

DOCUMENT MADE AVAILABLE UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

International application number:	PCT/KR2015/014422
International filing date:	30 December 2015 (30.12.2015)
Document type:	Certified copy of priority document
Document details:	Country/Office: KR
	Number: 10-2014-0193800
	Filing date: 30 December 2014 (30.12.2014)
Date of receipt at the International Bureau:	14 January 2016 (14.01.2016)

Remark: Priority document submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a),(b) or (b-bis)



별첨 사본은 아래 출원의 원본과 동일함을 증명함.

This is to certify that the following application annexed hereto
is a true copy from the records of the Korean Intellectual
Property Office

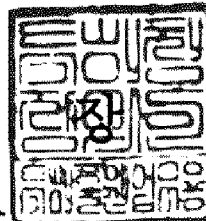
출 원 번 호 : 10-2014-0193800
Application Number

출 원 년 월 일 : 2014년 12월 30일
Filing Date DEC 30, 2014

출 원 인 : 한미약품 주식회사
Applicant(s) HANMI PHARM. CO., LTD.

2016 년 01 월 12 일

특 허 청
COMMISSIONER



【서지사항】

【서류명】	특허출원서
【출원구분】	특허출원
【출원인】	
【명칭】	한미약품 주식회사
【출원인코드】	1-2010-035663-8
【대리인】	
【성명】	손민
【대리인코드】	9-1999-000420-6
【포괄위임등록번호】	2011-049126-0
【발명의 국문명칭】	안정성이 증가된 글루카곤 유도체
【발명의 영문명칭】	Gluagon Derivatives With Improved Stability
【발명자】	
【성명】	김정국
【성명의 영문표기】	KIM, Jung Kuk
【주민등록번호】	810515-1XXXXXX
【우편번호】	445-320
【주소】	경기도 화성시 동탄원천로 350, 1002호 (능동)
【국적】	KR
【발명자】	
【성명】	이종민
【성명의 영문표기】	LEE, Jong Min
【주민등록번호】	881110-1XXXXXX
【우편번호】	156-724
【주소】	서울특별시 동작구 만양로 19, 703동 1408호 (노량진동, 신 동아리버파크아파트)

【국적】	KR
【발명자】	
【성명】	김상윤
【성명의 영문표기】	KIM, Sang Yun
【주민등록번호】	840215-2XXXXXX
【우편번호】	415-010
【주소】	경기도 김포시 감정로 42, 104동 505호 (감정동)
【국적】	KR
【발명자】	
【성명】	배성민
【성명의 영문표기】	BAE, Sung Min
【주민등록번호】	730529-1XXXXXX
【우편번호】	463-901
【주소】	경기도 성남시 분당구 정자로 143, 205동 603호 (정자동, 한솔마을LG아파트)
【국적】	KR
【발명자】	
【성명】	정성엽
【성명의 영문표기】	JUNG, Sung Youb
【주민등록번호】	691121-1XXXXXX
【우편번호】	448-521
【주소】	경기도 용인시 수지구 만현로 107, 709동 104호 (상현동, 만현마을쌍용1차아파트)
【국적】	KR
【발명자】	
【성명】	권세창

【성명의 영문표기】 KWON, Se Chang

【주민등록번호】 630620-1XXXXXX

【우편번호】 135-506

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

【국적】 KR

【핵산염기 서열목록 또는 아미노산 서열목록】

【서열개수】 14

【서열목록 전자파일】 미첨부

【취지】 위와 같이 특허청장에게 제출합니다.

대리인 손민

(서명 또는 인)

【수수료】

【출원료】 0 면 46,000 원

【가산출원료】 33 면 0 원

【우선권주장료】 0 건 0 원

【심사청구료】 0 항 0 원

【합계】 46,000 원

【명세서】

【발명의 명칭】

안정성이 증가된 글루카곤 유도체{Gluagon Derivatives With Improved Stability}

【기술분야】

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

【배경기술】

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

<3> 과체중 및 비만은 혈압과 콜레스테롤 수치를 증가시켜서 심장 질환, 당뇨, 관절염 등의 각종 질환의 발병 또는 악화의 원인이 되고 있다. 또한, 과체중 및 비

만은 성인뿐만 아니라, 어린이나 청소년에서도 동맥경화, 고혈압, 고지혈증 또는 심장질환 등의 발병률을 증가시키는 주요한 요인이 되고 있다.

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

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

<6> 이처럼 종래 비만 치료제의 문제점을 해소할 수 있는 새로운 의약품을 개발하려는 연구가 활발히 진행되고 있으며, 최근에는 글루카곤 유도체에 관심이 집중

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

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

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

<9> 이에, 상기 GLP-1의 대안으로서, GLP-1과 글루카곤 두 펩티드의 수용체에 모두 결합할 수 있는 옥신토모듈린(oxyntomodulin)이 각광받고 있다. 상기 옥신토모듈린은 글루카곤의 전구체인 프리-글루카곤(pre-glucagon)으로부터 만들어지는 펩티드로서, GLP-1의 음식물 섭취 저해, 포만감 증진 효력과 글루카곤의 지방분해 기

능을 보여 항-비만 치료제로서의 가능성을 높이고 있다.

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

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

<12> 이에 본 발명자들은 글루카곤의 물성을 개선하여 저혈당과 비만에 대한 치료 효과를 증진시키기 위하여 글루카곤의 아미노산 서열이 일부 변형된 유도체를 개발하였고, 상기 글루카곤 유도체가 천연 글루카곤과는 다른 변화된 pI로 인해 중성 pH에서 개선된 용해도 및 높은 안정성을 나타냄을 확인함으로써, 본 발명을 완성하였다.

【발명의 내용】

【해결하려는 과제】

<13> 본 발명의 목적은 물성이 개선된 신규한 펩티드를 제공하는 것이다.

<14> 본 발명의 다른 목적은 상기 펩티드를 포함하는 저혈당의 예방 또는 치료용

조성물을 제공하는 것이다.

<15> 본 발명의 또 다른 목적은 상기 펩티드를 포함하는 비만의 예방 또는 치료용 조성물을 제공하는 것이다.

