



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2017-0137198
 (43) 공개일자 2017년12월12일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 14/605 (2006.01) *A61K 38/22* (2006.01)
A61K 38/26 (2006.01) *A61K 38/28* (2006.01)
A61K 45/06 (2006.01)
- (52) CPC특허분류
C07K 14/605 (2013.01)
A61K 38/2271 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2017-7033115
- (22) 출원일자(국제) 2016년04월15일
 심사청구일자 없음
- (85) 번역문제출일자 2017년11월15일
- (86) 국제출원번호 PCT/EP2016/058359
- (87) 국제공개번호 WO 2016/166289
 국제공개일자 2016년10월20일
- (30) 우선권주장
 15163903.6 2015년04월16일
 유럽특허청(EPO)(EP)

- (71) 출원인
질랜드 파마 에이/에스
 덴마크 디케이-2600 글로스트룹 스메텔란드 36
베링거 인겔하임 인터내셔널 게엠베하
 독일 55216 인겔하임 암 라인 빙거 슈트라쎄 173
- (72) 발명자
리버 디테
 덴마크 디케이-2600 글로스트룹 스메텔란드 36 질
 랜드 파마 에이/에스
톨보르 야콥 린
 덴마크 디케이-2600 글로스트룹 스메텔란드 36 질
 랜드 파마 에이/에스
 (뒷면에 계속)
- (74) 대리인
장훈

전체 청구항 수 : 총 17 항

(54) 발명의 명칭 **아실화된 글루카곤 유사체**

(57) 요약

본 발명은 비만 및 과체중, 당뇨병, 및 다른 관련 대사 장애의 치료를 위한 물질 및 방법을 제공한다. 특히, 본 발명은 이러한 방법에 효과적인 신규한 아실화된 글루카곤 유사체 펩타이드를 제공한다. 상기 펩타이드는 사람 글루카곤과 비교하여 GLP-1 수용체에 대해 증가된 선택도를 가짐에 의해 이의 효과를 매개할 수 있다.

(52) CPC특허분류

A61K 38/26 (2013.01)

A61K 38/28 (2013.01)

A61K 45/06 (2013.01)

A61K 2300/00 (2013.01)

(72) 발명자

함프레흐트 디터 볼프강

독일 55216 잉겔하임 암 라인 빙거 슈트라쎬 173

베링거 잉겔하임 게엠베하 코르포라테 파텐츠

토마스 레오

독일 55216 잉겔하임 암 라인 빙거 슈트라쎬 173

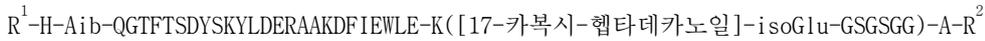
베링거 잉겔하임 게엠베하 코르포라테 파텐츠

명세서

청구범위

청구항 1

하기 화학식의 화합물 또는 약제학적으로 허용되는 이의 염 또는 용매화물:



상기 화학식에서,

R¹은 H(수소), C₁₋₄ 알킬, 아세틸, 포밀, 벤조일 또는 트리플루오로아세틸이고;

R²는 OH 또는 NH₂이다.

청구항 2

제1항에 있어서,

H-H-Aib-QGTFTSDYSKYLDERAAKDFIEWLE-K([17-카복시-헵타데카노일]-isoGlu-GSGSGG)-A-NH₂인, 화합물 또는 약제학적으로 허용되는 이의 염 또는 용매화물.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 따른 화합물을 담체와 함께 포함하는 조성물.

청구항 4

제3항에 있어서, 상기 조성물이 약제학적 조성물이고, 상기 담체가 약제학적으로 허용되는 담체인, 조성물.

청구항 5

제1항 또는 제2항에 있어서, 의학적 치료 방법에서 사용하기 위한 화합물.

청구항 6

제1항 또는 제2항에 있어서, 체중 증가의 예방 또는 체중 감소의 촉진이 필요한 개체에서 체중 증가를 예방하거나 체중 감소를 촉진하는 방법에서 사용하기 위한 화합물.

청구항 7

제1항 또는 제2항에 있어서, 순환 LDL 수준의 감소 및/또는 HDL/LDL 비의 증가가 필요한 개체에서 순환 LDL 수준을 감소시키고/시키거나 HDL/LDL 비를 증가시키는 방법에서 사용하기 위한 화합물.

청구항 8

제1항 또는 제2항에 있어서, 과체중에 의해 야기되거나 특성규명되는 상태를 치료하는 방법에서 사용하기 위한 화합물.

청구항 9

제1항 또는 제2항에 있어서, 혈당 조절을 개선시키거나, 비만, 병적 비만, 수술 전 병적 비만, 비만 연계 염증, 비만 연계 당남 질환, 비만 유도된 수면 무호흡, 당뇨병, 대사 증후군, 고혈압, 죽종형성 이상지질혈증, 죽상동맥경화증, 동맥경화증, 관상동맥 심장 질환, 말초동맥 질환, 뇌졸중 또는 미세혈관 질환을 예방 또는 치료하는 방법에서 사용하기 위한 화합물.

청구항 10

제6항 내지 제9항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 화합물이 당뇨병, 비만, 이상지질혈증 또는 고혈압 치료제와

함께 병용 요법의 일부로서 투여되는, 상기 방법에서 사용하기 위한 화합물.

청구항 11

제10항에 있어서, 상기 당뇨병 치료제가 비구아나이드, 설포닐우레아, 메글리티나이드 또는 글리나이드, DPP-IV 저해제, SGLT2 저해제, 글리타존, GLP-1 수용체 작용제, SGLT2 저해제, GPR40 작용제, 또는 인슐린 또는 인슐린 유사체인, 상기 방법에서 사용하기 위한 화합물.

청구항 12

제10항에 있어서, 상기 비만 치료제가 GLP-1 수용체 작용제, 펩타이드 YY 또는 이의 유사체, 신경펩타이드 Y(NPY) 또는 이의 유사체, 칸나비노이드 수용체 1 길항제, 리파제 저해제, 사람 전구췌도(proIslet) 펩타이드(HIP), 멜라노코르틴 수용체 4 작용제, 멜라닌 농축 호르몬 수용체 1 길항제, 펜테르민(단독 또는 토피라메이트와 병용), 노르에피네프린/도파민 재흡수 저해제 및 오피오이드 수용체 길항제의 병용물, Orlistat™, Sibutramine™, CCK, 아밀린, 프람린타이드 및 렙틴 및 이의 유사체, 또는 세로토닌성 제제인, 상기 방법에서 사용하기 위한 화합물.

청구항 13

제10항에 있어서, 상기 고혈압 치료제가 안지오텐신-전환 효소 저해제, 안지오텐신 II 수용체 차단제, 이뇨제, 베타-차단제, 또는 칼슘 채널 차단제인, 상기 방법에서 사용하기 위한 화합물.

청구항 14

제10항에 있어서, 상기 이상지질혈증 치료제가 스타틴, 피브레이트, 니아신, PSCK9(Proprotein convertase subtilisin/kexin type 9) 저해제 및/또는 콜레스테롤 흡수 저해제인, 상기 방법에서 사용하기 위한 화합물.

청구항 15

제1항 또는 제2항에 따른 화합물 또는 제3항 또는 제4항에 따른 조성물을 포함하는 치료학적 키트.

청구항 16

제1항 또는 제2항에 따른 화합물의 합성 방법.

청구항 17

제1항 또는 제2항에 따른 화합물의 제조 방법으로서,

상기 방법이 전구체 펩타이드를 암호화하는 핵산 작제물로부터 전구체 펩타이드 서열을 발현시키고, 상기 발현 생성물을 회수하고, 상기 전구체 펩타이드를 변형시켜 제1항 또는 제2항에 따른 화합물을 수득함을 포함하는, 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 아실화된 글루카곤 유사체 및, 예를 들면, 비만 및 과체중, 당뇨병, 및 다른 대사 장애의 치료에서 이의 의학적 용도에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 프리-프로글루카곤은 조직에서 별도로 처리되어 다수의 구조적으로 관련된 프로글루카곤-유도된 펩타이드를 형성하는 158 아미노산 전구체 폴리펩타이드이고, 글루카곤(Glu), 글루카곤-유사 펩타이드-1(GLP-1), 글루카곤-유사 펩타이드-2(GLP-2), 및 옥신토모듈린(OXM)을 포함한다. 이들 분자는 포도당 항상성, 인슐린 분비, 위 배출 및 장 성장, 뿐만 아니라 음식 섭취의 조절을 포함하는 광범위한 생리학적 기능에 관여한다.

[0003] 글루카곤은 프리-프로글루카곤의 아미노산 53 내지 81에 상응하는 29-아미노산 펩타이드이다. 옥신토모듈린

(OXM)은 옥타펩타이드 카복시말단 연장을 갖는 글루카곤의 완전한 29 아미노산 서열을 포함하는 37 아미노산 펩타이드이고(프리-프로글루카곤의 아미노산 82 내지 89), "개재(intervening) 펩타이드 1" 또는 IP-1로 명명된다. GLP-1의 주요한 생물학적 활성 단편은 30-아미노산, C-말단 아미드화된 펩타이드로서 생성되고, 이는 프리-프로글루카곤의 아미노산 98 내지 127에 상응한다.

