명세서

발명의 명칭: 글루카곤, GLP-1 및 GIP 삼중 활성체의 지속형 결합체의 액상 제제

기술분야

[1] 본 발명은 글루카곤, GLP-1 및 GIP 삼중 활성체의 지속형 결합체의 액상 제제 및 이의 제조방법에 관한 것이다.

[2]

배경기술

[3] 비만과 2형 당뇨를 포함하는 당뇨는 현대사회에 들어서 발생되는 대표적인 대사질환 중 하나로서 전세계적인 건강위협요소로 인식되고 있으며, 질병의 발병에 수반되는 경제적 비용도 급증하는 추세다.

[4] GLP-1, GIP는 대표적인 위장 호르몬이자 신경 호르몬으로서 음식물 섭취에 따른 혈중 당 농도 조절에 관여하는 물질이다. 글루카곤은 췌장에서 분비되는 펩타이드 호르몬으로 전술한 두 물질과 함께 혈중 당 농도 조절 작용에 관여한다.

[5] GLP-1은 음식물 섭취에 자극을 받아 소장에서 분비되는 호르몬으로 혈당 농도 의존적으로 췌장에서의 인슐린 분비를 촉진하고 글루카곤의 분비를 억제하여 혈당 농도를 낮추는 작용을 돕는다. 또한, 포만 인자로 작용하여 위장의 소화작용을 늦추고 음식 소화물의 위장 통과시간을 지연시켜 음식물 섭취를 줄이는 역할을 지닌다. 더욱이 쥐에 투여 시 음식 섭취억제와 체중 감소효과가 있음이 보고되었으며, 이러한 효과는 정상과 비만 상태 모두에서 동일하게 나타남이 확인되어 비만 치료제로서의 가능성을 보여주었다.

[6] GLP-1과 더불어 음식 섭취에 자극을 받아 분비되는 위장 호르몬의 하나인 GIP는 소장의 K 세포로부터 분비되는 42개 아미노산으로 구성된 호르몬으로서 혈당 농도에 의존적으로 췌장에서의 인슐린 분비를 촉진하고 혈당 농도를 낮추는데 도움을 주는 기능을 수행하며 GLP-1의 활성 증가 효과, 항염증 효과 등이 보고 되었다.

[7] 글루카곤은 약물 치료 또는 질병, 호르몬이나 효소 결핍 등의 원인으로 혈당이 떨어지기 시작하면 췌장에서 생산된다. 글루카곤은 간에 신호하여 글리코겐을 분해하여 글루코스를 방출하도록 유도하고, 혈당 수준을 정상 수준까지 높이는 역할을 한다. 뿐만 아니라, 글루카곤은 혈당 상승 효과 이외에 동물과 사람에서의 식욕억제 및 지방세포의 호르몬 민감성 리파제(hormone sensitive lipase)를 활성화시켜 지방 분해를 촉진 및 에너지 대사(energy expenditure)를 촉진하여 항-비만 효과를 나타냄이 보고되었다.

[8] 이에, GLP-1의 혈당 조절 및 체중감소 효과를 이용하여 당뇨병과 비만의 치료제로서 개발하고자 하는 연구가 활발하게 진행되고 있으며, GLP-1과 약

50% 수준의 아미노산 배열 유사성을 가지는 도마뱀 독액(lizard venom)으로 부터 만들어지는 엑센딘-4(exendin-4) 역시 동종 질환에 대한 치료제로서의 개발이 진행 중이다. 그러나 현재까지 보고된 바에 따르면 GLP-1과 엑센딘-4를 사용한 치료제의 경우 부작용으로 구토와 메스꺼움을 동반한다는 문제가 발생하는 것으로 알려져 있다 (Syed YY., Drugs., 2015 Jul; 75(10): 1141-1152).

[9] 이에, 혈당 조절, 체중 감소 효과를 가지면서 구토와 메스꺼움 같은 부작용이 발생하지 않으며, GLP-1과 GIP, 그리고 글루카곤 수용체를 높게 활성화 시킬 수 있는 신규한 물질의 개발되고 있다. 또한, GLP-1, GIP, 글루카곤 수용체에 대한 활성화 비율이 다양한 물질, 예컨대, 혈당강화를 위해 GLP-1 및 GIP의 활성은 높으면서 상대적으로 글루카곤의 활성은 낮아 체중감소 효력도 있지만 혈당조절능력이 보다 높은 물질이나, GLP-1, GIP, 및 글루카곤 모두의 활성이 높아 체중 감소 효과가 높은 물질이 개발되고 있다.

[10]

발명의 상세한 설명

기술적 과제

[11] 개발된 글루카곤 수용체, GLP-1 수용체, 및 GIP 수용체 모두에 대하여 활성을 갖는 펩타이드의 지속형 결합체를 바이러스 오염의 우려 없이 장시간 동안 보관할 수 있는 안정한 액상 제제의 개발이 요구된다.

[12]

기술적 해결방법

[13] 본 발명은 글루카곤, GLP-1 및 GIP 삼중 활성체의 지속형 결합체의 액상 제제를 제공하는 것이다.

[14] 본 발명의 다른 목적은 상기 액상 제제를 제조하는 방법을 제공하는 것이다.

[15]

발명의 효과

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

[17]

도면의 간단한 설명

[18] 도 1a 및 1b는 실시예 3의 액상 제제 (구연산나트륨, pH 5.5, 만니톨, 폴리소르베이트 20, 메티오닌)에 기초하여, 완충물질의 종류에 따른 글루카곤, GLP-1 및 GIP 삼중 활성체의 지속형 결합체의 안정성을 확인한 결과이다. 구체적으로, 표 9와 같은 조성을 각각 글루카곤, GLP-1 및 GIP 삼중 활성체의 지속형 결합체의 액상 제제로 사용하여 25℃에서 6주 보관 후 안정성 결과를 나타낸 것이다.

[19]

발명의 실시를 위한 최선의 형태

[20] 본 발명을 구현하는 하나의 양태는 글루카곤, GLP-1 (Glucagon-like peptide-1) 및 GIP (Glucose-dependent insuliontropic polypeptide) 삼중 활성체의 지속형 결합체의 액상 제제이다. 상기 지속형 결합체는 글루카곤 수용체, GLP-1 수용체 및 GIP 수용체에 대해 활성을 갖는 펩타이드가 면역글로불린 Fc 절편에 링커에 의해 공유결합되어 있는 물질을 의미한다.

[21] 하나의 구체예에서, 본 발명은 글루카곤 수용체, GLP-1 수용체, 및 GIP 수용체에 대해 활성을 갖는 펩타이드 및 면역글로불린 Fc 절편이 서로 연결된, 글루카곤 수용체, GLP-1 수용체, 및 GIP 수용체에 대해 활성을 갖는 펩타이드의 지속형 결합체를 약리학적 유효량으로 포함하고, i)완충물질 및 ii) 당알코올, 당, 또는 이들의 조합을 포함하는 알부민-비함유 안정화제를 포함하는, 글루카곤 수용체, GLP-1 수용체, 및 GIP 수용체에 대해 활성을 갖는 펩타이드의 지속형 결합체의 액상 제제에 관한 것이다. 상기 지속형 결합체는 글루카곤 수용체, GLP-1 수용체, 및 GIP 수용체에 대해 활성을 갖는 펩타이드가 면역글로불린 Fc 절편에 공유결합되어 있는 물질을 의미한다.

[22] 하나의 구체예로서, 상기 액상 제제는 하기 화학식 1의 지속형 결합체; 완충물질; 및 당알코올, 당, 또는 이들의 조합을 포함하는 지속형 결합체의 액상 제제인 것을 특징으로 한다:

[23]

[24] [화학식 1]

[25] Q - La - Z

[26] 상기 화학식 1에서 Q는 하기 일반식 1의 펩타이드이고;

[27] L은 에틸렌글리콜 반복 단위를 함유하는 링커이고;

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

[29] Z는 면역글로불린 Fc 절편이며;

[30] - 는 공유결합을 나타냄:

[31] [일반식 1]

[32] Xaa1-Aib-Xaa3-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Xaa10-Ser-Xaa12-Xaa13-Xaa14-Xaa15-Glu-Xaa17-Xaa18-Xaa19-Lys-Xaa21-Phe-Val-Xaa24-Trp-Leu-Leu-Xaa28-Xaa29-Xaa30-R1 (일반식 1, 서열번호 47)

[33] 상기 일반식 1에서,

[34] 밑줄 친 N-말단으로부터 16번인 글루탐산 (Glu) 및 20번인 리신 (Lys) 잔기 사이에서 락탐 고리가 형성되고,

[35] Xaa1은 히스티딘, 4-이미다조아세틸 (CA), 또는 티로신이고,

[36] Xaa3은 글루탐산 또는 글루타민이고,

[37] Xaa10은 티로신, 또는 시스테인이고,

[38] Xaa12는 리신, 또는 이소류신이며,

[39] Xaa13은 티로신, 알라닌, 또는 시스테인이고,

[40] Xaa14는 류신, 또는 메티오닌이며,

[41] Xaa15는 시스테인, 또는 아스파르트산이며,

[42] Xaa17은 아르기닌, 이소류신, 시스테인, 또는 리신이며,

[43] Xaa18은 알라닌, 아르기닌, 또는 히스티딘이고,

[44] Xaa19는 알라닌, 글루타민, 또는 시스테인이며,

[45] Xaa21은 글루탐산, 또는 아스파르트산이며,

[46] Xaa24는 글루타민, 아스파라긴, 또는 아스파르트산이며,

[47] Xaa28은 알라닌, 아스파라긴, 또는 아스파르트산이며,

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

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

[50] R1은 시스테인, m-Ser-Ser-Gly-Ala-Pro-Pro-Pro-Ser-n (서열번호 48), 또는 m-Ser-Ser-Gly-Gln-Pro-Pro-Pro-Ser-n (서열번호 49)이거나, 부존재하며,

[51] 여기서,

[52] m은 Cys, 또는 Pro 이고,

[53] n은 Cys, 또는 Gly, 이거나, 부존재할 수 있다. 상기 Aib는 아미노이소부티르산을 의미한다.

[54] 앞선 구체예 중 어느 하나에 따른 액상 제제로서, 상기 액상 제제는 18~ 920 nmol/mL의 상기 화학식 1의 지속형 결합체; 상기 액상 제제의 pH를 5.0 ~ 7.0의 범위에서 유지하기 위한 분량의 완충 물질; 및 0.5 ~ 10%(w/v)의 당알코올, 당, 또는 이들의 조합;을 포함하는 지속형 결합체의 액상 제제인 것을 특징으로 한다.

[55]

[56] 앞선 구체예 중 어느 하나에 따른 액상 제제로서, 상기 액상 제제는 등장화제, 비이온성 계면활성제, 및 아미노산으로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 성분을 더 포함하는 것을 특징으로 한다.

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

[58] 앞선 구체예 중 어느 하나에 따른 액상 제제로서, 상기 액상 제제는 비이온성 계면활성제, 및 아미노산으로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 성분을 추가적으로 포함하지 않는 것을 특징으로 한다.

[59] 앞선 구체예 중 어느 하나에 따른 액상 제제로서, 상기 펩타이드는 서열번호 1 내지 46 중에서 선택된 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하는 것을 특징으로 한다.

[60] 앞선 구체예 중 어느 하나에 따른 액상 제제로서, 상기 펩타이드는 서열번호 1, 2, 9, 19, 21 내지 27, 30 내지 32, 또는 40 내지 46 중에서 선택된 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하는 것을 특징으로 한다.

[61] 앞선 구체예 중 어느 하나에 따른 액상 제제로서, 상기 펩타이드는 서열번호 9. 30 내지 32, 또는 42 내지 46 중에서 선택된 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하는 것을 특징으로 한다.

[62] 앞선 구체예 중 어느 하나에 따른 액상 제제로서, 상기 펩타이드는 서열번호 9의 아미노산 서열을 포함하는 것을 특징으로 한다.

