



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2016년04월06일

(11) 등록번호 10-1609302

(24) 등록일자 2016년03월30일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C07K 14/575 (2006.01) A61K 38/22 (2006.01)

A61P 3/10 (2006.01) C07K 14/605 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2012-7033002

(22) 출원일자(국제) 2010년05월17일

심사청구일자 2013년01월29일

(85) 번역문제출일자 2012년12월17일

(65) 공개번호 10-2013-0039740

(43) 공개일자 2013년04월22일

(86) 국제출원번호 PCT/CN2010/000692

(87) 국제공개번호 WO 2011/143788

국제공개일자 2011년11월24일

(56) 선행기술조사문헌

WO2007030519 A2*

KR1020030009537 A

WO2003033671 A2

WO2009083549 A1

*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자

베타 파머수티컬 컴퍼니 리미티드

중국 311100 저지양 항저우 위항 홍평 로드 589

(72) 발명자

후, 샤오정

중국, 100176, 베이징, 비즈니스 디벨롭먼트
지역, 놀스 디생 스트리트 1, 베이징 폴리테크닉
유니버시티 소프트웨어 파크, 존 비, 빌딩 29

탄, 펜라이

중국, 100176, 베이징, 비즈니스 디벨롭먼트
지역, 놀스 디생 스트리트 1, 베이징 폴리테크닉
유니버시티 소프트웨어 파크, 존 비, 빌딩 29
(뒷면에 계속)

(74) 대리인

특허법인 플러스

전체 청구항 수 : 총 22 항

심사관 : 안규정

(54) 발명의 명칭 새로운 글루카곤 유사 웹타이드 유사체, 조성물, 및 사용 방법

(57) 요약

본 발명은 포유동물에 있어서 인슐린 발현을 상향-조절하고 당뇨병을 치료하는데 있어 유용한, 글루카곤 유사 웹타이드의 새로운 유사체 및 조성물에 관한 것이다. 특히, 이들 웹타이드 유사체는 웹타이드 모방 링커를 가지며 당뇨병 및 기타 인슐린분비촉진(insulinotropic) 웹타이드 관련 질환의 치료 활성의 긴 지속기간, 위장 기능 및 글루카곤 수준과 관련있는 활성을 제공한다.

(72) 발명자

왕, 얀평

중국, 100176, 베이징, 비즈니스 디벨롭먼트 지역,
놀스 디센 스트리트 1, 베이징 폴리테크닉 유니버
시티 소프트웨어 파크, 존 비, 빌딩 29

마, 쿤보

중국, 100176, 베이징, 비즈니스 디벨롭먼트 지역,
놀스 디센 스트리트 1, 베이징 폴리테크닉 유니버
시티 소프트웨어 파크, 존 비, 빌딩 29

후, 앤

중국, 100176, 베이징, 비즈니스 디벨롭먼트 지역,
놀스 디센 스트리트 1, 베이징 폴리테크닉 유니버
시티 소프트웨어 파크, 존 비, 빌딩 29

카오, 흥

중국, 100176, 베이징, 비즈니스 디벨롭먼트 지역,
놀스 디센 스트리트 1, 베이징 폴리테크닉 유니버
시티 소프트웨어 파크, 존 비, 빌딩 29

자오, 시양동

중국, 100176, 베이징, 비즈니스 디벨롭먼트 지역,
놀스 디센 스트리트 1, 베이징 폴리테크닉 유니버
시티 소프트웨어 파크, 존 비, 빌딩 29

통, 웨이

중국, 100176, 베이징, 비즈니스 디벨롭먼트 지역,
놀스 디센 스트리트 1, 베이징 폴리테크닉 유니버
시티 소프트웨어 파크, 존 비, 빌딩 29

왕, 인시앙

중국, 100176, 베이징, 비즈니스 디벨롭먼트 지역,
놀스 디센 스트리트 1, 베이징 폴리테크닉 유니버
시티 소프트웨어 파크, 존 비, 빌딩 29

덩, 리에밍

중국, 100176, 베이징, 비즈니스 디벨롭먼트 지역,
놀스 디센 스트리트 1, 베이징 폴리테크닉 유니버
시티 소프트웨어 파크, 존 비, 빌딩 29

명세서

청구범위

청구항 1

화학식 I의 GLP-1 유사체 또는 이들의 약제학적으로 허용되는 염:

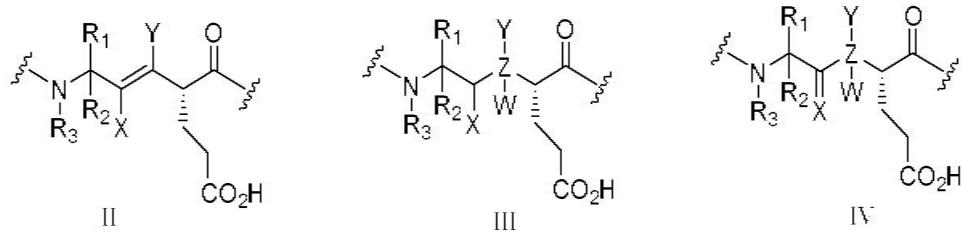
Xaa₇-Q-Gly-Thr-Phe-Thr-Xaa₁₄-Asp-Xaa₁₆-Ser-Xaa₁₈-Tyr-Leu-Glu-Xaa₂₂-Xaa₂₃-Ala-Ala-Xaa₂₆-Xaa₂₇-Phe-Ile-Ala-Trp-Leu-Val-Xaa₃₄-Xaa₃₅-Xaa₃₆-B

I

상기식에서,

Xaa₇은 L-His, D-히스티딘, 데스아미노-히스티딘, 2-아미노-히스티딘, β-하이드록시-히스티딘, 호모히스티딘, α-플루오로메틸-히스티딘, 또는 α-메틸-히스티딘이고;

Q는 링커 II, III, 또는 IV이다:



여기서,

R₁은 수소 또는 (C₁-C₆)알킬이다;

R₂는 수소 또는 (C₁-C₆)알킬이다;

R₃은 수소이다;

X는 수소, 불소, 트리플루오로메틸, 또는 산소이다;

Y는 수소, 불소, 또는 (C₁-C₆)알킬이다;

Z는 질소 또는 탄소이다;

Z가 질소일 때, W는 존재하지 않는다; Z가 탄소일 때, W는 수소, 또는 불소이다;

Q가 링커 III일 때, X는 CF₃이 아니다;

Xaa₁₄는 세린이다;

Xaa₁₆은 벌린이다;

Xaa₁₈은 세린이다;

Xaa₂₂은 독립적으로 글리신 또는 글루탐산이고; Xaa₂₃은 글루타민이다;

Xaa₂₆은 리신이다;

Xaa₂₇은 글루탐산이다;

Xaa₃₄는 리신 또는 아르기닌이다;

Xaa₃₅는 글리신이다;

Xaa₃₆은 아르기닌이다; 또는

Xaa₂₆은 T-U와 연결된 리신으로, 여기서,

T는 γ-글루탐산, β-알라닌, γ-아미노부틸산 또는 HOOC(CH₂)_nCOOH이고,

이때, n은 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 또는 27이다;

U는 T가 γ-글루탐산, β-알라닌 또는 γ-아미노부틸산일 때에만 존재 및 8 내지 20개의 탄소 길이를 갖는 지방 산이다;

B는 글리신, 또는 말단 아미노산의 아미드 형태 또는 유리산을 나타내는 NH₂ 또는 OH 이거나, 또는

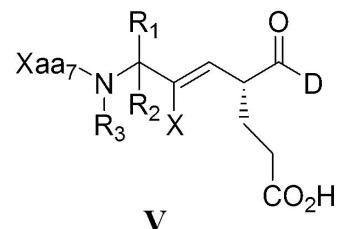
Xaa₂₆가 리신인 경우, B는 시스테인 및 각각 독립적으로 세린, 글리신, 알라닌, 또는 모노메톡시폴리에틸렌 글리콜 말레이미드인 1개 내지 4개의 아미노산으로 이루어진 웨타이드 절편이다.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 Xaa₂₆가 리신이고; B는 시스테인-세린-글리신 또는 시스테인-알라닌 또는 시스테인-모노메톡시폴리에틸렌 글리콜 말레이미드인 GLP-1 유사체.

청구항 3

화학식 V의 GLP-1 유사체 또는 이들의 약제학적으로 허용되는 염:



상기식에서,

R₁은 수소 또는 (C₁-C₆)알킬이다;

R₂는 수소 또는 (C₁-C₆)알킬이다;

R₃은 수소 또는 (C₁-C₆)알킬이다;

X는 수소, 불소, 또는 트리플루오로메틸이다;

Xaa₇은 L-His, D-히스티딘, 데스아미노-히스티딘, 2-아미노-히스티딘, β-하이드록시-히스티딘, 호모히스티딘, α-플루오로메틸-히스티딘, 및 α-메틸-히스티딘이다;

D는 Gly-Phe-Thr-Xaa₁₄-Asp-Xaa₁₆-Ser-Xaa₁₈-Tyr-Leu-Glu-Xaa₂₂-Xaa₂₃-Ala-Ala-Xaa₂₆-Xaa₂₇-Phe-Ile-Ala-Trp-Leu-Val-Xaa₃₄-Xaa₃₅-Xaa₃₆-B이다;

여기서,

Xaa₁₄는 세린이다;

Xaa₁₆은 발린이다;

Xaa₁₈은 세린이다;

Xaa₂₂은 독립적으로 글리신 또는 글루탐산이고; Xaa₂₃은 글루타민이다;

Xaa₂₆은 리신이다;

Xaa₂₇은 글루탐산이다;

Xaa₃₄는 리신 또는 아르기닌이다;

Xaa₃₅는 글리신이다;

Xaa₃₆은 아르기닌이다; 또는

Xaa₂₆은 T-U와 연결된 리신으로, 여기서,

T는 γ -글루탐산, β -알라닌, γ -아미노부틸산 또는 HOOC(CH₂)_nCOOH이고;

이때, n은 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 또는 27이다;

U는 T가 γ -글루탐산, β -알라닌 또는 γ -아미노부틸산일 때에만 존재 및 8 내지 20개의 탄소 길이를 갖는 지방산이다;

B는 글리신, 또는 말단 아미노산의 아미드 형태 또는 유리산을 각각 나타내는 NH₂ 또는 OH 이거나; 또는

Xaa₂₆가 리신인 경우, B는 시스테인 및 각각 독립적으로 시스테인, 세린, 글리신, 알라닌, 또는 모노메톡시폴리에틸렌 글리콜 말레이미드인 1개 내지 4개의 아미노산으로 이루어진 웹타이드 철판이다.

청구항 4

제3항에 있어서, 상기 Xaa₂₆가 리신이고; B는 시스테인-세린-글리신 또는 시스테인-알라닌, 또는 시스테인-모노메톡시폴리에틸렌 글리콜 말레이미드인 GLP-1 유사체.

청구항 5

삭제

청구항 6

제3항에 있어서, 상기 R₁, R₂ 및 R₃은 각각 독립적으로 수소 또는 메틸인 GLP-1 유사체.

청구항 7

제3항에 있어서, 상기 R₁은 메틸이고, R₂ 및 R₃은 각각 독립적으로 수소인 GLP-1 유사체.

청구항 8

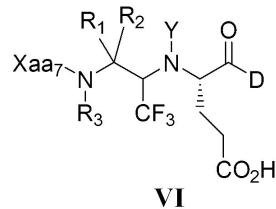
제3항에 있어서, 상기 R₁ 및 R₃은 각각 독립적으로 수소이고, R₂는 메틸인 GLP-1 유사체.

청구항 9

삭제

청구항 10

화학식 VI의 GLP-1 유사체 또는 약제학적으로 허용되는 염:



여기에서,

R₁은 수소, 또는 (C₁-C₆)알콕시이다;

R₂는 수소, 또는 (C₁-C₆)알콕시이다;

R₃은 수소 또는 (C₁-C₆)알킬이다;

Y는 수소 또는 (C₁-C₆)알킬이다;

Xaa₇은 L-His, D-히스티딘, 데스아미노-히스티딘, 2-아미노-히스티딘, β-하이드록시-히스티딘, 호모히스티딘, α-플루오로메틸-히스티딘, 또는 α-메틸-히스티딘이다;

D는 Gly-Phe-Thr-Xaa₁₄-Asp-Xaa₁₆-Ser-Xaa₁₈-Tyr-Leu-Glu-Xaa₂₂-Xaa₂₃-Ala-Ala-Xaa₂₆-Xaa₂₇-Phe-Ile-Ala-Trp-Leu-Val-Xaa₃₄-Xaa₃₅-Xaa₃₆-B이다.

Xaa₁₄는 세린이다;

Xaa₁₆은 발린이다;

Xaa₁₈은 세린이다;

Xaa₂₂은 독립적으로 글리신 또는 글루탐산이고; Xaa₂₃은 글루타민이다;

Xaa₂₆은 리신이다;

Xaa₂₇은 글루탐산이다;

Xaa₃₄는 리신 또는 아르기닌이다;

Xaa₃₅는 글리신이다;

Xaa₃₆은 아르기닌이다; 또는

Xaa₂₆은 T-U와 연결된 리신으로, 여기서,

T는 γ-글루탐산, β-알라닌, γ-아미노부틸산 또는 HOOC(CH₂)_nCOOH이고,

이때, n은 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 또는 27이다;

U는 T가 γ-글루탐산, β-알라닌 또는 γ-아미노부틸산일 때에만 존재 및 8 내지 20개의 탄소 길이를 갖는 지방 산이다;

B는 글리신, 또는 말단 아미노산의 아미드 형태 또는 유리산을 각각 나타내는 NH₂ 또는 OH 이거나, 또는

Xaa₂₆가 리신인 경우, B는 시스테인 및 각각 독립적으로 시스테인, 세린, 글리신, 알라닌, 또는 모노메톡시폴리 에틸렌 글리콜 말레이미드인 1개 내지 4개의 아미노산으로 이루어진 웹타이드 절편이다.

청구항 11

제10항에 있어서, 상기 Xaa₂₆가 리신이고; B는 시스테인-세린-글리신, 시스테인-알라닌, 또는 시스테인-모노메톡시폴리에틸렌 글리콜 말레이이미드인 GLP-1 유사체.

청구항 12

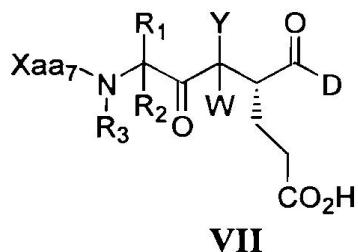
제10항에 있어서, 상기 R₃은 수소인 GLP-1 유사체.

청구항 13

삭제

청구항 14

화학식 VII의 GLP-1 유사체 또는 약제학적으로 허용되는 염:



상기식에서,

R₁은 수소 또는 (C₁-C₆)알킬이다;

R₂는 수소 또는 (C₁-C₆)알킬이다;

R₃은 수소 또는 (C₁-C₆)알킬이다;

Y는 수소, 불소, 또는 (C₁-C₆)알킬이다;

W는 수소, 또는 불소이다;

Xaa₇은 L-His, D-히스티딘, 데스아미노-히스티딘, 2-아미노-히스티딘, β-하이드록시-히스티딘, 호모히스티딘, α-플루오로메틸-히스티딘, 또는 α-메틸-히스티딘이다;

D는 Gly-Phe-Thr-Xaa₁₄-Asp-Xaa₁₆-Ser-Xaa₁₈-Tyr-Leu-Glu-Xaa₂₂-Xaa₂₃-Ala-Ala-Xaa₂₆-Xaa₂₇-Phe-Ile-Ala-Trp-Leu-Val-Xaa₃₄-Xaa₃₅-Xaa₃₆-B 으로; 여기서,

Xaa₁₄는 세린이다;

Xaa₁₆은 발린이다;

Xaa₁₈은 세린이다;

Xaa₂₂은 독립적으로 글리신 또는 글루탐산이고; Xaa₂₃은 글루타민이다;

Xaa₂₆은 리신이다;

Xaa₂₇은 글루탐산이다;

Xaa₃₄는 리신 또는 아르기닌이다;

Xaa₃₅는 글리신이다;

Xaa₃₆은 아르기닌이다; 또는

Xaa₂₆은 T-U와 연결된 리신으로; 여기서,

T는 γ -글루탐산, β -알라닌, γ -아미노부틸산 또는 HOOC(CH₂)_nCOOH이고;

이때, n은 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 또는 27이다;

U는 T가 γ -글루탐산, β -알라닌 또는 γ -아미노부틸산일 때에만 존재 및 8 내지 20개의 탄소 길이를 갖는 지방산이다;

B는 글리신, 또는 말단 아미노산의 아미드 형태 또는 유리산을 각각 나타내는 NH₂ 또는 OH 이거나, 또는

Xaa₂₆가 리신인 경우, B는 시스테인 및 각각 독립적으로 시스테인, 세린, 글리신, 알라닌, 또는 모노메톡시폴리에틸렌 글리콜 말레이미드인 1개 내지 4개의 아미노산으로 이루어진 웨타이드 절편이다.

청구항 15

제14항에 있어서, 상기 Xaa₂₆이 리신이고; B는 시스테인-세린-글리신, 시스테인-알라닌, 또는 시스테인-모노메톡시폴리에틸렌 글리콜 말레이미드인 GLP-1 유사체.

청구항 16

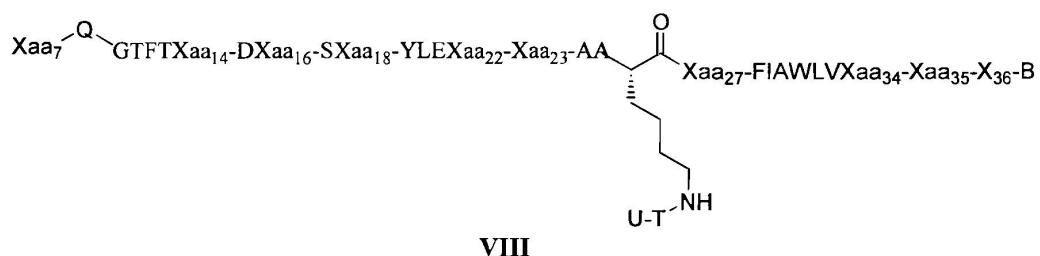
제14항에 있어서, 상기 R₃은 수소인 GLP-1 유사체.

청구항 17

제14항에 있어서, 상기 Y는 수소, 또는 불소인 GLP-1 유사체.

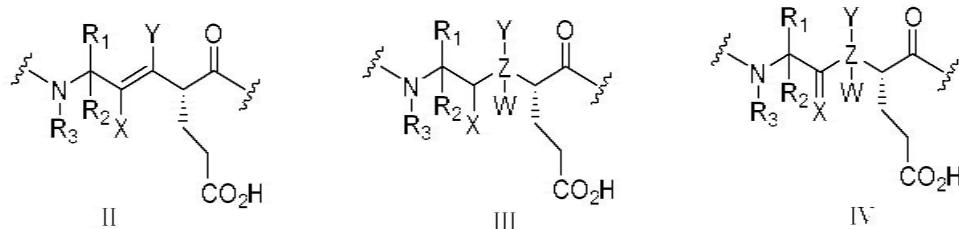
청구항 18

화학식 VIII의 GLP-1 유사체 또는 약제학적으로 허용되는 염:



Xaa₇은 L-His, D-히스티딘, 데스아미노-히스티딘, 2-아미노-히스티딘, β -하이드록시-히스티딘, 호모히스티딘, α -플루오로메틸-히스티딘, 또는 α -메틸-히스티딘이다;

Q는 링커 II, III, 또는 IV이다:



여기서,

R₁은 수소 또는 (C₁-C₆)알킬이다;

R₂는 수소 또는 (C₁-C₆)알킬이다;

R₃은 수소 또는 (C₁-C₆)알킬이다;

X는 수소, 불소, 트리플루오로메틸, 또는 산소이다;

Y는 수소, 불소, 또는 (C₁-C₆)알킬이다;

Z는 질소 또는 탄소이다;

Z가 질소일 때, W는 존재하지 않는다; 또는 Z가 탄소일 때, W는 수소, 또는 불소이다;

Xaa₇은 L-His, D-히스티딘, 데스아미노-히스티딘, 2-아미노-히스티딘, β-하이드록시-히스티딘, 호모히스티딘, α-플루오로메틸-히스티딘, 또는 α-메틸-히스티딘이고;

Xaa₁₄는 세린이다;

Xaa₁₆은 발린이다.

Xaa₁₈은 세린이다;

Xaa₂₂은 독립적으로 글리신 또는 글루탐산이고; Xaa₂₃은 글루타민이다;

Xaa₂₇은 글루탐산이다;

Xaa₃₄는 리신 또는 아르기닌이다;

Xaa₃₅는 글리신이다;

Xaa₃₆은 아르기닌이다;

T는 γ-글루탐산, β-알라닌, γ-아미노부틸산 또는 HOOC(CH₂)_nCOOH이고;

이때, n은 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 또는 27이고다;

U는 T가 γ-글루탐산, β-알라닌 또는 γ-아미노부틸산일 때에만 존재 및 8 내지 20개의 탄소 길이를 갖는 지방산이다;

B는 글리신, 또는 말단 아미노산의 아미드 형태 또는 유리산을 나타내는 NH₂ 또는 OH 이다.

청구항 19

화학식 IX의 GLP-1 유사체 또는 이들의 약제학적으로 허용되는 염:

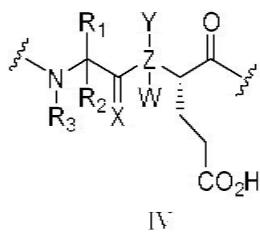
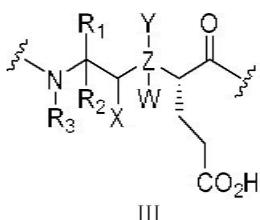
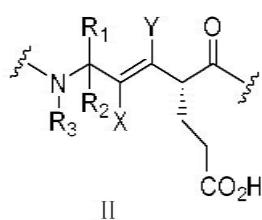
Xaa₇-Q-Gly-Thr-Phe-Thr-Xaa₁₄-Asp-Xaa₁₆-Ser-Xaa₁₈-Tyr-Leu-Glu-Xaa₂₂-Xaa₂₃-Ala-Ala-Xaa₂₆-Xaa₂₇-Phe-Ile-Ala-Trp-Leu-Val-Xaa₃₄-Xaa₃₅-Xaa₃₆-Gly-Xaaⁿ-Xaaⁿ⁺¹-Xaaⁿ⁺²-Xaaⁿ⁺³-Xaaⁿ⁺⁴-Cys^(PEG)-Xaa^m-Xaa^{m+1}-Xaa^{m+2}-Xaa^{m+3}-Xaa^{m+4}

IX

상기식에서,

Xaa₇은 L-His, D-히스티딘, 데스아미노-히스티딘, 2-아미노-히스티딘, β-하이드록시-히스티딘, 호모히스티딘, α-플루오로메틸-히스티딘, 또는 α-메틸-히스티딘이다;

Q는 링커 II, III, 또는 IV 이다:



여기서,

R_1 은 수소 또는 (C_1-C_6)알킬이다;

R_2 는 수소 또는 (C_1-C_6)알킬이다;

R_3 은 수소 또는 (C_1-C_6)알킬이다;

X는 수소, 불소, 하이드록시, 트리플루오로메틸, 또는 산소이다;

Y는 수소, 하이드록실, 불소, 또는 (C_1-C_6)알킬이다;

Z는 질소 또는 탄소이다;

Z가 질소일 때, W는 존재하지 않는다; Z가 탄소일 때, W는 수소, 또는 불소이다;

Xaa_{14} 는 세린이다;

Xaa_{16} 은 발린이다;

Xaa_{18} 은 세린이다;

Xaa_{22} 은 독립적으로 글리신 또는 글루탐산이고; Xaa_{23} 은 글루타민이다;

Xaa_{26} 은 리신이다;

Xaa_{27} 은 글루탐산이다;

Xaa_{34} 는 리신 또는 아르기닌이다;

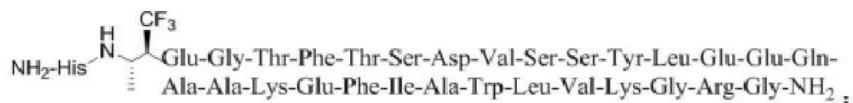
Xaa_{35} 는 글리신이다;

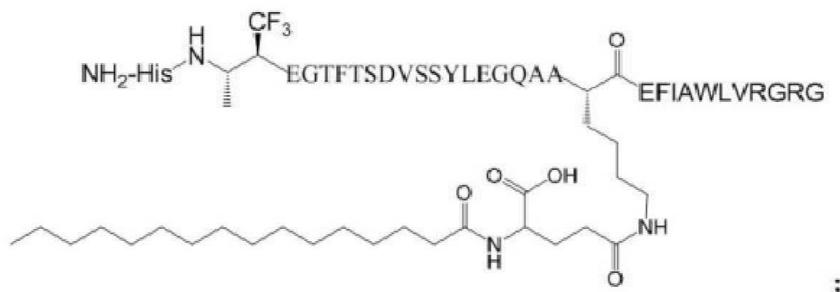
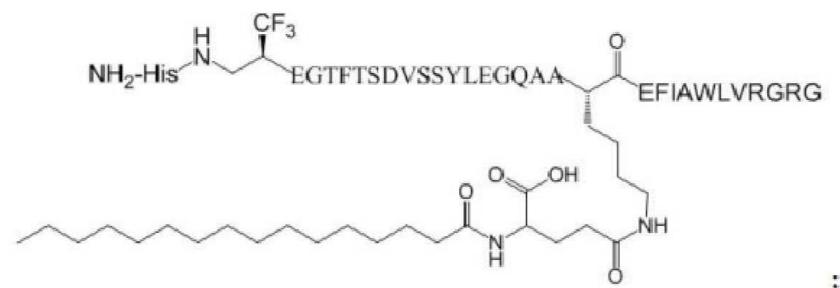
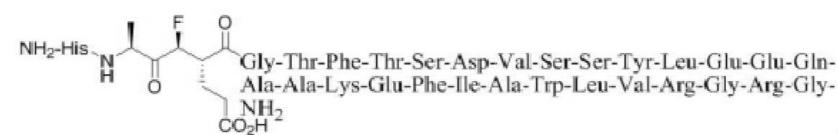
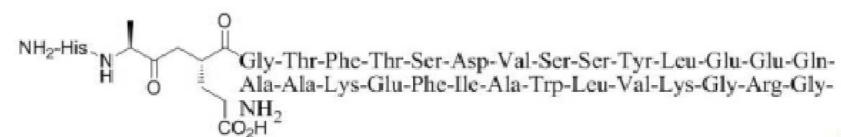
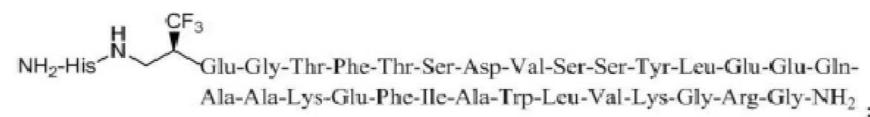
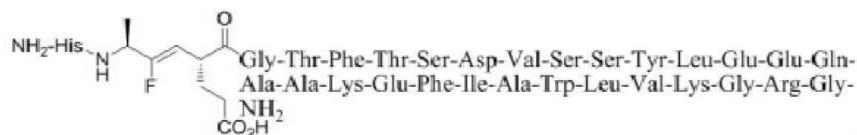
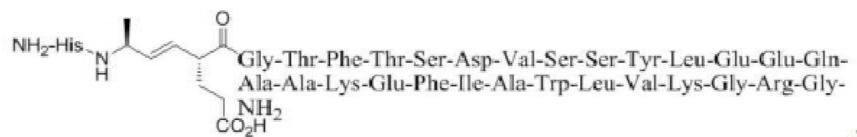
Xaa_{36} 은 아르기닌이다;

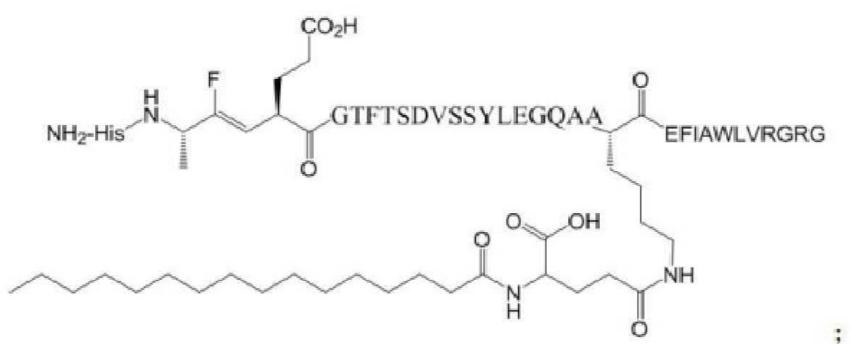
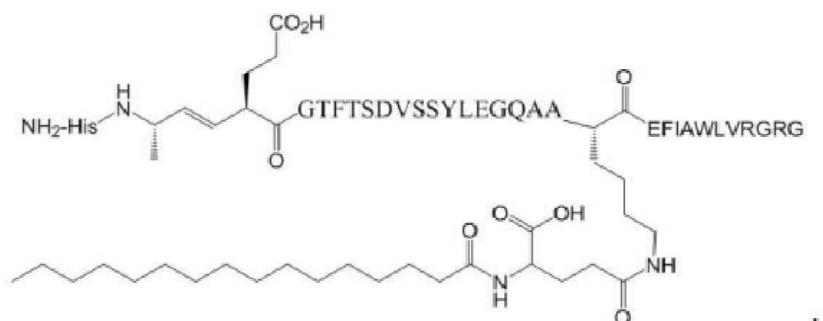
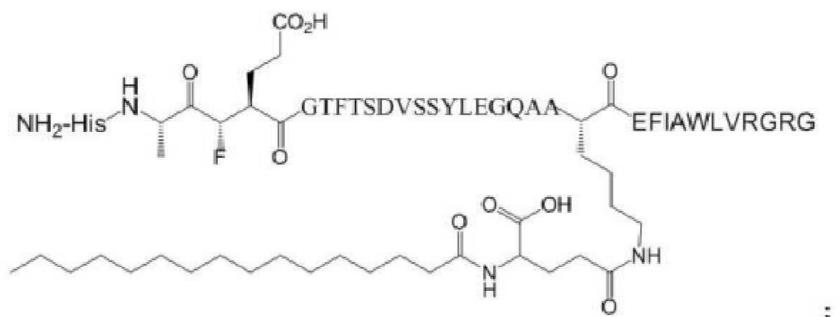
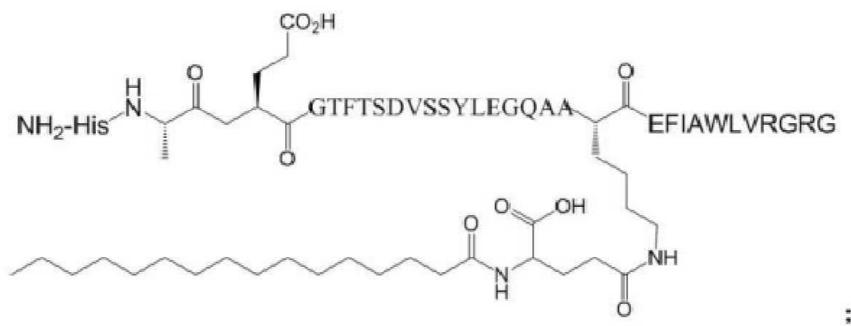
Xaa^n , Xaa^{n+1} , Xaa^{n+2} , Xaa^{n+3} , 및 Xaa^{n+4} 는 모두 함께, 존재하지 않거나 또는 1개, 2개, 3개, 또는 4개의 아미노산의 웨타이드 절편이다; 그리고 Xaa^m , Xaa^{m+1} , Xaa^{m+2} , Xaa^{m+3} , 및 Xaa^{m+4} 는 모두 함께, 존재하지 않거나 또는 1개, 2개, 3개, 또는 4개의 아미노산의 웨타이드 절편이다; 즉 모든 Xaa^n , Xaa^{n+1} , Xaa^{n+2} , Xaa^{n+3} , Xaa^{n+4} , Xaa^m , Xaa^{m+1} , Xaa^{m+2} , Xaa^{m+3} , 및 Xaa^{m+4} 에 의해 제공된 아미노산의 총 개수는 1개, 2개, 3개, 또는 4개이며, 그리고 시스테인은 모노메톡시폴리에틸렌 글리콜 말레이미드에 연결된다.

