(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2025-0046293
(43) 공개일자 2025년04월02일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 14/605 (2006.01) *A61K 38/26* (2006.01)
A61P 3/08 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C07K 14/605 (2013.01)
A61K 38/26 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2025-7006821
(22) 출원일자(국제) 2023년08월02일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2025년02월28일
(86) 국제출원번호 PCT/US2023/071477
(87) 국제공개번호 WO 2024/030934
국제공개일자 2024년02월08일
(30) 우선권주장
63/395,783 2022년08월05일 미국(US)

(71) 출원인
인디애나 유니버시티 리서치 앤드 테크놀로지 코퍼레이션
미국, 인디애나 47405, 블루밍턴, 107 에스 인디애나 애비뉴
(72) 발명자
디마르치 리차드 디
미국 인디애나 46033 카멜 윌밍턴 드라이브 10890
므로즈 피오트르 안드르제이
미국 인디애나 47403 블루밍턴 사우스 페이퍼 버치 코트 1207
탈루리 키쇼어
미국 인디애나 47403 블루밍턴 웨스트 체리 오차드 코트 4303
(74) 대리인
김진희, 신윤숙, 이원천, 김태홍

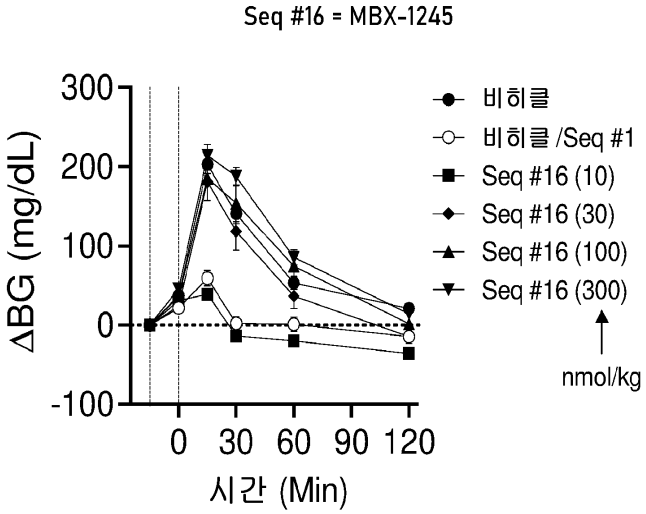
전체 청구항 수 : 총 21 항

(54) 발명의 명칭 **글루카곤 유사 펩타이드-1 수용체 길항물질**

(57) 요 약

글루카곤 유사 펩타이드-1(GLP-1)은 인간의 혈당 수준을 조절하는 데 중요한 역할을 한다. 이의 작용에는 인슐린 합성 및 분비 자극, 글루카곤 분비 억제, 및 음식 섭취 억제가 포함된다. 본원에는 저혈당증 치료를 위한 GLP-1 수용체 길항물질 펩타이드와 약학 조성물이 제공된다. 또한, 본원에는 비만 수술 후 고인슐린혈증이 된 환자를 포함하여 고인슐린혈증이 된 환자에서 비정형 저혈당증을 치료하는 방법이 제공된다.

대 표 도 - 도1



(52) CPC특허분류
A61P 3/08 (2018.01)

명 세 서

청구범위

청구항 1

GLP-1 수용체 길항물질로서, 상기 길항물질은

R_{10}-DV$X_{11}X_{12}$YL$X_{15}X_{16}$QA$X_{19}X_{20}$EF$X_{23}X_{24}$WLVRGGPSSGAPPPS-R_{20}(서열 번호 97)의 아미노산 서열을 포함하고, 여기서

R_{10}은 GLP-1 길항물질 아미노산 서열의 N 말단 알파 아민에 공유 결합되는 C14-C20 지방산 또는 이산이고;

X_{11}은 Trp, dTrp 또는 Ser이고;

X_{12}는 Arg, 또는 Ser이고;

X_{15}는 Glu 또는 dGlu이고;

X_{16}은 Glu, dGlu, Asp, 호모글루탐산 또는 호모시스테인산이고;

X_{19}는 Val, 사이클로프로판, 사이클로펜탄, 사이클로헥산 또는 페닐 글리신이고;

X_{20}은 Arg, 호모리신 또는 시트룰린이고;

X_{23}은 Ile, 또는 dIle이고;

X_{24}는 Glu, 또는 Ala이고;

R_{20}은 COOH 또는 $CONH_2$이고, 선택적으로 천연 Exendin4(서열 번호 1)의 넘버링을 기초로 위치 16, 18, 19, 24, 26, 또는 28 중 임의의 위치에서의 1개, 2개 또는 3개의 아미노산이 Aib로 치환되는 것인 GLP-1 수용체 길항물질.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 길항물질은

R_{10}-DV$X_{11}X_{12}$YL$X_{15}X_{16}$QA$X_{19}X_{20}$EFX_{23}EWLVRGGPSSGAPPPS-R_{20}(서열 번호 99)의 아미노산 서열을 포함하고, 여기서

R_{10}은 GLP-1 길항물질 아미노산 서열의 N 말단 알파 아민에 공유 결합되는 C14-C20 지방산 또는 이산이고;

X_{11}은 Trp, dTrp 또는 Ser이고;

X_{12}는 Arg 또는 Ser이고;

X_{15}는 Glu 또는 dGlu이고;

X_{16}은 Glu, dGlu, Asp, 호모글루탐산 또는 호모시스테인산이고;

X_{19}는 Val이고;

X_{20}은 Arg, 호모리신 또는 시트룰린이고;

X_{23}은 Ile, 또는 dIle이고;

R_{20}은 COOH 또는 $CONH_2$이고, 선택적으로 천연 Exendin4(서열 번호 1)의 넘버링을 기초로 위치 16, 18, 19, 24, 26, 또는 28 중 임의의 위치에서의 1개, 2개 또는 3개의 아미노산이 Aib로 치환되는 것인 GLP-1 길항물질.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서,

R_{10}은 $-CO(CH_2)_{14-20}CH_3$ 또는 $-CO(CH_2)_{14-20}COOH$이고;

X_{11}은 Trp, dTrp 또는 Ser이고;

X_{12}는 Ser이고;

X_{15}는 Glu 또는 dGlu이고;

X_{16}은 Glu 또는 dGlu이고;

X_{19}는 Val이고;

X_{20}은 Arg이고;

X_{23}은 Ile 또는 dIle이고;

R_{20}은 COOH인 GLP-1 길항물질.

청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, R_{10}은 GLP-1 길항물질 아미노산 서열의 N 말단 알파 아민에 공유 결합되는 $-CO(CH_2)_{16-18}COOH$인 GLP-1 길항물질.

청구항 5

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 천연 Exendin4(서열 번호 1)의 넘버링을 기초로 위치 16, 18, 19, 24, 26 또는 28에서의 아미노산이 Aib로 치환되는 것인 GLP-1 길항물질.

청구항 6

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서, 1개 내지 3개의 아미노산의 C 말단 연장을 추가로 포함하고, 선택적으로 상기 C 말단 연장의 아미노산 중 하나는 아실화된 아미노산, 선택적으로 아실화된 Lys를 포함하는 것인 GLP-1 길항물질.

청구항 7

GLP-1 수용체 길항물질로서, 상기 길항물질은

R_{10}-D$X_{10}X_{11}X_{12}$YL$X_{15}X_{16}$QAVREF$X_{23}X_{24}$WLVRGGPSSGAPPPS-R_{20}(서열 번호 98)의 아미노산 서열을 포함하고; 여기서

R_{10}은 GLP-1 길항물질 아미노산 서열의 N 말단 알파 아민에 공유 결합되는 C14-C20 지방산 또는 이산이고;

X_{10}은 Trp, dTrp 또는 Val이고;

X_{11}은 Trp, dTrp 또는 Ser이고;

X_{12}는 Arg, Lys 또는 Ser이고;

X_{15}는 Glu 또는 dGlu이고;

X_{16}은 Trp, dTrp, dGlu 또는 Glu이고;

X_{23}은 Ile 또는 dIle이고;

X_{24}는 Ala 또는 Glu이고;

R_{20}은 COOH 또는 $CONH_2$인 GLP-1 수용체 길항물질.

청구항 8

제7항에 있어서,

R_{10}은 GLP-1 수용체 길항물질의 N 말단 알파 아민에 연결되는 $-CO(CH_2)_{14-20}CH_3$ 또는 $-CO(CH_2)_{14-20}COOH$이고;

X_{10}은 Trp, dTrp 또는 Val이고;

X_{11}은 Trp, dTrp 또는 Ser이고;

X_{12}는 Arg, Lys 또는 Ser이고;

X_{15}는 Glu 또는 dGlu이고;

X_{16}은 Trp, dTrp, dGlu 또는 Glu이고;

X_{23}은 Ile 또는 dIle이고;

X_{24}는 Ala 또는 Glu인 GLP-1 수용체 길항물질.

청구항 9

GLP-1 수용체 길항물질로서, 상기 길항물질은

R_{10}-DVSSYLEEQAVREFIAWLVKGGPSSGAPPPS-R_{20}(서열 번호 3)의 아미노산 서열, 또는 GLP-1 작용물질 활성을 가지면서 1개, 2개 또는 3개의 아미노산 치환에 의해 서열 번호 3과 상이한 아미노산 서열

을 포함하고,

R_{10}은 GLP-1 수용체 길항물질의 N 말단 알파 아민에 결합되는 $-CO(CH_2)_{14-20}CH_3$ 또는 $-CO(CH_2)_{14-20}COOH$이고;

R_{20}은 COOH 또는 $CONH_2$인 GLP-1 수용체 길항물질.

청구항 10

제9항에 있어서, 상기 GLP-1 수용체 길항물질은 위치 16, 18, 19, 24, 26 또는 28 중 임의의 조합에서의 Aib의 1개 내지 3개의 치환을 포함하고, 상기 위치 번호는 천연 Exendin4 아미노산 서열에 대한 것인 GLP-1 수용체 길항물질.

청구항 11

제9항 또는 제10항에 있어서,

R_{10}은 $-CO(CH_2)_{14-20}COOH$이고;

R_{20}은 COOH인 GLP-1 수용체 길항물질.

청구항 12

제7항 내지 제11항 중 어느 한 항에 있어서, X_{11}은 Trp 또는 dTrp인 GLP-1 길항물질.

청구항 13

제7항 내지 제12항 중 어느 한 항에 있어서, 위치 16, 18, 19, 24, 26 또는 28에서의 아미노산이 Aib로 치환되는 것인 GLP-1 길항물질.

청구항 14

제9항 내지 제13항 중 어느 한 항에 있어서,

X_{15}는 dGlu이고;

X_{16}은 Glu이고;

X_{23}은 Ile인 GLP-1 길항물질.

청구항 15

제9항 내지 제13항 중 어느 한 항에 있어서,

X_{15}는 Glu이고;

X_{16}은 Glu이고;

X_{23}은 Ile인 GLP-1 길항물질.

청구항 16

제9항 내지 제15항 중 어느 한 항에 있어서, 선택적으로 스페이서를 통해, 아미노산의 측쇄에 연결된 아실 기를 갖는 아미노산의 C 말단 연장을 추가로 포함하는 GLP-1 길항물질.

청구항 17

제16항에 있어서, 상기 아실화된 아미노산은 아실화된 리신인 GLP-1 길항물질.

청구항 18

제16항 또는 제17항에 있어서, 아실화된 아미노산의 아실 기는 스페이서를 통해 아실화된 아미노산의 아미노산 측쇄에 공유 결합되고, 선택적으로 스페이서는

i) 감마 글루탐산,

ii) 미니페그 중합체: $-[COCH_2(OCH_2CH_2)_kNH]-$, 여기서 k는 2, 4, 6 또는 8임, 또는

iii) i) 및/또는 ii)의 임의의 다수 또는 조합

을 포함하는 것인 GLP-1 길항물질.

청구항 19

제9항 내지 제18항 중 어느 한 항에 있어서, R_{20}은 $CONH_2$인 GLP-1 길항물질.

청구항 20

제1항 내지 제19항 중 어느 하나의 항의 GLP-1 길항물질 및 약학적으로 허용 가능한 담체, 희석제, 또는 부형제를 포함하는 약학 조성물.

청구항 21

비정형 저혈당증(atypical hypoglycemia)을 앓고 있는 환자를 치료하는 방법으로서, 상기 방법은 이를 필요로 하는 환자에게 제20항의 약학 조성물을 혈당 수준을 상승시키기에 효과적인 양으로 투여하는 단계를 포함하는, 방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 관련 출원에 대한 상호 참조

[0002] 본 출원은 2022년 8월 5일에 출원된 미국 가특허 출원 번호 63/395,783의 우선권을 주장하며, 이의 개시내용은 본원에 분명하게 포함된다.

[0003] 전자적으로 제출된 자료의 참조에 의한 포함

[0004] 본 출원에는 XML 파일 형식으로 전자적으로 제출된 서열 목록이 포함되어 있으며, 이는 그 전문이 본원에 참조로 포함된다. 2023년 8월 1일에 생성된 해당 XML 사본은 32993-392613_SL.xml이라는 이름이며 크기는 281 킬로바이트이다.

배 경 기 술

[0005] 글루카곤 유사 펩타이드-1(GLP-1)은 인간에서 혈당 수준을 조절하는데 중요한 역할을 한다. 그것의 작용에는 인슐린 합성 및 분비의 자극, 글루카곤 분비의 억제, 및 식품 흡수의 억제가 포함된다. 정상적으로, 신체는 데시리터당 약 70 내지 110 밀리그램(mg/dL) 또는 리터당 3.9 내지 6.1 밀리몰(mmol/L) 범위 내로 혈중 글루코스 농도를 유지한다. 그러나, 글루코스 수준이 너무 낮아져서 저혈당증(hypoglycemia)으로 이어지는 상태가 발생할 수 있다. 저혈당증은 당뇨병을 제어하기 위해 복용한 약물에 의해 가장 자주 유발된다. 저혈당증의 훨씬 더 흔하지 않은 원인은 본원에서 "비정형 저혈당증(atypical hypoglycemia)"으로서 언급되며, 외인성 인슐린 투여와 무관하게 발생할 수 있다.

[0006] 비정형 저혈당증은 알코올이 간에서 글루코스의 형성을 차단할 수 있기 때문에 식사 없이 과음하는 사람들에게서 발생할 수 있다. 더불어, 진행된 간 질환, 예컨대 바이러스성 간염, 간경변, 또는 간의 암을 가진 사람은 충분한 글루코스를 저장하고 생산하지 못할 수 있다. 비정형 저혈당증은 또한 고인슐린혈증성(hyperinsulinemic)으로 만드는 선천적 돌연변이가 있는 영유아를 초래할 수 있다.

[0007] 보다 최근에, 지난 10년 동안 비정형 저혈당증이 극단적인 형태의 비만을 되돌릴 목적으로 수행된 수술 절차 후에 발생할 수 있는 합병증이라는 인식이 높아졌다. Roux-en-Y 위 우회술(RYGB) 수술을 받은 일부 환자(10% 미만)는 후속해서 고인슐린혈증성 저혈당증이 발생하며, 이 경우 혈당 농도가 발작, 정신 상태 변화, 의식 상실, 인지 장애, 무능력, 및 사망을 유발할 만큼 충분히 낮아질 수 있다(20-40 mg/dL).

[0008] 고인슐린혈증성 유도 저혈당증을 치료하는 한 가지 접근법은 GLP-1 수용체 길항물질을 투여하는 것이다. 그러한 펩타이드 길항물질은 부적절하게 상승된 농도의 혈장 GLP-1이 인슐린 분비를 자극하는 능력을 차단하고, 비정형 저혈당증을 겪고 있는 환자에서 혈장 글루코스를 정상화하고 인지 손상, 혈관 질환 및 잠재적으로 급사의 위험을 감소시키는 기능을 한다.

[0009] 엑센딘(Exendin)-4(서열 번호 1)는 글루카곤 유사 펩타이드 1(GLP-1) 수용체의 39개 아미노산 작용물질이다. 엑센딘-4는 길라 몬스터인 헬로더마 서스펙텀(*Heloderma suspectum*)의 타액에 존재한다. Ex-4(9-39)a(서열 번호 2)는 GLP-1 수용체 길항물질로서 기능하는 것으로 알려져 있는 엑센딘-4의 N 말단 절단 유도체이다. 그러나, Ex-4(9-39)a는 만성 비정형 저혈당증을 치료하기 위한 잠재적 사용과 관련하여 2가지의 주목할만한 한계: 비인간 아미노산 서열, 및 상대적으로 짧은 생체내 작용 기간의 문제를 갖고 있다.

[0010] 본 개시의 한 구현예에 따르면 신규한 최적화된 GLP-1 길항물질 세트가 비만 수술 절차 후 또는 선천적 돌연변이로 인해 발생하는 고인슐린혈증성 유도 저혈당증을 포함한, 비정형 저혈당증의 치료에 약물 후보로서 사용하기 위해 제공된다.

발명의 내용

[0011] 본원에서 개시된 것과 같이 비정형 저혈당증을 겪고 잇는 환자를 치료하기 위한, 보다 구체적으로 한 구현예에서, 고인슐린혈증(hyperinsulinemia) 유도 저혈당증을 겪고 있는 환자를 치료하기 위한 조성물 및 방법이 제공된다. 한 구현예에 따르면 비만 수술 후 고인슐린혈증 유도 저혈당증을 치료하기 위한 조성물 및 방법이 제공된다. 한 구현예에서 방법은 혈당 수준을 상승시키고 저혈당증과 관련된 급성 증상 및 만성 결과를 완화시키기에 효과적인 양으로 글루카곤 유사 펩타이드-1 수용체 길항물질(GLP1RA)의 투여를 포함한다.

[0012] 한 구현예에 따르면 아미노산 서열

[0013] R_{10}-D$X_{10}X_{11}$RYL$X_{15}X_{16}$QAVREFX_{23}EWLVRGGPSSGAPPPS$X_{40}R_{20}$(서열 번호 5)을 포함하는 GLP-1 수용체 길항물질 펩타이드가 제공되고, 여기서

[0014] X_{10}은 Trp, dTrp 또는 Val이며;

[0015] X_{11}은 Trp, dTrp 또는 Ser이고;

[0016] X_{15}는 Glu 또는 dGlu이며;

[0017] X_{16}은 Trp, dTrp, dGlu 또는 Glu이고;

[0018] X_{23}은 Ile 또는 dIle이며;

[0019] X_{40}은 부재하거나 또는 아실화된 아미노산이고,

[0020] R_{10}은 NH_2, $-CO(CH_2)_{14-20}CH_3$ 또는 $-CO(CH_2)_{14-20}COOH$이고,

[0021] R_{20}은 COOH 또는 $CONH_2$이며, 선택적으로 펩타이드는 천연 Exendin4 서열(서열 번호 1)에 대해 위치 16, 18, 19, 24, 26 또는 28 중 임의의 위치에서 Aib의 하나 이상의 치환을 포함하거나, 또는 선택적으로 천연 Exendin4 서열(서열 번호 1)에 대해 위치 12에서 Lys의 치환을 포함하고, 선택적으로 단 X_{10} 또는 X_{11} 중 하나가 Trp 또는 dTrp일 때, 다른 하나는 Trp 또는 dTrp가 아니고, 선택적으로 단 X_{40}이 부재하는 경우, R_{10}은 NH_2가 아니다. 한 구현예에서 서열 번호 5의 GLP-1 수용체 길항물질이 제공되며, 여기서 X_{40}은 아실화된 Lys이며, 아실화된 Lys의 아실 기는 C16-C18 산 또는 이산이며, 선택적으로 스페이서를 통해 Lys 측쇄에 연결된다.

[0022] 한 구현예에서 GLP-1 수용체 길항물질이 제공되며, 길항물질은

[0023] R_{10}-$DX_{10}X_{11}X_{12}YLX_{15}X_{16}QAVREFX_{23}X_{24}WLVRGGPSSGAPPPS$(서열 번호 98)의 아미노산 서열을 포함하고, 여기서

[0024] X_{10}은 Trp, dTrp 또는 Val이고;

[0025] X_{11}은 Trp, dTrp 또는 Ser이고;

[0026] X_{12}는 Arg, Lys 또는 Ser이고;

[0027] X_{15}는 Glu 또는 dGlu이고;

[0028] X_{16}은 Trp, dTrp, dGlu 또는 Glu이고;

[0029] X_{23}은 Ile 또는 dIle이고;

[0030] X_{24}는 Ala 또는 Glu이고;

[0031] R_{10}은 $-CO(CH_2)_{14-20}CH_3$ 또는 $-CO(CH_2)_{14-20}COOH$이다.

[0032] 한 구현예에 따르면 GLP-1 수용체 길항물질 펩타이드가

[0033] $DVWRYLX_{15}EQAVREFIEWLVRGGPSSGAPPPSX_{40}$ R_{20}(서열 번호 96)의 아미노산 서열을 갖는 것이 제공되며, 여기서

[0034] X_{15}는 dGlu이고;

[0035] X_{40}은 아실화된 Lys이고 R_{20}은 COOH 또는 $CONH_2$이고, 아실화된 Lys의 아실 기는 C16-C18 산 또는 이산이며, 선택적으로 스페이서를 통해 Lys 측쇄에 연결된다. 한 구현예에서 스페이서는 미니페그(minipeg) 또는 감마 글루탐산 하위단위 또는 그러한 미니페그 또는 감마 Glu 분자의 임의의 다수 또는 조합을 포함한다. 한 구현예에서 서열 번호 96의 펩타이드는 예를 들어, 서열 번호 1의 천연 Exendin4 서열에 대해 위치 16, 18, 19, 24, 26 또는 28 중 하나 이상에서 아미노 아이소부티르산(Aib)으로의 치환; 또는 위치 12에서 Lys의 치환을 포함한 1, 2 또는 3개의 아미노산 치환으로 변형된다.

[0036] 한 구현예에 따르면 아미노산 서열

[0037] $DX_{10}X_{11}RYLX_{15}X_{16}QAVREFX_{23}EWLVRGGPSSGAPPPSX_{40}R_{20}$(서열 번호 5)을 포함하는 GLP-1 수용체 길항물질 펩타이드가 제공되고, 여기서

[0038] X_{10}은 Trp, dTrp 또는 Val이며;

[0039] X_{11}은 Trp, dTrp 또는 Ser이고;

[0040] X_{15}는 Glu 또는 dGlu이며;

[0041] X_{16}은 Trp, dTrp, dGlu 또는 Glu이고;

[0042] X_{23}은 Ile 또는 dIle이며;

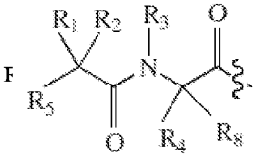
[0043] X_{40}은 아실화된 아미노산이고, R_{20}은 COOH 또는 $CONH_2$이며, 선택적으로 펩타이드는 천연 Exendin4 서열(서열 번호 1)에 대해 위치 16, 18, 19, 24, 26 또는 28 중 임의의 위치에서 Aib의 하나 이상의 치환을 포함하거나, 또는 선택적으로 서열 번호 5의 펩타이드의 N 말단은 X_7X_8에 의해 연장되고, 여기서 X_7은 아실화된 아미노산(예컨대, Lys)이며 X_8은 Gly 또는 C_1-C_3 N-알킬 Gly이고, 이때 위치 넘버링은 천연 Exendin4 서열(서열 번호 1)에 대한 것이며, 선택적으로 단 X_{10} 또는 X_{11} 중 하나가 Trp 또는 dTrp일 때, 다른 하나는 Trp 또는 dTrp이 아니다.

[0044] 한 구현예에 따르면 $DVWRYLX_{15}EQAVREFIEWLVRGGPSSGAPPPSX_{40}R_{20}$(서열 번호 96)의 아미노산 서열을 가지는 GLP-1 수용체 길항물질 펩타이드가 제공되고, 여기서

[0045] X_{15}는 dGlu이며;

[0046] X_{40}은 아실화된 Lys이고 R_{20}은 COOH 또는 $CONH_2$이며, 여기서 아실화된 Lys의 아실 기는 C16-C18 산 또는 이산이며, 선택적으로 스페이서를 통해 Lys 측쇄에 연결된다. 한 구현예에서 스페이서는 미니페그 또는 감마 글루탐산 하위단위 또는 그러한 미니페그 또는 감마 Glu 분자의 임의의 다수 또는 조합을 포함한다. 한 구현예에서 서열 번호 96의 펩타이드는 예를 들어, 서열 번호 1의 천연 Exendin4 서열에 대해 위치 16, 18, 19, 24, 26 또는 28 중 하나 이상에서 아미노 아이소부티르산(Aib)으로의 치환을 포함한 1, 2 또는 3개의 아미노산 치환으로; 또는 서열 번호 96의 N 말단에 다이펩타이드 X_7X_8의 첨가에 의해 변형되며, 여기서 X_7은 아실화된 아미노산(예컨대, Lys)이고 X_8은 Gly 또는 C_1-C_3 N-알킬 Gly이며, 이때 위치 넘버링은 천연 Exendin4 서열(서열 번호 1)에 대한 것이다.

[0047] 한 구현예에서 1 내지 3개의 아미노산이 서열 번호 5의 펩타이드 또는 그것의 유사체의 N 말단에 첨가된다. 한 구현예에서 N 말단 연장을 포함하는 아미노산 중 하나는 아실화된 아미노산이다. 한 구현예에서 N 말단 연장은 다이펩타이드인 X_7X_8이며, 여기서 X_7은 아실화된 리신이고, 선택적으로 리신은 D-입체형태이며 X_8은 임의의 아미노산이다. 한 구현예에서 N 말단 연장은 9-29 Exendin4 유사체(예컨대, 서열 번호 5의 펩타이드)의 N 말단 알파 아민에 연결되어 본 개시의 임의의 GLP-1 길항물질의 전구약물을 형성하는 자가 절단 다이펩타이드이다. GLP-1 길항물질의 전구약물 유도체를 사용하는 한 가지 장점은 그러한 접근법이 GLP-1 수용체에 의한 전구약물의 인식을 억제하는 전략을 토대로 펩타이드의 생물학적 반감기를 연장시킨다는 것이다. 한 구현예에서 전구약물 유도체는 GLP-1 길항물질에 공유 결합된 자가 절단 다이펩타이드(A-B)를 포함하고 여기서 다이펩타이드는 생리적 조건 하에 및 효소적 활성의 부재 하에 절단되어 GLP-1 길항물질에 대한 완전한 활성이 복원된다. 한 구현예에서 GLP-1 길항물질은 GLP-1 길항물질의 아민에 대한 하나 이상의 다이펩타이드(A-B)의 공유 결합에 의해 변형되며, 여기서 A는 아미노산 또는 하이드록시산이고 B는 B의 카르복실 모이어티와 GLP-1 길항물질의 아민 사이의 아미드 결합을 통해 GLP-1 길항물질에 연결된 N-알킬화된 아미노산이다. 한 구현예에서, A-B는 A-B의 카르복실과 GLP-1 길항물질의 아민 사이의 아미드 결합을 통해 GLP-1 길항물질에 연결된 구조:

[0048] 

[0049] 를 포함하고, 여기서

[0050] R_1, R_2, R_4 및 R_8은 H, C_1-C_{18} 알킬, C_2-C_{18} 알케닐, (C_1-C_{18} 알킬)OH, (C_1-C_{18} 알킬)SH, (C_2-C_3 알킬)SCH_3, (C_1-C_4 알킬)$CONH_2$, (C_1-C_4 알킬)COOH, (C_1-C_4 알킬)NH_2, (C_1-C_4 알킬)$NHC(NH_2^+)NH_2$, (C_0-C_4 알킬)(C_3-C_6 사이클로알킬),

(C_0-C_4 알킬)(C_2-C_5 헤테로고리형), (C_0-C_4 알킬)(C_6-C_{10} 아릴)R_7, (C_1-C_4 알킬)(C_3-C_9 헤테로아릴), 및 C_1-C_{12} 알킬(W1)C_1-C_{12} 알킬로 이루어진 군으로부터 독립적으로 선택되며, W1은 N, S 및 O로 이루어진 군으로부터 선택된 헤테로원자이고;

[0051] R_3은 C_1-C_{18} 알킬, (C_1-C_{18} 알킬)OH, (C_1-C_{18} 알킬)NH_2, (C_1-C_{18} 알킬)SH, (C_0-C4 알킬)(C_3-C_6)사이클로알킬, (C_0-C_4 알킬)(C_2-C_5 헤테로고리형), (C_0-C_4 알킬)(C_6-C_{10} 아릴)R_7, 및 (C_1-C_4 알킬)(C_3-C_9 헤테로아릴)로 이루어진 군으로부터 선택되거나 또는 R_4 및 R_3은 이들이 부착된 원자와 함께 피롤리딘 고리를 형성하며;

[0052] R_5는 NHR_6 또는 OH이고;

[0053] R_6은 H, C_1-C_8 알킬이고;

[0054] R_7은 H 및 OH로 이루어진 군으로부터 선택되며, 상기 GLP-1 길항물질로부터 A-B의 화학적 절단 반감기($t_{1/2}$)는 생리적 조건 하에서 PBS에서 적어도 약 1시간 내지 약 1주이다. 한 구현예에서 다이펩타이드 A-B는 GLP-1 길항물질 아미노산 서열의 N 말단 알파 아민에 공유 결합된다. 한 구현예에서 R_1은 H, C_1-C_4 알킬, (C_1-C_4 알킬)OH 또는 (C_1-C_4 알킬)NH_2이고; R_2는 H이며, R_3은 C_1-C_6 알킬이고; R_4는 H, C_1-C_4 알킬, 또는 (CH_2)(C_6 아릴)R_7이며; R_5는 NH_2이고; R_7은 H 또는 OH이며 R_8은 수소이다.

