(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2017-0069997
(43) 공개일자 2017년06월21일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 38/08 (2006.01) *A61K 38/10* (2006.01)
A61K 38/22 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 38/08 (2013.01)
A61K 38/10 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2017-7004924
(22) 출원일자(국제) 2015년08월11일
심사청구일자 2017년02월22일
(85) 번역문제출일자 2017년02월22일
(86) 국제출원번호 PCT/US2015/044618
(87) 국제공개번호 WO 2016/025459
국제공개일자 2016년02월18일
(30) 우선권주장
62/035,916 2014년08월11일 미국(US)

(71) 출원인
알바니 메디칼 칼리지
미국, 뉴욕 12208, 알바니, 뉴 스코틀랜드 애버뉴 47
(72) 발명자
그라쏘 패트리시아
미국, 뉴햄프셔 12303, 스키넥터디, 세이브 로드 1073
노바코빅 자크리
미국, 펜실베니아 16509, 이리, 아파트먼트 102, 코퍼 드라이브 5551
(74) 대리인
강명구

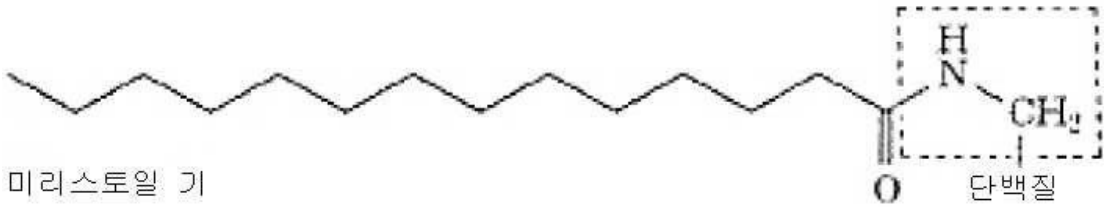
전체 청구항 수 : 총 16 항

(54) 발명의 명칭 **미리스토일화된 렙틴-관련된 펩티드 및 이들의 용도**

(57) 요 약

미리스트산 및 렙틴-관련된 펩티드의 접합체인, 비만 관련된 장애의 치료를 위한 제약학적 화합물. 바람직하게는, 렙틴-관련된 펩티드는 Leu-4에서 D-치환된 OB3이다. 결과의 접합체는 전달 루트에 따라 이의 반감기를 1 시간 이하로부터 길게는 28 시간까지 연장하고, 흡수를 증가시키고, 혈장 청소율을 감소시키고, 그리고 최소 효과량이 수배 감소될 수 있게 함으로써, 렙틴-관련된 펩티드의 약동학적 프로필을 유의미하게 향상시켰다.

대 표 도



(52) CPC특허분류
A61K 38/2264 (2013.01)
Y10S 514/866 (2013.01)
Y10S 514/909 (2013.01)

명 세 서

청구범위

청구항 1

렙틴-관련된 펩티드에 접합된 미리스트산을 포함하는 제약학적 화합물.

청구항 2

청구항 1에 있어서, 미리스트산은 렙틴-관련된 펩티드의 N 말단에 부착된 것을 특징으로 하는 제약학적 화합물.

청구항 3

청구항 2에 있어서, 렙틴-관련된 펩티드는 OB3인 것을 특징으로 하는 제약학적 화합물.

청구항 4

청구항 3에 있어서, 렙틴-관련된 펩티드는 서열 번호: 16인 것을 특징으로 하는 제약학적 화합물.

청구항 5

청구항 4에 있어서, 렙틴-관련된 펩티드는 최소한 하나의 D-동종형 아미노산을 내포하는 것을 특징으로 하는 제약학적 화합물.

청구항 6

청구항 5에 있어서, 렙틴-관련된 펩티드는 Leu-4에서 D-치환된 것을 특징으로 하는 제약학적 화합물.

청구항 7

청구항 3에 있어서, 렙틴-관련된 펩티드는 서열 번호: 1인 것을 특징으로 하는 제약학적 화합물.

청구항 8

신체 질량의 항상성에 관련된 질환에 대해 개체를 치료하는 방법에 있어서, 렙틴-관련된 펩티드에 접합된 미리스트산의 분자의 제약학적 효과량을 투여하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 9

청구항 8에 있어서, 미리스트산은 렙틴-관련된 펩티드의 N 말단에 부착된 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 10

청구항 9에 있어서, 렙틴-관련된 펩티드는 OB-3인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 11

청구항 10에 있어서, 렙틴-관련된 펩티드는 서열 번호: 1인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 12

청구항 11에 있어서, 렙틴-관련된 펩티드는 최소한 하나의 D-동종형 아미노산을 내포하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 13

청구항 12에 있어서, 렙틴-관련된 펩티드는 Leu-4에서 D-치환된 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 14

청구항 10에 있어서, 렙틴-관련된 펩티드는 서열 번호: 16인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 15

청구항 8에 있어서, 질환은 비만, 과혈당증, 고인슐린혈증, 과식증, 갑상선 기능장애, 불임 또는 당뇨병인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 16

청구항 15에 있어서, 질환은 영양실조, 기아, 신경성 식욕부진, 골다공증, 암, 당뇨병, 결핵, 만성 설사, AIDS, 그리고 위장간막 동맥 증후군인 것을 특징으로 하는 방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 관련된 출원에 대한 교차 참조

[0002] 본 출원은 2014년 8월 11일자 제출된 U.S. 가출원 번호 62/035,916에 우선권을 주장한다.

[0003] 발명의 배경

[0004] 1. 발명의 분야

[0005] 본 발명은 렙틴-관련된 펩티드 및 더욱 구체적으로, 미리스토일화된 렙틴-관련된 펩티드에 관계한다.

배 경 기 술

[0006] 2. 관련된 분야의 설명

[0007] 마른 체중에 비하여 과잉의 체지방으로서 규정된 비만은 다수의 중요한 임상적 및 심리학적 병적 상태, 예를 들면, 고혈압, 상승된 혈액 지질 및 유형 II 또는 인슐린 비의존성 당뇨병 (NIDDM), 그리고 감소된 기대 수명과 연관된다. 미국에는 NIDDM을 앓는 대략 6-10 백만 명의 개체가 있는데, 이들은 65 세 이상의 전체 인구 중에서 18%를 차지한다. 이에 더하여, NIDDM을 앓는 남성의 대략 45% 및 여성의 70%는 비만하고, 그리고 이들의 당뇨병은 체중 감소에 의해 실제적으로 향상되거나 또는 심지어 소멸된다.

[0008] 렙틴-관련된 펩티드 및 유사체는 인간 비만 및 이의 관련된 기능장애를 치료하는데 큰 잠재력을 보였다. 렙틴-관련된 합성 펩티드 효현제 및 길항제의 설계, 개발, 그리고 전임상 적용에서 계속되는 노력은 대다수의 비만한 인간의 치료적 요구를 충족시키지 못하는 임상 중인 렙틴의 명확한 실패가 이러한 질환 및 이의 연관된 물질대사 기능장애의 범유행 비율을 감소시키는 것을 목적으로 하는 신규한 펩티드 치료제를 개발하려는 노력에서 촉매제로서 기능하였다는 것을 지시한다. 이점에 관하여, 작은-분자 펩티드 치료제는 재조합 렙틴의 한계를 극복하는 잠재력을 갖는데, 그 이유는 중추신경계 (CNS) 내로 이들의 흡수가 혈액 뇌 장벽 (BBB)을 교차하여 가포화 수송에 의존하지 않기 때문이다. CNS 내로 결함성 수송은 인간 비만의 대다수의 사례에서 렙틴 내성의 원인으로서 확인되었다.

[0009] 가령, 렙틴-유사 활성을 갖는 합성 펩티드, 예를 들면, 생쥐 [D-Leu-4]-OB3 및 이의 유사체는 렙틴-결함성 ob/ob 및 렙틴-내성 db/db 생쥐 모형에서 체중 증가, 사료 및 물 섭취, 혈당, 인슐린 감수성, 그리고 골 교체의 민감하고 특정한 마커인 혈청 오스테오칼신에 유의미하게 영향을 준다. 하지만, 인간에서 약물 후보로서 [D-Leu-4]-OB3 및 이의 유사체의 약물동력학은 치료적 용도를 위해 필요한 만큼 최적은 아니다. 특히, [D-Leu-4]-OB3 및 이의 유사체는 짧은 혈청 반감기 및 높은 혈장 청소율을 갖기 때문에, [D-Leu-4]-OB3 및 이의 유사체의 감소된 생체이용률이 유발되고, 따라서 더욱 높은 용량이 필요하다.

[0010] 따라서, 인간 비만 및 이의 관련된 기능장애의 치료를 위한 효과적인 치료제를 제공하는, 향상된 약물동력학을 갖는 변형된 렙틴-관련된 펩티드 및 유사체의 개발이 요구된다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0011] 발명의 간단한 요약

[0012] 본 발명은 비-미리스트산 접합된 렙틴-관련된 펩티드에 비하여 향상된 약리학적 효과를 제공하는, 미리스트산 및 렙틴-관련된 펩티드의 폴리펩티드 접합체를 포함한다. 바람직하게는, 미리스트산은 렙틴-관련된 펩티드의 N 말단에 접합된다. 본 발명의 폴리펩티드 접합체는 투여 이후에, 체중 증가, 식품 섭취, 물소비량, 및/또는 혈당 수준을 감소시킴으로써 신체 질량을 조정할 수 있다. 본 발명의 폴리펩티드 접합체는 또한, 골 형성을 증가시킬 수 있다.

[0013] 본 발명의 한 구체예에서, 렙틴-관련된 펩티드는 서열 SCSLPQT (서열 번호:1)를 갖는 렙틴-유사 활성의 합성 펩티드 아미드, [D-Leu-4]-OB3을 포함하고, 그리고 미리스트산에 접합되어 화합물 MA-[D-Leu-4]-OB3을 형성한다.

[0014] 본원에서 설명된 제약학적 조성물은 비-미리스토일화된 렙틴-관련된 펩티드의 용량보다 최소한 4배, 그리고 심지어 10-배 낮은 용량에서 투여될 수 있다. 미리스트산 접합된 렙틴-관련된 펩티드는 치료 효과량을 개체에 투여함으로써, 치료가 필요한 개체에서 신체 질량의 항상성에 관련된 질환을 치료하는데 이용될 수 있다. 가령, 치료되는 질환은 비만, 과혈당증, 고인슐린혈증, 과식증, 갑상선 기능장애, 불임 또는 당뇨병일 수 있다. 미리스트산 접합된 렙틴-관련된 펩티드는 또한, 골 형성을 증가시키는데 이용될 수 있다. 가령, 미리스트산 접합된 렙틴-관련된 펩티드는 영양실조, 기아, 신경성 식욕부진, 골다공증, 암, 당뇨병, 결핵, 만성 설사, AIDS, 그리고 위장간막 동맥 증후군으로 구성된 군에서 선택되는 장애로 고통받는 개체를 치료하는데 이용될 수 있다. 미리스트산 접합된 렙틴-관련된 펩티드는 피하, 복막내, 근육내, 경구 또는 비내 투여를 통해 투여될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0015] 도면의 간단한 설명

본 발명은 첨부 도면과 함께 다음의 상세한 설명을 읽음으로써 더욱 충분히 이해되고 인지될 것인데, 여기서:

도면 1은 본 발명에 따른 미리스트산 접합된 렙틴-관련된 펩티드의 계통도이다.

