약용량(안전하게 투여할 수 있는 투여량) 등을 모두 고려한 임상시험 설계 및 그 결과를 통해서만 최적의 투여주기 및 투여용량을 도출해 낼 수 있다는 의미이다.

[8] 예를 들어, 발기부전치료제 '비아그라'의 의약물질인 실데나필에 관한 의약물질발명의 특허(등록번호 제78931호)에서는 실데나필의 투여용량과 투여주기를 "인간에게 투여하기 위한 화합물의 경구 투여량은 일반적으로 평균 성인 환자(70kg)에 대해서 하루에 4 내지 800mg의 범위 내에 있다."고 제시하고 있다. 그런데 실제로 실데나필은 미국에서 25mg 미만은 약효의 부족으로 허가를 받지 못하고, 1일 투여용량 25mg, 50mg 및 100mg으로 허가받아 출시되었는데, 이 중 25mg의 경우 용량부족으로 환자들이 많이 찾지 않았고, 국내에서는 50mg과 100mg만이 출시되었다. 상기 예에서 알 수 있듯이, 의약물질발명에서 제시한 용법용량인 '1일 4mg ~ 800mg'은 최소치와 최대치가 200배에 이르는 광범위한 수치이다. 즉, 실데나필 의약물질특허의 명세서는 투여용량 최소치 4mg과 최대치 800mg 사이에 아무런 차별을 두지 않아 모두 인체에 적용할 수 있는 것처럼 개시하고 있지만, 위 수치범위 내에서 약리효과와 안전성을 보장하지 못한다. 실제로 임상시험을 거쳐 확인된 결과에 의하면 4mg부터 25mg 미만의 용량에서는 약효가 부족하여 발기부전의 병증을 치료하지 못했고, 100mg에서도 어느 정도의 조홍 및 시력이상의 부작용이 나타났으므로, 최대치인 800mg에서는 물론 100mg을 초과하는 용량에서도 결코 안전성을 담보할 수 없는 것이다.

[9] 또한, 투여주기를 정함에 있어서 유의할 점은 약물의 지속력인데 흔히 반감기를 통해 예측한다. 즉, 약물 유효량의 지속력이 6시간인 경우에는 하루에 4번 투여하는 것이 효과적이다. 약물은 투여량을 증가시킬수록 약효가 증가하는 것이 보통이지만 부작용 역시 증가하므로 무한정 투여량을 늘리는 것은 바람직하지 않다. 또한 대개의 약물은 일정한 투여량에 이르면 약효의 최대치가 도달하여 더 이상 증가하지 않는 경향을 보이기도 하고(시그모이달 곡선), 오히려 약물의 효과가 떨어지는 경우(biphasic effect)도 존재한다. 따라서 투여주기와 투여용량을 결정함에 있어서는 이러한 제반사정을 모두 함께 결정하여야 하므로 결코 쉬운 작업이라 할 수 없다.

[10] 이러한 측면에서, 기존에 효능이 알려진 약물이라 하더라도 종래에 사용되던

용법용량과는 다른 용법용량으로 치료효능을 높이고, 부작용을 감소시키며 복약편의성을 증대시킬 수 있다면 이 또한 새로운 의약물질이나 의약용도를 개발하는 것 못지 않은 가치를 지닌다고 할 수 있다. 투여용량이나 투여주기를 종래보다 줄이면서도 동일한 치료효과를 얻을 수 있다면 복용의 편의성 측면에서 환자에게 주는 가치 역시 작지 않다. 매일 일정한 시간에 지속적으로 약물을 복용하는 것은 쉬운 일이 아니고 복용의 어려움 때문에 치료를 중단하거나 정해진 용법을 지키지 않아 질병이 잘 치료되지 않는 경우도 허다하다.

[11] 이에, 의약으로서의 유용성과 결정적 부작용을 피할 수 있으면서 약효가 발휘되는 범위를 광범위하게 확인한 삼중활성체가 실제 임상에 적용될 수 있도록 임상적으로 유효한 용법과 용량을 규명하는 것이 요구된다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

[12] 삼중활성체의 임상적으로 유효한 용법과 용량을 규명하는 것이 요구된다.

과제 해결 수단

[13] 본 발명의 하나의 목적은 글루카곤, GLP-1(Glucagon-like peptide-1) 및 GIP(Glucose-dependent insulinotropic polypeptide) 수용체 모두에 활성을 갖는 삼중 활성체 지속형 결합체를 유효성분으로 포함하는 조성물로서, 상기 삼중 활성체 지속형 결합체는 1주에 1회 비만 및/또는 비알코올성 지방간 질환 환자에게 0.5 내지 8 mg 비경구 투여하는 것을 특징으로 하는 비만 및/또는 비알코올성 지방간 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공하는 것이다.

발명의 효과

[14] 본 발명에 따른 삼중 활성체의 지속형 결합체를 포함하는 조성물은 안정성과 비만 및/또는 비알코올성 지방간 질환 치료 효능에 따라 부작용 없이 비만 및/또는 비알코올성 지방간 질환 치료에 적용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[15] 도 1은, 고지방 식이를 통한 비만 동물 모델 (마우스)에 서열번호 42, 43, 및 50의 지속형 결합체를 2일 1회, 28일간 투여하는 동안, 2일 단위로 마우스의 체중변화를 측정하고, 투여 후 28일째의 체중을 나타낸 도이다 ($p<0.05$, $**p<0.01$, $***p<0.001$, vs. vehicle by One-way ANOVA).

[16] 도 2는, 고지방 식이를 통한 비만 동물 모델 (마우스)에 서열번호 42, 43, 및 50의 지속형 결합체를 2일 1회, 28일간 투여하는 동안, 2일 단위의 마우스의 장간막 지방량을 측정 하고, 투여 후 28일째의 장간막 지방량을 나타낸 도이다 ($p<0.05$, $**p<0.01$, $***p<0.001$, vs. vehicle by One-way ANOVA).

[17] 도 3은 서열번호 42의 지속형 결합체를 투여한 비만 환자군의 정보를 정리한 도이다.

[18] 도 4는 서열번호 42의 지속형 결합체를 투여한 비만 환자에서 서열번호 42의

지속형 결합체의 혈중 농도를 확인한 도이다.

[19] 도 5는 서열번호 42의 지속형 결합체를 투여한 비만 환자에서 Cmax (ng/mL), T_{max} (hr), $T_{1/2}$ (hr), AUC_{0-inf} (ng/mL·h), Dose-normalized C_{max} (ng/mL/mg) 및 Dose-normalized AUC_{inf} (ng/mL·h/mg)를 확인한 도이다.

[20] 도 6은 서열번호 42의 지속형 결합체 투여 후 한달 간 이상반응(TEAE, treatment emergent adverse events)을 확인한 도이다.

[21] 도 7은 서열번호 42의 지속형 결합체를 투여 후 4일간 심박수(HR), 수축기 혈압(SPB), 확장기 혈압(DBP), 심근산소소모량(RPP, Rate pressure product)을 확인한 도이다.

[22] 도 8 내지 10은 서열번호 42의 지속형 결합체를 투여 후 면역원성(Immunogenicity: ADAbs, Anti-drug antibodies; nAbs, neutralizing antibodies; anti-PEG, anti-polyethylene glycol antibodies)을 확인한 도이다.

[23] 도 11은 서열번호 42의 지속형 결합체를 투여한 비알코올성 지방간 질환 환자군의 정보를 정리한 도이다.

[24] 도 12는 서열번호 42의 지속형 결합체를 투여한 비알코올성 지방간 질환 환자에서 서열번호 42의 지속형 결합체의 혈중 농도를 확인한 도이다.

[25] 도 13은 서열번호 42의 지속형 결합체를 투여한 비알코올성 지방간 질환 환자에서 C_{max} (ng/mL), T_{max} (hr), $T_{1/2}$ (hr) 및 AUC_{0-168} (ng/mL·h)을 확인한 도이다. W1은 1주차, W12는 12주차를 의미한다.

[26] 도 14는 서열번호 42의 지속형 결합체 투여 후 한달 간 이상반응(TEAE, treatment emergent adverse events)을 확인한 도이다.

[27] 도 15는 서열번호 42의 지속형 결합체를 투여한 비알코올성 지방간 질환 환자에서 간의 내장 지방 감소를 MRI 촬영을 통해 확인한 도이다.

[28] 도 16은 서열번호 42의 지속형 결합체를 투여한 비알코올성 지방간 질환 환자의 간 지방 함유량 감소를 확인한 도이다.

[29] 도 17은 서열번호 42의 지속형 결합체를 투여한 비알코올성 지방간 질환 환자의 간 지방 함유량 감소를 확인한 도이다.

발명의 실시를 위한 최선의 형태

[30] 본 발명을 구현하는 하나의 양태는 글루카곤, GLP-1(Glucagon-like peptide-1) 및 GIP(Glucose-dependent insuliontropic polypeptide) 수용체 모두에 활성을 갖는 삼중 활성체 지속형 결합체를 유효성분으로 포함하는 조성물이다.

[31] 하나의 구체예로서, 상기 삼중 활성체 지속형 결합체는 1주에 1회 비만 및/또는 비알코올성 지방간 질환 환자에게 0.5 내지 8 mg 비경구 투여하는 것을 특징으로 하는 비만 및/또는 비알코올성 지방간 질환 예방 또는 치료용 약학 조성물이다.

[32] 다른 구체예로서, 상기 삼중 활성체 지속형 결합체를 1주에 1회 비만 및/또는 비알코올성 지방간 질환 환자에게 2 내지 6 mg 투여하는 것을 특징으로 한다.

[33] 앞선 구체예 중 어느 하나에 따른 약학적 조성물로서, 상기 비경구 투여는 피하

투여인 것을 특징으로 한다.

[34] 앞선 구체예 중 어느 하나에 따른 약학적 조성물로서, 상기 비만환자는 BMI(Body mass index)가 23 kg/m^2 이상인 것을 특징으로 한다.

[35] 앞선 구체예 중 어느 하나에 따른 약학적 조성물로서, 상기 비알코올성 지방간질환 환자는 자기공명영상-양자밀도 지방비율(MRI-PDFF)에 따른 지방간이 8% 이상인 것을 특징으로 한다.

[36] 앞선 구체예 중 어느 하나에 따른 약학적 조성물로서, 상기 결합체는 하기 화학식 1로 표시되는 약학 조성물인 것을 특징으로 한다:

[37] [화학식 1]

[38] X - L - F

[39] 여기서, X는, 서열번호 1 내지 102 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하는 펩타이드이고;

[40] L은, 에틸렌글리콜 반복 단위를 함유하는 링커이며;

[41] F는, 면역글로불린 Fc 영역이고,

[42] -는 X와 L 사이, L과 F 사이의 공유결합 연결을 나타낸다.

[43] 앞선 구체예 중 어느 하나에 따른 약학적 조성물로서, 상기 약학 조성물이 투여된 개체는 하기 (a) 내지 (f) 중 하나 이상의 특성을 나타내는 것을 특징으로 한다:

[44] (a) 체중 감소;

[45] (b) 혈압 감소;

[46] (c) 간의 내장 지방량 감소;

[47] (d) NAS 점수 감소;

[48] (e) 간세포 풍선화 변성 또는 소엽염증의 개수 감소; 및

[49] (f) 섬유화 점수 감소.

[50] 앞선 구체예 중 어느 하나에 따른 약학적 조성물로서, 상기 약학 조성물은 팔(상박), 허벅지, 복부에 투여되는 것을 특징으로 한다.

[51] 앞선 구체예 중 어느 하나에 따른 약학적 조성물로서, 상기 F는 IgG Fc 영역인 것을 특징으로 한다.

[52] 앞선 구체예 중 어느 하나에 따른 약학적 조성물로서, 상기 지속형 결합체는 상기 Fc 영역이 두 개의 폴리펩타이드 사슬로 이루어진 이량체 형태이며, 상기 지속형 결합체 내의 Fc 이량체의 두 폴리펩타이드 사슬 중 어느 하나에만 X 펩타이드가 연결되어 있는 구조인 것을 특징으로 한다.

[53] 앞선 구체예 중 어느 하나에 따른 약학적 조성물로서, 상기 Fc 이량체의 폴리펩타이드 사슬은 서열번호 123의 아미노산 서열을 포함하는 것을 특징으로 한다.

[54] 앞선 구체예 중 어느 하나에 따른 약학적 조성물로서, 상기 X의 N-말단으로부터 16번 아미노산과 20번 아미노산은 서로 고리를 형성하는 것을 특징으로 한다.

