(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2016-0091980
(43) 공개일자 2016년08월03일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 47/48 (2006.01) *A61K 38/17* (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 47/48038 (2013.01)
A61K 38/1709 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2016-7017206
(22) 출원일자(국제) 2014년11월26일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2016년06월27일
(86) 국제출원번호 PCT/DK2014/050402
(87) 국제공개번호 WO 2015/078477
국제공개일자 2015년06월04일
(30) 우선권주장
PA 2013 70735 2013년12월01일 덴마크(DK)

(71) 출원인
유니버시티 오브 코펜하겐
덴마크, 디케이-1165 코펜하겐 케이, 뇌레가데 10
(72) 발명자
스트롬가드, 크리스티안
덴마크, 디케이-4000 로스킬레, 에스티. 티브이., 묄레후세네 17
바흐, 안데르스
덴마크, 디케이-2500 발뷔, 1., 낙스코우베이 86
니센, 클라우스 베르트람
덴마크, 디케이-5792 아스레브, 스테이션베이 40
(74) 대리인
손민

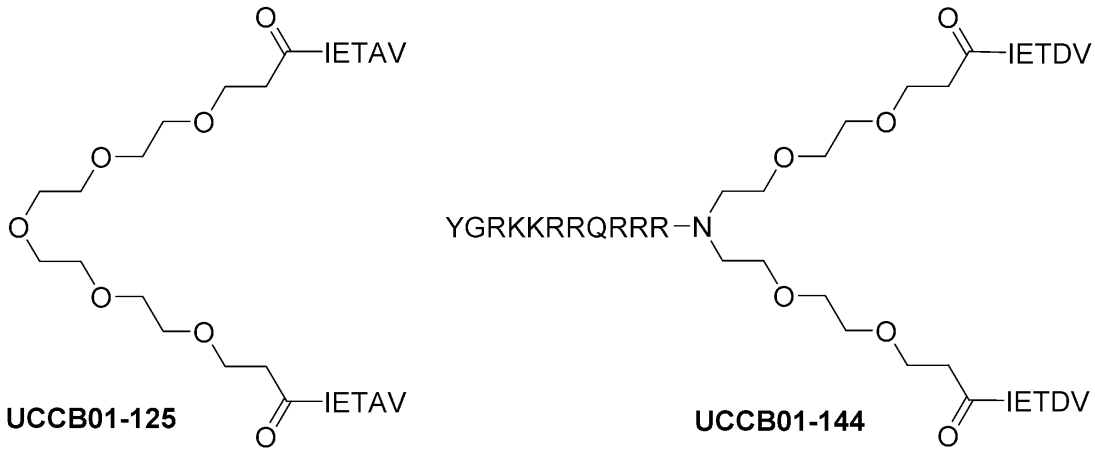
전체 청구항 수 : 총 64 항

(54) 발명의 명칭 **PSD-95의 이량체 억제제의 지방산 유도체**

(57) 요 약

본 발명은 PSD-95의 PDZ 도메인에 결합할 수 있는 지방산 유도화 화합물 및 PSD-95에 의해 매개되는 단백질-단백질 상호작용 억제제로서의 그의 의학적 용도에 관한 것이다.

대 표 도 - 도1



(52) CPC특허분류
A61K 47/48215 (2013.01)
A61K 47/48338 (2013.01)

명 세 서

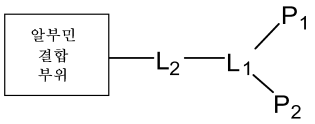
청구범위

청구항 1

제1 펩티드 (P_1) 및 제2 펩티드 (P_2)를 포함하고, 여기서 P_1 및 P_2는 각각 적어도 2개의 단백질원성 (proteinogenic) 또는 비-단백질원성 (non-proteinogenic) 아미노산 잔기를 포함하며, 양 P_1 및 P_2는 그들의 N-말단을 통해 제1 링커 L_1에 접합되고, 상기 L_1은 폴리에틸렌 글리콜 (PEG)을 포함하며, PEG의 적어도 하나의 산소 원자는 질소 원자로 치환되어 MPEG를 제공하고, 알부민 결합 부분이 아미드 결합에 의해 또는 임의의 링커 L_2를 통해 MPEG의 질소 원자에 연결된, 화합물.

청구항 2

제1항에 있어서, 다음 화학식 (I)의 일반 구조를 가지는 것인 화합물:



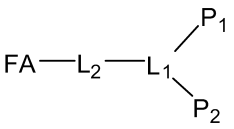
화학식 (I)

청구항 3

이전 항 중 어느 한 항에 있어서, 알부민 결합 부분이 지방산 (FA)인 것인 화합물.

청구항 4

이전 항 중 어느 한 항에 있어서, 다음 화학식 (II)의 일반 구조를 가지는 것인 화합물:



화학식 (II)

청구항 5

이전 항 중 어느 한 항에 있어서, 지방산이 포화 또는 불포화 지방산인 것인 화합물.

청구항 6

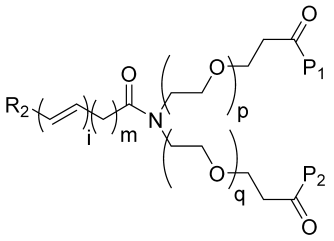
이전 항 중 어느 한 항에 있어서, 지방산이 제2 링커 L_2를 통해 MPEG 링커 (L_1)의 질소 원자에 연결되고, 여기서, L_2는 질소 원자를 포함하는 것인 화합물.

청구항 7

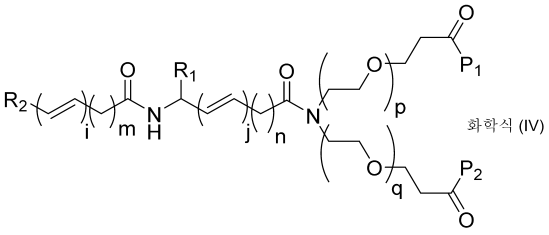
이전 항 중 어느 한 항에 있어서, 제2 링커 L_2가 γ-Glu, γ-부티르산 (GABA), 5-아미노 발레르산 (5-Ava), 단백질원성 아미노산, 비-단백질원성 아미노산, 및 일반 화학식 H_2N-[Q]-COOH (여기서, Q는 임의의 적합한 원자 또는 원자들임)를 가지는 임의의 화합물로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 이상의 부분을 포함하는 것인 화합물.

청구항 8

이전 항 중 어느 한 항에 있어서, 다음 화학식 (III) 또는 (IV)의 일반 구조를 가지는 것인 화합물:



화학식 (III)



화학식 (IV)

상기 식에서,

R_1 및 R_2는 각각 H 및 COOH로 구성된 군으로부터 선택되고,

n은 0 내지 48의 정수이고,

m은 1 내지 48의 정수이고,

p는 0 내지 28의 정수이고,

q는 0 내지 28의 정수이고,

i는 0 내지 12의 정수이고,

j는 0 내지 12의 정수이고,

P_1 및 P_2는 각각 적어도 2개의 단백질원성 또는 비-단백질원성 아미노산 잔기를 포함하는 펩티드중에서 선택된다.

청구항 9

이전 항 중 어느 한 항에 있어서, p = q인 것인 화합물.

청구항 10

이전 항 중 어느 한 항에 있어서, p > q인 것인 화합물.

청구항 11

이전 항 중 어느 한 항에 있어서, p < q인 것인 화합물.

청구항 12

이전 항 중 어느 한 항에 있어서, p와 q의 합이 1 내지 28의 정수인 것인 화합물.

청구항 13

이전 항 중 어느 한 항에 있어서, 에틸렌 글리콜 부분의 수, p가 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27 또는 28로부터 선택되는 것인 화합물.

청구항 14

이전 항 중 어느 한 항에 있어서, 에틸렌 글리콜 부분의 수, p가 0 내지 4인 것인 화합물.

청구항 15

이전 항 중 어느 한 항에 있어서, 에틸렌 글리콜 부분의 수, q가 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27 또는 28개의 에틸렌 글리콜 부분으로부터 선택되는 것인 화합물.

청구항 16

이전 항 중 어느 한 항에 있어서, 에틸렌 글리콜 부분의 수, q가 0 내지 4인 것인 화합물.

청구항 17

이전 항 중 어느 한 항에 있어서, 에틸렌 글리콜 부분의 총수 p + q가 2 내지 12인 것인 화합물.

청구항 18

이전 항 중 어느 한 항에 있어서, 에틸렌 글리콜 부분의 총수 p + q가 4인 것인 화합물.

청구항 19

이전 항 중 어느 한 항에 있어서, 에틸렌 글리콜 부분의 총수 p + q가 6인 것인 화합물.

청구항 20

이전 항 중 어느 한 항에 있어서, n이 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47 및 48로 구성된 군으로부터 선택되는 정수인 것인 화합물.

청구항 21

이전 항 중 어느 한 항에 있어서, n이 1 내지 3의 정수인 것인 화합물.

청구항 22

이전 항 중 어느 한 항에 있어서, n이 1인 것인 화합물.

청구항 23

이전 항 중 어느 한 항에 있어서, n이 2인 것인 화합물.

청구항 24

이전 항 중 어느 한 항에 있어서, n이 3인 것인 화합물.

청구항 25

이전 항 중 어느 한 항에 있어서, m이 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47 및 48로 구성된 군으로부터 선택되는 정수인 것인 화합물.

청구항 26

이전 항 중 어느 한 항에 있어서, m이 10 내지 16의 정수인 것인 화합물.

청구항 27

이전 항 중 어느 한 항에 있어서, m이 10인 것인 화합물.

청구항 28

이전 항 중 어느 한 항에 있어서, m이 16인 것인 화합물.

청구항 29

이전 항 중 어느 한 항에 있어서, 지방산이 C_4-C_{22} 지방산인 것인 화합물.

청구항 30

이전 항 중 어느 한 항에 있어서, 지방산이 카프릴산, 카프르산, 라우르산, 미리스트산, 팔미트산, 스테아르산, 아라키딘산, 베헨산, 리그노세린산 및 세로틴산으로 구성된 군으로부터 선택되는 것인 화합물.

청구항 31

이전 항 중 어느 한 항에 있어서, 지방산이 미리스트올레산, 팔미톨레산, 사피엔산, 올레산, 엘라이드산, 박센산, 리놀레산, 리노엘라이드산, α-리놀렌산, 아라키돈산, 에이코사펜타엔산, 에루신산 및 도코사헥사엔산으로 구성된 군으로부터 선택되는 것인 화합물.

청구항 32

이전 항 중 어느 한 항에 있어서,

P_1이 아미노산 서열 $X_4X_3X_2X_1$ (서열번호: 1)을 포함하고,

P_2는 아미노산 서열 $Z_4Z_3Z_2Z_1$ (서열번호: 2)을 포함하며,

여기서,

a) X_1 및/또는 Z_1은 I, L 및 V로부터 선택되는 아미노산 잔기이고,

b) X_2 및/또는 Z_2는 A, D, E, Q, N, S, V, *N*-Me-A, *N*-Me-D, *N*-Me-E, *N*-Me-Q, *N*-Me-N, *N*-Me-S 및 *N*-Me-V로부터 선택되는 아미노산 잔기이고,

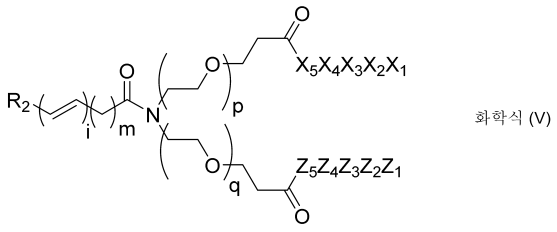
c) X_3 및/또는 Z_3은 S 및 T로부터 선택되는 아미노산 잔기이고,

d) X_4 및/또는 Z_4는 E, Q, A, N 및 S로부터 선택되는 아미노산 잔기이며,

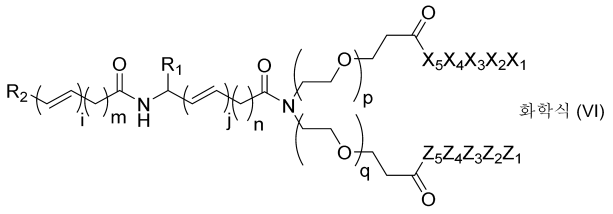
여기에서, X_1 및 Z_1은 둘 다 개별적으로 자유 카복실산을 포함하는 최종 C-말단 아미노산 잔기를 나타내는 것인 화합물.

청구항 33

이전 항 중 어느 한 항에 있어서, 화학식 (V) 또는 (VI)의 일반 구조를 가지는 것인 화합물:



화학식 (V)



화학식 (VI)

상기 식에서,

R_1 및 R_2는 각각 H 및 COOH로 구성된 군으로부터 선택되고,

n은 0 내지 48의 정수이고,

m은 1 내지 48의 정수이고,

p는 0 내지 28의 정수이고,

q는 0 내지 28의 정수이고,

i는 0 내지 12의 정수이고,

j는 0 내지 12의 정수이고,

X_5 및/또는 Z_5는 임의의 아미노산 잔기, 펩티드 또는 폴리펩티드이고,

X_4 및/또는 Z_4는 E, Q, A, N 및 S로부터 선택되는 아미노산 잔기이고,

X_3 및/또는 Z_3은 S 및 T로부터 선택되는 아미노산 잔기이고,

X_2 및/또는 Z_2는 A, D, E, Q, N, S, V, *N*-Me-A, *N*-Me-D, *N*-Me-E, *N*-Me-Q, *N*-Me-N, *N*-Me-S 및 *N*-Me-V로부터 선택되는 아미노산 잔기이고

X_1 및/또는 Z_1은 I, L 및 V로부터 선택되는 아미노산 잔기이다.

청구항 34

이전 항 중 어느 한 항에 있어서, X_5가 단백질원성 또는 비-단백질원성 아미노산 잔기인 것인 화합물.

청구항 35

이전 항 중 어느 한 항에 있어서, X_5가 I, A, L 및 V로 구성된 군으로부터 선택되는 아미노산 잔기인 것인 화합물.

청구항 36

이전 항 중 어느 한 항에 있어서, X_5가 2 내지 100개의 아미노산 잔기로 구성된 아미노산 서열을 가지는 펩티드 또는 폴리펩티드이고, 여기서, 상기 펩티드 또는 폴리펩티드의 C 말단은 I, A, L 및 V로 구성된 군으로부터 선택되는 아미노산 잔기인 것인 화합물.

청구항 37

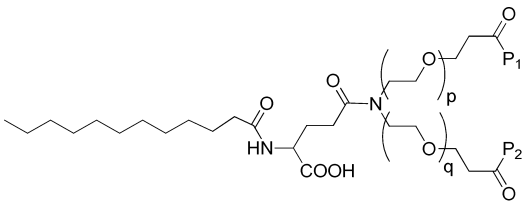
제2항 또는 제3항에 있어서, X_5가 2 내지 100개의 잔기, 예컨대 2 내지 90개의 아미노산 잔기, 예컨대 2 내지 80개의 아미노산 잔기, 예컨대 2 내지 70개의 아미노산 잔기, 예컨대 2 내지 60개의 아미노산 잔기, 예컨대 2 내지 50개의 아미노산 잔기, 예컨대 2 내지 40개의 아미노산 잔기, 예컨대 2 내지 30개의 아미노산 잔기, 예컨대 2 내지 20개의 아미노산 잔기, 예컨대 2 내지 10개의 아미노산 잔기, 예컨대 2 내지 9개의 아미노산 잔기, 예컨대 2 내지 8개의 아미노산 잔기, 예컨대 2 내지 7개의 아미노산 잔기, 예컨대 2 내지 6개의 아미노산 잔기, 예컨대 2 내지 5개의 아미노산 잔기, 예컨대 2 내지 4개의 아미노산 잔기, 예컨대 2 내지 3개의 아미노산 잔기를 포함하는 펩티드이고,

여기서, C 말단은 I, A, L 및 V로 구성된 군으로부터 선택되는 아미노산인 것인 화합물.

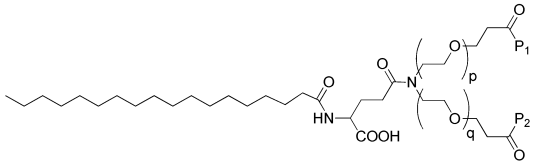
청구항 38

이전 항 중 어느 한 항에 있어서,

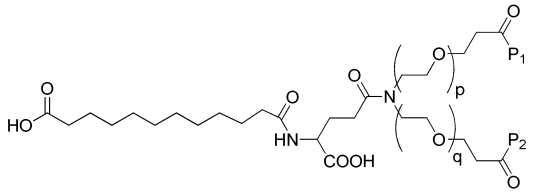
a) KBN41 **(5)**
유도체



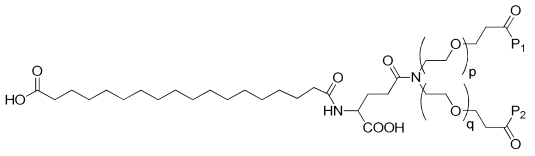
b) KBN42 **(7)**
유도체



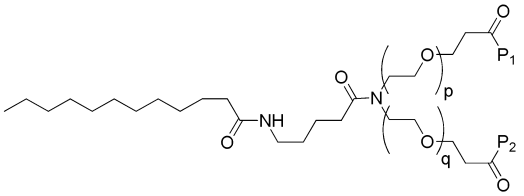
c) KBN43 **(6)**
유도체



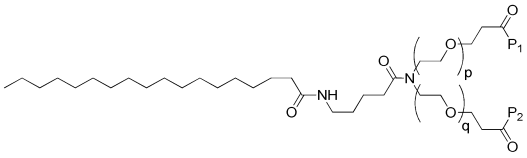
d) KBN44 **(8)**
유도체



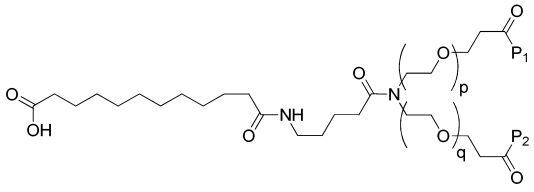
e) KBN45 **(9)**
유도체



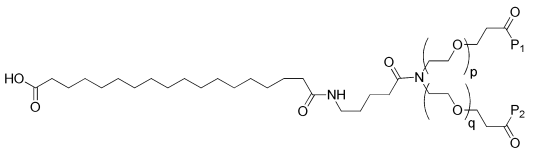
f) KBN46
(11)
유도체



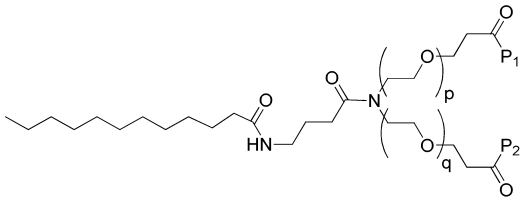
g) KBN47
(10)
유도체



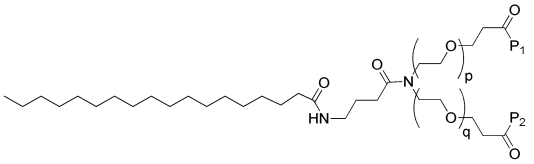
h) KBN48 **(12)** 유도체



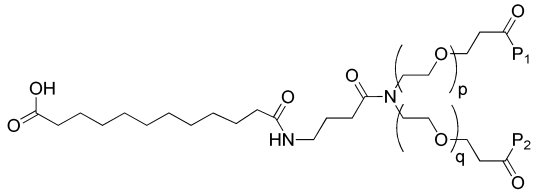
i) KBN52 **(1)** 유도체



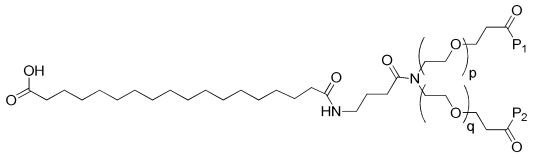
j) KBN53 **(3)** 유도체



k) KBN54 **(4)** 유도체



l) KBN55 **(4)** 유도체

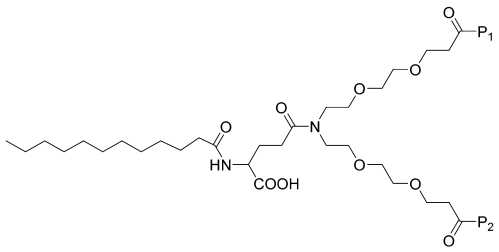


로 구성된 군으로부터 선택되는 것인 화합물.

