

명세서

발명의 명칭: 지속형 GLP-1 및 글루카곤 수용체 이중작용제

기술분야

- [1] 본 발명은 GLP-1 및 글루카곤 수용체 이중작용제의 약물동력학적 활성을 개선한 아실화 옥신토모듈린 펩타이드 유사체 및 이를 포함하는 비만 및 과체중, 또는 이를 동반하는 비 인슐린 의존성 당뇨병의 예방 또는 치료에 사용할 수 있는 약학조성물에 관한 것이다.

[2]

배경기술

- [3] 대사성 질환 (Metabolic Disease, Metabolic Syndrome)은 포도당, 지방, 단백질 등의 대사 이상에서 기원하는 질병으로 주로 포도당과 지방대사의 이상으로 유발되는 암, 당뇨병, 골대사질환, 지방간, 비만, 심혈관계 질환 등을 통칭한다. 2001년에 보고된 미국 국가 콜레스테롤 교육프로그램(National Cholesterol Education Program; NCEP)의 adult treatment panel III (ATP III) 또는 2012년에 발표된 국제당뇨병연맹(International Diabetes Federation; IDF)에 따른 대사성 질환 진단 기준은 다음과 같다. ① 허리둘레가 남자 102 또는 94 cm(각각 NCEP 또는 IDF), 여자 88 또는 80 cm(각각 NCEP 또는 IDF) 이상인 복부 비만, ② 중성지방(triglycerides) 150 mg/dL 이상인 고중성지방혈증, ③ HDL 콜레스테롤이 남자 40 mg/dL, 여자 50 mg/dL 이하, ④ 혈압 130/85 mmHg 이상인 고혈압, 또는 ⑤ 공복혈당(fasting glucose)이 110 mg/dL 이상 등의 다섯 가지 위험인자 중 세 개 이상을 나타낼 경우 대사성 질환으로 분류할 수 있다.

[4]

- [5] 세계보건기구(World Health Organization; WHO)에 따르면 전세계 비만 유병률은 1980년에서 2014년 사이에 2배 이상 증가하였으며, 2014년에는 18세 이상의 성인 중 39% (남성 38%, 여성 40%)가 과체중, 13% (남성 11%, 여성 15%)가 비만이었다. 이러한 비만 및 과체중의 근본적인 원인으로는 칼로리 섭취 및 소비 사이의 에너지 불균형으로 지방이 많고 에너지 밀도가 높은 식사와 현대 사회 일의 성격, 교통 수단의 변화, 도시화의 증가 등으로 인한 신체 활동 저하가 비만의 위험 요소로 여겨지고 있다.

[6]

- [7] 또한, 비만과 함께 동반되는 질환 중 당뇨 역시 그 유병률이 빠르게 증가하고 있는 추세로 18세 이상 성인 중 1980년 4.7%에서 2015년 8.5%로 상승하였다. 당뇨병 유병률은 중산층과 저소득 국가에서 더욱 빠르게 늘고 있으며 실명, 신부전, 심장마비, 뇌졸중 등의 주요 원인이 된다.

[8]

- [9] 글루카곤은 췌장의 알파 세포에서 생산되는 호르몬으로 일반적으로 포도당

신생합성 및 간에 저장되어 있는 글리코젠을 분해하여 혈당을 높이는 역할을 한다. 저장된 글리코젠이 고갈되면 글루카곤은 간과 신장에서 포도당을 재합성, 식욕억제, 그리고 저장되어 있는 중성지방(Triglyceride)을 지방산으로 분해시켜 에너지 대사량 증가시킴으로써 체중감소에 영향을 주는 것으로 알려져 있다(Diabetes.co.uk. the global diabetes community, Anim Sci J. 2016;87(9):1090-1098).

[10]

[11] GLP-1(Glucagon-like peptide-1)은 글루카곤 유도체 중의 하나로 혈당을 감소시키는 역할을 하는 펩타이드 호르몬이다. 식후 소장 L-세포에서 분비되며, 반감기가 2분 미만으로 매우 짧은데, 포도당에 의해 분비가 증가되면 췌장의 베타 세포에서 인슐린 분비를 유도함으로써 궁극적으로 혈당을 조절하고 베타세포 기능을 개선시키는 역할을 하는 것으로 보고되고 있다. 또한 글루카곤 분비 저해, 위공복억제, 음식물 섭취를 감소시키는 기능을 가진다(Physiol Rev. 2007;87(4):1409-1439).

[12]

[13] Novo Nordisk의 리라글루타이드(Liraglutide)는 제2형 당뇨병 및 비만 적응증에 대해 개발된 치료제로 1일 1회 주사되는 사람 GLP-1 유도체이다. Liraglutide는 지속성 GLP-1 수용체 작용제로 내인성 GLP-1과 동일한 수용체에 결합하여 인슐린 분비를 촉진시킴으로써 혈당을 조절하고 식욕을 감소시켜 체중증가를 억제하고 중성지방을 낮추는 작용으로 제2형 당뇨병에 대해서는 빅토자(Victoza), 비만에 대해서는 삭센다(Saxenda)라는 이름으로 미국 및 유럽에서 발매되었다(Expert Rev Cardiovasc Ther. 2015;13(7):753-767). Liraglutide 외에도 엑세나타이드 (Exenatide), 리시세나타이드 (Lixisenatide), 알비글루타이드 (Albiglutide), 둘라글루타이드 (Dulaglutide), 세마글루타이드 (Semaglutide) 등이 당뇨병 치료제로 개발되었다. 그러나 이와 같은 GLP-1 수용체 작용제들의 부작용으로는 구역, 구토 및 식욕감소, 두통과 변비, 복부팽만감 발생 등이 보고되고 있다(Korean J Med. 2014;87(1):9-13).

[14]

[15] 옥신토모듈린은 글루카곤의 전구체인 프로글루카곤(proglucagon)에서 유래되는 펩타이드로 글루카곤의 완전한 29개 아미노산 서열을 포함하는 37개 아미노산 펩타이드로 구성되어 있으며, GLP-1 및 글루카곤 수용체에 모두 결합하는 이중작용을 갖는다. 옥신토모듈린은 비임상실험에서 사료섭취량, 체중감소 및 에너지 소비 증가와 당 대사를 향상시키는 것으로 보고되었으며(Diabetes. 2009;58(10):2258-2266), 임상시험에서도 과체중 및 비만 환자들에게 1일 3회씩, 4주간 피하투여를 했을 때 평균 2.3 kg의 체중감소를 보였고(Diabetes. 2005;54:2390-2395), 플라시보 군 대비 유의적인 인슐린 분비 및 혈당 감소 효과도 확인되었으며(Diabetes. 2013;62(Suppl. 1):A48), 또 다른 임상시험에서는 옥신토모듈린의 지속적인 주입으로 인한 구토나 식욕촉진 등의

부작용 없이 에너지 섭취를 감소시키는 것이 확인되어(J Clin Endocrinol Metab. 2003;88:4696-4701), 옥신토모듈린은 혈당 조절, 음식물 섭취 감소, 포만감 증진 등의 기능을 나타낼 수 있기에 비만 치료 및 혈당조절을 목적으로 하는 새로운 치료법으로 각광받고 있다(Molecular metabolism. 2014;3:241-251).

