



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2011-0039230  
(43) 공개일자 2011년04월15일

(51) Int. Cl.

A61K 38/26 (2006.01) C07K 14/605 (2006.01)

A61P 31/10 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2011-7000019

(22) 출원일자(국제출원일자) 2009년06월16일

심사청구일자 없음

(85) 번역문제출일자 2011년01월03일

(86) 국제출원번호 PCT/US2009/047437

(87) 국제공개번호 WO 2009/155257

국제공개일자 2009년12월23일

(30) 우선권주장

61/073,193 2008년06월17일 미국(US)

(뒷면에 계속)

(71) 출원인

인디애나 유니버시티 리서치 앤드 테크놀로지 코퍼레이션

미합중국 인디애나주 46202 인디애나폴리스 10번가 웨스트 351

(72) 발명자

디마치, 리차드, 디.

미국, 인디애나 46033, 카멜, 월링톤 드라이브 10890

스마일리, 데이비드, 엘.

미국, 인디애나 47401, 블루밍톤, 사우스 라우라웨이 3823

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

강명구

전체 청구항 수 : 총 96 항

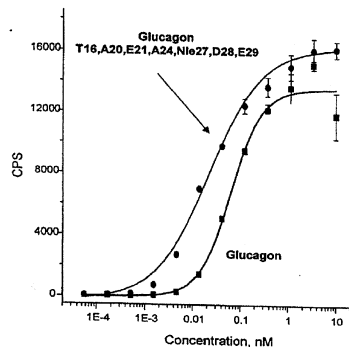
(54) 생리학적 pH 완충액에서 강화된 용해도 및 안정성을 나타내는 글루카곤 유사체

### (57) 요약

글루카곤 항진 활성을 보유하면서 용해도 및/또는 반감기가 개선된 변형된 글루카곤 펩티드가 제공된다. 글루카곤 펩티드는 고유 아미노산의 치환, 카르복시 말단 말단에 전하를 띤 아미노산 첨가에 의해 변형된다. 변형된 글루카곤 항진제는 폐경화에 의해 또는 SEQ ID NO:20, SEQ ID NO:21, SEQ ID NO:23으로 구성된 군으로부터 선택된 카르복시 말단 펩티드의 추가에 의해 추가 변형되거나 또는 이들의 변형에 의해 추가 변형되어, 글루카곤 항진제 유사체의 용해도가 강화된다.

대표도 - 도11a

글루카곤 수용체 매개된 cAMP 유도



(72) 발명자

**디마치, 마리아**

미국, 인디애나 46033, 카멜, 윌밍톤 드라이브  
10890

**차베네, 조셉**

미국, 인디애나 46037, 피셔스, 이스트 114쓰 스트  
리트 13505

**데이, 조나단**

미국, 인디애나 47402, 블루밍톤, 에이퍼터. 11,  
사우스 아담스 스트리트 1331

(30) 우선권주장

61/078,165 2008년07월03일 미국(US)

61/090,415 2008년08월20일 미국(US)

## 특허청구의 범위

### 청구항 1

(i) SEQ ID NO: 1의 아미노산 서열과, 위치 16, 20, 21, 및 24 중에서 하나, 둘, 셋 또는 이들 모든 아미노산이  $\alpha$ ,  $\alpha$ -이치환된 아미노산을 가지는, 글루카곤 펩티드 항진 활성을 가지는 글루카곤 펩티드.

### 청구항 2

청구항 제 2 항에 있어서,

- (a) 글루카곤 펩티드의 위치 16에서 아미노 이소부틸산(AIB),
- (b) 글루카곤 펩티드의 위치 20에서 AIB,
- (c) 글루카곤 펩티드의 위치 21에서 AIB,
- (d) 글루카곤 펩티드의 위치 24에서 AIB,
- (e) 글루카곤 펩티드의 위치 16 및 20에서 AIB,
- (f) 글루카곤 펩티드의 위치 16 및 24에서 AIB,
- (g) 글루카곤 펩티드의 위치 20 및 24에서 AIB; 또는
- (h) 글루카곤 펩티드의 위치 16, 20 및 24에서 AIB를 포함하는, 글루카곤 펩티드.

### 청구항 3

청구항 제 2 항에 있어서, 글루카곤 펩티드 위치 16에 AIB를 포함하는, 글루카곤 펩티드.

### 청구항 4

청구항 제 1 항 내지 제 3 항중 임의의 항에 따른 글루카곤 펩티드의 유사체에 있어서, 추가 아미노산 변형을 포함하며, 여기서 글루카곤 펩티드는 (i) 글루카곤 펩티드 위치 27의 아미노산의 C-말단에 적어도 하나의 전하를 띤 아미노산; (ii) 글루카곤 펩티드의 위치 3에서 아미노산을 글루타민 유사체로의 치환; 또는 (iii) (i) 및 (ii)을 모두 포함하는, 글루카곤 펩티드의 유사체.

### 청구항 5

청구항 제 4 항에 있어서, 다음으로 구성된 군으로부터 선택된 최소 하나의 아미노산 변형을 포함하는, 글루카곤 펩티드 유사체:

위치 28의 Asn은 전하를 띤 아미노산으로 치환;

위치 28의 Asn은 Lys, Arg, His, Asp, Glu, 시스테인산, 및 호모시스테인산으로 구성된 군으로부터 선택된 전하를 띤 아미노산으로 치환;

위치 28은 Asn, Asp, 또는 Glu으로 치환;

위치 28은 Asp으로 치환;

위치 28은 Glu으로 치환;

위치 29의 Thr는 전하를 띤 아미노산으로 치환;

위치 29의 Thr는 Lys, Arg, His, Asp, Glu, 시스테인산, 및 호모시스테인산으로 구성된 군으로부터 선택된 전하를 띤 아미노산으로 치환;

위치 29는 Asp, Glu, 또는 Lys으로 치환;

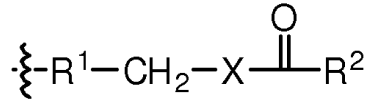
위치 29는 Glu으로 치환;

위치 29 다음에 1-3개의 전하를 띤 아미노산 삽입;

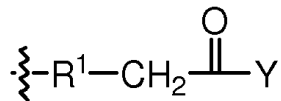
위치 29 다음에 Glu 또는 Lys 삽입;

위치 29 다음에 Gly-Lys 또는 Lys-Lys;

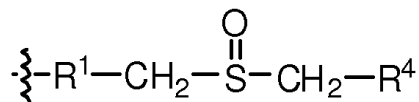
위치 3의 Gln은 구조 I, II 또는 III의 측쇄를 포함하는 아미노산으로 치환;



Structure I



Structure II



Structure III

상기 식에서, R<sup>1</sup>은 C<sub>0-3</sub> 알킬 또는 C<sub>0-3</sub> 헤테로알킬이며;

R<sup>2</sup>는 NHR<sup>4</sup> 또는 C<sub>1-3</sub> 알킬이며;

R<sup>3</sup>는 C<sub>1-3</sub> 알킬이며;

R<sup>4</sup>는 H 또는 C<sub>1-3</sub> 알킬이며;

X는 NH, O, 또는 S이며; 그리고

Y는 NHR<sup>4</sup>, SR<sup>3</sup>, 또는 OR<sup>3</sup>이다.

#### 청구항 6

청구항 제 4 항 또는 제 5 항에 있어서, 다음으로 구성된 군으로부터 선택된 적어도 하나의 아미노산 변형을 더 포함하는, 글루카곤 펩티드 유사체:

위치 20의 Gln은 Ala, Ser 또는 Thr으로의 치환;

위치 24의 Gln은 Ala, Ser 또는 Thr으로의 치환;

C-말단에 SEQ ID NO: 20의 아미노산 서열 추가, 여기서 위치 29의 아미노산은 Thr 또는 Gly이며; 그리고

이의 조합.

#### 청구항 7

청구항 제 6 항에 있어서, SEQ ID NO: 71-74 중 임의의 아미노산 서열을 포함하는, 글루카곤 펩티드 유사체.

#### 청구항 8

청구항 제 4 항 내지 제 7 항중 임의의 항에 있어서, 친수성 모이어티를 더 포함하는, 글루카곤 펩티드 유사체.

## 청구항 9

청구항 제 8 항에 있어서, 친수성 모이어티는 위치 16, 17, 20, 21, 24, 또는 29의 아미노산중 임의의 아미노산 또는 유사체의 C-말단 아미노산에 공유적으로 링크된, 글루카곤 펩티드 유사체.

## 청구항 10

청구항 제 8 항 또는 제 9 항에 있어서, 친수성 모이어티는 Lys, Cys, Orn, 호모시스테인, 또는 아세틸-페닐알라닌에 공유적으로 링크된, 글루카곤 펩티드 유사체.

## 청구항 11

청구항 제 8 항 내지 제 10 항중 임의의 항에 있어서, 친수성 모이어티는 폴리에틸렌 글리콜 (PEG)이 되는, 글루카곤 펩티드 유사체.

## 청구항 12

청구항 제 11 항에 있어서, PEG는 약 1,000 Daltons 내지 약 40,000 Daltons의 분자량을 가지는, 글루카곤 펩티드 유사체.

## 청구항 13

청구항 제 12 항에 있어서, PEG는 약 20,000 Daltons 내지 약 40,000 Daltons의 분자량을 가지는, 글루카곤 펩티드 유사체.

## 청구항 14

청구항 제 4 항 내지 제 13 항중 임의의 항에 있어서,

(i) 위치 1의 His는 디펩티딜 펩티다제 IV (DPP-IV)에 의한 절단에 대하여 글루카곤 펩티드의 민감성을 감소시키는 비-고유 아미노산으로 치환되며, (ii) 위치 2의 Ser은 디펩티딜 펩티다제 IV (DPP-IV)에 의한 절단에 대하여 글루카곤 펩티드의 민감성을 감소시키는 비-고유 아미노산으로 치환되며, 또는 (iii) 상기 (i) 및 (ii) 모두를 포함하는, 글루카곤 펩티드 유사체.

## 청구항 15

청구항 제 14 항에 있어서, 위치 1의 His는 D-His,  $\alpha$ -메틸 His, 이미디아졸 아세트산, Des-아미노-His, 하이드록실-His, 아세틸-His, 호모-His, 또는  $\alpha$ ,  $\alpha$ -디메틸 이미디아졸 아세트산 (DMIA)으로 치환된, 글루카곤 펩티드 유사체.

## 청구항 16

청구항 제 15 항에 있어서, 위치 1의 His은 DMIA으로 치환된, 글루카곤 펩티드 유사체.

## 청구항 17

청구항 제 14 항 내지 제 16 항중 임의의 항에 있어서, 위치 2의 Ser은 D-Ser, D-Ala, Gly, n-메틸-Ser, Val, 또는  $\alpha$  아미노 이소부틸산(AIB)으로 치환된, 글루카곤 펩티드 유사체.

## 청구항 18

청구항 제 4 항 내지 제 17 항중 임의의 항에 있어서, 아실 또는 알킬기에 공유적으로 부착된 측쇄를 가지는 아미노산을 포함하며, 여기서 아실 또는 알킬기는 자연 생성 아미노산에 비-고유적인, 글루카곤 펩티드 유사체.

## 청구항 19

청구항 제 18 항에 있어서, 아실 또는 알킬기가 부착된 아미노산은 유사체의 위치 10의 아미노산 또는 C-말단 아미노산이 되는, 글루카곤 펩티드 유사체.

#### 청구항 20

청구항 제 18 또는 제 19 항에 있어서, 아실 또는 알킬기는 스페이스를 통하여 아미노산 측쇄에 부착되는, 글루카곤 펩티드 유사체.

#### 청구항 21

청구항 제 18 항 내지 제 20 항중 임의의 항에 있어서, 아실기는  $C_4$  내지  $C_{30}$  지방 아실기 또는 알킬기는  $C_4$  내지  $C_{30}$  알킬기 되는, 글루카곤 펩티드 유사체.

#### 청구항 22

청구항 제 4 항 내지 제 21 항중 임의의 항에 있어서, 다음으로 구성된 군으로부터 선택된 아미노산 변형을 더 포함하는, 글루카곤 펩티드 유사체:

위치 7의 Thr은 하이드록시기가 없는 아미노산으로 치환;

위치 27 또는 28의 아미노산 말단에 아미노산 결손; 그리고

이들의 조합

#### 청구항 23

청구항 제 22 항에 있어서, 하이드록시기가 없는 아미노산은 Ile 또는 아미노부틸산(Abu)이 되는, 글루카곤 펩티드 유사체.

#### 청구항 24

청구항 제 4 항 내지 제 23 항중 임의의 항에 있어서, 다음으로 구성된 군으로부터 선택된 아미노산 변형을 더 포함하는, 글루카곤 펩티드 유사체:

위치 10의 Tyr은 Phe 또는 Val으로 치환;

위치 12의 Lys 은 Arg으로 치환;

위치 15의 Asp는 Glu로 치환;

위치 16의 Ser은 Thr 또는 AIB로 치환;

위치 20의 Gln은 Ala 또는 AIB으로 치환;

위치 21의 Asp는 Glu으로 치환;

위치 24의 Gln은 Ala 또는 AIB으로 치환;

위치 27의 Met은 Leu 또는 Nle로 치환;

위치 27-29의 아미노산 결손;

위치 28-29의 아미노산 결손;

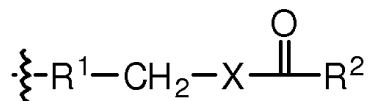
위치 29의 아미노산 결손;

C-말단에 SEQ ID NO:20의 아미노산 서열 추가, 이때 위치 29의 아미노산은 Thr 또는 Gly이 되며; 그리고

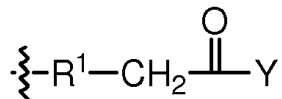
이들의 조합.

#### 청구항 25

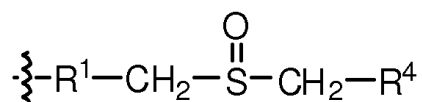
아미노산 서열 SEQ ID NO: 77을 포함하며, 여기서 위치 3의 Xaa는 구조 I, II 또는 3의 측쇄를 가지는 아미노산 이고



Structure I



Structure II



Structure III

상기 식에서,  $\text{R}^1$ 은  $\text{C}_{0-3}$  알킬 또는  $\text{C}_{0-3}$  헤테로알킬이며;

$\text{R}^2$ 는  $\text{NHR}^4$  또는  $\text{C}_{1-3}$  알킬이며;

$\text{R}^3$ 는  $\text{C}_{1-3}$  알킬이며;

$\text{R}^4$ 는 H 또는  $\text{C}_{1-3}$  알킬이며;

X는 NH, O, 또는 S이며; 그리고

Y는  $\text{NHR}^4$ ,  $\text{SR}^3$ , 또는  $\text{OR}^3$ 이다.

#### 청구항 26

청구항 제 25 항에 있어서, X는 NH이거나 Y는  $\text{NHR}^4$ 인, 글루카곤 펩티드 유사체.

#### 청구항 27

청구항 제 25 항 또는 제 26항에 있어서,  $\text{R}^1$ 은  $\text{C}_{0-2}$  알킬 또는  $\text{C}_1$ 헤테로알킬이 되는, 글루카곤 펩티드 유사체.

#### 청구항 28

청구항 제 25 항 내지 제 27 항중 임의의 항에 있어서,  $\text{R}^2$ 는  $\text{NHR}^4$  또는  $\text{C}_1$  알킬이 되는, 글루카곤 펩티드 유사체.

#### 청구항 29

청구항 제 25 항 내지 제 28 항중 임의의 항에 있어서,  $\text{R}^4$ 은 H 또는  $\text{C}_1$  알킬이 되는, 글루카곤 펩티드 유사체.

#### 청구항 30

청구항 제 25 항에 있어서, 위치 3의 Xaa는 다음의 측쇄를 가지는 아미노산이 되는, 글루카곤 펩티드 유사체:

(i) 구조 I,  $\text{R}^1$ 은  $\text{CH}_2\text{--S}$ 이며, X는 NH이고, and  $\text{R}^2$ 는  $\text{CH}_3 \text{C}(\text{Acm})$ 이다;

- (ii) 구조 I,  $R^1$ 은  $CH_2$ 이며, X는 NH이고,  $R^2$ 는  $CH_3$  (Dab(Ac))이며;
- (iii) 구조 I,  $R^1$ 은  $C_0$  알킬이며, X는 NH이고,  $R^2$ 는  $NHR^4$  이고,  $R^4$ 는 H (Dap(우레아))이며;
- (iv) 구조 II,  $R^1$ 은  $CH_2$ 이며, Y는  $NHR^4$ 이며,  $R^4$ 는  $CH_3$  (Q(Me))이다;
- (v) 구조 III,  $R^1$ 은  $CH_2$ 이며,  $R^4$ 는 H(M(O))가 되며;
- (vi) 구조 I,  $R^1$ 은  $CH_2-CH_2$ 이고, X는 NH이며,  $R^2$ 는  $CH_3$  (아세틸오르니틴, Orn(Ac))이다.

### 청구항 31

청구항 제 25 항 내지 제 30 항중 임의의 항에 있어서, 글루카곤 펩티드는 (i) 위치 i와 i+4의 아미노산을 연결하는 분자내 다리를 포함하며, 여기서 i는 12, 16, 20, 또는 24가 되며, (ii) 위치 16, 20, 21, 및 24의 하나, 둘, 셋 또는 이들 모두에서  $\alpha$ ,  $\alpha$ -이중치환된 아미노산, 또는 (iii) 상기 (i) 및 (ii) 모두를 포함하는, 글루카곤 펩티드 유사체.

### 청구항 32

청구항 제 31 항에 있어서,  $\alpha$ ,  $\alpha$ -이중치환된 아미노산은 AIB가 되는, 글루카곤 펩티드 유사체.

### 청구항 33

청구항 제 32 항에 있어서, AIB는 글루카곤 펩티드의 위치 16에 있는, 글루카곤 펩티드 유사체.

### 청구항 34

청구항 제 31 항 내지 제 33 항중 임의의 항에 있어서, 글루카곤 펩티드는 다음으로 구성된 군으로부터 선택된 아미노산 변형을 포함하는, 글루카곤 펩티드 유사체:

위치 1의 His을 DPP-IV에 의한 절단에 글루카곤 펩티드의 민감성을 감소시키는 비-고유 아미노산으로의 치환;

위치 2의 Ser은 디펩티딜 펩티다제 IV (DPP- IV)에 의한 절단에 글루카곤 펩티드의 감응성을 감소시키는 비-고유 아미노산으로 치환;

위치 7의 Thr은 Abu 또는 Ile로의 치환;

위치 10의 Tyr은 Phe 또는 Val으로 치환;

위치 12의 Lys 은 Arg으로 치환;

위치 15의 Asp는 Glu로 치환;

위치 16의 Ser은 Thr 또는 AIB로 치환;

위치 20의 Gln은 Ala 또는 AIB으로 치환;

위치 21의 Asp는 Glu으로 치환;

위치 24의 Gln은 Ala 또는 AIB으로 치환;

위치 27의 Met은 Leu 또는 Nle로 치환;

위치 27-29의 아미노산 결손;

위치 28-29의 아미노산 결손;

위치 29의 아미노산 결손;

C-말단에 SEQ ID NO:20의 아미노산 서열 추가, 이때 위치 29의 아미노산은 Thr 또는 Gly이 되며;

아실 또는 알킬기에 공유적으로 부착된 측쇄를 포함하는 아미노산의 치환 또는 추가, 여기서 아실 또는 알킬기



는 자연 발생 아미노산에 비-고유한 것이 되며; 그리고  
또는 이들의 조합.

#### 청구항 35

청구항 제 34 항에 있어서, 글루카곤 펩티드는 SEQ ID NO:62-67 및 69-74중 임의의 아미노산 서열을 포함하는, 글루카곤 펩티드 유사체.

#### 청구항 36

청구항 제 31 항 내지 제 35 항중 임의의 항에 있어서, 위치 16, 17, 20, 21, 24 및 29중 임의의 위치 아미노산 또는 C-말단 아미노산에 공유적으로 연결된 친수성 모이어티를 포함하는, 글루카곤 펩티드 유사체.

#### 청구항 37

청구항 제 36 항에 있어서, 친수성 모이어티는 폴리에틸렌 글리콜 (PEG)이 되는, 글루카곤 펩티드 유사체.

#### 청구항 38

청구항 제 34 항 내지 제 37 항중 임의의 항에 있어서, 아실 또는 알킬기가 부착된 아미노산은 유사체의 위치 10의 아미노산 또는 C-말단 아미노산이 되는, 글루카곤 펩티드 유사체.

#### 청구항 39

청구항 제 34 항 내지 제 38 항중 임의의 항에 있어서, 아실기는  $C_4$  내지  $C_{30}$  지방 아실기 또는 알킬기는  $C_4$  내지  $C_{30}$  알킬기 되는, 글루카곤 펩티드 유사체.

#### 청구항 40

청구항 제 34 항 내지 제 39 항중 임의의 항에 있어서, 아실 또는 알킬기는 스페이스를 통하여 아미노산 측쇄에 부착된, 글루카곤 펩티드 유사체.

#### 청구항 41

청구항 제 40 항에 있어서, 글루카곤 펩티드는 위치 7에 하이드록시기가 없는 아미노산을 포함하는, 글루카곤 펩티드 유사체.

#### 청구항 42

청구항 제 41 항에 있어서, 하이드록시기가 없는 아미노산은 Abu 또는 Ile가 되는, 글루카곤 펩티드 유사체.

#### 청구항 43

다음의 아미노산 서열을 포함하고, 글루카곤 항진 활성을 가지는 글루카곤 펩티드:

X1-X2-Gln-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Lys-Tyr-Leu-Asp-Ser- Arg-Arg-Ala-Gln-Asp-Phe-Val-Gln-Trp-Leu-Met-Z (SEQ ID NO: 39)

여기서, X1 및/또는 X2는 디펩티딜 펩티다제 IV (DPP-IV)에 의한 절단에 글루카곤 펩티드의 민감성을 감소시키는 비-고유 아미노산이며,

Z는 -COOH (자연 생성되는 C-말단 카르복시산염), -Asn-COOH, Asn-Thr-COOH, 및 Y-COOH이며, 여기서 Y는 1 내지 2개의 아미노산이고, 그리고

분자내 다리, 바람직하게는 공유 결합은 위치 i의 아미노산과 i+4의 아미노산의 측쇄를 연결하고, i는 12, 16, 20 또는 24이다.

#### 청구항 44

청구항 제 43 항에 있어서, SEQ ID NO: 39의 위치 i과 i+4의 아미노산은 Lys 및 Glu가 되는, 글루카곤 펩티드 유사체.

#### 청구항 45

청구항 제 44 항에 있어서, 위치 16의 아미노산은 Glu이며, 위치 20의 아미노산은 Lys이 되는, 글루카곤 펩티드 유사체.

#### 청구항 46

청구항 제 43 항 내지 제 45 항중 임의의 항에 있어서, X1은 다음으로 구성된 군으로부터 선택되는, 글루카곤 펩티드 유사체: D-His, N-메틸-His,  $\alpha$ -메틸-His, 이미다졸 아세트산, 데스-아미노-His, 하이드록실-His, 아세틸-His, 호모-His, 및  $\alpha$ ,  $\alpha$ -디메틸 이미디아졸 아세트산 (DMIA).

#### 청구항 47

청구항 제 46 항에 있어서, X1은 DMIA가 되는, 글루카곤 펩티드 유사체.

#### 청구항 48

청구항 제 43 항 내지 제 47 항중 임의의 항에 있어서, X2는 D-Ser, D-Ala, Gly, N-메틸-Ser, Val, 및 아미노 이소부틸산 (AIB)으로 구성된 군으로부터 선택되는, 글루카곤 펩티드 유사체.

#### 청구항 49

청구항 제 43 항 내지 제 48 항중 임의의 항에 있어서, Z는 Asn-Thr-COOH가 되는, 글루카곤 펩티드 유사체.

#### 청구항 50

청구항 제 43 항 내지 제 48 항중 임의의 항에 있어서, Z는 Asn-COOH가 되는, 글루카곤 펩티드 유사체.

#### 청구항 51

청구항 제 43 항 내지 제 48 항중 임의의 항에 있어서, Z는 -COOH가 되는, 글루카곤 펩티드 유사체.

#### 청구항 52

청구항 제 43 항 내지 제 51 항중 임의의 항에 있어서, 글루카곤 펩티드는 위치 16, 17, 20, 21, 24 또는 29중 임의의 아미노산 또는 C-말단 아미노산에 친수성 모이어티에 공유적으로 링크된, 글루카곤 펩티드 유사체.

#### 청구항 53

청구항 제 52 항에 있어서, 친수성 모이어티는 Lys, Cys, Orn, 호모시스테인, 또는 아세틸-페닐알라닌에 공유적으로 링크된, 글루카곤 펩티드 유사체.

#### 청구항 54

청구항 제 52 항 내지 제 53 항중 임의의 항에 있어서, 친수성 모이어티는 폴리에틸렌 글리콜 (PEG)이 되는, 글루카곤 펩티드 유사체.

#### 청구항 55

청구항 제 54 항에 있어서, PEG는 약 1,000 Daltons 내지 약 40,000 Daltons의 분자량을 가지는, 글루카곤 펩티드 유사체.

#### 청구항 56

청구항 제 54 항에 있어서, PEG는 약 20,000 Daltons 내지 약 40,000 Daltons의 분자량을 가지는, 글루카곤 펩티드 유사체.

#### 청구항 57

청구항 제 43 항 내지 제 56 항중 임의의 항에 있어서, 인간 글루카곤 수용체에서 EC<sub>50</sub>값은 글루카곤 수용체를 과다발현시키는 HEK293 세포에서 cAMP 유도를 측정하는 *in vitro* 분석에서 측정하였을 때 약 10nM 또는 그 미만

이 되는, 글루카곤 펩티드 유사체.

#### 청구항 58

글루카곤 항진 활성을 가지고, 다음의 아미노산 서열을 포함하는 글루카곤 펩티드:

X1-X2-Gln-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Lys-Tyr-Leu-Asp-Ser-Arg-Arg-Ala-Gln-Asp-Phe-Val-Gln-Trp-Leu-Met-Z (SEQ ID NO: 39),

여기서, X1 및/또는 X2는 디펩티딜 펩티다제 IV (DPP-IV)에 의한 절단에 글루카곤 펩티드의 민감성을 감소(또는 저항성을 증가)시키는 비-고유 아미노산이며,

글루카곤 펩티드의 위치 16, 20, 21, 및 24중 하나, 둘, 셋, 넷 또는 그 이상은  $\alpha$ ,  $\alpha$ -이중치환된 아미노산으로 치환되며, 그리고

Z는 -COOH (자연 생성되는 C-말단 카르복시산염), -Asn-COOH, Asn-Thr-COOH, 및 Y-COOH이며, 여기서 Y는 1 내지 2개의 아미노산이며; 그리고

선택적으로, 글루카곤 펩티드는 위치 16, 17, 20, 21, 24 또는 29중 임의의 아미노산 또는 C-말단 아미노산에 친수성 모이어티에 공유적으로 링크된다.

#### 청구항 59

청구항 제 58 항에 있어서, 다음을 포함하는 글루카곤 펩티드:

- (a) 글루카곤 펩티드의 위치 16에서 AIB,
- (b) 글루카곤 펩티드의 위치 20에서 AIB,
- (c) 글루카곤 펩티드의 위치 21에서 AIB,
- (d) 글루카곤 펩티드의 위치 24에서 AIB,
- (e) 글루카곤 펩티드의 위치 16 및 20에서 AIB,
- (f) 글루카곤 펩티드의 위치 16 및 24에서 AIB,
- (g) 글루카곤 펩티드의 위치 20 및 24에서 AIB; 또는
- (h) 글루카곤 펩티드의 위치 16, 20 및 24에서 AIB.

#### 청구항 60

청구항 제 58 항 또는 제 59 항중 임의의 항에 있어서, X1은 다음으로 구성된 군으로부터 선택되는, 글루카곤 펩티드:

D-His, N-메틸-His,  $\alpha$ -메틸-His, 이미다졸 아세트산, 데스-아미노-His, 하이드록실-His, 아세틸-His, 호모-His, 및  $\alpha$ ,  $\alpha$ -디메틸 이미디아졸 아세트산 (DMIA).

#### 청구항 61

청구항 제 60 항에 있어서, X1은 DMIA가 되는, 글루카곤 펩티드.

#### 청구항 62

청구항 제 58 항 내지 제 61 항중 임의의 항에 있어서, X2는 D-Ser, D-Ala, Gly, N-메틸-Ser, Val, 및 아미노 이소부틸산 (AIB)으로 구성된 군으로부터 선택되는, 글루카곤 펩티드.

#### 청구항 63

청구항 제 58 항 내지 제 62 항중 임의의 항에 있어서, Z는 Asn-Thr-COOH가 되는, 글루카곤 펩티드.

#### 청구항 64

청구항 제 58 항 내지 제 62 항중 임의의 항에 있어서, Z는 Asn-COOH가 되는, 글루카곤 펩티드.

#### 청구항 65

청구항 제 58 항 내지 제 62 항중 임의의 항에 있어서, Z는 -COOH가 되는, 글루카곤 펩티드.

#### 청구항 66

청구항 제 58 항 내지 제 65 항중 임의의 항에 있어서, 친수성 모이어티는 Lys, Cys, Orn, 호모시스테인, 또는 아세틸-페닐알라닌에 공유적으로 링크된, 글루카곤 펩티드.

#### 청구항 67

청구항 제 58 항 내지 제 66 항중 임의의 항에 있어서, 친수성 모이어티는 폴리에틸렌 글리콜 (PEG)이 되는, 글루카곤 펩티드.

#### 청구항 68

청구항 제 67 항에 있어서, PEG는 약 1,000 Daltons 내지 약 40,000 Daltons의 분자량을 가지는, 글루카곤 펩티드.

#### 청구항 69

청구항 제 67 항에 있어서, PEG는 약 20,000 Daltons 내지 약 40,000 Daltons의 분자량을 가지는, 글루카곤 펩티드.

#### 청구항 70

청구항 제 58 항 내지 제 69 항중 임의의 항에 있어서, 인간 글루카곤 수용체에서 EC<sub>50</sub>값은 글루카곤 수용체를 과다발현시키는 HEK293 세포에서 cAMP 유도를 측정하는 *in vitro* 분석에서 측정하였을 때 약 10nM 또는 그 미만 이 되는, 글루카곤 펩티드 유사체.

#### 청구항 71

청구항 43항 또는 제58항에 있어서, 다음으로 구성된 군으로부터 선택된 추가 아미노산 변형을 가지며, 글루카곤 항진 활성을 보유하는, 글루카곤 펩티드 유사체:

위치 10에서 Tyr은 Phe 또는 Val으로 치환;

위치 12에서 Lys를 Arg으로 치환;

위치 15에서 Asp를 Glu으로 치환;

위치 16에서 Ser을 Thr 또는 AIB으로 치환;

위치 20에서 Gln을 Ala 또는 AIB으로 치환;

위치 21에서 Asp를 Glu으로 치환;

위치 24에서 Gln을 Ala 또는 AIB으로 치환;

위치 27에서 Met을 Leu 또는 Nle로 치환;

위치 28에서 Asn은 전하를 띤 아미노산으로 치환;

위치 28에서 Asn은 Lys, Arg, His, Asp, Glu, 시스테인산, 및 호모시스테인산으로 구성된 군으로부터 선택된 전하를 띤 아미노산으로 치환;

위치 28에서 Asn, Asp, 또는 Glu으로 치환;

위치 28에서 Asp로 치환;

위치 28에서 Glu으로 치환;

위치 29에서 Thr를 전하를 띤 아미노산으로 치환;

위치 29에서 Thr는 Lys, Arg, His, Asp, Glu, 시스테인산, 및 호모시스테인산으로 구성된 군으로부터 선택된 전

하를 띤 아미노산으로 치환;

위치 29에서 Asp, Glu, 또는 Lys으로 치환;

위치 29에서 Glu으로 치환;

위치 29 다음에 1-3개의 전하를 띤 아미노산 추가;

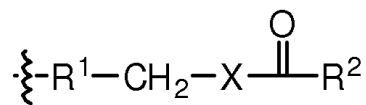
위치 30에 Glu 또는 Lys 추가;

위치 31에 Lys 추가; 또는 이의 조합.

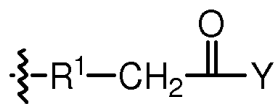
## 청구항 72

청구항 제 71 항에 있어서, 다음의 아미노산 변형중 하나 또는 이의 조합을 더 포함하는, 글루카곤 펩티드 유사체:

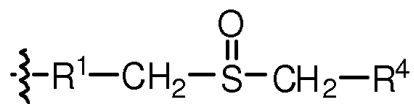
위치 3에 하기 구조 I, II 또는 III의 측쇄를 보유하는 아미노산으로 치환



Structure I



Structure II



Structure III

상기 식에서, R<sup>1</sup>은 C<sub>0-3</sub> 알킬 또는 C<sub>0-3</sub> 헤테로알킬이며; R<sup>2</sup>는 NHR<sup>4</sup> 또는 C<sub>1-3</sub> 알킬이며; R<sup>3</sup>는 C<sub>1-3</sub> 알킬이며; R<sup>4</sup>는 H 또는 C<sub>1-3</sub> 알킬이며; X는 NH, O, 또는 S이며; 그리고 Y는 NHR<sup>4</sup>, SR<sup>3</sup>, 또는 OR<sup>3</sup>이며;

아실 또는 알킬기에 선택적으로 스페이스를 통하여 공유적으로 부착된 측쇄를 포함하는 아미노산의 치환 또는 추가, 이때 아실 또는 알킬기는

자연-생성 아미노산에 비-고유한 것이며, 선택적으로 다음의 변형이 복합된다:

위치 7에서 Thr이 Abu 또는 Ile로 치환;

위치 20의 Gln은 Ala, Ser 또는 Thr으로 치환;

위치 24의 Gln은 Ala, Ser 또는 Thr으로 치환;

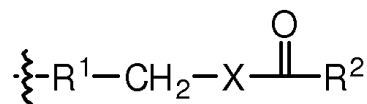
C-말단에 SEQ ID NO: 20의 아미노산 서열 추가, 여기서 위치 29의 아미노산은 Thr 또는 Gly임,

친수성 모이어티에 공유적으로 부착된 아미노산 치환 또는 추가; 또는 이의 조합.

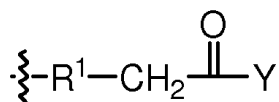
## 청구항 73

청구항 제 43 항 또는 제 58 항에 있어서, 다음의 아미노산 변형중 하나 또는 이의 조합을 더 포함하고, 글루카곤 항진 활성을 보유하는, 글루카곤 펩티드 유사체:

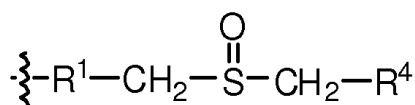
위치 3에 하기 구조 I, II 또는 III의 측쇄를 보유하는 아미노산으로 치환



Structure I



Structure II



Structure III

상기 식에서, R<sup>1</sup>은 C<sub>0-3</sub> 알킬 또는 C<sub>0-3</sub> 헤테로알킬이며; R<sup>2</sup>는 NHR<sup>4</sup> 또는 C<sub>1-3</sub> 알킬이며; R<sup>3</sup>는 C<sub>1-3</sub> 알킬이며; R<sup>4</sup>는 H 또는 C<sub>1-3</sub> 알킬이며; X는 NH, O, 또는 S이며; 그리고 Y는 NHR<sup>4</sup>, SR<sup>3</sup>, 또는 OR<sup>3</sup>이며;

아실 또는 알킬기에 선택적으로 스페이스를 통하여 공유적으로 부착된 측쇄를 포함하는 아미노산의 치환 또는 추가, 이때 아실 또는 알킬기는 자연-생성 아미노산에 비-고유한 것이며, 선택적으로 다음의 변형이 복합된다:

위치 7에서 Thr이 Abu 또는 Ile로 치환;

위치 20의 Gln은 Ala, Ser 또는 Thr으로 치환;

위치 24의 Gln은 Ala, Ser 또는 Thr으로 치환;

C-말단에 SEQ ID NO: 20의 아미노산 서열 추가, 여기서 위치 29의 아미노산은 Thr 또는 Gly임,

친수성 모이어티에 공유적으로 부착된 아미노산의 치환 또는 추가; 또는 이의 조합

#### 청구항 74

글루카곤 항진 활성을 보유하며, 다음의 변형을 포함하는, SEQ ID NO: 1의 글루카곤 펩티드의 유사체:

(a) 하기로 구성된 군으로부터 선택된 최소 하나의 아미노산 변형

위치 28의 Asn은 전하를 띠는 아미노산으로 치환;

위치 28의 Asn은 Lys, Arg, His, Asp, Glu, 시스테인산, 및 호모시스테인산으로 구성된 군으로부터 선택된 전하를 띠는 아미노산으로 치환;

위치 28은 Asn, Asp, 또는 Glu으로 치환;

위치 28은 Asp으로 치환;

위치 28은 Glu으로 치환;

위치 29의 Thr는 전하를 띠는 아미노산으로 치환;

위치 29의 Thr는 Lys, Arg, His, Asp, Glu, 시스테인산, 및 호모시스테인산으로 구성된 군으로부터 선택된 전하를 띠는 아미노산으로 치환;

위치 29는 Asp, Glu, 또는 Lys으로 치환;

위치 29는 Glu으로 치환;

위치 29 다음에 1-3개의 전하를 띤 아미노산 삽입;

위치 29 다음에 Glu 또는 Lys 삽입;

위치 29 다음에 Gly-Lys 또는 Lys-Lys;

또는 이의 조합;

그리고 A군 또는 B 군 또는 이의 조합으로부터 선택된 최소 하나의 아미노산 변형, 여기서 A군은 위치 15의 Asp가 Glu으로 치환, 위치 16의 Ser이 Thr 또는 AIB로 치환;

그리고 B군은 다음으로 구성된 것으로부터 선택된 아미노산 변형이다:

위치 1의 His은 디펩티딜 펩티다제 IV (DPP- IV)에 의한 절단에 글루카곤 펩티드의 감응성을 감소시키는 비-고유 아미노산으로 치환;

위치 2의 Ser은 디펩티딜 펩티다제 IV (DPP- IV)에 의한 절단에 글루카곤 펩티드의 감응성을 감소시키는 비-고유 아미노산으로 치환;

위치 10의 Tyr은 Phe 또는 Val로 치환;

위치 12의 Lys 은 Arg으로 치환;

위치 20의 Gln은 Ala 또는 AIB으로 치환;

위치 21의 Asp는 Glu으로 치환;

위치 24의 Gln은 Ala 또는 AIB으로 치환;

위치 27의 Met은 Leu 또는 Nle로 치환;

위치 27-29의 아미노산 결손;

위치 28-29의 아미노산 결손;

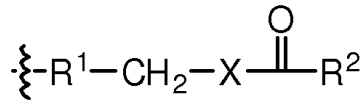
위치 29의 아미노산 결손;

또는 이들의 조합.

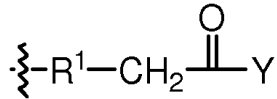
#### 청구항 75

청구항 제 74 항에 있어서, 다음의 아미노산 변형중 하나 또는 이의 조합을 더 포함하는, 글루카곤 펩티드 유사체:

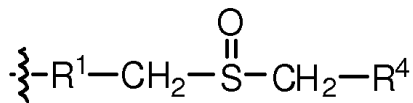
위치 3에 하기 구조 I, II 또는 III의 측쇄를 보유하는 아미노산으로 치환



Structure I



Structure II



Structure III

상기 식에서,  $\text{R}^1$ 은  $\text{C}_{0-3}$  알킬 또는  $\text{C}_{0-3}$  헤테로알킬이며;  $\text{R}^2$ 는  $\text{NHR}^4$  또는  $\text{C}_{1-3}$  알킬이며;  $\text{R}^3$ 는  $\text{C}_{1-3}$  알킬이며;  $\text{R}^4$ 는 H 또는  $\text{C}_{1-3}$  알킬이며; X는 NH, O, 또는 S이며; 그리고 Y는  $\text{NHR}^4$ ,  $\text{SR}^3$ , 또는  $\text{OR}^3$ 이며;

아실 또는 알킬기에 선택적으로 스페이스를 통하여 공유적으로 부착된 측쇄를 포함하는 아미노산의 치환 또는 추가, 이때 아실 또는 알킬기는 자연-생성 아미노산에 비-고유한 것이며, 선택적으로 다음의 변형이 복합된다:

위치 7에서 Thr이 Abu 또는 Ile로 치환;

위치 20의 Gln은 Ala, Ser 또는 Thr으로 치환;

위치 24의 Gln은 Ala, Ser 또는 Thr으로 치환;

C-말단에 SEQ ID NO: 20의 아미노산 서열 추가, 여기서 위치 29의 아미노산은 Thr 또는 Gly임,

친수성 모이어티에 공유적으로 부착된 아미노산의 치환 또는 추가; 또는 이의 조합.

#### 청구항 76

청구항 제 74 항 또는 제 75 항에 있어서, 락탐 다리는 위치 i 및 i+4 사이의 아미노산 측쇄를 연결시키며, 이때 i는 12, 61, 20, 또는 24인, 글루카곤 펩티드 유사체.

#### 청구항 77

청구항 제 74 항 내지 제76 항중 임의의 항에 있어서, 위치 16, 20, 21, 및 24의 하나, 둘, 셋 또는 이들 모두에서  $\alpha$ ,  $\alpha$ -이중치환된 아미노산 를 포함하는, 글루카곤 펩티드 유사체.

#### 청구항 78

청구항 제 77 항에 있어서,  $\alpha$ ,  $\alpha$ -이중치환된 아미노산은 AIB가 되는, 글루카곤 펩티드 유사체.

#### 청구항 79

청구항 제 78 항에 있어서, SEQ ID NO: 76의 아미노산 서열을 포함하는, 글루카곤 펩티드 유사체.

#### 청구항 80

SEQ ID NO: 40-56 중 임의의 아미노산 서열을 포함하는 글루카곤 펩티드.

#### 청구항 81



SEQ ID NO: 40의 아미노산 서열을 포함하는 글루카곤 펩티드.

#### 청구항 82

전술한 어느 한 항에 있어서, 글루카곤 펩티드 또는 이의 유사체가 친수성 모이어티가 없을 때, 글루카곤 펩티드 또는 이의 유사체는 글루카곤 수용체에서 고유 글루카곤 활성의 적어도 약 20%를 나타내는, 글루카곤 펩티드 또는 이의 유사체.

#### 청구항 83

전술한 어느 한 항에 있어서, 글루카곤 펩티드 또는 이의 유사체가 친수성 모이어티가 없을 때, 글루카곤 펩티드 또는 이의 유사체는 GLP-1 수용체에서 고유 GLP-1 활성의 단지 약 0.5%를 나타내는, 글루카곤 펩티드 또는 이의 유사체.

#### 청구항 84

링커를 통하여 결합된 두 개 펩티드를 포함하는 이량체에 있어서, 두 개 펩티드는 청구항 1-3, 25-30, 43-70, 및 80-83의 글루카곤 펩티드 또는 청구항 4-24, 31-42, 및 71-79의 유사체가 되는, 이량체.

#### 청구항 85

청구항 제 84 항에 있어서, 이량체는 동종이량체인 것을 특징으로 하는 이량체.

#### 청구항 86

청구항 제 84 항 또는 제 85 항에 있어서, 링커는 2기능성 티올 교차 링커 또는 바이오 기능 아민 교차 링커로부터 선택된, 이량체.

#### 청구항 87

콘주게이트 모이어티와 청구항 1-3, 25-30, 43-70, 및 80-83의 글루카곤 펩티드 또는 청구항 4-24, 31-42, 및 71-79의 유사체 및 청구항 84-86의 이량체 또는 이의 조합을 포함하는, 콘주게이트.

#### 청구항 88

청구항 1-3, 25-30, 43-70, 및 80-83의 글루카곤 펩티드 또는 청구항 4-24, 31-42, 및 71-79의 유사체 및 청구항 84-86의 이량체가 SEQ ID NO: 20의 아미노산 서열을 포함하는 펩티드에 융합된 것을 포함하는 융합 펩티드.

#### 청구항 89

청구항 1-3, 25-30, 43-70, 및 80-83의 글루카곤 펩티드 또는 청구항 4-24, 31-42, 및 71-79의 유사체 및 청구항 84-86의 이량체, 청구항 87의 콘주게이트, 청구항 88의 융합 펩티드 또는 이의 조합과, 약리학적으로 허용가능한 캐리어를 포함하는 약학 조성물.

#### 청구항 90

환자에게 글루카곤 항진제를 투여하기 위한 키트에 있어서, 키트는 청구항 89항의 약학 조성물과, 환자에게 약학 조성물을 투여하는 장치를 포함하는, 키트.

#### 청구항 91

청구항 제 90 항에 있어서, 장치는 주사기와 바늘을 포함하며, 약학 조성물은 주사기내에 미리-채워져 있는, 키트.

#### 청구항 92

환자에서 소장관의 일시적 마비를 유도하는 방법에 있어서, 이 방법은 환자에게서 소장관의 일시적 마비를 일으키는데 효과적인 유효량의 청구항 89항의 약학 조성물을 환자에게 투여하는 것을 포함하는, 방법.

#### 청구항 93

환자에서 체중 증가를 감소 또는 체중 감소를 유도하는 방법에 있어서, 이 방법은 환자에게서 체중 증가를 감소 또는 체중 감소를 유도하는 효과적인 유효량의 청구항 89항의 약학 조성물을 환자에게 투여하는 것을 포함하는, 방법.

#### 청구항 94

환자에서 저혈당을 치료 또는 예방하는 방법에 있어서, 이 방법은 환자에게서 저혈당을 치료 또는 예방하는 효과적인 유효량의 청구항 89항의 약학 조성물을 환자에게 투여하는 것을 포함하는, 방법.

#### 청구항 95

환자에서 혈당 수준을 안정화시키는 방법에 있어서, 이 방법은 환자는 인슐린 투여를 포함하는 치료 섭생을 받고 있으며, 환자에게서 혈당 수준을 안정화시키는데 효과적인 유효량의 청구항 89항의 약학 조성물을 환자에게 투여하는 것을 포함하는, 방법.

#### 청구항 96

청구항 제 95 항에 있어서, 약학 조성물은 인슐린을 더 포함하는, 방법.

## 명세서

### 기술분야

[0001] 관련 출원의 교차 참고

[0002] 본 출원은 하기 특허에 대하여 우선권을 주장한다: 2008년 6월 17일자 제출된 미국 가특허 출원 06/073,193; 2008년 7월 3일자로 제출된 미국 가특허 출원 61/078,165; 2008년 8월 20일자로 제출된 61/090,415. 각 특허의 내용물은 전문이 참고문헌에 통합되어 있음을 밝혀둔다.

### 배경기술

[0003] 전(Pre)-프로글루카곤은 상이한 조직들에서 상이한 다수의 프로글루카곤-유도된 펩티드(글루카곤, 글루카곤-유사 펩티드-1(GLP-1), 글루카곤-유사 펩티드-2 (GLP-2) 및 옥시토모둘린 (OXM)을 포함)를 형성하도록 프로세스되는 158개 아미노산 전구물질 폴리펩티드로써, 전(Pre)-프로글루카곤은 포도당 항상성(homeostasis), 인슐린 분비, 위 배출(gastric emptying), 및 장의 성장 뿐만 아니라 음식 섭취 조절을 포함하는 다양한 광범위한 생리학적 기능에 관련되어 있다. 글루카곤은 전-프로글루카곤의 아미노산 33부터 61까지의 아미노산에 상응하는 29개-아미노산으로 된 펩티드이며, GLP-1은 전-프로글루카곤의 아미노산 72 내지 108에 상응하는 37개 아미노산으로 된 펩티드로 생성된다.

[0004] 혈당 수준이 너무 떨어져 신체의 활동을 위한 충분한 에너지를 제공할 수 없을 때 저혈당이 일어난다. 성인 또는 10살 이상의 어린이에서, 저혈당은 당뇨 치료의 부작용을 제외하고는 흔한 것은 아니지만, 다른 약물 또는 질환, 호르몬 또는 효소 기능이상 또는 중양으로 발생할 수도 있다. 혈당이 떨어지기 시작할 때, 췌장에서 생산되는 호르몬인 글루카곤은 간으로 신호를 보내 글리코겐을 분해하여, 포도당을 방출시키도록 함으로써 혈당이 다시 정상 수준으로 상승되도록 만든다. 따라서, 혈당 조절에서 글루카곤의 가장 잘 인지된 역할은 인슐린 작용을 중화시키고, 혈당 수준을 유지시키는 것이다. 그러나, 당뇨병의 경우, 저혈당에 대한 이와 같은 글루카곤의 반응이 훼손되어, 혈당 수준을 정상 범위로 되돌리는 것이 더 어렵게 된다.

[0005] 저혈당은 즉각적인 의료 조치를 요구하는 생명을 위협하는 사안이다. 글루카곤 투여는 급성 저혈당 치료를 위해 정립된 약물이며, 투여 후 몇 분내에 혈당을 정상 수준으로 회복시킬 수 있다.

[0006] 글루카곤이 저혈당의 긴급 의료 치료에 이용되면, 글루카곤의 결정형은 희석된 산 완충액에 용해되고, 용액은 근육으로 주사된다. 이와 같은 치료가 효과는 있지만, 방법적으로 번거로우며, 의식이 온전하지 않은 일부 사람들에게는 위험하다. 따라서, 모 분자의 생리학적 거동은 유지되면서, 관련된 생리학적 조건하에서 충분히 가용성이 있으며 안정적이어서, 바로 주사할 수 있는 용액으로 선-조제될 수 있는 글루카곤 유사체가 필요하다.

[0007] 추가로, 당뇨병은 미세혈관 합병증을 지연 또는 예방하기 위하여 정상적인 혈당 수준으로 유지시켜야 한다. 이와 같은 목표는 강력한 인슐린 치료법을 사용해야 이루어진다. 이와 같은 목적을 이루기 위한 노력에 있어서,

의사들은 그들의 당뇨병 환자들이 저혈당을 자주 겪게 되고 그 심각성이 증가된다는 문제에 봉착한다. 따라서, 현재 인슐린 치료법보다 저혈당을 덜 야기시키는 당뇨병 치료를 위한 개선된 약제 및 방법이 요구된다.

[0008] 여기에서 논의된 것과 같이, 시판용 약학 조성물내에 생리학적 pH에서 생체물리적 안정성 및 수용성 용해도가 개선된 고효능 글루카곤 항진제들이 제공된다. 고효능 글루카곤은 생리학적 pH 범위에서 가용성이거나 안정적이지 않기 때문에, 건조 제품으로 제조되어, 재구성시켜 사용해야만 한다. 여기에서 논의되는 글루카곤 유사체는 현재 고효능 호르몬이 이용되는 의학적 환경에서 사용함에 있어서 우수한 강화된 물리적 성질들을 가진다. 이들 화합물들은 한 구체예에 따르면, 사전-조제된 용액으로 준비되어, 저혈당 치료에 바로 주사될 수 있다. 대안으로, 글루카곤 항진제는 좀더 안정적인 혈당 수준을 유지하도록 인슐린의 효과를 완충시키기 위하여 인슐린과 공동-투여될 수 있다. 또한, 여기에서 논의된 것과 같이, 변형된 글루카곤 펩티드를 포함하는 조성물의 유익한 용도들도 하기에 논의된다.

[0009] **요약**

[0010] 본 발명의 한 구체예는 고효능 글루카곤 펩티드(SEQ ID NO:1)과 비교하여 개선된 용해도를 나타내면서, 글루카곤 수용체 활성을 보유하는 글루카곤 펩티드를 제공한다. 고효능 글루카곤은 수용액, 특히, 생리학적 pH에서 응집되고, 시간이 지남에 따라 침전되는 저조한 용해도를 보인다. 대조적으로 본 발명의 한 구체예의 글루카곤 펩티드는 pH 6 내지 8, 또는 6 내지 9, 예를 들면, 25℃에서 24시간 후, pH 7에서 고효능 글루카곤과 비교하여, 적어도 2배, 5배 또는 더 높은 용해도를 나타낸다.

[0011] 한 구체예에서, 글루카곤 펩티드는 고효능 글루카곤 활성의 적어도 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 75% 활성, 80% 활성, 85% 활성, 또는 90%를 나타낸다(글루카곤 펩티드 vs. 글루카곤의 EC<sub>50</sub>의 역비례로 계산, 예를 들면, 실시예 13에서 전반적으로 설명된 것을 이용하여 cAMP 생산으로 측정). 한 구체예에서, 본 발명의 글루카곤 펩티드는 글루카곤과 동일한 또는 더 큰 활성 (여기에서 “효능”과 동의어로 이용됨)을 가진다. 일부 구체예에서, 글루카곤 펩티드는 고효능 글루카곤 활성의 최대 약 100%, 1000%, 10,000%, 100,000%, 또는 1,000,000%를 가진다. 글루카곤은 정상적으로 GLP-1 수용체에서 고효능 GLP-1 활성의 약 1%를 가진다. GLP-1(7-36) 아미드(SEQ ID NO: 57) 또는 GLP-1(7-37) 산(SEQ ID NO: 58)은 GLP-1의 생물학적 효능형이며, 이는 GLP-1 수용체에서 기본적으로 등가의 활성을 가진다. 글루카곤은 또한 GLP-1 수용체와 비교하여 글루카곤 수용체에 대해 10 내지 20배 이상 선택적이다(글루카곤 수용체 vs. GLP-1 수용체에 대한 글루카곤의 EC<sub>50</sub>의 역비로 계산된 선택성). 예를 들면, 글루카곤 수용체에서 글루카곤의 EC<sub>50</sub>은 0.22 nM이며, GLP-1 수용체에서 글루카곤의 EC<sub>50</sub>은 3.85 nM 이 되는 분석에서, 계산된 선택성은 17.5-배이다. 활성은 실시예 13에서 전반적으로 설명된 분석을 이용한 cAMP 생산으로 측정될 수 있다. 일부 구체예에서, 본 발명의 글루카곤 펩티드는 GLP-1 수용체에서 고효능 GLP-1의 활성의 약 5%, 4%, 3%, 2% 또는 1% 미만의 활성을 나타내거나 및/또는 GLP-1 수용체와 비교하여 글루카곤 수용체에 대해 약 5-배, 10-배, 또는 15-배이상의 선택성을 나타낸다. 예를 들면, 일부 구체예에서, 본 발명의 글루카곤 펩티드는 GLP-1 수용체에서 고효능 GLP-1 활성의 5% 미만을 나타내고, GLP-1 수용체와 비교하여 글루카곤 수용체에 대해 5배 이상의 선택성을 나타낸다.

[0012] 본 발명의 임의의 글루카곤 펩티드는 추가적으로 개선된 안정성 및/또는 감소된 분해를 나타내는데, 예를 들면, 25℃에서 24시간 후에 측정되었을 때 고효능 펩티드의 적어도 95%를 보유한다. 일부 구체예에서, 본 발명의 글루카곤 펩티드는 개선된 안정성을 보이는데, 예를 들면, 적어도 20 ℃ (예, 21 ℃, 22 ℃, 23 ℃, 24 ℃, 25 ℃, 26 ℃, 적어도 27.5 ℃, 적어도 30 ℃, 적어도 35 ℃, 적어도 40 ℃, 적어도 50 ℃)의 온도에서, 그리고 100 ℃ 미만, 85 ℃ 미만, 75 ℃ 미만, 또는 70 ℃ 미만에서 용액내 1주 이상(예, 2 주, 4 주, 1달, 2달, 3달, 4달, 6달, 8달, 10달, 12달) 펩티드 농도의 적어도 75% (예, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 95% 이상, 최대 100%) 또는 분해된 펩티드의 약 25%가 (예, 20% 미만, 15% 미만, 10% 미만, 5% 미만, 4%, 3%, 2%, 1%, 0% 까지) UV 감지기에 의해 280nm에서 감지된다.

[0013] 한 구체예에 따르면, 개선된 용해도를 가진 글루카곤 펩티드가 제공되는데, 여기서, 펩티드는 펩티드의 C-말단 부분, 한 구체예에서 SEQ ID NO: 1의 위치 1의 C-말단 위치로 전하를 띤 아미노산을 도입시키는 아미노산 치환 및/또는 첨가에 의해 변형된다. 선택적으로, C-말단 부분내로 도입 되고, 하나, 둘, 또는 세 개의 전하를 띤 아미노산이 도입될 수 있고, 한 구체예에서 위치 27의 C-말단에 도입될 수 있다. 한 구체예에 따르면, 위치 28 및/또는 29의 고효능 아미노산은 전하를 띤 아미노산으로 치환되며, 및/또는 1 내지 3개의 전하를 띤 아미노산이 위치 29 다음의 펩티드 C-단부에 추가된다. 예시적인 구체예에서, 하나, 둘 또는 모든 전하를 띤 아미노산은 음 전하를 띤다. 추가 변형, 예를 들면, 글루카곤 활성은 유지되면서 글루카곤 펩티드에 보존성 치환이 만들어

질 수도 있다.

- [0014] 한 예시적인 구체예에서, 글루카곤 펩티드는 SEQ ID NO: 11의 아미노산 서열을 포함하거나 고유 글루카곤에 대해 1 내지 3개의 추가 아미노산을 포함하는 이의 유사체, 또는 이의 글루카곤 항진제를 포함한다. SEQ ID NO: 11은 변형된 글루카곤 펩티드를 나타내는데, 여기서, 고유 단백질의 위치 28의 아스파라진 잔기는 아스파르트산으로 치환되었다. 또 다른 예시적인 구체예에서, 글루카곤 펩티드는 SEQ ID NO: 38의 아미노산 서열을 포함하는데, 여기서, 고유 단백질의 위치 28의 아스파라진 잔기는 글루타민산으로 치환되었다. 다른 예시적인 구체예들은 SEQ ID NO: 24, 25, 26, 33, 35, 36 및 37의 글루카곤 펩티드를 포함한다.
- [0015] 또 다른 구체예에 따르면, 글루카곤 수용체에서 강화된 효능을 가지는 글루카곤 펩티드가 제공되는데, 이때 펩티드는 고유 글루카곤 (SEQ ID NO: 1)의 위치 16에 아미노산 변형을 포함한다. 비-제한적 실시예에 따르면, 위치 16에서 자연 생성 세린을 글루타민산 또는 길이가 4개의 원자인 측쇄를 가지는 또 다른 음 전하를 띤 아미노산으로 치환되거나, 대안으로 글루타민, 호모글루타민산, 또는 호모시스테인산중 임의의 하나로 치환되거나, 또는 적어도 하나의 이형원자(예 N, O, S, P)를 포함하고, 측쇄 길이가 약 4개(또는 3-5개)원자를 가지는 전하를 띤 아미노산으로 치환되면, 이와 같은 강화된 능력이 제공된다. 세린(위치 16)을 글루타민산으로 치환시키면 글루카곤 수용체에서 적어도 2-배, 4-배, 5-배 및 최대 10-배 더 글루카곤 활성이 강화된다. 일부 구체예에서, 글루카곤 펩티드는 GLP-1 수용체와 비교하여 글루카곤 수용체에 대한 선택성, 예, 적어도 5-배, 10-배, 또는 15-배 선택성은 보유한다.
- [0016] 전술한 화합물들의 용해도는 펩티드에 친수성 모이어티를 부착시켜 더 개선시킬 수 있다. 이와 같은 기들을 도입시키면, 순환계에서 연장된 반감기로 나타나는 것과 같이, 작용 기간도 증가된다. 한 구체예에서, 친수성 모이어티는 글루카곤 펩티드의 위치 16, 17, 21, 24, 29, 40 중 하나이상, C-말단 연장부내에, 또는 C-말단 아미노산의 잔기의 측쇄에 공유 링크된 폴리에틸렌 글리콜 (PEG) 쇄 또는 다른 수용성 폴리머다. 일부 구체예에서, 이 위치의 고유 아미노산은 친수성 모이어티와 교차 링크에 적합한 측쇄를 가진 아미노산으로 치환되어, 펩티드에 친수성 모이어티의 링크지를 만든다. 예시적인 아미노산은 Cys, Lys, Orn, 호모-Cys, 또는 아세틸 페닐알라닌 (Ac-Phe)이 포함된다. 다른 구체예에서, 친수성기를 포함하도록 변형된 아미노산은 C-말단에서 펩티드에 추가된다. 한 구체예에 따르면, 폴리에틸렌 글리콜 사슬은 약 500 내지 40,000 Daltons 범위에서 선택된 평균적 총 분자량을 가진다. 한 구체예에서, 폴리에틸렌 글리콜 사슬은 약 500 내지 약 5,000 Daltons 범위에서 선택된 평균적 총 분자량을 가진다. 또 다른 구체예에서, 폴리에틸렌 글리콜 사슬은 약 10,000 내지 약 20,000 Daltons의 분자량을 가진다. 또 다른 예시적인 구체예에서, 폴리에틸렌 글리콜 사슬은 약 20,000 내지 약 40,000 Daltons의 분자량을 가진다.
- [0017] 일부 구체예에 따르면, 여기에서 논의된 글루카곤 펩티드는 아실기 또는 알킬기를 포함하도록 변형되고, 아실 또는 알킬기는 자연-생성 아미노산에 고유한 것이 아니다. 아실화 또는 알킬화는 순환계에서 글루카곤 펩티드의 반감기를 증가시킬 수 있고, 글루카곤 및/또는 GLP-1 수용체에서 작용 개시의 지연 및/또는 작용 기간을 연장시킬 수 있으며 및/또는 DPP-IV와 같은 프로테아제에 대한 저항성을 개선시킬 수 있다. 아실화 또는 알킬화는 또한 중성 pH에서 펩티드의 용해도를 강화시킬 수도 있다. 여기에서 나타난 것과 같이, 글루카곤 수용체와 글루카곤 펩티드의 GLP-1 수용체에서의 활성은 아실화 후에 강화되지 않았다면 유지된다. 일부 측면에서, 글루카곤 펩티드는 스페이스를 통하여 아실 또는 알킬기에 부착되는데, 스페이스의 예로는 아미노산, 이가펩티드, 삼가펩티드, 친수성 2기능성 스페이스, 또는 소수성 2기능성 스페이스가 된다. 특정 측면에서, GLP-1 및 글루카곤 수용체에서 활성은 스페이스를 통하여 펩티드가 아실화될 때 관측된다. 선택된 측면에서, 예를 들면, 펩티드가 분자내 다리 (예, 공유적 분자내 다리)를 가지지 않을 때, 스페이스 없이 아실기가 펩티드에 부착된 아실화된 펩티드와 비교하였을 때, 스페이스에 의한 펩티드의 아실화되는 시점에 GLP-1 및 글루카곤 수용체에서의 활성의 강화가 관측된다. 일부 구체예에 따르면, 스페이스는 길이가 3개 내지 10개 원자(예, 6 내지 10개 원자)의 아미노산 또는 펩티드 기본골격 구조를 가지는 아미노산 또는 이가펩티드다. 특정 구체예에 따르면, 스페이스와 아실 또는 알킬기의 전체 길이는 약 14개 내지 약 28개 원자, 예, 17 내지 28개, 19 내지 26개 원자, 19 내지 21개 원자다. 글루카곤 활성 강화의 목적에 적합한 스페이스는 여기에서 더 논의된다. 일부 구체예에서, 여기에서 논의된 아실화된 또는 알킬화된 펩티드는 GLP-1 수용체에서 선택적으로 활성을 감소시키는 변형을 더 포함하는데, 예를 들면, 위치 7에서 Thr의 변형, 예를 들면, Thr은 하이드록실기가 없는 아미노산, 예, 아미노부틸산 (Abu) 또는 Ile로의 치환; 위치 27 또는 28의 아미노산에서 C-말단 아미노산을 결손시켜 길이가 27-개 또는 28-개 아미노산 펩티드를 생성시키는 변형.
- [0018] 글루카곤 펩티드는 친수성 모이어티가 링크된 동일한 아미노산 위치에서 또는 상이한 아미노산 위치에서 아실화

또는 알킬화될 수 있다.

