(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2025년04월30일
(11) 등록번호 10-2801994
(24) 등록일자 2025년04월24일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 14/605 (2006.01) *A61K 38/26* (2006.01)
A61P 3/04 (2006.01) *A61P 3/10* (2006.01)
(52) CPC특허분류
C07K 14/605 (2013.01)
A61K 38/26 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2020-7031696
(22) 출원일자(국제) 2019년04월05일
심사청구일자 2022년03월23일
(85) 번역문제출일자 2020년11월03일
(65) 공개번호 10-2020-0141469
(43) 공개일자 2020년12월18일
(86) 국제출원번호 PCT/IB2019/052835
(87) 국제공개번호 WO 2019/193576
국제공개일자 2019년10월10일
(30) 우선권주장
201821013109 2018년04월05일 인도(IN)
(뒷면에 계속)
(56) 선행기술조사문헌
WO2006097537 A2

(73) 특허권자
썬 파마슈티칼 인더스트리스 리미티드
인도, 마하라시트라 400063, 뭄바이, 고레가온(이),웨스턴 익스프레스 하이웨이, 플롯 넘버 201 비/1, 썬 하우스
(72) 발명자
텐나티, 라자만나르
인도 390012 구자라트 바로다 탄다지아 로드 니어 프라탐 엔클레이브 니마 컴파운드
차투르베디, 니시트
인도 390012 구자라트 바로다 탄다지아 로드 니어 프라탐 엔클레이브 니마 컴파운드
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
양영준, 이상영

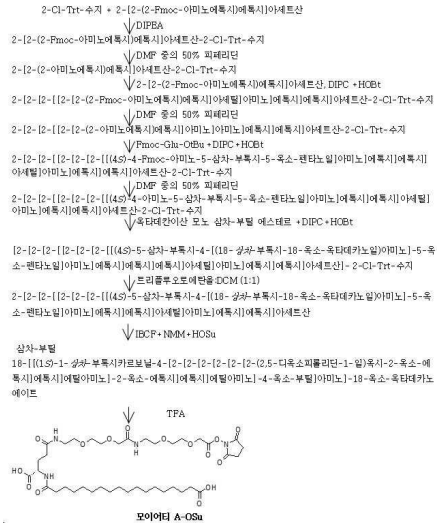
전체 청구항 수 : 총 33 항 심사관 : 강덕희

(54) 발명의 명칭 **신규한 GLP-1 유사체**

(57) 요 약

본 개시는 C-말단에서 Leu 또는 Ile이 있는 아미노산 서열을 갖는 신규한 글루카곤 유사 펩티드-1(GLP-1) (7-37) 유사체에 관한 것이다. 새로운 유사체는 부작용이 감소되고 작용 지속기간이 개선된 강력한 GLP-1 효능제이다. 본 개시는 추가로 새로운 유사체의 아실화된 유도체에 관한 것으로, 이는 개선된 효능과 작용 지속시간을 가지며 경구 투여에 적합하다. 본 개시의 유사체는 당뇨와 비만 치료에 유용할 수 있다.

대 표 도 - 도1a



(52) CPC특허분류
A61P 3/04 (2018.01)
A61P 3/10 (2018.01)

(72) 발명자
부라데, 비노드 삼파트라오
인도 390012 구자라트 바로다 탄다지아 로드 니어 프라탐 엔클레이브 니마 컴파운드
샤히, 프라딥 디네쉬
인도 390012 구자라트 바로다 탄다지아 로드 니어 프라탐 엔클레이브 니마 컴파운드
나타라잔, 무투쿠마란
인도 390012 구자라트 바로다 탄다지아 로드 니어 프라탐 엔클레이브 니마 컴파운드
나가라자, 라비샨카라 마다바티
인도 390012 구자라트 바로다 탄다지아 로드 니어 프라탐 엔클레이브 니마 컴파운드
잘라와디아, 리시트 만수클랄
인도 390012 구자라트 바로다 탄다지아 로드 니어 프라탐 엔클레이브 니마 컴파운드
판디아, 쿠날
인도 390012 구자라트 바로다 탄다지아 로드 니어 프라탐 엔클레이브 니마 컴파운드
파텔, 브리제쉬쿠마르
인도 390012 구자라트 바로다 탄다지아 로드 니어 프라탐 엔클레이브 니마 컴파운드
조시, 디렌 라메쉬찬드라
인도 390012 구자라트 바로다 탄다지아 로드 니어 프라탐 엔클레이브 니마 컴파운드
소니, 크루날 하리쉬바이
인도 390012 구자라트 바로다 탄다지아 로드 니어 프라탐 엔클레이브 니마 컴파운드
티와리, 아비셰크
인도 390012 구자라트 바로다 탄다지아 로드 니어 프라탐 엔클레이브 니마 컴파운드
파텔, 비풀쿠마르 샨카르바이
인도 390012 구자라트 바로다 탄다지아 로드 니어 프라탐 엔클레이브 니마 컴파운드

(30) 우선권주장
201821040468 2018년10월26일 인도(IN)
201821040474 2018년10월26일 인도(IN)

명 세 서

청구범위

청구항 1

하기 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드로서:

H-X2-X3-X4-G-T-F-T-S-D-V-S-S-Y-L-X16-G-Q-A-A-X21-E-F-X24-A-W-L-V-R-G-R-G-X33-X34

여기서 X2는 Ser, Ser(OMe), D-Ser, D-Ser(OMe), Ala 또는 Aib이고;

X3은 부재하거나 Gln이고;

X4는 Glu이고;

X16은 Glu이고;

X24는 Ile이고;

X33은 Leu, -D-Leu, D-Ile 또는 Ile이고;

X34 부재하고;

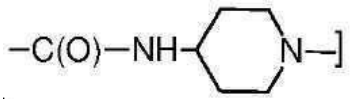
X21은 Lys이고, 여기서 Lys의 측쇄 아미노(ε 아미노) 기는 하기 모이어티로 아실화되고:

{-Q-T-U-W-Y-Z

여기서 Q 및 T는 부재하고;

U는 부재하거나 -C(O)-CH_2-O-$(CH_2)_2$-O-$(CH_2)_2$-NH-}이고, 여기서 }는 W 기와의 부착 지점이고;

W는 부재하거나 -C(O)-CH_2-O-$(CH_2)_2$-O-$(CH_2)_2$-NH-], -C(O)-NH-$(CH_2)_{3-4}$-NH-], -C(O)-C$(CH_3)_2$-NH-] 및



로 이루어진 군으로부터 선택되고, 여기서]는 Y 기와의 부착 지점이고;

Y는 -C(O)-$(CH_2)_2$-CH(COOH)NH--이고, 여기서 --는 Z 기와의 부착 지점이고;

Z는 -C(O)-$(CH_2)_n$-COOH 또는 -C(O)-$(CH_2)_n$-CH_3이고, 여기서 n은 14 내지 20의 정수인, 폴리펩티드.

청구항 2

제1항에 있어서, X2는 Aib이고;

X3은 부재하고;

X33은 Leu이고;

U는 -C(O)-CH_2-O-$(CH_2)_2$-O-$(CH_2)_2$-NH-}이고;

W는 -C(O)-CH_2-O-$(CH_2)_2$-O-$(CH_2)_2$-NH-]이고;

Z는 -C(O)-$(CH_2)_n$-COOH이고, 여기서 n은 16의 정수인, 폴리펩티드.

청구항 3

제1항에 있어서, X2는 Aib이고;

X3은 부재하고;

X33은 Leu이고;

U는 -C(O)-CH_2-O-$(CH_2)_2$-O-$(CH_2)_2$-NH-}이고;

W는 -C(O)-$C(CH_3)_2$-NH-]이고;

Z는 -C(O)-$(CH_2)_n$-COOH이고, 여기서 n은 16의 정수인, 폴리펩티드.

청구항 4

제1항에 있어서, X2는 Aib이고;

X3은 부재하고;

X33은 Leu이고;

U는 -C(O)-CH_2-O-$(CH_2)_2$-O-$(CH_2)_2$-NH-}이고;

W는 -C(O)-NH-$(CH_2)_4$-NH-]이고;

Z는 -C(O)-$(CH_2)_n$-COOH이고, 여기서 n은 16의 정수인, 폴리펩티드.

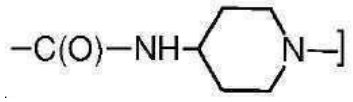
청구항 5

제1항에 있어서, X2는 Aib이고;

X3은 부재하고;

X33은 Leu이고;

U는 -C(O)-CH_2-O-$(CH_2)_2$-O-$(CH_2)_2$-NH-}이고;

W는 

이고;

Z는 -C(O)-$(CH_2)_n$-COOH이고, 여기서 n은 16의 정수인, 폴리펩티드.

청구항 6

제1항에 있어서, X2는 Aib이고;

X3은 부재하고;

X33은 Leu이고;

U는 -C(O)-CH_2-O-$(CH_2)_2$-O-$(CH_2)_2$-NH-}이고;

W는 -C(O)-NH-$(CH_2)_3$-NH-]이고;

Z는 -C(O)-$(CH_2)_n$-COOH이고, 여기서 n은 16의 정수인, 폴리펩티드.

청구항 7

제1항에 있어서, X2는 Ser, Ser(OMe), D-Ser, 또는 D-Ser(OMe)이고;

X3은 부재하고;

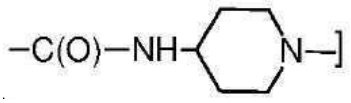
X33은 Leu이고;

U는 -C(O)-CH_2-O-$(CH_2)_2$-O-$(CH_2)_2$-NH-}이고;

W는 -C(O)-CH_2-O-$(CH_2)_2$-O-$(CH_2)_2$-NH-], -C(O)-NH-$(CH_2)_{3-4}$-NH-], -C(O)-$C(CH_3)_2$-NH-]이고;

Z는 -C(O)-$(CH_2)_n$-COOH 또는 -C(O)-$(CH_2)_n$-CH_3이고, 여기서 n은 14 내지 20의 정수인, 폴리펩티드.

청구항 8

제1항에 있어서, W는 -C(O)-NH-$(CH_2)_{3-4}$-NH-], -C(O)-$C(CH_3)_2$-NH-] 및  로 이루어진 군으로부터 선택되는, 폴리펩티드.

청구항 9

제1항에 있어서, X2는 Ala이고;

X3은 부재하고;

X33은 Leu이고;

W는 부재하고;

Z는 -C(O)-$(CH_2)_n$-CH_3이고, 여기서 n은 14의 정수인, 폴리펩티드.

청구항 10

제1항에 있어서, X2는 Aib이고;

X3은 부재하고;

X33은 Leu이고;

W는 부재하고;

Z는 -C(O)-$(CH_2)_n$-CH_3이고, 여기서 n은 14의 정수인, 폴리펩티드.

청구항 11

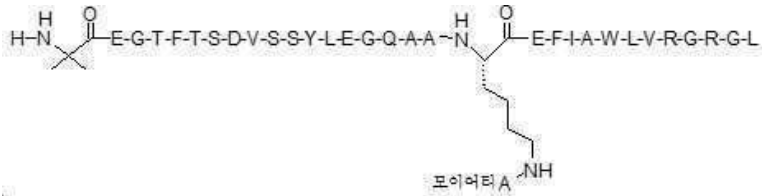
당뇨병 또는 비만을 치료하기 위한, 제1항 내지 제10항 중 어느 한 항의 폴리펩티드를 포함하는 제약 조성물.

청구항 12

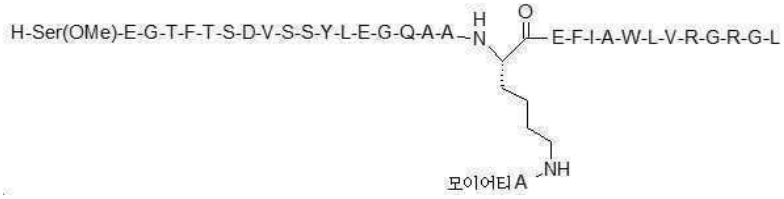
제11항에 있어서, 당뇨병은 2형 당뇨병인, 제약 조성물.

청구항 13

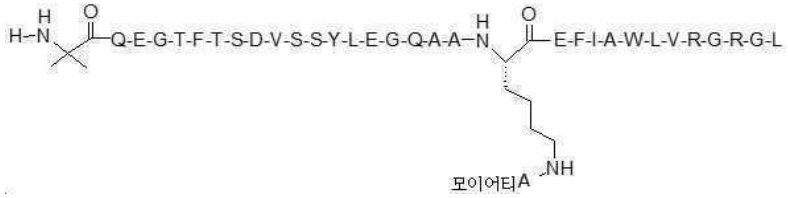
하기 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드로서:

(a) 

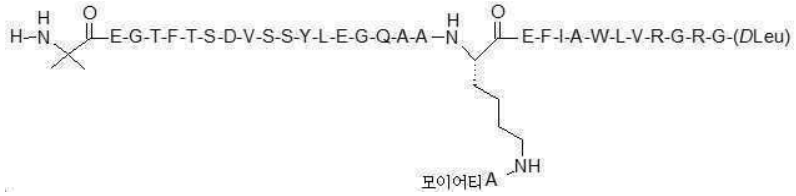
(서열번호 5); 또는

(b) 

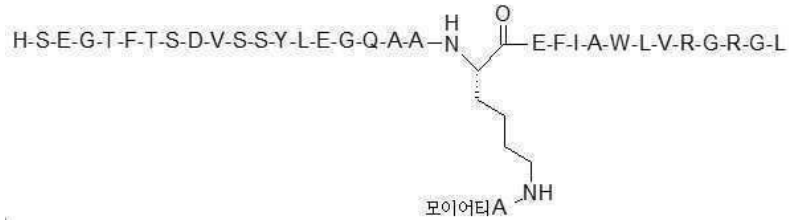
(서열번호 6); 또는

(c) 

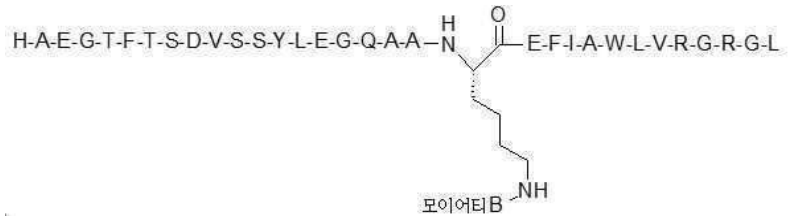
(서열번호 7); 또는

(d) 

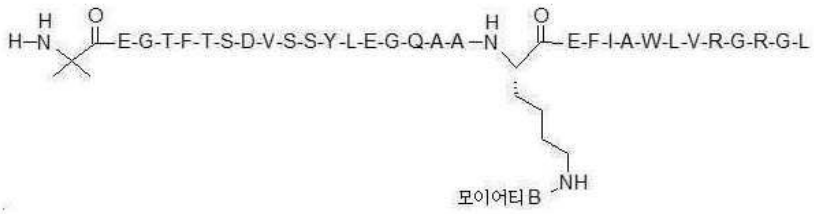
(서열번호 8); 또는

(e) 

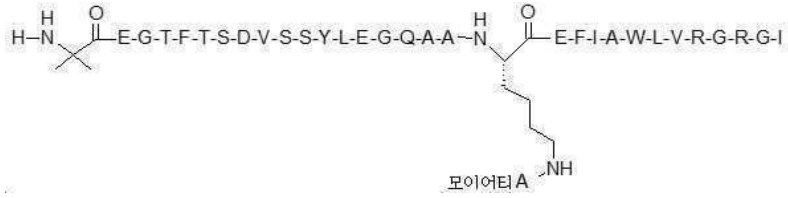
(서열번호 9); 또는

(f) 

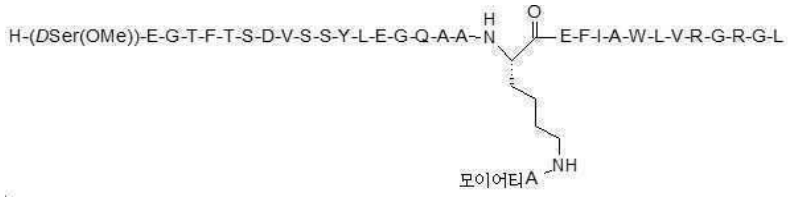
(서열번호 10); 또는

(g) 

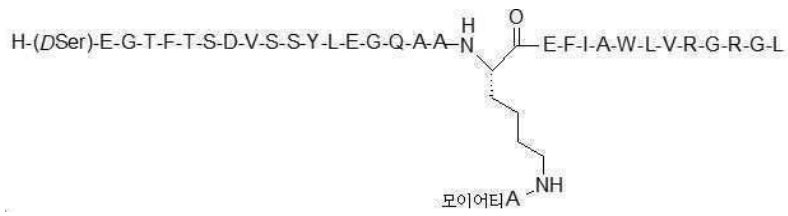
(서열번호 5); 또는

(h) 

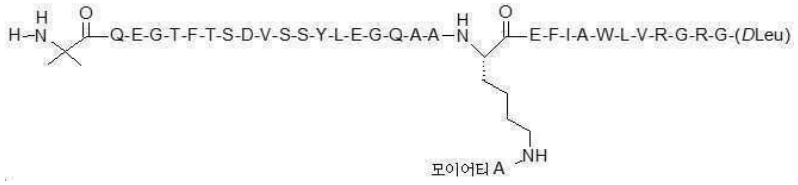
(서열번호 11); 또는

(i) 

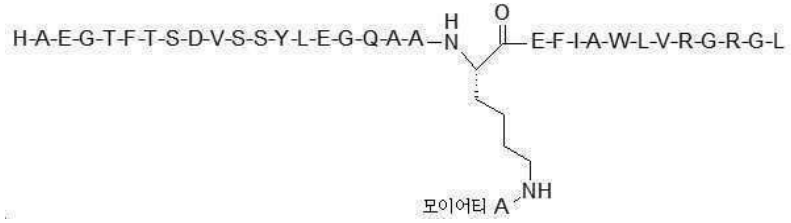
(서열번호 12); 또는

(j) 

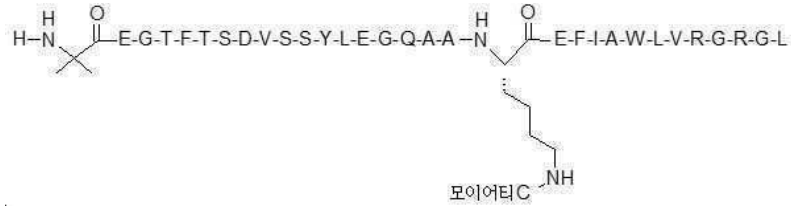
(서열번호 13); 또는

(k) 

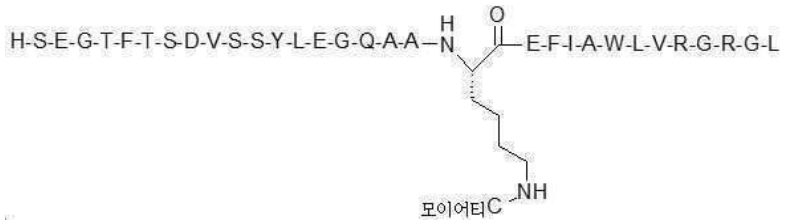
(서열번호 14); 또는

(l) 

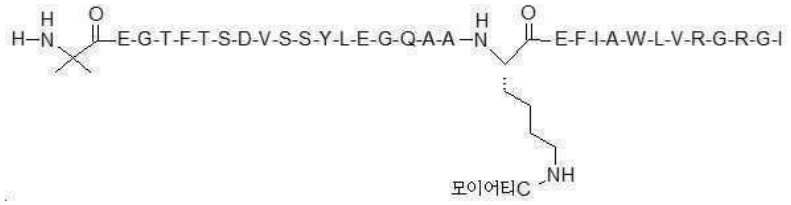
(서열번호 10); 또는

(m) 

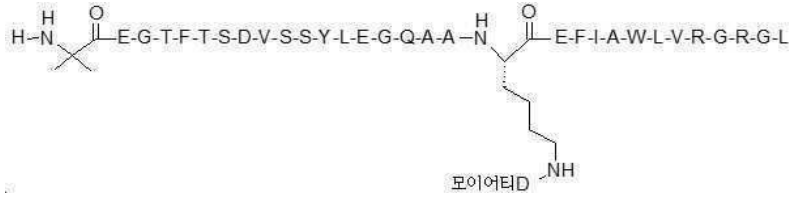
(서열번호 5); 또는

(n) 

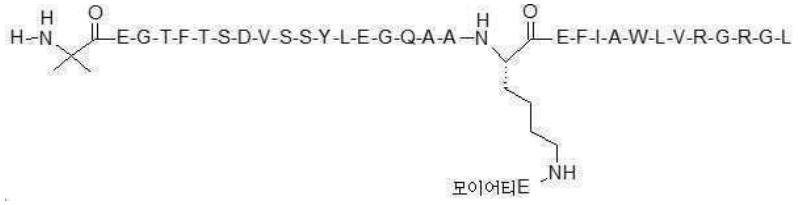
(서열번호 9); 또는

(o) 

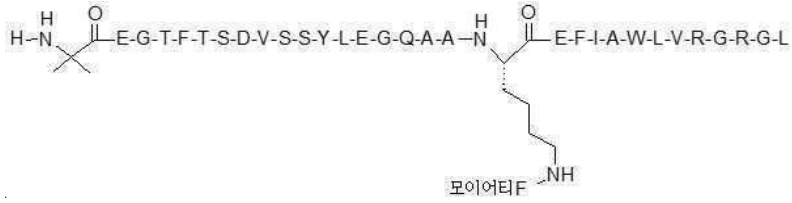
(서열번호 11); 또는

(p) 

(서열번호 5); 또는

(q) 

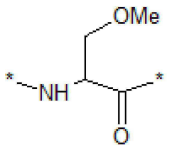
(서열번호 5); 또는

(r) 

(서열번호 5);

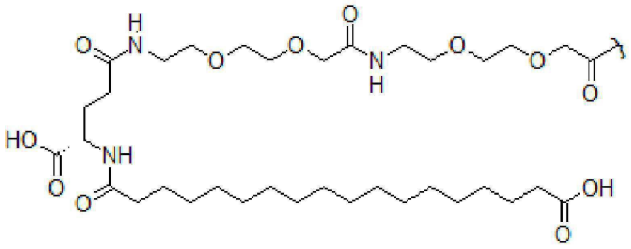
여기서 *D*Ser는 D-구성을 갖는 세린 잔기이고, *D*Leu는 D-구성을 갖는 류신 잔기이고;

Ser(OMe)는 하기 구조를 갖는 세린 잔기이고:

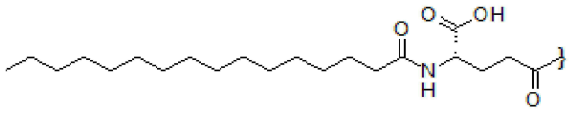


;

모이어티 A는 하기 구조를 갖고:

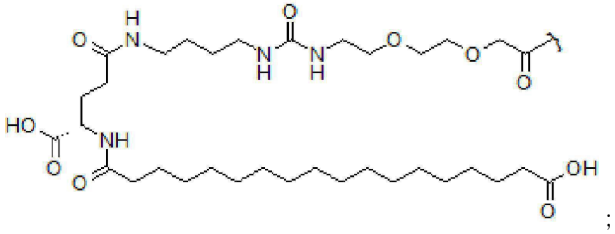


모이어티 B는 하기 구조를 갖고:



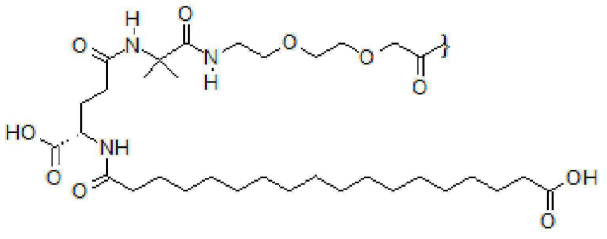
;

모이어티 C는 하기 구조를 갖고:



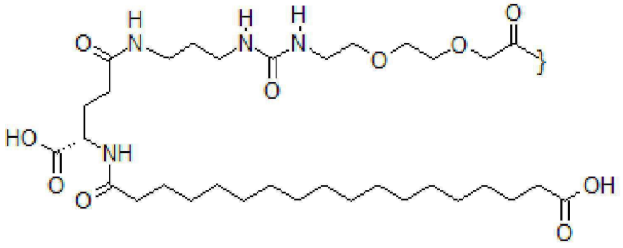
;

모이어티 D는 하기 구조를 갖고:



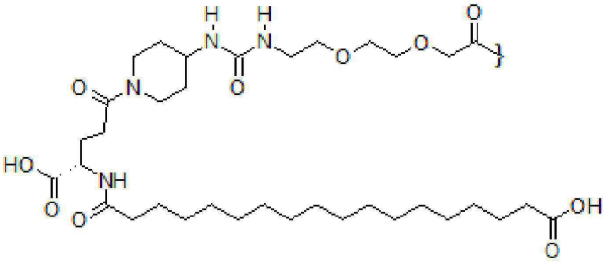
;

모이어티 E는 하기 구조를 갖고:



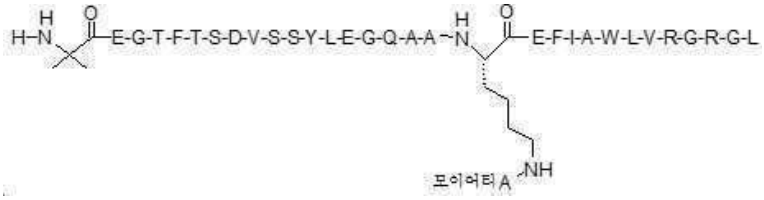
;

모이어티 F는 하기 구조를 갖는, 폴리펩티드.



