



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2021-0040818
(43) 공개일자 2021년04월14일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
 - A61K 38/17 (2006.01) A61K 38/22 (2006.01)
 - A61K 38/26 (2006.01) A61K 47/54 (2017.01)
 - A61K 47/56 (2017.01) A61K 47/60 (2017.01)
 - A61K 47/64 (2017.01) A61K 47/68 (2017.01)
 - A61P 3/00 (2006.01) C07K 14/575 (2006.01)
 - C07K 14/605 (2006.01)
- (52) CPC특허분류
 - A61K 38/1709 (2020.05)
 - A61K 38/1796 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2020-0128260
- (22) 출원일자 2020년10월05일
 - 심사청구일자 없음
- (30) 우선권주장
 - 1020190123250 2019년10월04일 대한민국(KR)
- (71) 출원인
 - 한미약품 주식회사
 - 경기도 화성시 팔탄면 무하로 214
- (72) 발명자
 - 김정국
 - 경기도 화성시 동탄기흥로 550
 - 이중석
 - 경기도 화성시 동탄기흥로 550
 - (뒷면에 계속)
- (74) 대리인
 - 특허법인한얼

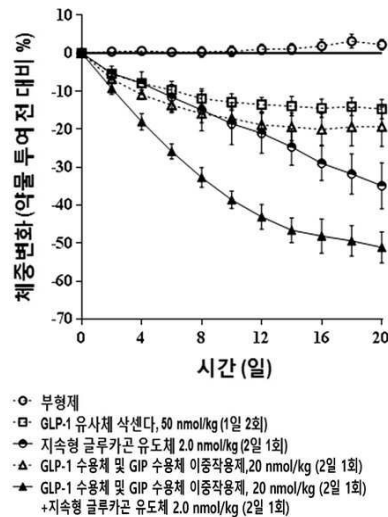
전체 청구항 수 : 총 15 항

(54) 발명의 명칭 글루카곤, 및 GLP-1 수용체 및 GIP 수용체 이중 작용제를 포함하는 조성물 및 이의 치료학적 용도

(57) 요약

본 발명은 글루카곤 유도체; 및 GLP-1 수용체 및 GIP 수용체 이중 작용제를 포함하는 조성물 및 이의 용도에 관한 것이다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

A61K 38/2278 (2013.01)

A61K 38/26 (2013.01)

A61K 47/542 (2017.08)

A61K 47/56 (2017.08)

A61K 47/60 (2017.08)

A61K 47/643 (2017.08)

A61K 47/6811 (2017.08)

A61P 3/00 (2018.01)

C07K 14/57563 (2013.01)

(72) 발명자

이아람

경기도 화성시 동탄기흥로 550

동주영

경기도 화성시 동탄기흥로 550

명세서

청구범위

청구항 1

(i) 글루카곤 수용체에 대한 활성을 갖는 물질 및 (ii) GLP-1 수용체 및 GIP 수용체 이중 작용제를 포함하는, 대사증후군의 예방 또는 치료용 약학적 조성물로서,

상기 글루카곤 수용체에 대한 활성을 갖는 물질은 하기 일반식 1의 아미노산 서열을 포함하는 펩타이드인, 조성물:

X1-X2-QGTF-X7-SD-X10-S-X12-X13-X14-X15-X16-X17-X18-X19-X20-X21-F-X23-X24-W-L-X27-X28-X29-X30 (일반식 1, 서열번호 46)

상기 식에서,

X1은 티로신(Y)이고;

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

X7은 트레오닌(T), 발린(V) 또는 시스테인(C)이고;

X10은 티로신(Y) 또는 시스테인(C)이고;

X12는 리신(K) 또는 시스테인(C)이고;

X13은 티로신(Y) 또는 시스테인(C)이고;

X14는 류신(L) 또는 시스테인(C)이고;

X15는 아스파르트산(D), 글루탐산(E) 또는 시스테인(C)이고;

X16은 글루탐산(E), 아스파르트산(D), 세린(S), 알파-메틸-글루탐산, 또는 시스테인(C)이거나, 부존재하며;

X17은 아스파르트산(D), 글루타민(Q), 글루탐산(E), 리신(K), 아르기닌(R), 세린(S), 시스테인(C), 또는 발린(V)이거나, 부존재하며;

X18은 알라닌(A), 아스파르트산(D), 글루탐산(E), 아르기닌(R), 발린(V), 또는 시스테인(C)이거나, 부존재하며;

X19는 알라닌(A), 아르기닌(R), 세린(S), 발린(V), 또는 시스테인(C)이거나, 부존재하며;

X20은 리신(K), 히스티딘(H), 글루타민(Q), 아스파르트산(D), 아르기닌(R), 알파-메틸-글루탐산, 또는 시스테인(C)이거나, 부존재하며;

X21은 아스파르트산(D), 글루탐산(E), 류신(L), 발린(V), 또는 시스테인(C)이거나, 부존재하며;

X23은 이소류신(I), 발린(V), 또는 아르기닌(R)이거나, 부존재하며;

X24는 발린(V), 아르기닌(R), 알라닌(A), 시스테인(C), 글루탐산(E), 리신(K), 글루타민(Q), 알파-메틸-글루탐산, 또는 류신(L)이거나, 부존재하며;

X27은 이소류신(I), 발린(V), 알라닌(A), 리신(K), 메티오닌(M), 글루타민(Q), 또는 아르기닌(R)이거나, 부존재하며;

X28은 글루타민(Q), 리신(K), 아스파라긴(N), 또는 아르기닌(R)이거나, 부존재하며;

X29는 트레오닌(T)이며;

X30은 시스테인(C)이거나, 부존재함

(단, 상기 일반식 1의 아미노산 서열이 서열번호 1 또는 서열번호 12와 동일한 경우는 제외함).

청구항 2

제 1항에 있어서, 상기 펩타이드는 지속형 결합체의 형태이고, 상기 지속형 결합체는 하기 화학식 1로 표시되는, 조성물:

[화학식 1]

X - L - F

단 이 때 X는 상기 일반식 1의 아미노산 서열을 포함하는 펩타이드이고;

L은 에틸렌글리콜 반복 단위를 함유하는 링커이며,

F는 면역글로불린 Fc 영역이고,

-는 X와 L 사이, L과 F 사이의 공유결합 연결을 나타낸다.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서,

상기 일반식 1에서,

X2가 Aib(aminoisobutyric acid)이며;

X7은 트레오닌(T), 발린(V) 또는 시스테인(C)이고;

X10은 티로신(Y)이고;

X12는 리신(K)이고;

X13은 티로신(Y)이고;

X14는 류신(L) 또는 시스테인(C)이고;

X15는 아스파르트산(D) 이고;

X16은 글루탐산(E), 또는 세린(S) 이며;

X17은 리신(K), 아르기닌(R), 또는 시스테인(C) 이고;

X18은 아르기닌(R) 이며;

X19는 알라닌(A), 또는 시스테인(C)이고;

X20은 글루타민(Q), 또는 리신(K) 이며;

X21은 아스파르트산(D), 또는 글루탐산(E) 이고;

X23은 발린(V) 이며;

X24는 글루타민(Q) 이고;

X27는 메티오닌(M) 이며;

X28은 아스파라긴(N) 이고;

X29는 트레오닌(T)이며;

X30은 시스테인(C)인,

조성물.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 펩타이드는 서열번호 7 내지 11, 및 13 내지 25, 27, 29, 31, 33, 35 내지 45로 이루어진 군에서 선택된 아미노산 서열을 포함하는 것인, 조성물.

청구항 5

제3항에 있어서, 상기 펩타이드는 서열번호 20, 22, 23, 27, 33, 35, 37, 38, 40, 41, 42, 및 44로 이루어진 군에서 선택되는 아미노산 서열을 포함하는 것인, 조성물.

청구항 6

제1항에 있어서, 일반식 1의 X10과 X14, X12와 X16, X16과 X20, X17과 X21, X20과 X24, 및 X24와 X28의 아미노산 쌍 중 적어도 하나의 아미노산 쌍에서 각각의 아미노산이 고리를 형성하는, 조성물.

청구항 7

제1항에 있어서, 상기 펩타이드의 C-말단이 아미드화된, 조성물.

청구항 8

제1항에 있어서, 상기 GLP-1 수용체 및 GIP 수용체 이중 작용제는 GLP-1 (Glucagon-like peptide-1) 수용체 및 GIP (Glucose-dependent insulintropic polypeptide) 수용체에 대해 활성을 갖는 펩타이드인, 조성물.

청구항 9

제1항에 있어서, 상기 GLP-1 수용체 및 GIP 수용체 이중 작용제는 tirzepatide, NN9709, 및 SAR-438335으로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상인 것인, 조성물.

청구항 10

제2항에서, 상기 L 내의 에틸렌글리콜 반복 단위 부분의 화학식량은 1 내지 100 kDa 범위에 있는, 조성물.

청구항 11

제1항에 있어서, 상기 대사증후군은 내당증 장애, 고콜레스테롤혈증, 이상지혈증, 비만, 당뇨, 고혈압, 간 질환, 이상지혈증에 의한 동맥경화, 죽상동맥경화증, 동맥경화증, 관상동맥 심질환(관동맥성 심장병), 및 뇌졸중으로 이루어진 군에서 선택된, 조성물.

청구항 12

제11항에 있어서, 상기 간 질환은 단순 지방증, 비알코올성 지방간, 간 염증, 비알코올성 지방간염(non-alcoholic steatohepatitis, NASH), 담즙정체성 간질환, 간 섬유증, 간경변, 간 부전 및 간암으로 이루어진 군

에서 선택하는 적어도 하나의 질환인, 조성물.

청구항 13

제12항에 있어서, 상기 담즙정체성 간질환은 원발성 담즙성 경변증 (Primary biliary cirrhosis), 원발성 경화성 담관염(primary sclerosing cholangitis) 및 이들의 조합으로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나인, 조성물.

청구항 14

제12항에 있어서, 상기 간 질환은 비알코올성지방간염으로 인한 것이거나, 또는 동반하는 것인, 조성물.

청구항 15

제1항에 있어서, 상기 조성물은 하기 특성 중 하나 이상의 특성을 수행하는 것인 조성물:

- (a) 체중 및 지방 무게 감소;
- (b) 혈중 지질수치 개선;
- (c) 인슐린 감수성 개선;
- (d) UCP-1, 및 PGC-1 α 유전자 발현 감소;
- (e) NAS (NAFLD activity score) 감소; 및
- (f) 간조직 내 콜라겐 발현 감소.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 글루카곤 활성을 가지는 화합물 또는 물질과 GLP-1 수용체 및 GIP 수용체 이중 작용제를 포함하는 조성물 및 이의 치료학적 용도에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 최근 경제적 발전과 식습관 등의 변화에 따라 비만, 고지혈증, 고혈압, 동맥경화, 고인슐린혈증, 당뇨병 또는 간질환 등 다양한 질환을 포함하는 대사증후군 관련 질환의 발병이 급증하고 있는 상황이다. 이와 같은 질환들은 각각 발생하기도 하지만 일반적으로는 서로 밀접한 관련을 맺고 있으면서 여러 증상을 동반하여 발생하는 경우가 대부분이다.

[0004] 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.

[0005] 비만은 식욕조절 및 에너지 대사의 작용기작이 관련된 복잡한 질환이어서, 식욕조절 및 에너지 대사와 관련된 비정상적인 작용기작을 치료하는 방법이 동시에 수행되어야만 하므로, 상기 비정상적인 작용기작을 치료할 수 있는 의약을 개발하려는 노력이 계속되고 있다. 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 중추신경장에 부작용을 나타내고, 시부트라민과 콘트라베는 심혈관 부작용을 나

타내며, 오르리스타트는 1년 복용 시 약 4 kg의 체중감소 효력이 나타내는 것에 불과하다고 보고되었다.

[0006] 한편, 비만을 비롯한 대사증후군은 간에서도 질환을 일으킬 가능성을 높인다. 그 예로는, 대사성 간질환, 지방간, 비알코올성 지방간 질환, 지방간염, 간섬유증 등을 들 수 있다. 이러한 간질환은 비만 및 당뇨병이 증가함에 따라 함께 증가하고 있는 추세이며, 우리나라에서도 연간 발병률이 약 16%에 이르고 있다. 간질환은 초기에 자각 증상이 없어 상당히 진행되어서야 발견되기 때문에, 국내뿐만 아니라 세계적으로 사망 원인의 수위를 차지하고 있어 약물 개발의 필요성이 높다.

[0007] 한편, 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. 그러나, 글루카곤은 낮은 용해도와 중성 pH에서의 침전으로 인해 치료제로서 그 사용이 제한되어 왔다.

[0009] 이러한 글루카곤의 유도체 중의 하나인 글루카곤-유사 펩타이드-1(GLP-1)은 음식물 섭취에 자극을 받아 소장에서 분비되는 호르몬으로 혈당 농도 의존적으로 췌장에서의 인슐린 분비를 촉진하고 글루카곤의 분비를 억제하여 혈당 농도를 낮추는 작용을 돕는다. 또한, 포만 인자로 작용하여 위장의 소화작용을 늦추고 음식 소화물의 위장 통과시간을 지연시켜 음식물 섭취를 줄이는 역할을 지닌다.

[0011] GLP-1과 더불어 음식섭취에 자극을 받아 분비되는 위장 호르몬의 하나인 GIP는 소장의 K 세포로부터 분비되는 42개 아미노산으로 구성된 호르몬으로서 혈당 농도에 의존적으로 췌장에서의 인슐린 분비를 촉진하고 혈당 농도를 낮추는데 도움을 주는 기능을 수행하며 GLP-1의 활성 증가 효과, 항염증 효과, 지질대사 개선 효과 등이 보고되었다.

[0013] 이에, GLP-1의 혈당 조절 및 체중감소 효과를 이용하여 당뇨병과 비만의 치료제로서 개발하고자 하는 연구가 활발하게 진행되고 있다. 그러나 GLP-1 만으로는 HbA1c의 감소가 0.5% 에서 1.8%까지 밖에 보이지 않아 HbA1c가 9% 이하인 환자들에게 적절하다고 여겨진다 (Ther Adv Endocrinol Metab. 2015 Feb; 6(1): 3-18). 즉, GLP-1 단독 투여만으로는 기대할 수 있는 혈당 조절능력의 한계가 있다.

[0014] 이에, GLP-1 및 GIP 수용체를 동시에 활성화 시킬 수 있는 이중 작용제의 연구가 이루어졌으며, 이러한 이중 작용제의 예는 국제공개공보 W02013164483, 국제공개공보 W02016111971, 국제공개공보 W02014192284 등에 기재되어 있다.

[0016] 상기 글루카곤 및 GLP-1 수용체 및 GIP 수용체 이중 작용제는 일반적으로 서로 반대되는 작용을 하는 것으로 알려져 있으며, 서로 다른 병증에 대한 치료제로 사용되어 왔다. 즉, 글루카곤 및 GLP-1 수용체 및 GIP 수용체 이중 작용제는 체내에서 서로 반대되는 역할을 수행하기 때문에, 이를 함께 투여하는 약물 치료법은 아직 알려진 바 없다. 한편, 다양한 대사증후군 관련 치료제들은 환자에게 투여할 경우, 체중 증가와 과다 투여, 저혈당과 같은 부작용의 위험이 존재한다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0018] 본 발명의 하나의 목적은 글루카곤 수용체에 대한 활성을 갖는 물질 및 GLP-1 수용체 및 GIP 수용체 이중 작용제를 포함하는 대사증후군의 예방 또는 치료용 약학적 조성물에 관한 것이다.

[0019] 본 발명의 다른 하나의 목적은 글루카곤 수용체에 대한 활성을 갖는 물질 및 GLP-1 수용체 및 GIP 수용체 이중 작용제를 이를 필요로 하는 개체에 투여하는 단계를 포함하는, 대사증후군의 예방 또는 치료 방법을 제공하는 것이다.

[0020] 본 발명의 또 다른 하나의 목적은 글루카곤 수용체에 대한 활성을 갖는 물질 및 GLP-1 수용체 및 GIP 수용체 이

중 작용제의 대사증후군의 예방 또는 치료 용도를 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

- [0022] 본 발명을 구현하는 하나의 양태는 발명은 글루카곤 수용체에 대한 활성을 갖는 물질 및 GLP-1 수용체 및 GIP 수용체 이중 작용제를 병용하는 치료학적 용도이다.
- [0024] 하나의 구체예에서, 본 발명은 글루카곤 수용체에 대한 활성을 갖는 물질 및 GLP-1 수용체 및 GIP 수용체 이중 작용제를 포함하는 조성물에 관한 것이다.
- [0026] 앞선 구체예에서, 본 발명은 글루카곤 수용체에 대한 활성을 갖는 물질 및 GLP-1 수용체 및 GIP 수용체 이중 작용제를 포함하는 대사증후군의 예방 또는 치료용 약학적 조성물에 관한 것이다.
- [0028] 앞선 구체예(들)에 있어서, 상기 글루카곤 수용체에 대한 활성을 갖는 물질은 하기 일반식 1의 아미노산 서열을 포함하는 펩타이드인 것을 특징으로 한다:
- [0030] X1-X2-QGTF-X7-SD-X10-S-X12-X13-X14-X15-X16-X17-X18-X19-X20-X21-F-X23-X24-W-L-X27-X28-X29-X30 (일반식 1, 서열번호 46)
- [0032] 상기 식에서,
- [0033] X1은 티로신(Y)이고,
- [0034] X2는 알파-메틸-글루탐산(α -methyl-glutamic acid), Aib(aminoisobutyric acid), D-알라닌, 글리신(G), Sar(N-methylglycine), 세린(S) 또는 D-세린이며;
- [0035] X7은 트레오닌(T), 발린(V) 또는 시스테인(C)이고;
- [0036] X10은 티로신(Y) 또는 시스테인(C)이고;
- [0037] X12는 리신(K) 또는 시스테인(C)이고;
- [0038] X13은 티로신(Y) 또는 시스테인(C)이고;
- [0039] X14는 류신(L) 또는 시스테인(C)이고;
- [0040] X15는 아스파르트산(D), 글루탐산(E) 또는 시스테인(C)이고;
- [0041] X16은 글루탐산(E), 아스파르트산(D), 세린(S), 알파-메틸-글루탐산, 또는 시스테인(C)이거나, 부존재하며;
- [0042] X17은 아스파르트산(D), 글루타민(Q), 글루탐산(E), 리신(K), 아르기닌(R), 세린(S), 시스테인(C), 또는 발린(V)이거나, 부존재하며;
- [0043] X18은 알라닌(A), 아스파르트산(D), 글루탐산(E), 아르기닌(R), 발린(V), 또는 시스테인(C)이거나, 부존재하며;
- [0044] X19는 알라닌(A), 아르기닌(R), 세린(S), 발린(V), 또는 시스테인(C)이거나, 부존재하며;
- [0045] X20은 리신(K), 히스티딘(H), 글루타민(Q), 아스파르트산(D), 아르기닌(R), 알파-메틸-글루탐산, 또는 시스테인(C)이거나, 부존재하며;
- [0046] X21은 아스파르트산(D), 글루탐산(E), 류신(L), 발린(V), 또는 시스테인(C)이거나, 부존재하며;
- [0047] X23은 이소류신(I), 발린(V), 또는 아르기닌(R)이거나, 부존재하며;
- [0048] X24는 발린(V), 아르기닌(R), 알라닌(A), 시스테인(C), 글루탐산(E), 리신(K), 글루타민(Q), 알파-메틸-글루탐

산, 또는 류신(L)이거나, 부존재하며;

- [0049] X27는 이소류신(I), 발린(V), 알라닌(A), 리신(K), 메티오닌(M), 글루타민(Q), 또는 아르기닌(R)이거나, 부존재하며;
- [0050] X28은 글루타민(Q), 리신(K), 아스파라긴(N), 또는 아르기닌(R)이거나, 부존재하며;
- [0051] X29는 트레오닌(T)이며;
- [0052] X30은 시스테인(C)이거나, 부존재함
- [0053] (단, 상기 일반식 1의 아미노산 서열이 서열번호 1 또는 서열번호 12와 동일한 경우는 제외함).

- [0055] 앞선 구체예(들)에 있어서,
- [0056] 상기 펩타이드는 지속형 결합체의 형태이고, 상기 지속형 결합체는 하기 화학식 1로 표시되는 것을 특징으로 한다:
- [0057] [화학식 1]
- [0058] X - L - F
- [0059] 단 이 때 X는 상기 일반식 1의 아미노산 서열을 포함하는 펩타이드이고;
- [0060] L은 에틸렌글리콜 반복 단위를 함유하는 링커이며,
- [0061] F는 면역글로불린 Fc 영역이고,
- [0062] -는 X와 L 사이, L과 F 사이의 공유결합 연결을 나타낸다.

- [0064] 앞선 구체예(들)에 있어서, 상기 일반식 1에서,
- [0065] X2가 Aib(aminoisobutyric acid)이며;
- [0066] X7은 트레오닌(T), 발린(V) 또는 시스테인(C)이고;
- [0067] X10은 티로신(Y)이고;
- [0068] X12는 리신(K)이고;
- [0069] X13은 티로신(Y)이고;
- [0070] X14는 류신(L) 또는 시스테인(C)이고;
- [0071] X15는 아스파르트산(D) 이고;
- [0072] X16은 글루탐산(E), 또는 세린(S) 이며;
- [0073] X17은 리신(K), 아르기닌(R), 또는 시스테인(C) 이고;
- [0074] X18은 아르기닌(R) 이며;
- [0075] X19는 알라닌(A), 또는 시스테인(C)이고;
- [0076] X20은 글루타민(Q), 또는 리신(K) 이며;
- [0077] X21은 아스파르트산(D), 또는 글루탐산(E) 이고;
- [0078] X23은 발린(V) 이며;
- [0079] X24는 글루타민(Q) 이고;
- [0080] X27는 메티오닌(M) 이며;
- [0081] X28은 아스파라긴(N) 이고;

- [0082] X29는 트레오닌(T)이며;
- [0083] X30은 시스테인(C)이거나, 부존재한 것을 특징으로 한다.
- [0085] 앞선 구체예(들)에 있어서, 상기 펩타이드는 서열번호 2 내지 45로 이루어진 군에서 선택된 아미노산 서열을 포함하는 것을 특징으로 한다.
- [0087] 앞선 구체예(들)에 있어서, 상기 펩타이드는 서열번호 7 내지 11, 및 13 내지 25, 27, 29, 31, 33, 35 내지 45로 이루어진 군에서 선택된 아미노산 서열을 포함하는 것을 특징으로 한다.
- [0089] 앞선 구체예(들)에 있어서, 상기 펩타이드는 서열번호 20, 22, 23, 27, 33, 35, 37, 38, 40, 41, 42, 및 44로 이루어진 군에서 선택되는 아미노산 서열을 포함하는 것을 특징으로 한다.
- [0091] 앞선 구체예(들)에 있어서, 일반식 1의 X10과 X14, X12와 X16, X16과 X20, X17과 X21, X20과 X24, 및 X24와 X28의 아미노산 쌍 중 적어도 하나의 아미노산 쌍에서 각각의 아미노산이 고리를 형성하는 것을 특징으로 한다.
- [0093] 앞선 구체예(들)에 있어서, 상기 펩타이드의 C-말단이 아미드화된 것을 특징으로 한다.
- [0095] 앞선 구체예(들)에 있어서, 상기 GLP-1 수용체 및 GIP 수용체 이중 작용제는 GLP-1 (Glucagon-like peptide-1) 수용체 및 GIP (Glucose-dependent insulinotropic polypeptide) 수용체에 대해 활성을 갖는 물질인 것을 특징으로 한다.
- [0097] 앞선 구체예(들)에 있어서, 상기 GLP-1 수용체 및 GIP 수용체 이중 작용제는 tirzepatide, NN9709, 및 SAR-438335으로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상인 것을 특징으로 한다.
- [0099] 앞선 구체예(들)에 있어서, 상기 L 내의 에틸렌글리콜 반복 단위 부분의 화학식량은 1 내지 100 kDa 범위에 있는 것을 특징으로 한다.
- [0101] 앞선 구체예(들)에 있어서, 상기 대사증후군은 내당증 장애, 고콜레스테롤혈증, 이상지혈증, 비만, 당뇨, 고혈압, 간 질환, 이상지혈증에 의한 동맥경화, 죽상동맥경화증, 동맥경화증, 관상동맥 심질환(관동맥성 심장병), 및 뇌졸중으로 이루어진 군에서 선택된 것을 특징으로 한다.
- [0103] 앞선 구체예(들)에 있어서, 상기 간 질환은 단순 지방증, 비알코올성 지방간, 간 염증, 비알코올성 지방간염(non-alcoholic steatohepatitis, NASH), 담즙정체성 간질환, 간 섬유증, 간경변, 간 부전 및 간암으로 이루어진 군에서 선택하는 적어도 하나의 질환인 것을 특징으로 한다.
- [0105] 앞선 구체예(들)에 있어서, 상기 담즙정체성 간질환은 원발성 담즙성 경변증 (Primary biliary cirrhosis), 원발성 경화성 담관염(primary sclerosing cholangitis) 및 이들의 조합으로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나인 것을 특징으로 한다.
- [0107] 앞선 구체예(들)에 있어서, 상기 간 질환은 비알코올성 지방간염으로 인한 것이거나, 또는 동반하는 것을 특징

으로 한다.

