

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일

2022년 3월 31일 (31.03.2022)



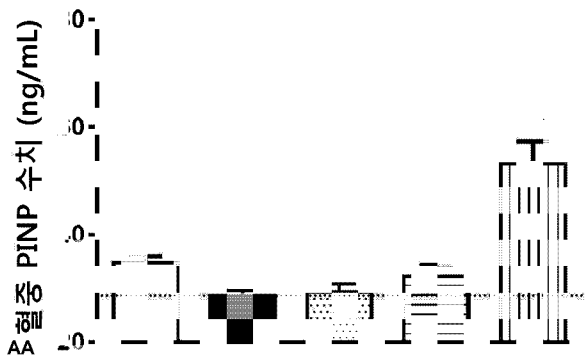
(10) 국제공개번호

WO 2022/065898 A1

- (51) 국제특허분류: A61K 38/16 (2006.01) A61K 38/26 (2006.01)
A61K 47/68 (2017.01) A61P 19/00 (2006.01)
A61K 38/17 (2006.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2021/013007
- (22) 국제출원일: 2021년 9월 24일 (24.09.2021)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보: 10-2020-0125196 2020년 9월 25일 (25.09.2020) KR
- (71) 출원인: 한미약품 주식회사 (HANMI PHARM. CO., LTD.) [KR/KR]; 18536 경기도 화성시 팔탄면 무하로 214, Gyeonggi-do (KR).
- (72) 발명자: 이종석 (LEE, Jong Suk); 18469 경기도 화성시 동탄기흥로 550, Gyeonggi-do (KR). 이상돈 (LEE, Sang Don); 18469 경기도 화성시 동탄기흥로 550, Gyeonggi-do (KR). 이상현 (LEE, Sang Hyun); 18469 경기도 화성시 동탄기흥로 550, Gyeonggi-do (KR).
- (74) 대리인: 특허법인한얼 (HANOL INTELLECTUAL PROPERTY & LAW); 05836 서울시 송파구 법원로 135, 6층, Seoul (KR).
- (81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, IT, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW.
- (84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI

(54) Title: PHARMACEUTICAL COMPOSITION FOR PREVENTING OR TREATING BONE DISEASES, COMPRISING TRIPLE AGONIST OR CONJUGATE THEREOF HAVING ACTIVITY WITH RESPECT TO ALL OF GLUCAGON, GLP-1 AND GLP RECEPTORS

(54) 발명의 명칭: 글루카곤, GLP-1 및 GIP 수용체 모두에 활성을 갖는 삼중 활성체 또는 이의 결합체를 포함하는 골 질환에 대한 예방 또는 치료용 약학적 조성물



- BB □ 정상 대조군
- CC ■ 난소 절제 대조군
- DD ▨ 리라글루타이드 (25 nmol/kg/BID)
- EE ▩ 서열번호: 42의 지속형 결합체 (2.2 nmol/kg/Q3D)
- EE ▩ 서열번호: 42의 지속형 결합체 (4.4 nmol/kg/Q3D)

AA ... Blood PINP value
 BB ... Normal control group
 CC ... Ovariectomized control group
 DD ... Liraglutide (25 nmol/kg/BID)
 EE ... Long-acting conjugate of SEQ ID NO: 42

(57) Abstract: The present invention relates to a therapeutic use, for bone disease, of a triple agonist and/or a long-acting conjugate thereof having activity with respect to all of glucagon, glucagon-like peptide-1 (GLP-1) and glucose-dependent insulinotropic polypeptide (GIP) receptors, and can significantly reduce symptoms of bone diseases, and enhance patient convenience through a dramatic increase in blood half-life and long-acting in-vivo effects.

(57) 요약서: 본 발명은 글루카곤 수용체, GLP-1 (Glucagon-like peptide-1) 수용체, 및 GIP(Glucose-dependent insulinotropic polypeptide) 수용체에 대해 활성을 갖는 삼중 활성체 및/또는 이의 지속형 결합체의 골 질환에 대한 치료적 용도에 관한 것으로, 골 질환의 증상을 유의적으로 감소시키며, 혈중 반감기 및 생체 내 효력 지속 효과의 획기적인 증가로 인하여 환자들의 편리성을 증대시킬 수 있다.



WO 2022/065898 A1

(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML,
MR, NE, SN, TD, TG).

공개:

- 국제조사보고서와 함께 (조약 제21조(3))
- 명세서의 서열목록 부분과 함께 (규칙 5.2(a))

명세서

발명의 명칭: 글루카곤, GLP-1 및 GIP 수용체 모두에 활성을 갖는 삼중 활성체 또는 이의 결합체를 포함하는 골 질환에 대한 예방 또는 치료용 약학적 조성물

기술분야

[1] 본 발명은 글루카곤, GLP-1 및 GIP 수용체 모두에 활성을 갖는 삼중 활성체 및/또는 이의 지속형 결합체의 골 질환에 대한 치료적 용도에 관한 것이다.

[2]

배경기술

[3] 뼈의 발생, 성장 및 대사과정에는 뼈의 형성(bone modeling)과 재형성(remodeling) 과정이 중요한 역할을 한다. 뼈의 형성은 태생기부터 시작하여 이후 골격이 성숙되어 성장이 끝나는 청장년기까지 지속되어 20대에서 30대 초반까지 최대 골량을 형성하게 된다. 이후 약 30년 동안은 뼈를 제거하고 다시 이를 보충하는 골재형성 과정을 반복하게 되는데 이때는 골 형성과 골 흡수가 서로 짝을 이루어 균형을 유지하게 된다. 이 시기가 지난 후에는 골 흡수에 따른 골 소실을 골 형성이 충분히 따라갈 수 없어 결국 연 0.3 ~ 0.5% 정도의 골량 감소를 겪게 되며, 특히 여성의 경우에는 폐경 초기에 연 2 ~ 3%의 상당한 골 손실을 겪게 된다.

[4]

[5] 골 조직은 연골과 골격계를 구성하며 기계적 기능으로 지지와 근 부착의 역할을 하고, 생체기관 및 골수를 보호하는 기능을 하며, 칼슘과 인 이온의 항상성 유지를 위해 이들을 보존하는 기능을 담당한다. 골 조직은 교원질, 당단백질과 같은 세포 기질과 조골세포, 파골 세포 및 골세포 등 여러 종류의 세포들로 이루어진다. 골수 내 간질세포(bone marrow stromal cell)로부터 유래한 조골세포는 골 형성에 주된 역할을 담당하며, 조혈모세포로부터 유래 되는 파골 세포는 파괴되고, 노화된 골의 흡수를 담당하여, 조골세포와 파골 세포의 균형 있는 작용을 하여 골의 재형성(remodeling)을 유지하게 된다. 그러나 파골세포의 과도한 활성이나 조골세포의 활성 저하는 골형성의 리모델링 과정에서 불균형을 초래하여, 생체 내에서 파골세포와 조골세포와의 평형이 깨짐으로써 골 질환을 유발하게 된다.

[6]

[7] 골 질환의 대표적인 예로서 골다공증은 정도에 차이는 있으나 노년층, 특히 폐경기 이후의 여성에게 있어서는 피할 수 없는 증상으로, 선진국에서는 인구가 노령화됨에 따라 골다공증 및 그 치료제에 대한 관심이 점차 증가하고 있다. 골다공증은 정상인에 비하여 현저하게 뼈의 양이 줄어든 상태를 지칭하며, 체중이나 기계적인 압력에 견디는 힘이 약해지고 실내에서 가볍게 넘어지는

것과 같은 미약한 충격에도 뼈가 쉽게 골절을 일으키는 흔한 대사성 질환이다. 우리 몸의 뼈는 흡수되고 생성되는 재현성 과정을 반복하며 골다공증은 이런 골형성과 골흡수 과정의 균형이 깨져 생기는 것으로 보고 있다. 즉 골흡수 속도가 빨라지거나 생성속도가 느려져 골생성량이 골흡수량을 따라지 못하는 경우 골다공증이 발생하며, 30대 후반부터 나이가 들수록 뼈의 생성속도보다는 흡수속도가 빨라져 골량이 점차 감소하여 결국 뼈는 점차 약해지는 것으로 알려지고 있다. 골다공증을 치료하기 위하여 골 형성을 증가시키거나 골소실을 방지하여 현재의 골량을 유지하기 위한 약물들이 개발되고 있다. 골흡수를 억제시키는 약물로는 비스포스포네이트(bisphosphonate)이 사용되거나 (Can Fam Physician. 2014 Apr; 60(4): 324-333)), 칼시토닌, 또는 에스트로겐 등이 사용되고 있으며, 골 형성을 증가시키기 위해 부갑상선호르몬이 사용되고 있다.

[8]

발명의 상세한 설명

기술적 과제

[9] 골 질환에 대한 실질적이고 효과적인 치료제의 개발은 미비한 상태인 바, 지속적인 치료제의 개발의 필요성이 대두되고 있다.

[10]

과제 해결 수단

[11] 본 발명의 하나의 목적은 글루카곤 수용체, GLP-1(Glucagon-like peptide-1) 수용체, 및 GIP(Glucose-dependent insulintropic polypeptide) 수용체에 대해 활성을 갖는 펩타이드 또는 이러한 펩타이드의 지속형 결합체를 포함하는 골 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공하는 것이다.

[12] 본 발명의 다른 목적은 글루카곤 수용체, GLP-1 수용체, 및 GIP 수용체에 대해 활성을 갖는 펩타이드 또는 이러한 펩타이드의 지속형 결합체를 포함하는 골 질환의 예방 또는 개선용 식품 조성물을 제공하는 것이다.

[13] 본 발명의 다른 목적은 상기 펩타이드 또는 이러한 펩타이드의 지속형 결합체; 또는 상기 펩타이드 또는 상기 지속형 결합체를 포함하는 조성물을 이를 필요로 하는 개체에 투여하는 단계를 포함하는, 골 질환의 예방 또는 치료 방법을 제공하는 것이다.

[14] 본 발명의 다른 목적은 골 질환의 예방 또는 치료를 위한 약제의 제조에 있어서, 상기 펩타이드 또는 이러한 펩타이드의 지속형 결합체; 또는 상기 펩타이드 또는 상기 지속형 결합체를 포함하는 조성물의 용도를 제공하는 것이다.

[15]

발명의 효과

[16] 본 발명에 따른 삼중 활성체 또는 이의 지속형 결합체는 글루카곤 수용체, GLP-1 수용체, 및 GIP 수용체에 대해 활성을 가져, 골다공증을 비롯한 골 관련 질환의 치료에 적용될 수 있다.

[17]

도면의 간단한 설명

[18] 도 1은, 골다공증 모델로서 난소 적출 랫트를 사용하여 서열번호 42의 지속형 삼중활성체 결합체를 3일 1회 간격으로 4주간 지속적으로 투여한 후 랫트의 혈중 PINP 수치를 나타낸 도이다. 효력비교 목적으로 GLP-1 아고니스트로 알려진 리라글루타이드는 1일 2회 간격으로 투여를 진행하였다 (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, vs. 부형제 대조군 by One-way ANOVA).

[19] 도 2는 골다공증 모델로서 난소 적출 랫트를 사용하여 서열번호 42의 지속형 삼중활성체 결합체를 3일 1회 간격으로 4주간 지속적으로 투여한 후 랫트의 혈중 오스테오칼신 수치를 나타낸 도이다. 효력비교 목적으로 GLP-1 아고니스트로 알려진 리라글루타이드는 1일 2회 간격으로 투여를 진행하였다 (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, vs. 부형제 대조군 by One-way ANOVA).

[20] 도 3은, 서열번호: 42의 지속형 결합체를 MC3T3-E1 조골세포에 처리하여 조골세포 분화 유전자인 RUNX2, OCN, ALP, ColA1의 mRNA 발현을 확인한 결과를 나타낸 도이다 (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, vs. 부형제 대조군 by One-way ANOVA).

[21] 도 4는, 서열번호: 42의 지속형 결합체를 MC3T3-E1 조골세포에 처리하여 ColA1 단백질 발현의 변화를 확인한 도이다 (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, vs. 부형제 대조군 by One-way ANOVA).

[22] 도 5는, 서열번호: 42의 지속형 결합체의 처리에 따른 MC3T3-E1 조골세포의 세포 생존 능력 증가 효과를 확인한 도이다 (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, vs. 부형제 대조군 by One-way ANOVA).

[23]

발명의 실시를 위한 최선의 형태

[24] 본 발명을 구현하는 하나의 양태는 글루카곤 수용체, GLP-1(Glucagon-like peptide-1) 수용체, 및 GIP(Glucose-dependent insulinotropic polypeptide) 수용체에 대해 활성을 갖는 펩타이드를 포함하는 골 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물이다.

[25] 하나의 구체예로서, 상기 골 질환의 예방 또는 치료를 위한 약학적 조성물은, 약학적으로 허용되는 부형제와 서열번호 1 내지 102 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하는 펩타이드를 약학적 유효량으로 포함하는 것을 특징으로 한다.

[26] 앞선 구체예 중 어느 하나에 따른 약학적 조성물로서, 상기 펩타이드는 지속형 결합체의 형태이고, 상기 지속형 결합체는 하기 화학식 1로 표시되는 것을 특징으로 한다:

[27] [화학식 1]

[28] X - L - F

[29] 단 이 때 X는 서열번호 1 내지 102 중 어느 하나의 아미노산 서열의

펩타이드이고;

- [30] L은 에틸렌글리콜 반복 단위를 함유하는 링커이며,
- [31] F는 면역글로불린 Fc 영역이고,
- [32] -는 X와 L 사이, L과 F 사이의 공유결합 연결을 나타낸다.
- [33] 앞선 구체에 중 어느 하나에 따른 조성물로서, 상기 펩타이드는 그 C-말단이 아미드화된 것을 특징으로 한다.
- [34] 앞선 구체에 중 어느 하나에 따른 조성물로서, 상기 펩타이드는 이의 C-말단이 아미드화되거나 또는 자유 카르복실기 (-COOH)를 갖는 것을 특징으로 한다.
- [35] 앞선 구체에 중 어느 하나에 따른 조성물로서, 상기 펩타이드는 서열번호 21, 22, 42, 43, 50, 64, 66, 67, 70, 71, 76, 77, 96, 97과 100으로 이루어진 군으로부터 선택하는 아미노산을 포함하는 것을 특징으로 한다.
- [36] 앞선 구체에 중 어느 하나에 따른 조성물로서, 상기 펩타이드는 서열번호 21, 22, 42, 43, 50, 66, 67, 77, 96, 97과 100으로 이루어진 군으로부터 선택하는 아미노산 서열을 포함하는 것을 특징으로 한다.
- [37] 앞선 구체에 중 어느 하나에 따른 조성물로서, 상기 펩타이드는 서열번호 21, 22, 42, 43, 50, 77과 96으로 이루어진 군으로부터 선택하는 아미노산 서열을 포함하는 것을 특징으로 한다.
- [38] 앞선 구체에 중 어느 하나에 따른 조성물로서, 펩타이드 서열은 N-말단으로부터 16번 아미노산과 20번 아미노산은 서로 고리를 형성하는 것을 특징으로 한다.
- [39] 앞선 구체에 중 어느 하나에 따른 조성물로서, 상기 L은 폴리에틸렌 글리콜인 것을 특징으로 한다.
- [40] 앞선 구체에 중 어느 하나에 따른 조성물로서, 상기 L 내의 에틸렌글리콜 반복 단위 부분의 화학식량은 1 내지 100 kDa 범위에 있는 것을 특징으로 한다.
- [41] 앞선 구체에 중 어느 하나에 따른 조성물로서, 상기 F는 IgG Fc 영역인 것을 특징으로 한다.
- [42] 앞선 구체에 중 어느 하나에 따른 조성물로서, 상기 면역글로불린 Fc 영역은 비당쇄화된 것을 특징으로 한다.
- [43] 앞선 구체에 중 어느 하나에 따른 조성물로서, 상기 면역글로불린 Fc 영역은 (a) CH1 도메인, CH2 도메인, CH3 도메인 및 CH4 도메인; (b) CH1 도메인 및 CH2 도메인; (c) CH1 도메인 및 CH3 도메인; (d) CH2 도메인 및 CH3 도메인; (e) CH1 도메인, CH2 도메인, CH3 도메인 및 CH4 도메인 중 1개 또는 2개 이상의 도메인과 면역글로불린 힌지 영역 또는 힌지 영역의 일부와의 조합; 및 (f) 중쇄 불변영역 각 도메인과 경쇄 불변영역의 이량체로 구성된 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 한다.
- [44] 앞선 구체에 중 어느 하나에 따른 조성물로서, 상기 면역글로불린 Fc 영역은 이황화 결합을 형성할 수 있는 부위가 제거되거나, 천연형 Fc에서 N-말단의 일부 아미노산이 제거되거나, 천연형 Fc의 N-말단에 메티오닌 잔기가 부가되거나,

보체결합부위가 제거되거나 또는 ADCC(antibody dependent cell mediated cytotoxicity) 부위가 제거된 것을 특징으로 한다.

- [45] 앞선 구체에 중 어느 하나에 따른 조성물로서, 상기 면역글로불린 Fc 영역은 IgG, IgA, IgD, IgE 또는 IgM에서 유래된 것을 특징으로 한다.
- [46] 앞선 구체에 중 어느 하나에 따른 조성물로서, 상기 면역글로불린 Fc 영역은 IgG, IgA, IgD, IgE, IgM으로 이루어진 군에서 선택되는 면역글로불린에서 유래된 상이한 기원을 가진 도메인의 하이브리드인 것을 특징으로 한다.
- [47] 앞선 구체에 중 어느 하나에 따른 조성물로서, 상기 면역글로불린 Fc 영역은 이량체 형태(dimeric form)인 것을 특징으로 한다.
- [48] 앞선 구체에 중 어느 하나에 따른 조성물로서, 상기 면역글로불린 Fc 영역은 두 개의 폴리펩타이드 사슬로 이루어진 이량체이며, L의 한 말단이 상기 두 폴리펩타이드 사슬 중 하나의 폴리펩타이드 사슬에만 연결되어 있는 것을 특징으로 한다.
- [49] 앞선 구체에 중 어느 하나에 따른 조성물로서, 상기 면역글로불린 Fc 영역은 IgG4 Fc 영역인 것을 특징으로 한다.
- [50] 앞선 구체에 중 어느 하나에 따른 조성물로서, 상기 면역글로불린 Fc 영역은 인간 IgG4 유래의 비-당쇄화된 Fc 영역인 것을 특징으로 한다.
- [51] 앞선 구체에 중 어느 하나에 따른 조성물로서, 상기 면역글로불린 Fc 영역은 2개의 폴리펩타이드 사슬이 이황화결합으로 연결되어 있는 구조이며, 상기 두 사슬 중 한 사슬의 질소 원자를 통해서만 연결된 것을 특징으로 한다.
- [52] 앞선 구체에 중 어느 하나에 따른 조성물로서, 상기 면역글로불린 Fc 영역은 서열번호 123의 아미노산 서열인 단량체를 포함하는 것을 특징으로 한다.
- [53] 앞선 구체에 중 어느 하나에 따른 조성물로서, 상기 면역글로불린 Fc 영역은 서열번호 123의 아미노산 서열의 단량체의 동종이량체인 것을 특징으로 한다.
- [54] 앞선 구체에 중 어느 하나에 따른 조성물로서, 상기 면역글로불린 Fc 영역은 그 N-말단 프롤린의 질소 원자를 통하여 연결된 것을 특징으로 한다.
- [55] 앞선 구체에 중 어느 하나에 따른 조성물로서, 상기 면역글로불린 Fc 영역인 F와 X가 당쇄화되어 있지 않은 것을 특징으로 한다.
- [56] 앞선 구체에 중 어느 하나에 따른 조성물로서, 상기 에틸렌글리콜 반복 단위는 $[OCH_2CH_2]_n$ 로서, n은 자연수로, 상기 펩타이드 결합체 내 $[OCH_2CH_2]_n$ 부위의 평균 분자량, 예컨대 수평균 분자량이 1 내지 100 kDa이 되도록 정해지는 것을 특징으로 한다.
- [57] 앞선 구체에 중 어느 하나에 따른 조성물로서, 상기 n의 값은 상기 펩타이드 결합체 내 $[OCH_2CH_2]_n$ 부위의 평균 분자량, 예컨대 수평균 분자량이 10 kDa이 되도록 정해지는 것을 특징으로 한다.
- [58] 앞선 구체에 중 어느 하나에 따른 조성물로서, 상기 결합체는 L의 한쪽 말단이 F의 아민기 또는 티올기와, L의 다른 말단이 X의 아민기 또는 티올기에 각각 반응하여 형성된 공유결합으로 F 및 X에 각각 연결되어 있는 것을 특징으로

한다.

