명세서

발명의 명칭: N-말단 전하가 변형된 인슐린 분비 펩티드 유도체

기술분야

[1] 본 발명은 증가된 인슐린 분비 활성 및 혈당 저하능을 갖도록 변형된 인슐린 분비 펩티드의 유도체 및 이를 포함하는 약학적 조성물에 관한 것으로, 본 발명에 따른 인슐린 분비 펩티드 유도체는 인슐린 분비 펩티드의 N-말단 전하가 중성 또는 알짜 음전하를 갖도록 변형된 것을 특징으로 한다.

[2]

배경기술

[3] 펩티드는 일반적으로 안정성이 낮아 쉽게 변성되고 체내 단백질 가수 분해 효소에 의해 분해되어 그 활성을 잃으며, 또한 상대적으로 크기가 작아 신장을 통해 쉽게 제거되기 때문에 약리학적 활성성분으로 펩티드를 포함하는 의약품의 혈중 농도 및 역가를 유지하기 위해서는 펩티드 약물을 환자에게 자주 투여할 필요가 있다.

[4] 그러나 펩티드 약물은 대부분 주사제 형태로 환자에게 투여되고, 따라서 생리활성 펩티드의 혈중 농도를 유지하기 위해서는 그만큼 빈번한 주사가 요구되는데, 이는 환자에게 엄청난 고통을 야기하게 된다. 이러한 문제점을 극복하기 위해 펩티드 약물의 혈중 안정성을 증가시키고 혈중 약물 농도를 오랫동안 높게 지속시켜 약효를 극대화하려는 노력이 활발하게 진행되고 있다.

[5] 특히, 이러한 펩티드 약물의 지속형 제제는 펩티드 약물의 안정성을 높이는 동시에 약물 자체의 역가가 충분히 높게 유지되어야 하고 환자에게 면역반응을 유발하지 않아야 한다. 이에, 펩티드 약물을 안정화시키고 단백질 가수분해효소에 의한 분해를 억제하기 위한 방법으로, 단백질 가수분해효소에 민감한 특정 아미노산 서열을 변경하는 시도가 있어 왔다.

[6] 예를 들어, 혈중 글루코스 농도를 감소시키는 작용을 하여 제2형 당뇨병 치료 효능을 갖는 GLP-1(7-37 또는 7-36 아미드)의 경우 생리활성 반감기가 4분 이하로 매우 짧은데, 이는 다이펩티딜 펩티다아제(dipeptidyl pepdidase IV, DPP IV)에 의한 GLP-1의 8번째(Ala) 및 9번째(Asp) 아미노산 사이의 절단에 의한 GLP-1의 역가 상실에 기인한다. 이에 GLP-1의 Ala^8를 Gly, Leu 또는 D-Ala로 치환하여 DPP IV에 대한 저항성을 증가시키면서 생리활성을 그대로 유지하는 GLP-1 유도체가 개발되었다. 또한 GLP-1의 N-말단 아미노산 His^7은 GLP-1의 활성에 매우 중요하며 동시에 DPP IV의 타겟이다. 이에 N-말단을 알킬기 또는 아실기로 변형하거나 His^7을 N-메틸화(N-methylation) 또는 알파-메틸화(alpha-methylation)시켜 DPP IV 저항성을 증가시키고 생리활성을 유지하였다. 그러나 이 경우 DPP IV 저항성 증가로 인해 안정성이 좋아짐을 확인하였지만 His^7을 변형시킨 유도체들의 수용체 친화도(receptor affinity)가

상당히 감소하며 동일 농도에서 cAMP의 분비능이 저하되는 문제점이 보고되었다(Gallwitz et al., Regulatory Peptide 79: 93-102, 1999; Gallwitz et al., Regulatory Peptide 86: 103-111, 2000).

[7] 또한, GLP-1과 같은 인슐린 분비 펩티드 중에서 엑센딘-4는 DPP IV의 기질로 작용하는 GLP-1의 서열인 His-Ala가 아닌 His-Gly의 서열로 이루어져 있어 DPP IV 에 대한 저항성과 함께 GLP-1보다 높은 생리활성을 가지며, 따라서 GLP-1에 비해 더 긴 체내 반감기를 갖는다. 그러나 엑센딘-4의 체내 반감기가 GLP-1보다 길다고 하더라도 현재 시판 중인 엑센딘-4(엑세나티드, exenatide)의 경우 환자에게 하루 2회 주사를 통해 투여되어야 하는데 이는 여전히 환자에게 큰 부담이 아닐 수 없다.

[8] 이러한 배경 하에, 본 발명자들은 인슐린 분비 펩티드의 활성 및 혈중 안정성을 증가시키기 위해 예의 노력한 결과, 인슐린 분비 펩티드의 N-말단 아미노산의 전하를 변형시킨 유도체가 그의 천연형 인슐린 분비 펩티드보다 우월한 약물동력학 및 높은 인슐린 분비 활성을 나타낸다는 사실을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.

[9]

발명의 상세한 설명

기술적 과제

[10] 본 발명의 목적은 인슐린 분비 활성이 증가하여 혈당 저하능이 우수한 인슐린 분비 펩티드 유도체를 제공하는 것이다.

[11] 본 발명의 다른 목적은 상기 인슐린 분비 펩티드 유도체를 유효성분으로 함유하는 당뇨병 치료용 약학적 조성물을 제공하는 것이다.

[12] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 인슐린 분비 펩티드 유도체를 이용하여 당뇨병을 치료하는 방법을 제공하는 것이다.

[13]

과제 해결 수단

[14] 상기 과제를 해결하기 위한 하나의 양태로서, 본 발명은 인슐린 분비 펩티드의 N-말단 전하(charge)가 변형된 인슐린 분비 펩티드 유도체를 제공한다.

[15] 하나의 구체예로서, 본 발명은 인슐린 분비 펩티드의 N-말단 아미노 그룹 또는 아미노산 잔기가 중성 전하(neutral charge) 또는 알짜 음전하(net negative charge)를 갖도록 변형된 인슐린 분비 펩티드 유도체를 제공한다.

[16] 다른 하나의 구체예로서, 본 발명에 따른 인슐린 분비 펩티드 유도체는 인슐린 분비 펩티드의 N-말단 히스티딘 잔기의 알파-아미노 그룹을 제거 또는 치환하거나, 알파-카본을 제거함으로써 중성 또는 알짜 음전하를 갖도록 화학적으로 변형된 것을 특징으로 한다.

[17] 또 다른 하나의 구체예로서, 본 발명에 따른 인슐린 분비 펩티드 유도체는 인슐린 분비 펩티드의 N-말단 아미노 그룹이 제거되고; 상기 N-말단 아미노

그룹을 히드록실 그룹으로 치환하고; 상기 N-말단 아미노 그룹을 2개의 메틸 잔기로 수식하고; 상기 N-말단 아미노 그룹을 카르복실 그룹으로 치환하고; 상기 N-말단 히스티딘 잔기의 알파 카본을 제거하여 이미다졸아세틸 잔기만을 남겨두거나; 상기 N-말단 아미노 그룹을 제거하고 C-말단 카르복실 그룹이 프로필아미드(propylamide)로 치환된 것 중의 하나 이상에 해당하는 화학적 변형이 도입된 것을 특징으로 한다.

[18] 또 다른 하나의 구체예로서, 본 발명에 따른 인슐린 분비 펩티드 유도체는 인슐린 분비 펩티드의 N-말단 히스티딘 잔기가 데스-아미노-히스티딜, 다이메틸-히스티딜, 베타-히드록시 이미다조프로피오닐, 4-이미다조아세틸 및 베타-카르복시 이미다조프로피오닐로 구성되는 군에서 선택되는 물질로 치환된 것을 특징으로 한다.

