(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2021 년 2 월 18 일 (18.02.2021)

WIPO | PCT

(10) 국제공개번호
WO 2021/029698 A1

(51) 국제특허분류:
C07K 14/605 (2006.01) *A61P 3/10* (2006.01)
A61K 38/26 (2006.01) *A61P 3/04* (2006.01)
A23L 29/281 (2016.01)

(21) 국제출원번호: PCT/KR2020/010751

(22) 국제출원일: 2020 년 8 월 13 일 (13.08.2020)

(25) 출원언어: 한국어

(26) 공개언어: 한국어

(30) 우선권정보:
10-2019-0098911 2019 년 8 월 13 일 (13.08.2019) KR
10-2020-0101087 2020 년 8 월 12 일 (12.08.2020) KR
10-2020-0101088 2020 년 8 월 12 일 (12.08.2020) KR

(71) 출원인: 애니젠 주식회사 (**ANYGEN CO., LTD.**) [KR/KR]; 61008 광주시 북구 첨단과기로 333, Gwangju (KR).

(72) 발명자: 류재하 (**RYU, Jae Ha**); 62278 광주시 광산구 임방울대로825번길 60-6 101동 901호, Gwangju (KR). 주상현 (**JOO, Sang Hyun**); 61258 광주시 북구 서강로54번길 10 207동 1501호, Gwangju (KR). 박예가 (**PARK, Ye Ga**); 62274 광주시 광산구 첨단중앙로152번길 17-6 409호, Gwangju (KR).

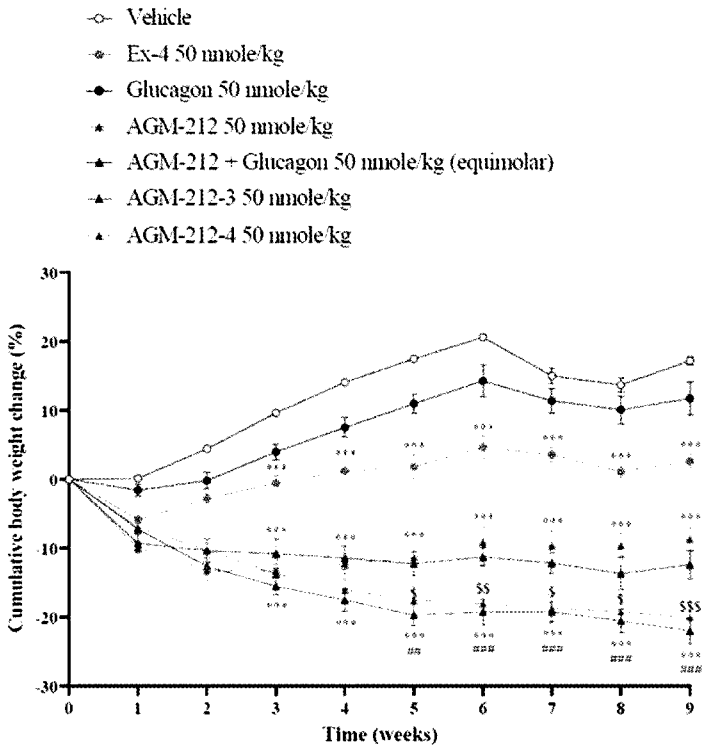
(74) 대리인: 윤대웅 (**YOON, Dae Woong**); 08793 서울시 관악구 남부순환로 1922 603호, Seoul (KR).

(81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, IT, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW.

WO 2021/029698 A1

(54) **Title:** EXENATIDE ANALOGUE AND USE THEREOF

(54) **발명의 명칭:** 엑세나타이드 유사체 및 이의 용도



(57) **Abstract:** The present invention pertains to an exenatide analogue glycosylated to a specific residue, and a use thereof. The present invention provides a novel substance for treating diabetes, the novel substance exhibiting improved in vivo stability compared to conventional exenatides and analogues thereof. The present invention pertains to an exenatide dimer analogue and a use thereof. The present invention provides a novel substance for treating diabetes and obesity, the novel substance exhibiting significantly improved in vivo stability compared to conventional exenatides and analogues thereof.

[다음 쪽 계속]

(84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

공개:

— 국제조사보고서와 함께 (조약 제21조(3))

— 청구범위 보정 기한 만료 전의 공개이며, 보정서를 접수하는 경우 그에 관하여 별도 공개함 (규칙 48.2(h))

— 명세서의 서열목록 부분과 함께 (규칙 5.2(a))

(57) 요약서: 본 발명은 특정 잔기에 당쇄화된 엑세나타이드 유사체 및 이의 용도에 관한것으로, 본 발명은 종래의 엑세나타이드 및 이의 유사체에 비해 향상된 체내 안정성을 보이는 신규 당뇨 치료 물질을 제공한다. 본 발명은 엑세나타이드 이량 유사체 및 이의 용도에 관한 것으로, 본 발명은 종래의 엑세나타이드 및 이의 유사체에 비해 매우 향상된 체내 안정성을 보이는 신규 당뇨 및 비만 치료 물질을 제공한다.

명세서

발명의 명칭: 엑세나타이드 유사체 및 이의 용도

기술분야

[1] 본 특허출원은 2019년 08월 13일에 대한민국 특허청에 제출된 대한민국 특허출원 제10-2019-0098911호에 대하여 우선권을 주장하며, 상기 특허출원의 개시 사항은 본 명세서에 참조로서 삽입된다.

[2] 본 특허출원은 2020년 08월 12일에 대한민국 특허청에 제출된 대한민국 특허출원 제10-2020-0101087호에 대하여 우선권을 주장하며, 상기 특허출원의 개시 사항은 본 명세서에 참조로서 삽입된다.

[3] 본 특허출원은 2020년 08월 12일에 대한민국 특허청에 제출된 대한민국 특허출원 제10-2020-0101088호에 대하여 우선권을 주장하며, 상기 특허출원의 개시 사항은 본 명세서에 참조로서 삽입된다.

[4] 본 발명은 당쇄화 엑세나타이드 유사체 및 이의 용도에 관한 것이다.

[5] 본 발명은 엑세나타이드 이량 유사체 및 이의 용도에 관한 것이다.

배경기술

[6] 생체 내에서 발현되는 단백질에 당이 붙는 과정인 당쇄화 (glycosylation)는 세포 내 소기관인 골지체에서 일어나는 반응으로, 당쇄화로 인해 형성된 당단백질은 세포간 결합, 조직의 발달, 면역 반응, 호르몬 작용 등의 다양한 생체현상에 관여하는 것으로 알려져 있다. 1880년도에 당의 구조 연구가 시작되어 현재까지 당 및 당쇄화 연구는 활발히 진행되고 있으며, 최근 당쇄화 기술을 활용한 약물개발 연구가 진행되고 있는 실정이다.

[7] 엑세나타이드 (Exenatide)는 미국 남서부에 서식하는 왕도마뱀 (*Heloderma suspectum*)의 침샘으로부터 분리된 GLP-1 (Glucagon-like Peptide-1)의 기능적 유사체 (analog)로서 제2형 당뇨병 펩타이드 치료제로 사용되고 있다. 최근 엑세나타이드를 비롯한 GLP-1 유사체의 체내 안정성이 개선된 지속적 작용성의 유사체 개발이 활발히 이루어지고 있다.

[8] 학술명 'Exendin-4'인 엑세나타이드는 39개 아미노산으로 구성된 생리활성 펩타이드로서 사람 생체 내에 존재하나 GLP-1과 53% 아미노산이 유사하며 DPP-4(Dipetidyl peptidase-4)와 같은 분해효소에 안정하여 GLP-1에 비해 체내 반감기가 비교적 길다.

[9] 엑세나타이드는 하루 두 번, 아침과 저녁 식사 이전에 투여한다. 엑세나타이드는 신장으로 배설되므로 심각한 신장 기능의 손상이나 말기 신질환을 가진 환자에게 사용은 추천되지 않는다.

[10] 엑세나타이드의 배설은 간기능에 의존적이지 않으므로 간으로 대사되는 약물과 상호작용을 가지지 않는다. 반면 엑세나타이드는 위장관 운동성 (gastric motility)에 영향을 주기 때문에 흡수와 관련하여 다른 약물과 상호작용을 일으킬

수 있다.

[11] 또한, 엑세나타이드 펩타이드의 합성 과정에서 과량의 시약과 재료의 비용이 많이 드는 단점이 있다. 또한 반응 단계수가 많고 각 단계별로 중간체를 유리해야하고 또한 이성질체가 생길 가능성이 있어 정제하기도 쉽지 않다.

[12] GLP-1 유사체를 이용한 신규 당뇨병 신규 치료제는 활발히 연구되고 있으나, 대부분의 경우 약효 지속 효과 개선을 위한 제형 개발에 중점을 두고 있으며, 효능 및 안정성을 개선한 획기적인 엑세나타이드 유사체 및 모사체의 개발은 거의 없다.

[13] 한편, 엑세나티이드는 체내 면역반응으로 인한 약물 효능 저하 등의 부작용이 보고되고 있는 실정이다. 따라서, 체내에서 일어나는 당쇄화 과정을 이용한 펩타이드 약물의 개발은 증진된 체내 안정성 및 개선된 면역원성 (immunogenicity)을 나타낼 것으로 기대된다.

[14] 엑세나타이드는 GLP-1R (glucagon-like peptide-1 receptor)의 효현제(agonist)로 제2형 당뇨병 펩타이드 치료제로 사용되고 있으며, 최근 엑세나타이드를 비롯한 GLP-1 유사체의 체내 안정성과 저혈당 등의 부작용이 개선된 지속적 작용성의 유사체 개발이 활발히 이루어지고 있다.

[15] GLP-1R 및 GCGR(glucagon receptor)은 각각 체내의 GLP-1, 글루카곤과 결합하여 혈당 조절을 통해 체내 항상성 유지에 중요한 작용을 한다. GLP-1R은 대뇌 피질 및 장에서 활성화되어 식욕을 저해하는 동시에 장 운동성을 감소시켜 체중 감소에 중요하게 작용하는 것으로 알려져 있다. 또한 GCGR은 백색 지방 조직에서 지방 분해 효소인 HSL, ATGL 활성 증가, 갈색 지방 조직에서의 열에너지 발생 증가를 통해 축적된 지방을 분해하여 체중 감소에 기여하는 것으로 알려져 있으며 (REFERENCE), 제2형 당뇨병, 비만을 가진 환자를 대상으로 한 대사 기능 연구에서 글루카곤과 GLP-1을 동시에 투여하였을 시 글루카곤의 고혈당 위험성이 GLP-1의 인슐린 분비 증진에 의해 방지되어 혈당수준이 안정화되고, 열에너지 발생이 증가됨을 확인하였다.

[16] 상기 결과들은 GCGR과 GLP-1R을 동시에 표적하는 이중 표적 효현제 (Dual agonist)가 기존의 GLP-1 표적 효현제 대비 혈당 수준 조절 및 증진된 체중 감소 효과를 보유할 것이라는 점을 시사하며, 이중 표현 효현제가 새로운 제2형 당뇨병, 비만의 두 종류의 대사 질환의 동시적인 치료를 위한 새로운 약물 후보 물질이 될 수 있을 것으로 예상된다.

[17] 생체 내에서 발현되는 단백질에 당이 붙는 과정인 당쇄화 (glycosylation)는 세포 내 소기관인 골지체에서 일어나는 반응으로, 당쇄화로 인해 형성된 당단백질은 세포간 결합, 조직의 발달, 면역 반응, 호르몬 작용 등의 다양한 생체현상에 관여하는 것으로 알려져 있다. 1880년도에 당의 구조 연구가 시작되어 현재까지 당 및 당쇄화 연구는 활발히 진행되고 있으며, 최근 당쇄화 기술을 활용한 약물개발 연구가 진행되고 있는 실정이다.

[18] 엑세나타이드 (Exenatide)는 미국 남서부에 서식하는 왕도마뱀 (*Heloderma*

suspectum)의 침샘으로부터 분리된 GLP-1 (Glucagon-like Peptide-1)의 기능적 유사체(analog)로서 제2형 당뇨병 펩타이드 치료제로 사용되고 있다. 최근 엑세나타이드를 비롯한 GLP-1 유사체의 체내 안정성이 개선된 지속적 작용성의 유사체 개발이 활발히 이루어지고 있다.

[19] 학술명 'Exendin-4'인 엑세나타이드는 39개 아미노산으로 구성된 생리활성 펩타이드로서 사람 생체 내에 존재하나 GLP-1과 53% 아미노산이 유사하며 DPP-4(Dipetidyl peptidase-4)와 같은 분해효소에 안정하여 GLP-1에 비해 체내 반감기가 비교적 길다.

[20] 엑세나타이드는 하루 두 번, 아침과 저녁 식사 이전에 투여한다. 엑세나타이드는 신장으로 배설되므로 심각한 신장 기능의 손상이나 말기 신질환을 가진 환자에게 사용은 추천되지 않는다.

[21] 엑세나타이드의 배설은 간기능에 의존적이지 않으므로 간으로 대사되는 약물과 상호작용을 가지지 않는다. 반면 엑세나타이드는 위장관 운동성 (gastric motility)에 영향을 주기 때문에 흡수와 관련하여 다른 약물과 상호작용을 일으킬 수 있다.

[22] 또한, 엑세나타이드 펩타이드의 합성 과정에서 과량의 시약과 재료의 비용이 많이 드는 단점이 있다. 또한 반응 단계수가 많고 각 단계별로 중간체를 유리해야하고 또한 이성질체가 생길 가능성이 있어 정제하기도 쉽지 않다.

[23] GLP-1 유사체를 이용한 신규 당뇨병 신규 치료제는 활발히 연구되고 있으나, 대부분의 경우 약효 지속 효과 개선을 위한 제형 개발에 중점을 두고 있으며, 효능 및 안정성을 개선한 획기적인 엑세나타이드 유사체 및 모사체의 개발은 거의 없다.

[24] 한편, 엑세나티이드는 체내 면역반응으로 인한 약물 효능 저하 등의 부작용이 보고되고 있는 실정이다. 따라서, 체내에서 일어나는 당쇄화 과정을 이용한 펩타이드 약물의 개발은 증진된 체내 안정성 및 개선된 면역원성 (immunogenicity)을 나타낼 것으로 기대된다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

[25] 본 발명에서는 당쇄화 기술을 접목한 엑세나타이드 유사체를 개발하여, 약물의 효능 및 체내 안정성이 증진된 신규 당뇨 치료 후보물질의 개발을 하고자 한다.

[26] 본 발명의 목적은 당쇄화 엑세나타이드 유사체를 제공하는 것이다.

[27] 본 발명의 다른 목적은 당쇄화 엑세나타이드 유사체를 포함하는 당뇨 개선, 예방 또는 치료용 약제학적 조성물을 제공하는 것이다.

[28] 본 발명의 또 다른 목적은 당쇄화 엑세나타이드 유사체를 포함하는 비만 개선, 예방 또는 치료용 약제학적 조성물을 제공하는 것이다.

[29] 본 발명의 또 다른 목적은 당쇄화 엑세나타이드 유사체를 포함하는 당뇨 개선 또는 완화용 식품 조성물을 제공하는 것이다.

[30] 본 발명의 또 다른 목적은 당쇄화 엑세나타이드 유사체를 포함하는 비만 개선 또는 완화용 식품 조성물을 제공하는 것이다.

[31] 본 발명의 또 다른 목적은 당쇄화 엑세나타이드 유사체를 포함하는 식욕 억제용 식품 조성물을 제공하는 것이다.

[32] 본 발명의 또 다른 목적은 당쇄화 엑세나타이드 유사체를 당뇨의 개선, 예방 또는 치료 유효량으로 이를 필요로 하는 대상에 투여하여 당뇨의 개선, 예방 또는 치료하는 방법을 제공하는 것이다.

[33] 본 발명의 또 다른 목적은 당쇄화 엑세나타이드 유사체를 비만의 개선, 예방 또는 치료 유효량으로 이를 필요로 하는 대상에 투여하여 비만의 개선, 예방 또는 치료하는 방법을 제공하는 것이다.

[34] 본 발명의 또 다른 목적은 당쇄화 엑세나타이드 유사체의 당뇨 개선, 예방 또는 치료 용도를 제공하는 것이다.

[35] 본 발명의 또 다른 목적은 당쇄화 엑세나타이드 유사체의 비만 개선, 예방 또는 치료 용도를 제공하는 것이다.

[36] 본 발명의 또 다른 목적은 당쇄화 엑세나타이드 유사체의 식욕 억제 용도를 제공하는 것이다.

[37] 본 발명자들은 다량 항원성 펩타이드 (Multiple antigenic peptide, MAP)를 적용하여 GLP-1R 효현제인 엑세나타이드를 기반으로 개발된 혈당 조절능 및 생체 내 안정성이 개선된 엑세나타이드 이량 유사체를 개발하여 신규 당뇨 및 비만 치료 후보물질의 개발을 하고자 한다.

[38] 본 발명의 목적은 엑세나타이드 이량 유사체를 제공하는 것이다.

[39] 본 발명의 다른 목적은 엑세나타이드 이량 유사체를 포함하는 당뇨 개선, 예방 또는 치료용 약제학적 조성물을 제공하는 것이다.

[40] 본 발명의 또 다른 목적은 엑세나타이드 이량 유사체를 포함하는 비만 개선, 예방 또는 치료용 약제학적 조성물을 제공하는 것이다.

[41] 본 발명의 또 다른 목적은 엑세나타이드 이량 유사체를 포함하는 당뇨 개선 또는 완화용 식품 조성물을 제공하는 것이다.

[42] 본 발명의 또 다른 목적은 엑세나타이드 이량 유사체를 포함하는 비만 개선 또는 완화용 식품 조성물을 제공하는 것이다.

[43] 본 발명의 또 다른 목적은 엑세나타이드 이량 유사체를 포함하는 식욕 억제용 식품 조성물을 제공하는 것이다.

[44] 본 발명의 또 다른 목적은 엑세나타이드 이량 유사체를 당뇨의 개선, 예방 또는 치료 유효량으로 이를 필요로 하는 대상에 투여하여 당뇨의 개선, 예방 또는 치료하는 방법을 제공하는 것이다.

[45] 본 발명의 또 다른 목적은 엑세나타이드 이량 유사체를 비만의 개선, 예방 또는 치료 유효량으로 이를 필요로 하는 대상에 투여하여 비만의 개선, 예방 또는 치료하는 방법을 제공하는 것이다.

[46] 본 발명의 또 다른 목적은 엑세나타이드 이량 유사체의 당뇨 개선, 예방 또는

치료 용도를 제공하는 것이다.

[47] 본 발명의 또 다른 목적은 엑세나타이드 이량 유사체의 비만 개선, 예방 또는 치료 용도를 제공하는 것이다.

[48] 본 발명의 또 다른 목적은 엑세나타이드 이량 유사체의 식욕 억제 용도를 제공하는 것이다.

과제 해결 수단

[49] 본 발명은 당쇄화 엑세나타이드 (exenatide) 유사체 및 이의 용도에 관한 것이다.

[50] 이하 본 발명을 더욱 자세히 설명하고자 한다.

[51] 본 발명의 일 예는 당쇄화 엑세나타이드 유사체에 관한 것이다.

[52] 본 발명에 있어서 엑세나타이드는 GLP-1 수용체 항진제로, 디펩티딜 펩티데이즈-IV(DPP-IV)에 의해 빠르게 분해되는 GLP-1을 모방한 유사체 (GLP-1 metrics)로서, DPP-IV에 의해 빠르게 분해되지 않으면서 당-의존적 인슐린 분비를 촉진하고 글루카곤 분비, 위 배출 및 식욕을 억제하며, 베타세포 보호효과를 보이는 GLP-1의 효과를 나타내는 약물이다.

[53] 본 발명에 있어서 엑세나타이드는 서열번호 1의 아미노산 서열을 포함하는 엑세나타이드 또는 서열번호 1의 아미노산 서열과 서열 상동성 최소 80% 이상, 90% 이상, 95% 이상을 나타내는 엑세나타이드 유사체를 포함한다.

[54] 본 발명의 일 예에 있어서, 엑세나타이드는 서열번호 1의 아미노산 서열을 포함하는 것일 수 있으며, 예를 들어, 서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어진 것일 수 있다.

[55] 본 발명에 있어서 엑세나타이드 유사체는 엑세나타이드의 아미노산 서열의 일부 아미노산이 결실되고 지방산이 접합 (conjugation)된 것일 수 있다.

[56] 본 발명에 있어서 결실은 엑세나타이드의 아미노산 서열의 1 내지 15개, 1 내지 14개, 1 내지 13개, 1 내지 12개, 1 내지 11개, 1 내지 10, 1 내지 9개, 4 내지 15개, 4 내지 14개, 4 내지 13개, 4 내지 12개, 4 내지 11개, 4 내지 10, 4 내지 9개, 7 내지 15개, 7 내지 14개, 7 내지 13개, 7 내지 12개, 7 내지 11개, 7 내지 10, 예를 들어, 7 내지 9개의 아미노산이 결실된 것일 수 있다.

[57] 본 발명에 있어서 결실은 엑세나타이드의 아미노산 서열의 N-말단 또는 C-말단의 아미노산이 결실된 것일 수 있으며, 예를 들어, 엑세나타이드의 아미노산 서열의 C-말단의 아미노산이 결실된 것일 수 있다.

[58] 본 발명의 일 구체예에 있어서, 결실은 엑세나타이드의 아미노산 서열의 C-말단의 아미노산이 1 내지 15개, 1 내지 14개, 1 내지 13개, 1 내지 12개, 1 내지 11개, 1 내지 10, 1 내지 9개, 4 내지 15개, 4 내지 14개, 4 내지 13개, 4 내지 12개, 4 내지 11개, 4 내지 10, 4 내지 9개, 7 내지 15개, 7 내지 14개, 7 내지 13개, 7 내지 12개, 7 내지 11개, 7 내지 10, 예를 들어, 7 내지 9개 결실된 것일 수 있다.

[59] 본 발명의 엑세나타이드 유사체에서의 지방산은 아미노산 서열의 일부 아미노산이 결실된 엑세나타이드의 다양한 위치에 접합된 것일 수 있다.

[60] 본 발명에 있어서 지방산은 당업계에 공지된 다양한 포화 지방산 및 불포화 지방산을 포함한다.

[61] 본 발명에 있어서 지방산은 C_3 내지 C_{36}의 탄소수를 갖는 지방산인 것일 수 있으며, 예를 들어, 프로피온산 (propionic acid), 부티르산 (butyric acid), 발레르산 (valeric acid), 카프로산 (caproic acid), 에난트산 (enanthic acid), 카프릴릭산 (caprylic acid), 펠라르곤산 (pelargonic acid), 카프릭산 (capric acid), 언데실산 (undecylic acid), 라우르산 (lauric acid), 트리데실산 (tridecylic acid), 미리스트산 (myristic acid), 펜타데실산 (pentadecylic acid), 팔미트산 (palmitic acid), 마르가르산 (margaric acid), 스테아르산 (stearic acid), 논아데실산 (nonadecylic acid), 아라키트산 (arachidic acid), 헤네이코실산 (heneicosylic acid), 베헨산 (behenic acid), 트리코실(tricosylic acid), 리그노세르산 (lignoceric acid), 펜타코실산 (pentacosylic acid), 세로트산 (cerotic acid), 헵타코실산 (heptacosylic acid), 몬탄산 (montanic acid), 논아코실산 (nonacosylic acid), 멜리스산 (melissic acid), 헤나트리아콘틸산 (henatriacontylic acid), 라세로산 (lacceroic acid), 사일산 (psyllic acid), 게드산 (geddic acid), 세로플라스트산 (ceroplastic acid) 및 헥사트리아콘틸산 (hexatriacontylic acid)로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상인 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[62] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 지방산은 일부 아미노산이 결실된 엑세나타이드의 아미노산 서열의 C-말단의 Lys 잔기, N-말단 또는 C-말단에 접합된 것일 수 있으며, 예를 들어, C-말단에 접합된 것일 수 있다.

[63] 본 발명에 있어서 아미노산 서열의 일부 아미노산이 결실된 엑세나타이드 및 지방산의 접합은 직접 결합 및/또는 간접 결합을 모두 포함한다.

[64] 본 발명에 있어서 직접 결합은 지방산에 있는 카복실기와 같은 작용기와 아미노산이 결실된 엑세나타이드의 작용기 (예를 들어, $-NH_2$)가 반응하여 공유결합을 형성함으로써 결실된 엑세나타이드-지방산 접합을 형성할 수 있다.

[65] 본 발명에 있어서 간접 결합은 당업계에서 링커로 통상적으로 이용되는 화합물이 중개하여 결실된 엑세나타이드-지방산 접합을 형성할 수 있다.

[66] 본 발명에서 이용되는 링커는 당업계에서 링커로 이용되는 어떠한 화합물도 가능하며, 결실된 엑세나타이드에 있는 작용기 종류에 따라 적합한 링커를 선택할 수 있으며, 예를 들어, 링커는 N-숙시니미딜 요오도아세테이드 (N-succinimidyl iodoacetate), N-히드록시숙시니미딜 브로모아세테이트(N-Hydroxysuccinimidyl Bromoacetate), m-말레이미도벤조일-N-히드록시숙신이미드 에스테르 (m-Maleimidobenzoyl-N-hydroxysuccinimide ester), m-말레이미도벤조일-N-히드록시설포숙신이미드 에스테르 (m-Maleimidobenzoyl-N-hydroxysulfosuccinimide ester), N-말레이미도부티릴옥시숙신아미드 에스테르 (N-Maleimidobutyryloxysuccinamide ester) 및 Lys을 포함하나, 이에 한정되는 것은

아니다.

[67] 구체적으로, 아미노산이 결실된 엑세나타이드는 그의 C-말단에 링커를 추가적으로 결합되며, 상기 지방산은 상기 C-말단에 결합된 링커에 접합되어 있다. 예를 들어, 아미노산이 결실된 엑세나타이드의 C-말단에 링커로서 Lys이 결합되고 이 Lys에 지방산이 접합될 수 있다. 이 경우, 상기 추가적인 Lys의 $-NH_2$ 작용기와 지방산의 카복실기가 반응하여 컨쥬게이트를 형성할 수 있다.

[68] 본 발명에 있어서 당쇄화 엑세나타이드 유사체는 엑세나타이드 유사체의 적어도 하나 이상의 아미노산에 당류가 결합된 것일 수 있으며, 당류가 결합된 아미노산은 다른 일 아미노산으로 치환된 후 당류가 결합된 것일 수 있다.

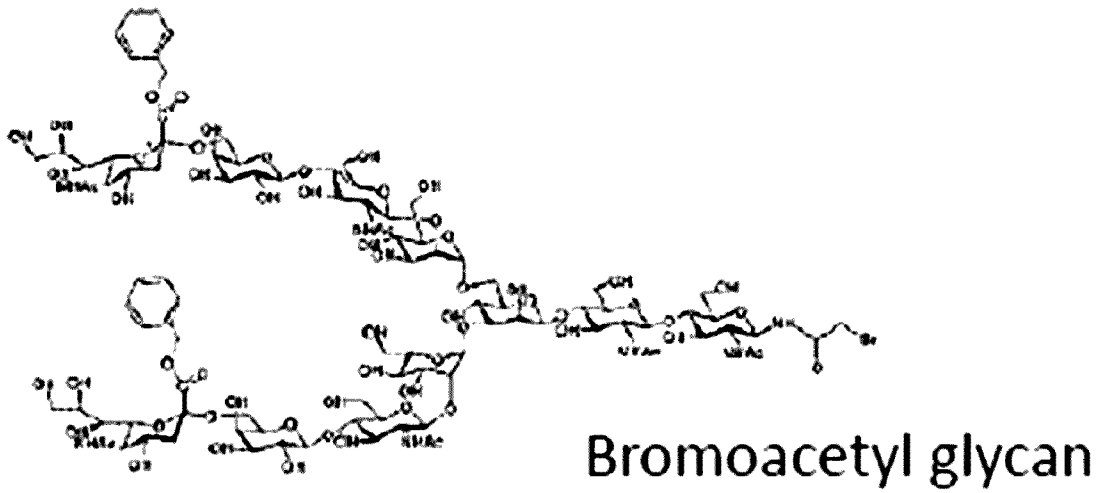
[69] 본 발명의 일 구체예에 있어서, 상기 당류의 결합은 서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어진 엑세나타이드의 17, 24 및 28번째 위치로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상의 위치에서 이루어진 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[70] 본 발명의 일 구체예에 있어서, 상기 치환은 서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어진 엑세나타이드의 17번째 아미노산 Glu이 Cys로 치환, 서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어진 엑세나타이드의 24번째 아미노산 Glu이 Cys로 치환, 및 서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어진 엑세나타이드의 28번째 아미노산 Asn이 Cys로 치환으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상인 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[71] 본 발명에 있어서 당류는 1 내지 11당, 2 내지 11당, 3 내지 11당, 4 내지 11당, 5 내지 11당, 6 내지 11당, 7 내지 11당, 8 내지 11당, 9 내지 11당, 10 내지 11당, 예를 들어, 11당인 것일 수 있으며, 구체적으로는 하기 구조식 1의 브로모아세틸 글리칸 (Bromoacetyl glycan) 및/또는 하기 구조식 2의 11NC-Asn-Fmoc인 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

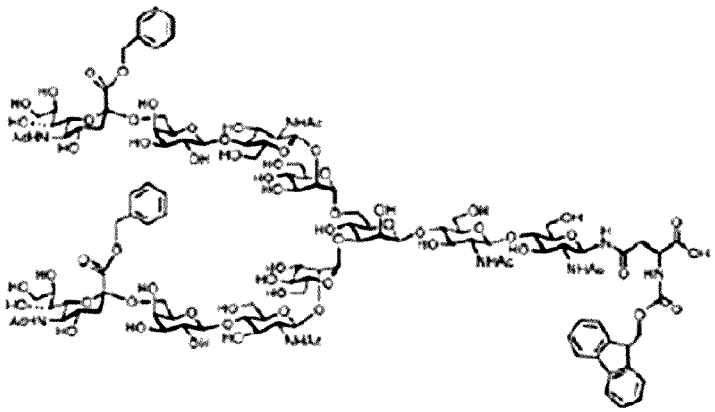
[72] [구조식 1]

[73]



[74] [구조식 2]

[75]



[76] 본 명세서에서 용어 "AGM-212"는 서열번호 1로 이루어진 엑세나타이드의 서열의 1번부터 32번까지의 서열로 이루어지며, 상기 서열 C-말단에 카프릭 산 (capric acid)이 측쇄에 결합된 라이신 (lysine)을 접합한 것으로, Ex4(1-32)K-cap의 서열로 명시한다.

[77] 본 명세서에서 용어 "AGM-212(E17C-11 sugar)"는 Ex4(1-32)-cap의 서열에서, 17번의 글루탐산 (Glutamic acid, Glu, E)이 Cys로 치환되고, 치환된 아미노산에 11 당의 구조를 갖는 당이 결합된 서열이다.

[78] 본 명세서에서 용어 "AGM-212(N28C-11 sugar)"는 Ex4(1-32)-cap의 서열에서, 28번의 아스파라진 (Asparagine, Asn, N)이 Cys로 치환되고, 치환된 아미노산에 11 당의 구조를 갖는 당이 결합된 서열이다.

[79] 본 명세서에서 용어 "AGM-212(N28-11 sugar)"는 Ex4(1-32)-cap의 서열에서, 28번의 아스파라진에 11 당의 구조를 갖는 당이 결합된 서열이다.

[80] 본 명세서에서 용어 "AGM-212(E24-11 sugar)"는 Ex4(1-32)-cap의 서열에서, 24번의 글루탐산이 이 Cys로 치환되고, 치환된 아미노산에 11 당의 구조를 갖는 당이 결합된 서열이다.

[81] 본 명세서에서 용어 "AGM-212(E17C-11 sugar & E24C-11 sugar)"는 Ex4(1-32)-cap의 서열에서, 17번의 글루탐산을 Cys로 치환하고 24번의 글루탐산을 치환하여, 각각의 치환된 아미노산에 11 당의 구조를 갖는 당이 결합된 서열이다.

[82] 본 명세서에서 용어 "AGM-212(E17C-11 sugar & N28C-11 sugar)"는 Ex4(1-32)-cap의 서열에서, 17번의 글루탐산을 Cys로 치환하고 28번의 아스파라진을 치환하여, 각각의 치환된 아미노산에 11 당의 구조를 갖는 당이 결합된 서열이다.

[83] 본 발명의 다른 일 예는 당쇄화 엑세나타이드 유사체를 포함하는 당뇨 개선, 예방 또는 치료용 약제학적 조성물에 관한 것이다.

[84] 본 발명의 또 다른 일 예는 당쇄화 엑세나타이드 유사체를 포함하는 비만 개선, 예방 또는 치료용 약제학적 조성물에 관한 것이다.

[85] 본 발명의 약제학적 조성물에 있어서 당쇄화 엑세나타이드 유사체에 관한

기재는 상술한 바와 동일하여, 그 기재를 생략한다.

[86] 본 발명의 약제학적 조성물은 약제학적으로 허용되는 담체를 포함할 수 있다.

[87] 본 발명에 있어서 약제학적으로 허용되는 담체는 제제시에 통상적으로 이용되는 것으로서, 락토스, 덱스트로스, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 전분, 아카시아 고무, 인산 칼슘, 알기네이트, 젤라틴, 규산 칼슘, 미세결정성 셀룰로스, 폴리비닐피롤리돈, 셀룰로스, 물, 시럽, 메틸 셀룰로스, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 활석, 스테아르산 마그네슘 및 미네랄 오일 등을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[88] 본 발명의 약제학적 조성물은 상기 성분들 이외에 윤활제, 습윤제, 감미제, 향미제, 유화제, 현탁제, 보존제 등을 추가로 포함할 수 있다. 적합한 약제학적으로 허용되는 담체 및 제제는 Remington's Pharmaceutical Sciences (19th ed., 1995)에 상세히 기재되어 있다.

[89] 본 발명의 약제학적 조성물은 경구 또는 비경구로 투여할 수 있고, 비경구 투여인 경우에는 정맥내 주입, 피하 주입, 근육 주입, 복강 주입, 경피 투여 등으로 투여할 수 있다.

