



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2016년02월12일

(11) 등록번호 10-1593406

(24) 등록일자 2016년02월03일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 14/605 (2006.01) *A61K 38/26* (2006.01)
A61P 3/00 (2006.01) *C12N 15/16* (2006.01)
- (21) 출원번호 10-2011-7016185
- (22) 출원일자(국제) 2008년12월15일
 심사청구일자 2013년11월04일
- (85) 번역문제출일자 2011년07월12일
- (65) 공개번호 10-2011-0126590
- (43) 공개일자 2011년11월23일
- (86) 국제출원번호 PCT/GB2008/004157
- (87) 국제공개번호 WO 2010/070255
 국제공개일자 2010년06월24일
- (56) 선행기술조사문헌
 Genbank Accession #: 0810207A (1996. 06. 19.)
 glucagon37
 WO2008101017 A1
 WO2007056362 A1
 JBC Vol.268(26):19650-19655 (1993. 09. 15.)

- (73) 특허권자
 질랜드 파마 에이/에스
 덴마크 디케이-2600 글로스트롭 스메델란드 36
- (72) 발명자
 마이어, 에디
 덴마크 디케이-3500 바엘로스, 브린지바켄 88
 리버, 디테
 덴마크 디케이-2000 프레더릭스보르그, 2, 노르드
 레 파산베이 37비
 (뒷면에 계속)
- (74) 대리인
 장훈

전체 청구항 수 : 총 17 항

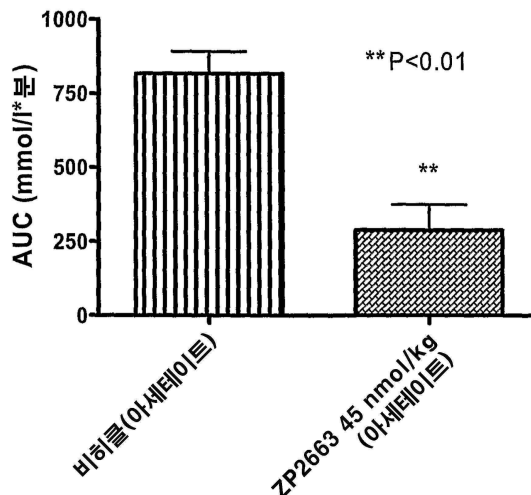
심사관 : 안규정

(54) 발명의 명칭 **글루카곤 유사체**

(57) 요약

본 발명은 체중 감소를 촉진하거나 체중 증가를 예방하기 위한 물질 및 방법, 및 당뇨병, 대사 증후군 및 관련 질환의 치료시의 물질 및 방법을 제공한다. 특히, 본 발명은 이러한 방법에 효과적인 신규의 글루카곤 유사체 펩타이드를 제공한다. 당해 펩타이드는 사람 글루카곤과 비교하여 GLP-1 수용체에 대해 증가된 선택성을 가짐으로써 이들의 효과를 매개할 수 있다.

대표도



(72) 발명자

스코브가드, 마리

덴마크 디케이-2100 뢰벤하우운 외, 3, 스트랜드베인
75에이

라르센, 반, 듀

덴마크 디케이-4000 로스킬레, 히메레브, 로홀름
12

다우가드, 옌스, 로젠그렌

덴마크 디케이-2830 비룸, 바케베이 6

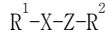
니럽, 트라인, 스코브런드, 라이지

덴마크 디케이-3600 프레데릭순, 니가드 48

특허청구의 범위

청구항 1

다음 식의 화합물 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염:



상기식에서,

R^1 은 H, C_{1-4} 알킬, 아세틸, 포르밀, 벤조일 또는 트리플루오로아세틸이고;

R^2 는 OH 또는 NH_2 이며;

X는 다음 화학식 1: His-Ser-Gln-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Lys-Tyr-Leu-Asp-Glu-Arg-Arg-Ala-Lys-Asp-Phe-Ile-Glu-Trp-Leu-Leu-Ser-Ala(서열번호 4)을 갖는 펩타이드이거나;

화학식 1과 상이할 경우, 다음 위치들 중의 4개 이하에서 화학식 1과는 상이한 펩타이드이고:

2번 위치에서 잔기는 D-Ser 및 Aib중에서 선택되고;

16번 위치에서 잔기는 Ser이고;

20번 위치에서 잔기는 Gln이며;

24번 위치에서 잔기는 Gln 및 Arg 중에서 선택되며;

28번 위치에서 잔기는 Arg이며;

Z는 부재하거나 4개, 5개, 6개 또는 7개의 연속 라이신 잔기의 서열이다.

청구항 2

제1항에 있어서, X가, 화학식 1과 상이할 경우, 다음 위치들 중의 3개 이하에서 화학식 1과는 상이한 화합물:

2번 위치에서 잔기는 D-Ser 및 Aib 중에서 선택되고;

16번 위치에서 잔기는 Ser이고; 또한

20번 위치에서 잔기는 Gln이다.

청구항 3

제1항에 있어서, 16번 및 20번 위치, 20번 및 24번 위치, 또는 상기 둘다의 위치에서 잔기가 염 브리지를 형성할 수 있는 화합물.

청구항 4

제1항에 있어서, X가 다음 잔기들의 세트들 중의 하나 이상을 포함하는 화합물:

20-Lys, 24-Glu;

16-Glu, 20-Lys, 24-Glu;

16-Glu, 20-Lys;

27-Leu, 28-Ser, 29-Ala;

16-Ser;

20-Gln;

24-Gln;

16-Ser, 20-Gln;

24-Arg; 또는

28-Arg.

청구항 5

제1항에 있어서, X가 다음 서열을 갖는 화합물:

HSQGTFTSDYSKYLDERRAQDF IEWLLSA (서열번호 5);

HSQGTFTSDYSKYLDERRAKDF IQWLLSA (서열번호 7);

HSQGTFTSDYSKYLDSRRAQDF IEWLLSA (서열번호 8);

HSQGTFTSDYSKYLDERRAKDF IRWLLSA (서열번호 11);

HSQGTFTSDYSKYLDERRAKDF IEWLLRA (서열번호 12);

HSQGTFTSDYSKYLDSRRAKDF IEWLLSA (서열번호 13); 또는

HSQGTFTSDYSKYLDERRAKDF IEWLLSA (서열번호 17).

청구항 6

제1항에 있어서, R¹이 H인 화합물.

청구항 7

제1항에 있어서, R²가 NH₂인 화합물.

청구항 8

제1항에 있어서, Z가 부재하는 화합물.

청구항 9

제1항에 있어서, 상기 화합물내에 아미노산 측쇄 중 하나 이상이 친지성 치환체 또는 중합체성 잔기에 접합되는 화합물.

청구항 10

제9항에 있어서, 펩타이드 X내에 아미노산 측쇄 중 하나 이상이 친지성 치환체 또는 중합체성 잔기에 접합되는 화합물.

청구항 11

제1항 내지 제10항 중 어느 한 항에 따른 화합물을 암호화하는 핵산.

청구항 12

제11항에 따른 핵산을 포함하는 발현 벡터.

청구항 13

제11항에 따른 핵산을 포함하는 숙주 세포.

청구항 14

약제학적으로 허용되는 담체와 함께 제1항 내지 제10항 중 어느 한 항에 따른 화합물을 포함하는, 체중 증가를 예방하거나 체중 감소를 촉진시키는 방법에 사용하기 위한, 또는 병적인 비만, 비만 관련 염증, 비만 관련 담낭 질환 및 비만 유도된 수면 무호흡으로부터 선택된 병태를 치료하기 위한, 또는 인슐린 내성, 내당성, 제2형 당뇨병, 고혈압, 죽종형성 이상지질혈증, 죽상경화증, 동맥경화증, 관상동맥심질환 또는 뇌졸중을 치료하기 위한

약제학적 조성물.

청구항 15

약제학적으로 허용되는 담체와 함께 제11항에 따른 핵산을 포함하는, 체중 증가를 예방하거나 체중 감소를 촉진시키는 방법에 사용하기 위한, 또는 병적인 비만, 비만 관련 염증, 비만 관련 담낭 질환 및 비만 유도된 수면 무호흡으로부터 선택된 병태를 치료하기 위한, 또는 인슐린 내성, 내당성, 제2형 당뇨병, 고혈압, 죽종형성 이상지질혈증, 죽상경화증, 동맥경화증, 관상동맥심질환 또는 뇌졸중을 치료하기 위한 약제학적 조성물.

청구항 16

약제학적으로 허용되는 담체와 함께 제12항에 따른 발현 벡터를 포함하는, 체중 증가를 예방하거나 체중 감소를 촉진시키는 방법에 사용하기 위한, 또는 병적인 비만, 비만 관련 염증, 비만 관련 담낭 질환 및 비만 유도된 수면 무호흡으로부터 선택된 병태를 치료하기 위한, 또는 인슐린 내성, 내당성, 제2형 당뇨병, 고혈압, 죽종형성 이상지질혈증, 죽상경화증, 동맥경화증, 관상동맥심질환 또는 뇌졸중을 치료하기 위한 약제학적 조성물.

청구항 17

약제학적으로 허용되는 담체와 함께 제13항에 따른 숙주 세포를 포함하는, 체중 증가를 예방하거나 체중 감소를 촉진시키는 방법에 사용하기 위한, 또는 병적인 비만, 비만 관련 염증, 비만 관련 담낭 질환 및 비만 유도된 수면 무호흡으로부터 선택된 병태를 치료하기 위한, 또는 인슐린 내성, 내당성, 제2형 당뇨병, 고혈압, 죽종형성 이상지질혈증, 죽상경화증, 동맥경화증, 관상동맥심질환 또는 뇌졸중을 치료하기 위한 약제학적 조성물.

청구항 18

삭제

청구항 19

삭제

청구항 20

삭제

청구항 21

삭제

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 글루카곤 유사체 및 예를 들면, 과식, 비만 및 과체중의 치료시 이의 의학적 용도에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 프레프로글루카곤(preproglucagon)은 조직내에서 차등적으로 프로세싱되어 글루카곤(Glu), 글루카곤과 유사한 펩타이드-1(GLP-1), 글루카곤과 유사한 펩타이드-2(GLP-2), 및 옥신토모듈린(OXM)을 포함하는 다수의 구조적으로 관련된 프로글루카곤-기원한 펩타이드를 형성하는 158개 아미노산 전구체 폴리펩타이드이다. 이들 분자는 포도당 항상성(glucose hmeostasis), 인슐린 분비, 위 배출 및 장 성장, 및 또한 식품 섭취의 조절을 포함하는 매우 다양한 생리학적 기능에 관련되어 있다.

[0003] 글루카곤은 프레-프로글루카곤의 53번 내지 81번 아미노산에 상응하는 29개 아미노산 펩타이드이며 또한 서열 His-Ser-Gln-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Lys-Tyr-Leu-Asp-Ser-Arg-Arg-Ala-Gln-Asp-Phe-Val-Gln-Trp-Leu-Met-Asn-Thr(서열번호 1)을 갖는다. 옥신토모듈린(OXM)은 옥타펩타이드 카복시말단 연장부[서열 Lys-Arg-Asn-Arg-Asn-Asn-Ile-Ala(서열번호 2)]를 갖고 또한 "개재 펩타이드(intervening peptide) 1" 또는 IP-1로 명명되는, 프레-프로글루카곤의 82번 내지 89번 아미노산]를 갖는 글루카곤의 완전한 29개 아미노산 서열을 포함하

는 37개 아미노산 펩타이드이며; 따라서, 사람 옥신토모돌린의 완전한 서열은 His-Ser-Gln-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Lys-Tyr-Leu-Asp-Ser-Arg-Arg-Ala-Gln-Asp-Phe-Val-Gln-Trp-Leu-Met-Asn-Thr-Lys-Arg-Asn-Arg-Asn-Asn-Ile-Ala)(서열번호 3)이다. GLP-1의 주요 생물학적으로 활성인 단편은 30개 아미노산, 즉 프레-프로글루카곤의 98번 내지 127번 아미노산에 상응하는 C-말단으로 아미드화된 펩타이드로서 생산된다.

[0004] 글루카곤은 간세포 상의 글루카곤 수용체에 결합함으로써 글리코겐 분해를 통해- 글리코겐 형태로 저장된- 포도당을 간이 방출하도록 함으로써, 혈중 포도당 농도를 유지하는데 도움을 준다. 글리코겐 저장분이 고갈됨에 따라, 글루카곤은 간을 자극하여 포도당신합성에 의해 추가의 포도당을 합성하도록 한다. 상기 포도당은 혈류내로 방출하여, 저혈당증의 진행을 예방한다.

[0005] OXM은 식품 섭취에 반응하여 및 식사 열량 함량에 비례하여 혈액내로 방출된다. OXM은 사람에서 식욕을 억제하고 식품 섭취를 억제하는 것으로 나타났다(Cohen et al, Journal of Endocrinology and Metabolism, 88, 4696-4701, 2003; WO 2003/022304). GLP-1의 효과와 유사한, 이들 식욕억제 효과 외에도, OXM은 또한, 옥신토모돌린으로 처리된 랫트가 쌍으로 사육한 랫트보다 체중 증가가 더 적게 나타나므로, 다른 메카니즘에 의해 체중에 영향을 미쳐야 한다(Bloom, Endocrinology 2004, 145, 2687). 비만 설치류를 OXM으로 처리하는 것은 또한 이들의 내당성(glucose tolerance)을 개선시키며(Parlevliet et al, Am J Physiol Endocrinol Metab, 294, E142-7, 2008) 또한 체중 증가를 억제한다(WO 2003/022304).

[0006] OXM은 GLP-1 수용체보다 글루카곤 수용체에 대해 2배 더 높은 효능으로 글루카곤 수용체 및 GLP-1 수용체 둘다를 활성화시키지만, 이들의 각각의 수용체 상에서 천연의 글루카곤 및 GLP-1보다는 효능이 덜하다. 사람 글루카곤은 또한, 비록 GLP-1 수용체보다 글루카곤 수용체에 대해 더 강력한 선호성을 지닌다고 해도, 이들 수용체 둘다를 활성화시킬 수 있다. 옥신토모돌린의 작용 메카니즘은 잘 이해되어 있지 않다. 특히, 호르몬의 효과가 글루카곤 수용체 및 GLP-1 수용체를 통해, 또는 하나 이상의 확인되지 않은 수용체를 통해 전적으로 매개되는지는 알려져 있지 않다.

[0007] 다른 펩타이드는 글루카곤 및 GLP-1 수용체 둘다에 결합하여 이들을 활성화시키며(Hjort et al, Journal of Biological Chemistry, 269, 30121-30124, 1994) 또한 체중 증가를 억제하고 식품 섭취를 감소시키는(WO 2006/134340; WO 2007/100535; WO 2008/101017) 것으로 나타났다.