도면 2는 치료 전 (시간 0), 그리고 수컷 Swiss Webster 생쥐 (시점마다 n = 3 생쥐)에 0.1 mg 펩티드의 피하 전달 후 1, 2, 4, 6, 18 및 24 시간에 MA-[D-Leu-4]OB3의 혈청 농도를 보여주는 그래프이다. 각 값은 평균 ± SEM을 나타낸다. 오차 막대는 포인트 내에 내포되고 0.01 및 0.12 ng/ml 사이의 범위에서 변하였다;

도면 3은 치료 전 (시간 0), 그리고 수컷 Swiss Webster 생쥐 (시점마다 n = 3 생쥐)에 0.1 mg 펩티드의 복막내 전달 후 1, 2, 4, 6, 18 및 24 시간에 MA-[D-Leu-4]OB3의 혈청 농도를 보여주는 그래프이다. 각 값은 평균 ± SEM을 나타낸다. 오차 막대는 포인트 내에 내포되고 0.01 및 0.12 ng/ml 사이의 범위에서 변하였다;

도면 4는 치료 전 (시간 0), 그리고 수컷 Swiss Webster 생쥐 (시점마다 n = 3 생쥐)에 0.1 mg 펩티드의 근육내 전달 후 1, 2, 4, 6, 18 및 24 시간에 MA-[D-Leu-4]OB3의 혈청 농도를 보여주는 그래프이다. 각 값은 평균 ± SEM을 나타낸다. 오차 막대는 포인트 내에 내포되고 0.01 및 0.12 ng/ml 사이의 범위에서 변하였다;

도면 5는 치료 전 (시간 0), 그리고 수컷 Swiss Webster 생쥐 (시점마다 n = 3 생쥐)에 0.1 mg 펩티드의 경구 전달 (위관영양) 후 1, 2, 4, 6, 18 및 24 시간에 MA-[D-Leu-4]OB3의 혈청 농도를 보여주는 그래프이다. 각 값은 평균 ± SEM을 나타낸다. 오차 막대는 포인트 내에 내포되고 0.01 및 0.12 ng/ml 사이의 범위에서 변하였다;

도면 6은 치료 전 (시간 0), 그리고 수컷 Swiss Webster 생쥐 (시점마다 n = 3 생쥐)에 0.1 mg 펩티드의 비내 점적 후 1, 2, 4, 6, 18 및 24 시간에 MA-[D-Leu-4]OB3의 혈청 농도를 보여주는 그래프이다. 각 값은 평균 ± SEM을 나타낸다. 오차 막대는 포인트 내에 내포되고 0.01 및 0.12 ng/ml 사이의 범위에서 변하였다;

도면 7은 0.3% 도데실 말토시드에서 경구 전달 이후에 db/db 생쥐에서 공복 혈당에 대한 미리스트산-접합된 [D-Leu-4]-OB3의 효과를 보여주는 그래프이다;

도면 8은 PBS에서 경구 전달 이후에 db/db 생쥐에서 공복 혈당에 대한 미리스트산-접합된 [D-Leu-4]-OB3의 효과를 보여주는 그래프이다;

도면 9는 STZ-유도된 고혈당 수컷 Swiss Webster 생쥐에서 MA-[D-Leu-4]-OB3 또는 메트포르민의 부재 또는 존재에서, 체중 증가에 대한 디테미르 인슐린의 효과를 보여주는 그래프이다. 각 포인트는 초기의 퍼센트로서 표시된 평균 ± SEM 체중을 나타낸다 (군마다 n = 6 생쥐); 그리고

도면 10은 STZ-유도된 고혈당 수컷 Swiss Webster 생쥐에서 MA-[D-Leu-4]-OB3 또는 메트포르민의 부재 또는 존재에서, 공복 혈당 수준에 대한 디테미르 인슐린의 효과를 보여주는 그래프이다. 각 막대 및 수직선은 평균 ± SEM 공복 혈당을 나타낸다 (군마다 n = 6 생쥐).

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0016] 발명의 상세한 설명

[0017] 이들 도면 (유사한 참조 번호는 전역에서 유사한 부분을 지칭한다)을 참조하면, 렙틴-관련된 단백질 단독에 비하여 유의미하게 향상된 약동학적 프로필을 유발하는, 미리스트산 및 렙틴-관련된 펩티드의 접합체가 도면 1에서 목격된다. 바람직하게는, 렙틴-관련된 펩티드는 렙틴의 잔기 116-122에 상응하는 OB3으로서 알려져 있는 합성 펩티드이고, 여기서 생쥐 OB3은 서열 SCSLPQT (서열 번호:1)를 갖고, 그리고 인간 OB3은 서열 SCHLPWA(서열 번호: 16)를 갖는다.

[0018] 렙틴-관련된 펩티드는 또한, SCSLPQT (서열 번호:1) 및 SCHLPWA(서열 번호: 16)에 상응하는 영역에 가장 가깝거나 또는 겹치는 다른 영역 렙틴을 포함할 수 있다. 가령, AVPIQKVQDDTKTLI (서열 번호: 2); TKTLIKTIVTRINDI (서열 번호: 3); RINDISHTQSVSAKQ (서열 번호: 4); VSAKQRVTGLDFIPG (서열 번호: 5); DFIPGLHPILSLSKM (서열 번호: 6); SLSKMDQTLAVYQQV (서열 번호: 7); VYQQVLTSLPSQNVL (서열 번호: 8); SQNVLQIANDLENLR (서열 번호: 9); DLLHLLAFSKSCSLP (서열 번호: 10); SCSLPQTSGLQKPES (서열 번호: 11); QKPESLDGVLEASLY (서열 번호: 12); EASLYSTEVVALSRL (서열 번호: 13); ALSRLQGSLQDILQQ (서열 번호: 14); 또는 DILQQLDVSPEC (서열 번호: 15)는 아래의 프로토콜을 이용하여 평가될 수 있었다.

[0019] 바람직하게는, 렙틴-관련된 펩티드는 최소한 하나의 D-치환된 아미노산을 포함한다. 가령, D-동종형 아미노산은 서열 번호: 1에 대하여 [D-Ser-1]; [D-Cys-2]; [D-Ser-3]; [D-Leu-4]; [D-Pro-5]; [D-Gln-6]; 및 [D-Thr-7]로 구성된 군에서 선택될 수 있고, 그리고 서열 번호: 16에 대하여 [D-Ser-1]; [D-Cys-2]; [D-His-3]; [D-Leu-4]; [D-Pro-5]; [D-Trp-6]; 및 [D-Ala-7]로 구성된 군에서 선택될 수 있다.

[0020] 도면 1에서 목격되는 바와 같이, 미리스트산은 렙틴-관련된 펩티드의 잔기의 유리 아미노 기에 공유 부착된다. 대안으로, 미리스트산은 상기 펩티드의 잔기의 임의의 유리 아미노 기에 접합될 수 있다. 가령, 인간 OB3 펩티드 (서열 번호: 16)의 위치 3에서 히스티딘 (H) 잔기는 알파-아미노 기 이외에 추가 유리 아미노 기를 제공한다. 다음의 지질이 또한, 미리스트산 대신에 이용될 수 있고 아래의 프로토콜에 따라 시험될 수 있다: 시클로헥실발레로일, 아실-글루타밀, 라우로일, 2-숙시닐아미도 미리스트산, 2-숙시닐아미도에틸옥시 팔미트산, 미리스토일-α-글루타밀, 미리스토일-α-글루타밀-글리실, 콜로일, 7-데옥시콜로일, 리토콜로일, 리토콜로일-글루타밀, 4-벤조일-페닐알라닌, L-티록실, 수베로일-D-티록신, 3,3',5,5'-테트라요오도티로아세틸, 시클로헥실발레로일.

[0021] 청구된 발명의 합성은 아실화의 공지된 과정에 기초되고, 여기서 지방산은 단백질에 공유 부착된다. ε-아미노 기를 선별적으로 아실화 (가령, 미리스토일화)하기 위해, 다양한 보호 기가 연계 동안 α-아미노 기를 차단하는데 이용될 수 있다. 적합한 보호 기의 선별은 당업자에게 공지되어 있고 p-메톡시벤족시-카르보닐 (pmZ)을 포함한다. 바람직하게는, ε-아미노 기는 아미노-보호 기의 이용 없이 일-단계 합성에서 아실화 (가령, 미리스토일화)될 수 있다. 아실화 (가령, 미리스토일화)는 활성화된 지방산 에스테르를 염기성 조건 하에 극성 용매에서 단백질의 ε-아미노 기와 반응시킴으로써 수행된다. 반응의 염기도는 렙틴 유사체의 모든 유리 아미노 기를 탈양자화하는데 충분해야 한다. 약염기성 조건 하에, 모든 유리 아미노 기가 탈양자화되지는 않고, 그리고 N 말단 또는 α-아미노 기의 우선적 아실화 (가령, 미리스토일화)가 발생한다. 아실화 (가령, 미리스토일화) 후, 산물은 표준 방법, 예를 들면, 역상 소수성 크로마토그래피에 의해 정제된다. 그 후에, 산물은 표준 방법, 예를 들면, 동결건조에 의해 또는 결정화에 의해 회수된다.

[0022] 가령, 펩티드의 표본은 Rink 아미드 수지 상에서 Fmoc/tertbutyl 전략을 이용하여 Rainin Symphony 합성장치에서 합성되었다. 이들 아미노산은 HCTU/DIPEA 용액과 연계되고, 그리고 Fmoc가 20% 피페리딘/DMF의 용액으로 제거되었다. 자동화된 합성이 완결된 후에, 미리스트산 무수물이 펩티드의 N 말단에 수동으로 부가되었다. 펩티드는 TFA 개열 칵테일을 이용하여 수지로부터 개열되었다. Maldi-Tof 질량 분광분석법이 표적 덩어리가 존재하는지를 점검하는데 이용되었다. 펩티드는 역상 HPLC 및 C-18 Waters Sunfire 칼럼을 이용하여 정제되었다.

[0023] 미리스토일화된 펩티드의 약물동력학은 당분야에서 임의의 공지된 방법에 따라 결정될 수 있다. 가령, 미리스토일화된 렙틴-관련된 펩티드의 약물동력학은 총 흡수, 혈청 반감기, 그리고 혈장 청소율을 분석함으로써 결정될 수 있다. 총 흡수, 혈청 반감기, 그리고 혈장 청소율을 결정하는 검정은 당분야에서 널리 공지되고, 그리고 아래의 실시예에서 이용되었다. [D-Leu-4]-OB3에 미리스트산의 접합은 전달 루트에 따라 반감기를 1 시간 이하로부터 길게는 28 시간까지 연장하고, 흡수를 증가시키고, 혈장 청소율을 감소시키고, 그리고 최소 효과량이 4-배 또는 그 이상 감소될 수 있게 함으로써 약동학적 프로필을 유의미하게 향상시켰다. 본 발명의 미리스토일화된

펩티드는 따라서, 비-미리스토일화된 렙틴 펩티드에 비하여 유의미한 이점을 제공한다, 예를 들면, 이들은 더욱 낮은 용량에서 및 더욱 적은 투여 빈도로 투여될 수 있다. 비록 본 발명이 서열 번호: 1을 이용하여 시험되긴 했지만, 본 발명의 접근법은 다른 렙틴-관련된 단백질에 적용되고, 그리고 이후, 아래에 설명된 바와 같이 효력에 대해 시험될 수 있다.

[0024] 실시예 1

[0025] [D-Leu-4]-OB3, 생물학적으로 활성 렙틴-관련된 합성 펩티드 아미드에 미리스트산의 접합은 이의 약동학적 프로필을 유의미하게 향상시킨다.

[0026] 재료와 방법

[0027] 동물의 하우징

[0028] 12 및 15 g 사이의 무게가 나가는 3 내지 4 주령 수컷 Swiss Webster 생쥐는 Charles River Laboratories (Troy, NY, USA)로부터 획득되었다. 이들 동물은 스테인리스강 와이어 뚜껑 및 공기 필터가 구비된 폴리카보네이트 케이지 내에 케이지마다 3마리씩 수용되고, 그리고 Albany Medical College Animal Resources Facility 내에 통풍된 선반 (Thoren Caging Systems, Hazelton, PA, USA)에서 지지되었다. 이들 생쥐는 07:00 시부터 19:00 시까지 밝음 하에 일정한 온도 (24 ℃)에서 유지되고, 그리고 흡수 연구를 위해 이용 때까지 사료 및 물이 무제한으로 허용되었다.

