



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2015년07월02일  
(11) 등록번호 10-1533376  
(24) 등록일자 2015년06월26일

- |   |   |
|---|---|
| <p>(51) 국제특허분류(Int. Cl.)<br/>A61K 31/343 (2006.01) A61K 31/10 (2006.01)<br/>A61P 3/00 (2006.01) A61P 3/10 (2006.01)</p> <p>(21) 출원번호 10-2014-0023133</p> <p>(22) 출원일자 2014년02월27일<br/>심사청구일자 2014년02월27일</p> <p>(56) 선행기술조사문헌<br/>논문(Archives of Pharmacal Research, 2011.07)<br/>논문(J. MED. CHEM., 1993)</p> | <p>(73) 특허권자<br/>한국화학연구원<br/>대전광역시 유성구 가정로 141 (장동)</p> <p>(72) 발명자<br/>김광록<br/>대전광역시 유성구 구즉로 16, 109동 906호 (송강동, 한마을아파트)</p> <p>이준미<br/>대전광역시 대덕구 동춘당로 151 (법동, 그린타운아파트) 110-403<br/>(뒷면에 계속)</p> <p>(74) 대리인<br/>특허법인 플러스</p> |
|---|---|

전체 청구항 수 : 총 4 항

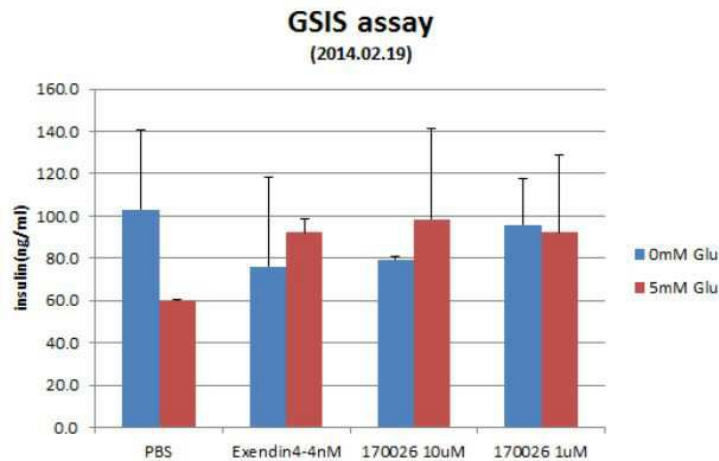
심사관 : 윤동준

(54) 발명의 명칭 비펩티드성의 글루카곤 유사 펩티드-1 수용체 작용제 화합물을 유효성분으로 포함하는 제2형 당뇨병 치료용 약학 조성물

(57) 요약

본 발명은 GLP-1 수용체의 활성을 증가시키는 효과가 우수한 상기 화학식 I로 표시되는 새로운 비펩티드성 작용제 화합물 ID: 170026 화합물을 유효성분으로 포함하는 제2형 당뇨병 치료용 약학 조성물을 제공하며, 상기 조성물은 제2형 당뇨병을 치료하는데 유용하게 사용될 수 있다.

대표도 - 도2



(72) 발명자

**안진희**

대전광역시 유성구 유성대로 1741, 109-804 (전민동, 세종아파트)

**최상운**

대전광역시 유성구 어은로 57, 132-104 (어은동, 한빛아파트)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 10038744

부처명 지식경제부

연구관리전문기관 한국산업기술평가관리원

연구사업명 산업융합원천기술개발사업

연구과제명 (RCMS)Drug Repositioning 기술을 이용한 신약개발 활용시스템 구축

기여율 1/1

주관기관 한국화학연구원

연구기간 2013.04.01 ~ 2014.03.31

---

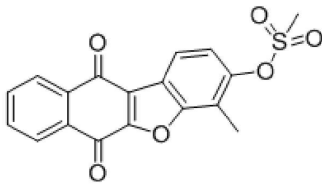
**명세서**

**청구범위**

**청구항 1**

하기 화학식 I로 표시되는 화합물 또는 이의 약학적으로 허용되는 염을 유효성분으로 포함하는 당뇨병 치료용 약학 조성물.