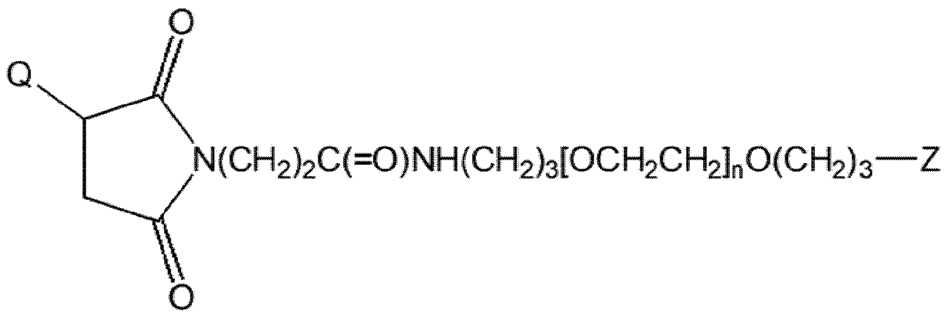
[63] 앞선 구체예 중 어느 하나에 따른 액상 제제로서, 상기 R1은 시스테인, Cys-Ser-Ser-Gly-Gln-Pro-Pro-Pro-Ser (서열번호 50), Pro-Ser-Ser-Gly-Ala-Pro-Pro-Pro-Ser (서열번호 51), Pro-Ser-Ser-Gly-Ala-Pro-Pro-Pro-Ser-Gly (서열번호 52), Pro-Ser-Ser-Gly-Gln-Pro-Pro-Pro-Ser (서열번호 53), 또는 Pro-Ser-Ser-Gly-Gln-Pro-Pro-Pro-Ser-Cys (서열번호 54)이거나, 또는 부존재하는 것을 특징으로 한다.

[64] 앞선 구체예 중 어느 하나에 따른 액상 제제로서, 상기 L은 폴리에틸렌글리콜인 것을 특징으로 한다.

[65] 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.

[66] 앞선 구체예 중 어느 하나에 따른 액상 제제로서, 상기 화학식 1의 구조는 하기 화학식 2의 구조인 것을 특징으로 한다:

[67] [화학식 2]

[68] 

[69]

[70] 여기서, Q 및 Z는 화학식 1에서 정의한 바와 같다.

[71] 앞선 구체예 중 어느 하나에 따른 액상 제제로서, 상기 에틸렌글리콜 반복 단위는 $[OCH_2CH_2]n$로서, n은 자연수로, 상기 펩타이드 결합체 내 $[OCH_2CH_2]n$ 부위의 평균 분자량, 예컨대 수평균 분자량이 1 내지 100 kDa이 되도록 정해지는 것을 특징으로 한다.

[72] 앞선 구체예 중 어느 하나에 따른 액상 제제로서, 상기 n의 값은 상기 펩타이드 결합체 내 $[OCH_2CH_2]n$ 부위의 평균 분자량, 예컨대 수평균 분자량이 10 kDa이 되도록 정해지는 것을 특징으로 한다.

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

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

[75] 앞선 구체예 중 어느 하나에 따른 액상 제제로서, 상기 면역글로불린 Fc 절편은

IgG4 유래인 것을 특징으로 한다.

[76] 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.

[77] 앞선 구체예 중 어느 하나에 따른 액상 제제로서, 상기 Z는 서열번호 76의 아미노산 서열인 단량체를 포함하는 것을 특징으로 한다.

[78] 앞선 구체예 중 어느 하나에 따른 액상 제제로서, 상기 Z는 서열번호 76의 아미노산 서열의 단량체의 동종이량체인 것을 특징으로 한다.

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

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

[81] 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.

[82] 앞선 구체예 중 어느 하나에 따른 액상 제제로서, 상기 완충물질은 구연산 완충용액, 아세트산 완충용액, 히스티딘 완충용액, 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 한다.

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

[84] 앞선 구체예 중 어느 하나에 따른 액상 제제로서, 상기 액상 제제의 pH는 5.0 내지 5.5인 것을 특징으로 한다.

[85] 앞선 구체예 중 어느 하나에 따른 액상 제제로서, 상기 액상 제제의 pH는 5.0 내지 6.5인 것을 특징으로 한다.

[86] 앞선 구체예 중 어느 하나에 따른 액상 제제로서, 상기 액상 제제의 pH는 5.1 내지 6.0인 것을 특징으로 한다.

[87] 앞선 구체예 중 어느 하나에 따른 액상 제제로서, 상기 액상 제제의 pH는 5.1 내지 5.5인 것을 특징으로 한다.

[88] 앞선 구체예 중 어느 하나에 따른 액상 제제로서, 상기 완충물질의 농도는 액상 제제의 pH를 5.0 내지 7.0의 범위에서 유지하기 위한 5 내지 100mM인 것을 특징으로 한다.

[89]

[90] 앞선 구체예 중 어느 하나에 따른 액상 제제로서, 상기 당 또는 당알코올은 수크로오스, 만니톨, 및 소르비톨로 구성되는 군으로부터 선택되는 하나 이상인 것을 특징으로 한다.

[91] 앞선 구체예 중 어느 하나에 따른 액상 제제로서, 상기 당 또는 당알코올은 제제 내에 1 내지 20% (w/v)의 농도로 존재하는 것을 특징으로 한다. 앞선 구체예 중 어느 하나에 따른 액상 제제로서, 상기 지속형 결합체는 제제 내에 18 내지 2757

nmol/ml, 18 내지 920 nmol/ml, 18 내지 919 nmol/ml, 90 내지 552 nmol/ml, 150 내지 600 nmol/ml, 183 내지 552 nmol/ml, 400 내지 550 nmol/ml, 또는 150 내지 200 nmol/ml 의 농도로 존재하는 것을 특징으로 한다.

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

[93] 앞선 구체예 중 어느 하나에 따른 액상 제제로서, 상기 당은 수크로스인 것을 특징으로 한다.

[94] 앞선 구체예 중 어느 하나에 따른 액상 제제로서, 상기 당알코올은 만니톨 및 소르비톨로 구성되는 군으로부터 선택되는 하나 이상인 것을 특징으로 한다.

[95] 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.

[96] 앞선 구체예 중 어느 하나에 따른 액상 제제로서, 상기 액상 제제는 등장화제를 더 포함하는 것을 특징으로 한다.

[97] 앞선 구체예 중 어느 하나에 따른 액상 제제로서, 상기 등장화제는 염화나트륨인 것을 특징으로 한다.

[98] 앞선 구체예 중 어느 하나에 따른 액상 제제로서, 0.01 ~ 0.1%(w/v)의 비이온성 계면활성제를 포함하는 것을 특징으로 한다.

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

[100] 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.

[101] 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.

[102] 앞선 구체예 중 어느 하나에 따른 액상 제제로서, 상기 액상 제제는 90 ~ 552 nmol/mL의 화학식 1의 펩타이드 결합체; 상기 액상 제제의 pH가 5.0 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 ~ 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 아르기닌, 글리신, 메티오닌 및 이들의 조합으로 이루어진 군에서 선택하는 0.01 ~ 1 mg/mL의 안정화제를 함유하는 것을 특징으로 한다.

[103] 앞선 구체예 중 어느 하나에 따른 액상 제제로서, 상기 액상 제제는 90 ~ 552 nmol/mL의 화학식 1의 펩타이드 결합체; 상기 액상 제제의 pH가 5.0 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 아르기닌, 글리신, 메티오닌 및 이들의 조합으로 이루어진 군에서 선택하는 0.01 ~ 1 mg/mL의 안정화제를 함유하는 것을 특징으로 한다.

[104] 앞선 구체예 중 어느 하나에 따른 액상 제제로서, 상기 액상 제제는 90 ~ 552 nmol/mL의 화학식 1의 펩타이드 결합체; 상기 액상 제제의 pH가 5.1 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 아르기닌, 글리신, 메티오닌 및 이들의 조합으로 이루어진 군에서 선택하는 0.01 ~ 1 mg/mL의 안정화제를 함유하는 것을 특징으로 한다.

[105] 앞선 구체예 중 어느 하나에 따른 액상 제제로서, 상기 액상 제제는 90 ~ 552 nmol/mL의 화학식 1의 펩타이드 결합체; 상기 액상 제제의 pH가 5.1 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; 및 4 ~ 10%(w/v)의 당을 함유하는 것을 특징으로 한다.

[106] 앞선 구체예 중 어느 하나에 따른 액상 제제로서, 상기 액상 제제는 90 ~ 552 nmol/mL의 화학식 1의 펩타이드 결합체; 상기 액상 제제의 pH가 5.0 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; 및 4 ~ 10%(w/v)의 당을 함유하는 것을 특징으로 한다.

[107] 앞선 구체예 중 어느 하나에 따른 액상 제제로서, 상기 액상 제제는 90 ~ 552 nmol/mL의 화학식 1의 펩타이드 결합체; 상기 액상 제제의 pH가 5.0 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 아르기닌, 글리신, 메티오닌 및 이들의 조합으로 이루어진 군에서 선택하는 0.01 ~ 1 mg/mL의 안정화제를 함유하는 것을 특징으로 한다.

[108] 앞선 구체예 중 어느 하나에 따른 액상 제제로서, 상기 액상 제제는 90 ~ 552 nmol/mL의 화학식 1의 펩타이드 결합체; 상기 액상 제제의 pH가 5.0 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 계면활성제를 함유하는 것을 특징으로 한다.

[109] 앞선 구체예 중 어느 하나에 따른 액상 제제로서, 상기 액상 제제는 90 ~ 552 nmol/mL의 화학식 1의 펩타이드 결합체; 상기 액상 제제의 pH가 5.0 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;

아르기닌, 글리신, 메티오닌 및 이들의 조합으로 이루어진 군에서 선택하는 0.01 ~ 1 mg/mL의 안정화제; 및 폴록사머, 폴리소르베이트 또는 이들의 조합 중에서 선택하는 0.01 ~ 0.1%(w/v)의 비이온성 계면활성제를 함유하는 것을 특징으로 한다.

[110]

[111] 앞선 구체예 중 어느 하나에 따른 액상 제제로서, 상기 아미노산은 메티오닌 인 것을 특징으로 한다.

[112] 앞선 구체예 중 어느 하나에 따른 액상 제제로서, 상기 메티오닌은 제제 내에 0.01 내지 1 mg/mL의 농도로 존재하는 것을 특징으로 한다.

[113] 앞선 구체예 중 어느 하나에 따른 액상 제제로서, 상기 아미노산은 메티오닌 또는 아르기닌인 것을 특징으로 한다.

[114] 앞선 구체예 중 어느 하나에 따른 액상 제제로서, 상기 메티오닌 또는 아르기닌은 제제 내에 0.01 내지 1 mg/mL의 농도로 존재하는 것을 특징으로 한다.

[115] 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.

[116]

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

[118] 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.

[119] 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.

[120] 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.

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

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

[123] 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.

[124] 본 발명을 구현하는 다른 하나의 양태는 상기 액상 제제의 제조방법이다.

[125] 하나의 구체예로서, 본 발명은 (a) 글루카곤 수용체, GLP-1 수용체, 및 GIP 수용체에 대해 활성을 갖는 펩타이드 및 면역글로불린 Fc 절편이 서로 연결된, 글루카곤 수용체, GLP-1 수용체, 및 GIP 수용체에 대해 활성을 갖는 펩타이드의 지속형 결합체와 (b) i)완충물질 및 ii)당 또는 당알코올을 혼합하는 단계를 포함하는 앞선 구체예 중 어느 하나에 따른 액상 제제인, 지속형 결합체의 액상 제제의 제조 방법 관한 것이다.

[126] 앞선 구체예 중 어느 하나에 따른 방법으로서, 상기 액상제제는 등장화제, 비이온성 계면활성제, 및 아미노산으로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 성분을 더 포함하는 것을 특징으로 한다.