[19] 또 다른 하나의 구체예로서, 본 발명에 따른 인슐린 분비 펩티드 유도체는 인슐린 분비 펩티드의 N-말단 히스티딘 잔기가 데스-아미노-히스티딜로 치환되고, C-말단 카르복실 그룹이 프로필아미드(propylamide)로 치환된 것을 특징으로 한다.

[20] 또 다른 하나의 구체예로서, 본 발명에 따른 인슐린 분비 펩티드 유도체에서 인슐린 분비 펩티드는 GLP-1 수용체에 대해 결합능을 갖는 것을 특징으로 한다.

[21] 또 다른 하나의 구체예로서, 본 발명에 따른 인슐린 분비 펩티드 유도체에서 인슐린 분비 펩티드는 서열번호: 1로 표시되는 GLP-1, 서열번호: 2로 표시되는 엑센딘-4, 서열번호: 3으로 표시되는 엑센딘-3, 서열번호: 5로 표시되는 옥신토모듈린, 서열번호: 6으로 표시되는 GIP 또는 이들의 유사체인 것을 특징으로 한다.

[22] 또 다른 하나의 구체예로서, 본 발명에 따른 인슐린 분비 펩티드 유도체는 N-말단 전하의 변형으로 인해 GLP-1 수용체에 대해 천연형 인슐린 분비 펩티드에 비해 증가된 해리 상수(Kd)를 갖는 것을 특징으로 한다.

[23] 또 다른 하나의 구체예로서, 본 발명에 따른 인슐린 분비 펩티드 유도체는 GLP-1, 엑센딘-4, 엑센딘-3, 옥신토모듈린, GIP 또는 이의 유사체의 N-말단 히스티딘 잔기가 데스-아미노-히스티딜, 다이메틸-히스티딜, 베타-히드록시 이미다조프로피오닐, 4-이미다조아세틸 또는 베타-카르복시 이미다조프로피오닐로 치환된 것을 특징으로 한다.

[24] 또 다른 하나의 구체예로서, 본 발명에 따른 인슐린 분비 펩티드 유도체는GLP-1, 엑센딘-4, 엑센딘-3, 옥신토모듈린, GIP 또는 이의 유사체의 N-말단 히스티딘 잔기가 데스-아미노-히스티딜로 치환되고, C-말단 카르복실 그룹이 프로필아미드로 치환된 것을 특징으로 한다.

[25] 또 다른 하나의 구체예로서, 본 발명에 따른 인슐린 분비 펩티드 유도체는 엑센딘-4의 N-말단 아미노 그룹을 제거한 데스아미노-히스티딜-엑센딘-4(desamino-histidyl-exendin-4); 엑센딘-4의 N-말단 아미노 그룹을 히드록실 그룹으로 치환한 베타-히드록시

이미다조프로피오닐-엑센딘-4(beta-hydroxy imidazopropionyl-exendin-4); 엑센딘-4의 N-말단 아미노 그룹을 카르복실 그룹으로 치환한 베타-카르복시 이미다조프로필-엑센딘-4(beta-carboxyimidazopropionyl-exendin-4); 엑센딘-4의 N-말단 아미노 그룹을 2개의 메틸 잔기로 수식한 다이메틸-히스티딜-엑센딘-4 (dimethyl-histidyl-exendin-4); 및 엑센딘-4의 첫 번째 아미노산인 히스티딘의 알파 탄소를 제거한 이미다조아세틸-엑센딘-4(imidazoacetyl-exendin-4)로 구성된 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 한다.

[26] 또 다른 하나의 구체예로서, 본 발명에 따른 인슐린 분비 펩티드 유도체는 엑센딘-4의 N-말단 아미노 그룹을 제거하고 그의 C-말단 카르복실 그룹이 프로필아미드로 치환된 DA-엑센딘-4-프로필-아미드(DA-Exendin-4-propyl-amide)인 것을 특징으로 한다.

[27] 다른 양태로서, 본 발명은 전술한 바와 같은 N-말단의 전하가 변형된 인슐린 분비 펩티드 유도체를 유효성분으로 포함하는 당뇨병 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[28] 또 다른 양태로서, 본 발명은 전술한 바와 같은 N-말단의 전하가 변형된 인슐린 분비 펩티드 유도체를 이를 필요로 하는 대상에게 치료학적 유효량으로 투여하는 것을 포함하는, 대상에게서 당뇨병을 치료하는 방법을 제공한다.

[29]

발명의 효과

[30] 본 발명에 따른 N-말단 전하가 변형된 인슐린 분비 펩티드 유도체는 GLP-1 수용체로부터 신속하게 해리되어 상기 수용체에 의한 인슐린 분비 펩티드의 소거(clearance)를 방지할 수 있으며 탈감각(desensitization)을 덜 일어나게 할 수 있다. 또한 본 발명에 따른 N-말단 전하가 변형된 인슐린 분비 펩티드 유도체는 상기한 GLP-1 수용체에 대한 결합력 변화로 인해 천연형 인슐린 분비 펩티드에 비해 증가된 인슐린 분비 활성 및 생체 내(*in vivo*) 혈당 저하능을 나타내어 당뇨병 치료에 매우 유용하게 사용될 수 있다.

[31]

도면의 간단한 설명

[32] 도 1a 내지 1d는 GLP-1 수용체에 대한 본 발명에 따른 N-말단 전하가 변형된 인슐린 분비 펩티드 유도체들의 농도별 결합곡선을 나타내 것으로, 도 1a는 천연형 엑센딘-4, 도 1b는 CA-엑센딘-4, 도 1c는 DA-엑센딘-4, 도 1d는 DA-엑센딘-4-프로필-아미드, 도 1e는 HY-엑센딘-4에 대한 결과이다.

[33] 도 2는 천연형 엑센딘-4와 본 발명에 따른 N-말단 전하가 변형된 CA-엑센딘-4 유도체의 인슐린 분비 활성을 측정한 결과이다.

[34] 도 3은 천연형 엑센딘-4와 본 발명에 따른 N-말단 전하가 변형된 CA-엑센딘-4 유도체의 혈당 저하능력을 당뇨 모델 동물에서 측정한 결과이다.

[35]

발명의 실시를 위한 최선의 형태

[36] 본 발명은 인슐린 분비 펩티드의 N-말단의 전하가 변형된 인슐린 분비 펩티드 유도체에 관한 것이다.

[37] 본 발명에 따른 인슐린 분비 펩티드 유도체는 인슐린 분비 펩티드의 N-말단 전하를 변화시켜 수용체와의 빠른 해리를 일으키는 것을 특징으로 한다.

[38] 본 발명에서 용어 "인슐린 분비 펩티드 유도체"는 고유의 인슐린 분비 기능을 보유하면서 화학적, 유전적 또는 물리적 조작에 의해 천연형 인슐린 분비 펩티드, 이의 유사체 또는 단편의 N-말단 전하가 양전하에서 중성 또는 알짜 음전하를 갖도록 변형된 것을 지칭한다.

[39] 구체적으로, 본 발명에 따른 인슐린 분비 펩티드 유도체는 중성 pH에서 인슐린 분비 펩티드의 N-말단 아미노 그룹 또는 아미노산 잔기가 중성 또는 알짜 음전하를 갖도록 화학적으로 변형된 것이 바람직하다. 보다 바람직하게는, 본 발명에 따른 인슐린 분비 펩티드의 N-말단의 첫 번째 아미노산 잔기의 양전하가 중성 또는 알짜 음전하로 변형된 유도체이다.

[40] 본 발명에서 용어 "인슐린 분비 펩티드"는 인슐린 분비 기능을 보유한 펩티드로서 췌장 베타세포의 인슐린의 합성 및 발현을 자극한다. 본 발명에 적합한 인슐린 분비 펩티드는 GLP-1 수용체와 결합하여 생리학적 활성을 나타내는 것이라면 그 종류에 제한 없이 사용될 수 있으며, 비제한적인 예로서 서열번호: 1의 GLP-1(7-37), 서열번호: 2의 엑센딘-4, 서열번호: 3의 엑센딘-3, 서열번호: 5의 옥신토모듈린(oxyntomodulin), 서열번호: 6의 글루코스-의존성 인슐린 분비 폴리펩티드(glucose-dependent insulinotropic polypeptide, GIP), 이들의 유사체 또는 단편일 수 있다.