[16]

[17] 그러나 옥신토모듈린은 GLP-1처럼 디펩티딜 펩티다아제-IV(Dipeptidyl peptidase-IV; DPP-IV)에 의해 절단되어 생체 내에서 불안정하게 매우 짧은 반감기를 가진다(J Biol Chem. 2003;278: 22418-22423).

[18]

[19] 따라서 GLP-1 및 글루카곤 수용체에 균형 있게 선택적으로 결합하여 약리학 및 치료학적 측면에서 옥신토모듈린의 작용을 장기간 지속시키고 각 호르몬 펩타이드의 부작용을 극복할 수 있는 DPP-IV 내성 옥신토모듈린 유도체에 대한 연구들이 보고되고 있으며(Diabetes. 2009;58(10):2258-2266), 머크(Merck), 질랜드(Zeland), 메드이문(Medimmune), 한미약품 등 여러 회사에서 선통물질들에 대한 개발이 진행 중에 있다.

[20]

[21] 대한민국 특허출원 제2017-0103798호 및 대한민국 특허출원 제2018-0095717호에는 GLP-1 및 글루카곤 수용체에 대하여 이중작용을 갖는 아실화 옥신토모듈린 펩타이드 유사체가 개시되어 있다. 상기 종래기술에 기재되어 있는 아실화 옥신토모듈린 펩타이드 유사체 중에서 화합물 3은 내인성 호르몬 옥신토모듈린보다 GLP-1 및 글루카곤 수용체에 대한 우수한 potency(EC50<10pM)를 가지며, GLP-1 및 글루카곤 수용체에 대한 활성이 우수하고, 마우스 in vivo 1주 체중감소 평가에서 대조물질인 Liraglutide보다 우수한 체중감소 효과를 보이는 물질이다.

[22]

[23] 본 발명자들은 상기 화합물 3을 상업화하기 위해 개발하는 과정에서 마우스 약동력학 평가를 하였는데 반감기는 3.3시간으로 메드이문(Medimmune)사 MEDI0382의 반감기 4.0시간과 유사한 반감기를 가짐을 확인하였다(표 6, 도 1). MEDI0382는 현재 1일 1회 주사제로 임상 연구를 수행 중인 물질로서 상기 화합물 3은 MEDI0382의 반감기와 비교 시 1일 1회 주사제형으로 개발 가능할 것이다. 그러나, GLP-1 및 글루카곤 수용체 이중작용제의 1일 1회 제형은 매일 주사를 통해 투여해야 하므로 번거로움과 부담이 존재한다.

[24]

[25] 따라서, 본 발명자들은 약효를 유지하면서 생체내 반감기를 증가시켜 편의성을 증대시킬 수 있도록 주 1회 주사제형으로 투여할 수 있는 지속형 아실화 옥신토모듈린 펩타이드 유사체의 개발이 필요함을 인식하였다.

[26]

[27] 본 발명자들은 상기 필요성에 부합하는 지속형 GLP-1 및 글루카곤 수용체

이중작용제의 개발을 연구한 결과, 대한민국 특허출원 제2018-0095717호에 개시되어 있는 아실화된 옥신토모듈린 펩타이드 유사체인 화합물 3을 개량하여 GLP-1 및 글루카곤 수용체에 대한 이중 활성화 효능(dual GLP-1R/GlucagonR agonism)을 가지며, 대사 안정성을 증대시켜 생체내 반감기가 긴 지속형 아실화 옥신토모듈린 펩타이드 유사체를 개발함으로써 주 1회 주사제형으로 투여할 수 있는 본 발명을 완성하였다.

[28]

발명의 상세한 설명

기술적 과제

[29] 본 발명의 목적은 생체내 반감기가 증대된 GLP-1 및 글루카곤 수용체에 대한 이중 활성화 효능을 갖는 아실화 옥신토모듈린 펩타이드 유사체를 제공하는 것이고, 또한 상기 아실화 옥신토모듈린 펩타이드 유사체를 포함하는 비만 및 과체중, 또는 비만 또는 과체중을 동반하는 비 인슐린 의존성 당뇨병에 의해 야기되거나 특징지어지는 병태의 예방 또는 치료용 약학조성물을 제공하는 것이며, 또 다른 목적은 상기 아실화 옥신토모듈린 펩타이드 유사체를 유효성분을 함유하는 주 1회 투여할 수 있는 주사제형을 제공하는 것이다.

[30]

기술적 해결방법

[31] 상기 과제를 해결하기 위하여, 본 발명은 하기 화학식 I의 신규한 아실화 옥신토모듈린 펩타이드 유사체를 제공한다.

[32] <화학식 I>

[33] His-Aib-Gln-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-X₁

-Ser-Lys-Tyr-Leu-Asp-Aib-Arg-Arg-Ala-Gln-Asp-Phe-Val-Gln-Trp-Leu-Met-Asn-Thr-Lys-Glu-Tyr-Glu-X₂-Glu-Tyr-Glu (SEQ ID NO.14)

[34] 상기 식에서,

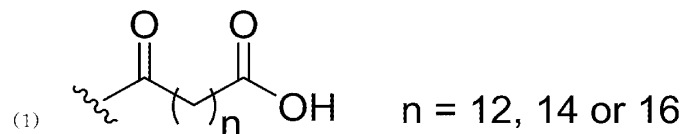
[35] X₁은 작용화된 Lys으로서 그 측쇄에 [(2-(2-(2-아미노에톡시)에톡시)아세트일)₂]-[감마글루타밀]-[옥타데카노일]([(2-(2-(2-aminoethoxy)ethoxy)acetoyl)₂]-

[36] [gamma glutamyl]-[octadecanoyl])가 접합된 형태이고;

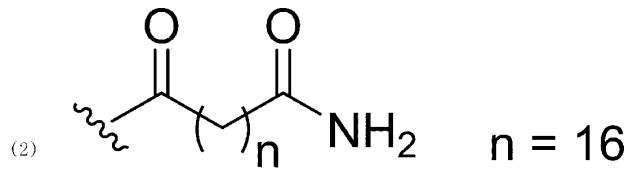
[37] X₂는 작용화된 Lys으로서 그 측쇄에 친유성 리피드 또는 스페이서-친유성 리피드 또는 중합체성 부분-스페이서-친유성 리피드 또는 스페이서-중합체성 부분-스페이서-친유성 리피드가 접합된 형태이며;

[38] 친유성 리피드는 하기 구조식 (1) 또는 (2)이고,

[39]



[40]



