

PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

zveřejněná podle § 31 zákona č. 527/1990 Sb.

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: 16.03.2000
(32) Datum podání prioritní přihlášky: 17.03.1999
(31) Číslo prioritní přihlášky: 1999/99610019
(33) Země priority: EP
(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: 13.02.2002
(Věstník č. 2/2002)
(86) PCT číslo: PCT/DK00/00117
(87) PCT číslo zveřejnění: WO00/55119

(21) Číslo dokumentu:

2001 - 3018

(13) Druh dokumentu: A3

(51) Int. Cl. ⁷:

C 07 C 235/72

C 07 K 1/06

(71) Přihlašovatel:

NOVO NORDISK A/S, Bagsvaerd, DK;

(72) Původce:

Hansen Louis Brammer, Vaerloese, DK;

(74) Zástupce:

PATENTSERVIS PRAHA a.s., Jivenská 1, Praha 4,
14000;

(54) Název přihlášky vynálezu:

**Způsob pro acylování aminoskupiny peptidu
nebo proteinu a sloučenina**

(57) Anotace:

Předložené řešení poskytuje způsob pro acylování jedné nebo více aminoskupin (typicky vznikající z lisinu) peptidu (nebo proteinu, např. GLP-1, způsob obsahující (a) reagování peptidu (nebo proteinu) mající alespoň jednu volnou aminoskupinu s acylačním činidlem o obecném vzorci (I), kde n je 0 až 8; R¹ je COOR⁴; R² je lipofilní podíl, např. vybraný z C₃₋₃₉-alkylu, C₃₋₃₉-alkenyly, C₃₋₃₉-alkadienyly a steroidových zbytků; R³ společně s karboxylovou skupinou, ke které je R³ připojen, určuje reaktivní ester nebo reaktivní N-hydroxyimidester; a R⁴ je vybrán z vodíku, C₁₋₁₂-alkylu a benzylu, za alkalických podmínek ve směsi aprotického polárního rozpouštědla a vody (např. N-methyl-2-pyrrolidon a voda); a (b) není-li R⁴ vodík, zmýdelňování acylované esterové skupiny peptidu (COOR⁴) za alkalických podmínek (např. při pH v intervalu 7 až 14); aby byl získán N-acylovaný peptid (nebo N-acylovaný protein).

09.10.01
712001-3018
4486

Způsob pro acylování aminoskupiny peptidu nebo proteinu a sloučenina.

OBLAST TECHNIKY

Předložený vynález se týká způsobu vnášení jedné nebo více acylových skupin do peptidu nebo proteinu. Podrobněji, vynález se týká vylepšeného způsobu acylování ϵ -aminoskupiny lysinového zbytku obsaženého v přirozeně se vyskytujícím GLP-1 nebo jeho analogu. Kromě toho, se předložený vynález týká sloučenin užitečných jako acylační činidla ve způsobu.

DOSAVADNÍ STAV TECHNIKY

Peptidy jsou široce používány v lékařské praxi a od té doby, co mohou být produkovány rekombinantní DNA technologií, může být očekáváno, že jejich význam bude vzrůstat také v nadcházejících letech. Pokud jsou přirozené peptidy nebo jejich analogy používány v terapii, je obecně zjištěno, že mají velkou vůli. Velká vůle terapeutického činidla je nevhodná v případech, kde je požadováno zachování jeho vysoké hladiny v krvi po prodloužené časové období dokud pak nebude nezbytné opakované podávání. Příklady peptidů, které mají ve své přirozené formě velkou vůli jsou: ACTH, faktor uvolňující kortikotropin, angiotenzin, kalcitonin, exendin, exendin-3, exendin-4, inzulin, glukagon, glukagonu podobný peptid-1, glukagonu podobný peptid-2, inzulinu podobný růstový faktor-1, inzulinu podobný růstový faktor-2, gastroinhibiční peptid, faktor uvolňující růstový hormon, hypofyzální peptid aktivující adenylatcyklázu, sekretin, enterogastrin, somatostatin, somatotropin, somatomedin, hormon příštítých tělísek, trombopoetin, erytropoetin, hypotalamické uvolňující faktory, prolaktin, thyreotropní hormony, endorfiny, enkefaliny, vazopresin, oxytocin, opiody a jejich analogy, peroxid dismutasa, interferon, asparaginasa, arginasa, arginindeaminasa, adenosindeaminasa a ribonukleasa.

Vnesení lipofilních acylových skupin do přirozeně se vyskytujících peptidů nebo jejich analogů vede k acylovaným peptidům, které mají prodloužený profil působení pokud jde o nativní peptid (nebo nemodifikovaný analog). Tento jev byl dokonale popsán a předveden v předchozích přihláškách předloženého přihlašovatele, WO 98/08871, který tj. odhalují acylování GLP-1 a analogů, a WO 99/43708, který tj. odhaluje acylování exendinu a analogů. Kromě toho, bylo doporučeno, že začleňování skupiny, která může být negativně nabitá, na příklad skupina karboxylové kyseliny, sousedící s lipofilní skupinou může být výhodná.

Evropská patentová přihláška č. 92 107 035.5 (Kuraray Co.) popisuje reaktivní monoestery dikarboxylových kyselin s dlouhým řetězcem pro vnášení karboxylových kyselin s dlouhým řetězcem do proteinů.

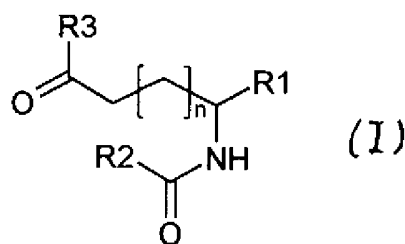
Vnášení lipofilních acylových skupin do GLP-1 přes mono- nebo dipeptidové vymežovače může být obzvláště zajímavé a bylo a doloženo příkladem v WO 98/08 871. Asparágová kyselina a glutamová kyselina byly zmíněny jako vhodné spojky. Nicméně, jako takové zahrnují mono- a dipeptidové vymežovače dodatečnou skupinu karboxylové kyseliny, kroky ochrany a následného sejmutí chránicí skupiny byly považovány za nezbytné. Sejmutí chránicí skupiny bylo prováděno za kyselých podmínek, které do určité míry vedly ke zničení peptidu (GLP-1). Takže jsou alternativní způsoby pro přípravu těchto variant žádoucí.

Takže cílem přítomného vynálezu je poskytnout alternativní způsob pro vnesení lipofilních skupin do peptidů přes vymežovače α -amino- α,ω -dikarboxylových kyselin. Takový způsob bude usnadňovat přípravu modifikovaných peptidů, kde jsou vnášeny nabitě skupiny karboxylových kyselin do bezprostřední blízkosti lipofilních skupin, ale bez přímého vlivu na lipofilní skupinu.

