명세서

발명의 명칭: 신규한 GLP-1, GIP, 및 글루카곤 수용체 모두에 활성을 갖는 삼중 활성체 및 이를 포함하는 비만의 예방 또는 치료용 약학적 조성물

기술분야

[1] 본 발명은 GLP-1, GIP, 및 글루카곤 수용체 모두에 활성을 갖는 삼중 활성체 및 이의 용도에 관한 것이다.

[2]

배경기술

[3] 비만은 현대사회에 들어서 발생되는 대표적인 대사질환 중 하나로서 비만으로 인해 다양한 질환을 초래할 수 있어 전세계적인 건강위협요소로 인식되고 있으며, 질병의 발병에 수반되는 경제적 비용도 급증하는 추세다.

[4] GLP-1 (Glucagon-like peptide-1) 및 GIP (Glucose-dependent insuliontropic polypeptide)는 대표적인 위장 호르몬이자 신경 호르몬으로서 음식물 섭취에 따른 혈중 당 농도 조절에 관여하는 물질이다. GLP-1은 음식물 섭취에 자극을 받아 소장에서 분비되는 호르몬으로 혈당 농도 의존적으로 췌장에서의 인슐린 분비를 촉진하고 글루카곤의 분비를 억제하여 혈당 농도를 낮추는 작용을 돕는다.

[5] 또한, GLP-1과 더불어 음식섭취에 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 보고되었다.

[6] 글루카곤 (Glucagon)은 췌장에서 분비되는 펩타이드 호르몬으로 전술한 두 물질과 함께 혈중 당 농도 조절 작용에 관여한다. 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 상승효과 이외에 동물과 사람에서의 식욕억제 및 지방세포의 호르몬 민감성 리파제 (hormone sensitive lipase)를 활성화시켜 지방 분해를 촉진 및 에너지대사 (energy expenditudre)를 촉진하여 항-비만 효과를 나타냄이 보고되었다.

[7]

[8] 기존에 알려진 GLP-1 수용체, GIP 수용체, 또는 글루카곤 수용체에 대한 단일 작용제에 비해, 효능 증대나 부작용 개선 등을 위해 상기 수용체에 동시에 작용할 수 있는 물질의 필요성이 최근 대두되었고, 본 발명자들은 GLP-1, GIP, 및 글루카곤 수용체에 작용할 수 있는 펩타이드 및 이의 결합체를 개발한 바 있다 (WO2017-116204; WO2017-116205).

[9]

발명의 상세한 설명

기술적 과제

[10] 이미 공지된 삼중 활성체 외에도, 신규한 구조와 서열을 갖는 GLP-1, GIP, 및 글루카곤 수용체 모두에 활성을 갖는 삼중 활성체를 추가로 연구하여 우수한 비만 치료제로 개발하려는 노력이 계속되고 있다.

[11]

과제 해결 수단

[12] 본 발명의 하나의 목적은 GLP-1 (Glucagon-like peptide-1) 수용체, GIP (Glucose-dependent insuliontropic polypeptide) 수용체, 및 글루카곤 수용체에 대해 활성을 갖는 펩타이드를 제공하는 것이다.

[13] 본 발명의 다른 하나의 목적은 상기 펩타이드를 포함하는 비만 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공하는 것이다.

[14] 본 발명의 또 다른 하나의 목적은 상기 펩타이드 또는 약학적 조성물을 필요로 하는 개체에 투여하는 단계를 포함하는 비만 예방 또는 치료 방법을 제공하는 것이다.

[15] 본 발명의 또 다른 하나의 목적은 상기 펩타이드 또는 약학적 조성물의 비만 예방 또는 치료 용도를 제공하는 것이다.

[16] 본 발명의 또 다른 하나의 목적은 비만 예방 또는 치료를 위한 약제를 제공하기 위한 상기 펩타이드 또는 약학적 조성물의 용도를 제공하는 것이다.

[17]

발명의 효과

[18] 본 발명의 GLP-1 (Glucagon-like peptide-1) 수용체, GIP (Glucose-dependent insuliontropic polypeptide) 수용체, 및 글루카곤 수용체에 대해 활성을 갖는 펩타이드는 3개 수용체를 동시에 활성화시킴으로써, 비만에 대한 우수한 예방 또는 치료 효과를 가질 수 있다.

[19]

도면의 간단한 설명

[20] 도 1은 본 발명에 따른 서열번호 1, 2, 및 4의 삼중 활성체의 투여에 따른 체중 변화 및 14일차 약물 투여 직전 대비 체중 변화를 나타낸 도이다.

[21] 도 2는 본 발명에 따른 서열번호 3, 5, 6, 및 7의 삼중 활성체의 투여에 따른 체중 변화 및 14일차 약물 투여 직전 대비 체중 변화를 나타낸 도이다.

[22]

발명의 실시를 위한 최선의 형태

[23] 본 발명의 하나의 양태는 신규한 GLP-1 (Glucagon-like peptide-1) 수용체, GIP (Glucose-dependent insuliontropic polypeptide) 수용체, 및 글루카곤 수용체에 대해 활성을 갖는 펩타이드이다.

[24] 하나의 구체예로서, 상기 펩타이드는 하기 일반식 1로 표시되는 것을 특징으로 한다:

[25] X1-Aib-X3-G-T-F-T-S-D-Y-S-X12-X13-L-D-E- X17-X18-A-K-X21-F-V-Q-W-L-L-D-X29-H-P-S-S-G-Q-P-P-P-S (일반식 1, 서열번호 29)

[26] 상기 일반식 1에서,

[27] X1은 히스티딘 또는 티로신이고;

[28] X3은 글루타민 또는 히스티딘이고;

[29] X12는 라이신 또는 아실화된 아미노산이고;

[30] X13은 알파-메틸-류신(α-methyl-leucine, αMeL), 티로신 또는 알라닌이고;

[31] X17은 라이신 또는 아실화된 아미노산이고;

[32] X18은 알라닌 또는 아르기닌이고;

[33] X21은 아스파르트산 또는 글루탐산이고;

[34] X29는 히스티딘 또는 글루타민이고;

[35] 상기 -은 펩타이드 결합을 나타내고, 상기 펩타이드는 시스테인을 포함하지 않음.

[36] 다른 구체예로서, 상기 펩타이드는

[37] 상기 일반식 1에서,

[38] X13은 티로신이고;

[39] X18은 알라닌인 것을 특징으로 한다.

[40] 또 다른 구체예로서, 상기 펩타이드는

[41] 상기 일반식 1에서,

[42] X1은 티로신이고;

[43] X3은 글루타민이고;

[44] X13은 티로신이고;

[45] X18은 아르기닌인 것을 특징으로 한다.

[46] 또 다른 구체예로서, 상기 펩타이드는

[47] 상기 일반식 1에서,

[48] X3이 히스티딘인 것을 특징으로 한다.

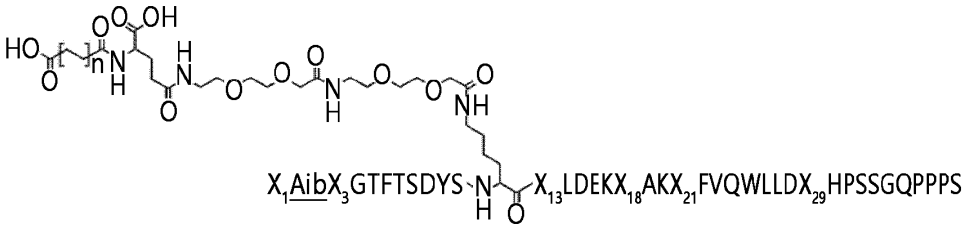
[49] 또 다른 구체예로서, 상기 펩타이드는

[50] 상기 일반식 1에서,

[51] X29는 글루타민인 것을 특징으로 한다.

[52] 또 다른 구체예로서, 상기 펩타이드는 하기 일반식 2의 구조를 갖는 것을 특징으로 한다:

[53] [일반식 2]

[54] 

[55] 상기 일반식 2에서,

[56] 상기 n은 16 또는 18이고,

[57] X1은 히스티딘 또는 티로신이고;

[58] X3은 글루타민 또는 히스티딘이고;

[59] X13은 알파-메틸 류신, 티로신 또는 알라닌이고;

[60] X18은 알라닌 또는 아르기닌이고;

[61] X21은 아스파르트산 또는 글루탐산이고;

[62] X29는 히스티딘 또는 글루타민임.

[63] 앞선 구체예 중 어느 하나에 따른 펩타이드로서, 상기 펩타이드는 천연형 글루카곤 대비 글루카곤 수용체에 대한 상대적 활성에 비해 각각의 천연형 GLP-1 및 GIP 대비 GLP-1 수용체 및 GIP 수용체에 대한 상대적 활성이 높은 것을 특징으로 한다.

[64] 앞선 구체예 중 어느 하나에 따른 펩타이드로서, 상기 펩타이드는 천연형 글루카곤 대비 글루카곤 수용체에 대한 상대적 활성에 비해 각각의 천연형 GLP-1 및 GIP 대비 GLP-1 수용체 및 GIP 수용체에 대한 상대적 활성이 각각 4배 이상인 것을 특징으로 한다.

[65] 앞선 구체예 중 어느 하나에 따른 펩타이드로서, 상기 펩타이드는 펩타이드의 하나 이상의 아미노산에 직접 또는 링커를 통해 아실기가 부착된 것을 특징으로 한다.

[66] 앞선 구체예 중 어느 하나에 따른 펩타이드로서, 상기 링커는 AEEA ((2-(2-aminoethoxy)ethoxy)acetic acid), GABA (4-Aminobutyric acid), Ava (5-Aminovaleric acid), Ahx (Aminohexanoic acid), 트리아졸(Triazole), 및 폴리에틸렌 글리콜(PEG)로 이루어진 그룹에서 선택되는 것을 특징으로 한다.

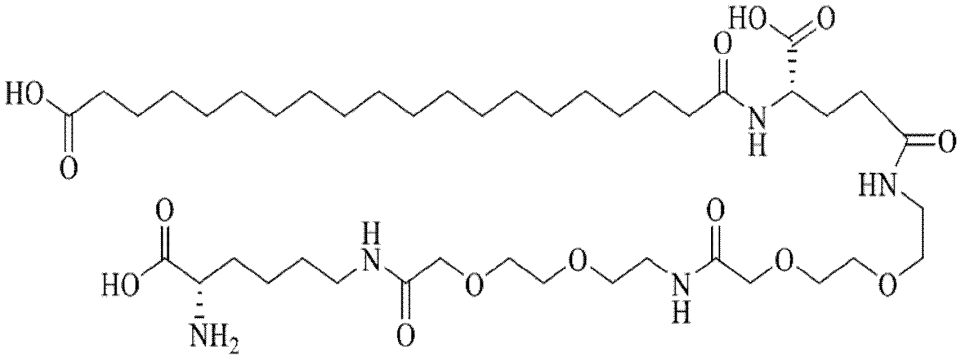
[67] 앞선 구체예 중 어느 하나에 따른 펩타이드로서, 상기 링커는 AEEA ((2-(2-aminoethoxy)ethoxy)acetic acid)를 포함하는 것을 특징으로 한다.

[68] 앞선 구체예 중 어느 하나에 따른 펩타이드로서, 상기 링커는 gammaGlu-$(AEEA)_2$인 것을 특징으로 한다.

[69] 앞선 구체예 중 어느 하나에 따른 펩타이드로서, 상기 링커는 AEEA를 0 내지 3개 포함하고, 상기 AEEA에 gamma-Glutamate가 0 내지 3개 연결되는 것을 특징으로 한다.

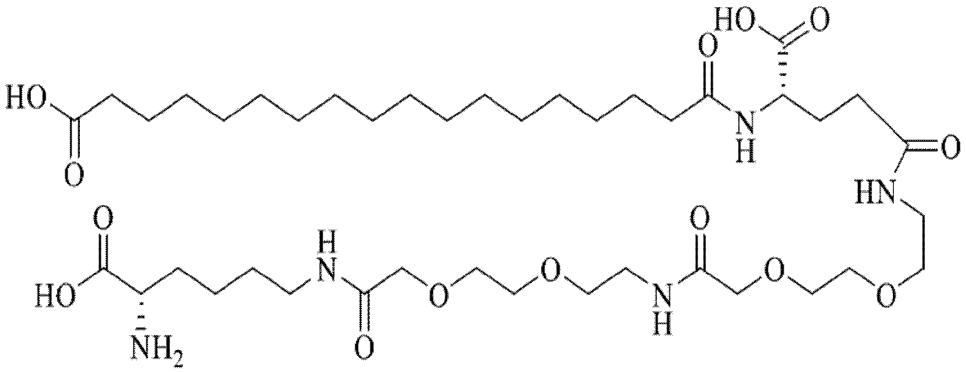
[70] 앞선 구체예 중 어느 하나에 따른 펩타이드로서, 상기 아실화된 아미노산은 하기 K(1) 또는 K(2)로 표시되는 아미노산 중 어느 하나인 것을 특징으로 한다:

[71] [K(1)] C20diacid-gammaGlu-$(AEEA)_2$-Lys



[72]

[73] [K(2)] C18diacid-gammaGlu-$(AEEA)_2$-Lys



[74]

[75] 앞선 구체예 중 어느 하나에 따른 펩타이드로서, 상기 펩타이드는 C-말단이 아미드화된 것을 특징으로 한다.

[76] 앞선 구체예 중 어느 하나에 따른 펩타이드로서, 상기 펩타이드는 1개 또는 2개의 카복실산을 포함한 C1-C30 직쇄 또는 분지쇄 아실기로 아실화된 것을 특징으로 한다.

[77] 앞선 구체예 중 어느 하나에 따른 펩타이드로서, 상기 아실기는 C4 내지 C30 지방산 또는 다이카복실산인 것을 특징으로 한다.