[0019] 일부 구체예에서, 본 발명은 글루카곤 펩티드의 위치 10의 아미노산에 공유적으로 링크된 아실기 또는 알킬기를 포함하도록 변형된 글루카곤 펩티드를 제공한다. 글루카곤 펩티드는 글루카곤 펩티드의 위치 120의 아미노산과 아실기 또는 알킬기 사이에 스페이스를 더 포함할 수 있다. 일부 구체예에서, 아실기는 지방산 또는 담즙산(bile acid), 또는 이의 염, 예를 들면, C4 내지 C30 지방산, C8 내지 C24 지방산, 콜린산(cholic acid), C4 내지 C30 알킬, C8 내지 C24 알킬, 또는 담즙산의 스테로이드 모이어티를 포함한다. 스페이스는 아실 또는 알킬기를 부착시키기 위한 적절한 반응기를 가진 임의의 모이어티다. 예시적인 구체예에서, 스페이스는 아미노산, 이가 펩티드, 삼가 펩티드, 친수성 2기능성, 예를 들면, 아미노 폴리(알킬옥시)카르복실레이트 또는 소수성 2기능성 스페이스를 포함한다. 일부 구체예에서, 스페이스는 Trp, Glu, Asp, Cys 및  $\text{NH}_2(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n(\text{CH}_2)_m\text{COOH}$ 을 포함하는 스페이스로 구성된 군으로부터 선택되는데, 여기서 m은 1 내지 6 사이의 임의의 정수이며, n은 2 내지 12 사이의 임의의 정수다. 이와 같은 아실화된 또는 알킬화된 글루카곤 펩티드는 추가로 친수성 모이어티, 선택적으로 폴리에틸렌 글리콜을 포함한다. 전술한 글루카곤 펩티드 중 임의의 것은 두 개의 아실기 또는 두 개의 알킬기, 또는 이의 복합을 포함할 수 있다.

[0020] 본 발명은 상기 글루카곤 항진제의 약제학적으로 허용가능한 염을 더 포함한다.

[0021] 다른 예시적인 구체예에서, 임의의 전술한 화합물들은 글루카곤 펩티드의 카르복시 말단에 제 2 펩티드를 추가함으로써 이의 약제학적으로 성질이 더 변형될 수 있다. 한 구체예에서, 글루카곤 펩티드는 펩티드 결합을 통하여 제 2 펩티드에 공유적으로 결합되는데, 여기서 제2 펩티드는 SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21 및 SEQ ID NO: 22로 구성된 군으로부터 선택된 서열을 포함한다. 일부 구체예에서, 위치 1 또는 2에서 변형은 디펩티드 펩티드 제 IV (DPP IV) 절단에 대한 펩티드의 저항성을 증가시킬 수 있다. 예를 들면, 위치 2의 아미노산은 D-세린, D-알라닌, 발린, 글리신, N-메틸 세린, N-메틸 알라닌, 또는 아미노 이소부틸산으로 치환될 수 있다. 대안으로, 또는 추가적으로, 위치 1의 아미노산은 D-히스티딘 (D-His), 데스아미노히스티딘, 하이드록실-히스티딘, 아세틸-히스티딘, 호모-히스티딘, N-메틸 히스티딘,  $\alpha$ -메틸 히스티딘, 이미디아졸 아세트산, 또는  $\alpha$ ,  $\alpha$ -디메틸 이미디아졸 아세트산 (DMIA)으로 치환될 수도 있다.

[0022] 위치 2에서의 변형 (예, 위치 2에서 AIB) 및 일부 경우, 위치 1에서 변형 (예, 위치 1에서 DMIA)은 글루카곤 활성을 감소시키고, 일부의 경우는 상당히 감소시키는 것으로 관측되었고; 놀랍게도, 글루카곤 활성에서 이와 같은 감소는 글루카곤의 C-말단 부분(아미노산 12-29)에서  $\alpha$ -헬릭스 구조의 안정화에 의해 복원될 수 있다. 일부 구체예에서, 안정화는 위치 "i" 와 위치 "i+4"의 아미노산[여기서 i는 12 내지 25 사이의 정수]에서 공유결합이다. 일부 특정 구체예에서, "i" 와 "i+4"는 12와 16, 16와 20, 또는 20와 24 또는 24와 28이다. 일부 구체예에서, 이와 같은 공유 결합은 락탐 다리가 되며, 위치 16에서 Glu와 위치 20의 리신 사이에 형성될 수 있다. 다른 구체예에서, 안정화는 위치 "i" 와 위치 "j+3"의 아미노산[여기서 j는 12 내지 27사이의 정수]에서 공유결합이다. 예시적인 구체예에서, 다리 또는 링커는 길이가 약 6개(또는 약 5-7개)이다. 다른 구체예에서, 안정화는 위치 "k" 와 위치 "k+7"의 아미노산[여기서 j는 12 내지 22사이의 정수]에서 공유결합이다. 일부 구체예에서, 이와 같은 공유 결합은 락탐 다리 이외의 분자내 다리가 된다. 예를 들면, 적합한 공유 결합 방법(공유적 분자내 다리를 만드는 수단)은 올레핀 복분해, 라티오난-계 고리화, 이황화물 다리 또는 변형된 황-함유 다리 형성,  $\alpha$ ,  $\omega$ -디아미노알칸 테터(tethers)를 이용, 금속-원자 다리 형성을 포함하며, 그리고 펩티드 고리화의 다른 수단들을 포함한다.

[0023] 다른 구체예에서, 헬릭스는 비-공유 결합(비-공유적 분자내 다리), 예를 들면, 수소-결합, 이온 상호작용, 가령, 염 다리 형성에 의해 안정화된다.

[0024] 본 발명의 다른 구체예에서, 예를 들면, 글루카곤 펩티드의 C-말단 부분(아미노산 12-29 주변)에서 알파 헬릭스 구조의 안정화는 원하는 활성을 보유하는 위치에서 하나 이상의  $\alpha$ ,  $\alpha$ -이중치환된 아미노산을 목적에 부합되게 도입시켜 이루어진다. 일부 구체예에서, 글루카곤 펩티드 또는 이의 유사체의 위치 16, 17, 18, 19, 20, 21, 24 또는 29중 하나, 둘, 셋, 넷 또는 그 이상이  $\alpha$ ,  $\alpha$ -이중치환된 아미노산으로 대체된다. 예를 들면, 글루카곤 펩티드 또는 이의 유사체의 위치 16은 아미노 이소-부틸산(AIB)으로 치환되어, 염 다리 또는 락탐 없이도 안정화된 알파 헬릭스를 제공한다. 이와 같은 펩티드들은 여기에서 분자간 다리가 없는 펩티드로 간주된다. 특정 측면에서, 알파-헬릭스의 안정화는 분자내 공유적 다리, 예를 들면, 락탐 다리, 이황화 다리와 같은 다리를 도입시키지 않고, 하나 이상의  $\alpha$ ,  $\alpha$ -이중치환된 아미노산을 도입시켜 이루어진다. 이와 같은 펩티드들은 여기에서 분자간 다리가 없는 펩티드로 간주된다. 일부 구체예에서, 위치 16, 20, 21 또는 24에서 하나, 둘, 셋 또는 그 이상이 AIB로 치환된다.



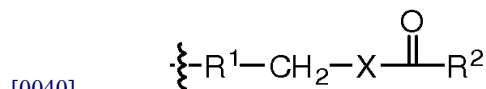
- [0025] 따라서, 일부 구체예에서, 본 발명은 글루카곤 항진 활성을 가지고, 1 내지 3개의 아미노산 변형을 가지며, 다음의 아미노산 서열을 포함하는 글루카곤 펩티드를 제공한다:
- [0026] X1-X2-Gln-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Lys-Tyr-Leu-Asp-Ser-Arg-Arg-Ala-Gln-Asp-Phe-Val-Gln-Trp-Leu-Met-Z (SEQ ID NO: 39)
- [0027] 여기서, X1 및/또는 X2는 디펩티딜 펩티다제 IV (DPP-IV)에 의한 절단에 글루카곤 펩티드의 민감성을 감소(또는 저항성을 증가)시키는 비-고유 아미노산이며,
- [0028] Z는 -COOH (자연 생성되는 C-말단 카르복시산염), -Asn-COOH, Asn-Thr-COOH, 및 Y-COOH이며, 여기서 Y는 1 내지 2개의 아미노산이고, 그리고
- [0029] 분자내 다리, 바람직하게는 공유 결합은 위치 i의 아미노산과 i+4의 아미노산의 측쇄를 연결한다(i는 12, 16, 20 또는 24임). 일부 구체예에서, 분자내 다리는 락탐 다리다. 일부 구체예에서, SEQ ID NO: 39의 위치 i과 i+4의 아미노산은 Lys 및 Glu, 예, Glu16 및 Lys20이 된다. 일부 구체예에서, X1은 D-His, N-메틸-His, α-메틸-His, 이미다졸 아세트산, 테스-아미노-His, 하이드록실-His, 아세틸-His, 호모-His, 및 α, α-디메틸 이미디아졸 아세트산 (DMIA)으로 구성된 군으로부터 선택된다. 다른 구체예에서, X2는 D-Ser, D-Ala, Gly, N-메틸-Ser, Val, 및 아미노 이소부틸산 (AIB)으로 구성된 군으로부터 선택된다. 일부 구체예에서, 글루카곤 펩티드는 글루카곤 펩티드의 위치 16, 17, 21, 24, 29, 40 중 임의의 위치, C-말단 연장부내에, 또는 C-말단 아미노산에서 친수성 모이어티에 공유적으로 링크된다. 예시적인 구체예에서, 친수성 모이어티는 이들 위치들중 임의의 위치에서 Lys, Cys, Orn, 호모시스테인, 또는 아세틸-페닐알라닌 잔기에 공유적으로 연결된다. 예시적인 친수성 모이어티는 약 1,000 Daltons 내지 약 40,000 Daltons의 분자량, 또는 약 20,000 Daltons 내지 약 40,000 Daltons의 분자량의 폴리에틸렌 글리콜 (PEG)을 포함한다.
- [0030] 다른 구체예에서, 글루카곤 항진 활성을 가지고, 다음의 아미노산 서열을 포함하는 글루카곤 펩티드를 제공한다:
- [0031] X1-X2-Gln-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Lys-Tyr-Leu-Asp-Ser-Arg-Arg-Ala-Gln-Asp-Phe-Val-Gln-Trp-Leu-Met-Z (SEQ ID NO: 39),
- [0032] 여기서, X1 및/또는 X2는 디펩티딜 펩티다제 IV (DPP-IV)에 의한 절단에 글루카곤 펩티드의 민감성을 감소(또는 저항성을 증가)시키는 비-고유 아미노산이며,
- [0033] 글루카곤 펩티드의 위치 16, 20, 21, 및 24중 하나, 둘, 셋, 넷 또는 그 이상은 α, α-이중치환된 아미노산으로 치환되며, 그리고
- [0034] Z는 -COOH (자연 생성되는 C-말단 카르복시산염), -Asn-COOH, Asn-Thr-COOH, 및 Y-COOH이며, 여기서 Y는 1 내지 2개의 아미노산이다.
- [0035] 전술한 글루카곤 펩티드 또는 유사체에 예시적인 추가 아미노산 변형에는 위치 7의 Thr 가 하이드록실기가 부족한 아미노산, 예를 들면, Abu 또는 Ile로의 치환과, 선택적으로 아실 또는 알킬기에 공유적으로 부착된(선택적으로 스페이스를 통하여) 측쇄를 포함하는 아미노산의 치환 또는 추가가 복합된 것이 포함되며, 이때 아실 또는 알킬기는 자연-생성 아미노산에 고유한 것이 아니며, 위치 12에서 Lys를 Arg으로 치환; 위치 15에서 Asp를 Glu으로 치환; 위치 16에서 Ser을 Thr 또는 AIB으로 치환; 위치 20에서 Gln을 Ser, Thr, Ala 또는 AIB으로 치환; 위치 21에서 Asp를 Glu으로 치환; 위치 24에서 Gln을 Ser, Thr, Ala 또는 AIB으로 치환; 위치 27에서 Met을 Leu 또는 Nle로 치환; 위치 28에서 Asn은 전하를 띤 아미노산으로 치환; 위치 28에서 Asn은 Lys, Arg, His, Asp, Glu, 시스테인산, 및 호모시스테인산으로 구성된 군으로부터 선택된 전하를 띤 아미노산으로 치환; 위치 28에서 Asn, Asp, 또는 Glu으로 치환; 위치 28에서 Asp로 치환; 위치 28에서 Glu으로 치환; 위치 29에서 Thr를 전하를 띤 아미노산으로 치환; 위치 29에서 Thr는 Lys, Arg, His, Asp, Glu, 시스테인산, 및 호모시스테인산으로 구성된 군으로부터 선택된 전하를 띤 아미노산으로 치환; 위치 29에서 Asp, Glu, 또는 Lys으로 치환; 위치 29에서 Glu으로 치환; 위치 29 다음에 1-3개의 전하를 띤 아미노산 추가; 위치 30 (가령, 위치 29 다음)에 Glu 또는 Lys 추가; 위치 31에 Lys 추가; C-말단에 SEQ ID NO: 20 추가, 선택적으로, 위치 29의 아미노산은 Thr 또는 Gly임; 친수성 모이어티에 공유적으로 부착된 아미노산 추가 또는 치환; 또는 이의 조합.
- [0036] 추가 예시적인 구체예에서, 전술한 펩티드중 임의의 글루카곤 펩티드는 시간이 경과함에 따른 펩티드 분해 감소, 특히, 산성 또는 알칼리 완충액에서의 분해를 감소시키기 위하여, SEQ ID NO:1의 위치 15 및/또는 16의 아미노산을 변형시킴으로써 안정성이 개선되도록 더 변형될 수 있다. 예시적인 구체예에서, 위치 15의 Asp는

Glu, 호모글루타민산, 시스테인산 또는 호모시스테인산으로 치환된다.

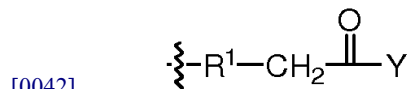
[0037] 대안으로, 여기에서 설명된 임의의 글루카곤 펩티드는 SEQ ID NO:1의 위치 16의 아미노산을 변형시켜 안정성이 개선되도록 더 변형될 수 있다. 위치 16에 Ser은 Thr 또는 AIB으로 치환 또는 글루카곤 수용체에서 효능을 강화시키는 상기에서 언급된 임의의 아미노산 치환이 된다. 이와 같은 변형들은 Asp15-Ser16 사이에 펩티드 결합의 절단 역시 감소시킨다.

[0038] 글루카곤 수용체에서 유지된 또는 강화된 활성은 위치 3의 Gln을 글루타민 유사체로 변형시키면 이루어질 수 있다. 예를 들면, 위치 3에서 글루타민 유사체를 포함하는 글루카곤 펩티드는 글루카곤 수용체에서 고유 글루카곤 (SEQ ID NO: 1)의 활성의 약 5%, 약 10%, 약 20%, 약 50%, 또는 약 85% 또는 그 이상을 나타낸다. 일부 구체예에서, 위치 3에서 글루타민 유사체를 포함하는 글루카곤 펩티드는 글루카곤 유사체와 동일한 아미노산 서열을 가지나, 단 위치 3에서 변형된 아미노산을 가지는 (예를 들면, SEQ ID NO: 69 또는 SEQ ID NO: 70) 글루카곤 펩티드의 활성의 약 20%, 약 50%, 약 75%, 약 100%, 약 200% 또는 약 500% 또는 그 이상을 나타낸다. 일부 구체예에서, 위치 3에서 글루타민 유사체를 포함하는 글루카곤 펩티드는 글루카곤 수용체에서 강화된 활성을 나타내지만, 강화된 활성은 고유 글루카곤, 또는 위치 3에 변형된 아미노산을 제외하고는 글루타민 유사체를 포함하는 펩티드와 동일한 아미노산 서열을 가진 대응하는 글루카곤 펩티드의 활성에 대해 단지 1000%, 10,000%, 100,000%, 또는 1,000,000%이다.

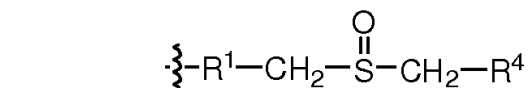
[0039] 일부 구체예에서, 글루타민 유사체는 구조 I, II 또는 III의 측쇄를 포함하는 자연 발생적 또는 자연에서 발생되지 않는 아미노산이다.



[0041] 구조 I



[0043] 구조 II



[0045] 구조 III

[0046] 상기 식에서,

[0047]  $R^1$ 은  $C_{0-3}$  알킬 또는  $C_{0-3}$  헤테로알킬이며;

[0048]  $R^2$ 는  $NHR^4$  또는  $C_{1-3}$  알킬이며;

[0049]  $R^3$ 는  $C_{1-3}$  알킬이며;

[0050]  $R^4$ 는 H 또는  $C_{1-3}$  알킬이며;

[0051] X는 NH, O, 또는 S이며; 그리고

[0052] Y는  $NHR^4$ ,  $SR^3$ , 또는  $OR^3$ 이다.

[0053] 일부 구체예에서, X는 NH이거나 또는 Y는  $NHR^4$ 이다. 일부 구체예에서,  $R^1$ 은  $C_{0-2}$  알킬 또는  $C_1$  헤테로알킬이다.

일부 구체예에서,  $R^2$ 는  $NHR^4$  또는  $C_1$  알킬이다. 일부 구체예에서,  $R^4$ 는 H 또는  $C_1$  알킬이다. 예시적인 구체예에서, 구조 I의 측쇄를 포함하는 아미노산이 제공되는데, 이때 식에서,  $R^1$ 은  $CH_2\text{---S}$ 이며, X는 NH이고,  $R^2$ 는

CH<sub>3</sub> (아세트아미도메틸-시스테인, C(Acm))이다; R<sup>1</sup>은 CH<sub>2</sub>이며, X는 NH이고, R<sup>2</sup>는 CH<sub>3</sub> (아세트아미도부타논산, Dab(Ac))이며; R<sup>1</sup>은 C<sub>0</sub> 알킬이며, X는 NH이고, R<sup>2</sup>는 NHR<sup>4</sup> 이고, R<sup>4</sup>는 H (카르바모일디아미노프로파논산, Dap(우레아))이며); 또는 R<sup>1</sup>은 CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>이고, X는 NH이며, R<sup>2</sup>는 CH<sub>3</sub> (아세틸오르니틴, Orn(Ac))이다. 예시적인 구체예에서, 구조 II의 측쇄를 포함하는 아미노산이 제공되는데, 이때 식에서, R<sup>1</sup>은 CH<sub>2</sub>이며, Y는 NHR<sup>4</sup>이며, R<sup>4</sup>는 CH<sub>3</sub> (메틸글루타민, Q(Me))이다; 예시적인 구체예에서, 구조 III의 측쇄를 포함하는 아미노산이 제공되는데, 이때 식에서, R<sup>1</sup>은 CH<sub>2</sub>이며, R<sup>4</sup>는 H (메티오닌-술폭시드, M(O))가 되며; 특정 구체예에서, 위치 3에서 아미노산은 Dab(Ac)으로 치환된다. 예를 들면, 글루카곤 항진제는 SEQ ID NO: 63, SEQ ID NO: 69, SEQ ID NO: 71, SEQ ID NO: 72, SEQ ID NO: 73, 및 SEQ ID NO: 74의 서열을 포함할 수 있다.

[0054] 글루카곤 펩티드의 글루카곤 수용체에서 강화된 활성은 글루카곤의 아미노산 측쇄에 아실 또는 알킬기에 공유적으로 부착되어 이루어지는데, 예를 들면, 아실 또는 알킬기는 자연 생성 아미노산에 고유한 것이 아니다(C4 내지 C30 지방 아실기, C4 내지 C30 알킬기). 일부 구체예에서, 아실화된 또는 알킬화된 글루카곤 펩티드는 분자 내 다리, 예를 들면, 공유 분자 내 다리 (예, 락탐)가 없다. 특정 측면에서, 아실 또는 알킬기는 스페이스, 예를 들면, 길이가 3 내지 10개 원자인 스페이스를 통하여 글루카곤 펩티드의 아미노산 측쇄에 부착된다. 일부 구체예에서, 아실 또는 알킬기는 스페이스를 통하여 글루카곤 펩티드의 알킬의 아미노산 측쇄에 부착된다. 특정 구체예에서, 아실화된 또는 알킬화된 글루카곤 펩티드는 GLP- 1 수용체에서 펩티드 활성을 선택적으로 감소시키는 변형을 더 포함한다. 예를 들면, 아실화된 또는 알킬화된 글루카곤 펩티드는 C- 말단 α 카르복시산염, 위치 7의 Thr이 하이드록시기가 없는 아미노산, 예를 들면, Abu 또는 Ile, 위치 27 또는 28의 아미노산 말단에 아미노산 결손으로 인하여 27개 또는 28개 아미노산 펩티드가 만들어지는 변형 또는 이들의 조합을 포함할 수 있다.

[0055] 일부 구체예에서, 여기에서 설명되는 임의의 글루카곤 펩티드는 다양한 아미노산 위치에서 분해를 감소시키도록 추가 변형될 수 있는데, 예를 들면, 위치 20, 21, 24, 또는 27중 하나, 둘, 셋 또는 네 개 모두를 변형시킨다. 예시적인 구체예에서, 위치 20의 Gln을 Ala 또는 AIB으로 치환; 위치 21의 Asp를 Glu으로 치환; 위치 24의 Gln을 Ala 또는 AIB으로 치환; 위치 27의 Met을 Leu 또는 Nle으로 치환을 포함한다. 메티오닌 제거 또는 치환은 메티오닌의 산화로 인한 분해를 감소시킨다. Gln 또는 Asn의 제거 또는 치환은 Gln 또는 Asn의 아미드제거반응으로 인한 분해를 감소시킨다. Asp의 제거 또는 치환은 고리 숙시니מיד 중산생성물의 형성하기 위하여 Asp의 탈수 과정과, 이어서 이소-아스파르트산염으로 이성체형성에서 발생하는 분해를 감소시킬 수 있다. 이와 같은 변형들은 발생하는 분해를 감소시킨다.

[0056] 일부 구체예에서, 여기에서 논의된 임의의 글루카곤 펩티드는 글루카곤 수용체에서 활성에 나쁜 영향은 주지 않고, 적어도 부분적인 글루카곤 수용체 활성은 유지되도록 변형될 수 있다. 예를 들면, 보존적 또는 비-보존성 치환, 추가 또는 결손은 위치 2, 5, 7, 10, 11, 12, 13, 14, 17, 18, 19, 20, 21, 24, 27, 28 또는 29 중 임의의 위치에서 실행될 수 있다. 예시적인 구체예에서, 위치 12의 Lys은 Arg으로 치환된다. 다른 예시적인 구체예에서, 위치 29 및/또는 28 및 선택적으로 위치 27의 아미노산은 결손된다.

[0057] 여기에서 논의된 임의의 글루카곤 펩티드는 실시예 13의 분석을 이용하여, 글루카곤 수용체를 과다발현시키는 HEK293세포에서 cAMP 유도에 대해 테스트되면, 인간 글루카곤 수용체에서 약 100 nM, 75 nM, 50 nM, 40nM, 30 nM, 20 nM, 10 nM, 5 nM, 1 nM 또는 그 미만의 EC<sub>50</sub>을 나타낼 수 있다. 일반적으로, 폐길화된 펩티드는 폐길화안된 펩티드와 비교하였을 때 더 높은 EC<sub>50</sub>을 나타낼 것이다. 예를 들면, 여기에서 논의된 글루카곤 펩티드가 폐길화안된 경우, 글루카곤 수용체에서 활성은 고유 글루카곤(SEQ ID NO:1)의 적어도 20% (예를 들면, 적어도 30%, 적어도 40%, 적어도 50%, 적어도 60%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 90% 적어도 95%, 적어도 98%, 적어도 99%, 100%, 150%, 200%, 400%, 500% 또는 그 이상)을 나타낼 것이다. 특정 구체예에서, 여기에서 논의된 글루카곤 펩티드가 친수성 모이어티를 가지지 않는 경우, 글루카곤 수용체에서 고유 글루카곤의 표시된 활성을 나타내겠지만, 친수성 모이어티를 포함하는 경우, 글루카곤 수용체에서 고유 글루카곤의 감소된 활성 %를 나타낼 것이다. 예를 들면, 여기에서 논의된 글루카곤 펩티드가 폐길화된 경우, 글루카곤 수용체에서 고유 글루카곤의 활성의 적어도 2% (예 적어도 3%, 적어도 4%, 적어도 5%, 적어도 6%, 적어도 7%, 적어도 8%, 적어도 9%, 또는 적어도)를 나타낼 수 있다. 일부 구체예에서, 여기에서 설명되는 글루카곤 펩티드는 글루카곤 수용체에서 표시된 활성중 하나를 나타내지만, 고유 글루카곤의 활성의 단지 1000%, 10,000%, 100,000%, 또는 1,000,000%가 된다.



- [0058] 일부 특이적인 구체예에서, 글루카곤 펩티드는 (a) DPP-IV 저항성을 부여하는 위치 1 및/또는 2에서 아미노산 변형, 예를 들면, 위치 1에서 DMIA로 치환 또는 위치 2에서 AIB로 치환, (b) 위치 12-29내에 분자내 다리, 예를 들면, 위치 16 및 20, 또는 위치 16, 20, 21, 및 24에서 하나 이상의 아미노산이  $\alpha$ ,  $\alpha$  이중치환된 아미노산으로 치환, 선택적으로 (c) 위치 24, 29 또는 C-말단 아미노산에서 Cys를 통하여 친수성 모이어티 가령 PEG에 연결, 선택적으로 (d) 위치 27에서 Met이 Nle으로 치환, 선택적으로 (e) 위치 20, 21 및 24에서 분해를 감소시키는 아미노산 변형, 그리고 선택적으로 (f) SEQ ID NO: 20에 링크된 것을 포함한다. 글루카곤 펩티드가 SEQ ID NO: 20에 링크되면, 특정 구체예에서, 위치 29의 아미노산은 Thr 또는 Gly이 된다. 다른 특이적 구체예에서, 글루카곤 펩티드는 (a) Asp28Glu29, 또는 Glu28Glu29, 또는 Glu29Glu30, 또는 Glu28Glu30 또는 Asp28Glu30, 그리고 선택적으로 (b) 위치 16에서 Ser은 예를 들면, Thr 또는 AIB으로 치환되는 아미노산 변형, 그리고 선택적으로 (c) 위치 27에서 Met이 예를 들면, Nle으로 치환되는 아미노산 변형, 그리고 선택적으로 (d) 위치 20, 21 및 24에서 분해를 감소시키는 아미노산 변형을 포함한다. 특이적 구체예에서, 글루카곤 펩티드는 T16,A20,E21,A24,Nle27,D28,E29이다.
- [0059] 글루카곤 펩티드는 링커를 통하여 연결된 최소한 두 개, 세 개 또는 그 이상의 펩티드를 포함하는 이량체, 삼량체 또는 더 높은 다중체의 일부가 될 수 있으며, 여기서 최소 하나 또는 두 개 펩티드는 글루카곤 펩티드가 된다. 이량체는 동중 이량체 또는 이종 이량체가 될 수 있다. 일부 구체예에서, 링커는 2기능성 티올 교차 링커 및 2기능성 아민 교차링커로 구성된 군으로부터 선택된다. 특정 구체예에서, 링커는 PEG, 예를 들면, 5 kDa PEG, 20 kDa PEG가 된다. 일부 구체예에서, 링커는 이황화 결합이다. 예를 들면, 이량체의 각 단량체는 Cys 잔기 (예를 들면, 말단 또는 내부에 위치된 Cys)을 포함하고, 각 Cys 잔기의 황 원자는 이황화 결합 형성에 참여한다. 본 발명의 일부 측면에서, 단량체들은 말단 아미노산 (예를 들면, N-말단 또는 C-말단), 내부 아미노산, 또는 최소 하나의 단량체의 말단 아미노산과 최소 하나의 또 다른 단량체의 내부 아미노산을 경유하여 연결된다. 특정 측면에서, 단량체들은 N-말단 아미노산을 통하여 연결되지는 않는다. 일부 측면에서, 다량체의 단량체들은 각 단량체의 C-말단 아미노산이 서로 연결되도록 “꼬리-대-꼬리” 방향으로 서로 연결된다.
- [0060] 콘주게이트 모이어티는 여기에서 설명되는 이량체, 삼량체 또는 더 높은 다량체를 포함하는 글루카곤 펩티드 중 임의의 것에 공유적으로 연결될 수 있다. SEQ ID NO:20 내지 22중 임의의 아미노산 서열을 포함하는 융합 펩티드도 고려된다.
- [0061] 글루카곤 수용체 활성이 증가된, 부분적인 글루카곤 수용체 활성을 보유하는, 용해도가 개선된, 안정성이 증가된 또는 분해를 감소시키는 여기에서 설명되는 변형들 중 임의의 것을 개별적인 글루카곤 펩티드 또는 복합물에 적용시킬 수 있을 것이다. 따라서, 글루카곤 수용체에서 고유 글루카곤 활성의 적어도 20%를 보유하도록 글루카곤 펩티드가 만들어지며, 글루카곤 펩티드는 pH 6과 8, 또는 pH 6과 9 (가령, 7) 사이에서 최소 1 mg/mL 농도에서 용해가능하며, 그리고 선택적으로 25°C에서 24시간 후에 고유 펩티드의 최소 95%를 보유한다(예를 들면, 고유 펩티드의 5% 또는 그 미만은 분해되거나 절단된다). 대안으로, 고효능 글루카곤 펩티드는 글루카곤 수용체에서 고유 글루카곤 활성의 적어도 약 100%, 125%, 150%, 175%, 200%, 250%, 300%, 350%, 400%, 450%, 500%, 600%, 700%, 800%, 900% 또는 그 이상을 나타내도록 준비되거나 또는 글루카곤 수용체에서 고유 글루카곤 활성의 10-배를 나타내고, 그리고 선택적으로 pH 6과 8, 또는 pH 6과 9(가령, 7) 사이에서 최소 1 mg/mL 농도에서 용해가능하며, 그리고 선택적으로 25°C에서 24시간 후에 고유 펩티드의 최소 95%를 보유한다(예를 들면, 고유 펩티드의 5% 또는 그 미만은 분해되거나 절단된다). 특정 구체예에서, 여기에서 논의된 글루카곤 펩티드는 친수성 모이어티가 부족한 경우, 글루카곤 수용체에서 고유 글루카곤 활성의 표시된 %만 나타내지만, 친수성 모이어티를 포함하는 경우, 글루카곤 수용체에서 고유 글루카곤 활성의 감소된 %를 나타낸다. 일부 구체예에서, 여기에서 논의된 글루카곤 펩티드는 글루카곤 수용체에서 표시된 활성중 하나를 나타내지만, 고유 글루카곤의 활성의 단지 1000%, 10,000%, 100,000%, 또는 1,000,000%가 된다.
- [0062] 한 구체예에 따르면, 본 발명은 여기에서 설명되는 신규한 글루카곤 펩티드, 바람직하게는 멸균된, 바람직하게는 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 수준의 순도로 된 임의의 글루카곤 펩티드, 그리고 약제학적으로 허용가능한 희석제, 캐리어 또는 부형제를 포함하는 약학 조성물을 제공한다. 이와 같은 조성물은 최소한 A 농도의 글루카곤 펩티드를 포함할 수 있는데, 여기서 A는 0.001 mg/ml, 0.01 mg/ml, 0.1 mg/ml, 0.5 mg/ml, 1 mg/ml, 2 mg/ml, 3 mg/ml, 4 mg/ml, 5 mg/ml, 6 mg/ml, 7 mg/ml, 8 mg/ml, 9 mg/ml, 10 mg/ml, 11 mg/ml, 12 mg/ml, 13 mg/ml, 14 mg/ml, 15 mg/ml, 16 mg/ml, 17 mg/ml, 18 mg/ml, 19 mg/ml, 20 mg/ml, 21 mg/ml, 22 mg/ml, 23 mg/ml, 24 mg/ml, 25 mg/ml 또는 그 이상이 된다. 다른 구체예들에서, 이와 같은 조성물은 최소한 B 농도의 글루카곤 펩티드를 포함할 수 있는데, 여기서 B는 30 mg/ml, 25 mg/ml, 24 mg/ml, 23, mg/ml, 22 mg/ml, 21 mg/ml, 20 mg/ml, 19 mg/ml, 18 mg/ml, 17 mg/ml, 16 mg/ml, 15 mg/ml, 14 mg/ml,

13 mg/ml, 12 mg/ml, 11 mg/ml 10 mg/ml, 9 mg/ml, 8 mg/ml, 7 mg/ml, 6 mg/ml, 5 mg/ml, 4 mg/ml, 3 mg/ml, 2 mg/ml, 1 mg/ml, 또는 0.1 mg/ml이 된다. 일부 구체예에서, 조성물은 A 내지 B mg/ml 범위, 예를 들면, 0.001 내지 30.0 mg/ml 범위의 농도의 글루카곤 펩티드를 포함할 수 있다. 한 구체예에서, 약학 조성물은 멸균 되고, 선택적으로 다양한 용기내에 보관된 수용액을 포함한다. 본 발명의 화합물들은 일부 구체예에서 주사용으로 이용되는 사전-조제된 용액을 만드는데 이용된다. 다른 구체예들에서, 약학 조성물은 동결건조된 분말을 포함한다. 약학 조성물은 환자에게 조성물을 투여하기 위한 일회용 장치가 포함된 키트의 일부분으로 포장될 수 있다. 장치는 주사기 및 바늘 또는 사전-채워진 주사기를 포함할 수 있다. 용기 또는 키트에는 실온 또는 냉장 온도에서 보관을 위하여 라벨이 붙어 있을 수 있다.

[0063] 한 구체예에 따르면, 본 발명의 글루카곤 펩티드의 사전-제조된 수용성 조성물을 이용하여 신속하게 포도당 수준을 증가시키고, 혈당 수준을 정상으로 만들고, 혈당 수준을 안정화시키거나 또는 저혈당을 예방 또는 치료하는 방법이 제공된다. 이 방법은 본 발명의 신규한 변형된 글루카곤 펩티드를 포함하는 수용액의 유효량을 투여하는 단계를 포함한다. 일부 구체예에서, 수용성 조성물은 환자에게 조성물을 투여하는데 이용되는 장치에 사전-포장된다. 또 다른 구체예에서 내장 기관의 일시적 마비를 유도하는 방법이 제공된다. 이 방법은 환자에게 본 발명의 하나 이상의 글루카곤 펩티드를 투여하는 단계를 포함한다.

[0064] 또 다른 구체예에서, 체중 증가를 감소 또는 체중 감소를 유도하는 방법이 제공되는데, 이 방법은 본 발명의 글루카곤 펩티드를 포함하는 수용액의 유효량을 투여하는 것을 포함한다. 체중 증가를 감소 또는 체중 감소를 유도하는 방법은 약물에 의해 유도된 비만을 포함하는 다양한 원인의 비만의 치료, 그리고 맥관 질환(관상 동맥 질환, 발작, 말초 맥관 질환, 허혈 재관류 등), 고혈압, 타입 II 당뇨병, 고지혈증 및 근골격계 질환을 포함하는 비만과 연관된 합병증의 감소에 유용할 것으로 기재된다.

[0065] 추가 구체예에서, 인슐린과 본 발명의 글루카곤 펩티드의 공동-투여를 포함하는 과다혈당 또는 당뇨병의 치료 방법이 제공된다. 과다혈당은 인슐린-의존적 또는 인슐린-비 의존적 당뇨병, 진성 당뇨병 타입 I, 진성 당뇨병 타입 II, 또는 임신성 당뇨병을 포함하고, 신증, 망막증 및 혈관 질환을 포함하는 당뇨 합병증을 감소시키는 것도 포함한다.

[0066] 인슐린과 본 발명의 글루카곤 펩티드의 공동-투여는 야간 저혈당을 감소시키거나 및/또는 인슐린의 저혈당 효과를 완충시켜 유해한 저혈당 효과가 적으면서도 동일한 또는 더 높은 약량의 단기 또는 장기 작용 인슐린을 투여할 수 있게 한다. 글루카곤 펩티드와 인슐린을 포함하는 조성물도 제공된다.

[0067] 인슐린 의존적 환자에서 혈당 수준을 조절하는 개선된 방법이 제시된다. 이 방법은 당뇨병 조절에 유효량의 인슐린을 투여하는 단계와, 본 발명의 신규한 변형된 글루카곤 펩티드의 저혈당 예방을 위한 유효량을 투여하는 단계를 포함하는데, 이때 투여 단계에서 각 투여는 12시간 이내에 실행된다. 한 구체예에서, 글루카곤 펩티드와 인슐린은 단일 조성물로 투여된다.

[0068] 여기에서 설명되는 모든 치료 방법, 약학 조성물, 키트 및 기타 유사한 구체예는 글루카곤 펩티드, 글루카곤 항진 유사체, 글루카곤 항진제 또는 글루카곤 유사체의 이용은 모든 약제학적으로 허용가능한 염 또는 이의 에스테르를 포함하는 것으로 간주된다.

[0069] 예시적인 글루카곤 펩티드는 SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11 및 SEQ ID NO: 33으로 구성된 군으로부터 선택되며, 여기서, 글루카곤 펩티드의 아미노산 29는 펩티드 결합을 통하여 제 2 펩티드에 결합되며, 제2 펩티드는 SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21 또는 SEQ ID NO: 22의 서열을 포함한다. 한 구체예에서, 글루카곤 펩티드는 폐기된다. 한 구체예에서, 이 방법은 SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 25, 및 SEQ ID NO: 26의 서열을 포함하는 펩티드를 투여하는 단계를 포함하는데, 이때, 폴리에틸렌 사슬은 위치 21 또는 위치 24의 아미노산에 공유적으로 링크된다.

[0070] 옥신토모듈린(Oxyntomodulin)은 글루카곤 (가령, SEQ ID NO: 1)의 29개 아미노산에 이어서 SEQ ID NO: 21의 8개 아미노산 카르복시 말단 연장부(KRNRNNIA)를 포함하는 37개 아미노산 펩티드이다. 본 발명은 여기에서 논의된 글루카곤 유사체가 이와 같은 8개 아미노산 카르복시 말단 연장부 (SEQ ID NO: 21)에 선택적으로 결합될 수 있다는 것을 고려하며, 본 발명의 일부 구체예는 특히 SEQ ID NO: 21의 8개 연속 카르복시 아미노산이 부족한 글루카곤 유사체와 이 유사체의 용도도 고려한다.

[0071] 전술한 요약은 본 발명의 모든 측면을 정의내리기 위한 의도는 아니며, 추가 구체예에서는 발명의 상세한 설명과 같은 다른 부분들에서 설명된다. 전체 자료는 하나의 개시물로 연관된 것이며, 여기에서 설명되는 특징들이

동일 문장, 단락 또는 부분에서 함께 언급되지 않았다 하더라도 이들 특징들의 모든 가능한 조합들도 고려되어야 한다.

[0072] 또한, 본 발명은 여기 특정 단락에 정의된 변이보다 임의의 방식으로 더 좁은 영역의 임의의 하나 또는 모든 구체예를 포함한다. 예를 들면, 본 발명의 특정 측면이 속(genus)으로 설명되었다면, 속의 모든 멤버는 개별적으로 본 발명의 구체예가 되며, 속의 두 가지 이상의 멤버의 조합도 본 발명의 구체예가 된다.

### 도면의 간단한 설명

[0073] 도 1은 24, 48, 72, 96, 144 및 166 시간동안 37℃에서 항온처리된 글루카곤 Cys<sup>21</sup>말레이미도PEG<sub>5K</sub>의 안정성을 나타내는 막대 그래프다.

도 2는 24, 72, 또는 144 시간동안 37℃에서 항온처리된 글루카곤 Cys<sup>21</sup>말레이미도PEG<sub>5K</sub>의 HPLC 분석에서 얻은 데이터를 나타낸다.

도 3은 pH 2, 4, 5.5, 7 및 8에서 차례로 25℃, 60시간 후에 고유 글루카곤에 비교하여 글루카곤 유사체(D28, E29, E30)의 용해도를 나타내는 데이터를 보여준다.

도 4는 pH 2, 4, 5.5 및 7에서 차례로 25℃, 24시간 그 다음 4℃에서 24시간 후 고유 글루카곤에 비교하여 글루카곤 유사체(E15D28, D28E29, D28E30)의 용해도를 나타내는 데이터를 보여준다.

도 5는 pH 7, 4 ℃에서 24시간 후, 글루카곤 유사체 D28, D28E30 및 E15,D28의 최대 용해도를 나타낸다.

도 6는 고유 글루카곤(■)에 비교하여 글루카곤 유사체 (K29 ▲, K30 ▼, K29K30 ◆)에 의한 글루카곤 수용체 중재된 cAMP 유도를 나타내는 데이터이다.

도 7은 고유 글루카곤 (■)에 비교하여 글루카곤 유사체 (D28 □, E29 △, E30 ▽, K30K31 ◇, K30 ◆)에 의한 글루카곤 수용체 중재된 cAMP 유도를 나타내는 데이터이다.

도 8은 고유 글루카곤 (■)에 비교하여 글루카곤 유사체 (D28 □, E28 (5각형), K29 ▲)에 의한 글루카곤 수용체 중재된 cAMP 유도를 나타내는 데이터이다.

도 9는 고유 글루카곤 (■)에 비교하여 글루카곤 유사체 (D28E29 +, D28E30 ×, E15D28 \*, E29 △)에 의한 글루카곤 수용체 중재된 cAMP 유도를 나타내는 데이터이다.

도 10은 글루카곤 및 글루카곤 유사체의 근육내 투여후 비글 개에서 혈청 포도당 농도에서 변화를 나타내는 데이터이다. 동물에는 글루카곤, SEQ ID NO: 31의 서열이 글루카곤의 C-말단에 연결된 글루카곤을 포함하는 유사체(글루카곤-CEX) 또는 SEQ ID NO: 11의 28의 아미노산에서 아스파르트산 치환을 포함하는 글루카곤 유사체(글루카곤-Asp28) 중 하나를 0.005 mg/kg의 약량으로 투여하였다.

도 11A와 11B는 차례로 다중 T16,A20,E21,A24,N1e27,D28,E29을 가지는 글루카곤 유사체에 의한 글루카곤 수용체 매개된 cAMP 유도 및 GLP-1 수용체 매개된 cAMP 유도를 보여주는 데이터이다.

도 12는 SEQ ID NO: 71의 펩티드를 포함하는 제제를 280nm에서 UV 흡수도 곡선 아래 면적을 시간(월)에 대한 함수로써 나타내는 그래프다.

도 13는 SEQ ID NO: 76의 펩티드를 포함하는 제제를 280nm에서 UV 흡수도 곡선 아래 면적을 시간(월)에 대한 함수로써 나타내는 그래프다.

도 14는 SEQ ID NO: 78의 펩티드를 포함하는 제제를 280nm에서 UV 흡수도 곡선 아래 면적을 시간(월)에 대한 함수로써 나타내는 그래프다.

도 15는 비이클 기준, 리라글루티드(Liraglutide), (C16) 글루카곤 아미드, γE-γE-C16글루카곤 아미드, AA-C16 글루카곤 아미드, 또는 βαβA-C16 글루카곤 아미드를 지정된 약량으로 주사한 마우스에서 총 체중 변화(%)의 그래프다.

도 16은 비이클 기준, 리라글루티드, (C16) 글루카곤 아미드, γE-γE-C16 글루카곤 아미드, AA-C 16 글루카곤 아미드, 또는 βαβA-C16 글루카곤 아미드를 지정된 약량으로 주사한 마우스에서 연구 7일 시점에 측정된 지방량(g)을 나타내는 그래프다.

도 17은 비이클 기준, 리라글루티드, (C16) 글루카곤 아미드,  $\gamma$ E- $\gamma$ E -C16 글루카곤 아미드, AA-C16 글루카곤 아미드, 또는  $\beta$ A $\beta$ A-C16 글루카곤 아미드 를 저정된 약량으로 주사한 마우스에서 연구 7일 시점에 혈당 변화 (mg/dL)를 나타내는 그래프다.

## 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

### [0074] 상세한 설명

### [0075] 정의

[0076] 본 발명을 설명하고 청구함에 있어서, 하기 용어들은 하기에 제시된 정의에 따라 이용될 것이다.

[0077] 여기에서 사용된 것과 같이, "약제학적으로 허용가능한 담체"는 표준적인 약제학적 담체중 임의의 것을 포함하는데, 예를 들면, 인산염 완충된 염 용액, 물, 오일/물 또는 물/오일 에멀전과 같은 에멀전 및 다양한 타입의 습윤제 등이 포함된다. 이 용어에는 또한, 미국 정부의 규제관청에서 승인한 임의의 물질 또는 인간을 포함하는 동물에 사용하기 위한 US 약전에 열거된 임의의 물질도 포함된다.

[0078] 여기에서 사용된 것과 같이, "약제학적으로 허용가능한 염"은 모 화합물의 생물학적 활성을 보유하나, 생물학 적이지 않은 화합물의 염을 지칭하고, 그렇지 않으면 바람직하지 않다. 여기에서 설명되는 화합물들 중 많은 것 들은 아미노 및/또는 카르복실기 또는 이에 유사한 기의 존재에 의해 산 및/또는 염기성 염을 형성할 수 있다.

[0079] 약제학적으로 허용가능한 염기 첨가 염은 무기 및 유기 염기로부터 제조될 수 있다. 무기 염기로부터 유도된 염에는 예를 들면, 나트륨, 칼륨, 리튬, 칼슘 및 마그네슘 염이 포함된다. 유기 염기로부터 유도된 염에는 1차, 2차 및 3차 아민이 포함되나 이에 한정되지 않는다.

[0080] 약제학적으로 허용가능한 산 첨가 염은 무기 및 유기 산으로부터 만들어 질 수 있다. 무기 산으로부터 유도된 염에는 염소산, 브롬수소산, 황산, 질산, 인산 및 이와 유사한 것들이 포함된다. 유기 산으로부터 유도된 염에 는 아세트산, 프로피온산, 글리콜산, 피루브산, 옥살산, 말산, 말론산, 숙신산, 말레산, 푸마르산, 타르타르산, 시트르산, 벤조산, 시나민산, 만델산, 메탄술폰산, 에탄술폰산, p-톨루엔-술폰산, 살리실산, 및 이와 유사한 것 들이 포함된다.

[0081] 여기에서 사용된 것과 같이, "치료하는(treating)"은 특정 질환 또는 장애의 예방, 또는 특정 질환 또는 장애 와 연관된 증상의 완화 및/또는 이와 같은 증상의 방지 또는 제거를 포함한다. 예를 들면, 여기에서 사용된 것 과 같이, "당뇨병의 치료"는 일반적으로 정상적인 수준으로 혈당 수준을 변경시키는 것을 말하며, 주어진 상 황에 따라 혈당 수준의 증가 또는 감소시키는 것을 포함할 수도 있다.

[0082] 여기에서 사용된 것과 같이, 글루카곤 펩티드의 "유효량(effective amount)" 또는 "치료적 유효량 (therapeutically effective amount)"은 원하는 효과를 제공하기 위한 펩티드의 비독성이면서 충분한 양을 말 한다. 예를 들면, 하나의 바람직한 효과는 저혈당의 예방 또는 치료가 될 수 있는데, 예를 들면, 혈당 수준에 서 증가됨이 측정된다. 본 내용에서 글루카곤 펩티드의 또 다른 바람직한 효과는 과혈당의 치료가 포함되는데, 예를 들면, 혈당 수준이 정상 수준에 근접하도록 혈당 수준 변화로 측정되거나, 또는 체중 감소의 유도/체중 증 가 예방이 포함되는데, 예를 들면, 체중의 감소 또는 체중 증가의 예방 또는 감소에 의해 측정되거나 체지방 분 포의 정상화로 측정된다. "유효량(effective)"은 개체의 나이, 전반적인 상태, 투여 방법 및 이와 유사한 것 들에 따라 개체마다 달라질 것이다. 따라서, 정확한 "유효량"을 명시하는 것이 항상 가능한 것은 아니다. 그 러나, 임의 개인의 경우 적절한 "유효량"은 통상적인 실험을 통하여 본 발명 분야의 숙지된 기술을 가진 자가 결정할 수 있을 것이다.

[0083] "장관외(parenteral)"란 소화관이 아닌 피하, 근육내, 척수내 또는 정맥과 같은 일부 다른 경로를 통한다는 것을 의미한다.

[0084] 여기에서 사용된 것과 같이, "정제된(purified)"과 이와 유사한 용어는 고유 또는 자연 환경에서 분자 또는 화합물에 정상적으로 연루된 오염물질이 실질적으로 없는 형태의 분자 또는 화합물의 분리와 관련된다. 여기에 서 사용된 것과 같이, "정제된"은 절대적인 순도를 요구하지 않는다; 다만, 상대적인 정의로써 의도된다. 여 기에서 "정제된 폴리펩티드"는 핵산 분자, 지질 및 탄수화물을 포함하나 이에 국한되지 않는 기타 화합물로부터 분리된 폴리펩티드를 말한다.

[0085] "분리된(isolated)"은 관련 물질이 고유 환경(예를 들면, 자연적으로 생성되는 경우에 자연 환경)으로부터 제 거되어야 한다는 것이다. 예를 들면, 살아있는 동물에 존재하는 자연적으로 생성되는 폴리뉴클레오티드는 분리



된 것이 아니지만, 자연 계에 공존하는 물질의 일부 또는 전부로부터 분리된 동일한 폴리뉴클레오티드는 분리된 것이다.

- [0086] 여기에서 사용된 것과 같이, “고유 글루카곤”은 SEQ ID NO: 1의 서열로 구성된 펩티드를 말하며, “고유 GLP-1”은 GLP-1(7-36)아미드 (SEQ ID NO: 57로 구성됨), GLP-1(7-37)산 (SEQ ID NO: 58로 구성됨) 또는 이들 두 화합물의 혼합물을 지칭하는 속명이다.
- [0087] 여기에서 사용된 것과 같이, 임의의 추가 지정 없이, “글루카곤” 또는 “GLP-1”은 차례로 고유 글루카곤 또는 고유 GLP-1를 의미한다.
- [0088] 여기에서 사용된 것과 같이, “글루카곤 펩티드”는 SEQ ID NO: 1의 아미노산 서열 또는 SEQ ID NO: 1의 아미노산 서열의 임의의 유사체[아미노산 치환, 추가, 결손 또는 펩티드의 전사후 변형들 (예를 들면, 메틸화, 아실화, 알킬화, 위비퀴틴화(ubiquitination) 및 이와 유사한 것을 포함)을 포함하는]를 포함하는 임의의 펩티드를 포함한다-실시예 13에서 설명된 분석을 이용하여 cAMP 생산으로 측정됨
- [0089] "글루카곤 항진제 (glucagon agonist)"는 글루카곤 수용체 활성을 자극하는 글루카곤 펩티드를 포함하는 복합체를 말한다-실시예 13에서 설명된 분석을 이용하여 cAMP 생산으로 측정됨.
- [0090] 여기에서 사용된 것과 같이, "글루카곤 항진 유사체"는 SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12 및 SEQ ID NO: 13으로 구성된 군으로부터 선택된 서열을 포함하는 글루카곤 펩티드 또는 위치 2, 5, 7, 10, 11, 12, 13, 14, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 24, 27, 28 또는 29에서 하나 이상의 보존적 치환을 포함하도록 변형된 이들 서열의 유사체.
- [0091] 여기에서 사용된 것과 같이, 아미노산 “변형(modification)”은 아미노산의 치환, 추가 또는 결손을 말하고, 인간 단백질에서 공통적으로 발견되는 20개 아미노산중 임의의 것 뿐만 아니라 비전형적 또는 자연적으로 발생되지 않는 아미노산으로 치환 또는 추가되는 것을 포함한다. 출원을 통하여, 숫자를 통하여(가령, 위치 28) 특정 아미노산에 대한 모든 언급은 고유 글루카곤 (SEQ ID NO: 1)에서 그 위치의 아미노산 또는 이의 임의의 유사체의 대응하는 아미노산 위치를 말한다. 예를 들면, "위치 28"이란 SEQ ID NO: 1의 제 1 아미노산이 결손된 글루카곤 유사체의 경우 대응하는 위치 27을 의미한다. 유사하게, "위치 28"은 SEQ ID NO: 1의 N 말단에 한 개 아미노산이 첨가된 글루카곤 유사체의 경우에는 대응하는 위치 29를 의미할 것이다.
- [0092] 여기에서 사용된 것과 같이, 아미노산 “치환”은 한 개 아미노산 잔기가 다른 아미노산으로 대체된 것을 말한다.
- [0093] 여기에서 사용된 것과 같이, “보존적(conservative) 아미노산 치환”은 다음의 5가지 기 중에서 하나의 기내에서 교환된 것으로 정의된다:
- [0094] I. 작은 지방족, 비극성 또는 약간 극성 잔기:
- [0095] Ala, Ser, Thr, Pro, Gly;
- [0096] II. 극성, 음 전하를 띤 잔기 및 이들의 아미드 및 에스테르:
- [0097] Asp, Asn, Glu, Gln, 시스테인산 및 호모시스테인산;
- [0098] III. 극성, 양 전하를 띤 잔기:
- [0099] His, Arg, Lys; 오르니틴 (Orn)
- [0100] IV. 큰 지방족, 비극성 잔기:
- [0101] Met, Leu, Ile, Val, Cys, 노르루이신 (Nle), 호모시스테인
- [0102] V. 큰 방향족 잔기:
- [0103] Phe, Tyr, Trp, 아세틸 페닐알라닌
- [0104] 여기에서 사용된 것과 같이, "폴리에틸렌 글리콜 사슬" 또는 "PEG 사슬"은 일반식  $H(OCH_2CH_2)_nOH$ 으로 나타내는 직쇄 또는 분지 사슬의 에틸렌 옥사이드와 물의 응축 폴리머의 혼합물을 말하는데, 상기 식에서 n은 최소 9가 된다. 임의의 추가 특징화없이, 이 용어는 500 내지 40,000 Daltons 범의에서 선택된 평균적 총 분자량을 가진 에틸렌 글리콜 폴리머를 포함한다. "폴리에틸렌 글리콜 사슬" 또는 "PEG 사슬"은 이의 대략적 평균 분자량을 표시

하는 숫자 접미사와 함께 사용된다. 예를 들면, PEG-5,000은 총 분자량이 약 5,000 이 되는 폴리에틸렌 글리콜 사슬을 말한다.

[0105] 여기에서 사용된 것과 같이, "페길화된(pegylated)" 및 이와 유사한 용어는 화합물에 폴리에틸렌 글리콜 사슬을 연결시킴으로써 고유 상태에서 변형된 화합물을 말한다. "페길화된 글루카곤 펩티드"는 글루카곤 펩티드에 PEG 사슬이 공유적으로 결합된 글루카곤 펩티드다.

[0106] 여기에서 사용된 것과 같이, 펩티드라고 언급하는 경우, 변형된 아미노 및 카르복시 말단을 가지는 펩티드를 포함한다. 예를 들면, 말단 카르복실산 위치에 아미드 기를 포함하는 아미노산 사슬은 표준 아미노산을 나타내는 아미노산 서열에 포함된다.

[0107] 여기에서 사용된 것과 같이, "링커(linker)"는 별개의 두 개 엔터티를 서로 결합시키는 결합(bond), 분자 또는 분자 군을 말한다. 링커는 두 개 엔터티에 최적의 공간을 제공할 수도 있고, 두 개 엔터티가 서로 분리되도록 불안정한 링키지를 더 공급할 수도 있다. 불안정한 링키지에는 광분해가능한 기(group), 산-불안정한 모이어티, 염기-불안정한 모이어티 및 효소-절단가능한 기들이 포함된다.

[0108] 여기에서 사용된 것과 같이, "이량체"는 링커를 통하여 서로 공유적으로 결합된 두 개 소단위를 포함하는 복합체다. 이량체는 임의의 한정된 용어 없이 사용된 경우 동종 이량체 및 이종 이량체를 모두 포함한다. 동종 이량체는 두 개의 동일한 소단위를 포함하는 것인 반면, 이종-이량체는 두 소단위가 비록 서로 실질적으로 유사할 지라도, 상이한 두 개 소단위를 포함한다.

[0109] 여기에서 사용된 것과 같이, "pH 안정화된 글루카곤 펩티드"는 약리학적 목적으로 이용되는 최대한 광역의 pH 범위의 수용성 완충액에서, 고유 글루카곤과 비교하여 우수한 안정성 및 용해도를 나타내는 글루카곤 항진 유사체를 말한다.

[0110] 여기에서 사용된 것과 같이, "전하를 띤 아미노산"은 생리학적 pH에서 수용액에서 음 전하를 띤(예를 들면, 양자가 제거된) 또는 양 전하를 띤(예를 들면, 양자가 추가된) 측쇄를 포함하는 아미노산을 말한다. 예를 들면 음 전하를 띤 아미노산은 아스파르트산, 글루타민산, 시스테인산, 호모시스테인산, 및 호모글루타민산을 포함하며, 양 전하를 띤 아미노산은 아르기닌, 리신, 히스티딘을 포함한다. 전하를 띤 아미노산은 인간 단백질에서 공통적으로 발견되는 20개 아미노산 중 전하를 띤 아미노산 뿐만 아니라 비-전형적 또는 자연적으로 생성되지 않는 아미노산에서 발견되는 전하를 띤 아미노산도 포함한다.

[0111] 비-자연적 생성 아미노산은 *in vivo* 에서 자연적으로 발생될 수 없지만, 여기에서 논의되는 펩티드 구조에 결합될 수 있는 아미노산을 말한다. 비-전형적인 아미노산의 상업적 출처에는 Sigma-Aldrich (*Milwaukee, WI*), ChemPep Inc. (*Miami, FL*), Genzyme Pharmaceuticals(*Cambridge, MA*)이 포함된다. 비-전형적 아미노산은 상업적 공급업자로부터 구입하거나, 새로 합성된 것 또는 화학적으로 변형된 것 또는 기타 아미노산으로부터 유도된 것이 될 수 있다.

[0112] 여기에서 사용된 것과 같이, "산성 아미노산"은 제2의 산성 모이어티, 예를 들면, 카르복실산 또는 술폰산 기를 포함하는 산성 모이어티를 포함한다.

[0113] 여기에서 사용된 것과 같이, "알킬"은 표시된 수의 탄소 원자를 포함하는 선형 또는 분지형 탄화수소를 말한다. 예시적인 알킬에는 메틸, 에틸, 및 선형 프로필 기이 포함된다.

[0114] 여기에서 사용된 것과 같이, "헤테로알킬"은 표시된 수의 탄소 원자를 포함하고, 기존 구조내에 적어도 하나의 이형(hetero) 원자를 포함하는 선형 또는 분지형 탄화수소를 말한다. 여기에 목적에 적합한 이형 원자에는 N, S, 및 O가 포함되나 이에 한정되지 않는다.

## [0115] 구체예

## [0116] 강화된 용해도

[0117] 출원인은 펩티드의 항진 성질은 유지되면서 펩티드의 용해도를 강화시키기 위하여 이의 카르복시 말단에 전하를 도입시키도록 고유 글루카곤이 변형될 수 있다는 사실을 발견하였다. 강화된 용해도는 거의 중성 pH에서 글루카곤 용액을 준비하고 보관할 수 있도록 한다. 상대적으로 중성 pH(예 pH 약 6.0 ~ 약 8.0)에서 글루카곤 용액을 조제하면 글루카곤 펩티드의 장기적 안정성이 개선된다.