[127]

발명의 실시를 위한 형태

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

[129] 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.

[130]

[131] 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.

[132] 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.

[133] 알라닌 Ala, A 아르기닌 Arg, R

[134] 아스파라긴 Asn, N 아스파르트산 Asp, D

[135] 시스테인 Cys, C 글루탐산 Glu, E

[136] 글루타민 Gln, Q 글리신 Gly, G

[137] 히스티딘 His, H 이소류신 Ile, I

[138] 류신 Leu, L 리신 Lys, K

[139] 메티오닌 Met, M 페닐알라닌 Phe, F

[140] 프롤린 Pro, P 세린 Ser, S

[141] 트레오닌 Thr, T 트립토판 Trp, W

[142] 티로신 Tyr, Y 발린 Val, V

[143]

[144] 본 발명을 구현하는 하나의 양태는 글루카곤, GLP-1 (Glucagon-like peptide-1) 및 GIP (Glucose-dependent insuliontropic polypeptide) 삼중 활성체의 지속형 결합체의 액상 제제를 제공한다.

[145] 구체적으로, 본 발명은 글루카곤 수용체, GLP-1 수용체, 및 GIP 수용체에 대해 활성을 갖는 펩타이드 및 면역글로불린 Fc 절편이 서로 연결된, 글루카곤 수용체, GLP-1 수용체, 및 GIP 수용체에 대해 활성을 갖는 펩타이드의 지속형 결합체를 약리학적 유효량으로 포함하고, 완충물질 및 당알코올, 당, 또는 이들의 조합을 포함하는, 글루카곤 수용체, GLP-1 수용체, 및 GIP 수용체에 대해 활성을 갖는 펩타이드의 지속형 결합체의 액상 제제에 관한 것이다.

[146]

[147] 구체적으로, 본 발명은 하기 화학식 1의 지속형 결합체; 완충 물질; 및 당알코올, 당, 또는 이들의 조합;을 포함하는 액상 제제를 제공한다:

[148] [화학식 1]

[149] Q - La - Z

[150] 상기 화학식 1에서 Q는 하기 일반식 1의 펩타이드이고;

[151] L은 에틸렌글리콜 반복 단위를 함유하는 링커이고;

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

[153] Z는 면역글로불린 Fc 절편이며;

[154] - 는 공유결합을 나타냄:

[155] [일반식 1]

[156] Xaa1-Aib-Xaa3-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Xaa10-Ser-Xaa12-Xaa13-Xaa14-Xaa15-Glu-Xaa17-Xaa18-Xaa19-Lys-Xaa21-Phe-Val-Xaa24-Trp-Leu-Leu-Xaa28-Xaa29-Xaa30-R1 (일반식 1, 서열번호 47)

[157] 상기 일반식 1에서,

[158] 밑줄 친 N-말단으로부터 16번인 글루탐산 (Glu) 및 20번인 리신 (Lys) 잔기 사이에서 락탐 고리가 형성되고,

[159] Xaa1은 히스티딘, 4-이미다조아세틸 (CA), 또는 티로신이고,

[160] Xaa3은 글루탐산 또는 글루타민이고,

[161] Xaa10은 티로신, 또는 시스테인이고,

[162] Xaa12는 리신, 또는 이소류신이며,

[163] Xaa13은 티로신, 알라닌, 또는 시스테인이고,

[164] Xaa14는 류신, 또는 메티오닌이며,

[165] Xaa15는 시스테인, 또는 아스파르트산이며,

[166] Xaa17은 아르기닌, 이소류신, 시스테인, 또는 리신이며,

[167] Xaa18은 알라닌, 아르기닌, 또는 히스티딘이고,

[168] Xaa19는 알라닌, 글루타민, 또는 시스테인이며,

[169] Xaa21은 글루탐산, 또는 아스파르트산이며,

[170] Xaa24는 글루타민, 아스파라긴, 또는 아스파르트산이며,

[171] Xaa28은 알라닌, 아스파라긴, 또는 아스파르트산이며,

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

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

[174] R1은 시스테인, m-Ser-Ser-Gly-Ala-Pro-Pro-Pro-Ser-n (서열번호 48), 또는 m-Ser-Ser-Gly-Gln-Pro-Pro-Pro-Ser-n (서열번호 49)이거나, 부존재하며,

[175] 여기서,

[176] m은 Cys, 또는 Pro 이고,

[177] n은 Cys, 또는 Gly, 이거나, 부존재함.

[178]

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

[180] 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.

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

[182]

[183] 본 발명은 약리 효과를 나타내는 물질인 화학식 1의 지속형 결합체의 특정 농도; pH를 5.0 ~ 7.0의 범위에서 유지하기 위한 분량의 완충 물질; 및 0.5 ~ 10%(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.

[184]

[185] 본 발명의 액상 제제에 포함되는 상기 글루카곤 수용체, GLP-1 수용체, 및 GIP 수용체에 대해 활성을 갖는 펩타이드의 지속형 결합체의 농도는 18 nmol/mL 내지 1840 nmol/mL일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[186] 하나의 구체예로서, 상기 지속형 결합체의 농도는 18 내지 920 nmol/mL일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[187] 본 발명에서 용어, "안정화제"란 제제에서 유효성분 등의 구성 성분을 일정

기간 동안 안정하게 유지시키는 물질을 말한다. 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 이종 단백질을 함유하지 않아서 바이러스 감염의 우려가 적다.

[188] 본 발명에서 상기 안정화제는 특히 글루카곤, GLP-1 및 GIP 삼중 활성체의 지속형 결합체가 안정하게 저장될 수 있도록 하는 물질을 의미한다. 글루카곤, GLP-1 및 GIP 삼중 활성체의 지속형 결합체에 있어서, 저장 안정성은 정확한 투여량을 보장하기 위해서뿐만 아니라, 글루카곤, GLP-1 및 GIP 삼중 활성체 결합체에 대한 항원성 물질의 잠재적인 생성을 억제하기 위해서 중요하다.

[189]

[190] 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.

[191] 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.

[192] 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.

[193] 상기 액상 제제의 pH는 약 5.0 내지 pH 약 7.0, 예컨대 pH 약 5.0 내지 pH 약 6.8, pH 약 5.0 내지 약 6.7, pH 약 5.0 내지 약 6.6, pH 약 5.0 내지 pH 약 6.5, pH 약 5.0 내지 약 6.4, pH 약 5.0 내지 약 6.3, pH 약 5.0 내지 약 6.2, pH 약 5.0 내지 약 6.1, pH 약 5.0 내지 6.0, pH 약 5.0 내지 약 5.9, pH 약 5.0 내지 5.8, pH 약 5.0 내지 약 5.7, pH 약 5.0 내지 약 5.6, pH 약 5.0 내지 약 5.5, pH 약 5.0 내지 약 5.4, pH 약 5.0 내지 약 5.3, pH 약 5.0 내지 약 5.2, 약 5.1 내지 pH 약 7.0, 예컨대 pH 약 5.1 내지 pH 약

6.8, pH 약 5.1 내지 약 6.7, pH 약 5.1 내지 약 6.6, pH 약 5.1 내지 pH 약 6.5, pH 약 5.1 내지 약 6.4, pH 약 5.1 내지 약 6.3, pH 약 5.1 내지 약 6.2, pH 약 5.1 내지 약 6.1, pH 약 5.1 내지 6.0, pH 약 5.1 내지 약 5.9, pH 약 5.1 내지 5.8, pH 약 5.1 내지 약 5.7, pH 약 5.1 내지 약 5.6, pH 약 5.1 내지 약 5.5, pH 약 5.1 내지 약 5.4, pH 약 5.1 내지 약 5.3, pH 약 5.1 내지 약 5.2,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, 6.5, 6.6, 6.7, 6.8, 6.9, 또는 7.0일 수 있으나, 특별히 이에 제한되지 않는다.

[194] 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.

[195]

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

[197] 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.

[198] 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.

[199] 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, GLP-1 및 GIP 삼중 활성체의 지속형 결합체의 안정성을 증대시킬 수 있다. 예컨대, 상기 당알코올은 만니톨 및 소르비톨로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[200] 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 덱스트란 등의 다당류 등을 들 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[201] 하나의 구체예로 상기 당은 글루코스, 프럭토스, 갈락토스, 락토스, 말토스, 수크로스, 또는 이들의 조합일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[202] 예컨대, 상기 당 은 수크로오스 일 수 있으나, 특별히 이에 제한되지 않는다.

[203] 상기 당알코올, 당, 또는 이들의 조합은 액상 제제의 전체 용액 대비 약 0.5 내지 약 20%(w/v), 약 0.5 내지 약 10%(w/v), 약 0.5 내지 약 6 %(w/v), 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 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.

[204] 또한, 특별히 이에 제한되지는 않으나, 상기 액상제제는 등장화제, 비이온성 계면활성제, 및 아미노산으로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 성분을 더 포함할 수 있다.

[205] 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, 및 iii) 등장화제; 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) 등장화제; i)완충물질, ii)당 또는 당알코올, iii) 비이온성 계면활성제, 및 iv) 아미노산; i)완충물질, ii)당 또는 당알코올, iii) 등장화제, 및 iv) 아미노산; 또는 i)완충물질, ii)당 또는 당알코올, iii) 비이온성 계면활성제, iv) 등장화제, 및 v) 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.

[206] 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.

[207] 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.

[208] 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.

[209] 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.

[210] 상기 액상 제제에 추가될 수 있는 선택적 구성요소로서의 안정화제의 일종인 아미노산은 메티오닌, 아르기닌, 글리신, 또는 이들의 조합일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 또한, 상기 아미노산은 L-형태일 수 있으나, 특별히 이에 제한되지 않는다. 상기 아미노산은 메티오닌 또는 아르기닌일 수 있다. 또한, 상기 메티오닌은 L-메티오닌이고, 상기 아르기닌은 L-아르기닌일 수 있으나, 특별히 이에 제한되지 않는다.

[211]

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

[213] 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.

[214]

[215] 하나의 구체예로서, 완충물질 및 당 또는 당알코올을 포함하는 상기 액상 제제는, 등장화제를 포함하거나, 또는 포함하지 않거나, 비이온성 계면활성제, 및 아미노산으로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 성분을 추가적으로 포함하지 않을 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[216] 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.

[217] 이러한 등장화제의 대표적인 예로는 수용성 무기염으로서 염화나트륨, 황산나트륨, 또는 구연산나트륨을 들 수 있으며, 구체적으로는 염화나트륨을 들 수 있으나, 특별히 이에 제한되는 것은 아니다. 이러한 무기염은 상술한 안정화제에 추가로 포함되는 선택적인 성분일 수 있으며, 특별히 이에 제한되지

않는다. 이와 더불어 상술한 안정화제도 등장화제로서 역할을 할 수 있다.

[218] 본 발명에 따른 제제에서 상기 등장화제의 농도는 0 내지 약 200mM, 0 내지 약 150mM, 0 내지 약 100mM, 약 10 내지 약 200mM, 약 10 내지 약 150mM, 약 10 내지 약 100mM, 약 10 내지 약 50mM, 약 20 내지 약 100mM, 약 40 내지 약 110mM, 약 20 내지 약 80mM, 약 20 내지 약 50mM, 약 20 내지 약 30mM, 또는 약 40 내지 약 50mM, 약 40 내지 약 60mM, 약 90 내지 약 110mM일 수 있으나, 특별히 이에 제한되는 것은 아니다.

[219] 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.

[220] 한편, 상기 제제는 추가로 다가알코올을 포함할 수 있으나, 특별히 이에 제한되지 않는다.