- [0109] 앞선 구체예(들)에 있어서, 상기 조성물은 하기 특성 중 하나 이상의 특성을 수행하는 것을 특징으로 한다:
- [0110] (a) 체중 및 지방 무게 감소;
- [0111] (b) 혈중 지질수치 개선;
- [0112] (c) 인슐린 감수성 개선;
- [0113] (d) UCP-1, 및 PGC-1 α 유전자 발현 감소;
- [0114] (e) NAS (NAFLD activity score) 감소; 및
- [0115] (f) 간조직 내 콜라겐 발현 감소.

- [0117] 본 발명을 구현하는 또 다른 하나의 양태는 글루카곤 수용체에 대한 활성을 갖는 물질, 및 GLP-1 수용체 및 GIP 수용체 이중 작용제,; 또는 이를 포함하는 조성물을 포함하는 대사증후군 예방 또는 치료를 위한 약학적 키트이다.

- [0119] 본 발명을 구현하는 또 다른 하나의 양태는 글루카곤 수용체에 대한 활성을 갖는 물질, 및 GLP-1 수용체 및 GIP 수용체 이중 작용제; 또는 이를 포함하는 조성물을 필요로 하는 개체에 투여하는 단계를 포함하는, 대사증후군의 예방 또는 치료 방법이다.

- [0121] 본 발명을 구현하는 또 다른 하나의 양태는 글루카곤 수용체에 대한 활성을 갖는 물질, 및 GLP-1 수용체 및 GIP 수용체 이중 작용제; 또는 이를 포함하는 조성물의 대사증후군의 예방 또는 치료 용도이다.

- [0123] 본 발명을 구현하는 또 다른 하나의 양태는 글루카곤 수용체에 대한 활성을 갖는 물질, 및 GLP-1 수용체 및 GIP 수용체 이중 작용제; 또는 이를 포함하는 조성물의 대사증후군의 예방 또는 치료를 위한 약제의 제조 용도이다.

발명의 효과

- [0125] 본 발명에 따른 글루카곤 수용체에 대한 활성을 갖는 물질 및 GLP-1 수용체 및 GIP 수용체 이중 작용제의 병용 투여는 비만, 당뇨, 비알코올지방간염 (nonalcoholic steatohepatitis, NASH)를 비롯한 대사증후군 (metabolic syndrome)과 이와 관련된 간질환의 예방 또는 치료에 유용하게 사용할 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0127] 도 1은 지속형 글루카곤 유도체 및 GLP-1 수용체 및 GIP 수용체 이중 작용제인 티르제파티드 (tirzepatide)의 병용 투여에 따른 체중 변화를 확인한 결과이다.
- 도 2(A) 및 (B)는 지속형 글루카곤 유도체 및 GLP-1 수용체 및 GIP 수용체 이중 작용제인 티르제파티드 (tirzepatide)의 병용 투여에 따른 지방 무게 및 혈중 지질 감소를 확인한 결과이다.
- 도 3(A) 및 (B)는 지속형 글루카곤 유도체 및 GLP-1 수용체 및 GIP 수용체 이중 작용제인 티르제파티드 (tirzepatide)의 병용 투여에 따른 인슐린 감수성 및 UCP-1, 및 PGC-1 α 유전자 발현 증가를 확인한 결과이다.
- 도 4는 지속형 글루카곤 유도체 및 GLP-1 수용체 및 GIP 수용체 이중 작용제인 티르제파티드 (tirzepatide)의 병용 투여에 따른 NAS(NAFLD activity score) 변화를 확인한 결과이다.
- 도 5는 지속형 글루카곤 유도체 및 GLP-1 수용체 및 GIP 수용체 이중 작용제인 티르제파티드 (tirzepatide)의

비용 투여에 따른 간조직 내 콜라겐 발현 감소를 확인한 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0129] 본 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용을 설명하면 다음과 같다. 한편, 본원에서 개시되는 각각의 설명 및 실시형태는 각각의 다른 설명 및 실시 형태에도 적용될 수 있다. 즉, 본원에서 개시된 다양한 요소들의 모든 조합이 본 발명의 범주에 속한다. 또한, 하기 기술되는 구체적인 서술에 의하여 본 발명의 범주가 제한된다고 할 수 없다.
- [0130] 또한, 당해 기술분야의 통상의 지식을 가진 자는 통상의 실험만을 사용하여 본 출원에 기재된 본 발명의 특정 양태에 대한 다수의 등가물을 인지하거나 확인할 수 있다. 또한, 이러한 등가물은 본 발명에 포함되는 것으로 의도된다.
- [0131] 본 명세서 전반을 통하여, 천연적으로 존재하는 아미노산에 대한 통상의 1문자 및 3문자 코드가 사용될 뿐만 아니라 Aib(α -아미노이소부티르산), Sar(N-methylglycine) 등과 같은 다른 아미노산에 대해 일반적으로 허용되는 3문자 코드가 사용된다. 또한 본 명세서에서 약어로 언급된 아미노산은 IUPAC-IUB 명명법에 따라 기재되었다.
- [0133] 알라닌 A 아르기닌 R
- [0134] 아스파라긴 N 아스파르트산 D
- [0135] 시스테인 C 글루탐산 E
- [0136] 글루타민 Q 글리신 G
- [0137] 히스티딘 H 이소류신 I
- [0138] 류신 L 리신 K
- [0139] 메티오닌 M 페닐알라닌 F
- [0140] 프롤린 P 세린 S
- [0141] 트레오닌 T 트립토판 W
- [0142] 티로신 Y 발린 V
- [0144] 본 발명을 구현하는 하나의 양태는 글루카곤 수용체에 대한 활성을 갖는 물질 및 GLP-1 수용체 및 GIP 수용체 이중 작용제를 병용하는 치료학적 용도를 제공한다.
- [0146] 구체적으로, 본 발명의 일 양태는 글루카곤 수용체에 대한 활성을 갖는 물질; 및 GLP-1 수용체 및 GIP 수용체 이중 작용제를 포함하는 조성물을 제공한다. 일 구현예로, 대사증후군의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.
- [0148] 본 발명의 (i) 글루카곤 수용체에 대한 활성을 갖는 물질; 및 (ii) GLP-1 수용체 및 GIP 수용체 이중 작용제를 포함하는 약학적 조성물은
- [0149] a) (i) 글루카곤 수용체에 대한 활성을 갖는 물질; 및 (ii) GLP-1 수용체 및 GIP 수용체 이중 작용제가 혼합된 하나의 혼합물(mixture)로 투여되거나; 또는
- [0150] b) (i) 글루카곤 수용체에 대한 활성을 갖는 물질; 및 (ii) GLP-1 수용체 및 GIP 수용체 이중 작용제가 분리된 형태로 투여될 수 있는 형태일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0151] 예를 들어, 글루카곤 수용체에 대한 활성을 갖는 물질 및 GLP-1 수용체 및 GIP 수용체 이중 작용제가 하나의 제제로 제제화된 것이거나, 또는 개별적으로 제제화된 것일 수 있다. 글루카곤 수용체에 대한 활성을 갖는 물질;

및 GLP-1 수용체 및 GIP 수용체 이중 작용제가 분리된 형태일 경우, 글루카곤 수용체에 대한 활성을 갖는 물질 및 GLP-1 수용체 및 GIP 수용체 이중 작용제가 별개의 제제로 제제화되어 동시, 개별, 순차, 또는 역순으로 투여될 수 있는 것일 수 있다.

[0152] 본 발명에서, 병용 투여는 단지 동시의 투여를 의미하는 것뿐만이 아니라, 글루카곤 수용체에 대한 활성을 갖는 물질 및 GLP-1 수용체 및 GIP 수용체 이중 작용제가 개체에 함께 작용하여 각 물질이 본연의 기능과 동등하거나 그 이상의 수준을 수행할 수 있는 투여 형태로 이해되어야 한다. 따라서, 본원에서, "병용"이란 용어가 사용될 경우 이는 글루카곤 수용체에 대한 활성을 갖는 물질 및 GLP-1 수용체 및 GIP 수용체 이중 작용제의 동시, 개별, 순차, 또는 역순 투여를 나타내는 것으로 이해되어야 한다. 상기 투여가 순차, 역순 또는 개별적인 경우, 투여의 순서는 특별히 제한되지 않고 다만 2차 성분 투여의 간격은 상기 병용의 이로운 효과를 잃지 않도록 하는 것이어야 한다.

[0154] 본 발명의 글루카곤 수용체에 대한 활성을 갖는 물질; 및 GLP-1 수용체 및 GIP 수용체 이중 작용제, 또는 이를 포함하는 조성물은 키트 형태로 제공되는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 본 발명에서 용어 “키트”는 글루카곤 수용체에 대한 활성을 갖는 물질 및 GLP-1 수용체 및 GIP 수용체 이중 작용제를 병용 투여하기 위해, 본 발명에 따른 조성물을 포함하는 것일 수 있다. 구체적으로, 본 발명에 따른 키트에는 하나의 제제로 제제화된 글루카곤 수용체에 대한 활성을 갖는 물질 및 GLP-1 수용체 및 GIP 수용체 이중 작용제, 또는 글루카곤 수용체에 대한 활성을 갖는 물질, GLP-1 수용체 및 GIP 수용체 이중 작용제의 개별 제제를 포함하는 것일 수 있고, 두 물질의 병용 투여에 필요한 물질을 추가적으로 포함하는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0156] 상기 글루카곤 수용체에 대한 활성을 갖는 물질은 글루카곤 수용체에 대해 유의한 수준의 활성을 가지는 다양한 물질, 예컨대 화합물 또는 펩타이드 형태의 물질을 포함한다.

[0157] 특별히 이에 제한되는 것은 아니나, 상기 글루카곤에 대해 유의한 수준의 활성을 가지는 물질은 천연형 글루카곤 뿐만 아니라, 글루카곤 수용체에 대해 *in vitro* 활성이 해당 수용체의 천연형 리간드 (천연형 글루카곤) 대비 0.1% 이상, 1% 이상, 2% 이상, 3% 이상, 4% 이상, 5% 이상, 6% 이상, 7% 이상, 8% 이상, 9% 이상, 10% 이상, 20% 이상, 30% 이상, 40% 이상, 50% 이상, 60% 이상, 70% 이상, 80% 이상, 90% 이상, 100% 이상을 나타내는 것일 수 있다.

[0159] 상기 글루카곤 수용체에 대한 활성을 갖는 물질의 예로서, 천연형 글루카곤, 이의 아고니스트(agonist), 또는 이의 유도체가 있으나, 특별히 이에 제한되는 것일 수 있다.

[0161] 본 발명에 따른 글루카곤 유도체는 천연형 글루카곤과 비교하여 아미노산 서열에 하나 이상의 차이가 있는 펩타이드, 천연형 글루카곤 서열을 개질(modification)을 통하여 변형시킨 펩타이드, 또는 천연형 글루카곤과 같이 글루카곤 수용체를 활성화시킬 수 있는 천연형 글루카곤의 모방체를 포함한다. 예를 들어, 상기 천연형 글루카곤의 유도체는 천연형 글루카곤에서 하나 이상의 아미노산이 변이된 것으로, 상기 변이는 치환(substitution), 추가(addition), 제거(deletion), 수식(modification) 및 이들의 조합으로 이루어지는 군에서 선택된 변이인 것일 수 있으나, 특별히 이에 제한되는 것은 아니다.

[0163] 이러한 글루카곤 유도체는 천연형 글루카곤에 대해 변화된 pI를 가져 개선된 물성을 나타내는 것일 수 있다. 또한, 상기 글루카곤 유도체는 글루카곤 수용체를 활성화시키는 활성을 보유하면서 용해도가 개선된 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0165] 또한, 상기 글루카곤 유도체는 천연적으로 존재하지 않는(non-naturally occurring) 것일 수 있다.

[0167] 한편, 천연형 글루카곤은 다음의 아미노산 서열을 가질 수 있다:

- [0168] 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)
- [0170] 본 발명에서 용어 "등전점(isoelectric point)" 또는 "pI"는 어떤 폴리펩타이드 혹은 펩타이드 같은 분자에 있어서 그 전체 순하전(net charge)이 없게 되는(0) pH 값을 의미한다. 다양한 하전된 작용기가 존재하는 폴리펩타이드의 경우, pI에서 이들 하전의 합은 제로이다. pI보다 높은 pH에서 폴리펩타이드의 전체 순하전은 음성이 될 것이고, pI보다 낮은 pH 값에서 폴리펩타이드의 전체 순하전은 양성이 될 것이다.
- [0171] pI는 폴리아크릴아미드, 전분 또는 아가로스로 구성되는 고정된 pH 구배 겔상에서 등전점 전기영동에 의해 또는 예를 들어 ExPASy 서버에서 pI/MW 툴(http://expasy.org/tools/pi_tool.html; Gasteiger et al., 2003)을 사용하여 아미노산 서열로부터 pI를 추산함으로써 결정될 수 있다.
- [0172] 본 발명에서 용어 "변화된 pI"는 천연 글루카곤의 아미노산 서열에서 일부 서열이 음전하 및 양전하를 띤 아미노산 잔기로 치환되어 천연 글루카곤의 pI와는 다른, 즉 이보다 감소하거나 증가한 pI를 갖는 것을 의미한다. 이렇게 변화된 pI를 갖는 펩타이드는 글루카곤 유도체로서 중성 pH에서 개선된 용해도 및/또는 높은 안정성을 나타낼 수 있다. 그러나, 특별히 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0173] 보다 구체적으로, 상기 글루카곤 유도체는 천연형 글루카곤의 pI 값 (6.8)이 아닌 변화된 pI 값을 가지는 것일 수 있으며, 보다 더 구체적으로 6.8 미만, 구체적으로 6.7 이하, 더 구체적으로 6.5 이하인 pI 값, 또한 구체적으로 6.8 초과, 7 이상, 더 구체적으로 7.5 이상일 수 있으나, 이에 제한되지 않으며, 천연형 글루카곤과 상이한 pI 값을 가진다면 본 발명의 범주에 포함된다. 특히, 천연형 글루카곤과 상이한 pI 값을 가짐으로써 천연형 글루카곤에 비해 중성 pH에서 개선된 용해도를 나타냄으로써 응집(agggregation)되는 정도가 낮다면, 본 발명의 범주에 특히 포함된다.
- [0174] 더 구체적으로, 4 내지 6.5 및/또는 7 내지 9.5, 더 구체적으로 7.5 내지 9.5, 더욱 더 구체적으로 8.0 내지 9.3의 pI 값을 가지는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 이 경우, 천연형 글루카곤에 비해 높거나 낮은 pI를 갖기 때문에 중성 pH 에서 천연형 글루카곤에 비해 개선된 용해도 및 높은 안정성을 나타낼 수 있다. 그러나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0176] 구체적으로, 천연형 글루카곤의 유도체는 천연형 글루카곤에서 일부 아미노산이 치환(substitution), 추가(addition), 제거(deletion) 및 수식(modification) 중 어느 하나의 방법 또는 이러한 방법들의 조합을 통하여 변형시킬 수 있다.
- [0177] 이러한 방법들의 조합으로 제조되는 글루카곤의 유도체의 예로, 천연형 글루카곤과 아미노산 서열이 하나 이상 다르고, N-말단 아미노산 잔기에 탈아미노화 (deamination)된, 글루카곤 수용체에 대한 활성화 기능을 보유한 펩타이드 등이 있으나, 이에 제한되지 않으며, 유도체 제조를 위한 여러 방법들의 조합으로 본 발명에 적용되는 천연형 글루카곤의 유도체를 제조할 수 있다.
- [0178] 또한, 천연형 글루카곤의 유도체의 제조를 위한 이러한 변형은 L-형 혹은 D-형 아미노산, 및/또는 비-천연형 아미노산을 이용한 변형; 및/또는 천연형 서열을 개질, 예를 들어 측쇄 작용기의 변형, 분자 내 공유결합, 예컨대, 측쇄 간 고리 형성, 메틸화, 아실화, 유비퀴틴화, 인산화, 아미노핵산화, 바이오틴화 등과 같이 개질함으로써 변형하는 것을 모두 포함한다. 또한, 상기 변형은 비 천연형 화합물로의 치환을 모두 포함한다.
- [0179] 또한, 천연형 글루카곤의 아미노 및/또는 카르복시 말단에 하나 또는 그 이상의 아미노산이 추가된 것을 모두 포함한다.
- [0180] 상기 치환되거나 추가되는 아미노산은 인간 단백질에서 통상적으로 관찰되는 20개의 아미노산뿐만 아니라 비정형 또는 비-자연적 발생 아미노산을 사용할 수 있다. 비정형 아미노산의 상업적 출처에는 Sigma-Aldrich, ChemPep과 Genzyme pharmaceuticals가 포함된다. 이러한 아미노산이 포함된 펩타이드와 정형적인 펩타이드 서열은 상업화된 펩타이드 합성 회사, 예를 들어 미국의 American peptide company나 Bachem, 또는 한국의 Anygen 을 통해 합성 및 구매 가능하다.
- [0181] 아미노산 유도체도 마찬가지로 방식으로 입수할 수 있는데, 그 예를 일부만 들자면 4-이미다조아세트산 (4-imidazoacetic acid) 등을 사용할 수 있다.

- [0183] 글루카곤은 약 7의 pI를 가지고 있어서 생리학적 pH (pH 4-8)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.
- [0185] 본 발명의 글루카곤 수용체에 대한 활성을 갖는 물질은 글루카곤 유도체로서, 천연 글루카곤의 pI를 음전하 및 양전하를 띤 아미노산 잔기의 치환에 의해 변화시켜 연장된 작용 프로파일을 갖는 것으로 개발된 것을 포함하며, 이러한 유도체는 천연 글루카곤에 비해 변화된 pI를 가짐으로써 중성 pH에서 개선된 용해도 및/또는 높은 안정성을 나타낼 수 있는 것을 특징으로 한다.
- [0187] 하나의 구체적인 양태로서, 상기 본 발명의 글루카곤 수용체에 대한 활성을 갖는 물질인 글루카곤 유도체는 하기 일반식 1의 아미노산 서열을 포함하는 펩타이드일 수 있다.
- [0189] X1-X2-QGTF-X7-SD-X10-S-X12-X13-X14-X15-X16-X17-X18-X19-X20-X21-F-X23-X24-W-L-X27-X28-X29-X30 (일반식 1, 서열번호 46)
- [0191] 상기 일반식 1에서,
- [0192] X1은 티로신이고;
- [0193] X2는 알파-메틸-글루탐산(α -methyl-glutamic acid), Aib(aminoisobutyric acid), D-알라닌, 글리신, Sar(N-methylglycine), 세린 또는 D-세린이며;
- [0194] X7은 트레오닌, 발린 또는 시스테인이고;
- [0195] X10은 티로신 또는 시스테인이고;
- [0196] X12는 리신 또는 시스테인이고;
- [0197] X13은 티로신 또는 시스테인이고;
- [0198] X14는 류신 또는 시스테인이고;
- [0199] X15는 아스파르트산, 글루탐산 또는 시스테인이고;
- [0200] X16은 글루탐산, 아스파르트산, 세린, 알파-메틸-글루탐산, 또는 시스테인이거나, 부존재하며;
- [0201] X17은 아스파르트산, 글루타민, 글루탐산, 리신, 아르기닌, 세린, 시스테인, 또는 발린이거나, 부존재하며;
- [0202] X18은 알라닌, 아스파르트산, 글루탐산, 아르기닌, 발린, 또는 시스테인이거나, 부존재하며;
- [0203] X19는 알라닌, 아르기닌, 세린, 발린, 또는 시스테인이거나, 부존재하며;
- [0204] X20은 리신, 히스티딘, 글루타민, 아스파르트산, 아르기닌, 알파-메틸-글루탐산, 또는 시스테인이거나, 부존재하며;
- [0205] X21은 아스파르트산, 글루탐산, 류신, 발린, 또는 시스테인이거나, 부존재하며;
- [0206] X23은 이소류신, 발린, 또는 아르기닌이거나, 부존재하며;
- [0207] X24는 발린, 아르기닌, 알라닌, 시스테인, 글루탐산, 리신, 글루타민, 알파-메틸-글루탐산, 또는 류신이거나, 부존재하며;

- [0208] X27는 이소류신, 발린, 알라닌, 리신, 메티오닌, 글루타민, 또는 아르기닌이거나, 부존재하며;
- [0209] X28은 글루타민, 리신, 아스파라긴, 또는 아르기닌이거나, 부존재하며;
- [0210] X29는 트레오닌이며;
- [0211] X30은 시스테인이거나, 부존재할 수 있다
- [0212] (단, 상기 일반식 1의 아미노산 서열이 서열번호 1 또는 서열번호 12와 동일한 경우는 제외함).

