

명세서

발명의 명칭: 글루카곤 유도체 또는 이의 결합체의 간질환에 대한 치료적 용도

기술분야

- [1] 본 발명은 글루카곤 유도체 또는 이의 결합체의 간질환에 대한 치료적 용도에 관한 것이다.

[2]

배경기술

- [3] 간은 동물의 주요 생체 기관 중 하나로, 지질 등의 대사 작용, 해독, 담즙의 배설, 각종 영양소의 저장, 조혈이나 혈액 응고, 및 순환 혈액량의 조절 등 다양한 역할을 담당하는 기관이다. 간은 매우 다양한 대량의 생화학적 작용을 조절하므로, 생명 유지를 위해 필수적이다. 이러한 간과 관련된 질환으로는 대표적으로 단순지방증, 간 섬유증, 간염증, 간경변, 간부전, 간암, 담즙정체성 간질환 등을 들 수 있다.

[4]

- [5] 지방의 과도한 섭취나 내인적으로 간내 지방 합성이 증가하거나 배출이 감소되어 간 세포 내에 지방이 축적되는 지방간의 일종인, 단순지방증은 염증을 유발하여 비알코올성 지방간염과 같은 다른 간 질환으로 진행되는 양상을 보일 수 있다.

- [6] 일반적으로 간에 염증이 생기는 간염이 간 질환의 대부분을 차지하며, 간염증이 진행되면서 다양한 간질환(간섬유증, 경변 등)이 나타나는 것으로 알려져 있다. 간염증의 양상에 따라 급성 간염과 만성 간염, 원인에 따라 바이러스성 간염, 알코올성 간염, 약물성 간염 등으로 나눌 수 있다. 담즙정체성 간질환(cholestasis liver disease) 역시 염증성 질환이 원인이 되어, 발생하는 것으로 추정되고 있다.

- [7] 다른 간질환으로는 간섬유증, 간경변, 간부전, 간암 등이 있으며, 이와 같은 간질환은 초기에 자각 증상이 없어 상당히 진행되어서야 발견되기 때문에, 국내뿐만 아니라 세계적으로 사망 원인의 수위를 차지하고 있어 약물 개발의 필요성이 높다.

- [8] 간 질환의 주요원인으로 알려진 간 염증은 다양한 유전적 및 환경적 요인으로 간 상주 대식세포 (liver resident macrophage)인 쿠퍼 세포 (kupffer cell)가 활성화되어 발생한다. 활성화된 쿠퍼 세포는 다양한 염증성 사이토카인을 분비하여 간 염증을 유발할 뿐만 아니라 케모카인을 혈중으로 분비하여 혈중 단핵구 세포 및 호중구를 포함하는 다양한 면역세포를 간으로 유도 (recruit) 함으로써 간 염증을 지속시킬 수 있다. 이러한 지속적인 간 염증은 간조직의 손상을 야기하는데, 이는 간 염증을 더욱 심화시킨다고 알려져있다. 이러한

악순환은 궁극적으로 간성상세포 (hepatic stellate cell)의 활성화를 유발함으로써 간 섬유화까지 유발한다고 알려져있다. 이러한 간 섬유화를 포함한, 다양한 간질환의 원인이 되는 간 염증을 치료코자 현재는 그 원인을 제거하는 요법이나 대증요법을 주로 수행하지만, 간염증은 상당히 진행되어서야 그 증상이 발견되기 때문에 예방 또는 대증요법만으로는 질환의 진행을 조절하기가 상당히 어렵다. 때문에 간염증에 직접적으로 작용할 수 있는 치료약물 개발의 필요성이 여전히 높은 실정이다.

- [9] 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. 뿐만 아니라, 글루카곤은 혈당 상승효과 이외에 식욕억제, 지방조직에서의 에너지 대사 (energy expenditure) 증가, 그리고 간조직에서의 지질 대사개선을 촉진하여 비만을 포함한 대사증후군의 치료제가 될 수 있음이 최근까지 제안되었다. 그러나, 글루카곤은 낮은 용해도와 중성 pH에서의 침전으로 인해 치료제로서 그 사용이 제한되어 왔다.

- [10] 따라서 물성이 개선된 글루카곤 유도체가 개발되어, 대사증후군 등의 치료에 이용되어 왔다(US 2017-0360892).

[11]

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [12] 효과적인 간질환의 예방 및 치료를 위한 약물의 개발이 요구된다.

[13]

기술적 해결방법

- [14] 본 발명의 하나의 목적은 일반식 1의 펩타이드 또는 이를 포함하는 결합체를 포함하는 조성물, 구체적으로 간질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공하는 것이다.

- [15] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 일반식 1의 펩타이드 또는 이를 포함하는 결합체, 또는 이를 포함하는 조성물을 이를 필요로 하는 개체에 투여하는 단계를 포함하는, 간질환의 예방 또는 치료 방법을 제공하는 것이다.

- [16] 본 발명의 또 다른 목적은 간질환의 예방 또는 치료를 위한 약제의 제조에 있어서 상기 일반식 1의 펩타이드 또는 이를 포함하는 결합체, 또는 이를 포함하는 조성물의 용도를 제공하는 것이다.

- [17] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 일반식 1의 펩타이드 또는 이를 포함하는 결합체, 또는 이를 포함하는 조성물의 간질환의 예방 또는 치료 용도를 제공하는 것이다.

- [18] 본 발명의 또 다른 목적은 서열번호 20, 22, 33, 37, 및 38 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하는 펩타이드 또는 이를 포함하는 결합체를 포함하는

간질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공하는 것이다.

- [19] 본 발명의 또 다른 목적은 서열번호 20, 22, 33, 37, 및 38 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하는 펩타이드 또는 이를 포함하는 결합체 또는 이를 포함하는 조성물을 이를 필요로 하는 개체에 투여하는 단계를 포함하는, 간질환의 예방 또는 치료 방법을 제공하는 것이다.
- [20] 본 발명의 또 다른 목적은 간질환의 예방 또는 치료를 위한 약제의 제조에 있어서 서열번호 20, 22, 33, 37, 및 38 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하는 펩타이드 또는 이를 포함하는 결합체 또는 이를 포함하는 조성물의 용도를 제공하는 것이다.
- [21] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 서열번호 20, 22, 33, 37, 및 38 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하는 펩타이드 또는 이를 포함하는 결합체, 또는 이를 포함하는 조성물의 간질환의 예방 또는 치료 용도를 제공하는 것이다.

[22]

발명의 효과

- [23] 본 발명에 따른 글루카곤 수용체에 대한 활성을 갖는 펩타이드 또는 이의 결합체는 간질환의 예방 또는 치료에 유용하게 사용할 수 있다.

[24]

도면의 간단한 설명

- [25] 도 1은 본 발명에 따른 서열번호 37의 글루카곤 유도체의 지속형 결합체의 간염증에 대한 효과를 확인한 도이다.
- [26] 도 2는 본 발명에 따른 서열번호 37의 글루카곤 유도체의 지속형 결합체의 간섬유증에 대한 효과를 확인한 도이다.
- [27] 도 3은 본 발명에 따른 서열번호 37의 글루카곤 유도체의 지속형 결합체의 간 내 중성지방 감소 효과를 확인한 도이다.

[28]

발명의 실시를 위한 최선의 형태

- [29] 본 발명을 구현하는 하나의 양태는 펩타이드 또는 이를 포함하는 결합체를 포함하는 조성물, 구체적으로 간질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물이다.
- [30] 하나의 구체예에서, 본 발명은 간질환의 예방 또는 치료를 위한 약학적 조성물로서, 약학적으로 허용되는 부형제와 하기 일반식 1의 아미노산 서열을 포함하는 펩타이드를 약학적 유효량으로 포함하는 약학적 조성물에 관한 것이다:
- [31] Y-X2-QGTF-X7-SDYSKY-X14-D-X16-X17-R-X19-X20-X21-FVQWLMNT-X30
(일반식 1, 서열번호: 46)
- [32] X2는 Aib(aminoisobutyric acid)이고;
- [33] X7은 트레오닌(T), 발린(V) 또는 시스테인(C)이고;
- [34] X14는 류신(L) 또는 시스테인(C)이고;

- [35] X16은 글루탐산(E), 또는 세린(S) 이고;
- [36] X17은 리신(K), 아르기닌(R), 또는 시스테인(C)이며;
- [37] X19는 알라닌(A), 또는 시스테인(C)이며;
- [38] X20은 리신(K), 또는 글루타민(Q)이며;
- [39] X21은 아스파르트산(D), 또는 글루탐산(E)이며;
- [40] X30은 시스테인(C)이거나, 부존제함
- [41] (단, 상기 일반식 1의 아미노산 서열이 서열번호: 1 또는 서열번호: 12와 동일한 경우는 제외함).
- [42] 다른 구체예로서, 상기 펩타이드는 지속형 결합체의 형태이고, 상기 지속형 결합체는 하기 화학식 1로 표시되는 약학적 조성물인 것을 특징으로 한다:
- [43] [화학식 1]
- [44] X - L - F
- [45] 단 이 때 X는 상기 일반식 1의 아미노산 서열을 포함하는 펩타이드이고;
- [46] L은 에틸렌글리콜 반복 단위를 함유하는 링커이며,
- [47] F는 면역글로불린 Fc 영역이고,
- [48] -는 X와 L 사이, L과 F 사이의 공유결합 연결을 나타낸다.
- [49] 앞선 구체예 중 어느 하나에 따른 조성물로서, 상기 간질환은
단순지방증(steatosis), 간 섬유증 (liver fibrosis), 간 염증(liver inflammation),
간경변(liver cirrhosis), 간부전 (liver decompensation), 간암(hepatocellular
carcinoma), 및 담즙정체성 간질환(cholestasis liver disease)으로 이루어진 군에서
선택되는 어느 하나인 것을 특징으로 한다.
- [50] 앞선 구체예 중 어느 하나에 따른 조성물로서, 상기 담즙정체성 간질환은
원발성 담즙성 경변증 (Primary biliary cirrhosis), 원발성 경화성 담관염(primary
sclerosing cholangitis) 및 이들의 조합으로 이루어진 군에서 선택되는 어느
하나인 것을 특징으로 한다.
- [51] 앞선 구체예 중 어느 하나에 따른 조성물로서, 상기 간질환은
비알코올성지방간염(non-alcoholic steatohepatitis, NASH)으로 인한 것이거나,
또는 동반하는 것을 특징으로 하나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [52] 앞선 구체예 중 어느 하나에 따른 조성물로서, 상기 펩타이드는 서열번호 20,
22, 23, 27, 33, 35, 37, 38, 40, 41, 42, 및 44로 이루어진 군에서 선택되는 아미노산
서열을 포함하는 것을 특징으로 한다.
- [53] 앞선 구체예 중 어느 하나에 따른 조성물로서, 상기 펩타이드는 서열번호 20,
22, 23, 27, 33, 37, 38, 및 44로 이루어진 군에서 선택되는 아미노산 서열을
포함하는 것을 특징으로 한다.
- [54] 앞선 구체예 중 어느 하나에 따른 조성물로서, 상기 약학적 조성물은 투여시
투여받은 개체에서 간염증 점수(liver inflammation score)를 감소시키는 것을
특징으로 한다.
- [55] 앞선 구체예 중 어느 하나에 따른 조성물로서, 상기 약학적 조성물은 투여시

투여받은 개체에서 하이드록시프롤린 함량을 감소시키는 것을 특징으로 한다.

[56] 앞선 구체예 중 어느 하나에 따른 조성물로서, 상기 약학적 조성물은 투여시 투여받은 개체에서 간 조직 내 중성 지방 함량을 감소시키는 것을 특징으로 한다.