【과제의 해결 수단】

<16> 상기 목적을 달성하기 위한 일 실시양태에 의하면, 본 발명은 하기의 일반식 1의 아미노산 서열을 포함하는 신규한 펩티드를 제공한다.

<17> X1-X2-QGTFTSDYSKYLD-X15-X16-X17-X18-X19-X20-X21-F-X23-X24-W-L-X27-X28-X29 (일반식 1)

<18> 상기 식에서,

<19> X1은 히스티딘, 데스아미노-히스티딜(desamino-histidyl), 디메틸-히스티딜(N-dimethyl-histidyl), 베타-히드록시 이미다조프로피오닐(β -hydroxy imidazopropionyl), 4-이미다조아세틸(4-imidazoacetyl), 베타-카르복시 이미다조프로피오닐(β -carboxy imidazopropionyl) 또는 티로신이고;

<20> X2는 알파-메틸-글루탐산(α -methyl-glutamic acid), Aib(aminoisobutyric acid), d-알라닌, 클리신, Sar(N-methylglycine), 세린 또는 d-세린이고;

<21> X15는 아스파르트산 또는 글루탐산이고

- <22> X16은 글루탐산, 아스파르트산, 세린, 알파-메틸-글루탐산 또는 결실된 서열이고;
- <23> X17은 아스파르트산, 글루타민, 글루탐산, 리신, 아르기닌, 세린 또는 결실된 서열이고;
- <24> X18은 알라닌, 아스파르트산, 글루탐산, 아르기닌, 발린 또는 결실된 서열이고;
- <25> X19는 알라닌, 아르기닌, 세린, 발린 또는 결실된 서열이고;
- <26> X20은 리신, 히스티딘, 글루타민, 아스파르트산, 리신, 아르기닌, 알파-메틸-글루탐산 또는 결실된 서열이고;
- <27> X21은 아스파르트산, 글루탐산, 류신 또는 결실된 서열이고;
- <28> X23은 이소류신, 발린 또는 결실된 서열이고;
- <29> X24는 발린, 알지닌, 알라닌, 시스테인, 글루탐산, 리신, 글루타민, 알파-메틸-글루탐산 또는 결실된 서열이고;
- <30> X27는 이소류신, 발린, 알라닌, 리신, 메티오닌, 글루타민, 아르기닌 또는 결실된 서열이고;
- <31> X28은 글루타민, 리신, 아스파라긴 또는 결실된 서열이고;
- <32> X29는 리신, 알라닌, 글리신, 트레오닌 또는 결실된 서열임(단, 상기 일반식 1의 아미노산 서열이 서열번호: 1과 동일한 경우는 제외함).

<33> 본 발명에 따른 펩티드는 천연 글루카곤의 일부 아미노산을 치환의 형태로 변형시켜서, 천연 글루카곤에 비해 변화된 pI를 가져 개선된 물성을 나타낼 수 있는 펩티드, 펩티드 유도체 또는 펩티드 모방체 등을 포함한다.

<34> 본 발명에서 용어 "천연 글루카곤"은 서열 His-Ser-Gln-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Lys-Tyr-Leu-Asp-Ser-Arg-Arg-Ala-Gln-Asp-Phe-Val-Gln-Trp-Leu-Met-Asn-Thr(서열번호: 1)을 갖는 천연의 인간 글루카곤을 나타낸다.

<35> 본 발명은 천연 글루카곤의 유도체로서 상기에서 정의한 바와 같은 펩티드를 제공하는데, 본원에 제공된 정의에서 X의 서열만이 기술된 위치에서 변이를 포함하여 천연 글루카곤과 상이한 것으로 의도된다.

<36> 본 발명에 따른 일반식 1의 서열에서 아미노산은 통상의 N-말단에서 C-말단 방향으로 1번부터 29번까지 연속적으로 넘버링되는 것으로 고려될 수 있다. 따라서, 일반식 1의 서열에서 "위치"에 대한 언급은 천연의 인간 글루카곤 및 다른 분자 내의 위치에 대한 언급에서와 같이 해석되어야 한다.

<37> 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.

<38> 또한 본 명세서에서 언급된 아미노산은 IUPAC-IUB 명명법에 따라 다음과 같이 약어로 기재하였다.

<39>	알라닌A	아르기닌R
<40>	아스파라긴N	아스파르트 산D
<41>	시스테인C	글루타민 산E
<42>	글루타민Q	글리신G
<43>	히스티딘H	아이소류이신I
<44>	루이신L	리신K
<45>	메티오닌M	페닐알라닌F
<46>	프롤린P	세린S
<47>	트레오닌T	트립토판W
<48>	타이로신Y	발린V

<49> 본 발명에서 용어 "펩티드"란 2개 이상의 -아미노산이 펩티드 결합으로 연결된 형태의 화합물을 의미한다. 본 발명의 목적상, 글루카곤 수용체 활성을 유지하면서 용해도가 개선된 펩티드를 의미한다. 본 발명에 따른 펩티드는 글루카곤의 일부 아미노산을 치환의 형태로 변형시켜서 천연 글루카곤에 비해 pI가 변화된 펩티드 모방체 등을 포함한다.

<50> 본 발명에서 용어 "pI(isoelectric point)"는 폴리펩티드와 같은 거대분자의 전체 순하전(net charge)이 제로(0)인 경우의 pH 값을 의미한다. 다양한 하전된 작

용기가 존재하는 폴리펩티드의 경우, pI에서 이들 하전의 합은 제로이다. pI보다 높은 pH에서 폴리펩티드의 전체 순하전은 음성이 될 것이고, pI보다 낮은 pH 값에서 폴리펩티드의 전체 순하전은 양성이 될 것이다.

<51> pI는 폴리아크릴아미드, 전분 또는 아가로스로 구성되는 고정된 pH 구배 겔 상에서 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.

