



(19)대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(51) Int. Cl.

A61K 31/4164 (2006.01)

A61P 3/00 (2006.01)

(11) 공개번호 10-2007-0029247

(43) 공개일자 2007년03월13일

(21) 출원번호 10-2007-7000466

(22) 출원일자 2007년01월08일

심사청구일자 없음

번역문 제출일자 2007년01월08일

(86) 국제출원번호 PCT/EP2005/052874

(87) 국제공개번호 WO 2006/005667

국제출원일자 2005년06월21일

국제공개일자 2006년01월19일

(30) 우선권주장 05102167.3 2005년03월18일 유럽특허청(EPO)(EP)
PA 2004 01083 2004년07월08일 덴마크(DK)

(71) 출원인 노보 노르디스크 에이/에스
덴마크 디케이-2880 박스바에르트 노보 알레

(72) 발명자 되르발트 플로렌시오 자라코자
덴마크 디케이-2765 스피름 너델룬덴 22
최드트 크리스틴 브루움
덴마크 디케이 2700 브뤼넝 에스티 리스비홈베 20
한센 토마스 크루세
덴마크 디케이-2730 헤르레브 티베반겐 78
마드센 젤트
덴마크 디케이-3500 베르뢰세 니베스테르가르드스베 3

(74) 대리인 송봉식
정삼영
김정욱
박종혁

전체 청구항 수 : 총 42 항

(54) 폴리펩티드 연장 태그

(57) 요약

혈장내 화합물의 반감기를 증가시키는 방법 및 그 화합물들의 신 유도체.

특허청구의 범위

청구항 1.

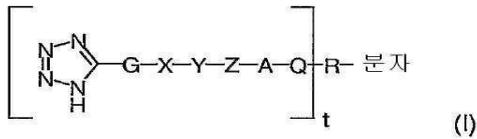
분자를 헤테로고리 카르복시산 생동배체에 공유결합시키는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 분자의 혈장 반감기 증가 방법.

청구항 2.

이 분자를 1H-테트라졸에 공유결합시키는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 분자의 혈장 반감기 증가 방법.

청구항 3.

상기 분자를 일반식(I)의 화합물로 전환시키는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 분자의 혈장 반감기 증가 방법:



여기서, G, X, 및 Y는 독립적으로

결합, -S-, -O-, -NH-, -(CH₂)₁₋₁₅-, -C(O)NH-, 또는

아릴렌, 하나 이상의 알킬로 선택적으로 치환, 아미노, 시클로알킬, 아릴, 헤테로아릴, 할로젠, 니트로, 저급 알콕시, 히드록시, MeCONH-, 알카노일, 또는 시아노, 또는

헤테로아릴렌, 하나 이상의 알킬로 선택적으로 치환, 아미노, 시클로알킬, 아릴, 헤테로아릴, 할로젠, 니트로, 저급 알콕시, 히드록시, MeCONH-, 알카노일, 또는 시아노를 나타내며,

Z는 결합 또는

-(CH₂)_n-, -O-(CH₂)_n-, -S-(CH₂)_n-, -(OCH₂CH₂)_n-, -(CF₂)_n-, -O-CH₂-(CF₂)_n-, -S-CH₂(CF₂)_n-을 나타내며, 여기서 n은 1 내지 40이며,

A는 -C(=O)-, -O-C(=O)-, -NH-C(=O)-, -C(C=O)NH-S(=O)₂-, -S(=O)₂NH-C(=O)-, -(CH₂)₁₋₅-, -O-(CH₂)₁₋₅-, 또는 -O-(CH₂)₁₋₅-C(=O)-를 나타내고,

Q는 결합 또는

-[NH-(CH₂CH₂O)_m-(CH₂)_p-E-C(=O)]_q-, 또는

-O-(CH₂CH₂O)_m-(CH₂)_p-E-C(=O)-, 또는

-S-(CH₂CH₂O)_m-(CH₂)_p-E-C(=O)-를 나타내며, 여기서 E는 결합, O, S, 또는 NH이고, m, p, 및 q는 독립적으로 1 내지 40이고,

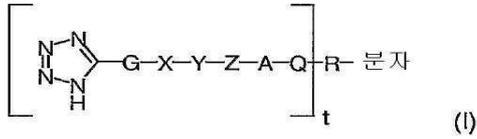
R은 결합 또는 [-NH(CH₂)₄CH(NH-)-C(=O)-]₁₋₅와 같은 폴리라디칼을 나타내며,

t는 1 내지 40이고, 그리고

용어 '분자'는 A기 또는 Q기가 공유결합될 수 있는 아미노기 또는 메르캡토기를 포함하는 화합물을 지칭한다.

청구항 4.

일반식 (I)의 화합물:



여기서, G, X, 및 Y는 독립적으로

결합, -S-, -O-, -NH-, -(CH₂)₁₋₁₀-, 또는

아릴렌, 하나 이상의 알킬로 선택적으로 치환된, 아미노, 시클로알킬, 아릴, 헤테로아릴, 할로젠, 니트로, 저급 알콕시, 히드록시, MeCONH-, 알카노일, 또는 시아노, 또는

헤테로아릴렌, 하나 이상의 알킬로 선택적으로 치환된, 아미노, 시클로알킬, 아릴, 헤테로아릴, 할로젠, 니트로, 저급 알콕시, 히드록시, MeCONH-, 알카노일, 또는 시아노를 나타내며,

Z는 결합 또는

-(CH₂)_n-, -O-(CH₂)_n-, -S-(CH₂)_n-, -(OCH₂CH₂)_n-, -(CF₂)_n-, -O-CH₂(CF₂)_n-, -S-CH₂(CF₂)_n-, 여기서 n은 1 내지 40이다,을 나타내고,

A는 -C(=O)-, -O-C(=O)-, -NH-C(=O)-, -C(C=O)NH-S(=O)₂-, -S(=O)₂NH-C(=O)-, -(CH₂)₁₋₅-, -O-(CH₂)₁₋₅-, 또는 -O-(CH₂)₁₋₅-C(=O)-를 나타내고,

Q는 결합 또는

-[NH-(CH₂CH₂O)_m-(CH₂)_p-E-C(=O)]_q-, 또는

-O-(CH₂CH₂O)_m-(CH₂)_p-E-C(=O)-, 또는

-S-(CH₂CH₂O)_m-(CH₂)_p-E-C(=O)-, 여기서 E는 결합, O, S, 또는 NH이고, m, p, 및 q는 독립적으로 1 내지 40이다,를 나타내고,

R은 결합 또는 [-NH(CH₂)₄CH(NH-)-C(=O)-]₁₋₅와 같은 폴리라디칼을 나타내며,

t는 1 내지 40이고, 그리고

용어 '분자'는 A기 또는 Q기가 공유결합될 수 있는 아미노기 또는 메르캅토기를 포함하는 화합물을 지칭한다.

청구항 5.

제 4 항에 있어서, G, X, 및 Y는 모두 결합인 것을 특징으로 하는 화합물.

청구항 6.

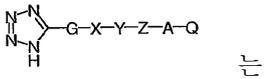
제 4 항에 있어서, G, X, 및 Y는 모두 $-(CH_2)_{1-10}-$ 으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 화합물.

청구항 7.

제 4 항 내지 제 6 항 중 어느 한 항에 있어서, t는 1인 것을 특징으로 하는 화합물.

청구항 8.

제 7 항에 있어서,



16-(5-테트라졸일)헥사데카노일, 4-[N-(16-{5-테트라졸일}헥사데카노일)술폰모일]부티릴, 2-(2-(2-(16-(테트라졸-5-일)(헥사데카노일아미노)에톡시)에톡시)아세틸), 또는 16-(1H-테트라졸-5-일)헥사데칸산[2-(2-{[2-(2-카르바모일메톡시)에톡시)에틸카르바모일]메톡시}에톡시)에틸]아미드인 것을 특징으로 하는 화합물.

청구항 9.

제 4 항 내지 제 8 항 중 어느 한 항에 있어서, 분자는 리신 잔기의 ε-아미노기를 통하여 R에 공유결합되는 것을 특징으로 하는 화합물.

청구항 10.

제 4 항 내지 제 8 항 중 어느 한 항에 있어서, 분자는 시스테인 잔기의 티올기를 통하여 R에 공유결합되는 것을 특징으로 하는 화합물.

청구항 11.

제 4 항 내지 제 10 항 중 어느 한 항에 있어서, 분자는 치료제인 것을 특징으로 하는 화합물.

청구항 12.

제 11 항에 있어서, 치료제는 생체중합체인 것을 특징으로 하는 화합물.

청구항 13.

제 11 항에 있어서, 치료제는 폴리펩티드인 것을 특징으로 하는 화합물.

청구항 14.

제 11 항에 있어서, 치료제는 소분자 약제인 것을 특징으로 하는 화합물.

청구항 15.

제 13 항에 있어서, 폴리펩티드는 인슐린반응성 펩티드인 것을 특징으로 하는 화합물.

청구항 16.

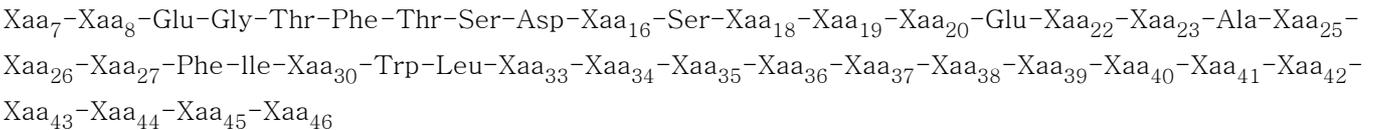
제 15 항에 있어서, 폴리펩티드는 GLP-1(7-37) 또는 그것의 변이체인 것을 특징으로 하는 화합물.

청구항 17.

제 15 항에 있어서, 폴리펩티드는 GLP-1(7-37) 또는 이것의 유사체인 것을 특징으로 하는 화합물.

청구항 18.