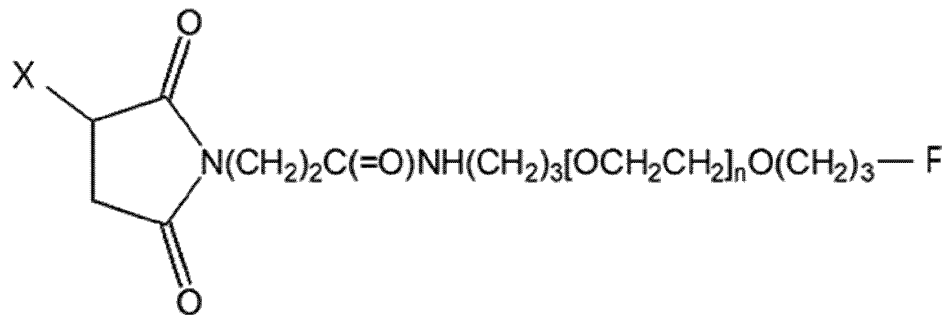
[57] 앞선 구체예 중 어느 하나에 따른 조성물로서, 상기 펩타이드의 C-말단이 아미드화된 것을 특징으로 한다.

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

[59] 앞선 구체예 중 어느 하나에 따른 조성물로서, 상기 화학식 1의 구조는 하기 화학식 3의 구조인 것을 특징으로 한다:

[60] [화학식 3]

[61]



[62] 여기서, X 및 F는 화학식 1에서 정의한 바와 같다.

[63] 앞선 구체예 중 어느 하나에 따른 조성물로서, 상기 에틸렌글리콜 반복 단위는 $[\text{OCH}_2\text{CH}_2]_n$ 로서, n은 자연수로, 상기 펩타이드 결합체 내 $[\text{OCH}_2\text{CH}_2]_n$ 부위의 평균 분자량, 예컨대 수평균 분자량이 1 내지 100 kDa이 되도록 정해지는 것을 특징으로 한다.

[64] 앞선 구체예 중 어느 하나에 따른 조성물로서, 상기 n의 값은 상기 펩타이드 결합체 내 $[\text{OCH}_2\text{CH}_2]_n$ 부위의 평균 분자량, 예컨대 수평균 분자량이 10 kDa이 되도록 정해지는 것을 특징으로 한다.

[65] 앞선 구체예 중 어느 하나에 따른 조성물로서, 상기 X는 펩타이드 내의 시스테인의 황 원자를 통하여 연결된 것을 특징으로 한다.

[66] 앞선 구체예 중 어느 하나에 따른 조성물로서, 상기 면역글로불린 Fc 영역은 IgG4 유래인 것을 특징으로 한다.

[67] 앞선 구체예 중 어느 하나에 따른 조성물로서, 상기 F는 2개의 폴리펩타이드 사슬이 이황화결합으로 연결되어 있는 구조이며, 상기 두 사슬 중 한 사슬의 질소 원자를 통해서만 연결된 것을 특징으로 한다.

[68] 앞선 구체예 중 어느 하나에 따른 조성물로서, 상기 F는 서열번호 69의 아미노산 서열인 단량체를 포함하는 것을 특징으로 한다.

[69] 앞선 구체예 중 어느 하나에 따른 조성물로서, 상기 F는 서열번호 69의

아미노산 서열의 단량체의 동종이량체인 것을 특징으로 한다.

[70] 앞선 구체예 중 어느 하나에 따른 조성물로서, 상기 F는 그 N-말단 프롤린의 질소 원자를 통하여 연결된 것을 특징으로 한다.

[71] 앞선 구체예 중 어느 하나에 따른 조성물로서, 상기 면역글로불린 Fc 영역인 F와 X가 당쇄화되어 있지 않은 것을 특징으로 한다.

[72] 본 발명을 구현하는 다른 양태는 간 질환의 예방 또는 치료를 위한 약학적 조성물로서, 약학적으로 허용되는 부형제와 서열번호 20, 22, 33, 37, 및 38 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하는 펩타이드를 약학적 유효량으로 포함하는 약학적 조성물이다.

[73] 하나의 구체예에서, 상기 펩타이드는 지속형 결합체의 형태이고, 상기 지속형 결합체는 하기 화학식 1로 표시되는 것을 특징으로 한다:

[74] [화학식 1]

[75] X - L - F

[76] 단 이 때 X는 서열번호 20, 22, 33, 37, 및 38 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하는 펩타이드고;

[77] L은 에틸렌글리콜 반복 단위를 함유하는 링커이며,

[78] F는 면역글로불린 Fc 영역이고,

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

[80] 다른 구체예로서, 상기 간질환은 단순지방증(steatosis), 간 섬유증 (liver fibrosis), 간 염증(liver inflammation), 간경변(liver cirrhosis), 간부전 (liver decompensation), 간암(hepatocellular carcinoma), 및 담즙정체성 간질환(cholestasis liver disease)으로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나인 것을 특징으로 한다.

[81] 앞선 구체예 중 어느 하나에 따른 조성물로서, 상기 담즙정체성 간질환은 원발성 담즙성 경변증 (Primary biliary cirrhosis), 원발성 경화성 담관염(primary sclerosing cholangitis) 및 이들의 조합으로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나인 것을 특징으로 한다.

[82] 앞선 구체예 중 어느 하나에 따른 조성물로서, 상기 간질환은 비알코올성지방간염(non-alcoholic steatohepatitis, NASH)으로 인한 것이거나, 또는 동반하는 것을 특징으로 하나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[83] 본 발명을 구현하는 다른 양태는 상기 펩타이드 또는 이를 포함하는 결합체, 또는 이를 포함하는 조성물을 이를 필요로 하는 개체에게 투여하는 단계를 포함하는, 간질환의 예방 또는 치료 방법이다.

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

[85]

발명의 실시를 위한 형태

- [86] 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.
- [87] 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.
- [88] 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.
- [89]
- [90] 알라닌 A 아르기닌 R
- [91] 아스파라긴 N 아스파르트산 D
- [92] 시스테인 C 글루탐산 E
- [93] 글루타민 Q 글리신 G
- [94] 히스티딘 H 이소류신 I
- [95] 류신 L 리신 K
- [96] 메티오닌 M 페닐알라닌 F
- [97] 프롤린 P 세린 S
- [98] 트레오닌 T 트립토판 W
- [99] 티로신 Y 발린 V
- [100]
- [101] 본 명세서에서 “Aib”는 “2-아미노이소부티르산(2-aminoisobutyric acid)” 또는 “아미노이소부티르산 (aminoisobutyric acid)”으로 혼용될 수 있으며, 2-아미노이소부티르산(2-aminoisobutyric acid)과 아미노이소부티르산 (aminoisobutyric acid)은 혼용되어 사용될 수 있다.
- [102]
- [103] 본 발명을 구현하는 하나의 양태는 펩타이드 또는 이를 포함하는 결합체를 포함하는 간질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다. 상기 펩타이드는 글루카곤 수용체에 대한 활성을 갖는 펩타이드로서, 구체적으로 글루카곤 유도체일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [104]
- [105] 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.
- [106] 상기 글루카곤 유도체의 종류로서, 국제공개특허 WO 2016/108586 및 국제공개특허 WO 2017/003191에 기재된 종류를 들 수 있으며, 상기 국제공개특허의 명세서 전체는 본원에 참고자료로서 모두 포함된다. 또한, 상기 글루카곤 유도체 펩타이드의 지속형 결합체의 제조 방법은 WO 2017/003191에 기재되어 있으며, 상기 국제공개특허의 명세서 전체 역시 본원에 참고자료로서 포함되는 것은 분명하다.
- [107]
- [108] 이러한 글루카곤 유도체는 천연형 글루카곤에 대해 변화된 pI를 가져 개선된 물성을 나타내는 것일 수 있다.
- [109] 또한, 상기 글루카곤 유도체는 천연적으로 존재하지 않는(non-naturally occurring) 것일 수 있다.
- [110]
- [111] 한편, 천연형 글루카곤은 다음의 아미노산 서열을 가질 수 있다:
- [112] 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)
- [113]
- [114] 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.
- [115] 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.
- [116] 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.
- [117] 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.
- [118] 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.

[119]

[120] 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.

[121] 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.

[122] 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, 예컨대, 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.

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

[124] 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.

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

[126]

[127] 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.

[128]

- [129] 본 발명에 따른 글루카곤 유도체는 천연 글루카곤의 pI를 음전하 및 양전하를 띤 아미노산 잔기의 치환에 의해 변화시켜 연장된 작용 프로파일을 갖는 것이다.
- [130]
- [131] 본 발명에서, 상기 글루카곤 유도체는 하기 일반식 1의 아미노산 서열을 포함하는 펩타이드일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다:
- [132] Y-X2-QGTF-X7-SDYSKY-X14-D-X16-X17-R-X19-X20-X21-FVQWLMNT-X30
(일반식 1, 서열번호: 46)
- [133]
- [134] X2는 Aib(aminoisobutyric acid)이고;
- [135] X7은 트레오닌(T), 발린(V) 또는 시스테인(C)이고;
- [136] X14는 류신(L) 또는 시스테인(C)이고;
- [137] X16은 글루탐산(E), 또는 세린(S) 이고;
- [138] X17은 리신(K), 아르기닌(R), 또는 시스테인(C)이며;
- [139] X19는 알라닌(A), 또는 시스테인(C)이며;
- [140] X20은 리신(K), 또는 글루타민(Q)이며;
- [141] X21은 아스파르트산(D), 또는 글루탐산(E)이며;
- [142] X30은 시스테인(C)이거나, 부존재함
- [143] (단, 상기 일반식 1의 아미노산 서열이 서열번호: 1 또는 서열번호: 12와 동일한 경우는 제외함).
- [144]
- [145] 그 예로, 상기 펩타이드는 서열번호 20, 22, 23, 27, 33, 35, 37, 38, 40, 41, 42, 및 44로 이루어진 군에서 선택된 아미노산 서열을 포함하는 것, 구체적으로 서열번호 20, 22, 23, 27, 33, 35, 37, 38, 40, 41, 42, 및 44로 이루어진 군에서 선택된 아미노산 서열로 (필수적으로) 구성된 것 일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [146] 구체적으로, 상기 펩타이드는 서열번호 20, 22, 23, 27, 33, 37, 38, 및 44로 이루어진 군에서 선택되는 아미노산 서열을 포함하는 것, 구체적으로 서열번호 20, 22, 23, 27, 33, 37, 38, 및 44로 이루어진 군에서 선택되는 아미노산 서열로 (필수적으로) 구성된 것 일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [147]
- [148] 다른 구체예로서, 본 발명의 펩타이드는 서열번호 2 내지 45로 이루어진 군에서 선택된 아미노산 서열을 포함하는 것, 또는 서열번호 2 내지 45로 이루어진 군에서 선택된 아미노산 서열로 (필수적으로) 구성된 것 일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 또는 서열번호 2 내지 11, 13 내지 45로 이루어진 군에서 선택된 아미노산 서열을 포함하는 것, 또는 서열번호 2 내지 11, 13 내지 45로 이루어진 군에서 선택된 아미노산 서열로 (필수적으로) 구성된 것 일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [149]
- [150] 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.