<52> 본 발명에서 용어 "변화된 pI"는 천연 글루카곤의 아미노산 서열에서 일부 서열을 음전하 및 양전하를 띤 아미노산 잔기로 치환되어 천연 글루카곤의 pI와는 다른, 즉 이보다 감소하거나 증가한 pI를 갖는 것을 의미한다. 이렇게 변화된 pI를 갖는 펩티드는 글루카곤 유도체로서 중성 pH에서 개선된 용해도 및 높은 안정성을 나타낼 수 있다.

<53> 구체적으로, 본 발명에 따른 일반식 1의 아미노산 서열을 포함하는 펩티드는 서열번호: 1로 기재되는 천연 글루카곤의 서열에서 아미노산의 치환, 부가 결실 또는 번역 후 변형(예를 들어, 메틸화, 아실화, 유비퀴틴화, 분자 내 공유결합)이 도입되어 글루카곤 수용체 활성은 그대로 유지하면서 천연 글루카곤에 비해 변화된 pI를 가져 중성 pH에서 증가된 용해도를 나타내고 그로 인해 생체 내 화학적 안정성이 증진된 임의의 펩티드를 포괄한다.

<54> 상기 아미노산의 치환 또는 부가 시에는 인간 단백질에서 통상적으로 관찰되는 20개의 아미노산뿐만 아니라 비정형 또는 비-자연적 발생 아미노산을 사용할 수 있다. 비정형 아미노산의 상업적 출처에는 Sigma-Aldrich, ChemPep, Genzyme Pharmaceuticals 등이 포함된다. 이러한 아미노산이 포함된 펩티드와 정형적인 펩티드 서열은 상업화된 펩티드 합성 회사, 예를 들어 미국의 American Peptide Company나 Bachem, 또는 한국의 Anygen을 통해 합성 및 구매 가능하다.

<55> 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 -시트 피브릴로 이루어지고, 이렇게 침전된 글루카곤은 겔이 주사바늘이나, 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.

<56> 이에 본 발명에서는 천연 글루카곤의 pI를 음전하 및 양전하를 띤 아미노산 잔기의 치환에 의해 변화시켜 연장된 작용 프로파일을 갖는 글루카곤 펩티드를 개발하였다. 본 발명의 펩티드는 천연 글루카곤에 비해 변화된 pI를 가짐으로써 중성 pH에서 개선된 용해도 및 높은 안정성을 나타내는 것을 특징으로 한다.

- <57> 바람직하게는, 본 발명의 펩티드는 상기 일반식 1의 아미노산 서열에서
- <58> X1이 히스티딘 또는 티로신이고,
- <59> X2가 세린 또는 알파-메틸-글루탐산이고,
- <60> X15가 아스파르트산이고;
- <61> X16이 세린, 시스테인 또는 글루탐산이고;
- <62> X17이 아스파르트산, 글루탐산, 시스테인 또는 리신이고;
- <63> X18이 아르기닌, 아스파르트산, 글루탐산 또는 시스테인이고;
- <64> X19가 알라닌이고;
- <65> X20이 글루타민, 아스파르트산 또는 리신고;
- <66> X21이 아스파르트산 또는 글루탐산이고;
- <67> X23이 발린이고;
- <68> X24가 글루타민 또는 발린이고;
- <69> X27이 메티오닌 또는 이소류신이고;
- <70> X28이 아스파라긴이고;
- <71> X29가 트레오닌인 것인 펩티드일 수 있다(단, 상기 일반식 1의 아미노산 서열이 서열번호: 1과 동일한 경우는 제외함).
- <72> 보다 바람직하게는, 본 발명의 펩티드는 서열번호: 2 내지 12로 기재되는 아미노산 서열 중 어느 하나를 포함하는 펩티드일 수 있다.
- <73> 본 발명의 펩티드는 표준 합성 방법, 제조합 발현 시스템, 또는 임의의 다른

당해 분야의 방법에 의해 제조될 수 있다. 따라서, 본 발명에 따른 글루카곤 유사체는, 예를 들어 하기를 포함하는 방법을 포함하는 다수의 방법으로 합성될 수 있다:

<74> (a) 펩티드를 고체상 또는 액체상 방법의 수단으로 단계적으로 또는 단편 조립에 의해 합성하고, 최종 펩티드 생성물을 분리 및 정제하는 방법; 또는

<75> (b) 펩티드를 인코딩하는 핵산 작제물을 숙주세포 내에서 발현시키고, 발현 생성물을 숙주 세포 배양물로부터 회수하는 방법; 또는

<76> (c) 펩티드를 인코딩하는 핵산 작제물의 무세포 시험관 내 발현을 수행하고, 발현 생성물을 회수하는 방법, 또는

<77> (a), (b) 및 (c)의 임의의 조합으로 펩티드의 단편을 수득하고, 이어서 단편을 연결시켜 펩티드를 수득하고, 당해 펩티드를 회수하는 방법.

<78> 바람직한 실시양태에서, 본 발명의 펩티드가 천연 글루카곤에 비해 변화된 pI를 가짐을 확인하였다(표 1 참조). 따라서, 본 발명의 펩티드는 중성 pH에서 개선된 용해도 및 높은 안정성을 가지므로, 저혈당 치료제로 사용시 환자 순응도를 높일 수 있고 다른 항비만 치료제와의 병용 투여에 적합하여 저혈당 및 비만의 예방 또는 치료에 유용하게 사용할 수 있다.

<79> 이에 본 발명의 펩티드는 저혈당, 비만 또는 이의 관련 질환에 대하여 매력

적인 치료적 선택을 제공할 수 있다.

<80> 예를 들면, 본 발명의 펩티드는 인슐린에 대한 주된 대응 조절 호르몬으로서 당뇨병 환자의 심한 저혈당을 치료하는데 유용하게 사용될 수 있다.