[0029] 펩티드 투여

[0030] MA-[D-Leu-4]OB3은 NeoBioLab (Cambridge, MA, USA)에 의해 C 말단 아미드로서 상업적으로 제조되었다. SC, IP 및 IM 전달을 위해, 상기 펩티드는 2가지 유전적으로 비만한 생쥐 모형에서 에너지 소비, 글루코오스 수준, 그리고 인슐린 감수성을 조절하는데 최적인 것으로 이전에 밝혀진 [D-Leu-4]-OB3의 농도보다 10-배 낮은 농도인 0.1 mg/200 μl의 농도에서 무균 인산염 완충된 식염수 (PBS, pH 7.2)에서 용해되었다. 경구 및 비내 전달을 위해, MA-[D-Leu-4]-OB3은 각각, 0.1 mg/100 μL 및 0.1 mg/10 μL의 농도에서 무균 탈이온수에서 재구성된 0.3% Intravail® (Aegis Therapeutics, San Diego, CA, USA)에서 용해되었다. 제로 (0) 시점에서, 생쥐 MA-[D-Leu-4]-OB3의 단일 200 μl SC, IM, 또는 IP 주사가 시점마다 각 3마리 생쥐에 제공되었다. 비내 전달은 생쥐를 이소플루란 (1-4%)으로 가볍게 마취시키고, 그리고 Gilson® P-20 피펫터를 이용하여, 10 μl의 MA-[D-Leu-4]OB3을 비공 내로 전달함으로써 달성되었다. 펩티드 투여 이후에, 생쥐는 지정된 기간 동안 별개의 케이지로 이전되었다.

[0031] 혈액 및 혈청 제조물의 수집

[0032] 펩티드 전달 후 1, 2, 4, 6, 18 및 24 시간에, 이들 생쥐는 이소플루란 (5%)으로 마취되고 심장 천자에 의해 방혈되었다. 혈액은 무균 비-헤파린화된 플라스틱 원심분리기 튜브에 수집되고 실온에서 1 시간 동안 그 상태로 있도록 허용되었다. 응고된 혈액은 튜브의 벽으로부터 무균 목재 애플리케이터 스틱으로 림드되었다. 개별 혈청 표본은 에펜도르프 5702R, A-4-38 회전자 (Eppendorf North America, Westbury, NY, USA)에서 2600 xg로 30 분 동안 원심분리에 의해 제조되고, 시점별로 모아지고, 그리고 MA-[D-Leu-4]OB3 함량에 대해 검정될 때까지 동결 보관되었다. 이들 동물 절차는 Albany Medical College Animal Care and Use Committee에 의해 승인되었고, 그리고 유관한 지침 및 규정에 따라서 수행되었다.

[0033] 혈청 MA[D-Leu-4]-OB3의 계측

[0034] 혼합 혈청 표본 내에 MA-[D-Leu-4]-OB3 농도는 다음의 변형으로, 본 발명자들에 의해 경쟁적 ELISA로 계측되고, 진전되고, 검증되었다: MA-[D-Leu-4]-OB3이 표준 곡선을 구축하는데 이용되었다. MA-[D-Leu-4]-OB3 및 ELISA에서 이용된 [D-Leu-4]-OB3에 대한 다중클론 항체의 교차반응성은 100%이었다. 각 혈청 표본은 2중으로 검정되었다. 검정내 및 검정간 변이 계수는 각각, 0.03% 및 0.2%이었다.

[0035] 약동학적 분석: 총 흡수 (AUC)

[0036] SC, IP, IM, 경구, 또는 비내 전달 이후에 시간과 대비하여 MA-[D-Leu-4]OB3의 혈청 농도는 그래픽 프로그램 SigmaPlot 8.0 (SPSS Science, Chicago, IL, USA)을 이용하여 플롯팅되었다. 각 곡선 아래 면적 (AUC)은 이러한 프로그램의 함수로 계산되고, 그리고 ng/ml/분으로서 표시되었다.

[0037] 약동학적 분석: 혈청 반감기 ($t_{1/2}$)

[0038] MA-[D-Leu-4]OB3의 혈청 농도가 IP, SC, IM, 경구 및 비내 투여 이후에 달성된 최고 농도의 정확하게 절반까지 감소되는데 필요한 기간은 다음의 공식을 이용하여 계산되었다:

[0039] $t_{1/2} = 0.693/k_{elim}$

[0040] 여기서 k_{elim}은 시간과 대비하여 흡수 프로필의 베타 시기에서 각 농도 포인트의 자연 로그 (log)를 플롯팅함으로써 결정된 제거 상수를 나타낸다. 이들 플롯 각각의 선형 회귀 분석은 직선을 유발하였는데, 이의 기울기는 각 전달 방법에 대한 k_{elim}을 나타낸다.

[0041] 약동학적 분석: 혈장 청소 (CL)

[0042] IP, SC, IM, 경구 및 비내 전달 이후에 혈장으로부터 MA-[D-Leu-4]-OB3의 청소는 다음의 공식을 이용하여 AUC로부터 계산되었다:

[0043] CL = 용량/AUC:

[0044] 약동학적 분석: 겉보기 분포 용적 (V_d)

[0045] 약물의 반감기가 혈장으로부터 이의 청소에 역으로 관련되고 이의 분포 용적에 직접적으로 비례하기 때문에, ip, sc, im 및 비내 전달 이후에 MA-[D-Leu-4]-OB3의 겉보기 분포 용적은 다음의 공식을 이용하여 이의 반감기 및 청소율로부터 계산되었다:

[0046] $t_{1/2} = 0.693 \times V_d/CL$

[0047] 결과

[0048] [D-Leu-4]-OB3의 반감기는 정상적으로 1 시간 이하이고, 그리고 생리학적으로 유효 용량은 밀리그램 범위 내에 있다. 인간 비만 및/또는 당뇨병의 치료에 [D-Leu-4]-OB3의 적용에 비추어, 일차적으로 혈청 반감기를 연장하고 및/또는 최적 유효 용량을 감소시키기 위해, [D-Leu-4]-OB3의 약동학적 프로필을 향상시키는 것은 매우 중요하였다. 본원에서 제공된 결과는 [D-Leu-4]-OB3에 미리스트산의 접합이 (a) 전달 루트에 따라 이의 반감기를 1 시간 이하로부터 길게는 28 시간까지 연장하고, (b) 이의 흡수를 증가시키고, (c) 이것이 혈장으로부터 청소되는 비율을 감소시키고, 그리고 (d) 최소 효과량이 4-배 감소될 수 있게 함으로써 이의 약동학적 프로필을 유의미하게 향상시킨다는 것을 보여주었다.

[0049] 흡수 프로필

[0050] SC, IP, IM, 경구 및 비내 전달 이후에 MA-[D-Leu-4]OB3의 흡수 프로필은 각각, 도면 2-6에서 도시된다. 0.1 mg 펩티드의 SC, IP 및 IM 투여 이후에 MA-[D-Leu-4]-OB3의 최대 흡수 (C_{max})는 2 시간 시점 (t_{max})에 일어났고, 그리고 시간의 흐름에서 급속히 감소하였다. 18 시간 후, 혈청 내에 MA-[D-Leu-4]-OB3의 농도는 거의 기저 수준까지 감소되었다 (도면 2-4). 경구 및 비내 투여 이후에 흡수 프로필 (도면 5 및 6)은 SC, IP, 또는 IM 전달에 대해 관찰된 것들과 뚜렷하게 상이하였다. MA-[D-Leu-4]-OB3의 경구 및 비내 전달 이후에 C_{max}는 각각, 4 시간 및 6 시간 시점에 달성되었다. 하지만, 경구 및 비내 전달 후 24 시간에, C_{max}는 각각 31% 및 80% 감소되었다.

[0051] 총 흡수

[0052] MA-[D-Leu-4]-OB3의 총 흡수는 각 전달 방법에 대한 흡수 곡선 아래 면적 (AUC)을 계측함으로써 결정되었다. 이러한 값은 전신 순환 내로 총 흡수 또는 펩티드 흡수의 정도, 또는 이의 투여 이후에 총 흡수를 나타낸다. SC, IP, IM, 경구 및 비내 전달 이후에 AUC 값은 각각, 1,829,225 ng/ml/분, 1,212,330 ng/ml/분, 842,374 ng/ml/분, 278,460 ng/ml, 그리고 158,426 ng/ml이었다. 이들 값으로부터, 비내, 경구, IM, IP 및 SC 전달 이후에 상대적 생체이용률은 각각, 1.0, 1.8, 5.3, 7.7 및 11.7인 것으로 계산되었다.

[0053] 제거 상수 (k_{elim}) 및 혈청 반감기 ($t_{1/2}$)

[0054] SC, IP, IM, 경구 및 비내 전달 이후에 MA-[D-Leu-4]-OB3에 대한 제거 상수는 재료와 방법에서 설명된 바와 같이 계산되었고, 그리고 각각, -0.350, -0.155, -0.117, -0.024, 그리고 -0.085인 것으로 결정되었다. SC, IP, IM, 경구 및 비내 투여 이후에 MA-[D-Leu-4]-OB3의 혈청 반감기는 각각, 2.0, 4.1, 5.5, 28.9, 그리고 8.2 시간이었다.

[0055] 혈장 청소율 (CL) 및 겉보기 분포 용적 (V_d)

[0056] SC, IP, IM, 경구 및 비내 투여 이후에 혈장으로부터 MA-[D-Leu-4]-OB3의 청소율은 각각, 0.05, 0.08, 0.12, 0.36, 그리고 0.63 ml/분이었다. SC, IP, IM, 경구 및 비내 전달 이후에 MA-[D-Leu-4]-OB3의 겉보기 분포 용적은 각각, 8.6, 30.9, 61.3, 900.8, 그리고 447.0 ml이었다. 이들 약동학적 파라미터, 그리고 [D-Leu-4]-OB3에 대해 앞서 설명된 것들은 아래의 표 1에서 요약된다.

[0057] [표 1]

[0058] SC, IP, IM, 경구 및 비내 전달 이후에 [D-Leu-4]-OB3 (1 mg)[1] 및 MA-[D-Leu-4]-OB3 (0.1 mg)의 약동학적 프로필

[0059] 전달파라미터[D-Leu-4]-OB3MA-[D-Leu-4]-OB3

[0060] [2]SC C_{max} (ng/ml) 35,063 389,490

[0061] T_{max}5 분 2 시간

[0062] AUC (ng/ml/분) 1,182,498 1,829,225

[0063] k_{elim}-0.020 -0.350

[0064] $t_{1/2}$34 분 2.0 시간

[0065] 혈장 CL (ml/분) 0.85 0.05

[0066] V_d (ml) 42.9 8.6

[0067] [2]IP C_{max} (ng/ml) 22,519 169,620

[0068] T_{max}5 분 2 시간

[0069] AUC (ng/ml/분) 1,072,270 1,212,330

[0070] k_{elim}-0.014 -0.155

[0071] $t_{1/2}$49 분 4.5 시간

[0072] 혈장 CL (ml/mm) 0.93 0.08

[0073] V_d (ml) 65.5 30.9

[0074] [2]IM C_{max} (ng/ml) 46,566 89,750

[0075] T_{max}5 분 2 시간

[0076] AUC (ng/ml/분) 1,481,060 842,374

[0077] k_{elim}-0.023 -0.117

[0078] $t_{1/2}$36 분 5.9 시간

[0079] 혈장 CL (ml/분) 0.68 0.12

[0080] V_d (ml) 29.4 60.3

[0081] [3]경구 C_{max} (ng/ml) 8,574 14,373

[0082] T_{max}50 분 4 시간

[0083] AUC (ng/ml/분) 552,710 278,460

[0084] k_{elim}-0.034 -0.024

[0085] $t_{1/2}$20 분 28.9 시간

[0086] 혈장 CL (ml/분) 1.81 0.36

[0087] V_d (ml) 47.9 900.8

[0088] [3]비내 C_{max} (ng/ml) 91,732, 36,069 10,047

[0089] T_{max}10 분, 60 분 6 시간

[0090] AUC (ng/ml/분) 4,336,963 158,426

[0091] k_{elim}-0.090, -0.020 -0.85

[0092] $t_{1/2}$41 분 8.2 시간

[0093] 혈장 CL (ml/분) 1.37 0.63

[0094] V_d (ml) 15.4 447.0

[0095] [1] 이전 연구로부터 취해진 데이터

[0096] [2] PBS에서 전달됨

[0097] [3] 0.3% DDM에서 전달됨

[0098] [D-Leu-4]-OB3으로 이전 연구에서, 비록 에너지 균형 및 글루코오스 항상성에 대한 이의 렙틴-유사 효과가 반복적으로 증명되긴 했지만, 전달 루트에 상관없이, 지속된 반응을 위해 높은 농도 (밀리몰 범위) 및 복수 일일량이 필요하였다. 이런 이유로, 본 발명에서는 인간 적용을 위해 [D-Leu-4]-OB3의 약물동력학을 향상시키는 것이 필수적이었다. 구체적으로, [D-Leu-4]-OB3의 생체이용률을 증가시키고, 이의 반감기를 연장하고, 그리고 이것이 전신 순환으로부터 청소되는 비율을 감소시키는 것이 추구되었다. 이런 향상은 전달되는 [D-Leu-4]-OB3의 용량 크기 및 투약 빈도를 감소시키면서, 이의 효력을 지속하거나 또는 향상시키는 것을 가능하게 만든다.