제 16 항 또는 제 17 항에 있어서, 상기 폴리펩티드는 화학식 (IV)의 아미노산 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 화합물:



식 (III) (SEQ ID No: 3)

여기서

Xaa₇는 L-히스티딘, D-히스티딘, 테스아미노-히스티딘, 2-아미노-3-(2-아미노이미다졸-4-일)프로피온산, β-히드록시-히스티딘, 호모히스티딘, N^α-아세틸-히스티딘, α-플루오로메틸-히스티딘, α-메틸-히스티딘, 3-피리딜알라닌, 2-피리딜알라닌 또는 4-피리딜알라닌이고;

Xaa₈는 Ala, Gly, Val, Leu, Ile, Lys, Aib, 1-아미노시클로프로판카르복시산, 1-아미노시클로부탄카르복시산, 1-아미노시클로펜탄카르복시산, 1-아미노시클로헥산카르복시산, 1-아미노시클로헵탄카르복시산, 또는 1-아미노시클로옥탄카르복시산이고;

Xaa₁₆은 Val 또는 Leu이고;

Xaa₁₈은 Ser, Lys, 또는 Arg이고;

Xaa₁₉는 Tyr 또는 Gln이고;

Xaa₂₀은 Leu 또는 Met이고;

Xaa₂₂는 Gly, Glu 또는 Aib이고;

Xaa₂₃은 Gln, Glu, Lys 또는 Arg이고;

Xaa₂₅는 Ala 또는 Val이고;

Xaa₂₆은 Lys, Glu 또는 Arg이고;

Xaa₂₇은 Glu 또는 Leu이고;

Xaa₃₀은 Ala, Glu 또는 Arg이고;

Xaa₃₃은 Val 또는 Lys이고;

Xaa₃₄는 Lys, Glu, Asn 또는 Arg이고;

Xaa₃₅는 Gly 또는 Aib이고;

Xaa₃₆은 Arg, Gly 또는 Lys이고;

Xaa₃₇은 Gly, Ala, Glu, Pro, Lys, 아미드이거나, 존재하지 않고;

Xaa₃₈은 Lys, Ser, 아미드이거나, 존재하지 않고;

Xaa₃₉는 Ser, Lys, 아미드이거나, 존재하지 않고;

Xaa₄₀은 Gly, 아미드이거나, 존재하지 않고;

Xaa₄₁은 Ala, 아미드이거나, 존재하지 않고;

Xaa₄₂는 Pro, 아미드이거나, 존재하지 않고;

Xaa₄₃은 Pro, 아미드이거나, 존재하지 않고;

Xaa₄₄는 Pro, 아미드이거나, 존재하지 않고;

Xaa₄₅는 Ser, 아미드이거나, 존재하지 않고;

Xaa₄₆은 아미드이거나, 존재하지 않고;

만약 Xaa₃₈, Xaa₃₉, Xaa₄₀, Xaa₄₁, Xaa₄₂, Xaa₄₃, Xaa₄₄, Xaa₄₅ 또는 Xaa₄₆가 존재하지 않으면 각 아미노산 잔기 하류도 또한 존재하지 않는 것을 조건으로 한다.

청구항 19.

제 18 항에 있어서, 상기 폴리펩티드는 화학식 (V)의 아미노산 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 화합물:

Xaa₇-Xaa₈-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Val-Ser-Xaa₁₈-Tyr-Leu-Glu-Xaa₂₂-Xaa₂₃-Ala-Ala-Xaa₂₆-Glu-Phe-Ile-Xaa₃₀-Trp-Leu-Val-Xaa₃₄-Xaa₃₅-Xaa₃₆-Xaa₃₇-Xaa₃₈

화학식 (IV) (SEQ ID No: 4)

여기서

Xaa₇는 L-히스티딘, D-히스티딘, 데스아미노-히스티딘, 2-아미노히스티딘, β-히드록시-히스티딘, 호모히스티딘, N^α-아세틸-히스티딘, α-플루오로메틸-히스티딘, α-메틸-히스티딘, 3-피리딜알라닌, 2-피리딜알라닌 또는 4-피리딜알라닌 이고;

Xaa₈은 Ala, Gly, Val, Leu, Ile, Lys, Aib, 1-아미노시클로프로판카르복시산, 1-아미노시클로부탄카르복시산, 1-아미노시클로펜탄카르복시산, 1-아미노시클로헥산카르복시산, 1-아미노시클로헵탄카르복시산, 또는 1-아미노시클로옥탄카르복시산이고;

Xaa₁₈은 Ser, Lys, 또는 Arg이고;

Xaa₂₂는 Gly, Glu 또는 Aib이고;

Xaa₂₃은 Gln, Glu, Lys 또는 Arg이고;

Xaa₂₆은 Lys, Glu 또는 Arg이고;

Xaa₃₀은 Ala, Glu 또는 Arg이고;

Xaa₃₄는 Lys, Glu 또는 Arg이고;

Xaa₃₅는 Gly 또는 Aib이고;

Xaa₃₆은 Arg 또는 Lys이고;

Xaa₃₇은 Gly, Ala, Glu 또는 Lys이고;

Xaa₃₈은 Lys, 아미드이거나, 존재하지 않는다.

청구항 20.

제 17 항 내지 제 19 항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 폴리펩티드는 GLP-1(7-35), GLP-1(7-36), GLP-1(7-36)-아미드, GLP-1(7-37), GLP-1(7-38), GLP-1(7-39), GLP-1(7-40), GLP-1(7-41) 또는 이것의 유사체로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 화합물.

청구항 21.

제 17 항 내지 제 20 항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 폴리펩티드는 GLP-1(7-37) (SEQ ID No. 1)에 비교하였을 때 교환되거나, 추가되거나, 또는 제거된 아미노산 잔기를 15 개 이하로 포함하거나, 또는 GLP-1(7-37) (SEQ ID No. 1)에 비교하였을 때 교환되거나, 추가되거나 또는 제거된 아미노산 잔기를 10개 이하 포함하는 것을 특징으로 하는 화합물.

청구항 22.

제 21 항에 있어서, 상기 폴리펩티드는 GLP-1(7-37) (SEQ ID No. 1)에 비교하였을 때 교환되거나, 추가되거나 또는 제거된 아미노산 잔기를 6개 이하 포함하는 것을 특징으로 하는 화합물.

청구항 23.

제 21 항 또는 제 22 항에 있어서, 상기 폴리펩티드는 유전자 코드에 의해 코드화되지 않는 아미노산 잔기를 4개 이하 포함하는 것을 특징으로 하는 화합물.

청구항 24.

제 17 항에 있어서, 상기 폴리펩티드는 DPP-IV 보호된 인슐린유도성 펩티드인 것을 특징으로 하는 화합물.

청구항 25.

제 17 항 내지 제 24 항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 폴리펩티드는 8번 위치에 Aib 잔기를 포함하는 것을 특징으로 하는 화합물.

청구항 26.

제 17 항 내지 제 25 항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 폴리펩티드의 7번 위치의 아미노산 잔기는 D-히스티딘, 테스아미노-히스티딘, 2-아미노-3-(2-아미노이미다졸-4-일)프로피온산, β-히드록시-히스티딘, 호모히스티딘, N^α-아세틸-히스티딘, α-플루오로메틸-히스티딘, α-메틸-히스티딘, 3-피리딜알라닌, 2-피리딜알라닌 및 4-피리딜알라닌으로 구성되는 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 화합물.

청구항 27.

제 17 항 내지 제 26 항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 폴리펩티드는 Arg³⁴GLP-1(7-37), Lys³⁸Arg^{26,34}GLP-1(7-38), Lys³⁸Arg^{26,34}GLP-1(7-38)-OH, Lys³⁶Arg^{26,34}GLP-1(7-36), Aib^{8,22,35}GLP-1(7-37), Aib^{8,35}GLP-1(7-37), Aib^{8,22}GLP-1(7-37), Aib^{8,22,35}Arg^{26,34}Lys³⁸GLP-1(7-38), Aib^{8,35}Arg^{26,34}Lys³⁸GLP-1(7-38), Aib^{8,22}Arg^{26,34}Lys³⁸GLP-1(7-38), Aib^{8,22,35}Arg^{26,34}Lys³⁸GLP-1(7-38), Aib^{8,35}Arg^{26,34}Lys³⁸GLP-1(7-38), Aib^{8,22,35}Arg²⁶Lys³⁸GLP-1(7-38), Aib^{8,35}Arg²⁶Lys³⁸GLP-1(7-38), Aib^{8,22}Arg²⁶Lys³⁸GLP-1(7-38), Aib^{8,22,35}Arg³⁴Lys³⁸GLP-1(7-38), Aib^{8,35}Arg³⁴Lys³⁸GLP-1(7-38), Aib^{8,22}Arg³⁴Lys³⁸GLP-1(7-38), Aib^{8,22,35}Ala³⁷Lys³⁸GLP-1(7-38), Aib^{8,35}Ala³⁷Lys³⁸GLP-1(7-38), Aib^{8,22}Ala³⁷Lys³⁸GLP-1(7-38), Aib^{8,22,35}Lys³⁷GLP-1(7-37), Aib^{8,35}Lys³⁷GLP-1(7-37) 및 Aib^{8,22}Lys³⁷GLP-1(7-38)으로 구성되는 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 화합물.

청구항 28.

제 17 항 내지 제 27 항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 폴리펩티드는 아미노산 서열 SEQ ID No:1에 관련하여 23, 26, 34, 36 또는 38번 위치의 아미노산 잔기를 통하여 R에 부착된 것을 특징으로 하는 화합물.

청구항 29.

제 13 항 내지 제 15 항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 폴리펩티드는 엑센딘-4 또는 이것의 유사체인 것을 특징으로 하는 화합물.

청구항 30.

제 29 항에 있어서, 상기 폴리펩티드는 엑센딘-4(1-39) (SEQ ID No. 2)에 비교하였을 때 교환되거나, 추가되거나, 또는 제거된 아미노산 잔기를 12개 이하로 포함하거나, 또는 엑센딘-4(1-39) (SEQ ID No. 2)에 비교하였을 때 교환되거나, 추가되거나 또는 제거된 아미노산 잔기를 8개 이하 포함하는 것을 특징으로 하는 화합물.

청구항 31.

제 13 항, 제 15항 또는 제 30항에 있어서, 상기 폴리펩티드는 ZP-10, 즉 HGEFTFTSDLSKQMEEEAVRLFIEWLKNGGPSSGAPPSKKKKKKK-아미드 (SEQ ID No. 5)인 것을 특징으로 하는 화합물.

청구항 32.

제 4 항에 있어서, 상기 화합물은 하기 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 화합물:

N-ε-26-(16-[5-테트라졸일]헥사데카노일)Arg³⁴GLP-1-(7-37),

Gly⁸Arg^{26,34}GLP-1(7-37)Lys(16-(5-테트라졸일)헥사데카노일),

Gly⁸,Arg^{26,34}GLP-1(7-37)Lys{4-[N-(16-{5-테트라졸일}헥사데카노일)술폰모일]부티릴},

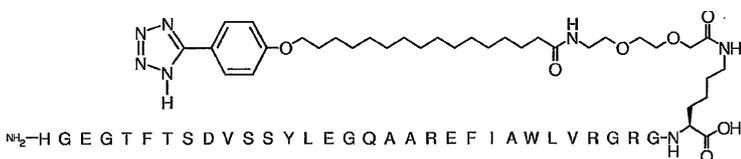
N-ε-26-{4-[N-(16-{5-테트라졸일}헥사데카노일)술폰모일]부티릴}Arg³⁴GLP-1(7-37),

N-ε-37-(2-(2-(2-(16-(테트라졸-5-일)(헥사데카노일아미노)에톡시)에톡시)아세틸))Aib^{8,22,35}Lys³⁷GLP-1(7-37),

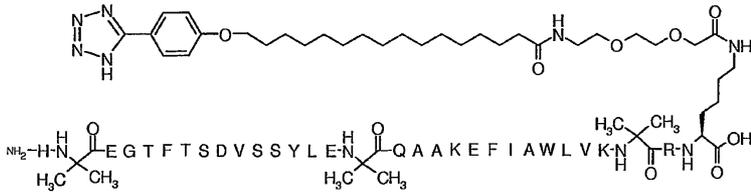
Gly⁸,Glu^{22,23,30}Arg^{18,26,34}GLP-1(7-37)Lys(16-(1H-테트라졸-5-일)헥사데칸산[2-(2-{2-(2-카르바모일메톡시에톡시)에틸카르바모일}메톡시)에톡시)에틸]아미드)-NH₂, 및

