명세서

발명의 명칭: 글루카곤, GLP-1 및 GIP 수용체 모두에 활성을 갖는 삼중 활성체의 지속형 결합체의 폐질환의 치료 용도

기술분야

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

[2]

배경기술

[3] 폐는 호흡을 주로 담당하는 기관으로서, 유해 물질, 바이러스, 면역 이상 등으로 인해 폐 질환이 발병한다. 폐 질환은 폐 기능 감소와 호흡 불편 등을 야기하기 때문에 발병 원인에 따른 적절한 치료가 요구된다.

[4] 폐와 관련된 질환으로는 간질성폐질환, 진행성 섬유화 간질성 폐 질환, 특발성 간질성 폐렴, 비특이성 간질성 폐렴, 폐섬유증, 간질성 폐섬유증, 특발성 폐섬유증, 폐포염, 폐렴, 폐기종, 기관지염, 만성 폐쇄성 폐질환(COPD), 복합 폐 섬유화와 폐기종(CPFE), 천식, 그리고 호흡기 감염 질환(예를 들어, 코로나 바이러스 감염증 (COVID-19))을 들 수 있다. 이러한 폐 질환은 서로 연관되어 여러 증상이 혼재되어 나타나므로, 치료제 선택에 주의가 필요하다고 알려져 있다. 폐 질환의 주요 발병 기전으로는 폐 손상 및 염증 반응, 그리고 섬유화를 들 수 있다.

[5] 구체적으로, 폐에서 바이러스, 미생물, 유해 물질 등으로 인한 염증 반응이 일어나면 폐포의 대식세포에 의한 염증 사이토카인(예를 들어, IL-1, IL-6, TNF-α) 분비, 호중구의 유인, 프로테아제 분비 등이 진행되고, 폐 조직을 구성하는 섬유를 분해하는 프로테아제(예를 들어, 엘라스타제)의 분비로 인해 폐 조직의 탄력성 및 구조가 손상되어 폐의 섬유화로 이어지는 것으로 알려져 있다. 폐의 염증과 섬유화는 많은 폐질환의 진행 과정에서 선행되므로, 폐질환의 예방 및 치료에 있어 근본적인 기전이라 할 수 있다.

[6] 폐 섬유증은 폐 질환의 대표적인 예로서, 섬유증 (fibrosis)은 기관 또는 조직에서 과도한 섬유질 결합조직을 형성하는 질환이다. 섬유증은 인체 내에서 조직이 여러 가지 스트레스 (감염, 화학적 자극, 방사선 등)에 의한 손상을 받은 후 창상 치유(wound healing) 과정 중에 정상적인 통제가 불가능한 상태를 말한다. 섬유증은 폐, 심장, 간 등 다양한 장기에 발생하며 아직까지 근본적인 치료제가 개발되지 않아 미충족 수요가 높은 분야 중 하나다.

[7] 원인 불명의 섬유성 간질성 폐렴이 만성적으로 진행되는, 원인이 알려지지 않은 폐섬유증 중 하나인 특발성 폐섬유증(idiopathic pulmonary fibrosis, IPF)은 폐포 상피세포의 지속적인 손상에 의한 섬유화가 진행되는 질병으로 피르페니돈(pirfenidone)과 닌테다닙(nintedanib) 약물 투여에 따른 치료 방법이

연구되어 왔으나, 식욕 감소, 위약감, 소화기계 부작용, 간독성 가능성, 광과민성 발진 등의 부작용이 알려져 있다.

[8] 또한, 폐질환의 다른 대표적인 예인 만성 폐쇄성 폐 질환(chronic obstructive pulmonary disease, COPD)은 담배, 대기 오염 또는 독성 흡입 물질에 의해 폐의 비정상적인 염증 반응으로 기도가 좁아지면서 서서히 기도 폐쇄가 일어나는 질환을 의미하며 크게 만성 기관지염과 폐기종(emphysema)으로 나뉜다. 특히 흡연이 만성 폐쇄성 폐 질환의 주요 원인으로 알려져 있다. 흡연은 폐 조직 내 강력한 자극물질로 작용하여, 다양한 전염증 인자, 성장 인자, 산화 물질 및 화학주성 인자들의 생성을 증가시키며, 염증성 신호 전달 체계를 활성화시켜 호중구 및 대식세포를 비롯한 많은 염증세포의 유주를 촉진시켜 폐염증을 더욱 악화시키고 이는 결국 폐조직의 비정상적인 변화, 이를테면 기도벽의 비후, 폐섬유화를 야기하여 폐기능을 저하시킨다. 이에, 만성폐쇄성 폐질환의 예방 및 치료를 위해 폐 염증 개선이 하나의 치료 방법으로서 이해되고 있다.

[9] 폐질환의 다른 대표적인 예로는 최근 발병하고 있는 신종 코로나 바이러스(2019-nCoV 혹은 SARS-CoV-2) 감염에 따른 폐손상 및 이에 따른 급성 호흡기 질환(COVID-19)이 있다. 호흡기를 통해 전파되는 신종 코로나 바이러스는 type II 폐포 상피세포에서 주로발현하는 ACE2, TMPRSS2를 통해 세포내로 침투하기 때문에 폐가 주요 취약 장기 (organ)로 알려져있다. 주요증상으로는 발열, 기침 등이 있고 건강한 성인은 시간이 지나면 회복될 가능성이 크다. 하지만, 초기 면역력이 떨어져 폐에 해당 바이러스 감염이 심하게 일어난 경우에는 폐 손상에 따른 심각한 염증반응을 유발, 섬유화 진행이 촉진되어 급성 호흡 곤란 증후군(ARDS) 및 폐혈증 등과 같은 증상을 수반할 수 있다고 알려져있다. 현재 COVID-19 치료는 바이러스의 감염 및 증식을 억제시키거나, 폐 염증을 조절하는 약물이 주로 사용되고 있다. 이에 COVID-19의 예방 및 치료를 위해 폐 염증 및 섬유화 개선이 하나의 치료 방법으로서 이해되고 있다.

[10] 이와 같이 폐 염증 및 섬유화는 폐 질환의 발병 및 발전의 주요한 원인이 되므로, 폐 염증 및 섬유화 개선은 여러 폐 질환의 치료 기전으로서 연구되어 오고 있다.

[11]

[12] 한편, GLP-1(Glucagon-like peptide-1) 및 GIP(Glucose-dependent insuliontropic polypeptide)는 대표적인 위장 호르몬이자 신경 호르몬으로서 음식물 섭취에 따른 혈중 당성분 조절에 관여하는 물질이다. 글루카곤(Glucagon)은 췌장에서 분비되는 펩타이드 호르몬으로 전술한 두 물질과 함께 혈중 당 농도 조절 작용에 관여한다. GLP-1 수용체, GIP 수용체, 및 글루카곤 수용체에 각각 또는 동시에 활성을 나타낼 수 있는 약물을 이용한 치료제 개발이 이루어 지고 있다 (US 10,370,426, US 10,400,020).

[13]

[14] 현재까지 폐질환에 대한 다양한 연구가 진행되고 있으나, 실질적이고 효과적인 치료제의 개발은 미비한 상태인 바, 지속적인 치료제의 개발의 필요성이 있다.

[15]

발명의 상세한 설명

기술적 과제

[16] 본 발명의 하나의 목적은 글루카곤 수용체, GLP-1 수용체 및 GIP 수용체에 대해 활성을 갖는 펩타이드 또는 이러한 펩타이드의 지속형 결합체를 포함하는 폐 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공하는 것이다.

[17] 본 발명의 다른 목적은 상기 펩타이드 또는 이러한 펩타이드의 지속형 결합체를 포함하는 조성물을 이를 필요로 하는 개체에 투여하는 단계를 포함하는, 폐 질환의 예방 또는 치료 방법을 제공하는 것이다.

[18] 본 발명의 다른 목적은 폐 질환의 예방 또는 치료를 위한 약제의 제조에 있어서 상기 펩타이드 또는 이러한 펩타이드의 지속형 결합체를 포함하는 조성물의 용도를 제공하는 것이다.

[19]

과제 해결 수단

[20] 본 발명을 구현하는 하나의 양태는 글루카곤 수용체, GLP-1 (Glucagon-like peptide-1) 수용체, 및 GIP (Glucose-dependent insulinotropic polypeptide) 수용체에 대해 활성을 갖는 펩타이드를 포함하는 폐 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물이다.

[21] 하나의 구체예로서, 상기 폐 질환의 예방 또는 치료를 위한 약학적 조성물은, 약학적으로 허용되는 부형제와 서열번호 1 내지 102 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하는 펩타이드를 약학적 유효량으로 포함하는 것을 특징으로 한다.

[22] 앞선 구체예 중 어느 하나에 따른 약학적 조성물로서, 상기 펩타이드는 지속형 결합체의 형태이고, 상기 지속형 결합체는 하기 화학식 1로 표시되는 것을 특징으로 한다:

[23] [화학식 1]

[24] X - L - F

[25] 단 이 때 X는 서열번호 1 내지 102 중 어느 하나의 아미노산 서열의 펩타이드이고;

[26] L은 에틸렌글리콜 반복 단위를 함유하는 링커이며,

[27] F는 면역글로불린 Fc 영역이고,

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

[29] 앞선 구체예 중 어느 하나에 따른 조성물로서, 상기 펩타이드는 그 C-말단이 아미드화된 것을 특징으로 한다.

[30] 앞선 구체예 중 어느 하나에 따른 조성물로서, 상기 펩타이드는 이의 C-말단이 아미드화되거나 또는 자유 카르복실기(-COOH)를 갖는 것을 특징으로 한다.

[31] 앞선 구체예 중 어느 하나에 따른 조성물로서, 상기 펩타이드는 서열번호 21, 22, 42, 43, 50, 64, 66, 67, 70, 71, 76, 77, 96, 97과 100으로 이루어진 군으로부터 선택하는 아미노산을 포함하는 것을 특징으로 한다.

[32] 앞선 구체예 중 어느 하나에 따른 조성물로서, 상기 펩타이드는 서열번호 21, 22, 42, 43, 50, 77과 96으로 이루어진 군으로부터 선택하는 아미노산 서열을 포함하는 것을 특징으로 한다.

[33] 앞선 구체예 중 어느 하나에 따른 조성물로서, 펩타이드 서열은 N-말단으로부터 16번 아미노산과 20번 아미노산은 서로 고리를 형성하는 것을 특징으로 한다.

[34] 앞선 구체예 중 어느 하나에 따른 조성물로서, 상기 L 내의 에틸렌글리콜 반복 단위 부분의 화학식량은 1 내지 100 kDa 범위에 있는 것을 특징으로 한다.

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

[36] 앞선 구체예 중 어느 하나에 따른 조성물로서, 상기 폐 질환은 간질성 폐질환(interstitial lung disease, ILD), 진행성 섬유화 간질성 폐 질환(progressive fibrosing Interstitial Lung Disease, PF-ILD), 특발성 간질성 폐렴(idiopathic interstitial pneumonias, IIP), 비특이성 간질성 폐렴(non-specific interstitial pneumonia, NSIP), 폐섬유증(pulmonary fibrosis), 간질성 폐섬유증(fibrosing interstitial lung diseases, FILD), 특발성 폐섬유증 (idiopathic pulmonary fibrosis, IPF), 폐포염 (alveolitis), 폐렴(pneumonia), 폐기종(emphysema), 기관지염(bronchitis), 만성 폐쇄성 폐질환(chronic obstructive pulmonary disease), 복합 폐 섬유화와 폐기종(combined pulmonary fibrosis and emphysema, CPFE), 천식(asthma), 또는 호흡기 감염 질환인 것을 특징으로 한다.

[37] 앞선 구체예 중 어느 하나에 따른 조성물로서, 상기 호흡기 감염 질환은 호흡기 바이러스, 세균, 마이코플라즈마(mycoplasma), 또는 진균 감염 질환인 것을 특징으로 한다.

[38] 앞선 구체예 중 어느 하나에 따른 조성물로서, 상기 호흡기 바이러스는 아데노바이러스(adenovirus), 백시니아 바이러스(vaccinia virus), 헤르페스 단순 바이러스(herpes simplex virus), 파라인플루엔자 바이러스(parainfluenza virus), 라이노 바이러스(rhinovirus), 수두바이러스(varicella Zoster Virus), 홍역 바이러스(measle virus), 호흡기 세포융합 바이러스(respiratorysyncytial virus), 뎅기바이러스(Dengue virus), HIV(human immunodeficiency virus), 인플루엔자 바이러스, 코로나바이러스(coronavirus), 중증급성 호흡기 증후군 바이러스(severe acute respiratory syndrome associated virus; SARS-associated virus), 및 중동 호흡기 증후군 코로나바이러스(middle east respiratory syndrome coronavirus; MERS-CoV)로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나인 것을 특징으로 한다.

[39] 앞선 구체예 중 어느 하나에 따른 조성물로서, 상기 코로나바이러스는

SARS-CoV-2인 것을 특징으로 한다.

[40] 앞선 구체예 중 어느 하나에 따른 조성물로서, 상기 약학적 조성물은 투여시 (i) 대식세포(macrophage) 활성 저해, 및/또는 (ii) IL-1β, IL-6, IL-12, 또는 TNF-α 의 발현을 감소시키는 것을 특징으로 한다.

[41] 앞선 구체예 중 어느 하나에 따른 조성물로서, 상기 약학적 조성물은 투여 시 하기 특성 중 하나 이상을 갖는 것을 특징으로 한다:

[42] (i) 근섬유아세포(myofibroblast) 분화 저해;

[43] (ii) α-SMA, collagen1α1, 또는 fibronectin의 발현 감소; 또는

[44] (iii) 폐포상피세포(alveolar epithelial cell)의 상피간엽이행(epithelial mesenchymal transition, EMT) 저해; 및

[45] (iv) collagen1α1, 또는 collagen1α3의 발현 감소

[46] 앞선 구체예 중 어느 하나에 따른 조성물로서, 상기 약학적 조성물은 점액용해제(mucolytic agents) 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염이 추가로 투여되는 것을 특징으로 한다.

[47] 앞선 구체예 중 어느 하나에 따른 조성물로서, 상기 점액용해제는 암브록솔(ambroxol), N-아세틸시스테인(N-acetylcystein), N-아세틸린(N-acetylin), 카르보시스테인(carbocysteine), 도미오돌 (domiodol), 푸도스테인(fudosteine), 브롬헥신(bromhexine), 엘도스테인(erdosteine), 레토스틴 (letostine), 리소자임 (lysozyme), 메스나 (mesna), 소브레롤 (sobrerol), 스테프로닌 (stepronin), 티오프로닌 (tiopronin), 틸록사폴 (tyloxapol), 카보시스테인(carbocisteine), 도르나제 알파 (dornase alfa), 에프라지논 (eprazinone), 레토스테인 (letosteine), 넬테넥신 (neltenexine), 및 메시스테인(mecysteine)으로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상인 것을 특징으로 한다.

[48] 앞선 구체예 중 어느 하나에 따른 조성물로서, 상기 펩타이드와 점액용해제 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염은 동시, 순차, 또는 역순으로 투여되는 것을 특징으로 한다.

[49] 앞선 구체예 중 어느 하나에 따른 조성물로서, 상기 폐 질환은 코로나바이러스감염증-19(COVID-19)에 의한 폐 염증 및 섬유증인 것을 특징으로 할 수 있다.

[50] 앞선 구체예 중 어느 하나에 따른 조성물로서, 상기 영역 F는 두 개의 폴리펩타이드 사슬로 이루어진 이합체이며, L의 한 말단이 상기 두 폴리펩타이드 사슬 중 하나의 폴리펩티드 사슬에만 연결되어 있는 것을 특징으로 한다.

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

[52] 본 발명을 구현하는 다른 하나의 양태는 폐 질환의 예방 또는 치료를 위한 약제의 제조에 있어서 상기 펩타이드 또는 이를 포함하는 조성물의 용도이다.

[53] 본 발명을 구현하는 다른 하나의 양태는 폐 질환의 예방 또는 치료를 위한 상기 펩타이드 또는 이를 포함하는 조성물의 용도이다.

[54]

발명의 효과

[55] 본 발명에 따른 삼중 활성체 또는 이의 지속형 결합체는 글루카곤 수용체, GLP-1 (Glucagon-like peptide-1) 수용체, 및 GIP (Glucose-dependent insulinotropic polypeptide) 수용체에 대해 활성을 가져, 폐 질환에 대한 예방 또는 치료 효과를 나타낼 수 있다.

[56]

도면의 간단한 설명

[57] 도 1은 삼중활성체 지속형 결합체 처리에 따른 폐 조직 내 염증성 사이토카인 발현 수준 변화를 in vivo에서 확인한 도이다.

[58] 도 2는 삼중활성체 지속형 결합체 처리에 따른 폐기종 개선 효과를 *in vivo*에서 확인한 도이다.

[59] 도 3은 삼중활성체 지속형 결합체의 처리에 따른 폐섬유아세포(lung fibroblast, MRC5 cell)에서의 근섬유아세포(myofibroblast) 분화 마커(α-SMA, collagen1α1, fibronectin) 발현 수준 변화를 확인한 도이다.