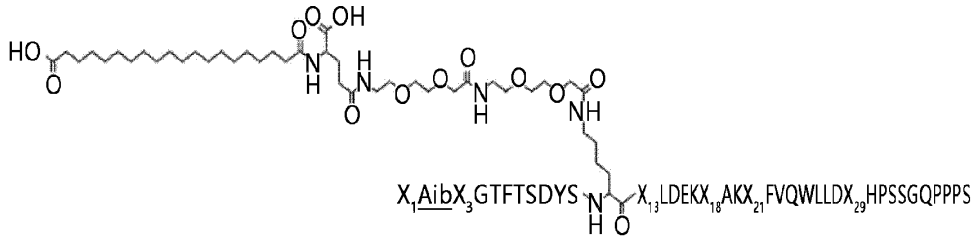
[78] 앞선 구체예 중 어느 하나에 따른 펩타이드로서, 상기 펩타이드는 N-말단 또는 C-말단에 위치한 아미노산 또는 라이신 잔기에 아실화된 것을 특징으로 한다.

[79] 앞선 구체예 중 어느 하나에 따른 펩타이드로서, 상기 펩타이드는 서열번호 1 내지 28의 아미노산 서열로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나의 서열을 포함하는 것을 특징으로 한다.

[80] 앞선 구체예 중 어느 하나에 따른 펩타이드로서, 상기 펩타이드는 N-말단으로부터 16번 아미노산과 20번 아미노산은 서로 고리를 형성하는 것을 특징으로 한다.

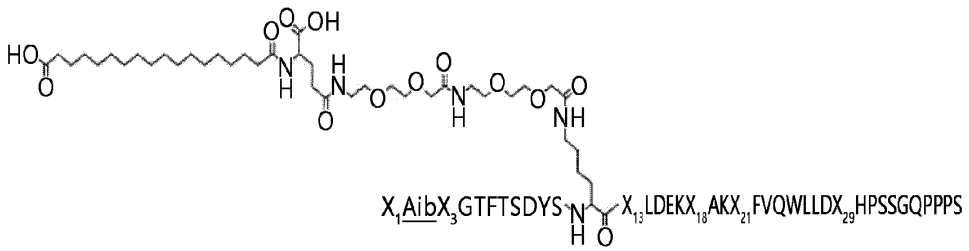
[81] 앞선 구체예 중 어느 하나에 따른 펩타이드로서, 상기 펩타이드는 하기 (i) 내지 (iv)의 구조 중 어느 하나의 구조를 갖는 것을 특징으로 한다:

[82] (i)

[83] 

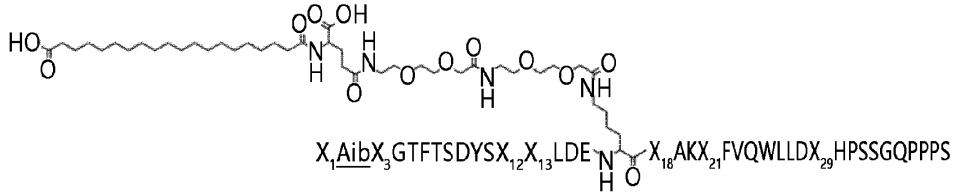
;

[84] (ii)

[85] 

;

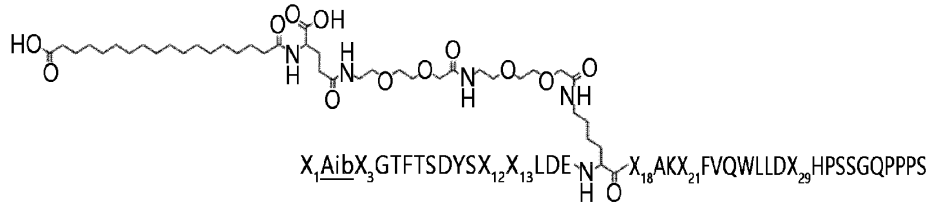
[86] (iii)

[87] 

;

및

[88] (iv)

[89] 

.

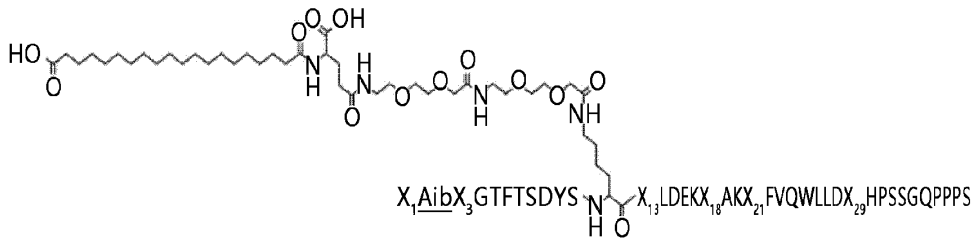
[90] 본 발명의 다른 하나의 양태는 상기 펩타이드를 약학적 유효량으로 포함하는 비만 예방 또는 치료용 약학적 조성물이다.

[91] 하나의 구체예로서, 상기 약학적 조성물은 약학적으로 허용 가능한 담체를 추가로 포함하는 것을 특징으로 한다.

[92] 다른 구체예로서, 상기 약학적 조성물은 투여시 개체의 체중을 감소시키는 것을 특징으로 한다.

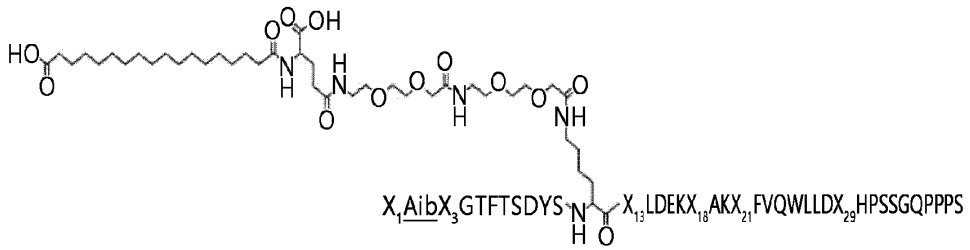
[93] 앞선 구체예 중 어느 하나에 따른 약학적 조성물로서, 상기 약학적 조성물은 하기 (i) 내지 (iv)의 구조 중 어느 하나의 구조를 갖는 펩타이드를 포함하는 것을 특징으로 한다:

[94] (i)

[95] 

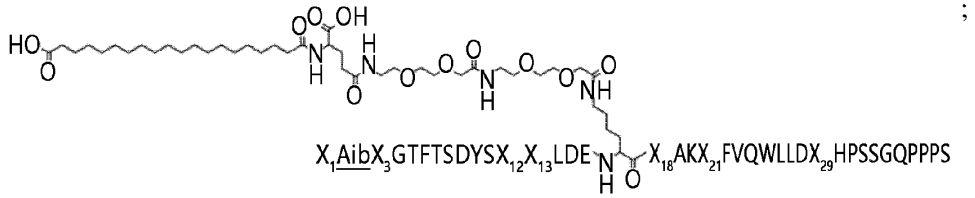
;

[96] (ii)

[97] 

;

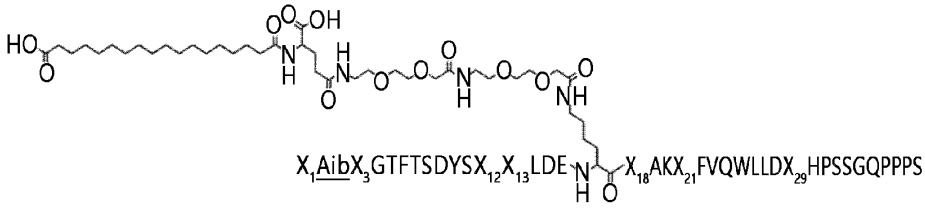
[98] (iii)

[99] 

;

및

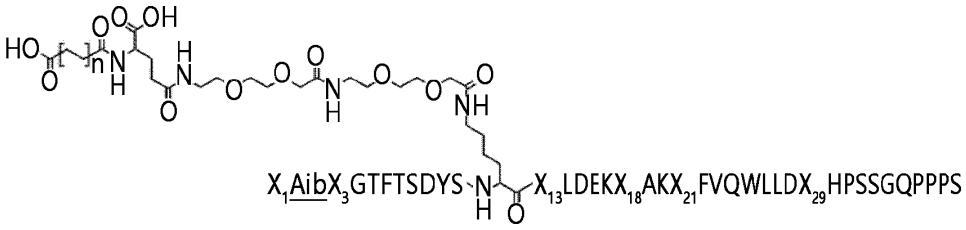
[100] (iv)

[101] 

.

[102] 앞선 구체예 중 어느 하나에 따른 약학적 조성물로서, 상기 약학적 조성물은 하기 일반식 2의 구조를 갖는 펩타이드를 포함하는 것을 특징으로 한다:

[103] [일반식 2]

[104] 

[105] 상기 일반식 2에서,

[106] 상기 n은 16 또는 18이고,

[107] X1은 히스티딘 또는 티로신이고;

[108] X3은 글루타민 또는 히스티딘이고;

[109] X13은 알파-메틸 류신, 티로신 또는 알라닌이고;

[110] X18은 알라닌 또는 아르기닌이고;

[111] X21은 아스파르트산 또는 글루탐산이고;

[112] X29는 히스티딘 또는 글루타민임.

[113] 본 발명의 또 다른 하나의 양태는 상기 펩타이드, 또는 이를 포함하는 조성물의 비만 예방 또는 치료 용도 이다.

[114] 본 발명의 또 다른 하나의 양태는 상기 펩타이드, 또는 이를 포함하는 조성물의 비만 예방 또는 치료를 위한 약제를 제공하기 위한 용도 이다.

[115]

발명의 실시를 위한 형태

[116] 본 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용을 설명하면 다음과 같다. 한편, 본원에서 개시된 각각의 설명 및 실시 형태는 각각의 다른 설명 및 실시 형태에도 적용될 수 있다. 즉, 본원에서 개시된 다양한 요소들의 모든 조합이 본 발명의 범주에 속한다. 또한, 하기 기술되는 구체적인 서술에 의하여 본 발명의 범주가 제한된다고 할 수 없다.

[117]

[118] 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), 알파-메틸-류신(α-methyl-leucine, αMeL) 등과 같은 다른 아미노산에 대해 일반적으로 허용되는 3문자 코드가 사용된다. 또한 본 명세서에서 약어로 언급된 아미노산은 IUPAC-IUB 명명법에 따라 기재되었다.

[119]

[120] 알라닌 A 아르기닌 R

[121] 아스파라긴 N 아스파르트산D

[122] 시스테인 C 글루탐산 E

[123] 글루타민 Q 글리신 G

[124] 히스티딘 H 이소류신 I

[125] 류신 L 라이신 K

[126] 메티오닌 M 페닐알라닌 F

[127] 프롤린 P 세린 S

[128] 트레오닌 T 트립토판 W

[129] 티로신 Y 발린 V

[130]

[131] 본 발명의 하나의 양태는 GLP-1 (Glucagon-like peptide-1) 수용체, GIP (Glucose-dependent insuliontropic polypeptide) 수용체, 및 글루카곤 수용체에 대해 활성을 갖는 펩타이드이다. 상기 GLP-1, GIP, 및 글루카곤 수용체에 대해 활성을 갖는 펩타이드, 또는 펩타이드는 본 발명에서 삼중 활성체로 혼용되어 사용될 수 있다.

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

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

[134] 한편, 본 발명에 따른 삼중 활성체는 하기 i) 내지 iii) 중 하나 이상의 활성, 구체적으로 유의한 활성을 보유하는 것을 특징으로 한다:

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

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

[137] 본 발명에서 용어, "약"은 ±0.5, ±0.4, ±0.3, ±0.2, ±0.1 등을 모두 포함하는 범위로, 약 이란 용어 뒤에 나오는 수치와 동등하거나 유사한 범위의 수치를 모두 포함하나, 이에 제한되지 않는다.

[138] 이와 같은 삼중 활성체의 활성은 당업계에 공지된 방법으로 측정될 수 있으며, 특정한 방법에 제한되지 않는다. 한 예로, 실험예 1에 개시된 것과 같은 방법으로 측정될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[139] 본 발명의 삼중 활성체는 GLP-1, GIP, 및 글루카곤 수용체에 대해 모두 활성을 가지면서도 각 수용체에 대한 상대 활성 간의 비율은 다양하게 나타날 수 있는데, 구체적으로, 본 발명에 따른 삼중 활성체는 천연형 글루카곤 대비 글루카곤 수용체에 대한 상대적 활성에 비해 천연형 GLP-1 및 GIP 대비 GLP-1 수용체 및 GIP 수용체에 대한 상대적 활성이 모두 높은 것일 수 있다. 각 수용체에 대해 나타내는 활성의 정도는 삼중 활성체의 체내 활성과 효능을 결정하는데 중요하며, 본 발명의 삼중 활성체는 GLP-1 및 GIP 수용체에 대해서 높은 활성을 나타내어 비만 등의 치료에 효과적이면서 글루카곤 수용체에 대해서도 동시에 활성을 나타내어 비만 치료에 있어서 상승적 효과를 기대할 수 있다.

[140] 구체적으로, 상기 삼중 활성체는 천연형 글루카곤 대비 글루카곤 수용체에 대한 상대적 활성에 비해 천연형 GLP-1 대비 GLP-1 수용체에 대한 상대적 활성이 각각 4배 이상, 5배 이상, 10배 이상, 15배 이상, 20배 이상, 또는 25배 이상, 또는 30배 이하인 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 또한, 상기 삼중 활성체는 천연형 글루카곤 대비 글루카곤 수용체에 대한 상대적 활성에 비해 천연형 GIP 대비 GIP 수용체에 대한 상대적 활성이 각각 4배 이상, 10배 이상, 또는 15배 이상, 또는 20배 이하인 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[141] 상기 삼중 활성체가 나타내는 천연형 글루카곤 대비 글루카곤 수용체에 대한 상대적 활성(a)을 기준으로, 천연형 GLP-1 대비 GLP-1 수용체에 대한 상대적 활성(b); 및 천연형 GIP 대비 GIP 수용체에 대한 상대적 활성(c) (즉, (b)/(a); 및 (c)/(a))은 각각 독립적으로 서로 다른 비율로 나타날 수 있으며, 보다 구체적으로는 천연형 글루카곤 대비 글루카곤 수용체에 대한 상대적 활성에 비해 천연형 GIP 및 GLP-1 대비 GIP 수용체 및 GLP-1 수용체에 대한 각각의 상대 활성이 높을 수 있다. 이에 제한되지 않으나, 상기 삼중 활성체는 천연형 글루카곤 대비 글루카곤 수용체에 대한 상대적 활성에 비해 각각의 천연형 GIP 및 GLP-1 대비 GIP 수용체 및 GLP-1 수용체에 대한 상대적 활성이 각각 4배 이상일 수 있다.