[55] 앞선 구체예 중 어느 하나에 따른 약학적 조성물로서, 상기 X는 서열번호 21, 22, 27, 30-32, 34, 36, 37, 42, 43, 50 내지 56, 58, 64 내지 80, 83, 86, 91, 93, 및 96 내지 102로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하는 것을 특징으로 한다.

[56] 앞선 구체예 중 어느 하나에 따른 약학적 조성물로서, 상기 X는 21, 22, 31, 32, 37, 42, 43, 50, 53, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 75, 76, 77, 79, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 및 102로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하는 것을 특징으로 한다.

[57] 앞선 구체예 중 어느 하나에 따른 약학적 조성물로서, 상기 X는 서열번호 42, 43 및 50으로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하는 것을 특징으로 한다.

[58] 앞선 구체예 중 어느 하나에 따른 약학적 조성물로서, 상기 X는 서열번호 1 내지 102로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열로 (필수적으로) 구성되는 펩타이드인 것을 특징으로 한다.

[59] 앞선 구체예 중 어느 하나에 따른 약학적 조성물로서, 상기 L은 1 내지 20 kDa 분자량을 갖는 폴리에틸렌 글리콜인 것을 특징으로 한다.

[60] 앞선 구체예 중 어느 하나에 따른 약학적 조성물로서, 상기 비알코올성 지방간 질환은 비알코올성 지방간 (non-alcoholic fatty liver, NAFL), 비알코올성지방간염 (non-acoholic steatohepatitis, NASH), 간섬유증(liver fibrosis), 간경변 (cirrhosis), 및 이들의 조합으로 구성된 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 한다.

[61]

[62] 본 발명을 구현하는 다른 양태는 상기 결합체 또는 이를 유효성분으로 포함하는 조성물을 이를 필요로 하는 개체에 투여하는 단계를 포함하는, 조성물이 목적하는 질환을 치료하는 방법이다.

[63] 하나의 구체예로서, 상기 질환은 비만 및/또는 비알코올성 지방간 질환인 것을 특징으로 한다.

[64] 다른 구체예로서, 상기 방법은 상기 결합체를 1주에 1회 비만 및/또는 비알코올성 지방간 질환 환자에게 0.5 내지 8 mg 비경구 투여하는 것을 특징으로 한다.

[65] 앞선 구체예 중 어느 하나에 따른 방법으로서, 상기 방법은 상기 결합체 또는 조성물을 피하 투여하는 것을 특징으로 한다.

[66]

[67] 본 발명을 구현하는 다른 양태는 비만 및/또는 비알코올성 지방간 질환 예방 또는 치료를 위한 상기 결합체 또는 이를 유효성분으로 포함하는 조성물의 용도이다.

[68] 하나의 구체예로서, 상기 결합체는 1주에 1회 비만 및/또는 비알코올성 지방간 질환 환자에게 0.5 내지 8 mg 비경구 투여되는 것을 특징으로 한다.

[69] 앞선 구체예 중 어느 하나에 따른 용도로서, 상기 용도는 상기 결합체 또는

조성물이 피하 투여되는 것을 특징으로 한다.

[70]

[71] 본 발명을 구현하는 다른 양태는 상기 결합체를 유효성분으로 포함하는 제제이다.

[72] 하나의 구체예로서, 상기 제제는 1주에 1회 비만 및/또는 비알코올성 지방간 질환 환자에게 0.5 내지 8 mg 비경구 투여되는 것을 특징으로 한다.

[73] 앞선 구체예 중 어느 하나에 따른 제제로서, 상기 제제는 비만 및/또는 비알코올성 지방간 질환 예방 또는 치료 용도를 갖는 것을 특징으로 한다.

[74] 앞선 구체예 중 어느 하나에 따른 제제로서, 상기 제제는 피하 투여되는 것을 특징으로 한다.

[75]

발명의 실시를 위한 형태

[76] 이하에서는, 본 발명을 더욱 상세히 설명한다.

[77] 한편, 본원에서 개시되는 각각의 설명 및 실시형태는 각각의 다른 설명 및 실시형태에도 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.

[78] 본 명세서 전반을 통하여, 천연적으로 존재하는 아미노산에 대한 통상의 1문자 및 3문자 코드가 사용될 뿐만 아니라 Aib (2-Aminoisobutyric acid), 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.

[79] 알라닌 Ala, A 아르기닌 Arg, R

[80] 아스파라긴 Asn, N 아스파르트산 Asp, D

[81] 시스테인 Cys, C 글루탐산 Glu, E

[82] 글루타민 Gln, Q 글리신 Gly, G

[83] 히스티딘 His, H 이소류신 Ile, I

[84] 류신 Leu, L 리신 Lys, K

[85] 메티오닌 Met, M 페닐알라닌 Phe, F

[86] 프롤린 Pro, P 세린 Ser, S

[87] 트레오닌 Thr, T 트립토판 Trp, W

[88] 티로신 Tyr, Y 발린 Val, V

[89]

[90] 본 발명을 구현하기 위한 하나의 양태는 글루카곤, GLP-1(Glucagon-like peptide-1) 및 GIP(Glucose-dependent insuliontropic polypeptide) 수용체 모두에 활성을 갖는 삼중 활성체 지속형 결합체를 유효성분으로 포함하는 조성물로서, 상기 삼중 활성체 지속형 결합체는 1주에 1회 비만 및/또는 비알코올성 지방간

질환 환자에게 0.5 내지 8 mg 비경구 투여하는 것을 특징으로 하는 비만 및/또는 비알코올성 지방간 질환 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.

[91] 본 발명에 따른 약학 조성물은 안전하면서도 효과적인 효능을 나타낼 수 있는 구체적인 투여 용량 및 투여 주기를 규명하여 실제로 인체에 적용될 수 있도록 한 것에 기술적 의의가 있다.

[92]

[93] 본 발명의 한 구체적인 양태로서, 본 발명의 약학 조성물은 삼중 활성체 또는 이의 지속형 결합체를 유효 성분으로 포함하는 것일 수 있다. 구체적으로, 상기 약학 조성물은 약리학적 유효량의 삼중 활성체 또는 이의 지속형 결합체와 약학적으로 허용 가능한 부형제를 포함하는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[94]

[95] 본 발명에서 상기 글루카곤 수용체, GLP-1 수용체, 및 GIP 수용체에 대해 활성을 갖는 삼중 활성체 지속형 결합체는, 글루카곤 수용체, GLP-1 수용체, 및 GIP 수용체에 대해 활성을 갖는 펩타이드(즉, 삼중 활성체)에 이의 생체 내 반감기를 증가시키기 위한 생체적합성 물질이 결합된 형태일 수 있다. 본 명세서에서 상기 생체적합성 물질은 캐리어와 혼용될 수 있다.

[96] 본 발명에서 상기 삼중 활성체 지속형 결합체는 캐리어가 결합되지 않은 상기 펩타이드에 비하여 증가된 효력의 지속성을 나타낼 수 있다. 한편, 이러한 결합체는 비자연적으로 발생된 (non-naturally occurring) 것일 수 있다.

[97] 본 발명의 하나의 구체예에서, 상기 결합체는 하기 화학식 1로 표시되는, 결합체이다:

[98] [화학식 1]

[99] X - L - F

[100] 여기서, X는, 서열번호 1 내지 102 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하는 펩타이드이고;

[101] L은, 에틸렌글리콜 반복 단위를 함유하는 링커이며;

[102] F는, 면역글로불린 Fc 영역이고,

[103] -는 X와 L 사이, L과 F 사이의 공유결합 연결을 나타낸다.

[104] 본 발명에서, 상기 "글루카곤 수용체, GLP-1 수용체, 및 GIP 수용체에 대해 활성을 갖는 펩타이드"는 상기 결합체를 구성하는 일 모이어티의 구성에 해당할 수 있다. 구체적으로, 상기 화학식 1에서 X에 해당한다.

[105] 상기 글루카곤, GLP-1, 및 GIP 수용체에 대해 활성을 갖는 펩타이드는 본 발명에서 삼중 활성체로 혼용되어 사용될 수 있다. 본 발명의 삼중 활성체는 서열번호 1 내지 102의 아미노산 서열 중 어느 하나의 서열을 포함하는 펩타이드를 포함할 수 있다. 또는, 서열번호 1 내지 102의 아미노산 서열 중 어느 하나의 서열로 필수적으로 구성되거나, 구성된 펩타이드도 본 발명의 삼중활성체에 포함될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[106]

[107] 본 발명의 삼중 활성체 또는 이의 지속형 결합체는 약리학적 유효량으로 비만 또는 비알코올성 지방간 질환 환자에게 투여될 수 있다.

[108] 본 발명에서, "약리학적 유효량"이란, 삼중 활성체 또는 이의 지속형 결합체가 비만 또는 비알코올성 지방간 질환 환자의 치료 효과를 나타내면서도 환자에게 독성이나 부작용을 나타내지 않는 안전한 투여 용량을 의미하며, 구체적으로는 비만 또는 비알코올성 지방간 질환 환자에서 체중 감소, 내장 지방량 감소, 혈중 지질 농도 감소, 글루코스 대사 파라미터 (Glucose Metabolism Parameter) 개선, 혈압 감소, 및/또는 지방간 감소의 효과를 나타내며, 간조직에서 간 지방 축적 분포(steatosis grade), 소엽염증 개수, 간세포 풍선화 변성 등이 감소되어 NAS(NAFLD activity score) 점수 감소, 및/또는 섬유화 점수 감소를 나타낼 수 있는 용량일 수 있다. 상기 혈중 지질 농도는 총 콜레스테롤, LDL-C, HDL-C, VLDL-C, 트리글리세리드, 유리 지방산 등의 혈중 농도를 의미하며, 상기 글루코스 대사 파라미터는 FPG(Fasting Plasma Glucose), 공복 인슐린(Fasting Insulin), 공복 C-펩타이드(Fasting C-Peptide), HbA1c, 인슐린 저항성(Homeostatic Model Assessment For Insulin Resistance, HOMA-IR), 인슐린 분비(Homeostatic Model Assessment For Insulin Secretion, HOMA-B) 등을 의미할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 추가적으로, 본 발명의 "약리학적 유효량"은 비알코올성 지방간염(NASH)의 바이오마커(Cytokeratin-18 M30/65 fragments, Enhanced Liver Fibrosis Score, Pro-C3, Non-invasive score 4, Fibrosis-4 index, NAFLD Fibrosis Score)의 유의미한 변화를 나타낼 수 있는 용량을 의미한다.

[109] 또는, 본 발명의 "약리학적 유효량"은 투여 이후 최고 농도(Cmax) 30 내지 1000 ng/mL, 또는 곡선 하면적 평균(AUC mean)5000 내지110000 h*ng/mL 을 나타낼 수 있는 용량일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[110] 본 발명의 약학 조성물은 일정 수준 이상의 최고농도(Cmax) 또는 곡선 하 면적 평균(AUC mean)을 유지할 수 있도록 1회 또는 1회 이상 투여되는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 구체적으로, 30 내지1000 ng/mL, 40 내지 900 ng/mL, 또는 41.8 내지 820 ng/mL의 최고농도를 나타내도록 투여되거나, 또는 0.01mg/kg 내지 0.12 mg/kg의 범위에서 5000 내지 110000 h*ng/mL, 5500 내지 105000 h*ng/mL, 또는 5609.2 내지 100933.9 h*ng/mL의 AUC 평균을 나타내도록 투여되는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[111] 구체적인 본 발명의 실시 양태에서는 본 발명에 따른 삼중 활성체 지속형 결합체는 1회에 약 0.01 mg, 0.02 mg, 0.03 mg, 0.04 mg, 0.05 mg, 0.06 mg, 0.07 mg, 0.08 mg, 0.09 mg, 0.1 mg, 0.2 mg, 0.3 mg, 0.4 mg, 0.5 mg, 0.6 mg, 0.7 mg, 0.8 mg, 0.9 mg, 1 mg, 1.1 mg, 1.2 mg, 1.3 mg, 1.4 mg, 1.5 mg, 1.6 mg, 1.7 mg, 1.8 mg, 1.9 mg 또는 2.0 mg 이상으로 투여되고, 약 10 mg, 9.9 mg, 9.8 mg, 9.7 mg, 9.6 mg, 9.5 mg, 9.4 mg, 9.3 mg, 9.2 mg, 9.1 mg, 9 mg, 8.9 mg, 8.8 mg, 8.7 mg, 8.6 mg, 8.5 mg, 8.4 mg, 8.3 mg, 8.2 mg, 8.1 mg, 8 mg, 7.9 mg, 7.8 mg, 7.7 mg, 7.6 mg, 7.5 mg, 7.4 mg,

7.3 mg, 7.2 mg, 7.1 mg, 7 mg, 6.9 mg. 6.8 mg, 6.7 mg, 6.6 mg, 6.5 mg, 6.4 mg, 6.3 mg, 6.2 mg, 6.1 mg 또는 6.0 mg 이하로 투여될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 구체적으로, 본 발명의 삼중 활성체 지속형 결합체의 투여 용량은 1회에 약 0.01 내지 10 mg, 약 0.1 내지 10 mg, 약 0.5 내지 8 mg, 약 1 내지 7 mg, 또는 약 2 내지 6 mg일 수 있으나, 이에 제한되지 않고 상기 1회 투여 용량은 의사 또는 처방하는 사람의 판단으로 질환의 정도, 환자의 연령, 투여기간 등에 의하여 적절히 조절될 수 있다. 상기 1회 투여 용량은 비만 또는 비알코올성 지방간 질환의 치료를 위해 일정 주기로 투여되어야 하는 용량을 의미한다.