- [0214] 또한, 상기 일반식 1에서,
- [0215] X1이 티로신이고;
- [0216] X2가 세린 또는 Aib(aminoisobutyric acid)이며;
- [0217] X7은 트레오닌, 발린 또는 시스테인이고;
- [0218] X10은 티로신 또는 시스테인이고;
- [0219] X12는 리신 또는 시스테인이고;
- [0220] X13은 티로신 또는 시스테인이고;
- [0221] X14는 류신 또는 시스테인이고;
- [0222] X15는 아스파르트산, 또는 시스테인이고;
- [0223] X16은 글루탐산, 세린 또는 시스테인이며;
- [0224] X17은 아스파르트산, 글루탐산, 리신, 아르기닌, 세린, 시스테인, 또는 발린 이고;
- [0225] X18은 아스파르트산, 글루탐산, 아르기닌, 또는 시스테인이며;
- [0226] X19는 알라닌, 또는 시스테인이고;
- [0227] X20은 글루타민, 아스파르트산, 리신, 또는 시스테인이며;
- [0228] X21은 아스파르트산, 글루탐산, 류신, 발린, 또는 시스테인이고;
- [0229] X23은 이소류신, 발린 또는 아르기닌이며;
- [0230] X24는 발린, 아르기닌, 알라닌, 글루탐산, 리신, 글루타민, 또는 류신이고;
- [0231] X27는 이소류신, 발린, 알라닌, 메티오닌, 글루타민 또는 아르기닌이며;
- [0232] X28은 글루타민, 리신, 아스파라긴 또는 아르기닌이고;
- [0233] X29는 트레오닌이며;
- [0234] X30은 시스테인이거나, 부존재할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다 (일반식 1의 아미노산 서열이 서열번호 1 또는 서열번호 12와 동일한 경우는 제외함).
- [0235] 그 예로, 상기 펩타이드는 서열번호 7 내지 11, 13 내지 25, 27, 29, 31, 33, 35 내지 45로 이루어진 군에서 선택된 아미노산 서열을 포함하는 것, 구체적으로 서열번호 서열번호 7 내지 11, 13 내지 25, 27, 29, 31, 33, 35 내지 45로 이루어진 군에서 선택된 아미노산 서열로 (필수적으로) 구성된 것 일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

- [0237] 또한, 상기 일반식 1에서,
- [0238] X2가 Aib(aminoisobutyric acid)이며;
- [0239] X7은 트레오닌(T), 발린(V) 또는 시스테인(C)이고;
- [0240] X10은 티로신(Y)이고;

- [0241] X12는 리신(K)이고;
- [0242] X13은 티로신(Y)이고;
- [0243] X14는 류신(L) 또는 시스테인(C)이고;
- [0244] X15는 아스파르트산(D) 이고;
- [0245] X16은 글루탐산(E), 또는 세린(S) 이며;
- [0246] X17은 리신(K), 아르기닌(R), 또는 시스테인(C) 이고;
- [0247] X18은 아르기닌(R) 이며;
- [0248] X19는 알라닌(A), 또는 시스테인(C)이고;
- [0249] X20은 글루타민(Q), 또는 리신(K) 이며;
- [0250] X21은 아스파르트산(D), 또는 글루탐산(E) 이고;
- [0251] X23은 발린(V) 이며;
- [0252] X24는 글루타민(Q) 이고;
- [0253] X27는 메티오닌(M) 이며;
- [0254] X28은 아스파라긴(N) 이고;
- [0255] X29는 트레오닌(T)이며;
- [0256] X30은 시스테인(C)일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

- [0258] 그 예로, 상기 펩타이드는 서열번호 20, 22, 23, 27, 33, 35, 37, 38, 40, 41, 42, 및 44로 이루어진 군에서 선택된 아미노산 서열을 포함하는 것, 구체적으로 서열번호 20, 22, 23, 27, 33, 35, 37, 38, 40, 41, 42, 및 44로 이루어진 군에서 선택된 아미노산 서열로 (필수적으로) 구성된 것 일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0259] 구체적으로, 상기 펩타이드는 서열번호 20, 22, 23, 27, 33, 37, 38, 및 44로 이루어진 군에서 선택되는 아미노산 서열을 포함하는 것, 구체적으로 서열번호 20, 22, 23, 27, 33, 37, 38, 및 44로 이루어진 군에서 선택되는 아미노산 서열로 (필수적으로) 구성된 것 일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0260] 또한, 상기 일반식 1에서,
- [0261] 상기 일반식 1에서
- [0262] X1이 티로신이고;
- [0263] X2가 세린 또는 Aib(aminoisobutyric acid)이며;
- [0264] X7은 시스테인, 트레오닌, 또는 발린이고;
- [0265] X10은 티로신 또는 시스테인이고;
- [0266] X12는 리신 또는 시스테인이고;
- [0267] X13은 티로신 또는 시스테인이고;
- [0268] X14는 류신 또는 시스테인이고;
- [0269] X15는 아스파르트산, 또는 시스테인이고;
- [0270] X16은 글루탐산, 세린 또는 시스테인이며;
- [0271] X17은 글루탐산, 리신, 아르기닌, 시스테인, 또는 발린이고;
- [0272] X18은 아르기닌, 또는 시스테인이며;
- [0273] X19는 알라닌, 또는 시스테인이고;

- [0274] X20은 글루타민 또는 리신이며;
- [0275] X21은 아스파르트산, 글루탐산, 발린, 또는 시스테인이고;
- [0276] X23은 발린이며;
- [0277] X24는 발린 또는 글루타민이고;
- [0278] X27는 메티오닌이며;
- [0279] X28은 아스파라긴 또는 아르기닌이고;
- [0280] X29는 트레오닌이며;
- [0281] X30은 시스테인이거나, 부존재하는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0283] 그 예로, 상기 펩타이드는 서열번호 11, 13 내지 17, 19 내지 27, 29, 31, 33, 35 내지 45로 이루어진 군에서 선택된 아미노산 서열을 포함하는 것, 구체적으로 서열번호 11, 13 내지 17, 19 내지 27, 29, 31, 33, 35 내지 45로 이루어진 군에서 선택된 아미노산 서열로 (필수적으로) 구성된 것 일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0285] 또한,
- [0286] 상기 일반식 1에서
- [0287] X1이 티로신이고;
- [0288] X2가 Aib(aminoisobutyric acid)이며;
- [0289] X7은 시스테인, 트레오닌, 또는 발린이고;
- [0290] X10은 티로신 또는 시스테인이고;
- [0291] X12는 리신이고;
- [0292] X13은 티로신 또는 시스테인이고;
- [0293] X14는 류신 또는 시스테인이고;
- [0294] X15는 아스파르트산, 또는 시스테인이고;
- [0295] X16은 글루탐산, 세린 또는 시스테인이며;
- [0296] X17은 리신, 아르기닌, 시스테인, 또는 발린이고;
- [0297] X18은 아르기닌, 또는 시스테인이며;
- [0298] X19는 알라닌, 또는 시스테인이고;
- [0299] X20은 글루타민 또는 리신이며;
- [0300] X21은 아스파르트산, 글루탐산, 또는 시스테인이고;
- [0301] X23은 발린이며;
- [0302] X24는 글루타민이고;
- [0303] X27는 메티오닌이며;
- [0304] X28은 아스파라긴 또는 아르기닌이고;
- [0305] X29는 트레오닌이며;
- [0306] X30은 시스테인이거나, 부존재하는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

- [0308] 그 예로, 상기 펩타이드는 서열번호 11, 14, 17, 19 내지 25, 27, 29, 31, 33, 35 내지 44로 이루어진 군에서 선택된 아미노산 서열을 포함하는 것, 구체적으로 서열번호 11, 14, 17, 19 내지 25, 27, 29, 31, 33, 35 내지 44로 이루어진 군에서 선택된 아미노산 서열로 (필수적으로) 구성된 것 일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0310] 또한, 상기 일반식 1에서
- [0311] X1이 티로신이고;
- [0312] X2가 세린 또는 Aib(aminoisobutyric acid)이며;
- [0313] X7은 트레오닌, 발린 또는 시스테인이고;
- [0314] X10은 티로신 또는 시스테인이고;
- [0315] X12는 리신 또는 시스테인이고;
- [0316] X13은 티로신 또는 시스테인이고;
- [0317] X14는 류신 또는 시스테인이고;
- [0318] X15는 아스파르트산, 또는 시스테인이고;
- [0319] X16은 글루탐산, 세린 또는 시스테인이며;
- [0320] X17은 아스파르트산, 글루탐산, 리신, 아르기닌, 세린, 시스테인, 또는 발린 이고;
- [0321] X18은 아스파르트산, 글루탐산, 아르기닌, 또는 시스테인이며;
- [0322] X19는 알라닌, 또는 시스테인이고;
- [0323] X20은 글루타민, 아스파르트산, 또는 리신이며;
- [0324] X21은 아스파르트산, 또는 글루탐산이고;
- [0325] X23은 발린이며;
- [0326] X24는 발린 또는 글루타민이고;
- [0327] X27는 이소류신 또는 메티오닌이며;
- [0328] X28은 아스파라긴 또는 아르기닌이고;
- [0329] X29는 트레오닌이며;
- [0330] X30은 시스테인이거나, 부존재하는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0332] 그 예로, 상기 펩타이드는 서열번호 7 내지 11, 13 내지 15, 17, 19 내지 24, 27, 29, 31, 33, 35 내지 45로 이루어진 군에서 선택된 아미노산 서열을 포함하는 것, 구체적으로 서열번호 7 내지 11, 13 내지 15, 17, 19 내지 24, 27, 29, 31, 33, 35 내지 45로 이루어진 군에서 선택된 아미노산 서열로 (필수적으로) 구성된 것 일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0334] 또한, 상기 일반식 1에서
- [0335] X1이 티로신이거나;
- [0336] X2가 Aib(aminoisobutyric acid)이며;
- [0337] X7은 트레오닌이고;
- [0338] X10은 티로신이고;
- [0339] X12는 리신이고;

- [0340] X13은 티로신이고;
- [0341] X14는 류신이고;
- [0342] X15는 아스파르트산, 또는 시스테인이고;
- [0343] X16은 글루탐산, 세린 또는 시스테인이며;
- [0344] X17은 리신 또는 아르기닌이고;
- [0345] X18은 아르기닌이며;
- [0346] X19는 알라닌이고;
- [0347] X20은 글루타민, 시스테인, 또는 리신이며;
- [0348] X21은 아스파르트산, 시스테인, 발린 또는 글루탐산이고;
- [0349] X23은 발린 또는 아르기닌이며;
- [0350] X24는 글루타민 또는 류신이고;
- [0351] X27는 메티오닌이며;
- [0352] X28은 아스파라긴 또는 아르기닌이고;
- [0353] X29는 트레오닌이며;
- [0354] X30은 부존재하는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

- [0356] 그 예로, 상기 펩타이드는 서열번호 14, 16, 18, 19, 25, 31, 33, 37, 및 44로 이루어진 군에서 선택된 아미노산 서열을 포함하는 것, 구체적으로 서열번호 14, 16, 18, 19, 25, 31, 33, 37, 및 44로 이루어진 군에서 선택된 아미노산 서열로 (필수적으로) 구성된 것 일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

- [0358] 더 구체적으로, 상기 펩타이드는 하기 일반식 2의 아미노산 서열을 포함하는 펩타이드일 수 있다:

- [0360] Y-Aib-QGTF-X7-SD-X10-S-X12-Y-L-X15-X16-X17-R-A-X20-X21-F-V-X24-W-L-M-N-T-X30 (일반식 2, 서열번호 47)

- [0362] 상기 일반식 2에서
- [0363] X7은 트레오닌, 발린 또는 시스테인이고;
- [0364] X10은 티로신 또는 시스테인이고;
- [0365] X12는 리신 또는 시스테인이고;
- [0366] X15는 아스파르트산, 또는 시스테인이고;
- [0367] X16은 글루탐산 또는 세린이며;
- [0368] X17은 리신 또는 아르기닌이고;
- [0369] X20은 글루타민 또는 리신이며;
- [0370] X21은 아스파르트산, 또는 글루탐산이고;
- [0371] X24는 발린 또는 글루타민이고;
- [0372] X30은 시스테인이거나, 부존재할 수 있다.

- [0374] 그 예로, 상기 펩타이드는 서열번호 13, 15 및 36 내지 45로 이루어진 군에서 선택된 아미노산 서열을 포함하는 것, 구체적으로 서열번호 13, 15 및 36 내지 45로 이루어진 군에서 선택된 아미노산 서열로 (필수적으로) 구성된 것 일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 보다 더 구체적으로, 상기 펩타이드는 서열번호 20, 혹은 37의 아미노산 서열을 포함하거나, 해당 아미노산 서열로 (필수적으로) 구성되는 것을 특징으로 한다. 그러나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0376] 구체적으로, 상기 일반식 2에서
- [0377] X7은 트레오닌, 발린 또는 시스테인이고;
- [0378] X10은 티로신 또는 시스테인이고;
- [0379] X12는 리신이고;
- [0380] X15는 아스파르트산이고;
- [0381] X16은 글루탐산 또는 세린이며;
- [0382] X17은 리신 또는 아르기닌이고;
- [0383] X20은 글루타민 또는 리신이며;
- [0384] X21은 아스파르트산 또는 글루탐산이고;
- [0385] X24는 글루타민이고;
- [0386] X30은 시스테인이거나, 부존재하는 것일 수 있으나, 특별히 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0387] 그 예로, 상기 펩타이드는 서열번호 36 내지 38, 40 내지 42, 44, 및 45로 이루어진 군에서 선택된 아미노산 서열을 포함하는 것, 구체적으로 서열번호 36 내지 38, 40 내지 42, 44, 및 45로 이루어진 군에서 선택된 아미노산 서열로 (필수적으로) 구성된 것 일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0389] 상기 펩타이드의 다른 예로, 서열번호 2 내지 11, 13 내지 45로 이루어진 군에서 선택된 아미노산 서열을 포함하는 펩타이드, 구체적으로 서열번호 2 내지 11, 13 내지 45로 이루어진 군에서 선택된 아미노산 서열로(필수적으로) 구성된 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0391] 단, 상기 펩타이드들은 상기 범주로부터 제외되는 조합도 존재할 수도 있으나, 특별히 이에 제한되는 것은 아니며, 청구항에 별도의 다른 언급이 없는 한 청구항에 기술된 펩타이드는 모두 본 발명의 범주에 포함된다.
- [0393] 또한, 본원에서 '특정 서열번호로 구성되는 펩타이드'라고 기재되어 있다 하더라도, 해당 서열번호의 아미노산 서열로 이루어진 펩타이드와 동일 혹은 상응하는 활성을 가지는 경우라면 해당 서열번호의 아미노산 서열 앞뒤의 무의미한 서열 추가 또는 자연적으로 발생할 수 있는 돌연변이, 혹은 이의 잠재성 돌연변이 (silent mutation)를 제외하는 것이 아니며, 이러한 서열 추가 혹은 돌연변이를 가지는 경우에도 본원의 범위 내에 속하는 것이 자명하다.
- [0394] 이상의 내용은 본 발명의 다른 구체예 혹은 다른 양태에도 적용될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0396] 본 발명에서, 상기 펩타이드는 천연형 글루카곤과 서열 동일성을 비교하였을 때, 적어도 60% 이상, 65% 이상, 70% 이상, 75% 이상, 80% 이상, 85% 이상, 90% 이상, 91% 이상, 92% 이상, 93% 이상, 94% 이상, 또는 95% 이상의 서열 동일성을 가지는 것일 수 있으나, 특별히 이에 제한되는 것은 아니고, 상기 펩타이드와 천연형 글루카곤의 서열 비교를 통하여 당업자가 용이하게 파악할 수 있다.
- [0397] 본 발명의 용어, "상동성(homology)"은, 야생형(wild type) 단백질의 아미노산 서열 또는 이를 코딩하는 염기 서열과의 유사한 정도를 나타내기 위한 것으로서, 본 발명의 아미노산 서열 또는 염기 서열과 상기와 같은 퍼센

트 이상의 동일한 서열을 가지는 서열을 포함한다. 이러한 상동성은 두 서열을 육안으로 비교하여 결정할 수도 있으나, 비교대상이 되는 서열을 나란히 배열하여 상동성 정도를 분석해 주는 생물정보 알고리즘(bioinformatic algorithm)을 사용하여 결정할 수 있다. 상기 두 개의 아미노산 서열 사이의 상동성은 백분율로 표시할 수 있다. 유용한 자동화된 알고리즘은 Wisconsin Genetics Software Package (Genetics Computer Group, Madison, W, USA)의 GAP, BESTFIT, FASTA와 TFASTA 컴퓨터 소프트웨어 모듈에서 이용가능하다. 상기 모듈에서 자동화된 배열 알고리즘은 Needleman & Wunsch와 Pearson & Lipman과 Smith & Waterman 서열 배열 알고리즘을 포함한다. 다른 유용한 배열에 대한 알고리즘과 상동성 결정은 FASTP, BLAST, BLAST2, PSIBLAST와 CLUSTAL W를 포함하는 소프트웨어에서 자동화되어 있다.

- [0399] 또한, 본 발명에서, 상기 펩타이드는 글루카곤 수용체에 대한 활성을 나타내는 펩타이드 또는 글루카곤 유도체 일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0400] 특별히 이에 제한되는 것은 아니나, 상기 글루카곤 수용체에 대해 유의한 수준의 활성을 가지는 펩타이드는 글루카곤 수용체에 대해 *in vitro* 활성이 천연형 리간드 (천연형 글루카곤) 대비 약 0.001% 이상, 약 0.01% 이상, 약 0.1% 이상, 약 1% 이상, 약 2% 이상, 약 3% 이상, 약 4% 이상, 약 5% 이상, 약 6% 이상, 약 7% 이상, 약 8% 이상, 약 9% 이상, 약 10% 이상, 약 20% 이상, 약 30% 이상, 약 40% 이상, 약 50% 이상, 약 60% 이상, 약 70% 이상, 약 80% 이상, 약 90% 이상, 약 100% 이상을 나타낼 수 있으나, 유의적으로 활성을 나타내는 범위는 제한 없이 포함된다. 이러한 펩타이드의 *in vitro* 활성을 측정하는 방법은 본원 명세서의 실시예 4를 참조할 수 있으나, 특별히 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0401] 본 발명에서 용어, "약"은 ± 0.5 , ± 0.4 , ± 0.3 , ± 0.2 , ± 0.1 등을 모두 포함하는 범위로, 약 이란 용어 뒤에 나오는 수치와 동등하거나 유사한 범위의 수치를 모두 포함하나, 이에 제한되지 않는다.
- [0402] 특별히 이에 제한되는 것은 아니나, 이러한 상기 펩타이드는 비자연적으로 발생된 (non-naturally occurring) 것일 수 있다.
- [0404] 사슬한 글루카곤 유도체는 분자 내 가교 (intramolecular bridge)를 포함할 수 있으며 (예컨대, 공유결합적 가교 또는 비공유결합적 가교), 구체적으로 고리를 포함하는 형태일 수 있다. 예컨대 글루카곤 유도체의 16번 및 20번 아미노산 사이에 고리가 형성된 형태일 수 있으나, 특별히 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0405] 상기 고리의 비제한적인 예로 락탐 가교 (또는 락탐 고리)를 포함할 수 있다.
- [0406] 또한, 상기 글루카곤 유도체는 고리를 포함하도록, 목적하는 위치에 고리를 형성할 수 있는 아미노산을 포함하도록 변형된 것을 모두 포함한다.
- [0407] 이러한 고리는 상기 글루카곤 유도체 내의 아미노산 곁 사슬 간에 형성될 수 있으며, 그 예로 리신의 곁 사슬과 글루탐산의 곁 사슬 간에 락탐 고리가 형성되는 형태일 수 있으나, 특별히 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0408] 예컨대, 상기 일반식 1 혹은 일반식 2의 아미노산 서열을 포함하는 펩타이드는 일반식 1 혹은 일반식 2의 X10과 X14, X12와 X16, X16과 X20, X17과 X21, X20과 X24, 및 X24와 X28의 아미노산 쌍에서, 각 아미노산 쌍의 아미노산이 각각 글루탐산 또는 리신으로 치환된 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 상기, X_n (n은 자연수)에서 n은 제시된 아미노산 서열의 N-말단으로부터의 아미노산 위치를 나타낸다.
- [0409] 또한, 상기 일반식 1 혹은 일반식 2의 아미노산 서열을 포함하는 펩타이드는 X12와 X16의 아미노산 쌍, X16과 X20의 아미노산 쌍, 또는 X17과 X21의 아미노산 쌍의 아미노산 각각이 고리를 형성할 수 있는 글루탐산 또는 리신으로 치환된 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0410] 또한, 상기 일반식 1 혹은 2에서, X10과 X14, X12와 X16, X16과 X20, X17과 X21, X20과 X24, 및 X24와 X28의 아미노산 쌍 중 적어도 하나의 아미노산 쌍에서 각 아미노산 쌍의 각각의 아미노산 간에 고리 (예컨대, 락탐 고리)를 형성한 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0411] 또한, 상기 일반식 1 또는 2에서, X16이 글루탐산이고, X20은 리신이며, X16과 X20의 측쇄가 락탐 고리를 형성하고 있는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

- [0413] 또한, 본 발명에 따른 펩타이드는 N-말단 및/또는 C-말단이 변형되지 않은 것일 수 있으나, 생체 내의 단백질 절단 효소들로부터 보호하고 안정성을 증가시키기 위하여 이의 N-말단 및/또는 C-말단 등이 화학적으로 수식되거나 유기단으로 보호되거나, 또는 펩타이드 말단 등에 아미노산이 추가되어 변형된 형태 역시 본 발명에 따른 펩타이드의 범주에 포함된다. C-말단이 변형되지 않은 경우, 본 발명에 따른 펩타이드의 말단은 카르복실기를 가지나, 특별히 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0414] 특히, 화학적으로 합성한 펩타이드의 경우, N- 및 C-말단이 전하를 띠고 있기 때문에, 이러한 전하를 제거하기 위하여 N-말단을 아세틸화 (acetylation) 및/또는 C-말단을 아미드화 (amidation)할 수 있으나, 특별히 이에 제한되지는 않는다.
- [0415] 본 명세서에서 따로 가리키는 바가 없으면, 본 발명에 따른 "펩타이드" 또는 이러한 펩타이드가 생체적합성 물질에 공유결합으로 연결된 "결합체"에 대한 명세서 상세한 설명이나 청구 범위의 기술은 해당 펩타이드 또는 결합체는 물론이고, 해당 펩타이드 또는 결합체의 염(예컨대, 상기 펩타이드의 약학적으로 허용가능한 염), 또는 이의 용매화물의 형태를 모두 포함하는 범주에도 적용된다. 따라서 명세서에 "펩타이드" 또는 "결합체"라고만 기재되어 있더라도 해당 기재 내용은 그 특정 염, 그 특정 용매화물, 그 특정 염의 특정 용매화물에도 마찬가지로 적용된다. 이러한 염 형태는 예를 들어 약학적으로 허용되는 임의의 염을 사용한 형태일 수 있다. 상기 염의 종류는 특별히 제한되지는 않는다. 다만, 개체, 예컨대 포유류에게 안전하고 효과적인 형태인 것이 바람직하나, 특별히 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0416] 상기 용어, "약학적으로 허용되는"은 의약학적 판단의 범위 내에서, 과도한 독성, 자극, 또는 알레르기 반응 등을 유발하지 않고 원하는 용도에 효과적으로 사용 가능한 물질을 의미한다.
- [0417] 본 발명에서 용어, "약학적으로 허용되는 염" 이란 약학적으로 허용되는 무기산, 유기산, 또는 염기로부터 유도된 염을 포함한다. 적합한 산의 예로는 염산, 브롬산, 황산, 질산, 과염소산, 푸마르산, 말레산, 인산, 글리콜산, 락트산, 살리실산, 숙신산, 툴루엔-p-설폰산, 타르타르산, 아세트산, 시트르산, 메탄설폰산, 포름산, 벤조산, 말론산, 나프탈렌-2-설폰산, 벤젠설폰산 등을 들 수 있다. 적합한 염기로부터 유도된 염은 나트륨, 칼륨 등의 알칼리 금속, 마그네슘 등의 알칼리 토금속, 및 암모늄 등을 포함할 수 있다.
- [0418] 또한, 본 발명에서 사용된 용어 "용매화물"은 본 발명에 따른 펩타이드, 결합체, 또는 이의 염이 용매 분자와 복합체를 형성한 것을 말한다.
- [0420] 또한, 본 발명의 글루카곤 유도체 펩타이드는 그 길이에 따라 이 분야에서 잘 알려진 방법, 예를 들어 자동 펩타이드 합성기에 의해 합성할 수 있으며, 유전자 조작 기술에 의하여 생산할 수도 있다.
- [0421] 구체적으로, 본 발명의 글루카곤 유도체 펩타이드는 표준 합성 방법, 재조합 발현 시스템, 또는 임의의 다른 당해 분야의 방법에 의해 제조될 수 있다. 따라서, 본 발명에 따른 글루카곤 유도체는, 예를 들어 하기를 포함하는 방법을 포함하는 다수의 방법으로 합성될 수 있다:
- [0422] (a) 펩타이드를 고체상 또는 액체상 방법의 수단으로 단계적으로 또는 단편 조립에 의해 합성하고, 최종 펩타이드 생성물을 분리 및 정제하는 방법; 또는
- [0423] (b) 펩타이드를 인코딩하는 핵산 작제물을 숙주세포 내에서 발현시키고, 발현 생성물을 숙주 세포 배양물로부터 회수하는 방법; 또는
- [0424] (c) 펩타이드를 인코딩하는 핵산 작제물의 무세포 시험관 내 발현을 수행하고, 발현 생성물을 회수하는 방법; 또는
- [0425] (a), (b) 및 (c)의 임의의 조합으로 펩타이드의 단편을 수득하고, 이어서 단편을 연결시켜 펩타이드를 수득하고, 당해 펩타이드를 회수하는 방법.
- [0426] 보다 구체적인 예로, 유전자 조작을 통하여, 융합파트너 및 글루카곤 유도체를 포함하는 융합 단백질을 코딩하는 융합 유전자를 제조하고 이를 숙주 세포에 형질전환시킨 후, 융합 단백질 형태로 발현하고, 단백질 분해효소 또는 화합물을 이용하여 융합 단백질로부터 글루카곤 유도체를 절단, 분리하여 원하는 글루카곤 유도체를 생산할 수 있다. 이를 위하여 예를 들어 Factor Xa나 엔테로키나제와 같은 단백질 분해효소, CNBr 또는 하이드록실아민과 같은 화합물에 의해 절단될 수 있는 아미노산 잔기를 코딩하는 DNA 서열을 융합파트너와 글루카곤 유도체를 코딩하는 폴리뉴클레오티드 사이에 삽입할 수 있다.

