

명세서

발명의 명칭: 글루카곤 유도체, 이의 결합체, 및 이를 포함하는 조성물, 및 이의 치료적 용도

기술분야

- [1] 본 발명은 글루카곤 유도체, 이의 결합체, 및 이를 포함하는 조성물, 및 이의 용도, 특히 대사증후군, 저혈당증 및 선천성 고인슐린증에 대한 치료적 용도에 관한 것이다.

배경기술

- [2] 최근 경제적 발전과 식습관 등의 변화에 따라 비만, 고지혈증, 고혈압, 동맥경화, 고인슐린혈증, 당뇨병 또는 간질환 등 다양한 질환을 포함하는 대사증후군 관련 질환의 발병이 급증하고 있는 상황이다. 이와 같은 질환들은 각각 발생하기도 하지만 일반적으로는 서로 밀접한 관련을 맺고 있으면서 여러 증상들을 동반하여 발생하는 경우가 대부분이다.
- [3] 과체중 및 비만은 혈압과 콜레스테롤 수치를 증가시켜서 심장 질환, 당뇨, 관절염 등의 각종 질환의 발병 또는 악화의 원인이 되고 있다. 또한, 과체중 및 비만은 성인뿐만 아니라, 어린이나 청소년에서도 동맥경화, 고혈압, 고지혈증 또는 심장질환 등의 발병률을 증가시키는 주요한 요인이 되고 있다.
- [4] 비만은 의외로 치료가 용이하지 않은데, 그 이유는 비만이 식욕조절 및 에너지 대사의 작용기작이 관련된 복잡한 질환이기 때문이다. 따라서, 비만을 치료하기 위하여는, 환자 자신의 노력뿐만 아니라 식욕조절 및 에너지 대사와 관련된 비정상적인 작용기작을 치료하는 방법이 동시에 수행되어야만 하므로, 상기 비정상적인 작용기작을 치료할 수 있는 의약을 개발하려는 노력이 계속되고 있다.
- [5] 상술한 노력의 결과로서, 리모나반트(Rimonabant, Sanofi-Aventis), 시부트라민(Sibutramin, Abbott), 콘트라베(Contrave, Takeda), 오르리스타트(Orlistat, Roche) 등의 비만 치료제가 개발되었으나, 이들은 치명적인 부작용을 나타내거나 비만 치료효과가 미비하다는 단점이 있었다. 예를 들어, 리모나반트는 중추신경장애 부작용을 나타내고, 시부트라민과 콘트라베는 심혈관 부작용을 나타내며, 오르리스타트는 1년 복용 시 약 4 kg의 체중감소 효력이 나타내는 것에 불과하다고 보고되었다.
- [6] 한편, 글루카곤은 약물 치료 또는 질병, 호르몬이나 효소 결핍 등의 원인으로 혈당이 떨어지기 시작하면 췌장에서 생산된다. 글루카곤은 간에서 글리코젠을 분해하여 글루코스를 방출하도록 신호하고, 혈당 수준을 정상 수준까지 높이는 역할을 한다. 또한, 글루카곤은 저혈당증을 치료하는 데 효과적인 것으로 알려졌다. 글루카곤의 저혈당 치료 효과는 간 글리코젠의 글루코스로의 분해(글리코젠 분해)를 자극하거나, 간으로부터 증가된 글루코스 유출을 초래하는

아미노산 전구체로부터 유도된 글루코스 생성 (글루코스 생합성)을 증가시킨 결과이다.

- [7] 뿐만 아니라, 글루카곤은 혈당 상승효과 이외에 식욕억제 및 지방세포의 호르몬 민감 리파제(hormone-sensitive lipase)를 활성화시켜 지방 분해를 촉진하여 항비만 효과를 나타냄이 보고되었다. 그러나, 글루카곤은 낮은 용해도와 중성 pH에서의 침전으로 인해 치료제로서 그 사용이 제한되어 왔다.
- [8] 따라서 물성이 개선된 글루카곤은 심각한 저혈당의 치료나 지방분해와 간에서의 베타 산화(β -oxydation) 증가 등 글루카곤 단독으로 비알콜성지방간(NASH) 혹은 이상 지혈증(dyslipidemia)등의 치료에 유용하게 사용될 수 있다.
- [9] 이러한 글루카곤의 유도체 중의 하나인 글루카곤-유사 펩타이드-1(GLP-1)은 당뇨 환자의 고혈당증을 감소시키는 치료제로 개발 중인 물질이다. GLP-1은 인슐린 합성과 분비 촉진, 글루카곤의 분비 저해, 위공복 억제, 글루코스 사용 증진과 더불어 음식물 섭취를 저해하는 기능을 가진다.
- [10] GLP-1과 대략 50%의 아미노산 상동성을 가지는 도마뱀 독액(lizard venom)으로부터 만들어지는 엑센딘-4(exendin-4) 또한 GLP-1 수용체를 활성화시켜 당뇨 환자의 고혈당증을 감소시키는 것으로 알려져 있다 (J Biol Chem. 1992 Apr 15;267(11):7402-5.). 그러나, 상기 GLP-1 또는 엑센딘-4를 포함하는 비만 치료용 의약품은 구토와 메스꺼움의 부작용을 발생시킨다는 문제점을 나타내는 것으로 보고되었다.
- [11] 이에, 상기 GLP-1의 대안으로서, GLP-1과 글루카곤 두 펩타이드의 수용체에 모두 결합할 수 있는 옥신토모듈린(oxyntomodulin)이 각광받고 있다. 상기 옥신토모듈린은 글루카곤의 전구체인 프리-글루카곤(pre-glucagon)으로부터 만들어지는 펩타이드로서, GLP-1의 음식물 섭취 저해, 포만감 증진 효력과 글루카곤의 지방분해 기능을 보여 항-비만 치료제로서의 가능성을 높이고 있다.
- [12] 그러나, 옥신토모듈린 또는 이의 유도체는 생체 내에서 반감기가 짧은 반면 낮은 약효로 인해 매일 과량의 약물을 투여해야 하는 심각한 단점을 가지고 있다. 또한 하나의 펩타이드에 GLP-1과 글루카곤 활성이 모두 존재하는 경우 그 활성비가 고정되어 다양한 비율을 갖는 이중 작용제의 사용이 곤란하다. 따라서 GLP-1과 글루카곤의 함량을 조절하여 다양한 활성 비율로 사용할 수 있는 병용 치료가 더 효과적일 수 있다. 다만, 이를 위해서는 중성 pH에서 응집되고 시간이 지남에 따라 침전되는 저조한 용해도를 보이는 글루카곤의 물성을 개선하는 것이 요구된다.
- [13] 한편, 선천성 고인슐린증 (congenital hyperinsulnism)은 신생아와 소아에서 발생하는 심각하고 지속적인 저혈당을 일으키는 가장 흔한 원인 질환 중 하나이다. 인슐린은 인체 내에서 혈당을 조절하는 호르몬으로, 음식물 섭취 등으로 혈당이 상승할 경우 혈당을 낮추는 역할을 하는데 선천성 고인슐린증 환자에서는 이러한 조절 역할을 하지 못하고 혈당에 관계없이 췌장에서

- 인슐린을 분비한다. 그 결과 환자들은 저혈당에 빠지게 된다.
- [14] 저혈당이 발생하면 뇌세포가 주로 사용하는 포도당, 케톤, 젖당 등을 유지하지 못하며, 체내의 단백질이나 지방으로부터의 에너지 공급을 차단하여 뇌세포의 손상을 입게 되고 그 결과 경련질환, 학습장애, 뇌성마비, 실명, 심하게는 사망에도 이르게 된다.
- [15] 그 원인의 한가지로는 일시적으로 과다한 인슐린 분비로 인해 저혈당이 발생할 수 있다. 또한 태아절박가사 (fetal distress)를 겪은 영아에서도 저혈당이 발생한다. 인슐린 이상 분비의 원인은 뚜렷하지 않지만 이런 경우에는 며칠에서 몇 달 내에 호전이 된다. 당뇨가 있던 산모에게서 당 조절이 잘 되지 않을 경우에도 일과성으로 저혈당이 발생할 수 있으나 수유가 잘 진행되어 저혈당이 사라지면 다시 재발하지는 않는다. 또 다른 원인으로는 몇가지 유전적 결함에 따른 지속성 고인슐린증이다. 유전적 결함에 의한 고인슐린증의 원인으로는 11p15.1 염색체에 있는 SUR 또는 Kir6.2 유전자의 돌연변이, 7p15-p13 염색체에 있는 GK (glucokinase) 유전자 돌연변이로 GK 활성도가 증가, GDH (Glutamate dehydrogenase) 유전자 돌연변이로 GDH가 활성화 되고 이로 인하여 베타 섬세포 내 ATP가 증가한다는 등이 보고되었다.
- [16] 따라서, 저혈당에 대한 즉각적인 치료가 뇌손상 예방을 위해 중요하다. 저혈당은 입으로 탄수화물을 함유한 음료를 마심으로써 치료될 수 있으나 심할 경우 정맥으로 포도당을 주입하거나 글루카곤을 주사해야 한다. 치료의 목표는 소아가 정상적인 식생활 주기 속에서 약간의 안전장치로도 지낼 수 있게 하는 것이다. 예를 들어 1세 영아의 경우 밤에 10-12시간 동안 먹지 않고 자기 때문에 적어도 14-15시간 동안 약물의 도움을 받으며 금식을 유지할 수 있게 하는 것이다.
- [17] 약물로는 디아족사이드 (diazoxide), 옥트레오타이드 (octreotide), 글루카곤 등이 이용된다. 디아족사이드는 하루 2~3회 경구 복용을 하며, KATP 통로 (ATP dependent K⁺channel)에 작용하여 인슐린 분비를 억제하므로 GK 고인슐린증이나 GDH 고인슐린증에서는 효과를 볼 수 있지만, 상염색체 열성 KATP 통로 이상에 의한 고인슐린증에서는 반응이 없는 경우가 많다. 옥트레오타이드는 주사제제로 피하주사를 통해 투여하는데, 처음에는 약물에 반응을 보이다가 시간이 지나면 효과가 떨어지는 경우가 있다. 글루카곤은 간에서의 당 배출을 촉진 시키는 작용을 하며 피하주사나 정맥주사로 투여하게 되는데, 응급상황에 경구 섭취를 할 수 없는 경우 사용하는 것으로 알려져 있다.
- [18] 이 중 글루카곤은 낮은 용해도와 중성 pH에서의 침전에 의해 현재는 동결제형으로 사용되어 사용전 용매에 녹여서 사용해야 하는 불편함이 있으며, 더욱이 짧은 반감기로 인해 장기 치료가 필요한 선천성 고인슐린증 치료제로 사용시 잦은 투여로 인해 그 사용이 제한되어 왔다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [19] 본 발명의 하나의 목적은 글루카곤 유도체 또는 이를 포함하는 결합체를 포함하는 조성물, 구체적으로 선천성 고인슐린증, 저혈당, 또는 대사증후군의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공하는 것이다.
- [20] 본 발명의 다른 목적은 글루카곤 유도체를 제공하는 것이다.
- [21] 본 발명의 다른 목적은 글루카곤 유도체를 코딩하는 분리된 폴리뉴클레오티드, 상기 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터, 및 상기 폴리뉴클레오티드 혹은 벡터를 포함하는 분리된 세포를 제공하는 것이다.
- [22] 본 발명의 다른 목적은 펩타이드 부위 및 상기 펩타이드 부위에 공유결합으로 연결된 생체적합성 물질부를 포함하는 분리된 결합체를 제공하는 것이다.
- [23] 본 발명의 하나의 목적은 글루카곤 유도체 또는 이를 포함하는 결합체를 포함하는 키트, 구체적으로 선천성 고인슐린증, 저혈당, 또는 대사증후군의 예방 또는 치료용 키트를 제공하는 것이다.
- [24] 본 발명의 다른 목적은 상기 글루카곤 유도체, 또는 이를 포함하는 결합체, 또는 이를 포함하는 조성물을 이를 필요로 하는 개체에 투여하는 단계를 포함하는, 선천성 고인슐린증의 예방 또는 치료 방법을 제공하는 것이다.
- [25] 본 발명의 다른 목적은 선천성 고인슐린증의 예방 또는 치료를 위한 약제의 제조에 있어서 상기 글루카곤 유도체, 또는 이를 포함하는 결합체, 또는 이를 포함하는 조성물의 용도를 제공하는 것이다.
- [26] 본 발명의 다른 목적은 상기 글루카곤 유도체, 또는 이를 포함하는 결합체, 또는 이를 포함하는 조성물을 이를 필요로 하는 개체에 투여하는 단계를 포함하는, 저혈당의 예방 또는 치료 방법을 제공하는 것이다.
- [27] 본 발명의 다른 목적은 저혈당의 예방 또는 치료를 위한 약제의 제조에 있어서 상기 글루카곤 유도체, 또는 이를 포함하는 결합체, 또는 이를 포함하는 조성물의 용도를 제공하는 것이다.
- [28] 본 발명의 다른 목적은 글루카곤 유도체 혹은 분리된 결합체, 또는 이를 포함하는 조성물을 이를 필요로 하는 개체에 투여하는 단계를 포함하는, 대사증후군을 예방 또는 치료하는 방법을 제공하는 것이다.
- [29] 본 발명의 다른 목적은 글루카곤 유도체 혹은 분리된 결합체, 혹은 상기 조성물을 대사증후군에 대한 예방 또는 치료용 약제 (혹은 약학적 조성물)의 제조에 사용하는 용도를 제공하는 것이다.

과제 해결 수단

- [30] 본 발명을 구현하는 하나의 양태는 글루카곤 유도체 또는 이를 포함하는 결합체를 포함하는 조성물, 구체적으로 선천성 고인슐린증, 저혈당, 또는 대사증후군의 예방 또는 치료용 약학적 조성물이다.
- [31]
- [32] 하나의 구체예에서, 본 발명은 하기 일반식 1의 아미노산 서열을 포함하는

글루카곤 유도체 펩타이드를 포함하는 조성물, 구체적으로, 선천성 고인슐린증, 저혈당, 또는 대사증후군의 예방 또는 치료용 약학적 조성물에 관한 것이다:

- [33]
- [34] X1-X2-QGTF-X7-SD-X10-S-X12-X13-X14-X15-X16-X17-X18-X19-X20-X21-F-X23-X24-W-L-X27-X28-X29-X30 (일반식 1, 서열번호: 45)
- [35]
- [36] 상기 식에서,
- [37] X1은 히스티딘(H), 데스아미노-히스티딜(desamino-histidyl), 디메틸-히스티딜(N-dimethyl-histidyl), 베타-히드록시 이미다조프로피오닐(beta-hydroxy imidazopropionyl), 4-이미다조아세틸(4-imidazoacetyl), 베타-카르복시 이미다조프로피오닐(beta-carboxy imidazopropionyl), 트립토판(W), 또는 티로신(Y)이거나, 부존재하고;
- [38] X2는 알파-메틸-글루탐산(α -methyl-glutamic acid), Aib(aminoisobutyric acid), D-알라닌, 글리신(G), Sar(N-methylglycine), 세린(S) 또는 D-세린이며;
- [39] X7은 트레오닌(T), 발린(V) 또는 시스테인(C)이고;
- [40] X10은 티로신(Y) 또는 시스테인(C)이고;
- [41] X12는 리신(K) 또는 시스테인(C)이고;
- [42] X13은 티로신(Y) 또는 시스테인(C)이고;
- [43] X14는 류신(L) 또는 시스테인(C)이고;
- [44] X15는 아스파르트산(D), 글루탐산(E) 또는 시스테인(C)이고;
- [45] X16은 글루탐산(E), 아스파르트산(D), 세린(S), 알파-메틸-글루탐산, 또는 시스테인(C)이거나, 부존재하며;
- [46] X17은 아스파르트산(D), 글루타민(Q), 글루탐산(E), 리신(K), 아르기닌(R), 세린(S), 시스테인(C), 또는 발린(V)이거나, 부존재하며;
- [47] X18은 알라닌(A), 아스파르트산(D), 글루탐산(E), 아르기닌(R), 발린(V), 또는 시스테인(C)이거나, 부존재하며;
- [48] X19는 알라닌(A), 아르기닌(R), 세린(S), 발린(V), 또는 시스테인(C)이거나, 부존재하며;
- [49] X20은 리신(K), 히스티딘(H), 글루타민(Q), 아스파르트산(D), 아르기닌(R), 알파-메틸-글루탐산, 또는 시스테인(C)이거나, 부존재하며;
- [50] X21은 아스파르트산(D), 글루탐산(E), 류신(L), 발린(V), 또는 시스테인(C)이거나, 부존재하며;
- [51] X23은 이소류신(I), 발린(V), 또는 아르기닌(R)이거나, 부존재하며;
- [52] X24는 발린(V), 아르기닌(R), 알라닌(A), 시스테인(C), 글루탐산(E), 리신(K), 글루타민(Q), 알파-메틸-글루탐산, 또는 류신(L)이거나, 부존재하며;
- [53] X27은 이소류신(I), 발린(V), 알라닌(A), 리신(K), 메티오닌(M), 글루타민(Q), 또는 아르기닌(R)이거나, 부존재하며;

- [54] X28은 글루타민(Q), 리신(K), 아스파라긴(N), 또는 아르기닌(R)이거나, 부존재하며;
- [55] X29는 리신(K), 알라닌(A), 글리신(G), 또는 트레오닌(T)이거나, 부존재하며;
- [56] X30은 시스테인(C)이거나, 부존재함
- [57] (단, 상기 일반식 1의 아미노산 서열이 서열번호: 1과 동일한 경우는 제외함).
- [58] 하기는 본 발명의 추가 구체예에 해당한다.
- [59] 구체적으로, 앞선 구체예에 따른 약학적 조성물로서,
- [60] 상기 일반식 1에서
- [61] X1이 히스티딘(H), 트립토판(W), 또는 티로신(Y)이거나, 부존재하고;
- [62] X2가 세린(S) 또는 Aib(aminoisobutyric acid)이며;
- [63] X7은 트레오닌(T), 발린(V) 또는 시스테인(C)이고;
- [64] X10은 티로신(Y) 또는 시스테인(C)이고;
- [65] X12는 리신(K) 또는 시스테인(C)이고;
- [66] X13은 티로신(Y) 또는 시스테인(C)이고;
- [67] X14는 류신(L) 또는 시스테인(C)이고;
- [68] X15는 아스파르트산(D), 또는 시스테인(C)이고;
- [69] X16은 글루탐산(E), 세린(S) 또는 시스테인(C)이며;
- [70] X17은 아스파르트산(D), 글루탐산(E), 리신(K), 아르기닌(R), 세린(S), 시스테인(C), 또는 발린(V) 이고;
- [71] X18은 아스파르트산(D), 글루탐산(E), 아르기닌(R), 또는 시스테인(C)이며;
- [72] X19는 알라닌(A), 또는 시스테인(C)이고;
- [73] X20은 글루타민(Q), 아스파르트산(D), 리신(K), 또는 시스테인(C)이며;
- [74] X21은 아스파르트산(D), 글루탐산(E), 류신(L), 발린(V), 또는 시스테인(C)이고;
- [75] X23은 이소류신(I), 발린(V) 또는 아르기닌(R)이며;
- [76] X24는 발린(V), 아르기닌(R), 알라닌(A), 글루탐산(E), 리신(K), 글루타민(Q), 또는 류신(L)이고;
- [77] X27은 이소류신(I), 발린(V), 알라닌(A), 메티오닌(M), 글루타민(Q) 또는 아르기닌(R)이며;
- [78] X28은 글루타민(Q), 리신(K), 아스파라긴(N) 또는 아르기닌(R)이고;
- [79] X29는 트레오닌(T)이며;
- [80] X30은 시스테인(C)이거나, 부존재하는 것을 특징으로 한다.
- [81]
- [82] 앞선 구체예 중 어느 하나에 따른 약학적 조성물로서,
- [83] 상기 일반식 1에서
- [84] X1이 히스티딘(H), 트립토판(W), 또는 티로신(Y)이고;
- [85] X2가 세린(S) 또는 Aib(aminoisobutyric acid)이며;
- [86] X7은 시스테인(C), 트레오닌(T), 또는 발린(V)이고;
- [87] X10은 티로신(Y) 또는 시스테인(C)이며;

- [88] X12는 리신(K) 또는 시스테인(C)이고;
- [89] X13은 티로신(Y) 또는 시스테인(C)이며;
- [90] X14는 류신(L) 또는 시스테인(C)이고;
- [91] X15는 아스파르트산(D), 또는 시스테인(C)이며;
- [92] X16은 글루탐산(E), 세린(S) 또는 시스테인(C)이고;
- [93] X17은 글루탐산(E), 리신(K), 아르기닌(R), 시스테인(C), 또는 발린(V)이며;
- [94] X18은 아르기닌(R), 또는 시스테인(C)이고;
- [95] X19는 알라닌(A), 또는 시스테인(C)이며;
- [96] X20은 글루타민(Q) 또는 리신(K)이고;
- [97] X21은 아스파르트산(D), 글루탐산(E), 발린(V), 또는 시스테인(C)이며;
- [98] X23은 발린(V)이고;
- [99] X24는 발린(V) 또는 글루타민(Q)이며;
- [100] X27는 메티오닌(M)이고;
- [101] X28은 아스파라긴(N) 또는 아르기닌(R)이며;
- [102] X29는 트레오닌(T)이고;
- [103] X30은 시스테인(C)이거나, 부존재하는 것을 특징으로 한다.
- [104]
- [105] 앞선 구체예 중 어느 하나에 따른 약학적 조성물로서,
- [106] 상기 일반식 1에서
- [107] X1이 티로신(Y)이고;
- [108] X2가 Aib(aminoisobutyric acid)이며;
- [109] X7은 시스테인(C), 트레오닌(T), 또는 발린(V)이고;
- [110] X10은 티로신(Y) 또는 시스테인(C)이며;
- [111] X12는 리신(K)이고;
- [112] X13은 티로신(Y) 또는 시스테인(C)이며;
- [113] X14는 류신(L) 또는 시스테인(C)이고;
- [114] X15는 아스파르트산(D), 또는 시스테인(C)이며;
- [115] X16은 글루탐산(E), 세린(S) 또는 시스테인(C)이고;
- [116] X17은 리신(K), 아르기닌(R), 시스테인(C), 또는 발린(V)이며;
- [117] X18은 아르기닌(R), 또는 시스테인(C)이고;
- [118] X19는 알라닌(A), 또는 시스테인(C)이며;
- [119] X20은 글루타민(Q) 또는 리신(K)이고;
- [120] X21은 아스파르트산(D), 글루탐산(E), 또는 시스테인(C)이며;
- [121] X23은 발린(V)이고;
- [122] X24는 글루타민(Q)이며;
- [123] X27는 메티오닌(M)이고;
- [124] X28은 아스파라긴(N) 또는 아르기닌(R)이며;
- [125] X29는 트레오닌(T)이고;

- [126] X30은 시스테인(C)이거나, 부존재하는 것을 특징으로 한다.
- [127]
- [128] 앞선 구체예 중 어느 하나에 따른 약학적 조성물로서,
- [129] 상기 일반식 1에서
- [130] X1이 히스티딘(H), 트립토판(W), 또는 티로신(Y)이거나, 부존재하고;
- [131] X2가 세린(S) 또는 Aib(aminoisobutyric acid)이며;
- [132] X7은 트레오닌(T), 발린(V) 또는 시스테인(C)이고;
- [133] X10은 티로신(Y) 또는 시스테인(C)이며;
- [134] X12는 리신(K) 또는 시스테인(C)이고;
- [135] X13은 티로신(Y) 또는 시스테인(C)이며;
- [136] X14는 류신(L) 또는 시스테인(C)이고;
- [137] X15은 아스파르트산(D), 또는 시스테인(C)이며;
- [138] X16은 글루탐산(E), 세린(S) 또는 시스테인(C)이고;
- [139] X17은 아스파르트산(D), 글루탐산(E), 리신(K), 아르기닌(R), 세린(S),
시스테인(C), 또는 발린(V)이며;
- [140] X18은 아스파르트산(D), 글루탐산(E), 아르기닌(R), 또는 시스테인(C)이고;
- [141] X19는 알라닌(A), 또는 시스테인(C)이며;
- [142] X20은 글루타민(Q), 아스파르트산(D), 또는 리신(K)이고;
- [143] X21은 아스파르트산(D), 또는 글루탐산(E)이며;
- [144] X23은 발린(V)이고;
- [145] X24는 발린(V) 또는 글루타민(Q)이며;
- [146] X27는 이소류신(I) 또는 메티오닌(M)이고;
- [147] X28은 아스파라긴(N) 또는 아르기닌(R)이며;
- [148] X29는 트레오닌(T)이고;
- [149] X30은 시스테인(C)이거나, 부존재하는 것을 특징으로 한다.
- [150]
- [151] 앞선 구체예 중 어느 하나에 따른 약학적 조성물로서,
- [152] 상기 일반식 1에서
- [153] X1이 티로신(Y)이고;
- [154] X2가 Aib(aminoisobutyric acid)이며;
- [155] X7은 트레오닌(T)이고;
- [156] X10은 티로신(Y)이며;
- [157] X12는 리신(K)이고;
- [158] X13은 티로신(Y)이며;
- [159] X14는 류신(L)이고;
- [160] X15은 아스파르트산(D), 또는 시스테인(C)이며;
- [161] X16은 글루탐산(E), 세린(S) 또는 시스테인(C)이고;
- [162] X17은 리신(K) 또는 아르기닌(R)이며;

- [163] X18은 아르기닌(R)이고;
[164] X19는 알라닌(A)이며;
[165] X20은 글루타민(Q), 시스테인(C), 또는 리신(K)이고;
[166] X21은 아스파르트산(D), 시스테인(C), 발린(V) 또는 글루탐산(E)이며;
[167] X23은 발린(V) 또는 아르기닌(R)이고;
[168] X24는 글루타민(Q) 또는 류신(L)이며;
[169] X27는 메티오닌(M)이고;
[170] X28은 아스파라긴(N) 또는 아르기닌(R)이며;
[171] X29는 트레오닌(T)이고;
[172] X30은 부존재하는 것을 특징으로 한다.
[173]
[174] 앞선 구체에 중 어느 하나에 따른 약학적 조성물로서, 상기 펩타이드는 하기 일반식 2의 아미노산 서열을 포함하는 펩타이드인 것을 특징으로 한다:
[175]
[176] Y-Aib-QGTF-X7-SD-X10-S-X12-Y-L-X15-X16-X17-R-A-X20-X21-F-V-X24-W-L-M-N-T-X30 (일반식 2, 서열번호: 46)
[177]
[178] 상기 일반식 2에서
[179] X7은 트레오닌(T), 발린(V) 또는 시스테인(C)이고;
[180] X10은 티로신(Y) 또는 시스테인(C)이고;
[181] X12는 리신(K) 또는 시스테인(C)이고;
[182] X15는 아스파르트산(D), 또는 시스테인(C)이고;
[183] X16은 글루탐산(E) 또는 세린(S)이며;
[184] X17은 리신(K) 또는 아르기닌(R)이고;
[185] X20은 글루타민(Q) 또는 리신(K)이며;
[186] X21은 아스파르트산(D), 또는 글루탐산(E)이고;
[187] X24는 발린(V) 또는 글루타민(Q)이고;
[188] X30은 시스테인(C)이거나, 부존재함.
[189]
[190] 앞선 구체에 중 어느 하나에 따른 약학적 조성물로서, 상기 펩타이드는 천연형 글루카곤의 pI인 6.8과 상이한 pI, 예컨대 pI 6.5 이하거나 pI 7.0 이상인 것을 특징으로 한다.
[191]
[192] 앞선 구체에 중 어느 하나에 따른 약학적 조성물로서, 본 발명의 한 구체적 형태는 상기 일반식 1 또는 2의 X10과 X14, X12와 X16, X16과 X20, X17과 X21, X20과 X24, 및 X24와 X28의 아미노산 쌍 중 적어도 하나의 아미노산 쌍의 아미노산 각각이 고리를 형성할 수 있는 글루탐산 또는 리신으로 치환된 것을 특징으로 한다.