[0099] 본 발명에 따른 [D-Leu-4]-OB3에 미리스트산의 접합은 [D-Leu-4]-OB3의 약동학적 프로필을 향상시키기 위한 유효한 접근법을 제공한다. IP, SC, 또는 IM 주사에 의해 전달될 때, 또는 위관영양에 의해 경구 전달될 때, MA-[D-Leu-4]-OB3의 최대 흡수 (C_{max})는 심지어 10-배 낮은 용량에서도, [D-Leu-4]-OB3의 것보다 극히 높았다. 비내 점적 이후에 관찰된 [D-Leu-4]-OB3의 이상성 흡수는 하지만, MA-[D-Leu-4]-OB3의 비내 전달 이후에 관찰되지 않았는데, 이러한 현상은 투여된 더욱 낮은 용량에 관련될 수 있다. 비내 점적 이후에 MA-[D-Leu-4]-OB3의 흡수 프로필에서 이러한 변화는 [D-Leu-4]-OB3의 흡수 프로필에서 관찰된 2개의 피크와 비교할 때, 펩티드의 최고 농도가 훨씬 늦게 달성되는 흡수의 단일 위치를 암시한다 (각각, 10 분 및 60 분과 대비하여 6 시간에 T_{max}).

[0100] 상기 데이터에 의해 지시된 바와 같이, MA-[D-Leu-4]-OB3의 흡수는 [D-Leu-4]-OB3의 경우에 5 내지 60 분과 비교하여, 투여 루트에 따라 2 내지 6 시간의 기간에 걸쳐 천천히 발생한다. 이들 조사 결과는 미리스트산 접합이 [D-Leu-4]-OB3과 비교하여, 더욱 느린 비율에서 더욱 높은 농도의 MA-[D-Leu-4]-OB3의 흡수를 용이하게 한다는 것을 지시한다. 비록 흡수의 이러한 패턴이 이용된 모든 전달 방법에서 MA[D-Leu-4]-OB3의 총 흡수 (AUC)를 상승시키는 것으로 보이지는 않지만, 상기 펩티드가 전신 순환 동안 상승된 수준으로 존재하는 시간을 연장하였다.

[0101] 특히 주목할 만하고, 그리고 MA-[D-Leu-4]-OB3의 생물학적 활성을 연장하는데 직접적으로 관련되는 것은 [D-Leu-4]-OB3과 비교하여, 본 연구에서 활용된 각 전달 방법 이후에 관찰된 혈장으로부터 이의 더욱 긴 반감기 및 더욱 느린 청소율이다. 이러한 패턴은 혈청 내에서 급속히 상승되고 급속히 청소되는 [D-Leu-4]-OB3과 비교할 때, 더욱 긴 기간에 걸쳐 MA-[D-Leu-4]-OB3의 생물학적 활성을 지속시킬 수 있다. [D-Leu-4]-OB3에서 이전에 이용된 것보다 더욱 낮은 용량의 MA-[D-Leu-4]-OB3이 전달된 *db/db* 생쥐에서 경구 효력 연구로부터 결과는 이것이

사실이라는 것을 지시하였다.

[0102] 본 발명에 따른 [D-Leu-4]-OB3의 미리스트산 접합은 따라서, 이의 약동학적 프로필을 유의미하게 향상시킨다. 상기 데이터는 또한, MA-[D-Leu-4]-OB3이 인간에서 비만 및/또는 당뇨병의 관리를 위한 경구, 비침습성, 그리고 안전한 치료적 접근법으로서 이용될 수 있다는 것을 지시한다.

[0103] 실시예 2

[0104] 6 내지 7 주령 수컷 BKS.Cg-Dock7^{m} +/+ Lepr^{db}/J 당뇨병성 *db/db* 생쥐에서 공복 혈당에 대한, PBS 또는 0.3% 도데실 말토시드 (DDM, Intravail®)에서 미리스트산-접합된 [D-Leu-4]-OB3의 경구 전달의 효과를 비교하는 연구.

[0105] 수컷 *db/db* 생쥐는 14 연속일 동안 저녁에 하루 1회 위관영양에 의해, PBS 또는 DDM에서 증가하는 농도의 MA-[D-Leu-4]-OB3이 경구 제공되었다. 공복 (8 시간) 혈당 수준은 Accu-Chek Nano 글루코오스 미터 (Roche, Indianapolis, IN)를 이용하여 격일로 계측되었다. 14 일간의 치료 후, PBS에서 MA-[D-Leu-4]-OB3 (250 또는 500 mcg/일)을 제공받는 생쥐에서 혈당 수준은 PBS 단독을 제공받는 대조 생쥐에서 혈당 수준으로부터 변화가 없었다. 하지만, 0.3% DDM에서 100 또는 250 mcg/일을 제공받는 *db/db* 생쥐에서 혈당 수준은 250 mcg/일로 치료된 생쥐에서 14-일 치료 기간의 종결 시점에, 비-당뇨병성 BKS 생쥐에서 목격되는 수준까지 현저하게 감소되었다.

[0106] 이들 결과는 [D-Leu-4]-OB3을 이용한 우리의 이전 연구에서 이용된 농도보다 4-배 낮은 농도에서 MA-[D-Leu-4]-OB3이 DDM에서 경구 전달될 때 혈당 수준을 감소시키는데 효과적이라는 것을 지시한다. 이들 결과는 DDM에서 [D-Leu-4]-OB3의 것과 비교하여 DDM에서 MA-[D-Leu-4]-OB3의 증강된 흡수, 더욱 느린 청소, 그리고 더욱 긴 반감기를 지시하는 약동학적 데이터와 일치하였다.

[0107] 실시예 3

[0108] 인슐린-결함성 당뇨병의 생쥐 모형에서 체중 증가 및 혈당 제어에 대한 미리스트산-접합된 [D-Leu-4]-OB3 (MA-[D-Leu-4]-OB3)의 효력을 증명하는 연구.

[0109] 목적

[0110] 스트렙토조토신 (STZ)-유도된 수컷 Swiss Webster 생쥐가 당뇨병의 인슐린-결함성 생쥐 모형에서 체중 증가 및 인슐린 감수성에 대한 MA-[D-Leu-4]-OB3의 효과를 조사하는 이들 연구에서 이용되었다. 이러한 모형을 이용하여, MA-[D-Leu-4]-OB3의 인슐린 민감화 효과가 다른 충분히 특징화된 인슐린-민감화 약물, 메트포르민의 것들과 비교되었다.

[0111] 재료와 방법

[0112] 7-주령 수컷 Swiss Webster 생쥐는 150 mg/kg STZ의 단일 복막내 (ip) 용량으로 고혈당이 되도록 만들어졌다. 공복 혈당 수준은 정상적인 (비-당뇨병성) 글루코오스 수준을 확립하고, 그리고 그 후에 매일, 과혈당증을 사정하기 위해 STZ 처리에 앞서 계측되었다. 공복 혈당 수준은 일과적으로, STZ 처리 후 4-5 일에 정상보다 3- 내지 4-배 높았다.

[0113] 디테미르 인슐린 (Levemir®, Novo Nordisk, Malov, Denmark) 전달 펜이 0.025U/100 μL 인산염 완충된 식염수 (PBS)를 분여하는데 이용되었고, 그리고 14 일 동안 오전 8:00 및 9:00 사이에 및 오후 4:00 및 5:00 사이에 하루 2회 피하 (sc) 주사에 의해 전달되었다. MA-[D-Leu-4]-OB3 (NeoBiolab, Cambridge, MA) 및 메트포르민 (Sigma Aldrich, St. Louis, MO)은 무균 탈이온수에서 재구성된 0.3% 도데실 말토시드 (DDM, Intravail®, Aegis Therapeutics, San Diego, CA)에서 용해되었고, 그리고 14 일 동안 각각, 5 mg/kg/100 μL 또는 100 mg/kg/100 uL의 농도에서 8:00 시 및 9:00 시 사이에 및 16:00 시 및 17:00 시 사이에 경구 위관영양에 의해 하루 2회 전달되었다.

[0114] 제로 일자에 및 그 후에 매일, 사료 및 물 섭취가 계측되었고, 그리고 생쥐는 아침 8:00 시 및 9:00 시 사이에 계량되었다. 혈당이 계측되는 일자에 공복 (8 시간) 글루코오스 수준을 확실하게 하기 위해, 사료는 8:00 시 및 9:00 시 사이에 케이지로부터 제거되고 계측 직후에 대체되었다.

[0115] 결과

[0116] STZ-유도된 고혈당 수컷 SW 생쥐에서 체중 증가에 대한, 단독으로 또는 MA-[D-Leu-4]-OB3 또는 메트포르민과 합동으로 인슐린의 효과는 도면 9 및 아래의 표 2에서 도시된다:

[0117] [표 2]

[0118] STZ-유도된 고혈당 수컷 Swiss Webster 생쥐에서 체중 증가, 사료 및 물 섭취, 그리고 혈당 수준에 대한, 단독으로 또는 MA-[D-Leu-4]-OB3 또는 메트포르민과 합동으로 디테미르 인슐린의 효과

	DDM	MA-[D-Leu-4]-OB3	디테미르 인슐린	디테미르 인슐린+ MA-[D-Leu-4]-OB3	디테미르 인슐린+ 메트포르민
초기 체중 (gm)	27.7±4.1	24.8±1.4	24.8±2.2	26.8±2.3	24.0±1.3
최종 체중 (gm)	31.0±4.0	26.8±1.6	28.8±3.0	30.0±1.3	26.4±2.0
초기의 %	111.9	108.1	116.1	111.9	110
변화 (gm)	+3.3	+2.0	+4.0	+3.2	+2.4
누적 사료 섭취 (gm/생쥐)	121.7±1.2	103.3±2.3	106.4±2.0	105.2±3.1	109.5±2.1
누적 물 섭취 (mL/생쥐)	540.8±5.8	452.5±6.4	542.8±11.2	472.6±8.3	403.2±12.1
초기 혈당 (mg/dL)	522.3±5.0	507.0±6.0	551.0±5.0	568.7±7.0	506.5±13.0
최종 혈당 (mg/dL)	568.3±4.1	501.0±12.3	351.0±11.3	232.8±7.0	124.6±15.0
초기의 %	108.8	98.8	63.7	40.9	24.6
변화 (mg/dL)	46	-6	-200	-335.9	-381.9

[0119]

[0120] DDM 단독이 제공된 생쥐는 14-일 시험 기간의 종결점에서 체중이 11.9% 증가한 반면, 0.05U 인슐린을 매일 제공받는 생쥐는 체중이 16.1% 증가하였다. MA-[D-Leu-4]-OB3 단독을 제공받는 생쥐는 체중이 단지 8.1% 증가하였다. MA-[D-Leu-4]-OB3이 인슐린과 합동으로 제공될 때, 인슐린에 의해 유도된 체중 증가가 처리되지 않은 생쥐에서 관찰된 수준까지 감소되었다 (11.9%). 메트포르민이 인슐린과 합동으로 제공될 때, 체중은 단지 10.0% 증가하였다.