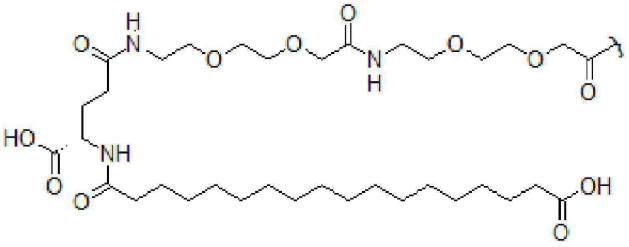
청구항 14

제13항에 있어서, 폴리펩티드가 하기 아미노산 서열을 포함하고:



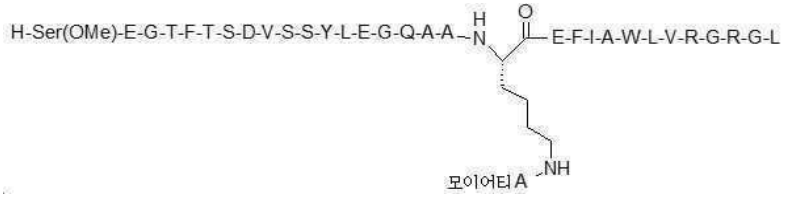
(서열번호 5);

여기서 모이어티 A는 하기 구조를 갖는, 폴리펩티드.



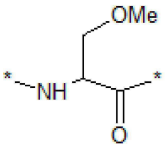
청구항 15

제13항에 있어서, 폴리펩티드가 하기 아미노산 서열을 포함하고:



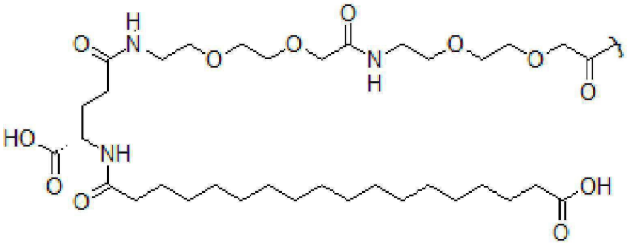
(서열번호 6);

여기서 Ser(OMe)는 하기 구조를 갖는 세린 잔기이고:



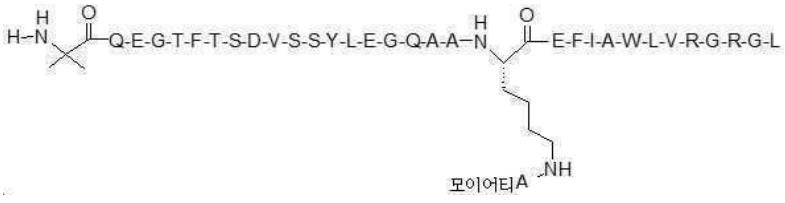
;

모이어티 A는 하기 구조를 갖는, 폴리펩티드.



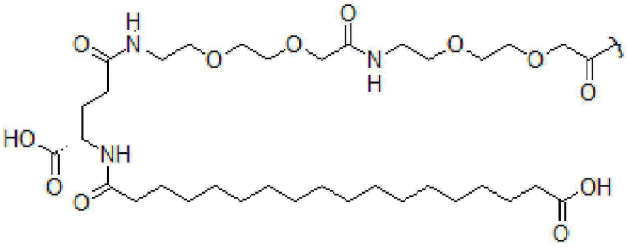
청구항 16

제13항에 있어서, 폴리펩티드가 하기 아미노산 서열을 포함하고:



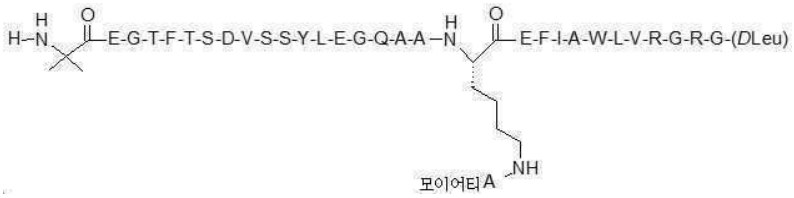
(서열번호 7);

여기서 모이어티 A는 하기 구조를 갖는, 폴리펩티드.



청구항 17

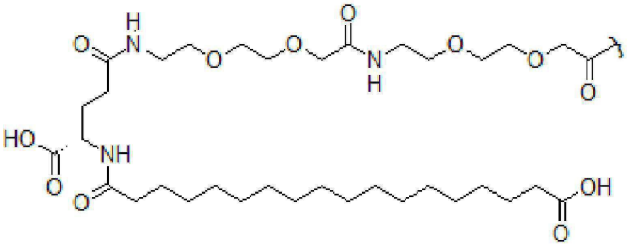
제13항에 있어서, 폴리펩티드가 하기 아미노산 서열을 포함하고:



(서열번호 8);

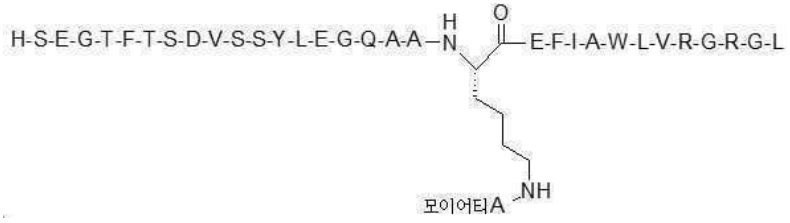
여기서 *D*Leu는 D-구성을 갖는 류신 잔기이고;

모이어티 A는 하기 구조를 갖는, 폴리펩티드.



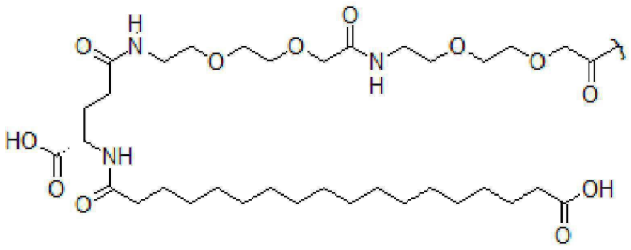
청구항 18

제13항에 있어서, 폴리펩티드가 하기 아미노산 서열을 포함하고:



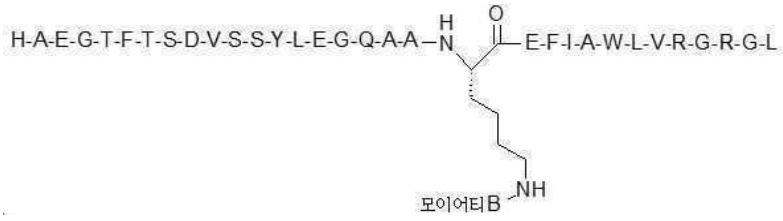
(서열번호 9);

여기서 모이어티 A는 하기 구조를 갖는, 폴리펩티드.



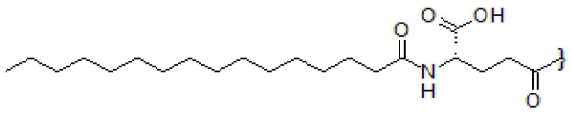
청구항 19

제13항에 있어서, 폴리펩티드가 하기 아미노산 서열을 포함하고:



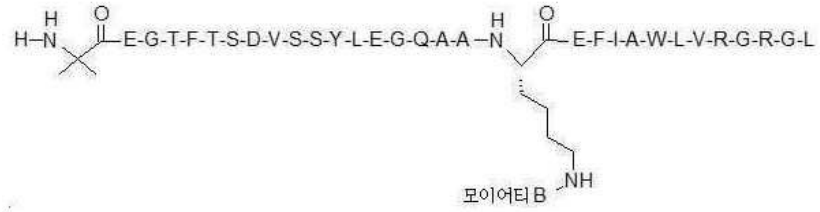
(서열번호 10);

여기서 모이어티 B는 하기 구조를 갖는, 폴리펩티드.



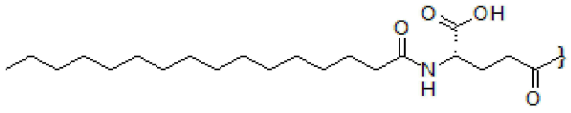
청구항 20

제13항에 있어서, 폴리펩티드가 하기 아미노산 서열을 포함하고:



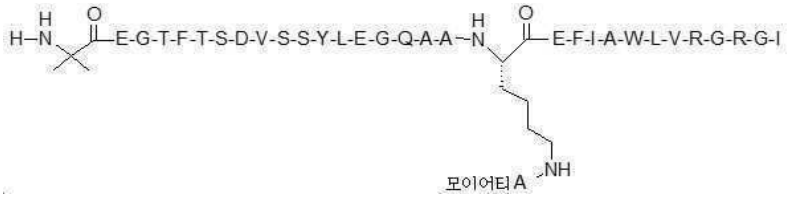
(서열번호 5);

여기서 모이어티 B는 하기 구조를 갖는, 폴리펩티드.



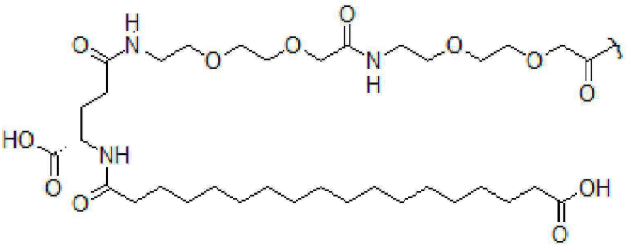
청구항 21

제13항에 있어서, 폴리펩티드가 하기 아미노산 서열을 포함하고:



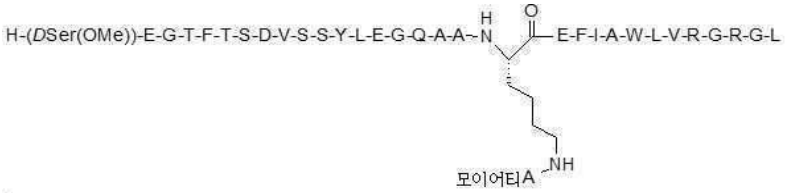
(서열번호 11);

여기서 모이어티 A는 하기 구조를 갖는, 폴리펩티드.



청구항 22

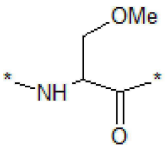
제13항에 있어서, 폴리펩티드가 하기 아미노산 서열을 포함하고:



(서열번호 12);

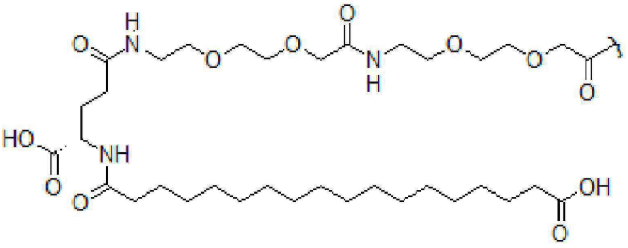
여기서 *D*Ser는 D-구성을 갖는 세린 잔기이고, *D*Leu는 D-구성을 갖는 류신 잔기이고;

Ser(OMe)는 하기 구조를 갖는 세린 잔기이고:



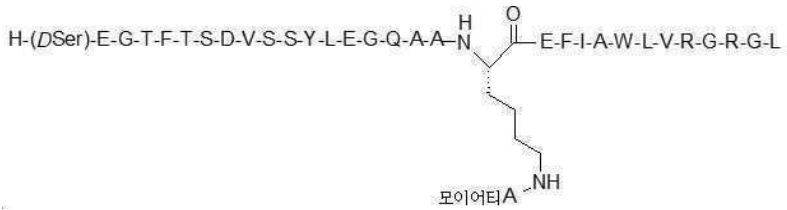
;

모이어티 A는 하기 구조를 갖는, 폴리펩티드.



청구항 23

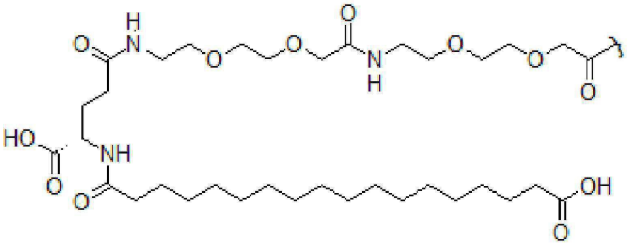
제13항에 있어서, 폴리펩티드가 하기 아미노산 서열을 포함하고:



(서열번호 13);

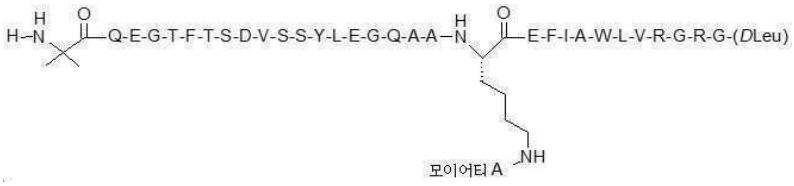
여기서 *D*Ser는 D-구성을 갖는 세린 잔기이고;

모이어티 A는 하기 구조를 갖는, 폴리펩티드.



청구항 24

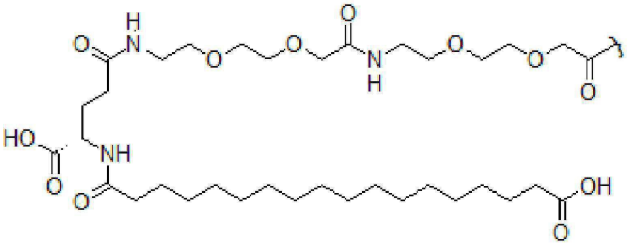
제13항에 있어서, 폴리펩티드가 하기 아미노산 서열을 포함하고:



(서열번호 14);

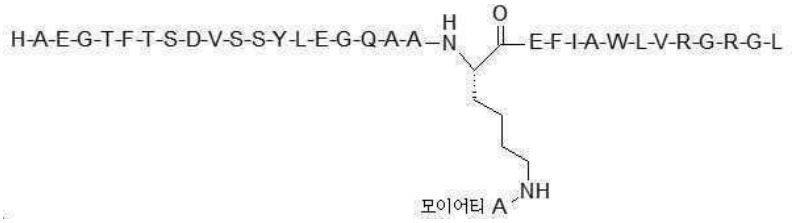
여기서 *D*Leu는 D-구성을 갖는 류신 잔기이고;

모이어티 A는 하기 구조를 갖는, 폴리펩티드.



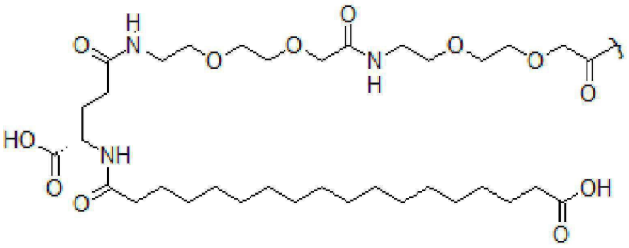
청구항 25

제13항에 있어서, 폴리펩티드가 하기 아미노산 서열을 포함하고:



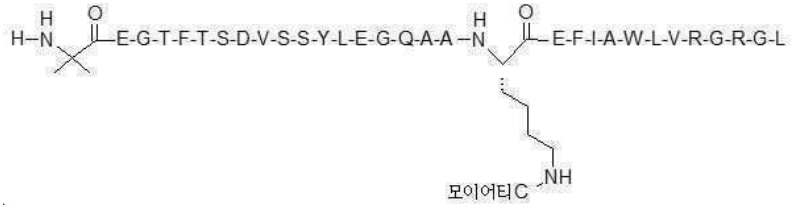
(서열번호 10);

여기서 모이어티 A는 하기 구조를 갖는, 폴리펩티드.



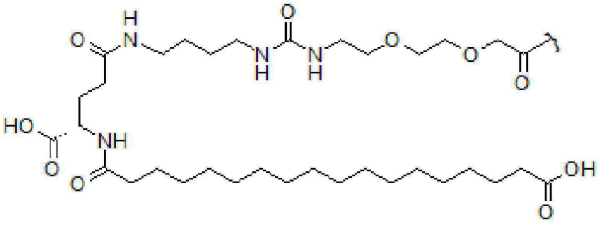
청구항 26

제13항에 있어서, 폴리펩티드가 하기 아미노산 서열을 포함하고:



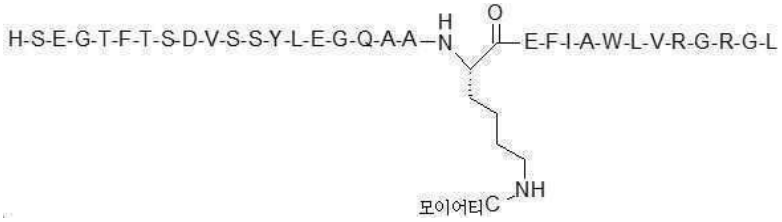
(서열번호 5);

여기서 모이어티 C는 하기 구조를 갖는, 폴리펩티드.



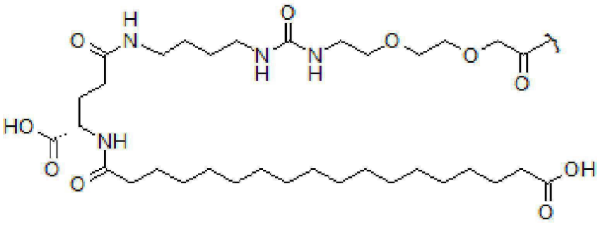
청구항 27

제13항에 있어서, 폴리펩티드가 하기 아미노산 서열을 포함하고:



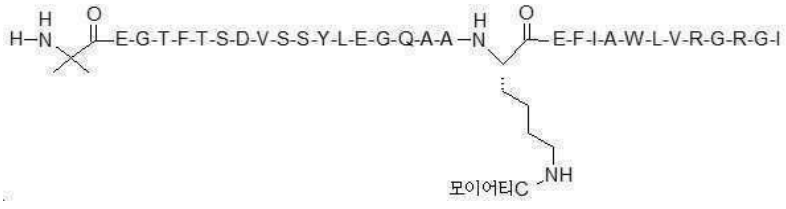
(서열번호 9);

여기서 모이어티 C는 하기 구조를 갖는, 폴리펩티드.



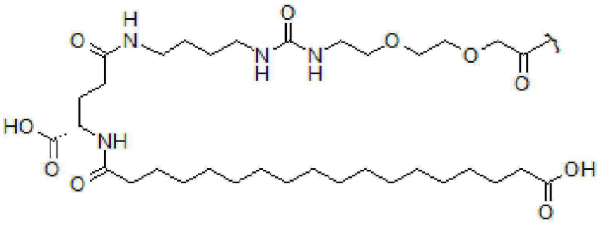
청구항 28

제13항에 있어서, 폴리펩티드가 하기 아미노산 서열을 포함하고:



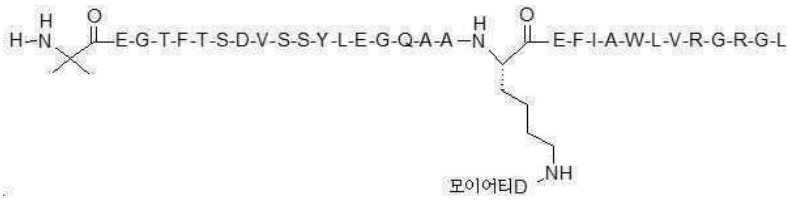
(서열번호 11);

여기서 모이어티 C는 하기 구조를 갖는, 폴리펩티드.



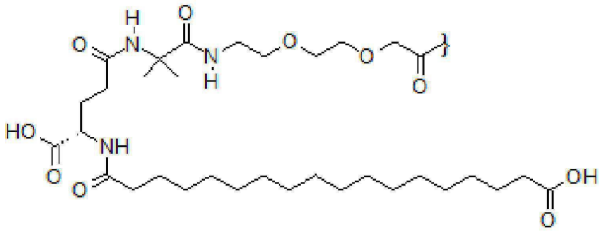
청구항 29

제13항에 있어서, 폴리펩티드가 하기 아미노산 서열을 포함하고:



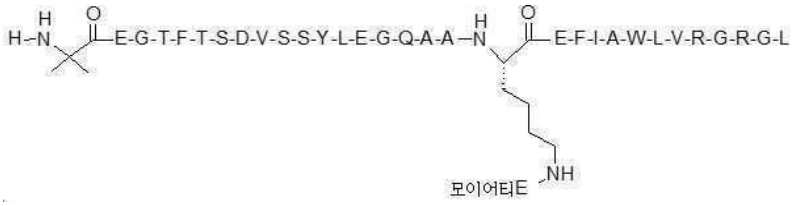
(서열번호 5);

여기서 모이어티 D는 하기 구조를 갖는, 폴리펩티드.



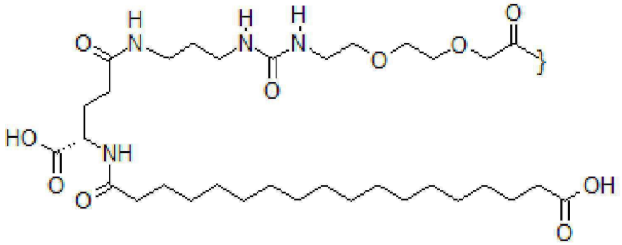
청구항 30

제13항에 있어서, 폴리펩티드가 하기 아미노산 서열을 포함하고:



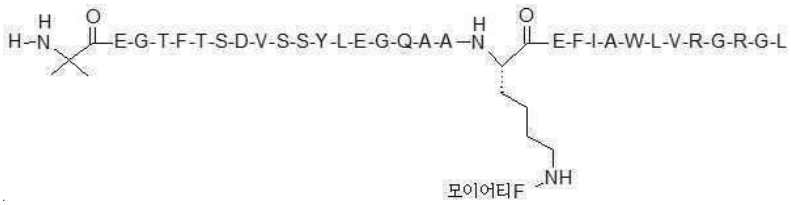
(서열번호 5);

여기서 모이어티 E는 하기 구조를 갖는, 폴리펩티드.



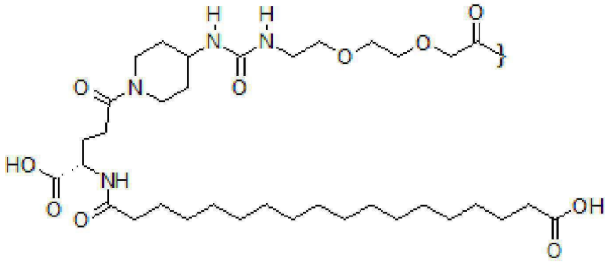
청구항 31

제13항에 있어서, 폴리펩티드가 하기 아미노산 서열을 포함하고:



(서열번호 5);

여기서 모이어티 F는 하기 구조를 갖는, 폴리펩티드.