[41] 본 발명에서 용어 "인슐린 분비 펩티드의 유사체"는 천연형 인슐린 분비 펩티드와 아미노산 서열이 하나 이상 다른 펩티드로서 인슐린 분비 기능을 보유한 펩티드를 의미한다. 바람직하게는, 본 발명에 따른 인슐린 분비 펩티드의 유사체는 천연형 인슐린 분비 펩티드와 비교 시 최소한 80% 이상 아미노산 서열에서 상동성을 보이는 폴리펩티드를 지칭하는 것으로, 아미노산 잔기의 일부 그룹이 화학적으로 치환(예: alpha-methylation, alpha-hydroxylation), 제거(예: deamination) 또는 수식(예: N-methylation)된 형태일 수 있다.

[42] 발명의 일 바람직한 실시형태에서, 인슐린 분비 펩티드의 유사체는 인슐린 분비 기능이 천연형 인슐린 분비 펩티드와 비교하여 동등 또는 그 이상을 나타내는 것을 의미하지만 본 발명에 따른 인슐린 분비 펩티드의 유사체의 범위가 반드시 이 정도 수준의 인슐린 분비 기능을 지니는 것들로만 한정되는 것은 아니다.

[43] 본 발명에서 용어 "인슐린 분비 펩티드의 단편"은 인슐린 분비 기능을 보유하면서 천연형 인슐린 분비 펩티드의 N-말단 또는 C-말단에 하나 또는 그 이상 아미노산이 추가 또는 삭제된 형태를 의미하며 추가된 아미노산은 천연에

존재하지 않는 아미노산(예: D형 아미노산)도 가능하다.

[44] GLP-1은 소장에서 분비되는 호르몬으로서 일반적으로 인슐린 생합성 및 분비를 촉진하고 글루카곤 분비를 억제하며 세포 내 글루코스 흡수를 촉진한다. 소장에서 글루카곤 전구체는 3개의 펩티드, 즉 글루카곤, GLP-1 및 GLP-2로 분해된다. 여기서 GLP-1은 GLP-1(1~37)을 의미하며 인슐린 분비 기능이 없는 형태이고 GLP-1(7-37) 형태로 프로세싱되어 활성형 GLP-1(7-37)이 된다. GLP-1(7-37)은 서열번호: 2로 표시되는 아미노산 서열을 갖는다.

[45] 바람직하게는, GLP-1 유사체는 Arg^{34}-GLP-1(7-37), Gly^{8}-GLP-1(7-36)-아미드, Gly^{8}-GLP-1(7-37), Val^{8}-GLP-1(7-36)-아미드, Val^{8}-GLP-1(7-37), $Val^{8}Asp^{22}$-GLP-1(7-36)-아미드, $Val^{8}Asp^{22}$-GLP-1(7-37), $Val^{8}Glu^{22}$-GLP-1(7-36)-아미드, $Val^{8}Glu^{22}$-GLP-1(7-37), $Val^{8}Lys^{22}$-GLP-1(7-36)-아미드, $Val^{8}Lys^{22}$-GLP-1(7-37), $Val^{8}Arg^{22}$-GLP-1(7-36)-아미드, $Val^{8}Arg^{22}$-GLP-1(7-37), $Val^{8}His^{22}$-GLP-1(7-36)-아미드, $Val^{8}His^{22}$-GLP-1(7-37), $Val^{8}Trp^{16}Glu^{22}$-GLP-1(7-37), $Val^{8}Glu^{22}Val^{25}$-GLP-1(7-37), $Val^{8}Tyr^{16}Glu^{22}$-GLP-1(7-37), $Val^{8}Trp^{16}Glu^{22}$-GLP-1(7-37), $Val^{8}Leu^{16}Glu^{22}$-GLP-1(7-37), $Val^{8}Tyr^{18}Glu^{22}$-GLP-1(7-37), $Val^{8}Glu^{22}His^{37}$-GLP-1(7-37), $Val^{8}Glu^{22}$,Il^{33}-GLP-1(7-37), $Val^{8}Trp^{16}Glu^{22}Val^{25}Ile^{33}$-GLP-1(7-37), $Val^{8}Trp^{16}Glu^{22}Ile^{33}$-GLP-1(7-37), $Val^{8}Glu^{22}Val^{25}Ile^{33}$-GLP-1(7-37), 및 $Val^{8}Trp^{16}Glu^{22}Val^{25}$-GLP-1(7-37)로 구성된 군으로부터 선택된 것일 수 있으나, 이들로 제한되는 것은 아니다.

[46] 또 다른 유형의 인슐린 분비 펩티드로서 엑센딘-4는 GLP-1과 53%의 아미노산 서열 유사성을 보이는 39개 아미노산으로 이루어진 폴리펩티드로서, 서열번호: 2로 표시되는 아미노산 서열을 갖는다. 엑센딘-3은 서열번호: 3으로 표시되는 아미노산 서열을 갖는데, 엑센딘-4와 2번 및 3번 위치 아미노산만이 상이한 엑센딘-4 유사체이다. 엑센딘-3은 엑센딘-4의 2번 및 3번 위치의 아미노산이 각각 세린 및 아스파르트산으로 치환된 것으로 $Ser^{2}Asp^{3}$-엑센딘-4(1-39)로 표시될 수 있다. 또 다른 엑센딘-4 유사체로서 엑센딘-4의 38번 및 39번 위치의 아미노산이 각각 세린 및 라이신으로 치환된 ZP-10은 $Ser^{38}Lys^{39}$-엑센딘-4(1-39)-LysLysLysLysLys-아미드로 표시되며 서열번호: 4의 아미노산 서열을 갖는다.

[47] 옥신토모듈린(oxyntomodulin)은 글루카곤의 전구체인 프리-글루카곤(pre-glucagon)으로부터 만들어지는 펩티드로서, GLP-1과 함께 영양소 섭취에 비례하여 소장의 L-세포로부터 방출된다. 옥신토모듈린은 서열번호: 5로 표시되는 37개의 아미노산으로 구성된 펩티드 호르몬으로서 음식물 섭취 저해, 포만감 증진 효력과 글루카곤의 지방분해 기능을 나타낸다.

[48] 글루코스-의존성 인슐린 분비 폴리펩티드(GIP)는 장내 영양분 흡수에 반응하여 글루코스 농도에 의존적으로 췌장에서 인슐린의 분비를 조절하는 인크레틴(incretin)으로서, 서열번호: 6으로 기재되는 42개의 아미노산으로 구성되며 소장의 K 세포에서 분비된다. GIP는 베타세포에서 글루코스 의존적으로 인슐린 분비를 자극시킬 뿐만 아니라 인슐린의 합성을 촉진하고,

베타세포 증식을 유도하며, 사멸에는 억제적인 효과를 가지고 있다.

[49] 상기한 바와 같은 천연형 인슐린 분비 펩티드, 이의 유사체 또는 단편에서 각각 사용된 제조방법은 독립적으로 사용될 수 있고 조합도 가능하다. 예를 들어 아미노산 서열이 하나 이상 다르고 N-말단 아미노산 잔기에 탈아미노화(deamination)된 인슐린 분비 펩티드도 포함된다.

[50] 구체적인 일 양태로서, 본 발명에서 사용한 천연형 인슐린 분비 펩티드와 변형된 인슐린 분비 펩티드 유도체는 고상(Solid phase) 합성법을 통하여 합성될 수 있으며, 천연형 인슐린 분비 펩티드를 포함한 대부분의 천연형 폴리펩티드는 재조합 방법으로도 생산 가능하다.

