



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2014-0058104  
(43) 공개일자 2014년05월14일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
A61K 38/26 (2006.01) C07K 14/605 (2006.01)  
A61K 39/395 (2006.01) A61P 3/10 (2006.01)  
(21) 출원번호 10-2012-0124724  
(22) 출원일자 2012년11월06일  
심사청구일자 없음

(71) 출원인  
한미약품 주식회사  
경기도 화성시 팔탄면 무하로 214  
(72) 발명자  
김진선  
경기도 용인시 기흥구 사은로126번길 10 103동 1501호  
김대진  
경기도 화성시 병점2로 103 (병점동, 안화동마을 주공아파트) 506동 1901호  
(뒷면에 계속)  
(74) 대리인  
손민

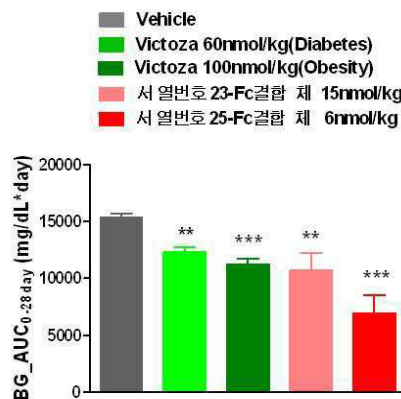
전체 청구항 수 : 총 9 항

(54) 발명의 명칭 옥신토모듈린 유도체를 포함하는 당뇨병 또는 비만성 당뇨병 치료용 조성물

(57) 요약

본 발명은 옥신토모듈린 유도체를 유효성분으로 포함하는 당뇨병, 비만성 당뇨병 또는 당뇨 합병증의 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것이다. 본 발명의 옥신토모듈린 유도체는 천연형의 옥신토모듈린에 비해 GLP-1 수용체 및 글루카곤 수용체에 대해 높은 활성을 가진다. 본 발명의 옥신토모듈린 유도체는 베타세포의 확장을 유도하고 인슐린 분비량을 증가시켜 고칼로리 및 고지방 식이로 인해 증가된 혈당을 감소시킨다. 또한, 체중 및 식이섭취 감소를 유도하여 인슐린 감수성을 개선시키고, 인슐린 저항성으로 인해 조절이 되지 않는 혈당을 정상 수준으로 유지하게 한다. 따라서, 당뇨병 및 이와 관련된 질환의 예방 또는 치료에 있어서 유용하게 사용할 수 있다.

대표도 - 도4



(72) 발명자

**이상현**

서울특별시 성동구 독서당로 40길 25 (옥수동, 현대아파트) 107동 306호

**정성엽**

경기도 수원시 팔달구 권광로 373 (우만동, 월드메르디앙) 109동 105호

**권세창**

서울특별시 강남구 선릉로 221 (도곡동, 도곡렉슬아파트) 408동 1804호

**특허청구의 범위**

**청구항 1**

옥신토모듈린 유도체를 유효성분으로 포함하는 당뇨병, 비만성 당뇨병, 또는 당뇨 합병증의 예방 또는 치료용 조성물.

**청구항 2**

제1항에 있어서, 상기 옥신토모듈린 유도체는 서열번호 2 내지 34로 구성된 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 갖는 것인 조성물.

**청구항 3**

제1항에 있어서, 상기 옥신토모듈린 유도체는 면역글로불린 단편, 항체, 엘라스틴, 알부민, 피브로넥틴으로 구성된 군으로부터 선택된 것이 연결된 결합체 형태인 것인 조성물.

**청구항 4**

제3항에 있어서, 상기 결합체는 서열번호 2 내지 34로 구성된 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 갖는 옥신토모듈린 유도체 및 면역글로불린 Fc 영역이 비펩타이드성 중합체를 통해 연결된 것인 조성물.

**청구항 5**

제4항에 있어서, 상기 비펩타이드성 중합체는 폴리에틸렌 글리콜, 폴리프로필렌 글리콜, 에틸렌 글리콜과 프로필렌 글리콜의 공중합체, 폴리옥시 에틸화 폴리올, 폴리비닐 알콜, 폴리사카라이드, 텍스트란, 폴리비닐 에틸에테르, PLA(polylactic acid), PLGA(polylactic-glycolic acid), 지질 중합체, 키틴류, 히아루론산, 및 이들의 조합으로 구성된 군으로부터 선택되는 것인 조성물.

**청구항 6**

제4항에 있어서, 상기 비펩타이드성 중합체의 양 말단이 각각 면역글로불린 Fc 영역 및 옥신토모듈린의 아민그룹 또는 티올 그룹(Thiol group)에 결합하는 것인 조성물.

**청구항 7**

제1항에 있어서, 상기 약학적 조성물은 당뇨병, 비만성 당뇨병 또는 당뇨 합병증의 예방 또는 치료 효과를 나타내는 약학적 제제가 추가로 포함되는 것인 조성물.

**청구항 8**

제1항에 있어서, 상기 당뇨병은 인슐린 의존성 일형 당뇨와 인슐린 비의존성인 이형당뇨인 것인 조성물.

**청구항 9**

제1항에 있어서, 상기 비만성 당뇨병은 비만으로 부터 발생하는 것인 조성물.

**명세서**

**기술분야**

[0001] 본 발명은 옥신토모듈린 유도체를 유효성분으로 포함하는 당뇨병, 비만성 당뇨병 또는 당뇨 합병증의 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것이다.

**배경기술**

[0002] 최근 우리나라에서는 경제 성장과 식생활의 서구화로 인하여 음식물에서 얻는 지방분의 섭취량이 증가하였으며,

운동부족 등으로 인한 비만, 당뇨병, 고지혈증, 고혈압, 동맥 경화증 및 지방간과 같은 대사성 질환이 증가하고 있는 추세이다.

- [0003] 당뇨병은 인슐린의 분비량이 부족하거나 정상적인 기능이 이루어지지 않는 등의 대사질환의 일종으로(DeFronzo, 1988), 혈중 포도당의 농도가 높아지는 고혈당을 특징으로 하며, 고혈당으로 인하여 여러 증상 및 징후를 일으키고 소변에서 포도당을 배출하게 되는 질환이다. 최근 비만률, 특히 복부 비만의 증가로 인하여 당뇨의 발생률이 폭발적으로 증가하고 있는 추세이다.
- [0004] 당뇨병환자의 수는 2,000년 전 세계적으로 1억 7천만명으로 평가 되었고, 2030년에 3억 7천만명에 이를 것으로 예상 되었으나, 최근 분석에 의하면 2008년에 이미 전 세계적으로 약 3억 5천만명에 이르렀다고 보고되어(Danaei et al., 2011), 예상보다 훨씬 심각한 수준이다. 이형 당뇨 환자의 약 80% 이상이 비만인 것에 비해 비만 환자의 단지 10% 미만이 당뇨로 보고되어(Harris et al., 1987) 있다. 이런 당뇨와 비만의 연관성은 아디포카인들(adipokines)과 유리지방산(free fatty acid)의 불규칙적인 분비로 인하여 지방산이 베타세포나 신장, 간, 심장 등 인슐린 민감성 조직내에 쌓여 지방 독성(lipototoxicity)을 나타내기 때문이다.
- [0005] 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. 이런 합병증들은 삶의 질의 감소시키며, 궁극적으로는 당뇨병환자의 수명을 단축시킨다. 따라서 당뇨로 인한 합병증을 예방하기 위해서는 효과적인 혈당 관리가 필수적이다.
- [0006] 현재 혈당을 조절하는 방법으로는 생활습관 교정(식이요법, 운동 요법) 및 약물 요법 등이 사용되고 있다. 하지만 식이 요법이나 운동 요법은 엄격한 관리 및 실시가 곤란하며, 그 치료 효과에 있어서도 한계가 있다. 따라서 대부분의 당뇨병환자들은 생활습관의 교정과 더불어 인슐린, 인슐린 분비 촉진제, 인슐린 감수성 개선제, 그리고 혈당 강하제 등의 약물에 혈당조절에 의존하고 있다.
- [0007] 재조합 방법에 의해 생산되고 있는 인슐린은 일형 당뇨병환자 및 혈당조절이 되지 않는 이형 환자에 필수적인 약물로 혈당 조절에 있어서 유리하지만, 주사침에 대한 거부감, 투여 방법의 어려움, 저혈당 위험, 그리고 체중 증가 등의 단점을 가지고 있다.
- [0008] 인슐린 분비 촉진제의 일종인 메글리티나이드계는 약효가 매우 빠른 제제로 식전에 복용하며, 노보넵(레파글리나이드), 파스틱(나테글리나이드), 글루팩스트(미티글리나이드) 등이 있다. 인슐린 감수성 개선제는 단독으로 복용 시 저혈당이 거의 없는 것이 특징이며, 바이구아나이드(biguanide) 계열 약물인 메트포르민(metformin)과, 치아졸리딘다이온(thiazolidinedione) 계열의 아반디아(로지글리타존), 액토스(피오글리타존) 등이 있다.
- [0009] 최근 개발되고 있는 약물로는 인슐린 분비를 촉진시키는 호르몬인 글루카곤 유사 펩타이드-1(glucagon-like peptide-1)의 작용을 이용하여 개발된 GLP-1 아고니스트(agonist)가 있으며, 엑센타이드(exenatide)와 빅토자(liraglutide)가 여기에 해당된다. 또한 GLP-1을 신속하게 불활성화시키는 효소인 DPP-4 (dipeptidyl peptidase-4)의 작용을 억제하는 DPP-4 억제제(inhibitor)도 최근 개발된 신약이며, 자누비아(성분명: 시타글립틴 sitagliptin)가 대표적이다.
- [0010] 그러나 이들 약제는 간독성, 위장장애, 심혈관계 질환 및 발암성 등의 부작용들이 보고 되고 있으며, 연간 치료 비용 또한 높아 당뇨병의 치료에 있어서 장애가 되고 있다. 실제로 전 당뇨병(pre-diabetes) 및 당뇨병 관련 비용은 2007년을 기준으로 미국에서만 약 200조원에 육박하며(Dall et al., 2010), 비만 관련 비용 또한 2008년 기준으로 미국에서만 150조원에 육박한다(Finkelstein et al., 2009).
- [0011] 따라서 체중을 감소시키고, 혈당을 효과적으로 낮추어서 당뇨병 및 비만성 당뇨병의 치료에 동시에 사용할 수 있으면서 부작용이 적은 약제의 개발이 시급한 실정이다.
- [0012] 이러한 하나의 후보물질로서 옥신토모듈린이 최근 각광을 받고 있다. 옥신토모듈린은 전구체인 프리 글루카곤(pre-glucagon)으로부터 만들어지며 주요 특징으로서 Glucagon-Like Peptide-1 (GLP-1)과 글루카곤(glucagon) 수용체에 모두 결합하여 이중 기능(dual function)을 할 수 있는 펩타이드이기 때문에, 비만, 당뇨병, 고지혈증, 지방간 치료 등 다양한 목적으로 연구가 되고 있다.
- [0013] 그러나, 옥신토모듈린은 생체 내에서 반감기가 짧고, 이의 활성이 상기 비만, 당뇨, 고지혈증, 지방간 치료 등에 사용될 수 있을 정도로 나타나지 않아 고용량을 투여해야 하는 문제점이 존재한다.

[0014] 이에, 본 발명자들은 천연형 옥신토모듈린보다 활성이 증진된 옥신토모듈린 유도체를 개발하고, 상기 유도체가 고지방 식이를 통하여 유도된(HF DIO) 마우스모델과 렙틴 수용체의 변이를 통하여 유도된 당뇨 마우스(db/db) 모델에서 혈당 및 당 부하능 그리고 당화혈색소(HbA1c)의 비율을 개선시킴으로써, 당뇨병, 비만성 당뇨병 또는 당뇨 합병증 치료에 유용하게 사용될 수 있음을 확인함으로써, 본 발명을 완성하게 되었다.

**발명의 내용**

**해결하려는 과제**

[0015] 본 발명의 목적은 옥신토모듈린 유도체를 유효성분으로 포함하는 당뇨병, 비만성 당뇨병, 또는 당뇨 합병증의 예방 또는 치료용 조성물을 제공하는 것이다.

**과제의 해결 수단**

[0016] 상기 과제를 해결하기 위해, 본 발명은 일 양태로서, 옥신토모듈린 유도체를 유효성분으로 포함하는 당뇨병, 비만성 당뇨병, 또는 당뇨 합병증의 예방 또는 치료용 조성물을 제공한다.

[0017] 본 발명에서 용어, "옥신토모듈린(oxyntomodulin)"이란 글루카곤의 전구체인 프리-글루카곤(pre-glucagon)으로부터 만들어지는 펩타이드를 의미한다. 본 발명의 옥신토모듈린은 천연형 옥신토모듈린, 이의 전구물질(precursor), 유도체(analog), 단편(fragments) 및 변이체(variants) 등을 포함한다. 바람직하게는 서열번호1(HSQGTFTSDYSKYLDSRRAQDFVQWLMNTRNRNIA)의 아미노산 서열을 갖는다.

[0018] 본 발명에서 용어, "옥신토모듈린 변이체"는, 천연형 옥신토모듈린과 아미노산 서열이 하나 이상 다른 펩타이드로서, GLP-1과 글루카곤 수용체 활성화 기능을 보유한 펩타이드를 의미하며, 천연형 옥신토모듈린에서 일부 아미노산이 치환(substitution), 추가(addition), 제거(deletion) 및 수식(modification) 중에 어느 하나의 방법 또는 이들의 방법의 조합을 통해 제조될 수 있다.

[0019] 본 발명에서 용어, "옥신토모듈린 유도체"란 상기 천연형 옥신토모듈린의 일부 아미노산을 부가, 결실 또는 치환의 형태로 변형시켜서, GLP-1 수용체와 글루카곤 수용체를 모두 활성화시킬 수 있고, 원래의 옥신토모듈린에 비하여 상기 각 수용체를 높은 수준으로 활성화시킬 수 있는 펩타이드, 펩타이드 유도체 또는 펩타이드 모방체 등을 포함한다.

[0020] 본 발명에서 용어, "옥신토모듈린 단편"은 옥신토모듈린의 아미노말단 또는 카르복시말단에 하나 또는 그 이상의 아미노산이 추가 또는 삭제된 형태를 의미하며 추가된 아미노산은 천연에 존재하지않는 아미노산 (예; D형 아미노산)도 가능할 수 있다. 이러한 옥신토모듈린 단편은 체내에서 혈당조절 기능을 보유한다.

[0021] 옥신토모듈린 변이체, 유도체, 및 단편에서 각각 사용된 제조방법은 독립적으로 사용될 수 있고 조합도 가능하다. 예를 들어 아미노산 서열이 하나 이상 다르고, N-말단 아미노산 잔기에 탈아미노화(deamination)된 GLP-1 수용체와 글루카곤 수용체 둘 다에 대한 활성화 기능을 보유한 펩타이드도 포함된다.

