



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2014년02월06일

(11) 등록번호 10-1357117

(24) 등록일자 2014년01월23일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 47/48 (2006.01) A61K 47/30 (2006.01)

A61K 38/22 (2006.01) A61P 3/10 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2011-0062858

(22) 출원일자 2011년06월28일

심사청구일자 2012년09월24일

(65) 공개번호 10-2013-0008665

(43) 공개일자 2013년01월23일

(56) 선행기술조사문헌

Bioconjugate Chem., 2011, 22 (4), pp 625-632

(73) 특허권자

비엔엘엘리팜 주식회사

경기도 수원시 장안구 천천동 서부로 2066, 성균관대학교 산학협력센터 85502호

(72) 발명자

이성권

서울특별시 마포구 성산동 572-564

김원배

서울특별시 강남구 언주로30길 13, 대림아크로빌

A동 1801호 (도곡동)

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

이원희

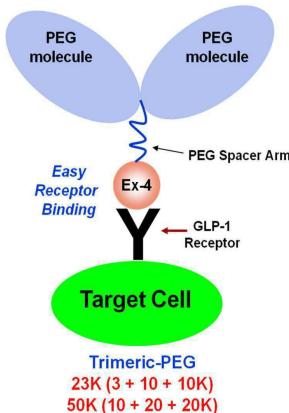
심사관 : 이재정

전체 청구항 수 : 총 8 항

(54) 발명의 명칭 폴리에틸렌글라이콜 또는 이의 유도체로 폐길화된 엑센딘-4 유사체, 이의 제조방법 및 이를 유효성분으로 함유하는 당뇨병 예방 또는 치료용 약학적 조성물

(57) 요약

본 발명은 폴리에틸렌글라이콜 또는 이의 유도체로 폐길화된 엑센딘-4 유사체, 이의 제조방법 및 이를 유효성분으로 함유하는 당뇨병 예방 또는 치료용 약학적 조성물에 관한 것이다. 본 발명에 의하면 C-말단 40번 위치에 시스테인(Cys)이 도입된 엑센딘-4를 사용하여 상기 시스테인 선택적 폐길화(PEGylation)을 통하여 폐길화(PEGylation)된 엑센딘-4 유사체의 수율을 증가시킬 수 있고, 약물의 치료효과를 증가시킬 수 있어, 인슐린 과다분비에 의해 유발되는 질환의 예방 또는 치료용 조성물로 유용하게 사용할 수 있다.

대 표 도 - 도11

(72) 발명자
이슬기
서울특별시 성북구 화랑로 112, 301호 (하월곡동)

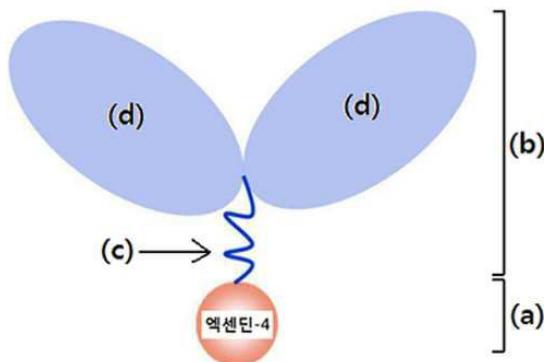
김태형
경기 고양시 일산서구 강선로 169, 1502동 1503호
(일산동, 후곡마을15단지아파트)

특허청구의 범위

청구항 1

하기 구조에 나타낸 바와 같이,

엑센딘-4(a)의 C-말단 40번 위치에 도입된 시스테인(Cys)에 삼중가지형 폴리에틸렌글라이콜(PEG) 또는 이의 유도체(b)가 폐길화(PEGylation)된 엑센딘-4:



(여기서, 상기 삼중가지형 폴리에틸렌글라이콜 또는 이의 유도체(b)는,

폴리에틸렌글라이콜 또는 이의 유도체로 구성되는 PEG 스페이서(c); 및

상기 PEG 스페이서(c)의 일말단에 연결되는 2개의 폴리에틸렌글라이콜 또는 이의 유도체(d);로 구성되어, 상기 PEG 스페이서(c)의 타말단에는 엑센딘-4(a)의 C-말단 40번 위치에 도입된 시스테인과 폐길화가 가능한 작용기로서 숙신이미딜프로피오네이트, N-히드록시숙신이미드, 프로피온알데히드 및 말레이이미드로 이루어지는 군으로부터 선택되는 어느 하나의 치환기가 연결된 구조를 가지며,

상기 (b), (c) 및 (d)에서 폴리에틸렌글라이콜 유도체는 메톡시폴리에틸렌글라이콜 숙신이미딜프로피오네이트, 메톡시폴리에틸렌글라이콜 N-히드록시숙신이미드, 메톡시폴리에틸렌글라이콜 프로피온알데히드 및 메톡시폴리에틸렌글라이콜 말레이이미드로 이루어지는 군으로부터 선택되는 어느 하나이다).

청구항 2

삭제

청구항 3

삭제

청구항 4

삭제

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 삼중가지형 폴리에틸렌글라이콜 또는 이의 유도체(b)의 분자량은 5-60 kDa인 것을 특징으로 하는 폐길화된 엑센딘-4.

청구항 6

제5항에 있어서, 상기 삼중가지형 폴리에틸렌글라이콜 또는 이의 유도체(b)의 분자량은 20-50 kDa인 것을 특징으로 하는 폐길화된 엑센딘-4.

청구항 7

작제

청구항 8

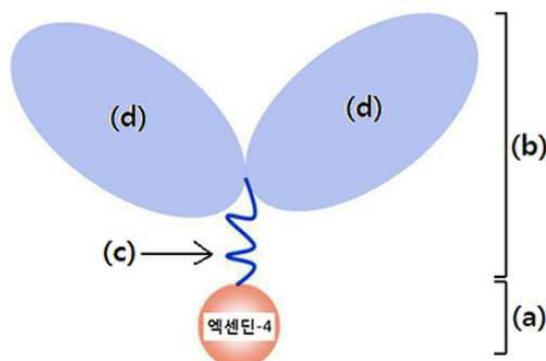
제1항에 있어서, 상기 (b), (c) 및 (d)에서 폴리에틸렌글라이콜 유도체는 메톡시폴리에틸렌글라이콜 말레이미드인 것을 특징으로 하는 폐길화된 액센딘-4.

청구항 9

작제

청구항 10

인산완충식염수(phosphate buffer saline)용액에 C-말단 40번 위치에 시스테인이 도입된 엑센딘-4(a)와 삼중가지형 폴리에틸렌글라이콜(PEG) 또는 이의 유도체(b)를 녹인 후 실온에서 반응시키는 단계를 포함하는 하기 구조에 나타낸 바와 같은 제1항의 폐질화된 엑센딘-4의 제조방법:



(여기서, 상기 삼중가지형 폴리에틸렌글라이콜 또는 이의 유도체(b)는,

폴리에틸렌글라이콜 또는 이의 유도체로 구성되는 PEG 스페이서(c); 및

상기 PEG 스페이서(c)의 일말단에 연결되는 2개의 폴리에틸렌글라이콜 또는 이의 유도체(d);로 구성되되, 상기 PEG 스페이서(c)의 타말단에는 엑센딘-4(a)의 C-말단 40번 위치에 도입된 시스테인과 폐길화가 가능한 작용기로서 숙신이미딜프로피오네이트, N-히드록시숙신이미드, 프로피온알데히드 및 말레이이미드로 이루어지는 군으로부터 선택되는 어느 하나의 치환기가 연결된 구조를 가지며,

상기 (b), (c) 및 (d)에서 폴리에틸렌글라이콜 유도체는 메톡시폴리에틸렌글라이콜 숙신이미딜프로피오네이트, 메톡시폴리에틸렌글라이콜 N-히드록시숙신이미드, 메톡시폴리에틸렌글라이콜 프로피온알데히드 및 메톡시폴리에틸렌글라이콜 말레이이미드로 이루어지는 군으로부터 선택되는 어느 하나이다).