PODSTATA VYNÁLEZU

Předložený vynález poskytuje způsob pro acylování jedné nebo více aminoskupin peptidu (nebo proteinu), způsob obsahuje:

- (a) reagování peptidu (nebo proteinu) mající alespoň jednu volnou aminoskupinu s acylačním činidlem o obecném vzorci I:



kde

n je 0 až 8;

R^1 je COOR^4 ;

R^2 je lipofilní podíl, např. vybraný z C_{3-39} -alkylu, C_{3-39} -alkenyly, C_{3-39} -alkadienyl a steroidových zbytků;

R^3 společně s karboxylovou skupinou, ke které je R^3 připojen, určuje reaktivní ester nebo *N*-hydroxyimidester; a

R^4 je vybrán z vodíku, C_{1-12} -alkylu a benzylu,

za alkalických podmínek ve směsi aprotického polárního rozpouštědla a vody; a

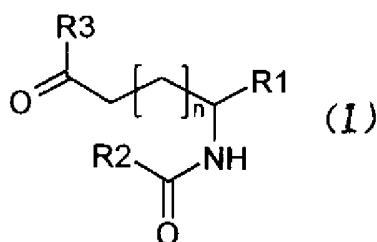
(b) není-li R⁴ vodík, zmýdelňování acylované esterové skupiny peptidu (COOR⁴) za alkalických podmínek

aby byl získán *N*-acylovaný peptid (nebo *N*-acylovaný protein).

Bylo zjištěno, že zmýdelňování acylovaného esteru peptidu (kde R⁴ je alkylová nebo benzylová skupina) za alkalických podmínek je možné s jenom zanedbatelnou nebo žádnou racemizací různých α -aminokyselinových fragmentů peptidu a vmezovače. Předložený přihlašovatel našel určité výhody oproti předchozí používané kyselé hydrolyze s ohledem na čistotu a potlačení vedlejších produktů, např. produktů degradace.

Bylo také zjištěno, že acylování používající acylační činidlo jako volnou kyselinu (kde R⁴ je vodík) za alkalických podmínek v podstatě vede přímo k žádanému produktu, acylovanému peptidu, bez vedlejších produktů a bez potřeby kroku sejmutí chránicí skupiny.

Předložený vynález také poskytuje nové sloučeniny užitečné jako acylační činidla ve výše zmíněném způsobu, takové nové sloučeniny mají obecný vzorec I:



kde

n je 0 až 8;

R¹ je COOH;

R² je lipofilní podíl, např. vybraný z C₃₋₃₉-alkylu, C₃₋₃₉-alkenylu, C₃₋₃₉-alkadienyl a steroidových zbytků; a

R³ společně s karboxylovou skupinou, ke které je R³ připojen, určuje reaktivní ester nebo reaktivní *N*-hydroxyimidester.

Peptidy a proteiny

Obecně se má za to, že předložený vynález je užitečný pro vnesení lipofilních acylových skupin do jakéhokoliv peptidu (nebo proteinu) aby snížil rychlost clearance (rychlost očisty) *in vivo*. Příklady takových peptidů a proteinů jsou ACTH, faktor uvolňující kortikotropin, angiotenzin, kalcitonin, exendin a jeho analogy, inzulin a jeho analogy, glukagon a jeho analogy, glukagonu podobný peptid-1 a jeho analogy, glukagonu podobný peptid-2 a jeho analogy, inzulinu podobný růstový faktor-1, inzulinu podobný růstový faktor-2, gastroinhibiční peptid, faktor uvolňující růstový hormon, hypofyzální peptid aktivující adenylatcyklázu, sekretin, enterogastrin, somatostatin, somatotropin, somatomedin, hormon příštítných tělísek, trombopoetin, erytropoetin, hypotalamické uvolňující faktory, prolaktin, thyreotropní hormony, endorfíny, enkefaliny, vazopresin, oxytocin, opiody a jejich analogy, peroxid dismutasa, interferon, asparaginasa, arginasa, arginindeaminasa, adenosindeaminasa a ribonukleasa.

Mělo by být srozumitelné, že peptid (nebo protein) by měl nést alespoň jednu volnou aminoskupinu, takovou aminoskupinu, která je N-koncová aminoskupina nebo aminoskupina vedlejšího řetězce. Zvláště zajímavé jsou aminoskupiny lysinových a ornithinových aminokyselinových zbytků. Způsob je částečně platný pro *N*-acylace ϵ -aminoskupin lysinových zbytků. Mělo by být také srozumitelné, že dotyčný peptid nebo protein může obsahovat dvě nebo více doplňkových aminoskupin, které všechny mohou být *N*-acylované podle předloženého vynálezu.

Nyní se má za to, že předložený vynález je obzvláště vhodný pro modifikování GLP-1 a jeho analogů. Příklady GLP-1 a analogů, které mohou být *N*-acylované podle předloženého vynálezu jsou GLP-1 a zkrácené analogy, takové jako Arg²⁶-GLP-

1(7-37); Arg³⁴-GLP-1(7-37); Lys³⁶-GLP-1(7-37); Arg^{26,34}Lys³⁶-GLP-1(7-37); Arg^{26,34}Lys³⁸GLP-1(7-38); Arg^{26,34}Lys³⁹-GLP-1(7-39); Arg^{26,34}Lys⁴⁰-GLP-1(7-40); Arg²⁶Lys³⁶-GLP-1(7-37);