- [0428] 보다 구체적인 양태로서, 본 발명에 따른 펩타이드, 혹은 글루카곤 유도체, 예컨대 상기 일반식 1의 아미노산 서열을 포함하는 펩타이드는 이의 생체 내 반감기를 증가시키는 생체적합성 물질부에 결합된, 지속형 결합체의 형태일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 상기 생체적합성 물질부는 캐리어와 혼용될 수 있다.
- [0429] 구체적으로, 상기 결합체는 펩타이드 부위 및 상기 펩타이드 부위에 공유결합으로 연결된 생체적합성 물질부를 포함하며, 상기 펩타이드 부위는 상기 일반식 1의 아미노산 서열과 동일한 서열이거나 이를 포함하는 서열일 수 있다.
- [0430] 본 발명에서 상기 펩타이드의 결합체는 캐리어가 결합되지 않은 펩타이드에 비하여 증가된 효력의 지속성을 나타낼 수 있으며, 본 발명에서는 이러한 결합체를 "지속형 결합체"로 지칭한다.
- [0431] 한편, 이러한 결합체는 비자연적인 (non-naturally occurring) 것일 수 있다.
- [0432] 본 발명에서 용어, "지속형 결합체"는 생리활성물질 (예, 글루카곤 유도체)에 생체적합성 물질부 또는 캐리어가 결합된 형태로서, 생체적합성 물질부 또는 캐리어가 결합되지 않은 생리활성물질에 비하여 증가된 효력의 지속성 (예, 체내 반감기 증가)을 나타내는 결합체를 지칭한다. 상기 지속형 결합체에서 생체적합성 물질부 또는 캐리어는 생리활성물질에 공유결합으로 연결된 것일 수 있으나, 특별히 이에 제한되지 않는다.
- [0433] 본 발명의 구체적인 실시 형태에서 상기 글루카곤 유도체의 지속형 결합체는 효력의 지속성이 캐리어가 결합되지 않은 천연형 글루카곤 혹은 글루카곤 유도체에 비해 증가할 수 있다.
- [0435] 본 발명의 하나의 구체예에서, 상기 지속형 결합체는 하기 화학식 1로 표시되는, 결합체일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다:
- [0436] [화학식 1]
- [0437] X - L - F
- [0438] 단 이 때 X는 상기 펩타이드이고;
- [0439] L은 에틸렌글리콜 반복 단위를 함유하는 링커이며,
- [0440] F는 면역글로불린 Fc 영역이고,
- [0441] -는 X와 L 사이, L과 F 사이의 공유결합 연결을 나타낸다.
- [0443] 상기 지속형 결합체에서 X는 본 발명에 따른 펩타이드(글루카곤 유도체)일 수 있다. 구체적으로, 상기 X는 일반식 1의 아미노산 서열을 포함하는 펩타이드일 수 있고, 또는, 상기 X는 서열번호 2 내지 11, 13 내지 45 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하는 펩타이드일 수 있고, 또는, 상기 X는 서열번호 20, 22, 23, 27, 33, 35, 37, 38, 40, 41, 42, 및 44로 이루어진 군에서 선택되는 아미노산 서열을 포함하는 펩타이드일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0444] 상기 지속형 결합체에서 F는 X, 즉 글루카곤 유도체의 반감기를 증가시킬 수 있는 물질로서, 본 발명의 상기 결합체를 구성하는 모이어티의 일 구성에 해당한다.
- [0445] 상기 F는 X와 공유 화학결합 또는 비공유 화학결합으로 서로 결합되는 것일 수 있으며, 구체적으로는 공유 화학결합으로 L을 통하여 F와 X가 서로 결합되는 것일 수 있다.
- [0446] 구체적인 예로, 상기 F는 면역글로불린 Fc 영역일 수 있으며, 보다 구체적으로 상기 면역글로불린 Fc 영역은 IgG 유래 일 수 있으나, 특별히 이에 제한되지 않는다.
- [0448] 본 발명에서, "면역글로불린 Fc 영역"은, 면역글로불린의 중쇄와 경쇄 가변영역을 제외한, 중쇄 불변영역 2(CH2) 및/또는 중쇄 불변영역 3(CH3)부분을 포함하는 부위를 의미한다. 상기 면역글로불린 Fc 영역은 본 발명의 단백질 결합체의 모이어티를 이루는 일 구성일 수 있다.

- [0449] 본 명세서에서 Fc 단편이라고 하면 면역글로불린의 과파인 소화에서 얻는 천연형 서열뿐 아니라 그 유도체, 예컨대 천연 서열 중의 하나 이상의 아미노산 잔기가 결실, 삽입, 비보전적 또는 보전적 치환 또는 이들의 조합에 의하여 변환되어 천연형과 상이하게 된 서열까지 망라하여 포함된다.
- [0450] 상기 F는 2개의 폴리펩타이드 사슬이 이황화결합으로 연결되어 있는 구조이며, 상기 두 사슬 중 한 사슬의 질소 원자를 통해서만 연결되어 있는 구조일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 상기 질소 원자를 통한 연결은 리신의 입실론 아미노 원자나 N-말단 아미노기에 환원적 아민화를 통하여 연결될 수 있다.
- [0451] 환원적 아민화 반응이란 반응물의 아민기 또는 아미노기가 다른 반응물의 알데히드 (즉, 환원적 아민화가 가능한 작용기)와 반응하여 아민을 생성한 다음, 환원 반응에 의해 아민 결합을 형성시키는 반응을 의미하여, 당해 기술 분야에 널리 알려져 있는 유기합성 반응이다.
- [0452] 하나의 구체예로, 상기 F는 그 N-말단 프롤린의 질소 원자를 통하여 연결될 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0454] 이러한 면역글로불린 Fc 단편은 중쇄 불변영역에 힌지(hinge) 부분을 포함할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0455] 본 발명에서, 면역글로불린 Fc 단편은 N-말단에 특정 힌지 서열을 포함할 수 있다.
- [0456] 본 발명의 용어, “힌지 서열”은 중쇄에 위치하여 이황화결합(inter disulfide bond)를 통하여 면역글로불린 Fc 단편의 이량체를 형성하는 부위를 의미한다.
- [0457] 본 발명에서, 상기 힌지 서열은 하기의 아미노산 서열을 갖는 힌지 서열 중 일부가 결실되어 하나의 시스테인 잔기만을 갖도록 변이된 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다:
- [0458] Glu-Ser-Lys-Tyr-Gly-Pro-Pro-Cys-Pro-Ser-Cys-Pro(서열번호 51).
- [0459] 상기 힌지 서열은 서열번호 51의 힌지 서열 중 8번째 또는 11번째 시스테인 잔기가 결실되어 하나의 시스테인 잔기만을 포함하는 것일 수 있다. 본 발명의 힌지 서열은 하나의 시스테인 잔기만을 포함하는, 3 내지 12개의 아미노산으로 구성된 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 보다 구체적으로, 본 발명의 힌지 서열은 다음과 같은 서열을 가질 수 있다: Glu-Ser-Lys-Tyr-Gly-Pro-Pro-Pro-Ser-Cys-Pro(서열번호 52), Glu-Ser-Lys-Tyr-Gly-Pro-Pro-Cys-Pro-Ser-Pro(서열번호 53), Glu-Ser-Lys-Tyr-Gly-Pro-Pro-Cys-Pro-Ser(서열번호 54), Glu-Ser-Lys-Tyr-Gly-Pro-Pro-Cys-Pro-Pro(서열번호 55), Lys-Tyr-Gly-Pro-Pro-Cys-Pro-Ser(서열번호 56), Glu-Ser-Lys-Tyr-Gly-Pro-Pro-Cys(서열번호 57), Glu-Lys-Tyr-Gly-Pro-Pro-Cys(서열번호 58), Glu-Ser-Pro-Ser-Cys-Pro(서열번호 59), Glu-Pro-Ser-Cys-Pro(서열번호 60), Pro-Ser-Cys-Pro(서열번호 61), Glu-Ser-Lys-Tyr-Gly-Pro-Pro-Ser-Cys-Pro(서열번호 62), Lys-Tyr-Gly-Pro-Pro-Pro-Ser-Cys-Pro(서열번호 63), Glu-Ser-Lys-Tyr-Gly-Pro-Ser-Cys-Pro(서열번호 64), Glu-Ser-Lys-Tyr-Gly-Pro-Pro-Cys(서열번호 65), Lys-Tyr-Gly-Pro-Pro-Cys-Pro(서열번호 66), Glu-Ser-Lys-Pro-Ser-Cys-Pro(서열번호 67), Glu-Ser-Pro-Ser-Cys-Pro(서열번호 68), Glu-Pro-Ser-Cys(서열번호 69), Ser-Cys-Pro(서열번호 70).
- [0460] 더욱 구체적으로는 상기 힌지 서열은 서열번호 61(Pro-Ser-Cys-Pro)또는 서열번호 70(Ser-Cys-Pro)의 아미노산 서열을 포함하는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0461] 본 발명의 면역글로불린 Fc 단편은 힌지 서열의 존재로 면역글로불린 Fc 사슬 두 분자가 이량체를 형성한 형태일 수 있고, 또한, 본 발명의 화학식 1의 결합체는 링커의 일 말단이 이량체의 면역글로불린 Fc 단편의 한 사슬에 연결된 형태일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0462] 본 발명의 용어, “N-말단”은 단백질 또는 폴리펩타이드의 아미노 말단을 의미하는 것으로, 아미노 말단의 최말단, 또는 최말단으로부터 1개, 2개, 3개, 4개, 5개, 6개, 7개, 8개, 9개, 또는 10개 이상의 아미노산까지 포함하는 것일 수 있다. 본 발명의 면역글로불린 Fc 단편은 힌지 서열을 N-말단에 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0464] 또한 본 발명의 면역글로불린 Fc 단편은 천연형과 실질적으로 동등하거나 향상된 효과를 갖는 한, 면역 글로불린의 중쇄와 경쇄 가변영역만을 제외하고, 일부 또는 전체 중쇄 불변영역 1(CH1) 및/또는 경쇄불변영역 1(CL1)

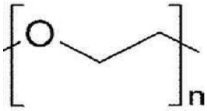
을 포함하는 확장된 Fc 단편일 수 있다. 또한, CH2 및/또는 CH3에 해당하는 상당히 긴 일부 아미노산 서열이 제거된 단편일 수도 있다.

- [0465] 예컨대, 본 발명의 면역글로불린 Fc 영역은 1) CH1 도메인, CH2 도메인, CH3 도메인 및 CH4 도메인, 2) CH1 도메인 및 CH2 도메인, 3) CH1 도메인 및 CH3 도메인, 4) CH2 도메인 및 CH3 도메인, 5) CH1 도메인, CH2 도메인, CH3 도메인 및 CH4 도메인 중 1개 또는 2개의 이상의 도메인과 면역글로불린 힌지 영역(또는 힌지 영역의 일부)와의 조합, 6) 중쇄 불변 영역 각 도메인과 경쇄 불변영역의 이량체일 수 있다. 그러나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0466] 또한, 하나의 구체예로서, 상기 면역글로불린 Fc 영역은 이량체 형태(dimeric form)일 수 있으며, 이합체 형태의 하나의 Fc 영역에 글루카곤 유도체 한 분자가 공유결합적으로 연결될 수 있으며, 이때 상기 면역글로불린 Fc와 글루카곤 유도체는 비펩타이드성 중합체에 의해 서로 연결될 수 있다. 한편, 이량체 형태의 하나의 Fc 영역에 글루카곤 유도체 두 분자가 대칭적으로 결합하는 것 역시 가능하다. 이때 상기 면역글로불린 Fc와 글루카곤 유도체 혹은 인슐린 분비 펩타이드는 비펩타이드성 링커에 의해 서로 연결될 수 있다. 그러나, 상기 기술된 예에 제한되는 것은 아니다.
- [0467] 또한, 본 발명의 면역글로불린 Fc 영역은 천연형 아미노산 서열뿐만 아니라 이의 서열 유도체를 포함한다. 아미노산 서열 유도체란 천연 아미노산 서열 중의 하나 이상의 아미노산 잔기가 결실, 삽입, 비보전적 또는 보전적 치환 또는 이들의 조합에 의하여 상이한 서열을 가지는 것을 의미한다.
- [0468] 예를 들면, IgG Fc의 경우 결합에 중요하다고 알려진 214 내지 238, 297 내지 299, 318 내지 322 또는 327 내지 331번 아미노산 잔기들이 변형을 위해 적당한 부위로서 이용될 수 있다.
- [0470] 또한, 이황화 결합을 형성할 수 있는 부위가 제거되거나, 천연형 Fc에서 N-말단의 몇몇 아미노산이 제거되거나 또는 천연형 Fc의 N-말단에 메티오닌 잔기가 부가될 수도 있는 등 다양한 종류의 유도체가 가능하다. 또한, 이펙터 기능을 없애기 위해 보체결합부위, 예로 C1q 결합부위가 제거될 수도 있고, ADCC(antibody dependent cell mediated cytotoxicity) 부위가 제거될 수도 있다. 이러한 면역글로불린 Fc 영역의 서열 유도체를 제조하는 기술은 국제특허공개 제WO 97/34631호, 국제특허공개 제96/32478호 등에 개시되어 있다.
- [0471] 분자의 활성을 전체적으로 변경시키지 않는 단백질 및 펩타이드에서의 아미노산 교환은 당해 분야에 공지되어 있다(H.Neurath, R.L.Hill, The Proteins, Academic Press, New York, 1979). 가장 통상적으로 일어나는 교환은 아미노산 잔기 Ala/Ser, Val/Ile, Asp/Glu, Thr/Ser, Ala/Gly, Ala/Thr, Ser/Asn, Ala/Val, Ser/Gly, Thy/Phe, Ala/Pro, Lys/Arg, Asp/Asn, Leu/Ile, Leu/Val, Ala/Glu, Asp/Gly 간의 교환이다. 경우에 따라서는 인산화(phosphorylation), 황산화(sulfation), 아크릴화(acrylation), 당화(glycosylation), 메틸화(methylation), 파네실화(farnesylation), 아세틸화(acetylation) 및 아미드화(amidation) 등으로 수식(modification)될 수도 있다.
- [0472] 상기 기술한 Fc 유도체는 본 발명의 Fc 영역과 동등한 생물학적 활성을 나타내며 Fc 영역의 열, pH 등에 대한 구조적 안정성을 증대시킨 것일 수 있다.
- [0474] 또한, 이러한 Fc 영역은 인간, 소, 염소, 돼지, 마우스, 래빗, 햄스터, 랫트 또는 기니아 피그 등의 동물의 생체 내에서 분리한 천연형으로부터 얻어질 수도 있고, 형질전환된 동물세포 또는 미생물로부터 얻어진 재조합형 또는 이의 유도체일 수 있다. 여기서, 천연형으로부터 획득하는 방법은 전체 면역글로불린을 인간 또는 동물의 생체로부터 분리한 후, 단백질 분해효소를 처리하여 획득하는 방법일 수 있다. 파파인을 처리할 경우에는 Fab 및 Fc로 절단되고, 펩신을 처리할 경우에는 pF'c 및 F(ab)2로 절단된다. 이를 크기 배제 크로마토그래피(size-exclusion chromatography) 등을 이용하여 Fc 또는 pF'c를 분리할 수 있다. 더 구체적인 실시 형태에서는 인간 유래의 Fc 영역을 미생물로부터 수득한 재조합형 면역글로불린 Fc 영역이다.
- [0475] 또한, 면역글로불린 Fc 영역은 천연형 당쇄, 천연형에 비해 증가된 당쇄, 천연형에 비해 감소한 당쇄 또는 당쇄가 제거된 형태일 수 있다. 이러한 면역글로불린 Fc 당쇄의 증감 또는 제거에는 화학적 방법, 효소학적 방법 및 미생물을 이용한 유전 공학적 방법과 같은 통상적인 방법이 이용될 수 있다. 여기서, Fc에서 당쇄가 제거된 면역글로불린 Fc 영역은 보체(c1q)와의 결합력이 현저히 저하되고, 항체-의존성 세포독성 또는 보체-의존성 세포 독성이 감소 또는 제거되므로, 생체 내에서 불필요한 면역 반응을 유발하지 않는다. 이런 점에서 약물의 캐

리어로서의 본래의 목적에 보다 부합하는 형태는 당쇄가 제거되거나 비당쇄화된 면역글로불린 Fc 영역이라 할 것이다.

- [0476] 본 발명에서 "당쇄의 제거(Deglycosylation)"는 효소로 당을 제거한 Fc 영역을 말하며, 비당쇄화(Aglycosylation)는 원핵동물, 더 구체적인 실시 형태에서는 대장균에서 생산하여 당쇄화되지 않은 Fc 영역을 의미한다.
- [0477] 한편, 면역글로불린 Fc 영역은 인간 또는 소, 염소, 돼지, 마우스, 래빗, 햄스터, 랫트, 기니아 피그 등의 동물기원일 수 있으며, 더 구체적인 실시 형태에서는 인간기원이다.
- [0478] 또한, 면역글로불린 Fc 영역은 IgG, IgA, IgD, IgE, IgM 유래 또는 이들의 조합(combination) 또는 이들의 혼성(hybrid)에 의한 Fc 영역일 수 있다. 더 구체적인 실시 형태에서는 인간 혈액에 가장 풍부한 IgG 또는 IgM 유래이며 보다 더 구체적인 실시 형태에서는 리간드 결합 단백질의 반감기를 향상시키는 것으로 공지된 IgG 유래이다. 더욱 더 구체적인 실시 형태에서 상기 면역글로불린 Fc 영역은 IgG4 Fc 영역이며, 가장 구체적인 실시 형태에서 상기 면역글로불린 Fc 영역은 인간 IgG4 유래의 비-당쇄화된 Fc 영역이나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0479] 또한, 하나의 구체적인 실시 형태에서, 면역글로불린 Fc 단편은 인간 IgG4 Fc의 단편으로서, 각 단량체(monomer)의 3번 아미노산인 시스테인 사이의 이황화 결합(inter-chain 형태)을 통해 2개의 단량체가 연결된 동종이합체(homodimer) 형태일 수 있으며, 이 때 동종이합체의 각 단량체는 독립적으로 35번 및 95번의 시스테인 간의 내부의 이황화 결합 및 141번 및 199번의 시스테인 간의 내부의 이황화 결합, 즉 2개의 내부의 이황화 결합(intra-chain 형태)을 가지거나/가질 수 있다. 각 단량체의 아미노산 수는 221개의 아미노산으로 구성될 수 있으며, 동종이합체를 형성하는 아미노산은 전체 442개의 아미노산으로 이루어질 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 구체적으로 면역글로불린 Fc 단편은 서열번호 71의 아미노산 서열 (221개의 아미노산으로 구성됨)을 갖는 단량체 2개가 각 단량체의 3번 아미노산인 시스테인 사이에 이황화 결합을 통해 동종이합체를 형성하고, 상기 동종이합체의 단량체는 각각 독립적으로 35번 및 95번의 시스테인 간의 내부의 이황화 결합 및 141번 및 199번의 시스테인 간의 내부의 이황화 결합을 형성하는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0480] 한편, 본 발명에서 "조합(combination)"이란 이량체 또는 다량체를 형성할 때, 동일 기원 단쇄 면역글로불린 Fc 영역을 암호화하는 폴리펩타이드가 상이한 기원의 단쇄 폴리펩타이드와 결합을 형성하는 것을 의미한다. 즉, IgG Fc, IgA Fc, IgM Fc, IgD Fc 및 IgE의 Fc 단편으로 이루어진 그룹으로부터 선택된 2개 이상의 단편으로부터 이량체 또는 다량체의 제조가 가능하다.
- [0482] 한편, 상기 L은 비펩타이드성 링커, 예를 들어 에틸렌글리콜 반복 단위를 함유하는 링커일 수 있다.
- [0483] 본 발명에서 "비펩타이드성 링커"는 반복 단위가 2개 이상 결합된 생체 적합성 중합체를 포함한다. 상기 반복 단위들은 펩타이드 결합이 아닌 임의의 공유결합을 통해 서로 연결된다. 상기 비펩타이드성 링커는 본 발명의 결합체의 모이어티를 이루는 일 구성일 수 있으며, 상기 화학식 1에서 L에 해당된다. 본 발명에서 사용될 수 있는 비펩타이드성 링커는 생체 내 단백질 분해 효소에 저항성 있는 중합체이면 제한 없이 사용될 수 있다. 본 발명에서 상기 비펩타이드성 링커는 비펩타이드성 중합체와 혼용되어 사용될 수 있다.
- [0484] 특별히 이에 제한되지 않으나, 상기 비펩타이드성 링커는 에틸렌글리콜 반복 단위를 함유하는 링커, 예를 들어, 폴리에틸렌 글리콜일 수 있고, 또한, 당해 분야에 이미 알려진 이들의 유도체 및 당해 분야의 기술 수준에서 용이하게 제조할 수 있는 유도체들도 본 발명의 범위에 포함된다.
- [0485] 상기 비펩타이드성 링커의 반복 단위는 에틸렌글리콜 반복 단위일 수 있고, 구체적으로, 상기 비펩타이드성 링커는 에틸렌글리콜 반복 단위를 포함하면서, 결합체의 제조에 이용되는 작용기를 말단에 포함하는 것일 수 있다. 본 발명에 따른 지속형 결합체는 상기 작용기를 통해 X와 F가 연결된 형태일 수 있으나 이에 제한되지 않는다. 본 발명에서, 상기 비펩타이드성 링커는 2개, 또는 3개 이상의 작용기를 포함할 수 있고, 각 작용기는 동일하거나, 서로 상이할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0486] 구체적으로, 상기 링커는 하기 화학식 2로 표시되는 폴리에틸렌글리콜(PEG)일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다:

[0487] [화학식 2]



[0488]

[0489] 여기서, $n = 10$ 내지 2400, $n = 10$ 내지 480, 또는 $n = 50$ 내지 250이나, 이에 제한되지 않는다.

[0490] 상기 지속형 결합체에서 PEG 모이어티는, $-(CH_2CH_2O)_n$ -구조 뿐만 아니라 연결 요소와 이 $-(CH_2CH_2O)_n$ 사이에 개재하는 산소 원자도 포함할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0491] 또한, 하나의 구체적인 실시 형태에서 상기 결합체는 상기 글루카곤 유도체 펩타이드 또는 일반식 1의 아미노산 서열을 포함하는 펩타이드(X)와 면역글로불린 단편(F)이 에틸렌글리콜 반복 단위를 함유하는 링커를 통해 공유 결합으로 연결된 구조 일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 상기 폴리에틸렌 글리콜은, 에틸렌 글리콜 동종 중합체, PEG 공중합체, 또는 모노메틸-치환된 PEG 중합체 (mPEG)의 형태를 모두 포괄하는 용어이나, 특별히 이에 제한되는 것은 아니다. 구체적으로, 상기 L 내의 에틸렌글리콜 반복 단위 부분의 화학식량은 1 내지 100 kDa 범위에 있는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0492] 상기 비펩타이드성 중합체의 분자량은 1 내지 100 kDa 범위, 구체적으로 1 내지 20 kDa 범위, 또는 1 내지 10 kDa 범위이나, 이에 제한되지 않는다. 또한, 상기 F에 해당하는 폴리펩타이드와 결합되는 본 발명의 비펩타이드성 링커는 한 종류의 중합체뿐만 아니라 상이한 종류의 중합체들의 조합이 사용될 수도 있다.

[0493] 하나의 구체적인 실시 형태에서 상기 비펩타이드성 링커의 양 말단은 각각 F, 예컨대 면역글로불린 Fc 단편의 아민기 또는 티올기 및 X의 아민기 또는 티올기에 결합할 수 있다.

[0494] 구체적으로, 상기 비펩타이드성 중합체는 양쪽 말단에 각각 F (예컨대, 면역글로불린 Fc 단편) 및 X와 결합될 수 있는 반응기, 구체적으로는 X, 혹은 F의 N-말단 또는 리신에 위치한 아민기, 또는 시스테인의 티올기와 결합될 수 있는 반응기를 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0495] 또한, F, 예컨대 면역글로불린 Fc 단편 및 X와 결합될 수 있는, 상기 비펩타이드성 중합체의 반응기는 알데히드기, 말레이미드기 및 석시니미드 유도체로 구성된 군으로부터 선택될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0496] 상기에서, 알데히드기로 프로피온 알데히드기 또는 부틸 알데히드기를 예로서 들 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0497] 상기에서, 석시니미드 유도체로는 석시니미딜 발레레이트, 석시니미딜 메틸부타노에이트, 석시니미딜 메틸프로피온에이트, 석시니미딜 부타노에이트, 석시니미딜 프로피오네이트, N-하이드록시석시니미드, 히드록시 석시니미딜, 석시니미딜 카르복시메틸 또는 석시니미딜 카보네이트가 이용될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0498] 비펩타이드성 링커는 이러한 반응기를 통하여 X와 F에 연결될 수 있으나, 특별히 이에 제한되는 것은 아니다.

[0499] 또한, 알데히드 결합에 의한 환원성 아민화로 생성된 최종 산물은 아미드 결합으로 연결된 것보다 훨씬 안정적이다. 알데히드 반응기는 낮은 pH에서 N-말단에 선택적으로 반응하며, 높은 pH, 예를 들어 pH 9.0 조건에서는 리신 잔기와 공유결합을 형성할 수 있다.

