

명세서

발명의 명칭: 3-(4-(벤질옥시)페닐)헥스-4-이노익산 유도체의 신규 용도

기술분야

- [1] 본 발명은 3-(4-(벤질옥시)페닐)헥스-4-이노익산 유도체의 신규 용도에 관한 것이다. 구체적으로 본 발명은 3-(4-(벤질옥시)페닐)헥스-4-이노익산 유도체의 췌장 베타세포 보호 용도 및 인슐린분비촉진제로 혈당이 정상적으로 조절되지 않는 환자에 있어서의 II형 당뇨병 치료 용도에 관한 것이다.

배경기술

- [2] II형 당뇨병에 사용되는 설폰닐우레아는 췌장 베타세포 세포막의 ATP 감수성 K⁺ 채널이나 SUR-1 수용체에 결합하여, 세포막을 탈분극시켜 Ca²⁺ 유입을 증가시키고, 증가된 세포질 내 Ca²⁺로 인하여 인슐린 분비를 촉진시킨다.
- [3] 그러나, 설폰닐우레아와 같은 인슐린 분비 촉진제는 장기 투여 시 부작용을 나타낸다. 설폰닐우레아는 혈중 글루코스 농도와 관계 없이 인슐린을 분비하게 되므로 베타세포의 과흥분(hyperexcitation)에 의해 손상을 받게 되고, 흥분독성적 반응(excitotoxic reactions)으로 인해 베타세포의 아포토시스(Apoptosis)가 유발된다. 결국 베타세포의 양 감소는 인슐린 분비 감소를 초래하게 되고, 이는 혈중 글루코스 조절 장애로 이어지게 된다.
- [4] 이러한 설폰닐우레아계 약물의 2차 실패는 당뇨병 치료에 있어 주요한 임상적 어려움이 되고 있으며, 따라서, 이러한 부작용의 위험이 적은 글루코스-의존성 인슐린 분비가 가능한 신약의 개발이 필요한 실정이다.
- [5] 최근 유리 지방산 수용체 1 (Free fatty acid receptor 1(FFAR1) / G-protein coupled receptor(GPR40))은 췌장 베타세포에서 글루코스-자극 인슐린 분비 (Glucose-Stimulated Insulin Secretion, GSIS)에 의한 혈당 조절을 향상시킬 수 있음이 밝혀졌다. 본 출원인은 이와 관련하여 GPR40에 대한 활성화제를 연구하였고, 3-(4-(벤질옥시)페닐)헥스-4-이노익산 유도체, 이의 약학적으로 허용가능한 염 또는 이의 광학 이성질체가 GPR40에 대한 활성을 통하여 세포 내 칼슘 농도를 증가시키고, 우수한 혈당강하 효과를 나타낸다는 점을 밝힌 바 있다(특허문헌 1: 10-2014-0126248 A).

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [6] 본 발명은 3-(4-(벤질옥시)페닐)헥스-4-이노익산 유도체의 췌장 베타세포 보호 용도 및 인슐린분비촉진제로 혈당이 정상적으로 조절되지 않는 환자에 있어서의 II형 당뇨병 치료 용도를 제공한다.

과제 해결 수단

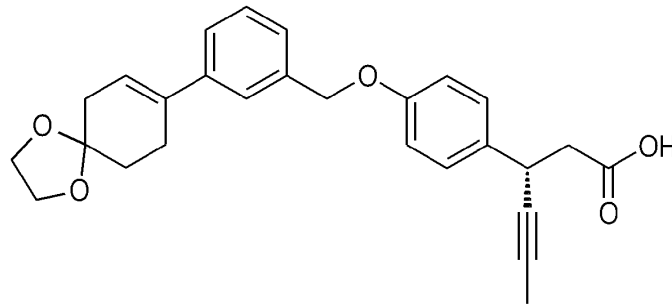
- [7] 3-(4-(벤질옥시)페닐)헥스-4-이노익산 유도체의 임상을 위한 연구 과정에서, 본

발명자들은 상기 물질이 혈당강하 효과뿐만 아니라 췌장 베타세포의 보호에 우수한 효과를 나타낸다는 점을 발견하고 본 발명을 완성하였다.

- [8] 본 발명에 따른 3-(4-(벤질옥시)페닐)헥스-4-이노익산 유도체는 하기 화학식 1의 화합물, 이의 광학 이성질체 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 의미한다.

[9] [화학식 1]

[10]



- [11] 화학식 1의 화합물명은
(3S)-3-(4-(3-(1,4-다이옥사스파이로[4,5]데스-7-엔-8-일)벤질옥시)페닐)헥스-4-이노익산이다.
- [12] 본 발명의 화학식 1의 화합물은 약학적으로 허용가능한 염의 형태로 사용할 수 있다.
- [13] 예를 들어, 염기를 사용하여 약학적으로 허용가능한 금속염을 만들 수 있다. 알칼리 금속 또는 알칼리 토금속 염은 예를 들면 화합물을 과량의 알칼리 금속 수산화물 또는 알칼리 토금속 수산화물 용액 중에 용해하고, 비용해 화합물 염을 여과하고, 여액을 증발, 건조시켜 얻는다. 이때, 금속염으로는 나트륨, 칼륨 또는 칼슘염을 제조하는 것이 제약상 적합하다. 또한, 이에 대응하는 염은 알칼리 금속 또는 알칼리 토금속 염을 적당한 은염(예, 질산은)과 반응시켜 얻는다.
- [14] 나아가, 유기산에 아미노기를 붙인 아미노산을 사용하여 약학적으로 허용가능한 염을 제조할 수 있으며, 상기 아미노산 염으로는 예를 들면, 글라이신, 알라닌, 페닐알라닌, 발린, 라이신, 글루타믹산 등의 천연 아미노산을 제조하는 것이 제약상 적합하며, 가장 바람직하게는 L-라이신을 제조하는 것이 제약상 적합하다.
- [15] 또한, 본 발명에 따른 화합물에는 상기 화학식 1의 화합물 및 이의 약학적으로 허용가능한 염뿐만 아니라, 이로부터 제조될 수 있는 용매화물, 광학 이성질체, 수화물 등을 모두 포함한다.
- [16] 본 발명은 화학식 1의 화합물, 이의 광학 이성질체 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염의 췌장 베타세포 보호 용도, 및 화학식 1의 화합물, 이의 광학 이성질체 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염의 인슐린분비촉진제로 혈당이 정상적으로 조절되지 않는 환자에 있어서의 II형 당뇨병 치료 용도를 제공한다.
- [17] 하기 실시예를 통해 본 발명자들은, 먼저 인 비트로(*in vitro*) 실험을 통해

화학식 1의 화합물이 인간 GPR40에 대해 우수한 작용활성을 가지며, 글루코스 자극에 의한 인슐린 분비능이 우수한 약물임을 확인하였다(실시예 1). 또한, 2차 실패와 췌장 베타세포의 세포사멸을 가진 II형 당뇨병 모델인 GK(Goto-Kakizaki) 랫트에 대해 경구 내당능 검사(Oral Glucose Tolerance test, OGTT), 글루코스-자극 인슐린 분비(GSIS) 시험을 수행하였다(실시예 2 및 3). 그 결과 화학식 1의 화합물이 췌장이 이미 손상된 GK 랫트에서도 췌장 베타세포의 보호를 통해 장기간 반복 투여 후에도 우수한 혈당 조절 능력 및 인슐린 분비 조절능을 유지하고 있는 반면, 당뇨병 치료에 있어 2차 실패를 빈번히 야기하는 설폰닐우레아계 약물인 글리메피리드는 베타세포 기능이 저하(인슐린 분비능 감소)됨을 확인함으로써, 화학식 1의 화합물이 췌장 베타세포 보호 효과를 가지고 있음을 확인하였으며, 랫트 췌장 조직의 면역조직화학 염색 결과로부터 이러한 효과를 재차 확인하였다(실시예 4).