[112] 상기 삼중 활성체 지속형 결합체는 환자의 체중에 무관하게 일정 용량으로 투여될 수 있으나, 필요할 경우, 체중에 따라 적절히 조절될 수 있다.

[113] 본 발명에서 용어, "약"은 ±0.5, ±0.4, ±0.3, ±0.2, ±0.1, ±0.05, ±0.01 등을 모두 포함하는 범위로, 약 이란 용어 뒤에 나오는 수치와 동등하거나 유사한 범위의 수치를 모두 포함하나, 이에 제한되지 않는다.

[114] 본 발명의 삼중 활성체 또는 이의 지속형 결합체는 상기 1회 투여 용량으로 일정 주기로 일정 기간 동안 투여되어 비만 및/또는 비알코올성 지방간 질환에 예방 또는 치료 효과를 나타내는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[115]

[116] 본 발명의 약학 조성물은 삼중 활성체 또는 지속형 결합체를 상기 1회 투여 용량으로 포함하는 것일 수 있고, 약학적으로 허용되는 부형제를 필요량으로 추가적으로 포함하는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[117]

[118] 본 발명의 삼중 활성체 지속형 결합체는 면역글로불린 Fc 영역의 결합으로 인해 삼중 활성체로서의 활성을 보유하면서도 반감기가 늘어나 충분한 시간 동안 약리 효과를 발휘하므로 투약의 주기를 늘릴 수 있어 환자의 편의성을 높일 수 있다.

[119] 구체적으로, 본 발명의 삼중 활성체 또는 이의 지속형 결합체는 1주에 1회, 2주에 1회, 3주에 1회, 4주에 1회, 또는 1개월에 1회 투여되는 것일 수 있으나, 약리 효과를 발휘할 수 있는 체내 농도를 유지할 수 있는 투여 주기라면, 특별히 이에 제한되지 않는다.

[120]

[121] 본 발명의 삼중 활성체 지속형 결합체는 환자에게 다중 투여량 (multiple dose)으로 장기간 투여되는 분할 치료 방법 (fractionated treatment protocol)에 의해 투여될 수 있다.

[122] 구체적으로, 본 발명의 약학 조성물은 충분한 치료 효과를 나타낼 수 있을 정도의 기간 동안 투여되는 것일 수 있다. 한 예로, 체중, BMI, 지방간, 내장 지방량, 혈중 지질 농도, 글루코스 대사 파라미터 (Glucose Metabolism Parameter) 등의 비만 또는 비알코올성 지방간 질환 환자의 비정상적인 지표 중 하나 이상을 기술 분야에서 인정되는 정상 범위(예를 들어, BMI 23 미만, 지방간 5% 이하

등)로 복귀 시킬 수 있는 기간일 수 있고, 또는, 당업계에서 비알코올성 지방간 질환의 진단 및 치료를 위해 이용하는 지표인 NAS (NAFLD activity score) 점수, 간세포 풍선화 변성 또는 소엽염증의 개수, 섬유화 점수를 정상 수준으로 복귀 시킬 수 있는 기간일 수 있으나, 상기 충분한 기간은 의사나 처방을 하는 자의 판단에 따라 적절히 결정될 수 있고, 특별히 이에 제한되지 않는다.예컨대, 4주, 5주, 6주, 7주, 8주, 9주, 10주, 11주, 12주, 13주, 14주, 15주, 16주, 17주, 18주, 19주, 20주, 21주, 22주, 23주, 24주, 25주, 26주, 27주, 28주, 29주, 30주, 31주, 32주, 33주, 34주, 35주, 36주, 37주, 38주, 39주, 40주, 41주, 42주, 43주, 44주, 45주, 46주, 47주, 48주, 49주, 50주, 51주, 또는 52주 이상 투여될 수 있으며, 질환의 정도에 따라 투여기간은 적절히 조절될 수 있다.

[123] 본 발명에 따른 약학 조성물은 상기 투여 기간 동안 1주 간격으로 1회 투여되는 것일 수 있다.

[124]

[125] 본 발명의 약학 조성물은 비만 및/또는 비알코올성 지방간 질환 환자에 투여되는 것일 수 있다.

[126]

[127] 본 발명에서 용어 "비만"은 체내에 지방조직이 과다한 상태로, 비만은 오랜 기간에 걸쳐 에너지 소비량에 비해 영양소를 과다하게 섭취할 경우 에너지 불균형에 의해 유발되는 것이 통상적이다. 비만은 신체 전체에 영향을 미치는 대사질환으로 당뇨병 및 고지혈증에 걸릴 가능성이 높아지고, 성기능 장애, 관절염, 심혈관계 질환의 발병 위험이 커지며 일부의 경우 암의 발생과도 연관이 있다.

[128] 본 발명의 약학적 조성물은 비만 환자에게 투여될 수 있으며, 대상 비만 환자는 대표적으로 BMI(Body mass index) 지수에 따라 결정될 수 있다.

[129] 본 발명에서, BMI는 체중(kg)을 신장(m)의 제곱으로 나눈 값을 의미하며, 본 발명의 비만 환자는 BMI 지수가 23 kg/m^2, 24 kg/m^2, 25 kg/m^2, 26 kg/m^2, 27 kg/m^2, 28 kg/m^2, 29 kg/m^2, 30 kg/m^2, 31 kg/m^2, 32 kg/m^2, 33 kg/m^2, 34 kg/m^2, 35 kg/m^2, 36 kg/m^2, 37 kg/m^2, 38 kg/m^2, 39 kg/m^2, 또는 40 kg/m^2 이상일 때 비만 환자로 정의될 수 있다.

[130] 또는, 생체전기저항 측정법으로 측정된 체지방률이 남성의 경우 25% 이상, 여성의 경우 30% 이상인 사람, 허리 둘레가 남성의 경우 90cm 이상, 여성의 경우 85cm 이상인 사람, 복부 지방 CT 촬영 결과 내장 지방과 피하 지방의 비율이 0.4 이상인 사람 등을 비만 환자로 진단할 수 있으나, 기술 분야에 알려진 비만 진단 기준에 의해 비만으로 진단된 환자에게 본 발명의 약학 조성물을 투여할 수 있다.

[131] 본 발명의 약학 조성물은 비만 환자에서 체중 감소, 내장 지방량 감소, 혈압 감소 등의 효과를 나타낼 수 있다.

[132]

[133] 본 발명에서 용어 "비알코올성 지방간 질환"은 알코올 섭취와 관련 없음에도 알코올 간염과 유사한 조직소견을 보이는 질환의 일종으로 비알코올성 지방간 질환은 비알코올성 지방간 (non-alcoholic fatty liver, NAFL), 비알코올성지방간염 (non-acoholic steatohepatitis, NASH), 간섬유증(liver fibrosis), 및 간경변 (cirrhosis)까지를 아우르는 질환이다. 구체적으로, 본 발명의 비알코올성 지방간 질환은 비알코올성 지방간과 이를 수반하는 비알코올성 지방간염을 포함할 수 있다.

[134] 본 발명의 약학적 조성물은 비알코올성 지방간 질환 환자에게 투여될 수 있으며, 대상 비알코올성 지방간 질환 환자는 대표적으로 자기공명영상-양자밀도 지방비율(MRI-PDFF)에 따른 지방간 수치에 따라 결정될 수 있다.

[135] 본 발명에서, 자기공명영상-양자밀도 지방비율(MRI-PDFF)은 MRI를 이용하여 간내 지방량을 정량적으로 측정한 지표로서, 본 발명의 비알코올성 지방간 질환 환자는 지방간이 8% 이상, 9% 이상, 10% 이상, 11% 이상, 12% 이상, 13% 이상, 14% 이상, 15% 이상, 16% 이상, 17% 이상, 18% 이상, 19% 이상, 20% 이상, 21% 이상, 22% 이상, 23% 이상, 24% 이상, 25% 이상, 26% 이상, 27% 이상, 28% 이상, 29% 이상, 또는 30% 이상일 때 비알코올성 지방간 질환 환자로 정의될 수 있다.

[136] 또는, 기술 분야에 알려진 생화학적, 영상학적 방법 등을 통해 비알코올성 지방간 질환 환자를 진단할 수 있으며, 예를 들어, NAS 점수 (NAFLD activity score)가 4 이상이거나, AST/ALT 비(ratio)가 1 이상일 경우, FibroScan에 따른 지방간측정기술(CAP, Controlled Attenuation Parameter) 수치가 300 dB/m 이상일 경우, 섬유화 점수(Fibrosis Score) 1 이상, 비알코올성 지방간 질환 환자로 진단할 수 있으나, 기술 분야에 알려진 비알코올성 지방간 질환 진단 기준에 의해 비알코올성 지방간 질환으로 진단된 환자에게 본 발명의 약학 조성물을 투여할 수 있다.

[137] 본 발명에서, 비알코올성 지방간 질환 환자는 특정한 하나의 비알코올성 지방간 질환만을 갖는 환자일 수도 있지만, 다른 질환(예를 들어, 비만) 또는 여러 비알코올성 지방간 질환을 함께 갖는 환자일 수도 있다. 예를 들어, 비만이면서 비알코올성 지방간 질환(예를 들어, 비알코올성 지방간염(non-acoholic steatohepatitis, NASH))을 갖는 환자일 수도 있고, 비알코올성 지방간(non-alcoholic fatty liver, NAFL) 환자이면서 비알코올성 지방간염을 갖는 환자일 수도 있으나, 본 발명의 약학 조성물로 예방 또는 치료 효과를 얻을 수 있는 한, 이에 제한되지 않는다.

[138] 본 발명의 약학 조성물은 비알코올성 지방간 질환 환자에서 체중 감소, 내장 지방량 감소, 간내 지방량 감소, 혈중 지질 농도 감소, 글루코스 대사 파라미터 (Glucose Metabolism Parameter) 개선과 같은 비알코올성 지방간 질환 환자의 예방 또는 치료를 위한 약리 효과를 나타낼 수 있으며, 그에 따라, 간조직에서 간 지방 축적 분포(steatosis grade) 감소, NAS(NAFLD activity score) 점수 감소,

간세포 풍선화 변성 또는 소엽염증의 개수 감소, 섬유화 점수 감소, 및/또는 비알코올성 지방간염(NASH)의 바이오마커(Cytokeratin-18 M30/65 fragments, Enhanced Liver Fibrosis Score, Pro-C3, Non-invasive score 4, Fibrosis-4 index, NAFLD Fibrosis Score)의 유의미한 변화 등의 특성을 나타내어 비알코올성 지방간 질환에 대한 예방 또는 치료 효과를 나타낼 수 있다.

[139]

[140] 본 발명의 약학 조성물은 비만 및/또는 비알코올성 지방간 질환의 병증의 정도, 투여 기간에 따라 투여량을 조절할 수 있다.