[142] 구체적인 예로, 서열번호 1, 3, 6, 및 9 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하는 것, 서열번호 1, 3, 6, 및 9 중 어느 하나의 아미노산 서열로 (필수적으로) 구성된 것을 들 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[143]

[144] 또한, 상기 삼중 활성체는 천연형 GLP-1, 천연형 GIP, 및 천연형 글루카곤 중 어느 하나 대비 체내 반감기가 증가된 것일 수 있으나, 특별히 이에 제한되는 것은 아니다. 본 발명의 삼중 활성체는 GLP-1 수용체, GIP 수용체, 및 글루카곤 수용체에 모두 활성을 나타내면서 특히 글루카곤 수용체에 대한 활성이 상대적으로 낮은 특징을 갖고, 동시에, 체내 반감기가 증가되어 약효를 오래 유지할 수 있어 다양한 질환, 예를 들어 비만의 효과적인 치료제로 이용될 수 있다.

[145]

[146] 특별히 이에 제한되는 것은 아니나, 이러한 상기 삼중 활성체는 비자연적으로 발생하는 (non-naturally occurring) 것일 수 있다.

[147]

[148] 하나의 구체적인 양태로서, 상기 삼중 활성체는 하기 일반식 1로 표시된 아미노산 서열을 포함하는, 펩타이드일 수 있다:

[149] X1-Aib-X3-G-T-F-T-S-D-Y-S-X12-X13-L-D-E- X17-X18-A-K-X21-F-V-Q-W-L-L-D-X29-H-P-S-S-G-Q-P-P-P-S (일반식 1, 서열번호 29)

[150] 상기 일반식 1에서,

[151] X1은 히스티딘 또는 티로신이고;

[152] X3은 글루타민 또는 히스티딘이고;

[153] X12는 라이신 또는 아실화된 아미노산이고;

[154] X13은 알파-메틸 류신(α-methyl-leucine, αMeL), 티로신 또는 알라닌이고;

[155] X17은 라이신 또는 아실화된 아미노산이고;

[156] X18은 알라닌 또는 아르기닌이고;

[157] X21은 아스파르트산 또는 글루탐산이고;

[158] X29는 히스티딘 또는 글루타민이고;

[159] 상기 -은 펩타이드 결합을 나타내고, 상기 펩타이드는 시스테인을 포함하지 않음.

[160]

[161] 본 발명에 따른 삼중 활성체의 예로는 서열번호 1 내지 28 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하는 것, 서열번호 1 내지 28 중 어느 하나의 아미노산 서열로 (필수적으로) 구성된 것을 들 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[162]

[163] 보다 구체적으로, 상기 삼중 활성체는 상기 일반식 1에서,

[164] X13은 티로신이고;

[165] X18은 알라닌인 펩타이드일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[166]

[167] 상기 삼중활성체의 예로는 서열번호 1, 3, 6, 및 9 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하는 것, 서열번호 1, 3, 6, 및 9 중 어느 하나의 아미노산 서열로 (필수적으로) 구성된 것을 들 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[168]

[169] 또는, 상기 삼중 활성체는 상기 일반식 1에서,

[170] X1은 티로신이고;

[171] X3은 글루타민이고;

[172] X13은 티로신이고;

[173] X18은 아르기닌인 펩타이드일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다

[174]

[175] 상기 삼중활성체의 예로는 서열번호 2, 4, 7, 및 8 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하는 것, 서열번호 2, 4, 7, 및 8 중 어느 하나의 아미노산 서열로 (필수적으로) 구성된 것을 들 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[176]

[177] 또는, 상기 삼중 활성체는 상기 일반식 1에서,

[178] X29는 글루타민인 펩타이드일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[179]

[180] 상기 삼중활성체의 예로는 서열번호 3, 5, 6, 및 7 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하는 것, 서열번호 3, 5, 6, 및 7 중 어느 하나의 아미노산 서열로 (필수적으로) 구성된 것을 들 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[181]

[182] 또는, 상기 삼중 활성체는 상기 일반식 1에서,

[183] X3이 히스티딘인 펩타이드일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

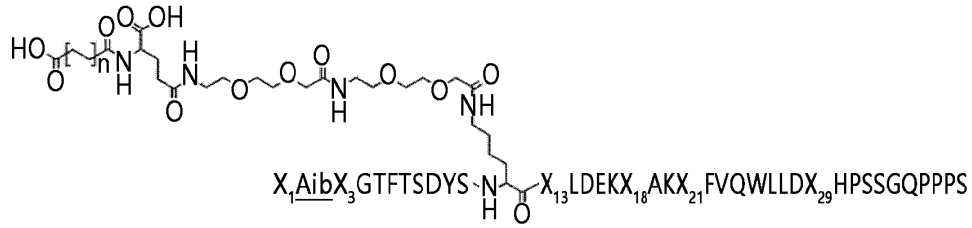
[184]

[185] 상기 삼중활성체의 예로는 서열번호 6의 아미노산 서열을 포함하는 것, 서열번호 6의 아미노산 서열로 (필수적으로) 구성된 것을 들 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[186]

[187] 다른 하나의 구체적인 양태로서, 상기 삼중 활성체는 하기 일반식 2로 표시된 아미노산 서열을 포함하는 펩타이드일 수 있다:

[188] [일반식 2]

[189] 

[190]

[191] 상기 일반식 2에서,

[192] 상기 n은 16 내지 20, 구체적으로는 16 또는 18이고,

[193] X1은 히스티딘 또는 티로신이고;

[194] X3은 글루타민 또는 히스티딘이고;

[195] X13은 알파-메틸 류신, 티로신 또는 알라닌이고;

[196] X18은 알라닌 또는 아르기닌이고;

[197] X21은 아스파르트산 또는 글루탐산이고;

[198] X29는 히스티딘 또는 글루타민임.

[199] 여기에서, 상기 일반식 2로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 펩타이드는 시스테인을 포함하지 않는 것일 수 있다.

[200]

[201] 상기 일반식 2의 펩타이드 부위는 상기 일반식 1의 펩타이드와 동일한 것일 수 있고, 일반식 1에 관한 기술 내용은 일반식 2에도 모두 적용될 수 있다.

[202]

[203] 상기 일반식 2의 삼중 활성체의 한 예로, 16번 및 20번 아미노산인 글루탐산 및 라이신에는 고리, 구체적으로는 락탐 링이 형성된 형태일 수 있으나, 특별히 이에 제한되는 것은 아니다.

[204]

[205] 본 발명에서, 상기 삼중 활성체는 아실화된 펩타이드일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 본 발명에서 삼중 활성체는 아실화되거나, 또는 아실화되지 않은 삼중 활성체를 모두 의미할 수 있다.

[206]

[207] 아실화(acylation)는 펩타이드 약물의 약동학적 및 약력학적 특성을 개선하기 위한 방법으로 알려져 있다. 펩타이드 약물의 경우, 체내 효소 분해로 인해 약효를 발휘하기 어려운 문제점이 있다. 이에, 지방산을 펩타이드에 부착시키는 펩타이드의 아실화를 통해 효소 작용 부위를 차단함으로써 펩타이드 약물의 안정성을 높이고 반감기를 증가시킬 수 있다. 본 발명의 목적상, 본 발명의 삼중 활성체는 반감기 증가를 위해 아실화된 형태일 수 있다. 본 발명의 아실화된 삼중 활성체는 GLP-1 수용체, GIP 수용체, 및 글루카곤 수용체에 모두 활성을 나타내는 동시에 체내 반감기가 증가되어 효과적인 치료제로 이용될 수 있다.

[208]

[209] 본 발명에서, 아실화 여부에 대한 기재 없이 "삼중 활성체" 또는 "펩타이드"로 기재되어 있다 하더라도, 아실화된 형태를 배제하지 않으며, "아실화된 삼중 활성체", "아실화된 펩타이드"와 혼용되어 혼용될 수 있다.

[210]

[211] 본 발명의 아실화된 삼중 활성체는 삼중 활성체 펩타이드의 아미노산에 직접 아실기를 연결시키거나, 또는 링커를 통해 아실기를 부착한 것일 수 있다. 이에 제한되지 않으나, 상기 링커는 AEEA ((2-(2-aminoethoxy)ethoxy)acetic acid), GABA (4-Aminobutyric acid), Ava (5-Aminovaleric acid), Ahx (Aminohexanoic acid), 트리아졸(Triazole), 및 폴리에틸렌 글리콜(PEG)로 이루어진 그룹에서 선택되는 링커일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[212] 구체적인 예로, 상기 링커는 AEEA ((2-(2-aminoethoxy)ethoxy)acetic acid)를 포함하는 것일 수 있고, 더 구체적으로 gamma-Glutamate가 추가로 연결되는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 구체적인 링커의 예로, $(gammaGlu)_m$-$(AEEA)_n$을 들 수 있고, 상기 m 및 n은 각각 독립적으로 0, 1, 2, 3, 또는 그 이상의 정수 일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[213] 다른 예로, 상기 링커는 말레이미드 반응기를 갖는 폴리에틸렌 글리콜(maleimide-PEG)일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[214] 또 다른 예로, 상기 삼중 활성체 펩타이드와 아실기는 클릭 화학 반응을 통해 연결된 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[215] 상기 링커의 아민기, 히드록시기, 티올기 등을 통해 삼중 활성체의 아미노산의 아민기, 히드록시기, 티올기, 카르복실기 등에 아실기를 결합시킬 수 있으나, 아실기를 삼중 활성체에 결합시켜 삼중 활성체의 구조적 안정성 및 반감기 증가에 기여할 수 있다면, 특별한 종류나 길이에 제한되지 않는다. 또한, 상기 링커는 아실기에 공유적으로 결합될 수 있고, 1, 2, 3, 또는 그 이상 반복되어 아실기와 연결될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[216]

[217] 상기 아실기는 임의의 길이를 갖는 탄소쇄일 수 있고, 선형 또는 분지쇄형일 수 있다. 구체적으로, 상기 쇄는 선형 지방족 쇄, 분지형 지방족 쇄, 사이클릭 알킬 모이어티를 함유하는 쇄, 소수성 천연 생성물, 예컨대, 스테로이드, 아르알킬 쇄, 또는 아실 모이어티를 함유하는 알킬 쇄를 포함할 수 있다.

[218] 이에 제한되지 않으나, 상기 아실화된 삼중 활성체는 1개 이상, 2개 이상, 구체적으로는 1개 또는 2개의 카르복실산을 포함하는 C1-C30 직쇄 또는 분지쇄 아실기로 아실화된 것일 수 있고, 한 예로, 상기 아실기는 지방산 또는 다이카복실산, 구체적으로는 C4 내지 C30 지방산 또는 다이카복실산일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 보다 구체적인 예로, C16, C18, C20, C22, C24, C26, C28, 또는 C30의 지방산 또는 다이카복실산일 수 있다. 다른 예의 아실기로는 콜산, 케노데옥시콜산, 데옥시콜산, 리토콜산, 타우로콜산, 글리코콜산, 콜레스테롤산 등의 담즙산, 숙신산 또는 숙신산 유도체, 말레산, 또는 말레산 유도체 등을 들 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[219] 한 구체적인 실시예로, 상기 아실기는 C18 이상의 지방산 또는 지방 이산 또는 그 유도체일 수 있고, 더 구체적으로는 옥타데칸산, 옥타데칸이산, 리놀레산, 리놀렌산, 올레산 등일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[220] 또 다른 구체적인 실시예로, 상기 아실기는 C20 이상의 지방산 또는 지방 이산 또는 그 유도체일 수 있고, 더 구체적으로는 에이코산산, 도코산산, 이코사펜타엔산, 아드렌산 등일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[221]

[222] 본 발명의 아실화된 삼중 활성체는 당업계의 공지된 방법으로 아실기가 삼중 활성체에 부착된 것이거나, 아실화된 아미노산을 사용하여 펩타이드를 합성하여 제조된 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

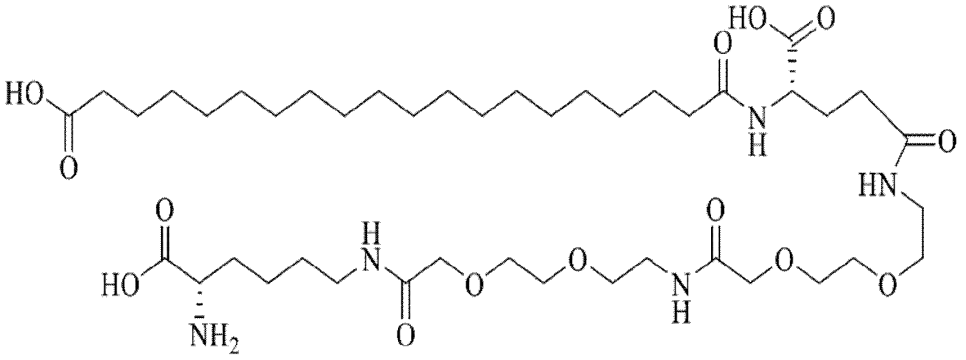
[223]