청구항 32

당뇨병 또는 비만을 치료하기 위한, 제13항 내지 제31항 중 어느 한 항의 폴리펩티드를 포함하는 제약 조성물.

청구항 33

제32항에 있어서, 당뇨병은 2형 당뇨병인, 제약 조성물.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] **관련 출원**

[0002] 본 출원은 출원 번호 IN 201821013109 (2018년 4월 5일 출원); IN 201821040468 (2018년 10월 26일 출원) 및 IN 201821040474 (2018년 10월 26일 출원)을 가진 세 개의 인도 가출원의 이익을 주장하며, 이들은 참조로 본원에 원용된다.

[0003] **본 발명의 분야**

[0004] 본 개시는 C-말단에서 Leu 또는 Ile이 있는 아미노산 서열을 갖는 신규한 글루카곤 유사 펩티드-1(GLP-1) (7-38) 유사체에 관한 것이다. 새로운 유사체는 부작용이 감소되고 작용 지속기간이 개선된 강력한 GLP-1 효능제이다. 본 개시는 추가로 새로운 유사체의 아실화된 유도체에 관한 것으로, 이는 개선된 효능과 작용 지속시간을 가지며 경구 투여에 적합하다. 본원에 개시된 유사체는 연장 모이어티(protracting moiety)로 아실화되며, 화합물 활성의 지속기간을 증가시킨다. 본원에 개시된 유사체는 당뇨와 비만 치료에 유용할 수 있다.

배 경 기 술

[0005] 글루카곤-유사 펩티드-1(GLP-1)은 주로 장(gut)의 장내분비 L 세포에서 생산되고 지방, 단백질 가수분해물 및/또는 글루코오스가 함유된 음식이 십이지장으로 들어갈 때 혈류로 분비되는 호르몬이다. GLP-1은 전구 프로글루카곤(preproglucagon) 유전자의 세포 특이적 번역-후 가공으로부터 유도된다. 초기에, 펩티드 GLP-1(1-37)은 이 가공으로부터 동정되었으나, 그것은 두 개의 *N*-말단이 절단된(truncated) 산물, GLP-1(7-37) (서열번호 1) 및 GLP-1(7-36) 아미드로, 췌장 수용체를 인식하는 것으로 밝혀졌고 *생체내* 활성 종으로 결정되었다. GLP-1은 인슐린 분비를 자극하고, 이에 의해 세포에 의한 포도당 흡수를 유도하고 혈청 포도당 수준을 감소시키는 것으로 밝혀졌다. GLP-1 효능제는 저혈당증이 없고 체중 감소에 긍정적 이점이 있기 때문에 선호되는 약물로서 2형 당뇨병(Type 2 Diabetes Mellitus, T2DM) 치료를 위해 이용 가능하다. 내인성 물질인, GLP-1(7-37) 및 GLP-1(7-36)아미드는 펩티다아제에 의해 절단되고, 따라서 매우 짧은 반감기를 갖는다. 개선된 반감기를 갖는 GLP-1 유사체를 개발함으로써 성능을 향상시키기 위한 노력이 이루어지고 있다. 2005년에 승인된 첫 번째 약물은 10 mcg 투여량 수준에서 1일 2회 투약하는 엑세나타이드(Exenatide)였으며, 포도당 대조군 마커인, HbA1c의 현저한 개선을 나타내는 것으로 밝혀졌다. 또한, 노보 노르디스크(Novo Nordisk)는 1일 1회 1.8mg, 피하/일 투여량을 가지고 2010년에 승인된 리라글루티드(Liraglutide)(미국 특허 제6,268,343호)(서열번호 2)를 개발하였다. 추가 연구 개발 및 개발은 GSK에서 개발한 알비글루티드(Albiglutide) 및 엘리 릴리(Eli Lilly)에서 개발한 둘라글루티드(Dulaglutide) 같은 1주 1회 제품을 생산하였다. 최근, 세마글루티드(Semaglutide)(국제 공개 번호 WO 2006/097537 A2), GLP-1 유사체가 USFDA에 의해 승인되었다. 세마글루티드(Semaglutide)(서열번호 3)는 Ozempic®라는 브랜드 명으로 판매된다. 이는 주 1회 피하 주사로 투여된다.

[0006] 개선된 효능과 작용 지속시간을 갖는 GLP-1 유사체를 만들려는 많은 시도가 문헌에 보고된다. 미국특허

7,291,594B2(US '594 특허)는 점막을 통해 높은 생체이용률을 제공하기 위해 이의 C-말단에 아르기닌 및/또는 리신의 여러 잔기가 첨가된 GLP-1(7-35) 유도체를 개시하고 있다. US '594 특허는 이들 유도체에 GLP-1 아미노산 서열에서 아미노산 8을 Ser로 치환함으로써 디펩티딜 펩티다아제 IV(DPP-IV)에 대한 저항성이 부여되거나, 아미노산 26 및 34를 Gln 및 Asn 각각으로 치환함으로써 트립신에 대한 저항성이 부여될 수 있음을 추가로 개시하고 있다.

[0007] 미국특허 7,893,017 B2(US '017 특허)는 아실화된 GLP-1 유사체를 개시하고 있으며, 여기서 GLP-1 유사체는 서열 GLP-1 (7-37)에 대해 위치 7 및 8에서 적어도 하나의 아미노산 잔기의 변형에 의해 DPP-IV에 대해 안정화되고 여기서 상기 아실화는 상기 GLP-1 유사체의 C-말단 아미노산 잔기에 직접 부착된 이산(diacid)이다.

[0008] 미국 특허 8,951,959 B2(US '959 특허)는 서열 GLP-1에 대해 위치 8에서 트리플루로메틸기를 함유하는 비-단백질원성 아미노산 잔기를 갖는 DPP-IV 저항성 GLP-1 (7-37) 유사체를 개시하고 있으며, 위치 26에서 리신 잔기에 2개의 산성 기를 포함하는 모이어티로 아실화된다.

[0009] 미국 특허 7,084,243 B2(US '243 특허)는 DPP-IV 저항성 펩티드로서 서열 GLP-1(7-37)에 대해 위치 8에서 Val 또는 Gly를 갖는 GLP-1 (7-37) 유사체를 개시하고 있다.

[0010] 국제 공개 번호 WO 2017/149070 A1(WO '070)은 GLP-1 (7-37)의 위치 8에 대응하는 위치에 Trp를 갖는 GLP-1 유사체를 개시하고 있으며, 이러한 Trp8 화합물은 DPP-IV에 의한 분해에 대해 매우 안정적인 것으로 나타났다.

[0011] 국제 공개 번호 WO 2004/103390A2(WO '390)는 P'_1 위치(GLP-1 (7-37)의 경우에 9 위치에 해당함)에서의 변형으로 천연 기질에 대해 효소 매개 (예컨대 DPP-IV) 절단에 대한 상당히 민감성이 감소된 GLP-1 유사체를 생산할 수 있으며, 천연 기질의 생물 활성을 보유하는 것을 개시하고 있다. WO '390은 9 위치에서 4 치환된 Cβ 탄소를 갖는 아미노산 (예컨대, *삼차-* 류신)을 갖는 GLP-1 (7-37) 유사체가 DPP-IV에 의한 분해에 저항성을 제공하는 것을 추가로 개시하고 있다.

[0012] 국제 공개 번호 WO 2015/086686 A2(WO '686 공개)는 알파-메틸-관능화된 아미노산을 GLP-1 유사체의 주 사슬에 직접 혼입시켜서 프로테아제-저항성(DPP-IV 저항성 포함) 펩티드를 생산하는 것으로 개시하고 있다.

[0013] 다양한 다른 DPP-IV 저항성 GLP-1 효능제들이, 국제 공개 번호 WO 2007/030519 A2, WO 2004/078777 A2, WO 2007/039140 A1, WO 2014/209886 A1, WO 2012/016419 A1, WO 2017/211922 A2, WO 2016/198544 A1 및 WO 2013/051938 A2 같은 특허 공개들에 개시되어 있다.

[0014] 다양한 특허 출원들은 증가된 안정성과 더 긴 작용 지속기간을 갖는 C-말단 연장된 GLP-1 유사체를 개시하고 있다. 예를 들어, 미국특허 번호 7,482,321 B2, 9,498,534 B2 및 7,897,566 B2이다.

[0015] 다양한 특허 출원들은 아실화된 GLP-1 유사체를 개시하고 있으며, 여기서 GLP-1 유사체는 선택적으로 링커를 통해 친유성 치환체에 부착되어 더 긴 작용 지속시간을 제공한다.

[0016] 미국특허 번호 8,603,972 B2(US '972)는 GLP-1 유사체의 모노아실화된 유도체를 개시하고 있으며, 여기서 GLP-1 유사체의 위치 37 또는 38에서의 Lys 잔기가 아실화된다.

[0017] 미국특허 번호 8,648,041 B2, 9,758,560 B2, 9,006,178 B2, 9,266,940 B2, 9,708,383 B2 및 미국특허 출원 공개 번호 2015/0152157 A1, US 2015/0133374 A1은 GLP-1 유사체의 디-아실화된(di-acylated) 유도체를 개시하고 있다.

[0018] 미국특허 출원 공개 번호 US 2016/0200791 A1은 GLP-1 유사체의 트리아실화된(triacylated) 유도체를 개시하고 있다.

[0019] 국제 공개 번호 WO 2016/083499 A1, WO 2016/097108 A1 및 WO 2014/202727 A1은 아실화된 GLP-1 유사체를 개시하고 있으며, 여기서 GLP-1 유사체의 Lys 잔기가 분지형 링커를 통해 2개의 연장 모이어티에 부착된다.

[0020] 국제 공개 번호 WO 2009/030771 A1 및 WO 2018/083335 A1은, 더 긴 작용 지속시간을 제공하기 위해 GLP-1 유사체의 Lys 잔기에 부착될 수 있는 다양한 아실화제(측쇄)를 개시하고 있다.

[0021] 국제 공개 번호 WO 2013/186240 A2는 exendin-4 아미노산 서열의 위치 2에서 Gly, Ser 또는 관능화된 Ser, 예를 들어, Ser (OCH_3), D-Ser 또는 관능화된 D-Ser, 예를 들어, D-Ser(OCH3), Aib, Ala, 또는 D-Ala를 갖는 exendin-4 유사체를 개시하고 있다.

[0022] 다양한 다른 GLP-1 유사체는 국제 공개 번호 WO 2005/027978 A2, WO 1998/008871 A1, WO 1999/043705 A1, WO

1999/043706 A1, WO 1999/043707 A1, WO 1999/043708 A1, WO 2000/034331 A2, WO 2009/030771 A1, WO 2011/080103 A1, WO 2012/140117 A1, WO 2012/062803 A1, WO 2012/062804 A1, WO 2013/037690 A1, WO 2014/202727 A1, WO 2015/000942 A1, WO 2015/022400 A1, WO 2016/083499 A1, WO 2016/097108 A1 및 WO 2017/149070 A1 같은 특허 공개들에 개시되어 있다.

[0023] 여전히, 안정성 및 작용 지속시간 면에서 최적의 바람직한 특성을 갖는 GLP-1 유사체를 개발할 필요가 있다.

발명의 내용

[0024] 본 개시의 일 측면은 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드를 제공한다:

[0025] H-X2-X3-X4-G-T-F-T-S-D-V-S-S-Y-L-X16-G-Q-A-A-X21-E-F-X24-A-W-L-V-R-G-R-G-X33-X34

[0026] 여기서 X2는 Ser, Ser(OMe), D-Ser, D-Ser(OMe), Ala 또는 Aib이고,;

[0027] X3은 부재하거나 Gln이고;

[0028] X4는 Glu이고;

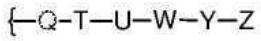
[0029] X16은 Glu이고;

[0030] X24는 Ile이고;

[0031] X33은 Leu, D-Leu, D-Ile 또는 Ile이고;

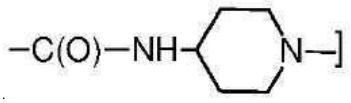
[0032] X34 부재하고 그리고

[0033] X21은 Lys이고, 여기서 Lys의 측쇄 아미노(ε 아미노) 기는 모이어티로 아실화되고:

[0034] 

[0035] 여기서 Q 및 T는 부재하고;

[0036] U는 부재하거나 -C(O)-CH_2-O-$(CH_2)_2$-O-$(CH_2)_2$-NH-}이고 여기서 }는 W 기와의 부착 지점이고;

[0037] W는 부재하거나 -C(O)-CH_2-O-$(CH_2)_2$-O-$(CH_2)_2$-NH-], -C(O)-NH-$(CH_2)_{3-4}$-NH-], -C(O)-C$(CH_3)_2$-NH-] 및  로 이루어진 군으로부터 선택되고 여기서]는 Y 기와의 부착 지점이고;

[0038] Y는 -C(O)-$(CH_2)_2$-CH(COOH)NH--이고, 여기서 --는 Z 기와의 부착 지점이고;

[0039] Z는 -C(O)-$(CH_2)_n$-COOH 또는 -C(O)-$(CH_2)_n$-CH_3이고, 여기서 n은 14 내지 20의 정수이다.

[0040] 본 개시의 폴리펩티드는 부작용이 더 적은 강력한 GLP-1 효능제이다. 또한, 본 개시의 폴리펩티드는 안정적이고 긴 작용 지속시간을 가지며 경구 투여에 적합하다.

도면의 간단한 설명

[0041] 도 1a는 모이어티 A-OSu (중간체 3)의 제조를 도시한다. 도 1b는 모이어티 A-OSu (중간체 3)의 제조를 도시한다.

도 2는 모이어티 C-OSu의 제조를 도시한다.

도 3은 모이어티 D-OSu 제조를 도시한다.

도 4는 모이어티 E-OSu 제조를 도시한다.

도 5는 모이어티 F-OSu의 제조를 도시한다.

도 6a 및 도 6b는 랫트(rat)에서 화합물 1에 대한 경구 포도당 내성 테스트(oral glucose tolerance test, OGTT)의 결과를 도시한다; 단일 주사; 1mg/kg 포도당 AUC 0-120분(도 6a=22시간 후, 도 6b=46시간 후).

도 7은 화합물 1로 만성 치료 후 db/db 2형 당뇨병 마우스에서의 혈액 포도당 수준의 감소를 도시한다.

도 8은 화합물 1로 치료 후 db/db 마우스에서 음식 섭취의 감소를 도시한다.

도 9는 체중 감소에 있어서 db/db 마우스에서 화합물 1의 효능을 도시한다.

도 10은 화합물 1로 치료 후 db/db 마우스에서 Hb1Ac의 감소를 도시한다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0042] **약어**

[0043] Aib: 2-아미노이소부티르산

[0044] ADO: 8-아미노-3,6-디옥소-옥탄산

[0045] OGTT: 경구 포도당 내성 테스트

[0046] DIPEA: *N*,*N*'-디-이소프로필에틸아민

[0047] HOBt: 1-하이드록시벤즈트리아졸

[0048] DIPC: *N*,*N*'-디-이소프로필카르보디이미드

[0049] HOSu: *N*-하이드록시숙신이미드

[0050] IBCF: 이소부틸 클로로포르메이트

[0051] NMM: *N*-메틸모폴린

[0052] THF: 테트라하이드로푸란

[0053] DCM: 디클로로메탄

[0054] DMAP: 4-디메틸아미노피리딘

[0055] DCC: 디시클로헥실 카르보디이미드

[0056] DMAc: 디메틸아세트아미드

[0057] 본 개시는 안정적인 장시간 작용하는 GLP-1 유사체를 제공하며, 이는 빈번한 피하 투여를 필요로 하지 않으며 경구 투여에도 적합하다. 놀랍게도, 서열의 C 말단에서 초과 Leu를 첨가하면 모체 펩티드와 비교할 때 상당히 개선된 효능과 작용 지속시간을 갖는 펩티드를 생산하였다. 초과 Ile를 갖는 펩티드는 또한 모체 펩티드와 비교할 때 개선된 효능과 작용 지속시간의 유사한 효과를 보여주었다. 추가적으로, 본원의 개시는 아실화 반응을 통해 GLP-1(7-37)의 유사체인 펩티드에 첨부되어 상당히 개선된 효능과 더 긴 작용 지속시간을 갖는 화합물을 생산할 수 있는, 모이어티를 나타낸다. 개시된 화합물의 연장 모이어티는 생물 효소에 의한 절단에 덜 민감한, 보다 안정적인 접합을 갖는다. 따라서, 본원에 개시된 화합물은 보다 안정적이며, 환자의 수용(patient compliance)에 추가적인 투여를 덜 빈번히 요구한다. 따라서, 일부 실시예에서, 본 개시는 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드를 제공한다:

[0058] H-X2-X3-X4-G-T-F-T-S-D-V-S-S-Y-L-X16-G-Q-A-A-X21-E-F-X24-A-W-L-V-R-G-R-G-X33-X34 (서열번호 4)

[0059] 여기서 X2는 Ser, Ser(OMe), D-Ser, D-Ser(OMe), Ala 또는 Aib이고,;

[0060] X3은 부재하거나 Gln이고;

[0061] X4는 Glu이고;

[0062] X16은 Glu이고;

[0063] X24는 Ile이고;

[0064] X33은 Leu, D-Leu, D-Ile 또는 Ile이고;

[0065] X34 부재하고 그리고

[0066] X21은 Lys이고, 여기서 Lys의 측쇄 아미노(ε 아미노) 기는 아실화된다.

[0067] 일부 실시예에서, X21은 미국특허 번호 6,268,343, 8,951,959 A2, 8,603,972 B2, 8,648,041 B2, 9,758,560 B2,

9,006,178 B2, 9,266,940 B2, 9,708,383 B2 및 미국특허 출원공개 번호 US 2015/0152157 A1 및 US 2015/0133374 A1; 국제 공개 번호 WO 2009/030771 A1, WO 2006/097537 A2 및 WO 2018/083335 A1에 보고된 연장 모이어티로 아실화될 수 있다.

[0068] 일부 실시예에서, X21 Lys는 지방산 기를 포함하는 모이어티를 가지고 측쇄 아미노 (ε 아미노) 기에서 아실화된다. 지방산 기는 링커를 통해 X21 Lys에 부착될 수 있다. 따라서, 일부 실시예에서, 본 개시는 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드를 제공한다:

[0069] H-X2-X3-X4-G-T-F-T-S-D-V-S-S-Y-L-X16-G-Q-A-A-X21-E-F-X24-A-W-L-V-R-G-R-G-X33-X34

[0070] 여기서 X2는 Ser, Ser(OMe), D-Ser, D-Ser(OMe), Ala 또는 Aib이고,;

[0071] X3은 부재하거나 Gln이고;

[0072] X4는 Glu이고;

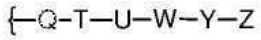
[0073] X16은 Glu이고;

[0074] X24는 Ile이고;

[0075] X33은 Leu, D-Leu, D-Ile 또는 Ile이고;

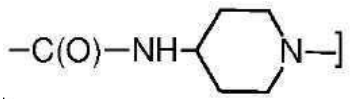
[0076] X34 부재하고 그리고

[0077] X21은 Lys이고, 여기서 Lys의 측쇄 아미노(ε 아미노) 기는 모이어티로 아실화되고:

[0078] 

[0079] 여기서 Q 및 T는 부재하고;

[0080] U는 부재하거나 -C(O)-CH_2-O-$(CH_2)_2$-O-$(CH_2)_2$-NH-}이고 여기서 }는 W 기와의 부착 지점이고;

[0081] W는 부재하거나 -C(O)-CH_2-O-$(CH_2)_2$-O-$(CH_2)_2$-NH-], -C(O)-NH-$(CH_2)_{3-4}$-NH-], -C(O)-C$(CH_3)_2$-NH-] 및  로 이루어진 군으로부터 선택되고 여기서]는 Y 기와의 부착 지점이고;

[0082] Y는 -C(O)-$(CH_2)_2$-CH(COOH)NH--이고, 여기서 --는 Z 기와의 부착 지점이고;

[0083] Z는 -C(O)-$(CH_2)_n$-COOH 또는 -C(O)-$(CH_2)_n$-CH_3이고, 여기서 n은 14 내지 20의 정수이다.

[0084] 일부 실시예에서, X2에서의 아미노산은 Ser, Ser(OMe), D-Ser, D-Ser(OMe), Ala 또는 Aib로부터 선택된다.

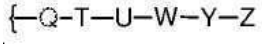
[0085] 일부 실시예에서, X2는 Aib이다.

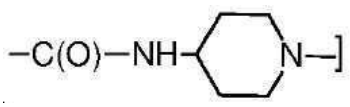
[0086] 일부 실시예에서, X3는 부재한다.

[0087] 일부 실시예에서, X33은 Leu이다.

[0088] 일부 실시예에서, X33은 Ile이다.

[0089] 일부 실시예에서, X21은 Lys이고, 여기서 Lys의 측쇄 아미노(ε 아미노) 기는 모이어티로 아실화되고:

[0090] ,

[0091] 여기서 W는 -C(O)-NH-$(CH_2)_{3-4}$-NH-], -C(O)-C$(CH_3)_2$-NH-] 및  로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0092] 일부 실시예에서, X21은 Lys이고, 여기서 Lys의 측쇄 아미노(ε 아미노) 기는 모이어티로 아실화되고:

[0093] {—Q-T—U—W—Y—Z ,

[0094] 여기서 U와 W 모두 부재하고 Z는 -C(O)-$(CH_2)_n$-CH_3이고 여기서 n은 정수 14이다.

[0095] 일부 실시예에서, X21은 Lys이고, 여기서 Lys의 측쇄 아미노(ε 아미노) 기는 모이어티로 아실화되고:

[0096] {—Q-T—U—W—Y—Z ,

[0097] 여기서 W는 -C(O)-CH_2-O-$(CH_2)_2$-O-$(CH_2)_2$-NH-]이다.

[0098] 일부 실시예에서, X21은 Lys이고, 여기서 Lys의 측쇄 아미노(ε 아미노) 기는 모이어티로 아실화되고:

[0099] {—Q-T—U—W—Y—Z ,

[0100] 여기서 W는 -C(O)-$C(CH_3)_2$-NH-]이다.

[0101] 일부 실시예에서, X21은 Lys이고, 여기서 Lys의 측쇄 아미노(ε 아미노) 기는 모이어티로 아실화되고

[0102] {—Q-T—U—W—Y—Z ,

[0103] 여기서 W는 -C(O)-NH-$(CH_2)_4$-NH-]이다.

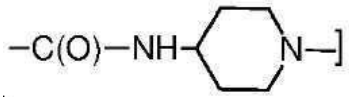
[0104] 일부 실시예에서, X21은 Lys이고, 여기서 Lys의 측쇄 아미노(ε 아미노) 기는 모이어티로 아실화되고:

[0105] {—Q-T—U—W—Y—Z ,

[0106] 여기서 W는 -C(O)-NH-$(CH_2)_3$-NH-]이다.

[0107] 일부 실시예에서, X21은 Lys이고, 여기서 Lys의 측쇄 아미노(ε 아미노) 기는 모이어티로 아실화되고:

[0108] {—Q-T—U—W—Y—Z ,

[0109] 여기서 W는  이다.

[0110] 일부 실시예에서, X21은 Lys이고, 여기서 Lys의 측쇄 아미노(ε 아미노) 기는 모이어티로 아실화되고:

[0111] {—Q-T—U—W—Y—Z ,

[0112] 여기서 Z는 -C(O)-$(CH_2)_n$-COOH이고, 여기서 n은 정수 16이다.

[0113] 일부 실시예에서, X21은 Lys이고, 여기서 Lys의 측쇄 아미노(ε 아미노) 기는 모이어티로 아실화되고:

[0114] {—Q-T—U—W—Y—Z ,

[0115] 여기서 Z는 -C(O)-$(CH_2)_n$-CH_3이고 여기서 n은 정수 14이다.

[0116] 일부 실시예에서, X2는 Ala 또는 Aib이고;

[0117] X3은 부재하고;

[0118] X33은 Leu이고;

[0119] U는 부재하고;

[0120] W는 부재하고;

[0121] Y는 -C(O)-$(CH_2)_2$-CH(COOH)NH--이고, 여기서 --는 Z 기와의 부착 지점이고;

[0122] Z는 -C(O)-(CH_2)n-CH_3이고, 여기서 n은 정수 14이다.