- [18] GK 랫트는 췌장이 이미 손상된 동물모델이라는 점에서, 본 발명에 따른 화학식 1의 화합물의 반복 투여가 이미 손상되어 버린 췌장 베타세포의 양을 증가시켜 줄 수는 없지만, 췌도세포(pancreatic islets)의 추가적 손상을 막아 이를 보존하고 췌장 베타세포의 기능성을 강화시켜 준다는 점을 시사한다.
- [19] 본 발명자들은 화학식 1의 화합물의 췌장 베타세포 보호 효과가 GPR40 활성화제로 알려져 있는 다케다사의 TAK-875(특허문헌 2: WO2008-001931)에서도 동일한 양상으로 나타나는지 확인해 보고자 TAK-875를 양성 대조군으로 하여 인슐린 분비 조절능을 평가하였다(실시예 6). 그 결과, 화학식 1의 화합물은 저용량으로 투여되었음에도 불구하고, 동일한 GPR40 활성화제인 TAK-875 대비 인슐린 분비 조절능력이 우수하였다. 인슐린 분비 조절능의 이상은 췌장 베타세포의 손상에 의해 나타나는 것이므로, 이 결과는 GPR40 활성화제라고 하여 반복 투여에 의한 췌장 베타세포의 손상, 즉 2차 실패가 일어나지 않는 것은 아니라는 점을 보여주며, 본 발명의 화학식 1의 화합물이 나타내는 췌장 베타세포 보호능은 본 발명의 화합물만이 나타내는 예기치 못한 유리한 효과라는 점을 의미한다.
- [20] 췌장이 이미 손상된 GK 랫트에 대한 앞선 실험 결과에 기초하여, 본 발명자들은 화학식 1의 화합물의 췌장 베타세포 보호 효과가 글리메피리드와 같은 2차 실패를 야기하는 당뇨병 치료제를 이미 투약 중인 환자의 추가적인 췌장 베타세포의 손상을 막고 췌장 베타세포의 기능성을 회복시킬 수 있는지 확인하고자 하였다.
- [21] 이에 Wistar DIO(diet-induced obesity) 랫트를 대상으로 한 약물의 반복 투여 후의 췌장 베타세포 보호 효과를 평가하였으며(실시예 7 및 실시예 8), 그 결과, 글리메피리드의 4주 반복 투여 후 화학식 1의 화합물로 시험약물을 변경하여 추가로 반복 투여한 시험군에서도, 췌장 베타세포가 추가적으로 손상되는 것으로부터 보호하고 나아가 췌장 베타세포의 인슐린 분비 조절능력을 회복시킬 수 있음을 확인하였다.

- [22] 화학식 1의 화합물의 이러한 췌장 베타세포 보호능은 인슐린 분비 자극을 위해 당뇨병 치료제를 장기간 복용하는 II형 당뇨병 환자들에게 나타나는 부작용인 췌장 베타세포의 손상, 즉 2차 실패를 막고 췌장 베타세포가 제 기능을 발휘할 수 있도록 해 준다. 따라서, 화학식 1의 화합물을 II형 당뇨병의 1차 치료제로 사용할 경우, 췌장 베타세포의 손상 없이 지속적이고도 우수한 혈당 강하 효과와 인슐린 분비 조절능을 제공할 수 있다.
- [23] 또한, 이미 II형 당뇨병 치료제를 복용하여 2차 실패가 야기된 II형 당뇨병 환자에게 투여할 경우, 췌장 베타세포의 추가적 손상을 막을 뿐만 아니라 췌장 베타세포의 인슐린 분비 기능성을 회복시키므로, 인슐린분비촉진제로 혈당이 정상적으로 조절되지 않는 환자에 있어서의 II형 당뇨병 치료에 특히 유용하게 사용할 수 있다.
- [24] 따라서, 본 발명은 화학식 1의 화합물, 이의 광학 이성질체 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는 췌장 베타세포 보호용 약학 조성물, 췌장 베타세포의 보호용 약학 조성물의 제조를 위한 화학식 1의 화합물, 이의 광학 이성질체 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염의 용도 및 치료상 유효량의 화학식 1의 화합물, 이의 광학 이성질체 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 대상체에게 투여하는 것을 포함하는 췌장 베타세포의 보호 방법을 제공한다.
- [25] 한 구체예에서, 본 발명은 화학식 1의 화합물, 이의 광학 이성질체 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는 II형 당뇨병 환자에서의 췌장 베타세포 보호용 약학 조성물을 제공한다. 본 구체예에서, II형 당뇨병 환자는 췌장 베타세포의 손상을 입었거나 췌장 베타세포가 손상될 우려가 있는 환자를 모두 포함한다.
- [26] 또 다른 구체예에서, 본 발명에 따른 췌장 베타세포 보호용 약학 조성물은 단독 투여 또는 II형 당뇨병의 치료를 위한 다른 약물과 병용 투여될 수 있다. 즉, 본 발명에 따른 췌장 베타세포 보호용 약학 조성물은 단일 치료제로 사용될 수도 있지만, 다른 종류의 II형 당뇨병 치료제와의 병용 투여시에도 사용 가능하다. 병용 투여가능한 약물의 종류는 특별히 제한되지 않으며, 공지된 II형 당뇨병 치료제로 사용되는 약물은 모두 그 예가 될 수 있다. 공지된 II형 당뇨병 치료제로는 예를 들어, 경구용 혈당 강하제, 예컨대, 메트포르민(metformin), 부포르민(buformin), 펜포르민(phenformin) 또는 그의 유도체와 같은 바이구아나이드계 약물(biguanides), 또는 아카보스(acarbose), 보글리보스(voglibose) 등과 같은 알파 글루코시다제(alpha-glucosidase) 억제제, 인슐린분비촉진제로서 작용하는 설폰닐우레아계 약물(sulfonylureas), 메글리티나이드계 약물(meglitinides) 등을 포함한다. 상기 병용 투여는 순차적 또는 동시적 투여를 모두 포함한다. 본 발명의 실시예에서, 이미 2차 실패가 유발된 II형 당뇨병 치료제 투여군에서도 췌장세포 보호능이 확인 되었으므로, 병용 투여되는 II형 당뇨병 치료제로 인한 췌장 베타세포의 손상을 예방할 수

있으리라 기대된다.