[141]

[142] 본 발명의 약학 조성물의 제형은 약학적으로 허용가능한 부형제와 혼합하여 다양하게 제조될 수 있다. 구체적인 양태로, 본 발명의 약학 조성물은 삼중 활성체 또는 이의 지속형 결합체를 투여, 특히, 비경구 투여하기 적절한 제형으로 제제화된 것일 수 있다. 또한, 본 발명의 약학 조성물은 삼중 활성체 또는 이의 지속형 결합체가 약리 활성을 유지할 수 있는 안정화된 제형으로 제제화된 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[143] 예컨대, 본 발명의 약학 조성물을 단위 투약 앰플 또는 다수회 투약 형태로 제조할 수 있다. 기타, 용액, 현탁액, 정제, 환약, 캡슐, 서방형 제제 등으로 제형화할 수 있다.

[144] 구체적으로는, 피하로 투여될 수 있도록 주사제 형태로 제형화된 것일 수 있다.

[145] 주사제는, 바로 인체의 피하, 혈관(혈액주사)이나 근육(근육주사)에 투여되므로, 위장관에서의 흡수나 간에서의 대사를 거치지 않으므로 용해도나 흡수율 등은 문제가 되지 않고 직접적으로 효과를 발휘할 수 있으나, 바로 인체조직에 영향을 미칠 수 있으므로 약물 성분으로 인한 독성에 극히 유의할 필요가 있다, 즉, 인체에서의 약리작용, 부작용, 내약용량(안전하게 투여할 수 있는 투여량) 등을 모두 고려한 임상시험 설계 및 그 결과를 통해서만 비경구 투여경로에 대한 안정성을 담보할 수 있다.

[146]

[147] 또한, 본 발명의 약학 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 비경구 투여 방법을 이용하여 투여될 수 있으며, 비경구 투여 방법으로서 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 당업자는 적절히 선택할 수 있다. 구체적으로는 피하 투여로 본 발명의 약학 조성물을 투여할 수 있고, 보다 구체적으로는 본 발명의 약학 조성물을 환자의 팔(상박), 허벅지 또는 복부에 피하로 투여되는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[148] 본 발명의 목적상, 상기 약학 조성물이 투여된 개체는 하기 (a) 내지 (f) 중 하나 이상의 특성을 나타내어 비만 및/또는 비알코올성 지방간 질환에 대한 예방 또는

치료 효과를 가질 수 있다:

[149] (a) 체중 감소;

[150] (b) 혈압 감소;

[151] (c) 간의 내장 지방량 감소;

[152] (d) NAS 점수 감소;

[153] (e) 간세포 풍선화 변성 또는 소엽염증의 개수 감소; 및

[154] (f) 섬유화 점수 감소..

[155] 구체적으로, 본 발명의 약학 조성물이 투여된 환자는 최초 투여 시점과 비교하여 지방량이 30% 이상 감소, 체중 5% 이상 감소 될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[156]

[157] 본 발명의 약학 조성물은 서열번호 1 내지 102의 아미노산 서열 중 어느 하나의 서열을 포함하거나, 필수적으로 구성되거나, 구성된 펩타이드(삼중 활성체)를 약리학적 유효량으로 포함하는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[158]

[159] 본 발명에서, 상기 삼중 활성체는 하기 화학식 1로 표현되는 지속형 결합체의 형태일 수 있다:

[160] [화학식 1]

[161] X - L - F

[162] 여기서, X는, 서열번호 1 내지 102 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하는 펩타이드이고;

[163] L은, 에틸렌글리콜 반복 단위를 함유하는 링커이며;

[164] F는, 면역글로불린 Fc 영역이고,

[165] -는 X와 L 사이, L과 F 사이의 공유결합 연결을 나타낸다.

[166]

[167] 상기 결합체에서, X는 본 발명의 삼중 활성체에 해당하며, 구체적으로, 서열번호 1 내지 102 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하거나, 필수적으로 구성되거나, 구성된 펩타이드일 수 있다.

[168] 본원에서 특정 서열번호로 '구성되는' 펩타이드라고 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.

[169] 예를 들어, 본 발명의 삼중 활성체에 WO2017-116204 및 WO2017-116205를 참조할 수 있다.

[170]

[171] 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, 100% 이상을 나타낼 수 있다.

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

[173] 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:

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

[175] 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, 100% 이상을 나타내는 경우를 예로 들 수 있다. 그러나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[176] 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.

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

[178]

[179] 본 발명의 결합체는 결합체의 형태에서도 글루카곤 수용체, GLP-1 수용체, 및 GIP 수용체에 대해 유의적인 활성을 나타낼 수 있고, 따라서, 비만 및/또는 비알코올성 지방간 질환에 대한 예방 또는 치료 효과를 발휘할 수 있다.

[180] 구체적으로, 본 발명의 결합체는 천연형 대비 글루카곤 수용체, GLP-1 수용체, 및/또는 GIP 수용체에 대한 in vitro 활성이 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.

[181]

[182] 본 발명에 따른 구체적인 양태로서, 상기 삼중 활성체는 서열번호 1 내지 102 중

어느 하나의 아미노산 서열을 포함하거나, 서열번호 1 내지 102 중 어느 하나의 아미노산 서열로 (필수적으로) 구성되거나, 또는 서열번호 1 내지 102 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 있으나, 비만 또는 비알코올성 지방간 질환에 치료 효과를 나타내는 한, 특정 서열로 제한되지 않는다.

[183]

[184] 다른 구체적인 양태로서, 상기 삼중 활성체는 서열번호 21, 22, 27, 30-32, 34, 36, 37, 42, 43, 50 내지 56, 58, 64 내지 80, 83, 86, 91, 93, 및 96 내지 102로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하거나, 서열번호 21, 22, 27, 30-32, 34, 36, 37, 42, 43, 50 내지 56, 58, 64 내지 80, 83, 86, 91, 93, 및 96 내지 102 중 어느 하나의 아미노산 서열로 (필수적으로) 구성되거나, 또는 서열번호 21, 22, 27, 30-32, 34, 36, 37, 42, 43, 50 내지 56, 58, 64 내지 80, 83, 86, 91, 93, 및 96 내지 102 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 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[185]

[186] 다른 구체적인 양태로서, 상기 삼중 활성체는 서열번호 21, 22, 31, 32, 37, 42, 43, 50, 53, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 75, 76, 77, 79, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 및 102로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하거나, 서열번호 21, 22, 31, 32, 37, 42, 43, 50, 53, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 75, 76, 77, 79, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 및 102 중 어느 하나의 아미노산 서열로 (필수적으로) 구성되거나, 또는 서열번호 21, 22, 31, 32, 37, 42, 43, 50, 53, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 75, 76, 77, 79, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 및 102 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 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[187]

[188] 다른 구체적인 양태로서, 상기 삼중 활성체는 서열번호 42, 43 및 50으로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하거나, 서열번호 42, 43 및 50 중 어느 하나의 아미노산 서열로 (필수적으로) 구성되거나, 또는 서열번호 42, 43 및 50 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 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[189]

[190] 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.

[191] 용어 상동성 및 동일성은 종종 상호교환적으로 이용될 수 있다.

[192] 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.

[193] 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 패널티 10, 갭 연장 패널티 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.

[194]

[195] 이러한 삼중 활성체는 분자 내 가교 (intramolecular bridge)를 포함할 수 있으며 (예컨대, 공유결합적 가교 또는 비공유결합적 가교), 구체적으로 고리를 포함하는 형태일 수 있으며, 예컨대 삼중 활성체의 16번 및 20번 아미노산

사이에 고리가 형성된 형태일 수 있으나, 특별히 이에 제한되는 것은 아니다.

[196] 상기 고리의 비제한적인 예로 락탐 가교 (또는 락탐 고리)를 포함할 수 있다.

[197] 또한, 상기 삼중 활성체는 고리를 포함하도록, 목적하는 위치에 고리를 형성할 수 있는 아미노산을 포함하도록 변형된 것을 모두 포함한다.

[198] 예컨대, 삼중 활성체의 16번 및 20번 아미노산 쌍이 각각 고리를 형성할 수 있는 글루탐산 또는 리신으로 치환된 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[199] 이러한 고리는 상기 삼중 활성체 내의 아미노산 곁 사슬 간에 형성될 수 있으며, 그 예로 리신의 곁 사슬과 글루탐산의 곁 사슬 간에 락탐 고리가 형성되는 형태일 수 있으나, 특별히 이에 제한되는 것은 아니다.

[200] 또한, 특별히 이에 제한되지 않으나, 본 발명의 펩타이드는 체내 반감기의 증가를 위해 활성체 분해 효소의 인식작용을 회피하기 위하여 일부 아미노산을 타 아미노산 혹은 비천연형 화합물로 치환할 수 있다.

[201] 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.

[202] 또한, 삼중 활성체의 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 고리 형성, 메틸화, 아실화, 유비퀴틴화, 인산화, 아미노헥산화, 바이오틴화 등과 같이 개질함으로써 변형하는 것을 모두 포함한다.

[203] 또한, 삼중 활성체의 아미노 및/또는 카르복시 말단에 하나 또는 그 이상의 아미노산이 추가된 것을 모두 포함한다.

[204] 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.

[205] 아미노산 유도체도 마찬가지 방식으로 입수할 수 있는데, 그 예를 일부만 들자면 4-이미다조아세트산 (4-imidazoacetic acid) 등을 사용할 수 있다.

[206] 또한, 본 발명에 따른 삼중 활성체는 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.

[207] 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.

[208] 또한, 본 발명에 따른 삼중 활성체는 삼중 활성체 그 자체, 이의 염 (예컨대, 상기 펩타이드의 약학적으로 허용가능한 염), 또는 이의 용매화물의 형태를 모두 포함한다. 또한, 펩타이드는 약학적으로 허용되는 임의의 형태일 수 있다.

[209] 상기 염의 종류는 특별히 제한되지는 않는다. 다만, 개체, 예컨대 포유류에게 안전하고 효과적인 형태인 것이 바람직하나, 특별히 이에 제한되는 것은 아니다.

[210] 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.

[211] 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.

[212] 또한, 본 발명에서 사용된 용어 "용매화물"은 본 발명에 따른 삼중 활성체 또는 이의 염이 용매 분자와 복합체를 형성한 것을 말한다.

[213] 한편, 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.

[214] 구체적으로, 본 발명의 펩타이드는 표준 합성 방법, 재조합 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:

[215] (a) 펩타이드를 고체상 또는 액체상 방법의 수단으로 단계적으로 또는 단편 조립에 의해 합성하고, 최종 펩타이드 생성물을 분리 및 정제하는 방법; 또는

[216] (b) 펩타이드를 인코딩하는 핵산 작제물을 숙주세포 내에서 발현시키고, 발현 생성물을 숙주 세포 배양물로부터 회수하는 방법; 또는

[217] (c) 펩타이드를 인코딩하는 핵산 작제물의 무세포 시험관 내 발현을 수행하고, 발현 생성물을 회수하는 방법; 또는

[218] (a), (b) 및 (c)의 임의의 조합으로 펩타이드의 단편을 수득하고, 이어서 단편을 연결시켜 펩타이드를 수득하고, 당해 펩타이드를 회수하는 방법.

[219]

[220] 상기 화학식 1의 지속형 결합체에서, F는 X, 즉 글루카곤 수용체, GLP-1 수용체, 및 GIP 수용체에 대해 활성을 갖는 펩타이드의 반감기를 증가시킬 수 있는 물질로서, 본 발명의 결합체를 구성하는 모이어티의 일 구성에 해당한다.

[221] 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.

[222] 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.

[223] 상기 F는 면역글로불린 Fc 영역일 수 있으며, 보다 구체적으로 상기 면역글로불린 Fc 영역은 IgG 유래 일 수 있으나, 특별히 이에 제한되지 않는다.

[224] 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.

[225] 본 명세서에서 Fc 영역이라고 하면 면역글로불린의 파파인 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 서열까지 망라하여 포함된다.

[226] 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.

[227] 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.

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

[229] 상기 면역글로불린 Fc 영역은 본 발명의 화학식 1의 결합체의 모이어티를 이루는 일 구성으로, 구체적으로, 상기 화학식 1에서 F에 해당할 수 있다.

[230] 이러한 면역글로불린 Fc 영역은 중쇄 불변영역에 힌지(hinge) 부분을 포함할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[231] 본 발명에서, 면역글로불린 Fc 영역은 N-말단에 특정 힌지 서열을 포함할 수 있다.

[232] 본 발명의 용어, "힌지 서열"은 중쇄에 위치하여 이황화결합(inter disulfide bond)를 통하여 면역글로불린 Fc 영역의 이량체를 형성하는 부위를 의미한다.