<화학식 I>



**청구항 2**

제 1항에 있어서,

상기 화학식 I로 표시되는 화합물 또는 이의 약학적으로 허용되는 염이 글루카곤 유사 펩티드-1 수용체 (Glucagon like peptide-1 receptor, GLP-1R)를 활성을 증가시키는 비펩티드성 작용제인 것을 특징으로 하는 당뇨병 치료용 약학 조성물.

**청구항 3**

제 1항에 있어서,

상기 화학식 I로 표시되는 화합물 또는 이의 약학적으로 허용되는 염이 0.1 내지 10 μM의 양으로 포함되는 것을 특징으로 하는 당뇨병 치료용 약학 조성물.

**청구항 4**

제 1항에 있어서,

상기 당뇨병은 제2형 당뇨병인 것을 특징으로 하는 당뇨병 치료용 약학 조성물.

**발명의 설명**

**기술분야**

[0001]

본 발명은 비펩티드성의 글루카곤 유사 펩티드-1 수용체(GLP-1R) 작용제 화합물을 유효성분으로 포함하는 제2형 당뇨병 치료용 약학 조성물 및 이를 이용한 2형 당뇨병 치료방법에 관한 것이다.

**배경기술**

[0002]

인슐린은 췌장의 베타세포에서 분비되는 펩티드로서 체내의 혈당을 조절하는데 매우 중요한 역할을 담당하는 물질이다. 이러한 인슐린의 분비량이 부족하거나 정상적인 기능이 이루어지지 않아 혈중 포도당의 농도가 높아지

는 대사질환을 당뇨병이라 한다. 췌장에서 인슐린을 분비하지 못하여 혈당이 상승하는 경우를 제1형 당뇨병이라 하고, 이를 치료하기 위해서는 인슐린의 투여가 필수적으로 요구된다.

[0003] 반면, 인슐린 분비가 제대로 되지 않거나 분비된 인슐린이 제대로 작용하지 못하여 체내의 혈당이 조절되지 못하고 상승하는 경우를 제2형 당뇨병이라 하고, 화학물질을 주성분으로 하는 경구용 혈당 강하제를 이용하여 치료한다.

[0004] 당뇨병 치료에 있어서 정상 혈당에 가까운 엄격한 혈당의 조절은 당뇨병으로 인해 발생하는 다양한 합병증 예방에 중요하다는 것은 이미 대규모 임상연구를 통해 잘 알려져 있다.

[0005] 강력하게 인슐린분비를 자극하여 혈당을 낮출 수 있는 후보 화합물로 글루카곤 유사 펩티드-1 (Glucagon like peptide-1, GLP-1)이라는 호르몬이 있다. GLP-1은 회장과 대장의 L-세포에서 분비되는 인크레틴(incrutin) 호르몬으로 1985년 처음 발견되었다. GLP-1은 GLP-1R(glucagon like peptide-1 Receptor)이라는 수용체를 증가시켜 인슐린 분비를 증가시킨다. GLP-1R은 흡수되는 영양분 또는 혈당 농도에 자극을 받아 분비된다. GLP-1을 이용한 당뇨병 치료는 포도당 농도에 따라 인슐린 분비가 되기 때문에 저혈당이 일어나지 않는 장점이 있다. 또한, 이 호르몬은 상부 소화기관의 운동저하, 식욕억제 등의 작용이 있고 기존에 존재하는 췌장의 베타세포를 증식시킬 수도 있다고 알려져 있다.

[0006] 이러한 특징으로 제2형 당뇨병의 치료방법으로 적용되나, 혈중 반감기가 2분에 지나지 않아 약제로 개발하는 데는 많은 장애가 있었던 후보 화합물이었다. 작용시간이 짧아서 문제가 되던 GLP-1의 단점을 극복하기 위해 최근 혈중에 GLP-1을 파괴하는 Dipeptidyl Peptidase IV (DPP-IV)라는 효소에 대해 저항성을 갖는 GLP-1 유사체와 DPP-IV 억제제라는 두 가지 방법으로 치료제를 개발하여 왔다(Oh, S. J. "Glucagon-like Peptide-1 Analogue and Dipeptidyl Peptidase-IV Inhibitors" 대한내분비학회지 Vol. 21(6), pp. 437-447, 2006; Holst, J. J. "Glucagon like peptide 1: a newly discovered gastrointestinal hormone" Gastroenterology Vol. 107, pp. 1848-1855, 1994).