[90] 본 발명의 약제학적 조성물의 적합한 투여량은 제제화 방법, 투여 방식, 환자의 연령, 체중, 성, 병적 상태, 음식, 투여 시간, 투여 경로, 배설 속도 및 반응 감응성과 같은 요인들에 의해 다양하며, 보통으로 숙련된 의사는 소망하는 치료 또는 예방에 효과적인 투여량을 용이하게 결정 및 처방할 수 있다.

[91] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명의 약제학적 조성물의 1일 투여량은 0.001-10000 ㎎/㎏이다.

[92] 본 발명의 약제학적 조성물은 당해 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자가 용이하게 실시할 수 있는 방법에 따라, 약제학적으로 허용되는 담체 및/또는 부형제를 이용하여 제제화 함으로써 단위 용량 형태로 제조되거나 또는 다용량 용기 내에 내입시켜 제조될 수 있다. 이때 제형은 오일 또는 수성 매질중의 용액, 현탁액 또는 유화액 형태이거나 엑스제, 분말제, 과립제, 정제 또는 캅셀제 형태일 수도 있으며, 분산제 또는 안정화제를 추가적으로 포함할 수 있다.

[93] 본 명세서에서 용어 '유효성분으로 포함하는'이란 하기의 엑세타나이드 유사체의 효능 또는 활성을 달성하는 데 충분한 양을 포함하는 것을 의미한다. 본 발명의 조성물에 포함된 양적 상한은 당업자가 적절한 범위 내에서 선택하여 실시할 수 있다.

[94] 본 발명의 또 다른 일 예는 당쇄화 엑세나타이드 유사체를 포함하는 당뇨 개선 또는 완화용 식품 조성물에 관한 것이다.

[95] 본 발명의 또 다른 일 예는 당쇄화 엑세나타이드 유사체를 포함하는 비만 개선 또는 완화용 식품 조성물에 관한 것이다.

[96] 본 발명의 또 다른 일 예는 당쇄화 엑세나타이드 유사체를 포함하는 식욕 억제용 식품 조성물에 관한 것이다.

[97] 본 발명의 식품 조성물에 있어서 당쇄화 엑세나타이드 유사체에 관한 기재는 상술한 바와 동일하여, 그 기재를 생략한다.

[98] 본 발명의 조성물이 식품 조성물인 경우에는 분말, 과립, 정제, 캡슐 또는 음료 등의 형태로 제조될 수 있다. 예컨대 캔디류의 각종 식품류, 음료, 껌, 차, 비타민 복합제, 또는 건강보조 식품류 등이 있다.

[99] 본 발명의 식품 조성물은 유효성분으로서 식품 제조 시에 통상적으로 첨가되는 성분을 포함할 수 있으며, 예를 들어, 단백질, 탄수화물, 지방, 영양소, 조미제 및 향미제를 포함한다.

[100] 상술한 탄수화물의 예는 모노사카라이드, 예를 들어, 포도당, 과당 등; 디사카라이드, 예를 들어 말토스, 슈크로스, 올리고당 등; 및 폴리사카라이드, 예를 들어 덱스트린, 사이클로덱스트린 등과 같은 통상적인 당 및 자일리톨, 소르비톨, 에리트리톨 등의 당알콜이다. 향미제로서 천연 향미제 [타우마틴, 스테비아 추출물 (예를 들어 레바우디오시드 A, 글리시르히진 등]) 및 합성 향미제(사카린, 아스파르탐 등)를 사용할 수 있다. 예컨대, 본 발명의 식품 조성물이 드링크제로 제조되는 경우에는 본 발명의 화합물 이외에 구연산, 액상과당, 설탕, 포도당, 초산, 사과산, 과즙, 두충 추출액, 대추 추출액, 감초 추출액 등을 추가로 포함시킬 수 있다.

[101] 본 발명의 또 다른 목적은 엑세나타이드 유사체를 당뇨의 개선, 예방 또는 치료 유효량으로 이를 필요로 하는 대상에 투여하여 당뇨의 개선, 예방 또는 치료하는 방법을 제공하는 것이다.

[102] 본 발명의 또 다른 목적은 엑세나타이드 유사체를 비만의 개선, 예방 또는 치료 유효량으로 이를 필요로 하는 대상에 투여하여 비만의 개선, 예방 또는 치료하는 방법을 제공하는 것이다.

[103] 본 발명의 또 다른 목적은 엑세나타이드 유사체의 당뇨 개선, 예방 또는 치료 용도를 제공하는 것이다.

[104] 본 발명의 또 다른 목적은 엑세나타이드 유사체의 비만 개선, 예방 또는 치료 용도를 제공하는 것이다.

[105] 본 발명의 또 다른 목적은 엑세나타이드 유사체의 식욕 억제 용도를 제공하는 것이다.

[106] 본 발명은 엑세나타이드 (exenatide) 이량 유사체 및 이의 용도에 관한 것이다.

[107] 이하 본 발명을 더욱 자세히 설명하고자 한다.

[108] 본 발명의 일 예는 엑세나타이드 이량 유사체에 관한 것이다.

[109] 본 발명에 있어서 엑세나타이드 이량 유사체는 엑세나타이드 (exenatide) 아미노산 서열의 1 내지 15개의 아미노산이 결실되고, 지방산이 접합 (conjugation)된 엑세나타이드 유사체로 이루어진 제1체; 및 엑세나타이드 (exenatide) 아미노산 서열의 1 내지 15개의 아미노산이 결실되고 지방산이 접합 (conjugation)된 엑세나타이드 유사체, 또는 글루카곤으로 이루어진 제2체;를 포함하고, 상기 제1체 및 제2체는 결합되어 이량 유사체를 형성하고 있는 것일

수 있다.

[110] 본 발명에 있어서 엑세나타이드는 GLP-1 수용체 항진제로, 디펩티딜 펩티데이즈-IV (DPP-IV)에 의해 빠르게 분해되는 GLP-1을 모방한 유사체 (GLP-1 metrics)로서, DPP-IV에 의해 빠르게 분해되지 않으면서 당-의존적 인슐린 분비를 촉진하고 글루카곤 분비, 위 배출 및 식욕을 억제하며, 베타세포 보호효과를 보이는 GLP-1의 효과를 나타내는 약물이다.

[111] 본 발명에 있어서 엑세나타이드는 서열번호 1의 아미노산 서열을 포함하는 엑세나타이드 또는 서열번호 1의 아미노산 서열과 서열 상동성 최소 80% 이상, 90% 이상, 95% 이상을 나타내는 엑세나타이드 유사체를 포함한다.

[112] 본 발명의 일 예에 있어서, 엑세나타이드는 서열번호 1의 아미노산 서열을 포함하는 것일 수 있으며, 예를 들어, 서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어진 것일 수 있다.

[113] 본 발명에 있어서 글루카곤은 서열번호 2의 아미노산 서열을 포함하는 글루카콘 또는 서열번호 1의 아미노산 서열과 서열 상동성 최소 80% 이상, 90% 이상, 95% 이상을 나타내는 글루카콘 유사체를 포함한다.

[114] 본 발명의 일 예에 있어서, 글루카곤은 서열번호 2의 아미노산 서열을 포함하는 것일 수 있으며, 예를 들어, 서열번호 2의 아미노산 서열로 이루어진 것일 수 있다.

[115] 본 발명에 있어서 상기 제2체가 엑세나타이드 유사체인 경우, 상기 제1체 및 제2체의 결합은 이황화결합인 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[116] 본 발명에 있어서 상기 제2체가 글루카곤인 경우, 상기 제1체 및 제2체의 결합은 제1체의 C-말단에 Lys 잔기를 첨가하고 이의 측쇄에 글루카곤으로 이루어진 제2체가 결합, 또는 이황화결합된 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[117] 본 발명에 있어서 엑세나타이드 유사체는 엑세나타이드의 아미노산 서열의 일부 아미노산이 결실되고 지방산이 접합 (conjugation)된 것일 수 있다.

[118] 본 발명에 있어서 결실은 엑세나타이드의 아미노산 서열의 1 내지 15개, 1 내지 14개, 1 내지 13개, 1 내지 12개, 1 내지 11개, 1 내지 10, 1 내지 9개, 4 내지 15개, 4 내지 14개, 4 내지 13개, 4 내지 12개, 4 내지 11개, 4 내지 10, 4 내지 9개, 7 내지 15개, 7 내지 14개, 7 내지 13개, 7 내지 12개, 7 내지 11개, 7 내지 10, 예를 들어, 7 내지 9개의 아미노산이 결실된 것일 수 있다.

[119] 본 발명에 있어서 결실은 엑세나타이드의 아미노산 서열의 N-말단 또는 C-말단의 아미노산이 결실된 것일 수 있으며, 예를 들어, 엑세나타이드의 아미노산 서열의 C-말단의 아미노산이 결실된 것일 수 있다.

[120] 본 발명의 일 구체예에 있어서, 결실은 엑세나타이드의 아미노산 서열의 C-말단의 아미노산이 1 내지 15개, 1 내지 14개, 1 내지 13개, 1 내지 12개, 1 내지 11개, 1 내지 10, 1 내지 9개, 4 내지 15개, 4 내지 14개, 4 내지 13개, 4 내지 12개, 4 내지 11개, 4 내지 10, 4 내지 9개, 7 내지 15개, 7 내지 14개, 7 내지 13개, 7 내지

12개, 7 내지 11개, 7 내지 10, 예를 들어, 7 내지 9개 결실된 것일 수 있다.

[121] 본 발명의 엑세나타이드 유사체에서의 지방산은 아미노산 서열의 일부 아미노산이 결실된 엑세나타이드의 다양한 위치에 접합된 것일 수 있다.

[122] 본 발명에 있어서 지방산은 당업계에 공지된 다양한 포화 지방산 및 불포화 지방산을 포함한다.

[123] 본 발명에 있어서 지방산은 C_3 내지 C_{36}의 탄소수를 갖는 지방산인 것일 수 있으며, 예를 들어, 프로피온산(propionic acid), 부티르산(butyric acid), 발레르산(valeric acid), 카프로산(caproic acid), 에난트산(enanthic acid), 카프릴릭산(caprylic acid), 펠라르곤산(pelargonic acid), 카프릭산(capric acid), 언데실산(undecylic acid), 라우르산(lauric acid), 트리데실산(tridecylic acid), 미리스트산(myristic acid), 펜타데실산(pentadecylic acid), 팔미트산(palmitic acid), 마르가르산(margaric acid), 스테아르산(stearic acid), 논아데실산(nonadecylic acid), 아라키트산(arachidic acid), 헤네이코실산(heneicosylic acid), 베헨산(behenic acid), 트리코실(tricosylic acid), 리그노세르산(lignoceric acid), 펜타코실산(pentacosylic acid), 세로트산(cerotic acid), 헵타코실산(heptacosylic acid), 몬탄산(montanic acid), 논아코실산(nonacosylic acid), 멜리스산(melissic acid), 헤나트리아콘틸산(henatriacontylic acid), 라세로산(lacceroic acid), 사일산(psyllic acid), 게드산(geddic acid), 세로플라스트산(ceroplastic acid) 및 헥사트리아콘틸산(hexatriacontylic acid)로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상인 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[124] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 지방산은 일부 아미노산이 결실된 엑세나타이드의 아미노산 서열의 C-말단의 Lys 잔기, N-말단 또는 C-말단에 접합된 것일 수 있으며, 예를 들어, C-말단에 접합된 것일 수 있다.

[125] 본 발명에 있어서 아미노산 서열의 일부 아미노산이 결실된 엑세나타이드 및 지방산의 접합은 직접 결합 및/또는 간접 결합을 모두 포함한다.

[126] 본 발명에 있어서 직접 결합은 지방산에 있는 카복실기와 같은 작용기와 아미노산이 결실된 엑세나타이드의 작용기 (예를 들어, $-NH_2$)가 반응하여 공유결합을 형성함으로써 결실된 엑세나타이드-지방산 접합을 형성할 수 있다.

[127] 본 발명에 있어서 간접 결합은 당업계에서 링커로 통상적으로 이용되는 화합물이 중개하여 결실된 엑세나타이드-지방산 접합을 형성할 수 있다.

[128] 본 발명에서 이용되는 링커는 당업계에서 링커로 이용되는 어떠한 화합물도 가능하며, 결실된 엑세나타이드에 있는 작용기 종류에 따라 적합한 링커를 선택할 수 있으며, 예를 들어, 링커는 N-숙시니미딜 요오도아세테이드 (N-succinimidyl iodoacetate), N-히드록시숙시니미딜 브로모아세테이트(N-Hydroxysuccinimidyl Bromoacetate), m-말레이미도벤조일-N-히드록시숙신이미드 에스테르 (m-Maleimidobenzoyl-N-hydroxysuccinimide ester), m-말레이미도벤조일-N-히드록시설포숙신이미드 에스테르

(m-Maleimidobenzoyl-N-hydroxysulfosuccinimide ester),
N-말레이미도부티릴옥시숙신아미드 에스테르
(N-Maleimidobutyryloxysuccinamide ester) 및 Lys을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[129] 구체적으로, 아미노산이 결실된 엑세나타이드는 그의 C-말단에 링커를 추가적으로 결합되며, 상기 지방산은 상기 C-말단에 결합된 링커에 접합되어 있다. 예를 들어, 아미노산이 결실된 엑세나타이드의 C-말단에 링커로서 Lys이 결합되고 이 Lys에 지방산이 접합될 수 있다. 이 경우, 상기 추가적인 Lys의 $-NH_2$ 작용기와 지방산의 카복실기가 반응하여 컨쥬게이트를 형성할 수 있다.

[130] 본 발명에 있어서 엑세나타이드 이량 유사체는 제1체, 제2체 또는 이들 각각의 일 아미노산에 당류가 결합된 것일 수 있다.

[131] 본 발명에 있어서 엑세나타이드 이량 유사체는 제1체, 제2체 또는 이들 각각의 일 아미노산이 다른 일 아미노산으로 치환되고, 치환된 아미노산에 당류가 결합된 것일 수 있다.

[132] 본 발명의 일 구체예에 있어서, 상기 당류의 결합은 서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어진 엑세나타이드의 17, 24 및 28번째 위치로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상의 위치에서 이루어진 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[133] 본 발명의 일 구체예에 있어서, 상기 치환은 서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어진 엑세나타이드의 17번째 아미노산 Glu이 Cys로 치환, 서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어진 엑세나타이드의 24번째 아미노산 Glu이 Cys로 치환, 및 서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어진 엑세나타이드의 28번째 아미노산 Asn이 Cys로 치환으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상인 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

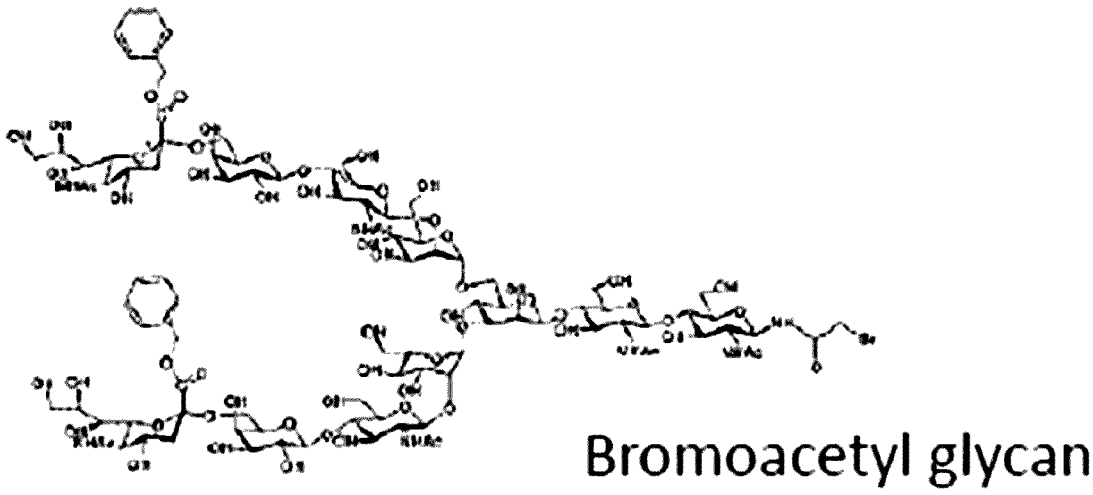
[134] 본 발명의 일 구체예에 있어서, 상기 당류의 결합은 서열번호 2의 아미노산 서열로 이루어진 글루카곤의 16 및 24번째 위치로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상의 위치에서 이루어진 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[135] 본 발명의 일 구체예에 있어서, 상기 치환은 서열번호 2의 아미노산 서열로 이루어진 글루카곤의 16번째 아미노산 Ser이 Cys또는 Asn로 치환, 및 서열번호 2의 아미노산 서열로 이루어진 글루카곤의 24번째 아미노산 Gln이 Cys 또는 Asn로 치환으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상인 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[136] 본 발명에 있어서 당류는 1 내지 11당, 2 내지 11당, 3 내지 11당, 4 내지 11당, 5 내지 11당, 6 내지 11당, 7 내지 11당, 8 내지 11당, 9 내지 11당, 10 내지 11당, 예를 들어, 11당인 것일 수 있으며, 구체적으로는 하기 구조식 1의 브로모아세틸 글리칸 (Bromoacetyl glycan) 및/또는 하기 구조식 2의 11NC-Asn-Fmoc인 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

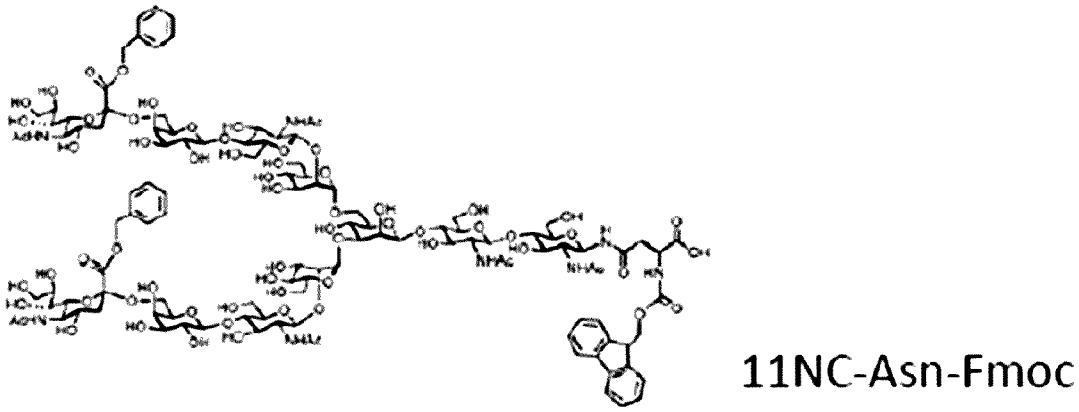
[137] [구조식 1]

[138]



[139] [구조식 2]

[140]



[141] 본 명세서에서 용어 “AGM-212”는 서열번호 1로 이루어진 엑세나타이드의 서열의 1번부터 32번까지의 서열로 이루어지며, 상기 서열 C-말단에 카프릭 산 (capric acid)이 측쇄에 결합된 라이신 (lysine)을 접합한 것으로, Ex4(1-32)K-cap의 서열로 명시한다.

[142] 본 명세서에서 용어 "AGM-212-1"는 AGM-212의 서열에서, 17번의 글루탐산 (Glu, E)이 Cys로 치환된 서열 2개가 이황화결합을 통해 이량체를 이루고, 각 서열의 24번 글루탐산이 Cys로 치환되어 아미노산에 11 당이 결합된 서열이다.

[143] 본 명세서에서 용어 "AGM-212-2"는 AGM-212의 서열에서, 17번의 글루탐산이 Cys로 치환된 서열 2개가 이황화결합을 통해 이량체를 이루고, 각 서열의 28번 Aspargine이 Cys로 치환되어 11 당이 결합된 서열이다.

[144] 본 명세서에서 용어 "AGM-212-3"는 AGM-212의 서열에서, C-말단에 Lys을 첨가하고, 이의 측쇄에 글루카곤 (Glucagon)이 결합된 서열이다.

[145] 본 명세서에서 용어 "AGM-212-4"는 AGM-212의 서열에서, 28번의 Asparagine에 11 당이 결합되며, C-말단에 Lys을 첨가하고 이의 측쇄에 글루카곤이 결합된 서열이다.

[146] 본 명세서에서 용어 "AGM-212-5"는 AGM-212의 서열에서, 28번의

Asparagine에 11 당이 결합되며, C-말단에 Lys을 첨가하고 이의 측쇄에 글루카곤이 결합되며, 글루카곤의 서열에서 16번의 Serine (Ser, S)이 11NC-Asn으로 치환하여 11 당이 결합된 서열이다.

[147] 본 명세서에서 용어 "AGM-212-6"는 AGM-212의 서열에서, 28번의 Asparagine에 11 당이 결합되며, C-말단에 Lys을 첨가하고 이의 측쇄에 글루카곤이 결합되며, 글루카곤의 서열에서 24번의 Glutamine (Gln, Q)가 11NC-Asn으로 치환하여 11 당이 결합된 서열이다.

[148] 본 명세서에서 용어 "AGM-212-7"는 AGM-212의 서열에서, 17번의 Glutamic acid(Glu, E)을 Cys로 치환하고, 24번의 Glutamic acid을 Cys로 치환하여 11 당이 결합된 서열과, 글루카곤의 서열에서 16번의 Serine(Ser, S)을 Cys로 치환하여 11 당이 결합되고, 24번의 Glutamine(Gln, Q)을 Cys로 치환한 서열과 이황화결합을 통해 이량체로 구성된 물질이다.

[149] 본 명세서에서 용어 "AGM-212-8"는 AGM-212의 서열에서 17번의 Glutamic acid(Glu, E)을 Cys로 치환하고, 24번의 Glutamic acid을 Cys로 치환하여 11 당이 결합된 서열과, 글루카곤의 구성 서열에서 24번의 Glutamine(Gln, Q)을 Cys로 치환하여 11 당이 결합되고, 16번의 Serine을 Cys로 치환한 서열과 이황화결합을 통해 이량체로 구성된 물질이다.

[150] 본 명에서의 용어 "이황화결합"은 두 개의 AGM-212의 E17이 C17로 치환된 후, 각각의 C17-C17이 서로 이황화결합을 이루는 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[151] 본 발명의 다른 일 예는 엑세나타이드 이량 유사체를 포함하는 당뇨 개선, 예방 또는 치료용 약제학적 조성물에 관한 것이다.

[152] 본 발명의 또 다른 일 예는 엑세나타이드 이량 유사체를 포함하는 비만 개선, 예방 또는 치료용 약제학적 조성물에 관한 것이다.

[153] 본 발명의 약제학적 조성물에 있어서 엑세나타이드 이량 유사체에 관한 기재는 상술한 바와 동일하여, 그 기재를 생략한다.

[154] 본 발명의 약제학적 조성물은 약제학적으로 허용되는 담체를 포함할 수 있다.

[155] 본 발명에 있어서 약제학적으로 허용되는 담체는 제제시에 통상적으로 이용되는 것으로서, 락토스, 덱스트로스, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 전분, 아카시아 고무, 인산 칼슘, 알기네이트, 젤라틴, 규산 칼슘, 미세결정성 셀룰로스, 폴리비닐피롤리돈, 셀룰로스, 물, 시럽, 메틸 셀룰로스, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 활석, 스테아르산 마그네슘 및 미네랄 오일 등을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[156] 본 발명의 약제학적 조성물은 상기 성분들 이외에 윤활제, 습윤제, 감미제, 향미제, 유화제, 현탁제, 보존제 등을 추가로 포함할 수 있다. 적합한 약제학적으로 허용되는 담체 및 제제는 Remington's Pharmaceutical Sciences (19th ed., 1995)에 상세히 기재되어 있다.

[157] 본 발명의 약제학적 조성물은 경구 또는 비경구로 투여할 수 있고, 비경구

투여인 경우에는 정맥내 주입, 피하 주입, 근육 주입, 복강 주입, 경피 투여 등으로 투여할 수 있다.

[158] 본 발명의 약제학적 조성물의 적합한 투여량은 제제화 방법, 투여 방식, 환자의 연령, 체중, 성, 병적 상태, 음식, 투여 시간, 투여 경로, 배설 속도 및 반응 감응성과 같은 요인들에 의해 다양하며, 보통으로 숙련된 의사는 소망하는 치료 또는 예방에 효과적인 투여량을 용이하게 결정 및 처방할 수 있다.

[159] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명의 약제학적 조성물의 1일 투여량은 0.001-10000 ㎎/㎏이다.

[160] 본 발명의 약제학적 조성물은 당해 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자가 용이하게 실시할 수 있는 방법에 따라, 약제학적으로 허용되는 담체 및/또는 부형제를 이용하여 제제화 함으로써 단위 용량 형태로 제조되거나 또는 다용량 용기 내에 내입시켜 제조될 수 있다. 이때 제형은 오일 또는 수성 매질중의 용액, 현탁액 또는 유화액 형태이거나 엑스제, 분말제, 과립제, 정제 또는 캅셀제 형태일 수도 있으며, 분산제 또는 안정화제를 추가적으로 포함할 수 있다.

[161] 본 명세서에서 용어 '유효성분으로 포함하는'이란 하기의 엑세타나이드 유사체의 효능 또는 활성을 달성하는 데 충분한 양을 포함하는 것을 의미한다. 본 발명의 조성물에 포함된 양적 상한은 당업자가 적절한 범위 내에서 선택하여 실시할 수 있다.

[162] 본 발명의 또 다른 일 예는 엑세나타이드 이량 유사체를 포함하는 당뇨 개선 또는 완화용 식품 조성물에 관한 것이다.

[163] 본 발명의 또 다른 일 예는 엑세나타이드 이량 유사체를 포함하는 비만 개선 또는 완화용 식품 조성물에 관한 것이다.

[164] 본 발명의 또 다른 일 예는 엑세나타이드 이량 유사체를 포함하는 식욕 억제용 식품 조성물에 관한 것이다.

[165] 본 발명의 식품 조성물에 있어서 엑세나타이드 이량 유사체에 관한 기재는 상술한 바와 동일하여, 그 기재를 생략한다.

[166] 본 발명의 조성물이 식품 조성물인 경우에는 분말, 과립, 정제, 캡슐 또는 음료 등의 형태로 제조될 수 있다. 예컨대 캔디류의 각종 식품류, 음료, 껌, 차, 비타민 복합제, 또는 건강보조 식품류 등이 있다.

[167] 본 발명의 식품 조성물은 유효성분으로서 식품 제조 시에 통상적으로 첨가되는 성분을 포함할 수 있으며, 예를 들어, 단백질, 탄수화물, 지방, 영양소, 조미제 및 향미제를 포함한다.

[168] 상술한 탄수화물의 예는 모노사카라이드, 예를 들어, 포도당, 과당 등; 디사카라이드, 예를 들어 말토스, 슈크로스, 올리고당 등; 및 폴리사카라이드, 예를 들어 덱스트린, 사이클로덱스트린 등과 같은 통상적인 당 및 자일리톨, 소르비톨, 에리트리톨 등의 당알콜이다. 향미제로서 천연 향미제 [타우마틴, 스테비아 추출물 (예를 들어 레바우디오시드 A, 글리시르히진 등]) 및 합성

향미제(사카린, 아스파르탐 등)를 사용할 수 있다. 예컨대, 본 발명의 식품 조성물이 드링크제로 제조되는 경우에는 본 발명의 화합물 이외에 구연산, 액상과당, 설탕, 포도당, 초산, 사과산, 과즙, 두충 추출액, 대추 추출액, 감초 추출액 등을 추가로 포함시킬 수 있다.

[169] 본 발명의 또 다른 목적은 엑세나타이드 유사체를 당뇨의 개선, 예방 또는 치료 유효량으로 이를 필요로 하는 대상에 투여하여 당뇨의 개선, 예방 또는 치료하는 방법을 제공하는 것이다.

[170] 본 발명의 또 다른 목적은 엑세나타이드 유사체를 비만의 개선, 예방 또는 치료 유효량으로 이를 필요로 하는 대상에 투여하여 비만의 개선, 예방 또는 치료하는 방법을 제공하는 것이다.

[171] 본 발명의 또 다른 목적은 엑세나타이드 유사체의 당뇨 개선, 예방 또는 치료 용도를 제공하는 것이다.

[172] 본 발명의 또 다른 목적은 엑세나타이드 유사체의 비만 개선, 예방 또는 치료 용도를 제공하는 것이다.

[173] 본 발명의 또 다른 목적은 엑세나타이드 유사체의 식욕 억제 용도를 제공하는 것이다.

[174] 본 명세서에서 용어 "당뇨"는 포도당-비관용(intolerance)을 초래하는 인슐린의 상대적 또는 절대적 부족으로 특징되는 만성질환을 의미한다. 용어 당뇨는 모든 종류의 당뇨병을 포함하며, 예를 들어, 제1형 당뇨, 제2형 당뇨 및 유전성 당뇨를 포함한다. 제1형 당뇨는 인슐린 의존성 당뇨병으로서, β-세포의 파괴에 의해 주로 초래된다. 제2형 당뇨는 인슐린 비의존성 당뇨병으로서, 식사 후 불충분한 인슐린 분비에 의해 초래되거나 또는 인슐린 내성에 의해 초래된다.

[175] 본 명세서에서 용어 "비만"은 건강에 이상을 초래할 정도로 지방 조직이 체내에 과잉으로 축적된 상태를 의미한다.

[176] 본 명세서에서 용어 "식욕 억제"는 음식을 섭취하고자 하는 욕구가 억제되는 것을 의미한다.

발명의 효과

[177] 본 발명은 특정 잔기에 당쇄화된 엑세나타이드 유사체 및 이의 용도에 관한 것으로, 본 발명은 종래의 엑세나타이드 및 이의 유사체에 비해 향상된 체내 안정성을 보이는 신규 당뇨 치료 물질을 제공한다.

[178] 본 발명은 엑세나타이드 이량 유사체 및 이의 용도에 관한것으로, 본 발명은 종래의 엑세나타이드 및 이의 유사체에 비해 향상된 체내 안정성을 보이는 신규 당뇨 치료 물질을 제공한다.

도면의 간단한 설명

[179] 도 1은 본 발명의 일 실시예에 따른 당쇄화 AGM-212 유사체(실시예 1,2 및 4)의 인슐린 분비능을 rat islets에서 rat insulin ELISA를 통해 분석한 결과이다.

[180] 도 2는 본 발명의 일 실시예에 따른 당쇄화 AGM-212 유사체(실시예 5 및 6)의

인슐린 분비능을 rat islets에서 rat insulin ELISA를 통해 분석한 결과이다.

[181] 도 3은 본 발명의 일 실시예에 따른 당쇄화 AGM-212 유사체를 피하 투여하여 2형 당뇨 질병 마우스 동물 모델에서의 당부하 정도를 혈당측정기를 통해 분석한 결과이다.

[182] 도 4는 본 발명의 일 실시예에 따른 당쇄화 AGM-212 유사체를 피하 투여하여 야생형 마우스 동물 모델에서의 약동력학 평가 시험을 분석한 결과이다.

[183] 도 5는 본 발명의 일 실시예에 따른 당쇄화 AGM-212 유사체의 면역원성 시험 결과이다.

[184] 도 6은 본 발명의 일 실시예에 따른 유사체의 인슐린 분비능을 rat islets에서 rat insulin ELISA를 통해 분석한 결과이다.

[185] 도 7a는 본 발명의 일 실시예에 따른 AGM-212-1 및 AGM-212-2를 포함한 유사체들을 피하 투여하여 2형 당뇨 질병 마우스 동물 모델에서의 항당뇨 효능을 혈당측정기를 통해 분석한 결과이다.

[186] 도 7b는 본 발명의 일 실시예에 따른 AGM-212-1 및 AGM-212-2를 포함한 유사체들을 피하 투여하여 2형 당뇨 질병 마우스 동물 모델에서의 항당뇨 효능을 혈당측정기를 통해 분석한 결과이다.

[187] 도 8a는 본 발명의 일 실시예에 따른 AGM-212-3, AGM-212-4, AGM-212-5 및 AGM-212-6을 포함한 유사체들을 피하 투여하여 2형 당뇨 질병 마우스 동물 모델에서의 항당뇨 효능을 혈당측정기를 통해 분석한 결과이다.

[188] 도 8b는 본 발명의 일 실시예에 따른 AGM-212-3, AGM-212-4, AGM-212-5 및 AGM-212-6을 포함한 유사체들을 피하 투여하여 2형 당뇨 질병 마우스 동물 모델에서의 항당뇨 효능을 혈당측정기를 통해 분석한 결과이다.

[189] 도 9a는 본 발명의 일 실시예에 따른 유사체를 피하 투여하여 야생형 마우스 동물 모델에서의 약동력학 평가 시험을 분석한 결과이다.

[190] 도 9b는 본 발명의 일 실시예에 따른 유사체를 피하 투여하여 야생형 마우스 동물 모델에서의 약동력학 평가 시험을 분석한 결과이다.

[191] 도 10a는 본 발명의 일 실시예에 따른 유사체의 식이조절능 시험 결과이다.

[192] 도 10b는 본 발명의 일 실시예에 따른 유사체의 식이조절능 시험 결과이다.

[193] 도 10c는 본 발명의 일 실시예에 따른 유사체의 식이조절능 시험 결과이다.

[194] 도 11a는 본 발명의 일 실시예에 따른 유사체의 당내성 개선 시험 결과이다.

[195] 도 11b는 본 발명의 일 실시예에 따른 유사체의 당내성 개선 시험 결과이다.

[196] 도 12a는 본 발명의 일 실시예에 따른 유사체의 인슐린 내성 개선 시험 결과이다.

[197] 도 12b는 본 발명의 일 실시예에 따른 유사체의 인슐린 내성 개선 시험 결과이다.

[198] 도 13a는 본 발명의 일 실시예에 따른 유사체의 간 내 지방 축적량 시험 결과이다.

[199] 도 13b는 본 발명의 일 실시예에 따른 유사체의 간 내 지방 축적량 시험

결과이다.

[200] 도 14a는 본 발명의 일 실시예에 따른 유사체의 열에너지 증진효과 시험 결과이다.

[201] 도 14b는 본 발명의 일 실시예에 따른 유사체의 열에너지 증진효과 시험 결과이다.

[202] 도 15a는 본 발명의 일 실시예에 따른 유사체의 열에너지 발생 관련 인자 시험 결과이다.

[203] 도 15b는 본 발명의 일 실시예에 따른 유사체의 열에너지 발생 관련 인자 시험 결과이다.