[0500] 또한, 상기 비펩타이드성 링커의 양쪽 말단의 반응기는 서로 동일하거나 또는 서로 상이할 수 있으며, 예를 들어, 한쪽 말단에는 말레이미드기를, 다른 쪽 말단에는 알데히드기, 프로피온 알데히드기, 또는 부틸 알데히드기를 가질 수 있다. 그러나, 비펩타이드성 링커의 각 말단에 F, 구체적으로 면역글로불린 Fc 단편과 X가 결합될 수 있다면, 특별히 이에 제한되지 않는다.

[0501] 예를 들어, 상기 비펩타이드성 링커의 한쪽 말단에는 반응기로서 말레이미드기를 포함하고, 다른 쪽 말단에는 알데히드기, 프로피온 알데히드기 또는 부틸 알데히드기 등을 포함할 수 있다.

[0502] 양쪽 말단에 히드록시 반응기를 갖는 폴리에틸렌 글리콜을 비펩타이드성 중합체로 이용하는 경우에는 공지의 화학반응에 의해 상기 히드록시기를 상기 다양한 반응기로 활성화하거나, 상업적으로 입수 가능한 변형된 반응기를 갖는 폴리에틸렌 글리콜을 이용하여 본 발명의 지속형 단백질 결합체를 제조할 수 있다.

[0503] 하나의 구체적인 실시 형태에서 상기 비펩타이드성 중합체는 X의 시스테인 잔기, 보다 구체적으로 시스테인의

-SH 기에 연결되는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

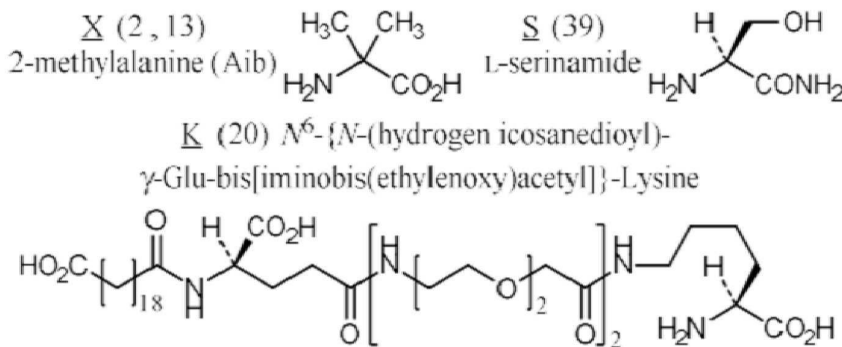
- [0504] 구체적으로, 상기 시스테인 잔기의 -SH 기에 비펩타이드성 중합체의 반응기가 연결될 수 있으며, 반응기에 대해서는 앞서 기술한 내용이 모두 적용된다. 만약, 말레이미드-PEG-알데히드를 사용하는 경우, 말레이미드 기는 X의 -SH 기와 티오에테르(thioether) 결합으로 연결하고, 알데히드기는 F, 구체적으로 면역글로불린 Fc의 -NH₂기와 환원적 아민화 반응을 통해 연결할 수 있으나, 이에 제한되지 않으며, 이는 하나의 일례에 해당한다.
- [0505] 또한, 상기 결합체에서, 비펩타이드성 중합체의 반응기가 면역글로불린 Fc 단편의 N-말단에 위치한 -NH₂와 연결된 것일 수 있으나, 이는 하나의 일례에 해당한다.
- [0506] 또한, 상술한 결합체는 효력의 지속성이 천연형 글루카곤에 비해, 또는 F가 수식되지 않은 X에 비해 증가된 것일 수 있으며, 이러한 결합체는 상술한 형태뿐만 아니라, 생분해성 나노파티클에 봉입된 형태 등을 모두 포함한다.
- [0508] 한편, 본 발명의 GLP-1 수용체 및 GIP 수용체 이중 작용제는 GLP-1 수용체 및 GIP 수용체에 대해 유의한 수준의 활성을 가지는 다양한 물질, 예컨대 화합물 또는 펩타이드 형태의 물질을 포함한다. 본원에서 GLP-1 수용체 및 GIP 수용체 이중 작용제는 “GLP-1/GIP 이중 작용제”, 또는 “이중 작용제”와 혼용되어 사용될 수 있다.
- [0510] 구체적으로, 이중 작용제는 하기 i) 내지 ii) 중 하나 이상의 활성, 구체적으로 유의한 활성을 보유하는 것을 특징으로 한다:
- [0511] i) GLP-1 수용체의 활성화; 및 ii) GIP 수용체의 활성화.
- [0513] 특별히 이에 제한되는 것은 아니나, 상기 GLP-1 (Glucagon-like peptide-1) 수용체 및 GIP (Glucose-dependent insulinotropic polypeptide) 수용체 이중 작용제는, 상기 수용체에 대해 유의한 수준의 활성을 가지는 물질로서, 천연형 GLP-1 및 GIP 뿐만 아니라, GLP-1 수용체 및 GIP 수용체에 대해 *in vitro* 활성이 해당 수용체의 천연형 리간드 (천연형 GLP-1 및 GIP) 대비 0.1% 이상, 1% 이상, 2% 이상, 3% 이상, 4% 이상, 5% 이상, 6% 이상, 7% 이상, 8% 이상, 9% 이상, 10% 이상, 20% 이상, 30% 이상, 40% 이상, 50% 이상, 60% 이상, 70% 이상, 80% 이상, 90% 이상, 100% 이상을 나타내는 것일 수 있으나, 유의적으로 증가한 범위는 제한 없이 포함된다.
- [0515] 이러한 이중 작용제의 *in vitro* 활성을 측정하는 방법은 당업계에 공지된 다양한 *in vitro* 활성을 측정을 이용하여 달성될 수 있으며, 그 예로 본원 명세서의 실시예 2를 참조할 수 있으나, 특별히 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0516] 특별히 이에 제한되는 것은 아니나, 이러한 상기 이중 작용제는 비자연적으로 발생하는 (non-naturally occurring) 것일 수 있다.
- [0518] 상기 GLP-1 수용체 및 GIP 수용체에 대한 활성을 갖는 물질의 예로서, 천연형 GLP-1 및 GIP, 이의 아고니스트 (agonist), 또는 이의 유도체가 있으나, 특별히 이에 제한되는 것일 수 있다. “유도체”는 상기 서술한 바와 같다.
- [0519] 특별히 이에 제한되는 것은 아니나, 상기 GLP-1 수용체 및 GIP 수용체 이중 작용제는 GLP-1 수용체 및 GIP 수용체에 대해 활성을 갖는 펩타이드일 수 있다.
- [0521] 구체적으로, 본 발명의 GLP-1 수용체 및 GIP 수용체 이중 작용제는 GLP-1 수용체 및 GIP 수용체에 대해 활성을 나타내는 GLP-1 또는 GIP의 유도체로서, 당업계에 알려진 GLP-1 수용체 및 GIP 수용체 이중 작용제라면 제한 없이 본 발명의 범주에 포함될 수 있다. 본 발명에 따른 GLP-1 수용체 및 GIP 수용체 이중 작용제는 GLP-1 수용체 및 GIP 수용체에 대해 활성을 나타낼 수 있는 한, 판매되는 것이나, 또는 당업계에 공지된 방법으로 제조한 것

일 수 있다. GLP-1 수용체 및 GIP 수용체 이중 작용제의 예로, tirzepatide, NN9709, SAR-438335 일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0522] 본 발명에 따른 GLP-1 수용체 및 GIP 수용체 이중 작용제의 한 예인, 티르제파티드 (tirzepatide)는 L-tyrosyl-2-methylalanyl-L- α -glutamylglycyl-L-threonyl-L-phenylalanyl-L-threonyl-L-seryl-L- α -aspartyl-L-tyrosyl-L-seryl-L-isoleucyl-2-methylalanyl-L-leucyl-L- α -aspartyl-L-lysyl-L-isoleucyl-L-alanyl-L-glutamyl-N₆-(22S)-22,42-dicarboxy-10,19,24-trioxo-3,6,12,15-tetraoxa-9,18,23-triazadotetracontan-1-oyl]-L-lysyl-L-alanyl-L-phenylalanyl-L-valyl-L-glutamyl-L-tryptophyl-L-leucyl-L-isoleucyl-L-alanyl-glycylglycyl-L-prolyl-L-seryl-L-seryl-glycyl-L-alanyl-L-prolyl-L-prolyl-L-prolyl-L-serinamide(CAS# 2023788-19-2)로 알려져 있으며, 다음과 같은 서열을 갖는 물질이다:

[0523] YXEGTFTSDY SI \underline{X} LDKIAQ \underline{K} AFVQWLIAGG PSSGAPPPS (서열번호 50)

[0524] 여기에서, \underline{X} , \underline{K} 및 \underline{S} 는 각각 다음과 같이 변형된 잔기임.



[0525]

[0527] 한편, 특별히 이에 제한되는 것은 아니나, 본 발명의 GLP-1 수용체 및 GIP 수용체 이중 작용제는 말단이 변형된 형태, 구체적으로 상기 이중 작용제의 일 말단이 아실화 또는 아미드화된 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0529] 본 발명의 펩타이드는 그 길이에 따라 이 분야에서 잘 알려진 방법, 예를 들어 자동 펩타이드 합성기에 의해 합성할 수 있으며, 유전자 조작 기술에 의하여 생산할 수도 있다.

[0530] 구체적으로, 본 발명의 펩타이드는 표준 합성 방법, 제조합 발현 시스템, 또는 임의의 다른 당해 분야의 방법에 의해 제조될 수 있다. 따라서, 본 발명에 따른 펩타이드는, 예를 들어 하기를 포함하는 방법을 포함하는 다수의 방법으로 합성될 수 있다:

[0531] (a) 펩타이드를 고체상 또는 액체상 방법의 수단으로 단계적으로 또는 단편 조립에 의해 합성하고, 최종 펩타이드 생성물을 분리 및 정제하는 방법; 또는

[0532] (b) 펩타이드를 인코딩하는 핵산 작제물을 숙주세포 내에서 발현시키고, 발현 생성물을 숙주 세포 배양물로부터 회수하는 방법; 또는

[0533] (c) 펩타이드를 인코딩하는 핵산 작제물의 무세포 시험관 내 발현을 수행하고, 발현 생성물을 회수하는 방법; 또는

[0534] (a), (b) 및 (c)의 임의의 조합으로 펩타이드의 단편을 수득하고, 이어서 단편을 연결시켜 펩타이드를 수득하고, 당해 펩타이드를 회수하는 방법.

[0535] 보다 구체적인 예로, 유전자 조작을 통하여, 펩타이드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 제조하고 이를 숙주 세포에 형질전환시킨 후, 원하는 펩타이드를 생산할 수 있다.

[0537] 특별히 이에 제한되는 것은 아니나, 본 발명의 조성물은 글루카곤의 *in vitro* 활성이 글루카곤 수용체의 천연형 리간드 활성대비 약 0.1% 이상, 약 1% 이상, 약 2% 이상, 약 3% 이상, 약 4% 이상, 약 5% 이상, 약 6% 이상,

약 7% 이상, 약 8% 이상, 약 9% 이상, 약 10% 이상, 약 20% 이상, 약 30% 이상, 약 40% 이상, 약 50% 이상, 약 60% 이상, 약 70% 이상, 약 80% 이상, 약 90% 이상, 약 100% 이상, GLP-1 수용체 및 GIP 수용체 이중 작용제의 경우 *in vitro* 활성이 해당 수용체의 천연형 리간드 활성의 각각 GLP-1 활성은 약 0.1% 이상, 약 1% 이상, 약 2% 이상, 약 3% 이상, 약 4% 이상, 약 5% 이상, 약 6% 이상, 약 7% 이상, 약 8% 이상, 약 9% 이상, 약 10% 이상, 약 20% 이상, 약 30% 이상, 약 40% 이상, 약 50% 이상, 약 60% 이상, 약 70% 이상, 약 80% 이상, 약 90% 이상, 약 100% 이상, GIP 수용체 활성은 약 0.1% 이상, 약 1% 이상, 약 2% 이상, 약 3% 이상, 약 4% 이상, 약 5% 이상, 약 6% 이상, 약 7% 이상, 약 8% 이상, 약 9% 이상, 약 10% 이상, 약 20% 이상, 약 30% 이상, 약 40% 이상, 약 50% 이상, 약 60% 이상, 약 70% 이상, 약 80% 이상, 약 90% 이상, 약 100% 이상 인 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 특별히 이에 제한되는 것은 아니나, 본 발명의 조성물은 글루카곤의 *in vitro* 활성이 글루카곤 수용체의 천연형 리간드 활성대비 약 0.1% 이상 약 300% 이하, 약 2% 이상 약 300% 이하, 약 3% 이상 약 300% 이하, 약 4% 이상 약 300% 이하, 약 5% 이상 약 300% 이하, 약 6% 이상 약 300% 이하, 약 7% 이상 약 300% 이하, 약 8% 이상 약 300% 이하, 약 9% 이상 약 300% 이하, 약 10% 이상 약 300% 이하, 약 20% 이상 약 300% 이하, 약 30% 이상 약 300% 이하, 약 40% 이상 약 300% 이하, 약 50% 이상 약 300% 이하, 약 60% 이상 약 300% 이하, 약 70% 이상 약 300% 이하, 약 80% 이상 약 300% 이하, 약 90% 이상 약 300% 이하, 약 100% 이상 약 300% 이하, GLP-1 수용체 및 GIP 수용체 이중 작용제의 경우 *in vitro* 활성이 해당 수용체의 천연형 리간드 활성대비 각각 GLP-1 활성은 약 0.1% 이상 약 200% 이하, 약 2% 이상 약 200% 이하, 약 3% 이상 약 200% 이하, 약 4% 이상 약 200% 이하, 약 5% 이상 약 200% 이하, 약 6% 이상 약 200% 이하, 약 7% 이상 약 200% 이하, 약 8% 이상 약 200% 이하, 약 9% 이상 약 200% 이하, 약 10% 이상 약 200% 이하, 약 20% 이상 약 200% 이하, 약 30% 이상 약 200% 이하, 약 40% 이상 약 200% 이하, 약 50% 이상 약 200% 이하, 약 60% 이상 약 200% 이하, 약 70% 이상 약 200% 이하, 약 80% 이상 약 200% 이하, 약 90% 이상 약 200% 이하, 약 100% 이상 약 200% 이하, GIP 수용체 활성은 약 0.1% 이상 약 300% 이하, 약 2% 이상 약 300% 이하, 약 3% 이상 약 300% 이하, 약 4% 이상 약 300% 이하, 약 5% 이상 약 300% 이하, 약 6% 이상 약 300% 이하, 약 7% 이상 약 300% 이하, 약 8% 이상 약 300% 이하, 약 9% 이상 약 300% 이하, 약 10% 이상 약 300% 이하, 약 20% 이상 약 300% 이하, 약 30% 이상 약 300% 이하, 약 40% 이상 약 300% 이하, 약 50% 이상 약 300% 이하, 약 60% 이상 약 300% 이하, 약 70% 이상 약 300% 이하, 약 80% 이상 약 300% 이하, 약 90% 이상 약 300% 이하, 약 100% 이상 약 300% 이하인 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

- [0539] 본 발명의 조성물은 대사증후군의 예방 또는 치료에 사용될 수 있다.
- [0540] 본 발명에서 용어 "예방"은 (i) 글루카곤 활성을 가지는 물질, 및 (ii) GLP-1 수용체 및 GIP 수용체 이중 작용제; 또는 이를 포함하는 조성물의 투여로 목적하는 질환, 예컨대 대사증후군의 발병을 억제 또는 지연시키는 모든 행위를 의미하며, "치료"는 (i) 글루카곤 활성을 가지는 물질, 및 (ii) GLP-1 수용체 및 GIP 수용체 이중 작용제; 또는 이를 포함하는 조성물의 투여로 목적하는 질환, 예컨대 대사증후군의 증세가 호전되거나 이롭게 되는 모든 행위를 의미한다.
- [0541] 본 발명에서 용어 "투여"는 어떠한 적절한 방법으로 환자에게 소정의 물질을 도입하는 것을 의미하며, 상기 조성물의 투여 경로는 특별히 이에 제한되지 않으나, 상기 조성물이 생체 내 표적에 도달할 수 있는 어떠한 일반적인 경로를 통하여 투여될 수 있으며, 예를 들어 복강 내 투여, 정맥 내 투여, 근육 내 투여, 피하 투여, 피내 투여, 경구 투여, 국소 투여, 비 내 투여, 폐 내 투여, 직장 내 투여 등이 될 수 있다.
- [0542] 상기 글루카곤 활성을 가지는 물질, 및 GLP-1 수용체 및 GIP 수용체 이중 작용제는 대사증후군의 예방 또는 치료에 사용될 수 있다.
- [0544] 본 발명의 (i) 글루카곤 활성을 가지는 물질, 및 (ii) GLP-1 수용체 및 GIP 수용체 이중 작용제의 병용 투여는 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)에 대해 효과를 나타낼 뿐만 아니라, 비만 관련 염증, 비만 관련 쓸개 질환 및 비만 유도된 수면 무호흡을 포함한 질환에도 효능을 나타낸다. 또한, 본 발명의 (i) 글루카곤 활성을 가지는 물질, 및 (ii) GLP-1 수용체 및 GIP 수용체 이중 작용제의 병용 투여는 대사증후군 또는 비만과 관련된 간 질환에서도 효능을 나타낼 수 있으나, 이에 한정되지 않는 관련 질환 및 건강 상태를 치료하기 위한 약제로서 사용될 수 있다. 본 발명의 글루카곤 활성을 가지는 물질, 및 GLP-1 수용체 및 GIP 수용체 이중 작용제는 또한 비만 외의 대사증후군, 즉 내당증 장애, 고콜레스테롤혈증, 이상지혈증, 비

만, 당뇨, 고혈압, 간 질환, 이상지혈증에 의한 동맥경화, 죽상동맥경화증, 동맥경화증, 관상동맥 심질환(관동맥성 심장병), 및 뇌졸중 등과 같은 관련 질환의 치료에 사용될 수 있다. 그러나, 이들 병태에 있어서 본 발명에 따른 글루카곤 활성을 가지는 물질, 및 GLP-1 수용체 및 GIP 수용체 이중 작용제의 효과는 전술한 체중 관련 효과를 통해 전체적으로 또는 부분적으로 매개될 수 있거나 이와는 독립적일 수 있다.

[0545] 본 발명에서 용어 "대사증후군(metabolic syndrome)"은 만성적인 대사 장애로 인하여 일어나는 다양한 질환이 단독 또는 복합적으로 일어나는 증상을 말하며, 특히 대사증후군에 해당하는 질환으로는 내당성 장애, 고콜레스테롤혈증, 이상 지혈증(dyslipidemia), 비만, 당뇨, 고혈압, 간 질환, 이상지혈증에 의한 동맥경화, 죽상동맥경화증, 동맥경화증, 관상동맥 심질환(관동맥성 심장병), 및 뇌졸중 등이 있으나, 이에 제한되지는 않는다.

[0546] 본 발명에서 용어 "비만"은 체내에 지방조직이 과도한 상태로, 신체비만지수(체중(kg)을 신장(m)의 제곱으로 나눈 값)가 25 이상이면 비만으로 정의된다. 비만은 오랜 기간에 걸쳐 에너지 소비량에 비해 영양소를 과도하게 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. 비만의 치료는 체중 및 체내 지방의 감소를 통해 이루어질 수 있으나 이에 제한되지 않는다.

[0548] 본 발명에서 용어 "고지혈증(Hyperlipidemia)"은 혈액 내에 유리 콜레스테롤, 콜레스테롤 에스테르, 인지질, 중성 지방 등의 지방질이 비정상적으로 증가된 상태를 말한다. 고지혈증은 일반적으로 그 자체가 특정 증상을 나타내는 것은 아니나, 혈액 내에 과도한 지질은 혈관 벽에 달라붙어 혈관 크기를 줄이며, 염증 반응을 통한 동맥경화(Atherosclerosis)를 일으킨다. 이로 인해 관상동맥 심장질환이나 뇌혈관 질환, 말초 혈관의 폐쇄 등이 발생할 수 있다. 또한 과도한 혈액 내 지질은 간 조직에 축적되게 되며 이로 인해 지방간(Fat liver)이 유발될 수 있다. 상기에서 지방간은 간의 무게에서 지방이 차지하는 비율이 5%를 초과한 상태를 말하며, 과도한 지방 섭취뿐만 아니라 알코올 섭취에 의해서도 유발될 수 있다. 고지혈증의 치료는 혈중 지질수치 개선을 통해 이루어질 수 있으나 이에 제한되지 않는다.

[0550] 본 발명에서 용어 "당뇨"는 인슐린의 분비량이 부족하거나 정상적인 기능이 이루어지지 않는 등의 대사질환의 일종으로, 혈중 포도당의 농도가 높아지는 고혈당을 특징으로 하며, 최근 비만률, 특히 복부 비만의 증가로 인하여 당뇨의 발생률이 폭발적으로 증가하고 있는 추세이다. 만성적인 고혈당 상태에 적절한 치료가 되지 않으면, 신체에서 여러 병적 증상이 수반되는데, 대표적인 것이 망막병증, 신기능장애, 신경병증, 혈관 장애로 인한 뇌졸중, 신장, 심장 질환이나 당뇨병 족부 궤양, 그리고 심혈관계 질환의 위험이 높아지게 된다. 당뇨의 치료는 인슐린 감수성 개선을 통한 혈당 개선을 통해 이루어질 수 있으나 이에 제한되지 않는다.

[0552] 상술한 대사증후군은 간 조직에 축적되는 지방과 그로 인한 염증 발생과 섬유화로 이어지는 간 질환과 밀접한 관련을 갖고, 대사증후군의 예로서 다양한 간질환이 포함될 수 있다.

[0554] 이에, 본 발명의 조성물은 간질환에 대한 예방 또는 치료 용도를 갖는 것일 수 있다. 구체적으로, 본 발명에 따른 (i) 글루카곤 활성을 가지는 물질, 및 (ii) GLP-1 수용체 및 GIP 수용체 이중 작용제를 포함하는 조성물은 간 조직에서의 염증 및/또는 섬유화를 억제하고 개선하는 효과를 나타내어 간질환에 대한 예방 또는 치료 용도를 갖는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0556] 본 발명에서 용어 "간질환"은 간에서 발생하는 질환을 의미하는 것으로, 대사성 간질환을 포함할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 상기 간질환의 대표적인 예로는, 단순 지방증, 비알코올성 지방간, 간 염증, 비알코올성 지방간염, 담즙정체성 간질환(cholestasis liver disease), 간섬유증, 간경변, 간 부전 및 간암등을 들 수 있고, 간의 조직 및 기능에 이상이 생기는 한, 본 발명에 따른 간질환일 수 있다. 알코올 섭취, 약물, 바이러스 감염 외에도 비만, 대사 장애 등에 의해 간에 염증이 발생할 수 있고, 간염증의 진행 및 만성화에 따라 간경변, 간암 등의 질환으로 발병하는 것으로 알려져 있다.

