

명세서

발명의 명칭: 아실화 옥신토모듈린 펩타이드 유사체

기술분야

- [1] 본 발명은 옥신토모듈린 펩타이드 유사체, 및 이를 포함하는 비만 또는 과체중, 또는 이를 동반하는 비 인슐린 의존성 당뇨병의 예방 또는 치료에 사용할 수 있는 약학조성물에 관한 것이다.

배경기술

- [2] 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.
- [3]
- [4] 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 비만이였다. 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. 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.
- [5]
- [6] 글루카곤은 췌장의 알파 세포에서 생산되는 호르몬으로 일반적으로 포도당 신생합성과 간에 저장되어 있는 글리코젠을 분해하여 혈당을 높이는 역할을 하는데, 저장된 글리코젠이 고갈되면 글루카곤은 간과 신장으로 하여금 포도당을 새로 합성하게 하며, 식욕억제 및 저장되어 있는 중성지방(Triglyceride)을 지방산으로 분해하여 에너지 대사량 증가를 통한

체중감소에도 영향이 있음이 알려져 있다(Diabetes.co.uk. the global diabetes community, Anim Sci J. 2016;87(9):1090-1098).

[7]

[8] 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, 위공복 억제, 음식물 섭취를 감소시키는 기능을 가진다(Physiol Rev. 2007;87(4):1409-1439). 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 포도당 의존적으로 인슐린 분비를 촉진시킴으로써 혈당을 조절하고 식욕을 감소시켜 체중증가를 억제하고 중성지방을 낮추는 작용으로 제2형 당뇨병에 대해서는 Victoza, 비만에 대해서는 Saxenda라는 이름으로 미국 및 유럽에서 발매되었다(Expert Rev Cardiovasc Ther. 2015;13(7):753-767). Liraglutide 외에도 엑세나타이드(Exenatide), 리시세나타이드(Lixisenatide), 알비글루타이드(albiglutide) 및 둘라글루타이드(dulaglutide) 등이 당뇨병 치료제로 개발되었다. 그러나 이와같은 GLP-1 수용체 작용제들의 부작용으로는 구역, 구토 및 식욕감소, 두통과 변비, 복부팽만감 발생 등이 보고되고 있다(Korean J Med. 2014;87(1):9-13).

[9] 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. 음식물 섭취 감소 및 에너지 대사를 증가시킴으로써 체중감소효과를 나타내는데, 옥신토모듈린의 이러한 작용은 선택적인 GLP-1 수용체 작용제 보다 우수한 것으로 알려져 있으며, 글루카곤 수용체 활성화에 따른 포도당 증가로 인한 고혈당 위험은 함께 활성화 되는 GLP-1 수용체에 의한 인슐린 분비를 통해 혈당 조절 작용을 할 수 있는 것으로 보고되어 있다. 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 감소시킴이 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). 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. 2002;278: 22418-22423).

- [10] 따라서 GLP-1 및 글루카곤 수용체에 균형있게 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(Zealand), 메드이문(Medimmune), 한미약품 등 여러 회사에서 선도물질들에 대한 개발이 진행 중에 있다.

[11]

- [12] 이러한 배경 하에서, 본 발명은 ① DPP-IV에 대한 저항성을 부여하고, ② 아실화에 의한 대사 안정성을 최적화시켜, ③ GLP-1 및 글루카곤 수용체에 대하여 원래의 옥신토모듈린 보다 우수한 활성을 나타내는 합성 옥신토모듈린 펩타이드 유사체 개발을 통한 비만 또는 비만을 동반하는 당뇨병 치료에 사용하기 위한 치료용 약학조성물에 관한 것이다.

[13]

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [14] 본 발명의 목적은 기존의 옥신토모듈린보다 GLP-1 및 글루카곤 수용체에 대한 활성이 높고, 아실화에 의해 화학적으로 안정화되어(Molecular metabolism 2013;2:468-479) 생체내 반감기가 증가된 옥신토모듈린 펩타이드 유사체를 제공하여 비만 또는 과체중, 또는 이들을 동반하는 비 인슐린 의존성 당뇨병에 의해 야기되거나 특징지어지는 병태의 예방 또는 치료에 사용할 수 있는 옥신토모듈린 펩타이드 유사체 및 이를 포함한 약학조성물을 제공하는 것이다.

[15]

과제 해결 수단

- [16] 상기 과제를 해결하기 위하여, 본 발명은 옥신토모듈린 펩타이드 유사체인 하기 화학식 I의 아미노산 서열을 포함하는 신규한 펩타이드를 제공한다.

[17]

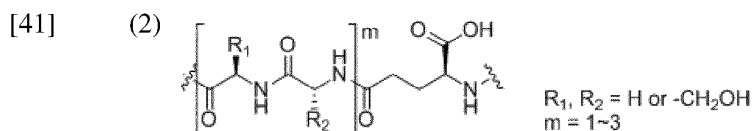
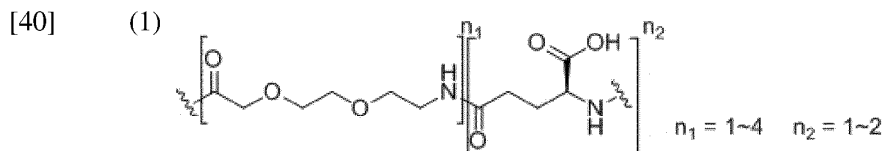
[18] <화학식 I>

[19] His-X₁-Gln-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-X₂-X₃-X₄-X₅-X₆-X₇-X₈-X₉-Arg-Arg-Ala-X₁₀-Asp-Phe-Val-Gln-Trp-Leu-X₁₁-X₁₂-X₁₃-X₁₄-X₁₅-X₁₆ (SEQ ID NO.49)

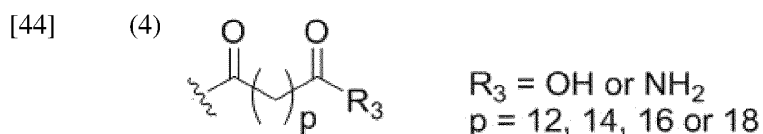
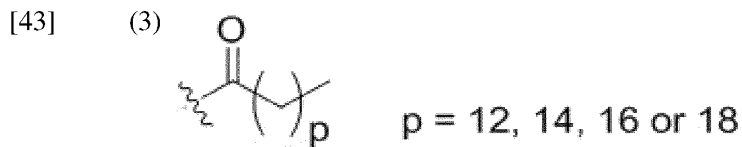
[20] 상기 식에서,

[21] X₁은 Ser 또는 Aib (aminoisobutyric acid)이고;

- [22] X_2 는 Asp 또는 Z이며;
 [23] X_3 는 Tyr 또는 Z이며;
 [24] X_4 는 Ser 또는 Z이며;
 [25] X_5 는 Lys 또는 Z이며;
 [26] X_6 은 Tyr 또는 Z이며;
 [27] X_7 은 Leu 또는 Z이며;
 [28] X_8 은 Asp 또는 Z이며;
 [29] X_9 는 Ser, Aib(aminoisobutyric acid) 또는 Z이며;
 [30] X_{10} 은 Gln 또는 Z이며;
 [31] X_{11} 은 Met 또는 Leu이며;
 [32] X_{12} 은 Asn 또는 Arg이며;
 [33] X_{13} 은 Thr 또는 Ala이며;
 [34] X_{14} 은 Lys 또는 Z이며;
 [35] X_{15} 는 RNRNNIA(SEQ ID NO.51) 이거나 존재하지 않으며;
 [36] X_{16} 은 X_{15} 가 존재할 경우, Z이거나 존재하지 않으며;
 [37] C-말단 아미노산은 임의로 아미드화될 수 있으며;
 [38] 여기서 $X_2, X_3, X_4, X_5, X_6, X_7, X_8, X_9, X_{10}, X_{14}$ 또는 X_{16} 중 적어도 하나가 Z이며;
 [39] Z는 작용화된 Lys으로서 그 측쇄에 중합체성 부분과 스페이서의 접합체인 Z_1 과 친유성 리피드 부분인 Z_2 가 접합된 형태이며, 여기서 Z_1 은 아실 작용기를 통하여 Lys 측쇄와 직접적으로 접합되고 Z_2 는 Z_1 을 통해 Lys 측쇄에 접합되고, Z_1 은 하기 구조식 (1) 또는 (2)이고,



[42] Z_2 는 하기 구조식 (3) 또는 (4) 이다.



- [45]
- [46] 본 발명에서 아미노산은 하기 약어를 병용 기재하였다;
- [47] 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).
- [48]
- [49] 본 발명에서 용어, “옥신토모듈린(oxynomodulin)” 이란 글루카곤의 전구체인 프리-글루카곤으로부터 만들어지는 펩타이드를 의미하며, 천연형의 옥신토모듈린은 HSQGTFTSDYSKYLDSSRAQDFVQWLMNTKRNRRNNIA(SEQ ID NO.1)의 아미노산 서열을 갖는다.
- [50]
- [51] 본 발명에서 Z의 구성요소 중 하나인 Z₁은 중합체성 부분으로 폴리에틸렌 글리콜, 단량체로서 에틸렌 글리콜, 에탄올아민, 락틱산을 갖는 공중합체, 또는 단량체로서 글라이신과 세린을 갖는 폴리-아미노산 공중합체의 형태를 가질 수 있고, 폴리-아미노산은 GGSGSG의 아미노산 서열(SEQ ID NO. 52)일 수 있으며, 본 발명의 화합물은 상기 중합체성 부분의 반복 단위를 2개 이상 가질 수 있다.
- [52]
- [53] 또한, Z₁은 한 말단에 상술한 옥신토모듈린 펩타이드 유사체의 임의의 잔기 또는 그 측쇄에 부착되기 위한 작용기를 가질 수 있다. 바람직하게는 아실기이며, 이 경우 측쇄의 아미노기에 아미드 결합의 형태로 부착될 수 있으며, 일부 구현예에서, Z₁은 한 말단에 스페이서와 결합되기 위한 작용기를 가질 수 있다. 바람직하게는 아미노기이며, 이 경우 스페이서의 카복시기에 아미드 결합의 형태로 부착될 수 있으며, Z₁은 바람직하게는 수용성을 가지며, 따라서 양친매성이나 친수성일 수 있다.
- [54]
- [55] 본 발명에서 스페이서는 L-글루타민산 잔기로서, 그 γ -카복실산에는 중합체성 부분인 Z₁과 공유결합되고 α -아미노기에는 친유성 리피드 부분인 Z₂가 공유결합될 수 있으며, 2개 이상 반복단위를 가질 수 있다.
- [56]
- [57] Z의 또 다른 구성요소인 Z₂의 리피드 부분은 스페이서와 직접적으로 접합되고, 스페이서는 중합체성 부분과 직접적으로 접합되며, 중합체성 부분은 본 발명의 옥신토모듈린 펩타이드 유사체의 X₂, X₃, X₄, X₅, X₆, X₇, X₈, X₉, X₁₀, X₁₄ 또는 X₁₆ 위치에 존재하는 아미노산 잔기의 측쇄와 직접적으로 접합될 수 있으며, 바람직하게는, 이 접합을 가능케 하는 아미노산 잔기로서 Lys이 도입될 수 있다.
- [58]
- [59] 또한, Z₂는 C₁₄~C₂₀ 포화 탄화수소 쇄를 포함하며, 이 탄화수소 쇄의 말단 탄소가 카복실산 형태, 일차 아미드 형태 또는 임의의 단일 아미노산과 공유결합으로 연결된 카복실산 형태인 펩타이드 유도체이다. 이때 탄화수소 쇄는

분지형이거나 직선형일 수 있다. 탄화수소쇄가 스페이서에 부착되기 위하여 필요한 작용기는 상술한 리피드 부분의 일부를 형성하며, 아실기, 설폰닐기, N 원자, O 원자, S 원자 등이 포함될 수 있다.

[60]

[61] 따라서 스페이서 부착은 에스테르, 설폰닐 에스테르, 티오에스테르, 아미드 또는 설폰 아미드를 통해 이루어질 수 있다. 바람직하게는, 탄화수소쇄는 아실기를 통하여 아미드 결합의 형태로 스페이서의 아미노기와 접합되며, 따라서 탄화수소쇄는 특히 알카노일기의 형태의 일부일 수 있다.

[62]

[63] 특정한 이론에 그 해석을 제한받고자 하는 바는 아니나, 친유성 리피드 부분은 혈류 내에서 알부민과 결합함으로써 본 발명의 화합물이 혈류 내 다양한 분해 효소의 기질로서 반응하는 것을 방지하여 그 생체 내 반감기를 향상시키는 것으로 여겨진다.

[64]

[65] 본 발명에서 옥신토모듈린 펩타이드 유사체 내의 하나 이상의 아미노산 측쇄는 중합체성 부분과 스페이서를 통하여 친유성 리피드 부분과 접합되며, 이러한 화학적 변형은 본 발명의 옥신토모듈린 펩타이드 유도체의 생체내 가용성 또는/및 반감기를 증가시키고/시키거나 생체이용률을 증가시키는 등의 약학적으로 유리한 효과를 유도할 수 있다.

[66]

[67] 상기 화학식 I의 아미노산 서열을 포함하는 신규한 펩타이드는 천연형 옥신토모듈린의 2번 위치에 존재하는 Ser 잔기를 Aib로 치환하여 제조될 수 있다. 본 발명의 상기 구현예에서 제시된 화합물은 옥신토모듈린 펩타이드 유사체 X₁ 위치에 Aib가 도입된 경우로서, 천연의 옥신토모듈린에 비교하여 디펩티딜 펩티다제 IV에 대해 더 큰 저항성을 가지는 것으로 여겨진다. 결과적으로 본 발명의 옥신토모듈린 펩타이드 유사체는 천연형의 옥신토모듈린에 비하여 개선된 생체 내 안정성을 가진다.

[68]

[69] 또한, 상기 본 발명에 의한 아실화 옥신토모듈린 펩타이드 유사체는 천연형 옥신토모듈린의 27번 위치에 존재하는 Met 잔기를 Leu으로 치환시키고, 28번 위치에 존재하는 Asn 잔기를 Arg 으로, 29번 위치에 존재하는 Thr 잔기를 Ala으로 치환시켜 제조될 수 있으며, 예로서 하기 구현예 중 화합물 12(SEQ ID NO. 13)의 경우, X₁₁ 위치를 Leu, X₁₂ 위치를 Arg, X₁₃ 위치를 Ala으로 치환시켜 제조한 것이다.

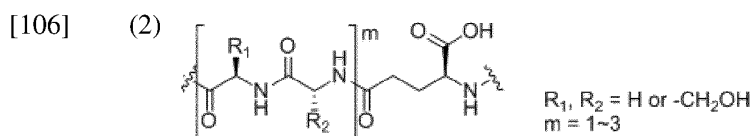
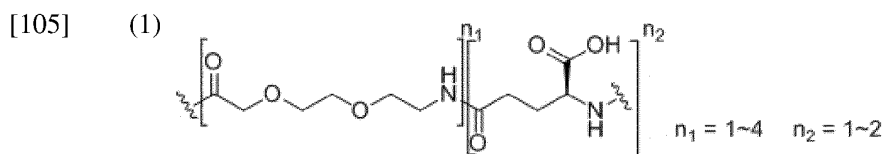
[70]

[71] 본 발명에서 바람직한 옥신토모듈린 펩타이드 유도체는 하기 화학식 I-1의 아미노산 서열을 포함하는 신규한 펩타이드이다.