- [41] 중합체성 부분은 1~3개의
2-(2-(2-아미노에톡시)에톡시)아세트일(2-(2-(2-aminoethoxy)ethoxy)acetoyle)이며;
- [42] 스페이서는 r-Glu 또는 Lys 이다.
- [43]
- [44] 본 발명에서 아미노산은 하기 약어를 병용 기재하였다;
- [45] Ala(A), Lys(K), Asn(N), Asp(D), Cys(C), His(H), Ile(I), Met(M), Ser(S), Val(V), Gly(G), Leu(L), Pro(P), Thr(T), Phe(F), Arg(R), Tyr(Y), Trp(W), Glu(E), Gln(Q), Aib(aminoisobutyric acid).
- [46]
- [47] 본 발명에서 용어, “옥신토모듈린(oxyntomodulin)” 이란 글루카곤의 전구체인 프리-글루카곤으로부터 만들어지는 펩타이드를 의미하며, 야생형의 옥신토모듈린은 HSQGTFTSDYSKYLDSSRAQDFVQWLMNTKRNRNNIA(SEQ ID NO.1)의 아미노산 서열을 갖는다.
- [48]
- [49] 본 발명에서 X_2 의 구성요소 중 하나인 친유성 리피드는 리피드 말단의 아실기가 Lys 측쇄 또는 스페이서의 아민기와 아미드 결합의 형태로 부착될 수 있으며, 탄화수소 쇄의 말단 탄소가 카복실산 형태의 경우 C14~C18 포화 탄화수소 쇄를 포함하고, 탄화수소 쇄의 말단 탄소가 아미노카르복실산 형태의 경우 C18 포화 탄화수소 쇄를 포함한다.
- [50]
- [51] 스페이서는 r-Glu 또는 Lys 이며, Lys의 경우 아미노산 잔기의 아민기가, r-Glu의 경우 α -아미노기가 친유성리피드 또는 중합체성 부분과 공유결합 될 수 있다.
- [52]
- [53] 특정한 이론에 그 해석을 제한 받고자 하는 바는 아니나, 상기 화학식 I의 X_1 의 아실화는 펩타이드의 알파 나선 구조를 안정화시켜 GLP-1 수용체 또는/ 및 글루카곤 수용체에서 그 선택성이나 약리상 효능을 증가시키는 것으로 여겨지며(ACS Chem Biol. 2016;11:324-328), X_2 를 포함하는 7개의 아미노산 말단은 (EYEX₂EYE)혈류 내에서 알부민과 결합함으로써 본 발명의 화합물이 혈류 내 다양한 분해 효소의 기질로서 반응하는 것을 방지하여 생체 내 반감기를 향상시키는 것으로 여겨진다(Nat. Commun. 2017;8:16092).
- [54]
- [55] 상기 화학식 I의 펩타이드 구현예에는, 화합물 1(SEQ ID NO. 2), 화합물 2(SEQ ID NO. 3), 화합물 3(SEQ ID NO. 4), 화합물 4(SEQ ID NO. 5), 화합물 5(SEQ ID

NO. 6), 화합물 6(SEQ ID NO. 7), 화합물 7(SEQ ID NO. 8)이다.

[56]

[57] 본 발명의 상기 아실화 옥신토모듈린 펩타이드 유사체는 그 구조에 존재하는 임의의 아민기의 산부가염이나 임의의 카르복시기의 카르복실레이트염 또는 이의 알칼리 부가염으로서 제공될 수 있다.

[58]

[59] 또한, 본 발명은 상기 아실화 옥신토모듈린 펩타이드 유사체를 유효성분으로 하며, 약학적으로 허용 가능한 부형제를 포함하는 비만 및 과체중, 또는 비만 또는 과체중을 동반하는 비 인슐린 의존성 당뇨병의 예방 및 치료용 약학조성물에 관한 것이다.

[60]

[61] 본 발명의 용어 “예방”이란 목적하는 질환의 발병을 억제하거나 지연시키는 모든 행위를 의미한다. 또한, 본 발명의 용어 “치료”란 발생된 질병의 증상을 경감, 개선 또는 완화시키는 모든 행위를 의미한다.

[62]

[63] 본 발명의 아실화 옥신토모듈린 펩타이드 유사체는 글루카곤 수용체와 GLP-1 수용체에 대한 이중 작용제로서 음식 섭취에 있어서의 GLP-1의 효과와 지방 대사와 에너지 소비에 있어서의 글루카곤의 효과를 모두 나타내므로, 본 발명의 아실화 옥신토모듈린 펩타이드 유사체를 포함하는 비만 및 과체중의 예방 및 치료용 약학조성물은 과도하게 축적된 지방의 제거와 음식 섭취 억제의 조합된 효과를 통해 체중의 조절에 있어서 의학적으로 유리한 효과를 유도할 수 있다.

[64]

[65] 또한, 본 발명의 아실화 옥신토모듈린 펩타이드 유사체를 포함한 약학 조성물은 혈당을 감소시켜 비만 또는 과체중을 동반하는 당뇨병 예방 또는 치료에 사용될 수 있다. 특히 비만이 동반되는 비 인슐린 의존성 당뇨병인 2형 당뇨병을 치료하는데 사용될 수 있다. 특정한 이론에 그 해석을 제한 받고자 하는 바는 아니나, 본 발명의 아실화 옥신토모듈린 펩타이드 유사체를 포함한 약학 조성물은 글루카곤 유도체 중의 하나로 혈당을 감소시키는 역할을 하는 GLP-1 수용체에의 활성이 높아 궁극적으로 혈당 조절에 유용하다.

[66]

[67] 따라서, 본 발명의 아실화 옥신토모듈린 펩타이드 유사체를 포함한 약학조성물은 비만, 병적 비만, 수술전 병적 비만, 비만 관련 염증, 비만 관련 췌장 질환, 비만 유도된 수면 무호흡, 비만을 동반하는 당뇨병의 치료 및 예방과 같은, 과체중에 의해 야기되거나 특징지어지는 임의의 병태의 직접 또는 간접 치료법의 일환으로 단독으로 투여되거나 또는 다른 관련 약제와 병용 투여될 수 있다. 또한, 본 발명의 아실화 옥신토모듈린 펩타이드 유사체를 포함한 약학조성물은 체중에 의한 효과의 결과이거나 이와 관련되어 있을 수 있는 병태, 예를 들면 대사 증후군, 고혈압, 동맥경화 유발 이상지혈증, 죽상동맥경화증,

동맥경화증, 관상동맥 심장 질환, 또는 뇌졸중의 예방을 위해 단독으로 투여되거나 또는 다른 관련 약제와 병용 투여될 수 있다.

[68]

[69] 또한, 본 발명은 아실화 옥신토모듈린 펩타이드 유사체를 유효성분을 함유하는 주 1회 투여할 수 있는 주사제형을 제공한다.

[70]

[71] 본 발명의 아실화 옥신토모듈린 펩타이드 유사체를 포함하는 주사제형은 완충제, 보존제, 무통화제, 가용화제, 등장화제, 안정화제 등을 혼합하여 사용할 수 있고, 단위 투약 앰플 또는 다수회 투약 형태로 제조할 수 있다.