- [0004] 글루카곤은 간세포 상 글루카곤 수용체에 결합함에 의해, 간에서 글리코겐 분해를 통해 - 글리코겐 형태로 저장된 - 포도당을 방출하게 하여 혈당 수준을 유지하는 것을 돕는다. 저장된 것이 고갈되면, 글루카곤은 간을 자극하여 포도당신합성에 의해 추가의 포도당을 합성한다. 이러한 포도당은 혈류 내로 방출되어, 저혈당의 발달을 예방한다.
- [0005] GLP-1은 포도당-자극된 인슐린 분비를 향상시켜 상승된 혈당 수준을 감소시키고, 주로 음식 섭취 감소를 통해 체중 감소를 촉진한다.
- [0006] OXM은 식품 섭취에 반응하여 그리고 식사 칼로리 함량에 비례하여 혈액 내로 방출된다. OXM은 사람에서 식욕을 억제하고 음식 섭취를 저해하는 것으로 나타났다[문헌: Cohen et al, Journal of Endocrinology and Metabolism, 88, 4696-4701, 2003; WO 2003/022304]. GLP-1와 유사한 이러한 식욕억제 효과에 더하여, 옥신토 모듈린으로 치료된 래트가 한쌍-사육(pair-fed) 래트 보다 더 적은 체중 증가를 나타내기 때문에, OXM은 또한 또다른 기전에 의해 틀림없이 체중에 영향을 줄 것이다[참조: Bloom, Endocrinology 2004, 145, 2687]. 비만 설치류의 OXM을 사용한 치료는 또는 이들의 포도당 내성을 향상시키고[참조: Parlevliet et al, Am J Physiol Endocrinol Metab, 294, E142-7, 2008], 체중 증가를 억제한다(참조: WO 2003/022304).
- [0007] OXM은 GLP-1 수용체 보다 글루카곤 수용체에 대한 2-배 더 높은 효능으로 글루카곤 및 GLP-1 수용체 둘 다를 활성화시키지만, 이들 각 수용체에 대한 본래(native) 글루카곤 및 GLP-1 보다 효능이 더 적다. 사람 글루카곤은 또한, GLP-1 수용체 보다 글루카곤 수용체에 대해 강한 선호도를 갖더라도, 수용체 둘 다를 활성화시킬 수 있다. 다른 한편으로, GLP-1은 글루카곤 수용체를 활성화시킬 수 없다. 옥신토모듈린의 작용 기전은 잘 이해되어 있지 않다. 특히, 호르몬의 간위 효과의 일부가 GLP-1 및 글루카곤 수용체를 통해, 또는 하나 이상의 확인되지 않은 수용체를 통해 조정되는지 여부는 공지되어 있지 않다.
- [0008] 다른 펩타이드는 글루카곤 및 GLP-1 수용체 둘 다를 결합하고 활성화시키고[참조: Hjort et al, Journal of Biological Chemistry, 269, 30121-30124, 1994] 체중 증가를 억제하고 음식 섭취를 감소시키는 것으로 나타났다[참조: 예를 들면, WO 2006/134340, WO 2007/100535, WO 2008/10101, WO 2008/152403, WO 2009/155257, WO 2009/155258, WO2010/070252, WO2010/070253, WO2010/070255, WO2010/070251, WO2011/006497, WO2011/160630, WO2011/160633, WO2013/092703, WO2014/041195, PCT/EP2014/072294 및 PCT/EP2014/072293].
- [0009] 비만은 다양한 질환, 특히 심혈관 질환(CVD), 2형 당뇨병, 폐쇄 수면 무호흡, 특정 타입의 암, 및 골관절염에 관련된 세계적으로 증가하는 건강 문제이다. 결과적으로, 비만은 기대 수명을 감소시키는 것으로 밝혀졌다. 세계보건기구의 2005년 예측에 따라서, 전세계적으로 비만으로 분류된 4억명의 성인(연령 > 15)이 존재한다. 미국에서, 비만은 현재 예방가능한 흡연후 사망의 두번째-주요 원인인 것으로 여겨진다.
- [0010] 비만의 증가는 당뇨병의 증가를 유도하고, 2형 당뇨병을 갖는 사람 중 대략 90%가 비만으로 분류될 수 있다. 전세계적으로 당뇨병을 갖는 2억4천6백만 명의 사람이 존재하고, 2025년까지 3억8천만이 당뇨병을 가질 것으로 추정된다. 이들 다수는 높은/비정상 LDL 및 트리글리세라이드 및 저 HDL을 포함하는 추가의 심혈관 위험 인자를 갖는다.

발명의 내용

- [0011] 발명의 요지
- [0012] 본 발명은 하기 화학식을 갖는 화합물 또는 약제학적으로 허용되는 이의 염 또는 용매화물을 제공한다.
- [0013] R^1 -H-Aib-QGTFSTDSYKYLDERAAKDFIEWLE-K([17-카복시-헵타데카노일]-isoGlu-GSGSGG)-A-R²
- [0014] 상기 화학식에서,
- [0015] R¹은 H (수소), C₁₋₄ 알킬, 아세틸, 포밀, 벤조일 또는 트리플루오로아세틸이고;
- [0016] R²는 OH 또는 NH₂이다.

- [0017] 화합물은:
- [0018] H-H-Aib-QGTFTSDYSKYLDERAAKDFIEWLE-K([17-카복시-헵타테카노일]-isoGlu-GSGSGG)-A-NH₂
- [0019] 일 수 있다.
- [0020] 본 발명의 화합물은 글루카곤 유사체인 것으로 고려될 수 있다. 글루카곤 유사체 펩타이드에 대한 본원의 언급은, 문맥상 달리 요구되지 않는 한, 본 발명의 화합물에 대한 언급으로서 간주되어야 한다.
- [0021] 본 발명의 화합물에 대한 언급은, 문맥상 달리 기재되거나 제외되지 않는 한, 임의의 약제학적으로 허용되는 염(예를 들면, 아세테이트 또는 클로라이드 염) 또는 이의 용매화물을 포함하는 것으로 이해하여야 한다.
- [0022] 본 발명은 본원에 정의된 본 발명의 화합물(이미 기재된 바와 같이 이의 약제학적으로 허용되는 염 또는 용매화물을 포함함)을 담체와 혼합하여 포함하는 조성물을 제공한다. 바람직한 양태에서, 조성물은 약제학적 조성물이고, 담체는 약제학적으로 허용되는 담체이다. 화합물은 약제학적으로 허용되는 염의 형태로 존재할 수 있다.
- [0023] 본원에 기재된 화합물은 그 중에서도 체중 증가의 예방 또는 체중 감소의 촉진에서 용도를 발견하다. "예방"은 치료의 부재와 비교하여 저해 또는 감소를 의미하고, 반드시 체중 증가의 완전한 중지를 의미하는 것은 아니다. 펩타이드는 음식 섭취의 감소 및/또는 증가된 에너지 소비를 야기할 수 있고, 체중에 대해 관찰되는 효과를 야기한다. 체중에 영향을 주는 이들 효과와 독립적으로, 본 발명의 화합물은 포도당 조절 및/또는 순환 콜레스테롤 수준에 영향을 주는 유익한 효과를 가질 수 있는데, 순환 LDL 수준을 감소시키고 HDL/LDL 비를 증가시킬 수 있다. 따라서, 본 발명의 화합물은 과체중에 의해 야기되거나 특성규명되는 임의의 상태의 직접적 또는 간접적 요법을 위해, 예를 들면, 비만, 병적 비만, 비만 연계 염증, 비만 연계 당남 질환, 비만 유도된 수면 무호흡의 치료 및/또는 예방을 위해 사용될 수 있다. 이들은 또한 혈당 조절의 개선을 위해, 또는 부적당한 포도당 조절에 의해 야기되거나 특성규명되는 상태 또는 이상지질혈증(예를 들면, 상승된 LDL 수준 또는 감소된 HDL/LDL 비), 당뇨병(특히 2형 당뇨병), 대사 증후군, 고혈압, 죽종형성 이상지질혈증, 죽상동맥경화증, 동맥경화증, 관상동맥 심장 질환, 말초동맥 질환, 뇌졸중 또는 미세혈관 질환의 예방 또는 치료를 위해 사용될 수 있다. 이들 상태의 이러한 효과는 체중에 미치는 효과의 결과일 수 있거나 이와 관련될 수 있거나, 이에 독립적일 수 있다.
- [0024] 본 발명은 또한 의학적 치료 방법에 사용하기 위한, 특히 상기한 상태의 치료 방법에 사용하기 위한 본 발명의 화합물을 제공한다.
- [0025] 본 발명은 또한 상기한 상태를 치료하기 위한 약제의 제조에서의 본 발명의 화합물의 용도를 제공한다.
- [0026] 본 발명의 화합물은 당뇨병, 비만, 이상지질혈증 또는 고혈압 치료제와 함께 병용 요법의 부분으로서 투여될 수 있다.
- [0027] 이러한 경우, 2개의 활성제가 함께 또는 개별적으로, 동일한 약제학적 제형의 부분으로서 또는 개별적인 제형으로서 제공될 수 있다.
- [0028] 따라서, 본 발명의 화합물은, 이에 제한되는 것은 아니지만, 비구아나이드(예를 들면, 메트포르민), 설포닐우레아, 메글리티나이드 또는 글리나이드(예를 들면, 나테글리나이드), DPP-IV 저해제, SGLT2 저해제, 글리타존, GLP-1 수용체 작용제, SGLT2 저해제(즉, 나트륨-포도당 수송의 저해제, 예를 들면, 글리플로진, 예를 들면, 엠파글리플로진, 카나글리플로진, 다파글리플로진 또는 이프라글리플로진), GPR40 작용제(FFAR1/FFA1 작용제, 예를 들면, 파시글리팜), 또는 인슐린 또는 인슐린 유사체를 포함하는, 항-당뇨병 제제와 병용하여 사용될 수 있다.
- [0029] 화합물은 추가로, 이에 제한되는 것은 아니지만, GLP-1 수용체 1 작용제, 펩타이드 YY 또는 이의 유사체, 신경 펩타이드 Y(NPY) 또는 이의 유사체, 칸나비노이드 수용체 1 길항제, 리파제 저해제, 사람 전구체도(proIslet) 펩타이드(HIP), 멜라노코르틴 수용체 4 작용제, 멜라닌 농축 호르몬 수용체 1 길항제, 펜테르민(단독 또는 토피라메이트와 병용), 노르에피네프린/도파민 재흡수 저해제 및 오피오이드 수용체 길항제의 병용물(예를 들면, 부프로피온 및 날트렉손의 병용물), Orlistat™, Sibutramine™, CCK, 아밀린, 프람린타이드 및 렙틴 및 이의 유사체, 또는 세로토닌성 제제(예를 들면, 로르카세린)를 포함하는, 항-비만 제제와 병용하여 사용될 수 있다.
- [0030] 화합물은 추가로, 이에 제한되는 것은 아니지만, 안지오텐신-전환 효소 저해제, 안지오텐신 II 수용체 차단제, 이노제, 베타-차단제, 또는 칼슘 채널 차단제를 포함하는, 항-고혈압 제제와 병용하여 사용될 수 있다.