- [59] 앞선 구체에 중 어느 하나에 따른 조성물로서, 상기 L은 폴리에틸렌 글리콜인 것을 특징으로 한다.
- [60] 앞선 구체에 중 어느 하나에 따른 조성물로서, 상기 골 질환은 골다공증, 골절, 골경화증, 골화석증, 관절염, 파제트병(Paget's disease), 치주질환, 골 형성 부전증, 또는 골감소증(osteopenia)인 것을 특징으로 한다.
- [61] 앞선 구체에 중 어느 하나에 따른 조성물로서, 상기 골 질환은 골 감소성 질환인 것을 특징으로 한다.
- [62] 앞선 구체에 중 어느 하나에 따른 조성물로서, 상기 약학적 조성물은 투여 시 하기 특성 중 하나 이상을 갖는 것을 특징으로 한다:
- [63] (i) 혈중 오스테오칼신 수치 감소; 또는
- [64] (ii) 혈중 PINP (procollagen I intact N-terminal propeptide) 수치 증가.
- [65] 앞선 구체에 중 어느 하나에 따른 조성물로서, 상기 약학적 조성물은 하기 특성 중 하나 이상을 갖는 것을 특징으로 한다:
- [66] (i) 조골세포의 분화 증가; 또는
- [67] (ii) 조골세포의 생존 능력 증가.
- [68]
- [69] 본 발명을 구현하기 위한 다른 하나의 양태는 상기 펩타이드 또는 이러한 펩타이드의 지속형 결합체; 또는 상기 펩타이드 또는 상기 지속형 결합체를 포함하는 조성물을 이를 필요로 하는 개체에 투여하는 단계를 포함하는, 골 질환의 예방 또는 치료 방법이다.
- [70]
- [71] 본 발명을 구현하기 위한 다른 하나의 양태는 골 질환의 예방 또는 치료를 위한 약제의 제조에 있어서 상기 펩타이드 또는 이러한 펩타이드의 지속형 결합체; 또는 상기 펩타이드 또는 상기 지속형 결합체를 포함하는 조성물의 용도이다.
- [72]
- [73] 본 발명을 구현하기 위한 다른 하나의 양태는 골 질환의 예방 또는 치료를 위한 상기 펩타이드 또는 이러한 펩타이드의 지속형 결합체; 또는 상기 펩타이드 또는 상기 지속형 결합체를 포함하는 조성물의 용도이다.
- [74]
- 발명의 실시를 위한 형태**
- [75] 이하에서는, 본 발명을 더욱 상세히 설명한다.
- [76] 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.
- [77] 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.

[78]

[79] 본 명세서 전반을 통하여, 천연적으로 존재하는 아미노산에 대한 통상의 1문자 및 3문자 코드가 사용될 뿐만 아니라 Aib (2-아미노이소부티르산, 2-aminoisobutyric acid), Sar (N-methylglycine), 알파-메틸-글루탐산 (α -methyl-glutamic acid) 등과 같은 다른 아미노산에 대해 일반적으로 허용되는 3문자 코드가 사용된다. 또한 본 명세서에서 약어로 언급된 아미노산은 IUPAC-IUB 명명법에 따라 기재되었다.

[80] 본 명세서에서 “Aib”는 “2-아미노이소부티르산(2-aminoisobutyric acid)” 또는 “아미노이소부티르산 (aminoisobutyric acid)”으로 혼용될 수 있으며, 2-아미노이소부티르산(2-aminoisobutyric acid)과 아미노이소부티르산 (aminoisobutyric acid)은 혼용되어 사용될 수 있다.

[81]

[82] 알라닌 Ala, A 아르기닌 Arg, R

[83] 아스파라긴 Asn, N 아스파르트산 Asp, D

[84] 시스테인 Cys, C 글루탐산 Glu, E

[85] 글루타민 Gln, Q 글리신 Gly, G

[86] 히스티딘 His, H 이소류신 Ile, I

[87] 류신 Leu, L 리신 Lys, K

[88] 메티오닌 Met, M 페닐알라닌 Phe, F

[89] 프롤린 Pro, P 세린 Ser, S

[90] 트레오닌 Thr, T 트립토판 Trp, W

[91] 티로신 Tyr, Y 발린 Val, V

[92]

[93] 본 발명을 구현하기 위한 하나의 양태는 글루카곤 수용체, GLP-1 (Glucagon-like peptide-1) 수용체, 및 GIP (Glucose-dependent insulinotropic polypeptide) 수용체에 대해 활성을 갖는, 펩타이드를 포함하는, 골 질환의 예방 또는 치료를 위한 약학적 조성물을 제공한다. 구체적으로, 상기 골 질환은 골 대사성 질환일 수 있고, 골 감소성 질환일 수 있으나, 특별히 이에 제한되지는 않는다.

[94] 하나의 구현예로, 상기 펩타이드는 서열번호 1 내지 102 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하는 것일 수 있다.

[95] 또 하나의 구현예로, 상기 골 질환의 예방 또는 치료를 위한 약학적 조성물은 약학적으로 허용되는 부형제와 서열번호 1 내지 102 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하는 펩타이드를 약학적 유효량으로 포함하는 약학적 조성물일 수 있다.

[96] 본 발명의 조성물은 글루카곤 수용체, GLP-1 수용체, 및 GIP 수용체에 대해

활성을 갖는 펩타이드를 약리학적 유효량으로 포함하는 것일 수 있고, 구체적으로는 서열번호 1 내지 102의 아미노산 서열 중 어느 하나의 서열을 포함하거나, 필수적으로 구성되거나, 구성된 펩타이드(삼중 활성체)를 약리학적 유효량으로 포함하는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[97]

[98] 상기 "글루카곤 수용체, GLP-1 수용체, 및 GIP 수용체에 대해 활성을 갖는, 펩타이드"는 본 발명에서 "삼중 활성체" 또는 "삼중 활성체 펩타이드"라는 명칭으로도 혼용되어 사용될 수 있다. 본 발명의 삼중활성체는 서열번호 1 내지 102의 아미노산 서열 중 어느 하나의 서열을 포함하는 펩타이드를 포함할 수 있다. 또는, 서열번호 1 내지 102의 아미노산 서열 중 어느 하나의 서열로 필수적으로 구성되거나, 구성된 펩타이드도 본 발명의 삼중활성체에 포함될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 상기 서열번호 1 내지 102 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하는 펩타이드는 글루카곤 수용체, GLP-1 수용체, 및 GIP 수용체에 대해 활성을 갖는, 펩타이드의 한 예이나, 이에 제한되지 않는다.

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

[100] 특별히 이에 제한되는 것은 아니나, 상기 글루카곤, GLP-1, 및 GIP 수용체에 대해 유의한 수준의 활성을 가지는 삼중 활성체는 글루카곤, GLP-1, 및 GIP 수용체 중 하나 또는 그 이상의 수용체, 구체적으로 둘 또는 그 이상의 수용체, 보다 구체적으로 세 개의 수용체 모두에 대해 *in vitro* 활성이 해당 수용체의 천연형 리간드 (천연형 글루카곤, 천연형 GLP-1, 및 천연형 GIP) 대비 약 0.001% 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% 이상, 약 150% 이상, 약 200% 이상을 나타낼 수 있으나, 유의적으로 증가한 범위는 제한 없이 포함된다.

[101] 여기서, 수용체에 대한 활성은, 천연형 대비 수용체에 대한 *in vitro* 활성이 약 0.001% 이상, 0.01% 이상, 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% 이상, 약 200% 이상을 나타내는 경우를 예로 들 수 있다. 그러나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[102] 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.

[103]

[104] 이러한 삼중 활성체의 *in vitro* 활성을 측정하는 방법은 본원 명세서의 실험예 1을 참조할 수 있으나, 특별히 이에 제한되는 것은 아니다.

[105]

- [106] 한편, 상기 펩타이드는 하기 i) 내지 iii) 중 하나 이상, 둘 이상, 구체적으로 세 개의 활성을 보유하는 것, 구체적으로 유의한 활성을 보유하는 것을 특징으로 한다:
- [107] i) GLP-1 수용체의 활성화; ii) 글루카곤 수용체의 활성화; 및 iii) GIP 수용체의 활성화.
- [108] 여기서, 수용체를 활성화시킨다는 것은, 천연형 대비 수용체에 대한 *in vitro* 활성이 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% 이상, 약 150% 이상, 약 200% 이상을 나타내는 경우를 예로 들 수 있다. 그러나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [109]
- [110] 또한, 상기 펩타이드는 천연형 GLP-1, 천연형 글루카곤 및 천연형 GIP 중 어느 하나 대비 체내 반감기가 증가된 것일 수 있으나, 특별히 이에 제한되는 것은 아니다.
- [111]
- [112] 특별히 이에 제한되는 것은 아니나, 이러한 상기 펩타이드는 비자연적으로 발생된 (non-naturally occurring) 것일 수 있다.
- [113] 본원에서 특정 서열번호로 '구성되는' 펩타이드라고 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. 즉, 일부 서열의 차이가 있더라도 일정 수준 이상의 상동성을 나타내며 글루카곤 수용체, GLP-1 수용체, 및 GIP 수용체에 대한 활성을 나타낸다면 본 발명의 범위에 속할 수 있다.
- [114] 이상의 내용은 본 발명의 다른 구체에 혹은 다른 양태에도 적용될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [115] 예를 들어, 본 발명의 펩타이드는 WO2017-116204 및 WO2017-116205를 참조할 수 있다.
- [116]
- [117] 예를 들어, 본 발명의 펩타이드는 서열번호 1 내지 102 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하거나, 서열번호 1 내지 102 중 어느 하나의 아미노산 서열로 (필수적으로) 구성되거나, 또는 서열번호 1 내지 102 중 어느 하나의 아미노산 서열과 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 펩타이드도 포함할 수 있으며, 골 질환의 치료 및/또는 예방 효과를 갖는 이상, 특정 서열로 제한되지 않는다.

- [118] 상기 삼중 활성체의 예로, 서열번호: 1 내지 102로 이루어진 군에서 선택된 아미노산 서열을 포함하는 것, 서열번호: 1 내지 11, 13 내지 102로 이루어진 군에서 선택된 아미노산 서열을 포함하는 것, 서열번호: 1 내지 11, 13 내지 102로 이루어진 군에서 선택된 아미노산 서열로 (필수적으로) 구성된 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [119] 또 하나의 구체예로, 상기 삼중 활성체 펩타이드는 서열번호 21 내지 24, 28, 29, 31, 32, 37, 42, 43, 50, 51 내지 54, 56, 58, 64 내지 73, 75 내지 79, 82, 83, 91, 및 96 내지 102 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하거나, 필수적으로 구성되거나, 또는 구성되는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 한 예로, 상기 삼중 활성체 펩타이드는 서열번호 21, 22, 42, 43, 50, 64, 66, 67, 70, 71, 76, 77, 96, 97 및 100 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하거나, 필수적으로 구성되거나, 또는 구성되는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [120] 또 하나의 예로, 상기 펩타이드는 서열번호 21, 22, 42, 43, 50, 66, 67, 77, 96, 97 및 100 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하거나, 필수적으로 구성되거나, 또는 구성되는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [121] 또 하나의 예로, 상기 펩타이드는 서열번호 21, 22, 42, 43, 50, 77과 96 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하거나, 필수적으로 구성되거나, 또는 구성되는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [122] 본 발명에서 용어, '상동성(homology)' 또는 '동일성(identity)'은 두 개의 주어진 아미노산 서열 또는 염기 서열과 서로 관련된 정도를 의미하며 백분율로 표시될 수 있다.
- [123] 용어 상동성 및 동일성은 종종 상호교환적으로 이용될 수 있다.
- [124] 임의의 두 펩타이드 서열이 상동성, 유사성 또는 동일성을 갖는지 여부는 예를 들어, Pearson et al (1988)[*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85]: 2444에서와 같은 디폴트 파라미터를 이용하여 "FASTA" 프로그램과 같은 공지의 컴퓨터 알고리즘을 이용하여 결정될 수 있다. 또는, EMBOSS 패키지의 니들만 프로그램(EMBOSS: The European Molecular Biology Open Software Suite, Rice et al., 2000, *Trends Genet.* 16: 276-277)(버전 5.0.0 또는 이후 버전)에서 수행되는 바와 같은, 니들만-운치(Needleman-Wunsch) 알고리즘(Needleman and Wunsch, 1970, *J. Mol. Biol.* 48: 443-453)이 사용되어 결정될 수 있다. (GCG 프로그램 패키지 (Devereux, J., et al, *Nucleic Acids Research* 12: 387 (1984)), BLASTP, BLASTN, FASTA (Atschul, [S.] [F.,] [ET AL, *J MOLEC BIOL* 215]: 403 (1990); *Guide to Huge Computers*, Martin J. Bishop, [ED.,] Academic Press, San Diego, 1994, 및 [CARILLO ETA/](1988) *SIAM J Applied Math* 48: 1073을 포함한다). 예를 들어, 국립 생물공학 정보 데이터베이스 센터의 BLAST, 또는 ClustalW를 이용하여 상동성, 유사성 또는 동일성을 결정할 수 있다.

- [125] 펩타이드의 상동성, 유사성 또는 동일성은 예를 들어, Smith and Waterman, Adv. Appl. Math (1981) 2:482에 공지된 대로, 예를 들면, Needleman et al. (1970), J Mol Biol.48: 443과 같은 GAP 컴퓨터 프로그램을 이용하여 서열 정보를 비교함으로써 결정될 수 있다. 요약하면, GAP 프로그램은 두 서열 중 더 짧은 것에서의 기호의 전체 수로, 유사한 배열된 기호(즉, 아미노산)의 수를 나눈 값으로 정의한다. GAP 프로그램을 위한 디폴트 파라미터는 (1) 일진법 비교 매트릭스(동일성을 위해 1 그리고 비-동일성을 위해 0의 값을 함유함) 및 Schwartz and Dayhoff, eds., Atlas Of Protein Sequence And Structure, National Biomedical Research Foundation, pp. 353-358 (1979)에 의해 개시된 대로, Gribskov et al(1986) Nucl. Acids Res. 14: 6745의 가중된 비교 매트릭스(또는 EDNAFULL(NCBI NUC4.4의 EMBOSS 버전) 치환 매트릭스); (2) 각 갭을 위한 3.0의 페널티 및 각 갭에서 각 기호를 위한 추가의 0.10 페널티(또는 갭 개방 페널티 10, 갭 연장 페널티 0.5); 및 (3) 말단 갭을 위한 무 페널티를 포함할 수 있다. 따라서, 본 발명에서 사용된 것으로서, 용어 "상동성" 또는 "동일성"은 서열들간의 관련성(relevance)를 나타낸다.
- [126] 상기 글루카곤 수용체, GLP-1 수용체, 및 GIP 수용체에 대해 활성을 갖는, 펩타이드는 분자 내 가교 (intramolecular bridge)를 포함할 수 있으며 (예컨대, 공유결합적 가교 또는 비공유결합적 가교), 구체적으로 고리를 포함하는 형태일 수 있으며, 예컨대 펩타이드의 16번 및 20번 아미노산 사이에 고리가 형성된 형태일 수 있으나, 특별히 이에 제한되는 것은 아니다.
- [127] 상기 고리의 비제한적인 예로 락탐 가교 (또는 락탐 고리)를 포함할 수 있다.
- [128] 또한, 상기 펩타이드는 고리를 포함하도록, 목적하는 위치에 고리를 형성할 수 있는 아미노산을 포함하도록 변형된 것을 모두 포함한다.
- [129] 예컨대, 펩타이드의 16번 및 20번 아미노산 쌍이 각각 고리를 형성할 수 있는 글루탐산 또는 리신으로 치환된 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [130] 이러한 고리는 상기 펩타이드 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.
- [131] 이러한 방법들의 조합으로 제조되는 펩타이드의 예로, 천연형 글루카곤과 아미노산 서열이 하나 이상 다르고, N-말단의 아미노산 잔기의 알파-탄소가 제거된, 글루카곤 수용체, GLP-1 수용체, 및 GIP 수용체에 대해 활성을 보유한 펩타이드 등이 있으나, 이에 제한되지 않으며, 아날로그 제조를 위한 여러 방법들의 조합으로 본 발명에 적용되는 펩타이드를 제조할 수 있다.
- [132] 또한, 특별히 이에 제한되지 않으나, 본 발명의 펩타이드는 체내 반감기의 증가를 위해 활성체 분해 효소의 인식작용을 회피하기 위하여 일부 아미노산을 타 아미노산 혹은 비 천연형 화합물로 치환할 수 있다.
- [133] 구체적으로, 상기 펩타이드의 아미노산 서열 중 두 번째 아미노산 서열의 치환을 통해 분해효소의 인식 작용을 회피하여 체내 반감기를 증가시킨

펩타이드일 수 있으나, 체내 분해 효소의 인식 작용을 회피하기 위한 아미노산 치환 또는 변형은 제한 없이 포함된다.

- [134] 또한, 펩타이드 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.
- [135] 또한, 천연형 글루카곤의 아미노 및/또는 카르복시 말단에 하나 또는 그 이상의 아미노산이 추가된 것을 모두 포함한다.
- [136] 상기 치환되거나 추가되는 아미노산은 인간 단백질에서 통상적으로 관찰되는 20개의 아미노산뿐만 아니라 비정형 또는 비-자연적 발생 아미노산을 사용할 수 있다. 비정형 아미노산의 상업적 출처에는 Sigma-Aldrich, ChemPep과 Genzyme pharmaceuticals가 포함된다. 이러한 아미노산이 포함된 펩타이드와 정형적인 펩타이드 서열은 상업화된 펩타이드 합성 회사, 예를 들어 미국의 American peptide company나 Bachem, 또는 한국의 Anygen을 통해 합성 및 구매 가능하다.
- [137] 아미노산 유도체도 마찬가지로 방식으로 입수할 수 있는데, 그 예를 일부만 들자면 4-이미다조아세트산 (4-imidazoacetic acid) 등을 사용할 수 있다.
- [138] 또한, 본 발명에 따른 펩타이드는 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 형태일 수 있다.
- [139] 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.
- [140] 구체적으로, 본 발명의 펩타이드의 N-말단 또는 C-말단은 아민기(-NH₂) 또는 카르복실기(-COOH)를 가질 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [141] 본 발명에 따른 펩타이드의 C-말단은 아미드화되거나 또는 자유 카르복실기 (-COOH)를 갖는 펩타이드이거나, 또는 C-말단이 변형되지 않은 펩타이드를 포함하는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [142] 하나의 구체예로, 상기 펩타이드는 C-말단이 아미드화되어 있는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [143] 하나의 구체예로, 상기 펩타이드는 비당쇄화된 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [144]
- [145] 본 발명의 펩타이드는 Solid phase 합성법을 통하여 합성될 수 있으며, 제조 방법으로도 생산 가능하고, 상업적으로 의뢰하여 제조할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [146] 또한, 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.

[147] 구체적으로, 본 발명의 펩타이드는 표준 합성 방법, 재조합 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:

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

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

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

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

[152]

[153] 또한, 상기 글루카곤 수용체, GLP-1 수용체, 및 GIP 수용체에 대해 활성을 갖는 펩타이드는, 글루카곤 수용체, GLP-1 수용체, 및 GIP 수용체에 대해 활성을 갖는 펩타이드에 이의 생체 내 반감기를 증가시키기 위한 생체적합성 물질이 결합된, 지속형 결합체 형태일 수 있다. 본 명세서에서 상기 생체적합성 물질은 캐리어와 혼용될 수 있다. 본 발명의 약학적 조성물에 포함되는 펩타이드는 지속형 결합체 형태일 수 있다.

[154] 본 발명에서 상기 펩타이드의 결합체는 캐리어가 결합되지 않은 상기 펩타이드에 비하여 증가된 효력의 지속성을 나타낼 수 있으며, 본 발명에서는 이러한 결합체를 "지속형 결합체"로 지칭한다.

[155] 한편, 이러한 결합체는 비자연적인 (non-naturally occurring) 것일 수 있다.

[156] 본 발명의 구체적인 실시 형태에서, 상기 지속형 결합체는 글루카곤 수용체, GLP-1 수용체, 및 GIP 수용체에 대해 활성을 갖는 펩타이드에 면역글로불린 Fc 영역이 서로 연결된 형태를 지칭한다. 구체적으로, 상기 결합체는 글루카곤 수용체, GLP-1 수용체, 및 GIP 수용체에 대해 활성을 갖는 펩타이드에 면역글로불린 Fc 영역이 링커를 통하여 공유결합적으로 연결된 것일 수 있으나, 특별히 이에 제한되지 않는다.

