

(19)대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(51) Int. Cl.⁷
A61K 31/425
A61P 3/10

(11) 공개번호 10-2005-0104428
(43) 공개일자 2005년11월02일

(21) 출원번호 10-2005-7019835(분할)
(22) 출원일자 2005년10월18일
(62) 원출원 특허10-1998-0707018
원출원일자 : 1998년09월07일 심사청구일자 2001년04월09일
번역문 제출일자 2005년10월18일
(86) 국제출원번호 PCT/DE1997/000820 (87) 국제공개번호 WO 97/40832
국제출원일자 1997년04월24일 국제공개일자 1997년11월06일

(30) 우선권주장 196 16 486.9 1996년04월25일 독일(DE)

(71) 출원인 프로비오드루크 아게
독일연방공화국, 데-06120 할레/잘레 바인베르크베크 23

(72) 발명자 데무트 한스-올리히
독일연방공화국, 데-06114 할레, 헤겔슈트라세 14
로쉴 프레트
독일연방공화국, 데-06184 디스카우, 벤도르퍼 슈트라세 18아
슈미트 외른
독일연방공화국, 데-06114 할레, 아헨도르프슈트라세 2
폴리 로버트 피.
캐나다, 브리티쉬 콜롬비아 브이6티 2비8, 벤쿠버, 페어뷰크레센트 2631
미친토쉬 크리스토퍼 에이치. 에스
캐나다, 브리티쉬 콜롬비아 브이6티 1티7, 벤쿠버, 알리슨 로드605-2233
피데르스 레이 에이.
캐나다, 브리티쉬 콜롬비아 브이6에스 1케이9, 벤쿠버, 웨스트23번가 3876

(74) 대리인 이원희

심사청구 : 있음

(54) 포유류에서 혈당을 낮추는데 효과가 있는 이가펩티드성펩티다제의 활성억제제의 용도

요약

본 발명의 목적은 혈당을 낮추는 새로운 방법에 관한 것으로서, 효소 효과물질에 의해 유도된 포유류의 혈액에서 이가펩티드성 펩티다아제(DP IV 또는 CD 26) 또는 DP IV-유사 효소 활성을 감소시켜 내생 또는(외부에서 투여한) 항인슐린성

펩티드(인크리틴), 위장 저해성 폴리펩티드/포도당 의존성 펩티드 1-42(GIP₁₋₄₂)와 글루카곤-유사 펩티드-1 7-36(GLP-1₇₋₃₆)(또는 이들 펩티드 유사체)의 분해를 감소시킨다. DP IV 또는 DP IV-유사 효소에 의해 분해된 이와 같은 펩티드 또는 이들 유사체의 농도가 감소되는 것이 줄거나 지연된다.

내생 또는 외부에서 투여된 인크리틴 또는 이들의 유사체의 안정성이 DP IV 활성이 감소함에 따라 증가되어 이들의 항인슐린성 효과가 강화되고, 따라서 췌장 랑게르한스섬으로부터 인슐린 분비를 자극하고 혈액으로부터 포도당을 더욱 신속하게 제거할 수 있다. 결과적으로 포도당 내성이 개선된다.

결과적으로 탄수화물과 지질 대사의 이상, 당뇨, 심각한 대사 산성증 및 장시간 순환계 혈당 수준을 상승시키는 미세혈관 및 거대혈관 질환과 다발신경병과 같은 만성 변화 등을 포함하는 진성 당뇨병과 연관된 대사 이상을 예방하거나 줄일 수 있다.

본 발명은 상승된 혈당 수준을 낮추는 새로운 방법에 관계하는데, 이는 간단하고, 상업적으로 이용할 수 있고, 사람 질환 특히, 상승된 또는 정상이 아닌 혈당 수준으로 인한 질병의 치료요법에 적절히 이용될 수 있다.

대표도

도 1

명세서

도면의 간단한 설명

도 1은 이소루이실 티아졸리디드(a)에 의해 GIP1-42(b)와 GLP-17-36의 DP IV 촉매한 가수분해와 이들의 방해를 MALDI-TOF 분석을 나타낸다.

도 2는 생체 내 조건에서 DP IV 활성 억제제인 이소루이실 티아졸리디드 유무 하에 GLP-1 대사물질이 혈청에 존재하는지를 HPLC 분석한 결과를 나타낸다.

도 3은 i.d. 투여된 포도당에 의해 자극을 받은 쥐에서 여러 가지 혈액변수에 대해 DP IV 활성 억제제인 이소루이실 티아졸리디드의 영향을 나타내었다.

발명의 상세한 설명

발명의 목적

발명이 속하는 기술 및 그 분야의 종래기술

본 발명은 효소 이가펩티드성 펩티다아제 IV의 효소활성과 동일한 또는 유사한 효소의 활성을 낮추는 효과물질(기질, 가상기질, 활성 억제제, 결합 단백질, 항체 등의)을 이용하여 순환계 혈당 농도를 낮추는 신규한 방법에 관한 것이다.