- [27] 다른 구체예에서, 본 발명은 화학식 1의 화합물, 이의 광학 이성질체 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 함유하는 췌장 베타세포의 손상을 입은 II형 당뇨병 환자에서의 췌장 베타세포 보호용 약학 조성물을 제공한다.
- [28] “췌장 베타세포의 손상을 입은 II형 당뇨병 환자”의 췌장 베타세포의 손상의 원인이나 손상의 정도는 특별히 제한되지 않는다. 혈당이 높음에도 인슐린이 정상보다 특이적으로 낮은 경우, 혈당 조절이 되지 않게 되는데, 이는 인슐린 분비를 담당하는 췌장 베타세포가 제 역할을 하지 못하는 것을 의미하므로, 이를 베타세포 손상으로 판단하게 된다. 따라서, 인슐린 분비를 확인하는 방법(예컨대, GSIS, ASIS 등), 또는 인슐린 합성을 확인하는 방법(예컨대, 췌장 내 인슐린 함량 확인 방법 등) 등을 이용하여 췌장 베타세포의 기능을 확인함으로써, 베타세포의 손상 여부를 검증할 수 있다.
- [29] 췌장 베타세포의 손상은 II형 당뇨병의 진행 정도에 따라 가속화되며, 글루코스 농도에 관계없이 무분별하게 인슐린의 분비를 촉진시키는 당뇨병 치료제의 사용이 췌장 베타세포 손상의 주된 원인이 될 수 있다. 췌장 베타세포에서의 인슐린 분비를 촉진시키는 작용기전을 갖는 인슐린분비촉진제로는 설폰닐우레아계 약물 및 메글리티나이드계 약물 등을 예로 들 수 있다. 설폰닐우레아계 약물의 대표적인 예로는 글리메피리드(glimepiride), 글리클라지드(gliclazide), 글리벤클라미드(glibenclamide), 글리피지드(glipizide) 등이 있으며, 메글리티나이드계 약물로는 나테글리니드(nateglinide), 레파글리니드(repaglinide) 등이 있다.
- [30] 본 발명의 한 구체예에서, 췌장 베타세포의 손상을 입은 II형 당뇨병 환자는 인슐린분비촉진제, 예컨대, 설폰닐우레아계 약물, 및/또는 메글리티나이드계 약물을 투여 받은 환자일 수 있다.
- [31] 또한, 본 발명은 화학식 1의 화합물, 이의 광학 이성질체 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는 인슐린분비촉진제로 혈당이 정상적으로 조절되지 않는 환자에 있어서의 II형 당뇨병 치료용 약학 조성물, 인슐린분비촉진제로 혈당이 정상적으로 조절되지 않는 환자에 있어서의 II형 당뇨병 치료용 약학 조성물의 제조를 위한 화학식 1의 화합물, 이의 광학 이성질체 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염의 용도 및 치료상 유효량의 화학식 1의 화합물, 이의 광학 이성질체 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 인슐린분비촉진제로 혈당이 정상적으로 조절되지 않는 환자에게 투여하는 것을 포함하는 II형 당뇨병의 치료 방법을 제공한다.
- [32] 인슐린분비촉진제로 혈당이 정상적으로 조절되지 않는 환자는 인슐린분비촉진제를 투여 받은 환자일 수 있다. 앞서 설명한 바와 같이, 인슐린분비촉진제를 투여받은 환자는 장기 투여시 췌장 베타세포의 손상을 입을 수 있다.
- [33] 또한, 인슐린분비촉진제로 혈당이 정상적으로 조절되지 않는 환자는

인슐린분비촉진제 및 다른 혈당강하제를 병용 투여 받은 환자일 수도 있다.

- [34] 임상적으로, II형 당뇨병 환자들은 1차 선택약으로서 바이구아나이드계 약물을 투여 받고, 만일 바이구아나이드계 약물에 의해 혈당 조절이 적절하게 이루어지지 않는 경우, 인슐린분비촉진제를 투여 받거나, 인슐린분비촉진제 및 바이구아나이드계 약물을 병용 투여받는 경우가 많다. 인슐린분비촉진제를 단독으로 투여 받던지 인슐린분비촉진제와 바이구아나이드계 약물을 병용투여 받던지 간에 인슐린분비촉진제를 투여 받은 환자들은 장기 투여시 췌장 베타세포의 손상에 의해 혈당이 정상적으로 조절되지 않는 환자가 될 가능성이 높다.
- [35] 한 구체예에서, 인슐린분비촉진제는 설폰닐우레아계 약물, 및/또는 메글리티나이드계 약물일 수 있다.
- [36] 또한, 인슐린분비촉진제와 병용투여되는 혈당강하제는 바이구아나이드계 약물일 수 있다.
- [37] 화학식 1의 화합물, 이의 광학 이성질체 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 포함하는 본 발명에 따른 약학 조성물은 단독 투여 또는 II형 당뇨병의 치료를 위한 다른 약물과 병용 투여될 수 있다. 즉, 본 발명에 따른 단일 치료제로 사용될 수도 있지만, 다른 종류의 II형 당뇨병 치료제와의 병용 투여시에도 사용 가능하다. 병용 투여 가능한 약물의 종류는 특별히 제한되지 않으며, 공지의 II형 당뇨병 치료제로 사용되는 약물은 모두 그 예가 될 수 있다. 공지의 II형 당뇨병 치료제로는 예를 들어, 경구용 혈당 강하제, 예컨대, 메트포르민, 부포르민, 펜포르민 또는 그의 유도체와 같은 바이구아나이드계 약물, 또는 아카보스, 보글리보스 등과 같은 알파 글루코시다제 억제제, 인슐린분비촉진제로서 작용하는 설폰닐우레아계 약물, 메글리티나이드계 약물 등을 포함한다. 상기 병용 투여는 순차적 또는 동시적 투여를 모두 포함한다.
- [38] 특히, 본 발명에 따른 약학 조성물은 바이구아나이드계 약물과 병용 투여될 수 있다.
- [39] 예를 들어, 제1제 바이구아나이드계 약물과 제2제로 설폰닐우레아계 약물을 복용하는 II형 당뇨병 환자에 있어서, 혈당의 조절능이 떨어져 제2제 약물의 변경이 필요한 경우, 설폰닐우레아계 약물 대신 본 발명에 따른 약학 조성물을 바이구아나이드계 약물과 병용 투여함으로써, 인슐린분비촉진제로 혈당이 정상적으로 조절되지 않는 환자에 있어서의 II형 당뇨병을 치료할 수 있다.
- [40] 본 발명의 약학 조성물은 유효성분 이외에 약제학적으로 허용되는 담체를 포함할 수 있다. 이때, 약제학적으로 허용되는 담체는 제제 시에 통상적으로 이용되는 것으로서, 락토스, 텍스트로스, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 전분, 아카시아고무, 인산 칼슘, 알기네이트, 젤라틴, 규산 칼슘, 미세결정성셀룰로스, 폴리비닐피롤리돈, 셀룰로스, 물, 시럽, 메틸 셀룰로스, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필 히드록시벤조에이트, 활석, 스테아르산 마그네슘 및 미네랄 오일 등을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 또한, 상기

성분들 이외에 윤활제, 습윤제, 감미제, 향미제, 유화제, 현탁제, 보존제 등을 추가로 포함할 수 있다.