[60] 도 4는 삼중활성체 지속형 결합체의 처리에 따른 폐포상피세포(lung alveolar epithelial cell, A549 cell)에서의 상피간엽이행(epithelial mesenchymal transition, EMT) 마커(collagen1α1, collagen1α3) 발현 수준 변화를 확인한 도이다.

[61] 도 5는 삼중활성체 지속형 결합체 처리에 따른 BLM 마우스 폐 조직 섬유화 개선 효과를 in vivo에서 확인한 도이다.

[62] 도 6은 삼중활성체 지속형 결합체 처리에 따른 BLM 마우스의 생존률 변화를 확인한 도이다.

[63]

발명의 실시를 위한 최선의 형태

[64] 이하에서는, 본 발명을 더욱 상세히 설명한다.

[65] 한편, 본원에서 개시되는 각각의 설명 및 실시형태는 각각의 다른 설명 및 실시형태에도 적용될 수 있다. 즉, 본원에서 개시된 다양한 요소들의 모든 조합이 본 발명의 범주에 속한다. 또한, 하기 기술되는 구체적인 서술에 의하여 본 발명의 범주가 제한된다고 할 수 없다.

[66]

[67] 본 명세서 전반을 통하여, 천연적으로 존재하는 아미노산에 대한 통상의 1문자 및 3문자 코드가 사용될 뿐만 아니라 Aib (2-아미노이소부티르산, 2-aminoisobutyric acid), Sar (N-methylglycine), 알파-메틸-글루탐산 (α-methyl-glutamic acid) 등과 같은 다른 아미노산에 대해 일반적으로 허용되는 3문자 코드가 사용된다. 또한 본 명세서에서 약어로 언급된 아미노산은

IUPAC-IUB 명명법에 따라 기재되었다.

[68]

[69] 알라닌 Ala, A 아르기닌 Arg,R

[70] 아스파라긴 Asn, N 아스파르트산 Asp, D

[71] 시스테인 Cys, C 글루탐산 Glu, E

[72] 글루타민 Gln, Q 글리신 Gly, G

[73] 히스티딘 His, H 이소류신 Ile, I

[74] 류신 Leu, L 리신 Lys, K

[75] 메티오닌 Met, M 페닐알라닌 Phe, F

[76] 프롤린 Pro, P 세린 Ser, S

[77] 트레오닌 Thr, T 트립토판 Trp, W

[78] 티로신 Tyr, Y 발린 Val, V

[79]

[80] 본 발명을 구현하기 위한 하나의 양태는 글루카곤 수용체, GLP-1 (Glucagon-like peptide-1) 수용체, 및 GIP (Glucose-dependent insulinotropic polypeptide) 수용체에 대해 활성을 갖는, 펩타이드를 포함하는, 폐 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물이다.

[81] 하나의 구현예로, 상기 펩타이드는 서열번호 1 내지 102 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하는 것일 수 있다.

[82] 또 하나의 구현예로, 상기 폐 질환의 예방 또는 치료를 위한 약학적 조성물은 약학적으로 허용되는 부형제와 서열번호 1 내지 102 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하는 펩타이드를 약학적 유효량으로 포함하는 약학적 조성물일 수 있다.

[83]

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

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

[86] 특별히 이에 제한되는 것은 아니나, 상기 글루카곤, GLP-1, 및 GIP 수용체에 대해 유의한 수준의 활성을 가지는 삼중 활성체는 글루카곤, GLP-1, 및 GIP 수용체 중 하나 또는 그 이상의 수용체, 구체적으로 둘 또는 그 이상의 수용체, 보다 구체적으로 세 개의 수용체 모두에 대해 *in vitro* 활성이 해당 수용체의 천연형 리간드 (천연형 글루카곤, 천연형 GLP-1, 및 천연형 GIP) 대비 약 0.001%이상, 약 0.01% 이상, 약 0.1% 이상, 약 1% 이상, 약 2% 이상, 약 3 % 이상, 약 4% 이상, 약 5% 이상, 약 6% 이상, 약 7% 이상, 약 8% 이상, 약 9% 이상, 약 10 % 이상, 약 20% 이상, 약 30% 이상, 약 40% 이상, 약 50 % 이상, 약 60% 이상, 약 70% 이상, 약 80% 이상, 약 90% 이상, 약 100% 이상을 나타낼 수 있으나,

유의적으로 증가한 범위는 제한 없이 포함된다.

[87] 여기서, 수용체에 대한 활성은, 천연형 대비 수용체에 대한 *in vitro* 활성이 0.1% 이상, 1% 이상, 2% 이상, 3 % 이상, 4% 이상, 5% 이상, 6% 이상, 7% 이상, 8% 이상, 9% 이상, 10 % 이상, 20% 이상, 30% 이상, 40% 이상, 50 % 이상, 60% 이상, 70% 이상, 80% 이상, 90 % 이상, 100% 이상, 약 200% 이상을 나타내는 경우를 예로 들 수 있다. 그러나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[88] 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.

[89]

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

[91]

[92] 한편, 상기 펩타이드는 하기 i) 내지 iii) 중 하나 이상, 둘 이상, 구체적으로 세 개의 활성을 보유하는 것, 구체적으로 유의한 활성을 보유하는 것을 특징으로 한다:

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

[94] 여기서, 수용체를 활성화시킨다는 것은, 천연형 대비 수용체에 대한 *in vitro* 활성이 약 0.1% 이상, 약 1% 이상, 약 2% 이상, 약 3 % 이상, 약 4% 이상, 약 5% 이상, 약 6% 이상, 약 7% 이상, 약 8% 이상, 약 9% 이상, 약 10 % 이상, 약 20% 이상, 약 30% 이상, 약 40% 이상, 약 50 % 이상, 약 60% 이상, 약 70% 이상, 약 80% 이상, 약 90 % 이상, 약 100% 이상을 나타내는 경우를 예로 들 수 있다. 그러나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[95]

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

[97]

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

[99] 상기 펩타이드는 천연형 글루카곤의 아날로그일 수 있으나, 특별히 이에 제한되는 것은 아니다. 구체적으로, 상기 천연형 글루카곤 아날로그는 천연형 글루카곤과 비교하여 아미노산 서열에 하나 이상의 차이가 있는 펩타이드, 천연형 글루카곤 서열의 개질 (modification)을 통하여 변형시킨 펩타이드, 천연형 글루카곤의 모방체를 포함한다.

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

[101] His-Ser-Gln-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Lys-Tyr-Leu-Asp-Ser-Arg-Arg-Ala-Gln-Asp-Phe-Val-Gln-Trp-Leu-Met-Asn-Thr (서열번호: 118)

[102] 구체적으로, 상기 펩타이드는 천연형 글루카곤 서열에서 적어도 하나 이상의 아미노산에 치환 (substitution), 추가 (addition), 제거 (deletion), 수식 (modification) 및 이들의 조합으로 이루어지는 군에서 선택된 변형이 일어난, 천연형 글루카곤의 아날로그일 수 있으나, 특별히 이에 제한되는 것은 아니다.

[103] 또한, 상기 아미노산의 치환은 아미노산으로의 치환이나 비 천연형 화합물로의 치환을 모두 포함한다.

[104] 또한, 추가는 펩타이드의 N-말단 및/또는 C-말단에 이루어질 수 있다. 한편, 추가되는 아미노산의 길이는 특별히 이에 제한되지 않으며, 1 이상, 2 이상, 3 이상, 4 이상, 5 이상, 6 이상, 7 이상, 8 이상, 9 이상, 10 이상, 11 이상의 아미노산이 추가될 수 있으며, 넓게는 폴리펩타이드의 추가를 포함하나, 특별히 이에 제한되는 것은 아니다.

[105] 보다 구체적으로, 상기 펩타이드는 천연형 글루카곤 아미노산 서열에서 1번, 2번, 3번, 7번, 10번, 12번, 13번, 14번, 15번, 16번, 17번, 18번, 19번, 20번, 21번, 23번, 24번, 27번, 28번 및 29번으로 이루어진 군에서 선택된, 1 이상, 2 이상, 3 이상, 4 이상, 5 이상, 6 이상, 7 이상, 8 이상, 9 이상, 10 이상, 11 이상, 12 이상, 13 이상, 14 이상, 15 이상, 16 이상, 17 이상, 18 이상, 19 이상, 또는 20개의 아미노산이 다른 아미노산이 치환된 것일 수 있으며, 또한 독립적으로 또는 추가적으로 이의 C-말단에 1 이상, 2 이상, 3 이상, 4 이상, 5 이상, 6 이상, 7 이상, 8 이상, 9 이상, 10 이상, 11개 이상의 아미노산이 추가된 것일 수 있으나, 특별히 이에 제한되는 것은 아니다.

[106] 보다 더 구체적으로 상기 펩타이드는 천연형 글루카곤 아미노산 서열에서 1번, 2번, 3번, 10번, 12번, 13번, 14번, 15번, 16번, 17번, 18번, 19번, 20번, 21번, 23번, 24번, 27번, 28번 및 29번으로 이루어진 군에서 선택된, 1 이상, 2 이상, 3 이상, 4 이상, 5 이상, 6 이상, 7 이상, 8 이상, 9 이상, 10 이상, 11 이상, 12 이상, 13 이상, 14 이상, 15 이상, 16 이상, 17 이상, 18 이상, 19개의 아미노산이 다른 아미노산이 치환된 것일 수 있으며, 또한 독립적으로 또는 추가적으로 이의 C-말단에 1 이상, 2 이상, 3 이상, 4 이상, 5 이상, 6 이상, 7 이상, 8 이상, 9 이상, 10 이상, 또는 11개 이상의 아미노산이 추가된 것일 수 있으나, 특별히 이에 제한되는 것은 아니다.

[107] 보다 더 구체적으로 상기 펩타이드는 천연형 글루카곤 아미노산 서열에서 1번, 2번, 3번, 10번, 13번, 14번, 15번, 16번, 17번, 18번, 19번, 20번, 21번, 23번, 24번, 28번 및 29번으로 이루어진 군에서 선택된, 1 이상, 2 이상, 3 이상, 4 이상, 5 이상, 6 이상, 7 이상, 8 이상, 9 이상, 10 이상, 11 이상, 12 이상, 13 이상, 14 이상, 15 이상, 16 이상, 17개의 아미노산이 다른 아미노산이 치환된 것일 수 있으며, 또한 독립적으로 또는 추가적으로 이의 C-말단에 1 이상, 2 이상, 3 이상, 4 이상, 5 이상, 6 이상, 7 이상, 8 이상, 9 이상, 10 이상, 또는 11개 이상의 아미노산이 추가된 것일 수 있으나, 특별히 이에 제한되는 것은 아니다.

[108] 보다 더 구체적으로 상기 펩타이드는 천연형 글루카곤 아미노산 서열에서 1번, 2번, 13번, 16번, 17번, 18번, 19번, 20번, 21번, 23번, 24번, 27번, 28번 및 29번으로 이루어진 군에서 선택된, 1 이상, 2 이상, 3 이상, 4 이상, 5 이상, 6 이상, 7 이상, 8 이상, 9 이상, 10 이상, 11 이상, 12이상, 13이상, 또는 14개의 아미노산이 다른 아미노산이 치환된 것일 수 있으며, 또한 독립적으로 또는 추가적으로 이의 C-말단에 1 이상, 2 이상, 3 이상, 4 이상, 5 이상, 6 이상, 7 이상, 8 이상, 9 이상, 10 이상, 11개 이상의 아미노산이 추가된 것일 수 있으나, 특별히 이에 제한되는 것은 아니다.

[109] 상기 도입되는 아미노산은 티로신, 알파-메틸-글루탐산, Aib, 메티오닌, 글루탐산, 히스티딘, 리신, 류신, 이소류신, 글루타민, 발린, 글리신, 알라닌, 시스테인, 세린, 알라닌, 아스파르트산, 및 아르기닌으로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있으나, 특별히 이에 제한되는 것은 아니다.

[110] 예컨대, 상기 추가되는 아미노산 서열은 천연형 GLP-1, 천연형 GIP, 또는 천연형 엑센딘-4 아미노산 서열에서 유래되는 1개 이상의 아미노산 서열일 수 있다.

[111] 이러한 펩타이드는 분자 내 가교 (intramolecular bridge)를 포함할 수 있으며 (예컨대, 공유결합적 가교 또는 비공유결합적 가교), 구체적으로 고리를 포함하는 형태일 수 있으며, 예컨대 펩타이드의 16번 및 20번 아미노산 사이에 고리가 형성된 형태일 수 있으나, 특별히 이에 제한되는 것은 아니다.

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

[113] 또한, 상기 펩타이드는 고리를 포함하도록, 목적하는 위치에 고리를 형성할 수 있는 아미노산을 포함하도록 변형된 것을 모두 포함한다.

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

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

[116] 이러한 방법들의 조합으로 제조되는 펩타이드의 예로, 천연형 글루카곤과 아미노산 서열이 하나 이상 다르고, N-말단의 아미노산 잔기의 알파-탄소가 제거된, 글루카곤 수용체, GLP-1 수용체, 및 GIP 수용체에 대해 활성을 보유한 펩타이드 등이 있으나, 이에 제한되지 않으며, 아날로그 제조를 위한 여러 방법들의 조합으로 본 발명에 적용되는 펩타이드를 제조할 수 있다.

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

[118] 구체적으로, 상기 펩타이드의 아미노산 서열 중 두 번째 아미노산 서열의 치환을 통해 분해효소의 인식 작용을 회피하여 체내 반감기를 증가시킨 펩타이드일 수 있으나, 체내 분해 효소의 인식 작용을 회피하기 위한 아미노산

치환 또는 변경은 제한 없이 포함된다.

[119] 또한, 펩타이드 제조를 위한 이러한 변형은 L-형 혹은 D-형 아미노산, 및/또는 비-천연형 아미노산을 이용한 변형; 및/또는 천연형 서열을 개질, 예를 들어 측쇄 작용기의 변형, 분자 내 공유결합, 예컨대, 측쇄 간 고리 형성, 메틸화, 아실화, 유비퀴틴화, 인산화, 아미노헥산화, 바이오틴화 등과 같이 개질함으로써 변형하는 것을 모두 포함한다.

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

[121] 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.

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

[123] 또한, 본 발명에 따른 펩타이드는 생체 내의 단백질 절단 효소들로부터 보호하고 안정성을 증가시키기 위하여 이의 N-말단 및/또는 C-말단 등이 화학적으로 수식되거나 유기단으로 보호되거나, 또는 펩타이드 말단 등에 아미노산이 추가되어 변형된 형태일 수 있다.

[124] 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.

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

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

[127] 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.

[128] 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.

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

[130]

[131] 하나의 구체예로서, 상기 펩타이드는 하기 일반식 1로 표시된 아미노산 서열을 포함할 수 있다.

[132] Xaa1-Xaa2-Xaa3-Gly-Thr-Phe-Xaa7-Ser-Asp-Xaa10-Ser-Xaa12-Xaa13-Xaa14-Xaa15-Xaa16-Xaa17-Xaa18-Xaa19-Xaa20-Xaa21-Phe-Xaa23-Xaa24-Trp-Leu-Xaa27-Xaa28-Xaa29-Xaa30-R1 (일반식 1, 서열번호 103)

[133] 상기 일반식 1에서,

[134] Xaa1은 히스티딘, 4-이미다조아세틸, 또는 티로신이고,

[135] Xaa2는 글리신, 알파-메틸-글루탐산, 또는 Aib이며,

[136] Xaa3은 글루탐산 또는 글루타민이고,

[137] Xaa7은 트레오닌 또는 이소류신이며,

[138] Xaa10은 류신, 티로신, 리신, 시스테인, 또는 발린이고,

[139] Xaa12는 리신, 세린, 또는 이소류신이며,

[140] Xaa13은 글루타민, 티로신, 알라닌, 또는 시스테인이고,

[141] Xaa14는 류신, 메티오닌, 또는 티로신이며,

[142] Xaa15는 시스테인, 아스파르트산, 글루탐산, 또는 류신이며,

[143] Xaa16은 글리신, 글루탐산, 또는 세린이고,

[144] Xaa17은 글루타민, 아르기닌, 이소류신, 글루탐산, 시스테인, 또는 리신이며,

[145] Xaa18은 알라닌, 글루타민, 아르기닌, 또는 히스티딘이고,

[146] Xaa19는 알라닌, 글루타민, 시스테인, 또는 발린이며,

[147] Xaa20은 리신, 글루타민, 또는 아르기닌이고,

[148] Xaa21은 글루탐산, 글루타민, 류신, 시스테인, 또는 아스파르트산이며,

[149] Xaa23은 이소류신 또는 발린이고,

[150] Xaa24는 알라닌, 글루타민, 시스테인, 아스파라긴, 아스파르트산, 또는 글루탐산이며,

[151] Xaa27은 발린, 류신, 또는 리신이고,

[152] Xaa28은 시스테인, 리신, 알라닌, 아스파라긴, 또는 아스파르트산이며,

[153] Xaa29는 시스테인, 글리신, 글루타민, 트레오닌, 글루탐산, 또는 히스티딘이고,

[154] Xaa30은 시스테인, 글리신, 리신, 또는 히스티딘이거나, 부존재하며,

[155] R1은 시스테인, GKKNDWKHNIT (서열번호 106), m-SSGAPPPS-n (서열번호 107), 또는 m-SSGQPPPS-n (서열번호 108)이거나, 부존재하며,

[156] 여기서,

[157] m은 -Cys-, -Pro-, 또는 -Gly-Pro-이고,

[158] n은 -Cys-, -Gly-, -Ser-, 또는 -His-Gly-이거나, 부존재함.