[0123] 일부 실시예에서, 본 개시는 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드를 제공한다:

[0124] H-X2-X3-X4-G-T-F-T-S-D-V-S-S-Y-L-X16-G-Q-A-A-X21-E-F-X24-A-W-L-V-R-G-R-G-X33-X34

[0125] 여기서 X2는 Aib이고,;

[0126] X3은 부재하고;

[0127] X4는 Glu이고;

[0128] X16은 Glu이고;

[0129] X24는 Ile이고;

[0130] X33은 Leu이고;

[0131] X34 부재하고 그리고

[0132] X21은 Lys이고, 여기서 Lys의 측쇄 아미노(ε 아미노) 기는 모이어티로 아실화되고:

[0133] {-Q-T-U-W-Y-Z

[0134] 여기서 Q 및 T는 부재하고;

[0135] U는 -C(O)-CH_2-O-(CH_2)$_2$-O-(CH_2)$_2$-NH-}이고 여기서 }는 W 기와의 부착 지점이고;

[0136] W는 -C(O)-CH_2-O-(CH_2)$_2$-O-(CH_2)$_2$-NH-]이고, 여기서]는 Y 기와의 부착 지점이고;

[0137] Y는 -C(O)-(CH_2)$_2$-CH(COOH)NH--이고, 여기서 --는 Z 기와의 부착 지점이고;

[0138] Z는 -C(O)-(CH_2)$_n$-COOH이고, 여기서 n은 정수 16이다.

[0139] 일부 실시예에서, 본 개시는 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드를 제공한다:

[0140] H-X2-X3-X4-G-T-F-T-S-D-V-S-S-Y-L-X16-G-Q-A-A-X21-E-F-X24-A-W-L-V-R-G-R-G-X33-X34

[0141] 여기서 X2는 Aib이고,;

[0142] X3은 부재하고;

[0143] X4는 Glu이고;

[0144] X16은 Glu이고;

[0145] X24는 Ile이고;

[0146] X33은 Leu이고;

[0147] X34 부재하고 그리고

[0148] X21은 Lys이고, 여기서 Lys의 측쇄 아미노(ε 아미노) 기는 모이어티로 아실화되고:

[0149] {-Q-T-U-W-Y-Z

[0150] 여기서 Q 및 T는 부재하고;

[0151] U는 -C(O)-CH_2-O-(CH_2)$_2$-O-(CH_2)$_2$-NH-}이고 여기서 }는 W 기와의 부착 지점이고;

[0152] W는 -C(O)-C(CH_3)$_2$-NH-]이고, 여기서]는 Y 기와의 부착 지점이고;

[0153] Y는 -C(O)-(CH_2)$_2$-CH(COOH)NH--이고, 여기서 --는 Z 기와의 부착 지점이고;

[0154] Z는 -C(O)-(CH_2)$_n$-COOH이고, 여기서 n은 정수 16이다.

[0155] 일부 실시예에서, 본 개시는 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드를 제공한다:

[0156] H-X2-X3-X4-G-T-F-T-S-D-V-S-S-Y-L-X16-G-Q-A-A-X21-E-F-X24-A-W-L-V-R-G-R-G-X33-X34

[0157] 여기서 X2는 Aib이고,;

[0158] X3은 부재하고;

[0159] X4는 Glu이고;

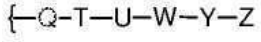
[0160] X16은 Glu이고;

[0161] X24는 Ile이고;

[0162] X33은 Leu이고;

[0163] X34 부재하고 그리고

[0164] X21은 Lys이고, 여기서 Lys의 측쇄 아미노(ε 아미노) 기는 모이어티로 아실화되고:

[0165] 

[0166] 여기서 Q 및 T는 부재하고;

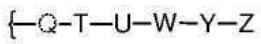
[0167] U는 -C(O)-CH_2-O-$(CH_2)_2$-O-$(CH_2)_2$-NH-}이고 여기서 }는 W 기와의 부착 지점이고;

[0168] W는 -C(O)-NH-$(CH_2)_{3-4}$-NH-]이고, 여기서]는 Y 기와의 부착 지점이고;

[0169] Y는 -C(O)-$(CH_2)_2$-CH(COOH)NH--이고, 여기서 --는 Z 기와의 부착 지점이고;

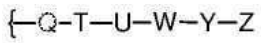
[0170] Z는 -C(O)-$(CH_2)_n$-COOH이고, 여기서 n은 정수 16이다.

[0171] 일부 실시예에서, X21은 Lys이고, 여기서 Lys의 측쇄 아미노(ε 아미노) 기는 모이어티로 아실화되고:

[0172] ,

[0173] 여기서 W는 -C(O)-NH-$(CH_2)_4$-NH-]이다.

[0174] 일부 실시예에서, X21은 Lys이고, 여기서 Lys의 측쇄 아미노(ε 아미노) 기는 모이어티로 아실화되고:

[0175] ,

[0176] 여기서 W는 -C(O)-NH-$(CH_2)_3$-NH-]이다.

[0177] 일부 실시예에서, 본 개시는 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드를 제공한다:

[0178] H-X2-X3-X4-G-T-F-T-S-D-V-S-S-Y-L-X16-G-Q-A-A-X21-E-F-X24-A-W-L-V-R-G-R-G-X33-X34

[0179] 여기서 X2는 Aib이고,;

[0180] X3은 부재하고;

[0181] X4는 Glu이고;

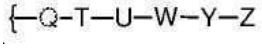
[0182] X16은 Glu이고;

[0183] X24는 Ile이고;

[0184] X33은 Leu이고;

[0185] X34 부재하고 그리고

[0186] X21은 Lys이고, 여기서 Lys의 측쇄 아미노(ε 아미노) 기는 모이어티로 아실화되고:

[0187] 

[0188] 여기서 Q 및 T는 부재하고;

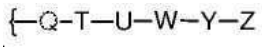
[0189] U는 -C(O)-CH_2-O-$(CH_2)_2$-O-$(CH_2)_2$-NH-}이고 여기서 }는 W 기와의 부착 지점이고;

[0190] W는 -C(O)-NH-$(CH_2)_4$-NH-]이고, 여기서]는 Y 기와의 부착 지점이고;

[0191] Y는 -C(O)-$(CH_2)_2$-CH(COOH)NH--이고, 여기서 --는 Z 기와의 부착 지점이고;

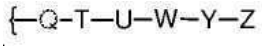
[0192] Z는 -C(O)-$(CH_2)_n$-COOH 또는 -C(O)-$(CH_2)_n$-CH_3이고, 여기서 n은 14 내지 20의 정수이다.

[0193] 일부 실시예에서, X21은 Lys이고, 여기서 Lys의 측쇄 아미노(ε 아미노) 기는 모이어티로 아실화되고:

[0194] ,

[0195] 여기서 Z는 -C(O)-$(CH_2)_n$-COOH이고, 여기서 n은 정수 16이다.

[0196] 일부 실시예에서, X21은 Lys이고, 여기서 Lys의 측쇄 아미노(ε 아미노) 기는 모이어티로 아실화되고:

[0197] ,

[0198] 여기서 Z는 -C(O)-$(CH_2)_n$-CH_3이고, 여기서 n은 정수 14이다.

[0199] 일부 실시예에서, 본 개시는 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드를 제공한다:

[0200] H-X2-X3-X4-G-T-F-T-S-D-V-S-S-Y-L-X16-G-Q-A-A-X21-E-F-X24-A-W-L-V-R-G-R-G-X33-X34

[0201] 여기서 X2는 Aib이고,;

[0202] X3은 부재하고;

[0203] X4는 Glu이고;

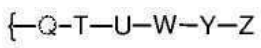
[0204] X16은 Glu이고;

[0205] X24는 Ile이고;

[0206] X33은 Leu이고;

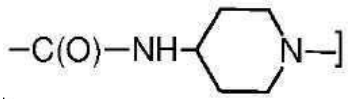
[0207] X34 부재하고 그리고

[0208] X21은 Lys이고, 여기서 Lys의 측쇄 아미노(ε 아미노) 기는 모이어티로 아실화되고:

[0209] 

[0210] 여기서 Q 및 T는 부재하고;

[0211] U는 -C(O)-CH_2-O-$(CH_2)_2$-O-$(CH_2)_2$-NH-}이고 여기서 }는 W 기와의 부착 지점이고;

[0212] W는 이고, 여기서]는 Y 기와의 부착 지점이고;

[0213] Y는 -C(O)-$(CH_2)_2$-CH(COOH)NH--이고, 여기서 --는 Z 기와의 부착 지점이고; 그리고

[0214] Z는 -C(O)-(CH_2)n-COOH이고, 여기서 n은 정수 16이다.

[0215] 일부 실시예에서, 본 개시는 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드를 제공한다:

[0216] H-X2-X3-X4-G-T-F-T-S-D-V-S-S-Y-L-X16-G-Q-A-A-X21-E-F-X24-A-W-L-V-R-G-R-G-X33-X34

[0217] 여기서 X2는 Ser, Ser(OMe), D-Ser, D-Ser(OMe)이고,;

[0218] X3은 부재하고;

[0219] X4는 Glu이고;

[0220] X16은 Glu이고;

[0221] X24는 Ile이고;

[0222] X33은 Leu이고;

[0223] X34 부재하고 그리고

[0224] X21은 Lys이고, 여기서 Lys의 측쇄 아미노(ε 아미노) 기는 모이어티로 아실화되고:

[0225] {-Q-T-U-W-Y-Z

[0226] 여기서 Q 및 T는 부재하고;

[0227] U는 -C(O)-CH_2-O-$(CH_2)_2$-O-(CH2)$_2$-NH-}이고 여기서 }는 W 기와의 부착 지점이고;

[0228] W는 -C(O)-CH_2-O-$(CH_2)_2$-O-$(CH_2)_2$-NH-, -C(O)-NH-$(CH_2)_{3-4}$-NH-], -C(O)-C$(CH_3)_2$-NH-]이고, 여기서]는 Y 기와의 부착 지점이고;

[0229] Y는 -C(O)-$(CH_2)_2$-CH(COOH)NH--이고, 여기서 --는 Z 기와의 부착 지점이고; 그리고

[0230] Z는 -C(O)-$(CH_2)_n$-COOH 또는 -C(O)-$(CH_2)_n$-CH_3이고, 여기서 n은 14 내지 20의 정수이다.

[0231] 일부 실시예에서, X21은 Lys이고, 여기서 Lys의 측쇄 아미노(ε 아미노) 기는 모이어티로 아실화되고:

[0232] {-Q-T-U-W-Y-Z ,

[0233] 여기서 W는 -C(O)-NH-$(CH_2)_{3-4}$-NH-]이다.

[0234] 일부 실시예에서, X21은 Lys이고, 여기서 Lys의 측쇄 아미노(ε 아미노) 기는 모이어티로 아실화되고:

[0235] {-Q-T-U-W-Y-Z ,

[0236] 여기서 W는 -C(O)-CH_2-O-$(CH_2)_2$-O-$(CH_2)_2$-NH-이다;

[0237] 일부 실시예에서, X21은 Lys이고, 여기서 Lys의 측쇄 아미노(ε 아미노) 기는 모이어티로 아실화되고:

[0238] {-Q-T-U-W-Y-Z ,

[0239] 여기서 W는 -C(O)-C$(CH_3)_2$-NH-]이다

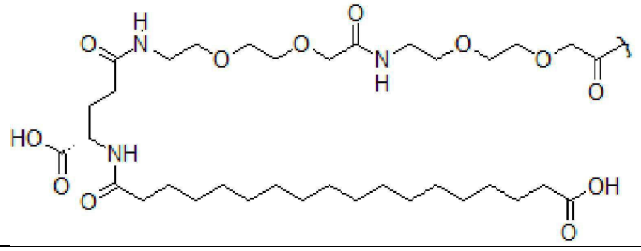
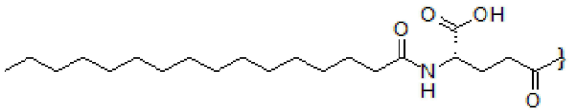
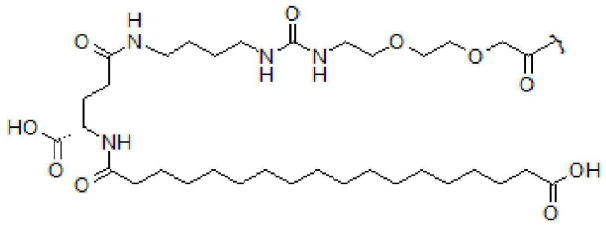
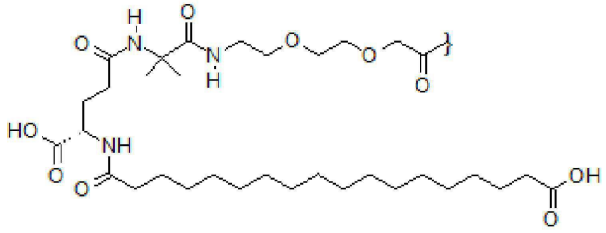
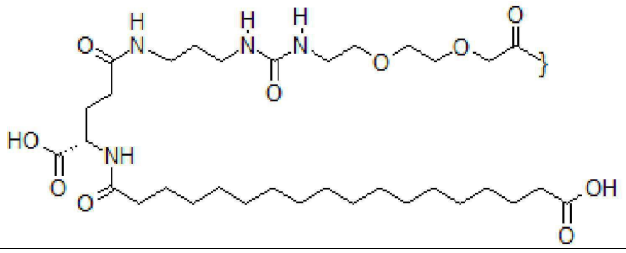
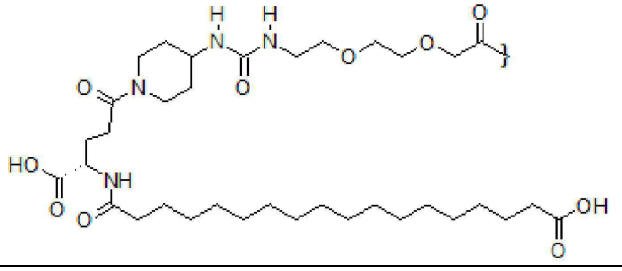
[0240] 일부 실시예에서, X21은 지질 개질된 Lys이고, 여기서 Lys의 측쇄 아미노(ε 아미노) 기는 모이어티로 아실화되고

[0241] {-Q-T-U-W-Y-Z

[0242] 이는 표 1에 제공된 모이어티로 표시되는 것이다

표 1

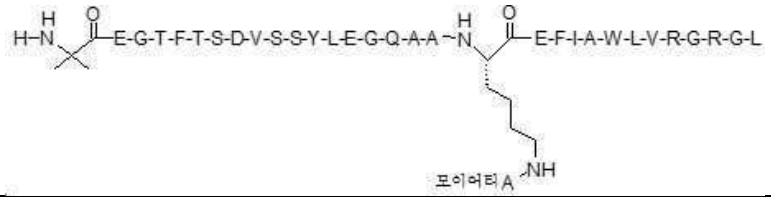
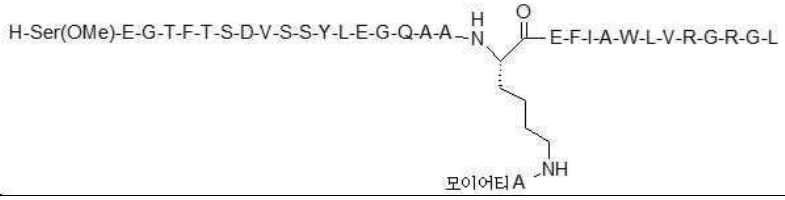
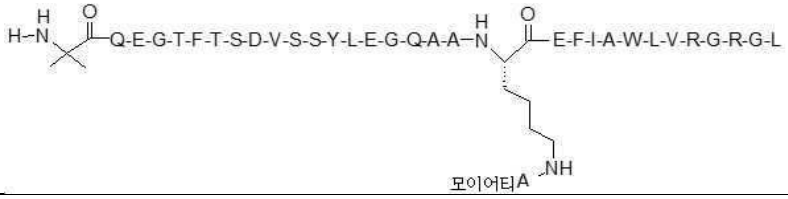
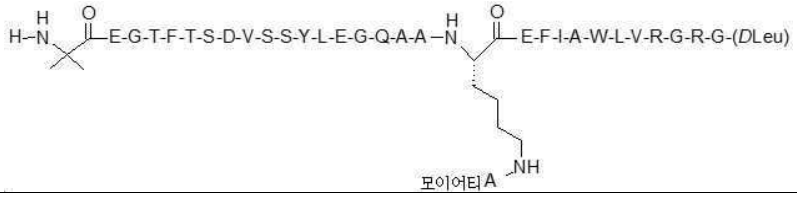
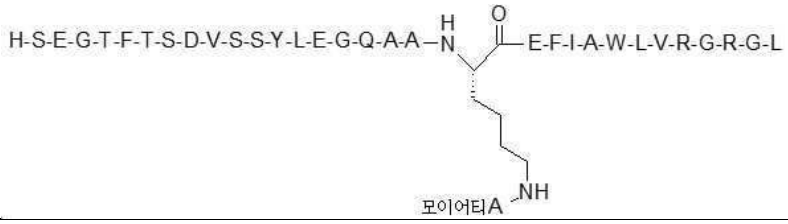
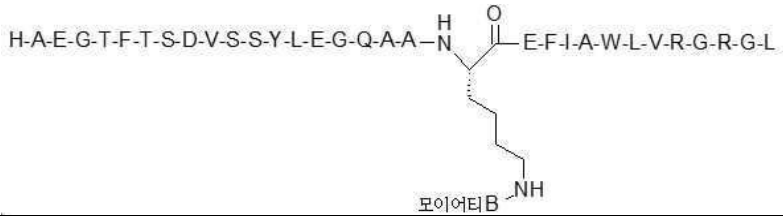
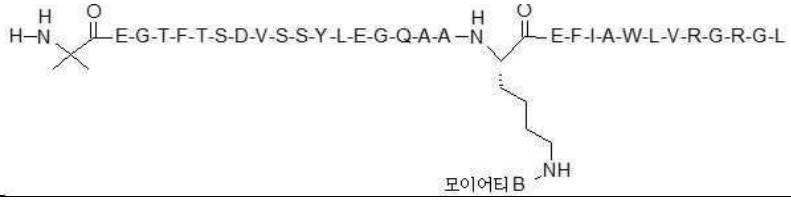
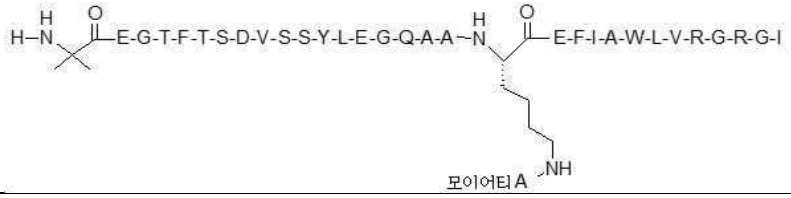
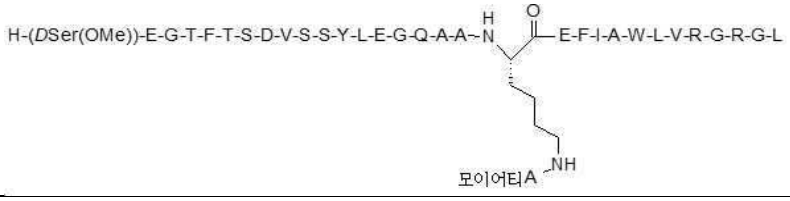
[0243] {-Q-T-U-W-Y-Z 기에 대한 대표적인 모이어티

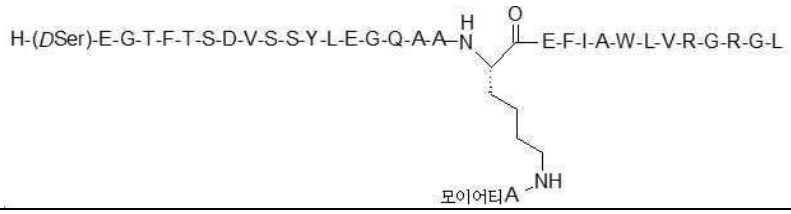
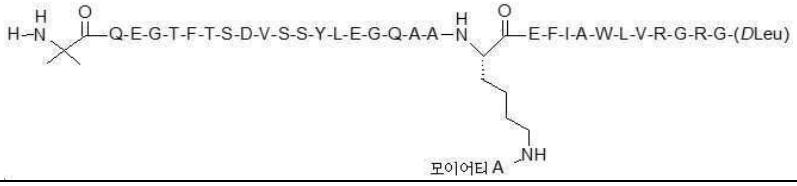
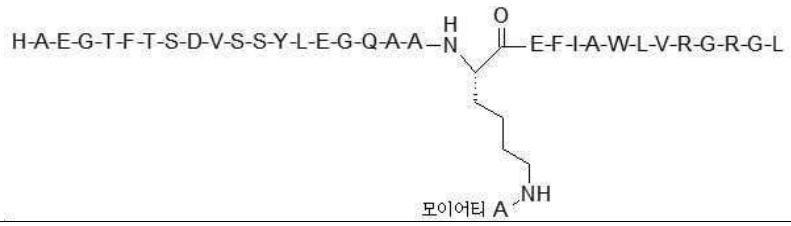
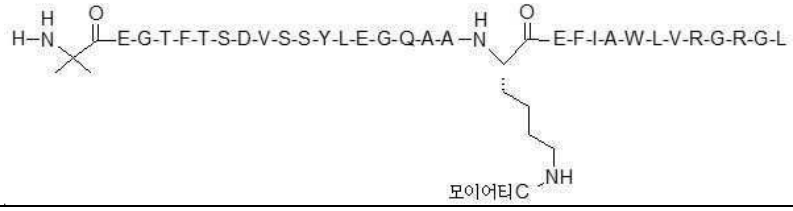
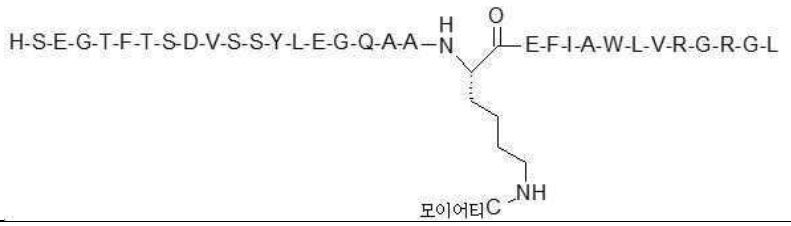
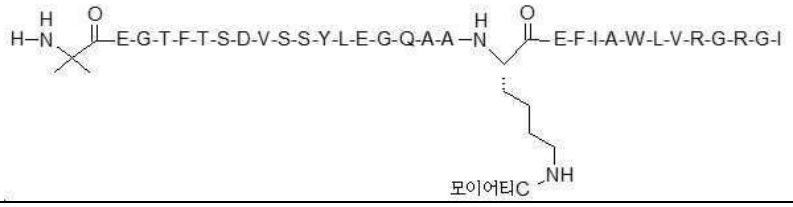
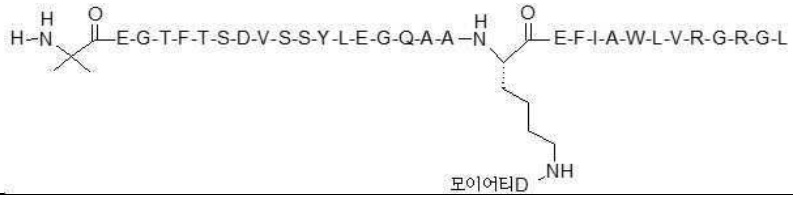
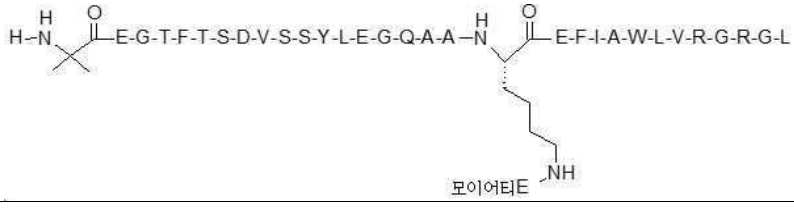
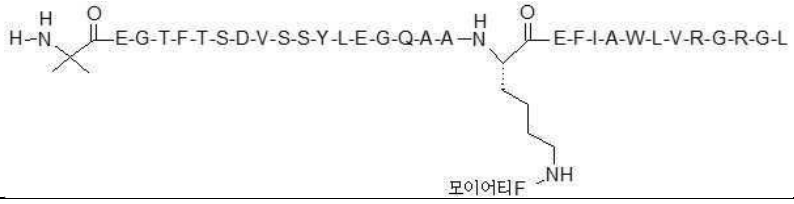
지정	모이어티
모이어티 A	
모이어티 B	
모이어티 C	
모이어티 D	
모이어티 E	
모이어티 F	

[0244] 다른 실시예에서, 본 개시는 하기 표 2에 제공된 펩티드로부터 선택되는, 선행하는 실시예들 중 어느 하나에 따른 폴리펩티드를 제공한다:

표 2

[0245] 본 개시의 대표적인 폴리펩티드 화합물

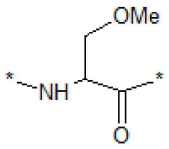
화합물 #	구조*	서열 번호
1		서열번호 05
2		서열번호 06
3		서열번호 07
4		서열번호 08
5		서열번호 09
6		서열번호 10
7		서열번호 05
8		서열번호 11
9		서열번호 12

10		서열번호 13
11		서열번호 14
12		서열번호 10
13		서열번호 05
14		서열번호 09
15		서열번호 11
16		서열번호 05
17		서열번호 05
18		서열번호 05

[0246] * 달리 언급되지 않는 한, 구조 내의 모든 아미노산은 α 위치에서 L 구성을 갖는다. *D*는 서열 내 아미노산에 대한 접두어로 사용될 때 아미노산의 D 구성을 가리킨다. 예를 들어 (*D*Ser)는 서열 내 세린 아미노산이 D-구성을 가짐을 나타낸다.