[72]

[73] 본 발명의 아실화 옥신토모듈린 펩타이드 유사체는 대한민국 특허출원 제2018-0095717호에 기재된 아실화 옥신토모듈린 펩타이드 유사체보다 개선된 약동력학(생체내 반감기)을 나타낸다. 그러므로 본 발명에서 개선된 생체내 반감기는 1일 1회 주사제의 단점을 극복한 주 1회 주사제와 같은 지속형 펩타이드 유사체로서 사용의 편의성을 증대시킬 수 있다.

[74]

[75] 나아가, 본 발명에서 “투여”는, 적절한 방법으로 환자에게 치료 용도의 물질을 도입하는 것을 포함하며, 본 발명의 아실화 옥신토모듈린 펩타이드 유사체를 포함한 약학조성물은 약물이 목적 조직에 도달하여 목적하는 효능을 나타낼 수 있는 한 다양한 제형의 형태로 다양한 경로를 통하여 투여될 수 있다. 즉, 복강내 투여, 정맥내 투여, 근육내 투여 이외에도 피하 투여, 피내 투여, 경구 투여, 국소 투여, 비내 투여, 폐내 투여, 직장내 투여 등이 가능하나, 그 제형과 투여 방법이 제한되지는 않는다.

[76]

[77] 본 발명의 아실화 옥신토모듈린 펩타이드 유사체를 포함한 약학조성물은 약제학적으로 허용 가능한 담체를 포함할 수 있다. 약제학적으로 허용되는 담체는 경구투여시에는 결합제, 활택제, 붕해제, 부형제, 가용화제, 분산제, 안정화제, 현탁화제, 색소, 향료 등을 사용할 수 있으며, 국소투여용의 경우에는 기제, 부형제, 윤활제, 보존제 등을 다양하게 사용할 수 있고, 담체, 부형제 및 희석제의 예로는 락토즈, 덱스트로즈, 수크로즈, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸셀룰로즈, 미정질셀룰로즈, 폴리비닐피롤리돈, 물, 메틸하이드록시벤조에이트, 프로필하이드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 또는 광물유 등이 있다.

[78]

[79] 본 발명의 아실화 옥신토모듈린 펩타이드 유사체를 포함한 약학조성물은 주사제형 이외에도 상술된 담체와 혼합하여 다양하게 제조될 수 있다. 예를 들어, 경구 투여 시에는 정제, 트로키, 캡슐, 엘릭서, 서스펜션, 시럽, 웨이퍼 등의

형태로 제조할 수 있으며, 이외 용액, 현탁액, 정제, 환약, 캡슐, 서방형 제제 등으로도 제형화 할 수 있다.

[80]

[81] 본 발명에 따른 투여량 또는 복용량은 환자의 체중, 연령, 성별, 건강상태, 식이, 배설율 및 질환의 중증도에 따라 그 범위가 다양하며, 성인 기준으로 투여량은 1일당 0.001 mg/kg 내지 500 mg/kg일 수 있다.

[82]

발명의 효과

[83]

본 발명은 GLP-1 및 글루카곤 수용체 모두에 대해 활성을 갖고, 생체내 반감기가 증대된 지속형 아실화 옥신토모듈린 펩타이드 유사체를 제공한다. 특히, 본 발명에 의한 아실화 옥신토모듈린 펩타이드 유사체는 야생형 옥신토모듈린 뿐만 아니라 종래 아실화된 옥신토모듈린 펩타이드 유사체(대한민국 특허출원 제10-2018-0095717호, 아실화 옥신토모듈린 펩타이드 유사체)에 비해 생체 내 반감기가 매우 우수한 특징을 가지고 있다.

[84]

[85] 따라서, 본 발명은 생체내 반감기가 증대된 지속형 아실화 옥신토모듈린 펩타이드 유사체를 포함하여 주 1회 주사 가능하므로 1일 1회 주사제의 단점인 매일 주사를 맞아야 하는 번거로움과 부담을 극복하고 사용의 편의성을 증대시킬 수 있을 뿐만 아니라, 일차적으로 비만 또는 과체중에 의해 야기되거나 특징지어지는 병태의 예방 또는 치료에 유용하게 적용될 수 있으며, 나아가 비만 또는 과체중을 동반하는 비 인슐린 의존성 당뇨의 예방 또는 치료에 사용될 수 있다.

[86]

도면의 간단한 설명

[87]

도 1은 본 발명에 의한 아실화 옥신토모듈린 펩타이드 유사체인 화합물 1, 화합물 2 또는 화합물 7의 마우스에서 1주 반복 체중감소 약효평가 결과를 나타낸 그래프로써, 도 1a는 체중감소 결과이고 도 1b는 누적 사료 섭취량 결과를 나타낸 그래프이다.

[88]

도 2는 본 발명에 의한 아실화 옥신토모듈린 펩타이드 유사체인 화합물 3의 마우스에서 1주 반복 체중감소 약효평가 결과를 나타낸 그래프로써, 도 2a는 체중감소 결과이고 도 2b는 누적 사료 섭취량 결과를 나타낸 그래프이다.

[89]

도 3은 본 발명에 의한 아실화 옥신토모듈린 펩타이드 유사체인 화합물 4, 화합물 5 또는 화합물 6의 마우스에서 1주 반복 체중감소 약효평가 결과를 나타낸 그래프로써, 도 3a는 체중감소 결과이고 도 3b는 누적 사료 섭취량 결과를 나타낸 그래프이다.

[90]

도 4는 본 발명에 의한 아실화 옥신토모듈린 펩타이드 유사체의 마우스에서 단회 투여 후 약동력학 결과를 나타낸 그래프이다.

[91] 도 5는 본 발명에 의한 아실화 옥신토모듈린 펩타이드 유사체의 원숭이에서 단회 투여 후 약동력학 결과를 나타낸 그래프이다.

[92] 도 6은 본 발명에 의한 아실화 옥신토모듈린 펩타이드 유사체의 마우스에서 내당력 개선 효과 검정 결과를 나타낸 그래프이다.

[93]

발명의 실시를 위한 최선의 형태

[94] 본 발명에 대한 보다 구체적인 내용을 하기 실시예 및 실험예에 의하여 설명한다. 이들 실시예는 본 발명에 대한 이해를 돕기 위한 것일 뿐, 어떤 의미로든 본 발명의 범위가 이들 실시예로 한정되는 것은 아니다.

[95]

[96] <실시예 1> 본 발명에 의한 아실화 옥신토모듈린 펩타이드 유사체 합성

[97] 본 발명의 일부 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.

[98]

[99] 본 발명에서 아실화 옥신토모듈린 펩타이드 유사체를 합성하기 위해 자동합성기인 protein technologies, Inc.사의 Symphomy X(합성 scale: 0.1mmol)모형을 이용하여 합성하였고, 본 발명의 의해 합성된 아실화 옥신토모듈린 펩타이드 유사체인 화합물 1(SEQ ID NO. 2) 내지 화합물 7(SEQ ID NO. 8)의 구조는 표 1 및 표 2에 나타내었다. 구체적인 합성 과정은 다음과 같다.