[159] 상기 삼중 활성체의 예로, 서열번호: 1 내지 102로 이루어진 군에서 선택된 아미노산 서열을 포함하는 것, 서열번호: 1 내지 11, 13 내지 102로 이루어진

군에서 선택된 아미노산 서열을 포함하는 것, 서열번호: 1 내지 11, 13 내지 102로 이루어진 군에서 선택된 아미노산 서열로 (필수적으로) 구성된 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[160] 또 하나의 구체예로, 상기 삼중 활성체는 서열번호 21, 22, 42, 43, 50, 64, 66, 67, 70, 71, 76, 77, 96, 97 및 100으로 이루어진 군에서 선택된 아미노산 서열로 (필수적으로) 구성된 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[161] 또 하나의 구체예로, 상기 삼중 활성체는 서열번호 21, 22, 42, 43, 50, 66, 67, 77, 96, 97 및 100으로 이루어진 군에서 선택된 아미노산 서열로 (필수적으로) 구성된 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[162] 또 하나의 구체예로, 상기 삼중 활성체는 서열번호 21, 22, 42, 43, 50, 77 및 96으로 이루어진 군에서 선택된 아미노산 서열로 (필수적으로) 구성된 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[163] 또한, 본원에서 특정 서열번호로 '구성되는' 펩타이드라고 기재되어 있다 하더라도, 해당 서열번호의 아미노산 서열로 이루어진 펩타이드와 동일 혹은 상응하는 활성을 가지는 경우라면 해당 서열번호의 아미노산 서열 앞뒤의 무의미한 서열 추가 또는 자연적으로 발생할 수 있는 돌연변이, 혹은 이의 잠재성 돌연변이 (silent mutation)를 제외하는 것이 아니며, 이러한 서열 추가 혹은 돌연변이를 가지는 경우에도 본원의 범위 내에 속하는 것이 자명하다.

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

[165] 구체적으로, 상기 일반식 1에서 Xaa14는 류신 또는 메티오닌이며, Xaa15는 시스테인, 아스파르트산, 또는 류신일 수 있다.

[166] 이러한 펩타이드의 예로, 서열번호: 1 내지 11, 14 내지 17, 및 21 내지 102로 이루어진 군에서 선택된 아미노산 서열을 포함하거나, 이로 (필수적으로) 구성된 펩타이드를 들 수 있으나, 특별히 이에 제한되는 것은 아니다.

[167] 이러한 펩타이드는 글루카곤 수용체, GLP-1 수용체, 및 GIP 수용체 중 하나 이상을 유의하게 활성화시킬 수 있으나, 특별히 이에 제한되는 것은 아니다. 구체적으로, GLP-1을 유의하게 활성화시키거나, 추가로 글루카곤 수용체 및/또는 GIP 수용체를 유의하게 활성화시키는 것일 수 있으나, 특별히 이에 제한되지 않는다.

[168] 보다 더 구체적으로,

[169] 상기 일반식 1에서,

[170] Xaa2는 글리신, 알파-메틸-글루탐산, 또는 Aib이고,

[171] Xaa7은 트레오닌이며,

[172] Xaa10은 티로신, 시스테인, 또는 발린이고,

[173] Xaa12는 리신 또는 이소류신이며,

[174] Xaa13은 티로신, 알라닌, 글루타민, 또는 시스테인이고,

[175] Xaa14는 류신, 시스테인, 또는 메티오닌이며,

[176] Xaa15는 시스테인, 류신, 글루탐산, 또는 아스파르트산이고,

[177] Xaa17은 글루타민, 아르기닌, 이소류신, 시스테인, 글루탐산, 또는 리신이며,

[178] Xaa18은 알라닌, 글루타민, 아르기닌, 또는 히스티딘이고,

[179] Xaa19는 알라닌, 글루타민, 발린, 또는 시스테인이며,

[180] Xaa20은 리신, 아르기닌, 또는 글루타민이고,

[181] Xaa21은 글루탐산, 글루타민, 류신, 시스테인, 또는 아스파르트산이며,

[182] Xaa23은 이소류신 또는 발린이고,

[183] Xaa24는 시스테인, 알라닌, 글루타민, 아스파라긴, 글루탐산, 또는 아스파르트산이며,

[184] Xaa27은 류신 또는 리신인, 펩타이드일 수 있으나, 특별히 이에 제한되는 것은 아니다.

[185] 보다 더 구체적으로,

[186] 상기 일반식 1에서,

[187] Xaa2는 글리신, 알파-메틸-글루탐산, 또는 Aib이고,

[188] Xaa7은 트레오닌이며,

[189] Xaa10은 티로신, 시스테인, 또는 발린이고,

[190] Xaa12는 리신 또는 이소류신이며,

[191] Xaa13은 티로신, 알라닌, 또는 시스테인이고,

[192] Xaa14는 류신 또는 메티오닌이며,

[193] Xaa15는 시스테인 또는 아스파르트산이고,

[194] Xaa17은 글루타민, 아르기닌, 이소류신, 시스테인, 또는 리신이며,

[195] Xaa18은 알라닌, 아르기닌, 또는 히스티딘이고,

[196] Xaa19는 알라닌, 글루타민, 또는 시스테인이며,

[197] Xaa20은 리신 또는 글루타민이고,

[198] Xaa21은 글루탐산, 시스테인, 또는 아스파르트산이며,

[199] Xaa23은 발린이고,

[200] Xaa24는 알라닌, 글루타민, 시스테인, 아스파라긴, 또는 아스파르트산이며,

[201] Xaa27은 류신 또는 리신일 수 있으나, 특별히 이에 제한되지는 않는다.

[202] 보다 더 구체적으로,

[203] 상기 일반식 1에서,

[204] Xaa2는 알파-메틸-글루탐산 또는 Aib이고,

[205] Xaa7은 트레오닌이며,

[206] Xaa10은 티로신 또는 시스테인이고,

[207] Xaa12는 리신 또는 이소류신이며,

[208] Xaa13은 티로신, 알라닌, 또는 시스테인이고,

[209] Xaa14는 류신 또는 메티오닌이며,

[210] Xaa15는 시스테인 또는 아스파르트산이고,

[211] Xaa16은 글루탐산이며,

[212] Xaa17은 아르기닌, 이소류신, 시스테인, 또는 리신이고,

[213] Xaa18은 알라닌, 아르기닌, 또는 히스티딘이며,

[214] Xaa19는 알라닌, 글루타민, 또는 시스테인이고,

[215] Xaa20은 리신 또는 글루타민이며,

[216] Xaa21은 글루탐산 또는 아스파르트산이고,

[217] Xaa23은 발린이며,

[218] Xaa24는 글루타민, 아스파라긴, 또는 아스파르트산이고,

[219] Xaa27은 류신이며,

[220] Xaa28은 시스테인, 알라닌, 아스파라긴, 또는 아스파르트산일 수 있다.

[221] 구체적으로,

[222] 상기 일반식 1에서,

[223] Xaa1은 히스티딘 또는 4-이미다조아세틸이고,

[224] Xaa2는 알파-메틸-글루탐산 또는 Aib이며,

[225] Xaa3은 글루타민이고,

[226] Xaa7은 트레오닌이며,

[227] Xaa10은 티로신이고,

[228] Xaa12는 이소류신이며,

[229] Xaa13은 알라닌 또는 시스테인이고,

[230] Xaa14는 메티오닌이며,

[231] Xaa15는 아스파르트산이고,

[232] Xaa16은 글루탐산이며,

[233] Xaa17은 이소류신 또는 리신이고,

[234] Xaa18은 알라닌 또는 히스티딘이며,

[235] Xaa19는 글루타민 또는 시스테인이고,

[236] Xaa20은 리신이며,

[237] Xaa21은 아스파르트산이고,

[238] Xaa23은 발린이며,

[239] Xaa24는 아스파라긴이고,

[240] Xaa27은 류신이며,

[241] Xaa28은 알라닌 또는 아스파라긴이고,

[242] Xaa29는 글루타민 또는 트레오닌이며,

[243] Xaa30은 시스테인 또는 리신이거나, 부존재할 수 있다.

[244] 보다 구체적으로,

[245] 상기 일반식 1에서,

[246] Xaa2는 글리신, 알파-메틸-글루탐산, 또는 Aib이며,

[247] Xaa3은 글루타민이고,

[248] Xaa7은 트레오닌이며,

[249] Xaa10은 티로신, 시스테인, 또는 발린이고,

[250] Xaa12는 리신이며,

[251] Xaa13은 티로신이고,

[252] Xaa14는 류신이며,

[253] Xaa15는 아스파르트산이며,

[254] Xaa16은 글리신, 글루탐산, 또는 세린이고,

[255] Xaa17은 글루타민, 아르기닌, 시스테인, 또는 리신이며,

[256] Xaa18은 알라닌, 아르기닌, 또는 히스티딘이고,

[257] Xaa19는 알라닌 또는 글루타민이며,

[258] Xaa20은 리신 또는 글루타민이고,

[259] Xaa21은 글루탐산, 시스테인, 또는 아스파르트산이며,

[260] Xaa23은 발린이고,

[261] Xaa24는 알라닌, 글루타민, 또는 시스테인이며,

[262] Xaa27은 류신 또는 리신이고,

[263] Xaa29는 글리신, 글루타민, 트레오닌, 또는 히스티딘일 수 있으나, 특별히 이에 제한되는 것은 아니다.

[264] 이러한 펩타이드는 GLP-1 수용체 및 글루카곤 수용체의 활성화 정도가 유의하고, GIP 수용체의 활성화 정도에 비해 높거나; GLP-1 수용체, 글루카곤 수용체 및 GIP 수용체의 활성화 정도가 모두 유의하거나; GLP-1 수용체 및 GIP 수용체의 활성화 정도가 유의하고, 글루카곤 수용체의 활성화에 비해 높은 경우에 해당할 수 있으나, 특별히 이에 제한되지 않는다.

[265] 이러한 펩타이드의 예로, 서열번호: 8, 9, 21 내지 37, 39, 42, 43, 49 내지 61, 64 내지 83, 85, 86, 88, 89, 91 내지 93, 95 내지 102로 이루어진 군에서 선택된 아미노산 서열을 포함하거나, 이로 (필수적으로) 구성된 펩타이드를 들 수 있으나, 특별히 이에 제한되는 것은 아니다.

[266] 구체적인 양태로서, 상기 펩타이드는 하기 일반식 2로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 것일 수 있다.

[267] Xaa1-Xaa2-Gln-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Xaa10-Ser-Lys-Xaa13-Xaa14-Xaa15-Xaa16-Xaa17-Xaa18-Xaa19-Xaa20-Xaa21-Phe-Xaa23-Xaa24-Trp-Leu-Leu-Xaa28-Xaa29-Xaa30-Xaa31- Ser-Ser-Gly-Gln-Pro-Pro-Pro-Ser-Xaa40 (일반식 2, 서열번호 104)

[268] 상기 식에서,

[269] Xaa1은 4-이미다조아세틸, 히스티딘, 또는 티로신이고;

[270] Xaa2는 글리신, 알파-메틸-글루탐산, 또는 Aib이며;

[271] Xaa10은 티로신, 또는 시스테인이며

[272] Xaa13은 알라닌, 글루타민, 티로신, 또는 시스테인이며;

[273] Xaa14는 류신, 메티오닌, 또는 티로신이고;

[274] Xaa15는 아스파르트산, 글루탐산, 또는 류신이며;

[275] Xaa16은 글리신, 글루탐산, 또는 세린이고;

[276] Xaa17은 글루타민, 아르기닌, 이소류신, 글루탐산, 시스테인, 또는 리신이며;

[277] Xaa18은 알라닌, 글루타민, 아르기닌, 또는 히스티딘이고;

[278] Xaa19는 알라닌, 글루타민, 시스테인, 또는 발린이며;

[279] Xaa20은 리신, 글루타민, 또는 아르기닌이고;

[280] Xaa21은 시스테인, 글루탐산, 글루타민, 류신, 또는 아스파르트산이며;

[281] Xaa23은 이소류신 또는 발린이고;

[282] Xaa24는 시스테인, 알라닌, 글루타민, 아스파라긴, 또는 글루탐산이며;

[283] Xaa28은 리신, 시스테인, 아스파라긴, 또는 아스파르트산이며;

[284] Xaa29는 글리신, 글루타민, 시스테인, 또는 히스티딘이고;

[285] Xaa30은 시스테인, 글리신, 리신, 또는 히스티딘이며;

[286] Xaa31은 프롤린 또는 시스테인이며;

[287] Xaa40은 시스테인이거나, 부존재함.

[288] 보다 구체적으로, 상기 일반식 2에서,

[289] Xaa13은 알라닌, 티로신, 또는 시스테인이며;

[290] Xaa15는 아스파르트산 또는 글루탐산이고,

[291] Xaa17은 글루타민, 아르기닌, 시스테인, 또는 리신이며;

[292] Xaa18은 알라닌, 아르기닌, 또는 히스티딘이고;

[293] Xaa21은 시스테인, 글루탐산, 글루타민, 또는 아스파르트산이며;

[294] Xaa23은 이소류신 또는 발린이고;

[295] Xaa24는 시스테인, 글루타민, 또는 아스파라긴이고,

[296] Xaa28은 시스테인, 아스파라긴, 또는 아스파르트산이며;

[297] Xaa29는 글루타민, 시스테인, 또는 히스티딘이고;

[298] Xaa30은 시스테인, 리신, 또는 히스티딘일 수 있다.

[299]

[300] 이러한 펩타이드의 예로, 서열번호: 21, 22, 42, 43, 50, 64 내지 77, 및 95 내지 102로 이루어진 군에서 선택된 아미노산 서열, 보다 구체적으로 서열번호: 21, 22, 42, 43, 50, 64 내지 77, 및 96 내지 102로 이루어진 군에서 선택된 아미노산 서열을 포함하거나, 이로 (필수적으로) 구성된 펩타이드를 들 수 있으나, 특별히 이에 제한되는 것은 아니다.

[301] 구체적인 양태로서, 상기 펩타이드는 하기 일반식 3의 아미노산 서열을 포함할 수 있다.

[302] Xaa1-Xaa2-Gln-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Lys-Xaa13-Leu-Asp-Glu-Xaa17-Xaa18-Xaa19-Lys-Xaa21-Phe-Val-Xaa24-Trp-Leu-Leu-Xaa28-Xaa29-Xaa30-Xaa31-Ser-Ser-Gly-Gln-Pro-Pro-Pro-Ser-Xaa40 (일반식 3, 서열번호 105),

[303] 상기 일반식 3에서,

[304] Xaa1은 히스티딘 또는 티로신이고;

[305] Xaa2는 알파-메틸-글루탐산 또는 Aib이며;

[306] Xaa13은 알라닌, 티로신 또는 시스테인이고;

[307] Xaa17은 아르기닌, 시스테인, 또는 리신이며;

[308] Xaa18은 알라닌 또는 아르기닌이고;

[309] Xaa19는 알라닌 또는 시스테인이며;

[310] Xaa21은 글루탐산 또는 아스파르트산이고;

[311] Xaa24는 글루타민 또는 아스파라긴이며,

[312] Xaa28은 시스테인 또는 아스파르트산이며;

[313] Xaa29는 시스테인, 히스티딘, 또는 글루타민이고;

[314] Xaa30은 시스테인 또는 히스티딘이며;

[315] Xaa31은 프롤린 또는 시스테인이며;

[316] Xaa40은 시스테인 또는 부존재할 수 있다.

[317] 이러한 펩타이드의 예로, 서열번호: 21, 22, 42, 43, 50, 64 내지 71, 75 내지 77, 및 96 내지 102로 이루어진 군에서 선택된 아미노산 서열을 포함하거나, 이로 (필수적으로) 구성된 펩타이드를 들 수 있으나, 특별히 이에 제한되는 것은 아니다.

[318] 또한, 상기 일반식 1에서 R1은 시스테인, GKKNDWKHNIT(서열번호 106), CSSGQPPPS (서열번호 109), GPSSGAPPPS (서열번호 110), GPSSGAPPPSC (서열번호 111), PSSGAPPPS (서열번호 112), PSSGAPPPSG (서열번호 113), PSSGAPPPSHG (서열번호 114), PSSGAPPPSS (서열번호 115), PSSGQPPPS (서열번호 116), 또는 PSSGQPPPSC (서열번호 117)이거나, 부존재할 수 있으나, 특별히 이에 제한되는 것은 아니다.

[319] 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.