청구항 11

제10항에 있어서, 상기 인산완충식염수는 pH 7.2-7.8인 것을 특징으로 하는 제조방법.

청구항 12

제10항에 있어서, 상기 시스테인이 도입된 엑센딘-4(a)와 삼중가지형 폴리에틸렌글라이콜 또는 이의 유도체(b)의 반응 몰 비율은 1:1-3인 것을 특징으로 하는 제조방법.

청구항 13

제1항의 폐길화된 엑센딘-4를 유효성분으로 함유하는 제1형 당뇨병, 제2형 당뇨병 또는 당뇨병 합병증의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 14

삭제

명세서**기술분야**

[0001]

본 발명은 폴리에틸렌글라이콜 또는 이의 유도체로 폐길화된 엑센딘-4 유사체, 이의 제조방법 및 이를 유효성분으로 함유하는 당뇨병 예방 또는 치료용 약학적 조성물에 관한 것이다.

배경기술

[0002]

치료용 웨타이드 및 단백질 폐길화(PEGylation)는 약제학적인 기술 중에서 가장 유효한 기술이다. 웨타이드 및 단백질의 폐길화는 그들의 분자량 증가, 단백질 분해부위 방어, 면역원성 부위 방어를 증가시키고, 이는 결국 생체 내 약물의 반감기를 증가시키며 웨타이드와 단백질의 면역원성을 감소시킨다. 따라서, 폐길화 기술은 오리지널 약품의 문제점을 해결함으로써 치료효과를 증가시키는 효과가 있고, 이러한 장점 때문에, 폐길화된 웨타이드 및 단백질 약물 전달시스템에 있어서 그 효과를 증가시키는데 중요한 역할을 한다.

[0003]

또한, 웨타이드와 단백질은 폴리에틸렌글라이콜(PEG)과 공유결합 함으로써 그들의 치료효과를 증가시킨다. 이러한 기술은 분자량, 대사부위의 방어력, 면역원성 부위 차단을 증가시킴으로써, 생체 내 반감기와 안정성이 증가되며 면역원성이 감소된다. 게다가, PEG가 접합된 웨타이드, 단백질은 PEG에 의한 분자량 증가로 인하여 신장배설이 감소하게 되어, 결국 폐길화는 약물동력학적으로나 약물학적으로나 그 효과를 증가시키는 장점이 있다.

[0004]

웨타이드와 단백질의 폐길화(PEGylation) 반응부위는 랜덤하게 분산되어 있으며 때때로 생체활성(Bioactive) 부위에 인접해 있는 경우도 있다. 그러나 전통적인 폐길화는 PEG 반응부위, PEG 접합 개수, 생물학적 활성 등을 고려하지 않은 비특이적 폐길화법을 사용하였다. 그러나 이러한 비특이적 폐길화법은 물리화학적, 생물학적, 약물동력학적 성질이 다른 여러 가지형 PEG 접합 이성질체를 생산하여 불충분한 구성을 가져와 치료효과를 감소시킨다. 이러한 문제점을 해결하고자 특이적 폐길화법이 연구되었고, 최근에 이러한 특이적 폐길화법은 유전공학 기술과 선택적 기능기 도입기술이 빠르게 발전하면서 그와 함께 약물의 치료효과를 극대화시키는 법으로써 빠르게 발전하고 있으며, 종래에는 과립구 콜로니 자극인자(G-CSF) 와 종양괴사인자 수용체는 다른 부위의 일차 아민 부위를 유전공학기법을 이용해 다른 아미노산으로 치환하여 반응 부위를 없앤 후에 N-말단 부위에 선택적으로 PEG를 결합하는 연구가 진행된 바 있다.

[0005]

또한, 스타필로키나아제(Staphylokinase), 인터페론 알파-2, 항체 ScFv(Single Chain Fragment Variable)와 같은 약물에도 유전공학 기법 및 치환기술을 이용하여 특정 치환기를 도입한 후, 상기 치환기에 선택적으로 폐길화하는 기술을 사용한 연구가 진행된 바 있다.

[0006]

엑센딘-4(Exendin-4)는 폴리웨타이드 물질로서, 힐라 몬스터 도마뱀의 타액 성분인 엑센딘-4를 합성해 만든 당뇨병 치료제로 최초의 인크레틴 유사체이다. 엑센딘-3와는 2번 및 3번 위치만이 상이하며, 포유동물류에서 DPP-IV(디펩티딜 웨타이드-4)효소에 의해 식후 위장에서 생성되어 인슐린의 분비를 촉진하고 혈당을 떨어뜨리는 이로운 역할을 하는 '인크레틴'효소를 바로 분해하는 것에 대한 저항성을 가지는 DPP-IV에 대하여 2분 이하의 반감기를 갖는 당뇨병 치료제인 글루카곤 유사 웨타이드-1(GLP-1)보다 더 긴 반감기를 가지는 것으로 알려져 있고, 또한, 생체내 실험에서 2-4 시간의 반감기를 나타내며, 1일 2-3회 복강투여로 충분한 혈중 농도에 도달할 수 있음이 밝혀진 바 있다.

[0007]

또한, 엑센딘-4는 위장관 운동성을 조절하고 음식섭취를 감소시켜주며 혈장 글루카곤을 억제한다고 알려져

있고, 최근에는 PLGA 미립구체형의 합성 엑센딘-4 (상품명: 바이에타(Byetta)TM)가 미국 식품의약품안전청으로부터 시판 허가되어 출시를 앞두고 있다. 하지만 이 Byetta LAR라는 제품은 제조과정이 복잡하고, 엑센딘-4의 생체 내 반감기가 4-6 시간으로 짧기 때문에 고용량 엑센딘-4의 잣은 투여가 요구되고, 4200 이하의 낮은 분자량 때문에 빠르게 배설되는 약물방출조절의 문제점이 있으며, 면역원성의 문제점 등을 여전히 가지고 있다.

[0008] 이에, 본 발명자들은 엑센딘-4의 낮은 분자량의 문제점을 해결하고, 엑센딘-4의 투여 횟수를 줄이기 위한 방법을 연구하던 중, 엑센딘-4의 C-말단 부위인 39번 다음 위치(40번 위치)에 시스테인(Cys) 아미노산을 삽입하여 선택적으로 폐길화를 수행함으로써 폐길화된 엑센딘-4의 제조시 수율이 증가하고, 약물의 치료효과를 증가시킬 수 있음을 확인하고 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0009] 본 발명의 목적은 C-말단 40번 위치에 시스테인(Cys)이 도입되고, 상기 시스테인이 폴리에틸렌글라이콜(PEG) 또는 이의 유도체로 폐길화(PEGylation)된 엑센딘-4 유사체를 제공하는 것이다.

[0010] 본 발명의 다른 목적은 상기 엑센딘-4 유사체의 제조방법을 제공하는 것이다.

[0011] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 엑센딘-4 유사체를 유효성분으로 함유하는 인슐린 과다분비에 의해 유발되는 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0012] 상기 목적을 해결하기 위하여, 본 발명은 C-말단 40번 위치에 시스테인(Cys)이 도입되고, 상기 시스테인이 폴리에틸렌글라이콜(PEG) 또는 이의 유도체로 폐길화(PEGylation)된 엑센딘-4 유사체를 제공한다.

[0013] 또한, 본 발명은 상기 엑센딘-4 유사체의 제조방법을 제공한다.

[0014] 나아가, 본 발명은 상기 엑센딘-4 유사체를 유효성분으로 함유하는 인슐린 과다분비에 의해 유발되는 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

발명의 효과

[0015] 본 발명에 의하면, 선택적인 폐길화를 수행하여, C-말단 40번 위치에 시스테인(Cys)이 도입되고, 상기 시스테인이 폴리에틸렌글라이콜(PEG) 또는 이의 유도체로 폐길화(PEGylation)된 엑센딘-4 유사체의 수율을 증가시킬 수 있고, 약물의 치료효과를 증가시킬 수 있어, 인슐린 과다분비에 의해 유발되는 질환의 예방 또는 치료용 조성물로 유용하게 사용할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0016] 도 1은 본 발명의 실시예 1의 C-말단에 시스테인(Cys 40)이 도입된 엑센딘-4의 폐길화 공정을 도식화한 도면이다.