[0007] GLP-1 이외의 인슐린 분비 펩티드 중 엑센딘(exendin)은 아리조나와 북멕시코 내생의 파충류인 멕시코산 구슬도마뱀 및 아메리카 독도마뱀의 타액 분비물에서 발견된 펩티드이다. 엑센딘-3은 헤로더모 호리듬(Heloderma horridum)의 타액 분비물에 존재하고, 엑센딘-4는 헬로더머 서스펙툼의 타액 분비물에 존재하는 것으로 GLP-1 서열과 높은 상동성을 나타낸다(Goke et al., J. Biol. Chem. Vol. 268, pp. 19650-19655, 1993). 약리학적 연구보고서에는 엑센딘-4가 특성의 인슐린 분비성 세포 상의 GLP-1 수용체, 기니아 피그 췌장으로부터의 분산된 포도상선 세포 및 위벽 세포에서 작용할 수 있다고 언급되어 있으며, 이러한 펩티드는 소마토스타틴 방출을 자극하고 분리된 위에서의 가스트린 방출을 억제하는 것으로 보고되었다.

[0008] 최근에는 GLP-1R을 활성화시키는 작용제(아고니스트)를 발굴하여 당뇨병 치료제 후보물질로 사용하고자 하는 연구가 진행되고 있으며, 주로 펩티드성의 GLP-1R 작용제에 대한 연구가 많으나, 일부 비펩티드성의 GLP-1R 작용제인 Boc5(cyclobutane derivative), Compound-2(quinoxaline derivative)에 대한 연구도 진행되고 있다(Chen, D. et al., "A nonpeptidic agonist of glucagon-like peptide 1 receptors with efficacy in diabetic db/db mice" PNAS Vol. 104(3), pp. 943-948, 2007; Wang, M.-W. et al. "Non-peptidic glucagon-like peptide 1 receptor agonist: aftermath of serendipitous discovery" Acta Pharmacologica Sinica Vol. 31, pp. 1026-1030, 2010).

[0009] 최근 우리나라에서도 문호상 등이 인간 및 쥐의 GLP-1 수용체를 선택적으로 자극할 수 있는 새로운 저분자 화합물인 DA-15864가 당뇨병과 비만을 치료하기 위하여 경구 투여가 가능한 GLP-1 수용체 작용제라고 보고한 바 있다(Moon, H.-S. et al., "The development of non-peptide glucagon-like peptide 1 receptor agonist for the treatment of type 2 diabetes" Arch. Pharm. Res. Vol. 34(7), pp. 1041-1043, 2011)

[0010] 본 발명에서는 다양한 후보물질로부터 GLP-1 수용체의 활성을 증가시키는 효과가 우수한 새로운 비펩티드성 작용제 화합물을 스크리닝하고, 이를 베타세포에 처리했을 때 인슐린 분비가 증가함을 밝힘으로써 이 작용제 화합물을 유효성분으로 포함하는 제2형 당뇨병 치료용 약학 조성물 및 이를 이용한 제2형 당뇨병 치료방법을 개발하였다.