<81> 또한, 본 발명의 펩티드는 체중 증가를 예방하거나, 체중 감소를 촉진하거나, 과체중을 감소시키거나, 병적 비만을 포함하는 비만(예컨대, 식욕, 섭식, 식품 섭취, 칼로리 섭취 및/또는 에너지 소비의 조절에 의해), 뿐만 아니라 비만 관련 염증, 비만 관련 쓸개 질환 및 비만 유도된 수면 무호흡을 포함하나, 이에 한정되지 않는 관련 질환 및 건강 상태를 치료하기 위한 약제로서 사용될 수 있다. 본 발명의 펩티드는 또한 대사 증후군, 고혈압, 동맥경화 유발 이상지혈증, 죽상동맥경화증, 동맥경화증, 관상 동맥 심질환, 뇌졸중 등과 같은 비만과 관련될 수 있는 상태의 치료에 사용될 수 있다. 그러나, 이들 병태에 있어서 본 발명에 따른 펩티드의 효과는 전술한 체중 관련 효과를 통해 전체적으로 또는 부분적으로 매개될 수 있거나 이와는 독립적일 수 있다.

<82> 한편, 본 발명의 글루카곤 유도체의 치료 효과를 높이기 위해 폴리에틸렌 글리콜(PEG), 당쇄 등을 비롯한 고분자의 수식이나 알부민, 트랜스페린, 지방산, 면역글로불린 등과의 융합 등 당해 기술분야의 통상적인 기술을 이용하여 글루카곤 유도체를 변형시킬 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 화합물 내의 하나 이상의 아미노산 측쇄는 생체 내에서 가용성 및/또는 반감기를 증가시키고/시키거나 생체이용율을 증가시키기 위해 고분자에 접합될 수 있다. 이러한 변형은 또한 치료학적 단

백질 및 펩티드의 소거(clearance)를 감소시키는 것으로 알려져 있다.

<83> 이러한 고분자는 수용성(양친매성 또는 친수성), 무-독성 및 약학적으로 불활성인 것이 적합하며, 바람직하게는 PEG, PEG의 동중-중합체 또는 공-중합체, PEG의 모노메틸-치환된 중합체(mPEG)이거나, 폴리-라이신, 폴리-아스파르트산 및 폴리-글루탐산과 같은 폴리-아미노산이 포함된다.

<84> 이렇게 변형된 글루카곤 유도체가 천연 글루카곤보다 우월한 치료학적 효과를 나타내리라는 것은 당업자에게 있어 주지의 사실이다. 따라서, 상기한 바와 같은 글루카곤 유도체의 변이체 역시 본 발명의 범위에 포함된다.

<85> 또 하나의 양태로서, 본 발명은 상기 펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 제공한다.

<86> 본 발명에서 폴리뉴클레오티드에 대해 사용된 용어 "상동성"이란 야생형(wild type) 아미노산 서열 및 야생형 핵산 서열과의 유사한 정도를 나타내기 위한 것으로서, 상기 펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열과 75% 이상, 바람직하게는 85% 이상, 보다 바람직하게는 90% 이상, 더욱 바람직하게는 95% 이상 동일할 수 있는 유전자 서열을 포함한다. 이러한 상동성의 비교는 육안으로나 구입이 용이한 비교 프로그램을 이용하여 수행한다. 시판되는 컴퓨터 프로그램은 2개 이상의 서열 간의 상동성을 백분율(%)로 계산할 수 있다. 상동성(%)은 인접한 서열에 대해 계산될 수 있다.

<87> 상기 펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 벡터에 삽입하여 이를 발현시킴으로써 상기 펩티드를 다량으로 확보할 수 있다.

<88> 이러한 재조합 발현의 경우, 본 발명의 폴리뉴클레오티드는 적합한 벡터 내에 일반적으로 삽입되어 본 발명의 폴리뉴클레오티드를 보유하는 클로닝 또는 재조합 벡터를 형성할 것이며, 이러한 벡터 또한 본 발명의 범주에 포함된다.

<89> 본 발명에서 용어 "재조합 벡터"는 적합한 숙주 내에서 목적 펩티드를 발현시킬 수 있도록 적합한 조절 서열에 작동 가능하게 연결된 상기 목적 펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드의 염기서열을 함유하는 DNA 제조물을 의미한다. 상기 조절 서열은 전사를 개시할 수 있는 프로모터, 그러한 전사를 조절하기 위한 임의의 오퍼레이터 서열, 적합한 mRNA 리보솜 결합부위를 코딩하는 서열, 및 전사 및 해독의 종결을 조절하는 서열을 포함한다. 재조합 벡터는 적당한 숙주세포 내로 형질전환된 후, 숙주 세포와 무관하게 복제되거나 기능할 수 있으며, 세포 그 자체에 통합될 수 있다.

<90> 본 발명에서 사용되는 재조합 벡터는 숙주세포 내에서 복제 가능한 것이면 특별히 한정되지 않으며, 당업계에 알려진 임의의 벡터를 이용하여 제작될 수 있다. 통상 사용되는 벡터의 예로는 천연 상태이거나 재조합된 상태의 플라스미드, 코스미드, 바이러스 및 박테리오파지를 들 수 있다. 예를 들어, 파지 벡터 또는 코스미드 벡터로서 pWE15, M13, MBL3, MBL4, IXII, ASHII, APII, t10, t11, Charon4A, 및 Charon21A 등을 사용할 수 있으며, 플라스미드 벡터로서 pBR계, pUC계, pBluescriptII계, pGEM계, pTZ계, pCL계 및 pET계 등을 사용할 수 있다. 본 발

명에서 사용 가능한 벡터는 특별히 제한되는 것이 아니며 공지된 발현 벡터를 사용할 수 있다.

<91> 상기 재조합 벡터는 본 발명의 펩티드를 생산하기 위해 숙주세포를 형질전환 시키는데 사용된다. 또한 본 발명의 일부인, 이러한 형질전환 세포는 본 발명의 핵산 단편 및 벡터의 증식에 사용되거나, 본 발명의 펩티드의 재조합 생산에 사용된 배양된 세포 또는 세포주일 수 있다.

<92> 본 발명에서 용어 "형질전환"은 표적 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 재조합 벡터를 숙주세포 내에 도입하여 숙주세포 내에서 상기 폴리뉴클레오티드가 코딩하는 단백질이 발현할 수 있도록 하는 것을 의미한다. 형질전환된 폴리뉴클레오티드가 숙주세포 내에서 발현될 수 있지만 한다면, 숙주세포의 염색체 내에 삽입되어 위치하거나 염색체 외에 위치하거나 상관없이 이들 모두를 포함한다.