[100]

[101] Fmoc-AA-OH(1mmol), HBTU(1mmol), NMM(n-methylmorpholine)(2mmol) 및 DMF(7ml) 혼합액을 Fmoc이 제거된 레진(resin)에 넣고 실온에서 1시간 교반시킨다. 반응액을 배출시키고 DMF(N,N-Dimethylmethanamide) 7ml로 2회 세척한다. 20% Piperidine DMF용액(5ml)으로 Fmoc 제거(cleavage)반응을 실온에서 5분 2회 수행한 후, DMF(7ml)로 6회 세척한다. 이 과정을 자동합성기를 이용하여 반복하면서 아미노산을 커플링(coupling) 시킨다.

[102]

[103] Lys side 합성은 Fmoc-K(dde)-OH 또는 Fmoc-K(Alloc)-OH를 사용하여 커플링하고, 마지막 His는 Boc-His(trt)-OH를 사용하여 커플링한다. 작용화된 Lys 측쇄의 합성은 2% hydralazine 또는 tetrakis(triphenylphosphine)palladium(0)을 이용하여 보호화 된 dde 또는 Alloc을 제거 후 목적하는 측쇄 부분(PEG2, rE, K, C14~18 di-acid 등)을 커플링시킨다.

[104]

[105] 상기에서 얻은 peptide-resin 0.1mmol에 Reagent K (trifluoroacetic acid, water, thioanisole, 1,2-ethanedithiol (87.5, 5.0, 5.0, 2.5)) 용액 8ml를 5~10°C로 냉각 후 넣고 실온에서 2~3시간 교반시킨다. Drain 후 소량의 TFA로 resin을 세척하고, 여액을

합하여 diethyl ether 100ml에 넣어 결정화 시킨 후, 생성된 고체를 여과하여 crude 펩타이드를 얻는다. 얻어진 조결 펩타이드를 preparative HPLC로 정제하여 목적 화합물을 얻는다.

[106]

[107] 분자량분석은 shimadzuAxima Assurance MALDI-TOF 이용하였으며, Matrix는 CHCA(α -Cyano-4-hydroxycinnamic acid)를 사용하였다.

[108]

[표1]

본 발명의 아실화 옥신토모듈린 펩타이드 유사체의 구조

화합물	구조
화합물 1	
화합물 2	
화합물 3	
화합물 4	
화합물 5	
화합물 6	
화합물 7	

[표 2]

본 발명의 아실화 옥신토모듈린 펩타이드 유사체의 서열 및 구조

SEQ ID NO.	명칭	서열
1	OXM(고유)	H-HSQTFTSDKSKYLDsRRAQDFVQWLMNTKRNRRNNIA-OH
2	화합물 1	H-HAibQGTFTSDK([2-(2-(2-aminoethoxy)ethoxy)acetyl] ₂)-[γ-glutamyl]-[octadecanoyl])SKYLDAibRRAQDFVQWLMNTKEYEK(13-carboxy-1-oxotridecyl)EYE-OH
3	화합물 2	H-HAibQGTFTSDK([2-(2-(2-aminoethoxy)ethoxy)acetyl] ₂)-[γ-glutamyl]-[octadecanoyl])SKYLDAibRRAQDFVQWLMNTKEYEK(15-carboxy-1-oxopentadecyl)EYE-OH
4	화합물 3	H-HAibQGTFTSDK([2-(2-(2-aminoethoxy)ethoxy)acetyl] ₂)-[γ-glutamyl]-[octadecanoyl])SKYLDAibRRAQDFVQWLMNTKEYEK(17-carboxy-1-oxoheptadecyl)EYE-OH
5	화합물 4	H-HAibQGTFTSDK([2-(2-(2-aminoethoxy)ethoxy)acetyl] ₂)-[γ-glutamyl]-[octadecanoyl])SKYLDAibRRAQDFVQWLMNTKEYEK([lysyl]-[17-carboxy-1-oxoheptadecyl])EYE-OH
6	화합물 5	H-HAibQGTFTSDK([2-(2-(2-aminoethoxy)ethoxy)acetyl] ₂)-[γ-glutamyl]-[octadecanoyl])SKYLDAibRRAQDFVQWLMNTKEYEK([2-(2-(2-aminoethoxy)ethoxy)acetyl] ₃)-[γ-glutamyl]-[17-carboxy-1-oxoheptadecyl])EYE-OH
7	화합물 6	H-HAibQGTFTSDK([2-(2-(2-aminoethoxy)ethoxy)acetyl] ₂)-[γ-glutamyl]-[octadecanoyl])SKYLDAibRRAQDFVQWLMNTKEYEK([lysyl]-[2-(2-(2-aminoethoxy)ethoxy)acetyl] ₃)-[γ-glutamyl]-[17-carboxy-1-oxoheptadecyl])EYE-OH
8	화합물 7	H-HAibQGTFTSDK([2-(2-(2-aminoethoxy)ethoxy)acetyl] ₂)-[γ-glutamyl]-[octadecanoyl])SKYLDAibRRAQDFVQWLMNTKEYEK(17-aminocarboxy-1-oxoheptadecyl)EYE-OH

[110] <비교예 1> 아실화 옥신토모듈린 펩타이드 유사체 합성

[111] 본 발명과 비교하기 위하여, 구조적으로 유사성을 갖는 아실화 옥신토모듈린 펩타이드 유사체를 실시예 1의 방법으로 합성하였다. 하기 비교예 화합물 8은

대한민국 특허출원 제2018-0095717호에 기재되어 있는 화합물 3으로서, C-말단 7개 아미노산 (EYEX2EYE)를 가지지 않은 펩타이드 유사체이고, 비교예 화합물 9는 비교예 화합물 8에 문헌(ACS Chem Biol. 2016;11:324-328)에서 언급한 리간드를 도입한 펩타이드 유사체이며, 비교예 화합물 10과 비교예 화합물 11은 X2의 친유성 리피드로서 각각 C14와 C16의 탄소쇄 말단에 아미노카르복실기를 가진 펩타이드 유사체이고, 비교예 화합물 12는 X2의 친유성 리피드로서 C16이 중합체성 부분으로 연결된 펩타이드 유사체이다. 상기 비교예 화합물 8 내지 비교예 화합물 12의 구조는 표 3 및 표 4에 나타내었다.