[193]

[194] 앞선 구체예 중 어느 하나에 따른 약학적 조성물로서, 본 발명의 한 구체적 형태는 상기 일반식 1 또는 2의 X12와 X16의 아미노산 쌍, X16과 X20의 아미노산 쌍, 또는 X17과 X21의 아미노산 쌍의 아미노산 각각이 고리를 형성할 수 있는 글루탐산 또는 리신으로 치환된 것을 특징으로 한다.

[195]

[196] 앞선 구체예 중 어느 하나에 따른 약학적 조성물로서, 본 발명의 한 구체적 형태는 상기 일반식 1 또는 2에서, X10과 X14, X12와 X16, X16과 X20, X17과 X21, X20과 X24, 및 X24와 X28의 아미노산 쌍 중 적어도 하나의 아미노산 쌍에서 각각의 아미노산 간에 고리 (예컨대, 락탐 고리)를 형성하는 것을 특징으로 한다.

[197]

[198] 앞선 구체예 중 어느 하나에 따른 약학적 조성물로서, 본 발명의 한 구체적 형태는 상기 일반식 1 또는 2에서, X16이 글루탐산이고, X20은 리신이며, X16과 X20의 측쇄가 락탐 고리를 형성하고 있는 것을 특징으로 한다.

[199]

[200] 앞선 구체예 중 어느 하나에 따른 약학적 조성물로서, 본 발명의 한 구체적 형태는 상기 펩타이드의 C-말단이 아미드화되거나, 변형되지 않은 것을 특징으로 한다.

[201]

[202] 앞선 구체예 중 어느 하나에 따른 약학적 조성물로서, 상기 펩타이드는 글루카곤 수용체를 활성화시킬 수 있는 천연형 글루카곤의 유도체인 것을 특징으로 한다.

[203]

[204] 앞선 구체예 중 어느 하나에 따른 약학적 조성물로서, 상기 펩타이드는 서열번호: 2 내지 44로 이루어진 군에서 선택된 아미노산 서열을 포함하는 것을 특징으로 한다.

[205]

[206] 앞선 구체예 중 어느 하나에 따른 약학적 조성물로서, 상기 펩타이드는 서열번호: 12, 13, 15 및 36 내지 44로 이루어진 군에서 선택된 아미노산 서열을 포함하는 것을 특징으로 한다.

[207]

[208] 앞선 구체예 중 어느 하나에 따른 약학적 조성물로서, 상기 펩타이드는 서열번호: 37의 아미노산 서열을 포함하는 것을 특징으로 한다.

[209]

[210] 앞선 구체예 중 어느 하나에 따른 약학적 조성물로서, 상기 펩타이드는 상기 펩타이드 부위, 구체적으로 일반식 1 또는 2의 아미노산 서열을 포함하는 펩타이드 부위에 생체적합성 물질부가 결합되어 있는, 지속형 결합체의 형태인

것을 특징으로 한다.

[211]

[212] 앞선 구체에 중 어느 하나에 따른 약학적 조성물로서, 상기 생체적합성 물질부는 고분자 중합체, 지방산, 콜레스테롤, 알부민 및 이의 단편, 알부민 결합물질, 특정 아미노산 서열의 반복단위의 중합체, 항체, 항체 단편, FcRn 결합물질, 생체 내 결합조직 혹은 그 유도체, 뉴클레오타이드, 파이브로넥틴, 트랜스페린(Transferrin), 당류(saccharide), 헤파린, 및 엘라스틴으로 이루어진 군에서 선택되는 것을 특징으로 한다.

[213]

[214] 앞선 구체에 중 어느 하나에 따른 약학적 조성물로서, 상기 고분자 중합체는 폴리에틸렌 글리콜, 폴리프로필렌 글리콜, 에틸렌 글리콜-프로필렌 글리콜 공중합체, 폴리옥시에틸화폴리올, 폴리비닐알콜, 다당류, 텍스트란, 폴리비닐에틸에테르, 생분해성 고분자, 지질 중합체, 키틴, 히알루론산, 올리고뉴클레오타이드 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 한다.

[215]

[216] 앞선 구체에 중 어느 하나에 따른 약학적 조성물로서, 상기 FcRn 결합 물질은 면역글로불린 Fc 영역을 포함하는 폴리펩타이드인 것을 특징으로 한다.

[217]

[218] 앞선 구체에 중 어느 하나에 따른 약학적 조성물로서, 상기 펩타이드 부위와 생체적합성 물질부는 링커를 통해 서로 연결된 것을 특징으로 한다.

[219]

[220] 앞선 구체에 중 어느 하나에 따른 약학적 조성물로서, 상기 링커는 펩타이드, 지방산, 당류, 고분자 중합체, 저분자 화합물, 뉴클레오타이드 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 한다.

[221]

[222] 앞선 구체에 중 어느 하나에 따른 약학적 조성물로서, 상기 고분자 중합체는 폴리에틸렌 글리콜, 폴리프로필렌 글리콜, 에틸렌 글리콜-프로필렌 글리콜 공중합체, 폴리옥시에틸화폴리올, 폴리비닐알콜, 다당류, 텍스트란, 폴리비닐에틸에테르, 생분해성 고분자, 지질 중합체, 키틴, 히알루론산, 올리고뉴클레오타이드 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 한다.

[223]

[224] 앞선 구체에 중 어느 하나에 따른 약학적 조성물로서, 상기 링커는 폴리에틸렌 글리콜인 것을 특징으로 한다.

[225]

[226] 앞선 구체에 중 어느 하나에 따른 약학적 조성물로서, 상기 면역글로불린 Fc 영역은 비당쇄화된 것을 특징으로 한다.

- [227]
- [228] 앞선 구체에 중 어느 하나에 따른 약학적 조성물로서, 상기 면역글로불린 Fc 영역은
- [229] (a) CH1 도메인, CH2 도메인, CH3 도메인 및 CH4 도메인;
- [230] (b) CH1 도메인 및 CH2 도메인;
- [231] (c) CH1 도메인 및 CH3 도메인;
- [232] (d) CH2 도메인 및 CH3 도메인;
- [233] (e) CH1 도메인, CH2 도메인, CH3 도메인 및 CH4 도메인 중 1개 또는 2개 이상의 도메인과 면역글로불린 힌지 영역 또는 힌지 영역의 일부와의 조합; 및
- [234] (f) 중쇄 불변영역 각 도메인과 경쇄 불변영역의 이량체
- [235] 로 구성된 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 한다.
- [236]
- [237] 앞선 구체에 중 어느 하나에 따른 약학적 조성물로서, 상기 면역글로불린 Fc 영역을 포함하는 폴리펩타이드는 이량체 형태 (dimeric form)인 것을 특징으로 한다.
- [238]
- [239] 앞선 구체에 중 어느 하나에 따른 약학적 조성물로서, 상기 면역글로불린 Fc 영역은 이황화 결합을 형성할 수 있는 부위가 제거되거나, 천연형 Fc에서 N-말단의 일부 아미노산이 제거되거나, 천연형 Fc의 N-말단에 메티오닌 잔기가 부가되거나, 보체결합부위가 제거되거나 또는 ADCC(antibody dependent cell mediated cytotoxicity) 부위가 제거된, 천연형 Fc의 유도체인 것을 특징으로 한다.
- [240]
- [241] 앞선 구체에 중 어느 하나에 따른 약학적 조성물로서, 상기 면역글로불린 Fc 영역은 IgG, IgA, IgD, IgE 및 IgM로 구성되는 군으로부터 선택되는 면역글로불린에서 유래된 Fc 영역인 것을 특징으로 한다.
- [242]
- [243] 앞선 구체에 중 어느 하나에 따른 약학적 조성물로서, 상기 면역글로불린 Fc 영역은 IgG4 Fc 영역인 것인 것을 특징으로 한다.
- [244]
- [245] 앞선 구체에 중 어느 하나에 따른 약학적 조성물로서, 상기 면역글로불린 Fc 영역은 인간 IgG4 유래의 비-당쇄화된 Fc 영역인 것을 특징으로 한다.
- [246]
- [247] 앞선 구체에 중 어느 하나에 따른 약학적 조성물로서, 상기 링커는 상기 일반식 1 또는 2의 아미노산 서열을 포함하는 펩타이드의 시스테인 잔기에 연결되는 것을 특징으로 한다.
- [248]
- [249] 앞선 구체에 중 어느 하나에 따른 약학적 조성물로서, 본 발명의 한 구체적 형태로서, 상기 결합체의 링커는 한쪽 말단이 생체적합성 물질부의 아민기 또는

티올기와, 상기 링커의 다른 말단이 일반식 1 또는 2의 아미노산 서열을 포함하는 펩타이드 부위의 아민기 또는 티올기와 각각 반응하여 형성된 공유결합으로 상기 펩타이드 부위와 상기 생체적합성 물질부에 각각 연결되어 있는 것을 특징으로 한다.

[250]

[251] 본 발명을 구현하는 다른 양태는 글루카곤 유도체이다.

[252] 하나의 구체예에서, 본 발명은 서열번호: 45로 표시되는 상기 일반식 1의 아미노산 서열을 포함하는 분리된 펩타이드에 관한 것이다.

[253] 다른 하나의 구체예에서, 본 발명은 하기 일반식 2의 아미노산 서열을 포함하는 분리된 펩타이드에 관한 것이다:

[254] Y-Aib-QGTF-X7-SD-X10-S-X12-Y-L-X15-X16-X17-R-A-X20-X21-F-V-X24-W-L-M-N-T-X30 (일반식 2, 서열번호: 46)

[255] 상기 일반식 2에서

[256] X7은 트레오닌(T), 발린(V) 또는 시스테인(C)이고;

[257] X10은 티로신(Y) 또는 시스테인(C)이고;

[258] X12는 리신(K) 또는 시스테인(C)이고;

[259] X15는 아스파르트산(D), 또는 시스테인(C)이고;

[260] X16은 글루탐산(E) 또는 세린(S)이며;

[261] X17은 리신(K) 또는 아르기닌(R)이고;

[262] X20은 글루타민(Q) 또는 리신(K)이며;

[263] X21은 아스파르트산(D), 또는 글루탐산(E)이고;

[264] X24는 발린(V) 또는 글루타민(Q)이고;

[265] X30은 시스테인(C)이거나, 부존재함.

[266]

[267] 앞선 구체예에 따른 펩타이드에서, 상기 일반식 2의 아미노산 서열을 포함하는 분리된 펩타이드 중 서열번호: 19, 33, 49, 및 50에 해당하는 펩타이드는 제외될 수 있다.

[268]

[269] 앞선 구체예 중 어느 하나에 따른 펩타이드에서, 상기 펩타이드는 일반식 2의 X16이 글루탐산이고, X20은 리신이며, X16과 X20의 측쇄가 락탐 고리를 형성하고 있는 것을 특징으로 한다.

[270]

[271] 앞선 구체예 중 어느 하나에 따른 펩타이드에서, 상기 일반식 2의 아미노산 서열을 포함하는 펩타이드의 C-말단이 아미드화되거나, 변형되지 않은 것을 특징으로 한다.

[272]

[273] 앞선 구체예 중 어느 하나에 따른 펩타이드에서, 상기 펩타이드는 글루카곤 수용체를 활성화시킬 수 있는 글루카곤 유도체인 것을 특징으로 한다.

[274]

[275] 앞선 구체예 중 어느 하나에 따른 펩타이드에서, 상기 펩타이드는 서열번호: 12, 13, 15 및 36 내지 44로 이루어진 군에서 선택된 아미노산 서열을 포함하는 것을 특징으로 한다.

[276]

[277] 본 발명을 구현하는 다른 양태는 상기 분리된 펩타이드, 구체적으로 상기 일반식 1 또는 일반식 2의 아미노산 서열을 포함하는 분리된 펩타이드를 코딩하는 분리된 폴리뉴클레오티드, 상기 분리된 폴리뉴클레오티드를 포함하는, 벡터, 및 상기 폴리뉴클레오티드 혹은 벡터를 포함하는 분리된 세포이다.

[278]

[279] 본 발명을 구현하는 다른 양태는 펩타이드 부위 및 상기 펩타이드 부위에 공유결합으로 연결된 생체적합성 물질부를 포함하는 분리된 결합체로서, 상기 펩타이드 부위는 상기 일반식 1 또는 2의 아미노산 서열과 동일한 서열이거나 이를 포함하는 서열인 분리된 결합체이다.

[280]

[281] 하나의 구체예에서, 본 발명은 펩타이드 부위 및 상기 펩타이드 부위에 공유결합으로 연결된 생체적합성 물질부를 포함하는 분리된 결합체로서, 상기 펩타이드 부위는 상기 일반식 1의 아미노산 서열과 동일한 서열이거나 이를 포함하는 서열인 분리된 결합체에 관한 것이다.

[282]

[283] 다른 하나의 구체예에서, 본 발명은 펩타이드 부위 및 상기 펩타이드 부위에 공유결합으로 연결된 생체적합성 물질부를 포함하는 분리된 결합체로서, 상기 펩타이드 부위는 상기 일반식 2의 아미노산 서열과 동일한 서열이거나 이를 포함하는 서열인 분리된 결합체에 관한 것이다.

[284]

[285] 앞선 구체예에 따른 결합체에 있어서, 상기 생체적합성 물질부는 고분자 중합체, 지방산, 콜레스테롤, 알부민 및 이의 단편, 알부민 결합물질, 특정 아미노산 서열의 반복단위의 중합체, 항체, 항체 단편, FcRn 결합물질, 생체 내 결합조직 혹은 그 유도체, 뉴클레오타이드, 파이브로넥틴, 트랜스페린(Transferrin), 당류, 헤파린, 및 엘라스틴으로 이루어진 군에서 선택되는 것을 특징으로 한다.

[286]

[287] 앞선 구체예 중 어느 하나에 따른 결합체에 있어서, 상기 고분자 중합체는 폴리에틸렌 글리콜, 폴리프로필렌 글리콜, 에틸렌 글리콜-프로필렌 글리콜 공중합체, 폴리옥시에틸화폴리올, 폴리비닐알콜, 다당류, 텍스트란, 폴리비닐에틸에테르, 생분해성 고분자, 지질 중합체, 키틴, 히알루론산, 올리고뉴클레오타이드 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것을

특징으로 한다.

[288]

[289] 앞선 구체예 중 어느 하나에 따른 결합체에 있어서, 상기 FcRn 결합 물질은 면역글로불린 Fc 영역을 포함하는 폴리펩타이드인 것을 특징으로 한다.

[290]

[291] 앞선 구체예 중 어느 하나에 따른 결합체에 있어서, 상기 펩타이드 부위와 상기 생체적합성 물질부 사이의 공유결합은 링커를 통해 서로 연결된 것을 특징으로 한다.

[292]

[293] 앞선 구체예 중 어느 하나에 따른 결합체에 있어서, 상기 링커는 펩타이드, 지방산, 당류, 고분자 중합체, 저분자 화합물, 뉴클레오타이드 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 한다.

[294]

[295] 앞선 구체예 중 어느 하나에 따른 결합체에 있어서, 상기 링커는 폴리에틸렌 글리콜, 폴리프로필렌 글리콜, 에틸렌 글리콜-프로필렌 글리콜 공중합체, 폴리옥시에틸화폴리올, 폴리비닐알콜, 다당류, 텍스트란, 폴리비닐에틸에테르, 생분해성 고분자, 지질 중합체, 키틴, 히알루론산, 올리고뉴클레오타이드 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 고분자 중합체인 것을 특징으로 한다.

[296]

[297] 앞선 구체예 중 어느 하나에 따른 결합체에 있어서,

[298] 상기 생체적합성 물질부는 FcRn 결합 물질이고,

[299] 상기 펩타이드 부위에 상기 펩타이드, 지방산, 당류, 고분자 중합체, 저분자 화합물, 뉴클레오타이드 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는, 링커를 통해 생체적합성 물질부가 결합된 것을 특징으로 한다.

[300]

[301] 앞선 구체예 중 어느 하나에 따른 결합체에 있어서, 상기 링커는 폴리에틸렌 글리콜인 것을 특징으로 한다.

[302]

[303] 앞선 구체예 중 어느 하나에 따른 결합체에 있어서, 상기 면역글로불린 Fc 영역은 비당쇄화된 것을 특징으로 한다.

[304]

[305] 앞선 구체예 중 어느 하나에 따른 결합체에 있어서, 상기 면역글로불린 Fc 영역은 (a) CH1 도메인, CH2 도메인, CH3 도메인 및 CH4 도메인; (b) CH1 도메인 및 CH2 도메인; (c) CH1 도메인 및 CH3 도메인; (d) CH2 도메인 및 CH3 도메인; (e) CH1 도메인, CH2 도메인, CH3 도메인 및 CH4 도메인 중 1개 또는 2개의 이상의 도메인과 면역글로불린 힌지 영역 또는 힌지 영역의 일부와의 조합; 및(f) 중쇄 불변영역 각 도메인과 경쇄 불변영역의 이량체로 구성된 군으로부터

선택되는 것을 특징으로 한다.

[306]

[307] 앞선 구체에 중 어느 하나에 따른 결합체에 있어서, 상기 면역글로불린 Fc 영역을 포함하는 폴리펩타이드는 이량체 형태 (dimeric form)인 것을 특징으로 한다.

[308]

[309] 앞선 구체에 중 어느 하나에 따른 결합체에 있어서, 상기 면역글로불린 Fc 영역은 이황화 결합을 형성할 수 있는 부위가 제거되거나, 천연형 Fc에서 N-말단의 일부 아미노산이 제거되거나, 천연형 Fc의 N-말단에 메티오닌 잔기가 부가되거나, 보체결합부위가 제거되거나 또는 ADCC (antibody dependent cell mediated cytotoxicity) 부위가 제거된, 천연형 Fc의 유도체인 것을 특징으로 한다.

[310]

[311] 앞선 구체에 중 어느 하나에 따른 결합체에 있어서, 상기 면역글로불린 Fc 영역은 IgG, IgA, IgD, IgE 및 IgM로 구성되는 군으로부터 선택되는 면역글로불린에서 유래된 Fc 영역인 것을 특징으로 한다.

[312]

[313] 앞선 구체에 중 어느 하나에 따른 결합체에 있어서, 상기 면역글로불린 Fc 영역은 IgG4 Fc 영역인 것을 특징으로 한다.

[314]

[315] 앞선 구체에 중 어느 하나에 따른 결합체에 있어서, 상기 면역글로불린 Fc 영역은 인간 IgG4 유래의 비-당쇄화된 Fc 영역인 것을 특징으로 한다.

[316]

[317] 앞선 구체에 중 어느 하나에 따른 결합체에 있어서, 상기 링커는 상기 펩타이드의 시스테인 잔기에 연결되는 것을 특징으로 한다.

[318]

[319] 앞선 구체에 중 어느 하나에 따른 결합체에 있어서, 본 발명의 한 구체적 형태로서, 상기 결합체의 링커는 한쪽 말단이 생체적합성 물질부의 아민기 또는 티올기와, 상기 링커의 다른 말단이 일반식 1 또는 2의 아미노산 서열을 포함하는 펩타이드 부위의 아민기 또는 티올기와 각각 반응하여 형성된 공유결합으로 상기 펩타이드 부위와 상기 생체적합성 물질부에 각각 연결되어 있는 것을 특징으로 한다.

[320]

[321] 본 발명을 구현하는 다른 양태는 글루카곤 유도체 또는 이를 포함하는 결합체; 및 약학적으로 허용되는 부형제를 포함하는 저혈당의 예방 또는 치료용 약학적 조성물이다.

[322]

[323] 하나의 구체에에서, 본 발명은 상기 분리된 펩타이드; 또는 상기 분리된 펩타이드와 동일한 서열이거나 이를 포함하는 서열인 펩타이드 부위 및 상기

펩타이드 부위에 공유결합으로 연결된 생체적합성 물질부를 포함하는 분리된 결합체를 포함하는, 저혈당의 예방 또는 치료용 약학적 조성물에 관한 것이다.

[324]

[325] 본 발명을 구현하는 다른 양태는 글루카곤 유도체 또는 이를 포함하는 결합체; 및 약학적으로 허용되는 부형제를 포함하는 대사증후군의 예방 또는 치료용 약학적 조성물이다.

[326]

[327] 하나의 구체예에서, 상기 분리된 펩타이드; 또는 상기 분리된 펩타이드와 동일한 서열이거나 이를 포함하는 서열인 펩타이드 부위 및 상기 펩타이드 부위에 공유결합으로 연결된 생체적합성 물질부를 포함하는 분리된 결합체를 포함하는, 대사증후군의 예방 또는 치료용 약학적 조성물에 관한 것이다.

[328]

[329] 앞선 구체예 중 어느 하나에 따른 약학적 조성물에서, 상기 약학적 조성물은 하나 이상의 대사증후군에 대한 치료적 활성을 가지는 화합물 또는 물질을 더 포함하는 것을 특징으로 한다.

[330]

[331] 앞선 구체예 중 어느 하나에 따른 약학적 조성물에서, 상기 대사증후군에 대한 치료적 활성을 가지는 화합물 또는 물질은 인슐린 분비 펩타이드, GLP-1(glucagon like peptide-1) 수용체 아고니스트, 렙틴(Leptin) 수용체 아고니스트, DPP-IV(dipeptidyl peptidase-IV) 저해제, Y5 수용체 안타고니스트, MCH(Melanin-concentrating hormone) 수용체 안타고니스트, Y2/4 수용체 아고니스트, MC3/4(Melanocortin 3/4) 수용체 아고니스트, 위/췌장 리파아제(gastric/pancreatic lipase) 저해제, 5HT2c(5-hydroxytryptamine receptor 2C, G protein-coupled) 아고니스트, β 3A 수용체 아고니스트, 아밀린(Amylin) 수용체 아고니스트, 그렐린(Ghrelin) 안타고니스트, 그렐린 수용체 안타고니스트, PPAR α (Peroxisome proliferator-activated receptor alpha) 아고니스트, PPAR δ (Peroxisome proliferator-activated receptor delta) 아고니스트, FXR(farnesoid X receptor) 아고니스트, 아세틸-CoA 카복실라제 억제제(acetyl-CoA carboxylase inhibitor), 펩타이드 YY, CCK(Cholecystokinin), 제닌(Xenin), 글리센틴(glicentin), 오베스타틴(obestatin), 세크레틴(secretin), 네스파틴(nesfatin), 인슐린(insulin), 및 GIP(glucose-dependent insulinotropic peptide)로 이루어진 군에서 선택되는 것을 특징으로 한다.

[332]

[333] 앞선 구체예 중 어느 하나에 따른 약학적 조성물에서, 상기 인슐린 분비 펩타이드는 GLP-1, 엑센딘-3, 엑센딘-4, 이들의 아고니스트(agonist), 유도체(derivative), 단편(fragment), 변이체(variant) 및 이들의 조합으로부터 구성되는 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 한다.