<93> 또한, 상기 폴리뉴클레오티드는 표적 단백질을 코딩하는 DNA 및 RNA를 포함한다. 상기 폴리뉴클레오티드는 숙주세포 내로 도입되어 발현될 수 있는 것이면, 어떠한 형태로 도입되는 것이든 상관없다. 예를 들면, 상기 폴리뉴클레오티드는 자체적으로 발현되는데 필요한 모든 요소를 포함하는 유전자 구조체인 발현 카세트(expression cassette)의 형태로 숙주세포에 도입될 수 있다. 상기 발현 카세트는 통상 상기 폴리뉴클레오티드에 작동 가능하게 연결되어 있는 프로모터(promoter), 전사 종결신호, 리보솜 결합부위 및 번역 종결신호를 포함할 수 있다. 상기 발현 카세트는 자체 복제가 가능한 발현벡터 형태일 수 있다. 또한, 상기 폴리뉴클레오

티드는 그 자체의 형태로 숙주세포에 도입되어, 숙주세포에서 발현에 필요한 서열과 작동 가능하게 연결되어 있는 것일 수도 있으며, 이에 한정되지 않는다.

<94> 또한, 상기에서 용어 "작동 가능하게 연결"된 것이란 본 발명의 목적 펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드의 전사를 개시 및 매개하도록 하는 프로모터 서열과 상기 유전자 서열이 기능적으로 연결되어 있는 것을 의미한다.

<95> 본 발명에 적합한 숙주는 본 발명의 폴리뉴클레오티드를 발현하도록 하는 한 특별히 제한되지 않는다. 본 발명에 사용될 수 있는 숙주의 특정한 예로는 대장균 (*E. coli*)과 같은 에스케리키아(*Escherichia*) 속 세균; 바실러스 서브틸리스 (*Bacillus subtilis*)와 같은 바실러스(*Bacillus*) 속 세균; 슈도모나스 푸티다 (*Pseudomonas putida*)와 같은 슈도모나스(*Pseudomonas*) 속 세균; 피키아 파스토리스(*Pichia pastoris*), 사카로마이세스 세레비지애(*Saccharomyces cerevisiae*), 스키향사카로마이세스 폼베(*Schizosaccharomyces pombe*)와 같은 효모; 스포도프테라 프루기페르다(SF9)와 같은 곤충세포; 및 CHO, COS, BSC 등과 같은 동물세포가 있다.

<96> 다른 실시양태로서, 본 발명은 상기 펩티드를 포함하는 저혈당 또는 비만의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

<97> 본 발명에서 용어 "예방"은 상기 펩티드 또는 조성물의 투여로 비만의 발병을 억제 또는 지연시키는 모든 행위를 의미하며, "치료"는 상기 펩티드 또는 조성

물의 투여로 비만의 증세가 호전되거나 이롭게 되는 모든 행위를 의미한다.

<98> 본 발명에서 용어 "투여"는 어떠한 적절한 방법으로 환자에게 소정의 물질을 도입하는 것을 의미하며, 상기 조성물의 투여 경로는 특별히 이에 제한되지 않으나, 상기 조성물이 생체내 표적에 도달할 수 있는 어떠한 일반적인 경로를 통하여 투여될 수 있으며, 예를 들어 복강 내 투여, 정맥내 투여, 근육내 투여, 피하 투여, 피내 투여, 경구 투여, 국소 투여, 비내 투여, 폐내 투여, 직장 내 투여 등이 될 수 있다.

<99> 본 발명에서 용어 "저혈당"은 당뇨병의 급성증상 중 하나로서, 혈중 당량이 정상인보다 낮은 상태를 말하는 것으로 일반적으로 혈당이 50 mg/dl 이하일 때를 말한다. 저혈당증이 생기는 흔한 원인은 경구용 혈당강하제나 인슐린을 사용하는 사람이 평소보다 음식 섭취량이 적거나 활동량이나 운동량이 과한 경우이다. 이외에도 음주나 일부 혈당을 떨어뜨리는 약물의 사용, 중증의 신체적 질환, 부신피질 호르몬이나 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.

<100> 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.

<101> 본 발명에서 용어 "비만"은 체내에 지방조직이 과다한 상태로, 신체비만지수

(체중(kg)을 신장(m)의 제곱으로 나눈 값)가 25 이상이면 비만으로 정의된다. 비만은 오랜 기간에 걸쳐 에너지 소비량에 비해 영양소를 과다하게 섭취할 경우 에너지 불균형에 의해 유발되는 것이 통상적이다. 비만은 신체 전체에 영향을 미치는 대사 질환으로 당뇨병 및 고지혈증에 걸릴 가능성이 높고, 성기능 장애, 관절염, 심혈관계 질환의 발병 위험이 커지며 일부의 경우 암의 발생과도 연관이 있다.

<102>

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

<103>

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

<104>

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.

<105>

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

<106>

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

<107>

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

<108>

또한, 상기 펩티드는 생리식염수 또는 유기용매와 같이 약제로 허용된 여러 전달체(carrier)와 혼합하여 사용될 수 있고, 안정성이나 흡수성을 증가시키기 위

하여 글루코스, 수크로스 또는 텍스트란과 같은 카보하이드레이트, 아스코르브 산 (ascorbic acid) 또는 글루타치온과 같은 항산화제(antioxidants), 킬레이팅 물질 (chelating agents), 저분자 단백질 또는 다른 안정화제(stabilizers) 등이 약제로 사용될 수 있다.

<109>

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

<110>

본 발명의 조성물의 총 유효량은 단일 투여량(single dose)으로 환자에게 투여될 수 있으며, 다중 투여량(multiple dose)으로 장기간 투여되는 분할 치료 방법 (fractionated treatment protocol)에 의해 투여될 수 있다. 본 발명의 약학적 조성물은 질환의 정도에 따라 유효성분의 함량을 달리할 수 있다. 바람직하게 본 발명의 펩티드의 바람직한 전체 용량은 하루에 환자 체중 1 kg당 약 0.0001 μ g 내지 500 mg일 수 있다. 그러나 상기 펩티드의 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.