도 2는 본 발명의 비교예 1의 엑센딘-4의 라이신 아민에 폐길화 공정을 도식화한 도면이다.

도 3은 본 발명의 비교예 2의 엑센딘-4의 N-말단에 폐길화 공정을 도식화한 도면이다.

도 4는 본 발명의 실시예 1의 흡광도를 나타낸 도면이다.

도 5는 본 발명의 비교예 1a 내지 1c의 흡광도를 나타내는 도면이다.

도 6은 본 발명의 비교예 2의 흡광도를 나타내는 도면이다.

도 7은 본 발명의 실시예 1의 제조 수율을 나타내는 도면이다.

도 8은 본 발명의 비교예 1a 내지 1c의 제조 수율을 나타내는 도면이다.

도 9는 본 발명의 비교예 2의 제조 수율을 나타내는 도면이다.

도 10은 본 발명의 일실시예에 따른 PEG 결합 엑센딘-4 유사체의 GLP-1 수용체에 대한 친화력을 나타내는 도면이다.

도 11은 본 발명의 실시예 4 및 실시예 5의 PEG 결합 엑센딘-4 유사체의 모식도를 나타내는 도면이다.

도 12는 본 발명의 일실시예에 따른 PEG 결합 엑센딘-4 유사체를 투여한 당뇨병 마우스에 대한 혈당수치를 나타내는 도면이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0017]

이하, 본 발명을 상세히 설명한다.

[0018]

본 발명은 C-말단 40번 위치에 시스테인(Cys)이 도입되고, 상기 시스테인이 폴리에틸렌글라이콜(PEG) 또는 이의 유도체로 폐길화(PEGylation)된 엑센딘-4 유사체를 제공한다.

[0019]

본 발명에 따른 폴리에틸렌글라이콜 또는 이의 유도체의 분자량은 5-60 kDa이고, 바람직하게는 20-50 kDa인 것을 사용할 수 있으나 이에 한정하지 않는다.

[0020]

또한, 본 발명에 따른 폴리에틸렌글라이콜 또는 이의 유도체는 선형 또는 가지형이고, 가지형의 경우, 바람직하게는 이중가지형 또는 삼중가지형인 것을 사용할 수 있고, 더욱 바람직하게는 삼중가지형인 것을 사용할 수 있다.

[0021]

구체적으로, 상기 폴리에틸렌글라이콜 유도체는 예를들면, 메톡시폴리에틸렌글라이콜 숙신이미딜프로페오네이트, 메톡시폴리에틸렌글라이콜 N-히드록시숙신이미드, 메톡시폴리에틸렌글라이콜 프로페온알데히드, 메톡시폴리에틸렌글라이콜 말레이이미드, 또는 이들 유도체의 다중가지형이다. 바람직하게는 상기 폴리에틸렌글라이콜 유도체는 선형 메톡시폴리에틸렌글라이콜 말레이이미드, 이중가지형 메톡시폴리에틸렌글라이콜 말레이이미드 또는 삼중가지형 메톡시폴리에틸렌글라이콜 말레이이미드이고, 더욱 바람직하게는 삼중가지형 메톡시 폴리에틸렌글라이콜 말레이이미드이다.

[0022]

또한, 본 발명은 인산완충식염수(phosphate buffer saline)용액에 C-말단 40번 위치에 시스테인이 도입된 엑센딘-4와 폴리에틸렌글라이콜 또는 이의 유도체를 녹인 후 실온에서 반응시키는 단계를 포함하는 상기 폴리에틸렌글라이콜 또는 이의 유도체로 폐길화된 엑센딘-4 유사체의 제조방법을 제공한다.

[0023]

구체적으로, pH 7.2-7.8, 바람직하게는 pH 7.5의 인산완충식염수에 C-말단 40번 위치에 시스테인이 도입된 엑센딘-4와 폴리에틸렌글라이콜 또는 이의 유도체를 1:1-3의 몰 비율로 첨가하여 녹인 후, 반응 온도는 특별히 제한되지는 않으나, 상온에서 1-3 시간 동안 반응을 수행하여 반응 종결 후, 컬럼크로마토그래피를 수행하여 폴리에틸렌글라이콜 또는 이의 유도체로 폐길화된 엑센딘-4 유사체를 제조할 수 있다.

[0024]

상기 인산완충식염수의 pH의 범위를 벗어나는 경우, 수율이 떨어지는 문제점이 있다.

[0025]

본 발명에서는 상기 폴리에틸렌글라이콜 또는 이의 유도체로 폐길화된 엑센딘-4 유사체를 제조한 후 질량 분광법, 액체 크로마토그래피법, X-선 구조결정법, 선광도 측정법과 대표적인 화합물의 원소 분석 계산치와 실측치의 비교 등을 통해 분자 구조를 확인할 수 있다.

[0026] 또한, 본 발명은 폴리에틸렌글라이콜 또는 이의 유도체로 폐길화된 엑센딘-4 유사체를 유효성분으로 함유하는 인슐린 과다분비에 의해 유발되는 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[0027] 상기 인슐린 과다분비에 의해 유발되는 질환으로는 제1형 당뇨병, 제2형 당뇨병 및 당뇨병 합병증 등을 포함할 수 있다.

[0028] 본 발명에 따른 폴리에틸렌글라이콜 또는 이의 유도체로 폐길화된 엑센딘-4 유사체는 GLP-1 수용체에 대한 친화력을 측정한 결과, IC_{50} 값이 1.04 nM로 나타났고, 이는 실시예 1(N_{ter} -PEG_{5K}-Ex4) (IC_{50} 값 = 121.78 nM)의 화합물보다 120배 우수한 활성을 나타내는 것으로 확인되었다(실험예 1, 표 3 및 도 10 참조).

[0029] 또한, 도 11에는 이해를 돋기 위해, 본 발명의 삼중가지형 PEG가 C40위치에 접합된 엑센딘-4의 모식도를 나타내었다.

[0030] 상기 접합된 PEG의 분자량이 23K인 경우는 PEG 스페이서로서 3KD의 PEG를 사용하고, 상기 3KD의 말단에 각각 10KD의 분자량을 갖는 PEG가 결합된다(실시예 4). 또한, 이와 유사하게 PEG의 분자량이 50K인 경우는 PEG 스페이서로서 10KD의 PEG를 사용하고, 상기 10KD의 말단에 각각 20KD의 분자량을 갖는 PEG가 결합된다(실시예 5). 이때, 상기 실시예 4(C40-PEG_{23K}-Ex4) 및 실시예 5(C40-PEG_{50K}-Ex4)의 엑센딘-4를 마우스에 투여 후, 혈중 글루코스 수치가 8.35 mmol/l 까지 반등하는데 걸리는 시간을 측정한 결과, 약물 투여 후, 저혈당 지속 시간이 45.5-56.1 시간 동안 유지되는 것으로 나타나(실험예 2, 표 4 및 도 12 참조), C40-PEG_{20K}-Ex4(23.2 시간)보다 두배 이상, 대조군(7.3 시간)보다 저혈당 지속 시간이 긴 것으로 확인되어 혈중 글루코스를 7-8 배 이상 안정하게 유지할 수 있다.

[0031] 따라서, 본 발명에 따른 C40 위치 특이적 PEG 접합 엑센딘-4 화합물은 종래의 엑센딘-4의 낮은 분자량으로 인한 약물의 빠른 배설의 단점을 해결할 수 있고, GLP-1 수용체에 대한 친화력이 우수하며, 혈중 글루코스 수준을 약물 투여 후, 3-4일 이후까지 안정하게 유지할 수 있어 저혈당 지속력이 강하므로 인슐린 과다분비에 의해 유발되는 제1형 당뇨병, 제2형 당뇨병 및 당뇨병 합병증과 관련된 질환을 예방 또는 치료하는 데 유용하게 사용될 수 있다.