[224] 본 발명에서, 아실화된 삼중 활성체는 삼중 활성체가 포함하는 아미노산 잔기에 직접 아실기가 부착된 형태일 수 있다. 예를 들어, 에스테르, 티오에스테르, 또는 아미드 결합을 통해 아실기가 부착된 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 구체적으로, 아실화된 삼중 활성체는 아민, 히드록실, 또는 티올기를 갖는 아미노산 잔기에 아실화가 이루어진 것일 수 있다. 예를 들어, 상기 아실화된 삼중 활성체는 N-말단 또는 C-말단에 위치한 아미노산 또는 라이신 잔기에 아실화된 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

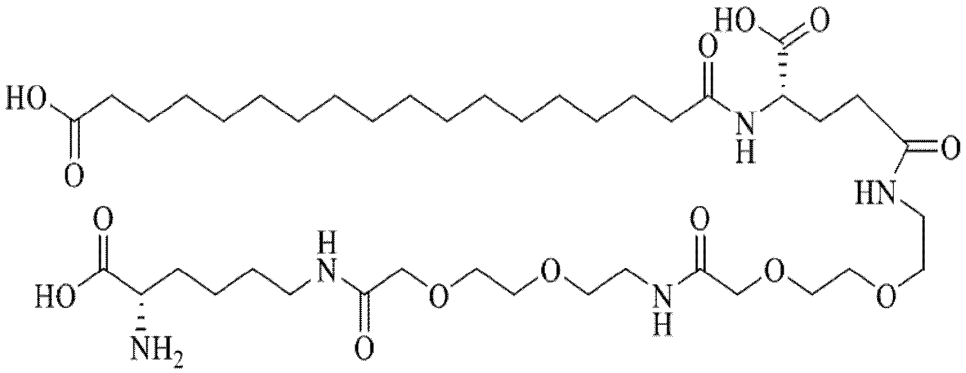
[225]

[226] 본 발명에서, 아실화된 삼중 활성체 또는 일반식 1의 아실화된 아미노산은 하기 K(1) 또는 K(2)로 표시되는 아미노산 중 어느 하나를 포함하는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다:

[227] [K(1)] C20diacid-gammaGlu-$(AEEA)_2$-Lys



[228] [K(2)] C18diacid-gammaGlu-$(AEEA)_2$-Lys



[229]

[230] 상기 아실화된 아미노산은 펩타이드 내 다른 아미노산과 연결된 것일 수 있다. 구체적으로, 상기 K(1) 및 K(2)의 라이신은 카르복실기 및/또는 아미노기를 통해 삼중 활성체의 인접한 다른 아미노산에 연결되고, 측쇄를 통해 링커 및 아실기와 연결될 수 있고, 다른 아미노산에 연결된 형태까지 본 발명의 K(1) 및 K(2)의 범주에 포함됨은 자명하다.

[231] 본 발명의 삼중 활성체는 N-말단으로부터 1 내지 39번째 위치의 아미노산 중 하나 또는 그 이상의 아미노산, 또는 N-말단, 또는 C-말단에 아실화된 형태일 수 있으나, 삼중 활성체로서의 활성을 보유하는 한 아실화의 위치나 아실화된 아미노산의 수는 제한되지 않는다.

[232] 구체적인 예로, 본 발명의 아실화된 삼중 활성체는 12번, 17번, 및 20번 위치 중 어느 하나 이상의 위치에 아실화된 아미노산을 포함하는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[233] 본 발명의 아실화된 삼중 활성체의 일 구체적인 양태로, 12번 위치에 아실화된 아미노산을 포함할 수 있다. 구체적으로, 12번 위치에서 K(1)을 포함할 수 있으며, 보다 구체적으로는 서열번호 1 내지 7 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하는 것일 수 있고, 또는 12번 위치에서 K(2)을 포함할 수 있으며, 보다 구체적으로는 서열번호 8 내지 14 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[234] 본 발명의 아실화된 삼중 활성체의 다른 일 구체적인 실시 양태로, 17번 위치에 아실화된 아미노산을 포함할 수 있다. 구체적으로, 17번 위치에서 K(1)을 포함할 수 있으며, 보다 구체적으로는 서열번호 15 내지 21 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하는 것일 수 있고, 또는 17번 위치에서 K(2)을 포함할 수 있으며, 보다 구체적으로는 서열번호 22 내지 28 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[235]

[236] 다른 하나의 구체적인 양태로서, 상기 삼중활성체는 서열번호 1 내지 28 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하거나, 서열번호 1 내지 28 중 어느 하나의 아미노산 서열로 (필수적으로) 구성된 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[237] 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.

[238]

[239] 또한, 본 발명의 삼중 활성체는 서열번호 1 내지 28의 아미노산 서열과 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 이상의 상동성 또는 동일성을 가지는 아미노산 서열을 포함할 수 있으나, GLP-1 수용체, GIP 수용체, 및 글루카곤 수용체에 작용하여 활성을 나타낼 수 있는 한, 이에 제한되지 않는다.

[240] 본 발명에서 용어, '상동성(homology)' 또는 '동일성(identity)'은 두 개의 주어진 아미노산 서열 또는 염기 서열과 서로 관련된 정도를 의미하며 백분율로 표시될 수 있다.

[241] 보존된(conserved) 폴리펩티드의 서열 상동성 또는 동일성은 표준 배열 알고리즘에 의해 결정되며, 사용되는 프로그램에 의해 확립된 디폴트 갭 페널티가 함께 이용될 수 있다. 실질적으로, 상동성을 갖거나(homologous) 또는 동일한(identical) 서열은 일반적으로 서열 전체 또는 일부분과 중간 또는 높은 엄격한 조건(stringent conditions)에서 하이브리드할 수 있다. 하이브리드화는 폴리뉴클레

오티드에서 일반 코돈 또는 코돈 축퇴성을 고려한 코돈을 함유하는 폴리뉴클레오티드와의 하이브리드화 역시 포함됨이 자명하다.

[242] 용어 상동성 및 동일성은 종종 상호교환적으로 이용될 수 있다.

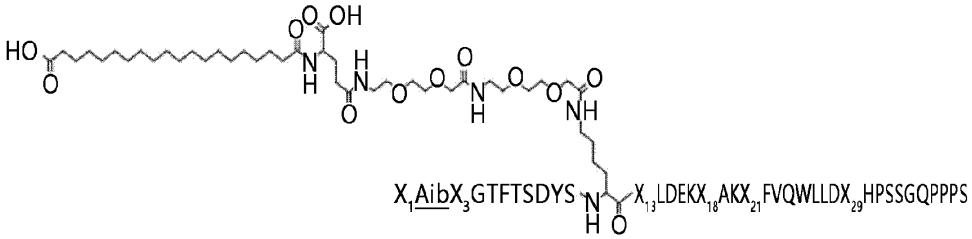
[243] 임의의 두 펩타이드 서열이 상동성, 유사성 또는 동일성을 갖는지 여부는 예를 들어, Pearson et al (1988)[Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85]: 2444에서와 같은 디폴트 파라미터를 이용하여 "FASTA" 프로그램과 같은 공지의 컴퓨터 알고리즘을 이용하여 결정될 수 있다. 또는, EMBOSS 패키지의 니들만 프로그램(EMBOSS: The European Molecular Biology Open Software Suite, Rice et al., 2000, Trends Genet. 16: 276-277)(버전 5.0.0 또는 이후 버전)에서 수행되는 바와 같은, 니들만-운치 (Needleman-Wunsch) 알고리즘(Needleman and Wunsch, 1970, J. Mol. Biol. 48: 443-453)이 사용되어 결정될 수 있다. (GCG 프로그램 패키지 (Devereux, J., et al, Nucleic Acids Research 12: 387 (1984)), BLASTP, BLASTN, FASTA (Atschul, [S.] [F.,] [ET AL, J MOLEC BIOL 215]: 403 (1990); Guide to Huge Computers, Martin J. Bishop, [ED.,] Academic Press, San Diego,1994, 및 [CARILLO ETA/.](1988) SIAM J Applied Math 48: 1073을 포함한다). 예를 들어, 국립 생물공학 정보 데이터베이스 센터의 BLAST, 또는 ClustalW를 이용하여 상동성, 유사성 또는 동일성을 결정할 수 있다.

[244] 펩타이드의 상동성, 유사성 또는 동일성은 예를 들어, Smith and Waterman, Adv. Appl. Math (1981) 2:482에 공지된 대로, 예를 들면, Needleman et al. (1970), J Mol Biol.48: 443과 같은 GAP 컴퓨터 프로그램을 이용하여 서열 정보를 비교함으로써 결정될 수 있다. 요약하면, GAP 프로그램은 두 서열 중 더 짧은 것에서의 기호의 전체 수로, 유사한 배열된 기호(즉, 뉴클레오티드 또는 아미노산)의 수를 나눈 값으로 정의한다. GAP 프로그램을 위한 디폴트 파라미터는 (1) 일진법 비교 매트릭스(동일성을 위해 1 그리고 비-동일성을 위해 0의 값을 함유함) 및 Schwartz and Dayhoff, eds., Atlas Of Protein Sequence And Structure, National Biomedical Research Foundation, pp. 353-358 (1979)에 의해 개시된 대로, Gribskov et al(1986) Nucl. Acids Res. 14: 6745의 가중된 비교 매트릭스 (또는 EDNAFULL(NCBI NUC4.4의 EMBOSS 버전) 치환 매트릭스); (2) 각 갭을 위한 3.0의 페널티 및 각 갭에서 각 기호를 위한 추가의 0.10 페널티 (또는 갭 개방 패널티 10, 갭 연장 패널티 0.5); 및 (3) 말단 갭을 위한 무 페널티를 포함할 수 있다. 따라서, 본 발명에서 사용된 것으로서, 용어 "상동성" 또는 "동일성"은 서열들간의 관련성(relevance)를 나타낸다.

[245]

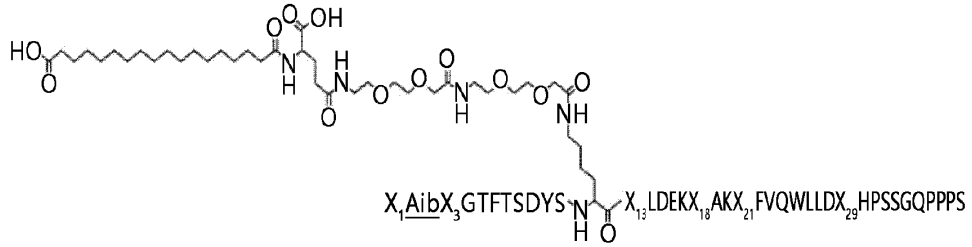
[246] 본 발명의 삼중 활성체의 하나의 구체적인 예로, 상기 삼중 활성체는 하기 (i) 내지 (iv)의 구조 중 어느 하나의 구조를 갖는 펩타이드일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다:

[247] (i)

[248] 

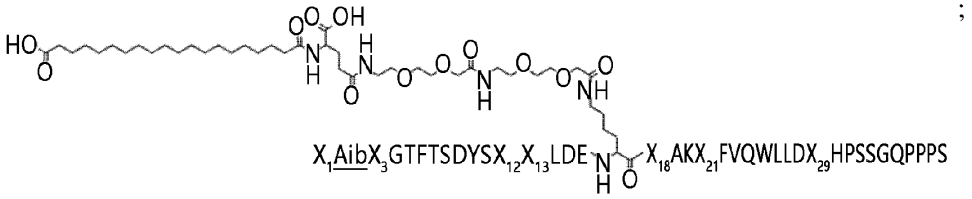
;

[249] (ii)

[250] 

;

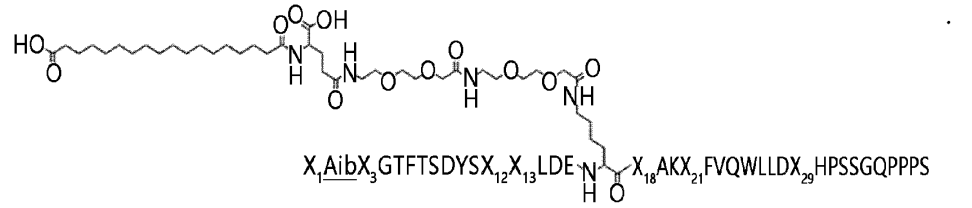
[251] (iii)

[252] 

;

및

[253] (iv)

[254] 

.

[255]

[256] 한편, 본 발명에 따른 삼중 활성체는 펩타이드 내부, 또는 양 말단에 시스테인(또는 이의 유도체)을 포함하지 않고, 시스테인을 제외한 천연형 또는 비천연형 아미노산 잔기로 구성된 것을 특징으로 할 수 있다.

[257]

[258] 또한, 본 발명에 따른 삼중 활성체는 펩타이드의 N-말단 및/또는 C-말단이 변형되지 않은 것일 수 있으나, 생체 내의 단백질 절단 효소들로부터 보호하고 안정성을 증가시키기 위하여 이의 N-말단 및/또는 C-말단 등이 화학적으로 수식되거나 유기단으로 보호되거나, 또는 펩타이드 말단 등에 아미노산이 추가되어 변형된 형태 역시 본 발명의 범주에 포함된다.

[259] 특히, 화학적으로 합성한 펩타이드의 경우, N- 및 C-말단이 전하를 띠고 있기 때문에, 이러한 전하를 제거하기 위하여 N-말단을 아세틸화 (acetylation) 및/또는 C-말단을 아미드화 (amidation)할 수 있으나, 특별히 이에 제한되지는 않는다.

[260] 본 발명에 따른 삼중 활성체는 C-말단이 변형되지 않은 것이거나, 또는 C-말단이 아미드화된 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[261]

[262] 한편, 본 발명의 삼중 활성체는 분자 내 가교 (intramolecular bridge)를 포함할 수 있으며 (예컨대, 공유결합적 가교 또는 비공유결합적 가교), 구체적으로 고리를 포함하는 형태일 수 있으며, 예컨대 삼중 활성체의 16번 및 20번 아미노산 사이, 및/또는 17번 및 21번 아미노산 사이에 고리가 형성된 형태일 수 있으나, 특별히 이에 제한되는 것은 아니다.