비-특이적 단백질분해에 관련된 프로테아제 이외에도, 내생 펩티드의 기능상의 조절(활성화작용, 비활성화작용 또는 조절)에 관계하는 단백질의 특정 분해에 관여하는 프로테아제는 공지되어 있다(Kirschke, H., Langner, J., Riemann, S., Wiederanders, B., Ansorge, S. and Bohley, P., Lysosomal cysteine proteases, Experpta Medica(Ciba Foundation Symposium 75), 15(1980); Krausslich, H.G., Wimmer, E., Viral Proteinases. Ann. Rev. Biochem. 57, 701(1987)).

신경 펩티드 연구 결과로 이와 같은 전이효소, 단일 펩티다아제 또는 엔케팔리나아제(enkephalinases)등이 면역계에서 발견되었다(Gomez, S., Gluschkof, P., Lepage, A., Marrakchi, N. and Cohen, P., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85, 5468(1988); Ansorge, S., and Schon, E., Histochem 82, 41(1987)).

상당수의 펩티드 호르몬에 비정상적으로 많은 아미노산인 프롤린은 이와 같은 펩티드의 특정 구조를 결정하기 때문에, 프롤린-특이적인 펩티다아제는 생물학적으로 활성이 있는 펩티드의 조절에 시그널 펩티다아제에 유사한 기능을 가지는 것인지에 대해 논의 되었다(Yaron, A., The Role of Proline in the Proteolytic Regulation of Biologically Active

Peptides. Biopolymers 26, 215(1987); Walter, R., Simmons, W.H. and Yoshimoto, T., Proline Specific Endo- and Exopeptidases, Mol. Cell. Biochem. 30, 111(1980); Vanhoff, G., Goossens, F., De Meester, I., Hendriks, D. and Scharpe, S., Proline motifs and their biological processing. FASEB Journal 9, 736(1995)). 이와 같은 예외적인 구조 때문에, 프롤린은 비-특이적인 프로테아제로 인한 분해를 막아줌으로써 이와 같은 펩티드의 구조와 안정성을 결정한다 (Kessler, H., Conformation and biological activity. Angew. Chem. 94, 509 (1982)). 대조적으로 프롤린을 포함하는 서열에 매우 특이적인 작용을 할 수 있는 효소(HIV-프로테아제, 사이클로필린을 포함하는)는 약품 화학 분야에서 매우 관심을 끄는 부분이다. 특히, 프롤린 엔도펩티다아제(PEP)와 이가펩티드성 펩티다아제 IV(DP IV)와 같은 추후 프롤린을 절단하는 펩티다아제의 활성은 천연 펩티드 기질의 생물학적 활성을 조절하고 이와 같은 효소에 의해 선택적으로 절단되는 활성에 연관된다. PEP는 기억과 학습에 관여하고, DP IV는 면역 반응 동안에 시그널 변환에 관계하는 것으로 보인다 (Ishiura, S., Tsukahara, T., Tabira, T., Shimizu, T., Arahata K. and Sugita, H. FEBS-Letters 260, 131(1990); Hegen, M., Niedobitek, G., Klein, C.E., Stein, H. and Fleischer, B., J. of Immunology 144, 2908(1990)).

이들의 높은 프롤린 특이성에 더하여, 이와 같은 효소는 전형적인 기질에 알라닌 아미노산을 포함하는 펩티드 결합을 선택적으로 인지하여 절단할 수 있다. 현재, 알라닌을 포함하는 펩티드가 구조적으로 연관된 프롤린을 포함하는 펩티드와 유사한 구조를 채택하고 있는 지에 대해 의견이 분분하다. 최근에, 이와 같은 성질은 단백질에서 프롤린과 알라닌의 교환과 연관된 점 돌연변이 실험으로 설명하고 있다(Dodge, R.W., and Scheraga, H.A., Folding and unfolding kinetics of the proline-to-alanine mutants of bovine pancreatic ribonuclease A. Biochemistry 35(5) 1548(1996)).

순환계에 있는 DP IV 또는 DP IV 유사 효소(가령, 세포질성 DP II는 DP IV와 동일한 기질 특이성을 보유함)은 펩티드 기질의 N-말단에 있는 두 번째에 프롤린 또는 알라닌이 위치한 생물학적으로 활성이 있는 펩티드의 N-말단으로부터 이가펩티드를 매우 특이적으로 절단한다. 그러므로, 이 효소는 생체에서 폴리펩티드 활성을 조절하는데 관여한다는 결론을 얻었다(Vanhoff, G., Goossens, F., De Meester, I., Hendriks, D. and Scharpe, S., Proline motifs and their biological processing, FASEB Journal 9, 736(1995)).