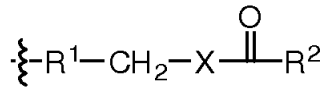
- [0118] 따라서, 본 발명의 한 구체예에서는 수용액에서 특히 pH 약 5.5 ~ 약 8.0의 범위에서 고유 펩티드의 생물학적 활성은 유지되면서 펩티드 용해도를 개선시키기 위하여 와일드 타입 펩티드[His-Ser-Gln-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Lys-Tyr-Leu-Asp-Ser-Arg-Arg-Ala-Gln-Asp-Phe-Val-Gln-Trp-Leu-Met-Asn-Thr (SEQ ID NO: 1)]가 변형된 글루카곤 항진제에 관한 것이다. 한 구체예에서, 고유의 전하를 띄지 않는 아미노산을 가령, 리신, 아르기닌, 히스티딘, 아스파르트산, 글루타민산으로 구성된 군으로부터 선택된 전하를 띤 아미노산으로 치환시키거나, 또는 전하를 띤 아미노산을 펩티드의 아미노 또는 카르복시 말단에 추가함으로써, 펩티드에 전하를 도입시킨다. 놀라운 것은, 출원인이 위치 28 및/또는 29에서 정상적으로 생성되는 아미노산을 전하를 띤 아미노산으로 치환, 및/또는 글루카곤 펩티드의 카르복시 말단에 하나 또는 두 개의 전하를 띤 아미노산을 추가시키면, 생리학적으로 관련된 pH (가령, pH of 약 6.5 ~ 약 7.5)에서 수용성 용액내에서 글루카곤 펩티드의 용해도 및 안정성이 적어도 5-배 내지 최대 30-배 강화된다는 것을 발견하였다.
- [0119] 따라서, 본 발명의 한 구체예의 글루카곤 펩티드는 25 °C에서 24시간 후에 측정하였을 때, 주어진 pH 약 5.5 ~ 8, 예, pH 7에서 고유 글루카곤과 비교하였을 때, 글루카곤 활성을 유지하면서 적어도 2-배, 5-배, 10-배, 15-배, 25-배, 30-배, 또는 그 이상의 용해도를 나타낸다. 여기에서 논의된 임의의 글루카곤 펩티드는 25 °C에서 24시간 후에 측정하였을 때, 고유 글루카곤과 비교하였을 때, 적어도 75%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 글루카곤 활성을 유지하면서 5.5 내지 8 사이의 pH에서 추가적으로 개선된 안정성을 나타낸다. 일부 구체예에서, 본 발명의 글루카곤 펩티드는 개선된 안정성을 나타내는데, 예를 들면, 적어도 20 °C (예, 21 °C, 22 °C, 23 °C, 24 °C, 25 °C, 26 °C, 적어도 27.5 °C, 적어도 30 °C, 적어도 35 °C, 적어도 40 °C, 적어도 50 °C)의 온도에서, 그리고 100 °C 미만, 85 °C 미만, 75 °C 미만, 또는 70 °C 미만에서 용액내 1주 이상(예, 2주, 4주, 1달, 2달, 3달, 4달, 6달, 8달, 10달, 12달) 후에, 펩티드 농도의 적어도 75% (예, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 95% 이상, 최대 100%) 또는 분해된 펩티드의 약 25% (예, 20% 미만, 15% 미만, 10% 미만, 5% 미만, 4%, 3%, 2%, 1%, 0%까지)가 UV 감지기에 의해 280nm에서 감지된다.
- [0120] 글루카곤 펩티드는 예를 들면, 증가된 효능, 순환계에서 연장된 반감기, 증가된 반감기, 감소된 침전 또는 응집, 및/또는 보관 후에 절단 발생 또는 화학적 변형 감소와 같은 감소된 분해 등과 같은 이의 약제학적 성질을 변경되도록 추가 변형을 포함할 수 있다.
- [0121] 한 구체예에서, 개선된 용해도를 가진 글루카곤 펩티드는 고유 글루카곤의 C-말단 부분(한 구체예에서, 위치 27의 C-말단에)에 하나, 둘, 셋 또는 그 이상의 전하를 띤 아미노산을 도입시킴으로써 준비될 수 있다. 이와 같은 전하를 띤 아미노산은 위치 28 또는 29에서 고유 아미노산을 전하를 띤 아미노산으로 치환하거나, 대안으로 위치 27, 28 또는 29 다음에 전하를 띤 아미노산을 추가하여 이루어진다. 예시적인 구체예에서, 하나, 둘, 세 개의 아미노산 또는 전하를 띤 아미노산 전부는 음전하를 띤다. 다른 구체예에서, 하나, 둘, 세 개의 아미노산 또는 전하를 띤 아미노산 전부는 양전하를 띤다. 특이적 예시적인 구체예에서, 글루카곤 펩티드는 다음의 변형 중 하나 또는 두 개를 포함할 수 있다: N28은 E로 치환; N28은 D로 치환; T29는 D로 치환; T29는 E로 치환; 위치 27, 28 또는 29 다음에 E 삽입; 위치 27, 28 또는 29 다음에 D 삽입. 예를 들면, D28E29, E28E29, E29E30, E28E30, D28E30.
- [0122] **추가적인 변형 및 이들의 조합**
- [0123] 글루카곤 펩티드에 추가 변형을 만들어 용해도 및/또는 안정성 및/또는 글루카곤 활성을 더 증가시킬 수 있다. 대안으로, 글루카곤 펩티드는 용해도 또는 안정성에 실질적으로 영향을 주지 않고, 글루카곤 활성을 실질적으로 감소시키지 않는 다른 변형을 포함할 수 있다. 예시적인 구체예에서, 글루카곤 펩티드는 고유 글루카곤 서열에 대하여 총 1회, 최대 2회, 최대 3회, 최대 4회, 최대 5회, 최대 6회, 최대 7회, 최대 8회, 최대 9회, 또는 최대 10회, 또는 최대 11회, 또는 최대 12회, 또는 최대 13회 또는 최대 14회의 아미노산 변형을 포함할 수 있다. 일부 구체예에서, 이와 같은 글루카곤 유사체는 고유 글루카곤에서 상응하는 위치에 적어도 22개, 23개, 24개, 25개, 26개, 27개 또는 28개의 자연적으로 생성되는 아미노산을 보유한다(예를 들면, 자연적으로 생성되는 글루카곤에 대해 1-7개, 1-5개 또는 1-3개 변형을 가짐).
- [0124] 일부 구체예에서, 위치 2, 5, 7, 10, 11, 12, 13, 14, 17, 18, 19, 20, 21, 24, 27, 28 또는 29 중 임의의 위치에서 1개, 2개, 3개, 4개 또는 5개 비-보존성 치환이 실행되며 그리고 최대 5개의 추가 보존성 치환이 이들 위치에서 실행된다. 일부 구체예에서 1개, 2개, 또는 3개 아미노산 변형이 위치 1-16의 아미노산 내에서 실행되며, 그리고 1개, 2개 또는 3개의 아미노산 변형은 위치 17-26의 아미노산 범위내에서 실행된다. 예시적인 변형은 다음을 포함하나 이에 한정되지 않는다:
- [0125] (a) 적어도 부분적 글루카곤 항진 활성을 유지시키면서, 위치 2, 5, 7, 10, 11, 12, 13, 14, 16, 17, 18, 19,

20, 21, 24, 27, 28 또는 29 중 하나 또는 그 이상에서 비-보존성 치환, 보존성 치환, 추가 또는 결손, 위치 10의 Tyr는 Val 또는Phe으로 치환, 위치 12에서 Lys는 Arg으로 치환, 이들 위치중 하나 이상에서 Ala으로 치환;

- [0126] (b) 적어도 부분적 글루카곤 항진 활성을 유지시키면서 위치 29 및/또는 28 및 선택적으로 위치 27의 아미노산 결손,;
- [0127] (c) 위치 15의 아스파르트산의 변형, 예를 들면, 글루타민산, 호모글루타민산, 시스테인산 또는 호모시스테인산으로 치환시키면 분해를 줄일 수 있으며; 또는 위치 16의 세린을 트레오닌, AIB, 글루타민산으로 치환시키거나 또는 길이가 4개 원자인 측쇄를 가지는 또 다른 음 전하를 띤 아미노산으로 치환, 또는 대안으로 글루타민, 호모글루타민산, 또는 호모시스테인산중 임의의 하나로 치환시키는 변형, 이와 같은 변형은 유사하게 Asp15-Ser16 결합의 절단으로 인한 분해를 감소시킬 수 있고;
- [0128] (d) 친수성 모이어티 가령, 물에 용해되는 고분자 폴리에틸렌 글리콜을 예 위치 16, 17, 20, 21, 24, 29, 40 또는 C-말단 아미노산에 추가, 이와 같은 변형은 용해도 및/또는 반감기를 증가시킬 수 있고;
- [0129] (e) 위치 27의 메티오닌은 루이신 또는 노르루이신으로 치환시키는 변형, 이와 같은 변형은 산화성 분해를 감소시키고;
- [0130] (f) 위치 20 또는 24의 Gln은 Ser, Thr, Ala 또는 AIB으로 치환시키는 변형, 이와 같은 변형은 Gln의 탈아미드화를 통해 발생하는 분해를 감소시키고;
- [0131] (g) 위치 21의 Asp은 Glu으로 치환되는 변형, 이와 같은 변형은 고리화 숙시니미드 중간생성물의 형성과 이어서 이소-아스파르트이트로의 이성체화를 위한 Asp의 탈수 동안 발생하는 분해를 감소시킬 수 있고;
- [0132] (h) 위치 "i" 및 "i+4"(이때, i 는 12 ~ 25사이의 정수, 예, 12, 16, 20, 24) 사이에 락탐 다리와 같은 분자내 다리와 복합하여, DPP-IV 절단에 저항성을 개선시키는 위치 1 또는 2에서 변형;
- [0133] (i) 여기에서 설명된 것과 같은 글루카곤 펩티드의 아실화 또는 알킬화는 글루카곤 및 GLP-1 수용체에서 활성을 증가시키고, 순환계에서 반감기를 증가시키고 및/또는 작용 기간을 연장시키고 및/또는 작용 개시를 지연시키고, 이 변형은 선택적으로 친수성 모이어티를 추가시키는 것과 복합되며, 추가적으로 또는 대안으로, GLP-1 펩티드에서 활성을 선택적으로 감소시키는 변형과 복합되는데, 예를 들면, 위치 7에서 Thr은 하이드록실기가 없는 아미노산, 예를 들면, Abu 또는 Ile로 치환; 위치 27에서 아미노산의 C-말단 아미노산 결손 (예, 위치 28 및 29의 아미노산 하나 또는 둘다 결손시켜, 길이가 27개 또는 28개의 아미노산으로된 펩티드 생성됨); 또는 이들의 조합.
- [0134] (j) 여기에서 논의된 C-말단 연장부;
- [0135] (k) 여기에서 논의된 동종이량체화 또는 이종이량체화; 그리고 상기 언급된 것들의 조합.
- [0136] 예시적인 변형은 A군에서 선택된 적어도 한 가지 아미노산 변형과 B군 및/또는 C군으로부터 선택된 하나 이상의 아미노산 변형을 포함하는데,
- [0137] 여기서, A군은 다음과 같다:
- [0138] 위치 28의 Asn은 전하를 띤 아미노산으로 치환;
- [0139] 위치 28의 Asn은 Lys, Arg, His, Asp, Glu, 시스테인산, 및 호모시스테인산으로 구성된 군으로부터 선택된 전하를 띤 아미노산으로 치환;
- [0140] 위치 28은 Asn, Asp, 또는 Glu으로 치환;
- [0141] 위치 28은 Asp으로 치환;
- [0142] 위치 28은 Glu으로 치환;
- [0143] 위치 29의 Thr는 전하를 띤 아미노산으로 치환;
- [0144] 위치 29의 Thr는 Lys, Arg, His, Asp, Glu, 시스테인산, 및 호모시스테인산으로 구성된 군으로부터 선택된 전하를 띤 아미노산으로 치환;
- [0145] 위치 29는 Asp, Glu, 또는 Lys으로 치환;
- [0146] 위치 29는 Glu으로 치환;

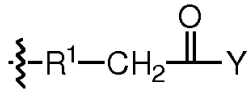


- [0147] 위치 29 다음에 1-3개의 전하를 띤 아미노산 삽입;
- [0148] 위치 29 다음에 Glu 또는 Lys 삽입;
- [0149] 위치 29 다음에 Gly-Lys 또는 Lys-Lys;
- [0150] 또는 이의 조합임.
- [0151] 여강서 B군의 변형은 다음과 같다
- [0152] 위치 15의 Asp는 Glu으로 치환;
- [0153] 위치 16의 Ser는 Thr 또는 AIB으로 치환; 그리고
- [0154] 여기서, C군의 변형은 다음과 같다:
- [0155] 위치 1의 His은 디펩티딜 펩티다제 IV (DPP- IV)에 의한 절단에 글루카곤 펩티드의 감응성을 감소시키는 비-고유 아미노산으로 치환;
- [0156] 위치 2의 Ser은 디펩티딜 펩티다제 IV (DPP- IV)에 의한 절단에 글루카곤 펩티드의 감응성을 감소시키는 비-고유 아미노산으로 치환;
- [0157] 위치 12의 Lys 은 Arg으로 치환;
- [0158] 위치 20의 Gln은 Ala 또는 AIB으로 치환;
- [0159] 위치 21의 Asp는 Glu으로 치환;
- [0160] 위치 24의 Gln은 Ala 또는 AIB으로 치환;
- [0161] 위치 27의 Met은 Leu 또는 Nle로 치환;
- [0162] 위치 27-29의 아미노산 결손;
- [0163] 위치 28-29의 아미노산 결손;
- [0164] 위치 29의 아미노산 결손;
- [0165] 또는 이들의 조합.
- [0166] **위치 3의 변형**
- [0167] 글루카곤 수용체 활성화는 위치 3에서의 아미노산 변형에 의해 감소될 수 있는데, 예를 들면, 위치 3의 자연적으로 생성되는 글루타민은 산성, 염기성 또는 소수성 아미노산으로 치환에 의해 감소된다. 예를 들면, 위치 3은 글루타민산, 오르니틴, 또는 노르루이신으로 치환되면 실질적으로 글루카곤 수용체 활성을 감소시키거나 파괴시킨다.
- [0168] 글루카곤 수용체에서 유지된 또는 강화된 활성화는 위치 3의 Gln을 글루타민 유사체로 변형시키면 이루어질 수 있다. 예를 들면, 위치 3에서 글루타민 유사체를 포함하는 글루카곤 펩티드는 글루카곤 수용체에서 고유 글루카곤 (SEQ ID NO: 1)의 활성화의 약 5%, 약 10%, 약 20%, 약 50%, 또는 약 85% 또는 그 이상을 나타낸다. 일부 구체예에서, 위치 3에서 글루타민 유사체를 포함하는 글루카곤 펩티드는 글루카곤 유사체와 동일한 아미노산 서열을 가지나, 단 위치 3에서 변형된 아미노산을 가지는 (예를 들면, SEQ ID NO: 67 또는 SEQ ID NO: 70) 글루카곤 펩티드의 활성화의 약 20%, 약 50%, 약 75%, 약 100%, 약 200% 또는 약 500% 또는 그 이상을 나타낸다. 일부 구체예에서, 위치 3에서 글루타민 유사체를 포함하는 글루카곤 펩티드는 글루카곤 수용체에서 강화된 활성을 나타내지만, 강화된 활성화는 고유 글루카곤, 또는 위치 3에 변형된 아미노산을 제외하고는 글루타민 유사체를 포함하는 펩티드와 동일한 아미노산 서열을 가진 대응하는 글루카곤 펩티드의 활성화에 대해 단지 1000%, 10,000%, 100,000%, 또는 1,000,000%이다.
- [0169] 일부 구체예에서, 글루타민 유사체는 자연적으로 생성되는 또는 구조 I, II 또는 III의 측쇄를 포함하는 자연적으로 생성되지 않는 아미노산이다:



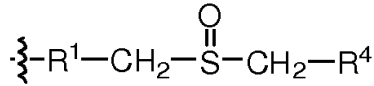
[0170]

[0171] 구조식 I



[0172]

[0173] 구조식 II



[0174]

[0175] 구조식 III

[0176] 상기 식에서,

[0177]  $R^1$ 은  $C_{0-3}$  알킬 또는  $C_{0-3}$  헤테로알킬이며;

[0178]  $R^2$ 는  $NHR^4$  또는  $C_{1-3}$  알킬이며;

[0179]  $R^3$ 는  $C_{1-3}$  알킬이며;

[0180]  $R^4$ 는 H 또는  $C_{1-3}$  알킬이며;

[0181] X는 NH, O, 또는 S이며; 그리고

[0182] Y는  $NHR^4$ ,  $SR^3$ , 또는  $OR^3$ 이다.

[0183] 일부 구체예에서, X는 NH이거나 또는 Y는  $NHR^4$ 이다. 일부 구체예에서,  $R^1$ 은  $C_{0-2}$  알킬 또는  $C_1$  헤테로알킬이다.

일부 구체예에서,  $R^2$ 는  $NHR^4$  또는  $C_1$  알킬이다. 일부 구체예에서,  $R^4$ 는 H 또는  $C_1$  알킬이다. 예시적인 구체예에서, 구조 I의 측쇄를 포함하는 아미노산이 제공되는데, 이때 식에서,  $R^1$ 은  $CH_2$ -S이며, X는 NH이고, and  $R^2$ 는  $CH_3$  (아세트아미도메틸-시스테인, C(Acm))이다;  $R^1$ 은  $CH_2$ 이며, X는 NH이고,  $R^2$ 는  $CH_3$  (아세트아미도부타논산, Dab(Ac))이며;  $R^1$ 은  $C_0$  알킬이며, X는 NH이고,  $R^2$ 는  $NHR^4$  이고,  $R^4$ 는 H (카르바모일디아미노프로파논산, Dap(우레아))이며); 또는  $R^1$ 은  $CH_2$ - $CH_2$ 이고, X는 NH이며,  $R^2$ 는  $CH_3$  (아세틸오르니틴, Om(Ac))이다. 예시적인 구체예에서, 구조 II의 측쇄를 포함하는 아미노산이 제공되는데, 이때 식에서,  $R^1$ 은  $CH_2$ 이며, Y는  $NHR^4$ 이며,  $R^4$ 는  $CH_3$  (메틸글루타민, Q(Me))이다; 예시적인 구체예에서, 구조 III의 측쇄를 포함하는 아미노산이 제공되는데, 이때 식에서,  $R^1$ 은  $CH_2$ 이며,  $R^4$ 는 H (메티오닌-술폭시드, M(O))가 되며; 특정 구체예에서, 위치 3에서 아미노산은 Dab(Ac)으로 치환된다. 예를 들면, 글루카곤 항진제는 SEQ ID NO: 63, SEQ ID NO: 69, SEQ ID NO: 71, SEQ ID NO: 72, SEQ ID NO: 73, 및 SEQ ID NO: 74의 아미노산 서열을 포함할 수 있다.

[0184] GLP-1 수용체에서 강화된 활성은 C 말단 아미노산의 카르복시산을 전하-중성 기, 가령, 아미드 또는 에스테르로 대체하여 제공된다. 역으로, 펩티드의 C-말단에 고유 카르복시산이 유지되면, 글루카곤 수용체 vs. GLP-1 수용체에 대한 글루카곤 펩티드의 상대적으로 큰 선택성은 유지된다(예, 약 5배, 6배, 7배, 8배, 9배, 10배, 11배, 12배, 13배, 14배, 15배, 16배, 17배, 18배, 19배, 또는 20-배 이상 더 크다).

[0185] **DPP-IV 저항성**

[0186] 일부 구체예에서, 여기에서 논의되는 글루카곤 펩티드는 위치 1 및/또는 2에서 추가 변형되어 이가펩티드성 펩티다제 IV (DPP FV) 절단에 대한 펩티드 저항성을 증가시킬 수 있다. 예를 들면, 위치 2의 아미노산은 D-세린,  $\alpha$ ,  $\alpha$ -디메틸 이미다졸 아세트산(DMIA), N-메틸 히스티딘,  $\alpha$ -메틸 히스티딘, 이미다졸 아세트산, 데스아미노히스티딘, 하이드록시-히스티딘, 아세틸-히스티딘 및 호모-히스티딘으로 구성된 군으로부터 선택된 아미노산으로 치환된다.

[0187] 좀더 구체적으로, 일부 구체예에서, 유사체 펩티드의 위치 2는 D-세린, D-알라닌, 발린, 아미노 N-부틸산, 글리신, N-메틸 세린 및 아미노이소부틸산으로 구성된 군으로부터 선택된 아미노산으로 치환된다. 한 구체예에서, 유사체 펩티드의 위치 2는 D-세린, D-알라닌, 글리신, N-메틸 세린 및 아미노이소부틸산으로 구성된 군으로부터 선택된 아미노산으로 치환된다. 또 다른 구체예에서, 유사체 펩티드의 위치 2는 D-세린, 글리신, 및 아미노이소부틸산으로 구성된 군으로부터 선택된 아미노산으로 치환된다.

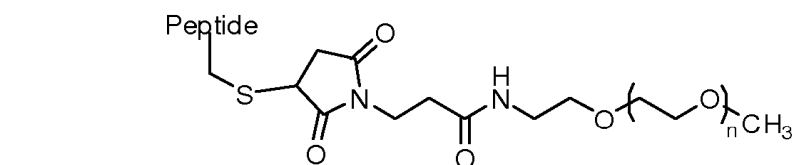
[0188] 위치 1 또는 2의 치환 또는 변형 또는 유도화는 글루카곤 수용체에서 활성을 감소시키고, C-말단 부분(아미노산 12-29)의 분자내 다리(예를 들면, “i” 및 “i+4” (이때 i는 12-25 사이의 정수)에서 아미노산 측쇄 사이에 락탐 다리)는 글루카곤 수용체에서 글루카곤 활성을 감소시킬 수 있다.

[0189] **친수성 모이어티의 추가**

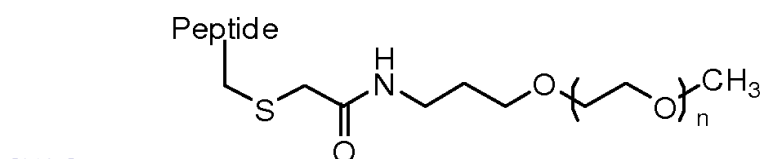
[0190] PEG와 같은 친수성 모이어티는 활성화된 폴리머 분자와 단백질이 반응되는데 사용되는 임의의 적합한 조건하에서 글루카곤 펩티드에 부착될 수 있다.

[0191] 본 기술분야에 공지된 표적 화합물의 반응기(예를 들면, 알데히드, 아미노, 에스테르, 티올,  $\alpha$ -할로아세틸, 멜레이미도 또는 하이드라지노 기)에 PEG 모이어티의 반응기(예를 들면, 알데히드, 아미노, 에스테르, 티올,  $\alpha$ -할로아세틸, 멜레이미도 또는 하이드라지노기)를 통하여 아실화, 환원성 알킬화, 마이클 첨가(Michael addition), 티올 알킬화 또는 다른 화학선택적 콘주게이션/리게이션 방법을 포함하는 임의의 수단이 이용된다. 물에 용해되는 폴리머를 하나 이상의 단백질에 연결시키는데 이용될 수 있는 활성화 기는 술폰, 말레이미드, 설프하이드릴, 티올, 트리플레이트, 트레실레이트, 아지디린, 옥시란, 5-피리딜, 및 알파-할로젠화된 아실기 (예를 들면, 알파-요오드 아세트산, 알파-브로모아세트산, 알파-클로로아세트산)를 포함하나 이에 한정되지 않는다. 환원성 알킬화에 의해 펩티드에 부착된다면, 선택된 폴리머는 하나의 반응성 알데히드를 가져야 하고, 폴리머화 정도는 조절된다. 예를 들면, *Kinstler et al., Adv. Drug. Delivery Rev. 54: 477-485 (2002)*; *Roberts et al., Adv. Drug Derivery Rev. 54: 459-476 (2002)*; and *Zalipsky et al., Adv. Drug Delivery Rev. 16: 157-182 (1995)* 참고.

[0192] 본 발명의 특정 측면에서, 티올을 가진 글루카곤 펩티드의 아미노산 잔기는 PEG와 같은 친수성 모이어티로 변형된다. 일부 구체예에서, 티올은 마이클 첨가 반응에서 말레이미드-활성화된 PEG로 변형되어, 하기에 나타낸 것과 같은 티오에테르 링키지를 포함하는 폐결화된 펩티드가 된다:



[0194] 일부 구체예에서, 티올은 친핵성 치환 반응에서 할로아세틸-활성화된 PEG로 변형되어, 하기에 나타낸 것과 같은 티오에테르 링키지를 포함하는 폐결화된 펩티드가 된다:

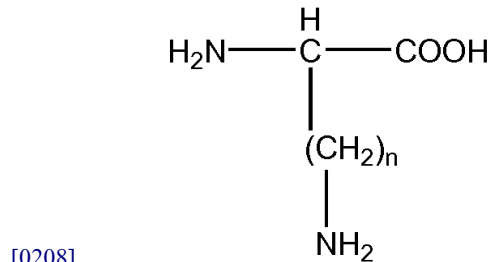


- [0196] 적합한 친수성 모이어티는 폴리에틸렌 글리콜 (PEG), 폴리프로필렌 글리콜, 폴리옥시에틸화된 폴리올 (예를 들면, POG), 폴리옥시에틸화된 솔비톨, 폴리옥시에틸화된 포도당, 폴리옥시에틸화된 글리세롤 (POG), 폴리옥시알킬렌, 폴리에틸렌 글리콜 프로피온알데히드, 에틸렌 글리콜/프로필렌 글리콜의 공중합체, 모노메톡시-폴리에틸렌 글리콜, 모노-(C1-C10) 알콕시- 또는 아릴옥시-폴리에틸렌 글리콜, 카르복시메틸셀룰로오스, 폴리아세탈, 폴리비닐 알코올 (PVA), 폴리비닐피롤리돈, 폴리-1,3-디옥소란, 폴리-1,3,6-트리옥산, 에틸렌/말레 안하이드리드 공중합체, 폴리 ( $\beta$ -아미노산) (호모폴리머 또는 랜덤 공중합체), 폴리(n-비닐 피롤리돈)폴리에틸렌 글리콜, 프로프로필렌 글리콜 호모폴리머 (PPG) 및 기타 폴리알킬렌 옥시드, 폴리프로필렌 옥시드/에틸렌 옥시드 공중합체, 콜론 산(colonic acids) 또는 다른 폴리사카라이드 폴리머, Ficoll 또는 텍스트란 및 이의 혼합물을 포함한다.
- [0197] 일부 구체예에 따른 친수성 모이어티, 예를 들면, 폴리에틸렌 글리콜 사슬은 약 500 내지 약 40,000 Daltons 범위에서 선택된 분자량을 가진다. 한 구체예에서 친수성 모이어티, 가령 PEG는 약 500 ~ 약 5,000 Daltons, 또는 약 1,000 ~ 약 5,000 Daltons 범위로부터 선택된 분자량을 가진다. 또 다른 구체예에서, 친수성 모이어티, 예를 들면, PEG는 약 10,000 ~ 약 20,000 Daltons의 분자량을 가진다. 또 다른 예에서, 친수성 모이어티, 예를 들면, PEG는 약 20,000 ~ 약 40,000 Daltons의 분자량을 가진다.
- [0198] 한 구체예에서, 텍스트란은 친수성 모이어티로 이용된다. 텍스트란은 포도당 소단위가  $\alpha$ 1-6 링키지에 의해 주로 연결된 폴리사카라이드 폴리머다. 텍스트란은 다양한 분자량의 범위 예를 들면, 약 1 kD ~ 약 100 kD, 또는 약 5, 10, 15 또는 20 kD ~ 약 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 또는 90 kD 까지의 범위로 이용가능하다.
- [0199] 선형 또는 분지형 폴리머도 고려된다. 콘주게이트의 최종 제조는 필수적으로 단일 분산 또는 다중 분산일 수 있으며, 펩티드 당 약 0.5, 0.7, 1, 1.2, 1.5 또는 2 개 폴리머 모이어티를 가질 수 있다.
- [0200] **아실화(Acylation)**
- [0201] 일부 구체예에 따르면, 글루카곤 펩티드는 아실기, 예를 들면, 자연적으로 생성되는 아미노산에 고유한 것이 아닌, 자연-생성되지 않는 아실기를 포함하도록 변형된다. 아실기의 추가로 순환계에서 연장된 반감기, 작용 개시의 지연, 작용 기간의 연장, DPP-IV와 같은 프로테아제에 대한 저항성의 개선, GLP-1 및 글루카곤 펩티드의 GIP 수용체에서 증가된 활성중 하나 또는 그 이상을 글루카곤 펩티드가 가지게 된다. 여기서 보여준 것과 같이, 글루카곤 펩티드의 아실화는 글루카곤 및 GLP-1 수용체에서 활성을 감소시키지 않는다. 다만, 일부 경우, 아실화는 GLP-1 및 글루카곤 수용체에서 실제로 활성을 증가시킨다. 따라서, 아실화된 유사체의 효능은 강화되지 않았다면 글루카곤 공동-항진제 유사체의 아실화안된 형태와 필적된다.
- [0202] 한 구체예에 따르면, 글루카곤 펩티드는 순환계에서 반감기의 연장 및/또는 작용 개시의 지연 및/또는 작용 기간의 연장 및/또는 프로테아제 예를 들면, DPP-IV에 대한 저항성을 개선시키기 위한 목적으로 에스테르, 티오에스테르, 또는 아마이드 링키지를 통하여 글루카곤 펩티드에 부착된 아실기를 포함하도록 변형된다.
- [0203] 아실화는 글루카곤 펩티드 내의 임의의 위치에서 실행될 수 있는데, 글루카곤 및/또는 GLP-1 활성이 강화되지 않고 유지된다면 위치 1-29, C-말단 연장부내 위치, 또는 C- 말단 아미노산 중 하나를 포함하는 위치에서 실행될 수 있다. 비-제한적 예로는 위치 5, 7, 10, 11, 12, 13, 14, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 24, 27, 28, 또는 29을 포함한다. 특이적 구체예에서, 아실화는 글루카곤 펩티드의 위치 10에서 일어나며, 글루카곤 펩티드는 분자내 다리, 예를 들면, 공유 분자내 다리 (예, 락탐 다리)가 없다. 분자내 다리가 없는 아실화된 펩티드는 공유 분자내 다리가 없는 아실화안된 대응 펩티드와 비교하였을 때, 그리고 위치 10이외의 위치에서 아실화된 분자내 다리가 없는 대응 펩티드와 비교하였을 때, GLP-1 및 글루카곤 수용체에서 강화된 활성을 보인다. 여기에서 볼 수 있는 것과 같이, 위치 10에서 아실화는 글루카곤 수용체에서 거의 활성이 없는 글루카곤 유사체를 글루카곤 및 GLP-1 수용체 모두에서 활성을 가진 글루카곤 유사체로 변형시킬 수도 있다. 따라서, 아실화가 일어나는 위치는 글루카곤 유사체의 전반적인 활성 프로파일을 변경시킬 수 있다.
- [0204] 글루카곤 펩티드는 친수성 모이어티가 연결된 위치와 동일한 위치 또는 상이한 아미노산 위치에서 아실화될 수 있다. 비-제한적 실시예는 글루카곤 펩티드의 위치 10에서 아실화와, 글루카곤 펩티드의 C-말단 부분내 하나 이상의 위치에서, 예를 들면, 위치 24, 28 또는 29, C-말단 연장부내에서, 또는 C-말단 (예를 들면, C-말단 Cys의 추가를 통하여) 폐길화를 포함한다.
- [0205] 아실기는 글루카곤 펩티드의 아미노산에 직접 공유적으로 링크되거나, 스페이스를 통하여 글루카곤 펩티드의 아

미노산에 간접적으로 링크되는데, 여기서 스페이스는 글루카곤 펩티드의 아미노산과 아실기 사이에 위치한다.

[0206] 본 발명의 특정 측면에서, 글루카곤 펩티드는 글루카곤 펩티드의 아미노산 측쇄의 아민, 하이드록시 또는 티올의 직접적인 아실화에 의한 아실기를 포함하도록 변형된다. 일부 구체예에서, 글루카곤 펩티드는 아미노산의 측쇄 아민, 하이드록시 또는 티올을 통하여 직접적으로 아실화된다. 일부 구체예에서, 아실화는 위치 10, 20, 24 또는 29에서 일어난다. 이에 대하여, 아실화된 글루카곤 펩티드는 SEQ ID NO : 1의 아미노산 서열, 또는 여기에서 설명된 하나 이상의 아미노산 변형들을 포함하는 이의 변형된 아미노산 서열을 포함할 수 있는데, 위치 10, 20, 24, 및 29의 아미노산들 중 적어도 하나는 측쇄 아민, 하이드록시 또는 티올을 포함하는 임의의 아미노산으로 변형된다. 본 발명의 일부 특정 구체예에서, 글루카곤 펩티드의 직접적인 알킬화는 위치 10의 아미노산의 측쇄 아민, 하이드록시 또는 티올을 통하여 일어난다.

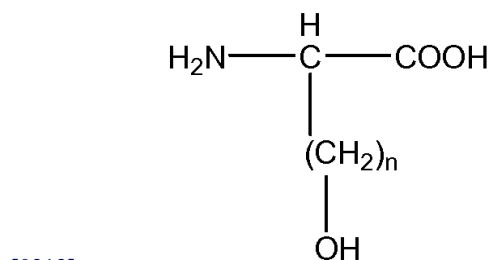
[0207] 일부 구체예에서, 측쇄 아민을 포함하는 아미노산은 화학식 I의 아미노산이다.



[0209] [화학식 I]

[0210] 일부 예시적인 구체예에서, 화학식 I의 아미노산은 화학식 I에서 n은 4인 아미노산(Orn) 또는 n은 3인 아미노산(Orn)이 된다.

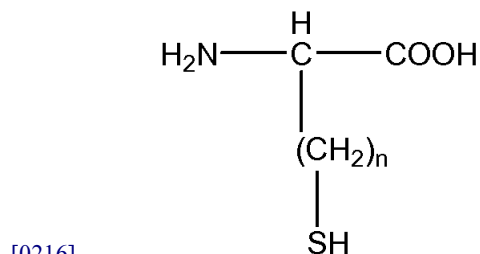
[0211] 다른 구체예들에서, 측쇄 하이드록시를 포함하는 아미노산은 화학식 II의 아미노산이다.



[0213] [화학식 II]

[0214] 일부 예시적인 구체예에서, 화학식 II의 아미노산은 화학식 II에서 n은 1인 아미노산(Ser)이 된다.

[0215] 다른 구체예에서, 측쇄 티올을 포함하는 아미노산은 화학식 III의 아미노산이다.



[0217] [화학식 III]

[0218] 일부 예시적인 구체예에서, 화학식 III의 아미노산은 화학식 III에서 n은 1인 아미노산(Cys)이 된다.

[0219] 다른 구체예에서, 측쇄 아민, 하이드록시 또는 티올을 포함하는 아미노산은 화학식 I, II, 또는 III의 동일한 구조지만, 단지 화학식 I, II, 또는 III의 아미노산의 알파 탄소에 결합된 수소가 제 2 측쇄로 대체된, 이중치환된 아미노산이다.

- [0220] 본 발명의 한 구체예에서, 아실화된 글루카곤 펩티드는 펩티드와 알킬기 사이에 스페이스를 포함한다. 일부 구체예에서, 글루카곤 펩티드는 스페이스에 공유적으로 결합되며, 이때 스페이스는 아실기에 공유적으로 결합된다.
- [0221] 스페이스가 부착된 아미노산은 스페이스에 링크를 할 수 있는 모이어티를 포함하는 임의의 아미노산(예를 들면, 단일 또는 이중  $\alpha$ -치환된 아미노산)일 수 있다. 예를 들면, 측쇄  $\text{NH}_2$ ,  $-\text{OH}$ , 또는  $-\text{COOH}$  (예를 들면, Lys, Orn, Ser, Asp, 또는 Glu)를 포함하는 아미노산이 적합하다. 이 점에 있어서, 아실화된 글루카곤 펩티드는 SEQ ID NO: 1의 아미노산, 또는 여기에서 논의된 것과 같이, 위치 10, 20, 24 및 29의 아미노산 중 하나가 측쇄 아민, 하이드록시, 또는 카르복시산염을 포함하는 임의의 아미노산으로 변형된 하나 이상의 아미노산 변형을 포함하는 SEQ ID NO : 1의 변형된 아미노산 서열을 포함할 수도 있다.
- [0222] 일부 구체예에서, 스페이스는 측쇄 아민, 하이드록시, 또는 티올을 포함하는 아미노산, 측쇄 아민, 하이드록시, 또는 티올을 포함하는 아미노산으로 구성된 이가 펩티드 또는 삼가펩티드다.
- [0223] 아실화가 스페이스의 아민기를 통하여 일어날 경우, 아실화는 아미노산의 알파 아민 또는 측쇄 아민을 통하여 일어날 수 있다. 알파 아민이 아실화된 경우라면, 스페이스 아미노산은 임의의 아미노산이 될 수 있다. 예를 들면, 스페이스 아미노산은 소수성 아미노산, 예를 들면, Gly, Ala, Val, Leu, Ile, Trp, Met, Phe, Tyr, 6-아미노 헥사논산, 5-아미노 발레르산, 7-아미노 헵타논산, 및 8-아미노옥타논산이 될 수 있다. 대안으로, 스페이스 아미노산은 산성 잔기, 예를 들면, Asp 및 Glu이 될 수 있다.
- [0224] 스페이스 아미노산의 측쇄 아민이 아실화된 경우, 스페이스 아미노산은 측쇄 아민을 포함하는 아미노산, 예를 들면, 화학식 I의 아미노산(예를 들면, Lys 또는 Orn)이 된다. 이 경우, 스페이스 아미노산의 알파 아민 및 측쇄 아민 모두 아실화되는 것이 가능하며, 이런 글루카곤 펩티드는 이중-아실화된다. 본 발명의 구체예는 이와 같은 이중-아실화된 분자들을 포함한다.
- [0225] 아실화는 스페이스의 하이드록시기를 통하여 일어나고, 아미노산 또는 이가펩티드 또는 삼가펩티드의 아미노산 중 하나는 화학식 II의 아미노산이 될 수 있다. 특정 예시적인 구체예에서, 아미노산은 Ser이다.
- [0226] 아실화는 스페이스의 티올기를 통하여 일어나고, 아미노산 또는 이가펩티드 또는 삼가펩티드의 아미노산 중 하나는 화학식 III의 아미노산이 될 수 있다. 특정 예시적인 구체예에서, 아미노산은 Cys이다.
- [0227] 일부 구체예에서, 스페이스는 친수성 2기능성 스페이스다. 특정 구체예에서, 친수성 2기능성 스페이스는 두 개 이상의 반응기 예를 들면, 아민, 하이드록시, 티올, 카르복실기 또는 이의 복합을 포함한다. 특정 구체예에서, 친수성 2기능성 스페이스는 하이드록시기 및 카르복시산염을 포함한다. 다른 구체예에서, 친수성 2기능성 스페이스는 아민기 및 카르복시산염을 포함한다. 다른 구체예에서, 친수성 2기능성 스페이스는 티올기 및 카르복시산염을 포함한다. 특정 구체예에서, 스페이스는 아미노 폴리(알킬옥시)카르복시산염을 포함한다. 이에 대하여, 스페이스는 예를 들면,  $\text{NH}_2(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n(\text{CH}_2)_m\text{COOH}$ (여기서, m은 1 내지 6까지 중 임의의 정수가 되며, n은 2 내지 12까지의 정수 중 임의의 정수가 된다)를 포함하며, 예를 들면, 8-아미노-3,6-디옥사옥타논산을 포함하며, 이는 *Peptide International, Inc. (Louisville, KY)*에서 시판된다.
- [0228] 일부 구체예에서, 스페이스는 소수성 2기능성 스페이스다. 소수성 2기능성 스페이스는 본 기술 분야에 공지되어 있다. 예를 들면, *Bioconjugate Techniques, G. T. Hermanson (Academic Press, San Diego, CA, 1996)*-참고문헌으로 결합됨. 특정 구체예에서, 소수성 2기능성 스페이스는 두 개 이상의 반응기, 예를 들면, 아민, 하이드록시, 티올, 및 카르복실기 또는 이의 임의의 복합을 포함한다. 특정 구체예에서, 소수성 2기능성 스페이스는 하이드록시기 및 카르복시산염을 포함한다. 다른 구체예들에서, 소수성 2기능성 스페이스는 아민기 및 카르복시산염을 포함한다. 다른 구체예들에서, 소수성 2기능성 스페이스는 티올기 및 카르복시산염을 포함한다. 카르복시산염, 그리고 하이드록시기 또는 티올기를 포함하는 적합한 소수성 2기능성 스페이스는 본 기술분야에 공지되어 있으며, 예를 들면, 8-하이드록시옥타논산 및 8-메틸덱토옥타논산을 포함한다.
- [0229] 일부 구체예에서, 2기능성 스페이스는 카르복시산염 기 사이에 1-7개 탄소원자로 된 비-분지형, 메틸렌을 포함하는 디카르복실산은 아니다. 일부 구체예에서, 2기능성 스페이스는 카르복시산염 기 사이에 1-7개 탄소원자로 된 비-분지형, 메틸렌을 포함하는 디카르복실산이다.
- [0230] 특정 구체예에서, 스페이스 (예를 들면, 아미노산, 이가 펩티드, 삼가펩티드, 친수성 2기능성, 또는 소수성 2기능성 스페이스)는 길이가 3 내지 10개 원자 (예를 들면, 6 내지 10 원자, 예를 들면, 6, 7, 8, 9, 또는 10개 원자)가 된다. 좀더 특정한 구체예에서, 스페이스는 길이가 약 3 내지 10개 원자 (예를 들면, 6 내지 10 원자)이



며, 아실기는 C12 내지 C18의 지방성 아실기, 예를 들면, C14 지방성 아실기, C16 지방성 아실기가 되며, 스페이스와 아실기의 전체 길이는 14 내지 28개 원자, 예를 들면, 약 14개, 15개, 16개, 17개, 18개, 19개, 20개, 21개, 22개, 23개, 24개, 25개, 26개, 27개, 또는 28개 원자의 길이가 된다. 일부 구체예에서, 스페이스 및 아실기의 길이는 17 내지 28개 (예를 들면, 19 내지 26개, 19 내지 21개)의 원자다.

[0231] 특정 전술한 구체예에 따르면, 2기능성 스페이스는 3 내지 10개의 원자 길이로 된 아미노산 기본 골격을 포함하는 합성되거나 또는 자연적으로 생성되는 아미노산 (여기에서 설명되는 것을 포함하나 이에 한정되지 않음) (예를 들면, 6-아미노 헥사논산, 5-아미노발레르산, 7-아미노헵타논산, 및 8-아미노옥타논산)이 될 수 있다. 대안으로, 스페이스는 3 내지 10개 원자 (예를 들면, 6 내지 10개 원자)의 길이로 된 펩티드 기본 골격을 가지는 이가 펩티드 또는 삼가 펩티드 스페이스다. 이가 펩티드 또는 삼가 펩티드 스페이스의 각 아미노산은 이가 펩티드 또는 삼가 펩티드의 다른 아미노산과 동일하거나 다를 수 있고, 다음으로 구성된 군으로부터 독립적으로 선택될 수 있다: 자연적으로 생성되는 및/또는 자연적으로 생성되지 않는 아미노산, 예를 들면, 자연적으로 생성되는 아미노산 (Ala, Cys, Asp, Glu, Phe, Gly, His, Ile, Lys, Leu, Met, Asn, Pro, Arg, Ser, Thr, Val, Trp, Tyr)의 D 또는 L 이성체중 임의의 것, 또는 다음의 군으로부터 선택된 자연적으로 생성되지 않는 아미노산의 D 또는 L 이성체:  $\beta$ -알라닌 ( $\beta$ -Ala), N- $\alpha$ -메틸-알라닌 (Me-Ala), 아미노부티르산 (Abu),  $\gamma$ -아미노부티르산 ( $\gamma$ -Abu), 아미노헥사논산 ( $\epsilon$ -Ahx), 아미노이소부티르산 (Aib), 아미노메틸피롤 카르복실산, 아미노피페리딘 카르복실산, 아미노세린 (Ams), 아미노테트라하이드로피란-4-카르복실산, 아르기닌 N-메톡시-N-메틸 아미드,  $\beta$ -아스파르트산 ( $\beta$ -Asp), 아제티딘 카르복실산, 3-(2-벤조티아졸일)알라닌, *a-tert*-부틸글리신, 2-아미노-5-우레이도-n-발레르산 (시트룰린, Cit),  $\beta$ -시클로헥실알라닌 (Cha), 아세트아미도메틸-시스테인, 디아미노부타논산(Dab), 디아미노프로피온산 (Dpr), 디하이드록시페닐알라닌 (DOPA), 디메틸티아졸리딘(DMTA),  $\gamma$ -글루타민산 ( $\gamma$ -Glu), 호모세린 (Hse), 하이드록시프롤린 (Hyp), 이소루이신 N-메톡시-N-메틸 아미드, 메틸-이소루이신 (MeIle), 이소노페코틴산(Isn), 메틸-루이신 (MeLeu), 메틸-리신, 디메틸-리신, 트리메틸-리신, 메타노프롤린, 메티오닌-술포시드(Met(O)), 메티오닌-술포 (Met(O<sub>2</sub>)), 노르루이신 (Nle), 메틸-노르루이신 (Me-Nle), 노르발린 (Nva), 오르니틴 (Orn), 파라-아미노벤조산 (PABA), 페니실아민 (Pen), 메틸페닐알라닌 (MePhe), 4-클로로페닐알라닌 (Phe(4-Cl)), 4-플로오르페닐알라닌 (Phe(4-F)), 4-니트로페닐알라닌 (Phe(4-NO<sub>2</sub>)), 4-시아노페닐알라닌 ((Phe(4-CN))), 페닐글리신 (Phg), 피페리디닐알라닌, 피페리디닐글리신, 3,4-데하이드로프롤린, 피롤리디닐알라닌, 사르코신(Sar), 셀레노시스테인 (Sec), 0-벤질-포스포세린, 4-아미노-3-하이드록시-6-메틸헵타논산 (Sta), 4-아미노-5-시클로헥실-3-하이드록시펜타논산(ACHPA), 4-아미노-3-하이드록시-5-페닐펜타논산(AHPPA), 1,2,3,4,-테트라하이드로-이소퀴놀린-3-카르복실산 (Tic), 테트라하이드로피란글리신, 티에닐알라닌 (Thi), 0-벤질-포스포티로신, 0-포스포티로신, 메톡시티로신, 에톡시티로신, 0-(비스-디메틸아미노-포스포노)-티로신, 티로신 설페이트 테트라부틸아민, 메틸-발린 (MeVal) 및 알킬화된 3-메틸캅토프로피온산.

[0232] 일부 구체예에서, 스페이스는 전반적으로 음 전하를 포함하는데, 예를 들면, 하나 또는 두 개 이상의 음 전하를 띤 아미노산을 포함한다. 일부 구체예에서, 이가 펩티드는 일반 구조 A-B의 이가 펩티드 중 임의의 것이 아니며, 여기서 A는 Gly, Gln, Ala, Arg, Asp, Asn, Ile, Leu, Val, Phe, 및 Pro으로 구성된 군으로부터 선택되며, B 는 Lys, His, Trp으로 구성된 군으로부터 선택된다. 일부 구체예에서, 이가 펩티드 스페이스는 다음으로 구성된 군으로부터 선택된다: Ala-Ala,  $\beta$ -Ala-  $\beta$ -Ala, Leu-Leu, Pro-Pro,  $\gamma$ -아미노부티르산- $\gamma$ -아미노부티르산, 및  $\gamma$ -Glu- $\gamma$ -Glu.

[0233] 일부 예시적인 구체예에서, 글루카곤 펩티드는 스페이스의 아민, 하이드록시 또는 티올의 아실화에 의한 아실기를 포함하도록 변형되며, 이때 스페이스는 아미노산 위치 10, 20, 24 또는 29의 아미노산 측쇄 또는 글루카곤 펩티드의 C-말단 아미노산에 부착된다.

[0234] 좀더 특이적인 구체예에서, 아실기는 글루카곤 펩티드의 위치 10의 아미노산에 부착되고, 선택적으로, 스페이스 및 아실기의 길이는 14 내지 28개의 원자가 된다. 일부 측면에서, 위치 10의 아미노산은 화학식 I의 아미노산, 예를 들면, Lys, 또는 화학식 I과 연관된 이중치환된 아미노산이다. 더욱 특이적인 구체예에서, 글루카곤 펩티드는 분자내 다리, 예를 들면, 공유적 분자내 다리가 없다. 글루카곤 펩티드는, 예를 들면, 펩티드의 알파 헬릭스 구조의 안정화를 위하여 하나이상의 알파, 알파-이중치환된 아미노산, 예를 들면, AIB를 포함하는 펩티드가 될 수 있다. 여기에서 보여진 것과 같이, 위치 10의 아미노산 측쇄에 공유적으로 부착된 아실화된 스페이스를 포함하는 이와 같은 펩티드는 GLP-1 및 글루카곤 수용체에서 강화된 효능을 나타낸다.

[0235] 아민, 하이드록시 및 티올을 통한 펩티드 아실화의 적합한 방법들은 본 기술 분야에 공지되어 있다. 예를 들면, 실시예 19 (아민을 통한 아실화 방법), *Miller, Biochem Biophys Res Commun 218: 377-382 (1996);*

*Shimohigashi and Stammer, Int J Pept Protein Res 19: 54-62 (1982); and Previero et al., Biochim Biophys Acta 263: 7-13 (1972) (하이드록시를 통한 아실화 방법); and San and Silvius, J Pept Res 66: 169-180 (2005) (티올을 통한 아실화 방법); Bioconjugate Chem. "Chemical Modifications of Proteins: History and Applications" pages 1, 2-12 (1990); Hashimoto et al., Pharmacuetical Res. "Synthesis of Palmitoyl Derivatives of insulin and their Biological Activity" Vol. 6, No: 2 pp.171-176 (1989)을 참고한다.*

- [0236] 아실화된 글루카곤 펩티드의 아실기는 임의의 길이가 될 수 있는데, 예를 들면, 임의 길이의 탄소 사슬이 되며, 선형 또는 분지형이 될 수 있다. 본 발명의 특정 구체예에서, 아실기는 C4 내지 C30의 지방산이다. 예를 들면, 아실기는 C4 지방산, C6 지방산, C8 지방산, C10 지방산, C12 지방산, C14 지방산, C16 지방산, C18 지방산, C20 지방산, C22 지방산, C24 지방산, C26 지방산, C28 지방산, 또는 C30 지방산 중 하나가 될 수 있다. 일부 구체예에서, 아실기는 C8 내지 C20의 지방산, 예를 들면, C14 지방산 또는 C16의 지방산이다.
- [0237] 대안적 구체예에서, 아실기는 담즙산(bile acid)이다. 담즙산은 콜린산(cholic acid), 케노테옥시콜린산, 데옥시콜린산, 리토콜린산, 타우로콜린산, 글리코콜린산 및 콜레스테롤 산을 포함하나 이에 한정되지 않는 임의의 적합한 담즙산이 될 수 있다.
- [0238] 본 발명의 일부 구체예에서, 글루카곤 펩티드는 글루카곤 펩티드의 긴 사슬 알칸의 아실화에 의한 아실기를 포함하도록 변형된다. 특정 측면에서, 긴 사슬 알칸은 글루카곤 펩티드의 카르복실기 또는 이의 활성화형과 반응하는 아민, 하이드록시, 또는 티올기 (예를 들면, 옥타데실아민, 테트라데카놀 및 헥사데칸티올)를 포함한다. 글루카곤 펩티드의 카르복실기, 또는 이의 활성화형은 글루카곤 펩티드의 아미노산(예를 들면, 글루타민산, 아스파르트산)의 측쇄의 일부분이거나 또는 펩티드 기본구조의 일부가 될 수 있다.
- [0239] 특정 구체예에서, 글루카곤 펩티드는 글루카곤 펩티드에 부착된 스페이스에 의하여 긴 사슬 알칸의 아실화에 의한 아실기를 포함하도록 변형된다. 특정 측면에서, 긴 사슬 알칸은 스페이스의 카르복실기, 또는 이의 활성화된 형태와 반응하는 아민, 하이드록시, 또는 티올기를 포함한다. 카르복실기 또는 이의 활성화된 형태를 포함하는 적절한 스페이스는 여기에서 설명되며, 예를 들면, 2기능성 스페이스, 예를 들면, 아미노산, 이가 펩티드, 삼가 펩티드, 친수성 2기능성 스페이스 및 소수성 2기능성 스페이스를 포함한다.
- [0240] 여기에서 사용된 바와 같이, “카르복시기의 활성화된 형”은 일반식  $R(C=O)X$ 의 카르복실기(여기서 X는 이탈기가 되며, R은 글루카곤 펩티드 또는 스페이스가 된다)를 말한다. 예를 들면, 카르복시의 활성화된 형에는 아실 클로라이드, 안하이드리드, 에스테르가 포함되나 이에 한정되지는 않는다. 일부 구체예에서, 활성화된 카르복실기는 N-하이드록시숙시니미드 에스테르 (NHS) 이탈기를 가지는 에스테르다.
- [0241] 긴 사슬 알칸은 글루카곤 펩티드 또는 스페이스에 의해 아실화되는 본 발명의 이와 같은 측면에 대하여, 긴 사슬 알칸은 임의의 크기가 될 수 있으며, 임의의 길이의 탄소 사슬을 포함할 수 있다. 긴 사슬 알칸은 선형 또는 분지형이다. 특정 측면에서, 긴 사슬 알칸은 C4 내지 C30의 알칸이다. 예를 들면, 긴 사슬 알칸은 C4 알칸, C6 알칸, C8 알칸, C10 알칸, C12 알칸, C14 알칸, C16 알칸, C18 알칸, C20 알칸, C22 알칸, C24 알칸, C26 알칸, C28 알칸, 또는 C30 알칸 중 임의의 것이 될 수 있다. 일부 구체예에서, 긴 사슬 알칸은 C8 내지 C20의 알칸, 예를 들면, C14 알칸, C16 알칸, 또는 C18 알칸을 포함한다.
- [0242] 또한, 일부 구체예에서, 글루카곤 펩티드의 아민, 하이드록시, 또는 티올기는 콜레스테롤산으로 아실화된다. 특정 구체예에서, 글루카곤 펩티드는 아실화된 -테스-아미도 Cys 스페이스, 예를 들면, 아실화된 3-merkaptopropion산 스페이스를 통하여 콜레스테롤산에 링크된다.
- [0243] 여기에서 논의된 것과 같이, 아실화된 글루카곤 펩티드는 친수성 모이어티를 포함하도록 추가 변형될 수 있다. 일부 특정 구체예에서, 친수성 모이어티는 폴리에틸렌 글리콜 (PEG) 사슬을 포함할 수 있다. 친수성 모이어티의 통합은 임의의 적절한 수단, 예를 들면, 여기에서 설명되는 방법들중 하나에 의해 이루어질 수 있다. 이점에 있어서, 아실화된 글루카곤 펩티드는 여기에서 설명되는 변형들중 임의의 것을 포함하는, SEQ ID NO: 1을 포함하는데, 여기서, 위치 10, 20, 24 및 29, 의 아미노산중 적어도 하나는 아실기가 되며, 위치 16, 17, 21, 24 또는 29 또는 C-말단 연장부 내의 위치 또는 C-말단 아미노산의 아미노산 중 적어도 하나는 Cys, Lys, Orn, 호모-Cys, 또는 Ac-Phe으로 변형되며, 아미노산의 측쇄는 친수성 모이어티 (예를 들면, PEG)에 공유적으로 결합된다. 일부 구체예에서, 아실기는 위치 10 에 부착되거나, 그리고 선택적으로 Cys, Lys, Orn, 호모-Cys, 또는 Ac-Phe을 포함하는 스페이스를 통하여 부착되며, 친수성 모이어티는 위치 24의 Cys 잔기에 통합된다.
- [0244] 대안으로, 아실화된 글루카곤 펩티드는 스페이스를 포함하는데, 이때 스페이스는 아실화 및 변형 둘 다 되어 친수성 모이어티를 포함한다. 적절한 스페이스의 비-제한적 실시예로는 Cys, Ac-Cys, Lys, Orn, 호모-Cys, 및 Ac-



Phe로 구성된 군으로부터 선택된 하나 이상의 아미노산을 포함하는 스페이스를 포함한다.

[0245] 알킬화(Alkylation)

[0246] 일부 구체예에 따르면, 글루카곤 펩티드는 알킬기, 예를 들면, 자연적으로 생성되는 아미노산에 고유한 것이 아닌, 자연-생성되지 않는 알킬기를 포함하도록 변형된다. 특정 이론에 구애받지 않고, 펩티드의 알킬기는 동일하지는 않지만, 펩티드의 아실기와 유사한 효과를 가질 것으로 보이는데, 예를 들면, 순환계에서 연장된 반감기, 작용 개시의 지연, 작용 기간의 연장, DPP-IV와 같은 프로테아제에 대한 저항성의 개선, GLP-1 및 글루카곤 펩티드의 GIP 수용체에서 증가된 활성을 가지게 된다.

[0247] 아실화는 글루카곤 펩티드 내의 임의의 위치에서 실행될 수 있는데, 글루카곤 및/또는 GLP-1 활성이 강화되지 않고 유지된다면 위치 1-29, C-말단 연장부내 위치, 또는 C- 말단 아미노산 중 하나를 포함하는 위치에서 실행될 수 있다. 비-제한적 예로는 위치 5, 7, 10, 11, 12, 13, 14, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 24, 27, 28, 또는 29을 포함한다. 알킬기는 글루카곤 펩티드의 아미노산에 직접 공유적으로 링크되거나, 스페이스를 통하여 글루카곤 펩티드의 아미노산에 간접적으로 링크되는데, 여기서 스페이스는 글루카곤 펩티드의 아미노산과 알킬기 사이에 위치한다. 글루카곤 펩티드는 친수성 모이어티가 연결된 위치와 동일한 위치 또는 상이한 아미노산 위치에서 알킬화될 수 있다. 비-제한적 실시예는 글루카곤 펩티드의 위치 10에서 알킬화와, 글루카곤 펩티드의 C-말단 부분내 하나 이상의 위치에서, 예를 들면, 위치 24, 28 또는 29, C-말단 연장부내에서, 또는 C-말단 (예를 들면, C-말단 Cys의 추가를 통하여) 폐길화를 포함한다.

[0248] 본 발명의 특정 측면에서, 글루카곤 펩티드는 글루카곤 펩티드의 아미노산 측쇄의 아민, 하이드록시 또는 티올의 직접적인 알킬화에 의한 알킬기를 포함하도록 변형된다. 일부 구체예에서, 글루카곤 펩티드는 아미노산의 측쇄 아민, 하이드록시 또는 티올을 통하여 직접적으로 알킬화된다. 일부 구체예에서, 알킬화는 위치 10, 20, 24 또는 29에서 일어난다. 이에 대하여, 알킬화된 글루카곤 펩티드는 SEQ ID NO : 1의 아미노산 서열, 또는 여기에서 설명된 하나 이상의 아미노산 변형들을 포함하는 이의 변형된 아미노산 서열을 포함할 수 있는데, 위치 10, 20, 24, 및 29의 아미노산들 중 적어도 하나는 측쇄 아민, 하이드록시 또는 티올을 포함하는 임의의 아미노산으로 변형된다. 본 발명의 일부 특정 구체예에서, 글루카곤 펩티드의 직접적인 알킬화는 위치 10의 아미노산의 측쇄 아민, 하이드록시 또는 티올을 통하여 일어난다.

[0249] 일부 구체예에서, 측쇄 아민을 포함하는 아미노산은 화학식 I의 아미노산이다. 일부 예시적인 구체예에서, 화학식 I의 아미노산은 화학식 I에서 n은 4인 아미민미노산)이고 또는 n은 3인 아미노산(Orn)이 된다.

[0250] 다른 구체예들에서, 측쇄 하이드록시를 포함하는 아미노산은 화학식 II의 아미노산이다. 일부 예시적인 구체예에서, 화학식 II의 아미노산은 화학식 II에서 n은 1인 아미노산(Ser)이 된다.

[0251] 다른 구체예에서, 측쇄 티올을 포함하는 아미노산은 화학식 III의 아미노산이다. 일부 예시적인 구체예에서, 화학식 III의 아미노산은 화학식 III에서 n은 1인 아미노산(Cys)이 된다.

[0252] 다른 구체예에서, 측쇄 아민, 하이드록시 또는 티올을 포함하는 아미노산은 화학식 I, II, 또는 III의 동일한 구조지만, 단지 화학식 I, II, 또는 III의 아미노산의 알과 탄소에 결합된 수소가 제 2 측쇄로 대체된, 이중치환된 아미노산이다.

[0253] 본 발명의 한 구체예에서, 알킬화된 글루카곤 펩티드는 펩티드와 알킬기 사이에 스페이스를 포함한다. 일부 구체예에서, 글루카곤 펩티드는 스페이스에 공유적으로 결합되며, 이때 스페이스는 알킬기에 공유적으로 결합된다. 일부 예시적인 구체예에서, 글루카곤 펩티드는 아미노산의 측쇄 아민, 하이드록시 또는 티올을 통하여 직접적으로 알킬화되고, 스페이스는 글루카곤 펩티드의 위치 10, 20, 24 또는 29의 아미노산 측쇄에 부착된다. 스페이스가 부착된 아미노산은 스페이스에 링크를 할 수 있는 모이어티를 포함하는 임의의 아미노산(예를 들면, 단일 또는 이중  $\alpha$ -치환된 아미노산)일 수 있다. 예를 들면, 측쇄  $\text{NH}_2$ ,  $-\text{OH}$ , 또는  $-\text{COOH}$  (예를 들면, Lys, Orn, Ser, Asp, 또는 Glu)를 포함하는 아미노산이 적합하다. 이 점에 있어서, 아실화된 글루카곤 펩티드는 SEQ ID NO: 1의 아미노산, 또는 여기에서 논의된 것과 같이, 위치 10, 20, 24 및 29의 아미노산 중 하나가 측쇄 아민, 하이드록시, 또는 카르복시산염을 포함하는 임의의 아미노산으로 변형된 하나 이상의 아미노산 변형을 포함하는 SEQ ID NO : 1의 변형된 아미노산 서열을 포함할 수도 있다.

[0254] 일부 구체예에서, 스페이스는 측쇄 아민, 하이드록시, 또는 티올을 포함하는 아미노산, 측쇄 아민, 하이드록시, 또는 티올을 포함하는 아미노산으로 구성된 이가 펩티드 또는 삼가펩티드다.