[0247] 달리 언급되지 않는 한, 본 개시는 서열 내의 아미노산의 L 및 D 이성질체를 모두 다루고자 한다.

[0248] 본 개시에서 기술된 바와 같은 Ser(OMe)는 아미노산 세린이 그 하이드록실기가 메틸화된 것이고 다음과 같은 구조를 갖는다.

[0249] 

[0250] 본 개시에서 언급된 폴리펩티드 서열은 IUPAC에 의해 승인된 아미노산들의 단일 글자 코드로 표현된다.

[0251] 본 개시의 실시예들의 아실화 모이어티를 정의하기 위해 본원에서 사용된 Q, T, U, W, Y 및 Z는 폴리펩티드 서열을 나타내는 데 사용된 아미노산의 단일 문자 코드와 상이하다.

[0252] 본 개시의 폴리펩티드는 놀랍게도 SD 랫트에서 경구 포도당 내성 테스트(OGTT)를 받을 때 혈당의 상당한 감소를 보였다. 경구 포도당으로 접종(challenge)시 SD 랫트에서의 혈당 감소율은 X33 위치에서 추가 Leu 또는 Ile이 결여된 상응하는 폴리펩티드보다 상당히 낮았다.

[0253] 하기 예들을 참조하여 본 발명을 더욱 상세히 예시한다. 예는 모든 면에서 예시적인 것으로 고려되는 것이 바람직하며 청구된 발명의 범위를 제한하려는 것이 아니다.

[0254] **예:**

[0255] **일반적인 제조 방법:**

[0256] 본 개시의 폴리펩티드 화합물은 이하 본원에서 설명되는 방법들에 의해 제조될 수 있다. 상기 방법은 모체 선형 펩티드의 제조 및 모체 펩티드에 대한 지방산 사슬의 후속 부착을 포함하는, 두 단계를 포함한다.

[0257] 본원에 기술된 펩티드는 G. Barany 및 R. B. Merrifield, "The Peptides: Analysis, Synthesis, Biology"; Volume 2－"Special Methods in Peptide Synthesis, Part A", pp. 3-284, E. Gross and J. Meienhofer, Eds., Academic Press, New York, 1980; 및 J. M. Stewart 및 J. D. Young, "Solid-Phase Peptide Synthesis", 2nd Ed., Pierce Chemical Co., Rockford, Ill., 1984에 기술된 것과 같은 고상 기법을 이용하는 화학 합성에 의해 제조될 수 있다. 원하는 전략은 아미노산 측쇄의 일시적 보호를 위한 *삼차*-부틸(-tBu), *삼차*-부틸옥시카르보닐(-Boc), 트리틸(-Trt) 기와 같은 보호기와 조합하여, α-아미노기의 일시적 보호를 위한 Fmoc (9-플루오레닐메틸-옥시카르보닐) 기에 기반한다 (예를 들어, E. Atherton 및 R. C. Sheppard, "The Fluorenylmethoxycarbonyl Amino Protecting Group", in "The Peptides: Analysis, Synthesis, Biology"; Volume 9-"Special Methods in Peptide Synthesis, Part C", pp. 1-38, S. Undenfriend and J. Meienhofer, Eds., Academic Press, San Diego, 1987) 참조).

[0258] 펩티드는 펩티드의 C-말단으로부터 시작하여 불용성 중합체 지지부("수지"라고도 함) 상에서 단계적으로 합성될 수 있다. 합성은 아미드 또는 에스테르 결합의 형성을 통해 펩티드의 C-말단 아미노산을 수지에 덧붙이는 것으로 시작된다. 이는 생성된 펩티드를 C-말단 아미드 또는 카르복실산으로서 각각 궁극적으로 방출할 수 있게 한다.

[0259] 합성에 사용되는 C-말단 아미노산 및 모든 다른 아미노산은 α-아미노 보호기가 합성 중에 선택적으로 제거될 수 있도록 차등적으로 보호되는 α-아미노기 및 측쇄 작용기를 (존재하는 경우) 갖는 것이 요구된다. 아미노산의 커플링은 활성 에스테르로서 카르복실기의 활성화 및 수지에 덧붙여진 *N*-말단 아미노산의 차단되지 않은 α-아미노기와의 그의 반응에 의해 수행된다. α-아미노기 탈보호 및 커플링의 시퀀스는 전체 펩티드 서열이 조립될 때까지 반복된다. 그런 다음 보통 측면 반응을 제한하기 위해 적절한 스캐빈저의 존재 하에, 펩티드는 측쇄 작용기의 부수적인 탈보호에 의해 수지로부터 방출된다. 생성된 펩티드는 최종적으로 역상 HPLC에 의해 정제된다.

[0260] 그런 다음, 모체 펩티드는 활성화된 지방산 사슬을 모체 펩티드와 커플링시킴으로써 지방산 사슬에 커플링될 수

있다. 지방산 사슬은 유기 화학에 주지된 방법에 의해 만들 수 있다. 예를 들어, 지방산 사슬은 선형 지방산 사슬의 제조를 가능하게 하는 고상 합성 방법을 사용하여 제조할 수 있다.

[0261] 합성된 선형 펩티드를 아래에 개략된 바와 같이 분취 HPLC 절차에 의해 정제하였다:

[0262] 분취 HPLC(preparative HPLC): WATERS 2555 Quaternary gradient module (최대 총 유동: 300mL/분, 최대 압력: 3000psi) 또는

[0263] Shimadzu LC-8A (최대 총 유동: 150mL: 최대 압력: 20Mpa)

[0264] 컬럼: C18, 10μ

[0265] 유동: 75mL/분

[0266] 이동상: 제1 정제

[0267] 이동상 A: pH 7.5 인산염 완충액

[0268] 이동상 B: 아세토니트릴

[0269] 기울기: 300분 내에 10-40% 이동상-B.

[0270] 제2 정제:

[0271] 이동상 A: 물 중의 1% 아세트산

[0272] 이동상 B: 아세토니트릴:n-프로판올(50:50) 중의 1% 아세트산

[0273] 기울기: 300분 내에 15-45% 이동상-B

[0274] 본 개시의 최종 화합물을 아래에 개략된 바와 같이 분취 HPLC 절차에 의해 정제하였다:

[0275] 분취 HPLC: WATERS 2555 Quaternary gradient module (최대 총 유동: 300mL/분, 최대 압력: 3000psi) 또는

[0276] Shimadzu LC-8A (최대 총 유동: 150mL, 최대 압력: 20Mpa)

[0277] 컬럼: C18, 10μ

[0278] 유동: 75mL/분

[0279] 이동상:

[0280]

	제1 정제	제2 정제
이동상 A	pH 7.5 인산염 완충액	물 중의 1% 아세트산
이동상 B	아세토니트릴	아세토니트릴:n-프로판올(50:50) 중의 1% 아세트산
기울기	300분 내에 10-40% 이동상-B	300분 내에 15-45% 이동상-B

[0281] 본 개시의 화합물의 순도를 아래에 개략된 바와 같이 RP-HPLC 방법에 의해 분석하였다:

[0282] **HPLC 방법 B1:**

[0283] 컬럼: YMC Pack-Ph (4.6 mm X 150 mm 3μ)

[0284] 용리액: 이동상 A: 물 중의 0.1% 트리플루오로아세트산

[0285] 이동상 B: 아세토니트릴 중의 0.1% 트리플루오로아세트산

[0286] 유량: 1.5mL/분

[0287] 검출: 210nm에서 UV 검출

[0288] 컬럼 온도: 50℃

[0289] 실행 시간: 50분

[0290] 기울기:

시간	이동상 A %	이동상 B %
0.01	90	10
35.0	20	80
40.0	20	80
41.0	90	10
50.0	90	10

[0291]

[0292] **HPLC 방법 B2:**

[0293] 컬럼: YMC-Pack Pro C18 (4 mm x 250 mm, 3 μ)

[0294] 용리액: 이동상 A: 완충액: 아세토니트릴 (900:100)

[0295] 이동상 B: 완충액: 아세토니트릴 (300:700

[0296] 완충액: 물 중의 오르토인산 이수소 칼륨, 오르토인산으로 pH 3.0±0.1로 조정됨

[0297] 유량: 1.0mL/분

[0298] 검출: 210nm에서 UV 검출

[0299] 컬럼 온도: 50℃

[0300] 샘플 트레이 온도: 8℃

[0301] 실행 시간: 38분

시간	이동상 A %	이동상 B %
0	100	0
5	100	0
30	0	100
32	0	100
32.1	100	0
38	100	0

[0302]

[0303] **HPLC 방법 B3:**

[0304] 컬럼: Waters X-Select CSH-C18 (150mm X 4.6 mm; 2.5 μ)

[0305] 용리액: 이동상 A: 완충액: 아세토니트릴 (900:100)

[0306] 이동상 B: 완충액: 아세토니트릴 (300:700

[0307] 완충액: 물 중의 오르토인산 이수소 칼륨, 오르토인산으로 pH 1.5±0.1로 조정됨

[0308] 유량: 0.9mL/분

[0309] 검출: 210nm에서 UV 검출

[0310] 컬럼 온도: 40℃

[0311] 샘플 트레이 온도: 5℃

[0312] 실행 시간: 100분

시간	이동상 A	이동상 B
0	50	50
40	43	57
55	43	57
90	0	100
91	50	50
100	50	50

[0313]

[0314] 본 개시의 화합물을 아래에 개략된 바와 같이 LCMS에 의해 분석하였다:

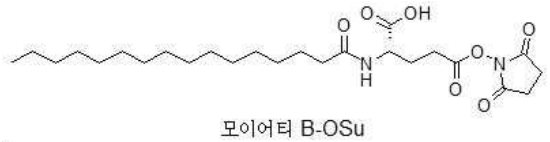
[0315] Waters Acquity® QDa®, Waters Micromass Quattro Micro API 또는 Thermo scientific LCQ Fleet™을 사용하여 질량 스펙트럼을 LCMS 상에서 기록하였다. 분석물의 이온화에 따라 1 μg/ml 내지 50 μg/ml의 최종 농도를 갖는 희석액 중에 적절한 양의 분석물을 용해시켜 시험 용액을 제조하였다. 시험 용액을 분 당 약 10 μl 내지 50 μl의 속도로 1분간 LCMS 내로 주입하고, 전자 분무 이온화(ESI) 양성 또는 음성 모드 및 적정 질량 범위에서 질량 스펙트럼을 기록하였다.

[0316] **예 1: 활성화된 지방산 측쇄 제조:**

[0317] **1. 18-[[(1*S*)-1-카르복시-4-[2-[2-[2-[2-[2-[2-(2,5-디옥소피롤리딘-1-일)옥시-2-옥소-에톡시]에톡시]에틸아미노]-2-옥소-에톡시]에톡시]에틸아미노]-4-옥소-부틸]아미노]-18-옥소-옥타데카논산] (모이어티 A-OSu 중간체-3)의 제조**

[0318] 활성화된 지방산 측쇄인, 모이어티 A-OSu를 도 1a에 개략적으로 나타낸 바와 같이 2-클로로트리틸 염화물 수지를 사용하여 고상 합성에 의해 제조하였다. *N,N'*-디-이소프로필에틸아민 (DIPEA)의 존재 하에 2-클로로트리틸 염화물 수지에 2-[2-(2-Fmoc-아미노에톡시)에톡시]아세트산 (중간체-1)을 부착하였으며 2-[2-(2-Fmoc-아미노에톡시)에톡시]아세트산-2-Cl-Trt-수지를 수득하였다. 중간체-1은 2-[2-(2-아미노 에톡시)-에톡시] 아세트산을 Fmoc *N*-하이드록시숙신이미드 에스테르와 커플링함으로써 제조할 수 있다. 대안적으로, 중간체-1은 상업적으로 이용 가능하며, 이와 같이 조달될 수 있다. 피페리딘을 사용하여 2-[2-(2-Fmoc-아미노에톡시)에톡시] 아세트산-2-Cl-Trt-수지의 아미노기의 선택적 차단-해제에 의해 Fmoc 보호기를 제거하고, 이어서, 1-하이드록시벤즈트라이아졸(HOBt) 및 *N,N'*-디-이소프로필카르보디이미드(DIPC)를 사용하여 유리 아미노기를 2-[2-(2-Fmoc-아미노에톡시)에톡시] 아세트산에 커플링하였으며 2-[2-[2-[[2-[2-(2-Fmoc-아미노에톡시)에톡시]아세틸]에톡시]에톡시]에톡시]아세트산-2-Cl-Trt-수지를 수득하였다. 이어서 피페리딘을 사용하여 2-[2-[2-[[2-[2-(2-Fmoc-아미노에톡시)에톡시]아세틸] 아미노]에톡시]에톡시]아세트산-2-Cl-Trt-수지의 아미노기의 선택적 차단-해제에 의해 Fmoc 기를 제거하고, 이어서, HOBt 및 DIPC를 사용하여 유리 아미노기를 Fmoc-Glu-OtBu에 커플링하여 2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[(4*S*)-4-Fmoc-아미노-5-*삼차*-부톡시-5-옥소-펜타노일]아미노]에톡시]에톡시]아세틸]아미노]에톡시] 아세트산-2-Cl-Trt-수지를 수득하였다. 생성된 2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[(4*S*)-4-Fmoc-아미노-5-*삼차*-부톡시-5-옥소-펜타노일]아미노]에톡시] 에톡시]아세틸]아미노]에톡시]에톡시] 아세트산-2-Cl-Trt-수지를 피페리딘을 사용하여 선택적으로 차단-해제시켰으며 이어서 옥타데칸이산 모노(octadecandioic acid mono) *삼차*-부틸 에스테르와 커플링하여 중간체-2, 소위 [2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[(4*S*)-5-삼차-부톡시-4-[(18-*삼차*-부톡시-18-옥소-옥타데카노일)아미노]-5-옥소-펜타노일]아미노]에톡시]에톡시]아세틸]아미노] 에톡시]에톡시] 아세트산-2-Cl-Trt-수지를 얻었다. 그런 다음, 중간체 2를 트리플루오로에탄올:DCM (1:1)를 사용하여 2-Cl-Trt-수지로부터 절단하였다. 그런 다음 생성된 화합물을 이소부틸 클로로포르메이트(IBCF) 및 *N*-메틸모폴린 (NMM)의 존재 하에 *N*-하이드록시숙신이미드(HOSu)와 반응시킨 후에 트리플루오로아세트산으로 탈보호하여 표제 화합물(모이어티 A-OSu, 중간체-3)을 수득하였다. 전체 공정을 도 1b에 개략적으로 나타낸 것처럼 도시할 수도 있다.

[0319] **2. *N*-팔미토일-L-γ-글루타밀 숙신이미드 에스테르 (모이어티 B-OSu)의 제조**



모이어티 B-OSu

[0320]

[0321] L-글루탐산 알파-*삼차*-부틸 에스테르 (H-Glu-OtBu)를 IBCF 및 NMM의 존재 하에 팔미트산과 반응시켜 CH_3-$(CH_2)_{14}$-C(O)-Glu-OtBu를 수득하였으며, 그런 다음 IBCF 및 NMM의 존재 하에 HOSu와 반응시켜 CH_3-$(CH_2)_{14}$-C(O)-Glu(OSu)-OtBu를 수득하였으며, 이어서, 트리플루오로아세트산으로 탈보호시켜 모이어티 B-OSu를 수득하였다.

[0322] **3. 18-[[(1*S*)-1-카르복시-4-[4-[2-[2-[2-(2,5-디옥소피롤리딘-1-일)옥시-2-옥소-에톡시]에톡시]에틸카르바모일아미노]부틸아미노]-4-옥소-부틸]아미노]-18-옥소-옥타데카논산 (모이어티 C-OSu)의 제조**

[0323] 활성화된 지방산 측쇄인, 모이어티 C-OSu를 도 2에 개략적으로 나타낸 바와 같이 2-클로로트리틸 염화물 수지를 사용하여 고상 합성을 사용하여 제조하였다. DIPEA의 존재 하에 2-클로로트리틸 염화물 수지에 2-[2-(2-Fmoc-아미노에톡시)에톡시]아세트산을 부착하여 2-[2-(2-Fmoc-아미노에톡시)에톡시]아세트산-2-Cl-Trt-수지를 수득하였다. 피페리딘을 사용하여 아미노기의 선택적 차단-해제에 의해 Fmoc 보호기를 제거하였으며, 이어서 THF 중의 *p*-니트로페닐클로로메이트 및 DIPEA를 사용하여 유리 아미노기를 활성화시킨 후에, THF:DMAc 및 DIPEA 중의 Fmoc-아미노 부틸아민 염화수소 염과 반응시켜서, 2-[2-[2-(4-Fmoc-아미노부틸카르바모일아미노)에톡시]에톡

시]아세트산-2-Cl-Trt-수지를 수득하였다. 피페리딘을 사용하여 선택적 차단-해제에 의해 Fmoc 기를 제거하였으며, 이어서 HOBt 및 DIPC를 사용하여 유리 아미노기를 Fmoc-Glu-OtBu에 커플링하였으며, 2-[2-[2-[4-[(4*S*)-4-Fmoc-아미노-5-삼차-부톡시-5-옥소-펜타노일]아미노] 부틸카르바모일아미노]에톡시]에톡시]아세트산-2-Cl-Trt-수지를 수득하였다. 생성된 2-[2-[2-[4-[[(4*S*)-4-Fmoc-아미노-5-삼차-부톡시-5-옥소-펜타노일]아미노]-부틸카르바모일아미노]에톡시] 에톡시]아세트산-2-Cl-Trt-수지를 피페리딘을 사용하여 선택적으로 차단-해제시킨 다음 옥타데칸이산 모노 *삼차*-부틸 에스테르와 커플링시켜 중간체 2-[2-[2-[4-[[(4*S*)-5-*삼차*-부톡시-4-[(18-삼차-부톡시-18-옥소-옥타데카노일)아미노]-5-옥소-펜타노일] 아미노]부틸카르바모일아미노]에톡시]에톡시]아세트산-2-Cl-Trt-수지를 얻었다. 이어서 중간체를 트리플루오로에탄올:DCM (1:1)을 사용하여 2-Cl-Trt-수지로부터 절단하여 2-[2-[2-[4-[[(4*S*)-5-*삼차*-부톡시-4-[(18-*삼차*-부톡시-18-옥소-옥타데카노일)아미노]-5-옥소-펜타노일] 아미노]부틸카르바모일아미노]에톡시]에톡시]아세트산 (LCMS= m/z: 814.56 ($M+H^+$))를 수득하였다. 그런 다음 생성된 화합물을 디시클로헥실 카르보디이미드 (DCC)의 존재 하에 HOSu와 반응시켜 숙신이미드 보호된 중간체를 수득하였으며, 트리플루오로아세트산으로 탈보호해서 표제 화합물 (모이어티 C-OSu)을 수득하였다.

[0324] **4. 18-[[(1S)-1-카르복시-4-[[2-[2-[2-[2-(2,5-다이옥소피롤리딘-1-일)옥시-2-옥소-에톡시]에톡시]에틸아미노]-1,1-디메틸-2-옥소-에틸]아미노]-4-옥소-부틸]아미노]-18-옥소-옥타데카논산 (모이어티 D-OSu)의 제조**

[0325] 도 3에 개략적으로 나타낸 바와 같이 2-클로로트리틸 염화물 수지를 사용하여 고상 합성을 사용하여 지방산 측쇄를 제조하였다. DIPEA의 존재 하에 2-클로로트리틸 염화물 수지에 2-[2-(2-Fmoc-아미노에톡시)에톡시]아세트산을 부착하여 2-[2-(2-Fmoc-아미노에톡시)에톡시]아세트산-2-Cl-Trt-수지를 수득하였다. 피페리딘을 사용하여 아미노기의 선택적 차단-해제에 의해 Fmoc 보호기를 제거한 후에 DIPC 및 HOBt를 사용하여 THF:DMAc 중의 Fmoc-Aib-OH와 커플링시켜 2-[2-[2-[(2-Fmoc-아미노-2-메틸-프로파노일)아미노]에톡시]에톡시]아세트산-2-Cl-Trt-수지를 수득하였다. 피페리딘을 사용하여 선택적 차단-해제에 의해 Fmoc 기를 제거하고, HOBt 및 DIPC를 사용하여 유리 아미노기를 Fmoc-Glu-OtBu와 커플링시켜 2-[2-[2-[[2-[[(4*S*)-4-Fmoc-아미노-5-삼차-부톡시-5-옥소-펜타노일]아미노]-2-메틸-프로판일] 아미노] 에톡시]에톡시]아세트산-2-Cl-Trt-수지를 수득하였다. 생성된 화합물의 Fmoc 기를 피페리딘을 사용하여 선택적 차단-해제시켰으며, 이어서 유리 아미노기를 옥타데칸이산 모노 *삼차* 부틸 에스테르와 커플링시켜 2-[2-[2-[[2-[[(4*S*)-5-삼차-부톡시-4-[(18-*삼차*-부톡시-18-옥소-옥타데카노일)아미노]-5-옥소-펜타노일]아미노]-2-메틸-프로파노일]- 아미노]에톡시]에톡시]아세트산-2-Cl-Trt-수지를 얻었다. 이어서 중간체를 트리플루오로에탄올:DCM (1:1)을 사용하여 2-Cl-Trt-수지로부터 절단하여 2-[2-[2-[[2-[[(4*S*)-5-*삼차*-부톡시-4-[(18-*삼차*-부톡시-18-옥소-옥타데카노일)아미노]-5-옥소-펜타노일]아미노]-2-메틸-프로파노일]아미노]에톡시]에톡시]아세트산 (LCMS= m/z:786.39 ($M+H^+$))을 얻었다. 그런 다음 생성된 화합물을 DCC의 존재 하에 HOSu와 반응시켜 숙신이미드 보호된 중간체를 수득하였으며, 트리플루오로아세트산으로 탈보호시켜 표제 화합물 (모이어티 D-OSu)을 수득하였다.