포도당-의존성 항인슐린성 폴리펩티드(인크리틴)인 위장 방해성 폴리펩티드 1-42(GIP1-42) 및 글루카곤-유사 펩티드 아미드-1 7-36(GLP-17-36)은 췌장으로부터 포도당에 의해 유도된 인슐린 분비를 강화시키는 호르몬이고, DP IV의 기질이다. 효소는 시험관 내 조건(*in vitro*) 및 생체 내 조건(*in vivo*)에서 이들 펩티드의 N-말단으로부터 이가펩티드 형태의 티로시닐-알라닌 및 히스티딜-알라닌을 절단한다(Mentlein, R., Gallwitz, B., and Schmidt, W.E., 이가펩티드성 펩티다아제 IV는 위장 방해성 폴리펩티드, 글루카곤-유사 펩티드-1(7-36), 펩티드 히스티딘 메티오닌을 가수분해하고, 사람 혈청에서 이들의 분해를 맡고 있다. Eur. J. Biochem. 214, 829(1993)).

생체 내 조건에서 DP IV 또는 DP IV 유사 효소에 의해 이와 같은 기질의 분해를 감소시킴으로써 실험적인 조건 및 포유류에서의 병리학적인 상태에서의 부적절한 효소 활성을 억제할 수 있다(Demuth, H.-U., Recent Developments in the irreversible inhibition of serine and cysteine proteases. J. Enzyme Inhibition 3, 249-278(1990); Demuth, H.-U. and Heins, J., On the catalytic Mechanism of Dipeptidyl Peptidase IV. in Dipeptidyl Peptidase IV(CD 26) in Metabolism and the Immune Response(B. Fleischer, Ed) R.G. Landes, Biomedical Publishers, Georgetown, 1-35(1995)). 예를 들어, 인슐린과 무관한 진성 당뇨병은 우세한 포도당 농도에 부적절한 인슐린 분비와 인슐린 저항성과 연관되고, 이는 순환하는 인크리틴(incrétins)의 농도에서 프로테아제에 의해 증가된 이상에 부분적으로 관련이 있다(Brown, J.C., Dahl, M., Kwark, S., McIntosh, C.H.S., Otte, S.C. and Pederson, R.A. Peptides 2, 241(1981); Schmidt, W.E., Siegel, E.G., Gallwitz, B. Kummel, H., Ebert, R. and Creutzfeldt, W., 위장 저해성 폴리펩티드로부터 유도된 단편의 항인슐린성 활성의 특징. Diabetologia 29, 591A(1986); Adelhorst, K., Hedegaard, B.B., Knudsen, L.B. and Kirk, O., 글루카곤-유사 펩티드의 구조-활성 연구. J. Biol. Chem. 269, 6275(1994)).

인슐린 의존성 진성 당뇨병(IDDM)은 현재 여러 가지 형태의 인슐린(소 또는 돼지 췌장에서 분리하거나 재조합 분자로 생산함)을 환자에 투여하여 치료한다. 인슐린과 무관한 진성 당뇨병(NIDDM)은 식이요법, 인슐린 분비를 자극하는 설포닐우레아를 투여하거나 포도당 흡수율을 증가시키는 비구아니드(biguanides)로 치료를 한다. 저항성을 가지는 개체는 인슐린 요법이 필요하다. IDDM을 치료하는 전통적인 방법뿐만 아니라 최근 방법 모두 환자의 노력 및 비용이 상당히 많이 소요되고 무엇보다도 환자 삶의 질을 급격히 떨어뜨린다. 지난 30년간 이용된 표준 치료요법(가령, 매일 인슐린을 주사하는 등)은 급성 증후를 치료하는 것과 연관성이 있으나 장시간 사용하면 혈관 질환 및 신경 손상을 일으킨다(Lacy, P., Status of Islet Cell Transplantation. Diabetes Care 16(3) 76(1993)). 피하 데포우(depot)-이식물(단백질 분해성 공격 없이도 인슐린 방출을 할 수 있는 그리고 매일 주사할 필요 없이 소량으로도 가능) 뿐만 아니라 랑게르한스섬과 같은 고유 섬의 설치와 같은 보다 최근의 방법이 시험 중에 있다. 그러나, 이와 같은 이식은 상당한 비용이 든다. 또한, 이와 같은 이식은 위험성이 있는 외과적인 수술을 요하고 이식의 경우 면역억제 또는 면역반응을 피하는 과정이 요구된다(Lacy, P., Treating

Diabetes with Transplanted Cells. Sci. Americ. 273(1) 40-46(1995)). 포도당 양을 줄이는 시도는 성공을 하지 못했다. NIDDM의 경우에, 설포닐우레아로 내생 인슐린의 분비를 자극하는 치료를 받은 대부분의 환자들은 이와 같은 약물에 저항성을 가진다. 추가로, 비구아니드(Biguanides)로 포도당을 증가시키는 방법은 제한적으로 성공하였다.