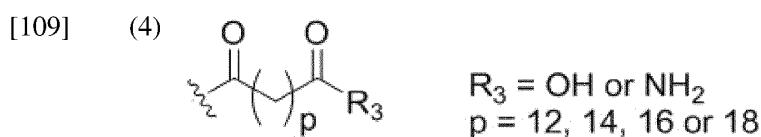
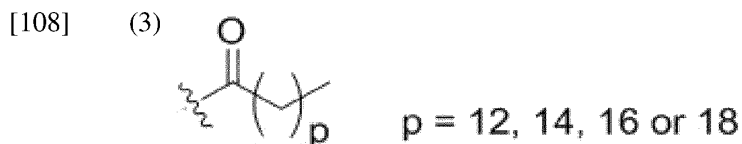
[72]

- [73] <화학식 I-1>
 [74] $\text{HX}_1\text{QGFTSDX}_3\text{SKYLDX}_9\text{RRAX}_{10}\text{DFVQWLX}_{11}\text{X}_{12}\text{X}_{13}\text{X}_{14}\text{X}_{15}\text{X}_{16}$ (SEQ ID NO.50)
 [75] 상기 아미노산 서열에서
 [76] X_1 은 Ser 또는 Aib (aminoisobutyric acid)이고;
 [77] X_3 은 Tyr 또는 Z;
 [78] X_9 은 Ser, Aib 또는 Z;
 [79] X_{10} 은 Gln 또는 Z이며;
 [80] X_{11} 은 Met 또는 Leu;
 [81] X_{12} 은 Asn 또는 Arg;
 [82] X_{13} 은 Thr 또는 Ala;
 [83] X_{14} 은 Lys 또는 Z;
 [84] X_{15} 은 RNRNNIA (SEQ ID NO. 51) 이거나 존재하지 않으며;
 [85] X_{16} 은 X_{15} 이 존재할 경우, Z이거나 존재하지 않으며, C-terminal 은 아미드화 될 수 있고,
 [86] Z은 상기 화학식 I에서 정의한 바와 같다.
 [87]
 [88] 상기 화학식 I의 펩타이드 유사체를 포함하는 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), 화합물 8 (SEQ ID NO. 9), 화합물 9 (SEQ ID NO. 10), 화합물 10 (SEQ ID NO. 11), 화합물 11 (SEQ ID NO. 12), 화합물 12 (SEQ ID NO. 13), 화합물 13 (SEQ ID NO. 14), 화합물 15 (SEQ ID NO. 16), 화합물 16 (SEQ ID NO. 17), 화합물 17 (SEQ ID NO. 18), 화합물 18 (SEQ ID NO. 19)를 포함할 수 있다.
 [89]
 [90] 또한, 상기 본 발명에 따른 화학식 I의 옥신토모듈린 펩타이드 유사체는 아미노산 서열 내에 하나 이상의 분자내 가교, 즉, X_9 와 X_{10} 은 분자내 결합 (락탐화, di-sulfide 결합) 또는 가교제 (cross linker)를 통하여 cyclic 펩타이드를 형성할 수 있다.
 [91]
 [92] 그러므로 본 발명의 다른 목적은 하기 화학식 II의 아미노산 서열을 포함하는 신규한 옥신토모듈린 펩타이드 유사체를 제공하는 것이다.
 [93]
 [94] <화학식 II>
 [95] His- X_{17} -Gln-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp- X_{18} -Ser-Lys-Tyr-Leu-Asp- X_{19} -Arg-Arg-Ala- X_{20} -Asp-Phe-Val-Gln-Trp-Leu-Met-Asn-Thr-Lys (SEQ ID NO.53)
 [96]
 [97] 상기 식에서,
 [98] X_{17} 은 Ser 또는 Aib (Aminoisobutric acid)이고;

- [99] X_{18} 은 Z이며;
- [100] X_{19} 는 Asp, Glu, Cys, Hcy (Homocysteine), Lys 또는 Orn (Ornithine)이며;
- [101] X_{20} 은 Asp, Glu, Cys, Hcy (Homocysteine), Lys 또는 Orn (Ornithine)이며;
- [102] X_{19} 와 X_{20} 은 분자내 결합 또는 가교제 (cross linker)을 통하여 cyclic 펩타이드를 형성할 수 있으며, 이때, cyclic 펩타이드는 두 잔기 사이에 아미드결합으로 형성된 락탐 링 또는 두 잔기 사이에 di-sulfide 결합으로 형성된 di-sulfide 링 또는 두 잔기 사이에 가교제 (cross linker) 결합으로 형성된 cross-linked 링을 가진 펩타이드이며;
- [103] C-말단 아미노산은 임의로 아미드화 될 수 있으며;
- [104] Z는 작용화된 Lys으로서 그 측쇄에 중합체성 부분과 스페이서의 접합체인 Z_1 과 친유성 리피드 부분인 Z_2 가 접합된 형태이며, 여기서 Z_1 은 아실 작용기를 통하여 Lys 측쇄와 직접적으로 접합되고 Z_2 는 Z_1 을 통해 Lys 측쇄에 접합되고, Z_1 은 하기 구조식 (1) 또는 (2)이고,



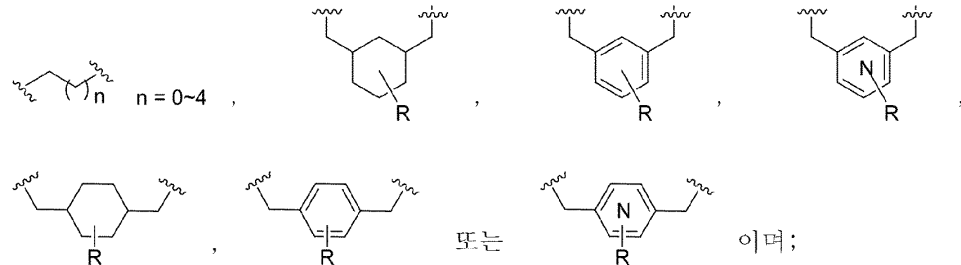
- [107] Z_2 는 하기 구조식 (3) 또는 (4) 이다.



- [110]
- [111] X_{19} 와 X_{20} 의 분자내 결합은 X_{19} 와 X_{20} 이 각각 Asp (또는 Glu)와 Lys (또는 Orn)일때 또는 각각 Lys (또는 Orn)와 Asp (또는 Glu)일때 분자내 락탐 링 형성 결합이거나; X_{19} 와 X_{20} 이 각각 Cys (또는 Hcy)와 Cys (또는 Hcy)일때 분자내 di-sulfide 링 형성 결합이며;
- [112]
- [113] X_{19} 와 X_{20} 이 각각 Cys(또는 Hcy)와 Cys(또는 Hcy)일때 가교제(cross linker)는 양쪽 Cys(또는 Hcy) 측쇄의 티올(thiol) 작용기에 결합되어 링을 형성하며, 이때

가교제는 C₁-C₆ 직쇄 또는 분지쇄 알킬, C₃-C₈ 포화 또는 불포화 사이클로알킬, C₆-C₁₀ 아릴, 또는 C₅-C₁₂ 헤테로 아릴 또는 융합된 헤테로사이클릭 아릴이며, 바람직하게는

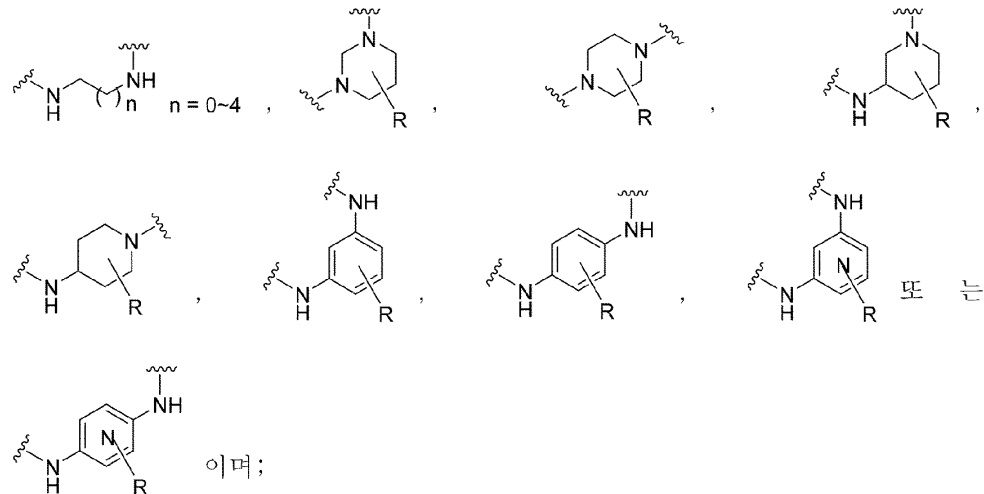
[114]

[115] R은 수소 또는 C₁-C₆ 직쇄 또는 분지쇄 알킬이며;

[116]

[117] X₁₉와 X₂₀이 각각 Asp(또는 Glu)와 Asp(또는 Glu)일때 가교제(cross linker)는 양쪽 Asp(또는 Glu) 측쇄의 카르복실기에 아미드결합으로 링을 형성하며, 이때 가교제(cross linker)는 디-아미노 C₁-C₆ 직쇄 또는 분지쇄 알킬, 디-아미노 C₃-C₈ 포화 또는 불포화 사이클로알킬, 아미노 피페리딘, 피페라진, 디-아미노 C₆-C₁₀ 아릴, 또는 디-아미노 C₅-C₁₂ 헤테로 아릴 또는 융합된 헤테로사이클릭 아릴이며, 바람직하게는

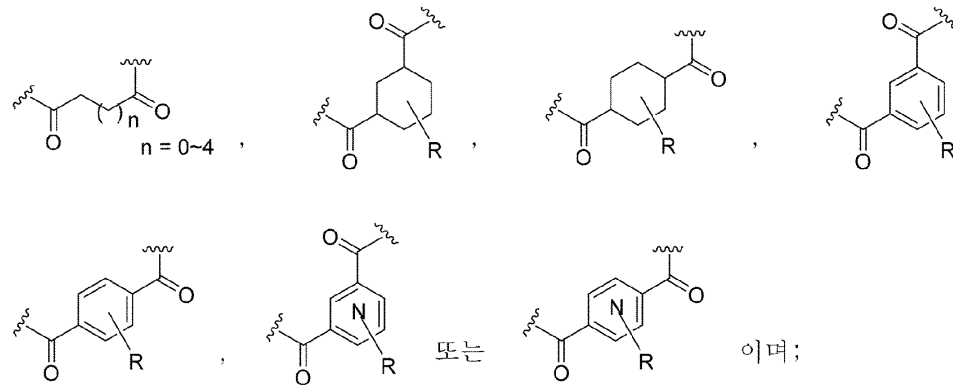
[118]

[119] R은 수소 또는 C₁-C₆ 직쇄 또는 분지쇄 알킬이며;

[120]

[121] X₁₉와 X₂₀이 각각 Lys(또는 Orn)와 Lys(또는 Orn)일때 가교제(cross linker)는 양쪽 Lys(또는 Orn) 측쇄의 아민기에 아미드결합으로 링을 형성하며, 이때 가교제(cross linker)는 디-카르보닐 C₁-C₆ 직쇄 또는 분지쇄 알킬, 디-카르보닐 C₃-C₈ 포화 또는 불포화 사이클로알킬, 디-카르보닐 C₆-C₁₀ 아릴 또는 디-카르보닐 C₅-C₁₂ 헤테로 아릴 또는 융합된 헤테로사이클릭 아릴이고, 바람직하게는

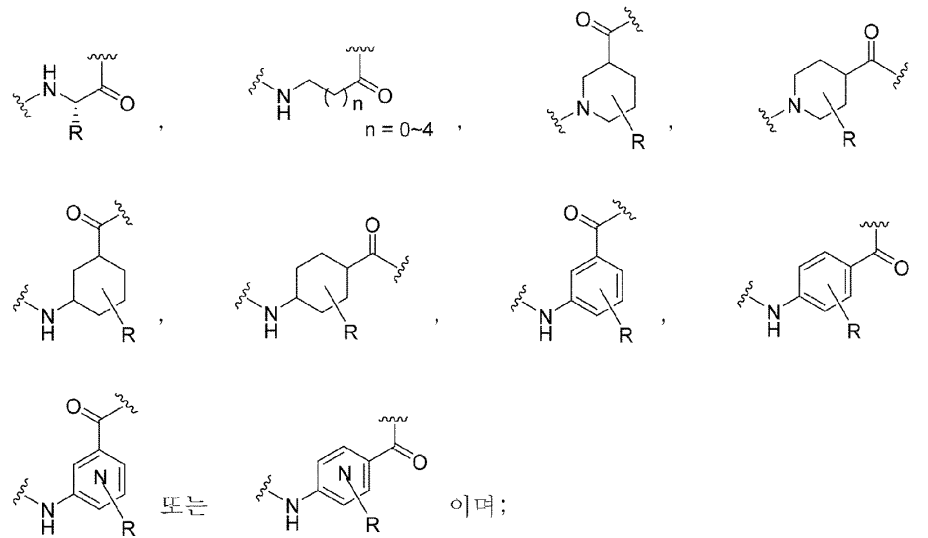
[122]

[123] R은 수소 또는 C₁-C₆ 직쇄 또는 분지쇄 알킬이며;

[124]

[125] X₁₀와 X₂₀이 각각 Asp(또는 Glu)와 Lys(또는 Orn)일 때 또는 각각 Lys(또는 Orn)와 Asp(또는 Glu)일 때, 가교제(cross linker)는 Asp(또는 Glu) 측쇄의 카르복실기와 가교제(cross linker)의 아민 작용기와 아미드결합으로 연결되며, Lys(또는 Orn) 측쇄의 아민기에는 가교제(cross linker)의 카르복실 작용기와 아미드결합으로 연결되어 링을 형성하며, 이때 가교제(cross linker)는 알파 아미노산(Gly, Val, Leu, Ile 등), 베타 아미노산, 카르보닐 C₁-C₆ 직쇄 또는 분지쇄 알킬아민, 카르보닐 C₃-C₈ 포화 또는 불포화 알킬아민, 카르보닐 피페리딘, 아미노 벤조일, 카르보닐 C₆-C₁₀ 아릴아민 또는 카르보닐 C₅-C₁₂ 헤테로 아릴아민 또는 융합된 헤테로사이클릭 아릴아민이며, 바람직하게는

[126]

[127] R은 수소 또는 C₁-C₆ 직쇄 또는 분지쇄 알킬이다.