[51] 상기 GLP-1, 엑센딘-4, 엑센딘-3, 옥신토모듈린 또는 GIP의 유사체는 천연형의 GLP-1, 엑센딘-4 또는 엑센딘-3의 하나 이상의 아미노산이 치환, 결실 및/또는 부가된 것이거나 하나 이상의 아미노산 잔기가, 예컨대, 알킬화, 아실화, 에스테르화 형성 또는 아미드 형성 등에 의해 화학적으로 변형된 펩티드를 지칭하며, 천연형의 인슐린 분비 활성을 지닌 것을 말한다.

[52] 이러한 GLP-1, 엑센딘-3 또는 엑센딘-4의 유사체에 대해서는, GLP-1 또는 엑센딘-4의 C-말단을 일부 삭제하거나 비천연형 아미노산인 노르류우신(norleucine)으로 치환한 엑센딘 변형체에 관한 WO97/46584; 펜틸글리신(pentylglycine), 호모프롤린(homoproline), 3급-부틸글리신(tert-butylglycine)과 같이 비천연형 아미노산을 포함한 엑센딘의 아미노산을 치환한 변형체에 관한 WO99/07404; 엑센딘-4의 C-말단 아미노산 잔기 일부를 절단하여 천연형 보다 짧은 아미노산 서열로 구성되게 하거나 다른 아미노산으로 치환한 엑센딘 변형체에 관한 US2008/0119390 등에 개시되어 있으며, 이들은 참고문헌으로서 본 명세서에 병합된다.

[53] 본 발명에 따른 인슐린 분비 펩티드 유도체는 상기한 바와 같은 천연형 인슐린 분비 펩티드, 이의 유사체 또는 단편의 N-말단 아미노 그룹 또는 아미노산 잔기가 중성 또는 알짜 음전하를 갖도록 변형된 것을 특징으로 한다.

[54] 바람직하게는, 본 발명에 따른 인슐린 분비 펩티드 유도체는 인슐린 분비 펩티드의 N-말단 첫 번째 아미노산 잔기의 양전하가 중성 또는 알짜 음전하를 갖도록 화학적으로 변형된 유도체이다.

[55] 상기와 같이 N-말단이 중성 또는 알짜 음전하를 갖도록 변형된 본 발명에 따른 인슐린 분비 펩티드 유도체는 천연형 인슐린 분비 펩티드에 비해 GLP-1 수용체에 대해 더 높은 해리 상수(Kd)를 갖는 것을 특징으로 한다. 바람직하게는, 본 발명에 따른 인슐린 분비 펩티드 유도체는 천연형 인슐린 분비 펩티드에 비해 2배 이상, 더욱 바람직하게는 3배 이상, 가장 바람직하게는 6배 이상 증가된 GLP-1 수용체에 대한 해리 상수(Kd)를 갖도록 변형된 것이나, 이에 제한되는 것은 아니다.

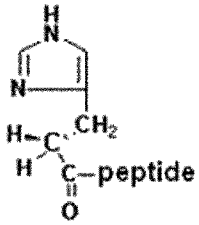
[56] 인슐린 분비 펩티드의 N-말단 양전하가 중성 또는 알짜 음전하로 변형된 본 발명에 따른 인슐린 분비 펩티드 유도체는 당해 분야에 공지된 다양한 방법에

의해 제조될 수 있으며, 바람직하게는 양전하를 갖는 인슐린 분비 펩티드의 N-말단 히스티딘 잔기의 알파-아미노 그룹을 제거 또는 치환하거나, 알파-카본을 제거함으로써 중성 또는 알짜 음전하를 갖도록 변형시킬 수 있다.

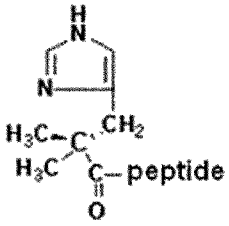
[57] 더욱 바람직하게는, 본 발명에 따른 N-말단의 전하가 변형된 인슐린 분비 펩티드 유도체에는 인슐린 분비 펩티드의 N-말단 아미노 그룹이 제거된 유도체(desamino-histidyl derivative); 그의 N-말단 아미노 그룹을 히드록실 그룹으로 치환한 유도체(beta-hydroxy imidazopropionyl-derivative); 그의 N-말단 아미노 그룹을 2개의 메틸(methyl) 잔기로 수식한 유도체(dimethyl-histidyl-derivative); 그의 N-말단 아미노 그룹을 카르복실 그룹으로 치환한 유도체(beta-carboxy imidazopropionyl-derivative); 그의 N-말단 히스티딘 잔기의 알파 카본을 제거하여 이미다졸아세틸(imidazoacetyl) 그룹만을 남겨둔 유도체(imidazoacetyl-derivative) 등이 포함될 수 있으며, N-말단의 양전하를 중성 또는 알짜 음전하로 변형시킬 수 있는 것이라면 임의의 형태의 아미노-말단 아미노 그룹 변형 유도체가 또한 본 발명의 범주에 속한다.

[58] 상기와 같이 N-말단의 전하가 변형된 인슐린 분비 펩티드 유도체는 하기 구조식으로 표시될 수 있다.

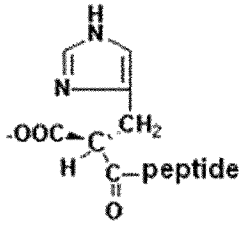
[59]



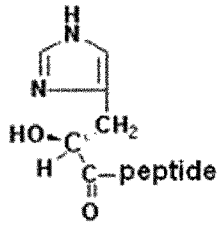
desamino-histidyl (DA)
insulinotropic peptide



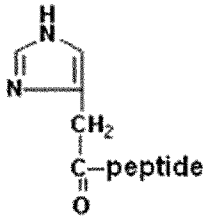
dimethyl-histidyl (DM)
insulinotropic peptide



beta-carboxy imidazopropionyl (CX)
insulinotropic peptide



beta-hydroxy imidazoproionyl (HY)
insulinotropic peptide



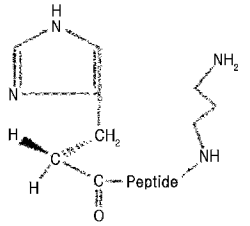
4-imidazoacetyl (CA)
insulinotropic peptide

[60]

[61] 나아가, 본 발명에 따른 N-말단의 전하가 변형된 인슐린 분비 펩티드 유도체에는 N-말단 아미노 그룹을 제거한 상기 데스아미노-히스티딜-유도체의 C-말단 카르복실 그룹이 프로필아미드(propylamide)로 치환된 유도체가 포함될 수 있다.

[62] 상기와 같이 N-말단의 전하가 변형된 인슐린 분비 펩티드 유도체는 하기 구조식으로 표시될 수 있다.

[63]



DA-insulunotropic
peptide-propylamide

[64]

[65] 더욱 더 바람직하게는, 본 발명에 따른 인슐린 분비 펩티드 유도체는 GLP-1, 엑센딘-4, 엑센딘-3, 옥신토모듈린, GIP, 이의 유사체 또는 단편의 N-말단 히스티딘 잔기가 데스-아미노-히스티딜, 다이메틸-히스티딜, 베타-히드록시 이미다조프로피오닐, 4-이미다조아세틸 또는 베타-카르복시 이미다조프로피오닐로 치환되어 N-말단의 전하가 변형된 것일 수 있다.

[66] 발명의 일 실시양태에서, 본 발명에 따른 N-말단 전하가 변형된 인슐린 분비 펩티드 유도체는 하기 화학식 1로 표시될 수 있다.