전술한 치료요법과는 대조적으로, 매우 효과적이고, 분자량이 적은 효소 저해물질을 경구 투여하면, 비용 면에서 효과가 있었다. 이와 같은 다양한 단백질분해성 효소 저해물질은 항-고혈압제, 면역억제제, 항바이러스제등으로 이미 이용되고 있다. 분자의 안정성, 운반성, 제거 성질 등을 고려하면 이들의 효과를 변형시킬 수 있고, 개체마다 상이한 화합물을 채택할 수 있다(Sandler, M. and Smith, H.J., eds., Design of Enzyme Inhibitors as Drugs. Oxford University Press. Oxford(1989); Munro, J.E., Shepherd, T.A., Jungheim, L.N., Hornback, W.J., Baxter, A.J., and Colacino, J.M., Potent, orally bioavailable HIV-1 protease inhibitors containing noncoded D-amino acids. Bioorg. Medicinal Chem. Letters 5(23) 2897(1995)).

발명이 이루고자 하는 기술적 과제

본 발명의 목적은 혈당을 낮추는 간단하고 새로운 방법에 관계하는데, 본 발명의 방법에 의하면, 효소 효과물질에 의해 포유류의 혈액에서 이가펩티드성 펩티다아제(DP IV 또는 CD 26) 또는 DP IV-유사 효소 활성을 감소시켜 내생 또는(외부에서 투여한) 항인슐린성 펩티드인 위장 방해성 폴리펩티드1-42(GIP1-42) 및 글루카곤-유사 펩티드-1 7-36(GLP-17-36)(또는 이들 펩티드 유사체)의 분해의 감소를 야기한다. 그럼으로써, 보통 DP IV 또는 DP IV-유사 효소에 의한 분해로부터 유래되는 이와 같은 펩티드 또는 이들 유사체의 농도의 감소는 줄거나 지연될 것이다.

발명의 구성 및 작용

본 발명은 포유류 혈액에서 이가펩티드성 펩티다아제(DP IV 또는 CD 26) 또는 DP IV-유사 효소의 순화계 효소활성이 감소되면 포도당 내성이 개선된다는 놀라운 발견에 기초한다.

우리는 다음과 같은 사항들을 규명하였다:

1. 이가펩티드성 펩티다아제(DP IV 또는 CD 26) 또는 DP IV-유사 효소의 활성을 감소시키면 포도당에 의해 자극을 받은 내생 또는 외부 투여된 인크리틴(또는 이의 유사체)의 안정성이 증가되고 결과적으로 DP IV 또는 DP IV 유사 단백질의 효과물질을 투여하여 순환계에서 인크리틴 분해를 조절할 수 있다;
2. 인크리틴(또는 이의 유사체)의 생물학적 안정성이 증가되면 인슐린 반응을 변형시킨다;
3. 이가펩티드성 펩티다아제(DP IV 또는 CD 26) 또는 DP IV-유사 효소의 감소에 의한 순환계 인크리틴의 안정성이 증가함으로써 포도당에 의해 유도된 인슐린 효과가 변형되고 이는 DP IV-효과물질을 사용함으로써 포도당 내성이 개선된다는 것을 나타낸다.

따라서, 본 발명은 임상적으로 부적절한 수준인 과혈당 및 과다한 식사 후 과혈당으로 설명되는 포유류에서 볼 수 있는 높아진 혈당 수준을 낮추기 위한 이가펩티드성 펩티다아제(DP IV 또는 CD 26) 또는 DP IV-유사 효소 활성의 효과물질을 이용하는 것에 관계한다. 본 발명의 용도는 당뇨, 과지혈증, 대사 산성증 및 진성 당뇨병과 같은 포유류 대사에서 병리학적인 이상을 예방 또는 방지하는데 DP IV 또는 DP IV-유사 효소의 효과물질을 투여하는 것을 특징으로 한다. 적절한 구체예에서, 본 발명은 포유류에서 상승된 혈당 수준을 낮추는 방법에 관계한다. 임상적으로 부적절한 수준인 과혈당 및 과다한 식사 후 과혈당으로 설명되는 포유류에서 볼 수 있는 이와 같은 증세는 포유류에 이가펩티드성 펩티다아제(DP IV 또는 CD 26) 또는 DP IV-유사 효소 활성의 효과물질의 효과량을 투여하는 것과 같은 치료를 요한다.

또 다른 적절한 구체예에서, 본 발명은 임상적으로 부적절한 수준인 과혈당 및 과다한 식사 후 과혈당으로 설명되는 포유류에서 볼 수 있는 상승된 혈당을 낮추는 방법에 이용되는 이가펩티드성 펩티다아제(DP IV 또는 CD 26) 또는 DP IV-유사 효소 활성의 효과 물질에 관계한다.