[128]

[129] 상기 화학식 I의 아미노산 서열 내에 하나 이상의 분자내 가교를 가질 수 있는 화학식 II의 펩타이드 유사체를 포함하는 구현예에는, 화합물 14(SEQ ID NO. 15),

화합물 19(SEQ ID NO. 20), 화합물 20(SEQ ID NO. 21), 화합물 21(SEQ ID NO. 22), 화합물 22(SEQ ID NO. 23), 화합물 23(SEQ ID NO. 24), 화합물 24(SEQ ID NO. 25), 화합물 25(SEQ ID NO. 26), 화합물 27(SEQ ID NO. 28), 화합물 28(SEQ ID NO. 29), 화합물 29(SEQ ID NO. 30), 화합물 30(SEQ ID NO. 31), 화합물 31(SEQ ID NO. 32), 화합물 32(SEQ ID NO. 33), 화합물 33(SEQ ID NO. 34), 화합물 34(SEQ ID NO. 35), 화합물 35(SEQ ID NO. 36), 화합물 36(SEQ ID NO. 37), 화합물 37(SEQ ID NO. 38), 화합물 38(SEQ ID NO. 39)를 포함할 수 있다.

[130]

[131] 상기 화학식 II 펩타이드의 가교는 화학식 I의 서열 내에서 3개의 아미노산의 간격을 두고 분리된 두 개의 임의의 아미노산들이 각기 포함하고 있는 잔기 내 또는 측쇄 내 임의의 작용기 간의 화학적 공유결합, 또는 이온간 상호작용에 의해 이루어질 수 있다. 바람직하게는, X_{19} 잔기와 X_{20} 잔기의 아미노산 측쇄들끼리 락톤 환, 락탐 환 또는 di-sulfide 환을 형성하면서 가교가 이루어질 수 있고, 또한 X_{19} 잔기와 X_{20} 잔기의 아미노산 측쇄와 가교제(cross linker)의 연결을 통하여 환을 형성하면서 가교가 이루어질 수 있다.

[132]

[133] 상기 화학식 II의 아미노산 서열을 포함하는 신규한 펩타이드는 천연항 옥신토모듈린의 16번 위치에 존재하는 Ser 잔기를 Cys 또는 Hcy으로 치환시키고, 20번 위치에 존재하는 Gln 잔기를 Cys 또는 Hcy으로 치환 시킨 후 분자내 di-sulfide 환을 형성시켜 제조할 수 있으며, 예로서 하기 구현예 중 화합물 28(SEQ ID NO. 29)의 경우, X_{19} 위치를 Cys, X_{20} 위치를 Cys으로 치환 후 분자내 di-sulfide 환을 형성시켜 제조할 수 있다.

[134]

[135] 또한, 상기 본 발명에 의한 아실화 옥신토모듈린 펩타이드 유사체는 천연항 옥신토모듈린의 16번 위치에 존재하는 Ser 잔기를 Cys 또는 Hcy으로 치환시키고, 20번 위치에 존재하는 Gln 잔기를 Cys 또는 Hcy으로 치환 시킨 후 가교제(cross linker)로 두 잔기를 연결하여 환을 형성시켜 제조할 수 있으며, 예로서 하기 구현예 중 화합물 22(SEQ ID NO. 23)의 경우, X_{19} 위치를 Cys, X_{20} 위치를 Cys으로 치환 후 가교제(cross linker)로 두 잔기를 연결하여 환을 형성시켜 제조할 수 있다.

[136]

[137] 또한, 상기 본 발명에 의한 아실화 옥신토모듈린 펩타이드 유사체는 천연항 옥신토모듈린의 16번 위치에 존재하는 Ser 잔기를 Asp 또는 Glu으로 치환시키고, 20번 위치에 존재하는 Gln 잔기를 Lys 또는 Orn으로 치환 시킨 후 분자내 락탐 환을 형성시켜 제조할 수 있으며, 예로서 하기 구현예 중 화합물 26(SEQ ID NO. 27)의 경우, X_{19} 위치를 Asp, X_{20} 위치를 Lys으로 치환 후 분자내 락탐 환을 형성시켜 제조할 수 있고, 화합물 14(SEQ ID NO.15), 화합물 19(SEQ ID NO.20), 화합물 20(SEQ ID NO.21), 화합물 24(SEQ ID NO.25), 화합물 25(SEQ ID

NO.26)의 경우, X₁₉ 위치를 Glu, X₂₀ 위치를 Lys으로 치환 후 분자내 락탐 환을 형성시켜 제조할 수 있다.

[138]

[139] 또한, 상기 본 발명에 의한 아실화 옥신토모듈린 펩타이드 유사체는 천연항 옥신토모듈린의 16번 위치에 존재하는 Ser 잔기를 Asp 또는 Glu으로 치환시키고, 20번 위치에 존재하는 Gln 잔기를 Lys 또는 Orn으로 치환 시킨 후 가교제(cross linker)로 두 잔기를 연결하여 환을 형성시켜 제조할 수 있으며, 예로서 하기 구현예 중 화합물 37(SEQ ID NO.38), 화합물 38(SEQ ID NO.39)의 경우, X₁₉ 위치를 Asp, X₂₀ 위치를 Lys으로 치환 후 가교제(cross linker)로 두 잔기를 연결하여 환을 형성시켜 제조할 수 있고, 화합물 33(SEQ ID NO.34), 화합물 34(SEQ ID NO.35), 화합물 35(SEQ ID NO.36), 화합물 36(SEQ ID NO.37)의 경우, X₁₉ 위치를 Glu, X₂₀ 위치를 Lys으로 치환 후 가교제 (cross linker)로 두 잔기를 연결하여 환을 형성시켜 제조할 수 있다.

[140]

[141] 또한, 상기 본 발명에 의한 아실화 옥신토모듈린 펩타이드 유사체는 천연항 옥신토모듈린의 16번 위치에 존재하는 Ser 잔기를 Lys 또는 Orn으로 치환시키고, 20번 위치에 존재하는 Gln 잔기를 Asp 또는 Glu으로 치환 시킨 후 분자내 락탐 환을 형성시켜 제조할 수 있으며, 예로서 하기 구현예 중 화합물 21(SEQ ID NO. 22)의 경우, X₁₉ 위치를 Lys, X₂₀ 위치를 Glu으로 치환 후 분자내 락탐 환을 형성시켜 제조할 수 있고, 화합물 27(SEQ ID NO.28)의 경우, X₁₉ 위치를 Lys, X₂₀ 위치를 Asp로 치환 후 분자내 락탐 환을 형성시켜 제조할 수 있다.

[142]

[143] 또한, 상기 본 발명에 의한 아실화 옥신토모듈린 펩타이드 유사체는 천연항 옥신토모듈린의 16번 위치에 존재하는 Ser 잔기를 Lys 또는 Orn으로 치환시키고, 20번 위치에 존재하는 Gln 잔기를 Asp 또는 Glu으로 치환 시킨 후 가교제(cross linker)로 두 잔기를 연결하여 환을 형성시켜 제조할 수 있으며, 예로서 하기 구현예 중 화합물 32(SEQ ID NO.33)의 경우, X₁₉ 위치를 Lys, X₂₀ 위치를 Glu로 치환 후 가교제(cross linker)로 두 잔기를 연결하여 환을 형성시켜 제조할 수 있다.

[144]

[145] 또한, 상기 본 발명에 의한 아실화 옥신토모듈린 펩타이드 유사체는 천연항 옥신토모듈린의 16번 위치에 존재하는 Ser 잔기를 Asp 또는 Glu으로 치환시키고, 20번 위치에 존재하는 Gln 잔기를 Asp 또는 Glu으로 치환 시킨 후 가교제(cross linker)로 두 잔기를 연결하여 환을 형성시켜 제조할 수 있으며, 예로서 하기 구현예 중 화합물 23(SEQ ID NO.24), 화합물 29(SEQ ID NO.30), 화합물 30(SEQ ID NO.31)의 경우, X₁₉ 위치를 Glu, X₂₀ 위치를 Glu으로 치환 후 가교제(cross linker)로 두 잔기를 연결하여 환을 형성시켜 제조할 수 있다.

[146]

- [147] 또한, 상기 본 발명에 의한 아실화 옥신토모듈린 펩타이드 유사체는 천연항 옥신토모듈린의 16번 위치에 존재하는 Ser 잔기를 Lys 또는 Orn으로 치환시키고, 20번 위치에 존재하는 Gln 잔기를 Lys 또는 Orn으로 치환 시킨 후 가교제(cross linker)로 두 잔기를 연결하여 환을 형성시켜 제조할 수 있으며, 예로서 하기 구현예 중 화합물 31(SEQ ID NO.32)의 경우, X₁₉ 위치를 Lys, X₂₀ 위치를 Lys으로 치환 후 가교제 (cross linker)로 두 잔기를 연결하여 환을 형성시켜 제조할 수 있다.
- [148]
- [149] 이와 같은 분자 내 가교는 펩타이드의 알파 나선 구조를 안정화시켜 GLP-1 수용체 또는/및 글루카곤 수용체에서 그 선택성이나 약리상 효능을 증가시키는 것으로 여겨진다(ACS Chem Biol. 2016;11:324-328).
- [150]
- [151] 본 발명의 옥신토모듈린 펩타이드 유사체는 화학적으로 변형될 수 있다. 특히, 펩타이드를 이루는 각각의 아미노산 잔기는 다양한 스페이서나 링커와 직접적으로 연결될 수 있으며, 또한 각각의 잔기들은 알킬화, 이황화 결합 형성, 금속 착화, 아미드화, 에스테르화, 산화, 환원 등의 화학적 반응을 일으켜 해당하는 화학적 산물로 변형될 수 있다. 특히, 본 발명의 옥신토모듈린 펩타이드 유사체 구조에 존재하는 임의의 카르복시 말단 또는 아미노 말단은 에스테르화, 아미드화, 아실화 등을 통해 유사체화될 수 있다. 더하여, 본 발명의 옥신토모듈린 펩타이드 유사체는 그 구조에 존재하는 임의의 아민기의 산 부가 염이나 임의의 카르복시기의 카르복실레이트 염 또는 이의 알칼리 부가 염으로서 제공될 수 있다.
- [152]
- [153] 또한, 본 발명은 상기 펩타이드 유사체를 유효성분으로 하며, 약학적으로 허용가능한 부형제를 포함하는 비만 또는 과체중 및 이를 동반하는 당뇨병 예방 및 치료용 약학조성물에 관한 것이다.
- [154]
- [155] 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.
- [156]
- [157] 특히, 본 발명의 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 펩타이드 유사체를 포함하는 비만 또는 과체중 및 이를 동반하는 당뇨병 예방 및 치료용 약학조성물은 과도하게 축적된 지방의 제거와 음식 섭취 억제의 조합된 효과를 통해 체중의 조절에 있어서 의학적으로 유리한 효과를 유도할 수 있다.
- [158]

- [159] 또한, 본 발명의 펩타이드 유사체와 이를 포함한 약학 조성물은 혈당을 감소시켜 비만을 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 제한받고자 하는 바는 아니나, 본 발명의 펩타이드 유사체를 포함한 약학 조성물은 글루카곤 유도체 중의 하나로 혈당을 감소시키는 역할을 하는 GLP-1 수용체제의 활성이 높아 궁극적으로 혈당 조절에 유용하다.
- [160]
- [161] 따라서, 본 발명의 펩타이드 유사체를 포함한 약학조성물은 비만, 병적 비만, 수술전 병적 비만, 비만 관련 염증, 비만 관련 쓸개 질환, 비만 유도된 수면 무호흡, 비만을 동반하는 당뇨병의 치료 및 예방과 같은, 과체중에 의한 야기되거나 특징지어지는 임의의 병태의 직접 또는 간접 치료법의 일환으로 단독으로 투여되거나 또는 다른 관련 약제와 병용 투여될 수 있다. 또한, 본 발명의 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.
- [162]
- [163] 본 발명에서 “투여”는, 적절한 방법으로 환자에게 치료 용도의 물질을 도입하는 것을 의미하며, 본 발명의 펩타이드 유사체를 포함한 약학조성물은 약물이 목적 조직에 도달하여 목적하는 효능을 나타낼 수 있는 한 다양한 제형의 형태로 다양한 경로를 통하여 투여될 수 있다. 복강내 투여, 정맥내 투여, 근육내 투여, 피하 투여, 피내 투여, 경구 투여, 국소 투여, 비내 투여, 폐내 투여, 직장내 투여 등이 가능하나, 그 제형과 투여 방법이 제한되지는 않는다.
- [164]
- [165] 본 발명의 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, 주사제의 경우에는 완충제, 보존제, 무통화제, 가용화제, 등장화제, 안정화제 등을 혼합하여 사용할 수 있으며, 국소투여용의 경우에는 기제, 부형제, 윤활제, 보존제 등을 다양하게 사용할 수 있다.
- [166]
- [167] 본 발명의 옥신토모듈린 펩타이드 유사체의 제제화에 사용될 수 있는 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 있다.

[168]

[169] 본 발명의 옥신토모듈린 펩타이드 유사체를 포함한 약학조성물은 상술된 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. 이외 용액, 현탁액, 정제, 환약, 캡슐, 서방형 제제 등으로도 제형화 할 수 있다.

[170]

[171] 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.

[172]

발명의 효과

[173] 본 발명은 신규의 아실화 옥신토모듈린 펩타이드 유사체를 제공하며, 본 발명에 의한 펩타이드 유사체는 천연형의 옥신토모듈린에 비해 GLP-1 수용체와 글루카곤 수용체 모두에 대하여 더 우수한 활성을 가지고 있다. 특히, 본 발명은 GLP-1 수용체에 비해 글루카곤 수용체 작용제로서 더 높은 생물학적 활성이 보여진다.

[174]

[175] 따라서, 본 발명은 신규의 아실화 옥신토모듈린 펩타이드 유사체를 포함하는 약학조성물은 일차적으로 비만 또는 과체중에 의해 야기되거나 특징지어지는 병태의 예방 또는 치료에 유용하게 적용될 수 있으며, 나아가 비만 또는 과체중을 동반하는 비 인슐린 의존성 당뇨병의 예방 또는 치료의 목적으로도 사용될 수 있다.

[176]

도면의 간단한 설명

[177] 도 1은 본 발명에 의한 아실화 옥신토모듈린 유사체의 마우스에서 단회 체중감소 약효평가 결과를 나타낸 그래프이다.

[178] 도 2는 본 발명에 의한 아실화 옥신토모듈린 펩타이드 유사체의 마우스에서 1주 반복 체중 감소 약효평가 결과를 나타낸 그래프로서, 도 2a는 체중 감소 결과, 도 2b는 누적 사료 섭취량 결과를 나타낸 그래프이다.

[179] 도 3은 본 발명에 의한 아실화 옥신토모듈린 펩타이드 유사체의 랫드에서 5일 반복 체중 감소 약효평가 결과를 나타낸 그래프로서, 도 3a는 체중 감소 결과, 도 3b는 누적 사료 섭취량 결과를 나타낸 그래프이다.