[233] 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:

[234] Glu-Ser-Lys-Tyr-Gly-Pro-Pro-Cys-Pro-Ser-Cys-Pro(서열번호 103).

[235] 상기 힌지 서열은 서열번호 103의 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 104),
Glu-Ser-Lys-Tyr-Gly-Pro-Pro-Cys-Pro-Ser-Pro(서열번호 105),
Glu-Ser-Lys-Tyr-Gly-Pro-Pro-Cys-Pro-Ser(서열번호 106),
Glu-Ser-Lys-Tyr-Gly-Pro-Pro-Cys-Pro-Pro(서열번호 107),
Lys-Tyr-Gly-Pro-Pro-Cys-Pro-Ser(서열번호 108),
Glu-Ser-Lys-Tyr-Gly-Pro-Pro-Cys(서열번호 109),
Glu-Lys-Tyr-Gly-Pro-Pro-Cys(서열번호 110), Glu-Ser-Pro-Ser-Cys-Pro(서열번호 111), Glu-Pro-Ser-Cys-Pro(서열번호 112), Pro-Ser-Cys-Pro(서열번호 113),
Glu-Ser-Lys-Tyr-Gly-Pro-Pro-Ser-Cys-Pro(서열번호 114),
Lys-Tyr-Gly-Pro-Pro-Pro-Ser-Cys-Pro(서열번호 115),
Glu-Ser-Lys-Tyr-Gly-Pro-Ser-Cys-Pro(서열번호 116),
Glu-Ser-Lys-Tyr-Gly-Pro-Pro-Cys(서열번호 117),
Lys-Tyr-Gly-Pro-Pro-Cys-Pro(서열번호 118),
Glu-Ser-Lys-Pro-Ser-Cys-Pro(서열번호 119), Glu-Ser-Pro-Ser-Cys-Pro(서열번호 120), Glu-Pro-Ser-Cys(서열번호 121), Ser-Cys-Pro(서열번호 122).

[236] 더욱 구체적으로는 상기 힌지 서열은 서열번호 113(Pro-Ser-Cys-Pro)또는 서열번호 122(Ser-Cys-Pro)의 아미노산 서열을 포함하는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[237] 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.

[238] 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.

[239]

[240] 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.

[241] 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.

[242] 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 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.

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

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

[245] 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.

[246] 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.

[247] 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.

[248] 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.

[249] 상기 기술한 Fc 유도체는 본 발명의 Fc 영역과 동등한 생물학적 활성을 나타내며 Fc 영역의 열, pH 등에 대한 구조적 안정성을 증대시킨 것일 수 있다.

[250] 또한, 이러한 Fc 영역은 인간, 소, 염소, 돼지, 마우스, 래빗, 햄스터, 랫트 또는 기니아 픽 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, 단백질 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.

[251] 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.

[252] 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.

[253] 한편, 면역글로불린 Fc 영역은 인간 또는 소, 염소, 돼지, 마우스, 래빗, 햄스터, 랫트, 기니아 픽 등의 동물기원일 수 있으며, 더 구체적인 실시 형태에서는 인간기원이다.

[254] 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 IgM유래이며,

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.

[255] 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 동종 이량체 (homodimer) 형태일 수 있으며, 이 때 동종 이량체 의 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. 각 단량체의 아미노산 수는 221개의 아미노산으로 구성될 수 있으며, 동종 이량체 를 형성하는 아미노산은 전체 442개의 아미노산으로 이루어질 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 구체적으로 면역글로불린 Fc 영역은 서열번호 123의 아미노산 서열 (221개의 아미노산으로 구성됨)을 갖는 단량체 2개가 각 단량체의 3번 아미노산인 시스테인 사이에 이황화 결합을 통해 동종 이량체 를 형성하고, 상기 동종 이량체의 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.

[256] 한편, 본 발명에서 면역글로불린 Fc 영역과 관련된 "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.

[257] 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.

[258] 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 절편이다.

[259] 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 포함하나 이에 제한되지 않는다.

[260]

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

[262] 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.

[263] 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.

[264] 또한, 상기 F에 해당하는 폴리펩타이드와 결합되는 본 발명의 비펩타이드성 링커는 한 종류의 중합체뿐만 아니라 상이한 종류의 중합체들의 조합이 사용될 수도 있다.

[265]

[266] 하나의 구체적인 실시 형태에서 상기 결합체는 양쪽 말단에 F, 구체적으로 면역글로불린 Fc 영역 및 X, 구체적으로 삼중 활성체와 결합될 수 있는 반응기를 포함하는 비펩타이드성 링커를 통하여 F와 X가 서로 공유결합적으로 연결된 것일 수 있다.

[267] 구체적으로, 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.

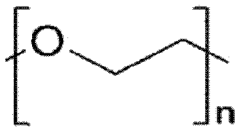
[268] 특별히 이에 제한되지 않으나, 상기 비펩타이드성 링커는 에틸렌글리콜 반복 단위를 함유하는 링커, 예를 들어, 폴리에틸렌 글리콜일 수 있고, 또한, 당해 분야에 이미 알려진 이들의 유도체 및 당해 분야의 기술 수준에서 용이하게 제조할 수 있는 유도체들도 본 발명의 범위에 포함된다.

[269] 상기 비펩타이드성 링커의 반복 단위는 에틸렌글리콜 반복 단위일 수 있고, 구체적으로, 상기 비펩타이드성 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.

[270] 구체적으로, 상기 링커는 하기 화학식 2로 표시되는 폴리에틸렌글리콜(PEG)일

수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다:

[271] [화학식 2]

[272] 

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

[274] 상기 지속형 결합체에서 PEG 모이어티는, -(CH2CH2O)n-구조 뿐만 아니라 연결 요소와 이 -(CH2CH2O)n- 사이에 개재하는 산소 원자도 포함할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[275] 또한, 하나의 구체적인 실시 형태에서 상기 결합체는 삼중 활성체(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.

[276] 상기 폴리에틸렌 글리콜은, 에틸렌 글리콜 동종 중합체, PEG 공중합체, 또는 모노메틸-치환된 PEG 중합체(mPEG)의 형태를 모두 포괄하는 용어이나, 특별히 이에 제한되는 것은 아니다.

[277] 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.

[278]

[279] 구체적으로, 상기 비펩타이드성 링커는 F 및 X와 결합하지 않은 상태에서 양 말단에 반응기를 갖고, 상기 반응기를 통해 F 및 X와 결합하는 것일 수 있다.

[280] 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.

[281] 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.

[282] 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.

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

[284] 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.

[285] 비펩타이드성 링커는 이러한 반응기를 통하여 X와 F에 연결될 수 있으나, 특별히 이에 제한되는 것은 아니다.

[286] 또한, 알데히드 결합에 의한 환원성 알킬화로 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.

[287] 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.

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

[289] 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.

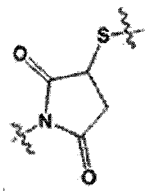
[290] 하나의 구체적인 실시 형태에서 상기 비펩타이드성 중합체는 X의 시스테인 잔기, 보다 구체적으로 시스테인의 -SH 기에 연결되는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[291] 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. 구체적으로, 상기 시스테인 잔기의 -SH 기에 비펩타이드성 중합체의 반응기가 연결될 수 있으며, 반응기에 대해서는 앞서 기술한 내용이 모두 적용된다.

[292] 만약, 말레이미드-PEG-알데히드를 사용하는 경우, 말레이미드 기는 X의 -SH

기와 티오에테르(thioether) 결합으로 연결하고, 알데히드기는 F, 구체적으로 면역글로불린 Fc의 -NH_2기와 환원적 알킬화 반응을 통해 연결할 수 있으나, 이에 제한되지 않으며, 이는 하나의 일례에 해당한다.

[293] 이와 같은 환원적 알킬화를 통하여 PEG의 한쪽 말단에 위치한 산소 원자에 면역글로불린 Fc 영역의 N-말단 아미노기가 -$CH_2CH_2CH_2$-의 구조를 가지는 링커 작용기를 통해 서로 연결되어, -PEG-O-$CH_2CH_2CH_2NH$-면역글로불린 Fc와 같은 구조를 형성할 수 있고, 티오에테르 결합을 통하여 PEG의 한쪽 말단이 삼중 활성체의 시스테인에 위치한 황 원자에 연결된 구조를 형성할 수 있다. 상술한 티오에테르 결합은 의 구조를 포함할 수 있다.



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

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

[296] 또한, 상기 결합체에서, 비펩타이드성 중합체의 반응기가 면역글로불린 Fc 영역의 N-말단에 위치한 -NH_2와 연결된 것일 수 있으나, 이는 하나의 일례에 해당한다.

[297] 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.

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

[299]

[300] 본 발명의 약학 조성물은 약학적으로 허용가능한 담체, 부형제 또는 희석제를 추가로 포함할 수 있다. 이러한 약학적으로 허용가능한 담체, 부형제, 또는

희석제는 비자연적으로 발생된 것일 수 있다.

[301] 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.

[302] 본 발명의 약학 조성물은 약학적으로 허용가능한 담체를 추가로 포함할 수 있다. 상기 담체는 특별히 이에 제한되지는 않으나, 완충제, 보존제, 무통화제, 가용화제, 등장화제, 안정화제 등을 혼합하여 사용할 수 있다.

[303]

[304] 본 발명의 약학 조성물은 삼중 활성체 또는 이의 지속형 결합체를 약리학적 유효량, 구체적으로는 0.5 내지 8 mg 포함하며, 비만 및/또는 비알코올성 지방간 질환 환자에게 1주에 1회 투여되는 것을 특징으로 한다.

[305] 이와 같은 1주에 1회, 0.5 내지 8 mg의 투여는 실제 비만 및/또는 비알코올성 지방간 질환 환자를 대상으로 한 임상시험을 통해 효능, 내약성 및 안정성을 시험적으로 확보한 최적의 투여주기 및 투여용량인 것에 기술적 의의를 갖고, 본 발명에 따른 약학 조성물의 투여로 비만 및/또는 비알코올성 지방간 질환에 대한 실질적인 예방 또는 치료 효과를 가진다.

[306]

[307] 본 발명을 구현하는 다른 하나의 양태는 상기 삼중 활성체 지속형 결합체 또는 이를 포함하는 약학 조성물을 비만 및/또는 비알코올성 지방간 질환 환자에게 투여하는 단계를 포함하는, 비만 및/또는 비알코올성 지방간 질환 예방 또는 치료 방법을 제공한다.

[308] 구체적으로, 상기 비만 및/또는 비알코올성 지방간 질환 예방 또는 치료 방법은 삼중 활성체 지속형 결합체를 1주에 1회 비만 및/또는 비알코올성 지방간 질환 환자에게 0.5 내지 8 mg 비경구 투여(특히, 피하 투여)하는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[309] 삼중 활성체, 지속형 결합체, 약학 조성물, 비만, 비알코올성 지방간 질환, 및 투여에 대해서는 앞서 설명한 바와 같다.

[310]

[311] 본 발명을 구현하는 다른 하나의 양태는 비만 및/또는 비알코올성 지방간 질환의 예방 또는 치료를 위한 약제의 제조에 있어서 상기 삼중 활성체 지속형 결합체 또는 이를 포함하는 조성물의 용도를 제공한다.

[312] 구체적으로, 상기 삼중 활성체 지속형 결합체는 1주에 1회 비만 및/또는 비알코올성 지방간 질환 환자에게 0.5 내지 8 mg 비경구 투여(특히, 피하 투여)되는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[313] 삼중 활성체, 지속형 결합체, 약학 조성물, 비만, 비알코올성 지방간 질환, 및 투여에 대해서는 앞서 설명한 바와 같다.

[314]

[315] 본 발명을 구현하는 다른 하나의 양태는 삼중 활성체 지속형 결합체를 포함하는 비만 및/또는 비알코올성 지방간 질환의 예방 또는 치료를 위한 제제를 제공한다.

[316] 구체적으로, 상기 제제는 1주에 1회 비만 및/또는 비알코올성 지방간 질환 환자에게 0.5 내지 8 mg 비경구 투여(특히, 피하 투여)되는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[317] 삼중 활성체, 지속형 결합체, 약학 조성물, 비만, 비알코올성 지방간 질환, 및 투여에 대해서는 앞서 설명한 바와 같다.

[318]

[319] 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.

[320]

[321] **실시예 1: 삼중 활성체의 제조**

[322] GLP-1, GIP 및 글루카곤 수용체에 모두 활성을 나타내는 삼중 활성체를 제조하여, 하기 표 1에 이의 서열을 나타냈다.