[157]

[158] 본 발명의 하나의 구체예에서, 상기 지속형 결합체는 하기 화학식 1로 표시되는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다:

[159] [화학식 1]

[160] X - L - F

[161] 단 이 때 X는 서열번호 1 내지 102 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하는 펩타이드이고;

- [162] L은 에틸렌글리콜 반복 단위를 함유하는 링커이며,
- [163] F는 면역글로불린 Fc 영역이고,
- [164] -는 X와 L 사이, L과 F 사이의 공유결합 연결을 나타낸다.
- [165] 본 발명에서 용어 "화학식 1의 지속형 결합체"는 서열번호 1 내지 102 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하는 펩타이드 및 면역글로불린 Fc 영역이 서로 링커로 연결된 형태로, 상기 결합체는 면역글로불린 Fc 영역이 결합되지 않은 서열번호 1 내지 102 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하는 펩타이드에 비하여 증가된 효력의 지속성을 나타낼 수 있다.
- [166] 본 발명의 결합체는 결합체의 형태에서도 글루카곤 수용체, GLP-1 수용체, 및 GIP 수용체에 대해 유의적인 활성을 나타낼 수 있고, 따라서, 역시 골 질환의 예방 및/또는 치료 효과를 발휘할 수 있다.
- [167] 구체적으로, 본 발명의 결합체는 천연형 대비 글루카곤 수용체, GLP-1 수용체, 및/또는 GIP 수용체에 대한 *in vitro* 활성이 약 0.01% 이상, 0.1% 이상, 0.2% 이상, 0.5% 이상, 0.7% 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% 이상일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [168] 본 발명의 목적상, 상기 펩타이드 또는 이의 결합체는 천연형 대비 글루카곤 수용체, GLP-1 수용체, 및/또는 GIP 수용체에 대한 활성이 약 0.01% 이상, 0.1% 이상, 1% 이상, 2% 이상, 3% 이상, 4% 이상, 5% 이상, 10% 이상, 20% 이상, 30% 이상, 40% 이상, 50% 이상, 60% 이상, 70% 이상, 80% 이상, 90% 이상, 100% 이상일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [169]
- [170] 본 발명의 조성물은 (i) 글루카곤 수용체, GLP-1 수용체, 및 GIP 수용체에 대해 활성을 갖는 펩타이드, 또는 (ii) 상기 글루카곤 수용체, GLP-1 수용체, 및 GIP 수용체에 대해 활성을 갖는 펩타이드의 지속형 결합체를 포함하는 것일 수 있으며, 상기 지속형 결합체는 증가된 체내 지속성을 바탕으로, 우수한 골 질환의 예방 및/또는 치료 효과를 나타낼 수 있다.
- [171]
- [172] 상기 지속형 결합체에서 F는 X, 즉 글루카곤 수용체, GLP-1 수용체, 및 GIP 수용체에 대해 활성을 갖는 펩타이드, 구체적으로 서열번호 1 내지 102의 아미노산 서열 중 어느 하나의 서열을 포함하는 펩타이드의 반감기를 증가시킬 수 있는 물질로서, 본 발명의 상기 결합체를 구성하는 모이어티의 일 구성에 해당한다.
- [173] 상기 F는 X와 공유 화학결합 또는 비공유 화학결합으로 서로 결합되는 것일 수 있으며, 공유 화학결합, 비공유 화학결합 또는 이들의 조합으로 링커(L)를 통하여 F와 X가 서로 연결되는 것일 수 있다.
- [174] 하나의 예로, 상기 결합체는 X와 L, 및 L과 F는 공유결합으로 서로 연결되는

것일 수 있으며, 이때 상기 결합체는 화학식 1의 형태로 X, L, 및 F가 공유결합을 통하여 각각 연결된 결합체이다.

- [175] 구체적으로, 화학식 1의 지속형 결합체의 서열번호 1 내지 102 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하는 펩타이드인 X와 면역글로불린 Fc 영역의 연결 방법은 특별히 제한되지 않으나, 링커를 통해 서열번호 1 내지 102 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하는 펩타이드와 면역글로불린 Fc 영역이 서로 연결된 것일 수 있다.
- [176] 구체적으로, 상기 L은 비펩타이드성 링커, 예를 들어 에틸렌글리콜 반복 단위를 함유하는 링커일 수 있다.
- [177] 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.
- [178] 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.
- [179] 본 발명에서 비펩타이드성 링커는 말단에 반응기를 포함하여, 결합체를 구성하는 다른 구성 요소와 반응을 통해 결합체를 형성할 수 있다. 양 말단에 반응성 작용기를 갖는 비펩타이드성 링커가 각 반응기를 통해 상기 화학식 1의 X 및 F와 결합하여 결합체를 형성할 경우, 상기 비펩타이드성 링커 또는 비펩타이드성 중합체는 비펩타이드성 중합체 연결부(linker moiety) 또는 비펩타이드성 링커 연결부로 명명할 수 있다.
- [180] 특별히 이에 제한되지 않으나, 상기 비펩타이드성 링커는 에틸렌글리콜 반복 단위를 함유하는 링커, 예를 들어, 폴리에틸렌 글리콜 링커일 수 있고, 또한, 당해 분야에 이미 알려진 이들의 유도체 및 당해 분야의 기술 수준에서 용이하게 제조할 수 있는 유도체들도 본 발명의 범위에 포함된다.
- [181] 본 발명에서 "폴리에틸렌 글리콜 링커"는 에틸렌글리콜 반복 단위가 2개 이상 결합된 생체 적합성 중합체를 포함한다. 상기 반복 단위들은 펩타이드 결합이 아닌 임의의 공유결합을 통해 서로 연결된다. 상기 폴리에틸렌 글리콜 링커는 본 발명의 결합체의 모이어티를 이루는 일 구성일 수 있으며, 상기 화학식 1에서 L에 해당된다.
- [182] 구체적으로, 상기 L(폴리에틸렌 글리콜 링커)은 에틸렌글리콜 반복 단위를 함유하는 링커, 예를 들어, 폴리에틸렌글리콜일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 본 명세서에서 상기 폴리에틸렌글리콜은 에틸렌글리콜 동중 중합체, PEG 공중합체, 또는 모노메틸-치환된 PEG 중합체(mPEG)의 형태를 모두 포괄하는 용어이나, 특별히 이에 제한되는 것은 아니다. 또한, 당해 분야에 이미 알려진 이의 유도체 및 당해 분야의 기술 수준에서 용이하게 제조할 수 있는 유도체들도 본 발명의 범위에 포함된다.

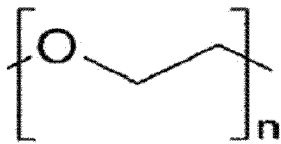
[183] 상기 폴리에틸렌 글리콜 링커는 에틸렌글리콜 반복 단위를 포함하면서, 결합체로 구성되기 이전에는 결합체의 제조에 이용되는 작용기를 말단에 포함하는 것일 수 있다. 본 발명에 따른 지속형 결합체는 상기 작용기를 통해 X와 F가 연결된 형태일 수 있으나 이에 제한되지 않는다. 본 발명에서, 상기 비펩타이드성 링커는 2개, 또는 3개 이상의 작용기를 포함할 수 있고, 각 작용기는 동일하거나, 서로 상이할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[184]

[185] 구체적으로, 상기 링커는 하기 화학식 2로 표시되는 폴리에틸렌글리콜(PEG)일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다:

[186] [화학식 2]

[187]



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

[189] 상기 지속형 결합체에서 PEG 모이어티는, -(CH₂CH₂O)_n-구조 뿐만 아니라 연결 요소와 이 -(CH₂CH₂O)_n- 사이에 개재하는 산소 원자도 포함할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[190] 하나의 구체예로, 상기 에틸렌글리콜 반복단위는 그 예로, [OCH₂CH₂]_n로 표시될 수 있으며, n 값은 자연수로 상기 펩타이드 결합체 내의 [OCH₂CH₂]_n 부위의 평균 분자량, 예컨대 수평균 분자량이 O 초과 내지 약 100 kDa이 되도록 정해질 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 또 하나의 예로, 상기 n 값은 자연수로 상기 펩타이드 결합체 내의 [OCH₂CH₂]_n 부위의 평균 분자량, 예컨대 수평균 분자량이 약 1 내지 약 100 kDa, 약 1 내지 약 80 kDa, 약 1 내지 약 50 kDa, 약 1 내지 약 30 kDa, 약 1 내지 약 25 kDa, 약 1 내지 약 20 kDa, 약 1 내지 약 15 kDa, 약 1 내지 약 13 kDa, 약 1 내지 약 11 kDa, 약 1 내지 약 10 kDa, 약 1 내지 약 8 kDa, 약 1 내지 약 5 kDa, 약 1 내지 약 3.4 kDa, 약 3 내지 약 30 kDa, 약 3 내지 약 27 kDa, 약 3 내지 약 25 kDa, 약 3 내지 약 22 kDa, 약 3 내지 약 20 kDa, 약 3 내지 약 18 kDa, 약 3 내지 약 16 kDa, 약 3 내지 약 15 kDa, 약 3 내지 약 13 kDa, 약 3 내지 약 11 kDa, 약 3 내지 약 10 kDa, 약 3 내지 약 8 kDa, 약 3 내지 약 5 kDa, 약 3 내지 약 3.4 kDa, 약 8 내지 약 30 kDa, 약 8 내지 약 27 kDa, 약 8 내지 약 25 kDa, 약 8 내지 약 22 kDa, 약 8 내지 약 20 kDa, 약 8 내지 약 18 kDa, 약 8 내지 약 16 kDa, 약 8 내지 약 15 kDa, 약 8 내지 약 13 kDa, 약 8 내지 약 11 kDa, 약 8 내지 약 10 kDa, 약 9 내지 약 15 kDa, 약 9 내지 약 14 kDa, 약 9 내지 약 13 kDa, 약 9 내지 약 12 kDa, 약 9 내지 약 11 kDa, 약 9.5 내지 약 10.5 kDa, 또는 약 10 kDa일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[191] 또한, 하나의 구체적인 실시 형태에서 상기 결합체는 펩타이드(X)와

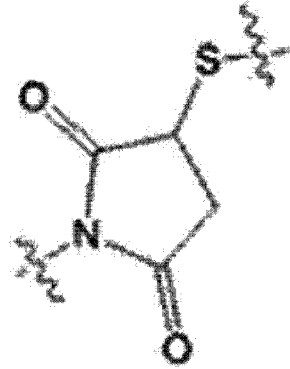
면역글로불린 Fc 영역(F)이 에틸렌글리콜 반복 단위를 함유하는 링커를 통해 공유 결합으로 연결된 구조일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

- [192] 또한, 하나의 구체적인 실시 형태에서 상기 지속형 결합체는 본 발명의 펩타이드(X)와 면역글로불린 Fc 영역(F)이 에틸렌글리콜 반복 단위를 함유하는 링커(L)를 통해 공유 결합으로 연결된 구조일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [193] 본 발명에서 사용될 수 있는 비펩타이드성 링커는 생체 내 단백질 분해 효소에 저항성 있는 에틸렌글리콜 반복단위를 포함하는 중합체이면 제한 없이 사용될 수 있다. 상기 비펩타이드성 중합체의 분자량은 0 초과 약 100 kDa 범위, 약 1 내지 약 100 kDa 범위, 구체적으로 약 1 내지 약 20 kDa 범위, 또는 약 1 내지 약 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.
- [194] 하나의 구체적인 실시 형태에서 상기 비펩타이드성 링커의 양 말단은 각각 F, 예컨대 면역글로불린 Fc 영역의 티올기, 아미노기, 하이드록실기 및 펩타이드(X)의 티올기, 아미노기, 아지드기 또는 하이드록실기에 결합할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [195] 구체적으로, 상기 링커는 양쪽 말단에 각각 F(예컨대, 면역글로불린 Fc 영역) 및 X와 결합될 수 있는 반응기, 구체적으로는 면역글로불린 Fc 영역의 시스테인의 티올기; N-말단, 리신, 아르기닌, 글루타민 및/또는 히스티딘에 위치한 아미노기; 및/또는 C-말단에 위치한 하이드록실기와 결합되고, 펩타이드(X)의 시스테인의 티올기; 리신, 아르기닌, 글루타민 및/또는 히스티딘의 아미노기; 아지도리신의 아지드기; 및/또는 하이드록실기와 결합될 수 있는 반응기를 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [196] 또한, F, 예컨대 면역글로불린 Fc 영역 및 X와 결합될 수 있는, 상기 링커의 반응기는 알데히드기, 말레이미드기 및 석시니미드 유도체로 구성된 군으로부터 선택될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [197] 상기에서, 알데히드기로 프로피온 알데히드기 또는 부틸 알데히드기를 예로서 들 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [198] 상기에서, 석시니미드 유도체로는 석시니미딜 발레르에이트, 석시니미딜 메틸부타노에이트, 석시니미딜 메틸프로피온에이트, 석시니미딜 부타노에이트, 석시니미딜 프로피오네이트, N-하이드록시석시니미드, 히드록시 석시니미딜, 석시니미딜 카르복시메틸 또는 석시니미딜 카보네이트가 이용될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [199] 상기 링커는 상기와 같은 반응기를 통해 면역글로불린 Fc 영역인 F 및 펩타이드(삼중활성체)인 X에 연결되어, 링커 연결부로 전환될 수 있다.
- [200] 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.

- [201] 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 영역과 X가 결합될 수 있다면, 특별히 이에 제한되지 않는다.
- [202] 예를 들어, 상기 비펩타이드성 링커의 한쪽 말단에는 반응기로서 말레이미드기를 포함하고, 다른 쪽 말단에는 알데히드기, 프로피온 알데히드기 또는 부틸 알데히드기 등을 포함할 수 있다.
- [203] 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.
- [204] 하나의 구체적인 실시 형태에서 상기 비펩타이드성 중합체는 X의 시스테인 잔기, 보다 구체적으로 시스테인의 -SH 기에 연결되는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [205]
- [206] 예컨대, 상기 X에 해당하는 펩타이드에서 10번 시스테인 잔기, 13번 시스테인 잔기, 15번 시스테인 잔기, 17번 시스테인 잔기, 19번 시스테인 잔기, 21번 시스테인 잔기, 24번 시스테인 잔기, 28번 시스테인 잔기, 29번 시스테인 잔기, 30번 시스테인 잔기, 31번 시스테인 잔기, 40번 시스테인 잔기, 또는 41번 시스테인 잔기에 상기 비펩타이드성 중합체가 연결된 것일 수 있으나, 특별히 이에 제한되지 않는다.
- [207] 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, 말레이미드기는 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.
- [208] 또한, 상기 결합체에서, 비펩타이드성 중합체의 반응기가 면역글로불린 Fc 영역의 N-말단에 위치한 -NH₂와 연결된 것일 수 있으나, 이는 하나의 일례에 해당한다.
- [209] 만약, 말레이미드-PEG-알데히드를 사용하는 경우, 말레이미드기는 펩타이드의 -SH 기와 티오에테르(thioether) 결합으로 연결하고, 알데히드기는 면역글로불린 Fc의 -NH₂ 기와 환원적 알킬화 반응을 통해 연결할 수 있으나, 이에 제한되지 않으며, 이는 하나의 일례에 해당한다.

[210] 이와 같은 환원적 알킬화를 통하여 PEG의 한쪽 말단에 위치한 산소 원자에 면역글로불린 Fc 영역의 N-말단 아미노기가 $-CH_2CH_2CH_2-$ 의 구조를 가지는 링커 작용기를 통해 서로 연결되어, $-PEG-O-CH_2CH_2CH_2NH-$ 면역글로불린 Fc와 같은 구조를 형성할 수 있고, 티오에테르 결합을 통하여 PEG의 한쪽 말단이 펩타이드의 시스테인에 위치한 황 원자에 연결된 구조를 형성할 수 있다. 상술한 티오에테르 결합은 의 구조를 포함할 수 있다.



[211] 그러나, 상술한 예에 특별히 제한되는 것은 아니며, 이는 하나의 일례에 해당한다.

[212] 또한, 상기 결합체에서, 링커의 반응기가 면역글로불린 Fc 영역의 N-말단에 위치한 $-NH_2$ 와 연결된 것일 수 있으나, 이는 하나의 일례에 해당한다.

[213] 또한, 상기 결합체에서, 본 발명에 따른 펩타이드는 반응기를 갖는 링커와 C-말단을 통해 연결될 수 있으나, 이는 하나의 일례에 해당한다.

[214] 본 발명에서 "C-말단"은, 펩타이드의 카르복시 말단을 의미하는 것으로, 본 발명의 목적상 링커와 결합할 수 있는 위치를 말한다. 그 예로, 이에 제한되지는 않으나, C-말단의 최말단 아미노산 잔기뿐만 아니라 C-말단 주위의 아미노산 잔기를 모두 포함할 수 있으며, 구체적으로는 최말단으로부터 첫 번째 내지 20 번째의 아미노산 잔기를 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[215]

[216] 또한, 상술한 결합체는 효력의 지속성이 F가 수식되지 않은 X에 비해 증가된 것일 수 있으며, 이러한 결합체는 상술한 형태뿐만 아니라, 생분해성 나노파티클에 봉입된 형태 등을 모두 포함한다.

[217]

[218] 한편, 상기 F는 면역글로불린 Fc 영역일 수 있으며, 보다 구체적으로 상기 면역글로불린 Fc 영역은 IgG 유래 일 수 있으나, 특별히 이에 제한되지 않는다.

[219] 본 발명의 구체적인 한 예로, 상기 F(면역글로불린 Fc 영역)는 두 개의 폴리펩타이드 사슬로 이루어진 이량체이며, L의 한 말단이 상기 두 폴리펩타이드 사슬 중 하나의 폴리펩티드 사슬에만 연결되어 있는 구조를 가질 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[220] 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 결합체의 모이어티를 이루는 일 구성일 수 있다. 상기 면역글로불린 Fc 영역은 “면역글로불린 Fc 단편”과 혼용되어 사용될 수 있다.

- [221] 본 명세서에서 Fc 영역이라고 하면 면역글로불린의 파파인 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 서열등 변형체까지 망라하여 포함된다. 상기 유도체, 치환체, 변형체는 FcRn에 결합하는 능력을 보유하는 것을 전제로 한다.
- [222] 본 발명에서, F는 사람 면역글로불린 영역일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 본 명세서에서 “생체적합성 물질” 또는 “캐리어”는 상기 Fc 영역을 의미할 수 있다.
- [223] 상기 F(면역글로불린 Fc 영역)는, 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.
- [224] 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.
- [225] 하나의 구체예로, 상기 F는 그 N-말단 프롤린의 질소 원자를 통하여 연결된 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [226] 상기 면역글로불린 Fc 영역은 본 발명의 화학식 1의 결합체의 모이어티를 이루는 일 구성으로, 구체적으로, 상기 화학식 1에서 F에 해당할 수 있다.
- [227]
- [228] 이러한 면역글로불린 Fc 영역은 중쇄 불변영역에 힌지(hinge) 부분을 포함할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [229] 본 발명에서, 면역글로불린 Fc 영역은 N-말단에 특정 힌지 서열을 포함할 수 있다.
- [230] 본 발명의 용어, "힌지 서열"은 중쇄에 위치하여 이황화결합(inter disulfide bond)를 통하여 면역글로불린 Fc 영역의 이량체를 형성하는 부위를 의미한다.
- [231] 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:
- [232] Glu-Ser-Lys-Tyr-Gly-Pro-Pro-Cys-Pro-Ser-Cys-Pro(서열번호 103).
- [233] 상기 힌지 서열은 서열번호 103의 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 104),

Glu-Ser-Lys-Tyr-Gly-Pro-Pro-Cys-Pro-Ser-Pro(서열번호 105),

Glu-Ser-Lys-Tyr-Gly-Pro-Pro-Cys-Pro-Ser(서열번호 106),

Glu-Ser-Lys-Tyr-Gly-Pro-Pro-Cys-Pro-Pro(서열번호 107),

Lys-Tyr-Gly-Pro-Pro-Cys-Pro-Ser(서열번호 108),

Glu-Ser-Lys-Tyr-Gly-Pro-Pro-Cys(서열번호 109),

Glu-Lys-Tyr-Gly-Pro-Pro-Cys(서열번호 110), Glu-Ser-Pro-Ser-Cys-Pro(서열번호

111), Glu-Pro-Ser-Cys-Pro(서열번호 112), Pro-Ser-Cys-Pro(서열번호 113),

Glu-Ser-Lys-Tyr-Gly-Pro-Pro-Ser-Cys-Pro(서열번호 114),

Lys-Tyr-Gly-Pro-Pro-Pro-Ser-Cys-Pro(서열번호 115),

Glu-Ser-Lys-Tyr-Gly-Pro-Ser-Cys-Pro(서열번호 116),

Glu-Ser-Lys-Tyr-Gly-Pro-Pro-Cys(서열번호 117),

Lys-Tyr-Gly-Pro-Pro-Cys-Pro(서열번호 118),

Glu-Ser-Lys-Pro-Ser-Cys-Pro(서열번호 119), Glu-Ser-Pro-Ser-Cys-Pro(서열번호

120), Glu-Pro-Ser-Cys(서열번호 121), Ser-Cys-Pro(서열번호 122).