[0121] STZ-유도된 고혈당 생쥐에서 공복 혈당에 대한 MA-[D-Leu-4]-OB3 또는 메트포르민의 부재 또는 존재에서 인슐린의 효과는 도면 10 및 표 2에서 도시된다. 정상적인 SW 생쥐에서 공복 혈당 수준은 14 일 연구 동안 안정된 상태 (150-170 mg/dl)에 있는 반면, DDM 단독을 제공받는 STZ-처리된 생쥐에서 공복 혈당 수준은 500 및 600 mg/dL 사이의 범위에서 변하였다. 0.05U 디테미르 인슐린은 혈당 수준을 64.0% 감소시키지만, 정상 범위까지는 감소시키지 못하였다. MA-[D-Leu-4]-OB3 단독은 공복 혈당 수준에 대한 효과가 거의 없었다. MA-[D-Leu-4]-OB3 또는 메트포르민과 합동으로 제공될 때, 0.05 U 디테미르 인슐린의 항고혈당 효과가 증폭되었다. 2 일 이내에, 인슐린과 합동으로 MA-[D-Leu-4]-OB3이 제공된 생쥐에서 공복 혈당 수준은 거의 정상화되었고, 그리고 연구 내내 그러한 상태로 있었다. 어떤 저혈당 이벤트도 확인되지 않았다. 메트포르민이 인슐린과 합동으로 제공될 때 유사한 결과가 관찰되었다. 하지만, 6 일간 치료 후, 메트포르민을 제공받는 생쥐는 점점 더 저혈당이 되었다.

[0122] 결론

[0123] 본 연구의 결과는 피하 투여된 인슐린과 합동으로 경구 제공될 때 MA-[D-Leu-4]-OB3이 인슐린 약물요법과 연관된 체중 증가를 예방한다는 것을 지시한다. 이들 결과는 당뇨병의 이러한 인슐린-결함성 생쥐 모형에서 MA-[D-Leu-4]-OB3이 외인성 인슐린에 의해 유도된 체중 증가를 예방하고, 그리고 인슐린에 대한 조직 감수성을 증강하는데 있어서 메트포르민만큼 우수하거나 또는 이를 능가한다는 것을 더욱 암시한다.

[0124] MA-[D-Leu-4]-OB3의 인슐린 민감화 효과는 인슐린 결함의 이러한 생쥐 모형에서, 고인슐린혈증 *ob/ob* 및 *db/db* 생쥐에서 [D-Leu-4]-OB3으로, 그리고 *db/db* 생쥐에서 MA-[D-Leu-4]-OB3으로 이전에 목격되었던 것과 대조적으로, MA-[D-Leu-4]-OB3 단독이 공복 혈당 수준을 유의미하게 감소시킬 수 없었다는 관찰 결과에 의해 더욱 뒷받침된다. 연구의 시작 시점에서보다 14-일 시험 기간의 종결점에서 단지 1.2% 낮은 이들 수준은 내인성 인슐린 생산이 STZ 처리에 의해 심하게 손상되었다는 것을 확증한다.

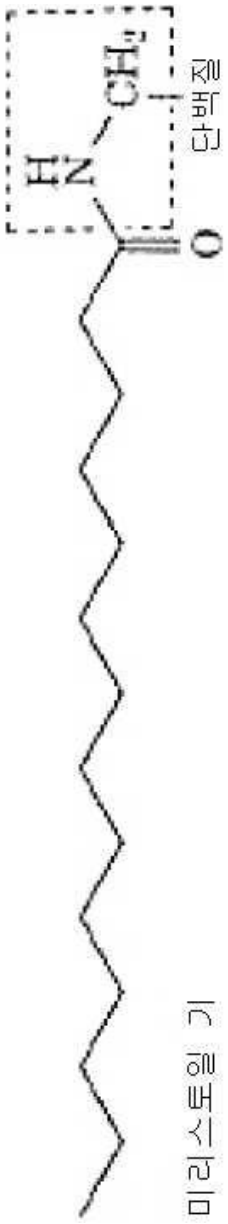
[0125] 본 데이터는 MA-[D-Leu-4]-OB3이 혈당 수준에 대한 이의 영향력을 발휘하기 위해, 인슐린의 존재에 대한 절대적인 의존을 반영한다. 이러한 결론은 MA-[D-Leu-4]-OB3 (0.25 mg/kg/일에서)이 외인성 인슐린과 합동으로 제공될 때, 연구의 첫 2 일 이내에 혈당 수준을 정상화할 수 있었다는 관찰 결과에 의해 더욱 뒷받침된다.

[0126] 이러한 생쥐 모형에서 글루코오스 항상성에 대한 MA-[D-Leu-4]-OB3의 효력에 관하여, 비록 MA-[D-Leu-4]-OB3 및 메트포르민 둘 모두 외인성 인슐린과 합동으로 제공될 때 혈당을 정상적인 수준 이내로 감소시킬 수 있지만, MA-[D-Leu-4]-OB3의 용량이 메트포르민의 용량보다 20-배 낮았다는 사실 (각각, 10 mg/kg/일 대 200 mg/kg/일)은 특히 주목할 만하다. 상기 데이터는 MA-[D-Leu-4]-OB3이 인슐린-결함의 이러한 생쥐 모형에서 인슐린 감수성을 향상시키는데 있어서 질량 기초에서 메트포르민보다 20 배 효과적이고, 그리고 몰 기초에서 6.1 배 효과적이라는 것을 지시한다.

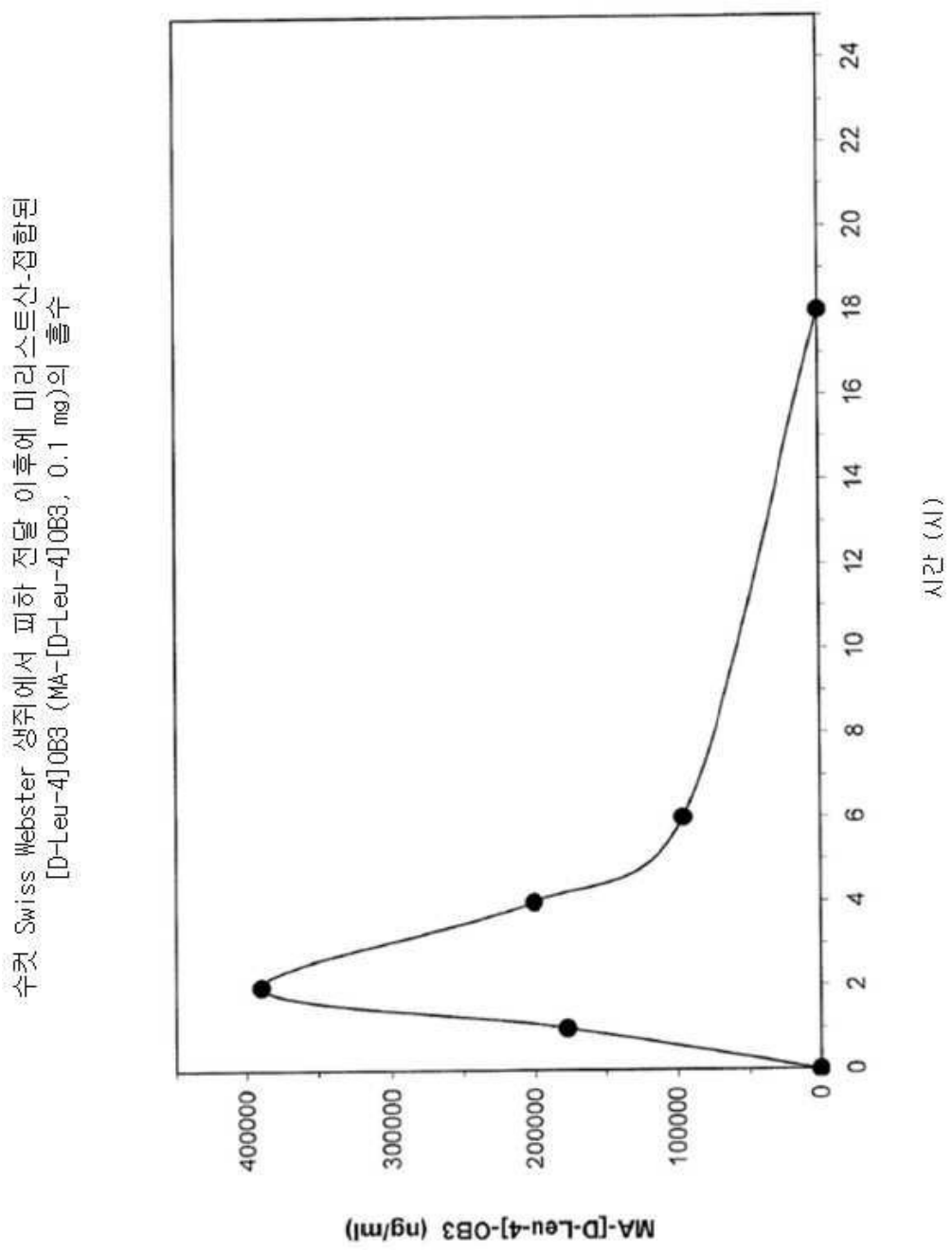
[0127] 다른 구체예에서, 본 발명은 렙틴-관련된 펩티드에 접합된 시클로헥실발레로일, 아실-글루타밀, 라우로일, 2-숙시닐아미도 미리스트산, 2-숙시닐아미도에틸옥시 팔미트산, 미리스토일-α-글루타밀, 미리스토일-α-글루타밀-글리실, 콜로일, 7-데옥시콜로일, 리토콜로일, 리토콜로일-글루타밀, 4-벤조일-페닐알라닌, L-티록실, 수베로일-D-티록신, 3,3',5,5'-테트라요오도티로아세틸, 시클로헥실발레로일 중에서 한 가지를 포함하는 제약학적 화합물일 수 있다. 렙틴 관련된 펩티드는 AVPIQKVQDDTKTLI (서열 번호: 2); TKTLIKTIVTRINDI (서열 번호: 3); RINDISHTQSVSAKQ (서열 번호: 4); VSAKQRVTGLDFIPG (서열 번호: 5); DFIPGLHPILSLSKM (서열 번호: 6); SLSKMDQTLAVYQQV (서열 번호: 7); VYQQVLTSLPSQNVL (서열 번호: 8); SQNVLQIANDLENLR (서열 번호: 9); DLLHLLAFSKSCSLP (서열 번호: 10); SCSLPQTSGLQKPES (서열 번호: 11); QKPESLDGVLEASLY (서열 번호: 12); EASLYSTEVVALSRL (서열 번호: 13); ALSRLQGSLQDILQQ (서열 번호: 14); 또는 DILQQLDVSPEC (서열 번호: 15) 중에서 한 가지일 수 있다.