[0022] 본 명세서에서 언급된 아미노산은 IUPAC-IUB 명명법에 따라 다음과 같이 약어로 기재하였다.

- [0023] 알라닌A            아르기닌R
- [0024] 아스파라긴N    아스파르트 산D
- [0025] 시스테인C        글루타민 산E
- [0026] 글루타민Q        글리신G
- [0027] 히스티딘H        아이소루이신I
- [0028] 루이신L           리신K
- [0029] 메티오닌M        페닐알라닌F

- [0030] 프롤린P 세린S
- [0031] 트레오닌T 트립토판W
- [0032] 타이로신Y 발린V
  
- [0033] 본 발명에서 옥신토모듈린 유도체는 상기 서열번호 1의 아미노산 서열에서 아미노산의 치환, 부가 결실 또는 번역후 변형(예를 들어, 메틸화, 아실화, 유비퀴틴화, 분자내 공유결합)되어, 글루카곤과 GLP-1 수용체를 동시에 활성화시킬 수 있는 임의의 펩타이드를 포괄한다. 상기 아미노산의 치환 또는 부가시에는 인간 단백질에서 통상적으로 관찰되는 20개의 아미노산뿐만 아니라 비정형 또는 비-자연적 발생 아미노산을 사용할 수 있다. 비정형 아미노산의 상업적 출처에는 Sigma-Aldrich, ChemPep과 Genzyme pharmaceuticals가 포함된다. 이러한 아미노산이 포함된 펩타이드와 정형적인 펩타이드 서열은 상업화된 펩타이드 합성 회사, 예를 들어 미국의 American peptide company나 Bachem, 또는 한국의 Anygen을 통해 합성 및 구매가능하다.
  
- [0034] 구체적인 일 양태에서, 본 발명의 옥신토모듈린 유도체는 하기 일반식 1의 아미노산을 포함하는 신규한 펩타이드이다.
  
- [0035] R1-X1-X2-GTFTSD-X3-X4-X5-X6-X7-X8-X9-X10-X11-X12-X13-X14-X15-X16-X17-X18-X19-X20-X21-X22-X23-X24-R2(일반식 1)
  
- [0036] 상기 식에서,
- [0037] R1은 히스티딘, 데스아미노-히스티딜 (desamino-histidyl), 디메틸-히스티딜 (N-dimethyl-histidyl), 베타-히드록시 이미다조프로피오닐 (beta-hydroxyimidazopropionyl), 4-이미다조아세틸(4-imidazoacetyl), 베타-카복시 이미다조프로피오닐 (beta-carboxy imidazopropionyl) 또는 티로신이며;
- [0038] X1은 Aib(aminoisobutyric acid), d-알라닌, 글리신, Sar(N-methylglycine), 세린 또는 d-세린이고;
- [0039] X2는 글루탐산 또는 글루타민이며;
- [0040] X3은 류신 또는 티로신이고;
- [0041] X4는 세린 또는 알라닌이며;
- [0042] X5는 리신 또는 아르기닌이며;
- [0043] X6는 글루타민 또는 티로신이고;
- [0044] X7은 류신 또는 메티오닌이며;
- [0045] X8은 아스파르트산 또는 글루탐산이고;
- [0046] X9은 글루탐산, 세린, 알파-메틸-글루탐산 또는 결실된 서열이며;
- [0047] X10는 글루타민, 글루탐산, 리신, 아르기닌, 세린 또는 결실된 서열이고;
- [0048] X11은 알라닌, 아르기닌, 발린 또는 결실된 서열이며;
- [0049] X12은 알라닌, 아르기닌, 세린, 발린 또는 결실된 서열이고;
- [0050] X13는 리신, 글루타민, 아르기닌, 알파-메틸-글루탐산 또는 결실된 서열이며;
- [0051] X14은 아스파르트산, 글루탐산, 류신 또는 결실된 서열이고;
- [0052] X15는 페닐알라닌 또는 결실된 서열이며;
- [0053] X16는 이소류신, 발린 또는 결실된 서열이며;
- [0054] X17는 알라닌, 시스테인, 글루탐산, 리신, 글루타민, 알파-메틸-글루탐산 또는 결실된 서열이고;

- [0055] X18는 트립토판 또는 결실된 서열이며;
- [0056] X19은 알라닌, 이소류신, 류신, 세린, 발린 또는 결실된 서열이며;
- [0057] X20는 알라닌, 리신, 메티오닌, 글루타민, 아르기닌 또는 결실된 서열이고;
- [0058] X21은 아스파라긴 또는 결실된 서열이며;
- [0059] X22은 알라닌, 글리신, 트레오닌 또는 결실된 서열이며;
- [0060] X23는 시스테인, 리신 또는 결실된 서열이고;
- [0061] X24은 알라닌, 글리신 및 세린의 조합으로 구성된 2 내지 10개의 아미노산을 가지는 펩타이드 또는 결실된 서열이며; 및,
- [0062] R2는 KRNRNIA(서열번호 35), GPSSGAPPPS(서열번호 36), GPSSGAPPPSK(서열번호 37), HSQGTFTSDYSKYLD(서열번호 38), HSQGTFTSDYSRYLDK(서열번호 39), HGEFTFTSDLSKQMEEEAVK(서열번호 40) 또는 결실된 서열이다(단, 상기 일반식 1의 아미노산 서열이 서열번호 1과 동일한 경우는 제외한다).
- [0063] 본 발명의 옥신토모듈린 유도체는 야생형의 옥신토모듈린의 글루카곤 수용체 및 GLP-1 수용체에 대한 활성을 높이기 위해 서열번호 1로 표시되는 아미노산 서열의 1번 아미노산인 히스티딘의 알파 카본을 결실시킨 4-이미다조아세틸(4-imidazoacetyl), N-말단 아미노기를 결실시킨 데스아미노-히스티딜 (desamino-histidyl), N-말단 아미노기를 2개의 메틸그룹으로 수식한 디메틸-히스티딜 (N-dimethyl-histidyl), N-말단 아미노기를 하이드록실 그룹으로 치환한 베타-히드록시 이미다조프로피오닐 (beta-hydroxyimidazopropionyl), 또는 N-말단 아미노기를 카르복실 그룹으로 치환한 베타-카르복시 이미다조프로피오닐 (beta-carboxy imidazopropionyl)로 치환할 수 있다. 또한, GLP-1 수용체와 결합하는 부위를 소수성 결합과 이온 결합을 강화시키는 아미노산으로 치환시키거나 또는 이들을 조합할 수 있다. 또한, 옥신토모듈린 서열의 일부 서열을 GLP-1의 아미노산 서열 또는 Exendin-4의 아미노산 서열로 치환하여 GLP-1 수용체의 활성을 높일 수 있다.
- [0064] 또한, 옥신토모듈린 서열의 일부 서열을 알파 헬릭스를 강화시키는 서열로 치환시킬 수 있다. 바람직하게는 상기 일반식 1의 아미노산 서열의 10, 14, 16, 20, 24 및 28번 아미노산이 알파 헬릭스에 도움을 주는 것으로 알려진 Tyr(4-Me), Phe, Phe(4-Me), Phe(4-Cl), Phe(4-CN), Phe(4-NO<sub>2</sub>), Phe(4-NH<sub>2</sub>), Phg, Pal, Nal, Ala(2-thienyl) 또는 Ala(benzothieryl)로 구성되는 아미노산 혹은 아미노산 유도체로 치환될 수 있으며, 삽입될 수 있는 알파 헬릭스에 도움을 주는 아미노산 혹은 아미노산 유도체의 종류 및 개수는 제한되지 않는다. 또한, 바람직하게는 10과 14번, 12와 16번, 16과 20번, 20과 24번 및 24와 28번은 각각 링을 형성할 수 있는 글루탐산 또는 리신으로 치환하여 링을 형성할 수 있으며, 삽입되는 링의 개수 역시 제한되지 않고, 가장 바람직하게는 하기의 일반식 2 내지 6으로부터 선택되는 아미노산 서열을 가지는 옥신토모듈린 유도체일 수 있다.
- [0065] 구체적인 일 양태에서, 본 발명의 옥신토모듈린 유도체는 옥신토모듈린의 아미노산 서열에 엑센딘 혹은 GLP-1의 서열로 치환한 하기 일반식 2의 아미노산을 포함하는 신규한 펩타이드이다.
- [0066] R1-A-R3(일반식 2)
- [0067] 다른 구체적인 일 양태에서, 본 발명의 옥신토모듈린 유도체는 옥신토모듈린의 아미노산 서열 일부와 엑센딘 또는 GLP-1의 서열 일부를 적당한 아미노산 링커로 연결한 하기 일반식 3의 아미노산을 포함하는 신규한 펩타이드이다.
- [0068] R1-B-C-R4(일반식 3)
- [0069] 다른 구체적인 일 양태에서, 본 발명의 옥신토모듈린 유도체는 옥신토모듈린의 아미노산 서열의 일부를 GLP-1



수용체와의 결합력을 높이는 아미노산으로 치환, 예컨대 26번째 Leu을 GLP-1 수용체와 소수성 결합을 하는 바, 소수성을 증가시키는 아미노산인 Ile 혹은 Val으로 치환된 하기 일반식 4를 포함하는 신규한 펩타이드이다.

[0070] R1-SQGTFTSDYSKYLD-D1-D2-D3-D4-D5-LFVQW-D6-D7-N-D8-R3(일반식 4)

[0071] 다른 구체적인 일 양태에서, 본 발명의 옥신토모듈린 유도체는 고유 옥신토모듈린의 GLP-1 수용체와 글루카곤 수용체의 활성을 높이기 위해 아미노산 서열 일부를 삭제하거나 아미노산 일부를 삽입하거나 아미노산 일부를 다른 아미노산으로 치환한 하기 일반식 5를 포함하는 신규한 펩타이드이다.

[0072] R1-E1-QGTFTSDYSKYLD-E2-E3-RA-E4-E5-FV-E6-WLMNT-E7-R5(일반식 5)

[0073] 상기 일반식 2 내지 5에 있어서,

[0074] R1은 상기 일반식 1에서 설명된 구성과 동일하고;

[0075] A는 SQGTFTSDYSKYLDSRRAQDFVQWLMNT(서열번호 41), SQGTFTSDYSKYLDDEEAVRLFIEWLMNT(서열번호 42), SQGTFTSDYSKYLDERRAQDFVAWLKNT(서열번호 43), GQGTFTSDYSRYLEEEAVRLFIEWLKNG(서열번호 44), GQGTFTSDYSRQMEEEAVRLFIEWLKNG(서열번호 45), GEGTFTSDLSRQMEEEAVRLFIEWAA(서열번호 46) 및 SQGTFTSDYSRQMEEEAVRLFIEWLMNG(서열번호 47)로 구성되는 군으로부터 선택되고;

[0076] B는 SQGTFTSDYSKYLDSRRAQDFVQWLMNT(서열번호 41), SQGTFTSDYSKYLDDEEAVRLFIEWLMNT(서열번호 42), SQGTFTSDYSKYLDERRAQDFVAWLKNT(서열번호 43), GQGTFTSDYSRYLEEEAVRLFIEWLKNG(서열번호 44), GQGTFTSDYSRQMEEEAVRLFIEWLKNG(서열번호 45), GEGTFTSDLSRQMEEEAVRLFIEWAA(서열번호 46), SQGTFTSDYSRQMEEEAVRLFIEWLMNG(서열번호 47), GEGTFTSDLSRQMEEEAVRLFIEW(서열번호 48), 및 SQGTFTSDYSRYLD(서열번호 49)로 구성되는 군으로부터 선택되며;

[0077] C는 알라닌, 글리신 및 세린의 조합으로 구성된 2 내지 10개의 아미노산을 가지는 펩타이드이고;

[0078] D1은 세린, 글루탐산 또는 아르기닌이며;

[0079] D2는 아르기닌, 글루탐산 또는 세린이고;

[0080] D3은 아르기닌, 알라닌 또는 발린이며;

[0081] D4는 아르기닌, 발린 또는 세린이고;

[0082] D5는 글루타민, 아르기닌 또는 리신이며;

[0083] D6은 이소류신, 발린 또는 세린이고;

[0084] D7은 메티오닌, 아르기닌 또는 글루타민이며;

[0085] D8은 트레오닌, 글리신 또는 알라닌이고;

[0086] E1은 세린, Aib, Sar, d-알라닌 또는 d-세린이며;

[0087] E2는 세린 또는 글루탐산이고;

[0088] E3은 아르기닌 또는 리신이며;

[0089] E4는 글루타민 또는 리신이고;

[0090] E5는 아스파르트산 또는 글루탐산이며;

[0091] E6는 글루타민, 시스테인 또는 리신이고;

[0092] E7은 시스테인, 리신 또는 결실된 서열이며;

[0093] R3은 KRNRNIA(서열번호 35), GPSSGAPPPS(서열번호 36) 또는 GPSSGAPPPSK(서열번호 37)이며;



- [0094] R4는 HSQGTFTSDYSKYLD(서열번호 38), HSQGTFTSDYSRYLDK(서열번호 39) 또는 HEGGTFTSDLSKQMEEAVK(서열번호 40)이고; 및,
- [0095] R5는 KRNRNNIA(서열번호 35), GPSSGAPPPS(서열번호 36), GPSSGAPPPSK(서열번호 37) 또는 결실된 서열이다(단, 상기 일반식 2 내지 5의 아미노산 서열이 서열번호 1과 동일한 경우는 제외한다).
- [0096] 바람직하게는, 본 발명의 옥신토모듈린 유도체는 하기 일반식 6의 신규한 펩타이드일 수 있다.
- [0097] R1-X1-X2-GTFTSD-X3-X4-X5-X6-X7-X8-X9-X10-X11-X12-X13-X14-X15-X16-X17-X18-X19-X20-X21-X22-X23-X24-R2(일반식 6)
- [0098] 상기 일반식 6에 있어서,
- [0099] R1은 히스티딘, 데스아미노-히스티딜(desamino-histidyl), 4-이미다조아세틸(4-imidazoacetyl) 또는 티로신이며;
- [0100] X1은 Aib(aminoisobutyric acid), 글리신, 세린 또는 d-세린이고;
- [0101] X2는 글루탐산 또는 글루타민이며;
- [0102] X3은 류신 또는 티로신이고;
- [0103] X4는 세린 또는 알라닌이며;
- [0104] X5는 리신 또는 아르기닌이며;
- [0105] X6는 글루타민 또는 티로신이고;
- [0106] X7은 류신 또는 메티오닌이며;
- [0107] X8은 아스파르트산 또는 글루탐산이고;
- [0108] X9은 글루탐산, 알파-메틸-글루탐산 또는 결실된 서열이며;
- [0109] X10는 글루타민, 글루탐산, 리신, 아르기닌 또는 결실된 서열이고;
- [0110] X11은 알라닌, 아르기닌 또는 결실된 서열이며;
- [0111] X12은 알라닌, 발린 또는 결실된 서열이고;
- [0112] X13는 리신, 글루타민, 아르기닌, 알파-메틸-글루탐산 또는 결실된 서열이며;
- [0113] X14은 아스파르트산, 글루탐산, 류신 또는 결실된 서열이고;
- [0114] X15는 페닐알라닌 또는 결실된 서열이며;
- [0115] X16는 이소류신, 발린 또는 결실된 서열이며;
- [0116] X17는 알라닌, 시스테인, 글루탐산, 글루타민, 알파-메틸-글루탐산 또는 결실된 서열이고;
- [0117] X18는 트립토판 또는 결실된 서열이며;
- [0118] X19은 알라닌, 이소류신, 류신, 발린 또는 결실된 서열이며;
- [0119] X20는 알라닌, 리신, 메티오닌, 아르기닌 또는 결실된 서열이고;
- [0120] X21은 아스파라긴 또는 결실된 서열이며;
- [0121] X22은 트레오닌 또는 결실된 서열이며;
- [0122] X23는 시스테인, 리신 또는 결실된 서열이고;
- [0123] X24은 글리신으로 구성된 2 내지 10개의 아미노산을 가지는 펩타이드 또는 결실된 서열이며; 및,