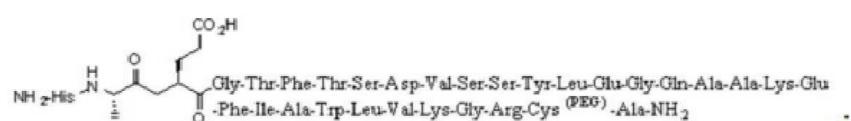
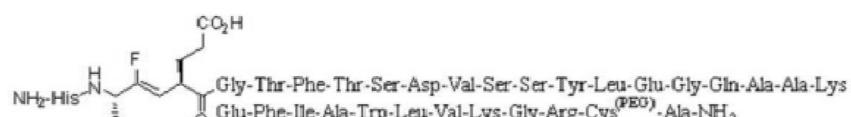
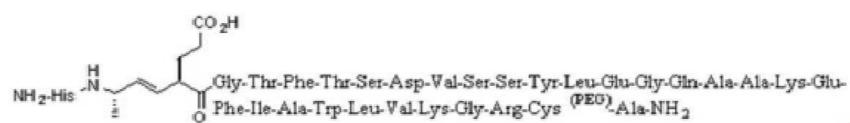
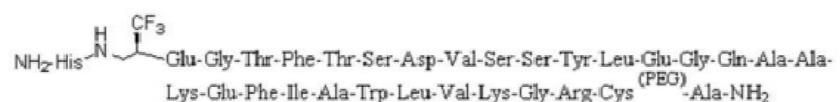
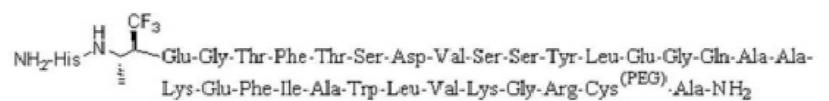
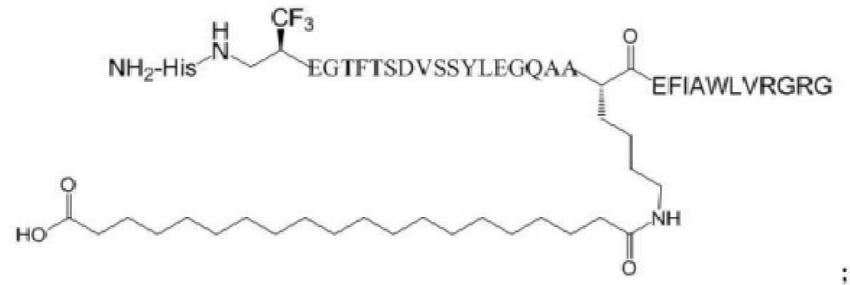
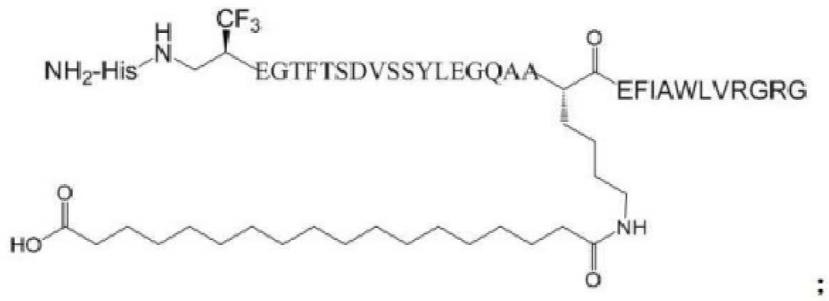
청구항 20

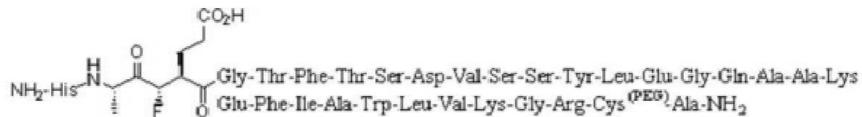
하기로부터 선택되는 GLP-1 유사체:











청구항 21

제1-4항, 제6-8항, 제10-12항 및 제14-20항으로 이루어진 군에서 선택되는 어느 한 항에 따르는 GLP-1 유사체, 및 약제학적으로 허용되는 부형제를 포함하는 고혈당증, 2형 당뇨병, 손상된 글루코오스 내성, 1형 당뇨병, 비만, 고혈압, X 증후군, 이상지질혈증, 인지 장애, 죽상동맥경화증, 심근경색증, 관상심장질환 및 기타 심혈관장애, 뇌졸증, 염증성 장증후군(inflammatory bowel syndrome), 소화불량 및 위궤양의 치료 또는 예방; 또는 2형 당뇨병에서 질환의 진행을 지연 또는 예방의 용도를 위한 약제학적 조성물.

청구항 22

제21항에 있어서, 상기 약제학적 조성물은 경구투여에 비경구적 투여에 적합한 약제학적 조성물.

청구항 23

약제의 제조의 용도를 위한, 제1-4항, 제6-8항, 제10-12항 및 제14-20항으로 이루어진 군에서 선택되는 어느 한 항에 따르는 GLP-1 유사체.

청구항 24

고혈당증, 2형 당뇨병, 손상된 글루코오스 내성, 1형 당뇨병, 비만, 고혈압, X 증후군, 이상지질혈증, 인지 장애, 죽상동맥경화증, 심근경색증, 관상심장질환 및 기타 심혈관장애, 뇌졸증, 염증성 장증후군(inflammatory bowel syndrome), 소화불량 및 위궤양의 치료 또는 예방의 용도를 위한, 제1-4항, 제6-8항, 제10-12항 및 제14-20항으로 이루어진 군에서 선택되는 어느 한 항에 따르는 GLP-1 유사체.

청구항 25

2형 당뇨병에서 질환의 진행을 지연 또는 예방의 용도를 위한, 제1-4항, 제6-8항, 제10-12항 및 제14-20항으로 이루어진 군에서 선택되는 어느 한 항에 따르는 GLP-1 유사체.

청구항 26

삭제

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 포유동물에서 인슐린 발현을 상향조절(up-regulation)하고 당뇨병을 치료하는데 유용한 글루카곤 유사 웨타이드의 새로운 유사체 및 조성물에 관한 것이다. 특히, 이들 웨타이드 유도체는 당뇨병 및 기타 인슐린 분비촉진(insulinotropic) 웨타이드 관련 질환의 치료 활성의 긴 지속기간, 위장 기능 및 글루카곤 수준과 관련 있는 활성을 제공한다.

배경 기술

[0002] 췌장도(이자섬; pancreatic islets)의 내분비는 글루코오스, 아미노산, 및 카테콜아민과 같은 블립게(blob-borne) 대사물질 뿐만 아니라, 국소 인접분비 효과에 의해 구동되는 복합 조절 메카니즘(complex control mechanism)에 의해 조절된다. 주요 췌장도 호르몬인, 글루카곤, 인슐린 및 소마토스타틴은 특이적 췌장 세포 타입 (각각 A, B 및 D 세포)과 상호반응하여 분비 반응을 조절한다. 인슐린 분비는 주로 혈중 글루코오스 수준에 의해 조절되지만, 소마토스타틴은 글루코오스-매개된 인슐린 분비를 억제한다. 인슐린 분비의 췌장도간 인접분비 조절 외에, 소장내에 인슐린분비촉진 인자가 존재하는 것을 지지하는 증거가 있다. 이런 인크레틴 (incretin) 개념은 식품 섭취 또는 경장내 글루코오스 투여가 정맥내로 주입된 유사한 양의 에너지(글루코오스)와 비교하여 인슐린 방출을 더 크게 자극함을 관찰한 것으로부터 기원한다 (문헌 참조: Elrick, H., et al.,

J. Clin. Endocrinol. Metab., 24, 1076-1082, 1964; McIntyre, N., et al., J. Clin. Endocrinol. Metab., 25, 1317-1324, 1965). 따라서, 경구적 영양 섭취에 의해 자극된 소화관-유래 시그널이 소화관 대 비경구적 경로를 통하여 에너지가 투여될 때 인슐린 방출을 증강시키는데 관여하는 강력한 인슐린 분비촉진물질인 것으로 추측된다 (문헌 참조: Dupre, J., et al., Diabetes, 15, 555-559, 1966). 수종의 신경전달자와 소화관 호르몬이 인크레틴-유사 활성을 갖고 있지만, 면역, 길항제, 및 녹아웃(knockout) 연구로부터의 상당한 증거는 글루코오스-의존 인슐린분비촉진 폴리펩타이드(GIP) 및 글루카곤-유사 웨პ타이드(GLP)-1이 대다수의 영양소-자극된 인슐린 분비에 관여하는 지배적인 웨პ타이드임을 나타낸다. 2형 당뇨병 환자가 식사-자극된 인슐린 분비 방출량의 크기에 있어서 상당한 감소를 나타냄을 관찰한 것은 부족한 인크레틴 방출 또는 인크레틴 작용에 대한 내성이 당뇨 환자에서 β -세포 역기능의 병태생리에 기여하는지를 결정하는데 있어서의 관심의 근간이 된다.

[0003] 글루카곤-유사 웨პ타이드-1(GLP-1)은 식품 섭취시 소화관에 의해 분비되는 웨პ타이드인, 인크레틴 호르몬으로서 1987년에 먼저 확인되었다. GLP1은 160개의 아미노산 천구체 단백질인, 프리프로글루카곤(preproglucagon)으로부터 단백질분해에 의해 가공된 후 장내 L-세포에 의해 분비된다. 프리프로글루카곤이 분해되어 먼저 37개의 아미노산 웨პ타이드인 GLP-1이 산출되는데, GLP-1(1-37)OH는 활성이 거의 없다. 7번-위치에서의 후속되는 분해로 생물학적으로 활성인 GLP-1(7-37)OH가 산출된다. 합성된 GLP-1(7-37)OH 중 대략 80%는 L-세포에서 말단 글리신 잔기가 제거된 후 C-말단에서 아미드화된다. 유리산 GLP-1(7-37)OH 및 아미드인 GLP-1(7-37) NH_2 의 생물학적 효과와 대사회전은 분명치않다.

[0004] GLP-1은 혈청 글루코오스 수준을 감소시키는 세포에 의해 글루코오스 흡수를 일으키는 인슐린 분비를 자극하는 것으로 알려져 있다 (문헌 참조: Mojsov, S., et al., J. Clin. Invest., 79, 616-619, 1987; Kreymann, B., et al., Lancet ii, 1300-1304, 1987; Orskov, C., et al., Endocrinology, 123, 2009-2013, 1988). GLP-1 또는 GLP-1 수용체 효능제를 급성 뇌실 주사하면 식품 섭취에 있어서 일시적인 감소가 일어나는 반면 (문헌 참조: Turton M.D., et al., Nature, 379, 60-72, 1996), GLP-1 수용체 효능제의 더욱 연장된 뇌실 또는 비경구적 투여는 일부 연구에 있어서 체중 손실과 관련이 있다 (문헌 참조: Meeran, K., et al., Endocrinology, 140, 244-250, 1999; Davies, H.R.Jr., Obes. Res., 6, 147-156, 1998; Szayna, M., et al., Endocrinology, 141, 1936-1941, 2000; Larsen, P.J., et al., Diabetes, 50, 2530-2539, 2001). 인슐린분비촉진 활성을 증명하는 수많은 GLP-1 유사체가 당해 분야에 공지되어 있다. 이들 유사체의 예로, GLP-1(7-36), Gln⁹-GLP-1(7-37), D-Gln⁹-GLP-1(7-37), 아세틸-Lys⁹-GLP-1(7-37), Thr¹⁶-Lys¹⁸-GLP-1(7-37) 및 Lys¹⁸-GLP-1(7-37)이 있다. GLP-1의 유도체의 예로는 산 부가염, 카복실레이트 염, 저급 알킬 에스테르, 및 아미드가 있다 (WO91/11457; EP0733644; US 특허 5512549).

[0005] 임상전 실험에 기술된 GLP-1 작용의 대부분은 인간을 대상으로하는 연구에서 입증된 것이다. GLP-1(7-36) NH_2 를 정상인에게 주입하면 인슐린 분비를 자극하고, 글루코오스 부하 또는 식품 섭취후 공복 상태에서의 혈당을 현격하게 감소시킨다 (문헌 참조: Orskov, C., et al., Diabetes, 42, 658-661, 1993; Qualmann, C., et al., Acta Diabetol., 32, 13-16, 1995).

[0006] GLP-1 기본 웨პ타이드가 술포닐우레아를 사용한 치료에서 실패한 당뇨병 환자에 대한 인슐린 요법에 대한 대안으로서 전망이 밝다 (문헌 참조: Nauck, M.A.:et al., Diabetes Care, 21, 1925-1931, 1998). GLP-1은 인슐린 분비를 자극하지만, 고혈당증 기간인 중에만 자극한다. 인슐린과 비교하여 GLP-1 안전성은 GLP-1의 이런 특성 및 인슐린 분비량이 고혈당증 크기에 비례함을 관찰함으로써 향상된다. 또한, GLP-1 요법은 인슐린의 췌장 방출을 일으키며 1회 통과 인슐린이 간에서 작용하도록 한다. 이들은 인슐린의 피하 주사와 비교하여 주변에서 순환하는 인슐린 수준을 저하시킨다. GLP-1은 식후 글루코오스 최고치는 감소시키면서, 더 긴 기간에 걸쳐 영양소 흡수가 확산되는데 바람직한 위 배출을 느리게 한다. 수개의 보고서에는 GLP-1이 근육, 간, 및 지방과 같은 주변 조직에서의 인슐린 감응도를 향상시킬 수 있다고 제시되어 있다. 마지막으로, GLP-1은 잠재적인 식욕 조절자인 것으로 밝혀졌다.

[0007] GLP-1 및 이의 유사체에 대한 치료 잠재성은 1형 당뇨병 환자에서 이의 사용을 고려할 때 더 커진다. 수많은 연구로 인슐린 의존성 진성 당뇨병(IDDM)의 치료에 있어서 천연 GLP-1의 효과가 증명되었다. 비-인슐린 의존성 진성 당뇨병(NIDDM) 환자와 유사하게, GLP-1은 이의 글루카곤정적 특성(glucagonostatic properties)을 통하여 공복 고혈당증을 감소시키는데 효과적이다. 추가의 연구는 위 배출에서의 지연을 통하는 것과 거의 마찬가지로, GLP-1이 IDDM에서 식후 혈당 외도(excursion)를 또한 감소시킴을 나타낸다. 이들 관찰은 GLP-1이 IDDM 뿐만 아니라 NIDDM에 대한 치료법으로 유용할 수 있음을 제시한다.

[0008] 그러나, 디펩티딜-펩타이드 IV(DPP-IV)의 활성에 의해 수행되는 천연 GLP-1의 생물학적 반감기가 극히 짧다. 예를 들어, GLP-1(7-37)OH의 생물학적 반감기는 단지 3 내지 5분이다 (US 특허 5118666). 혈중 글루코오스 농도를 자연시키며 저하시키는 것은 GLP-1을 24시간에 걸쳐 정맥내 주입에 의해 투여하는 연구에서 증명되는 바와 같이, 단지 연속적인 주입일 때만 관찰된다 (문헌 참조: Larsen, J.; et al. *Diabetes Care*, 24, 1416-1421, 2001). 끝에서 두번째 NH₂-말단 프롤린(Xaa-Pro-) 또는 알라닌(Xaa-Ala-) 이후 펩타이드를 우선적으로 가수분해시키는 세린 프로테아제인, 효소 DPP-IV(문헌 참조: Mentlein, R., *Regul. Pept.*, 85, 9-25, 1999)가 시험판내에서 GLP-1을 신속하게 대사시키는 것으로 나타났다. 따라서, DPP-IV에 대해 내성이 있는 연장된-활성 GLP-1 기본 펩타이드가 진성 당뇨병의 치료에 있어서 커다란 치료적 잠재성을 가질 수 있다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0009] 본 발명은 천연 GLP-1에 비해 연장된 작용시간을 가지며 DPP-IV 가수분해에 대해 완벽하게 내성이 있는 새로운 GLP-1 유사체를 제공한다.

[0010] 본 발명은 화학식 I의 화합물 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염을 포함한다:

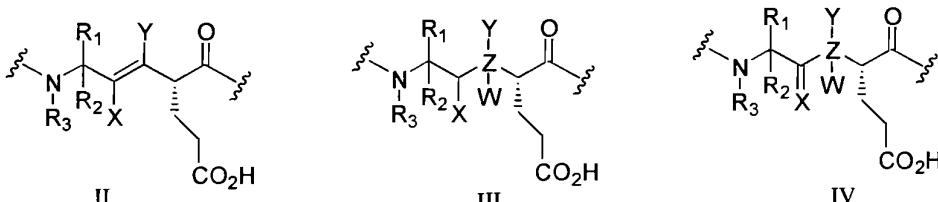
[0011] Xaa₇-Q-Gly-Thr-Phe-Thr-Xaa₁₄-Asp-Xaa₁₆-Ser-Xaa₁₈-Tyr-Leu-Glu-Xaa₂₂-Xaa₂₃-Ala-Ala-Xaa₂₆-Xaa₂₇-Phe-Ile-Ala-Trp-Leu-Val-Xaa₃₄-Xaa₃₅-Xaa₃₆-B

[0012] I

[0013] 상기식에서,

[0014] Xaa₇은 L-His, D-히스티딘, 데스아미노-히스티딘, 2-아미노-히스티딘, β-하이드록시-히스티딘, 호모히스티딘, α-플루오로메틸-히스티딘, 및 α-메틸-히스티딘으로 이루어진 군으로부터 선택되는 천연 또는 비-천연 아미노산이고;

[0015] Q는 하기 링커들 (II), (III), (IV)로부터 선택된다:



[0016]

[0017] (여기서,

[0018] R₁은 수소, (C₁-C₆)알킬, 또는 (C₁-C₆)알콕시이다;

[0019] R₂는 수소, (C₁-C₆)알킬, 또는 (C₁-C₆)알콕시이다;

[0020] R₃은 수소, (C₁-C₆)알킬이거나, R₁ 또는 R₂와 함께 5 내지 8원 환을 형성한다;

[0021] X는 수소, 불소, 하이드록시, 트리플루오로메틸, 또는 산소이다;

[0022] Y는 수소, 하이드록시, 불소, 또는 (C₁-C₆)알킬이다;

[0023] Z는 질소, 탄소, 산소, 또는 황이다;

[0024] Z가 질소, 산소, 또는 황일 때, W는 존재하지 않는다; Z가 탄소일 때, W는 수소, 또는 불소이다).

[0025] Xaa₁₄는 세린과 히스티딘으로 이루어진 군으로부터 선택되는 천연 또는 비-천연 아미노산으로; 상기 아미노산의 탄소 원자 중 1개 이상은 1개 이상의 알킬기로 임의로 치환된다.

[0026] Xaa₁₆은 발린, 리신 및 류신으로 이루어진 군으로부터 선택되는 천연 또는 비-천연 아미노산으로; 상기 아미노산의 탄소 원자 중 1개 이상은 1개 이상의 알킬기로 임의로 치환된다. 또는, Xaa₁₆은 T-U와 연결된 리신이다.

- [0027] Xaa₁₈은 세린, 아르기닌 및 리신으로 이루어진 군으로부터 선택되는 천연 또는 비-천연 아미노산으로; 상기 아미노산의 탄소 원자 중 1개 이상은 1개 이상의 알킬기로 임의로 치환된다.
- [0028] Xaa₂₂와 Xaa₂₃은 글리신, Aib 및 글루탐산으로 이루어진 군으로부터 선택되는 천연 또는 비-천연 아미노산으로; 상기 아미노산의 탄소 원자 중 1개 이상은 1개 이상의 알킬기로 임의로 치환된다.
- [0029] Xaa₂₆, Xaa₂₇, Xaa₃₄, Xaa₃₅ 및 Xaa₃₆는 글리신, 리신, 아르기닌, 류신 및 아스파라긴, Aib(α-아미노이소부틸산)로부터 이루어진 군으로부터 선택되는 천연 또는 비-천연 아미노산으로; 상기 아미노산의 탄소 원자 중 1개 이상은 1개 이상의 알킬기로 임의로 치환된다. 또는 Xaa₂₆은 T-U와 연결된 리신이다.
- [0030] B는 글리신, 말단 아미노산의 유리산의 아미드 형태를 나타내는 NH₂ 및 OH로 이루어진 군으로부터 선택된다. 또는 Xaa₂₆가 글리신, 리신, 아르기닌, 류신 및 아스파라긴, Aib(α-아미노이소부틸산)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 천연 또는 비-천연 아미노산이고 T-U와 연결되지 않은 경우, B는 2 내지 5개의 천연 또는 비-천연 아미노산으로 이루어진 펩타이드 절편으로부터 바람직하게 선택되고 아미노산 중 하나는 반드시 시스테인이어야하며, 비제한적으로, 예를 들면, 시스테인-세린-글리신 또는 시스테인-알라닌이고, 모노메톡시폴리에틸렌 글리콜 말레이미드는 시스테인에 연결된다.
- [0031] T는 γ-글루탐산, β-알라닌, γ-아미노부틸산 및 HOOC(CH₂)_nCOOH로 이루어진 군으로부터 선택되며;
- [0032] n은 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 또는 27이고;
- [0033] T는
-
- [0034]
- [0035] 로 이루어진 군으로부터 선택되며, 여기서 k는 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 또는 10의 군으로부터 선택되고, m은 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 또는 10으로부터 선택된다.
- [0036] U는 T가 γ-글루탐산, β-알라닌, γ-아미노부틸산으로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산일 때; 또는 T가
-
- [0037]
- [0038] 로 이루어진 군으로부터 선택될 때에만 존재하고, 여기서 k는 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 또는 10의 군으로부터 선택되고, m은 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 또는 10으로부터 선택된다.
- [0039] U는 8 내지 20개의 탄소 길이를 갖는 지방산이다.
- [0040] 다른 바람직한 화합물은 화학식 V로 나타낸 바와 같다:
-
- [0041]
- [0042] 상기식에서,
- [0043] R₁은 수소, (C₁-C₆)알킬, 또는 (C₁-C₆)알콕시이다.
- [0044] R₂는 수소, (C₁-C₆)알킬, 또는 (C₁-C₆)알콕시이다.

- [0045] R₃은 수소, (C₁-C₆)알킬이거나, R₁ 또는 R₂와 함께 5 내지 8원 환을 형성한다.
- [0046] X는 수소, 불소, 하이드록시, 트리플루오로메틸, 또는 산소이다.
- [0047] D는 Gly-Phe-Thr-Xaa₁₄-Asp-Xaa₁₆-Ser-Xaa₁₈-Thr-Leu-Glu-Xaa₂₂-Xaa₂₃-Ala-Ala-Xaa₂₆-Xaa₂₇-Phe-Ile-Ala-Trp-Leu-Val-Xaa₃₄-Xaa₃₅-Xaa₃₆-B이다.
- [0048] Xaa₇은 L-His, D-히스티딘, 데스아미노-히스티딘, 2-아미노-히스티딘, β-하이드록시-히스티딘, 호모히스티딘, α-플루오로메틸-히스티딘, 및 α-메틸-히스티딘으로 이루어진 군으로부터 선택되는 천연 또는 비-천연 아미노산이고;
- [0049] Xaa₁₄는 세린과 히스티딘으로 이루어진 군으로부터 선택되는 천연 또는 비-천연 아미노산으로; 상기 아미노산의 탄소 원자 중 1개 이상은 1개 이상의 알킬기로 임의로 치환된다.
- [0050] Xaa₁₆은 발린, 리신 및 류신으로 이루어진 군으로부터 선택되는 천연 또는 비-천연 아미노산으로; 상기 아미노산의 탄소 원자 중 1개 이상은 1개 이상의 알킬기로 임의로 치환된다. 또는, Xaa₁₆은 T-U와 연결된 리신이다.
- [0051] Xaa₁₈은 세린, 아르기닌 및 리신으로 이루어진 군으로부터 선택되는 천연 또는 비-천연 아미노산으로; 상기 아미노산의 탄소 원자 중 1개 이상은 1개 이상의 알킬기로 임의로 치환된다.
- [0052] Xaa₂₂와 Xaa₂₃은 글리신, Aib 및 글루탐산으로 이루어진 군으로부터 선택되는 천연 또는 비-천연 아미노산으로; 상기 아미노산의 탄소 원자 중 1개 이상은 1개 이상의 알킬기로 임의로 치환된다.
- [0053] Xaa₂₆, Xaa₂₇, Xaa₃₄, Xaa₃₅ 및 Xaa₃₆는 글리신, 리신, 아르기닌, 류신, 아스파라긴, Aib(α-아미노이소부틸산)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 천연 또는 비-천연 아미노산으로; 상기 아미노산의 탄소 원자 중 1개 이상은 1개 이상의 알킬기로 임의로 치환된다. 또는, Xaa₂₆은 T-U와 연결된 리신이다.
- [0054] B는 글리신, 말단 아미노산의 아미드 형태 또는 유리산을 나타내는 NH₂ 및 OH로 이루어진 군으로부터 선택된다. 또는 Xaa₂₆가 글리신, 리신, 아르기닌, 류신, 및 아스파라긴, Aib(α-아미노이소부틸산)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 천연 또는 비-천연 아미노산이고 T-U와 연결되지 않은 경우, B는 2 내지 5개의 천연 또는 비-천연 아미노산으로 이루어진 펩타이드 절편으로부터 바람직하게 선택되고 아미노산 중 하나는 반드시 시스테인어야 하며, 비제한적으로, 예를 들면, 시스테인-세린-글리신 또는 시스테인-알라닌이고, 모노메톡시폴리에틸렌 글리콜 말레이미드가 시스테인에 연결된다.
- [0055] T는 γ-글루탐산, β-알라닌, γ-아미노부틸산 및 HOOC(CH₂)_nCOOH로 이루어진 군으로부터 선택되며;
- [0056] n은 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 또는 27이고;
- [0057] 또는 T는
-
- [0058]
- [0059] 로 이루어진 군으로부터 선택되며, 여기서 k는 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 또는 10의 군으로부터 선택되고, m은 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 또는 10으로부터 선택된다.
- [0060] U는 T가 γ-글루탐산, β-알라닌, γ-아미노부틸산으로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산일 때; 또는 T가
-
- [0061]
- [0062] 로 이루어진 군으로부터 선택될 때에만 존재하고, 여기서 k는 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 또는 10의 군으로부터 선택되고, m은 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 또는 10으로부터 선택된다.

[0063]

U는 8 내지 20개의 탄소 길이를 갖는 지방산이다.

바람직한 기술적 해결로서, R₃은 수소이거나, R₁ 또는 R₂와 함께 5 내지 8원 환을 형성한다.

바람직한 기술적 해결로서, X는 수소, 불소, 또는 트리플루오로메틸이다.

바람직한 기술적 해결로서, R₁, R₂ 및 R₃은 수소 또는 메틸이다.

바람직한 기술적 해결로서, R₁은 메틸이고, R₂ 및 R₃은 수소이다.

바람직한 기술적 해결로서, R₁ 및 R₃은 수소이고, R₂는 메틸이다.

바람직한 기술적 해결로서, R₃은 R₁과 5 내지 8원 환을 형성하고 R₂는 수소이거나; R₃은 R₂와 5 내지 8원 환을 형성하고 R₁은 수소이다.

[0064]

삭제

[0065]

삭제

[0066]

삭제

[0067]

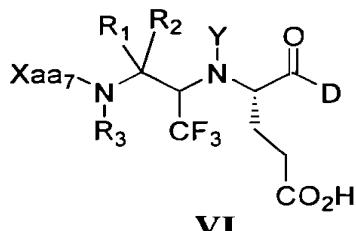
삭제

[0068]

삭제

[0069]

더욱 바람직한 화합물은 화학식 VI로 나타낸 바와 같다:



[0070]

상기식에서,

[0071]

R₁은 수소, (C₁-C₆)알킬, 또는 (C₁-C₆)알콕시이다.

[0072]

R₂는 수소, (C₁-C₆)알킬, 또는 (C₁-C₆)알콕시이다.

[0073]

R₃은 수소, (C₁-C₆)알킬이거나, R₁ 또는 R₂와 함께 5 내지 8원 환을 형성한다.

[0074]

Y는 수소, 하이드록실, 불소, 또는 (C₁-C₆)알킬이다.

[0075]

D는 Gly-Phe-Thr-Xaa₁₄-Asp-Xaa₁₆-Ser-Xaa₁₈-Thr-Leu-Glu-Xaa₂₂-Xaa₂₃-Ala-Ala-Xaa₂₆-Xaa₂₇-Phe-Ile-Ala-Trp-Leu-Val-Xaa₃₄-Xaa₃₅-Xaa₃₆-B^ο]다.