- [41] 약학 조성물의 제형 및 약제학적으로 허용되는 담체는 당업계에 공지된 기술에 따라 적절히 선택할 수 있으며, 예를 들어, 하기 문헌을 참조할 수 있다: [Urquhart et al., Lancet, 16:367, 1980]; [Lieberman et al., PHARMACEUTICAL DOSAGE FORMS-DISPERSE SYSTEMS, 2nd ed., vol. 3, 1998]; [Ansel et al., PHARMACEUTICAL DOSAGE FORMS & DRUG DELIVERY SYSTEMS, 7th ed., 2000]; [Martindale, THE EXTRA PHARMACOPEIA, 31st ed.]; [Remington's PHARMACEUTICAL SCIENCES, 16th-20th editions]; [THE PHARMACOLOGICAL BASIS OF THERAPEUTICS, Goodman and Gilman, eds., 9th ed., 1996]; [Wilson and Gisvolds' TEXTBOOK OF ORGANIC MEDICINAL AND PHARMACEUTICAL CHEMISTRY, Delgado and Remers, eds., 10th ed., 1998]. 또한 약학 조성물을 제제화하는 원리는 예를 들어, 하기 문헌[Platt, Clin Lab Med, 7:289-99, 1987]; [Aulton, PHARMACEUTICS: THE SCIENCE OF DOSAGE FORM DESIGN, Churchill Livingstone, NY, 1988]; [EXTEMPORANEOUS ORAL LIQUID DOSAGE PREPARATIONS, CSHP, 1998], ["Drug Dosage," J Kans Med Soc, 70(1):30-32, 1969] 등을 참조할 수 있다.
- [42] 본 발명의 약학 조성물은 목적하는 방법에 따라 경구투여하거나 비경구투여(예를 들어, 정맥 내, 피하, 복강 내 또는 국소에 적용)할 수 있으며, 투여량은 환자의 상태 및 체중, 질병의 정도, 약물형태, 투여경로 및 시간에 따라 다르지만, 당업자에 의해 적절하게 선택될 수 있다.
- [43] 본 발명의 약학 조성물의 유효성분의 유효량은 일반적으로 질환의 치료를 이루는데 요구되는 양을 의미한다. 본 발명에 있어서, 화학식 1의 화합물의 용도는 췌장 베타세포의 보호, 또는 인슐린분비촉진제로 혈당이 정상적으로 조절되지 않는 환자에 있어서의 II형 당뇨병의 치료이므로, 본 발명에 있어서 본 발명의 약학 조성물의 유효성분의 유효량은 췌장 베타세포를 보호하는데 요구되는 양, 또는 인슐린분비촉진제로 혈당이 정상적으로 조절되지 않는 II형 당뇨병 환자에 있어서 혈당을 정상 범위로 조절하는데 요구되는 양을 의미한다. 유효용량 수준은 환자의 질환의 종류, 중증도, 약물의 활성, 약물에 대한 민감도, 투여 시간, 투여 경로 및 배출비율, 치료기간, 동시 사용되는 약물을 포함한 요소 및 기타 의학 분야에 잘 알려진 요소에 따라 결정될 수 있다. 본 발명에 따른 약학 조성물은 개별 치료제로 투여하거나 다른 치료제와 병용하여 투여될 수 있고 종래의 치료제와는 순차적 또는 동시에 투여될 수 있으며, 단일 또는 다중 투여될 수 있다. 상기한 요소들을 모두 고려하여 부작용 없이 최소한의 양으로 최대 효과를 얻을 수 있는 양을 투여하는 것이 중요하며, 이는 당업자에 의해 용이하게 결정될 수 있다.
- [44] 구체적으로 본 발명의 약학 조성물의 유효량은 환자의 연령, 성별, 상태, 체중, 체내에 활성 성분의 흡수도, 불활성을 및 배설속도, 질병종류, 병용되는 약물에

따라 달라질 수 있으며, 일반적으로는 이에 제한되는 것은 아니나, 화학식 1의 화합물은 1일 1회 내지 수회 투여 시, 체중 1kg 당 0.001mg 내지 200mg, 바람직하게는 0.01mg 내지 100mg, 보다 바람직하게는 0.2mg 내지 50mg를 투여할 수 있다. 그러나 투여 경로, 비만의 중증도, 성별, 체중, 연령 등에 따라서 증감 될 수 있으므로 상기 투여량이 어떠한 방법으로도 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다.

- [45] 본 발명에서 "대상체"란 질병의 치료를 필요로 하는 대상을 의미하고, 보다 구체적으로는, 췌장 베타세포의 보호를 필요로 하는 인간 또는 비-인간인 영장류, 생쥐(mouse), 개, 고양이, 말 및 소 등의 포유류를 의미한다.

[46]

발명의 효과

- [47] 본 발명에 따른 3-(4-(벤질옥시)페닐)헥스-4-이노익산 유도체는 종래 개발된 당뇨병 치료제들이 흥분독성적 반응으로 인해 췌장 베타세포의 아포토시스를 유발하고 이로 인해 인슐린 분비능이 조절되지 못하는 2차 실패를 야기하는 부작용을 해결한다. 본 발명에 따른 3-(4-(벤질옥시)페닐)헥스-4-이노익산 유도체는 글루코스 농도가 증가할 때에 비로소 인슐린 분비를 촉진하고, 이를 통해 췌장 베타세포를 아포토시스로부터 보호하며, 췌장 베타세포의 인슐린 분비 기능을 회복시킨다. 따라서, 본 발명에 따른 3-(4-(벤질옥시)페닐)헥스-4-이노익산 유도체는 당뇨병의 1차 선택약으로서 투여될 때뿐만 아니라, 당뇨병의 1차 선택약으로서 2차 실패를 야기하는 타 약물이 사용되어 췌장 베타세포가 손상된 환자에게 투여될 경우에도 우수한 췌장 베타세포 보호 효과를 나타낸다. 뿐만 아니라 췌장 베타세포의 인슐린 분비 기능성을 회복시키므로, 결과적으로 인슐린분비촉진제로 혈당이 정상적으로 조절되지 않는 환자에 있어서 II형 당뇨병을 치료하기 위해 유용하다.

[48]

도면의 간단한 설명

- [49] 도 1A는 인 비트로에서 인간 GPR40에 대한 화합물 A의 작용 활성을 측정한 결과를 보여준다.
- [50] 도 1B는 화합물 A의 글루코스 자극에 의한 인슐린 분비능(GSIS)을 확인한 결과를 보여준다.
- [51] 도 2A 및 2B는 투여 1일째 경구 내당능 검사(OGTT) 결과를, 도 2C 및 2D는 투여 12주째 경구 내당능 검사(OGTT) 결과를 보여준다. 도 2A 및 도 2C는 글루코스 레벨을, 도 2B 및 2D는 글루코스 AUC 감소 수준을 나타낸다.
- [52] 도 3A, 3B 및 3C는 투여 1일째 경구 내당능 검사(OGTT) 및 혈중 인슐린 농도 측정 결과를, 도 3D, 3E 및 3F는 투여 4주째 경구 내당능 검사(OGTT) 결과 및 혈중 인슐린 농도 측정 결과를 보여준다. 도 3A 및 도 3D는 글루코스 레벨을, 도 3B 및 3E는 글루코스 AUC 감소 수준을, 도 3C 및 도 3F는 인슐린 분비

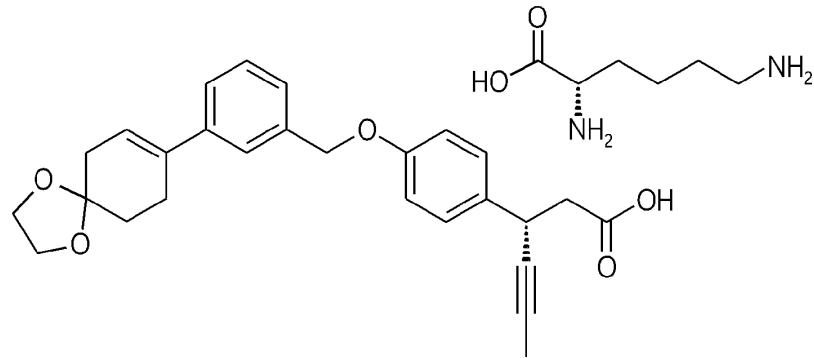
인덱스(Insulin secretion index, SI)를 나타낸다.