Gly⁸,Arg^{26,34}GLP-1(7-37)Lys(4-(4-(4-(4-(5-테트라졸일)페닐)페닐)페녹시)부티릴),

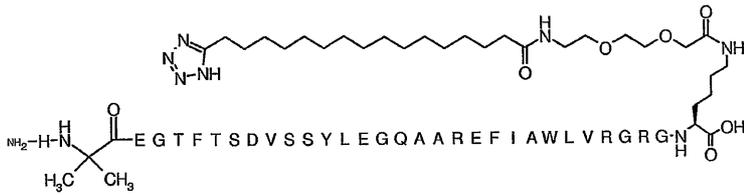
N^ε38-(2-(2-(2-(16-(4-(5-테트라졸일)페녹시)헥사데카노일)에톡시)에톡시)아세틸)[Gly8,Arg26,34,Lys38]GLP-1(7-37)펩티드



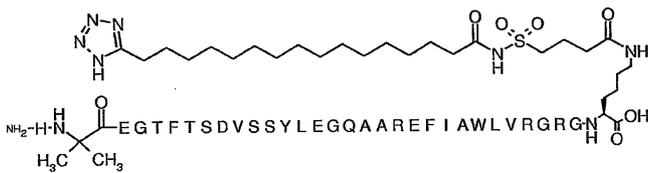
N-ε37-(2-(2-(2-(16-(4-(5-테트라졸일)페녹시)헥사데카노일)에톡시)에톡시)아세틸)[Aib8,22,35,Lys37]GLP-1(7-37)



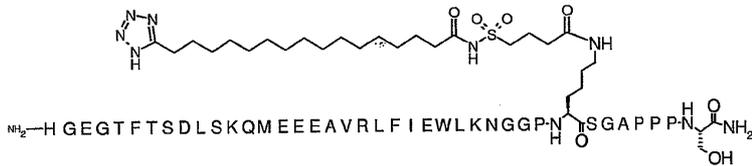
N^{ε38}-(2-(2-(2-(16-(테트라졸-5-일)헥사데카노일)에톡시)에톡시)아세틸) [Aib8,Arg26,34,Lys38]GLP-1(7-37)펩티드



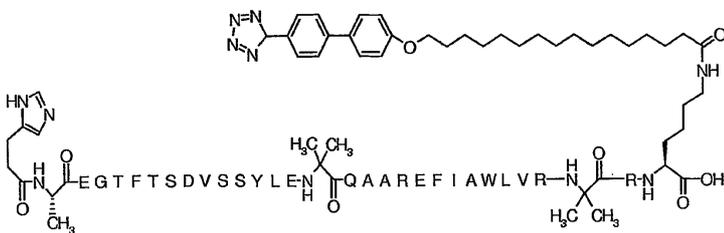
N^{ε38}-(4-(N-(16-(테트라졸-5-일)헥사데카노일)술파모일)부티릴)[Aib8,Arg26,34,Lys38]GLP-1(7-37)펩티드



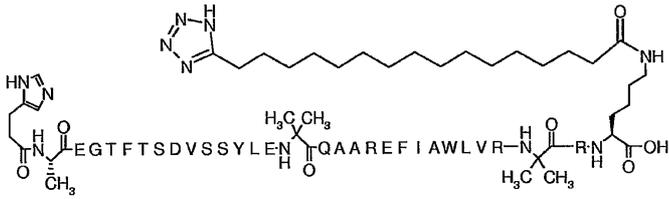
N-ε32-(4-[N-(16-{5-테트라졸일}헥사데카노일)술파모일]부티릴)-[Lys32]엑센딘[1-39]펩티드



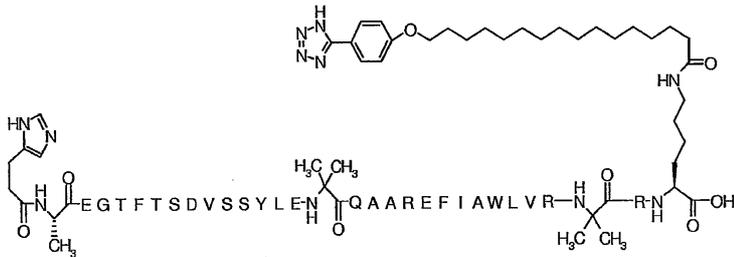
N-ε37-(16-(4'-(테트라졸-5-일)비페닐)-4-일옥시)헥사데카노일[3-(4-이미다졸일)프로피오닐 7,Aib22,35,Arg26,34,Lys37]GLP-1(7-37)펩티드



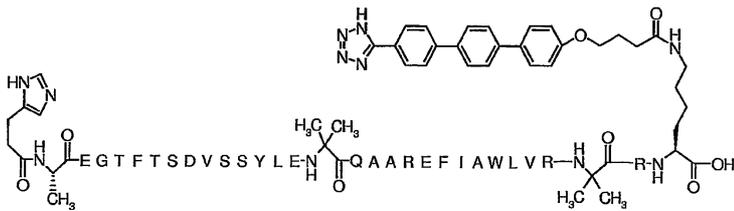
N-ε37-(16-(테트라졸-5-일)헥사데카노일)[3-(4-이미다졸일)프로피오닐 7,Aib22,35,Arg26,34,Lys37]GLP-1(7-37)



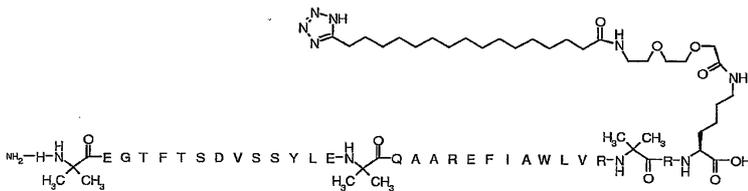
N-ε37-(16-(4-(테트라졸-5-일)페녹시)헥사데카노일)[3-(4-이미다졸일)프로피오닐]7,Aib22,35,Arg26,34,Lys37]GLP-1(7-37)



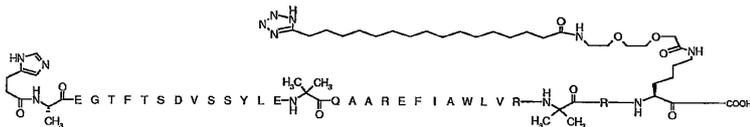
N-ε37-(4-(4-(테트라졸-5-일)[1,1',4',1'']테르페닐-4-일옥시)부티로일)[3-(4-이미다졸일)프로피오닐]7,Aib22,35,Arg26,34,Lys37]GLP-1(7-37)



N-ε37-(2-(2-(2-(16-(테트라졸-5-일)헥사데카노일)아미노)에톡시)에톡시)아세틸)[Aib8,22,35,Arg26,34,Lys37]GLP-1(7-37)



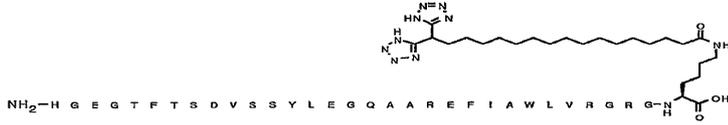
N-ε37-(2-(2-(2-(16-(테트라졸-5-일)(헥사데카노일아미노)에톡시)에톡시)아세틸))[3-(4-이미다졸일)프로피오닐]7,Aib22,35,Arg26,34,Lys37]GLP-1(7-37)펩티드



N-ε37-(2-(2-(2-(16-(테트라졸-5-일)헥사데카노일)아미노)에톡시)에톡시)아세틸))[3-(4-이미다졸일)프로피오닐]7,Aib8,22,35,Arg26,34,Lys37]GLP-1(7-37)펩티드



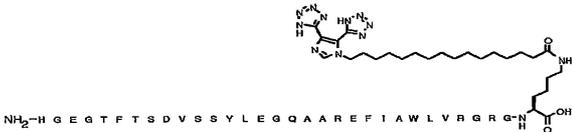
N^{ε37}-(17,17-비스(5-테트라졸일)헵타데카노일)[Gly8,Arg26,34]GLP-1-(7-37)펩티드



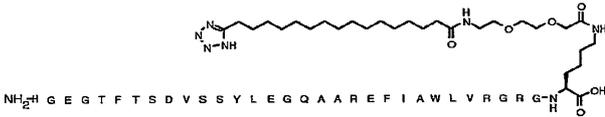
N^{ε37}-(4-(4'-{5-[4-(5-테트라졸일)페닐]-[1,2,4]옥사디아졸-3-일}비페닐-4-일옥시)부틸)[Gly8,Arg26,34]GLP-1-(7-37)펩티드



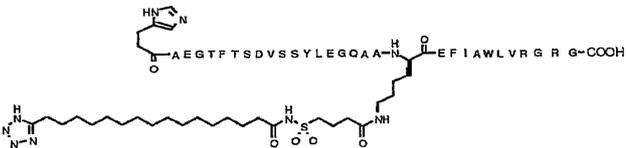
N^{ε37}-(16-(4,5-비스(5-테트라졸일)이미다졸-1-일)헥사데카노일)[Gly8,Arg26,34]GLP-1-(7-37)펩티드



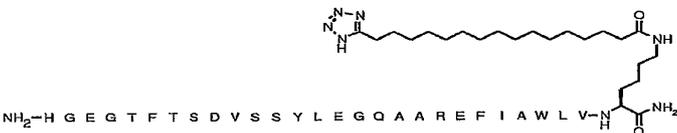
N^{ε37}-((2-(2-(16-(5-테트라졸일)헥사데카노일아미노)에톡시)에톡시)아세틸)[Gly8,Arg26,34]GLP-1-(7-37)펩티드



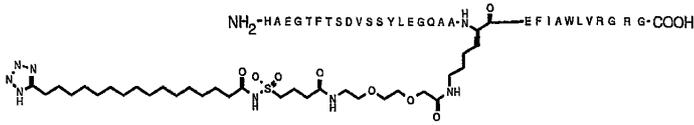
N^{ε26}-(4-{16-(테트라졸-5-일)헥사데카노일술폰파모일}부틸)[(3-(4-이미다졸일)프로피오닐7,Arg34]GLP-1-(7-37)펩티드



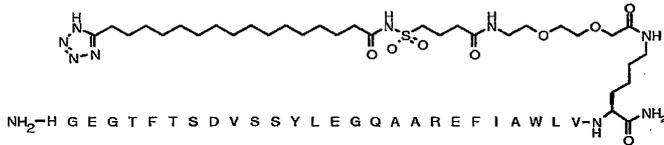
N^{ε34}-(16-{테트라졸-5-일}헥사데카노일)-[Gly8,Arg26]GLP-1(7-34)펩티드아미드