Arg³⁴Lys³⁶-GLP-1(7-37); Arg²⁶Lys³⁹-GLP-1(7-39); Arg³⁴Lys⁴⁰-GLP-1(7-40); Arg^{26,34}Lys^{36,39}-GLP-1(7-39); Arg^{26,34}Lys^{36,40}-GLP-1(7-40); Gly⁸Arg²⁶-GLP-1(7-37); Gly⁸Arg³⁴-GLP-1(7-37); Gly⁸Lys³⁶-GLP-1(7-37); Gly⁸Arg^{26,34}Lys³⁶-GLP-1(7-37); Gly⁸Arg^{26,34}Lys³⁹-GLP-1(7-39); Gly⁸Arg^{26,34}Lys⁴⁰-GLP-1(7-40); Gly⁸Arg²⁶Lys³⁶-GLP-1(7-37); Gly⁸Arg³⁴Lys³⁶-GLP-1(7-37); Gly⁸Arg²⁶Lys³⁹-GLP-1(7-39); Gly⁸Arg³⁴Lys⁴⁰-GLP-1(7-40); Gly⁸Arg^{26,34}Lys^{36,39}-GLP-1(7-39); Gly⁸Arg^{26,34}Lys^{36,40}-GLP-1(7-40); Arg^{26,34}Lys³⁸GLP-1(7-38); Arg^{26,34}Lys³⁹GLP-1(7-39); Arg^{26,34}Lys⁴⁰GLP-1(7-40); Arg^{26,34}Lys⁴¹GLP-1(7-41); Arg^{26,34}Lys⁴²GLP-1(7-42); Arg^{26,34}Lys⁴³GLP-1(7-43); Arg^{26,34}Lys⁴⁴GLP-1(7-44); Arg^{26,34}Lys⁴⁵GLP-1(7-45); Arg^{26,34}Lys³⁸GLP-1(1-38); Arg^{26,34}Lys³⁹GLP-1(1-39); Arg^{26,34}Lys⁴⁰GLP-1(1-40); Arg^{26,34}Lys⁴¹GLP-1(1-41); Arg^{26,34}Lys⁴²GLP-1(1-42); Arg^{26,34}Lys⁴³GLP-1(1-43); Arg^{26,34}Lys⁴⁴GLP-1(1-44); Arg^{26,34}Lys⁴⁵GLP-1(1-45); Arg^{26,34}Lys³⁸GLP-1(2-38); Arg^{26,34}Lys³⁹GLP-1(2-39); Arg^{26,34}Lys⁴⁰GLP-1(2-40); Arg^{26,34}Lys⁴¹GLP-1(2-41); Arg^{26,34}Lys⁴²GLP-1(2-42); Arg^{26,34}Lys⁴³GLP-1(2-43); Arg^{26,34}Lys⁴⁴GLP-1(2-44); Arg^{26,34}Lys⁴⁵GLP-1(2-45); Arg^{26,34}Lys³⁸GLP-1(3-38); Arg^{26,34}Lys³⁹GLP-1(3-39); Arg^{26,34}Lys⁴⁰GLP-1(3-40); Arg^{26,34}Lys⁴¹GLP-1(3-41); Arg^{26,34}Lys⁴²GLP-1(3-42); Arg^{26,34}Lys⁴³GLP-1(3-43); Arg^{26,34}Lys⁴⁴GLP-1(3-44); Arg^{26,34}Lys⁴⁵GLP-1(3-45); Arg^{26,34}Lys³⁸GLP-1(4-38); Arg^{26,34}Lys³⁹GLP-1(4-39); Arg^{26,34}Lys⁴⁰GLP-1(4-40); Arg^{26,34}Lys⁴¹GLP-1(4-41); Arg^{26,34}Lys⁴²GLP-1(4-42); Arg^{26,34}Lys⁴³GLP-1(4-43); Arg^{26,34}Lys⁴⁴GLP-1(4-44); Arg^{26,34}Lys⁴⁵GLP-1(4-45); Arg^{26,34}Lys³⁸GLP-1(5-38); Arg^{26,34}Lys³⁹GLP-1(5-39); Arg^{26,34}Lys⁴⁰GLP-1(5-40); Arg^{26,34}Lys⁴¹GLP-1(5-41); Arg^{26,34}Lys⁴²GLP-1(5-42); Arg^{26,34}Lys⁴³GLP-1(5-43); Arg^{26,34}Lys⁴⁴GLP-1(5-44); Arg^{26,34}Lys⁴⁵GLP-1(5-45); Arg^{26,34}Lys³⁸GLP-1(6-38); Arg^{26,34}Lys³⁹GLP-1(6-39); Arg^{26,34}Lys⁴⁰GLP-1(6-40); Arg^{26,34}Lys⁴¹GLP-1(6-41); Arg^{26,34}Lys⁴²GLP-1(6-42); Arg^{26,34}Lys⁴³GLP-1(6-43); Arg^{26,34}Lys⁴⁴GLP-1(6-44); Arg^{26,34}Lys⁴⁵GLP-1(6-45); Arg²⁶Lys³⁸GLP-1(1-38); Arg³⁴Lys³⁸GLP-1(1-38); Arg^{26,34}Lys^{36,38}GLP-1(1-38); Arg²⁶Lys³⁸GLP-1(7-38); Arg³⁴Lys³⁸GLP-1(7-38); Arg^{26,34}Lys^{36,38}GLP-1(7-38); Arg^{26,34}Lys³⁸GLP-1(7-38); Arg²⁶Lys³⁹GLP-1(1-39); Arg³⁴Lys³⁹GLP-1(1-39); Arg^{26,34}Lys^{36,39}GLP-1(1-39); Arg²⁶Lys³⁹GLP-1(7-39); Arg³⁴Lys³⁹GLP-1(7-39); Arg^{26,34}Lys^{36,39}GLP-1(7-39); Arg²⁶-GLP-1(7-37), Arg³⁴-GLP-1(7-37), Lys³⁶-GLP-1(7-37), Arg^{26,34}Lys³⁶-GLP-1(7-37), Arg²⁶Lys³⁶-GLP-1(7-37), Arg³⁴Lys³⁶-GLP-1(7-37), Gly⁸Arg²⁶-GLP-1(7-37), Gly⁸Arg³⁴-GLP-1(7-37), Gly⁸Lys³⁶-GLP-1(7-37), Gly⁸Arg^{26,34}Lys³⁶-GLP-1(7-37), Gly⁸Arg²⁶Lys³⁶-GLP-1(7-37); Gly⁸Arg³⁴Lys³⁶-GLP-1(7-37); Arg²⁶Lys³⁸-GLP-1(7-38), Arg^{26,34}Lys³⁸-GLP-1(7-38), Arg^{26,34}Lys^{36,38}-GLP-1(7-38), Gly⁸Arg²⁶Lys³⁸-GLP-1(7-38); Gly⁸Arg^{26,34}Lys^{36,38}-GLP-1(7-38); Gly⁸Arg^{26,34}, Glu³⁷, Lys³⁸-GLP-1(7-38), Arg²⁶Lys³⁹-GLP-1(7-39), Arg^{26,34}Lys^{36,39}-GLP-1(7-39), Gly⁸Arg²⁶Lys³⁹-GLP-1(7-39); Gly⁸Arg^{26,34}Lys^{36,39}-GLP-1(7-39); Arg³⁴Lys⁴⁰-GLP-1(7-40), Arg^{26,34}Lys^{36,40}-GLP-1(7-40), Gly⁸Arg³⁴Lys⁴⁰-GLP-1(7-40) and Gly⁸Arg^{26,34}Lys^{36,40}-GLP-1(7-40).