[204] 도 16a는 본 발명의 일 실시예에 따른 유사체의 지방 분해능 시험 결과이다.

[205] 도 16b는 본 발명의 일 실시예에 따른 유사체의 지방 분해능 시험 결과이다.

[206] 도 16c는 본 발명의 일 실시예에 따른 유사체의 지방 분해능 시험 결과이다.

[207] 도 16d는 본 발명의 일 실시예에 따른 유사체의 지방 분해능 시험 결과이다.

[208] 도 16e는 본 발명의 일 실시예에 따른 유사체의 지방 분해능 시험 결과이다.

[209] 도 17a는 본 발명의 일 실시예에 따른 유사체의 근육세포 내 지방 분해능 및 열에너지 발생 효과 시험 결과이다.

[210] 도 17b는 본 발명의 일 실시예에 따른 유사체의 근육세포 내 지방 분해능 및 열에너지 발생 효과 시험 결과이다.

[211] 도 17c는 본 발명의 일 실시예에 따른 유사체의 근육세포 내 지방 분해능 및 열에너지 발생 효과 시험 결과이다.

발명의 실시를 위한 최선의 형태

[212] 엑세나타이드 (exenatide) 아미노산 서열의 1 내지 15개의 아미노산이 결실되고, 지방산이 접합 (conjugation)된 당쇄화 엑세나타이드 유사체, 또는 엑세나타이드 (exenatide) 아미노산 서열의 1 내지 15개의 아미노산이 결실되고, 지방산이 접합 (conjugation)된 엑세나타이드 유사체로 이루어진 제1체; 및 엑세나타이드 (exenatide) 아미노산 서열의 1 내지 15개의 아미노산이 결실되고 지방산이 접합 (conjugation)된 엑세나타이드 유사체, 또는 글루카곤으로 이루어진 제2체;를 포함하고, 상기 제1체 및 제2체는 결합되어 이량 유사체를 형성하고 있는 것인, 엑세나타이드 이량 유사체.

발명의 실시를 위한 형태

[213] 이하, 본 발명을 하기의 실시예에 의하여 더욱 상세히 설명한다. 그러나 이들 실시예는 본 발명을 예시하기 위한 것일 뿐이며, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의하여 한정되는 것은 아니다.

[214]

[215] **I. 당쇄화된 엑세나타이드 유사체**

[216] **실시예 1. AGM-212(E17C-11 sugar)의 제조**

[217] **1-1. 화학식 1**

[218] AGM-212의 구성 서열인 Ex4(1-32)K-cap을 제조하기 위해, 트리틸 레진(trityl resin)에 Fmoc-Lys(dde)-OH 및 DMF를 첨가하여 Fmoc-Lys(dde) 트리틸 레진을 제조하였다. Fmoc-Lys(dde) 트리틸 레진에 20% 피페리딘(piperidine)이 포함된 DMF 및 Fmoc-Ser(tBu)-OH 및 HOBt(hydroxyl-benzo triazole)를 첨가하여 Fmoc-Ser(tBu)-Lys(dde) 트리틸 레진을 제조하였다. Fmoc-Ser(tBu)-Lys(dde) 트리틸 레진에 상기 제작 방법을 동일하게 하여 순차적으로 Fmoc-Pro-OH, Fmoc-Gly-OH, Fmoc-Gly-OH, Fmoc-Asn(trt)-OH, Fmoc-Lys(boc)-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Trp(Boc)-OH, Fmoc-Glu(tBu)-OH, Fmoc-Ile-OH, Fmoc-Phe-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Arg(pbf)-OH, Fmoc-Val-OH, Fmoc-Ala-OH, Fmoc-Glu(tBu)-OH, Fmoc-Glu(tBu)-OH, Fmoc-Glu(tBu)-OH, Fmoc-Met-OH, Fmoc-Gln(trt)-OH, Fmoc-Lys(boc)-OH, Fmoc-Ser(tBu)-OH, Fmoc-Le)-OH, Fmoc-Asp(tBu)-OH, Fmoc-Ser(tBu)-OH, Fmoc-Thr(tBu)-OH, Fmoc-Phe-OH, Fmoc-Thr(tBu)-OH, Fmoc-Gly-OH, Fmoc-GlutBu()-OH, Fmoc-Gly-OH, Fmoc-His(trt)-OH을 첨가하여 아래의 화학식 1을 제조하였다.

[219] [화학식 1]

[220] Fmoc-His(trt)-Gly-Glu(tBu)-Gly-Thr(tBu)-Phe-Thr(tBu)-Ser(tBu)-Asp(tBu)-Leu-Ser(tBu)-Lyc(Boc)-Gln(trt)-Met-Glu(tBu)-Glu(tBu)-Cys(tBu)-Ala-Val-Arg(pbf)-Leu-Phe-Ile-Glu(tBu)-Trp(Boc)-Leu-Lys(Boc)-Asn(trt)-Gly-Gly-Pro-Ser(tBu)-Lys(dde)-트리틸 레진

[221]

[222] **1-2. 화학식 2**

[223] 화학식 1에 2% $NH_2NH_2.H_2O$를 포함하는 DMF를 첨가하고 dde를 제거하여 화학식 2을 제조하였다.

[224] [화학식 2]

[225] Fmoc-His(trt)-Gly-Glu(tBu)-Gly-Thr(tBu)-Phe-Thr(tBu)-Ser(tBu)-Asp(tBu)-Leu-Ser(tBu)-Lyc(Boc)-Gln(trt)-Met-Glu(tBu)-Glu(tBu)-Cys(trt)-Ala-Val-Arg(pbf)-Leu-Phe-Ile-Glu(tBu)-Trp(Boc)-Leu-Lys(Boc)-Asn(trt)-Gly-Gly-Pro-Ser(tBu)-Lys-트리틸 레진

[226]

[227] **1-3. 화학식 3**

[228] 화학식 2에 카프릭산, 및 HOBt 및 DIC를 포함하는 DMF를 첨가하여 화학식 3을 제조하였다.

[229] [화학식 3]

[230] Fmoc-His(trt)-Gly-Glu(tBu)-Gly-Thr(tBu)-Phe-Thr(tBu)-Ser(tBu)-Asp(tBu)-Leu-Ser(tBu)-Lyc(Boc)-Gln(trt)-Met-Glu(tBu)-Glu(tBu)-Cys(trt)-Ala-Val-Arg(pbf)-Leu-Phe-Ile-Glu(tBu)-Trp(Boc)-Leu-Lys(Boc)-Asn(trt)-Gly-Gly-Pro-Ser(tBu)-Lys(capric acid)-트리틸 레진

[231]

[232] **1-4. 화학식 4**

[233] 화학식 3의 보호기를 절단 한 후, 정제하여 화학식 4를 제조하였다.

[234] [화학식 4]

[235] His-Gly-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Leu-Ser-Lyc-Gln-Met-Glu-Glu-Cys-Ala-Val-Arg-Leu-Phe-Ile-Glu-Trp-Leu-Lys-Asn-Gly-Gly-Pro-Ser-Lys(capric acid)-OH

[236]

[237] **1-5. 화학식 5**

[238] 화학식 4에 11 당의 구조를 이루는 Bromoacetyl glycan (11 suar) 및 NaOH, 인산 완충액 (Phosphate buffer)을 첨가하여, 화학식 5을 제조하였다.

[239] [화학식 5]

[240] His-Gly-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Leu-Ser-Lyc-Gln-Met-Glu-Glu-Cys(11 sugar)-Ala-Val-Arg-Leu-Phe-Ile-Glu-Trp-Leu-Lys-Asn-Gly-Gly-Pro-Ser-Lys(capric acid)-OH

[241]

[242] **실시예 2. AGM-212(N28C-11 sugar)의 제조**

[243] 실시예 1의 제조 과정에서 28번째 아미노산인 Fmoc-Asn(tBu)-OH를 Fmoc-Cys(trt)-OH로 대체하여 동일한 방법으로 화학식 6을 제조하였다.

[244] [화학식 6]

[245] His-Gly-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Leu-Ser-Lyc-Gln-Met-Glu-Glu-Glu-Ala-Val-Arg-Leu-Phe-Ile-Glu-Trp-Leu-Lys-Cys(11 sugar)-Gly-Gly-Pro-Ser-Lys(capric acid)-OH

[246]

[247] **실시예 3. AGM-212(N28-11 sugar)의 제조**

[248] 실시예 1의 제조 과정에서 28번째 아미노산인 Fmoc-Asn(tBu)-OH를 도면 2의 11NC-Asn-Fmoc으로 대체하여 동일한 방법으로 화학식 7을 제조하였다.

[249] [화학식 7]

[250] His-Gly-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Leu-Ser-Lyc-Gln-Met-Glu-Glu-Glu-Ala-Val-Arg-Leu-Phe-Ile-Glu-Trp-Leu-Lys-Asn(11 sugar)-Gly-Gly-Pro-Ser-Lys(capric acid)-OH

[251] [표1]

명명	서열
Ex4	HGEGTFTSDL SKQMEEEAVR LFIEWLKNGG PSSGAPPPS
AGM-212	HGEGTFTSDL SKQMEEEAVR LFIEWLKNGG PSK-capric acid
AGM-212(E17C-11 sugar)	HGEGTFTSDL SKQMEEC(11 sugar)AVR LFIEWLKNGG PSK-capric acid
AGM-212(E24C-11 sugar)	HGEGTFTSDL SKQMEEEAVR LFIC(11 sugar)WLKNGG PSK-capric acid
AGM-212(N28C-11 sugar)	HGEGTFTSDL SKQMEEEAVR LFIEWLKC(11 sugar)GG PSK-capric acid
AGM-212(N28-11 sugar)	HGEGTFTSDL SKQMEEEAVR LFIEWLKN(11 sugar)GG PSK-capric acid
AGM-212(E17C-11 sugar & E24C-11 sugar	HGEGTFTSDL SKQMEEC(11 sugar)AVR LFIC(11 sugar)WLKNGG PSK-capric acid
AGM-212(E17C-11 sugar & N28C-11 sugar	HGEGTFTSDL SKQMEEC(11 sugar)AVR LFICWLC (11sugar)NGG PSK-capric acid

[252]

[253] **실시예 4. AGM-212(E24C-11 sugar)의 제조**

[254] 실시예 1의 제조 과정에서 24번째 아미노산인 Fmoc-Glu(tBu)-OH를 Fmoc-Cys(trt)-OH로 대체하여 동일한 방법으로 화학식 8을 제조하였다.

[255] [화학식 8]

[256] His-Gly-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Leu-Ser-Lyc-Gln-Met-Glu-Glu-Glu-Ala-Val-Arg-Leu-Phe-Ile-Cys(11 sugar)-Trp-Leu-Lys-Asn-Gly-Gly-Pro-Ser-Lys(capric acid)-OH

[257]

[258] **실시예 5. AGM-212(E17C-11 sugar & E24C-11 sugar)의 제조**

[259] **5-1. 화학식 9**

[260] 실시예 1의 제조 과정에서 24번째 아미노산인 Fmoc-Glu(tBu)-OH를 Fmoc-Cys(trt)-OH로 대체하여 화학식 9을 제조하였다.

[261] [화학식 9]

[262] His-Gly-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Leu-Ser-Lyc-Gln-Met-Glu-Glu-Cys-Ala-Val-Arg-Leu-Phe-Ile-Cys-Trp-Leu-Lys-Asn-Gly-Gly-Pro-Ser-Lys(capric acid)-OH

[263]

[264] **5-2. 화학식 11**

[265] 화학식 9에 11 당의 구조를 이루는 Bromoacetyl glycan (11 suar) 및 NaOH, 인산 완충액을 첨가하여, 화학식 10을 제조하였다.

[266] [화학식 10]

[267] His-Gly-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Leu-Ser-Lyc-Gln-Met-Glu-Glu-Cys(11 sugar)-Ala-Val-Arg-Leu-Phe-Ile-Cys(11 sugar)-Trp-Leu-Lys-Asn-Gly-Gly-Pro-Ser-Lys(capric acid)-OH

[268]

[269] **실시예 6. AGM-212(E17C-11 sugar & N28C-11 sugar)의 제조**

[270] **6-1. 화학식 11**

[271] 실시예 1의 제조 과정에서 28번째 아미노산인 Fmoc-Asn(tBu)-OH를 Fmoc-Cys(trt)-OH로 대체하여 화학식 11을 제조하였다.

[272] [화학식 11]

[273] His-Gly-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Leu-Ser-Lyc-Gln-Met-Glu-Glu-Cys-Ala-Val-Arg-Leu-Phe-Ile-Glu-Trp-Leu-Lys-Cys-Gly-Gly-Pro-Ser-Lys(capric acid)-OH

[274]

[275] **6-2. 화학식 12**

[276] 화학식 11에 11 당의 구조를 이루는 Bromoacetyl glycan (11 suar) 및 NaOH, 인산 완충액을 첨가하여, 화학식 12을 제조하였다.

[277] [화학식 12]

[278] His-Gly-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Leu-Ser-Lyc-Gln-Met-Glu-Glu-Cys(11 sugar)-Ala-Val-Arg-Leu-Phe-Ile-Glu-Trp-Leu-Lys-Cys(11 sugar)-Gly-Gly-Pro-Ser-Lys(capric acid)-OH

[279]

[280] **실험예 1. 유사체의 GLP-1 수용체 결합력 확인**

[281] 실시예 1 내지 실시예 6에서 제조한 유사체의 GLP-1 수용체에 대한 결합력을 알아보기 위해, luciferase assay system을 사용하였다. Luciferase assay system은 세포의 특정 수용체에 대한 리간드의 결합력을 측정하여 수용체의 활성 정도를 확인할 수 있는 방법이다.

[282] 구체적으로, 섬유아세포주인 CV-1 (1 x 10^4 cells/ml, 한국세포주은행)을 96well white cell culture plate에 24시간 배양 후, human GLP-1R(pcDNA3.1_hGLP-1R), cAMP response element (CRE, pcDNA3.1_hCRE)를 첨가하여 형질전환(transfection)하였다. 24시간 배양 후, serum이 없는 배지로 교체하여, 16시간 배양 후, 각 유사체를 6시간 동안 처리하였다. 활성화된 GLP-1R에 의해 reporter gene인 luciferase의 발현 정도를 luminometer를 이용하여 정량하여, 그 결과를 표 2에 나타내었다.

[283] [표2]

목록	EC_{50} (nM)	Emax (fold induction over basal)
Ex4	12 ± 0.12	10.6 ± 1.5
AGM-212	11 ± 0.21	10.4 ± 1.4
AGM-212(E17C-11 sugar)	18.4 ± 0.4	10.1 ± 1.2
AGM-212(N28C-11 sugar)	35.6 ± 0.8	10.2 ± 1.3
AGM-212(N28-11 sugar)	58.5 ± 0.7	10.3 ± 1.4
AGM-212(E24C-11 sugar)	73.6± 0.4	10.1 ± 1.4
AGM-212(E17C-11 sugar & E24C-11 sugar)	80 ± 0.4	9.7 ± 1.2
AGM-212(E17C-11 sugar & N28C-11 sugar)	40 ± 0.5	9.8 ± 1.3

[284]

[285] 표 2에서 확인할 수 있듯이, AGM-212는 Ex4와 동등한 GLP-1R에 대한 활성을 보이며, 11 sugar가 결합된 AGM-212 유사체들은 Ex4 또는 AGM-212보다 다소 감소된 활성을 발견하였다. 당쇄화로 인해 각 유사체들의 활성이 감소되지만 여전히 nM 수준의 결합력을 가짐을 알 수 있었다.

[286]

[287] **실험예 2. 유사체의 인슐린 분비능 확인**

[288] 실시예 1 내지 실시예 6에서 제조한 유사체의 인슐린 분비능을 확인하기 위해, rat islets에 대한 유사체의 당 의존성 인슐린 분비능을 확인하였다.

[289] 구체적으로, SD rat (다물사이언스) 8주령의 pancreas를 추출하여, islets을 분리하였다. 분리된 islets을 28 mM glucose에서의 각 유사체를 농도별(10 nM, 100 nM)로 처리 한 후, rat insulin ELISA kit를 이용해 분비된 인슐린 양을 측정하여, 그 결과를 도 1 내지 도 2 및 표 3 내지 표 4에 나타내었다.

[290] [표3]

목록	Insulin secretion from rat islets (pg/ml)	
	10 nM	100 nM
Control	4018.30 ± 536.4	4018.30 ± 536.4
Ex4	5379.62 ± 1120	6038.49 ± 656.60
AGM-212	5740.38 ± 111.7	6725.28 ± 988.68
AGM-212(E17C-11 sugar)	7895.09 ± 2457.36	9523.02 ± 2852.08
AGM-212(N28C-11 sugar)	5879.25 ± 2162.26	8168.68 ± 2623.02
AGM-212(N28-11 sugar)	5676.60 ± 1180.76	8128.68 ± 732.45

[291]

[292] [표4]

목록	Insulin secretion from rat islets (pg/ml)	
	10 nM	100 nM
Control	5018.30 ± 536.4	5020.30 ± 536.4
Ex4	7803.40 ± 2216.2	9928.68 ± 1638.11
AGM-212	10978.11 ± 268.68	15476.60 ± 5468.30
AGM-212(E17C-11 sugar & E24C-11 sugar)	6763.40 ± 32.83	14650.94 ± 3305.28
AGM-212(E17C-11 sugar & N28C-11 sugar)	11250.94 ± 624.53	22183.40 ± 830.19

[293]

[294] 도 1 내지 도 2 및 표 3 내지 표 4에서 확인할 수 있듯이, 11 sugar가 결합된 유사체 모두 농도 의존적으로 인슐린 분비를 증진시키며, 또한 Ex4 및 AGM-212보다 증진된 인슐린 분비능을 확인하였다.

[295]

[296] **실험예 3. 유사체의 당부하 효과 확인**

[297] 실시예 1 내지 실시예 4에서 제조한 유사체의 당 부하 효과를 확인하기 위해, 2형 당뇨 질병 마우스 모델인 C57BKS/J dbdb mice (5-7주령, 중앙실험동물)를 16시간 절식 후, 각 유사체들을 10 nmole/kg으로 피하투여하고, 30분 후, 포도당(1.5 g/kg)을 복강으로 투여하였다. 120분 동안, 0, 15, 30, 45, 60, 90, 120분에서의 마우스 꼬리 미정맥에서 추출한 혈액을 이용하여 혈당측정기(acu-check, Roche, Germany)로 혈당을 측정하여, 그 결과를 도 3a 내지 도 3b에 나타내었다.

[298] 도 3a 내지 도 3b에서 확인할 수 있듯이, 모든 AGM-212 유사체가 Ex4 및 AGM-212 동등한 당부하 효능을 보였다. 이 결과는, 당쇄화된 AGM-212 유사체들이 Ex4의 생물학적인 활성을 가지고 있음을 의미한다.

[299]

[300] **실험예 4. 유사체의 약동력학 시험**

[301] 실시예 2내지 실시예 3에서 제조한 유사체의 약동력학(pharmacokinetics) 시험을 실시하였다. 야생형 C57BL/6J mice(male, 5-6주령, n=5)을 이용, 각 유사체들을 50 nmole/kg으로 피하 투여 후, 각 0, 0.5, 1, 2, 4, 8, 10, 12, 14, 24시간에 혈액을 추출하였다. 추출한 혈액의 혈장을 분리하여 Exendin-4 EIA를 이용하여 정량 분석을 진행하였다. 결과 분석은 winnolin 프로그램을 이용하여 Pharmacokinetics parameter를 결정하여, 그 결과를 도 4 및 표 5에 나타내었다.

[302] [표5]

Parameter	Ex4	AGM-212	AGM-212(N28C-11 sugar)	AGM-212(N28-11 sugar)
t1/2 (h)	0.56 ± 0.03	3.68 ± 0.35	2.3 ± 0.16	3.33 ± 0.74
Tmax (h)	0.5	4	4	5 ± 1
Cmax (ng/mL)	107.38 ± 12.48	750.67 ± 107.7	856.9 ± 103.4	762.9 ± 197.05
AUC (ng h/mL)	171.5 ± 7.15	6698.8 ± 621	4913.1 ± 380.5	5584.9 ± 968.5
Vd (mL/kg)	1004 .9 ± 81.51	334.8 ± 38.35	416.7 ± 62.5	256.9 ± 37.8
Cl (mL/h/kg)	1236.9 ± 52.4	63.36 ± 5.93	123.3 ± 10.3	57.7 ± 8.98

[303]

[304] 도 4 및 표 5에서 확인할 수 있듯이, AGM-212(N28-11 sugar)가 AGM-212와 유사한 반감기를 나타내었으며, AGM-212(N28C-11 sugar)의 경우, Ex4보다는 증진된 반감기가 관찰되었으나, AGM-212(N28-11 sugar)보다는 다소 감소된 수준을 보임을 확인하였다. 이 결과는 당쇄화가 되었을 때, 체내 반감기에는 영향을 주지 않는 것으로 보임을 알 수 있다.

[305]

[306] **실험예 5. 유사체의 면역원성 시험**

[307] 당쇄화 AGM-212 유사체에 대한 면역원성 시험을 하기 위해, 야생형 C57BL/6J mice(male, 6주령, 을 이용, 각 Ex4와 AGM-212(N28C-11 sugar)를 1 mg/kg으로 Freund's complete adjuvant(sigma)를 첨가하여 일주일에 한번씩 총 세 번을 피하 투여하였다. 혈액을 추출하여, antidrug antibody assay kit를 이용하여 생성된 항체를 정량 분석하여, 그 결과를 도 5에 나타내었다.

[308] 도 5에서 확인할 수 있듯이, Ex4를 투여한 군에서는 Ex4에 대한 lgG의 항체가

약 10 pg/ml이 형성된 반면에, 당쇄화 AGM-212 유사체를 투여한 군에서는 형성된 항체가 검출되지 않음을 확인하였다. 이 결과는 당쇄화 AGM-212 유사체가 당쇄화로 인해 이의 면역원성이 개선되었음을 의미한다.

[309]

[310] **실험예 6. 유사체의 용해도 시험**

[311] 당쇄화된 유사체는 당의 결합으로 증진된 용해도(solubility)를 가질 수 있기 때문에, 당쇄화 AGM-212 유사체에 대한 용해도 시험을 수행하였다. AGM-212(N28C-11 sugar) 및 AGM-212(E17C-11 sugar & N28C-11 sugar)를 각각 10 mg/ml로 H_2O 및 PBS(phosphate buffered saline)에서의 용해도를 HPLC를 이용하여 진행하여, 그 결과를 표 6에 나타내었다.

[312] [표6]

용매	명명	용해도
H_2O	Ex4	>10 mg/ml
	AGM-212	<2.5 mg/ml
	AGM-212(N28C-11 sugar)	<6.1 mg/ml
	AGM-212(E17C-11 sugar & N28C-11 sugar)	<8.3 mg/ml
PBS	Ex4	>10 mg/ml
	AGM-212	<5.4 mg/ml
	AGM-212(N28C-11 sugar)	<7.8 mg/ml
	AGM-212(E17C-11 sugar & N28C-11 sugar)	<9.5 mg/ml

[313]

[314] 표 6에서 확인할 수 있듯이, Ex4는 모든 용매에서 10 mg/ml의 용해도를 갖는데, AGM-212의 경우, H_2O에서는 다소 감소된 용해도를 갖음을 알 수 있었고, PBS에서는 Ex4 대비 약 0.5배 이상의 용해도를 나타내었다. 당쇄화 유사체의 경우, 모든 용매에서 AGM-212보다는 증진된 용해도를 보이며, 11 sugar가 하나 및 두개로 결합된 유사체의 용해도를 비교할 때, 결합된 당의 수의 증가로 인해, 보다 증진된 용해도를 가짐을 발견하였다.

[315]

[316] **II. 엑세나타이드 이량 유사체**

[317] **실시예 1. AGM-212-1의 제조**

[318] **1-1. 화학식 1**

[319] 트리틸 레진(trityl resin)에 Fmoc-Lys(dde)-OH 및 DMF를 첨가하여 Fmoc-Lys(dde) 트리틸 레진을 제조하였다. Fmoc-Lys(dde) 트리틸 레진에 20%

피페리딘(piperidine)이 포함된 DMF 및 Fmoc-Ser(tBu)-OH 및 HOBt(hydroxyl-benzo triazole)를 첨가하여 Fmoc-Ser(tBu)-Lys(dde) 트리틸 레진을 제조하였다. Fmoc-Ser(tBu)-Lys(dde) 트리틸 레진에 상기 제작 방법을 동일하게 하여 순차적으로 Fmoc-Pro-OH, Fmoc-Gly-OH, Fmoc-Gly-OH, Fmoc-Asn(trt)-OH, Fmoc-Lys(boc)-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Trp(Boc)-OH, Fmoc-Cys(trt)-OH, Fmoc-Ile-OH, Fmoc-Phe-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Arg(pbf)-OH, Fmoc-Val-OH, Fmoc-Ala-OH, Fmoc-Cys(Acm)-OH, Fmoc-Glu(tBu)-OH, Fmoc-Glu(tBu)-OH, Fmoc-Met-OH, Fmoc-Gln(trt)-OH, Fmoc-Lys(boc)-OH, Fmoc-Ser(tBu)-OH, Fmoc-Le)-OH, Fmoc-Asp(tBu)-OH, Fmoc-Ser(tBu)-OH, Fmoc-Thr(tBu)-OH, Fmoc-Phe-OH, Fmoc-Thr(tBu)-OH, Fmoc-Gly-OH, Fmoc-Glu(tBu)-OH, Fmoc-Gly-OH, Fmoc-His(trt)-OH을 첨가하여 아래의 화학식 1을 제조하였다.

[320] [화학식 1]

[321] Fmoc-His(trt)-Gly-Glu(tBu)-Gly-Thr(tBu)-Phe-Thr(tBu)-Ser(tBu)-Asp(tBu)-Leu-Ser(tBu)-Lyc(Boc)-Gln(trt)-Met-Glu(tBu)-Glu(tBu)-Cys(Acm)-Ala-Val-Arg(pbf)-Leu-Phe-Ile-Cys(trt)-Trp(Boc)-Leu-Lys(Boc)-Asn(trt)-Gly-Gly-Pro-Ser(tBu)-Ser(tBu)-Gly-Ala-Pro-Pro-Pro-Ser(tBu)-Lys(dde)-트리틸 레진

[322]

[323] **1-2. 화학식 2**

[324] 화학식 1에 2% $NH_2NH_2.H_2O$를 포함하는 DMF를 첨가하고 dde를 제거하여 화학식 2을 제조하였다.

[325] [화학식 2]

[326] Fmoc-His(trt)-Gly-Glu(tBu)-Gly-Thr(tBu)-Phe-Thr(tBu)-Ser(tBu)-Asp(tBu)-Leu-Ser(tBu)-Lyc(Boc)-Gln(trt)-Met-Glu(tBu)-Glu(tBu)-Cys(Acm)-Ala-Val-Arg(pbf)-Leu-Phe-Ile-Cys(trt)-Trp(Boc)-Leu-Lys(Boc)-Asn(trt)-Gly-Gly-Pro-Ser(tBu)-Ser(tBu)-Gly-Ala-Pro-Pro-Pro-Ser(tBu)-Lys-트리틸 레진

[327]

[328] **1-3. 화학식 3**

[329] 화학식 2에 capric acid 및 HOBt 및 DIC를 포함하는 DMF를 첨가하여 화학식 3를 제조하였다.

[330] [화학식 3]

[331] Fmoc-His(trt)-Gly-Glu(tBu)-Gly-Thr(tBu)-Phe-Thr(tBu)-Ser(tBu)-Asp(tBu)-Leu-Ser(tBu)-Lyc(Boc)-Gln(trt)-Met-Glu(tBu)-Glu(tBu)-Cys(Acm)-Ala-Val-Arg(pbf)-Leu-Phe-Ile-Cys(trt)-Trp(Boc)-Leu-Lys(Boc)-Asn(trt)-Gly-Gly-Pro-Ser(tBu)-Ser(tBu)-Gly-Ala-Pro-Pro-Pro-Ser(tBu)-Lys(capric acid)-트리틸 레진

[332]

[333] **1-4. 화학식 4**

[334] 화학식 3의 보호기를 절단 한 후, 정제하여 화학식 4를 제조하였다.

[335] [화학식 4]

[336] His-Gly-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Leu-Ser-Lyc-Gln-Met-Glu-Glu-Cys(Acm)-Ala-Val-Arg-Leu-Phe-Ile-Cys-Trp-Leu-Lys-Asn-Gly-Gly-Pro-Ser-Ser-Gly-Ala-Pro-Pro-Pro-Ser-Lys(capric acid)-OH

[337]

[338] **1-5. 화학식 5**

[339] 화학식 4에 11 당의 구조를 이루는 Bromoacetyl glycan (11 suar) 및 NaOH, Phosphate buffer를 첨가하여, 화학식 5을 제조하였다.

[340] [화학식 5]

[341] His-Gly-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Leu-Ser-Lyc-Gln-Met-Glu-Glu-Cys(Acm)-Ala-Val-Arg-Leu-Phe-Ile-Cys(11 sugar)-Trp-Leu-Lys-Asn-Gly-Gly-Pro-Ser-Ser-Gly-Ala-Pro-Pro-Pro-Ser-Lys(capric acid)-OH

[342]

[343] **1-6. AGM-212-1**

[344] 화학식 5에 Silver acetate, 및, iodine, 50% 아세트산을 첨가하여 표 1의 AGM-212-1을 제조하였다.

[345]

[346] **실시예 2. AGM-212-2의 제조**

[347] 실시예 1의 제조 과정에서 28번째 아미노산인 Fmoc-Asn(tBu)-OH를 Fmoc-Cys(trt)-OH로 대체하여 동일한 방법으로 표 1의 AGM-212-2를 제조하였다.

[348]

[349] **실시예 3. AGM-212-3의 제조**

[350] **3-1. 화학식 6**

[351] 트리틸레진에 Fmoc-Lys-OH 및 DMF를 첨가하여 Fmoc-Lys 트리틸 레진을 제조하였다. 상기 실시예 1의 제조과정에서 17번의 Fmoc-Cys(Acm)-OH을 Fmoc-Glu(tBu)-OH로 치환하는 것만 달리하여 화학식 6을 제조하였다.

[352] [화학식 6]

[353] His-Gly-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Leu-Ser-Lyc-Gln-Met-Glu-Glu-Glu-Ala-Val-Arg-Leu-Phe-Ile-Asn-Trp-Leu-Lys-Asn-Gly-Gly-Pro-Ser-Ser-Gly-Ala-Pro-Pro-Pro-Ser-Lys(capric acid)-Lys-OH

[354]

[355] **3-2. 화학식 7**

[356] 글루카곤을 제조하기 위해 트리틸레진에 Fmoc-Thr(tBu)-OH 및 DMF를 첨가하여 Fmoc-Thr(tBu) 트리틸 레진을 제조하였다. Fmoc-Thr(tBu) 트리틸 레진에 20% 피페리딘(piperidine)이 포함된 DMF 및 Fmoc-Asn(trt)-OH 및 HOBt(hydroxyl-benzo triazole)를 첨가하여 Fmoc-Asn(trt)-Thr(tBu) 트리틸 레진을 제조하였다. Fmoc-Asn(trt)-Thr(tBu) 트리틸 레진에 상기 제작 방법을 동일하게

하여 순차적으로 Fmoc-Met-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Trp(Boc)-OH, Fmoc-Gln(trt)-OH, Fmoc-Val-OH, Fmoc-Phe-OH, Fmoc-Asp(tBu)-OH, Fmoc-Gln(trt)-OH, Fmoc-Ala-OH, Fmoc-Arg(pbf)-OH, Fmoc-Arg(pbf)-OH, Fmoc-Ser(tBu)-OH, Fmoc-Asp(tBu)-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Tyr(tBu)-OH, Fmoc-Lys(trt)-OH, Fmoc-Ser(tBu)-OH, Fmoc-Tyr(tBu)-OH, Fmoc-Asp(tBu)-OH, Fmoc-Ser(tBu)-OH, Fmor-Thr(tBu)-OH, Fmoc-Phe-OH, Fmor-Thr(tBu)-OH, Fmoc-Gly-OH, Fmoc-Gln(trt)-OH, Fmoc-Ser(tBu)-OH, Fmoc-His(trt)-OH을 첨가하여 아래의 화학식 7을 제조하였다.

[357] [화학식 7]

[358] Fmoc-His(trt)-Ser(tBu)-Gln(trt)-Gly-Thr(tBu)-Phe-Thr(tBu)-Ser(tBu)-Asp(tBu)-Tyr(tBu)-Ser(tBu)-Lys(trt)-Tyr(tBu)-Leu-Asp(tBu)-Ser(tBu)-Arg(pbf)-Arg(pbf)-Ala-Gln(trt)-Asp(tBu)-Phe-Val-Gln(trt)-Trp(Boc)-Leu-Met-Asn(trt)-Thr(tBu)-트리틸 레진

[359]

[360] **3-3. 화학식 8**

[361] 화학식 7의 보호기를 절단하고 정제하여 화학식 8을 제조하였다.

[362] [화학식 8]

[363] 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

[364]

[365] **3-4. AGM-212-3**

[366] 상기 화학식 6과 화학식 8에 20% 피페리딘(piperidine)이 포함된 DMF 및 HOBt(hydroxyl-benzo triazole)를 첨가하여 화학식 8의 34번 Lys의 측쇄에 화학식 8의 30번 Thr이 결합된 표 1의 AGM-212-3을 제조하였다.

[367]

[368] **실시예 4. AGM-212-4의 제조**

[369] 실시예 3에서 화학식 6의 구성 서열 중 28번의 Asn을 11NC-Asn-Fmoc으로 치환하여 제조 후, 화학식 8의 물질을 20% 피페리딘(piperidine)이 포함된 DMF 및 HOBt(hydroxyl-benzo triazole)를 첨가하여 화학식 6의 34번 Lys의 측쇄에 결합된 표 1의 AGM-212-4를 제조하였다.

[370]

[371] **실시예 5. AGM-212-5의 제조**

[372] 상기 실시예 4의 제조 과정에서 화학식 6의 구성 서열 중 16번 Ser을 11NC-Asn-Fmoc으로 치환하여 동일한 제조 방법으로 표 1의 AGM-212-5를 제조하였다.

