명세서

발명의 명칭: 액상 제제

기술분야

[1] 본 발명은 글루카곤 수용체 및 GLP-1 수용체에 대해 활성을 갖는 펩타이드의 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 발생되는 경우가 대부분이다. 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. 비만은 전세계적인 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.

[4]

[5] 상술한 노력의 결과로서, 리모나반트(Rimonabant, Sanofi-Aventis), 시부트라민(Sibutramin, Abbott), 콘트라베(Contrave, Takeda), 오르리스타트(Orlistat, Roche) 등의 비만 치료제가 개발되었으나, 이들은 치명적인 부작용을 나타내거나 비만 치료효과가 미비하다는 단점이 있었다. 이처럼 종래 비만 치료제의 문제점을 해소할 수 있는 새로운 의약품을 개발하려는 연구가 활발히 진행되고 있으며, 최근에는 GLP-1과 글루카곤의 두 가지 펩타이드 수용체에 모두 활성을 가지는 옥신토모듈린(oxyntomodulin)이 각광받고 있다. 상기 옥신토모듈린은 글루카곤의 전구체인 프리-글루카곤(pre-glucagon)으로부터 만들어지는 펩타이드로서, GLP-1의 음식물 섭취 저해, 포만감 증진 효력과 글루카곤의 지방분해 기능을 보여 항-비만 치료제로서의 가능성을 높이고 있다. 이러한 옥신토모듈린 펩타이드의 이중 기능성(dual function)에 기반하여 비만 치료 목적의 의약을 개발하기 위한

연구가 활발하게 진행 중에 있다. 예를 들어, 한국특허등록 제925017호에는 인간의 과체중을 치료하기 위한, 경구, 비경구, 점막(mucosal), 직장, 피하 또는 경피성 투여용 약학적 조성물이 개시되어 있는데, 유효성분으로써 옥신토모듈린을 포함한다. 그러나 옥신토모듈린을 포함하는 비만치료제는 생체 내 반감기가 짧고, 하루에 세 번씩 고용량을 투여하여도 비만 치료 효과 또한 낮은 수준을 나타내는 것으로 보고되고 있다. 따라서, 옥신토모듈린을 변형시켜서 생체 내 반감기를 증대시키거나 비만 치료 효과를 증대시키려는 노력이 계속되고 있다. 한편, 기존에 개발된 옥신토모듈린 또는 그의 유도체는 여전히 짧은 반감기와 낮은 약효로 인해 매일 투여해야 되고 과량의 약물을 투여해야 되는 두 가지 커다란 단점을 가지고 있다.

[6]

발명의 상세한 설명

기술적 과제

[7] 용액 상태인 단백질 및 펩타이드에 안정화제를 첨가하여 약물의 물리화학적 변화를 억제하면서 장기간 저장을 하는 경우에도 약물의 생체 내 효력을 유지시키는 개발의 필요성이 대두되고 있다.

[8]

기술적 해결방법

[9] 본 발명의 하나의 목적은 글루카곤 수용체 및 GLP-1 (Glucagon-like peptide-1) 수용체에 대해 활성을 갖는 펩타이드 및 면역글로불린 Fc 절편이 서로 연결된, 글루카곤 수용체 및 GLP-1 수용체에 대해 활성을 갖는 펩타이드의 지속형 결합체의 액상 제제를 제공하는 것이다.

[10] 본 발명의 다른 목적은 글루카곤 수용체 및 GLP-1 수용체에 대해 활성을 갖는 펩타이드의 지속형 결합체의 액상 제제의 제조 방법을 제공하는 것이다.

[11]

발명의 효과

[12] 본 발명의 글루카곤 수용체 및 GLP-1 수용체에 대해 활성을 갖는 펩타이드의 지속형 결합체의 액상 제제는 당알코올이 존재하지 않고 당이 존재하는 것을 특징으로 하는 새로운 조성으로 장기 보관 안정성은 물론 의약품의 안정성을 판단하는 가혹 시험 및/또는 가속 시험에서 우수한 효과를 제공하여 의약품의 분해 없이 안정하게 보관할 수 있는 새로운 액상 제제로 이용될 수 있다. 또한, 본 발명의 액상 제제는 혈액의 삼투압과 유사한 수준의 삼투압 범위를 갖고 있는 바, 환자에게 투여 시에 통증을 유발하지 않아 환자 투여 편의성을 증진시킬 수 있다.

[13]

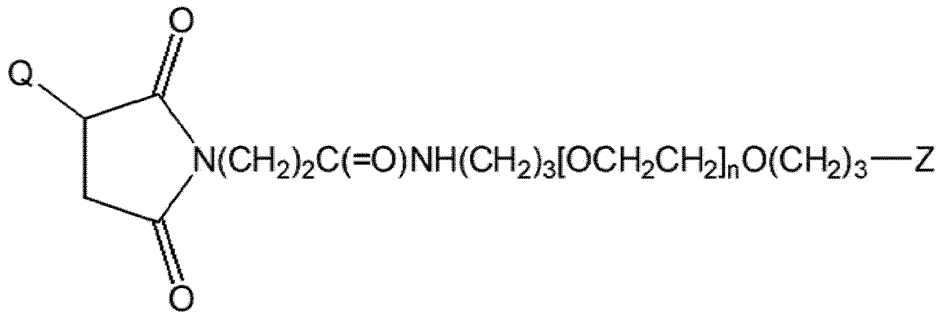
발명의 실시를 위한 최선의 형태

[14] 본 발명을 구현하는 하나의 양태는 글루카곤 수용체 및 GLP-1 (Glucagon-like

peptide-1) 수용체에 대해 활성을 갖는 펩타이드 및 면역글로불린 Fc 절편이 서로 연결된, 글루카곤 수용체 및 GLP-1 수용체에 대해 활성을 갖는 펩타이드의 지속형 결합체의 액상 제제이다. 상기 지속형 결합체는 글루카곤 수용체 및 GLP-1 수용체에 대해 활성을 갖는 펩타이드가 면역글로불린 Fc 절편에 링커에 의해 공유결합되어 있는 물질을 의미할 수 있다.

[15] 하나의 구체예로서, 상기 액상 제제는 하기 화학식 1의 펩타이드 결합체; 완충 물질; 당; 및 비이온성 계면활성제;를 포함하는 펩타이드 결합체의 액상 제제인 것을 특징으로 한다:

[16] [화학식 1]

[17] 

[18] 상기 화학식 1에서 Q는 하기 일반식 1의 펩타이드이고;

[19] Z는 사람 면역글로불린 Fc 절편이며;

[20] n은 자연수로서, n의 값은 상기 펩타이드 결합체 내 $[OCH_2CH_2]n$ 부위의 평균 분자량, 예컨대 수평균 분자량이 10 kDa이 되도록 정해지고,

[21] [일반식 1]

[22] His-Xaa2-Gln-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Xaa12-Tyr-Leu-Asp-Xaa16-Lys-Arg-Ala-Xaa20-Glu-Phe-Val-Gln-Trp-Leu-Met-Asn-Thr-Cys (서열번호 1),

[23] 이 때 일반식 1에서,

[24] Xaa2는 2-아미노이소부티르산, Xaa12는 리신, Xaa16은 글루탐산, Xaa20은 리신이며;

[25] Xaa12와 Xaa16 또는 Xaa16과 Xaa20의 잔기 사이에서 락탐 고리가 형성되어 있거나 되어 있지 않을 수 있다.

[26] 앞선 구체예 중 어느 하나에 따른 액상제제로서, 상기 액상 제제는 18 ~ 940 nmol/mL의 화학식 1의 펩타이드 결합체; 상기 액상 제제의 pH를 4.5 ~ 7.5의 범위에서 유지하기 위한 분량의 완충 물질; 1 ~ 20%(w/v)의 당; 및 0.001 ~ 0.2%(w/v)의 비이온성 계면활성제;를 포함하는 펩타이드 결합체의 액상 제제인 것을 특징으로 한다.

[27]

[28] 앞선 구체예 중 어느 하나에 따른 액상 제제로서, 상기 펩타이드는 서열번호 2, 3, 또는 4의 아미노산 서열을 포함하는 것을 특징으로 한다.

[29] 앞선 구체예 중 어느 하나에 따른 액상 제제로서, 상기 펩타이드, Q는 서열번호 3의 아미노산 서열을 포함하는 것을 특징으로 한다.

[30]

[31] 앞선 구체예 중 어느 하나에 따른 액상 제제로서, 상기 Q는 그 C-말단이 아미드화된 것을 특징으로 한다.

[32] 앞선 구체예 중 어느 하나에 따른 액상 제제로서, 상기 Q는 펩타이드 내의 시스테인의 황 원자를 통하여 연결된 것을 특징으로 한다.

[33] 앞선 구체예 중 어느 하나에 따른 액상 제제로서, 상기 면역글로불린 Fc 절편은 IgG4 유래인 것을 특징으로 한다.