Každý z těchto GLP-1 analogů a zkrácených analogů utváří alternativní ztvárnění předloženého vynálezu.

Nyní se má za to, že předložený vynález je také obzvláště vhodný pro modifikování GLP-2 a jeho analogů. Příklady GLP-2 a analogů, které mohou být *N*-acylované podle předloženého vynálezu jsou GLP-2 analogy a zkrácené analogy, takové jako Lys²⁰GLP-2(1-33); Lys²⁰Arg³⁰GLP-2(1-33); Arg³⁰Lys³⁴GLP-2(1-34); Arg³⁰Lys³⁵GLP-2(1-35); Arg^{30,35}Lys²⁰GLP-2(1-35); a Arg³⁵GLP-2(1-35). Každý z těchto GLP-2 analogů a zkrácených analogů utváří alternativní ztvárnění předloženého vynálezu.

Nyní se má za to, že předložený vynález je také obzvláště vhodný pro modifikování exendinu a jeho analogů. Příklady exendinu a analogů, které mohou být *N*-acylované podle předloženého vynálezu jsou analogy exendinu a zkrácené analogy, takové jako exendin-3 a exendin-4. Každý z těchto analogů exendinu a zkrácených analogů utváří alternativní ztvárnění předloženého vynálezu.

V dalším ztvárnění předloženého vynálezu se *N*-acylace koná na ϵ -aminoskupině lysinových zbytků.

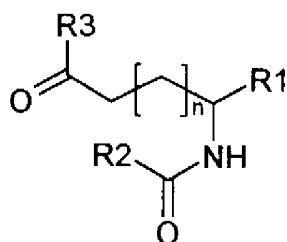
Účinky GLP-1 a jeho analogů jsou dokonale popsány v WO 98/08 871.

Účinky GLP-2 a jeho analogů jsou dokonale popsány v WO 98/08 872.

Účinky exendinu a jeho analogů jsou dokonale popsány v WO 99/43 708.

Acylační činidla

Ve způsobu podle vynálezu reaguje peptid (nebo protein), který má alespoň jednu volnou aminoskupinu, s acylačním činidlem o obecném vzorci I:



Celé číslo *n* v obecném vzorci I je raději 0 až 8, především 0 až 6, odpovídající např. asparágové kyselině, glutamové kyselině, atd. Raději je *n* 0 až 4 takové jako 0 až 2, např. 0 (asparágová kyselina) nebo 1 (glutamová kyselina). Každé z těchto celých čísel a intervalů utváří alternativní ztvárnění předloženého vynálezu.

Pojmy „C₃₋₃₉-alkyl“, „C₃₋₃₉-alkenyl“ a „C₃₋₃₉-alkadienyl“ jsou určeny, aby pokryly přímý řetězec a rozvětvený, raději přímý řetězec, nasycený, mononenasycený a dinenasycený,

popřípadě uhlovodíkové radikály o 3 až 39 uhlíkových atomech. Specifické příklady C_{3-39} -alkylu jsou heptyl, nonyl, undekanyl, tridekanyl, pentadekanyl, heptadekanyl a nonadekanyl.

Je-li zde používán pojem „steroidový zbytek“ je určen, aby znamenal lipofilní skupinu, která společně s karboxylovou skupinou, ke které je připojen R^2 , je odvozena od steroidové karboxylové kyseliny, např. tri-, tetra- a pentacyklického, plně nasyceného nebo částečně nenasyceného C_{16-36} -uhlovodíku. Příklady takových skupin $R^2-C(=O)-$ jsou lithocholoyl, deoxycholoyl a choloyl.

Mezi lipofilními skupinami zmíněnými výše jsou C_{7-25} -alkyl, C_{7-25} -alkenyl a C_{7-25} -alkadienyl a steroidové zbytky obzvláště platné. Zvláště zajímavými příklady jsou heptyl, nonyl, undekanyl, tridekanyl, pentadekanyl, heptadekanyl, nonadekanyl, lithocholoyl, deoxycholoyl a choloyl. Každý z těchto analogů exendinu a zkrácených analogů utváří alternativní ztvárnění předloženého vynálezu. Každá z těchto lipofilních skupin utváří alternativní ztvárnění předloženého vynálezu.

R^3 v obecném vzorci I společně s karboxylovou skupinou, ke které je R^3 připojen, určuje reaktivní ester nebo *N*-hydroxyimidester. Každý z těchto esterů utváří alternativní ztvárnění předloženého vynálezu. Reaktivní estery a reaktivní *N*-hydroxyimidestery jsou v oboru organické chemie (obzvláště chemie peptidů) velmi dobře známy jako funkční skupiny, které jsou používány v acylování amino-, thio- a hydroxyskupin. V kontextu předloženého vynálezu je pojem „reaktivní ester a reaktivní *N*-hydroxyimidester“ určen, aby znamenal funkční formu esteru skupiny karboxylové kyseliny vhodného pro acylování aminu, raději primárního aminu. Mělo by být tedy srozumitelné, že selektivita pro acylování primárních aminů je upřednostňována před acylováním hydroxy- a thioskupin. Reaktivní *N*-hydroxyimidestery jsou obzvláště upřednostňovány.

Příklady reaktivních esterů jsou estery 1-hydroxybenzotriazolu a deriváty. Počet vysoce účinných činidel, např. 2-(1H-benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium tetrafluoroborát, pro tvorbu takto aktivovaných esterů karboxylových kyselin jsou známy. Takové reaktivní estery jsou typicky tvořeny *in situ* v přítomnosti zásady, např. organické zásady takové jako trialkylamin.

Příklady imidové části reaktivních *N*-hydroxyimidesterů jsou ty specificky popsané v evropské patentové přihlášce č. 92 107 035.5, strana 13, řádek 3, do strany 17, řádek 10 (které jsou zde včleněny odkazy). Obzvláště zajímavé příklady imidových částí mezi nimi jsou sukcinimid, ftalimid, atd. Každá z těchto imidových částí utváří alternativní ztvárnění předloženého vynálezu.