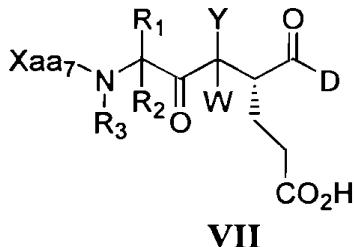
[0076]

Xaa₇은 L-His, D-히스티딘, 데스아미노-히스티딘, 2-아미노-히스티딘, β-하이드록시-히스티딘, 호모히스티딘, α-플루오로메틸-히스티딘, 및 α-메틸-히스티딘으로 이루어진 군으로부터 선택되는 천연 또는 비-천연 아미노산이고;

- [0078] Xaa₁₄는 세린과 히스티딘으로 이루어진 군으로부터 선택되는 천연 또는 비-천연 아미노산으로; 상기 아미노산의 탄소 원자 중 1개 이상은 1개 이상의 알킬기로 임의로 치환된다;
- [0079] Xaa₁₆은 발린, 리신 및 류신으로 이루어진 군으로부터 선택되는 천연 또는 비-천연 아미노산으로; 상기 아미노산의 탄소 원자 중 1개 이상은 1개 이상의 알킬기로 임의로 치환된다. 또는, Xaa₁₆은 T-U와 연결된 리신이다.
- [0080] Xaa₁₈은 세린, 아르기닌 및 리신으로 이루어진 군으로부터 선택되는 천연 또는 비-천연 아미노산으로; 상기 아미노산의 탄소 원자 중 1개 이상은 1개 이상의 알킬기로 임의로 치환된다.
- [0081] Xaa₂₂와 Xaa₂₃은 글리신, Aib 및 글루탐산으로 이루어진 군으로부터 선택되는 천연 또는 비-천연 아미노산으로; 상기 아미노산의 탄소 원자 중 1개 이상은 1개 이상의 알킬기로 임의로 치환된다.
- [0082] Xaa₂₆, Xaa₂₇, Xaa₃₄, Xaa₃₅ 및 Xaa₃₆는 글리신, 리신, 아르기닌, 류신, 아스파라긴, Aib(α-아미노이소부틸산)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 천연 또는 비-천연 아미노산으로; 상기 아미노산의 탄소 원자 중 1개 이상은 1개 이상의 알킬기로 임의로 치환된다. 또는, Xaa₂₆은 T-U와 연결된 리신이다.
- [0083] B는 글리신, 말단 아미노산의 아미드 형태 또는 유리산을 나타내는 NH₂ 및 OH로 이루어진 군으로부터 선택된다. 또는 Xaa₂₆가 글리신, 리신, 아르기닌, 류신, 및 아스파라긴, Aib(α-아미노이소부틸산)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 천연 또는 비-천연 아미노산이고 T-U와 연결되지 않을 때, B는 2 내지 5개의 천연 또는 비-천연 아미노산으로 이루어진 웨타이드 절편으로부터 바람직하게 선택되고 아미노산 중 하나는 반드시 시스테인이어야하며, 비제한적으로, 예를 들면, 시스테인-세린-글리신 또는 시스테인-알라닌이고, 모노메톡시폴리에틸렌 글리콜 말레이미드가 시스테인에 연결된다.
- [0084] T는 γ-글루탐산, β-알라닌, γ-아미노부틸산 및 HOOC(CH₂)_nCOOH로 이루어진 군으로부터 선택되고;
- [0085] n은 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 또는 27이거나;
- [0086] T는
-
- [0087]
- [0088] 로 이루어진 군으로부터 선택되며, 여기서 k는 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 또는 10의 군으로부터 선택되고, m은 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 또는 10으로부터 선택된다.
- [0089] U는 T가 γ-글루탐산, β-알라닌, γ-아미노부틸산으로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산일 때; 또는 T가
-
- [0090]
- [0091] 로 이루어진 군으로부터 선택될 때에만 존재하고, 여기서 k는 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 또는 10의 군으로부터 선택되고, m은 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 또는 10으로부터 선택된다.
- [0092] U는 8 내지 20개의 탄소 길이를 갖는 지방산이다.
- [0093] 삭제
- [0094] 삭제
- [0095] 바람직한 기술적 해결로서, R₃은 수소이다.

[0096] 바람직한 기술적 해결로서, Y는 수소, 또는 (C_1-C_6)알킬이다.

[0097] 다른 바람직한 화합물은 화학식 VII로 나타낸 바와 같다:



[0098]

상기식에서,

[0100] R_1 은 수소, (C_1-C_6)알킬, 또는 (C_1-C_6)알콕시이다.

[0101] R_2 는 수소, (C_1-C_6)알킬, 또는 (C_1-C_6)알콕시이다.

[0102] R_3 은 수소, (C_1-C_6)알킬이거나, R_1 또는 R_2 와 함께 5 내지 8원 환을 형성한다.

[0103] Y는 수소, 하이드록실, 불소, 또는 (C_1-C_6)알킬이다.

[0104] W는 수소, 또는 불소이다.

[0105] D는 Gly-Phe-Thr-Xaa₁₄-Asp-Xaa₁₆-Ser-Xaa₁₈-Thr-Leu-Glu-Xaa₂₂-Xaa₂₃-Ala-Ala-Xaa₂₆-Xaa₂₇-Phe-Ile-Ala-Trp-Leu-Val-Xaa₃₄-Xaa₃₅-Xaa₃₆-B이다.

[0106] Xaa₇은 L-His, D-히스티딘, 데스아미노-히스티딘, 2-아미노-히스티딘, β -하이드록시-히스티딘, 호모히스티딘, α -플루오로메틸-히스티딘, 및 α -메틸-히스티딘으로 이루어진 군으로부터 선택되는 천연 또는 비-천연 아미노산이고;

[0107] Xaa₁₄는 세린과 히스티딘으로 이루어진 군으로부터 선택되는 천연 또는 비-천연 아미노산으로; 상기 아미노산의 탄소 원자 중 1개 이상은 1개 이상의 알킬기로 임의로 치환된다.

[0108] Xaa₁₆은 발린, 리신 및 류신으로 이루어진 군으로부터 선택되는 천연 또는 비-천연 아미노산으로; 상기 아미노산의 탄소 원자 중 1개 이상은 1개 이상의 알킬기로 임의로 치환된다. 또는, Xaa₁₆은 T-U와 연결된 리신이다.

[0109] Xaa₁₈은 세린, 아르기닌 및 리신으로 이루어진 군으로부터 선택되는 천연 또는 비-천연 아미노산으로; 상기 아미노산의 탄소 원자 중 1개 이상은 1개 이상의 알킬기로 임의로 치환된다.

[0110] Xaa₂₂와 Xaa₂₃은 글리신, Aib 및 글루탐산으로 이루어진 군으로부터 선택되는 천연 또는 비-천연 아미노산으로; 상기 아미노산의 탄소 원자 중 1개 이상은 1개 이상의 알킬기로 임의로 치환된다.

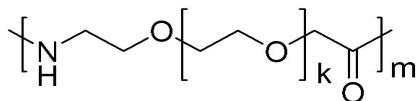
[0111] Xaa₂₆, Xaa₂₇, Xaa₃₄, Xaa₃₅ 및 Xaa₃₆는 글리신, 리신, 아르기닌, 류신, 및 아스파라긴, Aib(α -아미노이소부틸산)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 천연 또는 비-천연 아미노산으로; 상기 아미노산의 탄소 원자 중 1개 이상은 1개 이상의 알킬기로 임의로 치환된다. 또는 Xaa₂₆은 T-U와 연결된 리신이다.

[0112] B는 글리신, 말단 아미노산의 아미드 형태 또는 유리산을 나타내는 NH_2 및 OH 로 이루어진 군으로부터 선택된다. 또는 Xaa₂₆가 글리신, 리신, 아르기닌, 류신, 및 아스파라긴, Aib(α -아미노이소부틸산)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 천연 또는 비-천연 아미노산이고 T-U와 연결되지 않을 때, B는 2 내지 5개의 천연 또는 비-천연 아미노산으로 이루어진 팹타이드 절편으로부터 바람직하게 선택되고 아미노산 중 하나는 반드시 시스테인이어야하며, 비제한적으로, 예를 들면, 시스테인-세린-글리신 또는 시스테인-알라닌이고, 모노메톡시폴리에틸렌 글리콜 말레이미드가 시스테인에 연결된다.

[0113] T는 γ -글루탐산, β -알라닌, γ -아미노부틸산 및 $HOOC(CH_2)_nCOOH$ 로 이루어진 군으로부터 선택되고;

[0114] n은 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 또는 27이거나;

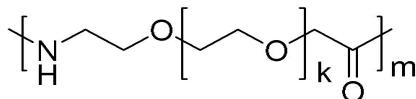
[0115] T는



[0116]

[0117] 로 이루어진 군으로부터 선택되며, 여기서 k는 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 또는 10의 군으로부터 선택되고, m은 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 또는 10으로부터 선택된다.

[0118] U는 T가 γ -글루탐산, β -알라닌, γ -아미노부틸산으로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산일 때; 또는 T가



[0119]

[0120] 로 이루어진 군으로부터 선택될 때에만 존재하고, 여기서 k는 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 또는 10의 군으로부터 선택되고, m은 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 또는 10으로부터 선택된다.

[0121] U는 8 내지 20개의 탄소 길이를 갖는 지방산이다.

바람직한 기술적 해결로서, R₃은 수소이거나, R₁ 또는 R₂와 함께 5 내지 8원 환을 형성한다.

바람직한 기술적 해결로서, Y는 수소, 또는 불소이다.

바람직한 기술적 해결로서, W는 수소, 또는 불소이다.

[0122] 또 다른 바람직한 화합물은 화학식 VIII로 나타낸 바와 같은 화합물 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염이다:

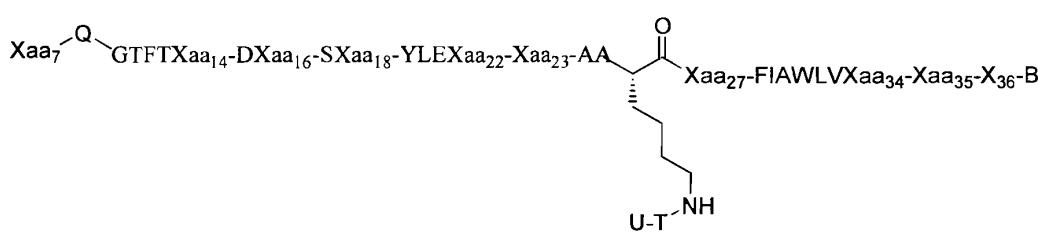
[0123] 삭제

[0124] 삭제

[0125] 삭제

[0126] 삭제

[0127] 삭제



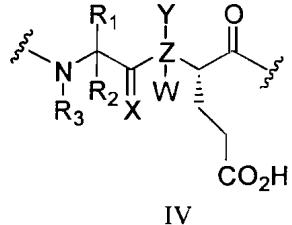
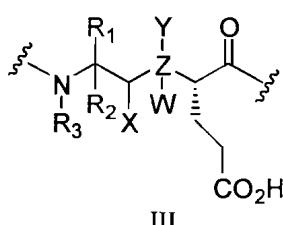
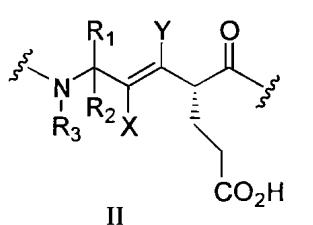
[0128]

상기식에서,

[0129] Xaa₇은 L-His, D-히스티딘, 데스아미노-히스티딘, 2-아미노-히스티딘, β -하이드록시-히스티딘, 호모히스티딘, α -플루오로메틸-히스티딘, 및 α -메틸-히스티딘으로 이루어진 군으로부터 선택되는 천연 또는 비-천연 아미노

산이고;

[0131] Q는 하기 템플릿 (II), (III), 또는 (IV)로부터 선택된다:



[0132]

여기서

[0134] R₁은 수소, (C₁-C₆)알킬, 또는 (C₁-C₆)알콕시이다.

[0135] R₂는 수소, (C₁-C₆)알킬, 또는 (C₁-C₆)알콕시이다.

[0136] R₃은 수소, (C₁-C₆)알킬이거나, R₁ 또는 R₂와 함께 5 내지 8원 환을 형성한다.

[0137] X는 수소, 불소, 하이드록시, 트리플루오로메틸, 또는 산소이다.

[0138] Y는 수소, 하이드록실, 불소, 또는 (C₁-C₆)알킬이다.

[0139] Z는 질소, 탄소, 산소, 또는 황이다.

[0140] Z가 질소, 산소, 또는 황일 때, W는 존재하지 않는다. Z가 탄소일 때, W는 수소, 불소이다.

[0141] Xaa₁₄는 세린과 히스티딘으로 이루어진 군으로부터 선택되는 천연 또는 비-천연 아미노산으로; 상기 아미노산의 탄소 원자 중 1개 이상은 1개 이상의 알킬기로 임의로 치환된다.

[0142] Xaa₁₆은 발린, 리신 및 류신으로 이루어진 군으로부터 선택되는 천연 또는 비-천연 아미노산으로; 상기 아미노산의 탄소 원자 중 1개 이상은 1개 이상의 알킬기로 임의로 치환된다.

[0143] Xaa₁₈은 세린, 아르기닌 및 리신으로 이루어진 군으로부터 선택되는 천연 또는 비-천연 아미노산으로; 상기 아미노산의 탄소 원자 중 1개 이상은 1개 이상의 알킬기로 임의로 치환된다.

[0144] Xaa₂₂와 Xaa₂₃은 글리신, Aib 및 글루탐산으로 이루어진 군으로부터 선택되는 천연 또는 비-천연 아미노산으로; 상기 아미노산의 탄소 원자 중 1개 이상은 1개 이상의 알킬기로 임의로 치환된다.

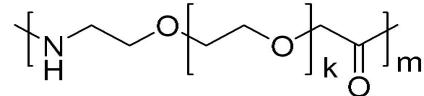
[0145] Xaa₂₇, Xaa₃₄, Xaa₃₅ 및 Xaa₃₆는 글리신, 리신, 아르기닌, 류신, 및 아스파라긴, Aib(α-아미노이소부틸산)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 천연 또는 비-천연 아미노산으로; 상기 아미노산의 탄소 원자 중 1개 이상은 1개 이상의 알킬기로 임의로 치환된다.

[0146] B는 글리신, 말단 아미노산의 아미드 형태 또는 유리산을 나타내는 NH₂ 및 OH로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0147] T는 γ-글루탐산, β-알라닌, γ-아미노부틸산 및 HOOC(CH₂)_nCOOH로 이루어진 군으로부터 선택되고;

[0148] n은 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 또는 27이거나;

[0149] T는

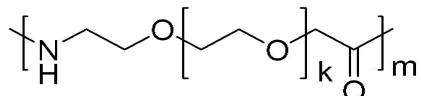


[0150]

[0151] 로 이루어진 군으로부터 선택되고, 여기서 k는 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 또는 10의 군으로부터 선택되고, m

은 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 또는 10으로부터 선택된다.

[0152] U는 T가 γ -글루탐산, β -알라닌, γ -아미노부틸산으로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산일 때; 또는 T가



[0153]

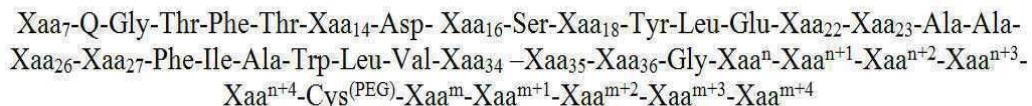
로 이루어진 군으로부터 선택될 때에만 존재하고, 여기서 k는 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 또는 10의 군으로부터 선택되고, m은 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 또는 10으로부터 선택된다.

[0155]

U는 8 내지 20개의 탄소 길이를 갖는 지방산이다.

[0156]

또 다른 바람직한 화합물은 화학식 IX로 나타낸 바와 같은 화합물 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염이다:



IX

[0157]

삭제

[0158]

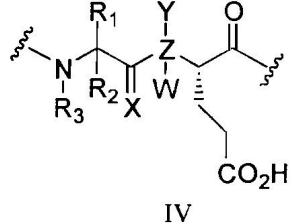
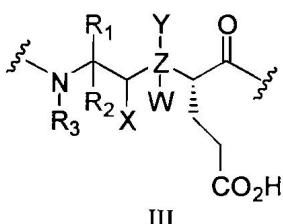
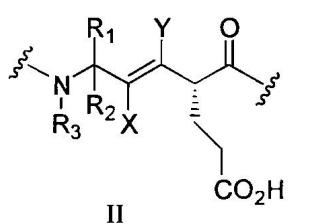
상기식에서,

[0159]

Xaa_7 은 L-His, D-히스티딘, D-아미노-히스티딘, 2-아미노-히스티딘, β -하이드록시-히스티딘, 호모히스티딘, α -플루오로메틸-히스티딘, 및 α -메틸-히스티딘으로 이루어진 군으로부터 선택되는 천연 또는 비-천연 아미노산이고;

[0160]

Q는 하기 링커들 (II), (III), 또는 (IV)로부터 선택된다:



[0161]

여기서

[0163]

R_1 은 수소, ($C_1\text{-}C_6$)알킬, 또는 ($C_1\text{-}C_6$)알콕시이다.

[0164]

R_2 는 수소, ($C_1\text{-}C_6$)알킬, 또는 ($C_1\text{-}C_6$)알콕시이다.

[0165]

R_3 은 수소, ($C_1\text{-}C_6$)알킬이거나, R_1 또는 R_2 와 함께 5 내지 8원 환을 형성한다.

[0166]

X는 수소, 불소, 하이드록시, 트리플루오로메틸, 또는 산소이다.

[0167]

Y는 수소, 하이드록실, 불소, 또는 ($C_1\text{-}C_6$)알킬이다.

[0168]

Z는 질소, 탄소, 산소, 또는 황이다.

[0169]

Z가 질소, 산소, 또는 황일 때, W는 존재하지 않는다. Z가 탄소일 때, W는 수소, 불소이다.

[0170]

Xaa_{14} 는 세린과 히스티딘으로 이루어진 군으로부터 선택되는 천연 또는 비-천연 아미노산으로; 상기 아미노산의 탄소 원자 중 1개 이상은 1개 이상의 알킬기로 임의로 치환된다.

- [0171] Xaa₁₆은 발린, 리신 및 류신으로 이루어진 군으로부터 선택되는 천연 또는 비-천연 아미노산으로; 상기 아미노산의 탄소 원자 중 1개 이상은 1개 이상의 알킬기로 임의로 치환된다.
- [0172] Xaa₁₈은 세린, 아르기닌 및 리신으로 이루어진 군으로부터 선택되는 천연 또는 비-천연 아미노산으로; 상기 아미노산의 탄소 원자 중 1개 이상은 1개 이상의 알킬기로 임의로 치환된다.
- [0173] Xaa₂₂와 Xaa₂₃은 글리신, Aib 및 글루탐산으로 이루어진 군으로부터 선택되는 천연 또는 비-천연 아미노산으로; 상기 아미노산의 탄소 원자 중 1개 이상은 1개 이상의 알킬기로 임의로 치환된다.
- [0174] Xaa₂₆, Xaa₂₇, Xaa₃₄, Xaa₃₅ 및 Xaa₃₆는 글리신, 리신, 아르기닌, 류신, 및 아스파라긴, Aib(α-아미노이소부틸산)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 천연 또는 비-천연 아미노산으로; 상기 아미노산의 탄소 원자 중 1개 이상은 1개 이상의 알킬기로 임의로 치환된다.
- [0175] Xaaⁿ, Xaaⁿ⁺¹, Xaaⁿ⁺², Xaaⁿ⁺³, Xaaⁿ⁺⁴, Xaa^m, Xaa^{m+1}, Xaa^{m+2}, Xaa^{m+3}, Xaa^{m+4} 는 모두 함께 천연 또는 비-천연 아미노산으로부터 선택되는 1개, 또는 2개, 또는 3개 또는 4개의 아미노산일 수 있다. 다시 말해서, Xaaⁿ, Xaaⁿ⁺¹, Xaaⁿ⁺², Xaaⁿ⁺³, Xaaⁿ⁺⁴, Xaa^m, Xaa^{m+1}, Xaa^{m+2}, Xaa^{m+3}, Xaa^{m+4} 는 모두 시스테인과 함께 2개의 아미노산 내지 5개의 아미노산 절편 및 모노메톡시폴리에틸렌 글리콜 말레이미드에 연결된 시스테인을 형성한다.
- [0176] 본 발명의 다음 화합물은 본 발명에 포함되는 화합물을 독자가 이해할 수 있도록 제공된다:
- [Q-링커-d8, Glu22]GLP-1-(7-37)-펩타이드;
 - [Q-링커-a8-9, Glu22]GLP-1-(7-37)-펩타이드;
 - [Q-링커-b8-9, Glu22]GLP-1-(7-37)-펩타이드;
 - [Q-링커-c8, Glu22]GLP-1-(7-37)-펩타이드;
 - [Q-링커-e8-9, Glu22]GLP-1-(7-37)-펩타이드;
 - [Q-링커-f8-9, Arg34]GLP-1-(7-37)-펩타이드;
 - N-ε²⁶-[γ-L-글루타밀(N-α-헥사데카노일)]-[Q-링커-c8, Arg34]GLP-1(7-37)-펩타이드;
 - N-ε²⁶-[γ-L-글루타밀(N-α-헥사데카노일)]-[Q-링커-d8, Arg34]GLP-1(7-37)-펩타이드;
 - N-ε²⁶-[γ-L-글루타밀(N-α-헥사데카노일)]-[Q-링커-e8-9, Arg34]GLP-1(7-37)-펩타이드;
 - N-ε²⁶-[γ-L-글루타밀(N-α-헥사데카노일)]-[Q-링커-f8-9, Arg34]GLP-1(7-37)-펩타이드;
 - N-ε²⁶-[γ-L-글루타밀(N-α-헥사데카노일)]-[Q-링커-a8-9, Arg34]GLP-1(7-37)-펩타이드;
 - N-ε²⁶-[γ-L-글루타밀(N-α-헥사데카노일)]-[Q-링커-b8-9, Arg34]GLP-1(7-37)-펩타이드;
 - N-ε²⁶-[(N^f-ω-카복시헵타데카노일)]-[Q-링커-c8, Arg34]GLP-1(7-37)-펩타이드;
 - N-ε²⁶-[(N^f-ω-카복시노나데카노일)]-[Q-링커-c8, Arg34]GLP-1(7-37)-펩타이드;
 - [Q-링커-d8]GLP-1-(7-37)-Cys^(PEG)-Ala-NH₂;
 - [Q-링커-c8]GLP-1-(7-37)-Cys^(PEG)-Ala-NH₂;
 - [Q-링커-a8-9]GLP-1-(7-37)-Cys^(PEG)-Ala-NH₂;
 - [Q-링커-b8-9]GLP-1-(7-37)-Cys^(PEG)-Ala-NH₂;

[0195] · [Q-링커-e8-9]GLP-1-(7-37)-Cys^(PEG)-Ala-NH₂;

[0196] · [Q-링커-f8-9]GLP-1-(7-37)-Cys^(PEG)-Ala-NH₂.

[0197] 본 발명에서 중요한 것은 DPP-IV에 대한 인식 부위인, GLP-1의 아미노 말단의 Ala⁸아미드 결합을 웨타이드 결합 모방 링커로 대체하는 것이다. 상기 웨타이드 결합 모방 링커는 약물 발견에 있어서 천연 웨타이드 결합을 모방함으로써 생물학적 표적물과 상호반응하고 동일한 생물학적 효과를 발휘할 수 있는 능력을 보유하는 전통적 접근법이다 (문헌 참조: *Curr Chem Bio*, 12, 292-296, 2008). 동일한 원리에 근거하여, 웨타이드 결합 모방 링커 개량된 GLP-1 유사체는 동일한 생물학적 활성을 보유하고 인슐린분비촉진제로서 장기간 활성을 가져야 한다.

[0198] 본 발명의 화합물은 화학식 I에서의 A-링커와 같이, 1개 이상의 비대칭 중심을 가질 수 있다. 그러한 화합물은 1개 이상의 입체이성체 형태로 존재할 수 있다. 이를 화합물은 예를 들어, 라세미체, 광학 활성 형태, 또는 입체이성질체의 거울상 이성질체가 풍부한 혼합물일 수 있다. 경우에 따라, 단일 거울상체, 즉, 광학 활성 형태를 공지의 방법으로, 예를 들어, 비대칭 합성법, 광학 활성 출발 물질로부터의 합성, 또는 라세미체의 분해에 의해 수득할 수 있다. 라세미체의 분해는 예를 들어, 분해제의 존재하에서의 결정화; 거울상 이성질체로 순수하거나 또는 풍부한 분해제로 유도한 다음 목적하는 이성체를 단리시킴으로써; 또는 예를 들어 키랄 HPLC 컬럼을 사용한 크로마토그라피와 같은 통상의 방법으로 수행할 수 있다.

[0199] 본 명세서에서 사용되는 바와 같은 용어 "폴리웨타이드" 및 "웨타이드"는 웨타이드 결합에 의해 연결된 적어도 5개의 성분 아미노산으로 이루어진 화합물을 의미한다. 성분 아미노산은 유전자 코드에 의해 암호화된 아미노산의 군으로부터 일 수 있으며 이들은 유전자 코드에 의해 암호화되지 않은 천연 아미노산, 뿐만 아니라 합성 아미노산일 수 있다. 유전자 코드에 의해 암호화되지 않은 천연 아미노산의 예로는 v-카복시글루타메이트, 오르니틴, 포스포세린, D-알라닌 및 D-글루타민이 있다. 합성 아미노산은 화학적 합성에 의해 제조된 아미노산, 즉, 유전자 코드에 의해 암호화된 아미노산의 D-이성체, 예로서 D-알라닌 및 D-류신, Aib(α-아미노이소부틸산), Abu(α-아미노부틸산), Tie (tert-부틸글리신), β-알라닌, 3-아미노메틸 벤조산, 안트라닐산이 있다.

[0200] 22개의 프로테오제닉(proteogenic) 아미노산은 다음과 같다:

[0201] 알라닌, 아르기닌, 아스파라긴, 아스파르트산, 시스테인, 시스틴, 글루타민, 글루탐산, 글리신, 히스티딘, 하이드록시프롤린, 이소류신, 류신, 리신, 메티오닌, 페닐알라닌, 프롤린, 세린, 트레오닌, 트립토판, 티로신, 발린.

[0202] 따라서, 비-프로테오제닉 아미노산은 웨타이드 결합을 통해 웨타이드 중에 포함될 수 있는 잔기이지만 프로테오제닉 아미노산은 아니다. 예로는 γ-카복시글루타메이트, 오르니틴, 포스포세린, D-알라닌 및 D-글루타민과 같은 D-아미노산이 있다. 합성 비-프로테오제닉 아미노산은 화학적 합성법에 의해 제조된 아미노산, 즉, D-알라닌 및 D-류신과 같이 유전자 코드에 의해 암호화된 아미노산의 D-이성체, Aib(α-아미노이소부틸산), Abu(α-아미노부틸산), Tie(tert-부틸글리신), 3-아미노메틸벤조산, 안트라닐산, 테스-아미노-히스티딘, β-알라닌과 같은 아미노산의 베타 유사체, D-히스티딘, 테스아미노-히스티딘, 2-아미노-히스티딘, β-하이드록시-히스티딘, 호모히스티딘, N^a-아세틸히스티딘, α-플루오로메틸-히스티딘, α-메틸-히스티딘, 3-페리딜알라닌, 2-페리딜알라닌 또는 4-페리딜알라닌, (1-아미노-사이클로프로필)카복실산, (1-아미노사이클로부틸)카복실산, (1-아미노사이클로펜틸)카복실산, (1-아미노사이클로헥실)카복실산, (1-아미노사이클로헵틸)카복실산, 또는 (1-아미노사이클로옥틸)카복실산을 포함한다;

[0203] GLP에 대한 아미노산 서열은 여러명의 연구자들에 의해 보고된 바 있다 (문헌 참조: Lopez, L. C. et al., *Proc. Nat'l Acad. Sci.*, USA 80, 5485-5489, 1983; Bell, G.I., et al., *Nature* 302:716-718(1983); Heinrich, G., et al, *Endocrinol*, 115:2176-2181(1984). 프리프로글루카곤의 mRNA 및 이의 대응하는 아미노산 서열의 구조는 숙지되어 있다. 전구체 유전자 생성물인 프로글루카곤이 글루카곤과 2개의 인슐린분비촉진 웨타이드로 되는 단백질분해 공정은 특징화되어 있다. 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, GLP-1(1-37)의 표기는 1번(N-말단)부터 37번(C-말단)까지의 아미노산을 모두 갖는 GLP-1 폴리웨타이드를 언급한다. 유사하게, GLP-1(7-37)은 7번(N-말단)부터 37번(C-말단)까지의 아미노산을 모두 갖는 GLP-1 폴리웨타이드를 언급한다. 유사하게, GLP-1(7-36)은 7번(N-말단)부터 36번(C-말단)까지의 아미노산을 모두 갖는 GLP-1 폴리웨타이드를 언급한다.