[323] [표1]

서열번호	서열	정보
1	HXQGTFTSDVSSYLDGQAAKEFIAWLVKGC	
2	HXQGTFTSDVSSYLDGQAQKEFIAWLVKGC	
3	HXQGTFTSDVSSYLLGQAAKQFIAWLVKGGGPSSGAPPPSC	
4	HXQGTFTSDVSSYLLGQQQKEFIAWLVKGC	
5	HXQGTFTSDVSSYLLGQQQKEFIAWLVKGGGPSSGAPPPSC	
6	HXQGTFTSDVSSYLDGQAAKEFVAWLLKGC	
7	HXQGTFTSDVSKYLDGQAAKEFVAWLLKGC	
8	HXQGTFTSDVSKYLDGQAAQEFVAWLLKGC	
9	HXQGTFTSDVSKYLDGQAAQEFVAWLLAGC	
10	HXQGTFTSDVSKYLDGQAAQEFVAWLLAGGGPSSGAPPPSC	
11	CAGEGTFTSDLSKYLDSRRQQLFVQWLKAGGPSSGAPPPSHG	
12	CAGEGTFISDLSKYMDEQAVQLFVEWLMAGGPSSGAPPPSHG	
13	CAGEGTFISDYSIQLDEIAVQDFVEWLLAQKPSSGAPPPSHG	
14	CAGQGTFTSDYSIQLDEIAVRDFVEWLKNGGPSSGAPPPSHG	
15	CAGQGTFTSDLSKQMDEEAVRLFIEWLKNGGPSSGAPPPSHG	
16	CAGQGTFTSDLSKQMDSEAQQLFIEWLKN	

	GGPSSGAPPPSHG	
17	CAGQGTFTSDLSKQMDEERAREFIEWLLA QKPSSGAPPPSHG	
18	CAGQGTFTSDLSKQMDSERAREFIEWLKN TGPSSGAPPPSHG	
19	CAGQGTFTSDLSIQYDSEHQRDFIEWLKDT GPSSGAPPPSHG	
20	CAGQGTFTSDLSIQYEEEAQQDFVEWLKD TGPSSGAPPPSHG	
21	YXQGTFTSDYSKYLDECRAKEFVQWLLD HHPSSGQPPPS	고리 형성
22	YXQGTFTSDYSKCLDEKRAKEFVQWLLD HHPSSGQPPPS	고리 형성
23	YXQGTFTSDYSKYLDECRAKEFVQWLLA QKGKKNDWKHNIT	고리 형성
24	YXQGTFTSDYSKYLDECRAKEFVQWLKN GGPSSGAPPPS	고리 형성
25	HXQGTFTSDCSKYLDERAAQDFVQWLLD GGPSSGAPPPS	
26	HXQGTFTSDCSKYLDSRAAQDFVQWLLD GGPSSGAPPPS	
27	HXQGTFTSDYSKYLDERACQDFVQWLLD QGGPSSGAPPPS	
28	HXQGTFTSDYSKYLDEKRAQEFVCWLLA QKGKKNDWKHNIT	
29	HXQGTFTSDYSKYLDEKAAKEFVQWLLN TC	고리 형성
30	HXQGTFTSDYSKYLDEKAQKEFVQWLLD TC	고리 형성
31	HXQGTFTSDYSKYLDEKACKEFVQWLLA Q	고리 형성
32	HXQGTFTSDYSKYLDEKACKDFVQWLLD GGPSSGAPPPS	고리 형성
33	HXQGTFTSDYSIAMDEIHQKDFVNWLLAQ	고리

	KC	형성
34	HXQGTFTSDYSKYLDEKRQKEFVNWLLA QKC	고리 형성
35	HXQGTFTSDYSIAMDEIHQKDFVNWLLNT KC	고리 형성
36	HXQGTFTSDYSKYLCEKRQKEFVQWLLN GGPSSGAPPPSG	고리 형성
37	HXQGTFTSDYSKYLDECRQKEFVQWLLN GGPSSGAPPPSG	고리 형성
38	CAXQGTFTSDKSSYLDERAAQDFVQWLLD GGPSSGAPPPSS	
39	HXQGTFTSDYSKYLDGQHAQCFVAWLLA GGGPSSGAPPPS	
40	HXQGTFTSDKSKYLDERACQDFVQWLLD GGPSSGAPPPS	
41	HXQGTFTSDKSKYLDECAAQDFVQWLLD GGPSSGAPPPS	
42	YXQGTFTSDYSKYLDEKRAKEFVQWLLD HHPSSGQPPPSC	고리 형성
43	YXQGTFTSDYSKYLDEKRAKEFVQWLLD HHCSSGQPPPS	고리 형성
44	HGQGTFTSDCSKQLDGQAAQEFVAWLLA GGPSSGAPPPS	
45	HGQGTFTSDCSKYMDGQAAQDFVAWLLA GGPSSGAPPPS	
46	HGQGTFTSDCSKYLDEQHAQEFVAWLLA GGPSSGAPPPS	
47	HGQGTFTSDCSKYLDGQRAQEFVAWLLA GGPSSGAPPPS	
48	HGQGTFTSDCSKYLDGQRAQDFVNWLLA GGPSSGAPPPS	
49	CAXQGTFTSDYSICMDEIHQKDFVNWLLN TK	고리 형성
50	HXQGTFTSDYSKYLDEKRAKEFVQWLLD	고리

	HHPSSGQPPPSC	형성
51	HXQGTFTSDYSKYLDEKRQKEFVQWLLNTC	고리 형성
52	HXQGTFTSDYSKYLDEKRQKEFVQWLLDTC	고리 형성
53	HXEGTFTSDYSIAMDEIHQKDFVNWLLAQC	고리 형성
54	HXEGTFTSDYSIAMDEIHQKDFVDWLLAEC	고리 형성
55	HXQGTFTSDYSIAMDEIHQKDFVNWLLAQC	고리 형성
56	HXQGTFTSDYSKYLDEKRQKEFVNWLLAQC	고리 형성
57	HXQGTFTSDYSIAMDEIHQKDFVNWLLNTC	고리 형성
58	HXQGTFTSDYSKYLDEKRQKEFVQWLLNTKC	고리 형성
59	CAXQGTFTSDYSICMDEKHQKDFVNWLLNTK	고리 형성
60	CAXQGTFTSDYSIAMDEKHCKDFVNWLLNTK	고리 형성
61	CAXQGTFTSDYSIAMDEIACKDFVNWLLNTK	고리 형성
62	CAXQGTFTSDKSKYLDERAAQDFVQWLLDGGPSSGAPPPS	-
63	CAXQGTFTSDCSKYLDERAAQDFVQWLLDGGPSSGAPPPS	-
64	YXQGTFTSDYSKYLDECAAKEFVQWLLDHHPSSGQPPPS	고리 형성
65	HXQGTFTSDYSKCLDEKRAKEFVQWLLDHHPSSGQPPPS	고리 형성
66	YXQGTFTSDYSKYLDECRAKDFVQWLLDHHPSSGQPPPS	고리 형성
67	YXQGTFTSDYSKYLDECAAKDFVQWLLD	고리

	HHPSSGQPPPS	형성
68	YXQGTFTSDYSKCLDEKAAKEFVQWLLD HHPSSGQPPPS	고리 형성
69	YXQGTFTSDYSKCLDERAAKEFVQWLLD HHPSSGQPPPS	고리 형성
70	YXQGTFTSDYSKCLDEKRAKDFVQWLLD HHPSSGQPPPS	고리 형성
71	YXQGTFTSDYSKYLDERACKDFVQWLLD HHPSSGQPPPS	고리 형성
72	YXQGTFTSDCSKYLDERAAKDFVQWLLD HHPSSGQPPPS	고리 형성
73	CAXQGTFTSDYSKYLDECRAKEFVQWLLD HHPSSGQPPPS	고리 형성
74	CAXQGTFTSDYSKCLDEKRAKEFVQWLLD HHPSSGQPPPS	고리 형성
75	YXQGTFTSDYSKYLDEKAAKEFVQWLLD HHPSSGQPPPSC	고리 형성
76	YXQGTFTSDYSKYLDEKRAKDFVQWLLD HHPSSGQPPPSC	고리 형성
77	YXQGTFTSDYSKYLDEKAAKDFVQWLLD HHPSSGQPPPSC	고리 형성
78	HXQGTFTSDYSKYLDEKRQKEFVQWLLDT KC	고리 형성
79	HXEGTFTSDYSIAMDEIHQKDFVNWLLAQ KC	고리 형성
80	HXEGTFTSDYSIAMDEIHQKDFVDWLLAE KC	고리 형성
81	CAXQGTFTSDYSKYLDEKRQKEFVQWLLN TC	고리 형성
82	CAXQGTFTSDYSKYLDEKRQKEFVQWLLD TC	고리 형성
83	CAXEGTFTSDYSIAMDEIHQKDFVNWLLA QC	고리 형성
84	CAXEGTFTSDYSIAMDEIHQKDFVDWLLA	고리

	E C	형성
85	C A 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 C	고리 형성
86	C A 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 C	고리 형성
87	C A 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 C	고리 형성
88	C A X Q G T F T S D Y S K Y L D E K R Q K E F V Q W L L N T K C	고리 형성
89	C A X Q G T F T S D Y S K Y L D E K R Q K E F V Q W L L D T K C	고리 형성
90	C A X E 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
91	C A X E G T F T S D Y S I A M D E I H Q K D F V D W L L A E K C	고리 형성
92	C A 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	C A 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	C A 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	고리

	Q H P S S G Q P P P S C	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

[324] 상기 표 1에 기재된 서열에서 X로 표기된 아미노산은 비천연형 아미노산인 Aib (2-Aminoisobutyric acid)이며, 밑줄로 표시된 아미노산은 밑줄로 표시된 아미노산들이 서로 고리를 형성하는 것을 의미한다. 또한, 상기 표 1에서 CA는 4-이미다조아세틸(4-imidazoacetyl)을, Y는 티로신을 의미한다.

[325] **실시예 2: 삼중 활성체의 지속형 결합체 제조**

[326] 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 페길화시키기 위하여, 삼중활성체와 말레이미드-PEG-알데히드의 몰비를 1 : 1 내지 3, 단백질의 농도를 1 내지 5 ㎎/㎖로 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-페길화된 삼중활성체를 정제하였다.

[327] 다음으로, 상기 정제된 모노-페길화된 삼중활성체와 면역글로불린 Fc(서열번호 123의 동종 이량체)을 몰비를 1 : 1 내지 5, 단백질의 농도를 10 내지 50㎎/㎖로 하여 4 내지 8℃에서 12 내지 18시간 동안 반응시켰다. 반응은 100 mM 인산칼륨 완충액 (pH 6.0)에 환원제인 10 내지 50 mM 소디움시아노보로하이드라이드와 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.

[328] 한편, 상기 면역글로불린 Fc는 서열번호 123의 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 결합이 형성된 것이다.

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

[330] 여기서, 서열번호 21의 삼중활성체 및 면역글로불린 Fc가 PEG를 통하여 연결된 결합체를, '서열번호 21과 면역글로불린 Fc를 포함하는 결합체' 혹은 '서열번호 21의 지속형 결합체'로 명명하였고, 이들은 본원에서 혼용되어 사용될 수 있다.

[331] 여기서, 서열번호 22의 삼중활성체 및 면역글로불린 Fc가 PEG를 통하여 연결된 결합체를, '서열번호 22와 면역글로불린 Fc를 포함하는 결합체' 혹은 '서열번호 22의 지속형 결합체'로 명명하였고, 이들은 본원에서 혼용되어 사용될 수 있다.

[332] 여기서, 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.

[333] 여기서, 서열번호 43의 삼중활성체 및 면역글로불린 Fc가 PEG를 통하여 연결된 결합체를, '서열번호 43과 면역글로불린 Fc를 포함하는 결합체' 혹은 '서열번호 43의 지속형 결합체'로 명명하였고, 이들은 본원에서 혼용되어 사용될 수 있다

[334] 여기서, 서열번호 50의 삼중활성체 및 면역글로불린 Fc가 PEG를 통하여 연결된 결합체를, '서열번호 50과 면역글로불린 Fc를 포함하는 결합체' 혹은 '서열번호 50의 지속형 결합체'로 명명하였고, 이들은 본원에서 혼용되어 사용될 수 있다.