- [151] 이상의 내용은 본 발명의 다른 구체에 혹은 다른 양태에도 적용될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [152]
- [153] 본 발명에서, 상기 펩타이드는 천연형 글루카곤과 서열 동일성을 비교하였을 때, 적어도 60% 이상, 65% 이상, 70% 이상, 75% 이상, 80% 이상, 85% 이상, 90% 이상, 91% 이상, 92% 이상, 93% 이상, 94% 이상, 또는 95% 이상의 서열 동일성을 가지는 것일 수 있으나, 특별히 이에 제한되는 것은 아니고, 상기 펩타이드와 천연형 글루카곤의 서열 비교를 통하여 당업자가 용이하게 파악할 수 있다.
- [154] 본 발명의 용어, "상동성(homology)"은, 야생형(wild type) 단백질의 아미노산 서열 또는 이를 코딩하는 염기 서열과의 유사한 정도를 나타내기 위한 것으로서, 본 발명의 아미노산 서열 또는 염기 서열과 상기와 같은 퍼센트 이상의 동일한 서열을 가지는 서열을 포함한다. 이러한 상동성은 두 서열을 육안으로 비교하여 결정할 수도 있으나, 비교대상이 되는 서열을 나란히 배열하여 상동성 정도를 분석해 주는 생물정보 알고리즘(bioinformatic algorithm)을 사용하여 결정할 수 있다. 상기 두 개의 아미노산 서열 사이의 상동성은 백분율로 표시할 수 있다. 유용한 자동화된 알고리즘은 Wisconsin Genetics Software Package (Genetics Computer Group, Madison, W, USA)의 GAP, BESTFIT, FASTA와 TFASTA 컴퓨터 소프트웨어 모듈에서 이용가능하다. 상기 모듈에서 자동화된 배열 알고리즘은 Needleman & Wunsch와 Pearson & Lipman과 Smith & Waterman 서열 배열 알고리즘을 포함한다. 다른 유용한 배열에 대한 알고리즘과 상동성 결정은 FASTP, BLAST, BLAST2, PSIBLAST와 CLUSTAL W를 포함하는 소프트웨어에서 자동화되어 있다.
- [155]
- [156] 또한, 본 발명에서, 상기 펩타이드는 글루카곤 수용체에 대한 활성을 나타내는 펩타이드 또는 글루카곤 유도체일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [157] 특별히 이에 제한되는 것은 아니나, 상기 글루카곤 수용체에 대해 유의한 수준의 활성을 가지는 펩타이드는 글루카곤 수용체에 대해 *in vitro* 활성이 천연형 리간드 (천연형 글루카곤) 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 활성을 나타내는 범위는 제한 없이 포함된다. 이러한 펩타이드의 *in vitro* 활성을 측정하는 방법은 본원

- 명세서의 실시예 4를 참조할 수 있으나, 특별히 이에 제한되는 것은 아니다.
- [158] 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.
- [159] 특별히 이에 제한되는 것은 아니나, 이러한 상기 펩타이드는 비자연적으로 발생된 (non-naturally occurring) 것일 수 있다.
- [160]
- [161] 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.
- [162] 상기 고리의 비제한적인 예로 락탐 가교 (또는 락탐 고리)를 포함할 수 있다.
- [163] 또한, 상기 글루카곤 유도체는 고리를 포함하도록, 목적하는 위치에 고리를 형성할 수 있는 아미노산을 포함하도록 변형된 것을 모두 포함한다.
- [164] 이러한 고리는 상기 글루카곤 유도체 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.
- [165] 예컨대, 상기 일반식 1의 아미노산 서열을 포함하는 펩타이드는 일반식 1의 X10과 X14, X12와 X16, X16과 X20, X17과 X21, X20과 X24, 및 X24와 X28의 아미노산 쌍에서, 각 아미노산 쌍의 아미노산이 각각 글루탐산 또는 리신으로 치환된 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 상기, X_n (n은 자연수)에서 n은 제시된 아미노산 서열의 N-말단으로부터의 아미노산 위치를 나타낸다.
- [166] 또한, 상기 일반식 1의 아미노산 서열을 포함하는 펩타이드는 X12와 X16의 아미노산 쌍, X16과 X20의 아미노산 쌍, 또는 X17과 X21의 아미노산 쌍의 아미노산 각각이 고리를 형성할 수 있는 글루탐산 또는 리신으로 치환된 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [167] 또한, 상기 일반식 1에서, X10과 X14, X12와 X16, X16과 X20, X17과 X21, X20과 X24, 및 X24와 X28의 아미노산 쌍 중 적어도 하나의 아미노산 쌍에서 각 아미노산 쌍의 각각의 아미노산 간에 고리 (예컨대, 락탐 고리)를 형성한 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [168] 또한, 상기 일반식 1에서, X16이 글루탐산이고, X20은 리신이며, X16과 X20의 측쇄가 락탐 고리를 형성하고 있는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [169]
- [170] 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.

- [171] 또는 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.
- [172] 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.
- [173] 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.
- [174] 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.
- [175] 또한, 본 발명에서 사용된 용어 "용매화물"은 본 발명에 따른 펩타이드, 결합체, 또는 이의 염이 용매 분자와 복합체를 형성한 것을 말한다.
- [176]
- [177] 본 발명에 따른 펩타이드의 C-말단은 아미드화되거나 또는 자유 카르복실기 (-COOH)를 갖는 펩타이드이거나, 또는 C-말단이 변형되지 않은 펩타이드를 포함하는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [178] 하나의 구체예로, 상기 펩타이드는 C-말단이 아미드화되어 있는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [179] 하나의 구체예로, 상기 펩타이드는 비당쇄화된 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [180]
- [181] 본 발명의 펩타이드는 Solid phase 합성법을 통하여 합성될 수 있으며, 재조합

방법으로도 생산 가능하고, 상업적으로 의뢰하여 제조할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[182]

[183] 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.

[184] 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:

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

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

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

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

[189] 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.

[190]

[191] 보다 구체적인 양태로서, 본 발명에 따른 펩타이드, 혹은 글루카곤 유도체는 이의 생체 내 반감기를 증가시키는 생체적합성 물질부에 결합된, 지속형 결합체의 형태일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 상기 생체적합성 물질부는 캐리어와 혼용될 수 있다.

[192] 본 발명에서 용어, "지속형 결합체"는 생리활성물질 (예, 글루카곤 유도체)에 생체적합성 물질부 또는 캐리어가 결합된 형태로서, 구체적으로, 상기 결합체는 펩타이드 부위 및 상기 펩타이드 부위에 공유결합으로 연결된 생체적합성 물질부를 포함하며, 상기 펩타이드 부위는 상기 일반식 1의 아미노산 서열 또는 서열번호 2 내지 11, 및 13 내지 45와 동일한 서열이거나 이를 포함하는 서열일 수 있다. 상기 지속형 결합체에서 생체적합성 물질부 또는 캐리어는

생리활성물질에 공유결합으로 연결된 것일 수 있으나, 특별히 이에 제한되지 않는다.

[193]

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

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

[196]

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

[198] 하나의 구체예로, 상기 면역글로불린 Fc 영역과 X는 당쇄화되어 있지 않을 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[199]

[200] 본 발명의 하나의 구체예에서, 상기 지속형 결합체는 하기 화학식 1로 표시되는, 결합체일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다:

[201] [화학식 1]

[202] X - L - F

[203] 단 이 때 X는 상기 펩타이드이고;

[204] L은 에틸렌글리콜 반복 단위를 함유하는 링커이며,

[205] F는 면역글로불린 Fc 영역이고,

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

[207]

[208] 상기 화학식 1의 지속형 결합체의 X는 상술한 글루카곤 유도체일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[209] 구체적으로, 상기 X는 일반식 1의 아미노산 서열을 포함하는 펩타이드일 수 있고, 또는, 상기 X는 서열번호 2 내지 45 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하는 펩타이드, 또는 서열번호 2 내지 11 및 13 내지 45 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하는 펩타이드일 수 있고, 또는, 상기 X는 서열번호 20, 22, 23, 27, 33, 35, 37, 38, 40, 41, 42, 및 44로 이루어진 군에서 선택되는 아미노산 서열을 포함하는 펩타이드일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[210]

[211] 본 발명에서 용어 "화학식 1의 지속형 결합체"는 글루카곤 유도체 및 면역글로불린 Fc 영역이 서로 링커로 연결된 형태로, 상기 결합체는 면역글로불린 Fc 영역이 결합되지 않은 글루카곤 유도체에 비하여 증가된 효력의 지속성을 나타낼 수 있다.

[212]

- [213] 상기 지속형 결합체에서 F는 X, 즉 글루카곤 유도체의 반감기를 증가시킬 수 있는 물질로서, 본 발명의 상기 결합체를 구성하는 모이어티의 일 구성에 해당한다.
- [214]
- [215] 화학식 1의 지속형 결합체에 있어서 글루카곤 유도체인 펩타이드인 X와 면역글로불린 Fc 영역의 연결은 물리 또는 화학 결합이거나, 비공유 또는 공유 결합일 수 있으며, 구체적으로 공유 결합일 수 있으나 이에 제한되지 않는다.
- [216] 또한, 화학식 1의 지속형 결합체의 글루카곤 유도체인 X와 면역글로불린 Fc 영역의 연결 방법은 특별히 제한되지 않으나, 링커를 통해 글루카곤 유도체와 면역글로불린 Fc 영역이 서로 연결된 것일 수 있다.
- [217] 상기 화학식 1에서 공유결합으로 L을 통하여 X와 F가 서로 결합될 수 있다.
- [218] 보다 구체적으로, X와 L, 및 L과 F는 공유결합으로 서로 연결될 수 있으며, 이때 상기 결합체는 화학식 1의 순서로, X, L, 및 F가 공유결합을 통하여 각각 연결된 결합체일 수 있다.
- [219] 또한, 상기 X는 F가 직접적으로 연결되거나(즉, 상기 화학식 1에서 a가 0이거나), 또는 링커(L)를 통해 연결된 것일 수 있다.
- [220]
- [221] 구체적인 예로, 상기 F는 면역글로불린 Fc 영역일 수 있으며, 보다 구체적으로 상기 면역글로불린 Fc 영역은 IgG 유래 일 수 있으나, 특별히 이에 제한되지 않는다.
- [222] 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 지속형 결합체의 모이어티를 이루는 일 구성일 수 있다. 상기 면역글로불린 Fc 영역은 "면역글로불린 Fc 단편"과 혼용되어 사용될 수 있다.
- [223]
- [224] 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 서열등 변형체까지 망라하여 포함된다. 상기 유도체, 치환체, 변형체는 FcRn에 결합하는 능력을 보유하는 것을 전제로 한다. 본 발명에서, F는 사람 면역글로불린 영역일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 상기 F는 2개의 폴리펩타이드 사슬이 이황화결합으로 연결되어 있는 구조이며, 상기 두 사슬 중 한 사슬의 질소 원자를 통해서만 연결되어 있는 구조일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 상기 질소 원자를 통한 연결은 리신의 입실론 아미노 원자나 N-말단 아미노기에 환원적 아민화를 통하여 연결될 수 있다.
- [225] 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.

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

[227]

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

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

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

[231] 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:

[232] Glu-Ser-Lys-Tyr-Gly-Pro-Pro-Cys-Pro-Ser-Cys-Pro(서열번호 49).

[233] 상기 힌지 서열은 서열번호 49의 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 50),

Glu-Ser-Lys-Tyr-Gly-Pro-Pro-Cys-Pro-Ser-Pro(서열번호 51),

Glu-Ser-Lys-Tyr-Gly-Pro-Pro-Cys-Pro-Ser(서열번호 52),

Glu-Ser-Lys-Tyr-Gly-Pro-Pro-Cys-Pro-Pro(서열번호 53),

Lys-Tyr-Gly-Pro-Pro-Cys-Pro-Ser(서열번호 54),

Glu-Ser-Lys-Tyr-Gly-Pro-Pro-Cys(서열번호 55),

Glu-Lys-Tyr-Gly-Pro-Pro-Cys(서열번호 56), Glu-Ser-Pro-Ser-Cys-Pro(서열번호

57), Glu-Pro-Ser-Cys-Pro(서열번호 58), Pro-Ser-Cys-Pro(서열번호 59),

Glu-Ser-Lys-Tyr-Gly-Pro-Pro-Ser-Cys-Pro(서열번호 60),

Lys-Tyr-Gly-Pro-Pro-Pro-Ser-Cys-Pro(서열번호 61),

Glu-Ser-Lys-Tyr-Gly-Pro-Ser-Cys-Pro(서열번호 62),

Glu-Ser-Lys-Tyr-Gly-Pro-Pro-Cys(서열번호 63),

Lys-Tyr-Gly-Pro-Pro-Cys-Pro(서열번호 64), Glu-Ser-Lys-Pro-Ser-Cys-Pro(서열번호

65), Glu-Ser-Pro-Ser-Cys-Pro(서열번호 66), Glu-Pro-Ser-Cys(서열번호 67),

Ser-Cys-Pro(서열번호 68).