- [53] 도 4A는 4주간의 반복 투여 후 12 주령의 GK 랫트에서 항인슐린 항체로 면역염색한 췌도 형태를, 도 4B는 14주 간의 반복 투여 후 40주령의 GK 랫트에서 항인슐린 항체로 면역염색한 췌도 형태를 보여준다.
- [54] 도 5는 시험물질 화합물 A 및 대조물질 TAK-875 투여군의 인슐린 분비 인덱스(SI)를 비히클(Vehicle) 투여군에 비한 비율로 환산하여 표현한 그래프이다.
- [55] 도 6은 GK 랫트에서 약물 반복 투여 후 공복 상태에서 인슐린분비 조절능력을 측정한 결과를 보여준다.
- [56] 도 7은 4주 투여군의 경구 내당능 검사(OGTT) 결과로서, 글루코스 AUC 감소 수준을 나타낸 그래프이다.
- [57] 도 8은 8주 투여군의 경구 내당능 검사(OGTT) 결과로서, 글루코스 AUC 감소 수준을 나타낸 그래프이다.
- [58] 도 9 및 도 10은 각각 4주 투여군과 8주 투여군의 인슐린 분비능(GSIS) 실험 결과로서 인슐린 분비 인덱스(SI)를 나타낸 그래프이다.
- [59] 도 11은 4주간의 시험물질 반복 투여 후 Wistar 랫트에서 항인슐린 항체로 면역염색한 췌도 형태를 보여준다.
- [60] 도 12는 10주 간의 시험물질 반복 투여 후 Wistar 랫트에서 항인슐린 항체로 면역염색한 췌도 형태를 보여준다.
- [61]

발명의 실시를 위한 형태

- [62] 본 발명의 이점 및 특징, 그리고 그것들을 달성하는 방법은 상세하게 후술되어 있는 실시예들을 참조하면 명확해질 것이다. 그러나 본 발명은 이하에서 개시되는 실시예들에 한정되는 것이 아니라 서로 다른 다양한 형태로 구현될 것이며, 단지 본 실시예들은 본 발명의 개시가 완전하도록 하고, 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 발명의 범주를 완전하게 알려주기 위해 제공되는 것이며, 본 발명은 청구항의 범주에 의해 정의될 뿐이다.
- [63] [실시예]
- [64] 하기에서 본 발명에 따른 화학식 1의 화합물의 일례로 사용된 시험물질은 다음과 같다.

[65]

[66] 화합물 A:

(3S)-3-(4-(3-(1,4-다이옥사스파이로[4,5]데스-7-엔-8-일)벤질옥시)페닐)헥스-4-이노익산 L-라이신염

[67]

[68] 실시예 1. 화합물 A의 약리활성 시험

[69] 실시예 1- 1. 인간 GPR40에 대한 화합물 A의 작용 활성 시험

[70] 인간 GPR40을 안정적으로 발현하는 CHO 세포를 37°C, 5% CO₂에서 하룻밤 동안 배양하였다. 그런 다음, 세포를 37°C에서 2시간 동안 loading buffer (50ml Ham'F-12 (1% FBS 함유) + 50ml Fluo-4 solution (Invitrogen, F10471)) 에서 배양하였다. 다양한 농도의 화합물 A를 세포에 첨가 후 세포 내 칼슘이온 농도의 증가를 Flexstation3 (Molecular Devices)로 100 초 동안 모니터링하였다.

[71] 인간 GPR40에 대한 화합물 A의 작용 활성은 다음 식으로 표현하였다.

[72] $(A / B) \times 100$ (증가된 세포내 Ca²⁺ 농도)

[73] A: 화합물 A를 첨가한 세포, B: 비히클을 첨가한 세포

[74] 그 결과, 도 1A에서 볼 수 있는 바와 같이, 인 비트로에서 인간 GPR40에 대한 화합물 A의 작용 활성이 매우 우수하였다(EC₅₀=15nM).

[75]

[76] 실시예 1-2. 화합물 A의 글루코스 자극에 의한 인슐린 분비능(GSIS) 확인

[77] 인슐린 분비능 시험을 위해 INS-1 췌장 세포를 5x10⁵cells/well의 24-웰 플레이트에 넣었다. 48시간 후, 세포를 1mM 글루코스-KRB 완충액(118mM NaCl, 4.7mM KCl, 1.2mM KH₂PO₄, 1.16mM MgCl₂, 10mM HEPES, 2.5mM CaCl₂, 25.5mM NaHCO₃, 0.2% BSA, pH7.4)으로 2 회 세척하고 starvation을 위해 1mM 글루코스-KRB 완충액으로 2시간 동안 배양하였다. starvation 후, 세포를 1mM 글루코스-KRB 완충액으로 2회 세척하고, 3mM 또는 16mM 글루코스-KRB 완충액 중에서 원하는 농도의 화합물 A와 함께 1시간 동안 배양하였다. 상등액을 수집하고 원심 분리를 통해 정화시키고, 인슐린 수치는 인슐린 ELISA 키트(Millipore, EZRMI-13K)를 사용하여 측정하였다(*p<0.05: Student t-test).

[78] 그 결과, 도 1B에서 볼 수 있는 바와 같이, INS-1 췌장 베타세포에서 글루코스로

자극하는 인슐린의 분비를 농도-의존적으로 촉진하였다.

[79]

[80] 실시예 2. 화합물 A의 췌장 베타세포 보호 효과 확인 26주령 GK(Goto-Kakizaki) 랫트

[81] 화합물 A의 췌장 베타세포 보호 효과를 확인하기 위하여 26주령의 GK 랫트에서 화합물 A의 반복 투여 후 그 효능을 평가하였다.

[82] 실험동물은 비 비만 모델(Non-obese model)이면서 생후 2주부터 고혈당증, 저인슐린혈증, 정상혈중지질농도 등의 II형 당뇨병의 특징을 가지는 GK 랫트를 사용하였다. GK 랫트는 2차 실패와 췌장 베타세포의 세포 사멸을 가진 II형 당뇨병 모델로 알려져 있다. GK 랫트 5주령 수컷을 구입하여 자유급이(*ad libitum*)로 26주령(old)까지 사육하여 췌장의 무게 손실을 유발한 후 실험에 사용하였다. 체중 및 혈당에 따라 난괴법(randomized complete block design)에 의해 당뇨 유발이 확인된 개체만을 이용하여 8마리씩, 무처리군(GK 랫트, Vehicle), 글리메피리드 투여군(Glimepiride, 10mg/kg) 및 화합물 A 투여군(1, 3, 10mg/kg)으로 구분하고, Wistar 랫트(26주령 수컷)에게 비히클을 투여한 군을 정상군(WT)으로 하여, 총 6개 군에 5ml/kg으로 12주 동안 경구투여를 하였다. 비히클 및 화합물 A에 사용된 용매는 0.5% CMC 용액이고, 글리메피리드 투여군은 0.25% CMC 에 1% PEG 및 1% 트윈 80이 함유된 용매를 사용하였다. 투여 1일째 및 12주차에 16 내지 18시간 절식 후에 경구 내당능 검사(OGTT)를 실시하였다. 시료를 투여하고 60분이 경과하면 글루코스(4g/kg)를 5ml/kg의 용량으로 경구투여 하였다. 혈당측정기(G-doctor AGM-4000)를 사용하여 절식혈당 및 글루코스 투여 기준 0, 20, 40, 60 및 120분 후 미정맥을 천자하여 혈당을 측정하였다. 경구 내당능 검사(OGTT) 동안의 혈당수치는 프리즘 통계 프로그램을 이용하여 일원분산분석(one-way ANOVA)을 실시한 후 무처리군 기준 Dunnett's test로 진행하여 각 실험군 평균혈당 간의 유의성을 검정하였고, 혈당 곡선하면적(area under the curve, AUC)값을 무처리군 기준으로 군당 혈당강하폭을 백분율로 환산하였다. 비히클 처리에 비한 통계학적 유의성을 * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ 및 *** $p < 0.001$ 로 표시하였다.

