(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2016 년 7 월 7 일 (07.07.2016)

WIPO | PCT

(10) 국제공개번호
WO 2016/108586 A1

(51) 국제특허분류:
C07K 14/605 (2006.01) *A61P 3/04* (2006.01)
A61K 38/26 (2006.01)

(21) 국제출원번호: PCT/KR2015/014422

(22) 국제출원일: 2015 년 12 월 30 일 (30.12.2015)

(25) 출원언어: 한국어

(26) 공개언어: 한국어

(30) 우선권정보:
10-2014-0193800 2014 년 12 월 30 일 (30.12.2014) KR

(71) 출원인: **한미약품 주식회사 (HANMI PHARM. CO., LTD.)** [KR/KR]; 18536 경기도 화성시 팔탄면 무하로 214, Gyeonggi-do (KR).

(72) 발명자: **김정국 (KIM, Jung Kuk)**; 18469 경기도 화성시 동탄기흥로 550, Gyeonggi-do (KR). **이종민 (LEE, Jong Min)**; 18469 경기도 화성시 동탄기흥로 550, Gyeonggi-do (KR). **김상윤 (KIM, Sang Yun)**; 18469 경기도 화성시 동탄기흥로 550, Gyeonggi-do (KR). **배성민 (BAE, Sung Min)**; 18469 경기도 화성시 동탄기흥로 550, Gyeonggi-do (KR). **정성엽 (JUNG, Sung Youb)**; 18469 경기도 화성시 동탄기흥로 550, Gyeonggi-do (KR). **권세창 (KWON, Se Chang)**; 18469 경기도 화성시 동탄기흥로 550, Gyeonggi-do (KR).

(74) 대리인: **손민 (SON, Min)**; 06302 서울시 강남구 양재천로 163 6 층 한얼국제특허사무소, Seoul (KR).

(81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

공개:
— 국제조사보고서와 함께 (조약 제 21 조(3))
— 명세서의 서열목록 부분과 함께 (규칙 5.2(a))

(54) Title: GLUCAGON DERIVATIVE HAVING IMPROVED STABILITY

(54) 발명의 명칭 : 안정성이 증가된 글루카곤 유도체

(57) Abstract: The present invention relates to a novel glucagon derivative peptide and a composition for preventing or treating hypoglycemia and obesity, including the peptide as an active ingredient. A glucagon derivative according to the present invention maintains activity against glucagon receptors and has enhanced physical properties due to modified pI, and thus is capable of improving patient compliance when being used as a medicine for hypoglycemia, and is suitable for concomitant administration with other anti-obesity medicines. Thus, the glucagon derivative according to the present invention can be usefully used in prevention or treatment of hypoglycemia and obesity.

(57) 요약서: 본 발명은 신규한 글루카곤 유도체 펩티드 및 상기 펩티드를 유효성분으로 포함하는 저혈당 및 비만의 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것이다. 본 발명에 따른 글루카곤 유도체는 글루카곤 수용체에 대한 활성을 유지하면서 변화된 pI 로 인해 개선된 물성을 지니므로, 저혈당 치료제로 사용시 환자 순응도를 높일 수 있고, 다른 항비만 치료제와의 병용 투여에 적합하다. 따라서 본 발명에 따른 글루카곤 유도체는 저혈당 및 비만의 예방 또는 치료에 유용하게 사용할 수 있다.

WO 2016/108586 A1

명세서

발명의 명칭: 안정성이 증가된 글루카곤 유도체

기술분야

[1] 본 발명은 pI의 변화에 의해 개선된 물성을 갖는 신규한 글루카곤 유도체 및 이를 유효성분으로 포함하는 저혈당 및 비만의 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것이다.

배경기술

[2] 경제성장과 생활방식의 변화에 따라 식습관에도 최근 많은 변화가 있어 왔다. 특히, 바쁜 현대인들은 패스트푸드 등의 고열량 식이와 적은 운동량으로 인하여 과체중 및 비만이 증가하고 있다. 국제보건기구(World Health Organisation, WHO)에 따르면, 전세계적으로 10억 이상의 성인이 과체중이고, 그 중 적어도 300만 이상이 임상적으로 비만이며, 특히 유럽에서 매년 250,000명, 전세계적으로는 매년 250만명 이상이 과체중과 관련되어 사망하였다(World Health Organization, Global Strategy on Diet, Physical Activity and Health, 2004).

[3] 과체중 및 비만은 혈압과 콜레스테롤 수치를 증가시켜서 심장 질환, 당뇨, 관절염 등의 각종 질환의 발병 또는 악화의 원인이 되고 있다. 또한, 과체중 및 비만은 성인뿐만 아니라, 어린이나 청소년에서도 동맥경화, 고혈압, 고지혈증 또는 심장질환 등의 발병률을 증가시키는 주요한 요인이 되고 있다.

[4] 이와 같이, 비만은 전세계적인 질병으로서 각종 질환의 원인이 되기도 하는 심각한 질병이지만 개인의 자구적인 노력에 의하여 극복될 수 있다고 믿어지고 있어, 비만 환자는 환자 자신의 자제력이 약하기 때문인 것으로 평가되고 있다. 그러나, 비만은 의외로 치료가 용이하지 않은데, 그 이유는 비만이 식욕조절 및 에너지 대사의 작용기작이 관련된 복잡한 질환이기 때문이다. 따라서, 비만을 치료하기 위하여는, 환자 자신의 노력뿐만 아니라 식욕조절 및 에너지 대사와 관련된 비정상적인 작용기작을 치료하는 방법이 동시에 수행되어야만 하므로, 상기 비정상적인 작용기작을 치료할 수 있는 의약을 개발하려는 노력이 계속되고 있다.

[5] 상술한 노력의 결과로서, 리모나반트(Rimonabant, Sanofi-Aventis), 시부트라민(Sibutramin, Abbott), 콘트라베(Contrave, Takeda), 오르리스타트(Orlistat, Roche) 등의 비만 치료제가 개발되었으나, 이들은 치명적인 부작용을 나타내거나 비만 치료효과가 미비하다는 단점이 있었다. 예를 들어, 리모나반트는 중추신경장애 부작용을 나타내고, 시부트라민과 콘트라베는 심혈관 부작용을 나타내며, 오르리스타트는 1년 복용 시 약 4 kg의 체중감소 효력이 나타내는 것에 불과하다고 보고되었다. 따라서, 현재 비만 환자에게 안전하게 처방될 수 있는 비만 치료제는 거의 없는 상태이다.

[6] 이처럼 종래 비만 치료제의 문제점을 해소할 수 있는 새로운 의약품을

개발하려는 연구가 활발히 진행되고 있으며, 최근에는 글루카곤 유도체에 관심이 집중되고 있다. 글루카곤은 약물 치료 또는 질병, 호르몬이나 효소 결핍 등의 원인으로 혈당이 떨어지기 시작하면 췌장에서 생산된다. 글루카곤은 간에서 글리코겐을 분해하여 글루코스를 방출하도록 신호하고, 혈당 수준을 정상 수준까지 높이는 역할을 한다. 뿐만 아니라, 글루카곤은 혈당 상승효과 이외에 식욕억제 및 지방세포의 호르몬 민감성 리파제(hormone sensitive lipase)를 활성화시켜 지방 분해를 촉진하여 항비만 효과를 나타냄이 보고되었다. 그러나, 글루카곤은 낮은 용해도와 중성 pH에서의 침전으로 인해 치료제로서 그 사용이 제한되어 왔다.

[7] 이러한 글루카곤의 유도체 중의 하나인 글루카곤-유사 펩티드-1(GLP-1)은 당뇨 환자의 고혈당증을 감소시키는 치료제로 개발 중인 물질이다. GLP-1은 인슐린 합성과 분비 촉진, 글루카곤의 분비 저해, 위공복 억제, 글루코스 사용 증진과 더불어 음식물 섭취를 저해하는 기능을 가진다.

[8] GLP-1과 대략 50%의 아미노산 상동성을 가지는 도마뱀 독액(lizard venom)으로부터 만들어지는 엑센딘-4(exendin-4) 또한 GLP-1 수용체를 활성화시켜 당뇨 환자의 고혈당증을 감소시키는 것으로 알려져 있다. 그러나, 상기 GLP-1 또는 엑센딘-4를 포함하는 비만 치료용 의약품은 구토와 메스꺼움의 부작용을 발생시킨다는 문제점을 나타내는 것으로 보고되었다.

[9] 이에, 상기 GLP-1의 대안으로서, GLP-1과 글루카곤 두 펩티드의 수용체에 모두 결합할 수 있는 옥신토모듈린(oxyntomodulin)이 각광받고 있다. 상기 옥신토모듈린은 글루카곤의 전구체인 프리-글루카곤(pre-glucagon)으로부터 만들어지는 펩티드로서, GLP-1의 음식물 섭취 저해, 포만감 증진 효력과 글루카곤의 지방분해 기능을 보여 항-비만 치료제로서의 가능성을 높이고 있다.

[10] 그러나, 옥신토모듈린 또는 이의 유도체는 생체 내에서 반감기가 짧은 반면 낮은 약효로 인해 매일 과량의 약물을 투여해야 하는 심각한 단점을 가지고 있다. 또한 하나의 펩타이드에 GLP-1과 글루카곤 활성이 모두 존재하는 경우 그 활성비가 고정되어 다양한 비율을 갖는 이중 작용제(dual agonist)의 사용이 곤란하다. 따라서 GLP-1과 글루카곤의 함량을 조절하여 다양한 활성 비율로 사용할 수 있는 병용 치료가 더 효과적일 수 있다.

[11] 다만, 이를 위해서는 중성 pH에서 응집되고 시간이 지남에 따라 침전되는 저조한 용해도를 보이는 글루카곤의 물성을 개선하는 것이 요구된다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

[12] 본 발명자들은 글루카곤의 물성을 개선하여 저혈당과 비만에 대한 치료효과를 증진시키기 위하여 글루카곤의 아미노산 서열이 일부 변형된 유도체를 개발하였고, 상기 글루카곤 유도체가 천연 글루카곤과는 다른 변화된 pI로 인해 중성 pH에서 개선된 용해도 및 높은 안정성을 나타냄을 확인함으로써, 본

발명을 완성하였다.

과제 해결 수단

[13] 본 발명의 목적은 물성이 개선된 신규한 글루카곤 유도체를 제공하는 것이다.

[14] 본 발명의 다른 목적은 상기 글루카곤 유도체를 포함하는 저혈당의 예방 또는 치료용 조성물을 제공하는 것이다.

[15] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 글루카곤 유도체를 포함하는 비만의 예방 또는 치료용 조성물을 제공하는 것이다.

발명의 효과

[16] 천연 글루카곤에 비하여 상이한 pI를 가짐에 따라, 용액의 pH에 따라서 우월한 안정성, 용해도를 나타내는 본 발명의 신규한 글루카곤 유도체는 저혈당 치료제로 사용시 환자 순응도를 높일 수 있고, 다른 항비만 치료제와의 병용 투여에 적합하므로, 저혈당 및 비만의 예방 또는 치료에 유용하게 사용할 수 있다.

발명의 실시를 위한 최선의 형태

[17] 상기 목적을 달성하기 위한 일 실시양태에 의하면, 본 발명은 하기의 일반식 1의 아미노산 서열을 포함하며, 천연형 글루카곤과 pI가 동일하지 않은, 즉 상이한 신규한 글루카곤 유도체를 제공한다.

[18]

[19] X1-X2-QGTF-X7-SDYS-X12-X13-X14-X15-X16-X17-X18-X19-X20-X21-F-X23-X24-W-L-X27-X28-T (일반식 1)

[20]

[21] 상기 식에서,

[22] X1은 히스티딘, 데스아미노-히스티딘(desamino-histidine), 디메틸-히스티딘(N-dimethyl-histidine), 베타-히드록시 이미다조프로피온산(beta-hydroxyimidazopropionic acid), 4-이미다조아세트산(4-imidazoacetic acid), 베타-카르복시 이미다조프로피온산(beta-carboxyimidazopropionic acid), 트립토판, 티로신 혹은 부존재하고;

[23] X2는 알파-메틸-글루탐산(α-methyl-glutamic acid), Aib(aminoisobutyric acid), D-알라닌, 글리신, Sar(N-methylglycine), 세린 또는 D-세린이고;

[24] X7는 트레오닌 또는 발린이고;

[25] X12는 리신 또는 시스테인이고;

[26] X13는 티로신 또는 시스테인이고;

[27] X14는 류신 또는 시스테인이고;

[28] X15는 아스파르트산, 글루탐산 또는 시스테인이고;

[29] X16은 글루탐산, 아스파르트산, 세린, 알파-메틸-글루탐산 또는 시스테인이고;

[30] X17은 아스파르트산, 글루타민, 글루탐산, 리신, 아르기닌, 세린, 발린 또는

시스테인이고;

[31] X18은 아스파르트산, 글루타민, 글루탐산, 아르기닌 또는 시스테인이고;

[32] X19는 알라닌 또는 시스테인이고;

[33] X20은 리신, 글루탐산, 글루타민, 아스파르트산, 리신, 또는 시스테인이고;

[34] X21은 아스파르트산, 글루탐산, 발린 또는 시스테인이고;

[35] X23은 발린 또는 아르기닌이고;

[36] X24는 발린, 류신, 글루타민 또는 아르기닌이고;

[37] X27는 이소류신 또는 메티오닌이고;

[38] X28은 아르기닌 또는 아스파라긴임

[39] (단, 상기 일반식 1의 아미노산 서열이 서열번호: 1과 동일한 경우는 제외함).

[40]

[41] 본 발명에 따른 글루카곤 유도체는 천연 글루카곤의 일부 아미노산을 변형시켜서, 천연 글루카곤과 다른 pI를 가짐으로써 물성을 개선한 펩티드, 펩티드 유도체 또는 펩티드 모방체 등을 포함한다.

[42] 본 발명에서 용어 "천연 글루카곤"은 서열 His-Ser-Gln-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Lys-Tyr-Leu-Asp-Ser-Arg-Arg-Ala-Gln-Asp-Phe-Val-Gln-Trp-Leu-Met-Asn-Thr(서열번호: 1)을 갖는 천연의 인간 글루카곤을 나타낸다.

[43] 본 발명에 따른 일반식 1의 서열에서 아미노산은 통상적인 방식의 기재에 따라 왼쪽의 N-말단에서 오른쪽의 C-말단 방향으로 진행한다. 따라서, 일반식 1의 서열에서 어떤 잔기의 "위치"에 대하여 언급한 때에는 천연의 인간 글루카곤 및 다른 분자 내의 위치에 대한 언급하는 경우와 마찬가지로 해석하여야 한다.

[44] 본 명세서 전반을 통하여, 천연적으로 존재하는 아미노산에 대한 통상의 1문자 및 3문자 코드가 사용될 뿐만 아니라 Aib(α-아미노이소부티르산), Sar(N-methylglycine), 알파-메틸-글루탐산(α-methyl-glutamic acid) 등과 같은 다른 아미노산에 대해 일반적으로 허용되는 3문자 코드가 사용된다.

[45] 또한 본 명세서에서 언급된 아미노산은 IUPAC-IUB 명명법에 따라 다음과 같이 약어로 기재하였다.

[46]

[47] 알라닌 A 아르기닌 R

[48] 아스파라긴 N 아스파르트산 D

[49] 시스테인 C 글루탐산 E

[50] 글루타민 Q 글리신 G

[51] 히스티딘 H 이소류신 I

[52] 류신 L 리신 K

[53] 메티오닌 M 페닐알라닌 F

[54] 프롤린 P 세린 S

[55] 트레오닌 T 트립토판 W

[56] 티로신 Y 발린 V

[57]

[58] 본 발명에서 용어 "펩티드"란 α-아미노산을 비롯한 천연형 및 비천연형 아미노산이나 아미노산 유도체 2개 이상이 펩티드 결합으로 연결된 형태의 화합물을 의미한다. 본 발명에서 "글루카곤 유도체"란 일반식 1의 서열을 포함하는 펩티드 또는 그 유도체, 유사체 또는 변형물을 의미한다. 본 발명에 따른 펩티드는 글루카곤의 일부 아미노산을 치환의 형태로 변형시켜서 천연 글루카곤에 비해 pI가 변화된 펩티드 모방체(peptidomimetic) 등을 포함한다. 본 발명의 한 실시 형태에서는 이러한 글루카곤 유도체가 글루카곤 수용체 활성을 유지하면서 천연형 글루카곤과 다른 등전점을 지닌다. 본 발명의 더욱 구체적인 형태에서 글루카곤 유도체는 글루카곤 수용체 활성을 유지하면서 생리적 pH에서 천연형 글루카곤 용해도가 개선된 펩티드를 의미한다.