[180] 도 4는 본 발명에 의한 아실화 옥신토모듈린 펩타이드 유사체의 마우스에서

- 10일 반복 체중 감소 약효평가 결과를 나타낸 그래프로서, 도 4a는 체중 감소 결과, 도 4b는 누적 사료 섭취량 결과를 나타낸 그래프이다.
- [181] 도 5는 본 발명에 의한 아실화 옥신토모듈린 펩타이드 유사체의 마우스에서 10일 반복 체중 감소 약효평가 결과를 나타낸 그래프로서, 도 5a는 체중 감소 결과, 도 5b는 누적 사료 섭취량 결과를 나타낸 그래프이다.
- [182] 도 6은 발명에 의한 아실화 옥신토모듈린 펩타이드 유사체의 마우스에서 1주 반복 체중 감소 약효평가 결과를 나타낸 그래프로서, 도 6a는 체중 감소 결과, 도 6b는 누적 사료 섭취량 결과를 나타낸 그래프이다.
- [183] 도 7은 본 발명에 의한 아실화 옥신토모듈린 펩타이드 유사체의 마우스에서 2주 반복 체중 감소 약효평가 결과를 나타낸 그래프로서, 도 7a와 도 7c는 체중 감소 결과이고, 도 7b는 도 7a에 표기된 아실화 옥신토모듈린 펩타이드 유사체의 누적 사료 섭취량 결과를 나타낸 그래프이며, 도 7d는 도 7c에 표기된 아실화 옥신토모듈린 펩타이드 유사체의 누적 사료 섭취량 결과를 나타낸 그래프이다.
- [184] 도 8은 본 발명에 의한 아실화 옥신토모듈린 펩타이드 유사체의 마우스에서 2주 반복 체중 감소 약효평가 결과를 나타낸 그래프로서, 도 8a는 체중 감소 결과, 도 8b는 누적 사료 섭취량 결과를 나타낸 그래프이다.
- [185] 도 9는 본 발명에 의한 아실화 옥신토모듈린 펩타이드 유사체의 마우스에서 5일 반복 체중 감소 약효평가 결과를 나타낸 그래프로서, 도 9a는 체중 감소 결과, 도 9b는 누적 사료 섭취량 결과를 나타낸 그래프이다.
- [186] 도 10은 본 발명에 의한 아실화 옥신토모듈린 펩타이드 유사체의 마우스에서 4주 반복 체중 감소 약효평가 결과를 나타낸 그래프로서, 도 10a는 체중 감소 결과, 도 10b는 체지방 감소 결과, 도 10c는 누적 사료 섭취량 결과를 나타낸 그래프이다.
- [187] 도 11은 본 발명에 의한 아실화 옥신토모듈린 펩타이드 유사체의 마우스에서 내당력 개선 효과 검정 결과를 나타낸 그래프이다.
- [188] 도 12는 본 발명에 의한 아실화 옥신토모듈린 펩타이드 유사체의 마우스에서 6주 반복 혈당조절 약효평가 결과를 나타낸 그래프로서, 도 12a는 최종 비절식 혈당 결과, 도 12b는 당화 혈색소 상승 억제 결과를 나타낸 그래프이다.
- [189] 도 13은 본 발명에 의한 아실화 옥신토모듈린 펩타이드 유사체의 마우스에서 4주 반복 혈당조절 약효평가 결과를 나타낸 그래프로서, 도 13a는 경시적인 비절식 혈당 결과, 도 13b는 당화 혈색소 상승 억제 및 개선에 대한 결과를 나타낸 그래프이다.

[190]

발명의 실시를 위한 최선의 형태

- [191] 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.

[192]

[193] <실시예 1> 아실화 옥신토모듈린 펩타이드 유사체 합성

[194] 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 구매가능하다.

[195]

[196] 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 38(SEQ ID NO. 39)의 구조는 표 1 및 표 2에 나타내었다. 구체적인 합성 과정은 다음과 같다.

[197]

[198] 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.

[199]

[200] K(Lys) side 합성은 Fmoc-K(dde)-OH를 사용하여 커플링하고, 마지막 H(His)는 Boc-His(trt)-OH를 사용하여 커플링한다. 2% hydralazine을 이용하여 보호화 된 dde제거 후 PEG2, rE, C18, C18 diacid 등을 커플링시킨다. 락탐 링 합성은 Glu(Oall) 및 Lys(Alloc)으로 편입된 아미노산을 사용하여 coupling하고, 보호기 제거 후 과량의 HBTU 및 DIPEA를 사용하여 락탐 결합을 수행한다. di-sulfide 링은 보호기로 편입된 Ser 아미노산을 사용하여 커플링하고, 보호기 제거 후, di-sulfide 결합을 수행한다. 가교제 (cross linker)를 도입하고자 하는 위치에 적절한 보호기로 편입된 아미노산을 사용하여 커플링하고, 보호기를 제거 후 아미드 커플링 시약 등을 사용하여 가교제 (cross linker)와 두 아미노산 간의 결합을 수행한다.

[201]

[202] 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. drain후 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.

[203] 분자량분석은 shimadzuAxima Assurance MALDI-TOF 이용하였으며,

Matrix는CHCA(α -Cyano-4-hydroxycinnamic acid)를 사용하였다.

[204] [표1]

<아실화 옥신토모듈린 펩타이드 유사체의 구조>

화합물	구조
화합물 1	
화합물 2	
화합물 3	
화합물 4	
화합물 5	
화합물 6	
화합물 7	
화합물 8	
화합물 9	
화합물 10	

[205]

화합물 11	$\text{H}-\text{H-Aib-Q-G-T-F-T-S-D-NH-CO-S-K-Y-L-D-Aib-R-R-A-Q-DF-V-Q-W-L-M-N-T-K-OH}$
화합물 12	$\text{H}-\text{H-Aib-Q-G-T-F-T-S-D-NH-CO-S-K-Y-L-D-Aib-R-R-A-Q-DF-V-Q-W-L-L-R-A-K-OH}$
화합물 13	$\text{H-H-Aib-Q-G-T-F-T-S-D-NH-CO-S-K-Y-L-D-Aib-R-R-A-Q-DF-V-Q-W-L-M-N-T-K-OH}$
화합물 14	$\text{H-H-Aib-Q-G-T-F-T-S-D-NH-CO-S-K-Y-L-D-Aib-R-R-A-Q-DF-V-Q-W-L-M-N-T-K-OH}$
화합물 15	$\text{H-H-Aib-Q-G-T-F-T-S-D-Y-S-K-Y-L-D-Aib-R-R-A-Q-DF-V-Q-W-L-M-N-T-K-OH}$
화합물 16	$\text{H-H-Aib-Q-G-T-F-T-S-D-Y-S-K-Y-L-D-Aib-R-R-A-Q-DF-V-Q-W-L-M-N-T-K-OH}$
화합물 17	$\text{H-H-Aib-Q-G-T-F-T-S-D-NH-CO-S-K-Y-L-D-Aib-R-R-A-Q-DF-V-Q-W-L-M-N-T-K-OH}$
화합물 18	$\text{H-H-Aib-Q-G-T-F-T-S-D-NH-CO-S-K-Y-L-D-Aib-R-R-A-Q-DF-V-Q-W-L-M-N-T-K-OH}$
화합물 19	$\text{H-H-Aib-Q-G-T-F-T-S-D-NH-CO-S-K-Y-L-D-Aib-R-R-A-Q-DF-V-Q-W-L-M-N-T-K-NH_2}$
화합물 20	$\text{H-H-Aib-Q-G-T-F-T-S-D-NH-CO-S-K-Y-L-D-Aib-R-R-A-Q-DF-V-Q-W-L-M-N-T-K-OH}$

[208]

[209]

화합물 21	$\text{H-HAlb-Q-G-T-F-T-S-D-NH-CO-S-K-Y-L-D-NH-CO-R-R-A-NH-CO-D-F-V-Q-W-L-M-N-T-K-OH}$
화합물 22	$\text{H-HAlb-Q-G-T-F-T-S-D-NH-CO-S-K-Y-L-D-NH-CO-R-R-A-NH-CO-D-F-V-Q-W-L-M-N-T-K-OH}$
화합물 23	$\text{H-HAlb-Q-G-T-F-T-S-D-NH-CO-S-K-Y-L-D-NH-CO-R-R-A-NH-CO-D-F-V-Q-W-L-M-N-T-K-OH}$
화합물 24	$\text{H-HAlb-Q-G-T-F-T-S-D-NH-CO-S-K-Y-L-D-NH-CO-R-R-A-NH-CO-D-F-V-Q-W-L-M-N-T-K-NH2}$
화합물 25	$\text{H-HAlb-Q-G-T-F-T-S-D-NH-CO-S-K-Y-L-D-NH-CO-R-R-A-NH-CO-D-F-V-Q-W-L-M-N-T-K-OH}$
화합물 26	$\text{H-HAlb-Q-G-T-F-T-S-D-NH-CO-S-K-Y-L-D-NH-CO-R-R-A-NH-CO-D-F-V-Q-W-L-M-N-T-K-OH}$
화합물 27	$\text{H-HAlb-Q-G-T-F-T-S-D-NH-CO-S-K-Y-L-D-NH-CO-R-R-A-NH-CO-D-F-V-Q-W-L-M-N-T-K-OH}$
화합물 28	$\text{H-HAlb-Q-G-T-F-T-S-D-NH-CO-S-K-Y-L-D-NH-CO-R-R-A-NH-CO-D-F-V-Q-W-L-M-N-T-K-OH}$
화합물 29	$\text{H-HAlb-Q-G-T-F-T-S-D-NH-CO-S-K-Y-L-D-NH-CO-R-R-A-NH-CO-D-F-V-Q-W-L-M-N-T-K-OH}$
화합물 30	$\text{H-HAlb-Q-G-T-F-T-S-D-NH-CO-S-K-Y-L-D-NH-CO-R-R-A-NH-CO-D-F-V-Q-W-L-M-N-T-K-OH}$

[210]

화합물 31	
화합물 32	
화합물 33	
화합물 34	
화합물 35	
화합물 36	
화합물 37	
화합물 38	

[211]

[212]

[213]

[214]

[215]

[216] [표2]

<아실화 옥신토모놀린 펩타이드 유사체의 시열 및 구조>

SEQ ID NO.	명칭	서열
1	OXM(고유)	HSQGTFTSDYSKYLDSRRAQDFVQWLMNTKRNRRNNIA
2	화합물 1	H-HSQGTFTSDZSKYLSRRAQDFVQWLMNTK-OH
3	화합물 2	H-HAibQGTFTSDZSKYLSRRAQDFVQWLMNTK-OH
4	화합물 3	H-HAibQGTFTSDZSKYLDAibRRAQDFVQWLMNTK-OH
5	화합물 4	H-HSQGTFTSDZSKYLSRRAQDFVQWLMNTK-NH ₂
6	화합물 5	H-HSQGTFTSDZSKYLSRRAQDFVQWLMNTKRNRRNNIA-OH
7	화합물 6	H-HAibQGTFTSDZSKYLDAibRRAQDFVQWLMNTK-NH ₂
8	화합물 7	H-HAibQGTFTSDZSKYLDAibRRAQDFVQWLMNTKRNRRNNIA-OH
9	화합물 8	H-HAibQGTFTSDZSKYLDAibRRAQDFVQWLMNTK-OH
10	화합물 9	H-HAibQGTFTSDZSKYLDAibRRAQDFVQWLMNTK-OH
11	화합물 10	H-HAibQGTFTSDZSKYLDAibRRAQDFVQWLMNTK-OH
12	화합물 11	H-HAibQGTFTSDZSKYLDAibRRAQDFVQWLMNTK-OH
13	화합물 12	H-HAibQGTFTSDZSKYLDAibRRAQDFVQWLLRAK-OH
14	화합물 13	H-HAibQGTFTSDZSKYLDAibRRAQDFVQWLMNTK-OH
15	화합물 14	H-HAibQGTFTSDZSKYLDERRAKDFVQWLMNTK-OH (<u>E</u> 와 <u>K</u> 사이에 락탐 링 형성)
16	화합물 15	H-HAibQGTFTSDYSKYLDZRRRAQDFVQWLMNTK-OH
17	화합물 16	H-HAibQGTFTSDYSKYLDAibRRAZDFVQWLMNTK-OH
18	화합물 17	H-HAibQGTFTSDZSKYLDAibRRAQDFVQWLMNTK-OH
19	화합물 18	H-HAibQGTFTSDZSKYLDAibRRAQDFVQWLMNTK-OH
20	화합물 19	H-HAibQGTFTSDZSKYLDERRAKDFVQWLMNTK-NH ₂ (<u>E</u> 와 <u>K</u> 사이에 락탐 링 형성)
21	화합물 20	H-HAibQGTFTSDZSKYLDERRAKDFVQWLMNTK-OH (<u>E</u> 와 <u>K</u> 사이에 락탐 링 형성)
22	화합물 21	H-HAibQGTFTSDZSKYLDKRRAEDFVQWLMNTK-OH (<u>K</u> 와 <u>E</u> 사이에 락탐 링 형성)
23	화합물 22	H-HAibQGTFTSDZSKYLD ~~C~~ RRACDFVQWLMNTK-OH (<u>C</u> 와 <u>C</u> 사이에 1,3-phenylenedimethyl 가교로 링 형성)
24	화합물 23	H-HAibQGTFTSDZSKYLDERRAEDFVQWLMNTK-OH (<u>E</u> 와 <u>E</u> 사이에 1,4-piperazinyl 가교로 링 형성)
25	화합물 24	H-HAibQGTFTSDZSKYLDERRAKDFVQWLMNTK-NH ₂ (<u>E</u> 와 <u>K</u> 사이에 락탐 링 형성)

[217]

26	화합물 25	H-HAibQGTFTSDZSKYLDERRAKDFVQWLMNTK-OH (E와 K 사이에 락탐 링 형성)
27	화합물 26	H-HAibQGTFTSDZSKYLD ~~D~~ RRAKDFVQWLMNTK-OH (D와 K 사이에 락탐 링 형성)
28	화합물 27	H-HAibQGTFTSDZSKYLDKRRADDFVQWLMNTK-OH (K와 D 사이에 락탐 링 형성)
29	화합물 28	H-HAibQGTFTSDZSKYLD ~~C~~ RRACDFVQWLMNTK-OH (C와 C 사이에 di-sulfide 링 형성)
30	화합물 29	H-HAibQGTFTSDZSKYLDERRAEDFVQWLMNTK-OH (E와 E 사이에 1,4-phenylenediamino 가교로 링 형성)
31	화합물 30	H-HAibQGTFTSDZSKYLDERRAEDFVQWLMNTK-OH (E와 E 사이에 1,2-ethylenediamino 가교로 링 형성)
32	화합물 31	H-HAibQGTFTSDZSKYLDKRRAKDFVQWLMNTK-OH (K와 K 사이에 1,4-phenylenebiscarbonyl 가교로 링 형성)
33	화합물 32	H-HAibQGTFTSDZSKYLDKRRAEDFVQWLMNTK-OH (K와 E 사이에 4-carboxypiperidin-1-yl 가교로 링 형성)
34	화합물 33	H-HAibQGTFTSDZSKYLDERRAKDFVQWLMNTK-OH (E와 K 사이에 1-aminocyclohexan-4-carbonyl 가교로 링 형성)
35	화합물 34	H-HAibQGTFTSDZSKYLDERRAKDFVQWLMNTK-OH (E와 K 사이에 4-aminobenzoyl 가교로 링 형성)
36	화합물 35	H-HAibQGTFTSDZSKYLDERRAKDFVQWLMNTK-OH (E와 K 사이에 glycine 가교로 링 형성)
37	화합물 36	H-HAibQGTFTSDZSKYLDERRAKDFVQWLMNTK-OH (E와 K 사이에 leucine 가교로 링 형성)
38	화합물 37	H-HAibQGTFTSDZSKYLD ~~D~~ RRAKDFVQWLMNTK-OH (D와 K 사이에 glycine 가교로 링 형성)
39	화합물 38	H-HAibQGTFTSDZSKYLD ~~D~~ RRAKDFVQWLMNTK-OH (D와 K 사이에 leucine 가교로 링 형성)