[0008] 비만은 세계적으로 증가하고 있는 건강 문제인 것으로 분류되어 있으며 또한 각종 질병, 특히 심혈관병(CVD), 제2형 당뇨병, 폐쇄수면무호흡, 특정 유형의 암 및 골관절염과 관련되어 있다. 그 결과, 비만은 기대 여명을 감소시키는 것으로 밝혀졌다. 세계 보건기구에 의한 2005년 계획안에 따르면, 전세계적으로 4억명의 성인(연령 >15세)이 비만으로 분류되어 있다. 미국에서, 비만은 현재 흡연 다음으로 예방가능한 사망의 두번째로 높은 원인인 것으로 여겨지고 있다.

[0009] 비만의 증가는 당뇨병의 증가를 초래하며, 또한 제2형 당뇨병을 가진 사람의 대략 90%가 비만으로 분류될 수 있다. 세계적으로 2억 4천 6백만명의 사람들이 당뇨병에 걸려있으며, 2025년까지 3억 8천만명이 당뇨병에 걸릴 것으로 추정된다. 많은 사람들이 고/이상(high/aberrant) LDL 및 트리글리세라이드와 저 HDL을 포함하는 추가의 심혈관 위험 인자를 가지고 있다.

[0010] 당뇨병 환자는 당뇨병에 걸리지 않은 사람들보다 심혈관병으로 진행될 가능성이 2 내지 4배 더 많으며, 이는 당뇨병의 가장 일반적인 합병증이 되도록 한다. 심혈관병은 당뇨병에 걸린 사람들에 있어 약 50%의 치사율을 차지한다. 당뇨병에 걸린 젊은 성인은 당뇨병이 없는 젊은 성인에서 보다 12 내지 40배 더 높은 관상 심장병(CHD)의 발생율을 가지며 또한 비만 및 제2형 당뇨병의 높은 발생율 및 유병율과 함께, 이들 대사 질환과 관련된 이환률 및 사망률은 효과적인 치료 선택에 대한 의학적 요구를 강조하고 있다.

[0011] 따라서, 비만을 치료하고 내당성을 개선하기 위한 강력한 의학적 요구가 존재한다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0012] 제1 국면에서, 본 발명은 다음 식의 화합물 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염을 제공한다:



- [0014] 상기식에서,
- [0015] R^1 은 H, C_{1-4} 알킬, 아세틸, 포르밀, 벤조일 또는 트리플루오로아세틸이고;
- [0016] R^2 는 OH 또는 NH_2 이며;
- [0017] X는 다음 화학식 1: His-Ser-Gln-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Lys-Tyr-Leu-Asp-Glu-Arg-Arg-Ala-Lys-Asp-Phe-Ile-Glu-Trp-Leu-Leu-Ser-Ala(서열번호 4)을 갖는 펩타이드이거나; 또는
- [0018] 화학식 1과 상이할 경우, 다음 위치들 중의 4개 이하에서 화학식 1과는 상이한 펩타이드이고:
- [0019] 2번 위치에서 잔기는 Aib 및 D-Ser 중에서 선택되고;
- [0020] 16번 위치에서 잔기는 Ser, Asp, Lys 및 Arg 중에서 선택되고;
- [0021] 18번 위치에서 잔기는 Ala이고;
- [0022] 20번 위치에서 잔기는 Gln, Arg, Glu 및 Asp 중에서 선택되며;
- [0023] 21번 위치에서 잔기는 Glu이고;
- [0024] 23번 위치에서 잔기는 Val이고;
- [0025] 24번 위치에서 잔기는 Gln, Asp, Lys, Arg 및 Ala 중에서 선택되며;
- [0026] 27번 위치에서 잔기는 Met, Cys 및 Lys중에서 선택되고;
- [0027] 28번 위치에서 잔기는 Asn, Arg, Lys, Ala, Glu 및 Asp 중에서 선택되며;
- [0028] 29번 위치에서 잔기는 Thr 및 Arg 중에서 선택되며;
- [0029] Z는 부재하거나 Ala, Leu, Ser, Thr, Tyr, Cys, Glu, Lys, Arg, Dbu, Dpr 및 Orn으로 이루어진 그룹 중에서 선택된 1 내지 20개 아미노산 단위의 펩타이드 서열이다.
- [0030] 일부 실시양태에서, X는, 화학식 1과 상이할 경우, 다음 위치들 중의 4개 이하에서 화학식 1과는 상이할 수 있고:
- [0031] 2번 위치에서 잔기는 D-Ser 및 Aib 중에서 선택되고;
- [0032] 16번 위치에서 잔기는 Ser, Asp 및 Lys 중에서 선택되고;
- [0033] 20번 위치에서 잔기는 Gln, Arg 및 Glu 중에서 선택되며;
- [0034] 27번 위치에서 잔기는 Met, Cys 및 Lys 중에서 선택되고; 또한
- [0035] 28번 위치에서 잔기는 Asn, Arg 및 Ala 중에서 선택된다.
- [0036] 이들 실시양태의 일부에서, X는 화학식 1과 상이할 경우, 다음 위치들 중의 3개 이하에서 화학식 1과는 상이할 수 있고:
- [0037] 2번 위치에서 잔기는 D-Ser 및 Aib 중에서 선택되고;
- [0038] 16번 위치에서 잔기는 Ser, Asp 및 Lys중에서 선택되고;
- [0039] 20번 위치에서 잔기는 Gln, Arg 및 Glu 중에서 선택된다.
- [0040] 대안적인 실시양태에서, X는, 화학식 1과 상이할 경우, 다음 위치들 중의 4개 이하에서 화학식 1과는 상이할 수 있고:
- [0041] 2번 위치에서 잔기는 D-Ser 및 Aib 중에서 선택되고;
- [0042] 16번 위치에서 잔기는 Ser, Asp 및 Lys 중에서 선택되고;
- [0043] 18번 위치에서 잔기는 Ala이고;
- [0044] 20번 위치에서 잔기는 Gln, Arg 및 Glu 중에서 선택된다.

- [0045] 또 다른 대안적인 실시양태에서, X는, 화학식 1과 상이할 경우, 다음 위치들 중의 4개 이하에서 화학식 1과는 상이할 수 있고:
- [0046] 23번 위치에서 잔기는 Val이고;
- [0047] 24번 위치에서 잔기는 Gln, Asp, Lys, Arg, 및 Ala이고;
- [0048] 27번 위치에서 잔기는 Met, Cys 및 Lys 중에서 선택되고;
- [0049] 28번 위치에서 잔기는 Asn, Arg, 및 Ala 중에서 선택된다.
- [0050] 상술한 실시양태의 어느 것에서, 16번 및 20번 위치에서 잔기는 염 브리지를 형성할 수 있다. 잔기의 적합한 쌍의 예는 다음을 포함한다:
- [0051] 16-Asp, 20-Lys;
- [0052] 16-Glu, 20-Lys;
- [0053] 16-Asp, 20-Arg;
- [0054] 16-Glu, 20-Arg;
- [0055] 16-Lys, 20-Asp;
- [0056] 16-Arg, 20-Asp;
- [0057] 16-Lys, 20-Glu;
- [0058] 16-Arg, 20-Glu.
- [0059] 추가적으로 또는 이와는 달리, 20번 및 24번 위치에서 잔기는 염 브리지를 형성할 수 있다. 잔기의 적합한 쌍의 예는 다음을 포함한다:
- [0060] 20-Asp, 24-Lys;
- [0061] 20-Glu, 24-Lys;
- [0062] 20-Asp, 24-Arg;
- [0063] 20-Glu, 24-Arg;
- [0064] 20-Lys, 24-Asp;
- [0065] 20-Arg, 24-Asp;
- [0066] 20-Lys, 24-Glu;
- [0067] 20-Arg, 24-Glu.
- [0068] 상기 정의와 일치하면서, X가 다음 잔기들의 세트들 중의 하나 이상을 포함하는 것이 바람직할 수 있다:
- [0069] 20-Lys, 24-Glu;
- [0070] 20-Lys, 23-Ile, 24-Glu;
- [0071] 16-Glu, 20-Lys, 24-Glu;
- [0072] 16-Glu, 20-Lys;
- [0073] 16-Glu, 20-Lys, 29-Ala;
- [0074] 16-Glu, 20-Lys, 23-Ile, 24-Glu;
- [0075] 16-Glu, 20-Lys, 23-Ile, 24-Glu, 29-Ala;
- [0076] 16-Glu, 20-Lys, 24-Glu, 29-Ala;
- [0077] 20-Lys, 23-Ile, 24-Glu, 29-Ala;

- [0078] 27-Leu, 28-Ser, 29-Ala;
- [0079] 29-Ala;
- [0080] 16-Ser;
- [0081] 20-Gln;
- [0082] 23-Val;
- [0083] 24-Gln;
- [0084] 16-Ser, 20-Gln;
- [0085] 16-Asp, 20-Arg, 24-Asp;
- [0086] 16-Lys, 20-Glu;
- [0087] 24-Arg; 또는
- [0088] 28-Arg.
- [0089] 예를 들면, X는 다음 서열을 가질 수 있다:
- [0090] HSQGTFTSDYSKYLDERRAQDFIEWLLSA (서열번호 5);
- [0091] HSQGTFTSDYSKYLDERRAKDFVEWLLSA (서열번호 6);
- [0092] HSQGTFTSDYSKYLDERRAKDFIQWLLSA (서열번호 7);
- [0093] HSQGTFTSDYSKYLDERRAQDFIEWLLSA (서열번호 8);
- [0094] HSQGTFTSDYSKYLDERRARDFIDWLLSA (서열번호 9);
- [0095] HSQGTFTSDYSKYLDKRRRAEDFIKWLLSA (서열번호 10);
- [0096] HSQGTFTSDYSKYLDERRAKDFIRWLLSA (서열번호 11);
- [0097] HSQGTFTSDYSKYLDERRAKDFIEWLLRA (서열번호 12);
- [0098] HSQGTFTSDYSKYLDERRAKDFIEWLLSA (서열번호 13);
- [0099] HSQGTFTSDYSKYLDERRAAKDFIEWLLSA (서열번호 14);
- [0100] HSQGTFTSDYSKYLDERRAKDFIDWLLSA (서열번호 15);
- [0101] HSQGTFTSDYSKYLDERRAKDFIEWLLAA (서열번호 16); 또는
- [0102] HSQGTFTSDYSKYLDERRAKDFIEWLLSA (서열번호 17).
- [0103] 본 발명은 또한 본 발명의 화합물을 암호화하는 핵산(이는 DNA 또는 RNA일 수 있다), 이러한 핵산을 포함하는 발현 벡터, 및 이러한 핵산 또는 발현 벡터를 함유하는 숙주 세포를 제공한다.
- [0104] 추가의 국면에서, 본 발명은 본 출원에서 정의한 바와 같은 글루카곤 유사체 펩타이드, 또는 이의 염 또는 유도체, 이러한 글루카곤 유사체 펩타이드를 암호화하는 핵산, 이러한 핵산을 포함하는 발현 벡터, 또는 이러한 핵산 또는 발현 벡터를 함유하는 숙주 세포를 담체와 혼합되게 포함하는 조성물을 제공한다. 바람직한 실시양태에서, 본 조성물은 약제학적으로 허용되는 조성물이며, 또한 담체는 약제학적으로 허용되는 담체이다. 글루카곤 펩타이드 유사체는 글루카곤 유사체의 약제학적으로 허용되는 산 부가염일 수 있다.
- [0105] 상술한 화합물은 체중 증가를 예방하거나 체중 감소를 촉진하는데 사용된다. "예방"은 치료의 부재시와 비교하여 체중 증가를 억제하거나 감소시킴을 의미하며, 필수적으로 체중 증가의 완전한 증지를 내포하는 것을 의미하지는 않는다. 펩타이드는 식품 섭취에 있어서의 감소 및/또는 증가된 에너지 소비를 유발하여, 체중에 있어서 관측된 효과를 초래할 수 있다. 체중에 있어서 이들의 효과와는 별개로, 본 발명의 화합물은 순환하는 LDL 수 준을 저하시키고 HDL/LDL 비를 증가시킬 수 있는, 내당성 및 순환하는 콜레스테롤 수준에 있어서 유리한 영향을 미칠 수 있다. 따라서, 본 발명의 화합물은 비만, 병적 비만, 비만 관련 염증, 비만 관련 쓸개 병, 비만 유도된 수면 무호흡의 치료 및/또는 예방과 같은, 과체중에 의해 원인이 되거나 나타나는 특정 증상의 직접 또는 간

접 치료법에 사용될 수 있다. 이들은 또한 대사 증후군, 인슐린 내성, 내당성, 제2형 당뇨병, 고혈압, 죽종형성 이상지질혈증, 죽상경화증, 동맥경화증, 관상동맥심질환 또는 뇌졸중의 치료에 사용될 수 있다. 이들 조건에서 그의 효과들은 체중의 결과이거나 체중에 대한 그의 영향과 연관되어 있을 수 있거나, 또는 그와 독립적일 수 있다.

- [0106] 따라서, 본 발명은 이를 필요로 하는 개체에서 위에서 기술한 바와 같은 증상의 치료시 본 발명의 화합물의 용도를 제공한다.
- [0107] 본 발명은 또한 의학적 치료 방법에서 사용하기 위한, 특히 위에서 기술한 바와 같은 증상의 치료 방법에서 사용하기 위한 본 발명의 화합물을 제공한다.
- [0108] 본 발명은 또한 위에서 기술한 바와 같은 증상 치료용 의약의 제조시 본 발명의 화합물의 용도를 제공한다.
- [0109] 이미 기술한 바와 같이, 본 발명은 임의로 이의 발현을 지시하기 위한 서열, 및 발현 벡터를 함유하는 숙주 세포와 함께, 위에서 기술한 핵산 서열을 포함하는 발현 벡터에 연장된다. 바람직하게는 숙주 세포는 본 발명의 화합물을 발현하고 분비할 수 있다. 여전히 추가의 국면에서, 본 발명은 상기 화합물을 발현하고 이렇게 생산된 화합물을 정제하기에 적합한 조건하에서 숙주 세포를 배양함을 포함하여, 상기 화합물을 생산하는 방법을 제공한다.
- [0110] 본 발명은 또한, 의학적 치료 방법에서 사용하기 위한, 본 발명의 핵산, 본 발명의 발현 벡터, 또는 본 발명의 화합물을 발현하고 분비할 수 있는 숙주 세포를 제공한다. 핵산, 발현 벡터 및 숙주 세포가 상기 화합물 자체로 치료될 수 있는 본 출원에 기술된 특정 질환의 치료에 사용될 수 있다는 것으로 이해될 것이다. 따라서, 본 발명의 화합물을 포함하는 치료학적 조성물, 본 발명의 화합물의 투여, 또는 이의 특정의 치료학적 용도에 대한 언급은, 내용이 달리 요구하는 경우를 제외하고는, 본 발명의 핵산, 발현 벡터 또는 숙주 세포의 동일한 용도를 포함하는 것으로 이해되어야 한다.