[234] 더욱 구체적으로는 상기 힌지 서열은 서열번호 113(Pro-Ser-Cys-Pro)또는 서열번호 122(Ser-Cys-Pro)의 아미노산 서열을 포함하는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[235] 본 발명의 면역글로불린 Fc 영역은 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 영역의 한 사슬에 연결된 형태일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[236] 본 발명의 용어, "N-말단"은 단백질 또는 폴리펩티드의 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 영역은 힌지 서열을 N-말단에 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[237]

[238] 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 Fc 영역일 수 있다. 또한, CH2 및/또는 CH3에 해당하는 상당히 긴 일부 아미노산 서열이 제거된 영역일 수도 있다.

[239] 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.

[240] 본 발명에서, 상기 면역글로불린 Fc 영역은 동일한 기원의 도메인으로 이루어진 단쇄 면역글로불린들로 구성된, 이량체 또는 다량체 형태일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[241] 또한, 하나의 구체예로서, 상기 면역글로불린 Fc 영역은 이량체 형태 (dimeric form)일 수 있으며, 이량체 형태(이합체 dimer 형태)의 하나의 Fc 영역에 X 한 분자가 공유결합적으로 연결될 수 있으며, 이때 상기 면역글로불린 Fc 영역과 X는 비펩타이드성 중합체에 의해 서로 연결될 수 있다. 또한, 본 발명의 지속형 결합체의 하나의 실시 형태로서, 상기 면역글로불린 Fc 영역 F는 두 개의 폴리펩타이드 사슬로 이루어진 이량체(이합체 dimer)이며, 이 때 상기 Fc 영역 이량체 F와 X는 에틸렌글리콜 반복 단위를 함유하는 하나의 동일한 링커 L을 통하여 공유결합적으로 연결되어 있다. 이 실시 형태의 한 구체예에서, X는 이러한 Fc 영역 이량체 F의 두 폴리펩타이드 사슬 중 하나의 폴리펩타이드 사슬에만 링커 L을 통하여 공유결합으로 연결되어 있다. 이 실시 형태의 더욱 구체적인 예시에서, 이러한 Fc 영역 이량체 F의 두 폴리펩타이드 사슬 중 X가 연결된 하나의 폴리펩타이드 사슬에는 한 분자의 X만이 L을 통하여 공유결합적으로 연결되어 있다. 이 실시 형태의 가장 구체적인 예시에서 상기 F는 동종이량체(homodimer)이다.

[242] 다른 구체예에서, 상기 면역글로불린 Fc 영역 F는 두 개의 폴리펩타이드 사슬로 이루어진 이량체며, L의 한 말단이 상기 두 폴리펩타이드 사슬 중 하나의 폴리펩타이드 사슬에만 연결되어 있는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[243] 본 발명의 지속형 결합체의 다른 실시 형태에서는, 이량체 형태의 하나의 Fc 영역에 X 두 분자가 대칭적으로 결합하는 것 역시 가능하다. 이때 상기 면역글로불린 Fc와 X는 비펩타이드성 링커에 의해 서로 연결될 수 있다. 그러나, 상기 기술된 예에 제한되는 것은 아니다.

[244] 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.

[245] 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.

[246] 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.

- [247] 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 아미드화(amidation) 등으로 수식(modification)될 수도 있다.
- [248] 상기 기술한 Fc 유도체는 본 발명의 Fc 영역과 동등한 생물학적 활성을 나타내며 Fc 영역의 열, pH 등에 대한 구조적 안정성을 증대시킨 것일 수 있다.
- [249] 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.
- [250] 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 캐리어로서의 본래의 목적에 보다 부합하는 형태는 당쇄가 제거되거나 비당쇄화된 면역글로불린 Fc 영역이라 할 것이다.
- [251] 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.
- [252] 한편, 면역글로불린 Fc 영역은 인간 또는 소, 염소, 돼지, 마우스, 래빗, 햄스터, 랫트, 기니아 피그 등의 동물기원일 수 있으며, 더 구체적인 실시 형태에서는

인간기원이다.

- [253] 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.
- [254] 또한, 하나의 구체적인 실시 형태에서, 면역글로불린 Fc 영역은 인간 IgG4 Fc의 단편으로서, 각 단량체(monomer)의 3번 아미노산인 시스테인 사이의 이황화 결합(inter-chain 형태)을 통해 2개의 단량체가 연결된 동종이량체(homodimer) 형태일 수 있으며, 이 때 동종이량체의 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, 동종이량체를 형성하는 아미노산은 전체 442개의 아미노산으로 이루어질 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 구체적으로 면역글로불린 Fc 절편은 서열번호 123의 아미노산 서열 (221개의 아미노산으로 구성됨)을 갖는 단량체 2개가 각 단량체의 3번 아미노산인 시스테인 사이에 이황화 결합을 통해 동종이량체를 형성하고, 상기 동종이량체의 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.
- [255] 상기 화학식 1의 F는 서열번호 123의 아미노산 서열인 단량체를 포함하는 것일 수 있으며, 상기 F는 서열번호 123의 아미노산 서열의 단량체의 동종이량체일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [256] 하나의 예로, 면역글로불린 Fc 영역은 서열번호 134의 아미노산 서열 (442개의 아미노산으로 구성됨)을 포함하는 동종이량체일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [257] 하나의 구체예로, 상기 면역글로불린 Fc 영역과 X는 당쇄화되어 있지 않을 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [258]
- [259] 한편, 본 발명에서 면역글로불린 Fc 영역과 관련된 "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.

- [260] 본 발명에서 "하이브리드(hybrid)"란 단백질의 면역글로불린 불변영역 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.
- [261] 한편, IgG 역시 IgG1, IgG2, IgG3 및 IgG4의 서브클래스로 나눌 수 있고 본 발명에서는 이들의 조합 또는 이들의 혼성화도 가능하다. 구체적으로는 IgG2 및 IgG4 서브클래스이며, 가장 구체적으로는 보체 의존적 독성(CDC, Complement dependent cytotoxicity)과 같은 이펙터 기능(effector function)이 거의 없는 IgG4의 Fc 절편이다.
- [262] 또한, 상술한 결합체는 효력의 지속성이 천연형 GLP-1, GIP, 혹은 글루카곤에 비해, 또는 F가 수식되지 않은 X에 비해 증가된 것일 수 있으며, 이러한 결합체는 상술한 형태뿐만 아니라, 생분해성 나노파티클에 봉입된 형태 등을 모두 포함하나 이에 제한되지 않는다.
- [263]
- [264] 또한, 상술한 결합체는 효력의 지속성이 천연형 GLP-1, GIP, 혹은 글루카곤에 비해, 또는 F가 수식되지 않은 X에 비해 증가된 것일 수 있으며, 이러한 결합체는 상술한 형태뿐만 아니라, 생분해성 나노파티클에 봉입된 형태 등을 모두 포함한다.
- [265] 한편, 상술한 삼중활성체 및 이의 지속형 결합체와 관련하여, 국제공개특허 WO 2017/116204 및 WO 2017/116205의 전문이 본 명세서의 참고자료로서 포함된다.
- [266] 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.
- [267] 상기 염의 종류는 특별히 제한되지는 않는다. 다만, 개체, 예컨대 포유류에게 안전하고 효과적인 형태인 것이 바람직하나, 특별히 이에 제한되는 것은 아니다.
- [268] 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.

- [269] 본 발명에서 용어, "약학적으로 허용되는 염" 이란 약학적으로 허용되는 무기산, 유기산, 또는 염기로부터 유도된 염을 포함한다. 적합한 산의 예로는 염산, 브롬산, 황산, 질산, 과염소산, 푸마르산, 말레산, 인산, 글리콜산, 락트산, 살리실산, 숙신산, 톨루엔-p-설펜산, 타르타르산, 아세트산, 시트르산, 메탄설펜산, 포름산, 벤조산, 말론산, 나프탈렌-2-설펜산, 벤젠설펜산 등을 들 수 있다. 적합한 염기로부터 유도된 염은 나트륨, 칼륨 등의 알칼리 금속, 마그네슘 등의 알칼리 토금속, 및 암모늄 등을 포함할 수 있다.
- [270] 또한, 본 발명에서 사용된 용어 "용매화물"은 본 발명에 따른 펩타이드 또는 이의 염이 용매 분자와 복합체를 형성한 것을 말한다.
- [271]
- [272] 상기 펩타이드 (예컨대 상기 펩타이드 자체 또는 이에 생체적합성 물질이 결합된 지속형 결합체 형태)를 포함하는 조성물은 골 질환의 예방 또는 치료용일 수 있다.
- [273] 본 발명에 따른 조성물은 펩타이드(예컨대 상기 펩타이드 자체 또는 이에 생체적합성 물질이 결합된 지속형 결합체 형태)를 포함하는 것일 수 있고, 구체적으로 약리학적 유효량의 펩타이드 또는 이의 지속형 결합체를 포함하는 것일 수 있다. 또한, 약학적으로 허용가능한 담체를 추가로 포함할 수 있다.
- [274] 본 발명에서 용어 "예방"은 상기 펩타이드 (예컨대 상기 펩타이드 자체 또는 이에 생체적합성 물질이 결합된 지속형 결합체 형태) 또는 이를 포함하는 조성물의 투여로 골 질환의 발병을 억제 또는 지연시키는 모든 행위를 의미하며, "치료"는 상기 펩타이드 (예컨대 상기 펩타이드 자체 또는 이에 생체적합성 물질이 결합된 지속형 결합체 형태) 또는 이를 포함하는 조성물의 투여로 골 질환의 증세가 호전되거나 이롭게 되는 모든 행위를 의미한다.
- [275] 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, 피 내 투여, 경구 투여, 국소 투여, 비 내 투여, 폐 내 투여, 또는 직장 내 투여 등이 될 수 있다.
- [276]
- [277] 본 발명의 지속형 글루카곤, GLP-1 및 GIP 수용체 모두에 활성을 갖는 삼중 활성체 또는 이의 지속형 결합체의 사용은 혈중 반감기 및 생체 내 효력 지속 효과의 획기적인 증가로 인해 매일 투여되어야 하는 만성환자에게 투여 횟수를 감소시켜 환자의 삶의 질을 향상시킬 수 있는 큰 장점이 있어 골 질환의 치료에 큰 도움을 준다. 더욱이, 상기 삼중 활성체 또는 이의 지속형 결합체는 골 질환의 증상의 재발 시기를 지연시키는 등 골 질환의 예방 효과 및/또는 골 질환의 증상을 유의적으로 감소시키는 효과가 있는 등 골 질환의 예방 및/또는 치료에

큰 도움을 준다.

[278]

[279] 본 발명의 조성물은 골 질환의 예방 또는 치료에 사용될 수 있으며 특히, 조골세포 및 파골세포의 불균형으로 인해 유발되는 골 질환에 제한 없이 사용될 수 있다. 이러한 "골 질환"의 예로는 골다공증, 골절, 골경화증, 골화석증, 관절염, 파제트병(Paget's disease), 치주질환, 골 형성 부전증, 또는 골감소증(osteopenia) 등을 들 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[280] 또한, 상기 골다공증의 보다 구체적인 종류로서 원발성 제1형 골다공증, 원발성 제2형 골다공증, 속발성 골다공증, 골연화증-유사 골다공증, 또는 폐경 또는 난소 절제로 인한 골다공증을 들 수 있으나, 특별히 이에 한정되는 것은 아니다.

[281] 본 발명에서 용어, "골 질환의 예방 또는 치료"란 상기 골 대사성질환, 특히, 골 감소성 질환의 예방 및 완전한 또는 부분적인 치료를 포함한다. 이는 또한 골 질환 증상의 감소, 개선, 그 증상의 고통 경감, 골 질환 발생을 감소 또는 치료결과를 증가시키는 환자의 어떠한 다른 변화를 포함한다.

[282] 골대사 과정에는 파골세포 (osteoclast)에 의한 골흡수 (bone resorption)와 조골세포(osteoblast)에 의한 골 형성 (bone formation)이 결합되어 반복적으로 일어나며 이러한 과정을 통해 신체의 무기질의 균형과 뼈의 재형성 (bone remodeling)이 이루어진다. 골대사 질환의 정확한 진단을 위하여 현재 사용되고 있는 골 생검외에 비교적 골흡수와 골 형성의 속도를 정확히 평가할 수 있는 비관혈적인 생화학적지표(biochemical marker)의 필요성이 요구되고 있다. 이에 따라 골 대사의 생화학적 지표 중 골 형성을 나타내는 지표로는 오스테오칼신(osteocalcin; OCN), 총 및 골-특이 알칼라인 포스파타제(total and bone-specific alkaline phosphatase; ALP) 등을, 골흡수를 반영하는 생화학적 지표로는 소변의 Ca/Cr의 비율(urinary Ca/Cr ratio), 하이드록시프롤린(hydroxyproline), 피리디놀린(pyridinoline; PYD), 데옥시피리디놀린(deoxypyridinoline; DPD) 등을 개발하여 사용하고 있다

[283] 골의 재형성 과정은 오래된 뼈가 주기적으로 새로운 뼈로 전환되는 과정으로, 이러한 과정은 증식, 분화, 및 세포 외 기질의 석회화유도 등의 단계를 거쳐 진행된다. 일반적으로 성인의 골 형성과 흡수 과정은 중간엽 줄기세포 유래의 조골세포와 조혈모세포 유래의 파골세포의 상호작용에 의해 균형을 이루면서 뼈의 건강을 유지한다. 그러나 이러한 조골세포와 파골세포의 불균형이 생기면 골다공증과 같은 대사성 골질환이 유발될 수 있다. 조골세포 분화는 다양한 성장요인과 사이토카인(cytokine) 및 유전자의 발현에 의해 조절되며 배양방법에 따라 고유한 특성을 가지고 있다. 즉, 증식과 분화, 석회화 과정을 거치며, ALP(alkaline phosphatase), 유형 I 콜라겐(type I collagen; Col 1), OPN(osteopontin) 및 OCN(osteocalcin) 등의 형질표현 유전자가 발현된다.

[284] 골세포의 분화 및 골 형성에 관여하는 중요한 신호전달 체계는 대표적으로 TGF- β (transforming growth factor- β)와 BMP(bone morphogenetic protein), Wnt/ β

-catenin, FGF(fibroblast growth factor), Hedgehog, Notch 등이 알려져 있다. 이러한 신호전달체계는 골세포 분화과정동안 Runx2(Runt-related transcription factor 2), Osterix, Msx(Msh homeobox) 및 Dlx(Distallessrelated homeobox) 등과 같이 골 형성과 관련한 다양한 전사인자의 발현과 활성화를 야기시킨다. Ids(Inhibitors of DNA binding/differentiation)는 BMP의 표적유전자 중 여러 형태의 세포에서 관찰되는 가장 중요한 전사인자로 알려져 있다.

[285]

[286] 본 발명에서 용어, "골다공증(osteoporosis)"은 가장 흔한 대사성 질환으로 골 형성(bone formation)과 골 흡수(bone resorption) 불균형에 의하여 골의 화학적 조성에는 변화가 없으나 단위용적내의 골량(bony quantity)을 감소시켜 척추, 요골 및 대퇴부의 골절을 쉽게 일으키는 질환이다. 구체적으로, 골 조직의 석회가 감소되어 뼈의 치밀질이 얇아지고 그로 인해 골수강(骨髓腔)이 넓어지는 상태로, 중세가 진전됨에 따라 뼈가 약해지기 때문에 작은 충격에도 골절되기 쉬우며, 골 흡수와 골 형성의 균형이 맞지 않는 골대체(bone turnover) 과정의 이상이 특징인 질환이다. 골량은 유전적 요인, 영양 섭취, 호르몬의 변화, 운동 및 생활 습관의 차이 등 여러 가지 요인들에 의해 영향을 받으며, 골다공증의 원인으로서는 노령, 운동 부족, 저체중, 흡연, 저칼슘 식이, 폐경, 난소절제 등이 알려져 있다. 한편, 개인차는 있지만 백인보다는 흑인이 골 재흡수 수준(bone resorption level)이 낮아 골량이 더 높으며, 대개 골량은 14 ~ 18세에 가장 높고 노후에는 1년에 약 1%씩 감소한다. 특히, 여성의 경우 30세 이후부터 골 감소가 지속적으로 진행되며, 폐경기에 이르면 호르몬 변화에 의해 골 감소가 급격히 진행된다. 즉, 폐경기에 이르면 에스트로젠 농도가 급속히 감소하는데, 이때, IL-7(interleukin-7)에 의한 것처럼 B-림프구(B-lymphocyte)가 다량 생성되어 골수(bone marrow)에 B 세포 전구체(pre-B cell)가 축적되고, 이로 인해 IL-6의 양이 증가하여 파골세포의 활성을 증가시키므로 결국 골량이 감소할 수 있다.

[287]

본 발명에서 용어, "골절"은 뼈나 골단판 또는 관절면의 연속성이 비정상적으로 끊어진 상태로, 뼈의 깨짐을 일컫는다. 골절을 유발하는 원인으로서는 교통사고 등의 외상, 산업장애에서 일어나는 안전사고, 골다공증, 골암, 대사이상증 등의 질병으로 인한 뼈의 변화 및 스포츠나 하중으로 인한 반복적인 뼈에 대한 스트레스 등이 있다. 또한, 골절 상태는 골절선(골 절단에 의해 발생된 뼈끝단을 따른 선)에 근거하여, 균열 골절, 그린스틱(greenstick) 골절, 횡상 골절, 사상 골절, 나선상 골절, 분절 골절, 분쇄골절, 견열 골절, 압박 골절, 함몰 골절 등으로 분류된다.

[288]

본 발명에서 용어, "골 경화증"은 뼈 조직의 대부분이 비정상적으로 치밀해지고 골수강도 좁아지는 질환을 말한다.

[289]

본 발명에서 용어, "골 화석증"은 뼈를 흡수하기 위한 파골세포의 기능부전으로 발생하는 질병으로, 뼈의 형성과 재형성 과정의 손상으로 뼈 질량이 증가함에도 불구하고 뼈가 부서지기 쉽고, 조혈모세포의 감소, 불규칙한

치아 돌출, 그리고 성장 장애가 초래될 수 있는 질환이다.

[290] 본 발명에서 용어, "관절염"은 관절염 내에 염증성 변화가 생긴 질환으로서, 골관절염, 및 류마티스 관절염 등을 들 수 있다.

[291] 본 발명에서 용어, "파제트 병"은 골 재형성(bone remodeling)이 과도하게 항진되어 광범위한 부위의 골격계가 침범되는 국소성 골 질환을 의미한다. 파제트병의 병리학적인 기전은 뼈를 청소하는 기능을 가진 파골 세포(osteoclast)에 의한 골 흡수의 과다한 증가와 이에 따른 보상작용으로 뼈를 만드는 기능을 가진 조골 세포(osteoblast)에 의한 새로운 골 형성의 증가가 결합된 것으로 알려져 있으며, 또한, 골 파제트병에서 새롭게 형성된 뼈는 구조적으로 무질서하고 뼈 변형과 골절에 매우 취약한 상태로 알려져 있다. 골 파제트병 환자는 무증상일 수도 있으며 다양한 증상이 동반될 수도 있다. 골 파제트병 환자에서는 뼈 조직의 침범에 의한 직접적인 합병증과 뼈 조직의 팽창과 이에 따른 주위 신경조직의 압박으로 인한 이차적인 합병증이 발생할 수 있다.

[292] 본 발명에서 용어, "치주질환"은 세균에 의해 야기되는 치아지지 조직의 염증 상태를 말하며, 치은염 및 치주염으로 분리할 수 있다. 발병원인은 불량한 구강 위생 상태로 인한 구강 세균이 치면 세균막을 형성하는데 있다. 치면 세균막이란 침에 있는 끈끈한 물질을 접착제로 이용하여 세균이 치아 표면에 달라붙은 후 증식한 세균덩어리를 말한다. 치면 세균막은 그냥 방치해 두면, 염증이 생겨 가끔 잇몸에서 피가 나고, 구취가 나는 경우가 있으며 이러한 증상을 치은염이라고 한다. 치은염이 더 진행되면, 치아와 잇몸사이의 벌어진 틈이 더 깊어져서 치주낭이 생기고, 여기에 치주질환을 일으키는 세균들이 번식하여 치주염이 발생 된다. 치주염이 진행되면 칫솔질과 같은 약한 자극에도 잇몸에서 피가 나기도 하며 붓고, 종종 급성염증으로 변화되어 통증을 유발한다. 이러한 염증은 골을 만드는 기능을 저하시키고, 골을 흡수하는 작용이 높아져서 치조골이 점점 낮아지게 되어 치조골이 파괴되고 결국 치아를 상실하게 된다. 따라서, 본 발명에 따른 조성물은 치주질환, 특히 치주질환으로 인한 치조골 소실에 유용하게 사용할 수 있다.