[234] 더욱 구체적으로는 상기 힌지 서열은 서열번호 59(Pro-Ser-Cys-Pro)또는 서열번호 68(Ser-Cys-Pro)의 아미노산 서열을 포함하는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

- [235] 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.
- [236] 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.
- [237]
- [238] 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.
- [239] 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.
- [240] 본 발명에서, 상기 면역글로불린 Fc 영역은 동일한 기원의 도메인으로 이루어진 단쇄 면역글로불린들로 구성된, 이량체 또는 다량체 형태일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [241]
- [242] 또한, 하나의 구체예로서, 상기 면역글로불린 Fc 영역은 이량체 형태 (dimeric form)일 수 있으며, 이량체 형태의 하나의 Fc 영역에 X 한 분자가 공유결합적으로 연결될 수 있으며, 이때 상기 면역글로불린 Fc와 X는 비펩타이드성 중합체에 의해 서로 연결될 수 있다. 한편, 이량체 형태의 하나의 Fc 영역에 X 두 분자가 대칭적으로 결합하는 것 역시 가능하다. 이때 상기 면역글로불린 Fc와 X는 비펩타이드성 링커에 의해 서로 연결될 수 있다. 그러나, 상기 기술된 예에 제한되는 것은 아니다.
- [243] 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.
- [244] 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.

- [245] 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.
- [246] 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.
- [247] 상기 기술한 Fc 유도체는 본 발명의 Fc 영역과 동등한 생물학적 활성을 나타내며 Fc 영역의 열, pH 등에 대한 구조적 안정성을 증대시킨 것일 수 있다.
- [248] 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.
- [249] 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.

- [250] 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.
- [251] 한편, 면역글로불린 Fc 영역은 인간 또는 소, 염소, 돼지, 마우스, 래빗, 햄스터, 랫트, 기니아 피그 등의 동물기원일 수 있으며, 더 구체적인 실시 형태에서는 인간기원이다.
- [252] 또한, 면역글로불린 Fc 영역은 IgG, IgA, IgD, IgE, IgM 유래 또는 이들의 조합(combination) 또는 이들의 혼성(hybrid)에 의한 것일 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.
- [253] 또한, 하나의 구체적인 실시 형태에서, 면역글로불린 Fc 영역은 인간 IgG4 Fc의 영역으로서, 각 단량체(monomer)의 3번 아미노산인 시스테인 사이의 이황화 결합(inter-chain 형태)을 통해 2개의 단량체가 연결된 동종이량체(homodimer) 형태일 수 있으며, 이 때 동종이량체의 각 단량체는 독립적으로 35번 및 95번의 시스테인 간의 내부의 이황화 결합 및 141번 및 199번의 시스테인 간의 내부의 이황화 결합, 즉 2개의 내부의 이황화 결합(intra-chain 형태)을 가지거나/가질 수 있다. 각 단량체의 아미노산 수는 221개의 아미노산으로 구성될 수 있으며, 동종이량체를 형성하는 아미노산은 전체 442개의 아미노산으로 이루어질 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 구체적으로 면역글로불린 Fc 영역은 서열번호 69의 아미노산 서열 (221개의 아미노산으로 구성됨)을 갖는 단량체 2개가 각 단량체의 3번 아미노산인 시스테인 사이에 이황화 결합을 통해 동종이량체를 형성하고, 상기 동종이량체의 단량체는 각각 독립적으로 35번 및 95번의 시스테인 간의 내부의 이황화 결합 및 141번 및 199번의 시스테인 간의 내부의 이황화 결합을 형성하는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [254] 상기 화학식 1의 F는 서열번호 69의 아미노산 서열인 단량체를 포함하는 것일 수 있으며, 상기 F는 서열번호 69의 아미노산 서열의 단량체의 동종이량체일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [255] 하나의 예로, 면역글로불린 Fc 영역은 서열번호 70의 아미노산 서열 (442개의 아미노산으로 구성됨)을 포함하는 동종이량체일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [256]
- [257] 한편, 본 발명에서 "조합(combination)"이란 이량체 또는 다량체를 형성할 때, 동일 기원 단쇄 면역글로불린 Fc 영역을 암호화하는 폴리펩타이드가 상이한 기원의 단쇄 폴리펩타이드와 결합을 형성하는 것을 의미한다. 즉, IgG Fc, IgA Fc, IgM Fc, IgD Fc 및 IgE의 Fc 영역으로 이루어진 그룹으로부터 선택된 2개 이상의

영역으로부터 이량체 또는 다량체의 제조가 가능하다.

[258]

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

[260] 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. 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.

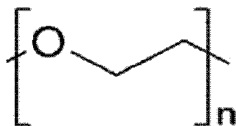
[261] 특별히 이에 제한되지 않으나, 상기 비펩타이드성 링커는 에틸렌글리콜 반복 단위를 함유하는 링커, 예를 들어, 폴리에틸렌 글리콜일 수 있고, 또한, 당해 분야에 이미 알려진 이들의 유도체 및 당해 분야의 기술 수준에서 용이하게 제조할 수 있는 유도체들도 본 발명의 범위에 포함된다.

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

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

[264] [화학식 2]

[265]



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

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

[268] 하나의 구체예로 상기 에틸렌글리콜 반복단위는 그 예로, $[\text{OCH}_2\text{CH}_2]_n$ 로 표시될 수 있으며, n 값은 자연수로 상기 펩타이드 결합체 내의 $[\text{OCH}_2\text{CH}_2]_n$ 부위의 평균 분자량, 예컨대 수평균 분자량이 0 초과 내지 약 100 kDa 이 되도록 정해질 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 또 하나의 예로, 상기 n 값은 자연수로

상기 펩타이드 결합체 내의 $[\text{OCH}_2\text{CH}_2]_n$ 부위의 평균 분자량, 예컨대 수평균 분자량이 약 1 내지 약 100 kDa, 약 1 내지 약 80 kDa, 약 1 내지 약 50 kDa, 약 1 내지 약 30 kDa, 약 1 내지 약 25 kDa, 약 1 내지 약 20 kDa, 약 1 내지 약 15 kDa, 약 1 내지 약 13 kDa, 약 1 내지 약 11 kDa, 약 1 내지 약 10 kDa, 약 1 내지 약 8 kDa, 약 1 내지 약 5 kDa, 약 1 내지 약 3.4 kDa, 약 3 내지 약 30 kDa, 약 3 내지 약 27 kDa, 약 3 내지 약 25 kDa, 약 3 내지 약 22 kDa, 약 3 내지 약 20 kDa, 약 3 내지 약 18 kDa, 약 3 내지 약 16 kDa, 약 3 내지 약 15 kDa, 약 3 내지 약 13 kDa, 약 3 내지 약 11 kDa, 약 3 내지 약 10 kDa, 약 3 내지 약 8 kDa, 약 3 내지 약 5 kDa, 약 3 내지 약 3.4 kDa, 약 8 내지 약 30 kDa, 약 8 내지 약 27 kDa, 약 8 내지 약 25 kDa, 약 8 내지 약 22 kDa, 약 8 내지 약 20 kDa, 약 8 내지 약 18 kDa, 약 8 내지 약 16 kDa, 약 8 내지 약 15 kDa, 약 8 내지 약 13 kDa, 약 8 내지 약 11 kDa, 약 8 내지 약 10 kDa, 약 9 내지 약 15 kDa, 약 9 내지 약 14 kDa, 약 9 내지 약 13 kDa, 약 9 내지 약 12 kDa, 약 9 내지 약 11 kDa, 약 9.5 내지 약 10.5 kDa, 또는 약 10 kDa일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[269]

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

[271]

[272] 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.

[273] 상기 비펩타이드성 중합체의 분자량은 1 내지 100 kDa 범위, 구체적으로 1 내지 20 kDa 범위, 또는 1 내지 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.

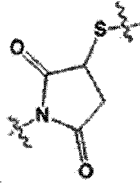
[274] 하나의 구체예로, 상기 링커의 양 말단은 면역글로불린 Fc 영역의 티올기, 아미노기, 하이드록실기 및 펩타이드(X)의 티올기, 아미노기, 아지드기, 하이드록실기에 결합할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[275] 구체적으로, 상기 링커는 양쪽 말단에 각각 면역글로불린 Fc 영역 및 펩타이드(X)와 결합될 수 있는 반응기, 구체적으로는 면역글로불린 Fc 영역의 시스테인의 티올기; N-말단, 리신, 아르기닌, 글루타민 및/또는 히스티딘에 위치한 아미노기; 및/또는 C-말단에 위치한 하이드록실기와 결합되고, 펩타이드(X)의 시스테인의 티올기; 리신, 아르기닌, 글루타민 및/또는 히스티딘의 아미노기; 아지도리신의 아지드기; 및/또는 하이드록실기와 결합될 수 있는 반응기를 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

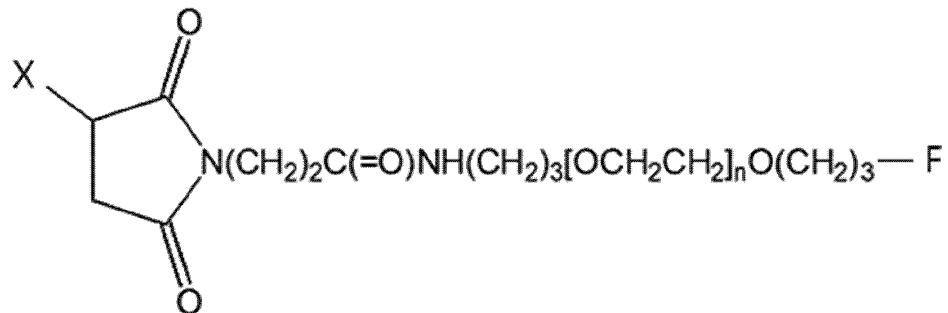
[276] 보다 구체적으로, 상기 링커의 반응기는 알데히드 그룹, 말레이미드 그룹 및

