

명세서

발명의 명칭: 글루카곤 유도체의 지속형 결합체의 액상 제제

기술분야

- [1] 본 발명은 글루카곤 유도체의 지속형 결합체의 액상 제제 및 이의 제조방법에 관한 것이다.

[2]

배경기술

- [3] 최근 경제적 발전과 식습관 등의 변화에 따라 비만, 고지혈증, 고혈압, 동맥경화, 고인슐린혈증, 당뇨병 또는 간질환 등 다양한 질환을 포함하는 대사증후군 관련 질환의 발병이 급증하고 있는 상황이다. 이와 같은 질환들은 각각 발생하기도 하지만 일반적으로는 서로 밀접한 관련을 맺고 있으면서 여러 증상들을 동반하여 발생하는 경우가 대부분이다.
- [4] 특히, 국제보건기구(World Health Organisation, WHO)에 따르면, 전 세계적으로 10억 이상의 성인이 과체중이고, 그 중 적어도 300만 이상이 임상적으로 비만이며, 특히 유럽에서 매년 250,000명, 전 세계적으로는 매년 250만명 이상이 과체중과 관련되어 사망하였다.
- [5] 비만은 전 세계적인 질병으로서 각종 질환의 원인이 되기도 하는 심각한 질병이지만 개인의 자구적인 노력에 의하여 극복될 수 있다고 믿어지는 경향이 있다. 그러나, 비만은 의외로 치료가 용이하지 않은데, 그 이유는 비만이 식욕조절 및 에너지 대사의 작용기작이 관련된 복잡한 질환이기 때문이다. 따라서, 비만을 치료하기 위하여는, 환자 자신의 노력뿐만 아니라 식욕조절 및 에너지 대사와 관련된 비정상적인 작용기작을 치료하는 방법이 동시에 수행되어야만 하므로, 상기 비정상적인 작용기작을 치료할 수 있는 의약을 개발하려는 노력이 계속되고 있다.
- [6] 상술한 노력의 결과로서, 리모나반트(Rimonabant, Sanofi-Aventis), 시부트라민(Sibutramin, Abbott), 콘트라베(Contrave, Takeda), 오르리스타트(Orlistat, Roche) 등의 비만 치료제가 개발되었으나, 이들은 치명적인 부작용을 나타내거나 비만 치료효과가 미비하다는 단점이 있었다. 이처럼 종래 비만 치료제의 문제점을 해소할 수 있는 새로운 의약품을 개발하려는 연구가 활발히 진행되고 있으며, 최근에는 글루카곤 유도체에 관심이 집중되고 있다.
- [7] 글루카곤은 약물 치료 또는 질병, 호르몬이나 효소 결핍 등의 원인으로 혈당이 떨어지기 시작하면 췌장에서 생산된다. 글루카곤은 간에서 글리코젠을 분해하여 글루코스를 방출하도록 신호하고, 혈당 수준을 정상 수준까지 높이는 역할을 한다. 또한, 글루카곤은 저혈당증을 치료하는데 효과적인 것으로 알려졌다. 글루카곤의 저혈당 치료 효과는 간 글리코젠의 글루코스로의

분해(글리코젠 분해)를 자극하거나, 간으로부터 증가된 글루코스 유출을 초래하는 아미노산 전구체로부터 유도된 글루코스 생성(글루코스 생합성)을 증가시킨 결과이다.

- [8] 뿐만 아니라, 글루카곤은 혈당 상승효과 이외에 식욕억제 및 지방세포의 호르몬 민감성 리파제(hormone-sensitive lipase)를 활성화시켜 지방 분해를 촉진하여 항비만 효과를 나타냄이 보고되었다. 그러나, 글루카곤은 낮은 용해도와 중성 pH에서의 침전으로 인해 치료제로서 그 사용이 제한되어 왔다.
- [9] 따라서 물성이 개선된 글루카곤은 심각한 저혈당의 치료나 지방분해와 간에서의 베타 산화(β -oxydation) 증가 등 글루카곤 단독으로 비알콜성지방간(NASH) 혹은 이상 지혈증(dyslipidemia)등의 치료에 유용하게 사용될 수 있다.
- [10] 저혈당 치료를 위한 약물로는 디아옥사이드(diazoxide), 옥트레오타이드(octreotide), 글루카곤 등이 이용된다. 이 중 글루카곤은 낮은 용해도와 중성 pH에서의 침전에 의해 현재는 동결제형으로 사용되어 사용 전 용매에 녹여서 사용해야 하는 불편함이 있으며, 더욱이 짧은 반감기로 인해 장기 치료가 필요한 선천성 고인슐린증 치료제로 사용시 잦은 투여로 인해 그 사용이 제한되어 왔다.
- [11] 이러한 기술적 배경 하에서 본 발명자들은 글루카곤의 물성을 개선하여 저혈당과 비만에 대한 치료효과를 증진시키기 위하여 글루카곤의 아미노산 서열이 일부 변형된 유도체를 개발하였다 (국제공개특허 WO 2016/108586 및 국제공개특허 WO2017/003191). *In vitro* 활성 측정을 통해 개발된 글루카곤 유도체가 글루카곤 수용체를 활성화시킴을 확인하였다. 또한 체내 반감기를 증가시키는 상기 글루카곤 유도체의 지속형 결합체를 개발하였으며, 상기 지속형 결합체가 천연 글루카곤과는 다른 변화된 pI로 인해 중성 pH에서 개선된 용해도 및 높은 안정성을 나타낼 수 있음을 확인하였다(국제공개특허 WO2017/003191).

[12]

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [13] 글루카곤 유도체의 지속형 결합체를 바이러스 오염의 우려 없이 장시간 동안 보관할 수 있는 안정한 액상 제제의 개발이 여전히 요구된다.

[14]

기술적 해결방법

- [15] 본 발명의 하나의 목적은 글루카곤 유도체의 지속형 결합체의 액상 제제를 제공하는 것이다.
- [16] 본 발명의 다른 목적은 상기 액상 제제를 제조하는 방법을 제공하는 것이다.
- [17]

발명의 효과

- [18] 본 발명에 따른 액상 제제는 간단한 제형으로 분자량이 큰 본 발명의 결합체에 저장 안정성을 제공하여, 경제적인 제공이 가능한 이점이 있다.

[19]

도면의 간단한 설명

- [20] 도 1a 및 1b는 완충물질의 종류에 따른 글루카곤 유도체의 지속형 결합체의 안정성을 확인한 결과이다. 구체적으로, 실시예 2의 표 3과 같은 조성 (표 3의 #1번, #3번, 및 #5번 조성)을 각각 글루카곤 유도체의 지속형 결합체의 액상 제제로 사용하여 25°C에서 7주 보관 후 안정성 결과를 나타낸 것이다. 결과 중, 완충물질로서 아세트산나트륨과 히스티딘 제제가 25°C에서 7주간 가장 높은 안정성을 나타냈다.

[21]

발명의 실시를 위한 최선의 형태

- [22] 본 발명을 구현하는 하나의 양태는 글루카곤 유도체의 지속형 결합체의 액상 제제이다. 상기 지속형 결합체는 글루카곤 유도체에 대해 활성을 갖는 펩타이드가 면역글로불린 Fc 절편에 링커에 의해 공유결합되어 있는 물질을 의미한다.

- [23] 하나의 구체예에서, 본 발명은 글루카곤 유도체 펩타이드 및 면역글로불린 Fc 절편이 서로 연결된, 글루카곤 유도체 펩타이드의 지속형 결합체를 약리학적 유효량으로 포함하고, i) 완충물질 및 ii) 당알코올, 당 또는 이들의 조합을 포함하는 알부민-비함유 안정화제를 포함하는, 글루카곤 유도체 펩타이드의 지속형 결합체의 액상 제제에 관한 것이다. 상기 지속형 결합체는 글루카곤 유도체 펩타이드가 면역글로불린 Fc 절편에 공유결합되어 있는 물질을 의미한다.

- [24] 하나의 구체예로서, 상기 액상제제는 하기 화학식 1의 지속형 결합체; 완충 물질; 및 당알코올, 당, 또는 이들의 조합을 포함하는 지속형 결합체의 액상 제제인 것을 특징으로 한다:

[25] [화학식 1]

[26] X - La - F

[27] 상기 화학식 1에서 X는 글루카곤 유도체 펩타이드이고;

[28] L은 링커이며;

[29] a는 0 또는 자연수이며, 다만 a가 2 이상일 때, 각각의 L은 서로 독립적이고;

[30] F는, 면역글로불린 Fc 절편이며;

[31] -는 공유결합을 나타냄;

[32] [일반식 1]

[33] Y-X2-QGTF-X7-SD-X10-S-X12-X13-X14-X15-X16-X17-X18-X19-X20-X21-F-X
23-X24-W-L-X27-X28-T-X30 (일반식 1, 서열번호 46)

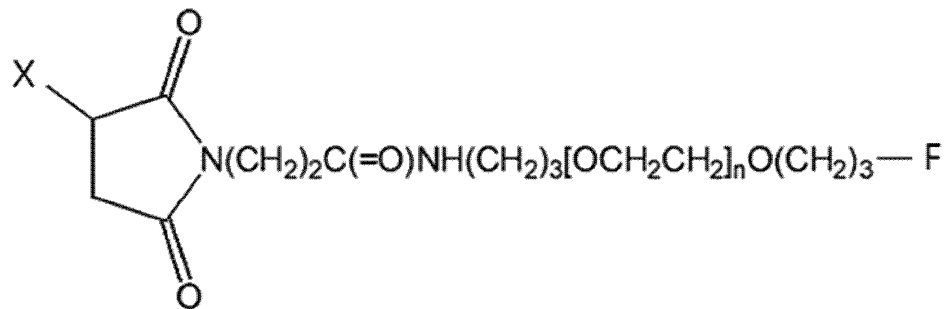
- [34] 상기 일반식 1에서,
- [35] X2는 알파-메틸-글루탐산(α -methyl-glutamic acid), Aib(aminoisobutyric acid), D-알라닌, 글리신(G), Sar(N-methylglycine), 세린(S) 또는 D-세린이며;
- [36] X7은 트레오닌(T), 발린(V) 또는 시스테인(C)이고;
- [37] X10은 티로신(Y) 또는 시스테인(C)이고;
- [38] X12는 리신(K) 또는 시스테인(C)이고;
- [39] X13은 티로신(Y) 또는 시스테인(C)이고;
- [40] X14는 류신(L) 또는 시스테인(C)이고;
- [41] X15는 아스파르트산(D), 글루탐산(E) 또는 시스테인(C)이고;
- [42] X16은 글루탐산(E), 아스파르트산(D), 세린(S), 알파-메틸-글루탐산, 또는 시스테인(C)이거나, 부존재하며;
- [43] X17은 아스파르트산(D), 글루타민(Q), 글루탐산(E), 리신(K), 아르기닌(R), 세린(S), 시스테인(C), 또는 발린(V)이거나, 부존재하며;
- [44] X18은 알라닌(A), 아스파르트산(D), 글루타민(Q), 글루탐산(E), 아르기닌(R), 발린(V), 또는 시스테인(C)이거나, 부존재하며;
- [45] X19는 알라닌(A), 아르기닌(R), 세린(S), 발린(V), 또는 시스테인(C)이거나, 부존재하며;
- [46] X20은 리신(K), 히스티딘(H), 글루탐산(E), 글루타민(Q), 아스파르트산(D), 아르기닌(R), 알파-메틸-글루탐산, 또는 시스테인(C)이거나, 부존재하며;
- [47] X21은 아스파르트산(D), 글루탐산(E), 류신(L), 발린(V), 또는 시스테인(C)이거나, 부존재하며;
- [48] X23은 이소류신(I), 발린(V), 또는 아르기닌(R)이거나, 부존재하며;
- [49] X24는 발린(V), 아르기닌(R), 알라닌(A), 시스테인(C), 글루탐산(E), 리신(K), 글루타민(Q), 알파-메틸-글루탐산, 또는 류신(L)이거나, 부존재하며;
- [50] X27은 이소류신(I), 발린(V), 알라닌(A), 리신(K), 메티오닌(M), 글루타민(Q), 또는 아르기닌(R)이거나, 부존재하며;
- [51] X28은 글루타민(Q), 리신(K), 아스파라긴(N), 또는 아르기닌(R)이거나, 부존재하며;
- [52] X30은 시스테인(C)이거나, 부존재할 수 있다 (단, 상기 일반식 1의 아미노산 서열이 서열번호: 1 및 서열번호 12와 동일한 경우는 제외함).
- [53] 상기 Aib는 아미노이소부티르산 (aminoisobutyric acid)을 의미한다. 본 명세서에서 “Aib”는 “2-아미노이소부티르산(2-aminoisobutyric acid)” 또는 “아미노이소부티르산 (aminoisobutyric acid)”으로 혼용될 수 있다.
- [54]
- [55] 앞선 구체예 중 어느 하나에 따른 액상 제제로서, 상기 글루카곤 유도체 펩타이드의 지속형 결합체에서 상기 글루카곤 유도체 펩타이드는 하기 일반식 2의 아미노산 서열을 포함하는 것을 특징으로 한다:
- [56] Y-Aib-QGTF-X7-SD-X10-S-X12-Y-L-X15-X16-X17-R-A-X20-X21-F-V-X24-W-L

-M-N-T-X30(일반식 2, 서열번호: 47)

- [57] 상기 일반식 2에서,
- [58] X7은 트레오닌(T), 발린(V) 또는 시스테인(C)이고;
- [59] X10은 티로신(Y) 또는 시스테인(C)이고;
- [60] X12는 리신(K) 또는 시스테인(C)이고;
- [61] X15는 아스파르트산(D), 또는 시스테인(C)이고;
- [62] X16은 글루탐산(E) 또는 세린(S)이며;
- [63] X17은 리신(K) 또는 아르기닌(R)이고;
- [64] X20은 글루타민(Q) 또는 리신(K)이며;
- [65] X21은 아스파르트산(D), 또는 글루탐산(E)이고;
- [66] X24는 발린(V) 또는 글루타민(Q)이고;
- [67] X30은 시스테인(C)이거나, 부존재함
- [68] (단, 상기 일반식 2의 아미노산 서열이 서열번호 1 및 서열번호 12와 동일한 경우는 제외함).
- [69]
- [70] 앞선 구체에 중 어느 하나에 따른 액상 제제로서, 상기 액상 제제는 18~ 936 nmol/mL의 상기 화학식 1의 지속형 결합체; 상기 액상 제제의 pH를 4.8 ~ 6.5의 범위에서 유지하기 위한 분량의 완충 물질; 및 1.0 ~ 20%(w/v)의 당알코올, 당, 또는 이들의 조합;을 포함하는 지속형 결합체의 액상 제제인 것을 특징으로 한다.
- [71]
- [72] 앞선 구체에 중 어느 하나에 따른 액상 제제로서, 상기 액상 제제는 당 또는 당알코올, 비이온성 계면활성제 및 아미노산으로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 성분을 더 포함하는 것을 특징으로 한다.
- [73] 앞선 구체에 중 어느 하나에 따른 액상 제제로서, 상기 액상 제제는 당 또는 당알코올, 아미노산, 또는 이들 둘 다를 더 포함하는, 글루카곤 유도체 펩타이드의 지속형 결합체의 액상 제제인 것을 특징으로 한다.
- [74] 앞선 구체에 중 어느 하나에 따른 액상 제제로서, 상기 액상 제제는 완충물질, 당 또는 당알코올, 및 아미노산을 포함하는 것을 특징으로 한다.
- [75] 앞선 구체에 중 어느 하나에 따른 액상 제제로서, 상기 액상 제제는 완충물질, 당 또는 당알코올, 비이온성 계면 활성제, 및 아미노산을 포함하는 것을 특징으로 한다.
- [76] 앞선 구체에 중 어느 하나에 따른 액상 제제로서, 상기 액상 제제는 비이온성 계면활성제, 아미노산, 또는 이들 둘 다를 더 포함하는 것을 특징으로 한다.
- [77] 앞선 구체에 중 어느 하나에 따른 액상 제제로서, 상기 액상 제제는 i) 당 또는 당알코올, ii) 비이온성 계면활성제, 또는 이들의 조합을 포함하는 것을 특징으로 한다.
- [78] 앞선 구체에 중 어느 하나에 따른 액상 제제로서, 상기 글루카곤 유도체

펩타이드는 서열번호 2 내지 11 및 13 내지 45로 이루어진 군에서 선택된 아미노산 서열을 포함하는 것을 특징으로 한다.

- [79] 상기 펩타이드는 서열번호 2 내지 11, 13 내지 45의 아미노산 서열을 포함하는 것, 서열번호 2 내지 11, 13 내지 45로 이루어진 군에서 선택된 아미노산 서열로 (필수적으로) 구성된 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [80] 이러한 펩타이드의 예로, 서열번호 13, 15 및 36 내지 44로 이루어진 군에서 선택된 아미노산 서열을 포함하거나, 이로 (필수적으로) 구성된 펩타이드를 들 수 있으나, 특별히 이에 제한되는 것은 아니다. 또 하나의 예로, 상기 펩타이드는 서열번호 37로 이루어진 군에서 선택된 아미노산 서열을 포함하거나, 이로 (필수적으로) 구성된 펩타이드일 수 있으나, 특별히 이에 제한되는 것은 아니다.
- [81] 앞선 구체예 중 어느 하나에 따른 액상 제제로서, 상기 L은 폴리에틸렌글리콜인 것을 특징으로 한다.
- [82] 앞선 구체예 중 어느 하나에 따른 액상 제제로서, 상기 L 내의 에틸렌글리콜 반복 단위 부위의 화학식량은 1 내지 100 kDa 범위에 있는 것을 특징으로 한다.
- [83] 앞선 구체예 중 어느 하나에 따른 액상 제제로서, 상기 화학식 1의 구조는 하기 화학식 2의 구조인 것을 특징으로 한다:
- [84] [화학식 2]
- [85]



- [86] 여기서, X 및 F는 화학식 1에서 정의한 바와 같다.
- [87] 앞선 구체예 중 어느 하나에 따른 액상 제제로서, 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.
- [88] 앞선 구체예 중 어느 하나에 따른 액상 제제로서, 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.
- [89] 앞선 구체예 중 어느 하나에 따른 액상 제제로서, 상기 X는 그 C-말단이 아미드화된 것을 특징으로 한다.
- [90] 앞선 구체예 중 어느 하나에 따른 액상 제제로서, 상기 X는 펩타이드 내의 시스테인의 황 원자를 통하여 연결된 것을 특징으로 한다.