[83] 도 2A 및 2B는 투여 1일째 경구 내당능 검사(OGTT) 결과를, 도 2C 및 2D는 투여 12주차 경구 내당능 검사(OGTT) 결과를 보여준다. 도 2A 및 도 2C는 글루코스 레벨을, 도 2B 및 2D는 글루코스 AUC 감소 수준을 나타낸다.

[84] 실험 결과, 26주의 GK 랫트에 화합물 A와 글리메피리드를 12주간 반복 투여했을 때, 글리메피리드 투여군은 혈당강하 효과가 저하되는 경향을 보이나 화합물 A는 그렇지 않았다. GK 랫트는 2차 실패와 췌장 베타세포의 세포 사멸을 가진 II형 당뇨병 모델이므로, 이러한 실험 결과는 화합물 A가 췌장이 이미 손상된 GK 랫트에서도 췌장 베타세포의 보호를 통해 장기간 반복 투여 후에도 혈당 조절 능력을 유지하고 있음을 시사한다.

[85]

- [86] 실시예 3. 화합물 A의 췌장 베타세포 보호 효과 확인 8주령 GK 랫트
- [87] 화합물 A의 췌장 베타세포 보호 효과를 평가하기 위하여 8주령의 GK 랫트에서 화합물 A의 반복 투여 후 그 효능을 평가하였다.
- [88] GK 랫트 6주령 수컷을 구입하여 자유급이로 8주령(young)까지 사육하였다. 체중 및 혈당에 따라 난괴법에 의해 당뇨 유발이 확인된 개체만을 이용하여 8마리씩, 무처리군(GK 랫트, Vehicle, Veh.), 글리메피리드 투여군(Glimepiride, 10mg/kg) 및 화합물 A 투여군(3, 10mg/kg)으로 구분하고, Wistar 랫트(8주령 수컷)에게 비히클을 투여한 군을 정상군(WT)으로 하여, 총 5군에 5ml/kg으로 4주 동안 경구투여를 하였다. 비히클 및 화합물 A에 사용된 용매는 0.5% CMC(CarboxyMethyl Cellulose) 용액이고, 글리메피리드 투여군은 0.25% CMC에 1% PEG(Polyethylene glycol) 및 1% Tween 80이 함유된 용매를 사용하였다. 투여 1일째 및 4주차에 16 내지 18시간 절식 후에 경구 내당능 검사(OGTT) 및 혈중 인슐린 농도 측정을 실시하였다. 시료를 투여하고 60분이 경과하면 글루코스(4g/kg)를 5ml/kg의 용량으로 경구투여 하였다. 혈당측정기(G-doctor AGM-4000)를 사용하여 절식혈당 및 글루코스 투여 기준 0, 30, 60 및 120분 후 꼬리 정맥에서 혈액을 채취하여 혈당을 측정하였다. 경구 내당능 검사(OGTT) 동안의 혈당수치는 프리즘 통계 프로그램을 이용하여 일원분산분석(one-way ANOVA)을 실시한 후 무처리군 기준 Dunnett's test로 진행하여 각 실험군 평균혈당 간의 유의성을 검정하였고, 혈당 곡선하면적(AUC)값을 무처리군 기준으로 군당 혈당강하폭을 백분율로 환산하였다. 비히클 처리에 비한 통계학적 유의성을 * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ 및 *** $p < 0.001$ 로 표시하였다. 한편, 혈중 인슐린 농도를 측정하기 위해 절식 상태 및 글루코스 투여 후 30분 후, GK 랫트에서 안와정맥 채혈을 통해 약 60 μ l의 혈액을 채취하였다. 채취한 혈액을 3,000rpm(4°C)에서 10분간 원심분리하여 혈청을 분리하였으며 Rat/mouse Insulin ELISA kit(Millipore merck)를 사용하였다. 글루코스 투여 30분 후의 인슐린 농도를 절식 상태의 인슐린 농도로 나누어 인슐린 분비 인덱스(SI)를 구하였다. (Secretion index(SI) = insulin at 30 min / fasting insulin)
- [89] 도 3A, 3B 및 3C는 투여 1일째 경구 내당능 검사(OGTT) 결과를, 도 3D, 3E 및 3F는 투여 4주째 경구 내당능 검사(OGTT) 결과를 보여준다. 도 3A 및 도 3D는 글루코스 레벨을, 도 3B 및 3E는 글루코스 AUC 감소 수준을, 도 3C 및 도 3F는 인슐린 분비 인덱스(SI)를 나타낸다.
- [90] 실험 결과, 4주간 반복 투여 후 글리메피리드 투여군은 혈당강하 효과 및 베타세포 기능이 저하(인슐린 분비능 감소)되는 경향을 보인 반면 화합물 A는 혈중 인슐린 농도가 증가되었고 혈당 조절 능력도 유지하고 있었다. 이것은 화합물 A가 췌장 베타세포 보호효과를 가지고 있음을 시사한다.
- [91]
- [92] 실시예 4. 화합물 A의 췌장 베타세포 보호 효과 확인(GK 랫트 췌장 조직 내 면역조직화학 염색 결과)

- [93] 화합물 A의 췌장 베타세포 보호 효과를 평가하기 위하여 실시예 2 및 3에서 사용되었던 GK 랫트를 각 시험군별로 췌장 조직을 떼어내어 조직 카세트에 넣고 10% 중성 포르말린 용액에 고정하였다. 자동 파라핀침투기에 넣어 조직을 투명화 시킨 후 조직포매장치에서 파라핀을 침투시켜 블록을 만들고 조직미세절편기로 5 μ m의 두께로 박절하여 슬라이드에 부착시킨 후 인슐린 면역염색(anti-insulin antibodies immunostain)을 하여 광학현미경으로 관찰하였다.
- [94] 도 4A는 실시예 3에서 사용되었던 랫트, 즉, 4주간의 반복 투여 후 12주령의 GK 랫트에서 항인슐린 항체로 면역염색한 췌도 형태를, 도 4B는 실시예 2에서 사용되었던 GK 랫트에서 추가로 2주 동안 더 투여하여 총 14주 간의 반복 투여 후 40주령의 GK 랫트에서 항인슐린 항체로 면역염색한 췌도 형태를 보여준다.
- [95] 도 4로부터 볼 수 있는 바와 같이, 야생형 랫트의 islet은 형태를 유지하고 있으나, GK 랫트는 전반적으로 형태학적 손상을 보인다. GK 랫트의 상대적인 베타세포의 양은 각 약물 4주 및 14주 반복 투여에도 유의한 차이를 보이지 않는다. 화합물 A에 의한 혈당 조절 효과는 베타세포의 양(mass)에 대한 영향이라기 보단, 베타세포 보호에 따른 베타세포의 기능 차이에서 기인함을 시사한다.
- [96]
- [97] 실시예 1 내지 4의 결과를 종합하여 보면 다음과 같이 정리할 수 있다. 화합물 A는 인 비트로에서 그 활성이 우수하였고 INS-1 췌장 베타세포에서 글루코스-자극 인슐린 분비(GSIS)를 증가시켰다. 어린 GK 랫트에서의 화합물 A 및 글리메피리드 투여는 혈당 조절 및 인슐린 분비를 개선 시켰지만, 글리메피리드의 만성 투여는 혈당 조절 효능의 상실을 유발한 반면 화합물 A는 그렇지 않았다. 만성 투여가 끝나면 글리메피리드 투여군은 화합물 A 투여군보다 경구 내당능 검사(OGTT)시 혈당 조절 및 인슐린 분비가 낮았다. 늙은 GK 랫트에 화합물 A 및 글리메피리드를 투여한 경우, 화합물 A 투여군은 혈당 조절 능력을 계속 유지하고 있었으나 글리메피리드 투여군에서는 그렇지 않았다.
- [98] 따라서 화합물 A의 반복 투여는 췌도세포를 보존하고 베타세포 기능을 향상시키는 효과가 있다.
- [99]
- [100] 실시예 5. 화합물 A의 인슐린 분비능 평가
- [101] 7 주령의 수컷 Sprague Dawley(SD) 랫트를 입수한 뒤 1주의 순화기간을 둔 후에 건강한 개체만을 이용하여 글루코스-자극 인슐린 분비(GSIS) 시험을 실시하였다. 12~16시간 절식 후에 무작위로 군 분리 후 비히클 (0.5% CMC)이나 시험물질 화합물 A, 대조물질 TAK-875를 각각 10mg/kg 용량으로 경구투여하였다.
- [102] 비히클이나 시험물질 투여 60분 후 글루코스 (2g/kg)를 복강투여하였다. 20분 후 미정맥을 천자하여 capillary tube를 통해 전혈을 채취 후 혈장을 분리하여