[112] [$\frac{5}{2}$ 3]

아실화 옥신토모돌린 펩타이드 유사체의 구조

화합물	구조
화합물 8*	
화합물 9	
화합물 10	
화합물 11	
화합물 12	

[113]

[표4]

아실화 옥신토모듈린 펩타이드 유사체의 서열 및 구조

SEQ ID NO.	명칭	서열
9	화합물 8	H-HAibQGTFTSDK([(2-(2-(2-aminoethoxy)ethoxy)acetyl) ₂]-[gammaglutamyl]-[octadecanoyl])SKYLDAibRRAQDFVQWLMNTK-OH
10	화합물 9	H-HAibQGTFTSDK([(2-(2-(2-aminoethoxy)ethoxy)acetyl) ₂]-[gammaglutamyl]-[octadecanoyl])SKYLDAibRRAQDFVQWLMNTKEYEK(hexadecanoyl)EYE-OH
11	화합물 10	H-HAibQGTFTSDK([(2-(2-(2-aminoethoxy)ethoxy)acetyl) ₂]-[gammaglutamyl]-[octadecanoyl])SKYLDAibRRAQDFVQWLMNTKEYEK(13-aminocarboxy-1-oxotridecyl)EYE-OH
12	화합물 11	H-HAibQGTFTSDK([(2-(2-(2-aminoethoxy)ethoxy)acetyl) ₂]-[gammaglutamyl]-[octadecanoyl])SKYLDAibRRAQDFVQWLMNTKEYEK(15-aminocarboxy-1-oxopentadecyl)EYE-OH
13	화합물 12	H-HAibQGTFTSDK([(2-(2-(2-aminoethoxy)ethoxy)acetyl) ₂]-[gammaglutamyl]-[octadecanoyl])SKYLDAibRRAQDFVQWLMNTKEYEK([(2-(2-(2-aminoethoxy)ethoxy)acetyl) ₃]-[hexadecanoyl])EYE-OH

[114] <실례 1> **GLP-1 및 글루카곤 수용체 활성화능 검증**

[115] 세포에 사람 GLP-1 또는 글루카곤 수용체를 일시적으로 과발현시켜 본 발명의 아실화 옥신토모듈린 펩타이드 유사체가 수용체를 활성화시킴으로써 증가되는 사이클릭 아데노신 일인산(cAMP)이 순차적으로 사이클릭 아데노신 일인산 반응성 프로모터(CRE)를 활성화시키게 되면 이후 증가되는 루시퍼라아제 활성정도를 각 수용체 활성화에 대한 효능의 의미로 평가하였다.

[116]

[117] 양성 대조약물로는 내인성 리간드 GLP-1 또는 글루카곤을 각각의 평가에 사용하였고, 비교예로는 상기 화합물 비교예 8-12 아실화 옥신토모듈린 펩타이드 유사체를 합성하여 이를 비교예로 하였다.

[118]

[119] 세포는 중국 햄스터 난소 세포(CHO-K1)에 사람 GLP-1 또는 글루카곤 발현벡터(이상 Origene)를 반딧불이 루시퍼라아제(firefly luciferase) 또는 레닐라루시퍼라아제(renilla luciferase) 발현을 유도할 수 있는 각각의 플라스미드 DNA들과 함께 리포펙타민 플러스 시약(Lipofectamine Plus reagent, Invitrogen)을 이용하여 상기 세포에 일시적으로 트랜스펙션시켰다. 3시간 트랜스펙션 후 10% 소태아혈청(FBS)을 포함하는 영양배지(α -MEM)로 교환하였다. 다음 날 본 발명의 아실화 옥신토모듈린 펩타이드 유사체 및 0.1% 소혈청알부민(BSA)을

포함하는 α -MEM 배지로 교환하였고, 6시간 후 세포가 잠긴 배지와 동량의 듀얼 루시퍼라아제 검색 시약(Dual luciferase assay reagent, Promega)을 가하여 연속적으로 반딧불이 루시퍼라아제 및 레닐라루시퍼라아제의 활성을 측정하였다. 반딧불이 루시퍼라아제 활성은 레닐라루시퍼라아제 활성으로 보정하여 트랜스펙션에 대한 효율을 산출하였다.

[120]

[121] 수용체의 활성 효능은 본 발명의 아실화 옥신토모듈린 펩타이드 유사체에 대한 다중 농도 평가를 실시하여 본 발명의 아실화 옥신토모듈린 펩타이드 유사체들의 GLP-1 또는 글루카곤 최대 효과에 대한 상대적 활성화도(%)를 구하여 50% 활성화를 나타내는 농도(EC_{50})를 비선형회귀 분석을 이용하여 산출한 값을 표 5에 나타내었다.

[122] [표5]

아실화 옥신토모듈린 펩타이드 유사체의 사람 GLP-1/글루카곤 수용체 활성화능

구분	화합물	수용체 활성			
		GLP-1 수용체		GCG 수용체	
		EC_{50} *	최대 활성 (% vs GLP-1)	EC_{50} *	최대 활성 (% vs GCG)
실시예	화합물 1	A	101.7%	A	107.0%
	화합물 2	B	103.9%	B	100.1%
	화합물 3	B	98.3%	B	98.3%
	화합물 4	B	87.9%	C	95.4%
	화합물 5	B	93.6%	B	99.4%
	화합물 6	B	83.8%	B	89.1%
	화합물 7	A	90.8%	A	100.1%
비교예	화합물 8	A	99.3%	A	102.8%
	화합물 9	B	70.4%	B	73.3%
	화합물 10	A	105.3%	A	110.5%
	화합물 11	A	92.8%	A	98.5%
	화합물 12	A	101.9%	A	89.6%

* A: $EC_{50} < 100 \text{ pM}$ 미만, B: $100 \text{ pM} \leq EC_{50} < 1000 \text{ pM}$, C: $EC_{50} \geq 1000 \text{ pM}$

[123] 실험을 통해 본 발명에 의한 아실화 옥신토모듈린 펩타이드 유사체의 화합물들은 야생형 옥신토모듈린과 같이 GLP-1 및 글루카곤 수용체에 대한 이중 활성을 나타내고 있음을 알 수 있고, 최대 efficacy 측면에서 내인성 호르몬인 GLP-1 및 glucagon이 갖는 충분한 활성을 나타냈다.

[124]

[125] <실험예 2> 본 발명에 의한 아실화 옥신토모듈린 펩타이드 유사체의 1주 반복 체중감소 약효평가

[126] 본 실험은 본 발명에 의한 아실화 옥신토모듈린 펩타이드 유사체의 체중 감소

약효를 확인하기 위해 음성 실험용 생쥐(C57BL/6 mouse)에 고지방을 함유하고 있는 식이를 공급하였고, 고지방 식이에 의해 비만이 유도된 쥐들을 이용하여 실험 전 체중에 따라 군분리 후 평가하였다. 본 발명의 실시예 중 화합물 1, 화합물 2 및 화합물 7은 각각 0.1% Cremophor EL이 함유된 멸균 주사용 증류수에 30 nmol/kg 용량이 되도록 조제 하였고, 표 6에 기재된 것과 같이 1일 1회 총 7일 동안 피하 주사 하였다. 매일 1회 일정한 시간에 체중 및 사료섭취량을 측정하여 초기 체중 대비 펩타이드 유사체들의 경시적인 체중 감소 약효를 확인하였고, 그 결과를 도 1a 및 도 1b에 나타내었다.