- [0255] 알킬화가 스페이스의 아민기를 통하여 일어날 경우, 알킬화는 아미노산의 알파 아민 또는 측쇄 아민을 통하여 일어날 수 있다. 알파 아민이 알킬화된 경우라면, 스페이스 아미노산은 임의의 아미노산이 될 수 있다. 예를 들면, 스페이스 아미노산은 소수성 아미노산, 예를 들면, Gly, Ala, Val, Leu, Ile, Trp, Met, Phe, Tyr, 6-아미노헥사논산, 5-아미노발레르산, 7-아미노헵타논산, 및 8-아미노옥타논산이 될 수 있다. 대안으로, 스페이스 아미노산은 산성 잔기, 예를 들면, Asp 및 Glu이 될 수 있다. 스페이스 아미노산의 측쇄 아민이 알킬화된 경우에, 스페이스 아미노산은 측쇄 아민을 포함하는 아미노산, 예를 들면, 화학식 I의 아미노산(예를 들면, Lys 또는 Orn)이 된다. 이 경우, 스페이스 아미노산의 알파 아민 및 측쇄 아민 모두 알킬화되는 것이 가능하며, 이런 글루카곤 펩티드는 이중-알킬화된다. 본 발명의 구체예에는 이와 같은 이중-알킬화된 분자들을 포함한다.
- [0256] 알킬화는 스페이스의 하이드록시기를 통하여 일어나고, 아미노산 또는 이가펩티드 또는 삼가펩티드의 아미노산 중 하나는 화학식 II의 아미노산이 될 수 있다. 특정 예시적인 구체예에서, 아미노산은 Ser이다.
- [0257] 알킬화는 스페이스의 티올기를 통하여 일어나고, 아미노산 또는 이가펩티드 또는 삼가펩티드의 아미노산 중 하나는 화학식 III의 아미노산이 될 수 있다. 특정 예시적인 구체예에서, 아미노산은 Cys이다.
- [0258] 일부 구체예에서, 스페이스는 친수성 2기능성 스페이스다. 특정 구체예에서, 친수성 2기능성 스페이스는 두 개 이상의 반응기 예를 들면, 아민, 하이드록시, 티올, 카르복실기 또는 이의 복합을 포함한다. 특정 구체예에서, 친수성 2기능성 스페이스는 하이드록시기 및 카르복시산염을 포함한다. 다른 구체예에서, 친수성 2기능성 스페이스는 아민기 및 카르복시산염을 포함한다. 다른 구체예에서, 친수성 2기능성 스페이스는 티올기 및 카르복시산염을 포함한다. 특정 구체예에서, 스페이스는 아미노 폴리(알킬옥시)카르복시산염을 포함한다. 이에 대하여, 스페이스는 예를 들면,  $\text{NH}_2(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n(\text{CH}_2)_m\text{COOH}$ (여기서, m은 1 내지 6까지 중 임의의 정수가 되며, n은 2 내지 12까지의 정수중 임의의 정수가 된다)를 포함하며, 예를 들면, 8-아미노-3,6-디옥사옥타논산을 포함하며, 이는 *Peptide International, Inc. (Louisville, KY)*에서 시판된다.
- [0259] 일부 구체예에서, 스페이스는 소수성 2기능성 스페이스다. 소수성 2기능성 스페이스는 본 기술 분야에 공지되어 있다. 예를 들면, *Bioconjugate Techniques, G. T. Hermanson (Academic Press, San Diego, CA, 1996)*-참고문헌으로 결합됨. 특정 구체예에서, 소수성 2기능성 스페이스는 두 개 이상의 반응기, 예를 들면, 아민, 하이드록시, 티올, 및 카르복실기 또는 이의 임의의 복합을 포함한다. 특정 구체예에서, 소수성 2기능성 스페이스는 하이드록시기 및 카르복시산염을 포함한다. 다른 구체예들에서, 소수성 2기능성 스페이스는 아민기 및 카르복시산염을 포함한다. 다른 구체예들에서, 소수성 2기능성 스페이스는 티올기 및 카르복시산염을 포함한다. 카르복시산염, 그리고 하이드록시기 또는 티올기를 포함하는 적합한 소수성 2기능성 스페이스는 본 기술분야에 공지되어 있으며, 예를 들면, 8-하이드록시옥타논산 및 8-멜캅토옥타논산을 포함한다.
- [0260] 특정 구체예에서, 스페이스 (예를 들면, 아미노산, 이가 펩티드, 삼가펩티드, 친수성 2기능성, 또는 소수성 2기능성 스페이스)는 길이가 3 내지 10개 원자 (예를 들면, 6 내지 10 원자, 예를 들면, 6, 7, 8, 9, 또는 10개 원자)가 된다. 좀더 특정한 구체예에서, 스페이스는 길이가 약 3 내지 10개 원자 (예를 들면, 6 내지 10 원자)이며, 아실기는 C12 내지 C18의 지방성 아실기, 예를 들면, C14 지방성 아실기, C16 지방성 아실기가 되며, 스페이스와 아실기의 전체 길이는 14 내지 28개 원자, 예를 들면, 약 14개, 15개, 16개, 17개, 18개, 19개, 20개, 21개, 22개, 23개, 24개, 25개, 26개, 27개, 또는 28개 원자의 길이가 된다. 일부 구체예에서, 스페이스 및 아실기의 길이는 17 내지 28개 (예를 들면, 19 내지 26개, 19 내지 21개)의 원자다.
- [0261] 특정 전술한 구체예에 따르면, 2기능성 스페이스는 3 내지 10개의 원자 길이로 된 아미노산 기본 골격을 포함하는 합성되거나 또는 자연적으로 생성되는 아미노산 (예를 들면, 6-아미노헥사논산, 5-아미노발레르산, 7-아미노헵타논산, 및 8-아미노옥타논산)이 될 수 있다. 대안으로, 스페이스는 3 내지 10개 원자 (예를 들면, 6 내지 10개 원자)의 길이로 된 펩티드 기본 골격을 가지는 이가 펩티드 또는 삼가 펩티드 스페이스다. 이가 펩티드 또는 삼가 펩티드 스페이스는 여기에서 개시된 임의의 아미노산을 포함하는 자연적으로 생성되는 및/또는 자연적으로 생성되지 않는 아미노산을 포함한다. 일부 구체예에서, 스페이스는 전반적으로 음 전하를 포함하는데, 예를 들면, 하나 또는 두 개 이상의 음 전하를 띤 아미노산을 포함한다. 일부 구체예에서, 이가 펩티드 스페이스는 다음으로 구성된 군으로부터 선택된다: Ala-Ala,  $\beta$ -Ala-  $\beta$ -Ala, Leu-Leu, Pro-Pro,  $\gamma$ -아미노부티르산- $\gamma$ -아미노부티르산, 및  $\gamma$ -Glu- $\gamma$ -Glu.
- [0262] 아민, 하이드록시, 및 티올을 통한 펩티드 알킬화의 적절한 방법들은 당분야에 공지되어 있다. 예를 들면, Williamson 에테르 합성은 글루카곤 펩티드의 하이드록시기와 알킬기 사이에 에테르 링키지를 형성시키는데 이용될 수 있다. 또한, 알킬 할로겐화물과 펩티드의 친핵성 치환 반응으로 에테르, 티오에테르, 또는 아미노 링

키지 중 하나를 만들 수 있다.

- [0263] 알킬화된 글루카곤 펩티드의 알킬기는 임의의 길이가 될 수 있는데, 예를 들면, 임의의 길이의 탄소 사슬이 되며, 선형 또는 분지형이 될 수 있다. 본 발명의 특정 구체예에서, 알킬기는 C4 내지 C30의 지방산이다. 예를 들면, 알킬기는 C4 지방산, C6 지방산, C8 지방산, C10 지방산, C12 지방산, C14 지방산, C16 지방산, C18 지방산, C20 지방산, C22 지방산, C24 지방산, C26 지방산, C28 지방산, 또는 C30 지방산 중 하나가 될 수 있다. 일부 구체예에서, 아실기는 C8 내지 C20의 지방산, 예를 들면, C14 지방산 또는 C16의 지방산이다.
- [0264] 일부 특정 구체예에서, 알킬기는 담즙산, 예를 들면, 콜린산, 케노데옥시콜린산, 데옥시콜린산, 리토콜린산, 타우로콜린산, 글리코콜린산 및 콜레스테롤 산의스테로이드 모이어티를 포함한다.
- [0265] 본 발명의 일부 구체예에서, 글루카곤 펩티드는 친핵성, 긴 사슬 알칸을 글루카곤 펩티드와 반응시켜 알킬기를 포함하도록 변형되는데, 여기서, 글루카곤 펩티드는 친핵성 치환에 적합한 이탈기를 포함한다. 특정 측면에서, 긴 사슬 알칸의 친핵성기는 아민, 하이드록시 또는 티올기 (예를 들면, 옥타데실아민, 테트라데카놀 및 헥사데칸티올)를 포함한다. 글루카곤 펩티드의 이탈기는 아미노산의 측쇄의 일부분이거나, 펩티드 기본 골격의 일부분이 될 수 있다. 적합한 이탈기는 예를 들면, N-하이드록시숙시니미드, 할로젠, 및 술폰산염 에스테르를 포함한다.
- [0266] 특정 구체예에서, 글루카곤 펩티드는 친핵성, 긴 사슬 알칸과 글루카곤 펩티드에 부착된 스페이스와 반응시킴으로써 알킬기를 포함하도록 변형되는데, 여기서, 스페이스는 이탈기를 포함한다. 특정 측면에서, 긴 사슬 알칸은 아민, 하이드록시 또는 티올기를 포함한다. 특정 구체예에서, 이탈기를 포함하는 스페이스는 여기에서 논의된 임의의 스페이스가 될 수 있는데, 예를 들면, 아미노산, 이가 펩티드, 삼가 펩티드, 친수성 2기능성 스페이스, 적합한 이탈기를 더 포함하는 소수성 2기능성 스페이스가 될 수 있다.
- [0267] 긴 사슬 알칸은 글루카곤 펩티드 또는 스페이스에 의해 알킬화되는 본 발명의 이와 같은 측면에 있어서, 긴 사슬 알칸은 임의의 크기가 될 수 있으며, 임의의 길이의 탄소 사슬을 포함할 수 있다. 긴 사슬 알칸은 선형 또는 분지형이다. 특정 측면에서, 긴 사슬 알칸은 C4 내지 C30의 알칸이다. 예를 들면, 긴 사슬 알칸은 C4 알칸, C6 알칸, C8 알칸, C10 알칸, C12 알칸, C14 알칸, C16 알칸, C18 알칸, C20 알칸, C22 알칸, C24 알칸, C26 알칸, C28 알칸, 또는 C30 알칸 중 임의의 것이 될 수 있다. 일부 구체예에서, 긴 사슬 알칸은 C8 내지 C20의 알칸, 예를 들면, C14 알칸, C16 알칸, 또는 C18 알칸을 포함한다.
- [0268] 또한, 일부 구체예에서, 알킬화는 글루카곤 펩티드와 콜레스테롤 모이어티 사이에서 일어날 수 있다. 예를 들면, 콜레스테롤의 하이드록시기는 긴 사슬 알칸상의 이탈기를 치환시켜, 콜레스테롤-글루카곤 펩티드 산물이 형성된다.
- [0269] 여기에서 논의된 바와 같은 알킬화된 글루카곤 펩티드는 더 변형되어 친수성 모이어티를 포함할 수 있다. 일부 특정 구체예에서, 친수성 모이어티는 폴리에틸렌 글리콜 (PEG) 사슬을 포함한다. 친수성 모이어티의 통합은 임의의 적합한 수단들, 예를 들면, 여기에서 설명되는 임의의 방법에 의해 이루어질 수 있다. 이점에 있어서, 알킬화된 글루카곤 펩티드는 SEQ ID NO: 1, 또는 여기에서 설명된 아미노산 변형들 중 하나 이상을 포함하는 변형된 아미노산 서열을 포함하는데, 여기에서, 위치 10, 20, 24 및 29의 아미노산들 중 최소 하나는 알킬기를 포함하고, 위치 16, 17, 21, 24 및 29, C-말단 연장 연장부내의 위치 또는 C-말단 아미노산 중 적어도 하나는 변형된 Cys, Lys, Orn, 호모-Cys, 또는 Ac-Phe으로 변형되며, 그리고 아미노산의 측쇄는 친수성 모이어티 (예를 들면, PEG)에 공유 결합된다. 일부 구체예에서, 알킬기는 위치 10에서, 선택적으로 Cys, Lys, Orn, 호모-Cys, 또는 Ac-Phe를 포함하는 스페이스를 통하여 부착되며, 그리고 친수성 모이어티는 위치 24의 Cys 잔기에 통합된다.
- [0270] 대안으로, 알킬화된 글루카곤 펩티드는 스페이스를 포함하는데, 여기서, 스페이스는 알킬화되고, 친수성 모이어티를 포함하도록 변형된다. 적합한 스페이스의 비-제한적 실시예에는 Cys, Lys, Orn, 호모-Cys, 및 Ac-Phe으로 구성된 군에서 선택된 하나 이상의 아미노산을 포함하는 스페이스가 포함된다.
- [0271] **GLP-1 활성을 감소시키는 변형**
- [0272] 특정 구체예에서, 글루카곤 펩티드 또는 이의 유사체는 GLP-1 활성을 선택적으로 감소시키는 아미노산 변형을 포함한다. 예를 들면, 아실화된 또는 알킬화된 글루카곤 펩티드, 또는 이의 유사체는 C-말단 α 카르복시산염기를 포함한다: 위치 7에서 Thr는 하이드록시기가 없는 아미노산, 예를 들면, Abu 또는 Ile로 치환; 위치 27

또는 28에서 아미노산의 C-말단 아미노산 결손, 이로써 길이가 27 또는 28개의 아미노산 펩티드 또는 이의 복합물이 생성.

## [0273] 콘쥬게이트

[0274] 본 내용은 본 발명의 글루카곤 펩티드가 선택적으로 공유 결합, 선택적으로 링커를 통하여 콘쥬게이트 모이어티에 링크된 다른 콘쥬게이트도 포함한다. 링키지는 공유 화학 결합, 정전기, 수소, 이온, 반 데르 발스 또는 소수성 또는 친수성 상호작용과 같은 물리적 힘을 통하여 이루어질 수 있다. 다양한 비-공유적 커플링 시스템이 이용될 수도 있는데, 이 시스템은 바이오틴-아비딘, 리간드/수용체, 효소/기질, 핵산/핵산 결합 단백질, 지질/지질 결합 단백질, 세포 흡착 분자 짝 또는 서로에 대해 친화력을 가지는 임의의 결합 짝 또는 이의 단편을 포함한다.

[0275] 펩티드는 펩티드의 표적되는 아미노산 잔기와, 표적 아미노산의 선택된 측쇄 또는 N- 또는 C-말단 잔기와 반응할 수 있는 유기 유도화 물질의 반응에 의해 직접 공유에 의한 링키지에 의해 콘쥬게이트 모이어티에 링크될 수 있다. 펩티드 또는 콘쥬게이트의 반응기는 예를 들면, 알데히드, 아미노, 에스테르, 티올,  $\alpha$ -할로아세틸, 멜레이미도 또는 하이드라지노기를 포함한다. 유도화 물질은 예를 들면, 멜레이미도벤조일 술포숙시니미드 에스테르 (시스테인 잔기를 통한 콘쥬게이션), N-하이드록시숙시니미드 (리신 잔기를 통하여), 글루타알데히드, 숙시닌 안하이드리드 또는 본 기술분야에 공지된 다른 물질들을 포함한다. 대안으로, 콘쥬게이트 모이어티는 폴리사카라이드 또는 폴리펩티드 캐리어와 같은 중간생성물 캐리어를 통하여 간접적으로 펩티드에 링크될 수 있다. 폴리사카라이드 캐리어의 예로는 아미노덱스트란을 포함한다. 적합한 폴리펩티드 캐리어의 예로는 폴리리신, 폴리글루타민산, 폴리아스파르트산, 이의 공동 폴리머 및 이들 아미노산과, 생성된 캐리어상에 원하는 용해도 성질을 부여할 수 있는 기타 다른 것들 가령, 세린으로 혼합된 폴리머가 포함된다.

[0276] 시스테인 잔기는 클로로아세트산, 클로로아세트아미드와 같은  $\alpha$ -할로아세테이트(및 대응 아민)과 가장 흔히 반응되어 카르복시메틸 또는 카르복시아미도메틸 유도체를 형성한다. 시스테인 잔기는 또한 브로모트리플로오로아세톤, 알파-브로모- $\beta$ -(5-이미도조일)프로피온산, 클로로아세틸 포스페이트, N-알킬말레이미드, 3-니트로-2-피리딜 디설피드, 메틸 2-피리딜 디설피드, p-클로로머큐리벤조에이트, 2-클로로머큐리-4-니트로페놀, 또는 클로로-7-니트로벤조-2-옥사-1,3-디아졸과의 반응에 의해 유도된다.

[0277] 히스티딘 잔기는 pH 5.5-7.0에서 디에틸피로카르보네이트와 반응에 의해 유도되는데, 이 물질은 히스티딘 측쇄에 상대적으로 특이적이기 때문이다. 파라-브로모벤질 브롬화물도 유용하며; 이 반응은 pH 6.0에서 0.1M 카오딜레이트 나트륨에서 바람직하게 실행된다.

[0278] 리신 및 아미노-말단 잔기는 숙시닌 또는 기타 카르복실산 안하이드리드와 반응한다. 이들 물질에 의한 유도화는 리신 잔기의 전하를 역전시키는 효과를 가진다. 알파-아미노-함유하는 잔기를 유도하는 기타 적합한 시약에는 이미도에스테르예를 들면, 피콜리니미테이트, 피리독살 포스페이트, 피리독살, 클로로보로하이드리드, 트리니트로벤젠술포산, O-메틸이소우레아, 글리옥실레이트와 함께 2,4-펜탄디온 및 트란스아미나제-촉매된 반응이 포함된다.

[0279] 아르기닌 잔기는 페닐글리옥살, 2,3-부탄디온, 1,2-시클로헥산디온 및 닌히드린 중에서 하나 또는 몇 가지 통상의 시약과 반응에 의해 변형된다. 아르기닌 잔기의 유도화 반응은 구아니딘 기능기의 높은  $pK_a$  값 때문에 알칼리 조건에서 실시되어야만 한다. 더욱이, 이들 시약들은 리신기 뿐만 아니라 아르기닌 입실론-아미노 기와도 반응할 수 있다.

[0280] 티로실 잔기의 특이적 변형은 방향족 디아조늄 화합물 또는 테트라니트로메탄과의 반응에 의해 티로실 잔기로 스펙트럼 라벨을 도입시켜 만들어질 수 있다. 가장 흔한 것으로, N-아세틸이미자돌 및 테트라니트로메탄이 각각 차례로 O-아세틸 티로실 중 및 3-니트로 유도체를 만드는데 이용된다.

[0281] 카르복실 측면기 (아스파틸 또는 글루타민)은 카르보디이미드( $R-N=C=N-R'$ )와의 반응에 의해 선택적으로 변형되는데, 식에서 R 및 R'는 상이한 알킬기, 예를 들면, 1-시클로헥실-3-(2-몰포리닐-4-에틸) 카르보디이미드 또는 1-에틸-3-(4-아조니아-4,4-디메틸펜틸)카르보디이미드가 된다. 더욱이, 아스파틸 및 글루타민 잔기는 암모늄 이온과의 반응에 의해 아스파라기닐 및 글루타미닐 잔기로 전환된다.

[0282] 기타 변형들에는 프롤린 및 리신의 하이드록실화, 세릴 또는 트레오닐의 하이드록시기의 포스포릴화, 리신과 아르기닌의 알파-아미노기, 및 히스티딘 측쇄의 메틸화 (*T. E. Creighton, Proteins: Structure and Molecular*



*Properties*, W.H. freeman & Co., San Francisco, pp. 79-86 (1983)), 아스파라진 또는 글루타민의 탈아미드화 반응, N-말단 아민의 아세틸화, 및/또는 C-말단 카르복실산기의 아미드화 또는 에스테르화가 포함된다.

[0283] 또 다른 타입의 공유적 변형은 펩티드에 화학적 또는 효소적으로 글리코시드를 결합시키는 것이다. 당은 (a) 아르기닌 및 히스티딘, (b) 자유 카르복실기, (c) 자유 설프하이드릴기 예를 들면, 시스테인, (d) 자유 하이드록시기 예를 들면, 세린, 트레오닌, 또는 하이드록시프롤린의 자유 하이드록시기, (e) 방향족 잔기 예를 들면, 티로신, 또는 트립토판의 방향족 잔기, 또는 (f) 글루타민의 아미드기에 부착될 수 있다. 이들 방법은 W087/05330 (1987년 9월 11일 공개) 및 *Aplin and Wriston, CRC Crit. Rev. Biochem.*, pp. 259-306 (1981)에서 설명되어 있다.

[0284] 여기에서 논의된 것과 같은 임의의 글루카곤 펩티드에 링크될 수 있는 예시적인 콘주게이트 모이어티에는 이형성 펩티드 또는 폴리펩티드 (예를 들면, 혈장 단백질을 포함), 표적화 물질, 이뮤노글로블린 또는 이의 일부분 (예를 들면, 가변 부분, CDR, 또는 Fc 부분), 진단용 라벨 예를 들면, 방사능동위원소, 형광단 또는 효소 라벨, 폴리머(수용성 폴리머 포함) 또는 기타 치료 또는 진단제가 포함된다. 한 구체예에서, 콘주게이트는 본 발명의 글루카곤 펩티드와 혈장 단백질을 포함하도록 제공되는데, 이때 혈장 단백질은 알부민, 트랜스페린, 피브리노겐 및 글로불린으로 구성된 군으로부터 선택된다. 한 구체예에서, 콘주게이트의 혈장 단백질 모이어티는 알부민 또는 트랜스페린이다. 일부 구체예에서, 링커는 1 내지 약 60개 원자, 또는 1 내지 30개 원자 또는 더 길거나, 2 내지 5개 원자, 2 내지 10개 원자, 5 내지 10개 원자, 또는 10 내지 20개의 원자 길이의 사슬을 포함한다. 일부 구체예에서, 사슬 원자는 모두 탄소 원자다. 일부 구체예에서, 링커의 기본 골격내 사슬 원자는 C, O, N, 및 S로 구성된 군으로부터 선택된다. 사슬 원자 및 링커들은 이들의 예상 용해도 (친수성)에 따라 선택되어, 더 잘 용해되는 콘주게이트가 제공된다. 일부 구체예에서, 링커는 표적 조직 또는 기관 또는 세포에서 볼 수 있는 효소 또는 기타 촉매 또는 가수분해 조건에 의해 절단되는 기능기를 제공한다. 일부 구체예에서, 링커의 길이는 공간적 방해 가능성을 줄일 수 있도록 충분히 길다. 링커는 공유 결합 또는 펩티드 결합이고, 콘주게이트가 폴리펩티드이면, 전체 콘주게이트는 융합 단백질이 될 수 있다. 이와 같은 펩티드 링커는 임의의 길이가 될 수 있다. 예를 들면, 링커는 약 1 내지 50개의 아미노산, 5 내지 50개의 아미노산, 3 내지 5개의 아미노산, 5 내지 10개의 아미노산, 5 내지 15개의 아미노산, 또는 10 내지 30개의 아미노산 길이를 가진다. 이와 같은 융합 단백질은 대안으로 본 기술분야에 공지된 재조합 유전 공학에 의해 만들어질 수도 있다.

[0285] 상기에서 언급된 바와 같이, 일부 구체예에서, 글루카곤 펩티드는 면역글로블린 또는 이의 일부분(예를 들면, 가변 부분, CDR, 또는 Fc 부분)에 융합된 콘주게이트다. 면역글로블린 (Ig)의 알려진 타입으로는 IgG, IgA, IgE, IgD 또는 IgM을 포함한다. Fc 부분은 Ig 중쇄의 C-말단 부분으로써, 예를 들면, 재활용(연장된 반감기를 가져온다), 항체 의존적 세포-중개된 세포독성(ADCC), 및 보체 의존적 세포독성(CDC)과 같은 활동을 실행하는 Fc 수용체에 결합을 담당하고 있다.

[0286] 예를 들면, 일부 정의에 따르면, 인간 IgG 중쇄 Fc 부분은 중쇄의 Cys226에서 C 말단까지 이어진다. "힌지 부분"은 일반적으로 인간 IgG1의 Glu216 에서 Pro230까지 이어진다( 다른 IgG 이소타입의 힌지 부분은 시스테인 결합에 관여하는 시스테인들을 배열함으로써 IgG1과 함께 정렬될 수 있다). IgG의 Fc 부분은 두 개의 불변 도메인(constant domains), CH2 및 CH3을 포함한다. 인간 IgG Fc 부분의 CH2 도메인은 통상적으로 아미노산 231 내지 아미노산 341까지 연장된다. 인간 IgG Fc 부분의 CH3 도메인은 통상적으로 아미노산 342 내지 아미노산 447까지 연장된다. 면역글로블린 또는 면역글로블린 단편들 또는 부분들에서 언급되는 아미노산 숫자는 *Kabat et al. 1991, Sequences of Proteins of Immunological Interest, U.S. Department of Public Health, Bethesda, Md*을 기초로 한다. 관련 구체예에서, Fc 부분은 CH1 보다는 면역글로블린 중쇄, 예를 들면, IgG 및 IgA의 CH2 및 CH3 또는 IgE의 CH3 및 CH4로부터 하나 이상의 고유한 또는 변형된 불변 부분을 포함할 수 있다.

[0287] 적절한 콘주게이트 모이어티는 FcRn 결합 부위를 포함하는 면역글로블린 서열의 일부분을 포함한다. FcRn, 구조(salvage) 수용체는 면역글로블린을 재순환시키고, 이들을 다시 혈액에서 순환되도록 돌려보내는 역할을 한다. FcRn 수용체에 결합되는 IgG의 Fc 부분의 부위는 X-선 결정학(*Burmeister et al. 1994, Nature 372:379*)으로 설명되었다. Fc와 FcRn의 주요 접촉 부위는 CH2 및 CH3 도메인의 정선 부근이다. Fc-FcRn 접촉은 모두 단일 Ig 중쇄내에 있다. 주요 접촉 부위는 CH2 도메인의 아미노산 잔기 248, 250-257, 272, 285, 288, 290-291, 308-311, 및 314, 그리고 CH3 도메인의 아미노산 잔기 385-387, 428, 및 433-436을 포함한다.

[0288] 일부 콘주게이트 모이어티는 Fc $\gamma$ R 결합 부위를 포함하거나 포함하지 않을 수 있다. Fc $\gamma$ R은 ADCC 및 CDC를 맡고 있다. Fc $\gamma$ R와 직접 접촉되는 Fc 부분내 예시적 위치는 아미노산 234-239 (하부 힌지 부분), 아미노산 265-

269 (B/C 루프), 아미노산 297-299 (CVE 루프), 및 아미노산 327-332 (F/G) 루프(Sondermann *et al.*, *Nature* 406: 267-273, 2000)다. IgE의 힌지 부분은 또한 FcRI 결합 (Henry, *et al.*, *Biochemistry* 36, 15568-15578, 1997)에도 연루되어 있다. IgA 수용체 결합에 관여하는 잔기는 Lewis *et al.*, (*J Immunol.* 175:6694-701, 2005)에서 설명되고 있다. IgE 수용체 결합에 관여하는 아미노산 잔기는 Sayers *et al.* (*J Biol Chem.* 279(34):35320-5, 2004)에서 설명되고 있다.

[0289] 면역글로블린의 Fc 부분에 아미노산 변형이 만들어 질 수 있다. 이와 같은 가변적 Fc 부분들은 Fc 부분의 CH3 도메인(잔기 342-447)내에 적어도 한 개의 아미노산 변형 및/또는 Fc 부분의 CH2 도메인내에 (잔기 231-341) 적어도 한 개의 아미노산 변형을 포함한다. FcRn에 대한 친화성 증가를 부여하는 것으로 간주되는 돌연변이는 T256A, T307A, E380A, 및 N434A (Shields *et al.* 2001, *J. Biol. Chem.* 276:6591)을 포함한다. 다른 돌연변이들도 FcRn에 대한 친화성을 심각하게 감소시키지 않으면서 Fc $\gamma$ RI, Fc $\gamma$ RIIA, Fc $\gamma$ RIIB, 및/또는 Fc $\gamma$ RIIIA에 대한 Fc 부분의 결합을 감소시킬 수 있다. 예를 들면, Fc 부분의 위치 297의 Asn을 Ala 또는 또 다른 아미노산으로 치환시키면, 잘 보존된 N-글리코실화 부위가 제거되어, 면역원성의 감소와 함께 Fc 부분의 연장된 반감기를 수반하게 될 뿐만 아니라 Fc $\gamma$ Rs에 대한 결합도 감소된다(Routledge *et al.* 1995, *Transplantation* 60:847; Friend *et al.* 1999, *Transplantation* 68: 1632; Shields *et al.* 1995, *J. Biol. Chem.* 276:6591). IgG1의 위치 233-236에서 아미노산 변형은 Fc $\gamma$ Rs에 대한 결합이 감소되도록 만들어진(Ward and Ghetie 1995, *Therapeutic Immunology* 2:77 and Armour *et al.* 1999, *Eur. J. Immunol.* 29:2613). 일부 예시적인 아미노산 치환은 US 특허 7,355,008 및 7,381,408에서 설명되고 있으며, 이들 각각은 참고문헌에 전문 통합된다. 본 내용은 또한 글루카곤 융합 펩티드 또는 단백질을 포함하는데, 여기서 제2 펩티드 또는 폴리펩티드는 말단, 예를 들면, 글루카곤 펩티드의 카르복시 말단에 융합된다. 일부 구체예에서, 카르복시 말단 융합에 예시적인 후보물질은 글루카곤 펩티드의 아미노산 29에 연결된 SEQ ID NO: 20 (GPSSGAPPPS), SEQ ID NO: 21 (KRNRNNIA) 또는 SEQ ID NO: 22 (KRNR)이다.

#### [0290] $\alpha$ -헬릭스 구조의 안정화

[0291] 글루카곤 펩티드의 위치 1 및/또는 2에서 아미노산 변형시에 글루카곤 활성의 감소는 글루카곤 펩티드의 C-말단 부분(아미노산 12-29)의 알파 헬릭스 구조를 안정화시키면 복원된다.  $\alpha$ -헬릭스 구조는 위치 12-29 주변에 공유 또는 비-공유 분자내 다리 형성, 알파 헬릭스-안정화 아미노산 (예를 들면,  $\alpha$ ,  $\alpha$ -이중치환된 아미노산)으로 치환 또는 삽입시켜 안정화된다.

[0292] 일부 구체예에서, 글루카곤 펩티드의 카르복시 말단 부분(아미노산 12-29)의 3차 구조를 안정화시키기 위하여 두 개 아미노산 측쇄 사이에 분자내 다리가 형성된다. 이들 두 아미노산 측쇄들은 수소-결합 또는 이온 상호작용, 가령, 염 다리 형성하는 것과 같은 비-공유 결합을 통하여, 또는 공유 결합을 통하여 서로 링크될 수 있다. 두 개 아미노산 측쇄는 비-공유 결합, 예를 들면, 수소-결합, 이온 상호작용, 가령, 염 다리 형성 또는 공유 결합을 통하여 서로 링크될 때, 펩티드는 비-공유적 분자내 다리를 포함하는 것으로 간주된다.

[0293] 일부 구체예에서, 분자내 다리는 3개 아미노산으로 떨어져 있는 두 개의 아미노산, 예를 들면, 위치 i와 i+4의 아미노산 간에 형성되는데, 여기서 i는 12 내지 25 사이의 임의의 정수(예를 들면, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 및 25)다. 좀더 특별하게는, 아미노산 쌍 12와 16, 16과 20, 20과 24 또는 24와 28의 측쇄 (아미노산 쌍에서 i = 12, 16, 20, 또는 24)는 서로 연결되어, 글루카곤 알파 헬릭스 구조가 안정화된다. 대안으로, i는 17이 될 수 있다.

[0294] 일부 특정 구체예에서, 위치 i 및 i+4의 아미노산은 분자내 다리에 의해 연결되는데, 링커의 크기는 약 8개 원자, 또는 약 7-9개 원자가 된다.

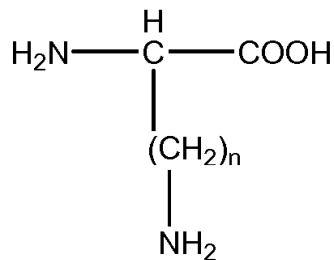
[0295] 또 다른 구체예에서, 분자내 다리는 서로 2개 아미노산이 떨어진, 예를 들면, 아미노산 위치 j와 j+3의 아미노산 간에 형성되며, 이때 j는 12 내지 26 사이의 임의의 정수(예를 들면, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 및 26)다. 일부 특정 구체예에서, j는 17이다.

[0296] 일부 특정 구체예에서, 위치 j 및 j+3의 아미노산은 분자내 다리에 의해 연결되는데, 링커의 크기는 약 6개 원자, 또는 약 5-7개 원자가 된다.

[0297] 또 다른 구체예에서, 분자내 다리는 서로 6개 아미노산이 떨어진, 예를 들면, 아미노산 위치 k와 k+7의 아미노산 간에 형성되며, 이때 k는 12 내지 22 사이의 임의의 정수(예를 들면, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20,

21 및 22)다. 일부 특정 구체예에서, k 는 17이다.

[0298] 6개 원자 연결 다리를 형성하기 위하여 공유 결합을 할 수 있는 아미노산 쌍의 예로는 Orn과 Asp, Glu과 화학식 I의 아미노산(이때 식에서 n은 2임), 호모글루타민산과 화학식 I의 아미노산(이때 식에서 n은 1임), 화학식 I은 다음과 같다:



[0299]

[0300] [화학식 I]

[0301] 7개 원자 연결 다리를 형성하기 위하여 공유 결합을 할 수 있는 아미노산 쌍의 예로는 Orn-Glu (락탐 링); Lys-Asp (락탐); 또는 호모ser-호모glu (락톤)을 포함한다. 8개 원자 연결 다리를 형성하기 위하여 공유 결합을 할 수 있는 아미노산 쌍의 예로는 Lys-Glu (락탐); 호모lys-Asp (락탐); Orn-호모glu (락탐); 4-아미노Phe-Asp (락탐); 또는 Tyr-Asp (락톤)을 포함한다. 9개 원자 연결 다리를 형성하기 위하여 공유 결합을 할 수 있는 아미노산 쌍의 예로는 호모lys-Glu (락탐); Lys-호모glu (락탐); 4-아미노Phe-Glu (락탐); 또는 Tyr-Glu (락톤)을 포함한다. 이들 아미노산 중 임의의 측쇄는 알파-헬릭스의 3차 구조가 파괴되지 않는 한, 추가 화학기로 추가적으로 치환될 수 있다. 본 발명 분야의 당업자는 유사한 크기 및 바람직한 효과를 가지는 구조를 안정화시킬 수 있는 대체 쌍 또는 화학적으로 변형된 유도체를 포함하는 대체 아미노산 유사체를 구상할 수 있을 것이다. 예를 들면, 호모시스테인-호모시스테인 이황화물 다리는 길이가 6개 원자이며, 원하는 효과를 제공하기 위하여 추가로 변형될 수 있다. 공유 연결이 없이도, 상기에서 설명된 아미노산 쌍 또는 당업자가 구상할 수 있는 유사한 쌍은 비-공유 결합, 예를 들면, 염다리 형성 또는 수소 결합 상호작용을 통하여 알파 헬릭스에 추가적인 안정성을 제공할 수 있다.

[0302] 락탐 링의 크기는 아미노산 측쇄의 길이에 따라 달라질 수 있으며, 한 구체예에서, 락탐은 글루타민산 측쇄에 리신 아미노산의 측쇄가 연결되어 형성된다. 추가 예시적인 구체예는 선택적으로 락탐 다리를 가진 다음의 쌍을 포함한다: 위치 12의 Glu과 위치 16의 Lys; 위치 12의 고유 Lys과 위치 16의 Glu; 위치 16의 Glu와 위치 20의 Lys 위치; 위치 16의 Lys와 위치 20의 Glu; 위치 20의 Glu와 위치 24의 Lys; 위치 20의 Lys 와 위치 24의 Glu; 위치 24의 Glu와 위치 28의 Lys; 위치 24의 Lys와 위치 28의 Glu. 대안으로, 락탐 링에서 아미드 결합의 순서는 역전될 수도 있다 (예를 들면, 락탐 링은 Lys 12의 측쇄와 Glu 16사이에 형성되거나 또는 Glu 12 와 Lys 16 사이에 형성될 수 있다).

[0303] 락탐 다리 이외의 분자내 다리가 글루카곤 유사체 펩티드의 알파 헬릭스 구조의 안정화에 이용될 수 있다. 한 구체예에서, 분자내 다리는 소수성 다리다. 이와 같은 경우, 분자내 다리는 선택적으로 글루카곤 유사체 펩티드의 알파 헬릭스의 소수성 면의 일부가 되는 두 개 아미노산의 측쇄 사이에 있다. 예를 들면, 소수성 다리에 의해 결합되는 아미노산 중 하나는 위치 10, 14 및 18의 아미노산이 될 수 있다.

[0304] 한 특정 측면에서, 올레핀 복분해가 이용되어, 모든-탄화수소 교차-연결 시스템을 이용하여, 글루카곤 펩티드의 알파 헬릭스의 1회 또는 2회 턴(turn)을 교차 연결시킨다. 이 경우, 글루카곤 펩티드는 다양한 길이의 올레핀 측매를 가진 α-메틸화된 아미노산을 포함할 수 있고, i 및 i+4 또는 i+7 위치에서 R 또는 S 입체 화학을 가진다. 예를 들면, 올레핀 측쇄는 (CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>을 포함하며, 여기서 n은 1 내지 6중 임의의 정수가 된다. 한 구체예에서, 8개 원자의 교차-링크 길이의 경우 n은 3 이다. 이와 같은 분자내 다리를 만드는 적합한 방법들은 본 기술분야에 설명되어 있다. 예를 들면, Schafmeister et al., J. Am. Chem. Soc. 122: 5891-5892 (2000) and Walensky et al., Science 305: 1466-1470 (2004)을 참고한다. 대안으로, 글루카곤 펩티드는 인접한 헬릭스 턴상에 위치한 O-알릴 Ser 잔기를 포함하며, 이들 잔기는 루테늄-촉매화된 링 닫힘 복분해를 통하여 서로 연결된다. 이와 같은 교차-연결 과정은 예를 들면, Blackwell et al., Angew. Chem., Int. Ed. 37: 3281- 3284 (1998)에서 설명되고 있다.

[0305] 또 다른 특정 측면에서, 시스틴의 펩티드 모방체로 광범위하게 사용되는 비자연적 티오-디알라닌 아미노산, 란티오닌(lanthionine)을 이용하여 알파 헬릭스의 한 개 턴을 교차-연결시킨다. 란티오닌-계 고리화의 적합한 방

법은 본 기술분야에 공지되어 있다. 예를 들면, *Matteucci et al., Tetrahedron Letters* 45: 1399- 1401 (2004); *Mayer et al., J. Peptide Res.* 51 : 432-436 (1998); *Polinsky et al., J. Med. Chem.* 35: 4185-4194 (1992); *Osapay et al., J. Med. Chem.* 40: 2241-2251 (1997); *Fukase et al., Bull. Chem. Soc. Jpn.* 65: 2227-2240 (1992); *Harpp et al., J. Org. Chem.* 36: 73-80 (1971); *Goodman and Shao, Pure Appl. Chem.* 68: 1303-1308 (1996); and *Osapay and Goodman, J. Chem. Soc. Chem. Commun.* 1599-1600 (1993).

[0306] 일부 구체예에서,  $\alpha, \omega$ -디아미노알칸 연결(tethers), 예를 들면, 위치 i 및 i+7 사이에 두 개 Glu 잔기 사이에 1,4-디아미노프로판 및 1,5-디아미노펜탄)를 이용하여 글루카곤 펩티드의 알파 헬릭스 구조를 안정화시킨다. 이와 같은 연결(tethers)은 디아미노알칸 연결(tethers)의 길이에 따라, 다리 길이가 9개 원자 또는 그 이상인 다리가 형성되도록 한다. 이와 같은 연결(tethers)된 펩티드를 만드는 적합한 방법은 본 기술 분야에서 설명되고 있다. 예를 들면, *Phelan et al., J. Am. Chem. Soc.* 119: 455-460 (1997)을 참고한다.

[0307] 본 발명의 또 다른 구체예에서, 이황화물 다리는 글루카곤 펩티드의 알파 헬릭스의 하나 또는 두 개의 턴을 교차 연결시키는데 이용된다. 대안으로, 하나 또는 두 개 황 원자 모두가 메틸렌기로 치환되어, 등전자 마크로사이클화(macrocyclization)가 일어나는 변형된 이황화물 다리가 이용되어 글루카곤 펩티드의 알파 헬릭스 구조를 안정화시킨다. 이황화물 다리로 또는 황-기초된 고리화(cyclization)로 펩티드를 변형시키는 적합한 방법들은 예를 들면, *Jackson et al., J. Am. Chem. Soc.* 113: 9391 -9392 (1991) and *Rudinger and Jost, Experientia* 20: 570-571 (1964)에서 설명된다.

[0308] 또 다른 구체예에서, 글루카곤 펩티드의 알파 헬릭스는 위치 i와 i+4에 위치한 두개의 His 잔기 또는 His과 Cys의 쌍에 의한 금속 원자의 결합을 통하여 안정화된다. 금속 원자는 예를 들면, Ru(III), Cu(II), Zn(II), 또는 Cd(II)가 될 수 있다. 금속 결합에 기초된 알파 헬릭스 안정화의 방법들은 본 기술 분야에 공지되어 있다. 예를 들면, *Andrews and Tabor, Tetrahedron* 55: 1 1711-11743 (1999); *Ghadiri et al., J. Am. Chem. Soc.* 112: 1630-1632 (1990); and *Ghadiri et al., J. Am. Chem. Soc.* 119: 9063-9064 (1997).

[0309] 글루카곤 펩티드의 알파 헬릭스 구조는 펩티드 고리화의 다른 수단을 통하여 대안적으로 안정화될 수 있는데, 이들 수단들은 *Davies, J. Peptide. Sci.* 9: 471-501 (2003)에서 볼 수 있다. 아미드 다리, 티오에테르 다리, 티오에스테르 다리, 우레아 다리, 카르바메이트 다리, 술폰아미드 다리, 및 이와 유사한 것의 형성을 통하여 알파 헬릭스 구조가 안정화될 수 있다. 예를 들면, 티오에스테르 다리는 C-말단과 Cys 잔기의 측쇄 간에 형성될 수 있다. 대안으로, 티오에스테르는 티올을 가지는 아미노산(Cys)과 카르복실산을 가지는 아미노산(예를 들면, Asp, Glu)의 측쇄를 통하여 형성된다. 또 다른 방법에서, 디카르복실산, 가령, 수베르산(옥탄디온산) 등의 교차-연결제는 자유 아미노, 하이드록시, 티올기, 및 이의 복합적 아미노산 측쇄의 두 개 기능기 사이에 링크를 도입할 수 있다.

[0310] 한 구체예에 따르면, 글루카곤 펩티드의 알파 헬릭스 구조의 안정화는 위치 i 와 i+4에서 소수성 아미노산의 통합을 통하여 이루어진다. 예를 들면, i 는 Tyr 이며, i+4 는 Val 또는 Leu 이 되며; i 는 Phe 이 되며, i+4 는 Cys 또는 Met 이 되며; i 는 Cys 이 되며, i+4 는 Met 이 되며; 또는 i 는 Phe 이 되며, i+4 는 Ile가 된다. 여기의 목적을 위하여, 상기 아미노산 쌍이 역전될 수 있는데, 예를 들면, 대안으로 위치 i의 명시된 아미노산은 위치 i+4에 있을 수 있으며, 위치 i+4의 아미노산은 위치 i 에 있을 수 있다.

[0311] 본 발명의 또 다른 구체예에 따르면, 알파 헬릭스 구조의 안정화는 글루카곤 펩티드의 C-말단 부분(아미노산 12-29)에서 하나 이상의 알파 헬릭스-안정화 아미노산의 통합(아미노산 치환 또는 삽입에 의해)을 통하여 이루어진다. 특정 구체예에서, 알파 헬릭스-안정화 아미노산은  $\alpha, \alpha$ -이중치환된 아미노산인데, 예를 들면, 아미노이소-부티르산 (AIB), 메틸, 에틸, 프로필, 및 n-부틸로부터 선택된 동일한 또는 상이한 기로 이중 치환된 또는 시클로옥탄 또는 시클로헥탄(예를 들면, 1-아미노시클로옥탄-1-카르복실산)으로 이중치환된 아미노산이 포함되나, 이에 한정되지 않는다. 일부 구체예에서, 글루카곤 펩티드의 위치 16, 17, 18, 19, 20, 21, 24 또는 29 중 하나, 둘, 셋, 넷, 또는 그 이상이  $\alpha, \alpha$ -이중치환된 아미노산으로 치환된다. 특정 구체예에서, 위치 16, 20, 21, 및 24 중 하나, 둘, 셋 또는 모두다  $\alpha, \alpha$ -이중치환된 아미노산, 예를 들면, AIB으로 치환된다. 예를 들면, 글루카곤 펩티드는 비-공유적 분자내 다리 (예를 들면, 염 다리) 또는 공유적 분자내 다리 (예를 들면, 락탐)와 같은 분자내 다리 없이 위치 16이 AIB로 치환된 것을 포함할 수 있다. 분자내 다리가 없는 이와 같은 펩티드는 제조하는데 용이하다.

[0312] 일부 구체예에 따르면, 분자내 다리가 없는 글루카곤 펩티드는 위치 12-29에서  $\alpha, \alpha$ -이중치환된 아미노산으로 하나이상 치환과, 글루카곤 펩티드의 아미노산의 측쇄, 가령, 글루카곤 펩티드의 위치 10에서 아미노산의 측쇄에 공유적으로 부착된 아실 또는 알킬기를 포함한다. 특정 구체예에서, 아실 또는 알킬기는 자연적으로 생성되



는 아미노산에 고유한 것이 아니다. 특정 측면에서, 아실 또는 알킬기는 위치 10의 아미노산에 고유한 것이 아니다. 분자내 다리가 없는 이와 같은 아실화된 또는 알킬화된 글루카곤 펩티드는 아실화 안된 대응 펩티드와 비교하였을 때, GLP-1 및 글루카곤 수용체에서 강화된 활성을 가진다. GLP-1 및 글루카곤 수용체에서 활성의 추가 강화는 펩티드의 위치 10의 아미노산 측쇄와 아실 또는 알킬기 사이에 스페이스를 통합시킨, 분자내 다리가 없는 아실화된 글루카곤 펩티드에 의해 수득될 수 있다. 스페이스의 유무하에 아실화 및 알킬화는 여기에서 추가로 논의된다.

[0313] 특정 구체예에서, 아실화된 또는 알킬화된 글루카곤 펩티드, 또는 이의 유사체는 GLP-1 수용체에서 선택적으로 활성을 감소시키는 변형을 더 포함한다. 예를 들면, 아실화된 또는 알킬화된 글루카곤 펩티드, 또는 이의 유사체는 C-말단 알파 카르복시산염, 위치 27 또는 28의 아미노산의 C 말단 아미노산의 결손 (예를 들면, 위치 29의 아미노산 결손, 위치 28 및 29의 아미노산의 결손), 위치 7의 Thr를 하이드록시기가 없는 아미노산 예를 들면, Abu 또는 Ile로 치환 중 하나 또는 이의 조합을 포함한다.

#### [0314] 구체예의 실시예들

[0315] 한 구체예에 따르면, SEQ ID NO:1의 고유 글루카곤 펩티드는 위치 28 및/또는 29의 고유 아미노산이 음전하를 띤 아미노산 (예, 아스파르트산 또는 글루타민산)으로 치환되고, 그리고 선택적으로 펩티드의 카르복시 말단에 음전하를 띤 아미노산 (예, 아스파르트산 또는 글루타민산)이 추가되는 것으로 변형된다. 또다른 구체예에서, SEQ ID NO:1의 고유 글루카곤 펩티드는 위치 28 및/또는 29의 고유 아미노산이 양전하를 띤 아미노산 (예, 리신, 아르기닌 또는 히스티딘)으로 치환되고, 그리고 선택적으로 펩티드의 카르복시 말단에 양전하를 띤 아미노산 (예, 리신, 아르기닌 또는 히스티딘)이 하나 또는 두 개 추가되는 것으로 변형된다. 한 구체예에 따르면, 개선된 용해도 및 안정성을 가지는 글루카곤 유사체가 제공되는데, 이때 유사체는 위치 28, 또는 29의 적어도 한 개 아미노산은 산성 아미노산으로 치환되고 및/또는 SEQ ID NO: 34의 카르복시 말단에 추가로 산성 아미노산이 추가된 조건의 SEQ ID NO:34의 아미노산 서열을 포함한다. 한 구체예에서, 산성 아미노산은 Asp, Glu, 시스테인산 및 호모시스테인산으로 구성된 군으로부터 독립적으로 선택된다.

[0316] 한 구체예에 따르면, 개선된 용해도 및 안정성을 가진 글루카곤 항진제가 제공되는데, 이때 항진제는 SEQ ID NO:33의 아미노산 서열을 포함하며, 이때 위치 27, 28 또는 29중 적어도 한 개의 아미노산은 비-고유 아미노산 잔기(예를 들면, 유사체의 위치 27, 28 또는 29에 존재하는 적어도 한 개의 아미노산은 SEQ ID NO:1에서 대응 위치에 존재한 아미노산과는 상이한 산성 아미노산이 된다)로 치환된다. 한 구체예에 따르면, SEQ ID NO:33의 서열을 포함하는 글루카곤 항진제가 제공되는데, 이때 위치 28의 아미노산은 아스파라진이고, 위치 29의 아미노산은 트레오닌이 되며, 펩티드는 글루카곤 펩티드의 카르복시 말단에 Lys, Arg, His, Asp 또는 Glu으로 구성된 군으로부터 독립적으로 선택된 1개 내지 2개의 아미노산이 추가된 것을 더 포함한다. 고유 글루카곤 펩티드의 특정 위치는 모 펩티드의 활성 일부는 유지되도록 하면서 변형될 수 있다고 보고되었다. 따라서, 출원인은 SEQ ID NO: 1의 위치 2, 5, 7, 10, 11, 12, 13, 14, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 24, 27, 28 또는 29에 있는 하나 이상의 아미노산은 고유 글루카곤 펩티드에 존재하는 것과는 상이한 아미노산으로 치환되고, 여전히 강화된 효능, 부모 글루카곤 펩티드의 생리학적 pH 안정성 및 생물학적 활성은 유지될 것으로 기대한다. 예를 들면, 한 구체예에 따르면, 고유 펩티드의 위치 27에 있는 메티오닌 잔기가 루이신 또는 노르루이신으로 치환되면 펩티드의 산화성 분해가 방지된다.

[0317] 한 구체예에서, SEQ ID NO: 33의 글루카곤 유사체가 제공되는데, 이 유사체의 위치 1, 2, 5, 7, 10, 11, 12, 13, 14, 16, 17, 18, 19, 20, 21 또는 24에서 선택된 1 내지 6개 아미노산은 SEQ ID NO: 1에서 대응 아미노산과는 상이하다. 또 다른 구체예에서, SEQ ID NO: 33의 글루카곤 유사체가 제공되는데, 이 유사체의 위치 1, 2, 5, 7, 10, 11, 12, 13, 14, 16, 17, 18, 19, 20, 21 또는 24에서 선택된 1 내지 3개 아미노산은 SEQ ID NO: 1에서 대응 아미노산과는 상이하다. 또 다른 구체예에서, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8 또는 SEQ ID NO: 34의 글루카곤 유사체가 제공되는데, 이 유사체의 위치 1, 2, 5, 7, 10, 11, 12, 13, 14, 16, 17, 18, 19, 20, 21 또는 24에서 선택된 1 내지 2개 아미노산은 SEQ ID NO: 1에서 대응 아미노산과는 상이하고, 추가 구체예에서, 하나 내지 두 개의 상이한 아미노산은 고유 서열 (SEQ ID NO: 1)에 존재하는 아미노산에 대해 보존성 아미노산 치환을 나타낸다. 한 구체예에서, SEQ ID NO: 11 또는 SEQ ID NO: 13의 글루카곤 펩티드가 제공되는데, 이때 글루카곤 펩티드는 위치 2, 5, 7, 10, 11, 12, 13, 14, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 24, 27 또는 29로부터 선택된 위치에 하나, 둘 또는 세 개 아미노산 치환을 더 포함한다. 한 구체예에서, 위치 2, 5, 7, 10, 11, 12, 13, 14, 16, 17, 18, 19, 20, 27 또는 29에서 치환은 보존성 아미노산 치환이다.

- [0318] 한 구체예에서, SEQ ID NO: 1의 유사체 펩티드를 포함하는 글루카곤 항진제가 제공되는데, 이때 유사체는 위치 2에서 세린 이외의 아미노산을 가지고, 위치 28 또는 29의 고유 아미노산 대신 산성 아미노산으로 치환되었으며 또는 SEQ ID NO: 1의 펩티드 카르복시 말단에 추가된 산성 아미노산을 가지는 점에서 SEQ ID NO:1과 차이가 있다. 한 구체예에서, 산성 아미노산은 아스파르트산 또는 글루타민산이다. 한 구체예에서, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13 또는 SEQ ID NO: 32의 글루카곤 유사체가 제공되는데, 이때 유사체는 위치 2의 치환에 의해 모분자와 상이하다. 좀더 특별하게는, 유사체 펩티드의 위치 2는 D-세린, 알라닌, D-알라닌, 글리신, n-메틸 세린 및 아미노 이소부틸산으로 구성된 군으로부터 선택된 아미노산으로 치환된다.
- [0319] 또 다른 구체예에서, SEQ ID NO:1의 유사체 펩티드를 포함하는 글루카곤 항진제가 제공되는데, 이때 유사체는 위치 1에서 히스티딘 이외의 아미노산을 가지고, 위치 28 또는 29의 고유 아미노산 대신 산성 아미노산으로 치환되었으며 또는 SEQ ID NO: 1의 펩티드 카르복시 말단에 추가된 산성 아미노산을 가지는 점에서 SEQ ID NO:1과 차이가 있다. 한 구체예에서, 산성 아미노산은 아스파르트산 또는 글루타민산이다. 한 구체예에서, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13 또는 SEQ ID NO: 32의 글루카곤 유사체가 제공되는데, 이때 유사체는 위치 1의 치환에 의해 모분자와 상이하다. 좀더 특별하게는, 유사체 펩티드의 위치 1은 DMIA, D-히스티딘, 데스아미노 히스티딘, 하이드록실-히스티딘, 아세틸-히스티딘 및 호모-히스티딘으로 구성된 군으로부터 선택된 아미노산으로 치환된다.
- [0320] 한 구체예에 따르면, 변형된 글루카곤 펩티드는 SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13 및 SEQ ID NO: 32으로 구성된 군으로부터 선택된 서열을 포함한다. 추가 구체예에서, 글루카곤 펩티드는 SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13 또는 SEQ ID NO: 32의 C-말단에 추가된 하나 내지 두 개 아미노산을 더 보유하는 SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13 또는 SEQ ID NO: 32을 포함하는데, 여기서 추가된 아미노산은 Lys, Arg, His, Asp Glu, 시스테인산 또는 호모시스테인산으로 구성된 군으로부터 독립적으로 선택된다. 한 구체예에서, 카르복시 말단에 추가된 아미노산은 Lys, Arg, His, Asp 또는 Glu으로 구성된 군으로부터 선택되거나, 또는 추가 구체예에서, 추가된 아미노산은 Asp 또는 Glu이다.
- [0321] 또 다른 구체예에서, 글루카곤 펩티드는 SEQ ID NO: 7의 서열을 포함하거나 또는 이의 글루카곤 항진 유사체다. 한 구체예에서, 펩티드는 SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12 및 SEQ ID NO: 13으로 구성된 군으로부터 선택된 서열을 포함한다. 또 다른 구체예에서, 펩티드는 SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10 및 SEQ ID NO: 11로 구성된 군으로부터 선택된 서열을 포함한다. 한 구체예에서, 글루카곤 펩티드는 글루카곤 펩티드의 C-말단에 Asp 및 Glu로 구성된 군으로부터 선택된 추가 아미노산을 더 가지는, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10 및 SEQ ID NO: 11을 포함한다. 한 구체예에서, 글루카곤 펩티드는 SEQ ID NO: 11 또는 SEQ ID NO: 13을 포함하며, 추가 구체예에서, 글루카곤 펩티드는 SEQ ID NO: 11을 포함한다. 한 구체예에 따르면, 다음으로 구성된 군으로부터 선택된 변형된 글루카곤 펩티드를 포함하는 글루카곤 항진제가 제공된다:
- [0322]  $\text{NH}_2\text{-His-Ser-Gln-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Lys-Tyr-Leu-Xaa-Ser-Arg-Arg-Ala-Gln-Asp-Phe-Val-Gln-Trp-Leu-Xaa-Xaa-Xaa-R}$  (SEQ ID NO: 34),
- [0323]  $\text{NH}_2\text{-His-Ser-Gln-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Lys-Tyr-Leu-Asp-Ser-Arg-Arg-Ala-Gln-Asp-Phe-Val-Gln-Trp-Leu-Met-Asp-Thr-R}$  (SEQ ID NO: 11): 그리고
- [0324]  $\text{NH}_2\text{-His-Ser-Gln-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Xaa-Tyr-Leu-Glu-Ser-Arg-Arg-Ala-Gln-Asp-Phe-Val-Gln-Trp-Leu-Met-Asp-Thr-R}$  (SEQ ID NO: 13)
- [0325] 이때, 위치 15의 Xaa는 Asp, Glu, 시스테인산, 호모글루타민산 또는 호모시스테인산이 되며,
- [0326] 위치 28의 Xaa는 Asn 또는 산성 아미노산이 되며; 그리고
- [0327] 위치 29의 Xaa는 Thr 또는 산성 아미노산이 되며, 그리고
- [0328] R은 산성 아미노산, COOH 또는  $\text{CONH}_2$ 이며,
- [0329] 조건은 위치 28, 29 또는 30중 한 위치에 산성 아미노산이 존재한다는 것이다. 한 구체예에서, R은 COOH이며, 또 다른 구체예에서, R은  $\text{CONH}_2$ 이다.
- [0330] 본 발명은 또한 글루카곤 융합 펩티드를 포함하는데, 글루카곤 펩티드의 안정성 및 용해도를 강화시키기 위하여, 글루카곤 펩티드의 C 말단에 제 2 펩티드 융합되어 있다. 좀더 구체적으로, 융합 글루카곤 펩티드는 글

루카곤 펩티드 NH<sub>2</sub>-His-Ser-Gln-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Lys-Tyr-Leu-Xaa-Ser-Arg-Arg-Ala-Gln-Asp-Phe-Val-Gln-Trp-Leu-Xaa-Xaa-Xaa-R(SEQ ID NO:34)를 포함하는 글루카곤 항진 유사체를 포함할 수 있으며, 여기서, R은 산성 아미노산 또는 결합이 되며, SEQ ID NO:20(GPSSGAPPPS), SEQ ID NO:21(KRNRNNIA) 또는 SEQ ID NO:22(KRNR)가 글루카곤 펩티드의 카르복시 말단에 링크되어 있다. 한 구체예에서, 글루카곤 펩티드는 SEQ ID NO:33, SEQ ID NO:7 또는 SEQ ID NO:8을 포함하며, 그리고 글루카곤 펩티드의 카르복시 말단에 링크된 SEQ ID NO:20(GPSSGAPPPS), SEQ ID NO:21(KRNRNNIA) 또는 SEQ ID NO:22(KRNR)의 아미노산 서열을 더 포함한다. 한 구체예에서, 글루카곤 융합 펩티드는 SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5 및 SEQ ID NO: 6을 포함하거나 또는 이의 글루카곤 항진제 유사체는 글루카곤 펩티드의 아미노산 29에 연결된 SEQ ID NO:20(GPSSGAPPPS), SEQ ID NO: 21 (KRNRNNIA) 또는 SEQ ID NO: 22 (KRNR)의 아미노산 서열을 더 포함한다. 한 구체예에 따르면, 융합 펩티드는 위치 16, 17, 21, 24, 29의 아미노산, C-말단 연장부내에, 또는 C-말단 아미노산에 링크된 PEG 사슬을 더 포함하며, PEG 사슬은 500 내지 40,000 Daltons 범위에서 선택된다. 한 구체예에서, SEQ ID NO: 20 (GPSSGAPPPS), SEQ ID NO: 21 (KRNRNNIA) 또는 SEQ ID NO: 22 (KRNR)의 아미노산 서열은 펩티드 결합을 통하여 글루카곤 펩티드의 아미노산 29 에 결합되어 있다. 구체예에서, 글루카곤 융합 펩티드의 글루카곤 펩티드 부분은 SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11 및 SEQ ID NO: 13으로 구성된 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함한다. 한 구체예에서, 글루카곤 융합 펩티드의 글루카곤 펩티드 부분은 SEQ ID NO: 11 또는 SEQ ID NO: 13의 서열을 포함하고, PEG 사슬은 위치 21, 24, 29의 아미노산, C-말단 연장부내에, 또는 C-말단 아미노산에 차례로 링크된다.

[0331] 또 다른 구체예에서, 글루카곤 펩티드는 SEQ ID NO: 11의 서열과, 글루카곤 펩티드의 아미노산 29에 링크된 SEQ ID NO: 20 (GPSSGAPPPS), SEQ ID NO: 21 (KRNRNNIA) 또는 SEQ ID NO: 22 (KRNR)의 아미노산 서열을 더 포함한다. 한 구체예에서, 글루카곤 융합 펩티드는 SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 25 및 SEQ ID NO: 26로 구성된 군으로부터 선택된 서열을 포함한다. 일반적으로, 본 발명의 융합 펩티드는 표준 카르복시산기의 C-말단 아미노산을 가질 것이다. 그러나, C-말단 아미노산이 카르복시산 대신 아미드로 대체된 서열의 유사체도 구체예로 포함된다. 한 구체예에 따르면, 융합 글루카곤 펩티드는 SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11 및 SEQ ID NO: 13로 구성된 군으로부터 선택된 글루카곤 항진 유사체를 포함하며, 글루카곤 펩티드의 아미노산 29에 링크된 SEQ ID NO: 23 (GPSSGAPPPS-CONH<sub>2</sub>)의 아미노산 서열을 더 포함한다.

[0332] 본 발명의 글루카곤 항진제는 글루카곤 펩티드의 생물학적 활성을 유지시키면서 수용성 용액내에서 펩티드의 용해도 및 안정성을 개선시키기 위하여 더 변형될 수 있다. 한 구체예에 따르면, SEQ ID NO:11의 펩티드 또는 이의 글루카곤 유사체의 위치 16, 17, 20, 21, 24 및 29 중에서 선택된 하나 이상의 위치에 친수성기를 도입시키면 pH 안정화된 글루카곤 유사체의 용해도 및 안정성이 개선될 것으로 기대된다. 좀더 구체적으로, 한 구체예에서, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 13, 또는 SEQ ID NO: 32의 글루카곤 펩티드는 하나 이상의 친수성기가 글루카곤 펩티드의 위치 21 및 24에 존재하는 아미노산의 측쇄에 공유적으로 연결되도록 변형된다.