[0031] 화합물은, 이에 제한되는 것은 아니지만, 스타틴, 피브레이트, 니아신, PSCK9(Proprotein convertase subtilisin/kexin type 9) 저해제 및/또는 콜레스테롤 흡수 저해제를 포함하는, 항-이상지질혈증 제제와 병용하여 사용될 수 있다.

[0032] 따라서, 본 발명은 추가로 본 발명의 화합물 및, 예를 들면, 상기한 항-당뇨병 제제, 항-비만 제제, 항-고혈압 제제 또는 항-이상지질혈증 제제를 포함하는 조성물 또는 치료학적 키트를 제공한다. 의학적 치료 방법에서 사용하기 위한, 특히 상기한 상태의 치료를 위한 이러한 조성물 또는 치료학적 키트가 또한 제공된다.

[0033] 본 발명의 화합물은 합성화학으로 제조될 수 있다. 따라서, 본 발명은 본 발명의 화합물의 합성 방법을 제공한다.

[0034] 본 발명은 또한 재조합 및 합성 방법의 조합으로 이루어질 수 있다. 상기 방법은 전구체 펩타이드 서열을 발현하는 단계, 임의로 이에 따라 생산된 화합물을 정제하는 단계, 및 하나 이상의 아미노산을 첨가하거나 변형시켜 본 발명의 화합물을 제조하는 단계를 포함할 수 있다. 변형의 단계는 Aib 잔기의 도입(예를 들면, 전구체 잔기의 변형에 의해), 잔기 28의 측쇄에서 치환체 [17-카복시-헵타데카노일]-isoGlu-GSGSGG의 도입, 및/또는, 예를 들면, 유리 C-말단에서 아마이드 그룹 R²의 도입에 의해 말단 그룹 R¹ 및 R² 중 하나 또는 둘 다의 변형을 포함할 수 있다.

[0035] 전구체 펩타이드는 이러한 핵산을 포함하는 세포 또는 세포-비함유 발현 시스템에서 전구체 펩타이드를 암호화하는 핵산으로부터 발현될 수 있다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0036] 발명의 상세한 설명

[0037] 본원 명세서에 걸쳐서, 천연 발생 아미노산에 대한 관례적인 한 문자 및 세 문자 코드 뿐만 아니라 다른 아미노산에 대해 일반적으로 허용되는 약어가 사용되고, Aib(α-아미노이소부티르산)을 포함한다.

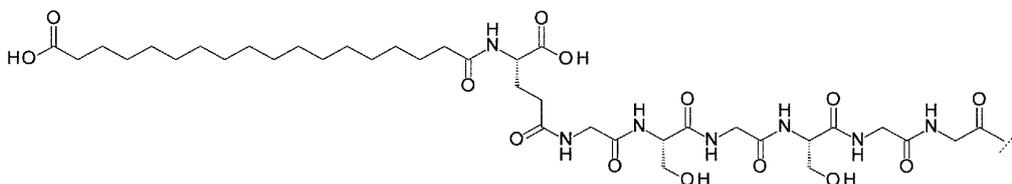
[0038] 글루카곤은 프리-프로글루카곤의 아미노산 53 내지 81에 상응하고 서열 His-Ser-Gln-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Lys-Tyr-Leu-Asp-Ser-Arg-Arg-Ala-Gln-Asp-Phe-Val-Gln-Trp-Leu-Met-Asn-Thr을 갖는 29-아미노산 펩타이드이다. 옥신토모듈린(OXM)은 옥타펩타이드 카복시말단 연장을 갖는 글루카곤의 완전한 29 아미노산 서열을 포함하는 37 아미노산 펩타이드이다(프리-프로글루카곤의 아미노산 82 내지 89, 서열 Lys-Arg-Asn-Arg-Asn-Asn-Ile-Ala를 갖고 "개재 펩타이드 1" 또는 IP-1로 명명되고; 이에 따라, 사람 옥신토모듈린의 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-Ala이다). GLP-1의 주요 생물학적 활성 단편은 30-아미노산, C-말단 아마이드화된 펩타이드로서 생산되고, 프리-프로글루카곤의 아미노산 98 내지 127에 상응한다.

[0039] 따라서, 용어 "본래 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-OH를 갖는 본래 사람 글루카곤을 언급한다.

[0040] 본 발명의 화합물의 선형 서열 내의 아미노산은 관례적인 N-말단에서 C-말단 방향으로 1에서 29로 연속적으로 번호매김되는 것으로 고려될 수 있다. 이에 따라 "위치"에 대한 언급은 본래 사람 글루카곤 및 다른 분자 내 위치에 대해 언급되는 것처럼 해석되어야 한다.

[0041] 위치 28에서 잔기는 아마이드 결합에 의해, 이의 엡실론 아미노 그룹을 통해 친유성 치환체에 공액된 리신 잔기(Lys)이다. 어떠한 특정 이론에 결부시키기를 바라지 않고, 치환체가 혈류 중 혈장 단백질(예를 들면, 알부민)에 결합하고, 이에 따라 본 발명의 화합물을 효소 분해로부터 보호하고, 이에 의해 화합물의 반감기를 향상시키는 것으로 고려된다. 또한 예를 들면, 글루카곤 수용체 및/또는 GLP-1 수용체에 대한 화합물의 효능을 조절할 수 있다.

[0042] 치환체는 하기 구조를 갖는다:



[0043]

- [0044] 치환체는 약어 표기법 [17-카복시-헵타데카노일]-isoGlu-GSGSGG로 본원에 언급된다. 이는 "이소" 배치로 글루탐산 잔기에 의해 결합된, 17-카복시-헵타데카노일 단위 및 서열 글리신-세린-글리신-세린-글리신-글리신을 갖는 헥사펩타이드 스페이스로 구성되는 것(즉, 이의 알파 아미노 그룹을 통해 17-카복시-헵타데카노일 단위에 그리고 이의 감마 카복실 그룹을 통해 헥사펩타이드 스페이스의 N-말단 중점에 결합됨)으로 명목상 고려될 수 있음을 나타낸다.
- [0045] 지방 쇠 말단에서 산 그룹의 존재는, 예를 들면, 반감기 및/또는 평균 체류 시간을 증가시키고, 청소율을 감소시켜 화합물의 약동학적 성질을 향상시키는 것으로 고려된다. 링커는 또한 이들 약동학적 성질에 기여할 수 있다. 하나 초과 아미노산 단위(또는 유사한 크기의 모이어티)를 포함하는 링커는, 단지 하나의 아미노산 단위 등으로 이루어진 것과 비교하여, 약동학적 성질을 개선시킬 수 있다. 이들 성질은 화합물이, 동일한 펩타이드 주쇄를 갖지만 변형이 없거나 또는 다르게 변형된(예를 들면, 극성 그룹이 결핍되고/되거나 더 짧은 링커 모이어티를 갖는 지방족 지방 쇠를 갖는 치환체) 등가 화합물 보다 덜 빈번하게 투여될 수 있게 한다.
- [0046] 용어 "공역된"은 본원에서 하나의 인식가능한 화학적 모이어티를 다른 것에 물리적으로 부착시킴 및 이러한 모이어티 간의 구조적 관계를 기술하는데 사용된다. 이는 임의의 특정한 합성 방법을 의미하기 위해 적용되어서는 안된다.
- [0047] 숙련된 독자는, 예를 들면, 문헌[참조: "Comprehensive Organic Transformations, A Guide to Functional Group Preparations", 2nd edition, Larock, R. C.; Wiley-VCH: New York, 1999]에 열거된 일반적 합성 방법론을 사용하여 커플링 반응을 수행하기 위해 사용할 수 있는 적합한 기술을 잘 알고 있을 것이다. 이러한 변형은 합성 공정 동안 임의의 적합한 스테이지에서 일어날 수 있다.
- [0048] 펩타이드 합성
- [0049] 본 발명의 화합물은 표준 합성 방법, 재조합 발현 시스템, 또는 당해 기술 방법의 임의의 다른 상태에 의해 제조될 수 있다. 따라서, 글루카곤 유사체는, 예를 들면, 하기를 포함하는 방법을 포함하는 다수의 방식으로 합성될 수 있다:
- [0050] (a) 펩타이드를 고체-상 또는 액체-상 방법론을 통해 단계적으로 또는 단편 조립으로 합성하고, 최종 펩타이드 생산물을 단리 및 정제하는 단계; 또는
- [0051] (b) 전구체 펩타이드를 암호화하는 핵산 작제물로부터의 전구체 펩타이드 서열을 발현시키고, 발현 생성물을 회수하고, 전구체 펩타이드를 변형시켜 본 발명의 화합물을 수득하는 단계.
- [0052] 발현은 통상적으로 전구체 펩타이드를 암호화하는 핵산으로부터 수행되고, 이는 이러한 핵산을 포함하는 세포 또는 세포-비함유 발현 시스템에서 수행될 수 있다.
- [0053] 고체-상 또는 액체-상 펩타이드 합성을 통해 본 발명의 유사체를 합성하는 것이 바람직하다. 이러한 맥락에서, WO 98/11125 및, 그 중에서도 문헌[참조: Fields, GB et al., 2002, "Principles and practice of solid-phase peptide synthesis". In: Synthetic Peptides (2nd Edition)], 및 본원의 실시예를 참조한다.
- [0054] 재조합 발현을 위해, 전구체 펩타이드를 암호화하는 핵산 단편은 정상적으로 적합한 벡터(vector)에 삽입되어 클로닝 또는 발현 벡터를 형성할 것이다. 벡터는, 적용 목적 및 타입에 좌우되어, 플라스미드, 파아지, 코스미드, 소형-염색체, 또는 바이러스의 형태일 수 있고, 그러나 또한 단지 특정 세포에서 일시 발현된 네이키드(naked) DNA가 중요한 벡터이다. 바람직한 클로닝 및 발현 벡터(플라스미드 벡터)는 자율적 복제가 가능하고, 이에 의해 후속 클로닝을 위한 고-수준 발현 또는 고-수준 복제의 목적을 위해 높은 카피-수를 가능하게 할 수 있다.
- [0055] 일반적인 개요에서, 발현 벡터는 5'→3' 방향에서 및 작동가능한 결합에서 하기 특징을 포함한다: 핵산 단편의 발현을 구동하는 촉진자, (세포외 상으로 또는, 적합한 경우, 페리플라스마(periplasma) 내로) 분비 가능한 리터 펩타이드를 암호화하는 임의의 핵산 서열, 전구체 펩타이드를 암호화하는 핵산 단편, 및 종료자(terminator)를 암호화하는 임의의 핵산 서열. 이들은 추가의 특징, 예를 들면, 선택가능한 마커 및 복제의 근원을 포함할 수 있다. 생산자 스트레인(producer strains) 또는 세포주에서 발현 벡터로 작동하는 경우, 벡터가 숙주 세포 계통 내로 통합될 수 있는 것이 바람직할 수 있다. 당해 기술 분야의 숙련가는 적합한 벡터에 매우 익숙하고, 이들의 특이 요구사항에 따른 것을 설계할 수 있다.
- [0056] 본 발명의 벡터는 숙주 세포를 변형하여 전구체 펩타이드를 생산하는데 사용된다. 이러한 변형된 세포는 핵산 단편 및 벡터의 전파를 위해 사용된, 및/또는 전구체 펩타이드의 재조합 생성을 위해 사용된 배양된 세포 또는

세포주일 수 있다.