- [0557] 구체적으로, 본 발명에 따른 (i) 글루카곤 활성을 가지는 물질, 및 (ii) GLP-1 수용체 및 GIP 수용체 이중 작용제를 포함하는 조성물은 대사성 증후군과 연관되어, 또는 대사성 증후군으로 인해 발생한 간질환에 대한 예방 또는 치료 효과를 나타낼 수 있다.
- [0559] 본 발명에 따른 (i) 글루카곤 활성을 가지는 물질, 및 (ii) GLP-1 수용체 및 GIP 수용체 이중 작용제를 포함하는 조성물이 치료 효과를 갖는 간질환은 대사성 간질환일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 대사성 간질환은 신체의 비정상적인 화학 반응이 신체의 신진 대사를 방해함으로써 발생하는 질환으로 단순 지방증, 지방간, 지방간염, 비알코올성 지방간 질환 등이 포함된다.
- [0560] 본 발명에서, "비알코올성 지방간 질환 (nonalcoholic fatty liver disease, NAFLD)"은 알코올 섭취 과거력이 없거나 알코올 섭취와 관련이 없으면서도 지방간을 동반하는 경우를 말한다. 지방간은 중성지방이 정상적인 경우와는 다르게 간 세포 내에 비정상적으로 침착되어 보이는 현상이 나타난 것을 말한다. 정상 간은 약 5%가 지방조직으로 구성되어 있으며 중성지방, 지방산, 인지질, 콜레스테롤 및 콜레스테롤 에스터가 지방의 주성분이나, 일단 지방간이 발생되면 대부분의 성분이 중성지방으로 대체되며, 중성지방의 양이 간 중량의 5% 이상이면 지방간으로 진단된다. 지방간은 간세포 내의 지방대사 장애나 과잉지방을 운반하는 과정에서의 결함 등에 의하여 초래되는 것으로서, 주로 간에서의 지방대사 장애로 인하여 발생한다. 상기 지방간에서 축적된 지방의 대부분은 중성지방 (triglyceride)일 수 있다.
- [0561] 비알코올성 지방간질환은 간세포에 지방의 과도한 축적만 있는 단순 지방증(simple steatosis), 비알코올성 지방간 (nonalcoholic fatty liver), 간세포 괴사와 염증과 섬유화를 동반하는 비알코올성 지방간염 (nonalcoholic steatohepatitis, NASH) 등을 포함하는 일련의 질환군을 의미하지만, 본 발명의 조성물로 치료되는 한 이에 제한되는 것은 아니다. 본 발명에 따른 비알코올성 지방간 질환은 비알코올성 지방간염을 수반하는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0563] 또한, 본 발명에 따른 (i) 글루카곤 활성을 가지는 물질, 및 (ii) GLP-1 수용체 및 GIP 수용체 이중 작용제를 포함하는 조성물이 치료 효과를 갖는 간질환은 간 염증(liver inflammation)일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 본 발명에서, "간 염증"은 간질환의 가장 큰 원인으로 간에 염증을 일으키는 질병을 의미하며, 원인과 증상에 따라서 급성간염과 만성간염으로 구별된다. 바이러스, 알코올, 약물, 면역 이상, 대사 질환 등을 주 원인으로 한다.
- [0564] 본 발명에 따른 (i) 글루카곤 활성을 가지는 물질, 및 (ii) GLP-1 수용체 및 GIP 수용체 이중 작용제를 포함하는 조성물은 간의 염증 자체를 완화하는 효과를 가질 뿐만 아니라, 간의 염증을 수반하거나, 간의 염증에 기인하여 발병한 질환, 예를 들어, 간염, 비알코올성 지방간염, 간섬유증 등에 효과를 나타낼 수 있다.
- [0566] 본 발명에서, "비알코올성 지방간염(nonalcoholic steatohepatitis)"은 비알코올성 지방간질환의 하나로, 간 세포 괴사, 염증, 및 섬유화를 수반하는 간 질환의 대표적 예이다. 본 발명에 따른 (i) 글루카곤 활성을 가지는 물질, 및 (ii) GLP-1 수용체 및 GIP 수용체 이중 작용제를 포함하는 조성물은 간 염증 및 섬유화를 억제하여 비알코올성 지방간염에 대한 효과를 나타낼 수 있으며, 구체적으로, 지방간, 간섬유증 또는 간경변을 수반한 비알코올성 지방간염; 또는 비알코올성 지방간염에 의한 간암에 대한 효과를 나타낼 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0567] 구체적으로, 본 발명의 (i) 글루카곤 활성을 가지는 물질, 및 (ii) GLP-1 수용체 및 GIP 수용체 이중 작용제를 포함하는 조성물은 NAS (NAFLD activity score) 감소 효과를 나타내고, 이는 비알코올성 지방간염에 대한 치료 효과를 의미한다.
- [0569] 본 발명에서, "간 섬유증 (liver fibrosis)"은 반복적인 간 손상에 대한 상처 회복 과정의 결과로, 재생 (reparative)이나 반응 과정에서 기관이나 조직에 과도한 섬유성 결합조직이 형성되는 것을 의미한다. 간염증의 만성화 및 심화가 발병의 한 원인으로 알려져 있다. 간경변증과는 달리 가역적이고, 얇은 원섬유(thin fibril)로 구성되며, 결절(nodule) 형성이 없는 것으로 알려져 있고, 간 손상의 원인이 소실되면 정상회복이 가능할 수 있으나, 이러한 간 섬유증 과정이 반복적으로 지속되면 ECM(extra cellular matrix) 간의 교차결합

(crosslinking)이 증가하여 결절(nodule)이 있는 비가역적인 간경변증으로 진행된다. 본 발명에 따른 조성물은 간섬유증, 구체적으로 비알코올성 지방간염을 수반하는 간섬유증에 대한 예방 또는 치료 효과를 나타낼 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

- [0570] 구체적으로, 본 발명의 (i) 글루카곤 활성을 가지는 물질, 및 (ii) GLP-1 수용체 및 GIP 수용체 이중 작용제를 포함하는 조성물은 간섬유증에 효과를 나타낼 수 있으며, 구체적으로, 간조직내 콜라겐 발현이 감소되어 간섬유증을 예방 또는 치료하는 것일 수 있다.
- [0572] 본 발명에서, “담즙정체증 (cholestasis)” 은, 간에서 십이지장으로의 담즙의 유동이 느려지거나 차단된 병태이고, “담즙정체성 간질환(cholestasis liver disease)” 은 간 내부에서, 담즙 형성이 각종 질환, 확장된 경정맥 영양, 또는 특정 약물 (예컨대, 일부 항생제) 의 부작용과 같은과 병태에 의해 방해된 것을 의미한다. 담즙정체증의 통상의 징후에는, 피로, 소양감 (가려움증), 황달, 및 황색종 (피하에의 고콜레스테롤 (cholesterol-rich) 물질의 증착) 이 포함된다. 담즙정체증의 영향은 극심하며 광범위하고, 이는 간 질환의 전신적 질환으로의 악화, 간부전, 및 간 이식의 필요를 초래한다. 담즙정체성 간질환의 원인으로는 급성 간염, 담관의 염증 등을 들 수 있다.
- [0573] 상기 담즙정체성 간질환에는, 원발성 담즙성 담관염 (PBC), 원발성 경화성 담관염 (PSC), 진행성 가족성 간내 담즙정체증 (PFIC), 및 알라질 증후군 (Alagille syndrome) (AS) 등이 포함될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0574] 원발성 담즙성 담관염 (primary biliary cholangitis: PBC)으로도 알려진 원발성 담즙성 경변증은 원인 불명의 만성 담즙정체성 간 질환이다. 문맥 (portal) 및 문맥주위 (periportal) 염증으로 인한 진행성 담관 손상은 진행성 섬유증 및 궁극적 간경화를 일으킬 수 있다. 지금까지는 면역학적, 유전적 및 환경적 요인이 질환에 잠재적인 원인으로 알려져 있다. 원발성 담즙성 경변증은 주로 중년 여성에서 많이 나타나며, 증상은 초기 발현에서 피로, 가려움증 또는 미규명된 고지혈증이 또한 원발성 담즙성 경변증의 증상으로 나타날 수 있다.
- [0575] 현재까지는 원발성 담즙성 경화증이 면역-매개된 질환이라고 알려져 있으며, 구체적으로, 문맥 및 문맥주위 부위에서 T 림프구의 면역조직화학적 염색은 CD4-양성 및 CD8-음성 T 세포를 나타낸다. 또한, 이환된 개체의 무증상 제1-등급 동류 (relatives)에서 비정상 억제자 T-세포 활성이 보고되었다. 인터류킨이 변경된 면역 기능 및 섬유증에 기여함으로써 PBC의 발병기전에 역할을 할 수 있다는 것이 보고되었다 (G.J. Webb et al, J. Autoimmunity, 2015 Nov; 64: 42-52).
- [0576] PBC의 치료방법은 우르소데옥시콜산 (UDSA) 및 오베티콜산 (OCA)을 이용한 담즙산 치료법이다. PBC에서 두 약물의 작용 메커니즘은 FXR 및 TGFR-5를 활성화시켜 항-염증성 효과를 발휘하게 하는 이들의 능력과 연관된다. 그러나, UDCA로 치료된 환자의 약 40%에서 충분한 생화학적 반응을 달성되지 않았다.
- [0577] 원발성 경화성 담관염(Primary sclerosing cholangitis: PSC)는 원인 모를 간내/간의 담도의 염증과 섬유화로 인해 발생하는 만성 진행성 담즙 정체성 간질환이다. 구체적으로, 담관 및 담도의 염증성 질환으로서 질환이 진행되면 섬유화가 일어나 담관벽이 두꺼워지면서 좁아지거나 협착이 오는 질환이다. 아직까지 원인은 불명이나, 유전적 요인, 환경적 요인, 이와 관련된 면역반응 등 다양한 인자가 복합적으로 원인으로 추정하고 있다.
- [0578] 혈액을 통한 간 기능 검사에서 alkaline phosphatase 수치 상승, aminotransferase 수치 상승, 감마글로불린혈증 등이 보이면 원발성 경화성 담관염으로 진단하고 있다.
- [0579] PSC의 치료방법은 아직까지 명확하게 보고된 바 없으며, 간이식 수술이 근본적으로 치료할 수 있는 유일한 치료 방법이다.
- [0580] 이에, 환자 편의성 확보 및 부작용 없이 PBS, 및 PSC를 치료할 수 있는 약물의 개발이 여전히 요구되고 있다.
- [0582] 본 발명의 “간경변(liver cirrhosis)” 은 간세포 재생 및 섬유조직의 증가를 반복하면서 발병하고 병리학적으로 괴사(necrosis), 염증(inflammation) 및 섬유화(fibrosis)가 수반되는 만성질환이며 궁극적으로 간 부전과 같은 간경변 합병증 및 간암 등의 질환으로 진행되어 사망에 이르게 한다. 특히, 초기에 자각증상이 없어 상당히 진행되어서야 발견되기 때문에, 간경변 등으로 진화되기 전의 상태인 간섬유증을 신속히 치료하는 것이 요구된다. 본 발명에 따른 조성물은 간경변, 구체적으로 비알코올성 지방간염을 수반하는 간경변에 대한 예방 또는

치료 효과를 나타낼 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

- [0584] 본 발명의 “간 부전(liver decompensation)”은 바이러스성 간염, 간경변증, 약물 또는 알코올과 같은 간 손상 또는 간 질환으로 인해, 간 기능이 약화되고 간이 정상적인 생리 작용으로서의 단백질 합성과 대사 기능을 수행할 수 없는 상태를 의미한다. 진행 속도에 따라 급성 간부전 또는 만성 간부전으로 나뉘며, 다양한 합병증을 일으키는 것으로 알려져 있다. 본 발명에 따른 조성물은 염증 및 섬유화 억제 등의 효과를 나타내므로, 간 부전에 대한 예방 또는 치료 효과를 나타낼 수 있다.
- [0586] 본 발명의 “간암(hepatocellular carcinoma)”은 간 세포에서 기원하는 악성 종양을 의미하며, 간세포 자체로부터 발생한 원발성 간암 (간세포암; hepatocellular carcinoma)과 다른 조직의 암이 간으로 전이되어 온 전이성 간암으로 구분할 수 있는데, 간암의 약 90% 이상은 원발성 간암이다. 주된 원인으로는 간염, 만성 간질환 외에 알코올, 흡연, 비만 등이 알려져 있다. 본 발명에 따른 조성물은 간암, 구체적으로 비알코올성 지방간염에 의한 간암에 대한 예방 또는 치료 효과를 나타낼 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0588] 본 발명의 실시예에서는 고지방 식이유도 비만 마우스 및 CD-HFD (콜린 결핍 및 고지방, 고콜레스테롤) 식이유도된 마우스 모델을 이용하였다. CD-HFD 식이유도된 모델은 고지방 및 고콜레스테롤 함량을 가지고 있어 장기 섭취 시, 지방간 및 지방간염을 유발할 수 있고, 콜린의 결핍은 이러한 지방간염을 더욱 심화시켜 섬유증까지 유발할 수 있다고 알려져 있다.
- [0590] 본 발명의 실시예에서는 본 발명의 (i) 글루카곤 활성을 가지는 물질, 및 (ii) GLP-1 수용체 및 GIP 수용체 이중 작용제를 포함하는 조성물의 효과를 상기 각 모델에서 확인하였는 바, 이는 대사성 증후군, 간섬유증, 단순 지방증, 지방간, 비알코올성 지방간염 등의 간질환 예방 또는 치료에 유용함을 시사하는 것이다.
- [0592] 본 발명에 따른 조성물은 하기 특성 중 하나 이상의 특성을 수행하는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다:
- [0593] (a) 체중 및 지방 무게 감소;
- [0594] (b) 혈중 지질수치 개선;
- [0595] (c) 인슐린 감수성 개선;
- [0596] (d) UCP-1, 및 PGC-1 α 유전자 발현 감소.
- [0597] (e) NAS (NAFLD activity score) 감소; 및
- [0598] (f) 간조직 내 콜라겐 발현 감소.
- [0600] 본 발명에 따른 조성물은 기존 간 질환 치료제의 부작용인 체중 증가가 없거나 그 정도가 상대적으로 낮은 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0602] 본 발명의 약학적 조성물은 약학적으로 허용가능한 담체, 부형제 또는 희석제를 추가로 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.
- [0603] 본 발명의 글루카곤 활성을 가지는 물질, 및 GLP-1 수용체 및 GIP 수용체 이중 작용제를 포함한 약학적 조성물은 약학적으로 허용가능한 담체를 추가로 포함할 수 있다. 상기 담체는 특별히 이에 제한되지는 않으나, 경구 투여 시에는 결합제, 활택제, 붕해제, 부형제, 가용화제, 분산제, 안정화제, 현탁화제, 색소, 향료 등을 사용할

수 있고, 주사제의 경우에는 완충제, 보존제, 무통화제, 가용화제, 등장화제, 안정화제 등을 혼합하여 사용할 수 있으며, 국소투여용의 경우에는 기제, 부형제, 유회제, 보존제 등을 사용할 수 있다.

[0604] 본 발명의 조성물의 제형은 상술한 바와 같은 약학적으로 허용가능한 담체와 혼합하여 다양하게 제조될 수 있다. 예를 들어, 경구 투여 시에는 정제, 트로키, 캡슐, 엘릭서, 서스펜션, 시럽, 웨이퍼 등의 형태로 제조할 수 있으며, 주사제의 경우에는 단위 투약 앰플 또는 다수회 투약 형태로 제조할 수 있다. 기타, 용액, 현탁액, 정제, 환약, 캡슐, 서방형 제제 등으로 제형화할 수 있다.

[0605] 한편, 제제화에 적합한 담체, 부형제 및 희석제의 예로는 락토스, 텍스트로스, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로스, 메틸 셀룰로스, 미정질 셀룰로스, 폴리비닐피롤리돈, 물, 메틸하이드록시벤조에이트, 프로필하이드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 또는 광물유 등이 사용될 수 있다. 또한, 충진제, 항응집제, 유회제, 습윤제, 향료, 방부제 등을 추가로 포함할 수 있다.

[0606] 또한, 본 발명의 약학적 조성물은 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제, 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제, 멸균된 수용액, 비수성용제, 동결건조제 및 좌제로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나의 제형을 가질 수 있다.

[0608] 또한, 상기 조성물은 약학적 분야에서 통상의 방법에 따라 환자의 신체 내 투여에 적합한 단위 투여형의 제제, 구체적으로는 펩타이드 의약품의 투여에 유용한 제제 형태로 제형화시켜 당업계에서 통상적으로 사용하는 투여 방법을 이용하여 경구, 또는 피부, 정맥 내, 근육 내, 동맥 내, 골수 내, 수막강 내, 심실 내, 폐, 경피, 피하, 복 내, 비강 내, 소화관 내, 국소, 설하, 질 내 또는 직장 경로를 포함하는 비경구 투여 경로에 의하여 투여될 수 있으나, 이들에 한정되는 것은 아니다.

[0609] 또한, 상기 글루카곤 활성을 가지는 물질, 및 GLP-1 수용체 및 GIP 수용체 이중 작용제는 생리식염수 또는 유기 용매와 같이 약제로 허용된 여러 전달체(carrier)와 혼합하여 사용될 수 있고, 안정성이나 흡수성을 증가시키기 위하여 글루코스, 수크로스 또는 텍스트라과 같은 탄수화물, 아스코르브산(ascorbic acid) 또는 글루타티온과 같은 항산화제(antioxidants), 킬레이트제, 저분자 단백질 또는 다른 안정화제(stabilizers) 등이 약제로 사용될 수 있다.

[0610] 본 발명의 약학적 조성물의 투여량과 횟수는 치료할 질환, 투여 경로, 환자의 연령, 성별 및 체중 및 질환의 중증도 등의 여러 관련 인자와 함께, 활성성분인 약물의 종류에 따라 결정된다.

[0611] 특별히 이에 제한되지 않으나, 본 발명의 상기 약학적 조성물은 상기 성분 (유효성분)을 0.01 내지 99% 중량 대 부피로 함유할 수 있다.

[0613] 본 발명의 조성물의 총 유효량은 단일 투여량(single dose)으로 환자에게 투여될 수 있으며, 다중 투여량(multiple dose)으로 장기간 투여되는 분할 치료 방법(fractionated treatment protocol)에 의해 투여될 수 있다. 본 발명의 약학적 조성물은 질환의 정도에 따라 유효성분의 함량을 달리할 수 있다. 구체적으로, 본 발명의 글루카곤 활성을 가지는 물질, 및 GLP-1 수용체 및 GIP 수용체 이중 작용제의 바람직한 전체 용량은 하루에 환자 체중 1 kg당 약 0.0001 µg 내지 500 mg일 수 있다.

[0614] 구체적으로, 본 발명의 조성물은 글루카곤 활성을 가지는 물질을 0.15 내지 2.5, 0.19 내지 2.25, 0.25 내지 1.5, 0.37 내지 1.12 nmol/kg으로, GLP-1 수용체 및 GIP 수용체 이중 작용제를 2.0 내지 35, 2.08 내지 31.16, 10.39 내지 31.16 nmol/kg으로 포함하는 것일 수 있고, 보다 구체적으로, 글루카곤 활성을 가지는 물질을 0.37, 0.75, 또는 1.12 nmol/kg으로, GLP-1 수용체 및 GIP 수용체 이중 작용제를 10.39, 20.77, 또는 31.16 nmol/kg으로 포함하는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 또한, 본 발명의 조성물은 글루카곤 활성을 가지는 물질 : GLP-1 수용체 및 GIP 수용체 이중작용제를 1 : 0.1 내지 1 : 500, 1 : 0.5 내지 1 : 250, 1 : 0.9 내지 1 : 167, 또는 1 : 10 내지 1 : 56.2의 몰비로 포함하는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0615] 그러나 상기 펩타이드의 용량은 약학적 조성물의 투여 경로 및 치료 횟수뿐만 아니라 환자의 연령, 체중, 건강 상태, 성별, 질환의 중증도, 식이 및 배설물 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 보이

는 한 그 제형, 투여 경로 및 투여 방법에 특별히 제한되지 아니한다.

- [0616] 본 발명의 약학적 조성물은 생체 내 지속성 및 역가가 우수할 수 있으며, 다른 약제에 비해 낮은 투여 횟수 및 빈도를 나타낼 수 있으나, 특별히 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0617] 특히, 본 발명의 약학적 조성물은 천연 글루카곤에 비해 변화된 pI를 갖는 글루카곤 유도체를 유효성분으로 포함하기 때문에 중성 pH에서 개선된 용해도 및/또는 높은 안정성을 나타내므로 대사증후군을 비롯한 목적하는 질환의 치료를 위한 안정한 글루카곤 제형의 제조에 유용하게 사용될 수 있다.
- [0619] 상기 대사증후군의 예방 또는 치료를 위한 약학적 조성물, 또는 대사증후군의 예방 또는 치료를 위한 요법 등에 있어서, 글루카곤 수용체에 대한 활성을 갖는 물질; 및/또는 GLP-1 수용체 및 GIP 수용체 이중 작용제 외에도 대사증후군에 대한 치료적 활성을 가지는 화합물 또는 물질을 포함할 수 있으며, 상기 요법은 상기 화합물 또는 물질의 추가 사용을 포함할 수 있다.
- [0621] 본 발명을 구현하는 다른 하나의 양태는 글루카곤 수용체에 대한 활성을 갖는 물질; 및 GLP-1 수용체 및 GIP 수용체 이중 작용제를 이를 필요로 하는 개체에 투여하는 단계를 포함하는, 대사증후군의 예방 또는 치료 방법을 제공한다.
- [0622] 상기 글루카곤 수용체에 대한 활성을 갖는 물질, GLP-1 수용체 및 GIP 수용체 이중 작용제, 이를 포함하는 조성물, 대사증후군, 예방, 및 치료에 대해서는 앞서 설명한 바와 같다.
- [0623] 본 발명에서 상기 개체는 대사증후군 (metabolic syndrome)이 의심되는 개체로서, 상기 대사증후군 (metabolic syndrome) 의심 개체는 해당 질환이 발병하였거나 발병할 수 있는 인간을 포함한 쥐, 가축 등을 포함하는 포유동물을 의미하나, 본 발명의 글루카곤 유도체 혹은 이를 포함하는 상기 조성물로 치료 가능한 개체는 제한 없이 포함된다. 또한, 본 발명의 약학적 조성물을 대사증후군 의심 개체에 투여함으로써, 개체를 효율적으로 치료할 수 있다. 대사증후군에 대해서는 상기에서 설명한 바와 같다.
- [0624] 본 발명의 방법은 (i) 글루카곤 수용체에 대한 활성을 갖는 물질 및 (ii) GLP-1 수용체 및 GIP 수용체 이중 작용제를 포함하는 약학적 조성물을 약학적 유효량으로 투여하는 것을 포함할 수 있다. 본 발명에 따른 방법은 (i) 글루카곤 수용체에 대한 활성을 갖는 물질 및 (ii) GLP-1 수용체 및 GIP 수용체 이중 작용제를 하나의 제제로서 투여하거나, 또는 개별 제제를 동시, 개별, 순차 또는 역순으로 투여하는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0625] 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.
- [0626] 구체적으로, 글루카곤 수용체에 대한 활성을 갖는 물질 및 GLP-1 수용체 및 GIP 수용체 이중 작용제는 각각 하루에 환자 체중 1 kg당 약 0.0001 mg 내지 500 mg 투여되는 것일 수 있고, 두 물질을 병용할 때에는 총량이 하루에 환자 체중 1 kg당 약 0.0001 mg 내지 1000 mg 투여되는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0627] 또한, 병용 투여되는 글루카곤 수용체에 대한 활성을 갖는 물질 및 GLP-1 수용체 및 GIP 수용체 이중 작용제는 1:0.01 내지 1:100의 몰비로 투여될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0628] 구체적으로, 글루카곤 활성을 가지는 물질을 0.15 내지 2.5, 0.19 내지 2.25, 0.25 내지 1.5, 0.37 내지 1.12 nmol/kg으로, GLP-1 수용체 및 GIP 수용체 이중 작용제를 2.0 내지 35, 2.08 내지 31.16, 10.39 내지 31.16 nmol/kg으로 투여하는 것일 수 있고, 보다 구체적으로, 글루카곤 활성을 가지는 물질을 0.37, 0.75, 또는 1.12 nmol/kg으로, GLP-1 수용체 및 GIP 수용체 이중 작용제를 10.39, 20.77, 또는 31.16 nmol/kg으로 투여하는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 또한, 글루카곤 활성을 가지는 물질 : GLP-1 수용체 및 GIP 수용체 이중 작용제를 1 : 0.1 내지 1 : 500, 1 : 0.5 내지 1 : 250, 1 : 0.9 내지 1 : 167, 또는 1 : 10 내지 1 : 56.2의 몰비로 투여하는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0630] 한편, 특별히 이에 제한되지 않으나, 상기 대사증후군의 예방 또는 치료 방법은 (i) 글루카곤 수용체에 대한 활성을 갖는 물질 및 (ii) GLP-1 수용체 및 GIP 수용체 이중 작용제 외에, 하나 이상의 대사증후군에 대한 치료적 활성을 가지는 화합물 또는 물질을 투여하는 것을 더 포함하는 병용요법일 수 있다.

[0632] 본 발명을 구현하는 다른 하나의 양태는 (i) 글루카곤 수용체에 대한 활성을 갖는 물질 및 (ii) GLP-1 수용체 및 GIP 수용체 이중 작용제를 포함하는 조성물의 대사증후군 예방 또는 치료 용도를 제공한다.

[0634] 본 발명을 구현하는 다른 하나의 양태는 대사증후군 예방 또는 치료를 위한, (i) 글루카곤 수용체에 대한 활성을 갖는 물질 및 (ii) GLP-1 수용체 및 GIP 수용체 이중 작용제를 포함하는 조성물의 약제 제조를 위한 용도를 제공한다.