[373]

[374] **실시예 6. AGM-212-6의 제조**

[375] 실시예 4의 제조 과정에서 화학식 6의 구성 서열 중 24번 Gln을 11NC-Asn-Fmoc으로 치환하여 동일한 제조 방법으로 표 1의 AGM-212-6을

제조하였다.

[376]

[377] **실시예 7. AGM-212-7의 제조**

[378] **7-1. 화학식 9**

[379] 실시예 5의 제작 과정 중 16번의 Ser을 Cys(Acm)으로 치환하고, 24번의 Glutamine을 Cys로 치환하여 화학식 10을 제조하였다.

[380] [화학식 9]

[381] His-Ser-Gln-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Lys-Tyr-Leu-Asp-Cys(Acm)-Arg-Arg-Ala-Gln-Asp-Phe-Val-Cys-Trp-Leu-Met-Asn-Thr-OH

[382]

[383] **7-1. 화학식 10**

[384] 화학식 9에 11 당의 구조를 이루는 Bromoacetyl glycan (11 suar) 및 NaOH, Phosphate buffer를 첨가하여, 화학식 10을 제조하였다.

[385] [화학식 10]

[386] His-Ser-Gln-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Lys-Tyr-Leu-Asp-Cys(Acm)-Arg-Arg-Ala-Gln-Asp-Phe-Val-Cys(11 sugar)-Trp-Leu-Met-Asn-Thr-OH

[387]

[388] **7-2. AGM-212-7**

[389] 화학식 5와 화학식 10에 Silver acetate, 및, iodine, 50% 아세트산을 첨가하여 표 1의 AGM-212-7을 제조하였다.

[390]

[391] **실시예 8. AGM-212-8의 제조**

[392] **8-1. 화학식 11**

[393] 실시예 5의 제작 과정 중 16번의 Ser을 Cys로 치환하고, 24번의 Gln을 Cys(Acm)으로 치환하여 화학식 11을 제조하였다.

[394] [화학식 11]

[395] His-Ser-Gln-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Lys-Tyr-Leu-Asp-Cys-Arg-Arg-Ala-Gln-Asp-Phe-Val-Cys(Acm)-Trp-Leu-Met-Asn-Thr-OH

[396]

[397] **8-2. 화학식 12**

[398] 화학식 11에 11 당의 구조를 이루는 Bromoacetyl glycan (11 suar) 및 NaOH, Phosphate buffer를 첨가하여, 화학식 12를 제조하였다.

[399] [화학식 12]

[400] His-Ser-Gln-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Lys-Tyr-Leu-Asp-Cys(11 sugar)-Arg-Arg-Ala-Gln-Asp-Phe-Val-Cys(Acm)-Trp-Leu-Met-Asn-Thr-OH

[401]

[402] **8-3. AGM-212-8**

[403] 화학식 6과 화학식 12에 Silver acetate, 및, iodine, 50% 아세트산을 첨가하여 표

7의 AGM-212-8을 제조하였다.

[404] [표7]

명명	서열목록
Ex4	HGEGTFTSDL SKQMEEEAVR LFIEWLKNGG PSSGAPPPS
Glucagon	HSQGTFTSDY SKYLDSRRAQ DFVQWLMNT
AGM-212	HGEGTFTSDL SKQMEEEAVR LFIEWLKNGG PSK-capric acid
AGM-212-1	AGM-212(E17C & E24C-11 sugar) -S-S - AGM-212(E17C & E24C-11 sugar)
AGM-212-2	AGM-212(E17C & N28C-11 sugar) -S-S - AGM-212(E17C & N28C-11 sugar)
AGM-212-3	AGM-212 - Lys(s.c) - 글루카곤
AGM-212-4	AGM-212(N28-11 sugar) -Lys(s.c) - 글루카곤
AGM-212-5	AGM-212(N28-11 sugar) -Lys(s.c) - 글루카곤(S16N-11 sugar)
AGM-212-6	AGM-212(N28-11 sugar) -Lys(s.c) - 글루카곤(Q24N-11 sugar)
AGM-212-7	AGM-212(E17C & E24C-11 sugar)-S-S - 글루카곤(S16C-11 sugar & Q24C)
AGM-212-8	AGM-212(E17C & E24C-11 sugar) -S-S - 글루카곤(S16C & Q24C-11 sugar)

[405]

[406] **실험예 1. 유사체의 GLP-1 수용체 결합력 확인**

[407] 실시예 1 내지 6에서 제조한 유사체의 GLP-1 수용체에 대한 결합력을 알아보기 위해, luciferase assay system을 사용하였다. Luciferase assay system은 세포의 특정 수용체에 대한 리간드의 결합력을 측정하여 수용체의 활성 정도를 확인할 수 있는 방법이다.

[408] 구체적으로, 섬유아세포주인 CV-1(1 x 10^4 cells/ml, 한국세포주은행)을 96well white cell culture plate에 24시간 배양 후, human GLP-1R(pcDNA3.1_hGLP-1R), cAMP response element (CRE, pcDNA3.1_hCRE)를 첨가하여 형질전환(transfection)한다. 24시간 배양 후, serum이 없는 배지로 교체하여, 16시간 배양 후, 각 유사체를 6시간 동안 처리한다. 활성화된 GLP-1R에 의해 reporter gene인 luciferase의 발현 정도를 luminometer를 이용하여 정량하여, 그

결과를 표 8에 나타내었다.

[409] [표8]

명명	EC_{50} (nM)	E_{max} (fold induction over basal)
Ex4	0.8 ± 0.12	10.6 ± 1.5
AGM-212	0.91 ± 0.21	10.4 ± 1.4
AGM-212-1	0.13 ± 0.4	10.1 ± 1.2
AGM-212-2	0.11 ± 0.8	10.2 ± 1.3
AGM-212-3	8 ± 0.7	10.1 ± 1.4
AGM-212-4	32 ± 1.7	10.2 ± 1.2
AGM-212-5	25 ± 1.2	10.4 ± 1.1
AGM-212-6	34 ± 1.5	7.2 ± 1.3
AGM-212-7	16 ± 1.5	10.2 ± 1.3
AGM-212-8	25 ± 1.5	10.3 ± 1.5

[410]

[411] 표 8에서 확인할 수 있듯이, AGM-212-1 및 AGM-212-2가 Ex4보다 약 6배이상 증진된 EC50 수준을 확인하였다. 이 결과는, 이황화결합으로 구성된 당쇄화된 엑세나타이드 동종 유사체가 GLP-1 수용체에 대해 기존의 Ex4보다 또한 AGM-212보다도 높은 활성을 가짐을 알 수 있다. AGM-212-3의 경우, 10배 정도 감소된 EC50 수준이 관찰되었으며, AGM-212-4, AGM-212-5 및 AGM-212-6은 AGM-212-3에 비해 4~5배 정도 감소된 활성을 관찰할 수 있었다. 이 결과는, 글루카곤과 엑세나타이드 유사체가 이황화결합으로 결합하여, GLP-1 수용체에 대해 활성이 다소 감소됨을 알 수 있으며, 이들 이종 유사체 구성 중 글루카곤의 당쇄화는 GLP-1 수용체의 활성을 감소시킴을 알 수 있다. 하지만 모든 유사체가 GLP-1 수용체에 대해 nM 수준의 높은 결합력을 보이며, 이것은 선택적이고 특이적인 효현제의 기능을 갖음을 알 수 있다.

[412] 그 결과, AGM-212는 Ex4와 동등한 GLP-1R에 대한 활성을 보이며, 11 당이 결합된 AGM-212 유사체들은 Ex4 또는 AGM-212보다 다소 감소된 활성을 확인하였다. 11 sugar로 인해 각 유사체들의 활성이 감소되지만 여전히 nM 수준의 결합력을 갖음을 알 수 있었다.

[413]

[414] **실험예 2. 유사체의 인슐린 분비능 확인**

[415] 실시예 1 내지 실시예 2에서 제조한 유사체의 인슐린 분비능을 확인하기 위해, rat islets에 대한 유사체의 당 의존성 인슐린 분비능을 확인하였다. SD rat (다물사이언스) 8주령의 pancreas를 추출하여, islets을 분리하였다. 분리된 islets을 28 mM glucose에서의 각 유사체를 농도별(10 nM, 100 nM)로 처리 한 후,

rat insulin ELISA kit를 이용해 분비된 인슐린 양을 측정하여, 그 결과를 도 6 및 표 9에 나타내었다.

[416] [표9]

목록	Insulin secretion from rat islets (pg/ml)	
	10 nM	100 nM
Control	5018.30 ± 534.4	5020.30 ± 533.4
Ex4	7803.40 ± 2216.2	9928.68 ± 1638.11
AGM-212	10978.11 ± 268.7	15476.60 ± 5468.3
AGM-212-1	14506.04 ± 3493.9	20080 ± 8384.9
AGM-212-2	14446.79 ± 654.34	24954.72 ± 2741.89

[417]

[418] 도 6 및 표 9에서 확인할 수 있듯이, 당쇄화 엑세나타이드 동종 유사체가 엑세나타이드 및 AGM-212에 비해 농도 의존적으로 증진된 인슐린 분비능을 보이고 있음을 확인하였다.

[419]

[420] **실험예 3. 유사체의 항당뇨 효과 확인**

[421] 실시예 1 내지 실시예 6에서 제조한 유사체의 항당뇨 효과를 확인하기 위하여, 2형 당뇨 질병 마우스 모델인 C57BKS/J dbdb mice(5-7주령, 중앙실험동물)에서 혈당 강하 효과를 확인하였다.

[422] 구체적으로, 각 유사체들을 20 nmole/kg으로 피하 투여하고, 0, 1, 2, 4, 6, 8, 12, 18, 24, 44, 48시간 경과 후, 마우스의 꼬리 미정맥 혈액을 채취하여 혈당 수준을 측정하여, 그 결과를 도 7a 내지 도 8b에 나타내었다.

[423] 도 7a 내지 도 7b에서 확인할 수 있듯이, AGM-212-2가 Ex4 및 AGM-212보다 증진된 혈당 강하 정도를 나타냄을 확인하였다. AGM-212-1과의 활성 결과를 비교해보면, AGM-212-1의 24번 Cys의 당쇄화가 감소된 항당뇨 효능을 나타냄을 알 수 있었다.

[424] 도 8a 내지 도 8b에서 확인할 수 있듯이, AGM-212-3, AGM-212-4, AGM-212-5 모두 유의미한 항당뇨 효능을 보였으나, AGM-212보다는 다소 감소된 효능을 보임을 확인하였다. AGM-212-4, AGM-212-5, AGM-212-6은 AGM-212-3의 구성 서열 중 글루카곤의 구성 잔기에 당이 결합된 구조인데, 항당뇨 효능에 있어서는 각 잔기로 인한 큰 활성 차이는 나타나지 않음을 확인하였다. AGM-212-7, AGM-212-8은 각각 서로 다른 잔기에 당쇄화된 글루카곤과 AGM-212가 이황화결합으로 구성된 형태로, Ex4와 유사한 항당뇨능을 가짐을 확인하였다.

[425]

[426] **실험예 4. 유사체의 약동력학 (pharmacokinetics) 시험**

[427] 실시예 1내지 실시예 8에서 제조한 유사체의 약동력학 시험을 실시하였다. 야생형 C57BL/6J mice(male, 5-6주령, n=5)을 이용, 각 유사체들을 50 nmole/kg으로 피하 투여 후, 각 0, 0.5, 1, 2, 4, 8, 10, 12, 14 및 24 시간에 혈액을 추출하였다. 추출한 혈액의 혈장을 분리하여 Exendin-4 EIA를 이용하여 정량 분석을 진행하였다. 결과 분석은 winnolin 프로그램을 이용하여 Pharmacokinetics parameter를 결정하여, 그 결과를 도 9a 내지 도 9b에 나타내었다.

[428] [표10]

Parameter	Ex4	AGM-212	AGM-212-2	AGM-212-3	AGM-212-4	AGM-212-5	AGM-212-6	AGM-212-7	AGM-212-8
t1/2 (h)	0.56 ± 0.03	3.68 ± 0.35	4.85 ± 0.278	4.86 ± 0.3	4.77 ± 0.33	3.72 ± 0.06	4.69 ± 0.18	5.82 ± 0.1	5.84 ± 0.23
Tmax (h)	0.5	4	2	1 ± 0.4	1.5 ± 0.28	2.5 ± 0.5	1.13 ± 0.32	1.75 ± 0.75	1
Cmax (ng/mL)	107.38 ± 12.48	750.67 ± 107.7	605.15 ± 19.03	1219.06± 66.12	1190.2 ± 84.8	1250 ± 83.3	1333.3	715.6 ± 81.1	675.1 ± 65.4
AUC (ng h/mL)	171.5 ± 7.15	6698.8 ± 621	4414.9 ± 226.38	7647.23± 548.3	8365.12± 271.5	7229.2 ± 741.3	9684.1 ± 294.1	4608.4 ± 383.02	4658.1 ± 130.77
Vd (mL/kg)	1004 .9 ± 81.51	334.8 ± 38.35	993 ± 54.15	440.3 ± 55.9	783.6 ± 93.4	453.3 ± 54.5	403.5 ± 12.9	822.2 ± 61.7	805.5 ± 43.9
Cl (mL/h/kg)	1236.9 ± 52.4	63.36 ± 5.93	133.9 ± 7.19	62.1 ± 4.22	55.5 ± 1.67	84.2 ± 8.9	59.73 ± 2	97.8 ± 7.15	95.4 ± 2.01

[429]

[430] 도 9a 내지 도 9b 및 표 10에서 확인할 수 있듯이, 모든 유사체가 Ex4보다 현저히 증진된 반감기를 나타냈으며, 구체적으로 AGM-212-1, AGM-212-2, AGM-212-3, AGM-212-4, AGM-212-5, AGM-212-6, AGM-212-7, AGM-212-8 모두 AGM-212보다 약 1~1.5배 이상 증진된 반감기 수준을 보임을 확인하였다. 이 결과는, 엑세나타이드 이량유사체가 이황화결합과 같은 특정 결합을 통해 생체 내 안정성이 크게 증진됨을 나타낸다.

[431]

[432] **실험예 5. 유사체의 비만 질병 동물 모델에서의 체중 및 식이 조절능 확인**

[433] 실시예 3에서 제조한 유사체의 비만 질병 동물 모델에서의 체중 감소 및 식이

조절능 시험 평가를 하였다. C57BL/6 마우스를 대상으로 비만과 고혈당 증세를 동시에 보유하도록 60% 이상 지방이 함유된 고지방 식이 섭취를 유도한 비만 질병 동물 모델을 제작하였다. 16주령의 비만 질병 마우스를 대상으로 9주간 AGM-212-3 및 AGM-212-4를 50 nmole/kg으로 일일 1회 피하 투여하였다. 그 결과를 도 10a 내지 도 10c 및 표 11에 나타내었다.

[434] [표11]

군	체중 변화량 (%)
Vehicle	17.17 ± 0.56
Ex4	-2.63 ± 1.06
AGM-212	11.71 ± 2.40
Glucagon	-8.67 ± 1.76
AGM-212 + 글루카곤	-12.36 ± 2.11
AGM-212-3	-21.95 ± 1.83
AGM-212-4	-20.04 ± 2.21

[435]

[436] 도 10a 내지 도 10c 및 표 11에서 확인할 수 있듯이, 3주차부터 각 유사체를 투여한 군의 체중이 유의미하게 감소됨을 확인하였고, 5주차부터 AGM-212 또는 AGM-212와 글루카곤의 동시 투여군과 대비하여 유의미한 차이를 보임을 확인하였다. 실험이 종료된 9주차에서 AGM-212-3 및 AGM-212-4를 투여한 군의 식이 섭취량도 유의미하게 감소됨을 확인하였다.

[437]

[438] **실험예 6. 유사체의 비만 질병 동물 모델에서의 당내성 개선효과 확인**

[439] 실시예 5의 실험 과정 중 7주에 해당하는 기간에 AGM-212-3으로 인한 당내성 개선 효과를 확인하였다. 구체적으로, 실험 7주차의 비만 질병 동 마우스를 16시간 절식한 후, 각 유사체들을 10 nmole/kg으로 피하투여하고, 30분 후, 포도당(1.5 g/kg)을 복강으로 투여하였다. 120분 동안, 0, 15, 30, 45, 60, 90, 120분에서의 마우스 꼬리 미정맥에서 추출한 혈액을 이용하여 혈당측정기(acu-check, Roche, Germany)로 혈당을 측정하여, 그 결과를 도 11a 내지 도 11b 및 표 12에 나타내었다.

[440] [표12]

군	Blood glucose (Area under curve)
Vehicle	43957.5 ± 2483.8
Ex4	17795.0 ± 2137.4
AGM-212	45846.2 ± 5538.1
Glucagon	29029.5 ± 1784.5
AGM-212 + 글루카곤	23687.5 ± 3393.1
AGM-212-3	19545 ± 623.1
AGM-212-4	20936.2 ± 837.3

[441]

[442] 도 11a 내지 도 11b 및 표 12에서 확인할 수 있듯이, 각 유사체를 투여한 마우스 군의 혈당이 감소되었고, 대조군 대비 각 혈당 측정 시간대에서 유의한 혈당 감소를 보였다. 상기 결과는 유사체의 장기간 투여에 따른 비만 질병 마우스의 당 내성이 개선되었음을 시사한다.

[443]

[444] **실험예 7. 유사체의 비만 질병 동물 모델에서의 인슐린 내성 개선효과 확인**

[445] 비만에 의한 체내 지방 축적량 증가는 인슐린을 생산하는 췌장 islet의 베타 세포에 대한 지방 독성을 증가시켜 인슐린 생산량을 감소시키고, 식후 증가한 혈당에 대해 이를 흡수, 저장하는 조직인 간, 근육에서의 인슐린 소비를 저해하여 고 인슐린 혈증과 인슐린의 기능 감소를 유도해 고혈당 증세를 유발하는 주 원인인 인슐린 저항성 증가의 주 원인으로 보고되어 있다.

[446] 실험예 5의 9주 비만 질병 마우스를 사용한 장기 투여 실험 8주에 해당하는 기간에 인슐린 내성 실험을 진행하여 약물의 장기 투여에 따른 인슐린에 대한 민감성 (insulin sensitivity)을 확인하였으며, 장기 투여 실험 종료 후 마우스 혈액을 채취하여 mouse insulin ELISA를 통해 혈중 인슐린 농도를 분석하여 인슐린 저항성 (insulin resistance)의 개선 여부를 확인하였다.

[447] 구체적으로, 장기 투여 실험 8주차의 비만 질병 마우스를 6시간 절식한 후, 각 유사체들을 1 nmol/kg의 농도로 피하 투여하고, 30분 경과 후, 인슐린 (1 unit/kg)을 복강 투여하였다. 0, 15, 30, 60, 90, 120 분 경과 후 마우스의 꼬리에서 혈액을 채취, 이를 혈당 측정기 (acc-check, Roche, Germany)로 혈당을 측정하여 인슐린에 대한 민감성을 분석하여, 그 결과를 도 12a 내지 12b 및 표 13, 표 14에 나타내었다.

[448] [표13]

군	Blood glucose (Area under curve)
Vehicle	21231.2 ± 293.4
Ex4	11847.0 ± 582.7
AGM-212	23749.5 ± 387.6
Glucagon	13102.5 ± 638.8
AGM-212 + 글루카곤	15222.0 ± 263.6
AGM-212-3	13288.5 ± 409.1
AGM-212-4	13966.2 ± 504.1

[449]

[450] [표14]

군	Insulin (ng/ml)	Leptin (pg/ml)	Triglyceride (nmol/ul)	Cholesterol(ug/ul)
Vehicle	241.72 ± 56.27	669.92 ± 30.47	56.25 ± 2.11	205.92 ± 7.19
Ex4	67.52 ± 12.33	341.41 ± 43.10	48.64 ± 1.94	156.17 ± 8.56
AGM-212	44.77 ± 12.21	212.52 ± 23.92	40.51 ± 1.28	134.28 ± 5.06
Glucagon	86.08 ± 21.43	463.09 ± 44.22	43.01 ± 1.38	161.43 ± 7.55
AGM-212 + 글루카곤	44.46 ± 9.17	175.21 ± 40.57	34.51 ± 0.85	111.23 ± 1.62
AGM-212-3	26.90 ± 6.86	95.81 ± 10.10	31.76 ± 1.81	92.83 ± 3.00

[451]

[452] 도 12a 내지 12b 및 표 13에서 확인할 수 있듯이, 각 유사체를 투여한 실험군의 혈당이 복강 투여한 인슐린에 대해 높은 민감성으로 보이며 혈당이 빠르게 감소됨을 확인하였다.

[453] 또한, 표 14에서 확인할 수 있듯이, 실험 종료 후 유사체를 투여한 마우스 군의 혈중 인슐린 농도가 유의하게 감소하였음을 확인하였다.

[454] 상기 결과들을 통해 AGM-212-3 및 AGM-212-4의 장기간 투여에 인슐린 민감성, 고인슐린 혈증이 개선되어 비만 질병 마우스의 인슐린 기능의 회복을 유도하였음을 시사한다.

[455]

[456] **실험예 8. 유사체의 비만 질병 동물 모델에서의 간내 지방 축적량 변화 확인**

[457] 고지방 식이 섭취에 의한 과체중, 비만의 발생은 대사 조직인 간 내 지방 축적 및 간세포 내 지질 합성 등을 증가시켜 대사 질환인 비알코올성 지방간

(non-alcoholic fatty liver disease)의 발병률을 증가시키는 원인으로 알려져 있다. AGM-212-3의 장기 투여에 따른 비만 질병 마우스의 체중 감소가 연관된 대사 질환인 지방간의 증세 완화에 영향을 주는지 확인하기 위해, 지질 확인 염색법인 Oil red O staining을 통해 간 조직 내 지질 량을 분석하였으며, 또한 간 조직을 분해하여 세포 내 지질 저장 형태인 Triglyceride의 양을 확인하였다.

[458] 구체적으로, 실험예 5의 9주 장기 투여 실험 종료 후 마우스 간을 적출하여 각 엽 (lobe) 별로 구분해 일부는 4% formaldehyde에 넣어 고정시킨 뒤, 파라핀 블록을 제조하여 슬라이스 한 후 만들어진 슬라이드에 지질 확인 염색 시약인 Oil red O를 처리하여 염색 시킨 후, 이를 현미경을 통해 관찰하였다. 간 조직 내 triglyceride 량의 측정은 분리한 간 조직을 70 um cell strainer를 이용해 분해한 후, 14,000 rpm에서 원심 분리해 얻어진 triglyceride를 포함한 상층액을 일정 비율로 희석한 후 Triglyceride ELISA를 이용해 분석하여, 그 결과를 도 13a 내지 도 13b에 나타내었다.

[459] [표15]

군	Hepatic triglyceride (mg/g)
Vehicle	39.38 ± 4.08
AGM-212	7.50 ± 1.01
AGM-212-3	3.58 ± 0.12

[460]

[461] 도 13a 내지 도 13b 및 표 15에서 확인할 수 있듯이, AGM-212-3을 투여한 마우스의 간 내 Oil red O 로 염색된 지질 범위가 감소하였음을 확인할 수 있으며, 간 조직 내 triglyceride 량 또한 유의하게 감소함을 확인하였다.

[462] 상기 결과는 AGM-212-3의 장기간 투여에 따른 체중 감소가 비만 질병 마우스에의 고지방 식이 섭취에 따른 지방간 발생 위험을 감소시키는 효능을 보유하고 있음을 시사한다.

[463]

[464] **실험예 9. 유사체의 비만 질병 동물 모델에서의 혈중 대사 관여 인자량 변화 확인**

[465] 혈당 조절 호르몬 인슐린, 식이 조절 호르몬 렙틴의 혈중 농도는 제2형 당뇨병, 비만 발생 시 각 호르몬에 대한 조직에서의 저항성으로 인해 정상치보다 높아지며 이러한 증상을 각각 고인슐린 혈증, 고렙틴 혈증 이라 하며 대사질환 진단의 표지로써 사용된다. 콜레스테롤, 트리글리세라이드 와 같은 지질의 혈중 농도의 증가, 즉 고지혈증은 과체중, 비만의 대표적인 증상으로 비만도를 측정하는 대표적인 표지이다.

[466] 실험예 5에서의 AGM-212-3의 장기 투여에 의해 인슐린, 렙틴 저항성 및 비만도와 같은 대사 이상 증세 개선이 유도되었는지 확인하기 위해 실험 종료 후

마우스 혈액을 채취하여 확인하고자 하는 각 인자에 해당하는 ELISA 검사를 통해 혈중 대사 관여 인자량을 분석하여, 그 결과를 표 13에 나타내었다.

[467] 표 14에서 확인할 수 있듯이, AGM-212-3을 투여한 마우스 군의 혈중 인슐린, 렙틴 농도가 유의하게 감소하였으며, 콜레스테롤, Triglyceride의 지질 농도 또한 유의하게 감소하였다.

[468] 상기 결과는 AGM-212-3의 투여에 따른 비만 질병 마우스의 고지방식이 섭취에 의해 발생하는 대사 호르몬에 대한 저항성 및 고지혈증의 개선이 유도되었음을 시사한다.

[469]

[470] **실험예 10. 유사체의 비만 질병 동물 모델에서의 열에너지 발생 증진 효과 확인**

[471] 글루카곤과 글루카곤 리셉터의 갈색 지방 조직에서의 상호작용에 의해 유도되는 열에너지 발생 증가는 단백질인 Uncoupling protein 1 (UCP-1)의 미토콘드리아에서의 발현을 증가시켜 지방산을 산화하여 발생한 Acetyl CoA 의 산화, 환원 과정 중에 발생하는 수소를 산화적 인산화, 즉 호흡에의 사용을 막고 UCP1을 통과하도록 하여, 이 때 발생한 에너지를 열로써 방출되도록 함으로써 체내 축적된 지방의 소비를 증가시켜 체중 감소에 주요하게 작용하는 것으로 보고되었다.

[472] AGM-212-3의 열에너지 발생 증진 효과를 확인하기 위해 16주령 비만 질병 마우스 (Diet induced obese C57BL/6)를 대상으로 5주간 일일 1회 피하 투여한 후 열에너지 발생량, 운동량, 호흡 계수, 직장 내 온도를 측정하였다.

[473] 구체적으로, 5주간 장기 투여한 마우스를 에너지 대사 분석 기기인 indirect calorimetry system 와 연결된 대사 사육장 (Metabolic cage)에서 24시간 동안 사육하면서, 호흡을 통해 소비되는 산소량, 방출되는 이산화탄소량을 1시간 간격으로 측정하여 열에너지 발생량과 체내 소비되는 영양소 선호도를 확인할 수 있는 지표인 호흡 계수 (Respiratory quotient)를 분석하였다. 24시간 후 마우스는 대사 사육장에서 꺼내어 thermal probe를 항문을 통해 삽입하여 직장 온도를 측정하여, 그 결과를 도 14a 내지 도 14b에 나타내었다.

[474] [표16]

군	Energy expenditure (kcal/day/kg$^{0.75}$)	
	Dark	Light
Vehicle	161.76 ± 3.49	145.56 ± 2.58
AGM-212	189.30 ± 3.53	158.01 ± 3.43
AGM-212-3	201.78 ± 3.33	175.39 ± 3.20

[475]

[476] 도 14a 내지 도 14b 및 표 16에서 확인할 수 있듯이, 12시간 간격으로 측정한 낮, 밤 시간대에서 AGM-212-3을 투여한 마우스 군의 열에너지 소비량, 직장 내

온도가 유의하게 증가됨을 확인하였다. 반면, 운동량은 대조군과 비교하여 운동 패턴의 변화는 있으나 전체 운동량에서는 유의한 변화가 일어나지 않았음을 확인하였다. 또한, 호흡 계수는 낮, 밤 시간대에서 모두 0.7에 근사하게 유의한 감소를 보였다.

[477] 상기 결과는 비만 질병 마우스의 운동량과 무관하게 유사체에 따른 글루카곤 활성의 장기적인 유지에 의해 지방을 소비하는 열에너지 발생이 증가되었으며 체중 감소에 주요하게 작용하였음을 시사한다.

[478]

[479] **실험예 11. 유사체의 비만 질병 동물 모델에서의 열에너지 발생 관여 인자량 변화 확인**

[480] 실험예 10에서의 AGM-212-3의 열에너지 발생 증진 기작을 검증하기 위해 5주 장기 투여 실험 후 마우스 갈색 지방 조직을 분리하여 웨스턴 블랏 (Western blotting)과 정량적 실시간 중합 효소 연쇄 반응 (Quantitative real time polymerase chain reaction, qRT-PCR)을 통해 열에너지 발생 기작의 주요 인자인 UCP1, PRDM16, CIDEA 의 발현량을 분석하였다. 또한, 4% paraformaldehyde에 고정된 갈색 지방 조직을 대상으로 UCP1에 특이적 affinity를 가지는 항체를 처리해 갈색 지방 조직 내 UCP1 발현량을 관찰하여, 그 결과를 도 15a 내지 도 15b에 나타내었다.

[481] [표17]

군	UCP-1/β-actin expression ratio (arbitrary units)
Vehicle	1.00 ± 0.02
AGM-212	0.93 ± 0.15
AGM-212-3	1.37 ± 0.01

[482]

[483] [표18]

군	mRNA expression (fold.)		
	UCP-1	PRDM16	CIDEA
Vehicle	1.02 ± 0.10	1.06 ± 0.05	1.00 ± 0.08
AGM-212	3.47 ± 1.69	1.01 ± 0.23	1.73 ± 0.31
AGM-212-3	6.03 ± 1.24	5.81 ± 1.12	5.63 ± 1.58

[484]

[485] 도 15a 내지 도 15b 및 표 17, 표 18에서 확인할 수 있듯이, 유사체를 투여한 군의 갈색 지방 조직 내 UCP1 단백질 발현량, UCP-1, PRDM16, CIDEA mRNA 발현량 모두 대조군과 비교하여 유의하게 증가되었음을 확인하였다. 또한, immunohistochemistry (IHC) 이미지에서도 갈색 지방 조직 내 UCP1 량이 대조군과 대비하여 증가됨을 확인하였다.

[486] 상기 결과는 AGM-212-3이 갈색 지방 조직에서의 글루카곤 수용체를 활성화 시켜 열에너지 발생 관여 인자들의 발현을 조절하는 신호 전달 경로의 발생을 증가시켰음을 시사한다.

[487]

[488] **실험예 12. 유사체의 지방 분해능 확인**

[489] AGM-212-3의 장기 투여에 따른 지방 조직의 감소 및 조직 내 지질 합성/분해 기작의 주요 인자들의 발현량 변화를 확인하기 위해, 상기 실시예 11의 장기 투여 실험 종료 후 고환부, 서혜부 백색지방 조직과 피하 갈색 지방 조직을 분리하여 각 조직 별 크기를 측정한 뒤, 웨스턴 블랏, qRT-PCR을 통해 각 대사 인자들의 발현량 변화를 분석하여, 그 결과를 도 16a 내지 도 16e에 나타내었다.

[490] 도 16a 내지 도 16e에서 확인할 수 있듯이, 실험군 마우스의 고환부 백색 지방 조직에서 지방 분해 신호 전달에 중요한 인자인 Protein kinase A와 지질 분해 효소인 HSL의 단백질 발현이 유의하게 증가하였음을 웨스턴 블랏을 통해 확인하였다.

[491] 또한, 지질 분해 효소인 ATGL, HSL과 지방 분해 작용의 주요 인자인 Perilipin의 mRNA 발현량이 유의하게 증가하였고, 지질 합성 및 세포 내 지방산 흡수에 관여하는 CD36, PPARr, C/EBPa, FABP4의 mRNA 발현량은 유의하게 감소함을 qRT-PCR을 통해 확인하였다.

[492] 더불어, 실험군 마우스의 서혜부 백색 지방 조직 내 지질 합성 신호 전달의 주요인자인 FAS의 단백질 발현량과 SCD, ACACA1의 mRNA 발현량은 감소한 반면, 지방산의 베타 산화 (Beta-oxidation) 신호 전달의 주요 인자인 ACSL1의 단백질 발현량, 그리고 CPT1a, CPT2, CACT, PGC-1a의 단백질, mRNA 발현량이 유의하게 증가하였음을 Western blot, qRT-PCR을 통해 확인하였다.

[493]

[494] **실험예 13. 유사체의 근육세포 내 지방 분해능 및 열에너지 발생 효과 확인**

[495] 골격근은 기초 대사율의 주 원인이 되는 기관으로 갈색 지방과 동일한 기작을 통해 열에너지 발생을 증가시켜 체중 조절에 중요한 역할을 담당하는 것으로 보고되어 있다.

[496] 이에, AGM-212-3의 근육에서의 열에너지 발생을 증가시킬 수 있는지의 기능 검증을 위해, 근원세포주인 C2C12를 대상으로, 지질 합성, 분해, 지방산 수송 신호 전달과 연관된 대사인자들의 발현량 변화를 웨스턴 블랏, qRT-PCR을 통해 분석하여, 그 결과를 도 17a 내지 도 17c에 나타내었다.

[497] 도 17a 내지 도 17c에서 확인할 수 있듯이, 웨스턴 블랏을 통해 C2C12 세포 내

열에너지 발생 신호 전달 경로의 주요 신호 전달자인 AMPK의 인산화 정도가 지방산인 palmitic acid (0.75mM) 를 처리한 경우 대조군과 비교하여 감소하는 경향을 보이나, 유사체의 농도 별 처리 (10nM, 20nM, 50nM, 100nM) 시 농도 의존적으로 AMPK의 인산화 정도가 유의하게 증가하였다.

[498] 또한, qRT-PCR을 통해, C2C12 세포 내 지방산 대사 및 미토콘드리아 기질 내 지방산 수송 관여 인자 (ACSL1, CPT1a, CPT2, CACT)와 지방산의 베타 산화 신호 전달 인자 (Acox1, PGC-1a, FoxA2)의 mRNA 발현량이 처리한 접합체의 농도 의존적으로 유의하게 증가한 반면, 지질 합성 신호 전달 인자 (FAS, SREBP-1c)의 mRNA 발현량은 접합체의 농도 의존적으로 감소함을 확인하였다.

[499] 상기 결과는 AGM-212-3이 갈색 지방과 마찬가지로 골격근에서도 열에너지 발생을 증가시키며 지질 합성을 저해할 수 있으며 유요한 체중 감소능을 보유하고 있음을 시사한다.