[0055] 본 개시는 또한 본원에 기술된 임의의 GLP-1 길항물질 펩타이드 및 변이 펩타이드 및 약학적으로 허용 가능한 담체, 희석제, 또는 부형제를 포함하는 약학 조성물을 제공한다. 한 구현예에서 비정형 저혈당증을 앓고 있는 환자를 치료하는 방법이 제공되며 방법은 본원에 기술된 임의의 GLP-1 길항물질 펩타이드 또는 변이 펩타이드를 포함하는 약학 조성물을 필요로 하는 환자에게 혈당 수준을 상승시키기에 효과적인 양으로 투여하는 단계를 포함한다.

[0056] 한 구현예에 따르면 비정형 저혈당증을 치료하는 방법이 본원에 제공되고 방법은 본원에 개시된 임의의 GLP-1 수용체 길항물질 펩타이드를 혈당 수준을 증가시키기에 치료적으로 충분한 양으로 투여하는 단계를 포함한다. 한 구현예에서 GLP-1 수용체 길항물질은 고친화도로 혈청 알부민에 결합하기에 충분한 크기의 지방산 또는 이산 기로 아실화된다. 한 구현예에서 방법은 아실화된 GLP-1 수용체 길항물질을 투여하는 단계를 포함하고, GLP-1 길항물질은 고친화도로 혈청 알부민에 결합하기에 충분한 크기의 지방산 또는 이산 기로 아실화된다. 한 구현예에서 GLP-1 수용체 길항물질의 N 말단 알파 아민은 아실화되고, 선택적으로 C 말단에서 제2 아실화가 이루어진다. 한 구현예에서 GLP-1 수용체 길항물질은 C 말단에서 아실화되고, 선택적으로 아실화된 아미노산은 C 말단 아미노산이고, 선택적으로 GLP-1 길항물질은 아미드 결합을 통해 자가 절단 다이펩타이드의 결합에 의해 추가로 변형되고, 선택적으로 다이펩타이드의 아미노산은 고친화도로 혈청 알부민에 결합하기에 충분한 크기의 지방-아실 기로 아실화된다. 한 구현예에서 아실화된 아미노산은 서열 번호 11의 C 말단에 위치 40에서 첨가되고 선택적으로 아실화된 아미노산은 선택적으로 본원에 개시된 임의의 스페이서를 통해 아미노산 측쇄에 연결된 C14-C20 지방산 또는 지방 이산으로 아실화된 Lys이다.

[0057] 한 구현예에서 비정형 저혈당증을 치료하기 위한 약학 조성물은 저혈당증을 치료하기에 유용한 임의의 기존 치료제와 함께 본원에 개시된 임의의 GLP-1 수용체 길항물질을 포함한다. 예를 들어, 약학 조성물에는 본 발명의 GLP-1 수용체 길항물질 및 다음: 글루코스 보충제(예컨대, 덱스트로스); 글루카곤 및 글루카곤 유사체와 같은 글루코스 상승제 및 인슐린 분비 억제제(예컨대, 다이아족사이드, 옥트레오타이드) 중 하나 이상이 포함될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0058] 도 1은 마우스에게 비히클 대조군, Ex-4(서열 번호 1의 아미노산 서열을 가진 GLP-1 작용물질), 또는 GLP-1 길항물질 펩타이드(DVSRYLEEQAVREFIEWLVRGGPSSGAPPPSK$_{40}$[mPEG-γE-C16]산; 서열 번호 16)의 피하 투여에 이어 글루코스(체중 1 kg당 1.5 g 글루코스)의 복강내 투여 후 시간 경과에 따른 혈당 수준의 용량 의존성 변화를 나타내는 그래프이며, 여기서 글루코스는 GLP-1 길항물질 투여 후 4시간 후에 피하로 투여된다.

도 2a 및 2b는 마우스에게 GLP-1 길항물질이 피하로 투여된 후 4시간 후에 글루코스(체중 1 kg당 1.5 g 글루코스)가 복강내로 투여되는 글루코스 내성 테스트로부터의 데이터를 나타낸다. 결과는 서열 번호 16의 GLP-1 길항물질이 완전한 길항물질이며(도 2a) GLP-1 길항물질 Ex-9-40(DVSKQMEEEAVRLFIEWLKNGGPSSGAPPPS; 서열 번호 2)

보다 훨씬 더 높은 효능을 가진 것(도 2b)을 입증한다.

도 3은 GLP-1 길항물질의 효능에 대한 Aib 치환의 효과를 조사하는 글루코스 내성 테스트로부터의 데이터를 나타낸다. 마우스는 GLP-1 길항물질이 피하로 투여된 후 4시간 후에 글루코스(체중 1 kg당 1.5 g 글루코스)가 복강내로 투여된다. 도 3은 (서열 번호 47)의 서열을 포함하는 9-40Jant4-K_{40}(DVSSYLEEQAVREFIAWLVKGGPSSGAPPPSK; 서열 번호 3), 및 일련의 Aib 치환을 포함하는 그것의 유도체, 서열 번호 43(위치 20에 Aib), 서열 번호 44(위치 18에 Aib), 및, 서열 번호 45(위치 11에 Aib), 서열 번호 46(위치 10에 Aib)의 GLP-1 길항물질 펩타이드 유사체의 활성을 입증한다.

도 4는 GLP-1 길항물질의 효능에 대한 D-아미노산 치환의 효과를 조사하는 글루코스 내성 테스트로부터의 데이터를 나타낸다. 마우스는 GLP-1 길항물질이 피하로 투여된 후 4시간 후에 글루코스(체중 1 kg당 1.5 g 글루코스)가 복강내로 투여된다. (miniPEG(미니PEG))$_2$-λE-C16 아실화된 9-40Jant4-K_{40}(DVSSYLEEQAVREFIAWLVKGGPSSGAPPPSX$_{40}$(서열 번호 12)) 펩타이드 서열 번호 48의 GLP-1 길항물질 활성, 여기서 X_{40}은 (miniPEG)2-감마 Glu-C16으로 아실화된 Lys이고 비히클 대조군 및 X_{40}이 C16으로 아실화된 치환 및 다음과 같이 D-위치배열의 상응하는 아미노산과의 C 말단 아미드: 서열 번호 49(*d-Glu*^{15}), 서열 번호 50(*d-Val*^{19}), 서열 번호 51(*d-Ile*^{23})를 포함하는 변이체에 대해 C 말단 아미드를 가진다.

도 5a-5d는 본 발명의 GLP-1 수용체 길항물질의 전구약물 유도체에 대한 데이터를 제공한다. 도 5a는 시간 경과에 따른 37℃에서 PBS에서 인큐베이션된 전구약물 dK^7(mPeg-γE-이산(diacid) C18) **N-Me-Gly**^{8} 펩타이드 서열 번호 19에 대한 질량 분광광도계 데이터를 제시한다. 도 5b-5d는 DVSRYLEEQAVREFIEWLVRGGPSSGAPPPSX$_{40}$; 서열 번호 18의 다이펩타이드 전구약물의 GLP-1 길항물질 활성을 나타내는 그래프이며, 펩타이드는 글루코스 내성 테스트에서 공유 결합된 dK^7(mPeg-γE-이산 C18) **N-iPr-Gly**^{8} 다이펩타이드로 변형되었고, 글루코스 도전은 길항물질 투여 후 24시간(도 5b), 48시간(도 5c) 또는 120시간(도 5d) 후에 투여된다.

도 6a 및 6b는 2개의 아실화된 아미노산을 포함하는 본 발명의 GLP-1 수용체 길항물질의 유도체에 대한 데이터를 제공한다. 도 6a 및 6b는 글루코스 내성 테스트의 결과를 나타내는 그래프이며, 글루코스 도전은 길항물질 투여 후 24시간(도 6a) 또는 48시간(도 6b) 후에 투여되고,

서열 번호 16은 R^{12}, E^{24}, R^{28}, K^{40}[mPEG-γE-C16]-(Jant4, 9-40)산(서열 번호 16)이며;

서열 번호 17은 dK^7(mPeg-γE(C18-이산)**G**^{8}, R^{12}, E^{24},R^{28}, K^{40}[mPEG-γE-C16]-(Jant4, 9-40)산(서열 번호 17)이고;

서열 번호 18 dK^7(mPeg-γE(C18-이산)**i-Pr,** G^8, R^{12}, E^{24}, R^{28}, K^{40}[mPEG-γE-C16]-(Jant4, 9-40)산(서열 번호 18);

서열 번호 19 dK^7(mPeg-γE(C18-이산)**N-Me**, G^8, R^{12}, E^{24}, R^{28}, K^{40}[mPEG-γE-C16]-(Jant4, 9-40)산(서열 번호 19);

서열 번호 20 dK^7(**K**(mPeg-γE-C18 이산)$_2$G^8, R^{12}, E^{24}, R^{28} K^{40}[mPEG-γE-**C18** 이산](Jant4, 9-40)아미드(서열 번호 20);

서열 번호 21 dK^7(**K**(mPeg-γE-C18 이산)$_2$G^8, R^{12}, E^{24}, R^{28} K^{40}[mPEG-γE-C16](Jant4, 9-40)아미드(서열 번호 21);

서열 번호 22 dK^7(**K**(mPeg-γE-C18 이산)$_2$**N-Me**, G^8, R^{12}, E^{24}, R^{28} K^{40}[mPEG-γE-C16](Jant4, 9-40)아미드(서열 번호 22)이다.

도 7은 본 개시내용에 따라 제조된 다양한 N 말단 아실화된 GLP-1 길항물질의 표(MBX 1391; 서열 번호 118; MBX 1401; 서열 번호 119; MBX 1402; 서열 번호 120; MBX 1403; 서열 번호 121; MBX 1404; 서열 번호 122; MBX 1406; 서열 번호 123; MBX 1407; 서열 번호 124; MBX 1408; 서열 번호 125; MBX 1416; 서열 번호 126)를 제공한다. 모든 이러한 GLP-1 유사체는 또한 최종 화합물인 MBX 1416을 제외하고 카르복시 말단에서 아실화되며,

MBX 1416은 N 말단에서만 아실화된다.

도 8은 24시간, 48시간, 및 72시간에 측정된 이중 아실화된 GLP-1 길항물질(MBX 1407; 서열 번호 116)을 세 가지 상이한 용량 10 nmol/kg, 30 nmol/kg, 100 nmol/kg 및 300 nmol/kg으로 피하 주사된 마우스의 혈당 수준을 나타내는 그래프이며, 이는 용량 의존적 반응을 나타낸다.

도 9는 시간 경과에 따른 300 nmol/kg의, 이중 아실화된 GLP-1 길항물질 (MBX 1407; X-DVSSYLEEQAVREFIAWLVRGGPSSGAPPPSO-산; 서열 번호 116) 대 단일 아실화된 GLP-1 길항물질(MBX 1342; DLSKQMEEEAVRLFIEWLKNGGPSSGAPPPSO-아미드; 서열 번호 117)로 피하 주사된 마우스의 혈당 수준을 나타내는 그래프이고, 여기서 X=C18-이산 및 O=Lys(C18-이산)이다. 단일 부위 지질화된 GLP-1 길항물질은 이중 부위 지질화된 GLP-1 길항물질보다 더 강력하다.

도 10은 GLP-1R 과발현 293 세포를 사용하여 시험관내 검정에서 측정된 다양한 GLP-1 길항물질 유사체(MBX 1342; 서열 번호 127; MBX 1373; 서열 번호 128; MBX 1416; 서열 번호 126; MBX 1417; 서열 번호 129; MBX 1418; 서열 번호 130)의 IC_{50}(nMoles)을 나타낸다.

도 11a 및 11b는 시간 경과에 따른 300 nmol/kg의, 이중 아실화된 GLP-1 길항물질(MBX 1407; 도 11a) 대 단일 아실화된 GLP-1 길항물질(MBX 1342; 도 11b)로 피하 주사된 마우스에서의 체중 변화를 나타내는 그래프이다. 단일 부위 지질화된 GLP-1 길항물질은 이중 부위 지질화된 GLP-1 길항물질보다 더 강력하다.

도 12는 2, 4, 7, 9, 11 및 14일째에 측정된 시간 경과에 따른 100 또는 300 nmol/kg의, 비아실화된 GLP-1 길항물질(MBX 1118 (Ex-9)), 이중 아실화된 GLP-1 길항물질(MBX 1407) 및 단일 아실화된 GLP-1 길항물질(MBX 1416)로 피하 주사된 마우스의 혈당 변화에 대한 데이터를 나타낸다.

도 13은 100 또는 300 nmol/kg의, 비아실화된 GLP-1 길항물질(MBX 1118 (Ex-9)), 이중 아실화된 GLP-1 길항물질(MBX 1407) 및 단일 아실화된 GLP-1 길항물질(MBX 1416)의 피하 주사 후 14일째에 실시된 글루코스 내성 테스트의 결과를 도시한다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0059] 정의

[0060] 발명을 기술하고 주장함에 있어서, 다음의 용어가 아래에 제시되는 정의에 따라 사용될 것이다.

[0061] 본원에서 사용되는 용어 "약"은 표시된 값 또는 값의 범위보다 10 퍼센트가 크거나 작은 것을 의미하지만 임의의 값 또는 값의 범위를 이 더 넓은 정의로만 지정하려는 의도는 아니다. 용어 "약"이 선행된 각각의 값 또는 값의 범위는 또한 표시된 절대 값 또는 값의 범위의 구현예를 포함하도록 의도된다.

[0062] 본원에서 사용된 바 용어 "아미노산"은 아미노 및 카르복실 작용기를 모두 함유하는 임의의 분자를 포함하며, 아미노 및 카르복실레이트 기는 동일한 탄소(알파 탄소)에 부착된다. 알파 탄소는 선택적으로 하나 또는 2개의 추가 유기 치환기를 가질 수 있다. 아미노산은 3 문자 암호, 한 문자 암호로, 또는 일부 경우에는 그것의 측쇄의 이름으로 지정될 수 있다. 예를 들어, 알파 탄소에 부착된 사이클로헥산 기를 포함하는 비표준 아미노산은 "사이클로헥산" 또는 "사이클로헥실"로 명명된다. 본 개시의 목적에 대해 입체화학을 명시하지 않은 아미노산의 지정은 아미노산의 L 또는 D 형태, 또는 라세미 혼합물을 포함하는 것으로 의도된다. 그러나, 아미노산이 3 문자 암호로 표시되는 경우(즉, Lys), 그러한 표시는 아미노산의 천연 L 형태를 명시하는 것으로 의도되는 반면, D 형태는 3 문자 암호 또는 단일 암호 앞에 소문자 d를 포함시켜 명시될 것이다(즉, dLys 또는 dK).

[0063] 본원에서 사용된 바 용어 "하이드록실산"은 알파 탄소 아미노 기를 하이드록실 기로 대체하도록 변형된 아미노산을 지칭한다.

[0064] 본원에서 사용된 바 용어 "비코딩 아미노산"은 다음의 20개 아미노산 중 임의의 것의 L 이성질체가 아닌 임의의 아미노산을 포함한다: Ala, Cys, Asp, Glu, Phe, Gly, His, Ile, Lys, Leu, Met, Asn, Pro, Gln, Arg, Ser, Thr, Val, Trp, Tyr.

[0065] "생체활성 폴리펩타이드"는 시험관내 및/또는 생체내에서 생물학적 효과를 발휘할 수 있는 폴리펩타이드를 지칭한다.

[0066] 본원에서 사용된 바 펩타이드에 대한 일반적인 언급은 변형된 아미노 및 카르복시 말단을 가지는 펩타이드를 포함하도록 의도된다. 예를 들어, 표준 아미노산을 표시하는 아미노산 서열은 N- 및 C 말단에 표준 아미노산뿐만

아니라 N 말단에 상응하는 하이드록실산 및/또는 말단 카르복실산 대신 아미드 기를 포함하도록 변형된 상응하는 C 말단 아미노산을 포함하도록 의도된다.

[0067] 본원에서 사용된 바 "아실화된" 아미노산은 생성되는 수단과 관계없이, 자연적으로 발생하는 아미노산에 대해 비천연적인 아실 기를 포함하는 아미노산이다. 아실화된 아미노산 및 아실화된 펩타이드를 생성하는 예시의 방법은 기술분야에 알려져 있고 펩타이드에 포함되기 전에 아미노산을 아실화하는 것 또는 펩타이드의 화학적 아실화가 뒤따르는 펩타이드 합성을 포함한다. 일부 구현예에서, 아실 기는 펩타이드가 (i) 순환에서 연장된 반감기, (ii) 지연된 작용 개시, (iii) 연장된 작용 기간, (iv) 프로테아제에 대한 개선된 내성, 및 (v) GLP-1 수용체에서 증가된 효능 중 하나 이상을 갖도록 유발한다.

[0068] 본원에서 사용된 바, "알킬화된" 아미노산은 생성되는 수단과 관계없이, 자연적으로 발생하는 아미노산에 대해 비천연적인 알킬 기를 포함하는 아미노산이다. 알킬화된 아미노산 및 알킬화된 펩타이드를 생성하는 예시의 방법은 기술분야에 알려져 있고 펩타이드 또는 펩타이드 합성에 포함되기 전에 알킬화하는 단계와 이어서 펩타이드의 화학적 알킬화 단계를 포함한다. 임의의 특정 이론에 매이지 않지만, 펩타이드의 알킬화는, 만약 동일하지 않다면, 펩타이드의 아실화와 유사한 효과, 예컨대, 순환에서의 연장된 반감기, 지연된 작용 개시, 연장된 작용 기간, 프로테아제에 대한 개선된 내성을 달성할 것으로 여겨진다.

[0069] 본원에서 사용된 바, 용어 "약학적으로 허용 가능한 담체"에는 임의의 표준 약학적 담체, 예컨대 인산염 완충 식염수 용액, 물, 오일/물 또는 물/오일 에멀션과 같은 에멀션, 및 다양한 유형의 습윤제가 포함된다. 용어는 또한 인간을 포함한 동물에서의 사용에 대해 미국 연방 정부의 규제 기관에 의해 승인되었거나 미국 약전에서 열거된 임의의 작용제를 포함한다.

[0070] 본원에서 사용된 바 용어 "약학적으로 허용 가능한 염"은 모 화합물의 생물학적 활성을 유지하고, 생물학적으로 또는 그렇지 않으면 바람직하지 않은 것이 아닌 화합물의 염을 지칭한다. 본원에 개시된 화합물 중 많은 것이 아미노 및/또는 카르복실 기 또는 그것과 유사한 기의 존재에 의해 산 및/또는 염기 염을 형성할 수 있다.

[0071] 본원에서 사용된 바, 용어 "친수성 모이어티"는 쉽게 수용성이거나 쉽게 물을 흡수할 수 있고, 생체내에서 포유류 종에 의해 독성 효과 없이 허용되는(즉 생체부합성) 임의의 화합물을 지칭한다. 친수성 모이어티의 예로는 폴리에틸렌 글리콜(PEG), 폴리락트산, 폴리글리콜산, 폴리락틱-폴리글리콜산 공중합체, 폴리비닐 알코올, 폴리비닐피롤리돈, 폴리메톡사졸린, 폴리에틸옥사졸린, 폴리하이드록시에틸 메타크릴레이트, 폴리하이드록시프로필 메타크릴아미드, 폴리메타크릴아미드, 폴리다이메틸아크릴아미드, 및 하이드록시메틸셀룰로스 또는 하이드록시에틸셀룰로스 및 그것의 공중합체와 같은 유도체화된 셀룰로스, 뿐만 아니라 예를 들어, 알부민, 헤파린 및 덱스트란을 포함한 천연 중합체를 들 수 있다.

[0072] 본원에서 사용된 바, 용어 "치료하는"에는 특정 장애 또는 병태와 관련된 증상의 완화 및/또는 상기 증상을 예방 또는 제거하는 것이 포함된다. 예를 들어, 본원에서 사용된 바 용어 "저혈당증을 치료하는"은 일반적으로 혈당 수준을 거의 정상 수준으로 유지 또는 증가시키는 것을 지칭할 것이다.

[0073] 본원에서 사용된 바 GLP-1 수용체 길항물질의 "유효"량 또는 "치료적 유효량"은 무독성이지만 GLP-1 길항물질의 원하는 효과를 제공하기에 충분한 양을 지칭한다. 예를 들어, 한 가지 원하는 효과는 저혈당증의 예방 또는 치료일 것이다. "효과적인"양은 개체의 연령 및 일반적인 상태, 투여 방식, 등에 따라 대상체별로 다를 것이다. 그러므로 언제나 정확한 "유효량"을 명시하는 것이 가능하지는 않다. 그러나, 임의의 개별 사례에서 적절한 "유효"량은 일상적인 실험을 사용하여 기술분야에 통상적인 지식을 가진 사람에 의해 결정될 수 있다.

[0074] 용어 "비경구"는 소화관을 통하지 않고 비강내, 흡입, 피하, 근육내, 척수내, 또는 정맥내와 같은 일부 다른 경로에 의한 것을 의미한다.

[0075] 본원에서 사용된 바 용어 "유도체"는 예컨대 폴리펩타이드의 하나 이상의 위치의 측쇄에 기를 도입함으로써, 예컨대 니트로 기를 티로신 잔기에, 또는 요오드를 티로신 잔기에 도입함으로써, 또는 유리 카르복실 기를 에스테르 기 또는 아미드 기로 전환시킴으로써, 또는 아미노 기를 아실화에 의해 아미드 기로 전환시킴으로써, 또는 하이드록시 기를 아실화하여 에스테르를 만듦으로써, 또는 일차 아민을 알킬화하여 이차 아민을 만들거나 또는 친수성 모이어티를 아미노산 측쇄에 연결함으로써 시험관내 화학적 변형을 포함한 화합물(예컨대, 아미노산)에 대한 화학적 변형을 포함하는 것으로 의도된다. 다른 유도체는 폴리펩타이드의 아미노산 잔기의 측쇄의 산화 또는 환원에 의해 얻어진다.

[0076] 본원에서 사용된 용어 "동일성"은 둘 이상의 서열 사이의 유사성과 관련이 있다. 동일성은 동일한 잔기의 수를 잔기의 총 수로 나누고 그 값에 100을 곱하여 백분율을 얻음으로써 측정된다. 그러므로, 정확히 동일한 서열의

두 복사물은 100% 동일성을 갖는 반면, 서로에 대해 아미노산 결실, 첨가, 또는 치환을 가지는 두 서열은 더 낮은 정도의 동일성을 가진다. 기술분야에 숙련된 사람은 여러 컴퓨터 프로그램, 예컨대 BLAST(Basic Local Alignment Search Tool, Altschul et al.(1993) J. Mol. Biol. 215:403-410)와 같은 알고리즘을 사용하는 프로그램이 서열 동일성을 결정하기 위해 이용 가능한 것을 인식할 것이다.

[0077] 본원에서 사용된 바, 제2 수용체에 대해 제1 수용체에 대한 분자의 용어 "선택성"은 다음의 비율을 지칭한다: 제1 수용체에서 분자의 EC_{50}으로 나누어진 제2 수용체에서의 분자의 EC_{50}. 예를 들어, 제1 수용체에서 1 nM의 EC_{50} 및 제2 수용체에서 100 nM의 EC_{50}을 가지는 분자는 제2 수용체에 비해 제1 수용체에 대해 100배 선택성을 가진다.

[0078] 본원에서 사용된 바 아미노산 "변형"은 아미노산의 치환, 또는 화학적 기의 아미노산에의 첨가 및/또는 아미노산으로부터 아미노산의 제거에 의한 아미노산의 유도체화를 지칭하며, 인간 단백질에서 일반적으로 발견되는 20개의 아미노산, 뿐만 아니라 비정형 또는 자연적으로 발생하지 않는 아미노산 중 어느 것으로의 치환을 포함한다. 비정형 아미노산의 상업적 공급원에는 Sigma-Aldrich(Milwaukee, WI), ChemPep Inc.(Miami, FL), 및 Genzyme Pharmaceuticals(Cambridge, MA)가 포함된다. 비정형 아미노산은 상업적 공급체로부터 구입할 수 있거나, 새롭게 합성되거나, 또는 자연적으로 발생하는 아미노산으로부터 화학적으로 변형되거나 유도체화될 수 있다.

[0079] 본원에서 사용된 바 아미노산 "치환"은 상이한 아미노산 잔기에 의한 한 아미노산 잔기의 대체를 지칭한다.