[0032] 본 발명의 조성물을 의약품으로 사용하는 경우, 상기 폴리에틸렌글라이콜 또는 이의 유도체로 폐길화된 엑센딘-4 유사체를 유효성분으로 함유하는 약학적 조성물은 임상투여 시에 다양한 하기의 경우 또는 비경구 투여 형태로 제제화되어 투여될 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0033] 경구 투여용 제형으로는 예를 들면 정제, 환제, 경/연질 캡슐제, 액제, 혼탁제, 유화제, 시럽제, 과립제, 엘리시르제, 트로키제 등이 있는데, 이들 제형은 유효성분 이외에 희석제(예: 락토즈, 엑스트로즈, 수크로즈, 만니톨, 솔비톨, 셀룰로즈 및/ 또는 글리신), 활택제(예: 실리카, 탈크, 스테아르산 및 그의 마그네슘 또는 칼슘염 및/또는 폴리에틸렌 글라이콜)를 함유하고 있다. 정제는 또한 마그네슘 알루미늄 실리케이트, 전분 페이스트, 젤라틴, 메틸셀룰로즈, 나트륨 카복시메틸셀룰로즈 및/또는 폴리비닐피롤리딘과 같은 결합제를 함유할 수 있으며, 경우에 따라 전분, 한천, 알긴산 또는 그의 나트륨 염과 같은 봉해제 또는 비등 혼합물 및/또는 흡수제, 착색제, 향미제, 및 감미제를 함유할 수 있다.

[0034] 상기 화학식 폴리에틸렌글라이콜 또는 이의 유도체로 폐길화된 엑센딘-4 유사체를 유효 성분으로 하는 약학적 조성물은 비경구 투여할 수 있으며, 비경구 투여는 피하주사, 정맥주사, 근육 내 주사 또는 흉부 내 주사를 주입하는 방법에 의한다.

[0035] 이때, 비경구 투여용 제형으로 제제화하기 위하여 상기 폴리에틸렌글라이콜 또는 이의 유도체로 폐길화된 엑센딘-4 유사체를 안정제 또는 완충제와 함께 물에 혼합하여 용액 또는 혼탁액으로 제조하고, 이를 앰플 또는 바이알 단위 투여형으로 제조할 수 있다. 상기 조성물은 멸균되고/되거나 방부제, 안정화제, 수화제 또는 유화 촉진제, 삼투압 조절을 위한 염 및/또는 완충제 등의 보조제, 및 기타 치료적으로 유용한 물질을 함유할 수 있으며, 통상적인 방법인 혼합, 과립화 또는 코팅 방법에 따라 제제화할 수 있다.

[0036] 본 발명에 따른 폴리에틸렌글라이콜 또는 이의 유도체로 폐길화된 엑센딘-4 유사체를 유효성분으로 함유하는 약학적 조성물의 인체에 대한 투여량은 환자의 나이, 몸무게, 성별, 투여형태, 건강상태 및 질환 정도에 따라 달라질 수 있으며, 바람직하게는 0.01 내지 200 mg/kg/일의 양으로 의사 또는 약사의 판단에 따라 경구 또는 비경구적 경로를 통해 투여할 수 있다.

[0037] 이하, 본 발명을 실시예 및 실험예에 의해 상세히 설명한다.

[0038] 하기 실시예 및 실험예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 이에 한정되는 것은 아니다.

[0039] <실시예 1~실시예 5> C40 위치 특이적 PEG 접합 엑센딘-4 제조

[0040] C40 위치 특이적 PEG 접합 엑센딘-4를 제조하기 위하여 C-말단 부위(40번 위치)에 시스테인(Cysteine, Cys)이 도입된 엑센딘-4-Cys(엑센딘-Cys, 분자량: 4290.7, 서열: HGEGTFTSDLSKQMEEEAVRLFIEWLKNNGPSSGAPPPSC)를 사용하였고, 말레이미드로 활성화된 모노메톡시 PEG(Maleimide activated monomethoxy PEG; mPEG-MAL, MW: 5, 20 kDa(선형(Linear type)), 20 kDa(이중가지형(Branch type)), 23, 50 kDa(3중가지형(Trimer type)))는 일본 낫폰 오일 및 팩트(Nippon Oil and Fats, NOF, Tokyo)에서 구입하여 사용하였다.

[0041] C-말단 40번 위치에 특이적으로 PEG 접합 엑센딘-4를 제조하기 위하여 20 mM 인산완충식염수(phosphate buffer saline, pH 7.5) 용액에 각각 엑센딘-4-Cys와 mPEG-MAL(MW: 5, 20(선형), 20(이중가지형), 23, 50 kDa)을 1:2의 물비율로 각각 완전히 녹인 후 2 시간 동안 실온에서 반응시켰다(도 1 참조). 반응 종결 후, 반응액을 캡셀-팩(Capcell-pak) RP-18 컬럼(250 × 10 mm, 5 μm, 시세이도, 일본)을 유속 5.0 mL/min으로하여 역상크로마토그램으로 분리하였다. 분리는 자외선 파장 215 nm에서 모니터링 하였다. 이동상은 0.1% TFA 중류수(이동상 A)와 0.1% TFA 아세토나이트릴(Acetonitrile, 이동상 B)를 선형 농도구배법(36-42% B over 30 min)을 이용하여 분리하였다(도 4 참조).

[0042] 상기 방법으로 분리된 피크는 각각 따로 모은 후, 기체 질소를 이용하여 아세토나이트릴을 제거하였고, 제거된 용액을 센트리콘-10(Centricon-10, Mw cut off 3000, Millipore Corp., Billerica, MA)을 이용하여 농축하였다. 제조된 물질은 4 °C에서 보관 후, 샘플-매트릭스 1 μL 샘플 용액 와 2 μL 매트릭스 용액을 혼합하여 준비하고, 매트릭스 용액은 알파-시아노하이드록시신남산(α-cyanohydroxycinnamic acid; α-CHCA)을 0.1% (v/v) TFA를 함유한 물/ACN(50:50) 용액에 용해시켜 제조하였다. 준비 한 1 μL의 샘플-매트릭스 용액은 샘플 플레이트에 올린 뒤 진공 상태에서 건조시킨 후, 크기별 배재 크로마토그래피(size exclusion chromatography(SEC))와 MALDI-TOF 질량분석기로 분석하였고, C40 위치 특이적 PEG 접합 반응(C40-PEG-Ex4)은 0, 20, 40, 60, 80분 간격으로 분석하였으며 엑센딘-4, C40-PEG-Ex4의 초기 대비 크로마토그램 면적 비율로 각각 나타내었다. 그 결과를 하기 표 1 및 도 7에 나타내었다.

표 1

	반응 시간	수율(%)
실시예 1 C40-PEG _{5k} -Ex4(선형)	80분	93%
실시예 2 C40-PEG _{20k} -Ex4(선형)	80분	89%
실시예 3 C40-PEG _{20k} -Ex4(이중가지형)	80분	91%
실시예 4 C40-PEG _{23k} -Ex4(삼중가지형)	80분	90%
실시예 5 C40-PEG _{50k} -Ex4(삼중가지형)	80분	85%

[0044] 표 1에 나타낸 바와 같이, 반응 시간은 평균 80분으로, 평균 90% 이상의 수율로 제조될 수 있음을 확인하였다(도 7 참조).

[0045] <비교예 1> 비특이적 PEG 접합 엑센딘-4의 제조

[0046] 상기 실시예 1에서 시스테인이 도입된 엑센딘-4-Cys과 말레이미드로 활성화된 모노메톡시 PEG를 사용하는 대신 엑센딘-4(분자량: 4186.6, 서열: HGEGTFTSDLSKQMEEEAVRLFIEWLKNNGPSSGAPPPS)와 숙신이미드로 활성화된 모노메톡시 PEG(succinimidyl activated monomethoxy PEG; mPEG-SPA, MW: 5, 20 kDa(Linear type))를 사용하는 것을 제외하고는 동일한 방법을 수행하여 비특이적 PEG 접합 엑센딘-4를 제조하였다(도 2 및 도 5 참조).