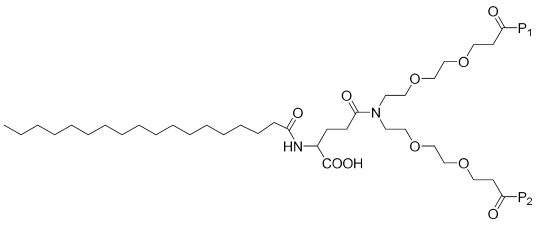
청구항 39

이전 항 중 어느 한 항에 있어서,

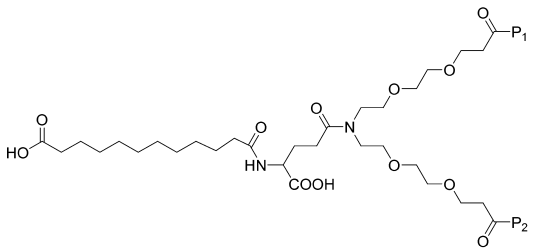
a) KBN41 (**5**) 유도체



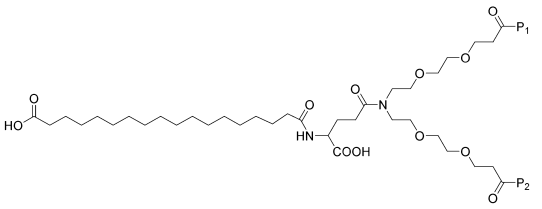
b) KBN42 (**7**) 유도체



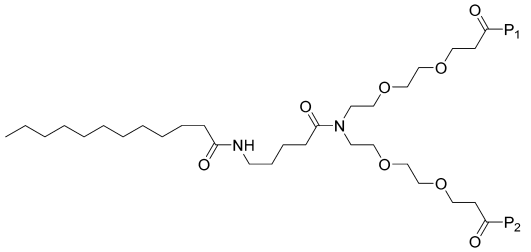
c) KBN43 (**6**)
유도체



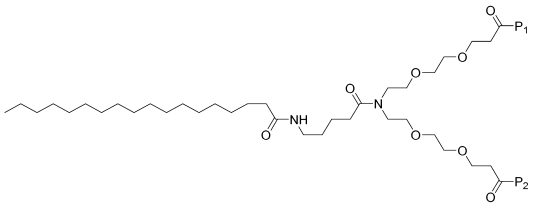
d) KBN44 (**8**)
유도체



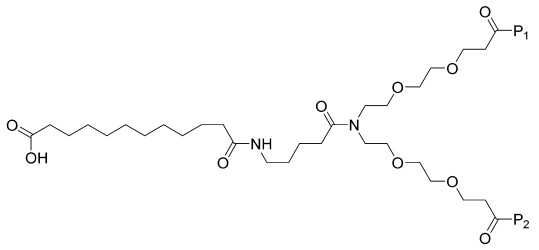
e) KBN45 (**9**)
유도체



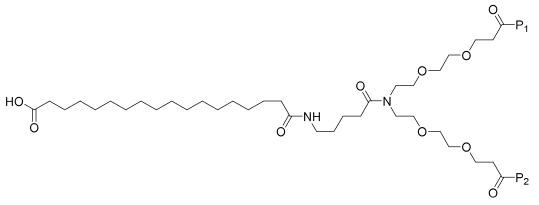
f) KBN46
(**11**)
유도체



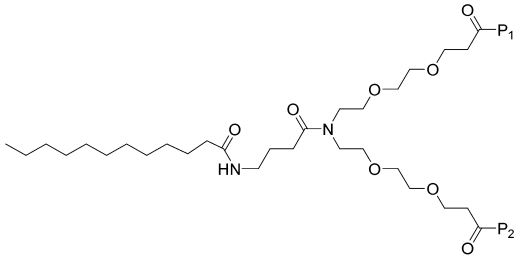
g) KBN47
(**10**)
유도체



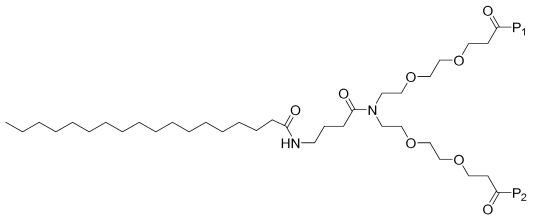
h) KBN48
(**12**)
유도체



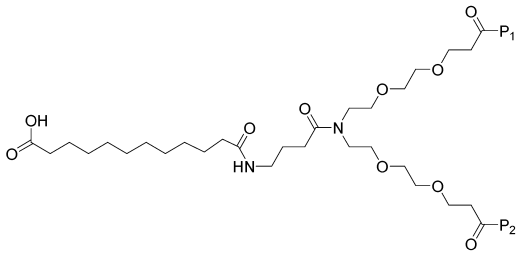
i) KBN52 (**1**)
유도체



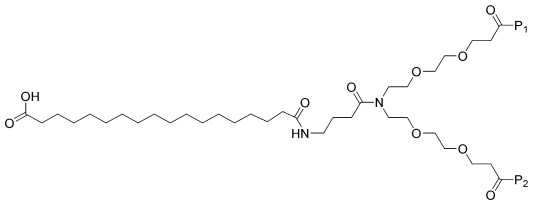
j) KBN53 (**3**)
유도체



k) KBN54 (**2**)
유도체



l) KBN55 (**4**)
유도체

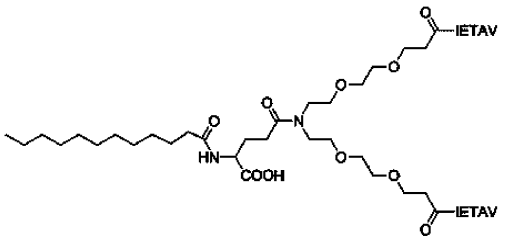


로 구성된 군으로부터 선택되는 것인 화합물.

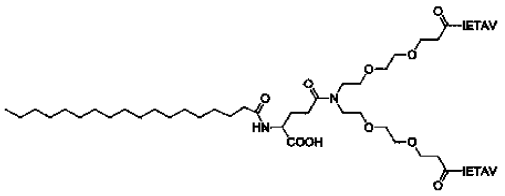
청구항 40

이전 항 중 어느 한 항에 있어서,

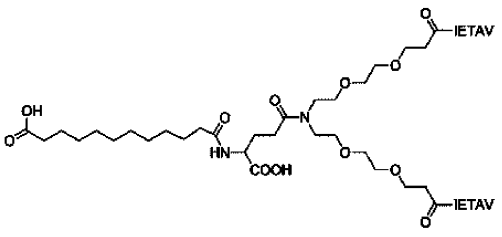
a) KBN41
(**5**)



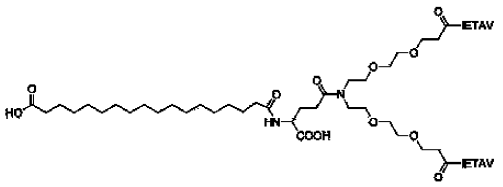
b) KBN42
(**7**)



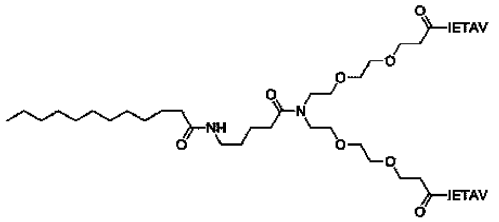
c) KBN43
(**6**)



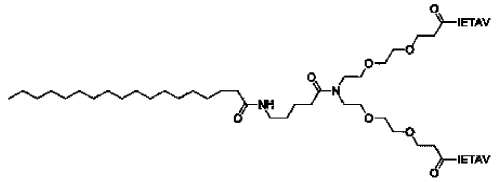
d) KBN44
(**8**)



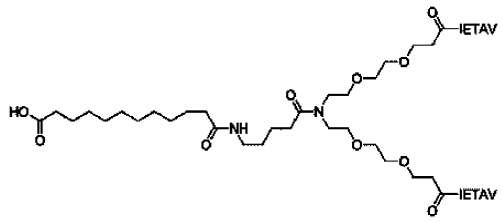
e) KBN45
(**9**)



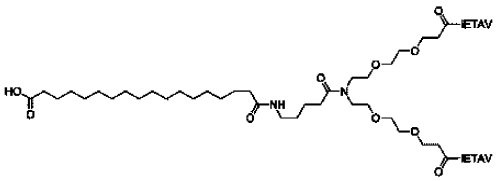
f) KBN46
(**11**)



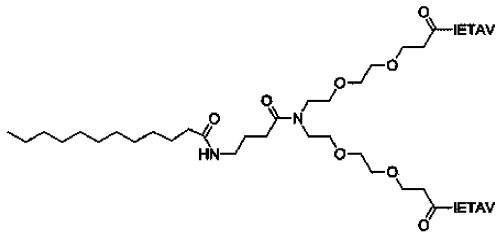
g) KBN47
(**10**)



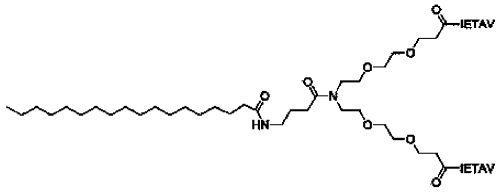
h) KBN48
(**12**)



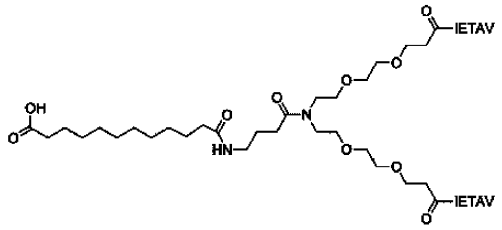
j) KBN52
(**1**)



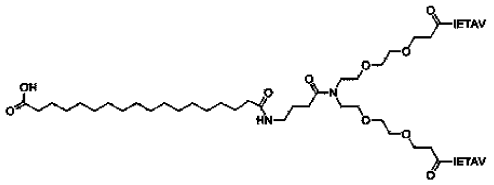
k) KBN53
(**3**)



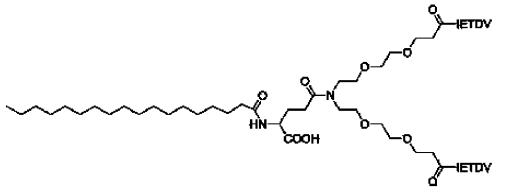
l) KBN54 (2)



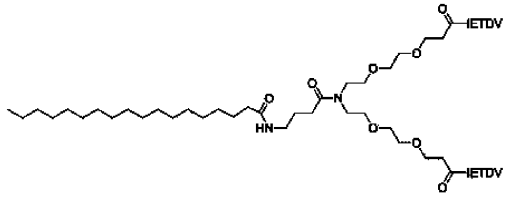
m) KBN55 (4)



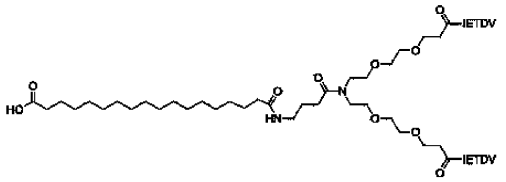
n) KBN63 (15)



o) KBN64 (13)



p) KBN65 (14)



로 구성된 군으로부터 선택되는 것인 화합물.

청구항 41

이전 항 중 어느 한 항에 있어서, 약학적으로 허용가능한 염 또는 전구약물의 형태인 것인 화합물.

청구항 42

이전 항 중 어느 한 항에 있어서, 의약으로서 사용하기 위한 것인 화합물.

청구항 43

제1항 내지 제41항 중 어느 한 항에 있어서, 통증의 치료 또는 예방에 사용하기 위한 화합물.

청구항 44

제1항 내지 제41항 중 어느 한 항에 있어서, 흥분독성-관련 질환의 치료 또는 예방에 사용하기 위한 화합물.

청구항 45

제44항에 있어서, 질환이 CNS에 대한/CNS내/CNS의 허혈성 또는 외상성 손상인 것인 화합물.

청구항 46

a) Ns-*M*PEG 이산 링커를 제조하는 단계,

b) Fmoc-기반 고체상 펩티드 합성을 이용하여 펩티드를 제조하는 단계,

c) Fmoc-탈보호 펩티드를 Ns-*M*PEG 이산 링커로 이량체화하는 단계,

d) 지방산을, 임의로 중간 링커, 예컨대 아미노산 링커 (L_2)를 통해, 링커-이량체 접합체에 커플링하는 단계,

를 포함하는, 제1항 내지 제41항중 어느 한 항에 따른 화합물의 제조방법.

청구항 47

제46항에 있어서, 단계 (a)에서, 오르토-니트로벤젠설포닐 (Ns)-보호된 *M*PEG 링커가 고체상으로 또는 용액에서 제조되는 것인 방법.

청구항 48

제47항에 있어서, 고체상 절차가, 유기 용매, 예컨대 DCM, DMF, ACN 또는 THF; 및 염기, 예컨대 DIPEA, DBU, 콜리딘 또는 NMM을 사용하여, Fmoc-NH-PEG-CH_2CH_2COOH와 함께, 고체상 펩티드 합성에 유용한 고체 지지체, 예컨대 2-클로로트리틸 클로라이드 수지를 로딩함으로써 수행되는 것인 방법.

청구항 49

제47항 또는 제48항에 있어서, Fmoc 그룹이 적합한 용매, 예컨대 DMF, DCM, ACN, THF 중에서 염기, 예컨대 피페리딘, 디메틸아민, 모르폴린, 피페라진, 디사이클로헥실아민 또는 DMAP에 의해 제거되는 것인 방법.

청구항 50

제47항 내지 제49항 중 어느 한 항에 있어서, 오르토-니트로벤젠설포닐 클로라이드를 적합한 염기, 예컨대 DIPEA; 및 적합한 용매, 예컨대 THF, DCM을 사용하여 자유 아민에 커플링하여 Ns-NH-PEG-CH_2CH_2COO-수지를 수득하는 것인 방법.

청구항 51

제47항 내지 제50항 중 어느 한 항에 있어서, 링커 생성물의 제2 부위를 미츠노부 화학 (Mitsunobu-chemistry)을 이용해 수지에 결합된 링커-부위에 연결하고, 이어 수지를 트리페닐포스핀, HO-PEG-CH_2CH_2COO*t*Bu, 용매, 및 아조디카복실산의 에스테르- 또는 아미드 시약, 예컨대 디이소프로필 아조디카복실레이트 (DIAD), 디에틸 아조디카복실레이트 (DEAD) 또는 1,1'-(아조디카보닐)-디피페리딘 (ADDP)으로 처리한 후; 수지를 산, 예컨대 트리플루오로아세트산 (TFA)으로 처리하여 최종 Ns-*M*PEG 이산 링커를 수득하는 것인 방법.

청구항 52

제46항에 있어서, 단계 (a)에서, NH_2-PEG-CH_2CH_2COO*t*Bu의 아민 그룹을 Ns로 보호한 후, 트리페닐포스핀 및 DIAD, DEAD, 또는 ADDP, 또는 유사 시약, HO-PEG-CH_2CH_2COO*t*Bu, 및 적합한 용매 (THF, DCM)를 사용하여 용액중에서 미츠노부 화학반응시키고, 산, 예컨대 TFA로 처리하여 Ns-보호된 *M*PEG-링커를 수득함으로써 용액-상 절차를 수행하는 것인 방법.

청구항 53

제46항에 있어서, 단계 (b)에서, 펩티드는, 고체 지지체, 예컨대 2-클로로트리틸 클로라이드 수지 또는 왕 (Wang) 수지, Fmoc-보호된 아미노산, 염기, 커플링 시약, 예컨대 HBTU [*N,N,N',N'*-테트라메틸-*O*-(1*H*-벤조트리아졸-1-일)우로늄 헥사플루오로포스페이트], *O*-(7-아자벤조트리아졸-1-일)-*N,N,N',N'*-테트라메틸우로늄 헥사플루오로포스페이트 [HATU], PyBOB, DIC/HOBt 및 용매를 사용하거나; 또는 선택적으로 Fmoc-보호된 아미노산의 활성화 에스테르, 예컨대 펜타플루오로페닐, 숙신이미드를 사용하여 Fmoc-기반 고체상 펩티드 합성에 의해 합성되는 것인 방법.

청구항 54

제46항에 있어서, 단계 (c)에서, Fmoc-탈보호 수지에 결합된 펩티드는, 수지를 1/6과 같은 아화학량론적 양의 Ns-MPEG 이산 링커, 염기, 커플링 시약, 및 적합한 용매, 예컨대 DMF, DCM 또는 THF로; 또는 선택적으로 Ns-MPEG 링커의 활성화 에스테르, 예컨대 펜타플루오로페닐 또는 숙신이미드를 사용하여 반복 처리하는 것을 포함하는 수지에서의 이량체화 (on-resin dimerization) 공정에 의해 Ns-MPEG 이산 링커로 이량체화되는 것인 방법.

청구항 55

제46항에 있어서, 단계 (c)에서, 이량체화 공정은, 용매, 예컨대 ACN, DMF, DCM, 또는 THF 중에서 1-하이드록시-7-아자벤조트리아졸 (HOAt) 또는 하이드록시벤조트리아졸 (HOBt) 및 tert-부틸과 같은 적합한 측쇄-보호된 펩티드와 함께 Ns-MPEG 링커의 활성화 에스테르, 예컨대 펜타플루오로페닐 또는 숙신이미드를 사용하여 용액에서 수행되는 것인 방법.

청구항 56

제46항에 있어서, 단계 (c)에서, 이량체화 공정은 Ns-MPEG 이산 링커, 커플링 시약 (예를 들어 HBTU, HATU 등), 염기 및 용매를 사용하여 용액에서 수행되는 것인 방법.

청구항 57

제54항 내지 제56항 중 어느 한 항에 있어서, Ns-그룹을 티올, 예컨대 머캅토에탄올 및 1,8-디아자비사이클로[5.4.0]운데크-7-엔 (DBU)에 의해 또는 소듐 티오페놀레이트에 의해 제거하는 단계를 추가로 포함하는 것인 방법.

청구항 58

제46항에 있어서, 단계 (d)에서, 지방산을 커플링 시약 및 활성화용 염기를 사용하거나 또는 활성화 에스테르를 사용하여 링커-이량체 접합체에 커플링하는 단계를 추가로 포함하는 것인 방법.