- [0057] 바람직한 변형된 세포는 미생물, 예를 들면, 박테리아[예를 들면, 에스케리키아(*Escherichia*) 종(예를 들면, 이 콜라이(*E. coli*)), 바실러스(*Bacillus*) 종(예를 들면, 바실러스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*)), 살모넬라(*Salmonella*), 또는 미코박테리움(*Mycobacterium*)](바람직하게는 비-병원성, 예를 들면, *M. bovis* BCG), 효모(예를 들면, 사카로마이세스 세레비시애(*Saccharomyces cerevisiae*) 및 피키아 파스토리스(*Pichia pastoris*)), 및 원생동물이다. 대안적으로, 변형된 세포를 다세포 유기체로부터 유도할 수 있고, 즉, 균류 세포, 곤충 세포, 조류 세포, 식물 세포, 또는 동물 세포, 예를 들면, 포유동물 세포일 수 있다. 클로닝 및/또는 최적화된 발현을 위해, 변형된 세포가 본 발명의 핵산 단편을 복제할 수 있는 것이 바람직하다. 핵산 단편을 발현하는 세포는 본 발명의 펩타이드의 소규모 또는 대규모 제조를 위해 사용될 수 있다.
- [0058] 전구체 펩타이드를 변형된 세포에 의해 생산하는 경우, 발현 생성물이 배양 배지 내로 분비되는 것이 필수적이지는 않지만 용이하다.
- [0059] 효능
- [0060] 관련 화합물의 GLP-1 또는 글루카곤(Glu) 수용체로의 결합은 작용제 활성의 표시로서 사용될 수 있지만, 일반적으로 화합물의 관련 수용체로의 결합에 의해 야기되는 세포내 시그널링을 측정하는 생물학적 검정을 사용하는 것이 바람직하다. 예를 들면, 글루카곤 작용제에 의한 글루카곤 수용체의 활성화는 세포 사이클릭 AMP(cAMP) 형성을 자극할 것이다. 유사하게는, GLP-1 작용제에 의한 GLP-1 수용체의 활성화는 세포 cAMP 형성을 자극할 것이다. 따라서, 이들 2개의 수용체 중 하나를 발현하는 적합한 세포 중 cAMP의 생성은 관련 수용체 활성을 모니터링하기 위해 사용될 수 있다. 각각 하나의 수용체를 발현하고 다른 수용체를 발현하지 않는 적합한 쌍의 세포 타입의 사용은, 이에 따라, 둘 다의 타입의 수용체에 대한 작용제 활성을 결정하는데 사용할 수 있다.
- [0061] 당해 기술 분야의 숙련가는 적합한 검정 포맷을 잘 알 수 있을 것이고, 예는 하기에 제공된다. GLP-1 수용체 및/또는 글루카곤 수용체는 예에 기재된 수용체의 서열을 가질 수 있다. 예를 들면, 검정은 주요 등록 번호 GI:4503947을 갖는 사람 글루카곤 수용체(글루카곤-R) 및/또는 주요 등록 번호 GI:166795283을 갖는 사람 글루카곤-유사 펩타이드 1 수용체(GLP-1R)를 이용할 수 있다(전구체 단백질의 서열이 언급되는 경우, 물론 검정에서 시그널 서열이 결핍된 성숙 단백질을 사용할 수 있음을 이해하여야 한다).
- [0062] EC₅₀ 값은 제공된 수용체에서 작용제 효능의 수치 측정값으로서 사용될 수 있다. EC₅₀ 값은 특정 검정에서 화합물의 최대 활성의 반을 성취하는데 요구되는 화합물의 농도의 측정값이다. 따라서, 예를 들면, 특정 검정에서 글루카곤의 EC₅₀ [GLP-1] 보다 낮은 EC₅₀[GLP-1]을 갖는 화합물은 글루카곤 보다 더 높은 GLP-1 수용체 작용제 효능을 갖는 것으로 고려될 수 있다.
- [0063] 본원 명세서에 기재된 화합물은 통상적으로 GluGLP-1 이중 작용제이고, 이는 글루카곤 수용체 및 GLP-1 수용체 둘 다에서 cAMP 형성을 자극할 수 있다는 관찰에 의해 결정되었다. 각 수용체의 자극은 독립적인 검정으로 측정되고 그 후에 서로에 대해 비교할 수 있다.
- [0064] 소정의 화합물에 대하여 GLP-1 수용체에 대한 EC₅₀ 값 (EC₅₀ [GLP-1R])을 글루카곤 수용체에 대한 EC₅₀ 값, (EC₅₀ [글루카곤R])과 비교하여, 상대적인 GLP-1R 선택도를 하기와 같이 계산할 수 있다:
- [0065] 상대적인 GLP-1R 선택도 [화합물] = (EC₅₀ [GLP-1R]) / (EC₅₀ [글루카곤-R])
- [0066] 용어 "EC₅₀"은 통상적으로 특정 수용체에서, 또는 수용체 기능에 대한 특정 마커의 수준에 대해, 최대 유효 농도의 반을 나타내고, 특정 생화학적 맥락에 좌우되어 저해 또는 길항 활성을 언급할 수 있다.
- [0067] 어떠한 특정 이론에 결부시키기를 바라지 않고, 화합물의 상대적인 선택도는, GLP-1 또는 글루카곤 수용체에 대한 이의 효과를, 다른 수용체에 대한 이의 효과와 직접적으로 비교되게 할 수 있다. 예를 들면, 화합물의 상대적인 GLP-1 선택도가 높을 수록, 화합물이 글루카곤 수용체와 비교하여 GLP-1 수용체 상에서 더욱 효율적일 수 있다. 통상적으로 결과를 동일한 종으로부터의 글루카곤 및 GLP-1 수용체, 예를 들면, 사람 글루카곤 및 GLP-1 수용체, 또는 뮤린 글루카곤 및 GLP-1 수용체에 대해 비교한다.
- [0068] 글루카곤-R 작용제 활성의 특정 수준에 대해, 화합물이 글루카곤 보다 더 높은 수준의 GLP-1R 작용제 활성(즉, GLP-1 수용체에서 더 큰 효능)을 나타낼 수 있다는 점에서, 본 발명의 화합물은 사람 글루카곤 보다 더 높은 상대적인 GLP-1R 선택도를 가질 수 있다. 글루카곤 및 GLP-1 수용체에서 특정 화합물의 절대 효능이, 적합한 상

대적인 GLP-1R 선택도가 성취되는 한, 본래 사람 글루카곤 보다 더 높거나, 더 낮거나, 대략적으로 동등할 수 있다는 것을 이해하여야 한다.