[221] 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, 및 iii) 등장화제; 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) 등장화제; i)완충물질, ii)당 또는 당알코올, iii) 비이온성 계면활성제, 및 iv) 아미노산; i)완충물질, ii)당 또는 당알코올, iii) 등장화제, 및 iv) 아미노산; 또는 i)완충물질, ii)당 또는 당알코올, iii) 비이온성 계면활성제, iv) 등장화제, 및 v) 아미노산으로 필수적으로 구성되는 안정화제에 다가알코올을 더 포함할 수 있으나, 특별히 이에 제한되는 것은 아니다.

[222] 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.

[223]

[224] 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 2800nmol/mL, 약 18 내지 약 2757 nmol/mL, 약 18 내지 약 2576 nmol/mL, 약 18 내지 약 2392 nmol/mL, 약 18 내지 약 2208 nmol/mL, 약 18 내지 약 2024 nmol/mL, 약 18 내지 약 1840 nmol/mL, 약 18 내지 약 1656 nmol/mL, 약 18 내지 약 1472 nmol/mL, 약 18 내지 약 1288 nmol/mL, 약 18 내지 약 1104 nmol/mL, 약 18 내지 약 920 nmol/mL, 약 18 내지 약 919 nmol/mL, 약 18 내지 약 828 nmol/mL, 약 18 내지 약 740 nmol/mL, 약 18 내지 약 736 nmol/mL, 약 18 내지 약 644 nmol/mL, 약 18 내지 약 552 nmol/mL, 약 18

내지 약 460 nmol/mL, 약 18 내지 약 368 nmol/mL, 약 18 내지 약 276 nmol/mL, 약 18 내지 약 184 nmol/mL, 약 18 내지 약 92 nmol/mL, 약 90 nmol/mL, 약 552 nmol/mL, 약 90 nmol/mL, 약 600 nmol/mL, 약 450 nmol/mL, 약 600 nmol/mL, 약 500 nmol/mL, 약 600 nmol/mL, 약 530 nmol/mL, 약 580 nmol/mL,약 183 nmol/mL, 약 184 nmol/mL,약 183.79 nmol/mL, 약 183.8 nmol/mL, 약 183 내지 약 276 nmol/mL, 약 183 내지 약 386 nmol/mL, 약 183 내지 약 460 nmol/mL, 약 183 내지 약 552nmol/mL, 약 183 내지 약 560nmol/mL, 약 183 내지 약 644nmol/mL, 약 183 내지 약 736 nmol/mL, 약 183 내지 약 740 nmol/mL, 약 551 nmol/mL,약 552 nmol/mL, 약 551.37 nmol/mL, 약 551.4 nmol/mL, 약 150 내지 약 200 nmol/mL, 약 170 내지 약 200 nmol/mL일 수 있으나, 특별히 이에 제한되는 것은 아니다.

[225]

[226] 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.

[227]

[228] 상기 액상 제제는 하나의 구체예로, 화학식 1의 펩타이드 결합체; 상기 액상 제제의 pH가 5.0 내지 5.5가 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 아르기닌, 글리신, 메티오닌 및 이들의 조합으로 이루어진 군에서 선택하는 안정화제를 함유하는 액상 제제일 수 있다,

[229] 상기 액상 제제는 하나의 구체예로, 90 ~ 552 nmol/mL의 화학식 1의 펩타이드 결합체; 상기 액상 제제의 pH가 5.0 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 ~ 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 아르기닌, 글리신, 메티오닌 및 이들의 조합으로 이루어진 군에서 선택하는 0.01 ~ 1 mg/mL의 안정화제를 함유하는 액상 제제일 수 있다.

[230] 상기 액상 제제는 하나의 구체예로, 90 ~ 552 nmol/mL의 화학식 1의 펩타이드 결합체; 상기 액상 제제의 pH가 5.0 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 아르기닌, 글리신, 메티오닌 및 이들의 조합으로 이루어진 군에서 선택하는 0.01 ~ 1 mg/mL의 안정화제를 함유하는 액상 제제일 수 있다.

[231] 상기 액상 제제는 하나의 구체예로, 90 ~ 552 nmol/mL의 화학식 1의 펩타이드 결합체; 상기 액상 제제의 pH가 5.1 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 아르기닌, 글리신, 메티오닌 및 이들의 조합으로 이루어진 군에서 선택하는 0.01 ~ 1 mg/mL의 안정화제를 함유하는 액상 제제일 수 있다.

[232] 상기 액상 제제는 하나의 구체예로, 90 ~ 552 nmol/mL의 화학식 1의 펩타이드 결합체; 상기 액상 제제의 pH가 5.1 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; 및 4 ~ 10%(w/v)의 당을 함유하는 액상 제제일 수 있다.

[233] 상기 액상 제제는 하나의 구체예로, 90 ~ 552 nmol/mL의 화학식 1의 펩타이드 결합체; 상기 액상 제제의 pH가 5.0 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; 및 4 ~ 10%(w/v)의 당을 함유하는 액상 제제일 수 있다.

[234] 상기 액상 제제는 하나의 구체예로, 90 ~ 552 nmol/mL의 화학식 1의 펩타이드 결합체; 상기 액상 제제의 pH가 5.0 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 아르기닌, 글리신, 메티오닌 및 이들의 조합으로 이루어진 군에서 선택하는 0.01 ~ 1 mg/mL의 안정화제를 함유하는 액상 제제일 수 있다.

[235] 상기 액상 제제는 하나의 구체예로, 90 ~ 552 nmol/mL의 화학식 1의 펩타이드 결합체; 상기 액상 제제의 pH가 5.0 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 계면활성제를 함유하는 액상 제제일 수 있다.

[236] 상기 액상 제제는 하나의 구체예로, 90 ~ 552 nmol/mL의 화학식 1의 펩타이드 결합체; 상기 액상 제제의 pH가 5.0 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; 아르기닌, 글리신, 메티오닌 및 이들의 조합으로 이루어진 군에서 선택하는 0.01 ~ 1 mg/mL의 안정화제; 및 폴록사머, 폴리소르베이트 또는 이들의 조합 중에서 선택하는 0.01 ~ 0.1%(w/v)의 비이온성 계면활성제를 함유하는 액상 제제일 수 있다.

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

[238] 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.

[239]

[240] 한편, 하기에서는 본 발명의 액상 제제에 포함되는 유효성분인 글루카곤 수용체, GLP-1 수용체, 및 GIP 수용체에 대해 활성을 갖는 펩타이드의 지속형 결합체에 대해 보다 구체적으로 설명한다.

[241] 본 발명에서 용어, "글루카곤 수용체, GLP-1 수용체, 및 GIP 수용체에 대해 활성을 갖는 펩타이드의 지속형 결합체"는 본 발명의 액상 제제에 포함되는 유효성분으로서, 약리학적 유효량으로 제제에 포함될 수 있다. 상기 지속형 결합체는 글루카곤 수용체, GLP-1 수용체, 및 GIP 수용체에 대해 활성을 갖는 펩타이드에 면역글로불린 Fc 절편이 연결된 형태일 수 있다.

[242] 상기 결합체는 면역글로불린 Fc 절편이 결합되지 않은 상기 펩타이드에 비하여 증가된 효력의 지속성을 나타낼 수 있으며, 본 발명에서 상기 일반식 1 펩타이드의 화학식 1에 따른 결합체는 "지속형 결합체"로 지칭하며, "지속형 삼중활성체 결합체", “펩타이드 결합체” 또는 “화학식 1의 지속형 결합체”와 혼용될 수 있다.

[243] 하나의 구체예로, 상기 면역글로불린 Fc 절편과 Q는 당쇄화되어 있지 않을 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

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

[245] 본원의 지속형 결합체는 글루카곤 수용체, GLP-1 수용체, 및 GIP 수용체에 대해 활성을 갖는 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.

[246] 하나의 구체예로, 본 발명의 지속형 결합체는 하기 화학식 1의 구조를 가진다.

[247] [화학식 1]

[248] Q - La - Z

[249] 상기 화학식 1에서 Q는 하기 일반식 1의 펩타이드이고;

[250] L은 에틸렌글리콜 반복 단위를 함유하는 링커이고;

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

[252] Z는 면역글로불린 Fc 절편이며;

[253] - 는 공유결합을 나타냄.

[254] 상기 화학식 1의 지속형 결합체의 Q는 글루카곤 수용체, GLP-1 수용체 및 GIP 수용체에 대해 활성을 갖는 펩타이드일 수 있다. "글루카곤 수용체, GLP-1 수용체 및 GIP 수용체에 대해 활성을 갖는 펩타이드"는 글루카곤 수용체, GLP-1 수용체 및 GIP 수용체에 대해 유의한 수준의 활성을 가지는 다양한 물질, 예컨대 다양한 펩타이드를 포함한다.

[255] 특별히 이에 제한되는 것은 아니나, 상기 글루카곤 수용체, GLP-1 수용체 및 GIP 수용체에 대해 유의한 수준의 활성을 가지는 펩타이드로, 본원에서 "삼중활성체"로 혼용될 수 있다.

[256] 보다 구체적으로, 상기 화학식 1의 Q는 글루카곤 수용체, GLP-1 수용체 및 GIP 수용체에 대해 활성을 갖는 펩타이드는 하기 일반식 1의 서열을 포함하는, 글루카곤 수용체, GLP-1 수용체 및 GIP 수용체에 대해 활성을 갖는 펩타이드이다:

[257] [일반식 1]

[258] Xaa1-Aib-Xaa3-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Xaa10-Ser-Xaa12-Xaa13-Xaa14-Xaa15-Glu-Xaa17-Xaa18-Xaa19-Lys-Xaa21-Phe-Val-Xaa24-Trp-Leu-Leu-Xaa28-Xaa29-Xaa30-R1 (일반식 1, 서열번호 47)

[259] 상기 일반식 1에서,

[260] 밑줄 친 N-말단으로부터 16번인 글루탐산 (Glu) 및 20번인 리신 (Lys) 잔기 사이에서 락탐 고리가 형성되고,

[261] Xaa1은 히스티딘, 4-이미다조아세틸 (CA), 또는 티로신이고,

[262] Xaa3은 글루탐산 또는 글루타민이고,

[263] Xaa10은 티로신, 또는 시스테인이고,

[264] Xaa12는 리신, 또는 이소류신이며,

[265] Xaa13은 티로신, 알라닌, 또는 시스테인이고,

[266] Xaa14는 류신, 또는 메티오닌이며,

[267] Xaa15는 시스테인, 또는 아스파르트산이며,

[268] Xaa17은 아르기닌, 이소류신, 시스테인, 또는 리신이며,

[269] Xaa18은 알라닌, 아르기닌, 또는 히스티딘이고,

[270] Xaa19는 알라닌, 글루타민, 또는 시스테인이며,

[271] Xaa21은 글루탐산, 또는 아스파르트산이며,

[272] Xaa24는 글루타민, 아스파라긴, 또는 아스파르트산이며,

[273] Xaa28은 알라닌, 아스파라긴, 또는 아스파르트산이며,

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

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

[276] R1은 시스테인, m-Ser-Ser-Gly-Ala-Pro-Pro-Pro-Ser-n (서열번호 48), 또는 m-Ser-Ser-Gly-Gln-Pro-Pro-Pro-Ser-n (서열번호 49)이거나, 부존재하며,

[277] 여기서,

[278] m은 Cys, 또는 Pro 이고,

[279] n은 Cys, 또는 Gly, 이거나, 부존재함.

[280] 상기 일반식 1의 Aib는 아미노이소부티르산 (aminoisobutyric acid)을 의미한다.

[281] 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.