[59] 본 발명에서 용어 "pI" 또는 "등전점(isoelectric point)"은 폴리펩티드와 같은 거대분자의 전체 순하전(net charge)이 없는(0) 경우의 pH 값을 의미한다. 다양한 하전된 작용기가 존재하는 폴리펩티드의 경우, pH 값이 pI인 점에서 전체 폴리펩티드의 순하전의 0이다. pI보다 높은 pH에서 폴리펩티드의 전체 순하전은 음성이 될 것이고, pI보다 낮은 pH 값에서 폴리펩티드의 전체 순하전은 양성이 될 것이다.

[60]

[61] pI는 이 분야에서 통상적으로 쓰이는 방법으로 측정하거나 추산할 수 있다. 예를 들어 폴리아크릴아미드, 전분 또는 아가로스로 구성되는 고정된 pH 구배 겔상에서 등전점 전기영동에 의해 측정하거나 예를 들어 ExPASy 서버에서 pI/MW 툴(http://expasy.org/tools/pi_tool.html; Gasteiger et al., 2003)을 사용하여 아미노산 서열로부터 pI를 추산할 수 있다.

[62]

[63] 본 발명의 한 구체적 실시 형태에서는 일반식 1의 아미노산 서열을 포함하는 글루카곤 유도체가 서열번호: 1로 기재되는 천연 글루카곤의 서열에서 아미노산의 치환, 부가 결실 또는 번역 후 변형(예를 들어, 메틸화, 아실화, 유비퀴틴화, 분자 내 공유결합)을 거친 물질로서, 글루카곤 수용체 활성은 그대로 유지하면서 천연 글루카곤에 비해 변화된 pI를 가져 용액의 pH에 따라 증가된 용해도를 나타내고 그로 인해 생체 내 화학적 안정성이 증진된 임의의 펩티드를 포괄한다.

[64] 상기 아미노산의 치환 또는 부가 시에는 인간 단백질에서 통상적으로 관찰되는 20개의 아미노산뿐만 아니라 비정형 또는 비자연적 발생 아미노산 및 아미노산 유도체를 사용할 수 있다. 비정형 아미노산의 상업적 출처에는 Sigma-Aldrich, ChemPep, Genzyme Pharmaceuticals 등이 포함된다. 이러한 아미노산이 포함된 펩티드와 정형적인 펩티드 서열은 상업화된 펩티드 합성 회사, 예를 들어 미국의 American Peptide Company나 Bachem, 또는 한국의 Anygen을 통해 합성 및 구매

가능하다. 아미노산 유도체도 마찬가지 방식으로 입수할 수 있는데, 그 예를 일부만 들자면 데스아미노-히스티딘(desamino-histidine), 베타-히드록시 이미다조프로피온산(beta-hydroxyimidazopropionic acid), 4-이미다조아세트산(4-imidazoacetic acid), 베타-카르복시 이미다조프로피온산(beta-carboxyimidazopropionic acid) 등을 사용할 수 있다.

[65]

[66] 글루카곤은 약 7의 pI를 가지고 있어서 생리학적 pH(pH 6-8)의 용액 중에서 불용성이고 중성 pH에서는 침전되는 경향이 있다. pH 3 이하의 수용액 중에서, 글루카곤은 초기에는 용해되지만 1시간 이내에 겔 형성으로 인해 침전된다. 겔화된 글루카곤은 주로 β-시트 피브릴로 이루어지고, 이렇게 침전된 글루카곤은 겔이 주사 바늘이나, 정맥으로 투여되는 경우, 혈관을 막히게 하기 때문에 주사제로 사용하기에 적합하지 않다. 침전 과정을 지연시키기 위하여, 산성(pH 2~4) 제형을 사용하는 것이 통상적인데, 이를 통해 단시간 동안 상대적으로 무응집 상태로 글루카곤을 유지할 수 있다. 그러나 글루카곤의 피브릴 형성이 낮은 pH에서 매우 신속하게 이루어지기 때문에 이러한 산성 제형은 조제 후 즉시 주사되어야만 한다.

[67] pI에 따라서 용액 내에서의 단백질의 용해도, 활성 및 안정성이 달라지는 것은 당업계에 널리 알려진 상식이다(Shaw, K. L. et al., Protein Science 10, pp1206-1215, 2001).

[68] 이에 본 발명에서는 천연 글루카곤의 서열을 변형하여 pI를 바꿈으로써 안정성 및 작용 효과가 연장된 글루카곤 유도체를 개발하였다. 본 발명의 글루카곤 유도체는 천연 글루카곤와 비교하여 변화된 pI를 가짐으로써 용액의 pH에 따라 천연 글루카곤에 비해 개선된 용해도 및 높은 안정성을 나타내는 것을 특징으로 한다.

[69] 본 발명의 한 구체적인 실시 형태에서 글루카곤 유도체는 상기 일반식 1의 아미노산 서열에서

[70] X1이 히스티딘 또는 트립토판, 티로신 혹은 부존재하고;

[71] X2가 세린 또는 Aib(aminoisobutyric acid)이고;

[72] X7는 트레오닌 또는 발린이고;

[73] X12는 리신 또는 시스테인이고;

[74] X13는 티로신 또는 시스테인이고;

[75] X14는 류신 또는 시스테인이고;

[76] X15는 아스파르트산, 또는 시스테인이고;

[77] X16은 글루탐산, 아스파르트산, 세린, 또는 시스테인이고;

[78] X17은 아스파르트산, 글루탐산, 리신, 아르기닌, 발린 또는 시스테인이고;

[79] X18은 아스파르트산, 글루탐산, 아르기닌 또는 시스테인이고;

[80] X19는 알라닌 또는 시스테인이고;

[81] X20은 리신, 글루탐산, 글루타민, 아스파르트산, 리신, 또는 시스테인이고;

[82] X21은 아스파르트산, 글루탐산, 발린 또는 시스테인이고;

[83] X23은 발린 또는 아르기닌이고;

[84] X24는 발린, 류신 또는 글루타민이고;

[85] X27는 이소류신 또는 메티오닌이고;

[86] X28은 아르기닌 또는 아스파라긴인 것인 펩티드일 수 있다(단, 상기 일반식 1의 아미노산 서열이 서열번호: 1과 동일한 경우는 제외함).

[87] 보다 바람직하게는, 본 발명의 글루카곤 유도체는 서열번호: 2 내지 34로 기재되는 아미노산 서열 중 어느 하나를 포함하는 펩티드일 수 있다.

[88] 본 발명의 글루카곤 유도체를 포함하는 펩티드는 표준 합성 방법, 재조합 발현 시스템, 또는 임의의 다른 당해 분야의 방법에 의해 제조될 수 있다. 따라서, 본 발명에 따른 글루카곤 유사체는, 예를 들어 하기를 포함하는 방법을 포함하는 다수의 방법으로 합성될 수 있다:

[89] (a) 펩티드를 고체상 또는 액체상 방법의 수단으로 단계적으로 또는 단편 조립에 의해 합성하고, 최종 펩티드 생성물을 분리 및 정제하는 방법; 또는

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

[91] (c) 펩티드를 인코딩하는 핵산 작제물의 무세포 시험관 내 발현을 수행하고, 발현 생성물을 회수하는 방법, 또는

[92] (d) (a), (b) 및 (c)의 임의의 조합으로 펩티드의 단편을 수득하고, 이어서 단편을 연결시켜 펩티드를 수득하고, 당해 펩티드를 회수하는 방법.

[93]

[94] 바람직한 실시양태에서, 본 발명의 글루카곤 유도체가 천연 글루카곤에 비해 변화된 pI를 가짐을 확인하였다(표 1 참조). 따라서, 본 발명의 글루카곤 유도체는 용액의 pH에 따라서 천연 글루카곤에 비해 개선된 용해도 및 높은 안정성을 가지므로, 저혈당 치료제로 사용시 환자 순응도를 높일 수 있고 다른 항비만 치료제와의 병용 투여에 적합하여 저혈당 및 비만의 예방 또는 치료에 유용하게 사용할 수 있다.

[95]

[96] 이에 본 발명의 글루카곤 유도체는 저혈당, 비만 또는 이의 관련 질환에 대하여 매력적인 치료적 선택을 제공할 수 있다.

[97] 예를 들면, 본 발명의 글루카곤 유도체는 인슐린에 대한 주된 대응 조절 호르몬으로서 당뇨병 환자의 심한 저혈당을 치료하는데 유용하게 사용될 수 있다.

[98] 또한, 본 발명의 글루카곤 유도체는 체중 증가를 예방하거나, 체중 감소를 촉진하거나, 과체중을 감소시키거나, 병적 비만을 포함하는 비만(예컨대, 식욕, 섭식, 식품 섭취, 칼로리 섭취 및/또는 에너지 소비의 조절에 의해), 뿐만 아니라 비만 관련 염증, 비만 관련 쓸개 질환 및 비만 유도된 수면 무호흡을 포함하나, 이에 한정되지 않는 관련 질환 및 건강 상태를 치료하기 위한 약제로서 사용될

수 있다. 본 발명의 글루카곤 유도체는 또한 대사 증후군, 고혈압, 동맥경화 유발 이상지혈증, 죽상동맥경화증, 동맥경화증, 관상 동맥 심질환, 뇌졸중 등과 같은 비만과 관련될 수 있는 상태의 치료에 사용될 수 있다. 그러나, 이들 병태에 있어서 본 발명에 따른 글루카곤 유도체의 효과는 전술한 체중 관련 효과를 통해 전체적으로 또는 부분적으로 매개될 수 있거나 이와는 독립적일 수 있다.

[99]

[100] 한편, 본 발명의 글루카곤 유도체의 치료 효과를 높이기 위해 폴리에틸렌 글리콜(PEG), 당쇄 등을 비롯한 고분자의 수식이나 알부민, 트랜스페린, 지방산, 면역글로불린 등과의 융합 등 당해 기술분야의 통상적인 기술을 이용하여 글루카곤 유도체를 변형시킬 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 화합물 내의 하나 이상의 아미노산 측쇄는 생체 내에서 가용성 및/또는 반감기를 증가시키고/시키거나 생체이용율을 증가시키기 위해 고분자에 접합될 수 있다. 이러한 변형은 또한 치료학적 단백질 및 펩티드의 소거(clearance)를 감소시키는 것으로 알려져 있다.

[101]

[102] 이러한 고분자는 수용성(양친매성 또는 친수성), 무-독성 및 약학적으로 불활성인 것이 적합하며, 바람직하게는 PEG, PEG의 동종-중합체 또는 공-중합체, PEG의 모노메틸-치환된 중합체(mPEG)이거나, 폴리-라이신, 폴리-아스파르트산 및 폴리-글루탐산과 같은 폴리-아미노산이 포함된다.

[103] 상기한 바와 같은 글루카곤 유도체의 변이체 역시 본 발명의 범위에 포함된다.

[104] 또 하나의 양태로서, 본 발명은 상기 글루카곤 유도체를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 제공한다.

[105] 본 발명에서 폴리뉴클레오티드에 대해 사용된 용어 "상동성"이란 야생형(wild type) 아미노산 서열 및 야생형 핵산 서열과의 유사한 정도를 나타내기 위한 것으로서, 상기 글루카곤 유도체를 코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열과 75% 이상, 바람직하게는 85% 이상, 보다 바람직하게는 90% 이상, 더욱 바람직하게는 95% 이상 동일할 수 있는 유전자 서열을 포함한다. 이러한 상동성의 비교는 육안으로나 구입이 용이한 비교 프로그램을 이용하여 수행한다. 시판되는 컴퓨터 프로그램은 2개 이상의 서열간의 상동성을 백분율(%)로 계산할 수 있다. 상동성(%)은 인접한 서열에 대해 계산될 수 있다.

[106] 상기 글루카곤 유도체를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 벡터에 삽입하여 이를 발현시킴으로써 상기 글루카곤 유도체를 다량으로 확보할 수 있다.

[107] 이러한 재조합 발현의 경우, 본 발명의 폴리뉴클레오티드는 적합한 벡터 내에 일반적으로 삽입되어 본 발명의 폴리뉴클레오티드를 보유하는 클로닝 또는 재조합 벡터를 형성할 것이며, 이러한 벡터 또한 본 발명의 범주에 포함된다.

[108] 본 발명에서 용어 "재조합 벡터"는 적합한 숙주 내에서 목적 펩티드, 가령 글루카곤 유도체를 발현시킬 수 있도록 적합한 조절 서열에 작동 가능하게 연결된 상기 목적 펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드의 염기서열을 함유하는

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

[109] 본 발명에서 사용되는 재조합 벡터는 숙주세포 내에서 복제 가능한 것이면 특별히 한정되지 않으며, 당업계에 알려진 임의의 벡터를 이용하여 제작될 수 있다. 통상 사용되는 벡터의 예로는 천연 상태이거나 재조합된 상태의 플라스미드, 코스미드, 바이러스 및 박테리오파지를 들 수 있다. 예를 들어, 파지 벡터 또는 코스미드 벡터로서 pWE15, M13, MBL3, MBL4, IXII, ASHII, APII, t10, t11, Charon4A, 및 Charon21A 등을 사용할 수 있으며, 플라스미드 벡터로서 pBR계, pUC계, pBluescriptII계, pGEM계, pTZ계, pCL계 및 pET계 등을 사용할 수 있다. 본 발명에서 사용 가능한 벡터는 특별히 제한되는 것이 아니며 공지된 발현 벡터를 사용할 수 있다.

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

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

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

[113] 또한, 상기에서 용어 "작동 가능하게 연결"된 것이란 본 발명의 목적 펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드의 전사를 개시 및 매개하도록 하는 프로모터 서열과 상기 유전자 서열이 기능적으로 연결되어 있는 것을 의미한다.

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

[115]

[116] 다른 실시양태로서, 본 발명은 상기 글루카곤 유도체를 포함하는 저혈당 또는 비만의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[117] 본 발명에서 용어 "예방"은 상기 글루카곤 유도체 또는 조성물의 투여로 비만의 발병을 억제 또는 지연시키는 모든 행위를 의미하며, "치료"는 상기 글루카곤 유도체 또는 조성물의 투여로 비만의 증세가 호전되거나 이롭게 되는 모든 행위를 의미한다.

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

[119] 본 발명에서 용어 "저혈당"은 당뇨병의 급성증상 중 하나로서, 혈중 당량이 정상인보다 낮은 상태를 말하는 것으로 일반적으로 혈당이 50 mg/dl 이하일 때를 말한다. 저혈당증이 생기는 흔한 원인은 경구용 혈당강하제나 인슐린을 사용하는 사람이 평소보다 음식 섭취량이 적거나 활동량이나 운동량이 과한 경우이다. 이외에도 음주나 일부 혈당을 떨어뜨리는 약물의 사용, 중증의 신체적 질환, 부신피질호르몬이나 글루카곤 등의 호르몬 결핍, 인슐린 생성 췌장 종양, 인슐린에 대한 자가면역질환이 있는 경우, 위절제술 환자, 유전성 탄수화물 대사효소이상 질환 등에 의해서도 저혈당이 발생할 수 있다.

[120] 저혈당의 증상은 기운이 없고 몸의 떨림이 있으며, 창백, 식은땀, 현기증, 흥분, 불안감, 가슴 두근거림, 공복감, 두통, 피로감 등을 포함한다. 저혈당이 오래 지속되면 경련이나 발작이 있을 수 있고 쇼크상태가 초래되어 의식을 잃을 수도 있다.

[121] 본 발명에서 용어 "비만"은 체내에 지방조직이 과다한 상태로, 신체비만지수(체중(kg)을 신장(m)의 제곱으로 나눈 값)가 25 이상이면 비만으로 정의된다. 비만은 오랜 기간에 걸쳐 에너지 소비량에 비해 영양소를 과다하게 섭취할 경우 에너지 불균형에 의해 유발되는 것이 통상적이다. 비만은 신체

전체에 영향을 미치는 대사질환으로 당뇨병 및 고지혈증에 걸릴 가능성이 높아지고, 성기능 장애, 관절염, 심혈관계 질환의 발병 위험이 커지며 일부의 경우 암의 발생과도 연관이 있다.