- [91] 앞선 구체예 중 어느 하나에 따른 액상 제제로서, 상기 면역글로불린 Fc 절편은 IgG4 유래인 것을 특징으로 한다.
- [92] 앞선 구체예 중 어느 하나에 따른 액상 제제로서, 상기 F는 2개의 폴리펩타이드 사슬이 이황화결합으로 연결되어 있는 구조이며, 상기 두 사슬 중 한 사슬의 질소 원자를 통해서만 연결된 것을 특징으로 한다.
- [93] 앞선 구체예 중 어느 하나에 따른 액상 제제로서, 상기 F는 서열번호 51의 아미노산 서열인 단량체를 포함하는 것을 특징으로 한다.
- [94] 앞선 구체예 중 어느 하나에 따른 액상 제제로서, 상기 F는 서열번호 51의 아미노산 서열의 단량체의 동종이량체인 것을 특징으로 한다.
- [95] 앞선 구체예 중 어느 하나에 따른 액상 제제로서, 상기 F는 그 N-말단 프롤린의 질소 원자를 통하여 연결된 것을 특징으로 한다.
- [96] 앞선 구체예 중 어느 하나에 따른 액상 제제로서, 상기 면역글로불린 Fc 절편인 F와 X가 당쇄화되어 있지 않은 것을 특징으로 한다.
- [97]
- [98] 앞선 구체예에 따른 액상 제제로서, 상기 액상 제제는 비이온성 계면활성제, 및 아미노산으로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 성분을 추가적으로 포함하지 않는 것을 특징으로 한다.
- [99] 앞선 구체예 중 어느 하나에 따른 액상 제제로서, 상기 완충물질은 구연산과 그 염, 아세트산과 그 염, 히스티딘과 그 염, 인산과 그 염 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 한다.
- [100] 앞선 구체예 중 어느 하나에 따른 액상 제제로서, 상기 완충물질은 아세트산과 그 염인 것을 특징으로 한다.
- [101] 앞선 구체예 중 어느 하나에 따른 액상 제제로서, 상기 액상 제제의 pH는 4.8 내지 6.5인 것을 특징으로 한다.
- [102] 앞선 구체예 중 어느 하나에 따른 액상 제제로서, 상기 액상 제제의 pH는 4.8 내지 6.0인 것을 특징으로 한다.
- [103] 앞선 구체예 중 어느 하나에 따른 액상 제제로서, 상기 액상 제제의 pH는 4.8 내지 5.5인 것을 특징으로 한다.
- [104] 앞선 구체예 중 어느 하나에 따른 액상 제제로서, 상기 완충물질의 농도는 액상 제제의 pH를 4.8 내지 6.5의 범위에서 유지하기 위한 5 내지 100mM인 것을 특징으로 한다.
- [105] 앞선 구체예 중 어느 하나에 따른 액상 제제로서, 상기 당 또는 당알코올은 수크로오스, 만니톨 및 소르비톨로 구성되는 군으로부터 선택되는 하나 이상인 것을 특징으로 한다.
- [106] 앞선 구체예 중 어느 하나에 따른 액상 제제로서, 상기 당 또는 당알코올은 액상 제제 내에 1 내지 20%(w/v)의 농도로 존재하는 것을 특징으로 한다.
- [107] 앞선 구체예 중 어느 하나에 따른 액상 제제로서, 상기 지속형 결합체는 제제 내에 18 내지 2807 nmol/ml, 18 내지 936 nmol/mL, 90 ~ 562 nmol/mL, 187 내지 562

nmol/ml, 187 내지 2807 nmol/ml, 또는 93 내지 936 nmol/mL의 농도로 존재하는 것을 특징으로 한다.

- [108] 앞선 구체예 중 어느 하나에 따른 액상 제제로서, 상기 당은 글루코스, 프럭토스, 갈락토스, 락토스, 말토스, 수크로스, 또는 이들의 조합인 것을 특징으로 한다.
- [109] 앞선 구체예 중 어느 하나에 따른 액상 제제로서, 상기 당은 수크로스인 것을 특징으로 한다.
- [110] 앞선 구체예 중 어느 하나에 따른 액상 제제로서, 상기 당은 3 내지 15%(w/v)의 농도로 존재하는 것을 특징으로 한다.
- [111] 앞선 구체예 중 어느 하나에 따른 액상 제제로서, 상기 당알코올은 만니톨 및 소르비톨로 구성되는 군으로부터 선택되는 하나 이상인 것을 특징으로 한다.
- [112] 앞선 구체예 중 어느 하나에 따른 액상 제제로서, 상기 액상 제제는 비이온성 계면활성제 및 아미노산으로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 성분을 더 포함하는 것을 특징으로 한다.
- [113]
- [114] 앞선 구체예에 따른 액상 제제로서, 상기 액상 제제는 등장화제를 포함하지 않는 것을 특징으로 한다.
- [115] 앞선 구체예 중 어느 하나에 따른 액상 제제로서, 상기 비이온성 계면활성제는 폴록사머, 폴리소르베이트, 또는 이들의 조합인 것을 특징으로 한다.
- [116] 앞선 구체예 중 어느 하나에 따른 액상 제제로서, 상기 비이온성 계면활성제는 폴록사머 188, 폴리소르베이트 20, 폴리소르베이트 40, 폴리소르베이트 60, 폴리소르베이트 80, 및 이들의 조합으로 이루어진 군에서 선택되는 것을 특징으로 한다.
- [117] 앞선 구체예 중 어느 하나에 따른 액상 제제로서, 상기 비이온성 계면활성제는 제제 내에 0.001 내지 0.5%(w/v)의 농도로 존재하는 것을 특징으로 한다.
- [118] 앞선 구체예 중 어느 하나에 따른 액상 제제로서, 상기 아미노산은 메티오닌, 아르기닌, 히스티딘, 글리신, 시스테인, 라이신 및 이들의 조합으로 이루어진 군에서 선택되는 것을 특징으로 한다.
- [119] 앞선 구체예 중 어느 하나에 따른 액상 제제로서, 상기 아미노산은 제제 내에 0.01 내지 1 mg/mL의 농도로 존재하는 것을 특징으로 한다.
- [120] 앞선 구체예 중 어느 하나에 따른 액상 제제로서, 상기 액상 제제는 90 ~ 562 nmol/mL의 화학식 1의 펩타이드 결합체; 상기 액상 제제의 pH가 4.8 내지 6.5가 되도록 구연산과 그 염, 아세트산과 그 염, 히스티딘과 그 염, 인산과 그 염 및 이들의 조합 중에서 선택하는 5 ~ 25 mM의 완충 물질; 1 ~ 20%(w/v)의 당알코올, 당, 또는 이들의 조합; 및 폴록사머, 폴리소르베이트 또는 이들의 조합 중에서 선택하는 0.01 ~ 0.1%(w/v)의 비이온성 계면활성제;와 메티오닌, 아르기닌, 히스티딘, 글리신, 시스테인, 라이신 및 이들의 조합으로 이루어진 군에서 선택하는 0.01 ~ 1 mg/mL의 안정화제를 함유하는 것을 특징으로 한다.

- [121] 앞선 구체에 중 어느 하나에 따른 액상 제제로서, 상기 액상 제제는 90 ~ 562 nmol/mL의 화학식 1의 펩타이드 결합체; 상기 액상 제제의 pH가 4.8 내지 6.5가 되도록 구연산과 그 염, 아세트산과 그 염, 히스티딘과 그 염, 인산과 그 염 및 이들의 조합 중에서 선택하는 5 ~ 25 mM의 완충 물질; 4 ~ 10%(w/v)의 당알코올, 당, 또는 이들의 조합; 및 폴록사머, 폴리소르베이트 또는 이들의 조합 중에서 선택하는 0.01 ~ 0.1%(w/v)의 비이온성 계면활성제;와 메티오닌, 아르기닌, 히스티딘, 글리신, 시스테인, 라이신 및 이들의 조합으로 이루어진 군에서 선택하는 0.01 ~ 1 mg/mL의 안정화제를 함유하는 것을 특징으로 한다.
- [122] 앞선 구체에 중 어느 하나에 따른 액상 제제로서, 상기 액상 제제는 90 ~ 562 nmol/mL의 화학식 1의 펩타이드 결합체; 상기 액상 제제의 pH가 4.8 내지 6.0이 되도록 구연산과 그 염, 아세트산과 그 염, 히스티딘과 그 염, 인산과 그 염 및 이들의 조합 중에서 선택하는 5 ~ 25 mM의 완충 물질; 4 ~ 10%(w/v)의 당알코올, 당, 또는 이들의 조합; 및 폴록사머, 폴리소르베이트 또는 이들의 조합 중에서 선택하는 0.01 ~ 0.1%(w/v)의 비이온성 계면활성제;와 메티오닌, 아르기닌, 히스티딘, 글리신, 시스테인, 라이신 및 이들의 조합으로 이루어진 군에서 선택하는 0.01 ~ 1 mg/mL의 안정화제를 함유하는 것을 특징으로 한다.
- [123] 앞선 구체에 중 어느 하나에 따른 액상 제제로서, 상기 액상 제제는 90 ~ 562 nmol/mL의 화학식 1의 펩타이드 결합체; 상기 액상 제제의 pH가 4.8 내지 5.5가 되도록 구연산과 그 염, 아세트산과 그 염, 히스티딘과 그 염, 인산과 그 염 및 이들의 조합 중에서 선택하는 5 ~ 25 mM의 완충 물질; 4 ~ 10%(w/v)의 당알코올, 당, 또는 이들의 조합; 및 폴록사머, 폴리소르베이트 또는 이들의 조합 중에서 선택하는 0.01 ~ 0.1%(w/v)의 비이온성 계면활성제;와 메티오닌, 아르기닌, 히스티딘, 글리신, 시스테인, 라이신 및 이들의 조합으로 이루어진 군에서 선택하는 0.01 ~ 1 mg/mL의 안정화제를 함유하는 것을 특징으로 한다.
- [124]
- [125] 앞선 구체에 중 어느 하나에 따른 액상 제제로서, 상기 제제는 pH 4.8 내지 6.5 범위인 완충물질; 수크로오스, 만니톨, 소르비톨 및 이들의 조합으로 이루어진 군에서 선택되는 당 또는 당알코올; 메티오닌, 아르기닌, 히스티딘, 글리신, 시스테인, 라이신 및 이들의 조합으로 이루어진 군에서 선택되는 아미노산; 및 비이온성 계면활성제로서 폴리소르베이트를 포함하는 것을 특징으로 한다.
- [126] 앞선 구체에 중 어느 하나에 따른 액상 제제로서, 상기 글루카곤 유도체 펩타이드의 지속형 결합체에서 상기 글루카곤 유도체 펩타이드는 하기 일반식 1의 아미노산 서열을 포함하는 것을 특징으로 한다:
- [127] Y-X2-QGTF-X7-SD-X10-S-X12-X13-X14-X15-X16-X17-X18-X19-X20-X21-F-X23-X24-W-L-X27-X28-T-X30(일반식 1, 서열번호: 46)
- [128] 상기 일반식 1에서,
- [129]
- [130] X2는 알파-메틸-글루탐산(α -methyl-glutamic acid), Aib(aminoisobutyric acid),

- D-알라닌, 글리신(G), Sar(N-methylglycine), 세린(S) 또는 D-세린이며;
- [131] X7은 트레오닌(T), 발린(V) 또는 시스테인(C)이고;
- [132] X10은 티로신(Y) 또는 시스테인(C)이고;
- [133] X12는 리신(K) 또는 시스테인(C)이고;
- [134] X13은 티로신(Y) 또는 시스테인(C)이고;
- [135] X14는 류신(L) 또는 시스테인(C)이고;
- [136] X15는 아스파르트산(D), 글루탐산(E) 또는 시스테인(C)이고;
- [137] X16은 글루탐산(E), 아스파르트산(D), 세린(S), 알파-메틸-글루탐산, 또는 시스테인(C)이거나, 부존재하며;
- [138] X17은 아스파르트산(D), 글루타민(Q), 글루탐산(E), 리신(K), 아르기닌(R), 세린(S), 시스테인(C), 또는 발린(V)이거나, 부존재하며;
- [139] X18은 알라닌(A), 아스파르트산(D), 글루타민(Q), 글루탐산(E), 아르기닌(R), 발린(V), 또는 시스테인(C)이거나, 부존재하며;
- [140] X19는 알라닌(A), 아르기닌(R), 세린(S), 발린(V), 또는 시스테인(C)이거나, 부존재하며;
- [141] X20은 리신(K), 히스티딘(H), 글루탐산(E), 글루타민(Q), 아스파르트산(D), 아르기닌(R), 알파-메틸-글루탐산, 또는 시스테인(C)이거나, 부존재하며;
- [142] X21은 아스파르트산(D), 글루탐산(E), 류신(L), 발린(V), 또는 시스테인(C)이거나, 부존재하며;
- [143] X23은 이소류신(I), 발린(V), 또는 아르기닌(R)이거나, 부존재하며;
- [144] X24는 발린(V), 아르기닌(R), 알라닌(A), 시스테인(C), 글루탐산(E), 리신(K), 글루타민(Q), 알파-메틸-글루탐산, 또는 류신(L)이거나, 부존재하며;
- [145] X27은 이소류신(I), 발린(V), 알라닌(A), 리신(K), 메티오닌(M), 글루타민(Q), 또는 아르기닌(R)이거나, 부존재하며;
- [146] X28은 글루타민(Q), 리신(K), 아스파라긴(N), 또는 아르기닌(R)이거나, 부존재하며;
- [147] X30은 시스테인(C)이거나, 부존재함
- [148] (단, 상기 일반식 1의 아미노산 서열이 서열번호 1 및 서열번호 12와 동일한 경우는 제외함).
- [149] 앞선 구체예 중 어느 하나에 따른 액상 제제로서, 상기 일반식 1에서
- [150] X2가 세린(S) 또는 Aib(aminoisobutyric acid)이며;
- [151] X7은 트레오닌(T), 발린(V) 또는 시스테인(C)이고;
- [152] X10은 티로신(Y) 또는 시스테인(C)이고;
- [153] X12는 리신(K) 또는 시스테인(C)이고;
- [154] X13은 티로신(Y) 또는 시스테인(C)이고;
- [155] X14는 류신(L) 또는 시스테인(C)이고;
- [156] X15는 아스파르트산(D), 또는 시스테인(C)이고;
- [157] X16은 글루탐산(E), 세린(S) 또는 시스테인(C)이며;

- [158] X17은 아스파르트산(D), 글루탐산(E), 리신(K), 아르기닌(R), 세린(S), 시스테인(C), 또는 발린(V) 이고;
- [159] X18은 아스파르트산(D), 글루탐산(E), 아르기닌(R), 또는 시스테인(C)이며;
- [160] X19는 알라닌(A), 또는 시스테인(C)이고;
- [161] X20은 글루타민(Q), 아스파르트산(D), 리신(K), 또는 시스테인(C)이며;
- [162] X21은 아스파르트산(D), 글루탐산(E), 류신(L), 발린(V), 또는 시스테인(C)이고;
- [163] X23은 이소류신(I), 발린(V) 또는 아르기닌(R)이며;
- [164] X24는 발린(V), 아르기닌(R), 알라닌(A), 글루탐산(E), 리신(K), 글루타민(Q), 또는 류신(L)이고;
- [165] X27는 이소류신(I), 발린(V), 알라닌(A), 메티오닌(M), 글루타민(Q) 또는 아르기닌(R)이며;
- [166] X28은 글루타민(Q), 리신(K), 아스파라긴(N) 또는 아르기닌(R)이고;
- [167] X30은 시스테인(C)이거나, 부존재하는 것을 특징으로 한다. (단, 상기 일반식 1의 아미노산 서열이 서열번호 1 및 서열번호 12와 동일한 경우는 제외함).
- [168] 앞선 구체예 중 어느 하나에 따른 액상 제제로서,
- [169] 상기 일반식 1에서
- [170] X2가 세린(S) 또는 Aib(aminoisobutyric acid)이며;
- [171] X7은 시스테인(C), 트레오닌(T), 또는 발린(V)이고;
- [172] X10은 티로신(Y) 또는 시스테인(C)이며;
- [173] X12는 리신(K) 또는 시스테인(C)이고;
- [174] X13은 티로신(Y) 또는 시스테인(C)이며;
- [175] X14는 류신(L) 또는 시스테인(C)이고;
- [176] X15는 아스파르트산(D), 또는 시스테인(C)이며;
- [177] X16은 글루탐산(E), 세린(S) 또는 시스테인(C)이고;
- [178] X17은 글루탐산(E), 리신(K), 아르기닌(R), 시스테인(C), 또는 발린(V)이며;
- [179] X18은 아르기닌(R), 또는 시스테인(C)이고;
- [180] X19는 알라닌(A), 또는 시스테인(C)이며;
- [181] X20은 글루타민(Q) 또는 리신(K)이고;
- [182] X21은 아스파르트산(D), 글루탐산(E), 발린(V), 또는 시스테인(C)이며;
- [183] X23은 발린(V)이고;
- [184] X24는 발린(V) 또는 글루타민(Q)이며;
- [185] X27는 메티오닌(M)이고;
- [186] X28은 아스파라긴(N) 또는 아르기닌(R)이며;
- [187] X30은 시스테인(C)이거나, 부존재하는 것을 특징으로 한다. (단, 상기 일반식 1의 아미노산 서열이 서열번호 1 및 서열번호 12와 동일한 경우는 제외함).
- [188] 앞선 구체예 중 어느 하나에 따른 액상 제제로서,
- [189] 상기 일반식 1에서
- [190] X2가 Aib(aminoisobutyric acid)이며;

- [191] X7은 시스테인(C), 트레오닌(T), 또는 발린(V)이고;
- [192] X10은 티로신(Y) 또는 시스테인(C)이며;
- [193] X12는 리신(K)이고;
- [194] X13은 티로신(Y) 또는 시스테인(C)이며;
- [195] X14는 류신(L) 또는 시스테인(C)이고;
- [196] X15은 아스파르트산(D), 또는 시스테인(C)이며;
- [197] X16은 글루탐산(E), 세린(S) 또는 시스테인(C)이고;
- [198] X17은 리신(K), 아르기닌(R), 시스테인(C), 또는 발린(V)이며;
- [199] X18은 아르기닌(R), 또는 시스테인(C)이고;
- [200] X19는 알라닌(A), 또는 시스테인(C)이며;
- [201] X20은 글루타민(Q) 또는 리신(K)이고;
- [202] X21은 아스파르트산(D), 글루탐산(E), 또는 시스테인(C)이며;
- [203] X23은 발린(V)이고;
- [204] X24는 글루타민(Q)이며;
- [205] X27는 메티오닌(M)이고;
- [206] X28은 아스파라긴(N) 또는 아르기닌(R)이며;
- [207] X30은 시스테인(C)이거나, 부존재하는 것을 특징으로 한다. (단, 상기 일반식 1의 아미노산 서열이 서열번호 1 및 서열번호 12와 동일한 경우는 제외함).
- [208] 앞선 구체예 중 어느 하나에 따른 액상 제제로서,
- [209] 상기 일반식 1에서
- [210] X2가 세린(S) 또는 Aib(aminoisobutyric acid)이며;
- [211] X7은 트레오닌(T), 발린(V) 또는 시스테인(C)이고;
- [212] X10은 티로신(Y) 또는 시스테인(C)이며;
- [213] X12는 리신(K) 또는 시스테인(C)이고;
- [214] X13은 티로신(Y) 또는 시스테인(C)이며;
- [215] X14는 류신(L) 또는 시스테인(C)이고;
- [216] X15은 아스파르트산(D), 또는 시스테인(C)이며;
- [217] X16은 글루탐산(E), 세린(S) 또는 시스테인(C)이고;
- [218] X17은 아스파르트산(D), 글루탐산(E), 리신(K), 아르기닌(R), 세린(S), 시스테인(C), 또는 발린(V)이며;
- [219] X18은 아스파르트산(D), 글루탐산(E), 아르기닌(R), 또는 시스테인(C)이고;
- [220] X19는 알라닌(A), 또는 시스테인(C)이며;
- [221] X20은 글루타민(Q), 아스파르트산(D), 또는 리신(K)이고;
- [222] X21은 아스파르트산(D), 또는 글루탐산(E)이며;
- [223] X23은 발린(V)이고;
- [224] X24는 발린(V) 또는 글루타민(Q)이며;
- [225] X27은 이소류신(I) 또는 메티오닌(M)이고;
- [226] X28은 아스파라긴(N) 또는 아르기닌(R)이며;