산업상 이용가능성

[500] 본 발명은 당쇄화 엑세나타이드 유사체 및 이의 용도, 및 엑세나타이드 이량 유사체 및 이의 용도에 관한 것이다.

청구범위

[청구항 1] 엑세나타이드 (exenatide) 아미노산 서열의 1 내지 15개의 아미노산이 결실되고, 지방산이 접합 (conjugation)된 당쇄화 엑세나타이드 유사체.

[청구항 2] 제1항에 있어서, 상기 엑세나타이드 아미노산 서열은 서열번호 1의 아미노산 서열을 포함하는 것인, 당쇄화 엑세나타이드 유사체.

[청구항 3] 제1항에 있어서, 상기 결실은 엑세나타이드의 아미노산 서열의 N-말단 또는 C-말단의 아미노산이 결실된 것인, 당쇄화 엑세나타이드 유사체.

[청구항 4] 제1항에 있어서, 상기 지방산은 엑세나타이드의 Lys 잔기, N-말단 또는 C-말단에 접합된 것인, 당쇄화 엑세나타이드 유사체.

[청구항 5] 제3항에 있어서, 상기 지방산은 링커를 통하여 Lys 잔기, N-말단 또는 C-말단에 접합된 것인, 당쇄화 엑세나타이드 유사체.

[청구항 6] 제1항에 있어서, 상기 지방산은 C_3 내지 C_{36}의 탄소수를 갖는 지방산인 것인, 당쇄화 엑세나타이드 유사체.

[청구항 7] 제1항에 있어서, 상기 지방산은 프로피온산 (propionic acid), 부티르산 (butyric acid), 발레르산 (valeric acid), 카프로산 (caproic acid), 에난트산 (enanthic acid), 카프릴릭산 (caprylic acid), 펠라르곤산 (pelargonic acid), 카프릭산 (capric acid), 언데실산 (undecylic acid), 라우르산 (lauric acid), 트리데실산 (tridecylic acid), 미리스트산 (myristic acid), 펜타데실산 (pentadecylic acid), 팔미트산 (palmitic acid), 마르가르산 (margaric acid), 스테아르산 (stearic acid), 논아데실산 (nonadecylic acid), 아라키트산 (arachidic acid), 헤네이코실산 (heneicosylic acid), 베헨산 (behenic acid), 트리코실(tricosylic acid), 리그노세르산 (lignoceric acid), 펜타코실산 (pentacosylic acid), 세로트산 (cerotic acid), 헵타코실산 (heptacosylic acid), 몬탄산 (montanic acid), 논아코실산 (nonacosylic acid), 멜리스산 (melissic acid), 헤나트리아콘틸산 (henatriacontylic acid), 라세로산 (lacceroic acid), 사일산 (psyllic acid), 게드산 (geddic acid), 세로플라스트산 (ceroplastic acid) 및 헥사트리아콘틸산 (hexatriacontylic acid)로 이루어진 군으로부터 선택된 1종 이상인 것인, 당쇄화 엑세나타이드 유사체.

[청구항 8] 제1항에 있어서, 상기 당쇄화 엑세나타이드 유사체는 엑세나타이드 유사체의 일 아미노산이 치환되어 당류가 결합된 것인, 당쇄화 엑세나타이드 유사체.

[청구항 9] 제8항에 있어서, 상기 당류는 1 내지 11당으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상인 것인, 당쇄화 엑세나타이드 유사체.

[청구항 10] 제1항에 있어서, 상기 당쇄화 엑세나타이드 유사체는 엑세나타이드 유사체의 적어도 하나 이상의 아미노산에 당류가 결합된 것인, 당쇄화 엑세나타이드 유사체.

[청구항 11] 제10항에 있어서, 상기 적어도 하나 이상의 아미노산은 다른 일

아미노산으로 치환된 것인, 당쇄화 엑세나타이드 유사체.

[청구항 12] 제1항 내지 제11항 중 어느 한 항의 당쇄화 엑세나타이드 유사체를 포함하는 당뇨 개선, 예방 또는 치료용 약제학적 조성물.

[청구항 13] 제1항 내지 제11항 중 어느 한 항의 당쇄화 엑세나타이드 유사체를 포함하는 비만 개선, 예방 또는 치료용 약제학적 조성물.

[청구항 14] 제1항 내지 제11항 중 어느 한 항의 당쇄화 엑세나타이드 유사체를 포함하는 당뇨 개선 또는 완화용 식품 조성물.

[청구항 15] 제1항 내지 제11항 중 어느 한 항의 당쇄화 엑세나타이드 유사체를 포함하는 비만 개선 또는 완화용 식품 조성물.

[청구항 16] 제1항 내지 제11항 중 어느 한 항의 당쇄화 엑세나타이드 유사체를 포함하는 식욕 억제용 식품 조성물.

[청구항 17] 엑세나타이드 (exenatide) 아미노산 서열의 1 내지 15개의 아미노산이 결실되고, 지방산이 접합 (conjugation)된 엑세나타이드 유사체로 이루어진 제1체; 및
엑세나타이드 (exenatide) 아미노산 서열의 1 내지 15개의 아미노산이 결실되고 지방산이 접합 (conjugation)된 엑세나타이드 유사체, 또는 글루카곤으로 이루어진 제2체;를 포함하고,
상기 제1체 및 제2체는 결합되어 이량 유사체를 형성하고 있는 것인, 엑세나타이드 이량 유사체.

[청구항 18] 제17항에 있어서, 상기 엑세나타이드의 아미노산 서열은 서열번호 1의 아미노산 서열을 포함하는 것인, 엑세나타이드 이량 유사체.

[청구항 19] 제17항에 있어서, 상기 글루카곤의 아미노산 서열은 서열번호 2의 아미노산 서열을 포함하는 것인, 엑세나타이드 이량 유사체.

[청구항 20] 제17항에 있어서, 상기 제2체가 엑세나타이드 유사체인 경우, 상기 1체 및 제2체의 결합은 이황화결합된 것인, 엑세나타이드 이량 유사체.

[청구항 21] 제17항에 있어서, 상기 제2체가 글루카곤인 경우, 상기 제1체 및 제2체의 결합은 체1체의 C-말단에 Lys 잔기를 첨가하고 이의 측쇄에 글루카곤으로 이루어진 제2체가 결합, 또는 이황화결합된 것인, 엑세나타이드 이량 유사체.

[청구항 22] 제17항에 있어서, 상기 결실은 엑세나타이드의 아미노산 서열의 N-말단 또는 C-말단의 아미노산이 결실된 것인, 엑세나타이드 이량 유사체.

[청구항 23] 제17항에 있어서, 상기 지방산은 엑세나타이드의 Lys 잔기, N-말단 또는 C-말단에 접합된 것인, 엑세나타이드 이량 유사체.

[청구항 24] 제19항에 있어서, 상기 지방산은 링커를 통하여 Lys 잔기, N-말단 또는 C-말단에 접합된 것인, 엑세나타이드 이량 유사체.

[청구항 25] 제17항에 있어서, 상기 지방산은 프로피온산(propionic acid), 부티르산(butyric acid), 발레르산(valeric acid), 카프로산(caproic acid), 에난트산(enanthic acid), 카프릴릭산(caprylic acid), 펠라르곤산(pelargonic

acid), 카프릭산(capric acid), 언데실산(undecylic acid), 라우르산(lauric acid), 트리데실산(tridecylic acid), 미리스트산(myristic acid), 펜타데실산(pentadecylic acid), 팔미트산(palmitic acid), 마르가르산(margaric acid), 스테아르산(stearic acid), 논아데실산(nonadecylic acid), 아라키트산(arachidic acid), 헤네이코실산(heneicosylic acid), 베헨산(behenic acid), 트리코실(tricosylic acid), 리그노세르산(lignoceric acid), 펜타코실산(pentacosylic acid), 세로트산(cerotic acid), 헵타코실산(heptacosylic acid), 몬탄산(montanic acid), 논아코실산(nonacosylic acid), 멜리스산(melissic acid), 헤나트리아콘틸산(henatriacontylic acid), 라세로산(lacceroic acid), 사일산(psyllic acid), 게드산(geddic acid), 세로플라스트산(ceroplastic acid) 및 헥사트리아콘틸산(hexatriacontylic acid)로 이루어진 군으로부터 선택된 1종 이상인 것인, 엑세나타이드 이량 유사체.

[청구항 26] 제17항에 있어서, 상기 엑세나타이드 이량 유사체는 제1체, 제2체 또는 이들 각각의 일 아미노산에 당류가 결합된 것인, 엑세나타이드 이량 유사체.

[청구항 27] 제26항에 있어서, 상기 당류는 1 내지 11당으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상인 것인, 엑세나타이드 유사체.

[청구항 28] 제26항에 있어서, 상기 엑세나타이드 이량 유사체는 제1체, 제2체 또는 이들 각각의 일 아미노산이 다른 일 아미노산으로 치환되고, 치환된 아미노산에 당류가 결합된 것인, 엑세나타이드 유사체.

[청구항 29] 제17항 내지 제28항 중 어느 한 항의 엑세나타이드 이량 유사체를 포함하는 당뇨 개선, 예방 또는 치료용 약제학적 조성물.

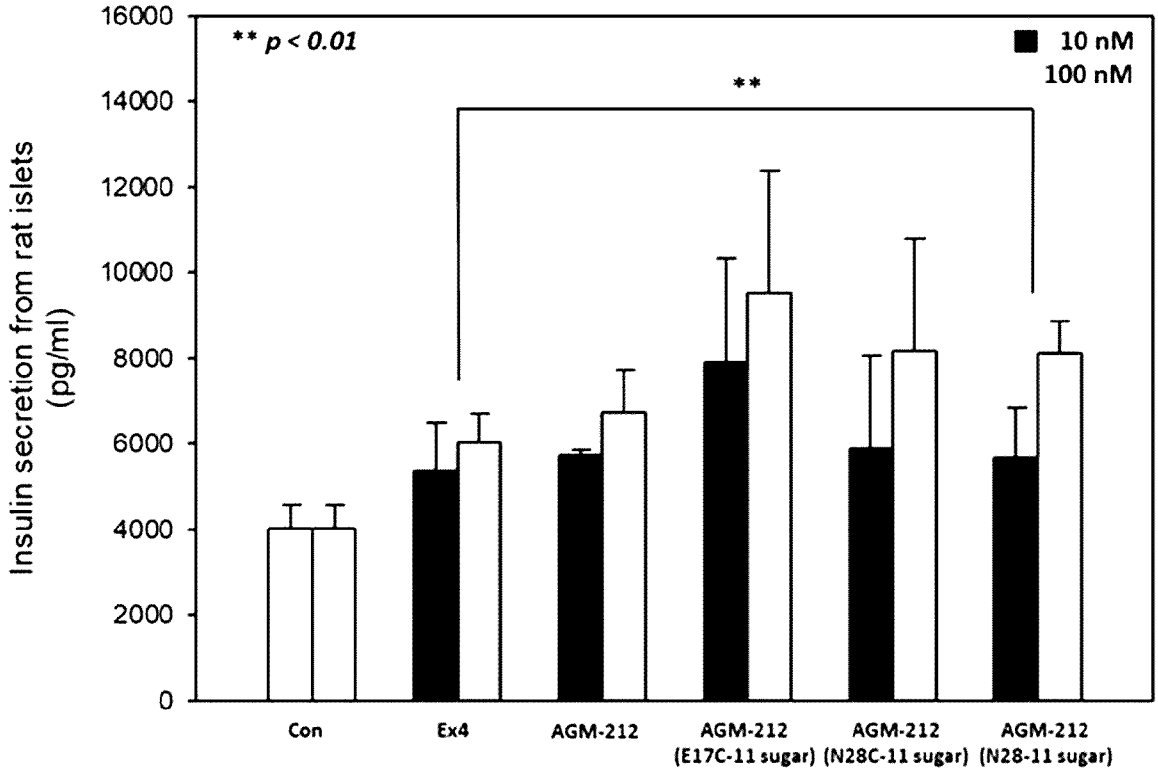
[청구항 30] 제17항 내지 제28항 중 어느 한 항의 엑세나타이드 이량 유사체를 포함하는 비만 개선, 예방 또는 치료용 약제학적 조성물.

[청구항 31] 제17항 내지 제28항 중 어느 한 항의 엑세나타이드 이량 유사체를 포함하는 당뇨 개선 또는 완화용 식품 조성물.

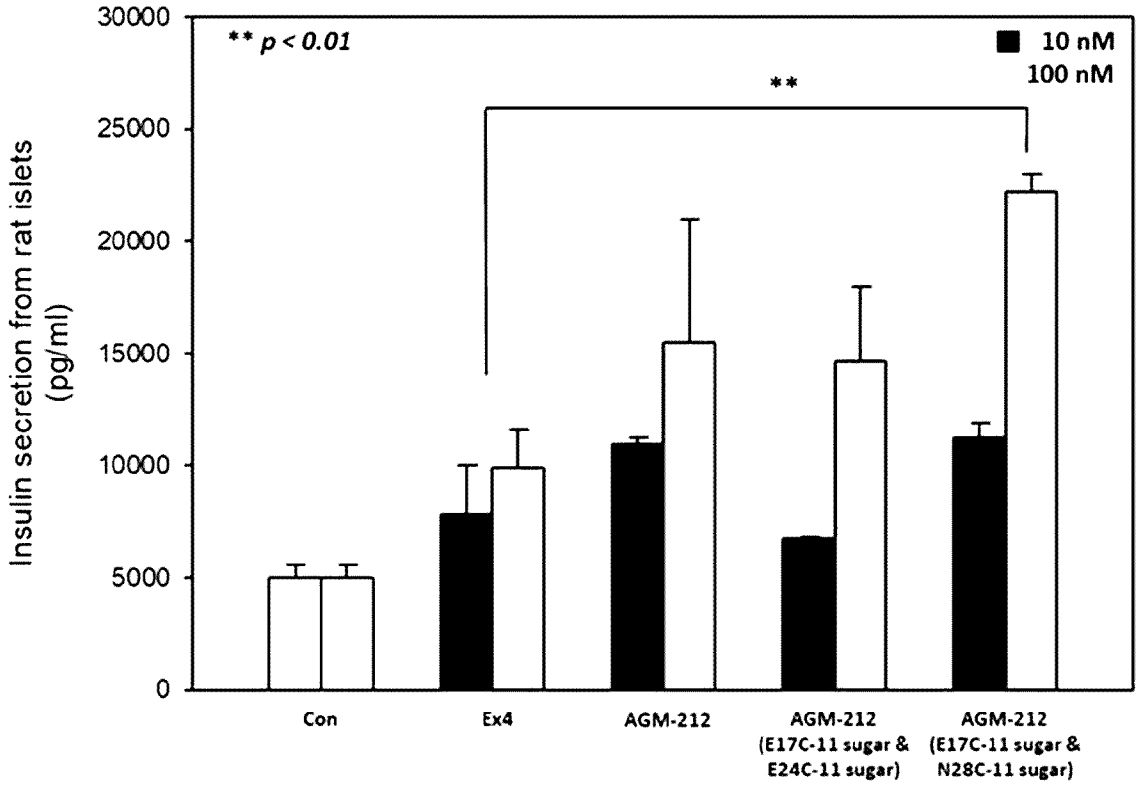
[청구항 32] 제17항 내지 제28항 중 어느 한 항의 엑세나타이드 이량 유사체를 포함하는 비만 개선 또는 완화용 식품 조성물.

[청구항 33] 제17항 내지 제28항 중 어느 한 항의 엑세나타이드 이량 유사체를 포함하는 식욕 억제용 식품 조성물.

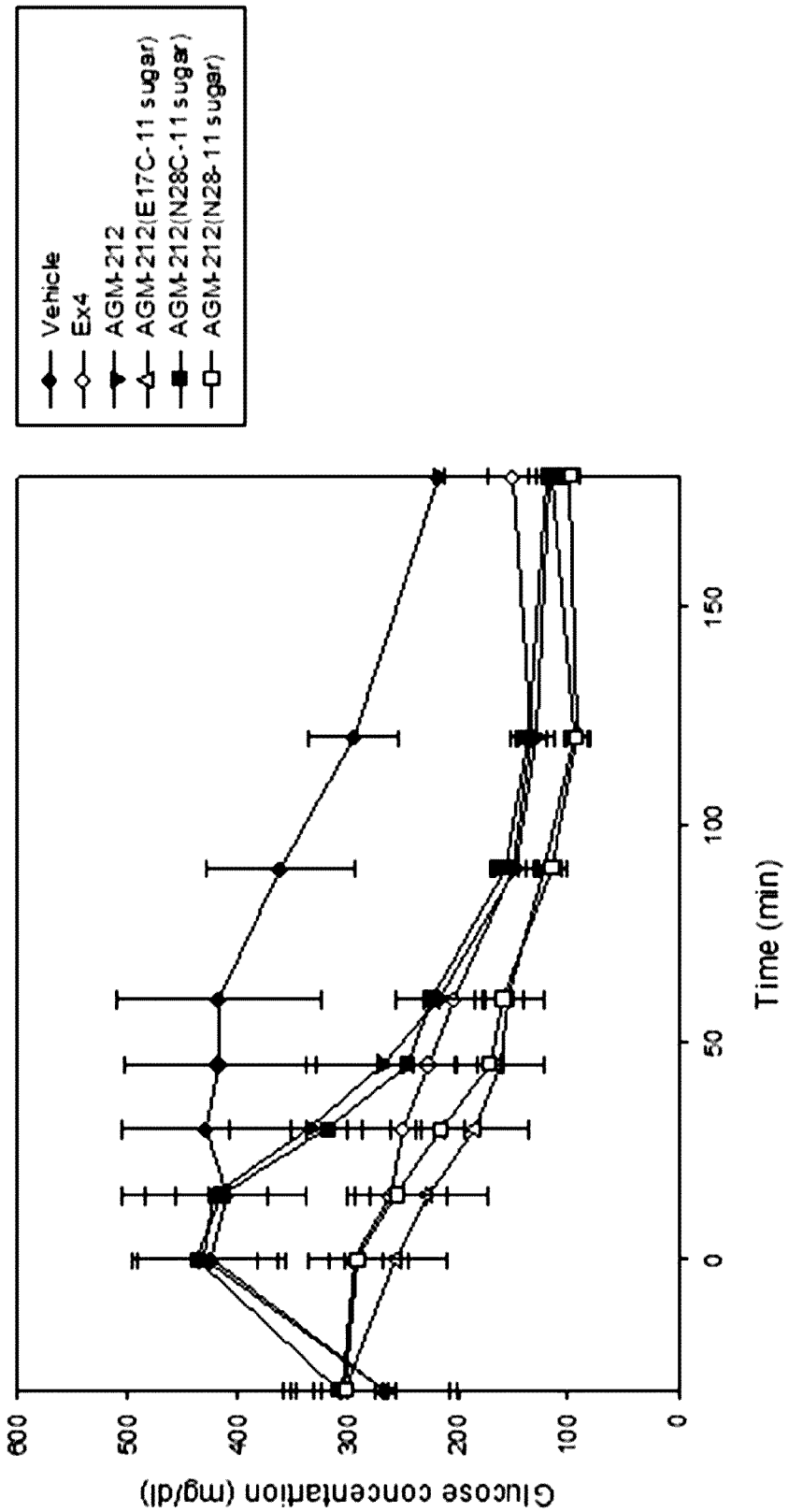
[도1]


** p < 0.01
10 nM
100 nM
**
Insulin secretion from rat islets (pg/ml)
16000
14000
12000
10000
8000
6000
4000
2000
0
Con
Ex4
AGM-212
AGM-212 (E17C-11 sugar)
AGM-212 (N28C-11 sugar)
AGM-212 (N28-11 sugar)

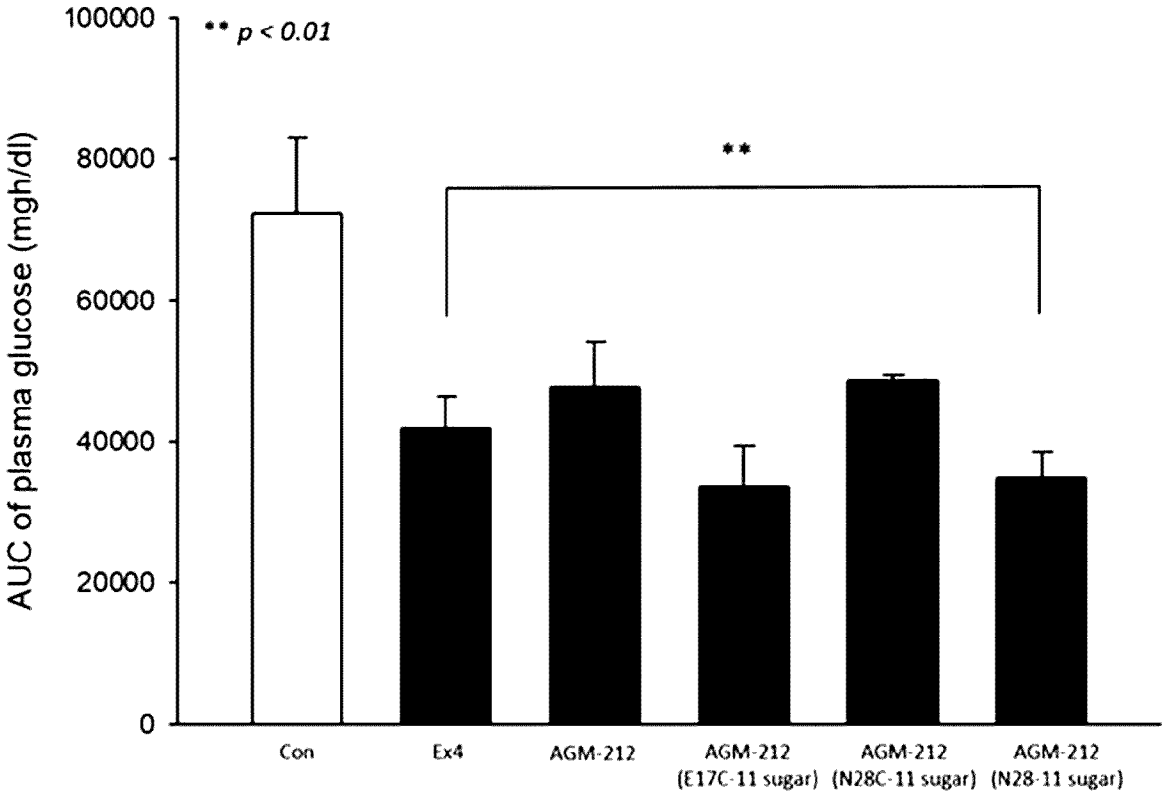
[도2]


** p < 0.01
10 nM
100 nM
**
Insulin secretion from rat islets (pg/ml)
30000
25000
20000
15000
10000
5000
0
Con
Ex4
AGM-212
AGM-212 (E17C-11 sugar & E24C-11 sugar)
AGM-212 (E17C-11 sugar & N28C-11 sugar)

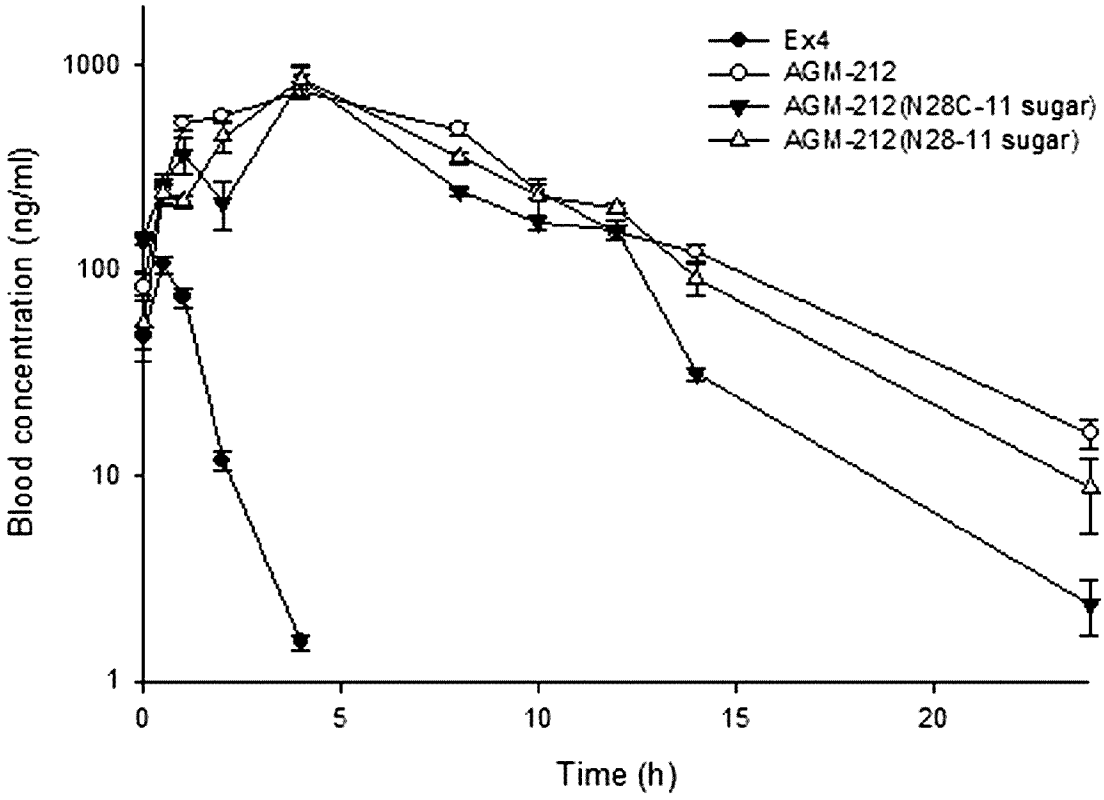
[도3a]


Vehicle
Ex4
AGM-212
AGM-212(E17C-11 sugar)
AGM-212(N28C-11 sugar)
AGM-212(N28-11 sugar)
Glucose concentration (mg/dl)
600
500
400
300
200
100
0
0
50
100
150
Time (min)

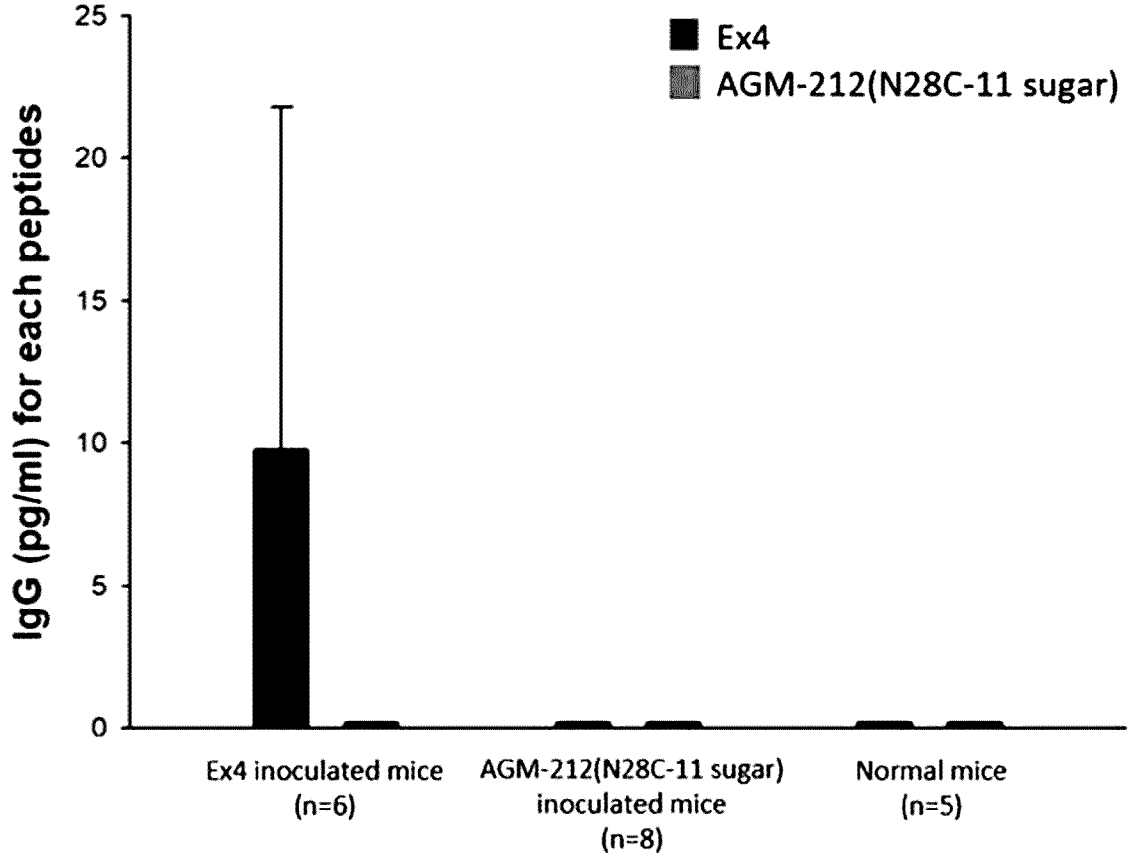
[도3b]


** p < 0.01
**
AUC of plasma glucose (mgh/dl)
100000
80000
60000
40000
20000
0
Con
Ex4
AGM-212
AGM-212 (E17C-11 sugar)
AGM-212 (N28C-11 sugar)
AGM-212 (N28-11 sugar)

[도4]

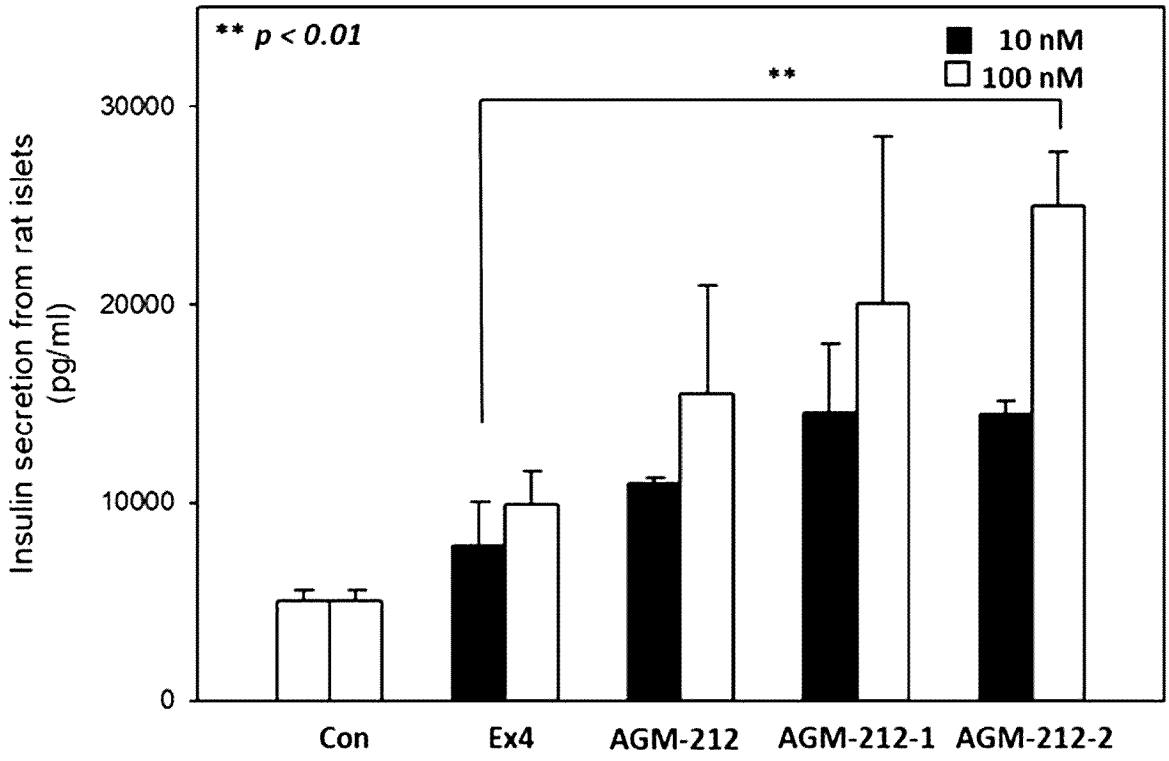

Ex4
AGM-212
AGM-212(N28C-11 sugar)
AGM-212(N28-11 sugar)
Blood concentration (ng/ml)
1000
100
10
1
0
5
10
15
20
Time (h)

[도5]