[122] 본 발명의 약학적 조성물은 약학적으로 허용가능한 담체, 부형제 또는 희석제를 포함할 수 있다. 본 발명에서 용어 "약학적으로 허용가능한"이란 치료효과를 나타낼 수 있을 정도의 충분한 양과 부작용을 일으키지 않는 것을 의미하며, 질환의 종류, 환자의 연령, 체중, 건강, 성별, 환자의 약물에 대한 민감도, 투여 경로, 투여 방법, 투여횟수, 치료 기간, 배합 또는 동시 사용되는 약물 등 의학 분야에 잘 알려진 요소에 따라 당업자에 의해 용이하게 결정될 수 있다.

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

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

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

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

[127] 또한, 상기 조성물은 약학적 분야에서 통상의 방법에 따라 환자의 신체 내 투여에 적합한 단위투여형의 제제, 바람직하게는 펩티드 의약품의 투여에 유용한 제제 형태로 제형화시켜 당업계에서 통상적으로 사용하는 투여 방법을 이용하여 경구, 또는 피부, 정맥내, 근육내, 동맥내, 골수내, 수막강내, 심실내, 폐, 경피, 피하, 복부내, 비강내, 소화관내, 국소, 설하, 질내 또는 직장 경로를 포함하는 비경구투여 경로에 의하여 투여될 수 있으나, 이들에 한정되는 것은 아니다.

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

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

[130]

[131] 본 발명의 조성물의 총 유효량은 단일 투여량(single dose)으로 환자에게 투여될 수 있으며, 다중 투여량(multiple dose)으로 장기간 투여되는 분할 치료 방법(fractionated treatment protocol)에 의해 투여될 수 있다. 본 발명의 약학적 조성물은 질환의 정도에 따라 유효성분의 함량을 달리할 수 있다. 바람직하게 본 발명의 글루카곤 유도체의 바람직한 전체 용량은 하루에 환자 체중 1 kg당 약 0.0001 mg 내지 500 mg일 수 있다. 그러나 상기 글루카곤 유도체의 용량은 약학적 조성물의 투여 경로 및 치료 횟수뿐만 아니라 환자의 연령, 체중, 건강 상태, 성별, 질환의 중증도, 식이 및 배설율 등 다양한 요인들을 고려하여 환자에 대한 유효 투여량이 결정되는 것이므로, 이러한 점을 고려할 때 당분야의 통상적인 지식을 가진 자라면 상기 본 발명의 조성물의 특정한 용도에 따른 적절한 유효 투여량을 결정할 수 있을 것이다. 본 발명에 따른 약학적 조성물은 본 발명의 효과를 보이는 한 그 제형, 투여 경로 및 투여 방법에 특별히 제한되지 아니한다.

[132] 본 발명의 약학적 조성물은 생체 내 지속성 및 역가가 우수하므로, 본 발명의 약학적 제제의 투여 횟수 및 빈도를 현저하게 감소시킬 수 있다.

[133] 특히, 본 발명의 약학적 조성물은 천연 글루카곤에 비해 변화된, 상이한 pI를 갖는 글루카곤 유도체를 유효성분으로 포함하기 때문에 용액의 pH에 따라 개선된 용해도 및 높은 안정성을 나타내므로 저혈당 또는 비만 치료를 위한 안정한 글루카곤 제형의 제조에 유용하게 사용될 수 있다.

[134]

[135] 아울러, 상기 약학적 조성물은 단독 또는 다른 비만 예방 또는 치료효과를 나타내는 약학적 제제와 병용하여 투여될 수 있다. 또한, 상기 약학적 조성물은 비만 예방 또는 치료효과를 나타내는 약학적 제제를 추가로 포함할 수 있다.

[136] 상기 비만 예방 또는 치료효과를 나타내는 약학적 제제는 특별히 이에 제한되지 않으나, GLP-1 수용체 작용제(agonist), GIP(glucose-dependent insulinotropic peptide) 수용체 길항제(antagonist), 렙틴(Leptin) 수용체 작용제, DPP-IV 저해제, Y5 수용체 길항제, MCH(Melanin-concentrating hormone) 수용체 길항제, Y2/3/4 수용체 작용제, MC3/4 수용체 작용제, 위/췌장

리파아제(gastric/pancreatic lipase) 저해제, 5HT2c 작용제, β3A 수용체 작용제, 아밀린(Amylin) 수용체 작용제, 그랠린(Ghrelin) 길항제 및 그랠린 수용체 길항제, FGF1, FGF21 수용체 작용제, CCK(Cholecystokinin) 수용체 작용제, PP(Pancreatic polypeptide) 수용체 작용제, 도파민 재흡수 억제제 등이 될 수 있다.

[137]

[138] 또 다른 양태로서, 본 발명은 상기 글루카곤 유도체 또는 이를 포함하는 약학적 조성물을 개체에게 투여하는 단계를 포함하는, 저혈당 또는 비만의 예방 또는 치료 방법을 제공한다.

[139] 본 발명에서 상기 개체는 저혈당 또는 비만이 의심되는 개체로서, 상기 저혈당 또는 비만 의심 개체는 해당 질환이 발병하였거나 발병할 수 있는 인간을 포함한 쥐, 가축 등을 포함하는 포유 동물을 의미하나, 본 발명의 글루카곤 유도체로 치료 가능한 개체는 제한 없이 포함된다. 본 발명의 글루카곤 유도체를 포함하는 약학적 조성물을 저혈당 또는 비만 의심 개체에 투여함으로써, 개체를 효율적으로 치료할 수 있다. 저혈당 또는 비만에 대해서는 상기에서 설명한 바와 같다.

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

[141]

[142] 또 다른 양태로서, 본 발명은 저혈당 또는 비만의 예방 또는 치료용 의약품의 제조에 있어서, 상기 글루카곤 유도체의 용도를 제공한다.

발명의 실시를 위한 형태

[143] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 보다 상세히 설명하고자 한다. 그러나, 이들 실시예는 본 발명을 예시적으로 설명하기 위한 것으로 본 발명의 범위가 이들 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[144]

[145] **실시예 1: 글루카곤에 대해 cAMP 반응을 보이는 세포주의 생산**

[146]

[147] 인간 글루카곤 수용체 유전자의 cDNA(OriGene Technologies, Inc. USA)에서 ORF에 해당하는 부분을 주형으로 하고, EcoRI 절단부위와 XhoI 절단부위를 각각 포함하는 하기 서열번호: 35 및 36의 정방향 및 역방향 프라이머를 이용한

PCR을 수행하였다.

[148] 이때, PCR 반응은 95℃에서 60초의 변성, 55℃에서 60초의 어닐링 및 68℃에서 30초의 신장 과정을 30회 반복 수행하였다. 이로부터 증폭된 PCR 산물을 1.0% 아가로스 겔에서 전기 영동한 후 450 bp 크기의 밴드를 용리하여 수득하였다.

[149]

[150] 정방향 프라이머: 5'-CAGCGACACCGACCGTCCCCCCGTACTTAAGGCC-3' (서열번호 35)

[151] 역방향 프라이머: 5'-CTAACCGACTCTCGGGGAAGACTGAGCTCGCC-3' (서열번호 36)

[152]

[153] 상기 PCR 산물을 공지된 동물세포 발현벡터인 x0GC/dhfr에 클로닝하여 재조합 벡터 x0GC/GCGR을 제조하였다.

[154] 상기 제조한 재조합 벡터 x0GC/GCGR를 10% FBS 함유 DMEM/F12 배지에서 배양한 CHO DG44 세포에 리포펙타민을 이용하여 형질전환하고, 1 mg/mL G418 및 10 nM 메토트렉세이트를 포함하는 선별배지에서 선별 배양하였다. 이로부터 제한 희석법으로 단일 클론 세포주를 선별하고, 이 중에서 글루카곤에 대해 우수한 농도의존적 cAMP 반응을 보이는 세포주를 최종적으로 선별하였다.

[155]

[156] **실시예 2: 글루카곤 유도체의 합성**

[157]

[158] pI에 따라서 용액 내에서의 단백질의 용해도, 활성 및 안정성이 달라지는 것은 당업계에 널리 알려진 상식이다 (Shaw, K. L. et al., Protein Science 10, pp1206-1215, 2001). 이에 따라 개선된 물성을 갖는 글루카곤 유도체를 개발하기 위하여, 서열번호: 1의 천연 글루카곤의 아미노산 서열을 음전하 및 양전하를 띤 아미노산 잔기로 치환하여 하기 표 1과 같은 글루카곤 유도체를 합성하였다

[159]

[160] [표1]

서열번호	아미노산 서열	링 형성
서열번호: 1	HSQGTFTSDYSKYLDSRRAQDFVQWLMNT	-
서열번호: 2	HSQGTFTSDYSKYLDCDRAQDFVQWLMNT	-
서열번호: 3	HSQGTFTSDYSKYLDCERAQDFVQWLMNT	-
서열번호: 4	HSQGTFTSDYSKYLDSCDAQDFVQWLMNT	-
서열번호: 5	HSQGTFTSDYSKYLDSCEAQDFVQWLMNT	-
서열번호: 6	HSQGTFTSDYSKYLDSCEADDFVQWLMNT	-
서열번호: 7	YSQGTFTSDYSKYLDSCEADDFVQWLMNT	-
서열번호: 8	YXQGTFTSDYSKYLDSCDAQDFVQWLINT	-
서열번호: 9	YXQGTFTSDYSKYLDSCDAQDFVVWLINT	-
서열번호: 10	YXQGTFTSDYSKYLDSCDADDFVVWLINT	-
서열번호: 11	YXQGTFTSDYSKYLDEKCAKEFVQWLMNT	-
서열번호: 12	YXQGTFTSDYSKYLDSRRAQDFVQWLMNT	-
서열번호: 13	YXQGTFTSDYSCYLDEKRAKEFVQWLMNT	-
서열번호: 14	YXQGTFTSDYSKYLDCKRAKEFVQWLMNT	-
서열번호: 15	YXQGTFTSDYSKYLCEKRAQDFVQWLMNT	-
서열번호: 16	YXQGTFTSDYSKYLDCRRAQVFVQWLMRT	-

서열번호: 17	YXQGTFTSDYSKYLDCVRAQDFVQW LMRT	-
서열번호: 18	YXQGTFTSDYSKYLDSRRACDFRLWL MNT	-
서열번호: 19	YXQGTFTSDYSKYLC**E**KRA**K**EFVQW LMNT	링 형성
서열번호: 20	YXQGTFTSDYSKYLD**E**CRA**K**EFVQW LMNT	링 형성
서열번호: 21	YXQGTFTSDYSKYLD**E**KCA**K**EFVQW LMNT	링 형성
서열번호: 22	YXQGTFTSDYSKYLD**E**KRC**K**EFVQW LMNT	링 형성
서열번호: 23	YXQGTFTSDYSKYCD**E**KRA**K**EFVQW LMNT	링 형성
서열번호: 24	YXQGTFTSDYSKCLD**E**KRA**K**EFVQW LMNT	링 형성
서열번호: 25	YXQGTFTSDYSKYLD**E**KRA**K**CFVQW LMNT	링 형성
서열번호: 26	WXQGTFTSDYSKYLD**E**CRA**K**DFVQW LMNT	링 형성
서열번호: 27	YXQGTFVSDYSKYLD**E**CRA**K**DFVQW LMNT	링 형성
서열번호: 28	WXQGTFVSDYSKYLD**E**CRA**K**DFVQW LMNT	링 형성
서열번호: 29	YXQGTFTSDYSKCLD**E**RRA**K**DFVQW LMNT	링 형성
서열번호: 30	WXQGTFTSDYSKCLD**E**RRA**K**DFVQW LMNT	링 형성
서열번호: 31	YXQGTFTSDYSKYLDC**K**RAK**E**FVQW LMNT	링 형성
서열번호: 32	-SQGTFTSDYSKYLD**E**CRA**K**EFVQWL MNT	링 형성
서열번호: 33	WXQGTFTSDYSKYCD**E**RRA**K**EFVQW LMNT	링 형성

서열번호: 34	YXQGTFTSDYSKYCDERRAKEFVQW LMNT	링 형성

[161] 상기 표 1에 기재된 서열번호: 8 내지 31 및 33 내지 34의 서열에서 X로 표기된 아미노산은 비천연형 아미노산인 Aib(aminoisobutyric acid)을 의미하며, 서열번호 32의 -는 해당 위치에 잔기가 존재하지 않는 것을, 두 잔기에 밑줄 및 볼드로 표시된 경우는 그 두 잔기 사이에 공유결합 고리가 형성된 것을 나타낸다.

[162]

[163] **실시예 3: 글루카곤 유도체의 pI 측정**

[164]

[165] 상기 실시예 2에서 합성된 글루카곤 유도체의 개선된 물성을 확인하기 위해 ExPASy 서버에서 pI/Mw 툴(http://expasy.org/tools/pi_tool.html; Gasteiger et al., 2003)을 사용하여 아미노산 서열로부터 pI를 추산하였다.

[166]

[167] [표2]

펩티드	pI
서열번호: 1	6.8
서열번호: 2	4.56
서열번호: 3	4.66
서열번호: 4	4.13
서열번호: 5	4.22
서열번호: 6	4.03
서열번호: 7	3.71
서열번호: 8	3.77
서열번호: 9	3.77
서열번호: 10	3.66
서열번호: 11	4.78
서열번호: 12	6.04
서열번호: 13	4.78
서열번호: 14	8.12
서열번호: 15	6.11
서열번호: 16	9.11
서열번호: 17	6.03
서열번호: 18	8.15
서열번호: 19	8.12
서열번호: 20	4.78
서열번호: 21	4.78
서열번호: 22	6.20
서열번호: 23	6.20
서열번호: 24	6.21
서열번호: 25	8.12
서열번호: 26	4.68
서열번호: 27	4.68
서열번호: 28	4.68
서열번호: 29	6.15

서열번호: 30	4.44
서열번호: 31	8.12
서열번호: 32	4.78
서열번호: 33	6.21
서열번호: 34	6.21

[168] 상기 표 2에 나타난 바와 같이, 서열번호: 1의 천연 글루카곤이 6.8의 pI를 갖는 반면, 본 발명에 따른 글루카곤 유도체는 약 4 내지 9 범위의 pI를 가져 개선된 물성을 나타내었다. 본 발명에 따른 글루카곤 유도체는 천연 글루카곤과 상이한 pI를 갖기 때문에 용액 pH 조건에 따라 개선된 용해도 및 높은 안정성을 나타낼 수 있다.

[169] 따라서, 본 발명에 따른 글루카곤 유도체는 저혈당 치료제로 사용시 환자 순응도를 높일 수 있으며, 다른 항비만 치료제, 예를 들어 GLP-1 수용체 길항제, GIP(glucose-dependent insulinotropic peptide) 수용체 길항제 등과의 병용 투여에 적합하여 저혈당 및 비만 치료제로서 유용하게 사용할 수 있다.

[170]

[171] 이상의 설명으로부터, 본 발명이 속하는 기술분야의 당업자는 본 발명이 그 기술적 사상이나 필수적 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 실시될 수 있다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 이와 관련하여, 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적인 것이 아닌 것으로서 이해해야만 한다. 본 발명의 범위는 상기 상세한 설명보다는 후술하는 특허 청구범위의 의미 및 범위 그리고 그 등가 개념으로부터 도출되는 모든 변경 또는 변형된 형태가 본 발명의 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.