[67] R1-X-R2 <화학식 1>

[68] 상기 식에서, R1은 데스-아미노-히스티딜, 다이메틸-히스티딜, 베타-히드록시 이미다조프로피오닐, 4-이미다조아세틸 및 베타-카르복시 이미다조프로피오닐로 구성되는 군으로부터 선택되고,

[69] R2는 $-NH_2$ 또는 -OH이고,

[70] X는 Ala Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Gly Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly Arg Gly;

[71] Ser Asp Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Gln Met Glu Glu Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Leu Lys Asn Gly Gly Pro Ser Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser;

[72] Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Gln Met Glu Glu Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Leu Lys Asn Gly Gly Pro Ser Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser; 또는

[73] 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 Lys Arg Asn Arg Asn Asn Ile Ala임.

[74]

[75] 발명의 바람직한 실시양태에서, 상기 인슐린 분비 펩티드 유도체는 엑센딘-4의 N-말단 전하가 변형된 유도체로서, 엑센딘-4의 N-말단 아미노 그룹을 제거한 데스아미노-히스티딜-엑센딘-4(desamino-histidyl-exendin-4, DA-엑센딘-4); 엑센딘-4의 N-말단 아미노 그룹을 히드록실 그룹으로 치환한 베타-히드록시 이미다조프로피오닐-엑센딘-4(beta-hydroxy imidazopropionyl-exendin-4, HY-엑센딘-4); 엑센딘-4의 N-말단 아미노 그룹을 카르복실 그룹으로 치환한 베타-카르복시 이미다조프로필-엑센딘-4(beta-carboxyimidazopropionyl-exendin-4, CX-엑센딘-4); 엑센딘-4의 N-말단 아미노 그룹을 2개의 메틸 잔기로 수식한 다이메틸-히스티딜-엑센딘-4 (dimethyl-histidyl-exendin-4, DM-엑센딘-4); 또는 엑센딘-4의 첫 번째 아미노산인 히스티딘의 알파 탄소를 제거한 이미다조아세틸-엑센딘-4(imidazoacetyl-exendin-4, CA-엑센딘-4)일 수 있다.

[76] 또한, 본 발명에 따른 인슐린 분비 펩티드 유도체는 GLP-1, 엑센딘-4, 엑센딘-3, 옥신토모듈린, GIP, 이의 유사체 또는 단편의 N-말단 히스티딘 잔기가 데스-아미노-히스티딜로 치환되고 그의 C-말단 카르복실 그룹이 프로필아미드로 치환된 것일 수 있다.

[77] 발명의 다른 실시양태에서, 상기 N-말단의 전하가 변형된 인슐린 분비 펩티드

유도체에는 엑센딘-4의 N-말단 아미노 그룹을 제거한 데스아미노-히스티딜-엑센딘-4(DA-엑센딘-4)의 C-말단 카르복실 그룹이 프로필아미드로 치환된 DA-엑센딘-4-프로필-아미드(DA-Exendin-4-propyl-amide)가 포함될 수 있다.

[78] 상기 유도체들은 아미노-말단 히스티딘 잔기의 알파-아미노 그룹을 제거 또는 치환하거나 알파-카본을 제거한 것으로서, 그 외의 아미노산 서열은 생리학적 활성이 유지되는 한, 특별히 제한되지 않는다.

[79] 상기 엑센딘-4 유도체와 같이 다른 종류의 인슐린 분비 펩티드, 예컨대 엑센딘-3, GLP-1, 옥신토모듈린 및 GIP의 N-말단에도 이러한 치환 또는 제거가 모두 적용될 수 있으며, 인슐린 분비 활성이 유지되는 한 이의 유사체 및 단편에도 모두 적용될 수 있다.

[80] 본 발명의 인슐린 분비 펩티드 유도체에서 N-말단 양전하의 중성 또는 알짜 음전하로의 변형은 GLP-1 수용체와의 해리를 신속하게 유도하여 상기 수용체에 의한 인슐린 분비 펩티드의 소거(clearance)를 방지할 수 있으며, 탈감각(desensitization)을 덜 일어나게 하여 우월한 생리활성을 나타낼 수 있다.

[81] 또한, 본 발명에 따른 인슐린 분비 펩티드 유도체는 인슐린 분비 펩티드의 N-말단의 전하가 중성 또는 순 양전하로 변형되어 GLP-1 수용체에 대한 결합력 변화로 인해 인슐린 분비 활성이 천연형 인슐린 분비 펩티드에 비해 증가되고, 생체 내(*in vivo*)에서 우수한 혈당 저하능을 나타낼 수 있다.

[82] 본 발명의 일 실시예에서는, 인슐린 분비 펩티드의 N-말단 아미노산의 양전하를 중성 또는 알짜 음전하로 변형시킨 인슐린 분비 펩티드 유도체가 GLP-1 수용체에 대해 천연형 인슐린 분비 펩티드보다 높은 해리 상수(Kd)를 가지며, 이로 인해 GLP-1 수용체와의 빈번한 결합/해리를 반복할 수 있음을 확인하였다(실시예 1 참조). 또한, 상기 N-말단의 전하가 변형된 인슐린 분비 펩티드 유도체는 전하가 변형되지 않은 천연형 인슐린 분비 펩티드에 비해 약 2배 정도 증가된 인슐린 분비 활성을 나타내었고(실시예 2 참조), 당뇨병 동물 모델(db/db 마우스)에서 천연형 인슐린 분비 펩티드에 비해 약 5배 정도 증가된 혈당 저하능을 나타내었다(실시예 3 참조).

[83] 따라서, 인슐린 분비 펩티드의 N-말단 전하가 변형된 본 발명에 따른 인슐린 분비 펩티드 유도체는 GLP-1 수용체에 대한 해리 상수가 증가하여, 즉 GLP-1 수용체로부터의 해리가 증가되어 우수한 혈중 안정성 및 인슐린 분비능을 나타냄을 알 수 있다.

[84] 전술한 바와 같이, 인슐린 분비 펩티드의 N-말단 전하를 중성 또는 알짜 음전하로 변형시키면 GLP-1 수용체와의 결합력, 특히 상기 수용체로부터의 해리가 증가되어 인슐린 분비 펩티드의 생물학적 활성을 증가시킬 수 있음은 본 발명에서 최초로 규명된 사실이다. 따라서, 본 발명에 따른 인슐린 분비 펩티드 유도체의 우수한 혈중 안정성 및 인슐린 분비 활성은 제2형 당뇨병 치료의 효과를 극대화시키는데 유용할 것이다.

[85]

[86] 다른 양태로서, 본 발명은 인슐린 분비 펩티드의 N-말단의 전하가 변형된 인슐린 분비 펩티드 유도체를 유효성분으로 함유하는 당뇨병 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[87] N-말단의 전하가 변형된 인슐린 분비 펩티드 유도체에 대한 설명은 전술한 바와 같다.

[88] 본 발명에 따른 N-말단 전하가 변형된 인슐린 분비 펩티드 유도체는 천연형 인슐린 분비 펩티드에 비해 높은 인슐린 분비 활성 및 혈당 저하능을 갖고 있는 바, 우수한 당뇨병 치료제로 사용할 수 있다.

[89] 본 발명의 당뇨병 치료용 약학적 조성물은 당뇨병 치료가 필요한 개체에 투여함으로써 당뇨병을 효과적으로 치료할 수 있다.

[90] 따라서, 본 발명의 범주에는 전술한 바와 같은 N-말단의 전하가 변형된 인슐린 분비 펩티드 유도체를 이를 필요로 하는 대상에게 치료학적 유효량으로 투여하는 것을 포함하는, 대상에게서 당뇨병을 치료하는 방법이 포함된다.

[91] 본 발명에서 용어 "치료"는 본 발명에 따른 N-말단의 전하가 변형된 인슐린 분비 펩티드 유도체 또는 이를 포함하는 약학적 조성물의 투여로 당뇨병의 증세가 호전되거나 이롭게 변경되는 모든 행위를 의미한다.