Morinaga Ultra Sensitive Mouse/Rat Insulin ELISA Kit (MioBS)를 이용하여 측정하였다. 인슐린 분비 인덱스(SI)는 다음 식으로 구하였다.

[103] $\text{Secretion Index (SI)} = \text{insulin at 20 min} / \text{insulin at 0 min}$

[104] 시험성적은 평균치와 표준오차(Mean±SE)로 나타내었으며, 대조군과 실험군의 차이의 유의성 검정은 ‘GraphPad Prism 4’ software (Graphpad co., La Jolla, CA, USA)의 one-way ANOVA (Dunnett’s test)를 통해 하였으며, *** p<0.001 vs. vehicle을 통계적인 유의성으로 판정하였다.

[105] 도 5는 시험물질 화합물 A 및 대조물질 TAK-875 투여군의 인슐린 분비인덱스를 비히클 투여군에 비한 비율로 환산하여 표현한 그래프이다.

[106] 도 5에서 볼 수 있는 바와 같이, SD 랫트를 이용한 글루코스-자극 인슐린 분비(GSIS) 시험에서 화합물 A의 인슐린 분비능이 대조물질 TAK-875 대비 우수하였다.

[107]

[108] 실시예 6. 화합물 A의 인슐린 분비 조절능 평가

[109] 20 주령의 수컷 GK 랫트에 비히클 (0.5% CMC)이나 시험물질 화합물 A (1, 3 mg/kg), 대조물질 TAK-875 (10mg/kg)를 4주 투여하였다. 인슐린 측정 12~16시간 전에 절식 후 미정맥을 천자하여 capillary tube를 통해 전혈을 채취하였다. 혈장을 분리하여 Morinaga Ultra Sensitive Mouse/Rat Insulin ELISA Kit (MioBS)를 이용하여 인슐린을 측정하였다.

[110] 시험성적은 평균치와 표준오차(Mean±SE)로 나타내었으며, 대조군과 실험군의 차이의 유의성 검정은 ‘GraphPad Prism 4’ software (Graphpad co., La Jolla, CA, USA)의 t-tests와 one-way ANOVA (Dunnett’s test)를 통해 하였으며, # p<0.05 vs. WT 혹은 * p<0.05 vs. vehicle을 통계적인 유의성으로 판정하였다.

[111] 도 6은 GK 랫트에서 약물 반복 투여 후 공복 상태에서 인슐린분비 조절능력을 측정한 결과를 보여준다. 당뇨병 치료제의 상당수는 반복 투여 시 글루코스 농도에 관계 없이 과다하게 인슐린을 분비하는 인슐린 분비 조절 장애를 나타낸다. 실험 결과, 화합물 A가 저용량으로 투여되었음에도 불구하고, 동일한 GPR40 활성화제인 TAK-875 대비 인슐린 분비 조절능력이 우수하였다. 인슐린 분비 조절능의 이상은 췌장 베타 세포의 손상에 의해 나타나는 것이므로, 화합물 A는 췌장 베타 세포 보호 능력이 우수한 것으로 판단할 수 있다.

[112]

[113] 실시예 7. 화합물 A의 췌장 베타세포 보호 효과 확인 Wistar DIO 랫트

[114] 실험동물은 Wistar DIO(diet-induced obesity) 랫트, 4주령 암컷을 구입하여 high fat diet(Research diets, D12492)를 자유급이로 37주 급이 후 시험에 사용하였다. 체중 및 혈당에 따라 난괴법에 의해 아래 표 1 에 의하여 군을 나누었다.

[115] [표1]

4주 투여군	정상군(Wistar 랫트, Lean)
	무처리군(Wistar DIO 랫트, Vehicle)
	글리메피리드 투여군(Glimepiride, 10mg/kg)
	화합물 A 투여군(1mg/kg)
8주 투여군	정상군(Wistar 랫트, Lean)
	무처리군(Wistar DIO 랫트, Vehicle)
	글리메피리드 투여군(Glimepiride, 10mg/kg)
	화합물 A 단독 투여군(1mg/kg)
	글리메피리드 (Glimepiride, 10mg/kg) 4주 투여 후 화합물 A 4주 투여군(1mg/kg)

- [116] 4주 투여군은 정상군(Wistar 랫트, Lean), 무처리군(Wistar DIO 랫트, Vehicle), 글리메피리드 투여군(Glimepiride, 10mg/kg) 및 화합물 A 투여군(1mg/kg)으로 구분하여 5ml/kg으로 4주 동안 경구투여를 하였다.
- [117] 8주 투여군은 정상군(Wistar 랫트, Lean), 무처리군(DIO 랫트, Vehicle), 글리메피리드 투여군(Glimepiride, 10mg/kg), 화합물 A 단독 투여군(1mg/kg) 및 글리메피리드(Glimepiride, 10mg/kg) 4주 투여 후 화합물 A 4주 투여군(1mg/kg)으로 구분하여 5ml/kg으로 8주 동안 경구투여를 하였다.
- [118] 비히클 및 화합물 A에 사용된 용매는 0.5 % CMC 용액이고, 글리메피리드 투여군은 0.25% CMC 에 1% PEG 및 1% Tween 80이 함유된 용매를 사용하였다.
- [119] 4주 및 8주 투여 후 경구 내당능 검사(OGTT) 및 글루코스-자극 인슐린 분비(GSIS) 시험을 실시하였다.
- [120] 4주 경구 내당능 검사(OGTT)의 경우, 시료를 투여하고 60분이 경과하면 글루코스(4g/kg)를 5ml/kg의 용량으로 경구투여 하였다. 혈당측정기(ACCU-CHEK active strip, Roche)로 절식혈당 및 글루코스 투여 기준 0, 30, 60, 및 120분 후 안와정맥에서 채혈한 혈액으로 혈당을 측정하였다. 경구 내당능 검사(OGTT) 동안의 혈당수치는 프리즘 통계 프로그램을 이용하여 일원분산분석(one-way ANOVA)을 실시한 후 무처리군 기준 Dunnett's test 혹은 t-test로 진행하여 각 실험군 평균혈당 간의 유의성을 검정하였고, 혈당 곡선하면적(AUC)값을 무처리군 기준으로 군당 혈당강하폭을 백분율로 환산하였다.
- [121] 8주 경구 내당능 검사(OGTT)의 경우, 시료를 투여하고 60분이 경과하면 글루코스(4g/kg)를 5ml/kg의 용량으로 경구투여 하였다. 혈당측정기(ACCU-CHEK active strip, Roche)로 절식혈당 및 글루코스 투여 기준 0, 20, 40, 60, 및 120분 후 미정맥을 천자하여 혈당을 측정하였다. 경구 내당능 검사(OGTT)

동안의 혈당수치는 프리즘 통계 프로그램을 이용하여 일원분산분석(one-way ANOVA)을 실시한 후 무처리군 기준 Dunnett's test 혹은 t-test로 진행하여 각 실험군 평균혈당 간의 유의성을 검정하였고, 혈당 곡선하면적(AUC)값을 무처리군 기준으로 군당 혈당강하폭을 백분율로 환산하였다.