[334]

- [335] 앞선 구체예 중 어느 하나에 따른 약학적 조성물에서, 상기 인슐린 분비 펩타이드는 인슐린 분비 펩타이드의 N-말단 히스티딘 잔기가 테스-아미노-히스티딜, 디메틸-히스티딜, 베타-히드록시 이미다조프로피오닐, 4-이미다조아세틸 및 베타-카르복시 이미다조프로피오닐로 구성되는 군에서 선택되는 것으로 치환된 인슐린 분비 펩타이드 유도체인 것을 특징으로 한다.
- [336]
- [337] 앞선 구체예 중 어느 하나에 따른 약학적 조성물에서, 상기 인슐린 분비 펩타이드는 천연형 엑센딘-4, 엑센딘-4의 N-말단 아민기가 제거된 엑센딘-4 유도체, 엑센딘-4의 N-말단 아민기가 하이드록실기로 치환된 엑센딘-4 유도체, 엑센딘-4의 N-말단 아민기가 디메틸기로 수식된 엑센딘-4 유도체, 엑센딘-4의 첫 번째 아미노산(히스티딘)의 알파 탄소를 제거(deletion)한 엑센딘-4 유도체, 엑센딘-4의 열두 번째 아미노산(리신)이 세린으로 치환된 엑센딘-4 유도체, 및 엑센딘-4의 열두 번째 아미노산(리신)이 아르기닌으로 치환된 엑센딘-4 유도체로 구성된 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 한다.
- [338]
- [339] 앞선 구체예 중 어느 하나에 따른 약학적 조성물에서, 상기 인슐린 분비 펩타이드는 전술한 인슐린 분비 펩타이드의 아미노산 서열을 지니는 펩타이드 부위 및 이에 공유결합으로 연결된 생체적합성 물질부를 포함하는 결합체 형태인 것을 특징으로 한다.
- [340]
- [341] 앞선 구체예 중 어느 하나에 따른 약학적 조성물에서, 상기 생체적합성 물질부는 고분자 중합체, 지방산, 콜레스테롤, 알부민 및 이의 단편, 알부민 결합물질, 특정 아미노산 서열의 반복단위의 중합체, 항체, 항체 단편, FcRn 결합물질, 생체 내 결합조직 혹은 그 유도체, 뉴클레오타이드, 파이브로넥틴, 트랜스페린(Transferrin), 당류, 헤파린, 및 엘라스틴으로 이루어진 군에서 선택되는 것을 특징으로 한다.
- [342]
- [343] 앞선 구체예 중 어느 하나에 따른 약학적 조성물에서, 상기 고분자 중합체는 폴리에틸렌 글리콜, 폴리프로필렌 글리콜, 에틸렌 글리콜-프로필렌 글리콜 공중합체, 폴리옥시에틸화폴리올, 폴리비닐알콜, 다당류, 텍스트란, 폴리비닐에틸에테르, 생분해성 고분자, 지질 중합체, 키틴, 히알루론산, 올리고뉴클레오타이드 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 한다.
- [344]
- [345] 앞선 구체예 중 어느 하나에 따른 약학적 조성물에서, 상기 FcRn 결합 물질은 면역글로불린 Fc 영역을 포함하는 폴리펩타이드인 것을 특징으로 한다.
- [346]
- [347] 앞선 구체예 중 어느 하나에 따른 약학적 조성물에서, 상기 인슐린 분비

펩타이드의 아미노산 서열을 지니는 펩타이드 부위는 링커를 통해 생체적합성 물질부에 연결된 것을 특징으로 한다.

[348]

[349] 앞선 구체예 중 어느 하나에 따른 약학적 조성물에서, 상기 링커는 펩타이드, 지방산, 당류, 고분자 중합체, 저분자 화합물, 뉴클레오타이드 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 한다.

[350]

[351] 앞선 구체예 중 어느 하나에 따른 약학적 조성물에서, 상기 링커는 폴리에틸렌 글리콜, 폴리프로필렌 글리콜, 에틸렌 글리콜-프로필렌 글리콜 공중합체, 폴리옥시에틸화폴리올, 폴리비닐알콜, 다당류, 텍스트란, 폴리비닐에틸에테르, 생분해성 고분자, 지질 중합체, 키틴, 히알루론산, 올리고뉴클레오타이드 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 고분자 중합체인 것을 특징으로 한다.

[352]

[353] 앞선 구체예에 따른 약학적 조성물에서, 상기 대사증후군은 내당증 장애, 고콜레스테롤혈증, 이상지혈증, 비만, 당뇨, 고혈압, 비알코올지방간염 (nonalcoholic steatohepatitis, NASH), 이상지혈증에 의한 동맥경화, 죽상동맥경화증, 동맥경화증, 관상동맥 심질환(관동맥성 심장병), 및 뇌졸중으로 이루어진 군에서 선택된 것을 특징으로 한다.

[354]

[355] 앞선 구체예 중 어느 하나에 따른 약학적 조성물에서, 상기 인슐린 분비 펩타이드는 폴리에틸렌글리콜, 폴리프로필렌 글리콜, 에틸렌 글리콜-프로필렌 글리콜 공중합체, 폴리옥시에틸화폴리올, 폴리비닐알콜, 다당류, 텍스트란, 폴리비닐에틸에테르, PLA(polylactic acid) 혹은 PLGA(polylactic-glycolic acid)와 같은 생분해성 고분자, 지질 중합체, 키틴류, 히알루론산, 지방산, 고분자 중합체, 저분자 화합물, 뉴클레오타이드, 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된 링커를 통해 생체적합성 물질부와 연결되는 것을 특징으로 한다.

[356]

[357] 앞선 구체예 중 어느 하나에 따른 약학적 조성물에서, 상기 생체적합성 물질부는 FcRn 결합 물질이고, 상기 인슐린 분비 펩타이드의 아미노산 서열을 지니는 펩타이드 부위는 펩타이드 링커, 또는 폴리에틸렌글리콜, 폴리프로필렌 글리콜, 에틸렌 글리콜-프로필렌 글리콜 공중합체, 폴리옥시에틸화폴리올, 폴리비닐알콜, 다당류, 텍스트란, 폴리비닐에틸에테르, PLA(polylactic acid) 혹은 PLGA(polylactic-glycolic acid)와 같은 생분해성 고분자, 지질 중합체, 키틴류, 히알루론산 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 비펩타이드성 링커를 통해 생체적합성 물질부에 결합된 것을 특징으로 한다.

[358]

[359] 앞선 구체예 중 어느 하나에 따른 약학적 조성물에서, 상기 조성물은 (i)

서열번호: 37의 아미노산 서열을 포함하는 펩타이드 부위 및 이에 공유결합으로 연결된 생체적합성 물질부를 포함하는 결합체, 및 (ii) 엑센딘-4의 첫 번째 아미노산(히스티딘)의 알파 탄소가 제거된, 이미다조아세틸 엑센딘-4 부위 및 이에 공유결합으로 연결된 생체적합성 물질부를 포함하는 결합체를 모두 포함하는 것을 특징으로 한다.

[360]

[361] 앞선 구체예 중 어느 하나에 따른 약학적 조성물에서, 상기 서열번호: 37의 아미노산 서열을 포함하는 펩타이드 부위 및 이미다조아세틸 엑센딘-4 부위는 각각의 생체적합성 물질부에 링커를 통해서 연결된 것을 특징으로 한다.

[362]

[363] 앞선 구체예 중 어느 하나에 따른 약학적 조성물에서, 상기 FcRn 결합 물질은 면역글로불린 Fc 영역을 포함하는 폴리펩타이드인 것을 특징으로 한다.

[364]

[365] 본 발명을 구현하는 다른 양태는 상기 글루카곤 유도체 또는 이를 포함하는 결합체, 또는 이를 포함하는 조성물을 이를 필요로 하는 개체에게 투여하는 단계를 포함하는, 선천성 고인슐린증의 예방 또는 치료 방법이다.

[366]

[367] 본 발명을 구현하는 다른 양태는 선천성 고인슐린증의 예방 또는 치료를 위한 약제의 제조에 있어서 상기 글루카곤 유도체, 또는 이를 포함하는 결합체, 또는 이를 포함하는 조성물의 용도이다.

[368]

[369] 본 발명을 구현하는 다른 양태는 상기 글루카곤 유도체 또는 이를 포함하는 결합체, 또는 이를 포함하는 조성물을 이를 필요로 하는 개체에 투여하는 단계를 포함하는, 저혈당의 예방 또는 치료 방법이다.

[370]

[371] 본 발명을 구현하는 다른 양태는 저혈당의 예방 또는 치료를 위한 약제의 제조에 있어서 상기 글루카곤 유도체, 또는 이를 포함하는 결합체, 또는 이를 포함하는 조성물의 용도이다.

[372]

[373] 본 발명을 구현하는 다른 양태는 상기 글루카곤 유도체 또는 이를 포함하는 결합체, 또는 이를 포함하는 조성물을 이를 필요로 하는 개체에 투여하는 단계를 포함하는, 대사증후군의 예방 또는 치료 방법이다.

[374]

[375] 하나의 구체예로서, 상기 방법은 하나 이상의 대사증후군에 대한 치료적 활성을 가지는 화합물 또는 물질을 투여하는 것을 더 포함하는 것을 특징으로 한다.

[376]

[377] 앞선 구체예에 따른 방법에서, 상기 글루카곤 유도체 또는 이를 포함하는

결합체와 하나 이상의 대사증후군에 대한 치료적 활성을 가지는 화합물 또는 물질은 동시, 개별, 또는 순차적으로 투여되는 것을 특징으로 한다.

[378]

[379] 본 발명을 구현하는 다른 양태는 글루카곤 유도체 혹은 분리된 결합체, 혹은 상기 조성물을 대사증후군에 대한 예방 또는 치료용 약제 (혹은 약학적 조성물)의 제조에 사용하는 용도이다.

[380]

발명의 효과

[381] 본 발명에 따른 글루카곤 유도체는 천연형 글루카곤에 비하여 개선된 물성을 나타내며, 비만, 당뇨, 비알코올지방간염 (nonalcoholic steatohepatitis, NASH)를 비롯한 대사증후군 (metabolic syndrome) 및 선천성 고인슐린증의 예방 또는 치료에 유용하게 사용할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[382] 도 1은, 고지방 식이를 통한 비만 동물 모델(랫트)에 지속형 인슐린 분비 펩타이드 결합체(지속형 엑센딘-4 유도체로 명명)와 지속형 글루카곤 유도체 결합체(서열번호 12 지속형 유도체로 명명)를 단독 또는 병용; 투여량 조절하여 15일간 투여하는 동안, 3일 단위의 랫트의 체중변화 결과를 나타낸 도이다.

[383] 도 2는, 고지방 식이를 통한 비만 동물 모델(랫트)에 지속형 인슐린 분비 펩타이드 결합체(지속형 엑센딘-4 유도체로 명명)와 지속형 글루카곤 유도체 결합체(서열번호 12 지속형 유도체로 명명)를 단독 또는 병용; 투여량 조절하여 15일간 투여한 결과, 장간막 지방량을 측정된 결과를 나타낸 도이다 (대조군 대비 * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, 1원 ANOVA 분석).

[384] 도 3은, 고지방 식이를 통한 비만 동물 모델(랫트)에 지속형 인슐린 분비 펩타이드 결합체(지속형 엑센딘-4 유도체로 명명)와 지속형 글루카곤 유도체 결합체(서열번호 12 지속형 유도체로 명명)를 단독 또는 병용; 투여량 조절하여 15일간 투여한 결과, 간 무게 차이를 측정된 결과를 나타낸 도이다 (대조군 대비 *** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, 1원 ANOVA 분석).

[385] 도 4는, 고지방 식이를 통한 비만 동물 모델(마우스)에 지속형 인슐린 분비 펩타이드 결합체(지속형 엑센딘-4 유도체로 명명)와 지속형 글루카곤 유도체 결합체(서열번호 20 지속형 유도체로 명명)를 단독 또는 병용; 투여량 조절하여 22일간 투여한 결과, 마우스의 체중 변화를 나타낸 도이다.

[386] 도 5는, 고지방 식이를 통한 비만 동물 모델(마우스)에 지속형 인슐린 분비 펩타이드 결합체(지속형 엑센딘-4 유도체로 명명)와 지속형 글루카곤 유도체 결합체(서열번호 20 지속형 유도체로 명명)를 단독 또는 병용; 투여량 조절하여 22일간 투여한 결과, 혈중 콜레스테롤 함량을 측정된 결과를 나타낸 도이다.

[387] 도 6은, 고지방 식이를 통한 비만 동물 모델(마우스)에 리라글루타이드 (노보 노르디스크) 및 지속형 인슐린 분비 펩타이드 결합체(지속형 엑센딘 유도체로

명명)를 각각 단독 투여하거나, 지속형 인슐린 분비 펩타이드 결합체(지속형 엑센딘 유도체로 명명)와 지속형 글루카곤 유도체 결합체(서열번호 37 지속형 유도체로 명명)를 28일간 병용투여한 후, 체중 변화, 혈중 콜레스테롤 수치, 지방 무게, 및 내당능을 측정된 결과를 나타낸 도이다. 대조군 (부형제 투여군) 대비 효능을 나타내었다.

[388] 도 7은, 급성 저혈당(acute hypoglycemia) 동물 모델(랫트)에서의 서열번호: 37의 글루카곤 유도체의 지속형 결합체 투여에 따른 저혈당 개선 효과를 나타낸 도이다.

[389] 도 8은, 만성 저혈당(chronic hypoglycemia) 동물 모델(랫트)에서의 서열번호: 37의 글루카곤 유도체의 지속형 결합체 투여에 따른 저혈당 개선 효과를 나타낸 도이다.

발명의 실시를 위한 최선의 형태

[390] 본 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용을 설명하면 다음과 같다. 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.

[391] 또한, 당해 기술분야의 통상의 지식을 가진 자는 통상의 실험만을 사용하여 본 출원에 기재된 본 발명의 특정 양태에 대한 다수의 등가물을 인지하거나 확인할 수 있다. 또한, 이러한 등가물은 본 발명에 포함되는 것으로 의도된다.

[392] 본 명세서 전반을 통하여, 천연적으로 존재하는 아미노산에 대한 통상의 1문자 및 3문자 코드가 사용될 뿐만 아니라 Aib(α -아미노이소부티르산), Sar(N-methylglycine) 등과 같은 다른 아미노산에 대해 일반적으로 허용되는 3문자 코드가 사용된다. 또한 본 명세서에서 약어로 언급된 아미노산은 IUPAC-IUB 명명법에 따라 기재되었다.

[393]

[394] 알라닌 A 아르기닌 R

[395] 아스파라긴 N 아스파르트산 D

[396] 시스테인 C 글루탐산 E

[397] 글루타민 Q 글리신 G

[398] 히스티딘 H 이소류신 I

[399] 류신 L 리신 K

[400] 메티오닌 M 페닐알라닌 F

[401] 프롤린 P 세린 S

[402] 트레오닌 T 트립토판 W

[403] 티로신 Y 발린 V

[404]

- [405] 본 발명을 구현하는 하나의 양태는 글루카곤 유도체 또는 이를 포함하는 결합체를 포함하는 조성물, 구체적으로 선천성 고인슐린증, 저혈당, 또는 대사증후군의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.
- [406]
- [407] 본 발명에 따른 글루카곤 유도체는 천연형 글루카곤과 비교하여 아미노산 서열에 하나 이상의 차이가 있는 펩타이드, 천연형 글루카곤 서열을 개질(modification)을 통하여 변형시킨 펩타이드, 천연형 글루카곤과 같이 글루카곤 수용체를 활성화시킬 수 있는 천연형 글루카곤의 모방체를 포함한다.
- [408] 이러한 글루카곤 유도체는 천연형 글루카곤에 대해 변화된 pI를 가져 개선된 물성을 나타내는 것일 수 있다. 또한, 상기 글루카곤 유도체는 글루카곤 수용체를 활성화시키는 활성을 보유하면서 용해도가 개선된 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [409] 또한, 상기 글루카곤 유도체는 천연적으로 존재하지 않는(non-naturally occurring) 것일 수 있다.
- [410]
- [411] 한편, 천연형 글루카곤은 다음의 아미노산 서열을 가질 수 있다:
- [412] His-Ser-Gln-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Lys-Tyr-Leu-Asp-Ser-Arg-Arg-Ala-Gln-Asp-Phe-Val-Gln-Trp-Leu-Met-Asn-Thr(서열번호: 1)
- [413]
- [414] 본 발명에서 용어 "등전점(isoelectric point)" 또는 "pI"는 어떤 폴리펩타이드 혹은 펩타이드 같은 분자에 있어서 그 전체 순하전(net charge)이 없게 되는(0) pH 값을 의미한다. 다양한 하전된 작용기가 존재하는 폴리펩타이드의 경우, pI에서 이들 하전의 합은 제로이다. pI보다 높은 pH에서 폴리펩타이드의 전체 순하전은 음성이 될 것이고, pI보다 낮은 pH 값에서 폴리펩타이드의 전체 순하전은 양성이 될 것이다.
- [415] pI는 폴리아크릴아미드, 전분 또는 아가로스로 구성되는 고정된 pH 구배 겔상에서 등전점 전기영동에 의해 또는 예를 들어 ExPASy 서버에서 pI/MW 툴(http://expasy.org/tools/pi_tool.html; Gasteiger et al., 2003)을 사용하여 아미노산 서열로부터 pI를 추산함으로써 결정될 수 있다.
- [416] 본 발명에서 용어 "변화된 pI"는 천연 글루카곤의 아미노산 서열에서 일부 서열이 음전하 및 양전하를 띤 아미노산 잔기로 치환되어 천연 글루카곤의 pI와는 다른, 즉 이보다 감소하거나 증가한 pI를 갖는 것을 의미한다. 이렇게 변화된 pI를 갖는 펩타이드는 글루카곤 유도체로서 중성 pH에서 개선된 용해도 및/또는 높은 안정성을 나타낼 수 있다. 그러나, 특별히 이에 제한되는 것은 아니다.
- [417] 보다 구체적으로, 상기 글루카곤 유도체는 천연형 글루카곤의 pI 값 (6.8)이 아닌 변화된 pI 값을 가지는 것일 수 있으며, 보다 더 구체적으로 6.8 미만, 구체적으로 6.7 이하, 더 구체적으로 6.5 이하인 pI 값, 또한 구체적으로 6.8 초과,

7 이상, 더 구체적으로 7.5 이상일 수 있으나, 이에 제한되지 않으며, 천연형 글루카곤과 상이한 pI 값을 가진다면 본 발명의 범주에 포함된다. 특히, 천연형 글루카곤과 상이한 pI 값을 가짐으로써 천연형 글루카곤에 비해 중성 pH에서 개선된 용해도를 나타냄으로써 응집(aggregation)되는 정도가 낮다면, 본 발명의 범주에 특히 포함된다.

[418] 더 구체적으로, 4 내지 6.5 및/또는 7 내지 9.5, 더 구체적으로 7.5 내지 9.5, 더욱 더 구체적으로 8.0 내지 9.3의 pI 값을 가지는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 이 경우, 천연형 글루카곤에 비해 높거나 낮은 pI를 갖기 때문에 중성 pH에서 천연형 글루카곤에 비해 개선된 용해도 및 높은 안정성을 나타낼 수 있다. 그러나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[419]

[420] 구체적으로, 천연형 글루카곤의 유도체는 천연형 글루카곤에서 일부 아미노산이 치환(substitution), 추가(addition), 제거(deletion) 및 수식(modification) 중 어느 하나의 방법 또는 이러한 방법들의 조합을 통하여 변형시킬 수 있다.

[421] 이러한 방법들의 조합으로 제조되는 글루카곤의 유도체의 예로, 천연형 글루카곤과 아미노산 서열이 하나 이상 다르고, N-말단 아미노산 잔기에 탈아미노화 (deamination)된, 글루카곤 수용체에 대한 활성화 기능을 보유한 펩타이드 등이 있으나, 이에 제한되지 않으며, 유도체 제조를 위한 여러 방법들의 조합으로 본 발명에 적용되는 천연형 글루카곤의 유도체를 제조할 수 있다.

[422] 또한, 천연형 글루카곤의 유도체의 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. 또한, 상기 변형은 비 천연형 화합물로의 치환을 모두 포함한다.

[423] 또한, 천연형 글루카곤의 아미노 및/또는 카르복시 말단에 하나 또는 그 이상의 아미노산이 추가된 것을 모두 포함한다.

[424] 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.

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

[426]

[427] 글루카곤은 약 7의 pI를 가지고 있어서 생리학적 pH (pH 4-8)의 용액 중에서

불용성이고 중성 pH에서는 침전되는 경향이 있다. pH 3 이하의 수용액 중에서, 글루카곤은 초기에는 용해되지만 1시간 이내에 겔 형성으로 인해 침전된다. 겔화된 글루카곤은 주로 β -시트 피브릴로 이루어지고, 이렇게 침전된 글루카곤은 겔이 주사 바늘이나, 정맥으로 투여되는 경우, 혈관을 막히게 하기 때문에 주사제로 사용하기에 적합하지 않다. 침전 과정을 지연시키기 위하여, 산성(pH 2-4) 제형을 사용하는 것이 통상적인데, 이를 통해 단시간 동안 상대적으로 무응집 상태로 글루카곤을 유지할 수 있다. 그러나 글루카곤의 피브릴 형성이 낮은 pH에서 매우 신속하게 이루어지기 때문에 이러한 산성 제형은 조제 후 즉시 주사되어야만 한다.

[428]

[429] 이에 본 발명에서는 천연 글루카곤의 pI를 음전하 및 양전하를 띤 아미노산 잔기의 치환에 의해 변화시켜 연장된 작용 프로파일을 갖는 글루카곤 유도체를 개발하였다. 본 발명의 글루카곤 유도체는 천연 글루카곤에 비해 변화된 pI를 가짐으로써 중성 pH에서 개선된 용해도 및/또는 높은 안정성을 나타낼 수 있는 것을 특징으로 한다.

[430]

[431] 하나의 구체적인 양태로서, 상기 글루카곤 유도체는 하기 일반식 1의 아미노산 서열을 포함하는 펩타이드일 수 있다.

[432]

[433] X1-X2-QGTF-X7-SD-X10-S-X12-X13-X14-X15-X16-X17-X18-X19-X20-X21-F-X23-X24-W-L-X27-X28-X29-X30 (일반식 1, 서열번호: 45)

[434]

[435] 상기 식에서,

[436] X1은 히스티딘, 데스아미노-히스티딜(desamino-histidyl), 디메틸-히스티딜(N-dimethyl-histidyl), 베타-히드록시 이미다조프로피오닐(beta-hydroxy imidazopropionyl), 4-이미다조아세틸(4-imidazoacetyl), 베타-카르복시 이미다조프로피오닐(beta-carboxy imidazopropionyl), 트립토판, 또는 티로신이거나, 부존재하고;

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

[438] X7은 트레오닌, 발린 또는 시스테인이고;

[439] X10은 티로신 또는 시스테인이고;

[440] X12는 리신 또는 시스테인이고;

[441] X13은 티로신 또는 시스테인이고;

[442] X14는 류신 또는 시스테인이고;

[443] X15는 아스파르트산, 글루탐산 또는 시스테인이고;

[444] X16은 글루탐산, 아스파르트산, 세린, 알파-메틸-글루탐산, 또는

- 시스테인이거나, 부존재하며;
- [445] X17은 아스파르트산, 글루타민, 글루탐산, 리신, 아르기닌, 세린, 시스테인, 또는 발린이거나, 부존재하며;
- [446] X18은 알라닌, 아스파르트산, 글루탐산, 아르기닌, 발린, 또는 시스테인이거나, 부존재하며;
- [447] X19는 알라닌, 아르기닌, 세린, 발린, 또는 시스테인이거나, 부존재하며;
- [448] X20은 리신, 히스티딘, 글루타민, 아스파르트산, 아르기닌, 알파-메틸-글루탐산, 또는 시스테인이거나, 부존재하며;
- [449] X21은 아스파르트산, 글루탐산, 류신, 발린, 또는 시스테인이거나, 부존재하며;
- [450] X23은 이소류신, 발린, 또는 아르기닌이거나, 부존재하며;
- [451] X24는 발린, 아르기닌, 알라닌, 시스테인, 글루탐산, 리신, 글루타민, 알파-메틸-글루탐산, 또는 류신이거나, 부존재하며;
- [452] X27는 이소류신, 발린, 알라닌, 리신, 메티오닌, 글루타민, 또는 아르기닌이거나, 부존재하며;
- [453] X28은 글루타민, 리신, 아스파라긴, 또는 아르기닌이거나, 부존재하며;
- [454] X29는 리신, 알라닌, 글리신, 또는 트레오닌이거나, 부존재하며;
- [455] X30은 시스테인이거나, 부존재할 수 있다
- [456] (단, 상기 일반식 1의 아미노산 서열이 서열번호: 1과 동일한 경우는 제외함).
- [457]
- [458] 보다 더 구체적으로는,
- [459] 상기 일반식 1에서,
- [460] X1이 히스티딘, 트립토판, 또는 티로신이거나, 부존재하고;
- [461] X2가 세린 또는 Aib(aminoisobutyric acid)이며;
- [462] X7은 트레오닌, 발린 또는 시스테인이고;
- [463] X10은 티로신 또는 시스테인이고;
- [464] X12는 리신 또는 시스테인이고;
- [465] X13은 티로신 또는 시스테인이고;
- [466] X14는 류신 또는 시스테인이고;
- [467] X15는 아스파르트산, 또는 시스테인이고;
- [468] X16은 글루탐산, 세린 또는 시스테인이며;
- [469] X17은 아스파르트산, 글루탐산, 리신, 아르기닌, 세린, 시스테인, 또는 발린
이고;
- [470] X18은 아스파르트산, 글루탐산, 아르기닌, 또는 시스테인이며;
- [471] X19는 알라닌, 또는 시스테인이고;
- [472] X20은 글루타민, 아스파르트산, 리신, 또는 시스테인이며;
- [473] X21은 아스파르트산, 글루탐산, 류신, 발린, 또는 시스테인이고;
- [474] X23은 이소류신, 발린 또는 아르기닌이며;
- [475] X24는 발린, 아르기닌, 알라닌, 글루탐산, 리신, 글루타민, 또는 류신이고;