[282] 상기 펩타이드는 서열번호 1 내지 46 중에서 선택된 아미노산 서열을 포함하는 것, 서열번호 1 내지 46 로 이루어진 군에서 선택된 아미노산 서열로

(필수적으로) 구성된 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[283] 이러한 펩타이드의 예로, 서열번호: 1, 2, 9, 19, 21 내지 27, 30 내지 32, 또는 40 내지 46 로 이루어진 군에서 선택된 아미노산 서열을 포함하거나, 이로 (필수적으로) 구성된 펩타이드를 들 수 있으나, 특별히 이에 제한되는 것은 아니다. 또 하나의 예로, 상기 펩타이드는 서열번호 9. 30 내지 32, 또는 42 내지 46 로 이루어진 군에서 선택된 아미노산 서열을 포함하거나, 이로 (필수적으로) 구성된 펩타이드일 수 있으며, 또는 서열번호 9의 아미노산 서열을 포함하거나, 이로 (필수적으로) 구성된 펩타이드일 수 있으나, 특별히 이에 제한되는 것은 아니다.

[284] 또한, 상기 일반식 1에서 R1은 시스테인, Cys-Ser-Ser-Gly-Gln-Pro-Pro-Pro-Ser (서열번호 50), Pro-Ser-Ser-Gly-Ala-Pro-Pro-Pro-Ser (서열번호 51), Pro-Ser-Ser-Gly-Ala-Pro-Pro-Pro-Ser-Gly (서열번호 52), Pro-Ser-Ser-Gly-Gln-Pro-Pro-Pro-Ser (서열번호 53), 또는 Pro-Ser-Ser-Gly-Gln-Pro-Pro-Pro-Ser-Cys (서열번호 54)이거나, 부존재할 수 있으나, 특별히 이에 제한되는 것은 아니다.

[285] 또한, 상기 글루카곤 수용체, GLP-1 수용체, 및 GIP 수용체에 대해 활성을 갖는 펩타이드는 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.

[286] 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.

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

[288] 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.

[289] 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.

[290] 또한, 본 발명에서 사용된 용어 "용매화물"은 본 발명에 따른 펩타이드 또는

이의 염이 용매 분자와 복합체를 형성한 것을 말한다.

[291] 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.

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

[293] 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.

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

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

[296]

[297] 상기 일반식 1의 펩타이드는 Solid phase 합성법을 통하여 합성될 수 있으며, 재조합 방법으로도 생산 가능하고, 상업적으로 의뢰하여 제조할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[298]

[299] 본 발명에서 용어 "화학식 1의 지속형 결합체"는 본 발명의 액상 제제에 포함되는 유효성분으로서, 약리학적 유효량으로 액상 제제에 포함될 수 있다. 구체적으로, 상기 글루카곤 수용체, GLP-1 수용체 및 GIP 수용체에 대해 활성을 갖는 펩타이드 및 면역글로불린 Fc 영역이 서로 링커로 연결된 형태로, 상기 결합체는 면역글로불린 Fc 영역이 결합되지 않은 글루카곤 수용체, GLP-1 수용체 및 GIP 수용체에 대해 활성을 갖는 펩타이드에 비하여 증가된 효력의 지속성을 나타낼 수 있다.

[300] 또한, 화학식 1의 지속형 결합체에 있어서 글루카곤 수용체, GLP-1 수용체 및 GIP 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.

[301] 또한, 화학식 1의 펩타이드 결합체는 글루카곤 수용체, GLP-1 수용체 및 GIP 수용체에 대해 활성을 갖는 펩타이드인 Q와 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.

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

[303] 상기 화학식 1에서 공유결합으로 L을 통하여 Q와 Z가 서로 결합될 수 있다.

[304] 보다 구체적으로, Q와 L, 및 L과 Z는 공유결합으로 서로 연결될 수 있으며, 이때 상기 결합체는 화학식 1의 순서로, Q, L, 및 Z가 공유결합을 통하여 각각 연결된 결합체일 수 있다.

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

[306]

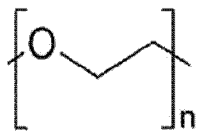
[307] 하나의 구체예로, 상기 화학식 1의 지속형 결합체의 일 구성요소인 La는 에틸렌글리콜 반복 단위를 함유하는 링커로, 예를 들어, 폴리에틸렌 글리콜일 수 있고, 또한, 당해 분야에 이미 알려진 이들의 유도체 및 당해 분야의 기술 수준에서 용이하게 제조할 수 있는 유도체들도 본 발명의 범위에 포함된다.

[308] 상기 에틸렌글리콜 반복 단위를 포함는 링커인 L은, 결합체로 구성되기 이전에는 결합체의 제조에 이용되는 작용기를 말단에 포함하는 것일 수 있다. 본 발명에 따른 지속형 결합체는 상기 작용기를 통해 Q와 Z가 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.

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

[310] [화학식 3]

[311]



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

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

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

[315] 하나의 구체예로 상기 에틸렌글리콜 반복단위는 그 예로, $[OCH_2CH_2]n$로 표시될 수 있으며, n 값은 자연수로 상기 펩타이드 결합체 내의 $[OCH_2CH_2]n$ 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 $[OCH_2CH_2]n$ 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.

[316] 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.

[317] 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.

[318] 보다 구체적으로, 상기 링커의 반응기는 알데히드 그룹, 말레이미드 그룹 및 석시니미드 유도체로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[319] 상기에서, 알데히드 그룹으로 프로피온 알데히드 그룹 또는 부틸 알데히드 그룹을 예로서 들 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[320] 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.

[321] 상기 링커는 상기와 같은 반응기를 통해 면역글로불린 Fc 절편인 Z 및 일반식 1의 펩타이드인 Q에 연결되어, 링커 연결부로 전환될 수 있다.

[322] 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.

[323] 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.

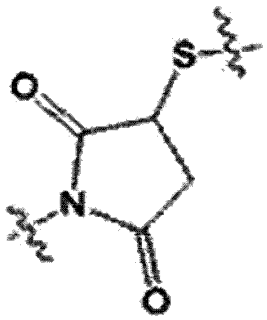
[324] 예를 들어, 한쪽 말단에는 말레이미드 그룹을, 다른 쪽 말단에는 알데히드 그룹, 프로피온 알데히드 그룹 또는 부틸 알데히드 그룹을 가질 수 있다. 또 한 가지 예로, 한쪽 말단에는 석시니미딜 그룹을, 다른 쪽 말단에는 프로피온 알데히드 그룹 또는 부틸 알데히드 그룹을 가질 수 있다.

[325] 프로피온쪽 말단에 하이드록시 반응기를 갖는 폴리에틸렌 글리콜을 링커로 이용하는 경우에는, 공지의 화학반응에 의해 상기 하이드록시기를 상기 다양한 반응기로 활성화하거나, 상업적으로 입수가능한 변형된 반응기를 갖는 폴리에틸렌 글리콜을 이용하여 본 발명의 결합체를 제조할 수 있다.

[326] 하나의 구체적인 실시 형태에서 상기 링커의 반응기가 일반식 1의 펩타이드의 시스테인 잔기, 보다 구체적으로 시스테인의 -SH 기에 연결되는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[327] 만약, 말레이미드-PEG-알데히드를 사용하는 경우, 말레이미드 기는 일반식 1의 펩타이드의 -SH 기와 티오에테르(thioether) 결합으로 연결하고, 알데히드기는 면역글로불린 Fc의 $-NH_2$ 기와 환원적 알킬화 반응을 통해 연결할 수 있으나, 이에 제한되지 않으며, 이는 하나의 일례에 해당한다.

[328] 이와 같은 환원적 알킬화를 통하여 PEG의 한쪽 말단에 위치한 산소 원자에 면역글로불린 Fc 절편의 N-말단 아미노기가 $-CH_2CH_2CH_2-$의 구조를 가지는 링커 작용기를 통해 서로 연결되어, -PEG-O-$CH_2CH_2CH_2$NH-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. 상술한 티오에테르 결합은 의 구조를 포함할 수 있다.



[329] 그러나, 상술한 예에 특별히 제한되는 것은 아니며, 이는 하나의 일례에 해당한다.

[330] 또한, 상기 결합체에서, 링커의 반응기가 면역글로불린 Fc 절편의 N-말단에 위치한 $-NH_2$와 연결된 것일 수 있으나, 이는 하나의 일례에 해당한다.

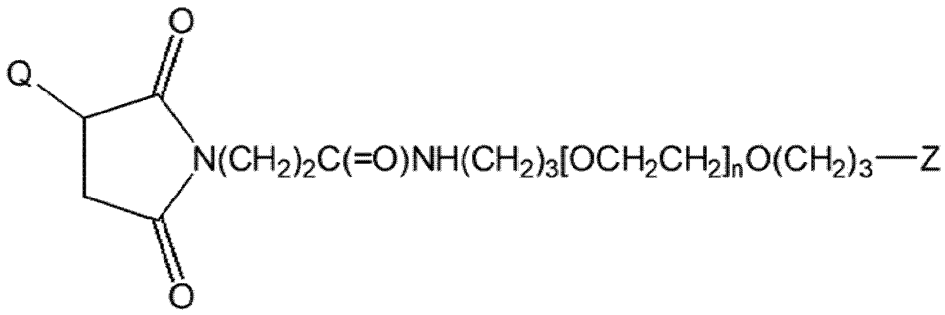
[331] 또한, 상기 결합체에서, 일반식 1의 펩타이드는 반응기를 갖는 링커와 C-말단을 통해 연결될 수 있으나, 이는 하나의 일례에 해당한다.

[332] 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.

[333] 하나의 구체예로, 상기 화학식 1의 결합체는 하기 화학식 2의 구조를 가질 수 있다.

[334] [화학식 2]

[335]



[336] 상기 화학식 2에서 Q는 상기에서 설명한 일반식 1의 펩타이드이고;

[337] Z는 면역글로불린 Fc 절편이며;

[338] n은 자연수일 수 있다. 이때, n에 대한 설명은 상기에서 설명한 바와 같다.

[339]

[340] 하나의 구체예로, 상기 화학식 2의 지속형 결합체는 서열번호 47의 일반식 1의 펩타이드 Q와 면역글로불린 Fc 절편 Z가 에틸렌글리콜 반복부를 개재하여 공유결합으로 연결된 구조로서, 각각 Q는 화학식 2의 숙신이미드 고리에, Z는 화학식 2의 옥시프로필렌기에 연결되는 형태일 수 있다.

[341] 상기 화학식 2에서, 상기 n의 값은 상기 펩타이드 결합체 내 $[OCH_2CH_2]n$ 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.

[342] 상기 펩타이드 결합체의 Q는 글루카곤 수용체, GLP-1 수용체 및 GIP 수용체에 대해 활성을 갖는 펩타이드일 수 있다.

[343] 한 실시 형태에서 화학식 2의 숙신이미드 고리에 Q가 연결되는 부위는 Q의 C-말단 시스테인의 황 원자일 수 있다.

[344]

[345] 상기 화학식 1 또는 2의 Z는 면역글로불린 Fc 절편으로서, 본 명세서에서 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 FcRn에 결합하는 능력을 보유하는 것을 전제로

한다.

[346] 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 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[347]

[348] 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 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[349] 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.

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

[351]

[352] 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.

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

[354]

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

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

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

[358] 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:

[359] Glu-Ser-Lys-Tyr-Gly-Pro-Pro-Cys-Pro-Ser-Cys-Pro(서열번호 55).