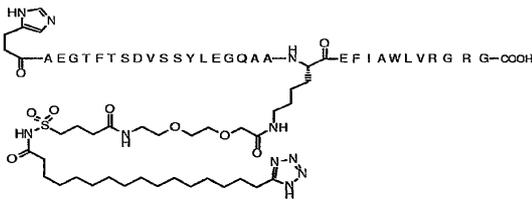
N^ε26-({2-[2-(4-(16-(테트라졸-5-일)헥사데카노일술폰과모일)부티릴아미노)에톡시]에톡시}아세틸)-[Arg34]GLP-1 (7-37)펩티드



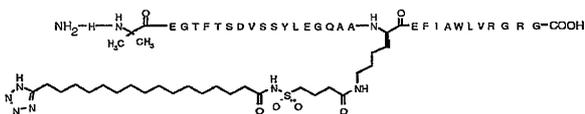
N^ε34-({2-[2-(4-(16-(테트라졸-5-일)헥사데카노일술폰과모일)부티릴아미노)에톡시]에톡시}아세틸)-[Arg26]GLP-1 (7-34)펩티드아미드



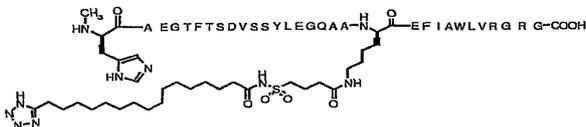
N^ε26-({2-[2-(4-(16-(테트라졸-5-일)헥사데카노일술폰과모일)부티릴아미노)에톡시]에톡시}아세틸)-[(3-(4-이미다졸일)프로피오닐)7,Arg34]GLP-1(7-37)펩티드



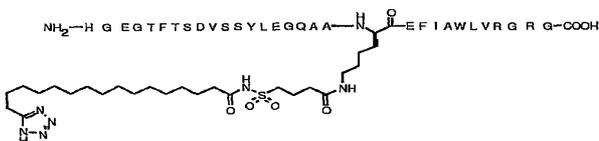
N^ε26-(4-(16-(테트라졸-5-일)헥사데카노일술폰과모일)부티릴)-[Aib8,Arg34]GLP-1-(7-37)펩티드



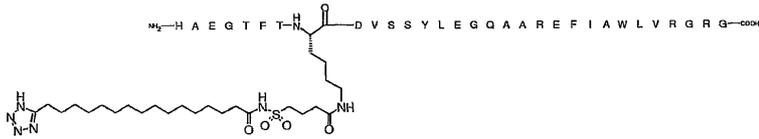
N^α7(Me)N^ε26-(4-(16-(테트라졸-5-일)헥사데카노일술폰과모일)부티릴)-[Arg34]GLP-1-(7-37)펩티드



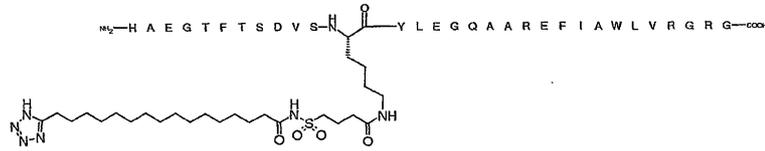
N^ε26-(4-(16-(테트라졸-5-일)헥사데카노일술폰과모일)부티릴)-[Gly8,Arg34]GLP-1-(7-37)펩티드



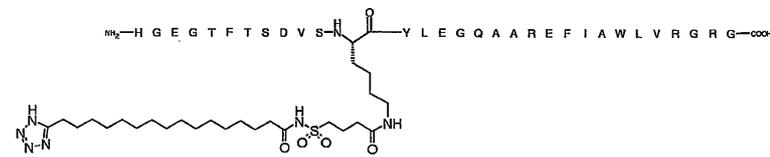
N^ε14-(4-(16-(테트라졸-5-일)헥사데카노일술폰과모일)부티릴)[Lys14;Arg26,34]GLP-1-(7-37)펩티드



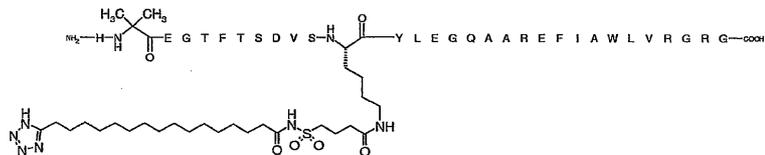
N^ε18-(4-(16-(테트라졸-5-일)헥사데카노일술포모일)부틸릴)[Lys18;Arg26,34]GLP-1-(7-37)펩티드



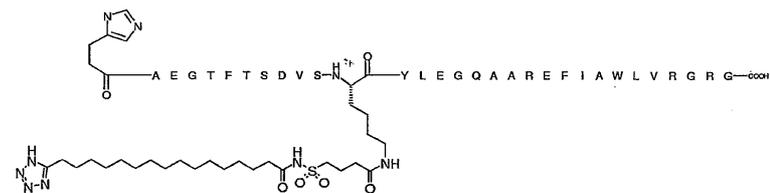
N^ε18-(4-(16-(테트라졸-5-일)헥사데카노일술포모일)부틸릴)[Gly8;Lys18;Arg26,34]GLP-1-(7-37)펩티드



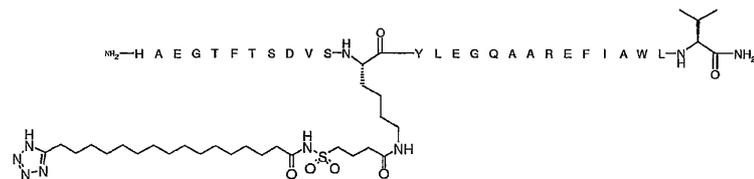
N^ε18-(4-(16-(테트라졸-5-일)헥사데카노일술포모일)부틸릴)[Aib8;Lys18;Arg26,34]GLP-1-(7-37)펩티드



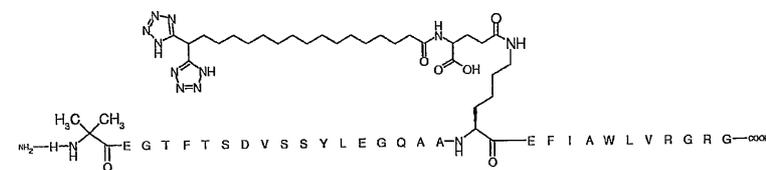
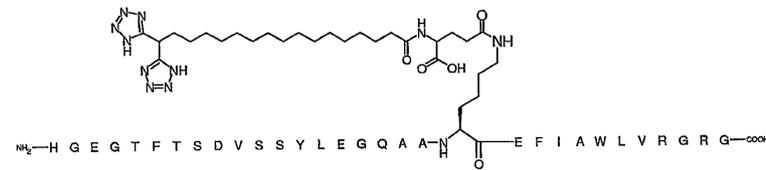
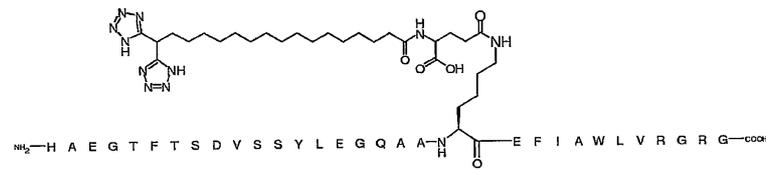
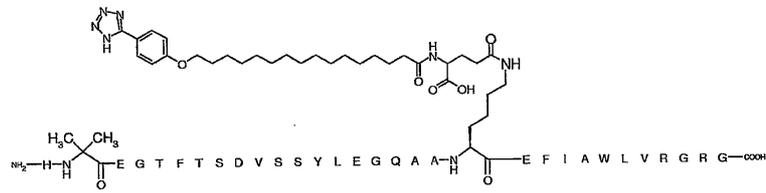
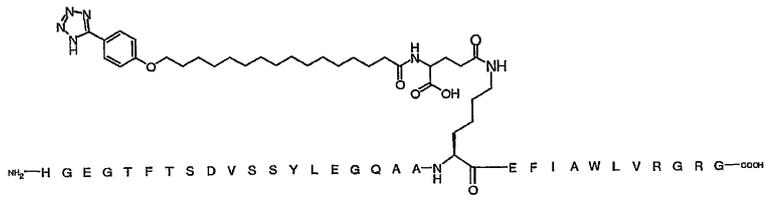
N^ε18-(4-(16-(테트라졸-5-일)헥사데카노일술포모일)부틸릴)[3-(4-이미다졸일)프로피오닐7;Lys18;Arg26,34]GLP-1-(7-37)펩티드

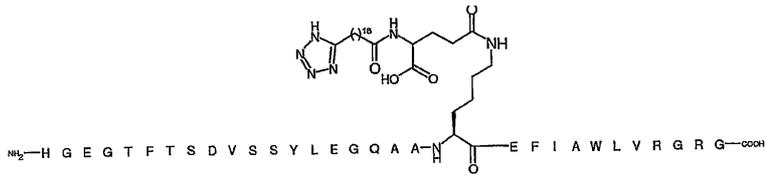


N^ε18-(4-(16-(테트라졸-5-일)헥사데카노일술포모일)부틸릴)[Lys18;Arg26]GLP-1-(7-33)펩티드아미드

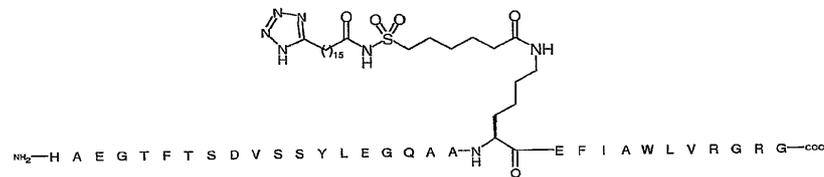
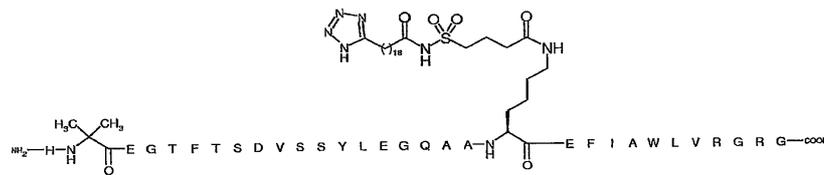
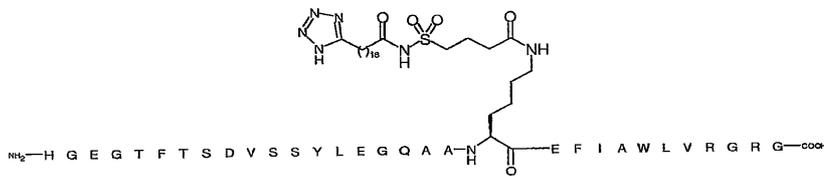
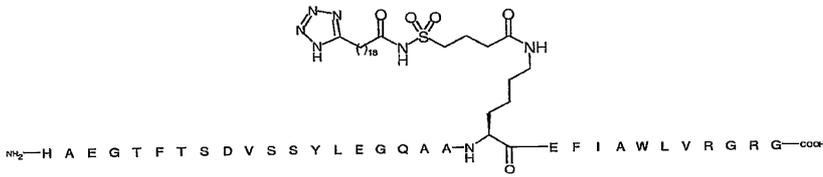