- [0204] 본 발명의 화합물을 약제학적으로 허용되는 담체, 희석제, 또는 부형제 1종 이상과 함께 포함하는 약제학적 조성물이 또한 본 발명에 의해 제공된다.
- [0205] 폴리펩타이드의 고체상 합성법의 원리는 당해 분야에 숙지되어 있으며 다음 문헌과 같은 부분의 일반 교재로부터 알 수 있다: Dugas, H. and Penney, C., *Bioorganic Chemistry* (1981) Springer-Verlag, New York, page 54-92; Merrifield, J.M., *Chem. Soc.*, 85, 2149, 1962, 및 Stewart and Young, *Solid Phase Peptide Synthesis*, page 24-66, Freeman (San Francisco, 1969).
- [0206] 예를 들어, 본 발명의 웨타이드 단편을, Applied Biosystems 430 웨타이드 합성기 (Applied Biosystems, Inc., 850 Lincoln Centre Drive, Foster City, CA 94404) 및 Applied Biosystems에 의해 공급되는 합성 사이클을 사용하여 고체상 방법으로 합성할 수 있다. Boc 보호된 아미노산과 기타 시약은 Applied Biosystems 및 기타 화학약품 판매처로부터 상업적으로 입수할 수 있다. C-말단 카복스아미드를 생산하기 위하여 이중 커플 프로토콜을 사용하는 Sequential Boc 화학을 출발 p-메틸 벤즈하이드릴 아민 수지에 적용한다. C-말단 산의 생산을 위해서는, 대응하는 PAM 수지를 사용할 수 있다. Asp, Gln 및 Arg는 미리 형성시킨 하이드록실 벤조트리아졸 에스테르를 사용하여 커플링시킨다.
- [0207] 본 발명의 다른 목적은 본 발명에 따르는 화합물을 포함하는 약제학적 제형을 제공하는 것으로, 본 발명에 따르는 화합물이 0.1 mg/ml 내지 25 mg/ml의 농도로 존재하며, 상기 제형의 pH는 3.0 내지 9.0이다. 본 발명의 제형은 완충 시스템, 보존제(들), 등장화제(들)(tonicity agent), 킬레이트화제(들), 안정제 및 계면활성제를 추가로 포함할 수 있다. 본 발명의 하나의 양태에서 약제학적 제형이 수성 제형, 즉, 물을 포함하는 제형이다. 그러한 제형은 전형적으로 액제 또는 혼탁제이다. 본 발명의 추가의 양태에서 약제학적 제형은 수성 액제이다. 용어 "수성 제형"은 물을 적어도 50% w/w 포함하는 제형으로 정의된다. 마찬가지로, 용어 "수성 액제"는 물을 적어도 50% w/w 포함하는 액제로 정의되며, 용어 "수성 혼탁제"는 물을 적어도 50% w/w 포함하는 혼탁제로 정의된다.
- [0208] 다른 양태로, 약제학적 제형이 동결-건조된 제형으로, 여기에 의사 또는 환자가 사용전에 용매 및/또는 희석제를 첨가한다.
- [0209] 다른 양태로, 약제학적 제형이 사전 용해 없이 즉시 사용할 수 있는 건조된 제형 (예를 들면, 동결-건조된 또는 분무-건조된)이다.
- [0210] 추가의 양태로, 본 발명은 본 발명에 따르는 화합물의 수용액, 및 완충제를 포함하여, 상기 화합물이 0.1 mg/ml 이상의 농도로 존재하며, pH가 약 3.0 내지 약 9.0인 약제학적 제형에 관한 것이다. 본 발명의 다른 양태로, 제형의 pH가 약 7.0 내지 약 9.5이다. 본 발명의 다른 양태로, 제형의 pH가 약 3.0 내지 약 7.0이다. 본 발명의 다른 양태로, 제형의 pH가 약 5.0 내지 약 7.5이다. 본 발명의 다른 양태로, 제형의 pH가 약 7.5 내지 약 9.0이다. 본 발명의 다른 양태로, 제형의 pH가 약 7.5 내지 약 8.5이다. 본 발명의 다른 양태로, 제형의 pH가 약 6.0 내지 약 7.5이다.
- [0211] 본 발명의 다른 양태로, 제형의 pH가 약 6.0 내지 약 7.0이다. 다른 양태로, 약제학적 제형은 8.0 내지 8.5이다.
- [0212] 본 발명의 추가의 양태로, 완충제가 아세트산나트륨, 탄산나트륨, 시트레이트, 글리실글리신, 히스티딘, 글리신, 리신, 아르기닌, 인산 이수소 나트륨, 인산 수소 이나트륨, 인산 나트륨 및 트리스(하이드록시메틸)-아미노메탄, 바이신(bicine), 트리신(tricine), 말산, 숙시네이트, 말레산, 푸마르산, 타르타르산, 아스파르트산 또는 이들의 혼합물로 이루어진 군으로부터 선택된다. 이들 특정 완충제 각각은 본 발명의 다른 양태를 구성한다.
- [0213] 본 발명의 추가의 양태로, 제형이 약제학적으로 허용되는 보존제를 추가로 포함한다. 본 발명의 추가의 양태로, 보존제가 페놀, o-크레졸, p-크레졸, 메틸 p-하이드록시벤조에이트, 프로필 p-하이드록시벤조에이트, 2-페녹시에탄올, 부틸 p-하이드록시벤조에이트, 2-페닐에탄올, 벤질 알코올, 클로로부탄올, 및 티오메로살, 브로노풀, 벤조산, 이미드우레아, 클로로헥시딘, 소듐 디하이드로아세테이트, 클로로크레졸, 에틸 p-하이드록시벤조에이트, 벤즈에토늄 클로라이드, 클로르페네신 (3p-클로르페녹시프로판-1,2-디올) 또는 이들의 혼합물로 이루어진 군으로부터 선택된다. 하나의 양태로, 보존제가 페놀 또는 m-크레졸이다. 본 발명의 추가의 양태로, 보존제가 0.1 mg/ml 내지 20 mg/ml의 농도로 존재한다. 본 발명의 추가의 양태로, 보존제가 0.1 mg/ml 내지 5 mg/ml의 농도로 존재한다. 본 발명의 추가의 양태로, 보존제가 5 mg/ml 내지 10 mg/ml의 농도로 존재한다. 본 발명의 추가의 양태로, 보존제가 10 mg/ml 내지 20 mg/ml의 농도로 존재한다. 이들 특정 보존제 각각은 본 발

명의 다른 양태를 구성한다. 약제학적 조성물에 보존제를 사용하는 것은 숙련가에게 숙지되어 있다. 편의를 위하여 다음 문현을 참고한다: Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 19th edition, 1995.

[0214] 본 발명의 추가의 양태로, 제형이 등장화제를 추가로 포함한다. 본 발명의 추가의 양태로, 등장화제가 염(예, 염화나트륨), 슈가 또는 슈가 알코올, 아미노산(예, L-글리신, L-히스티딘, 아르기닌, 리신, 이소류신, 아스파르트산, 트립토판, 트레오닌), 알디톨(예, 글리세롤(글리세린), 1,2-프로판디올(프로필렌글리콜), 1,3-프로판디올, 1,3-부탄디올), 폴리에틸렌글리콜(예, PEG400), 또는 이들의 혼합물로 이루어진 군으로부터 선택된다. 하나의 양태로, 등장화제가 프로필렌글리콜이다. 모노-, 디-, 또는 폴리사카라이드와 같은 슈가, 또는 예를 들어, 프력토오스, 글루코오스, 만노오스, 소르보오스, 자일로오스, 말토오스, 락토오스, 슈크로오스, 트레할로스, 텍스트란, 폴루란, 텍스트린, 사이클로텍스트린, 가용성 전분, 하이드록시에틸 전분 및 카복시메틸-셀룰로오스-Na를 포함한 수용성 글루칸이 사용될 수 있다. 하나의 양태로, 슈가 첨가제가 슈크로오스이다. 슈가 알코올은 적어도 1개의 -OH기를 갖는 C4-C8 탄화수소로 정의되며, 예를 들면, 만니톨, 소르비톨, 이노시톨, 갈락티톨, 둘시톨, 자일리톨, 및 아라비톨이 있다. 하나의 양태로, 슈가 알코올 첨가제가 만니톨이다. 상기 언급된 슈가 또는 슈가 알코올은 개별적으로 또는 함께 사용될 수 있다. 슈가 또는 슈가 알코올이 액체 제제에 가용성이고 본 발명의 방법을 사용하여 성취되는 안정화 효과에 나쁜 영향을 주지 않는 한 사용량에 대한 고정된 제한은 없다. 하나의 양태로, 슈가 또는 슈가 알코올 농도가 약 1 mg/ml 내지 약 150 mg/ml이다. 본 발명의 추가의 양태로, 등장화제가 1 mg/ml 내지 50 mg/ml의 농도로 존재한다. 본 발명의 추가의 양태로, 등장화제가 1 mg/ml 내지 7 mg/ml의 농도로 존재한다. 본 발명의 추가의 양태로, 등장화제가 5 mg/ml 내지 7 mg/ml의 농도로 존재한다. 본 발명의 추가의 양태로, 등장화제가 8 mg/ml 내지 24 mg/ml의 농도로 존재한다. 본 발명의 추가의 양태로, 등장화제가 25 mg/ml 내지 50 mg/ml의 농도로 존재한다. 등장화제 각각은 본 발명의 다른 양태를 구성한다. 약제학적 조성물에 등장화제를 사용하는 것은 숙련가에게 숙지되어 있다. 편의를 위하여 다음 문현을 참고한다: Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 19th edition, 1995.

[0215] 본 발명의 추가의 양태로, 제형이 퀼레이트화제를 추가로 포함한다. 본 발명의 추가의 양태로, 퀼레이트화제가 에틸렌디아민테트라아세트산(EDTA), 시트르산, 및 아스파르트산의 염, 및 이들의 혼합물로부터 선택된다. 본 발명의 추가의 양태로, 퀼레이트화제가 0.1 mg/ml 내지 5 mg/ml의 농도로 존재한다. 본 발명의 추가의 양태로, 퀼레이트화제가 0.1 mg/ml 내지 2 mg/ml의 농도로 존재한다. 본 발명의 추가의 양태로, 퀼레이트화제가 2 mg/ml 내지 5 mg/ml의 농도로 존재한다. 이러한 특정 퀼레이트화제 각각은 본 발명의 다른 양태를 구성한다. 약제학적 조성물에 퀼레이트화제를 사용하는 것은 숙련가에게 숙지되어 있다. 편의를 위하여 다음 문현을 참고한다: Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 19th edition, 1995.

[0216] 본 발명의 추가의 양태로, 제형은 안정화제를 추가로 포함한다. 약제학적 조성물에 안정화제를 사용하는 것은 숙련가에게 숙지되어 있다. 편의를 위하여 다음 문현을 참고한다: Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 19th edition, 1995.

[0217] 더욱 상세하게, 본 발명의 조성물은 안정화된 액상 약제학적 조성물로, 이의 치료적 활성 성분은 액상 약제학적 제형에서 보관중 응집물 형성을 나타낼 수 있는 폴리펩타이드를 포함한다. "응집물 형성"이란 폴리펩타이드 분자간의 물리적 상호반응에 의한 것으로 가용성을 보유할 수 있는 올리고머, 또는 용액으로부터 침전되는 커다란 가시성 응집물을 형성시킨다. "보관중"이란 일단 제조된 액상 약제학적 조성물 또는 제형이 즉시 환자에게 투여되지 않는 것이다. 대신, 제조 후, 보관을 위하여, 액체 형태, 동결된 상태, 또는 이후 액체 형태 또는 환자 투여에 적합한 다른 형태로 재조제하기 위한 건조 형태로 포장된다. "건조된 형태"란 액체 약제학적 조성물 또는 제형을 동결 건조법(즉, lyophilization; 예를 들어, Williams and Poili (1984) J. Parenteral Sci. Technol. 38:48-59 참조), 분무 건조법(참조: Masters (1991) in Spray-Drying Handbook (5th ed; Longman Scientific and Technical, Essex, U.K.), pp. 491 - 676; Broadhead et al. (1992) Drug Devel. Ind. Pharm. 18:1 169-1206; and Mumenthaler et al. (1994) Pharm. Res. 11:12-20) 또는 공기 건조법(Carpenter and Crowe (1988) Cryobiology 25:459-470; and Roser (1991) Biopharm. 4:47-53)에 의해 건조시킨다. 액체 약제학적 조성물의 보관중 폴리펩타이드에 의한 응집물 형성은 그러한 폴리펩타이드의 생물학적 활성에 나쁜 영향을 끼칠 수 있어, 약제학적 조성물의 치료 효과를 소실시킬 수 있다. 또한, 응집물 형성은 폴리펩타이드-함유 약제학적 조성물을 주입 시스템을 사용하여 투여할 때튜빙(tubing), 멤브레인, 또는 펌프의 막힘과 같은 다른 문제를 일으킬 수 있다.

[0218] 본 발명의 약제학적 조성물은 약제학적 조성물의 보관 중 폴리펩타이드에 의한 응집물 형성을 감소시키기에 충

분한 양의 아미노산 염기를 추가로 포함할 수 있다. "아미노산 염기"란 제공되는 아미노산이 유리 염기 형태 또는 이의 염 형태로 존재하는, 아미노산 또는 아미노산 조합물이다. 아미노산의 조합물이 사용되는 경우, 모든 아미노산은 이의 유리 염기 형태로 존재할 수 있으며, 모두 염 형태로 존재할 수 있거나, 일부는 이들의 유리 염기 형태로 존재하는 한편 다른 것은 이의 염 형태로 존재한다. 하나의 양태로, 본 발명의 조성물에 사용하고자 하는 아미노산이 하전된 측쇄를 갖는 것들, 예로서, 아르기닌, 리신, 아스파르트산, 및 글루탐산이다. 특정 아미노산 (예, 메티오닌, 히스티딘, 이미다졸, 아르기닌, 리신, 이소류신, 아스파르트산, 트립토판, 트레오닌 및 이들의 혼합물)의 입체이성체 (즉, L, D, 또는 이들의 혼합물) 또는 이들 입체이성체의 조합물은 특정 아미노산이 유리 염기 형태로 또는 이의 염 형태로 존재하는 한 본 발명의 약제학적 조성물에 존재할 수 있다. 하나의 양태로, L-입체이성체가 사용된다. 본 발명의 조성물은 또한 이들 아미노산의 유사체로 조제할 수 있다. "아미노산 유사체"란 본 발명의 액체 약제학적 조성물의 보관 중 폴리펩타이드에 의한 응집물 형성을 감소시키는 목적하는 효과를 가져오는 천연 아미노산의 유도체이다. 적합한 아르기닌 유사체의 예로는, 아미노구아이дин, 오르니틴 및 N-모노에틸 L-아르기닌이 있으며, 적합한 메티오닌 유사체로는 에티오닌 및 부티오닌이 있고 적합한 시스테인 유사체로는 S-메틸-L-시스테인이 있다. 다른 아미노산에 대해서도, 아미노산 유사체가 이들의 유리 염기 형태 또는 이들의 염 형태로 조성물중에 포함된다. 본 발명의 추가의 양태로, 아미노산 또는 아미노산 유사체가 단백질의 응집을 방지하거나 자연시키기에 충분한 농도로 사용된다. 본 발명의 추가의 양태로, 메티오닌 (또는 기타 술푸르 아미노산 또는 아미노산 유사체)을 첨가하여 치료제로서 작용하는 폴리펩타이드가 산화되기 쉬운 메티오닌 잔기를 적어도 1개 포함하는 폴리펩타이드일 때 메티오닌 잔기가 메티오닌 술푸사이드로 산화되는 것을 억제할 수 있다. "억제"란 시간에 따른 메티오닌 산화종의 최소의 축적을 의미한다. 메티오닌 산화를 억제하면 적합한 문자형태의 폴리펩타이드가 더 크게 보존된다. 메티오닌의 입체이성체 (L 또는 D) 또는 이들의 조합물이 사용될 수 있다. 첨가될 양은 메티오닌 술푸사이드의 양이 규제기관에 허용되도록 메티오닌 잔기의 산화를 억제하기에 충분한 양이어야 한다. 전형적으로, 이는 조성물이 메티오닌 술푸사이드를 약 10% 내지 약 30% 이하로 함유함을 의미한다. 일반적으로, 이는 첨가된 메티오닌 대 메티오닌 잔기의 비가 약 1:1 내지 약 1000:1의 범위, 예로서 10:1 내지 약 100:1이 되도록 메티오닌을 첨가함으로써 성취할 수 있다.

[0219]

본 발명의 추가의 양태로, 제형이 고분자량 폴리머 또는 저분자량 화합물로 이루어진 군으로부터 선택되는 안정화제를 추가로 포함한다. 본 발명의 추가의 양태로, 상기 안정화제가 폴리에틸렌 글리콜 (예, PEG 3350), 폴리비닐 알코올 (PVA), 폴리비닐피롤리돈, 카복시-/하이드록시셀룰로오스 또는 이들의 유도체 (예, HPC, HPC-SL, HPC-L 및 HPMC), 사이클로덱스트린, 황-함유 물질, 예로서, 모노티오클리세롤, 티오클리콜산 및 2-메틸티오에탄올, 및 상이한 염 (예, 염화나트륨)으로부터 선택된다. 이들 특정 안정화제 각각은 본 발명의 다른 양태를 구성한다.

[0220]

본 발명의 약제학적 조성물은 또한 추가의 안정화제를 포함할 수 있으며, 이는 조성물중의 치료 활성 폴리펩타이드의 안정성을 추가로 향상시킨다. 본 발명에 있어서 특히 유리한 안정화제로는, 비제한적으로, 메티오닌 산화로부터 폴리펩타이드를 보호하는, 메티오닌 및 EDTA, 및 동결-해동 또는 기계적 전단과 관련있는 응집으로부터 폴리펩타이드를 보호하는, 비이온성 계면활성제가 있다.

[0221]

본 발명의 추가의 양태로, 제형이 계면활성제를 추가로 포함한다. 본 발명의 다른 양태로, 약제학적 조성물이 2종의 상이한 계면활성제를 포함한다. 본 명세서에서 사용되는 바와 같은 용어 "계면활성제"란 수용성 (친수성) 부분, 헤드, 및 지용성 (친유성) 단편으로 이루어진 분자 또는 이온을 언급한다. 계면활성제는 계면 (interface)에서 바람직하게 축적되는데, 친수성 부분은 물 (친수성 상)쪽으로 배향되고 친유성 부분은 오일- 또는 소수성 상 (즉, 글래스, 공기, 오일 등)쪽으로 배향된다. 미셀(micelles)을 형성하기 시작하는 계면활성제의 농도는 임계 미셀 농도 또는 CMC로 알려져 있다. 또한, 계면활성제는 액체의 표면장력을 저하시킨다. 계면활성제는 또한 양쪽성 화합물로 알려져 있다. 용어 "세제"는 일반적으로 계면활성제에 대해 사용되는 동의어이다.

[0222]

음이온성 계면활성제는 케노데옥시콜산 (Chenodeoxycholic acid), 케노데옥시콜산 나트륨염, 콜산, 데하이드로콜산, 데옥시콜산, 데옥시콜산 메틸 에스테르, 디지토닌 (Digitonin), 디지톡시제닌 (Digitoxigenin), N,N-디메틸도데실아민 N-옥시드, 나트륨 도쿠세이트, 글리코케노데옥시콜산 나트륨, 글리코콜산 수화물, 글리코데옥시콜산 일수화물, 글리코데옥시콜산 나트륨염, 글리코데옥시콜산 나트륨염, 글리콜리토콜산 3-술페이트 이나트륨염, 글리콜리토콜산 에틸 에스테르, L-라우로일사르코신 나트륨염, N-라우로일사르코신 나트륨염, N-라우로일사르코신, N-라우로일사르코신, 리튬 도데실 술페이트, 루꼴 (Lugol), 1-옥탄술폰산 나트륨염, 1-옥탄술폰산 나트륨염, 나트륨 1-부탄술포네이트, 나트륨 1-데칸술포네이트, 나트륨 1-도데칸술포네이트, 나트륨 1-헵탄술포네이트, 나트륨 1-노난술포네이트, 나트륨 1-프로판술포네이트 일수화물, 나트륨 2-

브로모에탄술포네이트, 나트륨 콜레이트 수화물, 소 또는 양의 담즙, 나트륨 콜레이트 수화물, 나트륨 콜리에이트, 나트륨 데옥시콜레이트, 나트륨 도데실 술페이트, 나트륨 도데실 술페이트, 나트륨 헥산술포네이트, 나트륨 옥틸 술페이트, 나트륨 펜탄술포네이트, 나트륨 타우로콜레이트, 다우로케노데옥시콜산 나트륨염, 타우로데옥시콜산 나트륨염 일수화물, 타우로리토콜산 3-술페이트 이나트륨염, 타우로우르소데옥시콜산 나트륨염, Trizma[®] 도데실 술페이트, DSS (도쿠세이트 나트륨; docusate sodium, CAS 등록 번호 [577-1 1 -7]), 도쿠세이트 칼슘, CAS 등록 번호 [128-49-4]), 도쿠세이트 칼륨, CAS 등록 번호 [7491-09-0]), SDS (나트륨 도데실 술페이트 또는 나트륨 라우릴 술페이트), 도데실포스포콜린 (FOS-콜린-12), 데실포스포콜린 (FOS-콜린-10), 노닐포스포콜린 (FOS-콜린-9), 디팔미토일 포스파티드산, 나트륨 카프릴레이트 및/또는 우르소데옥시콜산의 군으로부터 선택할 수 있다.

[0223]

양이온성 계면활성제는 알킬트리메틸암모늄 브로마이드 벤즈알코늄 클로라이드, 벤질디메틸헥사데실암모늄 클로라이드, 벤질디메틸테트라데실암모늄 클로라이드, 벤질트리메틸암모늄 테트라클로로요오데이트, 디메틸디옥타데실암모늄 브로마이드, 도데실에틸디메틸암모늄 브로마이드, 도데실트리메틸암모늄 브로마이드, 도데실트리메틸암모늄 브로마이드, 에틸헥사데실디메틸암모늄 브로마이드, 헥사데실트리메틸암모늄 브로마이드, 헥사데실트리메틸암모늄 브로마이드, 폴리옥시에틸렌(10)-N-수지-1,3-디아미노프로판, 톤조늄 브로마이드 (Thonzonium bromide) 및/또는 트리메틸(테트라데실)암모늄 브로마이드의 군으로부터 선택할 수 있다.

[0224]

음이온성 계면활성제는 BigCHAP, 비스(폴리에틸렌 글리콜 비스프미다조일 카보닐], 폴리에틸렌옥시드/폴리프로필렌옥시드 블럭 코폴리머와 같은 블럭 코폴리머, 예로서, 폴록사머(poloxamers), 폴록사머 188 및 폴록사머 407, Brij[®] 35, Brij[®] 56, Brij[®] 72, Brij[®] 76, Brij[®] 92V, Brij[®] 97, Brij[®] 58P, 크레모포어(Cremophor)[®] EL, 데카에틸렌 글리콜 모노도데실 에테르, N-데카노일-N-메틸-글루카민, n-도데카노일-N-메틸글루카미드, 알킬-폴리글루코시드, 에톡실화된 피자마유, 헵타에틸렌 글리콜 모노데실 에테르, 헵타에틸렌 글리콜 모노도데실 에테르, 헵타에틸렌 글리콜 모노테트라데실 에테르, 헥사에틸렌 글리콜 모노도데실 에테르, 헥사에틸렌 글리콜 모노헥사데실 에테르, 헥사에틸렌 글리콜 모노옥타데실 에테르, 헥사에틸렌 글리콜 모노테트라데실 에테르, 일게팔(Igepal) CA-630, 일게팔 CA-630, 메틸-6-0-(N-헵틸카바모일)-베타-D-글루코파라노시드, 노나에틸렌 글리콜 모노도데실 에테르, N-노나노일-N-메틸글루카민, N-노나노일-N-메틸글루카민, 옥타에틸렌 글리콜 모노데실 에테르, 옥타에틸렌 글리콜 모노도데실 에테르, 옥타에틸렌 글리콜 모노헥사데실 에테르, 옥타에틸렌 글리콜 모노옥타데실 에테르, 옥타에틸렌 글리콜 모노테트라데실 에테르, 옥틸-β-D-글루코파라노시드, 웬타에틸렌 글리콜 모노데실 에테르, 웬타에틸렌 글리콜 모노도데실 에테르, 웬타에틸렌 글리콜 모노헥사데실 에테르, 웬타에틸렌 글리콜 모노헥실 에테르, 웬타에틸렌 글리콜 모노옥타데실 에테르, 웬타에틸렌 글리콜 모노옥틸 에테르, 폴레에틸렌 글리콜 디글리시딜 에테르, 폴리에틸렌 글리콜 에테르 W-1, 폴리옥시에틸렌 10 트리데실 에테르, 폴리옥시에틸렌 100 스테아레이트, 폴리옥시에틸렌 20 이소헥사데실 에테르, 폴리옥시에틸렌 20 올레일 에테르, 폴리옥시에틸렌 40 스테아레이트, 폴리옥시에틸렌 50 스테아레이트, 폴리옥시에틸렌 8 스테아레이트, 폴리옥시에틸렌 비스(이미다졸릴카보닐), 폴리옥시에틸렌 25 프로필렌 글리콜 스테아레이트, Quillaja bark로부터의 Saponin, Span[®] 20, Span[®] 40, Span[®] 60, Span[®] 65, Span[®] 80, Span[®] 85, Tergitol, Type 15-S-12, Tergitol, Type 15-S-30, Tergitol, Type 15-S-5, Tergitol, Type 15-S-7, Tergitol, Type 15-S-9, Tergitol, Type NP-10, Tergitol, Type NP-4, Tergitol, Type NP-40, Tergitol, Type NP-7, Tergitol, Type NP-9, 테트라데실-β-D-말토시드, 테트라에틸렌 글리콜 모노데실 에테르, 테트라에틸렌 글리콜 모노도데실 에테르, 테트라에틸렌 글리콜 모노테트라데실 에테르, 트리에틸렌 글리콜 모노데실 에테르, 트리에틸렌 글리콜 모노도데실 에테르, 트리에틸렌 글리콜 모노헥사데실 에테르, 트리에틸렌 글리콜 모노옥틸 에테르, 트리에틸렌 글리콜 모노테트라데실 에테르, Triton CF-21, Triton CF-32, Triton DF-12, Triton DF-16, Triton GR-5M, Triton QS-15, Triton QS-44, Triton X-100, Triton X-102, Triton X-15, Triton X-151, Triton X-200, Triton X-207, Triton X-100, Triton[®] X-114, Triton[®] X-165 용액, Triton[®] X-305 용액, Triton[®] X-405, Triton[®] X-45, Triton[®] X-705-70, TWEEN[®] 20, TWEEN[®] 40, TWEEN[®] 60, TWEEN[®] 6, TWEEN[®] 65, TWEEN[®] 80, TWEEN[®] 81, TWEEN[®] 85, 틸록사폴(Tyloxapol), 스팽고인지질(스팡고미엘린; sphingomyelin), 및 스팽고당지질(세라마이드, 강글리오시드), 인지질 및/또는 n-운데실-β-D-글루코파라노시드의 군으로부터 선택할 수 있다.

[0225]

쓰비터이온성 계면활성제는 CHAPS, CHAPSO, 3-(데실디메틸암모니오)프로판술포네이트 내부염, 3-(도데실디메틸암모니오)-프로판술포네이트 내부염, 3-(도데실디메틸암모니오)프로판술포네이트 내부염, 3-(N,N-디메틸미리스틸암모니오)프로판술포네이트, 3-(N,N-디메틸옥타데실암모니오)프로판술포네이트 내부염, 3-(N,N-디메틸옥틸암

모니오)프로판슬포네이트 내부염, 3-(N,N-디메틸팔미틸암모니오)프로판슬포네이트, N-알킬-N,N-디메틸암모니오-1-프로판슬포네이트, 3-콜라미도-1-프로필디메틸암모니오-1-프로판슬포네이트, 도데실포스포콜린, 미리스토일라이소포스파티딜콜린, Zwittergent 3-12(N-도데실-N,N-디메틸-3-암모니오-1-프로판슬포네이트 내부염), Zwittergent 3-10 (3-(데실디메틸암모니오)-프로판슬포네이트 내부염), Zwittergent 3-08 (3-(옥틸디메틸암모니오)-프로판슬포네이트), 글리세로인지질 (레시틴, 캐팔린, 포스파티일 세린), 글리세로당지질 (갈라토피라노시드), 라이소포스파티딜 및 포스파티딜콜린의 알킬, 알콕시(알킬 에스테르), 알콕시(알킬 에테르)-유도체, 예를 들면, 라이소포스파티딜콜린의 라우로일 및 미리스토일 유도체, 디팔미토일포스파티딜콜린, 및 극성 헤드기의 변형체, 즉, 콜린, 에탄올아민, 포스파티드산, 세린, 트레오닌, 글리세롤, 이노시톨, 라이소포스파티딜세린 및 라이소포스파티딜트레오닌, 아실카르니틴 및 유도체, 리신, 아르기닌 또는 히스티딘의 N^{베타}-아실화된 유도체, 또는 리신 또는 아르기닌의 측쇄 아실화된 유도체, 리신, 아르기닌 또는 히스티딘과 중성 또는 산성 아미노산의 조합물을 포함하는 디펩타이드의 N^{베타}-아실화된 유도체, 중성 아미노산과 2개의 하전된 아미노산의 조합물을 포함하는 트리펩타이드의 N^{베타}-아실화된 유도체의 군으로부터 선택할 수 있거나, 계면활성제를 이미다졸린 유도체, 이의 C₆-C₁₂ (예, 올레산 및 카프릴산) 장쇄 지방산 및 이의 염, N-헥사데실-N,N-디메틸-3-암모니오-1-프로판슬포네이트, 음이온성 (알킬-아릴-슬포네이트) 1가 계면활성제, 팔리토일 라이소포스파티딜-L-세린, 라이소인지질 (예, 에탄올아민, 콜린, 세린 또는 트레오닌의 1-아실-sn-글리세로-3-포스페이트 에스테르), 또는 이들의 혼합물의 군으로부터 선택할 수 있다.

[0226]

본 명세서에서 사용되는 바와 같은 용어 "알킬-폴리글루코시드"는 글루코시드 잔기, 예로서 말토시드, 사카라이드와 같은 잔기 1개 이상으로 치환된, 직쇄 또는 측쇄 C₅-C₂₀-알킬, -알케닐 또는 -알키닐 쇄에 관한 것이다. 이들 알킬-폴리글루코시드의 양태로는 C₆₋₁₈-알킬-폴리글루코시드가 있다. 이들 알킬-폴리글루코시드의 특정 양태로는 짹수의 탄소쇄, 예로서 C₆, C₈, C₁₀, C₁₂, C₁₄, C₁₆, C₁₈ 및 C₂₀ 알킬쇄가 있다. 글루코시드 잔기의 특정 양태로는 피라노시드, 글루코파라노시드, 말토시드, 말토트리오시드 및 슈크로오스가 있다. 본 발명의 양태로, 6개 미만의 글루코시드 잔기가 알킬기에 부착된다. 본 발명의 양태로, 5개 미만의 글루코시드 잔기가 알킬기에 부착된다. 본 발명의 양태로, 4개 미만의 글루코시드 잔기가 알킬기에 부착된다. 본 발명의 양태로, 3개 미만의 글루코시드 잔기가 알킬기에 부착된다. 본 발명의 양태로, 2개 미만의 글루코시드 잔기가 알킬기에 부착된다. 알킬-폴리글루코시드의 특정 양태는 n-데실β-D-글루코파라노시드, 데실β-D-말토파라노시드, 도데실β-D-글루코파라노시드, n-도데실β-D-말토시드, n-도데실β-D-말토시드, n-도데실β-D-말토시드, 테트라데실β-D-글루코파라노시드, 테실β-D-말토시드, 헥사데실β-D-말토시드, 데실β-D-말토트리오시드, 도데실β-D-말토트리오시드, 테트라데실β-D-말토트리오시드, 헥사데실β-D-말토트리오시드, n-도데실-슈크로오스, n-데실-슈크로오스, 슈크로오스 모노카프레이트, 슈크로오스 모노라우레이트, 슈크로오스 모노미리스테이트, 및 슈크로오스 모노팔미테이트와 같은 알킬-글루코시드이다. 약제학적 조성물에 계면활성제를 사용하는 것은 숙련가에게 숙지되어 있다. 편의를 위하여 다음 문현을 참고한다: Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 19th edition, 1995.

[0227]

본 발명의 추가의 양태로, 제형이 EDTA (에틸렌디아민 테트라아세트산) 및 벤즈아미딘HCl과 같은 프로테아제 억제제를 추가로 포함하지만, 기타 상업적으로 입수 가능한 프로테아제 억제제가 또한 사용될 수 있다. 프로테아제 억제제를 사용하는 것은 프로테아제의 지모겐을 포함하는 약제학적 조성물에서 자체촉매작용을 억제하는데 있어 특히 유용하다.

[0228]

기타 성분이 본 발명의 펩타이드 약제학적 제형중에 존재할 수 있음도 가능하다. 그러한 추가적인 성분은 습윤제, 유화제, 항산화제, 벌크화제, 등장성 개질제, 칼레이트화제, 금속 이온, 기름기가 많은 비히클, 단백질 (예, 인간 혈청 알부민, 젤라틴 또는 단백질) 및 쯔비터이온 (예, 베타인, 타우린, 아르기닌, 글리신, 리신 및 히스티딘과 같은 아미노산)을 포함할 수 있다. 그러한 추가적인 성분은 물론, 본 발명의 약제학적 제형의 전반적인 안정성에 나쁜 영향을 주어서는 안된다.