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

[264] 본 발명의 삼중 활성체는 고리를 포함하도록, 목적하는 위치에 고리를 형성할 수 있는 아미노산을 포함하도록 변형된 것을 모두 포함한다.

[265] 예컨대, 본 발명의 삼중 활성체는 16번 및 20번 아미노산 쌍 및/또는 17번 20번 아미노산 쌍이 고리를 형성할 수 있는 글루탐산 또는 리신을 가질 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

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

[267]

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

[269] 구체적으로, 상기 삼중 활성체의 아미노산 서열 중 두 번째 아미노산 서열의 치환을 통해 분해효소의 인식 작용을 회피하여 체내 반감기를 증가시킨 펩타이드일 수 있으나, 체내 분해 효소의 인식 작용을 회피하기 위한 아미노산 치환 또는 변경은 제한 없이 포함된다.

[270]

[271] 또한, 본 발명의 삼중 활성체는 L-형 혹은 D-형 아미노산, 및/또는 비-천연형 아미노산을 이용한 변형; 및/또는 천연형 서열을 개질, 예를 들어 측쇄 작용기의 변형, 분자 내 공유결합, 예컨대, 측쇄 간 고리 형성, 메틸화, 아실화, 유비퀴틴화, 인산화, 아미노헥산화, 바이오틴화 등과 같이 개질함으로써 변형된 것을 모두 포함할 수 있다.

[272] 또한, 본 발명의 삼중 활성체의 아미노 및/또는 카르복시 말단에 하나 또는 그 이상의 아미노산이 추가된 것을 모두 포함할 수 있다.

[273] 상기 치환되거나 추가되는 아미노산은 인간 단백질에서 통상적으로 관찰되는 20개의 아미노산뿐만 아니라 비정형 또는 비-자연적 발생 아미노산을 사용할 수

있다. 비정형 아미노산의 상업적 출처에는 Sigma-Aldrich, ChemPep과 Genzyme pharmaceuticals가 포함된다. 이러한 아미노산이 포함된 펩타이드와 정형적인 펩타이드 서열은 상업화된 펩타이드 합성 회사, 예를 들어 미국의 American peptide company나 Bachem, 또는 한국의 Anygen을 통해 합성 및 구매 가능하다.

[274] 아미노산 유도체도 마찬가지 방식으로 입수할 수 있는데, 그 예를 일부만 들자면 4-이미다조아세트산 (4-imidazoacetic acid), 또는 알파-메틸-류신(αMeL) 등을 사용할 수 있다.

[275]

[276] 본 명세서에서 따로 가리키는 바가 없으면, 본 발명에 따른 삼중 활성체에 대한 발명의 설명이나 청구 범위의 기술은 해당 삼중 활성체는 물론이고, 해당 펩타이드 (삼중 활성체)의 염(예컨대, 상기 펩타이드의 약학적으로 허용가능한 염), 또는 이의 용매화물의 형태를 모두 포함하는 범주에도 적용된다. 따라서 명세서의 해당 기재 내용은 그 특정 염, 그 특정 용매화물, 그 특정 염의 특정 용매화물에도 마찬가지로 적용된다. 이러한 염 형태는 예를 들어 약학적으로 허용되는 임의의 염을 사용한 형태일 수 있다. 상기 염의 종류는 특별히 제한되지는 않는다. 다만, 개체, 예컨대 포유류에게 안전하고 효과적인 형태인 것이 바람직하나, 특별히 이에 제한되는 것은 아니다.

[277] 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.

[278] 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.

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

[280]

[281] 본 발명의 삼중 활성체는 그 길이에 따라 이 분야에서 잘 알려진 방법, 예를 들어 자동 펩타이드 합성기에 의해 합성할 수 있으며, 유전자 조작 기술에 의하여 생산할 수도 있다.

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

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

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

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

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

[287]

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

[289]

[290] 본 발명을 구현하기 위한 다른 하나의 양태는 상기 삼중 활성체를 코딩하는 폴리뉴클레오티드, 상기 폴리뉴클레오티드를 포함하는 재조합 발현 벡터, 및 상기 폴리뉴클레오티드 또는 재조합 발현 벡터를 포함하는 형질전환체를 제공한다.

[291] 상기 삼중 활성체에 대해서는 앞서 설명한 바와 같다.

[292] 또한, 상기 삼중 활성체를 코딩하는 분리된 폴리뉴클레오티드는 해당 서열과 75% 이상, 구체적으로는 85% 이상, 보다 구체적으로는 90% 이상, 더욱 구체적으로는 95% 이상의 서열 동일성을 가지는 폴리뉴클레오티드 서열을 본 발명의 범주에 포함한다.

[293] 용어 "상동성"이란 야생형(wild type) 아미노산 서열 및 야생형 핵산 서열과의 유사한 정도를 나타내기 위한 것으로서, 상동성의 비교는 육안으로나 구입이 용이한 비교 프로그램을 이용하여 수행한다. 시판되는 컴퓨터 프로그램은 2개 이상의 서열간의 상동성을 백분율(%)로 계산할 수 있다. 상동성(%)은 인접한 서열에 대해 계산될 수 있다.

[294] 본 발명에서 용어 "재조합 벡터"는 적합한 숙주 내에서 목적 펩타이드를 발현시킬 수 있도록 목적 펩타이드가 적합한 조절 서열에 작동 가능하게 연결된 DNA 제조물을 의미한다. 상기 벡터는 상기 폴리뉴클레오티드를 숙주세포에서 발현시키기 위한 발현 벡터일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[295] 본 발명의 벡터는 적합한 숙주 내에서 목적 펩타이드를 발현시킬 수 있도록 적합한 발현조절영역(또는 발현 조절 서열)에 작동 가능하게 연결된 상기 목적 펩타이드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드의 염기서열을 포함하는 DNA 제조물을 포함할 수 있다.

[296] 상기 조절 서열은 전사를 개시할 수 있는 프로모터, 그러한 전사를 조절하기 위한 임의의 오퍼레이터 서열, 적합한 mRNA 리보좀 결합부위를 코딩하는 서열, 및 전사 및 해독의 종결을 조절하는 서열을 포함한다. 재조합 벡터는 적당한 숙주세포 내로 형질전환된 후, 숙주 게놈과 무관하게 복제되거나 기능할 수 있으며, 게놈 그 자체에 통합될 수 있다.

[297] 본 발명에서 사용되는 재조합 벡터는 숙주세포 내에서 복제 가능한 것이면 특별히 한정되지 않으며, 당업계에 알려진 임의의 벡터를 이용하여 제작될 수 있다. 통상 사용되는 벡터의 예로는 천연 상태이거나 재조합된 상태의 플라스미드, 코스미드, 바이러스 및 박테리오파지를 들 수 있다. 본 발명에서 사용 가능한 벡터는 특별히 제한되는 것이 아니며 공지된 발현 벡터를 사용할 수 있다.

[298] 상기 재조합 벡터는 본 발명의 삼중 활성체를 생산하기 위해 숙주세포를 형질전환시키는데 사용된다. 또한 본 발명의 일부인, 이러한 형질전환 세포는 본 발명의 핵산 단편 및 벡터의 증식에 사용되거나, 본 발명의 삼중 활성체의 재조합 생산에 사용된 배양된 세포 또는 세포주일 수 있다.

[299] 본 발명에서 용어 "형질전환"은 표적 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 재조합 벡터를 숙주세포 내에 도입하여 숙주세포 내에서 상기 폴리뉴클레오티드가 코딩하는 단백질이 발현할 수 있도록 하는 것을 의미한다. 형질전환된 폴리뉴클레오티드가 숙주세포 내에서 발현될 수 있기만 한다면, 숙주세포의 염색체 내에 삽입되어 위치하거나 염색체 외에 위치하거나 상관없이 이들 모두를 포함한다.

[300] 또한, 상기 폴리뉴클레오티드는 표적 단백질을 코딩하는 DNA 및 RNA를 포함한다. 상기 폴리뉴클레오티드는 숙주세포 내로 도입되어 발현될 수 있는 것이면, 어떠한 형태로 도입되는 것이든 상관없다. 예를 들면, 상기 폴리뉴클레오티드는 자체적으로 발현되는데 필요한 모든 요소를 포함하는 유전자 구조체인 발현 카세트(expression cassette)의 형태로 숙주세포에 도입될 수 있다. 상기 발현 카세트는 통상 상기 폴리뉴클레오티드에 작동 가능하게 연결되어 있는 프로모터(promoter), 전사 종결신호, 리보좀 결합부위 및 번역 종결신호를 포함할 수 있다. 상기 발현 카세트는 자체 복제가 가능한 발현벡터 형태일 수 있다. 또한, 상기 폴리뉴클레오티드는 그 자체의 형태로 숙주세포에 도입되어, 숙주세포에서 발현에 필요한 서열과 작동 가능하게 연결되어 있는 것일 수도 있으며, 이에 한정되지 않는다.

[301] 또한, 상기에서 용어 "작동 가능하게 연결"된 것이란 본 발명에서 목적하는 펩타이드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드의 전사를 개시 및 매개하도록 하는 프로모터 서열과 상기 유전자 서열이 기능적으로 연결되어 있는 것을 의미한다.

[302] 본 발명에 적합한 숙주는 본 발명의 폴리뉴클레오티드를 발현하도록 하는 한 특별히 제한되지 않는다. 본 발명에 사용될 수 있는 숙주의 특정한 예로는 대장균(*E. coli*)과 같은 에스케리키아(*Escherichia*) 속 세균; 바실러스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*)와 같은 바실러스(*Bacillus*) 속 세균; 슈도모나스 푸티다(*Pseudomonas putida*)와 같은 슈도모나스(*Pseudomonas*) 속 세균; 피키아 파스토리스(*Pichia pastoris*), 사카로마이세스 세레비지애(*Saccharomyces cerevisiae*), 스키조사카로마이세스 폼베(*Schizosaccharomyces pombe*)와 같은 효모; 스포도프테라 프루기페르다(Sf9)와 같은 곤충세포; 및 CHO, COS, BSC 등과 같은 동물세포가 있다.

[303]

[304] 본 발명의 구현하는 다른 양태는 상기 삼중 활성체를 제조하는 방법을 제공한다.

[305] 상기 삼중 활성체에 대해서는 앞서 설명한 바와 같다.

[306] 또한, 본 발명의 삼중 활성체는 그 길이에 따라 이 분야에서 잘 알려진 방법, 예를 들어 자동 펩타이드 합성기에 의해 합성할 수 있으며, 유전자 조작 기술에 의하여 생산할 수도 있다.

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

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

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

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

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

[312] 보다 구체적인 예로, 유전자 조작을 통하여, 융합파트너 및 삼중 활성체를 포함하는 융합 단백질을 코딩하는 융합 유전자를 제조하고 이를 숙주 세포에 형질전환시킨 후, 융합 단백질 형태로 발현하고, 단백질 분해효소 또는 화합물을 이용하여 융합 단백질로부터 펩타이드를 절단, 분리하여 원하는 펩타이드를 생산할 수 있다. 이를 위하여 예를 들어 Factor Xa나 엔테로키나제와 같은 단백질 분해효소, CNBr 또는 하이드록실아민과 같은 화합물에 의해 절단될 수 있는 아미노산 잔기를 코딩하는 DNA 서열을 융합파트너와 펩타이드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드 사이에 삽입할 수 있다.

[313]

[314] 본 발명을 구현하는 다른 양태는 상기 삼중 활성체를 포함하는 조성물을 제공한다.

[315] 상기 삼중 활성체에 대해서는 앞서 설명한 바와 같다.

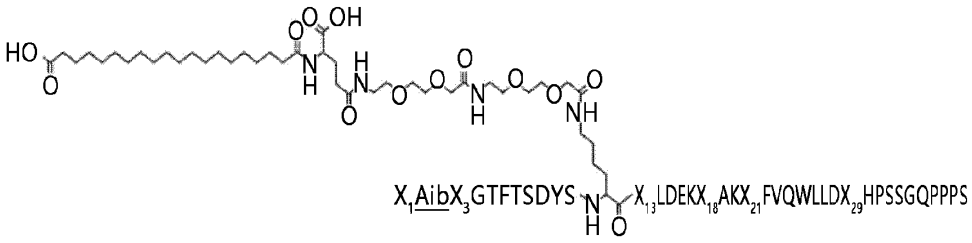
[316] 구체적으로, 상기 조성물은 약학적 조성물일 수 있으며, 보다 구체적으로 상기 조성물은 비만의 예방 또는 치료에 사용될 수 있다.

[317] 본 발명의 구체적인 일 양태는 상기 삼중 활성체를 약학적 유효량으로 포함하는 비만 치료 또는 예방용 약학적 조성물이다. 상기 조성물에 포함되는 삼중 활성체는 아실화된 형태도 포함할 수 있다.