- [0069] 그럼에도 불구하고, 본 발명의 화합물은 사람 글루카곤 보다 더 낮은 EC₅₀ [GLP-1R]을 가질 수 있다. 화합물은 글루카곤 보다 더 낮은 EC₅₀[GLP-1-R]을 가질 수 있지만 사람 글루카곤 보다 100-배 미만 더 높은, 사람 글루카곤 보다 50-배 미만 더 높은, 또는 사람 글루카곤 보다 10-배 미만 더 높은 EC₅₀ [글루카곤-R]을 유지할 수 있다.
- [0070] 본 발명의 화합물은 사람 글루카곤의 100-배 미만인 EC₅₀ [글루카곤-R]을 가질 수 있다. 화합물은 사람 글루카곤의 100-배 미만(예를 들면, 50 배 미만)인 EC₅₀ [글루카곤-R]을 가질 수 있고, 사람 글루카곤의 반 미만, 사람 글루카곤의 5분의 1 미만, 사람 글루카곤의 10분의 1 미만, 또는 사람 글루카곤의 100분의 1 미만인, 예를 들면, 글루카곤의 0.01 내지 0.1배, 예를 들면, 사람 글루카곤의 0.01 내지 0.05 배인 EC₅₀ [GLP-1R]을 가질 수 있다.
- [0071] 화합물의 상대적인 GLP-1R 선택도는 0.05 내지 20일 수 있다. 예를 들면, 화합물은 0.05-0.20, 0.1-0.30, 0.2-0.5, 0.3-0.7, 또는 0.5-1.0; 1.0-2.0, 1.5-3.0, 2.0-4.0 또는 2.5-5.0; 또는 0.05-20, 0.075-15, 0.1-10, 0.15-5, 0.75-2.5 또는 0.9-1.1의 상대적인 선택도를 가질 수 있다.
- [0072] 특정 양태에서, 글루카곤-R 또는 GLP-1R에 대한 (예를 들면, 사람 글루카곤 또는 GLP-1 수용체에 대한) 소정의 화합물의 EC₅₀이 1 nM 미만이어야 하는 것이 바람직할 수 있다. 특히, GLP-1R에 대한 (예를 들면, 사람 GLP-1 수용체에 대한) EC₅₀이 1 nM 미만이어야 하는 것이 바람직할 수 있다.
- [0073] 치료학적 용도
- [0074] 본 발명의 화합물은 하기 논의된 바와 같이, 그 중에서도, 비만 및 당뇨병을 포함하는 대사 질환을 위한 매력적인 치료 및/또는 예방 선택을 제공할 수 있다.
- [0075] 당뇨병은 인슐린 분비, 인슐린 작용, 또는 이들 둘 다의 결함이 원인인 고혈당으로 특성구명되는 대사 질환의 그룹을 포함한다. 당뇨병의 급성 징후는 과도한 소변 생성, 결과로 초래되는 보상적 갈증 및 증가된 수분 섭취, 흐린 시야, 설명할 수 없는 체중 감소, 무기력, 및 에너지 대사의 변화를 포함한다. 당뇨병의 만성 고혈당은 다양한 기관, 특히, 눈, 신장, 신경, 심장 및 혈관의 장기적 손상, 기능장애, 및 부전에 관련된다. 당뇨병은 병인론적 특성을 기초로 하여 1형 당뇨병, 2형 당뇨병 및 임신 당뇨병으로 분류된다.
- [0076] 1형 당뇨병은 모든 당뇨병 사건의 5 내지 10%를 차지하고, 인슐린-분비 췌장 β-세포의 자가면역 파괴에 의해 야기된다.
- [0077] 2형 당뇨병은 당뇨병 사건의 90 내지 95%를 차지하고, 일련의 복합적 대사 장애의 결과이다. 2형 당뇨병은 혈장 포도당 수준을 진단 역치(thresholds) 아래로 유지하는데 불충분한 내인성 인슐린 생성의 결과이다.
- [0078] 임신 당뇨병은 임신 동안 확인된 어느 정도의 포도당 불내성을 언급한다.
- [0079] 당뇨병전기는 공복혈당장애 및 내당능장애를 포함하고, 혈당 수준이 상승되는 경우이지만 당뇨병에 대한 임상적 진단이 확립된 수준 아래로 일어나는 상태를 언급한다.
- [0080] 2형 당뇨병 및 당뇨병전기를 갖는 대다수의 사람은, 복부 비만(복부 내부 기관 주변 과잉 지방 조직), 죽종형성 이상지질혈증(고 트리글리세라이드, 저 HDL 콜레스테롤 및/또는 고 LDL 콜레스테롤을 포함하는 혈액 지방 장애, 이는 동맥 벽에서 플라크 증강을 조성함), 상승된 혈압 (고혈압), 혈전유발 상태(예를 들면, 혈액 중 고 피브리노겐 또는 플라스미노겐 활성제 저해제-1), 및 염증유발 상태(예를 들면, 혈액 중 상승된 C-반응 단백질)를 포함하는 추가의 대사 위험 인자가 널리 퍼지기 때문에, 이환율 및 사망률이 증가될 위험에 처한다.
- [0081] 반대로, 비만은 당뇨병전기, 2형 당뇨병 뿐만 아니라, 예를 들면, 특정 타입의 암, 폐쇄 수면 무호흡 및 담낭 질환을 발병할 위험을 증가시킨다.
- [0082] 이상지질혈증은 심혈관 질환에 처할 위험이 증가되는 것과 관련된다. 고밀도 지질단백질(HDL)은 임상적으로 중요한 것인데, 혈장 HDL 농도와 죽상경화성 질환에 처할 위험 사이의 역 상관관계가 존재하기 때문이다. 죽상경화관에 저장되는 콜레스테롤 대부분은 LDL에 기인하고, 이에 따라 상승된 농도의 저밀도 지질단백질(LDL)은 죽상동맥경화증과 근접하게 관련된다. HDL/LDL 비는 특히 죽상동맥경화증 및 관상동맥 죽상동맥경화증에 대한 임

상적 위험 지시자이다.

- [0083] 대사 증후군은 개인에서 대사 위험 인자의 그룹으로 특성규명된다. 이는 복부 비만(복부 내부 기관 주변 과잉 지방 조직), 죽종형성 이상지질혈증(고 트리글리세라이드, 저 HDL 콜레스테롤 및/또는 고 LDL 콜레스테롤을 포함하는 혈액 지방 장애, 이는 동맥 벽에서 플라크 증강을 조성함), 상승된 혈압 (고혈압), 인슐린저항 및 포도당불내성, 혈전유발 상태(예를 들면, 혈액 중 고 피브리노겐 또는 플라스미노겐 활성제 저해제-1), 및 염증유발 상태(예를 들면, 혈액 중 상승된 C-반응 단백질)를 포함한다.
- [0084] 대사 증후군을 갖는 개인은 관상동맥 질환 및 동맥경화증의 다른 소견에 관련된 다른 질환(예를 들면, 뇌졸중 및 말초 혈관 질환)이 증가될 위험이 있다. 이러한 증후군을 위한 우세한 근본 위험 인자는 복부 비만인 것으로 나타난다.
- [0085] 어떠한 특정 이론에 결부시키기를 바라지 않고, 본 발명의 화합물이 사람 글루카곤-수용체 및 사람 GLP1-수용체 둘 다에 대해 이중 작용제로서 작용하고, 본원에서 이중 GluGLP-1 작용제로서 약어로 표시되는 것이 고려된다. 이중 작용제는, 예를 들면, 지방 대사에 대한 글루카곤의 효과를, 예를 들면, 혈당 수준 및 음식 섭취에 대한 GLP-1의 효과와 조합할 수 있다. 따라서, 이들은 과도한 지방 조직의 제거를 가속화시키고, 지속가능한 체중 감소를 유도하고, 혈당 조절을 개선시키는 작용을 할 수 있다. 이중 GluGLP-1 작용제는 또한 심혈관 위험 인자, 예를 들면, 고 콜레스테롤, 고 LDL-콜레스테롤 또는 저 HDL/LDL 콜레스테롤 비를 감소시키는 작용을 할 수 있다.
- [0086] 따라서, 본 발명의 화합물은 이를 필요로 하는 대상자에서 체중 증가의 예방을 위한, 체중 감소를 촉진하기 위한, 과체중을 감소시키기 위한 또는 병적 비만, 뿐만 아니라 이에 제한되는 것은 아니지만, 비만 연계 염증, 비만 연계 당남 질환 및 비만 유도된 수면 무호흡을 포함하는 관련 질환 및 건강 상태를 포함하는 비만을 (예를 들면, 식욕, 섭식(feeding), 음식 섭취, 칼로리 섭취량, 및/또는 에너지 소비의 조절에 의해) 치료하기 위한 약제학적 제제로서 사용될 수 있다.
- [0087] 화합물은 식욕 또는 그렇지 않으면 과도한 섭식(over-feeding)의 부적당한 조절을 특징으로 하는 상태, 예를 들면, 폭식 장애 및 프라더-윌리 증후군을 앓고 있는 대상자에서 체중 감소를 촉진하기 위해 또는 체중 증가를 예방하기 위해 유용할 수 있다.
- [0088] 화합물은 관련 상태 또는 위험 인자, 예를 들면, 당뇨병, 이상지질혈증, 고혈압 및 수면 무호흡을 앓고 있는 대상자에서 체중 감소를 촉진하기 위해 또는 체중 증가를 예방하기 위해 유용할 수 있다.
- [0089] 본 발명의 화합물은 또한 이를 필요로 하는 대상자에서 혈당 조절의 개선을 위해 또는 대사 증후군, 인슐린 저항, 포도당 불내성, 당뇨병진기, 증가된 공복 포도당, 2형 당뇨병, 고혈압, 죽상동맥경화증, 동맥경화증, 관상동맥 심장 질환, 말초동맥 질환 및 뇌졸중을 포함하는 포도당 조절 장애에 의해 야기되거나 이에 관련된 상태의 예방 또는 치료를 위해 사용될 수 있다. 몇몇 이들 상태는 비만에 관련될 수 있다. 그러나, 이들 상태에 미치는 본 발명의 화합물의 효과는 체중에 미치는 효과를 통해 전부 또는 부분적으로 조정될 수 있거나, 이에 독립적일 수 있다.
- [0090] 이중 GluGLP-1 작용제의 상승 효과는 또한 심혈관 위험 인자, 예를 들면, 고 콜레스테롤 및 LDL의 감소를 야기할 수 있고, 이는 체중에 미치는 이의 효과에 완전히 독립적일 수 있다.
- [0091] 따라서, 본 발명은 이를 필요로 하는 개체에서 상기한 상태의 치료에서 본 발명의 화합물의 용도를 제공한다.
- [0092] 본 발명은 또한 의학적 치료 방법에 사용하기 위한, 특히 상기한 상태의 치료 방법에 사용하기 위한 본 발명의 화합물을 제공한다.
- [0093] 본 발명은 또한 상기한 상태의 치료 방법에 사용하기 위한 의약의 제조에서 본 발명의 화합물의 용도를 제공한다.
- [0094] 바람직한 측면에서, 기재된 화합물은 당뇨병, 특히 2형 당뇨병의 치료에 사용될 수 있다.
- [0095] 특정 양태에서, 본 발명은 이를 필요로 하는 개체에서 당뇨병, 특히 2형 당뇨병을 치료하기 위한 화합물의 용도를 포함한다.
- [0096] 적어도 바람직한 측면에서, 기재된 화합물은 체중 증가를 예방하기 위해 또는 체중 감소를 촉진하기 위해 사용될 수 있다.