[0326] **5. 18-[[(1S)-1-카르복시-4-[3-[2-[2-[2-(2,5-디옥소피롤리딘-1-일)옥시-2-옥소-에톡시]에톡시]에틸카르바모일아미노]프로필아미노]-4-옥소-부틸]아미노]-18-옥소-옥타데카논산 (모이어티 E-OSu)의 제조**

[0327] 도 4에 개략적으로 나타낸 바와 같이 2-클로로트리틸 염화물 수지를 사용하여 고상 합성을 사용하여 지방산 측쇄를 제조하였다. DIPEA의 존재 하에 2-클로로트리틸 염화물 수지에 2-[2-(2-Fmoc-아미노에톡시)에톡시]아세트산을 부착하여 2-[2-(2-Fmoc-아미노에톡시)에톡시]아세트산-2-Cl-Trt-수지를 수득하였다. 피페리딘을 사용하여 아미노기의 선택적 차단-해제에 의해 Fmoc 보호기를 제거하였으며, 이어서 THF 및 DIPEA 중의 p-니트로페닐클로로포르메이트를 사용하여 유리 아미노기를 활성화시킨 다음 HOBt를 사용하여 DIPEA의 존재 하에 THF:DMAc 중의 1,3-디아미노프로판과 반응시켜 $NH_2-(CH_2)_3-NH-C(O)-\{(2-(2-아미노-에톡시)-에톡시\}-아세트산-2-Cl-Trt-수지$를 형성하였다. 그런 다음, HOBt 및 DIPC를 사용하여 유리 아미노기를 Fmoc-Glu-OtBu에 커플링시켰으며, 2-[2-[2-[3-[[(4*S*)-4-Fmoc-아미노-5-*삼차*-부톡시-5-옥소-펜타노일]아미노] 프로필카르바모일아미노]에톡시]에톡시]아세트산-2-Cl-Trt-수지를 수득하였다. 생성된 2-[2-[2-[3-[[(4*S*)-4-Fmoc-아미노-5-*삼차*부톡시-5-옥소-펜타노일]아미노]프로필카르바모일아미노]에톡시]- 에톡시]아세트산-2-Cl-Trt-수지를 피페리딘을 사용하여 선택적 차단-해제시켰으며 이어서 옥타데칸이산 모노 삼차 부틸 에스테르와 커플링시켜 2-[2-[2-[3-[[(4*S*)-5-*삼차*-부톡시-4-[(18-*삼차*-부톡시-18-옥소-옥타데카노일)아미노]-5-옥소-펜타노일]아미노]-프로필 카르바모일아미노]에톡시]에톡시]아세트산-2-Cl-Trt-수지를 얻었다. 이어서 중간체를 트리플루오로에탄올:DCM (1:1)을 사용하여 2-Cl-Trt-수지로부터 절단하여 2-[2-[2-[3-[[(4S)-5-삼차-부톡시-4-[(18-*삼차*-부톡시-18-옥소-옥타데카노일)아미노]-5-옥소-펜타노일]아미노]- 프로필카르바모일아미노]에톡시]에톡시]아세트산(LCMS= m/z:801.41($M+H^+$)을 수득하였

다. 그런 다음 생성된 화합물을 디시클로헥실 카르보디이미드 (DCC)의 존재 하에 HOSu와 반응시켜 숙신이미드 보호된 중간체를 수득하였으며, 트리플루오로아세트산으로 탈보호시켜 표제 화합물 (모이어티 E-OSu)을 수득하였다.

[0328] **6. 18-[[(1S)-1-카르복시-4-[4-[2-[2-[2-(2,5-디옥소피롤리딘-1-일)옥시-2-옥소-에톡시]에톡시]에틸카르바모일아미노]-1-피페리딜]-4-옥소-부틸]아미노]-18-옥소-옥타데카논산 (모이어티 F-OSu)의 제조**

[0329] 도 5에 개략적으로 나타낸 바와 같이 2-클로로트리틸 염화물 수지를 사용하여 고상 합성을 사용하여 지방산 측쇄를 제조하였다. DIPEA의 존재 하에 2-클로로트리틸 염화물 수지에 2-[2-(2-Fmoc-아미노 에톡시)에톡시]아세트산을 부착하여 2-[2-(2-Fmoc-아미노에톡시)에톡시]아세트산-2-Cl-Trt-수지를 수득하였다. 피페리딘을 사용하여 아미노기의 선택적 차단-해제에 의해 Fmoc 보호기를 제거하였으며, 이어서 THF 및 DIPEA 중의 p-니트로페닐클로로포르메이트를 사용하여 유리 아미노기를 활성화시킨 다음 HOBt를 사용하여 DIPEA의 존재 하에 THF:DMAc 중의 4-아미노-Boc-피페리딘과 반응시켜 (2-[2-[2-(4-Boc-피페리딜카르바모일아미노) 에톡시]에톡시]아세트산-2-Cl-Trt-수지를 수득하였다. 트리플루오로 아세트산을 사용하여 절단으로 생성된 화합물이 2-[2-[2-(4-피페리딜카르바모일아미노)에톡시]에톡시]아세트산을 수득하였으며, 트리에틸아민 (TEA)의 존재 하에 Fmoc-OSu과 추가로 반응하여 2-[2-[2-(4-Fmoc-피페리딜카르바모일아미노)에톡시]에톡시]아세트산을 수득하였다. 이어서 얻어진 화합물을 DIPEA의 존재 하에 2-클로로트리틸 염화물 수지에 추가로 부착하여 2-[2-[2-(4-Fmoc-피페리딜카르바모일아미노)에톡시]에톡시]아세트산-2-Cl-Trt-수지를 수득하였다. 피페리딘을 사용하여 선택적 차단-해제에 의해 Fmoc 기를 제거하였으며, 이어서 HOBt 및 DIPC를 사용하여 유리 아미노기를 Fmoc-Glu-OtBu와 커플링시켰으며, 2-[2-[2-[[1-[(4*S*)-4-아미노-5-*삼차*-부톡시-5-옥소-펜타노일]-4-피페리딜]카르바모일아미노]에톡시]에톡시]아세트산-2-Cl-Trt-수지를 수득하였다. 생성된 화합물을 피페리딘을 사용하여 선택적 차단-해제시켰으며 이어서 옥타데칸이산 모노 삼차-부틸 에스테르와 커플링시켜 2-[2-[2-[[1-[(4*S*)-5-삼차-부톡시-4-[(18-*삼차*-부톡시-18-옥소-옥타데카노일)아미노]-5-옥소-펜타노일]-4-피페리딜] 카르바모일아미노]에톡시]에톡시]아세트산-2-Cl-Trt-수지를 얻었다. 이어서 중간체를 트리플루오로에탄올:DCM (1:1)을 사용하여 2-Cl-Trt-수지로부터 절단하여 2-[[2-[[2-[[[[1-[[(4*S*)-5-삼차-부톡시-4-[[(18-*삼차*-부톡시-18-옥소-옥타데카노일)아미노]-5-옥소-펜타노일]-4-피페리딜]카르바모일아미노]에톡시]에톡시]아세트산 (LCMS= m/z: 827.40 ($M+H^+$))을 수득하였다. 그런 다음 생성된 화합물을 DCC의 존재 하에 HOSu와 반응시켜 숙신이미드 보호된 중간체를 수득하였으며, 트리플루오로아세트산을 사용하여 탈보호시켜 표제 화합물 (모이어티 F-OSu)을 수득하였다.

[0330] **예 2: 화합물 1의 합성:**

[0331] ***N*-ε^{26}-[2-(2-[2-(2-[2-(2-[4-(17-카르복시헵타데카노일아미노)-4(S)카르복시부틸아미노] 에톡시) 에톡시]아세틸아미노)에톡시]에톡시)아세틸][(Aib^{8}, Arg^{34}, Leu^{38} GLP-1(7-38) 펩티드**

[0332] **파트 A. 모체 선형 펩티드 Aib^{8}, Arg^{34}, Leu^{38} GLP-1(7-38)의 합성**

[0333] 모체 펩티드를 고상 방법에 의해 합성하였다. 합성에 사용된 시작 수지는 Wang 수지였다. Fmoc 보호된 류신을 Wang 수지와 커플링하기 위해 사용하였다. 커플링은 4-디메틸아미노피리딘(DMAP)의 존재 하에 커플링 시약으로서 디이소프로필카르보디이미드, *N*-하이드록시벤조트리아졸(DIC-HOBt)을 사용하여 수행하였으며, Fmoc-Leu-Wang 수지를 수득하였다. 피페리딘을 사용한 Fmoc-Leu-Wang 수지의 아미노기의 선택적 차단-해제 후에, HOBt 및 DIPC를 사용하여 Fmoc-Gly-OH와 커플링하여 Fmoc-Gly-Leu-Wang 수지를 수득하였다. 이렇게 하여 한 사이클을 완성시킨다. 아세트산 무수물 및 디이소프로필에틸 아민/피리딘을 사용하여 모든 아미노산 커플링에서 커플링 해제된 아미노기를 종결시켰다.

[0334] 상기 두 단계, 즉, 수지에 부착된 아미노산의 Fmoc-보호의 선택적 차단-해제 및 Fmoc-보호된 아미노기에 이어지는 다음 아미노산 잔기의 커플링을 나머지 30개 아미노산 잔기에 대해 반복하였다. 선택적 차단-해제, 즉, Fmoc 기의 탈보호는 피페리딘을 사용하여 수행하였으며, 다음 Fmoc 보호된 아미노산과의 커플링은 HOBt/DIPC를 사용하여 수행하였다. Fmoc-보호된 아미노산의 측쇄는 직교하여 보호되었는데(protected orthogonally), 예를 들어, 세린, 티로신 또는 트레오닌의 하이드록실기가 *삼차*-부틸(-tBu) 기로 보호하였으며, 리신 및 아르기닌의 아미노산 구아니도 기(guanido group)는 *삼차*-부틸옥시카르보닐(-Boc) 및 2,2,4,6,7-펜타메틸디하이드로벤조푸란-5-술포닐(-Pbf) 기로 각각 보호하였으며, 히스티딘의 이미다졸은 트리틸(-Trt)로 보호하였으며, 아스파르트산 또는 글루탐산의 카르복실산 기는 -tBu 기로 보호하였다. 위에서 언급한 두 단계, 즉, 선택적 차단-해제 및 다음 Fmoc 보호된 아미노산과의 커플링을 수행하여 Fmoc-His(Trt)-Aib-Glu(OtBu)-Gly-Thr(tBu)-Phe-Thr(tBu)-

Ser(tBu)-Asp(OtBu)-Val-Ser(tBu)-Ser(tBu)-Tyr(tBu)-Leu-Glu(OtBu)-Gly-Gln-Ala-Ala-Lys(Boc)-Glu(OtBu)-Phe-Ile-Ala-Trp-Leu-Val-Arg(Pbf)-Gly-Arg(Pbf)-Gly-Leu-수지를 얻었다.

[0335] 피페리딘을 사용한 Fmoc-His(Trt)-Aib-Glu(OtBu)-Gly-Thr(tBu)-Phe-Thr(tBu)-Ser(tBu)-Asp(OtBu)-Val-Ser(tBu)-Ser(tBu)-Tyr(tBu)-Leu-Glu(OtBu)-Gly-Gln-Ala-Ala-Lys(Boc)-Glu(OtBu)-Phe-Ile-Ala-Trp-Leu-Val-Arg(Pbf)-Gly-Arg(Pbf)-Gly-Leu-수지의 차단-해제 후에 에탄-1,2-디티올과 트리플루오로아세트산을 사용한 절단 및 탈보호 결과 미정제 H-His-Aib-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Val-Ser- Ser-Tyr-Leu-Glu-Gly-Gln-Ala-Ala-Lys-Glu-Phe-Ile-Ala-Trp-Leu-Val-Arg-Gly-Arg-Gly-Leu-OH (Aib^{8}, Arg^{34}, Leu^{38} GLP-1 (7-38) 펩티드)를 생성하였으며 HPLC로 정제하였다.

[0336] **파트 B:**

[0337] pH 약 10에서 아세토니트릴 중에서, 파트 A에서 수득된 정제된 (선형 펩티드) H-His-Aib-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Val-Ser-Ser-Tyr-Leu-Glu-Gly-Gln-Ala-Ala-Lys-Glu-Phe-Ile-Ala-Trp-Leu-Val-Arg-Gly-Arg-Gly-Leu-OH에 걸쳐 활성화된 지방산 사슬, 모이어티 A-OSu의 접목 결과 분취 HPLC에 의해 정제된 미정제 표제 펩티드를 생성하였다. 화합물의 특성화를 표 3에 제공한다.

[0338] **예 3: 화합물 2, 3, 5, 9, 10 및 12의 제조**

[0339] 화합물 2, 3, 5, 9, 10 및 12의 선형 펩티드는 예 1, 파트 A에 대해 주어진 유사한 공정에 따라 고상 방법에 의해 제조하였다. 예 1, 파트 B의 공정을 따름으로써 각각의 선형 펩티드에 걸쳐 활성화된 지방산 사슬, 모이어티 A-OSu의 접목으로 화합물 2, 3, 5, 9, 10 및 12을 제공하였다.

[0340] **예 4: 화합물 4 및 11 제조:**

[0341] 화합물 4 및 11의 선형 펩티드는 여기에서는 Fmoc 보호된 D-류신이 Wang 수지와 먼저 커플링하고 이어서 순차적으로 다른 아미노산을 커플링시키는 것을 제외하고 예 2, 파트 A에 대해 주어진 유사한 공정에 따라 고상 방법에 의해 제조하였다. 예 2, 파트 B의 공정을 따름으로써 각각의 선형 펩티드에 걸쳐 활성화된 지방산 사슬, 모이어티 A-OSu의 접목으로 화합물 4 및 11을 제공하였다.

[0342] **예 5: 화합물 8의 제조**

[0343] 선형 펩티드는 여기에서는 Fmoc 보호된 이소류신이 Wang 수지와 먼저 커플링하고 이어서 순차적으로 다른 아미노산을 커플링시키는 것을 제외하고 예 2, 파트 A에 대해 주어진 유사한 공정에 따라 고상 방법에 의해 제조하였다. 예 2, 파트 B의 공정을 따름으로써 선형 펩티드에 걸쳐 활성화된 지방산 사슬, 모이어티 A-OSu의 접목으로 화합물 8을 제공하였다.

[0344] **예 6: 화합물 6의 제조**

[0345] 선형 펩티드는 예 2, 파트 A에 대해 주어진 유사한 공정에 따라 고상 방법에 의해 제조하였다. 예 2, 파트 B의 유사한 공정을 따름으로써 선형 펩티드에 걸쳐 활성화된 지방산 사슬, 모이어티 B-OSu의 접목으로 화합물 6을 제공하였다.

[0346] **예 7: 화합물 7의 제조**

[0347] 예 2, 파트 B의 유사한 공정을 따름으로써 예 2, 파트 A의 선형 펩티드에 걸쳐 활성화된 지방산 사슬, 모이어티 B-OSu의 접목으로 화합물 7을 제공하였다.

[0348] **예 8: 화합물 13의 제조**

[0349] 예 1, 파트 B의 유사한 공정을 따름으로써 예 1, 파트 A의 선형 펩티드에 걸쳐 활성화된 지방산 사슬, 모이어티 C-OSu의 접목으로 화합물 13을 제공하였다.

[0350] **예 9: 화합물 14의 제조**

[0351] 선형 펩티드는 예 2, 파트 A에 대해 주어진 유사한 공정에 따라 고상 방법에 의해 제조하였다. 예 2, 파트 B의 유사한 공정을 따름으로써 선형 펩티드에 걸쳐 활성화된 지방산 사슬, 모이어티 C-OSu의 접목으로 화합물 14를 제공하였다.

[0352] **예 10: 화합물 15의 제조**

[0353] 선형 펩티드는 Fmoc 보호된 이소류신이 Wang 수지와 먼저 커플링하고 이어서 순차적으로 다른 아미노산을 커플링시키는 것에서 시작하여 예 2, 파트 A에 대해 주어진 유사한 공정에 따라 고상 방법에 의해 제조하였다. 예 2, 파트 B의 유사한 공정을 따름으로써 선형 펩티드에 걸쳐 활성화된 지방산 사슬, 모이어티 C-OSu의 접목으로 화합물 15를 제공하였다.

[0354] **예 11: 화합물 16의 제조**

[0355] 예 2, 파트 B의 유사한 공정을 따름으로써 예 2, 파트 A의 선형 펩티드에 걸쳐 활성화된 지방산 사슬, 모이어티 D-OSu의 접목으로 화합물 16을 제공하였다.

[0356] **예 12: 화합물 17의 제조**

[0357] 예 2, 파트 B의 유사한 공정을 따름으로써 예 2, 파트 A의 선형 펩티드에 걸쳐 활성화된 지방산 사슬, 모이어티 E-OSu의 접목으로 화합물 17을 제공하였다.

[0358] **예 13: 화합물 18의 제조**

[0359] 예 2, 파트 B의 유사한 공정을 따름으로써 예 2, 파트 A의 선형 펩티드에 걸쳐 활성화된 지방산 사슬, 모이어티 F-OSu의 접목으로 화합물 18을 제공하였다.

[0360] 본 개시의 합성된 화합물들의 특징화 데이터가 아래 표 3에 제공되어 있다.

표 3

[0361] **본 개시의 대표적인 화합물들의 특징화 데이터**

화합물 #	LCMS 데이터	HPLC 순도
1	m/z = 1057.52 (MH_4^{4+}), 계산된 질량= 4226.05	98.32% (방법 B2), RT=24.85분
2	m/z = 1061.74 (MH_4^{4+}), 계산된 질량= 4242.93	99.02% (방법 B1), RT=18.53분
3	m/z = 1087.65 $(M-4H)^{-4}$, 계산된 질량= 4354.63	98.12% (방법 B1), RT=18.48분
4	m/z = 1055.68 $(M-4H)^{-4}$, 계산된 질량= 4226.75	98.97% (방법 B1), RT=18.32분
5	m/z = 1057.88 (MH_4^{4+}), 계산된 질량= 4227.49	96.75% (방법 B1), RT=17.09분
6	m/z = 967.26 (MH_4^{4+}), 계산된 질량: 3865.01	98.68% (방법 B3), RT=44.04분
7	m/z= 968.53 $(M-4H)^{-4}$, 계산된 질량= 3878.15	97.39% (방법 B3), RT=27.79분
8	m/z = 1057.72 (MH_4^{4+}), 계산된 질량= 4226.85	95.70% (방법 B1), RT=16.62분
9	m/z = 1061.67 (MH_4^{4+}), 계산된 질량= 4242.65	95.15% (방법 B1), RT=16.48분
10	m/z = 1058.18 (MH_4^{4+}), 계산된 질량= 4228.69	93.66% (방법 B1), RT=16.13분
11	m/z = 1056.95 (MH_4^{4+}), 계산된 질량: 4223.77	95.70% (방법 B2), RT=24.46분
12	m/z = 1405.12 (MH_3^{3+}), 계산된 질량: 4212.34	97.51% (방법 B1), RT=19.06분
13	m/z = 1049.59 (MH_4^{4+}), 계산된 질량= 4194.33	96.01% (방법 B2), RT=25.16분
14	m/z = 1050.13 (MH_4^{4+}), 계산된 질량= 4196.49	92.06% (방법 B2), RT=24.55분
15	m/z = 1049.61 (MH_4^{4+}), 계산된 질량= 4194.41	94.41% (방법 B2), RT=24.82분
16	m/z = 1042.34 (MH_4^{4+}), 계산된 질량= 4165.32	94.56% (방법 B2), RT=25.26분
17	m/z = 1046.18 (MH_4^{4+}), 계산된 질량= 4180.72	94.33% (방법 B2), RT=25.17분
18	m/z = 1052.77 (MH_4^{4+}), 계산된 질량= 4207.08	93.12% (방법 B2), RT=24.92분

[0362] **예 14: 랫트에서의 경구 포도당 내성 테스트(OGTT); 단일 주사; 1mg/kg**

[0363] 동물들을 각 그룹에 4마리 동물을 가지고, 정상 대조군 그룹, 시험 그룹 및 제3 세마글루티드(semaglutide) 그룹인, 3개의 그룹으로 나누었다. OGTT 개시 전에 동물들을 12시간 금식시켰다. 시험 그룹 동물들에게, 화합물 1을 1 mg/kg 용량으로 피하 주사하였다. 세마글루티드 그룹에게는, 1 mg/kg의 용량을 피하 주사하였다. 시험 약

물 또는 세마글루티드를 피하 주사한 22시간, 166시간 및 334시간 후에, 혈당 측정기를 사용하여 혈당을 측정하였다(시간 0 측정). 그런 다음 모든 동물에게 2g/kg의 포도당 용액을 경구 투여하였다. 포도당 시험접종 후에 20, 40, 60, 90 및 120분에 혈당을 측정하였다. 체중 및 음식 섭취를 기록하였다. 혈당 데이터를 이 방향 ANOVA 후에 PRISM(그래프 패드 버전 5.03)를 사용하여 Bonferroni 사후테스트를 사용하여 분석하였다. 혈당 $AUC_{0-120분}$의 데이터를, t 테스트를 사용하여 분석하였다.

[0364] 본 개시의 폴리펩티드는 랫트에서의 경구 포도당 내성 테스트(OGTT)에서 연구했을 때 대조군 그룹과 비교하여 상당한 혈당 저하 효과를 보여주었다. 예를 들어, 도 6은 화합물 1을 투여한 시험 그룹 및 세마글루티드 치료 그룹에서 22시간 및 46시간 후 시간 0에서 120분까지 혈당 수준 변화를 제공한다. 단일 투여 22시간 후에, 화합물 1은 ANOVA 후 Bonferroni 사후테스트에서 정상 대조군 대비 $p<0.001$인 혈당 수준의 통계학적으로 유의한 감소를 보였다. 화합물 1의 포도당 저하 효과는 세마글루티드에서 관찰된 포도당 저하 효과 보다 우월하였다 (도 6a *참조*). 화합물 1의 포도당 저하 효과의 우월성은 심지어 46시간의 피하 투여 후에도 관찰되었다 (도 6b). 또한, 화합물 1과 세마글루티드 모두 4일차 뿐만 아니라 2일차 관찰된 경우에 대조군에 비해 음식 섭취에서 통계학적으로 유의한 감소를 보였다 (표 4 & 5 *참조*). 4 일차에 화합물 1에 의해 나타난 감소된 음식 섭취는 세마글루티드보다 컸다 (표 5 *참조*). 체중 감소의 관점에서, 시험 화합물만이 4일차에 체중 감소에서 유의한 감소를 보였다.

표 4

[0365] **2일차 음식 섭취 및 체중에 미치는 치료 효과**

음식 소모 (g) (0일차 - 2일차)			**체중 (g) (2일차)**		
	평균	**SD**	**평균**	**SD**	**기준선 대비 변화%**
정상 대조군	33.0	4.7	480.6	15.6	8.89
화합물 1	2.63***	2.5	365.6	21.0	-9.33
세마글루티드	5.03***	3.4	428.1	42.3	-7.65

[0366] *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001 대 정상 대조군; 일 방향 ANOVA 후 Bonferroni 사후테스트

표 5

[0367] **4일차 음식 섭취 및 체중에 미치는 치료 효과**

음식 소모 (g) (0일차 - 4일차)			**체중 (g) (4일차)**		
	평균	**SD**	**평균**	**SD**	**기준선 대비 변화%**
정상 대조군	90.5	5.6	491.3	16.9	2.1
화합물 1	43.25***,##	2.8	436.2*	21.1	-7.5
세마글루티드	55.73***	4.1	427.2	42.3	-5.3

[0368] *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001 대 정상 대조군; 일 방향 ANOVA 후 Bonferroni 사후테스트

[0369] #p<0.05, ##p<0.01, ###p<0.001 대 세마글루티드; 일 방향 ANOVA 후 Bonferroni 사후테스트

[0370] 놀랍게도 Leu와 Ile로서 X33을 갖는 화합물은 주어진 연구에서 혈당의 유의한 감소를 나타낸 반면, Leu와 Ile 이외의 아미노산을 갖는 화합물은 혈당 저하에 있어서 유의하게 적은 효과를 가지는 것으로 밝혀졌다. 본 개시의 폴리펩티드는 대조군 그룹과 비교했을 때 혈당에서 유의한 감소를 보여주었다. X33 위치에서 Leu 또는 Ile 이외의 아미노산을 갖는 화합물도 시험하였다. 예를 들어, 화합물 1(서열번호 05)의 32번째 위치에서 Leu를 Lys 및 Ser로 대체하여 화합물 Std-1과 Std-2를 각각 얻었다. Std-1 및 Std-2는 혈당 $AUC_{0-120분}$의 단지 약 35 및 15% 감소를 보였다 (표 6).