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

[35] 앞선 구체예 중 어느 하나에 따른 액상 제제로서, 상기 Z는 서열번호 5의 아미노산 서열인 단량체를 포함하는 것을 특징으로 한다.

[36] 앞선 구체예 중 어느 하나에 따른 액상 제제로서, 상기 Z는 그 N-말단 프롤린의 질소 원자를 통하여 연결된 것을 특징으로 한다.

[37] 앞선 구체예 중 어느 하나에 따른 액상 제제로서, 상기 면역글로불린 Fc 절편과 Q가 당쇄화되어 있지 않은 것을 특징으로 한다.

[38] 앞선 구체예 중 어느 하나에 따른 액상 제제로서, 상기 액상 제제는 당알코올을 포함하지 않는 것을 특징으로 한다.

[39] 앞선 구체예 중 어느 하나에 따른 액상 제제로서, 상기 액상 제제는 등장화제를 포함하지 않거나 또는 포함하는 것일 수 있다.

[40] 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 군에서 선택되는 것을 특징으로 한다.

[41] 앞선 구체예 중 어느 하나에 따른 액상 제제로서, 상기 완충물질은 아세트산과 그 염인 것을 특징으로 한다.

[42] 앞선 구체예 중 어느 하나에 따른 액상 제제로서, 상기 액상 제제의 pH는 4.8 내지 6.0인 것을 특징으로 한다.

[43] 앞선 구체예 중 어느 하나에 따른 액상 제제로서, 상기 액상 제제의 pH는 4.9 내지 5.3인 것을 특징으로 한다.

[44] 앞선 구체예 중 어느 하나에 따른 액상 제제로서, 상기 완충물질의 농도는 액상 제제의 pH를 4.5 내지 7.5의 범위에서 유지하기 위한 5 내지 100 mM인 것을 특징으로 한다.

[45] 앞선 구체예 중 어느 하나에 따른 액상 제제로서, 상기 당은 글루코스, 프럭토스, 갈락토스, 락토스, 말토스, 수크로스, 또는 이들의 조합인 것을 특징으로 한다.

[46] 앞선 구체예 중 어느 하나에 따른 액상 제제로서, 상기 당은 수크로스인 것을

특징으로 한다.

[47] 앞선 구체예 중 어느 하나에 따른 액상 제제로서, 상기 당은 액상 제제 내에 1 내지 20% (w/v)의 농도로 존재하는 것을 특징으로 한다.

[48] 앞선 구체예 중 어느 하나에 따른 액상 제제로서, 상기 비이온성 계면활성제는 폴록사머, 폴리소르베이트, 또는 이들의 조합인 것을 특징으로 한다.

[49] 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.

[50] 앞선 구체예 중 어느 하나에 따른 액상 제제로서, 상기 비이온성 계면활성제는 액상 제제 내에 0.001% 내지 0.2% (w/v)의 농도로 존재하는 것을 특징으로 한다.

[51] 앞선 구체예 중 어느 하나에 따른 액상 제제로서, 상기 화학식 1의 펩타이드 결합체는 액상 제제 내에 18 내지 940 nmol/ml의 농도로 존재하는 것을 특징으로 한다.

[52] 앞선 구체예 중 어느 하나에 따른 액상 제제로서, 상기 액상 제제는 아르기닌, 글리신, 메티오닌, 및 이들의 조합으로 이루어진 군에서 선택되는 아미노산을 안정화제로 추가로 포함하는 것을 특징으로 한다.

[53] 앞선 구체예 중 어느 하나에 따른 액상 제제로서, 상기 액상 제제는 화학식 1의 펩타이드 결합체; 구연산과 그 염, 아세트산과 그 염, 히스티딘과 그 염, 인산과 그 염, 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 완충물질; 글루코스, 프럭토스, 갈락토스, 락토스, 말토스, 수크로스, 또는 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 당; 및 폴록사머, 폴리소르베이트 및 이들의 조합으로 이루어진 군에서 선택되는 비이온성 계면활성제를 포함하고, pH는 4.8 내지 6.0인 것을 특징으로 한다.

[54] 앞선 구체예 중 어느 하나에 따른 액상 제제로서, 상기 액상 제제는 화학식 1의 펩타이드 결합체; 액상 제제의 pH를 4.8 내지 6.0의 범위에서 유지하기 위한 5 내지 100 mM의 구연산과 그 염, 아세트산과 그 염, 히스티딘과 그 염, 인산과 그 염, 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 완충물질; 1% 내지 20% (w/v)의 글루코스, 프럭토스, 갈락토스, 락토스, 말토스, 수크로스, 또는 이들의 조합으로 이루어진 군에서 선택되는 당; 및 0.001% 내지 0.2% (w/v)의 폴록사머, 폴리소르베이트 및 이들의 조합으로 이루어진 군에서 선택되는 비이온성 계면활성제를 포함하는 것을 특징으로 한다,

[55] 앞선 구체예 중 어느 하나에 따른 액상 제제로서, 상기 액상 제제는 화학식 1의 펩타이드 결합체; 액상 제제의 pH를 4.8 내지 6.0의 범위에서 유지하기 위한 5 내지 100 mM의 아세트산과 그 염; 1% 내지 20% (w/v)의 수크로스; 및 0.001% 내지 0.2% (w/v)의 폴리소르베이트를 포함하는 것을 특징으로 한다.

[56] 앞선 구체예 중 어느 하나에 따른 액상 제제로서, 상기 면역글로불린 Fc 절편은 IgG, IgA, IgD, IgE 또는 IgM에서 유래된 Fc 절편인 것을 특징으로 한다.

[57] 앞선 구체예 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.

[58] 앞선 구체예 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.

[59] 앞선 구체예 중 어느 하나에 따른 액상 제제로서, 상기 면역글로불린 Fc 절편은 동일한 기원의 도메인으로 이루어진 단쇄 면역글로불린으로 구성된, 이량체 또는 다량체 형태인 것을 특징으로 한다.

[60] 앞선 구체예 중 어느 하나에 따른 액상 제제로서, 상기 면역글로불린 Fc 절편이 IgG4 Fc 절편인 것을 특징으로 한다.

[61] 앞선 구체예 중 어느 하나에 따른 액상 제제로서, 상기 면역글로불린 Fc 절편이 인간 비당쇄화 IgG4 Fc 절편인 것을 특징으로 한다.

[62] 앞선 구체예 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.

[63] 앞선 구체예 중 어느 하나에 따른 액상 제제로서, 상기 액상 제제는, 서열번호 2, 3 또는 4를 함유하는 Q를 포함하는 화학식 1의 펩타이드 결합체; 액상 제제의 pH를 4.8 내지 6.0의 범위에서 유지하기 위한 5 내지 100 mM의 구연산과 그 염, 아세트산과 그 염, 히스티딘과 그 염, 인산염, 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 완충물질; 1% 내지 20% (w/v)의 글루코스, 프럭토스, 갈락토스, 락토스, 말토스, 수크로스, 또는 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 당; 및 0.001% 내지 0.2% (w/v)의 폴록사머, 폴리소르베이트 및 이들의 조합으로 이루어진 군에서 선택되는 비이온성 계면활성제를 포함하는 것을 특징으로 한다.

[64] 앞선 구체예 중 어느 하나에 따른 액상 제제로서, 상기 액상 제제는, 서열번호 2, 3 또는 4를 함유하는 Q를 포함하는 화학식 1의 펩타이드 결합체; 액상 제제의 pH를 4.8 내지 6.0의 범위에서 유지하기 위한 5 내지 100 mM의 구연산염, 아세트산과 그 염, 히스티딘과 그 염, 인산과 그 염, 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 완충물질; 1% 내지 20% (w/v)의 수크로스; 및 0.001% 내지

0.2% (w/v)의 폴록사머, 폴리소르베이트 및 이들의 조합으로 이루어진 군에서 선택되는 비이온성 계면활성제를 포함하는 것을 특징으로 한다.

[65] 앞선 구체예 중 어느 하나에 따른 액상 제제로서, 상기 액상 제제는 C-말단이 아미드화되어 있는 Q가 시스테인 황 원자를 통하여 연결된 93 ~ 565 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 0.01 ~ 0.1%(w/v)의 폴록사머, 폴리소르베이트 또는 이들의 조합 중에서 선택하는 비이온성 계면활성제;를 포함하는 것을 특징으로 한다.

[66] 앞선 구체예 중 어느 하나에 따른 액상 제제로서, 상기 액상 제제는 C-말단이 아미드화되어 있는 Q가 시스테인 황 원자를 통하여 연결되고, Z는 그 N-말단 프롤린의 질소 원자를 통하여 연결된, 93 ~ 565 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 0.01 ~ 0.1%(w/v)의 폴록사머, 폴리소르베이트 또는 이들의 조합 중에서 선택하는 비이온성 계면활성제;를 포함하는 것을 특징으로 한다.

[67] 앞선 구체예 중 어느 하나에 따른 액상 제제로서, 액상 제제 내의 상기 화학식 1의 펩타이드 결합체의 농도는 274 ~ 474 nmol/mL인 것을 특징으로 한다.