[360] 상기 힌지 서열은 서열번호 55의 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 56),
Glu-Ser-Lys-Tyr-Gly-Pro-Pro-Cys-Pro-Ser-Pro (서열번호 57),
Glu-Ser-Lys-Tyr-Gly-Pro-Pro-Cys-Pro-Ser (서열번호 58),
Glu-Ser-Lys-Tyr-Gly-Pro-Pro-Cys-Pro-Pro (서열번호 59),
Lys-Tyr-Gly-Pro-Pro-Cys-Pro-Ser (서열번호 60), Glu-Ser-Lys-Tyr-Gly-Pro-Pro-Cys (서열번호 61), Glu-Lys-Tyr-Gly-Pro-Pro-Cys (서열번호 62),
Glu-Ser-Pro-Ser-Cys-Pro (서열번호 63), Glu-Pro-Ser-Cys-Pro (서열번호 64),
Pro-Ser-Cys-Pro (서열번호 65), Glu-Ser-Lys-Tyr-Gly-Pro-Pro-Ser-Cys-Pro (서열번호 66), Lys-Tyr-Gly-Pro-Pro-Pro-Ser-Cys-Pro (서열번호 67),
Glu-Ser-Lys-Tyr-Gly-Pro-Ser-Cys-Pro (서열번호 68),
Glu-Ser-Lys-Tyr-Gly-Pro-Pro-Cys (서열번호 69), Lys-Tyr-Gly-Pro-Pro-Cys-Pro (서열번호 70), Glu-Ser-Lys-Pro-Ser-Cys-Pro (서열번호 71),
Glu-Ser-Pro-Ser-Cys-Pro (서열번호 72), Glu-Pro-Ser-Cys (서열번호 73),
Ser-Cys-Pro (서열번호 74). 더욱 구체적으로는 상기 힌지 서열은 서열번호 74(Ser-Cys-Pro) 또는 서열번호 65(Pro-Ser-Cys-Pro)의 아미노산 서열을 포함하는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[361] 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.

[362] 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.

[363] 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.

[364] 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.

[365] 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 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.

[366]

[367] 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.

[368] 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.

[369] 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.

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

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

[372] 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 재조합형 면역글로불린 Fc 절편이다.

[373] 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.

[374] 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.

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

[376] 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 IgM유래이며 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.

[377] 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 76의 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.

[378] 상기 화학식 1의 Z는 서열번호 76의 아미노산 서열인 단량체를 포함하는 것일 수 있으며, 상기 Z는 서열번호 76의 아미노산 서열의 단량체의 동종이량체일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[379] 하나의 예로, 면역글로불린 Fc 절편은 서열번호 75의 아미노산 서열 (442개의 아미노산으로 구성됨)을 포함하는 동종이량체일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[380] 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.

[381] 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.

[382] 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.

[383]

[384] 한편, 상기 액상 제제는 대사증후군의 예방 또는 치료를 위한 것일 수 있다.

[385] 본 발명에서 용어 "예방"은 상기 결합체 또는 이를 포함하는 제제의 투여로 대사 증후군의 발병을 억제 또는 지연시키는 모든 행위를 의미하며, "치료"는 상기 결합체 또는 이를 포함하는 제제의 투여로 대사 증후군의 증세가 호전되거나 이롭게 되는 모든 행위를 의미한다.

[386] 본 발명에서 용어 "투여"는 어떠한 적절한 방법으로 환자에게 소정의 물질을 도입하는 것을 의미하며, 상기 조성물의 투여 경로는 특별히 이에 제한되지

않으나, 상기 조성물이 생체 내 표적에 도달할 수 있는 어떠한 일반적인 경로를 통하여 투여될 수 있으며, 예를 들어 복강 내 투여, 정맥 내 투여, 근육 내 투여, 피하 투여, 피 내 투여, 경구 투여, 국소 투여, 비 내 투여, 폐 내 투여, 또는 직장 내 투여 등이 될 수 있다.

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

[388] 구체적으로, 상기 제조방법은 (a) 글루카곤 수용체, GLP-1 수용체, 및 GIP 수용체에 대해 활성을 갖는 펩타이드 및 면역글로불린 Fc 절편이 서로 연결된, 글루카곤 수용체, GLP-1 수용체, 및 GIP 수용체에 대해 활성을 갖는 펩타이드의 지속형 결합체와 (b) i)완충물질 및 ii) 당알코올, 당, 또는 이들의 조합을 포함하는 안정화제를 서로 혼합하는 단계를 포함하는 것일 수 있다.

[389] 한편, 상기 안정화제는 등장화제, 비이온성 계면활성제, 및 아미노산으로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 성분을 더 포함할 수 있으나, 특별히 이에 제한되는 것은 아니다.

[390] 상기 지속형 결합체, 완충물질, 당알코올, 당, 또는 이들의 조합, 등장화제, 비이온성 계면활성제, 아미노산, 및 안정화제에 대해서는 앞서 설명한 바와 같다.

[391] 본 발명을 구현하는 다른 하나의 양태는 상기 액상 제제를 이를 필요로 하는 개체에 투여하는 단계를 포함하는, 대사증후군의 예방 또는 치료 방법을 제공한다.

[392] 상기 액상 제제, 대사증후군, 예방, 및 치료에 대해서는 앞서 설명한 바와 같다.

[393] 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.

[394] 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 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.

[395] 본 발명을 구현하는 다른 하나의 양태는 대사증후군의 예방 또는 치료용 약제의 제조에 있어서, 상기 액상 제제의 용도이다.

[396] 상기 액상 제제, 대사증후군, 예방, 및 치료에 대해서는 앞서 설명한 바와 같다.

[397] 본 발명을 구현하는 다른 하나의 양태는 대사증후군의 예방 또는 치료에 사용하기 위한 상기 액상 제제의 용도이다.

[398] 상기 액상 제제, 대사증후군, 예방, 및 치료에 대해서는 앞서 설명한 바와 같다.

[399]

[400] 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.

[401]

[402] **제조예: 글루카곤, GLP-1 및 GIP 삼중 활성체의 지속형 결합체 제조**

[403] 글루카곤, GLP-1 및 GIP 삼중 활성체의 지속형 결합체를 다음과 같은 방법으로 제조하였다.

[404]

[405] **1-1: 글루카곤, GLP-1 및 GIP 삼중 활성체의 제조**

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

[407] [표1]

서열번호	서열	정보
1	YXQGTFTSDYSKYLDECRAKEFVQWLLDHHPSSGQPPPS	고리형성
2	YXQGTFTSDYSKCLDEKRAKEFVQWLLDHHPSSGQPPPS	고리형성
3	HXQGTFTSDYSKYLDEKAQKEFVQWLLDTC	고리형성
4	HXQGTFTSDYSKYLDEKACKEFVQWLLAQ	고리형성
5	HXQGTFTSDYSKYLDEKACKDFVQWLLDGGPSSGAPPPS	고리형성
6	HXQGTFTSDYSKYLDEKRQKEFVNWLLAQKC	고리형성
7	HXQGTFTSDYSKYLCEKRQKEFVQWLLNGGPSSGAPPPSG	고리형성
8	HXQGTFTSDYSKYLDECRQKEFVQWLLNGGPSSGAPPPSG	고리형

		성
9	YXQGTFTSDYSKYLDEKRAKEFVQWLLDHHPSSGQPPPSC	고리형성
10	YXQGTFTSDYSKYLDEKRAKEFVQWLLDHHCSSGQPPPS	고리형성
11	HXQGTFTSDYSKYLDEKRAKEFVQWLLDHHPSSGQPPPSC	고리형성
12	HXQGTFTSDYSKYLDEKRQKEFVQWLLNTC	고리형성
13	HXQGTFTSDYSKYLDEKRQKEFVQWLLDTC	고리형성
14	HXEGTFTSDYSIAMDEIHQKDFVNWLLAQC	고리형성
15	HXEGTFTSDYSIAMDEIHQKDFVDWLLAEC	고리형성
16	HXQGTFTSDYSIAMDEIHQKDFVNWLLAQC	고리형성
17	HXQGTFTSDYSKYLDEKRQKEFVNWLLAQC	고리형

		성
18	H X Q G T F T S D Y S K Y L D E K R Q K E F V Q W L L N T K C	고리형성
19	Y X Q G T F T S D Y S K Y L D E C A A K E F V Q W L L D H H P S S G Q P P P S	고리형성
20	H X Q G T F T S D Y S K C L D E K R A K E F V Q W L L D H H P S S G Q P P P S	고리형성
21	Y X Q G T F T S D Y S K Y L D E C R A K D F V Q W L L D H H P S S G Q P P P S	고리형성
22	Y X Q G T F T S D Y S K Y L D E C A A K D F V Q W L L D H H P S S G Q P P P S	고리형성
23	Y X Q G T F T S D Y S K C L D E K A A K E F V Q W L L D H H P S S G Q P P P S	고리형성
24	Y X Q G T F T S D Y S K C L D E R A A K E F V Q W L L D H H P S S G Q P P P S	고리형성
25	Y X Q G T F T S D Y S K C L D E K R A K D F V Q W L L D H H P S S G Q P P P S	고리형성
26	Y X Q G T F T S D Y S K Y L D E R A C K D F V Q W L L D H H P S S G Q P P P S	고리형

		성
27	YXQGTFTSDCSKYLDERAAKDFVQWLLDHHPSSGQPPPS	고리형성
28	CAXQGTFTSDYSKYLDECRAKEFVQWLLDHHPSSGQPPPS	고리형성
29	CAXQGTFTSDYSKCLDEKRAKEFVQWLLDHHPSSGQPPPS	고리형성
30	YXQGTFTSDYSKYLDEKAAKEFVQWLLDHHPSSGQPPPSC	고리형성
31	YXQGTFTSDYSKYLDEKRAKDFVQWLLDHHPSSGQPPPSC	고리형성
32	YXQGTFTSDYSKYLDEKAAKDFVQWLLDHHPSSGQPPPSC	고리형성
33	HXQGTFTSDYSKYLDEKRQKEFVQWLLDTKC	고리형성
34	HXEGTFTSDYSIAMDEIHQKDFVNWLLAQKC	고리형성
35	HXEGTFTSDYSIAMDEIHQKDFVDWLLAEKC	고리형

		성
36	CA X E G T F T S D Y S I A M D E I H Q K D F V N W L L A Q C	고리형성
37	CA X Q G T F T S D Y S K Y L D E K R Q K E F V N W L L A Q C	고리형성
38	CA X E G T F T S D Y S I A M D E I H Q K D F V D W L L A E K C	고리형성
39	CA X Q G T F T S D Y S K Y L D E K R Q K E F V N W L L A Q K C	고리형성
40	Y X Q G T F T S D Y S K Y L D E K R A K E F V Q W L L D H C P S S G Q P P P S	고리형성
41	Y X Q G T F T S D Y S K Y L D E K R A K E F V Q W L L D C H P S S G Q P P P S	고리형성
42	Y X Q G T F T S D Y S K A L D E K A A K E F V N W L L D H H P S S G Q P P P S C	고리형성
43	Y X Q G T F T S D Y S K A L D E K A A K D F V N W L L D H H P S S G Q P P P S C	고리형성
44	Y X Q G T F T S D Y S K A L D E K A A K E F V Q W L L D Q H P S S G Q P P P S C	고리형

		성
45	Y X Q G T F T S D Y S K A L D E K A A K E F V N W L L D Q H P S S G Q P P P S C	고리형성
46	Y X Q G T F T S D Y S K A L D E K A A K D F V N W L L D Q H P S S G Q P P P S C	고리형성

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

[409]

[410] **1-2: 삼중 활성체의 *in vitro* 활성 측정**

[411] 상기 1-1에서 제조된 삼중활성체의 활성을 측정하기 위해 GLP-1 수용체, 글루카곤(GCG) 수용체, 및 GIP 수용체가 각각 형질전환된 세포주를 이용하여 *in vitro*에서 세포 활성을 측정하는 방법을 이용하였다.

[412]

[413] 상기 각 세포주는 CHO (chinese hamster ovary)에 인간 GLP-1 수용체, 인간 GCG 수용체 및 인간 GIP 수용체 유전자를 각각 발현하도록 형질 전환된 것으로서, GLP-1, GCG 및 GIP의 활성을 측정하기에 적합하다. 따라서, 각 부분에 대한 활성을 각각의 형질 전환 세포주를 이용하여 측정하였다.