과제의 해결 수단

- [0111] 발명의 상세한 설명
- [0112] 본 명세서 전체에서, 천연적으로 존재하는 아미노산에 대한 통상의 1문자 및 3문자 코드가 사용되며, Aib(α -아미노이소부티르산), Orn(오르니틴), Dbu(2,4-디아미노부티르산) 및 Dpr(2,3-디아미노프로피오산)과 같은 다른 아미노산에 대해서는 3문자 코드가 일반적으로 허용된다.
- [0113] 용어 "천연 글루카곤"은 서열 H-His-Ser-Gln-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Lys-Tyr-Leu-Asp-Ser-Arg-Arg-Ala-Gln-Asp-Phe-Val-Gln-Trp-Leu-Met-Asn-Thr-OH(서열번호 1)를 갖는 천연의 사람 글루카곤을 말한다.
- [0114] 용어, "옥신토모듈린" 및 "OXM"은 서열 H-His-Ser-Gln-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Lys-Tyr-Leu-Asp-Ser-Arg-Arg-Ala-Gln-Asp-Phe-Val-Gln-Trp-Leu-Met-Asn-Thr-Lys-Arg-Asn-Arg-Asn-Asn-Ile-Ala-OH(서열번호 3)를 갖는, 천연의 사람 옥신토모듈린을 말한다.
- [0115] 본 발명은 위에서 정의한 바와 같은 화합물을 제공한다. 의구심을 방지하기 위하여, 본원에 제공된 정의에서, X의 서열은 변이를 허용하기 위해 기술된 위치에서 화학식 1과 단지 상이한 것으로 일반적으로 의도되고 있다. 서열 X내 아미노산은 통상의 N-말단 내지 C-말단 방향으로 1번으로부터 29번까지 연속적으로 번호매김되는 것으로 고려될 수 있다. 따라서 X내에서 "위치"에 대한 언급은 천연의 사람 글루카곤 및 다른 분자내 위치에 대한 언급에서와 같이 해석되어야 한다.
- [0116] 본 발명의 화합물은 펩타이드 서열 X내에 하나 이상의 분자내 브릿지(intramolecular bridge)를 수반할 수 있다. 각각의 이러한 브릿지는 선형의 서열 X내 3개의 아미노산에 의해 전형적으로 분리된(즉, 아미노산 A와 아미노산 A+4 사이에서) X의 2개 아미노산 잔기의 측쇄 사이에서 형성된다.
- [0117] 더욱 특히, 상기 브릿지는 12번과 16번, 16번과 20번, 17번과 21번, 20번과 24번, 또는 24번과 28번 잔기 쌍의 측쇄 사이에 형성될 수 있다. 2개의 측쇄는 서로 이온적 상호작용을 통해 또는 공유 결합에 의해 연결될 수 있다. 따라서, 잔기의 이들 쌍은 반대로 하전된 측쇄를 포함함으로써 이온적 상호작용에 의해 염 브릿지를 형성할 수 있다. 예를 들어, 잔기들 중의 하나는 Glu 또는 Asp일 수 있는 반면, 다른 것은 Lys 또는 Arg일 수 있다. Lys와 Glu의 쌍화(pairing) 및 Lys와 Asp의 쌍화는 또한 반응하여 락탐 환을 형성할 수 있다. 마찬가지로

로, Tyr과 Glu 또는 Tyr과 Asp는 락톤 환을 형성할 수 있다.

- [0118] 특히, 16번 및 20번, 및/또는 20번 및 24번 위치에서의 잔기는 분자내 브릿지를 형성할 수 있다. 이들 위치에서 잔기의 적합한 쌍의 예는 다음을 포함한다:
- [0119] 16-Asp, 20-Lys;
- [0120] 16-Glu, 20-Lys;
- [0121] 16-Asp, 20-Arg;
- [0122] 16-Glu, 20-Arg;
- [0123] 16-Lys, 20-Asp;
- [0124] 16-Arg, 20-Asp;
- [0125] 16-Lys, 20-Glu;
- [0126] 16-Arg, 20-Glu; 및/또는
- [0127] 20-Asp, 24-Lys;
- [0128] 20-Glu, 24-Lys;
- [0129] 20-Asp, 24-Arg;
- [0130] 20-Glu, 24-Arg;
- [0131] 20-Lys, 24-Asp;
- [0132] 20-Arg, 24-Asp;
- [0133] 20-Lys, 24-Glu;
- [0134] 20-Arg, 24-Glu.
- [0135] 어떠한 특정의 이론으로 구속받고 싶지는 않지만, 이러한 분자내 브릿지는 분자의 알파 나선 구조를 안정화시켜 GLP-1 수용체 및 가능하게는 또한 글루카곤 수용체에서 효능 및/또는 선택성을 증가시키는 것으로 여겨진다.
- [0136] 어떠한 특정의 이론으로 구속받고 싶지는 않지만, 천연의 글루카곤의 17번 및 18번 위치에서 아르기닌 잔기는 글루카곤 수용체에 대한 상당한 선택성을 제공하는 것으로 여겨진다. 18번 위치에서 소수성 잔기(예, Ala)는 GLP-1 및 글루카곤 수용체 둘 다에 대한 효능 및/또는 선택성을 증가시킬 수 있다
- [0137] 23번 위치에서 치환(예를 들면, Ile)은 또한 GLP-1 수용체의 효능 및/또는 선택성을 증가시킬 수 있다.
- [0138] 24번 위치에서 치환(예를 들면, Glu)은 또한 GLP-1 수용체의 효능 및/또는 선택성을 증가시킬 수 있다.
- [0139] 어떠한 특정의 이론으로 구속받고 싶지는 않지만, 천연의 글루카곤의 27번, 28번 및 29번 위치에서 잔기는 글루카곤 수용체에 대해 상당한 선택성을 제공하는 것으로 여겨진다. 천연의 글루카곤 서열과 관련하여 이들 위치 중 1개, 2개 또는 3개 모두에서의 치환은, 잠재적으로 글루카곤 수용체에서 효능의 상당한 감소없이, GLP-1 수용체에 대한 효능 및/또는 선택성을 증가시킬 수 있다. 특정의 예는 27번 위치에서 Leu, 28번 위치에서 Ser 및 29번 위치에서 Ala를 포함한다.
- [0140] 27번 위치에서(예를 들면, Leu 또는 Lys와 함께, 특히 Leu와 함께) 천연적으로 존재하는 Met 잔기의 치환은 또한 산화에 대한 가능성을 감소시키므로 상기 화합물의 화학적 안정성을 증가시킨다.
- [0141] 28번 위치에서 천연적으로 존재하는 Asn의 (예를 들면, Ser, Arg 또는 Ala에 의한) 치환은 또한 산성 용액의 탈아미드화 가능성을 감소시킴으로써 상기 화합물의 화학적 안정성을 증가시킨다.
- [0142] GLP-1 수용체에서 효능 및/또는 선택성은 또한 잠재적으로 글루카곤 수용체에서 효능의 상당한 손실없이, 양친매성 나선 구조를 형성하는 경향이 있는 잔기를 도입함으로써 증가시킬 수 있다. 이는 16번, 20번, 24번, 및 28번 위치 중 하나 이상에서 하전된 잔기를 도입함으로써 달성할 수 있다. 따라서, 16번 및 20번 위치의 잔기는 모두 하전될 수 있고, 16번, 20번, 및 24번 위치에서 잔기는 모두 하전될 수 있거나, 16번, 20번, 24번, 및

28번 위치에서 잔기는 모두 하전될 수 있다. 예를 들어, 16번 위치에서 잔기는 Glu, Lys 또는 Asp일 수 있다. 20번 위치에서 잔기는 Lys, Arg 또는 Glu일 수 있다. 24번 위치에서 잔기는 Glu, Asp, Lys 또는 Arg일 수 있다. 28번 위치에서 잔기는 Arg일 수 있다.

[0143] 20번 및 24번 위치에서 천연적으로 존재하는 Gln 잔기 중 하나 또는 둘다의 치환은 또한 산성 용액 속에서 탈아미드화 가능성을 감소시켜 상기 화합물의 화학적 안정성을 증가시킨다. 24번 위치에서 잔기는 Glu, Asp, Lys, Arg 또는 Ala일 수 있다.

[0144] 상기 화합물은 1 내지 20개 아미노산의 C-말단 펩타이드 서열 Z를 포함하여, 예를 들면, 글루카곤 유사체 펩타이드의 구조 및/또는 2차 구조를 안정화시키고/시키거나 예를 들면, W099/46283호에 기술된 바와 같이, 효소적 가수분해에 보다 내성인 글루카곤 유사체 펩타이드를 제조할 수 있다.

[0145] 존재하는 경우, Z는 1 내지 20개 아미노산 잔기, 예를 들면, 1 내지 15개 범위, 보다 바람직하게는 1 내지 10개 범위, 특히 1 내지 7개 범위의 아미노산 잔기, 예를 들면, 6개 아미노산 잔기와 같은, 1, 2, 3, 4, 5, 6 또는 7개 아미노산 잔기의 펩타이드 서열을 나타낸다. 펩타이드 서열 Z내 아미노산 잔기 각각은 Ala, Leu, Ser, Thr, Tyr, Cys, Glu, Lys, Arg, Dbu(2,4-디아미노부티르산), Dpr(2,3-디아미노프로파노산) 및 Orn(오르니틴) 중에서 독립적으로 선택될 수 있다. 바람직하게는, 아미노산 잔기는 Ser, Thr, Tyr, Glu, Lys, Arg, Dbu, Dpr 및 Orn 중에서 선택되며, 보다 바람직하게는 Glu, Lys, 및 Cys 중에서 전적으로 선택될 수 있다. 위에서 언급한 아미노산은 D- 또는 L-구조일 수 있으나, 바람직하게는 L-구조를 가진다. 특히 바람직한 서열 Z는 4, 5, 6 또는 7개의 연속적인 라이신 잔기(즉, Lys₃, Lys₄, Lys₅, Lys₆ 또는 Lys₇), 및 특히 5개 또는 6개의 연속적인 라이신 잔기의 서열이다. Z의 다른 예시적인 서열은 WO 01/04156호에 나타낸다. 이와는 달리, 서열 Z의 C-말단 잔기는 Cys 잔기일 수 있다. 이는 화합물의 변형(즉, PEG화)을 보조할 수 있다. 이러한 양태에서, 서열 Z는 예를 들면, 길이가 단지 1개 아미노산(즉, Z = Cys)이거나 길이가 2, 3, 4, 5, 6 또는 그 이상의 아미노산일 수 있다. 따라서, 다른 아미노산은 펩타이드 X와 말단 Cys 잔기 사이에 스페이서(spacer)로서 제공된다.

[0146] 펩타이드 서열 Z는 사람 OXM의 IP-1 부위의 상응하는 서열(이는 서열 Lys-Arg-Asn-Arg-Asn-Asn-Ile-Ala를 갖는 다)과 25% 이하의 서열 동일성(identity)을 가진다.

[0147] 다른 폴리펩타이드 서열(예를 들면, IP-1)과 관련하여 제공된 펩타이드 또는 폴리펩타이드 서열의 "아미노산 서열 동일성 퍼센트(%)"는, 2개가 다른 것과 정렬되어 있고, 필요에 따라 최적의 정렬을 위한 갭(gap)이 도입되어 있는 경우 또 다른 폴리펩타이드의 서열의 상응하는 서열내 상응하는 아미노산 잔기와 동일한 제공된 펩타이드 서열내 아미노산 잔기의 퍼센트로 계산된다. 동일성 값%는 WU-BLAST-2[참조: Altschul et al., Methods in Enzymology, 266:460-480 (1996)]에 의해 측정될 수 있다. WU-BLAST-2는 몇가지 조사 매개변수를 사용하며, 이들 중 대부분은 디폴트 값(default value)으로 설정된다. 조절가능한 매개변수는 다음 값으로 설정된다: 오버랩 길이(overlap span) = 1, 오버랩 부분(overlap fraction) = 0.125, 단어 한계점(word threshold)(T) = 11. 아미노산 서열 동일성 값의 %는 WU-BLAST-2로 측정된 것으로서 일치하는 동일한 잔기의 수를 참조 서열의 잔기의 총 수(정렬 점수를 최대화하기 위해 WU-BLAST-2에 의해 참조 서열내로 도입된 갭은 무시한다)로 나눈 후 100을 곱하여 측정한다.

[0148] 따라서, Z가 IP-1의 8개 아미노산과 최적으로 정렬되는 경우, 이는 IP-1의 상응하는 아미노산과 동일한 2개 이하의 아미노산을 갖는다.

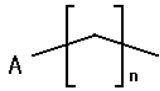
[0149] 본 발명의 화합물내에서 하나 이상의 아미노산 측쇄는 친지성 치환체에 접합(conjugated)될 수 있다. 친지성 치환체는 아미노산 측쇄내 원자에 공유결합적으로 결합되거나, 이와는 달리 스페이서에 의해 아미노산 측쇄로 접합될 수 있다. 아미노산은 펩타이드 X의 일부, 또는 펩타이드 Z의 일부일 수 있다.

[0150] 이론으로 구속받고 싶지는 않지만, 친지성 치환체는 혈류내 알부민에 결합함으로써 상기 화합물의 반감기를 향상시킬 수 있는 효소적 분해로부터 본 발명의 화합물을 차폐하는 것으로 고려된다. 스페이서는, 존재하는 경우, 상기 화합물과 친지성 치환체 사이에 공간을 제공하기 위해 사용된다.

[0151] 친지성 치환체는 아미노산 측쇄 또는 스페이서에 에스테르, 설포닐 에스테르, 티오에스테르, 아마이드 또는 설포나미드를 통해 부착될 수 있다. 따라서, 바람직하게는 친지성 치환체는 에스테르, 설포닐 에스테르, 티오에스테르, 아마이드 또는 설포나미드의 일부를 형성하는 아실 그룹, 설포닐 그룹, N 원자, O 원자 또는 S 원자를 포함한다. 바람직하게는, 친지성 치환체내 아실 그룹은 아미노산 측쇄 또는 스페이서를 가진 아마이드 또는 에스테르의 일부를 형성한다.