**선행기술문헌**

**특허문헌**

- [0011] (특허문헌 0001) KR 10-2008-0060685 A (2008. 7. 2. 공개)
- (특허문헌 0002) KR 10-2009-0008151 A (2009. 1. 21. 공개)
- (특허문헌 0003) WO 2006/126688 A1 (2006. 11. 30. 공개)

**비특허문헌**

- [0012] (비특허문헌 0001) Chen, D. et al., "A nonpeptidic agonist of glucagon-like peptide 1 receptors with efficacy in diabetic db/db mice" PNAS Vol. 104(3), pp. 943-948, 2007.
- (비특허문헌 0002) Wang, M.-W. et al. "Non-peptidic glucagon-like peptide 1 receptor agonist: aftermath of serendipitous discovery" Acta Pharmacologica Sinica Vol. 31, pp. 1026-1030, 2010.
- (비특허문헌 0003) Moon, H.-S. et al., "The development of non-peptide glucagon-like peptide 1 receptor agonist for the treatment of type 2 diabetes" Arch. Pharm. Res. Vol. 34(7), pp. 1041-1043, 2011.

**발명의 내용**

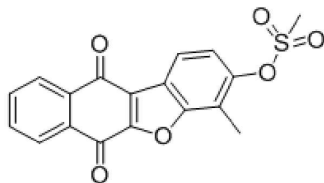
**해결하려는 과제**

- [0013] 본 발명에서는 다양한 후보물질로부터 GLP-1 수용체의 활성을 증가시키는 효과가 우수한 새로운 비펩티드성 작용제 화합물을 스크리닝하고, 이를 베타세포에 처리했을 때 인슐린 분비가 증가함을 밝힘으로써 이 작용제 화합물을 유효성분으로 포함하는 제2형 당뇨병 치료용 약학 조성물 및 이를 이용한 제2형 당뇨병 치료방법을 제공하는 것을 목적으로 한다.

**과제의 해결 수단**

- [0014] 위와 같은 발명의 목적을 달성하기 위하여 본 발명에서는 다양한 후보물질로부터 GLP-1 수용체의 활성을 증가시키는 효과가 우수한 새로운 비펩티드성 작용제 화합물을 스크리닝하고, 하기의 화학식 I로 표시되는 ID: 170026 화합물을 베타세포에 처리했을 때 인슐린 분비가 증가시켜 제2형 당뇨병 치료 효과를 밝힘으로써 본 발명을 완성하였다.

- [0015] <화학식 I>



- [0016]

**발명의 효과**

- [0017] 본 발명에서는 GLP-1 수용체의 활성을 증가시키는 효과가 우수한 상기 화학식 I로 표시되는 새로운 비펩티드성 작용제 화합물을 유효성분으로 포함하는 제2형 당뇨병 치료용 약학 조성물을 제공하고자 한다. 상기 약학 조성물은 제2형 당뇨병을 효율적으로 치료하는데 사용될 수 있다.

**도면의 간단한 설명**

[0018] 도 1은 Luciferase activity 측정을 통하여 ID: 170026 화합물과 엑센딘-4의 GLP-1 수용체 활성을 증가시키는 작용제로서의 활성을 비교한 데이터를 보여주고 있다.

도 2는 베타세포에 스크리닝된 2종의 새로운 GLP-1 수용체 작용제를 처리하였을 때 분비되는 인슐린의 양을 측정된 결과를 보여주고 있다. 새로운 작용제 화합물인 ID: 170026 화합물이 가장 높은 인슐린 분비 효과를 보이고 있다.

**발명을 실시하기 위한 구체적인 내용**

[0019] 이하, 본 발명을 구체적인 실시예에 의해 보다 상세히 설명하고자 한다. 하지만, 본 발명은 하기 실시예에 의해 한정되는 것은 아니며, 본 발명의 아이디어와 범위 내에서 여러 가지 변형 또는 수정할 수 있음은 이 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 자명한 것이다.

[0020] 본 명세서에서 사용되는 용어 “베타세포”는 췌장 유래의 베타세포를 의미한다. 또한, 본 명세서에서 사용되는 용어 “치료”는 제2형 당뇨병을 보유하고 있는 인간의 질병 상태를 개선하는 것을 의미한다.

[0021] 본 발명에 따른 상기 화학식 I의 화합물은 약학적으로 허용되는 염의 형태로 사용될 수 있으며, 이러한 염은 본 기술분야에서 알려진 통상의 방법을 통하여 화학식 I의 화합물로부터 제조할 수 있다.