<111>

본 발명의 약학적 조성물은 생체 내 지속성 및 역가가 우수하므로, 본 발명

의 약학적 제제의 투여 횟수 및 빈도를 현저하게 감소시킬 수 있다.

<112> 특히, 본 발명의 약학적 조성물은 천연 글루카곤에 비해 변화된 pI를 갖는 글루카곤 유도체를 유효성분으로 포함하기 때문에 중성 pH에서 개선된 용해도 및 높은 안정성을 나타내므로 저혈당 또는 비만 치료를 위한 안정한 글루카곤 제형의 제조에 유용하게 사용될 수 있다.

<113> 아울러, 상기 약학적 조성물은 단독 또는 다른 비만 예방 또는 치료효과를 나타내는 약학적 제제와 병용하여 투여될 수 있다. 상기 비만 예방 또는 치료효과를 나타내는 약학적 제제는 특별히 이에 제한되지 않으나, GLP-1 수용체 아고니스트, 렙틴(Leptin) 수용체 아고니스트, DPP-IV 저해제, Y5 수용체 안타고니스트, MCH(Melanin-concentrating hormone) 수용체 안타고니스트, Y2/3 수용체 아고니스트, MC3/4 수용체 아고니스트, 위/췌장 리파아제(gastric/pancreatic lipase) 저해제, 5HT2c 아고니스트, 3A 수용체 아고니스트, 아밀린(Amylin) 수용체 아고니스트, 그렐린(Ghrelin) 안타고니스트, 및/또는 그렐린 수용체 안타고니스트 등이 될 수 있다.

<114> 또 다른 양태로서, 본 발명은 상기 펩티드 또는 이를 포함하는 약학적 조성물을 개체에게 투여하는 단계를 포함하는, 저혈당 또는 비만의 예방 또는 치료 방법을 제공한다.

<115>

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

<116>

본 발명의 방법은 펩티드를 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.

<117>

또 다른 양태로서, 본 발명은 저혈당 또는 비만의 예방 또는 치료용 의약품의 제조에 있어서, 상기 펩티드의 용도를 제공한다.

【발명의 효과】

<118> 천연 글루카곤에 비하여 우월한 물성을 나타내는 본 발명의 신규한 펩티드는 저혈당 치료제로 사용시 환자 순응도를 높일 수 있고, 다른 항비만 치료제와의 병용 투여에 적합하므로, 저혈당 및 비만의 예방 또는 치료에 유용하게 사용할 수 있다.

【발명을 실시하기 위한 구체적인 내용】

<119> 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 보다 상세히 설명하고자 한다. 그러나, 이들 실시예는 본 발명을 예시적으로 설명하기 위한 것으로 본 발명의 범위가 이들 실시예에 한정되는 것은 아니다.

<120> 실시예 1: 글루카곤에 대해 cAMP 반응을 보이는 세포주의 생산

<121> 인간 글루카곤 수용체 유전자의 cDNA(OriGene Technologies, Inc. USA)에서 ORF에 해당하는 부분을 주형으로 하고, EcoRI 절단부위와 XhoI 절단부위를 각각 포함하는 하기 서열번호: 13 및 14의 정방향 및 역방향 프라이머를 이용한 PCR을 수행하였다.

<122> 이때, PCR 반응은 95℃에서 60초의 변성, 55℃에서 60초의 어닐링 및 68℃에서 30초의 신장 과정을 30회 반복 수행하였다. 이로부터 증폭된 PCR 산물을 1.0%

아가로스 겔에서 전기 영동한 후 450 bp 크기의 밴드를 용리하여 수득하였다.

<123> 정방향 프라이머: 5'-CAGCGACACCGACCGTCCCCCGTACTTAAGGCC-3'

<124> 역방향 프라이머: 5'-CTAACCGACTCTCGGGGAAGACTGAGCTCGCC-3'

<125> 상기 PCR 산물을 공지된 동물세포 발현벡터인 xOGC/dhfr에 클로닝하여 재조합 벡터 xOGC/GCGR을 제조하였다.

<126> 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.

<127> 실시예 2: 글루카곤 유도체의 합성

<128> 개선된 물성을 갖는 글루카곤 유도체를 개발하기 위하여, 서열번호: 1의 천연 글루카곤의 아미노산 서열을 음전하 및 양전하를 띤 아미노산 잔기로 치환하여 하기 표 1과 같은 글루카곤 유도체를 합성하였다.

<129> **【표 1】**

서열번호	아미노산 서열
서열번호: 1	HSQGTFTSDYSKYLDSRRAQDFVQWLMNT
서열번호: 2	HSQGTFTSDYSKYLDCDRAQDFVQWLMNT
서열번호: 3	HSQGTFTSDYSKYLDCERAQDFVQWLMNT
서열번호: 4	HSQGTFTSDYSKYLD SCDAQDFVQWLMNT
서열번호: 5	HSQGTFTSDYSKYLD SCEAQDFVQWLMNT
서열번호: 6	HSQGTFTSDYSKYLD SCEADDFVQWLMNT
서열번호: 7	YSQGTFTSDYSKYLD SCEADDFVQWLMNT
서열번호: 8	YXQGTFTSDYSKYLD SCDAQDFVQWLINT
서열번호: 9	YXQGTFTSDYSKYLD SCDAQDFVQWLINT
서열번호: 10	YXQGTFTSDYSKYLD SCDADDFVQWLINT
서열번호: 11	YXQGTFTSDYSKYLD EKCAKEFVQWLMNT
서열번호: 12	YXQGTFTSDYSKYLD SRRAQDFVQWLMNT

<130> 상기 표 1에 기재된 서열번호: 8 내지 12의 서열에서 X로 표기된 아미노산은 비천연형 아미노산인 알파-메틸-글루탐산을 의미한다.