[0152] 친지성 치환체는, 탄소 원자 수가 4 내지 30개인 탄화수소쇄를 포함할 수 있다. 바람직하게는, 이는, 탄소수가 적어도 8개 또는 12개이고, 바람직하게는, 이는, 탄소수가 24개 이하이거나, 20개 이하이다. 탄화수소쇄는 직쇄 또는 측쇄일 수 있고 포화되거나 불포화될 수 있다. 탄화수소쇄가 바람직하게는 아미노산 측쇄 또는 스페이서에 대한 부착의 일부를 형성하는 잔기, 예를 들면, 아실 그룹, 설포닐 그룹, N 원자, O 원자 또는 S 원자로 치환되는 것은 이해될 것이다. 가장 바람직하게는, 탄화수소쇄는 아실로 치환되며, 따라서 탄화수소쇄는 알카노일 그룹, 예를 들면, 팔미토일, 카프로일, 라우로일, 미리스토일 또는 스테아로일의 일부일 수 있다.

[0153] 따라서, 친지성 치환체는 하기 식을 가질 수 있다:



[0154]

[0155] 상기 식에서,

[0156] A는 예를 들면, 아실 그룹, 설포닐 그룹, NH, N-알킬, O 원자 또는 S 원자, 바람직하게는 아실일 수 있다. n은 3 내지 29, 바람직하게는 적어도 7 또는 적어도 11, 및 바람직하게는 23 이하, 보다 바람직하게는 19 이하의 정수이다.

[0157] 탄화수소쇄는 추가로 치환될 수 있다. 예를 들면, 이는 NH₂, OH 및 COOH로 부터 선택된 3개 이하의 치환체로 추가로 치환될 수 있다. 탄화수소쇄가 추가로 치환되는 경우, 바람직하게는, 이는 단지 하나의 치환체로 추가로 치환된다. 이와는 달리 또는 추가로, 탄화수소쇄는 예를 들면, 하기 나타낸 바와 같은 사이클로알칼 또는 헤테로사이클로알칸을 포함할 수 있다:

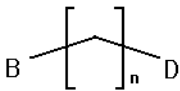


[0158]

[0159] 바람직하게는, 사이클로알칼 또는 헤테로사이클로알칸은 6원 환이다. 가장 바람직하게는, 이는 피페리딘이다.

[0160] 달리는, 친지성 치환체는 부분 또는 완전 불포화되거나 포화될 수 있는 사이클로펜타노페난트렌 골격을 기초로 할 수 있다. 각각의 골격내 탄소 원자는 Me 또는 OH로 치환될 수 있다. 예를 들면, 친지성 치환체는 콜릴, 테옥시콜릴 또는 리쑌콜릴(lithocholyl)일 수 있다.

[0161] 위에서 언급한 바와 같이, 친지성 치환체는 스페이서에 의해 아미노산 측쇄에 접합될 수 있다. 존재하는 경우, 스페이서는 친지성 치환체 및 아미노산 측쇄에 부착된다. 스페이서는 에스테르, 설포닐 에스테르, 티오에스테르, 아마이드 또는 설포나마이드에 의해 친지성 치환체 및 아미노산 측쇄에 독립적으로 부착될 수 있다. 따라서, 이는 아실, 설포닐, N 원자, O 원자 또는 S 원자로부터 독립적으로 선택된 2개의 잔기를 포함할 수 있다. 스페이서는 다음 식을 가질 수 있다:



[0162]

[0163] 상기식에서,

[0164] B 및 D는 각각 독립적으로 아실, 설포닐, NH, N-아실, O 원자 또는 S 원자로부터, 바람직하게는 아실 및 NH로부터 선택된다. 바람직하게는, n은 1 내지 10, 바람직하게는 1 내지 5의 정수이다. 스페이서는 또한 C₁₋₆ 알킬, C₀₋₆ 알킬 아민, C₀₋₆ 알킬 하이드록시 및 C₀₋₆ 알킬 카복시로부터 선택된 하나 이상의 치환체로 추가로 치환될 수 있다.

[0165] 이와는 달리, 스페이서는 2개 이상의 상기 식의 반복 단위를 가질 수 있다. B, D 및 n은 각각의 반복 단위에 대해 각각 독립적으로 선택된다. 인접한 반복 단위는 이들의 각각의 B 및 D 잔기를 통해 서로에 공유결합으로 부착될 수 있다. 예를 들면, 인접한 반복 단위의 B 및 D 잔기는 함께 에스테르, 설포닐 에스테르, 티오에스테르, 아마이드 또는 설포나마이드를 형성할 수 있다. 스페이서의 각각의 말단에서 유리된 B 및 D 단위는 위에서 기술한 바와 같이 아미노산 측쇄 및 친지성 치환체에 부착된다.

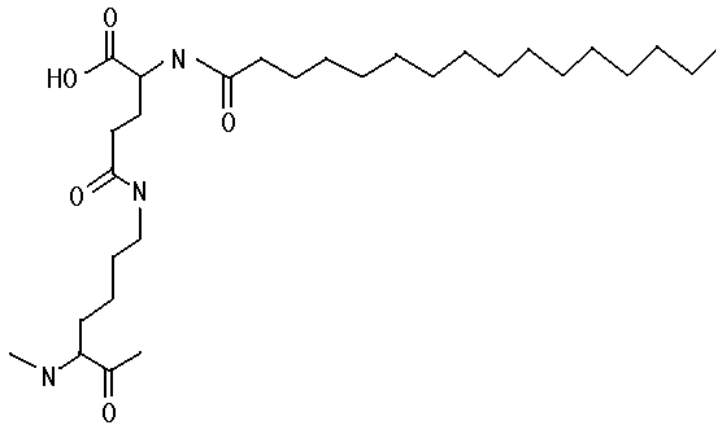
[0166] 바람직하게는, 스페이서는 5개 이하, 4개 이하 또는 3개 이하의 반복 단위를 가진다. 가장 바람직하게는, 스페이서는 2개의 반복 단위를 가지거나 하나의 반복 단위이다.

[0167] 스페이서(또는 이것이 반복 단위를 가지는 경우, 스페이서의 하나 이상의 반복 단위)는 예를 들면, 천연 또는 비천연 아미노산일 수 있다. 작용화된 측쇄를 갖는 아미노산의 경우, B 및/또는 D는 아미노산의 측쇄내의 잔기일 수 있음은 이해될 것이다. 스페이서는 어떠한 천연적으로 존재하거나 비천연의 아미노산일 수 있다. 예를 들어, 스페이서(또는 이것이 반복 단위를 가지는 경우, 스페이서의 하나 이상의 반복 단위)는 Gly, Pro, Ala, Val, Leu, Ile, Met, Cys, Phe, Tyr, Trp, His, Lys, Arg, Gln, Asn, α -Glu, γ -Glu, Asp, Ser, Thr, Gaba, Aib, β -Ala, 5-아미노펜타노일, 6-아미노헥사노일, 7-아미노헵타노일, 8-아미노옥타노일, 9-아미노나노일 또는 10-아미노데카노일일 수 있다.

[0168] 예를 들어, 스페이서는 γ -Glu, Gaba, β -Ala 및 α -Gly로부터 선택된 단일 아미노산일 수 있다.

[0169] 친지성 치환체는 본 발명의 화합물내 특정의 아미노산 측쇄에 접합될 수 있다. 바람직하게는, 아미노산 측쇄는 스페이서 또는 친지성 치환체를 지닌 에스테르, 설포닐 에스테르, 티오에스테르, 아마이드 또는 설포아미드를 형성하기 위한, 카복시, 하이드록실, 티올, 아마이드 또는 아민 그룹을 포함한다. 예를 들어, 친지성 치환체는 Asn, Asp, Glu, Gln, His, Lys, Arg, Ser, Thr, Tyr, Trp, Cys 또는 Dbu, Dpr 또는 Orn에 접합될 수 있다. 바람직하게는, 친지성 치환체는 Lys에 접합된다. 그러나, 본원에 제공된 식에서 Lys로 나타낸 특정 아미노산은, 친지성 치환체가 부가되는 경우, Dbu, Dpr 또는 Orn으로 치환될 수 있다.

[0170] 친지성 치환체 및 스페이서의 예는 하기 식으로 나타낸다:



[0171]

[0172] 여기서, 본 발명의 화합물로부터 Lys는 아마이드 잔기를 통해 γ -Glu(스페이서)에 공유결합으로 부착된다. 팔미토일은 아마이드 잔기를 통해 γ -Glu 스페이서에 공유결합으로 부착된다.

[0173] 이와는 달리 또는 추가로, 본 발명의 화합물내 하나 이상의 아미노산 측쇄는 예를 들면, 생체내(예를 들면 혈장내)에서 가용성 및/또는 반감기를 증가시키고/시키거나 생체이용성을 증가시키기 위해 중합체성 잔기에 접합될 수 있다. 이러한 변형은 또한 치료학적 단백질 및 펩타이드의 정화율(clearance)(예를 들면, 신장 정화율)을 감소시키는 것으로 알려져 있다.

[0174] 중합체성 잔기는 바람직하게는 수용성(양친매성 또는 친수성), 무독성 및 약제학적으로 불활성이다. 적합한 중합체성 잔기는 폴리에틸렌 글리콜(PEG), PEG의 단독중합체 또는 공중합체, PEG의 모노메틸-치환된 중합체(mPEG), 또는 폴리옥시에틸렌 글리세롤(POG)을 포함한다[예를 들면, Int. J. Hematology 68:1 (1998); Bioconjugate Chem. 6:150 (1995); and Crit. Rev. Therap. Drug Carrier Sys. 9:249 (1992)].

[0175] 다른 적합한 중합체성 잔기는 폴리-라이신, 폴리-아스파르트산 및 폴리-글루탐산과 같은 폴리-아미노산을 포함한다[예를 들면, Gombotz, et al. (1995), Bioconjugate Chem., vol. 6 : 332-351; Hudecz, et al. (1992), Bioconjugate Chem., vol. 3, 49-57; Tsukada, et al. (1984), J. Natl. Cancer Inst., vol 73, : 721-729; and Pratesi, et al. (1985), Br. J. Cancer, vol. 52: 841-848)].

[0176] 중합체성 잔기는 직쇄 또는 측쇄일 수 있다. 이는, 분자량이 500 내지 40,000 Da, 예를 들면, 500 내지 10,000 Da, 1000 내지 5000 Da, 10,000 내지 20,000 Da, 또는 20,000 내지 40,000 Da일 수 있다.

- [0177] 화합물은 이러한 잔기를 2개 이상 포함할 수 있으며, 이 경우, 이러한 잔기 모두의 총 분자량은 일반적으로 위에서 제공한 범위내에 속할 것이다.
- [0178] 중합체성 잔기는 아미노산 측쇄의 아미노, 카복실 또는 티올 그룹에 커플링(공유결합적 연결에 의해)될 수 있다. 바람직한 예는 Cys 잔기의 티올 그룹 및 Lys 잔기의 엡실론 아미노 그룹이며, Asp 및 Glu 잔기의 카복실 그룹이 또한 사용될 수 있다.
- [0179] 숙련가들은 커플링 반응을 수행하는데 사용될 수 있는 적합한 기술을 잘 인식할 것이다. 예를 들어, 메톡시 그룹을 수반하는 PEG 잔기는 제조업자[네크타 써라퓨틱스 에이엘(Nektar Therapeutics AL)]로부터 시판되는 시약을 사용한 말레이미도 연결에 의해 Cys 티올 그룹에 커플링시킬 수 있다(WO 2008/101017호 및 적합한 화학의 세부사항에 대해 위에서 인용된 문헌을 참조).
- [0180] 펩타이드 합성
- [0181] 본 발명의 화합물은 표준 합성 방법, 제조합체 발현 시스템, 또는 당해 분야의 어떠한 선행기술 방법에 의해서도 제조할 수 있다. 따라서, 글루카곤 유사체는 예를 들면,
- [0182] (a) 펩타이드를 고체상 또는 액체상 방법의 수단으로 단계적으로 또는 단편 조립에 의해 합성하고 최종 펩타이드 생성물을 분리 및 정제하는 방법;
- [0183] (b) 펩타이드를 암호화하는 핵산 작제물을 숙주 세포내에서 발현시키고 발현 생성물을 숙주 세포 배양물로부터 회수하는 방법; 또는
- [0184] (c) 펩타이드를 암호화하는 핵산 작제물의 세포-유리된 시험관내 발현을 수행하고 발현 생성물을 회수하는 방법, 또는
- [0185] 상기 방법(a), (b) 및 (c)의 특정 조합으로 펩타이드의 단편을 수득한 다음, 상기 단편을 연결시켜 펩타이드를 수득하고, 당해 펩타이드를 회수하는 방법을 포함하는 다수의 방식으로 합성할 수 있다.
- [0186] 본 발명의 유사체를 고체 상 또는 액체 상 펩타이드 합성을 이용하여 합성하는 것이 바람직하다. 본 내용에서, WO 98/11125호 및, 많은 다른 문헌 중에서, Fields, GB et al., 2002, "Principles and practice of solid-phase peptide synthesis". In: Synthetic Peptides (2nd Edition) 및 실시예에 대한 언급이 제공된다.
- [0187] 제조합체 발현의 경우, 본 발명의 핵산 단편은 적합한 벡터내에서 일반적으로 삽입하여 본 발명의 핵산 단편을 수반하는 클로닝 또는 발현 벡터를 형성할 것이며; 이러한 신규 벡터 또한 본 발명의 일부이다. 벡터는, 적용 목적 및 유형에 따라, 플라스미드, 파아지, 코스미드, 미니-염색체 또는 바이러스의 형태일 수 있으나, 또한 특정 세포내에서 단지 일시적으로 발현되는 네이키드(naked) DNA의 형태일 수 있다. 본 발명의 바람직한 클로닝 및 발현 벡터(플라스미드 벡터)는 자가 복제함으로써 후속적인 클로닝을 위한 고-수준 발현 또는 고-수준 복제 목적으로 높은 카피-수(copy-number)가 가능하다.
- [0188] 일반적으로 요약하면, 발현 벡터는 5'→3' 방향 및 작동가능한 연결로 다음과 같은 특징들을 포함한다: 본 발명의 핵산 단편, 임의로 (세포의 상 또는 경우에 따라, 원형질내로) 분비가능한 리더 펩타이드를 암호화하는 핵산 서열, 본 발명의 펩타이드를 암호화하는 핵산 단편, 및 임의로 터미네이터를 암호화하는 핵산 서열. 이들은 선택가능한 마커 및 복제 오리진과 같은 추가의 특징을 포함할 수 있다. 생산자 균주 또는 세포주내에서 발현 벡터를 사용하여 작동시키는 경우, 벡터는 숙주 세포 계능내로 통합될 수 있는 것이 바람직할 수 있다. 숙련가들은 적합한 벡터에 매우 친숙하며 이들의 특정 요건에 따라 하나를 설계할 수 있다.
- [0189] 본 발명의 벡터는 본 발명의 화합물을 생산하기 위해 숙주 세포를 형질전환시키는데 사용된다. 또한 본 발명의 일부인, 이러한 형질전환된 세포는 본 발명의 핵산 단편 및 벡터의 증식에 사용되거나, 본 발명의 펩타이드의 제조합체 생산에 사용된 배양된 세포 또는 세포주일 수 있다.
- [0190] 본 발명의 바람직한 형질전환된 세포는 세균[에스케리키아(Escherichia)(예를 들면, 이. 콜라이(E. coli)), 바실러스(예를 들면, 바실러스 서브틸리스(Bacillus subtilis)), 살모넬라, 또는 마이코박테리움(바람직하게는 비-병원성, 예를 들면, 엠. 보비스(M. bovis) BCG)], 효모(예를 들면, 사카로마이세스 세레비시아에(Saccharomyces cerevisiae)], 및 원생동물과 같은 미생물이다. 이와는 달리, 형질전환된 세포는 다세포 유기체로부터 기원할 수 있는데, 즉, 이는 진균 세포, 곤충 세포, 식물 세포 또는 포유동물 세포일 수 있다. 클로닝 및/또는 최적화된 발현의 목적을 위해, 형질전환된 세포는 본 발명의 핵산 단편을 복제할 수 있는 것이 바람직하다. 핵산 단편을 발현하는 세포는 본 발명의 유용한 양태이며; 이들은 본 발명의 펩타이드의 소-규모 또는

대-규모 제조를 위해 사용될 수 있다.