[0080] 본원에서 사용된 바, 용어 "보존성 아미노산 치환"은 본원에서 다음의 5개 그룹 중 하나 내에서의 교환으로서 정의된다:

[0081] I. 작은 지방족, 비극성 또는 약간 극성 잔기:

[0082] Ala, Ser, Thr, Pro, Gly;

[0083] II. 극성, 음전하 잔기 및 그것의 아미드:

[0084] Asp, Asn, Glu, Gln, 시스테인산 및 호모시스테인산;

[0085] III. 극성, 양전하 잔기:

[0086] His, Arg, Lys; 오르니틴(Orn)

[0087] IV. 큰, 지방족, 비극성 잔기:

[0088] Met, Leu, Ile, Val, Cys, 노르류신(Nle), 호모시스테인

[0089] V. 큰, 방향족 잔기:

[0090] Phe, Tyr, Trp, 아세틸 페닐알라닌

[0091] 출원 전체에서, 숫자에 의한 특정 아미노산 위치(예컨대, 위치 28)에 대한 모든 언급은 천연 Exendin4(서열 번호 1)에서의 그 위치 또는 그것의 임의의 유사체에서 상응하는 아미노산 위치에서의 아미노산을 지칭한다. 예를 들어, 본원에서 "위치 28"에 대한 언급은 서열 번호 1의 첫 번째 아미노산이 결실되어 있는 Exendin4의 유사체의 경우 위치 27을 의미할 것이다. 따라서 9-39 Exendin4는 처음 8개의 아미노산이 결실되어 있는 N 말단에서 절단된 Exendin4 펩타이드를 나타낸다. 더불어 39보다 큰 위치에 대한 언급(천연 Exendin4는 39개 아미노산만을 가짐)은 서열 번호 1의 상응하는 위치 39 다음에 C 말단 아미노산이 연장된 유사체의 아미노산 위치를 지칭하는 것으로 의도된다.

[0092] 본원에서 사용된 바 일반적인 용어 "폴리에틸렌 글리콜 사슬" 또는 "PEG 사슬"은 일반식 $H(OCH_2CH_2)_nOH$로 표시되는, 분지형 또는 직쇄형 사슬의, 산화 에틸렌과 물의 축합 중합체의 혼합물을 지칭하며, 식에서 n은 적어도 2이다. "폴리에틸렌 글리콜 사슬" 또는 "PEG 사슬"은 대략적인 평균 분자량을 표시하기 위하여 숫자 접미사와 함께 사용된다. 예를 들어, PEG-5,000은 약 5,000 달톤의 총 분자량 평균을 가진 폴리에틸렌 글리콜 사슬을 지칭한다.

[0093] 본원에서 사용된 바 용어 "페길화된" 등의 용어는 폴리에틸렌 글리콜 사슬을 화합물에 연결함으로써 천연 상태로부터 변형된 화합물을 지칭한다. "페길화된 폴리펩타이드"는 폴리펩타이드에 공유 결합된 PEG 사슬을 가지는 폴리펩타이드이다.

[0094] 본원에서 사용된 바 용어 "miniPEG" 또는 "OEG"는 다음 구조를 포함하는 기능화된 폴리에틸렌 화합물을 규정한다:

[0095] .

[0096] 본원에서 사용된 바 "링커" 또는 "스페이서"는 두 별도의 개체를 서로 결합시키는 결합, 분자 또는 분자기이다. 링커는 두 개체의 최적 간격을 제공할 수도 있고 두 개체가 서로 분리되는 것을 허용하는 불안정한 결합을 추가로 제공할 수 있다. 불안정한 결합에는 광절단 가능한 기, 산에 불안정한 모이어티, 염기에 불안정한 모이어티, 및 효소 절단 가능한 기가 포함된다.

[0097] 본원에서 사용된 바 "이량체"는 링커를 통해 서로에게 공유 결합된 두 하위단위를 포함하는 복합체이다. 용어 이량체는, 임의의 수식어 없이 사용될 때, 동종이량체와 이종이량체를 모두 포함한다. 동종이량체는 2개의 동일한 하위단위를 포함하는 반면, 이종이량체는 비록 두 하위단위가 실질적으로 서로 유사하더라도, 상이한 두 하위단위를 포함한다.

[0098] 본원에서 사용된 바 용어 C16-C20 지방산은 구조: $-CO(CH_2)_{14-20}CH_3$을 나타내고 용어 C16-C20 이산은 구조: $-CO(CH_2)_{14-20}COOH$를 나타내며, 여기서 접두사 "C16-C20"은 표시에 의해 포함된 화합물의 탄소의 가변적인 총 수를 나타낸다. 예를 들어, C18 이산은 구조: $-CO(CH_2)_{16}COOH$를 나타낸다. 본원에서 사용된 바 아실화된 아미노산에 대한 일반적인 언급은 지방산으로 아실화된 측쇄를 가진 아미노산과 이산으로 아실화된 측쇄를 가진 아미노산을 모두 포함한다.

[0099] 본원에 개시된 생리적 조건은 약 35 내지 40℃의 온도 및 약 7.0 내지 약 7.4의 pH, 보다 전형적으로는 7.2 내지 7.4의 pH 및 36 내지 38℃의 온도를 포함하는 것으로 의도된다. 생리적 pH 및 온도가 고도로 정의된 범위 내에서 인간에서 엄격하게 조절되기 때문에, 다이펩타이드/약물 복합체(전구약물)로부터 약물로의 전환 속도는 환자 내 및 환자 간 높은 재현성을 나타낼 것이다.

[0100] 본원에서 사용된 용어 "C_1-C_n 알킬", 여기서 n은 1 내지 6일 수 있는 알킬은 1 내지 특정 수의 탄소 원자를 갖는 분지형 또는 선형 알킬기를 나타낸다. 전형적인 C_1-C_6 알킬 기로는, 한정하는 것은 아니지만, 메틸, 에틸, n-프로필, 아이소-프로필, 부틸, 아이소-부틸, sec-부틸, tert-부틸, 펜틸, 헥실 등을 들 수 있다.

[0101] 본원에서 사용된 용어 "C_2-C_n 알케닐", 여기서 n은 2 내지 6일 수 있는 알케닐은 2 내지 특정 수의 탄소 원자 및 적어도 하나의 이중 결합을 가지는 올레핀계 불포화 분지형 또는 선형 기를 나타낸다. 그러한 기의 예로는, 한정하는 것은 아니지만, 1-프로페닐, 2-프로페닐($-CH_2-CH=CH_2$), 1,3-부타다이에닐($-CH=CHCH=CH_2$), 1-부티닐($-CH=CHCH_2CH_3$), 헥세닐, 펜테닐, 등을 들 수 있다.

[0102] 용어 "C_2-C_n 알키닐"은 n이 2 내지 6일 수 있고, 2 내지 n개의 탄소 원자 및 적어도 하나의 삼중 결합을 가지는 불포화 분지형 또는 선형 기를 지칭한다. 그러한 기의 예로는, 한정하는 것은 아니지만, 1-프로피닐, 2-프로피닐, 1-부티닐, 2-부티닐, 1-펜테닐, 등을 들 수 있다.

[0103] 본원에서 사용된 바 용어 "아릴"은, 한정하는 것은 아니지만 페닐, 나프틸, 테트라하이드로나프틸, 인다닐, 인데닐, 등을 포함한 하나 또는 2개의 방향족 고리를 가지는 단환식 또는 이환식 탄소고리형 고리 시스템을 지칭한다. 아릴 고리의 크기 및 치환기 또는 연결기의 존재는 존재하는 탄소 수를 표시함으로써 나타낸다. 예를 들어, 용어 "(C_1-C_3 알킬)(C_6-C_{10} 아릴)"은 1 내지 3원 알킬 사슬을 통해 모 모이어티에 부착되는 5 내지 10원 아릴을 지칭한다.

[0104] 본원에서 사용된 용어 "헤테로아릴"은 1 또는 2개의 방향족 고리를 함유하고 방향족 고리에 적어도 하나의 질소, 산소, 또는 황 원자를 함유하는 단환식 또는 이환식 고리 시스템을 지칭한다. 헤테로아릴 고리의 크기 및 치환기 또는 연결기의 존재는 존재하는 탄소 수를 표시함으로써 나타낸다. 예를 들어, 용어 "(C_1-C_n 알킬)(C_5-C_6 헤테로아릴)"은 1 내지 "n"원 알킬 사슬을 통해 모 모이어티에 부착되는 5 또는 6원 헤테로아릴을 지칭한다.

[0105] 본원에서 사용된 바 용어 "할로"는 불소, 염소, 브롬, 및 요오드로 이루어진 군의 하나 이상의 구성원을 지칭한다.

[0106] 본원에서 사용된 바 추가 표시 없이 용어 "환자"는 임의의 온혈 척추동물 가축화된 동물(예를 들어, 한정하는 것은 아니지만 가축, 말, 고양이, 개 및 다른 애완동물) 및 인간을 포함하는 것으로 의도되며 의사의 직접 진료를 받는 개인에게 한정되지 않는다.

[0107] 본원에서 사용된 용어 "분리된"은 자연적인 환경으로부터 제거된 것을 의미한다.

[0108] 본원에서 사용된 용어 "정제된"은 천연 또는 자연적인 환경의 분자 또는 화합물과 정상적으로 관련된 오염물이 실질적으로 없는 형태로 분자 또는 화합물의 분리에 관한 것이며 원래 조성물의 다른 구성요소로부터 분리된 결과로서 순도가 증가한 것을 의미한다. 용어 "정제된 펩타이드"는 본원에서 한정하는 것은 아니지만 핵산 분자, 지질 및 탄수화물을 포함한 다른 화합물로부터 분리된 펩타이드를 기술하기 위해 사용된다.

[0109] 본원에서 사용된 바 용어 "펩타이드"는 2개 이상의 아미노산 및 전형적으로 50개 아미노산 미만의 서열을 포함하며, 아미노산은 자연적으로 발생하거나 코딩되거나 자연적으로 발생하지 않거나 또는 비코딩 아미노산이다. 자연적으로 발생하지 않는 아미노산은 생체내에서 자연적으로 발생하지는 않지만, 그럼에도 불구하고, 본원에서 기술된 펩타이드 구조로 통합될 수 있는 아미노산을 지칭한다. 본원에서 사용된 "비코딩"은 다음 20개 아미노산 중 임의의 것의 L 이성질체가 아닌 아미노산을 지칭한다: Ala, Cys, Asp, Glu, Phe, Gly, His, Ile, Lys, Leu, Met, Asn, Pro, Gln, Arg, Ser, Thr, Val, Trp, Tyr.

[0110] 본원에서 사용된 바 "부분적으로 비펩타이드성"은 분자의 일부가 생물학적 활성을 가지며 아미노산 서열을 포함하지 않는 화학적 화합물 또는 치환기인 분자를 지칭한다.

[0111] "펩타이드 모방물"은 기존의 펩타이드의 일반 구조와 상이하지만, 기존의 펩타이드와 유사한 방식으로, 예컨대, 그 펩타이드의 생물학적 활성을 모방함으로써 기능하는 구조를 갖는 화학적 화합물을 지칭한다. 펩타이드 모방물은 전형적으로 자연적으로 발생하는 아미노산 및/또는 비천연 아미노산을 포함하지만, 또한 펩타이드 백본에 변형을 포함할 수 있다. 예를 들어, 펩타이드 모방물은 비펩타이드 모이어티, 예컨대 레트로인버소(retroinverso) 단편의 삽입 또는 치환, 또는 아자펩타이드 결합(NH에 의해 치환된 CO) 또는 슈도펩타이드 결합(예컨대 CH_2로 치환된 NH), 또는 에스테르 결합(예컨대, 아미드(-CONHR-) 결합 중 하나 이상이 에스테르(COOR) 결합에 의해 대체된 뎁시펩타이드)과 같은 비펩타이드 결합의 통합을 포함한 자연적으로 발생하는 아미노산의 서열을 포함할 수 있다. 대안적으로 펩타이드 모방물은 어떠한 자연적으로 발생하는 아미노산이 없을 수 있다.

[0112] 본원에서 사용된 바 용어 "전하를 띈 아미노산" 또는 "전하를 띈 잔기"는 생리적 pH에서 수용액에서 음전하(즉, 양성자 제거된) 또는 양전하(즉, 양성자화된)인 측쇄를 포함하는 아미노산을 지칭한다. 예를 들어, 음전하의 아미노산에는 아스파르트산, 글루탐산, 시스테인산, 호모시스테인산, 및 호모글루탐산이 포함되는 반면, 양전하 아미노산에는 아르기닌, 리신 및 히스티딘이 포함된다. 전하를 띈 아미노산에는 인간 단백질에서 흔히 발견되는 20개 아미노산, 뿐만 아니라 비정형 또는 자연적으로 발생하지 않는 아미노산 중에서 전하를 띤 아미노산이 포함된다.

[0113] 본원에서 사용된 바 용어 "산성 아미노산"은 예를 들어, 측쇄 카르복실산 또는 설폰산 기를 포함한, 제2 산성 모이어티(아미노산의 알파 카르복실산 이외의)를 포함하는 아미노산을 지칭한다.

[0114] 본원에서 사용된 바 용어 "전구약물"은 완전한 약물학적 효과를 나타내기 전에 화학적 변형이 진행되는 임의의 화합물로서 정의된다.

[0115] 본원에서 사용된 바 "다이펩타이드"는 펩타이드 결합을 통한, α-아미노산 또는 α-하이드록실산의 또 다른 아미노산에의 결합의 결과이다.

[0116] 본원에서 사용된 바 임의의 추가 표시 없이 용어 "화학적 절단"은 공유 화학적 결합의 파괴를 초래하는 비효소적 반응을 포함한다.

[0117] 본원에서 사용된 바 용어 "비정형 저혈당증"은 외인성 인슐린 투여와 무관하게 발생하는 저혈당증의 상태를 정의한다.

[0118] 약어:

[0119] 소문자 k = 리신의 D 이성질체

[0120] 대문자 K = 리신의 L 이성질체

[0121] ɣE = 감마, 글루탐산의 L 이성질체

[0122] $(miniPEG)_2$ = $COCH_2OCH_2CH_2OCH_2CH_2NH$

[0123] $COC_{16}H_{32}CO_2H$ =(C18 이산)

[0124] (N-Me)G = 사르코신

[0125] 구현예

[0126] 본 개시의 한 구현예에 따르면, 외인성 인슐린 투여와 무관하게 초래되는 저혈당 상태(즉, 비정형 저혈당증)를 앓고 있는 환자를 치료하기 위한 조성물 및 방법이 제공된다. 본 개시에 따르면 GLP-1 길항물질을 포함하는 조성물이 혈당 수준을 증가시키고/거나 저혈당증과 관련된 급성 증상 및 만성 결과를 완화시키기에 충분한 양으로 비정형 저혈당증을 앓고 있는 환자에게 투여된다. 한 구현예에서 비정형 저혈당증을 겪고 있는 환자는 또한 고인슐린혈증 병태를 가진다. 한 구현예에서 고인슐린혈증성 병태는 환자가 비만 수술을 받은 후 발생한다.

[0127] 한 구현예에 따르면 비정형 저혈당증을 앓고 있는 환자를 치료하는 방법은 아실화된 GLP-1 수용체 길항물질 펩타이드를 투여하는 단계를 포함하고, 상기 GLP-1 수용체 길항물질 펩타이드는 N 말단 및/또는 C 말단에서 고친화도로 혈청 알부민에 결합하기에 충분한 크기의 지방산 또는 지방 이산 기로 아실화된다. 한 구현예에서 C14-C20 아실 기는 GLP-1 수용체 길항물질 펩타이드의 N 말단 알파 아민에 공유 결합된다.

[0128] 한 구현예에서 GLP-1 수용체 길항물질은 GLP-1 수용체 길항물질의 N 말단에서 아실화되고, 선택적으로 아세틸기는 글루카곤 펩타이드의 N 말단 알파 아민에 공유 결합된다. 아실화된 글루카곤 펩타이드의 아실 기는 임의의 크기, 예컨대 임의의 길이의 탄소 사슬일 수 있고, 선형 또는 분지형일 수 있다. 본 발명의 일부 특정한 구현예에서, 아실 기는 C12 내지 C30 지방산 또는 지방 이산이다. 예를 들어, 아실 기는 임의의 C12 지방산/이산, C14 지방산/이산, C16 지방산/이산, C18 지방산/이산, C20 지방산/이산, C22 지방산/이산, C24 지방산/이산, C26 지방산/이산, C28 지방산/이산, 또는 C30 지방산/이산일 수 있다. 일부 구현예에서, 아실 기는 C14 내지 C20 지방산, 예컨대 C14 지방산 또는 지방 이산, C16 지방산 또는 지방 이산, 또는 C16 지방산 또는 지방 이산이다.

[0129] 한 구현예에 따르면 아실화된 GLP-1 수용체 길항물질 펩타이드는 DVSSYLEEQAVREFIAWLVKGGPSSGAPPPSK(서열 번호 3)의 아미노산 서열 또는 GLP-1 수용체 길항물질 활성을 유지하면서 서열 번호 3과 적어도 95% 서열 동일성을 갖는 이의 유사체를 포함한다.

[0130] 한 구현예에 따르면, 본 개시의 아실화된 GLP-1 수용체 길항물질 펩타이드는 펩타이드 DVSSYLEEQAVREFIAWLVKGGPSSGAPPPSK(서열 번호 3)의 유사체를 포함하고, 여기서 GLP-1 수용체 길항물질은 서열 번호 3과 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10개의 아미노산 변형만큼 상이하고, 변형은 한정하는 것은 아니지만 C 말단 아미노산의 아실화 및/또는 아미드화를 포함한, 아미노산 구조에 대한 아미노산 치환, 첨가 또는 변형으로부터 선택된다. 한 구현예에서 아미노산 변형은 펩타이드의 위치 12, 16, 18, 19, 24, 26, 27 및 28 중 하나 이상에서의 아미노산 치환 및/또는 위치 15, 16, 17, 19, 20, 21 및 23 중 하나 이상에서의 d 이성질체로의 치환이다(넘버링은 천연 Exendin4(서열 번호 1)에 대한 것임). 한 구현예에서 서열 번호 3의 유사체는 선택적으로 스페이서를 통한, C16-C18 지방산 또는 이산으로의 C 말단 아미노산 측쇄의 아실화에 의해 추가로 변형된다.

[0131] 한 구현예에 따르면 DVSRYLEEQAVREFIEWLVRGGPSSGAPPPSK(서열 번호 4)의 아미노산 서열, 또는 서열 번호 4와 1, 2, 3, 4 또는 5개의 아미노산 치환만큼 상이하지만 GLP-1 수용체 길항물질 활성을 유지하는 아미노산 서열을 포함하는 GLP-1 수용체 길항물질이 제공되며, 단 GLP-1 길항물질 펩타이드는 서열 번호 3의 서열을 포함하지 않는다. 한 구현예에서 서열 번호 4의 펩타이드와 다음 중 하나 이상이 상이한 펩타이드가 제공된다:

[0132] i. 위치 7, 10, 11, 13 또는 16 중 임의의 위치에서 1, 2 또는 3개 아미노산의 Trp 또는 dTrp으로의 치환;

[0133] i. 위치 15, 16 또는 23 중 임의의 위치에서 1, 2 또는 3개 아미노산의 D-입체형태의 상응하는 아미노산으로의 치환;

[0134] ii. 위치 16, 18, 19, 24, 26, 또는 28 중 임의의 위치에서 1, 2 또는 3개 아미노산의 Aib로의 치환;

[0135] iii. 위치 12에서 아실화된 아미노산, 선택적으로 아실화된 리신으로의 치환;

[0136] iv. 위치 16에서 dGlu, Asp, 호모글루탐산 또는 호모시스테인산으로의 치환;

[0137] v. 위치 19에서 사이클로프로판, 사이클로펜탄, 사이클로헥산 또는 페닐 글리신으로의 치환;

[0138] vi. 위치 20에서 dArg, 호모리신 또는 시트룰린으로의 치환;

[0139] vii. 천연 C 말단 카르복실 기의 아미드로의 치환;

[0140] viii. 1 내지 3개 아미노산의 N 말단 연장의 첨가, 선택적으로 N 말단 연장 아미노산 중 하나는 아실화됨;

[0141] ix. C 말단 아미노산의 아실화된 아미노산으로의 치환;

[0142] x. i) 내지 x)의 임의의 조합.

[0143] 한 구현예에 따르면 R_{10}-DV$X_{11}X_{12}$YL$X_{15}X_{16}$QA$X_{19}X_{20}$EFX_{23}EWLVRGGPSSGAPPPSX_{40}-R_{20}(서열 번호 23)의 아미노산 서열을 포함하는 GLP-1 수용체 길항물질이 제공되며,

[0144] 여기서

[0145] R_{10}은 NH_2, $-CO(CH_2)_{14-20}CH_3$, $-CO(CH_2)_{14-20}COOH$ 또는 1, 2 또는 3개 아미노산의 N 말단 연장이고, N 말단 연장의 아미노산 중 하나는, 선택적으로 스페이서를 통해, C16-C18 지방산 또는 이산으로 아실화되며, 선택적으로 R_{10}은 구조: X_7X_8의 다이펩타이드이고, 여기서 X_7은 아실화된 아미노산, 선택적으로 아실화된 Lys 또는 아실화된 dLys이며, X_8은 Gly 또는 C_1-C_4 N-알킬화된 Gly이고;

[0146] X_{11}은 Trp, dTrp 또는 Ser이며;

[0147] X_{12}는 Arg 또는 아실화된 아미노산, 선택적으로 아실화된 Lys이고;

[0148] X_{15}는 Glu 또는 dGlu이며;

[0149] X_{16}은 Glu, dGlu, Asp, 호모글루탐산 또는 호모시스테인산이고;

[0150] X_{19}는 Val, 사이클로프로판, 사이클로펜탄, 사이클로헥산 또는 페닐 글리신이며;

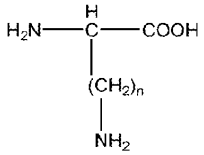
[0151] X_{20}은 Arg, 호모리신 또는 시트룰린이고;

[0152] X_{23}은 Ile, 또는 dIle이며;

[0153] X_{40}은 아실화된 아미노산, 선택적으로 아실화된 Lys이고;

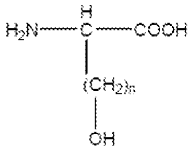
[0154] R_{20}은 COOH 또는 $CONH_2$이며, 선택적으로 위치 7, 10, 13, 또는 16으로부터 선택된 1, 2 또는 3개의 아미노산이 Trp 또는 dTrp로 치환되고, 단 선택적으로 위치 10 및 11은 둘 다 Trp 또는 dTrp이 아니며; 단 추가로 선택적으로 R_{10} 및 X_{12}는 둘 다 아실화된 아미노산을 포함할 수 없고; 선택적으로 위치 16, 18, 19, 24, 26, 또는 28 중 임의의 위치에서의 1, 2 또는 3개의 아미노산은 Aib로 치환된다.

[0155] 한 구현예에서 서열 번호 23의 펩타이드의 위치 7, 12 및 40 중 하나만이 아실화된 아미노산을 포함한다. 한 구현예에서 서열 번호 23의 펩타이드의 위치 7, 12 및 40 중 2개가 아실화된 아미노산을 포함한다. 한 구현예에서 위치 7, 12 및 40에서의 아실화된 아미노산은 독립적으로 식 I의 구조를 포함하는 아미노산(선택적으로, Lys), 또는 식 II의 구조를 포함하는 아미노산(선택적으로, Ser)이며, 각각의 식 I, 및 II는 하기와 같다:



[0156] [식 I]

[0157] 식에서 n = 1 내지 4임;



[0158] [식 II]

[0159] 식에서 n = 1 내지 4임.

[0160] 한 구현예에서 R_{10}이 X_7X_8인 서열 번호 23의 펩타이드가 제공되며, X_7은 아실화된 Lys 또는 아실화된 dLys이고, X_{12}는 Arg이며 X_{40}은 아실화된 Lys이다. 한 구현예에서 R_{10}이 NH_2이고, X_{12}는 아실화된 Lys이며 X_{40}은 아실화된 Lys인 서열 번호 23의 펩타이드가 제공된다. 한 구현예에서 R_{10}이 NH_2이고, X_{12}는 Arg이며 X_{40}은 아실화된 Lys인 서열 번호 23의 펩타이드가 제공된다. 한 구현예에서 서열 번호 23의 펩타이드의 아실화된 아미노산은 아실화된 Lys 잔기이고, 선택적으로 아실화된 Lys 잔기는 C14-C24 지방산 또는 지방 이산, 또는 C16-C18 지방산 또는 지방 이산으로 독립적으로 아실화되며, 선택적으로 지방산 또는 지방 이산은 본원에 개시된 임의의 스페이서를 통해 Lys 잔기의 측쇄에 연결된다.

[0161] 한 구현예에 따르면 R_{10}-$DVX_{11}X_{12}YLEX_{16}QAVREFIEWLVRGGPSSGAPPPSX_{40}$-$R_{20}$(서열 번호 24)의 아미노산 서열을 포함하는 GLP-1 수용체 길항물질이 제공되며,

[0162] 여기서

[0163] R_{10}은 NH_2-$CO(CH_2)_{14-20}CH_3$, -$CO(CH2)_{14-20}COOH$ 또는 구조: X_7X_8의 다이펩타이드이고, 여기서 X_7은 아실화된 아미노산, 선택적으로 아실화된 Lys 또는 아실화된 dLys이며, X_8은 Gly 또는 C_1-C_4 N-알킬화된 Gly이고;

[0164] X_{11}은 Trp, dTrp 또는 Ser이며;

[0165] X_{12}는 Arg 또는 아실화된 아미노산, 선택적으로 아실화된 Lys이고;

[0166] X_{16}은 Glu 또는 Asp이며;

[0167] X_{40}은 아실화된 아미노산, 선택적으로 아실화된 Lys이고;

[0168] R_{20}은 COOH 또는 $CONH_2$이며, 선택적으로 위치 16, 17, 18, 20 또는 21로부터 선택된 1, 2 또는 3개의 아미노산은 D-입체형태의 상응하는 아미노산으로 치환되고/거나, 위치 16, 18, 19, 24, 26, 또는 28 중 임의의 위치에서의 1, 2 또는 3개의 아미노산은 Aib로 치환된다.

[0169] 한 구현예에 따르면 R_{10}-$DVX_{11}X_{12}YLEX_{16}QAVREFIEWLVRGGPSSGAPPPSX_{40}$-$R_{20}$(서열 번호 24)의 아미노산 서열을 포함하는 GLP-1 수용체 길항물질이 제공되며,

[0170] 여기서

[0171] R_{10}은 구조: X_7X_8의 다이펩타이드이고, 여기서 X_7은 아실화된 Lys 또는 아실화된 dLys이며, X_8은 Gly 또는 사르코신이고;

[0172] X_{11}은 Trp 또는 dTrp이며;

[0173] X_{12}는 Arg이고;

[0174] X_{16}은 Glu이며;

[0175] X_{40}은 아실화된 Lys이고;

[0176] R_{20}은 COOH 또는 $CONH_2$이며, 펩타이드의 상기 아실화된 Lys 잔기는 선택적으로 본원에 개시된 스페이서를 통해 C16-C18 지방산 또는 지방 이산으로 독립적으로 아실화되고, 선택적으로 위치 16, 18, 19, 24, 26, 또는 28 중 임의의 위치에서의 1, 2 또는 3개의 아미노산은 Aib로 치환된다.

[0177] 한 구현예에서 GLP-1 수용체 길항물질이 제공되고, 여기서 길항물질은

[0178] $DX_{10}X_{11}X_{12}YLX_{15}X_{16}QAVREFX_{23}X_{24}WLVRGGPSSGAPPPS$(서열 번호 98)의 아미노산 서열을 포함하고; 여기서

[0179] X_{10}은 Trp, dTrp 또는 Val이고;

[0180] X_{11}은 Trp, dTrp 또는 Ser이고;

[0181] X_{12}는 Arg, Lys 또는 Ser이고;

[0182] X_{15}는 Glu 또는 dGlu이고;

[0183] X_{16}은 Trp, dTrp, dGlu 또는 Glu이고;

[0184] X_{23}은 Ile 또는 dIle이고;

[0185] X_{24}는 Ala 또는 Glu이고;

[0186] 상기 GLP-1 수용체 길항물질은 고친화도로 혈청 알부민에 결합하기에 충분한 크기의 지방산 또는 이산 기로 아실화되고, 선택적으로 GLP-1 수용체 길항물질의 아미노산은 C16-C18 지방산 또는 C16-C18 지방 이산으로 아실화된다.