- [476] X27는 이소류신, 발린, 알라닌, 메티오닌, 글루타민 또는 아르기닌이며;
- [477] X28은 글루타민, 리신, 아스파라긴 또는 아르기닌이고;
- [478] X29는 트레오닌이며;
- [479] X30은 시스테인이거나, 부존재할 수 있다 (일반식 1의 아미노산 서열이 서열번호 1과 동일한 경우는 제외함).
- [480]
- [481] 그 예로, 상기 펩타이드는 서열번호: 2 내지 44로 이루어진 군에서 선택된 아미노산 서열을 포함하는 것, 구체적으로 서열번호: 2 내지 44로 이루어진 군에서 선택된 아미노산 서열로 (필수적으로) 구성된 것 일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [482] 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.
- [483] 이상의 내용은 본 발명의 다른 구체예 혹은 다른 양태에도 적용될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [484]
- [485] 구체적으로, 상기 일반식 1에서,
- [486] 상기 일반식 1에서
- [487] X1이 히스티딘, 트립토판, 또는 티로신이고;
- [488] X2가 세린 또는 Aib(aminoisobutyric acid)이며;
- [489] X7은 시스테인, 트레오닌, 또는 발린이고;
- [490] X10은 티로신 또는 시스테인이고;
- [491] X12는 리신 또는 시스테인이고;
- [492] X13은 티로신 또는 시스테인이고;
- [493] X14는 류신 또는 시스테인이고;
- [494] X15는 아스파르트산, 또는 시스테인이고;
- [495] X16은 글루탐산, 세린 또는 시스테인이며;
- [496] X17은 글루탐산, 리신, 아르기닌, 시스테인, 또는 발린이고;
- [497] X18은 아르기닌, 또는 시스테인이며;
- [498] X19는 알라닌, 또는 시스테인이고;
- [499] X20은 글루타민 또는 리신이며;
- [500] X21은 아스파르트산, 글루탐산, 발린, 또는 시스테인이고;
- [501] X23은 발린이며;
- [502] X24는 발린 또는 글루타민이고;
- [503] X27는 메티오닌이며;

- [504] X28은 아스파라긴 또는 아르기닌이고;
- [505] X29는 트레오닌이며;
- [506] X30은 시스테인이거나, 부존재하는 것일 수 있다.
- [507]
- [508] 그 예로, 상기 펩타이드는 서열번호: 3, 11 내지 17, 19 내지 27, 29, 31, 33, 35 내지 44로 이루어진 군에서 선택된 아미노산 서열을 포함하는 것, 구체적으로 서열번호: 3, 11 내지 17, 19 내지 27, 29, 31, 33, 35 내지 44로 이루어진 군에서 선택된 아미노산 서열로 (필수적으로) 구성된 것 일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [509]
- [510] 구체적으로,
- [511] 상기 일반식 1에서
- [512] X1이 티로신이고;
- [513] X2가 Aib(aminoisobutyric acid)이며;
- [514] X7은 시스테인, 트레오닌, 또는 발린이고;
- [515] X10은 티로신 또는 시스테인이고;
- [516] X12는 리신이고;
- [517] X13은 티로신 또는 시스테인이고;
- [518] X14는 류신 또는 시스테인이고;
- [519] X15는 아스파르트산, 또는 시스테인이고;
- [520] X16은 글루탐산, 세린 또는 시스테인이며;
- [521] X17은 리신, 아르기닌, 시스테인, 또는 발린이고;
- [522] X18은 아르기닌, 또는 시스테인이며;
- [523] X19는 알라닌, 또는 시스테인이고;
- [524] X20은 글루타민 또는 리신이며;
- [525] X21은 아스파르트산, 글루탐산, 또는 시스테인이고;
- [526] X23은 발린이며;
- [527] X24는 글루타민이고;
- [528] X27는 메티오닌이며;
- [529] X28은 아스파라긴 또는 아르기닌이고;
- [530] X29는 트레오닌이며;
- [531] X30은 시스테인이거나, 부존재하는 것일 수 있다 (일반식 1의 아미노산 서열이 서열번호: 1과 동일한 경우는 제외함).
- [532]
- [533] 그 예로, 상기 펩타이드는 서열번호: 12, 14, 17, 19 내지 25, 27, 29, 33, 35 내지 38, 40 내지 42, 및 44로 이루어진 군에서 선택된 아미노산 서열을 포함하는 것, 구체적으로 서열번호: 12, 14, 17, 19 내지 25, 27, 29, 33, 35 내지 38, 및 40 내지 42, 44로 이루어진 군에서 선택된 아미노산 서열로 (필수적으로) 구성된 것 일 수

있으나, 이에 제한되지 않는다.

[534]

[535] 구체적으로, 상기 일반식 1에서

[536] X1이 히스티딘, 트립토판, 또는 티로신이거나, 부존재하고;

[537] X2가 세린 또는 Aib(aminoisobutyric acid)이며;

[538] X7은 트레오닌, 발린 또는 시스테인이고;

[539] X10은 티로신 또는 시스테인이고;

[540] X12는 리신 또는 시스테인이고;

[541] X13은 티로신 또는 시스테인이고;

[542] X14는 류신 또는 시스테인이고;

[543] X15는 아스파르트산, 또는 시스테인이고;

[544] X16은 글루탐산, 세린 또는 시스테인이며;

[545] X17은 아스파르트산, 글루탐산, 리신, 아르기닌, 세린, 시스테인, 또는 발린
이고;

[546] X18은 아스파르트산, 글루탐산, 아르기닌, 또는 시스테인이며;

[547] X19는 알라닌, 또는 시스테인이고;

[548] X20은 글루타민, 아스파르트산, 또는 리신이며;

[549] X21은 아스파르트산, 또는 글루탐산이고;

[550] X23은 발린이며;

[551] X24는 발린 또는 글루타민이고;

[552] X27은 이소류신 또는 메티오닌이며;

[553] X28은 아스파라긴 또는 아르기닌이고;

[554] X29는 트레오닌이며;

[555] X30은 시스테인이거나, 부존재하는 것일 수 있다 (일반식 1의 아미노산 서열이
서열번호 1과 동일한 경우는 제외함).

[556]

[557] 그 예로, 상기 펩타이드는 서열번호 2 내지 13, 15, 17, 20 내지 24, 26 내지 30, 및
32 내지 44로 이루어진 군에서 선택된 아미노산 서열을 포함하는 것, 구체적으로
서열번호 2 내지 13, 15, 17, 20 내지 24, 26 내지 30, 및 32 내지 44로 이루어진
군에서 선택된 아미노산 서열로 (필수적으로) 구성된 것 일 수 있으나, 이에
제한되지 않는다.

[558]

[559] 구체적으로, 상기 일반식 1에서

[560] X1이 티로신이거나;

[561] X2가 Aib(aminoisobutyric acid)이며;

[562] X7은 트레오닌이고;

[563] X10은 티로신이고;

[564] X12는 리신이고;

- [565] X13은 티로신이고;
- [566] X14는 류신이고;
- [567] X15는 아스파르트산, 또는 시스테인이고;
- [568] X16은 글루탐산, 세린 또는 시스테인이며;
- [569] X17은 리신 또는 아르기닌이고;
- [570] X18은 아르기닌이며;
- [571] X19는 알라닌이고;
- [572] X20은 글루타민, 시스테인, 또는 리신이며;
- [573] X21은 아스파르트산, 시스테인, 발린 또는 글루탐산이고;
- [574] X23은 발린 또는 아르기닌이며;
- [575] X24는 글루타민 또는 류신이고;
- [576] X27는 메티오닌이며;
- [577] X28은 아스파라긴 또는 아르기닌이고;
- [578] X29는 트레오닌이며;
- [579] X30은 부존재하는 것일 수 있다.
- [580]
- [581] 그 예로, 상기 펩타이드는 서열번호: 14, 16, 18, 19, 25, 및 31로 이루어진 군에서 선택된 아미노산 서열을 포함하는 것, 구체적으로 서열번호: 14, 16, 18, 19, 25, 및 31로 이루어진 군에서 선택된 아미노산 서열로 (필수적으로) 구성된 것 일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [582]
- [583] 더 구체적으로, 상기 펩타이드는 하기 일반식 2의 아미노산 서열을 포함하는 펩타이드일 수 있다:
- [584]
- [585] Y-Aib-QGTF-X7-SD-X10-S-X12-Y-L-X15-X16-X17-R-A-X20-X21-F-V-X24-W-L-M-N-T-X30 (일반식 2, 서열번호: 46)
- [586]
- [587] 상기 일반식 2에서
- [588] X7은 트레오닌, 발린 또는 시스테인이고;
- [589] X10은 티로신 또는 시스테인이고;
- [590] X12는 리신 또는 시스테인이고;
- [591] X15는 아스파르트산, 또는 시스테인이고;
- [592] X16은 글루탐산 또는 세린이며;
- [593] X17은 리신 또는 아르기닌이고;
- [594] X20은 글루타민 또는 리신이며;
- [595] X21은 아스파르트산, 또는 글루탐산이고;
- [596] X24는 발린 또는 글루타민이고;
- [597] X30은 시스테인이거나, 부존재할 수 있다.

[598]

[599] 그 예로, 상기 펩타이드는 서열번호: 12, 13, 15 및 36 내지 44로 이루어진 군에서 선택된 아미노산 서열을 포함하는 것, 구체적으로 서열번호: 12, 13, 15 및 36 내지 44로 이루어진 군에서 선택된 아미노산 서열로 (필수적으로) 구성된 것 일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 보다 더 구체적으로, 상기 펩타이드는 서열번호: 12, 20, 혹은 37의 아미노산 서열을 포함하거나, 해당 아미노산 서열로 (필수적으로) 구성되는 것을 특징으로 한다. 그러나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[600]

[601] 구체적으로, 상기 일반식 2에서
 [602] X7은 트레오닌, 발린 또는 시스테인이고;
 [603] X10은 티로신 또는 시스테인이고;
 [604] X12는 리신이고;
 [605] X15는 아스파르트산이고;
 [606] X16은 글루탐산 또는 세린이며;
 [607] X17은 리신 또는 아르기닌이고;
 [608] X20은 글루타민 또는 리신이며;
 [609] X21은 아스파르트산 또는 글루탐산이고;
 [610] X24는 글루타민이고;
 [611] X30은 시스테인이거나, 부존재하는 것일 수 있으나, 특별히 이에 제한되는 것은 아니다.

[612] 그 예로, 상기 펩타이드는 서열번호: 12, 36 내지 38, 40 내지 42, 및 44로 이루어진 군에서 선택된 아미노산 서열을 포함하는 것, 구체적으로 서열번호: 12, 36 내지 38, 40 내지 42, 및 44로 이루어진 군에서 선택된 아미노산 서열로 (필수적으로) 구성된 것 일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[613] 단, 상기 분리된 펩타이드 중에서 서열번호: 2 내지 11, 14, 16 내지 35, 49, 및 50, 구체적으로 서열번호: 19, 33, 49, 및 50에 해당하는 펩타이드들은 상기 청구된 범주로부터 제외되는 조합도 존재할 수도 있으나, 특별히 이에 제한되는 것은 아니며, 청구항에 별도의 다른 언급이 없는 한 청구항에 기술된 펩타이드는 모두 본 발명의 범주에 포함된다.

[614]

[615] 상술한 글루카곤 유도체는 분자 내 가교 (intramolecular bridge)를 포함할 수 있으며 (예컨대, 공유결합적 가교 또는 비공유결합적 가교), 구체적으로 고리를 포함하는 형태일 수 있다. 예컨대 글루카곤 유도체의 16번 및 20번 아미노산 사이에 고리가 형성된 형태일 수 있으나, 특별히 이에 제한되는 것은 아니다.

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

[617] 또한, 상기 글루카곤 유도체는 고리를 포함하도록, 목적하는 위치에 고리를 형성할 수 있는 아미노산을 포함하도록 변형된 것을 모두 포함한다.

[618] 이러한 고리는 상기 글루카곤 유도체 내의 아미노산 곁 사슬 간에 형성될 수

있으며, 그 예로 리신의 결 사슬과 글루탐산의 결 사슬 간에 락탐 고리가 형성되는 형태일 수 있으나, 특별히 이에 제한되는 것은 아니다.

- [619] 예컨대, 상기 일반식 1 혹은 일반식 2의 아미노산 서열을 포함하는 펩타이드는 일반식 1 혹은 일반식 2의 X10과 X14, X12와 X16, X16과 X20, X17과 X21, X20과 X24, 및 X24와 X28의 아미노산 쌍에서, 각 아미노산 쌍의 아미노산이 각각 글루탐산 또는 리신으로 치환된 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 상기, X_n (n은 자연수)에서 n은 제시된 아미노산 서열의 N-말단으로부터의 아미노산 위치를 나타낸다.
- [620] 또한, 상기 일반식 1 혹은 일반식 2의 아미노산 서열을 포함하는 펩타이드는 X12와 X16의 아미노산 쌍, X16과 X20의 아미노산 쌍, 또는 X17과 X21의 아미노산 쌍의 아미노산 각각이 고리를 형성할 수 있는 글루탐산 또는 리신으로 치환된 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [621] 또한, 상기 일반식 1 혹은 2에서, X10과 X14, X12와 X16, X16과 X20, X17과 X21, X20과 X24, 및 X24와 X28의 아미노산 쌍 중 적어도 하나의 아미노산 쌍에서 각 아미노산 쌍의 각각의 아미노산 간에 고리 (예컨대, 락탐 고리)를 형성한 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [622] 또한, 상기 일반식 1 또는 2에서, X16이 글루탐산이고, X20은 리신이며, X16과 X20의 측쇄가 락탐 고리를 형성하고 있는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [623]
- [624] 또한, 본 발명에 따른 펩타이드는 N-말단 및/또는 C-말단이 변형되지 않은 것일 수 있으나, 생체 내의 단백질 절단 효소들로부터 보호하고 안정성을 증가시키기 위하여 이의 N-말단 및/또는 C-말단 등이 화학적으로 수식되거나 유기단으로 보호되거나, 또는 펩타이드 말단 등에 아미노산이 추가되어 변형된 형태 역시 본 발명에 따른 펩타이드의 범주에 포함된다. C-말단이 변형되지 않은 경우, 본 발명에 따른 펩타이드의 말단은 카르복실기를 가지나, 특별히 이에 제한되는 것은 아니다.
- [625] 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.
- [626] 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.

- [627] 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.
- [628] 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.
- [629] 또한, 본 발명에서 사용된 용어 "용매화물"은 본 발명에 따른 펩타이드, 결합체, 또는 이의 염이 용매 분자와 복합체를 형성한 것을 말한다.
- [630]
- [631] 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.
- [632] 구체적으로, 본 발명의 펩타이드는 표준 합성 방법, 재조합 발현 시스템, 또는 임의의 다른 당해 분야의 방법에 의해 제조될 수 있다. 따라서, 본 발명에 따른 글루카곤 유도체는, 예를 들어 하기를 포함하는 방법을 포함하는 다수의 방법으로 합성될 수 있다:
- [633] (a) 펩타이드를 고체상 또는 액체상 방법의 수단으로 단계적으로 또는 단편 조립에 의해 합성하고, 최종 펩타이드 생성물을 분리 및 정제하는 방법; 또는
- [634] (b) 펩타이드를 인코딩하는 핵산 작제물을 숙주세포 내에서 발현시키고, 발현 생성물을 숙주 세포 배양물로부터 회수하는 방법; 또는
- [635] (c) 펩타이드를 인코딩하는 핵산 작제물의 무세포 시험관 내 발현을 수행하고, 발현 생성물을 회수하는 방법; 또는
- [636] (a), (b) 및 (c)의 임의의 조합으로 펩타이드의 단편을 수득하고, 이어서 단편을 연결시켜 펩타이드를 수득하고, 당해 펩타이드를 회수하는 방법.
- [637] 보다 구체적인 예로, 유전자 조작을 통하여, 융합파트너 및 글루카곤 유도체를 포함하는 융합 단백질을 코딩하는 융합 유전자를 제조하고 이를 숙주 세포에 형질전환시킨 후, 융합 단백질 형태로 발현하고, 단백질 분해효소 또는 화합물을 이용하여 융합 단백질로부터 글루카곤 유도체를 절단, 분리하여 원하는 글루카곤 유도체를 생산할 수 있다. 이를 위하여 예를 들어 Factor Xa나 엔테로키나제와 같은 단백질 분해효소, CNBr 또는 하이드록실아민과 같은 화합물에 의해 절단될 수 있는 아미노산 잔기를 코딩하는 DNA 서열을

융합파트너와 글루카곤 유도체를 코딩하는 폴리뉴클레오티드 사이에 삽입할 수 있다.

[638]

[639] 보다 구체적인 양태로서, 글루카곤 유도체, 예컨대 상기 일반식 1 혹은 2의 아미노산 서열을 포함하는 펩타이드는 이의 생체 내 반감기를 증가시키는 생체적합성 물질부에 결합된, 지속형 결합체의 형태일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 상기 생체적합성 물질부는 캐리어와 혼용될 수 있다.

[640]

구체적으로, 상기 결합체는 펩타이드 부위 및 상기 펩타이드 부위에 공유결합으로 연결된 생체적합성 물질부를 포함하며, 상기 펩타이드 부위는 상기 일반식 1 또는 2의 아미노산 서열과 동일한 서열이거나 이를 포함하는 서열일 수 있다.

[641]

본 발명에서 용어, "지속형 결합체"는 생리활성물질 (예, 글루카곤 유도체, 인슐린 분비 펩타이드 등)에 생체적합성 물질부 또는 캐리어가 결합된 형태로서, 생체적합성 물질부 또는 캐리어가 결합되지 않은 생리활성물질에 비하여 증가된 효력의 지속성 (예, 체내 반감기 증가)을 나타내는 결합체를 지칭한다. 상기 지속형 결합체에서 생체적합성 물질부 또는 캐리어는 생리활성물질에 공유결합으로 연결된 것일 수 있으나, 특별히 이에 제한되지 않는다.

[642]

본 발명의 구체적인 실시 형태에서 상기 글루카곤 유도체의 결합체는 효력의 지속성이 캐리어가 결합되지 않은 천연형 글루카곤 혹은 글루카곤 유도체에 비해 증가할 수 있다.

[643]

본 발명에서 용어, "생체적합성 물질부"는 생리활성물질 (예, 글루카곤 유도체, 인슐린 분비 펩타이드 등)에 결합되어 생체적합성 물질부 또는 캐리어와 결합되지 않은 생리활성물질에 비하여 생리활성물질의 효력의 지속성을 증가시켜줄 수 있는 물질을 지칭한다. 상기 생체적합성 물질부는 생리활성물질에 공유결합으로 연결된 것일 수 있으나, 특별히 이에 제한되지 않는다.

[644]

상기 생체적합성 물질부의 예로, 고분자 중합체, 지방산, 콜레스테롤, 알부민 및 이의 단편, 알부민 결합물질, 특정 아미노산 서열의 반복단위의 중합체, 항체, 항체 단편, FcRn 결합물질, 생체 내 결합조직 혹은 그 유도체, 뉴클레오타이드, 파이브로넥틴, 트랜스페린(transferrin), 당류, 헤파린, 혹은 엘라스틴을 들 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[645]

상기 고분자 중합체의 예로, 폴리에틸렌 글리콜 (PEG), 폴리프로필렌 글리콜, 에틸렌 글리콜-프로필렌 글리콜 공중합체, 폴리옥시에틸화폴리올, 폴리비닐알콜, 다당류, 텍스트란, 폴리비닐에틸에테르, 생분해성 고분자, 지질 중합체, 키틴, 히알루론산, 올리고뉴클레오타이드 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 고분자 중합체를 들 수 있으나, 특별히 이에 제한되지 않는다.

[646]

상기 폴리에틸렌 글리콜은, 에틸렌 글리콜 동중 중합체, PEG 공중합체, 또는

모노메틸-치환된 PEG 중합체 (mPEG)의 형태를 모두 포괄하는 용어이나, 특별히 이에 제한되는 것은 아니다.

- [647] 또한, 상기 생체적합성 물질부는 폴리-리신, 폴리-아스파르트산 및 폴리-글루탐산과 같은 폴리-아미노산을 포함하나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [648] 또한, 지방산은 생체 내 알부민과 결합력을 갖는 것일 수 있으나, 특별히 이에 제한되지 않는다.
- [649] 보다 구체적인 예로, 상기 FcRn 결합물질은 면역글로불린 Fc 영역일 수 있으며, 보다 구체적으로 IgG Fc 영역일 수 있으나, 특별히 이에 제한되지 않는다.
- [650] 본 발명의 펩타이드 내의 하나 이상의 아미노산 측쇄는 생체 내에서 가용성 및/또는 반감기를 증가시키고/시키거나 생체이용율을 증가시키기 위해 이러한 생체적합성 물질부에 접합될 수 있다. 이러한 변형은 또한 치료학적 단백질 및 펩타이드의 소거(clearance)를 감소시킬 수 있다.
- [651] 이러한 생체적합성 물질부는 수용성(양친매성 또는 친수성) 및/또는 무독성 및/또는 약학적으로 허용가능한 것일 수 있다.
- [652] 이렇게 변형된 글루카곤 유도체가 천연 글루카곤보다 우월한 치료학적 효과를 나타낼 수 있다는 것은 당업자에게 있어 주지의 사실이다. 따라서, 상기한 바와 같은 글루카곤 유도체의 변이체 역시 본 발명의 글루카곤 유도체의 범위에 포함된다.
- [653]
- [654] 상기 생체적합성 물질부는 상기 글루카곤 유도체와 직접적으로 연결되거나, 또는 링커를 통해 연결된 것일 수 있다. 상기 생체적합성 물질부는 글루카곤 유도체와 직접 혹은 링커와 연결될 때, 공유결합으로 연결된 것일 수 있다.
- [655] 구체적으로, 상기 링커는 펩타이드성 링커 또는 비펩타이드성 링커일 수 있다.
- [656] 상기 링커가 펩타이드성 링커일 때, 1개 이상의 아미노산을 포함할 수 있으며, 예컨대 1개부터 1000개의 아미노산을 포함할 수 있으나, 특별히 이에 제한되는 것은 아니다. 본 발명에서 공지된 다양한 펩타이드 링커가 본 발명에 사용될 수 있으며, 그 예로 [GS] x 링커, [GGGS] x 링커 및 [GGGGS] x 링커 등을 포함하며, 여기서 x 는 1 이상의 자연수일 수 있다. 그러나, 상기 예에 제한되는 것은 아니다.
- [657] 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 있다.
- [658] 본 발명에서 상기 비펩타이드성 링커는 비펩타이드성 중합체와 혼용되어 사용될 수 있다.
- [659] 하나의 구체적인 실시 형태에서 양쪽 말단에 생체적합성 물질부(구체적으로, 면역글로불린 Fc 영역) 및 펩타이드 약물과 각각 결합될 수 있는 반응기를 포함하는 비펩타이드성 링커를 통하여 상기 생체적합성 물질부와 상기 펩타이드가 공유결합적으로 연결된 것일 수 있다.