[0636] 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.

[0638] **실시예 1: 글루카곤에 대해 cAMP 반응을 보이는 세포주의 생산**

[0640] 인간 글루카곤 수용체 유전자의 cDNA(OriGene Technologies, Inc. USA)에서 ORF에 해당하는 부분을 주형으로 하고, EcoRI 절단부위와 XhoI 절단부위를 각각 포함하는 하기 서열번호 48 및 49의 정방향 및 역방향 프라이머를 이용한 PCR을 수행하였다.

[0641] 이때, PCR 반응은 95°C에서 60초의 변성, 55°C에서 60초의 어닐링 및 68°C에서 30초의 신장 과정을 30회 반복 수행하였다. 이로부터 증폭된 PCR 산물을 1.0% 아가로스 겔에서 전기 영동한 후 450 bp 크기의 밴드를 용리하여 수득하였다.

[0643] 정방향 프라이머(서열번호 48):

[0644] 5'-CAGCGACACCGACCGTCCCCCGTACTTAAGGCC-3'

[0645] 역방향 프라이머(서열번호 49):

[0646] 5'-CTAACCGACTCTCGGGGAAGACTGAGCTCGCC-3'

[0648] 상기 PCR 산물을 공지된 동물세포 발현벡터인 xOGC/dhfr에 클로닝하여 재조합 벡터 xOGC/GCGR을 제조하였다.

[0649] 상기 제조한 재조합 벡터 xOGC/GCGR를 10% FBS 함유 DMEM/F12 배지에서 배양한 CHO DG44 세포에 리포펙타민을 이용하여 형질전환하고, 1 mg/mL G418 및 10 nM 메토티렉세이트를 포함하는 선별배지에서 선별 배양하였다. 이로부터 제한 희석법으로 단일 클론 세포주를 선별하고, 이 중에서 글루카곤에 대해 우수한 농도의존적 cAMP 반응을 보이는 세포주를 최종적으로 선별하였다.

[0651] **실시예 2: 글루카곤 유도체의 합성**

[0653] 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. 이에 기재된 상대적 *in vitro* 활성은 하기 실시예 4에 기술된 방법으로 측정하였다.

표 1

글루카곤 친연형 및 글루카곤 유도체 아미노산 서열

서열번호	펩타이드 서열	고리 형성 여부	pI	In vitro 활성(서열번호 1에 대한 상대적 활성,%)
서열번호 1	HSQGTFTSDYSKYLDSRRAQDFVQWLMNT	-	6.8	100
서열번호 2	HSQGTFTSDYSKYLDCDRAQDFVQWLMNT	-	4.56	0.6
서열번호 3	HSQGTFTSDYSKYLDCERAQDFVQWLMNT	-	4.66	6.1
서열번호 4	HSQGTFTSDYSKYLDSCEAQDFVQWLMNT	-	4.13	< 0.1
서열번호 5	HSQGTFTSDYSKYLDSCEAQDFVQWLMNT	-	4.22	0.3
서열번호 6	HSQGTFTSDYSKYLDSCEADDFVQWLMNT	-	4.03	< 0.1
서열번호 7	YSQGTFTSDYSKYLDSCEADDFVQWLMNT	-	3.71	< 0.1
서열번호 8	YXQGTFTSDYSKYLDSCEAQDFVQWLINT	-	3.77	< 0.1
서열번호 9	YXQGTFTSDYSKYLDSCEADDFVQWLINT	-	3.77	< 0.1
서열번호 10	YXQGTFTSDYSKYLDSCEADDFVQWLINT	-	3.66	< 0.1
서열번호 11	YXQGTFTSDYSKYLDEKCAKEFVQWLMNT	-	4.78	4.6
서열번호 12	YXQGTFTSDYSKYLDEKRAKEFVQWLMNTC	고리 형성	6.20	56.3
서열번호 13	YXQGTFTSDYSKYLDSRRAQDFVQWLMNT	-	4.43	5.2
서열번호 14	YXQGTFTSDYSKYLDCRRAQDFVQWLMNT	-	8.12	18.1
서열번호 15	YXQGTFTSDYSKYLCEKRAQDFVQWLMNT	-	6.11	1.1
서열번호 16	YXQGTFTSDYSKYLDCRRAQDFVQWLMRT	-	9.11	4.2
서열번호 17	YXQGTFTSDYSKYLDCVRAQDFVQWLMRT	-	6.03	23.2
서열번호 18	YXQGTFTSDYSKYLDSRRACDFRLWLMNT	-	8.15	< 0.1
서열번호 19	YXQGTFTSDYSKYLCEKRAKEFVQWLMNT	고리 형성	8.12	12.1
서열번호 20	YXQGTFTSDYSKYLDECKRAKEFVQWLMNT	고리 형성	4.78	299.7
서열번호 21	YXQGTFTSDYSKYLDEKCAKEFVQWLMNT	고리 형성	4.78	57.8
서열번호 22	YXQGTFTSDYSKYLDEKRAKEFVQWLMNT	고리 형성	6.20	147.8
서열번호 23	YXQGTFTSDYSKYCDEKRAKEFVQWLMNT	고리 형성	6.20	76.8
서열번호 24	YXQGTFTSDYSKCLDEKRAKEFVQWLMNT	고리 형성	6.21	58.0
서열번호 25	YXQGTFTSDYSKYLDEKRAKCFVQWLMNT	고리 형성	8.12	46.9
서열번호 26	WXQGTFTSDYSKYLDECKRAKDFVQWLMNT	고리 형성	4.68	1.0
서열번호 27	YXQGTFTSDYSKYLDECKRAKDFVQWLMNT	고리 형성	4.68	93.6
서열번호 28	WXQGTFTSDYSKYLDECKRAKDFVQWLMNT	고리 형성	4.68	< 0.1
서열번호 29	YXQGTFTSDYSKCLDEERRAKDFVQWLMNT	고리 형성	6.15	61.3
서열번호 30	WXQGTFTSDYSKCLDEERRAKDFVQWLMNT	고리 형성	4.44	0.3
서열번호 31	YXQGTFTSDYSKYLDCRRAKEFVQWLMNT	고리 형성	8.12	6.3
서열번호 32	-SQGTFTSDYSKYLDECKRAKEFVQWLMNT	고리 형성	4.78	0.7
서열번호 33	YXQGTFTSDYSKYLDSRRAQDFVQWLMNT	-	6.04	108.2
서열번호 34	WXQGTFTSDYSKYCDEERRAKDFVQWLMNT	고리 형성	6.21	0.2
서열번호 35	YXQGTFTSDYSKYCDEERRAKDFVQWLMNT	고리 형성	6.2	17.7
서열번호 36	YXQGTFTSDYSKYLDEERRAKDFVQWLMNT	고리 형성	6.21	9.9
서열번호 37	YXQGTFTSDYSKYLDEERRAKDFVQWLMNTC	고리 형성	6.21	225.5
서열번호 38	YXQGTFTSDYSKYLDEERRAKDFVQWLMNT	고리 형성	6.15	167.3
서열번호 39	YXQGTFTSDYSKYLDEERRAKDFVQWLMNT	고리 형성	6.15	3.7
서열번호 40	YXQGTFTSDYSKYLDEERRAKDFVQWLMNTC	고리 형성	6.15	40.8
서열번호 41	YXQGTFTSDYSKYLDEERRAKDFVQWLMNT	고리 형성	6.03	45.2
서열번호 42	YXQGTFTSDYSKYLDSRRAQDFVQWLMNT	-	6.03	37.9
서열번호 43	YXQGTFTSDYSKYLDSRRAQDFVQWLMNT	-	6.03	1.6
서열번호 44	YXQGTFTSDYSKYLDSRRAQDFVQWLMNTC	-	6.21	75.4
서열번호 45	YXQGTFTSDYSKYLDEKRAKEFVQWLMNT	-	4.78	5.2

[0655]

상기 표 1에 기재된 서열에서 X로 표기된 아미노산은 비친연형 아미노산인 아미노이소부티르산(Aib)을, 아미노산 기호 아래 밑줄은 밑줄 친 해당 아미노산 쌍의 측쇄들 사이에서 락탐 고리의 형성을, 그리고 "-"는 해당 위치에는 아미노산 잔기가 없음을 나타낸다. 또한, 고리형성 여부에 대한 열에서 "-"은 해당 서열에는 고리가 형성되어 있지 않음을 가리킨다.

[0657] **실시예 3: 글루카곤 유도체의 pI 측정**

[0659] 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.

[0660] 상기 표 1에 나타난 바와 같이, 서열번호 1의 천연 글루카곤이 6.8의 pI를 갖는 반면, 본 발명에 따른 일부의 글루카곤 유도체는 약 4 내지 6 범위의 pI를 가졌다. 이러한 글루카곤 유도체는 천연 글루카곤에 비해 낮거나, 높은 pI를 갖기 때문에 중성 pH 등에서 천연형 글루카곤에 비해 개선된 용해도 및 높은 안정성을 나타낼 수 있다.

[0661] 이와 같은 본 발명에 따른 글루카곤 유도체는 대사증후군 등 목적하는 질환에 대한 치료제로 사용시 환자 순응도를 높일 수 있으며, 다른 항비만 치료제 또는 당뇨 치료제와 병용 투여에 적합하여 비만, 당뇨, 비알코올성 지방간염(nonalcoholic steatohepatitis, NASH), 이상지혈증, 관동맥성 심장병을 비롯한 대사증후군(metabolic syndrome) 치료제로서 유용하게 사용할 수 있다.

[0663] **실시예 4: 글루카곤 유도체의 cAMP 활성 측정**

[0665] 실시예 1에서 생산된 인간 글루카곤 수용체를 가진 세포주에서 실시예 2에서 합성된 글루카곤 유도체의 활성을 측정 하였다. 구체적으로, 상기 형질전환 세포주를 1주일에 3회 또는 4회 계대 배양한 후 384-웰 플레이트에 각 웰당 6×10^3 개의 계대배양된 세포주를 분주하여 24시간 동안 배양하였다. 상기 배양된 세포에 0.5 mM IBMX(3-isobutyl-1-methylxanthine), 0.1% BSA(Bovine serum albumin), 5mM HEPES(4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid)를 포함하는 HBSS(Hank's Balanced Salt Solution) 완충액에 천연형 글루카곤은 200 nM로, 글루카곤 유도체는 1600 nM로 각각 현탁 시킨 다음 4배씩 10회 연속적으로 희석 하고 이를 cAMP 어세이 키트(LANCE cAMP 384 kit, PerkinElmer)에 적용하여 상기 세포에 첨가한 다음 형광 값을 측정하였다. 측정 후 가장 높은 형광 값을 100%로 선정한 뒤 이로부터 글루카곤 유도체들의 EC₅₀ 값을 산출한 후 천연형 글루카곤과 상호 비교하였다. 그 결과를 상기 표 1에 나타내었다.

[0667] **실시예 5: 글루카곤 유도체와 면역글로불린 Fc를 포함하는 결합체의 제조(글루카곤 유도체-면역글로불린 Fc 영역 결합체)**

[0669] 대표적인 글루카곤 유도체로 상기 실시예 2에서 제조한 pI값이 6-7이고, in vitro 활성이 200%이상인 글루카곤 유도체를 선택하여 결합체를 제조하였다. 구체적으로, 양 말단에 각각 말레이미드기 및 알데히드기를 가지는 10kDa의 PEG, 즉 말레이미드-PEG-알데히드 (10kDa, NOF, 일본)를 글루카곤 유도체의 시스테인 잔기에 폐길화시키기 위하여, 글루카곤 유도체와 말레이미드-PEG-알데히드의 몰비를 1:1~5, 단백질의 농도를 3~10 mg/ml로 하여 저온에서 1~3 시간 동안 반응시켰다. 이때, 반응은 50 mM Tris 완충액(pH 7.5)에 20~60 % 아이소프로판올이 첨가된 환경하에서 수행되었다. 반응이 종료된 후, 상기 반응액을 SP sepharose HP(GE healthcare, 미국)에 적용하여 시스테인에 모노-폐길화된 글루카곤 유도체를 정제하였다.

[0670] 다음으로, 상기 정제된 모노-폐길화된 글루카곤 유도체와 면역글로불린 Fc(서열번호 71의 동종이합체)을 몰비가 1:2~10, 단백질의 농도를 10~50mg/ml로 하여 4~8℃에서 12~18시간 동안 반응시켰다. 반응액은 100 mM 인산칼륨 완충액(pH 6.0)에 환원제인 10~50 mM 소디움시야노보로하이드라이드와 10~20% 아이소프로판올이 첨가된 환경 하에서 수행되었다. 반응이 종료된 후, 상기 반응액을 Butyl sepharose FF 정제컬럼(GE healthcare, 미국)과 Source ISO 정제컬럼 (GE healthcare, 미국)에 적용하여, 글루카곤 유도체와 면역글로불린 Fc를 포함하는 결합체를 정제하였다.

[0671] 한편, 상기 면역글로불린 Fc는 서열번호 71의 아미노산 서열 (221개의 아미노산으로 구성됨)을 갖는 단량체 2개

가 각 단량체의 3번 아미노산인 시스테인 사이에 이황화 결합을 통해 동종이합체를 형성하고, 상기 동종이합체의 단량체는 각각 독립적으로 35번 및 95번의 시스테인 간의 내부의 이황화 결합 및 141번 및 199번의 시스테인 간의 내부의 이황화 결합이 형성된 것이다.

[0673] 제조 후 역상 크로마토그래피, 크기배제 크로마토그래피 및 이온교환 크로마토그래피로 분석한 순도는 95 % 이상이었다.

[0674] 여기서, 글루카곤 유도체 및 면역글로불린 Fc가 PEG를 통하여 연결된 결합체를, '글루카곤 유도체 지속형 결합체', 또는 '지속형 글루카곤 유도체'로 명명하였고, 이들은 본원에서 혼용되어 사용될 수 있다.

[0676] **실시예 6: GLP-1과 GIP에 대해 cAMP 반응을 보이는 세포주의 생산**

[0678] 인간 GLP-1 수용체, 및 인간 GIP 수용체를 발현 할 수 있도록 재조합 벡터를 발현 벡터 X0GC/dhfr를 사용하여 제작 후 CHO DG44 세포에 리포펙타민을 이용하여 형질전환하고, G418 및 메토티렉세이트를 포함하는 선별배지에서 선별 배양하였다. 이로부터 제한 희석법으로 단일 클론 세포주를 선별하고, 이 중에서 GLP-1 및 GIP에 대해 우수한 농도의존적 cAMP 반응을 보이는 세포주를 최종적으로 선별하였다.

[0680] **실시예 7: 아실화된 GLP-1 수용체 및 GIP 수용체 이중작용제 제조**

[0682] GLP-1 수용체 및 GIP 수용체에 모두 활성을 나타내는 이중작용제인 tirzepatide를 합성하였으며 그 제조방법은 공지된 방법(WO2016-111971 A1)을 참조하였다.

[0684] **실시예 8 : 아실화된 GLP-1 수용체 및 GIP 수용체 이중작용제의 cAMP 활성 측정**

[0686] 실시예 6에서 생산된 인간 GLP-1 수용체 및 인간 GIP 수용체를 발현하는 세포주에서 실시예 7에서 합성된 이중작용제의 활성을 측정 하였다.

[0688] 구체적으로, 상기 실시예 6의 형질전환 세포주를 1주일에 3회 또는 4회 계대 배양한 후, 384-웰 플레이트에 각 웰당 6×10^3 개의 계대배양된 세포주를 분주하여 24시간 동안 배양하였다. 상기 배양된 세포에 0.5 mM IBMX(3-isobutyl-1-methylxanthine), 0.1% BSA (Bovine serum albumin), 5mM HEPES(4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid)를 포함하는 HBSS(Hank's Balanced Salt Solution) 완충액에 천연형 GLP-1 및 GIP는 200 nM로, 이중작용제는 1600 nM로 각각 현탁 시킨 다음 4배씩 10회 연속적으로 희석 하고 이를 cAMP 어세이 키트(LANCE cAMP 384 kit, PerkinElmer)에 적용하여 각각의 상기 세포에 첨가한 다음 형광 값을 측정하였다. 이후, 각각의 세포주에서 사용한 가장 높은 농도의 천연형 물질의 형광 값을 100%로 선정한 뒤 이로부터 이중작용제의 EC₅₀ 값을 산출하였으며, 이를 천연형 GLP-1 및 GIP와 상호 비교하였다. 그 결과를 하기 표 2에 나타내었다.

표 2

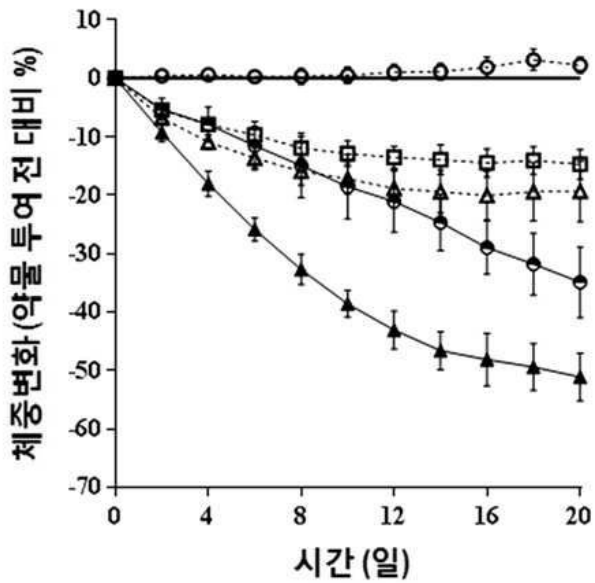
[0690] 시험물질	천연형 리간드 (EC ₅₀) 대비 상대적 <i>in vitro</i> 활성	
	GLP-1 수용체	GIP 수용체
이중작용제 (tirzaptide)	1.3%	6.7%

- [0692] **실험예 1: 고지방 식이유도된 비만 마우스에서 지속형 글루카곤 유도체 와 이중작용제의 체중 및 지방 무게 감소, 혈중 지질수치 개선, 인슐린 감수성 개선 및 에너지 대사 유전자 증가 효력 비교 및 병용 투여에 의한 추가 효력 확인**
- [0694] 비만 동물 모델로 널리 사용되고 있는 고지방 식이유도 비만 마우스를 이 연구를 위해 사용하였다. 마우스의 체중은 투여 전에 약 50-55g이었다. 연구 기간 동안 마우스는 7마리씩 수용되었고 물에 자유롭게 접근하도록 하였다. 빛은 6 PM에서 6 AM까지 꺼두었다.
- [0695] 고지방 식이 급식된 시험군은, 군 1: 지속형 글루카곤 유도체가 함유되지 않은 부형제 투여 (5 ml/kg, 2일 1회 주사)-대조군 (Vehicle), 군 2: GLP-1 유사체 비만치료제 삭센다 (Saxenda[®]) 50 nmol/kg (1일 2회 주사), 군 3: 지속형 글루카곤 유도체 2.0 nmol/kg (2일 1회 주사), 군 4: 이중작용제(tirzepatide) 20 nmol/kg (2일 1회 주사), 군 5: 이중작용제 20 nmol/kg (2일 1회 주사) 와 지속형 글루카곤 유도체 2.0 nmol/kg (2일 1회 주사)의 병용 투여가 있다. 모든 투여는 피하 주사로 이루어졌다.
- [0697] 실험은 21일째 종료하였으며, 실험이 진행되는 동안 2일 단위로 각 군에 해당하는 마우스의 체중변화를 측정하였으며 실험이 종료된 후, 지방 무게, 혈중 지질 수치 및 HOMA-IR 그리고 조직에서의 에너지 대사 관련 유전자 발현을 확인하였다.
- [0699] 체중 변화를 측정한 결과, 도 1에서 확인할 수 있듯이, 지속형 글루카곤 유도체 (2.0 nmol/kg, 2일 1회 투여) 단독 투여군과 지속형 글루카곤 유도체 (2.0 nmol/kg, 2일 1회 투여) 및 이중작용제(tirzepatide) 20 nmol/kg (2일 1회 주사) 병용 투여 군은 각각 투여 전 대비 -34.92%, -51.16%로 지속형 글루카곤 유도체의 단독 투여군 보다 병용 투여군에서 우수한 체중 감소 효력을 보였으며, 그 효과는 대조군 (Vehicle), GLP-1 유사체 비만치료제 삭센다 (Saxenda[®]), 및 이중작용제(tirzepatide) 의 체중 감소 효력인 2.22%, -14.73% 그리고 -19.39% 보다 우수하였다.
- [0701] 또한, 도 2 (A) 및 (B) 에서 확인할 수 있듯이 체중감소와 함께 지방 무게 및 혈중지질 수치의 두드러진 감소를 확인 하였고, 도 3 (A)에서와 같이 인슐린 감수성 역시 개선된 것을 HOMA-IR 측정 결과를 통해 확인하였다. 더 나아가, 도 3 (B)에서와 같이 지방 조직에서의 에너지 대사 관련 유전자의 (열 에너지 생성 관련 표지자인 UCP-1과 미토콘드리아 생합성 관련 표지자인 PGC-1 α) 발현 증가도 확인하였다.
- [0703] **실험예 2: 콜린 결핍 및 고지방, 고콜레스테롤 식이로 유도된 NASH 및 섬유증 마우스에서 지속형 글루카곤 유도체와 이중작용제의 NASH 및 섬유증 개선효과**
- [0705] 상기 실시예에서 제조된, 본 발명에 따른 제조된 지속형 글루카곤 유도체와 GLP-1/GIP 이중작용제(tirzaptide)의 병용에 따른 NASH 및 섬유화(fibrosis) 개선 효능을 확인하기 위해, CD-HFD (콜린 결핍 및 고지방, 고콜레스테롤) 식이 마우스 모델을 사용하였다.
- [0706] 8주 CD-HFD 식이로 유도된 마우스를 부형제 대조군, 지속형 글루카곤 유도체 (1.3 nmol/kg, Q2D, 피하) 투여군, 이중작용제 (73 nmol/kg, Q2D, 피하) 투여군, 그리고 지속형 글루카곤 유도체와 이중작용제의 병용투여군으로 나누었고, 6주간 반복투여를 진행하였다. 음성 대조군으로는 정상 식이 마우스에 부형제를 투여한 군을 사용하였다. 6주 반복투여 후 부검으로 각 마우스의 간조직을 취하였고, H&E 염색을 통한 NAS (NAFLD activity score) 및 정량(quantitative) PCR을 통한 콜라겐(collagen) 발현 측정으로 NASH 및 섬유화 개선효능을 평가하였다.

- [0708] 그 결과, 지속형 글루카곤 유도체 혹은 이중작용체를 6주간 반복 투여 시, CD-HFD 식이, 부형제 대조군 대비 NAS가 유의적으로 감소한 것을 확인하였다.
- [0709] 더 나아가, 지속형 글루카곤 유도체와 이중작용체를 병용투여 시, 추가적인 NAS 감소가 유의적으로 나타남을 확인(도 4)함으로써, 지속형 글루카곤 유도체와 GLP-1/GIP 이중작용체의 NASH 개선 효능이 병용투여를 통해 추가 개선될 수 있음을 확인하였다.
- [0711] 뿐만 아니라, CD-HFD 식이, 부형제 군에서 증가한 간조직 내 콜라겐 발현이 지속형 글루카곤 유도체 또는 이중작용체 투여에 의해 유의적으로 감소하였고, 이러한 감소 역시 지속형 글루카곤 유도체 또는 이중작용체의 병용투여를 통해 추가 개선되는 것을 확인하였다 (도 5).
- [0713] NAS 감소 및 간조직 내 콜라겐 발현 감소 효과를 통해 지속형 글루카곤 유도체와 GLP-1/GIP 이중작용체의 병용투여로 CD-HFD 식이 마우스에서 우수한 NASH 및 간 섬유화 개선 효능을 얻을 수 있음을 확인하였다.
- [0715] 모든 통계 처리는 1원 ANOVA를 사용하여 부형제 군(대조군) 및 시험군 사이를 비교하였고, t-test를 사용하여 단독투여 대비 병용투여군의 추가효능을 비교하였다 (* ~ *** $p < 0.05 \sim 0.001$ vs. 부형제 대조군).
- [0717] 이와 같은 결과는 지속형 글루카곤 유도체가 다른 비만 치료제인 GLP-1 유사체 및 이중작용체 단독 보다 우수한 체중 감소 효력을 나타냄을 시사한다. 나아가 지속형 글루카곤 유도체를 GLP-1 수용체 및 GIP 수용체 이중작용체와 병용 투여할 경우, 추가적인 체중 감소를 통해 강화된 비만 치료 효과를 기대할 수 있을 뿐만 아니라 인슐린 감수성을 개선 시켜 혈당 개선 효과도 기대할 수 있음을 확인하였다. 또한, 이러한 비만 및 혈당 개선 효과와 더불어, NAS 감소 및 간조직 내 콜라겐 발현 감소를 통해 비알코올성 지방간염 또는 이에 기인한 간섬유증과 같은 간질환에 있어서도, 지속형 글루카곤 유도체와 GLP-1 수용체 및 GIP 수용체 이중작용체와 병용 투여시 우수한 효과를 얻을 수 있음을 확인하였다.
- [0719] 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 실시 예들은 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.