[92] 본 발명에서 용어 "투여"는 임의의 적절한 방법으로 대상에게 소정의 물질, 즉 본 발명에 따른 N-말단의 전하가 변형된 인슐린 분비 펩티드 유도체 또는 이를 포함하는 약학적 조성물을 도입하는 것을 의미하며, 이의 투여 경로는 약물이 목적 조직에 도달할 수 있는 한 어떠한 일반적인 경로를 통하여 투여될 수 있다. 예컨대, 투여 경로는 복강내 투여, 정맥내 투여, 근육내 투여, 피하 투여, 피내 투여, 경구 투여, 국소 투여, 비내 투여, 폐내 투여, 직장내 투여 등이 될 수 있으나, 이에 제한되지는 않는다. 그러나 경구 투여 시 펩티드는 소화가 되기 때문에 경구용 조성물은 활성 약제를 코팅하거나 위에서의 분해로부터 보호되도록 제형화하는 것이 바람직하다. 바람직하게는 주사제 형태로 투여될 수 있다. 또한, 약학적 조성물은 활성 물질이 표적 세포로 이동할 수 있는 임의의 장치에 의해 투여될 수 있다.

[93] 본 발명의 유도체를 포함한 약학적 조성물은 약제학적으로 허용가능한 담체를 포함할 수 있다. 약제학적으로 허용되는 담체는 경구 투여용의 경우에는 결합제, 활택제, 붕해제, 부형제, 가용화제, 분산제, 안정화제, 현탁화제, 색소, 향료 등을 사용할 수 있으며, 주사제의 경우에는 완충제, 보존제, 무통화제, 가용화제, 등장화제, 안정화제 등을 혼합하여 사용할 수 있으며, 국소 투여용의 경우에는 기제, 부형제, 윤활제, 보존제 등을 사용할 수 있다. 본 발명의 약학적 조성물의 제형은 상술한 바와 같은 약제학적으로 허용되는 담체와 혼합하여 다양하게 제조될 수 있다. 예를 들어, 경구 투여용의 경우에는 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.

[94] 한편, 제제화에 적합한 담체, 부형제 및 희석제의 예로는 락토즈, 덱스트로즈, 수크로즈, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 미정질 셀룰로즈, 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.

[95] 본 발명에 따른 N-말단의 전하가 변형된 인슐린 분비 펩티드 유도체 또는 이를 포함하는 약학적 조성물은 치료학적 유효량으로 투여된다. 본 발명에서 용어 "치료학적 유효량"은 의학적 치료에 적용 가능한 합리적인 수혜/위험 비율로 질환을 치료하기에 충분한 양을 의미하며, 유효 용량 수준은 환자의 질환의 종류, 중증도, 약물의 활성, 약물에 대한 민감도, 투여 시간, 투여 경로 및 배출 비율, 치료 기간, 동시 사용되는 약물을 포함한 요소 및 기타 의학 분야에 잘 알려진 요소에 따라 결정될 수 있다. 본 발명에 따른 N-말단의 전하가 변형된 인슐린 분비 펩티드 유도체 또는 이를 포함하는 약학적 조성물은 개별 치료제로 투여하거나 다른 치료제와 병용하여 투여될 수 있고, 종래의 치료제와 순차적으로 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.

[96] 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. 본 발명의 약학적 조성물은 생체 내 지속성 및 역가가 우수하므로, 본 발명에 따른 약학적 제제의 투여 횟수 및 빈도를 현저하게 감소시킬 수 있다.

[97] 본 발명에서 "대상"은 인간, 원숭이, 소, 말, 양, 돼지, 닭, 칠면조, 메추라기, 고양이, 개, 마우스, 쥐, 또끼 또는 기니아 피그를 포함하나 이에 한정되지 아니하는 동물을 의미하고, 일 실시예에서는 포유류를, 또 다른 실시예에서는 인간을 의미한다.

[98]

발명의 실시를 위한 형태

[99] 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.

[100]

[101] **실시예 1: N-말단 전하가 변형된 인슐린 분비 펩티드 유도체의 GLP-1**

수용체에 대한 결합력 비교

[102] GLP-1 수용체와 N-말단 전하가 변형된 인슐린 분비 펩티드 유도체의 결합력을 표면 플라스몬 공명(surface plasmon resonance: SPR) 장치(BIACORE 3000, GE Healthcare)를 사용하여 측정하였다. 이때, N-말단 전하가 변형된 인슐린 분비 펩티드 유도체로 CA-엑센딘-4(CA-Exendin-4), DA-엑센딘-4(DA-Exendin-4), HY-엑센딘-4(HY-Exendin-4) 및 DA-엑센딘-4-프로필-아미드(DA-Exendin-4-propyl-amide)를 사용하였다. 상기 CA-엑센딘-4는 엑센딘-4의 N-말단 히스티딘 잔기의 알파 카본을 제거한 유도체이고; DA-엑센딘-4는 엑센딘-4의 N-말단 아미노 그룹을 제거한 유도체이고; HY-엑센딘-4는 엑센딘-4의 N-말단 아미노 그룹을 히드록실 그룹으로 치환한 유도체이고; DA-엑센딘-4-프로필-아미드는 엑센딘-4의 N-말단 아미노 그룹을 제거하고 C-말단 카르복실 그룹이 프로필아미드로 치환된 유도체이다. 아울러, 대조군으로 천연형 엑센딘-4(exenatide: Byetta)를 사용하였다. N-말단 전하가 변형된 엑센딘-4 유도체들은 American Peptide Corporation사를 통해 합성하였으며, 천연형 엑센딘-4는 Amylin Pharmaceuticals사로부터 입수하였다.

[103] GLP-1 수용체를 CHO-DG44 세포에서 hGLP-1R/GST 형태로 발현시키고 발현된 hGLP-1R/GST를 CM5 칩에 아민 결합법(amine coupling)으로 고정화하였다. hGLP-1R/GST가 고정된 CM5 칩에 상기 N-말단 전하가 변형된 인슐린 분비 펩티드 유도체를 농도별로 희석한 후 첨가하여 GLP-1 수용체와의 결합력을 측정하였다. 이때 N-말단 전하가 변형된 인슐린 분비 펩티드 유도체와 GLP-1 수용체 사이의 결합력은 1:1 랑무이르 적합 모델(Langmuir fitting model)에 따라 분석하였고, 그 결과를 도 1a 내지 1e와 하기 표 1에 나타내었다.

[104]

[105] 표 1

[Table 1]

시료	pH 7.4에서 N-말단 전하	ka(1/Ms, $\times 10^5$)	kd(1/s, $\times 10^4$)	K_D(nM)
천연형 엑센딘-4	양전하	3.70±0.06	5.26±0.11	1.4±0.05
CA-엑센딘-4	중성 전하	1.20±0.11	31.5±0.56	26.3±2.08
DA-엑센딘-4		1.13±0.08	36.5±1.40	32.2±1.89
DA-엑센딘-4-프로필-아미드		1.04±0.11	33.5±1.40	32.6±4.17
HY-엑센딘-4		0.90±0.07	38.3±1.92	42.7±4.10

[106]

[107] 상기 표 1 및 도 1a 내지 1e에 나타난 바와 같이, 천연형 엑센딘-4의 N-말단은

양전하를 띠는 반면, 이의 전하가 중성 전하로 변형된 엑센딘-4 유도체들은 천연형 엑센딘-4보다 현저히 증가된 해리상수(kd)를 갖는 것으로 확인되었다. 상기 결과는 GLP-1 수용체와 N-말단 전하가 변형된 인슐린 분비 펩티드 유도체 사이에 보다 빈번한 결합/해리가 반복적으로 일어날 수 있음을 나타내는 것이다.

[108] GLP-1 수용체에 대한 이러한 약물동력학적 변화는 상기 수용체에 의한 인슐린 분비 펩티드 유도체의 소거를 방지할 수 있으며 탈감각을 덜 일어나게 하여 혈중 안정성 증가에 유리하다.