- 석시니미드 유도체로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [277] 상기에서, 알데히드기로 프로피온 알데히드기 또는 부틸 알데히드기를 예로서 들 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [278] 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.
- [279] 상기 링커는 상기와 같은 반응기를 통해 면역글로불린 Fc 영역인 F 및 펩타이드(글루카곤 유도체)인 X에 연결되어, 링커 연결부로 전환될 수 있다.
- [280]
- [281] 또한, 알데히드 결합에 의한 환원성 알킬화로 생성된 최종 산물은 아미드 결합으로 연결된 것보다 훨씬 안정적이다. 알데히드 반응기는 낮은 pH에서 N-말단에 선택적으로 반응하며, 높은 pH, 예를 들어 pH 9.0 조건에서는 리신 잔기와 공유결합을 형성할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [282] 본 발명의 링커의 말단 반응기는 서로 같거나 다를 수 있다. 상기 링커는 말단에 알데히드 그룹 반응기를 갖는 것일 수 있고, 또한 상기 링커는 말단에 각각 알데히드 그룹 및 말레이미드 반응기를 가지거나, 말단에 각각 알데히드 그룹 및 석시니미드 반응기를 가질 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [283] 예를 들어, 한쪽 말단에는 말레이미드 그룹을, 다른 쪽 말단에는 알데히드 그룹, 프로피온 알데히드 그룹 또는 부틸 알데히드 그룹을 가질 수 있다. 또 한 가지 예로, 한쪽 말단에는 석시니미딜 그룹을, 다른 쪽 말단에는 프로피온 알데히드 그룹 또는 부틸 알데히드 그룹을 가질 수 있다.
- [284] 프로피온쪽 말단에 하이드록시 반응기를 갖는 폴리에틸렌 글리콜을 링커로 이용하는 경우에는, 공지의 화학반응에 의해 상기 하이드록시기를 상기 다양한 반응기로 활성화하거나, 상업적으로 입수가 가능한 변형된 반응기를 갖는 폴리에틸렌 글리콜을 이용하여 본 발명의 결합체를 제조할 수 있다.
- [285] 하나의 구체적인 실시 형태에서 상기 링커의 반응기가 펩타이드의 시스테인 잔기, 보다 구체적으로 시스테인의 -SH 기에 연결되는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [286] 만약, 말레이미드-PEG-알데히드를 사용하는 경우, 말레이미드 기는 펩타이드의 -SH 기와 티오에테르(thioether) 결합으로 연결하고, 알데히드기는 면역글로불린 Fc의 -NH₂ 기와 환원적 알킬화 반응을 통해 연결할 수 있으나, 이에 제한되지 않으며, 이는 하나의 일례에 해당한다.
- [287] 이와 같은 환원적 알킬화를 통하여 PEG의 한쪽 말단에 위치한 산소 원자에 면역글로불린 Fc 영역의 N-말단 아미노기가 -CH₂CH₂CH₂-의 구조를 가지는 링커 작용기를 통해 서로 연결되어, -PEG-O-CH₂CH₂CH₂NH-면역글로불린 Fc와 같은

구조를 형성할 수 있고, 티오에테르 결합을 통하여 PEG의 한쪽 말단이 펩타이드의 시스테인에 위치한 황 원자에 연결된 구조를 형성할 수 있다. 상술한 티오에테르 결합은



- [288] 그러나, 상술한 예에 특별히 제한되는 것은 아니며, 이는 하나의 일례에 해당한다.
- [289] 또한, 상기 결합체에서, 링커의 반응기가 면역글로불린 Fc 영역의 N-말단에 위치한 $-NH_2$ 와 연결된 것일 수 있으나, 이는 하나의 일례에 해당한다.
- [290] 또한, 상기 결합체에서, 본 발명에 따른 펩타이드는 반응기를 갖는 링커와 C-말단을 통해 연결될 수 있으나, 이는 하나의 일례에 해당한다.
- [291] 본 발명에서 "C-말단"은, 펩타이드의 카르복시 말단을 의미하는 것으로, 본 발명의 목적상 링커와 결합할 수 있는 위치를 말한다. 그 예로, 이에 제한되지는 않으나, C-말단의 최말단 아미노산 잔기뿐만 아니라 C-말단 주위의 아미노산 잔기를 모두 포함할 수 있으며, 구체적으로는 최말단으로부터 첫 번째 내지 20 번째의 아미노산 잔기를 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [292]
- [293] 하나의 구체예로, 상기 화학식 1의 결합체는 하기 화학식 3의 구조를 가질 수 있다.
- [294] [화학식 3]
- [295]



- [296] 상기 화학식 3에서 X는 상기에서 설명한 펩타이드(글루카곤 유도체)이고;
- [297] F는 사람 면역글로불린 Fc 영역이며;
- [298] n은 자연수일 수 있다. 이때, n에 대한 설명은 상기에서 설명한 바와 같다.
- [299]
- [300] 하나의 구체예로, 상기 화학식 3의 지속형 결합체는 펩타이드 X와 사람 면역글로불린 Fc 영역 F가 에틸렌글리콜 반복부를 개재하여 공유결합으로 연결된 구조로서, 각각 X는 화학식 3의 숙신이미드 고리에, F는 화학식 3의

옥시프로필렌기에 연결되는 형태일 수 있다.

- [301] 상기 화학식 3에서, 상기 n 의 값은 상기 펩타이드 결합체 내 $[\text{OCH}_2\text{CH}_2]_n$ 부위의 평균 분자량, 예컨대 수평균 분자량이 1 내지 100 kDa, 또는 1 내지 20 kDa 또는 10 kDa이 되도록 정해지는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [302] 한 실시 형태에서 화학식 3의 숙신이미드 고리에 X가 연결되는 부위는 X의 C-말단 시스테인의 황 원자일 수 있다.
- [303] F 내에서 상기 옥시프로필렌기에 연결되는 부위는 특별히 한정되지 않는다. 본 발명의 한 실시 형태에서 상기 옥시프로필렌기에 연결되는 F의 부위는 N-말단 질소 또는 F 내부 잔기의 질소 원자(예컨대 리신의 입실론 질소)일 수 있다. 본 발명의 한 구체적인 실시 형태에서, F가 상기 옥시프로필렌기에 연결되는 부위는 F의 N-말단 프롤린일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [304]
- [305] 또한, 상술한 결합체는 효력의 지속성이 천연형 글루카곤에 비해, 또는 F가 수식되지 않은 X에 비해 증가된 것일 수 있으며, 이러한 결합체는 상술한 형태뿐만 아니라, 생분해성 나노파티클에 봉입된 형태 등을 모두 포함한다.
- [306]
- [307] 본 발명에 따른 펩타이드 또는 이의 결합체는 간질환에 대한 예방 또는 치료 용도를 갖는 것일 수 있다. 구체적으로, 본 발명에 따른 펩타이드 또는 이의 결합체 또는 이를 포함하는 조성물은 간 조직에서의 염증 및/또는 섬유화를 억제하고 개선하는 효과를 나타내어 간질환에 대한 예방 또는 치료 용도를 갖는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 또한, 본 발명에 따른 펩타이드 또는 이의 결합체 또는 이를 포함하는 조성물은 간 조직에서의 지방 함량을 감소시켜 단순지방증 뿐만 아니라, 여러 간 질환의 원인이 되는 과도한 지방 침착을 개선하는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [308]
- [309] 본 발명에서, “간질환”은 간에서 발병하는 질환을 의미하는 것으로, 단순지방증(steatosis), 간 섬유증(liver fibrosis), 간 염증(liver inflammation), 간경변(liver cirrhosis), 간부전(liver decompensation), 간암(hepatocellular carcinoma), 및 담즙정체성 간질환(cholestasis liver disease)으로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나일 수 있고, 구체적으로 상기 담즙정체성 간질환은 원발성 담즙성 경변증(Primary biliary cirrhosis), 원발성 경화성 담관염(primary sclerosing cholangitis) 또는 이들의 조합일 수 있으나, 간의 조직 및 기능에 이상이 생기는 한, 간질환이 상기 질병으로 제한되는 것은 아니다.
- [310] 본 발명의 실시예에서는 AMLN(아밀린) 식이로 유도된 비알콜성 지방간 마우스 모델에서 간 조직 내 중성 지방 감소의 효과를 확인하였으므로(도 3), 본 발명에 따른 글루카곤 유도체, 이의 결합체, 또는 이를 포함하는 조성물은 간 조직 내 지방을 감소시켜 단순지방증을 비롯한 대사성 간질환에 대한 예방 및 치료 효과를 갖는다. 더욱이, 간 조직 내 지방 침착은 염증을 유발하여 다른 간

질환으로의 진행을 초래하게 된다.

[311]

[312] 본 발명의 펩타이드 또는 이의 결합체가 치료 효과를 갖는 간질환은 대사성 간질환일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 대사성 간질환은 신체의 비정상적인 화학 반응이 신체의 신진 대사를 방해함으로써 발생하는 질환으로 단순 지방증, 지방간, 지방간염 등이 포함된다.

[313] 본 발명에 따른 조성물은 투여시 간 조직내 중성 지방을 감소시키고 염증을 완화함으로써 대사성 간질환에 예방 또는 치료 효과를 나타내는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 상기 대사성 간질환은 염증을 수반하거나, 또는 염증을 수반하지 않을 수 있고, 본 발명에 따른 조성물로 치료할 수 있는 간질환의 예로는 단순 지방증, 비알코올성 지방간, 비알코올성 지방간염 등을 들 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[314] 대사성 간질환의 대표적 예인 "비알코올성 지방간 질환 (nonalcoholic fatty liver disease, NAFLD)"은 알코올 섭취 과거력이 없거나 알코올 섭취와 관련이 없으면서도 지방간을 동반하는 경우를 말한다. 지방간은 중성지방이 정상적인 경우와는 다르게 간 세포 내에 비정상적으로 침착되어 보이는 현상이 나타난 것을 말한다. 정상 간은 약 5%가 지방조직으로 구성되어 있으며 중성지방, 지방산, 인지질, 콜레스테롤 및 콜레스테롤 에스터가 지방의 주성분이나, 일단 지방간이 발생되면 대부분의 성분이 중성지방으로 대체되며, 중성지방의 양이 간 중량의 5%이상이면 지방간으로 진단된다. 지방간은 간세포 내의 지방대사 장애나 과잉지방을 운반하는 과정에서의 결함 등에 의하여 초래되는 것으로서, 주로 간에서의 지방대사 장애로 인하여 발생한다. 상기 지방간에서 축적된 지방의 대부분은 중성지방 (triglyceride)일 수 있다.

[315] 비알코올성 지방간질환은 간세포에 지방의 과도한 축적만 있는 단순 지방증(simple steatosis), 비알코올성 지방간 (nonalcoholic fatty liver), 간세포 괴사와 염증과 섬유화를 동반하는 비알코올성 지방간염(nonalcoholic steatohepatitis, NASH) 등을 포함하는 일련의 질환군을 의미하지만, 본 발명의 조성물로 치료되는 한 이에 제한되는 것은 아니다. 본 발명에 따른 비알코올성 지방간 질환은 비알코올성 지방간염을 수반하는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[316] 많은 경우에 있어서, 지방 침착, 바이러스, 알코올, 약물, 면역 이상, 대사 질환 등의 원인으로 인해 간에 염증이 발생할 수 있고, 간염증의 진행 및 만성화에 따라 간섬유증, 간경변, 간부전, 간암 등의 질환으로 발병하는 것으로 알려져 있다.

[317] 본 발명의 실시예에서는 AMLN (아밀린) /TAA (Thioacetamide) 마우스 모델에서 간염증 및 간섬유증 개선 효과를 확인하였고(도 1 및 2), 이는 간염증 및 간섬유증 뿐만 아니라, 간 염증으로 변이된 간세포에서 기인될 수 있는 원발성 간암 및 간 섬유증의 마지막 단계인 간경변 및 이에 따른 간부전과 같은

간질환의 발병에서 주요한 기전에 본 발명의 글루카곤 유도체가 효과를 나타낼 수 있음을 시사하는 것이다. 고지방, 고과당, 고콜레스테롤 함량을 가지고 있어 비만 및 지방간염을 유발하는 것으로 알려진 AMLN 식이 및 간 염증 유도를 통해 섬유화를 유발하는 것으로 알려진 TAA (Thioacetamide) 투여로 유도된 AMLN /TAA 마우스 모델은 일반적으로 염증 또는 섬유화 모델로 이용되며, 더 나아가 비알코올성 지방간염 모델로도 이용된다. 따라서, 본 발명에 따른 글루카곤 유도체, 이의 결합체, 또는 이를 포함하는 조성물은 간염증 및 간섬유증을 비롯한 간질환에 대한 예방 또는 치료 효과를 나타낼 수 있으며, 구체적으로 상기 간질환은 비알코올성 지방간염에 기인하거나 이를 동반하는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[318]

[319] 본 발명에서, “간 염증(liver inflammation)”은 간질환의 가장 큰 원인으로 간에 염증을 일으키는 질병을 의미하며, 원인과 증상에 따라서 급성간염과 만성간염으로 구별된다. 바이러스, 알코올, 약물, 면역 이상, 대사 질환 등을 주원인으로 한다. 본 발명의 조성물은 투여시 투여받은 개체에서 간염증 점수(liver inflammation score)를 감소시킴으로써 간염증에 대한 예방 또는 치료 효과를 나타낼 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[320] 본 발명에 따른 펩타이드 및 이의 결합체는 간의 염증 자체를 완화하는 효과를 가질 뿐만 아니라, 간의 염증을 수반하거나, 간의 염증에 기인하여 발병한 질환에도 효과를 나타낼 수 있다.

