



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2023-0095666
(43) 공개일자 2023년06월29일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 38/16 (2006.01) A61K 47/60 (2017.01)
A61K 47/68 (2017.01) A61P 1/16 (2006.01)
A61P 3/10 (2006.01)

(52) CPC특허분류
A61K 38/16 (2013.01)
A61K 47/60 (2017.08)

(21) 출원번호 10-2021-0185351
(22) 출원일자 2021년12월22일
심사청구일자 2022년12월23일

(71) 출원인
한미약품 주식회사
경기도 화성시 팔탄면 무하로 214

(72) 발명자
김정국
경기도 화성시 동탄기흥로 550
이중석
경기도 화성시 동탄기흥로 550
(뒷면에 계속)

(74) 대리인
특허법인한일

전체 청구항 수 : 총 23 항

(54) 발명의 명칭 **간 표적 물질 및 이의 용도**

(57) 요약

본 발명은 간 표적 약물 및 이의 간에서의 약물 작용이 필요한 질환에 대한 치료적 용도에 관한 것이다. 또한, 본 발명은 글루카곤에 대해 활성을 갖는 물질을 이용하여 간 조직으로의 표적화 또는 체내 투여 후 간 조직에서의 분포 증대를 유도하는 방법에 관한 것이다.

(52) CPC특허분류

A61K 47/6811 (2017.08)

A61P 1/16 (2018.01)

A61P 3/10 (2018.01)

(72) 발명자

최재혁

경기도 화성시 동탄기흥로 550

이종민

경기도 화성시 동탄기흥로 550

김상윤

경기도 화성시 동탄기흥로 550

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 9991007811

과제번호 HN21C0601

부처명 과학기술정보통신부, 보건복지부, 산업통상자원부

과제관리(전문)기관명 국가신약개발재단

연구사업명 국가신약개발사업

연구과제명 차세대 지속형 글루카곤 HM15136 선천성 고인슐린증 치료제 개발 위한 글로벌 임상

및 제품화 연구

기여율 1/1

과제수행기관명 한미약품(주)

연구기간 2021.09.01 ~ 2023.12.31

명세서

청구범위

청구항 1

간 표적 약물을 포함하는, 투여된 개체의 체내 장기 중 상기 약물의 간에서의 분포도가 높은, 약학적 조성물로써,

상기 간표적 약물은 하기 일반식 2의 아미노산 서열을 포함하는 펩타이드인, 약학적 조성물:

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

상기 일반식 2에서

X7은 트레오닌(T), 발린(V) 또는 시스테인(C)이고;

X10은 티로신(Y) 또는 시스테인(C)이고;

X12는 리신(K) 또는 시스테인(C)이고;

X15는 아스파르트산(D), 또는 시스테인(C)이고;

X16은 글루탐산(E) 또는 세린(S)이며;

X17은 리신(K) 또는 아르기닌(R)이고;

X20은 글루타민(Q) 또는 리신(K)이며;

X21은 아스파르트산(D), 또는 글루탐산(E)이고;

X24는 발린(V) 또는 글루타민(Q)이고;

X30은 시스테인(C)이거나, 부존재함

(단, 상기 일반식 2의 아미노산 서열이 서열번호 12와 동일한 경우는 제외함).

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 펩타이드는 지속형 결합체의 형태이고, 상기 지속형 결합체는 하기 화학식 1로 표시되는, 약학적 조성물:

[화학식 1]

X - L - F

여기서,

X는, 상기 일반식 2의 아미노산 서열을 포함하는 펩타이드이고;

L은 에틸렌글리콜 반복 단위를 함유하는 링커이며;

F는 면역글로불린 Fc 영역이고,

-는 X와 L 사이, L과 F 사이의 공유결합 연결을 나타낸다.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 체내 장기는 간, 심장, 폐, 대장, 비장, 췌장, 지방조직, 소장, 위, 근육, 신장 및 뇌로서, 상기 각 장기 중에서 간에서의 분포도가 가장 높은 것인, 약학적 조성물.

청구항 4

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 약학적 조성물은 간에서의 약물 작용이 필요한 질환의 예방 또는 치료에 사용하기 위한, 약학적 조성물.

청구항 5

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 간 표적 약물은 투여 후 간에서의 T/S 비율 (tissue-to-serum ratio)이 하기에서 선택된 하나 이상인 것인, 약학적 조성물:

- (a) 투여 후 40 시간 내지 50 시간에서 T/S 비율이 20% 내지 40%; 및
- (b) 투여 후 160 시간 내지 180 시간에서 T/S 비율이 25% 내지 40%.

청구항 6

제5항에 있어서, 상기 간 표적 약물은 투여 후 간에서의 T/S 비율이 하기에서 선택된 하나 이상인 것인, 약학적 조성물:

- (a) 투여 후 2일에서 T/S 비율이 25% 내지 35%; 및
- (b) 투여 후 7일에서 T/S 비율이 27% 내지 37%.

청구항 7

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 간 표적 약물은 투여 후 폐 조직 대비 간에서의 분포비가 1: 2 내지 4인 것인, 약학적 조성물.

청구항 8

제7항에 있어서, 상기 간 표적 약물은 투여 후 폐 조직 대비 간에서의 분포비가 1: 2.2 내지 3.2인 것인, 약학적 조성물.

청구항 9

제7항에 있어서, 상기 분포비는 투여 후 40시간 내지 180시간에서의 분포비인 것인, 약학적 조성물.

청구항 10

제8항에 있어서, 상기 분포비는 투여 후 2일 내지 7일에서의 분포비인 것인, 약학적 조성물.

청구항 11

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 간 표적 약물은

- (a) 투여 후 40 시간 내지 50 시간에서 심장 대비 간에서의 분포비가 1: 1.6 내지 3.0이고; 및
- (b) 투여 후 160 시간 내지 180 시간에서 심장 대비 간에서의 분포비가 1: 2.8 내지 7.0인, 약학적 조성물.

청구항 12

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 간 표적 약물은 간 질환, 저혈당 또는 선천성 고인슐린증에 치료적 활성을 가지는, 약학적 조성물.

청구항 13

제4항에 있어서, 상기 간에서의 약물 작용이 필요한 질환은 간 질환, 저혈당 또는 선천성 고인슐린증인, 약학적 조성물.

청구항 14

제13항에 있어서, 상기 저혈당은 급성 저혈당 또는 만성 저혈당인, 약학적 조성물.

청구항 15

제1항 또는 제2항에 있어서, 일반식 2의 X16과 X20의 아미노산 간에 고리를 형성하는, 약학적 조성물.

청구항 16

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 펩타이드는 서열번호 13, 15, 19, 33, 및 36 내지 45로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하는, 약학적 조성물.

청구항 17

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 펩타이드는 서열번호 33, 및 36 내지 44로 이루어진 군에서 선택되는 아미노산 서열을 포함하는, 약학적 조성물.

청구항 18

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 펩타이드는 이의 C-말단이 아미드화되거나 또는 자유 카르복실기 (-COOH)를 갖는, 약학적 조성물.

청구항 19

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 펩타이드는 이의 C-말단이 아미드화된, 약학적 조성물.

청구항 20

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 펩타이드의 C-말단은 변형되지 않은, 약학적 조성물.

청구항 21

제2항에 있어서, 상기 L은 폴리에틸렌 글리콜인, 약학적 조성물.

청구항 22

제2항에 있어서, 상기 L 내의 에틸렌글리콜 반복 단위 부분의 화학식량은 1 내지 100 kDa 범위에 있는 약학적 조성물.

청구항 23

제2항에 있어서, 상기 F는 IgG Fc 영역인, 약학적 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 간 표적 약물 및 이의 간에서의 약물 작용이 필요한 질환에 대한 치료적 용도에 관한 것이다. 또한, 본 발명은 간표적 약물을 이용하여 간 조직으로의 표적화 또는 체내 투여 후 간 조직에서의 분포 증대를 유도하는 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 간은 우리 몸에서 가장 큰 장기의 하나이며 다양하고 총괄적인 대사 과정에서 중요한 역할을 담당한다. 우리가 섭취하는 많은 식물성 혹은 동물성 물질, 그리고 생체 기능 수행에 따른 대사산물 가운데에는 몸에 이로운 것들도 있지만 해로운 물질들도 많다. 간은 이러한 물질들 중 이로운 것들에 대해서는 올바른 생체 이용을 돕는 화학적 과정을 수행하고 해로운 물질들에 대해서는 화학적 대사 과정을 통해서 소변이나 대변을 통해 안전하게 체외로 배출될 수 있도록 돕는다. 간은 우리 몸에 필요한 여러 종류의 단백질, 지방, 탄수화물을 합성하여 분비시킴으로써 생체 기능에 필수적인 역할을 한다. 따라서 간기능이 나빠지면 여러 기능 이상이 나타날 수 있다. 혈액의 응고에 관여하는 응고 인자의 생성이 부족하면 출혈이 잘 생겨 약한 잇몸 등에서 잦은 출혈이 나타나고 간경변증 환자의 경우 인슐린 분해가 잘 되지 않고 간의 글리코겐 저장량도 부족해 공복으로 인한 저혈당이 초래되기도 한다. 또한 간은 세균 침입에 대한 방어작용에 중추적인 역할도 한다. 특히, 간내의 세포 중에서 쿠퍼(Kupffer) 세포가 주로 이물질 혹은 박테리아를 잡아먹는 대식 작용을 하고, 체내에 들어온 바이러스를 면역체계에 노출시켜 체내의 자연스러운 면역 작용을 유도하는 역할도 한다. 또한 간세포에서 합성하여 분비하는 주요 물질인 담즙은 하루 약 800-1000cc 정도 형성되는데 주성분은 물, 전해질, 담즙산, 콜레스테롤, 인지질, 빌리루빈으로 구성되어 있다. 담즙의 주요 기능을 살펴보면, 담즙 내의 담즙산은 소장에서 지방과 지용성 비타민을 소화하고 흡수하는 데 중요한 역할을 하고, 담즙 자체가 체내에서 생산되는 많은 노폐물들을 대변으로 배설하는 역할을 한다. 다양한 원인으로 인해 야기되며, 간에서의 약물 작용이 필요한 질환으로 간질환, 저혈당 또는 선천성 고인슐린증 등 다양한 질환이 존재한다.

[0005] 한편, 상술한 간질환들을 치료하기 위해 약물을 높은 농도로 간에 도달하여 분포시키도록 하는 것은 중요한 기술적 과제 중의 하나이다 (한국 특허 공개 번호 KR10-2013-0131227).

[0007] 간 표적 약물은 기존 의약품의 부작용을 최소화하고 효능 및 효과를 극대화시켜 필요한 양의 약물을 효율적으로 전달할 수 있도록 하여 약물치료를 최적화 할 수 있다. 이는 목적 부위에 도달하는 약물의 양을 높여 생체이용률을 높이며, 보다 효과적인 치료가 가능하도록 하며, 목적부위 이외의 곳에 전달되지 않도록 해 부작용을 줄일 수 있으며 환자의 약물에 대한 반응을 좋게 하여 환자의 순응도 증진에 큰 역할을 한다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0009] 본 발명의 하나의 목적은 간 표적 약물을 포함하는 약학적 조성물, 구체적으로 간 표적 약물을 포함하는 투여된

개체의 체내 장기 중 상기 약물의 간에서의 분포도가 높은 약학적 조성물을 제공하는 것이다.

- [0010] 본 발명의 또 하나의 목적은, 간 표적 약물을 포함하는 약학적 조성물, 구체적으로 간 표적 약물을 포함하는 간에서의 약물 작용이 필요한 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공하는 것이다.
- [0011] 본 발명의 다른 목적은 상기 약학적 조성물 또는 간 조직으로 표적화된 생리활성 물질을 이를 필요로 하는 개체에 투여하는 단계를 포함하는, 간에서의 약물 작용이 필요한 질환의 예방 또는 치료 방법을 제공하는 것이다.
- [0012] 본 발명의 다른 목적은 상기 간에서의 약물 작용이 필요한 질환의 예방 또는 치료용 약제의 제조에 사용하기 위한, 상기 간 표적 약물, 구체적으로 간 조직으로 표적화된 생리활성 물질의 용도를 제공하는 것이다.
- [0013] 본 발명의 다른 목적은 상기 간 표적 약물, 구체적으로 간 조직으로 표적화된 생리활성 물질을 이를 필요로 하는 개체에 투여하여 간 표적화를 유도하는 방법을 제공하는 것이다.
- [0014] 본 발명의 다른 목적은 상기 간 표적 약물, 구체적으로 간 조직으로 표적화된 생리활성 물질을 이를 필요로 하는 개체에 투여하여 간 조직 내에서 상기 생리활성 물질의 분포 증대를 유도하는 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

- [0016] 본 발명을 구현하는 하나의 양태는 간 표적 약물을 포함하는 약학적 조성물, 구체적으로 투여된 개체의 체내 장기 중 상기 약물의 간에서의 분포도가 높은, 약학적 조성물이다. 하나의 구체예로서, 상기 간 표적 약물은 하기 일반식 1의 아미노산 서열을 포함하는 펩타이드 또는 이를 포함하는 지속형 결합체 형태인 것을 특징으로 한다. 또 하나의 구체예로서, 상기 간 표적 약물은 하기 일반식 2의 아미노산 서열을 포함하는 펩타이드 또는 이를 포함하는 지속형 결합체 형태인 것을 특징으로 한다.
- [0017] 하나의 구체예로서, 상기 간 표적 약물은 하기 일반식 1의 아미노산 서열을 포함하는 펩타이드인 것을 특징으로 한다:
- [0018] X1-X2-QGTF-X7-SD-X10-S-X12-X13-X14-X15-X16-X17-X18-X19-X20-X21-F-X23-X24-W-L-X27-X28-X29-X30 (일반식 1, 서열번호: 46),
- [0020] 상기 식에서,
- [0021] X1은 히스티딘(H), 데스아미노-히스티딜(desamino-histidyl), 디메틸-히스티딜(N-dimethyl-histidyl), 베타-히드록시 이미다조프로피오닐(beta-hydroxy imidazopropionyl), 4-이미다조아세틸(4-imidazoacetyl), 베타-카복시 이미다조프로피오닐(beta-carboxy imidazopropionyl), 트립토판(W), 또는 티로신(Y)이거나, 부존재하고;
- [0022] X2는 알파-메틸-글루탐산(α -methyl-glutamic acid), Aib(aminoisobutyric acid), D-알라닌, 글리신(G), Sar(N-methylglycine), 세린(S) 또는 D-세린이며;
- [0023] X7은 트레오닌(T), 발린(V) 또는 시스테인(C)이고;
- [0024] X10은 티로신(Y) 또는 시스테인(C)이고;
- [0025] X12는 리신(K) 또는 시스테인(C)이고;
- [0026] X13은 티로신(Y) 또는 시스테인(C)이고;
- [0027] X14는 류신(L) 또는 시스테인(C)이고;
- [0028] X15는 아스파르트산(D), 글루탐산(E) 또는 시스테인(C)이고;
- [0029] X16은 글루탐산(E), 아스파르트산(D), 세린(S), 알파-메틸-글루탐산, 또는 시스테인(C)이거나, 부존재하며;
- [0030] X17은 아스파르트산(D), 글루타민(Q), 글루탐산(E), 리신(K), 아르기닌(R), 세린(S), 시스테인(C), 또는 발린(V)이거나, 부존재하며;
- [0031] X18은 알라닌(A), 아스파르트산(D), 글루타민(Q), 글루탐산(E), 아르기닌(R), 발린(V), 또는 시스테인(C)이거나, 부존재하며;

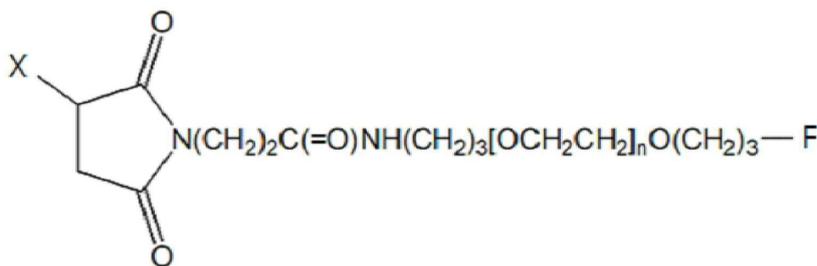
- [0032] X19는 알라닌(A), 아르기닌(R), 세린(S), 발린(V), 또는 시스테인(C)이거나, 부존재하며;
- [0033] X20은 리신(K), 히스티딘(H), 글루탐산(E), 글루타민(Q), 아스파르트산(D), 아르기닌(R), 알파-메틸-글루탐산, 또는 시스테인(C)이거나, 부존재하며;
- [0034] X21은 아스파르트산(D), 글루탐산(E), 류신(L), 발린(V), 또는 시스테인(C)이거나, 부존재하며;
- [0035] X23은 이소류신(I), 발린(V), 또는 아르기닌(R)이거나, 부존재하며;
- [0036] X24는 발린(V), 아르기닌(R), 알라닌(A), 시스테인(C), 글루탐산(E), 리신(K), 글루타민(Q), 알파-메틸-글루탐산, 또는 류신(L)이거나, 부존재하며;
- [0037] X27는 이소류신(I), 발린(V), 알라닌(A), 리신(K), 메티오닌(M), 글루타민(Q), 또는 아르기닌(R)이거나, 부존재하며;
- [0038] X28은 글루타민(Q), 리신(K), 아스파라긴(N), 또는 아르기닌(R)이거나, 부존재하며;
- [0039] X29는 리신(K), 알라닌(A), 글리신(G), 또는 트레오닌(T)이거나, 부존재하며;
- [0040] X30은 시스테인(C)이거나, 부존재함.