[0333] 한 구체예에 따르면, SEQ ID NO:11의 글루카곤 펩티드는 위치 16, 17, 20, 21, 24 및/또는 29에 하나 이상의 아미노산 치환을 포함하도록 변형되며, 이때 고유 아미노산은 친수성 모이어티(PEG 포함)와 교차 연결에 적합한 측쇄를 가지는 아미노산으로 치환된다. 고유 펩티드는 자연적으로 생성되는 아미노산 또는 합성(자연적으로 생성되지 않는) 아미노산으로 치환될 수 있다. 합성 또는 비-자연적으로 생성되는 아미노산은 *in vivo*에서 자연적으로 발생되지는 않지만, 여기에서 논의된 펩티드 구조에 결합될 수 있는 아미노산을 말한다.

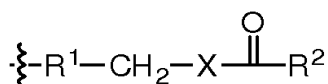
[0334] 한 구체예에서, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11 또는 SEQ ID NO: 13의 글루카곤 항진제가 제공되는데, 이때 고유 글루카곤 펩티드 서열은 위치 16, 17, 21, 24, 29 중 적어도 한 위치, C-말단 연장부내에 또는 고유 서열의 C-말단 아미노산에 자연적으로 생성되는 또는 합성 아미노산이 포함되도록 변형되는데, 아미노산 치환체는 추가로 친수성 모이어티를 포함한다. 한 구체예에서, 치환은 위치 21 또는 24에 일어나고, 또 다른 구체예에서, 친수성 모이어티는 PEG 사슬이다. 한 구체예에서, SEQ ID NO:11의 글루카곤 펩티드는 적어도 하나의 시스테인 잔기로 치환되는데, 여기서 시스테인 잔기의 측쇄는 티올 반응 시약으로 추가 변형되는데, 이때 시약은 말레이미도, 비닐 술폰, 2-피리도티오, 할로알킬, 및 할로아실을 포함한다. 이와 같은 티올 반응 시약은 카르복시, 케토, 하이드록실, 및 에테르기 뿐만 아니라 폴리메틸렌 글리콜 단위와 같은 다른 친수성 모이어티를 포함한다. 대체 구체예에서, 고유 글루카곤 펩티드는 리신으로 치환되는데, 치환되는 리신 잔기의 측쇄는 카르복시산의 활성 에스테르(숙시니미드, 안하이드리드, 등) 또는 PEG와 같은 친수성 모이어티의 알데히드와 같은 아민 반응 시약을 이용하여 더 변형된다. 한 구체예에서, 글루카곤 펩티드는 SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18 및 SEQ ID NO: 19으로 구성된 군으로부터 선택된다.

[0335] 한 구체예에 따르면, 폐길화된 글루카곤 펩티드는 글루카곤 펩티드에 공유적으로 결합된 두 개 이상의 폴리에틸렌 사슬을 포함하는데, 폴리에틸렌 글리콜 사슬의 총 분자량은 약 1,000 내지 약 5,000 Daltons 범위가 된다. 한 구체예에서, 폐길화된 글루카곤 항진제는 SEQ ID NO:6의 펩티드를 포함하는데, 이때 PEG 사슬은 위치 21 및 위치 24의 아미노산 잔기에 공유적으로 링크되며, 두 개 PEG 사슬의 복합 분자량은 약 1,000 내지 약 5,000 Daltons 범위가 된다. 또 다른 구체예에서, 폐길화된 글루카곤 항진제는 SEQ ID NO:6의 펩티드 of SEQ ID NO:6를 포함하는데, 이때 PEG 사슬은 위치 21 및 위치 24의 아미노산 잔기에 공유적으로 링크되며, 두 개 PEG 사슬의 복합 분자량은 약 5,000 내지 약 20,000 Daltons 범위가 된다.

[0336] PEG 사슬은 직쇄 또는 분지형일 수도 있다. 한 구체예에서, 폴리에틸렌 글리콜 사슬은 약 500 내지 약 40,000 Daltons 범위에서 선택된 분자량을 가진다. 한 구체예에서 PEG는 약 500 ~ 약 5,000 Daltons의 분자량을 가진다. 또 다른 구체예에서, PEG는 약 20,000 ~ 약 40,000 Daltons의 분자량을 가진다.

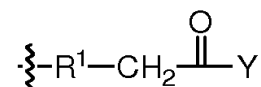
[0337] 상기에서 설명된 임의의 글루카곤 펩티드는 글루카곤 펩티드의 C-말단 부분 (아미노산 위치 12-29)내에 공유 또는 비-공유 분자내 다리 또는  $\alpha$ -헬릭스 안정화 아미노산을 포함하도록 더 변형될 수 있다. 한 구체예에 따르면, 글루카곤 펩티드는 위치 16, 20, 21, 또는 24의 아미노산이  $\alpha$ ,  $\alpha$ -이중치환된 아미노산, 예, AIB로 치환되는 것에 추가하여 상기에서 설명된 변형중 하나 이상을 포함(또는 이들의 복합)할 수 있다. 또 다른 구체예에 따르면, 글루카곤 펩티드는 글루카곤 펩티드의 위치 16 및 20의 아미노산 측쇄 사이에 분자내 다리, 가령, 락탐에 추가하여, 상기에서 논의된 임의의 하나이상의 변형을 포함한다.

[0338] 일부 구체예에 따르면, 글루카곤 펩티드는 SEQ ID NO: 77의 아미노산 서열을 포함하며, 여깁서 위치 3의 Xaa 은 구조 I, II, 또는 III의 측쇄를 가지는 아미노산이며:



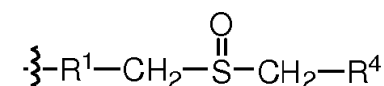
[0339]

[0340] 구조식 I



[0341]

[0342] 구조식 II



[0343]

[0344] 구조식 III

[0345] 상기 식에서,

[0346]  $R^1$ 은  $C_{0-3}$  알킬 또는  $C_{0-3}$  헤테로알킬이며;  $R^2$ 는  $NHR^4$  또는  $C_{1-3}$  알킬이며;  $R^3$ 는  $C_{1-3}$  알킬이며;  $R^4$ 는 H 또는  $C_{1-3}$  알킬이며; X는 NH, O, 또는 S이며; 그리고 Y는  $NHR^4$ ,  $SR^3$ , 또는  $OR^3$ 이다. 일부 구체예에서, X는 NH이거나 또는 Y는  $NHR^4$ 이다. 일부 구체예에서,  $R^1$ 은  $C_{0-2}$  알킬 또는  $C_1$  헤테로알킬이다. 일부 구체예에서,  $R^2$ 는  $NHR^4$  또는  $C_1$  알킬이다. 일부 구체예에서,  $R^4$ 는 H 또는  $C_1$  알킬이다. 예시적인 구체예에서, 구조 I의 측쇄를 포함하는 아미노산이 제공되는데, 이때 식에서,  $R^1$ 은  $CH_2-S$ 이며, X는 NH이고, and  $R^2$ 는  $CH_3$  (아세트아미도메틸-시스테인, C(Acm))이다;  $R^1$ 은  $CH_2$ 이며, X는 NH이고,  $R^2$ 는  $CH_3$  (아세트아미도부타논산, Dab(Ac))이며;  $R^1$ 은  $C_0$  알킬이며, X는 NH이고,  $R^2$ 는  $NHR^4$  이고,  $R^4$ 는 H (카르바모일디아미노프로파논산, Dap(우레아))이며; 또는  $R^1$ 은  $CH_2-CH_2$ 이고, X는 NH이며,  $R^2$ 는  $CH_3$  (아세틸오르니틴, Orn(Ac))이다. 예시적인 구체예에서, 구조 II의 측쇄를 포함하는 아미노산이 제공되는데, 이때 식에서,  $R^1$ 은  $CH_2$ 이며, Y는  $NHR^4$ 이며,  $R^4$ 는  $CH_3$  (메틸글루타민, Q(Me))이다; 예시적인 구체예



서, 구조 III의 측쇄를 포함하는 아미노산이 제공되는데, 이때 식에서,  $R^1$ 은  $CH_2$ 이며,  $R^4$ 는 H (메티오닌-술폭시드, M(O))가 되며; 특정 구체예에서, 위치 3에서 아미노산은 Dab(Ac)으로 치환된다. 예를 들면, 글루카곤 항진제는 SEQ ID NO: 63, SEQ ID NO: 69, SEQ ID NO: 71, SEQ ID NO: 72, SEQ ID NO: 73, 및 SEQ ID NO: 74의 아미노산 서열을 포함할 수 있다.

[0347] 특정 구체예에서, 글루카곤 펩티드는 SEQ ID NO:77의 글루카곤 펩티드의 유사체다. 특이적 측면에서, 유사체는 다음에서 설명된 변형중 임의의 것을 포함하나 이에 한정되지 않는 아미노산 변형을 포함한다: 위치 28의 Asn은 전하를 띤 아미노산으로 치환; 위치 28의 Asn은 Lys, Arg, His, Asp, Glu, 시스테인산, 및 호모시스테인산으로 구성된 군으로부터 선택된 전하를 띤 아미노산으로 치환; 위치 28은 Asn, Asp, 또는 Glu으로 치환; 위치 28은 Asp으로 치환; 위치 28은 Glu으로 치환; 위치 29의 Thr는 전하를 띤 아미노산으로 치환; 위치 29의 Thr는 Lys, Arg, His, Asp, Glu, 시스테인산, 및 호모시스테인산으로 구성된 군으로부터 선택된 전하를 띤 아미노산으로 치환: 위치 29는 Asp, Glu, 또는 Lys으로 치환; 위치 29는 Glu으로 치환; 위치 29 다음에 1-3개의 전하를 띤 아미노산 삽입; 위치 29 다음에 Glu 또는 Lys 삽입; 위치 29 다음에 Gly-Lys 또는 Lys-Lys; 또는 이의 조합.

[0348] 특정 구체예에서, SEQ ID NO: 77의 글루카곤 펩티드의 유사체는 위치 16, 20, 21, 및 24 중 하나, 둘, 셋 또는 모두에서  $\alpha$ ,  $\alpha$ -이중치환된 아미노산, 가령 AIB를 포함한다.

[0349] 특정 구체예에서, SEQ ID NO: 77의 글루카곤 펩티드의 유사체는 다음중 하나 이상을 포함한다: 위치 1의 His을 DPP-IV에 의한 절단에 글루카곤 펩티드의 민감성을 감소시키는 비-고유 아미노산으로의 치환; 위치 2의 Ser은 디펩티딜 펩티다제 IV (DPP- IV)에 의한 절단에 글루카곤 펩티드의 감응성을 감소시키는 비-고유 아미노산으로 치환; 위치 7의 Thr은 하드록시기가 없는 아미노산, 가령, Abu 또는 Ile로의 치환; 위치 10의 Tyr은 Phe 또는 Val으로 치환; 위치 12의 Lys 은 Arg으로 치환; 위치 15의 Asp는 Glu로 치환; 위치 16의 Ser은 Thr 또는 AIB로 치환; 위치 20의 Gln은 Ala 또는 AIB으로 치환; 위치 21의 Asp는 Glu으로 치환; 위치 24의 Gln은 Ala 또는 AIB으로 치환; 위치 27의 Met은 Leu 또는 Nle로 치환; 위치 27-29의 아미노산 결손; 위치 28-29의 아미노산 결손; 위치 29의 아미노산 결손; C-말단에 SEQ ID NO:20의 아미노산 서열 추가, 이때 위치 29의 아미노산은 Thr 또는 Gly이 되며; 또는 이들의 조합.

[0350] 특이적 구체예에 따르면, 글루카곤 펩티드는 SEQ ID NOs: 62-67 및 69-74 중 임의의 아미노산 서열을 포함한다.

[0351] 특정 구체예에서, SEQ ID NO: 77을 포함하는 글루카곤 펩티드의 유사체는 위치 16, 17, 20, 21, 24, 및 29 중 임의의 아미노산 또는 C-말단 아미노산에 공유적으로 연결된 친수성 모이어티, 예, PEG를 포함한다.

[0352] 특정 구체예에서, SEQ ID NO: 77을 포함하는 글루카곤 펩티드의 유사체는 선택적으로 스페이스를 통하여 아실기 또는 알킬기에 공유적으로 부착된 측쇄를 포함하며, 이때 아실기 또는 알킬기는 자연-생성 아미노산에 고유한 것은 아니다. 아실기는 일부 구체예에서 C4 내지 C30 지방 아실기가 된다. 다른 구체예에서, 알킬기는 C4 내지 C30 알킬이다. 특이적 측면에서, 아실기 또는 알킬기는 위치 10의 아미노산 측쇄에 공유적으로 부착된다. 일부 구체예에서, 위치 7의 아미노산은 Ile 또는 Abu다.

## [0353] 용도

[0354] 실시예에서 상세하게 설명되는 것과 같이, 본 발명의 글루카곤 항진제는 고유 펩티드와 비교하여 강화된 생활성을 유지하면서 생리학적 pH의 용액에서 강화된 생물리학적 안정성 및 수용성 용해도를 가진다. 따라서, 본 발명의 글루카곤 항진제는 고유 글루카곤 펩티드에 대해 이미 설명된 임의의 용도에 적합할 것으로 본다. 따라서, 여기에서 논의된 변형된 글루카곤 펩티드는 저혈당 치료, 혈당 수준의 증가, 방사능 사용을 위한 장의 일시적 마비의 유도, 체중 감소 및 유지, 인슐린으로 부족 치료 또는 글루카곤의 낮은 혈액 수준으로 인한 기타 다른 대사적 질환 치료에 이용될 수 있다.

[0355] 여기에서 논의된 글루카곤 펩티드는 체중의 감소 또는 유지, 또는 과혈당 치료, 또는 혈당 수준의 감소, 또는 혈당 수준의 정상화, 및/또는 혈당 수준의 안정화를 위해 이용될 수 있을 것으로 예상된다. 혈당 수준의 “정상화(Normalizing)”는 혈당 수준을 정상으로 되돌리는 것을 말한다(가령, 정상보다 높은 경우, 혈당 수준을 낮추거나, 정상보다 낮은 경우 혈당 수준을 올린다). 혈당 수준의 “안정화”는 일정 시간 동안, 8 시간, 16 시간, 24 시간, 2 일간, 3 일간, 4 일간, 5 일간, 6 일간 또는 1 주일간 혈당 수준의 최대 변이를 감소시키는 것을 말한다. 예를 들면, 글루카곤 펩티드를 투여하면, 시간이 경과하여도 글루카곤 펩티드를 투여하지 않은 경우보다 정상 범위의 포도당 수준에 더 근접하고 유지되게 된다.

- [0356] 본 발명의 글루카곤은 단독으로 또는 기타 항-당뇨병 또는 항-비만제와 병용 투여될 수 있다. 본 기술분야에 공지된 항-당뇨제 또는 연구중인 제제에는 인슐린, 술폰닐우레아, 예를 들면, 톨부타미드(Orinase), 아세토헥사미드 (Dymelor), 톨아자미드 (Tolinase), 클로로프로파미드 (Diabinese), 글리피지드(Glucotrol), 글리부리드 (Diabeta, Micronase, Glynase), 글리메피리드 (Amaryl), 또는 글리클라지드(Diamicon); 메글리티니드, 예를 들면, 레파글리니드(Prandin) 또는 나테글리니드(Starlix); 비구아니드 예를 들면, 메트포르민(Glucophage) 또는 펜포르민; 티아졸리디네디논 예를 들면, 로시글리타존(Avandia), 피오글리타존(Actos), 또는 트로글리타존 (Rezulin), 또는 기타 PPAR $\gamma$  억제제; 탄수화물 소화를 억제시키는 알파 글루코시다제 억제제, 예를 들면, 미글리톨(Glyset), 아카르보스 (Precose/Glucobay); 액세나티드 (Byetta) 또는 프람린티드; 이가렙티드성 펩티다제-4 (DPP-4) 억제제 예를 들면, 빌다글리프틴 또는 시타글리프틴; SGLT (나트륨-의존적 포도당 운반체 1) 억제제; 글루코키나제 활성제(GKA); 글루카곤 수용체 길항제 (GRA); 또는 FBPase (푸락토스 1,6-비스포스파타제) 억제제.
- [0357] 당분야에 공지된 또는 연구중인 항-비만제에는 렙틴(Leptin) 및 섬유아세포 성장 인자 21 (FGF-21), 식욕 억제제, 예를 들면, 펜에틸아민 타입 흥분제, 펜터민(선택적으로 펜플루아민 또는 엑스펜플루아민과 함께), 디에틸 프로피온 (Tenuate), 펜디메트라진(Prelu-2, Bontril), 벤즈페타민 (Didrex), 시부트라민 (Meridia, Reductil); 리모나반트(Acomplia), 기타 캐나비노이드 수용체 길항제; 옥시토몰롤린; 플루옥세틴 염화수소 (Prozac); Qnexa(토피라메이트 및 펜터민), Excalia (부프로피온 및 조니스아미드) 또는 Contrave (부프로피온 and naltrexone); 또는 제니칼(Orlistat)과 유사한 리파제 억제제, Cetilistat (ATL-962), 또는 GT 389-255.
- [0358] 본 발명의 한 측면은 저혈당 치료에 이용하기 위하여 현재 개시된 글루카곤 항진제의 사전-조제된 수용성 용액에 관한 것이다. 여기에서 논의된 항진성 조성물의 개선된 안정성 및/또는 용해도로 인하여 신속한 투여 및 저혈당 치료를 위한 사전-조제된 수용액의 제조가 허용된다. 따라서, 한 구체예에서, 저혈당을 앓고 있는 환자에게 투여하기 위한 본 발명의 글루카곤 항진제를 포함하는 용액이 제공된다. 한 구체예에서, 저혈당을 앓고 있는 환자에게 투여하기 위해 여기에서 논의된 폐길화된 글루카곤 항진제를 포함하는 용액이 제공되는데, 폐길화된 글루카곤 항진제에 링크된 PEG 사슬의 총 분자량은 약 500 내지 약 5,000 Daltons이다. 한 구체예에서, 폐길화된 글루카곤 항진제는 SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18 및 SEQ ID NO: 19 및 이의 글루카곤 항진 유사체로 구성된 군으로부터 선택된 펩티드를 포함하는데, 여기서 위치 16, 17, 21, 24 또는 29의 아미노산 잔기의 측쇄, C-말단 연장부의 아미노산의 측쇄 또는 글루카곤 펩티드의 C-말단 아미노산의 측쇄는 폴리에틸렌 글리콜 사슬에 공유적으로 결합된다. 한 구체예에서, 폐길화된 글루카곤 항진제는 SEQ ID NO: 16의 펩티드를 포함하며, 여기서 펩티드 위치 21의 아미노산 잔기는 폴리에틸렌 글리콜에 공유적으로 링크된다. 한 구체예에서, 폐길화된 글루카곤 항진제는 SEQ ID NO: 17의 펩티드를 포함하며, 여기서 펩티드 위치 24의 아미노산 잔기는 폴리에틸렌 글리콜에 공유적으로 링크된다.
- [0359] 저혈당 치료를 포함하나 이에 한정되지 않는 본 발명에 따른 치료 방법은 본 발명의 글루카곤 펩티드를 임의의 표준 투여 경로, 장관외 투여 예를 들면, 정맥, 복막, 피하, 근육, 척추, 경피, 직장, 경구, 비강, 또는 흡입을 포함하는 경로를 통하여 환자로 투여하는 단계를 포함한다. 한 구체예에서, 조성물은 피하 또는 근육으로 투여된다. 한 구체예에서, 조성물은 장관외로 투여되고, 글루카곤 조성물은 주사기에 사전 포장된다. 또 다른 구체예에서, 조성물은 흡입기 또는 다른 에어로졸화된 약물 운반 장치에 사전 포장된다. 유익하게는 여기에서 논의된 수용성 안정화된 글루카곤 유사체는 고유 글루카곤과 비교하여, 약제학적으로 목적에 이용되는 최대 광범위한 pH 범위의 수용성 완충액에서 우수한 안정성 및 용해도를 나타낸다. 여기에서 논의된 안정화된 글루카곤 유사체를 이용하면 장시간 동안 생리학적 pH에서 글루카곤 항진 용액을 준비하고 보관할 수 있다.
- [0360] 출원인은 부모 펩티드의 생활성 및 특이성을 보유하도록 폐길화된 글루카곤 펩티드가 만들어질 수 있다는 것을 발견하였다. 그러나, 펩티드에 부착되는 PEG 사슬의 길이가 증가되거나 또는 다중 PEG 사슬이 부착되면, 예를 들면, 링크된 PEG의 전체 분자량이 5,000 Daltons 이상 되면 변형된 글루카곤의 작용 시간이 지체되기 시작한다. 한 구체예에 따르면, SEQ ID NO:11 또는 SEQ ID NO:13의 글루카곤 펩티드 또는 이의 글루카곤 항진 유사체가 제공되는데, 이때 펩티드는 하나 이상의 폴리에틸렌 글리콜 사슬을 포함하고, 링크된 PEG의 전체 분자량은 5,000 Daltons 이상되며, 한 구체예에서는 10,000 Daltons 이상이나 40,000 Daltons 미만이 된다. 이와 같은 변형된 글루카곤 펩티드는 지연된 활성 시간을 가지지만, 생활성은 상실되지 않는다. 따라서, 이와 같은 화합물들은 투여된 글루카곤 펩티드의 효과를 연장시키기 위해 예방학적으로 투여될 수 있다.
- [0361] 10,000 Daltons 이상의 분자량을 가진 PEG 사슬에 공유적으로 결합되도록 변형된 글루카곤펩티드는 당뇨병에서 인슐린 작용을 완충시키고, 안정적인 혈당 수준을 유지하도록 돕기 위해 인슐린과 함께 투여될 수 있다. 본 발명의 내용에서 변형된 글루카곤 펩티드는 단일 조성물로 인슐린과 함께 투여되거나 또는 별도 용액으로 동시에

투여되거나, 대안으로, 인슐린과 변형된 글루카곤 펩티드는 서로 상이한 시간대에 투여될 수 있다. 한 구체예에서, 인슐린을 포함하는 조성물과 변형된 글루카곤 펩티드를 포함하는 조성물은 서로 12시간 내에 투여된다. 투여된 인슐린에 대한 변형된 글루카곤 펩티드의 정확한 비율은 환자의 글루카곤 수준의 결정에 따라 일부 달라질 수 있고, 통상의 실험을 통하여 결정될 수 있다. 한 구체예에 따르면, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5로 구성된 군으로부터 선택된 변형된 글루카곤 펩티드 및 이의 글루카곤 항진 유사체와 인슐린을 포함하는 조성물이 제공되는데, 여기서 변형된 글루카곤 펩티드는 위치 16, 17, 21, 24, 29의 아미노산 측쇄, C-말단 연장부의 아미노산 측쇄, 또는 C-말단 아미노산의 아미노산 측쇄에 공유적으로 결합된 PEG 사슬을 더 포함한다. 한 구체예에서, 조성물은 인슐린과 글루카곤 유사체를 포함하는 수용성 용액이다. 구체예에서, 글루카곤 펩티드는 SEQ ID NO: 11 또는 SEQ ID NO: 13의 서열을 포함하는데, 이 펩티드는 위치 16, 17, 21, 24, 29의 아미노산 측쇄, C-말단 연장부의 아미노산 측쇄, 또는 C-말단 아미노산의 아미노산 측쇄에 공유적으로 결합된 PEG 사슬을 더 포함할 수 있다. 한 구체예에서, 변형된 글루카곤 펩티드의 PEG 분자량은 10,000 Daltons 이상이다. 한 구체예에서, 폐길화된 글루카곤 펩티드는 SEQ ID NO: 11 및 SEQ ID NO: 13으로 구성된 군으로부터 선택된 펩티드를 포함하는데, 여기서 글루카곤 펩티드의 위치 21 또는 24의 아미노산 잔기 측쇄는 폴리에틸렌 글리콜 사슬에 공유적으로 결합된다. 한 구체예에서, 폴리에틸렌 글리콜 사슬은 약 10,000 내지 약 40,000의 분자량을 가진다.

[0362] 한 구체예에 따르면, 여기에서 논의된 변형된 글루카곤 펩티드는 소장관의 일시적 마비를 유도하는데 이용된다. 이 방법은 방사능 목적에 용도를 가지며, 폐길화된 글루카곤 펩티드를 포함하는 약학 조성물의 유효량을 투여하는 단계를 포함하고, 글루카곤 펩티드는 이와 같은 펩티드의 이량체 또는 C-말단 연장부를 포함한다. 한 구체예에서, 글루카곤 펩티드는 SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12 및 SEQ ID NO: 13으로 구성된 군으로부터 선택된 서열을 포함한다. 한 구체예에서, 글루카곤 펩티드는 위치 21, 24 또는 29의 아미노산, C-말단 연장부, 또는 C-말단 아미노산에 공유적으로 결합된 약 1,000 내지 40,000 Daltons의 PEG 사슬을 추가로 포함한다. 한 구체예에서, 글루카곤 펩티드는 SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16 및 SEQ ID NO: 17으로 구성된 군으로부터 선택된다. 한 구체예에서, PEG 사슬은 약 500 내지 약 5,000 Daltons의 분자량을 가진다. 추가 구체예에서, 창자 관의 일시적 마비를 유도하는데 이용되는 조성물은 제1 변형된 글루카곤 펩티드와 제2 변형된 글루카곤 펩티드를 포함하는데, 여기서 제1 변형된 펩티드는 SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11 및 SEQ ID NO: 13로 구성된 군으로부터 선택된 서열을 포함하고, 선택적으로 이들 서열은 약 500 내지 약 5,000 Daltons의 PEG 사슬에 링크되어 있으며, 그리고 제2 펩티드는 약 10,000 내지 약 40,000 Daltons의 공유적으로 링크된 PEG 사슬을 포함한다. 이 구체예에서, 각 펩티드의 PEG 사슬은 위치 21, 24 또는 29의 아미노산 잔기, C-말단 연장부, 또는 C-말단 아미노산에 서로 독립적으로 공유 결합되어 있다.

[0363] 소장에서 발견되는 자연적으로 생성되는 소화 호르몬인 옥시토모듈린은 체중 감소를 유도한다(*Diabetes 2005; 54:2390-2395* 참고). 옥시토모듈린은 글루카곤 (SEQ ID NO: 1)의 29개 아미노산과 SEQ ID NO: 97 (KRNRNNIA)의 8개 카르복시 말단 연장부를 포함하는 37개 아미노산으로 된 펩티드다. 따라서, 옥시토모듈린의 글루카곤 펩티드 일부분을 여기에서 논의된 변형된 글루카곤 펩티드로 치환시킴으로써 화합물의 용해도 및 안정성은 개선되면서 옥시토모듈린의 생활성은 유지될 수 있다(가령, 식욕 억제 및 체중 감소/체중 유지 유도)고 출원인은 보고 있다. 추가로, 출원인은 또한 본 발명의 글루카곤 펩티드를 포함하고, 옥시토모듈린의 말단 4개 아미노산이 제거된 절두형 옥시토모듈린 분자도 식욕 억제 및 체중 감소를 유도/체중 유지에 효과가 있을 것으로 보고 있다.

[0364] 따라서, 본 발명은 SEQ ID NO: 21 (KRNRNNIA) 또는 SEQ ID NO: 22의 카르복시 말단 연장부를 가지는 본 발명의 변형된 글루카곤 펩티드도 포함한다. 한 구체예에 따르면, 글루카곤 펩티드의 아미노산 29에 링크된 SEQ ID NO: 21 (KRNRNNIA) 또는 SEQ ID NO: 22를 보유하는 SEQ ID NO: 33의 글루카곤 항진 유사체는 체중 감소 유도 또는 체중 증가 방지를 위하여 개체에게 투여된다. 한 구체예에 따르면, 글루카곤 펩티드의 아미노산 29에 링크된 SEQ ID NO: 21 (KRNRNNIA) 또는 SEQ ID NO: 22를 보유하는 SEQ ID NO: 11 또는 SEQ ID NO: 13의 글루카곤 항진 유사체는 체중 감소 유도 또는 체중 증가 방지를 위하여 개체에게 투여된다. 또 다른 구체예에서, 개체에서 체중 증가를 감소 또는 체중 감소를 유도하는 방법은 SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4 또는 SEQ ID NO: 5로 구성된 군으로부터 선택된 글루카곤 펩티드를 포함하는 글루카곤 항진제를 포함하는 조성물의 유효량을 투여하는 것을 포함하며, 여기서 글루카곤 펩티드의 아미노산 29는 펩티드 결합을 통하여 제2 펩티드에 결합되며, 제2 펩티드는 SEQ ID NO: 24 (KRNRNNIA) 또는 SEQ ID NO: 25의 서열이며, PEG 사슬(약 1,000 내지 40,000 Daltons 분자량)은 위치 21 및/또는 24의 아미노산 잔기에 공유적으로 결합된다. 한 구체예에서, 글루카곤 항진제의 글루카곤 펩티드 단편은 SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID



NO: 18 및 SEQ ID NO: 19으로 구성된 군으로부터 선택되며, 여기서 각 펩티드의 PEG 사슬(약 1,000 내지 40,000 Daltons 분자량)은 위치 16, 17, 21, 24 또는 29의 아미노산 잔기, C-말단 연장부, 또는 C-말단 아미노산에 서로 독립적으로 공유 결합되어 있다.

[0365] 엑센딘-4는 최대 39개 아미노산으로 구성된 펩티드다. GLP-1으로 알려진 수용체의 강력한 자극물질이다. 이 펩티드는 식욕을 억제 및 체중 감소를 유도하는 것으로 보고된 바 있다. 출원인은 엑센딘-4의 말단 서열이 글루카곤의 카르복시 말단에 추가되면, 글루카곤의 생활성을 손상시키지 않고 글루카곤의 용해도 및 안정성이 개선된다는 것을 발견하였다. 한 구체예에서, 엑센딘의 말단 10개 아미노산 (가령, SEQ ID NO: 20 (GPSSGAPPPS))이 본 발명의 글루카곤 펩티드의 카르복시 말단에 링크된다. 특이적 측면에서, SEQ ID NO: 20의 서열이 글루카곤 펩티드의 C-말단에 링크되며, 위치 29의 아미노산은 Thr 또는 Gly이다. 이들 융합 단백질은 식욕을 억제하고 체중 감소를 유도/체중 유지를 위한 약제학적으로 활성을 가지는 것으로 예상된다. 한 구체예에서, SEQ ID NO: 20 연장부의 말단 아미노산은 카르복시 기를 대신하여 아미드기를 포함하고 (서열 SEQ ID NO: 23), 그리고 이 서열은 본 발명의 글루카곤 펩티드의 카르복시 말단에 링크된다.

[0366] 한 구체예에서, 개체에서 체중 증가를 감소 또는 체중 감소를 유도하는 방법은 SEQ ID NO: 33의 글루카곤 펩티드를 가지는 글루카곤 항진제를 포함하는 조성물의 유효량을 투여하는 것을 포함하는데, 여기서 글루카곤 펩티드의 아미노산 29는 펩티드 결합을 통하여 제2 펩티드에 결합되고, 제2 펩티드는 SEQ ID NO: 20 (GPSSGAPPPS) 또는 SEQ ID NO: 23의 서열을 포함한다. 한 구체예에서, 글루카곤 펩티드는 SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12 및 SEQ ID NO: 13으로 구성된 군으로부터 선택된 서열을 포함하며, 여기서 글루카곤 펩티드의 아미노산 29는 펩티드 결합을 통하여 제2 펩티드에 결합되고, 제2 펩티드는 SEQ ID NO: 20 (GPSSGAPPPS) 또는 SEQ ID NO: 23의 서열을 포함한다. 한 구체예에서, 글루카곤 항진제의 글루카곤 펩티드는 SEQ ID NO: 11 및 SEQ ID NO: 13으로 구성된 군으로부터 선택된다. 한 구체예에서, 융합 펩티드의 글루카곤 펩티드는 SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16 및 SEQ ID NO: 17으로 구성된 군으로부터 선택되며, PEG 사슬의 분자량은 500 내지 40,000 Daltons 범위로부터 선택된다. 좀더 구체적으로, 한 구체예에서, 융합 펩티드의 글루카곤 펩티드는 SEQ ID NO: 16 및 SEQ ID NO: 17으로 구성된 군으로부터 선택되며, PEG 사슬의 분자량은 1,000 내지 5,000에서 선택된다.

[0367] 또 다른 구체예에서, 식욕 억제시키고, 체중 증가 방지 및/또는 체중 감소 유도하기 위하여 제1 폐길화된 글루카곤 펩티드 및 제2 폐길화된 글루카곤 펩티드를 포함하는 약학 조성물이 환자에게 투여되는데, 제1 및 제2 펩티드는 SEQ ID NO: 20 (GPSSGAPPPS) 또는 SEQ ID NO: 23을 포함하는 C-말단 펩티드 연장부를 가지는 융합 펩티드이다. 제1 폐길화된 글루카곤 펩티드는 약 500 내지 약 10,000 Daltons의 공유적으로 링크된 PEG를 포함하며, 그리고 제2 폐길화된 글루카곤 펩티드는 약 10,000 내지 약 40,000 Daltons의 공유적으로 링크된 PEG를 포함한다.

[0368] 본 발명은 또한 여기에서 논의된 것과 같이, 변형된 글루카곤 펩티드의 다량체(multimers)를 포함한다. 변형된 글루카곤 펩티드 두 개 이상이 표준 연결체 및 본 발명 분야에 공지된 과정에 따라 함께 연결될 수 있다. 예를 들면, 2기능성 티올 교차링커를 이용하고, 그리고 시스테인, 리신 오르니틴, 호모시스테인 또는 아세틸 페닐알라닌 잔기(예 SEQ ID NO: 4 및 SEQ ID NO: 5)로 치환된 글루카곤 펩티드의 경우 특히, 2기능성 아민 교차링커를 이용하여 두 개의 변형된 글루카곤 펩티드 사이에 이량체가 형성될 수 있다. 이량체는 동종 이량체 또는 이종 이량체가 될 수 있다. 한 구체예에서, 이량체는 글루카곤 융합 펩티드의 동종 이량체를 포함하는데, 이때 글루카곤 펩티드 부분은 SEQ ID NO: 11의 항진 유사체와, 글루카곤 펩티드의 아미노산에 링크된 SEQ ID NO: 20 (GPSSGAPPPS), SEQ ID NO: 21 (KRNRNIA) 또는 SEQ ID NO: 22 (KRNR)의 아미노산 서열을 포함한다. 또 다른 구체예에서, 이량체는 SEQ ID NO: 11의 글루카곤 항진 유사체의 동종이량체를 포함하고, 글루카곤 펩티드는 위치 21, 24 또는 29의 아미노산 잔기, C-말단 연장부, 또는 C-말단 아미노산에 공유 결합된 PEG 사슬을 더 포함한다. 한 구체예에 따르면, 제2 글루카곤 펩티드에 링커를 경유하여 결합된 제 1 글루카곤 펩티드를 포함하는 이량체가 제공되는데, 여기서 제1 글루카곤 펩티드는 SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10 및 SEQ ID NO: 11으로 구성된 군으로부터 선택된 펩티드를 포함하고, 제2 글루카곤 펩티드는 SEQ ID NO: 33을 포함한다. 더욱이, 제2 글루카곤 펩티드에 대하여, 위치 28의 아미노산은 아스파라진이며, 위치 29의 아미노산은 트레오닌인 경우, 제2 글루카곤 펩티드는 제2 글루카곤 글루카곤 펩티드, 및 이의 약제학적으로 허용가능한 염의 카르복시 말단에 추가된 하나 내지 두 개의 아미노산(Lys, Arg, His, Asp 또는 Glu으로 구성된 군으로부터 독립적으로 선택됨)을 더 포함한다,

[0369] 또 다른 구체예에 따르면, 제2 글루카곤 펩티드에 링커를 경유하여 결합된 제 1 글루카곤 펩티드를 포함하는 이



량체, 및 이의 약제학적으로 허용가능한 염을 제공되는데, 여기서 제1 글루카곤 펩티드는 SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12 및 SEQ ID NO: 13 으로 구성된 군으로부터 선택된 펩티드를 포함하고, 제2 글루카곤 펩티드는 SEQ ID NO: 11 및 SEQ ID NO: 13으로 구성된 군으로부터 독립적으로 선택된 것을 포함한다. 한 구체예에서, 제1 글루카곤 펩티드는 SEQ ID NO: 7이 되며, 제2 글루카곤 펩티드는 SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12 및 SEQ ID NO: 13 으로 구성된 군으로부터 독립적으로 선택된다. 한 구체예에서, 이량체는 두 개 펩티드 사이에 형성되는데, 이때 각 펩티드는 SEQ ID NO: 11의 아미노산 서열을 포함한다.

[0370]

한 구체예에 따르면, 본 발명의 글루카곤 항진 유사체 또는 이의 약제학적으로 허용가능한 염 그리고 약제학적으로 허용가능한 캐리어를 포함하는 약학 조성물이 제공된다. 약학 조성물은 임의의 약제학적으로 허용가능한 성분을 포함하는데, 예를 들면, 산성화제, 첨가제, 흡착제, 에어로졸 추진제, 공기 치환제, 알칼리제, 고결방지제(anticaking agents), 항응고제, 항균 보존제, 항산화제, 소독제, 베이스(bases), 결합제, 완충제, 킬레이트제, 코팅제, 발색제, 건조제, 계면활성제, 희석제, 살균제, 붕괴제(disintegrants), 분산제, 용해강화제, 염료, 연화제, 유화제, 유제 안정화제, 충전제, 막 형성제, 풍미 보강제, 풍미제, 유동 강화제, 겔화제, 과립제, 습윤제, 유화제, 점막흡착제, 연고 베이스, 연고, 유성(oleaginous) 비이클, 유기 베이스, 방향제 베이스, 연고, 가소제, 광택제, 보존제, 정수제(sequestering agents), 피부 침투제, 용해제, 용매, 안정제, 좌약 베이스, 표면활성제, 계면활성제, 현탁제, 감미제, 치료제, 농후제, 강장제, 독성 물질, 점성-증가제, 물-흡수제, 물-혼합가능한 공용매, 경수 연화제 또는 가습제를 포함한다.

[0371]

일부 구체예에서, 약학 조성물은 다음의 성분들중 임의의 하나 또는 복합물을 포함한다: 아카시아, 아세살팜 칼륨, 아세틸트리부틸 구연산염, 아세틸트리에틸 구연산염, 한천, 알부민, 알코올, 탈수 알코올, 변성된 알코올, 희석 알코올, 알류리이드산, 알긴산, 지방족 폴리에스테르, 알루미늄, 알루미늄 하이드록시드, 알루미늄 스테아레이트, 아밀로펙틴,  $\alpha$ -아밀로즈, 아스코르브산, 아스코빌 팔미테이트, 아스파르탐, 주사용 세균발육억제용물, 벤토나이트, 벤토나이트 마그마, 염화 벤즈알코니움, 염화벤제토늄, 벤조산, 벤질 알코올, 벤질 벤조산염, 브로로폴, 부틸화된 하이드록시아니솔, 부틸화된 하이드록시톨루엔, 부틸파라벤, 부틸파라벤 나트륨, 알긴산 칼슘염, 아스코르베이트 칼슘, 탄산칼슘염, 시클라메이트 칼슘, 이염기성 무수 인산 칼슘염, 이염기성 탈수 인산 칼슘염, 삼염기성 인산 칼슘염, 프로피온 칼슘염, 실리카이트 칼슘염, 소르베이트 칼슘염, 스테아레이트 칼슘염, 황산칼슘염, 황산칼슘염 반수화물, 카놀라 오일, 카르보머, 이산화탄소, 카르복시메틸 셀룰로오스 칼슘, 카르복시메틸 셀룰로오스 나트륨,  $\beta$ -카로텐, 카라기닌, 카스터 오일, 수소첨가된 카스터 오일, 양이온 유화 왁스, 셀룰로오스 아세트산염, 셀룰로오스 아세트산염 프탈레이트, 에틸 셀룰로오스, 미소결정 셀룰로오스, 분말형 셀룰로오스, 규화된 미소결정 셀룰로오스, 카르복시메틸 셀룰로오스 나트륨, 설토스테아릴 알코올, 설토리이미드, 설토 알코올, 클로로헥시딘, 클로로부탄올, 클로로크레졸, 콜레스테롤, 클로로헥시딘 아세트산염, 클로로헥시딘 글루콘산염, 클로로헥시딘 염화수소, 클로로디플로오르에탄 (HCFC), 클로로디플로오르메탄, 클로로플로오르카본 (CFC)클로로페녹시에탄올, 클로로실레놀, 옥수수 시럽 고형, 무수 구연산염, 구연산 일수화물, 코코아 기름, 발색제, 옥수수 오일, 목화씨 오일, 크레졸, m-크레졸, o-크레졸, p-크레졸, 크로스카르멜로즈 나트륨, 크로스포비돈, 싸이클라민산, 시클로텍스트린, 텍스트레이트, 텍스트린, 텍스트로즈, 텍스트로즈 무수물, 디아졸리디닐 우레아, 디부틸 프탈레이트, 디부틸 세바케이트, 디에탄올아민, 디에틸 프탈레이트, 디플로오르에탄 (HFC-152a), 디메틸- $\beta$ -시클로텍스트린, 시클로텍스트린-타입 화합물 예를 들면, Captisol, 디메틸 에테르, 디메틸 프탈레이트, 에텐테이트 이칼륨, 에텐테이트 이나트륨, 인산 이나트륨 수소, 도큐세이트 칼슘, 도큐세이트 칼륨, 도큐세이트 나트륨, 도데실 갈레이트, 도데실트리메틸암모늄브롬화물, 에텐테이트 칼슘 이나트륨, 에텐테이트, 에글루민, 에틸 알코올, 에틸셀룰로오스, 에틸 갈레이트, 에틸 라우레이트, 에틸 말톨, 에틸 올레이트, 에틸파라벤, 에틸파라벤 칼륨, 에틸파라벤 나트륨, 에틸 바닐린, 푸락토즈, 푸락토즈 액체, 가공된 푸락토즈, 발열원-없는 푸락토즈, 분말형 푸락토즈, 푸마르산, 젤라틴, 포도당, 액상 포도당, 포화된 식물성 지방산의 글리세리드 혼합물, 글리세린, 글리세릴 베헤네이트, 글리세릴 모노올레이트, 글리세릴 모노스테아레이트, 자가-유화글리세릴 모노스테아레이트, 글리세릴 팔미토스테아레이트, 글리신, 글리콜, 글리코퓨롤, 구아르 검, 헵타플로오르프로판 (HFC-227), 헥사데실트리메틸암모늄브롬화물, 고농도 푸락토즈 시럽, 인간 혈청 알부민, 탄화수소 (HC), 희석 염화수소산, 수소화된 식물성 오일 타입 II, 하이드록시에틸 셀룰로오스, 2-하이드록시에틸- $\beta$ -시클로텍스트린, 하이드록시프로필 셀룰로오스, 저-치환된 하이드록시프로필 셀룰로오스, 2-하이드록시프로필- $\beta$ -시클로텍스트린, 하이드록시프로필 메틸셀룰로오스, 하이드록시프로필 메틸셀룰로오스 프탈레이트, 이미드우레아, 인디고 카르민, 이온 교환제, 산화 철, 이소프로필 알코올, 이소프로필 미리스테이트, 이소프로필 팔미테이트, 등장성 염, 카올린, 젖산, 락티톨, 락토즈, 라놀린, 라놀린 알코올, 무수 라놀린, 레시틴, 실리카이트 마그네슘 알루미늄, 탄산 마그네슘염, 표준 탄산 마그네슘염, 무수 탄산 마그네슘염, 탄산 마

그네슘 수산화물, 수산화 마그네슘, 라우릴 설페이트 마그네슘, 산화 마그네슘, 실리케이트 마그네슘, 스테아레이트 마그네슘, 트리실리케이트 마그네슘, 무수 트리실리케이트 마그네슘, 말산, 엿기름, 말티톨, 말티톨 용액, 말토덱스트린, 말톨, 말토즈, 만니톨, 중간(medium) 사슬 트리글리세리드, 메글루민, 멘톨, 메틸셀룰로오스, 메틸 메트아크릴레이트, 메틸 올레이트, 메틸파라벤, 메틸파라벤 칼륨, 메틸파라벤 나트륨, 미소결정 셀룰로오스 및 카르복시메틸셀룰로오스 나트륨, 미네랄 오일, 가벼운 미네랄 오일, 미네랄 오일, 및 라놀린 알코올, 오일, 올리브 오일, 모노에탄올아민, 몬트모리로나이트, 옥틸 갈레이트, 올레산, 팔미트산, 파라핀, 팜콩 오일, 바세린, 바세린 및 라놀린 알코올, 약학적 글레이즈, 페놀, 액화 페놀, 페녹시에탄올, 페녹시프로판올, 페닐에틸 알코올, 페닐수은 아세트산염, 페닐수은 붕산염, 페닐수은 질산염, 폴아크리린, 폴아크리린 칼륨, 폴옥사머, 폴리텍스트로즈, 폴리에틸렌 글리콜, 폴리에틸렌 옥사이드, 폴리아크릴산염, 폴리에틸렌-폴리옥시프로필렌-블록 폴리머, 폴리메타크릴산염, 폴리옥시에틸렌 알킬 에테르, 폴리옥시에틸렌 카스터 오일 유도체, 폴리옥시에틸렌 솔비톨 지방산 에스테르, 폴리옥시에틸렌 스테아레이트, 폴리비닐 알코올, 폴리비닐피롤리돈, 알긴산 칼륨염, 벤조산 칼륨염, 중탄산 칼륨염, 중아황산 칼륨염, 염화 칼륨염, 구연산 칼륨염, 무수 구연산 칼륨염, 인산 수소 칼륨염, 메타중아황산칼륨염, 일염기성 인산 칼륨염, 프로피온산 칼륨염, 소르베이트 칼륨염, 포비돈, 프로판올, 프로피온산, 탄산 프로필렌염, 프로필렌 글리콜, 프로필렌 글리콜 알긴산염, 프로필 갈레이트, 프로필파라벤, 프로필파라벤 칼륨, 프로필파라벤 나트륨, 프로토아민 황산염, 평지씨 오일, 링거 용액, 사카린, 사카린 암모니움, 사카린 칼슘, 사카린 나트륨, 홍화 오일, 사포나이트, 혈청 단백질, 참깨 오일, 콜로이드성 실리카, 콜로이드성 이산화 실리콘, 알긴산 나트륨염, 아스코르브산 나트륨염, 벤조산 나트륨염, 중탄산 나트륨염, 중아황산 나트륨염, 염화나트륨, 무수 구연산 나트륨 염, 탈수 구연산 나트륨염, 염화 나트륨, 시클라메이트 나트륨, 에텐테이트 나트륨, 도데실 황산나트륨, 라우릴 황산 나트륨, 메타중아황산나트륨, 인산나트륨염, 이염기성 인산 나트륨염, 일염기성 인산 나트륨염, 삼염기성 무수 프로피온산 나트륨염, 프로피온산 나트륨염, 솔베이트 나트륨, 전분 글리콜레이트 나트륨, 스테아릴 푸마레이트 나트륨, 아황산나트륨, 소르브산, 소르비탄 에스테르 (소르비탄 지방성 에스테르), 솔비톨, 솔비톨 용액 70%, 대두 오일, 경랍 밀랍, 전분, 옥수수 전분, 감자 전분, 사전-젤라틴화된 전분, 살균가능 옥수수 전분, 스테아르산, 정제된 스테아르산, 스테아릴 알코올, 수크로오스, 슈가, 압착가능 슈가, 가루 설탕, 슈가 스페어, 전화당, 슈가탭(Sugartab), 썬셋 옐로우(Sunset Yellow) FCF, 합성 파라핀, 활석, 타르타르산, 타르트라진, 테트라플로오로에탄 (HFC-134a), 테오브로마 오일, 타메로살, 이산화 티타늄, 알파 토크페롤, 토크페릴 아세트산염, 알파 토크페릴 산 숙신산염, 베타-토크페롤, 델타-토크페롤, 감마-토크페롤, 트라가칸, 트리아세틴, 트리부틸 구연산염, 트리에탄올아민, 트리에틸 구연산염, 트리메틸-β-시클로덱스트린, 트리메틸테트라데실암모니움브롬화물, 트리스 완충액, 트리나트륨 에텐테이트, 바닐린, 타입 I 수소화된 식물성 오일, 물, 연수, 경수, 이산화탄소-없는 물, 발열원-없는 물, 주사용 물, 흡입용 살균수, 주사용 살균수, 관주용 살균수, 왁스, 음이온성 유상 왁스, 카르나우바 왁스, 양이온성 유상 왁스, 세틸 에스테르 왁스, 미소결정 왁스, 비-이온성 유상 왁스, 좌약 왁스, 화이트 왁스, 옐로우 왁스, 화이트 바세린, 라놀린, 산탄 검, 자이티를, 제인, 프로피온산 아연염, 아연염, 스테아레이트 아연염, 또는 *Handbook of Pharmaceutical Excipients, Third Edition, A. H. Kibbe (Pharmaceutical Press, London, UK, 2000)*(전문이 참고문헌에 통합됨)의 임의의 부형제. *Remington's Pharmaceutical Sciences, Sixteenth Edition, E. W. Martin (Mack Publishing Co., Easton, Pa., 1980)*(전문이 참고문헌에 통합됨)에는 약제학적으로 허용가능한 조성물을 제조하는데 이용되는 다양한 성분들과 이를 준비하기 위한 공지의 기술들이 설명되어 있다. 임의의 공지의 성분들이 약학 조성물과 양립할 수 없는 경우를 제외하고, 약학 조성물에 사용하는 것이 고려된다. 보충 활성 성분들도 조성물에 통합될 수 있다.

[0372] 여기에서 설명되는 약학 제제는 하기에서 설명되는 것과 같이 단기-작용, 신속-방출, 장기-작용 또는 지연-방출 형태로 기획될 수 있다. 약학 제제는 또한 즉각 방출, 제어 방출 또는 지연-방출용으로 조제될 수도 있다. 본 조성물은 또한 예를 들면, 미셀 또는 리포솜 또는 다른 포집형을 더 포함하거나, 장시간 보관 및/또는 운반 효과를 제공하기 위하여 연장된 방출형태로 투여될 수도 있다. 개시된 약학 제제는 임의의 섭생에 따라 투여될 수 있는데, 예를 들면, 매일(일일 1회, 일일 2회, 일일 3회, 일일 4회, 일일 5회, 일일 6회), 2일에 한번, 3일에 한번, 4일에 한번, 5일에 한번, 6일에 한번, 일주마다, 2주일에 한번, 3주일에 한번, 한달에 한번 또는 두달에 한번으로 투여될 수 있다.

[0373] 일부 구체예에서, 다음의 성분들이 임의의 농도로 약학 조성물에 존재할 수 있는데, 예를 들면, 적어도 A, 여기서 A의 농도는 0.0001% w/v, 0.001% w/v, 0.01% w/v, 0.1% w/v, 1% w/v, 2% w/v, 5% w/v, 10% w/v, 20% w/v, 30% w/v, 40% w/v, 50% w/v, 60% w/v, 70% w/v, 80% w/v, 또는 90% w/v이다. 일부 구체예에서, 다음의 성분들이 임의의 농도로 약학 조성물에 존재할 수 있는데, 예를 들면, 기껏해야 B, 여기서 B의 농도는 90% w/v, 80% w/v, 70% w/v, 60% w/v, 50% w/v, 40% w/v, 30% w/v, 20% w/v, 10% w/v, 5% w/v, 2% w/v, 1% w/v, 0.1% w/v,

0.001% w/v, 또는 0.0001%. 다른 구체예들에서, 다음의 성분들이 임의의 농도로 약학 조성물에 존재할 수 있는데, 예를 들면, 약 A 내지 약 B로 존재한다. 일부 구체예에서, A는 0.0001% 이며, B는 90% 이다.

[0374] 약학 조성물은 생리학적으로 적합한 pH를 가지도록 조제될 수 있다. 일부 구체예에서, 약학 조성물의 pH는 적어도 5, 적어도 5.5, 적어도 6, 적어도 6.5, 적어도 7, 적어도 7.5, 적어도 8, 적어도 8.5, 적어도 9, 적어도 9.5, 적어도 10, 또는 적어도 10.5, 그리고 최대 pH 11이 될 수 있다. 특정 구체예에서, 약학 조성물은 생리학적으로 적합한 pH를 가지도록 완충제를 포함할 수 있다. 완충제는 원하는 pH에서 완충작용을 할 수 있는 임의의 화합물 예를 들면, 인산염 완충액 (예를 들면, PBS), 트리에탄올아민, 트리스, 바이신(bicine), TAPS, 트리신, HEPES, TES, MOPS, PIPES, 카코딜레이트, MES, 및 기타가 될 수 있다. 특정 구체예에서, 완충액의 농도는 적어도 0.5 mM, 적어도 1 mM, 적어도 5 mM, 적어도 10 mM, 적어도 20 mM, 적어도 30 mM, 적어도 40 mM, 적어도 50 mM, 적어도 60 mM, 적어도 70 mM, 적어도 80 mM, 적어도 90 mM, 적어도 100 mM, 적어도 120 mM, 적어도 150 mM, 또는 적어도 200 mM이다. 일부 구체예에서, 완충액의 농도는 단지 300 mM (예를 들면, 많아야 200 mM, 많아야 100 mM, 많아야 90 mM, 많아야 80 mM, 많아야 70 mM, 많아야 60 mM, 많아야 50 mM, 많아야 40 mM, 많아야 30 mM, 많아야 20 mM, 많아야 10 mM, 많아야 5 mM, 많아야 1 mM)이다.

[0375] 한 구체예에서, 약학 조성물은 pH 7.0-8.5, 또는 6-9, 또는 7-9에서 1 mg/ml의 글루카곤 항진 유사체 및 10-50 mM 트리에탄올아민을 포함한다. 한 구체예에서, 약학 조성물은 pH 8.5에서 1 mg/ml 농도의 글루카곤 항진 유사체와 20 mM 트리에탄올아민을 포함한다.

[0376] 본 발명의 변형된 글루카곤 펩티드는 한 구체예에 따르면 키트의 일부로 제공될 수 있다. 한 구체예에서, 이를 필요로 하는 환자에게 글루카곤 항진제를 투여하기 위한 키트를 제공하는데, 여기서 키트는 수용성 용액내 임의의 글루카곤 펩티드를 포함한다. 이와 같은 키트에 포함되는 예시적인 글루카곤 펩티드는 다음으로 구성된 군으로부터 선택된 글루카곤 펩티드를 포함한다; 1) 글루카곤 펩티드는 SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11 또는 SEQ ID NO: 13 또는 SEQ ID NO: 33; 2) 글루카곤 융합 펩티드는 SEQ ID NO: 11 또는 SEQ ID NO: 13 또는 SEQ ID NO: 33의 글루카곤 항진 유사체, 및 글루카곤 펩티드의 아미노산 29에 링크된 SEQ ID NO: 20 (GPSSGAPPPS), SEQ ID NO: 21 (KRNRRNNIA) 또는 SEQ ID NO: 22 (KRNRR)의 아미노산 서열; 그리고 3) SEQ ID NO: 11 또는 SEQ ID NO: 13 또는 SEQ ID NO: 33의 폐결화된 글루카곤 펩티드는 아미노산 29에 링크된 SEQ ID NO: 20 (GPSSGAPPPS), SEQ ID NO: 21(KRNRRNNIA) 또는 SEQ ID NO: 22 (KRNRR)의 아미노산을 더 포함하며, 여기서 위치 16, 17, 21, 24 또는 29의 아미노산, C-말단 연장부, 또는 C-말단 아미노산에 공유적으로 결합된 PEG 사슬은 약 500 내지 40,000 Daltons의 분자량을 가진다. 한 구체예에서, 키트는 환자에게 글루카곤 조성물을 투여하기 위한 장치, 예를 들면, 주사 바늘, 펜 장치, 제트 주사기 또는 다른 바늘없는 주사기와 같은 장치들과 함께 제공된다. 키트는 대안으로 또는 추가로 하나 이상의 용기, 예를 들면, 바이알, 튜브, 병, 단일-챔버 또는 다중-챔버로 된 사전 충전된 주사기, 카트릿지, 주입 펌프(외부용 또는 삽입용), 제트 주사기, 사전-충전된 펜 장치 그리고 이와 유사한 것, 선택적으로 동결건조된 형태의 또는 수용액 형태의 글루카곤 펩티드를 포함한다. 바람직하게는, 키트는 또한 사용 지침서도 포함할 수 있다. 일부 구체예에서, 키트의 장치는 에어로졸 분재 장치가 되는데, 여기서 조성물은 에어로졸 장치내에 사전 포장된다. 또 다른 구체예에서, 키트는 주사기 및 바늘을 포함하며, 한 구체예에서, 멸균된 글루카곤 조성물은 주사기내에 사전 포장된다.

[0377] 본 발명의 화합물은 표준 합성 방법, 재조합 DNA 기술 또는 펩티드 및 융합 단백질을 준비하는 임의의 기타 방법에 의해 준비될 수 있다. 표준 재조합 DNA 기술에 의해 특정 비-자연적 아미노산이 발현되지 않을 수도 있지만, 이들을 준비하는 기술은 본 기술 분야에 공지되어 있다. 비-펩티드 부분을 포함하는 본 발명의 화합물은 이용되는 표준 펩티드 화학 반응에 추가하여 표준 유기 화학 반응에 의해 합성될 수 있다.

## [0378] 실시예

### [0379] 일반적인 합성 프로토콜:

[0380] 글루카곤 유사체는 변형된 Applied Biosystem 430 A 펩티드 합성기 상에서 HBTU-활성화된 "Fast Boc" 단일 결합을 이용하여 0.2mmole의 Boc Thr(OBzl)Pam 수지로부터 시작하여 합성된다. Boc 아미노산 및 HBTU는 Midwest Biotech (Fishers, IN)에서 구입하였다. 이용된 측쇄 보호기는 다음과 같다: Arg(Tos), Asn(Xan), Asp(OcHex), Cys(pMeBzl), His(Bom), Lys(2Cl-Z), Ser(OBzl), Thr(OBzl), Tyr(2Br-Z), 및 Trp(CHO). N-말단 His의 측쇄 보호기는 Boc이다.

[0381] 각 완성된 펩티드 수지는 20% 피페리딘 디메틸포름아미드 용액으로 처리하여 트립토판으로부터 포밀기를 제거한

다. 액상 플로오르화 수소 절단은 p-크레졸 및 디메틸 황화물 존재하에서 실행된다. HF 장치를 이용하여 (Penninsula Labs) 얼음위에서 1시간 동안 절단이 진행된다. HF의 증발 후, 잔기는 디에틸 에테르에 현탁시키고, 고형 물질은 여과시켰다. 각 펩티드는 30-70ml 수용성 아세트산으로 추출시키고, 희석된 용액 몇 방울은 HPLC [Beckman System Gold, 0.46x5cm Zorbax C8, 1ml/min, 45C, 214nm, A 완충액 =0.1%TFA, B=0.1%TFA/90% 아세토니트릴, 그라디언트 10% 내지 80% B/10min]로 분석되었다.

[0382] 정제는 FPLC상에서 2.2 x 25 cm Kromasil C18 컬럼을 통하여 실시되고, 214nm에서 UV 모니터링되며, 분취물은 5분간격으로 수거된다. 균질한 분취물을 복합시켜, 동결건조시키면 >95% 순도의 산물이 얻어진다. 정확한 분자량과 순도는 MALDI-질량 스펙트럼 분석을 통하여 확인되었다.

# [0383] 일반적인 폐길화 프로토콜: (Cys-멜레이미도)

[0384] 일반적으로 글루카곤 Cys 유사체는 인산 완충염(5-10mg/ml)에 용해되고, 0.0 1M 에틸렌디아민 테트라아세트산이 추가된다(전체 용적의 10-15%). 과량(2-배)의 멜레이미도 메톡시PEG 시약(Nektar)이 추가되고, 반응물은 실온에서 교반되고, HPLC를 이용하여 반응 과정을 모니터링한다. 8-24 시간 후에, 반응 혼합물은 산성화되고, 0.1%TFA/아세토니트릴 그라디언트를 이용하여 정제용 예비 역상 컬럼에 로딩된다. 적절한 분취물들이 복합되고, 동결건조시키면, 원하는 폐길화된 유사체가 수득된다.

# [0385] 실시예 1

## [0386] 글루카곤 Cys<sup>17</sup> (1-29) 및 모노Cys 유사체의 합성

[0387] 60ml 반응 용기내에 0.2mmole Boc Thr(OBzl) Pam 수지 (SynChem Inc)와 다음의 서열을 넣고, 변형된 Applied Biosystems 430A 펩티드 합성기에서 FastBoc HBTU-활성화된 단일 커플링을 이용하여 실행한다.

[0388] HSQGTFTSDYSKYLDSCRAQDFVQWLMNT(SEQ ID NO:27)

[0389] 다음의 측쇄 보호기들이 이용되었다: Arg(Tos), Asp(OcHex), Asn(Xan), Cys(pMeBzl), Glu(OcHex), His(Boc), Lys(2Cl-Z), Ser(Bzl), Thr(Bzl), Trp(CHO), 및 Tyr(Br-Z). 완성된 펩티드 수지는 20% 피페리딘/디메틸포름아미드로 처리하여 Trp 포르밀 보호를 제거하고, 그 다음 HF 반응 용기로 옮기고, 진공에서 건조시킨다. 1.0 ml p-크레졸 및 0.5 ml 디메틸 황화물은 자석 교반 막대와 함께 첨가된다. 용기에는 드라이아이스/메탄올 조에서 냉각되고, 제거되고, 약 10ml 액화 플로오르화 수소가 응축된 HF 장치(Penninsula Labs)가 연결되어 있다. 반응물은 1시간 동안 얼음조에서 교반되고, 그 다음 HF는 진공에서 제거되었다. 잔기는 에틸 에테르에서 현탁되고; 고체는 여과되었고, 에테르로 세척되었고, 펩티드는 50 ml 수용성 아세트산으로 추출되었다. 절단 추출물 작은 샘플로 분석용 HPLC를 실시하였다[0.46 x 5 cm Zorbax C8, 1 ml/min, 45C, 214nm, A 완충액 0.1% TFA, B 완충액 0.1% TFA/90% ACN, 그라디언트 10%B 내지 80% B/10 min.] 나머지 완충액은 2.2 x 25cm Kromasil C18 예비 역상 컬럼상에 로딩시키고, 그리고 아세토니트릴 그라디언트는 Pharmacia FPLC 시스템. 214nm(2.0A)에서 UV로 모니터링하는 동안 5min 분취물이 수득되었다. A=0.1% TFA, B=0.1% TFA/50% 아세토니트릴. 그라디언트 = 30% B 내지 100% B/450 min.