[318] 상기 조성물에 포함되는 삼중 활성체의 하나의 예로, 서열번호 1 내지 28의 아미노산 서열 중 어느 하나를 포함하는 펩타이드를 들 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

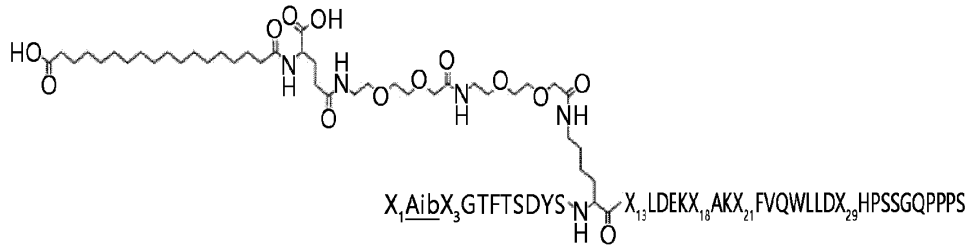
[319] 상기 조성물에 포함되는 삼중 활성체의 다른 하나의 예로, 하기 (i) 내지 (iv)의 구조 중 어느 하나의 구조를 갖는 펩타이드를 들 수 있으나, 이에 제한되지 않는다:

[320] (i)

[321] 

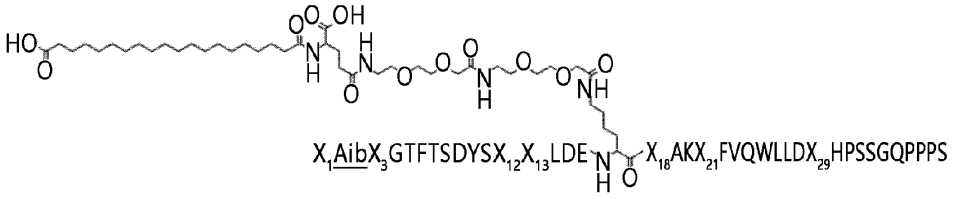
;

[322] (ii)

[323] 

;

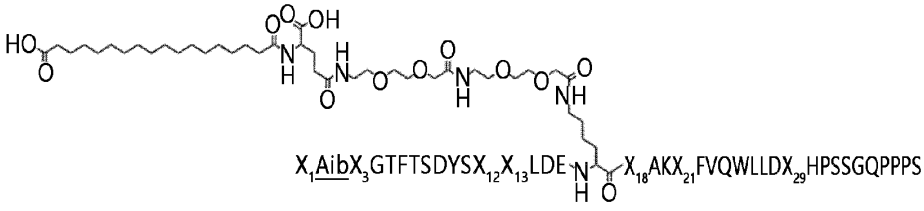
[324] (iii)

[325] 

;

및

[326] (iv)

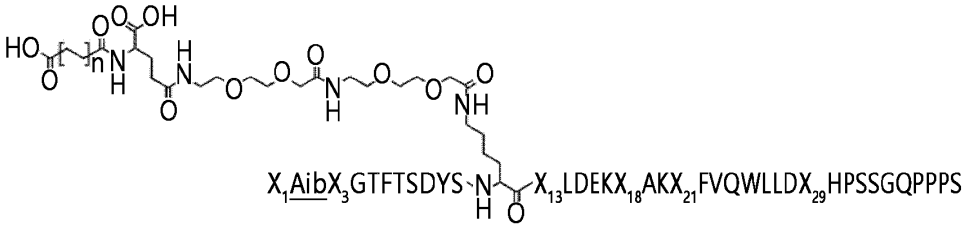
[327] 

.

[328]

[329] 상기 조성물에 포함되는 삼중 활성체의 다른 하나의 예로, 하기 일반식 2의 구조를 갖는 펩타이드를 들 수 있으나, 이에 제한되지 않는다:

[330] [일반식 2]

[331] 

[332]

[333] 상기 일반식 2에서,

[334] 상기 n은 16 또는 18이고,

[335] X1은 히스티딘 또는 티로신이고;

[336] X3은 글루타민 또는 히스티딘이고;

[337] X13은 알파-메틸 류신, 티로신 또는 알라닌이고;

[338] X18은 알라닌 또는 아르기닌이고;

[339] X21은 아스파르트산 또는 글루탐산이고;

[340] X29는 히스티딘 또는 글루타민임.

[341]

[342] 상기 일반식 2의 구조를 갖는 펩타이드는 상기에서 설명한 바와 같고, 일반식 1의 구조를 갖는 펩타이드의 기술 내용이 모두 적용될 수 있다.

[343]

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

[345]

[346] 본 발명에서 용어 "예방"은 상기 삼중 활성체 (아실화된 형태 포함), 또는 이를 포함하는 조성물의 투여로 목적하는 질환, 예컨대 비만의 발병을 억제 또는 지연시키는 모든 행위를 의미하며, "치료"는 상기 삼중 활성체 (아실화된 형태 포함), 또는 이를 포함하는 조성물의 투여로 목적하는 질환, 예컨대 비만의 증세가 호전되거나 이롭게 되는 모든 행위를 의미한다.

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

[348] 본 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 섭취할 경우 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.

[349]

[350] 본 발명의 삼중 결합체는 GLP-1 수용체, GIP 수용체, 및 글루카곤 수용체에 대한 작용을 통해 체중 감소 효과를 나타낼 수 있고, 특히, 천연형 GLP-1 및 GIP 대비 GLP-1 수용체 및 GIP 수용체에 대한 각각의 상대 활성이 천연형 글루카곤 대비 글루카곤 수용체에 대한 상대 활성 보다 상대적으로 높아 비만에 대한 예방 또는 치료 효과를 나타낼 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[351]

[352] 본 발명의 실시예에서 이용된, DIO 식이 및 AMLN 식이로 유도된 모델은 비만 모델로 알려져 있다. 상기와 같은 모델은 비만 관련 관련 연구에서 이용되는 모델로, 본 발명의 실시예에서는 본 발명에 따른 삼중 활성체가 상기 모델에서 모두 우수한 체중 감소 효과를 나타내는 것을 확인 하였는 바, 이는 본 발명의 삼중 활성체가 비만의 예방 또는 치료에 유용함을 시사하는 것이다.

[353]

[354] 본 발명의 약학적 조성물은 약학적으로 허용가능한 담체, 부형제 또는 희석제를 추가로 포함할 수 있다. 본 발명에서 용어 "약학적으로 허용가능한"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.

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

[356] 본 발명의 조성물의 제형은 상술한 바와 같은 약학적으로 허용가능한 담체와 혼합하여 다양하게 제조될 수 있다. 예를 들어, 경구 투여 시에는 정제, 트로키, 캡슐, 엘릭서, 서스펜션, 시럽, 웨이퍼 등의 형태로 제조할 수 있으며, 주사제의 경우에는 단위 투약 앰플 또는 다수회 투약 형태로 제조할 수 있다. 기타, 용액, 현탁액, 정제, 환약, 캡슐, 서방형 제제 등으로 제형화할 수 있다.

[357] 한편, 제제화에 적합한 담체, 부형제 및 희석제의 예로는 락토스, 덱스트로스, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로스, 메틸 셀룰로스, 미정질 셀룰로스, 폴리비닐피롤리돈, 물, 메틸하이드록시벤조에이트, 프로필하이드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 또는 광물유 등이 사용될 수 있다. 또한, 충진제, 항응집제, 윤활제, 습윤제, 향료, 방부제 등을 추가로 포함할 수 있다.

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

[359]

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

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

[362] 본 발명의 약학적 조성물의 투여량과 횟수는 치료할 질환, 투여 경로, 환자의 연령, 성별 및 체중 및 질환의 중등도 등의 여러 관련 인자와 함께, 활성성분인 약물의 종류에 따라 결정된다.

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

[364]

[365] 본 발명의 조성물의 총 유효량은 단일 투여량(single dose)으로 환자에게 투여될 수 있으며, 다중 투여량(multiple dose)으로 장기간 투여되는 분할 치료 방법(fractionated treatment protocol)에 의해 투여될 수 있다. 본 발명의 약학적 조성물은 질환의 정도에 따라 유효성분의 함량을 달리할 수 있다. 구체적으로, 본 발명의 삼중 활성체의 투여 주기는 하루 내지 일주일 일 수 있고, 일주일 동안 투여되는 용량은 환자 체중 1kg당 약 0.01 내지 0.9 mg 일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 아실화된 삼중 활성체의 경우, 상기 투여량은 삼중 활성체에서 지방산 부위의 질량을 제외한 질량값, 즉 폴리펩타이드 부위들만의 질량을 합산한 값을 기준으로 결정될 수 있다. 그러나 상기 삼중 활성체의 용량은 약학적 조성물의 투여 경로 및 치료 횟수뿐만 아니라 환자의 연령, 체중, 건강 상태, 성별, 질환의 중증

도, 식이 및 배설율 등 다양한 요인들을 고려하여 환자에 대한 유효 투여량이 결정되는 것이므로, 이러한 점을 고려할 때 당분야의 통상적인 지식을 가진 자라면 상기 본 발명의 조성물의 특정한 용도에 따른 적절한 유효 투여량을 결정할 수 있을 것이다. 본 발명에 따른 약학적 조성물은 본 발명의 효과를 보이는 한 그 제형, 투여 경로 및 투여 방법에 특별히 제한되지 아니한다.

[366] 본 발명의 약학적 조성물은 생체 내 지속성 및 역가가 우수할 수 있으며, 다른 약제에 비해 낮은 투여 횟수 및 빈도를 나타낼 수 있으나, 특별히 이에 제한되는 것은 아니다.

[367]

[368] 본 발명을 구현하는 또 다른 양태는 상기 삼중 활성체, 또는 이를 포함하는 조성물을 개체에 투여하는 단계를 포함하는, 비만의 예방 또는 치료 방법을 제공한다.

[369] 상기 삼중 활성체, 이를 포함하는 조성물, 비만, 예방, 및 치료에 대해서는 앞서 설명한 바와 같다.

[370] 본 발명에서 상기 개체는 비만이 의심되는 개체로서, 상기 비만 의심 개체는 해당 질환이 발병하였거나 발병할 수 있는 인간을 포함한 쥐, 가축 등을 포함하는 포유 동물을 의미하나, 본 발명의 삼중 활성체, 혹은 이를 포함하는 상기 조성물로 치료 가능한 개체는 제한 없이 포함된다. 또한, 본 발명의 삼중 활성체를 포함하는 약학적 조성물을 비만 의심 개체에 투여함으로써, 개체를 효율적으로 치료할 수 있다. 비만에 대해서는 상기에서 설명한 바와 같다.

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

[372] 본 발명의 방법은 상기 삼중활성체, 또는 이를 포함하는 조성물은 생체 내 표적에 도달할 수 있는 일반적인 경로를 통하여 투여될 수 있으며, 상기 투여 경로는, 예를 들어 복강 내 투여, 정맥 내 투여, 근육 내 투여, 피하 투여, 피내 투여, 경구 투여, 국소 투여, 비 내 투여, 폐 내 투여, 직장 내 투여 등이 될 수 있다.

[373]

[374] 본 발명을 구현하는 또 다른 양태는 삼중 활성체, 혹은 상기 조성물의 비만에 대한 예방 또는 치료 용도를 제공한다.

[375] 상기 삼중 활성체, 조성물, 비만, 예방, 및 치료에 대해서는 앞서 설명한 바와 같다.

[376]

[377] 본 발명을 구현하는 또 다른 양태는 삼중 활성체, 혹은 상기 조성물을 비만에 대한 예방 또는 치료용 약제 (혹은 약학적 조성물)의 제조에 사용하는 용도를 제공한다.

[378] 상기 삼중 활성체, 조성물, 비만, 예방, 및 치료에 대해서는 앞서 설명한 바와 같다.

[379]

[380] 한편, 본원 명세서에서 문맥상 달리 요구하지 않는 한, “포함한다”, “포함하는”, “함유하는”, 등의 표현은 명시된 정수(integer) 또는 정수 그룹의 포함을 의미하지만, 다른 정수 또는 정수의 집합을 배제하는 것이 아니라고 이해되어야 한다.

[381]

[382] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것은 아니다.

[383]

[384] <u>실시예: 삼중 활성체의 제조</u>

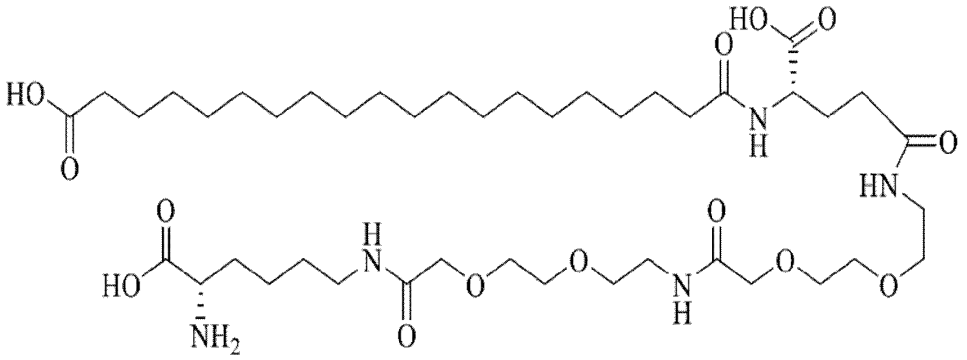
[385]

[386] 본 발명의 삼중 활성체의 합성은 고체상 합성법을 이용하는 자동 펩타이드 합성기(Symphony X, Gyros Protein Tech.)를 이용하였다. C-말단의 아미드화를 위해 Rink amide resin을 사용하였으며 각 아미노산을 C-말단에서 N-말단 순서로 합성하였다.

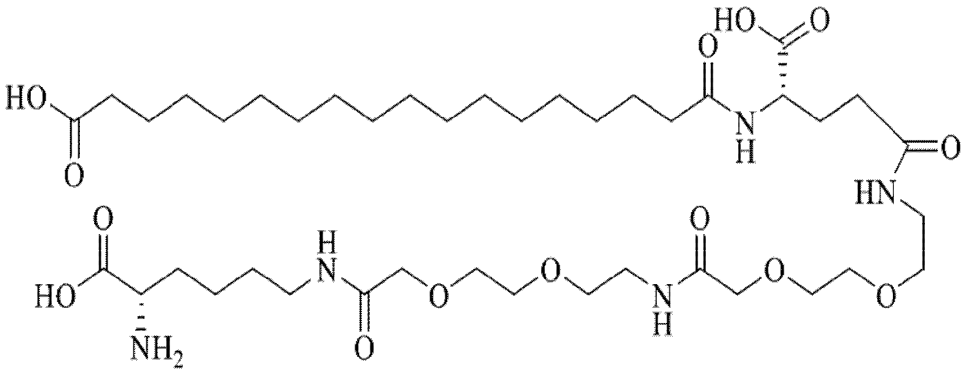
[387] Fmoc(9H-플루오렌-9-일메톡시카르보닐) 보호된(protected) 아미노산, (펩타이드-resin 대비 4 당량), HOBt(1-히드록시벤조트리아졸, 펩타이드-resin 대비 4 당량), DIC (디이소프로필카르보디이미드, 펩타이드-resin 대비 8 당량)를 사용하여 아미노산을 순차적으로 결합시켰다. 아실화 되어 있는 아미노산, K(1) 혹은 K(2)를 결합 시킬 때에도 위와 같은 방법을 사용하였다.