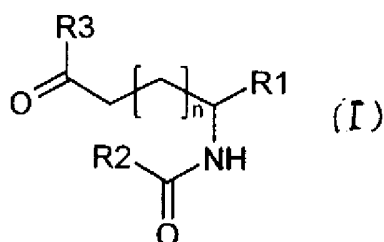
Reaktivní *N*-hydroxyimidestery o obecném vzorci I mohou být připraveny kondenzací odpovídající kyseliny (tj. *N*-acylované α -karboxychráněné dikyseliny (R^4 není vodík)) s ekvimolárním množstvím (např. 0,95 až 1,05 mol, raději 1,0 mol) *N*-hydroxyimidu odpovídajícího imidu. (*N*-Acylovaná α -karboxychráněná dikyselina je na druhé straně typicky připravována z odpovídající α -karboxychráněné, α -aminodikyseliny a esteru benzotriazolu lipofilního podílu. Tento ester benzotriazolu může např. být připravován z chloridu kyseliny a benzotriazolu DCC interakcí jak je popsáno v WO 98/02 460 (příklady 1 až 3).) Kondenzace je typicky prováděna za podmínek dehydratace, např. v přítomnosti interakčního činidla takového jako je karbodiimidové interakční činidlo (např. dicyklohexylkarbodiimid (DCC)). Interakční činidlo, je-li přítomno, je raději přidáváno v ekvimolárních množstvích vztažených ke kyselině. Reakce je typicky prováděna v polárním aprotickém rozpouštědle, takovém jako je bezvodý tetrahydrofuran (THF), bezvodý dimethylformamid (DMF), bezvodý aceton, bezvodý dichlormethan, bezvodý dioxan, bezvodý dimethylacetamid, nebo bezvodý *N*-methyl-2-pyrrolidon (NMP). Reakce je typicky prováděna při teplotě v intervalu 0 až 50 °C, např. 5 až 30 °C, takové, jako je pokojová teplota, po dobu 1 až 96 hodin takovou jako je 4 až 36 hodin. Jedna možná sada činidel a podmínek je jak následuje: *N*-hydroxyimid (např. sukcinimid nebo ftalimid) a dotyčná kyselina v molárním poměru přibližně 1 : 1 jsou rozpuštěny v bezvodém THF nebo DMF (nebo jejich směsi) a do roztoku je přidáno ekvimolární množství DCC. Po dokončení reakce mezi *N*-hydroxyimidem a kyselinou je produkt izolován a purifikován použitím běžných prostředků takových jako je filtrace (filtrace vysrážené dicyklohexylmočoviny (DCU), je-li DCC používán jako interakční činidlo), krystalizace, rekrystalizace, chromatografie atd.). Jedna možná cesta purifikace zahrnuje odstranění vysráženého použitého interakčního činidla filtrací, odpaření rozpouštědla za sníženého tlaku, resuspendování produktu, např. v acetonu, filtrace, krystalizace přidavkem nepolárního rozpouštědla, např. hexanu, a doplňková rekrystalizace a/nebo promytí. Produkt může být použit přímo jako acylační činidlo o obecném vzorci I ve způsobu podle vynálezu.

V případě, kde acylační činidlo o obecném vzorci I je používáno jako volná α -karboxylová kyselina (R^4 = vodík), sloučenina o obecném vzorci I, kde R^4 je skupina, která může být selektivně odstraněna, je přeměněna na odpovídající sloučeninu, kde R^4 je vodík. Chránicí skupina karboxylové kyseliny může být benzylová skupina, která může být odstraněna katalytickou hydrogenací nebo alylová skupina, která může být selektivně odstraněna. Benzylová chránicí skupina může být odstraněna katalytickou hydrogenací aprotickém polárním rozpouštědle, např. v acetonu při pokojové teplotě použitím paladia na uhlíku a vodíku. Reakce může být prováděna v uzavřené nádobce s vodíkovou atmosférou (typicky 0,1 až 10 ATM)

za intenzivního míchání. Reakce je typicky dokončena za 0,5 až 12 hodin v závislosti na kvalitě paládiového katalyzátoru. Jsou použity běžné dokončovací procesy.

Má se za to, že sloučeniny o obecném vzorci I, kde R^4 je vodík jsou nové jako takové a takže tyto sloučeniny utváří zvláštní hledisko předloženého vynálezu.

Takže předložený vynález také poskytuje nové sloučeniny o obecném vzorci I:



kde

n je 0 až 8;

R^1 je COOH;

R^2 je lipofilní podíl, např. raději vybraný z C₃₋₃₉-alkylu, C₃₋₃₉-alkenyly, C₃₋₃₉-alkadienyl a steroidových zbytků; a

R^3 společně s karboxylovou skupinou, ke které je R^3 připojen, určuje reaktivní ester nebo reaktivní *N*-hydroxyimidester.

Reakční podmínky

Reakce mezi acylačním činidlem o obecném vzorci I a peptidem nebo proteinem je prováděna za alkalických podmínek ve směsi aprotického polárního rozpouštědla a vody.

Acylační činidlo o obecném vzorci I je typicky používáno v mírném přebytku vztáženém k počtu aminoskupin peptidu, které mají být acylovány. Poměr je typicky 1 : 1 až 1 : 20 s přebytkem acylačního činidla, raději 1 : 1,2 až 1 : 5; zahrnující záznam počtu aminoskupin v peptidu.

Mělo by být srozumitelné, že peptid může být plně *N*-acylován nebo jen částečně *N*-acylován v závislosti na množství použitého acylačního činidla a reakčních podmínkách. Je upřednostňováno, že *N*-acylace je v podstatě stechiometrická.

Typicky je aprotické polární rozpouštědlo vybráno z bezvodého tetrahydrofuranu (THF), bezvodého dimethylformamidu (DMF), acetonu, dichlormethanu, dimethylsulfoxidu (DMSO), dioxanu, dimethylacetamidu, a *N*-methyl-2-pyrrolidonu a jejich směsi, mezi kterými jsou upřednostňovány dimethylformamid, dimethylsulfoxid, dimethylacetamid a

N-methyl-2-pyrrolidon a *N*-methyl-2-pyrrolidon je obzvláště upřednostňován. Poměr mezi aprotickým polárním rozpouštědlem a vodou (např. *N*-methyl-2-pyrrolidon a voda) je typicky 1 : 10 až 10 : 1, především 1 : 5 až 5 : 1, obzvláště 1 : 1 až 3 : 1.

Teplota je typicky zachovávána v intervalu -10 až 50 °C, raději v intervalu 0 až 25 °C.

Je důležité, že pH hodnota směsi rozpouštědla je v intervalu 7 až 14 , taková jako 9 až 13 , raději v intervalu $9,5$ až $12,5$, aby reakce probíhala klidně. Výsledek s ohledem na výtěžek a čistotu je normálně optimální, je-li hodnota pH směsi rozpouštědla v intervalu 10 až 12 . Požadovaná pH hodnota je získána přidáním hydroxidů alkalických kovů, např. hydroxid sodný a hydroxid draselný, a/nebo organických zásad takových jako jsou trialkylaminy (např. triethylamin, *N,N*-diisopropylethylamin, atd.).