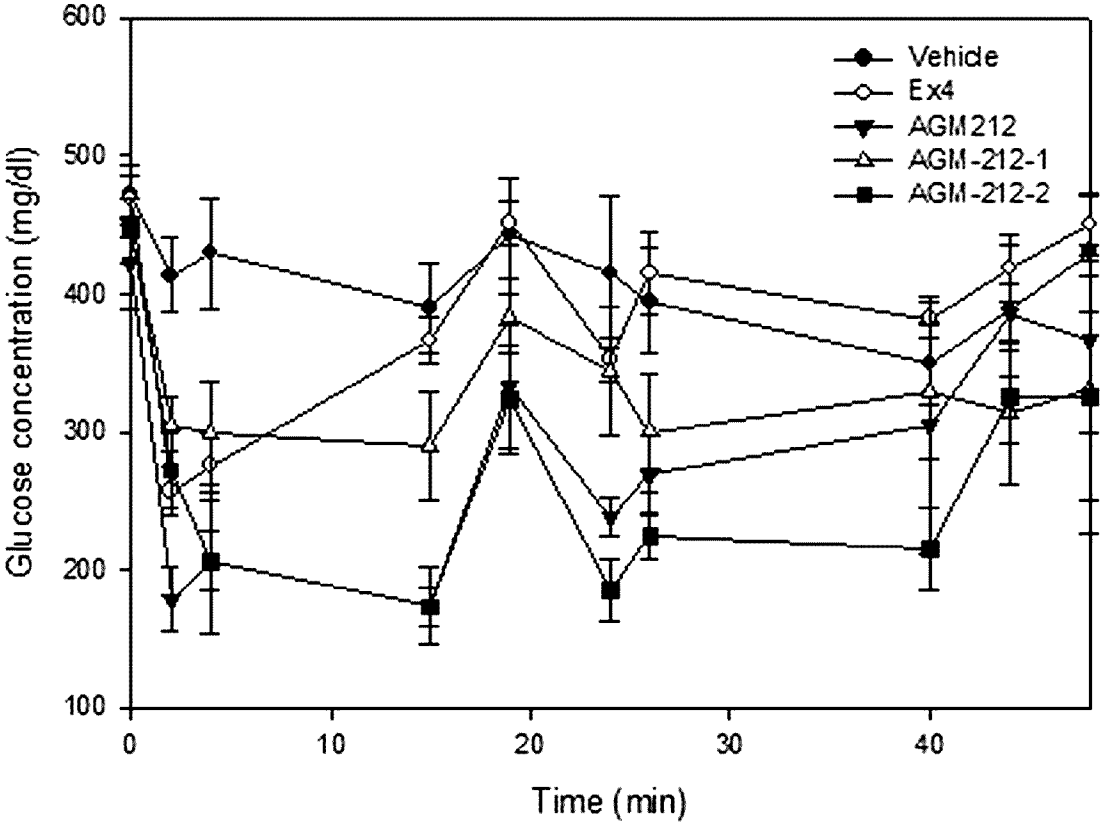


Histogram of IgG in each mice

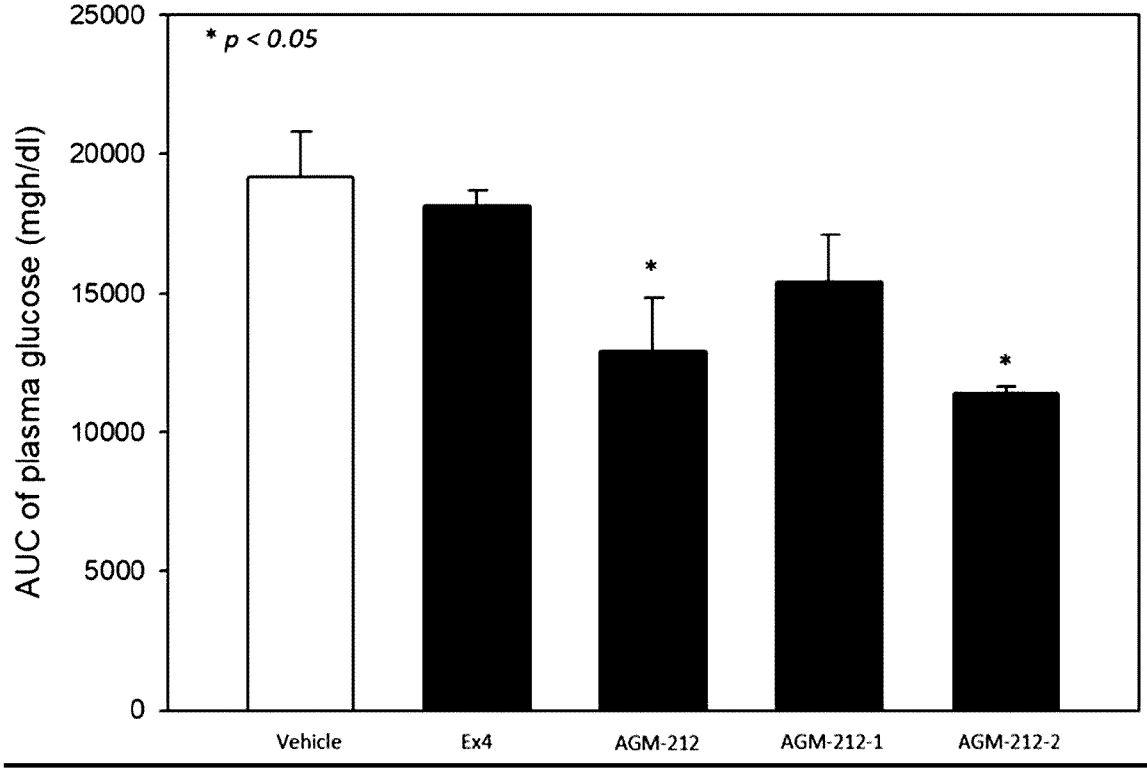
[도6]



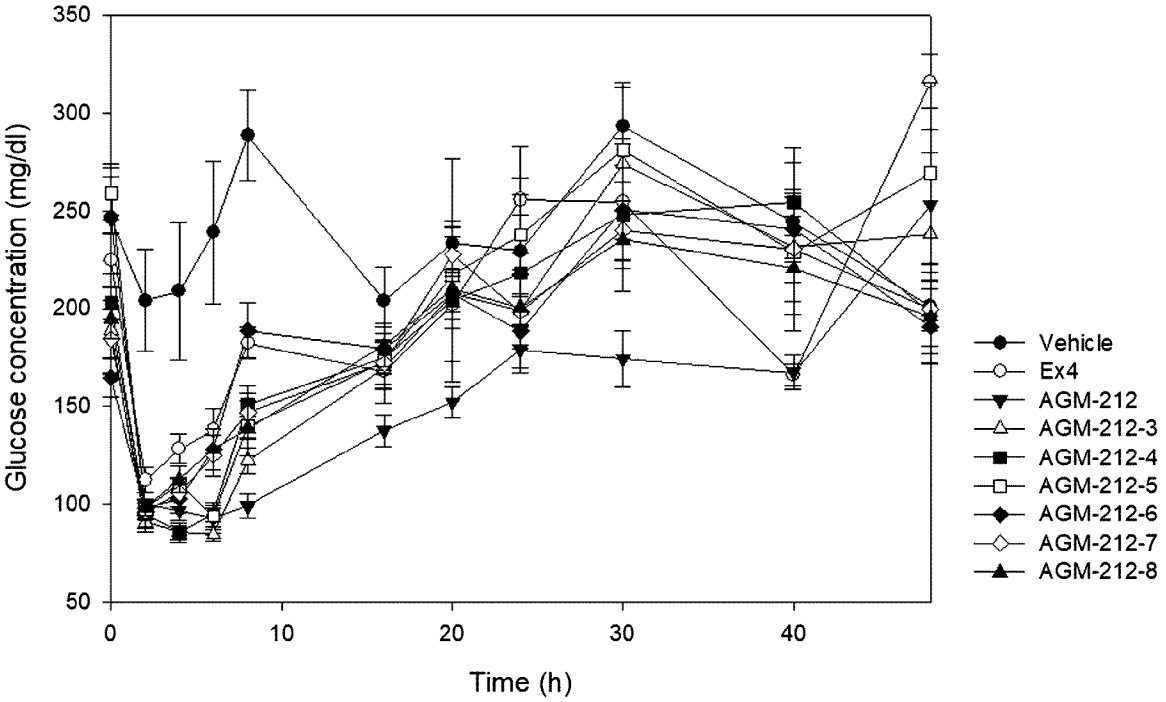
[도7a]


Vehicle
Ex4
AGM212
AGM-212-1
AGM-212-2
Glucose concentration (mg/dl)
600
500
400
300
200
100
0
10
20
30
40
Time (min)

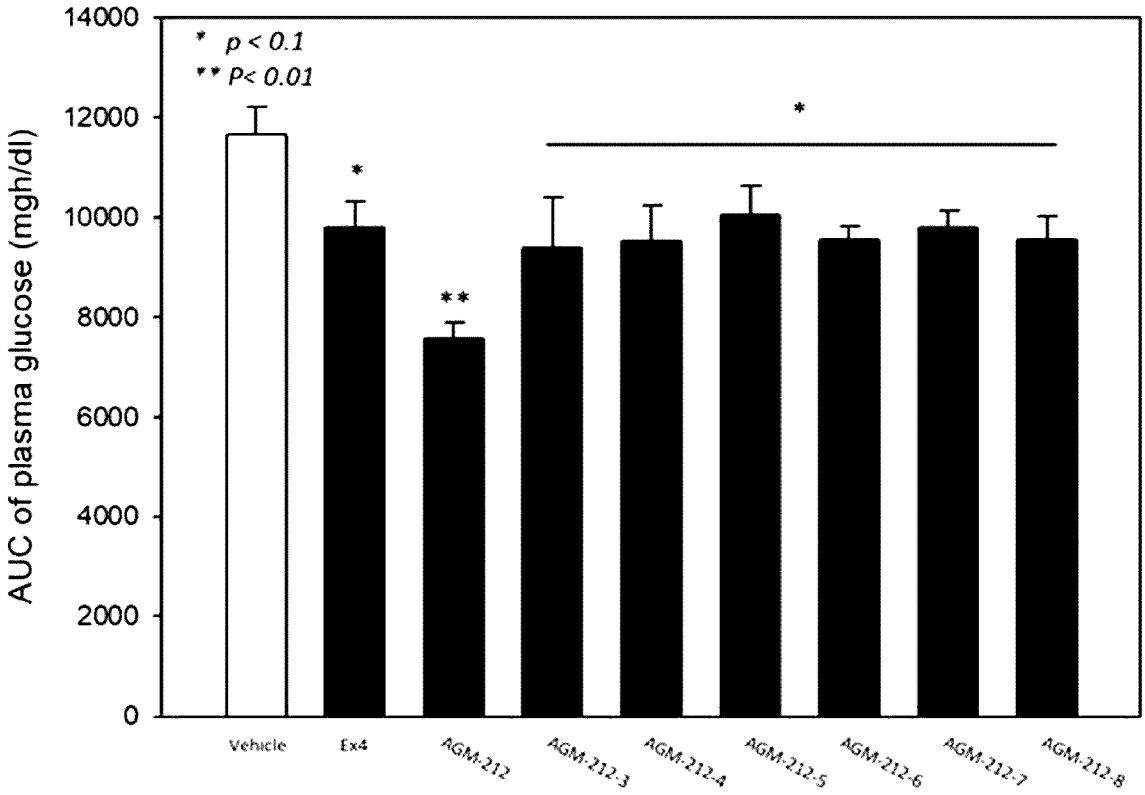
[도7b]


* p < 0.05
AUC of plasma glucose (mgh/dl)
25000
20000
15000
10000
5000
0
*
*
Vehicle
Ex4
AGM-212
AGM-212-1
AGM-212-2

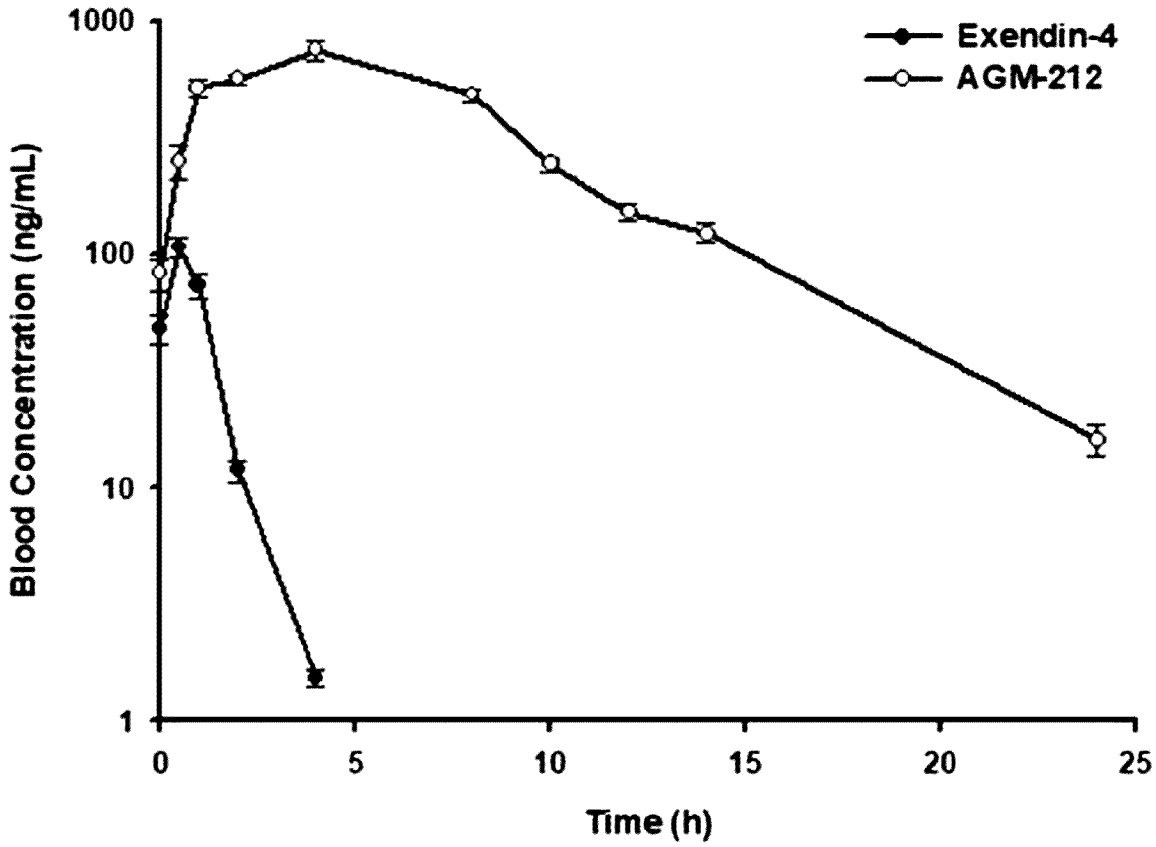
[도8a]


Glucose concentration (mg/dl)
350
300
250
200
150
100
50
0
10
20
30
40
Time (h)
Vehicle
Ex4
AGM-212
AGM-212-3
AGM-212-4
AGM-212-5
AGM-212-6
AGM-212-7
AGM-212-8

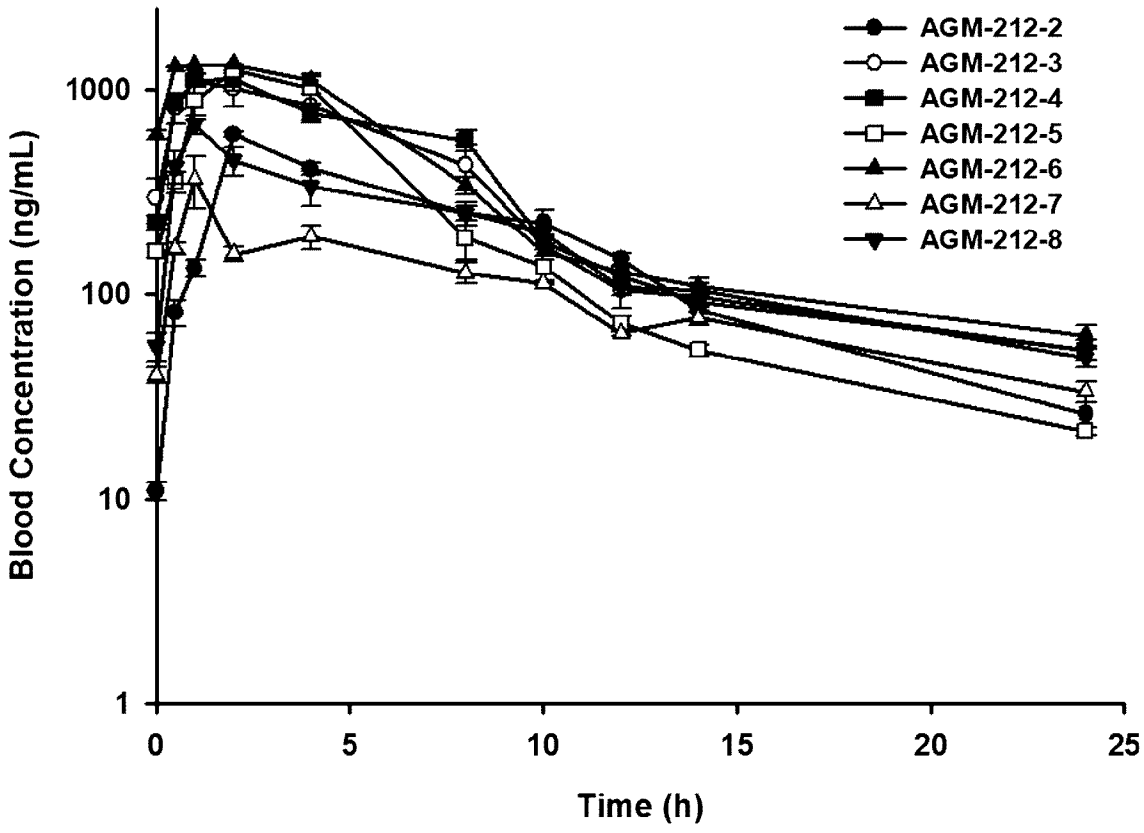
[도8b]


* p < 0.1
** P< 0.01
AUC of plasma glucose (mgh/dl)
14000
12000
10000
8000
6000
4000
2000
0
*
**
*
Vehicle
Ex4
AGM-212
AGM-212-3
AGM-212-4
AGM-212-5
AGM-212-6
AGM-212-7
AGM-212-8

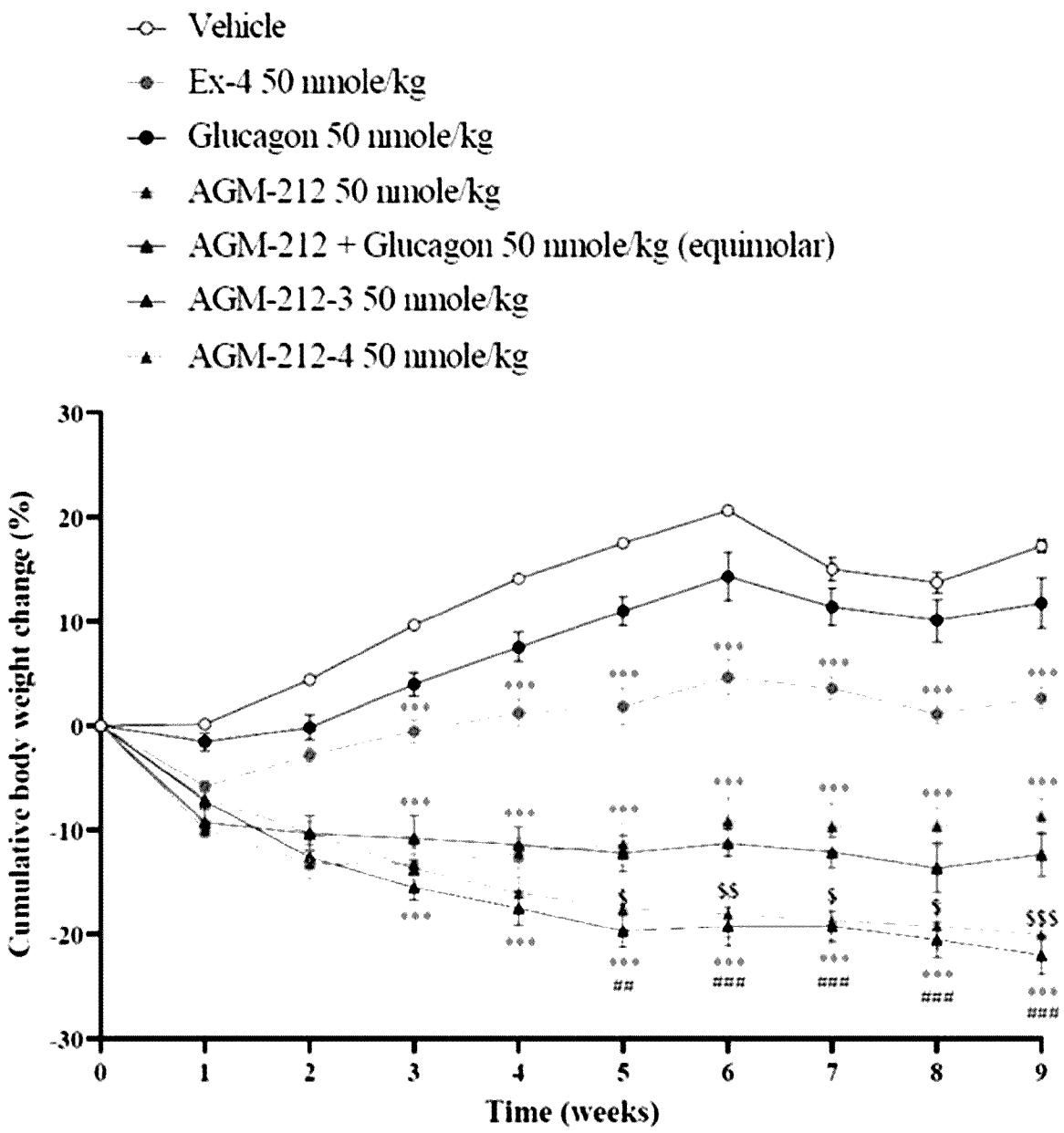
[도9a]


Exendin-4
AGM-212
Blood Concentration (ng/mL)
1000
100
10
1
0
5
10
15
20
25
Time (h)

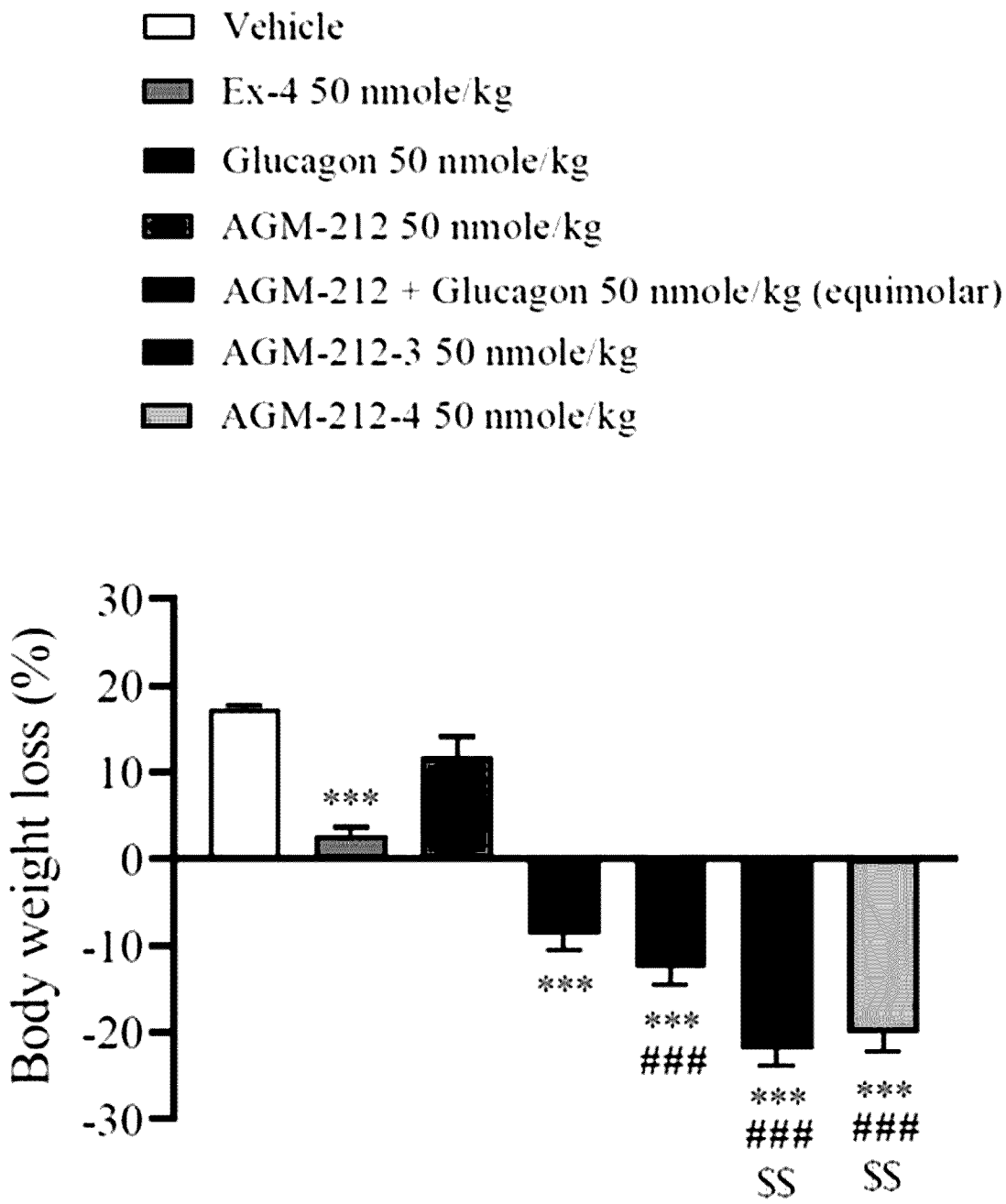
[도9b]


AGM-212-2
AGM-212-3
AGM-212-4
AGM-212-5
AGM-212-6
AGM-212-7
AGM-212-8
Blood Concentration (ng/mL)
1000
100
10
1
0
5
10
15
20
25
Time (h)

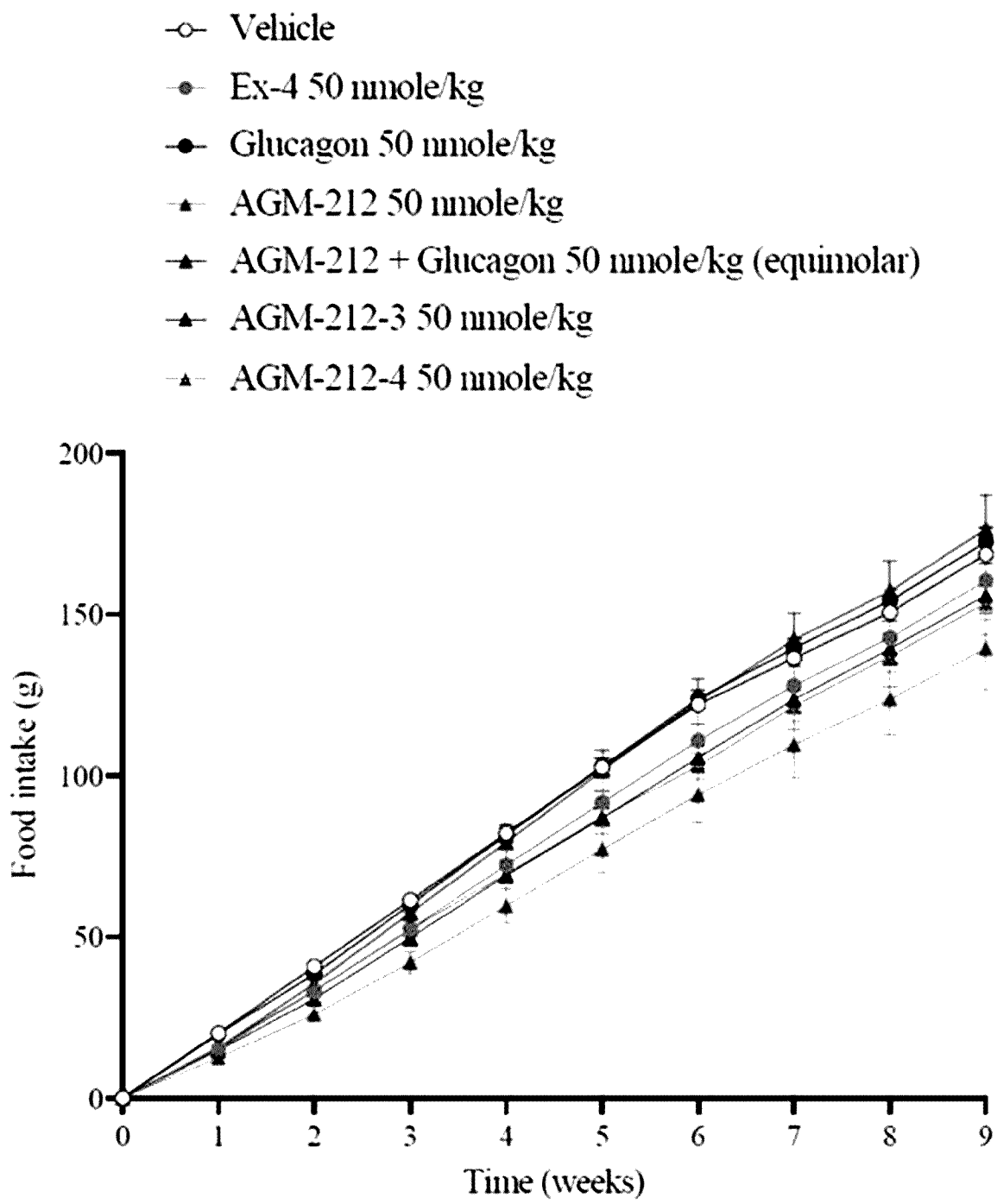
[도10a]


Vehicle
Ex-4 50 nmole/kg
Glucagon 50 nmole/kg
AGM-212 50 nmole/kg
AGM-212 + Glucagon 50 nmole/kg (equimolar)
AGM-212-3 50 nmole/kg
AGM-212-4 50 nmole/kg
Cumulative body weight change (%)
Time (weeks)
30
20
10
0
-10
-20
-30
0
1
2
3
4
5
6
7
8
9

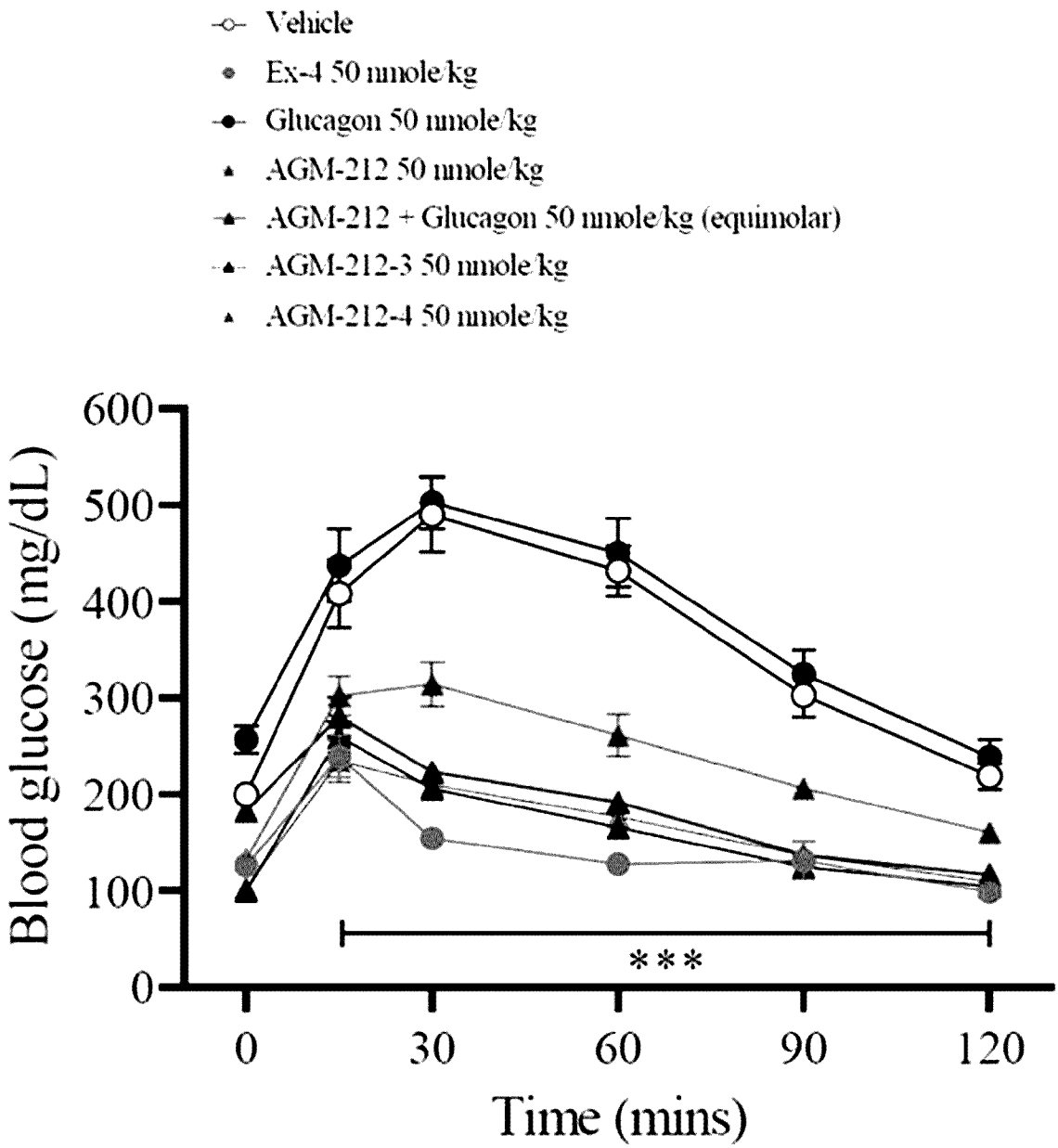
[도10b]


Vehicle
Ex-4 50 nmole/kg
Glucagon 50 nmole/kg
AGM-212 50 nmole/kg
AGM-212 + Glucagon 50 nmole/kg (equimolar)
AGM-212-3 50 nmole/kg
AGM-212-4 50 nmole/kg
Body weight loss (%)
30
20
10
0
-10
-20
-30
***
***
***
###
***
###
SS
***
###
SS