[0047] 상기 숙신이미드로 활성화된 모노메톡시 PEG(mPEG-SPA)는 일본 닛폰 오일 및 팩트(Nippon Oil and Fats, NOF, Tokyo)에서 구입하여 사용하였다.

표 2

[0048]

비교예 1	반응 시간	수율(%)
비교예 1a Lys ¹² -PEG _{20k} -Ex4	80분	20%
비교예 1b Lys ²⁷ -PEG _{20k} -Ex4	80분	31%
비교예 1c Lys ^{12,27} -PEG _{20k} -Ex4	80분	25%

[0049] 상기 표 2에 나타낸 바와 같이, 비특이적 일차아민 PEG 접합 반응의 반응 시간은 평균 80분으로 수율은 비교예 1a(Lys¹²-PEG_{20k}-Ex4)의 경우 평균수율 20%, 비교예 1b(Lys²⁷-PEG_{20k}-Ex4)의 경우 평균수율 31%로 확인되었다(도 8 참조).

[0050]

<비교예 2> N-말단 특이적 PEG 접합 엑센딘-4 제조

[0051]

상기 실시예 1에서 시스테인이 도입된 엑센딘-4-Cys과 말레이미드로 활성화된 모노메톡시 PEG를 사용하는 대신 엑센딘-4(분자량: 4186.6, 서열: HGEGTFTSDLSKQMEEEAVRLFIEWLKNNGPSSGAPPPS)와 모노메톡시 PEG-알데하이드(Monomethoxy PEG-aldehyde; mPEG-ALD, MW: 5 kDa(선형))를 사용하는 것을 제외하고는 동일한 방법을 수행하여 비특이적 PEG 접합 엑센딘-4를 제조하였다(도 3 및 도 6 참조).

[0052]

상기 모노메톡시 PEG-알데하이드(mPEG-ALD)는 일본 닛폰 오일 및 팩트(Nippon Oil and Fats, NOF, Tokyo)에서 구입하여 사용하였다.

[0053]

그 결과, N-말단 특이적 PEG 접합 반응(N_{ter}-PEG_{5k}-Ex4)의 반응 시간은 720분으로 평균 수율은 72%로 나타났다(도 9 참조).

[0054]

<실험 예 1> PEG 접합 엑센딘-4 유사체의 RIN-m5F 세포 수용체 결합친화력 분석

[0055]

상기 실시예 1, 비교예 1 및 2에서 제조된 실시예 1(C40-PEG_{5k}-Ex4), 비교예 1a(Lys¹²-PEG_{5k}-Ex4), 비교예 1b(Lys²⁷-PEG_{5k}-Ex4) 및 비교예 2(N_{ter}-PEG_{5k}-Ex4)의 PEG 접합 엑센딘-4 유사체의 GLP-1 수용체(GLP-1R)에 대한 친화력을 분석하기 위하여 하기 실험을 수행하였다.

[0056]

GLP-1 수용체(GLP-1R)를 많이 발현하고 있는 소도세포(RIN-m5F, ATCC, Manassas, VA)를 12웰 플레이트에 분주하였다. 48 시간 후 바인딩 버퍼(120 mM NaCl, 1.2 mM MgSO₄, 13 mM 아세트산나트륨(sodium acetate), 5 mM KC1, 1.2 g/ℓ 트리스(Tris), 2 g/ℓ 소혈청알부민(bovine serum albumin), 1.8 g/ℓ 글루코스(glucose), pH 7.6)로 두 번 씻은 후, 표지하지 않은 PEG 접합 엑센딘-4 유사체(최종 농도 범위: 0.001~1000 nM)와 30 pM 농도의 I-125로 표지 된 엑센딘-4(9-39, PerkinElmer, Boston, MA)를 동시에 처리하였다. 두 시간 경과 후 1 mg/ml 농도의 소혈청 알부민을 함유한 PBS로 충분히 세척하였다. 마지막으로 세포는 세포분해 버퍼(0.5 N NaOH

with 1% SDS)를 이용하여 15분 동안 충분히 분해시킨 뒤, I-125 방사능 정도는 감마카운터(GMI, Inc., Ramsey, MN)로 측정하였다. 그 결과를 하기 표 3 및 도 10에 나타내었다.

표 3

[0057]

	IC ₅₀ (nM)
실시예 1 (C40-PEG _{5K} -Ex4)	1.04 nM
비교예 1a (Lys ¹² -PEG _{5K} -Ex4)	6.45 nM
비교예 1b (Lys ²⁷ -PEG _{5K} -Ex4)	2.42 nM
비교예 2 (N _{ter} -PEG _{5K} -Ex4)	121.78 nM
대조군(액센딘-4)	0.23 nM

[0058]

상기 표 3에 나타낸 바와 같이, 본 발명에 따른 실시예 1(C40-PEG_{5K}-Ex4)는 GLP-1 수용체에 대한 친화력을 측정한 결과, IC₅₀값이 1.04 nM로 확인되었다. 이는 비교예 1b(Lys²⁷-PEG_{5K}-Ex4)(IC₅₀값= 2.42 nM)보다 2배 더 우수한 활성을 나타내고, 비교예 1a(Lys¹²-PEG_{5K}-Ex4)(IC₅₀값= 6.45 nM)보다 6배 우수한 활성을 나타내는 것으로 확인되었다. 또한, 본 발명에 따른 실시예 1(C40-PEG_{5K}-Ex4)는 비교예 2(N_{ter}-PEG_{5K}-Ex4)(IC₅₀값= 121.78 nM)보다 120배 우수한 활성을 나타내는 것으로 확인되었다.

[0059]

따라서, 본 발명에 따른 C40 위치 특이적 PEG 접합 액센딘-4 화합물은 액센딘-4의 낮은 분자량으로 인한 약물의 빠른 배설의 단점을 해결할 수 있을 뿐만 아니라, GLP-1 수용체에 대한 친화력이 액센딘-4와 유사한 생물학적 활성을 나타내므로 당뇨병 치료제로 유용하게 사용될 수 있다(도 10 참조).

[0060]

<실험 예 2> 금식하지 않은 제2형 당뇨병 마우스에서의 저혈당 지속력 평가

[0061]

본 발명에 따른 C40 위치 특이적 PEG 접합 액센딘-4 화합물의 제2형 당뇨병 마우스에서의 저혈당 지속력을 평가하기 위하여 하기 실험을 수행하였다.

[0062]

본 실험에서 사용된 제2형 당뇨병 C57BL/6 db/db 마우스(수컷, 4-5 주령, 중앙실험동물회사)을 사용하였고, 동물들은 12 시간 주기로 빛에 노출시켰으며, 먹이와 물을 자유롭게 먹을 수 있도록 2주 동안 안정화시키면서 사육하였다. 이러한 실험동물은 국립보건원(National Institute of Health(NIH))의 가이드라인에 따라 관리를 하였으며 성균관대학교 기관 내 동물실험윤리위원회의 승인을 받고, 인도적으로 실험을 수행하였다.

[0063]

상기 실시예 1 내지 5에서 제조된 C40-PEG_{5K}-Ex4(선형), C40-PEG_{20K}-Ex4(선형), C40-PEG_{20K}-Ex4(이중가지형), C40-PEG_{23K}-Ex4(삼중가지형) 및 C40-PEG_{50K}-Ex4(삼중가지형), 및 비교예 1b에서 제조된 Lys²⁷-PEG_{20K}-Ex4를 수컷

db/db 마우스(6-7 주령)에 25 nmol/kg의 용량으로 복강내(ip) 투여한 후, 부동한 시간:0, 0.5, 1, 2, 3, 4, 6, 8, 12, 24, 36, 48, 60, 72, 96 시간에 따라 마우스의 꼬리 정맥에서 혈액을 채취한 다음 혈중 글루코스의 농도를 아큐첵 혈당 측정기(ACCU-CHEK® Sensor, Roche Diagnostics Corp., USA)로 측정하였다. 그 후, 추가적으로 저혈당이 지속(혈중 글루코스 수치 < 8.35 mmol/l (150 mg/dL))되는 시간을 측정하여 하기 표 4 및 도 12에 나타내었다. 본 실험에서 대조군으로는 엑센딘-4를 사용하였다.