[0229]

본 발명에 따르는 화합물을 함유하는 약제학적 조성물은 치료를 필요로 하는 환자에게 수개의 부위에, 예를 들면, 국소 부위, 예로서, 피부 및 점막 부위, 바이페스 흡수 부위에, 예를 들면, 동맥, 정맥, 심장에서의 투여, 및 흡수와 관련된 부위, 예를 들면, 피부중, 피부하, 근육내 또는 복부에 투여와 같이 투여할 수 있다.

[0230]

본 발명에 따르는 약제학적 조성물의 투여는 수개의 투여 경로, 예를 들면, 혀, 설하, 구강, 입안, 입, 위 및 장내, 비강, 폐, 예를 들면, 세기관지 및 허파꽈리 또는 이들의 조합을 통하여, 상피, 진피, 경피, 질, 직장,

눈, 예를 들면, 결막, 요도, 및 그러한 치료를 필요로 하는 환자에게 비경구적 경로를 통하여 투여될 수 있다.

[0231] 본 발명의 조성물은 수종의 투여형으로, 예를 들면, 액제, 혼탁제, 유제, 미세유제, 다중 유제, 포움, 연고 (salves), 페이스트, 플래스터, 연고 (ointments), 정제, 피복 정제, 린스, 캡슐제, 예를 들면, 경질 젤라틴 캡슐제 및 연질 젤라틴 캡슐제, 좌제, 직장용 캡슐, 드롭스, 젤제, 스프레이, 산제, 에어로졸, 흡입제, 점안제, 안과용 연고, 안과용 린스, 질내 폐사리, 질내 링, 질내 연고, 주사용 액제, 동일계 전환 액제, 예를 들면, 동일계 젤화, 동일계 세팅, 동일계 침전, 동일계 결정화, 주입 액제, 및 임플란트로 투여할 수 있다. 본 발명의 조성물은 본 발명의 화합물의 안정성을 추가로 향상시키고, 생체유용도를 증가시키며, 가용성을 증가시키고, 부작용을 감소시키며, 당해 분야의 숙련가에게 숙지되어 있는 시간치료를 성취하고, 환자 순응도를 증가시키거나 또는 이들의 조합을 성취하기 위하여, 예를 들어, 공유결합, 소수성 및 정전기 상호반응을 통하여, 약물용 담체, 약물 운반 시스템 및 고급 약물 운반 시스템으로, 또는 이에 부착되어 추가로 조합될 수 있다. 담체, 약물 운반 시스템 및 고급 약물 운반 시스템의 예로는, 비제한적으로, 폴리머, 예를 들면, 셀룰로오스 및 유도체, 폴리사카라이드, 예를 들면, 텍스트란 및 유도체, 전분 및 유도체, 폴리비닐 알코올, 아크릴레이트 및 메타크릴레이트 폴리머, 폴리락트산 및 폴리글리콜산 및 이들 블럭 코폴리머, 폴리에틸렌 글리콜, 담체 단백질, 예를 들면, 알부민, 젤, 예를 들면, 열적결화 시스템, 예를 들어, 당해 분야의 숙련가에게 숙지되어 있는 블럭 코폴리머 시스템, 미셀, 리포좀, 미세구, 나노입자, 액정 및 이의 분산제, 지방-물 시스템에서의 상 행동 분야의 숙련가에게 숙지되어 있는, L2상 및 이의 분산액, 폴리머성 미셀, 다중 유액, 자가-유화, 자가-미세유화, 사이클로엑스트린 및 이들의 유도체, 및 덴드리머가 있다.

[0232] 본 발명의 조성물은 예를 들어, 계량식 투여량 흡입기, 무수 분말 흡입기 및 뉴불라이저 (이들 장치는 모두 당해 분야의 숙련가에게 숙지되어 있다)를 사용하여, 본 발명의 화합물을 폐에 투여하기 위한 고체, 반고체, 분말 및 용액의 제형에 유용하다. 본 발명의 조성물은 조절식, 지속식, 연장식, 지연식, 및 느린 방출 약물 운반 시스템의 제형에 특히 유용하다. 더욱 상세하게, 비제한적으로, 본 발명의 조성물은 당해 분야의 숙련가에게 숙지되어 있는, 비경구적 조절 방출 및 지속 방출 시스템 (두 시스템 모두 투여 회수를 수배로 감소시킨다)의 제형에 유용하다. 더욱 더 바람직하게는, 피하로 투여되는 조절 방출 및 지속 방출 시스템이다. 본 발명의 범주를 제한하지 않고, 유용한 조절 방출 시스템 및 조성물의 예는 하이드로겔, 기름기가 많은 젤, 액정, 폴리머성 미셀, 미세구, 나노입자이다. 본 발명의 조성물에 있어서 유용한 조절 방출 시스템을 제조하는 방법으로는 비제한적으로, 결정화, 축합, 동시-결정화, 침전, 동시-침전, 유화, 분산, 고압 균질화, 캡슐화, 스프레이 건조, 미세캡슐화, 코아세르베이션(coacervation), 상분리, 미세구를 생산하기 위한 용매 증발, 압출 및 초임계 유체 공법이 있다. 일반적인 사항에 대해서는 하기 문헌을 참고한다: Handbook of Pharmaceutical Controlled Release (Wise, D. L., ed. Marcel Dekker, New York, 2000) 및 Drug and the Pharmaceutical Sciences vol. 99: Protein Formulation and Delivery (MacNally, E.J., ed. Marcel Dekker, New York, 2000). 비경구적 투여는 피하, 근육내, 복강내 또는 정맥내 주사에 의해 시린지, 임의로는 펜-형 시린지를 사용하여 수행될 수 있다. 달리, 비경구적 투여가 주입 펌프를 사용하여 수행될 수 있다. 추가적인 옵션은 비강 또는 폐에 사용하기 위한 액체 또는 분말 스프레이 형태로 본 발명의 화합물의 투여를 위한 용액 또는 혼탁액 또는 분말일 수 있다. 추가적인 옵션으로서, 본 발명의 화합물을 함유하는 약제학적 조성물은 또한 경피적 투여, 예를 들어, 바늘이 없는 주사에 의해 또는 폐치로부터, 임의적으로는 이온영동적 폐치로부터, 또는 점막을 통하여, 예를 들면, 볼을 통한 투여법을 채택하여 투여할 수 있다. 본 발명의 화합물은 비히를 중에 폐 경로를 통하여, 폐 약물 운반에 적합한 공지된 타입의 장치를 사용하여 용액, 혼탁액 또는 무수 분말로 투여할 수 있다. 이들의 예로는, 비제한적으로, 3가지 일반적인 타입의, 폐 약물 운반을 위하여 발생되는 에어로졸을 포함하며, 제트 또는 초음파 뉴불라이저, 계량식-투여량 흡입기, 또는 무수 분말 흡입기를 포함할 수 있다 (Cf. Yu J, Chien YW. Pulmonary drug delivery: Physiologic and mechanistic aspects. Crit Rev Ther Drug Carr Sys 14(4) (1997) 395-453).

[0233] 표준화된 시험 방법론에 근거하여, 입자의 공기중력학적 직경(d_a)은 단위 밀도 (1 g/cm^3)를 갖는 참고용 표준 구형 입자의 기하학적 등가인 직경으로서 정의된다. 가장 단순한 경우로, 구형 입자에 대해, d_a 는 다음에 기술된 바와 같이 밀도비의 제곱근의 함수로서 참고용 직경(d)과 관련이 있다:

[0234] 상기 관계식에 대한 변형은 비-구형 입자의 경우 일어난다 (cf. Edwards DA, Ben-Jebria A, Langer R. Recent advances in pulmonary drug delivery using large, porous inhaled particles. J Appl Physiol 84(2) (1998) 379-385). 용어 "MMAD" 및 "MMEA"는 당해 분야에 잘 설명되어 있으며 공지되어 있다 (cf. Edwards DA, Ben-Jebria A, Langer R and represents a measure of the median value of an aerodynamic particle size distribution. Recent advances in pulmonary drug delivery using large, porous inhaled particles. J Appl Physiol 84(2) (1998) 379-385). 질량 중위 공기중력학적 직경 (MMAD) 및 질량 중위 유효 공기중력학적 직경

(MMEAD)은 상호교환적으로 사용되며, 통계학적 변수이고, 실제적인 형태, 크기, 또는 밀도와는 독립적으로, 폐에 침착할 이들의 가능성과 관련하여 에어로졸 입자의 크기를 경험적으로 기술한다 (cf. Edwards DA, Ben-Jebria A, Langer R. Recent advances in pulmonary drug delivery using large, porous inhaled particles. *J Appl Physiol* 84(2) (1998) 379-385). MMAD는 공기중에서 입자 관성 행동을 측정하는 장치인 임팩터 (impactors)로 측정한 측정치로부터 정상적으로 계산한다. 추가적인 양태로, 제형을 공지되어 있는 에어로졸화 기술, 예로서, 분무화에 의해 에어로졸화하여 10 μm 미만, 더욱 바람직하게는 1 내지 5 μm , 가장 바람직하게는 1 내지 3 μm 인 MMAD의 에어로졸 입자를 수득할 수 있다. 상기 바람직한 입자 크기는 단백질이 최적으로 흡수되는, 폐 심부로 약물을 운반하는데 가장 효과적인 크기를 기반으로 한다 (cf. Edwards DA, Ben-Jebria A, Langer A, Recent advances in pulmonary drug delivery using large, porous inhaled particles. *J Appl Physiol* 84(2) (1998) 379-385).

[0235] 본 발명의 화합물을 포함하는 폐에 사용하기 위한 제형의 폐 심부 침착은 임의로 흡입 기술을 변형시켜, 예를 들면, 비제한적으로: 느린 흡입 유속 (예, 30 L/분), 호흡 유지 및 발동작용의 타이밍을 사용하여 추가로 최적화시킬 수 있다.

[0236] 용어 "안정화된 제형"이란 증가된 물리적 안정성, 증가된 화학적 안정성 또는 증가된 물리적 및 화학적 안정성을 갖는 제형을 언급한다.

[0237] 본 명세서에서 사용되는 바와 같은 용어, 단백질 제형의 "물리적 안정성"은 단백질이 열적-기계적 스트레스에 노출되고/되거나 소수성 표면 및 계면과 같이, 탈안정화시키는 계면 및 표면과 상호반응한 결과 단백질의 생물학적으로 불활성 및/또는 불용성인 응집물을 형성하는 경향을 언급한다. 수성 단백질 제형의 물리적 안정성은 적합한 용기 (예, 카트리지 또는 바이알)에 충전된 제형을 기계적/물리적 스트레스 (예, 교반)에 상이한 온도에서 다양한 시간 동안 노출시킨 후 가시적 검사 및/또는 혼탁도 측정에 의해 평가한다. 제형의 가시적 검사는 암흑 배경에서 샤프 포커스 광 (sharp focused light)으로 수행한다. 제형의 혼탁도는 혼탁도의 정도를 가시적 점수로 랭크화하여, 예를 들면, 0부터 3까지의 스케일로 특징화한다 (혼탁을 전혀 나타내지 않는 제형은 가시적 점수 0에 상응하며, 일광에서 가시적 혼탁도를 나타내는 제형은 가시적 점수 3에 상응한다). 일광에서 가시적인 혼탁도를 나타낼 경우, 제형은 단백질 응집에 대해 물리적으로 불안정한 것으로 분류된다. 달리, 제형의 혼탁도는 숙련가에게 숙지되어 있는 단순한 혼탁도 측정법으로 평가할 수 있다. 수성 단백질 제형의 물리적 안정성은 또한 단백질의 배위 상태의 분광기를 이용한 조사제 또는 프로브를 사용하여 평가할 수 있다. 프로브는 바람직하게는, 단백질의 비-천연 형태이성질체에 우선적으로 결합하는 작은 문자이다. 단백질 구조의 작은 문자 분광기 프로브의 일례는 티오플라빈(thioflavin T)이다. 티오플라빈 T는 아밀로이드 피브릴의 검출에 널리 사용되는 형광 염료이다. 피브릴, 및 아마도 다른 단백질 배열의 존재하에서, 티오플라빈 T는 약 450 nm에서 새로운 최대 여기치를 나타내며 피브릴 단백질 형태에 결합될 때 약 482 nm에서 방출이 증강된다. 미결합 티오플라빈 T는 상기 과장에서 필수적으로 비-형광성이다.

[0238] 기타 작은 문자가 천연에서 비-천연 상태로의 단백질 구조에서의 변화의 프로브로서 사용될 수 있다. 예를 들어, "소수성 패치" 프로브는 단백질의 노출된 소수성 패치에 우선적으로 결합한다. 소수성 패치는 일반적으로 천연 상태의 단백질 3차 구조내에 매립되지만, 단백질이 퍼지거나 변성되기 시작함에 따라 노출되기 시작한다. 이들 작은 문자의 예로서, 분광기 프로브는 방향족, 소수성 염료, 예로서, 안트라센, 아크리딘, 페난트롤린 등이다. 다른 분광기 프로브는 금속-아미노산 복합체, 예로서 소수성 아미노산, 예를 들면, 페닐알라닌, 류신, 이소류신, 메티오닌, 및 발린 등의 코발트 금속 복합체 등이다.

[0239] 본 명세서에서 사용되는 바와 같은 용어 "화학적 안정성"은 천연 단백질 구조와 비교하여 더 낮은 생물학적 효능 및/또는 증가된 면역원성 특성을 가질 잠재성이 있는 화학적 분해 생성물을 형성시키는, 단백질 구조에서의 화학적 공유결합적 변화를 언급한다. 천연 단백질 타입 및 특성과 단백질이 노출되는 환경에 따라서 다양한 화학적 분해 생성물이 형성될 수 있다. 화학적 분해를 없애는 것은 거의 완전히 피할 수 없는 것이며 증가된 양의 화학적 분해 생성물을 통상적으로 당해 분야의 숙련에게 숙지되어 있는 바와 같은 단백질 제형의 보관 및 사용중에 발견된다. 대부분의 단백질은 탈아미드화되기 쉬운데, 탈아미드화 공정에서 글루타미닐 또는 아스파라기닐 잔기중의 측쇄 아미드기가 가수분해되어 유리 카복실산을 형성한다. 다른 분해 경로에는 2개 이상의 단백질 문자가 트랜스아미드화 및/또는 디술파이드 상호반응을 통하여 서로 공유결합을 형성하여 공유결합식으로 결합된 다이머, 올리고머 및 폴리머 분해 생성물을 형성시키는, 고분자량 변형 생성물의 형성을 포함한다 (Stability of Protein Pharmaceuticals, Ahem. T.J. & Manning M. C, Plenum Press, New York 1992). 산화 (예를 들어, 메티오닌 잔기의)는 화학적 분해의 다른 변이형으로 언급될 수 있다. 단백질 제형의 화학적 안정성은 상이한 환경 조건에 노출시킨 후 다양한 시점에서의 화학적 분해 생성물의 양을 측정함으로써 평가할 수

있다 (분해 생성물의 형성은 흔히 예를 들어 온도를 승온시킴으로써 촉진될 수 있다). 각 개별 분해 생성물의 양은 흔히 다양한 크로마토그라피 기술 (예, SEC-HPLC 및/또는 RP-HPLC)을 사용하여 분자 크기 및/또는 전하에 따라 분해 생성물을 분리시킴으로써 측정한다.

[0240] 따라서, 상기 개략된 바와 같이, "안정화된 제형"은 증가된 물리적 안정성, 증가된 화학적 안정성 또는 증가된 물리적 및 화학적 안정성을 갖는 제형을 언급한다. 일반적으로, 제형은 유효기간에 도달할 때 까지 사용 및 보관 중(권장되는 사용 및 보관 조건에 따라) 안정해야 한다.

[0241] 본 발명의 하나의 양태로, 본 발명의 화합물을 포함하는 약제학적 제형이 6주 이상의 사용 기간 및 3년 이상의 보관 기간 동안 안정하다.

[0242] 본 발명의 다른 양태로, 본 발명의 화합물을 포함하는 약제학적 제형이 4주 이상의 사용 기간 및 3년 이상의 보관 기간 동안 안정하다. 본 발명의 추가적인 양태로, 본 발명의 화합물을 포함하는 약제학적 제형이 4주 이상의 사용 기간 및 2년 이상의 보관 기간 동안 안정하다.

[0243] 본 발명의 추가의 양태로, 본 발명의 화합물을 포함하는 약제학적 제형이 2주 이상의 사용 기간 및 2년 이상의 보관 기간 동안 안정하다.

[0244] 다른 양태로, 본 발명은 본 발명에 따르는 화합물의 약제 제조에서의 용도에 관한 것이다.

[0245] 본 발명은 또한 GLP-1 유사체의 염 형태를 포함한다. 본 발명의 GLP-1 유사체는 수많은 무기 염기, 및 무기 산과 반응하여 염을 형성하기에 충분하게 산성 또는 충분하게 염기성일 수 있다. 산 부가염을 형성시키는데 통상적으로 사용되는 산은 염산, 브롬화수소산, 요오드화수소산, 황산, 인산 등과 같은 무기산, 및 p-톨루엔су폰산, 메탄술폰산, 옥살산, p-브로모페닐-술폰산, 카본산, 숙신산, 시트르산, 벤조산, 아세트산 등과 같은 유기산이다. 그러한 염의 예로는 술페이트, 하이드로술페이트, 비술페이트, 술파이트, 비술페이트, 포스페이트, 일수소인산염, 이수소인산염, 메타포스페이트, 피로포스페이트, 클로라이드, 브로마이드, 요오다이드, 프로피오네이트, 데카노에이트, 카프릴레이트, 아크릴레이트, 포르메이트, 이소부티레이트, 헵타노에이트, 프로피올레이트, 옥살레이트, 말로네이트, 숙시네이트, 수베레이트, 세바케이트, 푸마레이트, 말레에이트, 부틴-1,4-디오에이트, 헥신-1,6-디오에이트, 벤조에이트, 클로로벤조에이트, 메틸벤조에이트, 디니트로벤조에이트, 하이드록시벤조에이트, 메톡시벤조에이트, 프탈레이트, 술포네이트, 자일렌술포네이트, 페닐아세테이트, 페닐프로피오네이트, 페닐부티레이트, 시트레이트, 락테이트, 감마-하이드록시부티레이트, 글리콜레이트, 타르트레이트, 메탄술포네이트, 프로판술포네이트, 나프탈렌-1-술포네이트, 나프탈렌-2-술포네이트, 만델레이트 등이 있다. 바람직한 산 부가염은 염산 및 브롬화수소산과 같은 무기산, 특히 염산을 사용하여 형성된 것들이다.

[0246] 염기 부가염으로는 암모늄 또는 알칼리 또는 알칼리 토금속 하이드록사이드, 카보네이트, 비카보네이트 등과 같은 무기 염기로부터 유래되는 것들이 있다. 따라서 본 발명의 염을 제조하는데 유용한 그러한 염기로는 수산화나트륨, 수산화칼륨, 수산화암모늄, 탄산칼륨 등이 있다. GLP-1 유사체의 염 형태가 특히 바람직하다. 물론, 본 발명의 화합물을 치료 목적으로 사용할 경우, 그러한 화합물은 또한 염의 형태로 존재할 수 있지만, 염은 약제학적으로 허용가능한 것이어야 한다.

[0247] 본 발명의 개량된 GLP-1 유사체가 당뇨병의 치료제, 진정제, 신경계 질환의 치료제로서의 용도, CNS상에서의 불안완화 효과를 유발하기 위한 용도, CNS를 활성화시키기 위한 용도, 수술후 치료를 위한 용도 및 인슐린 내성에 대한 치료제로서의 용도를 포함한 여러가지 용도가 있는 것으로 밝혀졌다.

[0248] A. 당뇨병 치료

[0249] 본 발명의 개량된 GLP-1 유사체는 일반적으로 글루코오스-의존성 메카니즘을 통하여 고혈당증을 정상화시킨다. 그러한 바와 같이, 본 발명의 개량된 GLP-1 유사체는 II형 진성 당뇨병의 치료를 위한 1차적인 약제로서 및 I형 진성 당뇨병의 치료를 위한 보조 약제로서 유용하다.

[0250] 유효량의 개량된 GLP-1 유사체를 진성 당뇨병 치료제로서 사용하게 되면 비-개량된 GLP-1 보다 더욱 강력한 장점을 갖는다. 개량된 GLP-1 유사체가 생체내에서 더욱 안정하기 때문에, 효과적인 치료를 위하여 더 적은 양의 분자를 투여할 수 있다. I형 및 II형 둘 다의 당뇨병 환자의 치료에 있어서 본 발명이 특히 적합한데, 이는 웨타이드의 작용이 혈중 글루코오스 농도에 의존적이며, 따라서 통상의 치료법을 사용할 때의 저혈당 부작용의 위험 보다 위험이 크게 감소된다.

[0251] 본 발명은 또한 개별적인 진성 당뇨병의 치료 방법을 제공하며, 이 방법은 당뇨병을 치료하기에 충분한 양의 개

량된 GLP-1 유사체를 제공함을 특징으로 하며; 여기서 조성물은 개량된 GLP-1 유사체를 함유한다.

[0252] B. 신경계 질환의 치료

본 발명의 개량된 GLP-1 유사체는 또한 진정제로서의 용도가 있는 것으로 밝혀졌다. 본 발명의 하나의 양태로, 비정상성을 갖는 포유동물 환자에서 진정 또는 불안완화 효과를 발생시키기에 충분한 양으로 본 발명의 개량된 GLP-1 유사체를 사용하여 중추 또는 주변 신경계의 활성화를 증가시키는, 비정상성을 갖는 포유동물 환자를 진정시키는 방법이 제공된다. 개량된 GLP-1 유사체는 뇌실내로, 경구적으로, 피하, 근육내, 또는 정맥내로 투여 할 수 있다. 그러한 방법은 불안증, 운동 장애, 공격성, 정신병, 발작, 공황발작, 히스테리 및 수면장애와 같은 신경계 질환의 치료 또는 완화에 유용하다.

관련 양태로, 본 발명은 포유동물 개체에서 효과를 일으키고 활성화시키기에 충분한 양으로 개체에게 개량된 GLP-1 유사체를 투여함을 특징으로하는, 포유동물 개체에서 활성을 증가시키는 방법을 포함한다. 바람직하게는, 개체가 중추 또는 주변 신경계의 활성화가 감소된 상태를 갖는다. 개량된 GLP-1 유사체는 우울증, 분열정동장애, 수면무호흡증, 낮은 정도의 주의력 결핍 증후군, 기억상실, 건망증, 및 기면증의 치료 또는 완화에 특정한 용도가 있으며, 중추신경계의 각성이 유리할 수 있는 몇가지 질환이 호명될 수 있다.

본 발명의 개량된 GLP-1 유사체는 우울증, 분열정동장애, 수면무호흡증, 및 낮은 정도의 주의력 결핍 장애, 기억상실, 건망증, 및 기면증의 치료 또는 완화를 위하여 각성을 유발시키는데 사용될 수 있다. 개량된 GLP-1 유사체 치료의 치료 효과는 환자의 상태를 평가하기 위하여 환자를 인터뷰하거나, 심리학적/신경학적 테스트에 의하거나, 이를 질환과 관련있는 증상의 완화에 의해 모니터할 수 있다. 예를 들어, 기면성 발작의 발생을 모니터하여 기면증의 치료를 평가할 수 있다. 다른 예로서, 집중력, 또는 기억 용량에 있어서 개량된 GLP-1 유사체의 효과는 당해 분야의 숙련가에게 숙지되어 있는 수많은 진단 테스트 중 하나를 사용하여 테스트할 수 있다.

[0256] C. 포지 수술 치료 (Posy Surgery Treatments)

본 발명의 개량된 GLP-1 유사체를 수술후 치료에 사용할 수 있다. 환자는 수술을 수행하기 약 1 내지 16 시간 전에, 환자에 대한 수술 중에, 및 환자 수술 후 약 5일 이하의 기간 동안 본 발명의 개량된 GLP-1 유사체를 필요로 한다.

본 발명의 개량된 GLP-1 유사체는 수술을 시작하기 전 약 16시간부터 약 1시간 전까지 투여된다. 이화작용 효과를 감소시키기 위하여 본 발명에서 사용되는 화합물을 투여하여야 하고 인슐린 내성이 수많은 인자에 의존성 일 때 수술전 시간의 길이. 이를 인자는 일반적으로 당해 분야에 공지되어 있으며, 대부분 중요하게는, 환자를 공복시킬 것인지 아니면 수술전 준비기간 중에 글루코오스 주입 또는 음료, 또는 일부 다른 형태의 물질을 공급 할 것인지를 포함한다. 다른 중요한 인자로는 환자의 성별, 체중 및 나이, 혈당 조절 불능의 심화도, 혈당 조절 불능의 기초적인 원인, 수술에 의해 야기된 트라우마의 예측된 심화도, 투여 경로 및 생체이용도, 체내 지속성, 제형, 및 화합물의 효능이 있다. 본 발명에서 사용되는 개량된 GLP-1 유사체의 투여를 시작하기에 바람직 한 시간 간격은 수술 시작 전 약 1시간부터 약 10시간 까지이다. 투여를 시작하기에 가장 바람직한 시간 간격은 수술 시작 전 2시간부터 8시간 사이이다.

[0259] 특정 타입의 수술인, 대기 복부 수술 이후 인슐린 내성을 수술후 첫째날에 가장 크고, 적어도 5일간 지속되며 정상화되기 까지 3주가 소요될 수도 있다. 따라서, 수술후의 환자에게 환자를 공복시킬 것인지 아니면 수술 이후 글루코오스 주입 또는 음료, 또는 기타 형태의 음식물을 공급할 것인지에 따라, 그리고 또한, 제한없이, 환자의 성별, 체중 및 연령, 혈당 조절 불능의 심화도, 혈당 조절 불능의 기초적인 원인, 수술에 의해 야기된 트라우마의 예측된 심화도, 수술에 의해 야기된 트라우마의 실제 심화도, 투여 경로 및 생체이용도, 체내 지속성, 제형, 및 투여되는 화합물의 효능에 따르는 수술 트라우마 이후 기간 동안 본 발명에서 사용되는 개량된 GLP-1 유사체를 투여할 필요가 있을 수 있다. 본 발명에서 사용되는 화합물의 바람직한 투여 기간은 수술 이후 기껏 해야 5일이다.

[0260] D. 인슐린 내성 치료

본 발명의 개량된 GLP-1 유사체는 수술후 치료에서 사용되는 것과는 상관없이 인슐린 내성을 치료하는데 이용될 수 있다. 인슐린 내성은 인슐린이 세포-표면 수용체에 결합하는 것이 감소되거나, 또는 세포내 대사에서의 변형때문일 수 있다. 인슐린 감수성에서의 감소로 특징되는 첫번째 타입은 전형적으로 인슐린 농도를 증가시킴으

로써 극복될 수 있다. 인슐린 반응성에서의 감소로 특징되는 두번째 타입은 다량의 인슐린에 의해서는 극복될 수 없다. 트라우마에 따른 인슐린 내성은 인슐린 내성의 정도에 비례하는 인슐린 투여에 의해 극복될 수 있으며, 따라서 인슐린 감수성에서의 감소에 의해 야기되는 것이 분명하다.

[0262] 환자의 혈당 수준을 정상화시키는데 효과적인 개량된 GLP-1 유사체의 투여량은 인자의 숫자, 포함되는 양, 제한 없이, 환자의 성별, 체중 및 연령, 혈당 조절 불능의 심화도, 혈당 조절 불능의 기초적인 원인, 수술에 의해 야기된 트라우마의 예측된 심화도, 글루코오스, 또는 다른 탄수화물 공급원이 동시에 투여되는지 여부, 투여 경로 및 생체이용도, 체내 지속성, 제형, 및 효능에 따른다.

[0263] 인슐린 분비를 자극할 수 있는 GLP-1 유사체의 능력은 GLP-1 유사체를 배양된 동물 세포, 예로서 RIN-38 래트 인슐린종 세포주에 공급하고, 면역반응성 인슐린 (IRI)이 배지로 방출되는지 모니터링함으로써 측정할 수 있다. 달리, GLP-1 유사체를 동물에게 주사하고 면역반응성 인슐린(IRI)의 혈장 수준을 모니터할 수 있다.

[0264] IRI의 존재는 인슐린을 특이적으로 검출할 수 있는 방사성면역검정법의 사용을 통하여 검출한다. IRI의 존재를 검출할 수 있는 방사성면역학 검정법이라면 어느 것이라도 사용될 수 있으며, 그러한 검정법 중 하나가 하기 문헌에 기재되어 있는 개량법이다: Albano, J.D.M. et al., *Acta Endocrinol.* **70**: 487-509 (1972). 이 개량법에서는, pH가 7.4인 인산염/알부민 완충제를 사용한다. 500 μl 의 인산염 완충제, 50 μl 의 관류액 샘플 또는 관류액중 래트 인슐린 표준물질, 100 μl 의 항-인슐린 항혈청 (Wellcome Laboratories; 1:40,000 희석액), 및 100 μl 의 [^{125}I]인슐린을 연속해서 첨가하여, 10x75 mm 1회용 글래스 튜브에 총 750 μl 를 제공함으로써 인큐베이션을 제조한다. 4 °C에서 2 내지 3일간 배양시킨 후, 활성탄 분리에 의해 유리 인슐린을 항체-결합된 인슐린으로부터 분리시킨다. 검정 감응성은 1-2 uU/ $\text{m}\ell$ 이다. 조직 배양에서 성장한 세포의 세포 배양 배지중으로의 IRI의 방출량을 측정하기 위하여, 바람직하게는 방사성활성 표지물을 프로인슐린중에 포함시킨다. 폴리펩타이드를 표지시킬 수 있는 방사성활성 표지물이라면 어느 것이라도 사용할 수 있지만, 표지된 프로인슐린을 수득하기 위해서는 ^3H 류신을 사용하는 것이 바람직하다.

[0265] GLP-1 유사체가 인슐린분비촉진 특성을 갖는지 결정하는 것이 또한 췌장 침출액에 의해 결정될 수 있다. 동일 계 단리된 관류식 래트 췌장 검정법은 문헌 참조: Penhos, J, C., et al., *Diabetes*, **18**: 733-738 (1969)의 방법의 개량법이다. 체중이 350 내지 600 g인, 굽긴 수컷 찰스 리버종 알비노 래트에게 Amytal Sodium (Eli Lilly and Co, 160 ng/kg)을 복강내 주사하여 마취시킨다. 신장, 부신, 위, 및 하부 결장 혈관을 결찰시킨다. 약 4 cm의 십이지장을 제외하고 장 전체를 리색트시키고 결장과 직장을 바로 연결한다. 따라서, 작은 부분의 장만 관류되어, 글루카곤-유사 면역반응성을 갖는 장내 물질에 의한 가능한 간섭을 최소화시킨다. 관류액은 4% 텍스트란 T70 및 0.2% 소혈청 알부민 (V 분획)이 포함되어 있는 개량된 Krebs-Ringer 중탄산염 완충액이며, 95% O_2 와 5% CO_2 로 버블링시킨다. 비맥동류인, 4개-채널 롤러 베어링 펌프 (Buchler polystatic, Buchler Instruments Division, Nuclear-Chicago Corp)를 사용하고, 관류액 공급원 하나로부터 다른 것으로의 스위치는 3-웨이 스톱콕 (3-way stopcock)을 스위치함으로써 수행된다. 관류 방식대로 수행하고, 모니터하여 다음 방법에 따라 분석하며, 이 문헌은 본 명세서에서 참고로 인용된다: Weir, G. C., et al. *J. Clin. Investigat.* **54**: 1403-1412 (1974).