[68] 앞선 구체예 중 어느 하나에 따른 액상 제제로서, 액상 제제 내의 상기 화학식 1의 펩타이드 결합체의 농도는 320 ~ 430 nmol/mL인 것을 특징으로 한다.

[69]

[70] 앞선 구체예 중 어느 하나에 따른 액상 제제로서, 상기 액상 제제는 가혹 시험 조건인 40 ± 2℃ 및 상대습도 75 ± 5%인 조건에서 1주일간 보관 시에 성상이 투명한 것을 특징으로 한다.

[71]

[72] 본 발명을 구현하는 다른 하나의 양태는, 상기 (a) 화학식 1의 펩타이드 결합체와 (b) i)완충물질, ii) 당, 및 iii) 계면활성제를 혼합하는 단계를 포함하는, 앞선 구체예 중 어느 하나에 따른 액상 제제인, 펩타이드 결합체의 액상 제제의 제조 방법이다.

[73]

발명의 실시를 위한 형태

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

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

[76] 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.

[77] 본 명세서 전반을 통하여, 천연적으로 존재하는 아미노산에 대한 통상의 1문자 및 3문자 코드가 사용될 뿐만 아니라 Aib(2-아미노이소부티르산)와 같은 다른 아미노산에 대해 일반적으로 허용되는 3문자 코드가 사용된다. 또한 본 명세서에서 약어로 언급된 아미노산은 IUPAC-IUB 명명법에 따라 기재되었다.

[78]

[79] 알라닌 Ala, A 아르기닌 Arg, R

[80] 아스파라긴 Asn, N 아스파르트산 Asp, D

[81] 시스테인 Cys, C 글루탐산 Glu, E

[82] 글루타민 Gln, Q 글리신 Gly, G

[83] 히스티딘 His, H 이소류신 Ile, I

[84] 류신 Leu, L 리신 Lys, K

[85] 메티오닌 Met, M 페닐알라닌 Phe, F

[86] 프롤린 Pro, P 세린 Ser, S

[87] 트레오닌 Thr, T 트립토판 Trp, W

[88] 티로신 Tyr, Y 발린 Val, V

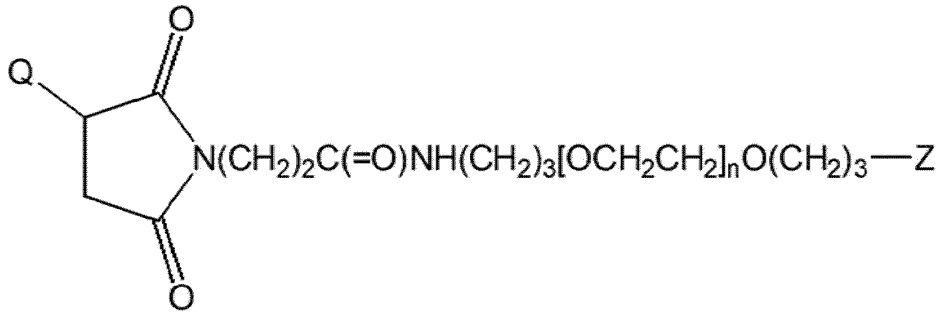
[89]

[90] 본 발명을 구현하기 위한 하나의 양태는 글루카곤 수용체 및 GLP-1 (Glucagon-like peptide-1) 수용체에 대해 활성을 갖는 펩타이드 및 면역글로불린 Fc 절편이 서로 연결된, 글루카곤 수용체 및 GLP-1 수용체에 대해 활성을 갖는 펩타이드의 지속형 결합체의 액상 제제를 제공한다.

[91] 구체적으로, 본 발명은 하기 화학식 1의 펩타이드 결합체; 완충 물질; 당; 및 비이온성 계면활성제;를 포함하는 액상 제제를 제공한다:

[92] [화학식 1]

[93]



[94] 상기 화학식 1에서 Q는 하기 일반식 1의 펩타이드이고;

[95] Z는 사람 면역글로불린 Fc 절편이며;

[96] n은 자연수로서, n의 값은 상기 펩타이드 결합체 내 $[OCH_2CH_2]n$ 부위의 평균

분자량, 예컨대 수평균 분자량이 10 kDa이 되도록 정해지고,

[97] [일반식 1]

[98] His-Xaa2-Gln-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Xaa12-Tyr-Leu-Asp-Xaa16-Lys-Arg-Ala-Xaa20-Glu-Phe-Val-Gln-Trp-Leu-Met-Asn-Thr-Cys (서열번호 1),

[99] 이 때 일반식 1에서,

[100] Xaa2는 2-아미노이소부티르산(Aib), Xaa12는 리신(K), Xaa16은 글루탐산(E), Xaa20은 리신(K)이며;

[101] Xaa12와 Xaa16 또는 Xaa16과 Xaa20의 잔기 사이에서 락탐 고리가 형성되어 있거나 되어 있지 않을 수 있다.

[102] 상기 화학식 1의 펩타이드 결합체는 서열번호 1의 펩타이드 Q와 사람 면역글로불린 Fc 절편 Z가 에틸렌글리콜 반복부를 개재하여 공유결합으로 연결된 구조로서, 각각 Q는 화학식 1의 숙신이미드 고리에, Z는 화학식 1의 옥시프로필렌기에 연결된다.

[103] 상기 펩타이드 결합체의 Q는 글루카곤 수용체 및 GLP-1 (Glucagon-like peptide-1) 수용체에 대해 활성을 갖는 펩타이드일 수 있다.

[104] 한 실시 형태에서 화학식 1의 숙신이미드 고리에 Q가 연결되는 부위는 Q의 C-말단 시스테인의 황 원자이다.

[105]

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

[107]

[108] Z 내에서 상기 옥시프로필렌기에 연결되는 부위는 특별히 한정되지 않는다. 본 발명의 한 실시 형태에서 상기 옥시프로필렌기에 연결되는 Z의 부위는 N-말단 질소 또는 Z 내부 잔기의 질소 원자(예컨대 리신의 입실론 질소)일 수 있다. 본 발명의 한 구체적인 실시 형태에서, Z가 화학식 1의 옥시프로필렌기에 연결되는 부위는 Z의 N-말단 프롤린일 수 있다.

[109]

[110] 상기 Z는 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.

[111] 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.

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

[113] 하나의 구체예로, 상기 면역글로불린 Fc 절편과 Q는 당쇄화되어 있지 않을 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 본 발명에서 상기 화학식 1의 펩타이드 결합체는 "지속형 결합체"로 지칭한다. 본 발명에서 지속형 결합체는 "지속형 옥신토모듈린 유도체 결합체" 또는 “펩타이드 결합체”와 혼용될 수 있다.

[114]

[115] 본 발명에서 용어 "액상 제제"는 의약품의 형태를 액상으로 제제화한 약물을 의미하며, 이는 액상의 내용 제제 및 외용 제제를 모두 포함한다.

[116]

[117] 본 발명의 액상 제제는 약리 효과를 나타내는 화학식 1의 펩타이드 결합체 및 상기 약리 효과를 나타내는 물질이 액상으로 제제화될 때 이를 일정 기간 동안 안정하게 유지 및/또는 저장시킬 수 있는 물질을 포함한다.

[118]

[119] 본 발명의 화학식 1 의 펩타이드 결합체의 액상 제제에 있어서, 저장 안정성은 정확한 투여량을 보장하기 위해서 중요하다.

[120] 상기 액상 제제는 완충물질, 당, 및 비이온성 계면 활성제를 포함할 수 있다. 이러한 액상 제제는 글루카곤 수용체 및 GLP-1 수용체에 대해 활성을 갖는 펩타이드의 지속형 결합체를 안정적으로 저장할 수 있는 용액 제형일 수 있다.

[121] 또한, 상기 액상 제제는 아르기닌, 글리신, 메티오닌, 및 이들의 조합으로 이루어진 군에서 선택되는 아미노산인 안정화제를 추가로 포함하는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[122] 예컨대, 상기 액상 제제는 약리 효과를 나타내는 화학식 1의 펩타이드 결합체 외에 액상 제제의 조성으로 완충물질, 당 및 비이온성 계면활성제를 필수적으로 포함하는 것일 수 있으며, 또는 완충물질, 당, 비이온성 계면활성제를 필수적으로 포함하고, 추가 구성요소로 아미노산인 안정화제를 포함하는 것일 수 있으나, 특별히 이에 제한되지 않는다. 본 발명자들은 놀랍게도 펩타이드 액상 제제의 조성으로서 완충물질, 당알코올 및 비이온성 계면활성제와 아미노산을 함유하는 기존 제제와 비교하여 당알코올 대신에 당으로 교체할 경우 아미노산 안정화제를 함유하지 않더라도 우수한 안정성을 나타내는 것을 발견하였다. 더욱이, 완충물질, 당알코올 및 비이온성 계면활성제와 아미노산을 함유하는 종래 기술의 제제의 경우 제제의 안정성을 확보할 수 있는 성분 농도에서는 혈액에 비해 삼투압이 높다는 문제점이 있었는데, 본 발명의 제제에서는 삼투압을 혈액과 유사한 수준으로 낮출 수 있을 뿐 아니라 안정성도 종래 기술의 제제와 적어도 대등하거나 향상시킬 수 있다는 장점이 있다. 구체적으로, 종래 기술의 제제에서 당알코올을 당으로 바꾸고 pH를 일부 조정함으로써 전술한 안정성과 혈액에 유사한 삼투압을 실현할 수 있다.