표 4

[0064]	혈중 글루코스 수치(mmol/1) (평균값)						비교예 1b (Lys ²⁷ - PEG _{20K} -Ex4)	대조군 (Ex-4)	무처리군		
	C40-PEG-Ex4										
시간 (h)	실시예 1 (PEG _{5K})	실시예 2 (PEG _{20K})	실시예 3 (PEG _{20K})	실시예 4 (PEG _{23K})	실시예 5 (PEG _{50K})						
0	23.38	24.28	24.44	24.22	24.56	24.13	22.61	24.23			
0.5	7.62	7.96	7.86	7.97	7.63	7.97	6.95	24.21			
1	7.36	6.13	6.89	6.99	6.25	6.56	6.41	23.44			
2	5.09	5.29	5.04	4.96	5.45	5.24	5.80	24.58			
3	4.46	4.18	4.15	4.11	4.64	4.22	5.85	22.96			
4	4.93	4.34	4.66	4.54	4.23	4.29	8.02	24.54			
6	5.73	4.9	4.67	4.87	4.26	4.85	10.69	23.43			
8	9.04	4.57	5.11	4.66	4.69	5.13	16.01	24.94			
12	16.2	5.86	7.89	4.9	4.87	5.40	23.89	22.47			
24	21.1	8.54	15.09	5.52	5.11	12.98	-	24.42			
36	-	11.47	20.14	8.08	6.31	17.34	-	23.92			
48	-	15.34	24.21	8.66	7.26	20.45	-	22.66			
60	-	20.45	23.76	11.34	8.87	23.02	-	23.41			
72	-	23.02	-	14.12	13.49	-	-	22.26			
96	-	-	-	18.79	17.07	-	-	24.51			
120	-	-	-	24.53	23.02	-	-	23.75			

[0065] 상기 표 4에 나타낸 바와 같이, 본 발명에 따른 실시예 1 내지 5의 C40 위치 특이적 PEG 접합 엑센딘-4의 혈중 글루코스 수치가 8.35 mmol/l 까지 반등하는데 걸리는 시간은 엑센딘-4(7.3 시간)보다 저혈당 지속 시간이 훨씬 더 긴 것으로 확인되었고, 특히, 삼중가지형 PEG가 도입된 실시예 4(C40-PEG_{23K}-Ex4) 및 실시예 5(C40-PEG_{50K}-Ex4)의 경우, 각각 45.5 시간, 56.1 시간 동안 유지되는 것으로 확인되었다(도 12 참조).

[0066] 따라서, 본 발명에 따른 C40 위치 특이적 PEG 접합 엑센딘-4 화합물은 엑센딘-4의 낮은 분자량으로 인한 약물의 빠른 배설의 단점을 해결함으로써 혈중 글루코스를 비교예보다 7-8 배로 안정하게 유지할 수 있으므로 당뇨병 치료제로 유용하게 사용될 수 있다.

[0067] 한편, 본 발명에 따른 C40 위치 특이적 PEG 접합 엑센딘-4 유사체는 목적에 따라 여러 형태로 제제화가 가능하다. 하기는 본 발명에 따른 C40 위치 특이적 PEG 접합 엑센딘-4 유사체를 활성 성분으로 함유시킨 몇몇 제제화 방법을 예시한 것으로 본 발명이 이에 한정되는 것은 아니다.

[0068] <제제예 1> 산제의 제조

C40 위치 특이적 PEG 접합 엑센딘-4 유사체 2 g

유당 1 g

상기의 성분을 혼합하고 기밀포에 충진하여 산제를 제조하였다.

[0072] <제제예 2> 정제의 제조

[0073] C40 위치 특이적 PEG 접합 엑센딘-4 유사체 100 mg

[0074] 옥수수전분 100 mg

[0075] 유당 100 mg

[0076] 스테아린산 마그네슘 2 mg

[0077] 상기의 성분을 혼합한 후, 통상의 정제의 제조방법에 따라서 타정하여 정제를 제조하였다.

[0078] <제제예 3> 캡슐제의 제조

[0079] C40 위치 특이적 PEG 접합 엑센딘-4 유사체 100 mg

[0080] 옥수수전분 100 mg

[0081] 유당 100 mg

[0082] 스테아린산 마그네슘 2 mg

[0083] 상기의 성분을 혼합한 후, 통상의 캡슐제의 제조방법에 따라서 젤라틴 캡슐에 충전하여 캡슐제를 제조하였다.

[0084] <제제예 4> 주사제의 제조

[0085] C40 위치 특이적 PEG 접합 엑센딘-4 유사체 100 mg

[0086] 만니톨 180 mg

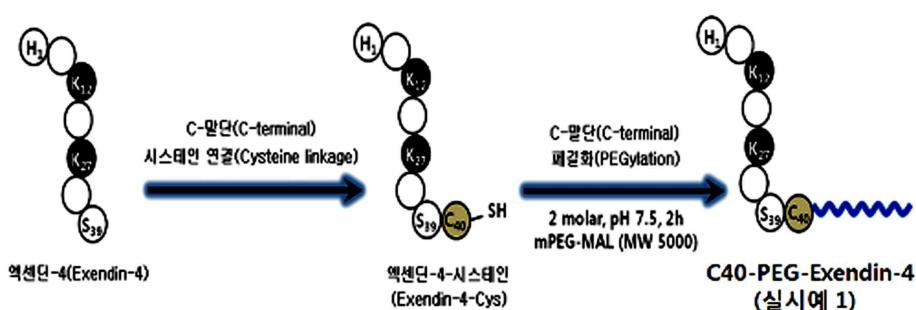
[0087] $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 26 mg

[0088] 증류수 2974 mg

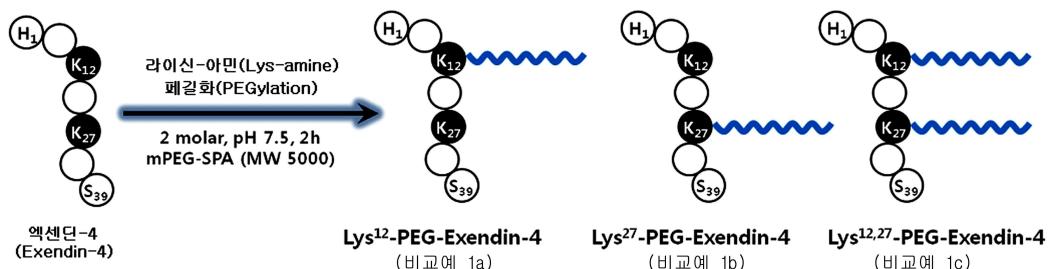
[0089] 통상적인 주사제의 제조방법에 따라, 상기 성분들을 제시된 함량으로 함유시켜 주사제를 제조하였다.