- [0191] 본 발명의 펩타이드를 형질전환된 세포를 이용하여 생산하는 경우, 비록 필수적이지는 않다고 해도, 발현 생성물이 배양 배지내로 분비되는 것이 편리하다.
- [0192] 효능
- [0193] GLP-1 또는 글루카곤(Glu) 수용체에 대한 관련 화합물의 결합은 작용제 활성의 지표로서 사용될 수 있지만, 일반적으로, 관련 수용체에 대한 화합물의 결합으로 야기되는 세포내 시그널링을 측정하는 생물학적 검정을 사용하는 것이 바람직하다. 예를 들면, 글루카곤 작용제에 의한 글루카곤 수용체의 활성화는 세포 사이클릭 AMP(cAMP) 형성을 자극할 것이다. 유사하게, GLP-1 작용제에 의한 GLP-1 수용체의 활성화는 세포 cAMP 형성을 자극할 것이다. 따라서, 이들 2개의 수용체 중 하나를 발현하는 적합한 세포내에서 cAMP의 생산을 사용하여 관련 수용체 활성을 모니터할 수 있다. 따라서, 각각 하나의 수용체를 발현하나 다른 것은 발현하지 않는 세포 유형의 적합한 쌍의 사용은 수용체 유형 둘다에 대한 작용제 활성을 측정하는데 사용될 수 있다.
- [0194] 숙련가는 적합한 검정 형식을 인식할 것이며, 실시예들이 하기에 제공된다. GLP-1 수용체 및/또는 글루카곤 수용체는 이러한 실시예들에 기술된 것으로서 수용체의 서열을 가질 수 있다. 예를 들면, 검정은 일차 수탁 번호 GI: 4503947을 갖는 사람 글루카곤 수용체(글루카곤-R) 및/또는 일차 수탁 번호 GI:166795283을 갖는 사람 글루카곤-유사 펩타이드 1 수용체(GLP-1R)를 사용할 수 있다(여기서, 전구체 단백질의 서열이 언급되며, 물론, 이는, 검정이 시그널 서열을 결여하고 있는 성숙한 단백질을 사용할 수 있음을 이해하여야 한다).
- [0195] EC₅₀ 값은 제공된 수용체에서 작용제 효능의 수치 척도로서 사용될 수 있다. EC₅₀ 값은 특수 검정에서 화합물의 최대 활성의 1/2을 달성하는데 요구되는 화합물의 농도의 척도이다. 따라서, 예를 들면, 특수 검정에서 글루카곤의 EC₅₀[GLP-1R]보다 낮은 EC₅₀[GLP-1R]을 갖는 화합물이 글루카곤 보다 GLP-1R에서 보다 높은 효능을 가지는 것으로 고려될 수 있다.
- [0196] 명세서에 기술된 화합물은 전형적으로 Glu-GLP-1 이중 작용제인데, 즉, 이들은 글루카곤 수용체 및 GLP-1 수용체 둘다에서 cAMP 형성을 자극할 수 있다. 각각의 수용체의 자극은 독립된 검정에서 측정된 후 서로 비교할 수 있다.
- [0197] 글루카곤 수용체에 대한 EC₅₀ 값(EC₅₀ [글루카곤-R])을 GLP-1 수용체에 대한 EC₅₀ 값, 제공된 화합물에 대한 (EC₅₀ [GLP-1R])을 비교함으로써, 화합물의 상대적인 글루카곤 선택률(%)을 알아낼 수 있다:
- [0198] 상대적인 글루카곤-R 선택률[화합물] = (1/EC₅₀[글루카곤-R])x100/(1/EC₅₀[글루카곤-R]+1/EC₅₀[GLP-1R])
- [0199] 상대적인 글루카곤-1R 선택률을 유사하게 알아낼 수 있다:
- [0200] 상대적인 GLP-1R 선택률[화합물] = (1/EC₅₀ [GLP-1R])x100 / (1/EC₅₀ [글루카곤-R] + 1/EC₅₀ [GLP-1R])
- [0201] 화합물의 상대적인 선택률은, GLP-1 또는 글루카곤 수용체 상에서의 이의 효과를 다른 수용체 상에서 이의 효과에 대해 직접 비교하도록 한다. 예를 들어, 화합물의 상대적 GLP-1 선택률이 더 높아질수록, 화합물이 글루카곤 수용체와 비교하여 GLP-1 수용체 상에 있는 경우에 더욱 더 효과적이다.
- [0202] 하기 기술된 검정을 사용하여, 본 발명자들은 사람 글루카곤에 대한 상대적인 GLP-1 선택률이 대략 5%인 것을 알아내었다.
- [0203] 본 발명의 화합물은 사람 글루카곤 보다 상대적인 GLP-1R 선택률이 더 높다. 따라서, 특수한 수준의 글루카곤-R 작용제 활성의 경우, 본 화합물은 글루카곤 보다 보다 더 높은 수준의 GLP-1R 작용제 활성(즉, GLP-1 수용체에서 더 높은 효능)을 나타낼 것이다. 글루카곤 및 GLP-1 수용체에서 특수 화합물의 절대 효능이, 적절한 상대적인 GLP-1R 선택률이 달성되는 한, 천연의 사람 글루카곤의 효능보다 더 높거나, 낮거나 또는 대략 동일할 수 있음을 이해할 것이다.
- [0204] 그럼에도 불구하고, 본 발명의 화합물은 사람 글루카곤보다 더 낮은 EC₅₀ [GLP-1R]을 가질 수 있다. 이 화합물은 글루카곤보다 더 낮은 EC₅₀[GLP-1R]을 가지면서 사람 글루카곤 보다 10배 미만 더 높은, 사람 글루카곤 보다 5배 미만 더 높은, 또는 사람 글루카곤보다 2배 미만 더 높은 EC₅₀[글루카곤-R]을 유지할 수 있다.
- [0205] 본 발명의 화합물은 사람 글루카곤보다 2배 미만인 EC₅₀[글루카곤-R]을 가질 수 있다. 이 화합물은 사람 글루카

곤보다 2배 미만인 EC₅₀ [글루카곤-R] 및 사람 글루카곤보다 1/2배 미만, 사람 글루카곤보다 1/5배 미만 또는 사람 글루카곤보다 1/10배 미만인 EC₅₀ [GLP-1R]을 가질 수 있다.

[0206] 본 발명의 화합물의 상대적인 GLP-1 선택률은 5% 내지 95%일 수 있다. 예를 들어, 화합물은, 5 내지 20%, 10 내지 30%, 20 내지 50%, 30 내지 70%, 또는 50 내지 80%; 또는 30 내지 50%, 40 내지 60%, 50 내지 70% 또는 75 내지 95%의 상대적인 선택률을 가질 수 있다.

발명의 효과

[0207] 치료학적 용도

[0208] 본 발명의 화합물은 비만 및 제2형 당뇨병을 포함하는 대사 질환의 매력적인 치료학적 선택을 제공할 수 있다.

[0209] 단순하게 당뇨병으로 흔히 언급되는 진성 당뇨병(diabetes mellitus)은 일반적으로 유전적 및 환경적 원인의 조합으로 인하여 비정상적으로 높은 혈당 수준(고혈당증)을 초래하는 장애가 있는 대사 증후군이다.

[0210] 혈당 수준은 췌장의 베타 세포내에서 제조된 호르몬 인슐린에 의해 조절된다. 당뇨병은 인슐린을 생산하는 췌장 베타-세포의 파괴로 인해 발전하거나(제1형 당뇨병) 인슐린의 효과에 대한 내성(임신 당뇨병)에 이어 베타 세포 손실로 인해 발전한다(제2형 당뇨병). 두 가지 유형의 당뇨병은 고혈당을 야기하며, 이는 대부분 당뇨병의 급성 신호: 과도한 뇨 생산, 결과적으로 보상적인 갈증 및 증가된 유액 섭취, 흐린 시력, 설명되지 않는 체중 감소, 기면, 및 에너지 대사에 있어서의 변화를 크게 유발한다.

[0211] 대사 증후군은 한 사람에서 대사 위험 인자 그룹으로 특징화된다. 이들은 비정상적인 비만(복부 내부 기관 주변의 과도한 지방 조직), 죽종형성 이상지질혈증[동맥 혈관 벽내에 플라크 축적(plaque buildup)을 조성하는 고트리글리세라이드, 저 HDL 콜레스테롤 및/또는 고 LDL 콜레스테롤을 포함하는 혈중 지방 질환], 상승된 혈압(고혈압), 인슐린 내성 및 내당성, 프로염전증 상태(예를 들면, 혈액 중 높은 피브리노겐 또는 플라스미노겐 활성 인자 억제제-1) 및 프로염증 상태(예를 들면, 혈중 상승된 C-반응성 단백질)을 포함한다.

[0212] 대사 증후군이 있는 개인은 제2형 당뇨병 뿐만 아니라 관상동맥심질환 및 동맥경화증(예를 들면, 뇌졸중 및 말초 혈관병)의 다른 manifestation과 관련된 기타 질병에도 걸릴 위험이 증가되어 있다. 이러한 증후군에 대한 우세하게 잠재하는 위험 인자는 복부 비만 및 인슐린 내성인 것으로 여겨진다. 인슐린 내성은 일반화된 대사질환이며, 여기서 체내에 인슐린을 효율적으로 이용할 수 없다.

[0213] 어떠한 특성의 이론에 의해 구속받고 싶지는 않지만, 본 발명의 화합물은 GluGLP-1 이중 작용제로 작용하는 것으로 여겨진다. 이중 작용제는 혈당 수준 및 음식 섭취에 있어서 GLP-1의 효과와 지방 대사에서 글루카곤의 효과를 조합한다. 따라서, 이들은 GLP-1 작용제 및 설폰닐우레아의 공동 사용과 관련된 저혈당증의 위험없이, 과도한 지방 축적의 제거를 가속화하는 상승 양식으로 작용하며, 지속적인 체중 감소를 유도하고, 이환률 당 수준을 정상 수준으로 직접 감소시킬 수 있다.

[0214] 이중 GluGLP-1 작용제의 상승 효과는 또한 고 콜레스테롤 및 LDL과 같은 심혈관 위험 인자의 감소, 및 체중에 있어서 이의 효과와는 전적으로 별개일 수 있는, 내당성에 있어서의 개선을 초래할 수 있다.

[0215] 따라서, 본 발명의 화합물은 체중 증가를 예방하거나, 체중 감소를 촉진하거나, 과체중을 감소시키거나, 병적인 비만을 포함하는 비만(예를 들면, 식욕, 섭식, 식품 섭취, 칼로리 섭취 및/또는 에너지 소비의 조절에 의해), 및 비만 관련 염증, 비만 관련 당뇨병 질환 및 비만 유도된 수면 무호흡을 포함하나, 이에 한정되지 않는 관련 질병 및 건강 상태를 치료하기 위한 약제로서 사용될 수 있다. 본 발명의 화합물은 또한 대사 증후군, 인슐린 내성, 내당성, 제2형 당뇨병, 고혈압, 죽종형성 이상지질혈증, 죽상경화증, 동맥경화증, 관상동맥심질환 및 뇌졸중의 치료에 사용될 수 있다. 이들은 비만과 관련될 수 있는 모든 상태이다. 그러나, 이들 상태에 있어서 본 발명의 화합물의 효과는 체중에 있어서의 효과를 통해 전체적으로 또는 부분적으로 매개될 수 있거나 이와는 독립적일 수 있다.

[0216] 약제학적 조성물

[0217] 본 발명의 화합물, 또는 이의 염은 약제학적으로 허용되는 담체 중에 치료학적 유효량의 본 발명의 화합물, 또는 이의 염을 전형적으로 포함하는 지장 또는 투여용으로 제조된 약제학적 조성물로 제형화될 수 있다.

[0218] 본 발명의 화합물의 치료학적 유효량은 투여 경로, 치료되는 포유동물의 유형, 및 고려되는 특정 포유동물의 물

리적 특성에 의존할 것이다. 이러한 양을 측정하기 위한 이들 인자들 및 이들의 관계는 의학 분야의 숙련자에게 잘 공지되어 있다. 이러한 투여량 및 투여 방법은 최적 효능을 달성하기 위해 조절할 수 있으며, 의학 분야의 숙련자에게 잘 공지된 제증, 식품, 동시처리되는 의약 및 기타 인자와 같은 인자들에 의존할 수 있다. 사람용으로 가장 적절한 용량 크기 및 투여 요법은 본 발명에 의해 수득된 결과에 의해 안내될 수 있으며, 적절히 설계된 임상 시험에서 확인될 수 있다.

[0219] 유효 용량 및 치료 프로토콜은 실험실 동물에서 낮은 투여량으로 개시한 후 효과를 모니터링하는 동안 당해 용량을 증가시키며, 용량 요법을 또한 전신계적으로 변화시켜 측정할 수 있다. 다수의 인자는 제공된 대상에 대해 최적의 용량을 측정하는 경우 임상가가 고려할 수 있다. 이러한 고려는 숙련자에게 공지되어 있다.