청구항 59

제46항에 있어서, 단계 (d)에서, Fmoc-보호된 링커, 예컨대 Fmoc-Glu-OtBu, Fmoc-GABA 또는 Fmoc-5-Ava-OH를 커플링 시약 및 활성화용 염기를 사용하거나 또는 Fmoc-보호된 아미노산 링커의 활성화 에스테르에 의해 연속 커플링함으로써 아미노산 링커를 MPEG-이량체화되고 수지-결합된 펩티드의 자유 질소에 커플링하는 단계를 추가로 포함하는 것인 방법.

청구항 60

제58항 또는 제59항에 있어서, 지방산의 카복실 그룹이 임의로 에스테르, 예컨대 메틸 에스테르로서 보호되는 것인 방법.

청구항 61

제46항 내지 제60항 중 어느 한 항에 있어서, 지방산에 연결된 이량체 리간드가 임의로 산, 예컨대 TFA 또는 HCl에 의해 동반 측쇄 탈보호를 이용하여 수지로부터 절단되는 것인 방법.

청구항 62

제46항 내지 제61항 중 어느 한 항에 있어서, 에스테르 보호 그룹이, 절단 생성물을 수성 염기, 예컨대 NaOH 또는 LiOH에서 교반한 후; TFA 또는 HCl을 사용하여 산성화함으로써 제거되는 것인 방법.

청구항 63

제46항 내지 제62항 중 어느 한 항에 있어서, 최종 생성물을 동결건조 및 크로마토그래피 방법을 이용한 정제에 의해 수득하는 것인 방법.

청구항 64

제63항에 있어서, 정제가 HPLC를 사용하여 수행되는 것인 방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 PSD-95의 PDZ 도메인에 결합할 수 있는 화합물 및 PSD-95에 의해 매개되는 단백질-단백질 상호작용 억제제로서의 그의 의학적 용도에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 시냅스후 밀도 단백질-95 (PSD-95)는 인간에서 DLG4 (디스크 대형 동족체 4: disks large homolog 4) 유전자에 의해 암호화되는 단백질이다. PSD-95는 막-관련 구아닐레이트 키나아제 (MAGUK) 패밀리의 일원이며, PSD-93과 함께 동일한 NMDA 수용체 및 칼륨 채널 클러스터로 동원된다.

[0003] PSD-95는 PDZ 도메인-함유 단백질의 가장 잘 연구된 MAGUK 패밀리 일원이다. 이는 모든 MAGUK 패밀리 단백질과 마찬가지로, 링커 영역에 의해 연결된 3개의 PDZ 도메인, SH3 도메인, 및 구아닐레이트 키나아제-유사 도메인 (GK)을 포함하고 있다. 이것은 거의 전적으로 뉴런의 시냅스후 밀도에 위치하고 있으며, 시냅스 단백질의 고정에 관여한다. 그의 직접 및 간접 결합 파트너는 뉴로리긴, 신경성 산화질소 합성 효소 (nNOS), N-메틸-D-아스파테이트 (NMDA) 수용체, AMPA 수용체 및 칼륨 채널을 포함한다.

[0004] PDZ 도메인은 주로 인간을 비롯한 다양한 생물의 골격 단백질 (scaffolding protein)에서 발견되는 80-90개의 아미노산으로 이루어진 일반적인 구조 도메인이다. PDZ는 상기 도메인을 포함하는 최초의 단백질이 발견된 3종 단백질 - PSD-95, 초파리 디스크 대형 종양 억제제 (Drosophila disc large tumor suppressor, Dlg1), 및 폐쇄소대 (Zonula occludens)-1 단백질 (ZO-1)의 첫 글자를 딴 약자이다.

[0005] 일반적으로, PDZ 도메인은 C 말단에 결합함으로써 다른 단백질과 상호작용을 한다. 이것은 β-시트 증대에 의해 달성되는데, 즉 PDZ 도메인내 β-시트가 결합 파트너 단백질의 C-말단 단부의 첨가에 의해 연장되고, 따라서 연장된 β-시트 유사 구조를 형성한다.

[0006] PDZ 도메인은 진핵 및 진정세균계 둘 다에서 광범위 단백질들에서 발견되는 반면, 고세균류 단백질에는 그 예가 매우 드물다. PSD-95의 세 PDZ 도메인, PDZ1-3은 Ser/Thr-X-Val/Ile/Leu-COOH와 같은 유사 공통 서열을 가지는 펩티드 리간드에 결합한다.

[0007] PDZ 도메인과 C-말단 펩티드의 상호작용에 대한 구조적 기반은 맨처음 천연 펩티드 리간드, CRIPT (서열: YKQTSV)와 복합체를 이룬 PSD-95의 PDZ3에 대한 X-선 결정 구조에 의해 설명되었다. PDZ3은 6개의 역평행 β-가닥 (βA-βF) 및 2개의 α-나선 (αA 및 αB)을 함유하고 있으며, C-말단 펩티드 리간드는 βB 가닥과 αB 나선 사이의 홈에서 결합한다. 펩티드 리간드내 두 잔기, 즉 C-말단으로부터 계산되어 제1 (P^0) 및 제3 (P^{-2}) 아미노산이 친화성 및 특이성에 있어 특히 중요한 것으로 생각된다. P^0 위치에서의 아미노산 측쇄는 소수성 포켓에서 돌출되며, 지방족 측쇄를 가지는 아미노산 (Val, Ile 및 Leu)이 필요하다. PDZ3-CRIPT X-선 결정 구조에서, Ser 또는 Thr (P^{-2})의 하이드록실 산소는 His372의 이미다졸 측쇄에 있는 질소와 수소 결합을 형성하며, 이러한 상호작용은 PDZ 도메인/리간드 상호작용의 친화성에 대한 중요한 결정인자인 것으로 판명되었다. PDZ 도메인의 보존 Gly-Leu-Gly-Phe (PDZ3에서 322-325번 위치) 모티브 및 양전하 잔기 (PSD-95 PDZ3에서 Arg318)는 C-말단 카복실레이트 그룹에 대한 결합을 중재한다.

[0008] PSD-95의 PDZ1 및 PDZ2 도메인은 NMDA-형 이온성 글루타메이트 수용체와 산화질소 (NO) 생성 효소 nNOS의 동시 결합을 비롯해 다수의 단백질과 상호작용한다. NMDA 수용체는 신경변성 질환 및 급성 뇌손상에 연루되는 흥분독성, 즉 글루타메이트-매개 신경독성의 주요 매개체이며, NMDA 수용체의 길항제가 글루타메이트-매개 이온 흐름을 방해함으로서 흥분독성을 효율적으로 감소시키지만, 이들은 또한 생리학적으로 중요한 과정도 방해한다. 따라서, NMDA 수용체 길항제는 낮은 내성 및 비효율성으로 인해 예컨대 뇌졸중에 대한 임상 실험에서 실패했다. 대신, PSD-95 억제제를 사용하여 세포내 nNOS/PSD-95/NMDA 수용체 복합체를 교란시킴으로써 흥분독성의 특이적 억제를 얻을 수 있었다.

[0009] PSD-95는 각각 PDZ1 및 PDZ2를 통해 NMDA 수용체, 주로 GluN2A 및 GluN2B 소단위, 및 nNOS에 동시에 결합한다. NMDA 수용체의 활성화는 칼슘 이온들의 유입을 일으켜 nNOS를 활성화함으로써 NO 발생을 초래한다. 따라서,

PSD-95는, 글루타메이트-매개 신경독성의 주요 촉진인자이고 장기간 유지되는 경우 세포에 유해할 수 있는 NMDA 수용체 활성화와 NO 생성 사이의 특이적 결합을 중재한다. PSD-95를 표적화함으로써 nNOS/PSD-95/NMDA 수용체 삼원 복합체의 상호작용을 억제하는 것은, 마우스에서, NMDA 수용체의 친생존 (pro-survival) 신호전달 경로와 이온-흐름과 같은 생리적 기능은 온전히 유지하면서 칼슘 이온 유입과 NO 생성 사이의 기능적 연결을 방해함으로써 허혈성 뇌손상을 예방하는 것으로 알려졌다. WO 2010/004003호는 폴리에틸렌 글리콜 링커 (PEG)에 의해 연결된 이량체 펩티드 리간드에 의해 PSD-95의 억제 개념을 개시한다. 이들 이량체는 PSD-95의 PDZ1 및 PDZ2 도메인에 동시에 결합한다.

[0010] PSD-95를 표적화하는 이량체 리간드가 만성 통증 치료제로서 사전 임상 평가중에 있다 [참조: Andreasen et al, Neuropharmacol, 2013, 67, 193-200; Bach et al, PNAS USA, 2012, 109, 3317-3322]. 그러나, 치료적 펩티드는 일반적으로 혈액으로부터 제거되고 신장 청소 및 간 대사에 의해 분해되기 쉽다. 따라서, 약물동태학적 특성을 개선함으로써 이량체 펩티드 리간드의 안정성 및 반감기를 증가시키는 것이 필요하다.

발명의 내용

[0011] PSD-95의 이량체 펩티드 리간드의 개선된 약물동태학적 특성과 생체내 증가된 안정성을 제공하도록 언급된 문제들을 다루기 위해, 본 발명은 2개의 펩티드 리간드가 MPEG 링커와 같은 링커에 의해 연결되고, 하나 이상의 지방산 또는 지방산 유도체가 MPEG 링커에 직접 또는 추가 링커를 통해 접합되어 있는 새로운 종류의 화합물을 개시한다.

[0012] 따라서, 본 발명자들은 지방산이 부착되지 않은 화합물, 예를 들어 WO2010/004003호에 개시된 화합물에 비해 시험관내 혈장 반감기가 개선된 이량체 PSD-95 리간드의 유도체를 개발하였다. 또한, 화합물은 피하 투여 시 피하 데포에서 증가된 체류 시간을 나타낸다.

[0013] 일 측면에서 본 발명은 제1 펩티드 (P_1) 및 제2 펩티드 (P_2)를 포함하고, 여기서 P_1 및 P_2는 각각 적어도 2개의 단백질원성 (proteinogenic) 또는 비-단백질원성 (non-proteinogenic) 아미노산 잔기를 포함하며, 양 P_1 및 P_2는 그의 각 N-말단을 통해 제1 링커 L_1에 접합되고, L_1은 폴리에틸렌 글리콜 (PEG)을 포함하고, 여기서 PEG의 적어도 하나의 산소 원자는 질소 원자로 치환되어 MPEG를 제공하고, 알부민 결합 부분은 아미드 결합에 의해, 또는 임의의 링커 L_2를 통해 MPEG의 질소 원자에 연결된, 화합물에 관한 것이다.

[0014] 본 발명의 화합물은 P_1 및 P_2가 본원에 정의된 바와 같이 선택되는 경우 PSD-95의 PDZ1-2에 결합하는 것으로 입증되었다. PSD-95는 치료제를 위한 중요한 표적이기 때문에, 본 발명은 일 측면에서 의약으로서의 본원에 정의된 바와 같은 화합물에 관한 것이다.

[0015] 보다 구체적으로, 본 발명의 화합물은 일 측면에서 흥분독성-관련 질환의 치료 또는 예방, 또는 통증의 예방 및/또는 치료를 위해서 사용될 수 있다.

[0016] 본 발명의 화합물은 개략적으로

[0017] a) Ns-MPEG 이산 링커를 제조하는 단계,

[0018] b) Fmoc-기반 고체상 펩티드 합성을 이용하여 펩티드를 제조하는 단계,

[0019] c) Fmoc-탈보호 펩티드를 Ns-MPEG 이산 링커와 이량체화하는 단계,

[0020] d) 지방산을, 임의로 중간 링커, 예컨대 아미노산 링커 (L_2)를 통해 링커-이량체 접합체에 커플링하는 단계를 포함하는 방법에 의해 합성할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0021] 도 1: 참조 리간드, UCCB01-125 및 UCCB01-144의 구조. 'N'(질소), 'O' (산소)를 제외한 다른 대문자는 L-아미노산을 지칭한다.

도 2: FA에 연결된 이량체 리간드 (**1-12**) 및 UCCB01-125 및 UCCB01-144의 HSA에 대한 친화성. 데이터는 평균±SEM (n=3)을 나타낸다.

도 3: FP에 의해 측정된, FA에 연결된 이량체 리간드 (**1-12**) 및 UCCB01-125 및 UCCB01-144의 PSD-95 PDZ1-2에 대한 친화성. A) TBS에서 측정; B) TBS + HSA에서 측정; C) fu에 대해 보정된 TBS + HSA에서 측정. 데이터는

평균±SEM (n≥3)을 나타낸다.

도 4: 화합물 (UCCB01-125, 1, 4, 7, 13)의 시험관내 혈장 안정성. 계산된 반감기는 다음과 같다: UCCB01-125: 1.7시간; 1: 23.6시간; 4, 7, 및 13: >24시간.

도 5: 래트에 피하 투여 후 이량체 리간드 UCCB01-125 (두 용량) 및 화합물 1, 4, 7 및 13의 혈장 프로파일.

도 6: FA에 연결된 이량체 리간드 (1-12)의 합성. 이 도면의 반응식 1에 나타낸 합성 반응 조건은 다음과 같다: (a) Fmoc-GABA-OH/Fmoc-(L)-Glu-OtBu/Fmoc-5-Ava, HATU, 콜리딘, DMF (1시간 × 2), 이어 DMF 중 20% 피페리딘; (b) FA1/FA2/FA3/FA4, HBTU, DIPEA, DMF/DCM, 45분, 이어 TFA/TIPS/H_2O (90/5/5); (c) 0.5M LiOH, H_2O/ACN (75/25), 30분, 이어 TFA로 pH<2 까지. 삼각형은 E 및 T가 측쇄 보호 (*tert*-부틸)되었음을 나타낸다.

도 7: 옥타데칸디오에이트 디메틸 에스테르의 단일 비누화. 반응 조건: (a) NaOH (1eq.), MeOH, 45℃, O/N.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0022] **I. 정의**

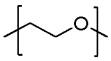
[0023] 아미드 결합: 본원에 사용된 용어 '아미드 결합'은 카복실산과 아민 사이의 반응 (및 물의 동시 제거)에 의해 형성된 화학적 결합이다. 반응이 두 아미노산 잔기 사이에서 일어난 경우, 반응 결과 형성된 결합은 펩티드 연결 (펩티드 결합)로 알려져 있다;

[0024] 포함하는: 본원에 사용된 용어 '포함하는'은 포괄적인 방식으로 이해하여야 한다. 따라서, 예로서, 화합물 X를 포함하는 조성물은, 화합물 X 및 임의로 추가의 화합물을 포함할 수 있다.

[0025] 이량체: 본원에 사용된 용어 이량체는 화학적 또는 물리적 상호작용에 의해 연결된 두 개의 동일하거나 동일하지 않은 화학적 부분을 의미한다. 예로서, 이량체는 링커에 의해 연결된 두 개의 동일한 펩티드와 같은 호모이량체일 수 있다. 이량체는 또한 링커에 의해 연결된 두 개의 상이한 펩티드와 같은 헤테로이량체일 수 있다. 이량체의 일례는 링커에 의해 공유적으로 연결된 두 개의 펩티드 또는 펩티드 유사체를 포함하는 화합물이며, 여기서 펩티드 또는 펩티드 유사체는 동시에 PSD-95의 PDZ1 및 PDZ2에 결합하거나 이와 상호작용할 수 있는 본 발명의 PSD-95 억제제이다.

[0026] 디펩티드: 본원에 사용된 용어 '디펩티드'는 펩티드 결합에 의해 연결된 두 개의 천연 또는 비천연 아미노산을 의미한다.

[0027] 에틸렌 글리콜 부분: 본원에 사용된 용어 '에틸렌 글리콜 부분'은 PEG 또는 MPEG 링커를 구성하는 구조 단위를 의미한다. '에틸렌 글리콜 부분'의 또 다른 명칭은 '옥시에틸렌'이고, 단량체 단위의 화학식은 다음과 같다:

[0028] 

[0029] 지방산: 본원에 사용된 용어 지방산 (FA로 약칭됨)은 전형적으로 포화 또는 불포화될 수 있는 긴 지방족 탄소쇄를 가진 카복실산을 의미한다. 지방산은 단쇄 지방산 (SCFA), 중쇄 지방산 (MCFA), 장쇄 지방산 (LCFA) 및 매우 긴 쇄의 지방산 (VLCFA)으로부터 선택될 수 있다. 단쇄 지방산 (SCFA)은 탄소수 6 미만의 지방족 말단을 가지는 지방산 (즉 부티르산)이다. 중쇄 지방산 (MCFA)은 중쇄 트리글리세리드를 형성할 수 있는 탄소수 6 내지 12의 지방족 말단을 가지는 지방산이다. 장쇄 지방산 (LCFA)은 탄소수 13 내지 21의 지방족 말단을 가지는 지방산이다. 매우 긴 쇄의 지방산 (VLCFA)은 탄소수 22 초과의 지방족 말단을 가지는 지방산이다. 본 발명의 지방산은 당업자에게 공지된 임의의 적합한 지방산 또는 지방산 유도체일 수 있다.

[0030] 링커: 본원에 사용된 용어 '링커'는 하나의 화학 실체에서 다른 화학 실체로의 연결을 형성하는 하나 이상의 원자를 의미한다. 예로서, 본원에서 지칭된 '제1 링커'는 각각의 그의 *N*-말단에 연결을 형성함으로써 두 PDZ-도메인 결합 펩티드를 연결하는 PEG 또는 MPEG이다.

[0031] 비-단백질원성 아미노산: 비-암호화, 비-표준 또는 비-천연 아미노산으로도 지칭되는 비-단백질원성 아미노산은 유전자 암호에 의해 암호화되지 않는 아미노산이다. 비-단백질원성 아미노산의 비포괄적 목록은 α-아미노-n-부티르산, 노르발린, 노르류신, 이소류신, 알로이소류신, tert-류신, α-아미노-n-헵탄산, 피페콜린산, α,β-디아미노프로피온산, α,γ-디아미노부티르산, 오르니틴, 알로트레오닌, 호모시스테인, 호모세린, β-알라닌, β-아미노-n-부티르산, β-아미노이소부티르산, γ-아미노부티르산, α-아미노이소부티르산, 이소발린, 사르코신,

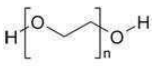
N-에틸 글리신, N-프로필 글리신, N-이소프로필 글리신, N-메틸 알라닌, N-에틸 알라닌, N-메틸 β-알라닌, N-에틸 β-알라닌, 이소세린 및 α-하이드록시-γ-아미노부티르산을 포함한다.

[0032] MPEG: 본원에 사용된 용어 MPEG는 하나 이상의 백본 산소 원자가 질소 원자로 대체된 PEG 링커의 링커 유도체이다.

[0033] Ns-MPEG 이산 링커: 'Ns-MPEG 이산 링커'는 MPEG 링커가 질소 상에서 링커 질소 상의 오르토-니트로벤젠설포닐(Ns) 보호 그룹으로 보호되고 MPEG 링커의 말단이 카복실산을 포함하는 구조이다. 이 화학 시약 또는 빌딩 블록은 두 펩티드 부분, P_1 및 P_2의 이량체화를 위해 사용된다.

[0034] PDZ: 본원에 사용된 용어 'PDZ'는 시냅스후 밀도 단백질-95 (Postsynaptic density protein-95: PSD-95), 초파리 동족체 디스크 대형 종양 억제제 (Drosophila homologue discs large tumor suppressor, DlgA), 및 폐쇄소대 (Zonula occludens)-1 단백질 (zo-1)을 지칭한다.