[127] [표6]

아실화 옥신토모듈린펩타이드 유사체의 1주 반복 체중감소 약효평가

그룹	투여 약물 및 용량	투여방법	
대조군	0.1% Cremophor EL, vehicle	S.C.	1일1회*7
실험군	화합물 1, 30 nmol/kg/QD		
	화합물 2, 30 nmol/kg/QD		
	화합물 7, 30 nmol/kg/QD		

[128] 실험 결과, 본 발명의 아실화 옥신토모듈린 펩타이드 유사체인 화합물 1, 화합물 2 및 화합물 7은 초기 체중 대비 각각 -44.9%, -26.9% 및 -6.8%의 유의적인 체중변화가 관찰되었고, 누적 사료 소비량은 vehicle 대조군 대비 각각 75%, 46% 및 10% 감소되었다.

[129]

[130] **<실험예 3> 본 발명에 의한 아실화 옥신토모듈린 펩타이드 유사체의 1주 반복 체중감소 약효평가**

[131] 본 실험은 본 발명에 의한 아실화 옥신토모듈린 펩타이드 유사체의 체중 감소 효과를 확인하기 위해 음성 실험용 생쥐(C57BL/6 mouse)에 고지방을 함유하고 있는 식이를 공급하였고, 고지방 식이에 의해 비만이 유도된 쥐들을 이용하여 실험 전 체중에 따라 군분리 후 평가하였다. 본 발명의 실시예에 의한 아실화 옥신토모듈린 펩타이드 유사체 중 화합물 3은 0.1% Cremophor EL이 함유된 멸균 주사용 증류수에 30 nmol/kg 용량이 되도록 조제 후 표 9에 기재된 것과 같이 1일 1회 총 7일 동안 피하 주사 하였다. 매일 1회 일정한 시간에 체중 및 사료섭취량을 측정하여 초기 체중 대비 경시적인 체중 감소 약효를 확인하였고, 그 결과를 도 2a 및 도 2b에 나타내었다.

[132]

[표7]

아실화 옥신토모듈린펩타이드 유사체의 1주 반복 체중감소 약효평가

그룹	투여 약물 및 용량	투여방법	
대조군	0.1% Cremophor EL, vehicle	S.C.	1일1회*7
실험군	화합물 3, 30 nmol/kg/QD		

- [133] 실험 결과, 본 발명에 의한 아실화 옥신토모듈린 펩타이드 유사체인 화합물 3을 주사한 군의 체중은 초기 수치 대비 -16.1%의 유의적인 변화가 관찰되었고, 누적 사료 소비량은 vehicle 대조군 대비 40% 수준 감소되었다.

[134]

- [135] **<실험예 4> 본 발명에 의한 아실화 옥신토모듈린 펩타이드 유사체의 1주 반복 체중감소 약효평가**

- [136] 본 실험은 본 발명에 의한 아실화 옥신토모듈린 펩타이드 유사체의 체중 감소 약효를 확인하기 위해 웅성 실험용 생쥐(C57BL/6 mouse)에 고지방을 함유하고 있는 식이를 공급하였고, 고지방 식이에 의해 비만이 유도된 쥐들을 이용하여 실험 전 체중에 따라 군분리 후 평가하였다. 본 발명의 실시예에 의한 아실화 옥신토모듈린 펩타이드 유사체 중 화합물 4, 화합물 5 또는 화합물 6은 각각 0.1% Cremophor EL이 함유된 멸균 주사용 증류수에 30 nmol/kg 용량이 되도록 조제하였고, 표 8에 기재된 것과 같이 1일 1회 총 7일 동안 피하 주사 하였다. 매일 1회 일정한 시간에 체중 및 사료섭취량을 측정하여 초기 체중 대비 아실화 옥신토모듈린 펩타이드 유사체들의 경시적인 체중 감소 약효를 확인하였고, 그 결과를 도 3a 및 도 3b에 나타내었다.

[137]

[138] [표8]

아실화 옥신토모듈린펩타이드 유사체의 1주 반복 체중감소 약효평가

그룹	투여 약물 및 용량	투여방법	
대조군	0.1% Cremophor EL, vehicle	S.C.	1일1회*7
실험군	화합물 4, 30 nmol/kg/QD		
	화합물 5, 30 nmol/kg/QD		
	화합물 6, 30 nmol/kg/QD		

- [139] 실험 결과, 본 발명의 아실화 옥신토모듈린 펩타이드 유사체인 화합물 4, 화합물 5 및 화합물 6은 초기 체중 대비 각각 -24.3%, -30.3% 및 -26.9%의 유의적인 체중변화가 관찰되었고, 누적 사료 소비량은 vehicle 대조군 대비 각각

67%, 83% 및 75% 감소되었다.

[140]

[141] <실험예 5> 단 회 마우스 약동력학 평가

[142] 본 발명에 의한 아실화 옥신토모듈린 펩타이드 유사체에 대한 마우스 약동력학 평가를 위해 ICR 마우스를 사용하였다. 본 발명에 의해 제조된 아실화 옥신토모듈린 펩타이드 유사체인 화합물 1, 화합물 2, 화합물 3, 또는 화합물 7을 0.1% Cremophore EL이 함유된 멸균 주사용 증류수에 30 nmmol/kg 용량이 되도록 조제한 후 ICR 마우스에 피하 주사 하였으며, 투여 후 지정된 시간에 채혈하여 혈중약물농도 분석을 통해 약동력학 지표들을 산출하고 그 결과를 표 9 및 도 4에 나타내었다.

[143] [표9]

아실화 옥신토모듈린 펩타이드 유사체의 마우스 약동력학 평가

구분	화합물	마우스 PK (S.C. 반감기)*
실시에	화합물 1	B
	화합물 2	B
	화합물 3	B
	화합물 7	B
비교예	화합물 8	A
	Semaglutide	B
	MEDI0382	A

* A: 6시간 미만, B: 6시간 이상

[144] 상기 표 9 및 도 4에서 알 수 있는 바와 같이, 실험 결과 본 발명의 실시에에 의한 아실화 옥신토모듈린 펩타이드 유사체 4종(화합물 1, 화합물 2, 화합물 3, 화합물 7)은 비교예 화합물 8(대한민국 특허출원 제 2018-0095717호 화합물 3) 및 비교예 MEDI0382 대비 6시간 이상의 긴 반감기를 나타내어 신규 알부민 리간드 도입으로 인한 화학적 안정성 개선을 통해 단일 아실화된 옥신토모듈린 펩타이드 유사체 비교예 화합물 8보다 월등히 반감기가 개선되었음을 확인하였다.

[145]

[146] 더구나, 비교예 화합물 8의 반감기는 1일 1회 주사제로 개발 중인 비교예 MEDI0382의 반감기와 유사하였고, 이는 비교예 화합물 8은 1일 1회 주사제로만 개발이 가능하다는 것을 확인할 수 있다. 반면, 본 발명의 실시에에 의한 아실화 옥신토모듈린 펩타이드 유사체 4종은 비교예 화합물 8 보다 개선된 PK 반감기를 보였고, 주 1회 주사제로 개발된 Semaglutide와 유사한 반감기를 보였다. 따라서, 상기 본 발명의 아실화 옥신토모듈린 펩타이드 유사체는 주 1회 제형의 지속성

약물로 개발이 가능한 물질임을 확인하였다.