도면

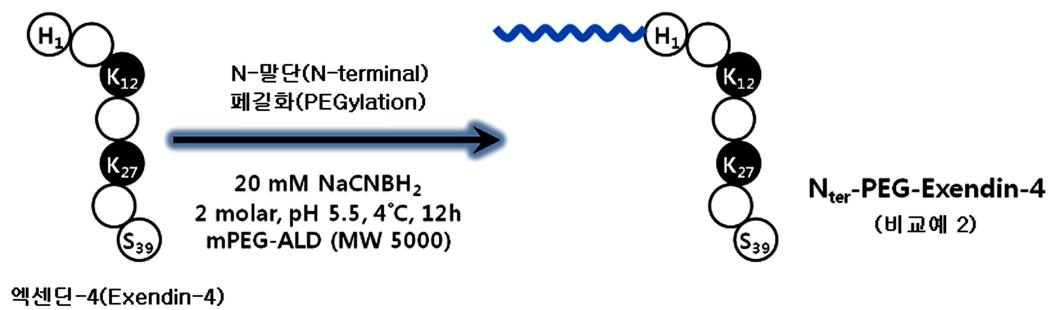
도면1



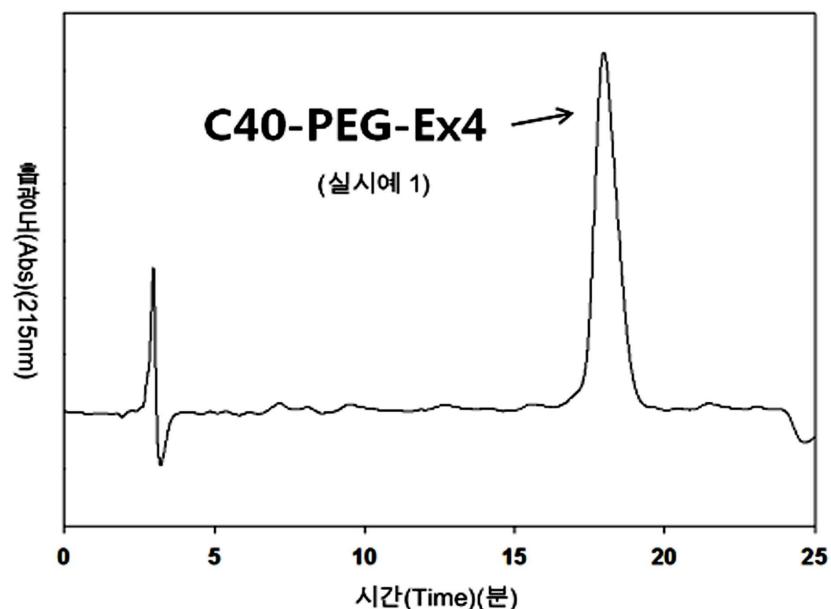
도면2



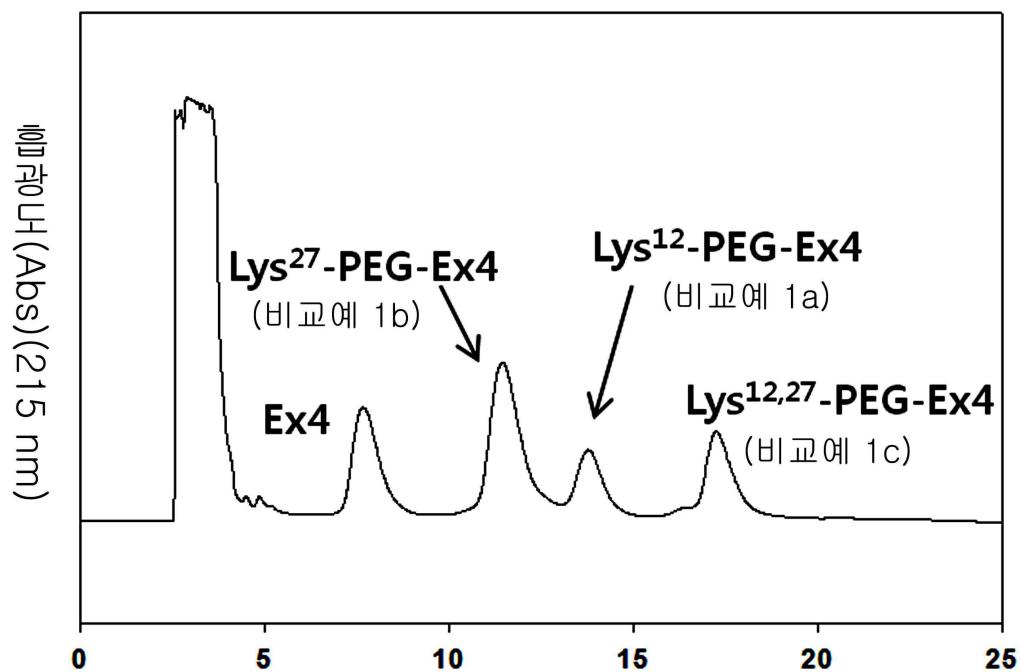
도면3



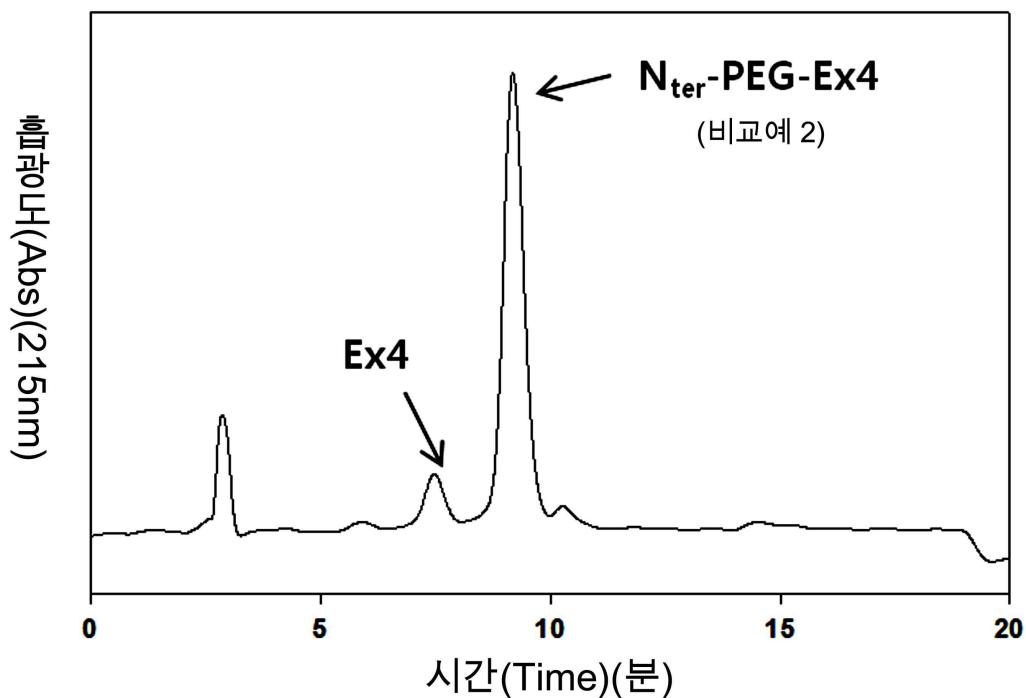
도면4



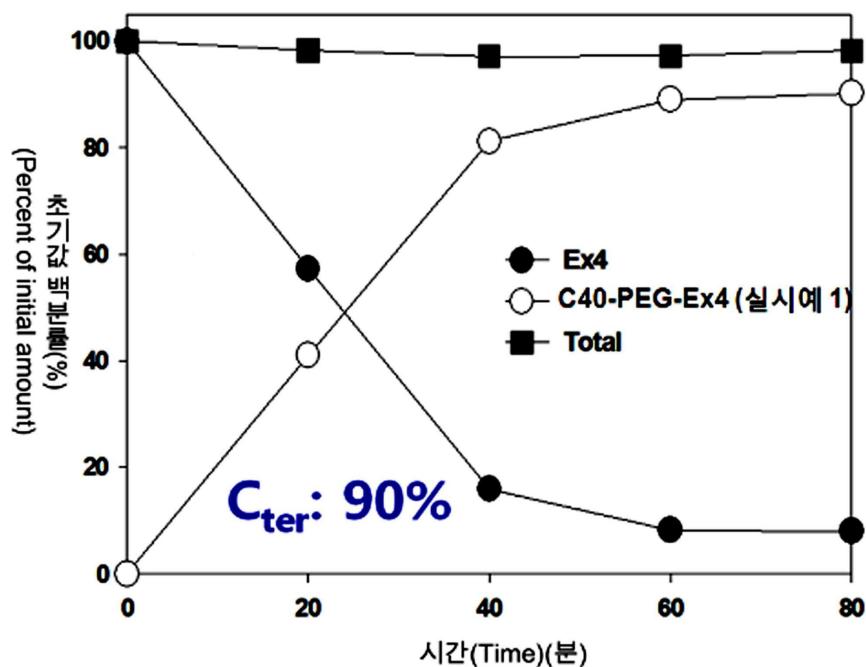