[0220] 용어 "약제학적으로 허용되는 담체"는 어떠한 표준 약제학적 담체도 포함한다. 치료학적 용도를 위한 약제학적으로 허용되는 담체는 약제학적 분야에 잘 공지되어 있으며 예를 들면, 문헌[Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co. (A. R. Gennaro edit. 1985)]에 기술되어 있다. 예를 들면, 약산성 또는 생리학적인 pH에서 멸균 염수 및 인산염-완충된 염수를 사용할 수 있다. pH 완충제는 인산염, 시트르산염, 아세트산염, 트리스/하이드록시메틸)아미노메탄(TRIS), N-트리스(하이드록시메틸)메틸-3-아미노프로판설폰산(TAPS), 중탄산암모늄, 디에탄올아민, 바람직한 완충제인 히스티딘, 아르기닌, 라이신 또는 아세테이트, 또는 이들의 혼합물일 수 있다. 이 용어는 사람을 포함하는 동물에서 사용하기 위해 미국 약전(US Pharmacopeia)에 나열된 특정 제제를 추가로 포함한다.

[0221] 용어 "약제학적으로 허용되는 염"은 화합물의 염을 말한다. 염은 산 부가 염 및 염기성염과 같은 약제학적으로 허용되는 염을 포함한다. 산 부가염의 예는 염산염, 시트르산염 및 아세트산염을 포함한다. 염기성 염의 예는, 양이온이 나트륨 및 칼륨과 같은 알칼리 금속, 칼슘 및 암모늄 이온 $N^+(R^3)_3(R^4)$ (여기서, R^3 및 R^4 는 독립적으로 임의 치환된 C_{1-6} -알킬, 임의 치환된 C_{2-6} -알케닐, 임의 치환된 아릴, 또는 임의 치환된 헤테로아릴이다)과 같은 알칼리 토 금속 중에서 선택되는 염을 포함한다. 약제학적으로 허용되는 염의 다른 예는 문헌["Remington's Pharmaceutical Sciences", 17th edition, Ed. Alfonso R. Gennaro (Ed.), Mark Publishing Company, Easton, PA, U.S.A., 1985 및 보다 최근 판, 및 in the Encyclopaedia of Pharmaceutical Technology]에 기술되어 있다.

[0222] "치료"는 유리하거나 원하는 임상 결과를 수득하기 위한 시도이다. 본 발명의 목적을 위해, 유리하거나 원하는 임상 결과는 검출가능하거나 검출가능하지 않은, 증상의 완화, 질병의 정도의 감소, 질병의 안정화된(즉, 악화되지 않은) 상태, 질병 진행의 지연 또는 저하, 질병 상태의 완화 또는 경감, 및 진정(부분적이거나 또는 전체적으로)을 포함하나, 이에 한정되지 않는다. "치료"는 또한 치료를 제공받지 않을 경우 예측 수명과 비교하여 연장된 수명을 의미할 수 있다. "치료"는 질환의 발달을 예방하거나 병리학을 변경시키는 의도로 수행된 개입이다. 따라서, "치료"는 치료학적 치료 및 예방적 또는 방지적 조치 둘다를 말한다. 치료가 요구되는 사람들은 이미 질환에 걸린 사람들 및 질환이 방지되어야 하는 사람들을 포함한다.

[0223] 약제학적 조성물은 단위 용량형일 수 있다. 이러한 제제 형태에서, 본 조성물은 적절한 양의 활성 성분을 함유하는 단위 투여량으로 분할된다. 단위 용량형은 포장된 제제, 즉 제제의 별개의 양을 함유하는 포장, 예를 들면, 포장된 정제, 캡슐제 및 바이알 또는 앰플 속의 분말일 수 있다. 단위 용량형은 또한 캡슐제, 카세트 또는 정제 자체일 수 있거나, 이는 적절한 수의 특정의 이들 포장된 형태일 수 있다. 이는 예를 들면, 펜(pen) 형태의 단일 투여량의 주사가 가능한 형태로 제공될 수 있다. 조성물은 특정의 적합한 경로 및 투여 수단을 위해 제형화될 수 있다. 약제학적으로 허용되는 담체 또는 희석제는 경구, 직장, 비강, 국소(불내 및 설하 포함), 질내 또는 비경구(피하, 근육내, 정맥내, 피내 및 경피 포함) 투여에 적합한 제형에 사용된 것들을 포함한다. 제형은 편리하게는 단위 용량형으로 제공될 수 있으며 또한 약제학 분야에 잘 공지된 특정의 방법으로 제조할 수 있다.

[0224] 피하 또는 경피 투여 방식이 본 출원에 기술된 화합물에 특히 적합할 수 있다.

[0225] 조합 치료법

[0226] 본 발명의 화합물은 당뇨병, 비만 또는 고혈압 치료용 제제와의 배합 치료요법의 일부로서 투여될 수 있다.

[0227] 이러한 경우에, 2개의 활성제는 함께 또는 별개로, 및 동일한 약제학적 제형의 일부로서 또는 별개의 제형으로서 제공될 수 있다.

[0228] 따라서, 본 발명의 화합물(또는 이의 염)은 메트포르민, 설폰닐우레아, 글리니드, DPP-IV 억제제, 글리타존 또

는 인슐린을 포함하나, 이에 한정되지 않는 항-당뇨병제와 함께 사용될 수 있다. 바람직한 양태에서, 본 화합물 또는 이의 염은 적절한 고혈당 조절을 달성하기 위해 인슐린, DPP-IV 억제제, 설포닐우레아 또는 메트포르민, 특히 설포닐우레아 또는 메트포르민과 함께 사용된다. 더욱더 바람직한 양태에서, 본 화합물 또는 이의 염은 적절한 고혈당 조절을 달성하기 위해 인슐린 또는 인슐린 유사체와 함께 사용된다. 인슐린 유사체의 예는 란투스, 노보라피드, 후말로그, 노보믹스 및 악트라판 HM을 포함하나, 이에 한정되지 않는다.

[0229] 본 화합물 또는 이의 염은 또한 글루카곤-유사 펩타이드 수용체 1 작용제, 펩타이드 YY 또는 이의 유사체, 칸나비노이드 수용체 1 길항제, 리파제 억제제, 멜라노코르틴 수용체 4 작용제, 또는 멜라닌 농축 호르몬 수용체 1 길항제를 포함하나, 이에 한정되지 않는 항-비만제와 함께 사용될 수 있다.

[0230] 유사체 화합물 또는 이의 염은 안지오텐신-전환 효소 억제제, 안지오텐신 II 수용체 차단제, 이노제, 베타-차단제 또는 칼슘 채널 차단제를 포함하나, 이에 한정되지 않는 항-고혈압제와 함께 사용될 수 있다.

[0231] **방법**

[0232] 글루카곤 유사체의 일반적인 합성

[0233] 고체상 펩타이드 합성을 SPPS로서 폴리스티렌 수지(TentaGel S Ram) 상에서 NMP내 표준 Fmoc 전략을 사용하여 초음파 보조된 합성기에서 수행하였다. HATU를 염기로서 DIPEA와 함께 커플링 시약으로 사용하였다. 피페리딘 (NMP중 20%)을 탈보호에 사용하였다. 경우에 따라, 슈도프롤린: Fmoc-Phe-Thr(.Psi. Me, Me pro)-OH 및 Fmoc-Asp-Ser(.Psi., Me, Me pro)-OH[노바바이오켄(NovaBiochem)으로부터 시판]을 사용하였다.

[0234] 분해:

[0235] 조 펩타이드를 실온에서 2시간 동안 95/2.5/2.5% (v/v) TFA/TIS/물로 처리함으로써 수지로부터 분해하였다. 서열내 메티오닌을 가진 펩타이드의 경우, 95/5% (v/v) TFA/EDT의 혼합물을 사용하였다. 대부분의 TFA를 감압하에 제거하고 조 펩타이드를 침전시키고 디에틸에테르로 세척하고 주위 온도에서 고정 중량으로 건조되도록 하였다.

[0236] 아실화된 글루카곤 유사체의 일반적인 합성

[0237] 라이신상의 엡실론-아민을 아실화하는 것 외에, 펩타이드 골격을 라이신 잔기의 측쇄 상에서 수지에 여전히 부착된 펩타이드로 아실화시키고 측쇄 그룹 상에서 완전히 보호되는 것을 제외하고는, 펩타이드 골격을 글루카곤 유사체의 일반적인 합성을 위해 위에서 기술한 바와 같이 합성하였다. 아실화될 라이신은 Fmoc-Lys(ivDde)-OH를 사용하여 혼입시킨다. 펩타이드의 N-말단은 NMP에서 Boc₂O를 사용하여 Boc 그룹으로 보호한다. 펩타이드는 여전히 수지에 부착되어 있는 반면, ivDde 보호 그룹은 NMP 속에서 2% 하이드라진 수화물을 사용하여 선택적으로 분해한다. 이후에, 보호되지 않은 라이신 측쇄를 피페리딘으로 탈보호시키고 위에서 기술한 바와 같은 표준 펩타이드 커플링 방법을 사용하여 지방산으로 아실화시킨, Fmoc-Glu-OtBu와 같은 스페이서 아미노산과 우선 커플링시킨다. 이와는 달리, N-말단에서 히스티딘을 Boc-His(Boc)-OH로 개시하여 혼입시킬 수 있다. 수지로부터의 분해 및 정제는 위에서 기술한 바와 같이 수행한다.

[0238] 펩타이드 안정성의 분석

[0239] 글루카곤 유사체를 고체 화합물로서 40°C에서 항온처리하고 0.1M 수성 HCl(2 mg/ml)중 용액으로 용해시켰다. 당해 용액을 40°C에서 항온처리하였다. 남은 순수한 글루카곤 유사체를 RP-HPLC에서 220 nM에서의 UV 시그널을 통합하여 측정하였다. 나머지 퍼센트는 상대적인 안정성에 대한 척도이다.

[0240] 글루카곤 화합물의 고체 및 용액을 분석 전에 HPLC 용매 속에 0.2 mg/mL의 농도로 희석시키고 적절한 시점에서 분석하였다.

표 1

분석적 HPLC 셋업

[0241]

컬럼	게미니(Gemini) C18 150x3mm
구배(시간; % B)	(0-3분; 18% B) (3-22분; 45% B) (22-23분; 95% B) (23-24분; 18% B) (24-30분; 18% B)
용매 A	1% MeCN:MQW 중 0.1% TFA
용매 B	MeCN 중 0.085% TFA
유동	0.300 mL/분

주사 용적	35 μ L
컬럼 온도	30 $^{\circ}$ C
UV 검출	220 nm

[0242] 사람 글루카곤- 및 GLP-1 수용체를 발현하는 세포주의 생성

[0243] 사람 글루카곤 수용체(글루카곤-R)(일차 수탁 번호 P47871) 또는 사람 글루카곤-유사 펩타이드 1 수용체(GLP-1R)(일차 수탁 번호 P43220)를 암호화하는 cDNA를 cDNA 클론 BC104854 (MGC:132514/IMAGE:8143857) 또는 BC112126 (MGC:138331/IMAGE:8327594)으로부터 각각 클로닝하였다. 글루카곤-R 또는 GLP-1R을 암호화하는 DNA를 아클로닝(subcloning)용의 말단 제한 부위를 암호화하는 프라이머를 사용하여 PCR로 증폭시켰다. 5'-말단 프라이머는 효율적인 해독을 보증하기 위해 근처의 코작 컨센서스 서열(Kozak consensus sequence)을 추가로 암호화하였다. 글루카곤-R 및 GLP-1-R을 암호화하는 DNA의 정확도를 DNA 서열분석으로 확인하였다. 글루카곤-R 또는 GLP-1-R을 암호화하는 PCR 생성물을 네오마이신(G418) 내성 마커를 함유하는 포유동물 발현 벡터내로 아클로닝하였다.

[0244] 글루카곤-R 또는 GLP-1-R을 암호화하는 포유동물 발현 벡터를 표준 인산칼슘 형질감염 방법에 의해 HEK293 세포내로 형질감염시켰다. 형질감염한지 48시간 후, 세포를 제한된 희석 클로닝을 위해 집중(seeding)하고 배양 배지 속에서 1 mg/ml G418로 선택하였다. 3주 후 글루카곤-R 및 GLP-1-R 발현 세포의 12개의 생존하는 콜로니를 집어들어, 증식시키고 하기 기술한 바와 같이 글루카곤-R 및 GLP-1-R 효능을 시험하였다. 하나의 글루카곤-R 발현 클론 및 하나의 GLP-1-R 발현 클론을 화합물 프로파일링을 위해 선택하였다.

[0245] 글루카곤 수용체 및 GLP-1-수용체 효능 검정

[0246] 사람 글루카곤-R, 또는 사람 GLP-1-R을 발현하는 HEK293 세포를 40,000개 세포/웰로 0.01% 폴리-L-라이신이 피복된 96-웰 미세역가 플레이트내에 접종하고 100 μ l의 성장 배지 중의 배양물 속에서 1일 동안 성장시켰다. 분석 당일에, 성장 배지를 제거하고 세포를 200 μ l의 타이로드 완충제(Tyrode buffer)로 1회 세척하였다. 세포를 증가하는 농도의 시험 펩타이드, 100 μ M IBMX, 및 6 mM 글루코즈의 농도를 함유하는 100 μ l의 타이로드 완충제 속에서 15분 동안 37 $^{\circ}$ C로 항온 처리하였다. 반응을 25 μ l의 0.5 M HCl을 가하여 중지시키고 병상에서 60분 동안 항온처리하였다. cAMP 함량을 FlashPlate[®] cAMP 키트[제조원: 퍼킨-엘머(Perkin-Elmer)]를 사용하여 평가하였다. EC₅₀ 및 참조 화합물(글루카곤 및 GLP-1)과 비교한 상대적인 효능을 컴퓨터 지원의 커브 핏팅(computer aided curve fitting)으로 평가하였다.