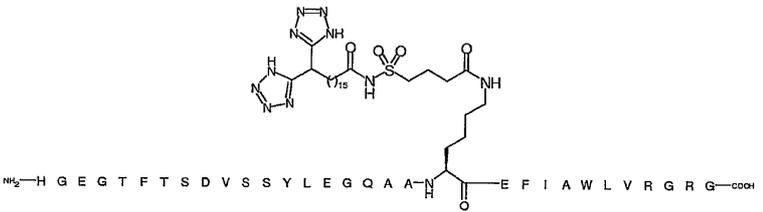
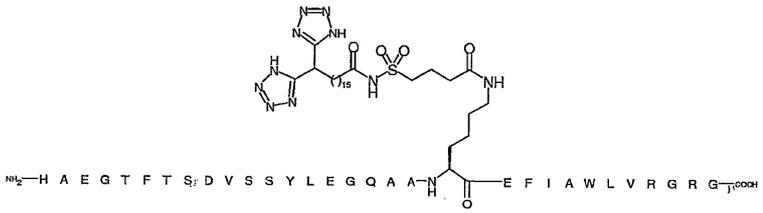
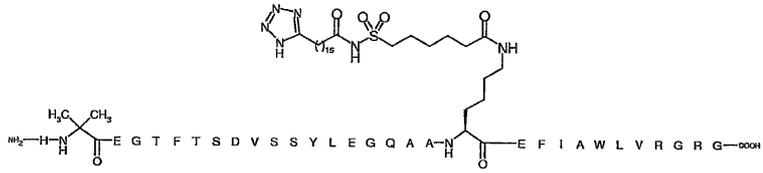
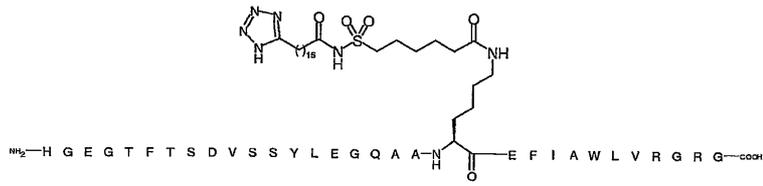
N^ε26-((2-(2-(2-(2-(2-(4-(16-(테트라졸-5-일)헥사데카노일술포모일)부틸릴)에톡시)에톡시)아세틸아미노)에톡시)에톡시)아세틸)-[Arg34]GLP-1-(7-37)펩티드

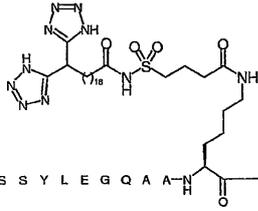




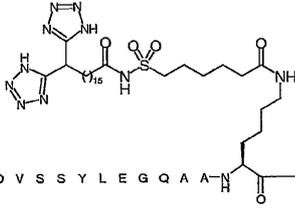
$N^{\epsilon 26}$ -(4-(19-(테트라졸-5-일)노나데카노일술폴아모일)부틸릴)[Arg34]GLP-1-(7-37)펩티드



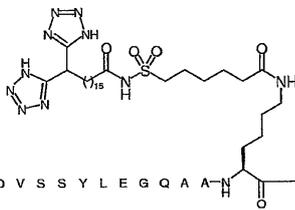




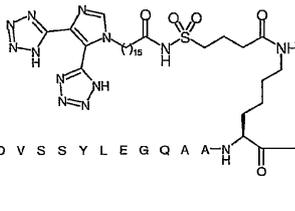
NH₂-H A E G T F T S D V S S Y L E G Q A A -NH-CO-E F I A W L V R G R G-COOH



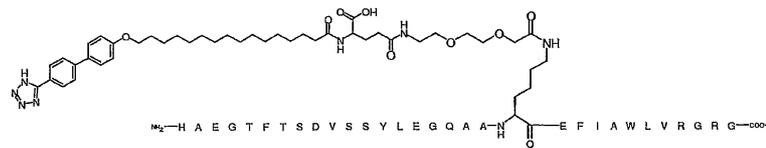
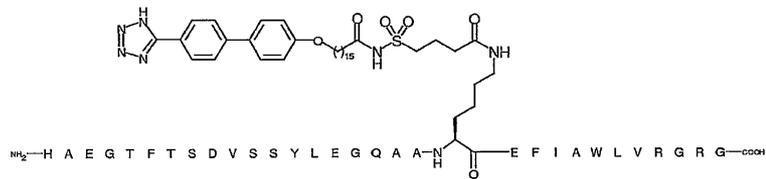
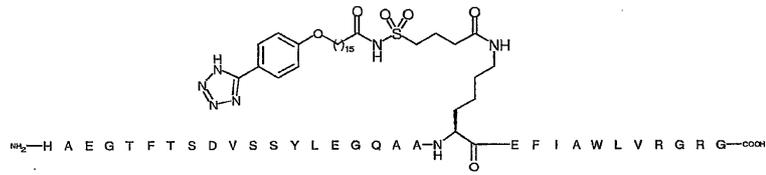
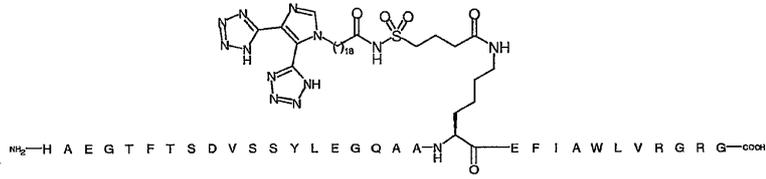
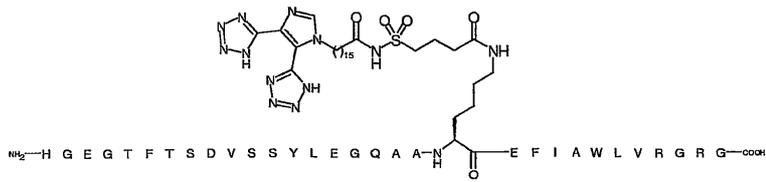
NH₂-H A E G T F T S D V S S Y L E G Q A A -NH-CO-E F I A W L V R G R G-COOH

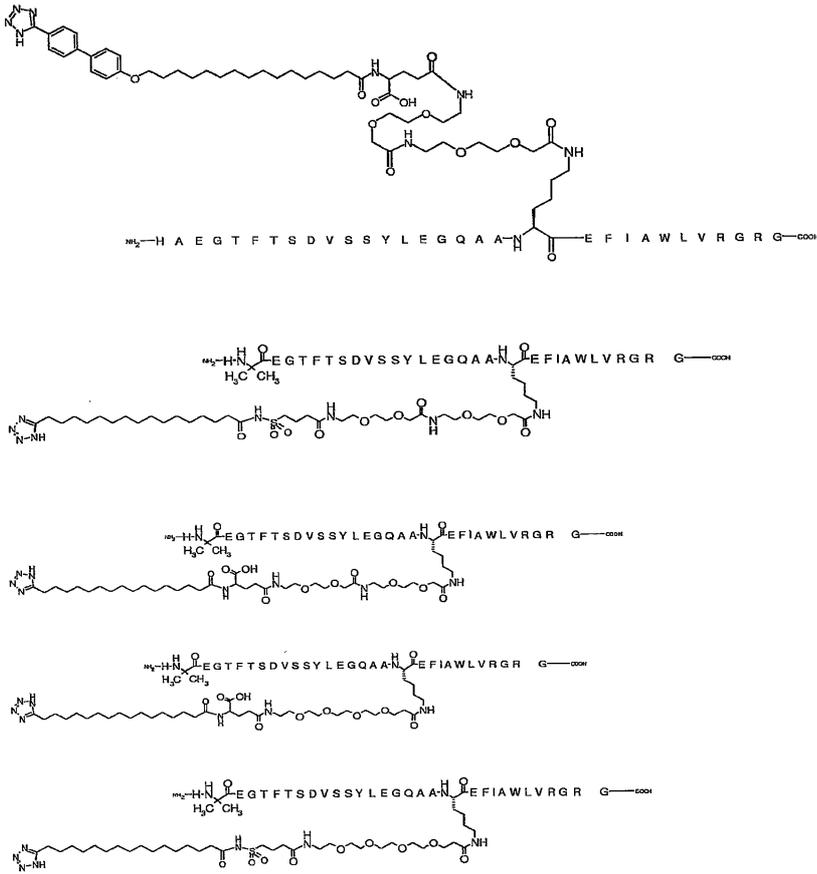


NH₂-H G E G T F T S D V S S Y L E G Q A A -NH-CO-E F I A W L V R G R G-COOH



NH₂-H A E G T F T S D V S S Y L E G Q A A -NH-CO-E F I A W L V R G R G-COOH





청구항 33.

제 13 항에 있어서, 상기 치료제는 인간 성장 호르몬 또는 이것의 유사체인 것을 특징으로 하는 화합물.

청구항 34.

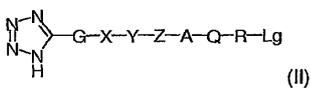
제 13 항에 있어서, 상기 치료제는 인간 인슐린 또는 이것의 유사체인 것을 특징으로 하는 화합물.

청구항 35.

제 13 항에 있어서, 상기 치료제는 인자 VII 또는 이것의 유사체인 것을 특징으로 하는 화합물.

청구항 36.

일반식 (II)의 화합물



여기서 G, X, Y, Z, A, Q, 및 R은 제 3 항에 정의된 기들을 나타내며, Lg는 Cl, Br, I, OH, $-\text{OSO}_2\text{Me}$, $-\text{OSO}_2\text{CF}_3$, $-\text{OTs}$, $-\text{SMe}_2^+$, $-\text{OSu}$, $-\text{OBt}$, $-\text{OAt}$, $-\text{OPh}$, 또는 $-\text{O}(4-\text{NO}_2)\text{Ph}$ 와 같은 이탈기이다.

청구항 37.

제 4 항 내지 제 35 항 중 어느 한 항에 따른 화합물의 합성을 위한 제 36 항에 따른 화합물의 사용.

청구항 38.

제 4 항 내지 제 35 항 중 어느 한 항에 따른 화합물 및 약학적으로 허용가능한 부형제를 포함하는 약학조성물.

청구항 39.

제 38 항에 있어서, 상기 약학조성물은 비경구 투여에 적합한 것을 특징으로 하는 약학조성물.

청구항 40.

고혈당증, 제2형 당뇨병, 손상된 포도당 내성, 제1형 당뇨병, 비만, 고혈압, 증후군 X, 고지혈증, 독성 혈액량과다증과 연관된 질환, 인지장애, 동맥경화, 심근경색, 관상동맥성 심장질환, 뇌졸중, 및 기타 심혈관질환, 염증성 장 증후군, 소화불량, 및 위궤양의 치료 또는 예방용 의약의 제조에 사용하기 위한 제 15 항 내지 제 32 항 중 어느 한 항에 따른 화합물의 사용.

청구항 41.

제2형 당뇨병에서 질병 진행을 지연 또는 방지하기 위한 의약의 제조를 위한 제 15 항 내지 제 32 항 중 어느 한 항에 따른 화합물의 사용.

청구항 42.