- [0124] R2는 KRRNRNIA(서열번호 35), GPSSGAPPPS(서열번호 36), GPSSGAPPPSK(서열번호 37), HSQGTFTSDYSKYLD(서열번호 38), HSQGTFTSDYSRYLDK(서열번호 39), HEGGTFTSDLSKQMEEEAVK(서열번호 40) 또는 결실된 서열이다(단, 상기 일반식 6의 아미노산 서열이 서열번호 1과 동일한 경우는 제외한다).
- [0125] 보다 바람직하게는 본 발명의 옥신토모듈린 유도체는 서열번호 2 내지 34의 펩타이드로 구성된 그룹으로부터 선택된 것일 수 있다. 보다 더 바람직하게는 실시예 2-1의 표 1에 기재된 옥신토모듈린 유도체일 수 있다.
- [0126] 본 발명의 일 실시예에서는 각각 서열번호 2 내지 34의 아미노산 서열을 갖는 옥신토모듈린 유도체를 제조하고, 상기 옥신토모듈린 유도체가 천연형 옥신토모듈린에 비해 우월한 GLP-1 수용체와 글루카곤 수용체 활성을 나타냄을 확인하였는(실시예 2). 즉, 상기 결과로부터 본 발명의 옥신토모듈린 유도체는 GLP-1 수용체 및 글루카곤 수용체를 활성화시켜서 종래의 옥신토모듈린보다 우수한 당뇨병, 비만성 당뇨병, 및/또는 당뇨 합병증 예방 또는 치료 효과를 나타냄을 알 수 있었다.
- [0127] 본 발명의 상기 옥신토모듈린 유도체는 치료학적 효능과 생체내 반감기를 증가시키기 위해 다양한 중합체의 결합체를 포함한다.
- [0128] 본 발명에서 결합체는 효력의 지속성이 천연형 옥신토모듈린에 비해 증가한 것을 의미하며, 상기 지속형 결합체는 천연형 옥신토모듈린의 아미노산이 수식, 치환, 추가 또는 제거된 형태, 폴리에틸렌글리콜 (PEG)과 같은 생분해성 중합체가 옥신토모듈린에 결합된 결합체 혹은 알부민 (albumin), 항체(antibody), 엘라스틴 (Elastin), 피브리넥틴 (Fibronectin), 키틴(chitin)과 같은 당중합체(polysaccharide), 면역글로불린 단편과 같은 지속성이 뛰어난 단백질이 옥신토모듈린에 결합된 결합체, 혹은 비정형화된 폴리펩타이드의 결합체, 생체 내 알부민과 결합력을 갖는 지방산이 결합된 결합체 또는 생분해성 나노파티클에 봉입된 형태의 옥신토모듈린을 포함할 수 있으며, 지속형 결합체의 종류는 본 발명에 제한을 두지 않는다.
- [0129] 바람직하게는, 상기 결합체는 서열번호 2 내지 34로 구성된 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 갖는 옥신토모듈린 유도체 및 면역글로불린 Fc 영역이 비펩타이드성 중합체를 통해 연결된 것이다.
- [0130] 면역글로불린 Fc 영역은 생체 내에서 대사되는 생분해성의 폴리펩타이드이기 때문에, 약물의 캐리어로 사용하기에 안전하다. 또한, 면역글로불린 Fc 영역은 면역글로불린 전체 분자에 비해 상대적으로 분자량이 적기 때문에 결합체의 제조, 정제 및 수율 면에서 유리할 뿐만 아니라 아미노산 서열이 항체마다 다르기 때문에 높은 비균질성을 나타내는 Fab 부분이 제거되기 때문에 물질의 동질성이 크게 증가되고 혈중 항원성의 유발 가능성도 낮아지게 되는 효과도 기대할 수 있다.
- [0131] 본 발명에서, "면역글로불린 Fc 영역"은, 면역글로불린의 중쇄와 경쇄 가변영역, 중쇄 불변영역 1(CH1)과 경쇄 불변영역(CL1)을 제외한, 중쇄 불변영역 2(CH2) 및 중쇄 불변영역 3(CH3)부분을 의미하며, 중쇄 불변영역에 힌지(hinge) 부분을 포함하기도 한다. 또한 본 발명의 면역글로불린 Fc 영역은 천연형과 실질적으로 동등하거나 향상된 효과를 갖는 한, 면역 글로불린의 중쇄와 경쇄 가변영역만을 제외하고, 일부 또는 전체 중쇄 불변영역 1(CH1) 및/또는 경쇄불변영역 1(CL1)을 포함하는 확장된 Fc영역일 수 있다. 또한, CH2 및/또는 CH3에 해당하는 상당히 긴 일부 아미노산 서열이 제거된 영역일 수도 있다. 즉, 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)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.
- [0132] 또한, 본 발명의 면역글로불린 Fc 영역은 천연형 아미노산 서열뿐만 아니라 이의 서열 유도체(mutant)를 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. 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.
- [0133] 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.

- [0134] 분자의 활성을 전체적으로 변경시키지 않는 단백질 및 펩타이드에서의 아미노산 교환은 당해 분야에 공지되어 있다 (H.Neurath, R.L.Hill, The Proteins, Academic Press, New York,1979). 가장 통상적으로 일어나는 교환은 아미노산 잔기 Ala/Ser, Val/Ile, Asp/Glu, Thr/Ser, Ala/Gly, Ala/Thr, Ser/Asn, Ala/Val, Ser/Gly, Thy/Phe, Ala/Pro, Lys/Arg, Asp/Asn, Leu/Ile, Leu/Val, Ala/Glu, Asp/Gly 간의 교환이다. 경우에 따라서는 인산화(phosphorylation), 황화(sulfation), 아크릴화(acrylation), 당화(glycosylation), 메틸화(methylation), 파네실화(farnesylation), 아세틸화(acetylation) 및 아밀화(amidation) 등으로 수식(modification)될 수도 있다.
- [0135] 상기 기술한 Fc 유도체는 본 발명의 Fc 영역과 동일한 생물학적 활성을 나타내며 Fc 영역의 열, pH 등에 대한 구조적 안정성을 증대시킨 유도체다.
- [0136] 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 유도체 일 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)<sub>2</sub>로 절단된다. 이를 크기 배제 크로마토그래피(size-exclusion chromatography) 등을 이용하여 Fc 또는 pF'c를 분리할 수 있다. 바람직하게는 인간 유래의 Fc 영역을 미생물로부터 수득한 재조합형 면역글로불린 Fc 영역이다.
- [0137] 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 세포독성이 감소 또는 제거되므로, 생체 내에서 불필요한 면역반응을 유발하지 않는다. 이런 점에서 약물의 캐리어로서의 본래의 목적에 보다 부합하는 형태는 당쇄가 제거되거나 비당쇄화된 면역글로불린 Fc 영역이라 할 것이다.
- [0138] 본 발명에서 "당쇄의 제거(Deglycosylation)"는 효소로 당을 제거한 Fc 영역을 말하며, 비당쇄화(Aglycosylation)는 원핵동물, 바람직하게는 대장균에서 생산하여 당쇄화되지 않은 Fc 영역을 의미한다.
- [0139] 한편, 면역글로불린 Fc 영역은 인간 또는 소, 염소, 돼지, 마우스, 래빗, 햄스터, 랫트, 기니아 피그 등의 동물기원일 수 있으며, 바람직하게는 인간기원이다.
- [0140] 또한, 면역글로불린 Fc 영역은 IgG, IgA, IgD, IgE, IgM 유래 또는 이들의 조합(combination) 또는 이들의 혼성(hybrid)에 의한 Fc 영역일 수 있다. 바람직하게는 인간 혈액에 가장 풍부한 IgG 또는 IgM 유래이며 가장 바람직하게는 리간드 결합 단백질의 반감기를 향상시키는 것으로 공지된 IgG 유래이다.
- [0141] 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.
- [0142] 본 발명에서 "하이브리드(hybrid)"란 단쇄의 면역글로불린 Fc 영역 내에 2개 이상의 상이한 기원의 면역글로불린 Fc 단편에 해당하는 서열이 존재함을 의미하는 용어이다. 본 발명의 경우 여러 형태의 하이브리드가 가능하다. 즉, IgG Fc, IgM Fc, IgA Fc, IgE Fc 및 IgD Fc의 CH1, CH2, CH3 및 CH4로 이루어진 그룹으로부터 1개 내지 4개 도메인으로 이루어진 도메인의 하이브리드가 가능하며, 힌지를 포함할 수 있다.
- [0143] 한편, IgG 역시 IgG1, IgG2, IgG3 및 IgG4의 서브클래스로 나눌 수 있고 본 발명에서는 이들의 조합 또는 이들의 혼성화도 가능하다. 바람직하게는 IgG2 및 IgG4 서브클래스이며, 가장 바람직하게는 보체 의존적 독성(CDC, Complement dependent cytotoxicity)과 같은 이펙터 기능(effector function)이 거의 없는 IgG4의 Fc 영역이다.
- [0144] 즉, 가장 바람직한 본 발명의 약물의 캐리어용 면역글로불린 Fc 영역은, 인간 IgG4 유래의 비-당쇄화된 Fc 영역

이다. 인간 유래의 Fc 영역은 인간 생체에서 항원으로 작용하여 이에 대한 새로운 항체를 생성하는 등의 바람직하지 않은 면역 반응을 일으킬 수 있는 비-인간 유래의 Fc 영역에 비하여 바람직하다.

- [0145] 본 발명에서 "비펩타이드성 중합체"는 반복 단위가 2개 이상 결합된 생체 적합성 중합체를 의미하며, 상기 반복 단위들은 펩타이드 결합이 아닌 임의의 공유결합을 통해 서로 연결된다. 본 발명에서 상기 비펩타이드성 중합체는 비펩타이드성 링커와 혼용되어 사용될 수 있다.
- [0146] 본 발명에 사용가능한 비펩타이드성 중합체는 폴리에틸렌 글리콜, 폴리프로필렌 글리콜, 에틸렌 글리콜과 프로필렌 글리콜의 공중합체, 폴리옥시 에틸화 폴리올, 폴리비닐 알콜, 폴리사카라이드, 텍스트란, 폴리비닐 에틸 에테르, PLA(폴리락트산, polylactic acid) 및 PLGA(폴리락틱-글리콜산, polylactic-glycolic acid)와 같은 생분해성 고분자, 지질 중합체, 키틴류, 히아루론산 및 이들의 조합으로 구성된 균으로부터 선택될 수 있으며, 바람직하게는 폴리에틸렌글리콜이다. 당해 분야에 이미 알려진 이들의 유도체 및 당해 분야의 기술 수준에서 용이하게 제조할 수 있는 유도체들도 본 발명의 범위에 포함된다.
- [0147] 기존 인프레임 퓨전(inframe fusion) 방법으로 제조된 융합단백질에서 사용된 펩타이드성 링커의 단점은 생체 내에서 단백질분해효소에 의해 쉽게 절단되어 캐리어에 의한 활성약물의 혈중반감기 증가 효과를 기대만큼 얻을 수 없다는 것이다. 그러나, 본 발명에서는 단백질분해효소에 저항성있는 중합체를 사용하여 캐리어와 유사하게 펩타이드의 혈중반감기를 유지할 수 있다. 그러므로, 본 발명에서 사용될 수 있는 비펩타이드성 중합체는 상기 와 같은 역할, 즉 생체 내 단백질분해효소에 저항성 있는 중합체이면 제한없이 사용될 수 있다. 비펩타이드성 중합체의 분자량은 1 내지 100 kDa 범위, 바람직하게는 1 내지 20 kDa 범위이다. 또한, 상기 면역글로불린 Fc 영역과 결합되는 본 발명의 비펩타이드성 중합체는 한 종류의 중합체뿐만 아니라 상이한 종류의 중합체들의 조합이 사용될 수도 있다.
- [0148] 본 발명에 사용되는 비펩타이드성 중합체는 면역글로불린 Fc 영역 및 단백질약물과 결합될 수 있는 반응기를 가질 수 있다. 상기 비 펩타이드성 중합체의 양 말단 반응기는 반응 알데히드 그룹, 프로피온 알데히드 그룹, 부틸 알데히드 그룹, 말레이미드(maleimide) 그룹 및 석시니미드(succinimide) 유도체로 이루어진 균으로부터 선택되는 것이 바람직하다.
- [0149] 상기에서, 석시니미드 유도체로는 석시니미딜 프로피오네이트, 히드록시 석시니미딜, 석시니미딜 카르복시메틸 또는 석시니미딜 카보네이트가 이용될 수 있다. 특히, 상기 비펩타이드성 중합체가 양 말단에 반응 알데히드 그룹의 반응기를 갖는 경우, 비특이적 반응을 최소화하고, 비펩타이드성 중합체의 양 말단에서 생리활성 폴리펩타이드 및 면역글로불린과 각각 결합하는데 효과적이다. 알데히드 결합에 의한 환원성 알킬화로 생성된 최종 산물은 아미드 결합으로 연결된 것보다 훨씬 안정적이다. 알데히드 반응기는 낮은 pH에서 N-말단에 선택적으로 반응하며, 높은 pH, 예를 들어 pH9.0 조건에서는 라이신 잔기와 공유결합을 형성할 수 있다.
- [0150] 상기 비펩타이드성 중합체인 링커의 양 말단 반응기는 서로 같거나 다를 수 있다. 예를 들어, 한쪽 말단에는 말레이미드 그룹을, 다른 쪽 말단에는 알데히드 그룹, 프로피온 알데히드 그룹, 또는 부틸 알데히드 그룹을 가질 수 있다. 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 결합체를 제조할 수 있다.
- [0151] 본 발명의 결합체는 비펩타이드성 중합체의 양 말단이 각각 면역글로불린 Fc 영역 및 옥신토모듈린 유도체의 아민그룹 또는 티올 그룹(Thiol group)에 결합하는 것등이 될 수 있다.
- [0152] 한편, 본 발명에서 상기 비펩타이드성 중합체는 양쪽 말단에 면역글로불린 Fc 영역 및 단백질 약물과 결합될 수 있는 반응기를 포함하고, 상기 반응기는 특별히 이에 제한되지 않으나, 알데히드 그룹, 프로피온 알데히드 그룹, 부틸 알데히드 그룹, 말레이미드(maleimide) 그룹, 석시니미드(succinimide) 유도체(석시니미딜 프로피오네이트, 히드록시 석시니미딜, 석시니미딜 카르복시메틸 또는 석시니미딜 카보네이트) 등이 될 수 있다.
- [0153] 상기 비펩타이드성 중합체의 양 말단 반응기는 서로 동일하거나 또는 상이할 수 있다. 예를 들어, 상기 비펩타이드성 중합체의 한쪽 말단에는 반응기로서 말레이미드 그룹을 포함하고, 다른 쪽 말단에는 알데히드 그룹, 프로피온 알데히드 그룹 또는 부틸 알데히드 그룹 등을 포함할 수 있다. 예를 들어, 상기 비펩타이드성 중합체의 한쪽 말단이 알데히드 그룹의 반응기를 포함하고, 다른 한쪽 말단이 말레이미드 그룹의 반응기를 포함하는 경우, 비특이적 반응을 최소화하고, 비펩타이드성 중합체의 양 말단에서 생리활성 폴리펩타이드 및 면역글로불린과 각각 결합하는데 효과적일 수 있다. 본 발명의 실시예에 의하면, 프로피온 알데히드를 단독으로 포함하