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

[415] 상기 1-1에서 제조된 삼중활성체의 GCG 활성 측정을 위해 인간 GCG을 50nM 부터 4배씩 0.000048nM까지 연속적으로 희석하고, 상기 1-1에서 제조된 삼중활성체를 400nM 부터 4배씩 0.00038nM까지 연속적으로 희석하였다. 상기

배양된 인간 GCG 수용체가 발현된 CHO 세포에서 배양액을 제거하고 연속적으로 희석된 각 물질들을 5㎕씩 상기 세포에 첨가한 다음, cAMP 항체가 포함된 완충액을 5㎕씩 추가 한 뒤 15분 동안 상온에서 배양하였다. 그런 다음 세포용해완충액(cell lysis buffer)이 포함된 detection mix를 10㎕씩 가하여 세포를 용해시키고, 90분 동안 상온에서 반응시켰다. 상기 반응이 완료된 세포용해물을 LANCE cAMP kit (PerkinElmer, USA)에 적용하여 축적된 cAMP를 통해 EC_{50}값을 산출한 후, 상호 비교하였다. 인간 GCG 대비 상대 역가는 하기 표 2에 나타내었다.

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

[417]

[418] [표2]
삼중활성체의 상대적 역가 비율

	천연형 펩타이드 대비In vitro 활성 (%)		
서열번호	vs GLP-1	vs Glucagon	vs GIP
1	17.8	267	22.7
2	20.1	140	59.7
3	142	0.7	0.8
4	135	2.2	2.4
5	151	1.7	8.8
6	19.1	0.92	0.6
7	37.4	0.39	0.2
8	236	6.21	2.2
9	33.9	205.8	7.8
10	12.6	88.4	3.70
11	67.4	50.5	2.7
12	14.4	2.0	0.1
13	44.1	7.5	0.3
14	161	8.4	1.3
15	30.6	1.4	0.1
16	27.1	0.7	2.4
17	57.9	4.9	0.8
18	39.1	2.6	0.2
19	64.6	60.1	92.9
20	95.4	25.2	11.6
21	15.8	172	17.2
22	28.5	46.2	39.8
23	27.9	8.8	107
24	24.3	9.6	62.8
25	15.1	71.3	64.4
26	90.1	12.7	94.7
27	11.5	1.0	1.6

28	22.6	5.4	3.0
29	12.9	0.9	1.0
30	35.1	8.5	18.0
31	10.3	47.6	11.7
32	38.7	12.2	35.5
33	51.0	14.0	0.12
34	41.5	4.9	1.4
35	8.1	0.0	0.1
36	47.3	1.3	0.4
37	28.4	0.4	0.2
38	31.9	16.8	0.3
39	5.7	0.3	0.7
40	34.4	194.8	5.2
41	10.5	62.8	2.6
42	28.1	8.2	47.1
43	20.9	14.9	57.7
44	42.2	12.7	118.5
45	23.2	13.9	40.1
46	23.3	29.5	58.0

[419] 상기에서 제조한 삼중활성체는 GLP-1, GIP 및 글루카곤 수용체에 모두 우수한 효과를 나타내는 것을 확인하였다.

[420]

[421] **1-3: 삼중 활성체의 지속형 결합체 제조**

[422]

[423] 대표적인 삼중활성체로서 서열번호 9번의 펩티드를 사용하여 지속형 결합체를 제조하였다. 삼중활성체와 폴리에틸렌글리콜 링커의 연결체를 제조하기 위하여 양 말단의 수소가 각각 3-(3-말레이미도프로피온아미도)프로필기 및 3-옥소프로필기(프로피온알데히드기)로 치환된 분자량 10 kDa의 선형 개질 폴리에틸렌글리콜인 말레이미드-PEG-알데히드(일본 NOF사)를 상기 삼중활성체의 시스테인 잔기에 반응시킴으로써 삼중활성체를 말레이미드-PEG-알데히드의 말레이미드쪽 말단에 페길화시켰다. 구체적으로, 삼중활성체와 말레이미드-PEG-알데히드의 몰비를 1 : 1 내지 3, 단백질의 농도를 1 내지 5 ㎎/㎖로 하여 저온에서 0.5 내지 3 시간 동안 반응시켰다. 이때, 반응은

50 mM Tris 완충액(pH 7.5)에 20 내지 60% 아이소프로판올이 첨가된 환경 하에서 수행되었다. 반응이 종료된 후, 상기 반응액을 SP 세파로스 HP (GE healthcare, 미국)에 적용하여 시스테인에 모노-페길화된 삼중활성체를 정제하였다.

[424] 면역글로불린 Fc 절편은 N-말단에 Pro-Ser-Cys-Pro 서열의 힌지 영역을 갖는 면역글로불린 Fc 절편(49.8kDa, 서열번호 76의 사슬 두 개가 이황화결합으로 연결된 동종이량체)를 사용하여 국제공개특허 WO2007/021129에 기재된 방법으로 제조하였다.

[425] 다음으로, 상기 정제된 모노-페길화된 삼중활성체와 면역글로불린 Fc을 몰 비를 1 : 1 내지 5, 단백질의 농도를 10 내지 50 ㎎/mL로 하여 4 내지 8℃에서 12 내지 18시간 동안 반응시켰다. 반응은 100 mM 인산칼륨 완충액 (pH 6.0)에 환원제인 10 내지 50 mM 소디움시아노보로하이드라이드와 10 내지 30 % 아이소프로판올이 첨가된 환경 하에서 수행되었다. 반응이 종료된 후, 상기 반응액을 부틸 세파로스 FF 정제컬럼 (GE healthcare, 미국)과 Source ISO 정제컬럼 (GE healthcare, 미국)에 적용하여, 상기 모노-페길화된 삼중활성체의 알데히드쪽 폴리에틸렌글리콜 말단이 면역글로불린 Fc 동종이량체의 두 사슬 중 한 사슬의 N-말단 프롤린 질소에 연결된 삼중활성체의 지속형 결합체를 정제하였다.

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

[427] 여기서, 글루카곤, GLP-1 및 GIP 삼중 활성체 및 면역글로불린 Fc 절편이 PEG를 통하여 연결된 결합체를, '글루카곤, GLP-1 및 GIP 삼중 활성체의 지속형 결합체'로 명명하였다.

[428]

[429] **<u>실시예 1: pH에 따른 글루카곤, GLP-1 및 GIP 삼중 활성체의 지속형 결합체의 안정성 평가</u>**

[430] 완충물질, 당알코올로서 만니톨, 계면활성제로서 폴리소르베이트 20, 그리고 메티오닌으로 이루어진 액상 제제를 기초로 하여 다양한 pH 하에서 글루카곤, GLP-1 및 GIP 삼중 활성체의 지속형 결합체의 안정성을 비교하였다. 비교예로, pH 4.5의 제제를 사용하였다.

[431] 위 제조예에서 얻은 삼중활성체의 지속형 결합체를 하기 표 3과 같은 조성(지속형 결합체 농도는 183.79 nmol/mL)의 액상 제제로 제조하여 25℃에서 6주간 보관 후, 이온교환 크로마토그래피법(Ion Exchange High Performance Liquid Chromatography, IE-HPLC)와 역상 크로마토그래피법(Reverse Phase-High Performance Liquid Chromatography, RP-HPLC)을 이용해 안정성을 분석하였다.

[432] 표 4의 IE-HPLC(%) 및 RP-HPLC(%)는 측정 시점에서의 면적% 값을 보존 시험 초기 면적% 값으로 나눈 비(Area% / Start Area%)의 백분율 수치로서 삼중 활성체의 지속형 결합체의 초기 농도(183.79 nmol/mL 농도)로부터의 잔존율을

나타낸다.

[433]

[434] [표3]

	완충물질	pH	당알코올	등장화제	계면활성제	그 외
비교예	20mM 구연산나트륨	4.5	5% 만니톨	-	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	6.5	5% 만니톨	-	0.02% 폴리소르베이트 20	0.1 mg/mL 메티오닌

[435] [표4]

	IE-HPLC (%)				RP-HPLC (%)			
	초기	2주	4주	6주	초기	2주	4주	6주
비교예	100	93.6	80.2	N/D※	100	95.5	91.6	N/D
#1	100	98.0	95.6	89.9	100	99.8	98.0	95.5
#2	100	96.1	93.1	83.4	100	99.6	96.8	94.0
#3	100	90.1	80.8	64.9	100	98.2	95.4	91.6
#4	100	74.9	54.8	33.9	100	97.8	94.0	89.9

[436] ※ N/D : 단백질 침전으로 분석 불가

[437] 상기 결과에서 보듯이, 구연산나트륨, pH 5.0 조성을 가지는 제제 (#1), 구연산나트륨, pH 5.5 조성을 가지는 제제(#2)에서, 25℃에서 6주간 높은 안정성을 나타냈다. pH 6.0 조성을 가지는 제제 (#3) 및 pH 6.5 조성을 가지는 제제 (#4) 역시 6주간 안정성을 나타냈다. 비교예인 pH 4.5의 조성의 경우에는 6주에서 침전이 일어는 것을 확인할 수 있었다.

[438]

[439] **실시예 2: 당 또는 당알코올 종류에 따른 글루카곤, GLP-1 및 GIP 삼중 활성체의 지속형 결합체의 안정성 평가**

[440] 글루카곤, GLP-1 및 GIP 삼중 활성체의 지속형 결합체의 저장 안정성을

증대시키기 위해 추가로 포함할 수 있는 당 또는 당알코올의 예로는 만노오스, 글루코오스, 푸코오스 및 크실로오스 등의 단당류와 락토오스, 말토오스, 수크로오스, 소르비톨, 라피노오스 및 덱스트란 등의 다당류를 들 수 있다. 그 중 상기 실시예 1에서 확인된 만니톨 및 수크로오스와 소르비톨에 따른 글루카곤, GLP-1 및 GIP 삼중 활성체의 지속형 결합체의 안정성을 비교하였다. 이때 만니톨, 수크로오스 및 소르비톨의 농도는 시판 제형 및 허가기관에서 권고하는 최대 허용범위를 고려하였다.

[441] 위 제조예에서 얻은 삼중활성체의 지속형 결합체를 하기 표 5와 같은 조성(지속형 결합체 농도는 183.79 nmol/mL)의 액상 제제로 제조하여 25℃에서 6주간 보관 후, 이온교환 크로마토그래피법과 역상 크로마토그래피법을 이용해 분석하였다.

[442] 표 6의 IE-HPLC(%) 및 RP-HPLC(%)는 측정 시점에서의 면적% 값을 보존 시험 초기 면적% 값으로 나눈 비(Area% / Start Area%)의 백분율 수치로서 삼중 활성체의 지속형 결합체의 초기 농도(183.79 nmol/mL 농도)로부터의 잔존율을 나타낸다.

[443] [표5]

	완충물질	pH	당 또는 당알코올	등장화제	계면활성제	그 외
#1	20mM 구연산나트륨	5.5	5% 만니톨	-	0.02% 폴리소르베이트 20	0.1 mg/mL 메티오닌
#2	20mM 구연산나트륨	5.5	5% 소르비톨	-	0.02% 폴리소르베이트 20	0.1 mg/mL 메티오닌
#3	20mM 구연산나트륨	5.5	8% 수크로오스	-	0.02% 폴리소르베이트 20	0.1 mg/mL 메티오닌

[444] [표6]

	IE-HPLC (%)				RP-HPLC (%)			
	초기	2주	4주	6주	초기	2주	4주	6주
#1	100	96.1	93.1	83.4	100	99.6	96.8	94.0
#2	100	96.3	92.6	83.3	100	99.7	96.9	94.0
#3	100	96.1	92.5	82.2	100	99.7	97.0	94.0

[445] 상기 결과에서 보듯이, 글루카곤, GLP-1 및 GIP 삼중 활성체의 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.

[446]

[447] **실시예 3: 당 또는 당알코올 농도에 따른 글루카곤, GLP-1 및 GIP 삼중 활성체의 지속형 결합체의 안정성 평가**

[448] 상기 실시예 1 또는 실시예 2에서 확인된 액상 제제의 조성 (구연산나트륨, pH 5.5, 만니톨, 폴리소르베이트 20, 및 메티오닌)에 기초하여 당 또는 당알코올 농도에 따른 글루카곤, GLP-1 및 GIP 삼중 활성체의 지속형 결합체의 안정성을 비교하였다. 이때 함께 추가된 등장화제 농도는 시판 제형 허용범위와 정상 혈장 삼투압을 고려하여 등장화제 농도를 선정하였다.