음식 섭취를 감소, β -세포의 세포자살을 감소, β -세포 기능 및 β -세포 질량을 증가, β -세포 재생을 자극, 및/또는 β -세포에 대한 포도당 민감성을 회복하기 위한 의약의 제조를 위한 제 15 항 내지 제 32 항 중 어느 한 항에 따른 화합물의 사용.

명세서

기술분야

본 발명은 헤테로고리 카르복시산 생동배체(bioisostere)를 포함하는 화합물, 그 화합물을 제조하는 방법 및 그 화합물의 의학적 활용에 관련된다.

배경기술

혈류 내의 지정 화합물을 특정 농도로 오랜 시간 유지하는 것이 종종 바람직하다. 예컨대 면역원이 투여되어 강한 면역반응이 요망될 때, 또는 치료 목표물이 치료약제에 오랜시간 연속적으로 노출되어야 할 때에 그러할 수 있다. 현재 어느 종류의 화합물의 혈장 반감기를 증가시키기 위하여 적용가능한 보편적 전략은 없다. 또한 인간 유전체의 진행중인 있는 연구의 결과로서, 흥미있는 생물학적 활성을 지닌 공지의 내생 폴리펩티드의 숫자는 빠르게 증가하고 있다. 그 생물학적 활성 때문에, 다수의 이들 폴리펩티드는 원칙적으로 치료제로서 사용될 수 있다. 그러나 내생 폴리펩티드는 약물 후보로서 항상

적합한 것이 아닌데, 이들 펩티드는 펩티다제에 의한 빠른 분해 및/또는 신장 여과 및 소변으로의 배출 때문에 종종 수분의 반감기를 가지기 때문이다. 인간 혈장 내 폴리펩티드의 반감기는 매우 다르다(수분 내지 일주일 이상). 유사하게, 소분자 약물의 반감기도 또한 매우 다양하다. 그러나, 펩티드, 단백질 및 기타 화합물의 혈장 반감기의 강한 다양성에 대한 이유는 잘 연구되지 않았다.

혈청 알부민은 일주일 이상의 반감기를 가지는데, 펩티드의 혈장 반감기를 증가시키는 접근법 하나는 혈청 알부민에 결합하는 화학적 요소로 펩티드를 유도체화 하는 것이었다.

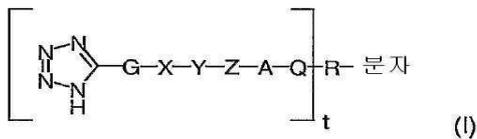
Knudsen et al (*J. Med. Chem.* 2000, 43, 1664-1669)는 아실화된 GLP-1 펩티드가 돼지 내에서 높은 수용기 잠재성 및 혈장 반감기의 열배의 증가를 나타낸다는 것을 보였다. Zobel et al. (*Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2003, 13, 1513-1515)는 토끼 내의 항응고 펩티드의 혈장반감기는 혈청 알부민에 결합한 포스페이트 에스테르계 소분자로 아미노 말단을 유도체화함에 따라 10 내지 50배 상승한다는 것을 보였다.

발명의 개요

본 발명에 따르면 분자를 헤테로고리 카르복시산 생동배체에 공유결합으로 연결하는 것을 포함하는 분자의 혈장 반감기를 증가시키는 방법이 제공된다.

본 발명은 또한 분자를 1H-테트라졸에 공유결합으로 연결하는 것을 포함하는 분자의 혈장 반감기를 증가시키는 방법에 관련된다.

본 발명에 따르면, 상기 분자를 일반식(I)의 화합물로 전환하는 것을 포함하는 분자의 혈장 반감기를 증가시키기 위한 방법이 또한 제공된다:



여기서, G, X, 및 Y는 독립적으로

결합, -S-, -O-, -NH-, -(CH₂)₁₋₁₀-, 또는

아릴렌, 하나 이상의 알킬로 선택적으로 치환, 아미노, 시클로알킬, 아릴, 헤테로아릴, 할로젠, 니트로, 저급 알콕시, 히드록시, MeCONH-, 알카노일, 또는 시아노, 또는

헤테로아릴렌, 하나 이상의 알킬로 선택적으로 치환, 아미노, 시클로알킬, 아릴, 헤테로아릴, 할로젠, 니트로, 저급 알콕시, 히드록시, MeCONH-, 알카노일, 또는 시아노를 나타내며,

Z는 결합 또는

-(CH₂)_n-, -O-(CH₂)_n-, -S-(CH₂)_n-, -(OCH₂CH₂)_n-, -(CF₂)_n-, -O-CH₂-(CF₂)_n-, -S-CH₂-(CF₂)_n-을 나타내는데, 여기서 n은 1 내지 40이며,

A는 -C(=O)-, -O-C(=O)-, -NH-C(=O)-, -C(C=O)NH-S(=O)₂-, -S(=O)₂NH-C(=O)-, -(CH₂)₁₋₅-, -O-(CH₂)₁₋₅-, 또는 -O-(CH₂)₁₋₅-C(=O)-를 나타내고,

Q는 결합 또는

-[NH-(CH₂CH₂O)_m-(CH₂)_p-E-C(=O)]_q-, 또는

-O-(CH₂CH₂O)_m-(CH₂)_p-E-C(=O)-, 또는

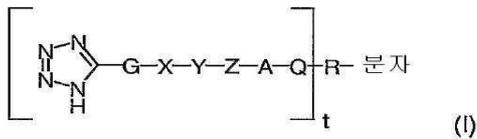
$-S-(CH_2CH_2O)_m-(CH_2)_p-E-C(=O)-$ 를 나타내는데, 여기서 E는 결합, O, S, 또는 NH이고, m, p, 및 q는 독립적으로 1 내지 40이며,

R은 결합 또는 $[-NH(CH_2)_4CH(NH-)-C(=O)-]_{1-5}$ 와 같은 폴리라디칼을 나타내며,

t는 1 내지 40이고, 그리고

용어 '분자'는 A기 또는 Q기가 공유결합될 수 있는 아미노기 또는 메르캡토기를 포함하는 화합물을 지칭한다.

본 발명은 따라서 일반식 (I)의 화합물을 제공한다:



여기서, G, X, 및 Y는 독립적으로

결합, $-S-$, $-O-$, $-NH-$, $-(CH_2)_{1-10}-$, 또는

아릴렌, 하나 이상의 알킬로 선택적으로 치환, 아미노, 시클로알킬, 아릴, 헤테로아릴, 할로젠, 니트로, 저급 알콕시, 히드록시, $MeCONH-$, 알카노일, 또는 시아노, 또는

헤테로아릴렌, 하나 이상의 알킬로 선택적으로 치환, 아미노, 시클로알킬, 아릴, 헤테로아릴, 할로젠, 니트로, 저급 알콕시, 히드록시, $MeCONH-$, 알카노일, 또는 시아노를 나타내며,

Z는 결합 또는

$-(CH_2)_n-$, $-O-(CH_2)_n-$, $-S-(CH_2)_n-$, $-(OCH_2CH_2)_n-$, $-(CF_2)_n-$, $-O-CH_2-(CF_2)_n-$, $-S-CH_2-(CF_2)_n-$ 을 나타내는데, 여기서 n은 1 내지 40이며,

A는 $-C(=O)-$, $-O-C(=O)-$, $-NH-C(=O)-$, $-C(C=O)NH-S(=O)_2-$, $-S(=O)_2NH-C(=O)-$, $-(CH_2)_{1-5}-$, $-O-(CH_2)_{1-5}-$, 또는 $-O-(CH_2)_{1-5}-C(=O)-$ 를 나타내고,

Q는 결합 또는

$-[NH-(CH_2CH_2O)_m-(CH_2)_p-E-C(=O)]_q-$, 또는

$-O-(CH_2CH_2O)_m-(CH_2)_p-E-C(=O)-$, 또는

$-S-(CH_2CH_2O)_m-(CH_2)_p-E-C(=O)-$, 여기서 E는 결합, O, S, 또는 NH를 나타내는데, m, p, 및 q는 독립적으로 1 내지 40이고,

R은 결합 또는 $[-NH(CH_2)_4CH(NH-)-C(=O)-]_{1-5}$ 와 같은 폴리라디칼을 나타내며,

t는 1 내지 40이고, 그리고

용어 '분자'는 A기 또는 Q기가 공유결합될 수 있는 아미노기 또는 메르캡토기를 포함하는 화합물을 지칭한다.

본 발명은 또한 화학식 (I)에 따른 화합물을 제공하는데, 여기서 G, X, 및 Y는 모두 결합이다.

본 발명은 화학식 (I)에 따른 화합물을 또한 제공하는데, 여기서 G, X, 및 Y는 모두 $-(CH_2)_{1-10}-$ 으로부터 선택된다.

본 발명은 화학식 (I)에 따른 화합물을 제공하는데, 여기서 t는 1이다.

정의

본 명세서에서, 하기 용어들은 제시된 의미를 지닌다:

용어 "폴리라디칼"은 하나 이상의 비공유 전자를 지닌 분자 또는 분자 부분을 의미한다. 본 정의에 따른 폴리라디칼은 두 개 이상의 (단일)라디칼을 서로 공유결합하는데 사용될 수 있다.

용어 "소분자 약물"은 분자량 1500g/mol 미만의 치료제를 의미한다.

용어 "치료제"는 생물학적 반응을 유도할 수 있는 펩티드, 단백질, 소분자 약물, 또는 기타 형태의 화합물을 의미한다.

용어 "혈장 반감기"는 사람과 같이 살아있는 포유동물의 혈장 내에 존재하는 주어진 화합물의 농도가 본래 농도의 반으로 감소하는데 필요한 시간을 의미한다.

용어 "유사체"는 본래 폴리펩티드의 아미노산의 30% 미만이 제거되거나 (입체이성질체, 비천연, 또는 화학적으로 변형된 아미노산을 포함하는) 다른 아미노산으로 교체된 폴리펩티드를 지칭하거나, 또는 예컨대 측쇄의 아실화 또는 알킬화에 의해서 화학적으로 변형된 폴리펩티드를 지칭한다. 용어 "유사체"는 또한 N-말단 아미노기가 제거되거나, 저급 알킬로 알킬화된 것, 또는 저급 알칸산, 아릴알칸산, 헤테로아릴알칸산, 또는 벤조산으로 아실화된 폴리펩티드를 지칭한다. 용어 "유사체"는 또한 C-말단 카르복시기가 제거되거나 암모니아, 저급 알킬 아민, 저급 디알킬 아민, 아지리딘, 아제티딘, 피롤리딘, 피페리딘, 또는 아제핀과 축합에 의해 아미드로 전환된 폴리펩티드를 포함한다. 용어 "유사체"는 또한 두 개 이상의 시스테인기 사이의 이황화 기능기가 환원되거나 두 개 이상의 시스테인기 사이의 연결이 변형된 폴리펩티드를 포함한다.

펩티드와 관련하여 본 명세서에서 사용된 용어 "유도체"는 화학적으로 변형된 펩티드 또는 그것의 유사 물질을 의미하는데, 여기서 적어도 하나의 치환기는 비변형 펩티드 또는 그것의 유사 물질, 즉 공유결합으로 변형된 펩티드 내에 존재하지 않는다. 전형적인 변형은 아미드, 탄수화물, 알킬기, 아실기, 에스테르 등과 같은 것이다. GLP-1(7-37)의 유도체의 예는 $Arg^{34}Lys^{26}(N^{\epsilon}-(\gamma-Glu(N^{\alpha}-\text{헥사데카노일}))-GLP-1(7-37))$ 이다.