Jako typický příklad, reakce v kroku (a) je prováděna použitím proteinu a acylačního činidla o obecném vzorci I v molárním poměru 1 : 1 až 1 : 5. Peptid je typicky předředěn ve vodě při -10 až 30 °C, takových jako 0 až 25 °C a pH je nastaveno na požadovanou hladinu použitím hydroxidu alkalického kovu (např. hydroxid sodný nebo hydroxid draselný). Hodnota pH může být dále nastavena použitím kyselin, např. octové kyseliny, a zásad, např. trialkylaminu, ale teplota je raději v intervalu viz výše. Aprotické polární rozpouštědlo (nebo směs rozpouštědel) je pak přidáno. Acylační činidlo je přidáno dodatečně. Reakce je typicky ponechána, aby probíhala do konce (může být sledováno HPLC), který je typicky získán za $0,2$ až 4 hodiny, takové jako $0,2$ až 1 hodina, před přidáním vody a kyseliny, např. octové kyseliny, na pH $6,5$ až $9,0$. Produkt je typicky izolován a purifikován HPLC nebo vysrážen izoelektrickým pH, nebo je hydrolyzován (krok (b)) před purifikací.

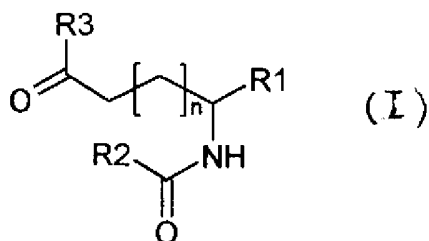
Je-li používáno acylační činidlo o obecném vzorci I, kde R^4 je vodík, je získán přímo *N*-acylovaný peptid nebo protein nesoucí lipofilní podíly a volné karboxylové skupiny. Takže, varianta, kde R^4 je vodík, představuje upřednostňované ztvárnění způsobu předloženého vynálezu.

Alternativně, tj. je-li skupina R^4 C_{1-12} -alkyl nebo benzyl, je *N*-acylovaný ester peptidu (nebo ester proteinu) zmýdelňován za alkalických podmínek tak, aby byl získán *N*-acylovaný peptid nebo *N*-acylovaný protein. Zmýdelnění je typicky prováděno v $0,001$ až $4,0$ M roztoku hydroxidu alkalického kovu, např. hydroxid sodný nebo draselný. pH roztoku je typicky 10 až 14 . Reakce je typicky ponechána, aby probíhala po $0,1$ až 12 hodin, raději po $0,5$ až 4 hodiny, při 0 až 40 °C takových jako jsou okolo pokojové teploty. Po reakci je produkt purifikován, např. vysrážením při izoelektrickém pH a/nebo preparativní HPLC. Takže varianta, kde R^4 je C_{1-12} -alkyl nebo benzyl, představuje jiné upřednostňované ztvárnění způsobu předloženého vynálezu.

Předložený vynález se také týká následujících hledisek:

Hledisko 1. Způsob pro acylování aminoskupiny peptidu nebo proteinu, způsob obsahuje:

(a) reagování peptidu mající alespoň jednu volnou aminoskupinu s acylačním činidlem o obecném vzorci I:



kde

n je 0 až 8;

R^1 je $COOR^4$;

R^2 je lipofilní podíl;

R^3 společně s karboxylovou skupinou, ke které je R^3 připojen, určuje reaktivní ester nebo reaktivní *N*-hydroxyimidester; a

R^4 je vybrán z vodíku, C_{1-12} -alkylu a benzylu,

za alkalických podmínek ve směsi aprotického polárního rozpouštědla a vody; a

(b) není-li R^4 vodík, zmýdelňování acylovaného esterové skupiny peptidu ($COOR^4$) za alkalických podmínek;

aby byl získán *N*-acylovaný peptid.

Hledisko 2. Způsob podle hlediska 1, kde R^4 je vodík.

Hledisko 3. Způsob podle hlediska 1, kde R^4 je vybrán z C_{1-8} -alkyl a benzyl.

Hledisko 4. Způsob podle jakéhokoliv z hledisek 1 až 3, kde R^3 společně s karboxylovou skupinou, ke které je R^3 připojen, určuje reaktivní *N*-hydroxyimidester.

Hledisko 5. Způsob podle jakéhokoliv z hledisek 1 až 4, kde směs aprotického rozpouštědla a vody je 1 : 5 až 5 : 1 směsí *N*-methyl-2-pyrrolidonu a vody.

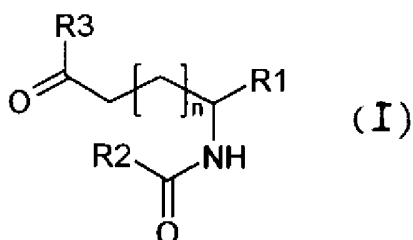
Hledisko 6. Způsob podle jakéhokoliv z hledisek 1 až 5, kde pH reakční směsi v kroku (a) je v intervalu 9 až 13.

Hledisko 7. Způsob podle jakéhokoliv z hledisek 1 až 6, kde je teplota reakční směsi v kroku (a) v intervalu 0 až 50 °C.

Hledisko 8. Způsob podle jakéhokoliv z hledisek 3 až 7, kde je acylovaný ester peptidu zmýdelněn při hodnotě pH v intervalu 10 až 14.

Hledisko 9. Způsob podle jakéhokoliv z předchozích hledisek, kde R^2 je vybrán z C_{3-39} -alkylu, C_{3-39} -alkenylu, C_{3-39} -alkadienyl a steroidových zbytků.

Hledisko 10. Sloučenina o obecném vzorci I:



kde

n je 0 až 8;

R^1 je COOH;

R^2 je lipofilní podíl, a

R^3 společně s karboxylovou skupinou, ke které je R^3 připojen, určuje reaktivní ester nebo reaktivní *N*-hydroxyimidester.

Hledisko 11. Sloučenina podle hlediska 10, kde n je 0 nebo 1 a R^3 společně s karboxylovou skupinou, ke které je R^3 připojen, určuje reaktivní *N*-hydroxyimidester.

Hledisko 12. Sloučenina podle jakéhokoliv z hledisek 10 až 11, kde R^2 je vybrán z C_{3-39} -alkylu, C_{3-39} -alkenylu, C_{3-39} -alkadienyl a steroidových zbytků.