- [227] X30은 시스테인(C)이거나, 부존재하는 것을 특징으로 한다. (단, 상기 일반식 1의 아미노산 서열이 서열번호 1 및 서열번호 12와 동일한 경우는 제외함).
- [228] 앞선 구체예 중 어느 하나에 따른 액상 제제로서,
- [229] 상기 일반식 1에서
- [230] X2가 Aib(aminoisobutyric acid)이며;
- [231] X7은 트레오닌(T)이고;
- [232] X10은 티로신(Y)이며;
- [233] X12는 리신(K)이고;
- [234] X13은 티로신(Y)이며;
- [235] X14는 류신(L)이고;
- [236] X15는 아스파르트산(D), 또는 시스테인(C)이며;
- [237] X16은 글루탐산(E), 세린(S) 또는 시스테인(C)이고;
- [238] X17은 리신(K) 또는 아르기닌(R)이며;
- [239] X18은 아르기닌(R)이고;
- [240] X19는 알라닌(A)이며;
- [241] X20은 글루타민(Q), 시스테인(C), 또는 리신(K)이고;
- [242] X21은 아스파르트산(D), 시스테인(C), 발린(V) 또는 글루탐산(E)이며;
- [243] X23은 발린(V) 또는 아르기닌(R)이고;
- [244] X24는 글루타민(Q) 또는 류신(L)이며;
- [245] X27은 메티오닌(M)이고;
- [246] X28은 아스파라긴(N) 또는 아르기닌(R)이며;
- [247] X30은 부존재하는 것을 특징으로 한다. (단, 상기 일반식 1의 아미노산 서열이 서열번호 1 및 서열번호 12와 동일한 경우는 제외함).
- [248]
- [249] 앞선 구체예 중 어느 하나에 따른 액상 제제로서, 상기 글루카곤 유도체 펩타이드의 지속형 결합체에서 상기 글루카곤 유도체 펩타이드는 하기 일반식 2의 아미노산 서열을 포함하는 것을 특징으로 한다:
- [250] Y-Aib-QGTF-X7-SD-X10-S-X12-Y-L-X15-X16-X17-R-A-X20-X21-F-V-X24-W-L-M-N-T-X30(일반식 2, 서열번호: 47)
- [251] 상기 일반식 2에서,
- [252] X7은 트레오닌(T), 발린(V) 또는 시스테인(C)이고;
- [253] X10은 티로신(Y) 또는 시스테인(C)이고;
- [254] X12는 리신(K) 또는 시스테인(C)이고;
- [255] X15는 아스파르트산(D), 또는 시스테인(C)이고;
- [256] X16은 글루탐산(E) 또는 세린(S)이며;
- [257] X17은 리신(K) 또는 아르기닌(R)이고;
- [258] X20은 글루타민(Q) 또는 리신(K)이며;
- [259] X21은 아스파르트산(D), 또는 글루탐산(E)이고;

- [260] X24는 발린(V) 또는 글루타민(Q)이고;
- [261] X30은 시스테인(C)이거나, 부존제함
- [262] (단, 상기 일반식 2의 아미노산 서열이 서열번호 1 및 서열번호 12와 동일한 경우는 제외함).
- [263] 앞선 구체예 중 어느 하나에 따른 액상 제제로서, 상기 글루카곤 유도체 펩타이드는 서열번호: 2 내지 45로 이루어진 군에서 선택된 아미노산 서열을 포함하는 것을 특징으로 한다.
- [264] 앞선 구체예 중 어느 하나에 따른 액상 제제로서, 상기 글루카곤 유도체 펩타이드는 서열번호: 13, 15 및 36 내지 44로 이루어진 군에서 선택된 아미노산 서열을 포함하는 것을 특징으로 한다.
- [265] 앞선 구체예 중 어느 하나에 따른 액상 제제로서, 상기 글루카곤 유도체 펩타이드는 서열번호: 37의 아미노산 서열을 포함하는 것을 특징으로 한다.
- [266] 앞선 구체예 중 어느 하나에 따른 액상 제제로서, 상기 글루카곤 유도체 펩타이드는 천연형 글루카곤의 pI인 6.8과 상이한 pI, 예컨대 pI 6.5 이하거나 pI 7.0 이상인 것을 특징으로 한다.
- [267] 앞선 구체예 중 어느 하나에 따른 액상 제제로서, 상기 글루카곤 유도체 펩타이드는 이의 C-말단이 카르복시기 (COOH)를 가지는 것을 특징으로 한다.
- [268] 앞선 구체예 중 어느 하나에 따른 액상 제제로서, 상기 글루카곤 유도체 펩타이드는 글루카곤 수용체를 활성화시킬 수 있는 천연형 글루카곤의 유도체인 것을 특징으로 한다.
- [269] 앞선 구체예 중 어느 하나에 따른 액상 제제로서, 상기 글루카곤 유도체 펩타이드의 지속형 결합체에서 상기 글루카곤 유도체 펩타이드의 pI는 6내지 7이고, 천연형 글루카곤 대비 상대적 *in vitro* 활성이 200% 이상인 것을 특징으로 한다.
- [270] 앞선 구체예 중 어느 하나에 따른 액상 제제로서, 상기 일반식 1 또는 2의 X10과 X14, X12와 X16, X16과 X20, X17과 X21, X20과 X24 및 X24와 X28의 아미노산 쌍 중 적어도 하나의 아미노산 쌍의 아미노산 각각이 고리를 형성할 수 있는 글루탐산 또는 리신으로 치환된 것을 특징으로 한다.
- [271] 앞선 구체예 중 어느 하나에 따른 액상 제제로서, 상기 일반식 1 또는 2의 X12와 X16의 아미노산 쌍, X16과 X20의 아미노산 쌍, 또는 X17과 X21의 아미노산 쌍의 아미노산 각각이 고리를 형성할 수 있는 글루탐산 또는 리신으로 치환된 것을 특징으로 한다.
- [272] 앞선 구체예 중 어느 하나에 따른 액상 제제로서, 상기 일반식 1 또는 2에서, X10과 X14, X12와 X16, X16과 X20, X17과 X21, X20과 X24 및 X24와 X28의 아미노산 쌍 중 적어도 하나의 아미노산 쌍에서 각각의 아미노산 간에 고리를 형성하는 것을 특징으로 한다.
- [273] 앞선 구체예 중 어느 하나에 따른 액상 제제로서, 상기 고리는 락탐 고리인 것을 특징으로 한다.

- [274] 앞선 구체에 중 어느 하나에 따른 액상 제제로서, 상기 일반식 1 또는 2에서, X16이 글루탐산이고, X20은 리신이며, X16과 X20의 측쇄가 락탐 고리를 형성하고 있는 것을 특징으로 한다.
- [275] 앞선 구체에 중 어느 하나에 따른 액상 제제로서, 상기 면역글로불린 Fc 절편은 IgG, IgA, IgD, IgE 또는 IgM에서 유래된 Fc 절편인 것을 특징으로 한다.
- [276] 앞선 구체에 중 어느 하나에 따른 액상 제제로서, 상기 면역글로불린 Fc 절편은 (a) CH1 도메인, CH2 도메인, CH3 도메인 및 CH4 도메인; (b) CH1 도메인 및 CH2 도메인; (c) CH1 도메인 및 CH3 도메인; (d) CH2 도메인 및 CH3 도메인; (e) CH1 도메인, CH2 도메인, CH3 도메인 및 CH4 도메인 중 1개 또는 2개의 이상의 도메인과 면역글로불린 힌지 영역 또는 힌지 영역의 일부와의 조합; 및 (f) 중쇄 불변영역 각 도메인과 경쇄 불변영역의 이량체로 구성된 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 한다.
- [277] 앞선 구체에 중 어느 하나에 따른 액상 제제로서, 상기 면역글로불린 Fc 절편의 각각의 도메인은, IgG, IgA, IgD, IgE, 및 IgM으로 이루어진 군에서 선택되는 면역글로불린에서 유래된 상이한 기원을 가진 도메인의 하이브리드인 것을 특징으로 한다.
- [278] 앞선 구체에 중 어느 하나에 따른 액상 제제로서, 상기 면역글로불린 Fc 절편은 동일한 기원의 도메인으로 이루어진 단쇄 면역글로불린들로 구성된, 이량체 또는 다량체 형태인 것을 특징으로 한다.
- [279] 앞선 구체에 중 어느 하나에 따른 액상 제제로서, 상기 면역글로불린 Fc 절편이 IgG4 Fc 절편인 것을 특징으로 한다.
- [280] 앞선 구체에 중 어느 하나에 따른 액상 제제로서, 상기 면역글로불린 Fc 절편이 인간 비당쇄화 IgG4 Fc 절편인 것을 특징으로 한다.
- [281] 앞선 구체에 중 어느 하나에 따른 액상 제제로서, 상기 면역글로불린 Fc 절편은 이황화 결합을 형성할 수 있는 부위가 제거되는 변형, 천연형 Fc에서 N-말단의 일부 아미노산이 제거되는 변형, 천연형 Fc의 N-말단에 메티오닌 잔기가 부가되는 변형, 보체결합부위가 제거되는 변형, 또는 ADCC(antibody dependent cell mediated cytotoxicity) 부위가 제거되는 변형을 포함하거나, 상기 변형의 조합을 포함하는, 천연형 Fc의 유도체인 것을 특징으로 한다.
- [282] 본 발명을 구현하는 다른 하나의 양태는 상기 액상 제제를 제조하는 방법이다.
- [283] 하나의 구체에로서, 본 발명은 (i) 글루카곤 유도체 펩타이드 및 면역글로불린 Fc 절편이 서로 연결된, 글루카곤 유도체 펩타이드의 지속형 결합체와 (ii) (a) 완충물질 및 (b) 당알코올, 당 또는 이들의 조합을 혼합하는 단계를 포함하는 액상 제제의 제조 방법이다.
- [284] 앞선 구체에 따른 방법으로서, 상기 안정화제는 당 또는 당알코올, 비이온성 계면활성제, 및 아미노산으로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 성분을 더 포함하는 것을 특징으로 한다.
- [285] 앞선 구체에 중 어느 하나에 따른 방법으로서, 상기 액상 제제는 당 또는

당알코올, 아미노산, 또는 이들 둘 다를 더 포함하는, 글루카곤 유도체 펩타이드의 지속형 결합체의 액상 제제인 것을 특징으로 한다.

[286] 앞선 구체예 중 어느 하나에 따른 방법으로서, 상기 액상 제제는 완충물질, 당 또는 당알코올, 및 아미노산을 포함하는 것을 특징으로 한다.

[287] 앞선 구체예 중 어느 하나에 따른 방법으로서, 상기 액상 제제는 완충물질, 당 또는 당알코올, 비이온 계면 활성제 및 아미노산을 포함하는 것을 특징으로 한다.

[288]

발명의 실시를 위한 형태

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

[290] 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.

[291] 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.

[292] 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.

[293] 알라닌 Ala, A 아르기닌 Arg, R

[294] 아스파라긴 Asn, N 아스파르트산 Asp, D

[295] 시스테인 Cys, C 글루탐산 Glu, E

[296] 글루타민 Gln, Q 글리신 Gly, G

[297] 히스티딘 His, H 이소류신 Ile, I

[298] 류신 Leu, L 리신 Lys, K

[299] 메티오닌 Met, M 페닐알라닌 Phe, F

[300] 프롤린 Pro, P 세린 Ser, S

[301] 트레오닌 Thr, T 트립토판 Trp, W

[302] 티로신 Tyr, Y 발린 Val, V

[303] 본 발명을 구현하는 하나의 양태는 글루카곤 유도체의 지속형 결합체의 액상 제제를 제공한다.

[304] 구체적으로, 본 발명은 글루카곤 유도체 펩타이드 및 면역글로불린 Fc 절편이 서로 연결된, 글루카곤 유도체 펩타이드의 지속형 결합체를 약리학적

유효량으로 포함하고, 완충물질 및 당알코올, 당, 또는 이들의 조합을 포함하는, 글루카곤 유도체 펩타이드의 지속형 결합체의 액상 제제에 관한 것이다.

- [305] 구체적으로, 본 발명은 하기 화학식 1의 지속형 결합체; 완충 물질; 및 당알코올, 당, 또는 이들의 조합;을 포함하는 액상 제제를 제공한다:
- [306] [화학식 1]
- [307] X - La - F
- [308] 상기 화학식 1에서 X는 글루카곤 유도체 펩타이드이고;
- [309] L은 링커이며;
- [310] a는 0 또는 자연수이며, 다만 a가 2 이상일 때, 각각의 L은 서로 독립적이고;
- [311] F는, 면역글로불린 Fc 절편이며;
- [312] -는 공유결합을 나타냄:
- [313] [일반식 1]
- [314] Y-X2-QGTF-X7-SD-X10-S-X12-X13-X14-X15-X16-X17-X18-X19-X20-X21-F-X
23-X24-W-L-X27-X28-T-X30 (일반식 1, 서열번호 46)
- [315] 상기 일반식 1에서,
- [316] X2는 알파-메틸-글루탐산(α -methyl-glutamic acid), Aib(aminoisobutyric acid), D-알라닌, 글리신(G), Sar(N-methylglycine), 세린(S) 또는 D-세린이며;
- [317] X7은 트레오닌(T), 발린(V) 또는 시스테인(C)이고;
- [318] X10은 티로신(Y) 또는 시스테인(C)이고;
- [319] X12는 리신(K) 또는 시스테인(C)이고;
- [320] X13은 티로신(Y) 또는 시스테인(C)이고;
- [321] X14는 류신(L) 또는 시스테인(C)이고;
- [322] X15는 아스파르트산(D), 글루탐산(E) 또는 시스테인(C)이고;
- [323] X16은 글루탐산(E), 아스파르트산(D), 세린(S), 알파-메틸-글루탐산, 또는 시스테인(C)이거나, 부존재하며;
- [324] X17은 아스파르트산(D), 글루타민(Q), 글루탐산(E), 리신(K), 아르기닌(R), 세린(S), 시스테인(C), 또는 발린(V)이거나, 부존재하며;
- [325] X18은 알라닌(A), 아스파르트산(D), 글루타민(Q), 글루탐산(E), 아르기닌(R), 발린(V), 또는 시스테인(C)이거나, 부존재하며;
- [326] X19는 알라닌(A), 아르기닌(R), 세린(S), 발린(V), 또는 시스테인(C)이거나, 부존재하며;
- [327] X20은 리신(K), 히스티딘(H), 글루탐산(E), 글루타민(Q), 아스파르트산(D), 아르기닌(R), 알파-메틸-글루탐산, 또는 시스테인(C)이거나, 부존재하며;
- [328] X21은 아스파르트산(D), 글루탐산(E), 류신(L), 발린(V), 또는 시스테인(C)이거나, 부존재하며;
- [329] X23은 이소류신(I), 발린(V), 또는 아르기닌(R)이거나, 부존재하며;
- [330] X24는 발린(V), 아르기닌(R), 알라닌(A), 시스테인(C), 글루탐산(E), 리신(K), 글루타민(Q), 알파-메틸-글루탐산, 또는 류신(L)이거나, 부존재하며;

- [331] X27는 이소류신(I), 발린(V), 알라닌(A), 리신(K), 메티오닌(M), 글루타민(Q), 또는 아르기닌(R)이거나, 부존재하며;
- [332] X28은 글루타민(Q), 리신(K), 아스파라긴(N), 또는 아르기닌(R)이거나, 부존재하며;
- [333] X30은 시스테인(C)이거나, 부존재함 (단, 상기 일반식 1의 아미노산 서열이 서열번호 1 및 서열번호 12와 동일한 경우는 제외함).
- [334]
- [335] 본 발명에서 용어 "액상 제제"는 의약품의 형태를 액상으로 제제화한 약물을 의미하며, 이는 액상의 내용 제제 및 외용 제제를 모두 포함한다.
- [336] 본 발명의 액상 제제는 약리 효과를 나타내는 화학식 1의 지속형 결합체 및 상기 약리 효과를 나타내는 물질이 액상으로 제제화될 때 이를 일정 기간 동안 안정하게 유지 및/또는 저장시킬 수 있는 물질을 포함한다. 상기 액상 제제의 약리효과를 나타내는 화학식 1의 지속형 결합체 이외에 포함되는 성분은 안정화제와 혼용될 수 있다.
- [337] 본 발명의 화학식 1의 지속형 결합체의 액상 제제에 있어서, 저장 안정성은 정확한 투여량을 보장하기 위해서 중요하다.
- [338]
- [339] 본 발명은 약리 효과를 나타내는 물질인 화학식 1의 지속형 결합체의 특정 농도; pH를 4.8 ~ 6.5의 범위에서 유지하기 위한 분량의 완충 물질; 및 1.0 ~ 20%(w/v)의 당알코올, 당 또는 이들의 조합;을 포함할 경우, 화학식 1의 지속형 결합체의 장기간 보관 시에 있어서도 안정함을 확인하여 본 발명의 새로운 제형을 제공하게 되었다.
- [340]
- [341] 본 발명의 액상 제제에 포함되는 상기 글루카곤 유도체 펩타이드의 지속형 결합체의 농도는 약 18 내지 약 2810 nmol/mL, 약 18 내지 약 2807 nmol/mL, 약 18 내지 약 2623 nmol/mL, 약 18 내지 약 2436 nmol/mL, 약 18 내지 약 2248 nmol/mL, 약 18 내지 약 2061 nmol/mL, 약 18 내지 약 1874 nmol/mL, 약 18 내지 약 1686 nmol/mL, 약 18 내지 약 1499 nmol/mL, 약 18 내지 약 1312 nmol/mL, 약 18 내지 약 1124 nmol/mL, 약 18 내지 약 940 nmol/mL, 약 18 내지 약 936 nmol/mL, 약 18 내지 약 843 nmol/mL, 약 18 내지 약 750 nmol/mL, 약 18 내지 약 656 nmol/mL, 약 18 내지 약 570 nmol/mL, 약 18 내지 약 562 nmol/mL, 약 18 내지 약 469 nmol/mL, 약 18 내지 약 375 nmol/mL, 약 18 내지 약 281 nmol/mL, 약 18 내지 약 188 nmol/mL, 약 18 내지 약 94 nmol/mL, 약 187 nmol/mL, 약 188 nmol/mL, 약 187.09 nmol/mL, 약 187.1 nmol/mL, 약 93 내지 약 188 nmol/mL, 약 93 내지 약 281 nmol/mL, 약 93 내지 약 375 nmol/mL, 약 93 내지 약 469 nmol/mL, 약 93 내지 약 562 nmol/mL, 약 93 내지 약 656 nmol/mL, 약 93 내지 약 750 nmol/mL, 약 93 내지 약 843 nmol/mL, 약 93 내지 약 940 nmol/mL, 약 93 내지 약 936 nmol/mL, 약 187 내지 약 281 nmol/mL, 약 187 내지 약 375 nmol/mL, 약 187 내지 약 469 nmol/mL, 약 187 내지

약 570 nmol/mL 또는 약 187 내지 약 562 nmol/mL 일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 하나의 구체예로서, 상기 지속형 결합체의 농도는 18 내지 936 nmol/mL 일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 본 발명에서 용어, "안정화제"란 제제에서 유효성분 등의 구성 성분을 일정 기간 동안 안정하게 유지시키는 물질을 말한다.