- [660] 구체적으로, 상기 비펩타이드성 링커는 지방산, 당류(saccharide), 고분자 중합체, 저분자 화합물, 뉴클레오타이드 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것일 수 있다.
- [661] 특별히 이에 제한되지는 않으나, 본 발명에서 상기 고분자 중합체는 0 초과 약 100 kDa 범위, 구체적으로 약 1 내지 약 100 kDa 범위, 보다 더 구체적으로 약 1 내지 약 20 kDa 범위일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [662] 특별히 이에 제한되지는 않으나, 상기 비펩타이드성 링커는 폴리에틸렌 글리콜, 폴리프로필렌 글리콜, 에틸렌 글리콜과 프로필렌 글리콜의 공중합체, 폴리옥시에틸화 폴리올, 폴리비닐알콜, 다당류, 덱스트란, 폴리비닐에틸에테르, PLA(poly(lactic acid)) 및 PLGA(poly(lactic-glycolic acid))와 같은 생분해성 고분자; 지질 중합체; 키틴류; 히알루론산; 올리고뉴클레오타이드 및 이들의 조합으로 구성된 군으로부터 선택되는 것일 수 있다.
- [663] 보다 구체적인 실시형태에서 상기 비펩타이드성 중합체는 폴리에틸렌글리콜일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 또한, 당해 분야에 이미 알려진 이들의 유도체 및 당해 분야의 기술 수준에서 용이하게 제조할 수 있는 유도체들도 본 발명의 범위에 포함된다.
- [664] 본 발명에서 사용될 수 있는 비펩타이드성 링커는 생체 내 단백질 분해 효소에 저항성 있는 중합체이면 제한 없이 사용될 수 있다. 비펩타이드성 중합체의 분자량은 0 초과 약 100kDa 이하인 범위, 구체적으로 약 1 내지 100 kDa 범위, 구체적으로 약 1 내지 약 20 kDa 범위이나, 이에 제한되지 않는다. 또한, 상기 면역글로불린 Fc 영역을 포함하는 폴리펩타이드와 결합되는 본 발명의 비펩타이드성 링커는 한 종류의 중합체뿐만 아니라 상이한 종류의 중합체들의 조합이 사용될 수도 있다.
- [665] 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.
- [666] 구체적으로, 상기 링커는 한쪽 말단이 생체적합성 물질부의 아민기 또는 티올기와, 상기 링커의 다른 말단이 펩타이드 부위, 구체적으로 일반식 1 또는 2의 아미노산 서열의 아민기 또는 티올기와 각각 반응하여 형성된 공유결합으로 상기 펩타이드 부위와 상기 생체적합성 물질부에 각각 연결되어 있는 것일 수 있다.
- [667] 하나의 구체적인 실시 형태에서 상기 비펩타이드성 링커의 한쪽 말단이 면역글로불린 Fc 영역의 아민기 또는 티올기와, 상기 링커의 다른 말단이 글루카곤 유도체의 아민기 또는 티올기와 각각 반응하여 형성된 공유결합을 형성할 수 있다. 구체적으로, 상기 비펩타이드성 중합체는 양쪽 말단에 각각 생체적합성 물질부, 구체적으로 면역글로불린 Fc 영역 및 글루카곤 유도체와 결합될 수 있는 반응기, 예를 들면 글루카곤 유도체의 N-말단 또는 리신에 위치한 아민기, 또는 시스테인의 티올기, 혹은 생체적합성 물질(예를 들어

구체적으로, 면역글로불린 Fc 영역)의 N-말단 또는 리신에 위치한 아민기, 또는 시스테인의 티올기와 반응함으로써 상기 생체적합성 물질과 상기 글루카곤 유도체에 공유결합을 형성할 수 있는 반응기를 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

- [668] 또한, 생체적합성 물질부, 구체적으로 면역글로불린 Fc 영역, 및 글루카곤 유도체와 결합될 수 있는, 상기 비펩타이드성 중합체의 말단 반응기는 알데히드기, 말레이미드기 및 석시니미드 유도체로 구성된 군으로부터 선택될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [669] 상기에서, 알데히드기로 프로피온 알데히드기 또는 부틸 알데히드기를 예로 들 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [670] 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.
- [671] 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.
- [672] 또한, 상기 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 면역글로불린 Fc 영역과 글루카곤 유도체가 결합될 수 있다면, 특별히 이에 제한되지 않는다.
- [673] 예를 들어, 상기 비펩타이드성 링커의 한쪽 말단에는 반응기로서 말레이미드기를 포함하고, 다른 쪽 말단에는 알데히드기, 프로피온 알데히드기 또는 부틸 알데히드기 등을 포함할 수 있다.
- [674] 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.
- [675] 하나의 구체적인 실시 형태에서 상기 비펩타이드성 중합체는 글루카곤 유도체의 시스테인 잔기, 보다 구체적으로 시스테인의 -SH기에 연결되는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 여기서, 상기 비펩타이드성 중합체는 폴리에틸렌글리콜일 수 있으나, 특별히 이에 제한되지 않으며, 앞서 기술한 다른 종류의 비펩타이드성 중합체 역시 해당될 수 있다.
- [676] 구체적인 양태로서, 상기 결합체는 서열번호: 12, 20, 혹은 37의 아미노산

서열을 포함하는 펩타이드와 면역글로불린 Fc 영역이 비펩타이드성 중합체를 통하여 연결된 것이고, 여기서 비펩타이드성 중합체는 서열번호: 12의 아미노산 서열에서 30번째에 위치한 시스테인 잔기, 서열번호: 20의 아미노산 서열에서 17번째에 위치한 시스테인 잔기, 혹은 서열번호: 37의 아미노산 서열에서 30번째에 위치한 시스테인 잔기에 연결된 것일 수 있다. 그러나, 이에 제한되는 것은 아니다. 여기서, 상기 비펩타이드성 중합체는 폴리에틸렌글리콜일 수 있으나, 특별히 이에 제한되지 않으며, 앞서 기술한 다른 종류의 비펩타이드성 중합체 역시 해당될 수 있다.

[677] 만약, 말레이미드-PEG-알데히드를 사용하는 경우, 말레이미드 기는 글루카곤 유도체의 -SH기와 티오에테르(thioether) 결합으로 연결하고, 알데히드기는 면역글로불린 Fc의 -NH₂기와 환원적 아민화 반응을 통해 연결할 수 있으나, 이에 제한되지 않으며, 이는 하나의 일례에 해당한다.

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

[679]

[680] 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 단백질 결합체의 모이어티를 이루는 일 구성일 수 있다.

[681]

[682] 이러한 면역글로불린 Fc 영역은 중쇄 불변영역에 힌지(hinge) 부분을 포함할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 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 Fc영역일 수 있다. 또한, CH2 및/또는 CH3에 해당하는 상당히 긴 일부 아미노산 서열이 제거된 영역일 수도 있다.

[683] 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.

[684] 또한, 하나의 구체예로서, 상기 면역글로불린 Fc 영역은 이량체 형태(dimeric form)일 수 있으며, 이합체 형태의 하나의 Fc 영역에 글루카곤 유도체 한 분자가 공유결합적으로 연결될 수 있으며, 이때 상기 면역글로불린 Fc와 글루카곤 유도체는 비펩타이드성 중합체에 의해 서로 연결될 수 있다. 한편, 이량체

형태의 하나의 Fc 영역에 글루카곤 유도체 두 분자가 대칭적으로 결합하는 것 역시 가능하다. 이때 상기 면역글로불린 Fc와 글루카곤 유도체 혹은 인슐린 분비 펩타이드는 비펩타이드성 링커에 의해 서로 연결될 수 있다. 그러나, 상기 기술된 예에 제한되는 것은 아니다.

- [685] 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.
- [686] 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.
- [687] 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.
- [688] 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), 황산화(sulfation), 아크릴화(acrylation), 당화(glycosylation), 메틸화(methylation), 파네실화(farnesylation), 아세틸화(acetylation) 및 아마이드화(amidation) 등으로 수식(modification)될 수도 있다.
- [689] 상기 기술한 Fc 유도체는 본 발명의 Fc 영역과 동등한 생물학적 활성을 나타내며 Fc 영역의 열, pH 등에 대한 구조적 안정성을 증대시킨 것일 수 있다.
- [690]
- [691] 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, 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.

- [692] 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.
- [693] 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.
- [694] 한편, 면역글로불린 Fc 영역은 인간 또는 소, 염소, 돼지, 마우스, 래빗, 햄스터, 랫트, 기니아 피그 등의 동물기원일 수 있으며, 더 구체적인 실시 형태에서는 인간기원이다.
- [695] 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.
- [696]
- [697] 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.
- [698]
- [699] 본 발명의 조성물은 선천성 고인슐린증, 저혈당, 또는 대사증후군의 예방 또는 치료에 사용될 수 있다.
- [700] 본 발명에서 용어 "예방"은 상기 글루카곤 유도체, 이를 포함하는 결합체, 또는 조성물의 투여로 목적하는 질환, 예컨대 선천성 고인슐린증, 저혈당, 또는 대사증후군의 발병을 억제 또는 지연시키는 모든 행위를 의미하며, "치료"는 상기 글루카곤 유도체, 이를 포함하는 결합체, 또는 조성물의 투여로 목적하는

질환, 예컨대 선천성 고인슐린증, 저혈당, 또는 대사증후군의 증세가 호전되거나 이롭게 되는 모든 행위를 의미한다.

- [701] 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, 피내 투여, 경구 투여, 국소 투여, 비 내 투여, 폐 내 투여, 직장 내 투여 등이 될 수 있다.
- [702] 본 발명에서 용어 "저혈당"은 혈중 당량이 정상인보다 낮은 상태를 말한다. 통상 혈당이 50 mg/dl 이하일 때를 말하나, 특별히 이에 제한되는 것은 아니다. 저혈당증이 생기는 흔한 원인은 경구용 혈당강하제나 인슐린을 사용하는 사람이 평소보다 음식 섭취량이 적거나 활동량이나 운동량이 과한 경우이다. 이외에도 음주나 일부 혈당을 떨어뜨리는 약물의 사용, 중증의 신체적 질환, 부신피질호르몬이나 글루카곤 등의 호르몬 결핍, 인슐린 생성 췌장 종양, 인슐린에 대한 자가면역질환이 있는 경우, 위절제술 환자, 유전성 탄수화물 대사효소이상 질환 등에 의해서도 저혈당이 발생할 수 있다.
- [703] 본 발명에서 상기 저혈당은 급성 저혈당 및 만성 저혈당을 모두 포함한다.
- [704] 저혈당의 증상은 기운이 없고 몸의 떨림이 있으며, 창백, 식은땀, 현기증, 흥분, 불안감, 가슴 두근거림, 공복감, 두통, 피로감 등을 포함한다. 저혈당이 오래 지속되면 경련이나 발작이 있을 수 있고 쇼크상태가 초래되어 의식을 잃을 수도 있다.
- [705] 보다 구체적으로, 상기 저혈당은 유전적 결함에 따른 지속성 고인슐린증에 의해 유발될 수 있다. 유전적 결함에 의한 고인슐린증의 원인으로는 11p15.1 염색체에 있는 SUR 또는 Kir6.2 유전자의 돌연변이, 7p15-p13 염색체에 있는 GK (glucokinase) 유전자 돌연변이로 GK 활성도가 증가, GDH (Glutamate dehydrogenase) 유전자 돌연변이로 GDH가 활성화 되고 이로 인하여 베타 섬세포 내 ATP가 증가 등이 알려져 있다.
- [706] 한편, 선천성 고인슐린증은 신생아와 소아에서 발생하는 심각하고 지속적인 저혈당을 일으키는 원인 질환 중 하나이다. 저체중 출생아 혹은 당뇨 산모의 출생아에서 일시적인 인슐린 분비 증가, 유전자 돌연변이로 인한 췌장 세포의 이상 기능 등으로 유발될 수 있다. 이러한 선천성 고인슐린증의 치료에 글루카곤이 사용될 수 있음은 알려져 있다.
- [707] 또한, 상기 글루카곤 유도체 혹은 이를 포함하는 결합체는 대사증후군의 예방 또는 치료에 사용될 수 있다.
- [708] 또한, 본 발명의 글루카곤 유도체 혹은 이를 포함하는 결합체는 체중 증가를 예방하거나, 체중 감소를 촉진하거나, 과체중을 감소시키거나, 병적 비만을 포함하는 비만(예컨대, 식욕, 섭식, 식품 섭취, 칼로리 섭취 및/또는 에너지 소비의 조절에 의해), 뿐만 아니라 비만 관련 염증, 비만 관련 쓸개 질환 및 비만

유도된 수면 무호흡을 포함하나, 이에 한정되지 않는 관련 질환 및 건강 상태를 치료하기 위한 약제로서 사용될 수 있다. 본 발명의 글루카곤 유도체 혹은 이를 포함하는 결합체는 또한 비만 외의 대사증후군, 즉 내당증 장애, 고콜레스테롤혈증, 이상지혈증, 비만, 당뇨, 고혈압, 비알코올지방간염(nonalcoholic steatohepatitis, NASH), 이상지혈증에 의한 동맥경화, 죽상동맥경화증, 동맥경화증, 관상동맥 심질환(관동맥성 심장병), 및 뇌졸중 등과 같은 관련 질환의 치료에 사용될 수 있다. 그러나, 이들 병태에 있어서 본 발명에 따른 펩타이드의 효과는 전술한 체중 관련 효과를 통해 전체적으로 또는 부분적으로 매개될 수 있거나 이와는 독립적일 수 있다.

[709] 본 발명에서 용어 "대사증후군(metabolic syndrome)"은 만성적인 대사 장애로 인하여 일어나는 다양한 질환이 단독 또는 복합적으로 일어나는 증상을 말하며, 특히 대사증후군에 해당하는 질환으로는 내당증 장애, 고콜레스테롤혈증, 이상지혈증(dyslipidemia), 비만, 당뇨, 고혈압, 비알코올지방간염(nonalcoholic steatohepatitis, NASH), 이상지혈증에 의한 동맥경화, 죽상동맥경화증, 동맥경화증, 관상동맥 심질환(관동맥성 심장병), 및 뇌졸중 등이 있으나, 이에 제한되지는 않는다.

[710] 본 발명에서 용어 "비만"은 체내에 지방조직이 과다한 상태로, 신체비만지수(체중(kg)을 신장(m)의 제곱으로 나눈 값)가 25 이상이면 비만으로 정의된다. 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.

[711] 본 발명에 따른 글루카곤 유도체는 천연형 글루카곤에 비해 변화된 pI를 갖는 중성 pH에서 개선된 용해도 및 높은 안정성을 나타낼 수 있으며, 또한 글루카곤 수용체에 대해 활성을 나타낼 수 있으므로, 저혈당, 대사증후군 및 선천성 고인슐린증을 비롯한 목적하는 질환의 예방 또는 치료에 유용하게 사용될 수 있다.

[712]

[713] 본 발명의 약학적 조성물은 약학적으로 허용가능한 담체, 부형제 또는 희석제를 추가로 포함할 수 있다. 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.

[714] 본 발명의 펩타이드 또는 이의 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, 윤회제, 보존제 등을 사용할 수 있다.

[715] 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.

[716] 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, 윤회제, 습윤제, 향료, 방부제 등을 추가로 포함할 수 있다.

[717] 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.

[718]

[719] 또한, 상기 조성물은 약학적 분야에서 통상의 방법에 따라 환자의 신체 내 투여에 적합한 단위 투여형의 제제, 구체적으로는 펩타이드 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.

[720] 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.

[721] 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.

[722] 특별히 이에 제한되지 않으나, 본 발명의 상기 약학적 조성물은 상기 성분

(유효성분)을 0.01 내지 99% 중량 대 부피로 함유할 수 있다.

[723]

[724] 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 펩타이드 또는 결합체의 바람직한 전체 용량은 하루에 환자 체중 1 kg당 약 0.0001 μ g 내지 500 mg일 수 있다. 그러나 상기 펩타이드 또는 결합체의 용량은 약학적 조성물의 투여 경로 및 치료 횟수뿐만 아니라 환자의 연령, 체중, 건강 상태, 성별, 질환의 중증도, 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.

[725] 본 발명의 약학적 조성물은 생체 내 지속성 및 역가가 우수할 수 있으며, 다른 약제에 비해 낮은 투여 횟수 및 빈도를 나타낼 수 있으나, 특별히 이에 제한되는 것은 아니다.

[726] 특히, 본 발명의 약학적 조성물은 천연 글루카곤에 비해 변화된 pI를 갖는 글루카곤 유도체를 유효성분으로 포함하기 때문에 중성 pH에서 개선된 용해도 및/또는 높은 안정성을 나타내므로 선천성 고인슐린증, 저혈당, 또는 대사증후군을 비롯한 목적하는 질환의 치료를 위한 안정한 글루카곤 제형의 제조에 유용하게 사용될 수 있다.

[727]

[728] 상기 대사증후군의 예방 또는 치료를 위한 약학적 조성물, 또는 대사증후군의 예방 또는 치료를 위한 요법에 있어서, 상기 약학적 조성물은 대사증후군에 대한 치료적 활성을 가지는 화합물 또는 물질을 추가로 포함할 수 있으며, 상기 요법은 상기 화합물 또는 물질의 추가 사용을 포함할 수 있다.

[729] 본 발명의 병용 투여 혹은 조성물에 포함되는 상기 대사증후군에 대한 치료적 활성을 가지는 화합물 또는 물질의 예로, 인슐린 분비 펩타이드, GLP-1(glucagon like peptide-1) 수용체 아고니스트, 렙틴(Leptin) 수용체 아고니스트, DPP-IV(dipeptidyl peptidase-IV) 저해제, Y5 수용체 안타고니스트, MCH(Melanin-concentrating hormone) 수용체 안타고니스트, Y2/4 수용체 아고니스트, MC3/4(Melanocortin 3/4) 수용체 아고니스트, 위/췌장 리파아제(gastric/pancreatic lipase) 저해제, 5HT2c(5-hydroxytryptamine receptor 2C, G protein-coupled) 아고니스트, β 3A 수용체 아고니스트, 아밀린(Amylin) 수용체 아고니스트, 그렐린(Ghrelin) 안타고니스트, 그렐린 수용체 안타고니스트, PPAR α (Peroxisome proliferator-activated receptor alpha) 아고니스트,

PPAR δ (Peroxisome proliferator-activated receptor delta) 아고니스트, FXR(farnesoid X receptor) 아고니스트, 아세틸-CoA 카복실라제 억제제(acetyl-CoA carboxylase inhibitor), 펩타이드 YY, CCK(Cholecystokinin), 제닌(Xenin), 글리센틴(glicentin), 오베스타틴(obestatin), 세크레틴(secretin), 네스파틴(nesfatin), 인슐린(insulin), 또는 GIP(glucose-dependent insulintropic peptide) 를 들 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 또한, 비만치료에 효과적인 약물과 간의 염증 및 섬유화증(fibrosis)을 억제하는 약물은 모두 포함될 수 있다.

- [730] 구체적으로, 상기 인슐린 분비 펩타이드는 GLP-1, 엑센딘-3, 엑센딘-4, 이들의 아고니스트(agonist), 유도체(derivative), 단편(fragment), 변이체(variant) 및 이들의 조합으로부터 구성되는 군으로부터 선택되는 것일 수 있다.
- [731] 보다 더 구체적으로, 상기 인슐린 분비 펩타이드는 인슐린 분비 펩타이드의 N-말단 히스티딘 잔기가 데스-아미노-히스티딘, 디메틸-히스티딘, 베타-히드록시 이미다조프로피오닐, 4-이미다조아세틸 및 베타-카르복시 이미다조프로피오닐로 구성되는 군에서 선택되는 것으로 치환된 인슐린 분비 펩타이드 유도체일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 여기서, 상기 인슐린 분비 펩타이드는 GLP-1, 엑센딘-3, 또는 엑센딘-4일 수 있다.
- [732] 더 구체적으로, 상기 인슐린 분비 펩타이드는 천연형 엑센딘-4, 엑센딘-4의 N-말단 아민기가 제거된 엑센딘-4 유도체, 엑센딘-4의 N-말단 아민기가 하이드록실기로 치환된 엑센딘-4 유도체, 엑센딘-4의 N-말단 아민기가 디메틸기로 수식된 엑센딘-4 유도체, 엑센딘-4의 첫 번째 아미노산(히스티딘)의 알파 탄소를 제거(deletion)한 엑센딘-4 유도체, 엑센딘-4의 열두 번째 아미노산(리신)이 세린으로 치환된 엑센딘-4 유도체, 및 엑센딘-4의 열두 번째 아미노산(리신)이 아르기닌으로 치환된 엑센딘-4 유도체로 구성된 군으로부터 선택되는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [733] 한편, 이러한 인슐린 분비 펩타이드 혹은 이의 지속형 결합체 형태의 예로, 미국공개특허 제 2010-0105877호에 기재된 전문이 본원에 참고자료로서 포함되나, 이에 제한되지 않는다.
- [734] 또한, 상기 인슐린 분비 펩타이드는 전술한 인슐린 분비 펩타이드의 아미노산 서열을 지니는 펩타이드 부위 및 이에 공유결합으로 연결된 생체적합성 물질부를 포함하는 결합체 형태일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 구체적으로, 상기 인슐린 분비 펩타이드의 아미노산 서열을 지니는 펩타이드 부위는 링커를 통해 공유결합으로 생체적합성 물질부에 연결된 결합체 형태인 것을 특징으로 하나, 특별히 이에 제한되지 않는다. 이러한 인슐린 분비 펩타이드의 결합체는 지속형 결합체일 수 있으며, 지속형에 대한 정의는 앞서 설명한 바와 같다.
- [735] 상기 결합체에 대해 기술한 모든 구성, 특히 생체적합성 물질부(예, 면역글로불린 Fc) 및 링커(예, 비펩타이드성 중합체)에 대해서는 앞서 기술한 바가 모두 적용된다. 예컨대, 상기 링커는 한쪽 말단이 생체적합성 물질부의

아민기 또는 티올기와, 상기 링커의 다른 말단이 인슐린 분비 펩타이드 부위의 아민기 또는 티올기와 각각 반응하여 형성된 공유결합으로 상기 인슐린 분비 펩타이드 부위와 상기 생체적합성 물질부에 각각 연결되어 있는 것일 수 있다.

[736] 하나의 구체적인 실시 형태에서 상기 비펩타이드성 링커의 한쪽 말단이 면역글로불린 Fc 영역의 아민기 또는 티올기와, 상기 링커의 다른 말단이 인슐린 분비 펩타이드 부위의 아민기 또는 티올기와 각각 반응하여 형성된 공유결합을 형성할 수 있다.

[737] 보다 구체적인 하나의 양태에서, 상기 언급된 대사증후군의 예방 또는 치료를 위한 조성물 또는 요법은 하기 기술된 일반식 2의 아미노산 서열을 포함하는 펩타이드, 또는 이에 공유결합으로 생체적합성 물질부가 결합된 결합체를 함유하는 조성물일 수 있다. 그러나, 특별히 이에 제한되는 것은 아니다.

[738]

[739] Y-Aib-QGTF-X7-SD-X10-S-X12-Y-L-X15-X16-X17-R-A-X20-X21-F-V-X24-W-L-M-N-T-X30 (일반식 2, 서열번호: 46)

[740]

[741] 상기 일반식 2에서

[742] X7은 트레오닌, 발린 또는 시스테인이고;

[743] X10은 티로신 또는 시스테인이고;

[744] X12는 리신 또는 시스테인이고;

[745] X15는 아스파르트산, 또는 시스테인이고;

[746] X16은 글루탐산 또는 세린이며;

[747] X17은 리신 또는 아르기닌이고;

[748] X20은 글루타민 또는 리신이며;

[749] X21은 아스파르트산, 또는 글루탐산이고;

[750] X24는 발린 또는 글루타민이고;

[751] X30은 시스테인이거나, 부존재함.

[752]

[753] 앞선 구체예에 따른 펩타이드에서, 상기 일반식 2의 아미노산 서열을 포함하는 분리된 펩타이드 중 서열번호: 19, 33, 49, 및 50에 해당하는 펩타이드 중 일부 또는 전부는 제외될 수 있다.

[754]

[755] 보다 더 구체적으로, 상기 조성물은 (i) 서열번호: 37의 아미노산 서열을 포함하는 펩타이드 부위 및 이에 공유결합으로 연결된 생체적합성 물질부를 포함하는 결합체, 및 (ii) 엑센딘-4의 첫 번째 아미노산(히스티딘)의 알파 탄소가 제거된, 이미다조아세틸 엑센딘-4 부위 및 이에 공유결합으로 연결된 생체적합성 물질부를 포함하는 결합체를 모두 포함하는 것일 수 있으며, 더욱 더 구체적으로 상기 서열번호: 37의 아미노산 서열을 포함하는 펩타이드 부위 및 이미다조아세틸 엑센딘-4 부위는 각각의 생체적합성 물질부에 링커를 통해서

연결된 것일 수 있으나, 특별히 이에 제한되는 것은 아니다.

[756]

[757] 상기 대사증후군에 대한 치료적 활성을 가지는 화합물 또는 물질, 구체적으로 인슐린 분비 펩타이드 및 이에 생체적합성 물질부가 연결된 결합체의 투여 용량은 환자 체중 1 kg당 약 0.0001 μ g 내지 500 mg일 수 있으나, 특별히 이에 제한되지 않는다.

[758] 또한, 본 발명의 상기 약학적 조성물은 상기 병용제, 즉 대사증후군에 대한 치료적 활성을 가지는 화합물 또는 물질 및 글루카곤 유도체 또는 이를 포함하는 결합체 (또는 상기 병용제의 각 성분)를 0.01 내지 99% 중량 대 부피로 함유할 수 있다.

[759] 한편, 하나의 양태에서, 상기 대사증후군에 대한 치료적 활성을 가지는 화합물 또는 물질 및 글루카곤 유도체 또는 이를 포함하는 결합체, 구체적으로 인슐린 분비 펩타이드에 생체적합성 물질부가 연결된 결합체 (예, 인슐린 분비 펩타이드 - PEG - 면역글로불린 Fc 결합체) 및 글루카곤 유도체에 생체적합성 물질이 연결된 결합체는 1:0.01~1:50의 물비로 사용될 수 있으나, 특별히 이에 제한되지 않는다.

[760]

[761] 본 발명을 구현하는 다른 양태는 글루카곤 유도체 또는 이를 포함하는 결합체를 포함하는 키트, 구체적으로 선천성 고인슐린증, 저혈당, 또는 대사증후군의 예방 또는 치료용 키트를 제공한다.

[762] 상기 글루카곤 유도체, 또는 이를 포함하는 결합체, 선천성 고인슐린증, 저혈당, 또는 대사증후군, 예방, 및 치료에 대해서는 앞서 설명한 바와 같다. 본 키트에 추가로 포함될 수 있는 성분의 종류는 앞서 설명한 조성물에 포함될 수 있는 성분들의 종류가 모두 포함된다.

[763] 특히, 상기 키트가 대사증후군의 예방 또는 치료용 키트인 경우, (i) 상기 글루카곤 유도체, 구체적으로 일반식 1 또는 2의 아미노산 서열을 포함하는 펩타이드, 또는 이를 포함하는 결합체와 (ii) 인슐린 분비 펩타이드, 특히 GLP-1, 엑센딘-3, 엑센딘-4, 또는 이의 유도체, 또는 이를 포함하는 결합체를 모두 포함할 수 있다. 그러나, 특별히 이에 제한되지 않는다.

[764]

[765] 본 발명을 구현하는 다른 양태는 글루카곤 유도체를 제공한다.

[766] 상기 글루카곤 유도체에 대해서는 앞서 설명한 바와 같다.

[767] 보다 구체적으로, 상기 유도체는 서열번호: 45로 표시되는 상기 일반식 1의 아미노산 서열을 포함하는 분리된 펩타이드인 것을 특징으로 한다. 상기 일반식 1의 아미노산 서열을 포함하는 분리된 펩타이드에 대한 설명 및 조합은 앞서 기술한 내용이 모두 적용된다.

[768] 상기 유도체는 상기 일반식 2의 아미노산 서열을 포함하는 분리된 펩타이드인 것을 특징으로 한다.