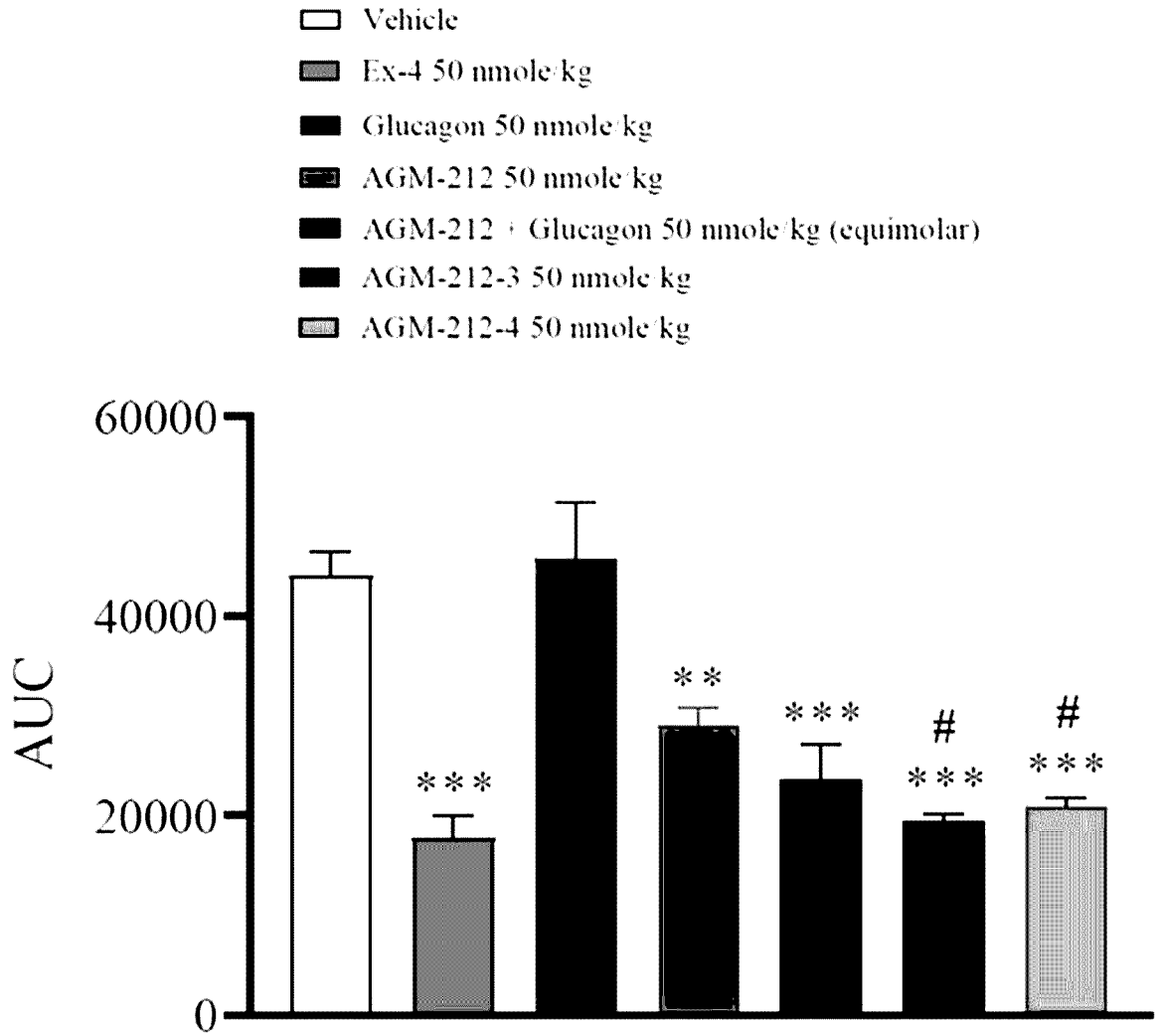
[도10c]


Vehicle
Ex-4 50 nmole/kg
Glucagon 50 nmole/kg
AGM-212 50 nmole/kg
AGM-212 + Glucagon 50 nmole/kg (equimolar)
AGM-212-3 50 nmole/kg
AGM-212-4 50 nmole/kg
Food intake (g)
200
150
100
50
0
0
1
2
3
4
5
6
7
8
9
Time (weeks)

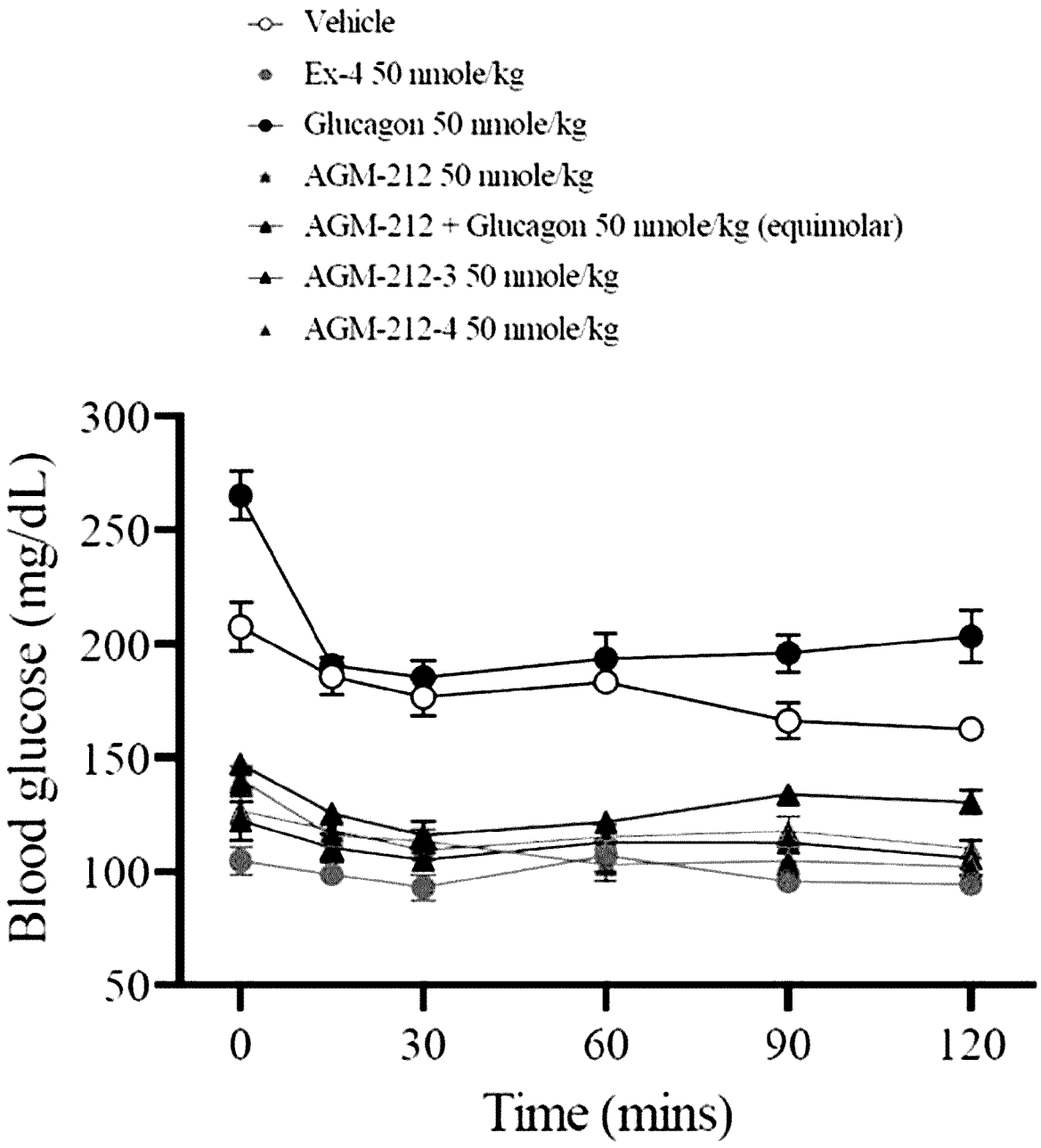
[도11a]


Vehicle
Ex-4 50 nmole/kg
Glucagon 50 nmole/kg
AGM-212 50 nmole/kg
AGM-212 + Glucagon 50 nmole/kg (equimolar)
AGM-212-3 50 nmole/kg
AGM-212-4 50 nmole/kg
Blood glucose (mg/dL)
600
500
400
300
200
100
0
***
0
30
60
90
120
Time (mins)

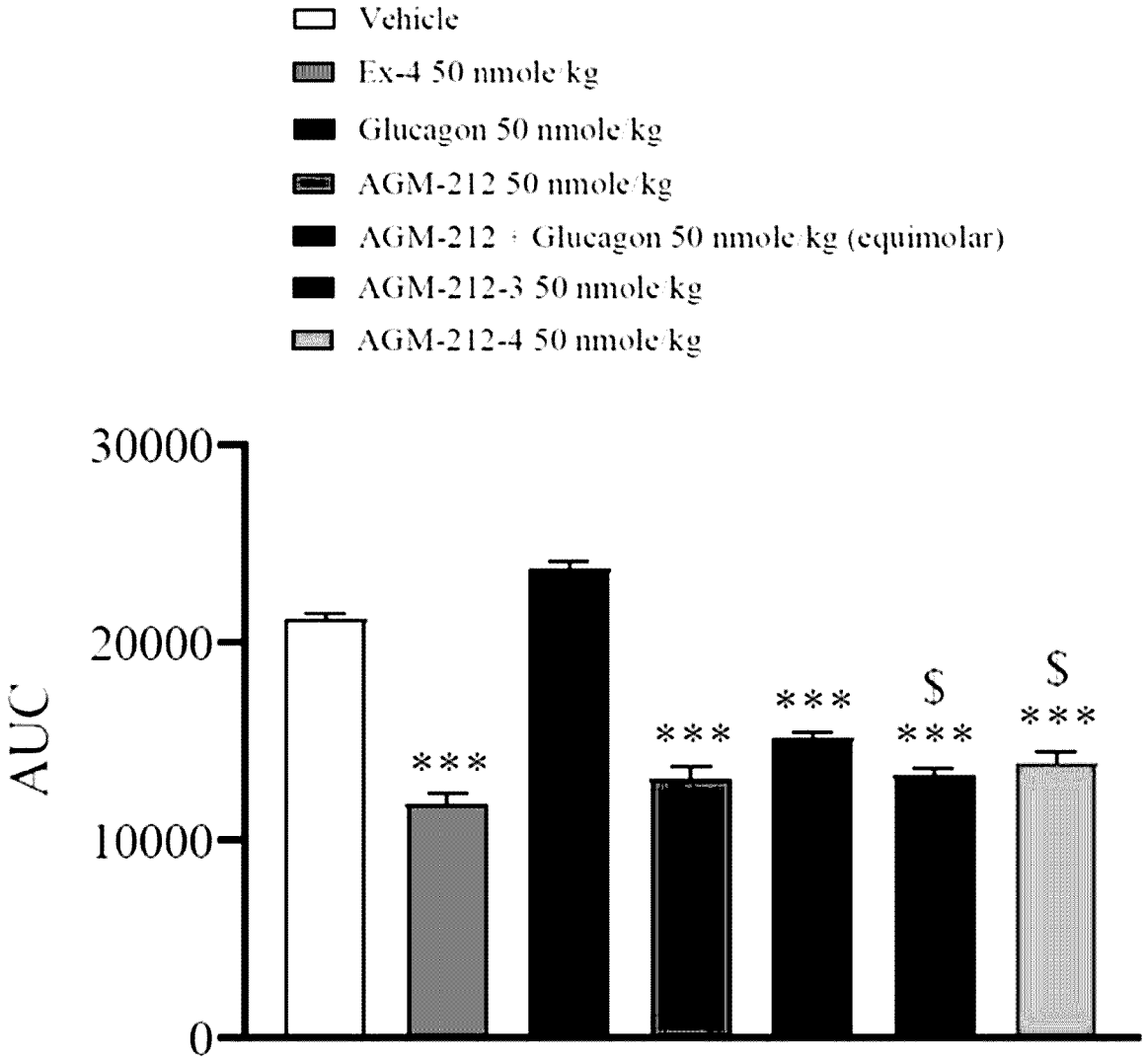
[도11b]


Vehicle
Ex-4 50 nmole/kg
Glucagon 50 nmole/kg
AGM-212 50 nmole/kg
AGM-212 + Glucagon 50 nmole/kg (equimolar)
AGM-212-3 50 nmole/kg
AGM-212-4 50 nmole/kg
AUC
60000
40000
20000
0
***
**
***
#
***
#
***

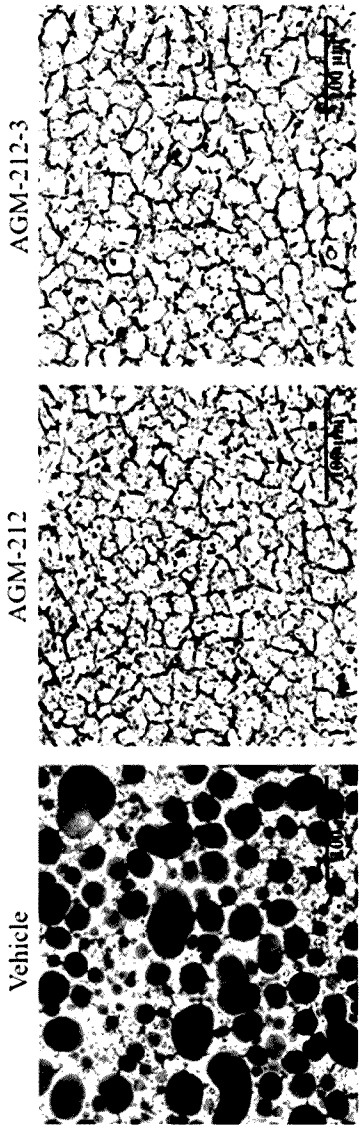
[도12a]


Vehicle
Ex-4 50 nmole/kg
Glucagon 50 nmole/kg
AGM-212 50 nmole/kg
AGM-212 + Glucagon 50 nmole/kg (equimolar)
AGM-212-3 50 nmole/kg
AGM-212-4 50 nmole/kg
Blood glucose (mg/dL)
300
250
200
150
100
50
0
30
60
90
120
Time (mins)

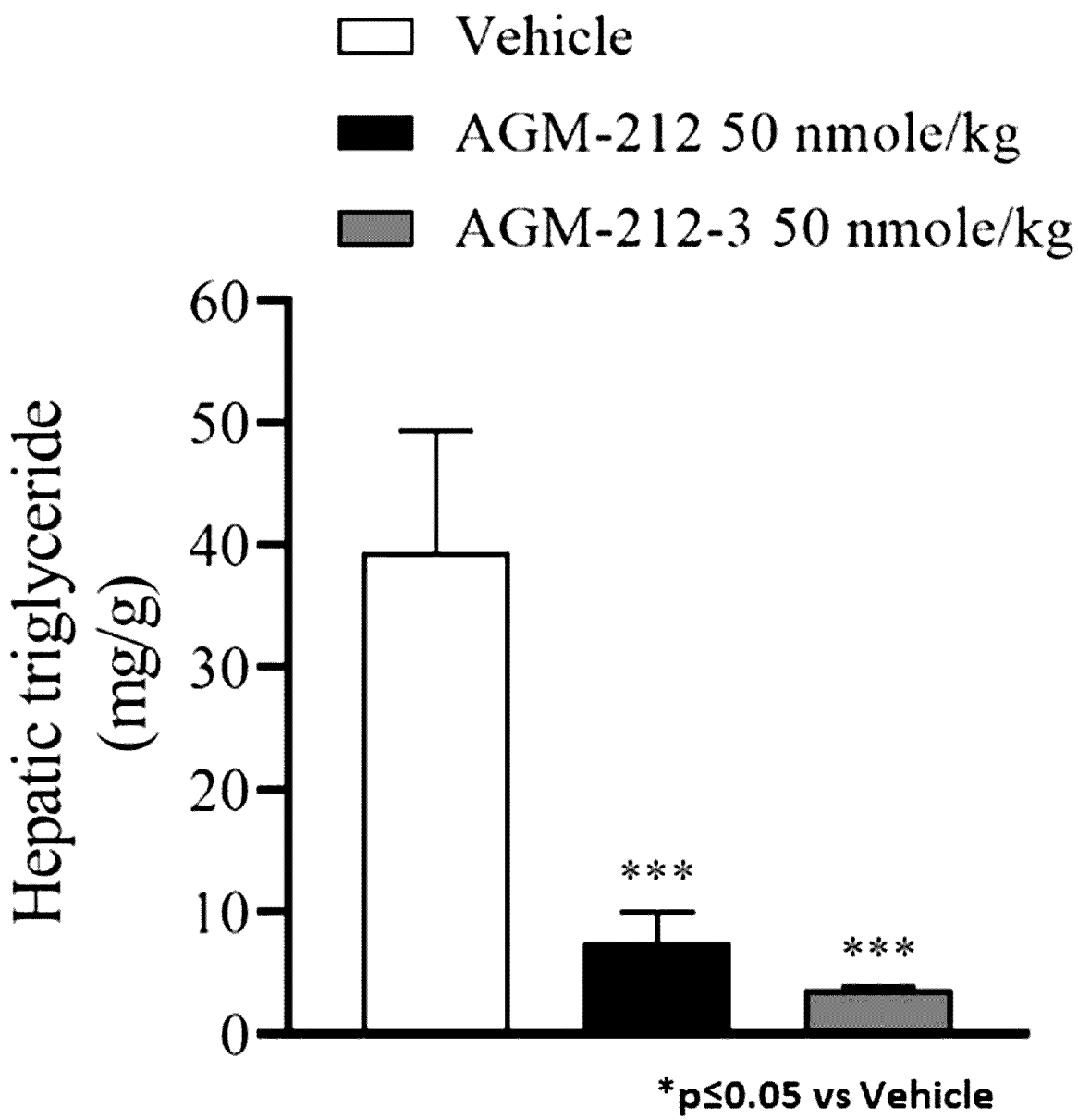
[도12b]


Vehicle
Ex-4 50 nmole/kg
Glucagon 50 nmole/kg
AGM-212 50 nmole/kg
AGM-212 + Glucagon 50 nmole/kg (equimolar)
AGM-212-3 50 nmole/kg
AGM-212-4 50 nmole/kg
AUC
30000
20000
10000
0
***
***
***
***
$
***
$
***

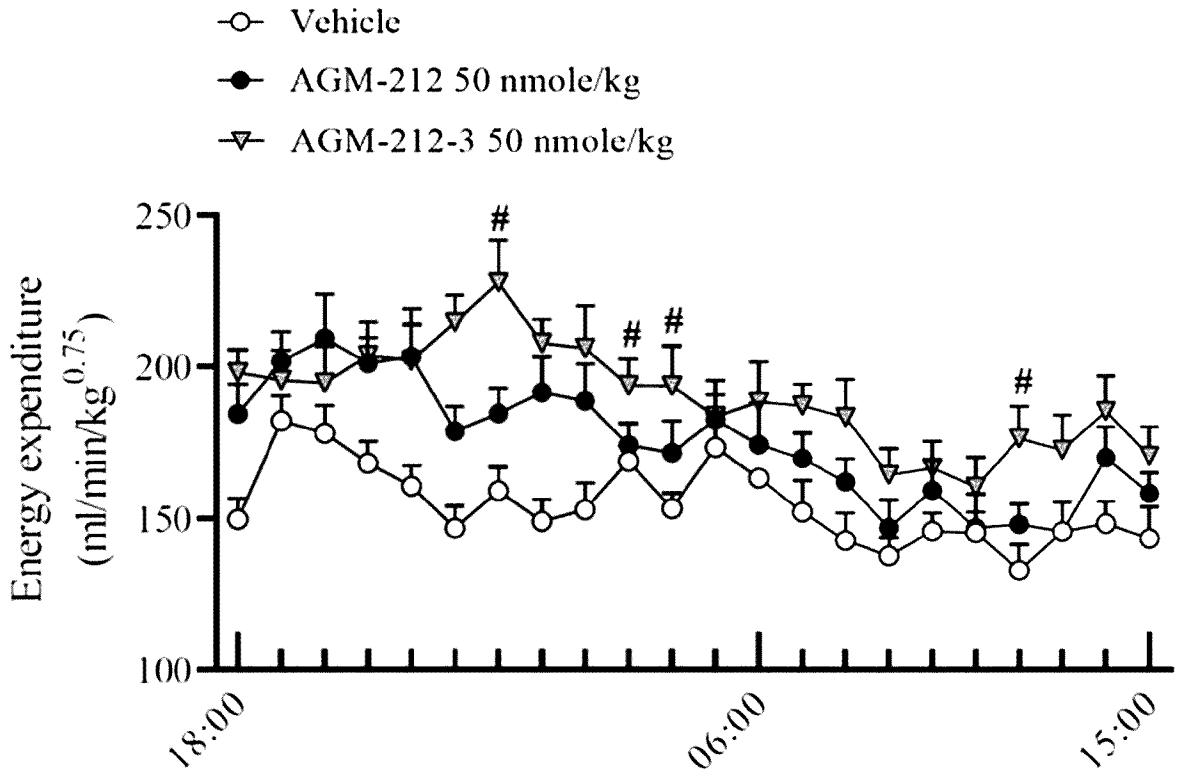
[도13a]



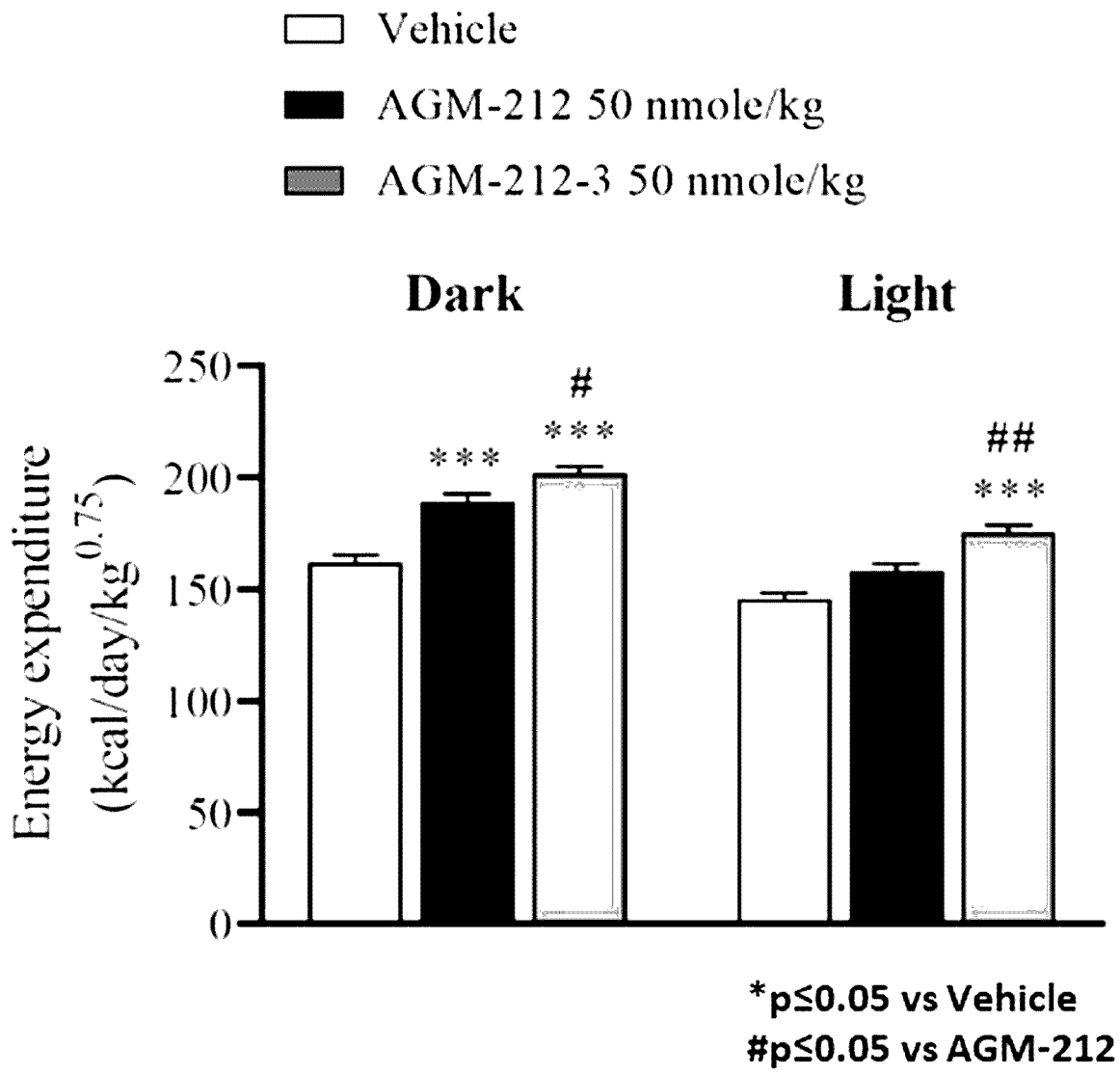
[도13b]


Vehicle
AGM-212 50 nmole/kg
AGM-212-3 50 nmole/kg
Hepatic triglyceride (mg/g)
60
50
40
30
20
10
0
***
***
*p≤0.05 vs Vehicle

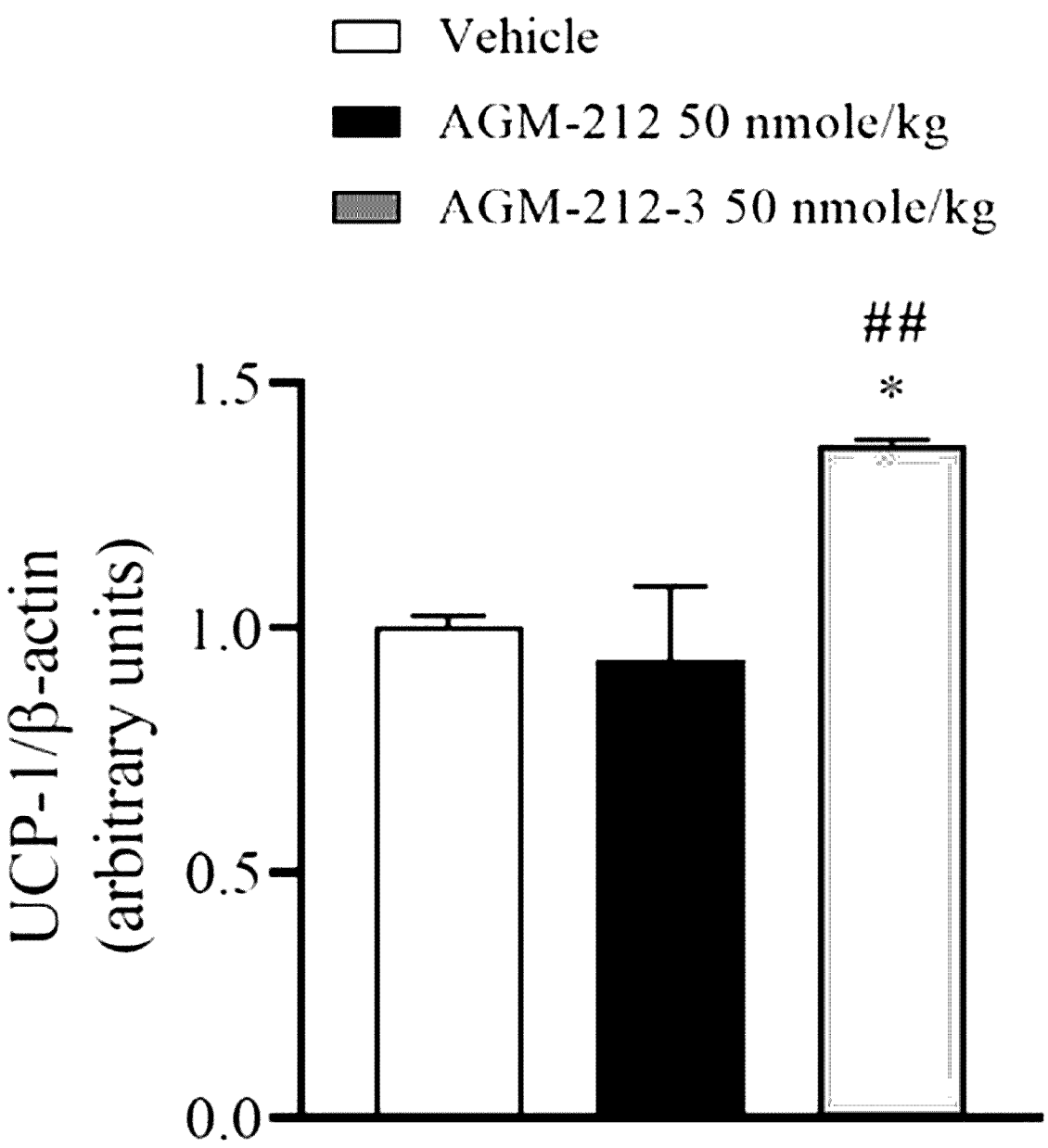
[도14a]


Vehicle
AGM-212 50 nmole/kg
AGM-212-3 50 nmole/kg
Energy expenditure
(ml/min/kg^0.75)
250
200
150
100
#
#
#
#
18:00
06:00
15:00

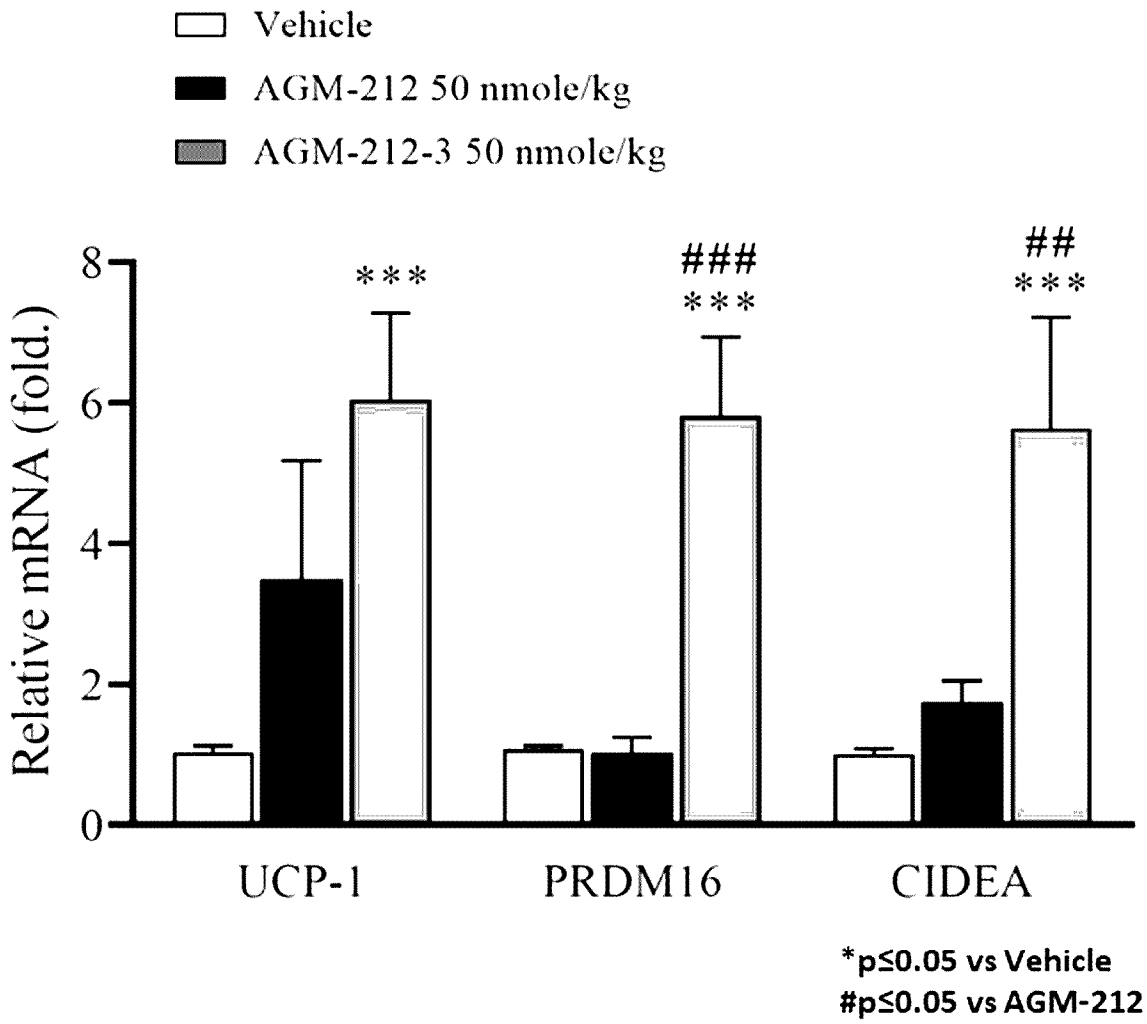
[도14b]


Vehicle
AGM-212 50 nmole/kg
AGM-212-3 50 nmole/kg
Dark
Light
Energy expenditure (kcal/day/kg^0.75)
250
200
150
100
50
0
***
#
***
##
***
*p≤0.05 vs Vehicle
#p≤0.05 vs AGM-212

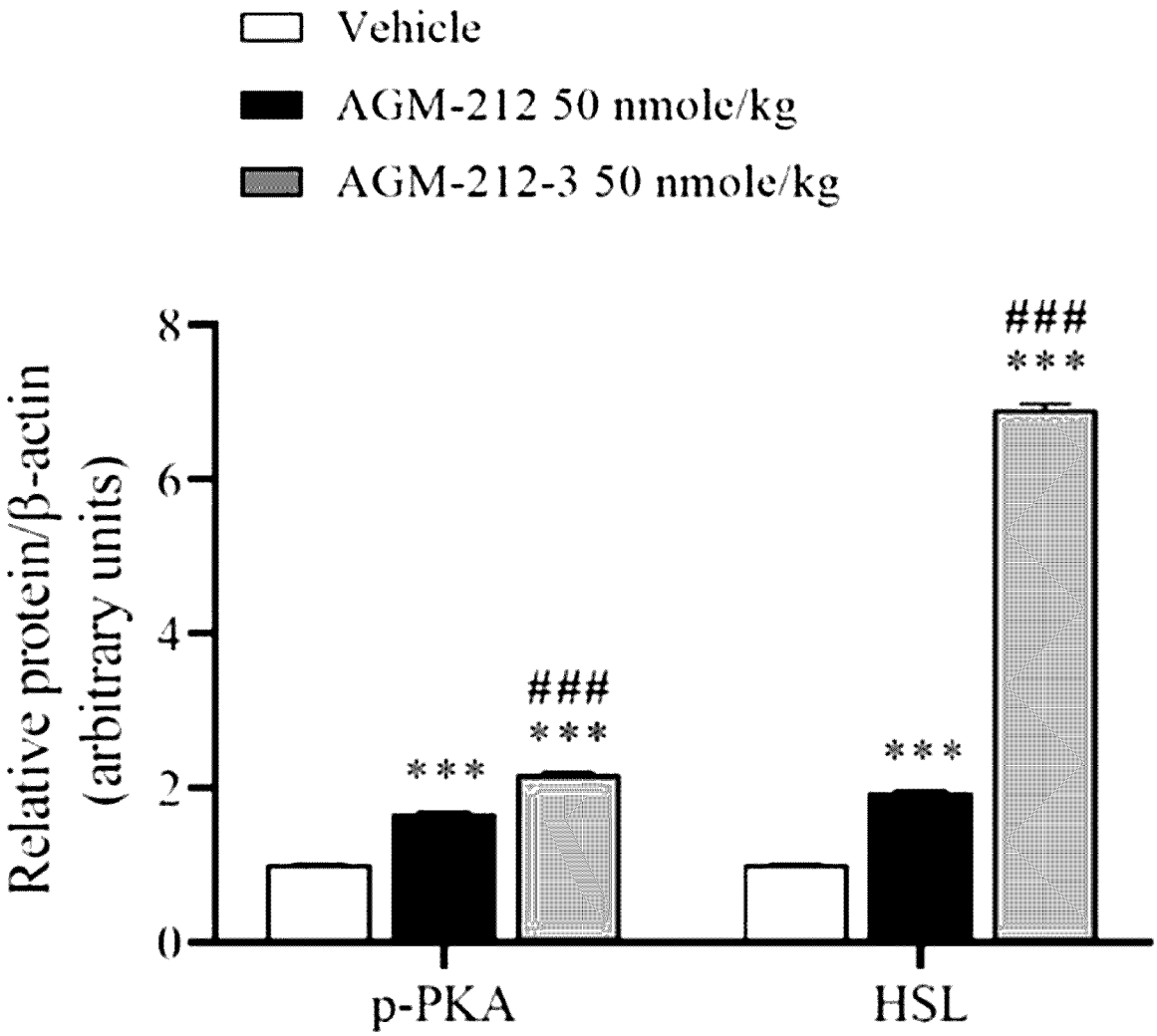
[도15a]