[321]

[322] 본 발명에서, “섬유증(fibrosis)”은 기관 또는 조직에서 과도한 섬유질 결합조직을 형성하는 질환이다. 섬유증은 인체 내에서 조직이 여러 가지 스트레스(염증, 화학적 자극, 방사선 등)에 의한 손상을 받은 후 창상치유(wound healing) 과정 중에 정상적인 통제가 불가능한 상태로, 특히 만성 질환에 공통적으로 거치게 되는 경로로서 그 기전이 매우 복잡하여 현재까지도 완전히 규명되고 있지 않다. 섬유증은 폐, 심장, 간 등 다양한 장기에 발생하며 아직까지 근본적인 치료제가 개발되지 않아 미충족 수요가 높은 분야 중 하나다.

[323]

[324] 본 발명에서, “간 섬유증(liver fibrosis)”은 반복적인 간 손상에 대한 상처 회복 과정의 결과로, 간경변증과는 달리 가역적이고, 얇은 원섬유(thin fibril)로 구성되며, 결절(nodule) 형성이 없는 것으로 알려져 있고, 간 손상의 원인이 소실되면 정상회복이 가능할 수 있으나, 이러한 간 섬유증 과정이 반복적으로 지속되면 ECM(extra cellular matrix) 간의 교차결합(crosslinking)이 증가하여 결절(nodule)이 있는 비가역적인 간경변증으로 진행된다.

[325]

본 발명의 조성물은 상기 약학적 조성물은 투여시 투여받은 개체에서 하이드록시프롤린 함량을 감소시킴으로써 간섬유증에 대한 예방 또는 치료 효과를 나타낼 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 본 발명에 따른 펩타이드

및 이의 결합체는 간의 섬유화 자체를 완화하는 효과를 가질 뿐만 아니라, 간의 섬유화를 수반하거나, 이에 기인하여 발병한 질환에도 효과를 나타낼 수 있다.

[326]

[327] 본 발명의 “간경변(liver cirrhosis)”은 간세포 재생 및 섬유조직의 증가를 반복하면서 발병하고 병리학적으로 괴사(necrosis), 염증(inflammation) 및 섬유화(fibrosis)가 수반되는 만성질환이며 궁극적으로 간 부전과 같은 간경변 합병증 및 간암 등의 질환으로 진행되어 사망에 이르게 한다. 특히, 초기에 자각증상이 없어 상당히 진행되어서야 발견되기 때문에, 간경변 등으로 진화되기 전의 상태인 간섬유증을 신속히 치료하는 것이 요구된다.

[328]

[329] 본 발명의 “간 부전(liver decompensation)”은 바이러스성 간염, 간경변증, 약물 또는 알코올과 같은 간 손상 또는 간 질환으로 인해, 간 기능이 악화되고 간이 정상적인 생리 작용으로서의 단백질 합성과 대사 기능을 수행할 수 없는 상태를 의미한다. 진행 속도에 따라 급성 간부전 또는 만성 간부전으로 나뉘며, 다양한 합병증을 일으키는 것으로 알려져 있다.

[330]

[331] 본 발명의 “간암(hepatocellular carcinoma)”은 간 세포에서 기원하는 악성 종양을 의미하며, 간세포 자체로부터 발생한 원발성 간암(간세포암; hepatocellular carcinoma)과 다른 조직의 암이 간으로 전이되어 온 전이성 간암으로 구분할 수 있는데, 간암의 약 90% 이상은 원발성 간암이다. 주된 원인으로는 간염, 만성 간질환 외에 알코올, 흡연, 비만 등이 알려져 있다.

[332]

[333] 본 발명에서, “담즙정체증(cholestasis)”은, 간에서 십이지장으로의 담즙의 유동이 느려지거나 차단된 병태이고, “담즙정체성 간질환(cholestasis liver disease)”은 간 내부에서, 담즙 형성이 각종 질환, 확장된 경정맥 영양, 또는 특정 약물(예컨대, 일부 항생제)의 부작용과 같은 병태에 의해 방해된 것을 의미한다. 담즙정체증의 통상의 징후에는, 피로, 소양감(가려움증), 황달, 및 황색종(피하에의 고콜레스테롤(cholesterol-rich) 물질의 증착)이 포함된다. 담즙정체증의 영향은 극심하며 광범위하고, 이는 간 질환의 전신적 질환으로의 악화, 간부전, 및 간 이식의 필요를 초래한다. 담즙정체성 간질환의 원인으로는 급성 간염, 담관의 염증 등을 들 수 있다.

[334]

상기 담즙정체성 간질환에는, 원발성 담즙성 담관염(PBC), 원발성 경화성 담관염(PSC), 진행성 가족성 간내 담즙정체증(PFIC), 및 알라질 증후군(Alagille syndrome)(AS) 등이 포함될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[335]

원발성 담즙성 담관염(primary biliary cholangitis: PBC)으로도 알려진 원발성 담즙성 경변증은 원인 불명의 만성 담즙정체성 간 질환이다. 문맥(portal) 및 문맥주위(periportal) 염증으로 인한 진행성 담관 손상은 진행성 섬유증 및 궁극적 간경화를 일으킬 수 있다. 지금까지는 면역학적, 유전적 및 환경적

- 요인이 질환에 잠재적인 원인으로 알려져 있다. 원발성 담즙성 경변증은 주로 중년 여성에서 많이 나타나며, 증상은 초기 발현에서 피로, 가려움증 또는 미규명된 고지혈증이 또한 원발성 담즙성 경변증의 증상으로 나타날 수 있다.
- [336] 현재까지는 원발성 담즙성 경화증이 면역-매개된 질환이라고 알려져 있으며, 구체적으로, 문맥 및 문맥주위 부위에서 T 림프구의 면역조직화학적 염색은 CD4-양성 및 CD8-음성 T 세포를 나타낸다. 또한, 이환된 개체의 무증상 제1-등급 동류 (relatives)에서 비정상 억제자 T-세포 활성이 보고되었다. 인터류킨이 변경된 면역 기능 및 섬유증에 기여함으로써 PBC의 발병기전에 역할을 할 수 있다는 것이 보고되었다 (G.J. Webb et al, J. Autoimmunity, 2015 Nov; 64: 42-52).
- [337] PBC의 치료방법은 우르소데옥시콜산 (UDSA) 및 오베티콜산 (OCA)을 이용한 담즙산 치료법이다. PBC에서 두 약물의 작용 메커니즘은 FXR 및 TGFR-5를 활성화시켜 항-염증성 효과를 발휘하게 하는 이들의 능력과 연관된다. 그러나, UDCA로 치료된 환자의 약 40%에서 충분한 생화학적 반응을 달성되지 않았다.
- [338]
- [339] 원발성 경화성 담관염(Primary sclerosing cholangitis: PSC)는 원인 모를 간내/간외 담도의 염증과 섬유화로 인해 발생하는 만성 진행성 담즙 정체성 간질환이다. 구체적으로, 담관 및 담도의 염증성 질환으로서 질환이 진행되면 섬유화가 일어나 담관벽이 두꺼워지면서 좁아지거나 협착이 오는 질환이다. 아직까지 원인은 불명이나, 유전적 요인, 환경적 요인, 이와 관련된 면역반응 등 다양한 인자가 복합적으로 원인으로 추정하고 있다.
- [340] 혈액을 통한 간 기능 검사에서 alkaline phosphatase 수치 상승, aminotransferase 수치 상승, 감마글로불린혈증 등이 보이면 원발성 경화성 담관염으로 진단하고 있다.
- [341] PSC의 치료방법은 아직까지 명확하게 보고된 바 없으며, 간이식 수술이 근본적으로 치료할 수 있는 유일한 치료방법이다.
- [342] 이에, 환자 편의성 확보 및 부작용 없이 PBS, 및 PSC를 치료할 수 있는 약물의 개발이 여전히 요구되고 있다.
- [343]
- [344] 본 발명의 조성물은 (a) 간 염증 수치(inflammation score) 감소; (b) 하이드록시프롤린 함량 감소의 효과; 및/또는 (c) 간 조직 내 중성 지방 함량 감소를 나타내어 간 질환을 예방 또는 치료할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [345]
- [346] 본 발명의 조성물은 단순지방증, 간염증 및 간섬유증에 대해 예방, 개선, 또는 치료 효과를 갖는 글루카곤 유도체 또는 이의 결합체를 포함함으로써 간질환의 예방 또는 치료에 사용될 수 있다. 본 발명의 조성물은 본 발명에 따른 펩타이드의 투여로 인해 개선 또는 치료될 수 있는, 상술한 간질환을 갖는 개체에 투여되어 간질환 예방 또는 치료 효과를 나타낼 수 있다. 또한, 본 발명의

조성물이 투여되는 개체는 비알코올성 지방간염을 갖거나, 이로 인한 간질환을 갖는 개체일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 본 발명에서 용어 "예방"은 상기 글루카곤 유도체, 이를 포함하는 결합체, 또는 조성물의 투여로 목적하는 질환, 예컨대 간질환의 발병을 억제 또는 지연시키는 모든 행위를 의미하며, "치료"는 상기 글루카곤 유도체, 이를 포함하는 결합체, 또는 조성물의 투여로 목적하는 질환, 예컨대 간질환의 증세가 호전되거나 이롭게 되는 모든 행위를 의미한다.

[347] 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.

[348] 본 발명에 따른 글루카곤 유도체는 천연형 글루카곤에 비해 변화된 pI를 가지며, 지속형 결합체의 형태에서 중성 pH에서 개선된 용해도 및 높은 안정성을 나타낼 수 있으며, 또한 글루카곤 수용체에 대해 활성을 나타낼 수 있으므로, 간질환을 비롯한 목적하는 질환의 예방 또는 치료에 유용하게 사용될 수 있다.

[349]

[350] 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.

[351] 본 발명의 펩타이드 또는 이의 결합체를 포함한 약학적 조성물은 약학적으로 허용가능한 부형제를 추가로 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, 윤활제, 보존제 등을 사용할 수 있다.

[352] 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.

[353] 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, 율활제, 습윤제, 향료, 방부제 등을 추가로 포함할 수 있다.

[354] 또한, 본 발명의 약학적 조성물은 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제, 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제, 멸균된 수용액, 비수성용제, 동결건조제 및 좌제로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나의 제형을 가질 수 있다.

[355]

[356] 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.

[357] 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 덱스트란과 같은 탄수화물, 아스코르브산(ascorbic acid) 또는 글루타티온과 같은 항산화제(antioxidants), 킬레이트제, 저분자 단백질 또는 다른 안정화제(stabilizers) 등이 약제로 사용될 수 있다.

[358] 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 펩타이드 또는 이를 포함하는 지속형 결합체를 약학적 유효량으로 포함하는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[359] 상기 펩타이드 또는 지속형 결합체를 약학적 유효량으로 포함하는 것은, 펩타이드 또는 지속형 결합체로 인한 목적하는 약리 활성(예를 들어, 간질환의 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.

[360]

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

[362]

[363] 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.