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

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

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

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

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

[325]

[326] 또한, 상기 글루카곤 수용체, GLP-1 수용체, 및 GIP 수용체에 대해 활성을 갖는 펩타이드는, 글루카곤 수용체, GLP-1 수용체, 및 GIP 수용체에 대해 활성을 갖는 펩타이드에 이의 생체 내 반감기를 증가시키기 위한 생체적합성 물질이 결합된,

지속형 결합체 형태일 수 있다. 본 명세서에서 상기 생체적합성 물질은 캐리어와 혼용될 수 있다.

[327] 본 발명에서 상기 펩타이드의 결합체는 캐리어가 결합되지 않은 상기 펩타이드에 비하여 증가된 효력의 지속성을 나타낼 수 있으며, 본 발명에서는 이러한 결합체를 "지속형 결합체"로 지칭한다.

[328] 한편, 이러한 결합체는 비자연적인 (non-naturally occurring) 것일 수 있다.

[329]

[330] 본 발명의 하나의 구체예에서, 상기 지속형 결합체는 하기 화학식 1로 표시되는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다:

[331] [화학식 1]

[332] X - L - F

[333] 단 이 때 X는 서열번호 1 내지 102 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하는 펩타이드이고;

[334] L은 에틸렌글리콜 반복 단위를 함유하는 링커 이며,

[335] F는 면역글로불린 Fc 단편 또는 그 유도체 이고,

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

[337]

[338] 상기 결합체에서 F는 X, 즉 글루카곤 수용체, GLP-1 수용체, 및 GIP 수용체에 대해 활성을 갖는 펩타이드, 구체적으로 서열번호 1 내지 102의 아미노산 서열 중 어느 하나의 서열을 포함하는 펩타이드의 반감기를 증가시킬 수 있는 물질로서, 본 발명의 상기 결합체를 구성하는 모이어티의 일 구성에 해당한다.

[339] 상기 F는 X와 공유 화학결합 또는 비공유 화학결합으로 서로 결합되는 것일 수 있으며, 공유 화학결합, 비공유 화학결합 또는 이들의 조합으로 L을 통하여 F와 X가 서로 결합되는 것일 수 있다.

[340] 구체적으로, 상기 L은 비펩타이드성 링커, 예를 들어 에틸렌글리콜 반복 단위를 함유하는 링커일 수 있다.

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

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

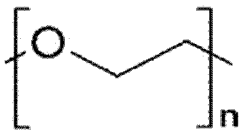
[343] 특별히 이에 제한되지 않으나, 상기 비펩타이드성 링커는 에틸렌글리콜 반복 단위를 함유하는 링커, 예를 들어, 폴리에틸렌 글리콜일 수 있고, 또한, 당해 분야에 이미 알려진 이들의 유도체 및 당해 분야의 기술 수준에서 용이하게 제조할 수 있는 유도체들도 본 발명의 범위에 포함된다.

[344] 상기 비펩타이드성 링커의 반복 단위는 에틸렌글리콜 반복 단위일 수 있고,

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

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

[346] [화학식 2]

[347] 

[348]

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

[350] 상기 지속형 결합체에서 PEG 모이어티는, $-(CH_2CH_2O)_n-$구조 뿐만 아니라 연결 요소와 이 $-(CH_2CH_2O)_n-$ 사이에 개재하는 산소 원자도 포함할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[351] 또한, 하나의 구체적인 실시 형태에서 상기 결합체는 일반식 1의 아미노산 서열을 포함하는 펩타이드(X)와 면역글로불린 Fc 영역(F)이 에틸렌글리콜 반복 단위를 함유하는 링커를 통해 공유 결합으로 연결된 구조 일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

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

[353] 본 발명에서 사용될 수 있는 비펩타이드성 링커는 생체 내 단백질 분해 효소에 저항성 있는 에틸렌글리콜 반복단위를 포함하는 중합체이면 제한 없이 사용될 수 있다. 상기 비펩타이드성 중합체의 분자량은 0 초과 약 100 kDa 범위, 약 1 내지 약 100 kDa 범위, 구체적으로 약 1 내지 약 20 kDa 범위, 또는 약 1 내지 약 10 kDa 범위이나, 이에 제한되지 않는다. 또한, 상기 F에 해당하는 폴리펩타이드와 결합되는 본 발명의 비펩타이드성 링커는 한 종류의 중합체뿐만 아니라 상이한 종류의 중합체들의 조합이 사용될 수도 있다.

[354] 하나의 구체적인 실시 형태에서 상기 비펩타이드성 링커의 양 말단은 각각 F, 예컨대 면역글로불린 Fc 영역의 아민기 또는 티올기 및 X의 아민기 또는 티올기에 결합할 수 있다.

[355] 구체적으로, 상기 비펩타이드성 중합체는 양쪽 말단에 각각 F (예컨대, 면역글로불린 Fc 영역) 및 X와 결합될 수 있는 반응기, 구체적으로는 X, 혹은 F

(예컨대, 면역글로불린 Fc 영역)의 N-말단 또는 리신에 위치한 아민기, 또는 시스테인의 티올기와 결합될 수 있는 반응기를 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[356] 또한, F, 예컨대 면역글로불린 Fc 영역 및 X와 결합될 수 있는, 상기 비펩타이드성 중합체의 반응기는 알데히드기, 말레이미드기 및 석시니미드 유도체로 구성된 군으로부터 선택될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

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

[358] 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.

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

[360] 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.

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

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

[363] 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.

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

[365]

[366] 예컨대, 상기 X에 해당하는 펩타이드에서 10번 시스테인 잔기, 13번 시스테인 잔기, 15번 시스테인 잔기, 17번 시스테인 잔기, 19번 시스테인 잔기, 21번

시스테인 잔기, 24번 시스테인 잔기, 28번 시스테인 잔기, 29번 시스테인 잔기, 30번 시스테인 잔기, 31번 시스테인 잔기, 40번 시스테인 잔기, 또는 41번 시스테인 잔기에 상기 비펩타이드성 중합체가 연결된 것일 수 있으나, 특별히 이에 제한되지 않는다.

[367] 구체적으로, 상기 시스테인 잔기의 -SH 기에 비펩타이드성 중합체의 반응기가 연결될 수 있으며, 반응기에 대해서는 앞서 기술한 내용이 모두 적용된다. 만약, 말레이미드-PEG-알데히드를 사용하는 경우, 말레이미드 기는 X의 -SH 기와 티오에테르(thioether) 결합으로 연결하고, 알데히드기는 F, 구체적으로 면역글로불린 Fc의 -NH_2기와 환원적 아민화 반응을 통해 연결할 수 있으나, 이에 제한되지 않으며, 이는 하나의 일례에 해당한다.

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

[369]

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

[371] 본 발명에서, "면역글로불린 Fc 영역"은, 면역글로불린의 중쇄와 경쇄 가변영역을 제외한, 중쇄 불변영역 2(CH2) 및/또는 중쇄 불변영역 3(CH3)부분을 포함하는 부위를 의미한다. 상기 면역글로불린 Fc 영역은 본 발명의 결합체의 모이어티를 이루는 일 구성일 수 있다. 상기 면역글로불린 Fc 영역은 "면역글로불린 Fc 단편"과 혼용되어 사용될 수 있다.

[372] 본 명세서에서 Fc 영역이라고 하면 면역글로불린의 파파인 소화에서 얻는 천연형 서열뿐 아니라 그 유도체, 예컨대 천연 서열 중의 하나 이상의 아미노산 잔기가 결실, 삽입, 비보전적 또는 보전적 치환 또는 이들의 조합에 의하여 변환되어 천연형과 상이하게 된 서열까지 망라하여 포함된다.

[373] 상기 F는, 2개의 폴리펩타이드 사슬이 이황화결합으로 연결되어 있는 구조이며, 상기 두 사슬 중 한 사슬의 질소 원자를 통해서만 연결되어 있는 구조일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 상기 질소 원자를 통한 연결은 리신의 입실론 아미노 원자나 N-말단 아미노기에 환원적 아민화를 통하여 연결될 수 있다.

[374] 환원적 아민화 반응이란 반응물의 아민기 또는 아미노기가 다른 반응물의 알데히드 (즉, 환원적 아민화가 가능한 작용기)와 반응하여 아민을 생성한 다음, 환원 반응에 의해 아민 결합을 형성시키는 반응을 의미하여, 당해 기술 분야에 널리 알려져 있는 유기합성 반응이다.

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

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

[377]

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

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

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

[381] 본 발명에서, 상기 힌지 서열은 하기의 아미노산 서열을 갖는 힌지 서열 중 일부가 결실되어 하나의 시스테인 잔기만을 갖도록 변이된 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다:

[382] Glu-Ser-Lys-Tyr-Gly-Pro-Pro-Cys-Pro-Ser-Cys-Pro(서열번호 119).

[383] 상기 힌지 서열은 서열번호 119의 힌지 서열 중 8번째 또는 11번째 시스테인 잔기가 결실되어 하나의 시스테인 잔기만을 포함하는 것일 수 있다. 본 발명의 힌지 서열은 하나의 시스테인 잔기만을 포함하는, 3 내지 12개의 아미노산으로 구성된 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 보다 구체적으로, 본 발명의 힌지 서열은 다음과 같은 서열을 가질 수 있다:
Glu-Ser-Lys-Tyr-Gly-Pro-Pro-Pro-Ser-Cys-Pro(서열번호 120),
Glu-Ser-Lys-Tyr-Gly-Pro-Pro-Cys-Pro-Ser-Pro(서열번호 121),
Glu-Ser-Lys-Tyr-Gly-Pro-Pro-Cys-Pro-Ser(서열번호 122),
Glu-Ser-Lys-Tyr-Gly-Pro-Pro-Cys-Pro-Pro(서열번호 123),
Lys-Tyr-Gly-Pro-Pro-Cys-Pro-Ser(서열번호 124),
Glu-Ser-Lys-Tyr-Gly-Pro-Pro-Cys(서열번호 125),
Glu-Lys-Tyr-Gly-Pro-Pro-Cys(서열번호 126), Glu-Ser-Pro-Ser-Cys-Pro(서열번호 127), Glu-Pro-Ser-Cys-Pro(서열번호 128), Pro-Ser-Cys-Pro(서열번호 129),
Glu-Ser-Lys-Tyr-Gly-Pro-Pro-Ser-Cys-Pro(서열번호 130),
Lys-Tyr-Gly-Pro-Pro-Pro-Ser-Cys-Pro(서열번호 131),
Glu-Ser-Lys-Tyr-Gly-Pro-Ser-Cys-Pro(서열번호 132),
Glu-Ser-Lys-Tyr-Gly-Pro-Pro-Cys(서열번호 133),
Lys-Tyr-Gly-Pro-Pro-Cys-Pro(서열번호 134),
Glu-Ser-Lys-Pro-Ser-Cys-Pro(서열번호 135), Glu-Ser-Pro-Ser-Cys-Pro(서열번호 136), Glu-Pro-Ser-Cys(서열번호 137), Ser-Cys-Pro(서열번호 138).

[384] 더욱 구체적으로는 상기 힌지 서열은 서열번호 129(Pro-Ser-Cys-Pro)또는 서열번호 138(Ser-Cys-Pro)의 아미노산 서열을 포함하는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[385] 본 발명의 면역글로불린 Fc 영역은 힌지 서열의 존재로 면역글로불린 Fc 사슬 두 분자가 이량체를 형성한 형태일 수 있고, 또한, 본 발명의 화학식 1의 결합체는 링커의 일 말단이 이량체의 면역글로불린 Fc 영역의 한 사슬에 연결된 형태일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[386] 본 발명의 용어, "N-말단"은 단백질 또는 폴리펩티드의 아미노 말단을 의미하는 것으로, 아미노 말단의 최말단, 또는 최말단으로부터 1개, 2개, 3개, 4개, 5개, 6개, 7개, 8개, 9개, 또는 10개 이상의 아미노산까지 포함하는 것일 수 있다. 본 발명의 면역글로불린 Fc 영역은 힌지 서열을 N-말단에 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[387]

[388] 또한 본 발명의 면역글로불린 Fc 영역은 천연형과 실질적으로 동등하거나 향상된 효과를 갖는 한, 면역 글로불린의 중쇄와 경쇄 가변영역만을 제외하고, 일부 또는 전체 중쇄 불변영역 1(CH1) 및/또는 경쇄불변영역 1(CL1)을 포함하는 확장된 Fc 영역일 수 있다. 또한, CH2 및/또는 CH3에 해당하는 상당히 긴 일부 아미노산 서열이 제거된 영역일 수도 있다.

[389] 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.

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

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

[392] 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.

[393] 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.

[394] 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.

[395] 분자의 활성을 전체적으로 변경시키지 않는 단백질 및 펩타이드에서의 아미노산 교환은 당해 분야에 공지되어 있다 (H.Neurath, R.L.Hill, The Proteins, Academic Press, New York, 1979). 가장 통상적으로 일어나는 교환은 아미노산 잔기 Ala/Ser, Val/Ile, Asp/Glu, Thr/Ser, Ala/Gly, Ala/Thr, Ser/Asn, Ala/Val, Ser/Gly, Thy/Phe, Ala/Pro, Lys/Arg, Asp/Asn, Leu/Ile, Leu/Val, Ala/Glu, Asp/Gly 간의 교환이다. 경우에 따라서는 인산화(phosphorylation), 황화(sulfation), 아크릴화(acrylation), 당화(glycosylation), 메틸화(methylation), 파네실화(farnesylation), 아세틸화(acetylation) 및 아미드화(amidation) 등으로 수식(modification)될 수도 있다.

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

[397] 또한, 이러한 Fc 영역은 인간, 소, 염소, 돼지, 마우스, 래빗, 햄스터, 랫트 또는 기니아 픽 등의 동물의 생체 내에서 분리한 천연형으로부터 얻어질 수도 있고, 형질전환된 동물세포 또는 미생물로부터 얻어진 재조합형 또는 이의 유도체일 수 있다. 여기서, 천연형으로부터 획득하는 방법은 전체 면역글로불린을 인간 또는 동물의 생체로부터 분리한 후, 단백질 분해효소를 처리하여 획득하는 방법일 수 있다. 파파인을 처리할 경우에는 Fab 및 Fc로 절단되고, 펩신을 처리할 경우에는 pF'c 및 $F(ab)_2$로 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.

[398] 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.

[399] 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.

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

[401] 또한, 면역글로불린 Fc 영역은 IgG, IgA, IgD, IgE, IgM 유래 또는 이들의 조합(combination) 또는 이들의 혼성(hybrid)에 의한 Fc 영역일 수 있다. 더 구체적인 실시 형태에서는 인간 혈액에 가장 풍부한 IgG 또는 IgM유래이며, 보다 더 구체적인 실시 형태에서는 리간드 결합 단백질의 반감기를 향상시키는 것으로 공지된 IgG 유래이다. 더욱 더 구체적인 실시 형태에서 상기 면역글로불린 Fc 영역은 IgG4 Fc 영역이며, 가장 구체적인 실시 형태에서 상기 면역글로불린 Fc 영역은 인간 IgG4 유래의 비-당쇄화된 Fc 영역이나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[402] 또한, 하나의 구체적인 실시 형태에서, 면역글로불린 Fc 절편은 인간 IgG4 Fc의 단편으로서, 각 단량체(monomer)의 3번 아미노산인 시스테인 사이의 이황화 결합(inter-chain 형태)을 통해 2개의 단량체가 연결된 동종이합체(homodimer) 형태일 수 있으며, 이 때 동종이합체의 각 단량체는 독립적으로 35번 및 95번의 시스테인 간의 내부의 이황화 결합 및 141번 및 199번의 시스테인 간의 내부의 이황화 결합, 즉 2개의 내부의 이황화 결합(intra-chain 형태)을 가지거나/가질 수 있다. 각 단량체의 아미노산 수는 221개의 아미노산으로 구성될 수 있으며, 동종이합체를 형성하는 아미노산은 전체 442개의 아미노산으로 이루어질 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 구체적으로 면역글로불린 Fc 절편은 서열번호 139의 아미노산 서열 (221개의 아미노산으로 구성됨)을 갖는 단량체 2개가 각 단량체의 3번 아미노산인 시스테인 사이에 이황화 결합을 통해 동종이합체를 형성하고, 상기 동종이합체의 단량체는 각각 독립적으로 35번 및 95번의 시스테인 간의 내부의 이황화 결합 및 141번 및 199번의 시스테인 간의 내부의 이황화 결합을 형성하는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[403] 한편, 본 발명에서 면역글로불린 Fc 영역과 관련된 "조합(combination)"이란 이량체 또는 다량체를 형성할 때, 동일 기원 단쇄 면역글로불린 Fc 영역을 암호화하는 폴리펩타이드가 상이한 기원의 단쇄 폴리펩타이드와 결합을 형성하는 것을 의미한다. 즉, IgG Fc, IgA Fc, IgM Fc, IgD Fc 및 IgE의 Fc 단편으로 이루어진 그룹으로부터 선택된 2개 이상의 단편으로부터 이량체 또는 다량체의 제조가 가능하다.