용어 "비천연 아미노산"은, L-알라닌, L-아르기닌, L-아스파라긴, L-아스파르트산, L-시스테인, L-글루타민, L-글루탐산, L-글리신, L-히스티딘, L-이소류신, L-류신, L-리신, L-메티오닌, L-페닐알라닌, 프롤린, L-세린, L-트레오닌, L-트립토판, L-트립신, 또는 L-발린은 아니면서, 적어도 하나의 1차 또는 2차 아미노기 및 적어도 하나의 카르복시기를 포함하는 화합물을 지칭한다.

용어 "GLP-1(7-37)"은 아미노산 서열, HAEGTFTSDVSSYLEGQAAKEFIAWLVKGRG (SEQ ID NO. 1)을 가진 펩티드를 지칭한다.

본 명세서에서 사용된 용어 "GLP-1 펩티드"는 GLP-1(7-37), GLP-1 유사체, GLP-1 유도체, 또는 GLP-1 유사체의 유도체를 지칭한다. 한 구체예에서 GLP-1 펩티드는 인슐린 유도성(insulinotropic) 약물이다.

용어 "엑센딘-4(1-39)"는 HEGTFTSDLSKQMEEEAVRLFIEWLKNNGPSSGAPPPS (SEQ ID NO. 2)의 아미노산 서열을 가진 펩티드를 지칭한다.

본 명세서에서 사용된 용어 "인슐린 유도성 약물"은 인간 GLP-1 수용기의 작용제, 즉 인간 GLP-1 수용기를 포함하는 적절한 배지에서 cAMP의 형성을 자극하는 화합물을 의미한다. 인슐린 유도성 약물의 유효성은 하기에 기술된 복용량-반응 곡선으로부터의 EC_{50} 값을 계산하여 결정된다.

클론된 인간 GLP-1 수용기(BHK-467-12A)를 발현하는 아기 햄스터 신장 (BHK) 세포를 100IU/mL 페니실린, 100 μ l/mL 스트렙토마이신, 10% 우태아 혈청 및 1 mg/mL Geneticin G-418 (Life Technologies)를 첨가한 DMEM 배지에서 성장시켰다. 원형질막은 완충액(5mg/L 류펩틴(Sigma, St. Louis, MO, USA), 5mg/L 펩스타틴(Sigma), 100mg/L 바시트라신(Sigma), 및 16 mg/L 아프로티닌(Calbiochem-Novabiochem, La Jolla, CA)을 추가적으로 함유하는 10mM Tris-HCl, 30mM NaCl 및 1mM 디티오프레이톨, pH 7.4)에서 균질화하여 제조하였다. 균질물을 41w/v% 수크로오스층 위에서 원심분리하였다. 두 층 사이의 흰색 밴드를 완충액 내에서 희석되고 원심분리하였다. 원형질막은 사용되기 전까지 -80°C에서 보관하였다.

기능성 수용기 분석은 인슐린 유도성 약물에 의한 자극에 대한 반응으로서 cAMP를 측정하여 수행하였다. 배양은 총부피 140 μ l이고, 50mM Tris-HCl, 1mM EGTA, 1.5mM MgSO₄, 1.7mM ATP, 20mM GTP, 2mM 3-이소부틸-1-메틸크산틴(IBMx), 0.01% Tween-20, pH 7.4의 최종농도를 지닌 96-웰(well) 마이크로타이터 플레이트에서 수행하였다. 작용제 활성을 위해 실험될 화합물을 용해하고 완충액에서 희석하였다. GTP를 각 실험을 위해 새로이 준비하는데: 2.5 μ g의 막을 각 웰에 첨가하고, 혼합물을 실온 암실에서 진탕하여 90분간 배양하였다. 반응은 25 μ l의 0.5M HCl을 첨가하여 정지하였다. 형성된 cAMP는 신틸레이션 근접 분석(RPA 542, Amersham, UK)에 의하여 측정하였다. 복용량-반응 곡선은 개별 화합물에 대해 좌표화 하였고, GraphPad Prism 소프트웨어를 사용하여 EC₅₀ 값을 계산하였다.

본 명세서에서 폴리펩티드를 지칭하며 사용된 용어 "DPP-IV 보호된"은 상기 화합물이 혈장 펩티다제인 디펩티딜 아미노펩티다제-4(DPP-IV)에 저항하도록 화학적으로 변형된 폴리펩티드를 의미한다. 혈장 내 DPP-IV 효소는 여러 가지 펩티드 호르몬, 예컨대, GLP-1, GLP-2, 엑센딘-4 등의 분해에 관여하는 것으로 알려져 있다. 따라서, DPP-IV에 의한 분해를 감소하기 위하여 DPP-IV 매개 가수분해에 민감한 폴리펩티드의 유사 물질 및 유도체를 개발하기 위해 상당히 노력하고 있다.

디펩티딜 아미노펩티다제-4에 의한 분해에 대한 펩티드의 저항은 다음 분해 분석에 의해 결정된다: 펩티드의 분취액(5nmol)을, 100 μ l의 0.1M 트리에틸아민-HCl, pH 7.4 완충액 내에서, 10 내지 180분 동안 5mU의 효소활성에 대응하는 1 μ l의 정제된 디펩티딜 아미노펩티다제-4와 함께 37°C에서 배양된다. 효소반응은 5 μ l의 10% 트리플루오로아세트산의 첨가에 의해 종료되고, 펩티드 분해 생산물은 분리되어, HPLC 분석을 사용하여 정량된다. 이 분석을 수행하기 위한 한 가지 방법은: 혼합물을 Vydac C18 거대구멍(30nm 구멍, 5 μ m 입자) 250 x 4.6mm 컬럼 상에 가하고, Siegel et al., Regul. Pept. 1999;79:93-102 및 Mentlein et al., Eur. J. Biochem. 1993;214:829-35에 따라 0.1% 트리플루오로아세트산 내에서 아세토니트릴의 순차적 선형 구배(3분간 0% 아세토니트릴, 17분간 0 내지 24%의 아세토니트릴, 1분간 24 내지 48%의 아세토니트릴)와 함께 1ml/분의 유량으로 용출한다. 펩티드 및 그들의 분해 생산물은 220nm(펩티드 결합) 또는 280nm(방향족 아미노산)에서의 흡수도에 의해 관찰할 수 있고, 이들의 표준에 관련된 피크 영역의 적분에 의해 정량화한다. 디펩티딜 아미노펩티다제 IV에 의한 펩티드의 가수분해율은 10% 미만의 가수분해된 펩티드를 발생시키 배양시간에서 산출한다.

용어 "인자 VII"는 혈액 응고 연쇄반응의 인간 인자 VII를 일컫는다.

용어 "생동배체"는 다른 분자 단편의 생물학적 특성을 모방할 수 있는 분자 단편을 지칭한다. 카르복시산의 전형적인 생동배체는 테트라졸, 페놀, N-아실술폰아미드, 또는 산성 NH- 또는 -OH기가 있는 기타 화합물을 포함한다.

용어 "할로젠"은 F, Cl, Br 또는 I를 의미한다.

본 명세서에서 사용된 용어 "알킬"은 선형, 가지형, 고리형 C₁ 내지 C₆ 알킬을 의미한다.

용어 "저급 알킬"은 C₁-C₆ 알킬을 의미한다.

본 명세서에서 사용된 용어 "아릴"은 페닐, 비페닐일, 나프틸, 안트라세닐, 페난트레닐, 플루오레닐, 인데닐, 펜탈레닐, 아줄레닐 등과 같은 탄화고리 방향족 환계를 포함하도록 의도된다. 아릴은 또한 상기에 열거된 탄화고리계의 부분적 수소화 유도체를 포함하도록 의도된다. 이렇게 부분적으로 수소화된 유도체의 비제한적 예들은 1,2,3,4-테트라히드로나프틸, 1,4-디히드로나프틸 등과 같은 것이다. 본 명세서에서 사용된 용어 "아릴렌"은 1,2-페닐렌, 1,3-페닐렌, 1,4-페닐렌, 1,2-나프틸렌, 1,4-나프틸렌, 4,4'-비페닐렌, 4,4'-테르페닐렌, 4,4'-퀴터페닐렌 등과 같은 아릴-유도된 디라디칼을 포함하도록 의도된다.

본 명세서에서 사용된 용어 "헤테로아릴렌"은 (4-페닐이미다졸)-4,1'-디일, (3,5-디페닐-1,2,4-옥사디아졸)-4,4"-디일 등과 같은 헤테로아릴렌 디라디칼과 아릴렌의 조합은 물론이고, 1,2,4-피라졸-2,5-디일, 이미다졸-1,2-디일, 티아졸-2,4-디일 등과 같은 헤테로아릴렌-유도된 디라디칼을 포함하도록 의도된다.

본 명세서에서 사용된 용어 "아릴옥시"는 라디칼-O-아릴을 지칭하는 것으로, 여기서 아릴은 상기에 정의된 것이다. 비제한적 예들은 페녹시, 나프톡시, 아트라센닐옥시, 페난트레닐옥시, 플루오레닐옥시, 인데닐옥시 등과 같은 것이다.

본 명세서에서 사용된 용어 "헤테로아릴"은 퓨릴, 티에닐, 피롤릴, 옥사졸일, 티아졸일, 이미다졸일, 이속사졸일, 이소티아졸일, 1,2,3-트리아졸일, 1,2,4-트리아졸일, 피라닐, 피리딜, 피리다지닐, 피리미디닐, 피라지닐, 1,2,3-트리아지닐, 1,2,4-트리아지닐, 1,3,5-트리아지닐, 1,2,3-옥사디아졸일, 1,2,4-옥사디아졸일, 1,2,5-옥사디아졸일, 1,3,4-옥사디아졸일, 1,2,3-티아디아졸일, 1,2,4-티아디아졸일, 1,2,5-티아디아졸일, 1,3,4-티아디아졸일, 테트라졸일, 티아디아지닐, 인돌일, 이소인돌일, 벤조퓨릴, 벤조티에닐, 인다졸일, 벤즈이미다졸일, 벤즈티아졸일, 벤즈이소티아졸일, 벤즈옥사졸일, 벤즈이속사졸일, 퓨리닐, 퀴나졸리닐, 퀴놀리지닐, 퀴놀리닐, 이소퀴놀리닐, 퀴녹사리닐, 나프티리디닐, 프테리디닐, 카르바졸일, 아제피닐, 디아제피닐, 아크리디닐 등과 같이, 질소, 산소 또는 황으로부터 선택되는 하나 이상의 헤테로원소를 함유하는 헤테로고리 방향족 환계를 포함하도록 의도된다. 이렇게 부분적으로 수소화된 유도체의 비 제한적인 예는 2,3-디히드로벤조퓨란일, 피롤리닐, 피라졸리닐, 인단닐, 인도리닐, 옥사졸리디닐, 옥사톨리닐, 옥사제피닐 등이다.