- [364] 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.
- [365]
- [366] 본 발명을 구현하는 또 다른 양태는 서열번호 20, 22, 33, 37, 및 38 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하는 펩타이드 또는 이의 결합체를 포함하는 간질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.
- [367] 상기 간질환은 단순지방증(statosis), 간 섬유증 (liver fibrosis), 간 염증(liver inflammation), 간경변(liver cirrhosis), 간부전 (liver decompensation), 간암(hepatocellular carcinoma), 또는 담즙정체성 간질환(cholestasis liver disease)일 수 있고, 상기 담즙정체성 간질환은 원발성 담즙성 경변증 (Primary biliary cirrhosis), 또는 원발성 경화성 담관염(primary sclerosing cholangitis)일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 또한, 상기 간질환은 비알코올성지방간염(non-alcoholic steatohepatitis, NASH)으로 인한 것이거나, 또는 동반하는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [368] 펩타이드, 결합체, 간질환, 예방, 치료, 약학적 조성물은 상기에서 설명한 바와 같다.
- [369]
- [370] 본 발명을 구현하는 또 다른 양태는 상기 펩타이드, 이를 포함하는 결합체, 또는 이를 포함하는 조성물을 개체에 투여하는 단계를 포함하는, 간질환을 예방 또는 치료하는 방법을 제공한다.
- [371] 상기 펩타이드, 이를 포함하는 결합체, 이를 포함하는 조성물, 간질환, 예방, 및 치료에 대해서는 앞서 설명한 바와 같다.
- [372] 본 발명에서 상기 개체는 간질환이 의심되는 개체로서, 상기 간질환 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 간질환 의심 개체에 투여함으로써, 개체를 효율적으로 치료할 수 있다. 간질환에 대해서는 상기에서 설명한 바와 같다.

- [373] 구체적으로, 상기 간질환이 의심되는 개체는 비알코올성지방간염(non-alcoholic steatohepatitis, NASH)을 갖는 개체일 수 있고, 또는 상기 비알코올성지방간염로 인해 단순지방증, 간 섬유증, 간 염증, 간경변, 간부전, 간암, 담즙정체성 간질환, 원발성 담즙성 경변증, 또는 원발성 경화성 담관염이 발병된 개체일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 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.

[374]

- [375] 본 발명을 구현하는 또 다른 양태는 상기 펩타이드 또는 이를 포함하는 결합체, 혹은 상기 조성물을 간질환에 대한 예방 또는 치료용 약제 (혹은 약학적 조성물)의 제조에 사용하는 용도를 제공한다.

- [376] 상기 펩타이드, 결합체, 상기 조성물, 간질환에 대해서는 앞서 설명한 바와 같다.

[377]

- [378] 본 발명을 구현하는 또 다른 양태는 상기 펩타이드 또는 이를 포함하는 결합체 또는 이를 포함하는 조성물의 간질환 예방 또는 치료 용도를 제공한다.

- [379] 상기 펩타이드, 결합체, 상기 조성물, 간질환에 대해서는 앞서 설명한 바와 같다.

[380]

- [381] 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.

[382]

- [383] **실시예 1: 글루카곤에 대해 cAMP 반응을 보이는 세포주의 생산**

[384]

- [385] 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.

[386] 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.

[387]

[388] 정방향 프라이머(서열번호: 47):

[389] 5'-CAGCGACACCGACCGTCCCCCGTACTTAAGGCC-3'

[390] 역방향 프라이머(서열번호: 48):

[391] 5'-CTAACCGACTCTCGGGGAAGACTGAGCTCGCC-3'

[392]

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

[394] 상기 제조한 재조합 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.

[395]

[396] **실시예 2: 글루카곤 유도체의 합성**

[397]

[398] 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.

[399]

[400] [표1]

서열번호	글루카곤 아날로그 서열	고리 형성 여부	pI	<i>In vitro</i> 활성(서열번호 1에 대한 상대적 활성,%)
서열번호: 1	HSQGTFTSDYSKYLD ~~SRRA~~ QDFVQ WLMNT	-	6.8	100
서열번호: 2	HSQGTFTSDYSKYLD ~~CDRA~~ QDFV QWLMNT	-	4.56	0.6
서열번호: 3	HSQGTFTSDYSKYLD ~~CERA~~ QDFVQ WLMNT	-	4.66	6.1
서열번호: 4	HSQGTFTSDYSKYLD ~~SCDA~~ QDFVQ WLMNT	-	4.13	< 0.1
서열번호: 5	HSQGTFTSDYSKYLD ~~SCEA~~ QDFVQ WLMNT	-	4.22	0.3
서열번호: 6	HSQGTFTSDYSKYLD ~~SCEAD~~ DFVQ WLMNT	-	4.03	< 0.1
서열번호: 7	YSQGTFTSDYSKYLD ~~SCEAD~~ DFVQ WLMNT	-	3.71	< 0.1
서열번호: 8	YXQGTFTSDYSKYLD ~~SCDA~~ QDFV QWLINT	-	3.77	< 0.1
서열번호: 9	YXQGTFTSDYSKYLD ~~SCDA~~ QDFV VWLINT	-	3.77	< 0.1
서열번호: 10	YXQGTFTSDYSKYLD ~~SCDAD~~ DFV VWLINT	-	3.66	< 0.1
서열번호: 11	YXQGTFTSDYSKYLD ~~EKCAKE~~ FV QWLMNT	-	4.78	4.6
서열번호: 12	YXQGTFTSDYSKYLD ~~EKRAKE~~ FV QWLMNTC	고리 형성	6.20	56.3
서열번호: 13	YXQGTFTSDYSCYLD ~~SRRA~~ QDFV QWLMNT	-	4.43	5.2
서열번호: 14	YXQGTFTSDYSKYLD ~~CKRAKE~~ FV QWLMNT	-	8.12	18.1

서열번호: 15	YXQGTFTSDYSKYLC E KRAQDFV VWLMNT	-	6.11	1.1
서열번호: 16	YXQGTFTSDYSKYLD C RRAQVFV QWLMRT	-	9.11	4.2
서열번호: 17	YXQGTFTSDYSKYLD C VRAQDFV QWLMRT	-	6.03	23.2
서열번호: 18	YXQGTFTSDYSKYLD S RRACDFRL WLMNT	-	8.15	< 0.1
서열번호: 19	YXQGTFTSDYSKYLC E KRA K EFV QWLMNT	고리 형성	8.12	12.1
서열번호: 20	YXQGTFTSDYSKYLD E CRA K EFV QWLMNT	고리 형성	4.78	299.7
서열번호: 21	YXQGTFTSDYSKYLD E KCA K EFV QWLMNT	고리 형성	4.78	57.8
서열번호: 22	YXQGTFTSDYSKYLD E KRC K EFV QWLMNT	고리 형성	6.20	147.8
서열번호: 23	YXQGTFTSDYSKYC D E K RA K EFV QWLMNT	고리 형성	6.20	76.8
서열번호: 24	YXQGTFTSDYSKCLD E KRA K EFV QWLMNT	고리 형성	6.21	58.0
서열번호: 25	YXQGTFTSDYSKYLD E KRA K CFV QWLMNT	고리 형성	8.12	46.9
서열번호: 26	WXQGTFTSDYSKYLD E CRA K DFV QWLMNT	고리 형성	4.68	1.0
서열번호: 27	YXQGTFTSDYSKYLD E CRA K DFV QWLMNT	고리 형성	4.68	93.6
서열번호: 28	WXQGTFTSDYSKYLD E CRA K DFV QWLMNT	고리 형성	4.68	< 0.1
서열번호: 29	YXQGTFTSDYSKCLD E RR A KDFV QWLMNT	고리 형성	6.15	61.3
서열번호: 30	WXQGTFTSDYSKCLD E RR A KDFV QWLMNT	고리 형성	4.44	0.3
서열번호: 31	YXQGTFTSDYSKYLD C KRA E EFV QWLMNT	고리 형성	8.12	6.3

서열번호: 32	-SQGTFTSDYSKYLD <u>E</u> CRA <u>K</u> EFVQ WLMNT	고리 형성	4.78	0.7
서열번호: 33	YXQGTFTSDYSKYLDSRRAQDFV QWLMNT	-	6.04	108.2
서열번호: 34	WXQGTFTSDYSKYCD <u>E</u> RR <u>A</u> K <u>E</u> FFV QWLMNT	고리 형성	6.21	0.2
서열번호: 35	YXQGTFTSDYSKYCD <u>E</u> RR <u>A</u> K <u>E</u> FFV QWLMNT	고리 형성	6.2	17.7
서열번호: 36	YXQGTFTSDCSKYLD <u>E</u> RR <u>A</u> K <u>E</u> FFV QWLMNT	고리 형성	6.21	9.9
서열번호: 37	YXQGTFTSDYSKYLD <u>E</u> RR <u>A</u> K <u>E</u> FFV QWLMNTC	고리 형성	6.21	225.5
서열번호: 38	YXQGTFCSDYSKYLD <u>E</u> RR <u>A</u> K <u>E</u> FFV QWLMNT	고리 형성	6.15	167.3
서열번호: 39	YXQGTFSVSDCSKYLD <u>E</u> RR <u>A</u> K <u>E</u> DFV QWLMNT	고리 형성	6.15	3.7
서열번호: 40	YXQGTFSVSDYSKYLD <u>E</u> RR <u>A</u> K <u>E</u> DFV QWLMNTC	고리 형성	6.15	40.8
서열번호: 41	YXQGTFCSDYSKYLD <u>E</u> RR <u>A</u> K <u>E</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
서열번호: 45	YXQGTFTSDYSCYLDEKRAKEFV QWLMNT	-	4.78	5.2

[401] 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.

[402]

[403] **실시예 3: 글루카곤 유도체의 pI 측정**

[404]

[405] 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.

[406] 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.

[407]

[408] **실시예 4: 글루카곤 유도체의 cAMP 활성 측정**

[409] 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 EC_{50} 값을 산출한 후 천연형 글루카곤과 상호 비교하였다. 그 결과를 상기 표 1에 나타내었다.

[410]

[411] **실시예 5: 글루카곤 유도체의 지속형 결합체 제조**

[412]

[413] 상기 글루카곤 유도체 펩타이드의 지속형 결합체는 다음과 같은 방법으로 제조되었다.

[414] 양 말단의 수소가 각각 3-(3-말레이미도프로피온아미도)프로필 기 및 3-옥소프로필기(프로피온알데히드기)로 치환된 분자량 10 kDa의 선형 개질 폴리에틸렌글리콜인 말레이미드-PEG-알데히드(일본 NOF사)를 앞에서 서술한 글루카곤 유도체 펩타이드 중 시스테인을 보유한 유도체에 반응시켜 이 글루카곤 유도체 펩타이드의 시스테인 잔기를 말레이미드-PEG-알데히드의 말레이미드쪽 말단에 폐결화시켰다. 구체적으로, 서열번호 37의 글루카곤 유도체 펩타이드와 말레이미드-PEG-알데히드의 몰비를 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.

[415] 면역글로불린 Fc 영역은 N-말단에 Pro-Ser-Cys-Pro 서열(서열번호 59)의 힌지 영역을 갖는 면역글로불린 Fc영역 (49.8kDa, 서열번호 69의 사슬 두 개가 이황화결합으로 연결된 동종이량체)를 사용하여 국제공개특허 WO2007/021129에 기재된 방법으로 제조하였다.