- [769]
- [770] Y-Aib-QGTF-X7-SD-X10-S-X12-Y-L-X15-X16-X17-R-A-X20-X21-F-V-X24-W-L-M-N-T-X30 (일반식 2, 서열번호: 46)
- [771]
- [772] 상기 일반식 2에서
- [773] X7은 트레오닌, 발린 또는 시스테인이고;
- [774] X10은 티로신 또는 시스테인이고;
- [775] X12는 리신 또는 시스테인이고;
- [776] X15는 아스파르트산, 또는 시스테인이고;
- [777] X16은 글루탐산 또는 세린이며;
- [778] X17은 리신 또는 아르기닌이고;
- [779] X20은 글루타민 또는 리신이며;
- [780] X21은 아스파르트산, 또는 글루탐산이고;
- [781] X24는 발린 또는 글루타민이고;
- [782] X30은 시스테인이거나, 부존재함.
- [783]
- [784] 여기서, 상기 일반식 2의 아미노산 서열을 포함하는 펩타이드 중에서 서열번호: 19, 33, 49, 및 50에 해당하는 펩타이드는 제외될 수 있다.
- [785]
- [786] 보다 구체적으로, 상기 일반식 2의 아미노산 서열을 포함하는 펩타이드는 일반식 2의 X16이 글루탐산이고, X20은 리신이며, X16과 X20의 측쇄가 락탐 고리를 형성하고 있는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [787] 또한, 상기 일반식 2의 아미노산 서열을 포함하는 펩타이드의 C-말단이 아미드화되거나, 변형되지 않은 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [788] 또한, 상기 펩타이드는 글루카곤 수용체를 활성화시킬 수 있는 글루카곤 유도체일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [789] 보다 구체적으로, 상기 펩타이드는 서열번호: 12, 13, 15 및 36 내지 44로 이루어진 군에서 선택된 아미노산 서열을 포함하는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [790]
- [791] 본 발명을 구현하는 또 다른 양태는 상기 글루카곤 유도체를 코딩하는 분리된 폴리뉴클레오티드, 상기 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터, 및 상기 폴리뉴클레오티드 혹은 벡터를 포함하는 분리된 세포를 제공한다.
- [792] 상기 글루카곤 유도체에 대해서는 앞서 설명한 바와 같다.
- [793] 구체적으로, 상기 유도체는 서열번호: 45로 표시되는 상기 일반식 1의 아미노산 서열을 포함하는 분리된 펩타이드일 수 있다. 상기 일반식 1의 아미노산 서열을 포함하는 분리된 펩타이드에 대한 설명 및 조합은 앞서 기술한 내용이 모두 적용된다. 또한 구체적으로, 상기 유도체는 서열번호: 46으로

표시되는 상기 일반식 2의 아미노산 서열을 포함하는 분리된 펩타이드인 것을 특징으로 한다. 상기 일반식 2의 아미노산 서열을 포함하는 분리된 펩타이드에 대한 설명 및 조합은 앞서 기술한 내용이 모두 적용된다.

- [794] 본 발명의 용어 "상동성"이란 야생형(wild type) 아미노산 서열 및 야생형 핵산 서열과의 유사한 정도를 나타내기 위한 것으로서, 상동성의 비교는 육안으로나 구입이 용이한 비교 프로그램을 이용하여 수행한다. 시판되는 컴퓨터 프로그램은 2개 이상의 서열간의 상동성을 백분율(%)로 계산할 수 있다. 상동성(%)은 인접한 서열에 대해 계산될 수 있다.
- [795] 본 발명에서 용어 "재조합 벡터"는 적합한 숙주 내에서 목적 펩티드, 가령 글루카곤 유도체를 발현시킬 수 있도록 목적 펩티드, 가령 글루카곤 유도체가 적합한 조절 서열에 작동 가능하게 연결된 DNA 제조물을 의미한다.
- [796] 상기 조절 서열은 전사를 개시할 수 있는 프로모터, 그러한 전사를 조절하기 위한 임의의 오퍼레이터 서열, 적합한 mRNA 리보솜 결합부위를 코딩하는 서열, 및 전사 및 해독의 종결을 조절하는 서열을 포함한다. 재조합 벡터는 적당한 숙주세포 내로 형질전환된 후, 숙주 게놈과 무관하게 복제되거나 기능할 수 있으며, 게놈 그 자체에 통합될 수 있다.
- [797] 본 발명에서 사용되는 재조합 벡터는 숙주세포 내에서 복제 가능한 것이면 특별히 한정되지 않으며, 당업계에 알려진 임의의 벡터를 이용하여 제작될 수 있다. 통상 사용되는 벡터의 예로는 천연 상태이거나 재조합된 상태의 플라스미드, 코스미드, 바이러스 및 박테리오파지를 들 수 있다. 본 발명에서 사용 가능한 벡터는 특별히 제한되는 것이 아니며 공지된 발현 벡터를 사용할 수 있다.
- [798] 상기 재조합 벡터는 본 발명의 글루카곤 유도체를 생산하기 위해 숙주세포를 형질전환시키는데 사용된다. 또한 본 발명의 일부인, 이러한 형질전환 세포는 본 발명의 핵산 단편 및 벡터의 증식에 사용되거나, 본 발명의 글루카곤 유도체의 재조합 생산에 사용된 배양된 세포 또는 세포주일 수 있다.
- [799] 본 발명에서 용어 "형질전환"은 표적 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 재조합 벡터를 숙주세포 내에 도입하여 숙주세포 내에서 상기 폴리뉴클레오티드가 코딩하는 단백질이 발현할 수 있도록 하는 것을 의미한다. 형질전환된 폴리뉴클레오티드가 숙주세포 내에서 발현될 수 있거나 한다면, 숙주세포의 염색체 내에 삽입되어 위치하거나 염색체 외에 위치하거나 상관없이 이들 모두를 포함한다.
- [800] 또한, 상기 폴리뉴클레오티드는 표적 단백질을 코딩하는 DNA 및 RNA를 포함한다. 상기 폴리뉴클레오티드는 숙주세포 내로 도입되어 발현될 수 있는 것이면, 어떠한 형태로 도입되는 것이든 상관없다. 예를 들면, 상기 폴리뉴클레오티드는 자체적으로 발현되는데 필요한 모든 요소를 포함하는 유전자 구조체인 발현 카세트(expression cassette)의 형태로 숙주세포에 도입될 수 있다. 상기 발현 카세트는 통상 상기 폴리뉴클레오티드에 작동 가능하게

연결되어 있는 프로모터(promoter), 전사 종결신호, 리보솜 결합부위 및 번역 종결신호를 포함할 수 있다. 상기 발현 카세트는 자체 복제가 가능한 발현벡터 형태일 수 있다. 또한, 상기 폴리뉴클레오티드는 그 자체의 형태로 숙주세포에 도입되어, 숙주세포에서 발현에 필요한 서열과 작동 가능하게 연결되어 있는 것일 수도 있으며, 이에 한정되지 않는다.

- [801] 또한, 상기에서 용어 "작동 가능하게 연결"된 것이란 본 발명에서 목적하는 펩타이드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드의 전사를 개시 및 매개하도록 하는 프로모터 서열과 상기 유전자 서열이 기능적으로 연결되어 있는 것을 의미한다.
- [802] 본 발명에 적합한 숙주는 본 발명의 폴리뉴클레오티드를 발현하도록 하는 한 특별히 제한되지 않는다. 본 발명에 사용될 수 있는 숙주의 특정한 예로는 대장균(*E. coli*)과 같은 에스케리키아(*Escherichia*) 속 세균; 바실러스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*)와 같은 바실러스(*Bacillus*) 속 세균; 슈도모나스 푸티다(*Pseudomonas putida*)와 같은 슈도모나스(*Pseudomonas*) 속 세균; 피키아 파스토리스(*Pichia pastoris*), 사카로마이세스 세레비지애(*Saccharomyces cerevisiae*), 스킴조사카로마이세스 폼베(*Schizosaccharomyces pombe*)와 같은 효모; 스포도프테라 프루기페르다(Sf9)와 같은 곤충세포; 및 CHO, COS, BSC 등과 같은 동물세포가 있다.
- [803]
- [804] 본 발명을 구현하는 또 다른 양태는 글루카곤 유도체와 이의 생체 내 반감기를 증가시키는 생체적합성 물질부가 결합된, 분리된 결합체를 제공한다. 상기 결합체는 지속형 결합체일 수 있다.
- [805] 구체적으로, 펩타이드 부위 및 상기 펩타이드 부위에 공유결합으로 연결된 생체적합성 물질부를 포함하는 분리된 결합체로서, 상기 펩타이드 부위는 상기 일반식 1 또는 2의 아미노산 서열과 동일한 서열이거나 이를 포함하는 서열인 분리된 결합체를 제공한다.
- [806] 상기 글루카곤 유도체, 일반식 1 또는 2의 아미노산 서열 및 생체적합성 물질부, 그리고 결합체의 구성에 대해서는 앞서 기술한 바가 모두 적용된다.
- [807] 구체적으로, 상기 유도체는 서열번호: 45로 표시되는 상기 일반식 1의 아미노산 서열을 포함하는 분리된 펩타이드일 수 있다. 상기 일반식 1의 아미노산 서열을 포함하는 분리된 펩타이드에 대한 설명 및 조합은 앞서 기술한 내용이 모두 적용된다.
- [808] 또한 구체적으로, 상기 유도체는 서열번호: 46으로 표시되는 상기 일반식 2의 아미노산 서열을 포함하는 분리된 펩타이드인 것을 특징으로 한다. 상기 일반식 2의 아미노산 서열을 포함하는 분리된 펩타이드에 대한 설명 및 조합은 앞서 기술한 내용이 모두 적용된다.
- [809] 구체적으로, 상기 생체적합성 물질부는 고분자 중합체, 지방산, 콜레스테롤, 알부민 및 이의 단편, 알부민 결합물질, 특정 아미노산 서열의 반복단위의 중합체, 항체, 항체 단편, FcRn 결합물질, 생체 내 결합조직 혹은 그 유도체,

뉴클레오타이드, 파이브로넥틴, 트랜스페린(Transferrin), 당류, 헤파린, 및 엘라스틴으로 이루어진 군에서 선택되는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 여기서, 상기 고분자 중합체는 폴리에틸렌 글리콜, 폴리프로필렌 글리콜, 에틸렌 글리콜-프로필렌 글리콜 공중합체, 폴리옥시에틸화폴리올, 폴리비닐알콜, 다당류, 텍스트란, 폴리비닐에틸에테르, 생분해성 고분자, 지질 중합체, 키틴, 히알루론산, 올리고뉴클레오타이드 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있으나, 특별히 이에 제한되는 것은 아니다.

[810] 보다 구체적으로, 상기 FcRn 결합물질은 면역글로불린 Fc 영역을 포함하는 폴리펩타이드일 수 있으나, 특별히 이에 제한되지 않는다. 앞서 설명된 면역글로불린 Fc 영역에 대한 설명이 본 양태에도 적용된다.

[811]

[812] 상기 분리된 결합체는 상기 글루카곤 유도체 부위, 구체적으로 상기 글루카곤 유도체 펩타이드의 아미노산 서열을 포함하는 펩타이드 부위 및 이에 생체적합성 물질부가 링커를 통해 서로 연결된 것일 수 있다. 앞서 설명된 링커에 대한 설명이 본 양태에도 적용된다.

[813]

[814] 또한, 상기 글루카곤 유도체 부위, 구체적으로 상기 글루카곤 유도체 펩타이드의 아미노산 서열을 포함하는 펩타이드 부위는 폴리에틸렌글리콜, 폴리프로필렌 글리콜, 에틸렌 글리콜-프로필렌 글리콜 공중합체, 폴리옥시에틸화폴리올, 폴리비닐알콜, 다당류, 텍스트란, 폴리비닐에틸에테르, PLA(poly(lactic acid)) 혹은 PLGA(poly(lactic-glycolic acid))와 같은 생분해성 고분자, 지질 중합체, 키틴류, 히알루론산, 지방산, 고분자 중합체, 저분자 화합물, 뉴클레오타이드, 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된 링커를 통해 생체적합성 물질부와 연결되는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[815] 또한, 상기 생체적합성 물질부는 FcRn 결합 물질이고, 상기 분리된 펩타이드는 펩타이드 링커, 또는 폴리에틸렌글리콜, 폴리프로필렌 글리콜, 에틸렌 글리콜-프로필렌 글리콜 공중합체, 폴리옥시에틸화폴리올, 폴리비닐알콜, 다당류, 텍스트란, 폴리비닐에틸에테르, PLA(poly(lactic acid)) 혹은 PLGA(poly(lactic-glycolic acid))와 같은 생분해성 고분자, 지질 중합체, 키틴류, 히알루론산 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 비펩타이드성 링커를 통해 생체적합성 물질부에 결합된 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[816] 여기서, 상기 FcRn 결합 물질은 면역글로불린 Fc 영역을 포함하는 폴리펩타이드일 수 있고, 링커는 구체적으로 폴리에틸렌글리콜일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[817] 또한, 상기 링커는 상기 글루카곤 유도체의 시스테인 잔기에 연결된 것일 수 있으나, 특별히 이에 제한되지 않는다.

[818] 또한, 상기 결합체에서 상기 링커는 이의 한쪽 말단이 생체적합성 물질부의

아민기 또는 티올기와, 상기 링커의 다른 말단이 상기 글루카곤 유도체의 아민기 또는 티올기에 각각 반응하여 형성된 공유결합으로, 상기 글루카곤 유도체와 생체적합성 물질부에 각각 연결되어 있는 것일 수 있으나, 특별히 이에 제한되지 않는다.

[819]

[820] 본 발명을 구현하는 또 다른 양태는 상기 글루카곤 유도체, 이를 포함하는 결합체, 또는 이를 포함하는 조성물을 개체에 투여하는 단계를 포함하는, 선천성 고인슐린증, 저혈당 또는 대사증후군을 예방 또는 치료하는 방법을 제공한다.

[821] 상기 글루카곤 유도체, 이를 포함하는 결합체, 이를 포함하는 조성물, 선천성 고인슐린증, 저혈당, 대사증후군, 예방, 및 치료에 대해서는 앞서 설명한 바와 같다.

[822] 본 발명에서 상기 개체는 선천성 고인슐린증, 저혈당 또는 대사증후군 (metabolic syndrome)이 의심되는 개체로서, 상기 선천성 고인슐린증, 저혈당 또는 대사증후군 (metabolic syndrome) 의심 개체는 해당 질환이 발병하였거나 발병할 수 있는 인간을 포함한 쥐, 가축 등을 포함하는 포유 동물을 의미하나, 본 발명의 글루카곤 유도체 혹은 이를 포함하는 상기 조성물로 치료 가능한 개체는 제한 없이 포함된다. 또한, 본 발명의 글루카곤 유도체를 포함하는 약학적 조성물을 선천성 고인슐린증, 저혈당 또는 비만 의심 개체에 투여함으로써, 개체를 효율적으로 치료할 수 있다. 선천성 고인슐린증, 저혈당 또는 비만에 대해서는 상기에서 설명한 바와 같다.

[823] 본 발명의 방법은 펩타이드를 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 구체적 조성물, 환자의 연령, 체중, 일반 건강 상태, 성별 및 식이, 투여 시간, 투여 경로 및 조성물의 분비율, 치료기간, 구체적 조성물과 함께 사용되거나 동시 사용되는 약물을 비롯한 다양한 인자와 의약 분야에 잘 알려진 유사 인자에 따라 다르게 적용하는 것이 바람직하다.

[824] 한편, 특별히 이에 제한되지 않으나, 상기 대사증후군의 예방 또는 치료 방법은 하나 이상의 대사증후군에 대한 치료적 활성을 가지는 화합물 또는 물질을 투여하는 것을 더 포함하는 병용요법일 수 있다.

[825] 본원에서, "병용"이란 용어가 사용될 경우 이는 동시, 개별 또는 순차 투여를 나타내는 것으로 이해되어야 한다. 상기 투여가 순차 또는 개별적인 경우, 2차 성분 투여의 간격은 상기 병용의 이로운 효과를 잃지 않도록 하는 것이어야 한다.

[826]

[827] 본 발명을 구현하는 또 다른 양태는 상기 글루카곤 유도체 혹은 분리된 결합체,

혹은 상기 조성물을 선천성 고인슐린증, 저혈당 혹은 대사증후군에 대한 예방 또는 치료용 약제 (혹은 약학적 조성물)의 제조에 사용하는 용도를 제공한다.

[828] 상기 글루카곤 유도체, 분리된 결합체, 상기 조성물, 선천성 고인슐린증, 저혈당, 및 대사증후군에 대해서는 앞서 설명한 바와 같다.

[829]

[830] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 보다 상세히 설명하고자 한다. 그러나, 이들 실시예는 본 발명을 예시적으로 설명하기 위한 것으로 본 발명의 범위가 이들 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[831]

[832]

[833] 실시예 1: 글루카곤에 대해 cAMP 반응을 보이는 세포주의 생산

[834]

[835] 인간 글루카곤 수용체 유전자의 cDNA(OriGene Technologies, Inc. USA)에서 ORF에 해당하는 부분을 주형으로 하고, EcoRI 절단부위와 XhoI 절단부위를 각각 포함하는 하기 서열번호: 47 및 48의 정방향 및 역방향 프라이머를 이용한 PCR을 수행하였다.

[836] 이때, PCR 반응은 95°C에서 60초의 변성, 55°C에서 60초의 어닐링 및 68°C에서 30초의 신장 과정을 30회 반복 수행하였다. 이로부터 증폭된 PCR 산물을 1.0% 아가로스 겔에서 전기 영동한 후 450 bp 크기의 밴드를 용리하여 수득하였다.

[837]

[838] 정방향 프라이머(서열번호: 47):

[839] 5'-CAGCGACACCGACCGTCCCCCGTACTTAAGGCC-3'

[840] 역방향 프라이머(서열번호: 48):

[841] 5'-CTAACCGACTCTCGGGGAAGACTGAGCTCGCC-3'

[842]

[843] 상기 PCR 산물을 공지된 동물세포 발현벡터인 x0GC/dhfr에 클로닝하여 제조합 벡터 x0GC/GCGR을 제조하였다.

[844] 상기 제조한 제조합 벡터 x0GC/GCGR를 10% FBS 함유 DMEM/F12 배지에서 배양한 CHO DG44 세포에 리포펙타민을 이용하여 형질전환하고, 1 mg/mL G418 및 10 nM 메토틱세이트를 포함하는 선별배지에서 선별 배양하였다. 이로부터 제한 희석법으로 단일 클론 세포주를 선별하고, 이 중에서 글루카곤에 대해 우수한 농도의존적 cAMP 반응을 보이는 세포주를 최종적으로 선별하였다.

[845]

[846] 실시예 2: 글루카곤 유도체의 합성

[847]

[848] 개선된 물성을 갖는 글루카곤 유도체를 개발하기 위하여, 서열번호: 1의 천연 글루카곤의 아미노산 서열을 음전하 및 양전하를 띤 아미노산 잔기로 치환하여 하기 표 1과 같은 글루카곤 유도체를 합성하였다. 이에 기재된 상대적 *in vitro*

활성은 하기 실시예 4에 기술된 방법으로 측정하였다.

[849] [표1]

글루카곤 천연형 및 글루카곤 유도체 아미노산 서열

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

14	QWLMNT			
서열번호: 15	YXQGTFTSDYSKYLCEKRAQDFV VWLMNT	-	6.11	1.1
서열번호: 16	YXQGTFTSDYSKYLCDRRAQVFV QWLMRT	-	9.11	4.2
서열번호: 17	YXQGTFTSDYSKYLCDVRAQDFV QWLMRT	-	6.03	23.2
서열번호: 18	YXQGTFTSDYSKYLD S RRACDFRL WLMNT	-	8.15	< 0.1
서열번호: 19	YXQGTFTSDYSKYLCE <u>K</u> RA <u>K</u> EFV QWLMNT	고리 형성	8.12	12.1
서열번호: 20	YXQGTFTSDYSKYLD E CRA <u>K</u> EFV QWLMNT	고리 형성	4.78	299.7
서열번호: 21	YXQGTFTSDYSKYLD E KCA <u>K</u> EFV QWLMNT	고리 형성	4.78	57.8
서열번호: 22	YXQGTFTSDYSKYLD E KRC <u>K</u> EFV QWLMNT	고리 형성	6.20	147.8
서열번호: 23	YXQGTFTSDYSKYCDE <u>K</u> RA <u>K</u> EFV QWLMNT	고리 형성	6.20	76.8
서열번호: 24	YXQGTFTSDYSKCLD E KRA <u>K</u> EFV QWLMNT	고리 형성	6.21	58.0
서열번호: 25	YXQGTFTSDYSKYLD E KRA <u>K</u> CFV QWLMNT	고리 형성	8.12	46.9
서열번호: 26	WXQGTFTSDYSKYLD E CRA <u>K</u> DFV QWLMNT	고리 형성	4.68	1.0
서열번호: 27	YXQGTFTSDYSKYLD E CRA <u>K</u> DFV QWLMNT	고리 형성	4.68	93.6
서열번호: 28	WXQGTFTSDYSKYLD E CRA <u>K</u> DFV QWLMNT	고리 형성	4.68	< 0.1
서열번호: 29	YXQGTFTSDYSKCLD E ERRA <u>K</u> DFV QWLMNT	고리 형성	6.15	61.3
서열번호: 30	WXQGTFTSDYSKCLD E ERRA <u>K</u> DFV QWLMNT	고리 형성	4.44	0.3
서열번호:	YXQGTFTSDYSKYLD C <u>K</u> RA <u>K</u> EFV	고리	8.12	6.3

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

[850]

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

[852]

[853] 실시예 3: 글루카곤 유도체의 pI 측정

[854]

[855] 상기 실시예 2에서 합성된 글루카곤 유도체의 개선된 물성을 확인하기 위해 ExPASy 서버에서 pI/Mw 툴(http://expasy.org/tools/pi_tool.html; Gasteiger et al., 2003)을 사용하여 아미노산 서열로부터 pI를 추산하였다.

[856] 상기 표 1에 나타난 바와 같이, 서열번호: 1의 천연 글루카곤이 6.8의 pI를 갖는 반면, 본 발명에 따른 일부의 글루카곤 유도체는 약 4 내지 6 범위의 pI를 가졌다. 이러한 글루카곤 유도체는 천연 글루카곤에 비해 낮거나, 높은 pI를 갖기 때문에 중성 pH 등에서 천연형 글루카곤에 비해 개선된 용해도 및 높은 안정성을 나타낼 수 있다.

[857] 이와 같은 본 발명에 따른 글루카곤 유도체는 선천성 고인슐린증, 저혈당 등 목격하는 질환에 대한 치료제로 사용시 환자 순응도를 높일 수 있으며, 다른 항비만 치료제 또는 당뇨 치료제와 병용 투여에 적합하여 저혈당 및 비만, 당뇨, 비알코올지방간염(nonalcoholic steatohepatitis, NASH), 이상지혈증, 관동맥성 심장병을 비롯한 대사증후군(metabolic syndrome) 치료제로서 유용하게 사용할 수 있다.

[858]

[859] 실시예 4: 글루카곤 유도체의 cAMP 활성 측정

[860] 실시예 1에서 생산된 인간 글루카곤 수용체를 가진 세포주에서 실시예 2에서 합성된 글루카곤 유도체의 활성을 측정 하였다. 구체적으로, 상기 형질전환 세포주를 1주일에 3회 또는 4회 계대 배양한 후 384-웰 플레이트에 각 웰당 6×10^3 개의 계대배양된 세포주를 분주하여 24시간 동안 배양하였다. 상기 배양된 세포에 0.5 mM IBMX(3-isobutyl-1-methylxanthine), 0.1% BSA(Bovine serum albumin), 5mM HEPES(4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid)를 포함하는 HBSS(Hank's Balanced Salt Solution) 완충액에 천연형 글루카곤은 200 nM로, 글루카곤 유도체는 1600 nM로 각각 현탁 시킨 다음 4배씩 10회 연속적으로 희석 하고 이를 cAMP 어세이 키트(LANCE cAMP 384 kit, PerkinElmer)에 적용하여 상기 세포에 첨가한 다음 형광 값을 측정하였다. 측정 후 가장 높은 형광 값을 100%로 선정한 뒤 이로부터 글루카곤 유도체들의 EC₅₀ 값을 산출한 후 천연형 글루카곤과 상호 비교하였다. 그 결과를 상기 표 1에 나타내었다.

[861]

[862] 실시예 5: 글루카곤 유도체와 면역글로불린 Fc를 포함하는 결합체의 제조(서열번호: 12 또는 서열번호: 20 -면역글로불린 Fc 영역 결합체)

[863]

[864] 양 말단에 각각 말레이미드기 및 알데히드기를 가지는 10kDa의 PEG, 즉 말레이미드-PEG-알데히드(10kDa, NOF, 일본)를 글루카곤 유도체(서열번호: 12 또는 서열번호: 20)의 시스테인 잔기에 폐길화시키기 위하여, 글루카곤 유도체와

말레이미드-PEG-알데히드의 물비를 1:1~5, 단백질의 농도를 3~10 mg/ml로 하여 저온에서 1~3 시간 동안 반응시켰다. 이때, 반응은 50 mM Tris 완충액(pH 7.5)에 20~60% 아이소프로판올이 첨가된 환경하에서 수행되었다. 반응이 종료된 후, 상기 반응액을 SP sepharose HP(GE healthcare, 미국)에 적용하여 시스테인에 모노-폐길화된 글루카곤 유도체를 정제하였다.

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

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

[867] 여기서, 서열번호: 12의 글루카곤 유도체 및 면역글로불린 Fc가 PEG를 통하여 연결된 결합체를, '서열번호: 12의 글루카곤 유도체와 면역글로불린 Fc를 포함하는 결합체', '서열번호: 12 지속형 결합체' 혹은 '서열번호: 12 지속형 유도체'로 명명하였고, 이들은 본원에서 혼용되어 사용될 수 있다.