[0022] 본 발명에 따른 제2형 당뇨병 치료용 약학 조성물은 화학식 I로 표시되는 화합물 또는 이의 염을 0.01 내지 50 μM, 바람직하게는 0.1 내지 10 μM의 양으로 포함할 수 있으나, 이에 제한되지는 않는다.

[0023] 본 발명에 따른 약학 조성물은 베타세포에서 인슐린의 분비를 증가시킴으로써 제2형 당뇨병에 대한 치료 용도를 갖는다

[0024] 본 발명에 따른 약학 조성물은 상기 유효성분 이외에 약학적으로 허용가능한 첨가제를 추가로 포함할 수 있으며, 약학 분야에서의 통상적인 방법에 따라 환자의 신체 내 투여에 적합한 단위 투여형의 제제로 제형화될 수 있다. 이러한 목적에 적합한 제형으로는 비경구투여 제제로서 주사용 용액 또는 현탁액, 또는 주사시에 주사용 증류수로 제조하여 사용할 수 있는 즉시 사용형 주사용 건조분말 등의 주사용 제제, 또는 연고제 등의 국소 투여용 제제 등이 바람직하다. 이때 일반적으로 사용되는 충전제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 함께 사용할 수 있다.

[0025] 상기 화학식 I로 표시되는 화합물 또는 이의 염의 1일 투여량은 1 내지 1,000 mg/kg 체중, 바람직하게는 100 mg/kg 체중이며, 바람직하게는 1회 또는 수회로 나누어 투여할 수 있다. 그러나 유효성분의 실제 투여량은 치료할 질환, 투여경로, 환자의 체중, 연령 및 성별 등 여러 관련 인자를 고려하여 결정할 수 있다. 따라서 상기 투여량은 어떠한 형태로든 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다.

[0026] 이하 실시예에서는 다양한 후보 화합물 중에서 스크리닝된 GLP-1 수용체의 활성을 증가시키는 효과가 우수한 상기 화학식 I로 표시되는 새로운 비펩티드성 작용제 화합물인 ID: 170026 화합물의 베타세포에서의 인슐린 분비 효과를 보여준다. 상기 화학식 I로 표시되는 화합물을 유효성분으로 포함하는 약학 조성물이 제2형 당뇨병의 치료에 효과적으로 사용될 수 있음을 이 기술분야에 있어서 통상의 지식을 가진 자에게 자명한 사항이다.

[0027] [실시예 1]

**[0028] GLP-1 수용체의 활성을 증가시키는 작용제의 스크리닝**

[0029] 1. 작용제 스크리닝을 위한 세포배양

[0030] CHO-K1 세포에 GLP-1 수용체를 삽입한 CHO-K1-GLP-1R 세포주를 확립하였다. 세포는 세포증식을 위해 10% 우태아

혈청 (fetal bovine serum, Gibco/16000-044), penicillin 100 IU/ml, streptomycin 100 µg/ml(PenStep, gibco, 15140-122), glutamine 2 mM이 포함된 RPMI1640 배지를 사용하여 3일마다 계대를 하며 배양하였고, 50 µg/ml G418(A.G. scientific, G-1033), 50 µg/ml hygromycin B(invitrogen, 10687-010)를 추가로 넣어주었다. GLP-1R 작용제 스크리닝을 위해 96 well plate(SPL, 30196)에 well 당  $4 \times 10^4$  세포를 넣어주어 24시간 배양 후 스크리닝에 사용하였다.

[0031] 2. 대상 후보물질

[0032] GLP-1 수용체의 활성을 증가시키는 작용제 화합물의 후보군으로는 한국화학물은행에서 대표 화합물 6,000종을 분양받아 이를 대상으로 하였다.