- [342] 본 발명의 상기 안정화제는 알부민을 함유하지 않는 것이 바람직하다. 단백질의 안정화제로 이용될 수 있는 인간 혈청 알부민은 인체의 혈액으로부터 제조되어서 인간 유래의 병원성 바이러스에 의한 오염 가능성이 존재하고, 젤라틴이나 소 혈청 알부민은 질환을 야기하거나 일부 환자에게 알러지 반응을 유발할 가능성이 있다. 본 발명의 알부민-비함유 안정화제는 인간이나 동물 유래의 혈청 알부민 또는 정제된 젤라틴 등의 이중 단백질을 함유하지 않아서 바이러스 감염의 우려가 적다.
- [343] 본 발명에서 상기 안정화제는 특히 글루카곤 유도체의 지속형 결합체가 안정하게 저장될 수 있도록 하는 물질을 의미한다. 글루카곤 유도체의 지속형 결합체에 있어서, 저장 안정성은 정확한 투여량을 보장하기 위해서뿐만 아니라, 글루카곤 유도체에 대한 항원성 물질의 잠재적인 생성을 억제하기 위해서 중요하다.
- [344] 본 발명의 액상 제제에 포함되는 일 구성요소인 완충물질은 화학식 1의 지속형 결합체가 안정해지도록 액상 제제의 pH가 급격히 변화하지 않게 용액의 pH를 유지시킬 수 있다. 상기 완충물질은 완충계(buffer system)로도 불릴 수 있으며, 상기 완충물질 또는 완충계는 액상 제제의 pH를 유지시키는 역할을 수행한다. 목적하는 안정화 대상 물질인 화학식 1의 지속형 결합체를 안정화시킬 수 있는 pH를 유지시킬 수 있는 완충물질은 제한 없이 이용될 수 있다.
- [345] 상기 완충물질은 인산과 그의 짝염인 알칼리 염(예를 들어, 인산염: 인산나트륨, 인산칼륨 또는 이들의 수소 또는 이수소 염), 구연산과 그의 염(예를 들어, 구연산 나트륨), 아세트산과 그 염(예를 들어, 아세트산나트륨), 히스티딘과 그 염을 비롯한 pH 완충물질일 수 있으며, 이들 완충물질의 혼합물도 사용될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [346] 본 발명의 액상 제제는 상기 완충물질을 포함하는 완충용액을 액상 제제의 용매로 포함할 수 있으며, 구체적으로, 상기 완충용액은 구연산 완충용액(예, 구연산 나트륨 완충용액), 아세트산 완충용액(예, 아세트산 나트륨 완충용액), 인산 완충용액(예, 인산 나트륨 완충용액), 히스티딘 완충용액, 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것일 수 있으며, 상기 완충용액 또는 액상 제제 내의 완충물질(구연산과 그 염, 아세트산과 그 염, 히스티딘과 그 염, 인산과 그 염, 또는 이들의 조합)은 목표로 하는 액상 제제의 pH를 유지하는 데 충분한 분량의 농도로 포함될 수 있다.
- [347] 상기 액상 제제의 pH는 약 4.6 내지 pH 약 6.5, 예컨대 pH 약 4.8 내지 pH 약 6.5, pH 약 4.8 내지 약 6.4, pH 약 4.8 내지 약 6.3, pH 약 4.8 내지 pH 약 6.2, pH 약 4.8

내지 약 6.1, pH 약 4.8 내지 약 6.0, pH 약 4.8 내지 약 5.9, pH 약 4.8 내지 약 5.8, pH 약 4.8 내지 5.7, pH 약 4.8 내지 약 5.6, pH 약 4.8 내지 5.5, pH 약 4.8 내지 약 5.4, pH 약 4.8 내지 약 5.3, pH 약 4.8 내지 약 5.2, pH 약 4.8 내지 약 5.1, pH 약 4.9 내지 pH 약 6.5, pH 약 4.9 내지 약 6.4, pH 약 4.9 내지 약 6.3, pH 약 4.9 내지 pH 약 6.2, pH 약 4.9 내지 약 6.1, pH 약 4.9 내지 약 6.0, pH 약 4.9 내지 약 5.9, pH 약 4.9 내지 약 5.8, pH 약 4.9 내지 5.7, pH 약 4.9 내지 약 5.6, pH 약 4.9 내지 5.5, pH 약 4.9 내지 약 5.4, pH 약 4.9 내지 약 5.3, pH 약 4.9 내지 약 5.2, pH 약 4.9 내지 약 5.1, 또는 pH 약 5.0, 5.1, 5.2, 5.3, 5.4, 5.5, 5.6, 5.7, 5.8, 5.9, 6.0, 6.1, 6.2, 6.3, 6.4, 또는 6.5일 수 있으나, 특별히 이에 제한되지 않는다.

[348] 상기 목표하는 pH가 될 수 있도록 하는 액상 제제의 농도는 약 1 mM 내지 약 200 mM일 수 있고, 보다 더 구체적으로, 약 5 mM 내지 약 100 mM, 약 5 mM 내지 약 80 mM, 약 5 mM 내지 약 40 mM, 약 8 mM 내지 약 40 mM, 약 5 mM 내지 약 30 mM, 또는 약 5 mM 내지 약 25 mM, 약 10 mM 내지 약 25 mM, 약 15 mM 내지 약 25 mM, 약 18 mM 내지 약 24 mM, 약 18 mM 내지 약 22 mM, 또는 약 20 mM 일 수 있으나, 특별히 이에 제한되는 것은 아니다.

[349]

[350] 하나의 구체예로, 상기 완충물질은 아세트산과 그 염일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[351] 또 하나의 구체예로, 상기 완충용액은 아세트산 완충용액 (예, 아세트산 나트륨 완충용액) 또는 구연산 완충용액 (예, 구연산 나트륨 완충용액)일 수 있으나, 특별히 이에 제한되는 것은 아니다.

[352] 한편, 제제의 제조에 있어서, 성분들을 물(예, WFI)에 녹이고, HCl 및/또는 NaOH 등을 사용하여 완충용액 또는 제제의 pH를 목적하는 pH로 조정할 수 있으며, 이는 당업계에 이미 통상적으로 사용되는 방법이다. 따라서, 청구항에 pH 조절자에 대한 별도의 언급이 없더라도, 이러한 방법을 통해서 제제가 조정된 pH를 가질 수 있다는 것은 당업자가 이해할 수 있는 것이다.

[353] 본 발명의 안정화제에 포함되는 일 구성 요소인 당알코올은 다수의 수산기를 포함하는 물질을 말하며, 당의 알데히드기 및/또는 케톤기 등이 알코올기로 치환된 물질을 포함하며, 다중 수산기를 포함하는 당류 등도 포함한다. 상기 당 또는 당알코올은 글루카곤 유도체의 지속형 결합체의 안정성을 증대시킬 수 있다. 예컨대, 상기 당알코올은 만니톨 및 소르비톨로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[354] 본 발명의 액상 제제에 포함되는 일 구성 요소인 당(saccharide)은 단당류, 이당류, 다당류, 올리고당류 등을 말하며, 글루카곤 수용체, GLP-1 수용체, 및 GIP 수용체에 대해 활성을 갖는 펩타이드의 지속형 결합체의 안정성을 증대시킬 수 있다. 구체적인 예로는 만노스, 글루코스, 프럭토스, 갈락토스, 푸코스 및 크실로스 등의 단당류; 락토스, 말토스, 수크로스 등의 이당류; 라피노스 및 텍스트란 등의 다당류 등을 들 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

- [355] 하나의 구체예로 상기 당은 글루코스, 프럭토스, 갈락토스, 락토스, 말토스, 수크로스, 또는 이들의 조합일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [356]
- [357] 예컨대, 상기 당은 수크로오스 일 수 있으나, 특별히 이에 제한되지 않는다.
- [358] 상기 당알코올, 당, 또는 이들의 조합은 액상 제제의 전체 용액 대비 약 0.5 내지 약 20%(w/v), 약 0.5 내지 약 15%(w/v), 약 0.5 내지 약 10%(w/v), 약 0.5 내지 약 8%(w/v), 약 1 내지 약 20%(w/v), 약 1 내지 15%(w/v), 약 1 내지 10%(w/v), 약 1 내지 8%(w/v), 약 2 내지 약 15%(w/v), 약 2 내지 약 12%(w/v), 약 2 내지 약 12%(w/v), 약 3 내지 약 10%(w/v), 약 4 내지 약 10%(w/v), 약 4 내지 약 8%(w/v), 약 4 내지 약 6%(w/v), 약 5 내지 약 10%(w/v), 약 6 내지 약 10%(w/v), 약 7 내지 약 10%(w/v), 약 7 내지 약 9%(w/v), 약 8 내지 약 9%(w/v), 또는 약 1.0%(w/v), 약 3.0%(w/v), 약 5.0%(w/v), 또는 약 8.0%(w/v)의 농도로 존재할 수 있으나, 특별히 이에 제한되지 않는다. 또한, 특별히 이에 제한되지는 않으나, 상기 액상제제는 비이온성 계면활성제, 및 아미노산으로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 성분을 더 포함할 수 있다.
- [359] 따라서, 상기 액상제제의 안정화제는 i)완충물질 및 ii)당 또는 당알코올로 필수적으로 구성될 수도 있지만, i)완충물질, ii)당 또는 당알코올, 및 iii) 비이온성 계면활성제; i)완충물질, ii)당 또는 당알코올, iii) 아미노산; 및 iv) 비이온성 계면활성제; i)완충물질, ii)당 또는 당알코올, 및 iii) 아미노산; i)완충물질, ii)당 또는 당알코올, iii) 비이온성 계면활성제, 및 iv) 아미노산으로 필수적으로 구성되는 것일 수 있으나, 특별히 이에 제한되는 것은 아니다. 여기서, 안정화제를 구성하는 각 성분의 종류 및 농도 혹은 pH에 대해서는 상기 혹은 하기에 기술된 내용들이 모두 적용됨은 분명하다.
- [360] 특별히 이에 제한되지 않으나, 상기 액상 제제에 포함되는 일 구성 요소인 비이온성 계면활성제는 단백질 용액의 표면장력을 낮추어 소수성 표면에 단백질이 흡착되거나 응집되는 것을 방지하여 줄 수 있다.
- [361] 본 발명에 사용될 수 있는 비이온성 계면활성제의 구체적인 예로는 폴리소르베이트류(예컨대, 폴리소르베이트 20(폴리옥시에틸렌(20) 소르비탄 모노라우레이트), 폴리소르베이트 40(폴리옥시에틸렌(20) 소르비탄 모노팔미테이트), 폴리소르베이트 60(폴리옥시에틸렌(20) 소르비탄 모노스테아레이트), 폴리소르베이트 80(폴리옥시에틸렌(20) 소르비탄 모노올레이트); 상기 폴리옥시에틸렌 뒤의 수치(20)은 옥시에틸렌기(-CH₂CH₂O-)의 총 개수를 의미함), 폴록사머(PEO-PPO-PEO 공중합체; PEO: poly(ethylene oxide), PPO: poly(propylene oxide)), 폴리에틸렌-폴리프로필렌 글리콜, 폴리옥시에틸렌 화합물(예컨대, 폴리옥시에틸렌-스테아레이트, 폴리옥시에틸렌 알킬 에테르(알킬: C1-C30), 폴리옥시에틸렌 모노알릴 에테르, 알킬페닐 폴리옥시에틸렌 코폴리머(알킬: C1-C30) 등), 소듐 도데실 설페이트(sodium dodecyl sulphate, SDS) 등일 수

있으며, 또는 폴리소르베이트 또는 폴록사머를 들 수 있으며, 이들이 하나 또는 둘 이상의 조합 형태로도 사용될 수 있다.

- [362] 구체적으로, 상기 비이온성 계면활성제는 폴리소르베이트 80, 폴리소르베이트 60, 폴리소르베이트 40, 폴리소르베이트 20, 또는 폴록사머 188일 수 있으며, 이들이 조합되어 사용될 수 있으나, 특별히 이에 제한되는 것은 아니다.
- [363] 본 발명에서 상기 비이온성 계면활성제는 고농도로 포함되지 않는 것이 바람직하며, 구체적으로는 본 발명의 제제에 약 0.2%(w/v) 이하의 농도, 예컨대 약 0.001 내지 약 0.2%(w/v), 약 0.001 내지 약 0.1%(w/v), 약 0.001 내지 약 0.05%(w/v), 약 0.005 내지 약 0.08%(w/v), 약 0.002 내지 약 0.05%(w/v), 약 0.005 내지 약 0.05%(w/v), 약 0.01 내지 약 0.05%(w/v), 약 0.01 내지 약 0.04%(w/v), 약 0.01 내지 약 0.03%(w/v), 약 0.01 내지 약 0.1%(w/v), 또는 약 0.02%(w/v)로 포함될 수 있으나, 특별히 이에 제한되지 않는다.
- [364] 상기 액상 제제에 추가될 수 있는 선택적 구성요소로서의 안정화제의 일종인 아미노산은 메티오닌, 아르기닌, 히스티딘, 글리신, 시스테인, 라이신 또는 이들의 조합일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [365] 상기 아미노산은 단백질의 산화 반응 등에 의해 일어날 수 있는 불순물 생성을 억제시킬 수 있으나, 특별히 이에 제한되는 것은 아니다.
- [366] 상기 아미노산은 제제 내에 약 0.01 내지 약 1 mg/mL의 농도, 약 0.01 내지 약 0.8 mg/mL, 약 0.01 내지 약 0.5 mg/mL, 약 0.02 내지 약 0.5 mg/mL, 또는 약 0.02 내지 약 0.4 mg/mL, 또는 약 0.1 mg/mL로 존재할 수 있으나, 특별히 이에 제한되는 것은 아니다.
- [367] 하나의 구체예로서, 완충물질 및 당 또는 당알코올을 포함하는 상기 액상 제제는, 등장화제를 포함하지 않거나, 비이온성 계면활성제, 및 아미노산으로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 성분을 추가적으로 포함하지 않을 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [368] 한편, 본 발명의 액상 제제에는 상기 설명한 액상 제제의 필수적 구성요소인 당알코올, 당, 또는 이들의 조합; 및 완충물질 이외에 선택적 구성요소인 비이온성 계면활성제 및 아미노산 이외에 본 발명의 효과를 손상시키지 않는 범위 내에서 당업계에 공지되어 있는 기타의 성분 내지 물질들이 선택적으로 더 포함될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [369]
- [370] 한편, 상기 제제는 추가로 다가알코올을 포함할 수 있으나, 특별히 이에 제한되지 않는다.
- [371] 예컨대, i) 완충물질 및 ii) 당 또는 당알코올 뿐만 아니라, 다가알코올, 을 포함할 수 있으며, i) 완충물질, ii) 당 또는 당알코올, 및 iii) 비이온성 계면활성제; i) 완충물질, ii) 당 또는 당알코올, iii) 아미노산; 및 iv) 비이온성 계면활성제; i) 완충물질, ii) 당 또는 당알코올, 및 iii) 아미노산; i) 완충물질, ii) 당 또는 당알코올, iii) 비이온성 계면활성제, 및 iv) 아미노산으로 필수적으로 구성되는 안정화제에

다가알코올을 더 포함할 수 있으나, 특별히 이에 제한되는 것은 아니다.

- [372] 본 발명의 제제에 추가로 포함될 수 있는 다가 알코올의 예로는 프로필렌글리콜 및 저분자량의 폴리에틸렌글리콜, 글리세롤, 저분자량의 폴리프로필렌글리콜 등을 들 수 있으며, 이들의 하나 또는 둘 이상의 조합 형태로 사용될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [373] 본 발명에서 화학식 1의 지속형 결합체는 본 발명의 액상 제제에 포함되는 유효성분으로서, 약리학적 유효량으로 제제에 포함될 수 있다. 그 예로 상기 지속형 결합체의 농도는 제제 내에 약 18 내지 약 2810 nmol/mL, 약 18 내지 약 2807 nmol/mL, 약 18 내지 약 2623 nmol/mL, 약 18 내지 약 2436 nmol/mL, 약 18 내지 약 2248 nmol/mL, 약 18 내지 약 2061 nmol/mL, 약 18 내지 약 1874 nmol/mL, 약 18 내지 약 1686 nmol/mL, 약 18 내지 약 1499 nmol/mL, 약 18 내지 약 1312 nmol/mL, 약 18 내지 약 1124 nmol/mL, 약 18 내지 약 940 nmol/mL, 약 18 내지 약 936 nmol/mL, 약 18 내지 약 843 nmol/mL, 약 18 내지 약 750 nmol/mL, 약 18 내지 약 656 nmol/mL, 약 18 내지 약 570 nmol/mL, 약 18 내지 약 562 nmol/mL, 약 18 내지 약 469 nmol/mL, 약 18 내지 약 375 nmol/mL, 약 18 내지 약 281 nmol/mL, 약 18 내지 약 188 nmol/mL, 약 18 내지 약 94 nmol/mL, 약 187 nmol/mL, 약 188 nmol/mL, 약 187.09 nmol/mL, 약 187.1 nmol/mL, 약 93 내지 약 188 nmol/mL, 약 93 내지 약 281 nmol/mL, 약 93 내지 약 375 nmol/mL, 약 93 내지 약 469 nmol/mL, 약 93 내지 약 562 nmol/mL, 약 93 내지 약 656 nmol/mL, 약 93 내지 약 750 nmol/mL, 약 93 내지 약 843 nmol/mL, 약 93 내지 약 940 nmol/mL, 약 93 내지 약 936 nmol/mL, 약 187 내지 약 281 nmol/mL, 약 187 내지 약 375 nmol/mL, 약 187 내지 약 469 nmol/mL, 약 187 내지 약 570 nmol/mL 또는 약 187 내지 약 562 nmol/mL 일 수 있으나, 특별히 이에 제한되는 것은 아니다.
- [374] 본 발명에서 용어, "약"은 ± 0.5 , ± 0.4 , ± 0.3 , ± 0.2 , ± 0.1 , ± 0.01 등을 모두 포함하는 범위로, 약 이란 용어 뒤에 나오는 수치와 동등하거나 유사한 범위의 수치를 모두 포함하나, 이에 제한되지 않는다.
- [375] 상기 액상 제제는 하나의 구체예로, 화학식 1의 펩타이드 결합체; 상기 액상 제제의 pH가 4.8 내지 6.5가 되도록 구연산과 그 염, 아세트산과 그 염, 히스티딘과 그 염, 인산과 그 염 및 이들의 조합 중에서 선택하는 완충 물질; 당; 및 폴록사머, 폴리소르베이트 또는 이들의 조합 중에서 선택하는 비이온성 계면활성제;와 메티오닌, 아르기닌, 히스티딘, 글리신, 시스테인, 라이신 및 이들의 조합으로 이루어진 군에서 선택하는 안정화제를 함유하는 액상 제제일 수 있다.
- [376] 상기 액상 제제는 하나의 구체예로, 90 ~ 562 nmol/mL의 화학식 1의 펩타이드 결합체; 상기 액상 제제의 pH가 4.8 내지 5.5가 되도록 구연산과 그 염, 아세트산과 그 염, 히스티딘과 그 염, 인산과 그 염 및 이들의 조합 중에서 선택하는 5 ~ 25 mM의 완충 물질; 1 ~ 20%(w/v)의 당알코올, 당, 또는 이들의 조합; 및 폴록사머, 폴리소르베이트 또는 이들의 조합 중에서 선택하는 0.01 ~

0.1%(w/v)의 비이온성 계면활성제;와 메티오닌, 아르기닌, 히스티딘, 글리신, 시스테인, 라이신 및 이들의 조합으로 이루어진 군에서 선택하는 0.01 ~ 1 mg/mL의 안정화제를 함유하는 액상 제제일 수 있다.

- [377] 상기 액상 제제는 하나의 구체예로, 90 ~ 562 nmol/mL의 화학식 1의 펩타이드 결합체; 상기 액상 제제의 pH가 4.8 내지 5.5가 되도록 구연산과 그 염, 아세트산과 그 염, 히스티딘과 그 염, 인산과 그 염 및 이들의 조합 중에서 선택하는 5 ~ 25 mM의 완충 물질; 4 ~ 10%(w/v)의 당; 및 폴록사머, 폴리소르베이트 또는 이들의 조합 중에서 선택하는 0.01 ~ 0.1%(w/v)의 비이온성 계면활성제;와 메티오닌, 아르기닌, 히스티딘, 글리신, 시스테인, 라이신 및 이들의 조합으로 이루어진 군에서 선택하는 0.01 ~ 1 mg/mL의 안정화제를 함유하는 액상 제제일 수 있다.
- [378]
- [379] 한편, 하기에서는 본 발명의 액상 제제에 포함되는 유효성분인 글루카곤 유도체 펩타이드의 지속형 결합체에 대해 보다 구체적으로 설명한다.
- [380] 본 발명에서 용어, "글루카곤 유도체의 지속형 결합체" 또는 "글루카곤 유도체 펩타이드의 지속형 결합체"는 글루카곤 유도체에 면역글로불린 Fc 절편이 서로 연결된 형태를 지칭한다. 구체적으로, 상기 결합체는 글루카곤 유도체에 면역글로불린 Fc 절편이 링커를 통하여 공유결합적으로 연결된 것일 수 있으나, 특별히 이에 제한되지 않는다.
- [381] 상기 결합체는 면역글로불린 Fc 절편이 결합되지 않은 상기 펩타이드에 비하여 증가된 효력의 지속성을 나타낼 수 있으며, 본 발명에서는 상기 일반식 1 펩타이드의 화학식 1에 따른 결합체는 "지속형 결합체"로 하며, "펩타이드 결합체" 또는 "화학식 1의 지속형 결합체"와 혼용될 수 있다.
- [382] 하나의 구체예로, 상기 면역글로불린 Fc 절편과 X는 당쇄화되어 있지 않을 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [383]
- [384] 한편, 이러한 결합체는 비자연적인 (non-naturally occurring) 것일 수 있다.
- [385] 본원의 지속형 결합체는 글루카곤 유도체 펩타이드와 면역글로불린 Fc 절편이 서로 연결된 형태일 수 있고, 그 연결 방법은 특별히 제한되지 않으나, 링커를 통해 상기 펩타이드와 면역글로불린 Fc 절편이 서로 연결된 것일 수 있다.
- [386] 하나의 구체예로, 본 발명의 지속형 결합체는 하기 화학식 1의 구조를 가진다.
- [387] [화학식 1]
- [388] X - La - F
- [389] 상기 화학식 1에서 X는 하기 일반식 1의 펩타이드이고;
- [390] L은 에틸렌글리콜 반복 단위를 함유하는 링커이고;
- [391] a는 0 또는 자연수이며, 다만 a가 2 이상일 때, 각각의 L은 서로 독립적이고;
- [392] F는 사람 면역글로불린 Fc 절편이며;
- [393] - 는 공유결합을 나타냄.