- [0042] 본 발명을 구현하는 하나의 양태는 간 표적 약물을 포함하는, 투여된 개체의 체내 장기 중 상기 약물의 간에서의 분포도가 높은 약학적 조성물이다. 하나의 구체예로서, 상기 간 표적 약물은 하기 일반식 2의 아미노산 서열을 포함하는 펩타이드인 것을 특징으로 한다:
- [0043] Y-Aib-QGTF-X7-SD-X10-S-X12-Y-L-X15-X16-X17-R-A-X20-X21-F-V-X24-W-L-M-N-T-X30 (일반식 2, 서열번호: 47)
- [0044] 상기 일반식 2에서
- [0045] X7은 트레오닌(T), 발린(V) 또는 시스테인(C)이고;
- [0046] X10은 티로신(Y) 또는 시스테인(C)이고;
- [0047] X12는 리신(K) 또는 시스테인(C)이고;
- [0048] X15는 아스파르트산(D), 또는 시스테인(C)이고;
- [0049] X16은 글루탐산(E) 또는 세린(S)이며;
- [0050] X17은 리신(K) 또는 아르기닌(R)이고;
- [0051] X20은 글루타민(Q) 또는 리신(K)이며;
- [0052] X21은 아스파르트산(D), 또는 글루탐산(E)이고;
- [0053] X24는 발린(V) 또는 글루타민(Q)이고;
- [0054] X30은 시스테인(C)이거나, 부존재함
- [0055] (단, 상기 일반식 2의 아미노산 서열이 서열번호 12와 동일한 경우는 제외함).
- [0056] 다른 구체예로서, 상기 펩타이드는 지속형 결합체의 형태이고, 상기 지속형 결합체는 하기 화학식 1로 표시되는, 약학적 조성물인 것을 특징으로 한다:
- [0057] [화학식 1]
- [0058] X - L - F
- [0059] 여기서,
- [0060] X는, 상기 일반식 2의 아미노산 서열을 포함하는 펩타이드이고;
- [0061] L은 에틸렌글리콜 반복 단위를 함유하는 링커이며;
- [0062] F는 면역글로불린 Fc 영역이고,

- [0063] -는 X와 L 사이, L과 F 사이의 공유결합 연결을 나타낸다.
- [0065] 앞선 구체예 중 어느 하나에 따른 약학적 조성물로서, 상기 체내 장기는 간, 심장, 폐, 대장, 비장, 췌장, 지방 조직, 소장, 위, 근육, 신장 및 뇌로서, 상기 각 장기 중에서 간에서의 분포도가 가장 높은 것을 특징으로 한다.
- [0067] 앞선 구체예 중 어느 하나에 따른 약학적 조성물로서, 상기 조성물은 간에서의 약물 작용이 필요한 질환의 예방 또는 치료에 사용하기 위한 것을 특징으로 한다.
- [0068] 앞선 구체예 중 어느 하나에 따른 약학적 조성물로서, 상기 간 표적 약물은 투여 후 간에서의 T/S 비율 (tissue-to-serum ratio)이 하기에서 선택된 하나 이상인 것을 특징으로 한다: (a) 투여 후 약 40 시간 내지 약 50 시간에서 T/S 비율이 약 20% 내지 약 40%; 및 (b) 투여 후 약 160 시간 내지 약 180 시간에서 T/S 비율이 약 25% 내지 약 40%.
- [0069] 앞선 구체예 중 어느 하나에 따른 약학적 조성물로서, 상기 간 표적 약물은 투여 후 간에서의 T/S 비율이 하기에서 선택된 하나 이상인 것을 특징으로 한다: (a) 투여 후 약 2일에서 T/S 비율이 약 25% 내지 약 35%; 및 (c) 투여 후 약 7일에서 T/S 비율이 약 27% 내지 약 35%.
- [0070] 앞선 구체예 중 어느 하나에 따른 약학적 조성물로서, 상기 간 표적 약물은 투여 후 폐 조직 대비 간에서의 분포비가 1: 약 2 내지 약 4인 것을 특징으로 한다.
- [0071] 앞선 구체예 중 어느 하나에 따른 약학적 조성물로서, 상기 간 표적 약물은 투여 후 폐 조직 대비 간에서의 분포비가 1: 약 2.2 내지 약 3.2인 것을 특징으로 한다.
- [0072] 앞선 구체예 중 어느 하나에 따른 약학적 조성물로서, 상기 투여 후 폐 조직 대비 간에서의 분포비는 투여 후 약 40시간 내지 약 180시간에서의 분포비인 것을 특징으로 한다.
- [0073] 앞선 구체예 중 어느 하나에 따른 약학적 조성물로서, 상기 투여 후 폐 조직 대비 간에서의 분포비는 투여 후 약 2일 내지 약 7일에서의 분포비인 것을 특징으로 한다.
- [0074] 앞선 구체예 중 어느 하나에 따른 약학적 조성물로서, 상기 간 표적 약물은 (a) 투여 후 40 시간 내지 50 시간에서 심장 대비 간에서의 분포비가 1: 1.6 내지 3.0이고; 및 (b) 투여 후 160 시간 내지 180 시간에서 심장 대비 간에서의 분포비가 1: 2.8 내지 7인 것을 특징으로 한다.
- [0075] 앞선 구체예 중 어느 하나에 따른 약학적 조성물로서, 상기 간 표적 약물은 투여 후 체내 장기 중 간에 상대적으로 많이 분포하는 펩타이드 또는 이를 포함하는 지속형 결합체 형태인 것을 특징으로 한다
- [0076] 앞선 구체예 중 어느 하나에 따른 약학적 조성물로서, 상기 간 표적 약물은 간에서의 약물 작용이 필요한 질환에 치료적 활성을 가지는 것을 특징으로 한다.
- [0077] 앞선 구체예 중 어느 하나에 따른 약학적 조성물로서, 상기 간에서의 약물 작용이 필요한 질환은 간 질환, 저혈당 또는 선천성 고인슐린증인 것을 특징으로 한다.
- [0078] 앞선 구체예 중 어느 하나에 따른 약학적 조성물로서, 상기 저혈당은 급성 저혈당 또는 만성 저혈당인 것으로 특징으로 한다.
- [0079] 앞선 구체예 중 어느 하나에 따른 약학적 조성물로서, 상기 간 표적 약물은 글루카곤 수용체에 대해 결합력을 갖는 펩타이드의 서열을 포함하는 단백질 혹은 펩타이드인 것을 특징으로 한다.
- [0080] 앞선 구체예 중 어느 하나에 따른 약학적 조성물로서, 상기 일반식 2의 X16과 X20의 아미노산 간에 고리를 형성하는 것을 특징으로 한다.
- [0081] 앞선 구체예 중 어느 하나에 따른 약학적 조성물로서, 상기 일반식 2의 아미노산 서열을 포함하는 펩타이드는 서열번호 13, 15, 19, 33, 및 36 내지 45로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하는 것을 특징으로 한다.
- [0082] 앞선 구체예 중 어느 하나에 따른 약학적 조성물로서, 상기 일반식 2의 아미노산 서열을 포함하는 펩타이드는

서열번호 33, 및 36 내지 44로 이루어진 군에서 선택되는 아미노산 서열을 포함하는 것을 특징으로 한다.

- [0083] 앞선 구체예 중 어느 하나에 따른 약학적 조성물로서, 상기 일반식 1의 아미노산 서열을 포함하는 펩타이드는 서열번호 20, 22, 23, 27, 33, 35, 37, 38, 40, 41, 42, 및 44 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하는 것을 특징으로 한다.
- [0084] 앞선 구체예 중 어느 하나에 따른 약학적 조성물로서, 상기 일반식 1의 아미노산 서열을 포함하는 펩타이드는 서열번호 20, 22, 23, 27, 33, 37, 38, 및 44 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하는 것을 특징으로 한다.
- [0085] 앞선 구체예 중 어느 하나에 따른 조성물로서, 상기 일반식 1의 X10과 X14, X12와 X16, X16과 X20, X17과 X21, X20과 X24, 및 X24와 X28의 아미노산 쌍 중 적어도 하나의 아미노산 쌍의 아미노산 각각이 고리를 형성할 수 있는 글루탐산 또는 리신으로 치환된 것을 특징으로 한다.
- [0086] 앞선 구체예 중 어느 하나에 따른 조성물로서, 상기 X12와 X16의 아미노산 쌍, X16과 X20의 아미노산 쌍, 또는 X17과 X21의 아미노산 쌍의 아미노산 각각이 고리를 형성할 수 있는 글루탐산 또는 리신으로 치환된 것을 특징으로 한다.
- [0087] 앞선 구체예 중 어느 하나에 따른 조성물로서, 상기 일반식 1에서, X10과 X14, X12와 X16, X16과 X20, X17과 X21, X20과 X24, 및 X24와 X28의 아미노산 쌍 중 적어도 하나의 아미노산 쌍에서 각각의 아미노산 간에 고리를 형성하는 것을 특징으로 한다.
- [0088] 앞선 구체예 중 어느 하나에 따른 조성물로서, 상기 펩타이드는 서열번호: 1 내지 44로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하는 것을 특징으로 한다.
- [0089] 앞선 구체예 중 어느 하나에 따른 조성물로서, 상기 펩타이드는 이의 C-말단이 아미드화되거나 또는 자유 카르복실기 (-COOH)를 갖는 것을 특징으로 한다.
- [0090] 앞선 구체예 중 어느 하나에 따른 조성물로서, 상기 펩타이드의 C-말단이 아미드화된 것을 특징으로 한다.
- [0091] 앞선 구체예 중 어느 하나에 따른 조성물로서, 상기 펩타이드의 C-말단은 변형되지 않은 것을 특징으로 한다.
- [0092] 앞선 구체예 중 어느 하나에 따른 조성물로서, 상기 L 내의 에틸렌글리콜 반복 단위 부분의 화학식량은 1 내지 100 kDa 범위에 있는 것을 특징으로 한다.
- [0093] 앞선 구체예 중 어느 하나에 따른 조성물로서, 상기 화학식 1의 구조는 하기 화학식 3의 구조인 것을 특징으로 한다:
- [0094] [화학식 3]



- [0095]
- [0096] 여기서, X 및 F는 화학식 1에서 정의한 바와 같다.
- [0097] 앞선 구체예 중 어느 하나에 따른 조성물로서, 상기 에틸렌글리콜 반복 단위는 [OCH₂CH₂]_n로서, n은 자연수로, 상기 펩타이드 결합체 내 [OCH₂CH₂]_n 부위의 평균 분자량, 예컨대 수평균 분자량이 1 내지 100 kDa이 되도록 정해지는 것을 특징으로 한다.
- [0098] 앞선 구체예 중 어느 하나에 따른 조성물로서, 상기 n의 값은 상기 펩타이드 결합체 내 [OCH₂CH₂]_n 부위의 평균 분자량, 예컨대 수평균 분자량이 10 kDa이 되도록 정해지는 것을 특징으로 한다.
- [0099] 앞선 구체예 중 어느 하나에 따른 약학적 조성물로서, 상기 L은 폴리에틸렌 글리콜인 것을 특징으로 한다.
- [0100] 앞선 구체예 중 어느 하나에 따른 조성물로서, 상기 X는 펩타이드 내의 시스테인의 황 원자를 통하여 연결된 것

을 특징으로 한다.

- [0101] 앞선 구체예 중 어느 하나에 따른 약학적 조성물로서, 상기 F는 IgG Fc 영역인 것을 특징으로 한다.
- [0102] 앞선 구체예 중 어느 하나에 따른 약학적 조성물로서, 상기 면역글로불린 Fc 영역은 IgG4 유래인 것을 특징으로 한다.
- [0103] 앞선 구체예 중 어느 하나에 따른 조성물로서, 상기 F는 2개의 폴리펩타이드 사슬이 이황화결합으로 연결되어 있는 구조이며, 상기 두 사슬 중 한 사슬의 질소 원자를 통해서만 연결된 것을 특징으로 한다.
- [0104] 앞선 구체예 중 어느 하나에 따른 조성물로서, 상기 F는 서열번호 70의 아미노산 서열인 단량체를 포함하는 것을 특징으로 한다.
- [0105] 앞선 구체예 중 어느 하나에 따른 조성물로서, 상기 F는 서열번호 70의 아미노산 서열인 단량체의 동종이량체인 것을 특징으로 한다.
- [0106] 앞선 구체예 중 어느 하나에 따른 조성물로서, 상기 F는 서열번호 71의 아미노산 서열을 포함하는 동종이량체인 것을 특징으로 한다.
- [0107] 앞선 구체예 중 어느 하나에 따른 조성물로서, 상기 F는 그 N-말단 프롤린의 질소 원자를 통하여 연결된 것을 특징으로 한다.
- [0108] 앞선 구체예 중 어느 하나에 따른 조성물로서, 상기 면역글로불린 Fc 영역인 F와 X가 당쇄화되어 있지 않은 것을 특징으로 한다.
- [0109] 본 발명을 구현하는 다른 하나의 양태는 간 조직으로 표적화된 생리활성 물질, 구체적으로 간에 존재하는 수용체와 결합력을 갖는 물질을 포함하여, 간 조직으로 표적화된 생리활성 물질이다.
- [0110] 본 발명을 구현하는 다른 하나의 양태는 상기 약학적 조성물 또는 간 조직으로 표적화된 생리활성 물질을 이를 필요로 하는 개체에 투여하는 단계를 포함하는, 간에서의 약물 작용이 필요한 질환의 예방 또는 치료 방법이다.
- [0111] 본 발명을 구현하는 다른 하나의 양태는 상기 간에서의 약물 작용이 필요한 질환의 예방 또는 치료용 약제의 제조에 사용하기 위한, 상기 간 표적 약물, 구체적으로 간 조직으로 표적화된 생리활성 물질의 용도이다.
- [0112] 본 발명을 구현하는 다른 하나의 양태는 상기 간 표적 약물, 구체적으로 간 조직으로 표적화된 생리활성 물질을 이를 필요로 하는 개체에 투여하여 간 표적화를 유도하는 방법이다.
- [0113] 본 발명을 구현하는 다른 하나의 양태는 상기 간 표적 약물, 구체적으로 간 조직으로 표적화된 생리활성 물질을 이를 필요로 하는 개체에 투여하여 간 조직 내에서 상기 생리활성 물질의 분포 증대를 유도하는 방법을 제공하는 것이다.

발명의 효과

- [0115] 간세포의 수용체와 결합하는 물질을 포함하는 본 발명의 약물 (예, 생리활성 단백질 혹은 펩타이드 유도체)은 혈관에서 간조직으로 보다 효과적으로 도달되어 생체 내 투여 후 체내 장기 중 간에 상대적으로 많이 분포하는 생리활성 물질, 구체적으로 글루카곤 수용체와 결합력을 가짐으로써, 간 조직에 상대적으로 많이 분포하는 생리활성 물질로 제공될 뿐 아니라, 약 7일 이내에도 간에서의 분포도가 높아 환자의 투약에 대한 불편을 감소시키면서, 간 질환, 저혈당, 또는 선천성 고인슐린증 등을 비롯한 간에서의 약물 작용이 필요한 질환 등의 치료에 적용될 수 있다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0117] 본 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용을 설명하면 다음과 같다. 한편, 본원에서 개시되는 각각의 설명 및 실시형태는 각각의 다른 설명 및 실시 형태에도 적용될 수 있다. 즉, 본원에서 개시된 다양한 요소들의 모든 조합이 본 발명의 범주에 속한다. 또한, 하기 기술되는 구체적인 서술에 의하여 본 발명의 범주가 제한된다고 할 수 없다.
- [0118] 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. 본 명세서에 기재된 문헌은 전체가 참조로 본원에 삽입될 수 있다. 또한, 본 명세서 전체에 걸쳐 다수의 논문 및 특허문헌이 참조되고 그 인용이 표시되어 있다. 인용된 논문 및 특허문헌의 개시 내용은 그 전체로서 본 명세서에 참조로 삽입되어 본 발명이 속하는 기술 분야의 수준 및 본 발명의 내용이 보다 명확하게 설명된다.

[0119] 본 명세서 전반을 통하여, 천연적으로 존재하는 아미노산에 대한 통상의 1문자 및 3문자 코드가 사용될 뿐만 아니라 Aib (α -아미노이소부티르산), Sar (N-methylglycine), 알파-메틸-글루탐산 (α -methyl-glutamic acid) 등과 같은 다른 아미노산에 대해 일반적으로 허용되는 3문자 코드가 사용된다. 또한 본 명세서에서 약어로 언급된 아미노산은 IUPAC-IUB 명명법에 따라 기재되었다.

[0121] 알라닌 Ala, A 아르기닌 Arg, R

[0122] 아스파라긴 Asn, N 아스파르트산 Asp, D

[0123] 시스테인 Cys, C 글루탐산 Glu, E

[0124] 글루타민 Gln, Q 글리신 Gly, G

[0125] 히스티딘 His, H 이소류신 Ile, I

[0126] 류신 Leu, L 리신 Lys, K

[0127] 메티오닌 Met, M 페닐알라닌 Phe, F

[0128] 프롤린 Pro, P 세린 Ser, S

[0129] 트레오닌 Thr, T 트립토판 Trp, W

[0130] 티로신 Tyr, Y 발린 Val, V

[0132] 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.

[0134] 본 발명을 구현하기 위한 하나의 양태는 간 표적 약물을 포함하는 조성물, 예컨대 약학적 조성물을 제공한다. 구체적으로, 본 발명을 구현하기 위한 하나의 양태는 간 표적 약물을 포함하는, 투여된 개체의 체내 장기 중 상기 약물의 간에서의 분포도가 높은, 약학적 조성물에 관한 것이다.

[0135] 체내 장기 중 간에서의 분포도가 높다는 것은, 간, 심장, 폐, 대장, 비장, 췌장, 지방조직, 소장, 위, 근육, 신장 및 뇌로 이루어진 체내 장기 중에서 간 표적 약물이 체내로 투여 후, 간 표적 약물의 분포가 간에서 가장 높은 것을 의미할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0136] 상기 약학적 조성물은 간에서의 약물 작용이 필요한 질환의 예방 또는 치료에 사용하기 위한 약학적 조성물일 수 있다.

[0137] 본 발명에서 용어, "간 표적 약물"은 간 조직으로 표적화될 수 있는 약물을 의미한다. 간 조직으로 표적화란 상기 약물이 투여 후 다른 장기에 비해 간에서의 분포가 높은 것을 의미할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 상기 간 표적 약물은 간에서의 약물 작용이 필요한 질환에 대한 치료적 활성을 보유할 수 있다.