도면

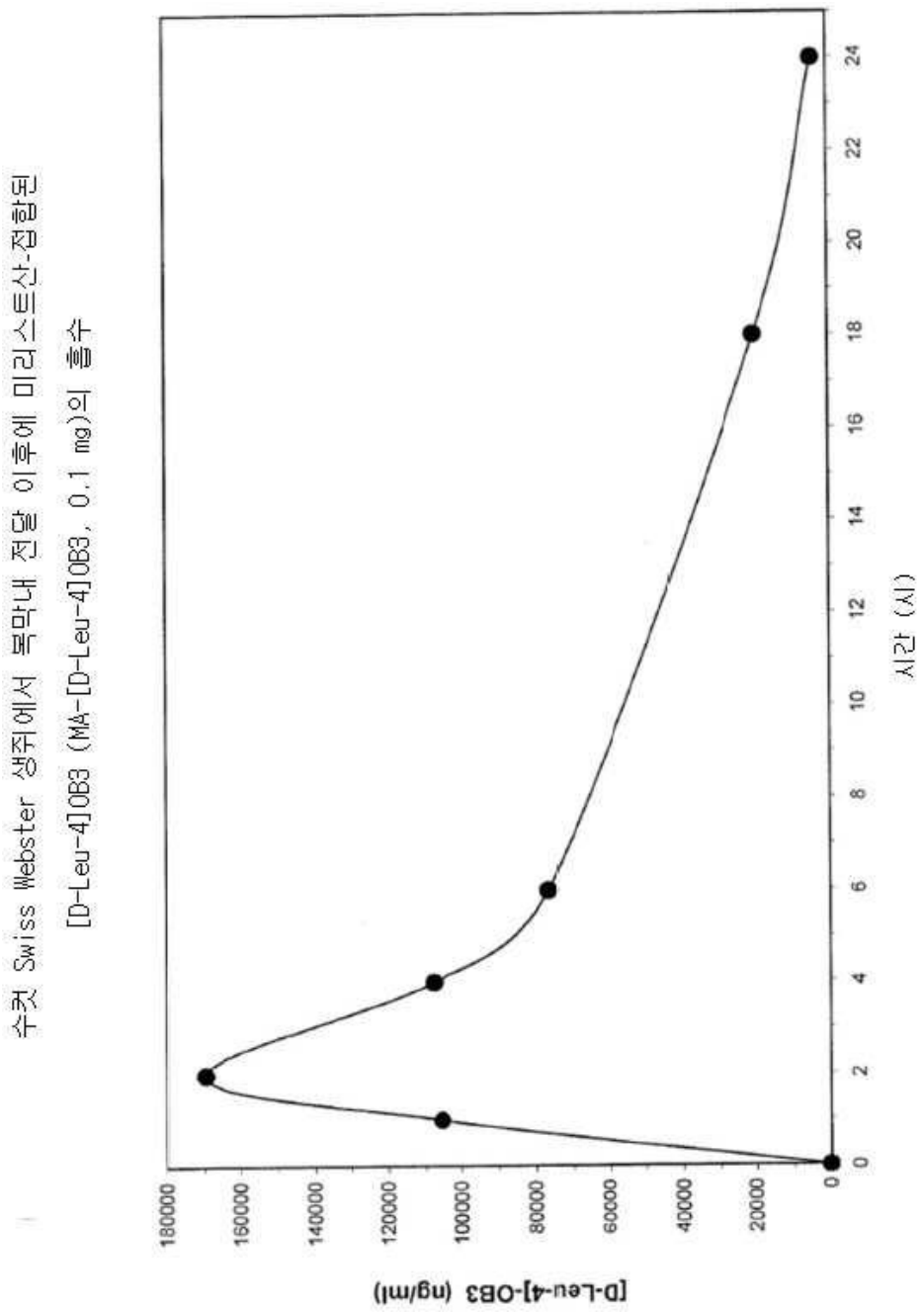
도면1



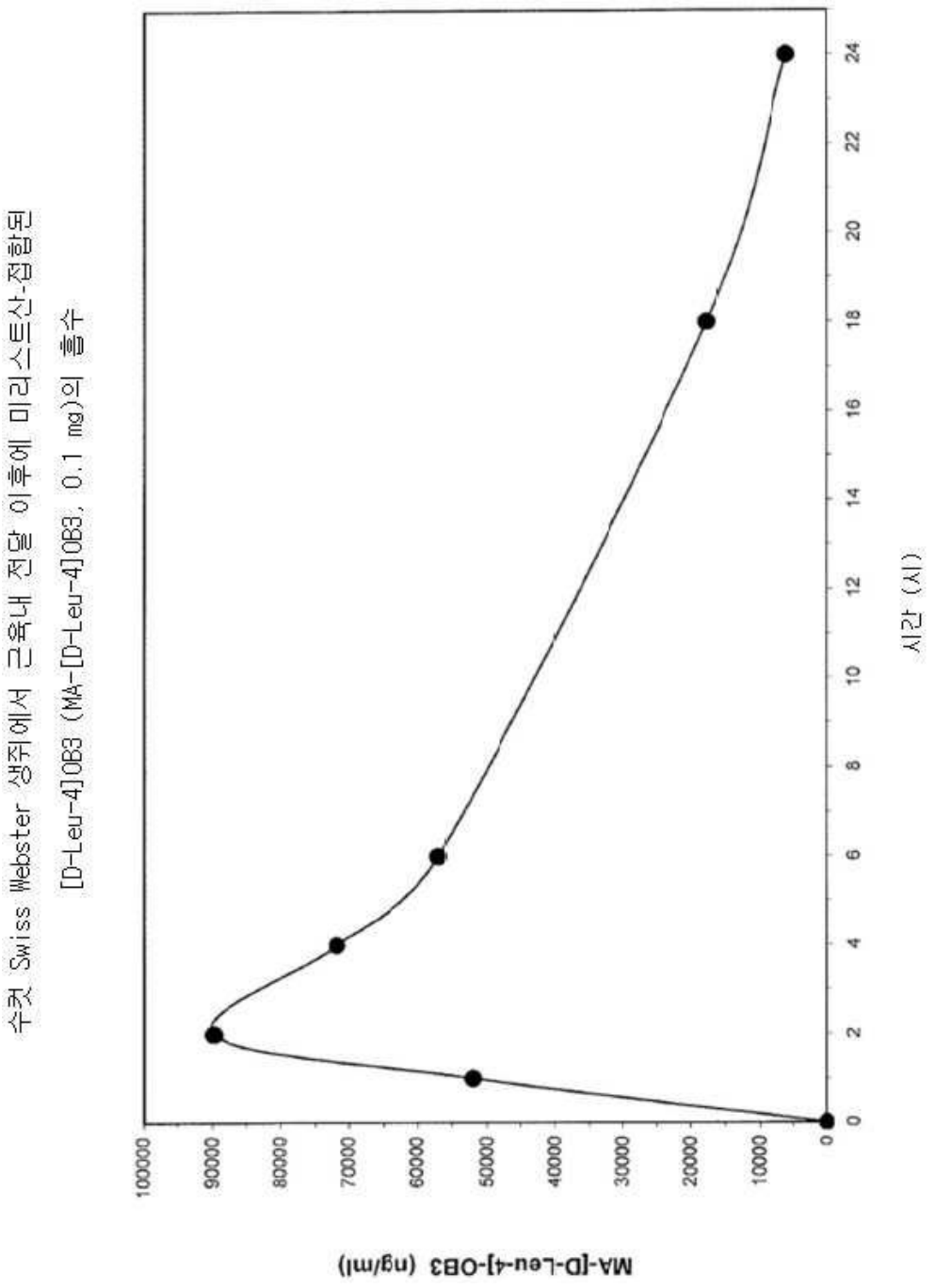
도면2


수컷 Swiss Webster 생쥐에서 피하 전달 이후에 미리스트산-접합된
[D-Leu-4]OB3 (MA-[D-Leu-4]OB3, 0.1 mg)의 흡수
MA-[D-Leu-4]-OB3 (ng/ml)
400000
300000
200000
100000
0
0
2
4
6
8
10
12
14
16
18
20
22
24
시간 (시)

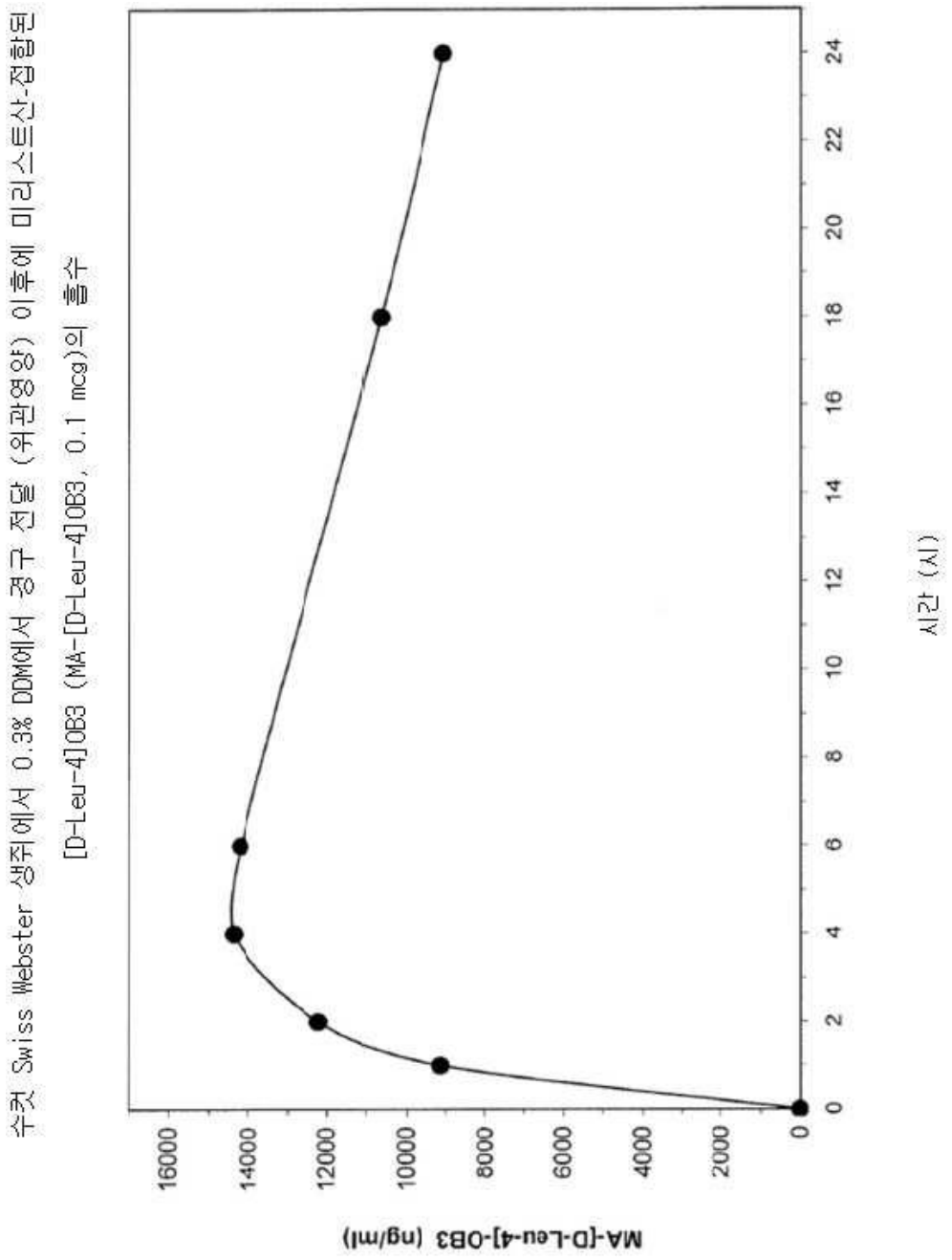
도면3


수컷 Swiss Webster 생쥐에서 복막내 전달 이후에 미리스트산-접합된
[D-Leu-4]OB3 (MA-[D-Leu-4]OB3, 0.1 mg)의 흡수
[D-Leu-4]-OB3 (ng/ml)
180000
160000
140000
120000
100000
80000
60000
40000
20000
0
0
2
4
6
8
10
12
14
16
18
20
22
24
시간 (시)