[0035] PEG: 본원에 사용된 용어 'PEG'는 본원에 상술된 에틸렌 글리콜 부분의 중합체를 의미한다. PEG는 $C_{2n+2}H_{4n+6}O_{n+2}$의 화학식을 가지며, 반복 구조는 다음과 같고:



[0036]

[0037] 여기서, 예를 들어 12개의 PEG 부분, 또는 PEG12는 12개 에틸렌 글리콜 부분의 중합체에 상응한다.

[0038] 약물동태 프로파일: 본원에 사용된 용어 '약물동태 프로파일'은 본원에 기재된 화합물의 혈류로의 흡수, 조직으로의 분포, 대사 및 배출의 생체내 특성을 의미한다. 약물동태 프로파일에 포함되는 파라미터의 일례는 혈장 프로테아제에 의한 화합물의 대사를 모델화한 시험관내 반 혈장 반감기이다.

[0039] 단백질원성 아미노산: 천연 아미노산으로도 칭해지는 단백질원성 아미노산은 알라닌, 시스테인, 셀레노시스테인, 아스파르트산, 글루탐산, 페닐알라닌, 글리신, 히스티딘, 이소류신, 리신, 류신, 메티오닌, 아스파라긴, 프롤린, 피롤리신, 글루타민, 아르기닌, 세린, 트레오닌, 발린, 트립토판 및 티로신을 포함한다.

[0040] PSD-95: 본원에 사용된 용어 'PSD-95'는 시냅스후 밀도 단백질-95를 의미한다.

[0041] PSD-95 억제제: 본원에 사용된 용어 'PSD-95 억제제'는 PSD-95의 PDZ1, PDZ2, 또는 PDZ1 및 PDZ2 둘 다에 결합하고 세포에서 이들 PDZ 도메인에 의해 촉진되는 단백질-단백질 상호작용을 억제하는 화합물을 의미한다. PSD-95 억제제에 의해 억제되는 상호작용의 일례로는 nNOS, PSD-95 및 NMDA 수용체 사이의 삼원 복합체 형성을 들 수 있다.

[0042] **II. 혈장 반감기가 개선된 이량체 화합물**

[0043] PSD-95를 표적으로 하는 이량체 리간드가 만성 통증 및 허혈성 뇌졸중에 대한 치료제로서 사전 임상 평가중에 있다 [참조: Andreasen et al, Neuropharmacol, 2013, 67, 193-200; Bach et al, PNAS USA, 2012, 109, 3317-3322]. 그러나, 치료적 펩티드는 일반적으로 프로테아제 의해 분해되고 신장 여과 및/또는 간 대사에 의해 제거되기 쉽다 [참조: Tang et al, J Pharm Sci, 2004, 93, 2184-204]. 신장은 일반적으로 60 kDa 아래의 분자량을 갖는 화합물을 걸러내기 때문에, 제한된 크기의 이량체 리간드는 신장 여과에 의해 혈액으로부터 소거될 가능성이 있다 [참조: Dennis et al, J Biol Chem 2002, 277, 35035-43]. 신경병증성 통증과 같은 만성 상황에서 이량체 펩티드 리간드를 임상적 유용성에 보다 더 적합하게 하기 위해서, 투여 방식은 순응성 (compliance) 향상을 위해 바람직하게는 1일 1회로 가능한 간단해야 한다 [참조: Claxton et al, Clin Ther 2001, 23, 1296-310]. 또한, 피하 (s.c.) 투여와 같은 적절한 경로를 통한 환자에 의한 자가 투여가 i.v. (정맥내) 주사보다 바람직하다. s.c. 투여에 대한 주요 제약은 낮은 주입량의 요구인데 [참조: Dychter et al, J Infus Nurs 2012, 35, 154-60], 이는 매우 강력하고 고농축성이며 가용성인 동시에 순환으로부터 천천히 분해 및 배출되는 약물을 필요로 한다. 또한, 약물은 주사 데포에서 안정해야 하고, 약물의 작용을 길게 하기 위해 순환으로 서서히 흡수되어야 한다 [참조: Havelund et al, Pharm Res 2004, 21, 1498-504]. 따라서, 이량체 펩티드 리간드의 약물동태 프로파일 및 생체내 반감기는 또한 이러한 사안을 고려하여 최적화되어야 한다.

[0044] *알부민 결합*

[0045] 전체 혈청 단백질의 55%로 인간 혈청에서 가장 풍부한 단백질인 인간 혈청 알부민 (HSA) [참조: Elsadek et al, J Control Release 2012, 157, 4-28]은, 이러한 문제들을 해결할 수 있는 기회를 제공한다. HSA의 평균 혈중

농도는 520-830 μM이고, 분자량은 약 66.5 kDa이다 [참조: Kragh-Hansen et al, Biol Pharm Bull 2002, 25, 695-704]. HSA는 혈액, 근조직 및 피부에 풍부하지만 [참조: Sleep et al, Biochim Biophys Acta 2013, 1830, 5526-34], 정상적인 상태에서는 뉴런내에 존재하지 않는다. 그러나, 이것은 뇌졸중과 같이 뇌 혈액 장벽 (BBB)이 손상된 질병 상태에서 뉴런으로 유입할 수 있다 (Loeberg, APMIS 1993, 101, 777-83). HSA는 지방산 (FA), 헤민, 빌리루빈 및 트립토판과 같은 수많은 내인성 리간드 [참조: Simard et al, PNAS USA, 2005, 102, 17958-63; Kragh-Hansen et al, Biol Pharm Bull 2002, 25, 695-704], 및 와파린 및 디아제팜과 같은 약물뿐만 아니라 금속 이온 [참조: Ymasaki et al, Biochim Biophys Acta 2013, 1830, 5435-43]에 대한 수송 및 저장소 단백질로서 기능한다.

[0046] HSA의 구조는 광범위하게 연구되어 왔으며, 71개의 상이한 리간드와 함께 90개 이상의 서로 다른 HSA의 x-선 구조가 단백질 데이터 은행 (PDB, 2013년 9월 26일 허용)에 기탁되었다. HSA는 80 × 80 × 30 Å의 근사 치수를 가지는 하트 모양의 분자이며, 세 개의 유사한 도메인 (I, II 및 III)으로 구성되고, 두 개의 하위 도메인 (a 및 b)으로 더 세분된다 [참조: Sugio et al, Protein Eng 1999, 12, 439-46]. 약물 대부분은 1975년에 형광 분광법에 의해 부위를 규명한 서드로우 (Sudlow)와 동료의 선구자적 연구의 이름을 따서 명명한 서드로우 부위 I (또한 와파린 부위라고도 함) 및 II (또한 디아제팜 부위라고도 함)에서 결합한다 [참조: Elsadek et al, J Control Release 2012, 157, 4-28; Yamasaki et al, Biochim Biophys Acta 2013, 1830, 5435-43]. 두 약물 결합 부위는 이후 지도화되었고 각각 하위도메인 IIa (하위도메인 IIIa 및 IIb 내 잔기의 기여와 함께) 및 IIIa 내에서 발견되었다 [참조: Yamasaki et al, Biochim Biophys Acta 2013, 1830, 5435-43]. 서드로우의 부위 I 및 II에서 리간드의 일반적인 결합에 대한 한가지 중요한 예외는 지방산 (FA)이다.

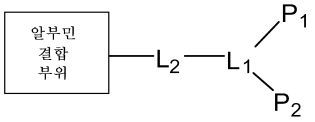
[0047] 약물의 높은 HSA 결합이 약물의 반감기를 증가시킨다는 개념은 1970년부터 알려져 왔다. 그러나, 치료 펩티드 및 단백질의 반감기를 증가시키기 위해 HSA를 사용하는 특정 개념은 2002년 (약 250건의 공보물/년)부터 2010년 (약 500건의 공보물/년)사이에 년간 공보물의 수가 두배로 서서히 발전되어 왔다 [참조: Elsadek et al, J Control Release 2012, 157, 4-28]. 천연원으로부터 단리되고 [참조: Jonsson et al, Protein Eng Des Sel 2008, 21, 515-27] 흔히 애드넥틴 [참조: Lipovsek et al, Protein Eng Des Sel 2011, 24, 3-9]으로 불리는, 파지 디스플레이에 의해 확인된 HSA-결합 서열 [참조: Dennis et al, J Biol Chem 2002, 277, 35035-43]을 비롯해 다수의 펩티드-기반 HSA 결합 부분이 설명되었다. 그러나, 이들은 프로테아제에 의해 분해되기 쉬워 개발된 화합물이 수 시간 동안 s.c. 데포에 머물러야 하는 경우 현재의 s.c. 투여의 경우에 특히 문제가 될 수 있다.

[0048] *전체 구조*

[0049] 약물동태 프로파일을 개선하기 위해, 본 발명자들은 생성된 화합물의 HSA 친화성, PSD-95에 대한 친화성 및 소수성에 대한 지방산 및 링커 타입의 영향을 조사하였다. 이 과정에서 신규 화합물은 인간 혈장에서 원하는 HSA-결합 프로파일 및 향상된 안정성을 제공하는 것으로 확인되었다.

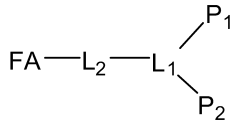
[0050] 따라서, 일 측면에서, 본 발명은 제1 펩티드 (P_1) 및 제2 펩티드 (P_2)를 포함하고, 여기서 P_1 및 P_2는 각각 적어도 2개의 단백질원성 또는 비-단백질원성 아미노산 잔기를 포함하며, 양 P_1 및 P_2는 그의 N-말단을 통해 제1 링커 L_1에 접합되고, L_1은 폴리에틸렌 글리콜 (PEG)을 포함하고, 여기서 PEG의 적어도 하나의 산소 원자는 질소 원자로 치환되어 *M*PEG를 제공하고, 알부민 결합 부분은 아미드 결합에 의해, 또는 임의의 링커 L_2를 통해 *M*PEG의 질소 원자에 연결된, 화합물에 관한 것이다

[0051] 특정 실시양태에서 상기 화합물은 하기 일반 화학식 (I)를 가진다:

[0052] 

화학식 (I)

[0053] 알부민 결합 부분은 임의의 적합한 화학적 그룹 결합 알부민일 수 있지만, 알부민 결합 부분이 지방산 (FA)인 것이 바람직하다. 따라서, 일 실시양태에서 화합물은 일반 화학식 (II)를 가진다:

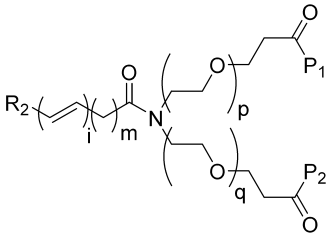


화학식 (II)

[0054]

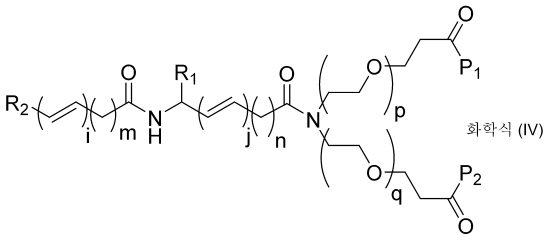
[0055] 지방산은 임의의 적합한 지방산, 예컨대 포화 또는 불포화 지방산일 수 있다. 상기 화학식 (I) 및 (II)에 나타낸 바와 같이, 지방산과 같은 알부민 결합 부분은 임의로 제2 링커 L_2를 통해 MPEG 링커 (L_1)의 질소 원자에 연결될 수 있다. 제2 링커 L_2가 포함되는 실시양태에서, 상기 링커는 질소 원자를 포함한다.

[0056] 일 실시양태에서 본 발명에 따른 화합물은 화학식 (III) 또는 (IV)의 일반 구조를 가진다:



화학식 (III)

[0057]



화학식 (IV)

[0058]

[0059] 상기 식에서,

[0060] R_1 및 R_2는 각각 H 및 COOH로 구성된 군으로부터 선택되고,

[0061] n은 0 내지 48의 정수이고,

[0062] m은 1 내지 48의 정수이고,

[0063] p는 0 내지 28의 정수이고,

[0064] q는 0 내지 28의 정수이고,

[0065] i는 0 내지 12의 정수이고,

[0066] j는 0 내지 12의 정수이고,

[0067] P_1 및 P_2는 각각 적어도 2개의 단백질원성 또는 비-단백질원성 아미노산 잔기를 포함하는 펩티드중에서 선택된다.

[0068] *제1 링커 (L_1)*

[0069] 활성 펩티드 P_1 및 P_2 상의 지방산에 의해 나타나는 특성은 이들 부분이 연결되는 방식에 좌우된다. 연결은 제1 링커 L_1 및 제2 링커 L_2를 통해 달성된다. 일부가 WO 2012/156308호에 기술되어있는 제1 링커 L_1은 폴리에틸렌 글리콜을 형성하는 다수의 에틸렌 글리콜 부분으로 구성되는데, 여기서 하나의 산소 원자가 질소 원자에 의해 대체되어 MPEG 링커를 형성하게 된다. MPEG 링커는 다수의 (p, q) 에틸렌 글리콜 부분에 의해 양 측면에 배치된 질소 원자로서 예시될 수 있다.

[0070] 질소 원자 측면의 에틸렌 글리콜 부분의 수는 본 발명의 상이한 실시양태에서 달라질 수 있다. 일 실시양태에서 한쪽 면 상의 에틸렌 글리콜 부분의 수 (p)는 반대쪽 면 상의 에틸렌 글리콜 부분의 수와 같고, 즉 p = q이다. 다른 실시양태에서, p > q 또는 p < q이다.

[0071] 일 실시양태에서 p와 q의 합은 0 내지 28의 정수이고, 예컨대 에틸렌 글리콜 부분의 수, p는 0, 1, 2, 3, 4, 5,

6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27 또는 28로부터 선택된다.

[0072] 일 실시양태에서 에틸렌 글리콜 부분의 수 p는, PSD-95에 대해 최고의 친화성을 제공하기 때문에 1 내지 4이다.

[0073] 일 실시양태에서 에틸렌 글리콜 부분의 수, q는 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27 또는 28개의 에틸렌 글리콜 부분으로부터 선택된다.

[0074] 일 실시양태에서 에틸렌 글리콜 부분의 수, q는 PSD-95에 대해 최고의 친화성을 제공하기 때문에 1 내지 4이다.

[0075] 일 실시양태에서 총 에틸렌 글리콜 부분의 수 p + q는 링커 길이가 PSD-95에 대해 최고의 친화성을 제공하기 때문에 2 내지 12이다.

[0076] 일 실시양태에서 총 에틸렌 글리콜 부분의 수 p + q는 링커 길이가 PSD-95에 대해 가장 최고의 친화성을 제공하기 때문에 4이다.

[0077] 다른 실시양태에서 총 에틸렌 글리콜 부분의 수 p + q는 링커 길이가 PSD-95에 대해 매우 높은 친화성을 제공하기 때문에 6이다.

[0078] *제2 링커 (L_2)*

[0079] 제2 링커 L_2는 임의적이고, 특정 목적을 위해 필요한 물리적 또는 화학적 성질에 따라 포함되거나 제외될 수 있다. 제2 링커 L_2는, 존재할 경우, 질소 원자를 포함한다. 제2 링커 L_2는 예를 들어 ɣ-Glu, ɣ-부티르산 (GABA), 5-아미노 발레르산 (5-Ava), 단백질원성 아미노산, 비-단백질원성 아미노산, 및 일반 화학식 H_2N-[Q]-COOH를 가지는 임의의 화합물 (여기서 Q는 임의의 적합한 원자 또는 원자들 또는 분자이다)로 구성된 군으로부터 선택될 수 있다.

[0080] 본원에서 전술한 바와 같이, 제2 링커는 반복 탄소 부분을 포함함으로써 예를 들어 알킬 또는 알케닐 쇄를 형성할 수 있다. 반복 단위의 수 (i) 및/또는 (m)은 목적하는 성질에 따라 달라질 수 있다. 따라서, i 및/또는 m은 각각 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47 및 48로 구성된 군으로부터 선택될 수 있는 정수이다.

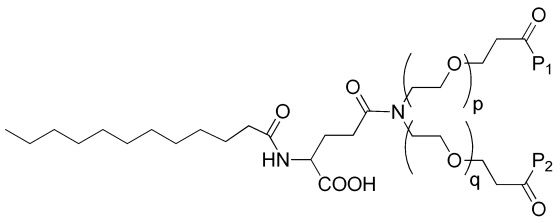
[0081] 일 실시양태에서 n은 1 내지 3의 정수이고, 예컨대 일 실시양태에서 n=1 또는 n=2 또는 n=3이다.

[0082] 특정 실시양태에서 i 및/또는 j는 0 내지 12의 정수, 예를 들어 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 및 12로 구성된 군으로부터 선택되는 정수이다.