Z= Lys 측쇄에 중합체, 스페이서, 친유성리피드가 결합된 변형된 Lys. 각 화합물의 Z는 다음과 같다;
 화합물 1~7, 12, 14~16, 19, 21~23, 26~38 ;
 Lys([(2-(2-(2-aminoethoxy)ethoxy)acetyl)₂]-[gamma glutamic acid]-[octadecanoyl])
 화합물 8 ; Lys([(2-(2-(2-aminoethoxy)ethoxy)acetyl)₂]-[gamma glutamic acid]-[icosanoyl])
 화합물 9 ;
 Lys([(2-(2-(2-aminoethoxy)ethoxy)acetyl)₂]-[(gamma glutamic acid)₂]-[octadecanoyl])
 화합물 10, 20 ;
 Lys([(2-(2-(2-aminoethoxy)ethoxy)acetyl)₃]-[gamma glutamic acid]-[octadecanoyl])
 화합물 11 ; Lys([Gly-Gly-Ser-Gly-Ser-Gly]-[gamma glutamic acid]-[octadecanoyl])
 화합물 13 ;
 Lys([(2-(2-(2-aminoethoxy)ethoxy)acetyl)₂]-[gamma glutamic acid]-[17-aminocarbonylheptadecanoyl])
 화합물 17 ;
 Lys([(2-(2-(2-aminoethoxy)ethoxy)acetyl)]-[gamma glutamic acid]-[octadecanoyl])
 화합물 18, 24, 25 ;
 Lys([(2-(2-(2-aminoethoxy)ethoxy)acetyl)₄]-[gamma glutamic acid]-[octadecanoyl])

[218] <비교예 1> 옥신토모듈린 펩타이드 유사체 합성

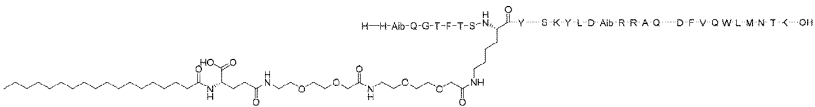
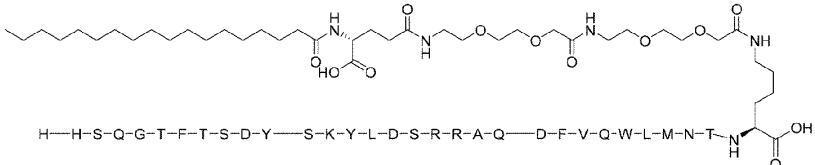
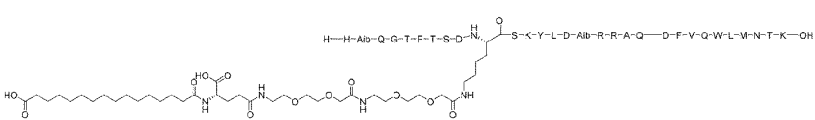
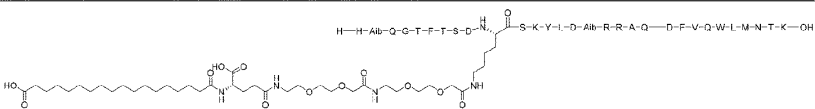
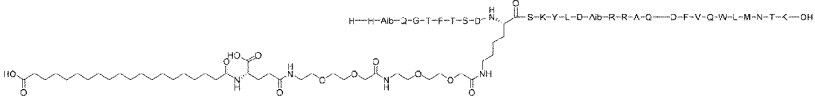
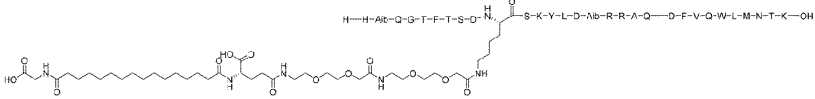
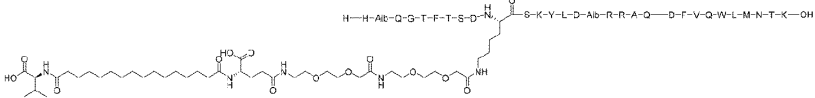
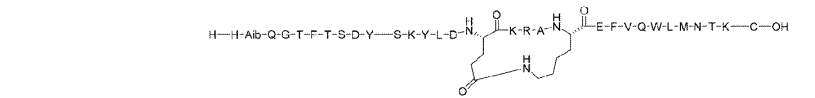
[219] 본 발명과 비교하기 위하여, 구조적으로 유사성을 갖는 옥신토모듈린 펩타이드 유사체를 실시예 1의 방법으로 합성하였다. 하기 화합물 39는 비아실화 된 옥신토모듈린 펩타이드 유사체이고, 화합물 40 및 41은 아실화 위치가 다른

옥신토모돌린 펩타이드 유사체이며, 화합물 42 내지 46은 아실화 말단이 다른 옥신토모돌린 펩타이드 유사체이며, 화합물 47은 대한민국 공개특허공보 제2012-139579호에 공지된 것으로서, 링 구조를 갖는 비아실화 된 옥신토모돌린 펩타이드 유사체이다. 상기 화합물 39 내지 47의 합성된 옥신토모돌린 펩타이드 유사체의 구조는 표 3 및 표 4에 나타내었다.

[220]

[221] [표3]

<옥신토모돌린 펩타이드 유사체의 구조>

화합물	구조
화합물 39	$\text{H}-\text{H}-\text{Aib}-\text{Q}-\text{G}-\text{T}-\text{F}-\text{T}-\text{S}-\text{D}-\text{K}-\text{S}-\text{K}-\text{Y}-\text{L}-\text{D}-\text{Aib}-\text{R}-\text{R}-\text{A}-\text{Q}-\text{D}-\text{F}-\text{V}-\text{Q}-\text{W}-\text{L}-\text{M}-\text{N}-\text{T}-\text{K}-\text{OH}$
화합물 40	
화합물 41	
화합물 42	
화합물 43	
화합물 44	
화합물 45	
화합물 46	
화합물 47	

[222]

[223] [표4]

<옥신토모돌린 펩타이드 유사체의 서열 및 구조>

옥신토모돌린 펩타이드 유사체의 서열 및 구조		
SEQ ID NO.	명칭	서열
40	화합물 39	H-HAibQGTFTSDSKYLDAibRRAQDFVQWLMNTK-OH
41	화합물 40	H-HAibQGTFTSZSKYLDAibRRAQDFVQWLMNTK-OH
42	화합물 41	H-HSQGTFTSDYSKYLDSRRAQDFVQWLMNTZ-OH
43	화합물 42	H-HAibQGTFTSDZSKYLDAibRRAQDFVQWLMNTK-OH
44	화합물 43	H-HAibQGTFTSDZSKYLDAibRRAQDFVQWLMNTK-OH
45	화합물 44	H-HAibQGTFTSDZSKYLDAibRRAQDFVQWLMNTK-OH
46	화합물 45	H-HAibQGTFTSDZSKYLDAibRRAQDFVQWLMNTK-OH
47	화합물 46	H-HAibQGTFTSDZSKYLDAibRRAQDFVQWLMNTK-OH
48	화합물 47	H-HAibQGTFTSDYSKYLDEKRAKEFVQWLMNTKC-OH (E와 K 사이에 락탐 링 형성)

Z= Lys 측쇄에 중합체, 스페이서, 친유성리피드가 결합된 변형된 Lys. 각 화합물의 Z는 다음과 같다;
 화합물 40, 41 ;
 Lys([[(2-(2-(2-aminoethoxy)ethoxy)acetyl)]₂]-[gamma]glutamic acid)-[octadecanoyl])
 화합물 42 ;
 Lys([[(2-(2-(2-aminoethoxy)ethoxy)acetyl)]₂]-[gamma]glutamic acid)-[15-carboxypentadecanoyl])
 화합물 43 ;
 Lys([[(2-(2-(2-aminoethoxy)ethoxy)acetyl)]₂]-[gamma]glutamic acid)-[17-carboxyheptadecanoyl])
 화합물 44 ;
 Lys([[(2-(2-(2-aminoethoxy)ethoxy)acetyl)]₂]-[gamma]glutamic acid)-[19-carboxynonadecanoyl])
 화합물 45 ;
 Lys([[(2-(2-(2-aminoethoxy)ethoxy)acetyl)]₂]-[gamma]glutamic acid)-[15-(N-(carboxymethyl)amino)carbonylpentadecanoyl])
 화합물 46 ;
 Lys([[(2-(2-(2-aminoethoxy)ethoxy)acetyl)]₂]-[gamma]glutamic acid)-[15-(N-(1S)-(1-carboxy-2-methylpropyl)amino)carbonylpentadecanoyl])

[224]

[225] <실예 1> GLP-1 및 글루카곤 수용체 활성화능 검정

[226] 세포에 사람 GLP-1 또는 글루카곤 수용체를 일시적으로 과발현시켜 본 발명의 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.

[227]

- [228] 양성 대조약물로는 GLP-1과 글루카곤을 각각의 평가에 사용하였고, 비교예로는 GLP-1 agonist로 당뇨병 치료제로의 승인받은 Liraglutide와 Semaglutide 그리고 옥신토모듈린 펩타이드 유사체로 임상 2상 개발 중인 MEDI0382(Diabetes, Obesity and Metabolism 2016; 18: 1176-1190, Lancet 2018; 391: 2607-2618) 및 상기 화합물 39 내지 47의 펩타이드를 합성하여 이를 비교예로 하였다.
- [229]
- [230] 세포는 중국 햄스터 난소 세포(CHO-K1)에 사람 GLP-1 또는 글루카곤 발현벡터(이상 Origene)를 반딧불이 루시페라아제(firefly luciferase) 또는 레닐라 루시페라아제(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 유사체 및 0.1% 소혈청알부민(BSA)을 포함하는 α -MEM 배지로 교환하였고, 6시간 후 세포가 잠긴 배지와 동량의 듀얼 루시페라아제 검색 시약(Dual luciferase assay reagent, Promega)을 가하여 연속적으로 반딧불이 루시페라아제 및 레닐라 루시페라아제의 활성을 측정하였다. 반딧불이 루시페라아제 활성은 레닐라 루시페라아제 활성으로 보정하여 트랜스펙션에 대한 효율을 산출하였다.
- [231]
- [232] 수용체의 활성 효능은 본 발명의 유사체에 대한 다중 농도 평가를 실시하여 본 발명의 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.
- [233]

[234] [표5]

<아실화 옥신토모듈린 펩타이드 유사체 및 옥신토모듈린 펩타이드 유사체의 사람 GLP-1 및 글루카곤 수용체 활성화능>

구분	화합물	EC ₅₀ (pM)	
		GLP-1 수용체	글루카곤 수용체
대조군	GLP-1	A	-
	Glucagon	-	A
실시예	화합물 1	A	B
	화합물 2	A	A
	화합물 3	A	A
	화합물 4	A	B
	화합물 5	A	B
	화합물 6	A	A
	화합물 7	A	A
	화합물 8	B	B
	화합물 9	A	A
	화합물 10	A	A
	화합물 11	A	B
	화합물 12	A	A
	화합물 13	B	B
	화합물 14	A	A
	화합물 15	A	A
	화합물 16	A	A
	화합물 17	A	A
	화합물 18	A	A
	화합물 19	A	A
	화합물 20	A	A
	화합물 21	A	A
	화합물 22	A	A
	화합물 23	A	A
	화합물 24	A	B
	화합물 25	A	A
	화합물 26	A	A
	화합물 27	A	A
	화합물 28	C	C
	화합물 29	A	A
	화합물 30	A	A
	화합물 31	A	A
	화합물 32	A	A
	화합물 33	A	A
	화합물 34	A	A
	화합물 35	A	A
	화합물 36	A	A
	화합물 37	A	A
	화합물 38	A	A

[235]

비교예	Oxyntomodulin	B	B
	Liraglutide	B	-
	Semaglutide	B	-
	MEDI0382	A	B
	화합물 39	D	D
	화합물 40	C	D
	화합물 41	C	D
	화합물 42	C	D
	화합물 43	D	D
	화합물 44	C	D
	화합물 45	C	C
	화합물 46	C	C
	화합물 47	A	B

* A : 10 pM 이하, B : 10 pM~100 pM, C : 100 ~ 1000 pM, D : 1000 pM 이상

[236]

[237] 실험결과, 본 발명에 의한 아실화 옥신토모듈린 유사체의 화합물들이 내인성 호르몬 옥신토모듈린보다 GLP-1 및 글루카곤 수용체에 대한 EC_{50} 값이 현저히 낮아 GLP-1 및 글루카곤 수용체에 대한 활성이 우수함을 알 수 있다. 또한 현재 시판중인 당뇨병 치료제인 Liraglutide와 Semaglutide를 비교하였을 때 GLP-1 수용체에 대한 활성이 우수하였고, 현재 임상중인 옥신토모듈린 펩타이드 유사체인 MEDI0382와 비교했을 때 글루카곤 수용체에 대한 활성은 우수하였고, GLP-1 수용체에 대한 활성은 유사하였다.

[238]

[239] 본 발명에 의한 아실화 옥신토모듈린 펩타이드 유사체인 화합물 3은 비아실화 옥신토모듈린 펩타이드 유사체인 비교예의 화합물 39와 비교하였을 때, GLP-1 및 글루카곤 수용체에 대한 활성을 매우 증가시켰음을 알 수 있어, 옥신토모듈린 펩타이드 유사체의 아실화는 활성 증가에 큰 영향을 끼치는 것으로 평가된다.

[240]

[241] 또한, X_2 의 위치에 아실화된 비교예의 화합물 40과 X_{14} 의 위치에 아실화된 비교예의 화합물 41은 각각 X_3 , X_9 , X_{10} 의 위치에 아실화된 본 발명에 의한 화합물 3, 화합물 15, 화합물 16과 비교하였을 때, GLP-1 및 글루카곤 수용체에 대한 활성이 매우 감소하였음을 알 수 있어, 옥신토모듈린 펩타이드 유사체에 대한 아실화 위치가 활성에 큰 영향을 주는 것으로 평가된다.

[242]

[243] 또한, Z_1 의 중합체성 부분으로서 2-(2-(2-aminoethoxy)ethoxy)acetyl기 개수가 각각 1~4개로 구성된 본 발명에 의한 아실화된 화합물 3, 화합물 10, 화합물 17, 화합물 18은 2-(2-(2-aminoethoxy)ethoxy)acetyl기 개수에 따른 in vitro 활성 차이는 없었고, 모두 GLP-1 및 글루카곤 수용체에 대한 활성이 우수하였다.