도면5



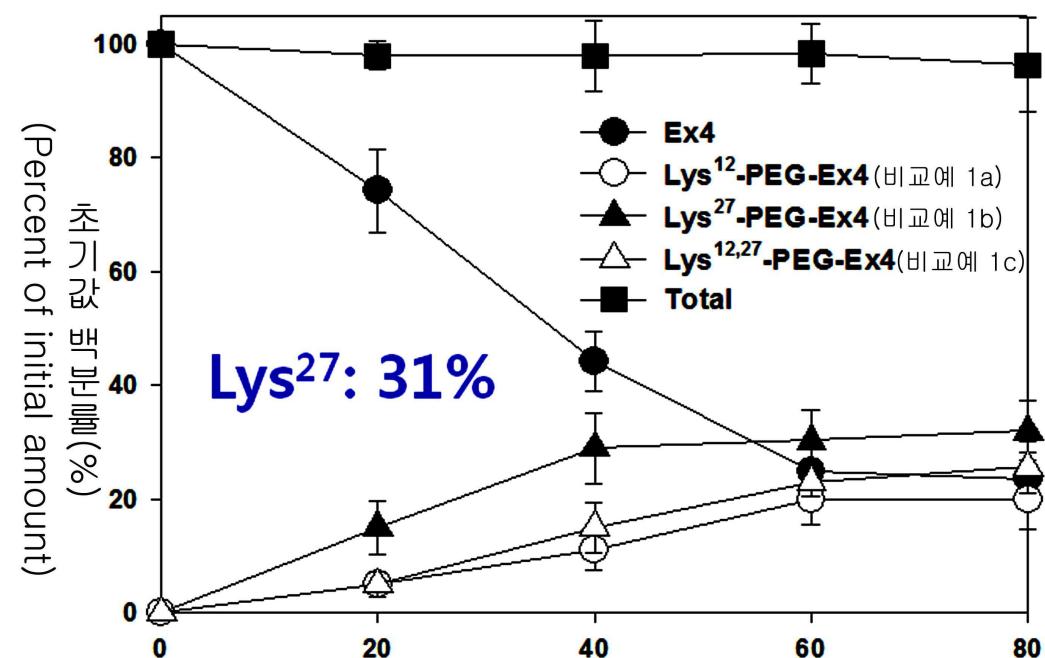
도면6



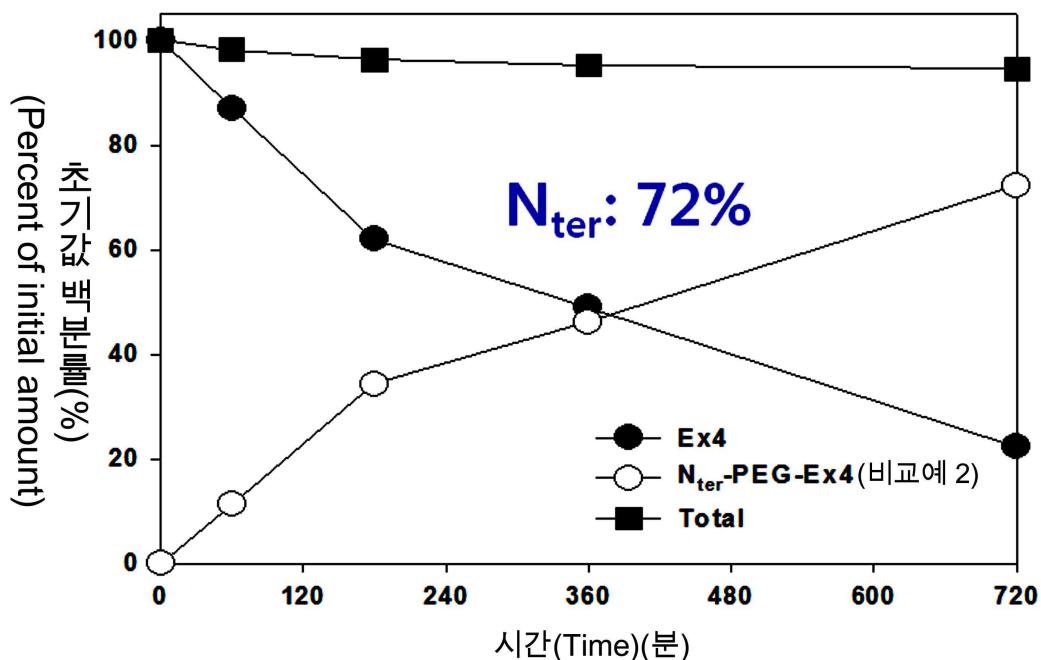
도면7



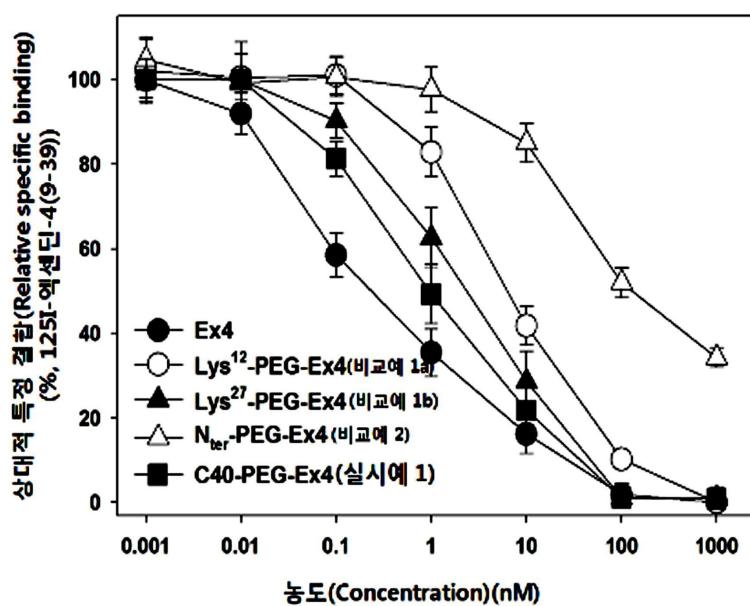
도면8



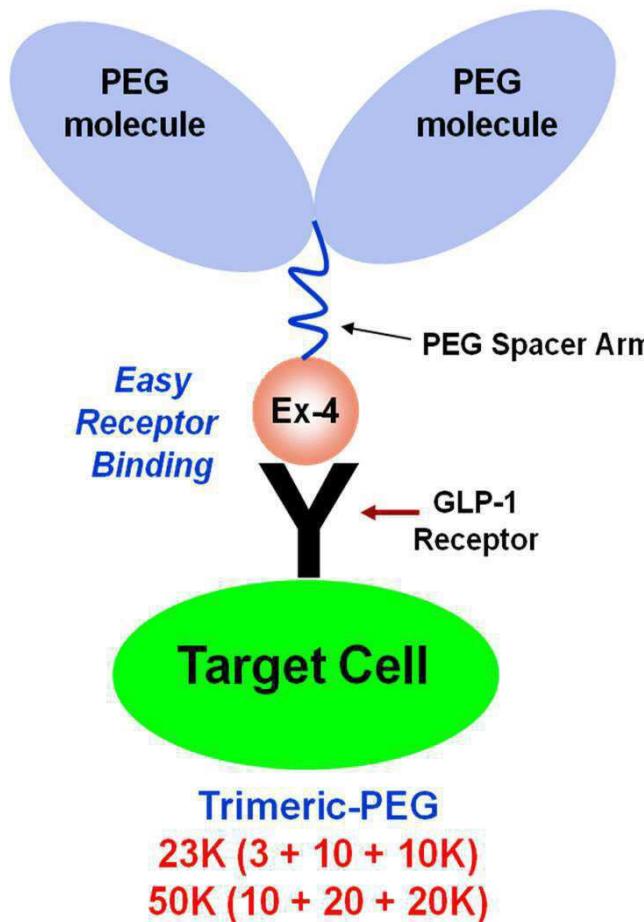
도면9



도면10



도면11



도면12