[0083] 특정 실시양태에서 링커 L_1 및 L_2는 본 발명에 따른 화합물이 다음으로 구성된 군으로부터 선택되도록 선택된다:

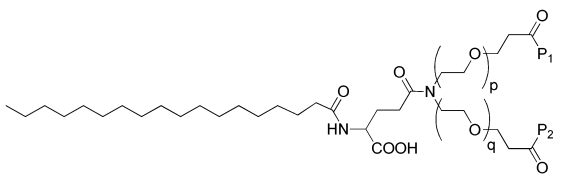
a) KBN41
유도체

[0084]

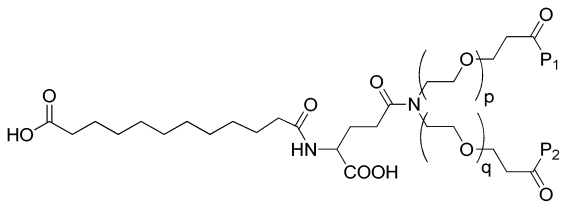


b) KBN42
유도체

[0085]

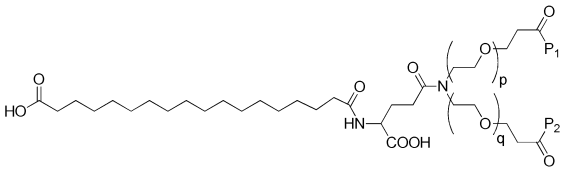


c) KBN43
유도체



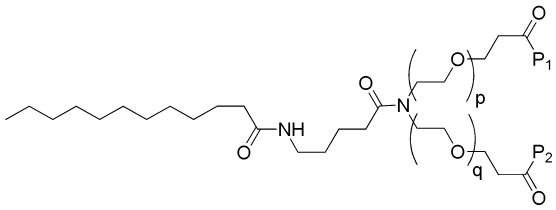
[0086]

d) KBN44
유도체



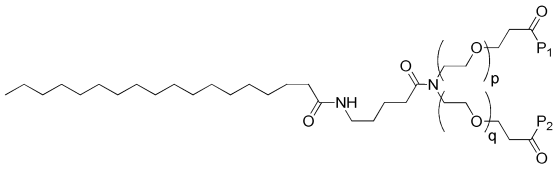
[0087]

e) KBN45
유도체



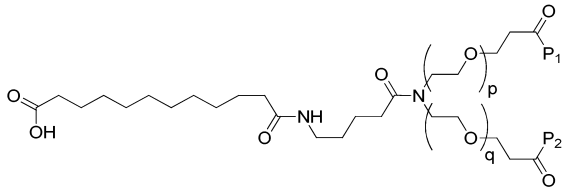
[0088]

f) KBN46
유도체



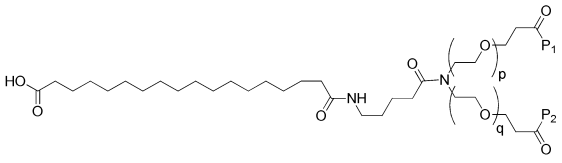
[0089]

g) KBN47
유도체



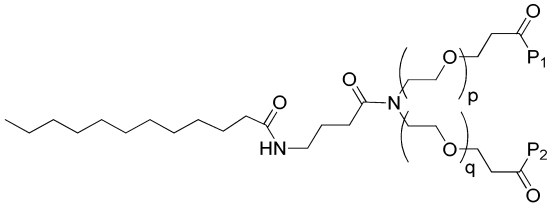
[0090]

h) KBN48
유도체



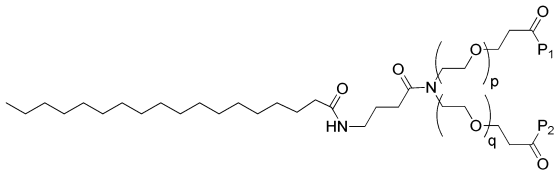
[0091]

i) KBN52
유도체



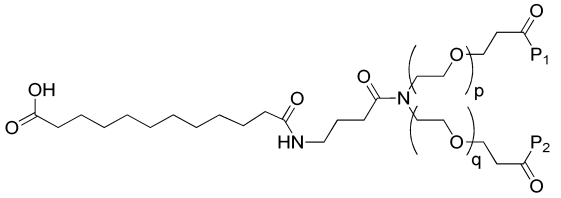
[0092]

j) KBN53
유도체



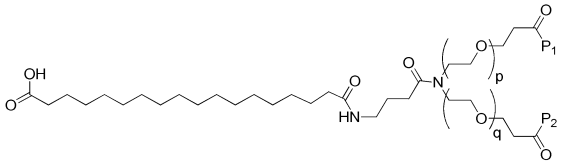
[0093]

k) KBN54
유도체



[0094]

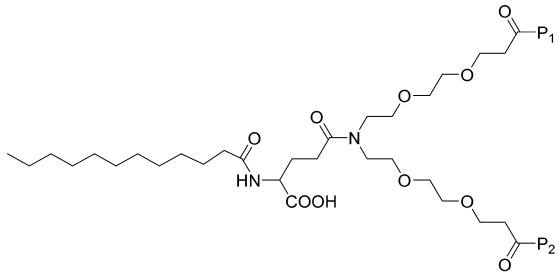
l) KBN55
유도체



[0095]

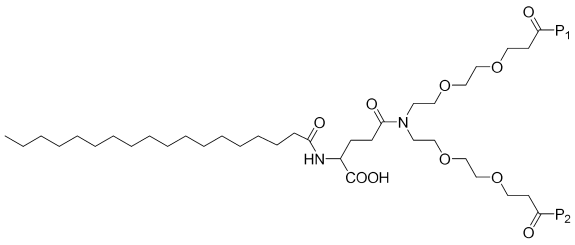
[0096] 추가 실시양태에서 링커는 본 발명의 화합물이 다음으로 구성된 군으로부터 선택되도록 선택된다:

a) KBN41
유도체



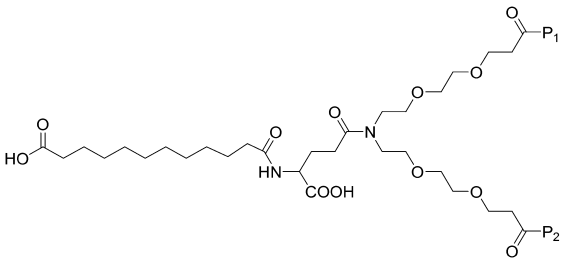
[0097]

b) KBN42
유도체



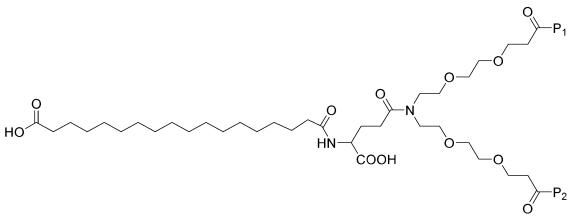
[0098]

c) KBN43
유도체



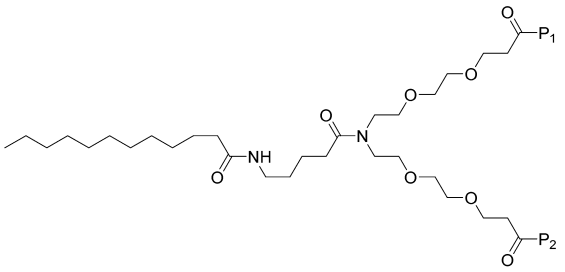
[0099]

d) KBN44
유도체



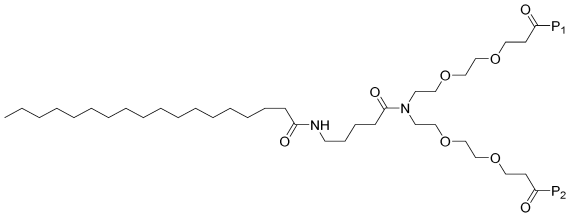
[0100]

e) KBN45
유도체



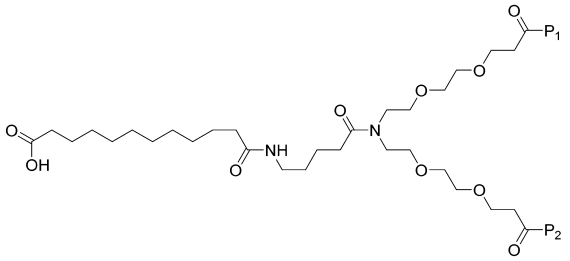
[0101]

f) KBN46
유도체



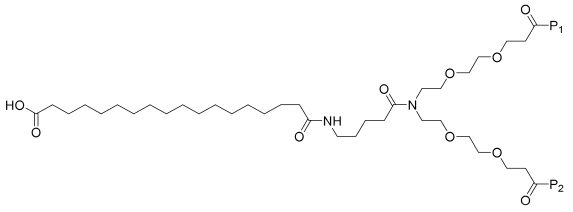
[0102]

g) KBN47
유도체



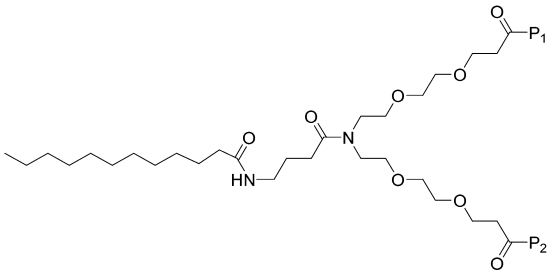
[0103]

h) KBN48
유도체



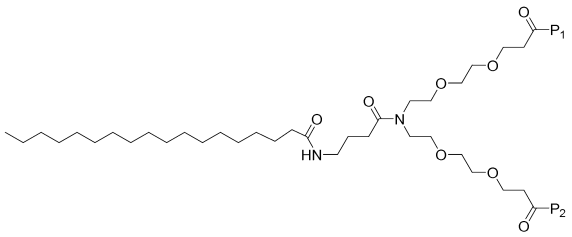
[0104]

i) KBN52
유도체



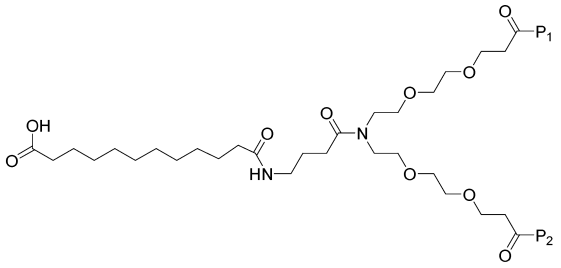
[0105]

j) KBN53
유도체



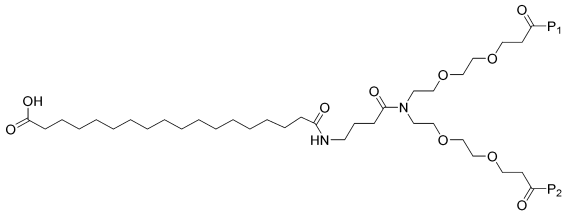
[0106]

k) KBN54
유도체



[0107]

l) KBN55
유도체



[0108]

[0109] *지방산 (FA)*

[0110] 지방산은 포화 또는 불포화된 지방족 말단 (쇄)을 가지는 카복실산이다. 대부분의 천연 지방산은 4 내지 28의 짝수 탄소 원자수의 쇄를 갖는다. 지방산은 일반적으로 트리글리세리드 또는 인지질로부터 유도된다. 이들이 다른 분자에 부착되지 않은 경우 이는 자유 지방산으로 알려져 있다.

[0111] 탄소-탄소 이중 결합을 가지는 지방산은 불포화 지방산으로 알려져 있고, 이중 결합이 없는 지방산은 포화된 것으로 알려져 있다. 불포화 지방산은 탄소 원자 사이에 하나 이상의 이중 결합을 갖는다. 특정 실시양태에서, 본 발명의 화합물은 불포화 지방산을 포함한다. 이러한 실시양태에서, 일반 화학식 (III), (IV), (V) 또는 (VI)의 지수 (i) 및/또는 (j)는 0 내지 12의 정수로부터 개별적으로 선택되는 정수, 예컨대 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12로 구성된 군으로부터 선택되는 정수이다.

[0112] 불포화 지방산은 시스 또는 트랜스 배열, 또는 이들의 혼합물로 이용가능하다.

[0113] 시스 배열은 인접한 수소 원자가 이중 결합의 동일 면에 있는 것을 의미한다. 이중 결합의 강성은 그의 배열을 동결시키고, 시스 이성체의 경우, 쇄를 구부려 지방산의 형태적 자유도를 제한한다. 시스 배열에서 쇄가 더 많은 이중 결합을 가질수록, 유연성이 더 떨어진다. 쇄가 시스 배열로 많은 이중 결합을 갖는 경우, 이는 그의 가장 접근하기 쉬운 배열로 상당히 만곡된다. 예를 들어, 하나의 이중 결합을 가지는 올레산은 그안에 "꼬임"을 가지는 반면, 두 개의 이중 결합을 가지는 리놀레산은 한층 더 현저한 구부림을 가진다. 세 개의 이중 결합을 가지는 α-리놀렌산은 후크 형상을 선호한다. 이것의 효과는, 제한된 환경에서, 예컨대 지방산이 지질 이중층에서 인지질의 일부 또는 지질 소적으로의 트리글리세리드인 경우, 시스 이중 결합이 치밀해지는 지방산의 능력을 제한하고, 따라서 막 또는 지방의 융점에 영향을 미칠 수 있다는 것이다.

[0114] 이에 반해 트랜스 배열은, 다음 두 수소 원자가 이중 결합의 반대 면에 결합되는 것을 의미한다. 그 결과, 이것은 쇄를 더 많이 구부러뜨리지 않고, 그 형상은 직쇄 포화 지방산과 유사하다.

[0115] 시스, 트랜스, 또는 혼합 지방산을 포함하여 임의의 지방산을 의도된 목적에 적합하게 선택하는 것은 본 발명의 범위내에 있다.

[0116] 본 발명에 따른 화합물은 임의의 적합한 지방산 또는 지방산 유도체를 포함할 수 있다. 일 실시양태에서, 지방산은 일반 화학식 (III) 또는 (IV)에 정의된 바와 같은 지방산이고, 여기서 m은, 의심할 여지없이 고도의 HSA 상호작용이 확인된, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23,

24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47 및 48로 구성된 군으로부터 선택되는 정수이고, 예컨대 m은 10 내지 16의 정수이고, 예를 들어 m은 10이거나 또는 m은 16이다 (표 1).

[0117] 본 발명의 지방산은 C_4-C_{22} 지방산이거나, 또는 카프릴산, 카프르산, 라우르산, 미리스트산, 팔미트산, 스테아르산, 아라키딘산, 베헨산, 리그노세린산, 세로틴산, 미리스트올레산, 팔미톨레산, 사피엔산, 올레산, 엘라이드산, 박센산, 리놀레산, 리노엘라이드산, α-리놀렌산, 아라키돈산, 에이코사펜타엔산, 에루신산 및 도코사헥사엔산으로 구성된 군으로부터 선택되는 지방산일 수 있다.

[0118] *펩티드 (P_1 및 P_2)*

[0119] 본 발명의 화합물은 두 펩티드 P_1 및 P_2를 포함한다.

[0120] P_1 및 P_2는 각각 각각 적어도 2개의 아미노산 잔기를 포함하는 임의의 펩티드일 수 있으며, 따라서 본 발명의 이량체 화합물은 의도된 용도에 적합할 수 있다.

[0121] 바람직한 실시양태에서, 본 발명의 화합물은 두 개의 펩티드가 PSD-95의 PDZ1-2에 결합된 PSD-95 억제제이다. 따라서, 특정 실시양태에서, 상기 화합물은 일반 화학식 (I), (II), (III) 또는 (IV) 중 어느 하나에 정의된 바와 같은 화합물이고, 여기서

[0122] P_1은 아미노산 서열 $X_4X_3X_2X_1$ (서열번호: 1)을 포함하고,

[0123] P_2는 아미노산 서열 $Z_4Z_3Z_2Z_1$ (서열번호: 2)을 포함하며,

[0124] 여기에서

[0125] a) X_1 및/또는 Z_1은 I, L 및 V로부터 선택되는 아미노산 잔기이고,

[0126] b) X_2 및/또는 Z_2는 A, D, E, Q, N, S, V, *N*-Me-A, *N*-Me-D, *N*-Me-E, *N*-Me-Q, *N*-Me-N, *N*-Me-S 및 *N*-Me-V로부터 선택되는 아미노산 잔기이고,

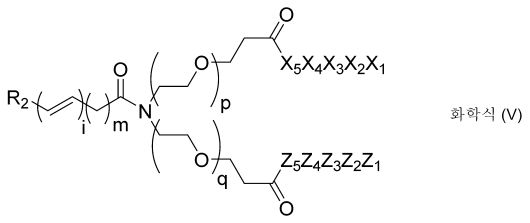
[0127] c) X_3 및/또는 Z_3은 S 및 T로부터 선택되는 아미노산 잔기이고,

[0128] d) X_4 및/또는 Z_4는 E, Q, A, N 및 S로부터 선택되는 아미노산 잔기이고,

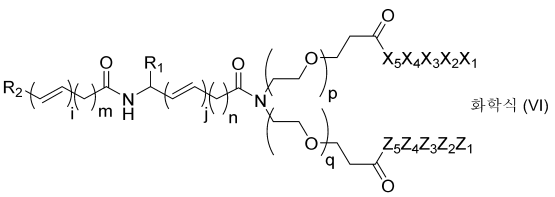
[0129] 상기 X_1 및 Z_1은 둘 다 개별적으로 자유 카복실산을 포함하는 최종 C-말단 아미노산 잔기를 나타낸다.

[0130] 따라서, 특정 실시양태에서, 본 발명에 따른 화합물은 화학식 (V) 또는 (VI)의 일반 구조를 가진다:

[0131]



화학식 (V)



화학식 (VI)

[0132]

[0133] 상기 식에서,

[0134] R_1 및 R_2는 각각 H 및 COOH로 구성된 군으로부터 선택되고,

[0135] n은 0 내지 48의 정수이고,

[0136] m은 1 내지 48의 정수이고,

[0137] p는 0 내지 28의 정수이고,

[0138] q는 0 내지 28의 정수이고,

[0139] i는 0 내지 12의 정수이고,

[0140] j는 0 내지 12의 정수이고,

[0141] X_5 및/또는 Z_5는 임의의 아미노산 잔기, 펩티드 또는 폴리펩티드이고,

[0142] X_4 및/또는 Z_4는 E, Q, A, N 및 S로부터 선택되는 아미노산 잔기이고,

[0143] X_3 및/또는 Z_3은 S 및 T로부터 선택되는 아미노산 잔기이고,

[0144] X_2 및/또는 Z_2는 A, D, E, Q, N, S, V, *N*-Me-A, *N*-Me-D, *N*-Me-E, *N*-Me-Q, *N*-Me-N, *N*-Me-S 및 *N*-Me-V로부터 선택되는 아미노산 잔기이고,

[0145] X_1 및/또는 Z_1은 I, L 및 V로부터 선택되는 아미노산 잔기이다.

[0146] X_5가 단일 아미노산 잔기인 경우, 이는 단백질원성 및 비-단백질원성 아미노산 잔기로부터 선택된다.

[0147] 일 실시양태에서 X_5는 I, A, L 및 V로 구성된 군으로부터 선택되는 아미노산 잔기이다.

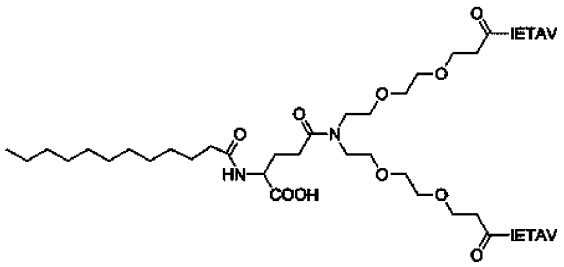
[0148] X_5는 또한 2 내지 100개의 아미노산 잔기로 이루어진 아미노산 서열을 가지는 펩티드 또는 폴리펩티드일 수 있고, 상기 펩티드 또는 폴리펩티드의 C 말단은 I, A, L 및 V로 구성된 군으로부터 선택되는 아미노산 잔기이다.

[0149] 본 발명의 특정 실시양태에서 X_5는 2 내지 100개의 잔기, 예컨대 2 내지 90개의 아미노산 잔기, 예컨대 2 내지 80개의 아미노산 잔기, 예컨대 2 내지 70개의 아미노산 잔기, 예컨대 2 내지 60개의 아미노산 잔기, 예컨대 2 내지 50개의 아미노산 잔기, 예컨대 2 내지 40개의 아미노산 잔기, 예컨대 2 내지 30개의 아미노산 잔기, 예컨대 2 내지 20개의 아미노산 잔기, 예컨대 2 내지 10개의 아미노산 잔기, 예컨대 2 내지 9개의 아미노산 잔기, 예컨대 2 내지 8개의 아미노산 잔기, 예컨대 2 내지 7개의 아미노산 잔기, 예컨대 2 내지 6개의 아미노산 잔기, 예컨대 2 내지 5개의 아미노산 잔기, 예컨대 2 내지 4개의 아미노산 잔기, 예컨대 2 내지 3개의 아미노산 잔기를 포함하고, 여기서 C 말단은 I, A, L 및 V로 구성된 군으로부터 선택되는 아미노산인 펩티드이다.

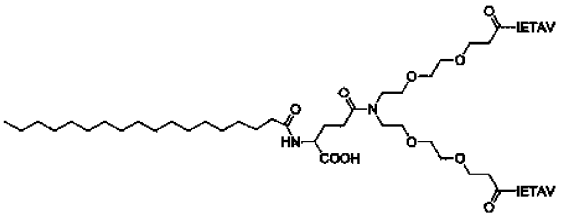
[0150] 본 발명의 개념은 일반적으로 일반 화학식 (I), (II), (III), (IV), (V) 및 (V)에 나타낸 바와 같이 적용되지만, 본 발명자들은 본 발명내에서 PSD-95의 PDZ1-2로의 결합에 적합한 P_1 및 P_2의 펩티드 모티브를 포함하여, 많은 수의 화합물을 제조하였다.