[404] 본 발명에서 "하이브리드(hybrid)"란 단쇄의 면역글로불린 불변영역 내에 2개 이상의 상이한 기원의 면역글로불린 Fc 단편에 해당하는 서열이 존재함을 의미하는 용어이다. 본 발명의 경우 여러 형태의 하이브리드가 가능하다. 즉, IgG Fc, IgM Fc, IgA Fc, IgE Fc 및 IgD Fc의 CH1, CH2, CH3 및 CH4로 이루어진 그룹으로부터 1개 내지 4개 도메인으로 이루어진 도메인의 하이브리드가

가능하며, 힌지를 포함할 수 있다.

[405] 한편, IgG 역시 IgG1, IgG2, IgG3 및 IgG4의 서브클래스로 나눌 수 있고 본 발명에서는 이들의 조합 또는 이들의 혼성화도 가능하다. 구체적으로는 IgG2 및 IgG4 서브클래스이며, 가장 구체적으로는 보체 의존적 독성(CDC, Complement dependent cytotoxicity)과 같은 이펙터 기능(effector function)이 거의 없는 IgG4의 Fc 절편이다.

[406] 또한, 상술한 결합체는 효력의 지속성이 천연형 GLP-1, GIP, 혹은 글루카곤에 비해, 또는 F가 수식되지 않은 X에 비해 증가된 것일 수 있으며, 이러한 결합체는 상술한 형태뿐만 아니라, 생분해성 나노파티클에 봉입된 형태 등을 모두 포함하나 이에 제한되지 않는다.

[407]

[408] 또한, 상술한 결합체는 효력의 지속성이 천연형 GLP-1, GIP, 혹은 글루카곤에 비해, 또는 F가 수식되지 않은에 비해 증가된 것일 수 있으며, 이러한 결합체는 상술한 형태뿐만 아니라, 생분해성 나노파티클에 봉입된 형태 등을 모두 포함한다.

[409]

[410] 상기 펩타이드 (예컨대 상기 펩타이드 자체 또는 이에 생체적합성 물질이 결합된 지속형 결합체 형태)를 포함하는 조성물은 폐 질환의 예방 또는 치료용일 수 있다.

[411] 본 발명에서 용어 "예방"은 상기 펩타이드 (예컨대 상기 펩타이드 자체 또는 이에 생체적합성 물질이 결합된 지속형 결합체 형태) 또는 이를 포함하는 조성물의 투여로 폐 질환의 발병을 억제 또는 지연시키는 모든 행위를 의미하며, "치료"는 상기 펩타이드 (예컨대 상기 펩타이드 자체 또는 이에 생체적합성 물질이 결합된 지속형 결합체 형태) 또는 이를 포함하는 조성물의 투여로 폐 질환의 증세가 호전되거나 이롭게 되는 모든 행위를 의미한다.

[412] 본 발명에서 용어 "투여"는 어떠한 적절한 방법으로 환자에게 소정의 물질을 도입하는 것을 의미하며, 상기 조성물의 투여 경로는 특별히 이에 제한되지 않으나, 상기 조성물이 생체 내 표적에 도달할 수 있는 어떠한 일반적인 경로를 통하여 투여될 수 있으며, 예를 들어 복강 내 투여, 정맥 내 투여, 근육 내 투여, 피하 투여, 피 내 투여, 경구 투여, 국소 투여, 비 내 투여, 폐 내 투여, 또는 직장 내 투여 등이 될 수 있다.

[413]

[414] 본 발명의 글루카곤, GLP-1 및 GIP 수용체 모두에 활성을 갖는 삼중 활성체 또는 이의 지속형 결합체의 사용은 혈중 반감기 및 생체 내 효력 지속 효과의 획기적인 증가로 인해 매일 투여되야 하는 만성환자에게 투여 횟수를 감소시켜 환자의 삶의 질을 향상시킬 수 있는 큰 장점이 있어 폐 질환의 치료에 큰 도움을 준다. 더욱이, 상기 삼중 활성체 또는 이의 지속형 결합체는 폐 질환의 증상의 재발 시기를 지연시키는 등 폐 질환의 예방 효과 및/또는 폐 질환의 증상을

유의적으로 감소시키는 효과가 있는 등 폐 질환의 예방 및/또는 치료에 큰 도움을 준다.

[415]

[416] 본 발명에서 용어, "폐 질환"은, 폐의 조직이나 기능에 이상이 생기는 모든 질환을 의미하며, 구체적으로, 본 발명의 삼중 활성체 또는 이의 지속형 결합체는 염증 및 섬유화 반응을 저해할 수 있으므로, 본 발명의 목적상 상기 폐 질환은 폐 염증 및 섬유화를 수반하는 질병 또는 섬유화에 진행에 따른 질병, 예를 들어, 간질성 폐질환 (interstitial lung disease, ILD), 진행성 섬유화 간질성 폐질환(Progressive Fibrosing Interstitial Lung Disease, PF-ILD), 특발성 간질성 폐렴(idiopathic interstitial pneumonias, IIP), 비특이성 간질성 폐렴(Non-specific interstitial pneumonia, NSIP), 폐섬유증(pulmonary fibrosis), 간질성 폐섬유증(fibrosing interstitial lung diseases, FILD), 특발성 폐섬유증 (idiopathic pulmonary fibrosis, IPF), 폐포염 (alveolitis), 폐렴(pneumonia), 폐기종(emphysema), 기관지염(bronchitis), 만성 폐쇄성 폐질환(chronic obstructive pulmonary disease), 복합 폐 섬유화와 폐기종(combined pulmonary fibrosis and emphysema, CPFE), 천식(asthma), 또는 호흡기 감염 질환 등을 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[417]

[418] 본 발명의 삼중 활성체는 폐 염증의 주요 기전인 대식세포(macrophage)의 활성을 저해하고, 폐섬유증의 주요 기전인 섬유아세포의 근섬유아세포로의 분화 및 폐포상피세포의 상피간엽이행을 저해함으로써 폐 질환에 대한 예방 또는 치료 효과를 나타내는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[419] 구체적으로, 본 발명의 약학적 조성물은 투여 시 (i) 대식세포(macrophage) 활성 저해, 및/또는 (ii) IL-1β, IL-6, IL-12, 또는 TNF-α 의 발현을 감소시킴으로써 염증을 억제하는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 또한, 이에 제한되지 않으나, 본 발명의 약학적 조성물은 투여 시 하기 특성 중 하나 이상을 갖는 것일 수 있다:

[420] (i) 근섬유아세포(myofibroblast) 분화 저해;

[421] (ii) α-SMA, collagen1α1, 또는 피브로넥틴(fibronectin)의 발현 감소;

[422] (iii) 폐포상피세포(alveolar epithelial cell)의 상피간엽이행(epithelial mesenchymal transition, EMT) 저해;

[423] (iv) collagen1α1, 또는 collagen1α3의 발현 감소. 이를 통해, 본 발명의 약학적 조성물은 섬유화를 억제하는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[424]

[425] 폐에서의 염증 반응에서는 폐포의 대식세포가 관여하며 상기 대식세포가 분비하는 염증 사이토카인 (IL-1, IL-6, TNF-α)로 인해 호중구가 유인되고, 프로테아제가 분비된다. 특히, 폐 조직을 구성하고 탄력성에 관여하는 섬유의 한 종류인 엘라스틴을 분해하는 엘라스타제(elastase)가 분비된다. 상기

엘라스타제에 의해 폐포의 탄성 조직인 엘라스틴이 손상되어 결국 폐포 역시 손상되며, 조직의 섬유화로 이어지는 것으로 알려져 있다. 폐에서의 염증 및 섬유화는 그 자체로도 폐질환이 되지만, 염증 및 섬유화의 진행 및 심화로 인해 다른 폐질환으로도 이어질 수 있으며, 따라서, 폐질환의 예방 및 치료에서는 염증 및 섬유화를 억제하는 것이 요구된다.

[426]

[427] 본 발명의 상기와 같은 삼중 활성체의 특성은 폐의 염증 및 섬유화 억제 및 개선 효과를 의미하고, 이는 폐의 염증 또는 섬유화를 수반하는 폐 질환에 대한 예방 또는 치료 효과 역시 시사한다.

[428]

[429] 본 발명에서 용어, 만성 폐쇄성 폐질환(chronic obstructive pulmonary disease, COPD)은 비가역적인 기도 폐쇄를 보이는 질환을 의미하며, 만성적인 염증과 손상에 따른 폐실질의 파괴, 폐섬유화가 나타나는 것으로 알려져 있다. 만성 폐쇄성 폐질환 환자의 기도에서는 다양한 염증세포의 침윤이 관찰되며, 특히 대식세포의 수가 질환의 중증도에 따라 증가하는 것으로 알려져 있으므로, 이는 만성 폐쇄성 폐질환의 발병 기전에 염증이 중요한 역할을 함을 시사한다. 유해 물질이 흡입되었을 때 선천 면역이 반응하여 상피세포가 많은 염증 매개 물질을 분비하고, 이는 폐포 대식세포와 호중구를 활성화시키는 역할을 하므로, 염증 반응의 제어는 만성 폐쇄성 폐질환 치료에 있어 중요한 요인이다. 일반적으로 만성 폐쇄성 폐질환은 폐기종과 만성 기관지염의 두 가지 유형으로 구별하지만, 실제 환자에서는 폐기종과 만성 기관지염이 동시에 존재하는 경우가 많은 것으로 알려져 있다.

[430]

[431] 본 발명에서 용어, 만성 기관지염은 만성적으로 기관지에 염증이 생겨 기도 내 점액샘의 비대 및 증가가 유발되거나 염증으로 인한 구조 손상이 일어나고, 그 결과 점액층이 두꺼워지고 섬모운동이 저하되면서 공기의 흐름을 막아 호흡 곤란 등을 일으키는 호흡기 질환을 의미한다.

[432]

[433] 본 발명에서 용어, 폐기종은 여러 원인에 의해서 기관지나 폐에 염증이 생기고, 이로 인하여 프로테아제가 분비되고, 폐포의 기본 골격이 파괴되고 혈관 구조가 손상되면서 기체 교환 기능을 상실하게 되는 질환을 의미한다.

[434]

[435] 본 발명에서 용어, 폐포염은 산소교환을 담당하는 폐포에 염증이 생긴 질환을 의미한다. 곰팡이, 먼지, 석유, 톨루엔, 아세톤, 화학 약품 등으로 인해 폐포 내에 대식세포가 축적되어 폐포의 중격이 두꺼워 지면 폐포염으로 진행될 수 있으며, 폐포염의 진행에 따라 폐포는 파괴되고 흉터가 생겨 딱딱해지고 호흡 곤란이 발생하는 것으로 알려져 있다.

[436]

[437] 본 발명에서 용어, 천식(asthma)은 만성 폐쇄성 폐질환과 달리 가역적인 병변을 나타내는, 기도 염증에 의해 유발되는 호흡 곤란을 일으키는 염증성 기도 폐쇄 질환이다. 천식 환자의 기도에서는 IL-4, IL-5, IL-13 등의 사이토카인 분비가 많이 이루어지며, 기관지 평활근의 증식 및 비후가 현저한 것으로 알려져 있다. 만성 폐쇄성 폐질환과 마찬가지로 염증 반응의 제어가 치료에 있어 중요하다.

[438]

[439] 본 발명에서 용어, 폐렴은 폐의 실질조직 또는 폐포에 염증이 생기는 질병을 의미한다. 세균 감염, 바이러스, 원충, 곰팡이, 화학물질 등이 원인이 되며, 여러 합병증을 동반할 수 있는 위험성이 큰 질환이다. 호흡 기관이 갖고 있는 병원체에 대한 면역 기전(대표적으로 폐포대식세포)이 제대로 기능하지 않거나, 병원체의 수준이 정상적인 면역 기전으로 방어할 수 있는 한도를 초과하여 폐렴이 발병하는 것으로 알려져 있다. 천식, 만성 폐쇄성 폐질환, 폐기종, 기관지확장증 등 만성폐질환자에서 폐렴 발병 가능성이 높은 것으로 알려져 있다. 본 발명에서, 폐염증 또는 폐렴은 다른 폐질환에 기인하거나, 또는 다른 폐질환과 동반하는 폐염증 또는 폐렴을 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[440]

[441] 본 발명에서 용어, 호흡기 감염 질환은 병원체(바이러스, 세균, 진균 등) 감염에 의한 호흡기 질환을 의미한다. 호흡기 감염 질환은 원인이 되는 병원체에 따라 구별될 수 있는데, 대표적인 호흡기 감염 원인으로는 호흡기 바이러스, 세균, 마이코플라즈마(mycoplasma), 진균(fungi) 등을 들 수 있다. 상기 병원체의 감염에 따른 호흡기 감염 질환에는 염증이 수반되므로, 염증 개선을 통한 치료 효과를 기대할 수 있다.

[442] 본 발명에서 용어, 호흡기 바이러스 감염 질환은 병원성 바이러스 감염에 의한 호흡기 질환을 의미하며, 경증의 상기도 감염에서부터 폐렴과 기관지염을 동반하는 심한 하기도 감염을 유발할 수 있고, 심폐기능이 저하된 사람은 호흡기 바이러스 감염이 치명적인 것으로 알려져 있다. 호흡기 바이러스에 감염되면, 폐를 포함한 호흡기에 염증이 일어나고 오랜 기간 염증이 억제되지 못하면 섬유화로 이어져 더 심각한 폐질환으로 이어지게 되므로, 염증 및 섬유화를 억제하면서 호흡기 바이러스 감염 질환을 치료하는 것이 중요하다.

[443] 호흡기 바이러스 감염 질환의 원인이 되는 상기 호흡기 바이러스는 아데노바이러스(adenovirus), 백시니아 바이러스(vaccinia virus), 헤르페스 단순 바이러스(herpes simplex virus), 파라인플루엔자 바이러스(parainfluenza virus), 라이노 바이러스(rhinovirus), 수두바이러스(varicella Zoster Virus), 홍역 바이러스(measle virus), 호흡기 세포융합 바이러스(respiratorysyncytial virus), 뎅기바이러스(Dengue virus), HIV(human immunodeficiency virus), 인플루엔자 바이러스, 코로나바이러스(coronavirus), 중증급성 호흡기 증후군 바이러스(severe acute respiratory syndrome associated virus; SARS-associated virus),

또는 중동 호흡기 증후군 코로나바이러스(middle east respiratory syndrome coronavirus; MERS-CoV)일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[444] 상기 코로나 바이러스의 제한되지 않는 한 예로, SARS-CoV-2를 들 수 있으며, SARS-CoV-2 감염으로 코로나바이러스감염증-19(coronavirus disease 2019, COVID-19)이 발병할 수 있다.

[445] 본 발명에서 용어, 코로나바이러스감염증-19(coronavirus disease 2019, COVID-19)은 코로나 바이러스 (2019-nCoV 또는 SARS-CoV-2) 감염으로 인한 바이러스 감염성 질환으로, 아직까지 명확한 감염원과 감염경로는 확인되지 않았으나, 전파력이 매우 강해 전세계적인 팬데믹 사태를 일으켰다. 코로나 바이러스는 사람과 다양한 동물에 감염될 수 있는 바이러스로서 유전자 크기 27~32kb의 RNA 바이러스로, 발열을 동반한 기침, 호흡곤란, 숨가쁨, 가래 등 호흡기 증상을 주로 나타내는 것으로 알려져 있다.

[446] 특히, 코로나바이러스감염증-19에 심한 폐렴이 동반되는 이유는 코로나 바이러스가 기관지의 섬모상피세포나 TypeII 폐포상피세포(폐포 안의 2형 상피세포)를 공격하기 때문이다. 이 세포들에는 코로나 바이러스가 잘 달라붙도록 만드는 효소수용체가 다량으로 존재한다. 'ACE2', 'TMPRSS2' 등의 수용체가 코로나 바이러스의 세포 내 침투능력을 강화해준다.

[447] 숨을 쉬는 동안 침투한 이물질이나 병원균은 기관지의 섬모상피세포에 있는 점막에 붙는다. 섬모상피세포는 이름 그대로 다수의 섬모들을 가지고 있어, 점막에 붙어있는 코로나 바이러스를 비롯한 병원균들을 입과 코의 방향으로 배출시킨다. 그러나 섬모상피세포의 섬모운동만으로 한꺼번에 많은 바이러스를 내쫓기에는 한계가 있다. 또 흡연, 먼지, 건조한 날씨, 낮은 온도 등은 섬모운동을 저하시킨다. 건조하고 추운 겨울은 섬모운동이 저하되기 때문에 코로나바이러스감염증-19를 비롯한 인플루엔자 바이러스성 감염병이 증가한다.

[448] 다른 바이러스와 마찬가지로 코로나 바이러스는 숙주 세포의 자원과 시스템을 탈취하여 왕성하게 증식하며 감염된 세포 밖으로 분출된다. 이때 기하급수적으로 증식된 바이러스들이 빠져나와 주변의 건강한 섬모상피세포와 TypeII 폐포상피세포들로 급속히 침투한다. 감염된 세포들은 강한 염증을 유발하는 사이토카인 물질을 분비하며 염증세포로 변하게 된다.