[416] 다음으로, 상기 정제된 모노-폐길화된 글루카곤 유도체 펩타이드와 면역글로불린 Fc 절편을 물비가 1:2~10, 단백질의 농도를 10~50mg/mL로 하여 4~8°C에서 12~18시간 동안 반응시켰다. 반응액은 100 mM 인산칼륨 완충액(pH 6.0)에 환원제인 10~50 mM 소디움시아노보로하이드라이드와 10~20 % 아이소프로판올이 첨가된 환경하에서 수행되었다. 반응이 종료된 후, 상기 반응액을 Butyl sepharose FF 정제컬럼(GE healthcare, 미국)과 Source ISO 정제컬럼(GE healthcare, 미국)에 적용하여, 상기 모노-폐길화된 글루카곤 유도체 펩타이드의 알데히드쪽 폴리에틸렌글리콜 말단이 면역글로불린 Fc 동종이량체의 두 사슬 중 한 사슬의 N-말단 프롤린 질소에 연결된 글루카곤 유도체 펩타이드의 지속형 결합체를 정제하였다.

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

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

[419]

[420] **실시예 6: 글루카곤 유도체의 지속형 결합체의 간염증 개선 효과**

[421]

[422] 상기 실시예 5에서 제조된 지속형 결합체의 간염증 개선 효능을 확인하고자 AMLN (아밀린) /TAA (Thioacetamide) 마우스 모델을 사용하였다. C57BL/6 마우스에 10주간 AMLN 식이섭취 및 TAA 투여 (50 ~ 400 mg/kg, TIW - 주당 3회)를 진행하여 모델을 유도하였다.

[423]

[424] 유도된 AMLN /TAA 마우스 모델은 부형제 대조군, 지속형 결합체 (1.3 nmol/kg, Q2D) 투여군으로 나누었고, 4주 동안 피하로 반복투여를 진행하였다. 음성대조군으로는 AMLN 식이만 섭취한 마우스를 사용하였다. 4주 반복투여 후 부검을 통해 취한 각 마우스의 간조직에 H&E 염색을 진행한 뒤, 간염증 점수(liver inflammation score)를 측정하였다.

[425]

[426] 그 결과, 도 1에서와 같이 지속형 결합체를 4주간 반복 투여한 결과, AMLN/TAA 부형제 대조군 대비 지속형 결합체 투여군에서 간염증 점수가 유의적으로 감소한 것을 확인하였다(**p < 0.001 vs. AMLN/TAA 부형제 대조군

by one-way ANOVA). 이와 같은 간염증 점수의 감소를 통해, 글루카곤 유도체의 지속형 결합체가 간염증 개선 효과를 가짐을 확인하였다.

[427]

[428] 실시예 7: 글루카곤 유도체의 지속형 결합체의 간염유화 개선 효과

[429]

[430] 상기 실시예 5에서 제조된 지속형 결합체의 섬유증 개선 효능을 확인하고자, 실시예 6과 동일한 AMLN (아밀린) /TAA (Thioacetamide) 마우스 모델을 사용하였다. 유도된 AMLN /TAA 마우스 모델을 부형제 대조군, 지속형 결합체 (1.3 nmol/kg, Q2D) 투여군으로 나누었고, 4주동안 피하로 반복투여를 진행하였다. 음성대조군으로는 AMLN 식이만 섭취한 마우스를 사용하였다. 4주 반복투여 후, 부검을 통해 취한 각 마우스의 간조직에서 침윤성 섬유증 마커인 하이드록시프롤린(hydroxyproline) 함량을 측정하였다.

[431]

[432] 그 결과, 도 2에서와 같이 AMLN/TAA 부형제 대조군에서 간조직 내 하이드록시프롤린 함량이 증가된 반면, 지속형 결합체 투여군에서는 지속형 결합체 투여에 의해 유의적으로 간조직 내 하이드록시프롤린 함량이 감소한 것을 확인하였다(*** $p < 0.001$ vs. AMLN/TAA 부형제 대조군 by one-way ANOVA). 이와 같은 침윤성 섬유증 지표 개선을 통해 글루카곤 유도체의 지속형 결합체가 간염유화에 대한 개선 효과를 가짐을 확인하였다.

[433]

[434] 실시예 8: 글루카곤 유도체의 지속형 결합체의 단순지방증 개선 효과

[435]

[436] 상기 실시예 5에서 제조된 글루카곤 유도체의 지속형 결합체의 단순 지방증 (steatosis) 개선 효능을 확인하고자 고지방 식이 유도를 통해 비알콜성 지방간을 유발한 동물 모델인 AMLN 마우스를 사용하였다. C57BL/6 마우스에서 29주간 AMLN (40 kcal-% fat, 22% fructose, 10% sucrose, 2% cholesterol) 식이 섭취를 진행하여 비알콜성 지방간을 유도하였으며, 시험은 정상 식이를 섭취한 정상마우스, AMLN 식이로 유도된 비알코올성 지방간질환 마우스 (부형제 대조군), 글루카곤 유도체의 지속형 결합체 투여군 (2.0 nmol/kg, Q2D)으로 나누었고, 해당 물질을 12주간 피하로 반복 투여 하였다. 반복 투여 후 부검을 통해 각 마우스의 간 조직을 취한 후, 간 내 중성지방 수치를 통하여 글루카곤 유도체의 지속형 결합체의 단순지방증 개선 정도를 평가하였다.

[437]

도 3은 각 군에서 간 g당 중성지방의 수치를 평가한 결과를 보여준다. 글루카곤 유도체의 지속형 결합체를 12주간 반복 투여한 결과, 간 조직 내의 중성지방 수치가 부형제 대조군과 비교했을 때 유의미하고 감소한 것을 확인할 수 있었다 (정상식이 섭취 군 = 간 g당 15.0 mg의 중성지방, AMLN 식이 대조군 = 간 g 당 139.0 mg, AMLN 식이 글루카곤 유도체의 지속형 결합체 2.0 nmol/kg = 간 g 당 25.0 mg의 중성지방).

- [438] 통계 처리는 1원 ANOVA를 사용하여 부형제 대조군과 비교하여 글루카곤 유도체의 지속형 결합체의 효능을 평가하였다. (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, and *** $p < 0.001$)
- [439]
- [440] 이와 같은 결과는 본 발명의 글루카곤 유도체의 지속형 결합체의 투약 시 단순지방증, 간염증 및 간섬유화의 효과적인 개선을 기대할 수 있을 뿐만 아니라, 이러한 단순지방증, 간염증 및 간섬유화에 의해 유발되는 기타 간 질환들에 대한 추가적인 개선을 나타낼 수 있음을 시사한다.
- [441]
- [442]
- [443] 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] 간 질환의 예방 또는 치료를 위한 약학적 조성물로서,
 약학적으로 허용되는 부형제;와
 하기 일반식 1의 아미노산 서열을 포함하는 펩타이드를 약학적
 유효량으로 포함하는 약학적 조성물:
 Y-X2-QGTF-X7-SDYSKY-X14-D-X16-X17-R-X19-X20-X21-FVQWLMNT-
 X30 (일반식 1, 서열번호: 46)
 X2는 Aib(aminoisobutyric acid)이고;
 X7은 트레오닌(T), 발린(V) 또는 시스테인(C)이고;
 X14는 류신(L) 또는 시스테인(C)이고;
 X16은 글루탐산(E), 또는 세린(S) 이고;
 X17은 리신(K), 아르기닌(R), 또는 시스테인(C)이며;
 X19는 알라닌(A), 또는 시스테인(C)이며;
 X20은 리신(K), 또는 글루타민(Q)이며;
 X21은 아스파르트산(D), 또는 글루탐산(E)이며;
 X30은 시스테인(C)이거나, 부존재함
 (단, 상기 일반식 1의 아미노산 서열이 서열번호: 1 또는 서열번호: 12와
 동일한 경우는 제외함).
- [청구항 2] 제 1항에 있어서, 상기 펩타이드는 지속형 결합체의 형태이고, 상기
 지속형 결합체는 하기 화학식 1로 표시되는 약학적 조성물:
 [화학식 1]
 X - L - F
 단 이 때 X는 상기 일반식 1의 아미노산 서열을 포함하는 펩타이드이고;
 L은 에틸렌글리콜 반복 단위를 함유하는 링커이며,
 F는 면역글로불린 Fc 영역이고,
 -는 X와 L 사이, L과 F 사이의 공유결합 연결을 나타낸다.
- [청구항 3] 제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 간질환은 단순지방증(steatosis), 간
 섬유증 (liver fibrosis), 간 염증(liver inflammation), 간경변(liver cirrhosis),
 간부전 (liver decompensation), 간암(hepatocellular carcinoma), 및
 담즙정체성 간질환(cholestasis liver disease)으로 이루어진 군에서
 선택되는 어느 하나인 것인, 약학적 조성물.
- [청구항 4] 제3항에 있어서, 상기 담즙정체성 간질환은 원발성 담즙성 경변증
 (Primary biliary cirrhosis), 원발성 경화성 담관염(primary sclerosing
 cholangitis) 및 이들의 조합으로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나인,
 약학적 조성물.
- [청구항 5] 제3항에 있어서, 상기 간질환은 비알코올성지방간염(non-alcoholic
 steatohepatitis, NASH)으로 인한 것이거나, 또는 동반하는 것인, 약학적

- 조성물.
- [청구항 6] 제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 펩타이드는 서열번호 20, 22, 23, 27, 33, 35, 37, 38, 40, 41, 42, 및 44로 이루어진 군에서 선택되는 아미노산 서열을 포함하는 것인, 약학적 조성물.
- [청구항 7] 제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 펩타이드는 서열번호 20, 22, 23, 27, 33, 37, 38, 및 44로 이루어진 군에서 선택되는 아미노산 서열을 포함하는 것인, 약학적 조성물.
- [청구항 8] 제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 약학적 조성물은 투여시 투여받은 개체에서 간염증 점수(liver inflammation score)를 감소시키는 것인, 약학적 조성물.
- [청구항 9] 제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 약학적 조성물은 투여시 투여받은 개체에서 하이드록시프로린 함량을 감소시키는 것인, 약학적 조성물.
- [청구항 10] 제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 약학적 조성물은 투여시 투여받은 개체에서 간 조직 내 중성 지방 함량을 감소시키는 것인, 약학적 조성물.
- [청구항 11] 제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 펩타이드의 C-말단이 아미드화된, 약학적 조성물.
- [청구항 12] 제2항에서, 상기 L 내의 에틸렌글리콜 반복 단위 부분의 화학식량은 1 내지 100 kDa 범위에 있는 약학적 조성물.
- [청구항 13] 간 질환의 예방 또는 치료를 위한 약학적 조성물로서,
약학적으로 허용되는 부형제;와
서열번호 20, 22, 33, 37, 및 38 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하는 펩타이드를 약학적 유효량으로 포함하는 약학적 조성물.
- [청구항 14] 제13항에 있어서, 상기 펩타이드는 지속형 결합체의 형태이고, 상기 지속형 결합체는 하기 화학식 1로 표시되는 약학적 조성물:
[화학식 1]
X - L - F
단 이 때 X는 서열번호 20, 22, 33, 37, 및 38 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하는 펩타이드고;
L은 에틸렌글리콜 반복 단위를 함유하는 링커이며,
F는 면역글로불린 Fc 영역이고,
-는 X와 L 사이, L과 F 사이의 공유결합 연결을 나타낸다.
- [청구항 15] 제13항 또는 제14항에 있어서, 상기 간질환은 단순지방증 (steatosis), 간 섬유증 (liver fibrosis), 간 염증(liver inflammation), 간경변(liver cirrhosis), 간부전 (liver decompensation), 간암(hepatocellular carcinoma), 및 담즙정체성 간질환(cholestasis liver disease)으로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나인 약학적 조성물.
- [청구항 16] 제15항에 있어서, 상기 담즙정체성 간질환은 원발성 담즙성 경변증 (Primary biliary cirrhosis), 원발성 경화성 담관염(primary sclerosing

cholangitis) 및 이들의 조합으로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나인 약학적 조성물.

[청구항 17] 제15항에 있어서, 상기 간질환은 비알코올성지방간염(non-alcoholic steatohepatitis, NASH)으로 인한 것이거나, 또는 동반하는 것인 약학적 조성물.