[0151] 따라서 일 실시양태에서, 본 발명에 따른 화합물은 다음으로 구성된 군으로부터 선택된다:

a) **KBN41 (5)**

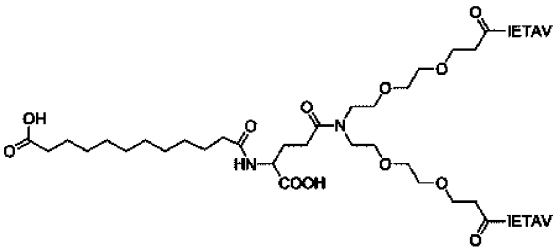
[0152] 

b) KBN42 (**7**)



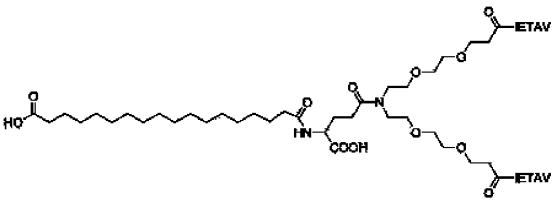
[0153]

c) KBN43 (**6**)



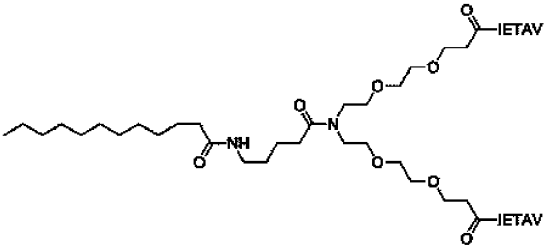
[0154]

d) KBN44 (**8**)



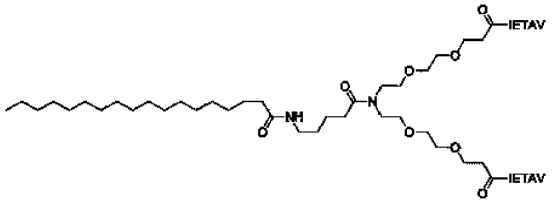
[0155]

e) KBN45 (**9**)



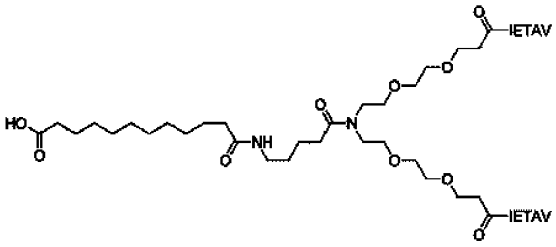
[0156]

f) KBN46 (**11**)



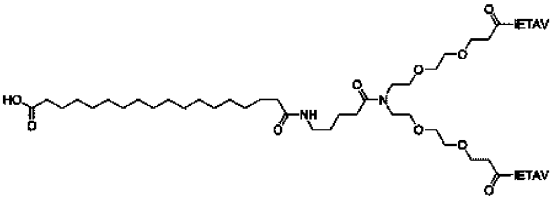
[0157]

g) KBN47 (**10**)



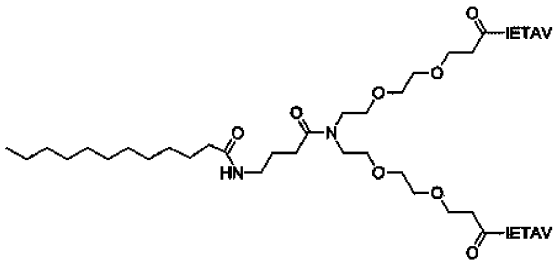
[0158]

h) KBN48 (**12**)



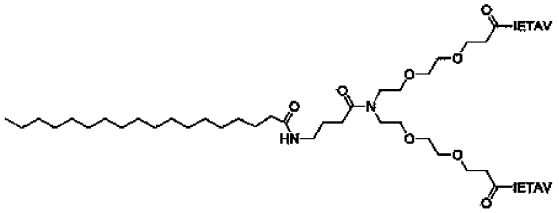
[0159]

j) KBN52 (**1**)



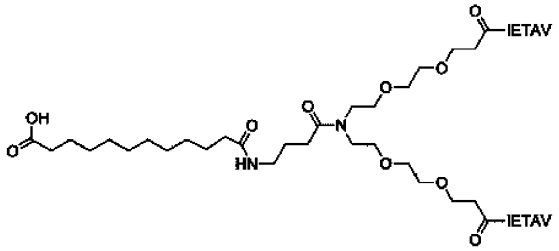
[0160]

k) KBN53 (**3**)



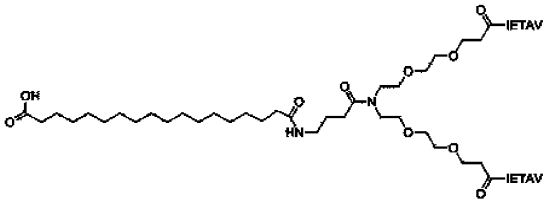
[0161]

l) KBN54 (**2**)



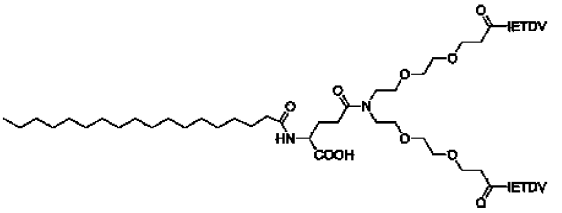
[0162]

m) KBN55 (**4**)



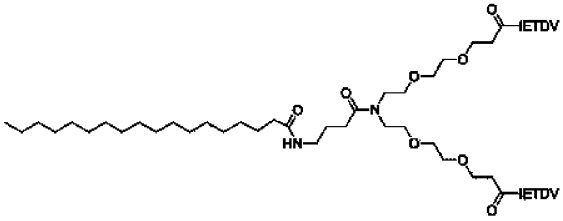
[0163]

n) KBN63 (**15**)



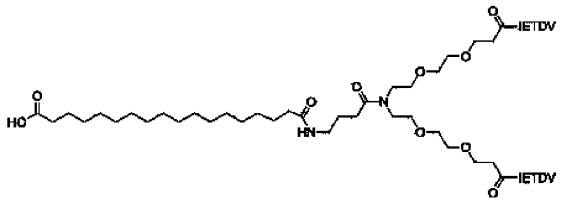
[0164]

o) KBN64 (**13**)



[0165]

p) KBN65 (14)



[0166]

[0167] *염 형태*

[0168] 본원에 정의된 바와 같은 화합물은 상기 화합물의 약학적으로 허용가능한 염 또는 전구약물의 형태일 수 있다. 본 발명의 일 실시양태에서, 일반 화학식 (I), (II), (III), (IV), (V) 및 (VI)의 어느 하나에 정의된 바와 같은 화합물은 예컨대 K^+, Na^+를 예로 들 수 있으나 이들에 한정되지 않는 상기 화합물의 약학적으로 허용가능한 부가염 또는 수화물뿐만 아니라 비-염, 예를 들어 H^+로 제형화될 수 있다.

[0169] *III. 의학적 용도*

[0170] 일 측면에서 본원에 정의된 바와 같은 본 발명의 화합물은 의약으로서 사용하기 위한 것이다.

[0171] 일 실시양태에서 본원에 정의된 바와 같은 화합물은 통증의 치료 또는 예방에 사용하기 위한 것이다.

[0172] 다른 실시양태에서 본원에 정의된 바와 같은 화합물은 흥분독성-관련 질환의 치료 또는 예방에 사용하기 위한 것이다.

[0173] 추가 실시양태에서 본 발명의 화합물에 의해 치료가능한 질환은 CNS의 허혈성 또는 외상성 손상이다.

[0174] *IV. 합성*

[0175] 본원에 정의된 바와 같은 본 발명의 지방산 유래 PSD-95 억제제는

[0176] *a) Ns-MPEG* 이산 링커를 제조하는 단계,

[0177] b) Fmoc-기반 고체상 펩티드 합성을 이용하여 펩티드를 제조하는 단계,

[0178] c) Fmoc-탈보호 펩티드를 Ns-MPEG 이산 링커와 이량체화하는 단계,

[0179] d) 지방산을, 임의로 중간 링커, 예컨대 아미노산 링커 (L_2)를 통해 링커-이량체 접합체에 커플링하는 단계를 포함하는 방법에 의해 제조할 수 있다.

[0180] 본 발명의 화합물은, 일 실시양태에서, 이하에서 정의된 바와 같이 합성될 수 있다.

[0181] Ns-MPEG 이산 링커: 오르토-니트로벤젠설포닐 (Ns)-보호된 MPEG 링커는 고체상으로 또는 용액에서 제조된다.

[0182] 고체상 절차는 전형적으로, 특정 수지에 적절한 유기 용매 (예를 들어 DCM, DMF, ACN, THF) 및 염기 (예를 들어 DIPEA, DBU, 콜리딘, NMM)를 사용하여 Fmoc-NH-PEG-CH_2CH_2COOH와 함께 고체상 펩티드 합성에 유용한 고체 지지체, 예컨대 2-클로로트리틸 클로라이드 수지를 로딩함으로써 개시된다.

[0183] Fmoc 그룹은 적절한 용매 (예를 들어 DMF, DCM, ACN, THF) 중에서 염기 (예를 들어 피페리딘, 디메틸아민, 모르폴린, 피페라진, 디사이클로헥실아민, DMAP)에 의해 제거될 수 있다.

[0184] 오르토-니트로벤젠설포닐 클로라이드를 염기 (예를 들어 DIPEA, DBU, 콜리딘, NMM) 및 적절한 용매 (예를 들어 THF, DCM)를 사용하여 자유 아민에 커플링하여 Ns-NH-PEG-CH_2CH_2COO-수지를 얻을 수 있다.

[0185] 링커 생성물의 제2 부분은 미츠노부 (Mitsunobu) 화학을 이용하여 수지에 결합된 링커-부위에 연결할 수 있다. 수지는 트리페닐포스핀, HO-PEG-$CH_2CH_2COOtBu$, 용매, 및 아조디카복실산의 에스테르- 또는 아미드 시약 [예를 들어 디이소프로필 아조디카복실레이트, DIAD; 디에틸 아조디카복실레이트, DEAD; 1,1'-(아조디카보닐)-디피페리딘, ADDP]로 처리된다.

[0186] 수지를 산, 예컨대 트리플루오로아세트산 (TFA)으로 처리하여 최종 Ns-MPEG 이산 링커를 얻는다.

[0187] 용액-상 절차는 NH_2-PEG-$CH_2CH_2COOtBu$의 아민 그룹을 Ns로 보호한 후, 트리페닐포스핀 및 DIAD, DEAD, 또는

ADDP, 또는 유사 시약, HO-PEG-$CH_2CH_2COOtBu$, 및 적절한 용매 (THF, DCM)를 사용하여 용액에서 미츠노부 화학을 진행하여 수행할 수 있다. 산, 예컨대 TFA로 처리하여 최종 Ns-보호된 *M*PEG-링커를 얻는다.

[0188] 펩티드 합성: 펩티드 서열은 고체 지지체, 예컨대 2-클로로트리틸 클로라이드 수지 또는 왕 (Wang) 수지, Fmoc-보호된 아미노산, 염기, 커플링 시약 (예를 들어 HBTU [*N,N,N',N'*-테트라메틸-*O*-(1*H*-벤조트리아졸-1-일)우로늄 헥사플루오로포스페이트], *O*-(7-아자벤조트리아졸-1-일)-*N,N,N',N'*-테트라메틸우로늄 헥사플루오로포스페이트 [HATU], PyBOB, DIC/HOBt) 및 용매를 사용하여 Fmoc-기반 고체상 펩티드 합성에 의해 합성한다. 커플링 시약의 대안으로, Fmoc-보호된 아미노산의 활성화 에스테르 (예를 들어 펜타플루오로페닐, 숙신이미드)가 사용될 수 있다.

[0189] 이량체화: Fmoc-탈보호 수지에 결합된 펩티드는 수지를 아화학량론적 양 (예를 들어 1/6)의 Ns-*M*PEG 이산 링커, 염기, 커플링 시약, 및 적절한 용매 (예를 들어 DMF, DCM, THF)로 반복 처리함으로써 수지에서의 이량체화 (on-resin dimerization) 공정에 의해 Ns-*M*PEG 이산 링커로 이량체화된다. 커플링 시약의 대안으로, Ns-*M*PEG 링커의 활성화 에스테르가 사용될 수 있다.

[0190] 이량체화 공정은 또한 용매 (예를 들어 ACN, DMF, DCM, THF) 중에서 1-하이드록시-7-아자벤조트리아졸 (HOAt) 또는 하이드록시벤조트리아졸 (HOBt) 및 적절한 측쇄-보호된 펩티드 (예를 들어 tert-부틸)와 함께 Ns-*M*PEG 링커의 활성화 에스테르 (예를 들어 펜타플루오로페닐, 숙신이미드)를 사용하여 용액에서 수행될 수 있다. 또한, 용액에서의 이량체화는 Ns-*M*PEG 이산 링커, 커플링 시약 (예를 들어 HBTU, HATU 등), 염기 및 용매를 사용하여 수행될 수 있다.

[0191] Ns-그룹은 머캅토에탄올 및 1,8-디아자비사이클로[5.4.0]운데크-7-엔 (DBU) 또는 소듐 티오페놀레이트에 의해 제거된다.

[0192] 링커 및 지방산 접합: 아미노산 링커는 커플링 시약 및 활성화용 염기를 사용하여 Fmoc-보호된 링커 (예를 들어 Fmoc-Glu-OtBu, Fmoc-GABA, Fmoc-5-Ava-OH)의 연속 커플링에 의해 *M*PEG-이량체화 및 수지에 결합된 펩티드의 자유 질소에 커플링될 수 있다. 커플링 시약의 대안으로, Fmoc-보호된 아미노산 링커의 활성화 에스테르가 사용될 수 있다. 이어 Fmoc 그룹은 탈보호 방법에 의해 제거된다.

[0193] 지방산은 커플링 시약 및 활성화용 염기를 사용하여 링커-이량체 접합체에 커플링된다. 선택적으로, 활성화 에스테르로서 커플링된다. 지방산이 카복실 그룹을 함유하는 경우, 이들은 링커-이량체 접합체의 아민과 반응하는 카복실 그룹 외에, 에스테르, 예를 들어 메틸 에스테르로서 보호될 수 있다.

[0194] 지방산에 연결된 이량체 리간드는 예컨대 TFA 또는 HCl과 같은 산을 사용하여 동반 측쇄 탈보호로 수지로부터 절단될 수 있다.

[0195] 에스테르 보호 그룹은 절단된 생성물을 수성 염기 (예를 들어 NaOH, LiOH) 및 아세토니트릴에서 교반한 후, TFA 또는 HCl로 산성화하여 제거될 수 있다.

[0196] 본 발명의 최종 화합물은 동결건조 및 HPLC 또는 유사 크로마토그래피 방법에 의한 정제로 수득한다.

[0197] 추가 실시양태에서, 본 발명의 화합물의 합성은 실시예 1에 기재된 바와 같이 수행된다.

[0198] **실시예**

[0199] **실시예 1: 합성**

[0200] 수지에 결합된 *M*PEG4 IETAV (서열번호: 3) 이량체 리간드 (I1)를 전술한 바와 같이 합성하였다 [참조: Bach et al, PNAS USA, 2012, 109, 3317-3322]. 이로부터, 적절히 보호된 링커 (각각 Fmoc-GABA-OH, Fmoc-(L)-Glu-OtBu, 및 Fmoc-5-Ava)를 커플링 시약으로서 HATU를 사용하여 두 후속 커플링에 의해 *M*PEG4 링커내 질소에 부착하고 피페리딘/DMF로 탈보호하여 중간체 I2-4 (도 6)를 수득하였다. 지방산 (FA1-4, 도 6)은 고체상 펩티드 합성 조건을 사용하여 링커내 유리된 질소에 용이하게 부착되었고 측쇄 보호 그룹의 동반 탈보호로 수지로부터 절단되었다. 이어 단일-보호된 FA 빌딩 블록의 말단 메틸 보호 그룹 (도데칸디오산 메틸 에스테르 및 옥타데칸디오산 메틸 에스테르, FA2 및 FA4)을 절단 생성물의 비누화에 의해 제거하고 산성화하였다 (도 6). 동결건조 후, 조 생성물을 100% DMSO에 용해시키고, 대규모 C18 RP-HPLC에 의해 정제하였다. 반순수 분획 (50-90% 순도)을 동결건조시킨 후, DMSO/ACN/H_2O에 재용해시키고, 제조용 C4 RP-HPLC에 의해 정제하였다 (>95% 순수).

[0201] 도 6은 FA에 연결된 이량체 리간드 (1-12)의 합성을 도시한다. 반응식 1의 반응 조건은 다음과 같다: (a) Fmoc-

GABA-OH/Fmoc-(L)-Glu-OtBu/Fmoc-5-Ava, HATU, 콜리딘, DMF (1시간 × 2), 이어 DMF 중 20% 피페리딘; (b) FA1/FA2/FA3/FA4, HBTU, DIPEA, DMF/DCM, 45분, 이어 TFA/TIPS/H_2O (90/5/5); (c) 0.5M LiOH, H_2O/ACN (75/25), 30분, 이어 TFA로 pH<2 까지. 삼각형은 E 및 T가 측쇄 보호 (*tert*-부틸)되었음을 나타낸다.

[0202] 옥타데칸디오에이트 모노메틸 에스테르 (FA4)는 상업적으로 구입할 수 없고 상응하는 디메틸 에스테르를 1 당량의 NaOH와 전술한 바와 같이 단일 비누화하여 합성하였다 [참조: Jonassen et al, Pharm Res, 2012, 29, 2104-2114] (도 7).

[0203] 결론적으로, 실시예 1은 본 발명의 화합물을 순수한 형태로 합성 및 수득할 수 있음을 보여준다.

[0204] **실시예 2: HSA에 대한 친화성 결정 방법**

[0205] 합성된 FA에 연결된 이량체 리간드 (1-12)에 대해 Transil^{XL} HSA 결합 분석 키트 (Sovicell GMBH, Leipzig, Germany)를 사용해 그의 HSA 친화성을 평가하였다. 이량체 리간드, UCCB01-125 [참조: Bach et al, Angew. Chem, Int. Ed, 2009, 48, 9685-9689] 및 UCCB01-144 [참조: Bach et al, PNAS USA, 2012, 109, 3317-3322]가 또한 비교를 위해 시험되었다 (표 1, 도 1).

[0206] 분석 키트는 농도 증가되는 고정화 HSA로 사전충전된 웰뿐 아니라 HSA를 갖지 않는 두 개의 대조 웰로 이루어졌다. HSA는 HSA 상의 모든 결합 부위가 이용가능하도록 무작위적으로 고정화되었다. 분석 수행을 위해, 웰을 기지 농도의 시험 화합물과 인큐베이션하고, 결합되지 않은 화합물의 양을 분석 RP-HPLC (C8 칼럼)에 의해 정량하였다. 각 데이터 점에 대한 비결합 약물의 분율 (f_u)을 RP-HPLC 데이터로부터 HSA를 갖지 않는 대조 샘플과 비교 계산하였다. 각 데이터 점에 대한 HSA에 결합된 약물 (f_b=1-f_u) 대 비결합 약물의 비를 웰내 총 HSA 농도 (c_{HSA})에 대해 플롯팅하고 방정식 1로 주어지는 선형 모델에 피팅하여 1/K_D를 피팅 곡선의 기울기로 제공하였다.