[123] 일반적으로 혈액의 경우 삼투압이 약 300 mOsm/kg이다. 본 발명의 제제는 상기 혈액의 삼투압과 유사한 범위일 수 있으며, 그 예로 300 ± 50 mOsm/kg일 수 있다. 이와 같이 혈액의 삼투압과 유사한 삼투압을 갖는 본 발명의 제제는 환자에게 투여 시에 통증을 유발하지 않아 투여 편의성을 증진시킬 수 있다.

[124] 한편, 본 발명의 제제에 추가로 포함될 수 있는 아미노산인 메티오닌의 경우 그 존재 유무에 따른 안정성에 영향은 없으므로 제외될 수 있다.

[125]

[126] 이러한 본 발명의 한 구체적인 실시 형태에 따르면 액상 제제가 12개월까지도 안정적으로 전술한 지속형 결합체를 유지할 수 있어 장기 안정성이 우수하고, 가속 조건에서도 6개월까지 잔존율이 좋을 뿐 아니라, 가혹 조건에서도 4주까지 투명한 성상을 유지한다.

[127]

[128] 본 발명의 액상 제제의 하나의 구체예는 당알코올을 포함하지 않는 것일 수 있다.

[129] 본 발명의 액상 제제의 하나의 구체예는 등장화제를 포함하거나 포함하지 않는 것일 수 있다. 그 예를 들어 본 발명의 액상 제제는 염화나트륨, 황산나트륨, 또는 구연산나트륨 등을 포함하지 않는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[130] 상기 등장화제는 삼투압 조절을 나타낼 수 있는 물질을 말한다. 상기 등장화제는 본 발명에 따른 액상 제제를 체내에 투여하는 경우 삼투압을 적절하게 유지하는 역할을 할 수 있다.

[131] 이러한 등장화제의 대표적인 예로는 수용성 무기염으로서 염화나트륨, 황산나트륨, 또는 구연산나트륨을 들 수 있으며, 구체적으로는 염화나트륨을 들 수 있으나, 특별히 이에 제한되는 것은 아니다.

[132] 본 발명에 따른 제제에서 상기 등장화제의 농도는 0 내지 200mM, 0 내지 150mM, 0 내지 100mM, 10 내지 200mM, 10 내지 150mM, 10 내지 100mM, 10 내지 50mM, 20 내지 100mM, 20 내지 80mM, 20 내지 50mM, 20 내지 30mM, 또는 40 내지 50mM일 수 있으나, 특별히 이에 제한되는 것은 아니다. 이러한 등장화제는 상술한 액상제제에 추가로 포함되는 선택적인 성분일 수 있으며, 특별히 이에 제한되지 않는다.

[133] 여기서, 액상 제제를 구성하는 각 성분의 종류 및 농도 혹은 pH에 대해서는 하기에 기술된 내용들이 모두 적용됨은 분명하다.

[134]

[135] 본 발명의 액상 제제에 포함되는 일 구성요소인 완충물질은 화학식 1의 펩타이드 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 펩타이드 결합체를 안정화시킬 수 있는 pH를 유지시킬 수 있는 완충물질은 제한 없이 이용될 수

있다.

[136] 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.

[137] 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 그염, 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.

[138] 상기 액상 제제의 pH는 pH 약 4.5 내지 pH 약 7.5, 예컨대 pH 약 4.5 내지 pH 약 7.0, pH 약 4.5 내지 약 6.5, pH 약 4.5 내지 약 6.3, pH 약 4.5 내지 pH 약 6.0, pH 약 4.5 내지 약 5.9, pH 약 4.6 내지 약 5.8, pH 약 4.7 내지 약 5.8, pH 약 4.8 내지 약 6.0, pH 약 4.8 내지 5.8, pH 약 4.8 내지 약 5.7, pH 약 4.8 내지 5.6, pH 약 4.8 내지 약 5.5, pH 약 4.8 내지 약 5.4, pH 약 4.8 내지 약 5.3, pH 약 4.9 내지 약 5.3, pH 약 4.9 내지 약 5.2, pH 약 5.0 내지 약 5.2, 또는 pH 약 5.1일 수 있으나, 특별히 이에 제한되지 않는다.

[139] 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 mM일 수 있으나, 특별히 이에 제한되는 것은 아니다.

[140]

[141] 본 발명의 액상 제제에 포함되는 일 구성 요소인 당(saccharide)은 단당류, 이당류, 다당류, 올리고당류 등을 말하며, 글루카곤 수용체 및 GLP-1 (Glucagon-like peptide-1) 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 덱스트란 등의 다당류 등을 들 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[142] 상기 당은 액상 제제의 전체 용액 대비 약 1 내지 약 20%(w/v), 약 1 내지 15%(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 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 8.5 %(w/v)의 농도로 존재할 수 있으나, 특별히 이에 제한되지 않는다.

[143]

[144] 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.

[145] 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.

[146] 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.

[147] 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), 또는 약 0.02%(w/v)로 포함될 수 있으나, 특별히 이에 제한되지 않는다.

[148]

[149] 상기 액상 제제에 추가될 수 있는 선택적 구성요소로서의 안정화제인 아미노산은 메티오닌, 아르기닌, 글리신, 또는 이들의 조합일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 또한, 상기 아미노산은 L-형태일 수 있으나, 특별히 이에 제한되지 않는다.

[150] 상기 아미노산은 단백질의 산화 반응 등에 의해 일어날 수 있는 불순물 생성을 억제시킬 수 있으나, 특별히 이에 제한되는 것은 아니다.

[151] 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 로 존재할 수 있으나, 특별히 이에 제한되는 것은 아니다.

[152]

[153] 한편, 본 발명의 액상 제제에는 상기 설명한 액상 제제의 필수적 구성요소인 당; 완충물질; 및 비이온성 계면활성제 이외에, 선택적 구성요소인 안정화제로서의 아미노산 이외에 본 발명의 효과를 손상시키지 않는 범위 내에서 당업계에 공지되어 있는 기타의 성분 내지 물질들이 선택적으로 더 포함될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[154]

[155] 상기 화학식 1의 펩타이드 결합체인 지속형 결합체는 액상 제제 내에 약리학적 유효량으로 존재할 수 있으며, 그 예로 화학식 1의 펩타이드 결합체의 농도가 약 18 내지 약 940 nmol/mL, 약 18.7 내지 약 935 nmol/mL 약 18 내지 약 842 nmol/mL, 약 18 내지 약 748 nmol/mL, 약 18 내지 약 655 nmol/mL, 약 18 내지 약 561 nmol/mL, 약 18 내지 약 468 nmol/mL, 약 18 내지 약 374 nmol/mL, 약 93 내지 약 940 nmol/mL, 약 93.5 내지 약 561 nmol/mL, 약 93 내지 약 842 nmol/mL, 약 93 내지 약 748 nmol/mL, 약 93 내지 약 655 nmol/mL, 약 93 내지 약 565 nmol/mL, 약 93 내지 약 561 nmol/mL, 약 93 내지 약 468 nmol/mL, 약 150 내지 약 468 nmol/mL, 약 200 내지 약 468 nmol/mL, 약 250 내지 약 468 nmol/mL, 약 274 내지 약 474 nmol/mL,약 280 내지 약 468 nmol/mL, 약 300 내지 약 468 nmol/mL, 약 300 내지 약 450 nmol/mL, 약 320 내지 약 430 nmol/mL, 약 320 내지 약 440 nmol/mL, 약 340 내지 약 420 nmol/mL, 약 340 내지 약 400 nmol/mL, 약 350 내지 약 400 nmol/mL, 약 360 내지 약 390 nmol/mL, 약 365 내지 약 385 nmol/mL, 약 370 내지 약 380 nmol/mL 약 93 내지 약 374 nmol/mL, 또는 약 374 nmol/mL 일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[156]

[157] 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.

[158]

[159] 상기 액상 제제는 하나의 구체예로, 화학식 1의 펩타이드 결합체; 구연산과 그 염, 아세트산과 그 염, 히스티딘과 그 염, 인산과 그 염, 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 완충물질; 글루코스, 프럭토스, 갈락토스, 락토스, 말토스, 수크로스, 또는 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 당; 및 폴록사머, 폴리소르베이트 및 이들의 조합으로 이루어진 군에서 선택되는 비이온성 계면활성제를 포함하고, pH는 4.8 내지 6.0일 수 있다.