[0187] 한 구현예에서 GLP-1 수용체 길항물질이 제공되며, 여기서 길항물질은

[0188] R_{10}-D$X_{10}X_{11}X_{12}$YL$X_{15}X_{16}$QAVREF$X_{23}X_{24}$WLVRGGPSSGAPPPS-R_{20}(서열 번호 98)의 아미노산 서열, 또는

[0189] 1개 또는 2개의 아미노산 치환에 의한 서열 번호 98과 상이한 서열

[0190] 을 포함하고; 여기서

[0191] X_{10}은 Trp, dTrp 또는 Val이고;

[0192] X_{11}은 Trp, dTrp 또는 Ser이고;

[0193] X_{12}는 Arg, Lys 또는 Ser이고;

[0194] X_{15}는 Glu 또는 dGlu이고;

[0195] X_{16}은 Trp, dTrp, dGlu 또는 Glu이고;

[0196] X_{23}은 Ile 또는 dIle이고;

[0197] X_{24}는 Ala 또는 Glu이고;

[0198] R_{10}은 NH_2, $-CO(CH_2)_{14-20}CH_3$ 또는 $-CO(CH_2)_{14-20}COOH$이고;

[0199] R_{20}은 COOH 또는 $CONH_2$이다. 한 구현예에서 서열 번호 98의 서열이 제공되고, 여기서

[0200] X_{10}은 Val이고;

[0201] X_{11}은 Trp, dTrp 또는 Ser이고;

[0202] X_{12}는 Arg, Lys 또는 Ser이고;

[0203] X_{15}는 Glu 또는 dGlu이고;

[0204] X_{16}은 dGlu 또는 Glu이고;

[0205] X_{23}은 Ile이고;

[0206] X_{24}는 Ala 또는 Glu이고;

[0207] R_{10}은 $-CO(CH_2)_{14-20}CH_3$ 또는 $-CO(CH_2)_{14-20}COOH$이고;

[0208] R_{20}은 COOH이고, 선택적으로 펩타이드는 천연 Exendin4 서열(서열 번호 1)에 대한 위치 16, 18, 19, 24, 26 또는 28 중 임의의 위치에서의 Aib의 하나 이상의 치환을 포함한다.

[0209] 한 구현예에서 GLP-1 수용체 길항물질이 제공되며, 여기서 길항물질은

[0210] R_{10}-D$X_{10}X_{11}X_{12}$YL$X_{15}X_{16}$QAVREF$X_{23}X_{24}$WLVRGGPSSGAPPPS-R_{20}(서열 번호 98)의 아미노산 서열을 포함하고; 여기서

[0211] X_{10}은 Val이고;

[0212] X_{11}은 Ser이고;

[0213] X_{12}는 Arg이고;

[0214] X_{15}는 Glu 또는 dGlu이고;

[0215] X_{16}은 dGlu 또는 Glu이고;

[0216] X_{23}은 Ile이고;

[0217] X_{24}는 Glu이고;

[0218] R_{10}은 $-CO(CH_2)_{14-20}CH_3$ 또는 $-CO(CH_2)_{14-20}COOH$이고;

[0219] R_{20}은 COOH 또는 $CONH_2$이다.

[0220] 한 구현예에서 GLP-1 길항물질 펩타이드는

[0221] R_{10}-DVSSYLEEQAVREFIAWLVKGGPSSGAPPPS(서열 번호 3)의 아미노산 서열 또는

[0222] GLP-1 작용물질 활성을 유지하면서 1, 2 또는 3개의 아미노산 치환에 의해 서열 번호 3과 상이한 아미노산 서열

[0223] 을 포함하고, 여기서 R_{10}은 서열 번호 3의 아미노산 서열의 N 말단 알파 아민에 연결된 $-CO(CH_2)_{14-20}CH_3$ 또는 $-CO(CH_2)_{14-20}COOH$이고, R_{20}은 COOH 또는 $CONH_2$이고, 선택적으로 R_{20}은 COOH이다.

[0224] 한 구현예에서 GLP-1 길항물질 펩타이드는

[0225] DVX_{11}RYLQ$X_{15}X_{16}$AVREFX_{23}EWLVRGGPSSGAPPPSX_{40}-R_{20}(서열 번호 25)의 아미노산 서열을 포함하며, 여기서

[0226] X_{11}은 Trp, dTrp 또는 Ser이고;

[0227] X_{15}는 Glu 또는 dGlu이며;

[0228] X_{16}은 Glu 또는 dGlu이고;

[0229] X_{23}은 Ile, 또는 dIle이며;

[0230] X_{40}은 선택적으로 스페이서를 통해 아실화된 아미노산, 선택적으로 C16-C18 지방산 또는 이산으로 아실화된 Lys이고;

[0231] R_{20}은 COOH 또는 $CONH_2$이다. 선택적으로, 서열 번호 25의 GLP-1 길항물질은 서열 번호 1의 천연 Exendin4 서열의 넘버링에 대해 위치 16, 18, 19, 24, 26, 또는 28 중 임의의 위치에서 하나 이상의 Aib 치환, 또는 위치 12에서 아실화된 Lys의 치환에 의해 추가로 변형된다. 한 구현예에서 위치 12에서 아실화된 Lys의 치환 및 위치 27에서 Aib의 선택적 치환을 추가로 포함하는 서열 번호 25의 펩타이드가 제공된다.

[0232] 한 구현예에서 GLP-1 길항물질 펩타이드는

[0233] DVX_{11}RYLEEQAVREFIEWLVRGGPSSGAPPPS$X_{40}R_2$(서열 번호 6) 또는

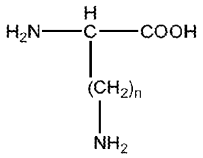
[0234] X_7X_8DVX_{11}RYLEEQAVREFIEWLVRGGPSSGAPPPS$X_{40}R_{20}$(서열 번호 26)의 아미노산 서열을 포함하며, 여기서 X_7은 아실화된 Lys 또는 아실화된 dLys이고, X_8은 Gly 또는 사르코신이며, X_{11}은 Trp 또는 dTrp이고, X_{40}은 아실화된 아미노산, 선택적으로 아실화된 Lys이며, 아실화된 Lys 잔기는 선택적으로 스페이서를 통해 Lys 측쇄에 공유 결합된 C16-C18 지방산 또는 이산을 포함하고, R_{20}은 COOH 또는 $CONH_2$이다. 선택적으로, 서열 번호 6 및 서열 번호 26의 펩타이드는 천연 Exendin4(서열 번호 1)의 넘버링을 기초로 위치 16, 18, 19, 24, 26 또는 28 중 임의의 위치에서

임의의 한 위치에서 Aib 치환으로 추가로 변형될 수 있거나 또는 서열 번호 6의 펩타이드는 위치 12에서 아실화된 Lys로 선택적으로 치환된다.

[0235] 한 구현예에서 GLP-1 길항물질 펩타이드는

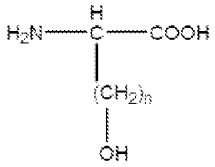
[0236] $DVX_{11}RYLEEQAVREFIEWLVRGGPSSGAPPPSX_{40}R_{20}$(서열 번호 6) 또는

[0237] $DVWRYLEEQAVREFIEWLVRGGPSSGAPPPSX_{40}R_{20}$(서열 번호 7)의 아미노산 서열 또는 서열 번호 6 또는 서열 번호 7과 1 또는 2개의 아미노산 치환이 상이한 아미노산을 포함하며, 여기서 X_{11}은 Trp 또는 dTrp이고, X_{40}은 아미노산의 측쇄에 연결된 혈청 알부민에 고친화성으로 결합하기에 충분한 크기의 아실 기를 가지는 아미노산이며, 선택적으로 아실 기는 스페이서를 통해 연결되고, R_{20}은 선택적으로 천연 Exendin4(서열 번호 1)의 넘버링에 대해 위치 16, 18, 19, 24, 26 또는 28 중 어느 하나에 Aib 치환을 갖는 COOH 또는 $CONH_2$이며 선택적으로 C 말단 아미노산의 카르복시 기는 아미드로 치환된다(즉, R_{20}은 $CONH_2$임). 한 구현예에서 X_{40}은 식 I의 구조를 포함하는 아미노산(선택적으로, Lys), 식 II의 구조를 포함하는 아미노산(선택적으로, Ser), 또는 식 III의 구조를 포함하는 아미노산(선택적으로, Cys)이며, 식 I, II, 및 III은 각각 다음과 같다:



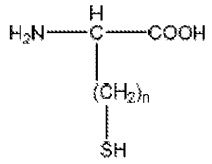
[0238] [식 I]

[0239] 식에서 n = 1 내지 4임;



[0240] [식 II]

[0241] 식에서 n = 1 내지 4임;



[0242] [식 III]

[0243] 식에서 n = 1 내지 4임.

[0244] 한 구현예에서 GLP-1 길항물질 펩타이드는

[0245] $DVX_{11}RYLEEQAVREFIEWLVRGGPSSGAPPPSX_{40}$-COOH(서열 번호 9) 또는

[0246] $DVX_{11}RYLEEQAVREFIEWLVRGGPSSGAPPPSX_{40}$-$NH_2$(서열 번호 10)의 아미노산 서열을 포함하며, X_{11}은 Trp 또는 dTrp이고, X_{40}은 선택적으로 스페이서를 통해 아미노산의 측쇄에 연결된 아실 기를 갖는 아미노산이다. 한 구현예에서 X_{40}은 아실화된 Lys이다.

[0247] 한 구현예에 따르면 $DVWX_{12}YLEEQAVREFIEWLVRGGPSSGAPPPSX_{40}$-$NH_2$(서열 번호 8)의 아미노산 서열을 가지는 GLP-1 수용체 길항물질 펩타이드가 제공되며, 여기서

[0248] X_{12}는 아실화된 Lys이고;

[0249] X_{40}은 C 말단 카르복실산에 대해 아미드로 치환된 아실화된 Lys이며, 아실화된 Lys의 아실 기는 선택적으로 스페이서를 통해 Lys 측쇄에 연결된 C16-C18 산 또는 이산이다.

[0250] 또 다른 측면으로, 본원에 개시된 GLP-1 수용체 길항물질 중 어느 것의 위치 1에 있는 아미노산은 펩타이드의

프로테아제 분해를 억제하기 위해 변형된다. 한 구현예에서, 프로테아제의 억제는:

[0251] i. N 말단 아미노산의 측쇄를 아실화함으로써;

[0252] ii. N 말단 아미노산을 그것의 D-입체이성질체로 치환함으로써;

[0253] iii. 예를 들어, 아세틸 기를 알파 아민에 공유 결합시키거나, 또는 알파 아민 기를 제거하는 것을 포함하여 N 말단 알파 아민을 변형시킴으로써; 또는

[0254] iv. i)-iii)의 임의의 조합에 의해 달성된다.

[0255] 한 구현예에서 $DVX_{11}RYLEEQAVREFIEWLVRGGPSSGAPPPSX_{40}R_2$(서열 번호 6)의 서열을 포함하는 펩타이드가 서열 번호 6에 대해 최대 3개의 아미노산 변형을 갖는 것이 제공되며, 여기서 X_{11}은 Trp 또는 dTrp이고, X_{40}은 아실화된 아미노산이며, R_{20}은 COOH 또는 $CONH_2$이고, 펩타이드는 인간 GLP-1에서 길항물질 활성을 나타낸다.

[0256] 한 구현예에서 GLP-1 수용체 길항물질은 다음으로 이루어진 군으로부터 선택된 펩타이드를 포함한다:

DV(dW)RYLEEQAVREFIEWLVRGGPSSGAPPPSX40 R20, (서열 번호 27)
DVWRYLEEQAVREFIEWLVRGGPSSGAPPPSX40 R20, (서열 번호 28)
DV(dW)RYLE(Aib)QAVREFIEWLVRGGPSSGAPPPSX40 R20, (서열 번호 29)
DVWRYLE(Aib)QAVREFIEWLVRGGPSSGAPPPSX40 R20, (서열 번호 30)
DV(dW)RYLEEQ(Aib)VREFIEWLVRGGPSSGAPPPSX40 R20, (서열 번호 31)
DVWRYLEEQ(Aib)VREFIEWLVRGGPSSGAPPPSX40 R20, (서열 번호 32)
DV(dW)RYLEEQA(Aib)REFIEWLVRGGPSSGAPPPSX40 R20, (서열 번호 33)
DVWRYLEEQA(Aib)REFIEWLVRGGPSSGAPPPSX40 R20, (서열 번호 34)
DV(dW)RYLEEQAVREFI(Aib)WLVRGGPSSGAPPPSX40 R20, (서열 번호 35)
DVWRYLEEQAVREFI(Aib)WLVRGGPSSGAPPPSX40 R20, (서열 번호 36)
DV(dW)RYLEEQAVREFIEW(Aib)VRGGPSSGAPPPSX40 R20, (서열 번호 37)
DVWRYLEEQAVREFIEW(Aib)VRGGPSSGAPPPSX40 R20, (서열 번호 38)
DV(dW)RYLEEQAVREFIEWLV(Aib)GGPSSGAPPPSX40 R20, (서열 번호 39)
DVWRYLEEQAVREFIEWLV(Aib)GGPSSGAPPPSX40 R20, (서열 번호 40)
DV(dW)RYLEEQAV(dR)EFIEWLVRGGPSSGAPPPSX40 R20, (서열 번호 41)

[0257] DVWRYLEEQAV(dR)EFIEWLVRGGPSSGAPPPSX40 R20, (서열 번호 42)

,

[0258] 여기서 X_{40}은 아실화된 아미노산, 선택적으로 C16-C18 지방산 또는 이산으로 아실화된 Lys이고, R_{20}은 COOH 또는 $CONH_2$이며, 펩타이드는 인간 GLP-1에서 길항물질 활성을 나타낸다.

[0259] 한 구현예에서 GLP-1 수용체 길항물질은 다음으로 이루어진 군으로부터 선택된 펩타이드를 포함한다:

R10-DV(dW)RYLEEQAVREFIEWLVRGGPSSGAPPPS-R20, (서열 번호 100)
R10-DVWRYLEEQAVREFIEWLVRGGPSSGAPPPS-R20, (서열 번호 101)
R10-DV(dW)RYLE(Aib)QAVREFIEWLVRGGPSSGAPPPS-R20, (서열 번호 102)
R10-DVWRYLE(Aib)QAVREFIEWLVRGGPSSGAPPPS-R20, (서열 번호 103)
R10-DV(dW)RYLEEQ(Aib)VREFIEWLVRGGPSSGAPPPS-R20, (서열 번호 104)
R10-DVWRYLEEQ(Aib)VREFIEWLVRGGPSSGAPPPS-R20, (서열 번호 105)
R10-DV(dW)RYLEEQA(Aib)REFIEWLVRGGPSSGAPPPS-R20, (서열 번호 106)
R10-DVWRYLEEQA(Aib)REFIEWLVRGGPSSGAPPPS-R20, (서열 번호 107)
R10-DV(dW)RYLEEQAVREFI(Aib)WLVRGGPSSGAPPPS-R20, (서열 번호 108)

[0260] R10-DVWRYLEEQAVREFI(Aib)WLVRGGPSSGAPPPS-R20, (서열 번호 109)

R10-DV(dW)RYLEEQAVREFIEW(Aib)VRGGPSSGAPPPS-R20, (서열 번호 110)
R10-DVWRYLEEQAVREFIEW(Aib)VRGGPSSGAPPPS-R20, (서열 번호 111)
R10-DV(dW)RYLEEQAVREFIEWLV(Aib)GGPSSGAPPPS-R20, (서열 번호 112)
R10 DVWRYLEEQAVREFIEWLV(Aib)GGPSSGAPPPS-R20, (서열 번호 113)
R10-DV(dW)RYLEEQAV(dR)EFIEWLVRGGPSSGAPPPS-R20, (서열 번호 114)

[0261] R10-DVWRYLEEQAV(dR)EFIEWLVRGGPSSGAPPPS-R20, (서열 번호 115)

,

[0262] 여기서 R_{10}은 폴리펩타이드의 N 말단 알파 아민에 연결된 $-CO(CH_2)_{14-20}CH_3$ 또는 $-CO(CH_2)_{14-20}COOH$이고, R_{20}은 COOH

또는 $CONH_2$이고, 펩타이드는 인간 GLP-1에서 길항물질 활성을 나타낸다.

[0263] 본 개시의 추가의 예시된 종은 표 1에서 열거된 것들을 포함한다:

표 1

서열 번호	설명/화합물 기재	서열
1	Exendin-4	HGEGTFTSDVSKQMEEEAVRLFIEWLKNGGPSSGAPPPS
2	Ex-4 (9-39)a	DVSKQMEEEAVRLFIEWLKNGGPSSGAPPPS
3	Jant4 9-40am; K40[C16]	DVSSYLEEQAVREFIAWLVKGGPSSGAPPPS**K[C16]**-OH
4		DVSRYLEEQAVREFIEWLVRGGPSSGAPPPSK
5		$DX_{10}X_{11}RYLX_{15}X_{16}QAVREFX_{23}EWLVRGGPSSGAPPPSX_{40}$
6		$DVX_{11}RYLEEQAVREFIEWLVRGGPSSGAPPPSX_{40}$
7		$DVWRYLEEQAVREFIEWLVRGGPSSGAPPPSX_{40}$
8		$DVWX_{12}YLEEQAVREFIEWLVRGGPSSGAPPPSX_{40}$-$NH_2$)
9		$DVX_{11}RYLEEQAVREFIEWLVRGGPSSGAPPPSX_{40}$-COOH
10		$DVX_{11}RYLEEQAVREFIEWLVRGGPSSGAPPPSX_{40}$-$NH_2$
11		$DVX_{11}RYLX_{15}X_{16}QAVREFX_{23}EWLVRGGPSSGAPPPSK$
12		$DVSSYLEEQAVREFIAWLVKGGPSSGAPPPSX_{40}$
13		$DVSRYLEEQAVREFIEWLVRGGPSSGAPPPSX_{40}$
14	X_7X_8 = dK(mPeg-γE-DiAcidC18)(N-Me-Gly)	$X_7X_8DVSRYLEEQAVREFIEWLVRGGPSSGAPPPSX_{40}$

[0264]

15	X_7X_8 = dK(mPeg-γE-DiAcidC18)(N-iPr-Gly	X_7X_8DVSRYLEEQAVREFIEWLVRGGPSSGAPPPSX_{40}
16	9-40AC; Jant4 (R12,E24,R28) K40[mPEG-gE-C16]	DVS**R**YLEEQAVREFI**E**WLV**R**GGPSSGAPPPS**K[miniPEG-γE-C16]-**OH
17	9-40AC, dK7(mPeg-γE(DiAcid C18))G8 R12,E24,R28, K40(mPeg-γE(C16)) (전구약물)	**dK(mPeg-γE-DiAcidC18)G**DVS**R**YLEEQAVREFI**E**WLV**R**GGPSSGAPPPS**K[miniPEG-gE-C16]**-OH
18	9-40AC, dK7(mPeg-γE(DiAcid C18)) (N-iPr-Gly8) R12,E24,R28, K40(mPeg-γE(C16)) (전구약물)	**dK(mPeg-γE-DiAcidC18)(N-iPr-Gly**)DVS**R**YLEEQAVREFI**E**WLV**R**GGPSSGAPPPSK**[miniPEG-gE-C16]-OH**
19	9-40AC, dK7(mPeg-γE(DiAcid C18)) (N-Me-Gly8) R12,E24,R28, K40(mPeg-γE(C16)) (전구약물)	dK(mPeg-γE-DiAcidC18)(N-Me-Gly8)DVSRYLEEQAVREFIEWLVRGGPSSGAPPPSK[miniPEG-gE-C16]-OH
20	Jant9-40am, dK7(C18 이산-gE-mPeg-K(mPeg-gE-C18 이산),G8, K40(mPeg-gE-C18 이산)	dK7(C18 이산-gE-mPeg-K(mPeg-gE-C18 이산)GDVSRYLEEQAVREFIEWLVRGGPSSGAPPPSK[miniPEG-gE-C18 이산)-NH2
21	Jant9-40am, dK7(C18 이산-gE-mPeg-K(mPeg-gE-C18 이산),G8, K40(mPeg-gE-C16)	dK7(C18 이산-gE-mPeg-K(mPeg-gE-C18 이산)GDVSRYLEEQAVREFIEWLVRGGPSSGAPPPSK[miniPEG-gE-C16)-NH2

[0265]

22	Jant9-40am, dK7(C18 이산-gE-mPeg-K(mPeg-gE-C18 이산),N-meGly, K40(mPeg-gE-C16)	dK7(C18 이산-gE-mPeg-K(mPeg-gE-C18 이산)-N-MeGly-DVSRYLEEQAVREFIEWLVRGGPSSGAPPPSK[miniPEG-gE-C16)-NH2
23		$DVX_{11}X_{12}YLX_{15}X_{16}QAX_{19}X_{20}EFX_{23}EWLVRGGPSSGAPPPSX_{40}$
24		$DVX_{11}X_{12}YLEX_{16}QAVREFIEWLVRGGPSSGAPPPSX_{40}$
25		$DVX_{11}RYLQX_{15}X_{16}AVREFX_{23}EWLVRGGPSSGAPPPSX_{40}$
26		$X_7X_8DVX_{11}RYLEEQAVREFIEWLVRGGPSSGAPPPSX_{40}R_{20}$
27		$DV(dW)RYLEEQAVREFIEWLVRGGPSSGAPPPSX_{40}R_{20}$
28		$DVWRYLEEQAVREFIEWLVRGGPSSGAPPPSX_{40}R_{20}$
29		$DV(dW)RYLE(Aib)QAVREFIEWLVRGGPSSGAPPPSX_{40}R_{20}$
30		$DVWRYLE(Aib)QAVREFIEWLVRGGPSSGAPPPSX_{40}R_{20}$
31		$DV(dW)RYLEEQ(Aib)VREFIEWLVRGGPSSGAPPPSX_{40}R_{20}$
32		$DVWRYLEEQ(Aib)VREFIEWLVRGGPSSGAPPPSX_{40}R_{20}$
33		$DV(dW)RYLEEQA(Aib)REFIEWLVRGGPSSGAPPPSX_{40}R_{20}$
34		$DVWRYLEEQA(Aib)REFIEWLVRGGPSSGAPPPSX_{40}R_{20}$
35		$DV(dW)RYLEEQAVREFI(Aib)WLVRGGPSSGAPPPSX_{40}R_{20}$
36		$DVWRYLEEQAVREFI(Aib)WLVRGGPSSGAPPPSX_{40}R_{20}$
37		$DV(dW)RYLEEQAVREFIEW(Aib)VRGGPSSGAPPPSX_{40}R_{20}$
38		$DVWRYLEEQAVREFIEW(Aib)VRGGPSSGAPPPSX_{40}R_{20}$
39		$DV(dW)RYLEEQAVREFIEWLV(Aib)GGPSSGAPPPSX_{40}R_{20}$
40		$DVWRYLEEQAVREFIEWLV(Aib)GGPSSGAPPPSX_{40}R_{20}$
41		$DV(dW)RYLEEQAV(dR)EFIEWLVRGGPSSGAPPPSX_{40}R_{20}$
42		$DVWRYLEEQAV(dR)EFIEWLVRGGPSSGAPPPSX_{40}R_{20}$
43	9-40am; Jant4 (K27, Aib28) K40[C16]	DVSSYLEEQAVREFIAWLK(Aib)GGPSSGAPPPSK[C16]-NH2
44	9-40am; Jant4 (Aib26) K40[C16]	DVSSYLEEQAVREFIAW(Aib)VKGGPSSGAPPPSK[C16]-NH2
45	9-40am; Jant4 (Aib19) K40[C16]	DVSSYLEEQA(Aib)REFIAWLVKGGPSSGAPPPSK[C16]-NH2
46	9-40am; Jant4 (Aib18) K40[C16]	DVSSYLEEQ(Aib)VREFIAWLVKGGPSSGAPPPSK[C16]-NH2

[0266]

[0267]

47	9-40am; Jant4 K40[C16]	DVSSYLEEQAVREFIAWLVKGGPSSGAPPPSK[C16]-NH2
48	9-40am; Jant4 K40[(mPEG)2-gE-C16]	DVSSYLEEQAVREFIAWLVKGGPSSGAPPPSK[(miniPEG)2-gE-C16]-NH2
49	9-40am; Jant4 (dE15) K40[C16]	DVSSYL(dE)EQAVREFIAWLVKGGPSSGAPPPSK[C16]-NH2
50	9-40am; Jant4 (dV19) K40[C16]	DVSSYLEEQA(dV)REFIAWLVKGGPSSGAPPPSK[C16]-NH2
51	9-40am; Jant4 (dI23) K40[C16]	DVSSYLEEQAVREF(dI)AWLVKGGPSSGAPPPSK[C16]-NH2
52	9-40am; Jant4 K40[gE-C16]	DVSSYLEEQAVREFIAWLVKGGPSSGAPPPSK[gE-C16]-NH2
53	9-40am; Jant4 K40[gE2-C16]	DVSSYLEEQAVREFIAWLVKGGPSSGAPPPSK[gE2-C16]-NH2
54	9-40am; Jant4 K40[gE4-C16]	DVSSYLEEQAVREFIAWLVKGGPSSGAPPPSK[gE4-C16]-NH2
55	9-40am; Jant4 K40[gE6-C16]	DVSSYLEEQAVREFIAWLVKGGPSSGAPPPSK[gE6-C16]-NH2
56	9-40am; Jant4 K40[mPEG-gE-C16]	DVSSYLEEQAVREFIAWLVKGGPSSGAPPPSK[miniPEG-gE-C16]-NH2
57	9-40am; Jant4 K40[EP2E-C16]	DVSSYLEEQAVREFIAWLVKGGPSSGAPPPSK[gE-(miniPEG)2-gE-C16]-NH2
58	9-40am; Jant4 K40(P2E2-C16)	DVSSYLEEQAVREFIAWLVKGGPSSGAPPPSK[(miniPEG)2-gE2-C16]-NH2
59	9-40am; Jant4 K40(PEPE-C16)	DVSSYLEEQAVREFIAWLVKGGPSSGAPPPSK[miniPEG-gE-miniPEG-gE-C16]-NH2
60	9-40am; Jant4 K40[PE2P-C16]	DVSSYLEEQAVREFIAWLVKGGPSSGAPPPSK[miniPEG-gE2-miniPEG-C16]-NH2
61	9-40am; Jant4 K40[E2P2-C16]	DVSSYLEEQAVREFIAWLVKGGPSSGAPPPSK[gE2-(miniPEG)2-C16]-NH2
62	9-40am; Jant4 K40[EPEP-C16]	DVSSYLEEQAVREFIAWLVKGGPSSGAPPPSK[gE-miniPEG-gE-miniPEG-C16]-NH2