[244]

[245] 또한, Z_2 로서 친유성 리피드 부분 말단에 카르복실산을 가진 아실화된 비교예 화합물 42, 화합물 43, 화합물 44는 리피드 탄소 길이에 상관없이 친유성 리피드

부분 말단이 탄화수소인 본 발명에 의한 화합물 3과 같은 아실화된 화합물에 비해 GLP-1 및 글루카곤 수용체에 대한 낮은 활성을 보였다. 그리고, Z₂로서 친유성 리피드 부분 말단에 카르복실산과 Gly, Val로 결합된 구조를 가진 비교예 화합물 45, 화합물 46은 친유성 리피드 부분 말단이 탄화수소인 본 발명에 의한 화합물 3과 같은 화합물에 비해 GLP-1 및 글루카곤 수용체에 대한 낮은 활성을 보여, Z₂로서 친유성 리피드 부분 말단에 극성 치환기를 가지는 아실화 화합물들은 낮은 in vitro 활성을 나타냄을 알 수 있다.

[246]

[247] 또한, 비아실화 옥신토모듈린 cyclic 펩타이드 유사체로서 비교예 화합물 47은 분자내 같은 형식의 락탐링 구조를 갖는 아실화된 본 발명에 의한 화합물 14에 비해 글루카곤 수용체에 대한 낮은 활성을 보여, 옥신토모듈린 펩타이드 유사체의 아실화는 활성 증가를 유도함을 알 수 있다.

[248]

[249] 또한, 본 발명에 의한 아실화 옥신토모듈린 cyclic 펩타이드 유사체 중 di-sulfide로 분자내 결합을 가진 화합물 28은 다른 아실화 옥신토모듈린 cyclic 펩타이드 유사체 화합물 22에 비해 GLP-1 및 글루카곤 수용체에 대한 낮은 활성을 보여, 아실화 옥신토모듈린 cyclic 펩타이드 유사체의 분자내 고리 크기가 활성에 영향이 있음을 알 수 있다.

[250]

[251] <실험예 2> 본 발명에 의한 펩타이드의 단회 체중 감소 약효평가

[252] 본 발명에 의한 아실화 옥신토모듈린 펩타이드 유사체의 체중 감소 약효를 평가하기 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 발명에 의한 화합물 3을 0.01% Tween80이 함유된 증류수에 100 nmol/kg 용량이 되도록 조제 후 마우스에 단 회 피하 주사 하였으며, 이후 매일 1회 일정한 시간에 체중 및 사료섭취량을 측정하여 그 결과를 도 1에 나타내었다.

[253]

[254] 실험 결과, 용매만 주사한 대조군에 비해 누적 사료 섭취량의 유의미한 차이가 없음에도 대조군의 체중감소를 대비 화합물 3 주사 후 체중 감소가 관찰되었고 그 효과가 4일간 지속됨을 알 수 있다. 따라서 생체 내에서 불안정하여 매우 짧은 반감기를 나타내 체중 감소 약효평가를 위해서는 1일 1회 이상의 투여가 필요한 옥신토모듈린 대비 본 발명의 아실화 옥신토모듈린 펩타이드 유사체는 화학적 안정성 개선으로 인해 단 회 투여만으로도 체중감소에 대한 약효가 일정 기간 유지될 수 있음을 알 수 있다.

[255]

[256] <실험예 3> 본 발명에 의한 펩타이드의 1주 반복 체중 감소 약효평가

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

약효를 시판중인 당뇨병/비만 치료제와 비교하기 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 실시예 중 화합물 3은 0.01% Tween80이 함유된 증류수에 100 nmol/kg 또는 300 nmol/kg 용량이 되도록 조제 하였고, 대조물질로서 당뇨병/비만 치료제로 시판중인 Liraglutide를 동일한 용매에 100 nmol/kg 용량이 되도록 조제 후 표 6에 기재된 것과 같이 1일 1회 총 6일 동안 피하 주사 하였다. 매일 1회 일정한 시간에 체중 및 사료섭취량을 측정하여 Liraglutide 대비 아실화 옥신토모듈린 유사체의 체중 감소 약효를 비교하였고, 7일째부터 투여를 중단하고 체중의 회복을 확인하여 그 결과를 도 2a 및 도 2b에 나타내었다.

[258]

[259] [표6]

그룹	투여 약물 및 용량	투여 방법	
비교군	Liraglutide, 100 nmol/kg/QD	S.C	1일1회*6
실험군	화합물 3, 100 nmol/kg/QD		
	화합물 3, 300 nmol/kg/QD		

[260]

[261] 실험 결과, 본 발명에 의한 화합물 3과 Liraglutide를 동일 용량(100 nmol/kg)으로 주사한 군의 누적 사료 섭취량에 유의미한 차이가 없음에도 Liraglutide의 경우 약 12.2%의 체중이 감소하였고, 화합물 3의 경우 약 24.6%의 체중이 감소하였다. 또한, 화합물 3의 용량을 300 nmol/kg 로 주사한 경우, 체중이 약 37.8% 감소한 것을 알 수 있는바, 본 발명에 의한 아실화 옥신토모듈린 펩타이드 유사체는 Liraglutide보다 2배 이상 우수한 용량의존적인 체중 감소 효과가 있었으며, 투여 중단 후에도 vehicle 대조군 대비 낮은 체중을 유지하였다.

[262]

[263] <실험예 4> 본 발명에 의한 펩타이드의 5일 반복 체중 감소 약효평가

[264] 본 실험은 본 발명에 의한 아실화 옥신토모듈린 펩타이드 유사체의 최대 체중 감소 효과를 확인하기 위해 웅성 실험용 생쥐(Wistar rat)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 3은 0.01% Tween80이 함유된 증류수에 100 nmol/kg 또는 300 nmol/kg 용량이 되도록 조제 후 표 7에 기재된 것과 같이 1일 1회 총 4일 동안 피하 주사 하였다. 매일 1회 일정한 시간에 체중 및 사료섭취량을 측정하여 초기 체중 대비 경시적인 체중 감소 약효를 확인하였고, 5일째부터 투여를 중단하고 체중의 회복을 확인하여 그 결과를 도 3a 및 도 3b에 나타내었다.

[265]

[266] [표7]

그룹	투여 약물 및 용량	투여 방법	
실험군	화합물 3, 100 nmol/kg/QD	S.C	1일1회*4
	화합물 3, 300 nmol/kg/QD		

[267]

[268] 실험 결과, vehicle 대조군 대비 화합물 3을 주사한 군의 누적 사료 섭취량에 유의적인 차이를 보였고, 두 용량 모두 약 12.5% 수준의 체중 감소 약효가 관찰되었으며, 투여 중단 후에도 vehicle 대조군 대비 낮은 체중을 유지하였다.

[269]

[270] <실험 예 5> 본 발명에 의한 펩타이드의 10일 반복 체중 감소 약효평가

[271] 본 실험은 본 발명에 의한 아실화 옥신토모듈린 펩타이드 유사체의 체중 감소 약효를 시판중인 당뇨병 치료제와 비교하기 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 실시예 중 화합물 3은 0.01% Tween80이 함유된 증류수에 100 nmol/kg 또는 300 nmol/kg 용량이 되도록 조제 하였고, 당뇨병 치료제로 시판중인 Semaglutide를 동일한 용매에 100 nmol/kg 용량이 되도록 조제 후 표 8에 기재된 것과 같이 3일 1회 간격으로 피하 주사하며 총 10일 동안 평가 하였다. 매일 1회 일정한 시간에 체중 및 사료섭취량을 측정하여 Semaglutide 대비 아실화 옥신토모듈린 펩타이드 유사체의 체중 감소 약효를 비교하여 그 결과를 도 4a 및 도 4b에 나타내었다.

[272]

[273] [표8]

그룹	투여 약물 및 용량	투여 방법	
비교군	Semaglutide, 100 nmol/kg/Q3D	S.C	3일1회*10
실험군	화합물 3, 100 nmol/kg/Q3D		
	화합물 3, 300 nmol/kg/Q3D		

[274]

[275] 실험 결과, 동일 용량(100 nmol/kg)에서 화합물 3은 Semaglutide 보다 더 많은 누적 사료 섭취량이 측정되었음에도 체중 감소 약효는 Semaglutide 대비 우수하였다 (화합물 3: 13.9%, Semaglutide: 9.7%). 또한, 화합물 3의 용량을 300 nmol/kg 로 주사한 경우, 체중이 약 16.9% 감소한 것을 알 수 있는바, 본 발명에 의한 아실화 옥신토모듈린 펩타이드 유사체는 Semaglutide 대비 우수한 용량의존적인 체중 감소 약효가 관찰되었다.

[276]

[277] <실험 예 6> 본 발명에 의한 펩타이드의 10일 반복 체중 감소 약효평가

[278] 본 실험은 본 발명에 의한 아실화 옥신토모듈린 펩타이드 유사체들의 구조에 따라 펩타이드 내에 중합체 개수 차이 또는 cyclic 펩타이드 형성에 따른 체중 감소 약효를 비교하기 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 발명에 의한 화합물 3, 10 및 14를 0.01% Tween80이 함유된 증류수에 100 nmol/kg 용량이 되도록 조제 후 표 9에 기재된 것과 같이 3일 1회 간격으로 피하 주사하며 총 10일 동안 평가하였다. 매일 1회 일정한 시간에 체중 및 사료섭취량을 측정하여 화합물 3 대비 화합물 10과 화합물 14의 체중 감소 약효를 비교하여 그 결과를 도 5a 및 도 5b에 나타내었다.

[279]

[280] [표9]

그룹	투여 약물 및 용량	투여 방법	
실험군	화합물 3, 100 nmol/kg/Q3D	S.C	3일1회*4
	화합물 10, 100 nmol/kg/Q3D		
	화합물 14, 100 nmol/kg/Q3D		

[281]

[282] 실험 결과, 동일 용량에서 vehicle 대조군 대비 화합물 10과 화합물 14에 의한 누적 사료 섭취량은 각각 20%와 27%의 유의적인 감소가 관찰되었고 화합물 3에 의한 누적 사료 섭취량은 vehicle 대조군 대비 약 17% 감소 수준으로 산출되었다. 체중 감소 측면에서는 세 화합물 모두 초기 체중 대비 약 19~22% 수준의 우수한 약효가 관찰되었고, cyclic 펩타이드 화합물 14는 화합물 3 및 화합물 10 대비 다소 우수한 경향을 보였다.

[283]

[284] <실험예 7> 본 발명에 의한 펩타이드의 1주 반복 체중 감소 약효평가

[285] 본 실험은 본 발명에 의한 아실화 옥신토모듈린 펩타이드 유사체들의 구조에 따라 펩타이드 내에 친유성리피드 부분 또는 중합체 개수 차이에 따른 체중 감소 약효를 비교하기 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 발명에 의한 화합물 3, 화합물 13 및 화합물 18은 0.01% Tween80이 함유된 증류수에 100 nmol/kg 용량이 되도록 조제 후 표 10에 기재된 것과 같이 3일 1회 간격으로 피하 주사하며 총 7일 동안 평가하였다. 매일 1회 일정한 시간에 체중 및 사료섭취량을 측정하여 화합물 3 대비 화합물 13과 화합물 18의 체중 감소 약효를 비교하여 그 결과를 도 6a 및 도 6b에 나타내었다.

[286]

[287] [표10]

그룹	투여 약물 및 용량	투여 방법	
실험군	화합물 3, 100 nmol/kg/Q3D	S.C	3일1회*3
	화합물 13, 100 nmol/kg/Q3D		
	화합물 18, 100 nmol/kg/Q3D		

[288] 실험 결과, 동일 용량에서 화합물 18은 화합물 3과 유사한 우수한 체중 감소 약효가 확인된 반면, 화합물 13은 체중에 대한 유의미한 약효는 없었다. 화합물 13은 화합물 3 대비 약 10배 이상 둔감한 *in vitro* 약효를 나타냈으며, 이는 동물실험으로 이어져 친유성리피드 부분 말단 구조에 따른 체중 감소 약효 소실을 확인함으로써 구조적인 중요성을 확인할 수 있었다.

[289]

[290] <실험 예 8> 본 발명에 의한 펩타이드의 2주 반복 체중 감소 약효평가

[291] 본 실험은 본 발명에 의한 아실화 옥신토모듈린 펩타이드 유사체들 중 cyclic 펩타이드 구조에 따른 체중 감소 약효를 비교하기 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 발명에 의한 화합물 3, 화합물 21 ~ 25를 0.01% Tween80이 함유된 증류수에 100 nmol/kg 용량이 되도록 조제 후 표 11에 기재된 것과 같이 3일 1회 간격으로 피하 주사하며 총 2주 동안 평가 하였다. 매일 1회 일정한 시간에 체중 및 사료섭취량을 측정하여 화합물 3 대비 화합물 21 ~ 25의 체중 감소 약효를 비교하여 그 결과를 도 7a 내지 도 7d에 나타내었다.

[292]

[293] [표11]

그룹	투여 약물 및 용량	투여 방법	
실험군	화합물 3, 100 nmol/kg/Q3D	S.C	3일1회*5
	화합물 21, 100 nmol/kg/Q3D		
	화합물 22, 100 nmol/kg/Q3D		
	화합물 23, 100 nmol/kg/Q3D		
	화합물 24, 100 nmol/kg/Q3D		
	화합물 25, 100 nmol/kg/Q3D		

[294] 실험 결과, 동일 용량에서 화합물 3 대비 화합물 23과 화합물 25는 더 많은 누적사료 섭취량이 산출되었고, 화합물 21과 화합물 22는 화합물 3과 유사한 수준의 누적 사료 섭취량을 나타냈다. 체중 측면에서는 화합물 3이 화합물 21, 화합물 23 및 화합물 25 대비 동등 수준 이상의 체중 감소가 관찰되었고, 화합물 25는 화합물 3 대비 우수한 체중 감소 약효가 확인되었다. 반면 *in vitro* assay에서 함께 평가된 다른 화합물들 대비 글루카곤 수용체 활성능이 다소 약했던 화합물

24는 초기체중 대비 약 13.4% 수준의 유의적인 체중 감소 약효를 보여, 화합물 3 대비 열등한 체중 감소 약효를 나타냈다. 화합물 25는 화합물 3 대비 유사한 체중 감소 약효를 보였으나, 누적 사료 섭취량이 더 적었다. 반면, 화합물 22는 화합물 3 대비 유사한 체중 감소 약효를 보였으나, 누적 사료 섭취량은 유사하였다. 아실화 옥신토모듈린 cyclic 펩타이드 유사체들은 구조에 따라 체중 감소 약효 패턴의 차이를 보였다.

[295]

[296] <실험예 9> 본 발명에 의한 펩타이드의 2주 반복 체중 감소 약효평가

[297] 본 실험은 <실험예 8>에 이어 본 발명에 의한 아실화 옥신토모듈린 펩타이드 유사체들의 저용량에서의 체중 감소 약효를 비교하기 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 발명에 의한 화합물 3 및 화합물 22를 0.01% Tween80이 함유된 증류수에 30 nmol/kg 또는 100 nmol/kg 용량이 되도록 조제 후 표 12에 기재된 것과 같이 3일 1회 간격으로 피하 주사하며 총 2주 동안 평가 하였다. 매일 1회 일정한 시간에 체중 및 사료섭취량을 측정하여 화합물 3과 화합물 22의 체중 감소 약효를 비교하여 그 결과를 도 8a 및 도 8b에 나타내었다.