[0390] 가장 순수한 산물을 포함하는 분취물(48-52번)을 냉동 복합시키고, 동결건조시키면 30.1mg이 제공된다. 산물의 HPLC 분석에 따르면 >90% 의 순도가 설명되며, MALDI 질량 스펙트럼 분석에서는 원하는 질량 3429.7이 설명되었다. 글루카곤 Cys<sup>21</sup>, 글루카곤 Cys<sup>24</sup>, 및 글루카곤 Cys<sup>29</sup>이 유사하게 준비되었다.

# [0391] 실시예 2

## [0392] 글루카곤-Cex 및 기타 C-말단 연장된 유사체의 합성.

[0393] 285mg (0.2mmole) 메톡시벤즈하이드릴아민 수지 (Midwest Biotech)를 60ml 반응 용기에 넣고, 다음의 서열이 들어가면 FastBoc HBTU-활성화된 단일 커플링을 이용하여 변형된 Applied Biosystems 430A 펩티드 합성기에서 시작하였다.



[0394] HSQGTFTSDYSKYLSRRRAQDFVQWLMNTGPSSGAPPPS(SEQ ID NO:28)

[0395] 다음의 측쇄 보호기들이 이용되었다: Arg(Tos), Asp(OcHex), Asn(Xan), Cys(pMeBzl), Glu(OcHex), His(Boc), Lys(2Cl-Z), Ser(Bzl), Thr(Bzl), Trp(CHO), 및 Tyr(Br-Z). 완성된 펩티딜 수지는 20% 피페르딘/디메틸포름아미드로 처리하여 Trp 포르밀 보호를 제거하고, 그 다음 HF 반응 용기로 옮기고, 진공에서 건조시킨다. 1.0 ml p-크레졸 및 0.5 ml 디메틸 황화물은 자석 교반 막대와 함께 첨가된다. 용기에는 드라이아이스/메탄올 조에서 냉각되고, 제거되고, 약 10ml 액화 플로오르화 수소가 응축된 HF 장치(Penninsula Labs)가 연결되어 있다. 반응물은 1시간 동안 얼음조에서 교반되고, 그 다음 HF는 진공에서 제거되었다. 잔기는 에틸 에테르에서 현탁되고; 고체는 여과되었고, 에테르로 세척되었고, 펩티드는 50 ml 수용성 아세트산으로 추출되었다. 절단 추출물 작은 샘플로 분석용 HPLC를 실시하였다[0.46 x 5 cm Zorbax C8, 1 ml/min, 45°C, 214nm, A 완충액 0.1% TFA, B 완충액 0.1% TFA/90% ACN, 그라디언트 10% B 내지 80% B/10 min.] 나머지 완충액은 2.2 x 25cm Kromasil C18 예비역상 컬럼상에 로딩시키고, 그리고 아세토니트릴 그라디언트는 Pharmacia FPLC 시스템. 214nm(2.0A)에서 UV로 모니터링하는 동안 5min 분취물이 수득되었다. A=0.1% TFA, B=0.1% TFA/50% 아세토니트릴. 그라디언트 = 30%B 내지 100%B/450 min. 가장 순수한 산물을 포함하는 분취물(58-65번)을 냉동 복합시키고, 동결건조시키면 198.1mg이 제공된다.

[0396] 산물의 HPLC 분석에 따르면 95% 이상의 순도가 설명되며, MALDI 질량 스펙트럼 분석에서는 원하는 질량 4316.7이 설명되었다. 옥시토모듈린 및 옥시토모듈린-KRNR은 적절하게 로드된 PAM-수지를 이용하여 C-말단 카르복실산으로 유사하게 준비되었다.

### [0397] 실시예 3

[0398] 글루카곤 Cys<sup>17</sup> Mal-PEG-5K

[0399] 15.1 mg의 글루카곤 Cys<sup>17</sup>(1-29) 및 27.3mg 메톡시 폴리(에틸렌글리콜) 말레이미드 avg. M.W.5000 (mPEG-Mal-5000, Nektar Therapeutics)은 3.5ml 인산염 완충액된 염(PBS)에 용해되었고, 0.5ml 0.01 M 에틸렌디아민 테트라아세트산 (EDTA)이 첨가되었다. 반응물은 실온에서 교반되었고, 반응의 진행은 HPLC 분석 [0.46 x 5 cm Zorbax C8, 1ml/min, 45°C, 214nm (0.5A), A=0.1 % TFA, B=0.1% TFA/90% ACN, 그라디언트=10% B 내지 80% B/10min.]으로 모니터링되었다. 5 시간후, 반응 혼합물은 2.2 x 25 cm Kromasil C18 예비역상 컬럼 상에 로딩되었다. 아세토니트릴 그라디언트는 Pharmacia FPLC상에서 진행되고, 214nm에서 UV 모니터링되면서, 5분 간격 분취물이 수거되었다. A=0.1% TFA, B=0.1 % TFA/50% 아세토니트릴, 그라디언트= 30% B 내지 100% B/450 min. 산물에 대응되는 분취물이 복합되었고, 냉동되고, 동결건조되어 25.9 mg가 수득되었다.

[0400] 이 산물은 HPLC [0.46 x 5 cm Zorbax C8, 1 ml/min, 45°C, 214nm (0.5A), A=0.1% TFA, B=0.1% TFA/90% ACN, 그라디언트 10% B 내지 80% B/10min.]으로 분석되었고, 순도는 약 90% 였다. MALDI (matrix assisted laser desorption ionization) 질량 스펙트럼 분석에 따르면, 광역의 질량 범위(전형적인 PEG 유도체)는 8700 내지 9500 이었다. 이는 출발 글루카곤 펩티드 (3429)의 5,000 a.m.u에 약간 추가되는 것이다.

### [0401] 실시예 4

[0402] 글루카곤 Cys<sup>21</sup> Mal-PEG-5K

[0403] 21.6mg의 글루카곤 Cys<sup>21</sup>(1-29)과 24mg mPEG-MAL-5000 (Nektar Therapeutics)는 3.5ml 인산염 완충된 염(PBS)에 용해되었고, 0.5 ml 0.01M 에틸렌 디아민 테트라아세트산 (EDTA)이 추가되었다. 반응물은 실온에서 교반되었다. 2시간 후, 12.7 mg의 mPEG-MAL-5000가 추가되었다. 8 hrs후, 반응 혼합물은 2.2 x 25cm Vydac C18 예비역상컬럼에 로드되었고, 아세토니트릴 그라디언트는 Pharmacia FPLC 상에 분당 4 ml/min, 5분 간격 분취물이 수거되었다. A=0.1 %TFA, B=0.1 % TFA/50% ACN. 그라디언트= 20% 내지 80%B/450min.

[0404] 산물에 대응되는 분취물이 복합되었고, 냉동되고, 동결건조되어 34 mg가 수득되었다. 이 산물은 HPLC [0.46 x 5 cm Zorbax C8, 1 ml/min, 45°C, 214nm (0.5A), A=0.1% TFA, B=0.1% TFA/90% ACN, 그라디언트 10% B 내지 80% B/10min.]에서 출발 글루카곤 펩티드와 상이한 균질성 산물이 나타났다. MALDI (matrix assisted laser

desorption ionization) 질량 스펙트럼 분석에 따르면, 광역의 질량 범위(전형적인 PEG 유도체)는 8700 내지 9500 였다. 이는 출발 글루카곤 펩티드 (3470)의 5,000 a.m.u에 약간 추가되는 것이다.

[0405] 실시예 5

[0406] 글루카곤 Cys<sup>24</sup> Mal-PEG-5K

[0407] 20.1mg 글루카곤 C<sup>24</sup>(1-29) 및 39.5mg mPEG-Mal-5000 (Nektar Therapeutics)는 교반시키면서 3.5ml PBS에 용해시키고, 0.5 ml 0.01 M EDTA가 추가되었다. 반응물은 실온에서 7시간 동안 교반되었고, 그 다음 40 mg의 mPEG-Mal-5000이 추가되었다. 약 15시간 후, 반응 혼합물은 2.2 x 25 cm Vydac C18 예비역상컬럼에 얹고, 아세토니트릴 그라디언트는 Pharmacia FPLC에서 진행되었다. 5 min. 분취물은 214nm (2.0A)에서 UV 모니터링하면서 수거되었다. A 완충액 = 0.1% TFA, B 완충액 = 0.1% TFA/50% ACN, 그라디언트 = 30% B 내지 100% B/450 min. 산물에 대응되는 분취물이 복합되었고, 냉동되고, 동결건조되어 45.8 mg가 수득되었다. MALDI (matrix assisted laser desorption ionization) 질량 스펙트럼 분석에 따르면, 전형적인 PEG 브로드 시그널(9175.2에서 최대)이 나타났고, 이는 출발 글루카곤 펩티드 C<sup>24</sup>(3457.8)의 5,000 a.m.u이다.

[0408] 실시예 6

[0409] 글루카곤 Cys<sup>24</sup> Mal-PEG-20K

[0410] 25.7mg 글루카곤 C<sup>24</sup>(1-29) 및 40.7mg mPEG-Mal-5000 (Nektar Therapeutics)는 교반시키면서 3.5ml PBS에 용해시키고, 0.5 ml 0.01 M EDTA가 추가되었다. 6시간 후에 생성물에 대한 출발 물질의 비율이 약 60:40이 되었고 (HPLC에 의해 측정됨), 그 다음 25.1 mg의 mPEG-Mal-20K가 추가되었고, 추가 16시간 교반되었다. 산물 비율이 상당히 개선되지 않았고, 반응 혼합물은 2.2 x 25 cm Vydac C18 예비역상컬럼에 얹고, Pharmacia FPLC 상에서 450분에 걸쳐 30% B 내지 100% B의 그라디언트를 이용하여 정제되었다. A 완충액 = 0.1% TFA, B 완충액 = 0.1% TFA/50% ACN, 유속 분당 4ml. 214nm에서 UV 모니터링되면서, 5분 간격 분취물이 수거되었다. 균질한 산물을 포함하는 분취물이 복합되었고, 냉동되고, 동결건조되어 25.7 mg가 수득되었다. 분석용 HPLC에 의해 결정된 순도는 ~90%였다. MALDI (matrix assisted laser desorption ionization) 질량 스펙트럼 분석에 따르면, 23,000 내지 27,000의 광범위한 피크가 나타났고, 이는 출발 글루카곤 펩티드 C<sup>24</sup>(3457.8)의 20,000 a.m.u이다.

[0411] 실시예 7

[0412] 글루카곤 Cys<sup>29</sup> Mal-PEG-5K

[0413] 20.0mg 글루카곤 C<sup>24</sup>(1-29) 및 24.7mg mPEG-Mal-5000 (Nektar Therapeutics)는 교반시키면서 3.5ml PBS에 용해시키고, 0.5 ml 0.01 M EDTA가 추가되었다. 4시간 후 15.6 mg의 mPEG-Mal-20K가 추가되어 반응을 완성시켰다. 8시간 후, 반응 혼합물은 2.2 x 25 cm Vydac C18 예비역상컬럼에 얹고, 아세토니트릴 그라디언트는 Pharmacia FPLC 시스템에서 진행되며, 214nm(2.0A)에서 UV 모니터링되면서, 5분 간격 분취물이 수거되었다. A=0.1% TFA, B=0.1% TFA/50% ACN. 분취물(75-97)이 복합되었고, 냉동되고, 동결건조되어 HPLC상의 회수된 출발 물질(분취물 58-63)과는 상이한 40.0 mg의 산물이 수득되었다. 분석용 HPLC[0.46 x 5 cm Zorbax C8, 1 ml/min, 45C, 214nm (0.5A), A=0.1% TFA, B=0.1% TFA/90% ACN, 그라디언트=10% B 내지 80% B/10min.]에 의해 결정된 순도는 95%이상이었다. MALDI (matrix assisted laser desorption ionization) 질량 스펙트럼 분석에 따르면, 8,000 내지 10,000의 질량 범위의 PEG 성분의 존재(최대 9025.3)가 나타났고, 이는 출발 글루카곤 펩티드 (3484.8) 보다 큰 5,540 a.m.u이다.

[0414] 실시예 8

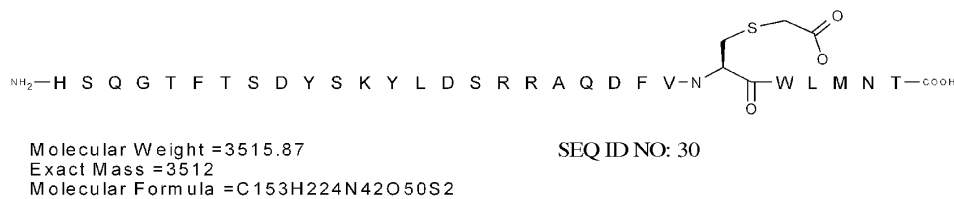
[0415] 글루카곤 Cys<sup>24</sup> (2-부티로락톤)

[0416] 24.7mg의 글루카곤 Cys<sup>24</sup>(1-29)에 4ml 0.05M 중탄산암모늄/50%아세트오니트릴 및 5.5  $\mu$ l의 2-브로모-4-하이드록시부티르산- $\gamma$ -락톤 (100 $\mu$ l/900 $\mu$ l 아세트오니트릴) 용액이 첨가되었다. 실온에서 3시간 교반 후에, 추가 105 $\mu$ l 락톤 용액이 반응 혼합물에 첨가되었고, 추가로 15시간 교반되었다. 반응 혼합물은 10% 수용성 아세트산으로 10ml로 희석되었고, 2.2 x 25 cm Kromasil C18 예비역상컬럼에 적하되었다. 아세트오니트릴 그라디언트 (20% B 내지 80% B/450min)가 Pharmacia FPLC 상에서 진행되었고, 그 동안 214nm(2.0A)에서 UV 모니터되면서, 5분 간격 분취물이 수거되었다. 유속 =4ml/min, A=0.1% TFA, B=0.1% TFA/50% ACN. 분취물 74-77이 냉동되고, 동결건조되어 7.5 mg이 수득되었다. HPLC 분석에서 순도는 95% 였고, MALDI 질량 스펙트럼 분석에서는 출발 물질보다 큰 3540.7 질량 또는 84 질량 단위가 나타났다. 이 결과는 단일 부티로락톤 모이어티 첨가와 일치하였다.

# [0417] 실시예 9

## [0418] 글루카곤 Cys<sup>24</sup> (S-카르복시메틸)

[0419] 18.1mg의 글루카곤 Cys<sup>21</sup>(1-29)이 9.4ml 인산염 완충된 염 (pH=9.2)에 용해되었고, 0.6 ml 0.01M 브로모아세트산 용액(1.3mg/ml 아세트오니트릴)이 추가되었다. 반응물은 실온에서 교반되었고, 반응 진행은 분석용 HPLC로 이어졌다. 1시간 후, 0.1ml 브로모아세트산 용액이 추가되었다. 반응물은 추가 60분간 교반되었고, 수용성 아세트산으로 산성화되었고, 정제를 위하여 2.2 x 25cm Kromasil C18 예비역상컬럼에 로드되었다. 아세트오니트릴 그라디언트는 Pharmacia FPLC 상에 분당 4 ml/min로 진행되었고, 214nm(2.0A)에서 UV 모니터되면서 5분 간격 분취물이 수거되었다. A=0.1 %TFA, B=0.1 % TFA/50% ACN. 분취물 26-29가 냉동되고, 동결건조되어 몇 mg의 산물이 수득되었다. 분석용 HPLC에서 순도는 90%로 나왔으며, MALDI 질량 스펙트럼 분석에 따르면, 원하는 산물에 대한 분자량이 3515임을 확인하였다.

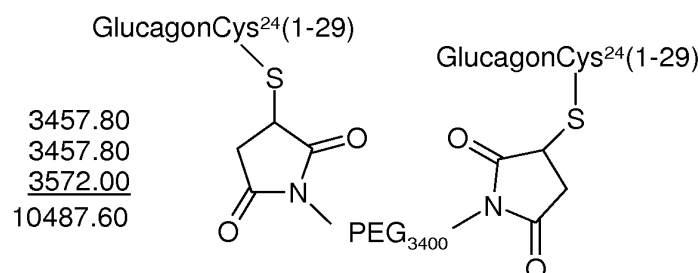


[0420]

# [0421] 실시예 10

## [0422] 글루카곤 Cys<sup>24</sup> 멜레이미도, PEG-3.4K-이량체

[0423] 16mg 글루카곤 Cys<sup>24</sup> 및 1.02mg Mal-PEG-Mal-3400, 폴리(에틸렌글리콜)-비스-말레이미드 avg. M. W. 3400, (Nektar Therapeutics)는 3.5ml 인산염 완충된 염 및 0.5ml 0.01M EDTA 에 용해시키고, 반응물은 실온에서 교반되었다. 16시간 후에, 추가 16mg의 글루카곤 Cys<sup>24</sup>이 추가되었고, 교반은 지속되었다. 약 40시간 후, Pharmacia PepRPC 16/10 컬럼에 로드되었고, 아세트오니트릴 그라디언트는 Pharmacia FPLC 상에 진행되었고, 214nm(2.0A)에서 UV 모니터되면서 2분 간격 분취물이 수거되었다. 유속 분당 2ml. A=0.1 %TFA, B=0.1 % TFA/50% ACN. 분취물 69-74가 냉동되고, 동결건조되어 10.4 mg의 산물이 수득되었다. 분석용 HPLC에서 순도는 90%로 나왔으며, MALDI 질량 스펙트럼 분석에 따르면, 9,500-11,000 범위의 성분이 나타났는데, 이는 원하는 이량체와 일치된다.



[0424]



[0425] 실시예 11

[0426] 글루카곤 용해도 분석:

[0427] 글루카곤(또는 유사체)의 용액(1mg/ml 또는 3mg/ml)은 0.01N HCl에서 준비된다. 100 $\mu$ l 원액은 1ml로 희석되고 (0.01N HCl 이용), UV 흡수도(276nm)가 결정된다. 나머지 원액의 pH는 pH7로 조정된다(200-250 $\mu$ l 0.1M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (pH 9.2)이용). 용액은 40℃에서 하룻밤 세워두고, 그 다음 원심분리시켰다. 100 $\mu$ l 상청액은 1ml로 희석되고 (0.01N HCl 이용), UV 흡수도(276nm)가 결정된다(이중측정).

[0428] 초기 흡수도 판독은 용적 증가에 대해 보정되었고, 그 다음 계산식을 이용하여 용해도를 결정한다:

[0429] 최종 A 흡수도/초기 A 흡수도  $\times$  100 = 용해도(%)

[0430] 표 1에 결과를 나타내었는데, 여기서 글루카곤-Cex는 와일드 타입 글루카곤 (SEQ ID NO: 1)과 카르복시 말단에 SEQ ID NO: 20의 추가를 포함하고, 그리고 글루카곤-Cex R<sup>12</sup>는 위치 12의 Lys이 Arg 으로 치환되며, SEQ ID NO: 20의 펩티드가 카르복시 말단에 추가된 SEQ ID NO: 1을 나타낸다.

### 표 1

[0431] 글루카곤 유사체에 대한 용해도 데이터

유사체	용해도%
글루카곤	16
글루카곤-Cex, R12	104
글루카곤-Cex	87
옥신토모듈린	104
글루카곤, Cys17PEG5K	94
글루카곤, Cys21PEG5K	105
글루카곤, Cys24PEG5K	133

[0432] 글루카곤 항진 유사체, D28, E29, E30, E15D28, D28E30, D28E29의 용해도는 표 1에 열거된 화합물에 이용된 동일한 분석을 이용하여 조사되었다. 데이터(도 3 & 4에 나타냄)에서 5.5 및 7.0의 pH에서 고유 글루카곤과 비교하여 D28, E29, E30, E15D28, D28E30, D28E29 유사체의 용해도가 우수하다는 것이 설명된다. 도 3에 나타낸 데이터는 25℃에서 60 시간 후에 측정된 것이며, 도 4의 데이터는 25℃에서 24시간 후에 그리고 4℃에서 24시간 후에 측정된 용해도를 나타낸다. 도 5는 글루카곤 유사체 D28, D28E30 및 E15D28의 최대 용해도에 대한 데이터를 나타낸다.

[0433] 실시예 12

[0434] 글루카곤 수용체 결합 분석

[0435] 글루카곤 수용체에 대한 펩티드의 친화성은 섬광 근접성 분석 기술(scintillation proximity assay technology)을 이용하여 경쟁 결합 분석에서 측정되었다. 96 웰 화이트/투명 바닥 플레이트(Corning Inc., Acton, MA)에서 신틸레이션 섬광 근접도 분석 완충액 (0.05M 트리스-HCl, pH 7.5, 0.15 M NaCl, 0.1% w/v 소 혈청 알부민)으로 펩티드의 연속 3배 희석액을 0.05 nM (3-[<sup>125</sup>I]-요오드티로실) Tyr10 글루카곤(Amersham Biosciences, Piscataway, NJ), 1-6 $\mu$ g/웰, 인간 글루카곤 수용체를 과다 발현시키는 세포로부터 준비한 혈장 막, 그리고 1 mg/well 폴리에틸렌이민-처리된 밀 맥아 어글루티닌 타입 A 섬광 근접도 분석 비드(Amersham Biosciences, Piscataway, NJ)와 혼합시켰다. 회전 교반기 상에서 800rpm에서 5분간 교반후, 플레이트는 실온에서 12시간 항온처리되고, 그 다음 MicroBeta1450 액체 섬광 카운터(Perkin-Elmer, Wellesley, MA)로 판독되었다. 비-특이적으로 결합된(NSB) 방사능활성은 테스트 샘플의 최대 농도보다 4배 높은 “콜드” 고유 리간드를 사용하여 웰에서 측정되었고, 전체 결합된 방사능 활성은 경쟁물질 없는 웰에서 탐지되었다. 특이적 결합 비율은 다음과 같이 계산되었다:

[0436] 특이적 결합  $\% = (\text{결합-NSB}) / (\text{전체 결합-NSB}) \times 100$

[0437] IC50 값은 Origin software (OriginLab, Northampton, MA)를 이용하여 결정되었다.

### [0438] 실시예 13

#### [0439] 기능 분석- cAMP 합성

[0440] cAMP를 유도하는 글루카곤 유사체의 능력은 반딧불이 루시페라제-기초한 리포터 분석에서 측정되었다. 수용체 (글루카곤 수용체, GLP-1 수용체 또는 GIP 수용체)와 cAMP-반응성 요소에 링크된 루시페라제 유전자로 공동 형질감염된 HEK293 세포는 0.25% 소 성장 혈청(HyClone, Logan, UT)이 보충된 DMEM(*Invitrogen, Carlsbad, CA*)에서 16시간 배양하여 혈청이 제거되었고, 그 다음 37°C, 5% CO<sub>2</sub>, 96 웰 폴리-D-리신-피복된 "Biocoat" 플레이트 (*BD Biosciences, San Jose, CA*)에서 글루카곤, GLP-1 또는 신규한 글루카곤 유사체 중 하나의 연속 희석액과 함께 항온처리되었다. 항온처리 종료 시점에 100 $\mu$ l의 LucLite 발광 기질 시약(*Perkin-Elmer, Wellesley, MA*) 이 각 웰이 추가되었다. 플레이트를 간단하게 흔들고, 10분간 어두운 곳에서 항온처리한 후, 출력되는 광은 MicroBeta-1450 액체 섬광 카운터에서 측정되었다(*Perkin-Elmer, Wellesley, MA*). 발광 출력은 루시페라제 리포터 유전자의 활성화를 나타내고, 이는 수용체의 활성화의 척도가 된다. Origin software (*OriginLab, Northampton, MA.*)를 이용하여 EC<sub>50</sub>이 계산되었다. 결과는 표 2와 3에 나타낸다. EC50은 표시된 수용체에서 펩티드의 최대 활성화 반응의 50%를 나타내는 펩티드의 농도를 말한다. 상대적으로 더 낮은 EC50은 그 수용체에 서 펩티드가 상대적으로 더 강력하며, EC50이 더 높은 경우, 펩티드는 효능이 덜하다는 것을 말한다.

표 2

[0441] C-말단 연장부를 가진 글루카곤 유사체에 의한 cAMP 유도

펩티드	cAMP 유도			
	글루카곤 수용체		GLP-1 수용체	
	EC <sub>50</sub> , nM	N*	EC <sub>50</sub> , nM	N
글루카곤	0.22±0.09	14	3.85±1.64	10
GLP-1	2214.00±182.43	2	0.04±0.01	14
글루카곤 Cex	0.25±0.15	6	2.75±2.03	7
옥신토모듈린	3.25±1.65	5	2.53±1.74	5
옥신토모듈린 KRNR	2.77±1.74	4	3.21±0.49	2
글루카곤 R12	0.41±0.17	6	0.48±0.11	5
글루카곤 R12 Cex	0.35±0.23	10	1.25±0.63	10
글루카곤 R12 K20	0.84±0.40	5	0.82±0.49	5
글루카곤 R12 K24	1.00±0.39	4	1.25±0.97	5
글루카곤 R12 K29	0.81±0.49	5	0.41±0.24	6
글루카곤 아미드	0.26±0.15	3	1.90±0.35	2
옥신토모듈린 C24	2.54±0.63	2	5.27±0.26	2
옥신토모듈린 C24 PEG 20K	0.97±0.04	1	1.29±0.11	1

[0442] \* 실험 수

표 3

[0443] 폐길화된 글루카곤 유사체에 의한 cAMP 유도

펩티드	cAMP 유도			
	글루카곤 수용체		GLP-1 수용체	
	EC <sub>50</sub> , nM	N*	EC <sub>50</sub> , nM	N
글루카곤	0.33±0.23	18	12.71±3.74	2

글루카곤 C17 PEG5K	$0.82 \pm 0.15$	4	$55.86 \pm 1.13$	2
글루카곤 C21 PEG5K	$0.37 \pm 0.16$	6	$11.52 \pm 3.68$	2
글루카곤 C24 PEG5K	$0.22 \pm 0.10$	12	$13.65 \pm 2.95$	4
글루카곤 C29 PEG5K	$0.96 \pm 0.07$	2	$12.71 \pm 3.74$	2
글루카곤 C24 PEG20K	$0.08 \pm 0.05$	3	측정안됨	
글루카곤 C24 이량체	$0.10 \pm 0.05$	3	측정안됨	
GLP-1	>1000		$0.05 \pm 0.02$	4

[0444] \* 실험 수

[0445] 추가 글루카곤 유사체에 대한 데이터는 도 6-9와 표 4에 나타낸다.

#### 표 4

[0446] 글루카곤 수용체를 과다발현시키는 세포에서 관찰된 EC<sub>50</sub>(nM)

	테스트 1	테스트 2	테스트 3	테스트 4
글루카곤 표준	0.12	0.04	0.05	0.11
K29	0.35			0.22
K30	0.22	0.06		
K29, K30	0.89			
K30, K31		0.12		
D28		0.05		0.17
E28			0.14	
E29		0.05	0.04	
E30		0.04		
D28, E29			0.03	
D28, E30			0.05	
D28, E15			0.15	

[0447] 도 11는 글루카곤 및 GLP-1 수용체에서 변형(T16,A20,E21,A24,N1e27,D28, 및 E29 (SEQ ID NO: 56))을 가지는 글루카곤 유사체의 cAMP 유도에 대한 데이터를 나타낸다. 데이터에서 다중 변형(7개 치환)을 가진 글루카곤 유사체는 실질적인 글루카곤 활성을 보유한다는 것을 보여준다.

[0448] 실시예 14

[0449] 글루카곤 Cys-말레이미도 PEG 유사체의 안정성 분석

[0450] 각 글루카곤 유사체는 물 또는 PBS에 용해되었고, 초기 HPLC 분석이 실시되었다. pH (4, 5, 6, 7)를 조정 한 후, 샘플은 37℃에서 명시된 시간동안 항온처리되고, HPLC를 이용하여 펩티드 온전성을 다시 분석하였다. 관심 대상 특정 펩티드의 농도를 측정하였고, 고유한 상태로 남아있는 비율은 초기 분석을 기초하여 계산되었다. 글루카곤 Cys<sup>21</sup>-말레이미도PEG<sub>5K</sub>의 결과는 도 1과 2에 나타낸다.

[0451] 실시예 15

[0452] 글루카곤 락탐의 합성

[0453] 285 mg (0.2 mmole)의 메톡시벤즈하이드릴아민 수지 (Midwest Biotech)가 60 mL 반응 용기에 첨가되고, 다음의 서열은 변형된 Applied Biosystems 430A 펩티드 합성기상에서 Boc DEPBT-활성화된 단일 커플링을 이용하여 어셈블리되었다.

[0454] HSQGTFTSDYSKYLDERRAQDFVQWLMNT-NH<sub>2</sub> (12-16 락탐: SEQ ID NO:12)

- [0455] 다음의 측쇄 보호기들이 이용되었다: Arg(Tos), Asp(OcHx), Asn(Xan), Glu(OFm), His(BOM), Lys(Fmoc), Ser(Bzl), Thr(Bzl), Trp(CHO), Tyr(Br-Z). 락탐이 위치 16-20, 20-24, 또는 24-28으로부터 만들어진다면, 위치 12에 있는 고유 Lys를 보호하기 위하여 Lys(Cl-Z)가 이용되었다. 완성된 펩티드 수지는 20% 피페르딘/디메틸포름아미드로 회전시키면서 1시간 동안 처리하여 Trp 포르밀 기 및 Lys12 및 Glu16으로부터 Fmoc 및 OFm 보호를 제거하였다. 양성 Ninhid린 테스트를 이용하여 제거가 완료됨이 확인되면, 수지는 디메틸포름아미드로 세척하고, 이어서 디클로로메탄으로 세척하고, 다시 디메틸포름아미드로 세척하였다. 수지는 520 mg (1 mmole)의 벤조트리아졸-1-일-옥시-트리스-피롤리디노-포스포니움 헥사플로오르포스페이트(PyBOP/디메틸포름아미드 및 디이소프로필에틸아민 (DIEA)으로 처리하였다. 반응은 8-10 시간 동안 진행되며, 고리화는 음성 Ninhid린 반응으로 확인되었다. 수지는 디메틸포름아미드로 세척되고, 이어서 디클로로메탄으로 세척된 후, 10분간 트리플로로아세트산으로 처리되었다. Boc 기의 제거는 양성 Ninhid린 반응으로 확인되었다. 수지는 디메틸포름아미드 및 디클로로메탄으로 처리하고, 플로오르화 수소산(HF) 반응 용기로 이동시키기 전에 건조된다. 500 $\mu$ l p-크레졸은 자석 교반 막대와 함께 첨가된다. 용기에는 드라이아이스/메탄올 조에서 냉각되고, 제거되고, 약 10ml 액화플로오르화 수소가 응축된 HF 장치(Penninsula Labs)가 연결되어 있다. 반응물은 1시간 동안 얼음조에서 교반되고, 그 다음 HF는 진공에서 제거되었다. 잔기는 에틸 에테르에서 현탁되고; 고체는 여과되었고, 에테르로 세척되었고, 펩티드는 150 ml 20% 아세토니트릴/1% 아세트산으로 용해되었다.
- [0456] 정제안된 용해된 펩티드의 분석용 HPLC는 다음 조건에서 실시되었다[4.6 X 30 mm Xterra C8, 1.50 mL/min, 220 nm, A 완충액 0.1% TF A/10% ACN, B 완충액 0.1 % TF A/100% ACN, 그라디언트 5-95% B/15 minutes]. 추출물은 두배의 물로 희석되었고, 2.2 x 25cm Vydac C4 예비역상 컬럼상에 로딩시키고, Waters HPLC 시스템 (A 완충액 0.1% TFA/10% ACN, B 완충액 0.1% TFA/10% CAN, 그라디언트 0-100% B/120 minutes, 유속 15.00 ml/min) 상에서 아세토니트릴 그라디언트로 용리되었다. 정제된 펩티드의 HPLC 분석에서 순도는 95% 이상이었고, 전자분무 이온화 질량 스펙트럼 분석으로 12-16 락탐의 경우 3506 Da의 질량이 확인되었다. 위치 16-20, 20-24 및 24-28로부터 형성된 락탐의 경우도 유사하게 준비되었다.
- [0457] **실시예 16**
- [0458] **예시적인 펩티드**
- [0459] 다음의 서열을 가진 글루카곤 펩티드도 여기에서 설명된 것과 같이 작제되었다:
- [0460] XSQGTFTSDYSKYLDERRAKDFVC\*WLMNT (16-20 위치에 락탐) (SEQ ID NO: 40)
- [0461] 여기서 X=DMIA, C\*는 PEG에 링크된 Cys이다.
- [0462] XSQGTFTSDYSKYLDERRAKDFVWLMNC\* (16-20 위치에 락탐) (SEQ ID NO: 41)
- [0463] 여기서, X=DMIA, Q24A, C\*는 PEG에 링크된 Cys이다.
- [0464] X1SQGTFTSDYSKYLDERRAKDFVC\*WLX2NT (16-20 위치에 락탐) (SEQ ID NO:42)
- [0465] 여기서, X1=DMIA, X2 는 N1e 또는 Leu이며, C\*는 PEG에 링크된 Cys이다.
- [0466] X1SQGTFTSDYSKYLDERRAKDFVWLX2NC\* (16-20 위치에 락탐) (SEQ ID NO:43)
- [0467] 여기서, X1=DMIA, Q24A, N1e 또는 Leu이며, C\*는 PEG에 링크된 Cys이다.
- [0468] SEQ ID NO:1에서 다음의 변형을 가진 글루카곤 펩티드는 여기에서 설명된 것과 같이 작제되었다:
- [0469] A20,A24,N1e27,D28 (SEQ ID NO: 44)
- [0470] A20,A24,N1e27,D28,E29 (SEQ ID NO: 45)
- [0471] A20,A24,N1e27,D28,E30 (SEQ ID NO: 46)
- [0472] A20,A24,N1e27,E28,E29 (SEQ ID NO: 47)
- [0473] A20,A24,N1e27,E28,E30 (SEQ ID NO: 48)
- [0474] A20,A24,N1e27,E29,E30 (SEQ ID NO: 49)

- [0475] A20,E21,A24,N1e27,D28 (SEQ ID NO: 50)
- [0476] A20,E21,A24,N1e27,D28,E29 (SEQ ID NO: 51)
- [0477] A20,E21,A24,N1e27,D28,E30 (SEQ ID NO: 52)
- [0478] A20,E21,A24,N1e27,E28,E29 (SEQ ID NO: 53)
- [0479] A20,E21,A24,N1e27,E28,E30 (SEQ ID NO: 54)
- [0480] A20,E21,A24,N1e27,E29,E30 (SEQ ID NO: 55).
- [0481] 대안으로, 이들 펩티드중 임의의 것은 A20 및/또는 A24 치환 대신 AIB20 및/또는 AIB24을 포함할 수 있다. 이들 펩티드 중 임의의 것은 T16 또는 AIB 16 아미노산 치환을 추가로 포함할 수 있다. 예를 들면, T16,A20,E21,A24,N1e27,D28,E29 (SEQ ID NO: 56)가 작제되었다.
- [0482] SEQ ID NO:1에서 다음의 변형을 가진 글루카곤 펩티드는 여기에서 설명된 것과 같이 작제되었다: DMIA1, E16, K20-글루카곤-COOH (C24-PEG, E16 내지 K20 락탐). 이의 서열은 하기에서 제시된 것과 같다: DMIA-Ser-Gln-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Lys-Tyr-Leu-Asp-Ser-Arg-Arg- Ala-Gln-Asp-Phe-Val-Cys\*-Trp-Leu-Met-Asn-Thr-COOH,
- [0483] 여기서, 위치 24의 Cys\*는 약 40,000 dalton 분자량의 PEG에 부착된 Cys이며, 위치 16의 Glu 와 위치 20의 Lys 는 락탐 다리를 통하여 링크되어 있다(SEQ ID NO: 40). 이 펩티드는 실시예 13에 따라 글루카곤 및 GLP-1 수용체에서 활성이 테스트되었다. 이 펩티드는 고유 글루카곤 능력의 27.7%를 그리고 고유 GLP-1의 능력의 1.1%를 나타내었다.
- [0484] **실시예 17**
- [0485] **아실화된 및/또는 폐길화된 펩티드의 준비**
- [0486] 아실화된 및/또는 폐길화된 펩티드는 다음과 같이 준비된다. 펩티드는 CS Bio 4886 펩티드 합성기 또는 Applied Biosystems 430A 펩티드 합성기를 이용하여 고정 기질 수지상에서 합성된다. *In situ* 중화 화학은 *Schnolzer et al., Int.J. Peptide Protein Res. 40: 180-193 (1992)*에서 설명된 것과 같이 이용된다. 아실화된 펩티드의 경우, 아실화(예를 들면, 위치 10)되는 표적 아미노산 잔기는 N  $\epsilon$ -Fmoc 리신 잔기로 치환된다. 완전한 N-말단 BOC 보호된 펩티드를 20% 피페르딘/DMF로 30분간 처리하면 Fmoc/포르밀기가 제거된다. 자유  $\epsilon$ -아미노 Lys 잔기에 커플링은 10배 과량 물 농도의 Fmoc-보호된 스페이스 아미노산 (ex. Fmoc-(N-BOC)-트립토판-OH) 또는 아실 사슬 (ex. C17-COOH) 및 DMF/DIEA내에 PyBOP 또는 DEPBT 커플링 시약을 이용하여 수득된다. 연속하여 스페이스 아미노산의 Fmoc 기 제거에 이어 아실 사슬로 커플링을 반복한다. 100% TFA으로 최종 처리하면 임의의 측쇄 보호기 및 N-말단 BOC 기가 제거된다. 펩티드 수지는 5% DIEA/DMF로 중화시키고, 건조시키고, 그 다음 HF/p-크레졸, 95:5을 이용하여 0℃에서 1시간 동안 기질로부터 절단시킨다. 에테르 추출후, 5% HOAc 용액을 이용하여 정제안된 펩티드를 용매화시켰다. ESI-MS를 이용하여 용액 샘플에 수정된 분자량의 펩티드가 포함되었다는 것이 증명된다. 수정된 펩티드는 선형 그라디언트 10% CH<sub>3</sub>CN/0.1% TFA 내지 0.1 % TFA/100% CH<sub>3</sub>CN을 이용하여 RP-HPLC에 의해 정제된다. Vydac C1 8 22 mm x 250 mm 단백질 컬럼이 정제에 이용된다. 아실화된 펩티드 유사체는 일반적으로 20:80 비율의 완충액에 의해 완전히 용출된다. 부분들을 합치고, 분석용 RP-HPLC 상에서 순도를 점검하였다. 순수 분취물은 동결건조시켜 백색 고체 펩티드를 만든다.
- [0487] 펩티드가 락탐 다리와 아실화된 표적 잔기를 포함하고 있다면, 펩티드 기본 골격에 아미노산을 추가할 때 상기에서 설명되는 것과 같이 아실화가 실행된다.
- [0488] 펩티드 폐길화를 위하여, 40 kDa의 메톡시 폴리(에틸렌 글리콜) 멜레이미도- 프로피온아미드(*Chirotech Technology Ltd.*)는 맑은 용액(2-3mg 펩티드를 이용하는 경우 일반적으로 2ml 미만)에 펩티드와 PEG를 용해시키는데 필요한 최소한의 양을 이용한 7M 우레아, 50mM 트리tm-HCl 완충액에 당량의 펩티드와 반응된다. 실온에서 왕성하게 교반이 4-6시간동안 시작되고, 반응물은 분석용 RP-HPLC에 의해 분석된다. 폐길화된 산물은 감소된 보유시간을 가지는 출발 물질과는 구별된다. 정제는 Vydac C4 컬럼에서 처음 펩티드 정제에 이용된 것과 유사한 조건으로 실시된다. 용리는 일반적으로 50:50의 완충액에서 일어난다. 순수한 폐길화된 펩티드들이 수거되고, 동결건조된다.

[0489] 실시예 18

[0490] 글루카곤 유사체 투여 후, 비이글(Beagle) 개에서 혈당 농도의 변화

[0491] 8-12kg, 8-16 월령, 건강상태가 양호한 개과/비이글 개들을 이용하여 약동학적 그리고 약력학적 글루카곤 작용을 측정하였다. 모든 동물을 하룻밤 굶기고, 각 투약 후 다음 시간대에 채혈하였다: 0 hr. (투약 전) 그리고 투약 후 5분, 10분, 20분, 30분, 45분, 60분, 90분, 120분, 240분. 각 약량에는 6마리 동물이 이용되었고, 각 시간대에 1-2ml의 전혈이 채혈되었다. 약 1.0 ml 전혈은 트라실올(아프로티닌) 충분량을 포함하는 K<sub>2</sub>EDTA 튜브에 첨가하여 최소한 500KIU/ml이 되도록 하였다. 약 1,500~3,000 ×g에서 10-15분간 냉장 원심분리기에서 샘플을 원심분리시킨 후에 약 500μl 혈청이 수거되었다. 샘플은 플라스틱 바이알로 이동시키고, -70℃ 또는 그 이하의 온도에서 냉동시켰다. 나머지 1.0 mL의 전혈은 빈 튜브에 혈액을 넣고, 15-20분간 실온에 방치한 후, 약 1,500~3,000 ×g에서 10-15분간 냉장 원심분리기에서 샘플을 원심분리시켜 혈청으로 전환시켰다. 샘플은 플라스틱 바이알로 이동시키고, -70℃ 또는 그 이하의 온도에서 냉동시켰다. 글루카곤 및 유사체는 0.1667 mg/ml 농도로 0.01N HCl에 용해시켰고, 동물에는 0.03 ml/kg의 농도로 투약되었다.

[0492] 동물에게 글루카곤 또는 SEQ ID NO: 31의 서열이 글루카곤 (글루카곤-CEX) 의 카르복시 말단에 링크된 글루카곤을 포함하는 글루카곤 유사체 또는 아미노산 28에서 아스파르트산 치환을 가진(글루카곤-Asp28) SEQ ID NO:11 글루카곤 유사체를 근육으로 0.005 mg/kg의 약량으로 투여하였다. 그 결과는 도 10에 나타나있다.

[0493] 실시예 19

[0494] 다음의 펩티드들은 상기에서 필수적으로 설명된 것과 같이 만들어졌다:

[0495] (A) 위치 16에서 AIB으로 치환된 아미노산 치환을 가지는, SEQ ID NO: 1의 아미노산 서열을 포함하는 펩티드 ("AIB 16 글루카곤");

[0496] (B) 위치 19에서 AIB으로 치환된 아미노산 치환을 가지는, SEQ ID NO: 1의 아미노산 서열을 포함하는 펩티드 ("AIB 19 글루카곤");

[0497] (C) 위치 20에서 AIB으로 치환된 아미노산 치환을 가지는, SEQ ID NO: 1의 아미노산 서열을 포함하는 펩티드 ("AIB 20 글루카곤");

[0498] (D) 위치 21에서 AIB으로 치환된 아미노산 치환을 가지는, SEQ ID NO: 1의 아미노산 서열을 포함하는 펩티드 ("AIB 21 글루카곤");

[0499] (E) 위치 24에서 AIB으로 치환된 아미노산 치환을 가지는, SEQ ID NO: 1의 아미노산 서열을 포함하는 펩티드 ("AIB 24 글루카곤");

[0500] (F) 위치 16 및 20에서 AIB으로 치환된 아미노산 치환을 가지는, SEQ ID NO: 1의 아미노산 서열을 포함하는 펩티드("AIB 16, 20 글루카곤");

[0501] (G) 위치 16 및 24에서 AIB으로 치환된 아미노산 치환을 가지는, SEQ ID NO: 1의 아미노산 서열을 포함하는 펩티드("AIB 16, 24글루카곤");

[0502] (H) 위치 20 및 24에서 AIB으로 치환된 아미노산 치환을 가지는, SEQ ID NO: 1의 아미노산 서열을 포함하는 펩티드("AIB 20, 24 글루카곤"); 그리고

[0503] (I) 위치 16, 20 및 24에서 AIB으로 치환된 아미노산 치환을 가지는, SEQ ID NO: 1의 아미노산 서열을 포함하는 펩티드 ("AIB 16, 20, 24 글루카곤").

표 5

[0504]

펩티드	글루카곤 수용체			GLP-1 수용체		
	평균	STDey	n	평균	STDey	n
GLP-1	2878.03	2510.39	7	0.05	0.02	#
글루카곤	0.14	0.06	14	13.70	4.26	#



AIB 16 글루카곤	0.37	0.05	2	32.43	8.63	4
AIB 19 글루카곤	13.52	0.64	3	64.75	11.38	4
AIB 20 글루카곤	0.32	0.14	6	7.88	0.36	2
AIB 21 글루카곤	0.55	0.17	6	5.92	1.83	2
AIB 24 글루카곤	0.22	0.02	3	23.92	7.20	4
AIB 16,20 글루카곤	0.26	0.06	2	13.62	8.92	2
AIB 16,24 글루카곤	0.18	0.01	2	31.81	-	1
AIB 20,24 글루카곤	0.34	0.15	2	10.59	1.95	2
AIB 16,20,24 글루카곤	0.42	0.18	2	12.15	3.77	2

[0505] 실시예 20

[0506] 다음의 펩티드들은 상기에서 필수적으로 설명된 것과 같이 만들어졌다:

[0507] 위치 28에 Asp와 위치 29에 Glu를 포함하도록 변형된 SEQ ID NO:1의 아미노산 서열을 포함하는 "D28/E29 글루카곤":

[0508] HSQGTFTSDYSKYLDSRRAQDFVQWLMDE(SEQ ID NO: 75); 그리고

[0509] 위치 16에 AIB를 포함하도록 추가 변형된 SEQ ID NO:75의 아미노산 서열을 포함하는 "AIB16/D28/E29 글루카곤":

[0510] HSQGTFTSDYSKYLD AibRRAQDFVQWLMDE (SEQ ID NO: 76).

[0511] 글루카곤 수용체에서 각 펩티드의 *in vitro* 활성은 실시예 13에서 설명된 것과 같이 테스트되었다. D28/E29 글루카곤 펩티드의 EC<sub>50</sub>은 0.06 nM였고, AIB16/D28/E29 글루카곤 펩티드의 EC<sub>50</sub>은 0.08 nM이었다.

[0512] 실시예 21

[0513] 세트 A의 펩티드(이때 각 펩티드는 표 6에 나열된 변형을 가지는 SEQ ID NO: 1의 아미노산을 포함한다)가 기본적으로 여기에서 설명된 것과 같이 만들어졌다.



표 6

아미노산 치환								C-terminal Extension- NH <sub>2</sub> (SEQ ID NO: 20)**
3	16	20	24	27	28	29	30*	
Gln	AIB	Gln	Gln	Met	Asn	Thr	CEX	Present
Dab(Ac)	AIB	Gln	Gln	Met	Asn	Thr	CEX	Present
Gln	AIB	Ala	Ala	Met	Asn	Thr	CEX	Present
Gln	AIB	Ser	Ser	Met	Asn	Thr	CEX	Present
Gln	AIB	Thr	Thr	Met	Asn	Thr	CEX	Present
Gln	AIB	Gln	Gln	Leu	Asn	Thr	CEX	Present
Gln	AIB	Gln	Gln	Nle	Asn	Thr	CEX	Present
Gln	AIB	Gln	Gln	Met	Asp	Thr	CEX	Present
Gln	AIB	Gln	Gln	Met	Asn	Glu	CEX	Present
Gln	AIB	Gln	Gln	Met	Asp	Glu	CEX	Present
Dab(Ac)	AIB	Ala	Ala	Met	Asn	Thr	CEX	Present
Dab(Ac)	AIB	Ala	Ala	Leu	Asn	Thr	CEX	Present
Dab(Ac)	AIB	Ala	Ala	Leu	Asp	Thr	CEX	Present

[0514]

아미노산 치환								C-terminal Extension- NH <sub>2</sub> (SEQ ID NO: 20)**
3	16	20	24	27	28	29	30*	
Dab(Ac)	AIB	Ala	Ala	Leu	Asp	Glu	CEX	Present
Dab(Ac)	AIB	Ala	Ala	Leu	Asn	Glu	CEX	Present
Dab(Ac)	AIB	Ala	Ala	Nle	Asn	Thr	CEX	Present
Dab(Ac)	AIB	Ala	Ala	Nle	Asp	Thr	CEX	Present
Dab(Ac)	AIB	Ala	Ala	Nle	Asp	Glu	CEX	Present
Dab(Ac)	AIB	Ala	Ala	Nle	Asn	Glu	CEX	Present
Dab(Ac)	AIB	Ser	Ser	Met	Asn	Thr	CEX	Present
Dab(Ac)	AIB	Ser	Ser	Leu	Asn	Thr	CEX	Present
Dab(Ac)	AIB	Ser	Ser	Leu	Asp	Thr	CEX	Present
Dab(Ac)	AIB	Ser	Ser	Leu	Asp	Glu	CEX	Present
Dab(Ac)	AIB	Ser	Ser	Leu	Asn	Glu	CEX	Present
Dab(Ac)	AIB	Ser	Ser	Nle	Asn	Thr	CEX	Present
Dab(Ac)	AIB	Ser	Ser	Nle	Asp	Thr	CEX	Present
Dab(Ac)	AIB	Ser	Ser	Nle	Asp	Glu	CEX	Present
Dab(Ac)	AIB	Ser	Ser	Nle	Asn	Glu	CEX	Present
Dab(Ac)	AIB	Thr	Thr	Met	Asn	Thr	CEX	Present

[0515]

아미노산 치환								C-terminal Extension- NH <sub>2</sub> (SEQ ID NO: 20)**
3	16	20	24	27	28	29	30*	
Dab(Ac)	AIB	Thr	Thr	Leu	Asn	Thr	CEX	Present
Dab(Ac)	AIB	Thr	Thr	Leu	Asp	Thr	CEX	Present
Dab(Ac)	AIB	Thr	Thr	Leu	Asp	Glu	CEX	Present
Dab(Ac)	AIB	Thr	Thr	Leu	Asn	Glu	CEX	Present
Dab(Ac)	AIB	Thr	Thr	Nle	Asn	Thr	CEX	Present
Dab(Ac)	AIB	Thr	Thr	Nle	Asp	Thr	CEX	Present
Dab(Ac)	AIB	Thr	Thr	Nle	Asp	Glu	CEX	Present
Dab(Ac)	AIB	Thr	Thr	Nle	Asn	Glu	CEX	Present
Gln	AIB	Gln	Gln	Met	Asn	Gly	CEX	Present
Dab(Ac)	AIB	Gln	Gln	Met	Asn	Gly	CEX	Present
Gln	AIB	Ala	Ala	Met	Asn	Gly	CEX	Present
Gln	AIB	Ser	Ser	Met	Asn	Gly	CEX	Present
Gln	AIB	Thr	Thr	Met	Asn	Gly	CEX	Present
Gln	AIB	Gln	Gln	Leu	Asn	Gly	CEX	Present
Gln	AIB	Gln	Gln	Nle	Asn	Gly	CEX	Present
Gln	AIB	Gln	Gln	Met	Asp	Gly	CEX	Present

[0516]

아미노산 치환								C-terminal Extension- NH <sub>2</sub> (SEQ ID NO: 20)**
3	16	20	24	27	28	29	30*	
Dab(Ac)	AIB	Ala	Ala	Met	Asn	Gly	CEX	Present
Dab(Ac)	AIB	Ala	Ala	Leu	Asn	Gly	CEX	Present
Dab(Ac)	AIB	Ala	Ala	Leu	Asp	Gly	CEX	Present
Dab(Ac)	AIB	Ala	Ala	Nle	Asn	Gly	CEX	Present
Dab(Ac)	AIB	Ala	Ala	Nle	Asp	Gly	CEX	Present
Dab(Ac)	AIB	Ser	Ser	Met	Asn	Gly	CEX	Present
Dab(Ac)	AIB	Ser	Ser	Leu	Asn	Gly	CEX	Present
Dab(Ac)	AIB	Ser	Ser	Leu	Asp	Gly	CEX	Present
Dab(Ac)	AIB	Ser	Ser	Nle	Asn	Gly	CEX	Present
Dab(Ac)	AIB	Ser	Ser	Nle	Asp	Gly	CEX	Present
Dab(Ac)	AIB	Thr	Thr	Met	Asn	Gly	CEX	Present
Dab(Ac)	AIB	Thr	Thr	Leu	Asn	Gly	CEX	Present
Dab(Ac)	AIB	Thr	Thr	Leu	Asp	Gly	CEX	Present
Dab(Ac)	AIB	Thr	Thr	Nle	Asn	Gly	CEX	Present
Dab(Ac)	AIB	Thr	Thr	Nle	Asp	Gly	CEX	Present
Gln	AIB	Gln	Gln	Met	Asn	Thr	n/a	Absent

[0517]

아미노산 치환								C-terminal Extension- NH <sub>2</sub> (SEQ ID NO: 20)**
3	16	20	24	27	28	29	30*	
Dab(Ac)	AIB	Gln	Gln	Met	Asn	Thr	n/a	Absent
Gln	AIB	Ala	Ala	Met	Asn	Thr	n/a	Absent
Gln	AIB	Ser	Ser	Met	Asn	Thr	n/a	Absent
Gln	AIB	Thr	Thr	Met	Asn	Thr	n/a	Absent
Gln	AIB	Gln	Gln	Leu	Asn	Thr	n/a	Absent
Gln	AIB	Gln	Gln	Nle	Asn	Thr	n/a	Absent
Gln	AIB	Gln	Gln	Met	Asp	Thr	n/a	Absent
Gln	AIB	Gln	Gln	Met	Asn	Glu	n/a	Absent
Gln	AIB	Gln	Gln	Met	Asp	Glu	n/a	Absent
Dab(Ac)	AIB	Ala	Ala	Met	Asn	Thr	n/a	Absent
Dab(Ac)	AIB	Ala	Ala	Leu	Asn	Thr	n/a	Absent
Dab(Ac)	AIB	Ala	Ala	Leu	Asp	Thr	n/a	Absent
Dab(Ac)	AIB	Ala	Ala	Leu	Asp	Glu	n/a	Absent
Dab(Ac)	AIB	Ala	Ala	Leu	Asn	Glu	n/a	Absent
Dab(Ac)	AIB	Ala	Ala	Nle	Asn	Thr	n/a	Absent
Dab(Ac)	AIB	Ala	Ala	Nle	Asp	Thr	n/a	Absent

[0518]

아미노산 치환								C-terminal Extension- NH <sub>2</sub> (SEQ ID NO: 20)**
3	16	20	24	27	28	29	30*	
Dab(Ac)	AIB	Ala	Ala	Nle	Asp	Glu	n/a	Absent
Dab(Ac)	AIB	Ala	Ala	Nle	Asn	Glu	n/a	Absent
Dab(Ac)	AIB	Ser	Ser	Met	Asn	Thr	n/a	Absent
Dab(Ac)	AIB	Ser	Ser	Leu	Asn	Thr	n/a	Absent
Dab(Ac)	AIB	Ser	Ser	Leu	Asp	Thr	n/a	Absent
Dab(Ac)	AIB	Ser	Ser	Leu	Asp	Glu	n/a	Absent
Dab(Ac)	AIB	Ser	Ser	Leu	Asn	Glu	n/a	Absent
Dab(Ac)	AIB	Ser	Ser	Nle	Asn	Thr	n/a	Absent
Dab(Ac)	AIB	Ser	Ser	Nle	Asp	Thr	n/a	Absent
Dab(Ac)	AIB	Ser	Ser	Nle	Asp	Glu	n/a	Absent
Dab(Ac)	AIB	Ser	Ser	Nle	Asn	Glu	n/a	Absent
Dab(Ac)	AIB	Thr	Thr	Met	Asn	Thr	n/a	Absent
Dab(Ac)	AIB	Thr	Thr	Leu	Asn	Thr	n/a	Absent
Dab(Ac)	AIB	Thr	Thr	Leu	Asp	Thr	n/a	Absent
Dab(Ac)	AIB	Thr	Thr	Leu	Asp	Glu	n/a	Absent
Dab(Ac)	AIB	Thr	Thr	Leu	Asn	Glu	n/a	Absent

[0519]



아미노산 치환								C-terminal Extension- NH <sub>2</sub> (SEQ ID NO: 20)**
3	16	20	24	27	28	29	30*	
Dab(Ac)	AIB	Thr	Thr	Nle	Asn	Thr	n/a	Absent
Dab(Ac)	AIB	Thr	Thr	Nle	Asp	Thr	n/a	Absent
Dab(Ac)	AIB	Thr	Thr	Nle	Asp	Glu	n/a	Absent
Dab(Ac)	AIB	Thr	Thr	Nle	Asn	Glu	n/a	Absent
Gln	AIB	Gln	Gln	Met	Asn	Thr	Glu	Absent
Dab(Ac)	AIB	Gln	Gln	Met	Asn	Thr	Glu	Absent
Gln	AIB	Ala	Ala	Met	Asn	Thr	Glu	Absent
Gln	AIB	Ser	Ser	Met	Asn	Thr	Glu	Absent
Gln	AIB	Thr	Thr	Met	Asn	Thr	Glu	Absent
Gln	AIB	Gln	Gln	Leu	Asn	Thr	Glu	Absent
Gln	AIB	Gln	Gln	Nle	Asn	Thr	Glu	Absent
Gln	AIB	Gln	Gln	Met	Asp	Thr	Glu	Absent
Gln	AIB	Gln	Gln	Met	Asn	Glu	Glu	Absent
Gln	AIB	Gln	Gln	Met	Asp	Glu	Glu	Absent
Dab(Ac)	AIB	Ala	Ala	Met	Asn	Thr	Glu	Absent
Dab(Ac)	AIB	Ala	Ala	Leu	Asn	Thr	Glu	Absent

[0520]

아미노산 치환								C-terminal Extension- NH <sub>2</sub> (SEQ ID NO: 20)**
3	16	20	24	27	28	29	30*	
Dab(Ac)	AIB	Ala	Ala	Leu	Asp	Thr	Glu	Absent
Dab(Ac)	AIB	Ala	Ala	Leu	Asp	Glu	Glu	Absent
Dab(Ac)	AIB	Ala	Ala	Leu	Asn	Glu	Glu	Absent
Dab(Ac)	AIB	Ala	Ala	Nle	Asn	Thr	Glu	Absent
Dab(Ac)	AIB	Ala	Ala	Nle	Asp	Thr	Glu	Absent
Dab(Ac)	AIB	Ala	Ala	Nle	Asp	Glu	Glu	Absent
Dab(Ac)	AIB	Ala	Ala	Nle	Asn	Glu	Glu	Absent
Dab(Ac)	AIB	Ser	Ser	Met	Asn	Thr	Glu	Absent
Dab(Ac)	AIB	Ser	Ser	Leu	Asn	Thr	Glu	Absent
Dab(Ac)	AIB	Ser	Ser	Leu	Asp	Thr	Glu	Absent
Dab(Ac)	AIB	Ser	Ser	Leu	Asp	Glu	Glu	Absent
Dab(Ac)	AIB	Ser	Ser	Leu	Asn	Glu	Glu	Absent
Dab(Ac)	AIB	Ser	Ser	Nle	Asn	Thr	Glu	Absent
Dab(Ac)	AIB	Ser	Ser	Nle	Asp	Thr	Glu	Absent
Dab(Ac)	AIB	Ser	Ser	Nle	Asp	Glu	Glu	Absent
Dab(Ac)	AIB	Ser	Ser	Nle	Asn	Glu	Glu	Absent

[0521]

아미노산 치환								C-terminal Extension- NH <sub>2</sub> (SEQ ID NO: 20)**
3	16	20	24	27	28	29	30*	
Dab(Ac)	AIB	Thr	Thr	Met	Asn	Thr	Glu	Absent
Dab(Ac)	AIB	Thr	Thr	Leu	Asn	Thr	Glu	Absent
Dab(Ac)	AIB	Thr	Thr	Leu	Asp	Thr	Glu	Absent
Dab(Ac)	AIB	Thr	Thr	Leu	Asp	Glu	Glu	Absent
Dab(Ac)	AIB	Thr	Thr	Leu	Asn	Glu	Glu	Absent
Dab(Ac)	AIB	Thr	Thr	Nle	Asn	Thr	Glu	Absent
Dab(Ac)	AIB	Thr	Thr	Nle	Asp	Thr	Glu	Absent
Dab(Ac)	AIB	Thr	Thr	Nle	Asp	Glu	Glu	Absent
Dab(Ac)	AIB	Thr	Thr	Nle	Asn	Glu	Glu	Absent

[0522]

[0523]

제2세트(세트 B)의 펩티드는 세트 A의 펩티드와 동일한 구조를 가지나, 단 세트 B의 펩티드는 위치 24의 Cys가 40kDa PEG에 공유적으로 부착된 것이 포함되는 차이가 있도록 만든다. 세트 A와 B의 펩티드들은 실시예 13에서 기본적으로 설명된 것과 같이, 글루카곤 수용체에서 *in vitro* 활성에 대해 테스트되었다.

[0524]

## 실시예 22

[0525]

하기의 펩티드 J의 골격을 포함하거나:

[0526]

HS-X-GTFTSDYSKYLDTRRAAEFVAWL(Nle)DE

[0527]

(SEQ ID NO: 59)

[0528]

또는 하기의 펩티드 K의 골격을 포함하고: 그리고

[0529]

HS-X-GTFTSDYSKYLD(Aib)RRAADFV AWLMDE

[0530]

(SEQ ID NO:60)

[0531]

위치 3의 추가 변형을 가지는 글루카곤 유사체 펩티드들은 여기에서 설명된 것과 같이 고품상 펩티드 합성에 의해 만들었다. 실시예 13에서 설명된 것과 같이 글루카곤 수용체에서의 *in vitro* 활성에 대해 펩티드들을 테스트하였다. 각 펩티드의 EC<sub>50</sub>(nM)은 표 7에 나타내었다.