청구범위

[청구항 1] 하기 일반식 1의 아미노산 서열을 포함하며, 천연형 글루카곤과 pI가 동일하지 않은 글루카곤 유도체:

X1-X2-QGTF-X7-SDYS-X12-X13-X14-X15-X16-X17-X18-X19-X20-X21-F-X23-X24-W-L-X27-X28-T (일반식 1)

상기 식에서,

X1은 히스티딘, 데스아미노-히스티딘(desamino-histidine), 디메틸-히스티딘(N-dimethyl-histidine), 베타-히드록시 이미다조프로피온산(beta-hydroxyimidazopropionic acid), 4-이미다조아세트산(4-imidazoacetic acid), 베타-카르복시 이미다조프로피온산(beta-carboxyimidazopropionic acid), 트립토판, 티로신 혹은 부존재하고;

X2는 알파-메틸-글루탐산(α-methyl-glutamic acid), Aib(aminoisobutyric acid), D-알라닌, 글리신, Sar(N-methylglycine), 세린 또는 D-세린이고;

X7은 트레오닌 또는 발린이고;

X12는 리신 또는 시스테인이고;

X13은 티로신 또는 시스테인이고;

X14는 류신 또는 시스테인이고;

X15는 아스파르트산, 글루탐산 또는 시스테인이고;

X16은 글루탐산, 아스파르트산, 세린, 알파-메틸-글루탐산 또는 시스테인이고;

X17은 아스파르트산, 글루타민, 글루탐산, 리신, 아르기닌, 세린, 발린 또는 시스테인이고;

X18은 아스파르트산, 글루타민, 글루탐산, 아르기닌 또는 시스테인이고;

X19는 알라닌 또는 시스테인이고;

X20은 리신, 글루탐산, 글루타민, 아스파르트산, 리신, 또는 시스테인이고;

X21은 아스파르트산, 글루탐산, 발린 또는 시스테인이고;

X23은 발린 또는 아르기닌이고;

X24는 발린, 류신, 글루타민 또는 아르기닌이고;

X27은 이소류신 또는 메티오닌이고;

X28은 아르기닌 또는 아스파라긴임

(단, 상기 일반식 1의 아미노산 서열이 서열번호: 1과 동일한 경우는 제외함).

[청구항 2] 제1항에 있어서, 일반식 1의 아미노산 서열에서

X1이 히스티딘 또는 트립토판, 티로신 혹은 부존재하고;

X2가 세린 또는 Aib(aminoisobutyric acid)이고;

X7은 트레오닌 또는 발린이고;
X12는 리신 또는 시스테인이고;
X13은 티로신 또는 시스테인이고;
X14는 류신 또는 시스테인이고;
X15는 아스파르트산, 또는 시스테인이고;
X16은 글루탐산, 아스파르트산, 세린, 또는 시스테인이고;
X17은 아스파르트산, 글루탐산, 리신, 아르기닌, 발린 또는 시스테인이고;
X18은 아스파르트산, 글루탐산, 아르기닌 또는 시스테인이고;
X19는 알라닌 또는 시스테인이고;
X20은 리신, 글루탐산, 글루타민, 아스파르트산, 리신, 또는 시스테인이고;
X21은 아스파르트산, 글루탐산, 발린 또는 시스테인이고;
X23은 발린 또는 아르기닌이고;
X24는 발린, 류신 또는 글루타민이고;
X27은 이소류신 또는 메티오닌이고;
X28은 아르기닌 또는 아스파라긴
(단, 상기 일반식 1의 아미노산 서열이 서열번호: 1과 동일한 경우는 제외함)인 글루카곤 유도체.

[청구항 3] 제1항에 있어서, 상기 글루카곤 유도체는 글루카곤 수용체 자극 활성이 있는 글루카곤 유도체.

[청구항 4] 제1항에 있어서, 상기 글루카곤 유도체가 서열번호: 2 내지 34의 아미노산 서열로 구성된 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하는 것인 글루카곤 유도체.

[청구항 5] 제1항 내지 제4항 중 어느 한 항의 글루카곤 유도체를 코딩하는 폴리뉴클레오티드.

[청구항 6] 제1항 내지 제4항 중 어느 한 항의 글루카곤 유도체를 유효성분으로 포함하는 저혈당의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

[청구항 7] 제1항 내지 제4항 중 어느 한 항의 글루카곤 유도체를 유효성분으로 포함하는 비만의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

[청구항 8] 제6항에 있어서, 약학적으로 허용가능한 담체를 추가로 포함하는 약학적 조성물.

[청구항 9] 제7항에 있어서, 약학적으로 허용가능한 담체를 추가로 포함하는 약학적 조성물.

[청구항 10] 제7항에 있어서, 상기 약학적 조성물이 단독 또는 다른 비만 예방 또는 치료효과를 나타내는 약학적 제제와 병용하여 투여되는 것인 약학적 조성물.

[청구항 11] 제7항에 있어서, 상기 약학적 조성물은 비만 예방 또는 치료효과를 나타내는 약학적 제제를 추가로 포함하는 약학적 조성물.

[청구항 12] 제10항에 있어서, 상기 비만 예방 또는 치료효과를 나타내는 약학적 제제를 GLP-1 수용체 작용제(agonist), GIP(glucose-dependent insulinotropic peptide) 수용체 길항제(antagonist), 렙틴(Leptin) 수용체 작용제, DPP-IV 저해제, Y5 수용체 길항제, MCH(Melanin-concentrating hormone) 수용체 길항제, Y2/3/4 수용체 작용제, MC3/4 수용체 작용제, 위/췌장 리파아제(gastric/pancreatic lipase) 저해제, 5HT2c 작용제, β3A 수용체 작용제, 아밀린(Amylin) 수용체 작용제, 그렐린(Ghrelin) 길항제 및 그렐린 수용체 길항제, FGF1, FGF21 수용체 작용제, CCK(Cholecystokinin) 수용체 작용제, PP(Pancreatic polypeptide) 수용체 작용제, 도파민 재흡수 억제제 및 이들의 조합으로 이루어진 군에서 선택하는 것인 약학적 조성물.

[청구항 13] 제11항에 있어서, 상기 비만 예방 또는 치료효과를 나타내는 약학적 제제를 GLP-1 수용체 작용제(agonist), GIP(glucose-dependent insulinotropic peptide) 수용체 길항제(antagonist), 렙틴(Leptin) 수용체 작용제, DPP-IV 저해제, Y5 수용체 길항제, MCH(Melanin-concentrating hormone) 수용체 길항제, Y2/3/4 수용체 작용제, MC3/4 수용체 작용제, 위/췌장 리파아제(gastric/pancreatic lipase) 저해제, 5HT2c 작용제, β3A 수용체 작용제, 아밀린(Amylin) 수용체 작용제, 그렐린(Ghrelin) 길항제 및 그렐린 수용체 길항제, FGF1, FGF21 수용체 작용제, CCK(Cholecystokinin) 수용체 작용제, PP(Pancreatic polypeptide) 수용체 작용제, 도파민 재흡수 억제제 및 이들의 조합으로 이루어진 군에서 선택하는 것인 약학적 조성물.

[청구항 14] 제1항 내지 제4항 중 어느 한 항의 글루카곤 유도체 또는 이를 포함하는 약학적 조성물을 개체에게 투여하는 단계를 포함하는, 저혈당 또는 비만의 예방 또는 치료 방법.

[청구항 15] 저혈당 또는 비만의 예방 또는 치료용 의약품의 제조에 있어서, 제1항 내지 제4항 중 어느 한 항의 글루카곤 유도체의 용도.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/KR2015/014422

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C07K 14/605(2006.01)i, A61K 38/26(2006.01)i, A61P 3/04(2006.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C07K 14/605; A61P 3/10; A61K 38/26; A61K 47/48; A61K 38/22; A61P 3/04

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched
Korean Utility models and applications for Utility models: IPC as above
Japanese Utility models and applications for Utility models: IPC as above

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

eKOMPASS (KIPO internal) & Keywords: glucagon derivative, glucagon receptor, GLP-1 agent, Aib, hypoglycemia, obesity

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2011-117415 A1 (NOVO NORDISK A/S.) 29 September 2011 See abstract; claim 9; and pages 30, 40, 49-51, 64-68.	1-13,15
A	WO 2014-170496 A1 (NOVO NORDISK A/S.) 23 October 2014 See the entire document.	1-13,15
A	CHABENNE et al., "A Glucagon Analog Chemically stabilized for Immediate Treatment of Life Threatening Hypoglycemia" Molecular Metabolism, Vol. 3, pp. 293-300 (January 2014) See the entire document.	1-13,15
A	US 8507428 B2 (DIMARCHI et al.) 13 August 2013 See the entire document.	1-13,15
A	JP 5476304 B2 (NOVO NORDISK A/S.) 23 April 2014 See the entire document.	1-13,15

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
12 APRIL 2016 (12.04.2016)	**14 APRIL 2016 (14.04.2016)**
Name and mailing address of the ISA/KR Korean Intellectual Property Office Government Complex-Daejeon, 189 Seonsa-ro, Daejeon 302-701, Republic of Korea Facsimile No. 82-42-472-7140	Authorized officer Telephone No.

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (January 2015)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/KR2015/014422

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: **14**
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

Claim 14 pertains to a method for treatment of the human body, and thus pertains to subject matter on which the International Searching Authority is not required to carry out an international search under the provisions of PCT Article 17 (2)(a)(i) and PCT Rule 39.1(iv).

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.

2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.

3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.

☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/KR2015/014422

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
WO 2011-117415 A1	29/09/2011	AU 2011-231503 A1	27/09/2012
		AU 2011-231503 B2	06/11/2014
		CA 2792663 A1	29/09/2011
		CN 102918056 A	06/02/2013
		EP 2552950 A1	06/02/2013
		JP 2013-523618 A	17/06/2013
		JP 2013-523619 A	17/06/2013
		KR 10-2013-0018410 A	21/02/2013
		MX 2012-010881 A	06/11/2012
		RU 2012-144289 A	10/05/2014
		US 2013-0035285 A1	07/02/2013
		US 2013-0143798 A1	06/06/2013
		US 2015-0274801 A1	01/10/2015
		US 2016-0002311 A1	07/01/2016
WO 2014-170496 A1	23/10/2014	AU 2014-255608 A1	08/10/2015
		CA 2909581 A1	23/10/2014
		US 2015-0374794 A1	31/12/2015
US 8507428 B2	13/08/2013	AU 2011-349331 A1	11/07/2013
		CA 2821766 A1	28/06/2012
		CL 2013-001783 A1	24/01/2014
		CN 103458920 A	18/12/2013
		CO 6761302 A2	30/09/2013
		EP 2654773 A2	30/10/2013
		JP 2014-507402 A	27/03/2014
		KR 10-2013-0132931 A	05/12/2013
		US 2012-238493 A1	20/09/2012
		US 2013-116173 A1	09/05/2013
		US 2015-259393 A1	17/09/2015
		WO 2012-088116 A2	28/06/2012
		WO 2012-088116 A3	15/11/2012
JP 5476304 B2	23/04/2014	CN 101868476 A	20/10/2010
		EP 2190872 A1	02/06/2010
		EP 2679597 A1	01/01/2014
		JP 2010-538042 A	09/12/2010
		US 2011-0082079 A1	07/04/2011
		US 2015-0025003 A1	22/01/2015
		US 8895694 B2	25/11/2014
		WO 2009-030738 A1	12/03/2009

국 제 조 사 보 고 서

국제출원번호
PCT/KR2015/014422

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))

C07K 14/605(2006.01)i, A61K 38/26(2006.01)i, A61P 3/04(2006.01)i

B. 조사된 분야

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)
C07K 14/605; A61P 3/10; A61K 38/26; A61K 47/48; A61K 38/22; A61P 3/04

조사된 기술분야에 속하는 최소문헌 이외의 문헌
한국등록실용신안공보 및 한국공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC
일본등록실용신안공보 및 일본공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC

국제조사에 이용된 전산 데이터베이스(데이터베이스의 명칭 및 검색어(해당하는 경우))
eKOMPASS(특허청 내부 검색시스템) & 키워드: 글루카곤 유도체, 글루카곤 수용체, GLP-1 작용제, Aib, 저혈당, 비만

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
X	WO 2011-117415 A1 (NOVO NORDISK A/S) 2011.09.29 요약; 청구항 9; 및 페이지 30, 40, 49-51, 64-68 참조.	1-13,15
A	WO 2014-170496 A1 (NOVO NORDISK A/S) 2014.10.23 전체 문헌 참조.	1-13,15
A	CHABENNE 등, 'A glucagon analog chemically stabilized for immediate treatment of life threatening hypoglycemia' Molecular Metabolism, Vol.3, pp.293-300 (2014.01) 전체 문헌 참조.	1-13,15
A	US 8507428 B2 (DIMARCHI 등) 2013.08.13 전체 문헌 참조.	1-13,15
A	JP 5476304 B2 (NOVO NORDISK A/S) 2014.04.23 전체 문헌 참조.	1-13,15

☐ 추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다.

☒ 대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.

* 인용된 문헌의 특별 카테고리:

"A" 특별히 관련이 없는 것으로 보이는 일반적인 기술수준을 정의한 문헌

"E" 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허 문헌

"L" 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌

"O" 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌

"P" 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌

"T" 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌

"X" 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신규성 또는 진보성이 없는 것으로 본다.

"Y" 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다.

"&" 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌

국제조사의 실제 완료일	국제조사보고서 발송일
2016년 04월 12일 (12.04.2016)	2016년 04월 14일 (14.04.2016)

ISA/KR의 명칭 및 우편주소
대한민국 특허청
(35208) 대전광역시 서구 청사로 189,
4동 (둔산동, 정부대전청사)
팩스 번호 +82-42-481-8578

심사관
김승범
전화번호 +82-42-481-3371

국제조사보고서

국제출원번호
PCT/KR2015/014422

제2기재란 일부 청구항을 조사할 수 없는 경우의 의견(첫 번째 용지의 2의 계속)

PCT 제17조(2)(a)의 규정에 따라 다음과 같은 이유로 일부 청구항에 대하여 본 국제조사보고서가 작성되지 아니하였습니다.

1. ☒ 청구항: 14
이 청구항은 본 기관이 조사할 필요가 없는 대상에 관련됩니다. 즉,
청구항 14는 인체의 치료방법에 관한 것이므로 PCT 제17조(2)(a)(i) 및 PCT 규칙 39.1(iv)의 규정에 의하여 국제조사기관이 국제 조사할 의무가 없는 대상에 해당됩니다.

2. ☐ 청구항:
이 청구항은 유효한 국제조사를 수행할 수 없을 정도로 소정의 요건을 충족하지 아니하는 국제출원의 부분과 관련됩니다. 구체적으로는,

3. ☐ 청구항:
이 청구항은 종속청구항이나 PCT규칙 6.4(a)의 두 번째 및 세 번째 문장의 규정에 따라 작성되어 있지 않습니다.

제3기재란 발명의 단일성이 결여된 경우의 의견(첫 번째 용지의 3의 계속)

본 국제조사기관은 본 국제출원에 다음과 같이 다수의 발명이 있다고 봅니다.

1. ☐ 출원인이 모든 추가수수료를 기간 내에 납부하였으므로, 본 국제조사보고서는 모든 조사 가능한 청구항을 대상으로 합니다.

2. ☐ 추가수수료 납부를 요구하지 않고도 모든 조사 가능한 청구항을 조사할 수 있었으므로, 본 기관은 추가수수료 납부를 요구하지 아니하였습니다.

3. ☐ 출원인이 추가수수료의 일부만을 기간 내에 납부하였으므로, 본 국제조사보고서는 수수료가 납부된 청구항만을 대상으로 합니다. 구체적인 청구항은 아래와 같습니다.

4. ☐ 출원인이 기간 내에 추가수수료를 납부하지 아니하였습니다. 따라서 본 국제조사보고서는 청구범위에 처음 기재된 발명에 한정되어 있으며, 해당 청구항은 아래와 같습니다.

이의신청에 관한 기재

☐ 출원인의 이의신청 및 이의신청료 납부(해당하는 경우)와 함께 추가수수료가 납부되었습니다.

☐ 출원인의 이의신청과 함께 추가수수료가 납부되었으나 이의신청료가 보정요구서에 명시된 기간 내에 납부되지 아니하였습니다.

☐ 이의신청 없이 추가수수료가 납부되었습니다.