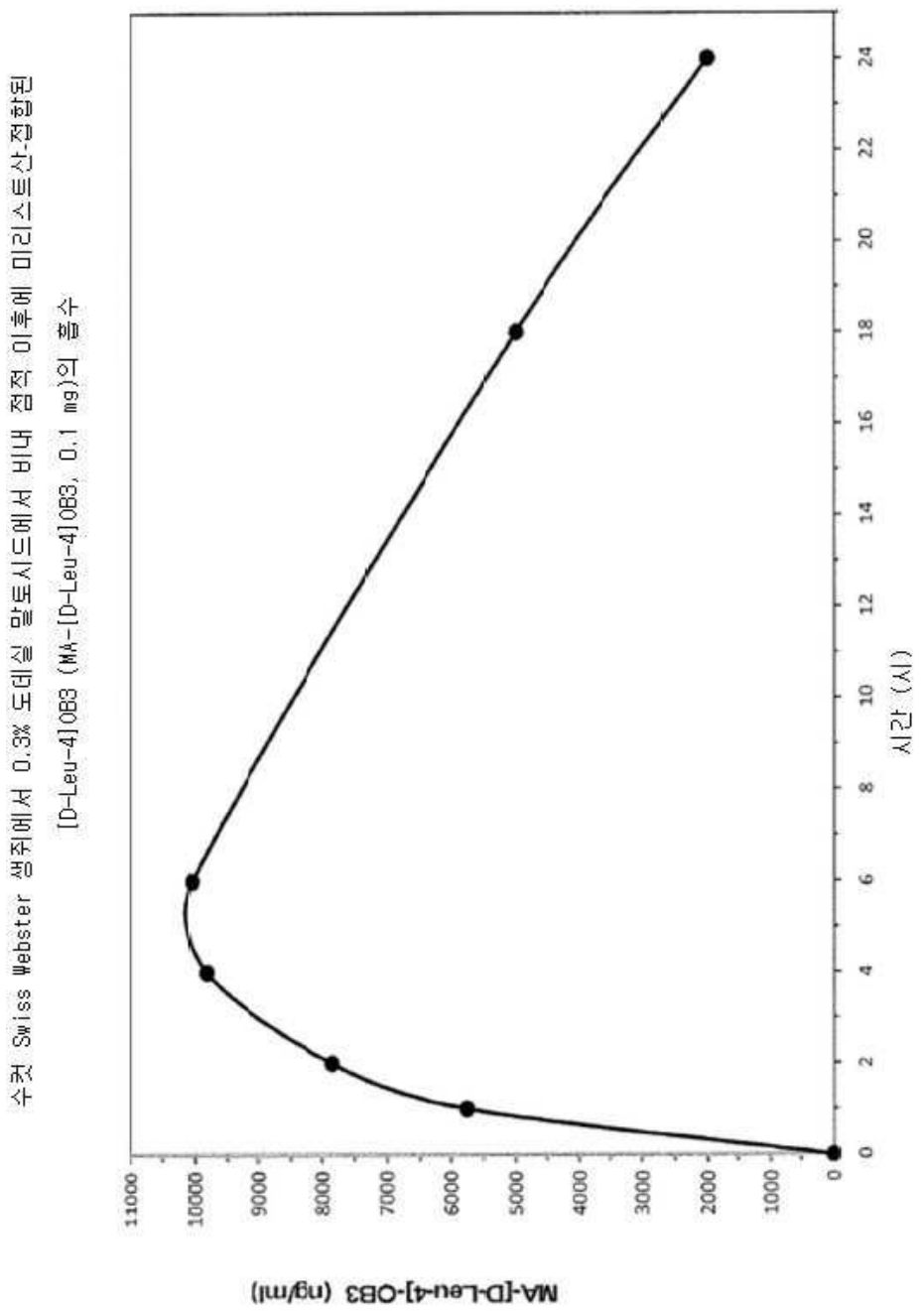
도면4


수컷 Swiss Webster 생쥐에서 근육내 전달 이후에 미리스트산-접합된
[D-Leu-4]OB3 (MA-[D-Leu-4]OB3, 0.1 mg)의 흡수
MA-[D-Leu-4]-OB3 (ng/ml)
100000
90000
80000
70000
60000
50000
40000
30000
20000
10000
0
0
2
4
6
8
10
12
14
16
18
20
22
24
시간 (시)

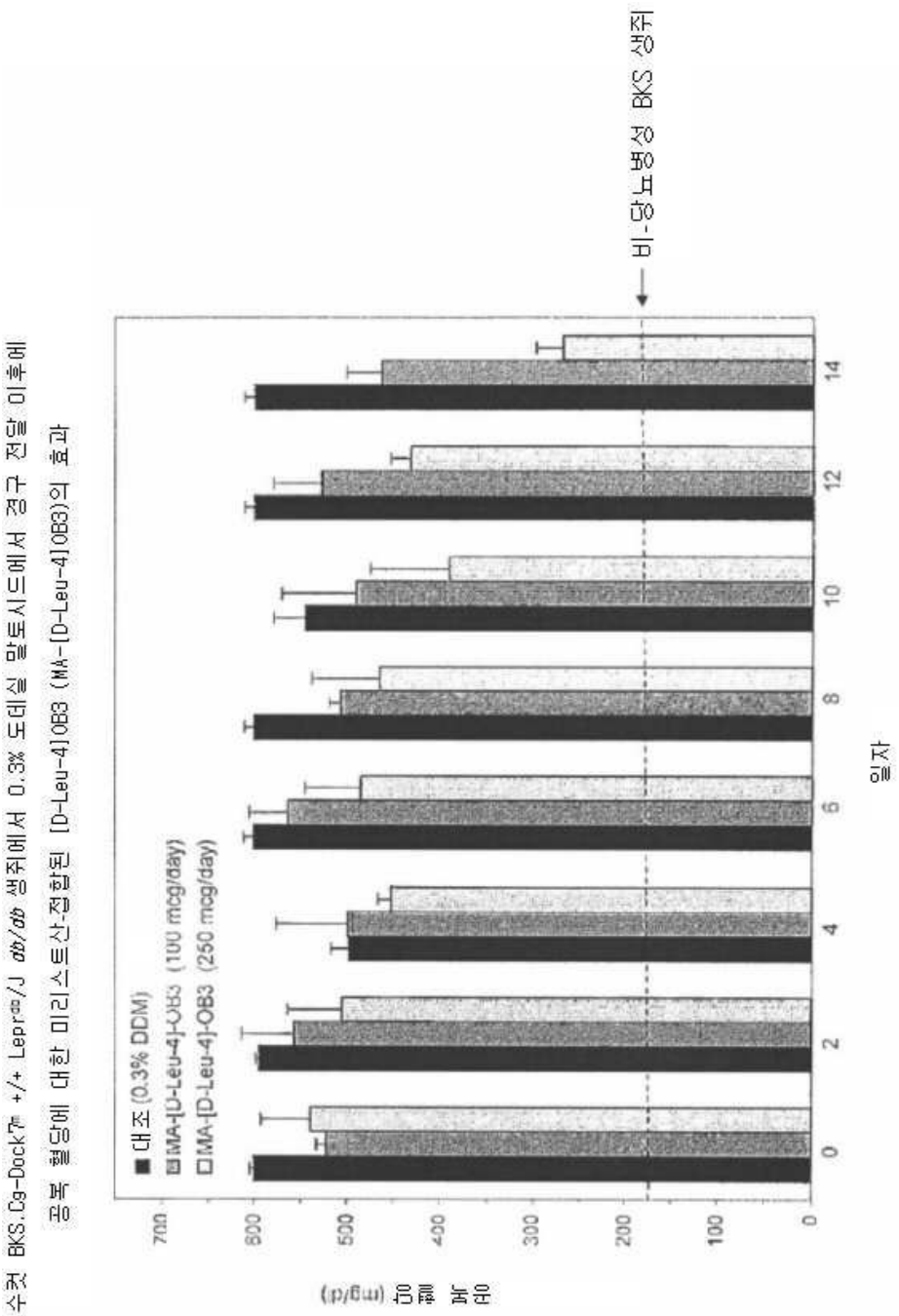
도면5


수컷 Swiss Webster 생쥐에서 0.3% DDM에서 경구 전달 (위관영양) 이후에 미리스트산-접합된
[D-Leu-4]OB3 (MA-[D-Leu-4]OB3, 0.1 mcg)의 흡수
MA-[D-Leu-4]-OB3 (ng/ml)
16000
14000
12000
10000
8000
6000
4000
2000
0
0
2
4
6
8
10
12
14
16
18
20
22
24
시간 (시)

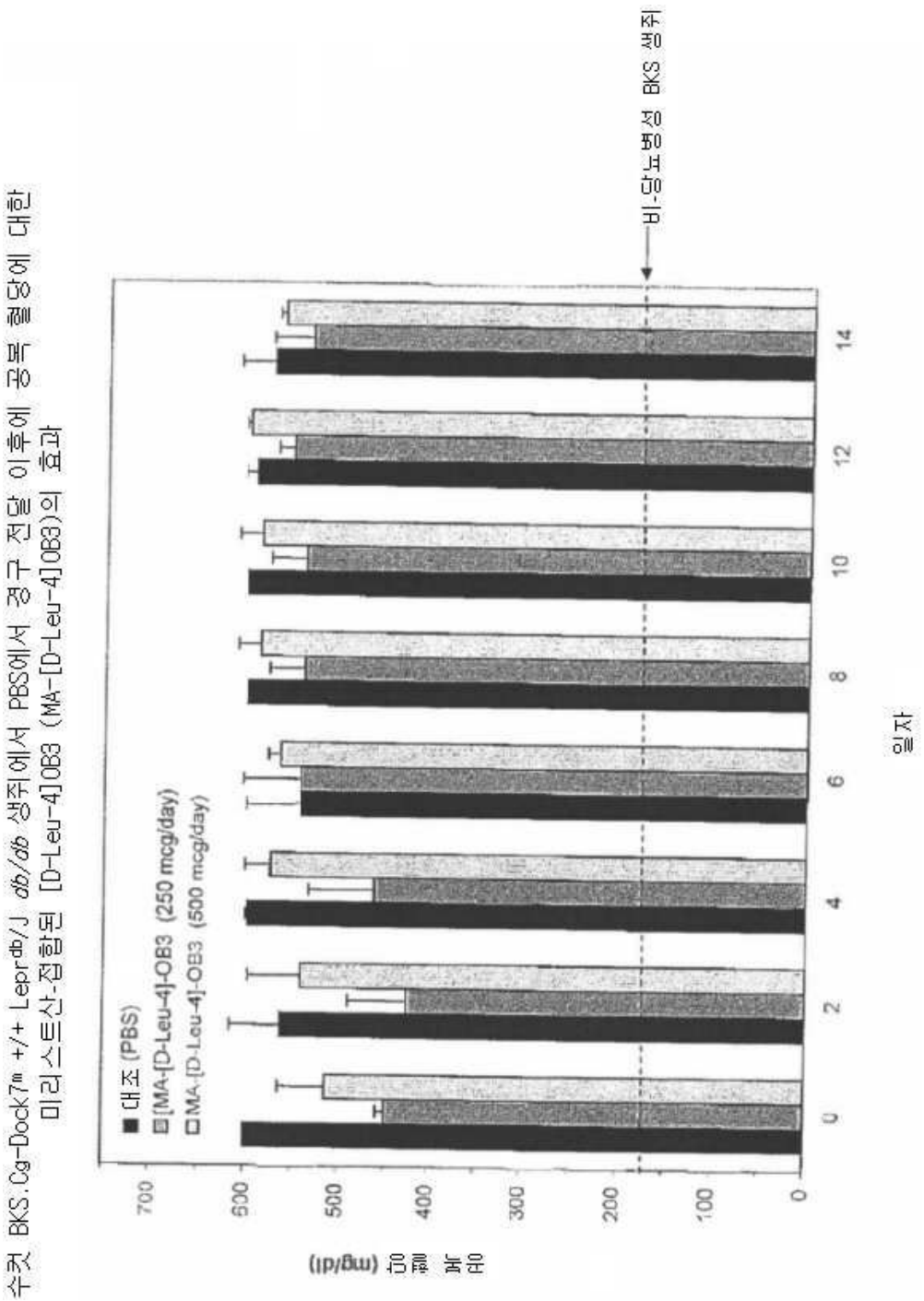
도면6


수컷 Swiss Webster 생쥐에서 0.3% 도데실 말토시드에서 비내 점적 이후에 미리스트산-접합된
[D-Leu-4]OB3 (MA-[D-Leu-4]OB3, 0.1 mg)의 흡수
MA-[D-Leu-4]-OB3 (ng/ml)
11000
10000
9000
8000
7000
6000
5000
4000
3000
2000
1000
0
0
2
4
6
8
10
12
14
16
18
20
22
24
시간 (시)