[449] 위 제조예에서 얻은 삼중활성체의 지속형 결합체를 하기 표 7과 같은 조성(지속형 결합체 농도는 183.79 nmol/mL)의 액상 제제로 제조하여 25℃에서 6주간 보관 후, 이온교환 크로마토그래피법과 역상 크로마토그래피법을 이용해 분석하였다.

[450] 표 8의 IE-HPLC(%) 및 RP-HPLC(%)는 측정 시점에서의 면적% 값을 보존 시험 초기 면적% 값으로 나눈 비(Area% / Start Area%)의 백분율 수치로서 삼중 활성체의 지속형 결합체의 초기 농도(183.79 nmol/mL 농도)로부터의 잔존율을 나타낸다.

[451] [표7]

	완충물질	pH	당알코올	등장화제	계면활성제	그 외
#1	20mM 구연산나트륨	5.5	5% 만니톨	-	0.02% 폴리소르베이트 20	0.1 mg/mL 메티오닌
#2	20mM 구연산나트륨	5.5	3% 만니톨	50mM NaCl	0.02% 폴리소르베이트 20	0.1 mg/mL 메티오닌
#3	20mM 구연산나트륨	5.5	1% 만니톨	100mM NaCl	0.02% 폴리소르베이트 20	0.1 mg/mL 메티오닌

[452] [표8]

	IE-HPLC (%)				RP-HPLC (%)			
	초기	2주	4주	6주	초기	2주	4주	6주
#1	100	95.3	88.0	83.9	100	98.2	94.5	90.8
#2	100	96.1	87.6	84.2	100	97.9	94.1	90.6
#3	100	96.3	87.3	83.9	100	97.8	93.8	88.3

[453] 상기 결과에서 보듯이, 글루카곤, GLP-1 및 GIP 삼중 활성체의 지속형 결합체의 제제에 당알코올 농도가 1% 내지 5% 포함된 경우, 유사한 안정성을 나타냈다.

[454]

[455] **실시예 4: 완충물질 종류에 따른 글루카곤, GLP-1 및 GIP 삼중 활성체의 지속형 결합체의 안정성 평가**

[456] 상기 액상 제제의 조성(구연산나트륨, pH 5.5, 만니톨, 폴리소르베이트 20, 및 메티오닌)를 기초하여 완충물질의 종류에 따른 글루카곤, GLP-1 및 GIP 삼중 활성체의 지속형 결합체의 안정성을 비교하였다.

[457] 위 제조예에서 얻은 삼중활성체의 지속형 결합체를 하기 표 9와 같은 조성(지속형 결합체 농도는 183.79 nmol/mL)의 액상 제제로 제조하여 25℃에서 6주간 보관 후, 이온교환 크로마토그래피법과 역상 크로마토그래피법을 이용해 분석하였다.

[458] 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 삼중 활성체의 지속형 결합체의 초기 농도(183.79 nmol/mL 농도)로부터의 잔존율을 나타낸다.

[459] [표9]

	완충물질	pH	당알코올	등장화제	계면활성제	그 외
#1	20mM 구연산나트륨	5.5	5% 만니톨	-	0.02% 폴리소르베이트 20	0.1 mg/mL 메티오닌
#2	20mM 아세트산나트륨	5.5	5% 만니톨	-	0.02% 폴리소르베이트 20	0.1 mg/mL 메티오닌
#3	20mM 히스티딘	5.5	5% 만니톨	-	0.02% 폴리소르베이트 20	0.1 mg/mL 메티오닌

[460] [표10]

	IE-HPLC (%)				RP-HPLC (%)			
	초기	2주	4주	6주	초기	2주	4주	6주
#1	100	95.3	88.0	83.9	100	98.2	94.5	90.8
#2	100	96.2	87.0	83.8	100	97.8	94.7	91.0
#3	100	95.6	83.2	77.8	100	97.7	93.9	88.3

[461] ※ N/D : 단백질 침전으로 분석 불가

[462] 상기 결과에서 보듯이, 완충물질이 구연산나트륨 (#1) 및 아세트산나트륨 (#2) 일 때, 25℃에서 6주간 높은 안정성을 나타냈다. 또한, 완충물질이 히스티딘 (#3) 일 때도 양호한 안정성을 나타냄을 확인하였다. (도 1a 및 b).

[463]

[464] **실시예 5: 비이온성 계면활성제 종류에 따른 글루카곤, GLP-1 및 GIP 삼중 활성체의 지속형 결합체의 안정성 평가**

[465] 아세트산나트륨, 수크로오스 및 메티오닌 조성의 액상 제제에서 비이온성 계면활성제 종류에 따른 글루카곤, GLP-1 및 GIP 삼중 활성체의 지속형 결합체의 안정성을 비교하였다.

[466] 이때 비이온성 계면활성제로서 폴리소르베이트 20, 폴리소르베이트 80 및 폴록사머 188의 농도는 시판 제형을 고려하였다.

[467] 위 제조예에서 얻은 삼중활성체의 지속형 결합체를 하기 표 11과 같은 조성(지속형 결합체 농도는 183.79 nmol/mL)의 액상 제제로 제조하여 25℃에서 6주간 보관 후, 이온교환 크로마토그래피법과 역상 크로마토그래피법을 이용해 분석하였다.

[468] 표 12의 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 삼중 활성체의 지속형 결합체의 초기 농도(183.79 nmol/mL 농도)로부터의 잔존율을 나타낸다.

[469] [표11]

	완충물질	pH	당	등장화제	계면활성제	그 외
#1	20mM 아세트산나트륨	5.1	8% 수크로오스	-	0.02% 폴리소르베이트 20	0.1 mg/mL 메티오닌
#2	20mM 아세트산나트륨	5.1	8% 수크로오스	-	0.02% 폴리소르베이트 80	0.1 mg/mL 메티오닌
#3	20mM 아세트산나트륨	5.1	8% 수크로오스	-	0.2% 폴록사머 188	0.1 mg/mL 메티오닌

[470] [표12]

	IE-HPLC (%)				RP-HPLC (%)			
	초기	2주	4주	6주	초기	2주	4주	6주
#1	100	97.3	90.8	86.0	100	98.8	97.7	96.3
#2	100	97.5	91.6	87.9	100	99.2	98.5	96.8
#3	100	97.3	91.4	87.8	100	99.1	98.3	96.8

[471] 비이온성 계면활성제로서 폴리소르베이트 20 (#1), 폴리소르베이트 80 (#2) 및 폴록사머 188 (#3)을 각각 포함하는 제제의 경우, 유사한 안정성을 나타냈다.

[472] **실시예 6: 비이온성 계면활성제 및 아미노산 포함 유무에 따른 지속형 글루카곤, GLP-1 및 GIP 삼중 활성체 결합체의 안정성 평가**

[473] 액상 제제가 비이온성 계면활성제 또는 아미노산 안정화제를 포함하거나 포함하지 않을 때 글루카곤, GLP-1 및 GIP 삼중 활성체의 지속형 결합체의 안정성을 비교하였다.

[474] 위 제조예에서 얻은 삼중활성체의 지속형 결합체를 하기 표 13과 같은 조성(지속형 결합체 농도는 183.79 nmol/mL)의 액상 제제로 제조하여 25℃에서 6주간 보관 후, 이온교환 크로마토그래피법과 역상 크로마토그래피법을 이용해 분석하였다.

[475] 표 14의 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 삼중 활성체의 지속형 결합체의 초기 농도(183.79 nmol/mL 농도)로부터의 잔존율을 나타낸다.

[476] [표13]

	완충물질	pH	당	등장화제	계면활성제	그 외
#1	20mM 아세트산나트륨	5.1	8% 수크로오스	-	0.02% 폴리소르베이트 20	0.1 mg/mL 메티오닌
#2	20mM 아세트산나트륨	5.1	8% 수크로오스	-	0.02% 폴리소르베이트 20	-
#3	20mM 아세트산나트륨	5.1	8% 수크로오스	-	-	0.1 mg/mL 메티오닌
#4	20mM 아세트산나트륨	5.1	8% 수크로오스	-	-	-

[477] [표14]

	IE-HPLC (%)				RP-HPLC (%)			
	초기	2주	4주	6주	초기	2주	4주	6주
#1	100	97.3	90.8	86.0	100	98.8	97.7	96.3
#2	100	97.0	91.0	85.8	100	98.6	97.4	96.0
#3	100	97.2	91.0	85.7	100	98.6	97.5	95.7
#4	100	97.5	90.9	84.9	100	99.5	97.5	95.6

[478] 상기 결과에서 보듯이, 비이온성 계면활성제 및 아미노산을 포함하는 제제와 이를 포함하지 않는 제제는 서로 유사한 안정성을 나타냈다.

[479] **실시예 7: 농도에 따른 지속형 글루카곤, GLP-1 및 GIP 삼중 활성체 결합체의 안정성 평가**

[480] 상기 실시예 6의 pH 5.1의 아세트산 나트륨, 수크로오스, 폴리소르베이트 20, 그리고 메티오닌으로 이루어진 액상 제제의 고농도 적용을 위하여 표 15와 같은 농도로 장기 보존 및 가속 안정성을 확인하였다.

[481] 이를 위해 5±3℃ 및 25±2℃에서 보관 후, 이온교환 크로마토그래피법, 역상 크로마토그래피법 및 크기 배제 크로마토그래피법을 이용해 분석하였다. 표 16 및 표 17의 IE-HPLC(%), RP-HPLC(%) 및 SE-HPLC(%)는 측정 시점에서의 면적 백분율 값을 보존 시험 초기 면적 백분율 값으로 나눈 비의 백분율 수치로서 삼중 활성체의 지속형 결합체의 잔존율을 나타낸다.

[482] [표15]

	지속형 결합체 농도	완충물질	pH	당	등장화제	계면활성제	그 외
#1	183.79nmol/mL	20mM 아세트산나트륨	5.1	8% 수크로오스	-	0.02% 폴리소르베이트 20	0.1 mg/mL 메티오닌
#2	551.37 nmol/mL						

[483] [표16]

		장기 보존 안정성 시험 (5±3℃ 보관)			
		초기	1개월	3개월	6개월
IE-HPLC (%)	#1	100	98.8	97.2	95.2
	#2	100	98.5	96.8	94.9
RP-HPLC (%)	#1	100	99.9	99.3	98.7
	#2	100	99.7	99.0	98.6
SE-HPLC (%)	#1	100	99.9	99.7	99.5
	#2	100	99.9	99.7	99.2

[484] [표17]

가속 안정성 시험 (25±2℃ 보관)												
	IE-HPLC (%)				RP-HPLC (%)				SE-HPLC (%)			
	초기	1개월	3개월	6개월	초기	1개월	3개월	6개월	초기	1개월	3개월	6개월
#1	100	90.7	79.3	65.9	100	98.4	97.0	88.7	100	98.9	97.4	95.0
#2	100	90.3	78.4	65.3	100	97.7	96.2	87.3	100	98.7	97.1	93.1

[485] 상기 결과에서 보듯이 장기 보존 안정성 시험 결과, 183.79 내지 551.37 nmol/mL 단백질 농도에서 지속형 글루카곤, GLP-1 및 GIP 삼중 활성체 결합체는 본 발명의 액상제제에서 유사하게 안정한 것을 확인하였다. 즉, 이와 같은 결과는 다양한 농도의 지속형 글루카곤, GLP-1 및 GIP 삼중 활성체 결합체가 본 발명의 액상 제제 조성에서 안정성을 갖고 있음을 시사하는 것이다.

[486] 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.