[0266] 본 발명에 따르는 화합물을 사용한 치료를 또한 예를 들어, 당뇨병치료제, 비만치료제, 식욕조절제, 고혈압치료제, 당뇨로부터 또는 이와 관련하여 발생되는 합병증의 치료 및/또는 예방제 및 비만으로부터 또는 이와 관련하여 발생되는 합병증 및 질환의 치료 및/또는 예방제로부터 선택되는 약리학적 활성 물질 2개 이상과 함께 조합 할 수 있다. 이들 약리학적 활성 물질의 예는 다음과 같다: 인슐린, 술포닐우레아, 비구아니드, 메글리티니드, 글루코시다제 억제제, 글루카곤 길항제, DPP-IV (디펩티딜 웨პ티다제-IV) 억제제, 글루코오스생성 및/또는 글리코겐축적의 자극과 연관된 간 효소 억제제, 글루코오스 흡수 조절제, HMG CoA 억제제 (statins)와 같은 고지혈증치료제와 같은 지질 대사를 조절하는 화합물, 가스트린 억제 폴리펩타이드 (GIP 유사체), 음식 흡수를 저하시키는 화합물, RXR 효능제 및 β -세포의 ATP-의존성 칼륨 채널에 작용하는 약제; 콜레스테리아민, 콜레스테리톨, 클로피브레이트, 켐피브로질, 로바스타틴, 프라바스타틴, 심바스타틴, 프로부콜, 텍스트로티록신, 네테글리니드, 레파글리니드; β -차단제, 예로서 알프레놀올, 아테놀올, 티몰롤, 편돌롤, 프로프라놀올 및 메토프롤올, ACE (안지오텐신 전환 효소) 억제제, 예로서 베나제프릴, 카프토프릴, 에날라프릴, 포시노프릴, 리시노프릴, 알라트리오프릴, 퀴나프릴 및 라미프릴, 칼슘 채널 차단제, 예로서 니페디핀, 펠로디핀, 니카르디핀, 이스라디핀, 니모디핀, 딜티아제 및 베라파밀, 및 α -차단제, 예로서 독사조신, 우라피딜, 프라조신 및 테라조신; CART (코카인 암페타민 조절된 전사물) 효능제, NPY (뉴로펩타이드 Y) 길항제, PYY 효능제, PYY2 효능제, PYY4 효능제, 혼합된 PYY2/PYY4 효능제, MC4(멜라노코르틴 4) 효능제, 오렉신 길항제, TNF (종양 괴사 인자) 효능제,

CRF (코르티코트로핀 방출 인자) 효능제, CRF BP (코르티코트로핀 방출 인자 결합 단백질) 길항제, 우로코르틴 효능제, β 3 효능제, MSH (멜라닌세포-자극 호르몬) 효능제, MCH (멜라닌세포-농축 호르몬) 길항제, CCK (콜레시스토카닌) 효능제, 세로토닌 재흡수 억제제, 세로토닌 및 노르아드레날린 재흡수 억제제, 혼합된 세로토닌 및 노르아드레날린에 의해 활성화된 화합물, 5HT (세로토닌) 효능제, 봄베신 효능제, 갈라닌 길항제, 성장 호르몬, 성장 호르몬 방출 화합물, TRH (티레오트로핀 방출 호르몬) 효능제, UCP 2 또는 3 (비커플링 단백질 2 또는 3) 조절제, 렙틴 효능제, DA 효능제 (브로모크립틴, 도프렉신), 리파제/아밀라제 억제제, RXR (레티노이드 X 수용체) 조절제, TR β 효능제; 히스타민 H3 길항제, 가스트린 억제 폴리펩타이드 효능제 또는 길항제 (GIP 유사체), 가스트린 및 가스트린 유사체. 본 발명에 따르는 화합물을 사용한 치료는 또한 수술 - 위 벤드 수술 또는 위 바이패스와 같이 글루코오스 수준 및/또는 지질 항상성에 영향을 주는 수술과 병행할 수도 있다.

[0267] 본 발명에 따르는 화합물과 상기 언급한 화합물 중 1종 이상 및 임의로 추가의 약리학적 활성 물질 1종 이상과의 적합한 조합물은 본 발명의 범주내에 있는 것으로 고려되는 것으로 이해되어야 한다.

[0268] 본 발명을 다음의 실시예로 추가로 설명하지만, 이들 실시예는 본 발명의 범주를 제한하는 것으로 간주되어서는 안된다. 전술한 기재 내용 및 하기 실시예에 개시된 특징은 별개 및 이들 조합으로 둘다 이들의 다양한 형태로 본 발명을 실현시키기 위한 물질일 수 있다.

[0269] 설명에 의해, 하기 실시예는 본 발명의 다양한 양태를 제조하고 실행하는 방법의 설명을 돋기 위하여 제공된다. 이들 실시예는 어떤 방식으로든 본 발명의 범주를 제한하는 것이 아니다.

실시예

[0271] 사용된 약어:

[0272] r.t: 실온;

[0273] DIPEA: 디이소프로필에틸아민;

[0274] H₂O: 물;

[0275] CH₃CN: 아세토니트릴;

[0276] DMF: N,N-디메틸포름아미드;

[0277] HBTU: 2-(1H-벤조트리아졸-1-일-)-1,1,3,3 테트라메틸우로늄 헥사플루오로포스페이트;

[0278] Fmoc: 9H-플루오렌-9-일메톡시카보닐;

[0279] Boc: tert 부틸옥시카보닐;

[0280] OtBu: tert 부틸 에스테르;

[0281] tBu: tert 부틸;

[0282] Trt: 트리페닐메틸;

[0283] Pmc: 2,2,5,7,8-펜타메틸-크로만-6-술포닐;

[0284] Dde: 1-(4,4-디메틸-2,6-디옥소사이클로헥실리덴)에틸

ivDde: 1-(4,4-디메틸-2,6-디옥소사이클로헥실리덴)-3-메틸부틸;

[0285] Mt t: 4-메틸트리틸;

[0286] Mmt: 4-메톡시트리틸;

[0287] DCM: 디클로로메탄;

[0288] TIS: 트리이소프로필실란);

[0289] TFA: 트리플루오로아세트산;

[0290] Et₂O: 디에틸에테르;

[0291] NMP: 1-메틸-피롤리딘-2-온;

[0292] DIPEA: 디이소프로필에틸아민;

[0293] HOAt: 1-하이드록시-7-아자벤조트리아졸;

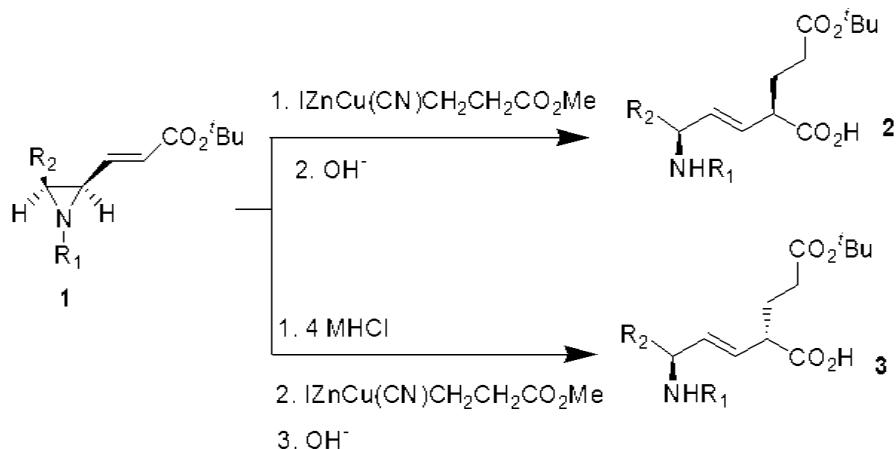
[0294] HOBt: 1-하이드록시벤조트리아졸;

[0295] DIC: 디이소프로필카르보디이미드.

[0296] Q의 합성

[0297] 화학식 II의 화합물과 같은 Q는 상업적으로 이용가능하며, 문헌에 공지되어 있거나, 당해 분야의 숙련가에게 친근한 다양한 방법에 의해 편리하게 제조될 수 있다. 화학식 II[여기서, X, Y 및 R₃은 문헌(참조: S. Oishi etc., *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*, 2001, 2445)에 보고된 수소이다]를 합성하기 위한 일반적인 경로 중 하나가 아래 반응식 1에 나타나 있다.

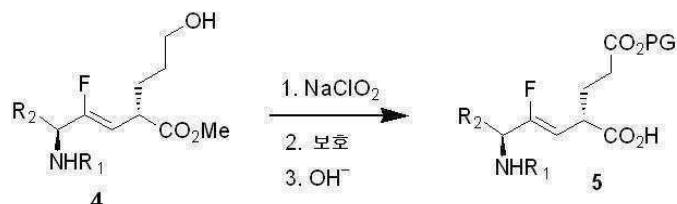
[0298] 반응식 1



[0299]

[0300] 화학식 II의 화합물과 같은 Q가 상업적으로 이용가능하며, 문헌에 공지되어 있거나, 당해 분야의 숙련가에게 친근한 다양한 방법에 의해 편리하게 제조될 수 있다. 화학식 II[여기서, X는 불소이고, Y 및 R₃은 수소이다]를 합성하기 위한 일반적인 경로 중 하나가 아래 반응식 2에 나타나 있다. 핵심 출발 물질 4는 상업적으로 이용가능하고, 문헌[참조: T. Narumi et al., *Tetrahedron*, 2008, 64, 4332]에 공지되어 있다.

[0301] 반응식 2

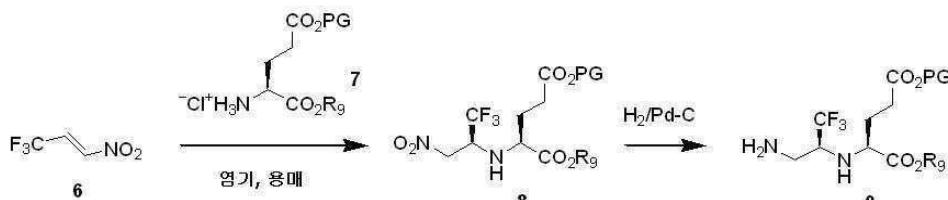


[0302]

[0303] 화학식 IIIa의 화합물과 같은 Q는 상업적으로 이용가능하며, 문헌에 공지되어 있거나, 당해 분야의 숙련가에게 친근한 다양한 방법에 의해 편리하게 제조될 수 있다. 화학식 III[여기서, X는 트리플루오로메틸, Z는 질소, Y, R₁, R₂ 및 R₃은 수소이다]를 합성하기 위한 일반적인 경로 중 하나가 아래 반응식 3에 나타나 있다. 핵심 출발 물질인 3,3,3-트리플루오로-1-니트로프로펜 6는 상업적으로 이용가능하고, 문헌에 공지되어 있다. 글루탐산 디에스테르를 3,3,3-트리플루오로-1-니트로프로펜 6에 스테레오조절 방식으로 아자-마이클(Aza-Michael) 첨가하였다(문헌 참조: M. Molteni et al., *Org. Lett.*, 2003, 5, 3887).

[0304]

반응식 3



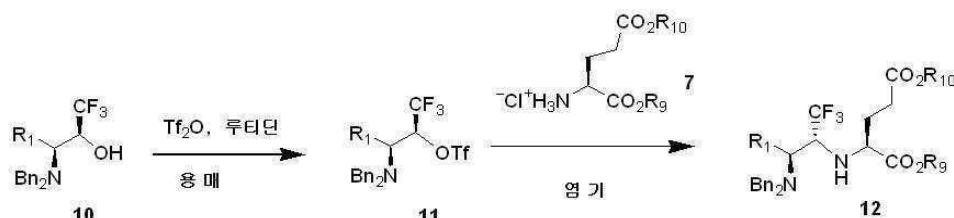
[0305]

[0306]

화학식 III_b의 화합물과 같은 Q가 상업적으로 이용가능하며, 문헌에 공지되어 있거나, 당해 분야의 숙련가에게 친근한 다양한 방법에 의해 편리하게 제조될 수 있다. 화학식 III[여기서, X는 트리플루오로메틸; Z는 질소; R₂는 알킬; Y, R₁ 및 R₃은 수소이다]을 합성하기 위한 일반적인 경로 중 하나는 반응식 4에 나타나 있다. 출발물질 10은 상업적으로 이용가능하고 문헌(참조: J. Andre et al., Eur. J. Org. Chem. 2004, 1558)에 공지되어 있다. 핵심 단계는 글루탐산 디에스테르 7로 치환된 입체특이성 S_N2 트리플레이트 11을 포함한다는 점이다. (문헌 참조: P. O'Shea et al., J. Org. Chem. 2009, 5, 1605).

[0307]

반응식 4



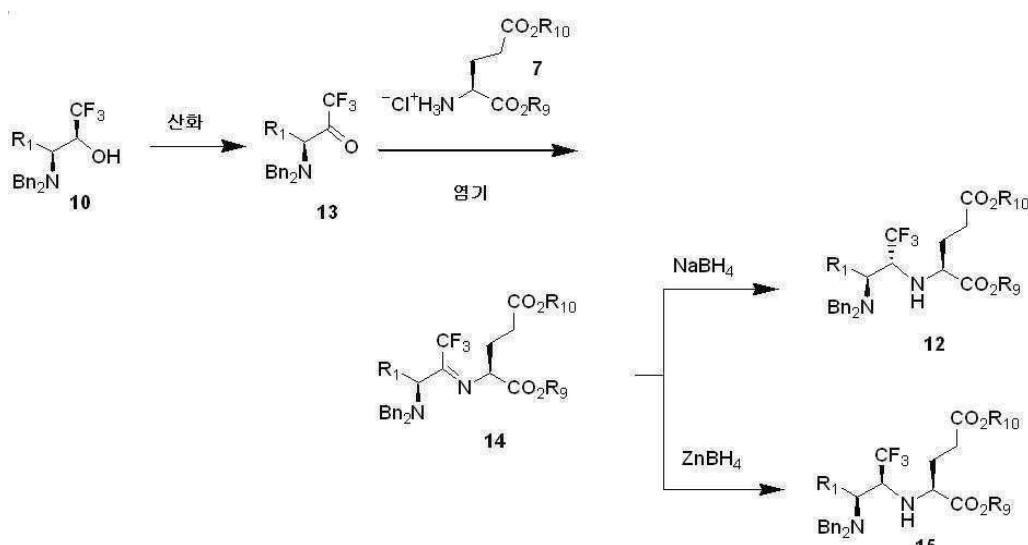
[0308]

[0309]

대안적으로, 화학식 IIIb의 화합물과 같은 Q는 다른 합성 경로[여기서, X는 트리플루오로메틸; Z는 질소; R₂는 알킬; Y, R₁ 및 R₃은 수소이다]로 제조되며, 아래 반응식 5에 나타나 있다. 핵심 출발 물질 10(문헌 참조: J. Andre et al., Eur. J. Org. Chem. 2004, 1558)을 산화하여 트리플루오로메틸케톤 13을 수득한다. 다음에 나타난 이민 형성은 염기의 존재로 완성된다. 최종 단계는 이민 14를 나트륨 보로하이드라이드 또는 아연 보로하이드라이드로 입체특이성 환원시켜 A의 기대하는 부분입체 이성체(diastereic isomer) 12 및 15를 수득함을 포함한다(문헌 참조: G. Huges et al., Angew Chem. Int. Ed. 2007, 46, 1839).

[0310]

반응식 5

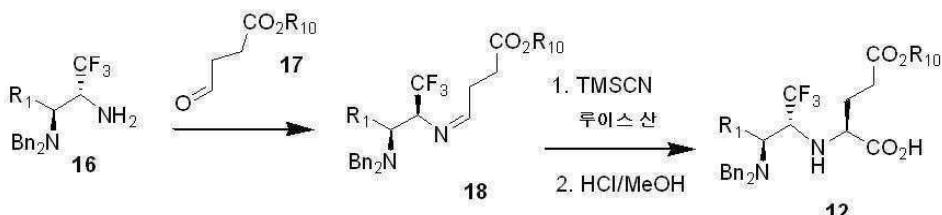


[0311]

[0312] 대안적으로, 화학식 IIIb의 화합물과 같은 Q는 다른 합성 경로[여기서, X는 트리플루오로메틸; Z는 질소; R₂는 알킬; Y, R₁ 및 R₃은 수소이다]가 아래 반응식 6에 나타나 있다. 공지된 출발 물질 디아민 16(문헌 참조: M. Mandal et al., *J. Am. Chem. Soc.* 2002, 6538)과 알데히드 17의 축합으로 이민 18을 수득한다. 이민 18을 TMSCN과 다음의 부분입체선택적 스트레커 타입(Strecker-type) 반응시켜 촉매량의 루이스산을 완성한다. 최종 단계는 시아노 중간체를 가수분해시켜 A의 기대하는 부분입체 이성체 12를 수득함을 포함한다.(문헌 참조: F. Huguennet et al., *J. Org. Chem.* 2006, 71, 7075).

[0313]

반응식 6

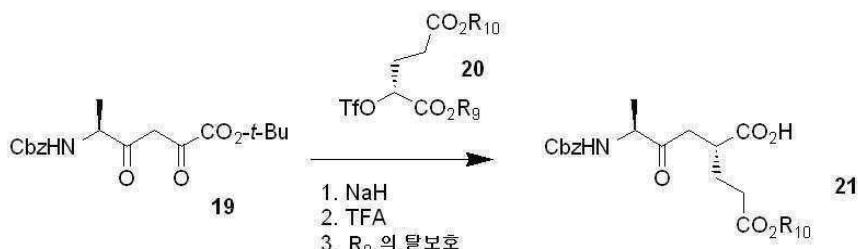


[0314]

[0315] 화학식 IV의 화합물과 같은 Q는 상업적으로 이용가능하며, 문헌에 공지되어 있거나, 당해 분야의 숙련가에게 친근한 다양한 방법에 의해 편리하게 제조될 수 있다. 화학식 IV[여기서, X는 산소; Z는 탄소; R₂는 알킬; W, Y, R₁ 및 R₃은 수소이다]의 화합물을 합성하기 위한 일반적인 경로 중 하나는 아래 반응식 7에 나타나 있다. 출발 물질 β -케토에스테르 19는 상업적으로 이용가능하고, 문헌(참조: R. Hoffman et al., *J. Org. Chem.* 1999, 64, 1558)에 공지되어 있다. β -케토에스테르 19를 트리플레이트 20로 알킬화시킨 다음, 탈카르복실화시키고, R₉를 탈보호시켜 케토메틸렌 이소에스테르 21을 수득한다(문헌 참조: R. Hoffman et al., *J. Org. Chem.* 1999, 64, 1558; P. S. Dragovich et al., *J. Med. Chem.* 1999, 42, 1203).

[0316]

반응식 7

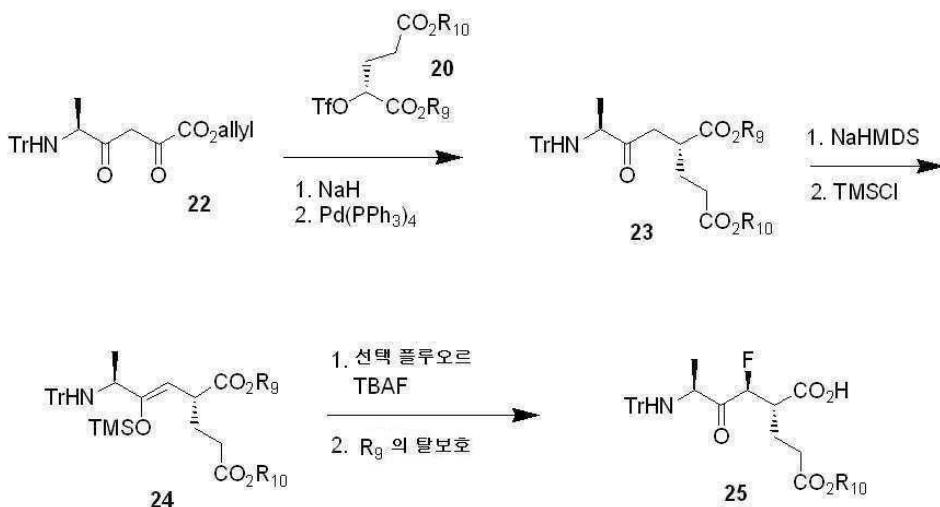


[0317]

[0318] 화학식 IV[여기서, X는 산소; Z는 탄소; R₂는 알킬; W는 불소; Y, R₁ 및 R₃은 수소이다]의 화합물과 같은 Q는 상업적으로 이용가능하며, 문헌에 공지되어 있거나, 당해 분야의 숙련가에게 친근한 다양한 방법에 의해 편리하게 제조될 수 있다. 화학식 IV를 합성하기 위한 일반적인 경로 중 하나는 아래 반응식 8에 나타나 있다. 출발 물질 트리틸화된 β -케토에스테르 22는 상업적으로 이용가능하거나, 문헌(참조: R. Hoffman et al., *J. Org. Chem.* 1999, 64, 1558)에 따라 제조된다. β -케토에스테르 22를 트리플레이트 20으로 알킬화한 다음, 탈카르복실화하여 케토메틸렌 이소에스테르 23을 수득하고, 이후 23을 상응하는 Z-TMS에놀에테르로 전환시키며, 선택플루오르(Selectfluor)로 불소화시키고, 최종 탈보호시켜 모노플루오로 케토메틸렌 이소에스테르 25(문헌 참조: R. Hoffman et al., *J. Org. Chem.* 1999, 64, 1558; P. S. Dragovich et al., *J. Med. Chem.* 1999, 42, 1203)를 수득한다.

[0319]

반응식 8



[0320]

일반

[0322]

MBHA 수지 상에 결합된 중간체 웹타이드 단편(fragment)은 MBHA 수지(제조원: 어플라이드 바이오시스템즈 인코 포레이션(Applied Biosystems Inc.), 제품 번호 A1A023, 0.77 mmol/g)를 사용하여 어플라이드 바이오시스템즈 (ABI) 460A 웹타이드 합성기로 고체상 웹타이드 화학법에 의해 제조할 수 있다. 모든 아미노산은 3급-부틸옥시 카보닐(t-Boc) 그룹으로 보호된 α -아미노산 그룹을 갖는다. 반응성 측쇄를 갖는 이들은 다음과 같이 보호된 아미노산을 갖는다: Arg (Tos); Lys (Cl-Z); Trp (CHO); Glu (CHex); Tyr (Br-Z); Ser (Bzl); Asp (OBzl); Thr (Bzl).

[0323]

보호된 아미노산은 아미노산의 당량당 디사이클로헥실카보디이미드(DCC)의 절반의 당량으로 디클로로메탄(DCM) 중에 활성화되어 아미노산의 대칭 무수물을 수득한다. 그러나, 아르기닌, 글루타민, 및 글라이신 잔기는 이들 아미노산(디메틸포름아미드(DMF) 중의 1:1:1 당량의 아미노산, HOEt, 및 DCC)의 1-하이드록시벤조트리아졸(HOBt)을 형성함으로써 활성화된다.

[0324]

잔기는 일련의 커플링 및 탈보호 주기와 함께, C-말단에서부터 N-말단으로 순차적으로 연결된다. 커플링 주기는 이미 커플링된 아미노산의 유리 1차 아민으로 친핵 치환된 활성화된 아미노산으로 구성된다. 탈보호는 무수 트리플루오로아세트산(TFA)으로 N-말단 블록킹 그룹(BOC)을 제거하는 것이다. 이는 디이소프로필에틸아민(DIEA)으로 중성화시킨 다음, 유리 아민 그룹을 생성한다.

[0325]

합성 규모는 0.5 mmol이다. MBHA-수지 상의 작용성 부위의 농도는 0.77 mmol/g으로, 649 mg의 수지를 사용하였다. 2배의 몰량을 초과하는 대칭 무수물은 모든 아미노산에 요구된다. C-말단 아르기닌을 표준 프로토콜을 통해 MBHA-수지와 커플링된다. 모든 잔기는 더블-커플링된다. 이는 각각의 잔기가 수지에 2회 커플링되어 수지 상에서 NH₂ 그룹의 완성된 반응을 확실히 한다. 2차 커플링은 아미노산을 재추가하기 전에 Boc 탈보호 그룹 단계를 거치지 않고 수행된다. 이는 수지의 모든 트리 아민 그룹이 완전히 반응하도록 돋는다. 트립토판 잔기는 4회 커플링된다. 각각의 더블-커플링 주기의 2차 커플링 단계 이후, 말단 Boc 그룹은 무수 TFA를 이용하여 제거된 다음, DIEA를 이용해 중화된다.

[0326]

트립토판 잔기 상의 포르밀 측쇄-블록킹 그룹을, 웹타이드를 수지로부터 분해하기 전에 DMF 내 피페리딘으로 제거한다. 웹타이드-수지를 50 mL 소결된 유리 깔때기로 옮긴 후, DCM 및 DMF로 수회 세척한다. 이후, 50/50 피페리딘/DMF 용액 3 mL 내지 5 mL를 웹타이드 수지에 가하여 즉시 커버시킨다. 5분 후, 피페리딘/DMF를 진공하에 제거한 다음, 피페리딘/DMF 3 mL 내지 5 mL를 가한다. 10분 후, 피페리딘/DMF를 다시 진공 여과로 제거한 다음, 피페리딘/DMF 15 mL 내지 20 mL를 가한다. 15분 후, 피페리딘/DMF를 제거한 다음, 웹타이드-수지를 DMF에 이어 DCM으로 수회 세척한다. 웹타이드-수지를 이후에 진공 오븐(열은 없음)에 위치시켜 용매를 제거한다.

[0327]

대안적으로, 요구되는 중합체-결합된 웹타이드 단편은 또한 보호된 Fmoc를 사용하여 제조될 수 있다. 링크 아미드(Rink Amide) MBHA 수지, Fmoc 보호된 아미노산, N,N-디메틸포름아미드(DMF) 용액 중 O-벤조트리아졸-1-일

-N, N, N', N'-테트라메틸-우로늄 혼사플루오로포스페이트(HBTU) 및 N-메틸 모르폴린(NMM)과의 활성화, 및 Fmoc 그룹을 피페리딘 탈보호시킨다(단계 1). 필요시, 수지를 CHCl₃: NMM: HOAc (18:1:0.5) 5 mL에 용해된 3당량의 Pd (PPh₃)₄의 용액으로 처리하여 Lys(Aloc) 그룹을 매뉴얼에 맞게 선택적 탈보호시킨다(단계 2). 이후, 수지를 CHCl₃(6x5 mL), DCM(6X5 mL) 중의 20% HOAc, DCM (6X5 mL), 및 DMF(6X5 mL)로 세척한다. 일부 경우에, 상기 합성을 AEEA(아미노에톡시에톡시아세트산) 그룹을 첨가하고, 아세트산 또는 3-말레이미도프로파온산(MPA)을 첨가하여 재자동화시킨다(단계 3). 85% TFA/5% TIS/5% 티오아니솔 및 5% 페놀을 사용하여 수지를 분해시키고 생성물을 분리한 다음, 건조-냉 Et₂O으로 침전시킨다(단계 4). 생성물을 바리안(Varian)(Rainin) 제조 바이너리 HPLC 시스템: Phenomenex Luna 10 μ 폐닐-헥실, 21mm x 25cm 칼럼 및 214 및 254 nm에서 UV 검출기(Varian Dynamax UVD II)를 사용하여 9.5 mL/분에서 180 분에 걸쳐 30-55% B(H₂O (A) 중의 0.045% TFA 및 CH₃CN (B) 중의 0.045% TFA)의 구배 용출로 제조 역상 HPLC로 정제하였다. 순도는, 다이오드 어레이 검출기가 장착된 휴렛 패커드(Hewlett Packard) LCMS-1100 시리즈 광학분광계 및 전기-스프레이 이온화기를 사용하여 RP-HPLC 질량 분광기로 95%로 측정되었다.

[0328] 보호 그룹은 자체 반응으로부터 웹타이드 유도체를 보호하는데 이용된 화학 잔기이다. 이러한 보호 그룹은 아세틸, 플루오레닐메틸옥시카보닐(FMOC), t-부틸옥시카보닐(Boc), 벤질옥시카보닐(CBZ) 등을 포함한다. 보호된 아미노산은 표 1에 구체적으로 나타나 있다.

[0329]

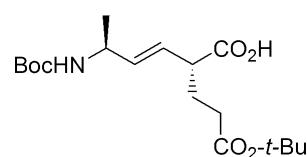
표 1

천연 아미노산 및 이의 약어

아미노산	3-글자 약어	1-글자 약어	보호된 아미노산
알라닌	Ala	A	Fmoc-Ala-OH
아르기닌	Arg	R	Fmoc-Arg (pbf)-OH
아스파라гин	Asn	N	Fmoc-Asn (Trt)-OH
아스파르트산	Asp	D	Fmoc-Asp (tBu)-OH
시스테인	Cys	C	Fmoc-Cys (Trt)-OH
글루탐산	Glu	E	Fmoc-Glu (tBu)-OH
글루타민	Gln	Q	Fmoc-Gln(Trt)-OH
글라이신	Gly	G	Fmoc-Gly-OH
히스티딘	His	H	Fmoc-His(Trt)-OH
이소루이신	Ile	I	Fmoc-Ile-OH
류신	Leu	L	Fmoc-Leu-OH
리신	Lys	K	Fmoc-Lys (Mt)-OH
메티오닌	Met	M	Fmoc-Met-OH
페닐알라닌	Phe	F	Fmoc-Phe-OH
프롤린	Pro	P	Fmoc-Pro-OH
세린	Ser	S	Fmoc-Ser (tBu)-OH
트레오닌	Thr	T	Fmoc-Thr (tBu)-OH
트립토판	Trp	W	Fmoc-Trp(Boc)-OH
티로신	Tyr	Y	Boc-Tyr(tBu)-OH
발린	Val	V	Fmoc-Val-OH

[0330]

[0331] Q-링커-a: 2S, 5R-2-(3-tert-부톡시카보닐아미노-부트-1-에닐)-펜탄디오익산 5-tert-부틸 에스테르의 제조



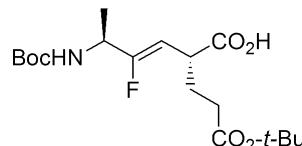
[0332]

[0333] 메탄올(2mL) 중의 2S, 5R-2-(3-tert-부톡시카보닐아미노-부트-1-에닐)-펜탄디오익산 5-3급-부틸 에스테르 1-메틸 에스테르(문헌 참조: *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*, 2001, 2445)(370mg, 1mmol)를 LiOH(1M, 2mL)로 실온에서 1시간 동안 처리한다. 대부분의 용매를 진공하에 증발시키고, 물(10mL)로 희석시키며, pH를 5로 조절한

다음, 수성 층을 에틸 아세테이트(3 X 30mL)로 추출하여 표제 생성물을 발포체(320mg, 90%)로서 수득하였다.