국제조사보고서
대응특허에 관한 정보

국제출원번호
PCT/KR2015/014422

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
WO 2011-117415 A1	2011/09/29	AU 2011-231503 A1	2012/09/27
		AU 2011-231503 B2	2014/11/06
		CA 2792663 A1	2011/09/29
		CN 102918056 A	2013/02/06
		EP 2552950 A1	2013/02/06
		JP 2013-523618 A	2013/06/17
		JP 2013-523619 A	2013/06/17
		KR 10-2013-0018410 A	2013/02/21
		MX 2012-010881 A	2012/11/06
		RU 2012-144289 A	2014/05/10
		US 2013-0035285 A1	2013/02/07
		US 2013-0143798 A1	2013/06/06
		US 2015-0274801 A1	2015/10/01
		US 2016-0002311 A1	2016/01/07
WO 2014-170496 A1	2014/10/23	AU 2014-255608 A1	2015/10/08
		CA 2909581 A1	2014/10/23
		US 2015-0374794 A1	2015/12/31
US 8507428 B2	2013/08/13	AU 2011-349331 A1	2013/07/11
		CA 2821766 A1	2012/06/28
		CL 2013-001783 A1	2014/01/24
		CN 103458920 A	2013/12/18
		CO 6761302 A2	2013/09/30
		EP 2654773 A2	2013/10/30
		JP 2014-507402 A	2014/03/27
		KR 10-2013-0132931 A	2013/12/05
		US 2012-238493 A1	2012/09/20
		US 2013-116173 A1	2013/05/09
		US 2015-259393 A1	2015/09/17
		WO 2012-088116 A2	2012/06/28
		WO 2012-088116 A3	2012/11/15
JP 5476304 B2	2014/04/23	CN 101868476 A	2010/10/20
		EP 2190872 A1	2010/06/02
		EP 2679597 A1	2014/01/01
		JP 2010-538042 A	2010/12/09
		US 2011-0082079 A1	2011/04/07
		US 2015-0025003 A1	2015/01/22
		US 8895694 B2	2014/11/25
		WO 2009-030738 A1	2009/03/12

(19) Europäisches Patentamt
European Patent Office
Office européen des brevets

(11) EP 3 241 841 A1

(12) EUROPEAN PATENT APPLICATION
published in accordance with Art. 153(4) EPC

(43) Date of publication:
08.11.2017 Bulletin 2017/45

(21) Application number: **15875680.9**

(22) Date of filing: **30.12.2015**

(51) Int Cl.:
C07K 14/605 *(2006.01)* ***A61K 38/26*** *(2006.01)*
A61P 3/04 *(2006.01)*

(86) International application number:
PCT/KR2015/014422

(87) International publication number:
WO 2016/108586 (07.07.2016 Gazette 2016/27)

(84) Designated Contracting States:
AL AT BE BG CH CY CZ DE DK EE ES FI FR GB GR HR HU IE IS IT LI LT LU LV MC MK MT NL NO PL PT RO RS SE SI SK SM TR
Designated Extension States:
BA ME
Designated Validation States:
MA MD

(30) Priority: **30.12.2014 KR 20140193800**

(71) Applicant: **Hanmi Pharm. Co., Ltd.**
Hwaseong-si, Gyeonggi-do 18536 (KR)

(72) Inventors:
- **KIM, Jung Kuk**
  Hwaseong-si
  Gyeonggi-do 18469 (KR)
- **LEE, Jong Min**
  Hwaseong-si
  Gyeonggi-do 18469 (KR)
- **KIM, Sang Yun**
  Hwaseong-si
  Gyeonggi-do 18469 (KR)
- **BAE, Sung Min**
  Hwaseong-si
  Gyeonggi-do 18469 (KR)
- **JUNG, Sung Youb**
  Hwaseong-si
  Gyeonggi-do 18469 (KR)
- **KWON, Se Chang**
  Hwaseong-si
  Gyeonggi-do 18469 (KR)

(74) Representative: **Andrews, Robert et al**
Mewburn Ellis LLP
City Tower
40 Basinghall Street
London EC2V 5DE (GB)

(54) GLUCAGON DERIVATIVE HAVING IMPROVED STABILITY

(57) The present invention relates to a novel glucagon derivative peptide, and a composition for preventing or treating hypoglycemia containing the novel glucagon derivative peptide as an active ingredient. The glucagon derivative according to the present invention has improved physical properties due to the change in isoelectric point (pI) while being capable of maintaining an activity on glucagon receptors, and thus can improve patient compliance when used as a hypoglycemic agent, and is also suitable for administration in combination with other anti-obesity agents. Accordingly, the glucagon derivative according to the present invention can be effectively used for the prevention and treatment of hypoglycemia and obesity.

EP 3 241 841 A1

Description

[Technical Field]

[0001] The present invention relates to novel glucagon derivatives having improved physical properties due to the change in isoelectric point (pI), and a composition for preventing or treating hypoglycemia and obesity containing the same as an active ingredient.

[Background Art]

[0002] Recent economic advances and lifestyle changes have been accompanied by great changes in dietary habits. Particularly, busy people of today are overweight and obese due to high-calorie diets and insufficient exercise. The World Health Organization (WHO) has reported that more than one billion adults are overweight worldwide, among them over three million are clinically diagnosed with severe obesity, and 25,000 people die of overweight- or obesity-related diseases every year (World Health Organization, Global Strategy on Diet, Physical Activity and Health, 2004).

[0003] Overweight and obesity are responsible for increasing blood pressure and cholesterol levels and causing or worsening various diseases, such as cardiac diseases, diabetes, arthritis, etc. In addition, the problem of obesity is also becoming a major cause in the increased incidence of atherosclerosis, hypertension, hyperlipidemia, or heart diseases in children or teenagers as well as in adults. However, obesity is not easy to treat, because it is a complex disease associated with the mechanisms of appetite control and energy metabolism. Accordingly, the treatment of obesity requires not only the patient's own efforts, but also a method capable of treating abnormal mechanisms associated with appetite control and energy metabolism. Thus, efforts have been made to develop drugs for treating the abnormal mechanisms.

[0004] As a result of these efforts, drugs such as Rimonabant (Sanofi-Aventis), Sibutramin (Abbott), Contrave (Takeda), and Orlistat (Roche) have been developed, but they have the disadvantages of serious adverse effects or very weak anti-obesity effects. For example, according to reports, Rimonabant showed a side-effect of central nervous system disorder, Sibutramine and Contrave showed cardiovascular side-effects, and Orlistat showed only about 4 kg of weight loss when taken for 1 year. Accordingly, there have been no therapeutic agents for obesity which can be prescribed safely for obese patients.

[0005] Many extensive studies have been made to develop novel therapeutic agents for obesity which can resolve the problems of the conventional anti-obesity drugs. Recently, glucagon derivatives have received much attention. Glucagon is produced by the pancreas when blood glucose levels drop as a result of other medications or diseases, or hormone or enzyme deficiencies. Glucagon stimulates glycogen breakdown in the liver, and facilitates glucose release to raise blood glucose levels to a normal range. In addition to the effect of increasing the blood glucose levels, glucagon suppresses appetite and activates hormone-sensitive lipase of adipocytes to facilitate lipolysis, thereby showing an anti-obesity effect. However, the use of glucagon as a therapeutic agent has been limited due to its low solubility and its property of being precipitated at a neutral pH.

[0006] One of the glucagon derivatives, glucagon like peptide-1 (GLP-1), is under development as a therapeutic agent for treating hyperglycemia in patients with diabetes. GLP-1 has the functions of stimulating insulin synthesis and secretion, inhibiting glucagon secretion, slowing gastric emptying, increasing glucose utilization, and inhibiting food intake.

[0007] Exendin-4, prepared from lizard venom and having an amino acid homology of about 50% with GLP-1, was also reported to activate the GLP-1 receptor, thereby reducing hyperglycemia in patients with diabetes. However, anti-obesity drugs containing GLP-1 are reported to show side-effects such as vomiting and nausea.

[0008] As an alternative to GLP-1, therefore, much attention has been focused on oxyntomodulin, which can bind to both receptors of the two peptides, GLP-1 and glucagon. Oxyntomodulin is a peptide prepared from a glucagon precursor, pre-glucagon, and has the functions of inhibiting food intake and enhancing satiety of GLP-1, and has lipolytic activity like glucagon, thus increasing its potency in anti-obesity therapy.

[0009] However, oxyntomodulin or derivatives thereof have a serious drawback in that an excess amount of the drug should be administered daily for obesity treatment because they have low efficacy and a short *in vivo* half-life.

[0010] Additionally, when both activities of GLP-1 and glucagon are present in a single peptide, the activity ratio thereof becomes fixed, and thus it is difficult to use a dual agonist with various ratios. Accordingly, a combined therapy capable of using various activity ratios by adjusting the contents of GLP-1 and glucagon may be more effective.

[0011] However, for the combined therapy, it is required to improve the physical characteristics of glucagon, which aggregates at a neutral pH and precipitates with time, thus showing poor solubility.

[0012] Under these circumstances, the present inventors have developed glucagon derivatives with partial modifications of the amino acid sequence of glucagon for the improvement of the therapeutic effects of glucagon on hypoglycemia and obesity by improving the physical properties of glucagon, and have discovered that these glucagon derivatives have improved solubility and higher stability at a neutral pH, thereby completing the present invention.

[Disclosure]

[Technical Problem]

[0013] An object of the present invention is to provide a novel glucagon derivative with improved physical properties.

[0014] Another object of the present invention is to provide a composition for preventing or treating hypoglycemia containing the glucagon derivative as an active ingredient.

[0015] A further object of the present invention is to provide a composition for preventing or treating obesity containing the glucagon derivative as an active ingredient.

[Technical Solution]

[0016] In order to achieve the above objects, in an aspect, the present invention provides a novel glucagon derivative which includes the amino acid sequence of the following General Formula 1 and has an isoelectric point (pI), which is not the same as, i.e., different from, that of native glucagon:

X1-X2-QGTF-X7-SDYS-X12-X13-X14-X15-X16-X17-X18-X19-X20-X21-F-X23-X2 4-W-L-X27-X28-T (General Formula 1)

wherein, in General Formula 1,

X1 is histidine, desamino-histidine, N-dimethyl-histidine, β-hydroxyimidazopropionic acid, 4-imidazoacetic acid, β-carboxyimidazopropionic acid, tryptophan, tyrosine, or deleted;
X2 is α-methyl-glutamic acid, aminoisobutyric acid (Aib), D-alanine, glycine, Sar(N-methylglycine), serine, or D-serine;
X7 is threonine or valine;
X12 is lysine or cysteine;
X13 is tyrosine or cysteine;
X14 is leucine or cysteine;
X15 is aspartic acid, glutamic acid, or cysteine;
X16 is glutamic acid, aspartic acid, serine, α-methyl-glutamic acid, or cysteine;
X17 is aspartic acid, glutamine, glutamic acid, lysine, arginine, serine, valine, or cysteine;
X18 is aspartic acid, glutamine, glutamic acid, arginine, or cysteine;
X19 is alanine or cysteine;
X20 is lysine, glutamic acid, glutamine, aspartic acid, lysine, or cysteine;
X21 is aspartic acid, glutamic acid, valine, or cysteine;
X23 is valine or arginine;
X24 is valine, leucine, glutamine, or arginine;
X27 is isoleucine or methionine; and
X28 is arginine or asparagine

(with the proviso that when the amino acid sequence of General Formula 1 is identical to SEQ ID NO: 1, it is excluded).

[0017] The glucagon derivative according to the present invention includes a peptide, a peptide derivative, or a peptide mimetic, which has improved physical properties by having a different pI from that of native glucagon by modifying a part of the amino acid(s) of native glucagon.

[0018] As used herein, the term "native glucagon" refers to native human glucagon having the sequence of

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).

[0019] Referring to the sequence of General Formula 1 according to the present invention, the amino acids proceed from the N-terminus on the left to the C-terminus on the right according to the conventional method of description. Accordingly, when the "position" of any particular residue is referred to in the sequence of General Formula 1, it should be interpreted in the same manner as when any position in native glucagon or other molecules is referred to.

[0020] Over the entire specification of the present invention, not only the conventional one-letter or three-letter codes for naturally occurring amino acids, but also those three-letter codes generally allowed for other amino acids, such as

α-aminoisobutyric acid (Aib), Sar(N-methylglycine), and α-methyl-glutamic acid, are used.

[0021] Additionally, the amino acids mentioned herein are abbreviated according to the nomenclature rules of IUPAC-IUB as follows:

Alanine	A;	Arginine	R;
Asparagine	N;	Aspartic acid	D;
Cysteine	C;	Glutamic acid	E;
Glutamine	Q;	Glycine	G;
Histidine	H;	Isoleucine	I;
Leucine	L;	Lysine	K;
Methionine	M;	Phenylalanine	F;
Proline	P;	Serine	S;
Threonine	T;	Tryptophan	W;
Tyrosine	Y; and	Valine	V.

[0022] As used herein, the term "peptide" refers to a compound of two or more native and non-native amino acids or amino acid derivatives such as α-amino acids linked by a peptide bond. As used herein, the term "glucagon derivative" refers to a peptide including the sequence of General Formula 1 or a derivative thereof, an analog, or a modified product thereof. The peptide according to the present invention includes peptidomimetics, which have a change in pI compared to that of native glucagon by modifying a part of the amino acid(s) of glucagon in the form of a substitution, etc. In an exemplary embodiment of the present invention, the glucagon derivative has an isoelectric point different from that of native glucagon while maintaining the activity of a glucagon receptor. In a more specific exemplary embodiment of the present invention, the glucagon derivative refers to a peptide with improved solubility of native glucagon at a physiological pH while maintaining the glucagon receptor activity.

[0023] As used herein, the term "pI" or "isoelectric point" refers to the pH value at which a macromolecule such as a polypeptide has no net charge (0). In the case of a polypeptide with various charged functional groups, the net charge of the total polypeptide is "0" at a point where the pH value is the same as that of pI. The net charge of the polypeptide at a pH higher than the pI will be negative while the net charge of the polypeptide at a pH lower than the pI will be positive.

[0024] The pI values may be measured or estimated by a conventional method used in the art. For example, the pI values may be measured on an immobilized pH gradient gel consisting of polyacrylamide, starch, or agarose by isoelectric electrophoresis, or, for example, may be estimated from an amino acid sequence using a pI/MW tool (http://expasy.org/tools/pi_tool.html; Gasteiger et al., 2003) in an ExPASy server.

[0025] In a specific embodiment of the present invention, the glucagon derivative containing an amino acid sequence of General Formula 1 encompasses any peptide that is prepared by the substitution, addition, deletion, or post-translational modification (e.g., methylation, acylation, ubiquitination, or intramolecular covalent bonding) of amino acid(s) in the amino acid sequence of native glucagon represented by SEQ ID NO: 1, which exhibits improved solubility according to the pH of a solution due to the difference of its pI from that of native glucagon while maintaining the glucagon receptor activities as they are, thereby having improved *in vivo* chemical stability.

[0026] During the substitution or addition of amino acids, not only the 20 amino acids commonly found in human proteins, but also atypical or non-naturally occurring amino acids and derivatives thereof can be used. Commercial sources of atypical amino acids may include Sigma-Aldrich, ChemPep Inc., Genzyme Pharmaceuticals, etc. The peptides including these amino acids and atypical peptide sequences may be synthesized and purchased from commercial suppliers, e.g., American Peptide Company, Bachem (USA), or Anygen (Korea). Amino acid derivatives, e.g., desamino-histidine, β-hydroxyimidazopropionic acid, 4-imidazoacetic acid, or β-carboxyimidazopropionic acid, may be obtained in the same manner.

[0027] Since glucagon has a pH of about 7, it is insoluble in a solution having a pH of 6 to 8 and tends to precipitate at a neutral pH. In an aqueous solution with a pH of 3 or below, glucagon is dissolved at the initial stage but precipitates within one hour by forming a gel. Since the gelated glucagon mainly consists of β-sheet fibrils, the administration of the thus-precipitated glucagon via an injection needle or intravenous injection will block blood vessels, and thus is not suitable for use as an injection agent. In order to delay the precipitation process, acidic (pH of 2 to 4) formulations are commonly used, and by doing so, glucagon can be maintained in a relatively non-aggregated state for a short period of time. However, glucagon can form fibrils very rapidly at a low pH, and thus these acidic formulations must be injected upon preparation.

[0028] It is widely known in the art that the solubility, activity, and stability of a protein in a solution can vary according to pI (Shaw, K. L. et al., Protein Science 10, pp 1206-1215, 2001).

[0029] As such, the present inventors have developed glucagon derivatives with extended stability and functional

effects by modifying the sequence of native glucagon, thereby altering its pI. The glucagon derivatives of the present invention, by having an altered pI compared to that of native glucagon, are characterized in that they have improved solubility and stability according to the pH of a given solution, compared to that of native glucagon.

[0030] In a specific embodiment of the present invention, the glucagon derivative may be a peptide in which, in the amino acid sequence of General Formula 1,

X1 is histidine or tryptophan, tyrosine, or deleted;
X2 is serine or aminoisobutyric acid (Aib);
X7 is threonine or valine;
X12 is lysine or cysteine;
X13 is tyrosine or cysteine;
X14 is leucine or cysteine;
X15 is aspartic acid or cysteine;
X16 is glutamic acid, aspartic acid, serine, or cysteine;
X17 is aspartic acid, glutamic acid, lysine, arginine, valine, or cysteine;
X18 is aspartic acid, glutamic acid, arginine, or cysteine;
X19 is alanine or cysteine;
X20 is lysine, glutamic acid, glutamine, aspartic acid, lysine, or cysteine;
X21 is aspartic acid, glutamic acid, valine, or cysteine;
X23 is valine or arginine;
X24 is valine, leucine, or glutamine;
X27 is isoleucine or methionine; and
X28 is arginine or asparagine
(with the proviso that when the amino acid sequence of General Formula 1 is identical to SEQ ID NO: 1, it is excluded).