[868] 여기서, 서열번호: 20의 글루카곤 유도체 및 면역글로불린 Fc가 PEG를 통하여 연결된 결합체를, '서열번호: 20의 글루카곤 유도체와 면역글로불린 Fc를 포함하는 결합체', '서열번호: 20 지속형 결합체' 혹은 '서열번호: 20 지속형 유도체'로 명명하였고, 이들은 본원에서 혼용되어 사용될 수 있다.

[869]

[870] **실시예 6: 액센딘-4 유도체 및 면역글로불린 Fc를 포함하는 결합체의 제조**

[871]

[872] N-말단의 히스티딘의 알파 탄소가 삭제된 이미다조-아세틸 액센딘-4(CA 액센딘-4, AP, 미국)를 이용하여 양 말단에 프로피온알데히드기를 가지는 3.4kDa의 PEG, 즉 3.4k PropionALD (2) PEG를 CA 액센딘-4의 Lys과 반응시킨 후, 두 개의 Lys 이성질체 피크 중 반응이 많이 가고 N-말단 이성질체와 확연히 구분되는 가장 뒤쪽의 이성질체 피크 (Lys27 위치이성질체)를 분리하였다. 이어서 이 폐길화된 펩타이드 이성질체를 이용하여 Fc에 연결하는 커플링을 진행하였다.

[873] 커플링은 전술한 폐길화된 이미다조-아세틸 액센딘-4 펩타이드와 면역글로불린 Fc 물비를 1:8, 전체단백질 농도를 60 mg/ml로 하여 4°C에서 20시간 반응하였다. 반응액은 100 mM K-P pH 6.0이며 환원제인 20 mM SCB를 첨가하였다. 커플링 반응액은 두 개의 정제 컬럼을 거쳐 정제되었다. 먼저 커플링 반응에 참여하지 않은 다량의 면역글로불린 Fc를 제거하기 위하여

SOURCE Q (XK-16mL, 아머삼 바이오사이언스)을 이용하였다. 20 mM Tris (pH7.5)에서 1M NaCl을 사용하여 염 구배(Salt gradient)를 주면 상대적으로 결합력이 약한 면역글로불린 Fc가 먼저 용출되고 바로 뒤이어 액센딘-4-면역글로불린 Fc가 용출된다. 일차 정제를 통하여 어느 정도 면역글로불린 Fc가 제거되지만 이온교환컬럼에서 면역글로불린 Fc와 액센딘-4-면역글로불린 Fc의 결합력 차이가 크지 않아 완전히 분리되지는 않았다. 따라서 두 물질의 소수성(Hydrophobicity) 차이를 이용하여 이차 정제를 하였다. SOURCE ISO(HR16 mL, 아머삼 바이오사이언스)에 20 mM Tris(pH7.5) 및 1.5M 황산암모늄을 이용하여 일차 정제된 시료를 결합시킨 후 차츰 황산암모늄 농도를 낮추면서 시료를 용출시켰다. HIC 컬럼에 결합력이 약한 면역글로불린 Fc가 먼저 용출되고 결합력이 강한 액센딘-4-면역글로불린 Fc 시료가 뒤쪽으로 용출되었다. 이들의 소수성 차이가 커 이온교환 컬럼보다 훨씬 분리가 용이하였다.

[874]

[875] 컬럼 : SOURCE Q(XK 16 mL, 아머삼 바이오사이언스)

[876] 유속 : 2.0 mL/분

[877] 구배 : A0 ->25% 70 분 B (A: 20mM 트리스 pH7.5, B: A+ 1M NaCl)

[878]

[879] 컬럼 : SOURCE ISO(HR 16 mL, 아머삼 바이오사이언스)

[880] 유속 : 7.0 mL/분

[881] 구배 : B 100 -> 0% 60분 B (A: 20mM 트리스 pH7.5, B: A + 1.5M 황산암모늄)

[882]

[883] 상기와 같이 제조된, 액센딘-4 유도체와 면역글로불린 Fc 영역이 PEG를 통하여 연결된 결합체를 '지속형 액센딘-4 유도체'로 명명하였다. 이는 본원에서 '지속형 액센딘 유도체'와 혼용되어 사용될 수 있다.

[884]

[885] 실시예 7: 글루카곤 유도체와 면역글로불린 Fc를 포함하는 결합체의 제조(서열번호 37 -면역글로불린 Fc 영역 결합체)

[886]

[887] 양 말단에 각각 말레이미드기 및 알데히드기를 가지는 10kDa의 PEG, 즉 말레이미드-PEG-알데히드 (10kDa, NOF, 일본)를 글루카곤 유도체 (서열번호: 37)의 시스테인 잔기에 폐길화시키기 위하여, 글루카곤 유도체와 말레이미드-PEG-알데히드의 물비를 1:1~5, 단백질의 농도를 3~10 mg/mL로 하여 저온에서 1~3 시간 동안 반응시켰다. 이때, 반응은 50 mM Tris 완충액(pH 7.5)에 20~60 % 아이소프로판올이 첨가된 환경하에서 수행되었다. 반응이 종료된 후, 상기 반응액을 SP sepharose HP(GE healthcare, 미국)에 적용하여 시스테인에 모노-폐길화된 글루카곤 유도체를 정제하였다.

[888] 다음으로, 상기 정제된 모노-폐길화된 글루카곤 유도체와 면역글로불린 Fc을

물비가 1:2~10, 단백질의 농도를 10~50mg/ml로 하여 4~8°C에서 12~18시간 동안 반응시켰다. 반응액은 100 mM 인산칼륨 완충액(pH 6.0)에 환원제인 10~50 mM 소듐시아노보로하이드라이드와 10~20% 아이소프로판올이 첨가된 환경 하에서 수행되었다. 반응이 종료된 후, 상기 반응액을 Butyl sepharose FF 정제컬럼(GE healthcare, 미국)과 Source ISO 정제컬럼 (GE healthcare, 미국)에 적용하여, 글루카곤 유도체와 면역글로불린 Fc를 포함하는 결합체를 정제하였다.

- [889] 제조 후 역상 크로마토그래피, 크기배제 크로마토그래피 및 이온교환 크로마토그래피로 분석한 순도는 95 % 이상이였다.
- [890] 여기서, 서열번호: 37의 글루카곤 유도체 및 면역글로불린 Fc가 PEG를 통하여 연결된 결합체를, '서열번호 37의 글루카곤 유도체와 면역글로불린 Fc를 포함하는 결합체', '서열번호 37의 지속형 결합체', 혹은 '서열번호: 37 지속형 유도체'로 명명하였고, 이들은 본원에서 혼용되어 사용될 수 있다.

[891]

[892] **실험예 1: 고지방 식이유도된 비만 랫트에서 체중 감소 효력**

[893]

- [894] 비만 동물 모델로 널리 사용되고 있는 고지방 식이유도 비만 랫트를 이 연구를 위해 사용하였다. 구체적으로, 고지방 식이유도 설치류는 비만치료제의 체중감소 효력을 전임상에서 평가하는데 사용되는 가장 일반적인 동물모델로, 모델의 유도는 다음과 같다. 정상 랫트 혹은 마우스에 60%가 지방으로 구성된 사료를 4주 (랫트) 혹은 6개월 (마우스)간 공급하면 랫트의 경우 투여 전 체중이 약 600g, 마우스는 약 55g으로 증가하며, 이에 따라 혈중 지질 수치도 함께 상승하여 사람에서의 비만과 유사한 상태가 된다. 본 실시예에서 사용된 랫트의 체중 역시 투여 전에 약 600g이었다. 연구 기간동안 랫트는 개별적으로 수용되었고 물에 자유롭게 접근하도록 하였다. 빛은 6 PM에서 6 AM까지 꺼두었다.

- [895] 고지방 식이 급식된 시험군은, 군 1: 지속형 글루카곤이 함유되지 않은 부형제 투여 (2 ml/kg, 3일 1회 주사)-대조군 (Vehicle), 군 2: 실시예 6의 지속형 엑센딘 유도체 3.3 nmol/kg (3일 1회 주사), 군 3: 서열번호: 12 지속형 유도체 1.6 nmol/kg (3일 1회 주사), 군 4: 서열번호: 12 지속형 유도체 3.3 nmol/kg (3일 1회 주사), 군 5: 서열번호: 12 지속형 유도체 6.6 nmol/kg (3일 1회 주사), 군 6: 실시예 6의 지속형 엑센딘 유도체 3.3 nmol/kg + 서열번호: 12 지속형 유도체 1.6 nmol/kg (각 3일 1회 주사), 군 7: 실시예 6의 지속형 엑센딘 유도체 3.3 nmol/kg + 서열번호: 12 지속형 유도체 3.3 nmol/kg (각 3일 1회 주사), 군 8: 실시예 6의 지속형 엑센딘 유도체 3.3 nmol/kg + 서열번호: 12 지속형 유도체 6.6 nmol/kg (각 3일 1회 주사), 군 9: 군 4와 짝 지워 급식, 군 10: 군 7과 짝 지워 급식;이 있다.

- [896] 실험은 15일째 종료하였으며, 실험이 진행되는 동안 3일 단위로 각 군에 해당하는 랫트의 체중변화를 측정하였다. 실험이 종료된 후, 부검을 통해 장간막

지방량과 간 무게를 측정하였다. 통계 처리는 1원 ANOVA를 사용하여 부형제 군(대조군) 및 시험군 사이를 비교하였다.

[897]

[898] 체중 변화를 측정한 결과, 도 1에서 확인할 수 있듯이, 지속형 액센딘 유도체와 서열번호: 12 지속형 유도체의 각 단독 투여군은 투여 개시 전에 비해 -8%와 -7%에서 -22%의 체중 감소를 각각 보인 반면, 지속형 액센딘 유도체와 서열번호: 12 지속형 유도체 병용 투여 시에는 체중 감소 효과가 -22%에서 -35%로 더욱 증가하는 것이 확인되었다.

[899] 또한 서열번호: 12 지속형 유도체 단독 투여군과 지속형 액센딘 유도체와 서열번호: 12 지속형 유도체 병용 투여군의 짝지워 급식군과의 체중 감소 효과를 비교 시, 체중 감소 효과가 -11%와 -17% 정도의 차이를 보이므로 글루카곤 유도체의 단독 또는 병용 투여 시에 식이 섭취 이외의 작용에 의해서도 체중 감소 효과가 나타났음을 알 수 있었다.

[900] 즉, 본 발명의 글루카곤 지속형 유도체는 식욕 감소 이외에 체중 감소에 있어 별도의 역할을 함을 확인할 수 있었다.

[901] 또한, 장간막 지방량과 간 무게를 측정한 결과, 도 2 및 도 3에서 확인할 수 있듯이 지속형 액센딘 유도체와 서열번호: 12 지속형 유도체 병용 투여 시, 부형제 투여군과의 비교에서 체내 지방이 유의적으로 감소하며, 간 무게 또한 감소하는 결과가 확인되었다. 한편, 간 무게의 증감은 일반적으로 간에 있는 지방의 증감에 의한 것으로, 상기 간 무게 감소 효과는 간 지방이 감소한 효과로, 비만, 당뇨, 비알코올지방간염 등의 대사증후군의 치료 효과를 측정하는 방법으로 간 지방의 감소를 측정할 수 있다.

[902]

[903] **실험예 2: 고지방 식이유도된 비만 마우스에서 체중 감소 효과**

[904] 비만 동물 모델로 널리 사용되고 있는 고지방 식이유도 비만 마우스를 이 연구를 위해 사용하였다. 마우스의 체중은 투여 전에 약 55g이었다. 연구 기간 동안 마우스는 7마리씩 수용되었고 물에 자유롭게 접근하도록 하였다. 빛은 6 PM에서 6 AM까지 꺼두었다.

[905] 고지방 식이 급식된 시험군은, 군 1: 지속형 글루카곤이 함유되지 않은 부형제 투여 (5 ml/kg, 2일 1회 주사)-대조군 (Vehicle), 군 2: 실시예 6의 지속형 액센딘 유도체 4.3 nmol/kg (2일 1회 주사), 군 3: 서열번호: 20 지속형 유도체 4.4 nmol/kg (2일 1회 주사), 군 4: 서열번호: 20 지속형 유도체 8.8 nmol/kg (2일 1회 주사), 군 5: 실시예 6의 지속형 액센딘 유도체 4.3 nmol/kg + 서열번호: 20 지속형 유도체 4.4 nmol/kg (각 2일 1회 주사), 군 6: 실시예 6의 지속형 액센딘 유도체 2.1 nmol/kg + 서열번호: 20 지속형 유도체 6.6 nmol/kg (각 2일 1회 주사), 군 7: 실시예 6의 지속형 액센딘 유도체 0.8 nmol/kg + 서열번호: 20 지속형 유도체 8.0 nmol/kg (각 2일 1회 주사)이 있다.

[906] 실험은 22일째 종료하였으며, 실험이 진행되는 동안 2일 단위로 각 군에

해당하는 마우스의 체중변화를 측정하였다. 실험이 종료된 후, 부검을 통해 간 무게를 측정하였다.

- [907] 체중 변화를 측정한 결과, 도 4에서 확인할 수 있듯이, 서열번호: 20 지속형 유도체 (8.8 nmol/kg, 2일 1회 투여)는 각 단독 군에서도 투여 개시 전에 비해 -25%와 -29%의 체중 감소를 각각 보이는 것으로 확인되었으며, 그 효과는 지속형 엑센딘 유도체와 병용투여시 더 커짐을 알 수 있다. 지속형 엑센딘 유도체와 서열번호: 20 지속형 유도체의 1:1, 1:3, 1:10 비율로 병용 투여 시에는 체중 감소 효과가 -50% 이상으로 더욱 증가하는 것이 확인되었다. 또한 서열번호: 20 지속형 유도체와 지속형 엑센딘 유도체 비율에 따라서 체중감소 효과는 크게 다르지 않았으나 식욕 감소는 지속형 엑센딘 유도체 비율이 높을수록 큰 것으로 보아 본 발명의 글루카곤 지속형 유도체는 식욕 감소 이외에 체중 감소에 있어 별도의 역할을 함을 확인할 수 있었다.

- [908] 또한, 혈액에서 총 콜레스테롤 양을 측정한 결과, 도 5에서 확인할 수 있듯이 유사한 체중 감소 효과를 보인 지속형 엑센딘 유도체 (4.4nmol/kg, 2일 1회 투여)와 서열번호: 20 지속형 유도체 (8.8 nmol/kg, 2일 1회 투여) 각 군에서 -35%와 -71%의 콜레스테롤 감소를 보였다. 이것으로 보아 본 발명의 글루카곤 지속형 유도체는 체중감소 효력 이외에 혈중 콜레스테롤 감소에 있어서 별도의 역할을 함을 확인할 수 있었다. 통계 처리는 1원 ANOVA를 사용하여 부형제 군(대조군) 및 시험군 사이를 비교하였다.

[909]

- [910] 실험예 3: 고지방 식이유도된 비만 마우스에서 지속형 엑센딘 유도체와 서열번호: 37의 지속형 결합체의 병용투여 효력

[911]

- [912] 비만 동물 모델로 널리 사용되고 있는 고지방 식이유도 비만 마우스를 이 연구를 위해 사용하였다. 마우스의 체중은 투여 전에 약 55g이었다. 연구 기간 동안 마우스는 7마리씩 수용되었고 물에 자유롭게 접근하도록 하였다. 빛은 6 PM에서 6 AM까지 꺼두었다.

- [913] 고지방 식이 급식된 시험군은, 군 1: 지속형 글루카곤이 함유되지 않은 부형제 투여 (5 ml/kg, 2일 1회 주사)-대조군 (vehicle), 군 2: 리라글루타이드 (Liraglutide, 노보 노르디스크) 50 nmol/kg (1일 2회 주사), 군 3: 실시예 6의 지속형 엑센딘 유도체 4.3 nmol/kg (2일 1회 주사), 군 4: 실시예 6의 지속형 엑센딘 유도체 4.3 nmol/kg + 서열번호: 37 지속형 유도체 2.2 nmol/kg (각 2일 1회 주사)이 있다.

- [914] 실험은 28일째 종료하였으며, 29일째 내당능 (intraperitoneal glucose tolerance test, IPGTT)을 측정 하였다. 실험이 진행되는 동안 2일 단위로 각 군에 해당하는 마우스의 체중변화를 측정하였으며 실험이 종료된 후, 혈액을 통하여 혈중 콜레스테롤 수치 및 부검을 통한 지방 무게를 측정하였다.

- [915] 체중 변화를 측정한 결과, 도 6에서 확인할 수 있듯이, 리라글루타이드 (노보 노르디스크) 50 nmol/kg (1일 2회 주사)와 지속형 엑센딘 유도체 4.3 nmol/kg (2일

- 1회 주사) 각각의 단독투여 군에서 대조군에 비해 각각 -22%, -32%의 체중 감소를 보이는 것으로 확인되었으며, 지속형 엑센딘 유도체 4.3 nmol/kg (2일 1회 주사)와 서열번호: 37 지속형 유도체 2.2 nmol/kg (각 2일 1회 주사) 병용투여시 체중감소 효과가 -32%에서 -62%로 더욱 증가하는 것이 확인되었다.
- [916] 지방무게의 감소효과 역시 지속형 엑센딘 유도체 4.3 nmol/kg (2일 1회 주사) 단독투여시 보다 서열번호: 37 지속형 유도체 2.2 nmol/kg (각 2일 1회 주사) 병용투여시 -62%에서 -88%로 더욱 증가하였다.
- [917] 또한, 혈액에서 총 콜레스테롤 양을 측정한 결과, 도 6 에서 확인할 수 있듯이 리라글루타이드 (노보 노르디스크) 50 nmol/kg (1일 2회 주사)와 지속형 엑센딘 유도체 4.3 nmol/kg (2일 1회 주사) 각각의 단독투여 군에서 대조군에 비해 각각 -40%와 -49%의 콜레스테롤 감소를 보였으며, 지속형 엑센딘 유도체 4.3 nmol/kg (2일 1회 주사)와 서열번호: 37 지속형 유도체 2.2 nmol/kg (각 2일 1회 주사) 병용투여시 콜레스테롤 감소 효과가 -49%에서 -70%로 더욱 증가하는 것이 확인되었다.
- [918] 도 6의 내당능 (intraperitoneal glucose tolerance test, IPGTT) 측정 결과에서는 지속형 엑센딘 유도체 4.3 nmol/kg (2일 1회 주사) 단독투여 군과 서열번호: 37 지속형 유도체 2.2 nmol/kg (각 2일 1회 주사)의 병용투여 군이 각각 -61%와 -67%로 유사한 효력을 가지는 것을 확인하였다.
- [919] 이것으로 보아 지속형 엑센딘 유도체 4.3 nmol/kg (2일 1회 주사)와 서열번호: 37 지속형 유도체 2.2 nmol/kg (각 2일 1회 주사) 병용투여시 유사한 혈당 조절 능력을 보이며, 체중감소 효력 및 혈중 콜레스테롤 감소에 있어서 더욱 우수한 역할을 함을 확인 할 수 있었다.
- [920]
- [921] 실험예 4: 서열번호: 37의 지속형 결합체의 급성 저혈당 (acute hypoglycemia) 개선효과
- [922] SD 랫트를 4시간 절식한 후, 저혈당을 유발하고자 인슐린 0.65 U/kg를 피하 투여하였다. 인슐린 투여 45분 후 저혈당을 확인한 뒤, 부형제 (2 ml/kg, 단회주사) (vehicle), 서열번호: 37 지속형 결합체 (5.16 nmol/kg, 10.31 nmol/kg, 20.63 nmol/kg, 이상 정맥투여), 그리고 천연형 글루카곤 60 nmol/kg를 피하 투여한 후 혈당변화를 측정하였다.
- [923] 그 결과, 도 7에서와 같이 서열번호: 37 지속형 결합체가 모든 투여용량에서 인슐린에 의한 저혈당을 개선하였다. 이를 통해 서열번호: 37의 지속형 결합체가 저혈당 관련질환에 대한 치료효과를 가질 수 있음을 확인하였다.
- [924]
- [925] 실험예 5: 서열번호: 37의 지속형 결합체의 만성 저혈당 (chronic hypoglycemia) 개선효과
- [926] 선천성 고인슐린증 치료제로서의 효력 평가는 인슐린 펌프삽입 설치류에서 진행하였다. 선천성 고인슐린증 질환모델은 인슐린 펌프를 설치류 (랫트 혹은

마우스)에 수술을 통해 삽입하여 유도한다. 해당 설치류는 펌프에서 인슐린이 지속적으로 분비되기 때문에 저혈당이 지속적으로 유발되는, 사람에서의 선천성 고인슐린과 유사한 질병상태가 된다.

[927] 구체적으로, SD 랫트에 인슐린이 채워진 삼투압펌프 (osmotic pump)를 피하에 삽입하는 수술을 진행하였다. 일주일간 혈당을 측정하여 지속적으로 저혈당이 유발된 개체를 선별한 뒤 부형제 (vehicle), 서열번호: 37 지속형 결합체를 3 nmol/kg 또는 6 nmol/kg씩 3일 간격으로 (Q3D) 피하투여한 후 혈당 변화를 2주간 측정하였고, 혈당 곡선의 곡선하 면적 수치(AUC_{BG})를 산출하였다.

[928] 혈당곡선하 면적 (AUC, area under curve)은 약물의 장기투여 시 혈당의 변화양상을 수치화하는 일반적인 방법이다. 그 결과, 도 8에서와 같이 서열번호: 37 지속형 결합체가 모든 투여용량에서 지속형 글루카곤이 함유되지 않은 부형제 투여 (2 ml/kg, 3일 1회 주사) 대조군 (vehicle)인 만성 저혈당 랫트 대비, 지속적인 혈당증가가 유의적으로 나타남을 확인하였다 (** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ vs . 만성 저혈당 랫트, 부형제, by 1원 ANOVA). 이를 통해 서열번호: 37의 지속형 결합체가 선천성 고인슐린증 (congenital hyperinsulinism) 환자에서 나타나는 만성 저혈당에 대한 치료효과가 있음을 확인하였다.

[929]

[930] 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] 하기 일반식 1의 아미노산 서열을 포함하는 펩타이드를 포함하는, 선천성 고인슐린증의 예방 또는 치료용 약학적 조성물:
 X1-X2-QGTF-X7-SD-X10-S-X12-X13-X14-X15-X16-X17-X18-X19-X20-X21-F-X23-X24-W-L-X27-X28-X29-X30 (일반식 1, 서열번호: 45)
 상기 식에서,
 X1은 히스티딘(H), 데스아미노-히스티딜(desamino-histidyl), 디메틸-히스티딜(N-dimethyl-histidyl), 베타-히드록시 이미다조프로피오닐(beta-hydroxy imidazopropionyl), 4-이미다조아세틸(4-imidazoacetyl), 베타-카르복시 이미다조프로피오닐(beta-carboxy imidazopropionyl), 트립토판(W), 또는 티로신(Y)이거나, 부존재하고;
 X2는 알파-메틸-글루탐산(α -methyl-glutamic acid), Aib(aminoisobutyric acid), D-알라닌, 글리신(G), Sar(N-methylglycine), 세린(S) 또는 D-세린이며;
 X7은 트레오닌(T), 발린(V) 또는 시스테인(C)이고;
 X10은 티로신(Y) 또는 시스테인(C)이고;
 X12는 리신(K) 또는 시스테인(C)이고;
 X13은 티로신(Y) 또는 시스테인(C)이고;
 X14는 류신(L) 또는 시스테인(C)이고;
 X15는 아스파르트산(D), 글루탐산(E) 또는 시스테인(C)이고;
 X16은 글루탐산(E), 아스파르트산(D), 세린(S), 알파-메틸-글루탐산, 또는 시스테인(C)이거나, 부존재하며;
 X17은 아스파르트산(D), 글루타민(Q), 글루탐산(E), 리신(K), 아르기닌(R), 세린(S), 시스테인(C), 또는 발린(V)이거나, 부존재하며;
 X18은 알라닌(A), 아스파르트산(D), 글루탐산(E), 아르기닌(R), 발린(V), 또는 시스테인(C)이거나, 부존재하며;
 X19은 알라닌(A), 아르기닌(R), 세린(S), 발린(V), 또는 시스테인(C)이거나, 부존재하며;
 X20은 리신(K), 히스티딘(H), 글루타민(Q), 아스파르트산(D), 아르기닌(R), 알파-메틸-글루탐산, 또는 시스테인(C)이거나, 부존재하며;
 X21은 아스파르트산(D), 글루탐산(E), 류신(L), 발린(V), 또는 시스테인(C)이거나, 부존재하며;
 X23은 이소류신(I), 발린(V), 또는 아르기닌(R)이거나, 부존재하며;
 X24는 발린(V), 아르기닌(R), 알라닌(A), 시스테인(C), 글루탐산(E), 리신(K), 글루타민(Q), 알파-메틸-글루탐산, 또는 류신(L)이거나, 부존재하며;

X27는 이소류신(I), 발린(V), 알라닌(A), 리신(K), 메티오닌(M), 글루타민(Q), 또는 아르기닌(R)이거나, 부존재하며;
 X28은 글루타민(Q), 리신(K), 아스파라긴(N), 또는 아르기닌(R)이거나, 부존재하며;
 X29는 리신(K), 알라닌(A), 글리신(G), 또는 트레오닌(T)이거나, 부존재하며;
 X30은 시스테인(C)이거나, 부존재함
 (단, 상기 일반식 1의 아미노산 서열이 서열번호: 1과 동일한 경우는 제외함).