[388]

[389] [K(1)] C20diacid-gammaGlu-$(AEEA)_2$-Lys



[390] [K(2)] C18diacid-gammaGlu-$(AEEA)_2$-Lys



[391]

[392] Fmoc 보호기는 자동 합성기에서 resin이 있는 반응 용기에 8 mL의 20% 피페리딘/DMF(2 x 5 분)를 가하여 떼어내었다. 남아 있는 불순물을 제거하기 위해 각 과정 후에는 DMF 12 mL로(6 x 10초) 세척하였다. 제거되지 않은 보호기는 펩타이드가 레진에서 절단될 때 함께 탈보호 되었다.

[393]

[394] 이와 같은 과정을 통해 제조된 삼중 활성체의 서열은 다음 표 1에 나타내었다.

[395]

[396] [표1]

서열번호	아미노산 서열
1	Y-Aib-QGTFTSDYSK(1)YLDEKAAKEFVQWLLDHHPSSGQPPPS
2	Y-Aib-QGTFTSDYSK(1)YLDEKRAKEFVQWLLDHHPSSGQPPPS
3	Y-Aib-QGTFTSDYSK(1)YLDEKAAKDFVQWLLDQHPSSGQPPPS
4	Y-Aib-QGTFTSDYSK(1)YLDEKRAKDFVQWLLDHHPSSGQPPPS
5	Y-Aib-QGTFTSDYSK(1)ALDEKRAKEFVQWLLDQHPSSGQPPPS
6	H-Aib-HGTFTSDYSK(1)YLDEKAAKDFVQWLLDQHPSSGQPPPS
7	Y-Aib-QGTFTSDYSK(1)YLDEKRAKDFVQWLLDQHPSSGQPPPS
8	Y-Aib-QGTFTSDYSK(2)YLDEKRAKEFVQWLLDHHPSSGQPPPS
9	Y-Aib-QGTFTSDYSK(2)YLDEKAAKEFVQWLLDHHPSSGQPPPS
10	Y-Aib-QGTFTSDYSK(2)YLDEKAAKDFVQWLLDQHPSSGQPPPS
11	Y-Aib-QGTFTSDYSK(2)YLDEKRAKDFVQWLLDHHPSSGQPPPS
12	Y-Aib-QGTFTSDYSK(2)ALDEKRAKEFVQWLLDQHPSSGQPPPS
13	H-Aib-HGTFTSDYSK(2)YLDEKAAKDFVQWLLDQHPSSGQPPPS
14	Y-Aib-QGTFTSDYSK(2)YLDEKRAKDFVQWLLDQHPSSGQPPPS
15	Y-Aib-QGTFTSDYSKYLDEK(1)AAKEFVQWLLDHHPSSGQPPPS
16	Y-Aib-QGTFTSDYSKYLDEK(1)RAKEFVQWLLDHHPSSGQPPPS
17	Y-Aib-QGTFTSDYSKYLDEK(1)AAKDFVQWLLDQHPSSGQPPPS
18	Y-Aib-QGTFTSDYSKYLDEK(1)RAKDFVQWLLDHHPSSGQPPPS
19	Y-Aib-QGTFTSDYSKALDEK(1)RAKEFVQWLLDQHPSSGQPPPS
20	H-Aib-HGTFTSDYSKYLDEK(1)AAKDFVQWLLDQHPSSGQPPPS
21	Y-Aib-QGTFTSDYSKYLDEK(1)RAKDFVQWLLDQHPSSGQPPPS
22	Y-Aib-QGTFTSDYSKYLDEK(2)AAKEFVQWLLDHHPSSGQPPPS
23	Y-Aib-QGTFTSDYSKYLDEK(2)RAKEFVQWLLDHHPSSGQPPPS
24	Y-Aib-QGTFTSDYSKYLDEK(2)AAKDFVQWLLDQHPSSGQPPPS
25	Y-Aib-QGTFTSDYSKYLDEK(2)RAKDFVQWLLDHHPSSGQPPPS
26	Y-Aib-QGTFTSDYSKALDEK(2)RAKEFVQWLLDQHPSSGQPPPS
27	H-Aib-HGTFTSDYSKYLDEK(2)AAKDFVQWLLDQHPSSGQPPPS
28	Y-Aib-QGTFTSDYSKYLDEK(2)RAKDFVQWLLDQHPSSGQPPPS

[397]

[398] 상기 표 1에서, K(1) 및 K(2)는 각각 상기 구조를 갖는 아실화된 아미노산 K(1) 및 K(2)를 의미한다. 밑줄 친 아미노산(16번째 글루탐산 및 20번째 라이신)은 서로 락탐 링(lactam bridge)을 형성하는 것을 의미한다.

[399]

[400] 제조된 삼중 활성체의 정제는 역상 크로마토그래피를 이용하였다. 합성된 펩타이드의 순도는 분석용 액상 크로마토그램 (RP-HPLC)를 이용하여 순도를 확인하였으며, 90%이상인 경우 실험에 사용 가능한 수준으로 판단하여 진행하였다. 또한, 액상 크로마토그램/질량분석기 (LC/MS)를 사용하여 펩타이드의 분자량 및 정보를 확인하였다.

[401] 합성된 펩타이드는 실험에 사용되기 전까지 -20℃에 보관하였다.

[402]

[403] **실험예 1: 삼중 활성체의 in vitro 활성 확인**

[404]

[405] 상기 실시예에서 제조된 삼중 활성체의 활성을 측정하기 위해 GLP-1 수용체, GIP 수용체, 및 글루카곤(GCG) 수용체가 각각 형질전환된 세포주를 이용하여 in vitro에서 세포 활성을 측정하는 방법을 이용하였다.

[406]

[407] 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, GIP, 및 GCG의 활성을 측정하기에 적합하다. 따라서, 각 부분에 대한 활성을 각각의 형질 전환 세포주를 이용하여 측정하였다.

[408]

[409] 상기 실시예에서 제조된 삼중 활성체의 GLP-1 수용체에 대한 활성 측정을 위해 인간 GLP-1을 4nM 부터 3배씩 0.00007nM까지 연속적으로 희석하고, 서열번호 1 내지 9의 삼중 활성체를 40nM 부터 3배씩 0.00068nM까지 연속적으로 희석하였다. 상기 배양된 인간 GLP-1 수용체가 발현된 CHO 세포에서 배양액을 제거하고 연속적으로 희석된 각 물질들을 10㎕씩 상기 세포에 첨가한 뒤 15분 동안 상온에서 배양하였다. 그런 다음 세포용해완충액 (cell lysis buffer)이 포함된 Eu-cAMP tracer mix와 anti-cAMP detection mix를 순서대로 각각 5㎕씩 가하여 세포를 용해시키고, 차광조건에서 60분 동안 상온에서 반응시켰다. 상기 반응이 완료된 세포 용해물에 축적된 cAMP를 형광으로 측정하고, 이를 통해 EC50값을 산출한 후 상호 비교하였다. 인간 GLP-1 대비 상대 역가는 하기 표 2에 나타내었다.

[410]

[411] 상기 실시예에서 제조된 삼중 활성체의 GCG(글루카곤) 수용체에 대한 활성 측정을 위해 인간 GCG를 4nM 부터 3배씩 0.00007nM까지 연속적으로 희석하고, 서열번호 1 내지 9의 삼중 활성체를 40nM 부터 3배씩 0.00068nM까지 연속적으로 희석하였다. 상기 배양된 인간 GCG 수용체가 발현된 CHO 세포에서 배양액을 제거하고 연속적으로 희석된 각 물질들을 10㎕씩 상기 세포에 첨가한 뒤 15분 동안 상온에서 배양하였다. 그런 다음 세포용해완충액 (cell lysis buffer)이 포함된 Eu-cAMP tracer mix와 anti-cAMP detection mix를 순서대로 각각 5㎕씩 가하여 세포를 용해시키고, 차광조건에서 60분 동안 상온에서 반응시켰다. 상기 반응이 완

료된 세포용해물에 축적된 cAMP를 형광으로 측정하고, 이를 통해 EC50값을 산출한 후 상호 비교하였다. 인간 GCG 대비 상대 역가는 하기 표 2에 나타내었다.

[412]

[413] 상기 실시예에서 제조된 삼중 활성체의 GIP 수용체에 대한 활성 측정을 위해 인간 GIP를 4nM 부터 3배씩 0.00007nM까지 연속적으로 희석하고, 서열번호 1 내지 9의 삼중 활성체를 40nM 부터 3배씩 0.00068nM까지 연속적으로 희석하였다. 상기 배양된 인간 GIP 수용체가 발현된 CHO 세포에서 배양액을 제거하고 연속적으로 희석된 각 물질들을 10㎕씩 상기 세포에 첨가한 뒤 15분 동안 상온에서 배양하였다. 그런 다음 세포용해완충액 (cell lysis buffer)이 포함된 Eu-cAMP tracer mix와 anti-cAMP detection mix를 순서대로 각각 5㎕씩 가하여 세포를 용해시키고, 차광조건에서 60분 동안 상온에서 반응시켰다. 상기 반응이 완료된 세포용해물에 축적된 cAMP를 형광으로 측정하고, 이를 통해 EC50값을 산출한 후 상호 비교하였다. 인간 GIP 대비 상대 역가는 하기 표 2에 나타내었다.

[414]

[415] [표2]

삼중 활성체의 상대적 역가 비율

	천연형 펩타이드 대비 in vitro 활성 (%)		
서열번호	vs. GLP-1	vs. Glucagon	vs. GIP
1	5.88	0.33	5.18
2	3.87	3.35	2.17
3	5.52	0.40	7.04
4	3.71	2.36	3.81
5	2.36	1.51	5.29
6	7.94	1.36	6.11
7	4.21	3.32	5.26
8	9.68	5.89	4.89
9	14.99	0.51	8.42

[416]

[417] 이를 통해, 실시예에서 제조된 본 발명의 서열번호 1 내지 9의 삼중 활성체는 GLP-1, GIP, 및 글루카곤 수용체의 3개 수용체에 대해 모두 활성을 갖는 것을 확인하였다.

[418]

[419] **실험예 2: 고지방, 고과당, 고콜레스테롤 식이로 유도된 비만 마우스에서 삼중 활성체에 의한 체중 감소 효과**

[420]

[421] 상기 실시예에서 제조된 서열번호 1의 삼중 활성체, 서열번호 2의 삼중 활성체, 및 서열번호 4의 삼중 활성체 3종의 각 체중 감소 효력을 확인하고자, 비만 모델로 알려진 AMLN (아밀린) 마우스 모델을 사용하였다. AMLN 식이로 비만이 유도된 마우스를 부형제 대조군, 삼중 활성체 3종 (351 ug/kg, Q2D, 피하) 투여 군으로 나누었고, 2주간 반복투여를 진행하였다.

[422]

[423] 2주 반복투여 후 체중을 측정하여 투여 직전(D0) 체중 대비 변화량을 측정하여 체중 감소 효능을 평가하였다.

[424]

[425] 그 결과, 서열번호 1의 삼중 활성체, 서열번호 2의 삼중 활성체, 및 서열번호 4의 삼중 활성체 모두 2주간 반복 투여 시, 부형제 대조군 대비 유의적인 체중 감소 효능을 확인할 수 있었다 (도 1, $p<0.001$ vs. 부형제 대조군 by one-way ANOVA).

[426]

[427] **실험예 3: 고지방 식이로 유도된 비만 마우스에서 삼중 활성체에 의한 체중 감소 효과**

[428]

[429] 상기 실시예에서 제조된 서열번호 3의 삼중 활성체, 서열번호 5의 삼중 활성체, 서열번호 6의 삼중 활성체, 및 서열번호 7의 삼중 활성체 4종의 각 체중 감소 효력을 확인하고자, 비만 모델로 알려진 DIO 마우스 모델을 사용하였다. DIO 식이로 비만이 유도된 마우스를 부형제 대조군, 삼중 활성체 (60 nmol/kg, Q2D, 피하) 투여 군으로 나누었고, 2주간 반복투여를 진행하였다.

[430] 2주 반복투여 후 체중을 측정하여 투여 직전(D0) 체중 대비 변화량을 측정하여 체중 감소 효능을 평가하였다.

[431]

[432] 그 결과, 본 발명이 삼중 활성체의 지속형 결합체 4종 모두 2주간 반복 투여 시, 부형제 대조군 대비 유의적인 체중 감소 효능을 확인할 수 있었다 (도 2, $p<0.001$ vs. 부형제 대조군 by one-way ANOVA).

[433]

[434] 상기 실시예로부터, 본 발명에서 제조된 삼중 활성체는 GLP-1 수용체, GIP 수용체, 및 글루카곤 수용체에 작용할 수 있으며, 이를 통해 비만 치료에 대한 유용한 치료제로 사용될 수 있음을 확인하였다.

[435]

[436] 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 면에

서 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.