[0031] More preferably, the glucagon derivative of the present invention may be a peptide including any one amino acid sequence among the amino acid sequences represented by SEQ ID NOS: 2 to 34.

[0032] The peptide including the glucagon derivative of the present invention may be prepared by a standard synthesis method, a recombinant expression system, or any other method in the art. Accordingly, the glucagon analog according to the present invention may be synthesized by many methods including the methods described below:

(a) a method of synthesizing a peptide by a solid-phase or liquid-phase method stepwise or by fragment assembly, followed by isolation and purification of the final peptide product; or
(b) a method of expressing a nucleic acid construct encoding a peptide in a host cell and recovering the expression product from the host cell culture; or
(c) a method of performing an *in vitro* cell-free expression of a nucleic acid construct encoding a peptide and recovering the expression product therefrom; or
(d) a method of obtaining peptide fragments by any combination of the methods (a), (b), and (c), obtaining the peptide by linking the peptide fragments, and then recovering the peptide.

[0033] In an exemplary aspect of the present invention, it was confirmed that the glucagon derivative of the present invention has a different pI compared to that of native glucagon (see Table 1). As a result, the glucagon derivative of the present invention has improved solubility and higher stability according to the pH of a given solution, compared to that of native glucagon. Accordingly, the glucagon derivative of the present invention can increase patient compliance when used as a hypoglycemic agent and is also suitable for the combined administration to be administered in combination with other anti-obesity agents, and thus can be effectively used for the prevention and treatment of hypoglycemia and obesity.

[0034] In this regard, the glucagon derivative of the present invention can provide an attractive therapeutic selection regarding hypoglycemia, obesity, or associated diseases thereof.

[0035] For example, the glucagon derivative of the present invention is a major insulin response-controlling hormone, and can be effectively used for the treatment of severe hypoglycemia in diabetic patients.

[0036] Additionally, the glucagon derivative of the present invention may be used as a pharmaceutical drug not only for preventing body weight increase, promotion of body weight decrease, reduction of overweight, and obesities including morbid obesity (e.g., by controlling appetite, ingestion, food intake, calorie intake, and/or energy consumption), but also for treating obesity-related inflammation, obesity-related gallbladder disease, and obesity-induced sleep apnea, but is not limited thereto, and may be used for treating the associated diseases or health conditions thereof. The glucagon derivative of the present invention may also be used for treating the health conditions that may be associated with obesity, such as metabolic syndrome, hypertension, atherosclerosis-induced dyslipidemia, arteriosclerosis, arterial chlerosis, coronary heart disease, strokes, etc. However, the effects of the glucagon derivative according to the present invention may be mediated entirely or partially by the body weight-related effects described above or may be independent

of the same.

[0037] Meanwhile, for the improvement of the therapeutic effects of the glucagon derivative of the present invention, the glucagon derivative may be modified using the typical techniques in the art, including a modification with polymers such as polyethylene glycol (PEG) and sugar chains, or a fusion with albumin, transferrin, fatty acid, and immunoglobulin, etc. For example, at least one amino acid side chain within the compounds of the present invention may be attached to a polymer in order to increase *in vivo* solubility and/or half-lives, and/or increase bioavailabilities thereof. These modifications are known to reduce the clearance of therapeutic proteins and peptides.

[0038] For these polymers, soluble (amphipathic or hydrophilic), non-toxic, and pharmaceutically inert polymers are appropriate, and preferably, they may include PEG, homopolymers or copolymers of PEG, monomethyl-substituted polymers (mPEG), and poly-amino acids such as poly-lysine, poly-aspartic acid, and poly-glutamic acid.

[0039] The variants of the glucagon derivative as described above also belong to the scope of the present invention.

[0040] In another aspect, the present invention provides polynucleotides encoding the glucagon derivatives described above.

[0041] The term "homology", as used herein for the polynucleotide, indicates the degree of similarity to a wild-type amino acid sequence and a wild-type nucleic acid sequence, and includes a gene sequence that is 75% or higher, preferably 85% or higher, more preferably 90% or higher, and even more preferably 95% or higher identical to the polynucleotide sequence encoding the glucagon derivatives. The homology evaluation may be done with the naked eye or using a commercially available program. Using a commercially available computer program, the homology between two or more sequences may be expressed as a percentage (%), and the homology (%) between adjacent sequences may be evaluated. The polynucleotide encoding the glucagon derivatives may be inserted into a vector and expressed to obtain a large amount of the glucagon derivatives.

[0042] For these recombinant expressions, the polynucleotides of the present invention are generally inserted into appropriate vectors to construct cloning vectors or recombinant vectors containing these polynucleotides, and these vectors also belong to the scope of the present invention.

[0043] As used herein, the term "recombinant vector" refers to a DNA construct including the sequence of a polynucleotide encoding a target peptide, which is operably linked to an appropriate regulatory sequence to enable the expression of the target peptide, e.g., a glucagon derivative, in a host cell. The regulatory sequence includes a promoter capable of initiating transcription, any operator sequence for the regulation of the transcription, a sequence encoding an appropriate mRNA ribosome-binding domain, and a sequence regulating the termination of transcription and translation. The recombinant vector, after being transformed into a suitable host cell, may be replicated or function irrespective of the host genome, or may be integrated into the host genome itself.

[0044] The recombinant vector used in the present invention may not be particularly limited as long as the vector is replicable in the host cell, and it may be constructed using any vector known in the art. Examples of the vector may include natural or recombinant plasmids, cosmids, viruses, and bacteriophages. For example, as a phage vector or cosmid vector, pWE15, M13, MBL3, MBL4, IXII, ASHII, APII, t10, t11, Charon4A, Charon21A, etc., may be used; and as a plasmid vector, those based on pBR, pUC, pBluescriptII, pGEM, pTZ, pCL, pET, etc., may be used. The vectors that can be used in the present invention are not particularly limited but any known expression vector may be used.

[0045] The recombinant vector is used for the transformation of a host cell for producing glucagon derivatives of the present invention. Additionally, these transformed cells, as a part of the present invention, may be used for the amplification of nucleic acid fragments and vectors, or may be cultured cells or cell lines used in the recombinant production of glucagon derivatives of the present invention.

[0046] As used herein, the term "transformation" refers to a process of introducing a recombinant vector including a polynucleotide encoding a target protein into a host cell, thereby enabling the expression of the polynucleotide encoded by the protein in the host cell. For the transformed polynucleotide, it does not matter whether it is inserted into the chromosome of a host cell and located therein or located outside the chromosome, as long as it can be expressed in the host cell, and both cases are included.

[0047] Additionally, the polynucleotide includes DNA and RNA which encode the target protein. The polynucleotide may be inserted in any form insofar as it can be introduced into a host cell and expressed therein. For example, the polynucleotide may be introduced into a host cell in the form of an expression cassette. The expression cassette may conventionally include a promoter operably linked to the polynucleotide, a transcription termination signal, a ribosome-binding domain, and a translation termination signal. The expression cassette may be in the form of an expression vector capable of self-replication. Additionally, the polynucleotide may be introduced into a host cell as it is and operably linked to a sequence essential for its expression in the host cell, but is not limited thereto. Additionally, as used herein, the term "operably linked" refers to a functional connection between a promoter sequence, which initiates and mediates the transcription of the polynucleotide encoding the target protein of the present invention, and the above gene sequence.

[0048] An appropriate host to be used in the present invention may not be particularly limited as long as it can express the polynucleotide of the present invention. Examples of the appropriate host may include bacteria belonging to the genus *Escherichia* such as *E. coli,* bacteria belonging to the genus *Bacillus* such as *Bacillus subtilis,* bacteria belonging

to the genus *Pseudomonas* such as *Pseudomonas putida*, yeasts such as *Pichia pastoris*, *Saccharomyces cerevisiae*, and *Schizosaccharomyces pombe*, insect cells such as *Spodoptera frugiperda* (Sf9), and animal cells such as CHO, COS, and BSC.

[0049] In another aspect, the present invention provides a pharmaceutical composition for preventing or treating hypoglycemia or obesity containing the glucagon derivatives.

[0050] As used herein, the term "prevention" refers to any action resulting in suppression or delay of the onset of obesity by the administration of the glucagon derivatives or the pharmaceutical composition, and the term "treatment" refers to any action resulting in improvement in symptoms of obesity or the beneficial alteration by the administration of the glucagon derivatives or the pharmaceutical composition.

[0051] As used herein, the term "administration" refers to introduction of a particular material to a patient by an appropriate manner, and the composition may be administered via any of the common routes as long as the composition can arrive at a target tissue. For example, administration may be performed intraperitoneally, intravenously, intramuscularly, subcutaneously, intradermally, orally, topically, intranasally, intrapulmonarily, intrarectally, etc.

[0052] As used herein, the term "hypoglycemia" refers to an acute symptom of diabetes, in which blood glucose levels are lower than those of normal people, and in general, refers to a state when the blood glucose levels are 50 mg/dL or less. Hypoglycemia is frequently caused when a person who takes an oral hypoglycemic agent has eaten less than usual or has performed activities or exercised more than usual. In addition, hypoglycemia may occur due to the use of glucose level-lowering drugs, severe physical diseases, hormone deficiency such as adrenocortical hormones and glucagon, tumor in insulin-producing pancreas, insulin autoimmune syndrome, gastrectomy patients, inborn error of carbohydrate metabolism disorder, etc.

[0053] Symptoms of hypoglycemia include weakness, trembling, pale skin, cold sweat, dizziness, excitement, anxiety, pounding heart, empty stomach, headache, fatigue, etc. In the case of persistent hypoglycemia, it may lead to convulsion or seizure, and may cause shock and thus fainting.

[0054] As used herein, the term "obesity" refers to a medical condition with excess body fat in the body, and when a person having a body mass index (BMI; body mass (kg) divided by the square of the body height (m)) of 25 or higher is diagnosed as having obesity. Obesity generally occurs due to a long-term energy imbalance in which energy intake exceeds energy expenditure. Obesity is a metabolic disease that affects the entire body, which increases the risk of diabetes, hyperlipidemia, sexual dysfunction, arthritis, and cardiovascular disease, and in some cases, it is also associated with the occurrence of cancers.

[0055] The pharmaceutical composition of the present invention may contain a pharmaceutically acceptable carrier, excipient, or diluent. As used herein, the term "pharmaceutically acceptable" refers to the properties of having a sufficient amount to exhibit a therapeutic effect and not causing adverse effects, and may be easily determined by a skilled person in the art based on the factors well known in the medical field, such as the kind of disease, age, body weight, health status, sex, drug sensitivity of a patient, administration route, administration method, administration frequency, duration of treatment, a drug to be mixed or administered simultaneously in combination, etc.

[0056] The pharmaceutical composition of the present invention containing the glucagon derivative of the present invention may further contain a pharmaceutically acceptable carrier. The pharmaceutically acceptable carrier may include, for oral administration, a binder, a glidant, a disintegrant, an excipient, a solubilizing agent, a dispersant, a stabilizing agent, a suspending agent, a coloring agent, a flavoring agent, etc.; for injections, a buffering agent, a preserving agent, an analgesic, a solubilizing agent, an isotonic agent, a stabilizing agent, etc., which may be combined to be used; and for topical administrations, a base, an excipient, a lubricant, a preserving agent, etc., although it is not limited thereto.

[0057] The formulation type of the composition according to the present invention may be prepared variously by combining with a pharmaceutically acceptable carrier as described above. For example, for oral administration, the composition may be formulated into tablets, troches, capsules, elixirs, suspensions, syrups, wafers, etc. For injections, the composition may be formulated into single-dose ampoules or multidose containers. The composition may be also formulated into solutions, suspensions, tablets, capsules, and sustained-release formulations.

[0058] Meanwhile, examples of suitable carriers, excipients, and diluents may include lactose, dextrose, sucrose, sorbitol, mannitol, xylitol, erythritol, maltitol, starch, acacia rubber, alginate, gelatin, calcium phosphate, calcium silicate, cellulose, methyl cellulose, microcrystalline cellulose, polyvinylpyrrolidone, water, methyl hydroxybenzoate, propyl hydroxybenzoate, talc, magnesium stearate, mineral oil, etc. Additionally, the composition may further contain a filler, an anti-coagulant, a lubricant, a humectant, a flavoring agent, a preservative, etc.

[0059] Additionally, the pharmaceutical composition of the present invention may be prepared in any formulation type selected from the group consisting of tablets, pills, powders, granules, capsules, suspensions, liquid medicine for internal use, emulsions, syrups, sterile injection solutions, non-aqueous solvents, lyophilized formulations, and suppositories.

[0060] Additionally, the composition may be formulated into a single dosage form suitable for the patient's body, and preferably is formulated into a preparation useful for peptide drugs according to the typical method in the pharmaceutical field so as to be administered by an oral or parenteral route, such as through skin, intravenously, intramuscularly, intraarterially, intramedullarily, intrathecally, intraventricularly, pulmonarily, transdermally, subcutaneously, intraperitoneally,

intranasally, intragastrically, topically, sublingually, vaginally, or rectally, but is not limited thereto.

[0061] Additionally, the glucagon derivative may be used by blending with a variety of pharmaceutically acceptable carriers such as physiological saline or organic solvents. In order to increase the stability or absorptivity, carbohydrates such as glucose, sucrose, or dextrans, antioxidants such as ascorbic acid or glutathione, chelating agents, low molecular weight proteins, or other stabilizers may be used.

[0062] The administration dose and frequency of the pharmaceutical composition of the present invention are determined by the type of active ingredient(s), together with various factors such as the disease to be treated, administration route, patient's age, gender, and body weight, and severity of the disease.

[0063] The total effective dose of the composition of the present invention may be administered to a patient in a single dose, or may be administered for a long period of time in multiple doses according to a fractionated treatment protocol. In the pharmaceutical composition of the present invention, the content of active ingredient(s) may vary depending on the disease severity. Preferably, the total daily dose of the peptide of the present invention may be approximately 0.0001 μg to 500 mg per 1 kg of body weight of a patient. However, the effective dose of the glucagon derivative is determined considering various factors including patient's age, body weight, health conditions, gender, disease severity, diet, and excretion rate, in addition to administration route and treatment frequency of the pharmaceutical composition. In this regard, those skilled in the art may easily determine the effective dose suitable for the particular use of the pharmaceutical composition of the present invention. The pharmaceutical composition according to the present invention is not particularly limited to the formulation and administration route and mode, as long as it shows the effects of the present invention.

[0064] The pharmaceutical composition of the present invention shows excellent *in vivo* duration of efficacy and titer, thereby remarkably reducing the number and frequency of administration thereof.

[0065] In particular, since the pharmaceutical composition of the present invention contains, as an active ingredient, a glucagon derivative having an altered pI different from that of native glucagon, it shows improved solubility and high stability according to the pH of a given solution, and thus the pharmaceutical composition of the present invention can be effectively used in the preparation of a stable glucagon formulation for treating hypoglycemia or obesity.

[0066] Furthermore, the pharmaceutical composition of the present invention may be administered alone or in combination with other pharmaceutical formulation(s) showing prophylactic or therapeutic effects on obesity. Additionally, the pharmaceutical composition of the present invention may further contain a pharmaceutical formulation showing prophylactic or therapeutic effects on obesity.

[0067] The pharmaceutical formulations showing prophylactic or therapeutic effects on obesity are not particularly limited, and may include a GLP-1 receptor agonist, a glucose-dependent insulinotropic peptide (GIP) receptor antagonist, a leptin receptor agonist, a DPP-IV inhibitor, a Y5 receptor antagonist, a melanin-concentrating hormone (MCH) receptor antagonist, a Y2/3/4 receptor agonist, an MC3/4 receptor agonist, a gastric/pancreatic lipase inhibitor, a 5HT2c agonist, a β3A receptor agonist, an amylin receptor agonist, a ghrelin antagonist and a ghrelin receptor antagonist, FGF1, an FGF21 receptor agonist, a cholecystokinin (CCK) receptor agonist, a pancreatic polypeptide (PP) receptor agonist, a dopamine reabsorption inhibitor, etc.