[0247] 주요 랫트 지방세포에서 지질분해

[0248] 지질분해에 있어서 글루카곤 유사체의 효과를 랫트 지방세포의 일차 배양물 속에서 평가하였다. 지방세포를 정상의 젊은 성숙한 스프라그-다울리 랫트(Sprague-Dawley rat)로부터 해부한 부고환 지방으로부터 분리하였다. 지방 덩이를 잘게 썰어서, 항온처리하고 4% BSA를 함유하는 크랩스-링거 완충제(Krebs-Ringer buffer)(KRB-BSA) 속에서 콜라게나제(1mg/ml)와 함께 60분 동안 37 $^{\circ}$ C에서 진탕(200rpm)시켰다. 현탁액을 나일론 여과기(160 μ m 공극 크기)를 통해 여과하고 여액을 200 x g에서 3분 동안 원심분리하였다. 지방세포의 상부 부유하는 층 밑의 아래 배지를 파스퇴르-피펫(Pasteur-pipette)으로 제거하였다. 지방세포를 KRB-BSA 완충제로 재-현탁 및 원심분리시켜 세척하였다. 지방세포를 KRB-BSA 속에서 재-현탁시키고, 혼합하고, 항온처리하며, 시험 화합물과 함께 96-깊이 웰 플레이트(50,000 세포/웰) 속에서 총 1 ml의 용적으로 37 $^{\circ}$ C에서 60분 동안 진탕시켰다. 플레이트를 항온처리에 이어 200 x g에서 3분 동안 원심분리한 후 적어도 10분 동안 병상에 두었다. 지방세포 층 밑의 완충제 300 μ l를 96-깊이 웰 플레이트 속에서 수집하였다. 이 과정을 2회 이상 반복하고, 3개의 추출물을 함께 혼주된 각각의 배양물로부터 추출하였다. 지방세포 배양물 속에서 지질분해에 의해 형성된 글리세롤은 유리 글리세롤 시약(200 μ l)을 지방세포 추출물의 분취량(25 μ l)에 가하고, 실온에서 15분 동안 항온처리하며 540nm에서 흡광도를 측정함으로써 측정하였다.

[0249] db/db 마우스에서 경구 내당성 시험(OGTT)

[0250] Db/db 마우스를 밤새 절식시키고 초기 혈액 시료(절식 혈당 수준)를 비히클(아세테이트 완충제, 20 mM 아세트산, 250 mM 만니톨, pH 5.0) 또는 시험 화합물 (5ml/kg, i.p.), 액센딘-4(PBS 중 0.56, 1.67 및 5.0 nmol/kg) 및 ZP2663(서열번호 4)(아세테이트 완충제 중 5 및 45 nmol/kg)의 투여 직전에 취하였다. 동물을 실험 동안 절식을 유지시켜 식이 섭취의 혼란을 방지하였다. 15분 후에, 글루코즈(5 ml/kg 중 1 g/kg)의 경구 투여

량을 제공하고 BG 수준을 t=30분, t=60분, t=120분 및 t=240분에서 측정하였다.

[0251] 기준선(t=0)으로부터의 차이를 각각의 시점에서 계산하고 AUC_{0-240분} 값을 측정하였다. 1개-방식 ANOVA 및 던넛 포스트-훅 분석(Dunnetts post-hoc analysis)에 의한 AUC 값의 통계적 분석을 그라파드 프리즘 버전(GraphPad Prism version) 4를 사용하여 수행하였다. 차이는 p < 0.05 수준에서 상당한 것으로 고려하였다.

[0252] 정상 마우스에서 사료 섭취

[0253] 연구 1주 전 C57BI/6 마우스(8주령)(각 그룹에서 N=9 내지 12마리 동물)을 0.2ml 비히클을 매일 주사(피하) 주사함으로써 처리에 대해 조건화하고 이들을 주당 2회 칭량하여 취급에 대해 익숙해지도록 하였다. 마우스를 실험 시작 1일 전에 유사한 체중(BW)의 그룹으로 계층화하였다. 계층화된 마우스의 그룹을 밤새 절식시키고 PYY₃₋₃₆(30 nmol/kg)(초기 양성 대조군), 글루카곤(500 nmol/kg) 및 ZP2669(서열번호 4)(500 nmol/kg) 또는 비히클로 처리(10 µl의 시험 용액/BW g, 피하 주사)하였다. 1시간 후, 예비-칭량된 사료를 마우스에게 제공하고 사료 섭취를 1시간 후 나머지 사료를 칭량하여 측정하고 체중에 대해 상대적으로 나타내었다(사료 mg/g BW). 1개-방식 ANOVA 및 던넛 포스트-훅 분석을 그라파드 프리즘 버전 4로 수행하였다. 차이는 0.05 수준에서 상당한 것으로 고려하였다.

[0254] 체중 증가 및 혈장 콜레스테롤에 있어서 GLP-1 및 이중 GluGLP-1 작용제를 사용한 식이 유도된 비만(DIO) 마우스의 28일 치료의 효과

[0255] 약물 처리 4주 전에, C57BI/6 수컷 마우스(7주령)(각 그룹에서 N=9 내지 12마리 동물)에게 고 지방 식이(HFD)를 제공하고 이들의 낮-밤 주기를 광 온/오프(lights On/Off)를 사용하여 2000/0800 시간에서 바꾸었다. 실험 동물은 0.1 ml의 비히클을 매일 주사(피하)에 의해 처리하여 조건화시키고 약물 투여 시작 전에 이들의 체중을 1주 동안 주당 2회 칭량하여 취급에 대해 익숙해지도록 하였다. 실험 개시 전날에, 마우스를 유사한 체중(BW)의 그룹으로 계층화하고 다음날 계층화된 마우스의 그룹을 ZP2663(서열번호 4)(500 nmol/kg) 또는 비히클(아세트산염-완충제 20mM 아세트산 250mM 만니톨 pH 5.0)로 처리(1일 2회; 피하주사)하였다. 옥신토모들린 및 엑세딘-4는 PBS 용액 (pH=7.4; 2.5 µl/g BW) 중에 제공한 반면, ZP2663(서열번호 4)를 등장성 아세트산염 완충제(pH 4.8; 2.5 µl/g BW) 중에 제공하였다. 정규 사료로 유지시킨 비만이 아닌 대조군 그룹은 DIO 그룹과 동일한 처리 섭생으로 비히클로 처리하였다. 체중은 매일 기록하고 연구 전체에서 펩타이드의 체중-교정된 투여량을 투여하기 위해 사용하였다. 동물을 침수시키기 전에 밤새 절식시켰다. 눈 혈액 시료(0.6 ml EDTA)를 다음날 아침에 경추 탈구 전 즉시 수득하였다. 혈액 혈장 시료를 콜레스테롤, HDL 및 LDL에 대해 시판되는 키트를 사용하여 분석할 때까지 -80°C에서 저장하였다. 처리 기간 전체에서 체중 증가를 각각의 동물에 대해 처리 초기에서 이의 체중을 감함으로써 계산하였다.

[0256] 체중 증가 및 콜레스테롤에 있어서 처리 효과를 반복된 측정을 사용한 2개-방식 ANOVA 및 본페로니(Bonferoni) 포스트-훅 분석에 의해 그라파드 프리즘 버전 4를 사용하여 평가하였다. 차이는 0.05 수준에서 상당한 것으로 고려하였다.

도면의 간단한 설명

[0257] 도 1은 db/db 마우스에서 경구 내당성에 대한 ZP2663의 효과를 도시한다. Db/db 마우스를 밤새 절식시키고 초기 혈액 시료(공복 혈당수준)을 비히클 또는 ZP2663(45 nmol/kg)를 복강내 투여하기 전에 취하였다. 15분 후 포도당의 경구 투여량(5 ml/kg로 1g/kg)을 제공하고 BG 수준을 t=30분, t=60분, t=120분 및 t=240분에서 측정하였다. 기준선(t=0)으로부터의 차이를 각 시점에서 계산하고 AUC_{0-240분} 값을 측정하였다. ZP2663은 당뇨병성 db/db 마우스에서 내당성을 상당히 개선시켰다.

도 2는 마우스에서 음식 섭취에 대한 ZP2663의 효과를 도시한다.

(체중에 따라 계층화시킨) 계층화된 마우스의 그룹을 밤새 절식시키고 PYY₃₋₃₆(30 nmol/kg)(내부 양성 대조군), 글루카곤(500 nmol/kg), ZP2663(500 nmol/kg) 또는 비히클로 처리하였다. 1시간 후 예비-칭량된 사료를 마우스에 도입하여 사료 섭취를 1시간 후 남은 사료를 칭량함으로써 측정하고 체중에 대해 상대치(사료 mg/g BW)로 측정하였다. PYY(3-36)는, 앞서의 발견으로부터 예측된 것으로서 식욕억제 효과를 나타내었다. ZP2663(500 nmol/kg)은 펩타이드의 주사 후 처음 1시간 동안 사료 섭취를 상당히 감소시켰다. 글루카곤은 사료 섭취에 효

과가 없었다.

도 3은 식이 유도시킨 비만(diet induced obese: DIO) 마우스에서 체중에 있어서 ZP2663를 사용한 처리 28일째의 효과를 나타낸다. C57BI/6 수컷 마우스에게 고지방 식이(HFD)를 제공하고 ZP2663(500 nmol/kg) 또는 비히클로 1일 2회 피하(b.i.d.; s.c.) 처리하였다. 정규의 음식을 유지시킨 비-비만 대조군 그룹은 DIO 그룹과 동일한 처리 섭생으로 비히클(CHOW)로 처리하였다. 체중을 매일 기록하여 연구 전체에서 펩타이드의 체중-교정된 용량을 투여하는데 사용하였다. ZP2663은 고형 사료 공급으로 관측된 것과 유사한 수준으로 체중 증가를 감소시켰다.

도 4는 LDL 콜레스테롤 농도에서 4주 동안(1일 2회) DIO 마우스의 이중 GluGLP-1 효능제 처리 결과를 나타낸다. OXM(P = 0.002) 및 ZP2663(P = 0.0001)의 효과는 비히클 그룹과 통계적으로 상당히 상이하였다.

도 5는 HDL/LDL 비에서 4주(1일 2회) 동안 DIO 마우스의 이중 GluGLP-1 효능제 처리 효과를 나타낸다. PBS(pH 7.4)는 OXM, 엑센딘-4에 사용된 비히클인 반면, 아세트이트(pH 5.0)는 ZP2663에 사용된 비히클이었다. OXM(P = 0.002) 및 ZP2663(P = 0.0003)의 효과는 비히클과 상당히 비교되었다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

결과

실시예 1: 펩타이드 안정성

HC1 스트레스 용액 중에서의 항온처리 결과는 하기 표 2에 나타낸다. 고체로서 모든 화합물은 40°C에서 5주에 걸쳐 90% 이상 순도의 회수로 안정하였다. 그러나, 본 화합물의 산성 분해의 결과는, 글루카곤 유사체가 천연의 글루카곤보다 거의 4배 더 안정함을 나타낸다.

표 2

펩타이드 안정성

ZP 화합물	고체 펩타이드 회수율(%)	0.1M HCl 회수율(%)
글루카곤	91	15
2663	95	71

실시예 2: 글루카곤 및 GLP-1 수용체에 대한 효능

표 3

글루카곤 및 GLP-1 수용체의 EC₅₀ 값

		GLP-1R EC ₅₀ (nmol)	GLUR EC ₅₀ (nmol)
글루카곤		2.0	0.10
OXM		1.0	0.50
엑센딘-4		0.02	>1,000.
ZP2663 (서열번호 4)	H-HSQGTFTSDYSKYLDERRAKDF IEWLLSA-NH2	0.06	0.06
L006-0082 (서열번호 5)*	H-HSQGTFTSDYSKYLDERRAQDF IEWLLSA-NH2	0.09	0.12
L006-0083 (서열번호 6)*	H-HSQGTFTSDYSKYLDERRAKDFVEWLLSA-NH2	0.08	0.12
L006-0084 (서열번호 7)*	H-HSQGTFTSDYSKYLDERRAKDF IQWLLSA-NH2	0.07	0.13

L006-0090 (서열 번호 8)*	H-HSQGTFTSDYSKYLDSTRRAQDF IEWLLSA-NH2	0.15	0.22
L006-0093 (서열 번호 9)*	H-HSQGTFTSDYSKYLDSTRRARDF IDWLLSA-NH2	0.07	0.10
L006-0094 (서열 번호 10)*	H-HSQGTFTSDYSKYLDKRRRAEDF IKWLLSA-NH2	0.16	0.25
L006-0128 (서열 번호 11)*	H-HSQGTFTSDYSKYLDERRAKDF IRWLLSA-NH2	0.16	0.22
L006-0138 (서열 번호 12)*	H-HSQGTFTSDYSKYLDERRAKDF IEWLLRA-NH2	0.29	0.38
L006-0081(서열 번호 13)*	H-HSQGTFTSDYSKYLDSTRRAKDF IEWLLSA-NH2	0.14	0.23
L006-0108(서열 번호 14)*	H-HSQGTFTSDYSKYLDERAAKDF IEWLLSA-NH2	0.53	0.81
L006-0129(서열 번호 15)*	H-HSQGTFTSDYSKYLDERRAKDF IDWLLSA-NH2	0.20	0.24
L006-0136(서열 번호 16)*	H-HSQGTFTSDYSKYLDERRAKDF IEWLLAA-NH2	0.22	0.33
L006-0295(서열 번호 17)*	H-HSQGTFTSDYSKYLDERRAKDF IEWLLSA-OH	0.28	0.12

[0264] "*"로 표시된 화합물은, 순도가 90% 미만인 조 펩타이드이다. EC50은 50%의 순도로 보정된다.

[0265] **실시예 3: 지질분석 검정**

표 4

[0266] 일차 랫트 지방세포 배양물내 지질분해의 자극(세부사항은 방법란 참조)

화합물	EC ₅₀ (nM)
엑센딘-4	효과 없음
글루카곤	6
OXM	180
ZP2663(서열번호 4)	4.4

[0267] 엑센딘-4 및 OXM은 일차 지방세포 배양물내 지질분해에 대한 효과를 거의 가지지 않았고, ZP2663(서열번호 4)는 글루카곤과 동등하였고 OXM과 같이 40배 더 강력하였다. DIO 마우스를 ZP2663(서열번호 4)로 4주 처리하는 것이 지방 축적을 상당히 감소시켰다는 발견은 일차 지방세포 배양물에서 지질 대사시 관측된 효과(표 4)와 일치한다.

[0268] **실시예 4: db/db 마우스에서 경구 내당성의 효과**

[0269] ZP2663(서열번호 4)는 당뇨병 db/db 마우스에서 OGTT 동안 측정된 내당성을 현저하게 개선시켰다(도 1). ZP2663(서열번호 4)는 45 nmol/kg에서 64.9%까지 내당성을 개선시켰다.

[0270]

실시예 5: 마우스에서 사료 섭취에 대한 효과

[0271]

비히클 처리한 동물은 처음 1시간 동안 체중 g당 $0.033 \pm 0.001g$ 의 사료를 먹었다. PYY(3-36)는 앞서의 발견으로부터 예상되는 바와 같이 식욕억제 효과를 나타내었다. ZP2663(서열번호 4)(500 nmol/kg)는 펩타이드의 주사 후 처음 1시간 동안 사료 섭취를 상당히 감소시켰다(도 2). 글루카곤은 사료 섭취에 대한 효과가 없었다.

[0272]

실시예 6: 식이 유도된 비만 마우스에서 체중에 대한 피하 투여의 효과

[0273]

ZP2663(서열번호 4)는 사료 공급으로 관측된 것과 유사한 수준으로 체중 증가를 감소시켰다(도 3). 체중 증가는 비히클 그룹보다 통계적으로 상당히 더 적었다.