[0033] 3. GLP-1 수용체의 활성을 증가시키는 작용제의 스크리닝

[0034] 실험에 사용할 후보 화합물을 DMSO(sigma, D2650)에 10 mM의 농도로 녹이고, 대조군 화합물로 엑센딘-4를 2 µM의 농도로 녹여 준비해 놓는다. RPMI 1640 without phenol red(Welgene, LM011-02)에 후보 화합물과 대조군 화합물을 1/1000 희석하여 100 µl를 추가로 넣어 세포를 6시간 배양시킨다. 정확도를 위해 화합물 1개당 2개의 well로 반복 실험한다. 6시간 배양이 끝난 후, 상등 배양액을 모두 제거한 후 Reporter Lysis 5x buffer를 증류수에 1x로 희석 후 상등 배양액이 모두 제거된 세포에 50 µl씩 처리하여 세포를 용해시켜 70°C에 하루 보관한다.

[0035] Luciferase activity를 측정하기 위해 Luminometer (Molecular Device)에 Luciferase assay substrate 50 µl씩 들어가도록 설정 후 측정하였다. 그 결과 활성이 우수한 화합물을 선별하였다. 그 화합물은 ID: 170026 화합물이다. 도 1은 ID: 170026 화합물과 엑센딘-4의 GLP-1 수용체 활성을 증가시키는 작용제로서의 활성을 비교한 데이터를 보여주고 있다.

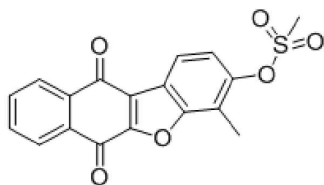
[0036] [실시에 2]

[0037] **후보 화합물의 인슐린 분비 효과**

[0038] 1. GLP-1 수용체 작용제 ID: 170026 화합물

[0039] GLP-1 수용체의 활성을 증가시키는 우수한 작용제 효과를 보인 ID: 170026 화합물의 구조는 아래 화학식 I과 같다.

[0040] <화학식 I>



[0041] 2. 후보 화합물의 인슐린 분비 효과

[0042] 상기 실시예 1에서 선별한 화합물이 인슐린을 얼마나 생산하는지 양을 측정하기 위해 Glucose stimulated insulin secretion (GSIS) 측정 실험을 추가적으로 실시하였다.

[0043] 베타 TC6 세포(βTC6 cell)을 15% 우태아 혈청 (fetal bovine serum, Gibco/16000-044)과 0.0005% β-mercaptoethanol(sigma, M7522)이 포함된 RPMI1640 배양액에서 배양하였다. 실험을 위해 96 well plate(BD falcon, 353072)에 well 당  $5 \times 10^4$  세포를 넣어주어 24시간 배양 후 사용하였다. 배양 후 현미경으로 베타 TC6 세포가 96 well plate 바닥에 붙어 잘 자랐는지 확인 후 기존 배지를 버리고, 37°C로 데운 Krebs Buffer(NaCl 119 mM, KCl 4.74 mM, CaCl<sub>2</sub> 2.54 mM, MgCl<sub>2</sub> 1.19 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.19 mM, NaHCO<sub>3</sub> 25 mM, HEPES 10 mM, BSA 0.5%, pH 7.2) 200 µl를 조심스럽게 넣어주고 버리고를 2번 반복하여 기존 배지를 완전히 제거해준다. Krebs Buffer 200 µl를 넣고 4시간 배양시킨다. 4시간 후 기존 Krebs buffer를 제거하고 새로운 Krebs buffer 200 µl를 넣

어주고 버리고를 2번 반복한다. 10 mM로 DMSO에 녹인 후보 화합물을 Krebs buffer에 1/1000 희석하여 200  $\mu$ l 를 넣어준 후 1시간 배양시킨다. 상등액 150  $\mu$ l 취하여 70°C에 보관하거나 바로 하단의 ELISA 방법을 통해 인슐린의 양을 정량한다.

[0045] Mouse Insulin ELISA kit(shibayagi, AKRIN-011T)를 사용하여 베타 TC6 세포에서 후보 화합물에 의해 분비된 인슐린의 양을 다음과 같은 방법으로 측정하였다.