Vehicle
AGM-212 50 nmole/kg
AGM-212-3 50 nmole/kg
##
*
1.5
1.0
0.5
0.0
UCP-1/β-actin
(arbitrary units)

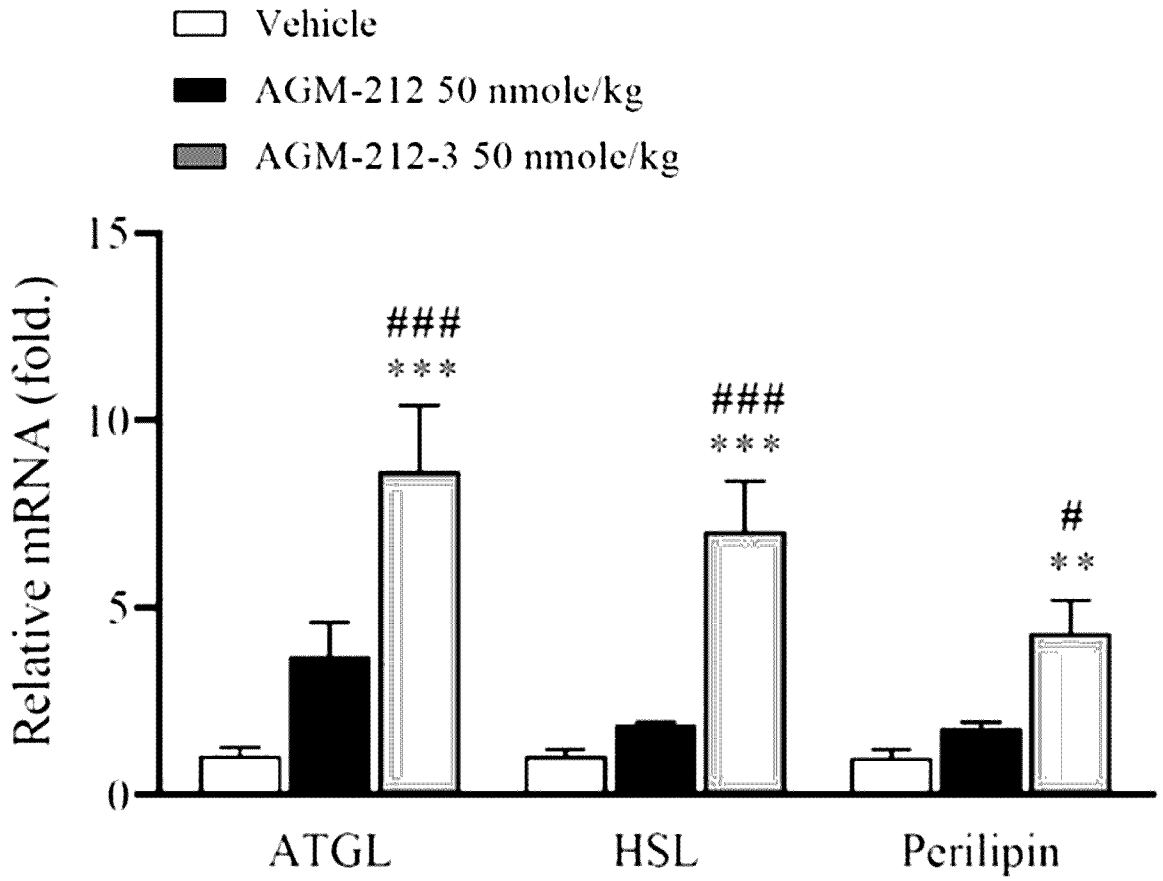
[도15b]


Vehicle
AGM-212 50 nmole/kg
AGM-212-3 50 nmole/kg
Relative mRNA (fold.)
0
2
4
6
8
***
###
***
##
***
UCP-1
PRDM16
CIDEA
*p≤0.05 vs Vehicle
#p≤0.05 vs AGM-212

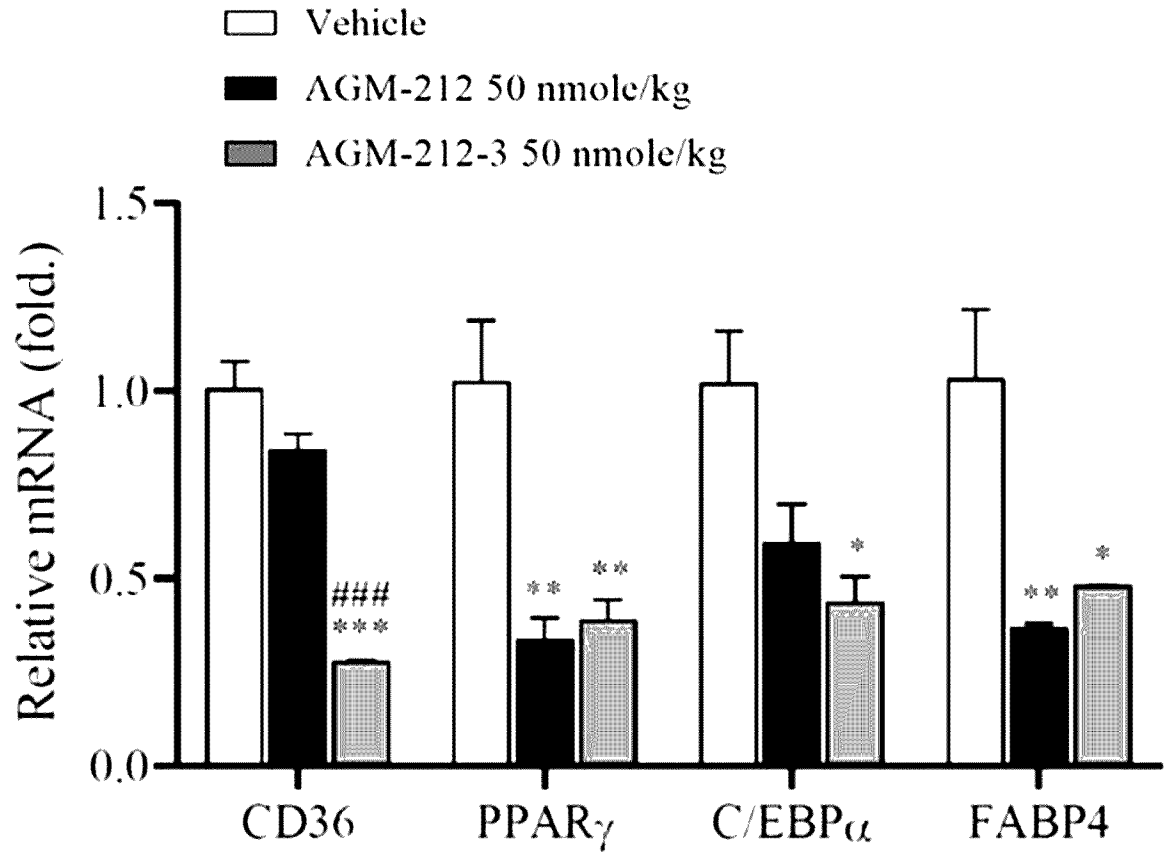
[도16a]


Vehicle
AGM-212 50 nmole/kg
AGM-212-3 50 nmole/kg
Relative protein/β-actin (arbitrary units)
0
2
4
6
8
***
###
***
***
###
***
p-PKA
HSL

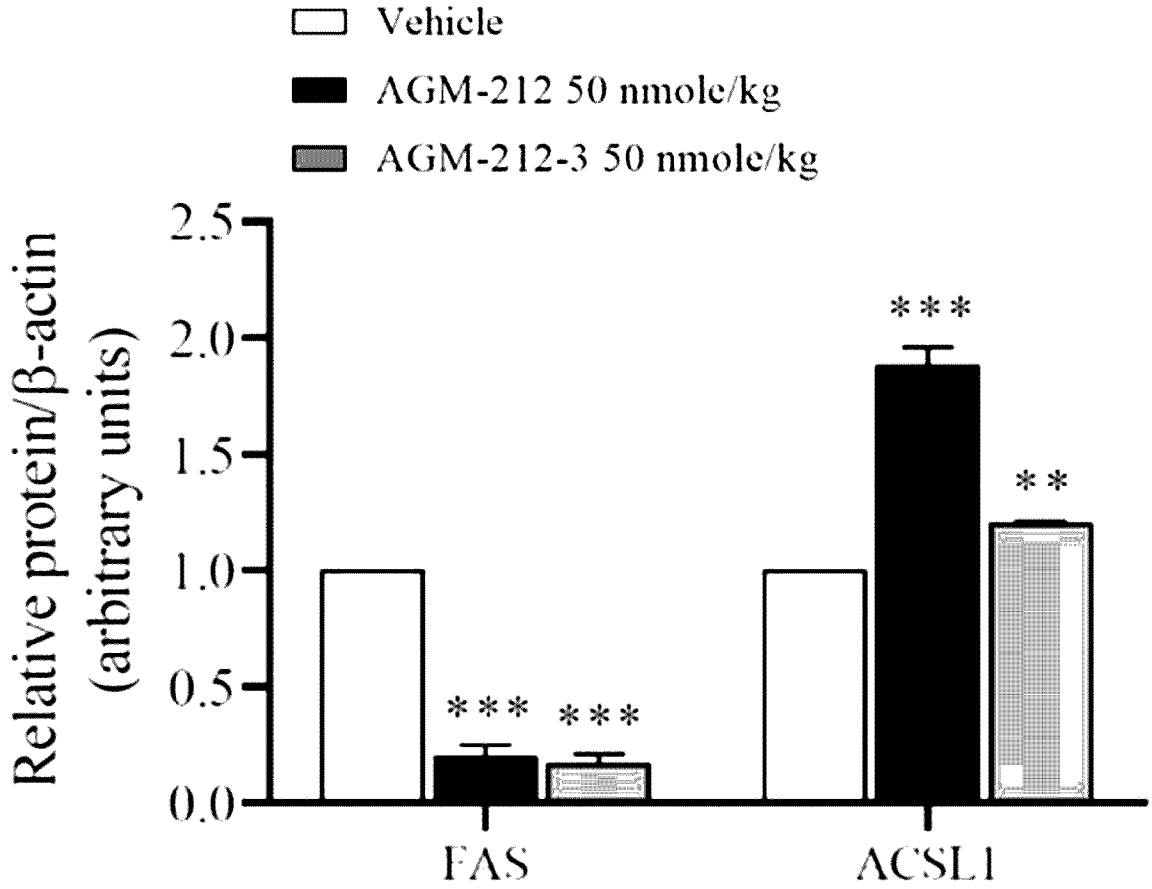
[도16b]


Vehicle
AGM-212 50 nmole/kg
AGM-212-3 50 nmole/kg
Relative mRNA (fold.)
15
10
5
0
###
***
###
***
#
**
ATGL
HSL
Perilipin

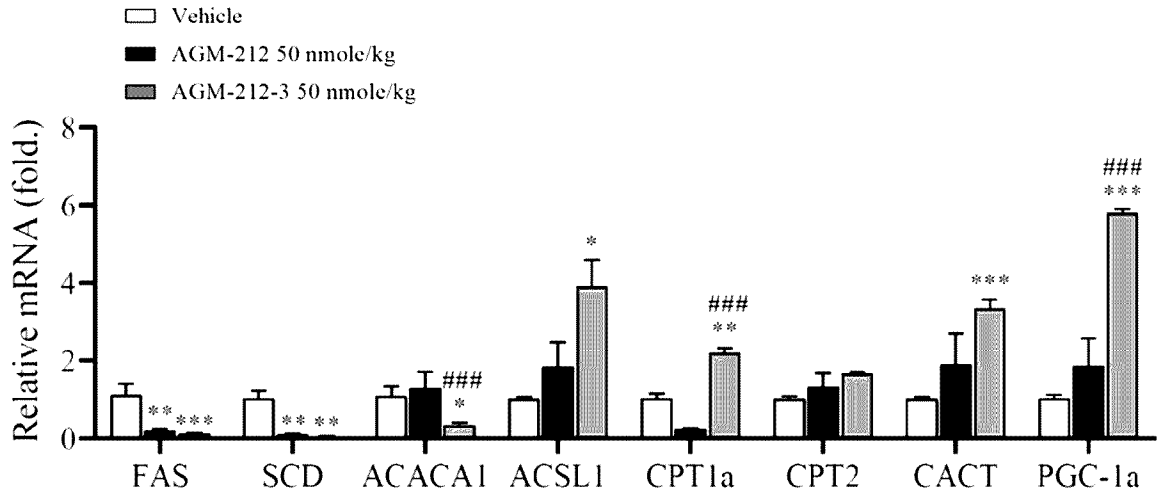
[도16c]


Vehicle
AGM-212 50 nmole/kg
AGM-212-3 50 nmole/kg
Relative mRNA (fold.)
1.5
1.0
0.5
0.0
###
***
**
**
*
**
*
CD36
PPARγ
C/EBPα
FABP4

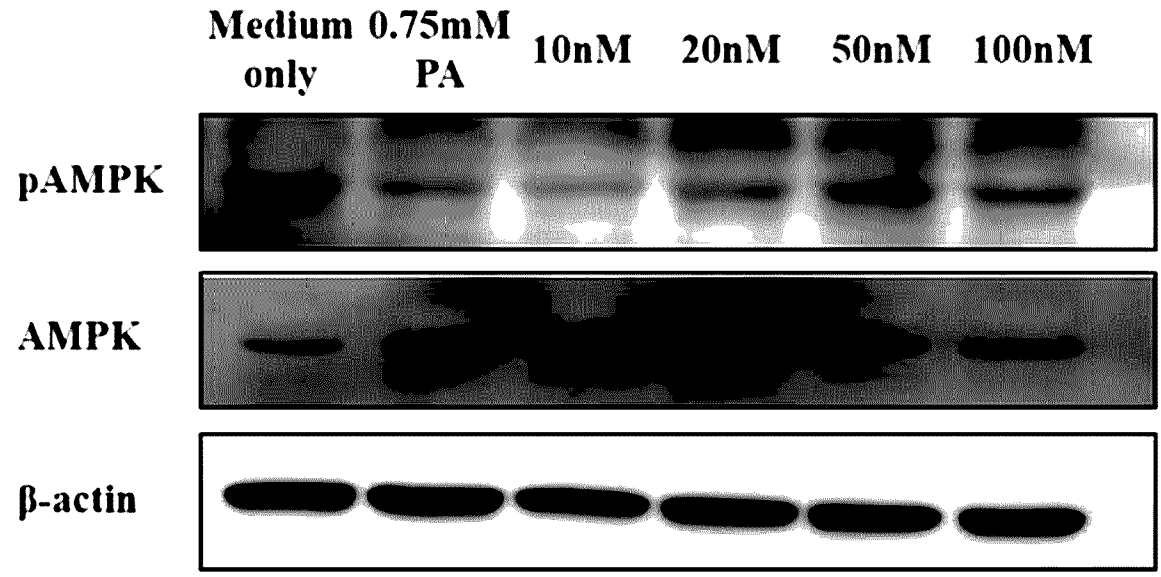
[도16d]


Vehicle
AGM-212 50 nmole/kg
AGM-212-3 50 nmole/kg
Relative protein/β-actin (arbitrary units)
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
***
***
***
**
FAS
ACSL1

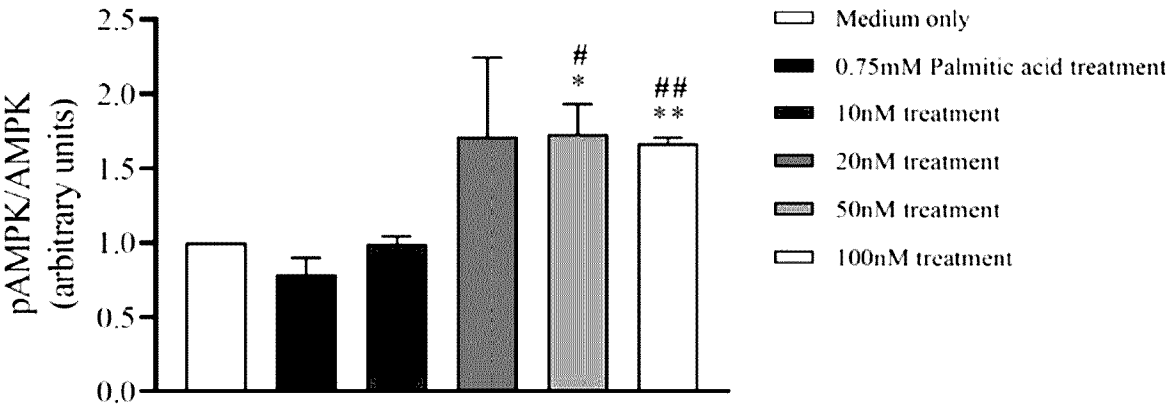
[도16e]


Vehicle
AGM-212 50 nmole/kg
AGM-212-3 50 nmole/kg
Relative mRNA (fold.)
8
6
4
2
0
**
***
***
**
###
*
*
###
**
***
###
***
FAS
SCD
ACACA1
ACSL1
CPT1a
CPT2
CACT
PGC-1a

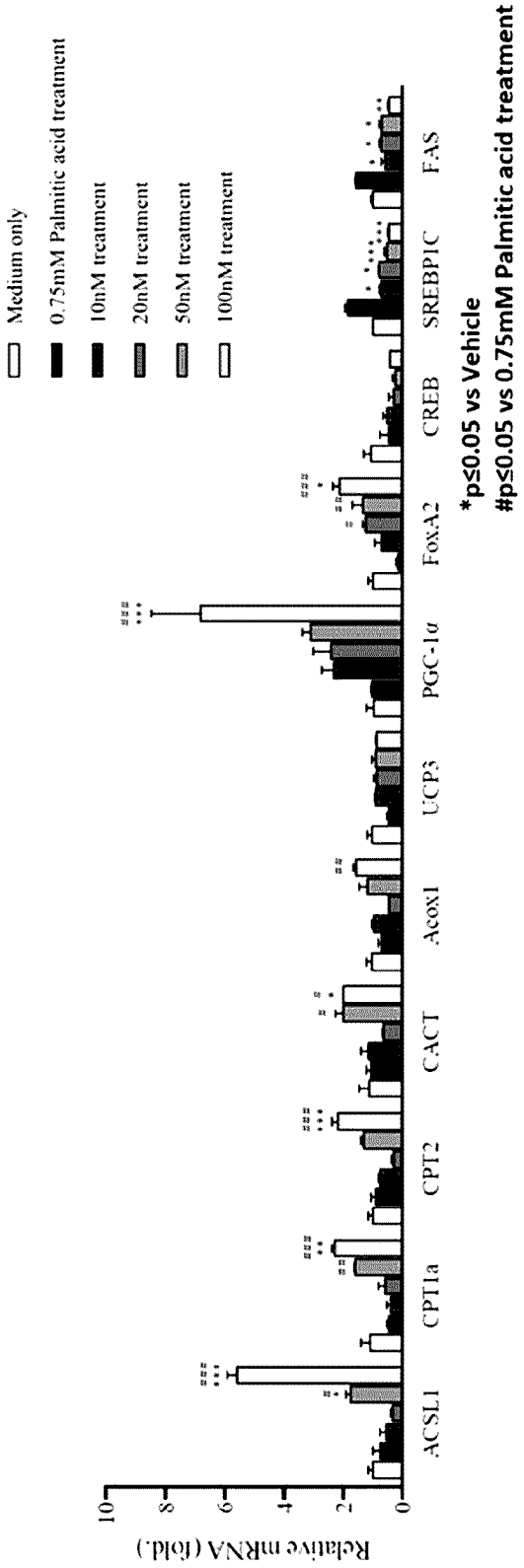
[도17a]


Medium only
0.75mM PA
10nM
20nM
50nM
100nM
pAMPK
AMPK
β-actin

[도17b]


pAMPK/AMPK (arbitrary units)
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
#
*
##
**
Medium only
0.75mM Palmitic acid treatment
10nM treatment
20nM treatment
50nM treatment
100nM treatment

[도17c]


Medium only
0.75mM Palmitic acid treatment
10nM treatment
20nM treatment
50nM treatment
100nM treatment
Relative mRNA (fold.)
0
2
4
6
8
10
ACSL1
CPT1a
CPT2
CACT
Acox1
UCP3
PGC-1α
FoxA2
CREB
SREBP1C
FAS
*p≤0.05 vs Vehicle
#p≤0.05 vs 0.75mM Palmitic acid treatment

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/KR2020/010751

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C07K 14/605(2006.01)i; ***A61K 38/26***(2006.01)i; ***A23L 29/281***(2016.01)i; ***A61P 3/10***(2006.01)i; ***A61P 3/04***(2006.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C07K 14/605; A61K 38/26; A61P 3/10; C07K 14/575; A23L 29/281; A61P 3/04

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Korean utility models and applications for utility models: IPC as above
Japanese utility models and applications for utility models: IPC as above

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

eKOMPASS (KIPO internal) & keywords: 엑세나타이드 유사체(exenatide analogs), 지방산(fatty acid), 접합(conjugation), 당쇄화(glycosylation), 이량체(dimer), 글루카곤(glucagon)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	KR 10-2015-0111297 A (ANYGEN CO., LTD.) 05 October 2015. See claims 1-8, 14-16 and 21-23; and SEQ ID NO: 1.	1-16
A		17-33
Y	MORADI, S. V. et al. Glycosylation, an effective synthetic strategy to improve the bioavailability of therapeutic peptides. Chem. Sci. 2016, vol. 7, pp. 2492-2500. See abstract.	1-16
A	PAN, Y. et al. A novel GLP-1 analog, a dimer of GLP-1 via covalent linkage by a lysine, prolongs the action of GLP-1 in the treatment of type 2 diabetes. Peptides. 2017, vol. 88, pp. 46-54. See entire document.	1-33
A	US 2011-0301084 A1 (LAU, J. et al.) 08 December 2011. See entire document.	1-33
A	US 9365632 B2 (SANOFI) 14 June 2016. See entire document.	1-33

☑ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☑ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"D" document cited by the applicant in the international application
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
07 December 2020	**07 December 2020**

Name and mailing address of the ISA/KR	Authorized officer
Korean Intellectual Property Office **Government Complex Daejeon Building 4, 189, Cheongsa-ro, Seo-gu, Daejeon, Republic of Korea** **35208**	
Facsimile No. **+82-42-481-8578**	Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/KR2020/010751

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	SONI, H. Peptide-based GLP-1/glucagon co-agonists: A double-edged sword to combat diabesity. Medical Hypotheses. 2016, vol. 95, pp. 5-9. See entire document.	1-33
A	AXELSEN, L. N. et al. Glucagon and a glucagon-GLP-1 dual-agonist increases cardiac performance with different metabolic effects in insulin-resistant hearts. British Journal of Pharmacology. 2012, vol. 165, pp. 2736-2748. See entire document.	1-33

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/KR2020/010751

Patent document cited in search report	Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
KR 10-2015-0111297 A	05 October 2015	CN 106661096 A	10 May 2017
		EP 3121195 A1	25 January 2017
		EP 3121195 B1	02 January 2019
		JP 2017-510636 A	13 April 2017
		JP 6438563 B2	12 December 2018
		US 2017-0128541 A1	11 May 2017
		KR 10-1768446 B1	17 August 2017
		WO 2015-142140 A1	24 September 2015
US 2011-0301084 A1	08 December 2011	EP 2330126 B1	23 December 2015
		EP 1799711 A2	27 June 2007
		EP 1799711 B1	20 June 2012
		EP 2330126 A1	08 June 2011
		JP 2008-515857 A	15 May 2008
		JP 5107713 B2	26 December 2012
		US 2008-0249007 A1	09 October 2008
		US 8772232 B2	08 July 2014
		US 8030273 B2	04 October 2011
		WO 2006-037811 A2	13 April 2006
		WO 2006-037811 A3	07 December 2006
US 9365632 B2	14 June 2016	AR 092925 A1	06 May 2015
		AR 105457 A2	04 October 2017
		AU 2013-328802 B2	12 October 2017
		AU 2013-328802 A1	07 May 2015
		BR 112015007685 A2	08 August 2017
		CA 2887272 A1	17 April 2014
		CL 2016002137 A1	22 December 2017
		CL 2015000811 A1	11 September 2015
		CN 104837864 B	05 July 2019
		CN 104837864 A	12 August 2015
		CR 20150200 A	11 June 2015
		CY 1119987 T1	12 December 2018
		DK 2906595 T3	27 November 2017
		DO P2015000073 A	31 May 2015
		EA 201590715 A1	30 November 2015
		EA 030023 B1	29 June 2018
		EP 2906595 A1	19 August 2015
		EP 2906595 B1	16 August 2017
		ES 2647418 T3	21 December 2017
		GT 201500081 A	15 December 2017
		HK 1209766 A1	08 April 2016
		HR P20171726 T1	29 December 2017
		HU E037150 T2	28 August 2018
		IL 237641 A	30 April 2015
		IL 237641 B	30 June 2019
		JP 6373270 B2	15 August 2018
		JP 2015-532297 A	09 November 2015
		KR 10-2015-0064093 A	10 June 2015
		KR 10-2179751 B1	17 November 2020
		LT 2906595 T	27 November 2017
		MA 38066 A1	31 May 2016

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/KR2020/010751

Patent document cited in search report	Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
		MA	38066	B1	31 May 2017
		MX	359533	B	01 October 2018
		MX	2015004531	A	01 December 2015
		NO	2906595	T3	13 January 2018
		NZ	706898	A	23 February 2018
		PE	09002015	A1	16 June 2015
		PE	20150900	A1	16 June 2015
		PH	12015500688	A1	25 May 2015
		PH	12015500688	B1	25 May 2015
		PL	2906595	T3	31 January 2018
		PT	2906595	T	16 November 2017
		RS	56515	B1	28 February 2018
		SG	11201501770	A	29 April 2015
		SI	2906595	T1	29 December 2017
		TN	2015000101	A1	29 June 2016
		TW	201427992	A	16 July 2014
		TW	I613213	B	01 February 2018
		UA	116217	C2	26 February 2018
		US	2018-0185450	A1	05 July 2018
		US	2016-0220643	A1	04 August 2016
		US	2014-0100156	A1	10 April 2014
		US	10758592	B2	01 September 2020
		UY	35072	A	30 May 2014
		WO	2014-056872	A1	17 April 2014
		ZA	201501694	B	27 January 2016

국제조사보고서

국제출원번호
PCT/KR2020/010751

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))

C07K 14/605(2006.01)i, A61K 38/26(2006.01)i, A23L 29/281(2016.01)i, A61P 3/10(2006.01)i, A61P 3/04(2006.01)i

B. 조사된 분야

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)
C07K 14/605; A61K 38/26; A61P 3/10; C07K 14/575; A23L 29/281; A61P 3/04

조사된 기술분야에 속하는 최소문헌 이외의 문헌
한국등록실용신안공보 및 한국공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC
일본등록실용신안공보 및 일본공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC

국제조사에 이용된 전산 데이터베이스(데이터베이스의 명칭 및 검색어(해당하는 경우))
eKOMPASS(특허청 내부 검색시스템) & 키워드: 엑세나타이드 유사체(exenatide analogs), 지방산(fatty acid), 접합(conjugation), 당쇄화(glycosylation), 이량체(dimer), 글루카곤(glucagon)

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
Y	KR 10-2015-0111297 A (애니젠 주식회사) 2015.10.05 청구항 1-8, 14-16, 21-23; 및 서열번호 1	1-16
A		17-33
Y	MORADI, S. V. 등, `Glycosylation, an effective synthetic strategy to improve the bioavailability of therapeutic peptides', Chem. Sci., 2016, 7권, 페이지 2492-2500 초록	1-16
A	PAN, Y. 등, `A novel GLP-1 analog, a dimer of GLP-1 via covalent linkage by a lysine, prolongs the action of GLP-1 in the treatment of type 2 diabetes', Peptides, 2017, 88권, 페이지 46-54 전체 문헌	1-33
A	US 2011-0301084 A1 (LAU, J. 등) 2011.12.08 전체 문헌	1-33
A	US 9365632 B2 (SANOFI) 2016.06.14 전체 문헌	1-33

☒ 추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다.

☒ 대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.

* 인용된 문헌의 특별 카테고리:

"A" 특별히 관련이 없는 것으로 보이는 일반적인 기술수준을 정의한 문헌

"D" 본 국제출원에서 출원인이 인용한 문헌

"E" 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허 문헌

"L" 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌

"O" 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌

"P" 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌

"T" 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌

"X" 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신규성 또는 진보성이 없는 것으로 본다.

"Y" 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다.

"&" 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌

국제조사의 실제 완료일	국제조사보고서 발송일
2020년 12월 07일 (07.12.2020)	2020년 12월 07일 (07.12.2020)

ISA/KR의 명칭 및 우편주소
대한민국 특허청
(35208) 대전광역시 서구 청사로 189, 4동 (둔산동, 정부대전청사)
팩스 번호 +82-42-481-8578

심사관
허주형
전화번호 +82-42-481-5373

국제조사보고서

국제출원번호
PCT/KR2020/010751

C (계속). 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
A	SONI, H., `Peptide-based GLP-1/glucagon co-agonists: A double-edged sword to combat diabesity', Medical Hypotheses, 2016, 95권, 페이지 5-9 전체 문헌	1-33
A	AXELSEN, L. N. 등, `Glucagon and a glucagon-GLP-1 dual-agonist increases cardiac performance with different metabolic effects in insulin-resistant hearts', British Journal of Pharmacology, 2012, 165권, 페이지 2736-2748 전체 문헌	1-33

국제조사보고서
대응특허에 관한 정보

국제출원번호
PCT/KR2020/010751

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
KR 10-2015-0111297 A	2015/10/05	CN 106661096 A	2017/05/10
		EP 3121195 A1	2017/01/25
		EP 3121195 B1	2019/01/02
		JP 2017-510636 A	2017/04/13
		JP 6438563 B2	2018/12/12
		KR 10-1768446 B1	2017/08/17
		US 2017-0128541 A1	2017/05/11
		WO 2015-142140 A1	2015/09/24
US 2011-0301084 A1	2011/12/08	EP 1799711 A2	2007/06/27
		EP 1799711 B1	2012/06/20
		EP 2330126 A1	2011/06/08
		EP 2330126 B1	2015/12/23
		JP 2008-515857 A	2008/05/15
		JP 5107713 B2	2012/12/26
		US 2008-0249007 A1	2008/10/09
		US 8030273 B2	2011/10/04
		US 8772232 B2	2014/07/08
		WO 2006-037811 A2	2006/04/13
		WO 2006-037811 A3	2006/12/07
US 9365632 B2	2016/06/14	AR 092925 A1	2015/05/06
		AR 105457 A2	2017/10/04
		AU 2013-328802 A1	2015/05/07
		AU 2013-328802 B2	2017/10/12
		BR 112015007685 A2	2017/08/08
		CA 2887272 A1	2014/04/17
		CL 2015000811 A1	2015/09/11
		CL 2016002137 A1	2017/12/22
		CN 104837864 A	2015/08/12
		CN 104837864 B	2019/07/05
		CR 20150200 A	2015/06/11
		CY 1119987 T1	2018/12/12
		DK 2906595 T3	2017/11/27
		DO P2015000073 A	2015/05/31
		EA 030023 B1	2018/06/29
		EA 201590715 A1	2015/11/30
		EP 2906595 A1	2015/08/19
		EP 2906595 B1	2017/08/16
		ES 2647418 T3	2017/12/21
		GT 201500081 A	2017/12/15
		HK 1209766 A1	2016/04/08
		HR P20171726 T1	2017/12/29
		HU E037150 T2	2018/08/28
		IL 237641 A	2015/04/30
		IL 237641 B	2019/06/30
		JP 2015-532297 A	2015/11/09
		JP 6373270 B2	2018/08/15
		KR 10-2015-0064093 A	2015/06/10

국제조사보고서
대응특허에 관한 정보

국제출원번호
PCT/KR2020/010751

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
		KR 10-2179751 B1	2020/11/17
		LT 2906595 T	2017/11/27
		MA 38066 A1	2016/05/31
		MA 38066 B1	2017/05/31
		MX 2015004531 A	2015/12/01
		MX 359533 B	2018/10/01
		NO 2906595 T3	2018/01/13
		NZ 706898 A	2018/02/23
		PE 09002015 A1	2015/06/16
		PE 20150900 A1	2015/06/16
		PH 12015500688 A1	2015/05/25
		PH 12015500688 B1	2015/05/25
		PL 2906595 T3	2018/01/31
		PT 2906595 T	2017/11/16
		RS 56515 B1	2018/02/28
		SG 11201501770 A	2015/04/29
		SI 2906595 T1	2017/12/29
		TN 2015000101 A1	2016/06/29
		TW 201427992 A	2014/07/16
		TW I613213 B	2018/02/01
		UA 116217 C2	2018/02/26
		US 10758592 B2	2020/09/01
		US 2014-0100156 A1	2014/04/10
		US 2016-0220643 A1	2016/08/04
		US 2018-0185450 A1	2018/07/05
		UY 35072 A	2014/05/30
		WO 2014-056872 A1	2014/04/17
		ZA 201501694 B	2016/01/27