[0138] 상기 간 표적 약물은 투여 후 간에서의 T/S 비율 (tissue-to-serum ratio)이 하기에서 선택된 하나 이상일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다: (a) 투여 후 약 40 시간 내지 약 50 시간에서 T/S 비율이 약 20% 내지 약 40%, 약 24% 내지 약 40%, 약 25% 내지 약 40%, 약 25% 내지 약 38%, 약 25% 내지 약 35%, 약 25% 내지 약 34%, 약 25% 내지 약 33%, 약 26% 내지 약 33%, 약 26% 내지 약 32%, 약 27% 내지 약 32%, 약 28% 내지 약 32%, 약 29% 내지 약 31%, 또는 약 29.5% 내지 약 30.5%; 및 (b) 투여 후 약 160 시간 내지 약 180 시간에서 T/S 비율이 약 25% 내지 약 40%, 약 26% 내지 약 38%, 약 27% 내지 약 35%, 약 27% 내지 약 34%, 약 27% 내지 약 33%, 약 28%

내지 약 33%, 약 29% 내지 약 33%, 약 29% 내지 약 32%, 약 30% 내지 약 32%, 또는 약 30.5% 내지 약 31.5%. 상기 특징은 (a) 또는 (b) 에서 선택된 1개 이상, 또는 2개 모두일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

- [0139] 상기 간 표적 약물은 투여 후 간에서의 T/S 비율이 하지에서 선택된 하나 이상일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다: (a) 투여 후 약 2일에서 T/S 비율이 약 25% 내지 약 35%, 약 26% 내지 약 34%, 약 27% 내지 약 33%, 약 28% 내지 약 32%, 약 29% 내지 약 31%, 약 29.5% 내지 약 30.5%, 또는 약 29.8%; 및 (c) 투여 후 약 7일에서 T/S 비율이 약 27% 내지 약 35%, 약 27% 내지 약 34%, 약 28% 내지 약 33%, 약 29% 내지 약 32%, 약 30% 내지 약 31.5%, 또는 약 31%. 상기 특징은 (a), 또는 (b) 에서 선택된 1개 이상, 또는 2개 모두일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0140] T/S 비율 (tissue-to-serum ratio)은 조직 대 혈청의 농도 비율로 %로 환산되며, 공지의 방법을 통해 측정할 수 있다. 그 예로, T/S 비율 (tissue-to-serum ratio), T/S ratio (%)는 조직농도/혈청농도 x 100으로 계산된다. 농도 측정은 장기를 적출한 후 ELISA 방법 등으로 물질 농도를 측정한다.
- [0141] T/S 비율이 높을수록 상기 조직에서 투여된 물질이 낮은 T/S 비율을 갖고 있는 조직에 비해 분포가 높은 것을 의미한다. 일반적으로, 약물이 체내에 투여될 경우, 약물의 분포도가 많은 장기가 폐 및 심장인 바, 폐 조직 및 심장 조직에서의 분포도를 간 조직과 비교하여, 폐 조직 및 심장 조직에 비해 간 조직에서의 분포가 많이 된다면, 이는 본 발명의 간 표적 약물이 효과적으로 간 조직에 표적화된다는 것을 의미할 수 있다. 이외에도 간 표적 약물이 효과적으로 간 조직에 표적화된다는 것을 확인할 수 있는 T/S 비율을 측정하여 간 조직의 T/S 비율과 비교할 수 있는 조직은 제한없이 포함될 수 있다.
- [0142]
- [0143] 상기 간 표적 약물은 투여 후 폐 조직 대비 간에서의 분포비가 1: 약 2 내지 약 4.0, 1: 약 2 내지 약 3.5, 1: 약 2.1 내지 약 3.4, 1: 약 2.2 내지 3.2, 1: 약 2.2 내지 약 3.3, 1: 약 2.3 내지 약 3.2, 1: 약 2.4 내지 약 3.2, 1: 약 2.4 내지 약 3.1, 1: 약 2.4 내지 약 3.0, 1: 약 2.5 내지 약 2.95, 1: 약 2.5 내지 2.9, 1:2.55 내지 약 2.87, 1: 또는 2.6 내지 2.9, 1: 약 2.5 내지 3.9 일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0144] 상기 분포비는 T/S(%)를 바탕으로 측정할 수 있으며, 폐의 T/S(%)를 기준인 1로 할 때 간에서의 T/S(%)가 어떤 배수인지로 확인할 수 있다.
- [0145] 상기 투여 후 폐 조직 대비 간에서의 분포비는 투여 후 약 40시간 내지 약 180시간, 약 45 시간 내지 약 170 시간, 또는 약 2일 내지 약 7일일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0146] 상기 투여 후 폐 조직 대비 간에서의 분포비는 투여 후 약 2일에서 1: 약 2.4 내지 약 2.7, 1: 약 2.4 내지 약 2.7, 1: 약 2.5 내지 약 2.6, 또는 1: 약 2.5 내지 3.7, 약 7일에서 1: 약 2.5 내지 3, 1: 약 2.7 내지 약 3, 1: 약 2.8 내지 약 3.0, 1: 약 2.8 내지 약 2.9, 또는 1: 약 2.8 내지 약 3.9 의 분포비일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0148] 상기 투여 후 심장 대비 간에서의 분포비는 (a) 투여 후 약 40 시간 내지 약 50 시간에서 심장 대비 간에서의 분포비가 1: 약 1.6 내지 약 3.0이고; 및(b) 투여 후 약 160 시간 내지 약 180 시간에서 심장 대비 간에서의 분포비가 1: 약 2.8 내지 약 7.0일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0149] 상기 투여 후 심장 대비 간에서의 분포비는 (a) 투여 후 약 40 시간 내지 약 50 시간, 약 45시간 내지 약 50시간, 또는 약 2일에서 심장 대비 간에서의 분포비가 1: 약 1.6 내지 3.0, 1: 약 1.6 내지 2.5, 1: 약 1.6 내지 약 2.2, 1: 약 1.7 내지 약 2.1, 1: 약 1.7 내지 약 2.0, 1: 약 1.8 내지 2.0, 1: 약 1.8 내지 2.0, 1: 약 1.89 내지 2.0, 1: 약 1.8 내지 2.0, 또는 1: 약 1.8 내지 2.9 이고; 및 (b) 투여 후 약 160 시간 내지 약 180 시간, 약 160 시간 내지 약 180 시간, 또는 약 7일에서 심장 대비 간에서의 분포비가 1: 약 2.8 내지 약 4, 1: 약 2.9 내지 약 3.8, 1: 약 3.0 내지 약 3.8, 1: 약 3.0 내지 약 3.6, 1: 약 3.0 내지 약 3.5, 1: 약 3.0 내지 약 3.4, 1: 약 3.1 내지 약 3.4, 1: 약 3.2 내지 약 3.4, 1: 약 3.2 내지 약 3.3, 1: 약 2.8 내지 약 7.0, 또는 1: 약 3.3 내지 약 6.6 일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0150] 상기 분포비는 T/S(%)를 바탕으로 측정할 수 있으며, 심장의 T/S(%)를 기준인 1로 할 때 간에서의 T/S(%)가 어떤 배수인지로 확인할 수 있다.
- [0151] 본 발명에서 용어, "약"은 ± 0.5 , ± 0.4 , ± 0.3 , ± 0.2 , ± 0.1 , ± 0.05 등을 모두 포함하는 범위로, 약 이란 용

어 뒤에 나오는 수치와 동등하거나 유사한 범위의 수치를 모두 포함하나, 이에 제한되지 않는다.

- [0153] 상기 간 표적 약물은 간 조직으로 표적화될 수 있는 물질을 포함할 수 있다. 구체적으로, 상기 간 표적 약물은 간 표적화를 유도할 수 있는
- [0154] 글루카곤 또는 이의 유도체를 포함하는 펩타이드 혹은 단백질로서, 글루카곤 수용체에 대해 활성을 갖는 펩타이드 서열을 포함하는 것일 수 있다. 그 예로, 상기 일반식 1의 아미노산 서열을 포함하는 펩타이드 또는 이를 포함하는 지속형 결합체 형태, 또는 상기 일반식 2의 아미노산 서열을 포함하는 펩타이드 또는 이를 포함하는 지속형 결합체 형태일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 상기 펩타이드는 글루카곤 수용체에 대한 활성을 갖는 펩타이드로서, 구체적으로 글루카곤 유도체일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0155] 한편, 본 발명에서 간 표적 약물인 글루카곤 또는 이의 유도체는 해당 약물을 동물의 혈액 내로 전달하였을 때 혈액으로부터 간으로 표적화될 수 있을 정도로 글루카곤 수용체에 결합력을 보유한다는 것을 말한다. 보다 구체적으로, 해당 약물을 동물의 혈액 내로 전달한 후 적어도 6시간, 30시간, 적어도 48시간, 또는 적어도 168시간에 상기 약물의 장기 분포 비율을 확인하였을 때, 심장, 폐, 대장, 비장, 췌장, 지방조직, 소장, 위, 근육, 신장, 또는 뇌와 같은 적어도 하나의 다른 장기에 비하여 간에 분포된 비율이 약 5% 이상, 약 10% 이상, 약 15% 이상, 약 20% 이상, 약 30% 이상, 또는 약 40% 이상 높은 것을 의미하나, 비교 대상 장기에 비해 분포 비율이 높은 한, 특별히 이에 제한되지는 않는다.
- [0156] 상기 글루카곤 수용체에 대한 활성을 갖는 물질은 글루카곤 수용체에 대해 유의한 수준의 활성을 가지는 다양한 물질, 예컨대 화합물 또는 펩타이드 형태의 물질을 포함한다.
- [0157] 특별히 이에 제한되는 것은 아니나, 상기 글루카곤에 대해 유의한 수준의 활성을 가지는 물질은 천연형 글루카곤 뿐만 아니라, 글루카곤 수용체에 대해 *in vitro* 활성이 해당 수용체의 천연형 리간드 (천연형 글루카곤) 대비 0.1% 이상, 1% 이상, 2% 이상, 3% 이상, 4% 이상, 5% 이상, 6% 이상, 7% 이상, 8% 이상, 9% 이상, 10% 이상, 20% 이상, 30% 이상, 40% 이상, 50% 이상, 60% 이상, 70% 이상, 80% 이상, 90% 이상, 100% 이상을 나타내는 것일 수 있다.
- [0158] 이러한 글루카곤 또는 글루카곤 유도체의 *in vitro* 활성을 측정하는 방법은 본원 명세서의 실험예 1을 참조할 수 있으나, 특별히 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0160] 상기 글루카곤 수용체에 대한 활성을 갖는 물질의 예로서, 천연형 글루카곤, 이의 아고니스트(agonist), 또는 이의 유도체가 있으나, 특별히 이에 제한되는 것일 수 있다.
- [0162] 본 발명에 따른 글루카곤 유도체는 천연형 글루카곤과 비교하여 아미노산 서열에 하나 이상의 차이가 있는 펩타이드, 천연형 글루카곤 서열을 개질(modification)을 통하여 변형시킨 펩타이드, 천연형 글루카곤과 같이 글루카곤 수용체를 활성화시킬 수 있는 천연형 글루카곤의 모방체를 포함하며, 투여된 개체의 체내 장기 중 상기 펩타이드의 간에서의 분포도가 높다면, 본 발명의 범위에 속할 수 있다.
- [0163] 상기 글루카곤 유도체의 종류로서, 국제공개특허 WO 2016/108586 및 국제공개특허 WO 2017/003191에 기재된 종류를 들 수 있으며, 상기 국제공개특허의 명세서 전체는 본원에 참고자료로서 모두 포함된다. 또한, 상기 글루카곤 유도체 펩타이드의 지속형 결합체의 제조 방법은 WO 2017/003191에 기재되어 있으며, 상기 국제공개특허의 명세서 전체 역시 본원에 참고자료로서 포함되는 것은 분명하다.
- [0165] 이러한 글루카곤 유도체는 천연형 글루카곤에 대해 변화된 pI를 가져 개선된 물성을 나타내는 것일 수 있다. 또한, 상기 글루카곤 유도체는 글루카곤 수용체를 활성화시키는 활성을 보유하면서 용해도가 개선된 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

- [0167] 또한, 상기 글루카곤 유도체는 천연적으로 존재하지 않는(non-naturally occurring) 것일 수 있다.
- [0169] 한편, 천연형 글루카곤은 다음의 아미노산 서열을 가질 수 있다:
- [0170] His-Ser-Gln-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Lys-Tyr-Leu-Asp-Ser-Arg-Arg-Ala-Gln-Asp-Phe-Val-Gln-Trp-Leu-Met-Asn-Thr(서열번호: 1)
- [0172] 본 발명에서 용어 "등전점(isoelectric point)" 또는 "pI"는 어떤 폴리펩타이드 혹은 펩타이드 같은 분자에 있어서 그 전체 순하전(net charge)이 없게 되는(0) pH 값을 의미한다. 다양한 하전된 작용기가 존재하는 폴리펩타이드의 경우, pI에서 이들 하전의 합은 제로이다. pI보다 높은 pH에서 폴리펩타이드의 전체 순하전은 음성이 될 것이고, pI보다 낮은 pH 값에서 폴리펩타이드의 전체 순하전은 양성이 될 것이다.
- [0173] pI는 폴리아크릴아미드, 전분 또는 아가로스로 구성되는 고정된 pH 구배 겔상에서 등전점 전기영동에 의해 또는 예를 들어 ExPASy 서버에서 pI/MW 툴(http://expasy.org/tools/pi_tool.html; Gasteiger et al., 2003)을 사용하여 아미노산 서열로부터 pI를 추산함으로써 결정될 수 있다.
- [0174] 본 발명에서 용어 "변화된 pI"는 천연 글루카곤의 아미노산 서열에서 일부 서열이 음전하 및 양전하를 띤 아미노산 잔기로 치환되어 천연 글루카곤의 pI와는 다른, 즉 이보다 감소하거나 증가한 pI를 갖는 것을 의미한다. 이렇게 변화된 pI를 갖는 펩타이드는 글루카곤 유도체로서 중성 pH에서 개선된 용해도 및/또는 높은 안정성을 나타낼 수 있다. 그러나, 특별히 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0175] 그 예로, 상기 글루카곤 유도체는 천연형 글루카곤의 pI 값 (6.8)이 아닌 변화된 pI 값을 가지는 것일 수 있으며, 6.8 미만, 6.7 이하, 6.5 이하, 또한 6.8 초과, 7 이상, 7.5 이상일 수 있으나, 이에 제한되지 않으며, 천연형 글루카곤과 상이한 pI 값을 가진다면 본 발명의 범주에 포함된다. 특히, 천연형 글루카곤과 상이한 pI 값을 가짐으로써 천연형 글루카곤에 비해 중성 pH에서 개선된 용해도를 나타냄으로써 응집(agggregation)되는 정도가 낮다면, 본 발명의 범주에 포함될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0176] 그 예로, 4 내지 6.5 및/또는 7 내지 9.5, 7.5 내지 9.5, 8.0 내지 9.3의 pI 값을 가지는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 이 경우, 천연형 글루카곤에 비해 높거나 낮은 pI를 갖기 때문에 중성 pH 에서 천연형 글루카곤에 비해 개선된 용해도 및 높은 안정성을 나타낼 수 있다. 그러나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0178] 구체적으로, 천연형 글루카곤의 유도체는 천연형 글루카곤에서 일부 아미노산이 치환(substitution), 추가(addition), 제거(deletion) 및 수식(modification) 중 어느 하나의 방법 또는 이러한 방법들의 조합을 통하여 변형시킬 수 있다.
- [0179] 이러한 방법들의 조합으로 제조되는 글루카곤의 유도체의 예로, 천연형 글루카곤과 아미노산 서열이 하나 이상 다르고, N-말단 아미노산 잔기에 탈아미노화 (deamination)된, 글루카곤 수용체에 대한 활성화 기능을 보유한 펩타이드 등이 있으나, 이에 제한되지 않으며, 유도체 제조를 위한 여러 방법들의 조합으로 본 발명에 적용되는 천연형 글루카곤의 유도체를 제조할 수 있다.
- [0180] 또한, 천연형 글루카곤의 유도체의 제조를 위한 이러한 변형은 L-형 혹은 D-형 아미노산, 및/또는 비-천연형 아미노산을 이용한 변형; 및/또는 천연형 서열을 개질, 예를 들어 측쇄 작용기의 변형, 분자 내 공유결합, 예컨대, 측쇄 간 고리 형성, 메틸화, 아실화, 유비퀴틴화, 인산화, 아미노핵산화, 바이오틴화 등과 같이 개질함으로써 변형하는 것을 모두 포함한다. 또한, 상기 변형은 비 천연형 화합물로의 치환을 모두 포함한다.
- [0181] 또한, 천연형 글루카곤의 아미노 및/또는 카르복시 말단에 하나 또는 그 이상의 아미노산이 추가된 것을 모두 포함한다.
- [0182] 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.

- [0183] 아미노산 유도체도 마찬가지로 방식으로 입수할 수 있는데, 그 예를 일부만 들자면 4-이미다조아세트산 (4-imidazoacetic acid) 등을 사용할 수 있다.
- [0185] 글루카곤은 약 7의 pI를 가지고 있어서 생리학적 pH (pH 4-8)의 용액 중에서 불용성이고 중성 pH에서는 침전되는 경향이 있다. pH 3 이하의 수용액 중에서, 글루카곤은 초기에는 용해되지만 1시간 이내에 겔 형성으로 인해 침전된다. 겔화된 글루카곤은 주로 β -시트 피브릴로 이루어지고, 이렇게 침전된 글루카곤은 겔이 주사 바늘이나, 정맥으로 투여되는 경우, 혈관을 막히게 하기 때문에 주사제로 사용하기에 적합하지 않다. 침전 과정을 지연시키기 위하여, 산성(pH 2-4) 제형을 사용하는 것이 통상적인데, 이를 통해 단시간 동안 상대적으로 무응집 상태로 글루카곤을 유지할 수 있다. 그러나 글루카곤의 피브릴 형성이 낮은 pH에서 매우 신속하게 이루어지기 때문에 이러한 산성 제형은 조제 후 즉시 주사되어야만 한다.
- [0187] 본 발명의 글루카곤 유도체는 천연 글루카곤의 pI를 음전하 및 양전하를 띤 아미노산 잔기의 치환에 의해 변화시켜 연장된 작용 프로파일을 갖는 것으로 개발된 것을 포함하며, 이러한 유도체는 천연 글루카곤에 비해 변화된 pI를 가짐으로써 중성 pH에서 개선된 용해도 및/또는 높은 안정성을 나타낼 수 있는 것을 특징으로 한다.
- [0189] 하나의 구체적인 양태로서, 상기 글루카곤 또는 글루카곤 유도체는 하기 일반식 1의 아미노산 서열을 포함하는 펩타이드일 수 있다.
- [0191] X1-X2-QGTF-X7-SD-X10-S-X12-X13-X14-X15-X16-X17-X18-X19-X20-X21-F-X23-X24-W-L-X27-X28-X29-X30 (일반식 1, 서열번호: 46)
- [0193] 상기 식에서,
- [0194] X1은 히스티딘, 데스아미노-히스티딜(desamino-histidyl), 디메틸-히스티딜(N-dimethyl-histidyl), 베타-히드록시 이미다조프로피오닐(beta-hydroxy imidazopropionyl), 4-이미다조아세틸(4-imidazoacetyl), 베타-카르복시 이미다조프로피오닐(beta-carboxy imidazopropionyl), 트립토판, 또는 티로신이거나, 부존재하고;
- [0195] X2는 알파-메틸-글루탐산(α -methyl-glutamic acid), Aib(aminoisobutyric acid), D-알라닌, 글리신, Sar(N-methylglycine), 세린 또는 D-세린이며;
- [0196] X7은 트레오닌, 발린 또는 시스테인이고;
- [0197] X10은 티로신 또는 시스테인이고;
- [0198] X12는 리신 또는 시스테인이고;
- [0199] X13은 티로신 또는 시스테인이고;
- [0200] X14는 류신 또는 시스테인이고;
- [0201] X15는 아스파르트산, 글루탐산 또는 시스테인이고;
- [0202] X16은 글루탐산, 아스파르트산, 세린, 알파-메틸-글루탐산, 또는 시스테인이거나, 부존재하며;
- [0203] X17은 아스파르트산, 글루타민, 글루탐산, 리신, 아르기닌, 세린, 시스테인, 또는 발린이거나, 부존재하며;
- [0204] X18은 알라닌, 아스파르트산, 글루타민, 글루탐산, 아르기닌, 발린, 또는 시스테인이거나, 부존재하며;
- [0205] X19는 알라닌, 아르기닌, 세린, 발린, 또는 시스테인이거나, 부존재하며;
- [0206] X20은 리신, 히스티딘, 글루탐산, 글루타민, 아스파르트산, 아르기닌, 알파-메틸-글루탐산, 또는 시스테인이거나, 부존재하며;
- [0207] X21은 아스파르트산, 글루탐산, 류신, 발린, 또는 시스테인이거나, 부존재하며;

- [0208] X23은 이소류신, 발린, 또는 아르기닌이거나, 부존재하며;
- [0209] X24는 발린, 아르기닌, 알라닌, 시스테인, 글루탐산, 리신, 글루타민, 알파-메틸-글루탐산, 또는 류신이거나, 부존재하며;
- [0210] X27는 이소류신, 발린, 알라닌, 리신, 메티오닌, 글루타민, 또는 아르기닌이거나, 부존재하며;
- [0211] X28은 글루타민, 리신, 아스파라긴, 또는 아르기닌이거나, 부존재하며;
- [0212] X29는 리신, 알라닌, 글리신, 또는 트레오닌이거나, 부존재하며;
- [0213] X30은 시스테인이거나, 부존재할 수 있다.