표 7

[0532]

펩티드골격	위치3에서 아미노산	SEQ ID NO:	글루카곤 수용체 서 EC <sub>50</sub> (nM)	활성 % *
J	Q	61	0.24	25%
J	C(Acm)	62	0.18	33%
J	Dab(Ac)	63	0.31	19%

J	Dap(urea)	64	0.48	13%
J	Q(Me)	65	0.48	13%
J	M(O)	66	0.91	7%
J	Orn(Ac)	67	0.92	7%
K	Q	68	0.39	15%
K	Dab(Ac)	69	0.07	86%
K	Q(Me)	70	0.11	55%

[0533] Q = 글루타민; C(Acm) = 아세트아미도메틸-시스테인; Dab(Ac) = 아세틸디아미노부타논산; Dap(우레아) = 카르바모일디아미노프로판산; Q(Me) = 메틸글루타민; M(O) = 메티오닌-술폭시드; Om(Ac) = 아세틸오르니틴.

[0534] 표 7에서 볼 수 있는 것과 같이, 다중 아미노산은 글루카곤 수용체에서 실질적인 활성 상실 없이 위치 3에서 Gln이 대체될 수 있으며, 일부 경우에는 변형이 실질적으로 활성을 감소시키는데, 예를 들면, 펩티드 K 기본골격에서 Dab(Ac) 및 Q(Me)이다.

### [0535] 실시예 23

[0536] 다양한 글루카곤 유사체 기본 골격상에서 위치 3에서 Aab(Ac)를 포함하는 글루카곤 유사체 펩티드는 여기에서 설명된 것과 같이 만들어졌고, 글루카곤 수용체에서 *in vitro* 활성에 대해 테스트되었다. 각 펩티드의 구조 및 활성은 표 8에 나타내었다.

표 8

Amino acid sequence	SEQ ID NO:	EC <sub>50</sub> (nM) at Glucagon Receptor	% activity*
Wildtype Glucagon	1	0.026	100
HSQGTFTSDYSKYLDsRRAQDFVQWLMDT	78	0.015	173
HSDab(Ac)GTFTSDYSKYLDAibRRAADFVAVLLDE	71	0.069	37
HSDab(Ac)GTFTSDYSKYLDAibRRAADFVAVLLDTGPSSGAPPPS amide	72	0.023	113
HSDab(Ac)GTFTSDYSKYLDAibRRASDFVSWLLDE	73	0.048	54
HSDab(Ac)GTFTSDYSKYLDAibRRATDFVTWLLDE	74	0.057	46

[0537]

### [0538] 실시예 24

[0539] 표 9에 나열된 변형을 가지는 SEQ ID NO: 1의 아미노산을 포함한 제 1 세트의 펩티드(세트 A)가 기본적으로 여기에서 설명된 것과 같이 만들어졌다:

표 9

Amino acid at Position 3	Amino acid at Position 7	Amino acid at position 16	Position of Acylated Lys	Fatty acyl group attached to Lys	Amino acid at Position 28	Amino acid at Position 29	C-terminal extension (SEQ ID NO: 20)
Gln	Ile	AIB	10	C14	Asp	Thr	Absent
Gln	Ile	AIB	10	C14	Asn	Glu	Absent
Gln	Ile	AIB	10	C14	Asp	Glu	Absent
Gln	Ile	AIB	10	C14	Glu	Thr	Absent
Gln	Ile	AIB	10	C14	Glu	Glu	Absent
Gln	Ile	AIB	10	C14	Asp	Gly	Present
Dab(Ac)	Ile	AIB	10	C14	Asp	Thr	Absent
Dab(Ac)	Ile	AIB	10	C14	Asn	Glu	Absent
Dab(Ac)	Ile	AIB	10	C14	Asp	Glu	Absent
Dab(Ac)	Ile	AIB	10	C14	Glu	Thr	Absent
Dab(Ac)	Ile	AIB	10	C14	Glu	Glu	Absent
Dab(Ac)	Ile	AIB	10	C14	Asp	Gly	Present
Gln	Ile	AIB	30	C14	Asp	Thr	Absent
Gln	Ile	AIB	30	C14	Asn	Glu	Absent
Gln	Ile	AIB	30	C14	Asp	Glu	Absent
Gln	Ile	AIB	30	C14	Glu	Thr	Absent
Gln	Ile	AIB	30	C14	Glu	Glu	Absent
Gln	Ile	AIB	40	C14	Asp	Gly	Present
Dab(Ac)	Ile	AIB	30	C14	Asp	Thr	Absent
Dab(Ac)	Ile	AIB	30	C14	Asn	Glu	Absent

[0540]

Amino acid at Position 3	Amino acid at Position 7	Amino acid at position 16	Position of Acylated Lys	Fatty acyl group attached to Lys	Amino acid at Position 28	Amino acid at Position 29	C-terminal extension (SEQ ID NO: 20)
Dab(Ac)	Ile	AIB	30	C14	Asp	Glu	Absent
Dab(Ac)	Ile	AIB	30	C14	Glu	Thr	Absent
Dab(Ac)	Ile	AIB	30	C14	Glu	Glu	Absent
Dab(Ac)	Ile	AIB	40	C14	Asp	Gly	Present
Gln	Thr	AIB	10	C14	Asn	deleted	Absent
Gln	Thr	AIB	10	C14	deleted	deleted	Absent
Dab(Ac)	Thr	AIB	10	C14	Asn	deleted	Absent
Dab(Ac)	Thr	AIB	10	C14	deleted	deleted	Absent

[0541]

[0542]

세트 A와 동일한 구조를 가지지만, 아실기는 C16 또는 C18 지방 아실기인 것이 상이한 펩티드들이 여기에서 설명된 것과 같이 만들어진다. C16 지방 아실기를 포함하는 펩티드는 세트 B의 펩티드로 구성되며, C18 지방 아실기를 포함하는 펩티드는 세트 C의 펩티드다.

[0543]

세트 A, B 및 C와 동일한 구조를 가지지만, 지정된 위치에서 Lys 잔기의 측쇄에 다음중 하나의 스페이스를 경유하여 지방 아실기가 공유적으로 부착된 것이 차이가 나는 세트 D의 펩티드들도 여기에서 설명된 것과 같이 만들어졌다:  $\gamma$ -Glu- $\gamma$ -Glu;  $\beta$ -Ala- $\beta$ -Ala, Ala-Ala, 6-아미노헥사논산, Leu-Leu, 및 Pro-Pro.

[0544]

세트 A-D의 펩티드는 실시예 13에서 설명된 것과 같이, 글루카곤 수용체에서 *in vitro* 활성화에 대해 테스트되었고, 각 화합물의 EC<sub>50</sub>은 글루카곤 수용체에서 고유 글루카곤의 활성과 비교된다.

[0545]

## 실시예 25

[0546]

공유 분자내 다리가 없고, 위치 2, 16에 AIB를 포함하고, 위치 10의 Lys 잔기에 스페이스를 통하여 부착된 지방 아실기를 포함하는 몇 가지 글루카곤 유사체는 여기에서 설명된 것과 같이 만든다. 아실화된 글루카곤 유사체는 스페이스 타입, 폐길화 준부 및/또는 아실기 크기에 따라 다르다. 아실화된 글루카곤 유사체는 실시예 13에서 기본적으로 설명된 것과 같이 글루카곤 수용체 및 GLP-1 수용체에서 *in vitro* 활성화에 대해 테스트되었다. 각 펩티드의 글루카곤 및 GLP-1 수용체에서 구조 및 *in vitro* 활성화에 대해 표 10과 11에 요약하여 나타내었다.



표 10

글루카곤 유사체 기본 골격 아미노산: HXQGTFTSDKSKYLDXRRRAQDFVQWLMNT-NH <sub>2</sub> wherein X = AIB (SEQ ID NO: 95)					
Peptide Name	SEQ ID NO:	Spacer	Size of Fatty Acyl Group	EC50 at Glucagon Receptor (nM)	EC50 at GLP-1 Receptor (nM)
wt glucagon	1	n/a	n/a	0.031 ± 0.014	
wt GLP-1		n/a	n/a		0.036 ± 0.010
26	96	None	None	0.653 ± 0.285	0.475 ± 0.046
50	97	None	C16	0.572 ± 0.084	0.291 ± 0.060
82	98	Ala-Ala	C16	0.024 ± 0.001	0.108 ± 0.018
83	99	γ-Glu- γ-Glu	C16	0.014 ± 0.002	0.043 ± 0.005
84	100	β-Ala-β-Ala	C16	0.011	0.004
85	101	6-amino-hexanoic acid	C16	0.010	0.005
86	102	Leu-Leu	C16	0.011	0.006
87	103	Pro-Pro	C16	0.017	0.009
77*	104	None	C14	21.94 ± 14.47	1.458 ± 0.132
78*	105	γ-Glu- γ-Glu	C14	0.319 ± 0.091	0.103 ± 0.023
81*	107	Ala-Ala	C14	0.597 ± 0.175	0.271 ± 0.019
79*	109	Ala-Ala	C16	0.102 ± 0.011	0.055 ± 0.001
80*	110	γ-Glu- γ-Glu	C16	0.108 ± 0.028	0.042 ± 0.008

[0547]

[0548]

\*는 이 펩티드가 위치 24(Gln 대신)의 Cys가 40 kDa PEG 기에 공유적으로 부착되어 있는 것을 포함한다는 것을 나타냄.

표 11

글루카곤 유사체 기본 골격 아미노산: HXQGTFTSDKSKYLDXRRAQDFVWLMNT-NH <sub>2</sub> wherein X = AIB (SEQ ID NO: 562)					
Peptide Name	SEQ ID NO:	Spacer	Size of Fatty Acyl Group	EC50 at Glucagon Receptor (nM)	EC50 at GLP-1 Receptor (nM)
wt glucagon	1	n/a	n/a	0.008 ± 0.003	
wt GLP-1		n/a	n/a		0.004 ± 0.001
77**	111	none	C14	0.144 ± 0.029	0.063 ± 0.012
78**	112	γ-Glu- γ-Glu	C14	0.009 ± 0.001	0.008 ± 0.001
81**	113	Ala-Ala	C14	0.027 ± 0.006	0.018 ± 0.001
80**	114	γ-Glu- γ-Glu	C16	0.006 ± 0.001	0.008 ± 0.001
79**	115	Ala-Ala	C16	0.010 ± 0.001	0.008 ± 0.001

[0549]

[0550]

\*\* 는 이 펩티드가 Cys가 40 kDa PEG 기에 공유적으로 부착되어 있지 않는 위치 24(Gln 대신)의 Cys를 포함한다는 것을 나타냄.

[0551]

표 10과 22에서 볼 수 있는 것과 같이, 스페이스를 통하여 부착된 지방 아실기를 포함하는 펩티드는 펩티드 기본골격에 직접적으로 부착된 지방 아실기를 포함하는 펩티드와 비교하였을 때 이들의 효능이 상당히 증가되었다.

[0552]

실시예 26

[0553]

SEQ ID NO: 71, 76, 및 78의 글루카곤 유사체 펩티드들은 안정성에 대해 분석되었다. 모든 펩티드는 위치 28에 Asp를 포함하며, SEQ ID NOs: 71 및 76은 추가적으로 위치 29에 Glu를 포함한다. SEQ ID NO: 78의 펩티드는 임의의 추가 변형을 포함하지 않으며, SEQ ID NOs: 71 및 76의 펩티드는 위치 16에 AIB를 포함한다. SEQ ID NO:71의 펩티드는 위치 3에 Dab(Ac)을, 위치 20과 24에 Ala을 그리고 위치 27에 Leu을 더 포함한다.

[0554]

펩티드는 1 mg/mL의 펩티드 농도로 용액내에서 조제되었다. 주사기에 펩티드 용액 중 하나를 채우고, 공기 접촉을 최소화하도록 하였다. 주사기는 4℃, 25℃, 30℃, 또는 40℃에 유지되었다. 분석용 RP-HPLC (reverse phase-high performance liquid chromatography)를 이용하여 280 nm에서 UV 감지기로 0월, 2월, 4월 및 6월 시점에서 잠재적인 화학 분해를 모니터링하였다. SEC (size exclusion chromatography)를 이용하여 280 nm에서 UV

감지기로 0월, 1월, 2월, 4월 및 6월 시점에서 임의의 응집물 형성을 평가하였다.

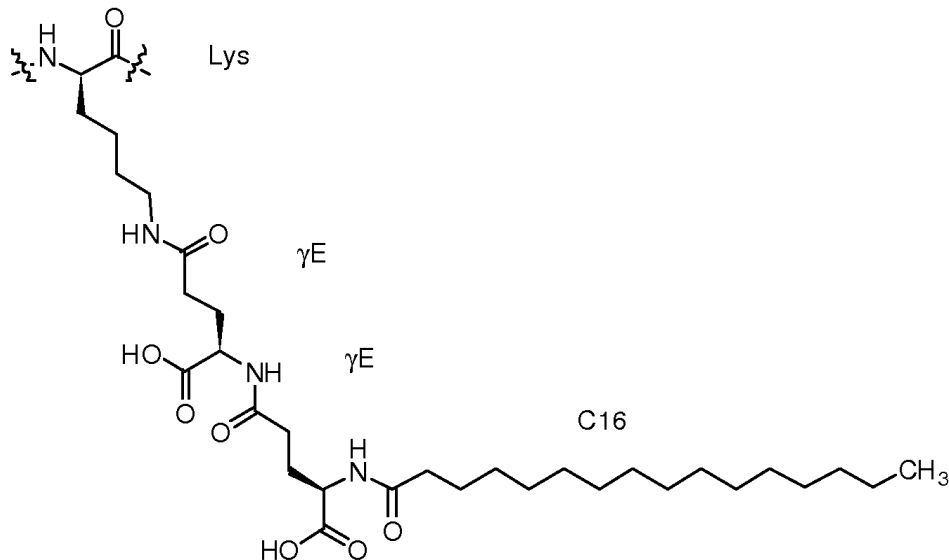
[0555] SEQ ID NO: 71, 76, 및 78의 펩티드의 UV 흡수도에 근거한 피크의 통합 면적은 차례로 도 12-14에 나타내었다. 이들 도면에서 볼 수 있는 것과 같이, 30℃에서 펩티드의 90%가 2개월 후에도 감지되었지만, SEQ ID NO:71의 펩티드가 최대의 안정성을 가지며, SEQ ID NO:78이 최소의 안정성을 가진다. SEQ ID NO: 71의 펩티드에서 피크 면적에 심각한 상실이 관찰되지 않았으며, 이는 펩티드의 양호한 화학적 그리고 생물학적 안정성을 나타낸다.

# [0556] 실시예 27

[0557] DIO 마우스 (군당 8 마리 마우스, 각 마우스 평균 체중 48.7 g)에게 7일간 비이클만, 30 nmol/kg 또는 100 nmol/kg의 아실화된 글루카곤 유사체 펩티드, 또는 장기 작용 GLP-1 유사체, 리라글루티드 (Novo Nordisk, Denmark)를 피하를 통하여 매일 주사하였다. 아실화된 글루카곤 유사체는 다음과 같다:

[0558] "(C16) 글루카곤 아미드"-위치 10의 Tyr이 아실화된 Lys 잔기로 변형된 와일드타입 글루카곤 (SEQ ID NO: 1)의 아미노산 서열로 구성되며, 여기서 아실화된 Lys는 C16 지방 아실기를 포함하며, C-말단 카르복시산염은 아미드 기로 대체됨;

[0559] "γE-γE-C16 글루카곤 아미드"-C16 글루카곤 아미드와 동일한 구조, 단, C16 지방 아실기는 γ-Glu-γ-Glu 이가펩티드 스페이스 (하기 아실화된 Lys 구조 참고)를 통하여 위치 10의 Lys에 부착된 것이 차이점임;



[0560]

[0561] "AA-C16 글루카곤 아미드"-C16 글루카곤 아미드와 동일한 구조, 단, C16 지방 아실기는 Ala-Ala 이가펩티드 스페이스를 통하여 위치 10의 Lys에 부착된 것이 차이점임; 그리고

[0562] "βAβA-C16 글루카곤 아미드"-C16 글루카곤 아미드와 동일한 구조, 단, C16 지방 아실기는 βAla-βAla 이가펩티드 스페이스를 통하여 위치 10의 Lys에 부착된 것이 차이점임

[0563] 마우스의 체중은 매일 모니터링되고, 체중에서 전체 변화(%)는 도 15에 나타낸다. 도 15에서 볼 수 있는 것과 같이, 각 약량에서 아실화된 글루카곤 펩티드의 대부분이 체중을 감소시켰다. 리라글루티드는 약 12% 감소시켰고, 글루카곤 유사체 펩티드 γE-γE-C16 글루카곤 아미드는 대응되는 약량에서 체중 감소에 최대 능력을 나타내었다. 좀더 낮은 약량의 γE-γE-C16 글루카곤 아미드도 체중의 실질적인 감소 원인이 되었다. 마우스의 지방량은 연구 7일 시점에 측정되었다. 도 16에서 볼 수 있는 것과 같이, 마우스에게 100 nmol/kg γE-γE-C16 글루카곤 아미드가 투여된 경우, 가장 낮은 지방량을 나타내었다.

[0564] 마우스의 혈당 수준도 분석 과정 동안 모니터링되었다. 도 17에서 볼 수 있는 것과 같이, 더 높은 약량에서 글루카곤 유사체 펩티드 γE-γE-C16 글루카곤 아미드 뿐만 아니라 리라글루티드(Liraglutide)는 마우스에서 혈당 수준을 감소하는데 작용하였다.

[0565]

[0566] 실시예 28

[0567] 글루카곤 유사체 펩티드는 여기에서 논의된 바와 같이 고품상 펩티드 합성에 의해 만들어졌고, 펩티드의 위치 10 또는 30에서 아실화되었다. 펩티드 및 이들 구조는 다음과 같다:

[0568] "펩티드 dS2E16K20K30-C14 Gluc 아미드"- 다음의 아미노산 서열을 포함한다HXQGTFTSDYSKYLDERRAKDFVQWLMNTK-아미드 (SEQ ID NO: 79), 여기서, 위치 2의 X는 d-Ser이며, 여기서, 위치 30의 Lys는 C14 지방 아실기로 아실화되고, 그리고 C-말단 카르복시산염은 아미드로 대체된다;

[0569] "펩티드 dS2K10(C14)E16K20-Gluc 아미드"는 다음의 아미노산 서열HXQGTFTSDKSKYLDERRAKDFVQWLMNT-아미드 (SEQ ID NO: 80)을 포함한다; 여기서, 위치 2의 X는 d-Ser이며, 여기서, 위치 30의 Lys는 C14 지방 아실기로 아실화되고, 그리고 C-말단 카르복시산염은 아미드로 대체된다;

[0570] "펩티드 dS2E16K20K30-C16 Gluc 아미드"는 다음의 아미노산 서열HXQGTFTSDYSKYLDERRAKDFVQWLMNTK-아미드 (SEQ ID NO: 81)을 포함한다; 여기서, 위치 2의 X는 d-Ser이며, 여기서, 위치 30의 Lys는 C16 지방 아실기로 아실화되고, 그리고 C-말단 카르복시산염은 아미드로 대체된다;

[0571] "펩티드 dS2K10(C16)E16K20-Gluc 아미드"는 다음의 아미노산 서열HXQGTFTSDKSKYLDERRAKDFVQWLMNT-아미드 (SEQ ID NO: 82)을 포함한다; 여기서, 위치 2의 X는 d-Ser이며, 여기서, 위치 30의 Lys는 C16 지방 아실기로 아실화되고, 그리고 C-말단 카르복시산염은 아미드로 대체된다;

[0572] "펩티드 키메라 2-AIB2-K10-아실화됨"는 다음의 아미노산 서열HXQGTFTSDKSKYLDEQAAKEFICWLMNT-아미드 (SEQ ID NO: 83)을 포함한다; 여기서, 위치 2의 X는 AIB이며, 여기서, 위치 10의 K는 C18 지방 아실기로 아실화되고, 위치 24의 Cys는 40 kDa PEG를 포함하고, 그리고 C-말단 카르복시산염은 아미드로 대체된다; 그리고

[0573] "펩티드 키메라 2-AIB2-K30-아실화됨" 다음의 아미노산 서열HXQGTFTSDYSKYLDQAQKEFICWLMNTK-아미드 (SEQ ID NO: 84)을 포함한다; 여기서, 위치 2의 X는 AIB이며, 여기서, 위치 30의 K는 C18 지방 아실기로 아실화되고, 위치 24의 Cys는 40 kDa PEG를 포함하고, 그리고 C-말단 카르복시산염은 아미드로 대체된다;

[0574] 각 펩티드의 GLP-1 수용체 및 글루카곤 수용체에서 *in vitro* 활성은 실시예 13에서 기본적으로 설명된 것과 같이 테스트되었다. 결과는 표 12에 나타낸다.

표 12

펩티드 이름	아실기가 발견되는 위치	글루카곤 수용체에서 EC <sub>50</sub> (nM)	GLP-1 수용체에서 EC <sub>50</sub> (nM)
펩티드 dS2E16K20K30-C14 Gluc 아미드	30	3.53	0.84
펩티드 dS2K10(C14)E16K20-Gluc 아미드	10	0.155	0.041
펩티드 dS2E16K20K30-C16 Gluc 아미드	30	4.89	3.05
펩티드 dS2K10(C16)E16K20-Gluc 아미드	10	0.076	0.041
펩티드 키메라 2-AIB2-K10-아실화됨	30	n/a	0.465
펩티드 키메라 2-AIB2-K30-아실화됨	10	n/a	0.007

[0576] 여기에서 언급된 모든 문헌들, 공개, 특허 출원 및 특허는 이들 각 문헌들이 개별적으로 또는 명시적으로 참고 문헌으로 통합되어 있다고 한 것과 같은 수준으로 여기에 통합된다.

[0577] 단수 부정관사 및 정관사("a", "an" 및 "the" )의 이용은 본 발명에서 다른 명시적인 언급이 없는 한, 단수 및 복수 모두를 포함하는 것으로 간주된다. 포함하는 및 보유하는, 함유하는("comprising," "having," "including," 및 "containing")는 다른 언급이 없는 한, 개방적 용어(예를 들면, 포함하나 이에 한정되지 않는)로 간주된다.

[0578] 여기에서 언급된 수치의 범위는 다른 명시적인 언급이 없는 한, 각 범위내에 속하는 별도의 수치 및 각 끝점을 지칭하며, 끝점은 개별적으로 언급된 것과 같이 명세서에 통합된다.

[0579] 여기에서 언급된 모든 방법은 다른 명시적인 언급이 없는 한 임의의 적합한 순서대로 실시될 수 있다. 임의의 그리고 모든 실시예 또는 예시적인 용어 (예를 들면, "예를 들면,")는 본 발명을 더 잘 설명하기 위함이며, 다른 언급이 없는 한, 이 범위로 제한시키고자 함이 아니다. 명세서에서는 본 발명을 실행하는데 필수적인 임의의

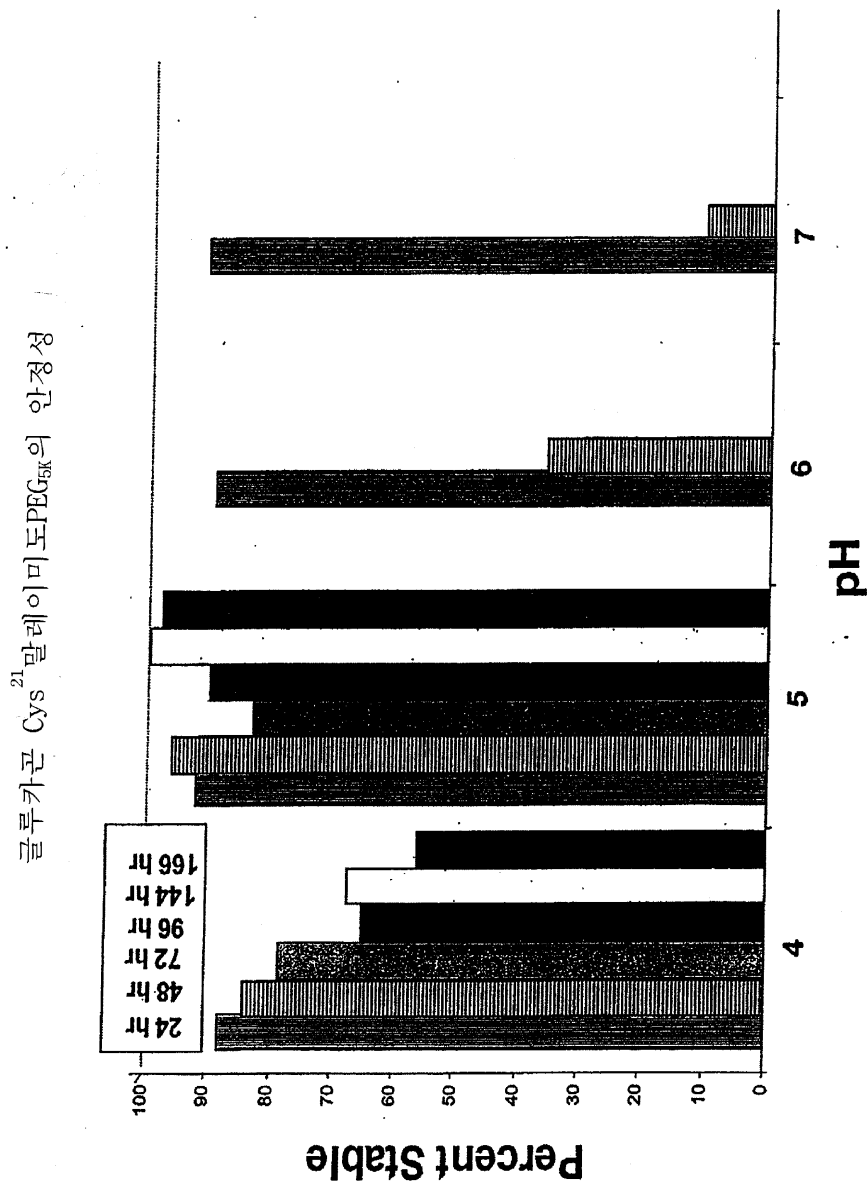
비-청구된 요소를 지적하는 용어는 없다.

[0580]

본 발명을 실행함에 있어서 발명자들이 알고 있는 가장 적합한 방식을 포함한 본 발명의 바람직한 구체예가 제공된다. 이들 바람직한 구체예의 변이 또한 설명을 참고하면 본 발명 분야의 업자들에게는 자명할 것이다. 발명자들은 당업자가 이와 같은 변이들을 적절하게 이용할 수 있을 것으로 기대되며, 여기에서 설명된 것과 같이 본 발명을 실행할 수 있다. 더욱이, 설명된 모든 가능한 변이들에서 임의의 복합 또한 다른 명시적인 언급이 없는 한, 본 발명의 범주내에 있다.

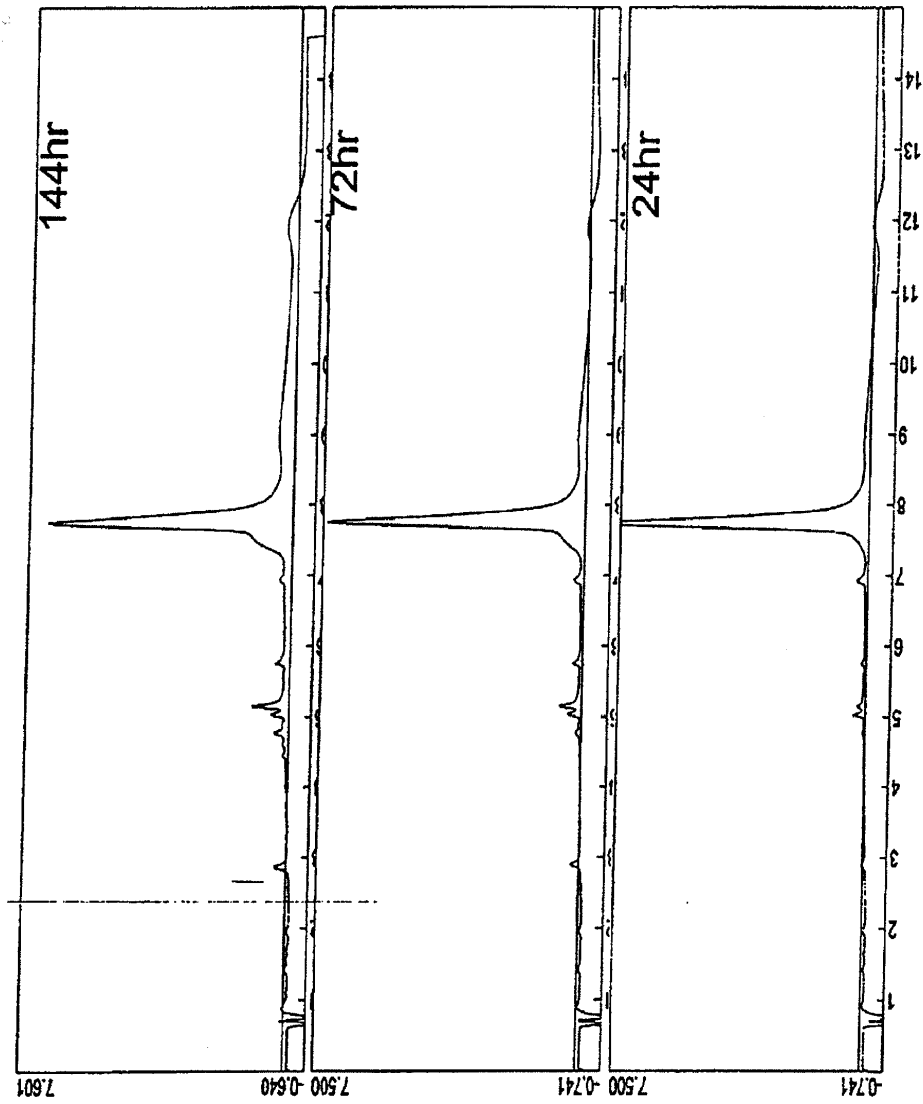
## 도면

### 도면1



도면2

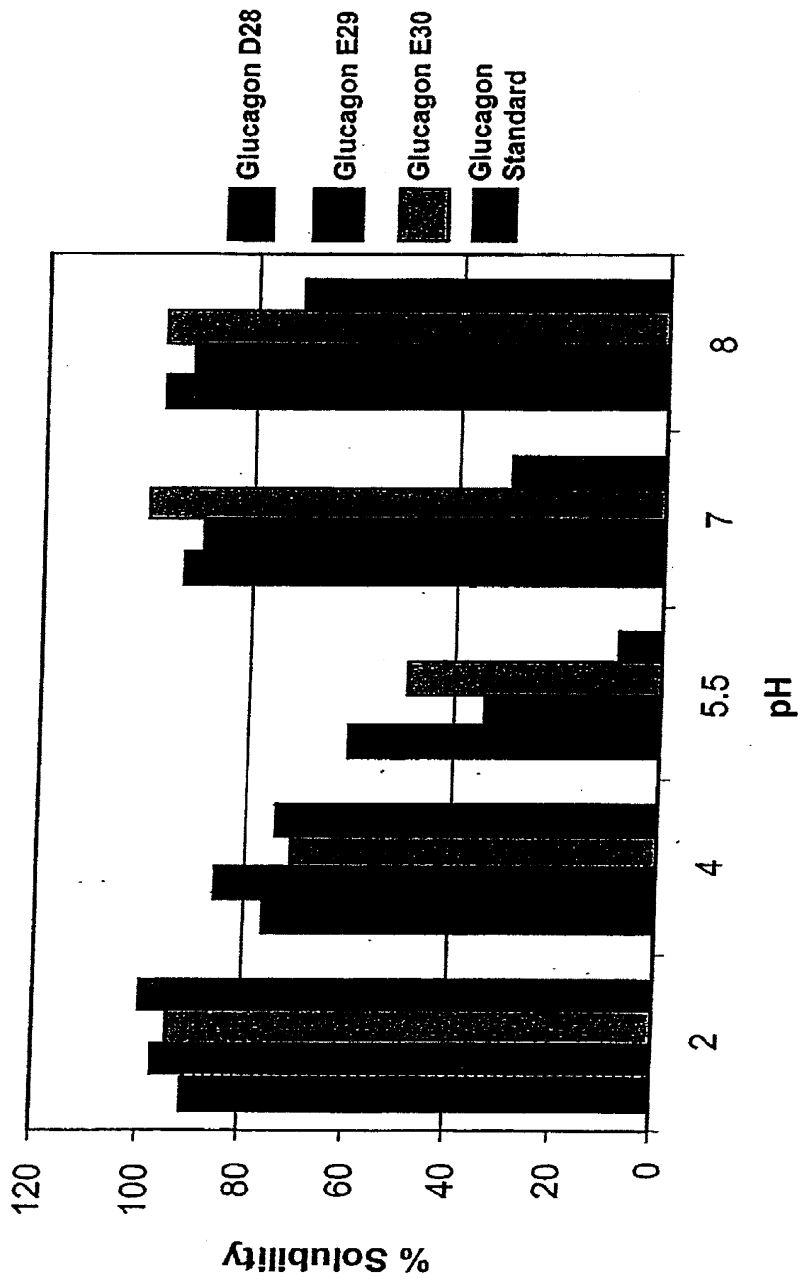
pH 5에서 글루카곤 Cys<sup>21</sup> 말레이미도PEG<sub>5k</sub>의 HPLC 분석