[109]

[110] **실시예 2: N-말단 전하가 변형된 인슐린 분비 펩티드 유도체의 인슐린 분비 활성 측정**

[111] RINm5F 세포를 대상으로 N-말단 전하가 변형된 엑센딘-4 유도체의 인슐린 분비 활성(insulinotropic activity)을 비교하였다. 해동 후 1회 이상 계대 배양한 RINm5F 세포를 96-웰 플레이트에 1×10^5 세포/웰이 되도록 FBS(Gibco, #11082) 함유 배양 배지와 함께 접종하고 37℃, 5% CO_2 배양기에서 48시간 동안 배양하였다. 인슐린 분비 활성 측정을 위해, 배양한 RINm5F 세포의 배지를 0.5% FBS 함유 배양 배지로 교환한 후 1시간 동안 추가 배양하였다.

[112] 상기 실시예 1에서와 같은 N-말단 전하가 변형된 인슐린 분비 펩티드 유도체와 천연형 엑센딘-4(exenatide: Byetta)를 각각 0.5% FBS와 글루코스를 함유한 배양 배지로 희석하여 10 nM에서 0.001 nM까지 준비하였다. 이때, 엑센딘-4를 함유하지 않는 배양 배지를 대조군으로 사용하였다. 배양된 RINm5F 세포의 배지를 모두 제거하고 준비한 시료들을 첨가한 후 1시간 동안 37℃, 5% CO_2 배양기에서 배양한 후, 각 웰의 배지를 모두 회수하였다. 랫트 인슐린 ELISA 키트(Mercodia사)를 이용하여 회수한 배지의 인슐린 농도를 측정하였으며, 그 결과를 도 2 및 하기 표 2에 나타내었다.

[113]

[114] 표 2

[Table 2]

시료	대조군 대비 최대 인슐린 분비량의 비율
N-말단 전하가 변형된 인슐린 분비 펩티드 유도체	198.9 %
천연형 엑센딘-4	159.0 %

[115]

[116] 상기 표 2 및 도 2에 나타난 바와 같이, 본 발명에 따른 N-말단 전하가 변형된 인슐린 분비 펩티드 유도체는 동일 농도 범위에서 천연형 엑센딘-4보다 약 1.25배 정도 우수한 인슐린 분비 활성을 나타내는 것으로 확인되었다.

[117]

[118] **실시예 3: N-말단 전하가 변형된 인슐린 분비 펩티드 유도체의 생체 내 활성 비교**

[119] N-말단 전하가 변형된 인슐린 분비 펩티드 유도체의 생체 내(*in vivo*) 활성을 측정하기 위해, 당뇨 모델 동물에서 이들의 혈당 저하능을 천연형 엑센딘-4와 비교하였다. db/db 마우스(Jackson Lab, 10-12주령)를 2시간 동안 절식시킨 후, 0.01 내지 1000 mcg/kg의 천연형 엑센딘-4(exenatide: Byetta)와 N-말단 전하가 변형된 인슐린 분비 펩티드 유도체를 각각 피하 경로를 통해 투여하였다. 이때 대조군으로 비히클(vehicle)을 동일하게 투여하였으며, 각 투여 농도에서 투여 약물에 따른 혈당 변화는 비히클 대비 % 변화 값으로 계산하였다.

[120] 약물 투여 1시간 후에 꼬리에서 혈액을 채취하여 혈당 측정기로 혈당을 측정하였고, 각 투여 농도에서 비히클 대비 혈당 저하 효과는 프리즘(Prism) 프로그램을 이용하여 그 활성(ED_{50})을 구하였다.

[121]

[122] 표 3

[Table 3]

시료	ED_{50}(mcg/kg)	R^2
N-말단 전하가 변형된 인슐린 분비 펩티드 유도체	2.30	0.99
천연형 엑센딘-4	9.92	0.98

[123]

[124] 상기 표 3 및 도 3에 나타난 바와 같이, 당뇨 모델 동물에서 본 발명에 따른 N-말단 전하가 변형된 인슐린 분비 펩티드 유도체는 천연형 엑센딘-4보다 약 5배 정도 증가된 혈당 저하능을 나타내었다.

[125]

[126] 상기 결과들로부터 본 발명에 따른 N-말단 전하가 변형된 인슐린 분비 펩티드 유도체는 GLP-1 수용체에 대한 해리 상수 증가로 인해 GLP-1 수용체로부터의 해리가 신속히 진행되어 천연형 인슐린 분비 펩티드에 비해 우수한 혈중 안정성을 나타내고, 따라서 증가된 인슐린 분비능 및 혈당 저하능을 나타내는 것임을 알 수 있다. 따라서 본 발명에 따른 인슐린 분비 펩티드 유도체는 제2형 당뇨병 치료에 매우 유용하게 사용될 수 있다.

[127]

[128] 이상의 설명으로부터, 본 발명이 속하는 기술분야의 당 업자는 본 발명이 그 기술적 사상이나 필수적 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 실시될 수 있다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 이와 관련하여, 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적인 것이 아닌 것으로서 이해해야만 한다. 본 발명의 범위는 상기 상세한 설명보다는 후술하는 특허

청구범위의 의미 및 범위 그리고 그 등가 개념으로부터 도출되는 모든 변경 또는 변형된 형태가 본 발명의 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.

[129]

산업상 이용가능성

[130] 본 발명에 따른 N-말단 전하가 변형된 인슐린 분비 펩티드 유도체는 GLP-1 수용체로부터 신속하게 해리되어 상기 수용체에 의한 인슐린 분비 펩티드의 소거(clearance)를 방지할 수 있으며 탈감각(desensitization)을 덜 일어나게 할 수 있다. 또한 본 발명에 따른 N-말단 전하가 변형된 인슐린 분비 펩티드 유도체는 상기한 GLP-1 수용체에 대한 결합력 변화로 인해 천연형 인슐린 분비 펩티드에 비해 증가된 인슐린 분비 활성 및 생체 내(*in vivo*) 혈당 저하능을 나타내어 당뇨병 치료에 매우 유용하게 사용될 수 있다.

[131]

[132]

청구범위

[청구항 1] 인슐린 분비 펩티드 유도체로서, 상기 유도체가 천연형 인슐린 분비 펩티드의 N-말단 전하(charge)에 변형이 있는, 인슐린 분비 펩티드 유도체.

[청구항 2] 제1항에 있어서, 상기 인슐린 분비 펩티드 유도체가 천연형 인슐린 분비 펩티드, 그 유사체 또는 단편의 N-말단 아미노 그룹 또는 아미노산 잔기의 양전하가 중성 또는 알짜 음전하를 갖도록 화학적으로 변형된 것인, 인슐린 분비 펩티드 유도체.

[청구항 3] 제2항에 있어서, 상기 천연형 인슐린 분비 펩티드, 그 유사체 또는 단편은 그의 N-말단 잔기가 히스티딘이고, 상기 변형은 상기 히스티딘 잔기의 알파-아미노 그룹을 제거 또는 치환하거나, 알파-카본을 제거함으로써 중성 또는 알짜 음전하를 갖도록 한 변형인 것인, 인슐린 분비 펩티드 유도체.

[청구항 4] 제3항에 있어서, 상기 변형은 천연형 인슐린 분비 펩티드, 그 유사체 또는 단편의 N-말단 아미노 그룹이 제거되고; 상기 N-말단 아미노 그룹을 히드록실 그룹으로 치환하고; 상기 N-말단 아미노 그룹을 2개의 메틸 잔기로 수식하고; 상기 N-말단 아미노 그룹을 카르복실 그룹으로 치환하고; 상기 N-말단 히스티딘 잔기의 알파 카본을 제거하여 이미다졸아세틸 잔기만을 남겨두거나; 상기 N-말단 아미노 그룹을 제거하고 C-말단의 카르복실 그룹을 프로필아미드(propylamide)로 치환하는 것 중의 하나 이상을 포함하는 것인, 인슐린 분비 펩티드 유도체.