- [0215] 보다 더 구체적으로는,
- [0216] 상기 일반식 1에서,
- [0217] X1이 히스티딘, 트립토판, 또는 티로신이거나, 부존재하고;
- [0218] X2가 세린 또는 Aib(aminoisobutyric acid)이며;
- [0219] X7은 트레오닌, 발린 또는 시스테인이고;
- [0220] X10은 티로신 또는 시스테인이고;
- [0221] X12는 리신 또는 시스테인이고;
- [0222] X13은 티로신 또는 시스테인이고;
- [0223] X14는 류신 또는 시스테인이고;
- [0224] X15는 아스파르트산, 또는 시스테인이고;
- [0225] X16은 글루탐산, 세린 또는 시스테인이며;
- [0226] X17은 아스파르트산, 글루탐산, 리신, 아르기닌, 세린, 시스테인, 또는 발린 이고;
- [0227] X18은 아스파르트산, 글루탐산, 아르기닌, 또는 시스테인이며;
- [0228] X19는 알라닌, 또는 시스테인이고;
- [0229] X20은 글루타민, 아스파르트산, 리신, 또는 시스테인이며;
- [0230] X21은 아스파르트산, 글루탐산, 류신, 발린, 또는 시스테인이고;
- [0231] X23은 이소류신, 발린 또는 아르기닌이며;
- [0232] X24는 발린, 아르기닌, 알라닌, 글루탐산, 리신, 글루타민, 또는 류신이고;
- [0233] X27는 이소류신, 발린, 알라닌, 메티오닌, 글루타민 또는 아르기닌이며;
- [0234] X28은 글루타민, 리신, 아스파라긴 또는 아르기닌이고;
- [0235] X29는 트레오닌이며;
- [0236] X30은 시스테인이거나, 부존재할 수 있다.

- [0238] 그 예로, 상기 펩타이드는 서열번호: 1 내지 44로 이루어진 군에서 선택된 아미노산 서열을 포함하는 것, 구체적으로 서열번호: 1 내지 44로 이루어진 군에서 선택된 아미노산 서열로 (필수적으로) 구성된 것 일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 다른 구체예로서, 본 발명의 펩타이드는 서열번호 2 내지 45로 이루어진 군에서 선택된 아미노산 서열을 포함하는 것, 또는 서열번호 2 내지 45로 이루어진 군에서 선택된 아미노산 서열로 (필수적으로) 구성된 것 일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0239] 또한, 본원에서 '특정 서열번호로 구성되는 펩타이드'라고 기재되어 있다 하더라도, 해당 서열번호의 아미노산 서열로 이루어진 펩타이드와 동일 혹은 상응하는 활성을 가지는 경우라면 해당 서열번호의 아미노산 서열 앞뒤

의 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 상동성 또는 동일성을 나타내며, 투여된 개체의 체내 장기 중 상기 펩타이드의 간에서의 분포도가 높다면, 본 발명의 범위에 속할 수 있다.

[0240] 그 예로, 특정 서열번호로 구성되는 펩타이드, 또는 특정 서열번호를 포함하는 펩타이드와 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, 투여된 개체의 체내 장기 중 상기 펩타이드의 간에서의 분포도가 높다면, 특정 서열로 제한되지 않는다.

[0242] 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. 용어 상동성 및 동일성은 종종 상호교환적으로 이용될 수 있다.

[0243] 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.

[0244] 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.

[0245] 이상의 내용은 본 발명의 다른 구체예 혹은 다른 양태에도 적용될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0247] 또 하나의 예로, 상기 펩타이드는 서열번호: 3, 11 내지 17, 19 내지 27, 29, 31, 33, 35 내지 44로 이루어진 군에서 선택된 아미노산 서열을 포함하는 것, 구체적으로 서열번호: 3, 11 내지 17, 19 내지 27, 29, 31, 33, 35 내지 44로 이루어진 군에서 선택된 아미노산 서열로 (필수적으로) 구성된 것 일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0249] 또 하나의 예로, 상기 펩타이드는 서열번호: 12, 14, 17, 19 내지 25, 27, 29, 33, 35 내지 38, 40 내지 42, 및 44로 이루어진 군에서 선택된 아미노산 서열을 포함하는 것, 구체적으로 서열번호: 12, 14, 17, 19 내지 25, 27, 29, 33, 35 내지 38, 및 40 내지 42, 44로 이루어진 군에서 선택된 아미노산 서열로 (필수적으로) 구성된 것 일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

- [0251] 또 하나의 예로, 상기 펩타이드는 서열번호 2 내지 13, 15, 17, 20 내지 24, 26 내지 30, 및 32 내지 44로 이루어진 군에서 선택된 아미노산 서열을 포함하는 것, 구체적으로 서열번호 2 내지 13, 15, 17, 20 내지 24, 26 내지 30, 및 32 내지 44로 이루어진 군에서 선택된 아미노산 서열로 (필수적으로) 구성된 것 일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0252] 또 하나의 예로, 상기 펩타이드는 서열번호 20, 22, 23, 27, 33, 35, 37, 38, 40, 41, 42, 및 44로 이루어진 군에서 선택된 아미노산 서열을 포함하는 것, 구체적으로 서열번호 20, 22, 23, 27, 33, 35, 37, 38, 40, 41, 42, 및 44로 이루어진 군에서 선택된 아미노산 서열로 (필수적으로) 구성된 것 일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0253] 또 하나의 예로, 상기 펩타이드는 서열번호 20, 22, 23, 27, 33, 37, 38, 및 44로 이루어진 군에서 선택된 아미노산 서열을 포함하는 것, 구체적으로 서열번호 20, 22, 23, 27, 33, 37, 38, 및 44로 이루어진 군에서 선택된 아미노산 서열로 (필수적으로) 구성된 것 일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0254]
- [0255] 또 하나의 예로, 상기 펩타이드는 서열번호: 14, 16, 18, 19, 25, 및 31로 이루어진 군에서 선택된 아미노산 서열을 포함하는 것, 구체적으로 서열번호: 14, 16, 18, 19, 25, 및 31로 이루어진 군에서 선택된 아미노산 서열로 (필수적으로) 구성된 것 일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0257] 하나의 구체예로, 간 표적 약물을 포함하는, 투여된 개체의 체내 장기 중 상기 약물의 간에서의 분포도가 높은, 약학적 조성물로서,
- [0258] 상기 간표적 약물은 하기 일반식 2의 아미노산 서열을 포함하는 펩타이드일 수 있다:
- [0260] Y-Aib-QGTF-X7-SD-X10-S-X12-Y-L-X15-X16-X17-R-A-X20-X21-F-V-X24-W-L-M-N-T-X30 (일반식 2, 서열번호: 47)
- [0262] 상기 일반식 2에서
- [0263] X7은 트레오닌(T), 발린(V) 또는 시스테인(C)이고;
- [0264] X10은 티로신(Y) 또는 시스테인(C)이고;
- [0265] X12는 리신(K) 또는 시스테인(C)이고;
- [0266] X15는 아스파르트산(D), 또는 시스테인(C)이고;
- [0267] X16은 글루탐산(E) 또는 세린(S)이며;
- [0268] X17은 리신(K) 또는 아르기닌(R)이고;
- [0269] X20은 글루타민(Q) 또는 리신(K)이며;
- [0270] X21은 아스파르트산(D), 또는 글루탐산(E)이고;
- [0271] X24는 발린(V) 또는 글루타민(Q)이고;
- [0272] X30은 시스테인(C)이거나, 부존재함
- [0273] (단, 상기 일반식 2의 아미노산 서열이 서열번호 12와 동일한 경우는 제외함).
- [0275] 그 예로, 상기 펩타이드는 서열번호 13, 15, 19, 33, 및 36 내지 45로 이루어진 군에서 선택된 아미노산 서열을 포함하는 것, 구체적으로 서열번호 13, 15, 19, 33, 및 36 내지 45로 이루어진 군에서 선택된 아미노산 서열로 (필수적으로) 구성된 것 일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0276]

- [0277] 구체적으로, 상기 일반식 2에서
- [0278] X7은 트레오닌, 발린 또는 시스테인이고;
- [0279] X10은 티로신 또는 시스테인이고;
- [0280] X12는 리신이고;
- [0281] X15는 아스파르트산이고;
- [0282] X16은 글루탐산 또는 세린이며;
- [0283] X17은 리신 또는 아르기닌이고;
- [0284] X20은 글루타민 또는 리신이며;
- [0285] X21은 아스파르트산 또는 글루탐산이고;
- [0286] X24는 글루타민이고;
- [0287] X30은 시스테인이거나, 부존재하는 것일 수 있으나, 특별히 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0288] 그 예로, 상기 펩타이드는 또 하나의 예로, 상기 펩타이드는 서열번호 33, 및 36 내지 44로 이루어진 군에서 선택되는 아미노산 서열을 포함하는 것, 구체적으로 서열번호 33, 및 36 내지 44로 이루어진 군에서 선택되는 아미노산 서열로 (필수적으로) 구성된 것 일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0289]
- [0290] 상술한 글루카곤 유도체는 분자 내 가교 (intramolecular bridge)를 포함할 수 있으며 (예컨대, 공유결합적 가교 또는 비공유결합적 가교), 구체적으로 고리를 포함하는 형태일 수 있다. 예컨대 글루카곤 유도체의 16번 및 20번 아미노산 사이에 고리가 형성된 형태일 수 있으나, 특별히 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0291] 상기 고리의 비제한적인 예로 락탐 가교 (또는 락탐 고리)를 포함할 수 있다.
- [0292] 또한, 상기 글루카곤 유도체는 고리를 포함하도록, 목적하는 위치에 고리를 형성할 수 있는 아미노산을 포함하도록 변형된 것을 모두 포함한다.
- [0293] 이러한 고리는 상기 글루카곤 유도체 내의 아미노산 곁 사슬 간에 형성될 수 있으며, 그 예로 리신의 곁 사슬과 글루탐산의 곁 사슬 간에 락탐 고리가 형성되는 형태일 수 있으나, 특별히 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0294] 예컨대, 상기 일반식 1 또는 일반식 2의 아미노산 서열을 포함하는 펩타이드는 일반식 1 또는 일반식 2의 X10과 X14, X12와 X16, X16과 X20, X17과 X21, X20과 X24, 및 X24와 X28의 아미노산 쌍에서, 각 아미노산 쌍의 아미노산이 각각 글루탐산 또는 리신으로 치환된 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 상기, X_n (n은 자연수)에서 n은 제시된 아미노산 서열의 N-말단으로부터의 아미노산 위치를 나타낸다.
- [0295] 또한, 상기 일반식 1 또는 일반식 2의 아미노산 서열을 포함하는 펩타이드는 X12와 X16의 아미노산 쌍, X16과 X20의 아미노산 쌍, 또는 X17과 X21의 아미노산 쌍의 아미노산 각각이 고리를 형성할 수 있는 글루탐산 또는 리신으로 치환된 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0296] 또한, 상기 일반식 1 또는 일반식 2에서, X10과 X14, X12와 X16, X16과 X20, X17과 X21, X20과 X24, 및 X24와 X28의 아미노산 쌍 중 적어도 하나의 아미노산 쌍에서 각 아미노산 쌍의 각각의 아미노산 간에 고리 (예컨대, 락탐 고리)를 형성한 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0297] 또한, 상기 일반식 1 또는 일반식 2에서, X16이 글루탐산이고, X20은 리신이며, X16과 X20의 측쇄가 락탐 고리를 형성하고 있는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0299] 또한, 상기 펩타이드는 천연형 글루카곤 대비 체내 반감기가 증가된 것일 수 있으나, 특별히 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0300]
- [0301] 또한, 본 발명에 따른 펩타이드는 N-말단 및/또는 C-말단이 변형되지 않은 것일 수 있으나, 생체 내의 단백질 절단 효소들로부터 보호하고 안정성을 증가시키기 위하여 이의 N-말단 및/또는 C-말단 등이 화학적으로 수식되

거나 유기단으로 보호되거나, 또는 펩타이드 말단 등에 아미노산이 추가되어 변형된 형태 역시 본 발명에 따른 펩타이드의 범주에 포함된다. C-말단이 변형되지 않은 경우, 본 발명에 따른 펩타이드의 말단은 카르복실기를 가지나, 특별히 이에 제한되는 것은 아니다.

- [0302] 또는 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.
- [0304] 본 명세서에서 따로 가리키는 바가 없으면, 본 발명에 따른 "펩타이드" 또는 이러한 펩타이드가 면역글로불린 Fc 영역에 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.
- [0306] 상기 염의 종류는 특별히 제한되지는 않는다. 다만, 개체, 예컨대 포유류에게 안전하고 효과적인 형태인 것이 바람직하나, 특별히 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0307] 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.
- [0308] 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-설폰산, 타르타르산, 아세트산, 시트르산, 메탄설폰산, 포름산, 벤조산, 말론산, 나프탈렌-2-설폰산, 벤젠설폰산 등을 들 수 있다. 적합한 염기로부터 유도된 염은 나트륨, 칼륨 등의 알칼리 금속, 마그네슘 등의 알칼리 토금속, 및 암모늄 등을 포함할 수 있다.
- [0309] 또한, 본 발명에서 사용된 용어 "용매화물"은 본 발명에 따른 펩타이드, 결합체, 또는 이의 염이 용매 분자와 복합체를 형성한 것을 말한다.
- [0310]
- [0311] 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.
- [0312] 하나의 구체예로, 상기 펩타이드는 C-말단이 아미드화되어 있는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0313] 하나의 구체예로, 상기 펩타이드는 비당쇄화된 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0315] 본 발명의 펩타이드는 Solid phase 합성법을 통하여 합성될 수 있으며, 제조합 방법으로도 생산 가능하고, 상업적으로 의뢰하여 제조할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0317] 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.
- [0318] 구체적으로, 본 발명의 펩타이드는 표준 합성 방법, 제조합 발현 시스템, 또는 임의의 다른 당해 분야의 방법에 의해 제조될 수 있다. 따라서, 본 발명에 따른 펩타이드는, 예를 들어 하기를 포함하는 방법을 포함하는 다수의 방법으로 합성될 수 있다:
- [0319] (a) 펩타이드를 고체상 또는 액체상 방법의 수단으로 단계적으로 또는 단편 조립에 의해 합성하고, 최종 펩타이드 생성물을 분리 및 정제하는 방법; 또는
- [0320] (b) 펩타이드를 인코딩하는 핵산 작제물을 숙주세포 내에서 발현시키고, 발현 생성물을 숙주 세포 배양물로부터 회수하는 방법; 또는