- [394] 상기 화학식 1의 지속형 결합체의 X는 글루카곤 유도체에 대해 활성을 갖는 펩타이드일 수 있다. "글루카곤 유도체에 대해 활성을 갖는 펩타이드"는 글루카곤 유도체에 대해 유의한 수준의 활성을 가지는 다양한 물질, 예컨대 다양한 펩타이드를 포함한다.
- [395] 보다 구체적으로, 상기 글루카곤 유도체에 대해 활성을 갖는 펩타이드는 하기 일반식 1의 서열을 포함하는, 글루카곤 유도체에 대해 활성을 갖는 펩타이드이다:
- [396] [일반식 1]
- [397] Y-X2-QGTF-X7-SD-X10-S-X12-X13-X14-X15-X16-X17-X18-X19-X20-X21-F-X23-X24-W-L-X27-X28-T-X30 (일반식 1, 서열번호 46)
- [398] 상기 일반식 1에서,
- [399] X2는 알파-메틸-글루탐산(α -methyl-glutamic acid), Aib(aminoisobutyric acid), D-알라닌, 글리신(G), Sar(N-methylglycine), 세린(S) 또는 D-세린이며;
- [400] X7은 트레오닌(T), 발린(V) 또는 시스테인(C)이고;
- [401] X10은 티로신(Y) 또는 시스테인(C)이고;
- [402] X12는 리신(K) 또는 시스테인(C)이고;
- [403] X13은 티로신(Y) 또는 시스테인(C)이고;
- [404] X14는 류신(L) 또는 시스테인(C)이고;
- [405] X15는 아스파르트산(D), 글루탐산(E) 또는 시스테인(C)이고;
- [406] X16은 글루탐산(E), 아스파르트산(D), 세린(S), 알파-메틸-글루탐산, 또는 시스테인(C)이거나, 부존재하며;
- [407] X17은 아스파르트산(D), 글루타민(Q), 글루탐산(E), 리신(K), 아르기닌(R), 세린(S), 시스테인(C), 또는 발린(V)이거나, 부존재하며;
- [408] X18은 알라닌(A), 아스파르트산(D), 글루타민(Q), 글루탐산(E), 아르기닌(R), 발린(V), 또는 시스테인(C)이거나, 부존재하며;
- [409] X19는 알라닌(A), 아르기닌(R), 세린(S), 발린(V), 또는 시스테인(C)이거나, 부존재하며;
- [410] X20은 리신(K), 히스티딘(H), 글루탐산(E), 글루타민(Q), 아스파르트산(D), 아르기닌(R), 알파-메틸-글루탐산, 또는 시스테인(C)이거나, 부존재하며;
- [411] X21은 아스파르트산(D), 글루탐산(E), 류신(L), 발린(V), 또는 시스테인(C)이거나, 부존재하며;
- [412] X23은 이소류신(I), 발린(V), 또는 아르기닌(R)이거나, 부존재하며;
- [413] X24는 발린(V), 아르기닌(R), 알라닌(A), 시스테인(C), 글루탐산(E), 리신(K), 글루타민(Q), 알파-메틸-글루탐산, 또는 류신(L)이거나, 부존재하며;
- [414] X27는 이소류신(I), 발린(V), 알라닌(A), 리신(K), 메티오닌(M), 글루타민(Q), 또는 아르기닌(R)이거나, 부존재하며;
- [415] X28은 글루타민(Q), 리신(K), 아스파라긴(N), 또는 아르기닌(R)이거나, 부존재하며;

- [416] X30은 시스테인(C)이거나, 부존재할 수 있다 (단, 상기 일반식 1의 아미노산 서열이 서열번호 1 및 서열번호 12와 동일한 경우는 제외함).
- [417]
- [418] 앞선 구체예 중 어느 하나에 따른 액상 제제로서, 상기 글루카곤 유도체 펩타이드의 지속형 결합체에서 상기 글루카곤 유도체 펩타이드는 하기 일반식 2의 아미노산 서열을 포함하는 것을 특징으로 한다:
- [419] Y-Aib-QGTF-X7-SD-X10-S-X12-Y-L-X15-X16-X17-R-A-X20-X21-F-V-X24-W-L-M-N-T-X30(일반식 2, 서열번호: 47)
- [420] 상기 일반식 2에서,
- [421] X7은 트레오닌(T), 발린(V) 또는 시스테인(C)이고;
- [422] X10은 티로신(Y) 또는 시스테인(C)이고;
- [423] X12는 리신(K) 또는 시스테인(C)이고;
- [424] X15는 아스파르트산(D), 또는 시스테인(C)이고;
- [425] X16은 글루탐산(E) 또는 세린(S)이며;
- [426] X17은 리신(K) 또는 아르기닌(R)이고;
- [427] X20은 글루타민(Q) 또는 리신(K)이며;
- [428] X21은 아스파르트산(D), 또는 글루탐산(E)이고;
- [429] X24는 발린(V) 또는 글루타민(Q)이고;
- [430] X30은 시스테인(C)이거나, 부존재함
- [431] (단, 상기 일반식 1의 아미노산 서열이 서열번호 1 및 서열번호 12와 동일한 경우는 제외함).
- [432]
- [433] 상기 펩타이드는 서열번호 2 내지 11, 13 내지 45의 아미노산 서열을 포함하는 것, 서열번호 2 내지 11, 13 내지 45로 이루어진 군에서 선택된 아미노산 서열로 (필수적으로) 구성된 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [434] 이러한 펩타이드의 예로, 서열번호 13, 15 및 36 내지 44로 이루어진 군에서 선택된 아미노산 서열을 포함하거나, 이로 (필수적으로) 구성된 펩타이드를 들 수 있으나, 특별히 이에 제한되는 것은 아니다. 또 하나의 예로, 상기 펩타이드는 서열번호 37로 이루어진 군에서 선택된 아미노산 서열을 포함하거나, 이로 (필수적으로) 구성된 펩타이드일 수 있으나, 특별히 이에 제한되는 것은 아니다.
- [435]
- [436] 또한, 상기 글루카곤 유도체는 분자 내 가교 (intramolecular bridge)를 포함하는 것을 특징으로 한다. 예컨대, 공유결합적 가교 또는 비공유결합적 가교일 수 있으며, 구체적으로 고리를 포함하는 형태일 수 있다. 상기 일반식 1의 밑줄친 아미노산 잔기인 16번 아미노산인 글루탐산과 20번 아미노산인 리신 간에 고리를 형성하는 것일 수 있으나, 특별히 이에 제한되지는 않는다. 상기 고리의 비제한적인 예로 락탐 가교 (또는 락탐 고리)를 포함할 수 있다.
- [437] 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 염의 형태일 수 있다.
- [438] 상기 염의 종류는 특별히 제한되지는 않는다. 다만, 개체, 예컨대 포유류에게 안전하고 효과적인 형태인 것이 바람직하나, 특별히 이에 제한되는 것은 아니다.
- [439] 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.
- [440] 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.
- [441] 또한, 본 발명에서 사용된 용어 "용매화물"은 본 발명에 따른 펩타이드 또는 이의 염이 용매 분자와 복합체를 형성한 것을 말한다.
- [442] 또한, 본원에서 '특정 서열번호로 구성되는 펩타이드'라고 기재되어 있다 하더라도, 해당 서열번호의 아미노산 서열로 이루어진 펩타이드와 동일 혹은 상응하는 활성을 가지는 경우라면 해당 서열번호의 아미노산 서열 앞뒤의 무의미한 서열 추가 또는 자연적으로 발생할 수 있는 돌연변이, 혹은 이의 잠재성 돌연변이 (silent mutation)를 제외하는 것이 아니며, 이러한 서열 추가 혹은 돌연변이를 가지는 경우에도 본원의 범위 내에 속하는 것이 자명하다.
- [443] 한편, 이러한 펩타이드는 비자연적인 (non-naturally occurring) 것일 수 있다.
- [444] 상기 펩타이드의 C-말단은 아미드화되거나 또는 자유 카르복실기 (-COOH)를 갖는 펩타이드이거나, 또는 C-말단이 변형되지 않은 펩타이드를 포함하는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [445] 하나의 구체예로, 상기 X는 C-말단이 아미드화되어 있는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [446] 하나의 구체예로, 상기 X는 비당쇄화된 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [447]
- [448] 상기 일반식 1의 펩타이드는 Solid phase 합성법을 통하여 합성될 수 있으며, 제조합 방법으로도 생산 가능하고, 상업적으로 의뢰하여 제조할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [449]
- [450] 본 발명에서 용어 "화학식 1의 지속형 결합체"는 본 발명의 액상 제제에 포함되는 유효성분으로서, 약리학적 유효량으로 액상 제제에 포함될 수 있다. 구체적으로, 상기 글루카곤 유도체에 대해 활성을 갖는 펩타이드 및 면역글로불린 Fc 영역이 서로 링커로 연결된 형태로, 상기 결합체는

면역글로불린 Fc 영역이 결합되지 않은 글루카곤 유도체에 대해 활성을 갖는 펩타이드에 비하여 증가된 효력의 지속성을 나타낼 수 있다.

[451] 또한, 화학식 1의 지속형 결합체에 있어서 글루카곤 유도체에 대해 활성을 갖는 펩타이드인 X와 면역글로불린 Fc 절편의 연결은 물리 또는 화학 결합이거나, 비공유 또는 공유 결합일 수 있으며, 구체적으로 공유 결합일 수 있으나 이에 제한되지 않는다.

[452] 또한, 화학식 1의 펩타이드 결합체는 글루카곤 유도체에 대해 활성을 갖는 펩타이드인 X와 면역글로불린 Fc 절편의 연결 방법은 특별히 제한되지 않으나, 링커를 통해 글루카곤 수용체, GLP-1 수용체 및 GIP 수용체에 대해 활성을 갖는 펩타이드와 면역글로불린 Fc 절편이 서로 연결된 것일 수 있다.

[453] 구체적으로, 본원의 액상제제에 포함되는 지속형 결합체는 상기 화학식 1로 표시되는 것일 수 있다.

[454] 상기 화학식 1에서 공유결합으로 L을 통하여 X와 F가 서로 결합될 수 있다.

[455] 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.

[456] 또한, 상기 X는 F가 직접적으로 연결되거나(즉, 상기 화학식 1에서 a가 0이거나), 또는 링커(L)를 통해 연결된 것일 수 있다.

[457]

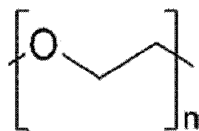
[458] 하나의 구체예로, 상기 화학식 1의 지속형 결합체의 일 구성요소인 La는 에틸렌글리콜 반복 단위를 함유하는 링커로, 예를 들어, 폴리에틸렌 글리콜일 수 있고, 또한, 당해 분야에 이미 알려진 이들의 유도체 및 당해 분야의 기술 수준에서 용이하게 제조할 수 있는 유도체들도 본 발명의 범위에 포함된다.

[459] 상기 에틸렌글리콜 반복 단위를 포함하는 링커인 L은, 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 에틸렌글리콜 반복 단위를 함유하는 링커는 2개, 또는 3개 이상의 작용기를 포함할 수 있고, 각 작용기는 동일하거나, 서로 상이할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[460] 구체적으로, 상기 링커는 하기 화학식 3로 표시되는 폴리에틸렌글리콜(PEG)일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다:

[461] [화학식 3]

[462]



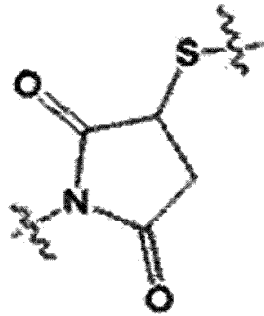
[463] 여기서, n = 10 내지 2400, n = 10 내지 480, 또는 n = 50 내지 250이나, 이에 제한되지 않는다.

- [464] 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.
- [465] 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.
- [466] 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 kDa이 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.
- [467] 하나의 구체예로, 상기 링커의 양 말단은 면역글로불린 Fc 절편의 티올기, 아미노기, 하이드록실기 및 일반식 1의 펩타이드의 티올기, 아미노기, 아지드기, 하이드록실기에 결합할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [468] 구체적으로, 상기 링커는 양쪽 말단에 각각 면역글로불린 Fc 및 일반식 1의 펩타이드와 결합될 수 있는 반응기, 구체적으로는 면역글로불린 Fc 절편의 시스테인의 티올기; N-말단, 리신, 아르기닌, 글루타민 및/또는 히스티딘에 위치한 아미노기; 및/또는 C-말단에 위치한 하이드록실기와 결합되고, 일반식 1의 펩타이드의 시스테인의 티올기; 리신, 아르기닌, 글루타민 및/또는 히스티딘의 아미노기; 아지도리신의 아지드기; 및/또는 하이드록실기와 결합될 수 있는 반응기를 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [469] 보다 구체적으로, 상기 링커의 반응기는 알데히드 그룹, 말레이미드 그룹 및 석시니미드 유도체로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [470] 상기에서, 알데히드 그룹으로 프로피온 알데히드 그룹 또는 부틸 알데히드

그룹을 예로서 들 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

- [471] 상기에서, 석시니미드 유도체로는 석시니미딜 카르복시메틸, 석시니미딜 발레르에이트, 석시니미딜 메틸부타노에이트, 석시니미딜 메틸프로피온에이트, 석시니미딜 부타노에이트, 석시니미딜 프로피온에이트, N-하이드록시석시니미드, 히드록시 석시니미딜 또는 석시니미딜 카보네이트가 이용될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [472] 상기 링커는 상기와 같은 반응기를 통해 면역글로불린 Fc 절편인 F 및 일반식 1의 펩타이드인 X에 연결되어, 링커 연결부로 전환될 수 있다.
- [473] 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.
- [474] 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 가질 수 있거나, 말단에 각각 알데히드 그룹 및 석시니미드 반응기를 가질 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [475] 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.
- [476] 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.
- [477] 하나의 구체적인 실시 형태에서 상기 링커의 반응기가 일반식 1의 펩타이드의 시스테인 잔기, 보다 구체적으로 시스테인의 -SH 기에 연결되는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [478] 만약, 말레이미드-PEG-알데히드를 사용하는 경우, 말레이미드 기는 일반식 1의 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.
- [479] 이와 같은 환원적 알킬화를 통하여 PEG의 한쪽 말단에 위치한 산소 원자에 면역글로불린 Fc 절편의 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 일반식 1의 펩타이드의 시스테인에 위치한 황 원자에 연결된 구조를 형성할 수 있다.

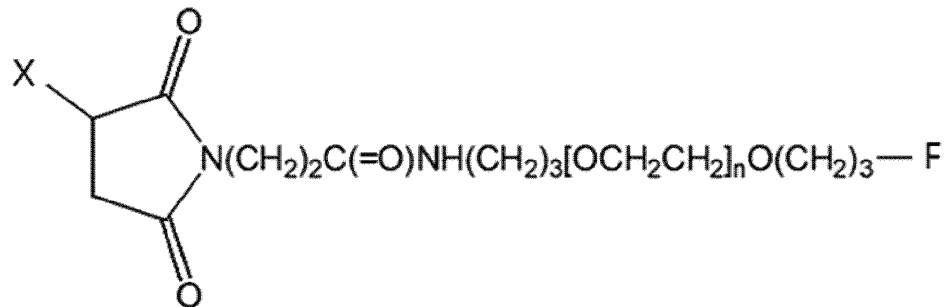
의 구조를 포함할 수 있다.



- [480] 그러나, 상술한 예에 특별히 제한되는 것은 아니며, 이는 하나의 일례에 해당한다.
- [481] 또한, 상기 결합체에서, 링커의 반응기가 면역글로불린 Fc 절편의 N-말단에 위치한 $-NH_2$ 와 연결된 것일 수 있으나, 이는 하나의 일례에 해당한다.
- [482] 또한, 상기 결합체에서, 일반식 1의 펩타이드는 반응기를 갖는 링커와 C-말단을 통해 연결될 수 있으나, 이는 하나의 일례에 해당한다.
- [483] 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.
- [484] 하나의 구체예로, 상기 화학식 1의 결합체는 하기 화학식 2의 구조를 가질 수 있다.

[485] [화학식 2]

[486]



- [487] 상기 화학식 2에서 X는 상기에서 설명한 일반식 1의 펩타이드이고;
- [488] F는 사람 면역글로불린 Fc 절편이며;
- [489] n은 자연수일 수 있다. 이때, n에 대한 설명은 상기에서 설명한 바와 같다.
- [490]
- [491] 하나의 구체예로, 상기 화학식 2의 지속형 결합체는 서열번호 46의 일반식 1의 펩타이드 X와 사람 면역글로불린 Fc 절편 F가 에틸렌글리콜 반복부를 개재하여 공유결합으로 연결된 구조로서, 각각 X는 화학식 2의 숙신이미드

고리에, F는 화학식 2의 옥시프로필렌기에 연결되는 형태일 수 있다..

- [492] 상기 화학식 2에서, 상기 n의 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.
- [493] 상기 펩타이드 결합체의 X는 글루카곤 유도체에 대해 활성을 갖는 펩타이드일 수 있다.
- [494] 한 실시 형태에서 화학식 2의 숙신이미드 고리에 X가 연결되는 부위는 X의 C-말단 시스테인의 황 원자일 수 있다.
- [495]
- [496] F는 사람 면역글로불린 Fc 절편으로서, 본 명세서에서 사람 면역글로불린 Fc 절편이라고 하면 면역글로불린의 파파인 소화에서 얻는 천연형 서열뿐 아니라 그 유도체, 치환체, 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 FcRn 에 결합하는 능력을 보유하는 것을 전제로 한다.
- [497] 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 화학식 1의 옥시프로필렌기에 연결되는 부위는 F의 N-말단 프롤린일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [498]
- [499] 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 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [500] 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.
- [501] 하나의 구체예로, 상기 F는 그 N-말단 프롤린의 질소 원자를 통하여 연결된 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [502]
- [503] 상기 글루카곤 유도체 펩타이드의 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.

[504]

[505] 이러한 글루카곤 유도체는 천연형 글루카곤에 대해 변화된 pI를 가져 개선된 물성을 나타내는 것일 수 있다. 또한, 상기 글루카곤 유도체는 글루카곤 수용체를 활성화시키는 활성을 보유하면서 용해도가 개선된 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[506] 또한, 상기 글루카곤 유도체는 천연적으로 존재하지 않는(non-naturally occurring) 것일 수 있다.

[507] 한편, 천연형 글루카곤은 다음의 아미노산 서열을 가질 수 있다:

[508] 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)

[509] 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.

[510] 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.

[511] 본 발명에서 용어 "변화된 pI"는 천연 글루카곤의 아미노산 서열에서 일부 서열이 음전하 및 양전하를 띤 아미노산 잔기로 치환되어 천연 글루카곤의 pI와는 다른, 즉 이보다 감소하거나 증가한 pI를 갖는 것을 의미한다. 이렇게 변화된 pI를 갖는 펩타이드는 글루카곤 유도체로서 중성 pH에서 개선된 용해도 및/또는 높은 안정성을 나타낼 수 있다. 그러나, 특별히 이에 제한되는 것은 아니다.

[512] 보다 구체적으로, 상기 글루카곤 유도체는 천연형 글루카곤의 pI 값(6.8)이 아닌 변화된 pI 값을 가지는 것일 수 있으며, 보다 더 구체적으로 6.8 미만, 구체적으로 6.7 이하, 더 구체적으로 6.5 이하인 pI 값, 또한 구체적으로 6.8 초과, 7 이상, 더 구체적으로 7.5 이상일 수 있으나, 이에 제한되지 않으며, 천연형 글루카곤과 상이한 pI 값을 가진다면 본 발명의 범주에 포함된다. 특히, 천연형 글루카곤과 상이한 pI 값을 가짐으로써 천연형 글루카곤에 비해 중성 pH에서 개선된 용해도를 나타냄으로써 응집(agggregation)되는 정도가 낮다면, 본 발명의 범주에 특히 포함된다.