<131> 실시예 3: 글루카곤 유도체의 pI 측정

<132> 상기 실시예 2에서 합성된 글루카곤 유도체의 개선된 물성을 확인하기 위해 ExPASy 서버에서 pI/Mw 툴(http://expasy.org/tools/pi_tool.html; Gasteiger et al., 2003)을 사용하여 아미노산 서열로부터 pI를 추산하였다.

<133> **【표 2】**

펩티드	pI
서열번호: 1	6.8
서열번호: 2	4.56
서열번호: 3	4.66
서열번호: 4	4.13
서열번호: 5	4.22
서열번호: 6	4.03

서열번호: 7	3.71
서열번호: 8	3.77
서열번호: 9	3.77
서열번호: 10	3.66
서열번호: 11	4.78
서열번호: 12	6.04

<134> 상기 표 2에 나타난 바와 같이, 서열번호: 1의 천연 글루카곤이 6.8의 pI를 갖는 반면, 본 발명에 따른 글루카곤 유도체는 약 4 내지 6 범위의 pI를 가져 개선된 물성을 나타내었다. 본 발명에 따른 글루카곤 유도체는 천연 글루카곤에 비해 낮은 pI를 갖기 때문에 중성 pH에서 개선된 용해도 및 높은 안정성을 나타낼 수 있다.

<135> 따라서, 본 발명에 따른 글루카곤 유도체는 저혈당 치료제로 사용시 환자 순응도를 높일 수 있으며, 다른 항비만 치료제, 예를 들어 GLP-1 수용체 길항제, GIP(glucose-dependent insulintropic peptide) 수용체 길항제 등과의 병용 투여에 적합하여 저혈당 및 비만 치료제로서 유용하게 사용할 수 있다.

【특허청구범위】

【청구항 1】

하기 일반식 1의 아미노산 서열을 포함하는 펩티드:

X1-X2-QGTFTSDYSKYLD-X15-X16-X17-X18-X19-X20-X21-F-X23-X24-W-L-X27-X28-

X29 (일반식 1)

상기 식에서,

X1은 히스티딘, 데스아미노-히스티딜 (desamino-histidyl), 디메틸-히스티딜 (N-dimethyl-histidyl), 베타-히드록시 이미다조프로피오닐 (β -hydroxy imidazopropionyl), 4-이미다조아세틸(4-imidazoacetyl), 베타-카르복시 이미다조 프로피오닐 (β -carboxy imidazopropionyl) 또는 티로신이고;

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

X15는 아스파르트산 또는 글루탐산이고

X16은 글루탐산, 아스파르트산, 세린, 알파-메틸-글루탐산 또는 결실된 서열 이고;

X17은 아스파르트산, 글루타민, 글루탐산, 리신, 아르기닌, 세린 또는 결실 된 서열이고;

X18은 알라닌, 아스파르트산, 글루탐산, 아르기닌, 발린 또는 결실된 서열이 고;

X19는 알라닌, 아르기닌, 세린, 발린 또는 결실된 서열이고;

X20은 리신, 히스티딘, 글루타민, 아스파르트산, 리신, 아르기닌, 알파-메틸-글루탐산 또는 결실된 서열이고;

X21은 아스파르트산, 글루탐산, 류신 또는 결실된 서열이고;

X23은 이소류신, 발린 또는 결실된 서열이고;

X24는 발린, 알지닌, 알라닌, 시스테인, 글루탐산, 리신, 글루타민, 알파-메틸-글루탐산 또는 결실된 서열이고;

X27는 이소류신, 발린, 알라닌, 리신, 메티오닌, 글루타민, 아르기닌 또는 결실된 서열이고;

X28은 글루타민, 리신, 아스파라긴 또는 결실된 서열이고;

X29는 리신, 알라닌, 글리신, 트레오닌 또는 결실된 서열임(단, 상기 일반식 1의 아미노산 서열이 서열번호: 1과 동일한 경우는 제외함).

【청구항 2】

제1항에 있어서, 일반식 1의 아미노산 서열에서

X1이 히스티딘 또는 티로신이고,

X2가 세린 또는 알파-메틸-글루탐산이고,

X15가 아스파르트산이고;

X16이 세린, 시스테인 또는 글루탐산이고;

X17이 아스파르트산, 글루탐산, 시스테인 또는 리신이고;

X18이 아르기닌, 아스파르트산, 글루탐산 또는 시스테인이고;

X19가 알라닌이고;

X20이 글루타민, 아스파르트산 또는 리신고;

X21이 아스파르트산 또는 글루탐산이고;

X23이 발린이고;

X24가 글루타민 또는 발린이고;

X27이 메티오닌 또는 이소류신이고;

X28이 아스파라긴이고;

X29가 트레오닌인 것(단, 상기 일반식 1의 아미노산 서열이 서열번호: 1과 동일한 경우는 제외함)인, 펩티드.

【청구항 3】

제1항에 있어서, 상기 펩티드가 글루카곤 수용체를 활성화시킬 수 있는 글루카곤 유도체인 것인, 펩티드.

【청구항 4】

제1항에 있어서, 상기 펩티드가 천연 글루카곤에 비해 변화된 pI를 갖는 것인, 펩티드.

【청구항 5】

제1항에 있어서, 상기 펩티드가 서열번호: 2 내지 12의 아미노산 서열로 구성된 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하는 것인, 펩티드.

【청구항 6】

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항의 펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드.

【청구항 7】

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항의 펩티드를 유효성분으로 포함하는 저혈당의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

【청구항 8】

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항의 펩티드를 유효성분으로 포함하는 비만의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

【청구항 9】

제7항 또는 제8항에 있어서, 약학적으로 허용가능한 담체를 추가로 포함하는 것인 약학적 조성물.

【청구항 10】

제8항에 있어서, 상기 약학적 조성물이 단독 또는 다른 비만 예방 또는 치료 효과를 나타내는 약학적 제제와 병용하여 투여되는 것인 약학적 조성물.