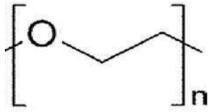
- [0321] (c) 펩타이드를 인코딩하는 핵산 작제물의 무세포 시험관 내 발현을 수행하고, 발현 생성물을 회수하는 방법; 또는
- [0322] (a), (b) 및 (c)의 임의의 조합으로 펩타이드의 단편을 수득하고, 이어서 단편을 연결시켜 펩타이드를 수득하고, 당해 펩타이드를 회수하는 방법.
- [0324] 또한, 상기 일반식 1 또는 일반식 2의 아미노산 서열을 포함하는 펩타이드, 또는 글루카곤 유도체는 이의 생체 내 반감기를 증가시키는 생체적합성 물질부에 결합된, 지속형 결합체 형태일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 본 명세서에서 상기 생체적합성 물질부는 캐리어와 혼용될 수 있다.
- [0325] 상기 지속형 결합체 형태의 일반식 1 또는 일반식 2의 아미노산 서열을 포함하는 펩타이드 (결합체 형태), 또는 일반식 1 또는 일반식 2의 아미노산 서열을 포함하는 펩타이드 그 자체는 간 표적 약물로, 투여된 개체의 체내 장기 중 상기 약물의 간에서의 분포도가 높은, 약학적 조성물의 유효성분이다.
- [0326] 본 발명에서 용어, "지속형 결합체"는 생리활성물질 (예, 글루카곤 유도체)에 생체적합성 물질부 또는 캐리어가 결합된 형태로서, 구체적으로, 상기 결합체는 펩타이드 부위 및 상기 펩타이드 부위에 공유결합으로 연결된 생체적합성 물질부를 포함하며, 상기 펩타이드 부위는 상기 일반식 1 또는 일반식 2의 아미노산 서열 또는 서열번호 2 내지 11, 및 13 내지 45와 동일한 서열이거나 이를 포함하는 서열일 수 있다. 상기 지속형 결합체에서 생체적합성 물질부 또는 캐리어는 생리활성물질에 공유결합으로 연결된 것일 수 있으나, 특별히 이에 제한되지 않는다.
- [0328] 본 발명에서 상기 펩타이드의 결합체는 캐리어가 결합되지 않은 상기 펩타이드에 비하여 증가된 효력의 지속성 및/또는 혈중 반감기 증대를 나타낼 수 있으며, 본 발명에서는 이러한 결합체를 "지속형 결합체"로 지칭한다.
- [0329] 한편, 이러한 결합체는 비자연적인 (non-naturally occurring) 것일 수 있다.
- [0331] 본 발명의 구체적인 실시 형태에서, 상기 지속형 결합체는 글루카곤 유도체에 면역글로불린 Fc 영역이 서로 연결된 형태를 지칭한다. 구체적으로, 상기 결합체는 글루카곤 유도체에 면역글로불린 Fc 영역이 링커를 통하여 공유결합적으로 연결된 것일 수 있으나, 특별히 이에 제한되지 않는다.
- [0332] 하나의 구체예로, 상기 면역글로불린 Fc 영역과 X는 당쇄화되어 있지 않을 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0334] 본 발명의 하나의 구체예에서, 상기 지속형 결합체는 하기 화학식 1로 표시되는, 결합체이다:
- [0335] [화학식 1]
- [0336] X - L - F
- [0337] 여기서,
- [0338] X는, 상기 펩타이드이고;
- [0339] L은 에틸렌글리콜 반복 단위를 함유하는 링커이며;
- [0340] F는 면역글로불린 Fc 영역이고,
- [0341] -는 X와 L 사이, L과 F 사이의 공유결합 연결을 나타낸다.
- [0343] 상기 화학식 1의 지속형 결합체의 X는 상술한 글루카곤 유도체일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0344] 하나의 구체예로, 상기 화학식 1의 지속형 결합체의 X는 상기 일반식 2의 아미노산 서열을 포함하는 펩타이드일 수 있다.
- [0345] 구체적으로, 상기 X는 서열번호 13, 15, 19, 33, 및 36 내지 45로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나의 서열 번호의 아미노산 서열을 포함하는 펩타이드일 수 있고, 또는 서열번호 33 및 36 내지 44로 이루어진 군에서 선

택된 어느 하나의 서열번호의 아미노산 서열을 포함하는 펩타이드일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

- [0347] 또 하나의 예로, 상기 X는 일반식 1의 아미노산 서열을 포함하는 펩타이드일 수 있고, 또는, 상기 X는 서열번호 2 내지 45 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하는 펩타이드, 또는 서열번호 2 내지 11 및 13 내지 45 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하는 펩타이드일 수 있고, 또는, 상기 X는 서열번호 20, 22, 23, 27, 33, 35, 37, 38, 40, 41, 42, 및 44로 이루어진 군에서 선택되는 아미노산 서열을 포함하는 펩타이드일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0349] 상기 결합체에서 F는 X, 즉 간 표적 약물, 구체적으로 글루카곤 수용체에 대해 활성을 갖는 펩타이드로서, 본 발명의 상기 결합체를 구성하는 모이어티의 일 구성에 해당한다. 상기 간 표적 약물은 앞서 기술한 바가 모두 적용된다. 상기 F는 X와 공유 화학결합 또는 비공유 화학결합으로 서로 결합되는 것일 수 있으며, 공유 화학결합, 비공유 화학결합 또는 이들의 조합으로 L을 통하여 F와 X가 서로 결합되는 것일 수 있다.
- [0350] 본 발명에서 용어 "화학식 1의 지속형 결합체"는 글루카곤 유도체 및 면역글로불린 Fc 영역이 서로 링커로 연결된 형태로, 상기 결합체는 면역글로불린 Fc 영역이 결합되지 않은 글루카곤 유도체에 비하여 증가된 효력의 지속성을 나타낼 수 있다.
- [0352] 상기 지속형 결합체에서 F는 X, 즉 글루카곤 유도체의 반감기를 증가시킬 수 있는 물질로서, 본 발명의 상기 결합체를 구성하는 모이어티의 일 구성에 해당한다.
- [0354] 화학식 1의 지속형 결합체에 있어서 글루카곤 유도체인 펩타이드인 X와 면역글로불린 Fc 영역의 연결은 물리 또는 화학 결합이거나, 비공유 또는 공유 결합일 수 있으며, 구체적으로 공유 결합일 수 있으나 이에 제한되지 않는다.
- [0355] 또한, 화학식 1의 지속형 결합체의 글루카곤 유도체인 X와 면역글로불린 Fc 영역의 연결 방법은 특별히 제한되지 않으나, 링커를 통해 글루카곤 유도체와 면역글로불린 Fc 영역이 서로 연결된 것일 수 있다.
- [0356] 상기 화학식 1에서 공유결합으로 L을 통하여 X와 F가 서로 결합될 수 있다.
- [0357] 보다 구체적으로, X와 L, 및 L과 F는 공유결합으로 서로 연결될 수 있으며, 이때 상기 결합체는 화학식 1의 순서로, X, L, 및 F가 공유결합을 통하여 각각 연결된 결합체일 수 있다.
- [0358] 또한, 상기 X는 F는 링커(L)를 통해 연결된 것일 수 있다.
- [0359]
- [0360] 한편, 상기 L은 비펩타이드성 링커, 예를 들어 에틸렌글리콜 반복 단위를 함유하는 링커일 수 있다.
- [0361] 본 발명에서 "비펩타이드성 링커"는 반복 단위가 2개 이상 결합된 생체 적합성 중합체를 포함한다. 상기 반복 단위들은 펩타이드 결합이 아닌 임의의 공유결합을 통해 서로 연결된다. 상기 비펩타이드성 링커는 본 발명의 결합체의 모이어티를 이루는 일 구성일 수 있으며, 상기 화학식 1에서 L에 해당된다. 본 발명에서 사용될 수 있는 비펩타이드성 링커는 생체 내 단백질 분해 효소에 저항성 있는 중합체이면 제한 없이 사용될 수 있다. 본 발명에서 상기 비펩타이드성 링커는 비펩타이드성 중합체와 혼용되어 사용될 수 있다.
- [0362] 특별히 이에 제한되지 않으나, 상기 비펩타이드성 링커는 에틸렌글리콜 반복 단위를 함유하는 링커, 예를 들어, 폴리에틸렌 글리콜일 수 있고, 또한, 당해 분야에 이미 알려진 이들의 유도체 및 당해 분야의 기술 수준에서 용이하게 제조할 수 있는 유도체들도 본 발명의 범위에 포함된다.
- [0363] 상기 비펩타이드성 링커의 반복 단위는 에틸렌글리콜 반복 단위일 수 있고, 구체적으로, 상기 비펩타이드성 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.

[0364] 구체적으로, 상기 링커는 하기 화학식 2로 표시되는 폴리에틸렌글리콜(PEG)일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다:

[0365] [화학식 2]



[0366]

[0367] 여기서, n= 10 내지 2400, n= 10 내지 480, 또는 n = 50 내지 250이나, 이에 제한되지 않는다.

[0368] 상기 지속형 결합체에서 PEG 모이어티는, $-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n$ -구조 뿐만 아니라 연결 요소와 이 $-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n$ - 사이에 개재하는 산소 원자도 포함할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0369] 하나의 구체예로 상기 에틸렌글리콜 반복단위는 그 예로, $[\text{OCH}_2\text{CH}_2]_n$ 로 표시될 수 있으며, n 값은 자연수로 상기 펩타이드 결합체 내의 $[\text{OCH}_2\text{CH}_2]_n$ 부위의 평균 분자량, 예컨대 수평균 분자량이 0 초과 내지 약 100 kDa이 되도록 정해질 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 또 하나의 예로, 상기 n 값은 자연수로 상기 펩타이드 결합체 내의 $[\text{OCH}_2\text{CH}_2]_n$ 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.

[0371] 또한, 하나의 구체적인 실시 형태에서 상기 화학식 1의 지속형 결합체는 일반식 2의 아미노산 서열을 포함하는 펩타이드(X)와 면역글로불린 영역(F)이 에틸렌글리콜 반복 단위를 함유하는 링커를 통해 공유 결합으로 연결된 구조 일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0373] 상기 폴리에틸렌 글리콜은, 에틸렌 글리콜 동중 중합체, PEG 공중합체, 또는 모노메틸-치환된 PEG 중합체 (mPEG)의 형태를 모두 포괄하는 용어이나, 특별히 이에 제한되는 것은 아니다.

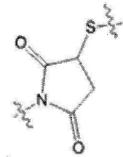
[0374] 상기 비펩타이드성 중합체의 분자량은 1 내지 100 kDa 범위, 구체적으로 1 내지 20 kDa 범위, 또는 1 내지 10 kDa 범위이나, 이에 제한되지 않는다. 또한, 상기 F에 해당하는 폴리펩타이드와 결합되는 본 발명의 비펩타이드 성 링커는 한 종류의 중합체뿐만 아니라 상이한 종류의 중합체들의 조합이 사용될 수도 있다.

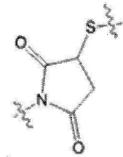
[0375] 하나의 구체예로, 상기 링커의 양 말단은 면역글로불린 Fc 영역의 티올기, 아미노기, 하이드록실기 및 펩타이드(X)의 티올기, 아미노기, 아지드기, 하이드록실기에 결합할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0376] 구체적으로, 상기 링커는 양쪽 말단에 각각 면역글로불린 Fc 영역 및 펩타이드(X)와 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.

[0377] 보다 구체적으로, 상기 링커의 반응기는 알데히드 그룹, 말레이미드 그룹 및 석시니미드 유도체로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

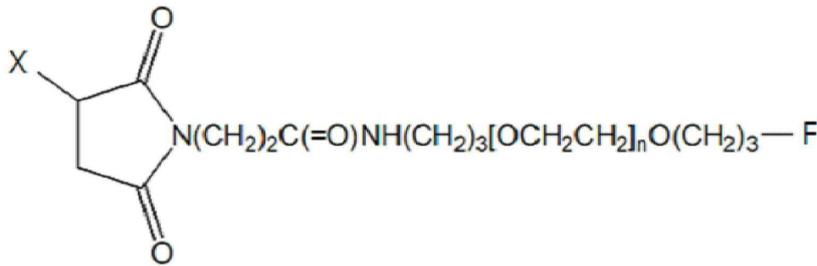
- [0379] 상기에서, 알데히드기(알데히드 그룹)로 프로피온 알데히드기 또는 부틸 알데히드기를 예로서 들 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0380] 상기에서, 석시니미드 유도체로는 석시니미딜 발레르에이트, 석시니미딜 메틸부타노에이트, 석시니미딜 메틸프로피온에이트, 석시니미딜 부타노에이트, 석시니미딜 프로피오네이트, N-하이드록시석시니미드, 히드록시 석시니미딜, 석시니미딜 카르복시메틸 또는 석시니미딜 카보네이트가 이용될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0381] 상기 링커는 상기와 같은 반응기를 통해 면역글로불린 Fc 영역인 F 및 펩타이드(글루카곤 유도체)인 X에 연결되어, 링커 연결부로 전환될 수 있다.
- [0382] 또한, 알데히드 결합에 의한 환원성 아민화 (또는 환원성 알킬화)로 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 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0383] 또한, 본 발명의 링커의 양쪽 말단의 반응기는 서로 동일하거나 또는 서로 상이할 수 있다. 상기 링커는 말단에 알데히드 그룹 반응기를 갖는 것일 수 있고, 또한 상기 링커는 말단에 각각 알데히드 그룹 및 말레이미드 반응기를 가지거나, 말단에 각각 알데히드 그룹 및 석시니미드 반응기를 가질 수 있으나, 링커의 각 말단에 F, 구체적으로 면역글로불린 Fc 영역과 X가 결합될 수 있다면, 이에 제한되지 않는다.
- [0384] 예를 들어, 한쪽 말단에는 말레이미드 그룹을, 다른 쪽 말단에는 알데히드 그룹, 프로피온 알데히드 그룹 또는 부틸 알데히드 그룹을 가질 수 있다. 또 한 가지 예로, 한쪽 말단에는 석시니미딜 그룹을, 다른 쪽 말단에는 프로피온 알데히드 그룹 또는 부틸 알데히드 그룹을 가질 수 있다.
- [0385] 프로피온쪽 말단에 하이드록시 반응기를 갖는 폴리에틸렌 글리콜을 링커로 이용하는 경우에는, 공지의 화학반응에 의해 상기 하이드록시기를 상기 다양한 반응기로 활성화하거나, 상업적으로 입수가 가능한 변형된 반응기를 갖는 폴리에틸렌 글리콜을 이용하여 본 발명의 결합체를 제조할 수 있다.
- [0386] 하나의 구체적인 실시 형태에서 상기 링커의 반응기가 펩타이드 (X)의 시스테인 잔기, 보다 구체적으로 시스테인의 -SH 기에 연결되는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0387] 만약, 말레이미드-PEG-알데히드를 사용하는 경우, 말레이미드 기는 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.
- [0388] 이와 같은 환원적 알킬화를 통하여 PEG의 한쪽 말단에 위치한 산소 원자에 면역글로불린 Fc 영역의 N-말단 아미노기가 -CH₂CH₂CH₂-의 구조를 가지는 링커 작용기를 통해 서로 연결되어, -PEG-O-CH₂CH₂CH₂NH-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.
- [0389] 그러나, 상술한 예에 특별히 제한되는 것은 아니며, 이는 하나의 일례에 해당한다.
- [0390] 또한, 상기 결합체에서, 링커의 반응기가 면역글로불린 Fc 영역의 N-말단에 위치한 -NH₂와 연결된 것일 수 있으나, 이는 하나의 일례에 해당한다.
- [0391] 또한, 상기 결합체에서, 본 발명에 따른 펩타이드는 반응기를 갖는 링커와 C-말단을 통해 연결될 수 있으나, 이는 하나의 일례에 해당한다.
- [0392] 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.

[0394] 하나의 구체예로, 상기 화학식 1의 결합체는 하기 화학식 3의 구조를 가질 수 있다.

[0395] [화학식 3]



[0396] 상기 화학식 3에서 X는 상기에서 설명한 펩타이드(글루카곤 유도체)이고;

[0398] F는 사람 면역글로불린 Fc 영역이며;

[0399] n은 자연수일 수 있다. 이때, n에 대한 설명은 상기에서 설명한 바와 같다.

[0401] 하나의 구체예로, 상기 화학식 3의 지속형 결합체는 펩타이드 X와 사람 면역글로불린 Fc 영역 F가 에틸렌글리콜 반복부를 개재하여 공유결합으로 연결된 구조로서, 각각 X는 화학식 3의 숙신이미드 고리에, F는 화학식 3의 옥시프로필렌기에 연결되는 형태일 수 있다..

[0402] 상기 화학식 3에서, 상기 n의 값은 상기 펩타이드 결합체 내 [OCH₂CH₂]_n 부위의 평균 분자량, 예컨대 수평균 분자량이 1 내지 100 kDa, 또는 1 내지 20 kDa 또는 10 kDa이 되도록 정해지는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0403] 한 실시 형태에서 화학식 3의 숙신이미드 고리에 X가 연결되는 부위는 X의 C-말단 시스테인의 황 원자일 수 있다.

[0404] F 내에서 상기 옥시프로필렌기에 연결되는 부위는 특별히 한정되지 않는다. 본 발명의 한 실시 형태에서 상기 옥시프로필렌기에 연결되는 F의 부위는 N-말단 질소 또는 F 내부 잔기의 질소 원자(예컨대 리신의 입실론 질소)일 수 있다. 본 발명의 한 구체적인 실시 형태에서, F가 상기 옥시프로필렌기에 연결되는 부위는 F의 N-말단 프롤린일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0405] 또한, 상기 결합체에서, 비펩타이드성 중합체의 반응기가 면역글로불린 Fc 영역의 N-말단에 위치한 -NH₂와 연결된 것일 수 있으나, 이는 하나의 일례에 해당한다.

[0407] 구체적인 예로, 상기 화학식 1의 F는 면역글로불린 Fc 영역이다. 그 예로, 상기 면역글로불린 Fc 영역은 IgG 유래 일 수 있으나, 특별히 이에 제한되지 않는다.

[0408] 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 지속형 결합체의 모이어티를 이루는 일 구성일 수 있다. 상기 면역글로불린 Fc 영역은 "면역글로불린 Fc 단편" 과 혼용되어 사용될 수 있다.

[0409] 본 명세서에서 Fc 영역이라고 하면 면역글로불린의 과파인 소화에서 얻는 천연형 서열뿐 아니라 그 유도체, 예컨대 천연 서열 중의 하나 이상의 아미노산 잔기가 결실, 삽입, 비보전적 또는 보전적 치환 또는 이들의 조합에 의하여 변환되어 천연형과 상이하게 된 서열등 변형체까지 망라하여 포함된다. 상기 유도체, 치환체, 변형체는 FcRn에 결합하는 능력을 보유하는 것을 전체로 한다. 본 발명에서, F는 사람 면역글로불린 영역일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 상기 F는 2개의 폴리펩타이드 사슬이 이황화결합으로 연결되어 있는 구조이며, 상기 두 사슬 중 한 사슬의 질소 원자를 통해서만 연결되어 있는 구조일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 상기 질소

원자를 통한 연결은 리신의 입실론 아미노 원자나 N-말단 아미노기에 환원적 아민화를 통하여 연결될 수 있다.