[0334] ^1H NMR δ 5.43(m, 1H), 5.33(dd, $J = 15.5, 5.2$ Hz, 1H), 4.59(d, $J = 7.6$ Hz, 1H), 3.88(m, 1H), 2.91(m, 1H), 2.25(m, 2H), 1.91-2.04(m, 1H), 1.67-1.80(m, 1H), 1.57(s, 9H), 1.47(s, 9H), 1.14(d, $J = 6.7$ Hz, 3H). LCMS 358($M^+ + 1$).

[0335] Q-링커-b: 2S, 5R-2-(3-tert-부톡시카보닐아미노-2-플루오로-부트-1-에닐)-펜탄디오익산 5-tert-부틸 에스테르의 제조



[0336]

단계 A: 2S, 5R-2-(3-tert-부톡시카보닐아미노-2-플루오로-부트-1-에닐)-펜탄디오익산 1-(S) 술탐의 제조

[0338] DMF(5mL) 중의 5-tert-부톡시카보닐아미노-4-플루오로-2-(3-하이드록시-프로필)-헥스-3-에노익산(S) 술탐(문헌 참조: *Tetrahedron*, 2008, 64, 4332)(502 mg, 1 mmol)에 PDC(파리디니움 디클로로메이트, 2.5 mmol)를 가하고, 생성된 용액을 실온에서 64시간 동안 교반시켰다. 생성된 혼합물을 염수(20mL)로 희석시키고, 에틸 아세테이트(3 X 20mL)로 추출하였다. 혼합된 유기 추출물을 MgSO_4 로 건조시킨 다음, 용매를 감압하에 증발시켰다. 잔기를 플래시 칼럼(flash column)으로 정제시켜 산을 발포체(425mg, 79%)로서 수득하고, 이를 추가의 정제없이 사용하였다.

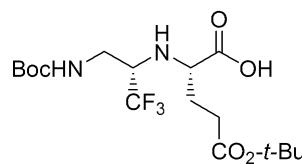
[0339] 단계 B: 2S, 5R-2-(3-tert-부톡시카보닐아미노-2-플루오로-부트-1-에닐)-펜탄디오익산 5-tert-부틸 에스테르 1-(S) 술탐의 제조

[0340] 디클로로메탄(10mL) 중의 단계 A(400mg, 0.75 mmol)로부터 제조된 2S, 5R-2-(3-tert-부톡시카보닐아미노-2-플루오로-부트-1-에닐)-펜탄디오익산 2-(S) 술탐을 tert-부탄올(0.5mL, 10 당량), DCC(1.5 mmol) 및 DMAP(1.5 mmol)로 처리하였다. 반응 혼합물을 염수(20mL)로 희석하기 전에 24시간 동안 교반시키고, 에틸 아세테이트(3 X 20mL)로 추출하였다. 혼합된 유기 추출물을 MgSO_4 로 건조시키고 용매를 감압하에 증발시켰다. 잔기를 플래시 칼럼으로 정제시켜 tert-부틸 에스테르를 발포체(425mg, 79%)로서 수득하였다. ^1H NMR δ 5.33(m, 1H), 4.54(m, 1H), 3.88(m, 1H), 3.37(s, 2H), 3.23(m, 1H), 2.25(m, 2H), 1.91-2.14(m, 4H), 1.67-1.80(m, 5H), 1.57(s, 9H), 1.47(d, $J = 7.6$ Hz, 3H), 1.18(s, 3H), 1.14(s, 3H). LCMS 574($M^+ + 1$).

[0341] 단계 C: 2S, 5R-2-(3-tert-부톡시카보닐아미노-2-플루오로-부트-1-에닐)-펜탄디오익산 5-tert-부틸 에스테르의 제조

[0342] THF-H₂O(5:1, 12mL) 중의 단계 B(410mg, 0.72 mmol)로부터 제조된 tert-부틸 에스테르 및 수성 50% H_2O_2 (260mL, 3.6 mmol)의 용액에 0°C에서 LiOH(1N, 1.44mL)를 가한 다음, 혼합물을 실온에서 2시간 동안 교반하였다. pH를 5로 조절한 후, 혼합물을 에틸 아세테이트(3 X 15mL)로 추출하였다. 혼합된 유기 추출물을 염수로 세척한 다음, MgSO_4 로 건조시켰다. 용매를 감압하에 증발시켜 상응하는 산을 발포체(262mg, 95%)로서 수득하였다. ^1H NMR δ 5.23(m, 1H), 4.45(m, 1H), 3.11(m, 1H), 2.45(m, 2H), 2.24(m, 2H), 1.52(s, 9H), 1.47(s, 9H). LCMS 376($M^+ + 1$).

[0343] Q-링커-c: 2R, 5R 2-[1-(tert-부톡시카보닐아미노-메틸)-2,2,2-트리플루오로-에틸아미노]-펜탄디오익산 5-tert-부틸 에스테르의 제조

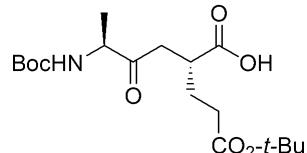


[0344]

- [0345] 단계A: 2R, 5R 2-[1-(tert-부톡시카보닐아미노-메틸)-2,2,2-트리플루오로-에틸아미노]-펜탄디오익산 5-tert-부틸 에스테르 1-메틸 에스테르의 제조
- [0346] 디클로로메탄(15mL) 중의 2-(1-아미노메틸-2,2,2-트리플루오로-에틸아미노)-펜탄디오익산 5-tert-부틸 에스테르 1-메틸 에스테르 염산염(문헌 참조: *Org. Lett.*, 2003, 5, 3887)(364 mg, 1 mol) 및 Boc_2O (260mg, 1.2 mmol)의 용액에 0°C에서 디클로로메탄(1mL) 중의 DIPEA(0.2mL, 1.5 mmol)의 용액을 가한 다음, 혼합물을 실온에서 6시간 동안 교반하였다. 혼합물을 에틸 아세테이트(30mL)로 희석하였다. 혼합물을 0.1N HCl, 염수로 세척하고, MgSO_4 로 건조시켰다. 용매를 감압하에 증발시킨 다음, FC를 수행하여 상응하는 디-에스테르를 밸포체(420mg, 85%)로서 수득하였다. ^1H NMR δ 4.54(m, 1H), 4.12(m, 1H), 3.68(s, 3H), 3.45(m, 1H), 3.11(m, 2H), 2.45(m, 2H), 2.24(m, 2H), 1.52(s, 9H), 1.47(s, 9H). LCMS $430(\text{M}^{\dagger}+1)$, 330 ($\text{M}^{\dagger}1\text{-3급-Bu}$).
- [0347] 단계B: 2R, 5R 2-[1-(tert-부톡시카보닐아미노-메틸)-2,2,2-트리플루오로-에틸아미노]-펜탄디오익산 5-tert-부틸 에스테르의 제조
- [0348] THF- H_2O (5:1, 12mL) 중의 단계 A로부터 제조된 tert-부틸 에스테르(420mg, 0.92 mmol)의 용액에 0°C에서 LiOH(1N, 1.44mL)를 가한 다음, 혼합물을 실온에서 2시간 동안 교반하였다. pH를 5로 조절한 후, 혼합물을 에틸 아세테이트(3 X 15mL)로 추출하였다. 혼합된 유기 추출물을 염수로 세척한 다음, MgSO_4 로 건조시켰다. 용매를 감압하에 증발시켜 상응하는 산을 밸포체(362mg, 92%)로서 수득하였다. ^1H NMR δ 4.50(m, 1H), 4.08(m, 1H), 3.45(m, 1H), 3.11(m, 2H), 2.45(m, 2H), 2.24(m, 2H), 1.52(s, 9H), 1.47(s, 9H). LCMS $430(\text{M}^{\dagger}+1)$, 330 ($\text{M}^{\dagger}1\text{-3급-Bu}$).
- [0349] Q-링커-d: 2R-2-(1S, 2S-2-tert-부톡시카보닐아미노-1-트리플루오로-메틸-프로필아미노)-펜탄디오익산 5-tert-부틸 에스테르의 제조
- [0350]
- [0351] 단계 A: 2S, 3S-3-디벤질아미노-1,1,1-트리플루오로부탄-2-트리플루오로메탄술포네이트의 제조
- [0352] c-헥산(25mL) 중의 2S, 3S-3-디벤질아미노-1,1,1-트리플루오로-부탄-2-올(문헌 참조: *Eur. J. Org. Chem.* 2004, 1558)(3.23g, 10 mmol) 및 2,6-루티딘(1.7 g, 16 mmol)의 용액에 -10°C에서 10°C 이하의 온도를 유지하는 비율로 트리플릭 무수물(4.2g, 15 mmol)을 가한 다음, 반응을 1.5 시간 동안 유지하였다. 반응 혼합물을 물(25mL) 및 c-헥산(50mL)으로 희석하였다. 유기 층을 1N HCl(2 X 15mL) 및 염수(15mL)로 세척하였다. MgSO_4 로 건조시킨 후, 용매를 감압하에 증발시켜 상응하는 트리플루오로메탄술포네이트(4.34g, 96%)를 수득하였다.
- [0353] 단계 B: 2S-2-(1S, 2S-2-디벤질아미노-1-트리플루오로메틸-프로필아미노)-펜탄디오익산 1-벤질 에스테르 5-tert-부틸 에스테르의 제조
- [0354] 탄산 칼륨(2.08g, 15 mmol)을 단계 A(4.55g, 10 mmol)로부터 제조된 트리플레이트, c-헥산(25mL)의 용액에 가하였다. 혼합물을 65 내지 70°C로 24시간 동안 가열하였다. 혼합물을 실온으로 냉각시킨 다음, 물(25mL) 및 c-헥산(50mL)으로 희석시킨 후, 혼합물을 10분 동안 교반하였다. 층을 분리시킨 후, 유기 층을 1N HCl(2 X 15mL) 및 염수(15mL)로 세척하였다. MgSO_4 로 건조시킨 후, 용매를 감압하에 증발시켜 상응하는 에스테르(5.88g, 95%)를 수득하였다.
- [0355] 단계 C: 2R-2-(1S, 2S-2-tert-부톡시카보닐아미노-1-트리플루오로메틸프로필아미노)-펜탄디오익산 5-tert-부틸 에스테르의 제조
- [0356] 단계 B(5.4g, 9 mmol)로부터 수득한 2S-2-(1S, 2S-2-디벤질아미노-1-트리플루오로메틸-프로필아미노)-펜탄디오익산 1-벤질 에스테르 5-tert-부틸 에스테르의 용액의 수소화를 메탄올(50mL) 및 Pd/C(0.9g) 중에 50Psi에서 24

시간 동안 수행하였다. 여과시켜 촉매를 제거한 후, 여액을 진공하에 농축시켰다. 잔기를 디클로로메탄(50mL) 중에 용해시키고, 디클로로메탄(25mL) 중의 Boc_2O (2.60g, 12 mmol)로 0°C에서 처리한 다음, 디클로로메탄(10mL) 중의 DIPEA(2mL, 15 mmol)의 용액을 가하고, 혼합물을 실온에서 6시간 동안 교반하였다. 혼합물을 에틸 아세테이트(60mL)로 희석하였다. 혼합물을 0.1N HCl, 염수로 세척하고, MgSO_4 로 건조시켰다. 용매를 감압하에 증발시키고 FC를 수행하여 상응하는 표제 화합물을 발포체로서 수득하였다.

[0357] Q-링커-e: 2S-2-(3S-3-tert-부톡시카보닐아미노-2-옥소-부틸)-펜탄디오익산 5-tert-부틸 에스테르의 제조

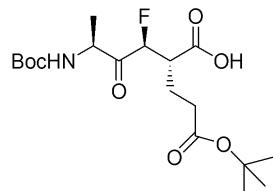


[0358]

THF-H₂O(5:1, 12mL) 중의 2S-2-(3S-3-tert-부톡시카보닐아미노-2-옥소-부틸)-펜탄디오익산 5-tert-부틸 에스테르 1-메틸 에스테르(문헌 참조: *J. Med. Chem.* 1999, 42, 1203; *Bioorg. Med. Chem.* 2005, 13, 5240)(387 mg, 1 mmol)의 용액에 0°C에서 LiOH(1N, 1.44mL)를 가한 다음, 혼합물을 실온에서 2시간 동안 교반하였다. pH를 5로 조절한 후, 혼합물을 에틸 아세테이트(3 X 15mL)로 추출하였다. 혼합된 유기 추출물을 염수로 세척한 다음, MgSO_4 로 건조시켰다. 용매를 감압하에 증발시켜 상응하는 산을 발포체(362mg, 92%)로서 수득하였다. ¹H NMR δ 4.63 (m, 1H), 4.38 (br, 1H), 2.68 (d, *J* = 7.6 Hz, 2H), 2.58 (m, 1H), 2.25 (dd, *J* = 12.3, 7.6 Hz, 2H), 1.92 (m, 2H), 1.49 (s, 9H), 1.47 (s, 9H), 1.41 (d, *J* = 7.6 Hz, 3H). LCMS 374 ($M^+ + 1$), 274 ($M^+ - 1$ -tert-Bu).

[0360]

Q-링커-f: 2R-2-(1S, 3S-3-tert-부톡시카보닐아미노-1-플루오로-2-옥소-부틸)-펜탄디오익산 5-tert-부틸 에스테르의 제조



[0361]

단계 A: 2S-2-(1S, 3S-3-tert-부톡시카보닐아미노-1-플루오로-2-옥소-부틸)-펜탄디오익산 5-tert-부틸 에스테르 1-메틸 에스테르의 제조

[0363]

메탄올(25mL) 중의 2S-2-[1S, 3S-플루오로-2-옥소-3-(트리틸-아미노)-부틸]-펜탄디오익산 5-벤질 에스테르 1-메틸 에스테르(581mg, 1 mmol) 및 10% Pd/C (100mg)를 파르 쉐이커(*parr shaker*) 50*PSi*에서 6시간 동안 수소화반응시켰다. 촉매를 셀라이트를 통해 여과시켜 제거하였다. 여액을 농축시켰다. 잔기를 디옥산(25mL) 중에 용해시키고 1N NaOH 용액(1.2mL)으로 처리하였다. 디옥산(2mL) 중의 Boc_2O (238mg, 1.1 mmol)를 상기 용액에 0°C에서 가한 다음, 혼합물을 실온에서 6시간 동안 교반하였다. 혼합물을 에틸 아세테이트(30mL)로 희석하였다. 혼합물을 0.1N HCl, 염수로 세척한 다음, MgSO_4 로 건조시켰다. 용매를 감압하에 증발시켰다. 잔기를 디클로로메탄(10mL) 중에 용해시키고, tert-부탄올(0.5mL, 10 당량), DCC(1.5 mmol) 및 DMAP(1.5 mmol)로 처리하였다. 반응 혼합물을 염수(20mL)로 희석시키기 전에 24시간 동안 교반시키고 에틸 아세테이트(3 X 20mL)로 추출하였다. 혼합된 유기 추출물을 MgSO_4 로 건조시키고, 용매를 감압하에 증발시켰다. 잔기를 플래시 칼럼으로 정제시켜 tert-부틸 에스테르를 발포체(315mg, 66%)로서 수득하였다. ¹H NMR δ 4.81 (m, 1H), 4.63 (m, 1H), 4.38 (br, 1H), 3.67 (s, 3H), 2.78 (m, 1H), 2.35 (dd, *J* = 12.3, 7.6 Hz, 2H), 2.06 (m, 2H), 1.49 (s, 9H), 1.47 (s, 9H), 1.41 (d, *J* = 7.6 Hz, 3H). LCMS 406 ($M^+ + 1$), 306 ($M^+ - 1$ -tert-Bu).

[0364]

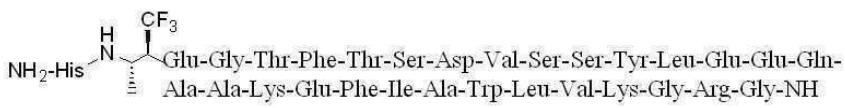
단계 B: 2S-2-(1S, 3S-3-tert-부톡시카보닐아미노-1-플루오로-2-옥소-부틸)-펜탄디오익산 5-tert-부틸 에스테르

의 제조

[0365]

THF-H₂O(5:1, 12mL) 중의 단계 A(260mg, 0.65 mmol)로부터 제조된 2S-2-(1*S*, 3*S*-3-tert-부톡시카보닐아미노-1-플루오로-2-옥소-부틸)-펜탄디오익산 5-tert-부틸 에스테르 1-메틸 에스테르에 0°C에서 LiOH(1N, 1.0mL)를 가한 다음, 혼합물을 실온에서 2시간 동안 교반하였다. pH를 5로 조절한 후, 혼합물을 에틸 아세테이트(3 X 15mL)로 추출하였다. 혼합된 유기 추출물을 염수로 세척하고, MgSO₄로 건조시켰다. 용매를 감압하에 증발시켜 상응하는 산을 발포체(238mg, 95%)로서 수득하였다. ¹H NMR δ 4.81 (m, 1H), 4.63 (m, 1H), 4.38 (br, 1H), 2.78 (m, 1H), 2.35 (dd, *J* = 12.3, 7.6 Hz, 2H), 2.06 (m, 2H), 1.49 (s, 9H), 1.47 (s, 9H), 1.41 (d, *J* = 7.6 Hz, 3H). LCMS 392 (M⁺+1), 292 (M⁺-1-tert-Bu).

실시예 1



[0366]

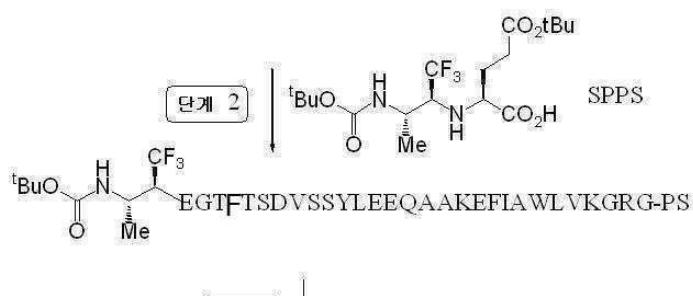
[Q-링커-d8, Glu22]GLP-1-(7-37)-펩타이드의 합성

[0368]

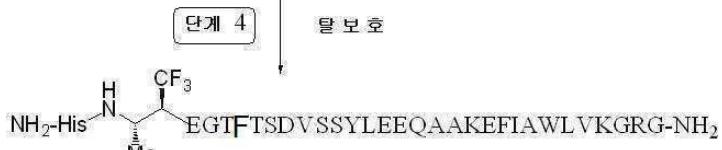
단계 1

Fmoc- 링크 아미드 MBHA 수지

단계 1 ↓ SPPS

H₂N-GTFTSDVSSYLEEQAAKEFIAWLVKGRG-PS

단계 3 ↓ Fmoc-His(Trt)-OH SPPS



[0369]

[0370]

100 μmole 규모로 유사체의 고체상 펩타이드 합성을, 고체상 합성 매뉴얼, 및 Fmoc 보호된 링크 아미드 MBHA 수지, Fmoc 보호된 아미노산, N, N-디메틸포름아미드(DMF) 용액 중 O-벤조트리아졸-1-일-N,N,N',N'-테트라메틸-우로늄 혼합액(HBTU)을 사용하는 심포니 펩타이드 합성기(Symphony Peptide Synthesizer)를 사용하여 수행하고, N-메틸 모르폴린(NMM)으로 활성화시킨 다음, Fmoc 그룹을 피페리딘 탈보호시켰다(단계 1). 단계 2의 생성물 중에 Boc 그룹을, Fmoc-His(Trt)-OH로 커플링시키기 전에 분해시켰다. 수지 분해 및 생성물 분리율, 85% TFA/5% TIS/5% 티오아니솔 및 5% 폐놀을 사용하여 수행한 다음, 건조-냉 Et₂O으로 침전시켰다(단계 2). 생성물을 바리안(Rainin) 제조 바이너리 HPLC 시스템: Phenomenex Luna 10 μ 페닐-헥실, 21mm x 25cm 칼

럼 및 λ 214 및 254 nm에서 UV 검출기(Varien Dynamax UVD II)를 사용하여 9.5 mL/분에서 180 분에 걸쳐 30-55%B(H_2O (A) 중의 0.045% TFA 및 CH_3CN (B) 중의 0.045% TFA)의 구배 용출로 제조 역상 HPLC로 정제하여 목적하는 펩타이드를 RP-HPLC로 측정한 결과 95%를 초과하는 순도로 수득하였다.

[0371]

Maldi-Tof MS: 3412. 계산치 MS: 3412.

실시 예 2



[0372]

[Q-렁커-a8-9, Glu22]GLP-1-(7-37)-펩타이드의 합성

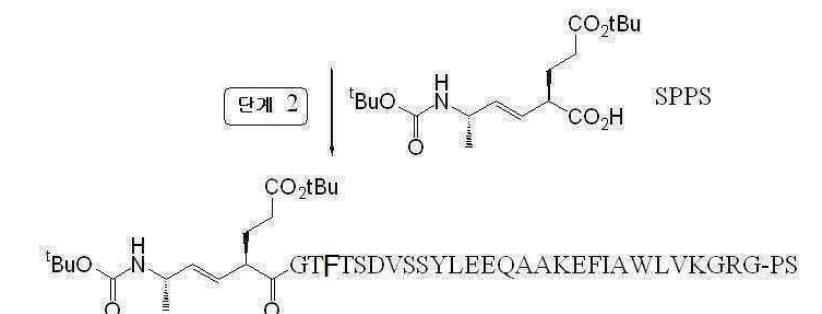
[0374]

단계 1

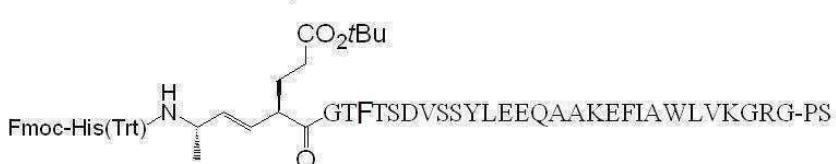
Fmoc- 렁크 아미드 MBHA 수지

단계 1 ↓ SPPS

$H_2N\text{-GTFSDVSSYLEEQAAKEFIAWLVKG}RG\text{-PS}$

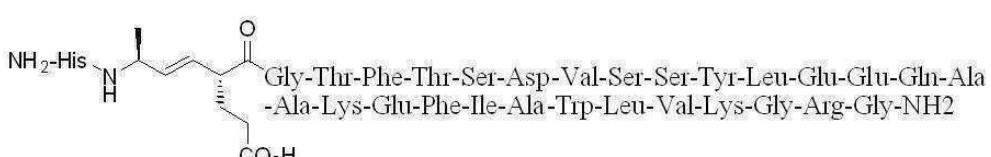


단계 2 ↓ Fmoc-Arg(Pbf)-OH SPPS



[0375]

단계 4 ↓ 풀보호



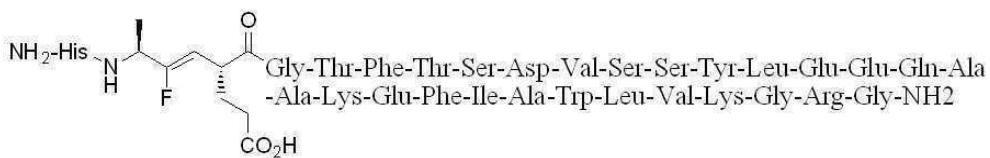
[0376]

목적하는 GLP-1 유사체를 실시 예 1에 기재된 것과 같은 동일한 순서 및 조건을 사용하여 합성하였다.

[0377]

LCMS: $1113 (M+3H)^{3+}$. 계산치 MS: $1113 (M+3H)^{3+}$.

실시 예 3

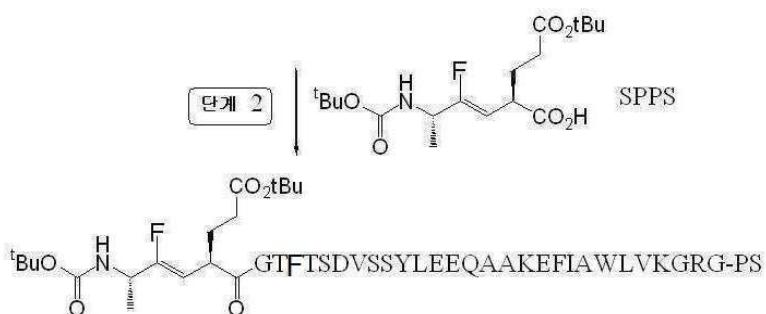


[0380] [Q-링커-b8-9, Glu22]GLP-1-(7-37)-펩타이드의 합성

[0381] 단계 1

Fmoc-링크 아미드 MBHA 수지

단계 1 ↓ SPPS

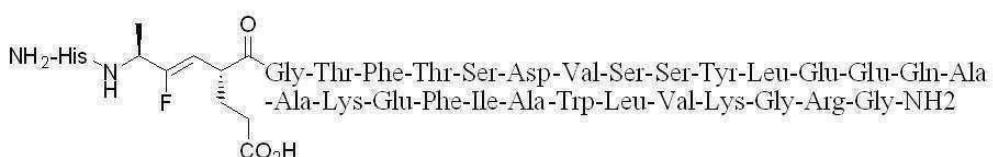
 $\text{H}_2\text{N-GTFTSDVSSYLEEQAKEFIAWLVKGRG-PS}$ 

[0382]

단계 3 ↓ Fmoc-His(Trt)-OH SPPS



단계 4 ↓ 탈보호

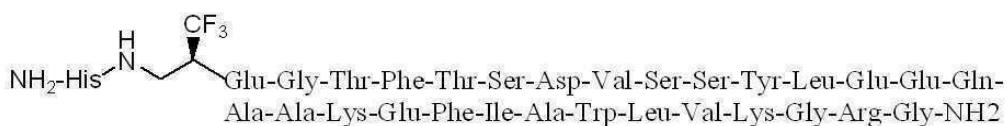


[0383]

[0384] 목적하는 GLP-1 유사체를 실시예 1에 기재된 것과 같은 동일한 순서 및 조건을 사용하여 합성하였다.

[0385] LCMS: $1119 (\text{M}+3\text{H})^{3+}$. 계산치 MS: $1119 (\text{M}+3\text{H})^{3+}$.

실시예 4



[0387] [Q-링커-c8, Glu22]GLP-1-(7-37)-펩타이드의 합성

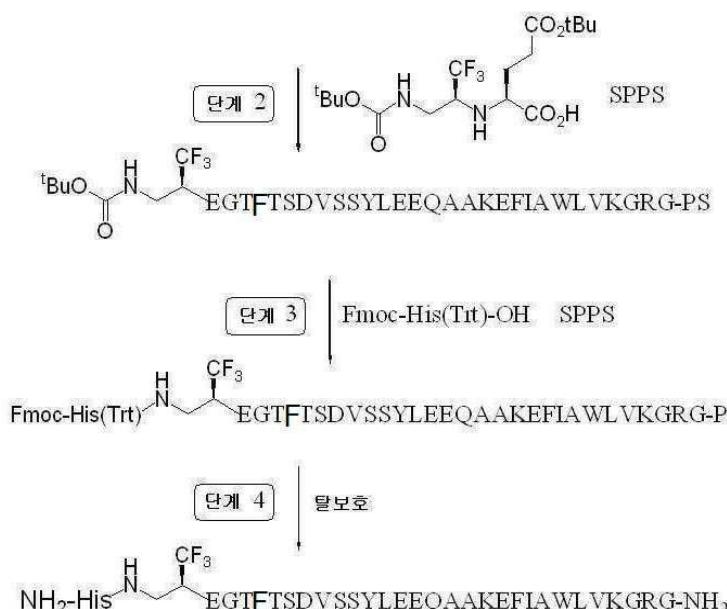
[0388] 단계 1

Fmoc-링크 아미드 MBHA 수지

단계 1 ↓ SPPS

H₂N-GTFTSDVSSYLEGQAAKEFIAWLVKGRG-PS

[0389]

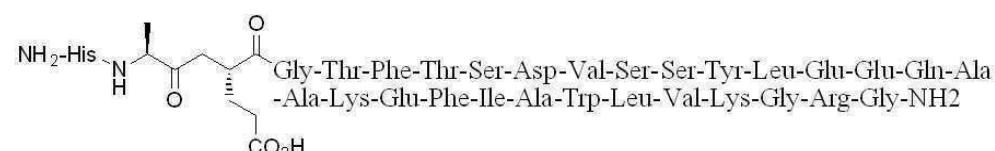


[0390]

[0391] 목적하는 GLP-1 유사체를 실시예 1에 기재된 것과 같은 동일한 순서 및 조건을 사용하여 합성하였다.

[0392] Maldi-Tof MS: 3398. 계산치 MS: 3398.