[293] 본 발명에서 용어, "골 형성 부전증"은 불완전 골형성증으로 불리우는 질환으로서, 골의 강도가 약해서 특별한 이유 없이 쉽게 골절되는 질환을 말한다.

[294] 본 발명에서 용어, "골감소증(osteopenia)"은 뼈가 약화되거나 뼈의 미네랄 밀도(BDM)이 정상에 비하여 떨어지는 상태를 말한다.

[295]

[296] 본 발명의 조성물은 개체에 투여 시 하기 특성 중 하나 이상의 특성을 수행하여, 골 질환을 예방 또는 치료할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다:

[297] (i) 혈중 오스테오칼신 수치 감소; 또는

[298] (ii) 혈중 PINP (procollagen I intact N-terminal propeptide) 수치 증가.

[299]

[300] 혈중 오스테오칼신 수치는 뼈 흡수 표지자로서 혈중에 많이 존재할 경우 뼈의 분해가 많이 일어나고, 혈중 PINP 수치는 뼈 형성 표지자로 혈 중에 높게 존재할 경우 뼈 형성이 원활하게 일어나고 있음을 의미하는 수치로 상기 수치는 혈중 내 농도로 측정할 수 있으나 이에 제한되지 않는다. 본 발명의 조성물은 미투여 대조군과 비교하여 혈중 오스테오칼신 수치가 감소 및/또는 혈중 PINP 수치를 증가시켜 뼈 분해 감소 및/또는 뼈 형성 증가 기전을 수행하여 골 질환의 예방 또는 치료 효과를 나타낼 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[301]

[302] 본 발명의 조성물은 하기 특성 중 하나 이상의 특성을 수행하여, 골 질환을 예방 또는 치료할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다:

[303] (i) 조골세포의 분화 증가; 또는

[304] (ii) 조골세포의 생존 능력 증가.

[305]

[306] 조골세포는 골 형성에 관여하는 세포로 조골세포의 분화 증가 및/또는 조골세포의 생존 능력 증가는 뼈 형성이 증가하는 것을 의미하는 것이다. 조골세포의 분화 증가는 콜라겐의 농도로 측정할 수 있으며, 조골세포의 생존 능력은 생존 세포의 ATP 수준에 따른 발광 정도로 측정할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 본 발명의 조성물은 미투여 대조군과 비교하여 조골세포의 분화 증가 및/또는 조골세포의 생존 능력을 증가시켜 뼈 형성 증가 및/또는 영양소 결핍 등에 의한 뼈 형성 감소등을 억제하여 골 질환의 예방 또는 치료 효과를 나타낼 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[307]

[308] 본 발명의 약학적 조성물은 약학적으로 허용가능한 담체, 부형제 또는 희석제를 추가로 포함할 수 있다. 이러한 약학적으로 허용가능한 담체, 부형제, 또는 희석제는 비자연적으로 발생된 것일 수 있다.

[309] 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.

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

[311] 본 발명의 조성물의 제형은 상술한 바와 같은 약학적으로 허용가능한 부형제와

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.

- [312] 한편, 제제화에 적합한 담체, 부형제 및 희석제의 예로는 락토스, 덱스트로스, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로스, 메틸 셀룰로스, 미정질 셀룰로스, 폴리비닐피롤리돈, 물, 메틸하이드록시벤조에이트, 프로필하이드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 또는 광물유 등이 사용될 수 있다. 또한, 충진제, 항응집제, 윤활제, 습윤제, 향료, 방부제 등을 추가로 포함할 수 있다.
- [313] 또한, 본 발명의 약학적 조성물은 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제, 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제, 멸균된 수용액, 비수성용제, 동결건조제제 및 좌제로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나의 제형을 가질 수 있다.
- [314] 또한, 상기 조성물은 약학적 분야에서 통상의 방법에 따라 환자의 신체 내 투여에 적합한 단위 투여형의 제제, 구체적으로는 단백질 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.
- [315] 또한, 상기 결합체는 생리식염수 또는 유기용매와 같이 약제로 허용된 여러 전달체(carrier)와 혼합하여 사용될 수 있고, 안정성이나 흡수성을 증가시키기 위하여 글루코스, 수크로스 또는 덱스트란과 같은 탄수화물, 아스코르브산(ascorbic acid) 또는 글루타티온과 같은 항산화제(antioxidants), 킬레이트제, 저분자 단백질 또는 다른 안정화제(stabilizers) 등이 약제로 사용될 수 있다.
- [316] 본 발명의 약학적 조성물의 투여량과 횟수는 치료할 질환, 투여 경로, 환자의 연령, 성별 및 체중 및 질환의 중등도 등의 여러 관련 인자와 함께, 활성성분인 약물의 종류에 따라 결정된다. 구체적으로, 본 발명의 조성물은 상기 펩타이드 또는 이를 포함하는 지속형 결합체를 약학적 유효량으로 포함하는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [317] 상기 펩타이드 또는 지속형 결합체를 약학적 유효량으로 포함하는 것은, 펩타이드 또는 지속형 결합체로 인한 목적하는 약리 활성(예를 들어, 골 질환의 예방, 개선 또는 치료)을 얻을 수 있는 정도를 의미하고, 또한 투여되는 개체에서 독성 또는 부작용이 일어나지 않거나 미미한 수준으로서 약학적으로 허용되는 수준을 의미할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 이와 같은 약학적 유효량은 투여 횟수, 환자, 제형 등을 종합적으로 고려하여 결정될 수 있다.

[318]

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

[320]

[321] 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 삼중활성체 또는 이의 지속형 결합체의 바람직한 전체 용량은 하루에 환자 체중 1 kg당 약 0.0001 mg 내지 500 mg일 수 있다. 그러나 상기 삼중활성체 또는 이의 결합체의 용량은 약학적 조성물의 투여 경로 및 치료 횟수뿐만 아니라 환자의 연령, 체중, 건강 상태, 성별, 질환의 중증도, 식이 및 배설을 등 다양한 요인들을 고려하여 환자에 대한 유효 투여량이 결정되는 것이므로, 이러한 점을 고려할 때 당분야의 통상적인 지식을 가진 자라면 상기 본 발명의 조성물의 특정한 용도에 따른 적절한 유효 투여량을 결정할 수 있을 것이다. 본 발명에 따른 약학적 조성물은 본 발명의 효과를 보이는 한 그 제형, 투여 경로 및 투여 방법에 특별히 제한되지 아니한다.

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

[323]

[324] 본 발명을 구현하는 다른 하나의 양태는 상기 삼중활성체(펩타이드) 및/또는 삼중활성체의 지속형 결합체를 포함하는, 골 질환의 예방 또는 개선을 위한 식품 조성물을 제공한다.

[325] 상기 펩타이드, 지속형 결합체, 골 질환 등에 대해서는 앞서 설명한 바와 같다.

[326] 상기 식품조성물은 건강기능식품으로 사용될 수 있다. 본 발명의 조성물을 식품 보조첨가제로 사용할 경우, 상기 펩타이드 (펩타이드 자체 혹은 이의 지속형 결합체)를 그대로 첨가하거나 다른 식품 또는 식품 성분과 함께 사용할 수 있고, 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용할 수 있다. 유효 성분의 혼합량은 사용목적(예방, 건강 또는 치료적 처치)에 따라 적합하게 결정될 수 있다.

[327] 본 발명에서의 용어 "건강기능식품"이란, 건강보조의 목적으로 특정성분을 원료로 하거나 식품 원료에 들어있는 특정성분을 추출, 농축, 정제, 혼합 등의 방법으로 제조, 가공한 식품을 말하며, 상기 성분에 의해 생체방어, 생체리듬의 조절, 질병의 방지와 회복 등 생체조절기능을 생체에 대하여 충분히 발휘할 수 있도록 설계되고 가공된 식품을 말하는 것으로서, 상기 건강식품용 조성물은 질병의 예방 및 질병의 회복 등과 관련된 기능을 수행할 수 있다.

[328]

[329] 본 발명을 구현하기 위한 다른 하나의 양태는 상기 삼중활성체(펩타이드) 및/또는 삼중활성체의 지속형 결합체, 또는 이를 포함하는 조성물을 이를 필요로

하는 개체에 투여하는 단계를 포함하는, 골 질환의 예방 또는 치료 방법을 제공한다.

[330] 상기 삼중활성체 및/또는 삼중활성체의 지속형 결합체, 또는 이를 포함하는 조성물, 골 대사성 질환 등에 대해서는 앞서 설명한 바와 같다.

[331] 본 발명에서 상기 개체는 골 질환이 의심되는 개체로서, 상기 골 질환 의심 개체는 해당 질환이 발병하였거나 발병할 수 있는 인간을 포함한 쥐, 가축 등을 포함하는 포유 동물을 의미하나, 본 발명의 펩타이드 및/또는 결합체, 또는 이를 포함하는 상기 조성물로 치료 가능한 개체는 제한 없이 포함된다.

[332] 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, 피 내 투여, 경구 투여, 국소 투여, 비 내 투여, 폐 내 투여, 또는 직장 내 투여 등이 될 수 있다.

[333]

[334] 본 발명의 방법은 상기 삼중활성체 또는 이의 지속형 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 사용되거나 동시 사용되는 약물을 비롯한 다양한 인자와 의약 분야에 잘 알려진 유사 인자에 따라 다르게 적용하는 것이 바람직하다.

[335]

[336] 본 발명을 구현하는 다른 하나의 양태는 골 질환의 예방 또는 치료를 위한 약제의 제조에 있어서 상기 삼중활성체 펩타이드 또는 상기 펩타이드의 지속형 결합체를 포함하는 조성물의 용도이다.

[337] 상기 펩타이드 및/또는 결합체, 또는 이를 포함하는 조성물, 골 질환, 예방 및 치료에 대해서는 앞서 설명한 바와 같다.

[338]

[339] 본 발명을 구현하는 다른 하나의 양태는 골 질환의 예방 또는 치료를 위한 펩타이드 및/또는 결합체, 또는 이를 포함하는 조성물의 용도를 제공하는 것이다.

[340] 상기 펩타이드 및/또는 결합체, 또는 이를 포함하는 조성물, 골 질환, 예방 및 치료에 대해서는 앞서 설명한 바와 같다.

[341]

[342] 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.

[343]

[344] 실시예 1: 삼중 활성체의 제조

[345]

[346] 글루카곤 수용체, GLP-1 수용체, 및 GIP 수용체 모두에 활성을 나타내는 삼중 활성체를 제조하여, 하기 표 1에 이의 서열을 나타냈다.

[347]

[348] [표1]

서열번호	서열	정보
1	HXQGTFTSDVSSYLDGQAAKEFIAWLKGC	
2	HXQGTFTSDVSSYLDGQAQKEFIAWLKGC	
3	HXQGTFTSDVSSYLLGQAAKQFIAWLKGGPSSGAPPSG	
4	HXQGTFTSDVSSYLLGQQQKEFIAWLKGC	
5	HXQGTFTSDVSSYLLGQQQKEFIAWLKGGPSSGAPPSG	
6	HXQGTFTSDVSSYLDGQAAKEFVAWLLKGC	
7	HXQGTFTSDVSKYLDGQAAKEFVAWLLKGC	
8	HXQGTFTSDVSKYLDGQAAQEFVAWLLKGC	
9	HXQGTFTSDVSKYLDGQAAQEFVAWLLAGC	
10	HXQGTFTSDVSKYLDGQAAQEFVAWLLAGGPSSGAPPSG	
11	CAGEGTFTSDLSKYLDLRRQQLFVQWLKAGGPSSGAPPSHG	
12	CAGEGTFISDLSKYMDEQAVQLFVEWLLMAGGPSSGAPPSHG	
13	CAGEGTFISDYSIQLDEIAVQDFVEWLLAQKPSSGAPPSHG	
14	CAGQGTFTSDYSIQLDEIAVRDFVEWLKNGGPSSGAPPSHG	
15	CAGQGTFTSDLSKQMDDEAVRLFIEWLKNGGPSSGAPPSHG	
16	CAGQGTFTSDLSKQMDSEAQQLFIEWLKN	

	NGGPSSGAPPPSHG	
17	CAGQGTFTSDLSKQMDEERAREFIEWLL AQKPSSGAPPPSHG	
18	CAGQGTFTSDLSKQMDSERAREFIEWLK NTGPSSGAPPPSHG	
19	CAGQGTFTSDLSIQYDSEHQ RDFIEWLKD TGPSSGAPPPSHG	
20	CAGQGTFTSDLSIQYEEEAQQDFVEWLK DTGPSSGAPPPSHG	
21	YXQGTFTSDYSKYLDE <u>C</u> RA <u>K</u> EFVQWLLD HHPSSGQPPPS	고리 형성
22	YXQGTFTSDYSKCLDE <u>K</u> RA <u>K</u> EFVQWLLD HHPSSGQPPPS	고리 형성
23	YXQGTFTSDYSKYLDE <u>C</u> RA <u>K</u> EFVQWLLA QKGKKNDWKHNIT	고리 형성
24	YXQGTFTSDYSKYLDE <u>C</u> RA <u>K</u> EFVQWLK NGGPSSGAPPPS	고리 형성
25	HXQGTFTSDCSKYLDERAAQDFVQWLL DGGPSSGAPPPS	
26	HXQGTFTSDCSKYLDSRAAQDFVQWLLD GGPSSGAPPPS	
27	HXQGTFTSDYSKYLDERACQDFVQWLL DQGGPSSGAPPPS	
28	HXQGTFTSDYSKYLDEKRAQEFVCWLLA QKGKKNDWKHNIT	
29	HXQGTFTSDYSKYLDE <u>K</u> AA <u>K</u> EFVQWLL NTC	고리 형성
30	HXQGTFTSDYSKYLDE <u>K</u> AQ <u>K</u> EFVQWLL DTC	고리 형성
31	HXQGTFTSDYSKYLDE <u>K</u> AC <u>K</u> EFVQWLLA Q	고리 형성
32	HXQGTFTSDYSKYLDE <u>K</u> AC <u>K</u> DFVQWLL DGGPSSGAPPPS	고리 형성
33	HXQGTFTSDYSIAMDE <u>I</u> HQ <u>K</u> DFVNWLLA	고리

	QKC	형성
34	HXQGTFTSDYSKYLDE <u>K</u> RQ <u>K</u> EFVNWLLA QKC	고리 형성
35	HXQGTFTSDYSIAMDE <u>I</u> HQ <u>K</u> DFVNWLLN TKC	고리 형성
36	HXQGTFTSDYSKYLCE <u>K</u> RQ <u>K</u> EFVQWLLN GGPSSGAPPSG	고리 형성
37	HXQGTFTSDYSKYLDE <u>C</u> RQ <u>K</u> EFVQWLLN GGPSSGAPPSG	고리 형성
38	CAXQGTFTSDKSSYLDERAAQDFVQWLL DGGPSSGAPPPSS	
39	HXQGTFTSDYSKYLDGQHAQCFVAWLL AGGGPSSGAPPPS	
40	HXQGTFTSDKSKYLDERACQDFVQWLL DGGPSSGAPPPS	
41	HXQGTFTSDKSKYLDECAAQDFVQWLL DGGPSSGAPPPS	
42	YXQGTFTSDYSKYLDE <u>K</u> RA <u>K</u> EFVQWLLD HHPSSGQPPPS	고리 형성
43	YXQGTFTSDYSKYLDE <u>K</u> RA <u>K</u> EFVQWLLD HHCSSGQPPPS	고리 형성
44	HGQGTFTSDCSKQLDGQAAQEFVAWLL AGGPSSGAPPPS	
45	HGQGTFTSDCSKYMDGQAAQDFVAWLL AGGPSSGAPPPS	
46	HGQGTFTSDCSKYLDEQHAQEFVAWLLA GGPSSGAPPPS	
47	HGQGTFTSDCSKYLDGQRAQEFVAWLL AGGPSSGAPPPS	
48	HGQGTFTSDCSKYLDGQRAQDFVNWLL AGGPSSGAPPPS	
49	CAXQGTFTSDYSICMDE <u>I</u> HQ <u>K</u> DFVNWLL NTK	고리 형성
50	HXQGTFTSDYSKYLDE <u>K</u> RA <u>K</u> EFVQWLLD	고리

	HHPSSGQPPSC	형성
51	HXQGTFTSDYSKYLDE <u>K</u> RQ <u>K</u> EFVQWLLN TC	고리 형성
52	HXQGTFTSDYSKYLDE <u>K</u> RQ <u>K</u> EFVQWLLD TC	고리 형성
53	HXEGTFTSDYSIAMDE <u>I</u> HQ <u>K</u> DFVNWLLA QC	고리 형성
54	HXEGTFTSDYSIAMDE <u>I</u> HQ <u>K</u> DFVDWLLA EC	고리 형성
55	HXQGTFTSDYSIAMDE <u>I</u> HQ <u>K</u> DFVNWLLA QC	고리 형성
56	HXQGTFTSDYSKYLDE <u>K</u> RQ <u>K</u> EFVNWLLA QC	고리 형성
57	HXQGTFTSDYSIAMDE <u>I</u> HQ <u>K</u> DFVNWLLN TC	고리 형성
58	HXQGTFTSDYSKYLDE <u>K</u> RQ <u>K</u> EFVQWLLN TKC	고리 형성
59	CAXQGTFTSDYSICMDE <u>K</u> HQ <u>K</u> DFVNWLL NTK	고리 형성
60	CAXQGTFTSDYSIAMDE <u>K</u> H <u>C</u> <u>K</u> DFVNWLL NTK	고리 형성
61	CAXQGTFTSDYSIAMDE <u>I</u> A <u>C</u> <u>K</u> DFVNWLL NTK	고리 형성
62	CAXQGTFTSDKSKYLDERAAQDFVQWLL DGGPSSGAPPS	
63	CAXQGTFTSDCSKYLDERAAQDFVQWLL DGGPSSGAPPS	
64	YXQGTFTSDYSKYLDE <u>C</u> AA <u>K</u> EFVQWLLD HHPSSGQPPS	고리 형성
65	HXQGTFTSDYSKCLDE <u>K</u> RA <u>K</u> EFVQWLLD HHPSSGQPPS	고리 형성
66	YXQGTFTSDYSKYLDE <u>C</u> RA <u>K</u> DFVQWLL DHPSSGQPPS	고리 형성
67	YXQGTFTSDYSKYLDE <u>C</u> AA <u>K</u> DFVQWLL	고리

	DHHPSSGQPPPS	형성
68	YXQGTFTSDYSKCLDE <u>K</u> AA <u>K</u> EFVQWLLD HHPSSGQPPPS	고리 형성
69	YXQGTFTSDYSKCLDE <u>R</u> AA <u>K</u> EFVQWLLD HHPSSGQPPPS	고리 형성
70	YXQGTFTSDYSKCLDE <u>K</u> RA <u>K</u> DFVQWLL DHHPSSGQPPPS	고리 형성
71	YXQGTFTSDYSKYLD <u>E</u> RAC <u>K</u> DFVQWLL DHHPSSGQPPPS	고리 형성
72	YXQGTFTSDCSKYLD <u>E</u> RAA <u>K</u> DFVQWLL DHHPSSGQPPPS	고리 형성
73	CAXQGTFTSDYSKYLD <u>E</u> CRA <u>K</u> EFVQWLL DHHPSSGQPPPS	고리 형성
74	CAXQGTFTSDYSKCLDE <u>K</u> RA <u>K</u> EFVQWLL DHHPSSGQPPPS	고리 형성
75	YXQGTFTSDYSKYLD <u>E</u> KAA <u>K</u> EFVQWLL DHHPSSGQPPPS C	고리 형성
76	YXQGTFTSDYSKYLD <u>E</u> KRA <u>K</u> DFVQWLL DHHPSSGQPPPS C	고리 형성
77	YXQGTFTSDYSKYLD <u>E</u> KAA <u>K</u> DFVQWLL DHHPSSGQPPPS C	고리 형성
78	HXQGTFTSDYSKYLD <u>E</u> KRQ <u>K</u> EFVQWLLD TKC	고리 형성
79	HXEGTFTSDYSIAMD <u>E</u> IHQ <u>K</u> DFVNWLLA QKC	고리 형성
80	HXEGTFTSDYSIAMD <u>E</u> IHQ <u>K</u> DFVDWLLA EKC	고리 형성
81	CAXQGTFTSDYSKYLD <u>E</u> KRQ <u>K</u> EFVQWLL NTC	고리 형성
82	CAXQGTFTSDYSKYLD <u>E</u> KRQ <u>K</u> EFVQWLL DTC	고리 형성
83	CAXEGTFTSDYSIAMD <u>E</u> IHQ <u>K</u> DFVNWLL AQC	고리 형성
84	CAXEGTFTSDYSIAMD <u>E</u> IHQ <u>K</u> DFVDWLL	고리

	AEC	형성
85	CAXQGTFTSDYSIAMDE <u>I</u> HQ <u>K</u> DFVNWLL AQC	고리 형성
86	CAXQGTFTSDYSKYLDE <u>K</u> RQ <u>K</u> EFVNWLL AQC	고리 형성
87	CAXQGTFTSDYSIAMDE <u>I</u> HQ <u>K</u> DFVNWLL NTC	고리 형성
88	CAXQGTFTSDYSKYLDE <u>K</u> RQ <u>K</u> EFVQWLL NTKC	고리 형성
89	CAXQGTFTSDYSKYLDE <u>K</u> RQ <u>K</u> EFVQWLL DTKC	고리 형성
90	CAXEGTFTSDYSIAMDE <u>I</u> HQ <u>K</u> DFVNWLL AQKC	고리 형성
91	CAXEGTFTSDYSIAMDE <u>I</u> HQ <u>K</u> DFVDWLL AEKC	고리 형성
92	CAXQGTFTSDYSIAMDE <u>I</u> HQ <u>K</u> DFVNWLL AQKC	고리 형성
93	CAXQGTFTSDYSKYLDE <u>K</u> RQ <u>K</u> EFVNWLL AQKC	고리 형성
94	CAXQGTFTSDYSIAMDE <u>I</u> HQ <u>K</u> DFVNWLL NTKC	고리 형성
95	YXQGTFTSDYSKYLDE <u>K</u> RA <u>K</u> EFVQWLLC HHPSSGQPPPS	고리 형성
96	YXQGTFTSDYSKYLDE <u>K</u> RA <u>K</u> EFVQWLLD HCPSSGQPPPS	고리 형성
97	YXQGTFTSDYSKYLDE <u>K</u> RA <u>K</u> EFVQWLLD CHPSSGQPPPS	고리 형성
98	YXQGTFTSDYSKALDE <u>K</u> AA <u>K</u> EFVNWLL DHPSSGQPPPS	고리 형성
99	YXQGTFTSDYSKALDE <u>K</u> AA <u>K</u> DFVNWLL DHPSSGQPPPS	고리 형성
100	YXQGTFTSDYSKALDE <u>K</u> AA <u>K</u> EFVQWLL DQHPSSGQPPPS	고리 형성
101	YXQGTFTSDYSKALDE <u>K</u> AA <u>K</u> EFVNWLL	고리

	DQHPSSGQPPPSC	형성
102	YXQGTFTSDYSKALDEKAAKDFVNWLL DQHPSSGQPPPSC	고리 형성

[349] 상기 표 1에 기재된 서열에서 X로 표기된 아미노산은 비천연형 아미노산인 Aib (2-aminoisobutyric acid)이며, 밑줄로 표시된 아미노산은 밑줄로 표시된 아미노산들이 서로 고리를 형성하는 것을 의미한다. 또한, 상기 표 1에서 CA는 4-이미다조아세틸(4-imidazoacetyl)을 의미한다. 상기 삼중활성체 펩타이드는 필요에 따라, C-말단을 아미드화한 삼중활성체로 이용한다.