[0068] In still another aspect, the present invention provides a method for preventing or treating hypoglycemia or obesity, including administration of the glucagon derivative or the pharmaceutical composition containing the same to a subject.

[0069] As used herein, the term "subject" refers to those suspected of having hypoglycemia or obesity, which are mammals including humans, mice, and livestock animals having hypoglycemia or obesity, or with the possibility of having hypoglycemia or obesity. However, any subject to be treated with the glucagon derivatives or the pharmaceutical composition of the present invention is included without limitation. The pharmaceutical composition containing the glucagon derivative of the present invention may be administered to a subject suspected of having hypoglycemia or obesity, thereby treating the subject effectively. The hypoglycemia and obesity are the same as described above.

[0070] The therapeutic method of the present invention may include administration of the pharmaceutical composition containing the glucagon derivative at a pharmaceutically effective amount. Preferably, the total daily dose should be determined based on appropriate medical judgment by a physician and administered once or several times. In view of the objects of the present invention, the specific therapeutically effective dose for any particular patient may vary depending on various factors, such as the kind and degree of the response to be achieved, specific compositions including whether other agent(s) is(are) used therewith or not, the patient's age, body weight, health condition, gender, and diet, the time and route of administration, the secretion rate of the composition, duration of therapy, other drug(s) used in combination or simultaneously with the specific compositions, and similar factors well known in the medical art.

[0071] In still another aspect, the present invention provides a use of the glucagon derivatives in the preparation of pharmaceutical drugs for the prevention or treatment of hypoglycemia or obesity.

[Advantageous Effects]

[0072] The novel glucagon derivatives of the present invention have excellent stability and solubility according to the

pH of a given solution by having a pI different from that of native glucagon. Therefore, when the novel glucagon derivatives of the present invention are used as a therapeutic agent for treating hypoglycemia, they can increase patient compliance. Additionally, the novel glucagon derivatives of the present invention are suitable for administration in combination with other anti-obesity agents, and thus they can be effectively used for preventing or treating hypoglycemia and obesity.

[DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION]

[0073] Hereinafter, the present invention will be described in more detail with reference to the following Examples. However, these Examples are for illustrative purposes only and are not intended to limit the scope of the present invention.

Example 1: Production of a cell line having a cAMP response to glucagon

[0074] PCR was performed using a region corresponding to an open reading frame (ORF) in cDNA (OriGene Technologies, Inc., USA) of human glucagon receptor gene as a template, and the following forward and reverse primers of SEQ ID NOS: 35 and 36, including each of the HindIII and EcoRI restriction sites.

[0075] In particular, PCR was performed for a total of 30 cycles using the following conditions: 95°C denaturation for 60 seconds, annealing at 55°C for 60 seconds, and extension at 68°C for 30 seconds. The thus-obtained PCR product was electrophoresed in a 1.0% agarose gel, and a band with a size of 450 bp was obtained therefrom by elution.

Forward primer: 5'-CAGCGACACCGACCGTCCCCCCGTACTTAAGGCC-3' (SEQ ID NO: 35)
Reverse primer: 5'-CTAACCGACTCTCGGGGAAGACTGAGCTCGCC-3' (SEQ ID NO: 36)

[0076] The PCR product was cloned into a known animal cell expression vector, x0GC/dhfr, to prepare a recombinant vector x0GC/GCGR. CHO DG44 cell line cultured in DMEM/F12 (10% FBS) medium was transfected with the recombinant vector x0GC/GCGR using Lipofectamine, and selectively cultured in a selection medium containing 1 mg/mL G418 and 10 nM Methotraxate. Single clone cell lines were selected therefrom by a limit dilution method, and among them, a cell line showing excellent cAMP response to glucagon in a concentration-dependent manner was finally selected therefrom.

Example 2: Synthesis of glucagon derivatives

[0077] It is widely known in the art that the solubility, activity, and stability of a protein in a solution can vary according to pI (Shaw, K. L. et al., Protein Science 10, pp 1206-1215, 2001). In order to prepare glucagon derivatives with improved physical properties, the amino acid sequence of native glucagon represented by SEQ ID NO: 1 was substituted with amino acid residues having positive and negative charges, and thereby glucagon derivatives were synthesized as shown in Table 1 below.

[TABLE 1]

SEQ ID NO	Amino Acid Sequence	Ring Formation
SEQ ID NO: 1	HSQGTFTSDYSKYLDSRRAQDFVQWLMNT	-
SEQ ID NO: 2	HSQGTFTSDYSKYLDCDRAQDFVQWLMNT	-
SEQ ID NO: 3	HSQGTFTSDYSKYLDCERAQDFVQWLMNT	-
SEQ ID NO: 4	HSQGTFTSDYSKYLDSCDAQDFVQWLMNT	-
SEQ ID NO: 5	HSQGTFTSDYSKYLDSCEAQDFVQWLMNT	-
SEQ ID NO: 6	HSQGTFTSDYSKYLDSCEADDFVQWLMNT	-
SEQ ID NO: 7	YSQGTFTSDYSKYLDSCEADDFVQWLMNT	-
SEQ ID NO: 8	YXQGTFTSDYSKYLDSCDAQDFVQWLINT	-
SEQ ID NO: 9	YXQGTFTSDYSKYLDSCDAQDFVVWLINT	-
SEQ ID NO: 10	YXQGTFTSDYSKYLDSCDADDFVVWLINT	-
SEQ ID NO: 11	YXQGTFTSDYSKYLDEKCAKEFVQWLMNT	-
SEQ ID NO: 12	YXQGTFTSDYSKYLDSRRAQDFVQWLMNT	-
SEQ ID NO: 13	YXQGTFTSDYSCYLDEKRAKEFVQWLMNT	-

(continued)

SEQ ID NO	Amino Acid Sequence	Ring Formation
SEQ ID NO: 14	YXQGTFTSDYSKYLDCKRAKEFVQWLMNT	-
SEQ ID NO: 15	YXQGTFTSDYSKYLCEKRAQDFVQWLMNT	-
SEQ ID NO: 16	YXQGTFTSDYSKYLDCRRAQVFVQWLMRT	-
SEQ ID NO: 17	YXQGTFTSDYSKYLDCVRAQDFVQWLMRT	-
SEQ ID NO: 18	YXQGTFTSDYSKYLDSRRACDFRLWLMNT	-
SEQ ID NO: 19	YXQGTFTSDYSKYLC**E**KRA**K**EFVQWLMNT	ring formed
SEQ ID NO: 20	YXQGTFTSDYSKYLD**E**CRA**K**EFVQWLMNT	ring formed
SEQ ID NO: 21	YXQGTFTSDYSKYLD**E**KCA**K**EFVQWLMNT	ring formed
SEQ ID NO: 22	YXQGTFTSDYSKYLD**E**KRC**K**EFVQWLMNT	ring formed
SEQ ID NO: 23	YXQGTFTSDYSKYCD**E**KRA**K**EFVQWLMNT	ring formed
SEQ ID NO: 24	YXQGTFTSDYSKCLD**E**KRA**K**EFVQWLMNT	ring formed
SEQ ID NO: 25	YXQGTFTSDYSKYLD**E**KRA**K**CFVQWLMNT	ring formed
SEQ ID NO: 26	WXQGTFTSDYSKYLD**E**CRA**K**DFVQWLMNT	ring formed
SEQ ID NO: 27	YXQGTFVSDYSKYLD**E**CRA**K**DFVQWLMNT	ring formed
SEQ ID NO: 28	WXQGTFVSDYSKYLD**E**CRA**K**DFVQWLMNT	ring formed
SEQ ID NO: 29	YXQGTFTSDYSKCLD**E**RRA**K**DFVQWLMNT	ring formed
SEQ ID NO: 30	WXQGTFTSDYSKCLD**E**RRA**K**DFVQWLMNT	ring formed
SEQ ID NO: 31	YXQGTFTSDYSKYLDC**K**RAK**E**FVQWLMNT	ring formed
SEQ ID NO: 32	-SQGTFTSDYSKYLD**E**CRA**K**EFVQWLMNT	ring formed
SEQ ID NO: 33	WXQGTFTSDYSKYCD**E**RRA**K**EFVQWLMNT	ring formed
SEQ ID NO: 34	YXQGTFTSDYSKYCD**E**RRA**K**EFVQWLMNT	ring formed

[0078] Regarding the SEQ ID NOS: 8 to 31 and 33 to 34 shown in Table 1, the amino acid represented by X represents a non-native amino acid, aminoisobutyric acid (Aib); "-" in the amino acid sequence of SEQ ID NO: 32 means that no amino acid residue is present on the corresponding position; and the two bold and underlined amino acid residues represent formation of a ring between the two amino acid residues.

Example 3: Measurement of pI of glucagon derivatives

[0079] In order to measure the improved physical properties of glucagon derivatives synthesized in Example 2, pI values were calculated based on the amino acid sequences using the pI/Mw tool (http://expasy.org/tools/pi_tool.html; Gasteiger et al., 2003) in the ExPASy server.

[TABLE 2]

Glucagon Derivatives	pI
SEQ ID NO: 1	6.8
SEQ ID NO: 2	4.56
SEQ ID NO: 3	4.66
SEQ ID NO: 4	4.13
SEQ ID NO: 5	4.22
SEQ ID NO: 6	4.03

(continued)

Glucagon Derivatives	pI
SEQ ID NO: 7	3.71
SEQ ID NO: 8	3.77
SEQ ID NO: 9	3.77
SEQ ID NO: 10	3.66
SEQ ID NO: 11	4.78
SEQ ID NO: 12	6.04
SEQ ID NO: 13	4.78
SEQ ID NO: 14	8.12
SEQ ID NO: 15	6.11
SEQ ID NO: 16	9.11
SEQ ID NO: 17	6.03
SEQ ID NO: 18	8.15
SEQ ID NO: 19	8.12
SEQ ID NO: 20	4.78
SEQ ID NO: 21	4.78
SEQ ID NO: 22	6.20
SEQ ID NO: 23	6.20
SEQ ID NO: 24	6.21
SEQ ID NO: 25	8.12
SEQ ID NO: 26	4.68
SEQ ID NO: 27	4.68
SEQ ID NO: 28	4.68
SEQ ID NO: 29	6.15
SEQ ID NO: 30	4.44
SEQ ID NO: 31	8.12
SEQ ID NO: 32	4.78
SEQ ID NO: 33	6.21
SEQ ID NO: 34	6.21

[0080] As shown in Table 2 above, while the native glucagon of SEQ ID NO: 1 had a pI of 6.8, the glucagon derivatives according to the present invention showed pI values in the range of from about 4 to about 9, thus showing improved physical properties. Since the glucagon derivatives according to the present invention have pI values different from that of native glucagon, they can exhibit improved solubility and higher stability according to the pH conditions of a given solution.

[0081] Accordingly, when the glucagon derivatives according to the present invention are used as a therapeutic agent for treating hypoglycemia, they can improve patient compliance, and are also suitable for administration in combination with other anti-obesity agents, e.g., a GLP-1 receptor antagonist, a glucose-dependent insulinotropic peptide (GIP) receptor antagonist, etc., and thus can be effectively used as a therapeutic agent for treating hypoglycemia and obesity.

[0082] Those of ordinary skill in the art will recognize that the present invention may be embodied in other specific forms without departing from its spirit or essential characteristics. The described embodiments are to be considered in all respects only as illustrative and not restrictive. The scope of the present invention is, therefore, indicated by the appended claims rather than by the foregoing description. All changes which come within the meaning and range of

equivalency of the claims are to be embraced within the scope of the present invention.

Sequence Listing

<110> HANMI PHARM. CO., LTD.

<120> Glucagon Derivatives With Improved Stability

<130> OPA15322

<150> KR 10-2014-0193800
<151> 2014-12-30

<160> 36

<170> KoPatentIn 3.0

<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 derivative

<400> 2
His Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Cys
1 5 10 15

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

<210> 3
<211> 29
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> glucagon derivative

<400> 3
His Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Cys
1 5 10 15

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

<210> 4

<211> 29
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> glucagon derivative

<400> 4
His Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Ser
1 5 10 15

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

<210> 5
<211> 29
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> glucagon derivative

<400> 5
His Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Ser
1 5 10 15

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

<210> 6
<211> 29
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> glucagon derivative

<400> 6
His Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Ser
1 5 10 15

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

<210> 7
<211> 29
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> glucagon derivative

<400> 7
Tyr Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Ser
1 5 10 15

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

<210> 8
<211> 29
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> glucagon derivative

<220>
<221> VARIANT
<222> (2)
<223> Xaa is aminoisobutyric acid

<400> 8
Tyr Xaa Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Ser
1 5 10 15

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

<210> 9
<211> 29
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> glucagon derivative

<220>
<221> VARIANT
<222> (2)
<223> Xaa is aminoisobutyric acid

<400> 9
Tyr Xaa Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Ser
1 5 10 15

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

<210> 10
<211> 29
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> glucagon derivative

<220>
<221> VARIANT
<222> (2)
<223> Xaa is aminoisobutyric acid

<400> 10

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

Cys Asp Ala Asp Asp Phe Val Val Trp Leu Ile Asn Thr
20 25

<210> 11
<211> 29
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> glucagon derivative

<220>
<221> VARIANT
<222> (2)
<223> Xaa is aminoisobutyric acid

<400> 11
Tyr Xaa Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Glu
1 5 10 15

Lys Cys Ala Lys Glu Phe Val Gln Trp Leu Met Asn Thr
20 25

<210> 12
<211> 29
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> glucagon derivative

<220>
<221> VARIANT
<222> (2)
<223> Xaa is aminoisobutyric acid

<400> 12
Tyr 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 Asn Thr
20 25

<210> 13
<211> 29
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> glucagon derivative

<220>
<221> VARIANT
<222> (2)
<223> Xaa is aminoisobutyric acid

<400> 13
Tyr Xaa Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Cys Tyr Leu Asp Glu
1 5 10 15

Lys Arg Ala Lys Glu Phe Val Gln Trp Leu Met Asn Thr
20 25

<210> 14
<211> 29
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> glucagon derivative

<220>
<221> VARIANT
<222> (2)
<223> Xaa is aminoisobutyric acid

<400> 14
Tyr Xaa Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Cys
1 5 10 15

Lys Arg Ala Lys Glu Phe Val Gln Trp Leu Met Asn Thr
20 25

<210> 15
<211> 29
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> glucagon derivative

<220>
<221> VARIANT
<222> (2)
<223> Xaa is aminoisobutyric acid

<400> 15
Tyr Xaa Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Cys Glu
1 5 10 15

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

<210> 16
<211> 29
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> glucagon derivative

<220>

<221> VARIANT
<222> (2)
<223> Xaa is aminoisobutyric acid

<400> 16
Tyr Xaa Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Cys
1 5 10 15

Arg Arg Ala Gln Val Phe Val Gln Trp Leu Met Arg Thr
20 25

<210> 17
<211> 29
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> glucagon derivative

<220>
<221> VARIANT
<222> (2)
<223> Xaa is aminoisobutyric acid

<400> 17
Tyr Xaa Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Cys
1 5 10 15

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

<210> 18
<211> 29
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> glucagon derivative

<220>
<221> VARIANT
<222> (2)
<223> Xaa is aminoisobutyric acid

<400> 18
Tyr Xaa Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Ser
1 5 10 15

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

<210> 19
<211> 29
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>

<223> glucagon derivative

<220>
<221> VARIANT
<222> (2)
<223> Xaa is aminoisobutyric acid

<220>
<221> VARIANT
<222> (16), (20)
<223> amino acids at position 16 and position 20 form a ring

<400> 19
Tyr Xaa Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Cys Glu
1 5 10 15

Lys Arg Ala Lys Glu Phe Val Gln Trp Leu Met Asn Thr
20 25

<210> 20
<211> 29
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> glucagon derivative

<220>
<221> VARIANT
<222> (2)
<223> Xaa is aminoisobutyric acid

<220>
<221> VARIANT
<222> (16), (20)
<223> amino acids at position 16 and position 20 form a ring

<400> 20
Tyr Xaa Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Glu
1 5 10 15

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

<210> 21
<211> 29
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> glucagon derivative

<220>
<221> VARIANT
<222> (2)
<223> Xaa is aminoisobutyric acid

<220>
<221> VARIANT

<222> (16), (20)
<223> amino acids at position 16 and position 20 form a ring

<400> 21
Tyr Xaa Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Glu
1 5 10 15