63	9-40am;Jant4 K40[DiAcC18]	DVSSYLEEQAVREFIAWLVKGGPSSGAPPPSK[DiAcid C18]-NH2
64	9-40am; Jant4 K40[gE2-DiAcC18]	DVSSYLEEQAVREFIAWLVKGGPSSGAPPPSK[gE2-DiAcidC18]-NH2
65	9-40am; Jant4 K40[gE4-DiAcC18]	DVSSYLEEQAVREFIAWLVKGGPSSGAPPPSK[gE4-DiAcidC18]-NH2
66	9-40am; Jant4 K40[gE6-DiAcC18]	DVSSYLEEQAVREFIAWLVKGGPSSGAPPPSK[gE6-DiAcidC18]-NH2
67	9-40am; Jant4 K40[(mPEG)2-gE-DiAC18]	DVSSYLEEQAVREFIAWLVKGGPSSGAPPPSK[(miniPEG)2-gE-DiAcidC18]-NH2
68	9-40am; Jant4 K40[mPEG-gE-DiAcC18]	DVSSYLEEQAVREFIAWLVKGGPSSGAPPPSK[miniPEG-gE-DiAcC18]-NH2
69	9-40am; Jant4 (R28) K40[C16]	DVSSYLEEQAVREFIAWLVRGGPSSGAPPPSK[C16]-NH2
70	9-40am; Jant4 (E24,R28) K40[C16]	DVSSYLEEQAVREFIEWLVRGGPSSGAPPPSK[C16]-NH2
71	9-40am; Jant4 (E17,R28) K40[C16]	DVSSYLEEEAVREFIAWLVRGGPSSGAPPPSK[C16]-NH2
72	9-40am; Jant4 (E17,E24,R28) K40[C16]	DVSSYLEEEAVREFIEWLVRGGPSSGAPPPSK[C16]-NH2
73	9-40am; Jant4 (R12,R28) K40[C16]	DVSRYLEEQAVREFIAWLVRGGPSSGAPPPSK[C16]-NH2
74	9-40am; Jant4 (R12,E24,R28) K40[C16]	DVSRYLEEQAVREFIEWLVRGGPSSGAPPPSK[C16]-NH2
75	9-40am; Jant4 (R12,E17,E24,R28) K40[C16]	DVSRYLEEEAVREFIEWLVRGGPSSGAPPPSK[C16]-NH2
76	Ex9 K40[C16]	DLSKQMEEEAVRLFIEWLKNGGPSSGAPPPSK[C16]-NH2
77	9-40AC; Jant4 (R28) K40[mPEG-gE-C16]	DVSSYLEEQAVREFIAWLVRGGPSSGAPPPSK[miniPEG-gE-C16]-OH

[0268]

78	9-40AC; Jant4 (E24,R28) K40[mPEG-gE-C16]	DVSSYLEEQAVREFIEWLVRGGPSSGAPPPSK[miniPEG-gE-C16]-OH
79	9-40AC; Jant4 (E24,R27,V28) K40[mPEG-gE-C16]	DVSSYLEEQAVREFIEWLRVGGPSSGAPPPSK[miniPEG-gE-C16]-OH
80	9-40AC; Jant4 (E24,R27,Aib28) K40[mPEG-gE-C16]	DVSSYLEEQAVREFIEWLR(Aib)GGPSSGAPPPSK[miniPEG-gE-C16]-OH
81	9-40am; Jant4 (Aib27) K40[C16]	DVSSYLEEQAVREFIAWL(Aib)KGGPSSGAPPPSK[C16]-NH2
82	9-40am; Jant4 (K26, Aib28) K40[C16]	DVSSYLEEQAVREFIAWKV(Aib)GGPSSGAPPPSK[C16]-NH2
83	9-40am; Jant4 (Aib24) K40[C16]	DVSSYLEEQAVREFI(Aib)WLVKGGPSSGAPPPSK[C16]-NH2
84	9-40am; Jant4 (Aib16) K40[C16]	DVSSYLE(Aib)QAVREFIAWLVKGGPSSGAPPPSK[C16]-NH2
85	9-40am; Jant4 (dE16) K40[C16]	DVSSYLE(dE)QAVREFIAWLVKGGPSSGAPPPSK[C16]-NH2
86	9-40am; Jant4 (dQ17) K40[C16]	DVSSYLEE(dQ)AVREFIAWLVKGGPSSGAPPPSK[C16]-NH2
87	9-40am; Jant4 (dR20) K40[C16]	DVSSYLEEQAV(dR)EFIAWLVKGGPSSGAPPPSK[C16]-NH2
88	9-40am; Jant4 (dE21) K40[C16]	DVSSYLEEQAVR(dE)FIAWLVKGGPSSGAPPPSK[C16]-NH2
89	Ex9, dK7(PEG2-γE(C16)), G8	dK(Peg2-gE(C16)) GDLSKQMEEEAVRLFIEWLKNGGPSSGAPPPS-NH2
90	Ex9-40am, K40(C18 이산)	DLSKQMEEEAVRLFIEWLKNGGPSSGAPPPSK(C18 이산)-NH2
91	Ex9-40am, W11, K40(C18 이산)	DLWKQMEEEAVRLFIEWLKNGGPSSGAPPPSK(C18 이산)-NH2
92	Ex9-40am, dW11, K40(C18 이산)	DLdWKQMEEEAVRLFIEWLKNGGPSSGAPPPSK(C18 이산)-NH2

[0269]

93	Ex9-40am, W11, K40(mPeg-gE-C18 이산)	DLWKQMEEEAVRLFIEWLKNGGPSSGAPPPSK(mPeg-gE(C18 이산))-NH2
94	Ex9-40am, dW11,K40(mPeg-gE-C18 이산)	DLdWKQMEEEAVRLFIEWLKNGGPSSGAPPPSK(mPeg-gE(C18 이산))-NH2
95	9-40am; Jant4 K40	DVSSYLEEQAVREFIAWLVKGGPSSGAPPPSK-NH2

[0270]

[0271] 한 구현예에서 본 개시의 둘 이상의 GLP-1 수용체 길항물질 펩타이드를 포함하는 이량체 및 다량체는 동종- 또는 이종-다량체 또는 동종- 또는 이종-이량체를 포함하여 제조된다. 둘 이상의 GLP-1 수용체 길항물질 펩타이드는 기술분야에 숙련된 사람들에게 알려져 있는 표준 결합제 및 과정을 사용하여 함께 결합될 수 있다. 예를 들어, 이량체는 특히 시스테인, 리신, 오르니틴, 호모시스테인 또는 아세틸 페닐알라닌 잔기를 포함하거나, 또는 이것들로 치환된 GLP-1 수용체 길항물질 펩타이드의 경우 이중작용성 티올 가교제 및 이중작용성 아민 가교제의 사용을 통해 두 펩타이드 사이에서 형성될 수 있다. 이량체는 동종이량체이거나 또는 대안적으로 이종이량체일 수 있다. 예시의 구현예에서, 두(또는 둘 이상) 유사체를 연결시키는 링커는 PEG, 예컨대, 5 kDa PEG, 20 kDa PEG이다. 일부 구현예에서, 링커는 이황화 결합이다. 예를 들어, 이량체의 각각의 단량체는 Cys 잔기(예컨대, 말단의 또는 내부에 위치한 Cys)를 포함할 수 있고 각각의 Cys 잔기의 황 원자는 이황화 결합의 형성에 참여한다. 예시의 측면으로, 이량체의 각각의 단량체는 티오에테르 결합을 통해 연결된다. 예시의 측면으로, 한 단량

체의 Lys 잔기의 엡실론 아민이 Cys 잔기에 결합되고, 그것은 계속해서, 화학적 모이어티를 통해 다른 단량체의 Lys 잔기의 엡실론 아민에 연결된다.

[0272] 일부 구현예에서, 단량체는 말단 아미노산(예컨대, N 말단 또는 C 말단, 선택적으로 아미노산이 이량체화된 펩타이드의 말단에 첨가됨)을 통해, 내부 아미노산을 통해, 또는 적어도 한 단량체의 말단 아미노산 및 적어도 하나의 다른 단량체의 내부 아미노산을 통해 연결된다. 일부 구현예에서, 다량체의 단량체는 각각의 단량체의 C 말단 아미노산이 함께 부착되는 "꼬리 대 꼬리" 방향으로 함께 부착된다. 대안적으로, 한 구현예에서 다량체는 각각의 단량체의 N 말단 아미노산이 함께 부착되는 "머리 대 머리" 방향으로 함께 부착된다.

[0273] 한 구현예에서 본원에 개시된 임의의 GLP-1 길항물질 펩타이드의 C 말단 아미노산은 천연 카르복실 기를 아미드로 대체하기 위해 변형될 수 있다. 한 구현예에서 본원에 개시된 임의의 GLP-1 길항물질 펩타이드의 C 말단 아미노산은 천연 아미노산 카르복실 기를 포함한다.

[0274] **약학 조성물**

[0275] 본 개시의 임의의 GLP-1 수용체 길항물질 펩타이드, 이량체, 다량체, 또는 콘쥬게이트(또는 이것들의 조합) 및 약학적으로 허용 가능한 담체, 희석제, 또는 부형제를 포함하는 약학 조성물이 본 개시에 의해 추가로 제공된다. 약학 조성물은 바람직하게 멸균되며 비경구 투여에 적합하다.

[0276] 한 구현예에 따르면 바람직하게는 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99%의 순도 수준의 본원에 개시된 임의의 신규한 GLP-1 수용체 길항물질, 및 약학적으로 허용 가능한 희석제, 담체 또는 부형제를 포함하는 약학 조성물이 제공된다. 그러한 조성물은 본원에 개시된 GLP-1 수용체 길항물질을 적어도 0.1 - 10 mg/ml, 또는 더 높은 농도로 함유할 수 있다. 한 구현예에서 약학 조성물은 멸균되고 선택적으로 다양한 포장 용기 내에서 보관되는 수용액을 포함한다. 다른 구현예에서 약학 조성물은 동결건조된 분말을 포함한다. 약학 조성물은 조성물을 환자에게 투여하기 위한 일회용 장치를 포함하는 키트의 일부분으로서 추가로 포장될 수 있다. 용기 또는 키트는 주변 실온에서 또는 냉장 온도에서 보관하기 위해 라벨이 붙여질 수 있다. 한 구현예에서 약학 조성물 및/또는 키트는 본원에 개시된 임의의 GLP-1 수용체 길항물질을, 한정하는 것은 아니지만 글루코스 보충제(예컨대, 덱스트로스); 글루카곤 및 글루카곤 유사체와 같은 글루코스 상승제 및 인슐린 분비 억제제(예컨대, 다이아족사이드, 옥트레오타이드)를 포함한, 저혈당증 치료에 유용한 임의의 기존 치료제와 함께 포함한다.

[0277] 한 구현예에 따르면 본원에 개시된 약학 조성물은 저혈당증의 병태를 치료 또는 예방하는 방법, 보다 구체적으로 비정형 저혈당증, 또는 저혈당증과 관련된 의학적 상태를 치료 또는 예방하는 방법에 사용하는 것이 고려된다.

[0278] 본 개시의 조성물은 임의의 표준 투여 경로를 사용하여 투여될 수 있다. 비경구 투여에 적합한 제제에는 항산화제, 완충제, 정균작용제, 및 의도된 수령체의 혈액으로 제제를 등장성으로 만드는 용질을 함유할 수 있는 수성 및 비수성, 등장성 멸균 주사 용액, 및 현탁제, 가용화제, 증점제, 안정화제, 및 보존제를 포함할 수 있는 수성 및 비수성 멸균 현탁액이 포함된다. 용어 "비경구"는 소화관을 통하지 않고 피하, 근육내, 척수내, 또는 정맥내와 같이 일부 다른 경로에 의한 것을 의미한다. 한 구현예에서 본 개시의 GLP-1 수용체 길항물질을 포함하는 약학 조성물은 피하 투여 또는 정맥내 투여용으로 제제화된다. 한 구현예에서 개시의 GLP-1 수용체 길항물질은, 단독으로 또는 다른 적합한 구성요소와 함께, 흡입을 통해 투여될 에어로졸 제제로서 제조될 수 있다.

[0279] 한 구현예에서 조성물은 펩타이드 길항물질의 흡수를 충분히 증대시킬 수 있는 흡수 강화제와 함께 본 개시의 GLP-1 수용체 길항물질의 공동 제제화에 의해 경구 전달용으로 제제화된다. 나트륨 N-[8-(2-하이드록시벤조일)아미노]카프릴레이트(SNAC)가 펩타이드를 포함하여 다양한 스펙트럼의 분자, 예컨대 인슐린, GLP-1, 칼시토닌, 및 헤파린과 같은 다른 거대분자의 투과도를 향상시키는 것으로 보고된 전달제이다. 한 구현예에 따르면 경구 전달용 약학 조성물이 제공되며, 조성물은 본 개시의 GLP-1 수용체 길항물질 및 SNAC를 포함하고, 선택적으로 약학 조성물은 정제로서 제제화된다.

[0280] **아실화**

[0281] 한 구현예에 따르면, GLP-1 길항물질 활성을 나타내는, 본원에 개시된 펩타이드, 이량체 또는 다량체 중 어느 것이든지, 예를 들어, 호모 사피엔스(*homo sapiens*)를 포함한 온혈 동물에게 투여될 때 개선된 치료 지수 및 생체내 연장된 작용 시간을 갖도록 추가로 변형될 수 있다. 보다 구체적으로, 한 구현예에서 본원에 개시된 펩타이드 및 이량체는 길항물질 펩타이드의 아미노산, 선택적으로 리신, 세린 또는 시스테인의 측쇄에 대한 알킬 또는 아실 기의 공유 결합에 의해 변형되며, 알킬 또는 아실 기는 높은 친화도로 혈청 알부민에 결합하기에 충분

한 크기의 것이다. 한 구현예에서 알킬화된 또는 아실화된 아미노산은 GLP-1 길항물질 펩타이드 또는 이량체의 C 말단에 위치한다. 한 구현예에서 GLP-1 길항물질 펩타이드는 2개의 아실화된 아미노산을 포함한다. 한 구현예에서 GLP-1 수용체 길항물질 펩타이드의 아미노산 중 하나 이상이 지방산 또는 지방 이산, 선택적으로 C16-C18 지방산 또는 C16-C18 지방 이산으로 아실화된다. 한 구현예에 따르면 본원에 개시된 GLP-1 길항물질 펩타이드 또는 이량체의 하나 이상의 리신 잔기는 리신의 측쇄에 대해 선택적으로 스페이서를 통한 C16-C18 지방산 또는 C16-C18 지방 이산의 공유 결합에 의해 변형된다. 한 구현예에서 아실화된 리신 잔기는 GLP-1 길항물질 펩타이드의 C 말단 아미노산이다. 한 구현예에서 아실화된 아미노산은 GLP-1 길항물질 펩타이드의 위치 40 및 위치 7 또는 12로부터 선택된 제2 위치에 존재한다. 둘 이상의 아실화된 아미노산을 갖는 구현예에서, 아실화된 아미노산은 동일하거나 상이할 수 있고, 연결된 아실 기는 동일하거나 상이할 수 있으며, 단 아실 기는 혈청 알부민에 결합하기에 충분한 크기의 것이어야 한다. 한 구현예에서 아실화된 아미노산은 측쇄가 선택적으로 스페이서를 통해 C16-C18 지방산 또는 C16-C18 지방 이산에 연결되어 있는 리신이다.

[0282] 한 구현예에서, C16-C18 지방산 또는 C16-C18 지방 이산은 스페이서를 통해 아미노산의 측쇄에 연결되며, 스페이서는 miniPEG, 감마 Glu, 또는 miniPEG 및/또는 감마 Glu의 임의의 다량체 또는 조합을 포함한다. 한 구현예에서 본원에 개시된 임의의 GLP-1 수용체 길항물질 펩타이드는 Exendin4의 천연 서열을 참조로, 선택적으로 7, 12 및 40으로부터 선택된 위치에서 아실화된 아미노산을 포함하도록 변형될 수 있다. 한 구현예에서 아실화된 아미노산은 다음 구조:

[0283] -[$COCH_2(OCH_2CH_2)_kNH]_q$-(감마 글루탐산)$_p$-를 포함하는 스페이서를 통해 리신 측쇄에 연결된 C16 내지 C18 지방산 또는 C16 내지 C18 지방 이산을 갖는 리신 잔기이며, 여기서 k는 2, 4, 6 또는 8로부터 선택된 정수이고 p 및 q는 독립적으로 1 또는 2로부터 선택된 정수이다. 한 구현예에서 스페이서는

[0284] -(감마 글루탐산)-$[COCH_2(OCH_2CH_2)_kNH]_2$-(감마 글루탐산)-, 또는

[0285] -$[COCH_2(OCH_2CH_2)_kNH]_q$-(감마 글루탐산)$_p$-$[COCH_2(OCH_2CH_2)_kNH]_q$-(감마 글루탐산)$_p$-, 또는

[0286] -$[COCH_2(OCH_2CH_2)_kNH]_2$-(감마 글루탐산)$_2$-, 또는

[0287] -$[COCH_2(OCH_2CH_2)_kNH]$-(감마 글루탐산)$_2$-$[COCH_2(OCH_2CH_2)_kNH]$-, 또는

[0288] -(감마 글루탐산)$_2$-$[COCH_2(OCH_2CH_2)_kNH]_2$, 또는

[0289] -(감마 글루탐산)-$[COCH_2(OCH_2CH_2)_kNH]$-(감마 글루탐산)$_p$-$[COCH_2(OCH_2CH_2)_kNH]$-, 또는 감마 글루탐산, 또는 감마 글루탐산-감마 글루탐산 다이펩타이드, 또는 감마 글루탐산-$[COCH_2(OCH_2CH_2)_kNH]$-감마 글루탐산으로 이루어진 군으로부터 선택되며, 여기서

[0290] k는 1-8의 범위로부터 선택된 정수이고;

[0291] q 및 p는 독립적으로 1-8의 범위로부터 선택된 정수이며, 선택적으로 k는 2이고 q 및 p는 독립적으로 1 또는 2이다. 한 구현예에서 스페이서는

[0292] -$[COCH_2(OCH_2CH_2)_kNH]_q$-(감마 글루탐산)$_p$-이며, 여기서

[0293] k는 1-4의 범위로부터 선택된 정수이고;

[0294] q 및 p는 독립적으로 1-4의 범위로부터 선택된 정수이며, 선택적으로 k는 2이고 q 및 p는 독립적으로 1 또는 2이며, 선택적으로 k는 2이고 p와 q는 둘 다 1이다.

[0295] 한 구현예에서 GLP-1 수용체 길항물질 펩타이드는 선택적으로 펩타이드의 C 말단에 위치한 아실화된 Lys를 포함하며, 여기서 Lys의 측쇄는 구조: -$[COCH_2(OCH_2CH_2)_kNH]_q$-(감마 글루탐산)$_p$-를 포함하는 스페이서를 통해 C16-C18 이산으로 아실화되고, 여기서

[0296] k는 1-4의 범위로부터 선택된 정수이고;

[0297] q 및 p는 독립적으로 1-4의 범위로부터 선택된 정수이고, 선택적으로 k는 2이고 q 및 p는 독립적으로 1 또는 2이며, 선택적으로 k는 2이고 p와 q는 둘 다 1이다. 한 구현예에서 아실화된 Lys의 측쇄는 구조 -$[COCH_2(OCH_2CH_2)_kNH]_q$-(감마 글루탐산)$_p$-$COC_{16}H_{32}CO_2H$를 포함하며, 여기서 k는 2이고 q 및 p는 독립적으로 1 또는

2이다. 한 구현예에서 DV(dW)RYLEEQAVREFIEWLVRGGPSSGAPPPSX$_{40}$ R$_{20}$(서열 번호 27) 또는 DVWRYLEEQAVREFIEWLVRGGPSSGAPPPSX$_{40}$ R$_{20}$(서열 번호 28)의 서열을 포함하는 GLP-1 수용체 길항물질이 제공되며, 여기서 R$_{20}$은 COOH 또는 CONH$_2$이고 X$_{40}$은 -[COCH$_2$(OCH$_2$CH$_2$)$_k$NH]$_q$-(감마 글루탐산)$_p$-COC$_{14}$H$_{28}$CO$_2$H 또는 -[COCH$_2$(OCH$_2$CH$_2$)$_k$NH]$_q$-(감마 글루탐산)$_p$-COC$_{16}$H$_{32}$CO$_2$H으로 아실화된 Lys이며, 여기서 k는 2이고 p 및 q는 독립적으로 1 또는 2이다.

[0298] **콘쥬게이트**

[0299] 일부 구현예에서 본원에 개시된 GLP-1 길항물질 펩타이드의 임의의 하나는 면역글로불린 또는 그것의 일부(예컨대 가변 영역, CDR, 또는 Fc 영역)에 콘쥬게이션된다. 공지된 유형의 면역글로불린(Ig)에는 IgG, IgA, IgE, IgD 또는 IgM이 포함된다. Fc 영역은 Ig 중쇄의 C 말단 영역으로, 재순환(연장된 반감기 초래), 항체 의존성 세포 매개 세포독성(ADCC), 및 보체 의존성 세포독성(CDC)과 같은 활성을 수행하는 Fc 수용체에 대한 결합을 담당한다.

[0300] 일부 구현예에서, 본원에 개시된 GLP-1 길항물질 펩타이드의 임의의 하나는 친수성 모이어티에 콘쥬게이션된다. 친수성 모이어티는 단백질을 활성화된 중합체 분자와 함께 반응시키기 위해 사용된 임의의 적합한 조건 하에서 GLP-1 길항물질 펩타이드에 공유 결합될 수 있다. 수용성 중합체를 하나 이상의 단백질에 연결시키기 위해 사용될 수 있는 활성화 기에는 제한 없이 설폰, 말레이미드, 설프하이드릴, 티올, 트리플레이트, 트레실레이트, 아지디린, 옥시란, 5-피리딜, 및 알파-할로겐화 아실 기(예컨대, 알파-요오도 아세트산, 알파-브로모아세트산, 알파-클로로아세트산)가 포함된다. 만약 환원성 알킬화에 의해 펩타이드에 부착되면, 선택된 중합체는 중합도가 제어되도록 단일 반응성 알데하이드를 가져야 한다. 예를 들어, 문헌 Kinstler et al., *Adv. Drug. Delivery Rev.* 54: 477-485 (2002); Roberts et al., *Adv. Drug Delivery Rev.* 54: 459-476 (2002); 및 Zalipsky et al., *Adv. Drug Delivery Rev.* 16: 157-182 (1995)]을 참고한다.

[0301] 적합한 친수성 모이어티에는 폴리에틸렌 글리콜(PEG), 폴리프로필렌 글리콜, 폴리옥시에틸화된 폴리올(예컨대, POG), 폴리옥시에틸화된 소르비톨, 폴리옥시에틸화된 글루코스, 폴리옥시에틸화된 글리세롤(POG), 폴리옥시알킬렌, 폴리에틸렌 글리콜 프로피온알데하이드, 에틸렌 글리콜/프로필렌 글리콜의 공중합체, 모노메톡시-폴리에틸렌 글리콜, 모노-(C1-C10) 알콕시- 또는 아릴옥시-폴리에틸렌 글리콜, 카르복시메틸셀룰로스, 폴리아세탈, 폴리비닐 알코올(PVA), 폴리비닐 피롤리돈, 폴리-1, 3-다이옥솔란, 폴리-1,3,6-트라이옥산, 에틸렌/말레산 무수물 공중합체, 폴리(.베타.-아미노산)(동종중합체 또는 무작위 공중합체), 폴리(n-비닐 피롤리돈)폴리에틸렌 글리콜, 프로프로필렌 글리콜 동종중합체(PPG) 및 다른 폴리알킬렌 옥사이드, 폴리프로필렌 옥사이드/에틸렌 옥사이드 공중합체, 콜론산 또는 다른 다당류 중합체, 피콜 또는 덱스트란 및 이것들의 혼합물이 포함된다. 덱스트란은 주로 α1-6 결합에 의해 연결된 글루코스 하위단위의 다당류 중합체이다. 덱스트란은 많은 분자량 범위에서, 예컨대, 약 1 kD 내지 약 100 kD, 또는 약 5, 10, 15 또는 20 kD 내지 약 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 또는 90 kD의 분자량 범위에서 이용 가능한다. 한 구현예에서 친수성 모이어티, 예컨대, 폴리에틸렌 글리콜 사슬은 약 500 내지 약 40,000 달톤의 범위로부터 선택된 분자량을 갖는다. 일부 구현예에서 친수성 모이어티는 약 500 내지 약 5,000 달톤, 또는 약 1,000 내지 약 5,000 달톤 범위로부터 선택된 분자량을 갖는 폴리에틸렌 글리콜 사슬이다. 또 다른 구현예에서 친수성 모이어티, 예컨대, 폴리에틸렌 글리콜 사슬은 약 10,000 내지 약 20,000 달톤의 분자량을 갖는다.

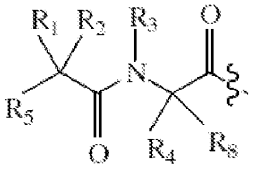
[0302] 한 구현예에서 서열 번호 5 또는 서열 번호 23의 펩타이드의 콘쥬게이트 유도체가 제공되는데, 여기서 다이펩타이드는 서열 번호 5 또는 서열 번호 23의 펩타이드의 N 말단에 펩타이드 결합을 통해 공유 결합되며, 선택적으로 다이펩타이드의 아미노산 중 하나는 아실화된 아미노산이다. 한 구현예에서 다이펩타이드는 X$_7$X$_8$의 구조를 가지며, 여기서 X$_7$은 아실화된 아미노산이고 X$_8$은 임의의 아미노산이며, 선택적으로 X$_7$은 아실화된 Lys 또는 dLys이고 X$_8$은 Gly 또는 C$_1$-C$_4$ N-알킬화된 Gly이며, 선택적으로 X$_7$은 C14-C20 지방산 또는 지방 이산으로 아실화된 Lys 또는 dLys이고 X$_8$은 Gly 또는 C$_1$-C$_4$ N-알킬화된 Gly(선택적으로 Gly 또는 사르코신)이며, 선택적으로 X$_7$은 본원에 개시된 임의의 스페이서를 통해 C14-C20 지방산 또는 지방 이산으로 아실화된 Lys이고 X$_8$은 C$_1$-C$_4$ N-알킬화된 Gly(선택적으로 Gly 또는 사르코신)이다.

[0303] 한 구현예에 따르면 자가 절단 다이펩타이드가 본원에 개시된 GLP-1 길항물질 펩타이드의 아미노산 측쇄 아민 또는 N 말단 알파 아민에 아미드 결합을 통해 공유 결합되어 있는 임의의 GLP-1 수용체 길항물질 펩타이드의 콘쥬게이트 유도체가 제공된다. 한 구현예에서 자가 절단 다이펩타이드는 GLP-1 길항물질 펩타이드의 N 말단 알파

아민에 공유 결합된다.

[0304] 예시의 측면으로, 자가 절단 다이펩타이드는 구조: A-B를 포함하며, 여기서 A는 아미노산 또는 하이드록시산이고; B는 A-B와 GLP-1 길항물질 펩타이드의 아민 사이에서 아미드 결합을 통해 GLP-1 길항물질 펩타이드에 연결된 N-알킬화된 아미노산이며, 선택적으로 GLP-1 길항물질 펩타이드로부터 A-B의 화학적 절단 반감기($t_{1/2}$)는 생리적 조건 하에서 PBS에서 적어도 약 1시간 내지 약 1주이다. 본원에서 사용된 바 용어 "하이드록시산"은 알파 탄소 아미노 기를 하이드록실 기로 대체하기 위해 변형된 아미노산을 지칭한다.