[513] 더 구체적으로, 4 내지 6.5 및/또는 7 내지 9.5, 더 구체적으로 7.5 내지 9.5, 더욱 더 구체적으로 8.0 내지 9.3의 pI 값을 가지는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 이 경우, 천연형 글루카곤에 비해 높거나 낮은 pI를 갖기 때문에 중성 pH

에서 천연형 글루카곤에 비해 개선된 용해도 및 높은 안정성을 나타낼 수 있다. 그러나, 이에 제한되는 것은 아니다.

- [514] 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. 상기 아미노산의 치환은 일반적으로 잔기의 극성, 전하, 용해도, 소수성, 친수성 및/또는 양친매성(amphipathic nature)에서의 유사성에 근거하여 발생할 수 있고, 이와 같은 유사한 성질을 갖는 아미노산으로의 보존적 치환은 동일 또는 유사한 활성을 나타낼 것으로 기대할 수 있다.
- [515] 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.
- [516] 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.
- [517] 또한, 상기 천연형 글루카곤의 유도체는 천연형 글루카곤의 아미노 및/또는 카르복시 말단에 하나 또는 그 이상의 아미노산이 추가된 것을 모두 포함한다.
- [518] 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.
- [519] 아미노산 유도체도 마찬가지로 방식으로 입수할 수 있는데, 그 예를 일부만 들자면 4-이미다조아세트산(4-imidazoacetic acid) 등을 사용할 수 있다.
- [520] 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.

- [521] 이에 본 발명에서는 천연 글루카곤의 pI를 음전하 및 양전하를 띤 아미노산 잔기의 치환에 의해 변화시켜 연장된 작용 프로파일을 갖는 글루카곤 유도체를 개발하였다. 본 발명의 글루카곤 유도체는 천연 글루카곤에 비해 변화된 pI를 가짐으로써 중성 pH에서 개선된 용해도 및/또는 높은 안정성을 나타낼 수 있는 것을 특징으로 한다.
- [522] 하나의 구체적인 양태로서, 상기 글루카곤 유도체는 하기 일반식 1의 아미노산 서열을 포함하는 펩타이드일 수 있다.
- [523] Y-X2-QGTF-X7-SD-X10-S-X12-X13-X14-X15-X16-X17-X18-X19-X20-X21-F-X23-X24-W-L-X27-X28-T-X30(일반식 1, 서열번호: 46)
- [524] 상기 식에서,
- [525] X2는 알파-메틸-글루탐산(α -methyl-glutamic acid), Aib(aminoisobutyric acid), D-알라닌, 글리신, Sar(N-methylglycine), 세린 또는 D-세린이며;
- [526] X7은 트레오닌, 발린 또는 시스테인이고;
- [527] X10은 티로신 또는 시스테인이고;
- [528] X12는 리신 또는 시스테인이고;
- [529] X13은 티로신 또는 시스테인이고;
- [530] X14는 류신 또는 시스테인이고;
- [531] X15는 아스파르트산, 글루탐산 또는 시스테인이고;
- [532] X16은 글루탐산, 아스파르트산, 세린, 알파-메틸-글루탐산, 또는 시스테인이거나, 부존재하며;
- [533] X17은 아스파르트산, 글루타민, 글루탐산, 리신, 아르기닌, 세린, 시스테인, 또는 발린이거나, 부존재하며;
- [534] X18은 알라닌, 아스파르트산, 글루탐산, 글루타민, 아르기닌, 발린, 또는 시스테인이거나, 부존재하며;
- [535] X19는 알라닌, 아르기닌, 세린, 발린, 또는 시스테인이거나, 부존재하며;
- [536] X20은 리신, 히스티딘, 글루탐산, 글루타민, 아스파르트산, 아르기닌, 알파-메틸-글루탐산, 또는 시스테인이거나, 부존재하며;
- [537] X21은 아스파르트산, 글루탐산, 류신, 발린, 또는 시스테인이거나, 부존재하며;
- [538] X23은 이소류신, 발린, 또는 아르기닌이거나, 부존재하며;
- [539] X24는 발린, 아르기닌, 알라닌, 시스테인, 글루탐산, 리신, 글루타민, 알파-메틸-글루탐산, 또는 류신이거나, 부존재하며;
- [540] X27는 이소류신, 발린, 알라닌, 리신, 메티오닌, 글루타민, 또는 아르기닌이거나, 부존재하며;
- [541]
- [542] X28은 글루타민, 리신, 아스파라긴, 또는 아르기닌이거나, 부존재하며;

- [543] X30은 시스테인이거나, 부존재하는 것일 수 있다
- [544] (단, 상기 일반식 1의 아미노산 서열이 서열번호 1 및 서열번호 12와 동일한 경우는 제외함).
- [545]
- [546] 보다 더 구체적으로는,
- [547] 상기 일반식 1에서,
- [548] X2가 세린 또는 Aib(aminoisobutyric acid)이며;
- [549] X7은 트레오닌, 발린 또는 시스테인이고;
- [550] X10은 티로신 또는 시스테인이고;
- [551] X12는 리신 또는 시스테인이고;
- [552] X13은 티로신 또는 시스테인이고;
- [553] X14는 류신 또는 시스테인이고;
- [554] X15는 아스파르트산, 또는 시스테인이고;
- [555] X16은 글루탐산, 세린 또는 시스테인이며;
- [556] X17은 아스파르트산, 글루탐산, 리신, 아르기닌, 세린, 시스테인, 또는 발린
이고;
- [557] X18은 아스파르트산, 글루탐산, 아르기닌, 또는 시스테인이며;
- [558] X19는 알라닌, 또는 시스테인이고;
- [559] X20은 글루타민, 아스파르트산, 리신, 또는 시스테인이며;
- [560] X21은 아스파르트산, 글루탐산, 류신, 발린, 또는 시스테인이고;
- [561] X23은 이소류신, 발린 또는 아르기닌이며;
- [562] X24는 발린, 아르기닌, 알라닌, 글루탐산, 리신, 글루타민, 또는 류신이고;
- [563] X27은 이소류신, 발린, 알라닌, 메티오닌, 글루타민 또는 아르기닌이며;
- [564] X28은 글루타민, 리신, 아스파라긴 또는 아르기닌이고;
- [565] X30은 시스테인이거나, 부존재하는 것일 수 있다(일반식 1의 아미노산 서열이
서열번호 1 및 서열번호 12와 동일한 경우는 제외함).
- [566]
- [567] 그 예로, 상기 글루카곤 유도체 펩타이드는 서열번호: 2 내지 45로 이루어진
군에서 선택된 아미노산 서열을 포함하는 것, 구체적으로 서열번호: 2 내지 45로
이루어진 군에서 선택된 아미노산 서열로(필수적으로) 구성된 것 일 수 있으나,
이에 제한되지 않는다.
- [568] 또한, 본원에서 '특정 서열번호로 구성되는 펩타이드'라고 기재되어 있다
하더라도, 해당 서열번호의 아미노산 서열로 이루어진 펩타이드와 동일 혹은
상응하는 활성을 가지는 경우라면 해당 서열번호의 아미노산 서열 앞뒤의
무의미한 서열 추가 또는 자연적으로 발생할 수 있는 돌연변이, 혹은 이의
잠재성 돌연변이(silent mutation)를 제외하는 것이 아니며, 이러한 서열 추가 혹은
돌연변이를 가지는 경우에도 본원의 범위 내에 속하는 것이 자명하다.
- [569] 이상의 내용은 본 발명의 다른 구체에 혹은 다른 양태에도 적용될 수 있으나,

이에 제한되는 것은 아니다.

[570]

[571] 구체적으로, 상기 일반식 1에서,

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

[573] X7은 시스테인, 트레오닌, 또는 발린이고;

[574] X10은 티로신 또는 시스테인이고;

[575] X12는 리신 또는 시스테인이고;

[576] X13은 티로신 또는 시스테인이고;

[577] X14는 류신 또는 시스테인이고;

[578] X15는 아스파르트산, 또는 시스테인이고;

[579] X16은 글루탐산, 세린 또는 시스테인이며;

[580] X17은 글루탐산, 리신, 아르기닌, 시스테인, 또는 발린이고;

[581] X18은 아르기닌, 또는 시스테인이며;

[582] X19는 알라닌, 또는 시스테인이고;

[583] X20은 글루타민 또는 리신이며;

[584] X21은 아스파르트산, 글루탐산, 발린, 또는 시스테인이고;

[585] X23은 발린이며;

[586] X24는 발린 또는 글루타민이고;

[587] X27는 메티오닌이며;

[588] X28은 아스파라긴 또는 아르기닌이고;

[589] X30은 시스테인이거나, 부존재하는 것일 수 있다(단, 상기 일반식 1의 아미노산 서열이 서열번호 1 및 서열번호 12와 동일한 경우는 제외함).

[590]

[591] 그 예로, 상기 글루카곤 유도체 펩타이드는 서열번호: 3, 11 내지 17, 19 내지 27, 29, 31, 33, 35 내지 44로 이루어진 군에서 선택된 아미노산 서열을 포함하는 것, 구체적으로 서열번호: 3, 11 내지 17, 19 내지 27, 29, 31, 33, 35 내지 44로 이루어진 군에서 선택된 아미노산 서열로(필수적으로) 구성된 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[592]

[593] 구체적으로,

[594] 상기 일반식 1에서

[595] X2가 Aib(aminoisobutyric acid)이며;

[596] X7은 시스테인, 트레오닌, 또는 발린이고;

[597] X10은 티로신 또는 시스테인이고;

[598] X12는 리신이고;

[599] X13은 티로신 또는 시스테인이고;

[600] X14는 류신 또는 시스테인이고;

[601] X15는 아스파르트산, 또는 시스테인이고;

- [602] X16은 글루탐산, 세린 또는 시스테인이며;
[603] X17은 리신, 아르기닌, 시스테인, 또는 발린이고;
[604] X18은 아르기닌, 또는 시스테인이며;
[605] X19는 알라닌, 또는 시스테인이고;
[606] X20은 글루타민 또는 리신이며;
[607] X21은 아스파르트산, 글루탐산, 또는 시스테인이고;
[608] X23은 발린이며;
[609] X24는 글루타민이고;
[610] X27는 메티오닌이며;
[611] X28은 아스파라긴 또는 아르기닌이고;
[612]
[613] X30은 시스테인이거나, 부존재하는 것일 수 있다(일반식 1의 아미노산 서열이 서열번호 1 및 서열번호 12와 동일한 경우는 제외함).
[614]
[615] 그 예로, 상기 글루카곤 유도체 펩타이드는 서열번호: 14, 17, 19 내지 25, 27, 29, 33, 35 내지 38, 40 내지 42, 및 44로 이루어진 군에서 선택된 아미노산 서열을 포함하는 것, 구체적으로 서열번호: 14, 17, 19 내지 25, 27, 29, 33, 35 내지 38, 및 40 내지 42, 44로 이루어진 군에서 선택된 아미노산 서열로(필수적으로) 구성된 것 일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
[616]
[617] 구체적으로, 상기 일반식 1에서
[618] X2가 세린 또는 Aib(aminoisobutyric acid)이며;
[619] X7은 트레오닌, 발린 또는 시스테인이고;
[620] X10은 티로신 또는 시스테인이고;
[621] X12는 리신 또는 시스테인이고;
[622] X13은 티로신 또는 시스테인이고;
[623] X14는 류신 또는 시스테인이고;
[624] X15는 아스파르트산, 또는 시스테인이고;
[625] X16은 글루탐산, 세린 또는 시스테인이며;
[626] X17은 아스파르트산, 글루탐산, 리신, 아르기닌, 세린, 시스테인, 또는 발린
이고;
[627] X18은 아스파르트산, 글루탐산, 아르기닌, 또는 시스테인이며;
[628] X19는 알라닌, 또는 시스테인이고;
[629] X20은 글루타민, 아스파르트산, 또는 리신이며;
[630] X21은 아스파르트산, 또는 글루탐산이고;
[631] X23은 발린이며;
[632] X24는 발린 또는 글루타민이고;
[633] X27는 이소류신 또는 메티오닌이며;

- [634] X28은 아스파라긴 또는 아르기닌이고;
- [635] X29는 트레오닌이며;
- [636] X30은 시스테인이거나, 부존재하는 것일 수 있다(일반식 1의 아미노산 서열이 서열번호 1 및 서열번호 12와 동일한 경우는 제외함).
- [637]
- [638] 그 예로, 상기 글루카곤 유도체 펩타이드는 서열번호 2 내지 13, 15, 17, 20 내지 24, 26 내지 30, 및 32 내지 44로 이루어진 군에서 선택된 아미노산 서열을 포함하는 것, 구체적으로 서열번호 2 내지 13, 15, 17, 20 내지 24, 26 내지 30, 및 32 내지 44로 이루어진 군에서 선택된 아미노산 서열로(필수적으로) 구성된 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [639]
- [640] 구체적으로, 상기 일반식 1에서
- [641] X2가 Aib(aminoisobutyric acid)이며;
- [642] X7은 트레오닌이고;
- [643] X10은 티로신이고;
- [644] X12는 리신이고;
- [645] X13은 티로신이고;
- [646] X14는 류신이고;
- [647] X15는 아스파르트산, 또는 시스테인이고;
- [648] X16은 글루탐산, 세린 또는 시스테인이며;
- [649] X17은 리신 또는 아르기닌이고;
- [650] X18은 아르기닌이며;
- [651] X19는 알라닌이고;
- [652] X20은 글루타민, 시스테인, 또는 리신이며;
- [653] X21은 아스파르트산, 시스테인, 발린 또는 글루탐산이고;
- [654] X23은 발린 또는 아르기닌이며;
- [655] X24는 글루타민 또는 류신이고;
- [656] X27는 메티오닌이며;
- [657] X28은 아스파라긴 또는 아르기닌이고;
- [658] X29는 트레오닌이며;
- [659] X30은 부존재하는 것일 수 있다(단, 상기 일반식 1의 아미노산 서열이 서열번호 1 및 서열번호 12와 동일한 경우는 제외함).
- [660]
- [661] 그 예로, 상기 글루카곤 유도체 펩타이드는 서열번호: 14, 16, 18, 19, 25, 및 31로 이루어진 군에서 선택된 아미노산 서열을 포함하는 것, 구체적으로 서열번호: 14, 16, 18, 19, 25, 및 31로 이루어진 군에서 선택된 아미노산 서열로 (필수적으로) 구성된 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [662]

- [663] 더 구체적으로, 상기 글루카곤 유도체 펩타이드는 하기 일반식 2의 아미노산 서열을 포함하는 펩타이드일 수 있다:
- [664]
- [665] Y-Aib-QGTF-X7-SD-X10-S-X12-Y-L-X15-X16-X17-R-A-X20-X21-F-V-X24-W-L-M-N-T-X30(일반식 2, 서열번호: 47)
- [666]
- [667] 상기 일반식 2에서
- [668] X7은 트레오닌, 발린 또는 시스테인이고;
- [669] X10은 티로신 또는 시스테인이고;
- [670] X12는 리신 또는 시스테인이고;
- [671] X15는 아스파르트산, 또는 시스테인이고;
- [672] X16은 글루탐산 또는 세린이며;
- [673] X17은 리신 또는 아르기닌이고;
- [674] X20은 글루타민 또는 리신이며;
- [675] X21은 아스파르트산, 또는 글루탐산이고;
- [676] X24는 발린 또는 글루타민이고;
- [677] X30은 시스테인이거나, 부존재할 수 있다(단, 상기 일반식 2의 아미노산 서열이 서열번호 1 및 서열번호 12와 동일한 경우는 제외함).
- [678]
- [679] 그 예로, 상기 글루카곤 유도체 펩타이드는 서열번호: 13, 15 및 36 내지 44로 이루어진 군에서 선택된 아미노산 서열을 포함하는 것, 구체적으로 서열번호: 13, 15 및 36 내지 44로 이루어진 군에서 선택된 아미노산 서열로(필수적으로) 구성된 것 일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 보다 더 구체적으로, 상기 펩타이드는 서열번호: 20, 혹은 37의 아미노산 서열을 포함하거나, 해당 아미노산 서열로(필수적으로) 구성되는 것을 특징으로 한다. 그러나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [680]
- [681] 구체적으로, 상기 일반식 2에서
- [682] X7은 트레오닌, 발린 또는 시스테인이고;
- [683] X10은 티로신 또는 시스테인이고;
- [684] X12는 리신이고;
- [685] X15는 아스파르트산이고;
- [686] X16은 글루탐산 또는 세린이며;
- [687] X17은 리신 또는 아르기닌이고;
- [688] X20은 글루타민 또는 리신이며;
- [689] X21은 아스파르트산 또는 글루탐산이고;
- [690] X24는 글루타민이고;
- [691] X30은 시스테인이거나, 부존재하는 것일 수 있으나 (단, 상기 일반식 2의

아미노산 서열이 서열번호 1 및 서열번호 12와 동일한 경우는 제외함), 특별히 이에 제한되는 것은 아니다.

[692]

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

[694] 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.

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

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

[697] 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.

[698] 예컨대, 상기 일반식 1 혹은 일반식 2의 아미노산 서열을 포함하는 펩타이드는 일반식 1 혹은 일반식 2의 X10과 X14, X12와 X16, X16과 X20, X17과 X21, X20과 X24, 및 X24와 X28의 아미노산 쌍에서, 각 아미노산 쌍의 아미노산이 각각 글루탐산 또는 리신으로 치환된 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 상기, X_n (n 은 자연수)에서 n 은 제시된 아미노산 서열의 N-말단으로부터의 아미노산 위치를 나타낸다.

[699] 또한, 상기 일반식 1 혹은 일반식 2의 아미노산 서열을 포함하는 펩타이드는 X12와 X16의 아미노산 쌍, X16과 X20의 아미노산 쌍, 또는 X17과 X21의 아미노산 쌍의 아미노산 각각이 고리를 형성할 수 있는 글루탐산 또는 리신으로 치환된 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[700] 또한, 상기 일반식 1 혹은 2에서, X10과 X14, X12와 X16, X16과 X20, X17과 X21, X20과 X24, 및 X24와 X28의 아미노산 쌍 중 적어도 하나의 아미노산 쌍에서 각 아미노산 쌍의 각각의 아미노산 간에 고리(예컨대, 락탐 고리)를 형성한 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[701] 또한, 상기 일반식 1 또는 2에서, X16이 글루탐산이고, X20은 리신이며, X16과 X20의 측쇄가 락탐 고리를 형성하고 있는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[702] 또한, 본 발명에 따른 글루카곤 유도체 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.

[703] 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.

[704] 본 명세서에서 따로 가리키는 바가 없으면, 본 발명에 따른 "글루카곤 유도체 펩타이드" 또는 이러한 펩타이드가 면역글로불린 Fc 절편에 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.

[705]

[706] 본 발명에서, "면역글로불린 Fc 절편"은, 면역글로불린의 중쇄와 경쇄 가변영역을 제외한, 중쇄 불변영역을 의미한다. 구체적으로, 상기 면역글로불린 Fc 절편은 중쇄 불변영역 2(CH2) 및/또는 중쇄 불변영역 3(CH3)부분을 포함하는 것일 수 있고, 보다 더 구체적으로, 힌지 영역 (힌지 영역 전체 또는 일부를 의미한다.)을 더 포함하는 것일 수 있다.

[707] 상기 면역글로불린 Fc 절편은 본 발명의 화학식 1의 펩타이드 결합체의 모이어티를 이루는 일 구성으로, 구체적으로, 상기 화학식 1에서 F에 해당할 수 있다. 이러한 면역글로불린 Fc 절편은 중쇄 불변영역에 힌지(hinge) 부분을 포함할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

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

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

[710] 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:

[711] Glu-Ser-Lys-Tyr-Gly-Pro-Pro-Cys-Pro-Ser-Cys-Pro(서열번호 48).