[160] 상기 액상 제제는 하나의 구체예로, 18 내지 940 nmol/mL의 화학식 1의 펩타이드 결합체; 액상 제제의 pH를 4.8 내지 6.0의 범위에서 유지하기 위한 5 내지 100 mM의 구연산과 그 염, 아세트산과 그 염, 히스티딘과 그 염, 인산과 그 염, 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 완충물질; 1% 내지 20%

(w/v)의 글루코스, 프럭토스, 갈락토스, 락토스, 말토스, 수크로스, 또는 이들의 조합으로 이루어진 군에서 선택되는 당; 및 0.001% 내지 0.2% (w/v)의 폴록사머, 폴리소르베이트 및 이들의 조합으로 이루어진 군에서 선택되는 비이온성 계면활성제를 포함할 수 있다.

[161] 상기 액상 제제는 하나의 구체예로, 18 내지 940 nmol/mL의 화학식 1의펩타이드결합체; 액상 제제의 pH를 4.8 내지 6.0의 범위에서 유지하기 위한 5 내지 100 mM의 아세트산과 그 염; 1% 내지 20% (w/v)의 수크로스; 및 0.001% 내지 0.2% (w/v)의 폴리소르베이트를 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[162] 상기 액상 제제는 하나의 구체예로, C-말단이 아미드화되어 있는 Q의 시스테인 황 원자를 통하여 연결된 93 ~ 565 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 0.01 ~ 0.1%(w/v)의 폴록사머, 폴리소르베이트 또는 이들의 조합 중에서 선택하는 비이온성 계면활성제;를 함유하는 액상 제제일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[163] 상기 액상 제제는 가혹 시험 조건인 40 ± 2℃ 및 상대습도 75 ± 5%인 조건에서 1주일간 보관 시에 성상이 투명한 것일 수 있다.

[164] 하나의 구체예로 상기 액상 제제는 가혹 시험 조건인 40 ± 2℃ 및 상대습도 75 ± 5%인 조건에서 약 1주일 이상, 약 2주일 이상, 약 3주일 이상, 약 4주일 이상 보관 시에 성상이 투명한 것일 수 있다.

[165] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 화학식 1의 펩타이드 결합체 외에 완충물질; 당; 및 비온성 계면활성제로 이루어진 액상 제제의 조성이 완충물질; 당알코올; 아미노산; 및 비이온성 계면활성제로 이루어진 액상 제제의 조성 보다 25 ± 2℃ 및 상대습도 60 ± 5%인 조건인 가속 조건에서 6개월까지 안정성이 높으며, 가혹 시험 조건인 40 ± 2℃ 및 상대습도 75 ± 5%인 조건에서 1주일간 보관 시에 성상이 투명하며, 4주까지도 여전히 성상이 투명한 것을 확인하였다 (표 6 내지 9).

[166] 본 발명에서 용어 "가속 시험 (accelerated testing)"은 의약품의 공식 안정성 시험의 일부 과도한 보관 조건을 채택하여 원료의약품 또는 완제의약품의 화학적 분해 또는 물리적 변화를 증가시키도록 고안된 시험을 의미한다. 장기 안정성 시험 이외에, 가속시험자료를 활용하여 비가속 조건에서 장기간에 걸친 화학적 영향을 평가하고 운송 중에 발생할 수 있는 상황 같이, 단기간 동안 표시 보관 조건을 벗어났을 때의 영향을 평가할 수 있다. 보통의 보관 상태보다 과도한 온도나 습도 조건 하에서 원료나 의약품의 화학적 변성, 물리적 변화의 속도를 증가하도록 고안된 시험이다.

[167] 본 발명에서 용어 "가혹 시험(stress testing)"은 의약품의 안정성에 대한 근본적 특성을 규명하고자 하는 시험을 의미한다. 의약품의 개발 과정에서 수행되고 가속시험보다 더 가혹한 조건에서 수행되며, 의약품의 예상 분해 산물과 물리적 변화를 규명하는데 도움이 된다.

[168]

[169] 상기 화학식 1의 펩타이드 결합체의 Q는 글루카곤 수용체 및 GLP-1 (Glucagon-like peptide-1) 수용체에 대해 활성을 갖는 펩타이드일 수 있다. "글루카곤 수용체 및 GLP-1 (Glucagon-like peptide-1) 수용체에 대해 활성을 갖는 펩타이드"는 글루카곤 수용체 및 GLP-1 수용체에 대해 유의한 수준의 활성을 가지는 다양한 물질, 예컨대 다양한 펩타이드를 포함한다.

[170] 특별히 이에 제한되는 것은 아니나, 상기 글루카곤 수용체 및 GLP-1 수용체에 대해 유의한 수준의 활성을 가지는 펩타이드로, 본원에서 "GCG/GLP-1 수용체 듀얼 아고니스트", "이중작용제", "옥신토모듈린 유도체"로 혼용될 수 있다.

[171] 보다 구체적으로, 상기 글루카곤 수용체 및 GLP-1 (Glucagon-like peptide-1) 수용체에 대해 활성을 갖는 펩타이드는 하기 일반식 1의 서열을 포함하는, 글루카곤 수용체 및 GLP-1 (Glucagon-like peptide-1) 수용체에 대해 활성을 갖는 펩타이드일 수 있다:

[172] [일반식 1]

[173] His-Xaa2-Gln-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Xaa12-Tyr-Leu-Asp-Xaa16-Lys-Arg-Ala-Xaa20-Glu-Phe-Val-Gln-Trp-Leu-Met-Asn-Thr-Cys (서열번호 1),

[174] 이 때 일반식 1에서,

[175] Xaa2는 2-아미노이소부티르산(Aib), Xaa12는 리신(K), Xaa16은 글루탐산(E), Xaa20은 리신(K)이며;

[176] Xaa12와 Xaa16 또는 Xaa16과 Xaa20의 잔기 사이에서 락탐 고리가 형성되어 있거나 되어 있지 않을 수 있음.

[177] 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.

[178] 상기 펩타이드는 서열번호 2, 3, 또는 4의 아미노산 서열을 포함하는 것, 서열번호 2, 3, 또는 4로 이루어진 군에서 선택된 아미노산 서열로 (필수적으로) 구성된 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[179] 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.

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

[181] 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.

[182] 하나의 구체예로, 상기 Q는 C-말단이 아미드화되어 있는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[183] 하나의 구체예로, 상기 Q는 비당쇄화된 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[184] 또한, 상기 글루카곤 수용체 및 GLP-1 (Glucagon-like peptide-1) 수용체에 대해 활성을 갖는 펩타이드는 분자 내 가교 (intramolecular bridge)를 포함할 수 있으며 (예컨대, 공유결합적 가교 또는 비공유결합적 가교), 구체적으로 고리를 포함하는 형태일 수 있으며, 상기 일반식의 12번 아미노산과 16번 아미노산, 또는 16번 아미노산과 20번 아미노산 간에 고리를 형성하는 것일 수 있으나, 특별히 이에 제한되지는 않는다. 상기 고리의 비제한적인 예로 락탐 가교 (또는 락탐 고리)를 포함할 수 있다.

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

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

[187] 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.

[188] 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.

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

[190]

[191] 본 발명에서 용어 "화학식 1의 펩타이드 결합체"는 본 발명의 액상 제제에 포함되는 유효성분으로서, 약리학적 유효량으로 액상 제제에 포함될 수 있다. 구체적으로, 상기 글루카곤 수용체 및 GLP-1 수용체에 대해 활성을 갖는 펩타이드 및 면역글로불린 Fc 영역이 서로 링커로 연결된 형태로, 상기 결합체는 면역글로불린 Fc 영역이 결합되지 않은 글루카곤 수용체 및 GLP-1 수용체에 대해 활성을 갖는 펩타이드에 비하여 증가된 효력의 지속성을 나타낼 수 있으며, 본 발명에서는 이러한 결합체를 "지속형 결합체"로 지칭한다. 본 발명에서 지속형 결합체는 "지속형 옥신토모듈린 유도체 결합체" 또는 “펩타이드 결합체”와 혼용된다.

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

[193] 또한, 화학식 1의 펩타이드 결합체에 있어서 글루카곤 수용체 및 GLP-1 수용체에 대해 활성을 갖는 펩타이드인 Q와 면역글로불린 Fc 절편의 연결은 물리 또는 화학 결합이거나, 비공유 또는 공유 결합일 수 있으며, 구체적으로 공유 결합일 수 있으나 이에 제한되지 않는다.

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

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

[196] 이러한 펩타이드 결합체의 제조 방법은 대한민국 등록특허 제10-725315호에 기재되어 있으며, 상기 명세서는 전체가 본원의 참조로 삽입된다.

[197] 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.

[198] 상기 면역글로불린 Fc 절편은 본 발명의 화학식 1의 펩타이드 결합체의 모이어티를 이루는 일 구성으로, 구체적으로, 상기 화학식 1에서 Z에 해당할 수 있다.