PŘÍKLADY PROVEDENÍ VYNÁLEZU

Příprava výchozích látek

Příklad 1: Příprava α -benzylesteru *N*-hexadekanoylglutamové kyseliny

α -Benzylester glutamové kyseliny (4,75 g, 20,0 mmol) byl suspendován v *N*-methyl-2-pyrrolidonu (100 ml) při 20 až 25 °C. Byl přidán triethylamin (2,53 g, 25,0 mmol) a pak hexadekanoylbenzotriazol (7,15 g, 20,0 mmol). Reakční směs byla míchána při 20 až 25 °C po 22 hodin. K výslednému roztoku byla přidána 0,2 M kyselina chlorovodíková (250 ml). Výsledná suspenze byla chlazená na 0 °C po 3 hodiny. Produkt byl izolován filtrací, promyt vodou (50 ml x 4), a sušen do konstantní hmotnosti za sníženého tlaku a při 40 °C.

Výtěžek: 9,15 g (96 %) bílé látky, tající při 90,0 °C (maximální hodnota), stanoveno diferenční snímání kalorimetrií (DSC).

Příklad 2: Příprava α -methylesteru *N*-hexadekanoylglutamové kyseliny

Za stejných reakčních podmínek jak jsou popsány v příkladu 1 byl připraven α -methylester *N*-hexadekanoylglutamové kyseliny, použitím 8,06 g (50,0 mmol) α -methylesteru glutamové kyseliny.

Výtěžek: 17,70 g (88 %) bílé látky, tající při 95,4 °C (maximální hodnota), stanoveno DSC.

Příklad 3: Příprava α -benzylesteru γ -*N*-hydroxysukcinimidesteru *N*-hexadekanoylglutamové kyseliny

α -Benzylester *N*-hexadekanoylglutamové kyseliny (23,78 g, 50,0 mmol) byl rozpuštěn v tetrahydrofuranu (200 ml) při 20 až 25 °C. Byl přidán *N*-hydroxysukcinimid (5,75 g, 50,0 mmol) a pak dicyklohexylkarbodiimid (10,32 g, 50,0 mmol). Reakční směs byla míchána při 20 až 25 °C po 20 hodin. Výsledná suspenze byla zfiltrována filtrát odpařen do sucha za sníženého tlaku. Krystalický zbytek byl rozpuštěn v acetonu (100 ml) při 40 °C a vyčeren filtrací. K filtrátu byl přidán *n*-heptan (300 ml). Výsledná suspenze byla míchána po 4 hodiny při 20 až 25 °C, pak chlazená na 0 °C po 0,5 hodiny. Produkt byl izolován filtrací, promyt *n*-heptanem (50 ml x 3) a sušen do konstantní hmotnosti za sníženého tlaku při 40 °C.

Výtěžek: 23,75 g (83 %) bílé látky, tající při 98,6 °C (maximální hodnota), stanoveno DSC.

Příklad 4: Příprava α -methylesteru γ -*N*-hydroxysukcinimidesteru *N*-hexadekanoylglutamové kyseliny

Za stejných reakčních podmínek jak jsou popsány v příkladu 3 byl připraven α -methylester γ -*N*-hydroxysukcinimidester *N*-hexadekanoylglutamové kyseliny, použitím 8,00 g (20,0 mmol) α -methylesteru *N*-hexadekanoylglutamové kyseliny.

Výtěžek: 6,45 g (65 %) bílé látky, tající při 106,0 °C (maximální hodnota), stanoveno DSC.

Příklad 5: Příprava γ -*N*-hydroxysukcinimidesteru *N*-hexadekanoylglutamové kyseliny

α -Benzylester γ -*N*-hydroxysukcinimidester *N*-hexadekanoylglutamové kyseliny (5,73 g, 10,0 mmol) byl rozpuštěn v acetonu (100 ml) při 20 až 25 °C. Byl přidána 10 % kaše paladium na uhlíku (přibližně 0,25 g jako suchý materiál). Suspenze byla míchána za přítomnosti vodíku, dokud se nezastavila spotřeba vodíku (290 ml vodíku, 45 minut). Katalyzátor byl odstraněn filtrací a filtrát byl odpařen do sucha za sníženého tlaku při 20 až 25 °C. Zbytek byl rozpuštěn v acetonu (25 ml) při 20 až 25 °C a vyčefěn filtrací. K filtrátu byl přidán *n*-heptan (200 ml). Výsledná suspenze byla míchána při 20 až 25 °C po 1 hodinu. Produkt byl izolován filtrací, promyt *n*-heptanem (50 ml x 2) a sušen do konstantní hmotnosti za sníženého tlaku při 40 °C.

Výtěžek: 4,20 g (87 %) bílé látky, tající při 100,8 °C (maximální hodnota), stanoveno DSC.

Příprava acylovaných GLP-1 analogů

Příklad 6: Příprava Arg³⁴Lys²⁶-[*N*- ϵ -(γ -Glu(*N*-hexadekanoyl))]-GLP-1⁷⁻³⁷

Arg³⁴-GLP-1⁷⁻³⁷ (5,0 g zmrazeného izo-vysrážené peptidové látky, přibližně 0,15 mmol) bylo rozpuštěno ve vodě (25 ml) při 0 až 5 °C. pH roztoku bylo nastaveno na 12,5 přidávkem 1,0 M hydroxidu sodného (2,25 ml). Po 2 minutách byl přidán *N*-methyl-2-pyrrolidon (50 ml) a 1,0 M kyselina octová (1,25 ml), za uchování teploty na 15 °C. Triethylamin (0,2 ml) a pak γ -*N*-hydroxysukcinimidester *N*-hexadekanoylglutamové kyseliny (97,0 mg, 0,20 mmol) byl přidán. Po 30 minutách při 15 °C byla přidána voda (50 ml), a pH bylo nastaveno na 8,0 přidávkem 1,0 M kyseliny octové (1,70 ml).

Výtěžek: Analytickou RP-HPLC bylo ukázáno, že reakční směs obsahuje 77 % (podle plochy) Arg³⁴Lys²⁶-[*N*- ϵ -(γ -Glu(*N*-hexadekanoyl))]-GLP-1⁷⁻³⁷.

Konečná purifikace produktu byla získána kolonovou chromatografií.

Příklad 7: Příprava Arg³⁴Lys²⁶-[*N*- ϵ -(γ -Glu-OMe(*N*-hexadekanoyl))]-GLP-1⁷⁻³⁷

Za stejných reakčních podmínek jak jsou popsány v příkladu 6 byl Arg³⁴-GLP-1⁷⁻³⁷ acylován, použitím α -methylesteru γ -*N*-hydroxysukcinimidesteru *N*-hexadekanoylglutamové kyseliny.