[350]

[351] **실시예 2: 삼중 활성체의 지속형 결합체 제조**

[352] 양 말단에 각각 말레이미드기 및 알데히드기를 가지는 10kDa의 PEG, 즉 말레이미드-PEG-알데히드 (10kDa, NOF, 일본)를 실시예 1의 삼중활성체 (서열번호 21, 22, 42, 43, 50, 77, 및 96)의 시스테인 잔기에 폐길화시키기 위하여, 삼중활성체와 말레이미드-PEG-알데히드의 몰비를 1 : 1 내지 3, 단백질의 농도를 1 내지 5 mg/ml로 하여 저온에서 0.5 내지 3 시간 동안 반응시켰다. 이때, 반응은 50 mM Tris 완충액(pH 7.5)에 20 내지 60% 아이소프로판올이 첨가된 환경 하에서 수행되었다. 반응이 종료된 후, 상기 반응액을 SP 세파로스 HP (GE healthcare, 미국)에 적용하여 시스테인에 모노-폐길화된 삼중활성체를 정제하였다.

[353] 다음으로, 상기 정제된 모노-폐길화된 삼중활성체와 면역글로불린 Fc을 몰비를 1 : 1 내지 5, 단백질의 농도를 10 내지 50mg/ml로 하여 4 내지 8°C에서 12 내지 18시간 동안 반응시켰다. 반응은 100 mM 인산칼륨 완충액 (pH 6.0)에 환원제인 10 내지 50 mM 소듐시아노보로하이드라이드와 10 내지 30 % 아이소프로판올이 첨가된 환경 하에서 수행되었다. 반응이 종료된 후, 상기 반응액을 부틸 세파로스 FF 정제컬럼 (GE healthcare, 미국)과 Source ISO 정제컬럼 (GE healthcare, 미국)에 적용하여, 삼중활성체와 면역글로불린 Fc를 포함하는 결합체를 정제하였다. 정제된 이 지속형 결합체는 분자 내에서 삼중 활성체 펩타이드, 폴리에틸렌 글리콜(PEG) 링커와 Fc 이합체가 1:1:1의 몰 비로 공유결합 연결된 구조이며, PEG 링커는 Fc 이합체의 두 폴리펩타이드 사슬 중 한 사슬에만 연결되어 있다.

[354] 한편, 상기 면역글로불린 Fc는 서열번호 123의 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 결합이 형성된 것이다.

[355]

- [356] 제조 후 역상 크로마토그래피, 크기배제 크로마토그래피 및 이온교환 크로마토그래피로 분석한 순도는 95 % 이상이었다.
- [357] 여기서, 서열번호: 21의 삼중활성체의 C-말단을 아미드화한 삼중활성체 및 면역글로불린 Fc가 PEG를 통하여 연결된 결합체를, '서열번호: 21과 면역글로불린 Fc를 포함하는 결합체' 혹은 '서열번호: 21의 지속형 결합체' 또는 '서열번호: 21 지속형 결합체'로 명명하였고, 이들은 본원에서 혼용되어 사용될 수 있다.
- [358] 여기서, 서열번호: 22의 삼중활성체의 C-말단을 아미드화한 삼중활성체 및 면역글로불린 Fc가 PEG를 통하여 연결된 결합체를, '서열번호: 22와 면역글로불린 Fc를 포함하는 결합체' 혹은 '서열번호: 22의 지속형 결합체' 또는 '서열번호: 22 지속형 결합체'로 명명하였고, 이들은 본원에서 혼용되어 사용될 수 있다.
- [359] 여기서, 서열번호: 42의 삼중활성체의 C-말단을 아미드화한 삼중활성체 및 면역글로불린 Fc가 PEG를 통하여 연결된 결합체를, '서열번호: 42와 면역글로불린 Fc를 포함하는 결합체' 혹은 '서열번호: 42의 지속형 결합체' 또는 '서열번호: 42 지속형 결합체'로 명명하였고, 이들은 본원에서 혼용되어 사용될 수 있다.
- [360] 여기서, 서열번호: 43의 삼중활성체의 C-말단을 아미드화한 삼중활성체 및 면역글로불린 Fc가 PEG를 통하여 연결된 결합체를, '서열번호: 43과 면역글로불린 Fc를 포함하는 결합체' 혹은 '서열번호: 43의 지속형 결합체' 또는 '서열번호: 43 지속형 결합체'로 명명하였고, 이들은 본원에서 혼용되어 사용될 수 있다.
- [361] 여기서, 서열번호: 50의 삼중활성체의 C-말단을 아미드화한 삼중활성체 및 면역글로불린 Fc가 PEG를 통하여 연결된 결합체를, '서열번호: 50과 면역글로불린 Fc를 포함하는 결합체' 혹은 '서열번호: 50의 지속형 결합체' 또는 '서열번호: 50 지속형 결합체'로 명명하였고, 이들은 본원에서 혼용되어 사용될 수 있다.
- [362] 여기서, 서열번호: 77의 삼중활성체의 C-말단을 아미드화한 삼중활성체 및 면역글로불린 Fc가 PEG를 통하여 연결된 결합체를, '서열번호: 77와 면역글로불린 Fc를 포함하는 결합체' 혹은 '서열번호: 77의 지속형 결합체' 또는 '서열번호: 77 지속형 결합체'로 명명하였고, 이들은 본원에서 혼용되어 사용될 수 있다.
- [363] 여기서, 서열번호: 96의 삼중활성체의 C-말단을 아미드화한 삼중활성체 및 면역글로불린 Fc가 PEG를 통하여 연결된 결합체를, '서열번호: 96과 면역글로불린 Fc를 포함하는 결합체' 혹은 '서열번호: 96의 지속형 결합체' 또는 '서열번호: 96 지속형 결합체'로 명명하였고, 이들은 본원에서 혼용되어 사용될 수 있다.
- [364]

- [365] **실험예 1: 삼중 활성화체 및 이의 지속형 결합체의 *in vitro* 활성화 측정**
- [366] 상기 실시예 1 및 2에서 제조된 삼중활성체와 이의 지속형 결합체의 활성을 측정하기 위해 GLP-1 수용체, 글루카곤(GCG) 수용체, 및 GIP 수용체가 각각 형질전환된 세포주를 이용하여 *in vitro*에서 세포 활성을 측정하는 방법을 이용하였다.
- [367] 상기 각 세포주는 CHO (chinese hamster ovary)에 인간 GLP-1 수용체, 인간 GCG 수용체 및 인간 GIP 수용체 유전자를 각각 발현하도록 형질 전환된 것으로서, GLP-1, GCG 및 GIP의 활성을 측정하기에 적합하다. 따라서, 각 부분에 대한 활성을 각각의 형질 전환 세포주를 이용하여 측정하였다.
- [368] 상기 실시예 1과 2에서 제조된 삼중활성체와 이의 지속형 결합체의 GLP-1 활성화 측정을 위해 인간 GLP-1을 연속적으로 희석하고, 상기 실시예 1과 2에서 제조된 삼중활성체와 이의 지속형 결합체를 연속적으로 희석하였다. 상기 배양된 인간 GLP-1 수용체가 발현된 CHO 세포에서 배양액을 제거하고 연속적으로 희석된 각 물질들을 5 μ l씩 상기 세포에 첨가한 다음, cAMP 항체가 포함된 완충액을 5 μ l씩 추가 한 뒤 15분 동안 상온에서 배양하였다. 그런 다음 세포용해완충액 (cell lysis buffer)이 포함된 detection mix를 10 μ l씩 가하여 세포를 용해시키고, 90분 동안 상온에서 반응시켰다. 상기 반응이 완료된 세포용해물을 LANCE cAMP kit (PerkinElmer, USA)에 적용하여 측정된 cAMP를 통해 EC₅₀값을 산출한 후, 상호 비교하였다. 인간 GLP-1 대비 상대 역가는 하기 표 2와 표 3에 나타내었다.
- [369] 상기 실시예 1과 2에서 제조된 삼중활성체와 이의 지속형 결합체의 GCG 활성화 측정을 위해 인간 GCG를 연속적으로 희석하고, 상기 실시예 1과 2에서 제조된 삼중활성체와 이의 지속형 결합체를 연속적으로 희석하였다. 상기 배양된 인간 GCG 수용체가 발현된 CHO 세포에서 배양액을 제거하고 연속적으로 희석된 각 물질들을 5 μ l씩 상기 세포에 첨가한 다음, cAMP 항체가 포함된 완충액을 5 μ l씩 추가 한 뒤 15분 동안 상온에서 배양하였다. 그런 다음 세포용해완충액 (cell lysis buffer)이 포함된 detection mix를 10 μ l씩 가하여 세포를 용해시키고, 90분 동안 상온에서 반응시켰다. 상기 반응이 완료된 세포용해물을 LANCE cAMP kit (PerkinElmer, USA)에 적용하여 측정된 cAMP를 통해 EC₅₀값을 산출한 후, 상호 비교하였다. 인간 GCG 대비 상대 역가는 하기 표 2와 표 3에 나타내었다.
- [370] 상기 실시예 1과 2에서 제조된 삼중활성체와 이의 지속형 결합체의 GIP 활성화 측정을 위해 인간 GIP를 연속적으로 희석하고, 상기 실시예 1과 2에서 제조된 삼중활성체와 이의 지속형 결합체를 연속적으로 희석하였다. 상기 배양된 인간 GIP 수용체가 발현된 CHO 세포에서 배양액을 제거하고 연속적으로 희석된 각 물질들을 5 μ l씩 상기 세포에 첨가한 다음, cAMP 항체가 포함된 완충액을 5 μ l씩 추가 한 뒤 15분 동안 상온에서 배양하였다. 그런 다음 세포용해완충액 (cell lysis buffer)이 포함된 detection mix를 10 μ l씩 가하여 세포를 용해시키고, 90분 동안 상온에서 반응시켰다. 상기 반응이 완료된 세포용해물을 LANCE cAMP kit

(PerkinElmer, USA)에 적용하여 측정된 cAMP를 통해 EC_{50} 값을 산출한 후, 상호 비교하였다. 인간 GIP 대비 상대 역가는 하기 표 2와 표 3에 나타내었다.

[371] [표2]

삼중활성체의 상대적 역가 비율

서열번호	천연형 펩타이드 대비 in vitro 활성 (%)		
	vs GLP-1	vs Glucagon	vs GIP
1	3.2	<0.1	<0.1
2	5.9	<0.1	<0.1
3	1.8	<0.1	<0.1
4	8.5	<0.1	<0.1
5	42.1	<0.1	<0.1
6	17.0	<0.1	<0.1
7	13.7	<0.1	<0.1
8	14.2	0.10	<0.1
9	32.1	0.13	<0.1
10	46.0	<0.1	<0.1
11	1.4	<0.1	<0.1
12	0.4	<0.1	<0.1
13	< 0.1	< 0.1	< 0.1
14	28.0	< 0.1	< 0.1
15	79.2	<0.1	<0.1
16	2.1	< 0.1	< 0.1
17	0.2	< 0.1	< 0.1
18	<0.1	<0.1	<0.1
19	<0.1	<0.1	<0.1
20	<0.1	<0.1	<0.1
21	17.8	267	22.7
22	20.1	140	59.7
23	4.01	9.3	<0.1
24	41.2	9.3	< 0.1
25	82.6	0.1	<0.1
26	64.5	0.2	<0.1
27	83.1	0.8	0.9

28	17.2	1.6	<0.1
29	38.5	6.0	<0.1
30	142	0.7	0.8
31	135	2.2	2.4
32	151	1.7	8.8
33	24.5	<0.1	10.4
34	19.1	0.92	0.6
35	7.5	<0.1	1.3
36	37.4	0.39	0.2
37	236	6.21	2.2
38	2.3	-	-
39	13.9	0.53	<0.1
40	75.2	<0.1	<0.1
41	34.3	<0.1	<0.1
42	33.9	205.8	7.8
43	12.6	88.4	3.70
44	1.3	<0.1	<0.1
45	6.6	< 0.1	< 0.1
46	1.4	< 0.1	< 0.1
47	2.4	< 0.1	< 0.1
48	1.5	< 0.1	< 0.1
49	29.8	<0.1	3.3
50	67.4	50.5	2.7
51	14.4	2.0	0.1
52	44.1	7.5	0.3
53	161	8.4	1.3
54	30.6	1.4	0.1
55	27.1	0.7	2.4
56	57.9	4.9	0.8
57	11.7	<0.1	0.3
58	39.1	2.6	0.2

59	40.3	<0.1	4.0
60	106.2	<0.1	8.2
61	59.8	<0.1	2.8
62	5.2	<0.1	<0.1
63	15.3	<0.1	<0.1
64	64.6	60.1	92.9
65	95.4	25.2	11.6
66	15.8	172	17.2
67	28.5	46.2	39.8
68	27.9	8.8	107
69	24.3	9.6	62.8
70	15.1	71.3	64.4
71	90.1	12.7	94.7
72	11.5	1.0	1.6
73	22.6	5.4	3.0
74	12.9	0.9	1.0
75	35.1	8.5	18.0
76	10.3	47.6	11.7
77	38.7	12.2	35.5
78	51.0	14.0	0.12
79	41.5	4.9	1.4
80	8.1	0.0	0.1
81	7.8	0.3	<0.1
82	9.5	1.1	<0.1
83	47.3	1.3	0.4
84	4.2	<0.1	<0.1
85	4.3	<0.1	0.3
86	28.4	0.4	0.2
87	0.9	<0.1	<0.1
88	9.6	0.3	<0.1
89	7.1	0.7	<0.1

90	7.4	<0.1	<0.1
91	31.9	16.8	0.3
92	0.8	<0.1	0.4
93	5.7	0.3	0.7
94	0.5	<0.1	<0.1
95	2.1	0.4	<0.1
96	34.4	194.8	5.2
97	10.5	62.8	2.6
98	28.1	8.2	47.1
99	20.9	14.9	57.7
100	42.2	12.7	118.5
101	23.2	13.9	40.1
102	23.3	29.5	58.0

[372] [표3]

삼중활성체 지속형 결합체의 상대적 역가 비율

지속형 결합체	친연형 펩타이드 대비 <i>in vitro</i> 활성 (%)		
	vs GLP-1	vs Glucagon	vs GIP
서열번호: 21 지속형 결합체	0.1	1.6	0.2
서열번호: 22 지속형 결합체	0.1	0.9	0.5
서열번호: 42 지속형 결합체	3.1	23.1	1.2
서열번호: 43 지속형 결합체	2.1	13.5	0.6
서열번호: 50 지속형 결합체	15.4	6.9	0.7
서열번호: 77 지속형 결합체	6.7	1.7	6.6
서열번호: 96 지속형 결합체	0.3	4.0	0.3

[373] 상기에서 제조한 삼중활성체 지속형 결합체는 GLP-1 수용체, GIP 수용체 및

글루카곤 수용체를 모두 활성화시킬 수 있는 삼중 활성화체로 기능을 가지는 바, 목적하는 질환의 치료적 물질로 이용될 수 있다.

[374]

[375] 실험예 2: 삼중활성체의 지속형 결합체의 투여에 따른 골다공증 모델 랫트에서의 혈중 오스테오칼신 수치 및 혈중 PINP 수치 변화 확인

[376] 실험적으로 유도된 골 질환의 대표적 모델인 골다공증 동물모델에서의 본 발명의 삼중 활성화체의 치료 효과를 확인하고자 하였다. 삼중 활성화체의 지속형 결합체의 대표예로 서열번호 42의 삼중 활성화체의 지속형 결합체 (서열번호 42의 지속형 결합체)를 선택하여 실험을 수행하였다.

[377]

[378] 구체적으로, 상기 실시예 2에서 제조한 삼중활성체의 지속형 결합체를 포함하는 조성물의 투여에 따른 인 비보 (*in vivo*) 효력을 측정하기 위하여 골다공증 모델인 난소 적출 랫트 (ovariectomized rats, OVX rats, Orient Inc. Korea)를 이용하였다. 난소 적출 랫트는 난소의 제거를 통해 난소 호르몬의 결핍으로 골다공증 증상을 나타내기 때문에 본 실험예에 사용하였다.

[379] 6주령의 암컷 랫트(Sprague dawley rat)의 난소를 제거 한 후 12주간 골다공증을 유발하였으며, 골다공증의 유발 정도는 정상 랫트와 난소 적출 랫트의 혈중 오스테오칼신 수치를 비교하여 판단하였다. 정상 군으로서, 암컷 랫트 5마리를 분리하였고 (G1), 난소 적출을 통해 골다공증이 유도된 군을 각각 군당 7마리씩 G2, G3, G4 및 G5의 4개 군으로 분리하였다.

[380] 상기 군들을 각각 아무것도 투여하지 않은 정상 대조군 (Vehicle), 난소 적출 후 아무것도 투여하지 않은 난소 적출 대조군 (OVX vehicle) 그리고 리라글루타이드 (Liraglutide, 25 nmol/kg/BID), 서열번호: 42의 지속형 결합체 (2.2 nmol/kg/Q3D), 서열번호: 42의 지속형 결합체 (4.4 nmol/kg/Q3D)를 각각 투여한 군으로 나누었다. 상기 시험물질을 4주간 반복 투여 후 상기 각 군에 대하여 혈중 오스테오칼신 수치 및 혈중 프로콜라겐 I 인такт N-말단 프로펩타이드 (procollagen I intact N-terminal propeptide, PINP) 수치를 측정하였다. 혈중 오스테오칼신 수치는 뼈 흡수 표지자로서 혈중에 많이 존재할 경우 뼈의 분해가 많이 일어나고 있음을 의미하며, 혈중 PINP 수치의 경우는 뼈 형성 표지자로서 혈중에 높게 존재할 경우 뼈 형성이 원활하게 일어나고 있음을 의미한다.

[381] 시험 결과 난소 적출 대조군에 비해 삼중활성체의 지속형 결합체 투여군에서 용량의존적으로 혈중 오스테오칼신 수치가 감소되는 것을 확인하였으며 (도 2), 혈중 PINP 수치는 용량의존적으로 증가하는 것을 확인하였다 (도 1). 이는 리라글루타이드 투여군에 비해서도 현저히 개선된 결과였다. 통계 처리는 1원 ANOVA를 사용하여 난소 적출 대조군 및 시험군 사이를 비교하였다.