- [0097] 특정 양태에서, 본 발명은 이를 필요로 하는 개체에서 체중 증가를 예방하기 위한 또는 체중 감소를 촉진하기 위한 화합물의 용도를 포함한다.
- [0098] 특정 양태에서, 본 발명은 과체중에 의해 야기되거나 특성규명되는 상태의 치료, 예를 들면, 이를 필요로 하는 개체에서 비만, 병적 비만, 수술 전 병적 비만, 비만 연계 염증, 비만 연계 당남 질환, 비만 유도된 수면 무호흡, 당뇨병전기, 당뇨병, 특히 2형 당뇨병, 고혈압, 죽종형성 이상지질혈증, 죽상동맥경화증, 동맥경화증, 관상동맥 심장 질환, 말초동맥 질환, 뇌졸중 또는 미세혈관 질환의 치료 및/또는 예방 방법에서 화합물의 용도를 포함한다.
- [0099] 또다른 측면에서, 기재된 화합물은 순환 LDL 수준을 감소시키고/시키거나, HDL/LDL 비를 증가시키는 방법에서 사용될 수 있다.
- [0100] 특정 양태에서, 본 발명은 이를 필요로 하는 개체에서 순환 LDL 수준을 감소시키고/시키거나, HDL/LDL 비를 증가시키는 방법에서 화합물의 용도를 포함한다.
- [0101] 또다른 측면에서, 기재된 화합물은 순환 트리글리세라이드 수준을 감소시키는 방법에서 사용될 수 있다.
- [0102] 약제학적 조성물
- [0103] 본 발명의 화합물은 저장 또는 투여를 위해 제조된 약제학적 조성물로서 제형화될 수 있다. 이러한 조성물은 통상적으로 본 발명의 화합물의 치료학적 유효량을, 적합한 형태로, 약제학적으로 허용되는 담체 중에 포함한다.
- [0104] 본 발명의 화합물의 치료학적 유효량은 투여 경로, 치료될 포유동물의 타입, 및 고려 중인 특정 포유동물의 신체적 특성에 좌우될 것이다. 이러한 양을 결정하기 위한 이들 인자 및 이들 관계는 의학 기술 분야의 숙련된 전문가에게 잘 공지되어 있다. 이러한 양 및 투여 방법은 최적 효능을 성취하기 위해 조정될 수 있고, 체중, 식이, 동시에 투약되는 의약(concurrent medication) 및 의학 기술 분야의 숙련가들에게 잘 공지된 다른 인자에 좌우될 수 있다. 사람 용도를 위해 가장 적합한 용량 크기 및 투약 용법은 본 발명으로 수득되는 결과에 의해 안내받을 수 있고, 적합하게 설계된 임상적 시도에서 확인될 수 있다. 본 발명의 화합물은 사람의 치료를 위해 특히 유용할 수 있다.
- [0105] 효과적인 용량 및 치료 프로토콜은 실험실 동물에서 저 용량을 사용하여 시작하고 이어서 용량을 증가시키면서 효과를 모니터링하고, 용량 용법을 또한 체계적으로 변화시키는 관례적인 수단으로 결정될 수 있다. 임상적 의는 소정의 대상자를 위해 최적 용량을 결정하는 경우 다수의 인자를 고려할 수 있다. 이러한 고려사항은 당해 기술 분야의 숙련가에 공지되어 있다.
- [0106] 용어 "약제학적으로 허용되는 담체"는 표준 약제학적 담체 중 어느 것을 포함한다. 치료학적 용도를 위한 약제학적으로 허용되는 담체는 약제학적 기술 분야에 잘 공지되어 있고, 예를 들면, 문헌[참조: Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co. (A. R. Gennaro edit. 1985)]에 기술되어 있다. 예를 들면, 멸균 식염수 및 포스페이트-완충된 식염수를 약간 산성 또는 생리학적 pH에서 사용할 수 있다. pH 완충제는 포스페이트, 시트레이트, 아세테이트, 트리스/하이드록시메틸)아미노메탄(TRIS), N-트리스(하이드록시메틸)메틸-3-아미노프로판설폰산(TAPS), 암모늄 비카보네이트, 디에탄올아민, 히스티딘, (이는 바람직한 완충제이다), 아르기닌, 리신, 또는 아세테이트 또는 이의 혼합물일 수 있다. 용어는 추가로 사람을 포함하는 동물에서 사용하기 위한 미국 약전(US Pharmacopeia)에 열거된 임의의 제제를 포함한다.
- [0107] 용어 "약제학적으로 허용되는 염"은 본 발명의 화합물의 어느 하나의 염을 언급한다. 염은 약제학적으로 허용되는 염, 예를 들면, 산 부가 염 및 염기 염을 포함한다. 산 부가 염의 예는 하이드로클로라이드 염, 시트레이트 염 및 아세테이트 염을 포함한다. 염기성 염의 예는, 양이온이 알칼리 금속, 예를 들면, 나트륨 및 칼륨, 알칼리 토금속, 예를 들면, 칼슘, 및 암모늄 이온 $+N(R^3)_3(R^4)$ 으로부터 선택되는 경우의 염을 포함하고, 여기서, R^3 및 R^4 는 독립적으로 임의로 치환된 C_{1-6} -알킬, 임의로 치환된 C_{2-6} -알케닐, 임의로 치환된 아릴, 또는 임의로 치환된 헤테로아릴을 지정한다. 약제학적으로 허용되는 염의 다른 예는 문헌에 기재되어 있다[참조: "Remington's Pharmaceutical Sciences", 17th edition. Ed. Alfonso R. Gennaro (Ed.), Mark Publishing Company, Easton, PA, U.S.A., 1985 and more recent editions, and in the Encyclopaedia of Pharmaceutical Technology].
- [0108] "치료"는 유리하거나 목적하는 임상적 결과를 수득하기 위한 접근법이다. 이러한 목적을 위해, 유리하거나 목

적하는 임상적 결과는, 이에 제한되는 것은 아니지만, 증상의 완화, 질환의 정도의 약화, 질환의 안정화된(즉, 악화되지 않는) 상태, 질환 진행의 지연 또는 서행, 질환 상태의 개선 또는 완화, 및 차도(부분적이든 또는 완전하든 상관없이)를, 검출가능하든지 또는 검출불가능하든지 상관없이, 포함한다. "치료"는 또한 치료를 받지 않는 경우 예상되는 생존과 비교하여 연장된 생존을 의미할 수 있다. "치료"는 발병을 예방하거나 장애의 병리를 변경시키려는 의도로 수행되는 개입이다. 따라서, "치료"는 특정 양태에서 치료학적 치료 및 예방적 또는 예방적인 조치 둘 다를 언급한다. 치료를 필요로 하는 것은 장애가 이미 있는 사람 뿐만 아니라 장애가 예방되어야 하는 사람을 포함한다. 치료는 치료의 부재와 비교하여 병리 또는 증상(예를 들면, 체중 증가, 고혈당)의 증가를 저해하거나 감소시킴을 의미하고, 반드시 관련 상태의 완전한 중지를 의미하는 것은 아니다.

[0109] 약제학적 조성물은 단위 투여형(unit dosage form)일 수 있다. 이러한 형태에서, 조성물은 활성 성분의 적합한 양을 포함하는 단위 용량으로 분할된다. 단위 투여형은 패키징된 제제, 제제의 분리된 양을 포함하는 패키징, 예를 들면, 패키징된 정제, 캡슐, 및 바이알 또는 앰플 중 산제일 수 있다. 단위 투여형은 또한 캡슐, 사체, 또는 정제 자체일 수 있거나, 적합한 수의 이들 패키징된 형태 중 어느 것일 수 있다. 단일 용량 주가가능한 형태, 예를 들면, 펜 형태로 제공될 수 있다. 특정 양태에서, 패키징된 형태는 사용 지시서를 갖는 라벨 또는 인서트를 포함한다. 조성물은 임의의 적합한 경로 및 투여 수단을 위해 제형화될 수 있다. 약제학적으로 허용되는 담체 또는 희석제는 경구, 직장내, 비내, 국소(구강 및 설하를 포함함), 질내 또는 비경구(피하, 근육내, 정맥내, 피내, 및 경피를 포함함) 투여에 적합한 제형에서 사용되는 것을 포함한다. 제형은 용이하게 단위 투여형으로 존재할 수 있고, 약학 기술 분야에 잘 공지된 방법 중 어느 것으로 제조될 수 있다.

[0110] 투여의 피하 또는 경피 방식은 본원에 기재된 화합물에 특히 적합할 수 있다.

[0111] 본 발명의 조성물은 추가로, 화합물의 안정성을 추가로 개선하기 위해, 생물학적이용가능성을 증가시키기 위해, 용해도를 증가시키기 위해, 유해 효과를 감소시키기 위해, 당해 기술 분야의 숙련가에게 잘 공지된 시간요법(chronotherapy)을 성취하기 위해, 그리고 환자 순응성을 증가시키기 위해 또는 임의의 조합을 위해, 예를 들면, 공유결합, 소수성 및 정전기 상호작용, 약물 담체, 약물 전달 시스템 및 개선된 약물 전달 시스템을 통해 조합하거나(compound) 부착될 수 있다. 담체, 약물 전달 시스템 및 개선된 약물 전달 시스템의 예는, 이에 제한되는 것은 아니지만, 중합체, 예를 들면, 셀룰로스 및 유도체, 폴리사카라이드, 예를 들면, 텍스트란 및 유도체, 전분 및 유도체, 폴리(비닐 알콜), 아크릴레이트 및 메타크릴레이트 중합체, 폴리락트산 및 폴리글리콜산 및 이의 블록 공-중합체, 폴리에틸렌 글리콜, 담체 단백질, 예를 들면, 알부민, 젤, 예를 들면, 써모겔링(thermogelling) 시스템, 예를 들면, 당해 기술 분야의 숙련가에게 잘 공지된 블록 공-중합체성 시스템, 미셀, 리포솜, 미소구, 나노입자, 액정 및 이의 분산물, L2 상 및 이의 분산물(지질-물 시스템의 상 거동의 기술 분야의 숙련가에게 잘 공지된), 중합체성 미셀, 다중 에멀전, 자가-에멀전화, 자가-미세에멀전화, 사이클로텍스트린 및 이의 유도체, 및 덴드리머를 포함한다.

[0112] 병용 요법

[0113] 본 발명의 화합물 또는 조성물은 비만, 고혈압, 이상지질혈증 또는 당뇨병의 치료제를 사용한 병용 요법의 일부로서 투여될 수 있다.

[0114] 이러한 경우, 2개의 활성제는 함께 또는 개별적으로, 그리고 동일한 약제학적 제형의 부분으로서 또는 개별적인 제형으로서 제공될 수 있다.

[0115] 따라서, 본 발명의 화합물 또는 조성물은 추가로, 이에 제한되는 것은 아니지만, GLP-1(글루카곤-유사 펩타이드 1) 수용체 작용제(예를 들면, 하기 기재된 바와 같음), 펩타이드 YY 또는 이의 유사체, 신경펩타이드 Y(NPY) 또는 이의 유사체, 칸나비노이드 수용체 1 길항제, 리파제 저해제, 사람 전구체도 펩타이드(HIP), 멜라노코르틴 수용체 4 작용제, 멜라닌 농축 호르몬 수용체 1 길항제, 펜테르민(단독 또는 토피라메이트와 병용), 노르에피네프린/도파민 재흡수 저해제 및 오피오이드 수용체 길항제의 병용물(예를 들면, 부프로피온 및 날트렉손의 병용물), Orlistat™, Sibutramine™, CCK, 아밀린, 프람린타이드 및 렙틴, 뿐만 아니라 이의 유사체 또는 세로토닌성 제제(예를 들면, 로르카세린)를 포함하는 항-비만 제제와 병용하여 사용될 수 있다.