[449] TypeII 폐포상피세포의 본래 기능은 계면활성제(surfactant)를 분비하여 폐포를 팽팽하게 유지하는 동시에 TypeI 폐포상피세포를 통한 가스교환이 원활하도록 만드는 데 있다. 코로나 바이러스는의 공격을 받은 TypeII 폐포상피세포들이 염증세포로 변하고, 주기능을 상실하면서 폐에 염증(폐렴)이 생기고, 이에 따라 이차적 증상(열, 기침, 호흡곤란 등)이 발생하는 것이다.

[450]

[451] 본 발명의 삼중 활성체는 대식세포 활성 저해 및/또는 폐 조직에서 염증성 사이토카인(IL-1β, IL-6, IL-12, 또는 TNF-α)의 발현 수준 감소를 통해 염증 반응을 억제할 수 있으므로, 염증에 기인하거나 염증을 동반하는 폐 질환(예를

들어, 폐포염, 폐렴, 폐기종, 기관지염, 만성 폐쇄성 폐질환, 천식, 또는 호흡기 감염 질환)에 예방 또는 치료 효과를 나타낼 수 있다.

[452]

[453] 한편, 섬유증은 기관 또는 조직에서 과도한 섬유질 결합조직을 형성하는 질환이다. 섬유증은 인체 내에서 조직이 여러 가지 원인 (감염, 화학적 자극, 방사선 등)에 의한 염증반응으로 손상을 받은 후 창상치유(wound healing) 과정 중에 정상적인 통제가 불가능한 상태를 의미한다. 특히 폐에서는, 폐의 염증이 발생하여 치료되지 않은 상태로 오래 지속되면서 조직이 재생되지 못하고 굳는 섬유화로 이어져 심각한 폐질환으로 이어지는 경우가 많다. 이에, 섬유증 치료에는 염증을 억제하여 섬유화의 진행을 막는 것이 필요하다고 알려져 있으므로, 치료제 역시 면역억제제(예를 들어, 스테로이드제, 사이톡산) 등이 이용된다. 본원에서 섬유증은 섬유화와 혼용되어 사용될 수 있다.

[454]

[455] 본 발명에서 용어, 폐섬유증은 폐에 섬유성 결합조직의 증식이 일어나 정상 폐구조의 파괴, 폐조직의 경화・황폐를 초래한 상태를 말한다. 실질성, 간질성 및 혼합형이 있으나, 특히 문제가 되는 것은 간질성 폐섬유증으로 폐포벽, 세기관지 주위에 섬유성결합직의 증식이 나타난다. 일반적으로, TGF-β(Transforming growth factor-β)가 폐포 대식세포(alveolar macrophage), 활성화된 폐포상피세포, 섬유아세포, 근섬유아세포와 같은 다양한 세포에서 생성되고, 섬유아세포 증식 및 대식세포와 섬유아세포의 이동을 유도하고, TNF-α, PDGF, IL-1β, IL-13과 같은 염증성 및 섬유성 사이토 카인의 발현을 자극하여 섬유화 반응을 더욱 강화시키는 것으로 알려져 있다 (Proc Am Thorac Soc., 9(3):111-116 (2012)). 본 발명의 폐섬유증은 다른 폐질환에 기인하거나, 또는 다른 폐질환과 동반하는 폐섬유증을 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[456] 본 발명에서 용어, 복합 폐 섬유화와 폐기종(combined pulmonary fibrosis and emphysema; CPFE)은 폐기종에 섬유화가 같이 공존하는 대표적인 질환이다.

[457]

[458] 본 발명에서 용어, 간질성 폐질환 (interstitial lung disease, ILD)은 미만성 간질성 폐질환(diffuse parenchymal lung disease, DPLD)으로도 알려져 있으며, 폐 간질부(interstitial compartment)의 증식, 염증세포의 침윤 및 섬유화(fibrosis)가 동반되어 비정상적인 콜라겐 침착을 나타내는 질환들을 총칭한다. 상기 간질성폐질환은 원인에 따라 직업성, 환경성, 의인성, 결체조직질환, 또는 특발성 등으로 분류된다.

[459] 본 발명에서 용어, 진행성 섬유화 간질성 폐 질환(Progressive Fibrosing Interstitial Lung Disease, PF-ILD)은 진행성 표현형을 나타내는 만성 섬유성 간질성폐질환을 의미하며, 자가면역성 간질성 폐질환, 전신경화증연관 간질성 폐질환, 혼합성 결합조직질환 연관 간질성 폐질환, 비특이성 특발성 간질성

폐렴, 분류되지 않은 특발성 간질성 폐렴 등을 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[460] 상기 간질성 폐질환 중 특발성 간질성 폐렴(idiopathic interstitial pneumonias, IIP)은 원인이 알려지지 않았으며, 폐간질을 침범하는 조직학적 형태로 구분되는 폐질환들을 의미하며 대표적으로 비특이성 간질성 폐렴(Non-specific interstitial pneumonia, NSIP), 및 특발성 폐섬유증 (idiopathic pulmonary fibrosis, IPF)을 들 수 있다.

[461] 본 발명에서 용어, 특발성 폐섬유증(idiopathic pulmonary fibrosis, IPF)은 특발성 간질성 폐렴 중 가장 흔한 질병으로서, 정확한 원인이 확인되지 않는 폐섬유화로 정의된다. 폐포상피세포가 다양한 노출에 의해 반복적인 염증반응으로 손상을 받은 후 정상적으로 상처가 치유되지 않으면서 섬유화가 유발되어 발병하며, 유전적 소인, 환경적 인자, 폐 감염 사이에 복잡한 상호작용으로 폐 섬유화가 진행되는 것으로 알려져 있다. 구체적으로는 손상된 폐포상피세포 및 침윤된 염증세포에서 분비된 다양한인자에 의한 폐 내 섬유모세포/근섬유모세포의 증식과 그로 인한 아교질(collagen)의 분비 및 축적, 및 세포외기질(extracellular matrix, ECM)의 과도한 침착 등이 발병 기전으로 알려져 있다.

[462]

[463] 본 발명의 삼중 활성체는 (i) 근섬유아세포(myofibroblast) 분화 저해; (ii) α-SMA, collagen1α1, 또는 피브로넥틴(fibronectin)의 발현 감소; (iii) 폐포상피세포(alveolar epithelial cell)의 상피간엽이행(epithelial mesenchymal transition, EMT) 저해; 및 (iv) collagen1α1, 또는 collagen1α3의 발현 감소 중 하나 이상의 특성을 가지므로, 섬유화를 억제하고 개선할 수 있으며, 섬유화에 기인하거나 섬유화를 동반하는 폐 질환(예를 들어, 간질성폐질환, 진행성 섬유화 간질성 폐 질환, 특발성 간질성 폐렴, 비특이성 간질성 폐렴, 폐섬유증, 간질성 폐섬유증, 특발성 폐섬유증, 복합 폐섬유화와 폐기종)에 예방 또는 치료 효과를 나타낼 수 있다.

[464]

[465] 한편, 본 발명에 따른 삼중활성체는 코로나바이러스감염증-19에 치료 효과를 나타낼 수 있을 뿐만 아니라, 코로나바이러스감염증-19은 완치 후에도 후유증으로 폐섬유화 증상이 남는 것으로 알려져 있고, 본 발명의 삼중활성체는 폐섬유화 개선 효과를 나타내므로, 삼중활성체는 코로나바이러스감염증-19에 의한 폐염증 및/또는 폐섬유증에 대해 효능을 나타낼 수 있다.

[466]

[467] 본 발명의 약학적 조성물은 점액용해제(mucolytic agents)또는 이의 약학적으로 허용가능한 염과 추가로 투여되는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 본 발명의 목적상, 상기 약학적 조성물은 삼중활성체 및 점액용해제를 병용 투여하기 위한 것으로, 삼중활성체 및 점액용해제가 동시, 순차, 또는 역순으로 투여되는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[468] 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. 삼중활성체 및 점액용해제의 병용 투여는 다음과 같은 형태로 이루어지는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다:

[469] a) (i) 삼중활성체 또는 이의 결합체 및 (ii) 점액용해제 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염이 혼합된 하나의 혼합물(mixture)로 투여되는 것이거나; 또는

[470] b) (i) 삼중활성체 또는 이의 결합체 및 (ii) 점액용해제 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염이 분리된 형태로 투여됨.

[471] 삼중활성체 및 점액용해제 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염이 분리된 형태일 경우, 삼중활성체 및 점액용해제 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염이 별개의 제제로 제제화되어 동시, 개별, 순차, 또는 역순으로 투여될 수 있는 것일 수 있다.

[472] 본 발명에서, 병용 투여는 단지 동시의 투여를 의미하는 것뿐만이 아니라, 삼중활성체 및 점액용해제또는 이의 약학적으로 허용가능한 염이 개체에 함께 작용하여 각 물질이 본연의 기능과 동등하거나 그 이상의 수준을 수행할 수 있는 투여 형태로 이해되어야 한다.

[473] 구체적인 한 예로, 삼중활성체 및 점액용해제 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염은 혼합되어 하나의 제제로 병용 투여되는 것일 수 있고, 또는, 삼중활성체 및 점액용해제 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염이 개별적으로 제제화되어 동시, 순차, 또는 역순으로 병용 투여되는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 개별적으로 제제화되어 병용 투여될 경우에 각 제제는 서로 다른 경로로 투여될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 또한, 이에 제한되지 않으나, 삼중활성체 및 점액용해제 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염은 개별적으로 제제화되어 하나의 키트에 포함될 수 있다. 점액용해제의 약학적으로 허용가능한 염은 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.

[474] 본 발명에서 용어, “점액용해제(mucolytic agents)”는 호흡기로부터 객담, 가래 또는 점액의 분비, 액화 또는 배출을 촉진하는 약물을 의미하며, 특히, 폐에 있는 점액을 분해하여 호흡기 분비물을 묽게 만드는 데까지만 역할을 하는 약을 의미한다. 본 발명에서, 점액용해제는 거담제와 혼용되어 사용될 수 있다.

[475] 본 발명의 점액용해제의 구체적인 예로는, 암브록솔(ambroxol), N-아세틸시스테인(N-acetylcystein), N-아세틸린(N-acetylin),

카르보시스테인(carbocysteine), 도미오돌 (domiodol), 푸도스테인(fudosteine), 브롬헥신(bromhexine), 엘도스테인(erdosteine), 레토스틴 (letostine), 리소자임 (lysozyme), 메스나 (mesna), 소브레롤 (sobrerol), 스테프로닌 (stepronin), 티오프로닌 (tiopronin), 틸록사폴 (tyloxapol), 카보시스테인(carbocisteine), 도르나제 알파 (dornase alfa), 에프라지논 (eprazinone), 레토스테인 (letosteine), 넬테넥신 (neltenexine), 및 메시스테인(mecysteine)으로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나이상일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[476]

[477] 한편, 삼중활성체 및 점액용해제의 병용 투여는 호흡기 감염 질환(예를 들어, 코로나바이러스감염증-19)에 치료 효과를 나타낼 수 있다. 본 발명의 삼중활성체는 폐 염증 및 폐섬유화 개선 효과를 나타내므로, 삼중활성체와 점액용해제의 병용 투여는 호흡기 감염 질환(예를 들어, 코로나바이러스감염증-19(COVID-19)), 또는 이에 의한 폐염증 및 폐섬유증에 대해 효능을 나타낼 수 있다.

[478]

[479] 본 발명의 약학적 조성물은 약학적으로 허용가능한 담체, 또는 희석제를 추가로 포함할 수 있다. 이러한 약학적으로 허용가능한 담체, 또는 희석제는 비자연적으로 발생된 것일 수 있다.

[480] 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.

[481] 본 발명의 펩타이드를 포함한 약학적 조성물은 약학적으로 허용가능한 부형제를 포함할 수 있다. 상기 부형제는 특별히 이에 제한되지는 않으나, 경구 투여 시에는 결합제, 활택제, 붕해제, 가용화제, 분산제, 안정화제, 현탁화제, 색소, 향료 등을 사용할 수 있고, 주사제의 경우에는 완충제, 보존제, 무통화제, 가용화제, 등장화제, 안정화제 등을 혼합하여 사용할 수 있으며, 국소투여용의 경우에는 기제, 부형제, 윤활제, 보존제 등을 사용할 수 있다.

[482] 본 발명의 조성물의 제형은 상술한 바와 같은 약학적으로 허용가능한 부형제와 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.

[483] 한편, 제제화에 적합한 담체, 부형제 및 희석제의 예로는 락토스, 덱스트로스, 수크로스, 소르비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아, 알지네이트, 젤라틴, 인산칼슘, 칼슘 실리케이트, 셀룰로스, 메틸 셀룰로스, 미정질 셀룰로스, 폴리비닐피롤리돈, 물, 메틸하이드록시벤조에이트,

프로필하이드록시벤조에이트, 탈크, 스테아르산마그네슘 또는 광물유 등이 사용될 수 있다. 또한, 충진제, 항응집제, 윤활제, 습윤제, 향료, 방부제 등을 추가로 포함할 수 있다.

[484] 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.

[485] 또한, 상기 조성물은 약학적 분야에서 통상의 방법에 따라 환자의 신체 내 투여에 적합한 단위 투여형의 제제, 구체적으로는 단백질 의약품의 투여에 유용한 제제 형태로 제형화시켜 당업계에서 통상적으로 사용하는 투여 방법을 이용하여 경구, 또는 피부, 정맥 내, 근육 내, 동맥 내, 골수 내, 수막강 내, 심실 내, 폐, 경피, 피하, 복 내, 비강 내, 소화관 내, 국소, 설하, 질 내 또는 직장 경로를 포함하는 비경구 투여 경로에 의하여 투여될 수 있으나, 이들에 한정되는 것은 아니다.

[486] 또한, 상기 결합체는 생리식염수 또는 유기용매와 같이 약제로 허용된 여러 전달체(carrier)와 혼합하여 사용될 수 있고, 안정성이나 흡수성을 증가시키기 위하여 글루코스, 수크로스 또는 덱스트란과 같은 탄수화물, 아스코르브산(ascorbic acid) 또는 글루타티온과 같은 항산화제(antioxidants), 킬레이트제, 저분자 단백질 또는 다른 안정화제(stabilizers) 등이 약제로 사용될 수 있다.

[487] 본 발명의 다른 측면에서는 서열번호 1 내지 102 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하는 펩타이드 또는 그 지속형 결합체를 약학적 유효량으로 함유하는 약학적 조성물을 개체에 투여하는 단계를 포함하는 폐 질환의 예방 또는 치료 방법을 제공한다.

[488]

[489] 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. 구체적으로, 본 발명의 조성물은 상기 삼중 활성체 또는 이를 포함하는 지속형 결합체를 약학적 유효량으로 포함하는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[490] 상기 펩타이드 또는 지속형 결합체를 약학적 유효량으로 포함하는 것은, 삼중 활성체 또는 지속형 결합체로 인한 목적하는 약리 활성(예를 들어, 폐 질환의 예방, 개선 또는 치료)을 얻을 수 있는 정도를 의미하고, 또한 투여되는 개체에서 독성 또는 부작용이 일어나지 않거나 미미한 수준으로서 약학적으로 허용되는 수준을 의미할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 이와 같은 약학적 유효량은 투여 횟수, 환자, 제형 등을 종합적으로 고려하여 결정될 수 있다.

[491]

[492] 특별히 이에 제한되지 않으나, 본 발명의 상기 약학적 조성물은 상기 성분(유효성분)을 0.01 내지 99% 중량 대 부피로 함유할 수 있다.

[493]

[494] 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 삼중 활성체 또는 이의 지속형 결합체의 바람직한 전체 용량은 하루에 환자 체중 1 kg당 약 0.0001 mg 내지 500 mg일 수 있다. 그러나 상기 삼중 활성체 또는 이의 결합체의 용량은 약학적 조성물의 투여 경로 및 치료 횟수뿐만 아니라 환자의 연령, 체중, 건강 상태, 성별, 질환의 중증도, 식이 및 배설율 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.

[495] 본 발명의 약학적 조성물은 생체 내 지속성 및 역가가 우수하여, 본 발명의 약학적 제제의 투여 횟수 및 빈도를 현저하게 감소시킬 수 있다.

[496]

[497] 본 발명을 구현하는 다른 하나의 양태는 상기 삼중활성체(펩타이드) 및/또는 삼중활성체의 지속형 결합체, 또는 이를 포함하는 조성물을 이를 필요로 하는 개체에 투여하는 단계를 포함하는, 폐 질환의 예방 또는 치료 방법을 제공한다.

[498] 상기 삼중활성체 및/또는 삼중활성체의 지속형 결합체, 또는 이를 포함하는 조성물, 폐 질환, 예방 및 치료에 대해서는 앞서 설명한 바와 같다.