[382] 이와 같은 결과는 본 발명의 삼중활성체의 지속형 결합체를 투여하면 뼈 분해 감소와 뼈 형성 증가의 기전을 통해 우수한 골다공증을 비롯한 골 대사성 질환의 예방 또는 치료적 효력을 나타낼 수 있음을 시사한다.

[383]

[384] **실험예 3: 지속형 GLP-1/Glucagon/GIP 삼중 결합체의 처리에 의한 MC3T3-E1 조골세포의 분화 증가 및 세포 생존 능력 증가 효과 확인**

[385] 골 질환에서 본 발명의 삼중 활성체의 치료 효과를 확인하고자 하였다. 삼중 활성체의 지속형 결합체의 대표예로서 열번호 42의 삼중 활성체의 지속형 결합체 (서열번호 42의 지속형 결합체)를 선택하여 실험을 수행하였다.

[386]

[387] 구체적으로, 상기 실시예 2에서 제조한 서열번호: 42의 지속형 결합체를 포함하는 조성물의 처리에 따른 조골세포의 분화 증가 및 생존능력 변화에 대한 인 비트로 (*in vitro*) 효력을 측정하기 위하여 MC3T3-E1 조골세포를 이용하였다.

[388]

[389] <지속형 GLP-1/Glucagon/GIP 삼중 결합체의 처리에 의한 MC3T3-E1 조골세포의 분화 증가 효과 확인> 및 <지속형 GLP-1/Glucagon/GIP 삼중 결합체의 처리에 의한 MC3T3-E1 조골세포의 세포 생존 능력 증가 효과 확인>의 시험 방법 및 결과는 아래와 같다.

[390]

[391] **(1) 지속형 GLP-1/Glucagon/GIP 삼중 결합체의 처리에 의한 MC3T3-E1 조골세포의 분화 증가 효과 확인**

[392]

[393] 상기 실시예 2에서 제조한 서열번호: 42의 지속형 결합체 처리에 의한 조골세포 분화 유도 효과를 확인하기 위해 분화에 관여하는 주요 표지자인 RUNX2, OCN, ColA1, ALP의 변화를 mRNA 수준에서 확인하였다.

[394]

MC3T3-E1 조골세포를 12웰 플레이트에 100,000 세포수/웰로 분주하고 10%의 우태아혈청을 포함한 배지를 사용하여 24시간 동안 배양한 후 서열번호: 42의 지속형 결합체가 처리되지 않은 정상 대조군과 서열번호: 42의 지속형 결합체(1 μ M)로 처리한 시험군, 및 서열번호: 42의 지속형 결합체(10 μ M)로 처리한 시험군으로 나누어 추가로 72시간 동안 분화를 유도하였다.

[395]

72시간 후 RNA 추출 키트 (Qiagen)를 사용하여 RNA를 수확한 뒤 cDNA 합성 키트 (Biorad)를 사용하여 cDNA 합성하였으며, 합성된 cDNA를 사용하여 RT-PCR을 수행하였다. RT-PCR은 다음의 특정 프라이머로 수행되었다.

[396]

[397] RUNX2

[398] 정방향 프라이머 : 5'- GCCCTCATCCTTCACTCCAAG-3' (서열번호: 124)

[399] 역방향 프라이머 : 5'- GGTCAGTCAGTGCCTTTCCTC-3' (서열번호: 125)

[400]

[401] OCN

[402] 정방향 프라이머 : 5'- GAGGGCAATAAGGTAGTGAA-3' (서열번호: 126)

[403] 역방향 프라이머 : 5'- CATAGATGCGTTTGTAGGC-3' (서열번호: 127)

[404]

[405] ALP

[406] 정방향 프라이머 : 5'- CCAGCAGGTTTCTCTCTTGG-3' (서열번호: 128)

[407] 역방향 프라이머 : 5'- GGAATGTTCCATGGAGGTTG-3' (서열번호: 129)

[408]

[409] ColA1

[410]

[411] 정방향 프라이머 : 5'- AGAGCATGACCGATGGATTC-3' (서열번호: 130)

[412] 역방향 프라이머 : 5'- CCTTCTTGAGGTTGCCAGTC-3' (서열번호: 131)

[413]

[414] GAPDH

[415] 정방향 프라이머 : 5'- GTCGTGGATCTGACGTGCC-3' (서열번호: 132)

[416] 역방향 프라이머 : 5'- TGCCTGCTTCACCACCTTC-3' (서열번호: 133)

[417]

[418] 시험 결과 (도 3)에 나타난 바와 같이 서열번호: 42의 지속형 결합체 처리가 조골세포 분화 유전자인 RUNX2, OCN, ALP, ColA1의 mRNA 발현량을 용량 의존적으로 증가시킴을 확인 할 수 있었다. 통계 처리는 1원 ANOVA를 사용하여 대조군 및 시험군 사이를 비교하였다.

[419]

[420] 이어, 본 발명자는 서열번호: 42의 지속형 결합체 처리에 의하여 조골세포의 분화에 주요한 표지자인 ColA1의 생성에 미치는 영향을 단백질 수준에서 확인 하였다.

[421] MC3T3-E1 조골세포를 12웰 플레이트에 100,000 세포수/웰로 분주하여 10%의 우태아혈청을 포함한 배지를 사용하여 24시간 동안 배양한 뒤 서열번호: 42의 지속형 결합체가 처리되지 않은 정상 대조군과 지속형 GIP (1 μ M)를 처리한 시험군, 서열번호: 42의 지속형 결합체(1 μ M) 처리한 시험군, 서열번호: 42의 지속형 결합체 (10 μ M) 처리한 시험군 그리고 서열번호: 42의 지속형 결합체 1 μ M 또는 10 μ M와 GIP 억제제 10 μ M, 또는 100 μ M을 함께 처리한 시험군으로 나누어 7일간 추가로 배양하였다. 본 실험예에서 사용한 지속형 GIP는 상기 실시예 2에서 기술한 삼중활성체의 지속형 결합체의 제조방법과 동일한 방법을 사용하여 제조한 것으로, GIP 아날로그에 PEG를 통하여 면역글로불린 Fc를 연결시킨 형태이며, GIP 억제제는 천연형 GIP에서 N-말단 부분이 부재한 형태인 GIP 3-30이다.

[422] 7일 후 배양된 배지를 회수하여 배지 내의 ColA1을 콜라겐 어세이 키트 (Biocolor)를 제조사의 지시대로 사용하여 정량하였다.

[423] 시험 결과 (도 4)에 나타난 바와 같이 지속형 GIP 뿐만 아니라, 서열번호: 42의 지속형 결합체 처리에 의하여 ColA1 단백질의 용량 의존적 증가를 확인하였으며, 서열번호: 42의 지속형 결합체에 의한 ColA1의 단백질의 발현에

대한 영향이 GIP 억제제에 의하여 감소되는 것 또한 확인하였다. 통계 처리는 1원 ANOVA를 사용하여 대조군 및 시험군 사이를 비교하였다.

- [424] 이와 같은 결과는 본 발명의 서열번호: 42의 지속형 결합체가 뼈 형성 촉진 기전을 통해 우수한 골다공증의 예방 효력을 나타낼 수 있음을 의미함과 동시에 서열번호: 42의 지속형 결합체가 가지고 있는 GIP의 활성이 이러한 기전에 중요한 역할을 하고 있음을 시사한다.

[425]

- [426] **(2) 지속형 GLP-1/Glucagon/GIP 삼중 결합체의 처리에 의한 MC3T3-E1 조골세포의 세포 생존 능력 증가 효과 확인**

[427]

- [428] 상기 실시예 2에서 제조한 서열번호: 42의 지속형 결합체를 포함하는 조성물의 처리에 따른 조골세포 생존능력 효력을 측정하기 위하여 CellTiter-Glo (Promega)를 사용하여 생존세포의 ATP수준에 따른 발광 정도를 측정하였다.

- [429] MC3T3-E1 조골세포를 96웰 플레이트에 10,000 세포수/웰로 분주하여 24시간동안 10%의 우태아혈청을 포함한 배지를 사용하여 배양한 후 시험을 진행하였다. 정상 대조군은 10% 우태아혈청 포함 배지로 배지를 교체하였으며, 시험군들은 모두 우태아혈청이 포함되지 않은 배지로 교체하였다. 상기 시험군은 서열번호: 42의 지속형 결합체가 처리되지 않은 시험군, 서열번호: 42의 지속형 결합체 (2 μ M) 처리한 시험군, 서열번호: 42의 지속형 결합체 (2 μ M)와 함께 GIP 억제제를 각각 0.31 μ M, 1.25 μ M, 5 μ M 그리고 20 μ M씩 병용 처리한 시험군으로 나누었다. 정상 대조군 및 시험군의 배지를 교체한 뒤 48시간 추가 배양 후 CellTiter-Glo를 제조사의 지시대로 사용하여 세포 생존 능력을 분석하였다. 상기 GIP 억제제는 천연형 GIP에서 N-말단 부분이 부재한 형태인 GIP 3-30이다.

- [430] 시험 결과 정상 대조군에 비하여 서열번호: 42의 지속형 결합체로 처리하지 않은 시험군은 세포 생존능력이 크게 감소한 것이 확인되었다. 여기에 서열번호: 42의 지속형 결합체로 처리함으로써 우태아혈청 결핍으로 감소된 세포 생존능력이 증가하는 것을 추가 확인하였으며, 서열번호: 42의 지속형 결합체에 의하여 증가된 세포 생존능력이 GIP 억제제에 의하여 용량 의존적으로 감소하는 것 또한 확인되었다 (도 5). 통계 처리는 1원 ANOVA를 사용하여 서열번호: 42의 지속형 결합체가 처리되지 않은 시험군 및 42의 지속형 결합체 (2 μ M)와 함께 GIP 억제제를 각각 0.31 μ M, 1.25 μ M, 5 μ M 그리고 20 μ M씩 병용 처리한 시험군 사이를 비교하였다.

- [431] 이와 같은 결과는 본 발명의 서열번호: 42의 지속형 결합체가 가지고 있는 GIP 활성이 세포 생존능력 증가 기전을 통해 영양소 결핍에 의한 골다공증의 예방 효력을 나타낼 수 있음을 시사한다.

[432]

- [433] 상기와 같은 결과들은 본 발명의 삼중활성체 및/또는 이의 결합체가 골 형성에

효과가 있어, 골 감소와 관련된 다양한 골 질환을 예방 또는 치료할 수 있음을 시사하는 것으로, 새로운 골 질환 치료제로 제공될 수 있음을 뒷받침한다.

[434]

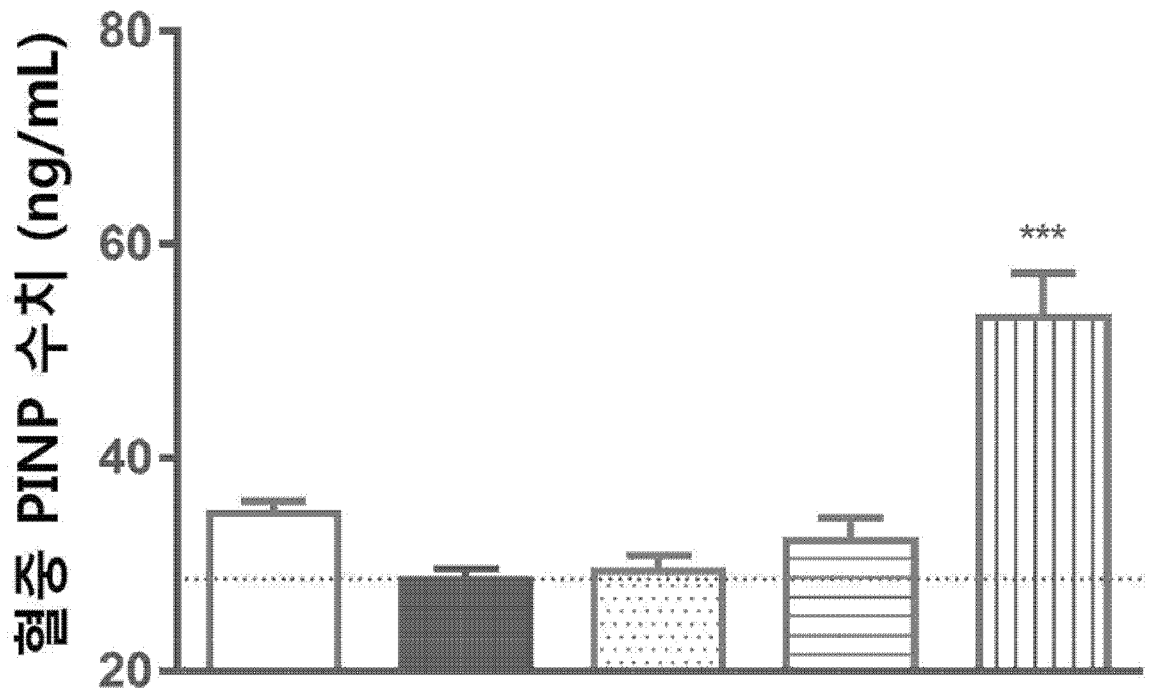
[435] 이상의 설명으로부터, 본 발명이 속하는 기술분야의 당업자는 본 발명이 그 기술적 사상이나 필수적 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 실시될 수 있다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 이와 관련하여, 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적인 것이 아닌 것으로서 이해해야만 한다. 본 발명의 범위는 상기 상세한 설명보다는 후술하는 특허 청구범위의 의미 및 범위 그리고 그 등가 개념으로부터 도출되는 모든 변경 또는 변형된 형태가 본 발명의 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.

청구범위

- [청구항 1] 골 질환의 예방 또는 치료를 위한 약학적 조성물로서,
약학적으로 허용되는 부형제와
서열번호 1 내지 102 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하는
펩타이드를 약학적 유효량으로 포함하는 약학적 조성물.
- [청구항 2] 제1항에 있어서, 상기 펩타이드는 지속형 결합체의 형태이고, 상기
지속형 결합체는 하기 화학식 1로 표시되는 약학적 조성물:
[화학식 1]
X - L - F
단 이 때 X는 서열번호 1 내지 102 중 어느 하나의 아미노산 서열의
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 펩타이드는 그 C-말단이 아미드화된
약학적 조성물.
- [청구항 4] 제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 펩타이드는 서열번호 21, 22, 42, 43, 50,
64, 66, 67, 70, 71, 76, 77, 96, 97과 100으로 이루어진 군으로부터 선택하는
아미노산 서열을 포함하는 약학적 조성물.
- [청구항 5] 제4항에 있어서, 상기 펩타이드는 서열번호 21, 22, 42, 43, 50, 66, 67, 77,
96, 97과 100으로 이루어진 군으로부터 선택하는 아미노산 서열을
포함하는 약학적 조성물.
- [청구항 6] 제5항에 있어서, 상기 펩타이드는 서열번호 21, 22, 42, 43, 50, 77과 96으로
이루어진 군으로부터 선택하는 아미노산 서열을 포함하는 약학적
조성물.
- [청구항 7] 제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 펩타이드 서열은 N-말단으로부터 16번
아미노산과 20번 아미노산은 서로 고리를 형성하는, 약학적 조성물.
- [청구항 8] 제2항에 있어서, 상기 L은 폴리에틸렌 글리콜인, 약학적 조성물.
- [청구항 9] 제2항에 있어서, 상기 L 내의 에틸렌글리콜 반복 단위 부분의 화학식량은
1 내지 100 kDa 범위에 있는 약학적 조성물.
- [청구항 10] 제2항에 있어서, 상기 면역글로불린 Fc 영역은 비당쇄화된 것인, 약학적
조성물.
- [청구항 11] 제2항에 있어서, 상기 F는 IgG Fc 영역인, 약학적 조성물.
- [청구항 12] 제2항에 있어서, 상기 면역글로불린 Fc 영역은 두 개의 폴리펩타이드
사슬로 이루어진 이량체며, L의 한 말단이 상기 두 폴리펩타이드 사슬 중
하나의 폴리펩타이드 사슬에만 연결되어 있는, 약학적 조성물.
- [청구항 13] 제2항에 있어서, 상기 결합체는 L의 한쪽 말단이 F의 아민기 또는

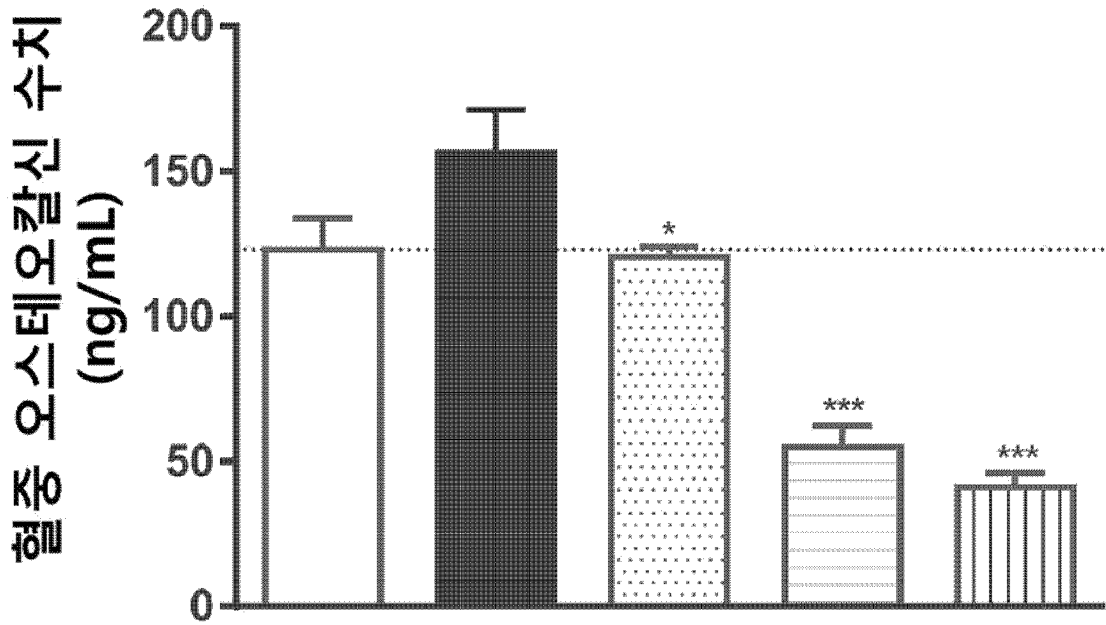
- 티올기와, L의 다른 말단이 X의 아민기 또는 티올기에 각각 반응하여 형성된 공유결합으로 F 및 X에 각각 연결되어 있는 것인, 약학적 조성물.
- [청구항 14] 제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 골 질환은 골다공증, 골절, 골경화증, 골화석증, 관절염, 파제트병(Paget's disease), 치주질환, 골 형성 부전증, 또는 골감소증(osteopenia)인, 약학적 조성물.
- [청구항 15] 제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 약학적 조성물은 투여 시 하기 특성 중 하나 이상을 갖는 것인, 약학적 조성물:
- (i) 혈중 오스테오칼신 수치 감소; 또는
 - (ii) 혈중 PINP (procollagen I intact N-terminal propeptide) 수치 증가.
- [청구항 16] 제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 약학적 조성물은 하기 특성 중 하나 이상을 갖는 것인, 약학적 조성물:
- (i) 조골세포의 분화 증가; 또는
 - (ii) 조골세포의 생존 능력 증가.