나 또는 말레이미드 그룹과 알데히드 그룹을 동시에 포함하는 비펩타이드성 중합체인 PEG를 사용하여, 옥신토모듈린 또는 그의 유도체와 면역글로블린 Fc 영역을 공유결합으로 연결하여, 결합체를 합성하였다.

- [0154] 본 발명의 조성물은 당뇨병, 비만성 당뇨병, 및/또는 당뇨 합병증의 예방 또는 치료에 사용할 수 있는 있다.
- [0155] 본 발명의 용어, "예방"이란 목적하는 질환의 발명을 억제하거나 지연시키는 모든 행위를 의미한다. 본 발명에서 "예방"이란 본 발명의 옥신토모듈린 유도체를 투여함에 의하여 혈액 내의 당 농도가 정상 수준으로 잘 조절되어 당뇨병, 비만성 당뇨병, 또는 당뇨 합병증으로의 진행을 억제하거나 지연되는 것을 의미한다.
- [0156] 본 발명의 용어, "치료"란 발생된 질병의 증상을 경감, 개선 또는 완화시키는 모든 행위를 의미한다. 본 발명에서 "치료"란 본 발명의 옥신토모듈린 유도체를 투여함에 의하여 혈액 내의 당 농도가 안정적으로 정상 수준을 유지되어, 당뇨병, 비만성 당뇨병, 또는 당뇨 합병증의 증상이 경감, 개선 또는 완화되는 것을 의미한다.
- [0157] 상기 "당뇨병"은 인슐린의 분비량이 부족하거나 정상적인 기능이 이루어지지 않는 등의 대사질환의 일종으로, 혈중 포도당의 농도가 높아지는 고혈당을 특징으로 하며, 고혈당으로 인하여 여러 증상 및 징후를 일으키고 소변에서 포도당을 배출하게 되는 질병의 의미한다.
- [0158] 상기 "비만성 당뇨병"은 당뇨의 원인이 되는 비만증상을 수반하는 당뇨병, 특히 이형 당뇨나, 일반적으로 이형 당뇨 환자에 수반되는 비만증상을 의미한다. 이형 당뇨환자의 약 80~90%는 비만증상을 수반하며, 이런 환자들은 인슐린 저항성을 특징으로 한다. 적절한 운동과 식이요법 그리고 약물요법으로 비만성 당뇨의 예방 및 증상 경감할 수 있다. 본 발명에서 상기 비만성 당뇨병은 비만으로부터 발생하는 것일 수 있다.
- [0159] 상기 "당뇨 합병증"은 오랜 기간 고혈당 상태가 유지되면서 신체에서 수반되는 여러 병적 증상을 의미하는 것으로, 예를 들어 망막병증, 신기능장애, 신경병증, 혈관 장애로 인한 뇌졸중, 신장, 심장 질환이나 당뇨성 족부 궤양, 그리고 심혈관계 질환이나, 이에 한정되는 것은 아니다. 고혈당 상태가 오랜 기간 유지되면 상기 망막병증, 신기능장애, 신경병증, 혈관 장애로 인한 뇌졸중, 신장, 심장 질환이나 당뇨성 족부 궤양, 그리고 심혈관계 질환의 위험이 높아지게 되므로, 이러한 합병증을 예방하기 위해서는 효과적인 혈당 관리가 필수적이다.
- [0160] 따라서, 본 발명의 약제학적 조성물은 당뇨병, 비만성 당뇨병, 또는 당뇨 합병증의 예방 또는 치료에 사용될 수 있다.
- [0161] 본 발명의 일 실시예에서는 폴리에틸렌글리콜을 통해 본 발명에 따른 옥신토모듈린 유도체와 면역글로블린 Fc 영역이 공유결합으로 연결된, 지속형 옥신토모듈린 유도체 결합체를 제조한 후 이를 고지방 식이 섭취로 인해 비만이 유도된 마우스 모델과 렙틴 수용체를 변이를 통하여 당뇨를 유발시킨 마우스 모델에 투여하였다. 그 결과, 본 발명에 따른 지속형 옥신토모듈린 유도체 결합체를 투여한 군에서 체중 및 사료섭취량이 비만 유도된 동물 모델 대비 현저히 감소하고(도 1), 혈액 내의 당 농도가 유의적으로 감소하는 것을 확인하였다(도 2). 또한, 본 발명에 따른 지속형 옥신토모듈린 유도체 결합체는 상용화된 지속형 GLP-1 유사체인 VICTOZA<sup>®</sup>와 비교시에도 동등 이상의 혈당 개선 효과를 나타내었다(도 2).
- [0162] 본 발명의 일 실시예에서는 폴리에틸렌글리콜을 통해 본 발명에 따른 옥신토모듈린 유도체와 면역글로블린 Fc 영역이 공유결합으로 연결된, 지속형 옥신토모듈린 유도체 결합체를 제조한 후 이를 렙틴 수용체를 변이를 통하여 당뇨를 유발시킨 마우스 모델에 투여하였다. 그 결과, 본 발명에 따른 지속형 옥신토모듈린 유도체 결합체를 투여한 군에서 대조군 대비 체중증가가 현저히 억제되고(도 3), 혈액 내의 당 농도가 유의적으로 감소하는 것을 확인하였으며(도 4), 상용화된 지속형 GLP-1 유사체인 VICTOZA<sup>®</sup>와 비교시에도 우월한 혈당 개선효과를 확인하였다(도 4).
- [0163] 즉, 본 발명에 따른 옥신토모듈린 유도체는 체내의 베타세포의 확장을 유도하여 인슐린 분비량을 늘려 혈액내 당의 조절 능력을 개선시킨다. 또한, 본 발명의 옥신토모듈린 유도체는 체중감소를 유도하여 인슐린 감수성 개선 및 인슐린 저항성으로 인하여 발생될 수 있는 동맥경화, 고지혈증, 고혈압 등 심혈관계 질환으로의 이행을 방지하여 준다. 따라서, 본 발명의 옥신토모듈린 유도체는 당뇨병, 비만성 당뇨병 및 당뇨 합병증 치료제로 유

용히 사용될 수 있다. 또한, 본 발명의 결합체는 천연형 옥신토모듈린에 비하여 GLP-1 수용체 및 글루카곤 수용체에 우수한 활성을 가지며, Fc 영역을 결합시킴에 따라 체내에서 혈중 반감기를 증가시켜서, 오랜 시간 생체 내에서 활성을 유지시킬 수 있다.

- [0164] 본 발명의 조성물은 약제학적 조성물일 수 있다.
- [0165] 본 발명의 약제학적 조성물에는 당뇨병, 비만성 당뇨병, 또는 당뇨 합병증의 예방 또는 치료 효과를 나타내는 약학적 제제가 추가로 포함될 수 있다. 당뇨병, 비만성 당뇨병, 또는 당뇨 합병증의 치료제로 공지된 약학적 제제를 병용투여하기 위해 본 발명의 조성물에 추가로 포함될 수 있다.
- [0166] 따라서, 본 발명의 조성물은 당뇨병, 비만성 당뇨병, 또는 당뇨 합병증의 예방 또는 치료에 사용하기 위하여 단독으로 사용하거나, 다른 약제와 병용 투여될 수 있다.
- [0167] 본 발명에서 "투여"는, 어떠한 적절한 방법으로 환자에게 소정의 물질을 도입하는 것을 의미하며, 상기 유도체의 투여 경로는 약물이 목적 조직에 도달할 수 있는 한 어떠한 일반적인 경로를 통하여 투여될 수 있다. 복강내 투여, 정맥내 투여, 근육내 투여, 피하 투여, 피내 투여, 경구 투여, 국소 투여, 비내 투여, 폐내 투여, 직장 내 투여 등이 될 수 있으나, 이에 제한되지는 않는다. 그러나 경구 투여시, 펩타이드는 소화가 되기 때문에 경구용 조성물은 활성 약제를 코팅하거나 위에서의 분해로부터 보호되도록 제형화 하는 것이 바람직하다. 바람직하게는 주사제 형태로 투여될 수 있다. 또한, 약제학적 조성물은 활성 물질이 표적 세포로 이동할 수 있는 임의의 장치에 의해 투여될 수 있다.
- [0168] 본 발명의 옥신토모듈린 유도체를 포함한 약제학적 조성물은 약제학적으로 허용 가능한 담체를 포함할 수 있다. 약제학적으로 허용되는 담체는 경구투여시에는 결합제, 활택제, 붕해제, 부형제, 가용화제, 분산제, 안정화제, 현탁화제, 색소, 향료 등을 사용할 수 있으며, 주사제의 경우에는 완충제, 보존제, 무통화제, 가용화제, 등장화제, 안정화제 등을 혼합하여 사용할 수 있으며, 국소투여용의 경우에는 기제, 부형제, 윤활제, 보존제 등을 사용할 수 있다. 본 발명의 약제학적 조성물의 제형은 상술한 바와 같은 약제학적으로 허용되는 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 제형화 할 수 있다.
- [0169] 한편, 제제화에 적합한 담체, 부형제 및 희석제의 예로는 락토즈, 텍스트로즈, 수크로즈, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 미정질 셀룰로즈, 폴리비닐피롤리돈, 물, 메틸하이드록시벤조에이트, 프로필하이드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 또는 광물유 등이 사용될 수 있다. 또한, 충전제, 향응집제, 윤활제, 습윤제, 향료, 방부제 등을 추가로 포함할 수 있다.
- [0170] 본 발명의 약제학적 조성물은 치료할 질환, 투여 경로, 환자의 연령, 성별 및 체중 및 질환의 중증도 등의 여러 관련 인자와 함께, 활성성분인 약물의 종류에 따라 결정된다. 본 발명의 약제학적 조성물은 생체 내 지속성 및 역가가 우수하므로, 본 발명의 약제학적 제제의 투여 횟수 및 빈도를 현저하게 감소시킬 수 있다.
- [0171] 다른 양태로서, 본 발명은 옥신토모듈린 유도체를 개체에 투여하는 단계를 포함하는, 당뇨병, 비만성 당뇨병, 또는 당뇨 합병증을 예방 또는 치료하는 방법을 제공한다.
- [0172] 상기 옥신토모듈린 유도체, 당뇨병, 비만성 당뇨병, 및 당뇨 합병증은 상기 설명한 바와 동일하다.
- [0173] 상기 개체는 당뇨병 및 비만성 당뇨병, 또는 당뇨 합병증이 의심되는 개체로서, 상기 질환이 발병하였거나 발병할 수 있는 인간을 포함한 쥐, 가축 등을 포함하는 포유 동물을 의미하나, 본 발명의 옥신토모듈린 유도체로 치료 가능한 개체는 제한 없이 포함된다.
- [0174] 본 발명의 치료 방법은 결합체를 포함하는 약학적 조성물을 약학적 유효량으로 투여하는 것을 포함할 수 있다. 적합한 총 1일 사용량은 올바른 의학적 판단범위 내에서 처치의에 의해 결정될 수 있으며, 1회 또는 수회로 나누어 투여할 수 있다. 그러나 본 발명의 목적상, 특정 환자에 대한 구체적인 치료적 유효량은 달성하고자 하는 반응의 종류와 정도, 경우에 따라 다른 제제가 사용되는지의 여부를 비롯한 구체적 조성물, 환자의 연령, 체중, 일반 건강 상태, 성별 및 식이, 투여 시간, 투여 경로 및 조성물의 분비율, 치료기간, 구체적 조성물과 함께 사

용되거나 동시 사용되는 약물을 비롯한 다양한 인자와 의약 분야에 잘 알려진 유사 인자에 따라 다르게 적용하는 것이 바람직하다.

- [0175] 또 다른 양태로서, 본 발명은 옥신토모듈린 유도체 결합체의 제조방법을 제공한다.
- [0176] 상기 제조방법은 (1) 양 말단에 알데히드, 말레이미드, 또는 석시니미드 유도체 반응기를 갖는 비펩타이드성 중합체를 사용하여 옥신토모듈린 유도체 펩타이드의 아민 그룹 또는 티올 그룹에 공유결합으로 연결하는 단계;
- [0177] (2) 상기 (1)의 반응 혼합물로부터 아미노말단 이외의 위치에 비펩타이드성 중합체가 공유 결합된 옥신토모듈린 유도체 펩타이드를 포함하는 연결체를 분리하는 단계; 및
- [0178] (3) 분리된 연결체의 비펩타이드성 중합체의 다른 쪽 말단에 면역글로불린 Fc 영역을 공유결합으로 연결하여 비펩타이드성 중합체의 양쪽 말단이 각각 면역글로불린 Fc 영역 및 옥신토모듈린 유도체 펩타이드와 결합된 펩타이드 결합체를 생성하는 단계를 포함할 수 있다.
- [0179] 보다 구체적으로, 상기 제조방법은 1) 각 말단에 알데히드 반응기와 말레이미드 반응기를 갖는 비펩타이드성 중합체를 옥신토모듈린 유도체의 시스테인 잔기에 공유결합으로 연결시키는 단계; (2) (1)의 반응 혼합물로부터 시스테인 잔기에 비펩타이드성 중합체가 공유결합된 옥신토모듈린 유도체를 포함하는 연결체를 분리하는 단계; 및 (3) 분리된 연결체의 비펩타이드성 중합체의 다른 쪽 말단에 면역글로불린 Fc 영역을 공유결합으로 연결하여 비펩타이드성 중합체의 양쪽 말단이 각각 면역글로불린 Fc 영역 및 옥신토모듈린 유도체와 결합된 단백질 결합체를 생성하는 단계를 포함할 수 있다.