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

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

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

[202] 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:

[203] Glu-Ser-Lys-Tyr-Gly-Pro-Pro-Cys-Pro-Ser-Cys-Pro(서열번호 6).

[204] 상기 힌지 서열은 서열번호 6의 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 7),
Glu-Ser-Lys-Tyr-Gly-Pro-Pro-Cys-Pro-Ser-Pro (서열번호 8),
Glu-Ser-Lys-Tyr-Gly-Pro-Pro-Cys-Pro-Ser (서열번호 9),

Glu-Ser-Lys-Tyr-Gly-Pro-Pro-Cys-Pro-Pro (서열번호 10), Lys-Tyr-Gly-Pro-Pro-Cys-Pro-Ser (서열번호 11), Glu-Ser-Lys-Tyr-Gly-Pro-Pro-Cys (서열번호 12), Glu-Lys-Tyr-Gly-Pro-Pro-Cys (서열번호 13), Glu-Ser-Pro-Ser-Cys-Pro (서열번호 14), Glu-Pro-Ser-Cys-Pro (서열번호 15), Pro-Ser-Cys-Pro (서열번호 16), Glu-Ser-Lys-Tyr-Gly-Pro-Pro-Ser-Cys-Pro (서열번호 17), Lys-Tyr-Gly-Pro-Pro-Pro-Ser-Cys-Pro (서열번호 18), Glu-Ser-Lys-Tyr-Gly-Pro-Ser-Cys-Pro (서열번호 19), Glu-Ser-Lys-Tyr-Gly-Pro-Pro-Cys (서열번호 20), Lys-Tyr-Gly-Pro-Pro-Cys-Pro (서열번호 21), Glu-Ser-Lys-Pro-Ser-Cys-Pro (서열번호 22), Glu-Ser-Pro-Ser-Cys-Pro (서열번호 23), Glu-Pro-Ser-Cys (서열번호 24), Ser-Cys-Pro (서열번호 25). 더욱 구체적으로는 상기 힌지 서열은 서열번호 25(Ser-Cys-Pro) 또는 서열번호 16(Pro-Ser-Cys-Pro)의 아미노산 서열을 포함하는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

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

[206] 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.

[207] 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 Fc 절편일 수 있다. 또한, CH2 및/또는 CH3에 해당하는 상당히 긴 일부 아미노산 서열이 제거된 영역일 수도 있다.

[208] 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.

[209] 또한, 하나의 구체예로서, 상기 면역글로불린 Fc 절편은 이량체 형태(dimeric form)일 수 있으며, 이량체 형태의 하나의 Fc 영역에 일반식 1의 펩타이드 한 분자가 공유결합적으로 연결될 수 있으며, 이때 상기 면역글로불린 Fc와 일반식 1의 펩타이드는 폴리에틸렌 글리콜 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 폴리에틸렌 글리콜 링커에 의해 서로 연결될 수 있다. 그러나, 상기 기술된 예에 제한되는 것은 아니다.

[210] 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.

[211] 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.

[212] 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.

[213] 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.

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

[215] 또한, 이러한 Fc 절편은 인간, 소, 염소, 돼지, 마우스, 래빗, 햄스터, 랫트 또는 기니아 픽 등의 동물의 생체 내에서 분리한 천연형으로부터 얻어질 수도 있고, 형질전환된 동물세포 또는 미생물로부터 얻어진 재조합형 또는 이의 유도체일 수 있다. 여기서, 천연형으로부터 획득하는 방법은 전체 면역글로불린을 인간 또는 동물의 생체로부터 분리한 후, 단백질 분해효소를 처리하여 획득하는 방법일 수 있다. 파파인을 처리할 경우에는 Fab 및 Fc로 절단되고, 펩신을 처리할 경우에는 pF'c 및 F(ab)2로 절단된다. 이를 크기 배제 크로마토그래피(size-exclusion chromatography) 등을 이용하여 Fc 또는 pF'c를 분리할 수 있다. 더 구체적인 실시 형태에서는 인간 유래의 Fc 절편을 미생물로부터 수득한 사람 면역글로불린 Fc 절편이다.

[216] 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.

[217] 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.

[218] 한편, 면역글로불린 Fc 절편은 인간 또는 소, 염소, 돼지, 마우스, 래빗, 햄스터, 랫트, 기니아 픽 등의 동물기원일 수 있으며, 더 구체적인 실시 형태에서는 사람 기원일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[219] 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 사람 IgG4 유래의 비-당쇄화된 Fc 절편이나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[220] 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 5의 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. 하나의 예로, 면역글로불린 Fc 절편은 서열번호 26의 아미노산 서열 (442개의 아미노산으로

구성됨)을 포함하는 동종이량체일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[221] 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.

[222] 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.

[223] 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.

[224]

[225] 본 본 발명을 구현하는 다른 하나의 양태는, 상기 (a) 화학식 1의 펩타이드 결합체와 (b) i)완충물질, ii) 당, 및 iii) 비이온성 계면활성제를 혼합하는 단계를 포함하는, 화학식 1의 펩타이드 결합체의 액상 제제의 제조 방법을 제공한다.

[226] 결합체, 완충물질, 당, 및 비이온성 계면활성제, 및 액상 제제는 상기에서 설명한 바와 같다.

[227]

[228] 본 발명의 또 다른 실시양태로서, 본 발명은 상기 액상 제제를 포함하는 비만이나 당뇨병의 예방 또는 치료용 약제학적 조성물을 제공한다.

[229] 본 발명에서 용어, "예방"이란 목적하는 질환의 발명을 억제하거나 지연시키는 모든 행위를 의미한다. 본 발명에서 "예방"이란 본 발명의 결합체를 투여함에 따라 혈당 이상이나 인슐린 분비량 조절 이상 등의 당뇨병 증상, 또는 체중 증가나 체지방 비율의 증가 등의 비만 증상의 발생을 억제하거나 지연시키는 것을 의미한다.

[230] 본 발명에서 용어, "치료"란 발생된 질병의 증상을 경감, 개선 또는 완화시키는 모든 행위를 의미한다. 본 발명에서 "치료"란 본 발명의 결합체를 투여함에 따라 상기 당뇨병 증상이나 비만 증상이 경감, 개선 또는 완화되어 혈당 정상화, 인슐린 분비 정상화, 체중 감소, 또는 체지방 비율 감소 등의 현상이 나타나는 것을 의미한다.

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

정의된다. 비만은 오랜 기간에 걸쳐 에너지 소비량에 비해 영양소를 과다하게 섭취해서 에너지 불균형에 의해 유발되는 것이 통상적이다. 비만은 신체 전체에 영향을 미치는 대사질환으로 당뇨병 및 고지혈증에 걸릴 가능성이 높아지고, 성기능 장애, 관절염, 심혈관계 질환의 발병 위험이 커지며 일부의 경우 암의 발생과도 연관이 있다.

[232] 본 발명에서 용어, "당뇨병"은 인슐린의 분비량이 부족하거나 정상적인 기능이 이루어지지 않는 등의 대사질환의 일종으로, 혈중 포도당의 농도가 높아지는 고혈당을 특징으로 하며, 고혈당으로 인하여 여러 증상을 일으키고 소변에서 포도당을 배출하게 되는 질병을 의미한다.

[233] 본 발명의 약학적 조성물은 약학적으로 허용 가능한 담체, 부형제 또는 희석제를 포함할 수 있다. 본 발명에서 용어, "약학적으로 허용"이란 치료 효과를 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.

[234]

[235] 본 발명의 또 다른 실시양태로서, 본 발명은 상기 액상 제제를 개체에 투여하는 단계를 포함하는, 비만이나 당뇨병의 예방 또는 치료 방법을 제공한다.

[236] 상기 액상 제제, 비만 및 당뇨병은 상기 설명한 바와 동일하다.

[237] 상기 개체는 비만 또는 당뇨병이 의심되는 개체로서 상기 질환이 발병하였거나 발병할 수 있는 인간 또는 쥐, 가축 등을 포함하는 포유 동물을 의미하지만, 본 발명의 액상 제제로 치료 가능한 개체는 제한 없이 포함된다.

[238] 본 발명의 치료 방법은 액상 제제를 포함하는 약학적 조성물을 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 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.

[239]

[240] 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.

[241]

[242] **실시예 1: GLP-1/글루카곤 수용체 듀얼 아고니스트 제조**

[243]

[244] GLP-1 수용체 및 글루카곤 수용체에 모두 활성을 나타내는 GLP-1/글루카곤 수용체 듀얼 아고니스트의 본 발명 액상 제제에서의 안정성을 측정하기 위하여, 하기의 아미노산 서열을 가지는 GLP-1/글루카곤 수용체 듀얼 아고니스트들을 합성하였다 (표 1). 본원에서 GLP-1/글루카곤 수용체 듀얼 아고니스트는 옥신토모듈린 유도체와 혼용될 수 있다.