본 발명에 따른 DP IV 또는 DP IV-유사 효소의 효과 물질은 효소활성 억제제, 기질, 유사기질, DP IV 유전자 발현 억제제, 표적 효소 단백질에 대한 결합 단백질 또는 그에 특이적인 항체 또는 상기 다른 화합물들의 조합의 약학적 조성물로 투여될 수 있으며, 이들은 포유동물에서 DP IV 및 DP IV-유사 단백질 농도 또는 효소 활성을 감소시킨다. 본 발명에 따른 효과물질은, 예를 들면, 유사기질인 N-발릴 프롤릴, O-벤조일 하이드록실아민 뿐만 아니라, 알라닐 피롤리디드, 이소루이실

티아졸리리드와 같은 디펩티드 유도체 또는 티펩티드 유사체인 DP IV의 활성 억제제가 있다. 이와 같은 화합물은 문헌에 공지되어 있거나(Demuth, H.-U. Recent developments in the irreversible inhibition of serine and cysteine proteases, J. Enzyme Inhibition 3, 249(1990)) 문헌에 설명된 방법에 따라 합성할 수도 있다.

본 발명의 방법은 포유류 혈액에서 순환하는 상승된 포도당 농도를 감소시키기 위한 새로운 방법이다.

이 방법은 간단하고, 상업적으로도 유용하고, 사람의 질병, 특히 상승된 또는 부적절한 혈당 수준으로 인한 질병의 치료 요법에 이용하기에 적합하다.

약물 수송용 물질과 함께 본 발명의 효과물질을 복합하여 만든 제약학적 조제물 형태로 효과물질을 투여한다. 효과물질은 비경구(가령, 생리학적 염 용액에) 또는 장으로(경구, 유용한 담체와 함께 조제된) 투여될 수 있다.

효과물질의 내생 안정성과 생체이용성에 따라, 단일 또는 여러 차례 투여를 하여 요구하는 정상 수준의 혈당 농도를 유지시킨다. 이와 같은 약량 범위는 예를 들면 DP IV 방해 물질로써 아미노아실 티아졸리리드의 경우 kg당 효과물질이 1.0mg 내지 10.0mg 정도로 다양하게 할 수 있다.

이하, 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명한다.

단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다.

<실시예 1> 생체 내 조건에서 DP IV에 의해 매개되는 인크리틴 GIP₁₋₄₂와 GLP-1₇₋₃₆의 가수분해의 방해

정제된 효소 또는 농축한 사람 혈청(도 1)을 이용하여 DP IV 또는 DP IV 유사 효소 활성으로 인한 인크리틴의 시험관 내 조건의 가수분해를 억제하는 것은 가능하다.

본 발명에 따르면, 이들 펩티드 호르몬의 효소-촉매한 가수분해를 시험관 내 조건에서 완전하게 억제하려면 24시간 이상 pH 7.6, 30℃에서 20% 농축한 혈청에 30mM GIP₁₋₄₂ 또는 GLP-1₇₋₃₆와 가역적인 DP IV 활성 억제체인 20mM 이소루이실 티아졸리리드(1a)를 첨가하여 반응시키면 된다(1b와 1c, 둘 상위 스펙트럼; 합성 GIP₁₋₄₂(5mM), GLP-1₇₋₃₆(15μM)을 24시간 동안 pH 7.6, 30℃에서 0.1mM 트리신 완충액에 사람 혈청(20%)과 함께 반응시켰다). GIP₁₋₄₂(2.5pmol), GLP-1₇₋₃₆(7.5pmol)의 경우에 여러 시간대에 배양 분석을 위해 시료를 취하였다. 시료는 2',6'-디하이드록시 아세트페논을 매트릭스로 하여 함께 결정을 만들고 MALDI-TOF-질량 분광광도계를 이용하여 분석하였다. 스펙트럼(도 1)은 시료당 250 단일 레이저 샷이 축적되는 것을 나타낸다.

(1b) m/z 4980.1±5.3 시그날은 DP IV-기질 GIP₁₋₄₂(M 4075.6)에 상응하고, m/z 4745.2±5.5 시그날은 DP IV-방출 산물 GIP₃₋₄₂(M 4740.4)에 상응한다.

(1c) m/z 3325.0±1.2 시그날은 DP IV-기질 GLP-1₇₋₃₆(M 3297.7)에 상응하고, m/z 3316.7±1.3 시그날은 DP IV-방출 산물 GLP-1₉₋₃₆(M 3089.6)에 상응한다.

억제제를 포함하지 않은 대조군 분석에서, 인크리틴은 거의 완전하게 분해되었다(도 1b 및 1c, 하단 스펙트럼).