청구범위

[청구항 1] GLP-1 (Glucagon-like peptide-1) 수용체, GIP (Glucose-dependent insuliontropic polypeptide) 수용체, 및 글루카곤 수용체에 대해 활성을 갖는 펩타이드로서,
상기 펩타이드는 하기 일반식 1로 표시된 아미노산 서열을 포함하는 것인, 펩타이드:
X1-Aib-X3-G-T-F-T-S-D-Y-S-X12-X13-L-D-E- X17-X18-A-K-X21-F-V-Q-W-L-L-D-X29-H-P-S-S-G-Q-P-P-P-S (일반식 1, 서열번호 29)
상기 일반식 1에서,
X1은 히스티딘 또는 티로신이고;
X3은 글루타민 또는 히스티딘이고;
X12는 라이신 또는 아실화된 아미노산이고;
X13은 알파-메틸 류신, 티로신 또는 알라닌이고;
X17은 라이신 또는 아실화된 아미노산이고;
X18은 알라닌 또는 아르기닌이고;
X21은 아스파르트산 또는 글루탐산이고;
X29는 히스티딘 또는 글루타민이고,
상기 -은 펩타이드 결합을 나타내고, 상기 펩타이드는 시스테인을 포함하지 않음.

[청구항 2] 제1항에 있어서, 상기 펩타이드는 천연형 글루카곤 대비 글루카곤 수용체에 대한 상대적 활성에 비해 각각의 천연형 GIP 및 GLP-1 대비 GIP 수용체 및 GLP-1 수용체에 대한 상대적 활성이 높은 것인, 펩타이드.

[청구항 3] 제2항에 있어서, 상기 펩타이드는 천연형 글루카곤 대비 글루카곤 수용체에 대한 상대적 활성에 비해 각각의 천연형 GIP 및 GLP-1 대비 GIP 수용체 및 GLP-1 수용체에 대한 상대적 활성이 각각 4배 이상인 것인, 펩타이드.

[청구항 4] 제1항에 있어서, 상기 일반식 1에서,
X3이 히스티딘인, 펩타이드.

[청구항 5] 제1항에 있어서, 상기 일반식 1에서,
X13은 티로신이고;
X18은 알라닌인, 펩타이드.

[청구항 6] 제1항에 있어서, 상기 일반식 1에서,
X1은 티로신이고;
X3은 글루타민이고;
X13은 티로신이고;
X18은 아르기닌인, 펩타이드.

[청구항 7] 제1항에 있어서, 상기 일반식 1에서,

X29는 글루타민인, 펩타이드.

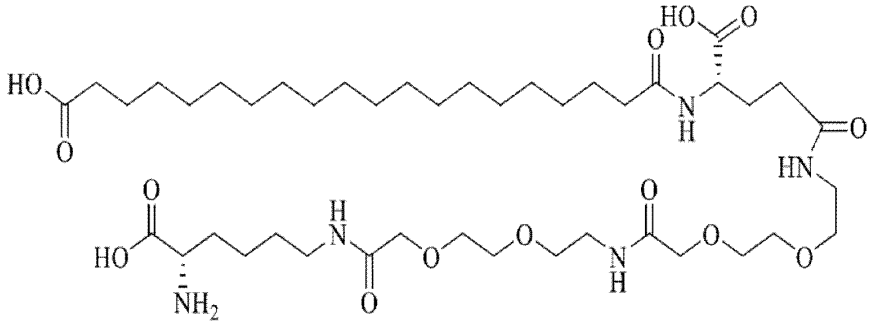
[청구항 8] 제1항에 있어서, 상기 펩타이드는 펩타이드의 하나 이상의 아미노산에 AEEA ((2-(2-aminoethoxy)ethoxy)acetic acid), GABA (4-Aminobutyric acid), Ava (5-Aminovaleric acid), Ahx (Aminohexanoic acid), 트리아졸(Triazole), 및 폴리에틸렌 글리콜(PEG)로 이루어진 그룹에서 선택되는 링커를 통해 아실기가 부착된 것인, 펩타이드.

[청구항 9] 제8항에 있어서, 상기 링커는 AEEA를 포함하는 것인, 펩타이드.

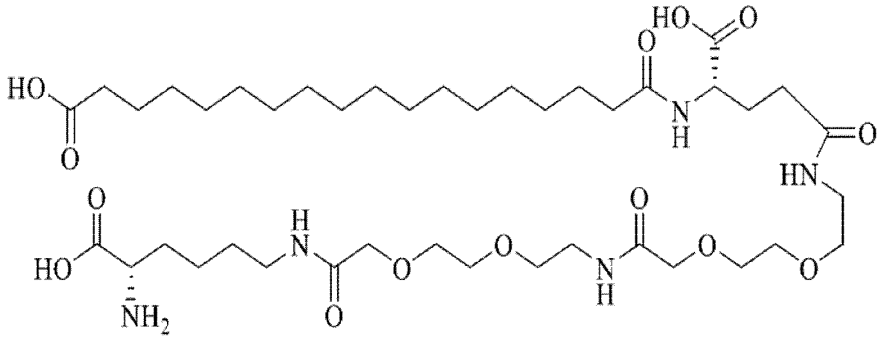
[청구항 10] 제8항에 있어서, 상기 링커는 AEEA를 0 내지 3개 포함하는 것인, 펩타이드.

[청구항 11] 제1항에 있어서, 상기 아실화된 아미노산은 하기 K(1) 또는 K(2)로 표시되는 아미노산인, 펩타이드:

[K(1)] C20diacid-gammaGlu-$(AEEA)_2$-Lys



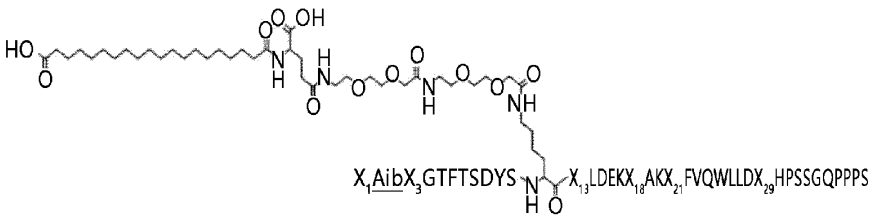
[K(2)] C18diacid-gammaGlu-$(AEEA)_2$-Lys



[청구항 12] 제1항에 있어서, 상기 펩타이드는 C-말단이 아미드화된 것인, 펩타이드.

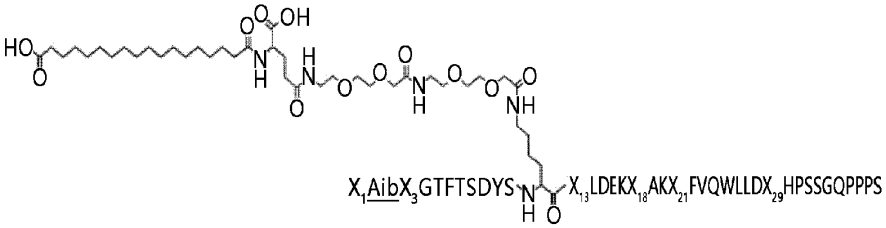
[청구항 13] 제1항에 있어서, 상기 펩타이드는 하기 (i) 내지 (iv)의 구조 중 어느 하나의 구조를 갖는 것인, 펩타이드:

(i)



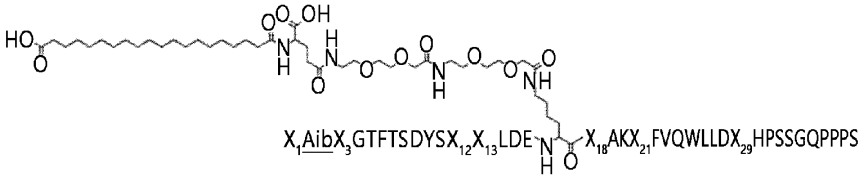
;

(ii)



;

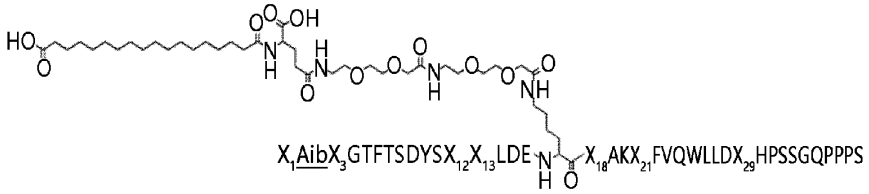
(iii)



;

및

(iv)



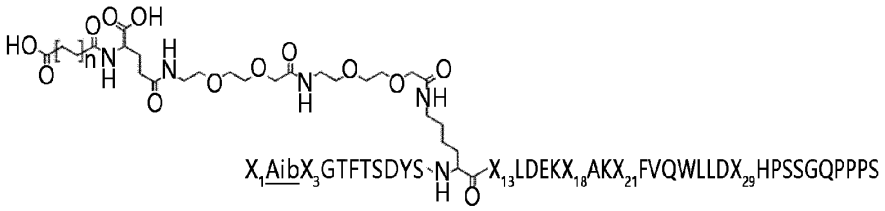
.

[청구항 14] 제1항에 있어서, 상기 펩타이드는 서열번호 1 내지 28의 아미노산 서열로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나의 서열을 포함하는 것인, 펩타이드.

[청구항 15] 제1항에 있어서, 상기 일반식 1의 N-말단으로부터 16번 아미노산과 20번 아미노산은 서로 고리를 형성하는, 펩타이드.

[청구항 16] 제1항에 있어서, 상기 펩타이드는 하기 일반식 2의 구조를 갖는 것인, 펩타이드:

[일반식 2]



상기 일반식 2에서,
상기 n은 16 또는 18이고,
X1은 히스티딘 또는 티로신이고;
X3은 글루타민 또는 히스티딘이고;
X13은 알파-메틸 류신, 티로신 또는 알라닌이고;
X18은 알라닌 또는 아르기닌이고;
X21은 아스파르트산 또는 글루탐산이고;
X29는 히스티딘 또는 글루타민임.

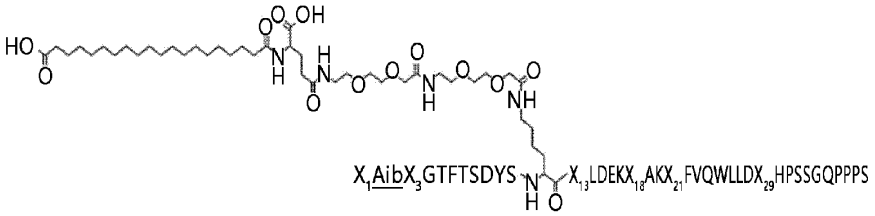
[청구항 17] 제1항 내지 제16항 중 어느 한 항의 펩타이드를 약학적 유효량으로 포함하는 비만 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

[청구항 18] 제17항에 있어서, 상기 약학적 조성물은 약학적으로 허용 가능한 담체를 추가로 포함하는 것인, 약학적 조성물.

[청구항 19] 제17항에 있어서, 상기 약학적 조성물은 투여시 개체의 체중 감소 효과를 갖는 것인, 약학적 조성물.

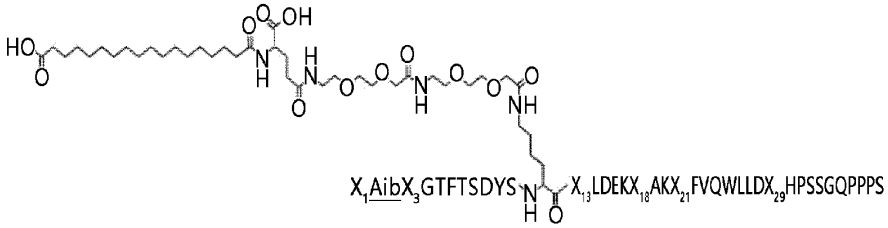
[청구항 20] 제17항에 있어서, 상기 펩타이드는 하기 (i) 내지 (iv)의 구조 중 어느 하나의 구조를 갖는 것인, 약학적 조성물:

(i)



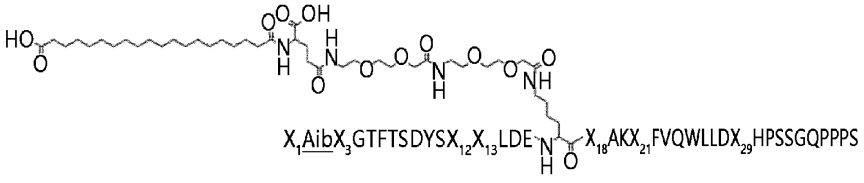
;

(ii)



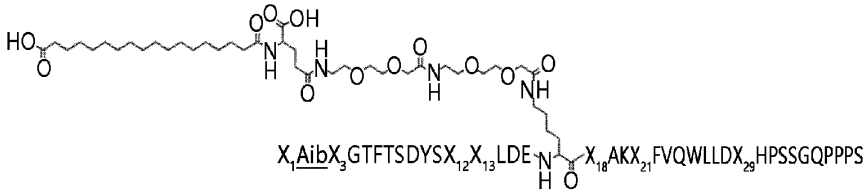
;

(iii)



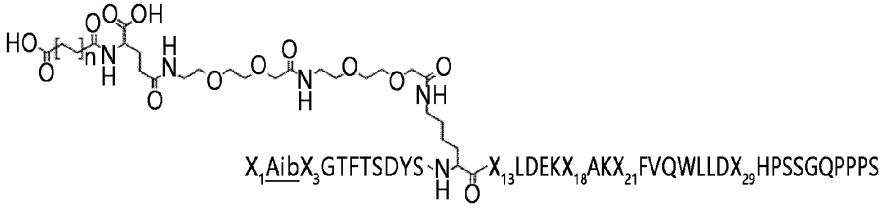
; 및

(iv)



[청구항 21] 제17항에 있어서, 상기 펩타이드는 일반식 2의 구조를 갖는 것인, 약학적 조성물:

[일반식 2]



상기 일반식 2에서,

상기 n은 16 또는 18이고,

X1은 히스티딘 또는 티로신이고;

X3은 글루타민 또는 히스티딘이고;

X13은 알파-메틸 류신, 티로신 또는 알라닌이고;

X18은 알라닌 또는 아르기닌이고;

X21은 아스파르트산 또는 글루탐산이고;

X29는 히스티딘 또는 글루타민임.