**발명의 효과**

- [0180] 본 발명의 옥신토모듈린 유도체는 천연형의 옥신토모듈린에 비해 GLP-1 수용체 및 글루카곤 수용체에 대해 높은 활성을 가진다. 본 발명의 옥신토모듈린 유도체는 베타세포의 확장을 유도하고 인슐린 분비량을 증가시켜 고칼로리 및 고지방 식이로 인해 증가된 혈당을 감소시킨다. 또한, 체중 및 식이섭취 감소를 유도하여 인슐린 감수성을 개선시키고, 인슐린 저항성으로 인해 조절이 되지 않는 혈당을 정상 수준으로 유지하게 한다. 따라서, 당뇨병 및 이와 관련된 질환의 예방 또는 치료에 있어서 유용하게 사용할 수 있다.

**도면의 간단한 설명**

- [0181] 도 1은 고지방 식이로 장기(26주) 유도된 비만 마우스(High fat diet-induced obesity mice)에 지속형 옥신토모듈린 유도체의 투여에 의한 체중(body weight)의 변화를 나타낸 그래프이다. 최초 투여일 측정된 체중을 기준으로 하여 체중 변화량을 백분율(%)로 환산하여 나타내었다.
- 도 2는 고지방 식이로 장기(26주) 유도된 비만 마우스(High fat diet-induced obesity mice)에 지속형 옥신토모듈린 유도체의 투여에 의한 혈중 당 농도의 변화를 AUC(area under curve)로 비교한 그래프이다.
- 도 3은 렙틴 수용체를 변이를 통하여 당뇨를 유발시킨 마우스 모델에 4주간의 지속형 옥신토모듈린 유도체 투여에 의한 4주간 체중(body weight)의 변화를 나타낸 그래프이다.
- 도 4는 렙틴 수용체를 변이를 통하여 당뇨를 유발시킨 마우스 모델에 4주간의 지속형 옥신토모듈린 유도체 투여에 의한 혈중 당 농도의 변화를 AUC(area under curve)로 비교한 그래프이다.

**발명을 실시하기 위한 구체적인 내용**

- [0182] 이하, 하기 실시예에 의하여 본 발명을 보다 상세하게 설명한다. 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하기 위한 것일 뿐 본 발명의 범위가 이들로 한정되는 것은 아니다.

**[0183] 실시예 1. in vitro 활성용 세포주 생산**



[0184] 실시예 1-1: GLP-1에 대해 cAMP 반응을 보이는 세포주의 생산

[0185] 인간 GLP-1 수용체 유전자의 cDNA(OriGene Technologies, Inc. USA)에서 ORF (open reading frame)에 해당하는 부분을 주형으로 하고, HindIII 절단부위와 EcoRI 절단부위를 각각 포함하는 정방향 및 역방향 프라이머를 이용한 PCR을 수행하여, PCR 산물을 수득하였다.

[0186] 정방향 프라이머: 5'-CCCGGCCCCCGCGGCCGCTATTTCGAAATAC-3'(서열번호 50)

[0187] 역방향 프라이머: 5'-GAACGGTCCGGAGGACGTCGACTCTTAAGATAG-3'(서열번호 51)

[0188] 상기 PCR 산물을 공지된 동물세포 발현벡터인 xOGC/dhfr에 클로닝하여 제조합 벡터 xOGC/GLP-1R를 제조하였다.

[0189] 상기 제조한 제조합 벡터 xOGC/GLP-1R를 DMEM/F12 (10% FBS) 배지에서 배양한 CHO DG44 세포주에 리포펙타민 (Lipofectamine, invitrogene, USA)을 이용한 방법으로 도입하여 형질전환체를 수득하고, 상기 형질전환체를 1mg/mL G418 및 10 nM 메토틱사이드(methotrexate)를 포함하는 선별배지에서 선별 배양한 다음, 이로부터 단일 클론 세포주를 선별하여, GLP-1에 대해 우수한 농도의존적 cAMP 반응을 보이는 세포주를 최종적으로 선별하였다.

[0190] 실시예 1-2: 글루카곤에 대해 cAMP 반응을 보이는 세포주의 생산

[0191] 인간 글루카곤 수용체 유전자의 cDNA(OriGene Technologies, Inc. USA)에서 ORF에 해당하는 부분을 주형으로 하고, EcoRI 절단부위와 XhoI 절단부위를 각각 포함하는 정방향 및 역방향 프라이머를 이용한 PCR을 수행하여, PCR 산물을 수득하였다.

[0192] HindIII 절단부위와 EcoRI 절단부위를 각각 포함하는 정방향 및 역방향 프라이머를 이용한 PCR을 수행하여, PCR 산물을 수득하였다.

[0193] 정방향 프라이머: 5'-CAGCGACACCGACCGTCCCCCGTACTTAAGGCC-3'(서열번호 52)

[0194] 역방향 프라이머: 5'-CTAACCGACTCTCGGGGAAGACTGAGCTCGCC-3'(서열번호 53)

[0195] 상기 PCR 산물을 공지된 동물세포 발현벡터인 xOGC/dhfr에 클로닝하여 제조합 벡터 xOGC/GCGR을 제조하였다.

[0196] 상기 제조한 제조합 벡터 xOGC/GCGR를 DMEM/F12 (10% FBS) 배지에서 배양한 CHO DG44 세포주에 리포펙타민을 이용한 방법으로 도입하여 형질전환체를 수득하고, 상기 형질전환체를 1mg/mL G418 및 10 nM 메토틱사이드를 포함하는 선별배지에서 선별 배양한 다음, 이로부터 단일 클론 세포주를 선별하여, 글루카곤에 대해 우수한 농도의존적 cAMP 반응을 보이는 세포주를 최종적으로 선별하였다.

[0197] 실시예 2. 옥신토모듈린 유도체 in vitro 활성

[0198] 실시예 2-1: 옥신토모듈린 유도체들의 합성

[0199] 옥신토모듈린 유도체들의 in vitro 활성을 측정하기 위하여 하기의 아미노산 서열을 가지는 옥신토모듈린 유도체들을 합성하였다(표 1).

**표 1**

옥신토모돌린 및 옥신토모돌린 유도체

[0200]

서열번호	서열
서열번호1	HSQGTFTSDYSKYLDSRRAQDFVQWLMNTKRNRRNIA
서열번호2	CA-SQGTFTSDYSKYLDEEAVRLFIEWLMNTKRNRRNIA
서열번호3	CA-SQGTFTSDYSKYLDERRAQDFVAWLKNTGPSSGAPPPS
서열번호4	CA-GQGTFTSDYSRYLEEEAVRLFIEWLKNGGPSSGAPPPS
서열번호5	CA-GQGTFTSDYSRQMEEEAVRLFIEWLKNGGPSSGAPPPS
서열번호6	CA-GEGTFTSDLRQMEEEAVRLFIEWAAHSQGTFTSDYSKYLD
서열번호7	CA-SQGTFTSDYSRYLDEEAVRLFIEWLMNTK
서열번호8	CA-SQGTFTSDLRQLEEEAVRLFIEWLMNK
서열번호9	CA-GQGTFTSDYSRYLDEEAVXLFIEWLMNTKRNRRNIA
서열번호10	CA-SQGTFTSDYSRQMEEEAVRLFIEWLMNGGPSSGAPPPSK
서열번호11	CA-GEGTFTSDLRQMEEEAVRLFIEWAAHSQGTFTSDYSRYLKD
서열번호12	CA-SQGTFTSDYSRYLDGGGHGEGTFTSDLRQMEEEAVK
서열번호13	CA-SQGTFTSDYSRYLDXEAVXLFIEWLMNTK
서열번호14	CA-GQGTFTSDYSRYLDEEAVXLFIXWLMNTKRNRRNIA
서열번호15	CA-GQGTFTSDYSRYLDEEAVRLFIXWLMNTKRNRRNIA
서열번호16	CA-SQGTFTSDLRQLEGGHSGQGTFTSDLRQLEK
서열번호17	CA-SQGTFTSDYSRYLDEEAVRLFIEWIRNTKRNRRNIA
서열번호18	CA-SQGTFTSDYSRYLDEEAVRLFIEWIRNGGPSSGAPPPSK
서열번호19	CA-SQGTFTSDYSRYLDEEAVKLFIEWIRNTKRNRRNIA
서열번호20	CA-SQGTFTSDYSRYLDEEAVKLFIEWIRNGGPSSGAPPPSK
서열번호21	CA-SQGTFTSDYSRQLEEEAVRLFIEWVRNTKRNRRNIA
서열번호22	DA-SQGTFTSDYSKYLDEKRAKEFVQWLMNTK
서열번호23	HAi <b>b</b> QGTFTSDYSKYLDEKRAKEFVQWLMNT
서열번호24	HAi <b>b</b> QGTFTSDY SKYLDEKRAK E <b>F</b> VQWLMNTC
서열번호25	HAi <b>b</b> QGTFTSDYSKYLDEKRAKE <b>F</b> VQWLMNTC
서열번호26	HAi <b>b</b> QGTFTSDYSKYLDEKRAKE <b>F</b> VQWLMNTC
서열번호27	HAi <b>b</b> QGTFTSDYSKYLDE <b>Q</b> AAKE <b>F</b> ICWLMNT
서열번호28	HAi <b>b</b> QGTFTSDY SKYLDEKRAK E <b>F</b> VQWLMNT
서열번호29	H(d)SQGTFTSDYSKYLDSRRAQDFVQWLMNTKRNRRNIA
서열번호30	CA-SQGTFTSDYSKYLDSRRAQDFVQWLMNTKRNRRNIA
서열번호31	CA-(d)SQGTFTSDYSKYLDSRRAQDFVQWLMNTKRNRRNIA
서열번호32	CA-Ai <b>b</b> QGTFTSDYSKYLDEKRAKEFVQWLMNTC
서열번호33	HAi <b>b</b> QGTFTSDYAKYLDEKRAKEFVQWLMNTC
서열번호34	YAi <b>b</b> QGTFTSDYSKYLDEKRAKEFVQWLMNTC

[0201]

상기 표 1에서 볼드체로 표시된 아미노산들은 링형성을 의미하며 X로 표기된 아미노산은 비천연형 아미노산인 알파-메틸-글루탐산을 의미한다. 또한, CA는 4-이미다조아세틸(4-imidazoacetyl)을, DA는 데스아미노-히스티딜(desamino-histidyl)을, (d)S는 d-serine을 의미한다.

[0202]

**실시예 2-2: 옥신토모돌린 유도체의 in vitro 활성 측정**

[0203]

상기 실시예 2-1에서 제조한 펩타이드의 효력을 측정하기 위해 상기 실시예 1-1 및 1-2에서 제조한 형질전환체를 이용한 in vitro 세포 활성을 측정하는 방법을 이용하였다.

[0204]

상기 각 형질전환체는 CHO (chinese hamster ovary)에 인간 GLP-1 수용체와 글루카곤 수용체 유전자를 각각 발현하도록 형질전환된 것으로서, GLP-1과 글루카곤의 활성을 측정하기에 적합하므로, 각 옥신토모돌린 유도체의 활성을 각각의 형질전환체를 이용하여 측정하였다.

[0205] 구체적으로, 상기 각 형질전환체를 1주일에 2 또는 3회 계대배양하고, 96웰 플레이트에 각 웰당  $1 \times 10^5$ 개의 계대배양된 형질전환체를 분주하여 24시간 동안 배양하였다.

[0206] 상기 배양된 세포를 KRB 완충액으로 세척하고, 1mM IBMX를 포함하는 KRB 완충액 40ml에 현탁시킨 다음, 5분간 상온에 정치하였다. 옥신토모듈린(서열번호 1) 또는 옥신토모듈린 유도체들(서열번호 2-6, 8, 10-13, 17, 18, 23-25, 27, 28 및 32-34)을 1000 nM부터 5배씩 0.02 nM까지 연속적으로 희석하고, 이를 40ml씩 상기 세포에 첨가한 다음, 1시간 동안 37°C의 온도조건으로 CO<sub>2</sub> 배양기에서 배양하였다. 그런 다음, 세포용해완충액(cell lysis buffer) 20ml씩 가하여 세포를 용해시키고, 상기 세포용해물을 cAMP assay kit(Molecular Device, USA)에 적용하여 cAMP 농도를 측정하고, 이로부터 EC<sub>50</sub>값을 산출한 후, 상호 비교하였다(표 2).

**표 2**

[0207] 옥신토모듈린 유도체의 GLP-1 수용체와 글루카곤 수용체 in vitro 활성비교

서열번호	EC <sub>50</sub> (nM)	
	CHO/GLP-1R	CHO/GCGR
서열번호1	50 - 210	10 - 43
서열번호2	51.8	12.8
서열번호3	>1,000	637.7
서열번호4	5.5	>1000
서열번호5	5.9	>1000
서열번호6	500.1	>1000
서열번호8	419.6	>1000
서열번호10	>1,000	>1000
서열번호11	>1,000	>1000
서열번호12	>1,000	>1,000
서열번호13	>1,000	>1000
서열번호17	97.9	>1000
서열번호18	96.3	>1000
서열번호23	2.46	5.8
서열번호24	1.43	6.95
서열번호25	1.9	1.3
서열번호27	2.8-5.5	3.1-5.6
서열번호28	3.1	0.3
서열번호32	41.3	17.7
서열번호33	2.2	80.2
서열번호34	12.5	1.04

[0208] 상기 표 2에서 보듯이, 서열번호 1인 고유 옥신토모듈린의 in vitro 활성에 비해 GLP-1 수용체와 글루카곤 수용체 활성이 우수한 옥신토모듈린 유도체들이 확인되었다.

[0209] 옥신토모듈린은 GLP-1 수용체와 글루카곤 수용체의 활성화를 통해 비만, 고지혈증, 지방간 치료, 동맥경화증 등에 효과가 있음이 알려져 있다. 본 발명에 따른 옥신토모듈린 유도체는 천연형 옥신토모듈린에 비해 GLP-1 수용체와 글루카곤 수용체에 대해 높은 in vitro 활성을 가지고 있는 바, 기존 옥신토모듈린에 비해 높은 효력의 당뇨병 치료제, 비만성 당뇨병 치료제, 또는 당뇨 합병증 치료제로 사용될 수 있음을 알 수 있다.