<실시예 2> 생체 내 조건에서 DP IV 활성 억제제 이소루이실 티아졸리리드에 의한 GLP-1₇₋₃₆ 분해의 방해

DP IV 활성 억제체인 이소루이실 티아졸리리드의 유무 하에(0.9% 생리식염수에 1.5M 활성 억제제의 주사), 쥐의 순환계에서 고유 인크리틴(이 경우 GLP-1₇₋₃₆)과 기준물질의 대사작용을 분석하였다. 실험시간 동안에(도 2), 처리된 동물(n=5)에서 활성 억제체인 이소루이실 티아졸리리드 0.1mg/kg 농도에서 항인슐린성 호르몬 GLP-1₇₋₃₆의 분해는 없었다.

DP IV 활성 억제제 유무 하에 인크리틴의 대사물질을 분석하게 위해, 시험 및 대조 동물에게 최초 활성 억제제 또는 생리식염수의 정맥주사한 후 20분 뒤에, 50-100pM ¹²⁵I-GLP-1₇₋₃₆(특이 활성 약 1μCi/pM)을 추가적으로 정맥주사하였다.

2-5분 배양 후에 혈액 샘플을 수득하고 20% 아세트니트릴을 이용하여 혈장을 추출하였다. 연속하여, RP-HPLC를 이용하여 펩티드 추출물을 분리하였다. 12-18분 사이에 여러 가지 부분의 용출물을 수득하고 γ -카운터로 측정하였다. 데이터는 분당 카운터수(cpm)으로 나타내었다.

<실시에 3> 생체 내 조건에서 DP IV 활성 억제제인 이소루이실 티아졸리디드를 정맥주사 후의 인슐린 반응 조절 및 혈당 수준의 감소

도 3은 이소루이실 티아졸리디드(0.1mg/kg) 유무 하에 쥐에게 포도당을 십이지장(i.d.)으로 투여한 후의 순환 포도당과 인슐린 반응을 나타낸 것이다. 처리 안된 대조 동물과 비교하였을 때, DP IV 효과물질을 수용한 동물에서 순환 포도당 농도가 더욱 신속하게 감소되었다. 관측된 효과는 투여량에 따라 달라졌고, 쥐에게 DP IV 활성 억제제인 이소루이실 티아졸리디드 0.05mg/min/kg 주입 종료 후에 가역적이 되었다. 십이지장내로 투여된 포도당에 의해 자극을 받은 동물과는 대조적으로, 활성 억제제로 처리를 한 대조동물에서 동일한 양의 포도당을 정맥주사로 투여한 후에는 필적할 만한 효과가 관찰되지 않았다. 도 3에서는 선택한 혈장 변수의 활성 억제제에 따른 변화에 대한 것을 설명한다: A는 DP IV-활성, B는 혈장-인슐린 수준, C는 혈당수준을 나타냄.

시험 동물(n=5, 수컷 Wistar 쥐, 200-225g)에 초기에 1.5M 이소루이실-티아졸리디드/0.9% 생리식염수(▲) 또는 동량의 0.9% 생리식염수(■)(기준 집단 n=5)를 제공하였다. 테스트 집단에는 30분 이상 실험시간(*)동안 0.75M/min의 활성 억제제를 주입시켰다. 대조 집단에는 동일한 시간 간격 동안에 활성 억제제가 없는 0.9% 생리식염수용액을 주입시켰다. 개시 시간(t=0)에서, 모든 동물에 십이지장내 주입을 통하여 40% 텍스트로즈 용액(w/v) 1g/kg의 포도당을 투여하였다. 10분 간격으로 모든 시험 동물로부터 혈액 시료를 수득하였다. 전체 혈액을 이용하여 포도당을 분석하는 반면, DP IV 활성과 인슐린 농도는 혈장을 이용하여 분석하였다. 인슐린 방사능 면역검사는 10 내지 160mU/ml 범위에서 감응성이 있는 것으로 나타났다(Pederson, R.A., Buchan, A.M.J., Zahedi-Ash. S., Chen, C.B. & Brown, J.C. Reg. Peptides. 3, 53-63(1982)). DP IV 활성은 분광광도계로 측정하였다(Demuth, H.-U., and Heins, J., On the catalytic Mechanism of Dipeptidyl Peptidase IV. in Dipeptidyl Peptidase IV(CD 26) in Metabolism and the Immune Response(B. Fleischer, Ed.) R.G. Landes, Biomedical Publishers, Georgetown, 1-35(1995)). 모든 데이터는 평균 $\pm$ 표준편차로 나타내었다.