- [0410] 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.
- [0411] 하나의 구체예로, 상기 F는 그 N-말단 프롤린의 질소 원자를 통하여 연결된 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0413] 이러한 면역글로불린 Fc 영역은 중쇄 불변영역에 힌지(hinge) 부분을 포함할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0414] 본 발명에서, 면역글로불린 Fc 영역은 N-말단에 특정 힌지 서열을 포함할 수 있다.
- [0415] 본 발명의 용어, “힌지 서열”은 중쇄에 위치하여 이황화결합(inter disulfide bond)를 통하여 면역글로불린 Fc 영역의 이량체를 형성하는 부위를 의미한다.
- [0416] 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:
- [0417] Glu-Ser-Lys-Tyr-Gly-Pro-Pro-Cys-Pro-Ser-Cys-Pro(서열번호 50).
- [0418] 상기 힌지 서열은 서열번호 50의 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 51), Glu-Ser-Lys-Tyr-Gly-Pro-Pro-Cys-Pro-Ser-Pro(서열번호 52), Glu-Ser-Lys-Tyr-Gly-Pro-Pro-Cys-Pro-Ser(서열번호 53), Glu-Ser-Lys-Tyr-Gly-Pro-Pro-Cys-Pro-Pro(서열번호 54), Lys-Tyr-Gly-Pro-Pro-Cys-Pro-Ser(서열번호 55), Glu-Ser-Lys-Tyr-Gly-Pro-Pro-Cys(서열번호 56), Glu-Lys-Tyr-Gly-Pro-Pro-Cys(서열번호 57), Glu-Ser-Pro-Ser-Cys-Pro(서열번호 58), Glu-Pro-Ser-Cys-Pro(서열번호 59), Pro-Ser-Cys-Pro(서열번호 60), Glu-Ser-Lys-Tyr-Gly-Pro-Pro-Ser-Cys-Pro(서열번호 61), Lys-Tyr-Gly-Pro-Pro-Pro-Ser-Cys-Pro(서열번호 62), Glu-Ser-Lys-Tyr-Gly-Pro-Ser-Cys-Pro(서열번호 63), Glu-Ser-Lys-Tyr-Gly-Pro-Pro-Cys(서열번호 64), Lys-Tyr-Gly-Pro-Pro-Cys-Pro(서열번호 65), Glu-Ser-Lys-Pro-Ser-Cys-Pro(서열번호 66), Glu-Ser-Pro-Ser-Cys-Pro(서열번호 67), Glu-Pro-Ser-Cys(서열번호 68), Ser-Cys-Pro(서열번호 69).
- [0419] 더욱 구체적으로는 상기 힌지 서열은 서열번호 60(Pro-Ser-Cys-Pro)또는 서열번호 69(Ser-Cys-Pro)의 아미노산 서열을 포함하는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0420] 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.
- [0421] 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.
- [0423] 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.
- [0424] 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 영역

의 일부)와의 조합 (예, CH2 도메인 및 CH3 도메인과 힌지 영역 또는 그 일부와의 조합, 그리고 상술한 조합을 가지는 폴리펩타이드 두 개의 이량체 형태), 6) 중쇄 불변영역 각 도메인과 경쇄 불변영역의 이량체일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

- [0425] 본 발명에서, 상기 면역글로불린 Fc 영역은 동일한 기원의 도메인으로 이루어진 단쇄 면역글로불린들로 구성된, 이량체 또는 다량체 형태일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0426] 또한, 하나의 구체예로서, 상기 면역글로불린 Fc 영역은 이량체 형태 (dimeric form)일 수 있으며, 이량체 형태의 하나의 Fc 영역에 X 한 분자가 공유결합적으로 연결될 수 있으며, 이때 상기 면역글로불린 Fc와 X는 비펩타이드성 중합체에 의해 서로 연결될 수 있다. 한편, 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.
- [0427] 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.
- [0428] 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.
- [0429] 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.
- [0430] 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.
- [0431] 상기 기술한 Fc 유도체는 본 발명의 Fc 영역과 동등한 생물학적 활성을 나타내며 Fc 영역의 열, pH 등에 대한 구조적 안정성을 증대시킨 것일 수 있다.
- [0432] 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. 과과인을 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.
- [0433] 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.
- [0434] 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.

- [0435] 한편, 면역글로불린 Fc 영역은 인간 또는 소, 염소, 돼지, 마우스, 래빗, 햄스터, 랫트, 기니아 피그 등의 동물기원일 수 있으며, 더 구체적인 실시 형태에서는 인간기원이다.
- [0436] 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.
- [0437] 또한, 하나의 구체적인 실시 형태에서, 면역글로불린 Fc 영역은 인간 IgG4 Fc의 영역으로서, 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 영역은 서열번호 70의 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.
- [0438] 상기 화학식 1의 F는 서열번호 70의 아미노산 서열인 단량체를 포함하는 것일 수 있으며, 상기 F는 서열번호 70의 아미노산 서열의 단량체의 동종이량체일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0439] 하나의 예로, 면역글로불린 Fc 영역은 서열번호 71의 아미노산 서열 (442개의 아미노산으로 구성됨)을 포함하는 동종이량체일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0441] 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.
- [0442] 또한, 상술한 결합체는 효력의 지속성이 천연형 글루카곤에 비해, 또는 F가 수식되지 않은 X에 비해 증가된 것일 수 있으며, 이러한 결합체는 상술한 형태뿐만 아니라, 생분해성 나노파티클에 봉입된 형태 등을 모두 포함한다.
- [0444] 상기 간 표적 약물을 포함하는 조성물, 예컨대 상기 펩타이드 (예컨대 상기 펩타이드 자체 또는 이에 면역글로불린 Fc 영역이 결합된 지속형 결합체 형태)를 포함하는 조성물은 간에서의 약물 작용이 필요한 질환 질환의 예방 또는 치료용일 수 있다.
- [0445] 본 발명에서 용어 "예방"은 상기 간 표적 약물을 포함하는 조성물의 투여로 간에서의 약물 작용이 필요한 질환의 발병을 억제 또는 지연시키는 모든 행위를 의미하며, "치료"는 상기 간 표적 약물을 포함하는 조성물의 투여로 간에서의 약물 작용이 필요한 질환의 증세가 호전되거나 이롭게 되는 모든 행위를 의미한다.
- [0446] 본 발명에서 용어 "투여"는 어떠한 적절한 방법으로 환자에게 소정의 물질을 도입하는 것을 의미하며, 상기 조성물의 투여 경로는 특별히 이에 제한되지 않으나, 상기 조성물이 생체 내 표적에 도달할 수 있는 어떠한 일반적인 경로를 통하여 투여될 수 있으며, 예를 들어 복강 내 투여, 정맥 내 투여, 근육 내 투여, 피하 투여, 피내 투여, 경구 투여, 국소 투여, 비 내 투여, 폐 내 투여, 또는 직장 내 투여 등이 될 수 있다.
- [0447] 본 발명에서 용어, "간에서의 약물 작용이 필요한 질환"은 본 발명에 따른 간 표적 약물이 치료적 활성을 나타낼 수 있는 질환으로, 간 조직에 투여된 약물의 분포도가 높아짐으로써 예방 또는 치료 효과를 나타낼 수 있는 질환을 말한다. 예컨대, 간 질환, 저혈당 또는 선천성 고인슐린증일 수 있으나, 특별히 이에 제한되는 것은 아니며, 본 발명의 간 표적 약물이 표적화하여 치료될 수 있는 질환은 제한없이 포함된다.
- [0448] 국제공개특허 WO 2020/263063에서 개시된 바와 같이, 글루카곤 수용체에 활성을 갖는 펩타이드 또는 이의 지속

형 결합체는 대사성 간질환, 단순 지방증, 비알코올성 지방간, 간 염증, 비알코올성 지방간염, 담즙정체성 간질환, 간 섬유증, 간경변, 간 부전 및 간암 등, 간 질환에 효과가 우수하다. 이에, 본 발명의 간 조직으로의 표적화가 우수한 간표적 약물인, 글루카곤 수용체에 활성을 갖는 펩타이드 또는 이의 지속형 결합체는 상기 간질환에 예방 또는 치료 효과 역시 존재하여, 간 질환 치료제로서도 효과적으로 제공될 수 있다.

- [0450] 본 발명에서, “간질환”은 간에서 발병하는 질환을 의미하는 것으로, 비알코올성 지방간 질환 (nonalcoholic fatty liver disease, NAFLD), 간 섬유증 (liver fibrosis), 간 염증(liver inflammation), 간경변(liver cirrhosis), 간부전 (liver decompensation), 간암(hepatocellular carcinoma), 및 담즙정체성 간질환 (cholestasis liver disease)으로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나일 수 있다. 그 예로, 상기 비알코올성 지방간 질환은 간세포에 지방의 과도한 축적만 있는 단순 지방증(simple steatosis), 비알코올성 지방간 (nonalcoholic fatty liver), 간세포 괴사와 염증과 섬유화를 동반하는 비알코올성 지방간염(nonalcoholic steatohepatitis, NASH) 등을 포함하는 일련의 질환군일 수 있으며, 상기 담즙정체성 간질환은 원발성 담즙성 경변증 (Primary biliary cirrhosis), 원발성 경화성 담관염(primary sclerosing cholangitis) 또는 이들의 조합일 수 있으나, 간의 조직 및 기능에 이상이 생기는 한, 간질환이 상기 질병으로 제한되는 것은 아니다.
- [0451] 본 발명에서 용어 “저혈당”은 혈중 당량이 정상인보다 낮은 상태를 말한다. 통상 혈당이 50 mg/dl 이하일 때를 말하나, 특별히 이에 제한되는 것은 아니다. 저혈당증이 생기는 흔한 원인은 경구용 혈당강하제나 인슐린을 사용하는 사람이 평소보다 음식 섭취량이 적거나 활동량이나 운동량이 과한 경우이다. 이외에도 음주나 일부 혈당을 떨어뜨리는 약물의 사용, 중증의 신체적 질환, 부신피질호르몬이나 글루카곤 등의 호르몬 결핍, 인슐린 생성 췌장 종양, 인슐린에 대한 자가면역질환이 있는 경우, 위절제술 환자, 유전성 탄수화물 대사효소이상 질환 등에 의해서도 저혈당이 발생할 수 있다.
- [0452] 본 발명에서 상기 저혈당은 급성 저혈당 및 만성 저혈당을 모두 포함한다.
- [0453] 저혈당의 증상은 기운이 없고 몸의 떨림이 있으며, 창백, 식은땀, 현기증, 흥분, 불안감, 가슴 두근거림, 공복감, 두통, 피로감 등을 포함한다. 저혈당이 오래 지속되면 경련이나 발작이 있을 수 있고 쇼크상태가 초래되어 의식을 잃을 수도 있다.
- [0454] 보다 구체적으로, 상기 저혈당은 유전적 결합에 따른 지속성 고인슐린증에 의해 유발될 수 있다. 유전적 결합에 의한 고인슐린증의 원인으로는 11p15.1 염색체에 있는 SUR 또는 Kir6.2 유전자의 돌연변이, 7p15-p13 염색체에 있는 GK (glucokinase) 유전자 돌연변이로 GK 활성도가 증가, GDH (Glutamate dehydrogenase) 유전자 돌연변이로 GDH가 활성화 되고 이로 인하여 베타 세포 내 ATP가 증가 등이 알려져 있다.
- [0455] 한편, 선천성 고인슐린증 (congenital hyperinsulnism)은 신생아와 소아에서 발생하는 심각하고 지속적인 저혈당을 일으키는 원인 질환 중 하나이다. 저체중 출생아 혹은 당뇨 산모의 출생아에서 일시적인 인슐린 분비 증가, 유전자 돌연변이로 인한 췌장 세포의 이상 기능 등으로 유발될 수 있다.
- [0456] 한편 간은 저장하고 있는 글리코겐 (glycogen)의 분해 (glycogenolysis) 및 포도당신생합성 (gluconeogenesis)을 통해 글루코스를 생산할 수 있다고 알려져 있다. 따라서 저혈당 발생 시, 간에서의 글리코겐 분해 및 포도당신생합성을 유발할 수 있는 약학적 조성물, 가령 글루카곤 및 이를 포함하는 결합체 등을 간으로 표적할 수 있다면 보다 효과적인 저혈당의 개선 및 혈당 정상화를 기대할 수 있을 것이다.
- [0458] 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.
- [0459] 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.
- [0460] 본 발명의 펩타이드를 포함한 약학적 조성물은 약학적으로 허용가능한 담체를 추가로 포함할 수 있다. 상기 담체는 특별히 이에 제한되지는 않으나, 경구 투여 시에는 결합체, 활택제, 봉해제, 부형제, 가용화제, 분산제, 안정화제, 현탁화제, 색소, 향료 등을 사용할 수 있고, 주사제의 경우에는 완충제, 보존제, 무통화제, 가용화제, 등장화제, 안정화제 등을 혼합하여 사용할 수 있으며, 국소투여용의 경우에는 기제, 부형제, 윤활제,

보존제 등을 사용할 수 있다.

- [0461] 본 발명의 조성물의 제형은 상술한 바와 같은 약학적으로 허용가능한 담체와 혼합하여 다양하게 제조될 수 있다. 예를 들어, 경구 투여 시에는 정제, 트로키, 캡슐, 엘릭서, 서스펜션, 시럽, 웨이퍼 등의 형태로 제조할 수 있으며, 주사제의 경우에는 단위 투약 앰플 또는 다수회 투약 형태로 제조할 수 있다. 기타, 용액, 현탁액, 정제, 환약, 캡슐, 서방형 제제 등으로 제형화할 수 있다.
- [0462] 한편, 제제화에 적합한 담체, 부형제 및 희석제의 예로는 락토스, 텍스트로스, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로스, 메틸 셀룰로스, 미정질 셀룰로스, 폴리비닐피롤리돈, 물, 메틸하이드록시벤조에이트, 프로필하이드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 또는 광물유 등이 사용될 수 있다. 또한, 충전제, 항응집제, 윤활제, 습윤제, 향료, 방부제 등을 추가로 포함할 수 있다.
- [0463] 또한, 본 발명의 약학적 조성물은 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제, 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제, 멸균된 수용액, 비수성용제, 동결건조제 및 좌제로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나의 제형을 가질 수 있다.
- [0464] 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.
- [0465] 또한, 상기 결합체는 생리식염수 또는 유기용매와 같이 약제로 허용된 여러 전달체(carrier)와 혼합하여 사용될 수 있고, 안정성이나 흡수성을 증가시키기 위하여 글루코스, 수크로스 또는 텍스트란과 같은 탄수화물, 아스코르브산(ascorbic acid) 또는 글루타티온과 같은 항산화제(antioxidants), 킬레이트제, 저분자 단백질 또는 다른 안정화제(stabilizers) 등이 약제로 사용될 수 있다.
- [0466] 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.
- [0467] 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 결합체의 바람직한 전체 용량은 하루에 환자 체중 1 kg당 약 0.0001 mg 내지 500 mg일 수 있다. 그러나 상기 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.
- [0468] 본 발명의 약학적 조성물은 생체 내 지속성 및 역가가 우수하여, 본 발명의 약학적 제제의 투여 횟수 및 빈도를 현저하게 감소시킬 수 있다.
- [0469] 본 발명을 구현하는 다른 하나의 양태는 간 조직으로 표적화된 생리활성 물질, 구체적으로 글루카곤 수용체와 결합력을 갖는 물질을 포함하여, 간 조직으로 표적화된 생리활성 물질을 제공한다.
- [0470] 상기 간 조직으로 표적화된 생리활성 물질, 글루카곤 수용체와 결합력을 갖는 물질 등에 대해서는 앞서 기술한 바가 모두 적용된다.
- [0471] 본 발명을 구현하는 다른 하나의 양태는 상기 약학적 조성물 또는 간 조직으로 표적화된 생리활성 물질을 이를 필요로 하는 개체에 투여하는 단계를 포함하는, 간에서의 약물 작용이 필요한 질환의 예방 또는 치료 방법을 제공한다.
- [0472] 상기 약학적 조성물, 간 조직으로 표적화된 생리활성 물질, 간에서의 약물 작용이 필요한 질환, 예방 및 치료에 대해서는 앞서 설명한 바가 모두 적용된다.
- [0473] 본 발명에서 상기 개체는 간에서의 약물 작용이 필요한 질환이 의심되는 개체로서, 상기 간에서의 약물 작용이 필요한 질환 의심 개체는 해당 질환이 발병하였거나 발병할 수 있는 인간을 포함한 쥐, 가축 등을 포함하는 포

유동물을 의미하나, 본 발명의 간 표적 약물을 포함하는 상기 조성물로 치료 가능한 개체는 제한 없이 포함된다.

[0474] 본 발명의 방법은 상기 간 표적 약물을 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.

[0475] 본 발명을 구현하는 다른 하나의 양태는 상기 간에서의 약물 작용이 필요한 질환의 예방 또는 치료용 약제의 제조에 사용하기 위한, 상기 간 표적 약물, 구체적으로 간 조직으로 표적화된 생리활성 물질의 용도를 제공하는 것이다.

[0476] 상기 간에서의 약물 작용이 필요한 질환, 간 표적 약물, 및 간 조직으로 표적화된 생리활성 물질에 대해서는 앞서 기술한 바가 모두 적용된다.

[0477] 본 발명을 구현하는 다른 하나의 양태는 상기 간 표적 약물, 구체적으로 간 조직으로 표적화된 생리활성 물질을 이를 필요로 하는 개체에 투여하여 간 표적화를 유도하는 방법을 제공하는 것이다.

[0478] 본 발명을 구현하는 다른 하나의 양태는 상기 간 표적 약물, 구체적으로 간 조직으로 표적화된 생리활성 물질을 이를 필요로 하는 개체에 투여하여 간 조직 내에서 상기 생리활성 물질의 분포 증대를 유도하는 방법을 제공하는 것이다.

[0479] 상기 간 표적 약물, 간 조직으로 표적화된 생리활성 물질, 및 개체에 대해서는 앞서 설명한 바가 모두 적용된다.

[0480] 상기 간 표적화를 유도하는 방법은 해당 물질이 간으로 표적화될 수 있도록 적절한 투여 경로를 통하여 투여될 수 있으며, 예컨대 피하 (s.c.)로 투여될 수 있으나, 특별히 이에 제한되는 것은 아니다.

[0482] 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.

[0484] **실시예 1: 글루카곤 및 이의 유도체 펩타이드의 제조**

[0485] 글루카곤 수용체에 활성을 나타내는 글루카곤 및 이의 유도체의 펩타이드를 제조하여, 하기 표 1에 이의 서열을 나타냈다. 구체적으로, 서열번호: 1의 천연 글루카곤의 아미노산 서열을 음전하 및 양전하를 띤 아미노산 잔기로 치환하여 하기 표 1과 같은 글루카곤 유도체 펩타이드를 합성하였다. 이에 기재된 상대적 *in vitro* 활성은 하기 실험예 1에 기술된 방법으로 측정하였다.