[0116] 본 발명의 화합물 또는 조성물은, 이에 제한되는 것은 아니지만, 안지오텐신-전환 효소 저해제, 안지오텐신 II 수용체 차단제, 이노제, 베타-차단제, 또는 칼슘 채널 차단제를 포함하는 항-고혈압 제제와 병용하여 사용될 수 있다.

[0117] 본 발명의 화합물 또는 조성물은, 이에 제한되는 것은 아니지만, 스타틴, 피브레이트, 니아신, PCSK9(Proprotein convertase subtilisin/kexin type 9) 저해제 및/또는 콜레스테롤 흡수 저해제를 포함하는

이상지질혈증 제제와 병용하여 사용될 수 있다.

- [0118] 추가로, 본 발명의 화합물 또는 조성물은, 이에 제한되는 것은 아니지만, 비구아나이드(예를 들면, 메트포르민), 설포닐우레아, 메글리티나이드 또는 글리나이드(예를 들면, 나테글리나이드), DPP-IV 저해제, SGLT2 저해제, 글리타존, GLP-1 수용체 작용제(이는 본 발명의 화합물과 상이함), SGLT2 저해제(즉, 나트륨-포도당 수송의 저해제, 예를 들면, 글리플로진, 예를 들면, 엠과글리플로진, 카나글리플로진, 다과글리플로진 또는 인프라글리플로진), GPR40 작용제(FFAR1/FFA1 작용제, 예를 들면, 파시글리팜), 또는 인슐린 또는 인슐린 유사체를 포함하는 항-당뇨병 제제와 병용하여 사용될 수 있다.
- [0119] GLP-1 수용체 작용제의 예는 GLP-1 및 GLP-1 유사체, 엑센딘-4 및 엑센딘-4 유사체, 리라글루타이드(Saxenda™, Victoza™), 엑세나타이드(Byetta™ 및 Bydureon™), Byetta LAR™, 릅시세나타이드(Lyxumia™), 둘라글루타이드 및 알비글루타이드를 포함한다.
- [0120] 인슐린 유사체의 예는, 이에 제한되는 것은 아니지만, Lantus™, Novorapid™, Humalog™, Novomix™, Actraphane™ HM, Levemir™ Degludec™ 및 Apidra™를 포함한다.
- [0121] 실시예
- [0122] 실시예 1: 글루카곤 유사체의 일반 합성
- [0123] 고체상 펩타이드 합성(SPPS)을 폴리스티렌 수지(TentaGel S Ram) 상 NMP에서 표준 Fmoc 계획을 사용하는 마이크로파 보조 합성기에서 수행하였다. HATU를 염기로서 DIPEA와 함께 커플링 시약으로서 사용하였다. 피페리딘(NMP 중 20%)을 탈보호를 위해 사용하였다. 슈도프롤린: Fmoc-Phe-Thr(psiMe, Mepro)-OH(NovaBiochem에서 구입)를 적용가능한 것으로 사용하였다.
- [0124] 사용되는 약어는 다음과 같다:
- [0125] Boc: 3급-부틸옥시카보닐
- [0126] ivDde: 1-(4,4-디메틸-2,6-디옥소사이클로헥실리덴)3-메틸-부틸
- [0127] Dde: 1-(4,4-디메틸-2,6-디옥소사이클로헥실리덴)-에틸
- [0128] DCM: 디클로로메탄
- [0129] DMF: N,N-디메틸포름아미드
- [0130] DIPEA: 디이소프로필에틸아민
- [0131] EDT: 1,2-에탄디티올
- [0132] EtOH: 에탄올
- [0133] Et₂O: 디에틸 에테르
- [0134] HATU: N-[(디메틸아미노)-1H-1,2,3-트리아졸[4,5-b]피리딘-1-일메틸렌]-N-메틸메탄아미늄 헥사플루오로포스페이트 N-옥사이드
- [0135] MeCN: 아세토니트릴
- [0136] NMP: N-메틸피롤리돈
- [0137] TFA: 트리플루오로아세트산
- [0138] TIS: 트라이소프로필실란
- [0139] 개열:
- [0140] 조 펩타이드를 수지로부터 95/2.5/2.5 % (v/v) TFA/TIS/물로 실온에서(r.t.) 2시간 동안 처리하여 개열하였다. 대부분의 TFA를 감압에서 제거하고, 조 펩타이드를 침전시키고, 디에틸에테르로 세척하고, 주위 온도에서 일정 중량으로 건조되게 하였다.
- [0141] 화합물 1:

- [0142] H-H-Aib-QGTFTSDYSKYLDERAAKDFIEWLE-K ([17-카복시-헵타데카노일]-isoGlu-GSGSGG)-A-NH₂
- [0143] 세마글루타이드 및 리라글루타이드를 참조 화합물로서 사용하였다.
- [0144] 실시예 2: 글루카곤 수용체 및 GLP-1-수용체 효능 검정
- [0145] 사람 글루카곤 수용체(글루카곤-R)(주요 등록 번호 P47871) 또는 사람 글루카곤-유사 펩타이드 1 수용체(GLP-1R)(주요 등록 번호 P43220) 중 어느 하나를 암호화하는 cDNA를 합성하고 Zeocin 저항 마커를 포함하는 포유동물 발현 벡터 내로 클로닝하였다.
- [0146] 글루카곤-R 또는 GLP-1-R을 암호화하는 포유동물 발현 벡터를 중국 햄스터 난소(CHO) 세포 내로 Attractene 방법으로 형질감염시켰다. 안정하게 발현하는 클론을 선택함에 대해 저항하는 제한된 세포 희석에서 Zeocin 선택(250 µg/mL)에 의해 획득하였다. 글루카곤-R 및 GLP-1-R 세포 클론 발현을 선택하고, 증식시키고, 하기한 글루카곤-R 및 GLP-1-R 효능 검정에서 시험하였다. 하나의 글루카곤-R 발현 클론 및 하나의 GLP-1-R 발현 클론을 화합물 프로파일링을 위해 선택하였다.
- [0147] 사람 글루카곤-R, 또는 사람 GLP-1-R을 발현하는 CHO 세포를, 검정 전 24시간에 384-웰 미세역가 플레이트에서 웰당 5000 세포로 50 µl 성장 배지 중 배양하여 시딩하였다. 분석일에, 성장 배지를 제거하고, 세포를 100 µl의 검정 완충제(Krebs-Ringer-buffer; KRBH)로 한번 세척하였다. 완충제를 제거하고, 세포를 15분 동안 실온에서 시험 펩타이드의 증가하는 농도를 포함하는 탈이온수 중 0.1 mM IBMX를 사용하는 10 µl KRBH(KRBH + 10 mM HEPES, 5 mM NaHCO₃, 0.1 % (V/V) BSA)에서 인큐베이션하였다. 반응물을 용해 완충제(0.1 % w/v BSA, 5 mM HEPES, 0.3 % v/v Tween-20)를 첨가하여 중지하였다. 실온에서 10분 동안 세포 용해 후, AlphaScreen™ cAMP 기능 검정 키트에 포함된 10 µl의 언셉터(acceptor)/도너 비드(donor bead) 혼합물을 첨가하였다. 실온에서 암실에서 2시간 인큐베이션 후, cAMP 함량을 제조자 지침에 따라서 AlphaScreen™ cAMP 기능 검정 키트(제조원: Perkin-Elmer)를 적용하여 결정하였다. 참조 화합물(글루카곤 및 GLP-1)과 비교한 EC₅₀ 및 상대적인 효능을 컴퓨터 보조 곡선 피팅을 적용하여 계산하였다. GLP-1/글루카곤 비를 앞에서 정의한 대로 계산한다. 표 1을 참조한다.

표 1

화합물	EC50 hGCGR CHO-K1 [nM]	EC50 hGLP-1R CHO-K1 [nM]	비 GLP-1/ 글루카곤
1	3.6 nM	0.48 nM	0.13

- [0148]
- [0149] 실시예 3: 내인성 GLP-1 수용체에 대한 작용 활성
- [0150] 내인성 GLP-1 수용체에 대한 시험 화합물의 작용 활성을 무린 인슐린종 세포주를 사용하여 결정하였다. 세포내 cAMP를 수용체 활성화의 지시자로서 사용하였다.
- [0151] 세포를 24시간 동안 10,000 세포/웰의 밀도로 384-웰 플레이트에서 배양하였다. 배지를 제거하고, 시험 화합물 또는 GLP-1(0.1 pM에서 100 nM로 증가하는 농도로) 또는 용매 대조군(0.1% (v/v) DMSO)을 포함하는 10 µL KRBH 완충제(NaCl 130 mM, KCl 3.6 mM, NaH₂PO₄ 0.5 mM, MgSO₄ 0.5 mM, CaCl₂ 1.5 mM)를 웰에 15분 동안 26°C의 온도에서 첨가하였다.
- [0152] 세포 cAMP 함량을 AlphaScreen cAMP 기능 검정 키트(Perkin Elmer)를 사용하여 측정한다. 측정을 Envision(PerkinElmer)를 사용하여 제조사의 추천에 따라 수행하였다.
- [0153] 결과를 0.1% (v/v) DMSO를 포함하는 KRBH 완충제 중에 제조된 cAMP 표준 곡선을 사용하여 cAMP 농도로 전환시켰다. 획득한 cAMP 곡선을 log(시험 화합물 농도)에 대해 절대 cAMP 농도(nM)로서 플롯팅하고, 곡선 피팅 프로그램 XLfit를 사용하여 분석하였다.
- [0154] EC₅₀을 cAMP 수준의 최대 상승의 반을 야기하는 시험 화합물의 농도로서 계산하고, 시험 화합물의 효능을 반영하

였다. 표 2를 참조한다.

표 2

화합물	EC50 [nM]
1	0.54 nM

[0155]

[0156]

실시예 4: 내인성 글루카곤 수용체에 대한 작용 활성

[0157]

내인성 글루카곤 수용체에 대한 시험 화합물의 작용 활성을 주요 래트 간세포에서 글리코겐 합성의 속도에 미치는 이들의 영향을 측정하여 결정하였다. 글루카곤 수용체의 활성화시, 글리코겐 합성 속도의 저해가 예상된다. 글리코겐 합성의 속도를 한정된 시간 기간 동안 세포 글리코겐 저장소 내에 도입된 방사능 표지된 포도당의 양을 계수하여 결정하였다.