[청구항 2]

제1항에 있어서,
 상기 일반식 1에서,
 X1이 히스티딘(H), 트립토판(W), 또는 티로신(Y)이거나, 부존재하고;
 X2가 세린(S) 또는 Aib(aminoisobutyric acid)이며;
 X7은 트레오닌(T), 발린(V) 또는 시스테인(C)이고;
 X10은 티로신(Y) 또는 시스테인(C)이고;
 X12는 리신(K) 또는 시스테인(C)이고;
 X13은 티로신(Y) 또는 시스테인(C)이고;
 X14는 류신(L) 또는 시스테인(C)이고;
 X15는 아스파르트산(D), 또는 시스테인(C)이고;
 X16은 글루탐산(E), 세린(S) 또는 시스테인(C)이며;
 X17은 아스파르트산(D), 글루탐산(E), 리신(K), 아르기닌(R), 세린(S), 시스테인(C), 또는 발린(V) 이고;
 X18은 아스파르트산(D), 글루탐산(E), 아르기닌(R), 또는 시스테인(C)이며;
 X19는 알라닌(A), 또는 시스테인(C)이고;
 X20은 글루타민(Q), 아스파르트산(D), 리신(K), 또는 시스테인(C)이며;
 X21은 아스파르트산(D), 글루탐산(E), 류신(L), 발린(V), 또는 시스테인(C)이고;
 X23은 이소류신(I), 발린(V) 또는 아르기닌(R)이며;
 X24는 발린(V), 아르기닌(R), 알라닌(A), 글루탐산(E), 리신(K), 글루타민(Q), 또는 류신(L)이고;
 X27는 이소류신(I), 발린(V), 알라닌(A), 메티오닌(M), 글루타민(Q) 또는 아르기닌(R)이며;
 X28은 글루타민(Q), 리신(K), 아스파라긴(N) 또는 아르기닌(R)이고;
 X29는 트레오닌(T)이며;
 X30은 시스테인(C)이거나, 부존재하는,
 약학적 조성물.

[청구항 3]

제1항에 있어서,

상기 일반식 1에서

X1이 히스티딘(H), 트립토판(W), 또는 티로신(Y)이고;
 X2가 세린(S) 또는 Aib(aminoisobutyric acid)이며;
 X7은 시스테인(C), 트레오닌(T), 또는 발린(V)이고;
 X10은 티로신(Y) 또는 시스테인(C)이며;
 X12는 리신(K) 또는 시스테인(C)이고;
 X13은 티로신(Y) 또는 시스테인(C)이며;
 X14는 류신(L) 또는 시스테인(C)이고;
 X15는 아스파르트산(D), 또는 시스테인(C)이며;
 X16은 글루탐산(E), 세린(S) 또는 시스테인(C)이고;
 X17은 글루탐산(E), 리신(K), 아르기닌(R), 시스테인(C), 또는 발린(V)이며;
 X18은 아르기닌(R), 또는 시스테인(C)이고;
 X19는 알라닌(A), 또는 시스테인(C)이며;
 X20은 글루타민(Q) 또는 리신(K)이고;
 X21은 아스파르트산(D), 글루탐산(E), 발린(V), 또는 시스테인(C)이며;
 X23은 발린(V)이고;
 X24는 발린(V) 또는 글루타민(Q)이며;
 X27는 메티오닌(M)이고;
 X28은 아스파라긴(N) 또는 아르기닌(R)이며;
 X29는 트레오닌(T)이고;
 X30은 시스테인(C)이거나, 부존제하는, 약학적 조성물.

[청구항 4]

제1항에 있어서,
 상기 일반식 1에서
 X1이 티로신(Y)이고;
 X2가 Aib(aminoisobutyric acid)이며;
 X7은 시스테인(C), 트레오닌(T), 또는 발린(V)이고;
 X10은 티로신(Y) 또는 시스테인(C)이며;
 X12는 리신(K)이고;
 X13은 티로신(Y) 또는 시스테인(C)이며;
 X14는 류신(L) 또는 시스테인(C)이고;
 X15는 아스파르트산(D), 또는 시스테인(C)이며;
 X16은 글루탐산(E), 세린(S) 또는 시스테인(C)이고;
 X17은 리신(K), 아르기닌(R), 시스테인(C), 또는 발린(V)이며;
 X18은 아르기닌(R), 또는 시스테인(C)이고;
 X19는 알라닌(A), 또는 시스테인(C)이며;
 X20은 글루타민(Q) 또는 리신(K)이고;

X21은 아스파르트산(D), 글루탐산(E), 또는 시스테인(C)이며;
 X23은 발린(V)이고;
 X24는 글루타민(Q)이며;
 X27는 메티오닌(M)이고;
 X28은 아스파라긴(N) 또는 아르기닌(R)이며;
 X29는 트레오닌(T)이고;
 X30은 시스테인(C)이거나, 부존재하는,
 약학적 조성물.

[청구항 5]

제1항에 있어서,
 상기 일반식 1에서
 X1이 히스티딘(H), 트립토판(W), 또는 티로신(Y)이거나, 부존재하고;
 X2가 세린(S) 또는 Aib(aminoisobutyric acid)이며;
 X7은 트레오닌(T), 발린(V) 또는 시스테인(C)이고;
 X10은 티로신(Y) 또는 시스테인(C)이며;
 X12는 리신(K) 또는 시스테인(C)이고;
 X13은 티로신(Y) 또는 시스테인(C)이며;
 X14는 류신(L) 또는 시스테인(C)이고;
 X15은 아스파르트산(D), 또는 시스테인(C)이며;
 X16은 글루탐산(E), 세린(S) 또는 시스테인(C)이고;
 X17은 아스파르트산(D), 글루탐산(E), 리신(K), 아르기닌(R), 세린(S),
 시스테인(C), 또는 발린(V)이며;
 X18은 아스파르트산(D), 글루탐산(E), 아르기닌(R), 또는
 시스테인(C)이고;
 X19은 알라닌(A), 또는 시스테인(C)이며;
 X20은 글루타민(Q), 아스파르트산(D), 또는 리신(K)이고;
 X21은 아스파르트산(D), 또는 글루탐산(E)이며;
 X23은 발린(V)이고;
 X24는 발린(V) 또는 글루타민(Q)이며;
 X27은 이소류신(I) 또는 메티오닌(M)이고;
 X28은 아스파라긴(N) 또는 아르기닌(R)이며;
 X29는 트레오닌(T)이고;
 X30은 시스테인(C)이거나, 부존재하는,
 약학적 조성물.

[청구항 6]

제1항에 있어서,
 상기 일반식 1에서
 X1이 티로신(Y)이고;
 X2가 Aib(aminoisobutyric acid)이며;
 X7은 트레오닌(T)이고;

X10은 티로신(Y)이며;
 X12는 리신(K)이고;
 X13은 티로신(Y)이며;
 X14는 류신(L)이고;
 X15는 아스파르트산(D), 또는 시스테인(C)이며;
 X16은 글루탐산(E), 세린(S) 또는 시스테인(C)이고;
 X17은 리신(K) 또는 아르기닌(R)이며;
 X18은 아르기닌(R)이고;
 X19는 알라닌(A)이며;
 X20은 글루타민(Q), 시스테인(C), 또는 리신(K)이고;
 X21은 아스파르트산(D), 시스테인(C), 발린(V) 또는 글루탐산(E)이며;
 X23은 발린(V) 또는 아르기닌(R)이고;
 X24는 글루타민(Q) 또는 류신(L)이며;
 X27는 메티오닌(M)이고;
 X28은 아스파라긴(N) 또는 아르기닌(R)이며;
 X29는 트레오닌(T)이고;
 X30은 부존재하는,
 약학적 조성물.

[청구항 7] 제1항에 있어서, 상기 펩타이드는 하기 일반식 2의 아미노산 서열을 포함하는 펩타이드인, 약학적 조성물:
 Y-Aib-QGTF-X7-SD-X10-S-X12-Y-L-X15-X16-X17-R-A-X20-X21-F-V-X24-W-L-M-N-T-X30 (일반식 2, 서열번호: 46)
 상기 일반식 2에서
 X7은 트레오닌(T), 발린(V) 또는 시스테인(C)이고;
 X10은 티로신(Y) 또는 시스테인(C)이고;
 X12는 리신(K) 또는 시스테인(C)이고;
 X15는 아스파르트산(D), 또는 시스테인(C)이고;
 X16은 글루탐산(E) 또는 세린(S)이며;
 X17은 리신(K) 또는 아르기닌(R)이고;
 X20은 글루타민(Q) 또는 리신(K)이며;
 X21은 아스파르트산(D), 또는 글루탐산(E)이고;
 X24는 발린(V) 또는 글루타민(Q)이고;
 X30은 시스테인(C)이거나, 부존재함.

[청구항 8] 제1항에 있어서, 상기 펩타이드는 천연형 글루카곤의 pI인 6.8과 상이한 pI를 가지는, 약학적 조성물.

[청구항 9] 제1항에 있어서, 일반식 1의 X10과 X14, X12와 X16, X16과 X20, X17과 X21, X20과 X24, 및 X24와 X28의 아미노산 쌍 중 적어도 하나의 아미노산 쌍의 아미노산 각각이 고리를 형성할 수 있는 글루탐산 또는 리신으로

- 치환된, 약학적 조성물.
- [청구항 10] 제9항에 있어서,
X12와 X16의 아미노산 쌍, X16과 X20의 아미노산 쌍, 또는 X17과 X21의 아미노산 쌍의 아미노산 각각이 고리를 형성할 수 있는 글루탐산 또는 리신으로 치환된, 약학적 조성물.
- [청구항 11] 제1항에 있어서, 상기 일반식 1에서, X10과 X14, X12와 X16, X16과 X20, X17과 X21, X20과 X24, 및 X24와 X28의 아미노산 쌍 중 적어도 하나의 아미노산 쌍에서 각각의 아미노산 간에 고리를 형성하는, 약학적 조성물.
- [청구항 12] 제1항에 있어서, 상기 펩타이드의 C-말단이 아미드화된, 약학적 조성물.
- [청구항 13] 제1항에 있어서, 상기 펩타이드의 C-말단은 변형되지 않은, 약학적 조성물.
- [청구항 14] 제1항에 있어서, 상기 펩타이드는 글루카곤 수용체를 활성화시킬 수 있는 천연형 글루카곤의 유도체인, 약학적 조성물.
- [청구항 15] 제1항에 있어서, 상기 펩타이드는 서열번호: 2 내지 44로 이루어진 군에서 선택된 아미노산 서열을 포함하는 약학적 조성물.
- [청구항 16] 제7항에 있어서, 상기 펩타이드는 서열번호: 12, 13, 15 및 36 내지 44로 이루어진 군에서 선택된 아미노산 서열을 포함하는 약학적 조성물.
- [청구항 17] 제1항에 있어서, 상기 펩타이드는 서열번호: 37의 아미노산 서열을 포함하는 약학적 조성물.
- [청구항 18] 제1항 내지 제17항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 펩타이드는 일반식 1의 아미노산 서열을 포함하는 펩타이드 부위에 생체적합성 물질부가 결합되어 있는 지속형 결합체의 형태인 약학적 조성물.
- [청구항 19] 제18항에 있어서, 상기 생체적합성 물질부는 고분자 중합체, 지방산, 콜레스테롤, 알부민 및 이의 단편, 알부민 결합물질, 특정 아미노산 서열의 반복단위의 중합체, 항체, 항체 단편, FcRn 결합물질, 생체 내 결합조직 혹은 그 유도체, 뉴클레오타이드, 파이브로넥틴, 트랜스페린(Transferrin), 당류, 헤파린, 및 엘라스틴으로 이루어진 군에서 선택되는 약학적 조성물.
- [청구항 20] 제19항에 있어서, 상기 고분자 중합체는 폴리에틸렌 글리콜, 폴리프로필렌 글리콜, 에틸렌 글리콜-프로필렌 글리콜 공중합체, 폴리옥시에틸화폴리올, 폴리비닐알콜, 다당류, 텍스트란, 폴리비닐에틸에테르, 생분해성 고분자, 지질 중합체, 키틴, 히알루론산, 올리고뉴클레오타이드 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 약학적 조성물.
- [청구항 21] 제19항에 있어서, 상기 FcRn 결합 물질은 면역글로불린 Fc 영역을 포함하는 폴리펩타이드인 약학적 조성물.
- [청구항 22] 제18항에 있어서, 상기 펩타이드 부위와 생체적합성 물질부는 링커를 통해 서로 연결된 약학적 조성물.

- [청구항 23] 제22항에 있어서, 상기 링커는 펩타이드, 지방산, 당류, 고분자 중합체, 저분자 화합물, 뉴클레오타이드 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 약학적 조성물.
- [청구항 24] 제23항에 있어서, 상기 고분자 중합체는 폴리에틸렌 글리콜, 폴리프로필렌 글리콜, 에틸렌 글리콜-프로필렌 글리콜 공중합체, 폴리옥시에틸화폴리올, 폴리비닐알콜, 다당류, 텍스트란, 폴리비닐에틸에테르, 생분해성 고분자, 지질 중합체, 키틴, 히알루론산, 올리고뉴클레오타이드 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는, 약학적 조성물.
- [청구항 25] 제22항에 있어서, 상기 링커는 폴리에틸렌 글리콜인 약학적 조성물.
- [청구항 26] 제21항에 있어서, 상기 면역글로불린 Fc 영역은 비당쇄화된 약학적 조성물.
- [청구항 27] 제21항에 있어서, 상기 면역글로불린 Fc 영역은 (a) CH1 도메인, CH2 도메인, CH3 도메인 및 CH4 도메인; (b) CH1 도메인 및 CH2 도메인; (c) CH1 도메인 및 CH3 도메인; (d) CH2 도메인 및 CH3 도메인; (e) CH1 도메인, CH2 도메인, CH3 도메인 및 CH4 도메인 중 1개 또는 2개 이상의 도메인과 면역글로불린 힌지 영역 또는 힌지 영역의 일부와의 조합; 및 (f) 중쇄 불변영역 각 도메인과 경쇄 불변영역의 이량체로 구성된 군으로부터 선택되는 것인 약학적 조성물.
- [청구항 28] 제21항에 있어서, 상기 면역글로불린 Fc 영역을 포함하는 폴리펩타이드는 이량체 형태(dimeric form)인 약학적 조성물.
- [청구항 29] 제21항에 있어서, 상기 면역글로불린 Fc 영역은 이항화 결합을 형성할 수 있는 부위가 제거되거나, 천연형 Fc에서 N-말단의 일부 아미노산이 제거되거나, 천연형 Fc의 N-말단에 메티오닌 잔기가 부가되거나, 보체결합부위가 제거되거나 또는 ADCC(antibody dependent cell mediated cytotoxicity) 부위가 제거된, 천연형 Fc의 유도체인 약학적 조성물.
- [청구항 30] 제21항에 있어서, 상기 면역글로불린 Fc 영역은 IgG, IgA, IgD, IgE 및 IgM로 구성되는 군으로부터 선택되는 면역글로불린에서 유래된 Fc 영역인 것인 약학적 조성물.
- [청구항 31] 제30항에 있어서, 상기 면역글로불린 Fc 영역은 IgG4 Fc 영역인 것인 약학적 조성물.
- [청구항 32] 제21항에 있어서, 상기 면역글로불린 Fc 영역은 인간 IgG4 유래의 비-당쇄화된 Fc 영역인 것인 약학적 조성물.
- [청구항 33] 제22항에 있어서, 상기 링커는 상기 일반식 1의 아미노산 서열을 포함하는 펩타이드의 시스테인 잔기에 연결되는 약학적 조성물.
- [청구항 34] 제22항에 있어서, 상기 지속형 결합체의 상기 링커는 한쪽 말단이 생체적합성 물질부의 아민기 또는 티올기와, 상기 링커의 다른 말단이 일반식 1의 아미노산 서열을 포함하는 펩타이드 부위의 아민기 또는

- 티올기에 각각 반응하여 형성된 공유결합으로 상기 펩타이드 부위와
상기 생체적합성 물질부에 각각 연결되어 있는 약학적 조성물.
- [청구항 35] 하기 일반식 2의 아미노산 서열을 포함하는 분리된 펩타이드:
Y-Aib-QGTF-X7-SD-X10-S-X12-Y-L-X15-X16-X17-R-A-X20-X21-F-V-X2
4-W-L-M-N-T-X30 (일반식 2, 서열번호: 46)
상기 일반식 2에서
X7은 트레오닌(T), 발린(V) 또는 시스테인(C)이고;
X10은 티로신(Y) 또는 시스테인(C)이고;
X12는 리신(K) 또는 시스테인(C)이고;
X15는 아스파르트산(D), 또는 시스테인(C)이고;
X16은 글루탐산(E) 또는 세린(S)이며;
X17은 리신(K) 또는 아르기닌(R)이고;
X20은 글루타민(Q) 또는 리신(K)이며;
X21은 아스파르트산(D), 또는 글루탐산(E)이고;
X24는 발린(V) 또는 글루타민(Q)이고;
X30은 시스테인(C)이거나, 부존재하며;
단, 상기 일반식 2의 아미노산 서열을 포함하는 분리된 펩타이드 중에서
서열번호: 19, 33, 49, 및 50에 해당하는 펩타이드는 제외됨.
- [청구항 36] 제35항에 있어서, 상기 펩타이드는 일반식 2의 X16이 글루탐산이고,
X20은 리신이며, X16과 X20의 측쇄가 락탐 고리를 형성하고 있는
펩타이드.
- [청구항 37] 제35항에 있어서, 상기 일반식 2의 아미노산 서열을 포함하는 펩타이드의
C-말단이 아미드화된 펩타이드.
- [청구항 38] 제35항에 있어서, 상기 펩타이드의 C-말단은 변형되지 않은, 펩타이드.
- [청구항 39] 제35항에 있어서, 상기 펩타이드는 서열번호: 12, 13, 15 및 36 내지 44로
이루어진 군에서 선택된 아미노산 서열을 포함하는 펩타이드.
- [청구항 40] 펩타이드 부위 및 상기 펩타이드 부위에 공유결합으로 연결된
생체적합성 물질부를 포함하는 분리된 결합체로서, 상기 펩타이드
부위는 하기 일반식 2의 아미노산 서열과 동일한 서열이거나 이를
포함하는 서열인 분리된 결합체:
Y-Aib-QGTF-X7-SD-X10-S-X12-Y-L-X15-X16-X17-R-A-X20-X21-F-V-X2
4-W-L-M-N-T-X30 (일반식 2, 서열번호: 46)
상기 일반식 2에서
X7은 트레오닌(T), 발린(V) 또는 시스테인(C)이고;
X10은 티로신(Y) 또는 시스테인(C)이고;
X12는 리신(K) 또는 시스테인(C)이고;
X15는 아스파르트산(D), 또는 시스테인(C)이고;
X16은 글루탐산(E) 또는 세린(S)이며;

X17은 리신(K) 또는 아르기닌(R)이고;
 X20은 글루타민(Q) 또는 리신(K)이며;
 X21은 아스파르트산(D), 또는 글루탐산(E)이고;
 X24는 발린(V) 또는 글루타민(Q)이고;
 X30은 시스테인(C)이거나, 부존재함.

- [청구항 41] 제40항에 있어서, 상기 생체적합성 물질부는 고분자 중합체, 지방산, 콜레스테롤, 알부민 및 이의 단편, 알부민 결합물질, 특정 아미노산 서열의 반복단위의 중합체, 항체, 항체 단편, FcRn 결합물질, 생체 내 결합조직 혹은 그 유도체, 뉴클레오타이드, 파이프록네티, 트랜스페린(Transferrin), 당류, 헤파린, 및 엘라스티인으로 이루어진 군에서 선택되는 분리된 결합체.
- [청구항 42] 제41항에 있어서, 상기 고분자 중합체는 폴리에틸렌 글리콜, 폴리프로필렌 글리콜, 에틸렌 글리콜-프로필렌 글리콜 공중합체, 폴리옥시에틸화폴리올, 폴리비닐알콜, 다당류, 텍스트란, 폴리비닐에틸에테르, 생분해성 고분자, 지질 중합체, 키틴, 히알루론산, 올리고뉴클레오타이드 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 분리된 결합체.
- [청구항 43] 제41항에 있어서, 상기 상기 FcRn 결합 물질은 면역글로불린 Fc 영역을 포함하는 폴리펩타이드인, 분리된 결합체.
- [청구항 44] 제40항에 있어서, 상기 펩타이드 부위와 상기 생체적합성 물질부 사이의 공유결합은 링커를 통해 서로 연결된 분리된 결합체.
- [청구항 45] 제44항에 있어서, 상기 링커는 펩타이드, 지방산, 당류, 고분자 중합체, 저분자 화합물, 뉴클레오타이드 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 분리된 결합체.
- [청구항 46] 제45항에 있어서, 상기 고분자 중합체는 폴리에틸렌 글리콜, 폴리프로필렌 글리콜, 에틸렌 글리콜-프로필렌 글리콜 공중합체, 폴리옥시에틸화폴리올, 폴리비닐알콜, 다당류, 텍스트란, 폴리비닐에틸에테르, 생분해성 고분자, 지질 중합체, 키틴, 히알루론산, 올리고뉴클레오타이드 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 분리된 결합체.
- [청구항 47] (i) 제35항 내지 제39항 중 어느 한 항의 분리된 펩타이드 또는 제40항 내지 제46항 중 어느 한 항의 분리된 결합체; 및 (ii) 약학적으로 허용되는 부형제를 포함하는, 저혈당의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.
- [청구항 48] (i) 제35항 내지 제39항 중 어느 한 항의 분리된 펩타이드 또는 제40항 내지 제46항 중 어느 한 항의 분리된 결합체; 및 (ii) 약학적으로 허용되는 부형제를 포함하는, 대사중후군의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.
- [청구항 49] 제48항에 있어서, 상기 조성물은 하나 이상의 대사중후군에 대한 치료적 활성을 가지는 화합물 또는 물질을 더 포함하는, 약학적 조성물.

- [청구항 50] 제49항에 있어서, 상기 대사증후군에 대한 치료적 활성을 가지는 화합물 또는 물질은 인슐린 분비 펩타이드, GLP-1(glucagon like peptide-1) 수용체 아고니스트, 렙틴(Leptin) 수용체 아고니스트, DPP-IV(dipeptidyl peptidase-IV) 저해제, Y5 수용체 안타고니스트, MCH(Melanin-concentrating hormone) 수용체 안타고니스트, Y2/4 수용체 아고니스트, MC3/4(Melanocortin 3/4) 수용체 아고니스트, 위/췌장 리파아제(gastric/pancreatic lipase) 저해제, 5HT2c(5-hydroxytryptamine receptor 2C, G protein-coupled) 아고니스트, β 3A 수용체 아고니스트, 아밀린(Amylin) 수용체 아고니스트, 그렐린(Ghrelin) 안타고니스트, 그렐린 수용체 안타고니스트, PPAR α (peroxisome proliferator-activated receptor alpha) 아고니스트, PPAR δ (peroxisome proliferator-activated receptor delta) 아고니스트, FXR(farnesoid X receptor) 아고니스트, 아세틸-CoA 카복실라제 억제제(acetyl-CoA carboxylase inhibitor), 펩타이드 YY, CCK(Cholecystokinin), 제닌(Xenin), 글리센틴(glicentin), 오베스타틴(obestatin), 세크레틴(secretin), 네스파틴(nesfatin), 인슐린(insulin), 및 GIP(glucose-dependent insulintropic peptide)로 이루어진 군에서 선택되는, 약학적 조성물.
- [청구항 51] 제47항에 있어서, 상기 대사증후군은 내당증 장애, 고콜레스테롤혈증, 이상지혈증, 비만, 당뇨, 고혈압, 비알코올지방간염 (nonalcoholic steatohepatitis, NASH), 이상지혈증에 의한 동맥경화, 죽상동맥경화증, 동맥경화증, 관상동맥 심질환(관동맥성 심장병), 및 뇌졸중으로 이루어진 군에서 선택된, 약학적 조성물.
- [청구항 52] 제48항에 있어서, 상기 조성물은 (i) 서열번호: 37의 아미노산 서열을 포함하는 펩타이드 부위 및 이에 공유결합으로 연결된 생체적합성 물질부를 포함하는 결합체, 및 (ii) 엑센딘-4의 첫 번째 아미노산(히스티딘)의 알파 탄소가 제거된 이미다조아세틸 엑센딘-4 부위 및 이에 공유결합으로 연결된 생체적합성 물질을 포함하는 결합체를 모두 포함하는, 약학적 조성물.
- [청구항 53] 제52항에 있어서, 상기 서열번호: 37의 아미노산 서열을 포함하는 펩타이드 부위 및 이미다조아세틸 엑센딘-4 부위는 각각의 생체적합성 물질부에 링커를 통해서 연결된, 약학적 조성물.
- [청구항 54] 제1항 내지 제34항 중 어느 한 항의 약학적 조성물을 이를 필요로 하는 개체에게 투여하는 단계를 포함하는, 선천성 고인슐린증의 예방 또는 치료 방법.
- [청구항 55] 제35항 내지 제39항 중 어느 한 항의 분리된 펩타이드 또는 제 40항 내지 제46항 중 어느 한 항의 분리된 결합체를 이를 필요로 하는 개체에 투여하는 단계를 포함하는, 저혈당의 예방 또는 치료 방법.
- [청구항 56] 제35항 내지 제39항 중 어느 한 항의 분리된 펩타이드 또는 제 40항 내지

제46항 중 어느 한 항의 분리된 결합체를 이를 필요로 하는 개체에 투여하는 단계를 포함하는, 대사증후군의 예방 또는 치료 방법.

[청구항 57] 제56항에 있어서, 상기 방법은 하나 이상의 대사증후군에 대한 치료적 활성을 가지는 화합물 또는 물질을 투여하는 것을 더 포함하는, 방법.

[청구항 58] 제57항에 있어서, 상기 방법은 상기 분리된 펩타이드 또는 상기 분리된 결합체와 하나 이상의 대사증후군에 대한 치료적 활성을 가지는 화합물 또는 물질을 동시, 개별 또는 순차적으로 투여하는 방법.