【청구항 11】

제10항에 있어서, 상기 비만 예방 또는 치료효과를 나타내는 약학적 제제가 GLP-1 수용체 아고니스트, 랩틴(Leptin) 수용체 아고니스트, DPP-IV 저해제, Y5 수용체 안타고니스트, MCH(Melanin-concentrating hormone) 수용체 안타고니스트, Y2/3 수용체 아고니스트, MC3/4 수용체 아고니스트, 위/췌장 리파아제

2014-12-30

(gastric/pancreatic lipase) 저해제, 5HT_{2c} 아고니스트, 3A 수용체 아고니스트, 아밀린(Amylin) 수용체 아고니스트, 그렐린(Ghrelin) 안타고니스트 및 그렐린 수용체 안타고니스트로 구성된 그룹으로부터 선택되는 것인 약학적 조성물.

【요약서】**【요약】**

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

【서열목록】

서열목록 전자파일 첨부

【서열목록】

<110> HANMI PHARM. CO., LTD.

<120> Gluagon Derivatives With Improved Stability

<130> PA141371-KR

<160> 14

<170> KopatentIn 2.0

<210> 1

<211> 29

<212> PRT

<213> human glucagon

<400> 1

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

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

<210> 2

<211> 29

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> glucagon derivative

<400> 2

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

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

20 25

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

<220>
<223> glucagon derivative

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

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

<210> 4
<211> 29
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> glucagon derivative

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

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

<210> 5
<211> 29

<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> glucagon derivative

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

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

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

<220>
<223> glucagon derivative

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

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

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

<220>

<223> glucagon derivative

<400> 7

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

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

<210> 8

<211> 29

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> glucagon derivative

<220>

<221> VARIANT

<222> (2)

<223> Xaa is alpha-methyl-glutamic acid

<400> 8

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

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

<210> 9

<211> 29

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> glucagon derivative

<220>

<221> VARIANT

<222> (2)

<223> Xaa is alpha-methyl-glutamic acid

<400> 9

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

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

<210> 10

<211> 29

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> glucagon derivative

<220>

<221> VARIANT

<222> (2)

<223> Xaa is alpha-methyl-glutamic acid

<400> 10

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

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

	20	25
<210>	11	
<211>	29	
<212>	PRT	
<213>	Artificial Sequence	
<220>		
<223>	glucagon derivative	
<220>		
<221>	VARIANT	
<222>	(2)	
<223>	Xaa is alpha-methyl-glutamic acid	
<400>	11	
	Tyr Xaa Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Glu	
	1 5 10 15	
	Lys Cys Ala Lys Glu Phe Val Gln Trp Leu Met Asn Thr	
	20 25	

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

<220>	
<223>	glucagon derivative

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

<223> Xaa is alpha-methyl-glutamic acid

<400> 12

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

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

<210> 13

<211> 34

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> forward primer

<400> 13

cagcgacacc gaccgtcccc ccgtacttaa ggcc 34

<210> 14

<211> 32

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> reverse primer

<400> 14

ctaaccgact ctcggggaag actgagctcg cc 32

ADVANCE E-MAIL

From the INTERNATIONAL BUREAU

PCT

NOTIFICATION CONCERNING SUBMISSION,
OBTENTION OR TRANSMITTAL
OF PRIORITY DOCUMENT

(PCT Administrative Instructions, Section 411)

To:

SON, Min
Hanol Intellectual Property&Law, 6th Floor, 163,
YangJaeCheon-ro,
Gangnam-gu,
Seoul 06302
RÉPUBLIQUE DE CORÉE

Date of mailing (day/month/year) 18 January 2016 (18.01.2016)	
Applicant's or agent's file reference OPA15322-PCT	IMPORTANT NOTIFICATION
International application No. PCT/KR2015/014422	International filing date (day/month/year) 30 December 2015 (30.12.2015)
International publication date (day/month/year) Not yet published	Priority date (day/month/year) 30 December 2014 (30.12.2014)
Applicant HANMI PHARM. CO., LTD.	

The applicant is hereby notified of the date of receipt (or of obtaining by the International Bureau) of the priority document(s) relating to all earlier application(s) whose priority is claimed. Unless otherwise indicated by the letters "NR", in the right-hand column or by an asterisk appearing next to the date of receipt, **the priority document concerned was submitted or transmitted to or obtained by the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a), (b) or (b-bis)**. This Form replaces any previously issued notification concerning submission, transmittal or obtaining of priority documents.

Priority datePriority application No.Country or regional Office
or PCT receiving OfficeDate of receipt
of priority document

30 December 2014 (30.12.2014)

10-2014-0193800

KR

14 January 2016 (14.01.2016)

The letters "NR" denote a priority document which, on the date of mailing of this Form, had not yet been received or obtained by the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a), (b) or (b-bis). Where the applicant has failed to either submit, request to prepare and transmit, or to request the International Bureau to obtain the priority document within the applicable time limit under that Rule, the attention of the applicant is directed to Rule 17.1(c) which provides that no designated Office may disregard the priority claim concerned before giving the applicant an opportunity, upon entry into the national phase, to furnish the priority document within a time limit which is reasonable under the circumstances.

An asterisk "*" next to a date of receipt, denotes a priority document submitted or transmitted to or obtained by the International Bureau but not in compliance with Rule 17.1(a), (b) or (b-bis) (the priority document was received after the time limit prescribed in Rule 17.1(a); the request to prepare and transmit the priority document was submitted to the receiving Office after the applicable time limit under Rule 17.1(b) or the request to the International Bureau to obtain the priority document was made after the applicable time limit under Rule 17.1(b-bis)). Even though the priority document was not furnished in compliance with Rule 17.1(a), (b) or (b-bis), the International Bureau will nevertheless transmit a copy of the document to the designated Offices, for their consideration. In case such a copy is not accepted by the designated Office as the priority document, Rule 17.1(c) provides that no designated Office may disregard the priority claim concerned before giving the applicant an opportunity, upon entry into the national phase, to furnish the priority document within a time limit which is reasonable under the circumstances.

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland Facsimile No. +41 22 338 70 90	Authorized officer Kihwan Moon e-mail pt01.pct@wipo.int Telephone No. +41 22 338 74 01
---	---