[0305] 일부 구현예에서 자가 절단 다이펩타이드는 다음 일반 구조를 가지며:



[0306]

[0307] 식에서

[0308] R_1, R_2, R_4 및 R_8은 H, C_1-C_{18} 알킬, C_2-C_{18} 알케닐, (C_1-C_{18} 알킬)OH, (C_1-C_{18} 알킬)SH, (C_2-C_3 알킬)SCH_3, (C_1-C_4 알킬)$CONH_2$, (C_1-C_4 알킬)COOH, (C_1-C_4 알킬)NH_2, (C_1-C_4 알킬)$NHC(NH_2^+)NH_2$, (C_0-C_4 알킬)(C_3-C_6 사이클로알킬), (C_0-C_4 알킬)(C_2-C_5 헤테로고리형), (C_0-C_4 알킬)(C_6-C_{10} 아릴)R_7, (C_1-C_4 알킬)(C_3-C_9 헤테로아릴), 및 C_1-C_{12} 알킬(W1)C_1-C_{12} 알킬로 이루어진 군으로부터 독립적으로 선택되고, 여기서 W1은 N, S 및 O로 이루어진 군으로부터 선택된 헤테로원자이며;

[0309] R_3은 C_1-C_{18} 알킬, (C_1-C_{18} 알킬)OH, (C_1-C_{18} 알킬)NH_2, (C_1-C_{18} 알킬)SH, (C_0-C4 알킬)(C_3-C_6)사이클로알킬, (C_0-C_4 알킬)(C_2-C_5 헤테로고리형), (C_0-C_4 알킬)(C_6-C_{10} 아릴)R_7, 및 (C_1-C_4 알킬)(C_3-C_9 헤테로아릴)로 이루어진 군으로부터 선택되거나 또는 R_4 및 R_3은 이들이 부착되는 원자와 함께 피롤리딘 고리를 형성하고;

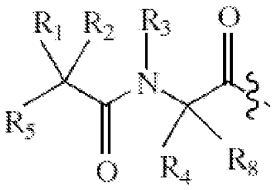
[0310] R_5는 NHR_6 또는 OH이며;

[0311] R_6은 H, C_1-C_8 알킬이고;

[0312] R_7은 H 및 OH로 이루어진 군으로부터 선택되며,

[0313] 상기 GLP-1 길항물질로부터 A-B의 화학적 절단 반감기($t_{1/2}$)는 생리적 조건 하에서 PBS에서 적어도 약 1시간 내지 약 1주이다. 한 구현예에서 다이펩타이드 A-B는 GLP-1 길항물질 아미노산 서열의 N 말단 알파 아민에 공유 결합된다.

[0314] 한 구현예에서 자가 절단 다이펩타이드는 다음 일반 구조를 가지며:



[0315]

[0316] 식에서

[0317] R_1 및 R_8은 독립적으로 H 또는 C_1-C_8 알킬이고;

[0318] R_2 및 R_4는 H, C_1-C_8 알킬, (C_1-C_4 알킬)OH, (C_1-C_4 알킬)SH, (C_2-C_3 알킬)SCH_3, (C_1-C_4 알킬)$CONH_2$, (C_1-C_4 알킬)COOH, (C_1-C_4 알킬)NH_2, 및 (C_1-C_4 알킬)(C_6 아릴)R_7로 이루어진 군으로부터 독립적으로 선택되며;

[0319] R_3은 C_1-C_6 알킬이고;

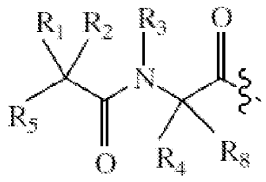
[0320] R_5는 NH_2이고;

[0321] R_7은 수소, 및 OH로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0322] 한 구현예에 따르면 본원에 개시된 임의의 GLP-1 길항물질 펩타이드 및 이량체는 자가 절단 다이펩타이드에 대한 결합에 의해 추가로 변형될 수 있고 다이펩타이드의 아미노산은 고친화도로 혈청 알부민에 결합하기에 충분한 크기의 지방-아실 기로 아실화된다.

[0323] 한 구현예에서 자가 절단 다이펩타이드 "A-B"의 아미노산 "A"는 C16-C30 지방산 또는 C16-C30 이산으로 아실화된 리신 잔기이다. 한 구현예에서 A 및 B는 생리적 조건 하에서 표준 PBS 용액에서 본원에 개시된 GLP-1 길항물질 펩타이드 또는 이량체로부터의 A-B의 적어도 약 24시간 내지 약 240시간, 약 48시간 내지 약 168시간, 또는 약 48 내지 약 120시간, 또는 약 70 내지 약 100시간의 화학적 절단 반감기($t_{1/2}$)를 제공하도록 선택된다.

[0324] 한 구현예에서 자가 절단 다이펩타이드는 다음의 일반 구조를 가지며:

[0325] 

[0326] 식에서

[0327] R_1은 C_1-C_8 알킬, (C_1-C_4 알킬)OH, (C_1-C_4 알킬)SH, (C_1-C_4 알킬)COOH, 및 (C_1-C_4 알킬)NH_2로 이루어진 군으로부터 선택된 측쇄를 포함하고, 선택적으로 C16-C18 지방산 또는 C16-C18 이산은 선택적으로 감마 글루탐산, 감마 글루탐산-감마 글루탐산 다이펩타이드, $-[COCH_2(OCH_2CH_2)_kNH]_q$-(감마 글루탐산)$_p$, 및 감마 글루탐산-$[COCH_2(OCH_2CH_2)_kNH]_q$-감마 글루탐산으로 이루어진 군으로부터 선택된 스페이서를 포함한, 본원에 개시된 임의의 스페이서를 통해 상기 측쇄에 공유 결합되며,

[0328] k는 1-8의 범위로부터 선택된 정수이고;

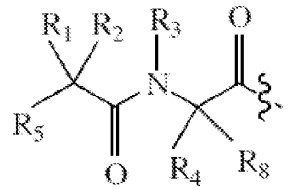
[0329] q 및 p는 독립적으로 1-8의 범위로부터 선택된 정수이며, 선택적으로 k는 2이고 q 및 p는 독립적으로 1 또는 2이며;

[0330] R_2, R_4 및 R_8은 독립적으로 H, 또는 C_1-C_4 알킬이고;

[0331] R_3은 C_1-C_6 알킬이고;

[0332] R_5는 NH_2이다.

[0333] 한 구현예에서 자가 절단 다이펩타이드는 다음 일반 구조를 가지며:

[0334] 

[0335] 식에서

[0336] R_1은 H, C_1-C_4 알킬, (C_1-C_4 알킬)OH 또는 (C_1-C_4 알킬)NH_2이고;

[0337] R_2는 H이며,

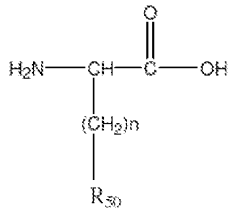
[0338] R_3은 C_1-C_4 알킬이고;

[0339] R_4는 H 또는 C_1-C_4 알킬이며;

[0340] R_5는 NH_2이고;

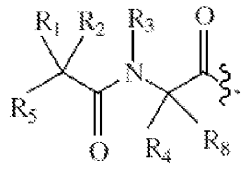
[0341] R_8은 수소이다.

[0342] 한 구현예에 따르면 자가 절단 다이펩타이드 A-B는 "A"로서 아실화된 아미노산 잔기 및 "B"로서 N-알킬화된 Gly 잔기를 포함하고, "B" 아미노산은 아미드 결합을 통해 GLP-1 수용체 길항물질 펩타이드의 N 말단 알파 아민에 연결되며, 선택적으로 상기 Lys 잔기는 D-입체형태이다. 한 구현예에서 A-B 다이펩타이드의 아실화된 아미노산 "A"는 다음 일반 구조를 가진 아미노산이며:

[0343] 

[0344] 여기서 n은 1-4의 범위로부터 선택된 정수이고 R_{50}은 $NH\text{-}CO(CH_2)_{14\text{-}20}COOH$, $NH\text{-}[스페이서]\text{-}CO(CH_2)_{14\text{-}20}COOH$, $S(CH_2)_{14\text{-}20}COOH$ 및 $S\text{-}[스페이서]\text{-}CO(CH_2)_{14\text{-}20}COOH$로 이루어진 군으로부터 선택되며, [스페이서]는 본원에 개시된 임의의 스페이서이다. 한 구현예에서 A의 아실화된 아미노산은 독립적으로 리신, d-리신, 오르니틴, 시스테인 또는 호모시스테인으로부터 선택되고 상기 아실화된 아미노산의 측쇄는 선택적으로 아미노산 또는 다이펩타이드를 포함하는 스페이서를 통해 C16-C22 지방산 또는 C16-C22 이산에 공유 결합된다. 한 구현예에서 스페이서는 감마 글루탐산을 포함한다. 한 구현예에서 스페이서는 감마 글루탐산의 다수의 단위 및 miniPEG 중합체를 임의의 조합으로 포함한다. 한 구현예에서 선택적 스페이서는 2개의 감마 글루탐산을 포함하고, 선택적으로 2개의 감마 글루탐산은 개재하는 기능화된 miniPEG 중합체, $[COCH_2(OCH_2CH_2)_kHN]q$를 통해 서로 연결되며, 여기서 k 및 q는 각각 독립적으로 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 또는 8로부터 선택된 정수이다.

[0345] 한 구현예에서 자가 절단 다이펩타이드는 다음의 일반 구조를 가지며:

[0346] 

[0347] 식에서

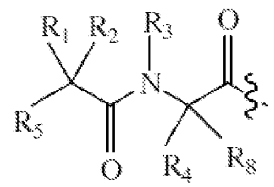
[0348] R_1은 (C_4 알킬)NH_2 또는 (C_4 알킬)NH(mPeg-γE-이산)-C18이고;

[0349] R_2, R_4 및 R_8은 각각 H이며;

[0350] R_3은 C_1-C_4 알킬이고;

[0351] R_5는 NH_2이며, 선택적으로 자가 절단 다이펩타이드의 첫 번째 아미노산은 D-입체형태이다.

[0352] 한 구현예에서 본원에 개시된 GLP-1 길항물질 펩타이드 및 이량체는 다음 구조의 자가 절단 다이펩타이드에 공유 결합되며:

[0353] 

[0354] 식에서

[0355] R_1은 C_1-C_{18} 알킬, (C_1-C_4 알킬)OH, (C_1-C_4 알킬)SH, (C_1-C_4 알킬)COOH, 및 (C_1-C_4 알킬)NH_2로 이루어진 군으로부터

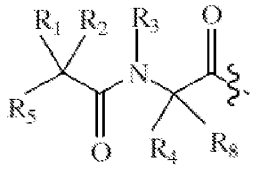
선택된 측쇄이고, 선택적으로 C16-C20 지방산 또는 C16 -C20 이산은 상기 측쇄에 공유 결합되며;

[0356] R_2, R_4 및 R_8은 독립적으로 H, 또는 C_1-C_4 알킬이고;

[0357] R_3은 C_1-C_4 알킬이거나, 또는 R_4 및 R_3은 이들이 부착되는 원자와 함께 피롤리딘 고리를 형성하며; 그리고

[0358] R_5는 NH_2이고, 단 R_4 및 R_3이 이들이 부착되는 원자와 함께 피롤리딘 고리를 형성할 때, R_2는 H가 아니다.

[0359] 추가의 구현예에서 자가 절단 다이펩타이드는 다음 구조를 가지며:

[0360] 

[0361] 식에서 R_1은 (C_1-C_4 알킬)NH-CO(CH_2)$_{14-20}CH_3$, (C_1-C_4 알킬)NH-[스페이서]-CO(CH_2)$_{14-20}CH_3$, (C_1-C_4 알킬)NH-CO(CH_2)$_{14-20}$COOH 또는 (C_1-C_4 알킬)NH-[스페이서]-CO(CH_2)$_{14-20}$COOH이고; R_2 및 R_8은 각각 H이며; R_4는 H 또는 CH_3이고; R_3은 C_1-C_4 알킬이며 R_5는 NH_2이고, 선택적으로 자가 절단 다이펩타이드의 첫 번째 아미노산은 D-입체화학 위치배열의 아미노산이며 스페이서는 본원에 개시된 임의의 스페이서로부터 선택된다. 한 구현예에서 R_2, R_4 및 R_8은 각각 H이다. 한 구현예에서 R_1은 (C_1-C_4 알킬)NH-CO(CH_2)$_{16}$COOH 또는 (C_1-C_4 알킬)NH-[스페이서]-CO(CH_2)$_{16}$COOH이고, R_2, R_4 및 R_8은 각각 H이며 R_3은 C_1-C_4 알킬, 선택적으로 CH_3이고, 선택적으로 스페이서는 구조:

[0362] -[$COCH_2$(OCH_2CH_2)$_k$NH]$_q$-(감마 글루탐산)$_p$-

[0363] 를 포함하며, 여기서 k는 2이고, p 및 q는 독립적으로 1 또는 2로부터 선택된 정수이다.

[0364] 한 구현예에 따르면 자가 절단 다이펩타이드는 첫 번째 아미노산으로서 아실화된 아미노산을 포함하고, 아실화된 아미노산의 측쇄는 C16-C20 지방산 또는 C16-C20 이산으로 아실화되며, 선택적으로 아실화된 아미노산은 C16-C20 아실화된 리신, C16-C20 아실화된 오르니틴, C16-C20 아실화된 시스테인 및 C16-C20 아실화된 호모시스테인으로부터 선택되고, 선택적으로 다이펩타이드의 아실화된 아미노산은 C16-C20 아실화된 Lys이며, 선택적으로 자가 절단 다이펩타이드의 첫 번째 아미노산은 D-입체화학 위치배열의 아미노산이다.

[0365] **구현예**

[0366] 구현예 1에 따르면, GLP-1 수용체 길항물질이 제공되며, 상기 길항물질은

[0367] R_{10}-DV$X_{11}X_{12}$YL$X_{15}X_{16}$QA$X_{19}X_{20}$EFX_{23}EWLVRGGPSSGAPPPSX_{40}-R_{20}(서열 번호 23)의 아미노산 서열을 포함하고, 여기서

[0368] R_{10}은 NH_2, 또는 1 또는 2개 아미노산의 N 말단 연장이며, N 말단 연장의 아미노산 중 하나는 선택적으로 스페이서를 통해 C14-C20 지방산 또는 이산으로 아실화되고, 선택적으로 R_{10}은 구조: X_7X_8의 다이펩타이드이며, 여기서 X_7은 아실화된 아미노산, 선택적으로 아실화된 Lys 또는 아실화된 dLys이고, X_8은 Gly 또는 C_1-C_4 N-알킬화된 Gly이며;

[0369] X_{11}은 Trp, dTrp 또는 Ser이고;

[0370] X_{12}는 Arg 또는 아실화된 아미노산, 선택적으로 아실화된 Lys이며;

[0371] X_{15}는 Glu 또는 dGlu이고;

[0372] X_{16}은 Glu, dGlu, Asp, 호모글루탐산 또는 호모시스테인산이며;

[0373] X_{19}는 Val, 사이클로프로판, 사이클로펜탄, 사이클로헥산 또는 페닐 글리신이고;

[0374] X_{20}은 Arg, 호모리신 또는 시트룰린이며;

[0375] X_{23}은 Ile, 또는 dIle이고;

[0376] X_{40}은 아실화된 아미노산, 선택적으로 아실화된 Lys이고;

[0377] R_{20}은 COOH 또는 $CONH_2$이고, 선택적으로 위치 7, 10, 13, 또는 16으로부터 선택된 1, 2 또는 3개의 아미노산이 Trp 또는 dTrp로 치환되며, 단 X_{10} 또는 X_{11} 중 하나가 Trp 또는 dTrp이면 다른 하나는 Trp 또는 dTrp이 아니고 R_{10} 및 X_{12}는 둘 다 아실화된 아미노산을 포함할 수 없고; 선택적으로 위치 16, 18, 19, 24, 26, 또는 28 중 임의의 위치에서의 1, 2 또는 3개의 아미노산은 Aib로 치환된다.

[0378] 구현예 2에 따르면 상기 길항물질이

[0379] R_{10}-DV$X_{11}X_{12}$YL$X_{15}X_{16}$QA$X_{19}X_{20}$EFX_{23}EWLVRGGPSSGAPPPSX_{40}-R_{20}(서열 번호 23)의 아미노산 서열을 포함하며, 여기서

[0380] R_{10}은 NH_2 또는 X_7X_8이고, X_7은 선택적으로 스페이서를 통해 C14-C20 지방산 또는 이산으로 아실화된 아미노산이며 X_8은 Gly 또는 C_1-C_4 N-알킬화된 Gly이고;

[0381] X_{11}은 Trp, dTrp 또는 Ser이며;

[0382] X_{12}는 Arg 또는 아실화된 아미노산, 선택적으로 아실화된 Lys이고;

[0383] X_{15}는 Glu 또는 dGlu이며;

[0384] X_{16}은 Glu, dGlu, Asp, 호모글루탐산 또는 호모시스테인산이고;

[0385] X_{19}는 Val, 사이클로프로판, 사이클로펜탄, 사이클로헥산 또는 페닐 글리신이며;

[0386] X_{20}은 Arg, 호모리신 또는 시트룰린이고;

[0387] X_{23}은 Ile, 또는 dIle이며;

[0388] X_{40}은 아실화된 아미노산, 선택적으로 아실화된 Lys이고;

[0389] R_{20}은 COOH 또는 $CONH_2$이며, 선택적으로 위치 16, 18, 19, 24, 26, 또는 28 중 임의의 위치에서 1, 2 또는 3개의 아미노산은 Aib로 치환되는 것인 구현예 1의 GLP-1 길항물질이 제공된다.

[0390] 구현예 3에 따르면 GLP-1 길항물질의 각각의 아실화된 아미노산이 아실화된 Lys인 것인 구현예 1 또는 2의 GLP-1 길항물질이 제공된다.

[0391] 구현예 4에 따르면 X_7이 아실화된 Lys이고 X_{12}가 Arg인 것인 구현예 1-3 중 어느 하나의 GLP-1 길항물질이 제공된다.

[0392] 구현예 5에 따르면 R_{10}이 NH_2이고 X_{12}가 아실화된 Lys인 것인 구현예 1-3 중 어느 하나의 GLP-1 길항물질이 제공된다.

[0393] 구현예 6에 따르면 X_7이 NH_2이고 X_{12}가 Arg인 것인 구현예 1-3 중 어느 하나의 GLP-1 길항물질이 제공된다.

[0394] 구현예 7에 따르면 길항물질은 서열 번호 5 내지 서열 번호 96 중 어느 하나, 또는 그것들의 임의의 조합으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하는 것인 구현예 1의 GLP-1 길항물질이 제공된다.

[0395] 구현예 8에 따르면 상기 GLP-1 길항물질의 아실화된 아미노산이 독립적으로 Lys 측쇄에 직접 연결된 또는 선택적으로

[0396] (i) 감마 글루탐산,

[0397] (ii) 미니페그 중합체: -[$COCH_2(OCH_2CH_2)_kNH$]-, 여기서 k는 2, 4, 6 또는 8인 중합체,

[0398] (iii) 또는 i) 및/또는 ii)의 임의의 다수 또는 조합

[0399] 을 포함하는 스페이서를 통해 연결된 C16-C18 지방산 또는 C16-C18 지방 이산으로 아실화된 Lys 잔기인 것인 구

현예 1-7 중 어느 하나의 GLP-1 길항물질이 제공된다.

[0400] 구현예 9에 따르면 상기 길항물질이

[0401] $DX_{10}X_{11}RYLX_{15}X_{16}QAVREFX_{23}EWLVRGGPSSGAPPPSX_{40}R_{20}$(서열 번호 5)의 아미노산 서열을 포함하고, 여기서

[0402] X_{10}은 Trp, dTrp 또는 Val이며;

[0403] X_{11}은 Trp, dTrp 또는 Ser이고;

[0404] X_{15}는 Glu 또는 dGlu이며;

[0405] X_{16}은 Trp, dTrp, dGlu 또는 Glu이고;

[0406] X_{23}은 Ile 또는 dIle이며;

[0407] X_{40}은 아실화된 아미노산이고;

[0408] R_{20}은 COOH 또는 $CONH_2$이며, 선택적으로 펩타이드는 위치 16, 18, 19, 24, 26 또는 28 중 임의의 위치에서 Aib의 하나 이상의 치환을 포함하거나, 또는 선택적으로 위치 12에서 아실화된 Lys의 치환을 포함하고, 상기 위치 번호는 천연 Exendin4 아미노산 서열에 대한 것인 구현예 1-8 중 어느 하나의 GLP-1 길항물질이 제공된다.

[0409] 구현예 10에 따르면 X_{11}이 Trp 또는 dTrp인 것인 구현예 1-9 중 어느 하나의 GLP-1 길항물질이 제공된다.

[0410] 구현예 11에 따르면 서열 번호 5의 위치 16, 18, 19, 24, 26 또는 28 중 임의의 위치에서의 아미노산이 Aib로 치환되고, 선택적으로 Aib는 위치 18에서 치환되는 것인 구현예 1-10 중 어느 하나의 GLP-1 길항물질이 제공된다.

[0411] 구현예 12에 따르면 위치 12에서의 아미노산이 아실화된 Lys로 치환되는 것인 구현예 1-11 중 어느 하나의 GLP-1 길항물질이 제공된다.

[0412] 구현예 13에 따르면

[0413] X_{15}는 dGlu이고;

[0414] X_{16}은 Glu이고;

[0415] X_{23}은 Ile인 것인 구현예 1-11 중 어느 하나의 GLP-1 길항물질이 제공된다.

[0416] 구현예 14에 따르면

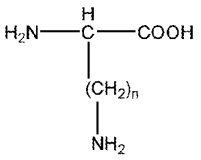
[0417] X_{15}는 Glu이고;

[0418] X_{16}은 Glu이고;

[0419] X_{23}은 Ile인 것인 구현예 1-11 중 어느 하나의 GLP-1 길항물질이 제공된다.

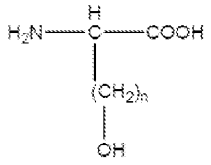
[0420] 구현예 15에 따르면 X_{40}이 선택적으로 스페이서를 통해 아미노산의 측쇄에 연결된 아실 기를 갖는 아미노산인 것인 구현예 1-14 중 어느 하나의 GLP-1 길항물질이 제공된다.

[0421] 구현예 16에 따르면 X_{40}이 식 I의 구조를 포함하는 아미노산(선택적으로, Lys), 식 II의 구조를 포함하는 아미노산(선택적으로, Cys), 또는 식 III의 구조를 포함하는 아미노산(선택적으로, Ser)이고, 식 I, II, 및 III은 각각 다음과 같은 것인 구현예 1-15 중 어느 하나의 GLP-1 길항물질이 제공된다.



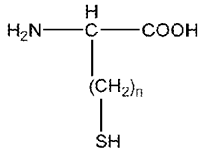
[0422] [식 I]

[0423] 식에서 n = 1 내지 4임;



[0424] [식 II]

[0425] 식에서 n = 1 내지 4임; 및



[0426] [식 III]

[0427] 식에서 n = 1 내지 4임.

[0428] 구현예 17에 따르면 X_{40}이 아실화된 리신인 것인 구현예 1-16 중 어느 하나의 GLP-1 길항물질이 제공된다.

[0429] 구현예 18에 따르면 아실화된 아미노산의 아실 기가 (C_1-C_4 알킬)NH-CO$(CH_2)_{14-20}CH_3$, (C_1-C_4 알킬)NH-[스페이서]-CO$(CH_2)_{14-20}CH_3$, (C_1-C_4 알킬)NH-CO$(CH_2)_{14-20}$COOH 또는 (C_1-C_4 알킬)NH-[스페이서]-CO$(CH_2)_{14-20}$COOH로부터 선택되는 것인 구현예 1-17 중 어느 하나의 GLP-1 길항물질이 제공된다.

[0430] 구현예 19에 따르면 아실화된 아미노산의 아실 기가 스페이서를 통해 아실화된 아미노산의 아미노산 측쇄에 공유 결합되는 것인 구현예 1-18 중 어느 하나의 GLP-1 길항물질이 제공된다.

[0431] 구현예 20에 따르면 스페이서가 아미노산 또는 다이펩타이드인 것인 구현예 1-19 중 어느 하나의 GLP-1 길항물질이 제공된다.

[0432] 구현예 21에 따르면 스페이서는

[0433] (i) 감마 글루탐산,

[0434] (ii) 미니페그 중합체: -[$COCH_2(OCH_2CH_2)_kNH$]-, 여기서 k는 2, 4, 6 또는 8인 중합체,

[0435] (iii) 또는 i) 및/또는 ii)의 임의의 다수 또는 조합을 포함하는 것인 구현예 1-20 중 어느 하나의 GLP-1 길항물질이 제공된다.

[0436] 구현예 22에 따르면 아실화된 아미노산은 C16 내지 C18 지방산 또는 C16 내지 C18 지방 이산에 연결되고, 선택적으로 산 또는 이산은 구조:

[0437] -(감마 글루탐산)$_p$-[$COCH_2(OCH_2CH_2)_kNH]_q$-(감마 글루탐산)$_n$- 또는

[0438] -[$COCH_2(OCH_2CH_2)_kNH]_q$-(감마 글루탐산)$_p$-[$COCH_2(OCH_2CH_2)_kNH]_m$-을 포함하는 스페이서를 통해 연결되며;

[0439] 여기서 k는 2, 4 또는 8로부터 선택된 정수이고, m 및 n은 독립적으로 0, 1 또는 2로부터 선택된 정수이며, p 및 q는 독립적으로 1, 2, 4 또는 8로부터 선택된 정수인 것인 구현예 1-11 중 어느 하나의 GLP-1 길항물질이 제공된다.

[0440] 구현예 23에 따르면 아실화된 아미노산이 구조:

[0441] -[$COCH_2(OCH_2CH_2)_kNH]_q$-(감마 글루탐산)$_p$-를 포함하는 스페이서를 통해 리신 측쇄에 연결된 C16 내지 C18 지방산을 가진 Lys이고,

[0442] 구조에서 k는 2이며, p 및 q는 독립적으로 1 또는 2로부터 선택된 정수인 것인 구현예 1-22 중 어느 하나의 GLP-1 길항물질이 제공된다.

[0443] 구현예 24에 따르면

[0444] X_{11}은 Trp, 또는 dTrp이고;

[0445] X_{15}는 Glu, 또는 dGlu이며;

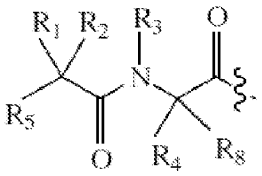
[0446] X_{16}은 Glu, 또는 dGlu이고;

[0447] X_{23}은 Ile, 또는 dIle이고;

[0448] X_{40}은 C16 또는 C18 이산으로 아실화된 Lys이고, 선택적으로 이산은 구조: $-[COCH_2(OCH_2CH_2)_kNH]_q-$(감마글루탐산)$_p-$를 포함하는 스페이서를 통해 연결되며, 구조에서 k는 2이고, p 및 q는 독립적으로 1 또는 2로부터 선택된 정수인 것인 구현예 1-23 중 어느 하나의 GLP-1 길항물질이 제공된다.

[0449] 구현예 25에 따르면 R_{20}이 $CONH_2$인 것인 구현예 1-24 중 어느 하나의 GLP-1 길항물질이 제공된다.