[298]

[299] [표12]

그룹	투여 약물 및 용량	투여 방법	
실험군	화합물 3, 10 nmol/kg/Q3D	S.C	3일1회*5
	화합물 3, 30 nmol/kg/Q3D		
	화합물 22, 10 nmol/kg/Q3D		
	화합물 22, 30 nmol/kg/Q3D		

[300]

[301] 실험 결과, 동일용량에서 화합물 22는 화합물 3 대비 더 많은 누적 사료 섭취량이 측정되었고, 화합물 22의 10 nmol/kg 용량군에서는 vehicle 대조군 수준의 사료섭취량을 보였음에도 7.5% 수준의 체중 감소 약효가 관찰되었다. 또한 화합물 22의 30 nmol/kg 용량군에서는 화합물 3 동일용량군과 비교 시 더 많은 사료를 섭취했음에도 체중 감소 약효는 유사수준이었다. 이는 화합물 22가 화합물 3 대비 글루카곤 수용체 활성화능에 기인한 약효에 영향을 더 받음을 알 수 있다.

[302]

[303] <실험예 10> 본 발명에 의한 펩타이드의 5일 반복 체중 감소 약효평가

[304] 본 실험은 본 발명에 의한 아실화 옥신토모듈린 펩타이드 유사체의 체중 감소 약효를 시판중인 당뇨병/비만 치료제 및 옥신토모듈린 펩타이드 유사체로 개발중인 선도물질과 비교하기 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 실시예 중 화합물 3은 0.01% Tween80이 함유된 증류수에 30 nmol/kg 용량이 되도록 조제하였고, 비교예로 당뇨병/비만 치료제로 시판중인 Liraglutide 및 임상시험 중인 MEDI0382를 동일한 용매에 30 nmol/kg 용량이 되도록 조제 후 표 13에 기재된 것과 같이 1일 1회 총 4일 동안 피하 주사 하였다. 매일 1회 일정한 시간에 체중 및 사료섭취량을 측정하여 Liraglutide 및 MEDI0382 대비 유사체의 체중 감소 약효를 비교하여 그 결과를 도 9a 및 도 9b에 나타내었다.

[305]

[306] [표13]

그룹	투여 약물 및 용량	투여 방법	
비교군	Liraglutide, 30 nmol/kg/QD	S.C	1일1회*4
	MEDI0382, 30 nmol/kg/QD		
실험군	화합물 3, 30 nmol/kg/Q3D		

[307]

[308] 실험 결과, 동일 용량에서 평가된 세 물질 중 화합물 3 투여군에서 초기 체중 대비 가장 우수한 체중 감소 약효가 관찰되었다 (화합물 3: 18.6%, Liraglutide: 12.7%, MEDI0382: 8.0%).

[309]

[310] <실험예 11> 본 발명에 의한 펩타이드의 4주 반복 체중 감소 약효평가

[311] 본 실험은 본 발명에 의한 아실화 옥신토모듈린 펩타이드 유사체의 체중 감소 약효를 시판중인 당뇨병 치료제와 비교하기 위해 웅성 비만 및 당뇨병 실험용 생쥐(FATZO mouse)에 고지방을 함유하고 있는 식이를 공급하고, 실험 전 체중, 체지방, 비절식 혈당 및 당화혈색소(HbA1c)에 따라 군분리 후 평가하였다. 본 발명에 의한 화합물 3과 화합물 22는 0.01% Tween80이 함유된 증류수에 30 nmol/kg 또는 100 nmol/kg 용량이 되도록 조제 하였고, 당뇨병 치료제로 시판중인 Semaglutide를 동일한 용매에 100 nmol/kg 용량이 되도록 조제 후 표 14에 기재된 것과 같이 3일 1회 간격으로 피하 주사하며 총 4주 동안 평가 하였다. 매일 1회 일정한 시간에 체중 및 사료섭취량을 측정하였고, 부검 전 4주차에 체지방을 측정하여 Semaglutide 대비 본 발명에 의한 옥신토모듈린 펩타이드 유사체의 체중 및 체지방 감소 약효를 비교하여 그 결과를 도 10a 내지 도 10c에 나타내었다.

[312]

[313] [표14]

그룹	투여 약물 및 용량	투여 방법	
비교군	Semaglutide, 100 nmol/kg/Q3D	S.C	3일1회*10
실험군	화합물 3, 30 nmol/kg/Q3D		
	화합물 3, 100 nmol/kg/Q3D		
	화합물 22, 30 nmol/kg/Q3D		
	화합물 22, 30 nmol/kg/Q3D		

[314]

[315] 실험 결과, 동일 용량(100 nmol/kg) 뿐 아니라 낮은 30 nmol/kg 용량에서 본 발명에 의한 화합물 3 및 화합물 22는 Semaglutide 보다 더 많은 누적 사료 섭취량이 측정되었음에도 체중 감소 약효는 매우 우수함을 알 수 있는데, 이는 본 발명에 의한 옥신토모듈린 펩타이드 유사체가 GLP-1 수용체 agonist인 Semaglutide와 달리 GLP-1과 글루카곤 수용체 모두에 작용을 하는 기전을 갖고 있기 때문임을 알 수 있다.

[316]

[317] <실험예 12> 본 발명에 의한 펩타이드의 마우스에서 내당력 개선 효과 검정

[318] 본 실험은 웅성 실험용 생쥐(C57BL/6 mouse)에 본 발명에 의한 아실화 옥신토모듈린 펩타이드 유사체의 내당력 개선효과를 식후 혈당 조절능 개선효과의 의미로서 평가하였다. 실험용 생쥐를 실험 전일 절식 시킨 후, 본 발명에 의한 화합물 3 또는 화합물 22 또는 화합물 25를 0.01% Tween80을 함유하는 증류수에 조제하여 포도당 투여 30분 전에 피하 주사 하였다. 옥신토모듈린 펩타이드 유사체 주사 30분 후에 포도당 용액을 경구 투여 하였고, 약물 주사 및 포도당 용액 투여 직전, 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 대조군의 혈당 AUC 대비 유사체 및 비교물질의 혈당 AUC를 백분율로 산출하여 내당력 개선 약효를 평가하였다. 화합물별 각각 별도의 실험으로 진행하였고 화합물 22 또는 화합물 25를 평가 시에는 화합물 3의 30 nmol/kg 용량을 비교예로 추가하여 합산된 결과를 도 11에 나타내었다.

[319]

[320] 실험결과, 펩타이드 유사체들은 30 nmol/kg 용량 이상에서 유의적이고 용량 의존적인 혈당 AUC 감소를 나타냈으며, 특히 화합물 25는 평가된 모든 용량 군에서 유의적인 내당력 개선 약효 및 화합물 3과 화합물 22 대비 3배 이상 우수한 내당력 약효가 관찰되었다.

[321]

[322] <실험예 13> 본 발명에 의한 펩타이드의 6주 반복 혈당조절 약효평가

[323] 본 실험은 본 발명에 의한 아실화 옥신토모듈린 펩타이드 유사체의 혈당 조절

약효를 시판중인 당뇨병 치료제와 비교하기 위해 웅성 당뇨병 실험용 생쥐(db/db mouse)를 실험 전 비절식 혈당, 당화혈색소 및 체중에 따라 군분리 후 평가하였다. 본 발명에 의한 화합물 3은 0.01% Tween80이 함유된 증류수에 100 nmol/kg 용량이 되도록 조제 하였고, 당뇨병 치료제로 시판중인 Semaglutide를 동일한 용매에 100 nmol/kg 용량이 되도록 조제 후 표 15에 기재된 것과 같이 3일 1회 간격으로 피하 주사하며 총 6주 동안 평가 하였다. 주 1회 약물 투여 24시간 후 비절식 혈당, 체중 및 사료섭취량을 측정하였고 3주, 5주 및 6주에는 당화혈색소를 측정하여 Semaglutide 대비 본 발명에 의한 옥신토모듈린 펩타이드 유사체의 혈당 조절 약효를 비교하여 그 결과를 도 12a 및 도 12b에 나타내었다.

[324]

[325] [표15]

그룹	투여 약물 및 용량	투여 방법	
비교군	Semaglutide, 100 nmol/kg/Q3D	S.C	3일1회*16
실험군	화합물 3, 100 nmol/kg/Q3D		

[326]

[327] 실험 결과, 동일 용량(100 nmol/kg)에서 본 발명에 의한 화합물 3은 평가 초기 Semaglutide 대비 동등이하의 약효를 나타냈으나, 장기간 투여에 의해 Semaglutide 대비 우수하 혈당 조절 약효를 나타냈다. Vehicle 대조군의 최종 비절식 혈당은 581 mg/dL로 매우 심한 중증당뇨 특성을 보인 반면, 대조물질 Semaglutide의 최종 비절식 혈당은 342 mg/dL였고, 화합물 3의 최종 비절식 혈당은 274 mg/dL로 유의적인 혈당 상승 억제가 관찰되었다. 당화혈색소 역시 Vehicle 대조군의 경우 초기 수치 대비 최종 수치가 5.15%Point 증가하였으나, Semaglutide 투여 군에서는 2.65%Point, 화합물 3 투여군에서는 1.73%Point만 증가하여 약물에 의한 당화혈색소 상승 억제 약효가 확인되었다. 따라서 본 발명에 의한 아실화 옥신토모듈린 펩타이드 유사체는 Semaglutide 대비 당뇨발병지연에 대한 우수한 약효가 관찰되었다.

[328]

[329] <실험예 14> 본 발명에 의한 펩타이드의 4주 반복 혈당조절 약효평가

[330] 본 실험은 <실험예 11>과 동일한 실험으로 본 발명에 의한 아실화 옥신토모듈린 펩타이드 유사체의 혈당조절 약효를 시판중인 당뇨병 치료제와 비교하기 위해 웅성 비만 및 당뇨병 실험용 생쥐(FATZO mouse)에 고지방을 함유하고 있는 식이를 공급하고, 실험 전 체중, 체지방, 비절식 혈당 및 당화혈색소(HbA1c)에 따라 군분리 후 평가하였다. 본 발명에 의한 화합물 3과 화합물 22는 0.01% Tween80이 함유된 증류수에 30 nmol/kg 또는 100 nmol/kg 용량이 되도록 조제 하였고, 당뇨병 치료제로 시판중인 Semaglutide를 동일한 용매에 100 nmol/kg 용량이 되도록 조제 후 표 16에 기재된 것과 같이 3일 1회

간격으로 피하 주사하며 총 4주 동안 평가 하였다. 매일 1회 일정한 시간에 체중 및 사료섭취량을 측정하였고, 약 10일 간격으로 투여 24시간 후 비절식 혈당을 측정하였다. 또한 부검 전 4주차에 당화혈색소를 측정하여 Semaglutide 대비 본 발명에 의한 옥신토모듈린 펩타이드 유사체의 혈당조절 약효를 비교하여 그 결과를 도 13a 및 도 13b에 나타내었다.

[331]

[332] [표16]

그룹	투여 약물 및 용량	투여 방법	
비교군	Semaglutide, 100 nmol/kg/Q3D	S.C	3일1회*10
실험군	화합물 3, 30 nmol/kg/Q3D		
	화합물 3, 100 nmol/kg/Q3D		
	화합물 22, 30 nmol/kg/Q3D		
	화합물 22, 100 nmol/kg/Q3D		

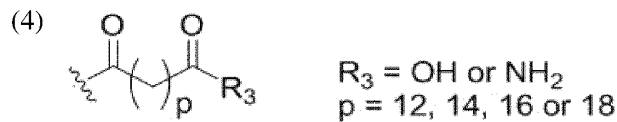
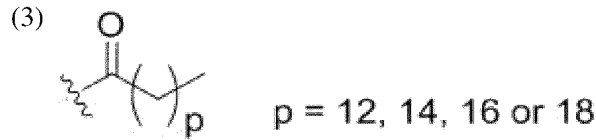
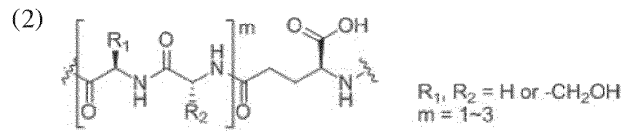
[333]

[334] 실험 결과, 동일 용량(100 nmol/kg)에서 본 발명에 의한 화합물 3 및 화합물 22 투여군에서 Semaglutide와 유사수준의 우수한 혈당조절 약효 및 당화혈색소 상승 억제 약효가 관찰되었다. 이는 본 발명에 의한 옥신토모듈린 펩타이드 유사체가 <실험예 11>에서 보인 체중 감소와 더불어 혈당조절이 동시에 가능한 약효를 갖고 있음을 알 수 있다.

[335]

$$\left[\text{O}=\text{C}(\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{NH}) \right]_{n_1} \left[\text{O}=\text{C}(\text{CH}_2)_2\text{CH}(\text{OH})\text{NH} \right]_{n_2}$$

$n_1 = 1 \sim 4$ $n_2 = 1 \sim 2$



- [청구항 2] 제 1 항에 있어서, X_1 위치가 Aib인 것을 특징으로 하는 옥신토모듈린 펩타이드 유사체.
- [청구항 3] 제 1 항에 있어서, X_{11} 위치가 Leu, X_{12} 위치가 Arg, X_{13} 위치가 Ala인 것을 특징으로 하는 옥신토모듈린 펩타이드 유사체.
- [청구항 4] 제 1 항에 있어서, X_{10} 위치가 Gln 또는 Lys, X_{11} 또는 X_{12} 위치가 각각 Leu, Arg 중에서 선택되는 것을 특징으로 하는 옥신토모듈린 펩타이드 유사체.
- [청구항 5] 제 1 항에 있어서, 상기 스페이서가 L-글루타민산 잔기로서 그 γ -카복실산에는 중합체성 부분이 공유결합되고, α -아미노기에는 친유성 리피드 부분이 공유결합되는 것을 특징으로 하는 옥신토모듈린 펩타이드 유사체.
- [청구항 6] 제 1 항에 있어서, 상기 중합체성 부분이 폴리에틸렌 글리콜(PEG), 단량체로서 에틸렌 글리콜, 에탄올아민 및 락틱산을 갖는 공중합체 또는 글라이신 및 세린을 갖는 폴리-아미노산 공중합체인 것을 특징으로 하는 옥신토모듈린 펩타이드 유사체.
- [청구항 7] 제 1 항에 있어서, 상기 Z가 구조식 (1) 또는 (2)의 Z_1 을 갖는 옥신토모듈린 펩타이드 유사체.
- [청구항 8] 제 1 항에 있어서, 상기 친유성 리피드 부분 Z_2 는 탄소 원자 수가 C_{14} ~ C_{20} 인 포화 탄화수소쇄를 포함하고, 이 탄화수소쇄의 말단 탄소가 카복실산 형태, 일차 아미드 형태 또는 임의의 단일 아미노산과 공유결합으로 연결된 카복실산 형태인 옥신토모듈린 펩타이드 유사체.
- [청구항 9] 제 1 항에 있어서, 상기 Z가 구조식 (3) 또는 (4)의 Z_2 를 갖는 옥신토모듈린 펩타이드 유사체.
- [청구항 10] 제 1 항에 있어서, 하기 화학식 I-1의 아미노산 서열을 포함하는 옥신토모듈린 펩타이드 유사체.