[499] 본 발명에서 상기 개체는 폐 질환이 의심되는 개체로서, 상기 폐 질환 의심 개체는 해당 질환이 발병하였거나 발병할 수 있는 인간을 포함한 쥐, 가축 등을 포함하는 포유 동물을 의미하나, 본 발명의 삼중 활성체 및/또는 결합체, 또는 이를 포함하는 상기 조성물로 치료 가능한 개체는 제한 없이 포함된다. 특히, 폐에 염증 및/또는 섬유증이 있는 개체일 수 있고, 또는 염증 및/또는 섬유증에 기인하거나 염증 및/또는 섬유증을 동반하는 폐질환을 갖는 개체일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[500] 본 발명에서 용어 "투여"는 어떠한 적절한 방법으로 환자에게 소정의 물질을 도입하는 것을 의미하며, 상기 조성물의 투여 경로는 특별히 이에 제한되지 않으나, 상기 조성물이 생체 내 표적에 도달할 수 있는 어떠한 일반적인 경로를 통하여 투여될 수 있으며, 예를 들어 복강 내 투여, 정맥 내 투여, 근육 내 투여, 피하 투여, 피 내 투여, 경구 투여, 국소 투여, 비 내 투여, 폐 내 투여, 또는 직장 내 투여 등이 될 수 있다.

[501]

[502] 본 발명의 방법은 상기 삼중 활성체 또는 이의 지속형 결합체를 포함하는 약학적 조성물을 약학적 유효량으로 투여하는 것을 포함할 수 있다. 적합한 총

1일 사용량은 올바른 의학적 판단범위 내에서 처치의에 의해 결정될 수 있으며, 1회 또는 수회로 나누어 투여할 수 있다. 그러나 본 발명의 목적상, 특정 환자에 대한 구체적인 치료적 유효량은 달성하고자 하는 반응의 종류와 정도, 경우에 따라 다른 제제가 사용되는지의 여부를 비롯한 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.

[503] 이에 제한되지 않으나, 본 발명의 약학적 조성물은 1주에 1회, 2주에 1회, 또는 4주에 1회 투여될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[504] 본 발명의 폐 질환의 예방 또는 치료 방법의 한 구체적인 예로, 삼중활성체(펩타이드) 및/또는 삼중활성체의 지속형 결합체, 또는 이를 포함하는 조성물과 점액용해제 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 동시, 순차, 또는 역순으로 병용 투여하는 방법이 있으나, 이에 제한되지 않는다. 상기 병용 투여는 앞서 설명한 바와 같다.

[505]

[506] 본 발명을 구현하는 다른 하나의 양태는 폐 질환의 예방 또는 치료를 위한 약제의 제조에 있어서 상기 삼중 활성체 또는 이의 지속형 결합체를 포함하는 조성물의 용도이다.

[507] 상기 삼중 활성체 및/또는 이의 결합체, 또는 이를 포함하는 조성물, 폐 질환, 예방 및 치료에 대해서는 앞서 설명한 바와 같다.

[508]

[509] 본 발명을 구현하는 다른 하나의 양태는 폐 질환의 예방 또는 치료를 위한 상기 삼중 활성체 또는 이의 지속형 결합체, 또는 이를 포함하는 조성물의 용도를 제공하는 것이다.

[510] 상기 삼중 활성체 및/또는 이의 결합체, 또는 이를 포함하는 조성물, 폐 질환, 예방 및 치료에 대해서는 앞서 설명한 바와 같다.

[511]

[512] 본 발명의 폐 질환의 예방 또는 치료를 위한 용도는 삼중활성체(펩타이드) 및/또는 삼중활성체의 지속형 결합체, 또는 이를 포함하는 조성물과 점액용해제 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염의 병용 투여를 위한 용도일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 상기 병용 투여는 앞서 설명한 바와 같다.

[513]

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

[515]

[516] **실시예 1: 삼중 활성체의 제조**

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

[518]

[519] [표1]

서열번호	서열	정보
1	H X Q G T F T S D V S S Y L D G Q A A K E F I A W L V K G C	
2	H X Q G T F T S D V S S Y L D G Q A Q K E F I A W L V K G C	
3	H X Q G T F T S D V S S Y L L G Q A A K Q F I A W L V K G G G P S S G A P P P S C	
4	H X Q G T F T S D V S S Y L L G Q Q Q K E F I A W L V K G C	
5	H X Q G T F T S D V S S Y L L G Q Q Q K E F I A W L V K G G G P S S G A P P P S C	
6	H X Q G T F T S D V S S Y L D G Q A A K E F V A W L L K G C	
7	H X Q G T F T S D V S K Y L D G Q A A K E F V A W L L K G C	
8	H X Q G T F T S D V S K Y L D G Q A A Q E F V A W L L K G C	
9	H X Q G T F T S D V S K Y L D G Q A A Q E F V A W L L A G C	
10	H X Q G T F T S D V S K Y L D G Q A A Q E F V A W L L A G G G P S S G A P P P S C	
11	C A G E G T F T S D L S K Y L D S R R Q Q L F V Q W L K A G G P S S G A P P P S H G	
12	C A G E G T F I S D L S K Y M D E Q A V Q L F V E W L M A G G P S S G A P P P S H G	
13	C A G E G T F I S D Y S I Q L D E I A V Q D F V E W L L A Q K P S S G A P P P S H G	
14	C A G Q G T F T S D Y S I Q L D E I A V R D F V E W L K N G G P S S G A P P P S H G	
15	C A G Q G T F T S D L S K Q M D E E A V R L F I E W L K N G G P S S G A P P P S H G	
16	C A G Q G T F T S D L S K Q M D S E A Q Q L F I E W L K	

	N G G P S S G A P P P S H G	
17	CA G Q G T F T S D L S K Q M D E E R A R E F I E W L L A Q K P S S G A P P P S H G	
18	CA G Q G T F T S D L S K Q M D S E R A R E F I E W L K N T G P S S G A P P P S H G	
19	CA G Q G T F T S D L S I Q Y D S E H Q R D F I E W L K D T G P S S G A P P P S H G	
20	CA G Q G T F T S D L S I Q Y E E E A Q Q D F V E W L K D T G P S S G A P P P S H G	
21	Y X Q G T F T S D Y S K Y L D E C R A K E F V Q W L L D H H P S S G Q P P P S	고리 형성
22	Y X Q G T F T S D Y S K C L D E K R A K E F V Q W L L D H H P S S G Q P P P S	고리 형성
23	Y X Q G T F T S D Y S K Y L D E C R A K E F V Q W L L A Q K G K K N D W K H N I T	고리 형성
24	Y X Q G T F T S D Y S K Y L D E C R A K E F V Q W L K N G G P S S G A P P P S	고리 형성
25	H X Q G T F T S D C S K Y L D E R A A Q D F V Q W L L D G G P S S G A P P P S	
26	H X Q G T F T S D C S K Y L D S R A A Q D F V Q W L L D G G P S S G A P P P S	
27	H X Q G T F T S D Y S K Y L D E R A C Q D F V Q W L L D Q G G P S S G A P P P S	
28	H X Q G T F T S D Y S K Y L D E K R A Q E F V C W L L A Q K G K K N D W K H N I T	
29	H X Q G T F T S D Y S K Y L D E K A A K E F V Q W L L N T C	고리 형성
30	H X Q G T F T S D Y S K Y L D E K A Q K E F V Q W L L D T C	고리 형성
31	H X Q G T F T S D Y S K Y L D E K A C K E F V Q W L L A Q	고리 형성
32	H X Q G T F T S D Y S K Y L D E K A C K D F V Q W L L D G G P S S G A P P P S	고리 형성
33	H X Q G T F T S D Y S I A M D E I H Q K D F V N W L L A	고리

	Q K C	형성
34	H X Q G T F T S D Y S K Y L D E K R Q K E F V N W L L A Q K C	고리 형성
35	H X Q G T F T S D Y S I A M D E I H Q K D F V N W L L N T K C	고리 형성
36	H X Q G T F T S D Y S K Y L C E K R Q K E F V Q W L L N G G P S S G A P P P S G	고리 형성
37	H X Q G T F T S D Y S K Y L D E C R Q K E F V Q W L L N G G P S S G A P P P S G	고리 형성
38	C A X Q G T F T S D K S S Y L D E R A A Q D F V Q W L L D G G P S S G A P P P S S	
39	H X Q G T F T S D Y S K Y L D G Q H A Q C F V A W L L A G G G P S S G A P P P S	
40	H X Q G T F T S D K S K Y L D E R A C Q D F V Q W L L D G G P S S G A P P P S	
41	H X Q G T F T S D K S K Y L D E C A A Q D F V Q W L L D G G P S S G A P P P S	
42	Y X Q G T F T S D Y S K Y L D E K R A K E F V Q W L L D H H P S S G Q P P P S C	고리 형성
43	Y X Q G T F T S D Y S K Y L D E K R A K E F V Q W L L D H H C S S G Q P P P S	고리 형성
44	H G Q G T F T S D C S K Q L D G Q A A Q E F V A W L L A G G P S S G A P P P S	
45	H G Q G T F T S D C S K Y M D G Q A A Q D F V A W L L A G G P S S G A P P P S	
46	H G Q G T F T S D C S K Y L D E Q H A Q E F V A W L L A G G P S S G A P P P S	
47	H G Q G T F T S D C S K Y L D G Q R A Q E F V A W L L A G G P S S G A P P P S	
48	H G Q G T F T S D C S K Y L D G Q R A Q D F V N W L L A G G P S S G A P P P S	
49	C A X Q G T F T S D Y S I C M D E I H Q K D F V N W L L N T K	고리 형성
50	H X Q G T F T S D Y S K Y L D E K R A K E F V Q W L L D	고리

	H H P S S G Q P P P S C	형성
51	H X Q G T F T S D Y S K Y L D E K R Q K E F V Q W L L N T C	고리 형성
52	H X Q G T F T S D Y S K Y L D E K R Q K E F V Q W L L D T C	고리 형성
53	H X E G T F T S D Y S I A M D E I H Q K D F V N W L L A Q C	고리 형성
54	H X E G T F T S D Y S I A M D E I H Q K D F V D W L L A E C	고리 형성
55	H X Q G T F T S D Y S I A M D E I H Q K D F V N W L L A Q C	고리 형성
56	H X Q G T F T S D Y S K Y L D E K R Q K E F V N W L L A Q C	고리 형성
57	H X Q G T F T S D Y S I A M D E I H Q K D F V N W L L N T C	고리 형성
58	H X Q G T F T S D Y S K Y L D E K R Q K E F V Q W L L N T K C	고리 형성
59	C A X Q G T F T S D Y S I C M D E K H Q K D F V N W L L N T K	고리 형성
60	C A X Q G T F T S D Y S I A M D E K H C K D F V N W L L N T K	고리 형성
61	C A X Q G T F T S D Y S I A M D E I A C K D F V N W L L N T K	고리 형성
62	C A X Q G T F T S D K S K Y L D E R A A Q D F V Q W L L D G G P S S G A P P P S	
63	C A X Q G T F T S D C S K Y L D E R A A Q D F V Q W L L D G G P S S G A P P P S	
64	Y X Q G T F T S D Y S K Y L D E C A A K E F V Q W L L D H H P S S G Q P P P S	고리 형성
65	H X Q G T F T S D Y S K C L D E K R A K E F V Q W L L D H H P S S G Q P P P S	고리 형성
66	Y X Q G T F T S D Y S K Y L D E C R A K D F V Q W L L D H H P S S G Q P P P S	고리 형성
67	Y X Q G T F T S D Y S K Y L D E C A A K D F V Q W L L	고리

	D H H P S S G Q P P P S	형성
68	Y X Q G T F T S D Y S K C L D E K A A K E F V Q W L L D H H P S S G Q P P P S	고리 형성
69	Y X Q G T F T S D Y S K C L D E R A A K E F V Q W L L D H H P S S G Q P P P S	고리 형성
70	Y X Q G T F T S D Y S K C L D E K R A K D F V Q W L L D H H P S S G Q P P P S	고리 형성
71	Y X Q G T F T S D Y S K Y L D E R A C K D F V Q W L L D H H P S S G Q P P P S	고리 형성
72	Y X Q G T F T S D C S K Y L D E R A A K D F V Q W L L D H H P S S G Q P P P S	고리 형성
73	C A X Q G T F T S D Y S K Y L D E C R A K E F V Q W L L D H H P S S G Q P P P S	고리 형성
74	C A X Q G T F T S D Y S K C L D E K R A K E F V Q W L L D H H P S S G Q P P P S	고리 형성
75	Y X Q G T F T S D Y S K Y L D E K A A K E F V Q W L L D H H P S S G Q P P P S C	고리 형성
76	Y X Q G T F T S D Y S K Y L D E K R A K D F V Q W L L D H H P S S G Q P P P S C	고리 형성
77	Y X Q G T F T S D Y S K Y L D E K A A K D F V Q W L L D H H P S S G Q P P P S C	고리 형성
78	H X Q G T F T S D Y S K Y L D E K R Q K E F V Q W L L D T K C	고리 형성
79	H X E G T F T S D Y S I A M D E I H Q K D F V N W L L A Q K C	고리 형성
80	H X E G T F T S D Y S I A M D E I H Q K D F V D W L L A E K C	고리 형성
81	C A X Q G T F T S D Y S K Y L D E K R Q K E F V Q W L L N T C	고리 형성
82	C A X Q G T F T S D Y S K Y L D E K R Q K E F V Q W L L D T C	고리 형성
83	C A X E G T F T S D Y S I A M D E I H Q K D F V N W L L A Q C	고리 형성
84	C A X E G T F T S D Y S I A M D E I H Q K D F V D W L L	고리

	A E C	형성
85	C A X Q G T F T S D Y S I A M D E I H Q K D F V N W L L A Q C	고리 형성
86	C A X Q G T F T S D Y S K Y L D E K R Q K E F V N W L L A Q C	고리 형성
87	C A X Q G T F T S D Y S I A M D E I H Q K D F V N W L L N T C	고리 형성
88	C A X Q G T F T S D Y S K Y L D E K R Q K E F V Q W L L N T K C	고리 형성
89	C A X Q G T F T S D Y S K Y L D E K R Q K E F V Q W L L D T K C	고리 형성
90	C A X E G T F T S D Y S I A M D E I H Q K D F V N W L L A Q K C	고리 형성
91	C A X E G T F T S D Y S I A M D E I H Q K D F V D W L L A E K C	고리 형성
92	C A X Q G T F T S D Y S I A M D E I H Q K D F V N W L L A Q K C	고리 형성
93	C A X Q G T F T S D Y S K Y L D E K R Q K E F V N W L L A Q K C	고리 형성
94	C A X Q G T F T S D Y S I A M D E I H Q K D F V N W L L N T K C	고리 형성
95	Y X Q G T F T S D Y S K Y L D E K R A K E F V Q W L L C H H P S S G Q P P P S	고리 형성
96	Y X Q G T F T S D Y S K Y L D E K R A K E F V Q W L L D H C P S S G Q P P P S	고리 형성
97	Y X Q G T F T S D Y S K Y L D E K R A K E F V Q W L L D C H P S S G Q P P P S	고리 형성
98	Y X Q G T F T S D Y S K A L D E K A A K E F V N W L L D H H P S S G Q P P P S C	고리 형성
99	Y X Q G T F T S D Y S K A L D E K A A K D F V N W L L D H H P S S G Q P P P S C	고리 형성
100	Y X Q G T F T S D Y S K A L D E K A A K E F V Q W L L D Q H P S S G Q P P P S C	고리 형성
101	Y X Q G T F T S D Y S K A L D E K A A K E F V N W L L	고리

	D Q H P S S G Q P P P S C	형성
102	Y X Q G T F T S D Y S K A L D E K A A K D F V N W L L D Q H P S S G Q P P P S C	고리 형성

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

[521]

[522] **실시예 2: 삼중 활성체의 지속형 결합체 제조**

[523]

[524] 양 말단에 각각 말레이미드기 및 알데히드기를 가지는 10 kDa의 PEG, 즉 말레이미드-PEG-알데히드 (10kDa, NOF, 일본)를 실시예 1의 삼중활성체 (서열번호 21, 22, 42, 43, 50, 77, 및 96)의 시스테인 잔기에 페길화시키기 위하여, 삼중활성체와 말레이미드-PEG-알데히드의 몰비를 1 : 1 내지 3, 단백질의 농도를 1 내지 5 ㎎/㎖로 하여 저온에서 0.5 내지 3 시간 동안 반응시켰다. 이때, 반응은 50 mM Tris 완충액(pH 7.5)에 20 내지 60% 아이소프로판올이 첨가된 환경 하에서 수행되었다. 반응이 종료된 후, 상기 반응액을 SP 세파로스 HP(GE healthcare, 미국)에 적용하여 시스테인에 모노-페길화된 삼중활성체를 정제하였다.