표 6

[0371] 24시간 후 1mg/Kg 용량에서 OGTT 시험 시 혈당 $AUC_{0-120분}$의 감소율.

화합물 #	포도당 감소%	화합물/표준 세마글루티드	화합물 #	포도당 감소%	화합물/표준 리라글루티드
Std-1	35.1	0.71	6	75.8	1.83
Std-2	14.8	0.30	7	71.9	1.73
세마글루티드	49.3		리라글루티드	41.5	

[0372] 마찬가지로, 32번째 위치에서 추가적인 Leu를 갖는 것에 있어서 리라글루티드와 상이한 화합물 6 및 2번째 아미노산 Ala를 Aib로 대체하고 32번째 아미노산으로서 Leu를 가짐으로써 리라글루티드와 상이한 화합물 7은, 리라글루티드보다 상당히 높은 24시간 혈당 감소 효과를 나타냈다 (표 6).

[0373] 화합물 1이 포도당 감소, 음식 섭취 및 체중 감소의 측면에서 상당히 양호하다고 결정되었다면, 본 발명의 화합물의 작용 지속시간을 결정하기 위해 실험을 수행하였다. 166시간(7일) 및 334시간(14일) 후에 본 발명의 대표적인 화합물들(화합물 1, 13 및 16)의 효과를 연구하고 세마글루티드의 효과와 비교하였다. 화합물들을 아래 제공된 방법에 따라 시험하였다:

[0374] 동물들을 각 그룹에 4마리 동물을 가지고, 정상 대조군 그룹, 시험 그룹 및 제3 세마글루티드(semaglutide) 그룹인, 3개의 그룹으로 나누었다. OGTT 개시 전에 동물들을 12시간 금식시켰다. 시험 그룹 동물들에게, 화합물 1, 화합물 13 및 화합물 16을 1 mg/kg 용량으로 피하 주사하였다. 세마글루티드 그룹에게는, 1 mg/kg의 용량을 피하 주사하였다. 시험 화합물 또는 세마글루티드를 피하 주사한 22시간, 166시간 및 334시간 후에, 혈당 측정기를 사용하여 혈당을 측정하였다(시간 0 측정). 그런 다음 모든 동물에게 2g/kg의 포도당 용액을 경구 투여하였다. 포도당 시험접종 후에 20, 40, 60, 90 및 120분에 혈당을 측정하였다. 체중 및 음식 섭취를 기록하였다. 혈당 데이터를 이 방향 ANOVA 후에 PRISM(그래프 패드 버전 5.03)를 사용하여 Bonferroni 사후테스트를 사용하여 분석하였다. 혈당 $AUC_{0-120분}$의 데이터를, t 테스트를 사용하여 분석하였다.

[0375] 표 7은 1일, 7일 및 14일의 투여 후에 대조군 그룹과 비교 시 본 발명의 대표적인 화합물들(화합물 1, 13 및 16)에 대한 혈당의 AUC 감소를 제공한다.

표 7

[0376] 1mg/Kg 용량에서 OGTT 시험 시 혈당 $AUC_{0-120분}$의 감소율.

화합물 #	시간	혈당 AUC (mg/dL*분)	AUC 변화 (mg/dL*분)
		평균	
세마글루티드 실험 1	22hr	5458.0	-63.4
	168hr	12785.0	-25.5
	336hr	16223.0	-2.4
화합물 1 실험 1	22hr	3173.0	-78.7
	168hr	5941.0	-65.4
	336hr	11920.0	-28.3
화합물 13 실험 1	22hr	2795.0	-81.2
	168hr	6950.0	-59.5
	336hr	11368.0	-31.6
세마글루티드 실험 2	22hr	4258	-50
	168hr	7410	-26.6
	336hr	8023.0	-5.5
화합물 16 실험 2	22hr	1646	-80.7
	168hr	4283	-57.6
	336hr	8295.0	-2.3

[0377] 화합물 1 및 13을 연구하고 하나의 실험(실험 1)에서 세마글루티드와 비교하였고 화합물 16을 연구하고 별도의 실험(실험 2)에서 세마글루티드와 비교하였다. 168시간 주사 후, 본 발명의 화합물 1, 13 및 16은 시간 0 혈당 수준과 비교할 때 혈당 AUC의 약 60% 감소를 보여주었다. 반면에, 세마글루티드는 시간 0 혈당 수준에 대해 혈당 수준의 약 25% 감소를 보여주었다.

[0378] 소모된 음식량과 체중 변화에 있어서 유사한 관찰을 수행하였다. 아래 표 8에서 볼 수 있는 바와 같이, 대표적인 화합물들(화합물 1, 13 및 16)로 투여된 동물들은, 세마글루티드로 투여된 동물들과 비교할 때 상당히 적은 음식을 소모하였다. 화합물 16은 비만 치료를 위한 잠재적인 유용성을 입증하는 유의한 체중 감소 저하를 보여주었다.

표 8

[0379] **1mg/Kg 용량에서 OGTT 시험 시 음식 소모 및 체중에 대한 효과**

화합물 #	**시간**	**음식 소모 (g)**	**체중 변화 (%)**
		평균	평균
세마글루티드 실험 1	48 h	17.5	-6.5
	154 h	86.3	4.5
	324 h	107.9	11.8
화합물 1 실험 1	48 h	8.3	-9.8
	154 h	69.6	5.2
	324 h	99.4	9.3
화합물 13 실험 1	48 h	8.4	-10.2
	154 h	62.3	4.5
	324 h	82.44	8.2
세마글루티드 실험 2	48 h	19.3	-8.7
	154 h	50.4	0.2
	324 h	96.8	3.8
화합물 16 실험 2	48 h	5.9	-10.7
	154 h	44.1.0	-7.0
	324 h	104.3	-4.3

[0380] **예 15: 만성 치료 후 db/db 2형 당뇨병 마우스에서의 HbA1c의 감소**

[0381] 이 연구는 당뇨병 마우스 모델에서 수행하였다. 동물들을 당뇨병 대조군 그룹, 시험 그룹 및 세마글루티드 치료 그룹인, 3개의 치료 그룹으로 나누었다. 본 개시의 화합물 1은 3일 동안 하루에 1회 0.3 mg/kg 용량(qd*3) 후 7 용량에 대해 격일로 0.1 mg/kg 용량(q2d*7) 후 2 용량 사이클에 대해 매 4일 마다 1회 0.1 mg/kg 용량으로(q4d*2) 피하 주사하였다. 동일한 투여량 요법을 세마글루티드 치료 그룹에 투여하였다. 혈당 수준 및 체중을 매일 측정하였다. %HbA1c는 칼럼 크로마토그래피에 의해 0일, 7일, 14일 및 27일에 측정되었다. 누적 음식 섭취량을 27일차에 계산하였다. %HbA1c 데이터를 이 방향 ANOVA 후 PRISM(그래프 패드 버전 5.03)를 사용하여 Bonferroni 사후테스트에 의해 분석하였다.

[0382] 화합물 1로 투여된 시험 그룹 동물들은 당뇨병 대조군 그룹과 비교하여 상당한 혈당 수준 감소를 보여주었으며(도 7 *참조*), 그 효과는 연구의 후자의 단계에서 세마글루티드 치료 그룹보다 우월하였다. 화합물 1로 투여된 시험 그룹 동물들은 도 8에 제공된 결과에서 알 수 있듯이 음식 섭취의 유의한 감소를 보였다. 도 8은 시험 화합물로 치료한 대조군 및 db/db 마우스에 의해 0-27 일차의 누적 음식 섭취를 제공한다. 시험 화합물 및 세마글루티드 둘 다 당뇨병 대조군에 비해 통계학적으로 유의한 음식 섭취 감소를 보여주었다. 또한, 시험 화합물은 세마글루티드에 비해, 유의하게 낮은 음식 섭취를 보였다. 동일한 연구에서, 화합물 1은 또한 당뇨병 대조군 그룹에 비해 유의한 체중 감소를 보여주었다. 도 9는 0-27 일차의 대조군 및 시험 그룹에 대한 체중 변화%의 결과를 제공한다. 시험 화합물 1은, 세마글루티드 치료 그룹에서 관찰된 -8%에 비해 -16%의 유의미한 감소를 나타냈다 (도 09 참조).

[0383] 당뇨병의 경우, 혈당 수준의 더 불량한 대조군을 표시하는, 더 높은 양의 HbA1c이 심혈관 질환, 신염(nephropathy), 신경병(neuropathy) 및 망막증(retinopathy)과 연관되고 있다. 27일 연구에서, 화합물 1은 만성 치료 후 db/db 2형 당뇨병 마우스에서 HbA1c 수준의 통계학적으로 유의한 감소를 나타냈다. 아래 표 9와 도

10은 당뇨병 대조군 그룹 및 화합물 1로 만성 치료 후 그룹에서 0일 및 27일에 HbA1c의 수준을 제공한다. 이러한 효과는 심지어 세마글루티드와 비교했을 때에도 통계적으로 유의하였다.

표 9

[0384] **db/db 마우스에서 % HbA1c 수준에 대한 치료 효과**

시점 (일)	% HbA1c										
	당뇨병 대조군 (DC)			화합물 1				세마글루티드			
	평균	SD	n	평균	SD	n	DC 대비 변화%	평균	SD	n	DC 대비 변화%
0	4.70	0.52	6	4.87	0.59	6	-	5.05	0.35	5	-
27	7.30	1.17	6	3.73$^{***\#\#}$	0.86	6	-3.57	5.03***	0.69	5	-2.26

[0385] *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001 대 당뇨병 대조군; 이 방향 ANOVA 후 Bonferroni 사후테스트

[0386] #p<0.05, ##p<0.01, ###p<0.001 대 세마글루티드; 일 방향 ANOVA 후 Bonferroni 사후테스트

[0387] 별개의 연구에서, 시험 화합물 1, 13 및 16을 연구하였고, HbA1c & 인슐린 수준 및 누적 음식 소비, 체중 변화 및 혈당 AUC에 대한 이들의 효과에 대해 세마글루티드와 비교하였다. 연구를 당뇨병 마우스 모델에 대해 상기에서와 유사한 방식으로 수행하였다. 동물들을 당뇨병 대조군 그룹, 시험 그룹 및 세마글루티드 치료 그룹인, 3개의 치료 그룹으로 나누었다. 화합물 1, 화합물 13 및 화합물 16의 본 개시의 대표적인 화합물을 3.04 또는 6.078 nM 용량으로 피하 주사하였다(격일로 28 일째까지 (q2d*15). 동일한 투여량 요법을 세마글루티드 치료 그룹에 투여하였다. 혈당 수준 및 체중을 매일 측정하였다. %HbA1c, 인슐린을 0일, 14일 및 29일에 측정하였다. 누적 음식 섭취 및 체중 변화를 14일과 29일째에 계산하였다. %HbA1c, 인슐린 데이터를 이 방향 ANOVA 후 PRISM(그래프 패드 버전 5.03)를 사용하여 Bonferroni 사후테스트에 의해 분석하였다. 반면, 혈당 AUC, 체중 변화 및 누적 음식 섭취 데이터는 일 방향 ANOVA 후 PRISM(그래프 패드 버전 5.03)를 사용하여 Bonferroni 사후테스트에 의해 분석하였다. 29일째부터 45일째까지, 동물들을 약물 치료가 주어지지 않는 회복 기간에 두었다. 이 기간 동안 혈당 및 체중을 측정하였다. 45일째에, 체중 변화, %HbA1c, 인슐린을 측정하였다.

[0388] 결과가 아래 표 10, 11 및 12에 제공되어 있다.

표 10

[0389] **HbA1C (%):** 화합물 1 (6.078nM), 화합물 13 (3.04 & 6.078nM), 화합물 16 (3.04 & 6.078nM); (q2d*15) (n=7)

시점 (일)	%HbA1C													
	당뇨병 대조군 (DC)		화합물 1, 6.078nM, q2d*15		화합물 13, 3.04nM, q2d*15		화합물 13, 6.078nM, q2d*15		화합물 16, 3.04nM, q2d*15		화합물 16, 6.078nM, q2d*15		세마글루티드, 12.15 nM, q2d*15	
	평균	SD	평균	SD	평균	SD	평균	SD	평균	SD	평균	SD	평균	SD
	7.7	1.2	7.8	0.8	7.7	1.5	7.83	0.76	7.74	1.27	7.83	0.99	7.66	1.13
	8.0	1.0	6.4**	0.5	6.6*	0.9	6.00 ***	0.53	5.67 ***#	0.68	5.64 ***#	0.49	7.04	1.15
	8.3	1.0	6.2***	0.5	6.4 ***	0.8	5.64 ***	0.51	5.33 ***#	0.39	5.16 ***#	0.24	6.47 ***	1.03

[0390] *=p<0.05, **=p<0.01, ***=p<0.001 대 당뇨병 대조군, #p<0.05, ##p<0.01, ###p<0.001 대 세마글루티드; 일 방향 ANOVA 후 Bonferroni 사후테스트

표 11

[0391] **인슐린(ng/mL):** 화합물 1 **(6.078nM),** 화합물 13 **(3.04 &6.078nM),** 화합물 16 **(3.04 및 6.078nM); (q2d*15) (n=7)**

시점 (일)	인슐린 (ng/mL)													
	당뇨병 대조군		화합물 1, 6.078nM, q2d*15		화합물 13, 3.04nM, q2d*15		화합물 13, 6.078nM, q2d*15		화합물 16, 3.04nM, q2d*15		화합물 16, 6.078nM, q2d*15		세마, 12.15 nM, q2d*15	
	평균	SD	평균	SD	평균	SD	평균	SD	평균	SD	평균	SD	평균	SD
	17.6	5.5	18.0	5.8	21.7	12.1	26.2	14.0	13.9	6.6	21.8	9.6	18.7	10.3
	23.0	10.7	58.1**	31.6	41.8	28.2	61.2***	23.7	50.8*	27.7	58.1**	12.5	37.5	26.5
	16.9	6.6	54.7**	6.4	54.4**	27.0	59.4***	22.4	53.8**	23.5	68.2***	27.1	48.1**	25.3

[0392] *=p<0.05, **=p<0.01, ***=p<0.001 대 당뇨병 대조군, #p<0.05, ##p<0.01, ###p<0.001 대 세마글루티드; 일 방향 ANOVA 후 Bonferroni 사후테스트

표 12

[0393] **누적 음식 소비, 혈당 AUC$_{(mg/dL*일)}$ 및 체중 변화:** 화합물 1 (6.078nM), 화합물 13 (3.04 & 6.078nM), 화합물 16 (3.04 & 6.078nM); (q2d*15)

그룹 (n=7)	누적 음식 섭취 (g) 0-29일		혈당 AUC (0-29일) (mg/dL*일)			체중 변화 29일, 0일째 대비 변화%	
	평균	SD	평균	SD	대조군 대비 변화%	평균	SD
당뇨병 대조군	99.3	37.16	16948.1	281.48		9.4	6.4
화합물 1, 6.078nM	79.8	25.09	9194.6***	450.84	-45.75	-0.3	2.2
화합물 13, 3.04nM	75.2	18.45	9515.4***	805.21	-43.86	1.2	3.8
화합물 13, 6.078nM	70.4	10.85	8451.7***##	612.94	-50.13	-1.1	2.4
화합물 16, 3.04nM	77.4	23.82	9399.0***	680.38	-44.54	-1.4	5.4
화합물 16, 6.078nM	66.7	29.48	8086.1***##	623.80	-52.29	-5.5	3.1
세마글루티드, 12.155nM	92.0	6.64	9867.9***	832.73	-41.78	0.7	3.9

[0394] *=p<0.05, **=p<0.01, ***=p<0.001 대 당뇨병 대조군, #p<0.05, ##p<0.01, ###p<0.001 대 세마글루티드; 일 방향 ANOVA 후 Bonferroni 사후테스트

[0395] 약 3 nM 및 6 nM 용량에서 본 개시의 대표적인 화합물(화합물 1, 13 및 16)은 대조군과 비교시 HbA1c, 혈당, 음식 소비 및 체중의 유의한 감소를 나타냈다(표 12). 감소는 약 12 nM 용량에서 세마글루티드에 의해 나타낸 것에 상당하였다. 또한, 29일 이후에도 효과가 나타났으며 (표 13 및 표 14) 빈번한 투여를 필요로 하지 않고 이에 따라 환자의 수용에 부가하는 장시간 작용하는 약물 개발을 위한 본 발명의 화합물의 잠재성을 입증하고 있다.

표 13

[0396] **회복 연구-혈당 AUC** $_{(mg/dL*일)}$

그룹 (n=3)	혈당 AUC (30-37일) (mg/dL*일)		대조군 대비 변화%	혈당 AUC (38-45일) (mg/dL*일)		대조군 대비 변화%
	평균	SD		평균	SD	
당뇨병 대조군	3591.7	47.04		3601.7	38.66	
화합물 1, 6.078nM	2787.3*	17.67	-22.39	3335.7	66.11	-7.39
화합물 13, 3.04nM	2588.7**	411.97	-27.93	3401.0	61.00	-5.57
화합물 13, 6.078nM	2875.7	436.87	-19.94	3361.0	205.83	-6.68
화합물 16, 3.04nM	2420.0**	89.71	-32.62	3284.0*	81.66	-8.82
화합물 16, 6.078nM	2167.7***	210.19	-39.65	3134.7**	103.39	-12.97
세마글루티드, 12.155nM	3032.0	182.40	-15.58	3415.7	88.82	-5.16

[0397] *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001 대 당뇨병 대조군 및 #p<0.05, ##p<0.01, ###p<0.001 대 세마글루티드; 일 방향 ANOVA 후 Bonferroni 사후테스트

표 14

[0398] **회복 연구-%Hba1C 및 인슐린 (ng/mL)**

그룹 (n=3)	%HbA1C		델타 HbA1C 대 DC	인슐린 (ng/mL)		체중 변화% 대 45일	
	평균	SD		평균	SD	평균	SD
당뇨병 대조군	8.5	0.4		20.6	12.0	7.8	1.08
화합물 1, 6.078nM	7.6	0.5	-0.9	30.9	8.9	5.9	3.68
화합물 13, 3.04nM	7.5	0.4	-1.0	31.2	32.7	6.6	0.86
화합물 13, 6.0788nM	7.3	0.4	-1.2	34.3	12.4	5.5	2.19
화합물 16, 3.04nM	7.1*	0.2	-1.4	15.5	8.2	6.1	0.38
화합물 16, 6.078nM	7.2*	0.5	-1.3	18.4	18.7	5.7	0.36
세마글루티드, 12.155nM	7.8	0.3	-0.7	19.7	4.2	9.5	4.68

[0399] *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001 대 당뇨병 대조군 및 #p<0.05, ##p<0.01, ###p<0.001 대 세마글루티드; 일 방향 ANOVA 후 Bonferroni 사후테스트

[0400] 이들 결과는 본 발명의 화합물이 당뇨와 비만 치료를 위한 잠재적 용도를 발견할 수 있음을 입증한다.

도면

도면1a

2-Cl-Trt-수지 + 2-[2-(2-Fmoc-아미노에톡시)에톡시]아세트산

↓DIPEA

2-[2-(2-Fmoc-아미노에톡시)에톡시]아세트산-2-Cl-Trt-수지

↓DMF 중의 50% 피페리딘

2-[2-(2-아미노에톡시)에톡시]아세트산-2-Cl-Trt-수지

↓2-[2-(2-Fmoc-아미노에톡시)에톡시]아세트산, DIPC +HOBt

2-[2-[2-[[2-[2-(2-Fmoc-아미노에톡시)에톡시]아세틸]아미노]에톡시]에톡시]아세트산-2-Cl-Trt-수지

↓DMF 중의 50% 피페리딘

2-[2-[2-[[2-[2-(2-아미노에톡시)에톡시]아미노]아미노]에톡시]에톡시]아세트산-2-Cl-Trt-수지

↓Fmoc-Glu-OtBu +DIPC +HOBt

2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[(4*S*)-4-Fmoc-아미노-5-삼차-부톡시-5-옥소-펜타노일]아미노]에톡시]에톡시]아세틸]아미노]에톡시]에톡시]아세트산-2-Cl-Trt-수지

↓DMF 중의 50% 피페리딘

2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[(4*S*)-4-아미노-5-삼차-부톡시-5-옥소-펜타노일]아미노]에톡시]에톡시]아세틸]아미노]에톡시]에톡시]아세트산-2-Cl-Trt-수지

↓옥타데칸이산 모노 삼차-부틸 에스테르 +DIPC +HOBt

[2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[(4*S*)-5-삼차-부톡시-4-[(18-*삼차*-부톡시-18-옥소-옥타데카노일)아미노]-5-옥소-펜타노일]아미노]에톡시]에톡시]에톡시]아세틸]아미노]에톡시]에톡시]아세트산]- 2-Cl-Trt-수지

↓트리플루오로에탄올:DCM (1:1)

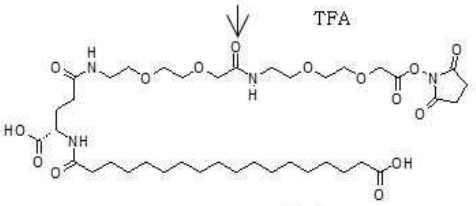
2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[(4*S*)-5-삼차-부톡시-4-[(18-*삼차*-부톡시-18-옥소-옥타데카노일)아미노]-5-옥소-펜타노일]아미노]에톡시]에톡시]아세틸]아미노]에톡시]에톡시]아세트산

↓IBCF+NMM+HOSu

삼차-부틸

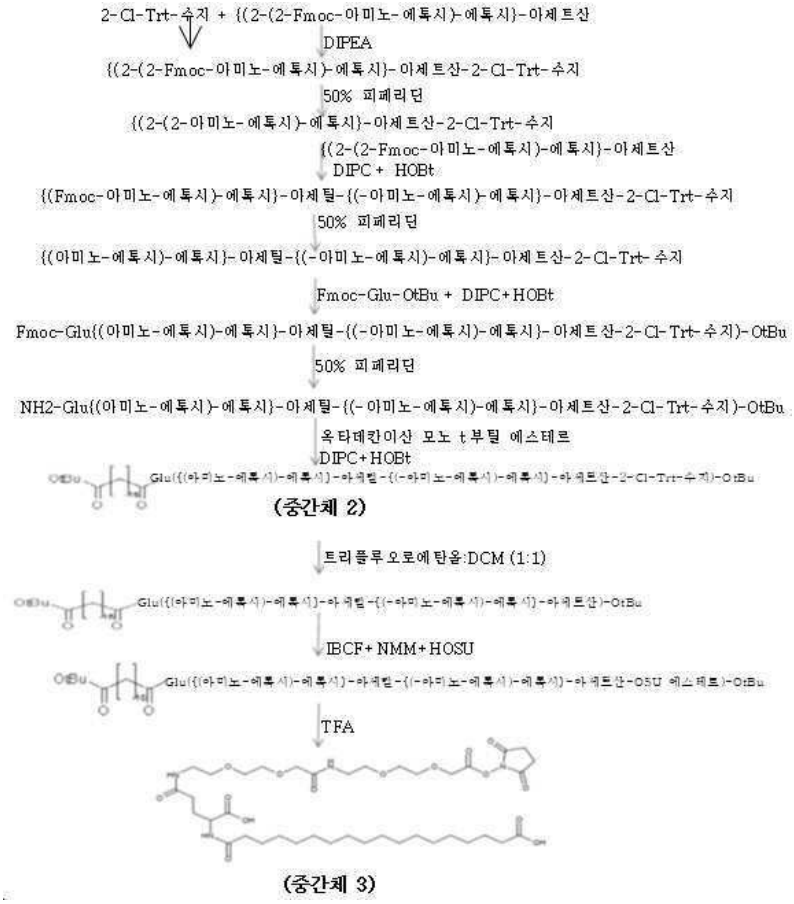
18-[[(1*S*)-1-*삼차*-부톡시카르보닐-4-[2-[2-[2-[2-[2-(2,5-디옥소피롤리딘-1-일)옥시-2-옥소-에톡시]에톡시]에틸아미노]-2-옥소-에톡시]에톡시]에틸아미노]-4-옥소-부틸]아미노]-18-옥소-옥타데카노에이트