실시예 5



[0394] [Q-링커-e8-9, Glu22]GLP-1-(7-37)-펩타이드의 합성

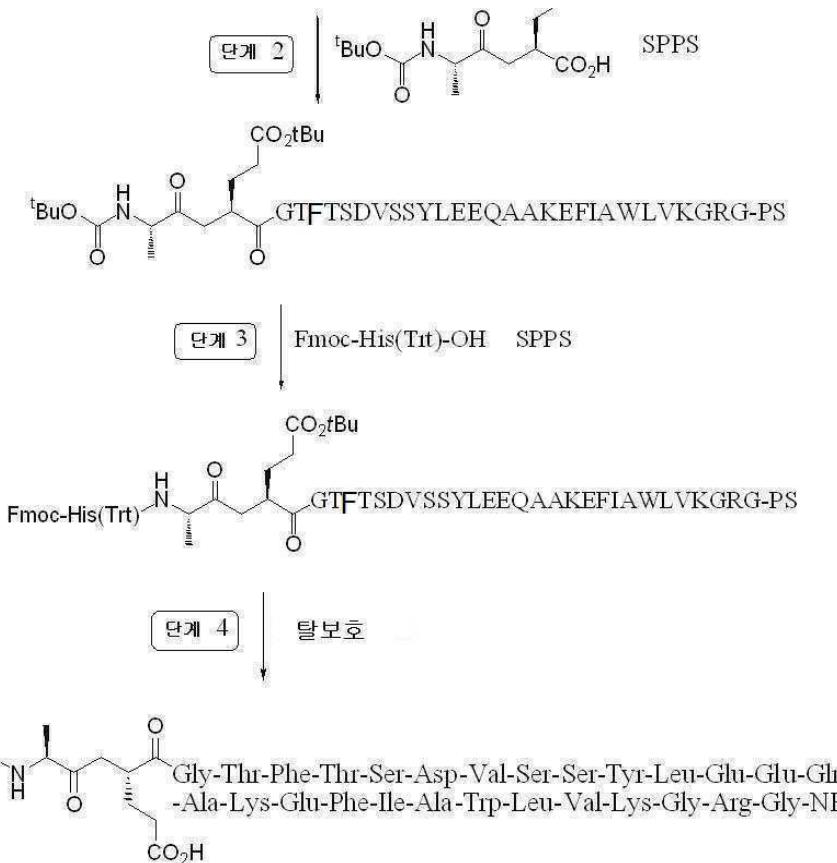
[0395] 단계 1

Fmoc-링크 아미드 MBHA 수지

단계 1 ↓ SPPS

H₂N-GTFTSDVSSYLEEQAQEFIAWLVKGRG-PS

[0396]



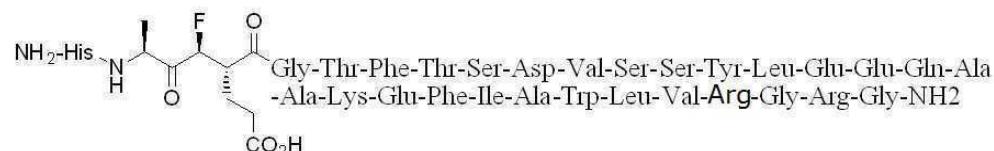
[0397]

[0398] 목적하는 GLP-1 유사체를 실시예 1에 기재된 것과 같은 동일한 순서 및 조건을 사용하여 합성하였다.

[0399]

LCMS: 1118 ($M+3H$)³⁺. 계산치 MS: 1118 ($M+3H$)³⁺.

실시예 6



[0401]

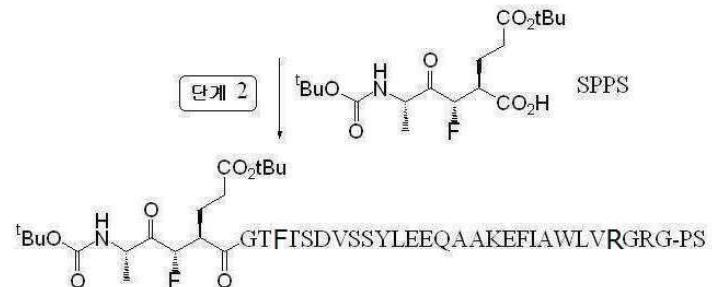
[Q-링커-f8-9, Arg34]GLP-1-(7-37)-펩타이드의 합성

[0402]

단계 1

Fmoc-링크 아미드 MBHA 수지

단계 1 ↓ SPPS

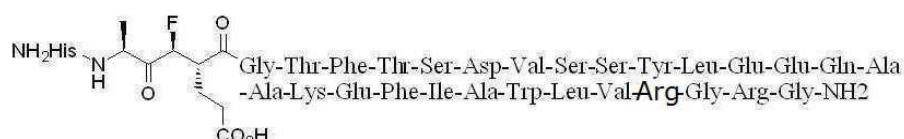


단계 3 Emoc-His(Trit)-OH SPPS



[0403]

단계 4



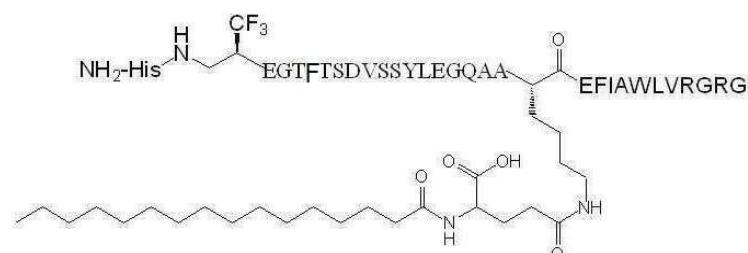
[0405]

목적하는 GLP-1 유사체를 실시에 1에 기재된 것과 같은 통일한 순서 및 조건을 사용하여 환성하였다.

[0406]

[LCMS: 1127 ($M+3H$)³⁺] 계산치 MS: 1127 ($M+3H$)³⁺

실시 예 7



[0408]

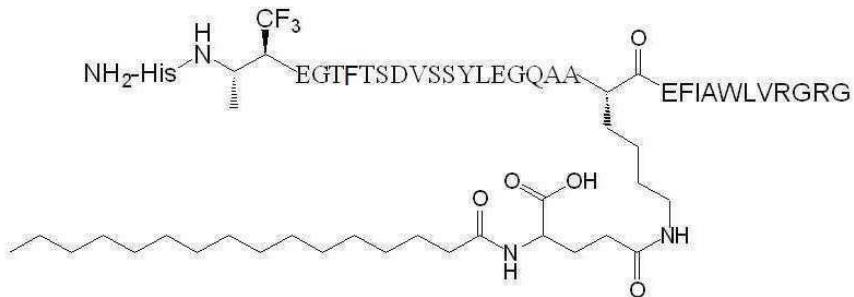
$N^{\perp} \varepsilon^{26} = [\chi - L\text{-글루타밀}(N^{\perp} \text{a-헥사데카노일})] - [Q\text{-링커-c8.Arg34}] \text{GLP-1-(7-37)-펩타이드의 혼성}$

[0409]

[A-링커-c8,Arg34]GLP-1-OH(36 mg, 11 μmol), EDPA(4.0 mg, 30.8 μmol), 아세토니트릴(260 μl) 및 물(260 μl)의 혼합물을 5 mm 동안 실온에서 부드럽게 진탕시켰다. 생성된 혼합물에 아세토니트릴(44.2 μl) 중의 N^{α} -헥사데카노일-Glu(ONSu)-OBu^t(1.8 mg, 3.3 μmol)의 용액을 가하고, 반응 혼합물을 1시간 20분 동안 실온에서 부드럽게 진탕시켰다. 반응물을 50% 수성 에탄올(181 μl) 중의 글라이신(1.8 mg, 24.2 μmol) 용액을 가하여 퀸

칭하였다. 암모늄-아세테이트(12 ml)의 0.5 % 수용액 및 NMP(300 μ l)를 가하고, 생성한 혼합물을 바리안(Varian) 1g C8 Mega Bond Elut[®] 카트리지 위로 용출시키고, 고정된 화합물을 5% 수성 아세토니트릴(10 ml)로 세척한 다음, 최종적으로 TFA(6 ml)로 용출시켜 카트리지로부터 분리시켰다. 용출물을 2시간 동안 실온에서 정 치시킨 다음, 진공하에 농축시켰다. 잔기를 칼럼 크로마토그래피 및 표준 아세토니트릴/TFA 시스템으로 정제시 켰다. 표제 화합물(12 mg, 46 %)을 분리시키고, 생성물을 PDMS로 분석하였다. 양자화된 분자 이온에 대한 m/z 값은 3790±3으로 밝혀졌다. 이에 따라, 생성물의 분자량은 3790±3 amu(이론치 3751 amu)이었다.

실시 예 8



[0410]

N- ϵ ²⁶-[γ -L-글루타밀(*N*- α -헥사데카노일)]-[Q-링커-d8,Arg34]GLP-1-(7-37)-펩타이드의 합성

[0412]

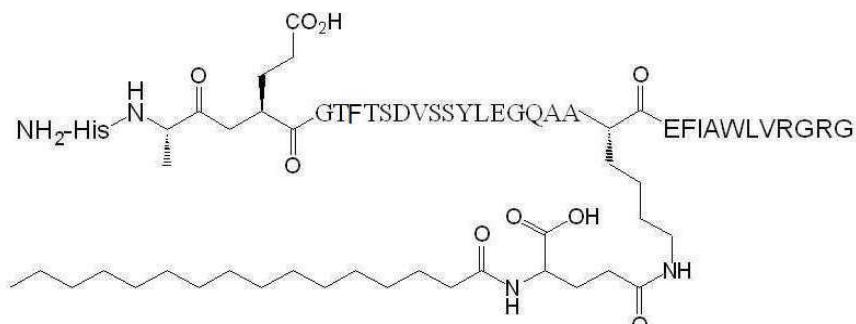
목적하는 GLP-1 유사체를 실시예 7에 기재된 것과 같은 동일한 순서 및 조건을 사용하여 합성하였다.

[0413]

LCMS: 1268 ($M+3H$)³⁺. 계산치 MS: 1268 ($M+3H$)³⁺.

실시 예 9

N- ϵ ²⁶-[γ -L-글루타밀(*N*- α -헥사데카노일)]-[Q-링커-e8-9,Arg34]GLP-1-(7-37)-펩타이드의 합성



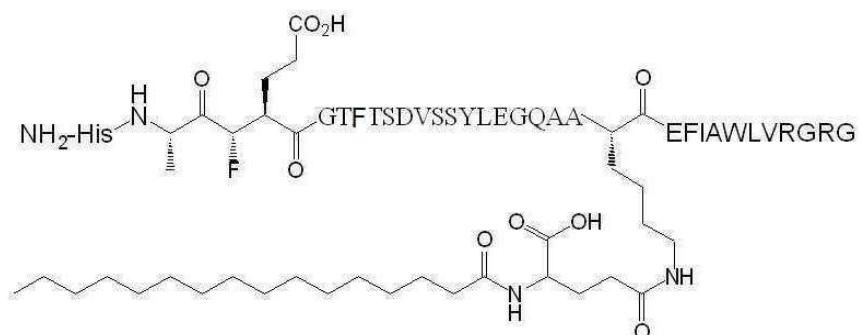
[0415]

목적하는 GLP-1 유사체를 실시예 7에 기재된 것과 같은 동일한 순서 및 조건을 사용하여 합성하였다.

[0417]

LCMS: 1250 ($M+3H$)³⁺. 계산치 MS: 1250 ($M+3H$)³⁺.

실시예 10



[0418]

[0419] $N-\epsilon^{26}-[\gamma-L\text{-글루타밀}(N\text{-}\alpha\text{-헥사데카노일})]-[Q\text{-링커-}f8\text{-9,Arg34}]GLP-1\text{-(7-37)-펩타이드}$ 의 합성

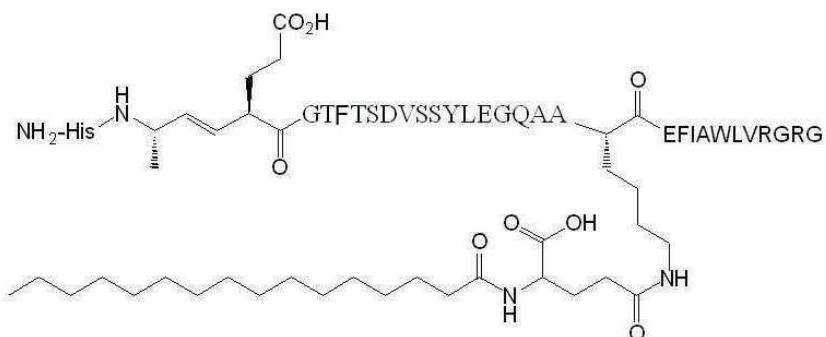
[0420]

목적하는 GLP-1 유사체를 실시예 7에 기재된 것과 같은 동일한 순서 및 조건을 사용하여 합성하였다.

[0421]

LCMS: 1256 ($M+3H$)³⁺. 계산치 MS: 1256 ($M+3H$)³⁺.

실시예 11



[0422]

[0423] $N-\epsilon^{26}-[\gamma-L\text{-글루타밀}(N\text{-}\alpha\text{-헥사데카노일})]-[Q\text{-링커-}a8\text{-9,Arg34}]GLP-1\text{-(7-37)-펩타이드}$ 의 합성

[0424]

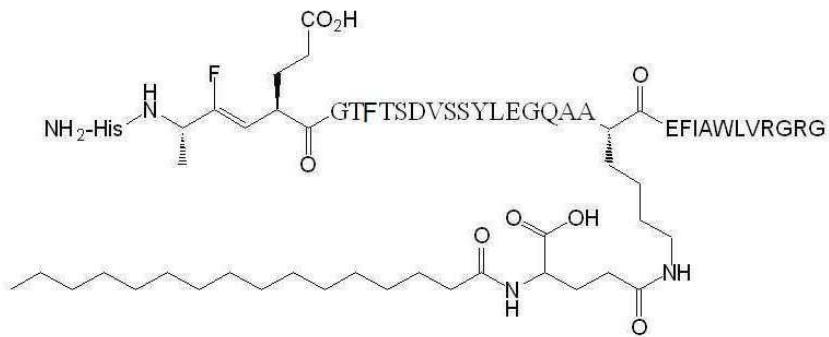
목적하는 GLP-1 유사체를 실시예 7에 기재된 것과 같은 동일한 순서 및 조건을 사용하여 합성하였다.

[0425]

LCMS: 1244 ($M+3H$)³⁺. 계산치 MS: 1244 ($M+3H$)³⁺.

실시예 12

[0426]

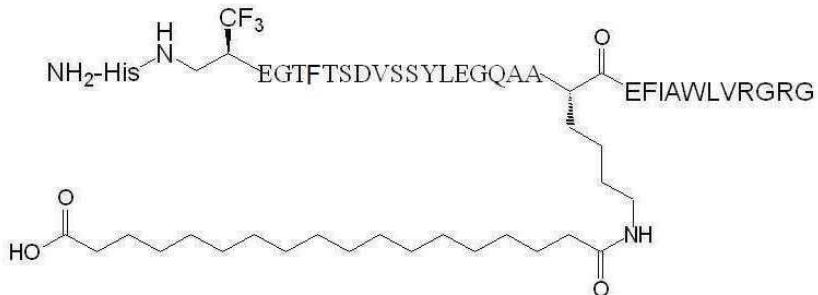
[0426] $N-\epsilon^{26}-[\gamma-L\text{-글루타밀}(N\text{-}\alpha\text{-헥사데카노일})]-[Q\text{-링커-}b8\text{-9,Arg34}]GLP-1\text{-(7-37)-펩타이드}$ 의 합성

[0427]

목적하는 GLP-1 유사체를 실시예 7에 기재된 것과 같은 동일한 순서 및 조건을 사용하여 합성하였다.

[0429] LCMS: 1250 ($M+3H$)³⁺. 계산치 MS: 1250 ($M+3H$)³⁺.

실시예 13



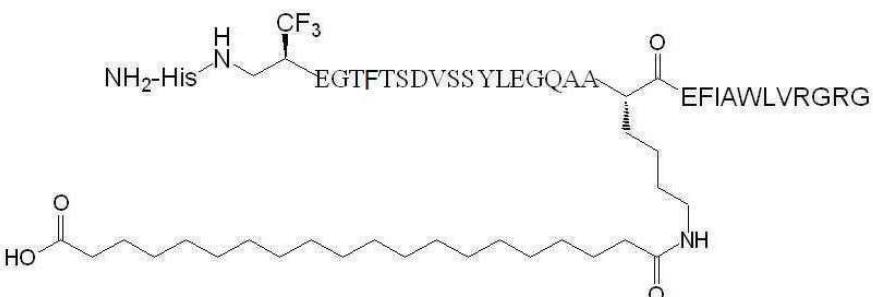
[0430]

[0431] $N^{26} - [N^{\varepsilon} - \omega - \text{카르복시헵타데카노일}] - [\text{Q-링}-\text{C8}, \text{Arg34}] \text{GLP-1-(7-37)-펩타이드의 합성}$

[0432] 목적하는 GLP-1 유사체를, 실시예 7에 기재된 것과 같은 동일한 순서 및 조건을 사용하고 N^{α} -헥사데카노일-Glu(ONSu)-OBu^t 대신 출발 물질로서 ω -카르복시헵타데카노익산 2,5-디옥소페롤리딘-1-일 에스테르를 사용하여 합성하였다.

[0433] LCMS: 1239 ($M+3H$)³⁺. 계산치 MS: 1239 ($M+3H$)³⁺.

실시예 14



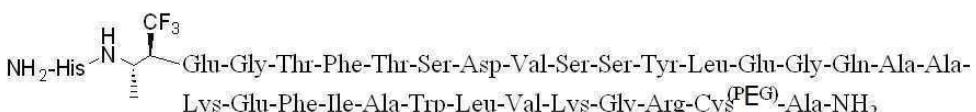
[0434]

[0435] $N^{26} - [(N^e_{-0}-\text{카르복시노나데카노일})] - [Q-\text{링커}-c8.\text{Arg34}]GP-1-(7-37)-\text{펩타이드의 협성}$

[0436] 목적하는 GLP-1 유사체를, 실시예 7에 기재된 것과 같은 동일한 순서 및 조건을 사용하고 N^{α} -헥사데카노일-Glu(ONSu)-OBu^t 대신 출발 물질로서 ω -카르복시노나데카노익산 2,5-디옥소페롤리딘-1-일 에스테르를 사용하여 합성하였다.

[0437] LCMS: 1249 ($M \pm 3H$)³⁺ 계산치 MS: 1249 ($M \pm 3H$)³⁺

식시예 15



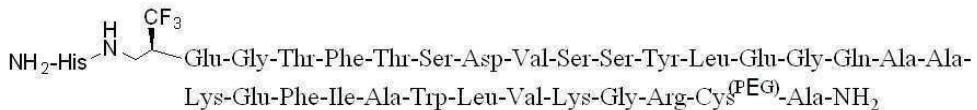
[0438]

[0439] [Q-링커-d8]GLP-1-(7-37)-Cys^(PEG)-Ala-NH₂의 합성

[0440] 50 mmol/L 와 총 용액(36mL) 중의 [A-릴케-d8]-GLP-1-(7-37)-Cys-Ala-NH₂(36 mg, 11 μmol)의 혼합물을 2 물을

초과하는 양의 20KDa mPEG-SPA(50 mmol/L 트리스-HCl 완충액을 사용하여 pH를 7.5 내지 9.0으로 조절함)과 실온에서 3시간 동안 반응시켰다. 모노-페길화된(PEGylated) GLP-1 콘쥬게이트를 모니터링하고, 실온에서 X-terra C18(4.6 X 250 mm, 5 μ, Waters, Milford, MA) 상에서 역상 고압 액체 크로마토그래피(RP-HPLC)로 정제시켰다. 이동상은 중류수 중의 0.1% TFA(용출 A) 및 0.1% TFA를 함유하는 ACN(용출 B)으로 구성되었다. 이동상을 30 내지 60% 용출 B의 선형 구배로 1 mL/분의 유동 속도로 20분 동안 구동시키고, 용출제의 UV 흡광을 215 nm에서 모니터링 하였다. 각각의 피크에 상응하는 HPLC 단편을 각각 수집하여 질소로 펴징하고, 동결건조시켰다.

실시예 16



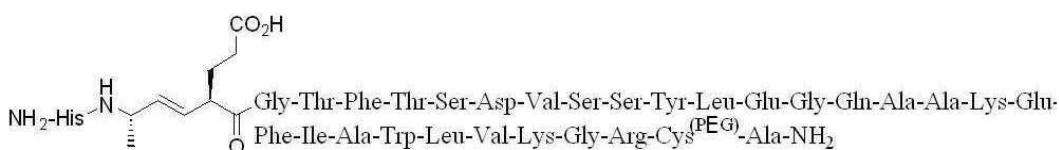
[0441]

[Q-링커-c8]GLP-1-(7-37)-Cys^(PEG)-Ala-NH₂의 합성

[0443]

목적하는 GLP-1 유사체를 실시예 13에 기재된 것과 같은 동일한 순서 및 조건을 사용하고 20KDa mPEG-SPA를 사용하여 합성하였다.

실시예 17



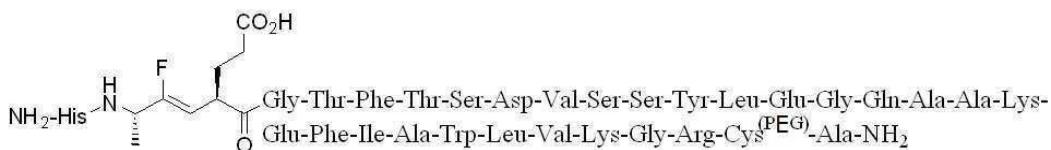
[0444]

[Q-링커-a8-9]GLP-1-(7-37)-Cys^(PEG)-Ala-NH₂의 합성

[0446]

목적하는 GLP-1 유사체를 실시예 13에 기재된 것과 같은 동일한 순서 및 조건을 사용하고 20KDa mPEG-SPA를 사용하여 합성하였다.

실시예 18



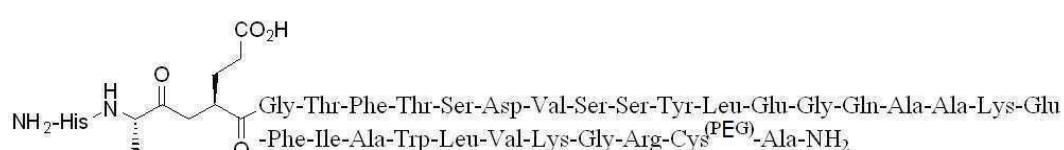
[0447]

[Q-링커-b8-9]GLP-1-(7-37)-Cys^(PEG)-Ala-NH₂의 합성

[0449]

목적하는 GLP-1 유사체를 실시예 13에 기재된 것과 같은 동일한 순서 및 조건을 사용하고 20KDa mPEG-SPA를 사용하여 합성하였다.

실시예 19

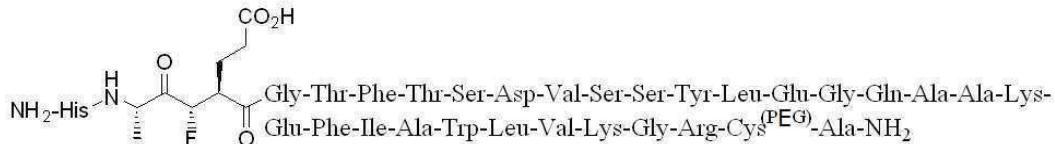


[0450]

[Q-링커-e8-9]GLP-1-(7-37)-Cys^(PEG)-Ala-NH₂의 합성

[0452] 목적하는 GLP-1 유사체를 실시예 13에 기재된 것과 같은 동일한 순서 및 조건을 사용하고 20kDa mPEG-SPA를 사용하여 합성하였다.

실시예 20



[0453]

[0454] [Q-링커-f8-9]GLP-1-(7-37)-Cys^(PEG)-Ala-NH₂의 합성

[0455] 목적하는 GLP-1 유사체를 실시예 13에 기재된 것과 같은 동일한 순서 및 조건을 사용하고 20kDa mPEG-SPA를 사용하여 합성하였다.

실시예 21

[0456]

In vitro에서의 DPP-IV의 안정성

[0457] GLP-1(100 nL, 5 nmol/L), 1 당량의 정제된 조직내 합성된 GLP-1 유사체를 트리에틸아민 HCl 완충액(10 mmol/L; pH 7.4) 중에 제조하였다. DPP-IV(5 mU, 900 μL)를 가한 다음, 용액을 37°C에서 항온처리하였다. 지정된 시점에서, 100 μL를 반응 혼합물로부터 제거한 다음, 반응을 10%(v/v) TFA 5 μL를 가하여 종결시켰다. 각 시료를 기재된 것과 같이 MALDI-TOF MS 및 RP-HPLC를 사용하여 분석하였다.

GLP-1 또는 GLP-1 유사체 플러스 DPP-IV	잔여 웹타이드 (1 h) (%)	잔여 웹타이드 (24 h) (%)
GLP-1	20	0
[Q-링커-c8, Glu22]GLP-1-(7-37)-웹타이드	98	90
[Q-링커-b8-9, Glu22]GLP-1-(7-37)-웹타이드	98	92
[Q-링커-e8-9, Glu22]GLP-1-(7-37)-웹타이드	98	91
Λ-ε ² -[γ-L-글루타밀(Λ-α-헥사데카노일)]-[Q-링커-d8, Arg34]GLP-1-(7-37)-웹타이드	98	98
Λ-ε ² -[γ-L-글루타밀(Λ-α-헥사데카노일)]-[Q-링커-c8, Arg34]GLP-1-(7-37)-웹타이드	98	98
Λ-ε ² -[γ-L-글루타밀(Λ-α-헥사데카노일)]-[Q-링커-a8-9, Arg34]GLP-1-(7-37)-웹타이드	98	98
[Q-링커-c8]GLP-1-(7-37)-Cys ^(PEG) -Ala-NH ₂	98	98
[Q-링커-b8]GLP-1-(7-37)-Cys ^(PEG) -Ala-NH ₂	98	98
[Q-링커-e8]GLP-1-(7-37)-Cys ^(PEG) -Ala-NH ₂	98	98

[0458]

실시예 22

[0459] 클론화된 인간 GLP-1 리셉터를 발현하는 세포주 내 cAMP 형성

[0460] GLP-1 유도체의 효능을 입증하기 위해서, 클론화된 인간 GLP-1 수용체를 발현하는 세포주 내 cAMP의 형성을 자극하는 유도체의 능력을 시험하였다. EC₅₀을 용량-반응 커브로부터 계산하였다.

[0461]

방사면역검정(radioimmunoassay)에서, NIT-1, 이식 유전자 NOD/Lt 마우스로부터 확립된 췌장 베타-세포주를 사용하였다. 이러한 검정을 140μL의 총 용적으로 96-웰 미세적정 플레이트에서 수행하였다. 사용된 완충액은 50 mmol/1 트리스-HCl로, 1 mmol/1 EGTA, 1.5 mmol/1 MgSO₄, 1.7 mmol/1 ATP, 20 mM GTP, 2 mmol/1 3-이소부틸-1-메틸크산틴, 0.01 % 트윈(Tween)-20 및 0.1 % 사람 혈청 알부민을 첨가하여 pH 7.4이었다. 길항 활성을 위해 시험하고자 하는 화합물을 용해시키고 완충액 중에 희석시킨 다음, 막 제조에 대하여 혼합물을 2시간 동안 37°C에서 항온처리하였다. 반응을 0.05 몰/1 HCl 25μL를 가하여 정지시켰다. 시료를 SPA(섬광 근접 검정(scintillation proximity assay))을 사용하여 cAMP를 분석하기 전에 10배 희석하였다.

GLP-1 또는 GLP-1 유사체 플러스 DPP-IV	세포 기준 cAMP ED ₅₀ (pM)
GLP-1	60
[Q-링커-c8, Glu22]GLP-1-(7-37)-펩타이드	120
[Q-링커-b8-9, Glu22]GLP-1-(7-37)-펩타이드	98
[Q-링커-e8-9, Glu22]GLP-1-(7-37)-펩타이드	78
$\Lambda-\epsilon^{26}-[\gamma-L\text{-글루타밀}(\Lambda-\alpha\text{-헥사데카노일})]-[Q\text{-링커-}d8,\text{Arg34}]GLP-1-(7-37)-펩타이드$	68
$\Lambda-\epsilon^{26}-[\gamma-L\text{-글루타밀}(\Lambda-\alpha\text{-헥사데카노일})]-[Q\text{-링커-}c8,\text{Arg34}]GLP-1-(7-37)-펩타이드$	98
$\Lambda-\epsilon^{26}-[\gamma-L\text{-글루타밀}(\Lambda-\alpha\text{-헥사데카노일})]-[Q\text{-링커-}9,\text{Arg34}]GLP-1-(7-37)-펩타이드$	135
[Q-링커-c8]GLP-1-(7-37)-Cys ^(PE) -Ala-NH ₂	168
[Q-링커-b8]GLP-1-(7-37)-Cys ^(PE) -Ala-NH ₂	239
[Q-링커-e8]GLP-1-(7-37)-Cys ^(PE) -Ala-NH ₂	334

[0462]

실시예 23

[0463] GLP-1 유사체의 항고혈당 활성(antihyperglycemic activity)

당뇨병-유도된 db/db 마우스를 4개의 그룹(n=5)으로 나누고 16시간 동안 단식시켰다. 식염수, GLP-I(7-36) 아미드 100 μg/kg, [Q-링커-c8, Glu22]GLP-1-(7-37)-펩타이드 100 μg 당량/kg 및 $\Lambda-\epsilon^{26}-[\gamma-L\text{-글루타밀}(\Lambda-\alpha\text{-헥사데카노일})]-[Q\text{-링커-}d8,\text{Arg34}]GLP-1-(7-37)-펩타이드$ 100 μg 당량/kg을 복막내 주입하고, 글루코스 용액 1g/kg를 10분 후에 경구 주입하였다. -10, 0, 10, 20, 30, 60, 90, 120 및 180 분 후, 혈액 시료를 취하여 혈당 수준을 측정하였다. GLP-I(7-36) 아미드, [Q-링커-c8, Glu22]GLP-1-(7-37)-펩타이드 및 $\Lambda-\epsilon^{26}-[\gamma-L\text{-글루타밀}(\Lambda-\alpha\text{-헥사데카노일})]-[Q\text{-링커-}d8,\text{Arg34}]GLP-1-(7-37)-펩타이드$ 의 혈당 증가를 억제하는 효과를 시간(0-180 분)에 대한 혈당 수준 커브 아래의 면적을 계산하여 비교하였다. GLP-I(7-36) 아미드 그룹의 AUC는 25165±463mg·분/dl이었고, 이는 식염 용액 그룹(34864+4774 mg·분/dl)과 비교하여 27.8% 감소된 값이다. 그러나, [Q-링커-c8, Glu22]GLP-1-(7-37)-펩타이드 및 $\Lambda-\epsilon^{26}-[\gamma-L\text{-글루타밀}(\Lambda-\alpha\text{-헥사데카노일})]-[Q\text{-링커-}d8,\text{Arg34}]GLP-1-(7-37)-펩타이드$ 는 각각 14470+5700 mg·분/dl 및 17520+2484 mg·분/dl(즉, 각각 58.5% 및 49.7% 감소된 값)이다. 이를 결과는 [Q-링커-c8, Glu22]GLP-1-(7-37)-펩타이드 및 $\Lambda-\epsilon^{26}-[\gamma-L\text{-글루타밀}(\Lambda-\alpha\text{-헥사데카노일})]-[Q\text{-링커-}d8,\text{Arg34}]GLP-1-(7-37)-펩타이드$ 가, GLP-I(7-36) 아미드와 비교하여, 혈당 수준을 억제하는데 훨씬 향상된 활성을 가짐을 나타낸다.

서열 목록

- <110> Betta Pharmaceuticals Co. Ltd.
- <120> Novel glucagon like peptide analogs, composition, and method of use
- <130> 12IC12054
- <150> 2010/000692
- <151> 2010-05-17
- <160> 1
- <170> Kopatent In 2.0
- <210> 1
- <211> 37
- <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

His Asp Glu Phe Glu Arg His Ala Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val

1 5 10 15

Ser Ser Tyr Leu Glu Gly Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu

20 25 30

Val Lys Gly Arg Gly

35