[0274]

실시예 7: LDL 및 HDL에 대한 효과

[0275]

엑센딘-4는 매우 강력한 GLP-1R 작용제이나, GluR에 대한 효과를 가지지 않으며 위에서 기술한 바와 같이 랫트 지방세포 지질분해 검정에서 효과를 가지지 않는다. 또한, 엑센딘-4는 총 콜레스테롤, HDL, LDL 또는 HDL/LDL 비의 혈중 농도에 대한 효과를 가지지 않는다(도 4, 5)

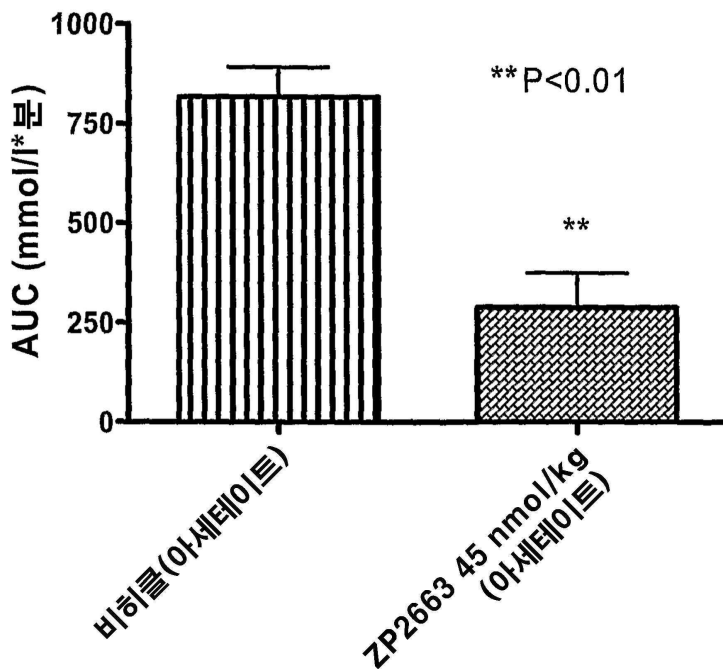
[0276]

반면, ZP2663(서열번호 4)를 사용한 DIO 마우스의 처리는 비히클과 비교하여 LDL 콜레스테롤($P = 0.0001$) 및 HDL/LDL 비($P = 0.0006$)의 혈중 농도에 대하여 상당한 효과를 가졌다(도 4 및 5).

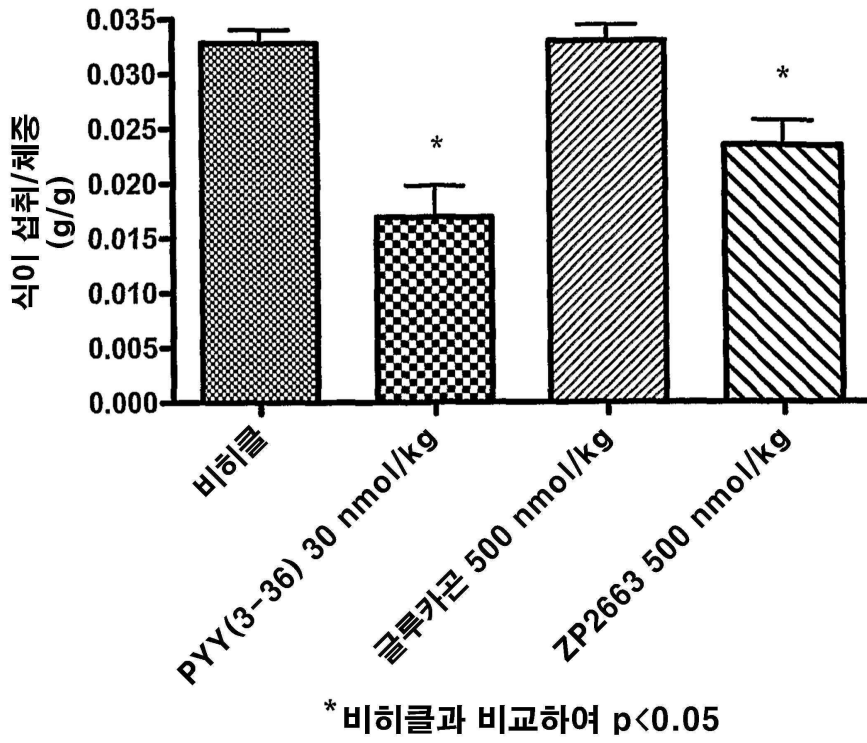
[0277]

도면

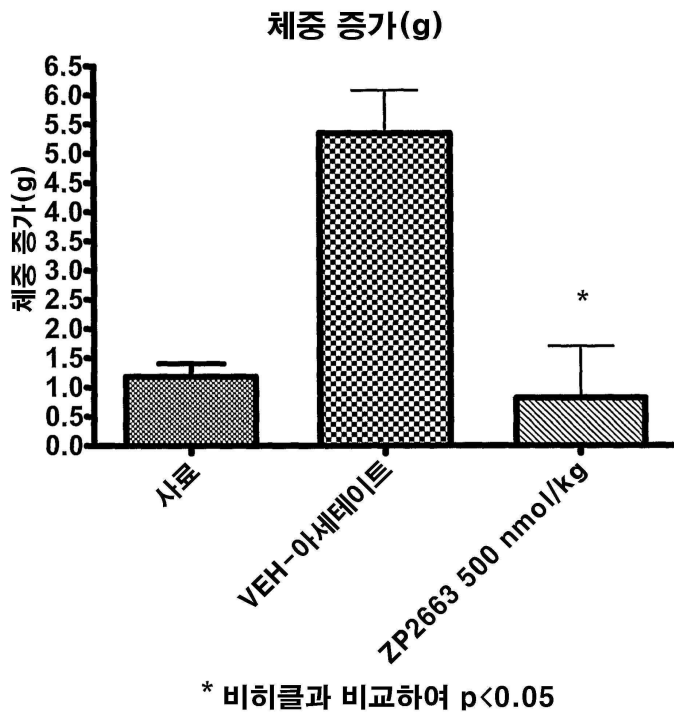
도면1



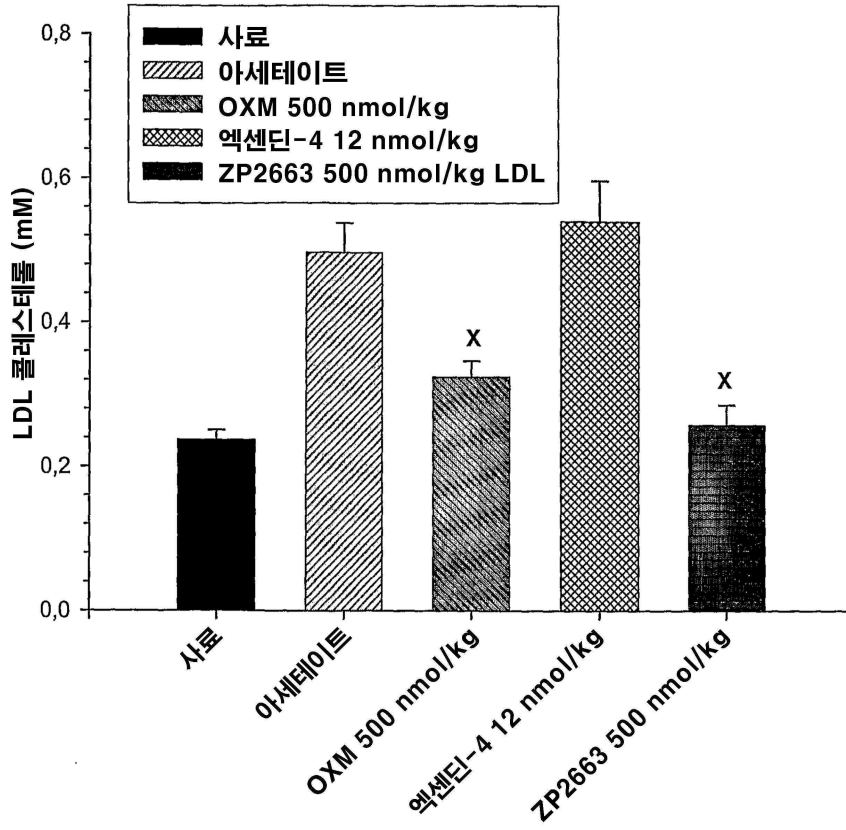
도면2



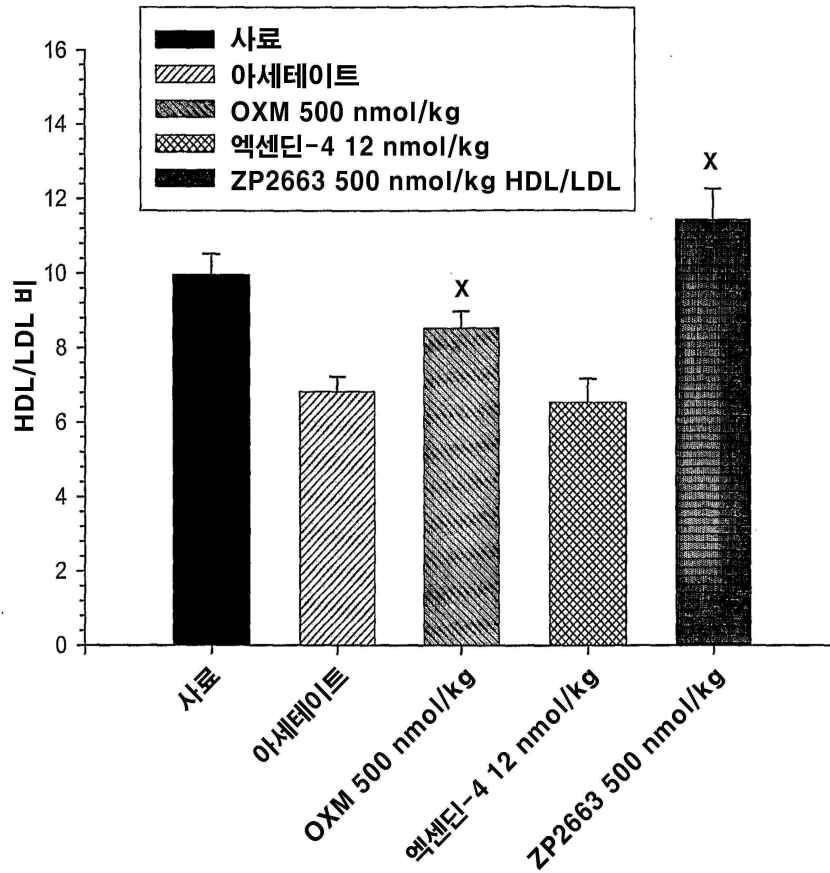
도면3



도면4



도면5



서열목록

- <110> Zealand Pharma A/S
- <120> Glucagon Analogues
- <130> IPA110468
- <160> 21
- <170> KopatentIn 2.0
- <210> 1
- <211> 29
- <212> PRT
- <213> Homo sapiens
- <400> 1

His Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Ser

1 5 10 15

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

20 25

<210> 2

<211> 8
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 2

Lys Arg Asn Arg Asn Asn Ile Ala

1 5

<210> 3
 <211> 37
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 3

His Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Ser

1 5 10 15

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

20 25 30

Arg Asn Asn Ile Ala

35

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

<220><223> Synthetic sequence ZP2663

<400> 4

His Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Glu

1 5 10 15

Arg Arg Ala Lys Asp Phe Ile Glu Trp Leu Leu Ser Ala

20 25

<210> 5
 <211> 29
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic sequence L006-0082

<400> 5

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

Arg Arg Ala Gln Asp Phe Ile Glu Trp Leu Leu Ser Ala
 20 25

<210> 6

<211> 29

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic sequence L006-0083

<400> 6

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

Arg Arg Ala Lys Asp Phe Val Glu Trp Leu Leu Ser Ala
 20 25

<210> 7

<211> 29

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic sequence L006-0084

<400> 7

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

Arg Arg Ala Lys Asp Phe Ile Gln Trp Leu Leu Ser Ala
 20 25

<210> 8

<211> 29

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic sequence L006-0090

<400> 8

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

Arg Arg Ala Gln Asp Phe Ile Glu Trp Leu Leu Ser Ala

20 25

<210> 9

<211> 29

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic sequence L006-0093

<400> 9

His Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Asp

1 5 10 15

Arg Arg Ala Arg Asp Phe Ile Asp Trp Leu Leu Ser Ala

20 25

<210> 10

<211> 29

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic sequence L006-0094

<400> 10

His Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Lys

1 5 10 15

Arg Arg Ala Glu Asp Phe Ile Lys Trp Leu Leu Ser Ala

20 25

<210> 11

<211> 29

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic sequence L006-0128

<400> 11

His Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Glu

1 5 10 15

Arg Arg Ala Lys Asp Phe Ile Arg Trp Leu Leu Ser Ala

20 25

<210> 12

<211> 29
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic sequence L006-0138
 <400> 12
 His Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Glu
 1 5 10 15
 Arg Arg Ala Lys Asp Phe Ile Glu Trp Leu Leu Arg Ala
 20 25

<210> 13
 <211> 29
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic sequence L006-0081
 <400> 13
 His Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Ser
 1 5 10 15
 Arg Arg Ala Lys Asp Phe Ile Glu Trp Leu Leu Ser Ala
 20 25

<210> 14
 <211> 29
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic sequence L006-0108
 <400> 14
 His Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Glu
 1 5 10 15
 Arg Ala Ala Lys Asp Phe Ile Glu Trp Leu Leu Ser Ala
 20 25

<210> 15
 <211> 29
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic sequence L006-0129

<400> 15

His Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Glu

1 5 10 15

Arg Arg Ala Lys Asp Phe Ile Asp Trp Leu Leu Ser Ala

20 25

<210> 16

<211> 29

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic sequence L006-0136

<400> 16

His Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Glu

1 5 10 15

Arg Arg Ala Lys Asp Phe Ile Glu Trp Leu Leu Ala Ala

20 25

<210> 17

<211> 29

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic sequence L006-0295

<400> 17

His Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Glu

1 5 10 15

Arg Arg Ala Lys Asp Phe Ile Glu Trp Leu Leu Ser Ala

20 25

<210> 18

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic sequence

<400> 18

Lys Lys Lys Lys

1

<210> 19

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic sequence

<400> 19

Lys Lys Lys Lys Lys

1 5

<210> 20

<211>

6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic sequence

<400> 20

Lys Lys Lys Lys Lys Lys

1 5

<210> 21

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic sequence

<400> 21

Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys

1 5