[0450] 구현예 26에 따르면 아미드 결합을 통해 상기 GLP-1 길항물질에 연결된 다이펩타이드 A-B를 추가로 포함하며:

[0451] 

[0452] 여기서

[0453] R_1, R_2, R_4 및 R_8은 H, C_1-C_{18} 알킬, C_2-C_{18} 알케닐, (C_1-C_{18} 알킬)OH, (C_1-C_{18} 알킬)SH, (C_2-C_3 알킬)SCH_3, (C_1-C_4 알킬)$CONH_2$, (C_1-C_4 알킬)COOH, (C_1-C_4 알킬)NH_2, (C_1-C_4 알킬)$NHC(NH_2^+)NH_2$, (C_0-C_4 알킬)(C_3-C_6 사이클로알킬), (C_0-C_4 알킬)(C_2-C_5 헤테로고리형), (C_0-C_4 알킬)(C_6-C_{10} 아릴)R_7, (C_1-C_4 알킬)(C_3-C_9 헤테로아릴), 및 C_1-C_{12} 알킬(W1)C_1-C_{12} 알킬로 이루어진 군으로부터 독립적으로 선택되며, W1은 N, S 및 O로 이루어진 군으로부터 선택된 헤테로원자이고;

[0454] R_3은 C_1-C_{18} 알킬, (C_1-C_{18} 알킬)OH, (C_1-C_{18} 알킬)NH_2, (C_1-C_{18} 알킬)SH, (C_0-C4 알킬)(C_3-C_6)사이클로알킬, (C_0-C_4 알킬)(C_2-C_5 헤테로고리형), (C_0-C_4 알킬)(C_6-C_{10} 아릴)R_7, 및 (C_1-C_4 알킬)(C_3-C_9 헤테로아릴)로 이루어진 군으로부터 선택되거나 또는 R_4 및 R_3은 이들이 부착된 원자와 함께 피롤리딘 고리를 형성하며;

[0455] R_5는 NHR_6 또는 OH이고;

[0456] R_6은 H, C_1-C_8 알킬이고;

[0457] R_7은 H 및 OH로 이루어진 군으로부터 선택되며,

[0458] 상기 GLP-1 길항물질로부터 A-B의 화학적 절단 반감기($t_{1/2}$)는 생리적 조건 하에서 PBS에서 적어도 약 1시간 내지 약 1주인 것인 청구항 제9항 내지 제25항 중 어느 하나의 GLP-1 길항물질의 유도체가 제공된다.

[0459] 구현예 27에 따르면 다이펩타이드 A-B는 GLP-1 길항물질 아미노산 서열의 N 말단 알파 아민에 공유 결합되는 것인 구현예 26의 GLP-1 길항물질이 제공된다.

[0460] 구현예 28에 따르면

[0461] R_1 및 R_8은 독립적으로 H 또는 C_1-C_8 알킬이고;

[0462] R_2 및 R_4는 H, C_1-C_8 알킬, (C_1-C_4 알킬)OH, (C_1-C_4 알킬)SH, (C_2-C_3 알킬)SCH_3, (C_1-C_4 알킬)$CONH_2$, (C_1-C_4 알킬)COOH, (C_1-C_4 알킬)NH_2, 및 (C_1-C_4 알킬)(C_6 아릴)R_7로 이루어진 군으로부터 독립적으로 선택되며;

[0463] R_3은 C_1-C_6 알킬이고;

[0464] R_5는 NH_2이고;

[0465] R_7은 수소, 및 OH로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 구현예 26 또는 27의 GLP-1 길항물질이 제공된다.

[0466] 구현예 29에 따르면

[0467] R_1은 C_1-C_8 알킬, (C_1-C_4 알킬)OH, (C_1-C_4 알킬)SH, (C_1-C_4 알킬)COOH, 및 (C_1-C_4 알킬)NH_2로 이루어진 군으로부터 선택된 측쇄를 포함하고, 선택적으로 C16-C30 지방산 또는 C16-C30 이산은 선택적으로 감마 글루탐산, 감마 글루탐산-감마 글루탐산 다이펩타이드, 및 감마 글루탐산-[$COCH_2(OCH_2CH_2)_kNH]_q$-감마 글루탐산으로 이루어진 군으로부터 선택된 스페이서를 통해 상기 측쇄에 공유 결합되며,

[0468] k는 1-8의 범위로부터 선택된 정수이고;

[0469] q는 1-8의 범위로부터 선택된 정수이며, 선택적으로 k는 2이고 q는 1-8의 범위로부터 선택된 정수이며;

[0470] R_2, R_4 및 R_8은 독립적으로 H, 또는 C_1-C_4 알킬이고;

[0471] R_3은 C_1-C_6 알킬이고;

[0472] R_5는 NH_2인 것인 구현예 26 또는 27의 GLP-1 길항물질이 제공된다.

[0473] 구현예 30에 따르면

[0474] R_1은 H, C_1-C_4 알킬, (C_1-C_4 알킬)OH 또는 (C_1-C_4 알킬)NH_2이고;

[0475] R_2는 H이며,

[0476] R_3은 C_1-C_4 알킬이고;

[0477] R_4는 H, 또는 C_1-C_4 알킬이며;

[0478] R_5는 NH_2이고;

[0479] R_8은 수소인 것인 구현예 26-29 중 어느 하나의 GLP-1 길항물질이 제공된다.

[0480] 구현예 31에 따르면 상기 다이펩타이드 A-B가 아실화된 Lys 잔기 및 N-알킬화된 Gly 잔기를 포함하고, 상기 Lys 및 N-알킬화된 Gly 잔기는 펩타이드 결합을 통해 연결되며, 선택적으로 상기 Lys 잔기는 D-입체형태인 것인 구현예 26-30 중 어느 하나의 GLP-1 길항물질이 제공된다.

[0481] 구현예 32에 따르면

[0482] R_1은 (C_4 알킬)NH_2 또는 (C_4 알킬)NH(mPeg-γE-이산)-C18이고;

[0483] R_2, R_4 및 R_8은 각각 H이며;

[0484] R_3은 C_1-C_4 알킬이고;

[0485] R_5는 NH_2이며;

[0486] R_5는 아민인 것인 구현예 26-30 중 어느 하나의 GLP-1 길항물질이 제공된다.

[0487] 구현예 33에 따르면 청구항 제1항 내지 제32항 중 어느 하나의 GLP-1 길항물질 또는 유도체 및 약학적으로 허용 가능한 담체, 희석제, 또는 부형제를 포함하는 약학 조성물이 제공된다.

[0488] 구현예 34에 따르면 비정형 저혈당증을 앓고 있는 환자를 치료하는 방법이 제공되며 상기 방법은 필요로 하는 환자에게 구현예 33의 약학 조성물을 혈당 수준을 상승시키기에 효과적인 양으로 투여하는 단계를 포함한다.

[0489] **실시예 1**

[0490] Ex-4(9-39)a(서열 번호 2)는 GLP-1 수용체의 확립된 길항물질이다. 그러나, 인간에서 그것의 치료제로서의 사용은 그것의 비인간 기원 및 상대적으로 짧은 생체내 작용 기간으로 인해 제한된다. 인간 GLP-1의 비슷한 N 말단 단축은 작용을 단축시키지만 높은 효능의 길항물질을 제공하지도 못한다. 일련의 GLP-1/Ex-4 하이브리드 펩타이

드를 통해, 순수한 GLP-1 기반 길항물질을 생성하기 위해 필요한 최소한의 구조적 변화를 Glu16, Val19, 및 Arg20로서 확인하였고, 이것으로 Ex-4(9-39)a와 비교하여 대략 3배 더 큰 시험관내 효능의 길항물질을 얻었다. 인간 기반 길항물질의 부위 특정 아실화는 GLP-1 수용체 길항물질로서 효능이 증가되고 GIP 수용체(Patterson, et al, ACS Chem. Biol. 2011, 6, 135-145)에 비해 10배 더 큰 선택성을 가진 펩타이드 "9-40 Jant4 K_{40}[C16](서열 번호 3)을 생성하였다.

[0491] 본원에 개시된 바와 같이, 9-40 Jant4-K_{40}의 변이체는 한층 더 개선된 GLP-1 수용체 길항물질을 제공하도록 제조되었다. 펩타이드 9-40 Jant4-K_{40}은 Lys 측쇄에 대한 C16 아실 기의 직접적인 결합에 의해 위치 40에서 아실화된다. Lys 측쇄와 C16 아실 기 사이에 스페이서를 삽입한 변이체가 제조되었다. 표 2는 GLP-1 길항물질 활성 및 이들 아실화 변이체의 용해도를 제시한다.

[0492] 9-40Jant4-K_{40}(DVSSYLEEQAVREFIAWLVKGGPSSGAPPPSK;서열 번호 3)의 일차 서열에 대해 다양한 아미노산 치환을 만들었고 이들 변이체의 GLP-1 길항물질 활성 및 용해도를 표 3에 제공한다.

[0493] 표 4는 Jant4-K_{40}(서열 번호 3) 변이체의 활성 및 용해도에 미치는 Aib 치환의 효과에 관련된 데이터를 제공한다. 표 5는 Jant4-K_{40}(C16)(서열 번호 3) 변이체의 용해도에 미치는 d-AA 치환의 효과에 관련된 데이터를 제공하며 표 6은 Jant4-K_{40}(서열 번호 3)의 위치 3에서의 Trp 치환에 관련된 데이터를 제시한다.

[0494] 물질 및 방법

[0495] **Fmoc 합성**

[0496] 펩타이드를 Wang 수지(AAPPtec, Louisville, KY)로 시작하는 Symphony 펩타이드 합성기(펩타이드 Tech-nology, Tucson, AZ) 및 6-Cl-HOBt/DIC 활성화를 사용하여 자동 Fmoc/t-Bu 고상 방법론에 의해 제조하였다. 모든 종래 잔기를 Midwest Biotech(Fisher, IN)로부터 구입하였고, 6-Cl-HOBt 및 DIC를 AAPPtec(Louisville, KY)로부터 얻었다. 펩타이드를 수지로부터 절단하고 2.5% TIS, 2.5% H2O, 1.5% 메탄올, 2.5% 페놀, 0.5% DODT 및 0.5%의 다이메틸설폭사이드를 함유한 TFA로의 처리에 의해 탈보호하였다. 펩타이드를 표준 과정에 따라 여과된 TFA 용액으로부터 저온 에틸 에테르로 침전시켰다. 펩타이드의 지방-아실화를 10배 과량의 Fmoc-Glu-OtBu/DEPBT/DIEA로 수지 상에서 수행하였고, 이중 커플링을 위해 반복한 후, 10배 과량의 팔미트산 또는 또 다른 지방산/DEPBT/DIEA로 수행하였다.

[0497] **길항물질 아실화**

[0498] 팔미트산을 직교 고상 보호 방식을 사용하여 합성된 길항물질 펩타이드에 도입하였다. 펩타이드 합성을 위해 Boc 합성을 이용하여, Lys40에서 염기 민감성 측쇄 보호된 Lys(Fmoc)-OH의 선택적 도입을 허용하였다. 완전히 보호된 펩타이드를 수지 상에서 DMF 중의 20% 피페리딘(부피/부피)으로 30분 동안 처리하여 Lys40 측쇄 Fmoc 기를 제거하였다. 아미드 결합 형성을 과량의 지방산 및 DMF/DIEA(4:1 부피/부피) 중의 5 당량의 벤조트라이아졸-1-일-옥시트라이피롤리디노포스포늄 헥사플루오로포스페이트(PyBOP)(Fluka)로 대략 18시간 동안 촉진하였다. 닌히드린 테스트를 사용하여 반응 진행을 모니터링하였고, ESI 질량 분석에 의해 펩타이드 절단 후에 아실화를 확인하였다.

[0499] **펩타이드 정제**

[0500] 역상 HPLC(RP-HPLC)를 펩타이드 정제에 사용하였다. C18 고정상(Vydac 218TP, 250 mm _ 22 mm, 10 μm)을 예비 RP-HPLC 정제 동안 0.1% 트라이플루오로아세트산에서 선형 아세토니트릴 구배와 함께 사용하였다. 분석적 분석을 C8 칼럼(Zorbax 300SB, 4.6 mm X 50 mm, 3.5 μm)으로 RP-HPLC를 사용함으로써 피크 분획에 대해 수행하였다. 펩타이드 동일성 및 순도를 분석적 RP-HPLC 및 ESI- 또는 MALDI-질량 분석에 의해 평가하였다. 모든 펩타이드가 정확한 분자량을 가진 것으로 나타났고 대략 95% 순수하였다. 동결건조된 펩타이드를 4℃에서 보관하였다.

[0501] **GLP-1 수용체 매개 cAMP 유도**

[0502] GLP-1 수용체에서 cAMP 유도를 자극하거나 차단하는 펩타이드의 능력을 루시페라제 기반 리포터 유전자 검정에 의해 조사하였다. 인간 GLP-1 수용체(Open Biosystems) 및 cAMP유도성(cAMP반응성 요소) 루시페라제 유전자로의 HEK 293 세포의 동시형질감염으로 수용체 활성화를 측정할 수 있는 세포 구성물을 구성하였다. 생물검정을 먼저 0.25% 소 성장 혈청(HyClone) 보충된 둘베코 변형 이글스 배지(Invitrogen)에서 16시간 동안 세포에서 혈청을 고갈시킨 후 96 웰 폴리-D-리신 코팅 플레이트(BD Biosciences)에서 적절한 농도 범위에 걸쳐 펩타이드의 연속

희석을 첨가함으로써 수행하였다. 길항작용 검정을 위해, 일정 농도의 GLP-1(0.05 nM)을 희석된 펩타이드 다음에 검정 플레이트에 첨가하였다. 인큐베이션을 37℃, 5% CO_2에서 5시간 동안 계속한 후 동등한 부피(100 μL)의 LucLite 발광 기질 시약(Perkin-Elmer)을 첨가하였다. 플레이트를 600 rpm에서 3분 동안 진동시킨 후 MicroBeta 1450 액체 신틸레이션 카운팅(Perkin-Elmer)으로 발광 신호를 초당 카운트(cps)로 정량화하였다. 데이터를 Origin 소프트웨어(OriginLab)를 사용하여 도표화하고 유효 농도 50(EC_{50}) 또는 억제 농도 50(IC_{50})을 시그모이드 피팅에 의해 결정하였다. 효능을 상대적인 EC_{50} 또는 IC_{50} 값의 비교 분석에 의해 결정하였다. 각각의 실험을 각 샘플을 이중으로 검정하면서 적어도 3회 반복하였다.

[0503] **동물**

[0504] C57Bl/6 마우스를 Jackson 실험실로부터 얻었다. 마우스는 12:12 명암 주기로 22℃에서 사료와 물에 자유롭게 접근하도록 하면서 단독으로 또는 그룹으로 하우징하였다. 모든 연구는 신시내티 대학교 동물 기관 관리 및 사용 위원회의 승인을 받았고 지침에 따라 수행하였다.

[0505] **글루코스 내성 테스트(GTT)**

[0506] 글루코스 내성의 결정을 위해, 마우스를 6시간의 금식에 적용하고 글루코스를 복강내로 주사하였다. 주사는 체중 1 kg당 1.5 g 글루코스(0.9% 중량/부피 식염수에 25% 중량/부피 D-글루코스(Sigma))로 이루어졌다. 꼬리 혈당 수준(mg dL-1)을 휴대용 혈당측정기(FreeStyle Freedom Lite)를 사용하여 주사 전 0분 및 주사 후 15, 30, 60, 및 120분에 측정하였다.

[0507] **급성 생체내 연구**

[0508] 마우스에게 다이펩티딜 펩티다제-IV 보호된 Ex-4(0.65 nmol kg-1)의 복강내 주사로 도전하기 전에 다양한 용량으로 1, 4, 8, 24, 48, 72, 또는 120에 펩타이드(PBS 중의)를 피하로 주사하였다. GTT를 GLP-1 주사 후 15분 후에 수행하였다. 꼬리 혈당 값을 위에서 기술한 것과 같이 얻었다.

표 2

표 2: Jant 4-K_{40} 서열(서열 번호 3)에 대한 C16 링커 최적화/분석

#	9-40아미드; Jant 4 K40[X]	생체활성 IC_{50}	생체활성 SDV	생체활성 N	용해도 [mg/mL] 80mM AmBicarb pH7.7
95	유리 아민	**281**	96	3	12.7
47	C16	**14**	7	15	6.1
52	γE-16	**12**	3	7	>20
53	γE_2-C16	**13**	5	10	>20
54	γE_4-C16	**21**	8	8	>20
55	γE_6-C16	**22**	15	5	>20
48	$(miniPEG)_2\gamma E$-C16	**9**	4	7	9.0
56	MiniPEG-γE-C16	**14**	2	3	>20
57	gE-Mini$(PEG)_2$-gE-C16	**9**	7	5	>25
58	(mini)PEG_2-gE_2-16				>25
59	miniPEG-gE-miniPEG-gE-C16	**11**	7	5	>25
60	miniPEG-gE_2 miniPEG-C16	**5**	2	5	>25
61	gE_2-$(miniPEG)_2$-C16	**6**	2	4	>25
62	gE-miniPEG-gE-C16 miniPEG-	**7**	3	4	>25
63	DiAcidC18	**114**	54	16	>25
64	gE_2-DiAcidC18	**841**	361	7	>25
65	gE_4-DiAcidC18	**1071**	624	8	>25
66	gE_6-DiAcidC18	**1464**	751	6	>25
67	$(miniPEG)_2$-gE-DiAcidC18	**579**	376	12	>25
68	miniPEG-gE DiAcidC18	**718**	130	3	>25

[0509]

표 3

표 3: Jant4-K_{40}(서열 번호 3)의 아미노산 치환 변이체

			생체활성			용해도
`#	9-40;Jant4	K40[C16]	**IC_{50}**	SDV	N	80mM AmeBicarb pH7.7
47		-아미드	**14**	7	15	**6.1**
69	R28	-아미드	**16**	1	3	**13.7‡**
70	E24, R28	-아미드	**14**	4	4	**>20**
71	E17, R28	-아미드	**18**	7	4	**>20**
72	E17,E24,R28	-아미드	**19**	6	4	**>20**
73	R12, R28	-아미드	**27**	17	4	**<0.1**
74	R12, E24,R28	-아미드	**15**	3	4	**>20**
75	R12,E17,E24,R28	-아미드	**19**	5	4	**18.6**
76	Exendin K40	-아미드	**6**	1	3	**18.6**
77		R28[※] -산	**13**	2	5	**>20**
78	E24,	R28[※] -산	**19**	13	13	**>20**
16	R12, E24,	R28[※] -산	**18**	12	13	**>20**
79	E24, R27	v28[※] -산	**115**	37	10	**>20**
80	E24, R27	Aib28[※] -산	**106**	1414		**>20**

※ K40[miniPEG-gE-C16]

‡ 고도로 점성인 용액

[0510]

표 4

표 4: Jant4-K_{40}(서열 번호 3)의 활성 및 용해도에 미치는 Aib의 효과

#	**9-40am; Jant4 k40[C16]**	생체활성			용해도 [mg/mL] 80mM AmBicarb pH7.7	용해도 [mg/mL] PBS pH7.7
		IC_{50}	SDV	N		
81	Aib27	**23**	10	4	19.0 (6.1)	1.6
4328	K27, Aib28	**13**	13	10	18.9 (5.10	0.2
82	K26, Aib	**6**	2	4	14.2 (6.0)	0.1
44	Aib26	**8**	1	4	19.0 (5.7)	0.1
83	Aib24	**14**	6	4	12.6 (4.2)	0.3
45	Aib19	**8**	2	4	11.1 (1.6)	0.4
46	Aib18	**7**	2	3	17.5 (3.5)	0.7
84	Aib16	**30**	13	3	5.2 (0.2)	0.2

[0511]

표 5

표 5: d-AA를 사용한 Jant4-K_{40}(C16)(서열 번호 3)의 용해도 개선

#	9-40am; Jan54 K40[C16]	생체활성			용해도 [mg/mL] 80mM/AmBicarb pH7.7
		KC_{50}	SDV	N	
49	*d-Glu*$_{25}$	**23**	12	**7**	**>20**
85	*d-Glu*$_{16}$	**41**	20	**7**	**10.7**
86	*d-Gln*$_{17}$	**41**	24	**6**	**2.2**
50	*d-Val*$_{19}$	**124**	86	**6**	**>20**
87	*d-Arg*$_{20}$	**16**	6	**4**	**0.8**
88	*d-Glu*$_{21}$	**27**	13	**4**	**1.7**
51	*d-HE*$_{23}$	**31**	12	**5**	**>20**

[0512]

표 6

표 6: Jant4-K_{40}(서열 번호 3)의 위치 3에서의 Trp 치환

서열 번호 : #	구조	IC50(nM)
89	Ex9-39아미드, dK7(PEG2-γE(C16)), G8	6.2
90	Ex9-40아미드, K40(C18 이산)	28
91	Ex9-40아미드, W11, K40(C18 이산)	43
92	Ex9-40아미드, dW11, K40(C18 이산)	32
93	Ex9-40아미드, W11, K40(mPeg-γE-C18 이산)	87
94	Ex9-40아미드, dW11,K40(mPeg-γE-C18 이산)	115

[0513]

[0514] 실시예 2

[0515] MBX-1416에 대한 합성 절차:

[0516] 0.1 mmol 규모로 Fmoc-Ser(tBu)-Wang의 출발 고체상 수지를 사용하여 MBX-1416의 합성을 수행했다. Fmoc-Ser(tBu)-Wang 수지에서 제1 Fmoc-기가 제거되면, 잔기 9 내지 38(Asp9-Pro38)을 구성하는 Fmoc-아미노산을 유리 N 말단 아민에 순차적으로 커플링했다. 하기 표에 제시된 표준 Fmoc/DIC/Oxyma 합성 프로토콜을 사용하여 자동 조립을 위해 ABI 펩타이드 합성기를 사용했다.

ABI433A 합성기에 사용된 Fmoc_DIC_Oxyma_0.10 mmol 프로토콜의 상세 정보

커플링 시약		Fmoc 보호 아미노산	용매	활성화 시간	커플링 시간	탈보호
NMP (1.0 mL) 중 1M DIC	NMP(1.0mL) 중 1M Oxyma	1.0 mmol 카트리지	NMP 및 DCM	16 min	37 min	DMF 중 20% 피페리딘, 11 min

[0517]

[0518] C18 이산 커플링 절차:

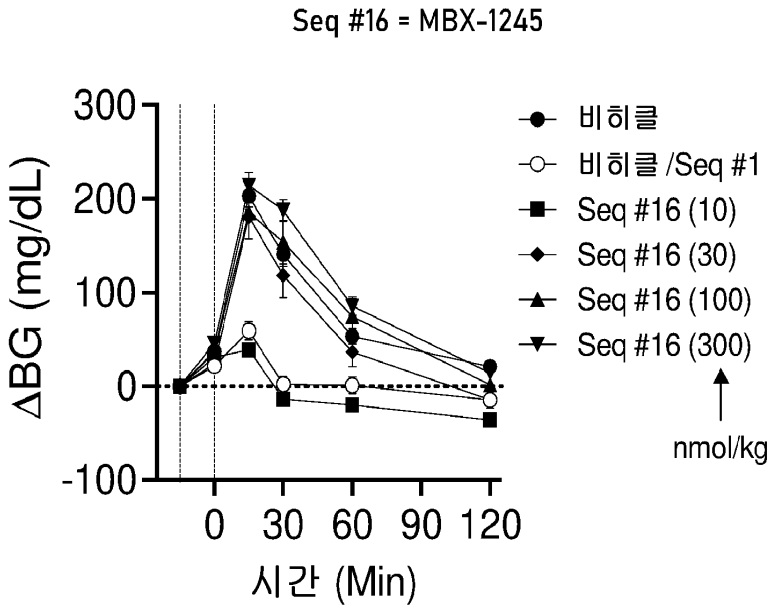
[0519] 전체 Asp9 내지 Ser39 펩타이드가 조립되면 N 말단 C18 이산을 펩티딜 수지에 커플링시켰다. 이는 DMF 중 DIC(1 mmol) 및 Oxyma(1 mmol)를 사용하여 tert-부틸 보호된 C18 이산(1 mmol)으로 도입되었다. tert-부틸 보호된 C18 이산(1 mmol) 및 Oxyma(1 mmol)를 DMF(10 mL) 중에 용해시켰다. 이러한 혼합물에, DIC(1 mmol)를 첨가하고 실온에서 10-15분 동안 사전-활성화되도록 했다. 이러한 반응 혼합물을 Asp9-Ser39 펩티딜 수지에 첨가하고 커플링을 진행하고 실온에서 4h 동안 교반했다.

[0520] MBX-1416 정제:

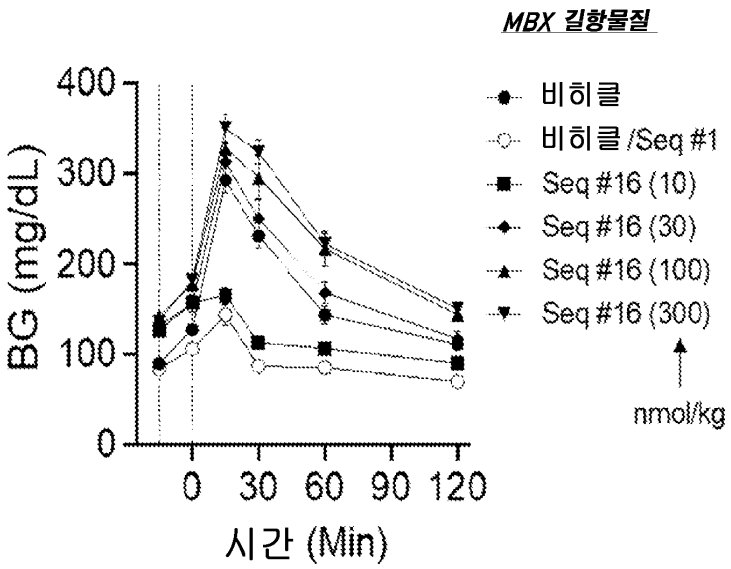
[0521] Gemini® 10 μm C8 100 Å, LC 250X21.2 mm 역상 컬럼(Cat. No 00G-4763-P0-AX)을 사용하여 Waters HPLC 컨트롤러 600에 의해 MBX-1416의 정제를, 80% A와 20% B에서 20% A와 80% B로의 선형 구배로서, 15 ml/min의 유속으로 90분에 걸쳐 실시했다. 2종의 완충제는 10% 아세토니트릴 및 90% H20 중 0.1% TFA(완충제 A) 및 100% 아세토니트릴 중 0.1% TFA(완충제 B)로 이루어졌다.