- [122] 글루코스-자극 인슐린 분비(GSIS) 시험의 경우, 절식 상태 및 글루코스 투여 기준, 0, 30 및 120분 뒤, DIO 랫트에서 안와정맥 채혈을 통해 약 60 μ l의 혈액을 채취하였다. 혈중 인슐린 농도를 측정하기 위해 채취한 혈액을 3,000rpm(4°C)에서 10분간 원심분리 하여 혈청을 분리하였으며 Rat/mouse Insulin ELISA kit (Millipore merck)를 사용하였다. 글루코스 투여 30분 후의 인슐린 농도에 절식 상태의 인슐린 농도를 나누어 인슐린 분비 인덱스(SI)를 구하였다. ('Secretion Index(SI) = insulin at 30 min / fasting insulin')
- [123] 도 7은 4주 투여군의 경구 내당능 검사(OGTT) 결과로서, 글루코스 AUC 감소 수준을 나타낸 그래프이다.
- [124] 4주 반복 투여 후 글리메피리드 투여군에서 2차 실패가 유발되어 혈당 조절 능력이 떨어지는 반면, 화합물 A 투여군은 혈당 조절 능력이 우수함을 확인할 수 있다. 2차 실패의 유발은 췌장 베타 세포의 손상을 나타내므로, 역으로 화합물 A는 췌장 베타 세포를 손상시키지 않으면서도 우수한 혈당 조절 능력을 나타냄을 시사한다.
- [125] 한편, 도 8은 8주 투여군의 경구 내당능 검사(OGTT) 결과로서, 글루코스 AUC 감소 수준을 나타낸 그래프이다.
- [126] 4주 반복 투여 결과와 마찬가지로 글리메피리드 투여군에서는 혈당 조절 능력이 떨어져 2차 실패가 유발되었음을 확인할 수 있었다. 반면, 화합물 A 단독 투여군은 가장 우수한 혈당 조절 능력을 나타내었다. 글리메피리드(Glimepiride, 10mg/kg) 4주 투여 후 화합물 A 4주 투여군(1mg/kg)은 화합물 A 단독 투여군보다는 낮지만 우수한 혈당 조절 능력을 보여주었는데, 이는 글리메피리드와 같은 설폰닐우레아계 약물의 장기 투여로 인한 췌장 베타세포의 손상을 입은 환자에 화합물 A를 투여할 경우, 췌장 베타세포가 추가적으로 손상되는 것으로부터 보호하고 나아가 췌장 베타세포의 인슐린 분비 가능성을 회복시킬 수 있음을 시사한다. 이는 하기 글루코스-자극 인슐린 분비(GSIS) 데이터 및 면역조직화학 염색 결과로에서도 추가적으로 확인되었다.
- [127] 도 9 및 도 10는 각각 4주 투여군과 8주 투여군의 글루코스-자극 인슐린 분비(GSIS) 시험 결과로서 인슐린 분비 인덱스(SI)를 나타낸 그래프이다. 화합물 A 투여군은 인슐린 조절능이 우수한 반면, 글리메피리드 투여군은 인슐린 조절 능력이 떨어지는 결과를 나타내었다. 그러나, 글리메피리드 (Glimepiride, 10mg/kg) 4주 투여 후 화합물 A 4주 투여군(1mg/kg)은 인슐린 조절 능력이 화합물 A 투여군과 비슷한 수준으로 회복되는 것을 확인할 수 있다. 이는 설폰닐우레아계 약물의 장기 투여로 인한 췌장 베타세포의 손상을 입은 환자에 화합물 A를 투여할 경우, 췌장 베타세포가 추가적으로 손상되는 것으로부터

보호하고 나아가 췌장 베타세포의 인슐린 분비 가능성을 회복시킬 수 있음을 확인해 주는 결과이다.

[128]

[129] 실시예 8. 화합물 A의 췌장 베타세포 보호 효과 확인(Wistar DIO 랫트 췌장 조직 내 면역조직화학 염색 결과)

[130] 실시예 4에서 시험된 4주 투여군에 속하는 랫트를 시험 종료 후 희생시키고, 각 시험군 별로 췌장 조직을 떼어 내었다. 조직 카세트에 넣고 10% 중성 포르말린 용액에 고정하였다. 자동 파라핀침투기에 넣어 조직을 투명화 시킨 후 조직포매장치에서 파라핀을 침투시켜 블록을 만들고 조직미세절편기로 5 μ m의 두께로 박절하여 슬라이드에 부착시킨 후 인슐린 면역 염색(anti-insulin antibodies immunostain)을 하여 Axio Scan.Z1[Carl Zeiss, Germany]로 슬라이드를 스캔하였다. 결과는 ZEN Imaging Software 를 이용하여 2.5x로 보여주었다.

[131] 한편, 실시예 6에서 시험된 8주 투여군에 속하는 랫트에 대해 동일한 조건으로 시료를 2주간 더 투여하였고, 총 10주간의 투여 종료 후 동일한 방법으로 면역염색을 수행하였다.

[132] 도 11은 4주간의 시험물질 반복 투여 후 Wistar 랫트에서 항인슐린 항체로 면역염색한 췌도 형태를 보여준다. 야생형의 Wistar 랫트(Lean)의 췌도세포는 그 형태를 유지하고 있으나, DIO 랫트(vehicle)은 약간의 형태학적 손상을 보인다. 글리메피리드 투여군은 전반적인 형태학적 손상을 보이는데 이는 2차 실패가 유발됨을 시사한다. 화합물 A 투여군은 4주 반복 투여에도 유의한 차이를 보이지 않는다.

[133] 도 12는 10주 간의 시험물질 반복 투여 후 Wistar 랫트에서 항인슐린 항체로 면역염색한 췌도 형태를 보여준다. 화합물 A 투여군은 10주 반복 투여한 경우에도 형태학적으로 변화를 보이지 않았다. 4주간의 글리메피리드 투여로 2차 실패가 유발된 DIO 랫트에 화합물 A 및 글리메피리드를 각각 6주 추가 투여한 경우, 글리메피리드 투여군(글리메피리드 10주 투여군)은 형태학적 손상이 심화된 반면 화합물 A 투여군(Glimepiride 10mg/kg pre-treatment (4w)+화합물 A, 1mg/kg(6w))은 손상 정도가 억제되었다. 이는 설폰닐우레아계 약물의 장기 투여로 인한 췌장 베타세포의 손상을 입은 환자에 화합물 A를 투여할 경우, 췌장 베타세포가 추가적으로 손상되는 것으로부터 보호하고 나아가 췌장 베타세포의 인슐린 분비 가능성을 회복시킬 수 있음을 확인해 주는 결과이다.