[525] 다음으로, 상기 정제된 모노-페길화된 삼중활성체와 면역글로불린 Fc(서열번호 139의 동종이합체)를 몰 비 1 : 1 내지 5, 단백질의 농도 10 내지 50 ㎎/㎖로 하여 4 내지 8℃에서 12 내지 18시간 동안 반응시켰다. 반응은 100 mM 인산칼륨 완충액 (pH 6.0)에 환원제인 10 내지 50 mM 소디움 시아노보로하이드라이드와 10 내지 30 % 아이소프로판올이 첨가된 환경 하에서 수행되었다. 반응이 종료된 후, 상기 반응액을 부틸 세파로스 FF 정제 컬럼(GE healthcare, 미국)과 Source ISO 정제 컬럼(GE healthcare, 미국)에 적용하여, 삼중활성체와 면역글로불린 Fc를 포함하는 결합체를 정제하였다. 정제된 이 지속형 결합체는 분자 내에서 삼중활성체 펩타이드, 폴리에틸렌 글리콜(PEG) 링커와 Fc 이합체가 1:1:1의 몰 비로 공유결합 연결된 구조이며, PEG 링커는 Fc 이합체의 두 폴리펩타이드 사슬 중 한 사슬에만 연결되어 있다.

[526] 한편, 상기 면역글로불린 Fc는 서열번호 139의 아미노산 서열 (221개의 아미노산으로 구성됨)을 갖는 단량체 2개가 각 단량체의 3번 아미노산인 시스테인 사이에 이황화 결합을 통해 동종이합체를 형성하고, 상기 동종이합체의 단량체는 각각 독립적으로 35번 및 95번의 시스테인 간의 내부의 이황화 결합 및 141번 및 199번의 시스테인 간의 내부의 이황화 결합이 형성된 것이다.

[527] 제조 후 역상 크로마토그래피, 크기배제 크로마토그래피 및 이온교환

크로마토그래피로 분석한 순도는 95 % 이상이었다.

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

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

[530] 여기서, 서열번호 42의 삼중활성체 및 면역글로불린 Fc가 PEG를 통하여 연결된 결합체를, '서열번호 42와 면역글로불린 Fc를 포함하는 결합체' 혹은 '서열번호 42의 지속형 결합체'로 명명하였고, 이들은 본원에서 혼용되어 사용될 수 있다.

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

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

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

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

[535]

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

[537]

[538] 상기 실시예 1 및 2에서 제조된 삼중활성체와 이의 지속형 결합체의 활성을 측정하기 위해 GLP-1 수용체, 글루카곤(GCG) 수용체, 및 GIP 수용체가 각각 형질전환된 세포주를 이용하여 *in vitro*에서 세포 활성을 측정하는 방법을 이용하였다.

[539]

[540] 상기 각 세포주는 CHO (chinese hamster ovary)에 인간 GLP-1 수용체, 인간 GCG

수용체 및 인간 GIP 수용체 유전자를 각각 발현하도록 형질 전환된 것으로서, GLP-1, GCG 및 GIP의 활성을 측정하기에 적합하다. 따라서, 각 부분에 대한 활성을 각각의 형질 전환 세포주를 이용하여 측정하였다.

[541]

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

[543]

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

[545]

[546] 상기 실시예 1과 2에서 제조된 삼중활성체와 이의 지속형 결합체의 GIP 활성 측정을 위해 인간 GIP을 50 nM 부터 4배씩 0.000048 nM까지 연속적으로 희석하고, 상기 실시예 1과 2에서 제조된 삼중활성체와 이의 지속형 결합체를 400 nM 부터 4배씩 0.00038 nM까지 연속적으로 희석하였다. 상기 배양된 인간 GIP 수용체가 발현된 CHO 세포에서 배양액을 제거하고 연속적으로 희석된 각 물질들을 5㎕씩 상기 세포에 첨가한 다음, cAMP 항체가 포함된 완충액을 5㎕씩 추가 한 뒤 15분 동안 상온에서 배양하였다. 그런 다음 세포용해완충액(cell lysis buffer)이 포함된 detection mix를 10㎕씩 가하여 세포를 용해시키고, 90분 동안 상온에서 반응시켰다. 상기 반응이 완료된 세포용해물을 LANCE cAMP kit

(PerkinElmer, USA)에 적용하여 축적된 cAMP를 통해 EC_{50}값을 산출한 후, 상호 비교하였다. 인간 GIP 대비 상대 역가는 하기 표 2와 표 3에 나타내었다.

[547]

[548] [표2]

삼중활성체의 상대적 역가 비율

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

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

59	40.3	<0.1	4.0
60	106.2	<0.1	8.2
61	59.8	<0.1	2.8
62	5.2	<0.1	<0.1
63	15.3	<0.1	<0.1
64	64.6	60.1	92.9
65	95.4	25.2	11.6
66	15.8	172	17.2
67	28.5	46.2	39.8
68	27.9	8.8	107
69	24.3	9.6	62.8
70	15.1	71.3	64.4
71	90.1	12.7	94.7
72	11.5	1.0	1.6
73	22.6	5.4	3.0
74	12.9	0.9	1.0
75	35.1	8.5	18.0
76	10.3	47.6	11.7
77	38.7	12.2	35.5
78	51.0	14.0	0.12
79	41.5	4.9	1.4
80	8.1	0.0	0.1
81	7.8	0.3	<0.1
82	9.5	1.1	<0.1
83	47.3	1.3	0.4
84	4.2	<0.1	<0.1
85	4.3	<0.1	0.3
86	28.4	0.4	0.2
87	0.9	<0.1	<0.1
88	9.6	0.3	<0.1
89	7.1	0.7	<0.1

90	7.4	<0.1	<0.1
91	31.9	16.8	0.3
92	0.8	<0.1	0.4
93	5.7	0.3	0.7
94	0.5	<0.1	<0.1
95	2.1	0.4	<0.1
96	34.4	194.8	5.2
97	10.5	62.8	2.6
98	28.1	8.2	47.1
99	20.9	14.9	57.7
100	42.2	12.7	118.5
101	23.2	13.9	40.1
102	23.3	29.5	58.0

[549] [표3]

삼중활성체 지속형 결합체의 상대적 역가 비율

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

[550] 상기에서 제조한 신규한 삼중활성체 지속형 결합체는 GLP-1 수용체, GIP 수용체 및 글루카곤 수용체를 모두 활성화시킬 수 있는 삼중 활성체로 기능을 가지는 바, 폐 질환의 치료제 물질로 이용될 수 있다.

[551]

[552] **실험예 2: 삼중 활성체 지속형 결합체의** 폐에서의 염증 개선 효과 확인

[553]

[554] 상기 실시예에서 제조된 본 발명에 따른 삼중 활성체 지속형 결합체가 폐에서의 염증 개선 효과를 나타내는지 엘라스타제(elastase, ELA)가 투여된

마우스를 이용하여 확인하였다.

[555]

[556] 구체적으로, C57BL/6 마우스(ORIENT Bio, Busan, Korea)에 ELA 0.2U/마리를 처리한 마우스를 부형제 대조군, 서열번호 42의 지속형 결합체(이하, 삼중활성체 지속형 결합체; 6.5 nmol/kg, Q2D, 피하) 투여군, 항염증제이자 COPD 치료제인 로플루밀라스트(roflumilast)(10 mg/kg, QD, 경구) 투여군으로 나누었고, 3주간 반복투여를 진행하였다. 이후 부형제, 삼중활성체 지속형 결합체 및 로플루밀라스트 투여에 따른 폐 조직 내 염증성 사이토카인의 발현 변화 정도를 qPCR을 통해 확인하였다. 통계 처리는 1원 ANOVA를 사용하여 삼중활성체 지속형 결합체의 효능을 평가하였다(* ~ **p<0 .05 ~ 0.01).

[557]

[558] 그 결과, 삼중활성체 지속형 결합체 반복투여 시, 부형제 대조군 및 로플루밀라스트 투여군 대비, 폐 조직 내 IL-1β, IL-6, IL-12, 그리고 TNF-α 발현이 유의적 및 동등이상으로 각각 감소되었음을 확인하였다(도 1).

[559]

[560] 이를 통해 본 발명의 삼중활성체 지속형 결합체가 폐에서의 염증을 억제하고 개선하는 효과를 갖는 사실을 확인하였다.

[561]

[562] **실험예 3: 삼중 활성체 지속형 결합체의** 폐기종 및 만성 폐쇄성 폐질환 치료 효과 확인

[563]

[564] 본 발명자들은 삼중활성체 지속형 결합체가 대표적인 폐질환이자, 폐 염증에 의한 질환인 폐기종과 만성 폐쇄성 폐질환(COPD)의 치료 효과를 *in vivo*에서 나타낼 수 있는지 확인하고자 하였다.

[565]

[566] 이를 위해, 엘라스타제의 기관내 (intratracheal) 투여로 폐 조직을 손상시켜 만성 폐쇄성 폐질환이 유발된 동물 모델을 사용하였다. 구체적으로, C57BL/6 마우스(ORIENT Bio, Busan, Korea)에 엘라스타제를 0.2U/마리로 처리한 COPD 마우스를 부형제 대조군, 삼중 활성체 지속형 결합체 (6.5 nmol/kg, Q2D, 피하) 투여군, 로플루밀라스트 (10 mg/kg, QD, 경구) 투여군으로 나누었고, 3주간 반복투여를 진행하였다. 3주 반복투여 후 부검으로 각 마우스의 폐조직을 취하였고, H&E staining을 통해 폐 조직의 폐기종 정도를 평가하였다.

[567]

[568] 그 결과, 삼중 활성체 지속형 결합체를 반복투여 시, 부형제 대조군 및 COPD 치료제로 알려진 로플루밀라스트 투여군 대비, 우수한 폐기종 개선효능을 확인할 수 있었다 (* ~ **p<0 .05 ~ 0.01) (도 2).

[569]

[570] 이를 통해 본 발명의 삼중 활성체 지속형 결합체는 폐 조직 내 염증 및 폐기종

개선 효과를 나타내며, 이를 통해 만성 폐쇄성 폐질환에 대해 우수한 치료 효능을 갖는 것을 확인하였다.

[571]

[572] **실험예 4: 삼중 활성체 지속형 결합체의 폐 섬유화 개선 효과 확인**

[573]

[574] 상기 실시예에서 확인한 폐 조직 내 염증 개선 효과에 더해, 본 발명에 따른 삼중활성체 지속형 결합체가 폐섬유화 개선 효과도 갖는지 확인하고자 하였다. 이에, 폐섬유화 과정에 중요하다고 알려져 있는 폐섬유아세포(lung fibroblast)의 근섬유아세포(myofibroblast)로의 분화 및 폐포상피세포(alveolar epithelial cell)의 상피간엽이행(epithelial mesenchymal transition, EMT)에 미치는 영향을 확인하고자 폐섬유아세포인 MRC5 세포주와 폐포 상피세포인 A549 세포주를 사용하였다.

[575]

[576] 실험예 4-1: 폐섬유아세포의 근섬유아세포 분화 억제 효과 확인

[577] 먼저, 폐섬유아세포인 MRC5 세포를 부형제(vehicle) 처리군과 삼중활성체 지속형 결합체 처리군으로 나누고, 근섬유아세포로의 분화를 유도하기 위해 TGF-β1을 동시 처리 하였다. 음성 대조군으로는 TGF-β1 및 삼중활성체 지속형 결합체를 모두 처리하지 않은 군을 사용하였다.

[578]

[579] 48 ~ 72시간 동시처리 후, 각각의 군에서 근섬유아세포 분화 마커인 α-SMA, collagen1α1, 및 피브로넥틴(fibronectin)의 발현 정도를 정량적(quantitative) PCR을 통해 확인하였다. 통계 처리는 1원 ANOVA를 사용하여 삼중 활성체 지속형 결합체의 효능을 평가하였다. (* ~ ** p <0 .05 ~ 0.01)

[580]

[581] 그 결과, 삼중 활성체 지속형 결합체를 TGF-β1과 동시 처리 시, 근섬유아세포 분화 마커의 발현이 부형제 처리 군 대비 감소한 것을 확인하였다 (도 3).

[582]

[583] 실험예 4-2: 폐포상피세포의 상피간엽이행(EMT) 억제 효과 확인

[584] 다음으로, A549 세포를 부형제 처리군과 삼중활성체 지속형 결합체 처리군으로 나누어 전처리한 후, TGF-β1 및 LPS를 순차적으로 처리하여 EMT를 유도하였다. 음성 대조군으로는 삼중활성체 지속형 결합체, TGF-β1, 및 LPS를 모두 처리하지 않은 군을 사용하였다.

[585]

[586] 48시간 후, 각각의 군에서 EMT 마커인 collagen1α1 및 collagen3α1의 발현 정도를 정량적 PCR을 통해 확인하였다. 통계 처리는 1원 ANOVA를 사용하여 삼중 활성체 지속형 결합체의 효능을 평가하였다. (* ~ *** p <0 .05 ~ 0.001)

[587]

[588] 그 결과, 삼중 활성체 지속형 결합체 전처리 시, 폐포 상피세포의 EMT 마커

발현이 부형제 처리 군 대비 유의적으로 감소한 것을 확인하였다 (도 4).

[589]

[590] 실험예 4-3: 섬유화 개선의 *in vivo* 효과 확인

[591] 상기 실시예에서 제조된 삼중활성체 지속형 결합체의 폐섬유증, 특히 대표적 폐섬유증인 특발성 폐섬유증 (IPF) 개선효능을 *in vivo* 에서 확인코자, 블레오마이신(bleomycin, BLM) 마우스를 사용하였다. 블레오마이신은 기관내 투여 시 폐포 상피세포의 DNA를 손상시킴으로써 상피 간엽 이행(epithelial-mesenchymal transition)이 발생하여, 특발성 섬유화가 유도되는 것으로 알려져 있다. 또한 BLM 처리 용량을 일정수준 이상으로 증량 시, 특발성 섬유화에 따른 심각한 폐손상으로 해당마우스의 생존률이 저하된다고 알려져 있다.

[592]

[593] 이에, BLM을 처리한 마우스에서 삼중활성체 지속형 결합체의 폐섬유화 개선 효과를 확인하고, 더 나아가 폐섬유화 개선을 통해 생존률을 높일 수 있는지 확인하였다.

[594]

[595] C57BL/6 마우스(ORIENT Bio, Busan, Korea)에 BLM 1.5U/head를 처리한 IPF 마우스를 부형제 대조군, 삼중 활성체 지속형 결합체 (3.9 nmol/kg, Q2D, 피하) 투여군, 피르페니돈(pirfenidone; 300 mg/kg, QD, 경구) 투여군, 암브록솔(ambroxol; 45 mg/kg, BID, 복강) 투여군으로 나누었고, 2주간 반복투여를 진행하였다. 2주 반복투여 후 부검으로 각 마우스의 폐조직을 취하였고, 폐조직 내 섬유화 정도를 masson trichrome staining으로 평가하였다. 통계 처리는 1원 ANOVA를 사용하여 삼중활성체 지속형 결합체의 효능을 평가하였다 (* ~ ***p<0 .05 ~ 0.001)

[596]

[597] 그 결과, 삼중 활성체 지속형 결합체를 반복투여 시, 부형제 대조군 및 IPF 치료제로 알려진 피르페니돈 투여군 대비, 우수한 폐 조직내 masson trichrome staining positive area 감소효능을 확인할 수 있었다 (* ~ ***p<0 .05 ~ 0.001). 또한, 진해 거담 제거제로 알려진 암브록솔의 경우, 삼중 활성체의 지속형 결합체와 동등한 수준의 효능을 보임을 확인하였다 (도 5)

[598]

[599] 또한, C57BL/6 마우스(ORIENT Bio, Busan, Korea)에 BLM 3.0U/head를 처리한 IPF 마우스를 부형제 대조군, 삼중 활성체의 지속형 결합체 (3.9 nmol/kg, Q2D, 피하) 투여군, 피르페니돈(300 mg/kg, QD, 경구) 투여군, 암보록솔(45 mg/kg, BID, 복강) 투여군으로 나누어 2주간 반복투여를 진행하였고, 반복투여 중 생존률을 확인하였다.

[600]

[601] 그 결과, 삼중 활성체의 지속형 결합체를 반복투여 시, 부형제 대조군,

피르페니돈 투여군 및 암브록솔 투여군 대비, 우수한 생존률을 보임을 확인할 수 있었다(도 6).

[602]

[603] 이를 통해 삼중 활성체의 지속형 결합체가 폐섬유증 또는 특발성 폐섬유증(IPF)에 치료 효과를 갖고, 이에 따른 생존률 개선에 효능이 있음을 확인하였다.

[604]

[605] 본 발명에 따른 삼중 활성체 지속형 결합체가 폐섬유아세포의 근섬유아세포 분화 및 폐포상피세포의 EMT를 억제함으로써 폐섬유화를 개선할 수 있음을 확인하였을 뿐만 아니라, *in vivo*에서도 폐섬유화 개선 효과를 통해 폐섬유증, 특히 특발성 폐섬유증 예방 및 치료에 효능을 나타낼 수 있음을 확인하였다.

[606]

[607] 종합하면, 상기와 같은 결과들은 본 발명의 삼중 활성체 결합체들이 효과적으로 폐 염증 및 폐섬유화 개선을 통해 관련된 폐 질환을 예방 또는 치료할 수 있음을 시사하는 것으로, 새로운 폐 질환 치료제로 제공될 수 있음을 의미한다.

[608]

[609] 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.