**[0210] 실시예 3. 옥신토모듈린 유도체(서열번호 23)와 면역글로블린 Fc를 포함하는 결합체의 제조(면역글로블린 Fc 영역 결합 옥신토모듈린 유도체 23)**

[0211] 우선, MAL-10K-ALD PEG(NOF., 일본)를 옥신토모듈린 유도체(서열번호 23)의 아미노산 서열 24번 시스테인 잔기에 페길화시키기 위하여, 옥신토모듈린 유도체(서열번호 23)와 MAL-10K-ALD PEG의 몰비를 1:3, 단백질의 농도를 3

mg/ml로 하여 상온에서 3 시간동안 반응시켰다. 이때, 반응은 50mM Tris 완충액(pH 8.0)에 1M 구아니딘이 첨가된 환경하에서 수행되었다. 반응이 종료된 후, 상기 반응액을 SOURCE S에 적용하여 시스테인에 모노-페길화된 옥신토모듈린 유도체를 정제하였다(Column : SOURCE S, 유속 : 2.0ml/분, 구배 : A 0 →100% 50분 B(A: 20mM Na-citrate, pH 3.0 + 45% 에탄올, B: A + 1M KCl)).

[0212] 다음으로, 상기 정제된 모노-페길화된 옥신토모듈린 유도체(서열번호 23)와 면역글로블린 Fc을 몰비가 1:5, 단백질의 농도를 20mg/ml로 하여 4℃에서 16시간 동안 반응시켰다. 반응액은 100mM 인산칼륨 완충액(pH6.0)에 환원제인 20mM SCB가 첨가된 환경하에서 수행되었다. 반응이 종료된 후, 상기 반응액을 SOURCE 15Q 정제컬럼(Column : SOURCE 15Q, 유속 : 2.0ml/분, 구배 : A 0 → 4% 1분 B → 20% 80분 B(A: 20mM Tris-HCl, pH 7.5, B: A + 1M NaCl))과 Source ISO 정제컬럼(Column : SOURCE ISO, 유속 : 2.0ml/분, 구배 : B 0 → 100% 100분 A,(A: 20mM Tris-HCl, pH 7.5, B: A + 1.1M AS))에 적용하여, 옥신토모듈린 유도체(서열번호 23)와 면역글로블린 Fc를 포함하는 결합체를 정제하였다.

[0213] **실시예 4. 옥신토모듈린 유도체(서열번호 25)와 면역글로블린 Fc를 포함하는 결합체의 제조(면역글로블린 Fc 영역 결합 옥신토모듈린 유도체 25)**

[0214] 우선, MAL-10K-ALD PEG를 옥신토모듈린 유도체(서열번호 25)의 아미노산 서열 30번 시스테인 잔기에 페길화시키기 위하여, 옥신토모듈린 유도체(서열번호 25)와 MAL-10K-ALD PEG의 몰비를 1:3, 단백질의 농도를 3mg/ml로 하여 상온에서 3 시간동안 반응시켰다. 이때, 반응은 50mM Tris 완충액(pH 8.0)에 1M 구아니딘이 첨가된 환경하에서 수행되었다. 반응이 종료된 후, 상기 반응액을 SOURCE S에 적용하여 시스테인에 모노-페길화된 옥신토모듈린 유도체를 정제하였다(Column : SOURCE S, 유속 : 2.0ml/분, 구배 : A 0 →100% 50분 B(A: 20mM Na-citrate, pH 3.0 + 45% 에탄올, B: A + 1M KCl)).

[0215] 다음으로, 상기 정제된 모노-페길화된 옥신토모듈린 유도체(서열번호 25)와 면역글로블린 Fc을 몰비가 1:5, 단백질의 농도를 20mg/ml로 하여 4℃에서 16시간 동안 반응시켰다. 반응액은 100mM 인산칼륨 완충액(pH6.0)에 환원제인 20mM SCB가 첨가된 환경하에서 수행되었다. 반응이 종료된 후, 상기 반응액을 SOURCE 15Q 정제컬럼(Column : SOURCE 15Q, 유속 : 2.0ml/분, 구배 : A 0 → 4% 1분 B → 20% 80분 B(A: 20mM Tris-HCl, pH 7.5, B: A + 1M NaCl))과 Source ISO 정제컬럼(Column : SOURCE ISO, 유속 : 2.0ml/분, 구배 : B 0 → 100% 100분 A,(A: 20mM Tris-HCl, pH 7.5, B: A + 1.1M AS))에 적용하여, 옥신토모듈린 유도체(서열번호 25)와 면역글로블린 Fc를 포함하는 결합체를 정제하였다.

[0216] **실시예 5. 옥신토모듈린 유도체(서열번호 27)와 면역글로블린 Fc를 포함하는 결합체의 제조(면역글로블린 Fc 영역 결합 옥신토모듈린 유도체 27)**

[0217] 우선, MAL-10K-ALD PEG를 옥신토모듈린 유도체(서열번호 27)의 아미노산 서열 30번 시스테인 잔기에 페길화시키기 위하여, 옥신토모듈린 유도체(서열번호 27)와 MAL-10K-ALD PEG의 몰비를 1:3, 단백질의 농도를 3mg/ml로 하여 상온에서 3 시간동안 반응시켰다. 이때, 반응은 50mM Tris 완충액(pH 8.0)에 1M 구아니딘이 첨가된 환경하에서 수행되었다. 반응이 종료된 후, 상기 반응액을 SOURCE S에 적용하여 시스테인에 모노-페길화된 옥신토모듈린 유도체를 정제하였다(Column : SOURCE S, 유속 : 2.0ml/분, 구배 : A 0 →100% 50분 B(A: 20mM Na-citrate, pH 3.0 + 45% 에탄올, B: A + 1M KCl)).

[0218] 다음으로, 상기 정제된 모노-페길화된 옥신토모듈린 유도체(서열번호 27)와 면역글로블린 Fc을 몰비가 1:5, 단백질의 농도를 20mg/ml로 하여 4℃에서 16시간 동안 반응시켰다. 반응액은 100mM 인산칼륨 완충액(pH6.0)에 환원제인 20mM SCB가 첨가된 환경하에서 수행되었다. 반응이 종료된 후, 상기 반응액을 SOURCE 15Q 정제컬럼(Column : SOURCE 15Q, 유속 : 2.0ml/분, 구배 : A 0 → 4% 1분 B → 20% 80분 B(A: 20mM Tris-HCl, pH 7.5, B: A + 1M NaCl))과 Source ISO 정제컬럼(Column : SOURCE ISO, 유속 : 2.0ml/분, 구배 : B 0 → 100% 100분 A,(A: 20mM Tris-HCl, pH 7.5, B: A + 1.1M AS))에 적용하여, 옥신토모듈린 유도체(서열번호 27)와 면역글로블린 Fc를 포함하는 결합체를 정제하였다.

[0219] 실시예 6. 지속형 옥신토모듈린 유도체가 비만 모델인 고 지방식이 유도(HF DIO) 마우스의 체중 및 혈당 개선에 미치는 영향

[0220] 실시예 6-1: 시험 방법

[0221] 6주령 마우스 (C57BL/6, 120-130g)는 (주)오리엔트 바이오(OrientBIO, Korea)에서 구입하였다. 구입 한 C57BL/6은 고지방 식이로 비교적 쉽게 비만을 유도 가능하여 비만 및 당뇨 시험에 널리 사용되는 동물이다. HF DIO 마우스는 당뇨병 연구에 많이 사용되는 설치류 중 한 종류로써 Leptin 수용기의 mutation을 통해 당뇨를 유발시킨 db/db mice 등과는 다르게 유전자 조작을 통하지 않고 고지방 사료의 장기 식이를 통해 자연스럽게 사람과 유사한 비만 당뇨 증상을 발현하기 때문에 본 연구에서도 비만성 당뇨병에 있어 본 제제의 체중 감소 및 혈당 강하 효능을 확인하기 위하여 본 시험계를 사용하였다.

[0222] 사료는 방사선 조사로 멸균된 실험동물용 사료 고지방 식이(high-fat-diet), 60% Kcal from fat diet, D12492; Research diets Inc.)를 공급받아 자유 급이 시켰으며, 물은 여과 후 자외선 살균된 상수도수를 급수 병을 이용하여 자유 섭취시켰다. GLP 시설기준에 부합되는 사육실에서 조명시간 12시간 (오전 6시 점등-오후 6시 소등)을 유지하였으며, 동물사육 표준 가이드라인에 따라 관리하였다. 이후, 26주간의 비만 유도 기간을 두고 약물 투여를 시작하였으며, 군 분류와 투여는 하기와 같이 5개 군 (n=6)으로 나누어 진행하였다(표 3).

표 3

그룹	투여 약물	투여 방법	
HF DIO 유도군	Vehicle (PBS)	S.C.	주 1회
HF DIO 유도군 + 약물 투여군	VICTOZA <sup>®</sup> 100 nmol/kg	S.C.	하루 1회
	서열번호 25-Fc 결합체 1 nmol/kg	S.C.	주 1회
	서열번호 25-Fc 결합체 3 nmol/kg		
	서열번호 25-Fc 결합체 5 nmol/kg		

[0224] 구체적으로, 1군 (HF DIO 유도군, 대조군)은 고지방 사료를 섭취시킨 군으로서, 약물 투여는 돌베코스 포스페이트 완충 식염수(DULBECCO'S PHOSPHATE BUFFERED SALINE, DPBS, Sigma)를 주 1회 이상 피하 투여하였으며, 투여 액량은 5 ml/kg로 주사하였다. 또한 혈당부하능 시험을 위하여, 24시간 전에 돌베코스 포스페이트 완충 식염수 (DULBECCO'S PHOSPHATE BUFFERED SALINE, DPBS, Sigma)를 피하 투여하고, 16시간동안 금식하였다. 꼬리부분에서 혈액을 채취 하여 공복 혈당(fasting glucose)을 측정하고, 1g/kg 체중 포도당(glucose)을 복강 내로 투여하여, 15분, 30분 60분, 90분, 120분후의 혈당을 측정하였다.

[0225] 2군 (HF DIO 유도군 + VICTOZA<sup>®</sup> 100 nmol/kg 투여군 )은 고지방 사료를 섭취시켜 비만 및 고혈당을 유도한 후, 시판 중인 VICTOZA<sup>®</sup> (GSK)를 일 1회 피하 투여하였으며, 투여액량은 5 ml/kg로 주사하였다. 또한, 혈당부하능 시험을 위하여, 시험 전 16시간 동안 금식하고, 4시간 전에 VICTOZA<sup>®</sup> 100 nmol/kg를 피하 투여하였다. 꼬리 부분에서 혈액을 채취하여 공복 혈당(fasting glucose)을 측정하고, 1g/kg 체중 포도당(glucose)을 복강 내로 투여한 뒤, 15분, 30분 60분, 90분, 120분 후의 혈당을 측정하였다

[0226] 3군 (HF DIO 유도군 + 서열번호 25-Fc 결합체 1 nmol/kg투여 군)은 고지방 사료를 섭취시켜 비만 및 고혈당을 유도한 후, 실시예 4에서 제조한 서열번호 25-Fc 결합체를 1 nmol/kg로 주 1회 피하 투여하였으며, 투여액량은 5 ml/kg로 주사하였다. 또한 혈당부하능 시험을 위하여, 24시간 전에 서열번호 25-Fc 결합체 1 nmol/kg을 피하 투여하고, 16시간동안 금식하였다. 꼬리부분에서 혈액을 채취 하여 공복 혈당(fasting glucose)을 측정하고, 1g/kg 체중 포도당(glucose)을 복강 내로 투여한 뒤, 15분, 30분 60분, 90분, 120분후의 혈당을 측정하였다.

[0227] 4군 (HF DIO 유도군 + 서열번호 25-Fc 결합체 3 nmol/kg투여 군)은 고지방 사료를 섭취시켜 비만 및 고혈당을 유도한 후, 실시예 4에서 제조한 서열번호 25-Fc 결합체를 3 nmol/kg로 주 1회 피하 투여하였으며, 투여액량은 5 ml/kg로 주사하였다. 또한 혈당부하능 시험을 위하여, 24시간 전에 서열번호 25-Fc 결합체 3 nmol/kg을 피하 투여하고, 16시간동안 금식하였다. 꼬리부분에서 혈액을 채취 하여 공복 혈당(fasting glucose)을 측정하고, 1g/kg 체중 포도당(glucose)을 복강 내로 투여한 뒤, 15분, 30분 60분, 90분, 120분후의 혈당을 측정하였다.



[0228] 5군 (HF DIO 유도군 + 서열번호 25-Fc 결합체 5 nmol/kg투여 군)은 고지방 사료를 섭취시켜 비만 및 고혈당을 유도한 후, 실시예 4에서 제조한 서열번호 25-Fc 결합체를 5 nmol/kg로 주 1회 피하 투여하였으며, 투여액은 5 ml/kg로 주사하였다. 또한 혈당부하능 시험을 위하여, 24시간 전에 서열번호 25-Fc 결합체 5 nmol/kg을 피하 투여하고, 16시간동안 금식하였다. 꼬리부분에서 혈액을 채취 하여 공복 혈당(fasting glucose)을 측정하고, 1g/kg 체중 포도당(glucose)을 복강 내로 투여한 뒤, 15분, 30분 60분, 90분, 120분후의 혈당을 측정하였다.

[0229] 각각의 군 (n=6) 모두 2주간 식염수 또는 약물을 투여한 후, 체중 및 혈당 개선에 미치는 영향에 대해 분석하였다.

[0230] **실시예 6-2. 지속형 옥신토모듈린 유도체가 안정적인 비만 모델인 고 지방식이 유도(HF DIO) 마우스의 체중 및 혈당 개선에 미치는 영향**

[0231] 본 발명에 따른 지속형 옥신토모듈린 유도체 결합체가 안정적(stable) 비만 모델인 26주간 고 지방식이 유도한 (HF DIO) 마우스의 혈당 개선에 미치는 영향을 알아보기 위하여, 상기 실시예 6-1에서 분류한 DIO 마우스에 지속형 옥신토모듈린 유도체를 주 1회 2주간 피하 투여하였다. 매일 체중 및 사료 섭취량을 측정하고, DIO 마우스의 꼬리부분에서 혈액을 0, 3, 7, 10, 14일에 채취하여 혈액 내의 혈당 변화량을 분석하였다 (HITACHI 7020 사용). 체중 및 혈당의 변화는 도면 1 내지 2에 나타내었다.

[0232] 체중 변화(도 1), 혈당 AUC (도 2)를 나타내었다. 상기에서 얻어진 결과는 통계처리하여 평균값과 평균의 표준 오차를 계산하였다. 각 실험군간(n=6)의 유의성 검정은 one-way ANOVA의 Dunnett's test를 이용하여 통계처리한 후, 신뢰구간 (p value)이 0.05보다 작은 경우 통계학적인 의의가 있는 것으로 판정하였다.