↓TFA



모이어티 A-OSu

도면1b


2-Cl-Trt-수지 + {(2-(2-Fmoc-아미노-에톡시)-에톡시}-아세트산
DIPEA
{(2-(2-Fmoc-아미노-에톡시)-에톡시}-아세트산-2-Cl-Trt-수지
50% 피페리딘
{(2-(2-아미노-에톡시)-에톡시}-아세트산-2-Cl-Trt-수지
{(2-(2-Fmoc-아미노-에톡시)-에톡시}-아세트산
DIPC + HOBt
{(Fmoc-아미노-에톡시)-에톡시}-아세틸-{(-아미노-에톡시)-에톡시}-아세트산-2-Cl-Trt-수지
50% 피페리딘
{(아미노-에톡시)-에톡시}-아세틸-{(-아미노-에톡시)-에톡시}-아세트산-2-Cl-Trt-수지
Fmoc-Glu-OtBu + DIPC+HOBt
Fmoc-Glu{(아미노-에톡시)-에톡시}-아세틸-{(-아미노-에톡시)-에톡시}-아세트산-2-Cl-Trt-수지)-OtBu
50% 피페리딘
NH2-Glu{(아미노-에톡시)-에톡시}-아세틸-{(-아미노-에톡시)-에톡시}-아세트산-2-Cl-Trt-수지)-OtBu
옥타데칸이산 모노 t부틸 에스테르
DIPC+HOBt
(중간체 2)
트리플루오로에탄올:DCM (1:1)
IBCF+NMM+HOSU
TFA
(중간체 3)

도면2

2-Cl-Trt-수지 + 2-[2-(2-Fmoc-아미노에톡시)에톡시]아세트산

↓DIPEA

2-[2-(2-Fmoc-아미노에톡시)에톡시]아세트산-2-Cl-Trt-수지

↓DMF 중의 50% 피페리딘

{2-(2-(2-아미노-에톡시)-에톡시}-아세트산-2-Cl-Trt-수지

↓4-니트로페닐클로로포르메이트 + DIPEA

↓4-Fmoc-아미노 부틸아민 염화수소 염

↓DIPC +HOBt

2-[2-[2-(4-Fmoc-아미노부틸카르바모일아미노)에톡시]에톡시]아세트산-2-Cl-Trt-수지

↓DMF 중의 50% 피페리딘

↓Fmoc-Glu-OtBu +DIPC +HOBt

2-[2-[2-[4-[[(4S)-4-Fmoc아미노-5-삼차-부톡시-5-옥소-펜타노일]아미노]부틸카르바모일아미노]에톡시]에톡시]아세트산-2-Cl-Trt-수지

↓DMF 중의 50% 피페리딘

↓옥타데칸이산 모노 *삼차*-부틸 에스테르 +DIPC +HOBt

2-[2-[2-[4-[[(4*S*)-5-*삼차*-부톡시-4-[(18-*삼차*-부톡시-18-옥소-옥타데카노일)아미노]-5-옥소-펜타노일]아미노] 부틸카르바모일아미노]에톡시]에톡시]아세트산-2-Cl-Trt-수지

↓트리플루오로에탄올:DCM (1:1)

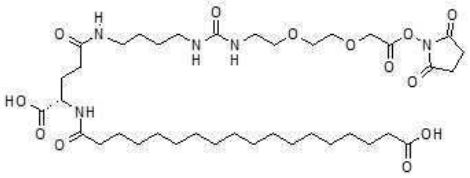
2-[2-[2-[4-[[(4*S*)-5-삼차-부톡시-4-[(18-*삼차*-부톡시-18-옥소-옥타데카노일)아미노]-5-옥소-펜타노일]아미노] 부틸카르바모일아미노]에톡시]에톡시]아세트산

↓DCC +HOSu

삼차-부틸

18-[[(1*S*)-1-삼차-부톡시카르보닐-4-[4-[2-[2-[2-(2,5-디옥소피롤리딘-1-일)옥시-2-옥소-에톡시]에톡시] 에틸카르바모일아미노]부틸아미노]-4-옥소-부틸]아미노]-18-옥소-옥타데카노에이트

↓TFA



모이어티 C-OSu

도면3

2-Cl-Trt-수지 + 2-[2-(2-Fmoc-아미노에톡시)에톡시]아세트산

↓ DIPEA

2-[2-(2-Fmoc-아미노에톡시)에톡시]아세트산-2-Cl-Trt-수지

↓ DMF 중의 50% 피페리딘

2-[2-(2-아미노에톡시)에톡시]아세트산 -2-Cl-Trt-수지

↓ Fmoc-Aib-OH, DIPC +HOBt

2-[2-[2-[(2-Fmoc-아미노-2-메틸-프로파노일)아미노]에톡시]에톡시]아세트산-2-Cl-Trt-수지

↓ 50% 피페리딘, Fmoc-Glu-OtBu +DIPC +HOBt

2-[2-[2-[[2-[[(4*S*)-4-Fmoc-아미노-5-*삼차*-부톡시-5-옥소-펜타노일]아미노]-2-메틸-프로파노일]아미노]에톡시]에톡시]아세트산-2-Cl-Trt-수지

↓ DMF 중의 50% 피페리딘, 옥타데칸이산 모노 *삼차* 부틸 에스테르 +DIPC+HOBt

2-[2-[2-[[2-[[(4*S*)-5-*삼차*-부톡시-4-[(18-삼차-부톡시-18-옥소-옥타데카노일)아미노]-5-옥소-펜타노일] 아미노]-2-메틸-프로파노일]아미노]에톡시]에톡시]아세트산-2-Cl-Trt-수지

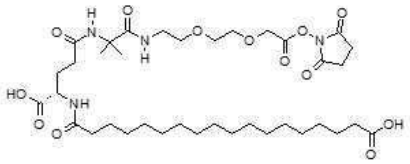
↓ 트리플루오로에탄올:DCM (1:1)

2-[2-[2-[[2-[[(4*S*)-5-삼차-부톡시-4-[(18-*삼차*-부톡시-18-옥소-옥타데카노일)아미노]-5-옥소-펜타노일] 아미노]-2-메틸-프로파노일]아미노]에톡시]에톡시]아세트산

↓ DCC +HOSu

삼차-부틸
18-[[(1S)-1-삼차-부톡시카르보닐-4-[[2-[2-[2-[2-(2,5-디옥소피롤리딘-1-일)옥시-2-옥소-에톡시]에톡시]에틸아미노]-1,1-디메틸-2-옥소-에틸]아미노]-4-옥소-부틸]아미노]-18-옥소-옥타데카노에이트

↓ TFA



모이어티 D-OSu

도면4

2-Cl-Trt-수지 + 2-[2-(2-Fmoc-아미노에톡시)에톡시]아세트산

↓ DIPEA

2-[2-(2-Fmoc-아미노에톡시)에톡시]아세트산 -2-Cl-Trt-수지

↓ DMF 중의 50% 피페리딘

2-[2-(2-아미노에톡시)에톡시]아세트산-2-Cl-Trt-수지

↓ 4-니트로페닐클로로포르메이트 + DIPEA
1,3-디아미노프로판 +HOBt
Fmoc-Glu-OtBu +DIPC+HOBt

2-[2-[2-[3-[[(4S)-4-Fmoc-아미노-5-삼차-부톡시-5-옥소-펜타노일]아미노]
프로필카르바모일아미노]에톡시]에톡시]아세트산-2-Cl-Trt-수지

↓ DMF 중의 50% 피페리딘
옥타데칸이산 모노 *삼차* 부틸 에스테르 +DIPC+HOBt

2-[2-[2-[3-[[(4S)-5-삼차-부톡시-4-[(18-삼차-부톡시-18-옥소-옥타데카노일)아미노]-5-옥소-펜타
노일]아미노]프로필카르바모일아미노]에톡시]에톡시]아세트산-2-Cl-Trt-수지

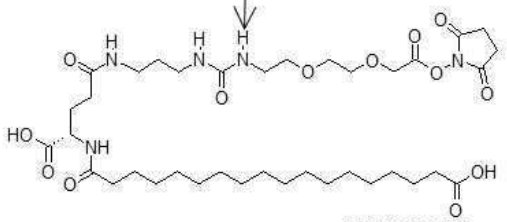
↓ 트리플루오로에탄올:DCM (1:1)

2-[2-[2-[3-[[(4S)-5-삼차-부톡시-4-[(18-삼차-부톡시-18-옥소-옥타데카노일)아미노]-5-옥소-펜타
노일]아미노]프로필카르바모일아미노]에톡시]에톡시]아세트산

↓ DCC+HOSu

삼차-부틸
18-[[(1S)-1-삼차-부톡시카르보닐-4-[3-[2-[2-[2-(2,5-디옥소피롤리딘-1-일)옥시-2-옥소-에톡시]에
톡시]에틸카르바모일아미노]프로필아미노]-4-옥소-부틸]아미노]-18-옥소-옥타데카노에이트

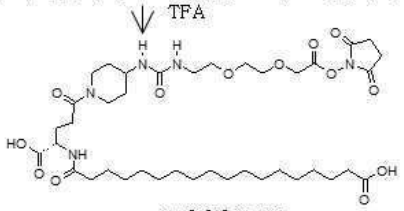
↓ TFA



모이어티 E-OSu

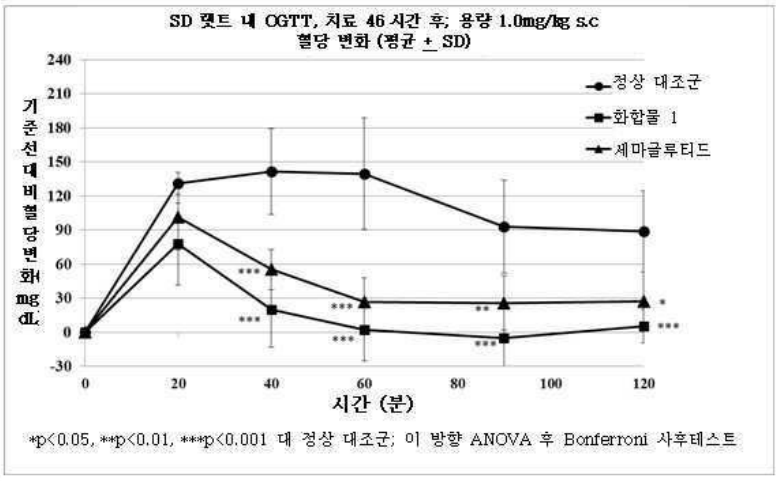
도면5

2-Cl-Trt-수지 + 2-[2-(2-Fmoc-아미노에톡시)에톡시]아세트산
↓ DIPEA
2-[2-(2-Fmoc-아미노에톡시)에톡시]아세트산-2-Cl-Trt-수지
↓ DMF 중의 50% 피페리딘
2-[2-(2-아미노에톡시)에톡시]아세트산-2-Cl-Trt-수지
4-니트로페닐클로로포르메이트 + DIPEA
↓ 4-아미노-Boc-피페리딘
DIPEA +HOBt
(2-[2-[2-(4-Boc-피페리딜카르바모일아미노)에톡시]에톡시]아세트산-2-Cl-Trt-수지
↓ TFA
2-[2-[2-(4-피페리딜카르바모일아미노)에톡시]에톡시]아세트산
↓ Fmoc-OSu, TEA
2-[2-[2-(4-Fmoc-피페리딜카르바모일아미노)에톡시]에톡시]아세트산 + 2-Cl-Trt-수지
↓ DIPEA
2-[2-[2-(4-Fmoc-피페리딜카르바모일아미노)에톡시]에톡시]아세트산-2-Cl-Trt-수지
↓ DMF 중의 50% 피페리딘
Fmoc-Glu-OtBu +DIPC +HOBt
2-[2-[2-[[1-[(4S)-4-아미노-5-삼차-부톡시-5-옥소-펜타노일]-4-피페리딜]카르바모일아미노]에톡시]에톡시]아세트산-2-Cl-Trt-수지
↓ DMF 중의 50% 피페리딘
옥타데칸이산 모노 *삼차* 부틸 에스테르 +DIPC+HOBt
2-[2-[2-[[1-[(4S)-5-삼차-부톡시-4-[(18-삼차-부톡시-18-옥소-옥타데카노일)아미노]-5-옥소-펜타노일]-4-피페리딜]카르바모일아미노]에톡시]에톡시]아세트산-2-Cl-Trt-수지
↓ 트리플루오로에탄올:DCM (1:1)
2-[2-[2-[[1-[(4S)-5-삼차-부톡시-4-[(18-삼차-부톡시-18-옥소-옥타데카노일)아미노]-5-옥소-펜타노일]-4-피페리딜]카르바모일아미노]에톡시]에톡시]아세트산
↓ DCC +HOSu
삼차-부틸
18-[[(1S)-1-삼차-부톡시카르보닐-4-[4-[2-[2-[2-(2,5-디옥소피롤리딘-1-일)옥시-2-옥소-에톡시]에톡시]에틸카르바모일아미노]-1-피페리딜]-4-옥소-부틸]아미노]-18-옥소-옥타데카노에이트
↓ TFA

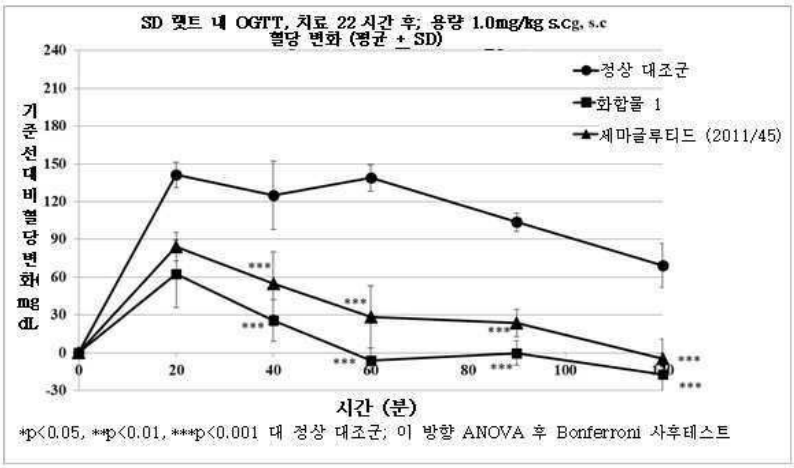


모이어티 F-OSu

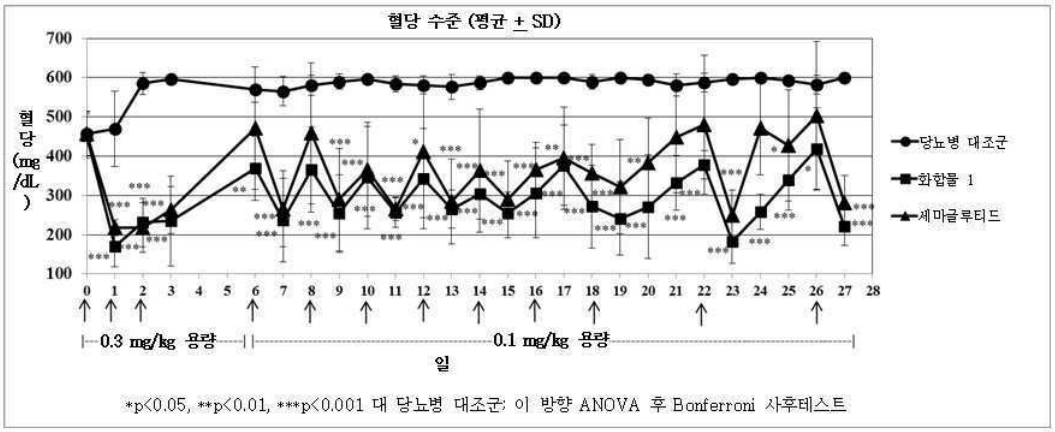
도면6a



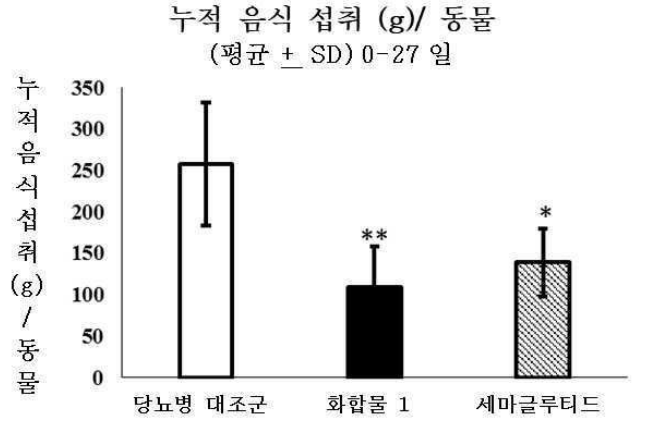
도면6b



도면7

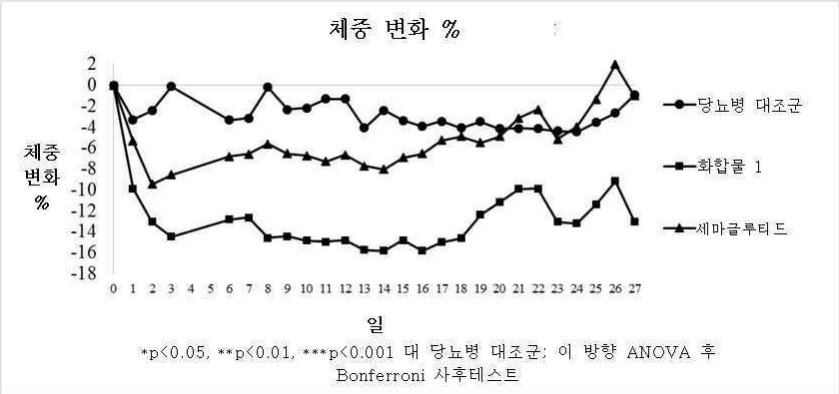


도면8

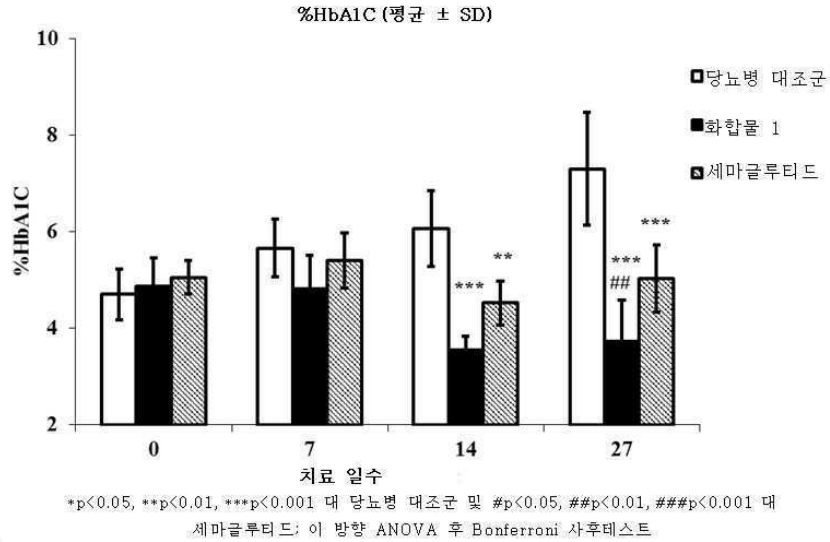


*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001 대 당뇨병 대조군; 일 방향 ANOVA 후 Bonferroni 사후테스트

도면9



도면10



서 열 목 록

SEQUENCE LISTING

<110> Sun Pharmaceutical Industries Ltd.

<120> NOVEL GLP-1 ANALOGUE

<130> SUN-069WO

<160> 14

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 31

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220><221> MISC_FEATURE

<223> Native GLP-1 (7-37)

<400> 1

His Ala Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Gly

1 5 10 15

Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly Arg Gly

20 25 30

<210> 2

<211> 31

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<220><221> MISC_FEATURE

<223> Liraglutide

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (20)..(20)

<223> Lys is substituted

<400> 2

His Ala Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Gly

1 5 10 15

Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Arg Gly Arg Gly

20 25 30

<210> 3

<211> 31

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<220><221> MISC_FEATURE

<223> Semaglutide

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (2)..(2)

<223> Xaa= Aib

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (20)..(20)

<223> Lys is substituted

<400> 3

His Xaa Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Gly

1 5 10 15

Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Arg Gly Arg Gly

20 25 30

<210>

4

<211> 34

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (2)..(2)

<223> Xaa= Ser, Ser(OMe), D-Ser, D-Ser(OMe), Ala or Aib

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (3)..(3)

<223> Xaa= Absent or Gln

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (4)..(4)

<223> Xaa= Glu

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (16)..(16)

<223> Xaa= Glu

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (21)..(21)

<223> Lys is substituted

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (24)..(24)

<223> Xaa= Ile

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (33)..(33)

<223> Xaa= Leu, D-Leu, D-Ile or Ile

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (34)..(34)

<223> Xaa= Absent

<400> 4

His Xaa Xaa Xaa Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Xaa
1 5 10 15

Gly Gln Ala Ala Xaa Glu Phe Xaa Ala Trp Leu Val Arg Gly Arg Gly
20 25 30

Xaa Xaa

<210> 5

<211> 32

<212> PRT

<213

> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (2)..(2)

<223> Xaa = Aib

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (20)..(20)

<223> Lys is substituted

<400> 5

His Xaa Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Gly
1 5 10 15

Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Arg Gly Arg Gly Leu
20 25 30

<210> 6

<211> 32

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (2)..(2)

<223> Xaa= Ser(OMe)

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (20)..(20)

<223> Lys is substituted

<400> 6

His Xaa Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Gly

1 5 10 15

Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Arg Gly Arg Gly Leu

20 25 30

<210> 7

<211> 33

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220

><223> Synthetic

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (2)..(2)

<223> Xaa = Aib

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (21)..(21)

<223> Lys is substituted

<400> 7

His Xaa Gln Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu

1 5 10 15

Gly Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Arg Gly Arg Gly

20 25 30

Leu

<210> 8

<211> 32

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (2)..(2)

<223> Xaa = Aib

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (20)..(20)

<223> Lys is substituted

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (32)..(32)

<223> Xaa= D-Leu

<400> 8

His Xaa Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Gly

1 5 10 15

Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Arg Gly Arg Gly Xaa

20 25 30

<210> 9

<211> 32

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (20)..(20)

<223> Lys is substituted

<400> 9

His Ser Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Gly

1 5 10 15

Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Arg Gly Arg Gly Leu

20 25 30

<210> 10

<211> 32

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (20)..(20)

<223> Lys is substituted

<400> 10

His Ala Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Gly

1 5 10 15

Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Arg Gly Arg Gly Leu

20 25 30

<210> 11

<211> 32

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (2)..(2)

<223> Xaa = Aib

<220><

221> MISC_FEATURE

<222> (20)..(20)

<223> Lys is substituted

<400> 11

His Xaa Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Gly

1 5 10 15

Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Arg Gly Arg Gly Ile

20 25 30

<210> 12

<211> 32

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (2)..(2)

<223> Xaa = D-Ser(OMe)

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (20)..(20)

<223> Lys is substituted

<400> 12

His Xaa Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Gly

1 5 10 15

Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Arg Gly Arg Gly Leu

20 25 30

<210> 13

<211> 32

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (2)..(2)

<223> Xaa = D-Ser

<220><221

> MISC_FEATURE

<222> (20)..(20)

<223> Lys is substituted

<400> 13

His Xaa Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Gly

1 5 10 15

Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Arg Gly Arg Gly Leu

20 25 30

<210> 14

<211> 33

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (2)..(2)

<223> Xaa = Aib

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (21)..(21)

<223> Lys is substituted

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (33)..(33)

<223> Xaa = D-Leu

<400> 14

His Xaa Gln Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu

1 5 10 15

Gly Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Arg Gly Arg Gly

20 25 30

Xaa