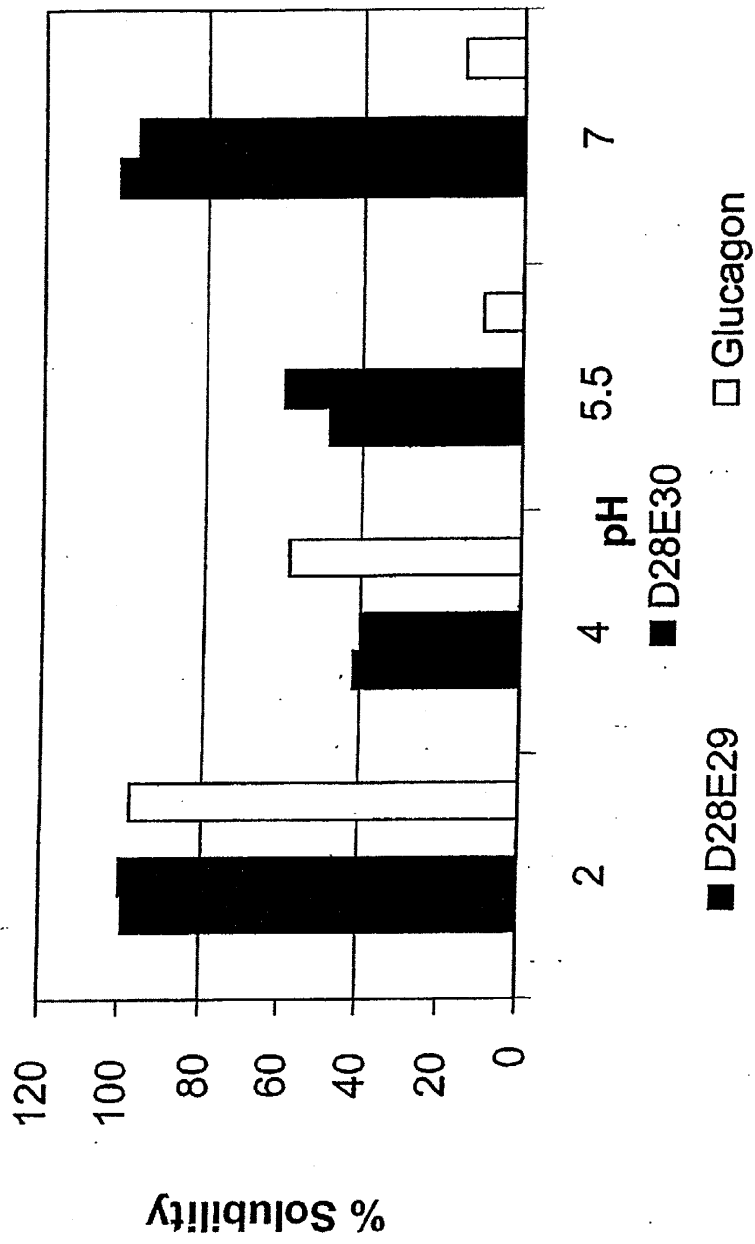
도면3

25℃, 다양한 pH에서 60시간 후, 글루카곤 유사제의 용해도



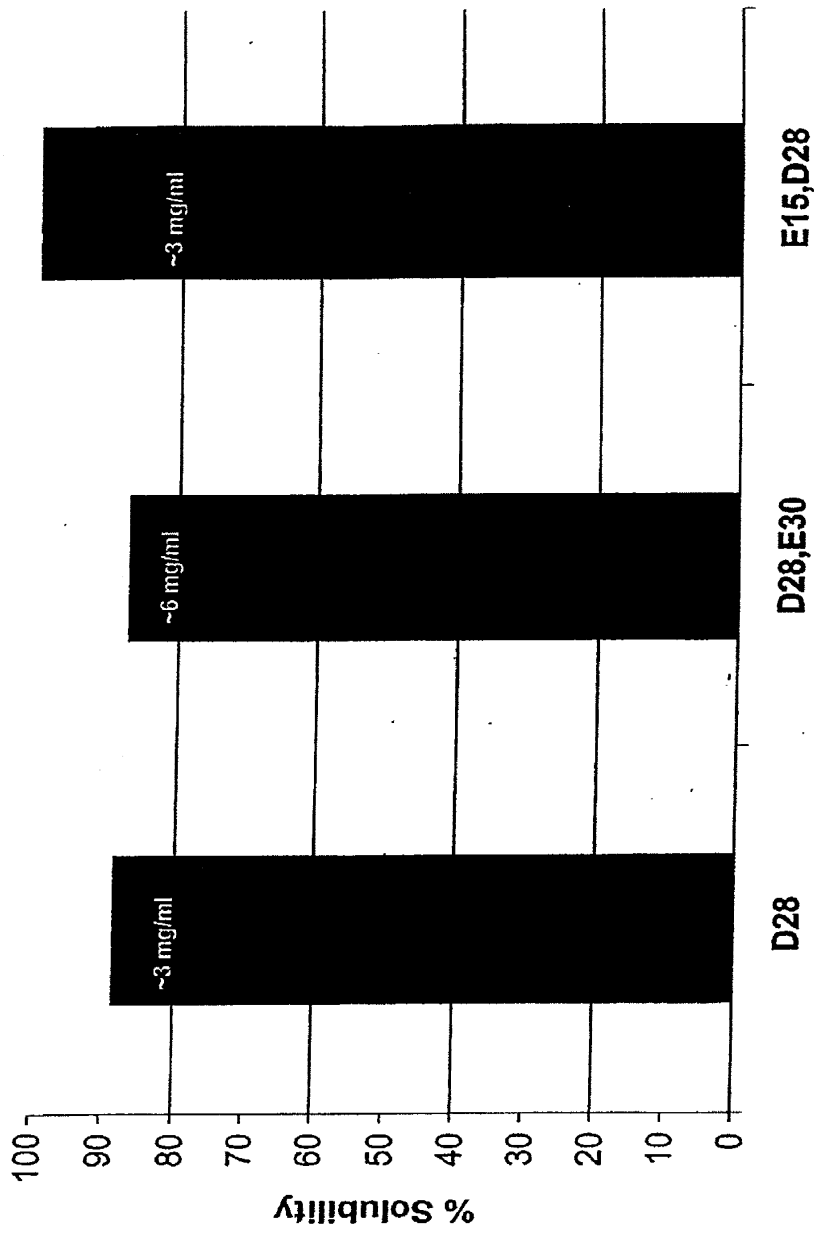
도면4

25℃, 24시간 그 다음 4℃에서 24시간 후 글루카곤 유사체의 용해도



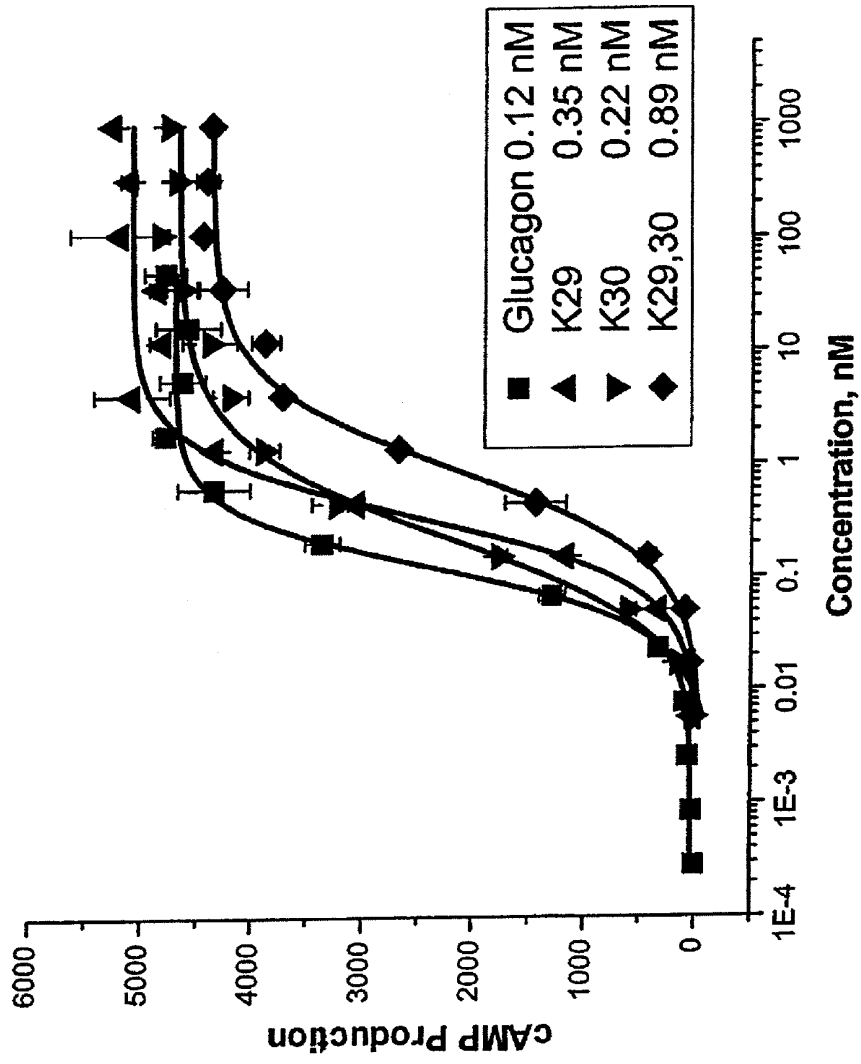
도면5

pH 7, 4 °C에서 24시간 후, 글루카곤 유사체의 최대 용해도



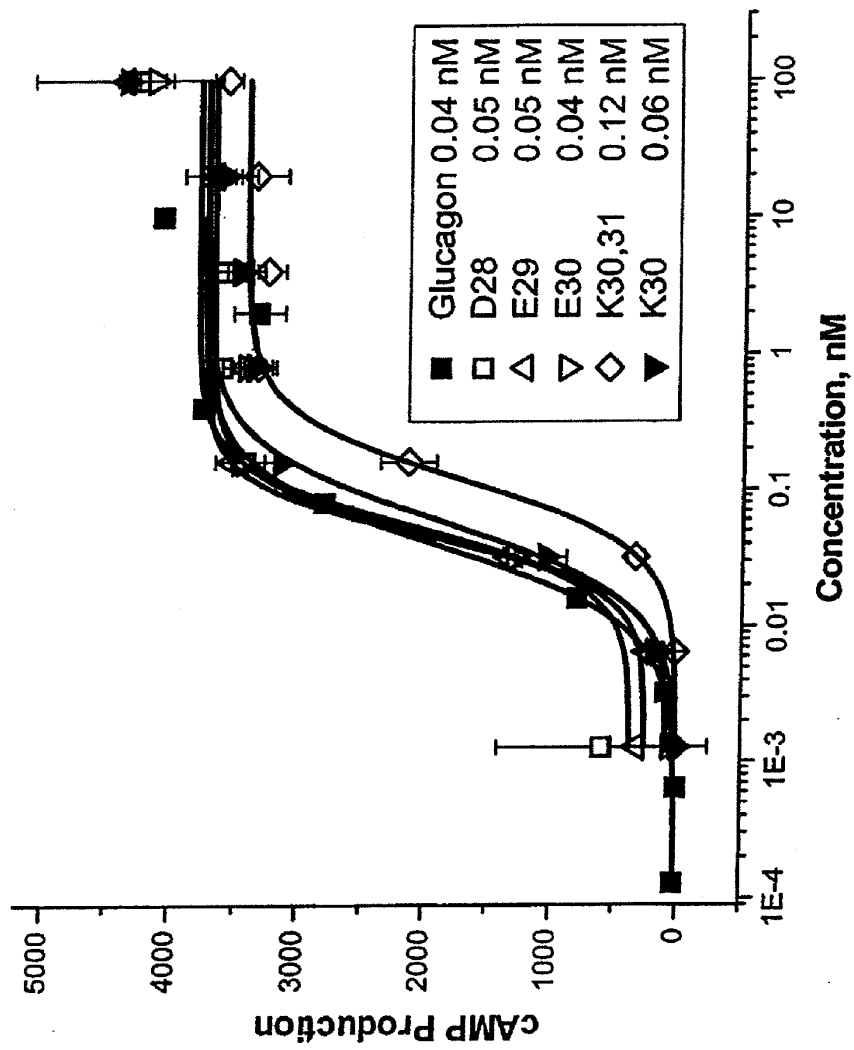
도면6

글루카곤 수용체 증제된 cAMP 유도



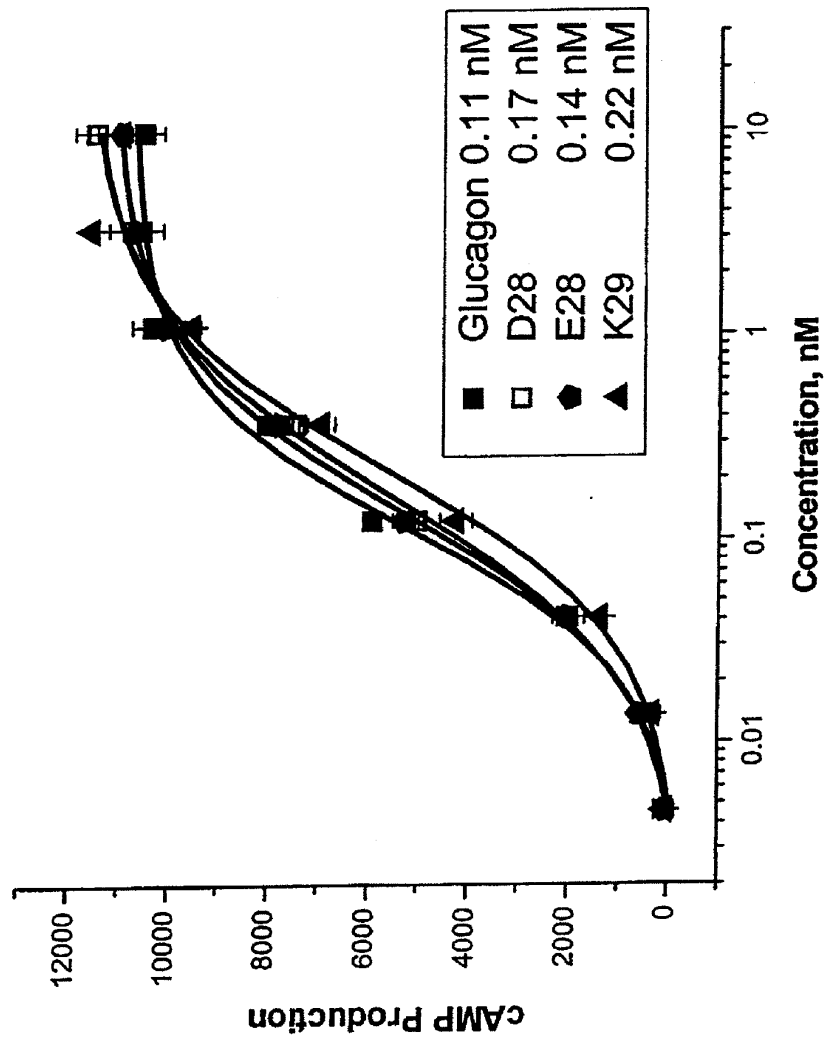
도면7

글루카곤 수용체 증대된 cAMP 유도



도면8

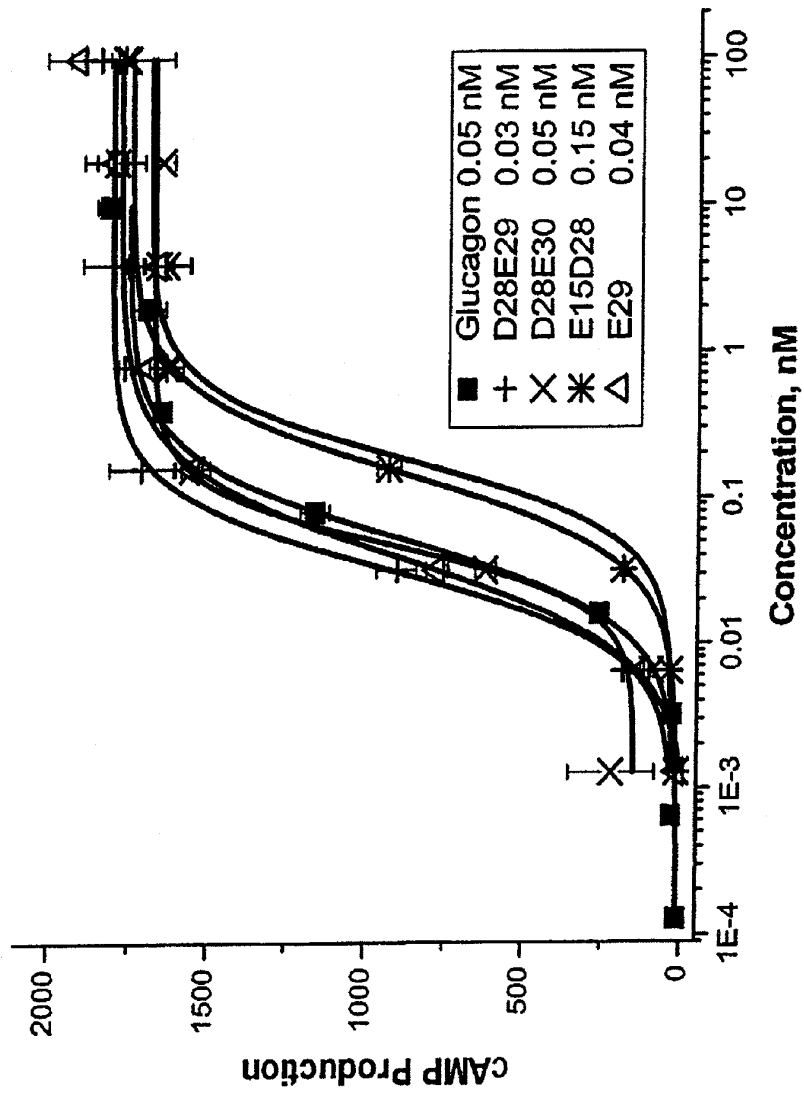
글루카곤 수용체 중재된 cAMP 유도





도면9

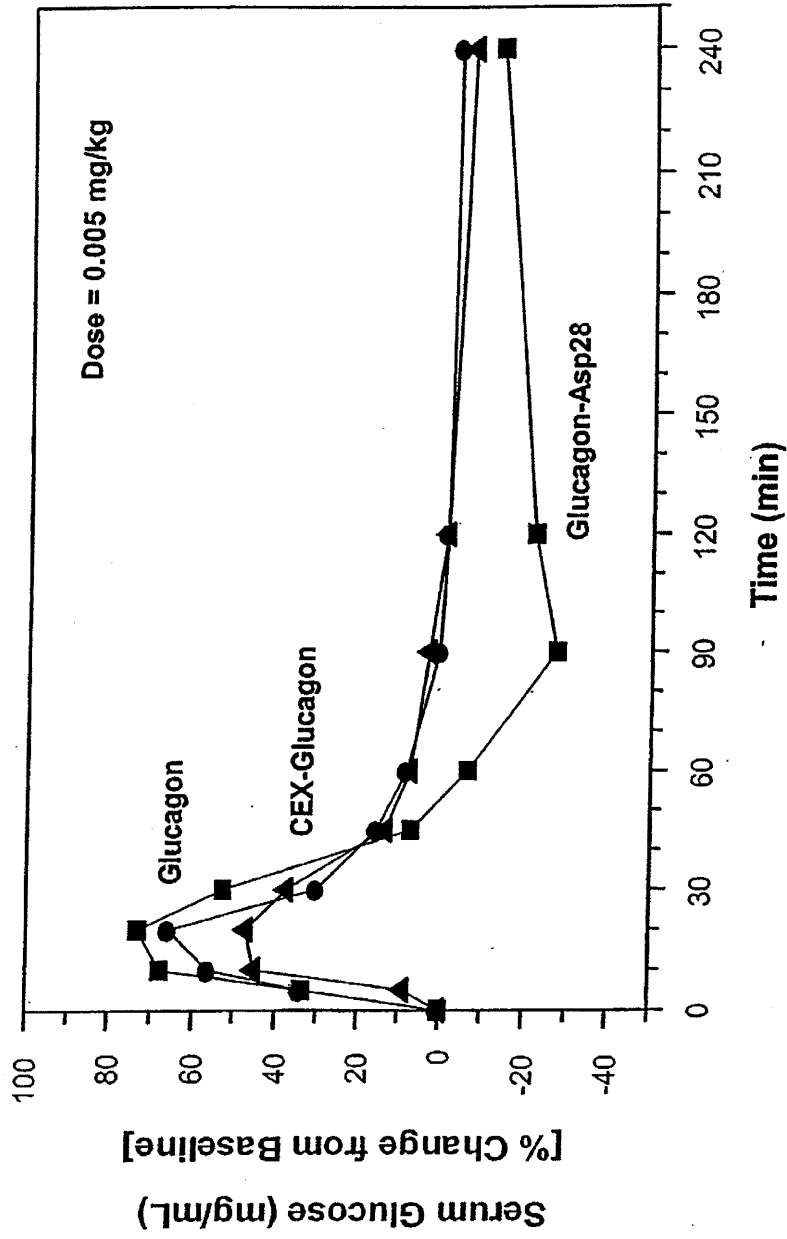
글루카곤 수용체 중재된 cAMP 유도



도면10

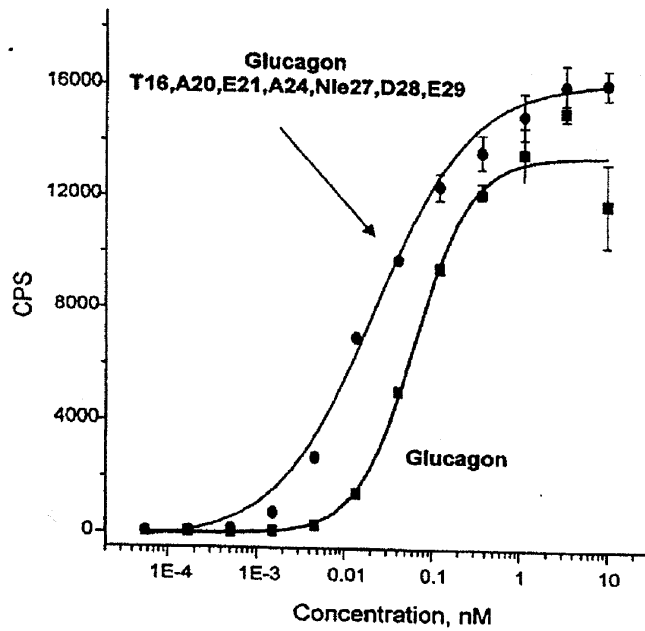
1M 글루카곤 및 글루카곤 유사체의 근육내 투여후

혈청 포도당 농도에서 변화



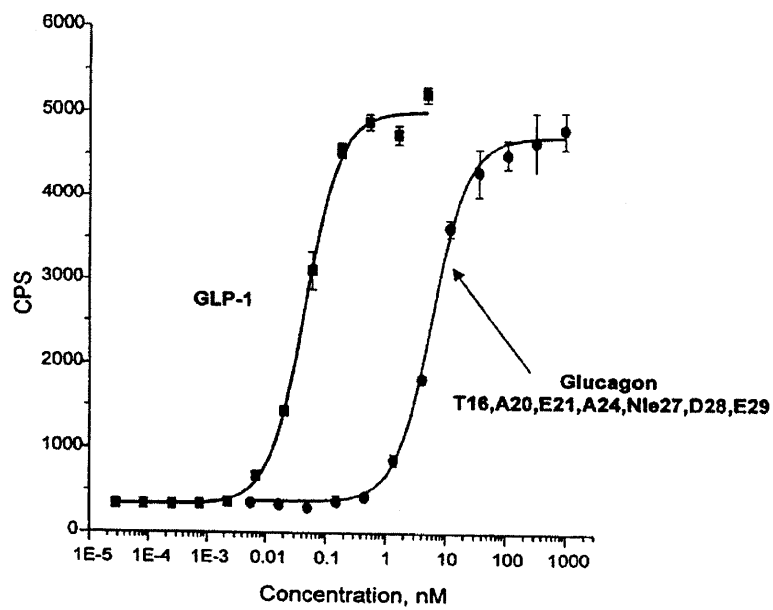
도면11a

글루카곤 수용체 매개된 cAMP 유도

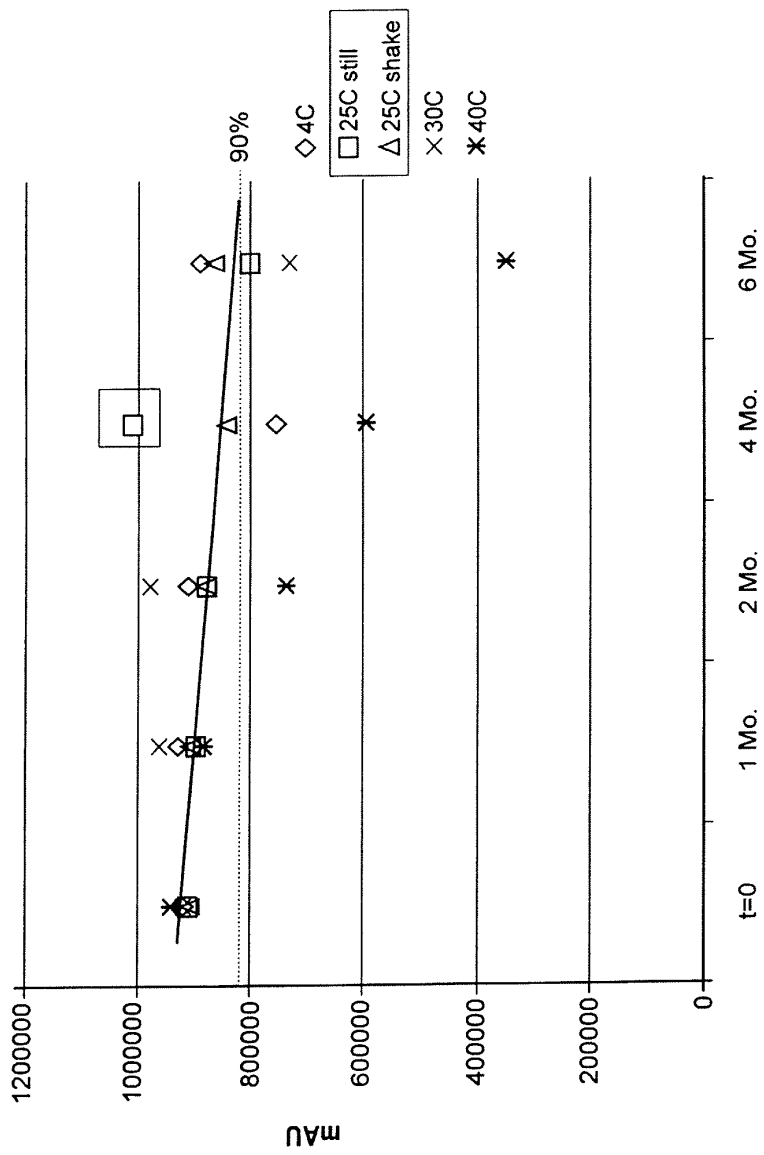


도면11b

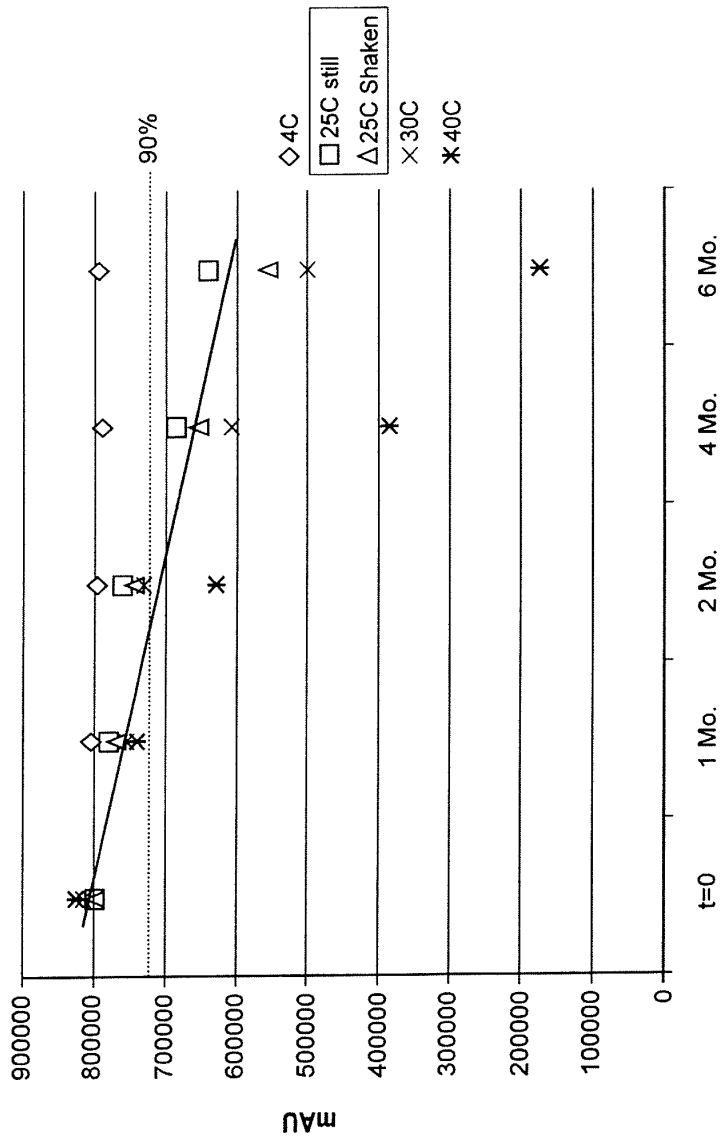
GLP-1 수용체 매개된 cAMP 유도



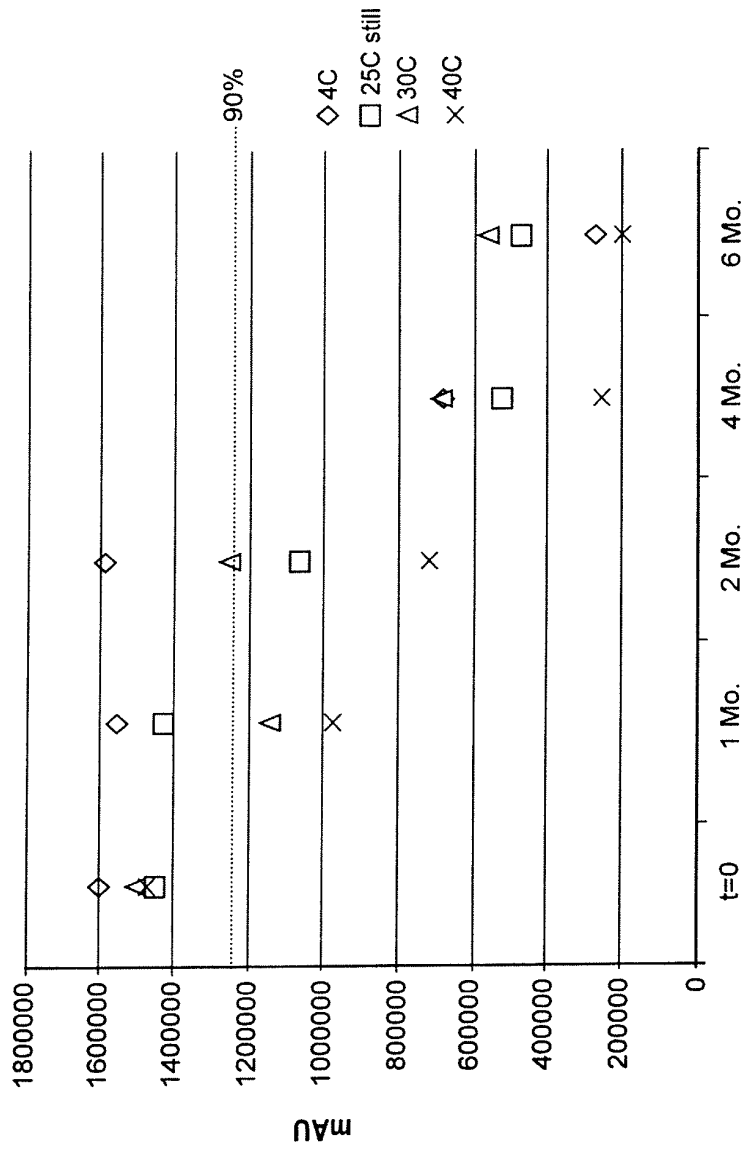
도면12



도면13

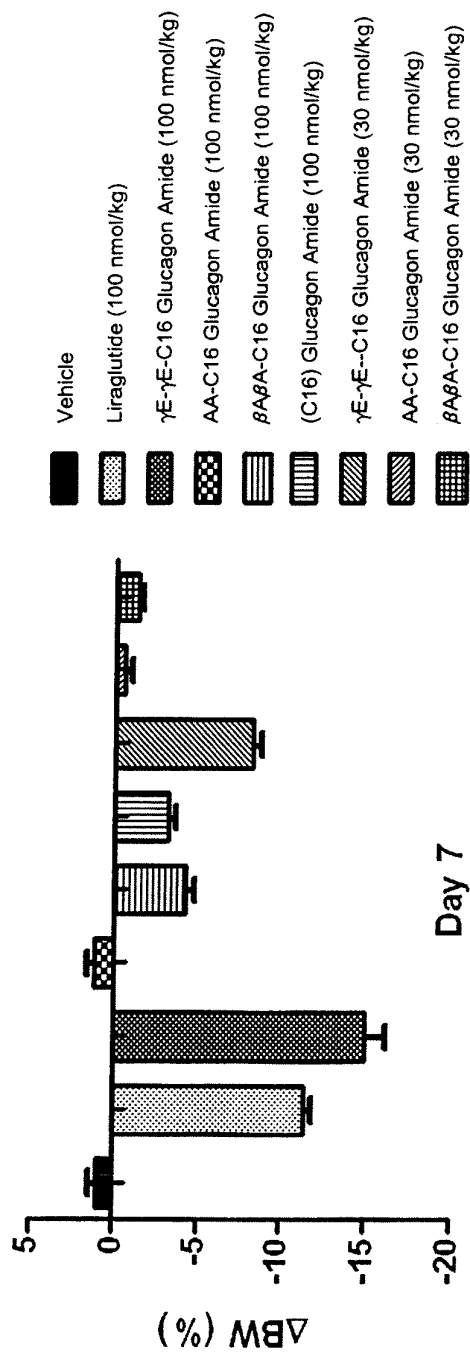


도면14

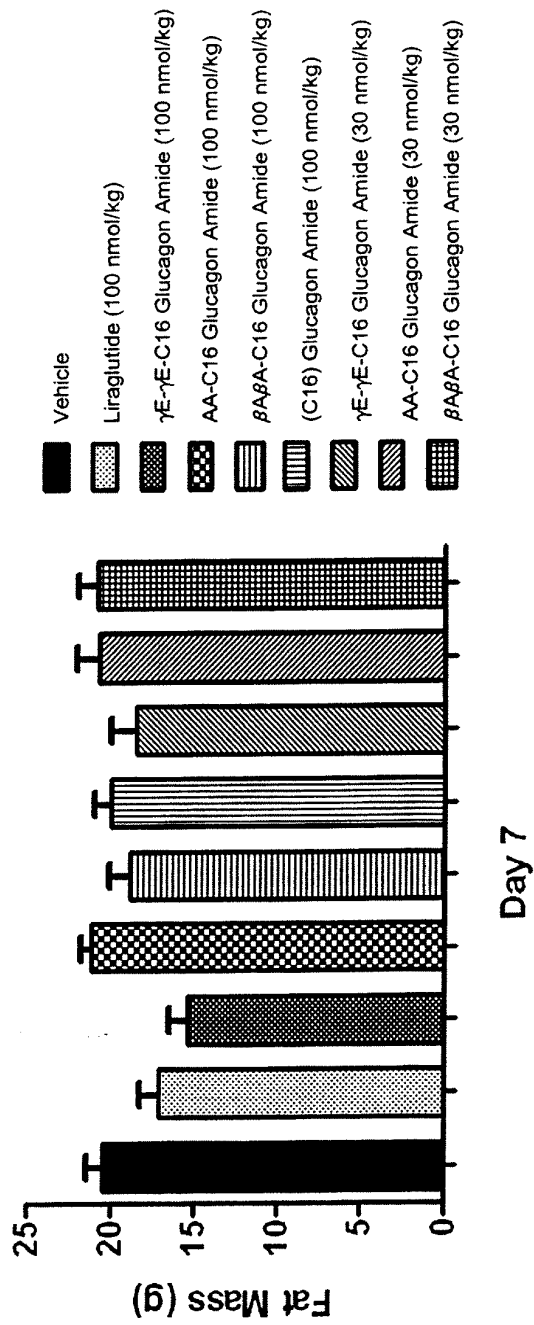




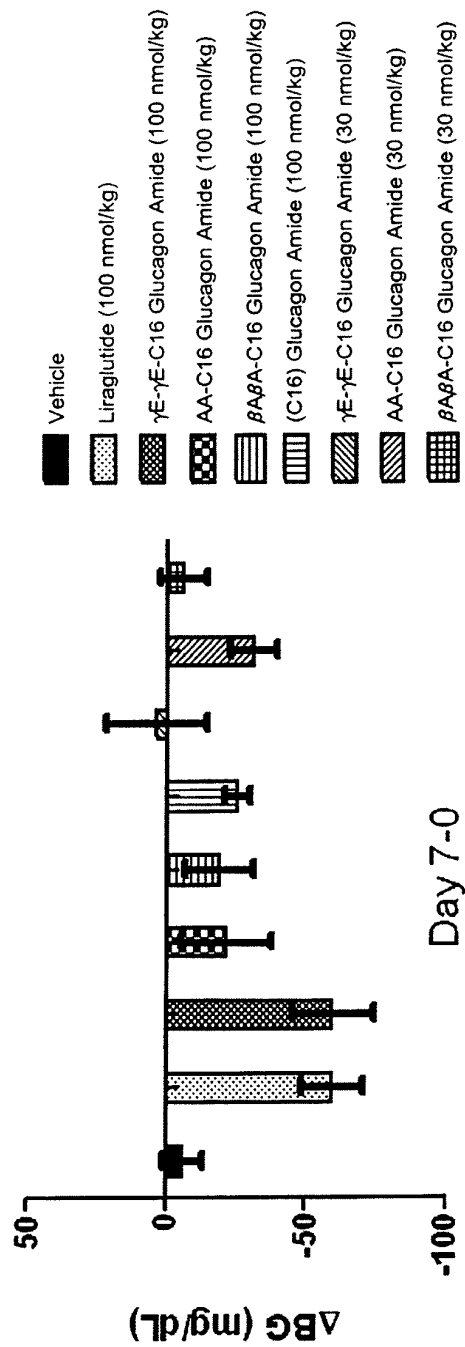
도면15



도면16



도면17



서열 목록

SEQUENCE LISTING

<110> DiMarchi, Richard  
Smiley, David  
DiMarchi, Maria  
Chabenne, Joseph  
Day, Jonathan

<120> GLUCAGON ANALOGS EXHIBITING ENHANCED STABILITY AND SOLUBILITY IN  
PHYSIOLOGICAL PH BUFFERS

<130> 29920-207041 (31135/43976C)

<160> 115

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 29

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

His Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Ser

1 5 10 15

Arg Arg Ala Gln Asp Phe Val Gln Trp Leu Met Asn Thr

20 25

<210> 2

<211> 29

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Glucagon analogue

<220><221> MOD\_RES

<222> (16)..(16)

<223> Xaa is Ser, Cys, Orn, homocysteine or acetyl phenyalanine

<220><221> MOD\_RES

<222> (27)..(27)

<223> Xaa is Met, Leu or Nle

<400> 2

His Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Xaa

1 5 10 15

Arg Arg Ala Gln Asp Phe Val Gln Trp Leu Xaa Asp Thr

20 25

<210> 3

<211> 29

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Glucagon analogue

<220><221> MOD\_RES

<222> (17)..(17)

<223> Xaa is Arg, Cys, Orn, homocysteine or acetyl phenyalanine

<220><221> MOD\_RES

<222> (27)..(27)

<223> Xaa is Met, Leu or Nle

<400> 3

His Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Ser

1 5 10 15

Xaa Arg Ala Gln Asp Phe Val Gln Trp Leu Xaa Asp Thr

20 25

<210> 4

<211> 29

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Glucagon analogue

<220><221> MOD\_RES

<222> (21)..(21)

<223> Xaa is Asp, Cys, Orn, homocysteine or acetyl phenylalanine

<220><221> MOD\_RES

<222> (27)..(27)

<223> Xaa is Met, Leu or Nle

<400> 4

His Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Ser

1 5 10 15

Arg Arg Ala Gln Xaa Phe Val Gln Trp Leu Xaa Asp Thr

20 25

<210> 5

<211> 29

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic peptide

<220><221> MOD\_RES

<222> (24)..(24)

<223> Xaa is Gln, Cys, Orn, homocysteine or acetyl phenylalanine

<220><221> MOD\_RES

<222> (27)..(27)

<223> Xaa is Met, Leu or Nle

<400> 5

His Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Ser

1 5 10 15

Arg Arg Ala Gln Asp Phe Val Xaa Trp Leu Xaa Asp Thr

20 25

<210> 6

<211> 29

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Glucagon analogue

<220><221> MOD\_RES

<222> (21)..(21)

<223> Xaa is Asp, Cys, Orn, homocysteine or acetyl phenylalanine

<220><221> MOD\_RES

<222> (24)..(24)

<223> Xaa is Gln, Cys, Orn, homocysteine or acetyl phenylalanine

<220><221> MOD\_RES

<222> (27)..(27)

<223> Xaa is Met, Leu or Nle

<400> 6

His Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Ser

1 5 10 15

Arg Arg Ala Gln Xaa Phe Val Xaa Trp Leu Xaa Asp Thr

20 25

<210> 7

<211> 29

<212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Glucagon analogue  
 <220><221> MOD\_RES  
 <222> (27)..(27)  
 <223> Xaa is Met, Leu or Nle  
 <220><221> MOD\_RES  
 <222> (28)..(28)  
 <223> Xaa is Lys, Arg, His, Asp, Glu, cysteic acid or homocysteic acid  
 <220><221> MOD\_RES  
 <222> (29)..(29)  
 <223> Xaa is Thr, Lys, Arg, His, Asp, Glu, cysteic acid or homocysteic

acid

<400> 7  
 His Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Ser  
 1 5 10 15  
 Arg Arg Ala Gln Asp Phe Val Gln Trp Leu Xaa Xaa Xaa  
 20 25

<210> 8  
 <211> 29  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Glucagon analogue  
 <220><221> MOD\_RES  
 <222> (27)..(27)  
 <223> Xaa is Met, Leu or Nle  
 <220><221> MOD\_RES  
 <222> (28)..(28)  
 <223> Xaa is Asp or Glu  
 <220><

221> MOD\_RES  
 <222> (29)..(29)  
 <223> Xaa is Thr, Asp or Glu  
 <400> 8



His Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Ser  
1 5 10 15

Arg Arg Ala Gln Asp Phe Val Gln Trp Leu Xaa Xaa Xaa  
20 25

<210> 9

<211> 29

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Glucagon analogue

<220><221> MOD\_RES

<222> (27)..(27)

<223> Xaa is Met, Leu or Nle

<220><221> MOD\_RES

<222> (29)..(29)

<223> Xaa is Asp or Glu

<400> 9

His Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Ser  
1 5 10 15

Arg Arg Ala Gln Asp Phe Val Gln Trp Leu Xaa Asn Xaa  
20 25

<210> 10

<211> 29

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic peptide

<220><221> MOD\_RES

<222> (27)..(27)

<223> Xaa is Met, Leu or Nle

<400> 10

His Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Ser

1 5 10 15

Arg Arg Ala Gln Asp Phe Val Gln Trp Leu Xaa Asp Thr  
20 25

<210> 11

<211> 29

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Glucagon analogue

<400> 11

His Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Ser

1 5 10 15

Arg Arg Ala Gln Asp Phe Val Gln Trp Leu Met Asp Thr

20 25

<210> 12

<211> 29

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Glucagon analogue

<220><221> MOD\_RES

<222> (29)..(29)

<223> Xaa is Lys, Arg or His

<400> 12

His Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Ser

1 5 10 15

Arg Arg Ala Gln Asp Phe Val Gln Trp Leu Met Asn Xaa

20 25

<210> 13

<211> 29

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Glucagon analogue

<400> 13

His Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Glu Ser

1 5 10 15

Arg Arg Ala Gln Asp Phe Val Gln Trp Leu Met Asp Thr

20 25

<210> 14

<211> 29

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic peptide

<220><221> MOD\_RES

<222> (16)..(16)

<223> Pegylation

<220><221> MOD\_RES

<222> (27)..(27)

<223> Xaa is Met, Leu or Nle

<400> 14

His Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Cys

1 5 10 15

Arg Arg Ala Gln Asp Phe Val Gln Trp Leu Xaa Asp Thr

20 25

<210> 15

<211> 29

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Glucagon analogue

<220><221> MOD\_RES

<222> (17)..(17)

<223> Pegylation

<220><221> MOD\_RES

<222> (27)..(27)

<223> Xaa is Met, Leu or Nle

<400> 15

His Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Ser

1 5 10 15

Cys Arg Ala Gln Asp Phe Val Gln Trp Leu Xaa Asp Thr

20 25

<210> 16

<211> 29

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Glucagon analogue

<220><221> MOD\_RES

<222> (21)..(21)

<223> Pegylation

<220><221> MOD\_RES

<222> (27)..(27)

<223> Xaa is Met, Leu or Nle

<400> 16

His Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Ser

1 5 10 15

Arg Arg Ala Gln Cys Phe Val Gln Trp Leu Xaa Asp Thr

20

25

<210> 17

<211> 29

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Glucagon analogue

<220><221> MOD\_RES

<222> (24)..(24)

<223> Pegylation

<220><221> MOD\_RES

<222> (27)..(27)

<223> Xaa is Met, Leu or Nle

<400> 17

His Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Ser

1 5 10 15

Arg Arg Ala Gln Asp Phe Val Cys Trp Leu Xaa Asp Thr

20

25

<210> 18

<211> 29

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Glucagon analogue

<220><221> MOD\_RES

<222> (21)..(21)

<223> Pegylation

<220><221> MOD\_RES

<222> (27)..(27)

<223> Xaa is Met, Leu or Nle

<400> 18

His Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Arg Tyr Leu Asp Ser

1 5 10 15

Arg Arg Ala Gln Lys Phe Val Gln Trp Leu Xaa Asp Thr

20 25

<210> 19

<211> 29

<

212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Glucagon analogue

<220><221> MOD\_RES

<222> (24)..(24)

<223> Pegylation

<220><221> MOD\_RES

<222> (27)..(27)

<223> Xaa is Met, Leu or Nle

<400> 19

His Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Arg Tyr Leu Asp Ser

1 5 10 15

Arg Arg Ala Gln Asp Phe Val Lys Trp Leu Xaa Asp Thr

20 25

<210> 20

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic peptide

<220><221> MISC\_FEATURE

<223> Peptide fragment representing carboxy terminal 10 amino acids of  
Exendin-4

<400> 20

Gly Pro Ser Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser

1 5 10

<210> 21

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic peptide

<220><221> MISC\_FEATURE

<223> Peptide fragment representing the carboxy terminal 8 amino acids  
of oxyntomodulin

<400> 21

Lys Arg Asn Arg Asn Asn Ile Ala

1 5

<210> 22

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic peptide

<220><221> MISC\_FEATURE

<223> Peptide fragment representing the amino 4 amino acids of  
oxyntomodulin carboxy terminus of SEQ ID NO: 21

<400> 22

Lys Arg Asn Arg

1

<210> 23

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic peptide

<220><221> MISC\_FEATURE

<223> Peptide fragment representing the carboxy terminal 10 amino acids

of Exendin-4

<220><221> MOD\_RES

<222> (10)..(10)

<223> AMIDATION

<400> 23

Gly Pro Ser Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser

1 5 10

<210> 24

<211> 39

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Glucagon analogue

<400> 24

His Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Ser

1 5 10 15

Arg Arg Ala Gln Asp Phe Val Gln Trp Leu Met Asp Thr Gly Pro Ser

20 25 30

Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser

35

<210> 25

<211> 37

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Glucagon analogue

<400> 25

His Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Ser

1 5 10 15

Arg Arg Ala Gln Asp Phe Val Gln Trp Leu Met Asp Thr Lys Arg Asn

20 25 30



Arg Asn Asn Ile Ala

35

<210> 26

<211> 33

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Glucagon analogue

<400> 26

His Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Ser

1 5 10 15

Arg Arg Ala Gln Asp Phe Val Gln Trp Leu Met Asp Thr Lys Arg Asn

20 25 30

Arg

<210> 27

<211> 29

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Glucagon analogue

<400> 27

His Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Ser

1 5 10 15

Cys Arg Ala Gln Asp Phe Val Gln Trp Leu Met Asn Thr

20 25

<210> 28

<211> 39

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic peptide

<400> 28

His Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Ser

1 5 10 15

Arg Arg Ala Gln Asp Phe Val Gln Trp Leu Met Asn Thr Gly Pro Ser

20 25 30

Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser

35

<210> 29

<211> 29

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Glucagon analogue

<220><221> MOD\_RES

<222> (24)..(24)

<223> 2-butyrolactone bound through Cys thiol group

<400> 29

His Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Ser

1 5 10 15

Arg Arg Ala Gln Asp Phe Val Gln Trp Leu Met Asn Thr

20 25

<210

> 30

<211> 29

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Glucagon analogue

<220><221> MOD\_RES

<222> (24)..(24)

<223> Carboxymethyl group bound through Cys thiol group

<400> 30

His Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Ser

1 5 10 15

Arg Arg Ala Gln Asp Phe Val Gln Trp Leu Met Asn Thr

20 25

<210> 31

<211> 39

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Glucagon analogue

<400> 31

His Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Ser

1 5 10 15

Arg Arg Ala Gln Asp Phe Val Gln Trp Leu Met Asn Thr Gly Pro Ser

20 25 30

Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser

35

<210> 32

<211> 30

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Glucagon analog

<220><221> MOD\_RES

<222> (30)..(30)

<223>

> Xaa is Asp, Glu, Lys, Arg or His

<400> 32

His Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Ser

1 5 10 15

Arg Arg Ala Gln Asp Phe Val Gln Trp Leu Met Asp Thr Xaa

20 25 30

<210> 33

<211> 29

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Glucagon analogue

<220><221> MOD\_RES

<222> (15)..(15)

<223> Xaa is Asp, Glu, cysteic acid, homoglutamic acid or homocysteic

acid

<220><221> MOD\_RES

<222> (27)..(27)

<223> Xaa is Met, Leu or Nle

<220><221> MOD\_RES

<222> (28)..(28)

<223> Xaa is Asn, Lys, Arg, His, Asp or Glu

<220><221> MOD\_RES

<222> (29)..(29)

<223> Xaa is Thr, Lys, Arg, His, Asp or Glu

<400> 33

His Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Xaa Ser

1 5 10 15

Arg Arg Ala Gln Asp Phe Val Gln Trp Leu Xaa Xaa Xaa

20 25

<210> 34

<211> 29

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Glucagon analogue

<220><221> MOD\_RES

<222> (15)..(15)

<223> Xaa is Asp, Glu, cysteic acid, homoglutamic acid or homocysteic acid

<220><221> MOD\_RES

<222> (27)..(27)

<223> Xaa is Met, Leu or Nle

<220><221> MOD\_RES

<222> (28)..(28)

<223> Xaa is Asn or an acidic amino acid

<220><221> MOD\_RES

<222> (29)..(29)

<223> Xaa is Thr or an acidic amino acid

<400> 34

His Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Xaa Ser

1 5 10 15

Arg Arg Ala Gln Asp Phe Val Gln Trp Leu Xaa Xaa Xaa

20 25

<210> 35

<211> 39

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic peptide

<400> 35

His Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Ser

1 5 10 15

Arg Arg Ala Gln Asp Phe Val Gln Trp Leu Met Glu Thr Gly Pro Ser

20 25 30

Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser

35

<210> 36

<211> 37

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Glucagon analogue

<400> 36

His Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Ser

1 5 10 15

Arg Arg Ala Gln Asp Phe Val Gln Trp Leu Met Glu Thr Lys Arg Asn

20 25 30

Arg Asn Asn Ile Ala

35

<210> 37

<211> 33

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Glucagon analogue

<400> 37

His Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Ser  
 1 5 10 15  
 Arg Arg Ala Gln Asp Phe Val Gln Trp Leu Met Glu Thr Lys Arg Asn  
 20 25 30  
 Arg

<210> 38

<211> 29

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Glucagon analogue

<400> 38

His Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Ser  
 1 5 10 15  
 Arg Arg Ala Gln Asp Phe Val Gln Trp Leu Met Glu Thr  
 20 25

<210> 39

<211> 27

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic peptide

<220><221> MOD\_RES

<222> (1)..(1)

<223> Xaa is any amino acid

<220><221> MOD\_RES

<222> (2)..(2)

<223> Xaa is any amino acid

<220><221> MOD\_RES

<222> (27)..(27)

<223> Met comprises Z

<400> 39

Xaa Xaa Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Ser  
 1 5 10 15

Arg Arg Ala Gln Asp Phe Val Gln Trp Leu Met

20

25

<210> 40

<211> 29

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic peptide

<220><221> MOD\_RES

<222> (1)..(1)

<223> Xaa is alpha, alpha-dimethyl imidazole acetic acid (DMIA)

<220><221> MISC\_FEATURE

<222> (16)..(20)

<223> Lactam bridge between residues 16 and 20

<220><221> MOD\_RES

<222> (24)..(24)

<223> Pegylation

<400> 40

Xaa Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Glu

1

5

10

15

Arg Arg Ala Lys Asp Phe Val Cys Trp Leu Met Asn Thr

20

25

<210> 41

<211> 29

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic peptide

<220><221> MOD\_RES

<222> (1)..(1)

<223> Xaa is alpha, alpha-dimethyl imidazole acetic acid (DMIA)

<220><221> MISC\_FEATURE

<222> (16)..(20)

<223> Lactam bridge between residues 16 and 20

<220><221> MOD\_RES



<222> (24)..(24)

<223> Glutamine to alanine mutation

<220><221> MOD\_RES

<222> (29)..(29)

<223> Pegylation

<400> 41

Xaa Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Glu

1 5 10 15

Arg Arg Ala Lys Asp Phe Val Ala Trp Leu Met Asn Cys

20 25

<210> 42

<211> 29

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic peptide

<220><221> MOD\_RES

<222> (1)..(1)

<223> Xaa is alpha, alpha-dimethyl imidiazole acetic acid (DMIA)

<220><221> MISC\_FEATURE

<222> (16)..(20)

<223> Lactam bridge between residues 16 and 20

<220><221> MOD\_RES

<222> (24)..(24)

<223> Pegylation

<220><221> MOD\_RES

<222> (27)..(27)

<223> Xaa is Nle or Leu

<400> 42

Xaa Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Glu

1 5 10 15

Arg Arg Ala Lys Asp Phe Val Cys Trp Leu Xaa Asn Thr

20 25

<210> 43

<211> 29  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Synthetic peptide  
 <220><221> MOD\_RES  
 <222> (1)..(1)  
 <223> Xaa is alpha, alpha-dimethyl imidazole acetic acid (DMIA)  
 <220><221> MISC\_FEATURE  
 <222> (16)..(20)  
 <223> Lactam bridge between residues 16 and 20  
 <220><221> MISC\_FEATURE  
 <222> (24)..(24)  
 <223> Glutamine to alanine mutation  
 <220><221> MISC\_FEATURE  
 <222> (27)..(27)  
 <223> Xaa is Nle or Leu  
  
 <220><221> MOD\_RES  
 <222> (29)..(29)  
 <223> Pegylation  
 <400> 43  
 Xaa Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Glu  
 1 5 10 15  
 Arg Arg Ala Lys Asp Phe Val Ala Trp Leu Xaa Asn Cys  
 20 25  
 <210> 44  
 <211> 29  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Synthetic peptide  
 <220><221> MISC\_FEATURE  
 <223> SEQ ID NO: 1 with Ala 20, Ala 24, Nle 27, and Asp 28  
 <220><221>  
 > MOD\_RES  
 <222> (27)..(27)

<223> Xaa is Nle

<400> 44

His Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Ser

1 5 10 15

Arg Arg Ala Ala Asp Phe Val Ala Trp Leu Xaa Asp Thr

20 25

<210> 45

<211> 29

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic peptide

<220><221> MISC\_FEATURE

<223> SEQ ID NO: 1 with Ala 20, Ala 24, Nle27 , Asp 28, and Glu 29

<220><221> MOD\_RES

<222> (27)..(27)

<223> Xaa is Nle

<400> 45

His Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Ser

1 5 10 15

Arg Arg Ala Ala Asp Phe Val Ala Trp Leu Xaa Asp Glu

20 25

<210> 46

<211> 30

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic peptide

<220><221> MISC\_FEATURE

<223> SEQ ID NO: 1 with Ala 20, Ala 24, Nle 27, Asp 28, and Glu 30

<220><221> MOD\_RES

<222>

> (27)..(27)

<223> Xaa is Nle

<400> 46

His Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Ser

1 5 10 15

Arg Arg Ala Ala Asp Phe Val Ala Trp Leu Xaa Asp Thr Glu

20 25 30

<210> 47

<211> 29

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic peptide

<220><221> MISC\_FEATURE

<223> SEQ ID NO: 1 with Ala 20, Ala 24, Nle 27, Glu 28, and Glu 29

<220><221> MOD\_RES

<222> (27)..(27)

<223> Xaa is Nle

<400> 47

His Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Ser

1 5 10 15

Arg Arg Ala Ala Asp Phe Val Ala Trp Leu Xaa Glu Glu

20 25

<210> 48

<211> 30

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic peptide

<220><221> MISC\_FEATURE

<223> SEQ ID NO: 1 with Ala 20, Ala 24, Nle 27, Glu 28, and Glu 30

<220><221> MOD\_RES

<222>

> (27)..(27)

<223> Xaa is Nle

<400> 48

His Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Ser

1 5 10 15

Arg Arg Ala Ala Asp Phe Val Ala Trp Leu Xaa Glu Thr Glu

20 25 30

<210> 49  
 <211> 30  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Synthetic peptide  
 <220><221> MOD\_RES  
 <222> (27)..(27)  
 <223> Xaa is Nle  
 <220><221> MISC\_FEATURE  
 <222> (27)..(27)  
 <223> SEQ ID NO: 1 with Ala 20, Ala 24, Nle 27, Glu 29, and Glu 30

<400> 49  
 His Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Ser  
 1 5 10 15  
 Arg Arg Ala Ala Asp Phe Val Ala Trp Leu Xaa Asn Glu Glu  
 20 25 30

<210> 50  
 <211> 29  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Synthetic peptide  
 <220><221> MISC\_FEATURE  
 <223> SEQ ID NO: 1 with Ala 20, Glu 21, Ala 24, Nle 27, and Asp 28  
 <220><221> MOD\_RES  
 <222> (27)..(27)  
 <223> Xaa is Nle

<400> 50  
 His Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Ser  
 1 5 10 15  
 Arg Arg Ala Ala Glu Phe Val Ala Trp Leu Xaa Asp Thr  
 20 25

<210> 51  
 <211> 29

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic peptide

<220><221> MISC\_FEATURE

<223> SEQ ID NO: 1 with Ala 20, Glu 21, Ala 24, Nle 27, Asp 28, and Glu  
29

<220><221> MOD\_RES

<222> (27)..(27)

<223>

Xaa is Nle

<400> 51

His Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Ser

1 5 10 15

Arg Arg Ala Ala Glu Phe Val Ala Trp Leu Xaa Asp Glu

20 25

<210> 52

<211> 29

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic peptide

<220><221> MISC\_FEATURE

<223> SEQ ID NO: 1 with Ala 20, Glu 21, Ala 24, Nle 27, Asp 28, and Glu  
30

<220><221> MOD\_RES

<222> (27)..(27)

<223> Xaa is Nle

<400> 52

His Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Ser

1 5 10 15

Arg Arg Ala Ala Glu Phe Val Ala Trp Leu Xaa Asp Glu

20 25

<210> 53

<211> 29

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic peptide

<220><221> MISC\_FEATURE

<223> SEQ ID NO :1 with Ala 20, Glu 21, Ala 24, Nle 27, Glu 28, and Glu  
29

<220><221> MOD\_RES

<222>

(27)..(27)

<223> Xaa is Nle

<400> 53

His Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Ser

1 5 10 15

Arg Arg Ala Ala Glu Phe Val Ala Trp Leu Xaa Glu Glu

20 25

<210> 54

<211> 29

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic peptide

<220><221> MISC\_FEATURE

<223> SEQ ID NO: 1 with Ala 20, Glu 21, Ala 24, Nle 27, Glu 28, and Glu  
30

<400> 54

His Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Ser

1 5 10 15

Arg Arg Ala Gln Asp Phe Val Gln Trp Leu Met Asn Thr

20 25

<210> 55

<211> 30

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic peptide

<220><221> MISC\_FEATURE

<223> SEQ ID NO: 1 with Ala 20, Glu 21, Ala 24, Nle 27, Glu 29, and Glu



30

<220><221> MOD\_RES

<222> (27)..(27)

<223> Xaa is Nle

<400> 55

His Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Ser

1 5 10 15

Arg Arg Ala Ala Glu Phe Val Ala Trp Leu Xaa Asn Glu Glu

20 25 30

<210> 56

<211> 29

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic peptide

<220><221> MISC\_FEATURE

<223> SEQ ID NO: 1 with Thr 16, Ala 20, Glu 21, Ala 24, Nle 27, Asp 28,  
and Glu29

<220><221> MOD\_RES

<222> (27)..(27)

<223> Xaa is Nle

<400> 56

His Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Thr

1 5 10 15

Arg Arg Ala Ala Glu Phe Val Ala Trp Leu Xaa Asp Glu

20 25

<210> 57

<211> 31

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 57

His Ala Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Gly

1 5 10 15

Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly Arg Gly

20 25 30

<210> 58

<211> 30

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220><221> MOD\_RES

<222> (30)..(30)

<223> AMIDATION

<400> 58

His Ala Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Gly

1 5 10 15

Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly Arg

20 25 30

<210> 59

<211> 29

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

><223> Synthetic peptide

<220><221> MOD\_RES

<222> (3)..(3)

<223> Xaa is Glutamine analog

<220><221> MOD\_RES

<222> (27)..(27)

<223> Xaa is Nle

<400> 59

His Ser Xaa Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Thr

1 5 10 15

Arg Arg Ala Ala Glu Phe Val Ala Trp Leu Xaa Asp Glu

20 25

<210> 60

<211> 29

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic peptide

<220><221> MOD\_RES

<222> (3)..(3)

<223> Xaa is Glutamine analog

<220><221> MOD\_RES

<222> (16)..(16)

<223> Xaa is Aminoisobutyric acid

<400> 60

His Ser Xaa Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Xaa

1 5 10 15

Arg Arg Ala Ala Asp Phe Val Ala Trp Leu Met Asp Glu

20 25

<210> 61

<211> 29

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic peptide

<220><221>

> MOD\_RES

<222> (27)..(27)

<223> Xaa is Nle

<400> 61

His Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Thr

1 5 10 15

Arg Arg Ala Ala Glu Phe Val Ala Trp Leu Xaa Asp Glu

20 25

<210> 62

<211> 29

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic peptide

<220><221> MOD\_RES

<222> (3)..(3)

<223> Xaa is Acetamidomethyl-cysteine

<220><221> MOD\_RES

<222>

(27)..(27)

<223> Xaa is Nle

<400> 62

His Ser Xaa Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Thr

1 5 10 15

Arg Arg Ala Ala Glu Phe Val Ala Trp Leu Xaa Asp Glu

20 25

<210> 63

<211> 29

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic peptide

<220><221> MOD\_RES

<222> (3)..(3)

<223> Xaa is Acetyldiaminobutanoic acid

<220><221> MOD\_RES

<222> (27)..(27)

<223>

> Xaa is Nle

<400> 63

His Ser Xaa Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Thr

1 5 10 15

Arg Arg Ala Ala Glu Phe Val Ala Trp Leu Xaa Asp Glu

20 25

<210> 64

<211> 29

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic peptide

<220><221> MOD\_RES

<222> (3)..(3)

<223> Xaa is Carbamoyldiaminopropanoic acid

<220><221> MOD\_RES

<222> (27)..(27)

<223> Xaa is Nle

<400> 64

His Ser Xaa Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Thr

1 5 10 15

Arg Arg Ala Ala Glu Phe Val Ala Trp Leu Xaa Asp Glu

20 25

<210> 65

<211> 29

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic peptide

<220><221> MOD\_RES

<222> (3)..(3)

<223> Xaa is Methylglutamine

<220><221> MOD\_RES

<222> (27)..(27)

<223> Xaa is Nle

<400> 65

His Ser Xaa Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Thr

1 5 10 15

Arg Arg Ala Ala Glu Phe Val Ala Trp Leu Xaa Asp Glu

20 25

<210> 66

<211> 29

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic peptide

<220><221> MOD\_RES

<222> (3)..(3)

<223> Xaa is Methionine sulfoxide

<220><221> MOD\_RES

<222> (27)..(27)

<223> Xaa is Nle

<400> 66

His Ser Xaa Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Thr

1 5 10 15

Arg Arg Ala Ala Glu Phe Val Ala Trp Leu Xaa Asp Glu

20 25

<210> 67

<211> 29

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic peptide

<220><221> MOD\_RES

<222> (3)..(3)

<223> Xaa is Acetylornithine

<220><221> MOD\_RES

<222> (27)..(27)

<223> Xaa is Nle

<400> 67

His Ser Xaa Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Thr

1 5 10 15

Arg Arg Ala Ala Glu Phe Val Ala Trp Leu Xaa Asp Glu

20 25

<210> 68

<211> 29

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic peptide

<220><221> MOD\_RES

<222> (16)..(16)

<223> Xaa is Aminoisobutyric acid

<400> 68

His Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Xaa

1 5 10 15

Arg Arg Ala Ala Asp Phe Val Ala Trp Leu Met Asp Glu

20 25

<210> 69

<211> 29

<212

> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic peptide

<220><221> MOD\_RES

<222> (3)..(3)

<223> Xaa is Acetyldiaminobutanoic acid

<220><221> MOD\_RES

<222> (16)..(16)

<223> Xaa is Aminoisobutryic acid

<400> 69

His Ser Xaa Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Xaa

1 5 10 15

Arg Arg Ala Ala Asp Phe Val Ala Trp Leu Met Asp Glu

20 25

<210> 70

<211> 29

<212

> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic peptide

<220><221> MOD\_RES

<222> (3)..(3)

<223> Xaa is Methylglutamine

<220><221> MOD\_RES

<222> (16)..(16)

<223> Xaa is Aib

<400> 70

His Ser Xaa Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Xaa

1 5 10 15

Arg Arg Ala Ala Asp Phe Val Ala Trp Leu Met Asp Glu

20

25

<210> 71

<211> 29

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic peptide

<220><221> MOD\_RES

<222> (3)..(3)

<223> Xaa is acetyldiaminobutanoic acid

<220><221> MOD\_RES

<222> (16)..(16)

<223> Xaa is Aib

<400> 71

His Ser Xaa Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Xaa

1

5

10

15

Arg Arg Ala Ala Asp Phe Val Ala Trp Leu Leu Asp Glu

20

25

<210> 72

<211> 39

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic peptide

<220><221> MOD\_RES

<222> (3)..(3)

<223> Xaa is Acetyldiaminobutanoic acid

<220><221> MOD\_RES

<222> (16)..(16)

<223> Aminoisobutyric Acid

<220><221> MOD\_RES

<222> (39)..(39)

<223> AMIDATION

<400> 72



His Ser Xaa Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Xaa  
 1 5 10 15  
 Arg Arg Ala Ala Asp Phe Val Ala Trp Leu Leu Asp Thr Gly Pro Ser  
 20 25 30  
 Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser

35  
 <210> 73  
 <211> 29  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Synthetic peptide  
 <220><221> MOD\_RES  
 <222> (3)..(3)  
 <223> Xaa is Acetyldiaminobutanoic acid  
 <220><221> MOD\_RES  
 <222> (16)..(16)  
 <223> Xaa is Aminoisobutyric acid  
 <400> 73

His Ser Xaa Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Xaa  
 1 5 10 15  
 Arg Arg Ala Ser Asp Phe Val Ser Trp Leu Leu Asp Glu  
 20 25

<210> 74  
 <211> 29  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Synthetic peptide  
 <220><221> MOD\_RES  
 <222> (3)..(3)  
 <223> Xaa is Acetyldiaminobutanoic acid  
 <220><221> MOD\_RES  
 <222> (16)..(16)  
 <223> Xaa is Aminoisobutyric acid

<400> 74

His Ser Xaa Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Xaa

1 5 10 15

Arg Arg Ala Thr Asp Phe Val Thr Trp Leu Leu Asp Glu

20 25

<210> 75

<211> 29

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic peptide

<400> 75

His Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Ser

1 5 10 15

Arg Arg Ala Gln Asp Phe Val Gln Trp Leu Met Asp Glu

20 25

<210> 76

<211> 29

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic peptide

<220><221> MOD\_RES

<222> (16)..(16)

<223> Xaa is Aib

<

400> 76

His Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Xaa

1 5 10 15

Arg Arg Ala Gln Asp Phe Val Gln Trp Leu Met Asp Glu

20 25

<210> 77

<211> 29

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic peptide

<220><221> misc\_feature

<222> (3)..(3)

<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<400> 77

His Ser Xaa Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Ser

1 5 10 15

Arg Arg Ala Gln Asp Phe Val Gln Trp Leu Met Asn Thr

20 25

<210> 78

<211> 29

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic peptide

<400> 78

His Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Ser

1 5 10 15

Arg Arg Ala Gln Asp Phe Val Gln Trp Leu Met Asp Thr

20 25

<210> 79

<211> 30

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic peptide

<220><221> MOD\_RES

<222> (2)..(2)

<223> D-Ser

<220><221> MOD\_RES

<222> (30)..(30)

<223> Acylated with a C14 fatty acyl group

<220><221> MOD\_RES

<222> (30)..(30)

<223> AMIDATION

<400> 79

His Xaa Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Glu  
 1                      5                      10                      15  
 Arg Arg Ala Lys Asp Phe Val Gln Trp Leu Met Asn Thr Lys  
                     20                      25                      30

<210> 80  
 <211> 29  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Synthetic peptide  
 <220><221> MOD\_RES  
 <222> (2)..(2)  
 <223> D-Ser  
 <220><221> MOD\_RES  
 <222> (10)..(10)  
 <223> Acylated with a C14 fatty acyl group  
 <220><221> MOD\_RES  
 <222> (29)..(29)  
 <223> AMIDATION  
 <400> 80

His Xaa Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Lys Ser Lys Tyr Leu Asp Glu  
 1                      5                      10                      15  
 Arg Arg Ala Lys Asp Phe Val Gln Trp Leu Met Asn Thr  
                     20                      25

<210> 81  
 <211> 30  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Synthetic peptide  
 <220><221> MOD\_RES  
 <222> (2)..(2)  
 <223> D-Ser  
 <220><221> MOD\_RES  
 <222> (30)..(30)

<223> Acylated with a C16 fatty acyl group

<220><221> MOD\_RES

<222> (30)..(30)

<223> AMIDATION

<400> 81

His Xaa Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Glu

1 5 10 15

Arg Arg Ala Lys Asp Phe Val Gln Trp Leu Met Asn Thr Lys

20 25 30

<210> 82

<211> 29

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic peptide

<220><221> MOD\_RES

<222> (2)..(2)

<223> D-Ser

<220><221> MOD\_RES

<222> (10)..(10)

<223> Acylated with a C16 fatty acyl group

<220><221> MOD\_RES

<222> (29)..(29)

<223> AMIDATION

<400> 82

His Xaa Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Lys Ser Lys Tyr Leu Asp Glu

1 5 10 15

Arg Arg Ala Lys Asp Phe Val Gln Trp Leu Met Asn Thr

20 25

<210> 83

<211> 29

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic peptide

<220><221> MOD\_RES

<222> (2)..(2)

<223> Aminoisobutryic Acid

<220><221> MOD\_RES

<222> (10)..(10)

<223> Acylated with a C18 fatty acyl group

<220><221> MOD\_RES

<222> (24)..(24)

<223> Cys-PEG

<220><221> MOD\_RES

<222> (29)..(29)

<223> AMIDATION

<400> 83

His Xaa Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Lys Ser Lys Tyr Leu Asp Glu

1 5 10 15

Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Cys Trp Leu Met Asn Thr

20 25

<210> 84

<211> 30

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic peptide

<220><221> MOD\_RES

<222> (2)..(2)

<223> Aminoisobutryic Acid

<220><221> MOD\_RES

<222> (24)..(24)

<223> Cys-PEG

<220><221> MOD\_RES

<222> (30)..(30)

<223> Acylated with a C18 fatty acyl group

<220><221> MOD\_RES

<222> (30)..(30)

<223> AMIDATION

<400> 84

His Xaa Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Glu

1 5 10 15

Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Cys Trp Leu Met Asn Thr Lys

20 25 30

<210> 85

<211> 29

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic peptide

<220><221> MOD\_RES

<222> (16)..(16)

<223> Xaa is Ser or alpha, alpha-disubstituted amino acid

<220><221> MOD\_RES

<222> (20)..(20)

<223> Xaa is Gln or alpha, alpha-disubstituted amino acid

<220><221> MOD\_RES

<222

> (21)..(21)

<223> Xaa is Asp or alpha, alpha-disubstituted amino acid

<220><221> MOD\_RES

<222> (24)..(24)

<223> Xaa is Gln or alpha, alpha-disubstituted amino acid

<400> 85

His Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Xaa

1 5 10 15

Arg Arg Ala Xaa Xaa Phe Val Xaa Trp Leu Met Asn Thr

20 25

<210> 86

<211> 29

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic peptide

<220><221> MOD\_RES

<222> (16)..(16)

<223> Xaa is Aib

<400> 86

His Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Xaa

1 5 10 15

Arg Arg Ala Gln Asp Phe Val Gln Trp Leu Met Asn Thr

20 25

<210> 87

<211> 29

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic peptide

<220><221> MOD\_RES

<222> (19)..(19)

<223> Xaa is Aib

<400> 87

His Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Ser

1 5 10 15

Arg Arg Xaa Gln Asp Phe Val Gln Trp Leu Met Asn Thr

20 25

<210> 88

<211> 29

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic peptide

<220><221> MOD\_RES

<222> (20)..(20)

<223> Xaa is Aib

<400> 88

His Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Ser

1 5 10 15

Arg Arg Ala Xaa Asp Phe Val Gln Trp Leu Met Asn Thr



20 25

<210> 89

<211> 29

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic peptide

<220><221> MOD\_RES

<222> (21)..(21)

<223> Xaa is Aib

<400> 89

His Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Ser

1 5 10 15

Arg Arg Ala Gln Xaa Phe Val Gln Trp Leu Met Asn Thr

20 25

<210> 90

<211> 29

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic peptide

<220><221> MOD\_RES

<222> (24)..(24)

<223> Xaa is Aib

<400> 90

His Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Ser

1 5 10 15

Arg Arg Ala Gln Asp Phe Val Xaa Trp Leu Met Asn Thr

20 25

<210> 91

<211> 29

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic peptide

<220><221> MOD\_RES

<222> (16)..(16)

<223> Xaa is Aib

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (20)..(20)

<223> Xaa is Aib

<400> 91

His Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Xaa

1 5 10 15

Arg Arg Ala Xaa Asp Phe Val Gln Trp Leu Met Asn Thr

20 25

<210> 92

<211> 29

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic peptide

<220><221> MOD\_RES

<222> (16)..(16)

<223> Xaa is Aib

<220><221> MOD\_RES

<222> (24)..(24)

<223> Xaa is Aib

<400> 92

His Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Xaa

1 5 10 15

Arg Arg Ala Gln Asp Phe Val Xaa Trp Leu Met Asn Thr

20 25

<210> 93

<211> 29

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic peptide

<220><221> MOD\_RES

<222> (20)..(20)

<223> Xaa is Aib

<220><221> MOD\_RES

<222> (24)..(24)

<223> Xaa is Aib

<400> 93

His Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Ser

1 5 10 15

Arg Arg Ala Xaa Asp Phe Val Xaa Trp Leu Met Asn Thr

20 25

<210> 94

<211> 29

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic peptide

<220><221> MOD\_RES

<222> (16)..(16)

<223> Xaa is Aib

<220><221> MOD\_RES

<222> (20)..(20)

<223> Xaa is Aib

<220><221> MOD\_RES

<222> (24)..(24)

<223> Xaa is Aib

<400> 94

His Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Xaa

1 5 10 15

Arg Arg Ala Xaa Asp Phe Val Xaa Trp Leu Met Asn Thr

20 25

<210> 95

<211> 29

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic peptide

<220><221> MOD\_RES

<222> (2)..(2)

<223> Xaa is Aib

<220><221> MOD\_RES

<222> (16)..(16)

<223> Xaa is Aib

<220><221> MOD\_RES

<222> (29)..(29)

<223> AMIDATION

<400> 95

His Xaa Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Lys Ser Lys Tyr Leu Asp Xaa

1 5 10 15

Arg Arg Ala Gln Asp Phe Val Gln Trp Leu Met Asn Thr

20 25

<210> 96

<211> 29

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic peptide

<220><221> MOD\_RES

<222> (2)..(2)

<223> Xaa is Aib

<220><221> MOD\_RES

<222> (16)..(16)

<223> Xaa is Aib

<220><221> MOD\_RES

<222> (29)..(29)

<223> AMIDATION

<400> 96

His Xaa Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Xaa

1 5 10 15

Arg Arg Ala Gln Asp Phe Val Gln Trp Leu Met Asn Thr

20 25

<210> 97

<211> 29  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Synthetic peptide  
 <220><221> MISC\_FEATURE  
 <223> Peptide 50  
 <220><221> MOD\_RES  
 <222> (2)..(2)  
 <223> Xaa is Aib  
 <220><221> MOD\_RES  
 <222> (10)..(10)  
 <223> Acylated with a C16 fatty acyl group  
 <220><221> MOD\_RES  
 <222> (16)..(16)  
 <223>  
 > Xaa is Aib  
 <220><221> MOD\_RES  
 <222> (29)..(29)  
 <223> AMIDATION  
 <400> 97  
 His Xaa Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Lys Ser Lys Tyr Leu Asp Xaa  
 1 5 10 15  
 Arg Arg Ala Gln Asp Phe Val Gln Trp Leu Met Asn Thr  
 20 25  
 <210> 98  
 <211> 29  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Synthetic peptide  
 <220><221> MISC\_FEATURE  
 <223> Peptide 82  
 <220><221> MOD\_RES  
 <222> (2)..(2)  
 <223> Xaa is Aib

<220><221> MOD\_RES

<222> (10)..(10)

<223> Acylated with a C16 fatty acyl group via Ala-Ala spacer

<220><221> MOD\_RES

<222> (16)..(16)

<223> Xaa is Aib

<220><221> MOD\_RES

<222> (29)..(29)

<223> AMIDATION

<400> 98

His Xaa Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Lys Ser Lys Tyr Leu Asp Xaa

1 5 10 15

Arg Arg Ala Gln Asp Phe Val Gln Trp Leu Met Asn Thr

20 25

<210> 99

<211> 29

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic peptide

<220><221> MISC\_FEATURE

<223> Peptide 83

<220><221> MOD\_RES

<222> (2)..(2)

<223> Xaa is Aib

<220><221> MOD\_RES

<222> (10)..(10)

<223> Acylated with a C16 fatty acyl group via gamma-Glu-gamma-Glu  
spacer

<220><221> MOD\_RES

<222> (16)..(16)

<223> Xaa is Aib

<220><221> MOD\_RES

<222> (29)..(29)

<223> AMIDATION

<400> 99

His Xaa Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Lys Ser Lys Tyr Leu Asp Xaa

1 5 10 15

Arg Arg Ala Gln Asp Phe Val Gln Trp Leu Met Asn Thr

20 25

<210> 100

<211> 29

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic peptide

<220><221> MISC\_FEATURE

<223> Peptide 84

<220><221> MOD\_RES

<222> (2)..(2)

<223> Xaa is Aib

<220><221> MOD\_RES

<222> (10)..(10)

<223> Acylated with a C16 fatty acyl group via beta-Ala-beta-Ala spacer

<220><221> MOD\_RES

<222> (16)..(16)

<223> Xaa is Aib

<220><221> MOD\_RES

<222> (29)..(29)

<223> AMIDATION

<400> 100

His Xaa Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Lys Ser Lys Tyr Leu Asp Xaa

1 5 10 15

Arg Arg Ala Gln Asp Phe Val Gln Trp Leu Met Asn Thr

20 25

<210> 101

<211> 29

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic peptide

<220><221> MISC\_FEATURE

<223> Peptide 85

<220><221> MOD\_RES

<222> (2)..(2)

<223> Xaa is Aib

<220><221> MOD\_RES

<222> (10)..(10)

<223> Acylated with a C16 fatty acyl group via 6-aminohexanoic acid  
spacer

<220><221> MOD\_RES

<222> (16)..(16)

<223> Xaa is Aib

<220><221> MOD\_RES

<222> (29)..(29)

<223> AMIDATION

<400> 101

His Xaa Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Lys Ser Lys Tyr Leu Asp Xaa

1 5 10 15

Arg Arg Ala Gln Asp Phe Val Gln Trp Leu Met Asn Thr

20 25

<210> 102

<211> 29

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic peptide

<220><221> MISC\_FEATURE

<223> Peptide 86

<220><221> MOD\_RES

<222> (2)..(2)

<223> Xaa is Aib

<220><221> MOD\_RES

<222> (10)..(10)



<223> Acylated with a C16 fatty acyl group via Leu-Leu spacer

<220><221> MOD\_RES

<222> (16)..(16)

<223> Xaa is Aib

<220><221> MOD\_RES

<222> (29)..(29)

<223> AMIDATION

<400> 102

His Xaa Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Lys Ser Lys Tyr Leu Asp Xaa

1 5 10 15

Arg Arg Ala Gln Asp Phe Val Gln Trp Leu Met Asn Thr

20 25

<210> 103

<211> 29

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic peptide

<220><221> MISC\_FEATURE

<223> Peptide 87

<220><221> MOD\_RES

<222> (2)..(2)

<223> Xaa is Aib

<220><221> MOD\_RES

<222> (10)..(10)

<223> Acylated with a C16 fatty acyl group via Pro-Pro spacer

<220><221> MOD\_RES

<222>

> (16)..(16)

<223> Xaa is Aib

<220><221> MOD\_RES

<222> (29)..(29)

<223> AMIDATION

<400> 103

His Xaa Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Lys Ser Lys Tyr Leu Asp Xaa

1                    5                    10                    15

Arg Arg Ala Gln Asp Phe Val Gln Trp Leu Met Asn Thr

20                    25

<210> 104

<211> 29

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic peptide

<220><221> MISC\_FEATURE

<223> Peptide 77\*

<220><221> MOD\_RES

<222> (2)..(2)

<223> Xaa is Aib

<220><221> MOD\_RES

<222> (10)..(10)

<223> Acylated with a C14 fatty acyl group

<220><221> MOD\_RES

<222> (16)..(16)

<223> Xaa is Aib

<220><221> MOD\_RES

<222> (24)..(24)

<223> Cys-PEG

<220><221> MOD\_RES

<222> (29)..(29)

<223> AMIDATION

<400> 104

His Xaa Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Lys Ser Lys Tyr Leu Asp Xaa

1                    5                    10                    15

Arg Arg Ala Gln Asp Phe Val Cys Trp Leu Met Asn Thr

20                    25

<210> 105

<211> 29

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic peptide

<220><221> MISC\_FEATURE

<223> Peptide 78\*

<220><221> MOD\_RES

<222> (2)..(2)

<223> Xaa is Aib

<220><221> MOD\_RES

<222> (10)..(10)

<223> Acylated with a C14 fatty acyl group via gamma-Glu-gamma-Glu  
spacer

<220><221> MOD\_RES

<222> (16)..(16)

<223> Xaa is Aib

<220><221> MOD\_RES

<222> (24)..(24)

<223> Cys-PEG

<220><221> MOD\_RES

<222> (29)..(29)

<223> AMIDATION

<400> 105

His Xaa Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Lys Ser Lys Tyr Leu Asp Xaa

1 5 10 15

Arg Arg Ala Gln Asp Phe Val Cys Trp Leu Met Asn Thr

20 25

<210> 106

<211> 29

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic peptide

<220><221> MISC\_FEATURE

<223> Peptide 78

<220><221> MOD\_RES

<222> (2)..(2)

<223> Xaa is Aib

<220><221> MOD\_RES

<222> (10)..(10)

<223> Acylated with a C14 fatty acyl group via gamma-Glu-gamma-Glu

spacer

<220><221> MOD\_RES

<222> (16)..(16)

<223> Xaa is Aib

<220><221> MOD\_RES

<222> (29)..(29)

<223> AMIDATION

<400> 106

His Xaa Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Lys Ser Lys Tyr Leu Asp Xaa

1 5 10 15

Arg Arg Ala Gln Asp Phe Val Gln Trp Leu Met Asn Thr

20 25

<210> 107

<211> 29

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic peptide

<220><221> MISC\_FEATURE

<223> Peptide 81\*

<220><221> MOD\_RES

<222> (2)..(2)

<223> Xaa is Aib

<220><221> MOD\_RES

<222> (10)..(10)

<223> Acylated with a C14 fatty acyl group via Ala-Ala spacer

<220><221> MOD\_RES

<222> (16)..(16)

<223> Xaa is Aib

<220><221> MOD\_RES

<222> (24)..(24)

<223> Cys-PEG

<220><221> MOD\_RES

<222> (29)..(29)

<223> AMIDATION

<400> 107

His Xaa Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Lys Ser Lys Tyr Leu Asp Xaa

1 5 10 15

Arg Arg Ala Gln Asp Phe Val Cys Trp Leu Met Asn Thr

20 25

<210> 108

<211> 29

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic peptide

<220><221> MISC\_FEATURE

<223> Peptide 81

<220><221> MOD\_RES

<222> (2)..(2)

<223> Xaa is Aib

<220><221> MOD\_RES

<222> (10)..(10)

<223> Acylated with a C14 fatty acyl group via Ala-Ala spacer

<220><221> MOD\_RES

<222> (16)..(16)

<223> Xaa is Aib

<220><221> MOD\_RES

<222> (29)..(29)

<223> AMIDATION

<400> 108

His Xaa Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Lys Ser Lys Tyr Leu Asp Xaa

1 5 10 15

Arg Arg Ala Gln Asp Phe Val Gln Trp Leu Met Asn Thr

20 25

<210> 109

<211> 29

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic peptide

<220><221> MISC\_FEATURE

<223> Peptide 79\*

<220><221> MOD\_RES

<222> (2)..(2)

<223> Xaa is Aib

<220><221> MOD\_RES

<222> (10)..(10)

<223> Acylated with a C16 fatty acyl group via Ala-Ala spacer

<220><221> MOD\_RES

<222> (16)..(16)

<223> Xaa is Aib

<220><221> MOD\_RES

<222> (24)..(24)

<223> Cys-PEG

<220><221> MOD\_RES

<222> (29)..(29)

<223> AMIDATION

<400> 109

His Xaa Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Lys Ser Lys Tyr Leu Asp Xaa

1 5 10 15

Arg Arg Ala Gln Asp Phe Val Cys Trp Leu Met Asn Thr

20 25

<210> 110

<211> 29

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic peptide

<220><221> MISC\_FEATURE  
 <223> Peptide 80\*  
 <220><221> MOD\_RES  
 <222> (2)..(2)  
 <223> Xaa is Aib  
 <220><221> MOD\_RES  
 <222> (10)..(10)  
 <223> Acylated with a C16 fatty acyl group via gamma-Glu-gamma-Glu  
 spacer  
 <220><221> MOD\_RES  
 <222> (16)..(16)  
 <223> Xaa is Aib  
 <220><221> MOD\_RES  
 <222> (24)..(24)  
 <223> Cys-PEG  
 <220><221> MOD\_RES  
 <222> (29)..(29)  
 <223> AMIDATION  
 <400> 110

His Xaa Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Lys Ser Lys Tyr Leu Asp Xaa

1 5 10 15

Arg Arg Ala Gln Asp Phe Val Cys Trp Leu Met Asn Thr

20 25

<210> 111

<211> 29

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic peptide

<220><221> MOD\_RES

<222> (2)..(2)

<223> Xaa is Aib

<220><221> MOD\_RES

<222> (10)..(10)

<223> Covalently bound to a C14 fatty acyl group

<220><221> MOD\_RES

<222> (16)..(16)

<223> Xaa is Aib

<220><221> MOD\_RES

<222> (29)..(29)

<223> AMIDATION

<400> 111

His Xaa Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Lys Ser Lys Tyr Leu Asp Xaa

1 5 10 15

Arg Arg Ala Gln Asp Phe Val Cys Trp Leu Met Asn Thr

20 25

<210> 112

<211> 29

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic peptide

<220><221> MOD\_RES

<222> (2)..(2)

<223> Xaa is Aib

<220><221> MOD\_RES

<222> (10)..(10)

<223> Covalently bound to C14 fatty acyl group via gamma-Glu-gamma-Glu  
spacer

<220><221> MOD\_RES

<222> (16)..(16)

<223> Xaa is Aib

<220><221> MOD\_RES

<222> (29)..(29)

<223> AMIDATION

<400> 112

His Xaa Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Lys Ser Lys Tyr Leu Asp Xaa

1 5 10 15

Arg Arg Ala Gln Asp Phe Val Cys Trp Leu Met Asn Thr



20 25

<210

> 113

<211> 29

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic peptide

<220><221> MOD\_RES

<222> (2)..(2)

<223> Xaa is Aib

<220><221> MOD\_RES

<222> (10)..(10)

<223> Covalently bound to C14 fatty acyl group via Ala-Ala spacer

<220><221> MOD\_RES

<222> (16)..(16)

<223> Xaa is Aib

<220><221> MOD\_RES

<222> (29)..(29)

<223> AMIDATION

<400> 113

His Xaa Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Lys Ser Lys Tyr Leu Asp Xaa

1 5 10 15

Arg Arg Ala Gln Asp Phe Val Cys Trp Leu Met Asn Thr

20 25

<210> 114

<211> 29

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic peptide

<220><221> MOD\_RES

<222> (2)..(2)

<223> Xaa is Aib

<220><221> MOD\_RES

<222> (10)..(10)

<223> Covalently bound to C16 fatty acyl group via gamma-Glu-gamma-Glu  
spacer

<220><221> MOD\_RES

<222> (16)..(16)

<223> Xaa is Aib

<220><221> MOD\_RES

<222> (29)..(29)

<223> AMIDATION

<400> 114

His Xaa Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Lys Ser Lys Tyr Leu Asp Xaa

1 5 10 15

Arg Arg Ala Gln Asp Phe Val Cys Trp Leu Met Asn Thr

20 25

<210> 115

<211> 29

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic peptide

<220><221> MOD\_RES

<222> (2)..(2)

<223> Xaa is Aib

<220><221> MOD\_RES

<222> (10)..(10)

<223> Covalently bound to C16 fatty acyl group via Ala-Ala spacer

<220><221> MOD\_RES

<222> (16)..(16)

<223> Xaa is Aib

<220><221> MOD\_RES

<222> (29)..(29)

<223> AMIDATION

<400> 115

His Xaa Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Lys Ser Lys Tyr Leu Asp Xaa

1 5 10 15

Arg Arg Ala Gln Asp Phe Val Cys Trp Leu Met Asn Thr  
20 25