[245]

[246] [표1]

서열번호	서열	비고
서열번호 2	HAibQGTFTSDYSKYLDEKRAKEFVQWLMNTC	
서열번호 3	HAibQGTFTSDYSKYLD**E**KRA**K**EFVQWLMNTC	링 형성
서열번호 4	HAibQGTFTSDYS**K**YLD**E**KRAKEFVQWLMNTC	링 형성

[247] 상기 표 1에서 볼드체로 표시된 아미노산은 볼드체로 표시된 아미노산들이 서로 링을 형성하는 것을 의미한다. 또한, Aib는 비천연형 아미노산인 aminoisobutyric acid를 의미한다.

[248]

[249] **실시예 2: 단일 페길화된(mono-PEGylated) 면역글로불린 Fc 절편의 제조**

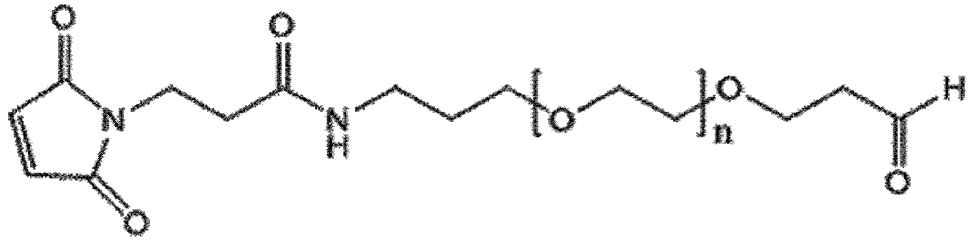
[250]

[251] 실시예 2-1. 단일 페길화된 면역글로불린 Fc 절편의 제조

[252] 면역글로불린 Fc 절편의 두 N 말단 중 하나에만 페길화(PEGylation)된 구조의 단일 페길화된 면역글로불린 Fc 절편을 제조하기 위하여, N-말단에 Pro-Ser-Cys-Pro 서열의 힌지 영역을 갖는 면역글로불린 Fc 절편(49.8kDa, 서열번호 5의 동종이량체)을 화학식 2의 PEG 링커(수평균 분자량 10kDa)에 몰비는 면역글로불린 Fc:PEG 링커 = 1:1로, 면역글로불린 Fc 절편의 농도를 50 g/L로 하여 6±4℃에서 약 4시간 반응시켰다.

[253]

[254] [화학식 2]

[255] 

[256]

[257] 구체적으로, 반응은 5 mM Bis Tris (pH 6.5)와 인산칼륨이 포함된 조성에서 이루어 졌으며, 10 mM $NaCNBH_3$ (sodium cyanoborohydride) 환원제를 첨가하여 반응시켰다. 단일 페길화된 면역글로불린 Fc 절편을 얻기 위해 상기 반응액을

BisTris 버퍼로 희석하고 정제하였다.

[258] 이 때, CaptoQ ImpRes (GE Healthcare, 음이온 교환 크로마토그래피) 컬럼을 이용하여 BisTris 가 포함된 버퍼와 염화나트륨 농도구배로 단일 페길화된 면역글로불린 Fc 절편을 정제하였다.

[259]

[260] 실시예 2-2. 단일 페길화된 면역글로불린 Fc 절편의 구조 분석

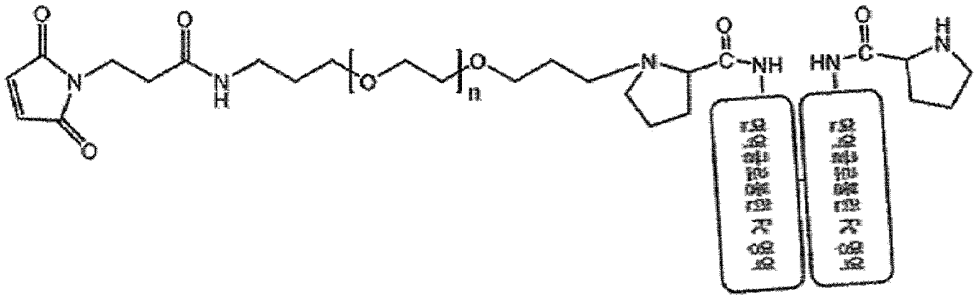
[261] 상기 실시예 2-1의 방법으로 제조된, 단일 페길화된 면역글로불린 Fc 절편의 구조를 MALDI-TOF 및 Peptide mapping을 통해 분석하였다. MALDI-TOF 분석 결과 단일 페길화된 면역글로불린 Fc 절편 예상 분자량과 일치하였고, Peptide mapping 분석 결과 면역글로불린 Fc 절편의 N 말단에 PEG가 90%이상 페길화된 것을 확인하였다.

[262]

[263] 한편, 상기 실시예 2-1의 방법으로 제조된 단일 페길화된(Mono-PEGylated) 면역글로불린 Fc 절편 (화학식 3)을 SE-HPLC, RP-HPLC와 IE-HPLC 분석법을 사용하여 분석한 결과, SE-HPLC 측정으로는 90%이상, RP-HPLC 측정으로는 90%이상, 및 IE-HPLC 측정으로는 80%이상의 순도로 제조된 것을 확인하였다.

[264]

[265] [화학식 3]

[266] 

[267]

[268] **실시예 3: 페길화된 면역글로불린 Fc 절편과 옥신토모듈린 유도체의 연결에 의한 결합체 제조**

[269]

[270] 상기 실시예 2-1에서 제조된 단일 페길화된 면역글로불린 Fc 절편을 대표적인 옥신토모듈린 유도체로 선택한 서열번호 3(C-말단 아미드화)의 옥신토모듈린 유도체와 연결하여 지속형 결합체를 다음과 같이 제조하였다.

[271] 한외/투석여과 없이 peptide conjugation을 통해 단일 페길화된 면역글로불린 Fc 절편을 옥신토모듈린 유도체와 반응시켰다. 구체적으로, 실시예 2-1의 음이온 교환크로마토그래피 후 한외/투석여과 없이 GLP-1/글루카곤 수용체 듀얼 아고니스트인 옥신토모듈린 유도체(서열번호 3)의 peptide conjugation 반응을 수행하여 지속형 결합체(면역글로불린 Fc 절편-PEG를 포함하는

링커-옥신토모듈린 유도체)를 제조하였다. 본원에서 "지속형 결합체"는 "지속형 옥신토모듈린 유도체 결합체"와 혼용될 수 있다.

[272]

[273] 이 때, 단일 페길화된 면역글로불린 Fc 절편의 PEG 한 쪽 말단의 말레이미드 반응기와 옥신토모듈린 유도체의 시스테인이 결합하도록 단일 페길화된 면역글로불린 Fc 절편과 옥신토모듈린 유도체의 몰비를 1:1로, 옥신토모듈린 유도체 단백질 농도를 0.2 g/L로 하여 6±4℃에서 약 2시간 반응시켰다. 이 때 반응액은 이소프로판올을 포함한 Tris-Cl(6±4℃)버퍼에서 수행되었다. 반응 후의 결과물을 SE-HPLC, RP-HPLC 및 IE-HPLC 분석법으로 분석한 결과, 면역글로불린 Fc 절편-PEG를 포함하는 링커-옥신토모듈린 유도체 결합체(화학식 4)의 순도는 SE-HPLC 측정으로는 90%이상, RP-HPLC 측정으로는 80% 이상, 및 IE-HPLC 측정으로는 80% 이상인 것으로 확인 되었다.

[274]

[275] 이후, 상기 반응물의 결과물로 Source 15ISO (GE Healthcare) 컬럼을 사용하여, 한 번의 소수성 상호작용 크로마토그래피를 수행하였다. 이를 통해, 반응 부산물을 제거하고 면역글로불린 Fc 절편-PEG를 포함하는 링커-옥신토모듈린 유도체의 결합체를 수득하였다. 이 때, 구연산나트륨이 포함된 버퍼와 황산암모늄의 농도 구배를 이용하여 정제하였다.

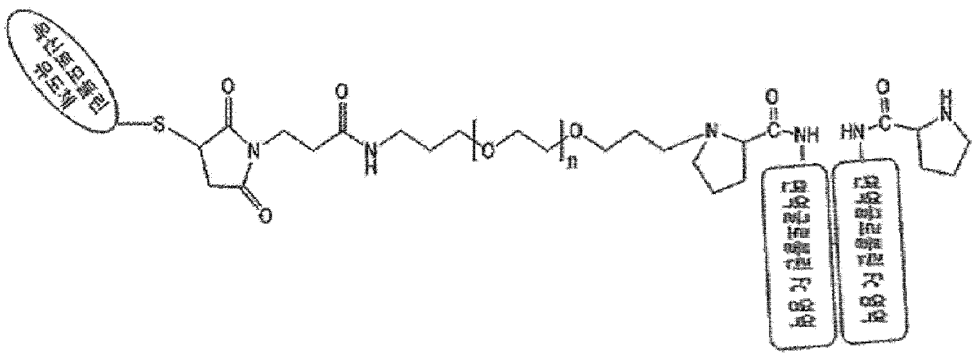
[276]

[277] 용출된 면역글로불린 Fc 절편-PEG를 포함하는 링커-옥신토모듈린 유도체 결합체(화학식 4)는 MALDI-TOF, SE-HPLC, RP-HPLC 및 IE-HPLC 분석법을 사용하여 분석하였으며, MALDI-TOF 분석 결과 면역글로불린 Fc 절편-PEG를 포함하는 링커-옥신토모듈린 유도체 결합체의 예상 분자량과 일치하였고, SE-HPLC측정으로는 90%이상, RP-HPLC측정으로는 90%이상, 및 IE-HPLC측정으로는 90%이상의 고순도로 제조되었음을 확인하였다.