[712] 상기 힌지 서열은 서열번호 48의 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 52),
 Glu-Ser-Lys-Tyr-Gly-Pro-Pro-Cys-Pro-Ser-Pro(서열번호 53),
 Glu-Ser-Lys-Tyr-Gly-Pro-Pro-Cys-Pro-Ser(서열번호 54),
 Glu-Ser-Lys-Tyr-Gly-Pro-Pro-Cys-Pro-Pro(서열번호 55),
 Lys-Tyr-Gly-Pro-Pro-Cys-Pro-Ser(서열번호 56),
 Glu-Ser-Lys-Tyr-Gly-Pro-Pro-Cys(서열번호 57),
 Glu-Lys-Tyr-Gly-Pro-Pro-Cys(서열번호 58), Glu-Ser-Pro-Ser-Cys-Pro(서열번호 59), Glu-Pro-Ser-Cys-Pro(서열번호 60), Pro-Ser-Cys-Pro(서열번호 61),
 Glu-Ser-Lys-Tyr-Gly-Pro-Pro-Ser-Cys-Pro(서열번호 62),
 Lys-Tyr-Gly-Pro-Pro-Pro-Ser-Cys-Pro(서열번호 63),
 Glu-Ser-Lys-Tyr-Gly-Pro-Ser-Cys-Pro(서열번호 64),
 Glu-Ser-Lys-Tyr-Gly-Pro-Pro-Cys(서열번호 65),
 Lys-Tyr-Gly-Pro-Pro-Cys-Pro(서열번호 66), Glu-Ser-Lys-Pro-Ser-Cys-Pro(서열번호 67), Glu-Ser-Pro-Ser-Cys-Pro(서열번호 68), Glu-Pro-Ser-Cys(서열번호 69).

서열번호 49(Ser-Cys-Pro) 또는 서열번호 50(Pro-Ser-Cys-Pro), 더욱 구체적으로는 상기 힌지 서열은 서열번호 49(Ser-Cys-Pro) 또는 서열번호 50(Pro-Ser-Cys-Pro)의 아미노산 서열을 포함하는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

- [713] 본 발명의 면역글로불린 Fc 절편은 힌지 서열의 존재로 면역글로불린 Fc 사슬 두 분자가 이량체를 형성한 형태일 수 있고, 또한, 본 발명의 화학식 1의 지속형 결합체는 링커의 일 말단이 이량체의 면역글로불린 Fc 절편의 한 사슬에 연결된 형태일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [714] 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 절편은 힌지 서열을 N-말단에 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [715] 또한 본 발명의 면역글로불린 Fc 절편은 천연형과 실질적으로 동등하거나 향상된 효과를 갖는 한, 면역 글로불린의 중쇄와 경쇄 가변영역만을 제외하고, 일부 또는 전체 중쇄 불변영역 1(CH1) 및/또는 경쇄불변영역 1(CL1)을 포함하는 확장된 Fc영역일 수 있다. 또한, CH2 및/또는 CH3에 해당하는 상당히 긴 일부 아미노산 서열이 제거된 영역일 수도 있다.
- [716] 예컨대, 본 발명의 면역글로불린 Fc 절편은 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.

- [717] 또한, 하나의 구체예로서, 상기 면역글로불린 Fc 절편은 이량체 형태(dimeric form)일 수 있으며, 이합체 형태의 하나의 Fc 영역에 일반식 1의 펩타이드 한 분자가 공유결합적으로 연결될 수 있으며, 이때 상기 면역글로불린 Fc와 일반식 1의 펩타이드는 에틸렌 글리콜 반복단위를 함유하는 링커에 의해 서로 연결될 수 있다. 한편, 이량체 형태의 하나의 Fc 영역에 일반식 1의 펩타이드 두 분자가 대칭적으로 결합하는 것 역시 가능하다. 이때 상기 면역글로불린 Fc와 일반식 1의 펩타이드는 에틸렌 글리콜 반복단위를 함유하는 링커에 의해 서로 연결될 수 있다. 그러나, 상기 기술된 예에 제한되는 것은 아니다.
- [718] 또한, 본 발명의 면역글로불린 Fc 절편은 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.
- [719] 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.
- [720] 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 절편의 서열 유도체를 제조하는 기술은 국제특허공개 제WO 97/34631호, 국제특허공개 제96/32478호 등에 개시되어 있다.
- [721] 분자의 활성을 전체적으로 변경시키지 않는 단백질 및 펩타이드에서의 아미노산 교환은 당해 분야에 공지되어 있다(H.Neurath, R.L.Hill, The Proteins, Academic Press, New York, 1979). 가장 통상적으로 일어나는 교환은 아미노산 잔기 Ala/Ser, Val/Ile, Asp/Glu, Thr/Ser, Ala/Gly, Ala/Thr, Ser/Asn, Ala/Val, Ser/Gly, Thy/Phe, Ala/Pro, Lys/Arg, Asp/Asn, Leu/Ile, Leu/Val, Ala/Glu, Asp/Gly 간의 교환이다. 경우에 따라서는 인산화(phosphorylation), 황산화(sulfation), 아크릴화(acrylation), 당화(glycosylation), 메틸화(methylation), 파네실화(farnesylation), 아세틸화(acetylation) 및 아미드화(amidation) 등으로 수식(modification)될 수도 있다.
- [722] 상기 기술한 Fc 유도체는 본 발명의 Fc 절편과 동등한 생물학적 활성을 나타내며 Fc 절편의 열, pH 등에 대한 구조적 안정성을 증대시킨 것일 수 있다.
- [723] 또한, 이러한 Fc 절편은 인간, 소, 염소, 돼지, 마우스, 래빗, 햄스터, 랫트 또는 기니아 피그 등의 동물의 생체 내에서 분리한 천연형으로부터 얻어질 수도 있고, 형질전환된 동물세포 또는 미생물로부터 얻어진 재조합형 또는 이의 유도체일 수 있다. 여기서, 천연형으로부터 획득하는 방법은 전체 면역글로불린을 인간

또는 동물의 생체로부터 분리한 후, 단백질을 분해효소를 처리하여 획득하는 방법일 수 있다. 파파인을 처리할 경우에는 Fab 및 Fc로 절단되고, 펩신을 처리할 경우에는 pF'c 및 F(ab)₂로 절단된다. 이를 크기 배제 크로마토그래피(size-exclusion chromatography) 등을 이용하여 Fc 또는 pF'c를 분리할 수 있다. 더 구체적인 실시 형태에서는 인간 유래의 Fc 절편을 미생물로부터 수득한 제조합형 면역글로불린 Fc 절편이다.

- [724] 또한, 면역글로불린 Fc 절편은 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 절편은 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 절편이라 할 것이다.
- [725] 본 발명에서 "당쇄의 제거(Deglycosylation)"는 효소로 당을 제거한 Fc 절편을 말하며, 비당쇄화(Aglycosylation)는 원핵동물, 더 구체적인 실시 형태에서는 대장균에서 생산하여 당쇄화되지 않은 Fc 절편을 의미한다.
- [726] 한편, 면역글로불린 Fc 절편은 인간 또는 소, 염소, 돼지, 마우스, 래빗, 햄스터, 랫트, 기니아 피그 등의 동물기원일 수 있으며, 더 구체적인 실시 형태에서는 인간기원이다.
- [727] 또한, 면역글로불린 Fc 절편은 IgG, IgA, IgD, IgE, IgM 유래 또는 이들의 조합(combination) 또는 이들의 혼성(hybrid)에 의한 Fc 절편일 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 절편은 IgG4 Fc 절편이며, 가장 구체적인 실시 형태에서 상기 면역글로불린 Fc 절편은 인간 IgG4 유래의 비-당쇄화된 Fc 절편이나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [728] 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 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 절편은 서열번호

51의 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.

- [729] 상기 화학식 1의 F는 서열번호 51의 아미노산 서열인 단량체를 포함하는 것일 수 있으며, 상기 F는 서열번호 51의 아미노산 서열의 단량체의 동종이량체일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [730] 상기 화학식 1의 F는 서열번호 51의 아미노산 서열인 단량체를 포함하는 것일 수 있으며, 상기 F는 서열번호 51의 아미노산 서열의 단량체의 동종이량체일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [731] 하나의 예로, 면역글로불린 Fc 절편은 서열번호 70의 아미노산 서열 (442개의 아미노산으로 구성됨)을 포함하는 동종이량체일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [732] 한편, 본 발명에서 "조합(combination)"이란 이량체 또는 다량체를 형성할 때, 동일 기원 단쇄 면역글로불린 Fc 절편을 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.
- [733] 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.
- [734] 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.
- [735]
- [736] 상기 액상 제제는 선천성 고인슐린증, 저혈당, 또는 대사증후군의 예방 또는 치료에 사용될 수 있다.
- [737] 본 발명에서 용어 "예방"은 상기 글루카곤 유도체, 이를 포함하는 결합체, 또는 조성물의 투여로 목적하는 질환, 예컨대 선천성 고인슐린증, 저혈당, 또는 대사증후군의 발병을 억제 또는 지연시키는 모든 행위를 의미하며, "치료"는 상기 글루카곤 유도체, 이를 포함하는 결합체, 또는 조성물의 투여로 목적하는 질환, 예컨대 선천성 고인슐린증, 저혈당, 또는 대사증후군의 증세가 호전되거나

이롭게 되는 모든 행위를 의미한다.

- [738] 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.
- [739] 본 발명에서 용어 "저혈당"은 혈중 당량이 정상인보다 낮은 상태를 말한다. 통상 혈당이 50 mg/dl 이하일 때를 말하나, 특별히 이에 제한되는 것은 아니다. 저혈당증이 생기는 흔한 원인은 경구용 혈당강하제나 인슐린을 사용하는 사람이 평소보다 음식 섭취량이 적거나 활동량이나 운동량이 과한 경우이다. 이외에도 음주나 일부 혈당을 떨어뜨리는 약물의 사용, 중증의 신체적 질환, 부신피질호르몬이나 글루카곤 등의 호르몬 결핍, 인슐린 생성 췌장 종양, 인슐린에 대한 자가면역질환이 있는 경우, 위절제술 환자, 유전성 탄수화물 대사효소이상 질환 등에 의해서도 저혈당이 발생할 수 있다.
- [740] 본 발명에서 상기 저혈당은 급성 저혈당 및 만성 저혈당을 모두 포함한다.
- [741] 저혈당의 증상은 기운이 없고 몸의 떨림이 있으며, 창백, 식은땀, 현기증, 흥분, 불안감, 가슴 두근거림, 공복감, 두통, 피로감 등을 포함한다. 저혈당이 오래 지속되면 경련이나 발작이 있을 수 있고 쇼크상태가 초래되어 의식을 잃을 수도 있다.
- [742] 보다 구체적으로, 상기 저혈당은 유전적 결함에 따른 지속성 고인슐린증에 의해 유발될 수 있다. 유전적 결함에 의한 고인슐린증의 원인으로는 11p15.1 염색체에 있는 SUR 또는 Kir6.2 유전자의 돌연변이, 7p15-p13 염색체에 있는 GK(glucokinase) 유전자 돌연변이로 GK 활성도가 증가, GDH(Glutamate dehydrogenase) 유전자 돌연변이로 GDH가 활성화 되고 이로 인하여 베타 세포 내 ATP가 증가 등이 알려져 있다.
- [743] 한편, 선천성 고인슐린증은 신생아와 소아에서 발생하는 심각하고 지속적인 저혈당을 일으키는 원인 질환 중 하나이다. 저체중 출생아 혹은 당뇨 산모의 출생아에서 일시적인 인슐린 분비 증가, 유전자 돌연변이로 인한 췌장 세포의 이상 기능 등으로 유발될 수 있다. 이러한 선천성 고인슐린증의 치료에 글루카곤이 사용될 수 있음은 알려져 있다.
- [744] 또한, 본 발명의 글루카곤 유도체 혹은 이를 포함하는 결합체는 체중 증가를 예방하거나, 체중 감소를 촉진하거나, 과체중을 감소시키거나, 병적 비만을 포함하는 비만(예컨대, 식욕, 섭식, 식품 섭취, 칼로리 섭취 및/또는 에너지 소비의 조절에 의해), 뿐만 아니라 비만 관련 염증, 비만 관련 쓸개 질환 및 비만 유도된 수면 무호흡을 포함하나, 이에 한정되지 않는 관련 질환 및 건강 상태를 치료하기 위한 약제로서 사용될 수 있다. 본 발명의 글루카곤 유도체 혹은 이를 포함하는 결합체는 또한 비만 외의 대사증후군, 즉 내당증 장애,

고콜레스테롤혈증, 이상지혈증, 비만, 고혈압, 비알코올지방간염(nonalcoholic steatohepatitis, NASH), 이상지혈증에 의한 동맥경화, 죽상동맥경화증, 동맥경화증, 관상동맥 심질환(관동맥성 심장병), 또는 뇌졸중 등과 같은 관련 질환의 치료에 사용될 수 있다. 그러나, 이들 병태에 있어서 본 발명에 따른 글루카곤 유도체 또는 이의 결합체의 효과는 전술한 체중 관련 효과를 통해 전체적으로 또는 부분적으로 매개될 수 있거나 이와는 독립적일 수 있다.

[745]

[746] 본 발명을 구현하는 또 다른 하나의 양태는 상기 액상 제제의 제조방법을 제공한다.

[747] 액상 제제 및 이를 구성하는 요소들에 대해서는 앞서 설명한 바와 같다.

[748] 구체적으로, 상기 제조방법은 i) 글루카곤 유도체 펩타이드 및 면역글로불린 Fc 절편이 서로 연결된, 글루카곤 유도체 펩타이드의 지속형 결합체와 (ii) (a)완충물질 및 (b) 당알코올, 당 또는 이들의 조합을 포함하는 안정화제를 서로 혼합하는 단계를 포함할 수 있다.

[749] 상기 안정화제는 당 또는 당알코올, 비이온성 계면활성제, 및 아미노산으로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 성분을 더 포함할 수 있고, 보다 구체적으로 당 또는 당알코올, 아미노산, 또는 이들 둘 다를 더 포함할 수 있다. 예컨대, 상기 안정화제는 완충물질, 당 또는 당알코올, 및 아미노산을 포함할 수 있다. 그러나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[750] 상기 지속형 결합체, 완충물질, 당, 당알코올 또는 이들의 조합, 비이온성 계면활성제, 아미노산, 및 알부민-비함유 안정화제에 대해서는 앞서 설명한 바와 같다.

[751]

[752] 본 발명을 구현하는 다른 하나의 양태는 선천성 고인슐린증, 저혈당, 또는 대사증후군의 예방 또는 치료용 약제의 제조에 있어서, 상기 액상 제제의 용도를 제공한다.

[753] 본 발명을 구현하는 다른 하나의 양태는 선천성 고인슐린증, 저혈당, 또는 대사증후군의 예방 또는 치료에 사용하기 위한 상기 액상 제제의 용도를 제공한다.

[754] 본 발명을 구현하는 다른 하나의 양태는 상기 액상 제제를 이를 필요로 하는 개체에 투여하는 단계를 포함하는, 선천성 고인슐린증, 저혈당, 또는 대사증후군의 예방 또는 치료방법을 제공한다.

[755] 상기 액상 제제, 선천성 고인슐린증, 저혈당, 및 대사증후군에 대해서는 앞서 설명한 바와 같다.

[756] 상기 개체는 본 발명의 제제의 투여가 필요한 개체로서, 본 발명의 액상 제제로 치료 가능한 개체는 제한 없이 포함하며, 구체적으로 인간 또는 쥐, 가축 등을 포함하는 포유 동물을 포함한다.

[757] 본 발명의 치료 방법은 액상 제제를 약학적 유효량으로 투여하는 것을 포함할

수 있다. 적합한 총 1일 사용량은 올바른 의학적 판단 범위 내에서 처치의에 의해 결정될 수 있으며, 1회 또는 수회로 나누어 투여할 수 있다. 그러나 본 발명의 목적상, 특정 환자에 대한 구체적인 치료적 유효량은 달성하고자 하는 반응의 종류와 정도, 경우에 따라 다른 제제가 사용되는지의 여부를 비롯한 구체적인 조성물, 환자의 연령, 체중, 일반 건강 상태, 성별 및 식이, 투여 시간, 투여 경로 및 조성물의 분비율, 치료기간, 구체적인 조성물과 함께 사용되거나 동시 사용되는 약물을 비롯한 다양한 인자와 의학 분야에 잘 알려진 유사 인자에 따라 다르게 적용하는 것이 바람직하다.

[758]

[759] 이하, 본 발명을 하기 실시예에 의하여 더욱 상세히 설명한다. 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하기 위한 것일 뿐, 본 발명의 범위가 이들만으로 한정되는 것은 아니다.

[760]

[761] 제조예: 글루카곤 유도체 펩타이드의 지속형 결합체 제조

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

[763] 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 폐길화시켰다. 구체적으로, 서열번호 37의 글루카곤 유도체 펩타이드와 말레이미드-PEG-알데히드의 물비를 1:1~5, 단백질의 농도를 3~10 mg/mL로 하여 저온에서 1~3 시간 동안 반응시켰다. 이때, 반응은 50 mM Tris 완충액(pH 7.5)에 20~60 % 아이소프로판올이 첨가된 환경하에서 수행되었다. 반응이 종료된 후, 상기 반응액을 SP sepharose HP(GE healthcare, 미국)에 적용하여 시스테인에 모노-폐길화된 글루카곤 유도체를 정제하였다.

[764] 면역글로불린 Fc 절편은 N-말단에 Pro-Ser-Cys-Pro 서열의 힌지 영역을 갖는 면역글로불린 Fc 절편 (49.8kDa, 서열번호 51의 사슬 두 개가 이황화결합으로 연결된 호모이합체)를 사용하여 국제공개특허 WO2007/021129에 기재된 방법으로 제조하였다.

[765] 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 소듐시아노보로하이드라이드와 10~20 % 아이소프로판올이 첨가된 환경하에서 수행되었다. 반응이 종료된 후, 상기 반응액을 Butyl sepharose FF 정제컬럼(GE healthcare, 미국)과 Source ISO 정제컬럼(GE healthcare, 미국)에 적용하여, 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.