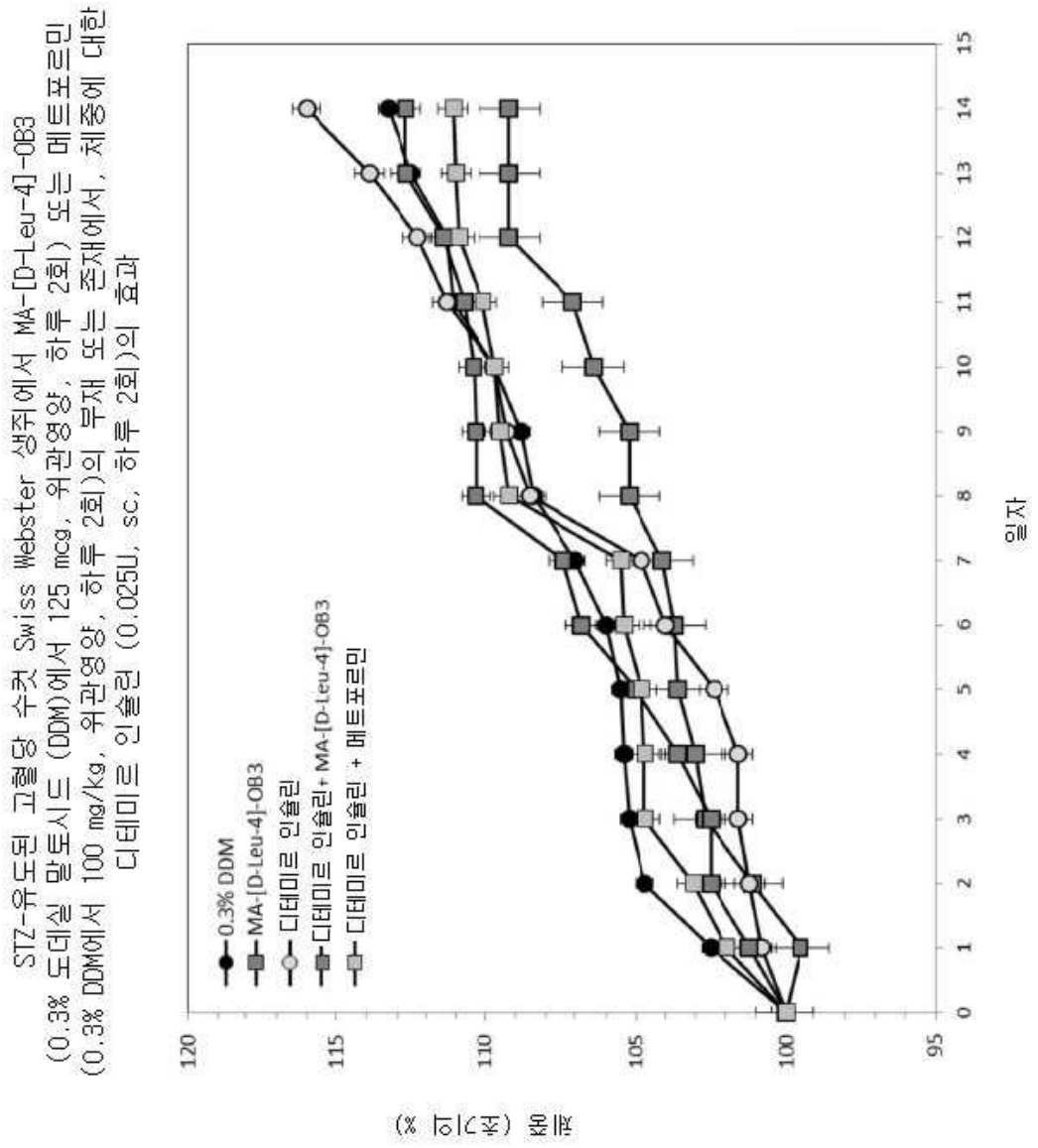
도면7


수컷 BKS.Cg-Dock7m +/+ Lepr db/J db/db 생쥐에서 0.3% 도데실 말토시드에서 경구 전달 이후에
공복 혈당에 대한 미리스트산-접합된 [D-Leu-4]OB3 (MA-[D-Leu-4]OB3)의 효과
비-당뇨병성 BKS 생쥐
■ 대조 (0.3% DDM)
▨ MA-[D-Leu-4]-OB3 (100 mcg/day)
□ MA-[D-Leu-4]-OB3 (250 mcg/day)
공복 혈당 (mg/d)
일자

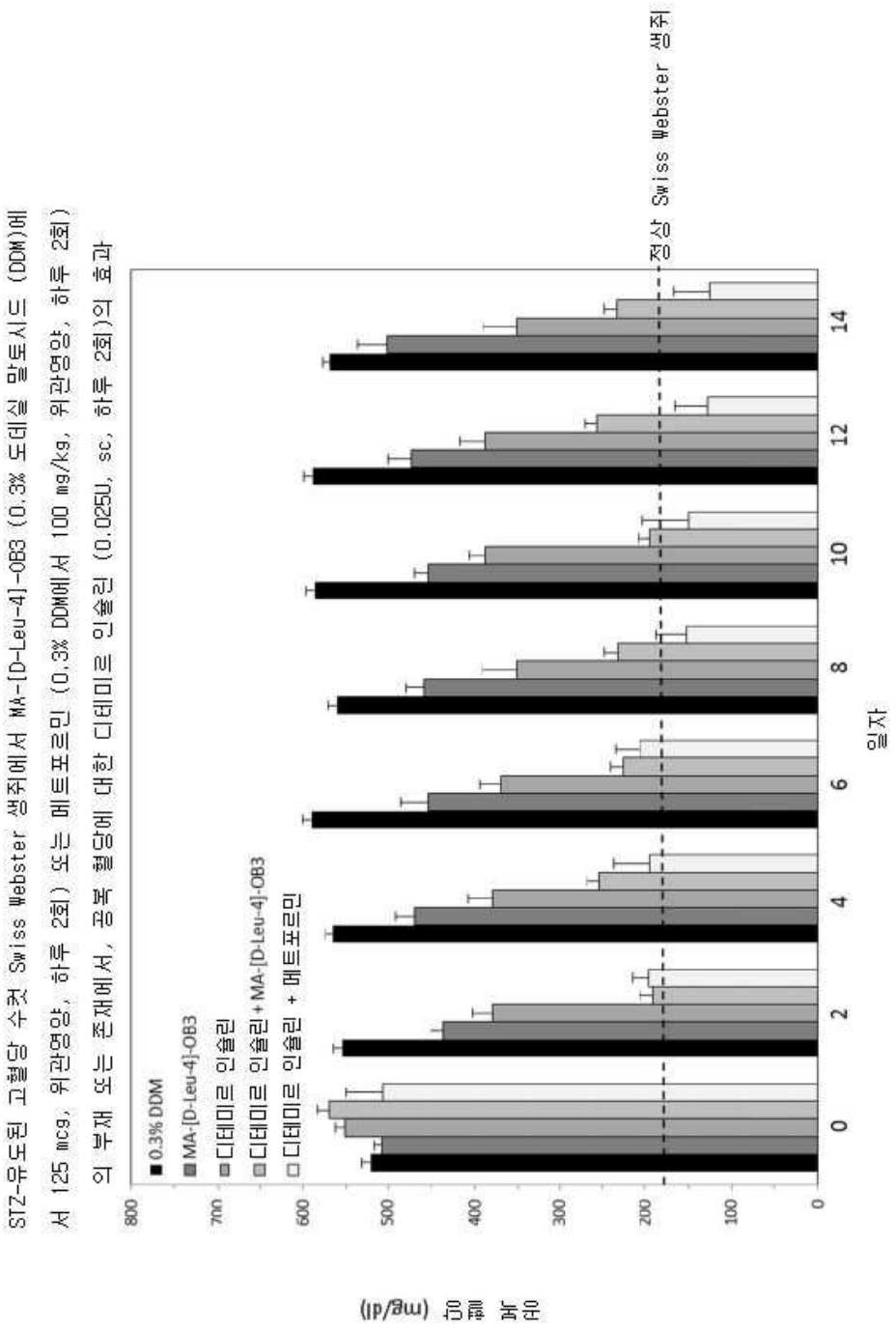
도면8


수컷 BKS.Cg-Dock7m +/+ Leprdb/J db/db 생쥐에서 PBS에서 경구 전달 이후에 공복 혈당에 대한
미리스트산-접합된 [D-Leu-4]OB3 (MA-[D-Leu-4]OB3)의 효과
비-당뇨병성 BKS 생쥐
■ 대조 (PBS)
▣ [MA-[D-Leu-4]-OB3 (250 mcg/day)
□ MA-[D-Leu-4]-OB3 (500 mcg/day)
공복 혈당 (mg/dl)
일자

도면9


STZ-유도된 고혈당 수컷 Swiss Webster 생쥐에서 MA-[D-Leu-4]-OB3
(0.3% 도데실 말토시드 (DDM)에서 125 mcg, 위관영양, 하루 2회) 또는 메트포르민
(0.3% DDM에서 100 mg/kg, 위관영양, 하루 2회)의 부재 또는 존재에서, 체중에 대한
디테미르 인슐린 (0.025U, sc, 하루 2회)의 효과
0.3% DDM
MA-[D-Leu-4]-OB3
디테미르 인슐린
디테미르 인슐린+ MA-[D-Leu-4]-OB3
디테미르 인슐린 + 메트포르민
체중 (처음의 %)
일자
120
115
110
105
100
95
0
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15

도면10



서 열 목 록

SEQUENCE LISTING

<110> Albany Medical College

<120> MYRISTOYLATED LEPTIN-RELATED PEPTIDES AND USES THEREOF

<130> 232P007A

<150> 62/035,916

<151> 2014-08-11

<160> 16

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic peptide corresponding to OB3 region of leptin

<400> 1

Ser Cys Ser Leu Pro Gln Thr

1 5

<210> 2

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic peptide corresponding to OB3 region of leptin

<400> 2

Ala Val Pro Ile Gln Lys Val Gln Asp Asp Thr Lys Thr Leu Ile

1 5 10 15

<210> 3

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic peptide corresponding to OB3 region of leptin

<400> 3

Thr Lys Thr Leu Ile Lys Thr Ile Val Thr Arg Ile Asn Asp Ile

1 5 10 15

<210> 4

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic peptide corresponding to OB3 region of leptin

<400> 4

Arg Ile Asn Asp Ile Ser His Thr Gln Ser Val Ser Ala Lys Gln

1 5 10 15

<210> 5

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic peptide corresponding to OB3 region of leptin

<400> 5

Val Ser Ala Lys Gln Arg Val Thr Gly Leu Asp Phe Ile Pro Gly

1 5 10 15

<210> 6

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic peptide corresponding to OB3 region of leptin

<400> 6

Asp Phe Ile Pro Gly Leu His Pro Ile Leu Ser Leu Ser Lys Met

1 5 10 15

<210> 7

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic peptide corresponding to OB3 region of leptin

<400> 7

Ser Leu Ser Lys Met Asp Gln Thr Leu Ala Val Tyr Gln Gln Val

1 5 10 15

<210> 8

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic peptide corresponding to OB3 region of leptin

<400> 8

Val Tyr Gln Gln Val Leu Thr Ser Leu Pro Ser Gln Asn Val Leu

1 5 10 15

<210> 9

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic peptide corresponding to OB3 region of leptin

<400> 9

Ser Gln Asn Val Leu Gln Ile Ala Asn Asp Leu Glu Asn Leu Arg

1 5 10 15

<210> 10

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic peptide corresponding to OB3 region of leptin

<400> 10

Asp Leu Leu His Leu Leu Ala Phe Ser Lys Ser Cys Ser Leu Pro

1 5 10 15

<210> 11

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic peptide corresponding to OB3 region of leptin

<400> 11

Ser Cys Ser Leu Pro Gln Thr Ser Gly Leu Gln Lys Pro Glu Ser

1 5 10 15

<210> 12

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic peptide corresponding to OB3 region of leptin

<400> 12

Gln Lys Pro Glu Ser Leu Asp Gly Val Leu Glu Ala Ser Leu Tyr

1 5 10 15

<210> 13

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic peptide corresponding to OB3 region of leptin

<400> 13

Glu Ala Ser Leu Tyr Ser Thr Glu Val Val Ala Leu Ser Arg Leu

1 5 10 15

<210> 14

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic peptide corresponding to OB3 region of leptin

<400> 14

Ala Leu Ser Arg Leu Gln Gly Ser Leu Gln Asp Ile Leu Gln Gln

1 5 10 15

<210> 15

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic peptide corresponding to OB3 region of leptin

<400> 15

Asp Ile Leu Gln Gln Leu Asp Val Ser Pro Glu Cys

1 5 10

<210> 16

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic peptide corresponding to OB3 region of leptin

<400> 16

Ser Cys His Leu Pro Trp Ala

1 5