[147]

[148] <실험예 6> 단 회 원숭이 약동력학 평가

[149] 본 발명에 의한 아실화 옥신토모듈린 펩타이드 유사체의 원숭이 약동력학 평가를 위해 게잡이 원숭이(Cynomolgus monkey)을 사용하였다. 본 발명에 의한 아실화 옥신토모듈린 펩타이드 유사체인 화합물 1, 화합물 2, 화합물 3, 화합물 4, 화합물 5, 화합물 6 또는 화합물 7을 0.1% Cremophor EL이 함유된 멸균 주사용 증류수에 100 nmol/kg 용량이 되도록 조제 후 게잡이 원숭이에 단 회 피하 주사 하였으며, 투여 후 지정된 시간에 채혈하여 혈중약물농도 분석을 통해 약동력학 지표들을 산출하여 그 결과를 표 10 및 도 5에 나타내었다.

[150]

[151] [표10]

아실화 옥신토모듈린 펩타이드 유사체의 원숭이 약동력학 평가

구분	화합물	원숭이 PK (S.C. 반감기)*
실시에	화합물 1	C
	화합물 2	C
	화합물 3	E
	화합물 4	D
	화합물 5	D
	화합물 6	C
	화합물 7	E
비교예	화합물 9	B
	화합물 10	A
	화합물 11	B
	화합물 12	B
	Semaglutide	E
	MEDI0382	A

* A: 6시간 미만, B: 6시간~12시간 미만, C: 12시간~18시간 미만, D: 18시간~24시간 미만, E: 24시간 이상

[152]

[153] 상기 표 10 및 도 5에서 알 수 있는 바와 같이, 실험 결과, 본 발명의 실시에에 의한 아실화 옥신토모듈린 펩타이드 유사체 7종(화합물 1~7)은 비교예 화합물 4종 및 1일 1회 주사제로 개발중인 비교예 MEDI0382 대비 12시간 이상의 긴 반감기를 나타내어 신규 알부민 리간드 도입으로 인한 화학적 안정성 개선을 통해 월등히 반감기가 개선되었음을 확인하였다. 특히, 화합물 3과 화합물 7은 원숭이 PK 반감기가 24시간 이상으로 주 1회 주사제로 개발된 Semaglutide와 유사한 반감기를 보여 주 1회 제형의 지속성 약물로의 개발이 가능한 물질이다.

[154]

[155] 비교예 화합물 9는 비교예 화합물 8 (대한민국 특허출원 제 2018-0095717호

화합물 3)에 문헌 (Nat. Commun. 2017;8:16092)에서 언급한 알부민 리간드를 도입한 펩타이드 유사체로서 반감기가 12시간 미만이었고, 이는 문헌의 알부민 리간드의 도입만으로는 지속형 (long-acting) 펩타이드 유사체를 개발할 수 없음을 알 수 있다.

[156]

[157] 펩타이드 유사체 골격의 34번 Lys 측쇄에 말단이 아미노카르복실기 형태의 친유성 리피드를 가진 비교예 화합물 10, 비교예 화합물 11, 화합물 7은 각각 C14, C16, C18의 탄소쇄 길이를 가지고 있다. 화합물 7은 반감기 시간이 24시간 이상인 반면 비교예 화합물 10과 비교예 화합물 11은 12시간 미만을 보여 친유성 리피드의 말단이 아미노카르복실기인 경우 탄소쇄 길이가 C18인 경우에만 긴 반감기를 가짐을 알 수 있다.

[158]

[159] 펩타이드 유사체 골격의 34번 Lys 측쇄에 말단이 카르복실기 형태의 친유성 리피드를 가진 화합물 1, 화합물 2, 화합물 3은 각각 C14, C16, C18의 탄소쇄 길이를 가지고 있다. 이 물질들은 모두 12시간 이상의 반감기를 보였고, 특히 화합물 3은 24시간 이상의 반감기를 보였다. 긴 반감기를 가지기 위하여 친유성 리피드의 말단은 카르복실기 치환체를 가지는 것이 바람직하며 탄소쇄의 길이가 길수록 더 나은 효과를 가진다.

[160]

[161] 펩타이드 유사체 골격의 34번 Lys 측쇄에 친유성 리피드가 스페이서와 중합체성 부분의 조합으로 결합된 화합물 4, 화합물 5, 화합물 6은 비교예 물질들과 비교하여 반감기 시간이 12시간~24시간 미만으로 긴 반감기를 보인 반면, 비교예 물질 12는 친유성 리피드가 중합체성 부분으로 연결됨에도 불구하고 12시간 미만의 보다 짧은 반감기를 보였다. 중합체성 부분이 반감기에 주는 영향보다 친유성 리피드의 말단의 영향이 큼을 알 수 있다.

[162]

[163] **<실험예 7> 마우스에서 내당력 개선 효과 검정**

[164] 본 실험은 웅성 실험용 생쥐(ICR mouse)에 본 발명에 의한 아실화 옥신토모듈린 펩타이드 유사체의 내당력 개선효과를 식후 혈당 조절능 개선효과의 의미로써 평가하였다. 실험용 생쥐를 실험 전일 절식 시킨 후, 본 발명의 실시예에 의한 아실화 옥신토모듈린 펩타이드 유사체인 화합물 2, 화합물 3 또는 화합물 7을 0.1% Cremophor EL을 함유하는 멸균 주사용 증류수에 조제하여 포도당 투여 6시간 전에 피하 주사 하였다. 아실화 옥신토모듈린 펩타이드 유사체 주사 6시간 후에 포도당 용액을 경구 투여하였고, 포도당 용액 투여 직전 및 포도당 용액 투여 후 2시간 동안 지정된 시간에 미정맥을 통해 전혈의 혈당을 측정하였다. 그 결과는 경시적인 혈당곡선의 곡선하면적(Area under the curve; AUC)을 산출하여 vehicle 대조군의 혈당 AUC 대비 아실화 옥신토모듈린 펩타이드 유사체의 혈당 AUC를 백분율로 산출하였고, 그 결과를

도 6에 나타내었다.

[165]

[166] 도 6에서 알 수 있는 바와 같이, 실험결과 본 발명에 의한 아실화 옥신토모듈린 펩타이드 유사체인 화합물 2, 화합물3 또는 화합물 7은 30 nmol/kg 용량에서 glucose 대조군 대비 각각 42.1%, 26.7% 또는 33.9% 의 유의적인 혈당 AUC 감소를 나타냈다. 본 발명에 의한 아실화 옥신토모듈린 펩타이드 유사체는 화학적 안정성에 의한 반감기 개선과 함께 GLP-1 및 글루카곤 수용체에 대한 활성을 통해 혈당 개선 및 체중감소에 유효함을 알 수 있다.