도면

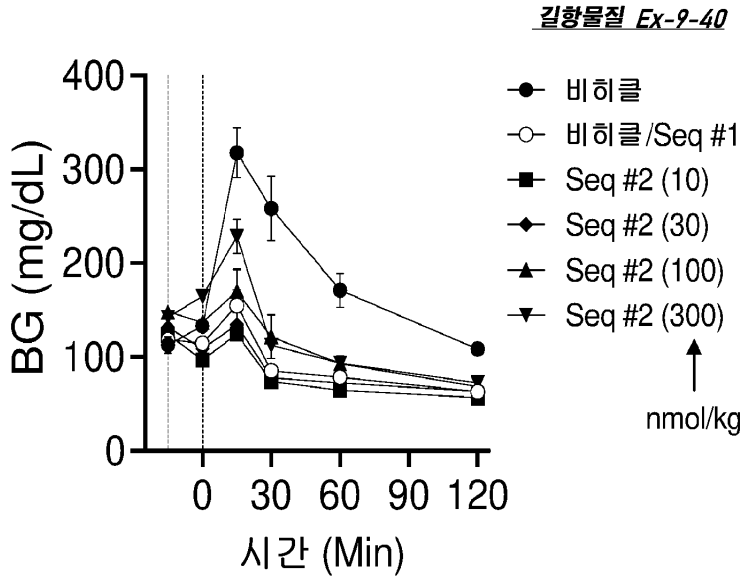
도면1



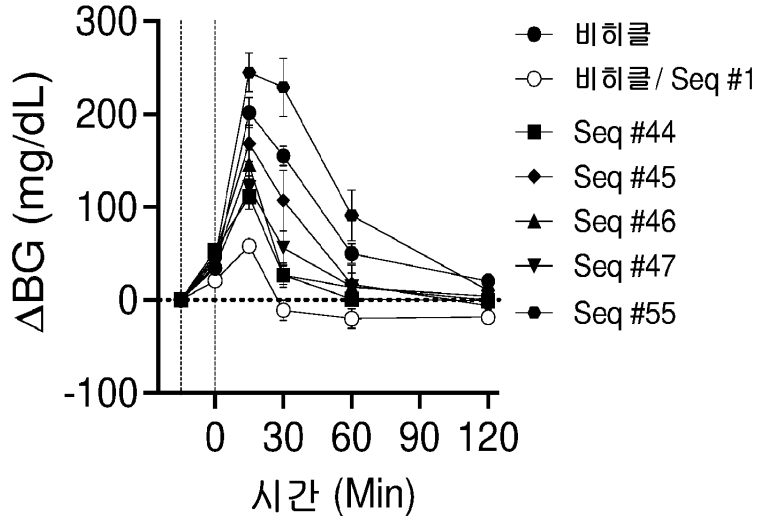
도면2a



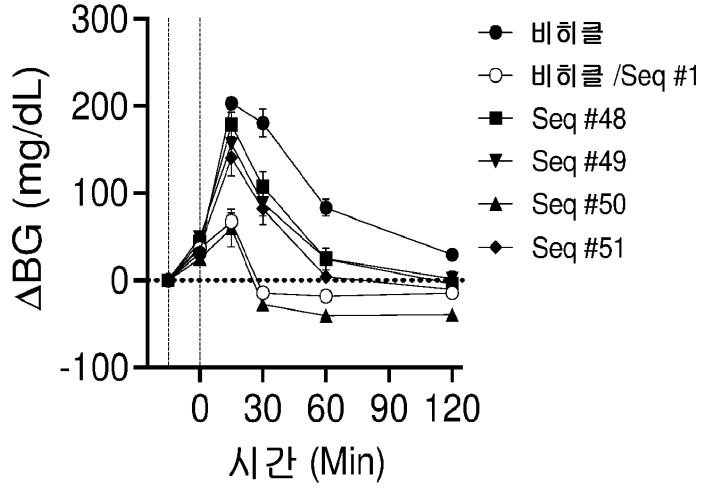
도면2b


길항물질 Ex-9-40
400
300
200
100
0
BG (mg/dL)
0 30 60 90 120
시간 (Min)
비히클
비히클/Seq #1
Seq #2 (10)
Seq #2 (30)
Seq #2 (100)
Seq #2 (300)
nmol/kg

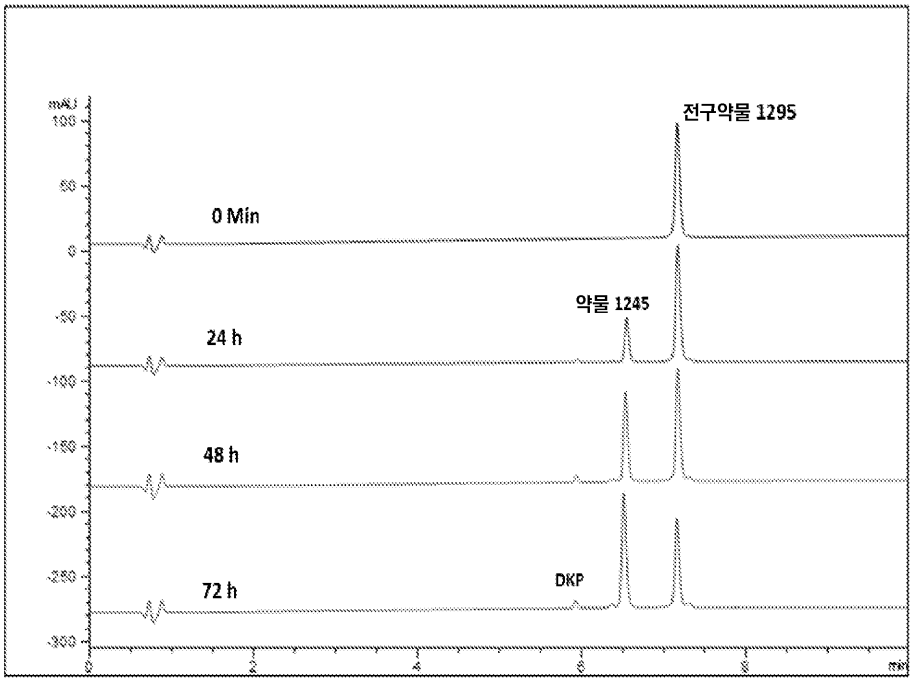
도면3


300
200
100
0
-100
ΔBG (mg/dL)
0 30 60 90 120
시간 (Min)
비히클
비히클/ Seq #1
Seq #44
Seq #45
Seq #46
Seq #47
Seq #55

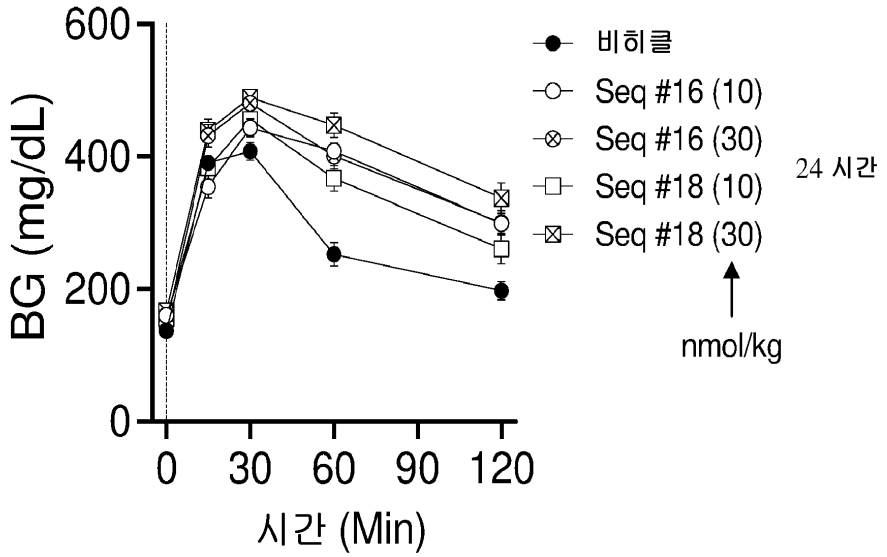
도면4


300
200
100
0
-100
ΔBG (mg/dL)
0 30 60 90 120
시간 (Min)
비히클
비히클 /Seq #1
Seq #48
Seq #49
Seq #50
Seq #51

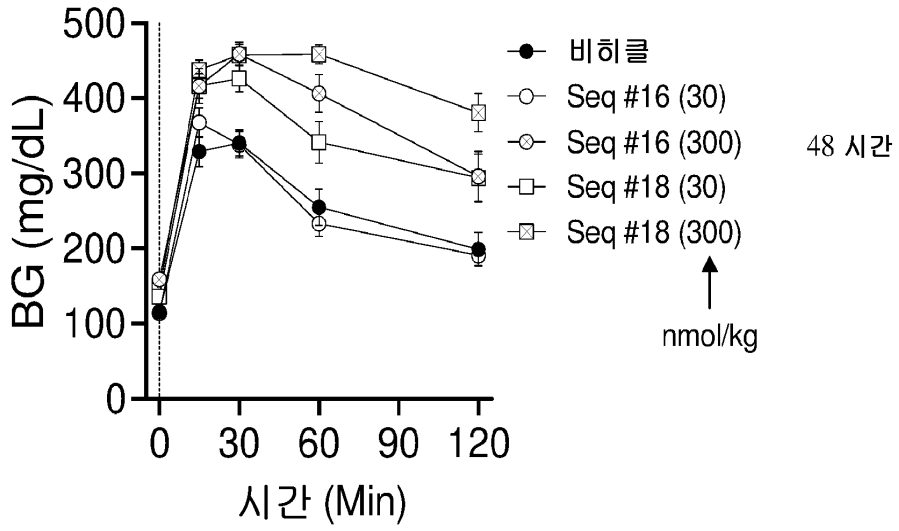
도면5a


전구약물 1295
0 Min
약물 1245
24 h
48 h
DKP
72 h

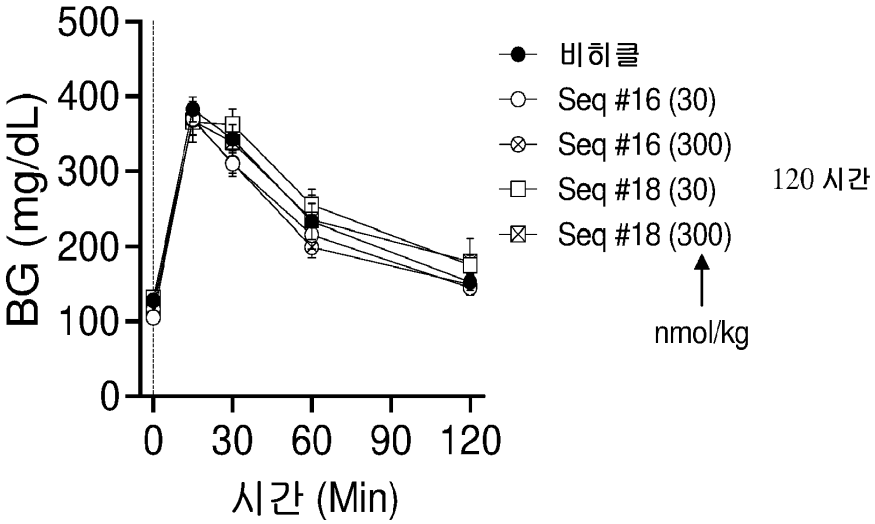
도면5b


600
400
200
0
BG (mg/dL)
0
30
60
90
120
시간 (Min)
비히클
Seq #16 (10)
Seq #16 (30)
Seq #18 (10)
Seq #18 (30)
24 시간
nmol/kg

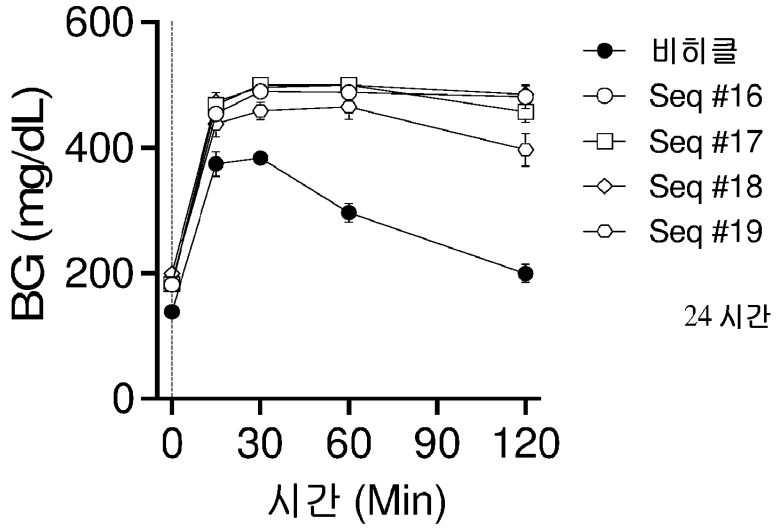
도면5c


500
400
300
200
100
0
BG (mg/dL)
0
30
60
90
120
시간 (Min)
비히클
Seq #16 (30)
Seq #16 (300)
Seq #18 (30)
Seq #18 (300)
nmol/kg
48 시간

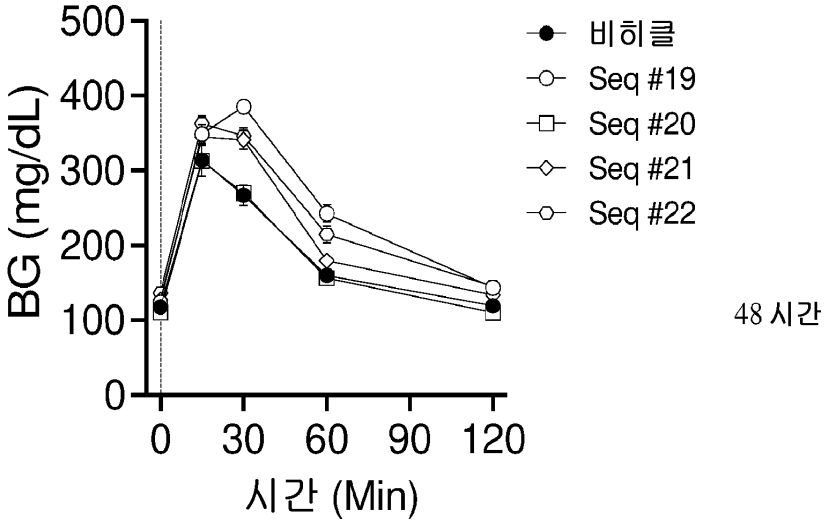
도면5d


500
400
300
200
100
0
BG (mg/dL)
0
30
60
90
120
시간 (Min)
비히클
Seq #16 (30)
Seq #16 (300)
Seq #18 (30)
Seq #18 (300)
nmol/kg
120 시간

도면6a



도면6b



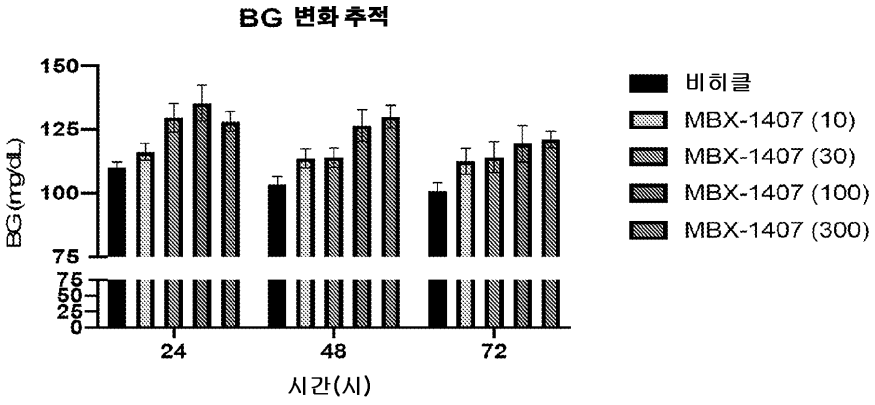
도면7

N-말단 지방 아실화된 GLP-1 길항물질

MBX 1391: X2GDVSSYLEEQAVREFIEWLVKGGPSSGAPPPSB-**아미드**
MBX 1401: X—DVS**R**YLEEQAVREFIEWLV**R**GGPSSGAPPPSO-**산**
MBX 1402: X—**E**VS**R**YLEEQAVREFIEWLV**R**GGPSSGAPPPSO-**산**
MBX 1403: X—D**L**S**KQM**EE**E**AV**RL**FIEWL**KN**GGPSSGAPPPSO-**산**
MBX 1404: X—DVSSYLEEQAVREFI**A**WLVKGGPSSGAPPPSO-**아미드**
MBX 1406: X—DVSSYLEEQAVREFI**A**WLVKGGPSSGAPPPSO-**산**
MBX 1407: X—DVSSYLEEQAVREFI**A**WLV**R**GGPSSGAPPPSO-**산**
MBX 1408: X—D**L**S**KQM**EE**E**AV**RL**FIEWL**KN**GGPSSGAPPPSO-**아미드**
MBX 1416: X—DVSSYLEEQAVREFI**A**WLV**R**GGPSSGAPPPS-**산**

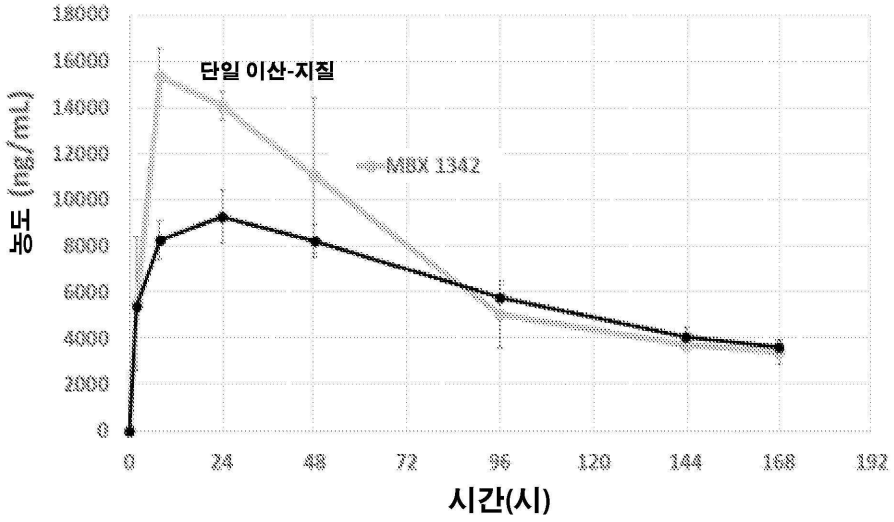
X=C18-**이산**　　2-rE-miniPEG　　O=K(C18-**이산**)　　B=K(miniPEG-rE-C18-**일산**)

도면8



1407	XDVSSYLEEQAVREFIAWLVRGGPSSGAPPPSO	-산	580nM

도면9

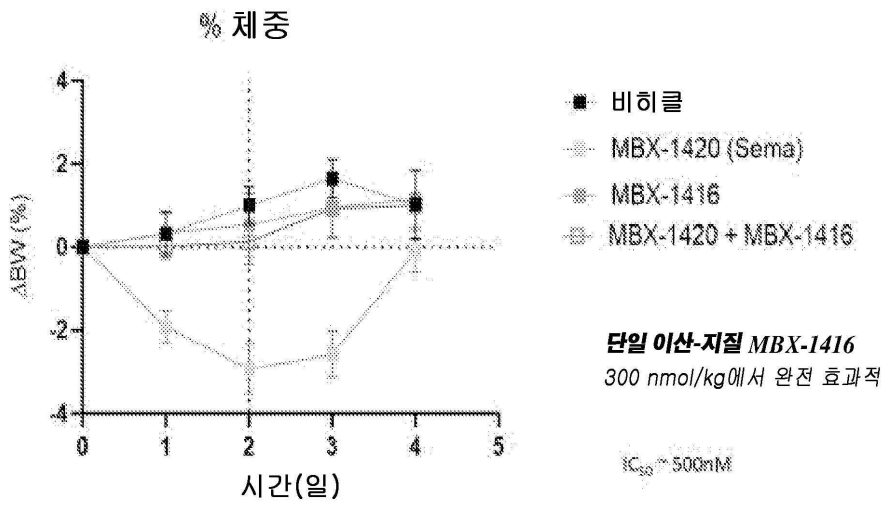


도면10

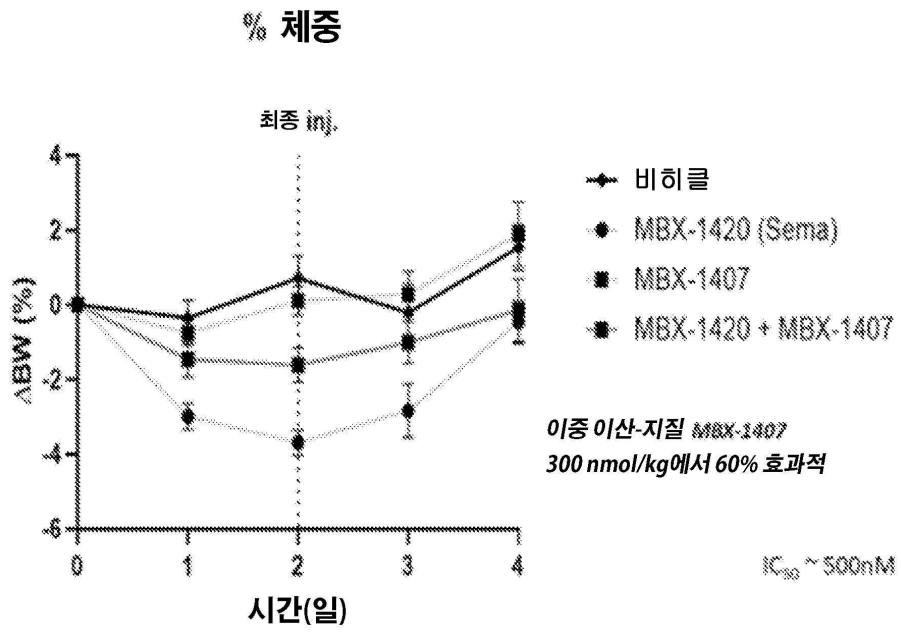
			IC_{50} nM
1342		DLSKQMEEEAVRLFIEWLKNGGPSSGAPPPSO-아미드	41
1373	K(X)G	DLSKQMEEEAVRLFIEWLKNGGPSSGAPPPS-아미드	14
1416	X	DVSSYLEEQAVREFIAWLVRGGPSSGAPPPS-산	36
1417	ZK(X)G	DVSSYLEEQAVREFIAWLVRGGPSSGAPPPS-산	80
1418	Z	DVSSYLEEQAVREFIAWLVRGGPSSGAPPPSO-산	67

Z=피로글루타민 X=C18-이산 O=K(C18-이산)

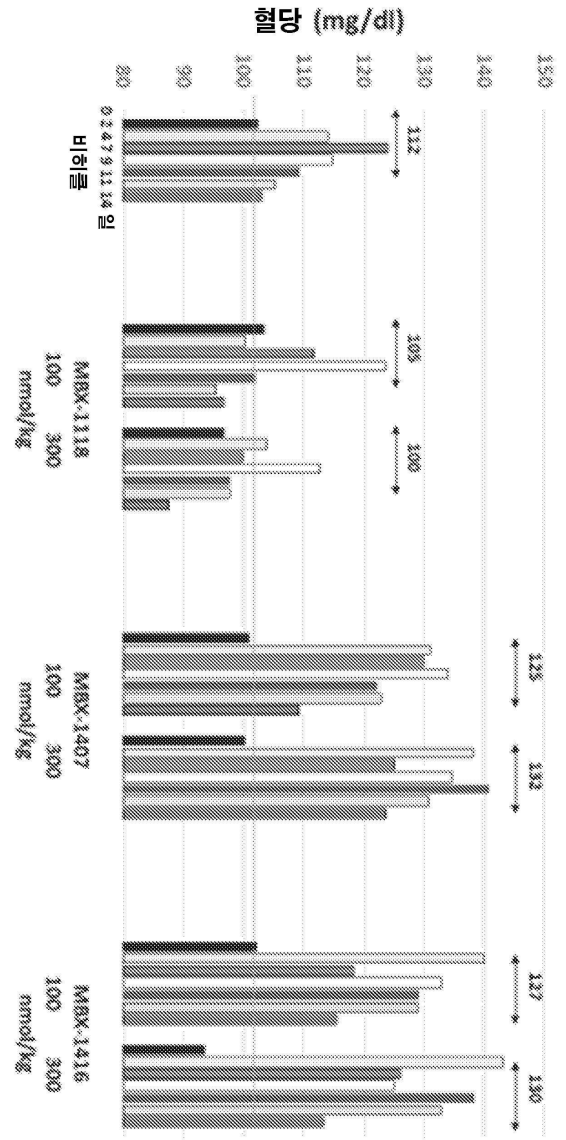
도면11a


% 체중
ΔBW (%)
4
2
0
-2
-4
0
1
2
3
4
5
시간(일)
비히클
MBX-1420 (Sema)
MBX-1416
MBX-1420 + MBX-1416
단일 이산-지질 MBX-1416
300 nmol/kg에서 완전 효과적
IC50 ~ 500nM

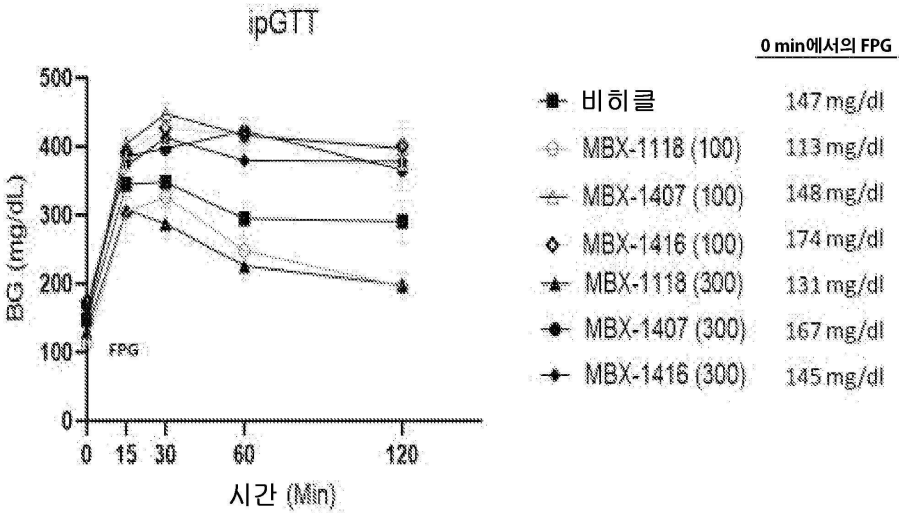
도면11b


% 체중
최종 inj.
ΔBW (%)
4
2
0
-2
-4
-6
0
1
2
3
4
시간(일)
비히클
MBX-1420 (Sema)
MBX-1407
MBX-1420 + MBX-1407
이중 이산-지질 MBX-1407
300 nmol/kg에서 60% 효과적
IC50 ~ 500nM

도면12


혈당 (mg/dl)
80
90
100
110
120
130
140
150
비히클
0 2 4 6 9 11 14 일
112
MBX-1118
100
300
mmol/kg
105
101
MBX-1407
100
300
mmol/kg
125
133
MBX-1416
100
300
mmol/kg
127
130

도면13


ipGTT
BG (mg/dL)
500
400
300
200
100
0
FPG
0
15
30
60
120
시간 (Min)
0 min에서의 FPG
비히클 147 mg/dl
MBX-1118 (100) 113 mg/dl
MBX-1407 (100) 148 mg/dl
MBX-1416 (100) 174 mg/dl
MBX-1118 (300) 131 mg/dl
MBX-1407 (300) 167 mg/dl
MBX-1416 (300) 145 mg/dl

서 열 목 록 (첨부)



아이콘을 클릭하시면 서열목록 파일이 열립니다.

본 공보 PDF는 첨부파일을 가지고 있습니다. Acrobat Reader PDF뷰어를 제공하지 않는 브라우저(크롬, 파이어폭스, 사파리 등)의 경우 첨부파일 열기가 제한되어 있으므로 Acrobat Reader PDF뷰어 설치 후 공보 PDF를 다운로드 받아 해당 뷰어에서 조회해주시기 바랍니다.