[0207] 방정식 1:
$$\frac{f_b}{f_u} = \frac{1}{K_D} c_{HSA}$$

[0208] 방정식 1에서, 약물에 결합된 HSA ([HSA-D])의 농도는 웰내 HSA의 총 농도 ([HSA-D]<<c_{HSA}) 보다 훨씬 낮은 것으로 가정한다. 분석 키트는 이러한 가정이 f_u>1%인 화합물에 유효하도록 설계되었다. 방정식 2를 이용하여 HSA의 생리적 농도 (588 μM)에서 f_b를 계산하는데 계산된 K_D-값을 이용하였다.

[0209] 방정식 2:
$$f_b = 1 - \frac{1}{1 + \frac{c_{HSA}}{K_D^{HSA}}}$$

[0210] 결론적으로, 실시예 3은 인간 혈청 알부민 (HSA)에 대한 본 발명의 화합물의 결합이 결정될 수 있고 그를 결정할 수 있는 방법을 설명한다.

[0211] **실시예 3: HSA에 대한 친화성**

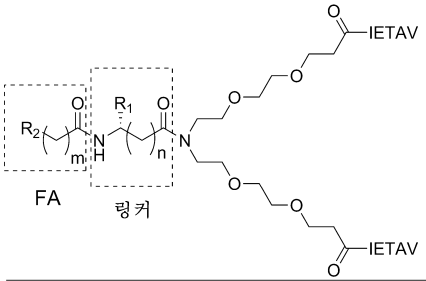
[0212] FA를 함유하지 않는 이량체 리간드 UCCB01-125 및 UCCB01-144는 각각 154.3 μM 및 317.5 μM의 HSA 친화성을 나타내었으며, 이는 각각 75% 및 65%의 HSA 결합 분율 (f_b)에 해당한다 (표 1). 그러나, FA에 연결된 모든 이량체 리간드 (1-12)는 FA가 없는 리간드에 비해 HSA에 대한 친화성이 훨씬 크고 따라서 더 높은 f_b 값을 나타내었다 (표 1). 따라서, 이는 명백히 FA가 이량체 리간드에 접합된 결과 HSA 결합이 상당히 증대되었음을 입증한다.

[0213] 더 긴 5-Ava 링커를 함유하는 화합물은 일반적으로 더 짧은 링커 (GABA, γGlu)를 가지는 화합물 보다 HSA에 대해 약간 더 낮은 친화성을 가진다 (표 1, 도 2). γGlu 링커내 추가의 산 부분 (R1)은 본원에서 합성된 FA에 연결된 이량체 리간드의 HSA에 대한 친화성에 어떤 영향도 주지 않는 것으로 나타났다 (표 1, 도 2). 이것은 다른 단백질-리간드 시스템에서 관찰된 것과 대조적이며 [참조: Hackett et al, Adv Drug Deliv Rev, 2013, 65, 1331-1339], γGlu 링커의 자유 카복실레이트는 본 발명의 화합물에 대한 HSA의 결합에 필수적이지 않음을 보여준다.

[0214] 긴 FA (m=16)에 연결된 이량체 리간드는 더 짧은 FA (m=10)에 연결된 이량체 리간드에 비해 더 뛰어난 HSA 친화성을 나타내고 (표 1); 말단 카복실 그룹 (R2)은 HSA 친화성에 부정적인 영향을 갖는다 (표 1 및 도 2).

표 1

FA에 연결된 이량체 리간드 (1-12), 및 이량체 리간드 UCCB01-125 및 UCCB01-144[a]에 대한 HSA 결합과 결합된 화합물의 계산 분율



화합물	링커	FA	m	R_2	K_D(HSA) (μM)	f_b(%)
1	GABA, n=2, R_1=H	C12:0	10	CH_3	26.6 ± 1.1	95.7 ± 0.2
2		C11:0-COOH	10	COOH	49.3 ± 4.7	92.3 ± 0.7
3		C18:0	16	CH_3	4.8 ± 1.1	99.2 ± 0.2
4		C17:0-COOH	16	COOH	19.4 ± 3.6	96.5 ± 0.6
5	γGlu, n=2, R_1=COOH	C12:0	10	CH_3	25.8 ± 3.2	95.8 ± 0.5
6		C11:0-COOH	10	COOH	64.6 ± 9.3	90.1 ± 1.3
7		C18:0	16	CH_3	6.8 ± 1.2	98.9 ± 0.2
8		C17:0-COOH	16	COOH	34.3 ± 0.3	94.5 ± 0.1
9	5-Ava, n=3, R_1=H	C12:0	10	CH_3	55.7 ± 5.2	91.4 ± 0.7
10		C11:0-COOH	10	COOH	240.0 ± 11	71.0 ± 1.0
11		C18:0	16	CH_3	12.7 ± 0.9	97.9 ± 0.2
12		C17:0-COOH	16	COOH	23.5 ± 3.9	96.2 ± 0.6
UCCB01-125	-	-	-	-	154.3 ± 15.8	77.6 ± 1.8
UCCB01-144	-	-	-	-	317.5 ± 38.6	65.3 ± 2.9

[a] 데이터는 평균 ± SEM 으로 표시됨, n=3

[0215]

[0216] 결론적으로, 실시예 3은 본 발명의 화합물이 비-FA 유도체화 이량체 참조 펩티드에 비해 HSA에 대해 증가된 친화성을 가짐을 입증한다.

[0217] **실시예 4: PSD-95의 PDZ1-2에 대한 친화성 결정방법:**

[0218] PSD-95에 대한 친화성을 바흐 (Bach) 등에 의해 문헌[참조: PNAS USA, 2012, 109, 3317-3322]에 기술된 바와 같이 시험관내 형광 편광 (FP) 분석을 이용하여 측정하였다. 먼저, 이량체 형광 프로브와 PSD-95 PDZ1-2 사이의 상호작용에 대한 K_D 값 결정을 위해 포화 결합 곡선을 얻었다. PDZ1-2를, 농도를 증가시키면서 일정한 농도 (0.5 nM)의 프로브에 첨가하였다. 샘플의 형광 분극을 635/670 nm의 여기/방출 파장에서 측정하고, FP 값을 GraphPad Prism 프로그램을 이용하여 단일 부위 결합 모델에 피팅하였다. 이어, 리간드를, 농도를 증가시키면서 고정 농도의 이량체 프로브 (0.5 nM) 및 PDZ1-2 (4 nM)에 첨가하여 비형광 이량체 리간드와 PDZ1-2 간의 친화성을 이종 경쟁 결합으로 측정하였다. FP 값을 GraphPad Prism으로 단일 부위 경쟁 (가변 기울기)에 피팅하였다. 얻은 IC_{50}을 [참조: Nikolovska-Coleska et al, Anal Biochem, 2004, 332, 261-273]에 기술된 바와 같이 경쟁 저해 상수 K_i 값으로 변환하였다. 이 분석에서 1% HSA를 사용하여 변형된 FP 분석을 상술한 바와 같이 실시하였다.

[0219] 결론적으로, 실시예 4는 PSD-95의 PDZ1-2에 대한 본 발명의 화합물의 결합에 대한 시험 방법을 보여준다.

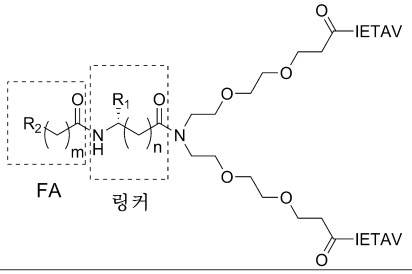
[0220] **실시예 5: PSD-95의 PDZ1-2에 대한 친화성:**

[0221] 합성된 FA에 연결된 이량체 리간드를 FP 분석에서 PSD-95 PDZ1-2에 대한 그의 친화성에 대해 평가하였다. UCCB01-125 및 UCCB01-144가 참조 화합물로서 사용되었다 (Bach et al, PNAS USA, 2012, 109, 3317-3322) (표 2, 도 3). 먼저 단순 트리스-완충 염수 (TBS) 완충제를 사용하여 친화성을 측정하였다 (표 2, 도 3A); 또한 본 발명자들은 분석 완충제에 존재하는 HSA로 FP 분석을 수행함으로써 HSA가 PSD95 PDZ1-2에 결합하는 FA에 연결된 이량체의 능력에 영향을 미치는지에 대해서도 조사하였다 (표 2, 도 3B). 더 높은 농도에서 프로브가 HSA에 결합하기 때문에, HSA의 농도를 추정 생리적 혈액 농도 (520-830 μM) [참조: Kragh-Hansen et al, Biol Pharm Bull 2002, 25, 695-704] 보다 대략 4배 정도 낮은 1% (~150 μM)로 설정하였다.

[0222] 전통적인 소분자 약물의 경우, 일반적으로 약물의 비결합 분획이 막을 통해 자유로이 확산하고 그의 표적과 상호작용하여 생리 효과를 발휘하는 것으로 인정되고 있다 [참조: Berezhkovskiy et al, J Pharm Sci 2007, 96, 249-257]. 즉, 약물이 다른 분자에 결합된 경우, 이는 동시에 표적과 상호작용할 수 없다. 이것을 설명하기 위해, 비결합 약물의 분율 (fu)을 150 μM의 HSA 농도에서 방정식 2 (fu=1-fb)로부터 계산하고, FP 분석 데이터 (TBS + HSA)를 계산된 fu에 대해 보정하였다 (표 2, 도 3C).

표 2

FP[a]에 의해 결정된, FA에 연결된 이량체 리간드 (1-12) 및 이량체 리간드 (UCCB01-125 및 UCCB01-144)의 PSD-95 PDZ1-2에 대한 친화성, 비결합 약물의 계산 분율 (f_u)[b], f_u-보정된 FP 데이터[a] 및 RP-HPLC (C8 칼럼)[c] 에 의해 결정된 화합물의 체류 시간 (R_t)



화합물	링커	FA	m	R_2	K_i(PSD95) (nM)	K_i(PSD95) + HSA (nM)	f_u (%)	K_i(PSD95), 자유 리간드 (nM)	R_t (분)
1	GABA n=2, R_1=H	C12:0	10	CH_3	13.6 ± 0.6	27.2 ± 2.9	15.1	3.2 ± 1.0	46
2		C11:0-COOH	10	COOH	15.4 ± 1.2	27.9 ± 2.7	24.7	5.5 ± 0.7	38
3		C18:0	16	CH_3	11.1 ± 0.6	1889 ± 155	3.1	57.2 ± 4.9	61
4		C17:0-COOH	16	COOH	11.4 ± 0.6	5717 ± 298	11.5	654 ± 34	48
5	γGlu, n=2, R_1=COOH	C12:0	10	CH_3	30.2 ± 4.2	24.0 ± 0.6	14.7	2.4 ± 0.1	46
6		C11:0-COOH	10	COOH	33.7 ± 1.6	26.4 ± 2.6	30.1	7.0 ± 0.9	37
7		C18:0	16	CH_3	17.0 ± 0.6	1391 ± 184	4.3	59.1 ± 7.8	59
8		C17:0-COOH	16	COOH	9.2 ± 1.6	3594 ± 132	18.6	669 ± 25	47
9	5-Ava, n=2, R_1=H	C12:0	10	CH_3	20.5 ± 1.1	13.4 ± 1.4	27.1	2.6 ± 0.5	48
10		C11:0-COOH	10	COOH	13.9 ± 2.1	18.5 ± 0.6	61.5	10.9 ± 0.4	38
11		C18:0	16	CH_3	26.5 ± 0.2	1889 ± 100	7.8	16.8 ± 3.3	61
12		C17:0-COOH	16	COOH	11.5 ± 1.2	2926 ± 335	8.3	250 ± 37	49
UCCB01-125	-	-	-	-	14.3 ± 1.1	9.7 ± 1.0	50.7	4.1 ± 0.5	28
UCCB01-144	-	-	-	-	4.3 ± 0.1	10.5 ± 0.9	67.9	6.7 ± 0.6	24

[0223]

[0224] [a]FP 데이터는 TBS 및 TBS + 1% HSA에서 기록됨. 데이터는 평균±SEM으로 표시됨, n≥3.

[0225] [b]F_u는 방정식 2, f_b=1-f_u에 따라 계산됨, [c]n=1.

[0226] TBS에서 PSD-95 PDZ1-2에 대한 친화성은 모든 FA에 연결된 이량체 리간드에 대해 UCCB01-125의 친화성과 대등하였으며 (표 2, 도 3A), 이는 PSD-95 PDZ1-2에 대한 친화성이 FA-유도화에 영향을 받지 않음을 나타낸다.

[0227] TBS + 1% HSA에서의 PSD-95 PDZ1-2에 대한 친화성은 화합물 간에 상당히 체계적으로 변하였다 (표 2, 도 3B). 더 긴 FA (C18:0 또는 C17:0-COOH)에 연결된 이량체 리간드는 일반적으로 더 짧은 FA (C12:0 또는 C11:0-COOH)에 연결된 이량체 리간드보다 PSD-95 PDZ1-2에 대해 명백한 >50-배 더 낮은 친화성을 가졌다.

[0228] FP 데이터를 fu에 대해 보정하고 (표 2, 도 3C), 각 링커 시리즈내에서 PSD-95 PDZ1-2에 대한 친화성의 체계적 순위를 얻었다. C12:0-연결 이량체 리간드 (1, 5, 9)가 최고의 친화성을 가졌으며, 이어 C11:0-COOH (2, 6, 10), C18:0 (3, 7, 11) 및 C17:0-COOH (4, 8, 12)가 그 뒤를 따랐다.

[0229] Fu-보정된 FP 데이터는 또한 TBS에서 기록된 FP 데이터에 비해, 3 및 7에서는 PSD-95에 대한 친화성에 4-5-배 감소가 관찰되었기는 하지만 (3: K_i=57.2 nM vs 11.1 nM; 7: K_i=59.1 nM vs 17.0 nM, 표 2), FP 측정을 TBS + HSA에서 수행한 경우 C18:0-연결 이량체 리간드 3, 7 및 11의 관찰된 50-배 친화성 손실은 주로 HSA에 대한 화합물의 고도의 결합에 기인하며, 현 상황에서 TBS에서 친화성 감소가 관찰되지 않았기 때문에, 친화성 감소는 HSA-의존성임을 보이고 있다.

[0230] 두 5-Ava에 연결된 이량체 리간드 11 및 12는 대응 GABA 및 γ-Glu에 연결된 이량체 리간드 (3, 4, 7 및 8) 보다 HSA에 영향을 덜 받았다.

[0231] 결론적으로, 실시예 5는 본 발명의 화합물이 PSD-95의 PDZ1-2에 결합함을 보여준다.

[0232] **실시예 6: FA에 연결된 이량체 리간드의 소수성**

[0233] HSA에 대해 최고의 친화성을 가지는 화합물 (3, 7, 11)은 또한 분석 RP-HPLC에 의해 결정된 체류 시간 (R_t)으로 판단하였을 때 합성된 화합물중에서 가장 소수성이다 (표 2). 이들 화합물의 친수성 및 따라서 용해성을 증가시킬 일환으로, 3 및 7의 유사체를 제조하였는데, 여기서는 Asp (D) 부분에 의해 도입되는 추가의 전하가 이량체의 친수성을 증가시킬 수 있기 때문에, 펩티드 서열이 IETAV (서열번호: 3) 대신 IETDV (서열번호: 4)로 대체되었다 (13, 15; 표 3). 말단 산 부분을 가지는 최고의 HSA 친화성 화합물 (4)의 IETDV 유사체를 또한 합성하고 비교 시험하였다 (14). 이들 FA에 연결된 이량체는 적절한 펩티드 서열 (IETDV)을 시작점으로 사용하여 1-12와 유사하게 합성되었다 (도 6).

[0234] HPLC 분석은 IETAV-기반 화합물 (3, 4, 7)에 대해서 IETDV-기반 화합물 (13-15)이 R_t 값, 및 따라서 소수성에 작은 감소를 나타내거나 감소를 나타내지 않은 것으로 보여주었으나; HSA 친화성에 체계적인 감소가 관찰되었다 (표 3). 예를 들어, 13은 분석 RP-HPLC 상에서 IETAV 유사체보다 3분 더 일찍 용출되었으나 (13: 58분, 3: 61분, 표 3), HSA 친화성은 감소하였다 (13: K_D=83.0 μM, 3: K_D=4.8 μM, 표 3).

표 3

상이한 펩티드 서열을 가지는 FA-연결 이량체 유사체 비교. 3, 4 및 7 펩티드 서열 IETAV (서열번호: 3); 13, 14 및 15 펩티드 서열 IETDV (서열번호: 4)

화합물	링커	FA	K_D(HSA) (μM)	K_i(PSD-95) (nM)	K_i(PSD-95) + HSA (nM)	f_u (%)	K_i(PSD-95), 자유 리간드 (nM)	R_t (분)
3	GABA	C18:0	4.8 ± 1.1	11.1 ±0.6	1889 ± 155	3.1	57.2 ± 4.9	61
4	GABA	C17:0-COOH	19.4 ± 3.6	11.4 ± 0.6	5717 ± 298	11.5	654 ± 34	48
7	γGlu	C18:0	6.8 ± 1.2	17.0 ± 0.6	1391 ± 184	4.3	59.1 ± 7.8	59
13	GABA	C18:0	83.0 ± 11.0	8.0 ± 0.8	2514 ± 149	35.6	896 ± 53	58
14	GABA	C17:0-COOH	116.0 ± 7.6	29.3 ± 0.7	770 ± 27	43.6	1097 ± 65	47
15	γGlu	C18:0	55.0 ± 3.4	6.7 ± 0.6	3806 ± 287	26.8	1022 ± 77	59

[0235]

[0236] 결론적으로, 실시예 6은 HSA에 대한 친화성이 선택된 지방산뿐만 아니라 선택한 펩티드 서열에 좌우됨을 보여준다.

[0237] **실시예 7: 화합물 1, 4, 7 및 13의 혈장 안정성**

[0238] 1, 4, 7 및 13의 혈장 안정성을, 시험관내 혈장 안정성 분석법 [참조: Bach et al, Angew. Chem, Int. Ed, 2009, 48, 9685-9689]의 변형 버전으로 평가하였다. 원래의 절차로, 연구 화합물을 인간 혈장에서 인큐베이션하였다. 이어 샘플을 적절한 시점에서 취하고, 혈청 단백질을 트리클로로아세트산 (TCA)으로의 침전에 의해 제거한 뒤, 상등액을 RP-HPLC에 의해 분석하였다. 얻은 피크 면적을 T_0에서의 양으로 정규화하고, 1차 감쇠 모델에 피팅하여 반감기를 계산하였다. 이 방법을 FA에 연결된 이량체 리간드에 적용한 경우, 샘플 회수율은 낮았다 (<5%). 이것은 FA에 연결된 이량체 리간드가 TCA 침전 동안 HSA에 연결된 복합체로서 제거되기 때문에 그렇다. 따라서 TCA 침전 전에, 샘플을 고체 구아니딘 하이드로클로라이드 (GnHCl)에 6M의 최종 농도로 용해시켰다. 이

것의 목적은 샘플내에 HSA를 전개하여 FA에 연결된 이량체 리간드를 방출하기 위한 것이다.