[0046] Washing buffer concentrate(10x)를 증류수에 1/10 희석하여 1x로 만들어 모든 washing 과정에 사용하였다. Anti-insulin-coated plate의 내용물을 버리고 Washing buffer concentrate(1x) 300  $\mu$ l 넣고 모두 제거하고를 4번 반복한다. Buffer solution에 Biotin conjugated anti-insulin을 1/4000으로 희석하여 100  $\mu$ l씩 넣어 준다. Standard mouse insulin solution(200ng/ml)을 Buffer solution에 희석하여 10ng/ml, 5ng/ml, 2.5ng/ml, 1.25ng/ml, 0.625ng/ml, 0.313ng/ml 만들고 Buffer solution만 넣어주는 것을 blank로 삼아 10  $\mu$ l씩 넣어주고 시료를 Buffer solution에 1/10 희석하여 10  $\mu$ l씩 넣어 상온에서 2시간 반응시킨다. 안에 있는 내용물을 버리고 Washing buffer concentrate(1x) 300  $\mu$ l 넣고 모두 제거하고를 4번 반복한다. HRP conjugated streptavidin을 Buffer solution에 1/2000으로 희석하여 100  $\mu$ l씩 넣어준 후 상온에서 2시간 반응시킨다. 안에 있는 내용물을 버리고 Washing buffer concentrate(1x) 300  $\mu$ l 넣고 모두 제거하고를 4번 반복한다. Substrate chromogen reagent(TMB) 100  $\mu$ l씩 넣어준 후 빛을 차광하여 상온에서 30분 반응시킨다. Reaction stopper(1M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>)를 추가 100  $\mu$ l씩 넣어주어 노란색으로 바뀌는 것을 확인하고 30분 이내에 450nm 흡광도를 측정한다.

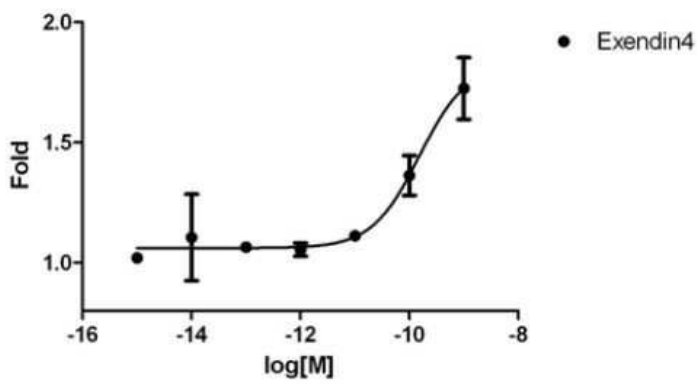
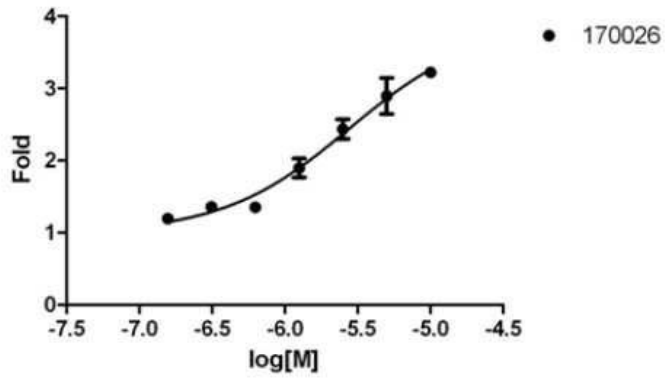
[0047] 도 2는 베타 TC6 세포에 상시 실시예 1에서 스크리닝된 후보 화합물을 처리하였을 때 인슐린의 분비가 증가한 효과를 보여주고 있다. ID: 170026 화합물이 가장 높은 인슐린 분비 효과를 보이는 것을 알 수 있다.

[0048] 상기 결과로부터 본 발명의 화학식 I로 표시되는 ID: 170026 화합물이 베타세포에서 인슐린 분비를 증가시키는 효과가 있음을 알 수 있었다. 또한, 상기 결과는 본 발명에 따른 화학식 I의 ID: 170026 화합물이 제2형 당뇨병을 치료하는데 효과적이라는 것을 입증한다.



도면

도면1



도면2

GSIS assay  
(2014.02.19)