[도1]



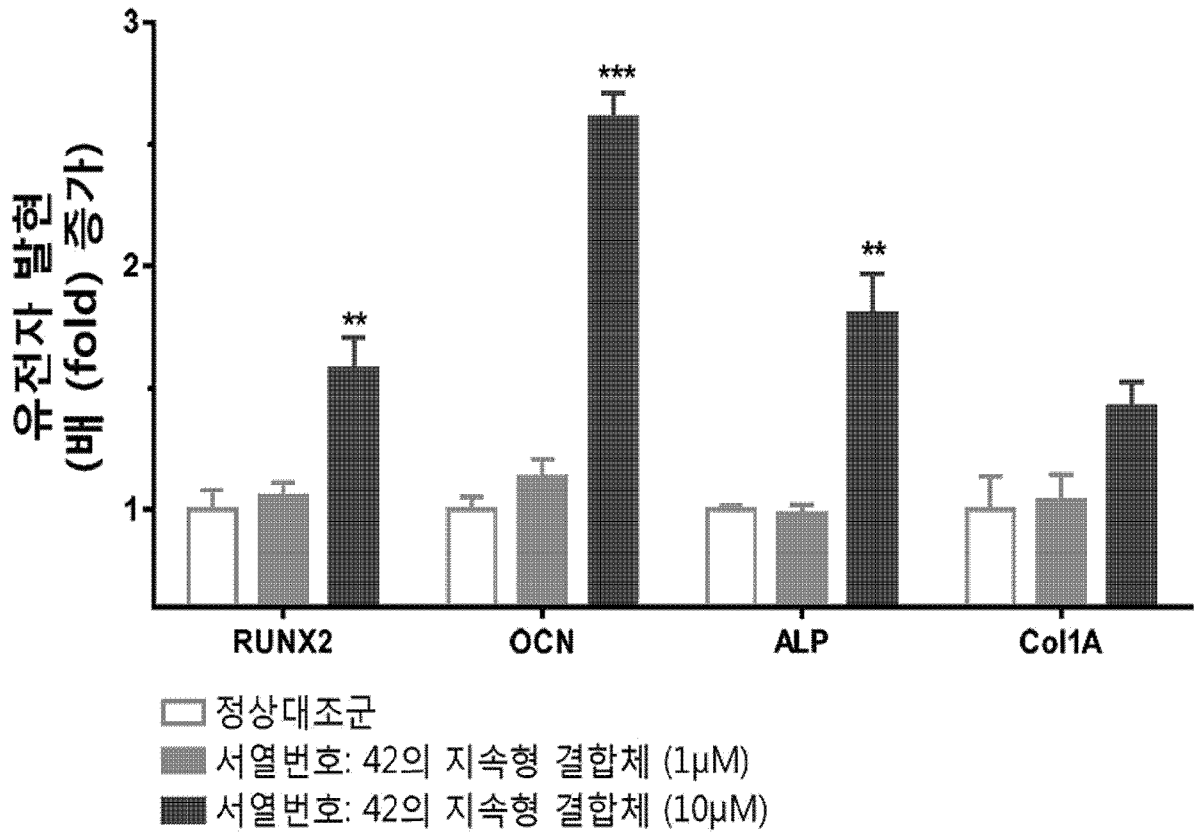
- 정상 대조군
- 나소 절제 대조군
- ▤ 리라글루타이드 (25 nmol/kg/BID)
- ▨ 서열번호: 42의 지속형 결합체 (2.2 nmol/kg/Q3D)
- ▩ 서열번호: 42의 지속형 결합체 (4.4 nmol/kg/Q3D)

[도2]

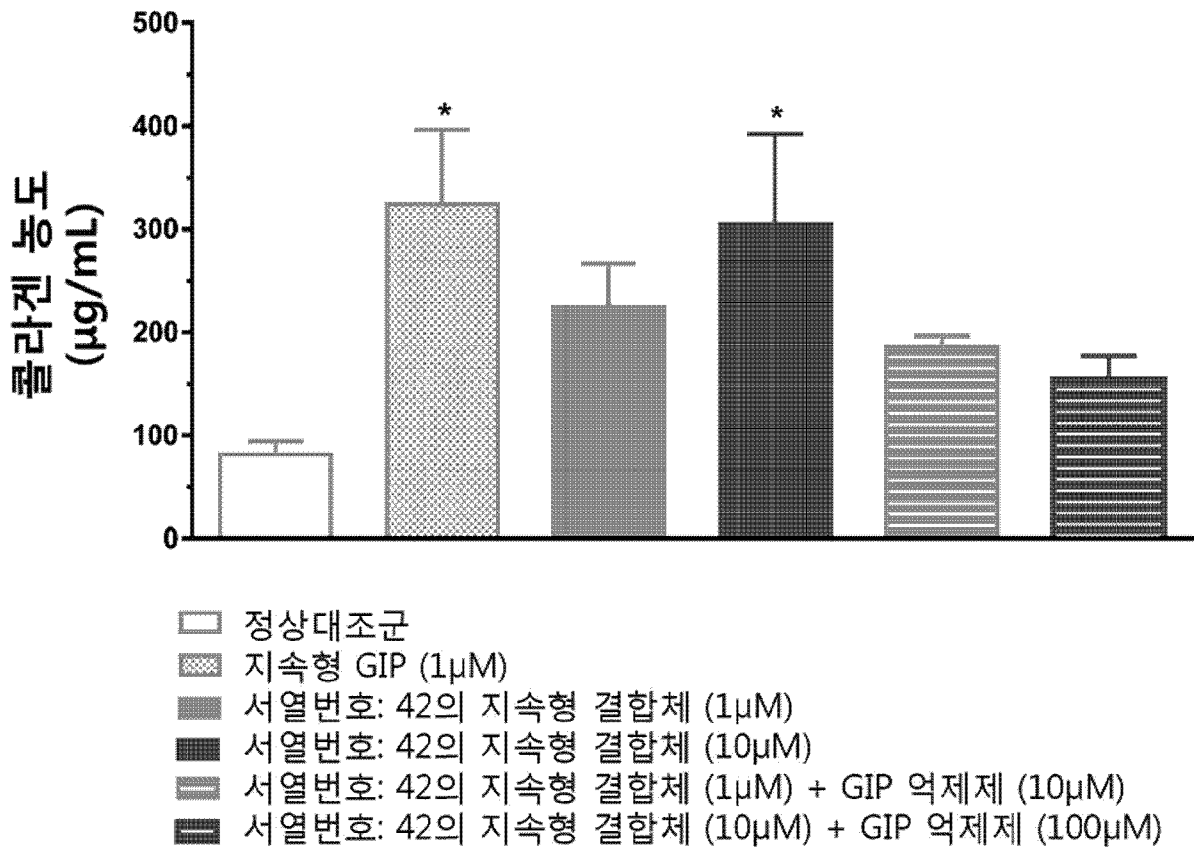


- 정상 대조군
- 난소 절제 대조군
- ▨ 리라글루타이드 (25 nmol/kg/BID)
- ▧ 서열번호: 42의 지속형 결합체 (2.2 nmol/kg/Q3D)
- ▩ 서열번호: 42의 지속형 결합체 (4.4 nmol/kg/Q3D)

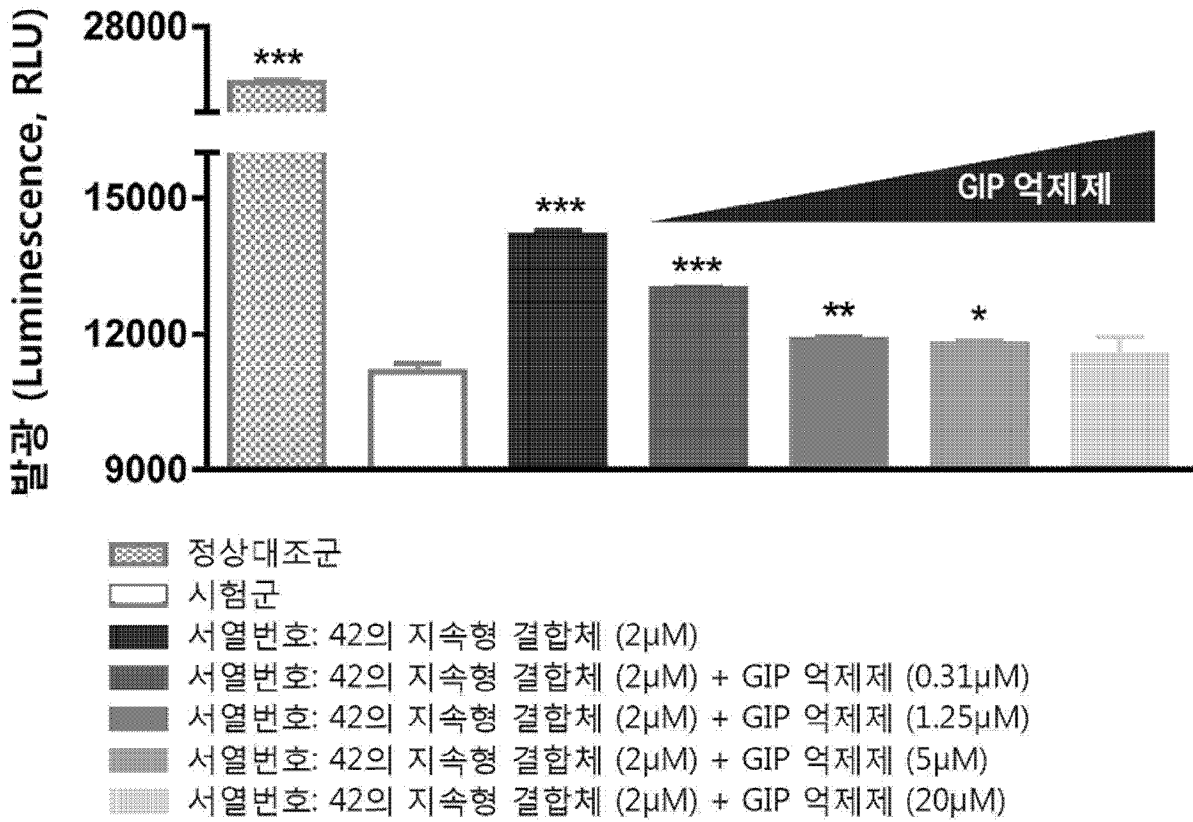
[도3]



[도4]



[도5]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2021/013007

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
A61K 38/16(2006.01)i; A61K 47/68(2017.01)i; A61K 38/17(2006.01)i; A61K 38/26(2006.01)i; A61P 19/00(2006.01)i		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) A61K 38/16(2006.01); A61K 38/00(2006.01); A61K 38/26(2006.01); C07K 14/46(2006.01); C07K 14/605(2006.01)		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Korean utility models and applications for utility models: IPC as above Japanese utility models and applications for utility models: IPC as above		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) eKOMPASS (KIPO internal) & keywords: 3중 활성체(triple agonist), 글루카곤 수용체(glucagon receptor), GIP 수용체(GIP receptor), GLP-1 수용체(GLP-1 receptor), 골 질환(bone disorder)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	LEE, Sangdon et al. Bone protective effect of a novel long-acting GLP-1/GIP/Glucagon triple agonist (HM 15211) in an animal model. Diabetes. 2018, vol. 67, Supplement 1. https://doi.org/10.2337/db18-1105-P . See abstract.	1-16
Y	KR 10-2017-0080522 A (HANMI PHARM. CO., LTD.) 10 July 2017 (2017-07-10) See paragraphs [0286], [0504], [0520], [0527] and [0555]; examples 1-2; claims 1, 14-15, 18-19 and 22-24; and table 1.	1-16
Y	US 2016-0257729 A1 (ZEALAND PHARMA A/S) 08 September 2016 (2016-09-08) See paragraph [0131]; and claims 1 and 30-31.	1-16
A	JP 2017-512800 A (SANOFI) 25 May 2017 (2017-05-25) See entire document.	1-16
A	WO 02-24214 A2 (OSTEOMETER BIOTECH A/S et al.) 28 March 2002 (2002-03-28) See entire document.	1-16
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "D" document cited by the applicant in the international application "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 10 January 2022		Date of mailing of the international search report 10 January 2022
Name and mailing address of the ISA/KR Korean Intellectual Property Office Government Complex-Daejeon Building 4, 189 Cheongsaro, Seo-gu, Daejeon 35208 Facsimile No. +82-42-481-8578		Authorized officer Telephone No.

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
 - a. forming part of the international application as filed:
 - in the form of an Annex C/ST.25 text file.
 - on paper or in the form of an image file.
 - b. furnished together with the international application under PCT Rule 13ter.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.
 - c. furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:
 - in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13ter.1(a)).
 - on paper or in the form of an image file (Rule 13ter.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).
2. In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2021/013007

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
KR	10-2017-0080522	A	10 July 2017	CN	108699125	A	23 October 2018
				CN	109071624	A	21 December 2018
				EP	3398961	A1	07 November 2018
				EP	3398962	A1	07 November 2018
				JP	2019-504055	A	14 February 2019
				JP	2019-504057	A	14 February 2019
				JP	6712322	B2	17 June 2020
				KR	10-2017-0080521	A	10 July 2017
				KR	10-2019-0060749	A	03 June 2019
				KR	10-2019-0062344	A	05 June 2019
				KR	10-2019-0104958	A	11 September 2019
				KR	10-2019-0105542	A	17 September 2019
				KR	10-2179391	B1	16 November 2020
				KR	10-2179392	B1	16 November 2020
				KR	10-2285377	B1	04 August 2021
				US	10370426	B2	06 August 2019
				US	10400020	B2	03 September 2019
				US	10981967	B2	20 April 2021
				US	2018-0311315	A1	01 November 2018
				US	2019-0002520	A1	03 January 2019
				US	2019-0218269	A1	18 July 2019
US	2021-0188937	A1	24 June 2021				
WO	2017-116204	A1	06 July 2017				
WO	2017-116205	A1	06 July 2017				
US	2016-0257729	A1	08 September 2016	CN	105829339	A	03 August 2016
				EP	3066117	A1	14 September 2016
				EP	3066117	B1	02 January 2019
				JP	2017-503474	A	02 February 2017
				JP	2020-045362	A	26 March 2020
				KR	10-2016-0074008	A	27 June 2016
				KR	10-2310392	B1	13 October 2021
				US	10131702	B2	20 November 2018
				US	11111285	B2	07 September 2021
				US	2019-0270789	A1	05 September 2019
				WO	2015-067716	A1	14 May 2015
JP	2017-512800	A	25 May 2017	CN	106414488	A	15 February 2017
				EP	3129397	A1	15 February 2017
				EP	3129397	B1	09 January 2019
				JP	6612251	B2	27 November 2019
				KR	10-2016-0143727	A	14 December 2016
				US	2015-0322129	A1	12 November 2015
				US	9771406	B2	26 September 2017
				WO	2015-155141	A1	15 October 2015
WO	02-24214	A2	28 March 2002	EP	1326630	A2	16 July 2003
				EP	1326630	B1	28 May 2008
				JP	2004-508410	A	18 March 2004
				JP	2004-524268	A	12 August 2004
				JP	5161412	B2	13 March 2013
				JP	5189723	B2	24 April 2013
				US	2002-0037836	A1	28 March 2002

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2021/013007

Patent document cited in search report	Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
		US 2004-0052862 A1	18 March 2004
		US 2004-0082507 A1	29 April 2004
		US 2005-0282749 A1	22 December 2005
		US 6770620 B2	03 August 2004
		US 7186683 B2	06 March 2007
		US 7371721 B2	13 May 2008
<hr/>			

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC)) A61K 38/16(2006.01)i; A61K 47/68(2017.01)i; A61K 38/17(2006.01)i; A61K 38/26(2006.01)i; A61P 19/00(2006.01)i		
B. 조사된 분야 조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재) A61K 38/16(2006.01); A61K 38/00(2006.01); A61K 38/26(2006.01); C07K 14/46(2006.01); C07K 14/605(2006.01)		
조사된 기술분야에 속하는 최소문헌 이외의 문헌 한국등록실용신안공보 및 한국공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC 일본등록실용신안공보 및 일본공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC		
국제조사에 이용된 전산 데이터베이스(데이터베이스의 명칭 및 검색어(해당하는 경우)) eKOMPASS(특허청 내부 검색시스템) & 키워드: 3중 활성체(triple agonist), 글루카곤 수용체(glucagon receptor), GIP 수용체(GIP receptor), GLP-1 수용체(GLP-1 receptor), 골 질환(bone disorder)		
C. 관련 문헌		
카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
Y	LEE, SANGDON 등, 'Bone protective effect of a novel long-acting GLP-1/GIP/Glucagon triple agonist (HM15211) in an animal model', Diabetes, 2018, 67권, Supplement 1, https://doi.org/10.2337/db18-1105-P 요약 참조.	1-16
Y	KR 10-2017-0080522 A (한미약품 주식회사) 2017.07.10 단락 [0286], [0504], [0520], [0527], [0555]; 실시예 1-2; 청구항 1, 14-15, 18-19, 22-24; 표 1 참조.	1-16
Y	US 2016-0257729 A1 (ZEALAND PHARMA A/S) 2016.09.08 단락 [0131]; 청구항 1, 30-31 참조.	1-16
A	JP 2017-512800 A (SANOFI) 2017.05.25 전체 문헌 참조.	1-16
A	WO 02-24214 A2 (OSTEOMETER BIOTECH A/S 등) 2002.03.28 전체 문헌 참조.	1-16
<input type="checkbox"/> 추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다. <input checked="" type="checkbox"/> 대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.		
* 인용된 문헌의 특별 카테고리: "A" 특별히 관련이 없는 것으로 보이는 일반적인 기술수준을 정의한 문헌 "D" 본 국제출원에서 출원인이 인용한 문헌 "E" 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허 문헌 "L" 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌 "O" 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌 "P" 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌		
국제조사의 실제 완료일 2022년01월10일(10.01.2022)		국제조사보고서 발송일 2022년01월10일(10.01.2022)
ISA/KR의 명칭 및 우편주소 대한민국 특허청 (35208) 대전광역시 서구 청사로 189, 4동 (둔산동, 정부대 전청사) 팩스 번호 +82-42-481-8578		심사관 허주형 전화번호 +82-42-481-5373

제1기재란 핵산염기 및/또는 아미노산 서열(첫 번째 용지의 1.c의 계속)

1. 국제출원에 개시된 핵산염기 및/또는 아미노산 서열과 관련하여, 국제조사는 다음에 기초하여 수행되었습니다.
 - a. 아래의 형태로 출원시 국제출원의 일부를 구성하는 서열목록
 - 부록 C/ST.25 텍스트 파일
 - 서면 혹은 이미지 파일
 - b. PCT 규칙 13의3.1(a)에 따라 국제출원과 함께 국제조사만을 목적으로 부록 C/ST.25 텍스트 파일의 형태로 제출된 서열목록
 - c. 국제조사만을 목적으로 국제출원일 이후에 아래 형태로 제출된 서열목록
 - 부록 C/ST.25 텍스트 파일 (규칙 13의3.1(a))
 - 서면 혹은 이미지 파일 (규칙 제13의3.1(b) 및 시행세칙 713).

2. 추가로 서열목록에 대하여 하나 이상의 버전이나 사본이 제출된 경우, 후속 버전 또는 추가된 사본에 기재되어 있는 정보가 출원시 출원의 일부를 구성하는 정보와 동일하거나 또는 출원시의 개시범위를 벗어나지 않는다는 진술서가 제출되었습니다.

3. 추가 의견:

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
KR 10-2017-0080522 A	2017/07/10	CN 108699125 A	2018/10/23
		CN 109071624 A	2018/12/21
		EP 3398961 A1	2018/11/07
		EP 3398962 A1	2018/11/07
		JP 2019-504055 A	2019/02/14
		JP 2019-504057 A	2019/02/14
		JP 6712322 B2	2020/06/17
		KR 10-2017-0080521 A	2017/07/10
		KR 10-2019-0060749 A	2019/06/03
		KR 10-2019-0062344 A	2019/06/05
		KR 10-2019-0104958 A	2019/09/11
		KR 10-2019-0105542 A	2019/09/17
		KR 10-2179391 B1	2020/11/16
		KR 10-2179392 B1	2020/11/16
		KR 10-2285377 B1	2021/08/04
		US 10370426 B2	2019/08/06
		US 10400020 B2	2019/09/03
		US 10981967 B2	2021/04/20
		US 2018-0311315 A1	2018/11/01
		US 2019-0002520 A1	2019/01/03
US 2019-0218269 A1	2019/07/18		
US 2021-0188937 A1	2021/06/24		
WO 2017-116204 A1	2017/07/06		
WO 2017-116205 A1	2017/07/06		
US 2016-0257729 A1	2016/09/08	CN 105829339 A	2016/08/03
		EP 3066117 A1	2016/09/14
		EP 3066117 B1	2019/01/02
		JP 2017-503474 A	2017/02/02
		JP 2020-045362 A	2020/03/26
		KR 10-2016-0074008 A	2016/06/27
		KR 10-2310392 B1	2021/10/13
		US 10131702 B2	2018/11/20
		US 11111285 B2	2021/09/07
		US 2019-0270789 A1	2019/09/05
WO 2015-067716 A1	2015/05/14		
JP 2017-512800 A	2017/05/25	CN 106414488 A	2017/02/15
		EP 3129397 A1	2017/02/15
		EP 3129397 B1	2019/01/09
		JP 6612251 B2	2019/11/27
		KR 10-2016-0143727 A	2016/12/14
		US 2015-0322129 A1	2015/11/12
		US 9771406 B2	2017/09/26
		WO 2015-155141 A1	2015/10/15
WO 02-24214 A2	2002/03/28	EP 1326630 A2	2003/07/16
		EP 1326630 B1	2008/05/28
		JP 2004-508410 A	2004/03/18
		JP 2004-524268 A	2004/08/12
		JP 5161412 B2	2013/03/13
		JP 5189723 B2	2013/04/24
		US 2002-0037836 A1	2002/03/28

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
		US 2004-0052862 A1	2004/03/18
		US 2004-0082507 A1	2004/04/29
		US 2005-0282749 A1	2005/12/22
		US 6770620 B2	2004/08/03
		US 7186683 B2	2007/03/06
		US 7371721 B2	2008/05/13