[0158]

주요 래트 간세포를 24-웰 플레이트에서 24시간 동안 37°C 및 5% CO₂에서 40,000 세포/웰의 밀도로 배양하였다.

[0159]

배지를 폐기하고, 세포를 PBS로 세척하였다. 이어서, 0.1% BSA 및 22.5 mM 농도의 포도당을 포함하는 180 µL의 KRBH-기반 완충제를 웰에 첨가하고, 이어서, 시험 화합물 및 40 µCi/ml D-[U¹⁴C] 포도당(각각 20 µL)을 첨가하였다. 인큐베이션을 3시간 동안 계속하였다.

[0160]

인큐베이션 기간의 종점에서, 인큐베이션 완충제를 흡인하고, 세포를, 인큐베이션으로 30분 동안 실온에서 100 µL 1 mol/l NaOH로 용해하기 전에, 빙냉 PBS로 1회 세척하였다.

[0161]

세포 용해물을 96-웰 필터 플레이트로 옮기고, 글리코겐을 필터-플레이트를 120분 동안 4°C에서 인큐베이션하고, 이어서, 필터 플레이트를 빙-냉 에탄올(70%)로 4회 세척하여 침전시켰다. 수득한 침전물을 여과 건조시키고, 도입된 ¹⁴C-포도당의 양을 제조사의 추천에 따라 Topcount 신틸레이션 계수기를 사용하여 결정하였다.

[0162]

비히클 대조군(KRBH 완충제 중 0.1% (v/v) DMSO)을 갖는 웰을 비-저해된 글리코겐 합성(100 %CTL)에 대한 참조로서 포함하였다. 첨가된 D-[U¹⁴C] 포도당이 없는 웰을 비-특이 배경 시그널(모든 값으로부터 공제됨)에 대한 대조군으로서 포함하였다. 내인성 글루카곤 펩타이드를 포지티브 대조군으로서 사용하였다.

[0163]

모든 치료를 적어도 이중으로 수행하였다.

[0164]

내인성 글루카곤 수용체에 대한 각 시험 화합물의 효능 뿐만 아니라 작용 활성 둘 다를 기재하기 위해 계산되는 파라미터는 pEC₅₀ 및 %CTL이다.

[0165]

%CTL을 배경 CPM/웰을 공제한 후 비히클 대조군의 CPM/웰과 비교하여 시험 화합물의 존재하에 CPM/웰의 퍼센트를 계산하여 결정하였다:

[0166]

$$[\text{CPM/웰(기저)} - \text{CPM/웰(샘플)}] * 100 / [\text{CPM/웰(기저)} - \text{CPM/웰(대조군)}]$$

[0167]

글루카곤 수용체의 활성제는 글리코겐 합성 속도의 저해를 야기할 것이고, 0%CTL(완전한 저해) 및 100%CTL(관찰 가능한 저해 없음) 사이의 %CTL 값을 제공할 것이다.

[0168]

수득한 활성 곡선을 log(시험 화합물 농도)에 대한 절대 계수(단위: cpm/샘플)로서 플롯팅하고, 곡선 피팅 프로그램 Xlfit를 사용하여 분석하였다.

[0169]

EC₅₀을 시험 화합물의 효능의 측정치로서 계산하고, 표 3에 나타내었다.

표 3

화합물	EC50 [nM]
1	5.6 nM

[0170]

[0171] GLP-1R 활성화에 관련되어 인용된 용어 EC₅₀ 및 pEC₅₀은 글리코젠 합성과 관련하여 IC₅₀ 및 pIC₅₀로서 동일하게 간주될 수 있다.

[0172] 실시예 5: 약동학적 파라미터의 추정

[0173] 시험 화합물의 약동학적 파라미터를 Han/Wistar 래트에게 정맥내 투여 후 결정하였다. 아실화된 GLP-1 유사체 세마글루타이드를 또한 비교 목적으로 시험하였다.

[0174] 시험 설비에서 출발시점에 대략 180 내지 210g으로 칭량되는 수컷 위스타 래트를 Charles River(Germany)로부터 입수하였다. 래트를 유럽 표준 래트 케이지 타입 IV에 12-시간 암흑 및 12-시간 빛의 광주기로 케이지에 넣었다. 연구 동안 래트를 표준 래트 케이지 타입 III에 수용하였다. 식이 Altromin 1324(Altromin, Germany) 및 물 둘 다를 전체 실험 기간 동안 자유롭게 투여하였다. 동물을 적합한 적응을 보장하기 위해 시험 설비에서 적어도 4일 동안 수용하였다.

[0175] 화합물을 먼저 0.1% 수성 암모니아에 2 mg/ml의 공칭 농도로 용해시키고, 이어서, 목적하는 용량 강도(dosing strength)(10 μM)로 25 mM 포스페이트 완충제, pH 7.4 함유 멸균 PBS 중에 희석하였다. 20 nmol/kg에 상응하는 정맥내 주사를 측부 꼬리 정맥을 통해 제공하였다.

[0176] 혈액 샘플(200 μl)을 투약 후 0.08, 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 8, 24, 32 및 48시간 시점에서 안와주위 신경얼기(plexus)로부터 K₂EDTA 관 내로 수집하고, 5분 동안 4°C에서 샘플링 20분 이내에 원심분리하였다. 혈장 샘플(>100 μl)을 96-웰 PCR 플레이트로 옮기고, 즉시 냉동시키고, 각 GLP-1-글루카곤 화합물에 대해 혈장 농도를 LC-MS/MS를 사용하여 분석할 때까지 -20°C에서 유지하였다. 개별적 혈장 농도-시간 프로파일을 비-구획 접근법으로 ToxKin™ 버전 3.2(Unilog IT Services)를 사용하여 분석하고, 수득한 약동학적 파라미터를 결정하였다. 표 4를 참조한다.

표 4

화합물	청소율 (ml/min/kg)	말단 반감기 (h)	평균 체류 시간 (h)
1	0.09	15.2	19.2
세마글루타이드	0.10	9.0	11.4

[0177]

[0178] 실시예 6: 경구포도당부하 시험

[0179] 혈당 조절에 대한 시험 화합물의 효과를 7 내지 8주령 수컷 C57BL6/J 마우스(Charles River Laboratories, Germany)로부터 입수)에서 경구포도당부하 시험(OGTT)에 의해 결정하였다. 동물을 개별적으로 환기된 케이지(Tecniplast green line)에 12-시간 광 주기로 그룹으로 수용하였다. 이들은 자유롭게 표준 설치류 식이(Provimi Kliba 3438) 및 물에 접근하였다. 동물을 시험 설비에 OGTT 전 적어도 1주일 동안 수용하였다. 실험 동물 사용에 관한 모든 실험 프로토콜은 연방 윤리 위원회(federal Ethics Committee)에 의해 검토되고, 정부 당국에 의해 승인되었다.

[0180] 화합물을 먼저 0.1% 수성 암모니아에 2 mg/ml의 공칭 농도로 용해시키고, 이어서, 25 mM 포스페이트 완충제, pH 7.4 함유 멸균 PBS에 목적하는 용량 강도로 희석하였다. 화합물을 아침에 피하 주사로 30 nmol/kg의 용량 및 5 ml/kg의 용적으로 투여하였다. 대조군 동물은 비히클 주사만 투여받았다. GLP-1 유사체 리라글루타이드를 비교 목적을 위해 시험하였다. 그룹 크기는 그룹당 5마리 동물이었다.

[0181] OGTT를 화합물 투여 후 24시간 또는 48시간에 수행하였다. 동물을 OGTT 전 10시간 동안 절식시키고, 그러나, 여전히 물에 자유롭게 접근하였다. 밤새 절식 후, 기준선 혈액 샘플(0 min)을 꼬리 채혈로 획득하고, 혈당을 혈당측정기로 측정하였다. 이어서, 동물을 위관영양(5 ml/kg)으로 용액으로 제공된 경우 포도당 부하(2 g/kg)로 시험하였다. 포도당 측정을 위한 추가의 혈액 샘플을 포도당 부하 후 연속 시간 지점(15, 30, 60, 90, 및 120분) 후 꼬리 채혈로 획득하였다.

[0182] 포도당 변동폭(Glucose excursion)을 0분 내지 120분 사이의 혈당-시간 전체 곡선하 면적(AUC)을 계산하여 정량화하였다. AUC의 계산을 기준선 보정 없이 사다리꼴 공식에 의해 수행하였다. 데이터를 대조군의 평균 %(%CTL)로서 표현한다. 100 %CTL의 값은 관찰가능한 효과가 없음을 지시하고, 100 %CTL 미만의 통계적으로 유의한 값은 포도당 내성의 개선을 나타낸다. 표 5를 참조한다.

표 5

	OGTT AUC 30 nmol/kg [%CTL]	
	24 h	48 h
화합물 1	56	74
리라글루타이드	73	

[0183]

서열 목록

SEQUENCE LISTING

- <110> ZEALAND PHARMA A/S
BOEHRINGER INGELHEIM INTERNATIONAL GMBH
- <120> ACYLATED GLUCAGON ANALOGUE
- <130> GRF/FP7192412
- <150> EP 15163903.6
- <151> 2015-04-16
- <160> 5
- <170> KopatentIn 1.71
- <210> 1
- <211> 29
- <212> PRT
- <213> Artificial sequence
- <220><223> Synthetic compound
- <220><221> MOD_RES
- <222> (2)..(2)
- <223> Aib
- <220><221> SITE

<222> (28)..(28)

<223> Lys([17-Carboxy-heptadecanoyl]-isoGlu-GSGSGG)

<400> 1

His Ala 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 Glu Lys Ala

 20 25

<210> 2

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic hexapeptide spacer

<400> 2

Gly Ser Gly Ser Gly Gly

1 5

<210> 3

<211> 29

<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

 20 25

<210> 4

<211> 8

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 4

Lys Arg Asn Arg Asn Asn Ile Ala

1 5

<210> 5

<211> 37

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 5

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