발명의 효과

본 발명은 효소 이가펩티드성 펩티다아제 IV의 효소활성과 동일한 또는 유사한 효소의 활성을 낮추는 효과물질(기질, 가상기질, 활성 저해제, 결합 단백질, 항체 등의)을 이용하여 순환계 혈당 농도를 낮추는 신규한 방법에 관한 것으로서, 본 발명의 방법에 의하면 내생 또는 외부에서 투여된 인크리틴 또는 이의 유사체의 안정성이 DP IV 활성이 감소함에 따라 증가되어 이들의 항인슐린성 효과가 강화되고, 따라서 췌장 랑게르한스섬으로부터 인슐린 분비를 자극하고 혈액으로부터 포도당을 더욱 신속하게 제거할 수 있어, 결과적으로 포도당 내성이 개선되어, 탄수화물과 지질 대사의 이상, 당뇨, 심각한 대사 산성증 및 장시간 순환계 혈당 수준을 상승시키는 미세혈관 및 거대혈관 질환과 다발신경병과 같은 만성 변화 등을 포함하는 진성 당뇨병과 연관된 대사 이상을 치료하거나 예방하는데 유용하게 사용될 수 있다.

(57) 청구의 범위

청구항 1.

하나 이상의 아가펩티드성 펩티다아제(dipeptidyl peptidase; DP IV) 또는 DP IV-유사 효소의 활성 억제제를 치료적 유효량으로 함유하는 포유동물에서 고혈당증의 특징인 상승된 혈당치를 낮추기 위한 약학적 조성물.

청구항 2.

제 1항에 있어서, 상기 활성 억제제는 이가펩티드 유도체 또는 이가펩티드 유사체인 것을 특징으로 하는 약학적 조성물.

청구항 3.

제 1항에 있어서, 상기 활성 억제제는 아미노아실 티아졸리딘인 것을 특징으로 하는 약학적 조성물.

청구항 4.

제 1항에 있어서, 상기 활성 억제제는 알라닐 피롤리딘 또는 이소류이실 티아졸리딘인 것을 특징으로 하는 약학적 조성물.

청구항 5.

제 1항 내지 제 4항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 포유동물은 사람인 것을 특징으로 하는 약학적 조성물.

청구항 6.

제 1항 내지 제 4항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 활성 억제제는 담체와 결합되는 것을 특징으로 하는 약학적 조성물.

청구항 7.

제 1항 내지 제 4항 중 어느 한 항에 있어서, 단일 또는 다중(multiple) 투여인 것을 특징으로 하는 약학적 조성물.

청구항 8.

제 1항 내지 제 4항 중 어느 한 항에 있어서, 비경구 또는 경장(enteral) 투여용인 것을 특징으로 하는 약학적 조성물.

청구항 9.

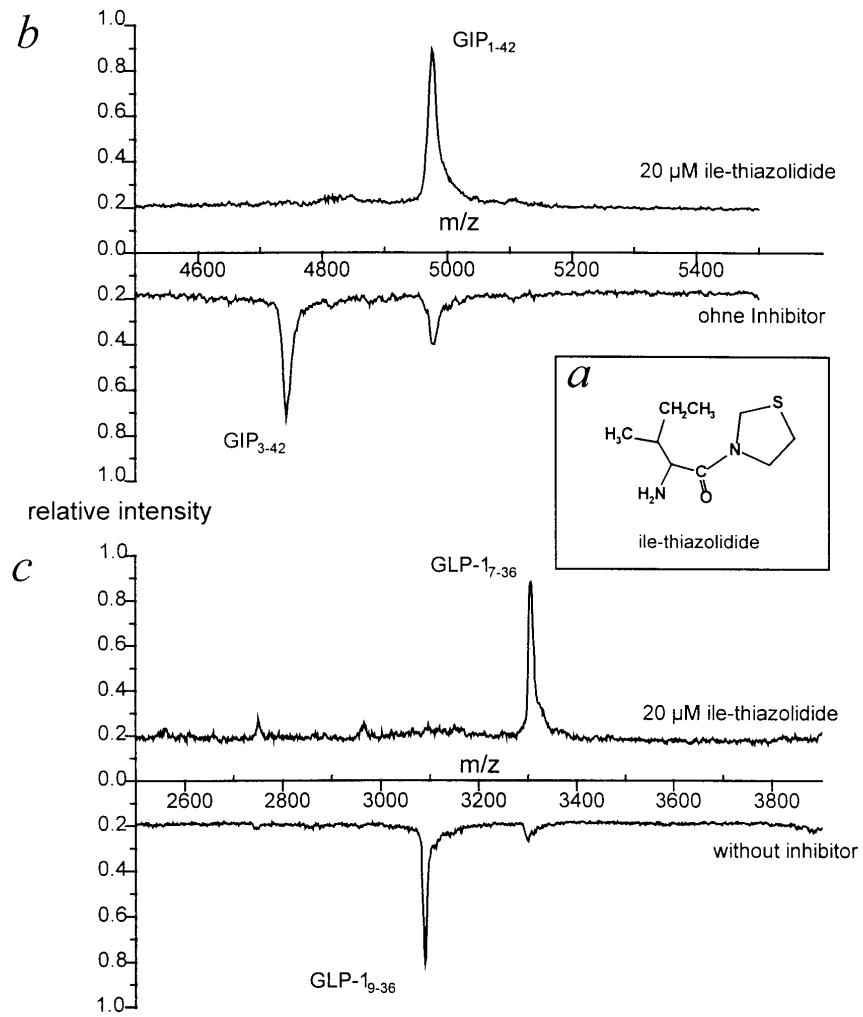
제 1항 내지 제 4항 중 어느 한 항에 있어서, 경구 투여용인 것을 특징으로 하는 약학적 조성물.