Výtěžek: Analytickou RP-HPLC bylo ukázáno, že reakční směs obsahuje 64 % (podle plochy) Arg³⁴Lys²⁶-[*N*- ϵ -(γ -Glu-OMe(*N*-hexadekanoyl))]-GLP-1⁷⁻³⁷. Produkt mohl být izolován

jako sraženina nastavením pH reakční směsi na 6,0 použitím 1M kyseliny octové. Alternativně může být reakční směs použita přímo jak je popsáno v dodatečném příkladu 8

Příklad 8: Příprava Arg³⁴Lys²⁶-[N-ε-(γ-Glu(*N*-hexadekanoyl))]-GLP-1⁷⁻³⁷

Reakční směs obsahující produkt získaná v příkladu 7 byla podrobena alkalické hydrolyze nastavením pH na 12 až 13 použitím 1M hydroxidu sodného. Teplota reakční směsi byla zachována při 8 až 18 °C. Po 2 hodinách byla reakce dokončena a pH reakční směsi bylo nastaveno na 7,45 přidáním 1M kyseliny octové.

Výtěžek: Analytickou RP-HPLC bylo ukázáno, že reakční směs obsahuje 65 % (podle plochy) Arg³⁴Lys²⁶-[N-ε-(γ-Glu(*N*-hexadekanoyl))]-GLP-1⁷⁻³⁷.

Konečná purifikace produktu byla získána kolonovou chromatografií.

Příklad 9:

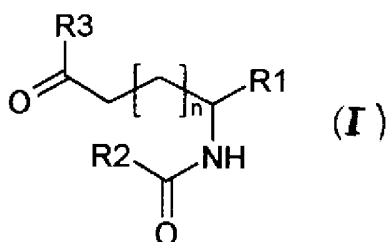
Následující sloučeniny jsou připraveny obdobně jako sloučeniny v příkladu 6 a konečná purifikace produktu je získána kolonovou chromatografií:

Arg^{26,34},Lys³⁶-[N-ε-(γ-Glu(*N*-hexadekanoyl))]-GLP-1⁷⁻³⁶,

Arg²⁶,Lys³⁴-[N-ε-(γ-Glu(*N*-hexadekanoyl))]-GLP-1⁷⁻³⁷, a

Gly⁸,Arg^{26,34},Glu³⁷, Lys³⁸-[N-ε-(γ-Glu(*N*-hexadekanoyl))]-GLP-1⁷⁻³⁸.

1. Způsob pro acylování aminoskupiny peptidu nebo proteinu, způsob, vyznačující se tím, že:
- (a) reagování peptidu mající alespoň jednu volnou aminoskupinu s acylačním činidlem o obecném vzorci I:



kde

n je 0 až 8;

R^1 je COOR^4 ;

R^2 je lipofilní podíl;

R^3 společně s karboxylovou skupinou, ke které je R^3 připojen, určuje reaktivní ester nebo reaktivní *N*-hydroxyimidester; a

R^4 je vybrán z vodíku, C_{1-12} -alkylu a benzylu,

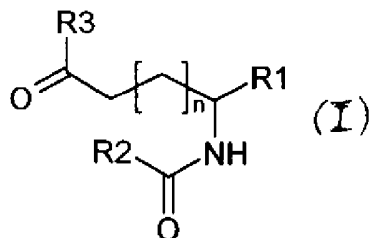
za alkalických podmínek ve směsi aprotického polárního rozpouštědla a vody; a

- (b) není-li R^4 vodík, zmýdelňování acylované esterové skupiny peptidu (COOR^4) za alkalických podmínek;

aby byl získán *N*-acylovaný peptid.

2. Způsob podle nároku 1, vyznačující se tím, že R^4 je vodík.
3. Způsob podle nároku 1, vyznačující se tím, že R^4 je vybrán z C_{1-8} -alkyl a benzyl.
4. Způsob podle jakéhokoliv z nároků 1 až 3, vyznačující se tím, že R^3 společně s karboxylovou skupinou, ke které je R^3 připojen, určuje reaktivní *N*-hydroxyimidester.
5. Způsob podle jakéhokoliv z nároků 1 až 4, vyznačující se tím, že směs aprotického rozpouštědla a vody je 1 : 5 k 5 : 1 směsi *N*-methyl-2-pyrrolidonu a vody.
6. Způsob podle jakéhokoliv z nároků 1 až 5, vyznačující se tím, že pH reakční směsi v kroku (a) je v intervalu 9 až 13.

7. Způsob podle jakéhokoliv z nároků 1 až 6, vyznačující se tím, že teplota reakční směsi v kroku (a) je v intervalu 0 až 50 °C.
8. Způsob podle jakéhokoliv z nároků 3 až 7, vyznačující se tím, že acylovaný ester peptidu je zmýdelněn při hodnotě pH v intervalu 10 až 14.
9. Způsob podle jakéhokoliv z předchozích nároků, vyznačující se tím, že R² je vybrán z C₃₋₃₉-alkylu, C₃₋₃₉-alkenyly, C₃₋₃₉-alkadienyl a steroidových zbytků.
10. Způsob podle jakéhokoliv z předchozích nároků, vyznačující se tím, že R² je vybrán z C₇₋₂₅-alkylu.
11. Způsob podle jakéhokoliv z předchozích nároků, vyznačující se tím, že peptid je vybrán z GLP-1(7-37) a jeho analogů, exendinu a jeho analogů, a GLP-2(1-34) a jeho analogů.
12. Způsob podle jakéhokoliv z předchozích nároků, vyznačující se tím, že peptid je vybrán z exendinu-3, exendinu-4, Arg²⁶-GLP-1(7-37), Arg³⁴-GLP-1(7-37), Val⁸-GLP-1(7-37), Thr⁸-GLP-1(7-37), Met⁸-GLP-1(7-37), Gly⁸-GLP-1(7-37), Val⁸-GLP-1(7-36) amid, Thr⁸-GLP-1(7-36) amid, Met⁸-GLP-1(7-36) amid, a Gly⁸-GLP-1(7-36) amid.
13. Sloučenina o obecném vzorci I:



kde

n je 0 až 8;

R¹ je COOH;

R² je lipofilní podíl, a

R³ společně s karboxylovou skupinou, ke které je R³ připojen, určuje reaktivní ester nebo reaktivní *N*-hydroxyimidester.

14. Sloučenina podle nároku 13, kde n je 0 nebo 1 a R³ společně s karboxylovou skupinou, ke které je R³ připojen, určuje reaktivní *N*-hydroxyimidester.
15. Sloučenina podle jakéhokoliv z nároků 13 až 14, kde R² je vybrán z C₃₋₃₉-alkylu, C₃₋₃₉-alkenyly, C₃₋₃₉-alkadienyl a steroidových zbytků.