[0239] FA에 연결된 모든 이량체 리간드는 시험관내 혈장 안정성 분석에서 UCCB01-125보다 더 안정적이었다 (도 4). 이론에 구애됨이 없이, 이는 화합물이 HSA에 고도로 결합함으로써 효소 분해에 이용가능한 화합물의 자유 농도를 저하시키기 때문인 것으로 예상된다. 더 짧은 C12:0 FA를 포함하는 화합물 (1)은 고도로 안정한 더 긴 C18:0 또는 C17:0-COOH FA를 포함하는 화합물 (4, 7, 13) 보다 더 빨리 분해되었다. 장기 안정성은 프로테아제에 의한 이량체 펩티드-기반 화합물의 절단을 방지하는 증가된 HSA에 대한 친화성 및 FA에 의해 매개되는 입체장애에 의해 설명된다.

[0240] 결론적으로, 실시예 7은 시험관내에서 혈장 안정성을 평가하는 방법을 설명하며, 본 발명의 FA에 연결된 이량체 화합물이 FA에 연결되지 않은 참조 화합물과 비교해서 혈장 안정성 및 반감기를 증가시킴을 보여준다.

[0241] **실시예 8: 생체내 약물동태학적 연구**

[0242] FA에 연결된 화합물의 약물동태학적 특성을 조사하기 위해, 본 발명자들은 수컷 위스타 (Wistar) 래트에 단일 피하 (s.c.) 정맥 일시주사 후 선택 화합물의 혈액내 농도를 LC-MS/MS에 의해 측정하였다 (도 5). 이로부터, 모든 FA에 연결된 이량체 리간드는 FA를 갖지 않는 이량체 리간드 (UCCB01-125) 보다 $T_{1/2}$이 더 길고 T_{max}가 더 크다는 것이 명백했다 (표 4 및 도 5). 이 효과는 1에 대해 가장 작았지만, 4, 7, 및 13에 대해서는 매우 현저하였는데, $T_{1/2}$이 8시간을 초과하였고 이는 UCCB01-125에 비해 >16-배 증가에 해당하는 것이다. 증가된 T_{max}는 주사 부위로부터 장기 흡수로 설명된다. 종합하면, 이러한 특성은 피하 데포 주사에 의한 투여를 가능케 하고, 이에 따라 화합물이 혈액으로 천천히 일정하게 방출됨으로써 더 적은 투여로 약의 관련 혈중 농도를 유지할 수가 있다.

표 4

래트에 피하 (s.c.) 주사 후 FA에 연결된 이량체 리간드의 약물동태 파라미터

화합물	링커	FA	펩티드 서열	용량 (mg/kg)	$T_{½}$ (h)[a]	T_{max} (h)[a]
UCCB01-125	-	-	IETAV	3	0.561 ± 0.101	0.5 ± 0
				30	0.450 ± 0.068	0.5 ± 0
1	GABA	C12	IETAV	15	0.768 ± 0.045	0.833 ± 0.167
4	GABA	C17:0-COOH	IETAV	15	8.13 ± 0.50	4.67 ± 0.66
7	ãGlu	C18:0	IETAV	10	10.7 ± 0.58	6.00 ± 1.15
13	GABA	C18:0	IETDV	10	16.3 ± 2.81	8.00 ± 0

[a] 데이터는 평균 ± SEM 으로 표시됨, n=3.

[0243]

[0244] **실시예 9: 서열**

[0245] **서열번호: 1**

[0246] $X_4X_3X_2X_1$

[0247] 상기 식에서,

[0248] X_4는 E, Q, A, N 및 S로부터 선택되는 아미노산 잔기이고,

[0249] X_3은 S 및 T로부터 선택되는 아미노산 잔기이고,

[0250] X_2는 A, D, E, Q, N, S, V, *N*-Me-A, *N*-Me-D, *N*-Me-E, *N*-Me-Q, *N*-Me-N, *N*-Me-S 및 *N*-Me-V로부터 선택되는 아미노산 잔기이고,

[0251] X_1은 I, L 및 V로부터 선택되는 아미노산 잔기이다.

[0252] **서열번호: 2**

[0253] $Z_4Z_3Z_2Z_1$

[0254] 상기 식에서,

[0255] Z_4는 E, Q, A, N 및 S로부터 선택되는 아미노산 잔기이고,

[0256] Z_3은 S 및 T로부터 선택되는 아미노산 잔기이고,

[0257] Z_2는 A, D, E, Q, N, S, V, *N*-Me-A, *N*-Me-D, *N*-Me-E, *N*-Me-Q, *N*-Me-N, *N*-Me-S 및 *N*-Me-V로부터 선택되는 아미노산 잔기이고

[0258] Z_1은 I, L 및 V로부터 선택되는 아미노산 잔기이다.

[0259] **서열번호: 3**

[0260] IETAV

[0261] **서열번호: 4**

[0262] IETDV

[0263] **서열번호: 5**

[0264] $X_5X_4X_3X_2X_1$

[0265] 상기 식에서,

[0266] X_5는 임의의 아미노산 잔기이고,

[0267] X_4는 E, Q, A, N 및 S로부터 선택되는 아미노산 잔기이고,

[0268] X_3은 S 및 T로부터 선택되는 아미노산 잔기이고,

[0269] X_2는 A, D, E, Q, N, S, V, *N*-Me-A, *N*-Me-D, *N*-Me-E, *N*-Me-Q, *N*-Me-N, *N*-Me-S 및 *N*-Me-V로부터 선택되는 아미노산 잔기이고

[0270] X_1은 I, L 및 V로부터 선택되는 아미노산 잔기이다.

[0271] **서열번호: 6**

[0272] $Z_5Z_4Z_3Z_2Z_1$

[0273] 상기 식에서,

[0274] Z_5는 임의의 아미노산 잔기이고,

[0275] Z_4는 E, Q, A, N 및 S로부터 선택되는 아미노산 잔기이고,

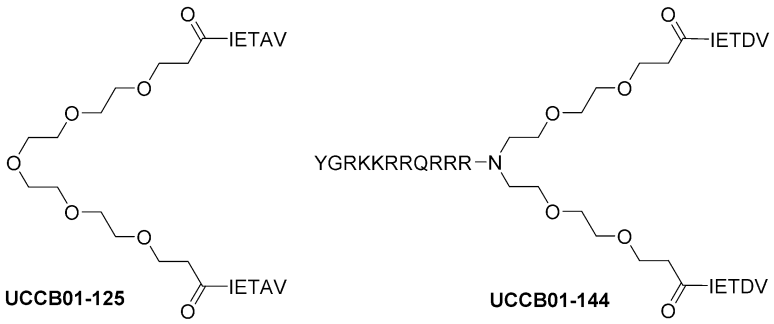
[0276] Z_3은 S 및 T로부터 선택되는 아미노산 잔기이고,

[0277] Z_2는 A, D, E, Q, N, S, V, *N*-Me-A, *N*-Me-D, *N*-Me-E, *N*-Me-Q, *N*-Me-N, *N*-Me-S 및 *N*-Me-V로부터 선택되는 아미노산 잔기이고

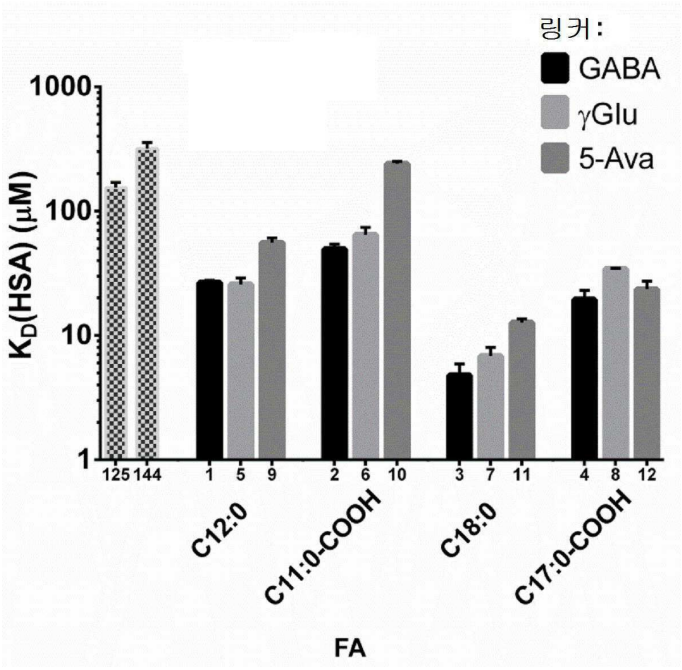
[0278] Z_1은 I, L 및 V로부터 선택되는 아미노산 잔기이다.

도면

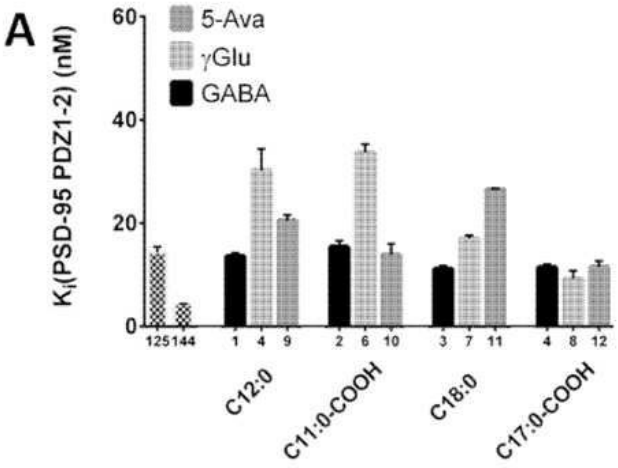
도면1


IETAV
IETAV
UCCB01-125
YGRKKRRQRRR
IETDV
IETDV
UCCB01-144

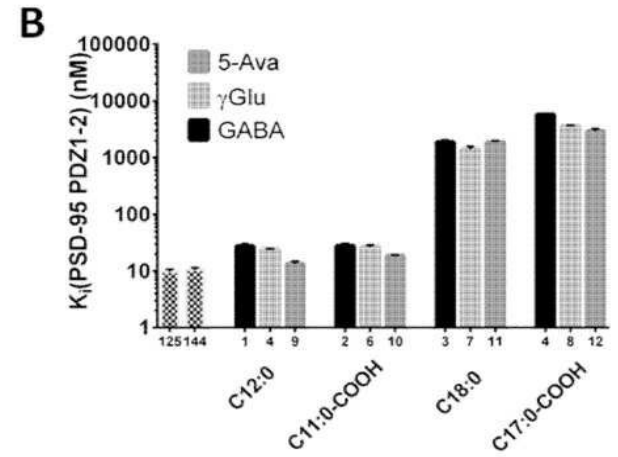
도면2


링커:
GABA
γGlu
5-Ava
1000
100
10
1
K_D(HSA) (μM)
125 144
1 5 9
2 6 10
3 7 11
4 8 12
C12:0
C11:0-COOH
C18:0
C17:0-COOH
FA

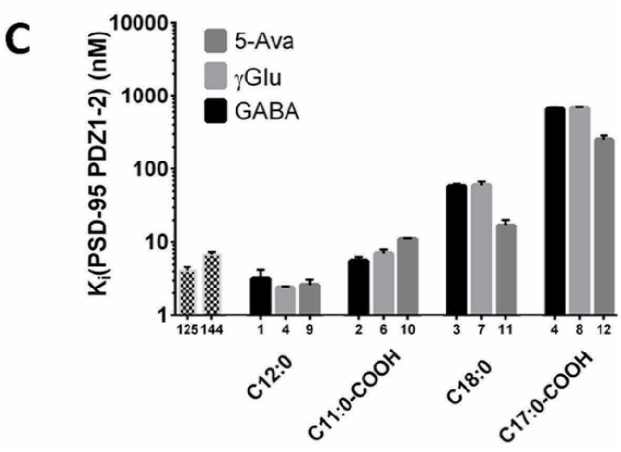
도면3a



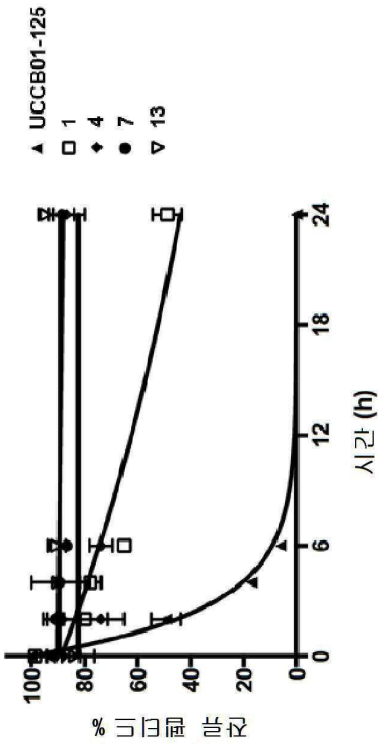
도면3b



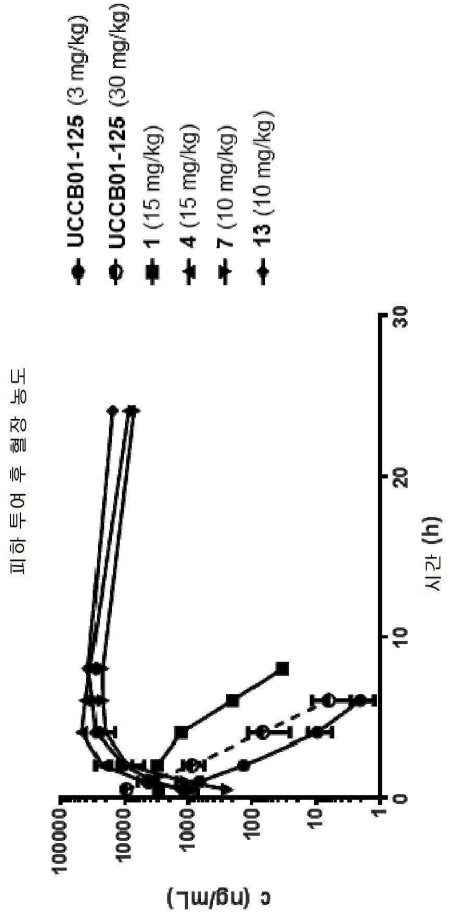
도면3c



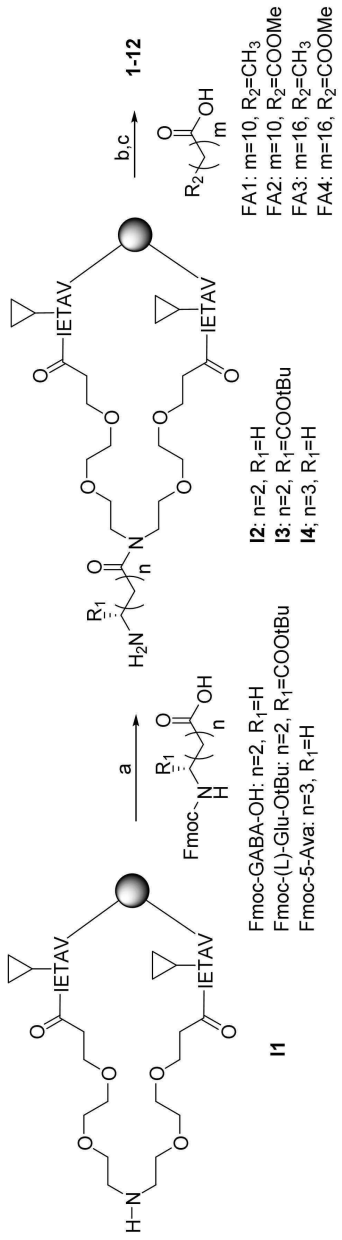
도면4


UCCB01-125
1
4
7
13
잔류 펩티드 %
시간 (h)

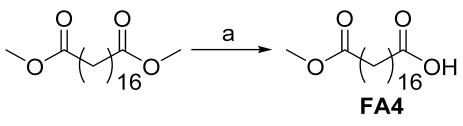
도면5


UCCB01-125 (3 mg/kg)
UCCB01-125 (30 mg/kg)
1 (15 mg/kg)
4 (15 mg/kg)
7 (10 mg/kg)
13 (10 mg/kg)
피하 투여 후 혈장 농도
c (ng/mL)
시간 (h)

도면6



도면7



서 열 목 록

SEQUENCE LISTING

<110> University of Copenhagen

<120> Fatty acid derivatives of dimeric inhibitors of PSD-95

<130> IPA160449-DK

<150> PA 2013 70735

<151> 2013-12-01

<160> 6

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> X is independently any amino acid

<220><221> SITE

<222> (1)..(4)

<223> Peptide 1

<220><221> SITE

<222> (1)..(1)

<223> X4 in description; amino acid residue selected from E, Q, A, N

and S

<220><221> SITE

<222> (2)..(2)

<223> X3 in description; amino acid residue selected from S and T

<220><221> SITE

<222> (3)..(3)

<223> X2 in description; amino acid residue selected from A, D, E, Q,

N, S, V, N-Me-A, N-Me-D, N-Me-E, N-Me-Q, N-Me-N, N-Me-S and

N-Me-V

<220><221> SITE

<222> (4)..(4)

<223> X1 in description; amino acid residue selected from I, L and V

<400> 1

Xaa Xaa Xaa Xaa

1

<210> 2

<211> 4

<212> PRT

<213>

Artificial Sequence

<220><223> X is independently any amino acid

<220><221> SITE

<222> (1)..(4)

<223> Peptide 2

<220><221> SITE

<222> (1)..(1)

<223> Z4 in description; amino acid residue selected from E, Q, A, N and S

<220><221> SITE

<222> (2)..(2)

<223> Z3 in description; amino acid residue selected from S and T

<220><221> SITE

<222> (3)..(3)

<223> Z2 in description; amino acid residue selected from A, D, E, Q, N, S, V, N-Me-A, N-Me-D, N-Me-E, N-Me-Q, N-Me-N, N-Me-S and N-Me-V

<220><221> SITE

<222> (4)..(4)

<223> Z1 in description; amino acid residue selected from I, L and V

<400> 2

Xaa Xaa Xaa Xaa

1

<210> 3

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> specific peptide

<220><221> PEPTIDE

<222> (1)..(5)

<223> Specific peptide

<400> 3

Ile Glu Thr Ala Val

1 5

<210> 4

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> specific peptide

<220><221> PEPTIDE

<222> (1)..(5)

<223> specific peptide

<400> 4

Ile Glu Thr Asp Val

1 5

<210> 5

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> X is independently any amino acid

<220><221> SITE

<222> (1)..(1)

<223> X5 in description; any amino acid residue

<220><221> SITE

<222> (2)..(2)

<223> X4 in description; amino acid residue selected from E, Q, A, N and S

<220><221> SITE

<222> (3)..(3)

<223> X3 in description; amino acid residue selected from S and T

<

220><221> SITE

<222> (4)..(4)

<223> X2 in description; amino acid residue selected from A, D, E, Q, N, S, V, N-Me-A, N-Me-D, N-Me-E, N-Me-Q, N-Me-N, N-Me-S and N-Me-V

<220><221> SITE

<222> (5)..(5)

<223> X1 in description; amino acid residue selected from I, L and V

<400> 5

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa

1 5

<210> 6

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> X is independently any amino acid

<220><221> SITE

<222> (1)..(1)

<223>

Z5 in description; any amino acid residue

<220><221> SITE

<222> (2)..(2)

<223> Z4 in description; amino acid residue selected from E, Q, A, N and S

<220><221> SITE

<222> (3)..(3)

<223> Z3 in description; amino acid residue selected from S and T

<220><221> SITE

<222> (4)..(4)

<223> Z2 in description; amino acid residue selected from A, D, E, Q, N, S, V, N-Me-A, N-Me-D, N-Me-E, N-Me-Q, N-Me-N, N-Me-S and N-Me-V

<220><221> SITE

<222> (5)..(5)

<223>

Z1 in description; amino acid residue selected from I, L and V

<400> 6

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa

1 5