표 1

[0486]

서열번호	글루카곤 및 이의 유도체 서열	고리 여부	형성 pI	<i>In vitro</i> 활성(서열번호 1에 대한 상대적 활성,%)
서열번호: 1	HSQGTFTSDYSKYLDSTRRAQDFVQWLMNT	-	6.8	100
서열번호: 2	HSQGTFTSDYSKYLDSDRAQDFVQWLMNT	-	4.56	0.6
서열번호: 3	HSQGTFTSDYSKYLDSCERAQDFVQWLMNT	-	4.66	6.1
서열번호: 4	HSQGTFTSDYSKYLDSCDAQDFVQWLMNT	-	4.13	< 0.1
서열번호: 5	HSQGTFTSDYSKYLDSCAQDFVQWLMNT	-	4.22	0.3
서열번호: 6	HSQGTFTSDYSKYLDSCAEDFVQWLMNT	-	4.03	< 0.1
서열번호: 7	YSQGTFTSDYSKYLDSCAEDFVQWLMNT	-	3.71	< 0.1
서열번호: 8	YXQGTFTSDYSKYLDSCDAQDFVWLINT	-	3.77	< 0.1
서열번호: 9	YXQGTFTSDYSKYLDSCDAQDFVWLINT	-	3.77	< 0.1
서열번호: 10	YXQGTFTSDYSKYLDSCDADFVWLINT	-	3.66	< 0.1
서열번호: 11	YXQGTFTSDYSKYLDKCAKEFVQWLMNT	-	4.78	4.6

서열번호: 12	YXQGTFTSDYSKYLDEKRAKEFVQWLMNTC	고리 형성	6.20	56.3
서열번호: 13	YXQGTFTSDYSCYLDSTRRAQDFVQWLMNT	-	4.43	5.2
서열번호: 14	YXQGTFTSDYSKYLDCRRAQDFVQWLMNT	-	8.12	18.1
서열번호: 15	YXQGTFTSDYSKYLCEKRAQDFVQWLMNT	-	6.11	1.1
서열번호: 16	YXQGTFTSDYSKYLDCRRAQDFVQWLMRT	-	9.11	4.2
서열번호: 17	YXQGTFTSDYSKYLDCVRAQDFVQWLMRT	-	6.03	23.2
서열번호: 18	YXQGTFTSDYSKYLDSRRACDFRLWLMNT	-	8.15	< 0.1
서열번호: 19	YXQGTFTSDYSKYLCEKRAKEFVQWLMNT	고리 형성	8.12	12.1
서열번호: 20	YXQGTFTSDYSKYLDEKRAKEFVQWLMNT	고리 형성	4.78	299.7
서열번호: 21	YXQGTFTSDYSKYLDEKCAKEFVQWLMNT	고리 형성	4.78	57.8
서열번호: 22	YXQGTFTSDYSKYLDEKRCKEFVQWLMNT	고리 형성	6.20	147.8
서열번호: 23	YXQGTFTSDYSKYCDEKRAKEFVQWLMNT	고리 형성	6.20	76.8
서열번호: 24	YXQGTFTSDYSKCLDEKRAKEFVQWLMNT	고리 형성	6.21	58.0
서열번호: 25	YXQGTFTSDYSKYLDEKRAKCFVQWLMNT	고리 형성	8.12	46.9
서열번호: 26	WXQGTFTSDYSKYLDEKRAKDFVQWLMNT	고리 형성	4.68	1.0
서열번호: 27	YXQGTFTSDYSKYLDEKRAKDFVQWLMNT	고리 형성	4.68	93.6
서열번호: 28	WXQGTFTSDYSKYLDEKRAKDFVQWLMNT	고리 형성	4.68	< 0.1
서열번호: 29	YXQGTFTSDYSKCLDEKRAKDFVQWLMNT	고리 형성	6.15	61.3
서열번호: 30	WXQGTFTSDYSKCLDEKRAKDFVQWLMNT	고리 형성	4.44	0.3
서열번호: 31	YXQGTFTSDYSKYLDCRRAQDFVQWLMNT	고리 형성	8.12	6.3
서열번호: 32	-SQGTFTSDYSKYLDEKRAKEFVQWLMNT	고리 형성	4.78	0.7
서열번호: 33	YXQGTFTSDYSKYLDSRRRAQDFVQWLMNT	-	6.04	108.2
서열번호: 34	WXQGTFTSDYSKYCDEKRAKEFVQWLMNT	고리 형성	6.21	0.2
서열번호: 35	YXQGTFTSDYSKYCDEKRAKEFVQWLMNT	고리 형성	6.2	17.7
서열번호: 36	YXQGTFTSDYSKYLDEKRAKEFVQWLMNT	고리 형성	6.21	9.9
서열번호: 37	YXQGTFTSDYSKYLDEKRAKEFVQWLMNTC	고리 형성	6.21	225.5
서열번호: 38	YXQGTFTSDYSKYLDEKRAKEFVQWLMNT	고리 형성	6.15	167.3
서열번호: 39	YXQGTFTSDYSKYLDEKRAKDFVQWLMNT	고리 형성	6.15	3.7
서열번호: 40	YXQGTFTSDYSKYLDEKRAKDFVQWLMNTC	고리 형성	6.15	40.8
서열번호: 41	YXQGTFTSDYSKYLDEKRAKDFVQWLMNT	고리 형성	6.03	45.2
서열번호: 42	YXQGTFTSDYSKYLDSRRRAQDFVQWLMNT	-	6.03	37.9
서열번호: 43	YXQGTFTSDYSKYLDSRRRAQDFVQWLMNT	-	6.03	1.6
서열번호: 44	YXQGTFTSDYSKYLDSRRRAQDFVQWLMNTC	-	6.21	75.4
서열번호: 45	YXQGTFTSDYSCYLDKRAKEFVQWLMNT	-	4.78	5.2

[0488] 상기 표 1에 기재된 서열에서 X로 표기된 아미노산은 비천연형 아미노산인 아미노이소부티르산(Aib)을, 아미노산 기호 아래 밑줄은 밑줄 친 해당 아미노산 쌍의 측쇄들 사이에서 락탐 고리의 형성을, 그리고 "-"는 해당 위치에는 아미노산 잔기가 없음을 나타낸다. 또한, 고리형성 여부에 대한 열에서 "-"은 해당 서열에는 고리가 형성되어 있지 않음을 가리킨다.

[0490] **실시예 2: 글루카곤 유도체 펩타이드의 지속형 결합체 제조**

[0491] 대표적인 글루카곤 유도체 펩타이드로 상기 실시예 1에서 제조한 표 1의 유도체 펩타이드 중 서열번호 37의 글루카곤 유도체를 선택하여 결합체를 다음과 같은 방법으로 제조하였다.

[0492] 양 말단의 수소가 각각 3-(3-말레이미도프로피온아미도)프로필 기 및 3-옥소프로필기(프로피온알데히드기)로 치환된 분자량 10 kDa의 선형 개질 폴리에틸렌글리콜인 말레이미드-PEG-알데히드(일본 NOF사)를 시스테인을 보유한 서열번호 37의 글루카곤 유도체 펩타이드 유도체에 반응시켜 이 글루카곤 유도체 펩타이드의 시스테인 잔기를 말레이미드-PEG-알데히드의 말레이미드쪽 말단에 폐길화시켰다.

[0493] 구체적으로, 서열번호 37의 글루카곤 유도체 펩타이드와 말레이미드-PEG-알데히드의 몰비를 1:1~5, 단백질의 농도를 3~10 mg/ml로 하여 저온에서 1~3 시간 동안 반응시켰다. 이때, 반응은 50 mM Tris 완충액(pH 7.5)에 20~60 % 아이소프로판올이 첨가된 환경하에서 수행되었다. 반응이 종료된 후, 상기 반응액을 SP sepharose HP(GE healthcare, 미국)에 적용하여 시스테인에 모노-폐길화된 글루카곤 유도체를 정제하였다.

- [0494] 면역글로불린 Fc 절편은 N-말단에 Pro-Ser-Cys-Pro 서열 (서열번호 60)의 힌지 영역을 갖는 면역글로불린 Fc 절편 (49.8kDa, 서열번호 70)의 단량체인 사슬 두 개가 이황화결합으로 연결된 동종이량체)를 사용하여 국제공개특허 WO2007/021129에 기재된 방법으로 제조하였다.
- [0495] 다음으로, 상기 정제된 모노-페길화된 글루카곤 유도체 펩타이드와 면역글로불린 Fc 절편을 몰비가 1:2~10, 단백질의 농도를 10~50mg/mL로 하여 4~8°C에서 12~18시간 동안 반응시켰다. 반응액은 100 mM 인산칼륨 완충액 (pH 6.0)에 환원제인 10~50 mM 소디움시아노보로하이드라이드와 10~20 % 아이소프로판올이 첨가된 환경하에서 수행되었다. 반응이 종료된 후, 상기 반응액을 Butyl sepharose FF 정제컬럼(GE healthcare, 미국)과 Source 150 정제컬럼(GE healthcare, 미국)에 적용하여, 상기 모노-페길화된 글루카곤 유도체 펩타이드의 알데히드쪽 폴리에틸렌글리콜 말단이 면역글로불린 Fc 동종이량체의 두 사슬 중 한 사슬의 N-말단 프롤린 질소에 연결된 글루카곤 유도체 펩타이드의 지속형 결합체를 정제하였다.
- [0496] 제조 후 역상 크로마토그래피, 크기배제 크로마토그래피 및 이온교환 크로마토그래피로 분석한 순도는 95 % 이상이었다.
- [0497] 여기서, 글루카곤 유도체 펩타이드 및 면역글로불린 Fc 절편이 PEG를 통하여 연결된 결합체를, '글루카곤 유도체 펩타이드의 지속형 결합체',
- [0498] '글루카곤 유도체와 면역글로불린 Fc를 포함하는 결합체', '글루카곤 유도체의 지속형 결합체', 또는 '지속형 글루카곤 유도체'로 명명하였고, 이들은 본원에서 혼용되어 사용될 수 있다.
- [0500] **실례 1: 글루카곤 유도체의 지속형 결합체의 *in vitro* 활성 측정**
- [0501] 상기 실시예 1에서 제조된 글루카곤 유도체의 활성을 측정하기 위해 글루카곤(GCG) 수용체가 각 형질전환된 세포주를 이용하여 *in vitro*에서 세포 활성을 측정하는 방법을 이용하였다.
- [0502] 상기 각 세포주는 CHO (chinese hamster ovary)에 인간 GCG 수용체 유전자를 각각 발현하도록 형질 전환된 것으로서, GCG의 활성을 측정하기에 적합하다. 따라서, GCG 수용체에 대한 활성을 각각의 형질 전환 세포주를 이용하여 측정하였다.
- [0503] 구체적으로, 인간 글루카곤 수용체 유전자의 cDNA(OriGene Technologies, Inc. USA)에서 ORF에 해당하는 부분을 주형으로 하고, EcoRI 절단부위와 XhoI 절단부위를 각각 포함하는 하기 서열번호: 48 및 49의 정방향 및 역방향 프라이머를 이용한 PCR을 수행하였다.
- [0504] 이때, PCR 반응은 95°C에서 60초의 변성, 55°C에서 60초의 어닐링 및 68°C에서 30초의 신장 과정을 30회 반복 수행하였다. 이로부터 증폭된 PCR 산물을 1.0% 아가로스 겔에서 전기 영동한 후 450 bp 크기의 밴드를 용리하여 수득하였다.
- [0506] 정방향 프라이머(서열번호: 48):
- [0507] 5'-CAGCGACACCGACCGTCCCCCGTACTTAAGGCC-3'
- [0508] 역방향 프라이머(서열번호: 49):
- [0509] 5'-CTAACCGACTCTCGGGGAAGACTGAGCTCGCC-3'
- [0511] 상기 PCR 산물을 공지된 동물세포 발현벡터인 xOGC/dhfr에 클로닝하여 재조합 벡터 xOGC/GCGR을 제조하였다.
- [0512] 상기 제조한 재조합 벡터 xOGC/GCGR를 10% FBS 함유 DMEM/F12 배지에서 배양한 CHO DG44 세포에 리포펙타민을 이용하여 형질전환하고, 1 mg/mL G418 및 10 nM 메토트렉세이트를 포함하는 선별배지에서 선별 배양하였다. 이로부터 제한 희석법으로 단일 클론 세포주를 선별하고, 이 중에서 글루카곤에 대해 우수한 농도의존적 cAMP 반응을 보이는 세포주를 최종적으로 선별하였다.
- [0514] 상기 세포주에서 실시예 1에서 합성된 글루카곤 유도체의 활성을 측정 하였다. 구체적으로, 상기 형질전환 세포

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

[0516] 상기에서 제조한 글루카곤 유도체는 글루카곤 수용체에 활성이 높아 간세포로의 표적이 증가되며 또한 글루카곤 수용체를 활성화 시켜 간에서 목적하는 질환의 치료적 물질로 이용될 수 있다.

[0518] **실험예 2: 글루카곤 유도체의 pI 측정**

[0520] 상기 실시예 1에서 합성된 글루카곤 유도체의 개선된 물성을 확인하기 위해 ExPASy 서버에서 pI/Mw 툴 (http://expasy.org/tools/pi_tool.html; Gasteiger et al., 2003)을 사용하여 아미노산 서열로부터 pI를 추산하였다.

[0521] 상기 표 1에 나타난 바와 같이, 서열번호: 1의 천연 글루카곤이 6.8의 pI를 갖는 반면, 본 발명에 따른 일부의 글루카곤 유도체는 약 4 내지 6 범위의 pI를 가졌다. 이러한 글루카곤 유도체는 천연 글루카곤에 비해 낮거나, 높은 pI를 갖기 때문에 중성 pH 등에서 천연형 글루카곤에 비해 개선된 용해도 및 높은 안정성을 나타낼 수 있다.

[0522] 이와 같은 본 발명에 따른 글루카곤 유도체는 간에서 목적하는 질환에 대한 치료제로 사용시 환자 순응도를 높일 수 있다.

[0524] **실험예 3: 글루카곤 유도체 지속형 결합체의 조직분포 확인**

[0525] 3 마리의 SD 랫드 (rat)에서 글루카곤 유도체 지속형 결합체의 대표예로 선택한 서열번호 37 지속형 결합체의 조직 및 장기 내 분포를 비교하였다.

[0526] 구체적으로, 글루카곤 유도체 지속형 결합체를 각 1558 µg/kg 씩 피하 주사한 후 4, 48, 및 168 시간에 장기를 적출한 후 ELISA 방법을 통해 조직 (혈청, 뇌, 췌장, 심장, 신장, 위, 소장, 대장, 폐, 간, 비장, 지방조직 및 근육)에서의 각 물질 농도를 측정 및 비교하였다. T/S ratio(%)는 조직농도/혈청농도*100으로 계산하였으며, 예를 들어, 하기 표 3의 48시간 데이터는 혈청:15500.8 ± 2686.9, 간: 4625.4 ± 1216.9인데, T/S ratio(%)는 4625.4/15500.8*100로 약 29.8%로 산출하였다. 농도 측정은 장기를 적출한 후 ELISA 방법으로 물질 농도를 측정하였다.

[0528] 그 결과, 글루카곤 유도체 지속형 결합체는 투여 후 48 시간에서 조직분포가 가장 강하게 검출되었으며 특히 간에서 높은 분포 비율을 보였다. 조직 분포는 간, 심장, 폐, 대장, 비장, 소장, 근육, 위, 췌장, 지방조직, 신장 순으로 높았다. 투여 후 168 시간에도 여전히 간에서 가장 높은 비율로 검출되어, 투여 후 7일째 까지도 간에서 높은 비율로 존재하는 것을 알 수 있었다. 아울러, 투여 후 168 시간에서는 간에서 가장 높은 비율로 존재하며, 48 시간과 비교하여 심장보다 폐에서 분포 비율이 높았다. 상기 실시예에서 확인한 서열번호 37 지속형 결합체의 혈청 대비 조직분포 비율 결과를 요약하면 하기 표 2와 같다.

표 2

조직	4 시간		48 시간			168 시간		
	농도 (ng/ml, ng/g)	분포비율 T/S (%)	농도 (ng/ml, ng/g)	분포비율 (%)	T/S	농도 (ng/ml, ng/g)	분포비율 (%)	T/S
혈청	416.0 ± 284.2	-	15500.8 ± 2686.9	-	-	6534.2 ± 2070.3	-	-
간	NA	NA	4625.4 ± 1216.9	29.8		2027.6 ± 444.5	31	
심장	NA	NA	2447.4 ± 261.9	15.8		615.9 ± 124.3	9.4	
폐	NA	NA	1820.5 ± 258.7	11.7		703.1 ± 175.5	10.8	
대장	NA	NA	1411.9 ± 222.9	9.1		221.1 ± 11.0	3.4	
비장	NA	NA	1323.7 ± 582.3	8.5		518.2 ± 29.5	7.9	
췌장	NA	NA	499.8 ± 331.7	3.2		NA	NA	
지방조직	NA	NA	453.9 ± 107.9	2.9		NA	NA	
소장	NA	NA	785.5 ± 137.9	5.1		NA	NA	
위	NA	NA	598.1 ± 152.9	3.9		NA	NA	
근육	NA	NA	735.4 ± 193.3	4.7		220.2 ± 30.3	3.4	
신장	NA	NA	284.9 ± 105.5	1.8		NA	NA	
뇌	NA	NA	NA	NA		NA	NA	

[0531] * T/S (tissue-to-serum ratio) = 조직 대 혈청 비율

[0532] * NA (Not applicable) = 해당사항 없음

[0533] * ng/ml은 혈청, ng/g은 조직에 대한 농도임

[0535] 상기와 같은 결과들은 본 발명의 글루카곤 유도체의 지속형 결합체가 다른 조직에 비하여 간에서 조직 분포성이 우수하여, 목적하는 질환의 치료적 물질로 이용될 수 있다는 것을 시사하는 것이다. 따라서, 간 조직으로의 표적화를 유도하여 필요한 양의 약물을 효율적으로 전달할 수 있도록 하여 약물 치료를 최적화할 수 있는 새로운 용도로 글루카곤 유도체의 지속형 결합체를 이용할 수 있다.

[0537] 또한, 상기와 같은 결과들은 투여 후 7일째에도 간에서의 분포가 높은 것을 시사하는 것으로 1주에 약 1회 투여 될 수 있는 제제로서의 편의성을 뒷받침하는 것이다.

[0539] 이상의 설명으로부터, 본 발명이 속하는 기술분야의 당업자는 본 발명이 그 기술적 사상이나 필수적 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 실시될 수 있다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 이와 관련하여, 이상에서 기술한 실시 예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적인 것이 아닌 것으로서 이해해야만 한다. 본 발명의 범위는 상기 상세한 설명보다는 후술하는 특허 청구범위의 의미 및 범위 그리고 그 등가 개념으로부터 도출되는 모든 변경 또는 변형된 형태가 본 발명의 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.