[0233] 구체적으로, 체중의 변화를 측정한 결과, 26주 고지방 식이를 유도한 마우스의 경우 체중감소가 되지 않은 반면, 지속형 옥신토모듈린 유도체(서열번호 25-Fc 결합체) 투여시 용량 의존적으로 체중이 감소함을 확인하였다(도 1).

[0234] 혈액 내의 당 농도의 양을 측정한 결과, 지속형 옥신토모듈린 유도체 (서열번호 25-Fc 결합체) 투여 시, 용량 의존적 혈당 감소를 확인하였고, 특히 지속형 옥신토모듈린 유도체 (서열번호 25-Fc 결합체) 5 nmol/kg 투여 시, 고지방 식이를 한 DIO 마우스 보다 유의적인 혈당 농도 감소를 확인하였으며, 당뇨병 치료제로 상용화되어 시판 중인 VICTOZA<sup>®</sup>와의 비교시에도 동등이상의 혈당 강하 효능을 확인하였다(도 2).

[0235] 상기 실시예 6-2의 결과로부터, PEG에 의해 면역글로블린 Fc 영역과 옥신토모듈린 유도체가 공유 결합된, 본 발명의 지속형 옥신토모듈린 유도체 결합체는 단고 지방식이 유도 (HF DIO) 마우스에서 체중을 감소시키고, 혈중 당농도를 개선시킴으로써, 당뇨병 또는 이와 관련된 비만성 당뇨병 치료에 유용히 사용될 수 있음을 확인하였다.

[0236] **실시예 7. 지속형 옥신토모듈린 유도체가 렙틴(leptin) 수용체의 변이를 통하여 당뇨를 유도한 db/db 마우스의 체중 및 혈당 개선에 미치는 영향**

[0237] **실시예 7-1: 시험 방법**

[0238] 수컷 7주령 BKS.Cg -/+Lepr<sup>db</sup>/+Lepr<sup>db</sup>/01aHsd mice 마우스 (25 ± 3 g, Harlan U.S.A)는 (주)두얼 바이오텍 (korea)를 통하여 구입하였다. BKS.Cg -/+Lepr<sup>db</sup>/+Lepr<sup>db</sup>/01aHsd 마우스(이하 db / db 마우스)는 ob/ ob 마우스와 더불어 당뇨병 연구에 가장 많이 사용되는 설치류로써, Leptin 수용기의 mutation을 통해 사람과 유사한 당뇨병 증상을 발현하기 때문에 본 연구에서도 당뇨병 치료제의 개발에 있어 본 제제의 혈당 강하 효능을 확인하기 위하여 본 시험계를 사용하였다.

[0239] 동물 입수 후, 1주일간 실험 환경에 순화 및 적응시키고 혈당에 따라 무작위로 군 분리하였다. 사료는 방사선 조사로 멸균된 실험동물용 고형사료(Picolab Rodent diet 5053)를 공급받아 자유 급이 시켰으며, 물은 여과 후

자외선 살균된 상수도수를 급수 병을 이용하여 자유 섭취시켰다. GLP 시설기준에 부합되는 사육실에서 조명시간 12시간 (오전 6시 점등-오후 6시 소등)을 유지하였으며, 동물사육 표준 가이드라인에 따라 관리하였다. 군 분류와 투여는 하기와 같이 4개 군 (n=7)으로 나누어 진행하였다(표 4).

**표 4**

그룹	투여 약물	투여 방법	
대조군	Vehicle (PBS)	S.C.	주 1회 x 4
약물 투여군	VICTOZA <sup>®</sup> 60 nmol/kg	S.C.	하루 1회 x 28
	VICTOZA <sup>®</sup> 100 nmol/kg		
	서열번호 23-Fc 결합체 15 nmol/kg	S.C.	주 1회 x 4
	서열번호 25-Fc 결합체 6 nmol/kg		

[0241] 구체적으로, 1군(vehicle)은 약물 대조군으로서, 약물 투여는 돌베코스 포스페이트 완충 식염수(DULBECCO'S PHOSPHATE BUFFERED SALINE, DPBS, Sigma)를 주 1회 피하 투여하였으며, 투여액량은 5 ml/kg로 주사하였다.

[0242] 2군(VICTOZA<sup>®</sup> 60nmol/kg 투여군)은 약물 투여군으로서, 시판 중인 Victoza<sup>®</sup> (GSK)60 nmol/kg(당뇨 용량)를 일 1회 피하 투여하였으며, 투여액량은 5 ml/kg로 주사하였다.

[0243] 3군(VICTOZA<sup>®</sup> 100nmol/kg 투여군)은 약물 투여군으로서, 시판 중인 Victoza<sup>®</sup> (GSK)100 nmol/kg(비만 용량)를 일 1회 피하 투여하였으며, 투여액량은 5 ml/kg로 주사하였다.

[0244] 4군 (서열번호 23-Fc 결합체 15 nmol/kg)은 약물 투여군으로서, 실시예 4에서 제조한 서열번호 23-Fc 결합체를 15 nmol/kg로 주 1회 피하 투여하였으며, 투여액량은 5 ml/kg로 주사하였다.

[0245] 5군 (서열번호 25-Fc 결합체 6 nmol/kg)은 약물 투여군으로서, 실시예 4에서 제조한 서열번호 25-Fc 결합체를 6 nmol/kg로 주 1회 피하 투여하였으며, 투여액량은 5 ml/kg로 주사하였다.

[0246] 각각의 군 (n=7) 모두 4주간 식염수 또는 약물을 투여한 후, 체중증가 억제와 혈당 개선에 미치는 영향에 대해 분석하였다.

[0247] **실시예 7-2: 지속형 옥신토모듈린 유도체가 렙틴(leptin) 수용체의 변이를 통하여 당뇨를 유도한 db/db 마우스의 체중 및 혈당 개선에 미치는 영향 분석**

[0248] 본 발명에 따른 지속형 옥신토모듈린 유도체 결합체가 렙틴 수용체 변이를 통하여 유도된 당뇨 모델인 db/db 마우스의 혈당 개선에 미치는 영향을 알아보기 위하여, 상기 실시예 7-1에서 분류한 db/db 마우스에 지속형 옥신토모듈린 유도체를 주 1회 4주간 피하 투여하였다. 주 2회 체중 변화를 측정하고, db/db 마우스의 꼬리부분에서 혈액을 채취하여(1,4주차-매일, 2,3주차-주2회) 혈당 변화량(HITACHI 7020 사용)을 측정하였다.

[0249] 체중 변화(도 3), 혈당 AUC (도 4)를 나타내었다. 상기에서 얻어진 결과는 통계처리하여 평균값과 평균의 표준 오차를 계산하였다. 각 실험군간(n=6)의 유의성 검정은 one-way ANOVA의 Dunnett's test를 이용하여 통계처리한 후, 신뢰구간 (p value)이 0.05보다 작은 경우 통계학적인 의미가 있는 것으로 판정하였다.

[0250] 구체적으로, 체중의 변화를 측정한 결과, db/db 마우스 대조군의 경우 체중이 투여 시작일 대비하여 지속적으로 증가한 반면, 지속형 옥신토모듈린 유도체 (서열번호 23-Fc 결합체, 서열번호 25-Fc 결합체) 투여 시, 투여 시작일 대비 거의 변화가 없어 유의적인 체중 증가 억제효과를 나타내었다(도 3).

[0251] 혈액 내의 당 농도의 양을 측정한 결과, 지속형 옥신토모듈린 유도체 (서열번호 23-Fc 결합체, 서열번호 25-Fc 결합체) 투여 시, 대조군 대비 유의한 혈당 감소를 확인하였고, 특히 지속형 옥신토모듈린 유도체 (서열번호 25-Fc 결합체) 6 nmol/kg 투여 시, 당뇨병 치료제로 상용화되어 시판 중인 VICTOZA<sup>®</sup>와의 비교시에도 우월한 혈당강하 효과를 나타내었다(도 4).

[0252]



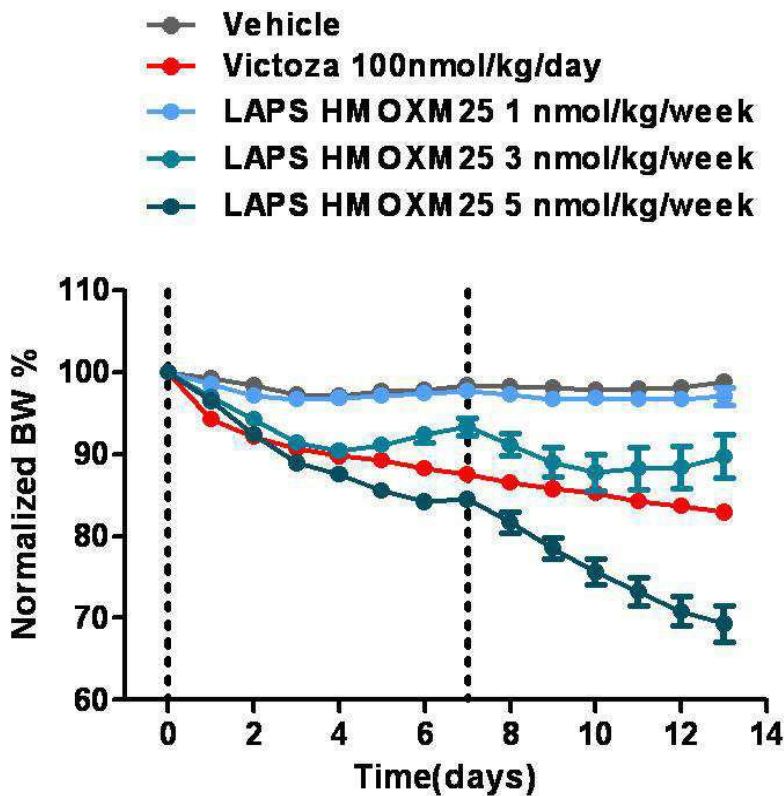
[0253] 상기 실시예 7의 결과로부터, PEG에 의해 면역글로블린 Fc 영역과 옥신토모듈린 유도체가 공유 결합된, 본 발명의 지속형 옥신토모듈린 유도체 결합체는 랩틴 수용체 변이를 통하여 당뇨를 유도한 db/db 마우스에서 당뇨치료의 지표인 혈당 농도를 당뇨 대조군 및 당뇨 치료제로 사용중인 VICTOZA® 대비 유의하게 개선시킴으로서 당뇨병 치료에 매우 유용히 사용될 수 있을 뿐 아니라, 뚜렷한 체중 증가 억제효과를 나타내어 당뇨와 관련된 심혈관계 합병증을 줄여 줄 수 있는 가능성을 확인하였다.

[0254] 상기 실시예 6과 7의 결과로부터, 본 발명의 지속형 옥신토모듈린 유도체 결합체는 혈당 강하 효과가 공지된 VICTOZA®와 비교하여 동등 이상의 우수한 혈당강하 효과 및 우월한 체중 감소효과를 나타내는 바, 혈당 강하 효과와 관련된 당뇨병 치료제, 비만성 당뇨병 치료제, 및 당뇨 합병증 치료제로 유용히 사용될 수 있음을 확인하였다.

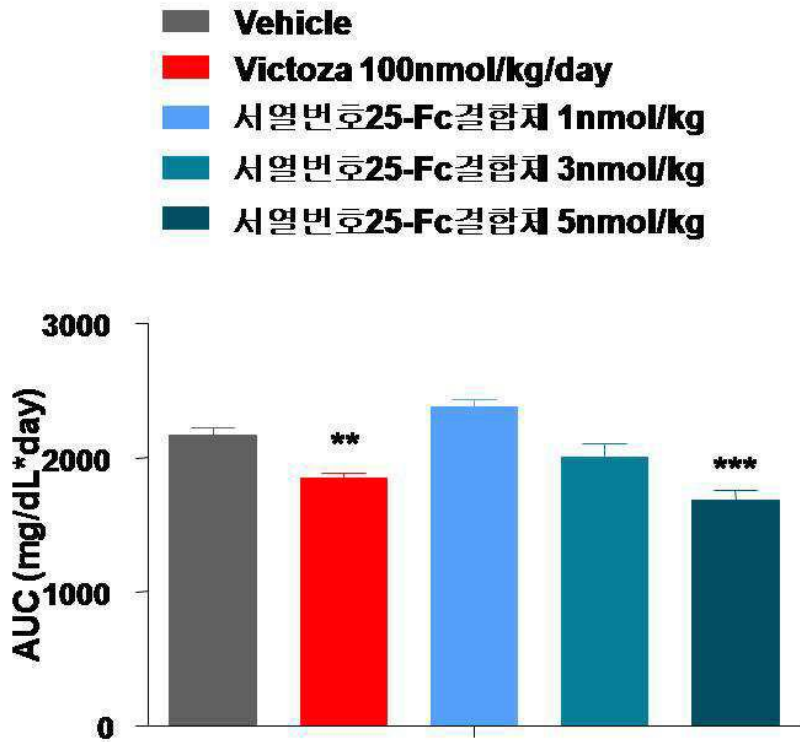
[0255] 이상의 설명으로부터, 본 발명이 속하는 기술분야의 당업자는 본 발명이 그 기술적 사상이나 필수적 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 실시될 수 있다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 이와 관련하여, 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적인 것이 아닌 것으로서 이해해야만 한다. 본 발명의 범위는 상기 상세한 설명보다는 후술하는 특허 청구범위의 의미 및 범위 그리고 그 등가 개념으로부터 도출되는 모든 변경 또는 변형된 형태가 본 발명의 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.