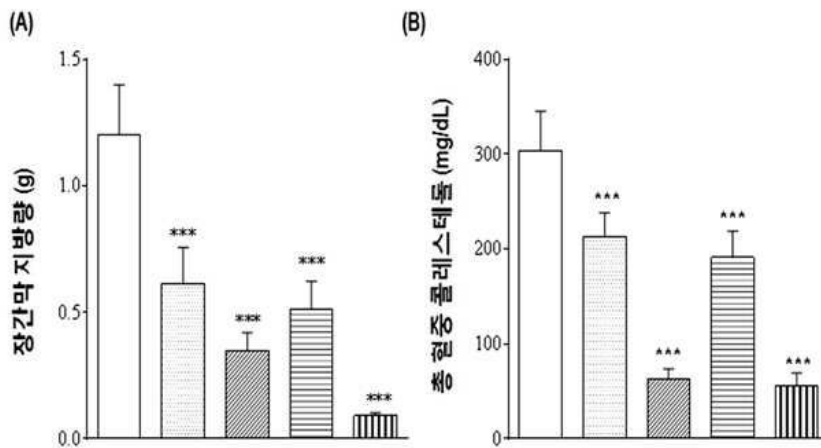
도면

도면1



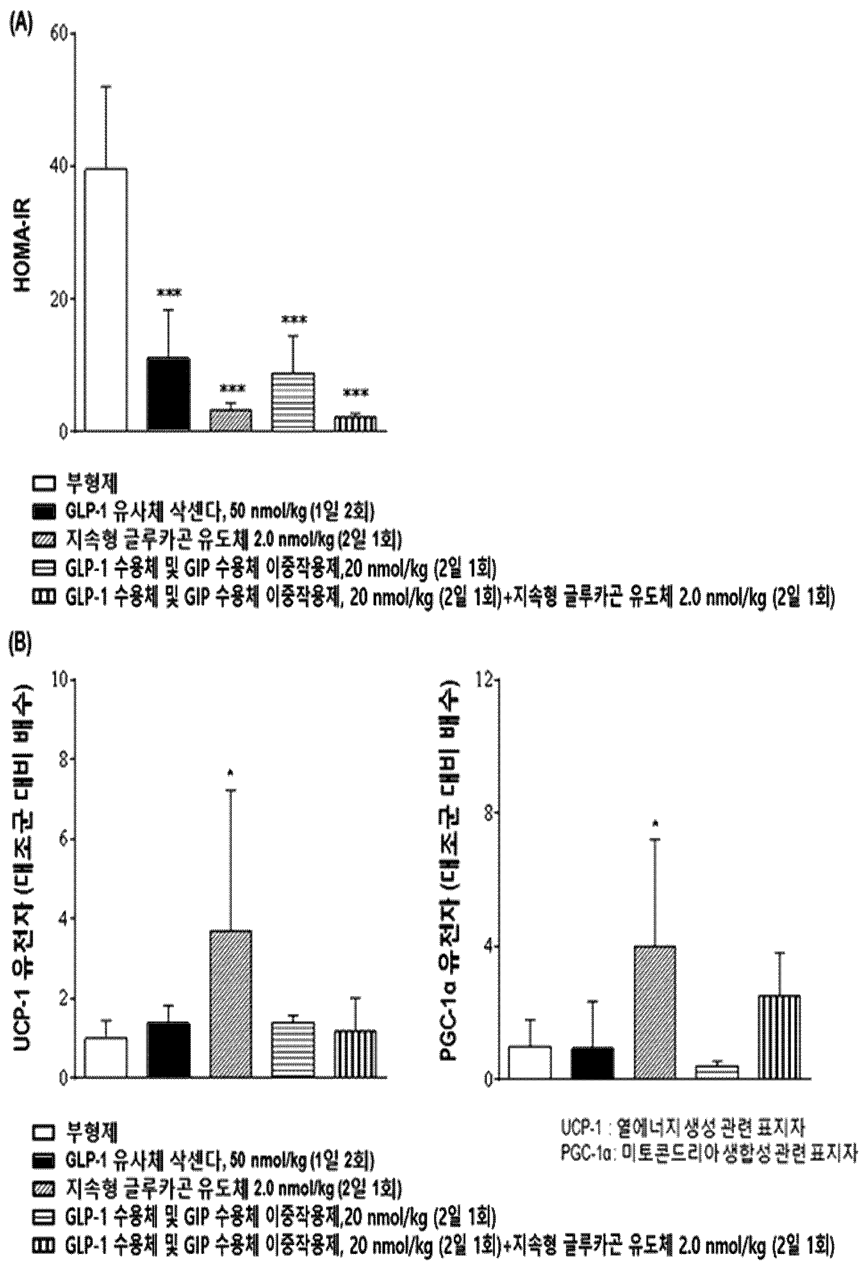
- 부형제
- GLP-1 유사체 삭센다, 50 nmol/kg (1일 2회)
- ◇ 지속형 글루카곤 유도체 2.0 nmol/kg (2일 1회)
- △ GLP-1 수용체 및 GIP 수용체 이중작용제, 20 nmol/kg (2일 1회)
- ▲ GLP-1 수용체 및 GIP 수용체 이중작용제, 20 nmol/kg (2일 1회) + 지속형 글루카곤 유도체 2.0 nmol/kg (2일 1회)

도면2

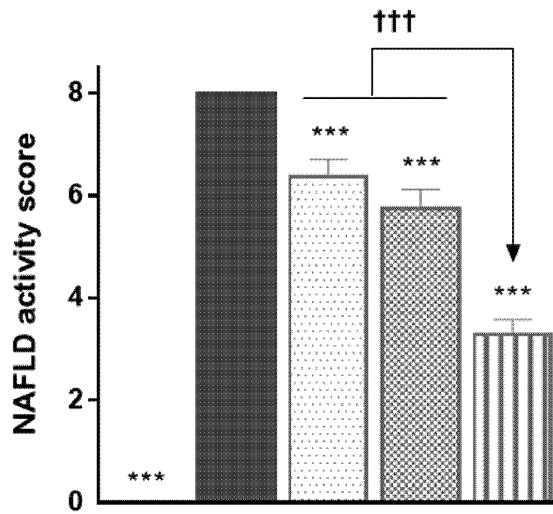


- 부형제
- GLP-1 유사체 삭센다, 50 nmol/kg (1일 2회)
- ▨ 지속형 글루카곤 유도체 2.0 nmol/kg (2일 1회)
- ▤ GLP-1 수용체 및 GIP 수용체 이중작용제, 20 nmol/kg (2일 1회)
- ▧ GLP-1 수용체 및 GIP 수용체 이중작용제, 20 nmol/kg (2일 1회) + 지속형 글루카곤 유도체 2.0 nmol/kg (2일 1회)

도면3

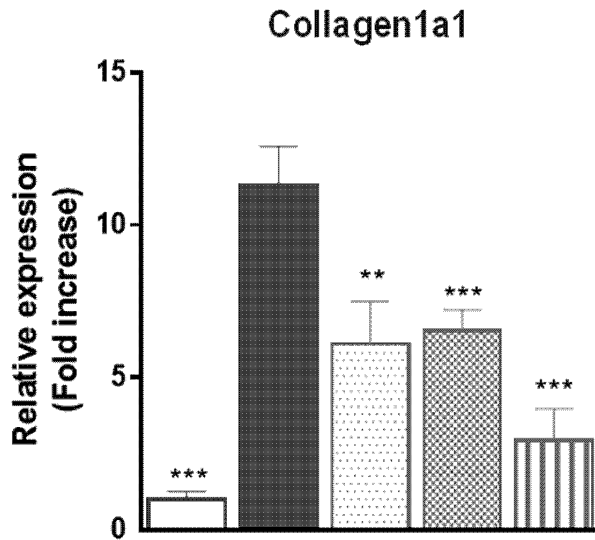


도면4



- Normal, 부형제 대조군
- CD-HFD, 부형제 대조군
- ▨ CD-HFD, 지속형 글루카곤 유도체 1.3 nmol/kg, Q2D
- ▩ CD-HFD, GLP-1 수용체 및 GIP 수용체 이중작용제 73 nmol/kg, Q2D
- ▧ CD-HFD, GLP-1 수용체 및 GIP 수용체 이중작용제 73 nmol/kg, Q2D + 지속형 글루카곤 유도체 1.3 nmol/kg, Q2D

도면5



- Normal, 부형제 대조군
- CD-HFD, 부형제 대조군
- ▨ CD-HFD, 지속형 글루카곤 유도체 1.3 nmol/kg, Q2D
- ▩ CD-HFD, GLP-1 수용체 및 GIP 수용체 이중작용제 73 nmol/kg, Q2D
- ▧ CD-HFD, GLP-1 수용체 및 GIP 수용체 이중작용제 73 nmol/kg, Q2D + 지속형 글루카곤 유도체 1.3 nmol/kg, Q2D

서열 목록

- <110> HANMI PHARM. CO., LTD.
- <120> Composition of Glucagon and Dual GLP-1/GIP receptor agonist, and therapeutic use thereof
- <130> KPA191164-KR-P1
- <150> KR 10-2019-0123250
- <151> 2019-10-04
- <160> 71
- <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> MISC_FEATURE
 <222> (2)
 <223> Xaa is aminoisobutyric acid (Aib)
 <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> MISC_FEATURE
 <222> (2)
 <223> Xaa is aminoisobutyric acid (Aib)
 <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> MISC_FEATURE
 <222> (2)
 <223> Xaa is aminoisobutyric acid (Aib)
 <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> MISC_FEATURE

<222>

> (2)

<223> Xaa is aminoisobutyric acid (Aib)

<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> 30

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> glucagon derivative

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (2)

<223> Xaa is aminoisobutyric acid (Aib)

<220><221>

> MISC_FEATURE

<222> (16)..(20)

<223> amino acids at positions 16 and 20 form a ring

<400> 12

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

Lys Arg Ala Lys Glu Phe Val Gln Trp Leu Met Asn Thr Cys
 20 25 30

<210> 13
 <211> 29
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> glucagon derivative
 <220><221> MISC_FEATURE
 <222> (2)
 <
 <223> Xaa is aminoisobutyric acid (Aib)
 <400> 13
 Tyr Xaa Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Cys Tyr Leu Asp Ser
 1 5 10 15
 Arg Arg Ala Gln Asp 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> MISC_FEATURE
 <222> (2)
 <223> Xaa is aminoisobutyric acid (Aib)
 <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> MISC_FEATURE
 <222> (2)

<223> Xaa is aminoisobutyric acid (Aib)
 <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> MISC_FEATURE
 <222> (2)

<223> Xaa is aminoisobutyric acid (Aib)
 <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> MISC_FEATURE
 <222> (2)

<223> Xaa is aminoisobutyric acid (Aib)
 <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> MISC_FEATURE
 <222> (2)
 <223> Xaa is aminoisobutyric acid (Aib)
 <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> MISC_FEATURE
 <222
 > (2)
 <223> Xaa is aminoisobutyric acid (Aib)
 <220><221> MISC_FEATURE
 <222> (16)..(20)
 <223> amino acids at positions 16 and 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> MISC_FEATURE

<222> (2)

<223> Xaa is aminoisobutyric acid (Aib)

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (16)..(20)

<223> amino acids at positions 16 and 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> MISC_FEATURE

<222> (2)

<223> Xaa is aminoisobutyric acid (Aib)

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (16)..(20)

<223> amino acids at positions 16 and 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> MISC_FEATURE

<222> (2)

<223> Xaa is aminoisobutyric acid (Aib)

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (16)..(20)

<223> amino acids at positions 16 and 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> MISC_FEATURE

<222> (2)

<223> Xaa is aminoisobutyric acid (Aib)

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (16)..(20)

<223> amino acids at positions 16 and 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> MISC_FEATURE

<222> (2)

<223> Xaa is aminoisobutyric acid (Aib)

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (16)..(20)

<223> amino acids at positions 16 and 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> MISC_FEATURE

<222> (2)

<223> Xaa is aminoisobutyric acid (Aib)

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (16)..(20)

<223> amino acids at positions 16 and 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> MISC_FEATURE

<222> (2)
 <223> Xaa is aminoisobutyric acid (Aib)
 <220><221> MISC_FEATURE
 <222> (16)..(20)
 <223> amino acids at positions 16 and 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> MISC_FEATURE
 <222> (2)
 <223> Xaa is aminoisobutyric acid (Aib)
 <220><221> MISC_FEATURE
 <222> (16)..(20)
 <223> amino acids at positions 16 and 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> MISC_FEATURE
 <222> (2)

<223> Xaa is aminoisobutyric acid (Aib)
 <220><221> MISC_FEATURE
 <222> (16)..(20)
 <223> amino acids at positions 16 and 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> MISC_FEATURE
 <222> (2)
 <223> Xaa is aminoisobutyric acid (Aib)
 <220><221> MISC_FEATURE
 <222> (16)..(20)
 <223> amino acids at positions 16 and 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> MISC_FEATURE
 <222> (2)
 <223> Xaa is aminoisobutyric acid (Aib)

<220><221> MISC_FEATURE
 <222> (16)..(20)
 <223> amino acids at positions 16 and 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 Lys 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> MISC_FEATURE
 <222> (2)
 <223> Xaa is aminoisobutyric acid (Aib)
 <220><221> MISC_FEATURE
 <222> (17)..(21)
 <223> amino acids at positions 17 and 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> MISC_FEATURE
 <222> (15)..(19)
 <223> amino acids at positions 15 and 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> MISC_FEATURE
 <222> (2)
 <223> Xaa is aminoisobutyric acid (Aib)
 <400> 33

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

<220><223> glucagon derivative
 <220><221> MISC_FEATURE
 <222> (2)
 <223> Xaa is aminoisobutyric acid (Aib)

<220><221> MISC_FEATURE
 <222> (16)..(20)
 <223> amino acids at positions 16 and 20 form a ring
 <400> 34

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> 35
 <211> 29
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> glucagon derivative

<220><221> MISC_FEATURE
 <222> (2)
 <223> Xaa is aminoisobutyric acid (Aib)
 <220><221> MISC_FEATURE
 <222> (16)..(20)
 <223> amino acids at positions 16 and 20 form a ring
 <400> 35

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> 36
 <211> 29
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220><223> glucagon derivative
 <220><221> MISC_FEATURE
 <222> (2)
 <223> Xaa is aminoisobutyric acid (Aib)
 <220><221> MISC_FEATURE
 <222> (16)..(20)
 <223> amino acids at positions 16 and 20 form a ring
 <400> 36

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

<210> 37

<211> 30

<

212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> glucagon derivative

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (2)

<223> Xaa is aminoisobutyric acid (Aib)

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (16)..(20)

<223> amino acids at positions 16 and 20 form a ring

<400> 37

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

1 5 10 15

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

20 25 30

<210> 38

<211> 29

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> glucagon derivative

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (2)

<223> Xaa is aminoisobutyric acid (Aib)

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (16)..(20)

<223> amino acids at positions 16 and 20 form a ring

<400> 38

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

1 5 10 15

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

20 25

<210> 39

<211> 29
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> glucagon derivative
 <220><221> MISC_FEATURE
 <222> (2)
 <223> Xaa is aminoisobutyric acid (Aib)
 <220><221> MISC_FEATURE
 <222> (16)..(20)
 <223> amino acids at positions 16 and 20 form a ring
 <400> 39
 Tyr Xaa Gln Gly Thr Phe Val Ser Asp Cys Ser Lys Tyr Leu Asp Glu
 1 5 10 15
 Arg Arg Ala Lys Asp Phe Val Gln Trp Leu Met Asn Thr
 20 25

<210> 40
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> glucagon derivative
 <220><221> MISC_FEATURE
 <222> (2)
 <223> Xaa is aminoisobutyric acid (Aib)
 <220><221> MISC_FEATURE
 <222> (16)..(20)
 <223> amino acids at positions 16 and 20 form a ring
 <400> 40
 Tyr Xaa Gln Gly Thr Phe Val Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Glu
 1 5 10 15
 Arg Arg Ala Lys Asp Phe Val Gln Trp Leu Met Asn Thr Cys
 20 25 30

<210> 41
 <211> 29

<212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> glucagon derivative
 <220><221> MISC_FEATURE
 <222> (2)
 <223> Xaa is aminoisobutyric acid (Aib)
 <220><221> MISC_FEATURE
 <222> (16)..(20)
 <223> amino acids at positions 16 and 20 form a ring
 <400> 41

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

<210> 42
 <211> 29
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> glucagon derivative
 <220><221> MISC_FEATURE
 <222> (2)
 <223> Xaa is aminoisobutyric acid (Aib)
 <400> 42

Tyr Xaa Gln Gly Thr Phe Cys 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> 43
 <211> 29
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> glucagon derivative
 <220><221> MISC_FEATURE

<222> (2)
 <223> Xaa is aminoisobutyric acid (Aib)
 <400> 43
 Tyr Xaa Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Cys 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> 44
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> glucagon derivative
 <220><221> MISC_FEATURE

<222> (2)
 <223> Xaa is aminoisobutyric acid (Aib)
 <400> 44
 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 Cys
 20 25 30
 <210> 45
 <211> 29
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> glucagon derivative
 <220><221> MISC_FEATURE

<222> (2)
 <223> Xaa is aminoisobutyric acid (Aib)
 <400> 45
 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> 46
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> glucagon derivative
 <220><221> MISC_FEATURE
 <222> (2)
 <223> Xaa is alpha-methyl-glutamic acid, aminoisobutyric acid (Aib),
 D-alanine, glycine, Sar (N-methylglycine), serine, or D-serine

<220><221> MISC_FEATURE
 <222> (7)
 <223> Xaa is threonine, valine, or cysteine

<220><221> MISC_FEATURE
 <222> (10)

<223> Xaa is tyrosine or cysteine

<220><221> MISC_FEATURE
 <222> (12)

<223> Xaa is lysine or cysteine

<220><221> MISC_FEATURE
 <222> (13)

<223> Xaa is tyrosine or cysteine

<220><221> MISC_FEATURE
 <222> (14)

<223> Xaa is leucine or cysteine

<220><221> MISC_FEATURE
 <222> (15)

<223> Xaa is aspartic acid, glutamic acid, or cysteine

<220><221> MISC_FEATURE
 <222> (16)

<223> Xaa is glutamic acid, aspartic acid, serine,
 alpha-methyl-glutamic acid, or cysteine, or is absent;

<220><221> MISC_FEATURE
 <222> (17)

<223> Xaa is aspartic acid, glutamine, glutamic acid, lysine, arginine, serine, cysteine, or valine, or is absent

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (18)

<223> Xaa is alanine, aspartic acid, glutamic acid, arginine, valine, or cysteine, or is absent

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (19)

<223> Xaa is alanine, arginine, serine, valine, or cysteine, or is absent

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (20)

<223> Xaa is lysine, histidine, glutamine, aspartic acid, arginine, alpha-methyl-glutamic acid, or cysteine, or is absent

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (21)

<223> Xaa is aspartic acid, glutamic acid, leucine, valine, or cysteine, or is absent

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (23)

<223> Xaa is isoleucine, valine, or arginine, or is absent

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (24)

<223> Xaa is valine, arginine, alanine, cysteine, glutamic acid, lysine, glutamine, alpha-methyl-glutamic acid, or leucine, or is absent;

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (27)

<223> Xaa is isoleucine, valine, alanine, lysine, methionine, glutamine, or arginine, or is absent

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (28)

<223> Xaa is glutamine, lysine, asparagine, or arginine, or is absent

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (30)

<223> Xaa is cysteine, or is absent

<400> 46

Tyr Xaa Gln Gly Thr Phe Xaa Ser Asp Xaa Ser Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa

1 5 10 15

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Phe Xaa Xaa Trp Leu Xaa Xaa Thr Xaa

20 25 30

<210> 47

<211> 30

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> glucagon derivative

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (2)

<223> Xaa is aminoisobutyric acid (Aib)

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (7)

<223> Xaa is threonine, valine, or cysteine

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (10)

<223> Xaa is tyrosine or cysteine

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (12)

<223> Xaa is lysine or cysteine

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (15)

<223> Xaa is aspartic acid or cysteine

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (16)

<223> Xaa is glutamic acid or serine

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (17)

<223> Xaa is lysine or arginine

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (20)

<223> Xaa is glutamine or lysine

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (21)

<223> Xaa is aspartic acid or glutamic acid

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (24)

<223> Xaa is valine or glutamine

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (30)

<223> Xaa is cysteine or is absent

<400> 47

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

1 5 10 15

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

20 25 30

<210> 48

<211> 34

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> forward primer

<400> 48

cagcgacacc gaccgtcccc ccgtacttaa ggcc 34

<210> 49

<211> 32

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> reverse primer

<400> 49

ctaaccgact ctcggggaag actgagctcg cc 32

<210> 50

<211> 39
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220><223> tirzepatide

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (2)

<223> Xaa is 2-methylalanine(Aib)

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (13)

<223> Xaa is 2-methylalanine(Aib)

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (20)

<223> Xaa is N6-{N-(hydrogen
 icosanedioyl)-g-Glu-bis[iminobis(ethylenoxy)acetyl]}-Lysine

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (39)

<223> Xaa is L-serinamide

<400> 50

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

1 5 10 15

Ile Ala Gln Lys Ala Phe Val Gln Trp Leu Ile Ala Gly Gly Pro Ser

20 25 30

Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser

35

<210> 51

<211> 12

<212> PRT

<213> HOMO SAPIENS

<400> 51

Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Ser Cys Pro

1 5 10

<210> 52

<211> 11

<212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Variant of hinge region
 <400> 52
 Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Pro Ser Cys Pro

1 5 10

<210> 53
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Variant of hinge region
 <400> 53
 Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Ser Pro

1 5 10

<210> 54
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Variant of hinge region
 <400> 54
 Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Ser

1 5 10

<210> 55
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Variant of hinge region
 <400> 55
 Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro

1 5 10

<210> 56
 <211> 8
 <212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Variant of hinge region

<400> 56

Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Ser

1 5

<210> 57

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Variant of hinge region

<400> 57

Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys

1 5

<210> 58

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Variant of hinge region

<400> 58

Glu Lys Tyr Gly Pro Pro Cys

1 5

<210> 59

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Variant of hinge region

<400> 59

Glu Ser Pro Ser Cys Pro

1 5

<210> 60

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Variant of hinge region

<400> 60

Glu Pro Ser Cys Pro

1 5

<210> 61

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Variant of hinge region

<400> 61

Pro Ser Cys Pro

1

<210> 62

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Variant of hinge region

<400> 62

Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Ser Cys Pro

1 5 10

<210> 63

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223>

> Variant of hinge region

<400> 63

Lys Tyr Gly Pro Pro Pro Ser Cys Pro

1 5

<210> 64

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Variant of hinge region

<400> 64
 Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Ser Cys Pro
 1 5
 <210> 65
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Variant of hinge region
 <400> 65
 Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys
 1 5

 <210> 66
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Variant of hinge region
 <400> 66
 Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro
 1 5
 <210> 67
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Variant of hinge region
 <400> 67
 Glu Ser Lys Pro Ser Cys Pro
 1 5
 <210> 68
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Variant of hinge region
 <400> 68

Glu Ser Pro Ser Cys Pro

1 5
 <210> 69
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Variant of hinge region
 <400> 69

Glu Pro Ser Cys

1
 <210> 70
 <211> 3
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Variant of hinge region
 <400> 70

Ser Cys Pro

1
 <210> 71
 <211> 221
 <212> PRT
 <213> homo sapiens
 <400> 71

Pro Ser Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu

1 5 10 15

Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu

20 25 30

Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln

35 40 45

Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys

50 55 60

Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu

65 70 75 80

Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys

85 90 95

Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys

100 105 110

Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser

115 120 125

Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys

130 135 140

Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln

145 150 155 160

Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly

165 170 175

Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln

180 185 190

Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn

195 200 205

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

210 215 220