[0541] [국가지원 연구개발에 대한 설명]

[0542] 본 연구는 과학기술정보통신부, 산업통상자원부, 보건복지부의 재원으로 국가신약개발사업단의 국가신약개발사업 지원에 의하여 이루어진 것임(HN21C0601).

서열 목록

<110> HANMI PHARM. CO., LTD.
 <120> Hepatic targeting agent and use thereof
 <130> KPA200247-KR
 <160> 71
 <170> KoPatentIn 3.0
 <210> 1
 <211> 29
 <212> PRT
 <213> homo sapiens
 <400> 1

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

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

<210> 2
 <211> 29
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220><223> glucagon derivative

<400> 2

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

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

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

<220><223> glucagon derivative

<400> 3

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

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

20 25
 <210> 4
 <211> 29
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> glucagon derivative
 <400> 4

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

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

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

Artificial Sequence

<220><223> glucagon derivative
 <400> 5

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

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

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

<220><223> glucagon derivative
 <400> 6

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

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

<210> 7
 <211> 29

<212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> glucagon derivative
 <400> 7
 Tyr Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Ser
 1 5 10 15
 Cys Glu Ala Asp Asp Phe Val Gln Trp Leu Met Asn Thr
 20 25

<210> 8
 <211> 29
 <212> PRT

<213>
 Artificial Sequence
 <220><223> glucagon derivative

<220><221> MISC_FEATURE
 <222> (2)
 <223> Xaa is aminoisobutyric acid (Aib)
 <400> 8
 Tyr Xaa Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Ser
 1 5 10 15
 Cys Asp Ala Gln Asp Phe Val Gln Trp Leu Ile Asn Thr
 20 25

<210> 9
 <211> 29
 <212> PRT

<213> Artificial Sequence
 <220><223> glucagon derivative

<220>
 ><221> MISC_FEATURE
 <222> (2)
 <223> Xaa is aminoisobutyric acid (Aib)
 <400> 9
 Tyr Xaa Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Ser
 1 5 10 15
 Cys Asp Ala Gln Asp Phe Val Val Trp Leu Ile Asn Thr

20 25

<210> 10

<211> 29

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> glucagon derivative

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (2)

<223> Xaa is aminoisobutyric acid (Aib)

<400> 10

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

1 5 10 15

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

20 25

<210> 11

<211> 29

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> glucagon derivative

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (2)

<223> Xaa is aminoisobutyric acid (Aib)

<400> 11

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

1 5 10 15

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

20 25

<210> 12

<211> 30

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> glucagon derivative

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (2)
 <223> Xaa is aminoisobutyric acid (Aib)
 <220><221> MISC_FEATURE
 <222> (16)..(20)
 <223> amino acids at positions 16 and 20 form a ring
 <400> 12
 Tyr Xaa Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Glu

1 5 10 15
 Lys Arg Ala Lys Glu Phe Val Gln Trp Leu Met Asn Thr Cys
 20 25 30

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

1 5 10 15
 Arg Arg Ala Gln Asp Phe Val Gln Trp Leu Met Asn Thr
 20 25

<210> 14
 <211> 29
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> glucagon derivative
 <220><221> MISC_FEATURE
 <222> (2)
 <223> Xaa is aminoisobutyric acid (Aib)
 <400> 14
 Tyr Xaa Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Cys

1 5 10 15
 Lys Arg Ala Lys Glu Phe Val Gln Trp Leu Met Asn Thr
 20 25

<210> 15
 <211> 29
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> glucagon derivative
 <220><221> MISC_FEATURE
 <222> (2)
 <223> Xaa is aminoisobutyric acid (Aib)
 <400> 15

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

<210> 16
 <211> 29
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> glucagon derivative
 <220><221> MISC_FEATURE
 <222> (2)
 <223> Xaa is aminoisobutyric acid (Aib)
 <400> 16

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

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

<220><223> glucagon derivative

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (2)

<223> Xaa is aminoisobutyric acid (Aib)

<400> 17

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

1 5 10 15

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

20 25

<210> 18

<211> 29

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> glucagon derivative

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (2)

<223> Xaa is aminoisobutyric acid (Aib)

<400>

> 18

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

1 5 10 15

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

20 25

<210> 19

<211> 29

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> glucagon derivative

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (2)

<223> Xaa is aminoisobutyric acid (Aib)

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (16)..(20)

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

<400> 19

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

1 5 10 15

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

20 25

<210> 20

<211> 29

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> glucagon derivative

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (2)

<223> Xaa is aminoisobutyric acid (Aib)

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (16)..(20)

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

<400> 20

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

1 5 10 15

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

20 25

<210> 21

<211> 29

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> glucagon derivative

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (2)

<223> Xaa is aminoisobutyric acid (Aib)

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (16)..(20)

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

<400> 21

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

1 5 10 15

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

20 25

<210> 22

<211> 29

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> glucagon derivative

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (2)

<223> Xaa is aminoisobutyric acid (Aib)

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (16)..(20)

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

<400> 22

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

1 5 10 15

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

20 25

<210> 23

<211> 29

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> glucagon derivative

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (2)

<223> Xaa is aminoisobutyric acid (Aib)

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (16)..(20)

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

<400> 23

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

1 5 10 15

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

20 25

<210> 24

<211> 29

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> glucagon derivative

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (2)

<223> Xaa is aminoisobutyric acid (Aib)

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (16)..(20)

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

<400> 24

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

1 5 10 15

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

20 25

<210> 25

<211> 29

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> glucagon derivative

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (2)

<223> Xaa is aminoisobutyric acid (Aib)

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (16)..(20)

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

<400> 25

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

1 5 10 15

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

20 25

<210> 26

<211> 29

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> glucagon derivative

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (2)

<223> Xaa is aminoisobutyric acid (Aib)

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (16)..(20)

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

<400> 26

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

1 5 10 15

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

20 25

<210> 27

<211> 29

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> glucagon derivative

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (2)

<223> Xaa is aminoisobutyric acid (Aib)

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (16)..(20)

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

<400> 27

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

1 5 10 15

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

20 25

<210> 28

<211> 29

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> glucagon derivative

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (2)

<223> Xaa is aminoisobutyric acid (Aib)

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (16)..(20)

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

<400> 28

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

1 5 10 15

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

20 25

<210> 29

<211> 29

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> glucagon derivative

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (2)

<223> Xaa is aminoisobutyric acid (Aib)

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (16)..(20)

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

<400> 29

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

1 5 10 15

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

20 25

<210> 30

<211> 29

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> glucagon derivative

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (2)

<223> Xaa is aminoisobutyric acid (Aib)

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (16)..(20)

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

<400> 30

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

1 5 10 15

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

20 25

<210> 31

<211> 29

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> glucagon derivative

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (2)

<223> Xaa is aminoisobutyric acid (Aib)

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (17)..(21)

<223> amino acids at positions 17 and 21 form a ring

<400> 31

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

1 5 10 15

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

20 25

<210> 32

<211> 28

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> glucagon derivative

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (15)..(19)

<223> amino acids at positions 15 and 19 form a ring

<400> 32

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

1 5 10 15

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

20 25

<210> 33

<211> 29

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> glucagon derivative

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (2)

<223> Xaa is aminoisobutyric acid (Aib)

<400> 33

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

1 5 10 15

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

20 25

<210> 34
 <211> 29
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> glucagon derivative
 <220><221> MISC_FEATURE
 <222> (2)
 <223> Xaa is aminoisobutyric acid (Aib)
 <220><221> MISC_FEATURE
 <222> (16)..(20)
 <223> amino acids at positions 16 and 20 form a ring
 <400> 34
 Trp Xaa Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Cys Asp Glu
 1 5 10 15
 Arg Arg Ala Lys Glu Phe Val Gln Trp Leu Met Asn Thr
 20 25

<210> 35
 <211> 29
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> glucagon derivative
 <220><221> MISC_FEATURE
 <222> (2)
 <223> Xaa is aminoisobutyric acid (Aib)
 <220><221> MISC_FEATURE
 <222> (16)..(20)
 <223> amino acids at positions 16 and 20 form a ring
 <400> 35
 Tyr Xaa Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Cys Asp Glu
 1 5 10 15
 Arg Arg Ala Lys Glu Phe Val Gln Trp Leu Met Asn Thr
 20 25

<210> 36

<211> 29
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> glucagon derivative
 <220><221> MISC_FEATURE
 <222> (2)
 <223> Xaa is aminoisobutyric acid (Aib)
 <220><221> MISC_FEATURE
 <222> (16)..(20)
 <223> amino acids at positions 16 and 20 form a ring
 <400> 36

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

20 25
 <210> 37
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> glucagon derivative
 <220><221> MISC_FEATURE
 <222> (2)
 <223> Xaa is aminoisobutyric acid (Aib)
 <220><221> MISC_FEATURE
 <222> (16)..(20)
 <223> amino acids at positions 16 and 20 form a ring
 <400> 37

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

20 25 30
 <210> 38
 <211> 29

<212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> glucagon derivative
 <220><221> MISC_FEATURE
 <222> (2)
 <223> Xaa is aminoisobutyric acid (Aib)
 <220><221> MISC_FEATURE
 <222> (16)..(20)
 <223> amino acids at positions 16 and 20 form a ring
 <400> 38

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

<210> 39
 <211> 29
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> glucagon derivative
 <220><221> MISC_FEATURE
 <222> (2)
 <223> Xaa is aminoisobutyric acid (Aib)
 <220><221> MISC_FEATURE
 <222> (16)..(20)
 <223> amino acids at positions 16 and 20 form a ring
 <400> 39

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

<210> 40
 <211> 30
 <212> PRT

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

20 25 30
 <210> 41
 <211> 29
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> glucagon derivative
 <220><221> MISC_FEATURE
 <222> (2)
 <223> Xaa is aminoisobutyric acid (Aib)
 <220><221> MISC_FEATURE
 <222> (16)..(20)
 <223> amino acids at positions 16 and 20 form a ring
 <400> 41
 Tyr Xaa Gln Gly Thr Phe Cys Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Glu
 1 5 10 15
 Arg Arg Ala Lys Asp Phe Val Gln Trp Leu Met Asn Thr

20 25
 <210> 42
 <211> 29
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220><223> glucagon derivative
 <220><221> MISC_FEATURE
 <222> (2)
 <223> Xaa is aminoisobutyric acid (Aib)
 <400> 42
 Tyr Xaa Gln Gly Thr Phe Cys Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Ser
 1 5 10 15
 Arg Arg Ala Gln Asp Phe Val Gln Trp Leu Met Asn Thr
 20 25

<210> 43
 <211> 29
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220><223> glucagon derivative
 <220><221> MISC_FEATURE
 <222> (2)
 <223> Xaa is aminoisobutyric acid (Aib)
 <400> 43
 Tyr Xaa Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Cys Ser Lys Tyr Leu Asp Ser
 1 5 10 15
 Arg Arg Ala Gln Asp Phe Val Gln Trp Leu Met Asn Thr
 20 25

<210> 44
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 ><223> glucagon derivative
 <220><221> MISC_FEATURE
 <222> (2)
 <223> Xaa is aminoisobutyric acid (Aib)
 <400> 44
 Tyr Xaa Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Ser
 1 5 10 15

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

20 25 30

<210> 45

<211> 29

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Glucagon analog

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (2)

<223> Xaa = aminoisobutyric acid (Aib)

<400> 45

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

1 5 10 15

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

20 25

<210> 46

<211> 30

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> glucagon derivative

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)

<223> Xaa is histidine, desamino-histidyl, N-dimethyl-histidyl,

beta-hydroxy imidazopropionyl, 4-imidazoacetyl, beta-carboxy
imidazopropionyl, tryptophan, or tyrosine, or is absent

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (2)

<223> Xaa is alpha-methyl-glutamic acid, aminoisobutyric acid (Aib),
D-alanine, glycine, Sar (N-methylglycine), serine, or D-serine

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (7)

<223> Xaa is threonine, valine, or cysteine

<220><221> MISC_FEATURE

- <222> (10)
- <223> Xaa is tyrosine or cysteine
- <220>
- <221> MISC_FEATURE
- <222> (12)
- <223> Xaa is lysine or cysteine
- <220><221> MISC_FEATURE
- <222> (13)
- <223> Xaa is tyrosine or cysteine
- <220><221> MISC_FEATURE
- <222> (14)
- <223> Xaa is leucine or cysteine
- <220><221> MISC_FEATURE
- <222> (15)
- <223> Xaa is aspartic acid, glutamic acid, or cysteine
- <220><221> MISC_FEATURE
- <222> (16)
- <223> Xaa is glutamic acid, aspartic acid, serine,
alpha-methyl-glutamic acid, or cysteine, or is absent;
- <220><221> MISC_FEATURE
- <222> (17)
- <223> Xaa is aspartic acid, glutamine, glutamic acid, lysine, arginine,
serine, cysteine, or valine, or is absent
- <220><221> MISC_FEATURE
- <222> (18)
- <223> Xaa is alanine, aspartic acid, glutamine, glutamic acid,
arginine, valine, or cysteine, or is absent
- <220><221> MISC_FEATURE
- <222> (19)
- <223> Xaa is alanine, arginine, serine, valine, or cysteine, or is
absent
- <220><221> MISC_FEATURE
- <222> (20)

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

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (21)

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

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (23)

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

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (24)

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

lysine, glutamine, alpha-methyl-glutamic acid, or leucine, or is absent;

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (27)

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

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (28)

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

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (29)

<223> Xaa is lysine, alanine, glycine, or threonine, or is absent

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (30)

<223> Xaa is cysteine, or is absent

<400> 46

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

1 5 10 15

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

20 25 30

<210> 47
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> glucagon derivative
 <220><221> MISC_FEATURE
 <222> (2)
 <223> Xaa is aminoisobutyric acid (Aib)

 <220><221> MISC_FEATURE
 <222> (7)
 <223> Xaa is threonine, valine, or cysteine
 <220><221> MISC_FEATURE
 <222> (10)
 <223> Xaa is tyrosine or cysteine
 <220><221> MISC_FEATURE
 <222> (12)
 <223> Xaa is lysine or cysteine
 <220><221> MISC_FEATURE
 <222> (15)
 <223> Xaa is aspartic acid or cysteine
 <220><221> MISC_FEATURE
 <222> (16)
 <223> Xaa is glutamic acid or serine
 <220><221> MISC_FEATURE
 <222> (17)
 <223> Xaa is lysine or arginine

 <220><221> MISC_FEATURE
 <222> (20)
 <223> Xaa is glutamine or lysine
 <220><221> MISC_FEATURE
 <222> (21)
 <223> Xaa is aspartic acid or glutamic acid
 <220><221> MISC_FEATURE

<222> (24)

<223> Xaa is valine or glutamine

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (30)

<223> Xaa is cysteine or is absent

<400> 47

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

1 5 10 15

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

20 25 30

<210> 48

<211> 34

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Forward primer

<400> 48

cagcgacacc gaccgtcccc ccgtacttaa ggcc 34

<210> 49

<211> 32

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Reverse primer

<400> 49

ctaaccgact ctcggggaag actgagctcg cc 32

<210> 50

<211> 12

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 50

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

1 5 10

<210> 51

<211> 11

<212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Variant of hinge region
 <400> 51

Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Pro Ser Cys Pro
 1 5 10

<210> 52
 <211> 11

<212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Variant of hinge region
 <400> 52

Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Ser Pro
 1 5 10

<210> 53
 <211> 10

<212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Variant of hinge region
 <400> 53

Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Ser
 1 5 10

<210> 54
 <211> 10

<212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Variant of hinge region
 <400> 54

Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro
 1 5 10

<210> 55
 <211> 8

<212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220><223> Variant of hinge region

<400> 55

Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Ser

1 5

<210> 56

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Variant of hinge region

<400> 56

Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys

1 5

<210> 57

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Variant of hinge region

<400> 57

Glu Lys Tyr Gly Pro Pro Cys

1 5

<210> 58

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Variant of hinge region

<400> 58

Glu Ser Pro Ser Cys Pro

1 5

<210> 59

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Variant of hinge region

<400> 59
 Glu Pro Ser Cys Pro
 1 5
 <210> 60
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Variant of hinge region
 <400> 60
 Pro Ser Cys Pro
 1
 <210> 61
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

 <220><223> Variant of hinge region
 <400> 61
 Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Ser Cys Pro
 1 5 10
 <210> 62
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Variant of hinge region
 <400> 62
 Lys Tyr Gly Pro Pro Pro Ser Cys Pro
 1 5
 <210> 63
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Variant of hinge region
 <400> 63
 Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Ser Cys Pro

1 5
<210> 64
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Variant of hinge region
<400> 64

Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys

1 5
<210> 65
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Variant of hinge region
<400> 65

Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro

1 5
<210> 66
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Variant of hinge region
<400> 66

Glu Ser Lys Pro Ser Cys Pro

1 5
<210> 67
<211> 6
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Variant of hinge region
<400> 67

Glu Ser Pro Ser Cys Pro

1 5

<210> 68
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Variant of hinge region

<400> 68
 Glu Pro Ser Cys

1

<210> 69
 <211> 3
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Variant of hinge region

<400> 69
 Ser Cys Pro

1

<210> 70
 <211> 221
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 70

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys
 100 105 110

Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser
 115 120 125

Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys
 130 135 140

Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln
 145 150 155 160

Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly
 165 170 175

Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln
 180 185 190

Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn
 195 200 205

His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
 210 215 220

<210> 71
 <211> 442
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <220><221> MISC_FEATURE
 <222> (1)..(442)
 <223> Amino acids at position 1 to 442 form Human Immunoglobulin G4 Fc
 Fragment (homodimer)
 <220><221> MISC_FEATURE
 <222> (1)..(221)
 <223> Amino acids at position 1 to 221 form one monomer
 <220><221> MISC_FEATURE
 <222> (222)..(442)
 <223> Amino acids at position 222 to 442 form one monomer
 <220><221> DISULFID
 <222> (3)..(224)

<223> Amino acids at position 3 and position 224 form an inter-disulfide bond

<220><221> DISULFID

<222> (35)..(95)

<223> Amino acids at position 35 and position 95 form an intra-chain disulfide bond

<220><221> DISULFID

<222> (141)..(199)

<223> Amino acids at position 141 and position 199 form an intra-chain disulfide bond

<220><221> DISULFID

<222> (256)..(316)

<223> Amino acids at position 256 and position 316 form an intra-chain disulfide bond

<220><221> DISULFID

<222> (362)..(420)

<223> Amino acids at position 362 and position 420 form an intra-chain disulfide bond

<400> 71

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