**도면**

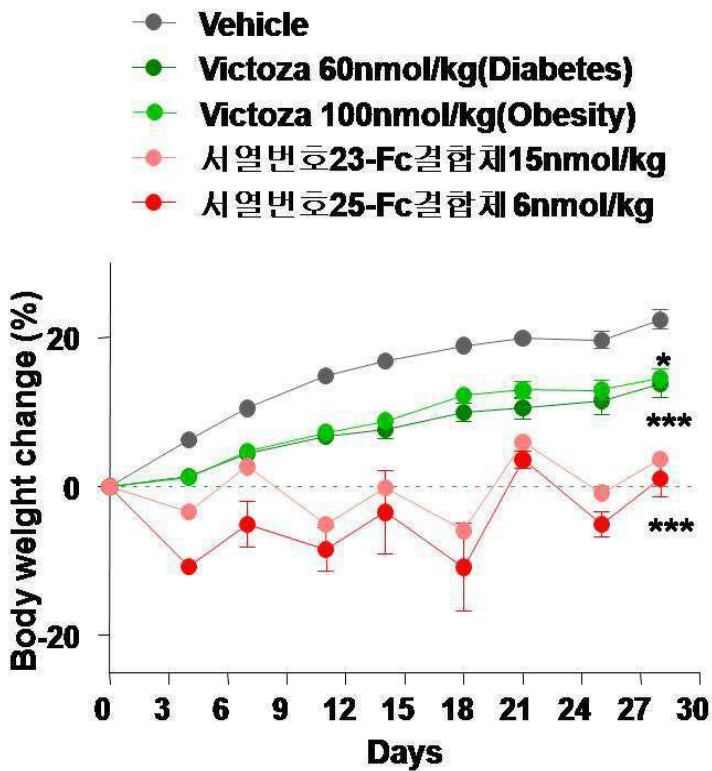
**도면1**



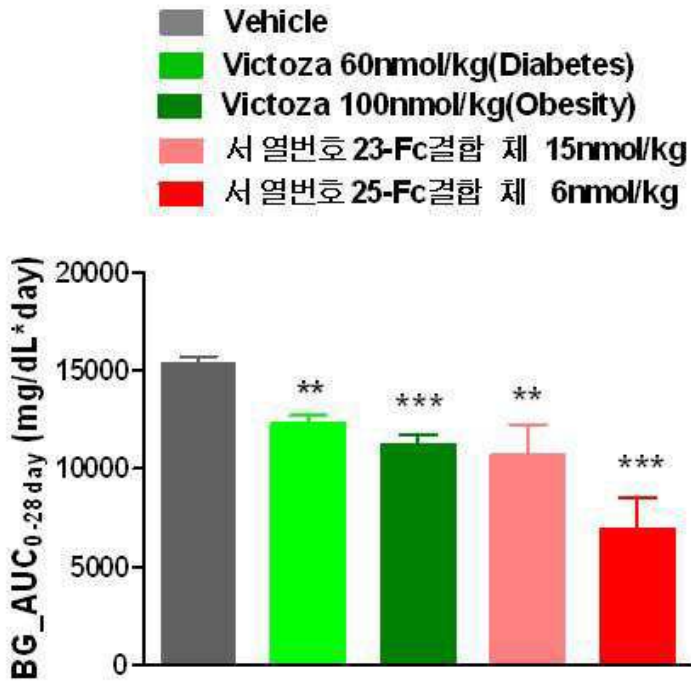
도면2



도면3



도면4



서열 목록

- <110> HANMI PHARM. CO., LTD.
  - <120> A composition for treating diabetes or diabetesity comprising  
oxyntomodulin analog
  - <130> PA120942KR
  - <160> 53
  - <170> KopatentIn 2.0
  - <210> 1
  - <211> 37
  - <212> PRT
  - <213> oxyntomodulin
  - <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 Lys Arg Asn  
 20                    25                    30
- Arg Asn Asn Ile Ala

35  
 <210> 2  
 <211> 37  
 <212> PRT  
 <213> oxyntomodulin derivative  
 <220><221> VARIANT  
 <222> (1)  
 <223> This "H" refers a derivative of histidine, 4-imidazoacetyl.  
 <400> 2

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

35  
 <210> 3  
 <211> 39  
 <212> PRT  
 <213> oxyntomodulin derivative  
 <220><221> VARIANT  
 <222> (1)  
 <223> This "H" refers a derivative of histidine, 4-imidazoacetyl.  
 <400> 3

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

35  
 <210> 4  
 <211> 39  
 <212> PRT  
 <213> oxyntomodulin derivative

<220><221> VARIANT

<222> (1)

<223> This "H" refers a derivative of histidine, 4-imidazoacetyl.

<400> 4

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

1 5 10 15

Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Leu Lys Asn Gly Gly Pro Ser

20 25 30

Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser

35

<210> 5

<211> 39

<212> PRT

<213> oxyntomodulin derivative

<220><221> VARIANT

<222> (1)

<223> This "H" refers a derivative of histidine, 4-imidazoacetyl.

<400> 5

His Gly Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Arg Gln Met Glu Glu

1 5 10 15

Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Leu Lys Asn Gly Gly Pro Ser

20 25 30

Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser

35

<210> 6

<211> 42

<212> PRT

<213> oxyntomodulin derivative

<220><221> VARIANT

<222> (1)

<223> This "H" refers a derivative of histidine, 4-imidazoacetyl.

<400> 6

His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Arg Gln Met Glu Glu

1                    5                    10                    15  
 Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Ala Ala His Ser Gln Gly Thr  
                          20                    25                    30  
 Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp  
                          35                    40

<210> 7  
 <211> 30  
 <212> PRT  
 <213> oxyntomodulin derivative  
 <220><221> VARIANT  
 <222> (1)  
 <223> This "H" refers a derivative of histidine, 4-imidazoacetyl.  
 <400> 7

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

<210> 8  
 <211> 29  
 <212> PRT  
 <213> oxyntomodulin derivative  
  
 <220><221> VARIANT  
 <222> (1)  
 <223> This "H" refers a derivative of histidine, 4-imidazoacetyl.  
 <400> 8

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

<210> 9  
 <211> 37  
 <212> PRT  
 <213> oxyntomodulin derivative

<220><221> VARIANT

<222> (1)

<223> This "H" refers a derivative of histidine, 4-imidazoacetyl.

<220><221> VARIANT

<222> (20)

<223> Xaa = alpha-methyl-glutamic acid

<400> 9

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

1 5 10 15

Glu Ala Val Xaa Leu Phe Ile Glu Trp Leu Met Asn Thr Lys Arg Asn

20 25 30

Arg Asn Asn Ile Ala

35

<210> 10

<211> 40

<212> PRT

<213> oxyntomodulin derivative

<220><221> VARIANT

<222> (1)

<223>

> This "H" refers a derivative of histidine, 4-imidazoacetyl.

<400> 10

His Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Arg Gln Met Glu Glu

1 5 10 15

Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Leu Met Asn Gly Gly Pro Ser

20 25 30

Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser Lys

35 40

<210> 11

<211> 43

<212> PRT

<213> oxyntomodulin derivative

<220><221> VARIANT



<222> (1)

<223> This "H" refers a derivative of histidine, 4-imidazoacetyl.

<400> 11

His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Arg Gln Met Glu Glu

1 5 10 15

Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Ala Ala His Ser Gln Gly Thr

20 25 30

Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Arg Tyr Leu Asp Lys

35 40

<210> 12

<211> 38

<212> PRT

<213> oxyntomodulin derivative

<220

><221> VARIANT

<222> (1)

<223> This "H" refers a derivative of histidine, 4-imidazoacetyl.

<400> 12

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Glu Glu Glu Ala Val Lys

35

<210> 13

<211> 30

<212> PRT

<213> oxyntomodulin derivative

<220><221

> VARIANT

<222> (1)

<223> This "H" refers a derivative of histidine, 4-imidazoacetyl.

<220><221> VARIANT

<222> (16)

<223> Xaa = alpha-methyl-glutamic acid

<220><221> VARIANT

<222> (20)

<223> Xaa = alpha-methyl-glutamic acid

<400> 13

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

1 5 10 15

Glu Ala Val Xaa Leu Phe Ile Glu Trp Leu Met Asn Thr Lys

20 25 30

<210> 14

<211> 37

<212> PRT

<213> oxyntomodulin derivative

<220><221> VARIANT

<222> (1)

<223> This "H" refers a derivative of histidine, 4-imidazoacetyl.

<220><221> VARIANT

<222> (20)

<223> Xaa = alpha-methyl-glutamic acid

<220><221> VARIANT

<222> (24)

<223> Xaa = alpha-methyl-glutamic acid

<400> 14

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

1 5 10 15

Glu Ala Val Xaa Leu Phe Ile Xaa Trp Leu Met Asn Thr Lys Arg Asn

20 25 30

Arg Asn Asn Ile Ala

35

<210> 15

<211> 37

<212> PRT

<213> oxyntomodulin derivative

<220><221> VARIANT

<222> (1)

<223> This "H" refers a derivative of histidine, 4-imidazoacetyl.

<220><221> VARIANT

<222> (24)

<223> Xaa = alpha-methyl-glutamic acid

<400> 15

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

1 5 10 15

Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Xaa Trp Leu Met Asn Thr Lys Arg Asn

20 25 30

Arg Asn Asn Ile Ala

35

<210> 16

<211> 34

<212> PRT

<213> oxyntomodulin derivative

<220><221> VARIANT

<222> (1)

<223> This "H" refers a derivative of histidine, 4-imidazoacetyl.

<400> 16

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Glu Lys

<210> 17

<211> 37

<212> PRT

<213> oxyntomodulin derivative

<220><221> VARIANT

<222> (1)

<223> This "H" refers a derivative of histidine, 4-imidazoacetyl.

<400> 17

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

1 5 10 15

Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Ile Arg Asn Thr Lys Arg Asn

20 25 30

Arg Asn Asn Ile Ala

35

<210> 18

<211> 40

<212> PRT

<213> oxyntomodulin derivative

<220><221> VARIANT

<222> (1)

<223> This "H" refers a derivative of histidine, 4-imidazoacetyl.

<400> 18

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

1 5 10 15

Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Ile Arg Asn Gly Gly Pro Ser

20 25 30

Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser Lys

35 40

<210> 19

<211> 37

<212> PRT

<213> oxyntomodulin derivative

<220><221> VARIANT

<222> (1)

<223> This "H" refers a derivative of histidine, 4-imidazoacetyl.

<400> 19

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

1 5 10 15

Glu Ala Val Lys Leu Phe Ile Glu Trp Ile Arg Asn Thr Lys Arg Asn



<211> 30  
 <212> PRT  
 <213> oxyntomodulin derivative  
 <220><221> VARIANT  
 <222> (1)  
 <223> This "H" refers a derivative of histidine, desamino-histidyl.  
 <400> 22

His Ser 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 Lys

20 25 30

<210> 23  
 <211> 29  
 <212> PRT  
 <213> oxyntomodulin derivative

<220><221> VARIANT  
 <222> (2)  
 <223> Xaa = aminoisobutyric acid  
 <400> 23

His 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 Cys Trp Leu Met Asn Thr

20 25

<210> 24  
 <211> 30  
 <212> PRT  
 <213> oxyntomodulin derivative

<220><221> VARIANT  
 <222> (2)  
 <223> Xaa = aminoisobutyric acid  
 <400> 24

His 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> 25

<211> 30

<212> PRT

<213> oxyntomodulin derivative

<220><221> VARIANT

<222> (2)

<223> Xaa = aminoisobutyric acid

<400> 25

His 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> 26

<211> 30

<212> PRT

<213> oxyntomodulin derivative

<220><221> VARIANT

<222> (2)

<223> Xaa = aminoisobutyric acid

<400> 26

His 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> 27

<211> 29

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> oxyntomodulin derivative

<220><221> VARIANT

<222> (2)



<223> Xaa = aminoisobutyric acid

<400> 27

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

1 5 10 15

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

20 25

<210> 28

<211> 29

<212> PRT

<213> oxyntomodulin derivative

<220><221> VARIANT

<222> (2)

<223> Xaa = aminoisobutyric acid

<400> 28

His 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

20 25

<210> 29

<211> 37

<212> PRT

<213> oxyntomodulin derivative

<220><221> VARIANT

<222> (2)

<223> This "S" refers a variant of serine, d-serine.

<400> 29

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Arg Asn Asn Ile Ala

35

<210> 30

<211> 37  
 <212> PRT  
 <213> oxyntomodulin derivative  
 <220><221> VARIANT  
 <222> (1)  
 <223> This "H" refers a derivative of histidine, 4-imidazoacetyl  
 <400> 30

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

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

Arg Asn Asn Ile Ala  
 35

<210> 31  
 <211> 37  
 <212> PRT  
 <213> oxyntomodulin derivative  
 <220><221> VARIANT  
 <222> (1)  
 <223> This "H" refers a derivative of histidine, 4-imidazoacetyl

<220><221> VARIANT  
 <222> (2)  
 <223> This "S" refers a variant of serine, d-serine.  
 <400> 31

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

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

Arg Asn Asn Ile Ala  
 35

<210> 32  
 <211> 30  
 <212> PRT

<213> Artificial Sequence  
 <220><223> oxyntomodulin derivative  
 <220><221> VARIANT  
 <222> (1)  
 <223> This "H" refers a derivative of histidine, 4-imidazoacetyl.  
 <220><221> VARIANT  
 <222> (2)  
 <223> Xaa = aminoisobutyric acid

<400> 32  
 His 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> 33  
 <211> 30  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence

<220><223> oxyntomodulin derivative  
 <220><221> VARIANT  
 <222> (2)  
 <223> Xaa = aminoisobutyric acid

<400> 33  
 His Xaa Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ala 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> 34  
 <211> 30  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence

<220><223> oxyntomodulin derivative  
 <220><221> VARIANT  
 <222> (2)

<223> Xaa = aminoisobutyric acid

<400> 34

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> 35

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> group R2

<400> 35

Lys Arg Asn Arg Asn Asn Ile Ala

1 5

<210> 36

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> group R2

<400> 36

Gly Pro Ser Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser

1 5 10

<210> 37

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

><223> group R2

<400> 37

Gly Pro Ser Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser Lys

1 5 10

<210> 38

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> group R2

<400> 38

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

<210> 39

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> group R2

<400> 39

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

1 5 10 15

<210> 40

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> group R2

<400> 40

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

1 5 10 15

Glu Ala Val Lys

20

<210> 41

<211> 28

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> group A or B

<400> 41

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

1 5 10 15

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

20

25

<210> 42  
 <211> 28  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> group A or B  
 <400> 42  
 Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Glu Glu  
 1 5 10 15

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

<210> 43

<211> 28

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> group A or B

<400> 43

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

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

<210> 44

<211> 28

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> group A or B

<400> 44

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

Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Leu Lys Asn Gly  
 20 25

<210> 45

<211> 28

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> group A or B

<400> 45

Gly Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Arg Gln Met Glu Glu Glu

1 5 10 15

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

20 25

<210> 46

<211> 26

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> group A or B

<400> 46

Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Arg Gln Met Glu Glu Glu

1 5 10 15

Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Ala Ala

20 25

<210> 47

<211> 28

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> group A or B

<400> 47

Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Arg Gln Met Glu Glu Glu

1 5 10 15

Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Leu Met Asn Gly

20 25

<210> 48

<211> 24

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> group B

<400> 48

Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Arg Gln Met Glu Glu Glu

1 5 10 15

Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp

20

<210> 49

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> group B

<400> 49

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

1 5 10

<210> 50

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 50

cccggccccc gcggccgcta ttcgaaatac 30

<210> 51

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 51

gaacggtccg gaggacgtcg actcttaaga tag 33

<210> 52

<211

> 34

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 52

cagcgacacc gaccgtcccc ccgtacttaa ggcc 34



<210> 53  
<211> 32  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 53

ctaaccgact ctcggggaag actgagctcg cc

32