[청구항 5] 제4항에 있어서, 상기 인슐린 분비 펩티드 유도체는 천연형 인슐린 분비 펩티드, 그 유사체 또는 단편의 N-말단 잔기가 데스-아미노-히스티딜, 다이메틸-히스티딜, 베타-히드록시 이미다조프로피오닐, 4-이미다조아세틸 및 베타-카르복시 이미다조프로피오닐로 구성되는 군에서 선택되는 물질로 치환된 것인, 인슐린 분비 펩티드 유도체.

[청구항 6] 제4항에 있어서, 상기 인슐린 분비 펩티드 유도체는 천연형 인슐린 분비 펩티드, 그 유사체 또는 단편의 N-말단 잔기가 데스-아미노-히스티딜로 치환되고, C-말단 카르복실 그룹이 프로필아미드로 치환된 것인, 인슐린 분비 펩티드 유도체.

[청구항 7] 제1항에 있어서, 상기 인슐린 분비 펩티드 유도체가 GLP-1 수용체에 대한 결합 활성을 갖는 것인, 인슐린 분비 펩티드 유도체.

[청구항 8] 제1항에 있어서, 상기 천연형 인슐린 분비 펩티드가 서열번호: 1로 표시되는 GLP-1, 서열번호: 2로 표시되는 엑센딘-4, 서열번호: 3으로 표시되는 엑센딘-3, 서열번호: 5로 표시되는 옥신토모듈린,

서열번호: 6으로 표시되는 GIP, 이들의 유사체 또는 단편인 것인, 인슐린 분비 펩티드 유도체.

[청구항 9] 제8항에 있어서, 상기 천연형 인슐린 분비 펩티드 또는 그의 유사체가 GLP-1 유사체이고, Arg^{34}-GLP-1(7-37), Gly^{8}-GLP-1(7-36)-아미드, Gly^{8}-GLP-1(7-37), Val^{8}-GLP-1(7-36)-아미드, Val^{8}-GLP-1(7-37), $Val^{8}Asp^{22}$-GLP-1(7-36)-아미드, $Val^{8}Asp^{22}$-GLP-1(7-37), $Val^{8}Glu^{22}$-GLP-1(7-36)-아미드, $Val^{8}Glu^{22}$-GLP-1(7-37), $Val^{8}Lys^{22}$-GLP-1(7-36)-아미드, $Val^{8}Lys^{22}$-GLP-1(7-37), $Val^{8}Arg^{22}$-GLP-1(7-36)-아미드, $Val^{8}Arg^{22}$-GLP-1(7-37), $Val^{8}His^{22}$-GLP-1(7-36)-아미드, $Val^{8}His^{22}$-GLP-1(7-37), $Val^{8}Trp^{16}Glu^{22}$-GLP-1(7-37), $Val^{8}Glu^{22}Val^{25}$-GLP-1(7-37), $Val^{8}Tyr^{16}Glu^{22}$-GLP-1(7-37), $Val^{8}Trp^{16}Glu^{22}$-GLP-1(7-37), $Val^{8}Leu^{16}Glu^{22}$-GLP-1(7-37), $Val^{8}Tyr^{18}Glu^{22}$-GLP-1(7-37), $Val^{8}Glu^{22}His^{37}$-GLP-1(7-37), $Val^{8}Glu^{22}$,Il^{33}-GLP-1(7-37), $Val^{8}Trp^{16}Glu^{22}Val^{25}Ile^{33}$-GLP-1(7-37), $Val^{8}Trp^{16}Glu^{22}Ile^{33}$-GLP-1(7-37), $Val^{8}Glu^{22}Val^{25}Ile^{33}$-GLP-1(7-37), 및 $Val^{8}Trp^{16}Glu^{22}Val^{25}$-GLP-1(7-37)로 구성된 군으로부터 선택되는 것인, 인슐린 분비 펩티드 유도체.

[청구항 10] 제8항에 있어서, 상기 천연형 인슐린 분비 펩티드 또는 그의 유사체가 서열번호: 4의 ZP-10($Ser^{38}Lys^{39}$-엑센딘-4(1~39)-LysLysLysLysLys-아미드) 엑센딘-4 유사체인, 인슐린 분비 펩티드 유도체.

[청구항 11] 제1항에 있어서, 상기 인슐린 분비 펩티드 유도체가 그의 천연형 인슐린 분비 펩티드와 비교하여 GLP-1 수용체에 대해 더 큰 해리 상수(Kd)를 갖는 것인, 인슐린 분비 펩티드 유도체.

[청구항 12] 제5항에 있어서, 상기 인슐린 분비 펩티드 유도체가 하기 화학식 1로 표시되는 것인, 인슐린 분비 펩티드 유도체:

R1-X-R2 <화학식 1>

상기 식에서, R1은 데스-아미노-히스티딜, 다이메틸-히스티딜, 베타-히드록시 이미다조프로피오닐, 4-이미다조아세틸 및 베타-카르복시 이미다조프로피오닐로 구성되는 군으로부터 선택되고,

R2는 $-NH_2$ 또는 -OH이고,

X는 Ala Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Gly Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly Arg Gly;

Ser Asp Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Gln Met Glu Glu Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Leu Lys Asn Gly Gly Pro Ser Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser;

Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Gln Met Glu Glu Glu

Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Leu Lys Asn Gly Gly Pro Ser Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser; 또는
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 Lys Arg Asn Arg Asn Asn Ile Ala임.

[청구항 13] 제6항에 있어서, 상기 인슐린 분비 펩티드 유도체가 GLP-1, 엑센딘-4, 엑센딘-3, 옥신토모듈린, GIP 또는 이의 유사체의 N-말단 히스티딘 잔기가 데스-아미노-히스티딜로 치환되고, C-말단 카르복실 그룹이 프로필아미드로 치환된 것인, 인슐린 분비 펩티드 유도체.

[청구항 14] 제12항에 있어서, 상기 인슐린 분비 펩티드 유도체가 엑센딘-4의 N-말단 아미노 그룹을 제거한 데스아미노-히스티딜-엑센딘-4(desamino-histidyl-exendin-4); 엑센딘-4의 N-말단 아미노 그룹을 히드록실 그룹으로 치환한 베타-히드록시 이미다조프로피오닐-엑센딘-4(beta-hydroxy imidazopropionyl-exendin-4); 엑센딘-4의 N-말단 아미노 그룹을 카르복실 그룹으로 치환한 베타-카르복시 이미다조프로필-엑센딘-4(beta-carboxyimidazopropionyl-exendin-4); 엑센딘-4의 N-말단 아미노 그룹을 2개의 메틸 잔기로 수식한 다이메틸-히스티딜-엑센딘-4 (dimethyl-histidyl-exendin-4); 및 엑센딘-4의 첫 번째 아미노산인 히스티딘의 알파 탄소를 제거한 이미다조아세틸-엑센딘-4(imidazoacetyl-exendin-4)로 구성된 군으로부터 선택되는 것인, 인슐린 분비 펩티드 유도체.

[청구항 15] 제13항에 있어서, 상기 인슐린 분비 펩티드 유도체가 엑센딘-4의 N-말단 아미노 그룹을 제거하고 그의 C-말단 카르복실 그룹이 프로필아미드로 치환된 DA-엑센딘-4-프로필-아미드(DA-Exendin-4-propyl-amide)인 것인, 인슐린 분비 펩티드 유도체.

[청구항 16] 제1항 내지 제15항 중 어느 한 항에 따른 인슐린 분비 펩티드 유도체를 유효성분으로 함유하는 당뇨병 치료용 약학적 조성물.

[청구항 17] 제1항 내지 제15항 중 어느 한 항에 따른 인슐린 분비 펩티드 유도체를 이를 필요로 하는 대상에게 치료학적 유효량으로 투여하는 것을 포함하는, 대상에게서 당뇨병을 치료하는 방법.