청구항 10.

제 1항 내지 제 4항 중 어느 한 항에 있어서, 당뇨, 고지혈증, 대사 산성증 및 진성 당뇨병으로 구성된 군으로부터 선택되는, 포유동물의 대사의 병리학적 이상의 예방 또는 경감을 위한 것을 특징으로 하는 약학적 조성물.

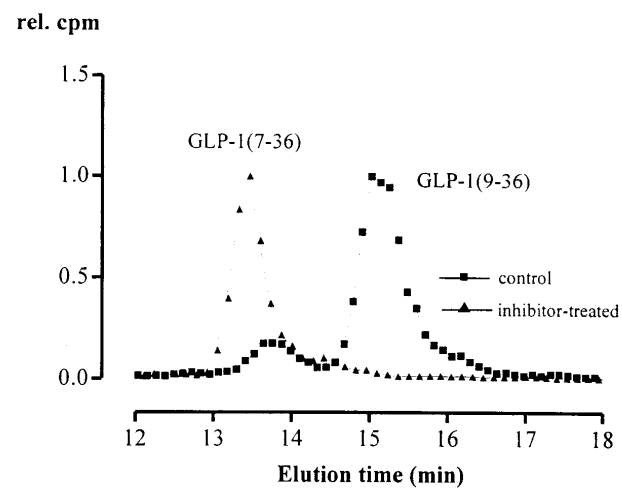
도면

도면1



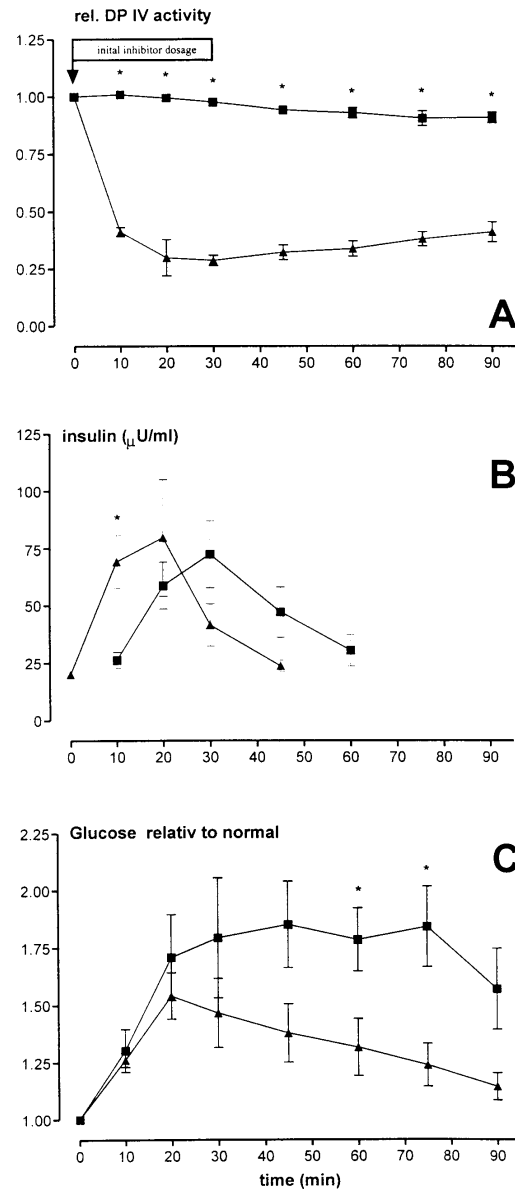
이소루이실 티아졸리디드(a)에 의해 GIP₁₋₄₂(b)와 GLP-1₇₋₃₆의 DP IV 촉매한 가수
분해와 이들의 방해를 MALDI-TOF 분석

도면2



in vivo에서 DP IV-방해물질 이소루이실 티아졸리디드 유무 하에 GLP-1 대사물질이 혈청에 존재하는 지를 HPLC 분석한 결과

도면3



i.d. 투여된 포도당에 의해 자극을 받은 쥐에서 여러 가지 혈액변수에 대해 DP IV 방해물질 이소루이실 티오졸리디드의 영향