<화학식 I-1>

HX₁QGTFTSDX₃SKYLDX₉RRAX₁₀DFVQWLX₁₁X₁₂X₁₃X₁₄X₁₅X₁₆ (SEQ ID

NO.50)

상기 식에서

X₁은 Ser 또는 Aib (aminoisobutyric acid)이고;

X₃은 Tyr 또는 Z;

X₉은 Ser, Aib 또는 Z;

X₁₀은 Gln 또는 Z이며;

X₁₁은 Met 또는 Leu;

X₁₂은 Asn 또는 Arg;

X₁₃은 Thr 또는 Ala;

X₁₄은 Lys 또는 Z;

X₁₅은 RNRNNIA(SEQ ID NO. 51)이거나 존재하지 않으며;

X₁₆은 X₁₅이 존재할 경우, Z이거나 존재하지 않으며, C-terminal 은
아미드화 될 수 있고,

Z은 상기 화학식 I에서 정의한 바와 같다.

[청구항 11] 제 10 항에 있어서, 상기 펩타이드 유사체는 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), 화합물 8(SEQ ID NO. 9), 화합물 9(SEQ ID NO. 10), 화합물 10(SEQ
ID NO. 11), 화합물 11(SEQ ID NO. 12), 화합물 12(SEQ ID NO. 13), 화합물
13(SEQ ID NO. 14), 화합물 15(SEQ ID NO. 16), 화합물 16(SEQ ID NO. 17),
화합물 17(SEQ ID NO. 18), 또는 화합물 18(SEQ ID NO. 19)인 것을
특징으로 하는 옥신토모듈린 펩타이드 유사체.

[청구항 12] 하기 화학식 II의 아미노산 서열을 포함하며, 아미노산 서열 내에 분자내
가교를 갖는 옥신토모듈린 펩타이드 유사체.

<화학식 II>

His-X₁₇-Gln-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-X₁₈-Ser-Lys-Tyr-Leu-Asp-X₁₉-Arg-Arg
-Ala-X₂₀-Asp-Phe-Val-Gln-Trp-Leu-Met-Asn-Thr-Lys (SEQ ID NO.53)

상기식에서,

X₁₇은 Ser 또는 Aib (Aminoisobutric acid)이고;

X₁₈은 Z이며;

X₁₉은 Asp, Glu, Cys, Hcy (Homocysteine), Lys 또는 Orn (Ornithine)이며;

X₂₀은 Asp, Glu, Cys, Hcy (Homocysteine), Lys 또는 Orn (Ornithine)이며;

X₁₉와 X₂₀은 분자내 결합 또는 가교제 (cross linker)를 통하여 cyclic
펩타이드를 형성하며, 이때, cyclic 펩타이드는 두 잔기 사이에
아미드결합으로 형성된 락탐 링 또는 두 잔기 사이에 di-sulfide 결합으로
형성된 di-sulfide 링 또는 두 잔기 사이에 가교제 (cross linker) 결합으로
형성된 cross-linked 링을 가진 펩타이드이며;

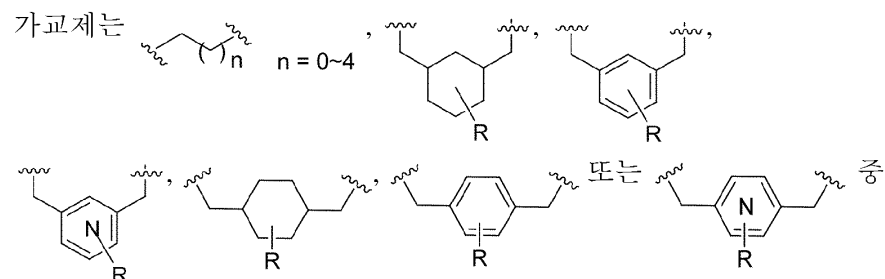
C-말단 아미노산은 임의로 아미드화 될 수 있으며;

Z은 상기 화학식 I에서 정의한 바와 같다.

[청구항 13] 제 12 항에 있어서, X_{19} 와 X_{20} 의 분자내 결합은 X_{19} 와 X_{20} 이 각각 Asp 또는 Glu와 Lys 또는 Orn이거나, 각각 Lys 또는 Orn와 Asp 또는 Glu 일 때, 분자내 락탐 링 형성 결합이거나; X_{19} 와 X_{20} 이 각각 Cys 또는 Hcy와 Cys 또는 Hcy 일 때, 분자내 di-sulfide 링 형성 결합인 것을 특징으로 하는 옥신토모듈린 펩타이드 유사체.

[청구항 14] 제 13 항에 있어서, X_{19} 와 X_{20} 이 각각 Cys 또는 Hcy와 Cys 또는 Hcy 일 때, 가교제(cross linker)는 양쪽 Cys 또는 Hcy 측쇄의 티올(thiol) 작용기에 결합되어 링을 형성하며, 이때 가교제는 C_1 - C_6 직쇄 또는 분지쇄 알킬, C_3 - C_8 포화 또는 불포화 사이클로알킬, C_6 - C_{10} 아릴, 또는 C_5 - C_{12} 헤테로 아릴 또는 융합된 헤테로사이클릭 아릴인 것을 특징으로 하는 옥신토모듈린 펩타이드 유사체.

[청구항 15] 제 14 항에 있어서,

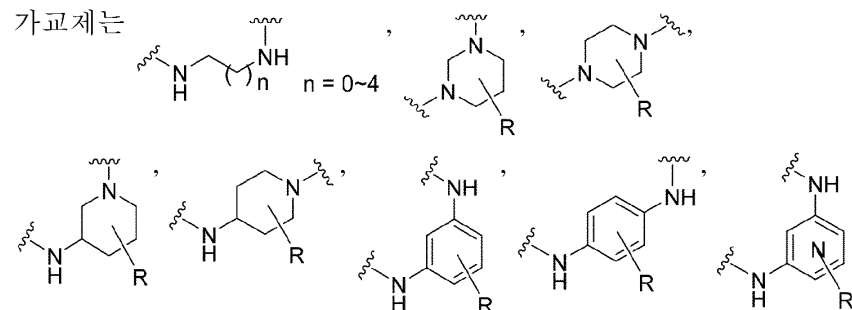


에서 선택됨을 특징으로 하는 옥신토모듈린 펩타이드 유사체.

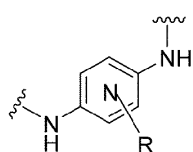
상기 식에서, R은 수소 또는 C_1 - C_6 직쇄 또는 분지쇄 알킬이다.

[청구항 16] 제 12 항에 있어서, X_{19} 와 X_{20} 이 각각 Asp 또는 Glu와 Asp 또는 Glu 일 때, 가교제(cross linker)는 양쪽 Asp 또는 Glu 측쇄의 카르복실기에 아미드결합으로 링을 형성하며, 이때 가교제(cross linker)는 디-아미노 C_1 - C_6 직쇄 또는 분지쇄 알킬, 디-아미노 C_3 - C_8 포화 또는 불포화 사이클로알킬, 아미노 피페리딘, 피페라진, 디-아미노 C_6 - C_{10} 아릴, 또는 디-아미노 C_5 - C_{12} 헤테로 아릴 또는 융합된 헤테로사이클릭 아릴인 것을 특징으로 하는 옥신토모듈린 펩타이드 유사체.

[청구항 17] 제 16 항에 있어서,



또는



중에서 선택됨을 특징으로 하는 옥신토모듈린

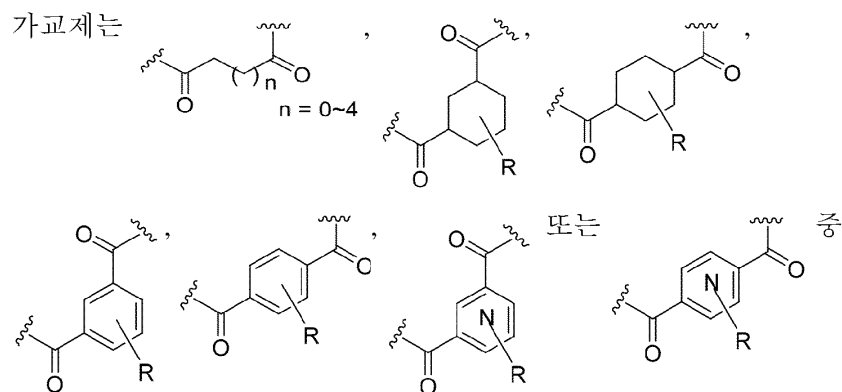
펩타이드 유사체.

상기 식에서, R은 수소 또는 C₁-C₆ 직쇄 또는 분지쇄 알킬이다.

[청구항 18] 제 12 항에 있어서, X₁₉와 X₂₀이 각각 Lys 또는 Orn와 Lys 또는 Orn 일 때, 가교제(cross linker)는 양쪽 Lys 또는 Orn 측쇄의 아민기에 아미드결합으로 링을 형성하며, 이때 가교제(cross linker)는 디-카르보닐 C₁-C₆ 직쇄 또는 분지쇄 알킬, 디-카르보닐 C₃-C₈ 포화 또는 불포화 사이클로알킬, 디-카르보닐 C₆-C₁₀ 아릴 또는 디-카르보닐 C₅-C₁₂ 헤테로아릴 또는 융합된 헤테로사이클릭 아릴인 것을 특징으로 하는 옥신토모듈린 펩타이드 유사체.

[청구항 19] 제 18 항에 있어서,

가교제는



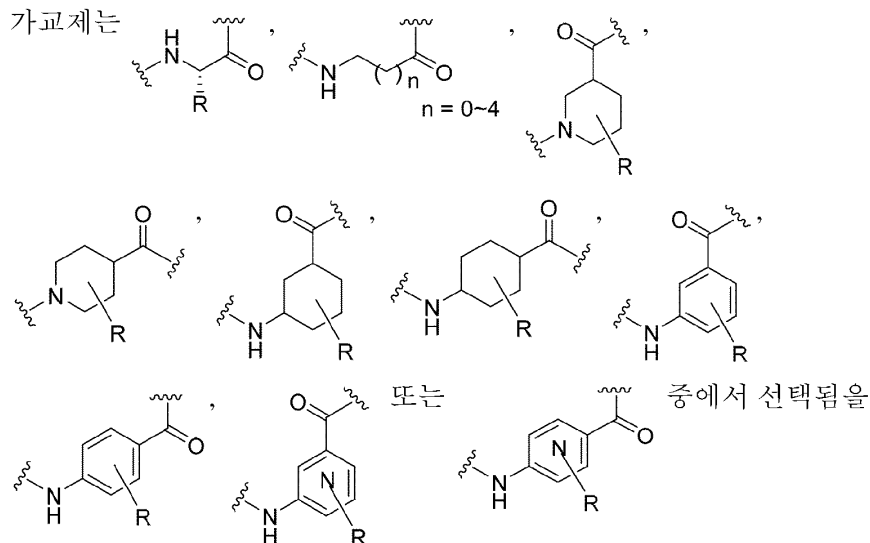
에서 선택됨을 특징으로 하는 옥신토모듈린 펩타이드 유사체.

상기 식에서, R은 수소 또는 C₁-C₆ 직쇄 또는 분지쇄 알킬이다.

[청구항 20] 제 12 항에 있어서, X₁₉와 X₂₀이 각각 Asp 또는 Glu와 Lys 또는 Orn 일 때, 또는 각각 Lys 또는 Orn와 Asp 또는 Glu 일 때, 가교제(cross linker)는 Asp 또는 Glu 측쇄의 카르복실기와 가교제(cross linker)의 아민 작용기와 아미드결합으로 연결되며, Lys 또는 Orn 측쇄의 아민기에는 가교제(cross linker)의 카르복실 작용기와 아미드결합으로 연결되어 링을 형성하며, 이때 가교제(cross linker)는 Gly, Val, Leu, Ile 중에서 선택되는 알파아미노산, 베타 아미노산, 카르보닐 C₁-C₆ 직쇄 또는 분지쇄 알킬아민, 카르보닐 C₃-C₈ 포화 또는 불포화 알킬아민, 카르보닐 피페리딘, 아미노 벤조일, 카르보닐 C₆-C₁₀ 아릴아민 또는 카르보닐 C₅-C₁₂ 헤테로아릴아민 또는 융합된 헤테로사이클릭 아릴아민인 것을 특징으로 하는 옥신토모듈린 펩타이드 유사체.

[청구항 21] 제 20 항에 있어서,

가교제는



특징으로 하는 옥신토모듈린 펩타이드 유사체.

상기 식에서, R은 수소 또는 C₁-C₆ 직쇄 또는 분지쇄 알킬이다.

[청구항 22] 제 12 항에 있어서, 상기 펩타이드 유사체는 화합물 14(SEQ ID NO. 15), 화합물 19(SEQ ID NO. 20), 화합물 20(SEQ ID NO. 21), 화합물 21(SEQ ID NO. 22), 화합물 22(SEQ ID NO. 23), 화합물 23(SEQ ID NO. 24), 화합물 24(SEQ ID NO. 25), 화합물 25(SEQ ID NO. 26), 화합물 27(SEQ ID NO. 28), 화합물 28(SEQ ID NO. 29), 화합물 29(SEQ ID NO. 30), 화합물 30(SEQ ID NO. 31), 화합물 31(SEQ ID NO. 32), 화합물 32(SEQ ID NO. 33), 화합물 33(SEQ ID NO. 34), 화합물 34(SEQ ID NO. 35), 화합물 35(SEQ ID NO. 36), 화합물 36(SEQ ID NO. 37), 화합물 37(SEQ ID NO. 38), 화합물 38(SEQ ID NO. 39)인 것을 특징으로 하는 펩타이드 유사체.

[청구항 23] 제 1 항 내지 제 11 항 중 어느 한 항에 기재된 펩타이드 유사체를 포함하고, 약학적으로 허용되는 부형제를 포함하는 비만 또는 과체중에 의해 야기되거나 특징지어지는 병태의 예방 또는 치료용 약학조성물.

[청구항 24] 제 1 항 내지 제 11 항 중 어느 한 항에 기재된 펩타이드 유사체를 포함하고, 약학적으로 허용되는 부형제를 포함하는 비만 또는 과체중을 동반하는 비 인슐린 의존성 당뇨병 치료 또는 예방용 약학조성물.

[청구항 25] 제 12 항 내지 제 22 항 중 어느 한 항에 기재된 펩타이드 유사체를 포함하고, 약학적으로 허용되는 부형제를 포함하는 비만 또는 과체중에 의해 야기되거나 특징지어지는 병태의 예방 또는 치료용 약학조성물.

[청구항 26] 제 12 항 내지 제 22 항 중 어느 한 항에 기재된 펩타이드 유사체를 포함하고, 약학적으로 허용되는 부형제를 포함하는 비만 또는 과체중을 동반하는 비 인슐린 의존성 당뇨병 치료 또는 예방용 약학조성물.