[278]

[279] [화학식 4]

[280]



[281]

[282] **실시예 4: 액상 제제의 제조 및 삼투압 평가**

[283]

[284] 실시예 3에서 제조된 지속형 옥신토모듈린 유도체 결합체의 새롭게 만들어진 조성인 액상 제제의 안정성을 확인하기 위해 비교예로 국제공개공보인 WO2014-073842에 공지된 조성의 액상 제제(비교예) 및 본원발명에 따른 새로운 조성의 액상 제제(실시예)를 하기 표 2와 같은 조성으로 제조하였다. 실시예 제제는 본원발명의 안정화제 조성인 완충제, 당 및 비이온성 계면활성제의 대표적인 예로 완충물질로는 아세트산과 아세트산나트륨, 당으로는 수크로스, 비이온성 계면활성제로는 폴리소르베이트 20을 선택하였다.

[285] 기존 제제인 비교예의 제제는 혈액에 비해 삼투압이 높았고 이에 더해 안정성을 더 개선시키기는 위해 새로운 제제를 만들었다. 안정성을 개선시키기 위해 기존 제제의 pH를 낮추면서, 만니톨을 수크로스로 변경하였다. 이에 따라 삼투압도 혈액과 유사한 수준으로 감소하였음을 확인하였으며, 메티오닌 첨가 유무는 안정성에 영향이 없어, 본원발명의 실시예에서는 제거하였다. 삼투압 측정 결과, 비교예의 제제는 494 mOsm/kg이고, 실시예의 제제는 305 mOsm/kg로, 혈액의 삼투압 (~ 300 mOsm/kg)과 유사한 수준이었다.

[286]

[287] [표2]

	완충물질	당알코올 또는 당	비이온성 계면활성제	안정화제	펩타이드 결합체
비교예	20 mM 시트르산-시트르산나트륨 (pH 5.4)	6%(w/v) 만니톨	0.02%(w/v) 폴리소르베이트 20	0.1 mg/mL 메티오닌	374nmol/mL
실시예	10 mM 아세트산-아세트산나트륨(pH 5.1)	8.5%(w/v) 수크로스	0.02%(w/v) 폴리소르베이트 20	-	374nmol/mL

[288] **실시예 5: 실시예 액상 제제의 장기 안정성 평가**

[289]

[290] 실시예 4에서 제조된 지속형 옥신토모듈린 유도체 결합체의 액상 제제 조성 (실시예) 의 장기 안정성을 확인하기 위해 5 ± 3℃에서 0 내지 12개월 동안 보관 후 이온교환 크로마토그래피법(Ion Exchange - High Performance Liquid Chromatography, IE-HPLC), 크기 배제 크로마토그래피법(Size Exclusion - High Performance Liquid Chromatography, SE-HPLC), 역상 크로마토그래피법(Reverse Phase - High Performance Liquid Chromatography, RP-HPLC)을 이용해 분석하였다. 표 3, 4, 5에서는 IE-HPLC(%),RP-HPLC(%)와 SE-HPLC(%)는 지속형

옥신토모듈린 유도체 결합체에 해당하는 피크의 각 분석 시점에서의 Area%를 나타낸다.

[291]

[292] [표3]

IE-HPLC	장기 안정성 평가 (5 ± 3℃)				
	0개월	1개월	3개월	6개월	12개월
실시예	97.8	95.3	95.5	95.0	91.7

[293] [표4]

RP-HPLC	장기 안정성 평가 (5 ± 3℃)				
	0개월	1개월	3개월	6개월	12개월
실시예	95.7	94.9	95.8	93.7	93.9

[294] [표5]

SE-HPLC	장기 안정성 평가 (5 ± 3℃)				
	0개월	1개월	3개월	6개월	12개월
실시예	98.7	99.1	99.2	98.2	98.1

[295] 상기 결과에서 알 수 있듯이, 본원발명의 액상 제제 조성은 12개월까지도 안정성이 높은 것을 확인하여 장기 보관에 있어서 최적의 조성임을 알 수 있었다.

[296]

[297] **실시예 6: 가속 안정성 평가**

[298]

[299] 실시예 4에서 제조된 실시예 액상 제제와 비교예 액상 제제의 가속 안정성을 확인하기 위해 25 ± 2℃ 및 상대습도 60 ± 5%인 조건에서 0 내지 6개월 동안 보관 후 IE-HPLC, RP-HPLC, SE-HPLC 를 이용해 분석하였다. 가속 안정성 시험은 과도한 보관 조건을 채택하여 원료 의약품 또는 완제 의약품의 화학적 분해 또는 물리적 변화를 증가시키도록 고안된 시험으로 장기 안정성 시험 이외에, 가속 안정성 평가를 통해 비가속 조건에서 장기간에 걸친 화학적 영향을 평가하고 운송 중에 발생할 수 있는 상황 같이, 단기간 동안 표시 보관 조건을 벗어났을 때의 영향을 평가할 수 있다. 표 6, 7, 8에서는 IE-HPLC(%), RP-HPLC(%)와SE-HPLC(%)는 지속형 옥신토모듈린 유도체 결합체에 해당하는 피크의 각 분석 시점에서의 Area%를 나타낸다.

[300]

[301] [표6]

IE-HPLC	가속 조건 (25 ± 2℃ / 60 ± 5%)			
	0개월	1개월	3개월	6개월
비교예	97.6	90.6	75.1	57.0
실시예	97.8	92.4	79.8	64.8

[302] [표7]

RP-HPLC	가속 조건 (25 ± 2℃ / 60 ± 5%)			
	0개월	1개월	3개월	6개월
비교예	95.5	94.5	94.2	89.7
실시예	95.7	94.9	94.5	91.6

[303] [표8]

SE-HPLC	가속 조건 (25 ± 2℃ / 60 ± 5%)			
	0개월	1개월	3개월	6개월
비교예	98.6	98.1	96.2	91.0
실시예	98.7	98.3	97.0	92.5

[304] 상기 표 6, 7, 및 8의 결과에서 알 수 있듯이, 본원발명의 당알콜이 부존재하고, 당인 수크로스가 존재하는 액상 제제의 조성물이 가속 조건하에서 비교예에 비하여 6개월까지도 안정성이 높은 것을 확인하였다. 이와 같은 결과는 본원발명의 액상 제제 조성이 안정성이 높은 것을 시사하는 것이다.

[305]

[306] **실시예 7: 가혹 안정성 평가**

[307]

[308] 실시예 4에서 제조된 지속형 옥신토모듈린 유도체 결합체의 실시예 액상 제제의 가혹 안정성을 확인하기 위해 비교예 액상 제제와개별적으로 40 ± 2℃ 및 상대습도 75 ± 5%인 조건에서 0 내지 4주 동안 보관 후 성상을 분석하였다. 가혹 안정성 시험은 신청된 저장조건 외의 다른 조건에 제품이 노출된 경우 이러한 조건 변화가 제품에 미치는 영향을 결정하고, 원료 의약품 및/또는 완제 의약품의 분해 양상 및 물리화학적 안정성을 파악하는 시험이다. 표 9에서는 상기 가혹 조건에서의 비교예 및 실시예 액상 제제의 성상을 나타냈다.

[309]

[310] [표9]

성상	가혹조건 (40 ± 2℃ / 75 ± 5%)				
	0주	1주	2주	3주	4주
비교예	투명	약간 불투명	약간 불투명	침전	침전
실시예	투명	투명	투명	투명	투명

[311] 상기 표 9의 결과에서 알 수 있듯이, 가혹 조건하에서 비교예 액상 제제 조성의 경우 1주부터 지속형 옥신토모듈린 유도체 결합체의 성상이 불투명해지고 3주에는 침전이 일어나는 것에 비하여 본원발명의 당알콜이 부존재하고, 당인 수크로스가 존재하는 액상 제제의 조성물인 실시예 조성은 4주까지도 투명한 성상을 유지하여 안정화 대상인 지속형 옥신토모듈린 유도체 결합체가 침전되지 않고 안정한 것을 확인하였다. 이와 같은 결과는 본원발명의 액상 제제 조성이 공지의 조성에 비해 안정성이 높아서 의약품의 액상제제로서 제공될 수 있음을 시사하는 것이다.

[312]

[313] 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.