[335] 여기서, 서열번호 77의 삼중활성체 및 면역글로불린 Fc가 PEG를 통하여 연결된 결합체를, '서열번호 77와 면역글로불린 Fc를 포함하는 결합체' 혹은 '서열번호 77의 지속형 결합체'로 명명하였고, 이들은 본원에서 혼용되어 사용될 수 있다

[336] 여기서, 서열번호 96의 삼중활성체 및 면역글로불린 Fc가 PEG를 통하여 연결된 결합체를, '서열번호 96과 면역글로불린 Fc를 포함하는 결합체' 혹은 '서열번호 96의 지속형 결합체'로 명명하였고, 이들은 본원에서 혼용되어 사용될 수 있다.

[337]

[338] **실험예 1: 삼중 활성체 및 이의 지속형 결합체의 *in vitro* 활성 측정**

[339] 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.

[340] 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.

[341] 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㎕씩 상기 세포에 첨가한 다음, cAMP 항체가 포함된 완충액을 5㎕씩 추가 한 뒤 15분 동안 상온에서 배양하였다. 그런 다음 세포용해완충액(cell lysis buffer)이 포함된 detection mix를 10㎕씩 가하여 세포를 용해시키고, 90분 동안 상온에서 반응시켰다. 상기 반응이 완료된 세포용해물을 LANCE cAMP kit (PerkinElmer, USA)에 적용하여 축적된 cAMP를 통해 EC_{50}값을 산출한 후, 상호 비교하였다. 인간 GLP-1 대비 상대 역가는 하기 표 2와 표 3에 나타내었다.

[342] 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㎕씩 상기 세포에 첨가한 다음, cAMP 항체가 포함된 완충액을 5㎕씩 추가 한 뒤 15분 동안 상온에서 배양하였다. 그런 다음 세포용해완충액(cell lysis buffer)이 포함된 detection mix를 10㎕씩 가하여 세포를 용해시키고, 90분 동안 상온에서 반응시켰다. 상기 반응이 완료된 세포용해물을 LANCE cAMP kit (PerkinElmer, USA)에 적용하여 축적된 cAMP를 통해 EC_{50}값을 산출한 후, 상호 비교하였다. 인간 GCG 대비 상대 역가는 하기 표2와 표3에 나타내었다.

[343] 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㎕씩 상기 세포에 첨가한 다음, cAMP 항체가 포함된 완충액을 5㎕씩 추가 한 뒤 15분 동안 상온에서 배양하였다. 그런 다음 세포용해완충액(cell lysis buffer)이 포함된 detection mix를 10㎕씩 가하여 세포를 용해시키고, 90분 동안 상온에서 반응시켰다. 상기 반응이 완료된 세포용해물을 LANCE cAMP kit (PerkinElmer, USA)에 적용하여 축적된 cAMP를 통해 EC_{50}값을 산출한 후, 상호 비교하였다. 인간 GIP 대비 상대 역가는 하기 표 2와 표 3에 나타내었다.

[344]

[345] [표2]
삼중활성체의 상대적 역가 비율

	천연형 펩타이드 대비in vitro 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

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
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
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

[346] [표3]
삼중활성체 지속형 결합체의 상대적 역가 비율

지속형 결합체	천연형 펩타이드 대비 in vitro 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

[347] 상기에서 제조한 신규한 삼중활성체 지속형 결합체는 GLP-1 수용체, GIP 수용체 및 글루카곤 수용체를 모두 활성화시킬 수 있는 삼중 활성체로 기능을 가지는 바, 비만 또는 비알코올성 지방간 질환 환자의 치료제 물질로 이용될 수 있다.

[348]

[349] **실험예 2: 삼중 활성체 지속형 결합체의 in vivo 활성 측정**

[350] 비만 동물 모델로 널리 사용되고 있는 고지방 식이유도 비만 마우스를 이 연구를 위해 사용하였다. 마우스의 체중은 투여 전에 약 50~60g이었다. 연구

기간 동안 마우스는 군별로 수용되었고 물에 자유롭게 접근하도록 하였다. 빛은 6 AM에서 6 PM까지 꺼두었다.

[351] 고지방 식이 급식된 시험군은, 군 1: 부형제 (2일 1회 주사)-고지방 식이유도 비만 마우스 대조군, 군 2: 서열번호 42의 지속형 결합체 1.44 nmol/kg (2일 1회 주사), 군 3: 서열번호 42의 지속형 결합체 2.88 nmol/kg (2일 1회 주사), 군 4: 서열번호 43의 지속형 결합체 1.44 nmol/kg (2일 1회 주사), 군 5: 서열번호 43의 지속형 결합체 2.88 nmol/kg (2일 1회 주사), 군 6: 서열번호 50의 지속형 결합체 1.44 nmol/kg (2일 1회 주사), 군 7: 서열번호 50의 지속형 결합체 2.88 nmol/kg (2일 1회 주사)가 있다. 실험은 28일째 종료하였으며, 실험이 진행되는 동안 2일 단위로 각 군에 해당하는 마우스의 체중변화를 측정하였다. 실험이 종료된 후, 부검을 통해 장간막 지방량을 측정하였다. 통계 처리는 1원 ANOVA를 사용하여 고지방 식이유도 비만 마우스 대조군 및 시험군 사이를 비교하였다.

[352] 체중 변화를 측정한 결과, 도 1에서 확인할 수 있듯이, 투여 후 28일이 경과한 시점에서 서열번호 42, 43, 및 50의 지속형 결합체의 고용량 투여군들 모두 투여 개시 전에 비해 각각 -56.9%, -57.0% 그리고 -63.5%의 체중 감소를 보였다(***p <0.001 vs. 부형제 대조군 by one-way ANOVA).

[353] 또한, 장간막 지방량을 측정한 결과, 도 2에서 확인할 수 있듯이, 투여 후 28일이 경과한 시점에서 서열번호 42, 43, 및 50의 지속형 결합체의 고용량 투여군들 모두 부형제 투여군과의 비교에서 체내 지방이 유의적으로 감소하는 것이 확인되었다(***p <0.001 vs. 부형제 대조군 by one-way ANOVA).

[354]

[355] **실험예 3: 삼중 활성체 지속형 결합체의 비만 환자에 대한 안정성 및 내약성 실험**

[356] 서열번호 42의 지속형 결합체를 0.01 내지 0.12 mg/kg으로 비만 환자에게 1회 피하투여 하였으며 투여 후 한달 간 안정성 및 내약성에 대해 확인하였고, 그 결과를 도 3 내지 도 10에 나타내었다.

[357] 18세 이상 65세 미만, BMI가 30 kg/m^2 이상 40 kg/m^2 이하, HbA1c가 6.5% 미만인 비만 환자를 모집하였으며 총 41명의 비만 환자가 모집되었다. 비만 환자 41명의 평균 나이는 45.7세, 평균 BMI는 33.6 kg/m^2 이며, 남성비율은 51.2%으로, 상기 비만 환자의 구체적인 정보는 도 3과 같다. 도 3에 나타난 바와 같이, 0.08 mg/kg 투여군의 비만 환자(7명)를 제외하고는 0.01 mg/kg, 0.02 mg/kg, 0.04 mg/kg 및 0.12 mg/kg 투여군의 비만 환자는 각각 6명이다. 플라시보(placebo)군의 비만 환자에게는 면역글로불린 Fc와 PEG만 연결된 결합체(서열번호 42의 삼중활성체는 포함하지 않음)를 포함하는 멸균된 무색의 용액을 투여하였으며, 0.01 mg/kg, 0.02 mg/kg, 0.04 mg/kg, 0.08 mg/kg 및 0.12 mg/kg 투여군 각각 2명씩 총 10명의 비만 환자를 대상으로 투여하였다.

[358] 투여 2일전부터 투여 7일차까지는 병원 입원 하에 비만 환자의 상태를 확인하였으며, 10일차 및 17일차에는 외래 진료로 관찰하였고, 그

이후(30일차)로 후속 관찰을 지속하였다.

[359] 임상시험 매뉴얼에 따라 투여 1일차(투여시로부터 4시간, 8시간 및 12시간 후), 2일차(24시간 및 36시간 후), 3일차(48시간 후), 4일차(72시간 후), 5일차(96시간 후), 7일차(144시간 후), 10일차(216시간 후), 17일차(384시간 후) 및 30일차(696시간 후)의 비만 환자의 혈액샘플 2mL을 채취하여 서열번호 42의 지속형 결합체의 혈중 농도를 측정하였고, 그 결과를 도 4에 나타내었다.

[360] 도 5는 서열번호 42의 지속형 결합체를 투여하였을 때의 C_{max} (ng/mL), T_{max} (hr), $T_{1/2}$ (hr), $AUC_{0\text{-}inf}$ (ng/mL·h), Dose-normalized C_{max} (ng/mL/mg) 및 Dose-normalized AUC_{inf} (ng/mL·h/mg)를 나타내었다.

[361] 투여 후 한달 간 이상반응(TEAE, treatment emergent adverse events)을 관찰하였으며, 그 결과를 도 6에 나타내었다.

[362] 투여 후 4일간 지속적으로 혈압을 측정(24-hour ABPM, ambulatory blood pressure monitoring)하였으며, 도 7에 심박수(HR), 수축기 혈압(SPB), 확장기 혈압(DBP), 심근산소소모량(RPP, Rate pressure product)을 나타내었다.

[363] 임상시험 매뉴얼에 따라 투여 전(1일 전), 7일차(144시간 후) 및 30일차(696시간 후)의 비만 환자의 혈액샘플 12mL을 채취하여 면역원성(Immunogenicity: ADAbs, Anti-drug antibodies; nAbs, neutralizing antibodies; anti-PEG, anti-polyethylene glycol antibodies)을 측정하였고, 그 결과를 도 8 내지 도 10에 나타내었다.

[364] 상기 결과에 따라, 비만환자에게 주 1회 0.5 내지 8 mg 비경구(피하) 투여 시 안정성 및 내약성이 확보되는 것을 확인하였다.

[365]

[366] **실험예 4: 삼중 활성체 지속형 결합체의 비알코올성 지방간 질환 환자에 대한 안정성, 내약성 및 효능 실험**

[367] 서열번호 42의 지속형 결합체를 주 1회 0.01 내지 0.08 mg/kg으로 비알코올성 지방간 질환 환자에게 12주간 피하투여 하였으며, 그 결과를 도 11 내지 17에 나타내었다.

[368] 구체적으로, BMI가 30 kg/m^2 이상, 허리 둘레 57 인치 이하, 공복 혈당(Fasting Plasma Glucose) 7 mmol/L (126 mg/dL) 이하, HbA1c 6.5% 미만, FibroScan에 따른 지방간측정기술(CAP, Controlled Attenuation Parameter) 300 dB/m 이상, MRI-PDFF에 따른 지방간이 10% 이상인 비알코올성 지방간 질환(NAFLD) 환자를 모집하였으며 총 66명의 비알코올성 지방간 질환 환자가 모집되었다. 비알코올성 지방간 질환 환자 66명의 여성비율은 50%, 평균나이는 46세(SD: 11.4), BM1는 36 kg/m^2(SD: 4.96), MRI-PDFF에 따른 지방간 19.2%(SD: 6.5)로, 상기 비알코올성 지방간 질환 환자의 구체적인 정보는 도 11과 같다.

[369] 도 11에 나타난 바와 같이, 0.01 mg/kg 투여군 9명, 0.02 mg/kg 투여군 10명, 0.04 mg/kg 투여군 12명, 0.06 mg/kg 투여군 9명, 0.08 mg/kg 투여군 9명의 비알코올성 지방간 질환 환자에게 서열번호 42의 지속형 결합체를 12주간 주1회

피하투여하였다. 플라시보(placebo)군의 비알코올성 지방간 질환 환자에게는 면역글로불린 Fc와 PEG만 연결된 결합체(서열번호 42의 삼중활성체는 포함하지 않음)를 포함하는 멸균된 무색의 용액을 투여하였으며, 0.01 mg/kg, 0.02 mg/kg, 0.04 mg/kg, 0.06 mg/kg 및 0.08 mg/kg 투여군 각각 3명씩 총 15명의 비알코올성 지방간 질환 환자를 대상으로 12주간 주 1회 피하투여하였다.