Lys Cys Ala Lys Glu Phe Val Gln Trp Leu Met Asn Thr
20 25

<210> 22
<211> 29
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> glucagon derivative

<220>
<221> VARIANT
<222> (2)
<223> Xaa is aminoisobutyric acid

<220>
<221> VARIANT
<222> (16), (20)
<223> amino acids at position 16 and position 20 form a ring

<400> 22
Tyr Xaa Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Glu
1 5 10 15

Lys Arg Cys Lys Glu Phe Val Gln Trp Leu Met Asn Thr
20 25

<210> 23
<211> 29
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> glucagon derivative

<220>
<221> VARIANT
<222> (2)
<223> Xaa is aminoisobutyric acid

<220>
<221> VARIANT
<222> (16), (20)
<223> amino acids at position 16 and position 20 form a ring

<400> 23
Tyr Xaa Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Cys Asp Glu
1 5 10 15

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

20 25

<210> 24
<211> 29
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> glucagon derivative

<220>
<221> VARIANT
<222> (2)
<223> Xaa is aminoisobutyric acid

<220>
<221> VARIANT
<222> (16), (20)
<223> amino acids at position 16 and position 20 form a ring

<400> 24
Tyr Xaa Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Cys Leu Asp Glu
1 5 10 15

Lys Arg Ala Lys Glu Phe Val Gln Trp Leu Met Asn Thr
20 25

<210> 25
<211> 29
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> glucagon derivative

<220>
<221> VARIANT
<222> (2)
<223> Xaa is aminoisobutyric acid

<220>
<221> VARIANT
<222> (16), (20)
<223> amino acids at position 16 and position 20 form a ring

<400> 25
Tyr Xaa Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Glu
1 5 10 15

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

<210> 26
<211> 29
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>

<223> glucagon derivative

<220>
<221> VARIANT
<222> (2)
<223> Xaa is aminoisobutyric acid

<220>
<221> VARIANT
<222> (16), (20)
<223> amino acids at position 16 and position 20 form a ring

<400> 26
Trp Xaa Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Glu
1 5 10 15

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

<210> 27
<211> 29
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> glucagon derivative

<220>
<221> VARIANT
<222> (2)
<223> Xaa is aminoisobutyric acid

<220>
<221> VARIANT
<222> (16), (20)
<223> amino acids at position 16 and position 20 form a ring

<400> 27
Tyr Xaa Gln Gly Thr Phe Val Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Glu
1 5 10 15

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

<210> 28
<211> 29
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> glucagon derivative

<220>
<221> VARIANT
<222> (2)
<223> Xaa is aminoisobutyric acid

<220>
<221> VARIANT

<222> (16), (20)
<223> amino acids at position 16 and position 20 form a ring

<400> 28
Trp Xaa Gln Gly Thr Phe Val Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Glu
1 5 10 15

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

<210> 29
<211> 29
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> glucagon derivative

<220>
<221> VARIANT
<222> (2)
<223> Xaa is aminoisobutyric acid

<220>
<221> VARIANT
<222> (16), (20)
<223> amino acids at position 16 and position 20 form a ring

<400> 29
Tyr Xaa Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Cys Leu Asp Glu
1 5 10 15

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

<210> 30
<211> 29
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> glucagon derivative

<220>
<221> VARIANT
<222> (2)
<223> Xaa is aminoisobutyric acid

<220>
<221> VARIANT
<222> (16), (20)
<223> amino acids at position 16 and position 20 form a ring

<400> 30
Trp Xaa Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Cys Leu Asp Glu
1 5 10 15

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

20 25

<210> 31
<211> 29
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> glucagon derivative

<220>
<221> VARIANT
<222> (2)
<223> Xaa is aminoisobutyric acid

<220>
<221> VARIANT
<222> (17), (21)
<223> amino acids at position 17 and position 21 form a ring

<400> 31
Tyr Xaa Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Cys
1 5 10 15

Lys Arg Ala Lys Glu Phe Val Gln Trp Leu Met Asn Thr
20 25

<210> 32
<211> 28
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> glucagon derivative

<220>
<221> VARIANT
<222> (15), (19)
<223> amino acids at position 15 and position 19 form a ring

<400> 32
Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Glu Cys
1 5 10 15

Arg Ala Lys Glu Phe Val Gln Trp Leu Met Asn Thr
20 25

<210> 33
<211> 29
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> glucagon derivative

<220>
<221> VARIANT
<222> (2)

<223> Xaa is aminoisobutyric acid

<220>
<221> VARIANT
<222> (16), (20)
<223> amino acids at position 16 and position 20 form a ring

<400> 33
Trp Xaa Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Cys Asp Glu
1 5 10 15

Arg Arg Ala Lys Glu Phe Val Gln Trp Leu Met Asn Thr
20 25

<210> 34
<211> 29
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> glucagon derivative

<220>
<221> VARIANT
<222> (2)
<223> Xaa is aminoisobutyric acid

<220>
<221> VARIANT
<222> (16), (20)
<223> amino acids at position 16 and position 20 form a ring

<400> 34
Tyr Xaa Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Cys Asp Glu
1 5 10 15

Arg Arg Ala Lys Glu Phe Val Gln Trp Leu Met Asn Thr
20 25

<210> 35
<211> 34
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> forward primer

<400> 35
cagcgacacc gaccgtcccc ccgtacttaa ggcc 34

<210> 36
<211> 32
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> reverse primer

<400> 36
ctaaccgact ctcggggaag actgagctcg cc 32

Claims

1. A glucagon derivative, which comprises the amino acid sequence of the following General Formula 1 and has a different isoelectric point (pI) from that of native glucagon:

X1-X2-QGTF-X7-SDYS-X12-X13-X14-X15-X16-X17-X18-X19-X20-X21-F-X23-X2 4-W-L-X27-X28-T (General Formula 1)

wherein, in General Formula 1,

X1 is histidine, desamino-histidine, N-dimethyl-histidine, β-hydroxyimidazopropionic acid, 4-imidazoacetic acid, β-carboxyimidazopropionic acid, tryptophan, tyrosine, or deleted;
X2 is α-methyl-glutamic acid, aminoisobutyric acid (Aib), D-alanine, glycine, Sar(N-methylglycine), serine, or D-serine;
X7 is threonine or valine;
X12 is lysine or cysteine;
X13 is tyrosine or cysteine;
X14 is leucine or cysteine;
X15 is aspartic acid, glutamic acid, or cysteine;
X16 is glutamic acid, aspartic acid, serine, α-methyl-glutamic acid, or cysteine;
X17 is aspartic acid, glutamine, glutamic acid, lysine, arginine, serine, valine, or cysteine;
X18 is aspartic acid, glutamine, glutamic acid, arginine, or cysteine;
X19 is alanine or cysteine;
X20 is lysine, glutamic acid, glutamine, aspartic acid, lysine, or cysteine;
X21 is aspartic acid, glutamic acid, valine, or cysteine;
X23 is valine or arginine;
X24 is valine, leucine, glutamine, or arginine;
X27 is isoleucine or methionine; and
X28 is arginine or asparagine

(with the proviso that when the amino acid sequence of General Formula 1 is identical to SEQ ID NO: 1, it is excluded).

2. The glucagon derivative of claim 1, wherein, in the amino acid sequence of General Formula 1,
X1 is histidine or tryptophan, tyrosine, or deleted;
X2 is serine or aminoisobutyric acid (Aib);
X7 is threonine or valine;
X12 is lysine or cysteine;
X13 is tyrosine or cysteine;
X14 is leucine or cysteine;
X15 is aspartic acid or cysteine;
X16 is glutamic acid, aspartic acid, serine, or cysteine;
X17 is aspartic acid, glutamic acid, lysine, arginine, valine, or cysteine;
X18 is aspartic acid, glutamic acid, arginine, or cysteine;
X19 is alanine or cysteine;
X20 is lysine, glutamic acid, glutamine, aspartic acid, lysine, or cysteine;
X21 is aspartic acid, glutamic acid, valine, or cysteine;
X23 is valine or arginine;
X24 is valine, leucine, or glutamine;
X27 is isoleucine or methionine; and
X28 is arginine or asparagine
(with the proviso that when the amino acid sequence of General Formula 1 is identical to SEQ ID NO: 1, it is excluded).

3. The glucagon derivative of claim 1, wherein the glucagon derivative has glucagon receptor-stimulating activity.

4. The glucagon derivative of claim 1, wherein the glucagon derivative comprises an amino acid sequence selected from the group consisting of amino acid sequences represented by SEQ ID NOS: 2 to 34.

5. A polynucleotide encoding the glucagon derivative according to any one of claims 1 to 4.

6. A pharmaceutical composition for preventing or treating hypoglycemia comprising the glucagon derivative according to any one of claims 1 to 4 as an active ingredient.

7. A pharmaceutical composition for preventing or treating obesity comprising the glucagon derivative according to any one of claims 1 to 4 as an active ingredient.

8. The pharmaceutical composition according to claim 6, further comprising a pharmaceutically acceptable carrier.

9. The pharmaceutical composition according to claim 7, further comprising a pharmaceutically acceptable carrier.

10. The pharmaceutical composition according to claim 7, wherein the pharmaceutical composition is administered alone or in combination with a pharmaceutical agent having the effect of preventing or treating obesity.

11. The pharmaceutical composition according to claim 7, further comprising a pharmaceutical agent having the effect of preventing or treating obesity.

12. The pharmaceutical composition according to claim 10, wherein the pharmaceutical agent having the effect of preventing or treating obesity is selected from the group consisting of a GLP-1 receptor agonist, a glucose-dependent insulinotropic peptide (GIP) receptor antagonist, a leptin receptor agonist, a DPP-IV inhibitor, a Y5 receptor antagonist, a melanin-concentrating hormone (MCH) receptor antagonist, a Y2/3/4 receptor agonist, an MC3/4 receptor agonist, a gastric/pancreatic lipase inhibitor, a 5HT2c agonist, a β3A receptor agonist, an amylin receptor agonist, a ghrelin antagonist, a ghrelin receptor antagonist, FGF1, an FGF21 receptor agonist, a cholecystokinin (CCK) receptor agonist, a pancreatic polypeptide (PP) receptor agonist, a dopamine reabsorption inhibitor, and a combination thereof.

13. The pharmaceutical composition according to claim 11, wherein the pharmaceutical agent having the effect of preventing or treating obesity is selected from the group consisting of a GLP-1 receptor agonist, a glucose-dependent insulinotropic peptide (GIP) receptor antagonist, a leptin receptor agonist, a DPP-IV inhibitor, a Y5 receptor antagonist, a melanin-concentrating hormone (MCH) receptor antagonist, a Y2/3/4 receptor agonist, an MC3/4 receptor agonist, a gastric/pancreatic lipase inhibitor, a 5HT2c agonist, a β3A receptor agonist, an amylin receptor agonist, a ghrelin antagonist, a ghrelin receptor antagonist, FGF1, an FGF21 receptor agonist, a cholecystokinin (CCK) receptor agonist, a pancreatic polypeptide (PP) receptor agonist, a dopamine reabsorption inhibitor, and a combination thereof.

14. A method of preventing or treating hypoglycemia or obesity, comprising administering the glucagon derivative according to any one of claims 1 to 4, or a pharmaceutical composition containing the same, to a subject in need thereof.

15. A use of the glucagon derivative according to any one of claims 1 to 4, or a pharmaceutical composition containing the same, in the preparation of a pharmaceutical drug for preventing or treating obesity.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/KR2015/014422

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C07K 14/605(2006.01)i, A61K 38/26(2006.01)i, A61P 3/04(2006.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
C07K 14/605; A61P 3/10; A61K 38/26; A61K 47/48; A61K 38/22; A61P 3/04

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched
Korean Utility models and applications for Utility models: IPC as above
Japanese Utility models and applications for Utility models: IPC as above

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
eKOMPASS (KIPO internal) & Keywords: glucagon derivative, glucagon receptor, GLP-1 agent, Aib, hypoglycemia, obesity

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2011-117415 A1 (NOVO NORDISK A/S.) 29 September 2011 See abstract; claim 9; and pages 30, 40, 49-51, 64-68.	1-13,15
A	WO 2014-170496 A1 (NOVO NORDISK A/S.) 23 October 2014 See the entire document.	1-13,15
A	CHABENNE et al., "A Glucagon Analog Chemically stabilized for Immediate Treatment of Life Threatening Hypoglycemia" Molecular Metabolism, Vol. 3, pp. 293-300 (January 2014) See the entire document.	1-13,15
A	US 8507428 B2 (DIMARCHI et al.) 13 August 2013 See the entire document.	1-13,15
A	JP 5476304 B2 (NOVO NORDISK A/S.) 23 April 2014 See the entire document.	1-13.15

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
12 APRIL 2016 (12.04.2016)	**14 APRIL 2016 (14.04.2016)**
Name and mailing address of the ISA/KR Korean Intellectual Property Office Government Complex-Daejeon, 189 Seonsa-ro, Daejeon 302-701, Republic of Korea Facsimile No. 82-42-472-7140	Authorized officer Telephone No.

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (January 2015)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/KR2015/014422

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: 14
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Claim 14 pertains to a method for treatment of the human body, and thus pertains to subject matter on which the International Searching Authority is not required to carry out an international search under the provisions of PCT Article 17 (2)(a)(i) and PCT Rule 39.1(iv).

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.

2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.

3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.

☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

Form PCT/ISA/210 (continuation of first sheet (2)) (January 2015)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/KR2015/014422

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
WO 2011-117415 A1	29/09/2011	AU 2011-231503 A1	27/09/2012
		AU 2011-231503 B2	06/11/2014
		CA 2792663 A1	29/09/2011
		CN 102918056 A	06/02/2013
		EP 2552950 A1	06/02/2013
		JP 2013-523618 A	17/06/2013
		JP 2013-523619 A	17/06/2013
		KR 10-2013-0018410 A	21/02/2013
		MX 2012-010881 A	06/11/2012
		RU 2012-144289 A	10/05/2014
		US 2013-0035285 A1	07/02/2013
		US 2013-0143798 A1	06/06/2013
		US 2015-0274801 A1	01/10/2015
		US 2016-0002311 A1	07/01/2016
WO 2014-170496 A1	23/10/2014	AU 2014-255608 A1	08/10/2015
		CA 2909581 A1	23/10/2014
		US 2015-0374794 A1	31/12/2015
US 8507428 B2	13/08/2013	AU 2011-349331 A1	11/07/2013
		CA 2821766 A1	28/06/2012
		CL 2013-001783 A1	24/01/2014
		CN 103458920 A	18/12/2013
		CO 6761302 A2	30/09/2013
		EP 2654773 A2	30/10/2013
		JP 2014-507402 A	27/03/2014
		KR 10-2013-0132931 A	05/12/2013
		US 2012-238493 A1	20/09/2012
		US 2013-116173 A1	09/05/2013
		US 2015-259393 A1	17/09/2015
		WO 2012-088116 A2	28/06/2012
		WO 2012-088116 A3	15/11/2012
JP 5476304 B2	23/04/2014	CN 101868476 A	20/10/2010
		EP 2190872 A1	02/06/2010
		EP 2679597 A1	01/01/2014
		JP 2010-538042 A	09/12/2010
		US 2011-0082079 A1	07/04/2011
		US 2015-0025003 A1	22/01/2015
		US 8895694 B2	25/11/2014
		WO 2009-030738 A1	12/03/2009

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (January 2015)

REFERENCES CITED IN THE DESCRIPTION

This list of references cited by the applicant is for the reader's convenience only. It does not form part of the European patent document. Even though great care has been taken in compiling the references, errors or omissions cannot be excluded and the EPO disclaims all liability in this regard.

Non-patent literature cited in the description

- Global Strategy on Diet. Physical Activity and Health. World Health Organization, 2004 **[0002]**
- **SHAW, K. L. et al.** *Protein Science,* 2001, vol. 10, 1206-1215 **[0028] [0077]**

摘要

本發明涉及新型胰高血糖素衍生肽，以及含有該新型胰高血糖素衍生肽作為有效成分的用於預防或治療低血糖症的組合物。根據本發明的胰高血糖素衍生物由於等電點(pI)的改變而具有改善的物理性質同時能夠保證對胰高血糖素受體的活性，因此當用作降血糖劑時可以改善患者依從性，並且也適於與其它抗肥胖劑組合施用。因此，根據本發明的胰高血糖素衍生物可以有效地用於預防和治療低血糖症或肥胖。