- [766] 제조 후 역상 크로마토그래피, 크기배제 크로마토그래피 및 이온교환 크로마토그래피로 분석한 순도는 95 % 이상이었다.
- [767] 여기서, 글루카곤 유도체 펩타이드 및 면역글로불린 Fc 절편이 PEG를 통하여 연결된 결합체를, '글루카곤 유도체 펩타이드의 지속형 결합체'로 명명하였다.
- [768]
- [769] 실시예 1: pH 및 당 또는 당알코올 종류에 따른 글루카곤 유도체 펩타이드의 지속형 결합체의 안정성 평가
- [770] 완충물질, 계면활성제로서 폴리소르베이트 20, 당 또는 당알코올, 그리고 메티오닌으로 이루어진 액상 제제를 기초로 하여 다양한 pH 및 안정화제 하에서 글루카곤 유도체 펩타이드 (이하, '글루카곤 유도체'로 명명)의 지속형 결합체의 안정성을 비교하였다. 비교예로, pH 4.5의 제제를 사용하였다.
- [771] 위 제조예에서 얻은 글루카곤 유도체 펩타이드의 지속형 결합체를 하기 표 1과 같은 조성(지속형 결합체 농도는 187.09 nmol/mL)의 액상 제제로 제조하여 25°C에서 6주간 보관 후, 이온교환 크로마토그래피법(Ion Exchange High Performance Liquid Chromatography, IE-HPLC), 및 역상 크로마토그래피법(Reverse Phase-High Performance Liquid Chromatography, RP-HPLC)을 이용해 안정성을 분석하였다.
- [772] 표 2의 IE-HPLC(%), 및 RP-HPLC(%)는 측정 시점에서의 면적 백분율 값을 보존 시험 초기 면적 백분율 값으로 나눈 비(Area% / Start Area%)의 백분율 수치로서 글루카곤 유도체의 지속형 결합체의 초기 농도(187.09 nmol/mL 농도)로부터의 잔존율을 나타낸다.
- [773]

[774] [표1]

	완충물질	pH	당 또는 당알코올	등장화 제	계면활성제	그 외
1	20mM 구연산나트륨	4.5	5% 만니톨	-	0.02% 폴리소르베이트 20	0.1 mg/mL 메티오닌
2	20mM 구연산나트륨	4.5	5% 소르비톨	-	0.02% 폴리소르베이트 20	0.1 mg/mL 메티오닌
3	20mM 구연산나트륨	4.5	8% 수크로오 스	-	0.02% 폴리소르베이트 20	0.1 mg/mL 메티오닌
# 1	20mM 구연산나트륨	5.0	5% 만니톨	-	0.02% 폴리소르베이트 20	0.1 mg/mL 메티오닌
# 2	20mM 구연산나트륨	5.5	5% 만니톨	-	0.02% 폴리소르베이트 20	0.1 mg/mL 메티오닌
# 3	20mM 구연산나트륨	6.0	5% 만니톨	-	0.02% 폴리소르베이트 20	0.1 mg/mL 메티오닌
# 4	20mM 구연산나트륨	5.0	5% 소르비톨	-	0.02% 폴리소르베이트 20	0.1 mg/mL 메티오닌
# 5	20mM 구연산나트륨	5.5	5% 소르비톨	-	0.02% 폴리소르베이트 20	0.1 mg/mL 메티오닌
# 6	20mM 구연산나트륨	6.0	5% 소르비톨	-	0.02% 폴리소르베이트 20	0.1 mg/mL 메티오닌
# 7	20mM 구연산나트륨	5.0	8% 수크로오 스	-	0.02% 폴리소르베이트 20	0.1 mg/mL 메티오닌
# 8	20mM 구연산나트륨	5.5	8% 수크로오 스	-	0.02% 폴리소르베이트 20	0.1 mg/mL 메티오닌

[775] [표2]

	IE-HPLC (%)			RP-HPLC (%)		
	초기	4주	6주	초기	4주	6주
비교예 1	100	92.3	N/D*	100	99.6	N/D
비교예 2	100	92.0	N/D	100	99.3	N/D
비교예 3	100	91.4	N/D	100	99.2	N/D
#1	100	87.1	83.6	100	100	98.3
#2	100	70.9	64.1	100	95.3	93.3
#3	100	46.3	38.3	100	88.2	84.9
#4	100	86.3	81.5	100	100.3	98.7
#5	100	69.7	70.1	100	95.0	93.6
#6	100	47.6	47.4	100	92.8	90.6
#7	100	87.4	87.4	100	101.8	100.6
#8	100	70.5	70.6	100	97.2	96.5

[776] ※ N/D : 단백질 침전으로 분석 불가

[777]

[778] 상기 결과에서 보듯이, 구연산나트륨, pH 5.0 조성을 가지는 제제(#1, #4, #7)가 안정성을 나타냄을 확인하였다.

[779] 또한, 구연산나트륨, pH 5.0 조성을 가지는 제제의 저장 안정성을 증대시키기 위해 포함될 수 있는 당 또는 당알코올인 만니톨, 소르비톨, 그리고 수크로오스를 각각 5%, 5% 및 8%로 포함하는 경우, 유사한 안정성을 나타냈다. 비교예 1, 2, 3인 pH 4.5의 조성의 경우에는 6주에서 침전이 일어난 것을 확인할 수 있었다.

[780]

[781] **실시예 2: 완충물질 종류, pH 및 당 또는 당알코올 종류에 따른 글루카곤 유도체의 지속형 결합체의 안정성 평가**

[782] 상기 액상 제제의 조성(구연산나트륨, 폴리소르베이트 20 및 메티오닌)에 기초하여 완충물질의 종류 및 pH에 따른 글루카곤 유도체의 지속형 결합체의 안정성을 비교하였다. 그 중 상기 실시예 1에서 확인된 만니톨, 소르비톨, 그리고 수크로오스 추가에 따른 글루카곤 유도체의 지속형 결합체의 안정성을 비교하였다. 이때 만니톨, 수크로오스 및 소르비톨의 농도는 시판 제형 및 허가기관에서 권고하는 최대 허용범위를 고려하였다.

- [783] 위 제조예에서 얻은 글루카곤 유도체 펩타이드의 지속형 결합체를 하기 표 3과 같은 조성(지속형 결합체 농도는 187.09 nmol/mL)의 액상 제제로 제조하여 25°C에서 7주간 보관 후, 이온교환 크로마토그래피법과 역상 크로마토그래피법을 이용해 분석하였다.
- [784] 표 4의 IE-HPLC(%), 및 RP-HPLC(%)는 측정 시점에서의 면적 백분율 값을 보존 시험 초기 면적 백분율 값으로 나눈 비($\text{Area\%} / \text{Start Area\%}$)의 백분율 수치로서 글루카곤 유도체의 지속형 결합체의 초기 농도(187.09 nmol/mL 농도)로부터의 잔존율을 나타낸다.

[785] [표3]

	완충물질	pH	당 또는 당알코올	등장화제	계면활성제	그 외
# 1	20mM 구연산나트륨	5.0	8% 수크로오스	-	0.02% 폴리소르베이트 20	0.1 mg/mL 메티오닌
# 2	20mM 아세트산나트륨	4.5	8% 수크로오스	-	0.02% 폴리소르베이트 20	0.1 mg/mL 메티오닌
# 3	20mM 아세트산나트륨	5.0	8% 수크로오스	-	0.02% 폴리소르베이트 20	0.1 mg/mL 메티오닌
# 4	20mM 아세트산나트륨	5.5	8% 수크로오스	-	0.02% 폴리소르베이트 20	0.1 mg/mL 메티오닌
# 5	10mM 히스티딘	5.5	8% 수크로오스	-	0.02% 폴리소르베이트 20	0.1 mg/mL 메티오닌
# 6	10mM 히스티딘	6.0	8% 수크로오스	-	0.02% 폴리소르베이트 20	0.1 mg/mL 메티오닌
# 7	20mM 구연산나트륨	5.0	5% 소르비톨	-	0.02% 폴리소르베이트 20	0.1 mg/mL 메티오닌
# 8	20mM 아세트산나트륨	4.5	5% 소르비톨	-	0.02% 폴리소르베이트 20	0.1 mg/mL 메티오닌
# 9	20mM 아세트산나트륨	5.0	5% 소르비톨	-	0.02% 폴리소르베이트 20	0.1 mg/mL 메티오닌
# 10	20mM 아세트산나트륨	5.5	5% 소르비톨	-	0.02% 폴리소르베이트 20	0.1 mg/mL 메티오닌
# 11	10mM 히스티딘	5.5	5% 소르비톨	-	0.02% 폴리소르베이트 20	0.1 mg/mL 메티오닌

# 1 2	10mM 히스티딘	6.0	5% 소르비톨	-	0.02% 폴리소르베이트 20	0.1 mg/mL 메티오닌
# 1 3	20mM 구연산나트륨	5.0	5% 만니톨	-	0.02% 폴리소르베이트 20	0.1 mg/mL 메티오닌
# 1 4	20mM 아세트산나트 륨	4.5	5% 만니톨	-	0.02% 폴리소르베이트 20	0.1 mg/mL 메티오닌
# 1 5	20mM 아세트산나트 륨	5.0	5% 만니톨	-	0.02% 폴리소르베이트 20	0.1 mg/mL 메티오닌
# 1 6	20mM 아세트산나트 륨	5.5	5% 만니톨	-	0.02% 폴리소르베이트 20	0.1 mg/mL 메티오닌
# 1 7	10mM 히스티딘	5.5	5% 만니톨	-	0.02% 폴리소르베이트 20	0.1 mg/mL 메티오닌
# 1 8	10mM 히스티딘	6.0	5% 만니톨	-	0.02% 폴리소르베이트 20	0.1 mg/mL 메티오닌

[786] [표4]

	IE-HPLC (%)			RP-HPLC (%)		
	초기	4주	7주	초기	4주	7주
#1	100	94.2	87.4	100	97.7	96.3
#2	100	94.8	N/D*	100	98.0	N/D
#3	100	95.0	88.1	100	98.2	97.4
#4	100	93.9	85.9	100	98.2	97.8
#5	100	95.7	88.0	100	98.2	97.8
#6	100	95.3	89.0	100	98.3	94.0
#7	100	94.2	87.3	100	97.6	94.9
#8	100	94.7	N/D	100	97.7	N/D
#9	100	95.4	89.1	100	97.8	98.1
#10	100	94.0	86.3	100	98.3	97.7
#11	100	95.5	89.1	100	97.5	97.4
#12	100	94.8	88.4	100	97.3	97.3
#13	100	94.2	87.3	100	97.7	97.7
#14	100	94.8	N/D	100	97.6	N/D
#15	100	94.4	87.9	100	97.9	98.0
#16	100	93.7	85.6	100	97.3	97.5
#17	100	94.9	87.7	100	97.4	97.2
#18	100	94.6	88.2	100	97.9	97.4

[787] ※ N/D : 단백질 침전으로 분석 불가

[788]

[789] 상기 결과에서 보듯이, 아세트산나트륨, pH 5.0 조성을 가지는 제제(#3, #9, #15)와 히스티딘, pH 5.5 조성을 가지는 제제(#5, #11, #17)일 때, 25°C에서 7주간 높은 안정성을 나타냈다. 그러나, pH 4.5의 조성을 가지는 제제(#2, #8, #14)의 경우에는 7주에서 침전이 일어나는 것을 확인할 수 있었다.

[790] 글루카곤 유도체의 지속형 결합체의 저장 안정성을 증대시키기 위해 포함될 수 있는 당 또는 당알코올인 만니톨, 소르비톨, 그리고 수크로오스를 각각 5%, 5% 및 8%로 포함하는 경우, 유사한 안정성을 나타냈다.

[791]

[792] 실시예 3: 비이온성 계면활성제 종류에 따른 글루카곤 유도체의 지속형

결합체의 안정성 평가

- [793] 상기 실시예 1 또는 실시예 2에서 확인된 액상 제제의 조성(아세트산나트륨, 수크로오스 및 메티오닌)에 기초하여 비이온성 계면활성제 종류에 따른 글루카곤 유도체의 지속형 결합체의 안정성을 비교하였다. 이때 비이온성 계면활성제로서 폴리소르베이트 20, 폴리소르베이트 80 및 폴록사머 188의 농도는 시판 제형을 고려하였다.
- [794] 위 제조예에서 얻은 글루카곤 유도체 펩타이드의 지속형 결합체를 하기 표 5와 같은 조성(지속형 결합체 농도는 187.09 nmol/mL)의 액상 제제로 제조하여 25°C에서 4주간 보관 후, 이온교환 크로마토그래피법과 역상 크로마토그래피법을 이용해 분석하였다.
- [795] 표 6의 IE-HPLC(%), 및 RP-HPLC(%)는 측정 시점에서의 면적 백분율 값을 보존 시험 초기 면적 백분율 값으로 나눈 비(Area% / Start Area%)의 백분율 수치로서 글루카곤 유도체의 지속형 결합체의 초기 농도(187.09 nmol/mL 농도)로부터의 잔존율을 나타낸다.

[796] [표5]

	완충물질	pH	당	등장화 제	계면활성제	그 외
#1	20mM 아세트산나트 륨	5.0	8% 수크로오 스	-	0.02% 폴리소르베이트 20	0.1 mg/mL 메티오닌
#2	20mM 아세트산나트 륨	5.0	8% 수크로오 스	-	0.005% 폴리소르베이트 80	0.1 mg/mL 메티오닌
#3	20mM 아세트산나트 륨	5.0	8% 수크로오 스	-	0.2% 폴록사머 188	0.1 mg/mL 메티오닌

[797] [표6]

	IE-HPLC (%)			RP-HPLC (%)		
	초기	2주	4주	초기	2주	4주
#1	100	92.9	83.8	100	99.5	95.1
#2	100	93.2	85.4	100	98.5	94.6
#3	100	92.6	84.4	100	97.5	94.5

- [798] 상기 결과에서 보듯이, 비이온성 계면활성제로서 폴리소르베이트 20, 폴리소르베이트 80 및 폴록사머 188을 각각 포함하는 제제의 경우에 안정성을

나타냄을 확인하였다.

[799] 실시예 4: 비이온성 계면활성제 및 아미노산 포함유무에 따른 글루카곤 유도체의 지속형 결합체의 안정성 평가

[800] 액상 제제가 비이온성 계면활성제 또는 아미노산 안정화제를 포함하거나 포함하지 않을 때 글루카곤 유도체의 지속형 결합체의 안정성을 비교하였다.

[801] 위 제조예에서 얻은 글루카곤 유도체 펩타이드의 지속형 결합체를 하기 표 7과 같은 조성(지속형 결합체의 농도는 187.09 nmol/mL)의 액상 제제로 제조하여 25°C에서 4주간 보관 후, 이온교환 크로마토그래피법과 역상 크로마토그래피법을 이용해 분석하였다.

[802] 표 8의 IE-HPLC(%), 및 RP-HPLC(%)는 측정 시점에서의 면적 백분율 값을 보존 시험 초기 면적 백분율 값으로 나눈 비(Area% / Start Area%)의 백분율 수치로서 글루카곤 유도체의 지속형 결합체의 초기 농도(187.09 nmol/mL 농도)로부터의 잔존율을 나타낸다.

[803] [표7]

	완충물질	pH	당	등장화제	계면활성제	그 외
#1	20mM	5.0	8% 수크로오스	-	0.02% 폴리소르베이트 20	0.1 mg/mL 메티오닌
#2	20mM 아세트산나트륨	5.0	8% 수크로오스	-	-	0.1 mg/mL 메티오닌
#3	20mM 아세트산나트륨	5.0	8% 수크로오스	-	0.02% 폴리소르베이트 20	-
#4	20mM 아세트산나트륨	5.0	8% 수크로오스	-	-	-

[804] [표8]

	IE-HPLC (%)			RP-HPLC (%)		
	초기	2주	4주	초기	2주	4주
#1	100	92.9	83.8	100	99.5	95.1
#2	100	93.0	83.7	100	92.1	93.8
#3	100	88.4	74.9	100	94.6	84.2
#4	100	87.8	74.9	100	92.9	82.8

- [805] 상기 결과에서 보듯이, 아미노산을 포함하는 제제(#1, #2)가 안정성을 나타냄을 확인하였다. 또한, 비이온성 계면활성제를 포함하는 제제와 이를 포함하지 않는 제제는 서로 유사한 안정성을 나타냄을 확인하였다.
- [806] 실시예 5: pH, 당 농도 및 아미노산 종류에 따른 글루카곤 유도체의 지속형 결합체의 안정성 평가
- [807] 상기 실시예 1 내지 실시예 4에서 확인된 액상 제제의 조성(아세트산나트륨, 수크로오스, 폴리소르베이트 20 및 메티오닌)에 기초하여 단백 이물 또는 침전이 발생하지 않는 pH 범위, 당으로서 수크로오스의 농도 및 메티오닌이 아닌 다른 아미노산 종류에 따른 글루카곤 유도체의 지속형 결합체의 안정성을 평가하였다.
- [808] 위 제조예에서 얻은 글루카곤 유도체 펩타이드의 지속형 결합체를 하기 표 9와 같은 조성(지속형 결합체 농도는 187.09 nmol/mL)의 액상 제제로 제조하여 25°C에서 7주간 보관 후, 이온교환 크로마토그래피법과 역상 크로마토그래피법을 이용해 분석하였다.
- [809] 표 10의 IE-HPLC(%), 및 RP-HPLC(%)는 측정 시점에서의 면적 백분율 값을 보존 시험 초기 면적 백분율 값으로 나눈 비(Area% / Start Area%)의 백분율 수치로서 글루카곤 유도체의 지속형 결합체의 초기 농도(187.09 nmol/mL 농도)로부터의 잔존율을 나타낸다.
- [810]

[811] [표9]

	완충용액	pH	당	등장화 제	계면활성제	그 외
# 1	20mM 아세트산트륨	4.6	8% 수크로오스	-	0.02% 폴리소르베이트 20	0.1 mg/mL 메티오닌
# 2	20mM 아세트산트륨	4.8	8% 수크로오스	-	0.02% 폴리소르베이트 20	0.1 mg/mL 메티오닌
# 3	20mM 아세트산트륨	5.0	8% 수크로오스	-	0.02% 폴리소르베이트 20	0.1 mg/mL 메티오닌
# 4	20mM 아세트산트륨	5.0	-	-	0.02% 폴리소르베이트 20	0.1 mg/mL 메티오닌
# 5	20mM 아세트산트륨	5.0	3% 수크로오스	-	0.02% 폴리소르베이트 20	0.1 mg/mL 메티오닌
# 6	20mM 아세트산트륨	5.0	5% 수크로오스	-	0.02% 폴리소르베이트 20	0.1 mg/mL 메티오닌
# 7	20mM 아세트산트륨	5.0	12% 수크로오스	-	0.02% 폴리소르베이트 20	0.1 mg/mL 메티오닌
# 8	20mM 아세트산트륨	5.0	15% 수크로오스	-	0.02% 폴리소르베이트 20	0.1 mg/mL 메티오닌
# 9	20mM 아세트산트륨	5.0	8% 수크로오스	-	0.02% 폴리소르베이트 20	0.1 mg/mL 아르기닌
# 10	20mM 아세트산트륨	5.0	8% 수크로오스	-	0.02% 폴리소르베이트 20	0.1 mg/mL 히스티딘
# 11	20mM 아세트산트륨	5.0	8% 수크로오스	-	0.02% 폴리소르베이트 20	0.1 mg/mL 라이신

[812] [표10]

	IE-HPLC (%)				RP-HPLC (%)			
	초기	2주	4주	6주	초기	2주	4주	6주
#1	100	91.8	76.9	59.7	100	90.3	84.5	74.0
#2	100	94.4	82.1	67.6	100	96.0	92.5	84.9
#3	100	95.0	83.9	70.6	100	96.8	93.2	86.2
#4	100	93.4	81.4	66.3	100	94.1	91.0	83.9
#5	100	93.8	82.0	67.4	100	94.4	91.2	83.7
#6	100	94.7	83.1	69.3	100	96.5	93.0	85.2
#7	100	95.1	84.0	70.2	100	96.4	93.0	86.0
#8	100	95.1	85.2	71.6	100	97.1	94.4	87.2
#9	100	93.4	82.4	69.4	100	94.6	90.7	79.0
#10	100	93.8	82.7	69.5	100	95.2	91.4	80.1
#11	100	93.9	83.1	69.5	100	94.7	91.0	80.6

[813] 상기 결과에서 보듯이, 완충용액으로서 아세트산나트륨 조성을 가지는 제제의 pH 범위가 pH 4.6 내지 pH 5.0일 때, pH 5.0 조성을 가지는 제제 (#3)가 다른 pH 조성보다 더 좋은 안정성을 나타냈다. 또한 pH 4.6 조성을 가지는 제제 (#1)일 때, 25°C에서 2주간 보관 시 작은 입자가 생성되고 5주간 보관 시 작은 입자의 수가 증가하였다. 수크로오스의 농도에 따른 글루카곤 유도체의 지속형 결합체의 안정성을 확인한 결과, 수크로오스를 0% (#4) 내지 15% (#8)로 포함하는 경우, 수크로오스의 농도가 높을수록 안정성이 높아지는 경향을 보였다.

[814] 또한, 아미노산 종류에 따른 글루카곤 유도체의 지속형 결합체의 안정성을 확인한 결과, 아르기닌 (#9), 히스티딘 (#10), 및 라이신 (#11)을 포함하는 제제에서 안정성을 확인하였다.

[815] 즉, 이와 같은 결과는 다양한 pH 범위, 당 농도 및 아미노산 종류에 따라 글루카곤 유도체의 지속형 결합체가 본 발명의 액상 제제 조성에서 안정성을 갖고 있음을 시사하는 것이다.

[816]

[817] 이상의 설명으로부터, 본 발명이 속하는 기술분야의 당업자는 본 발명이 그 기술적 사상이나 필수적 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 실시될 수 있음을 이해할 수 있다. 이와 관련하여, 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 제한적인 것이 아닌 것으로 이해하여야 한다. 본 발명의 범위는 전술한 상세한 설명보다는 후술되는 특허 청구범위의 의미 및 범위,

그리고 그 등가 개념으로부터 도출되는 모든 변경 또는 변형된 형태가 본 발명의 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.