[370] 최초 투여 2일전부터 2회차 투여일(최초 투여일 기준 8일차)까지는 병원 입원 하에 투여 및 비알코올성 지방간 질환 환자의 상태를 확인하였으며, 3회차 투여(최초 투여일 기준 15일차), 4회차 투여(최초 투여일 기준 22일), 5회차 투여(최초 투여일 기준 29일), 6회차 투여(최초 투여일 기준 36일), 7회차 투여(최초 투여일 기준 43일), 8회차 투여(최초 투여일 기준 50일), 9회차 투여(최초 투여일 기준 57일), 10회차 투여(최초 투여일 기준 64일) 및 11회차 투여(최초 투여일 기준 71일)는 외래 진료로 진행하였으며, 병원 입원 하에 12회차 투여(최초 투여일 기준 78일)와 함께 환자의 상태를 확인하였다. 최초 투여일 기준 13주차 및 15주차에 외래 진료로 환자의 상태를 다시 한번 확인하였고, 이후 2주간 계속 추적 관찰하였다.

[371] 임상시험 매뉴얼에 따라 투여 전, 투여 1주차(최초 투여시로부터 8시간, 24시간, 48시간 및 72시간 후), 투여 2주차(2차 투여 전 및 2차 투여 후 48시간 후), 투여 3주차(3차 투여 전으로 최초 투여 기준 15일차), 투여 4주차(4차 투여 전으로 최초 투여 기준 22일차), 투여 5주차(5차 투여 전으로 최초 투여 기준 29일차), 투여 6주차(6차 투여 전으로 최초 투여 기준 36일차), 투여 8주차(8차 투여 전으로 최초 투여 기준 50일차), 투여 9주차(9차 투여 전으로 최초 투여 기준 57일차), 투여 12주차(12차 투여 전, 12차 투여시로부터 48시간 후 및 72시간 후), 12차 투여시로부터 168시간 후(최초 투여 기준 85일차), 12차 투여시로부터 504시간 후(최초 투여 기준 99일차) 및 12차 투여시로부터 840시간 후(최초 투여 기준 113일차)의 비알코올성 지방간 질환 환자의 혈액샘플 2mL을 채취하여 서열번호 42의 지속형 결합체의 혈중 농도를 측정하였고, 그 결과를 도 12에 나타내었다.

[372] 도 13은 서열번호 42의 지속형 결합체를 투여하였을 때의 C_{max} (ng/mL), T_{max} (hr), $T_{1/2}$ (hr) 및 AUC_{0-168} (ng/mL·h)를 최초 투여 1주차 및 12주차에 확인하여 나타내었다.

[373] 최초 투여 후 17주차까지 이상반응(TEAE, treatment emergent adverse events)을 관찰하였으며, 그 결과를 도 14에 나타내었다.

[374] MRI 기반 이미징 기술을 이용한 지방 측정방법(MRI-PDFF, Magnetic resonance imaging-derived proton density fat fraction)을 통해 비알코올성 지방간 질환 환자의 간 지방 함유량(liver fat content) 및 간지방증(hepatic steatosis) 정도를 최초 투여 기준 8주차 및 12주차에 확인하였으며, 그 결과를 도 15 내지 도 17에 나타내었다.

[375] 상기 실험을 통해 본 발명에 따른 삼중 활성체 지속형 결합체를 비알코올성

지방간 질환 환자에게 투여함으로써 간내 지방량을 감소시켜 비알코올성 지방간 질환에 대한 치료 효과를 얻을 수 있음을 확인하였다.

[376] 상기 결과에 따라, 비알코올성 지방간 질환 환자에게 주 1회 0.5 내지 8 mg 비경구(피하) 투여 시 안정성, 내약성 및 효능이 확보되는 것을 확인하였다.

[377]

[378] **실험예 5: 삼중 활성체 지속형 결합체의 비알코올성 지방간 질환 환자에 대한 안정성, 내약성 및 효능 실험**

[379] 실험예 4의 결과에 따라 비알코올성 지방간 질환 환자의 주 1회 2mg 투여군, 주 1회 4mg 투여군 및 주 1회 6mg 투여군에 대한 실험예 5의 시험을 설계하여 그 결과를 확인하였다.

[380] 상기 실험예 4에서 효과를 확인한 서열번호 42의 지속형 결합체를 주 1회 2 내지 6 mg 으로 비알코올성 지방간 질환 환자에게 52주간 피하투여 하였다.

[381] 18세 이상 70세 미만, BMI가 18 kg/m^2 이상, 간섬유증(섬유화 F1-F3 단계)과 함께 비경변성의 비알코올성 지방간염 (non-alcoholic steatohepatitis, NASH) 진단을 받고, MRI-PDFF에 따른 지방간이 8% 이상인 비알코올성 지방간 질환 환자를 모집하였다.

[382] 구체적으로, 다음과 같은 3개의 투여군과 플라시보군으로 분류하여 52주간 주 1회 피하투여를 하였으며 최종 투여 이후 4주간 안정성(이상 반응)에 대한 추적 관찰을 진행하였다:

[383] - 주 1회 2mg 투여군

[384] - 주 1회 4mg 투여군

[385] - 주 1회 6mg 투여군

[386]

[387] MRI 기반 이미징 기술을 이용한 지방 측정방법(MRI-PDFF, Magnetic resonance imaging-derived proton density fat fraction)을 통해 비알코올성 지방간 질환 환자의 간 지방 함유량(liver fat content) 및 간지방증(hepatic steatosis) 정도를 최초 투여 기준 26주차 및 52주차에 확인하였다.

[388] 최초 투여 기준 14주차, 26주차, 38주차 및 52주차에 간섬유화 스캔(Fibroscan, echosens)을 진행하였으며, 혈중 지질 농도(총 콜레스테롤, LDL-C, HDL-C, VLDL-C, 트리글리세리드, 유리 지방산), NASH 바이오마커(Cytokeratin-18 M30/65 fragments, Enhanced Liver Fibrosis Score, Pro-C3, Non-invasive score 4, Fibrosis-4 index, NAFLD Fibrosis Score), PK/PD 분석 및 아래에 기재된 글루코스 대사 파라미터(Glucose Metabolism Parameter) 또한 최초 투여 기준 14주차, 26주차, 38주차 및 52주차에 확인하였다.

[389] <글루코스 대사 파라미터>

[390] - FPG(Fasting Plasma Glucose)

[391] - 공복 인슐린(Fasting Insulin)

[392] - 공복 C-펩타이드(Fasting C-Peptide)

[393] - HbA1c

[394] - 인슐린 저항성: HOMA-IR(Homeostatic Model Assessment For Insulin Resistance)

[395] - 인슐린 분비: HOMA-B(Homeostatic Model Assessment For Insulin Secretion)

[396]

[397] 비알코올성 지방간 질환 환자의 개선 정도를 평가하기 위하여 간조직 검사(Liver Biopsy)를 최초 투여 기준 52주차에 진행하였으며, 개선 정도의 평가는 아래 표 4의 NAS 점수(NAFLD activity score, 0~8점) 및 섬유화 점수(fibrosis score, 0~4점)를 이용하였다.

[398]

[399]

[400] [표4]

항목	점수	내용
간 지방 축적 분포(steatosis grade), 0~3점	0점	<5%
	1점	5~33%
	2점	>33~66%
	3점	>66%
소엽염증(Lobular inflammation)의 개수, 0~3점	0점	No foci
	1점	<2 foci per 200xfield
	2점	2~4 foci per 200xfield
	3점	>4 foci per 200xfield
간세포 풍선화 변성(Ballooning), 0~2점	0점	None
	1점	Few balloon cells
	2점	Many cells/prominent ballooning

[401] 섬유화 점수는 혈관 주위 섬유증(Perisinusoidal Chicken-Wire Fibrosis), 문맥주변부 섬유증(Portal Fibrosis) 및 연결된 섬유증(Bridging Fibrosis)에 대해 0~4점으로 점수화하여 평가하였다.

[402]

[403] 본 발명에서, 아래 3가지 항목 중 1개 이상의 항목을 충족하는 경우에는 비알코올성 지방간 질환이 개선된 것으로 볼 수 있다.

[404]

[405] - NAS 점수가 2점 이상 감소된 경우

[406] - 간세포 풍선화 변성의 점수가 0점이거나 소엽염증의 개수 점수가 0~1점인 경우

[407] - 섬유화 점수가 1점 이상 개선된 경우

[408]

[409] 안정성, 내약성 및 효능실험 결과에 따라, 비알코올성 지방간 질환 환자에게 주 1회 0.5 내지 8 mg 비경구 투여 시 안정성, 내약성 및 효능이 확보되며, 바람직하게 주 1회 2 내지 6 mg 투여가 제안된다.

[410]

[411] 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, GLP-1(Glucagon-like peptide-1) 및 GIP(Glucose-dependent insuliontropic polypeptide) 수용체 모두에 활성을 갖는 하기 화학식 1로 표시되는 삼중 활성체 지속형 결합체를 유효성분으로 포함하는 조성물로서, 상기 삼중 활성체 지속형 결합체는 1주에 1회 비만 또는 비알코올성 지방간 질환 환자에게 0.5 내지 8 mg 비경구 투여하는 것을 특징으로 하는 비만 또는 비알코올성 지방간 질환 예방 또는 치료용 약학 조성물:

[화학식 1]

X - L - F

여기서, X는, 서열번호 1 내지 102 중 어느 하나의 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 2] 제1항에 있어서, 상기 삼중 활성체 지속형 결합체는 1주에 1회 비만 또는 비알코올성 지방간 질환 환자에게 2 내지 6 mg 비경구 투여하는 것을 특징으로 하는 약학 조성물.

[청구항 3] 제1항에 있어서, 상기 비경구 투여는 피하 투여인 것을 특징으로 하는 약학 조성물.

[청구항 4] 제1항에 있어서, 상기 비만환자는 BMI(Body mass index)가 23 kg/m^2 이상인 것을 특징으로 하는 약학 조성물.

[청구항 5] 제1항에 있어서, 상기 비알코올성 지방간 질환 환자는 자기공명영상-양자밀도 지방비율(MRI-PDFF)에 따른 지방간이 8% 이상인 것을 특징으로 하는 약학 조성물.

[청구항 6] 제1항에 있어서, 상기 약학 조성물이 투여된 개체는 하기 (a) 내지 (f) 중 하나 이상의 특성을 나타내는 것인 약학 조성물:

(a) 체중 감소;

(b) 혈압 감소;

(c) 간의 내장 지방량 감소;

(d) NAS 점수 감소;

(e) 간세포 풍선화 변성 또는 소엽염증의 개수 감소; 및

(f) 섬유화 점수 감소.

[청구항 7] 제1항에 있어서, 상기 약학 조성물은 팔, 허벅지, 또는 복부에 투여되는 것인 약학 조성물.

[청구항 8] 제1항에 있어서, 상기 F는 IgG Fc 영역인 것을 특징으로 하는 약학 조성물.

[청구항 9] 제1항에 있어서, 상기 지속형 결합체는 상기 Fc 영역이 두 개의

폴리펩타이드 사슬로 이루어진 이량체 형태이며, 상기 지속형 결합체 내의 Fc 이량체의 두 폴리펩타이드 사슬 중 어느 하나에만 X 펩타이드가 연결되어 있는 구조인 것을 특징으로 하는 약학 조성물.

[청구항 10] 제9항에 있어서, 상기 Fc 이량체의 폴리펩타이드 사슬은 서열번호 123의 아미노산 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 약학 조성물.

[청구항 11] 제1항에 있어서, 상기 X는 서열번호 21, 22, 27, 30-32, 34, 36, 37, 42, 43, 50 내지 56, 58, 64 내지 80, 83, 86, 91, 93, 및 96 내지 102로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하는 약학 조성물.

[청구항 12] 제1항에 있어서, 상기 X는 21, 22, 31, 32, 37, 42, 43, 50, 53, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 75, 76, 77, 79, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 및 102로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하는 약학 조성물.

[청구항 13] 제1항에 있어서, 상기 X는 서열번호 42, 43 및 50으로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하는 약학 조성물.

[청구항 14] 제1항에 있어서, 상기 L은 1 내지 20 kDa 분자량을 갖는 폴리에틸렌 글리콜인 약학 조성물.

[청구항 15] 제1항에 있어서, 상기 비알코올성 지방간 질환은 비알코올성 지방간 (non-alcoholic fatty liver, NAFL), 비알코올성지방간염 (non-acoholic steatohepatitis, NASH), 간섬유증(liver fibrosis), 간경변 (cirrhosis), 및 이들의 조합으로 구성된 군으로부터 선택되는 것인 약학 조성물.