상기에 정의된 용어들의 특정 예들은 구조식에서 한번 이상 존재할 수 있고, 그 존재시에 각 용어는 다른 것과 독립적으로 정의될 것이다.

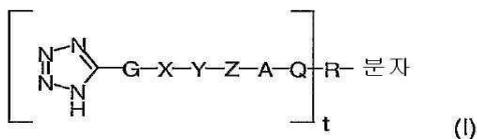
본명세서에서 사용된 용어 "선택적으로 치환"은 해당 기능기가 하나 이상의 특정된 치환기로 비치환되거나 또는 치환된 것을 의미한다. 해당 기능기가 하나 이상의 치환기로 치환된 때, 치환기들은 같거나 다를 수 있다.

발명의 상세한 설명

한 관점에서 본 발명은 분자를 헤테로고리 카르복시산 생동배체에 공유결합하는 단계를 포함하는 분자의 혈장 반감기를 증가시키기 위한 방법을 제공한다.

다른 관점에서 본 발명은 분자를 1H-테트라졸에 공유결합하는 단계를 포함하는 분자의 혈장 반감기를 증가시키는 방법을 제공한다.

다른 관점에서 본 발명은 상기 분자를 일반식 (I)의 화합물로 전환하는 단계를 포함하는 분자의 혈장 반감기를 증가시키는 방법을 제공한다:



여기서, G, X, 및 Y는 독립적으로

결합, -S-, -O-, -NH-, -(CH₂)₁₋₁₀-, 또는

아릴렌, 하나 이상의 알킬로 선택적으로 치환, 아미노, 시클로알킬, 아릴, 헤테로아릴, 할로젠, 니트로, 저급 알콕시, 히드록시, MeCONH-, 알카노일, 또는 시아노, 또는

헤테로아릴렌, 하나 이상의 알킬로 선택적으로 치환, 아미노, 시클로알킬, 아릴, 헤테로아릴, 할로젠, 니트로, 저급 알콕시, 히드록시, MeCONH-, 알카노일, 또는 시아노를 나타내며,

Z는 결합 또는

$-(\text{CH}_2)_n-$, $-0-(\text{CH}_2)_n-$, $-\text{S}-(\text{CH}_2)_n-$, $-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-$, $-(\text{CF}_2)_n-$, $-0-\text{CH}_2(\text{CF}_2)_n-$, $-\text{S}-\text{CH}_2(\text{CF}_2)_n-$ 을 나타내는데, 여기서 n 은 1 내지 40이며,

A는 $-\text{C}(=\text{O})-$, $-0-\text{C}(=\text{O})-$, $-\text{NH}-\text{C}(=\text{O})-$, $-\text{C}(\text{C}=\text{O})\text{NH}-\text{S}(=\text{O})_2-$, $-\text{S}(=\text{O})_2\text{NH}-\text{C}(=\text{O})-$, $-(\text{CH}_2)_{1-5}-$, $-0-(\text{CH}_2)_{1-5}-$, 또는 $-0-(\text{CH}_2)_{1-5}-\text{C}(=\text{O})-$ 를 나타내고,

Q는 결합 또는

$-\text{[NH}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_m-(\text{CH}_2)_p-\text{E}-\text{C}(=\text{O})]_q-$, 또는

$-0-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_m-(\text{CH}_2)_p-\text{E}-\text{C}(=\text{O})-$, 또는

$-\text{S}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_m-(\text{CH}_2)_p-\text{E}-\text{C}(=\text{O})-$, 여기서 E는 결합, O, S, 또는 NH를 나타내는데, 여기서 m , p , 및 q 는 독립적으로 1 내지 40이고,

R은 결합 또는 $[-\text{NH}(\text{CH}_2)_4\text{CH}(\text{NH}-)-\text{C}(=\text{O})-]_{1-5}$ 와 같은 폴리라디칼을 나타내며,

t 는 1 내지 40이고, 그리고

용어 '분자'는 A기 또는 Q기가 공유결합될 수 있는 아미노기 또는 메르캡토기를 포함하는 화합물을 지칭한다.

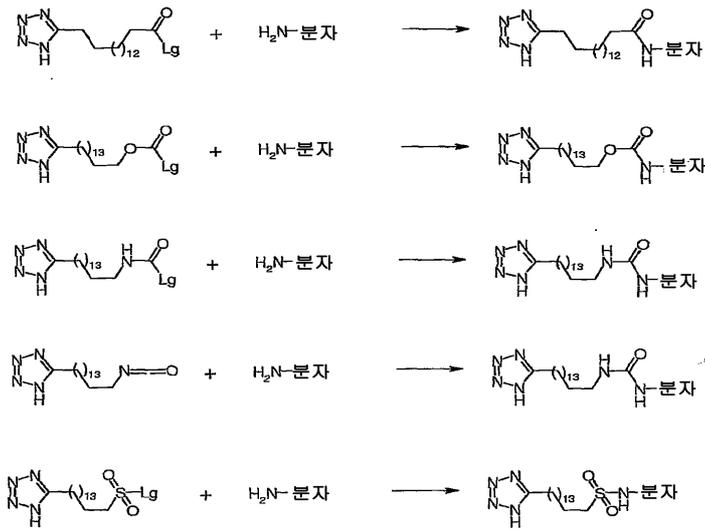
테트라졸은 카르복시산보다 약간 더 친유성이지만, 카르복시산에 대해 일어나는 많은 대사 분해경로에 대하여 저항성이 있다. 테트라졸은 아실화제로서 작용할 수 없기 때문에 단백질을 ω -(테트라졸-5-일)카르복시산으로 아실화할 때 보호가 필요하지 않다.

본 출원인은 테트라졸-함유 분자 요소로 폴리펩티드를 유도체화 하는 것은 용이하게 수행되며, 게다가 놀랍게도 결과 단백질-테트라졸 컨쥬게이트가 현저히 향상된 생물학적 및 약리학적 특성을 보인다는 것을 발견하였다.

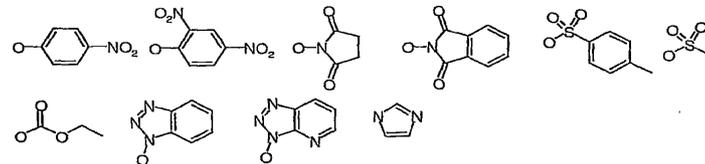
하기 실시예들을 의하여 예시된 것과 같이, 테트라졸 및 혈장 내 증가된 반감기가 필요로 하는 분자 사이의 선택적 스페이서, 즉 하나 또는 여러 테트라졸을 그 분자로 공유결합으로 연결할 수 있는 2가 또는 다가 분자 단편이 있을 수 있다. 이 2가 또는 다가 분자 단편은 화합물-테트라졸 컨쥬게이트의 생물학적 성질에 영향을 끼칠 수 있고, 스페이서의 구조적 변형은 그 컨쥬게이트의 성질을 조절 및 개선하는데 사용될 수 있다. 이 스페이서는 알킬렌 사슬, 부분적 또는 완전히 플루오로화된 알킬렌 사슬, 아릴렌, 헤테로아릴렌, 올리고(에틸렌 글리콜), 아마이드 결합, 리신, 짧은 펩티드, 짧은 올리고아미드, 및 기타 유사 단편들부터 선택되는하나 또는 여러 다른 구조의 원소의 조합일 수 있으나, 여기에 제한되지 않는다.

치료에 관련된 단백질 또는 펩티드와 같은 관심의 화합물에 테트라졸-포함 스페이서를 연결하기 위해서, 다양한 다른 전략들이 계획될 수 있다. 많은 폴리펩티드가 아미노기(예컨대, N-말단 아미노기 또는 리신-측쇄-아미노기)를 함유하는데, 이는, 이를테면 카르복시산 O-히드록시숙신이미딜 에스테르, 히드록시벤조트리아졸 에스테르, 카르복시산 안하이드라이드, 카르복시산 할라이드, 카르복시산 아지드, 니트로페닐 에스테르, 혼합 카르복시 카본 안하이드라이드, 혼합 카르복시 술폰 안하이드라이드, 이미다졸리드 등과 같은 적절한 커플링 시약의 존재하에서 카르복시산과 같은 아실화체에 의해 아실화될 수 있다. 대안으로는, 아미노기 포함 폴리펩티드는 알킬 할로포르미에이트, O-숙신이미딜카르보네이트, 알킬 아지도포르미에이트, 또는 관련된 시약의 처리에 의해서 카르바메이트로 전환되는 것에 의해 유도체화 될 수 있다. 대안으로, 아미노기 포함 폴리펩티드는 이소시아네이트, 카르바모일 할라이드, 니트로페닐 카르바메이트 또는 관련 시약으로 처리함에 의한 요소로의 전환에 의해 유도체화 될 수 있다. 대안으로는, 아미노기 포함 폴리펩티드는 술폰일 할라이드 또는 술폰일 이미다졸라이드로 처리함에 따른 술폰아미드로의 전환에 의해 유도체화 될 수 있다.

모든 이들 유도체화 반응은 테트라졸 고리를 위한 어떠한 보호기에 대한 필요성 없이 수행될 수 있고, 따라서 민감한 폴리펩티드의 유도체화에 특별히 적합하다. 비제한적이며, 예시적인 특정 테트라졸 유도체와의 아미노기-포함 분자의 유도체화 절차가 하기에 설명된다:



Lg = Cl, F, Br, I, N₃, CN, OPh,



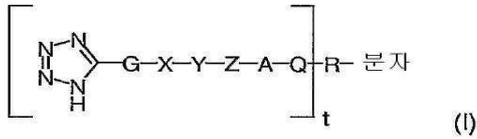
많은 폴리펩티드는 티올기를 포함하는데, 이것은 테트라졸-포함 단편을 폴리펩티드로 공유결합시키기 위하여 알킬 할라이드, 알킬 술폰산염, N-알킬말레이미드, 아크릴아미드 또는 관련된 알킬화제와 같은 적합한 알킬화제로 처리됨으로써 알킬화될 수 있다. 대안으로, 티올기는 또한 아릴 할라이드, 아릴 이오도늄염, 아릴디아조늄염 또는 유사 시약과 같은 적합한 아릴화제로 처리됨으로써 아릴화될 수 있다.

N-말단 세린 또는 관련된 기능기(1,2-디올, 2-아미노에탄올)를 가진 폴리펩티드는 과요오드화물로 처리함으로써 알데히드로 산화될 수 있다. 이 알데히드는 O-알킬히드록실아민과 반응하여 옥심을 수득하고, 따라서 O-알킬히드록실아민-함유 테트라졸을 폴리펩티드에 부착하도록 사용될 수 있다. N-말단 세린의 산화에 의해 형성된 알데히드는 또한 2-아미노에틸티올(HS-C-C-NH)과 반응하여 티아졸리딘을 생산하거나, 히드라진과 반응하여 히드라존을 산출하며, 이들 반응은 또한 테트라졸-포함 단편을 폴리펩티드로 부착하는데 사용될 수 있다. 알데히드는 또한 1,3-디케톤, 3-옥소부티라미드, 말로노디니트릴, 바르비투르산 유도체, 말론산 유도체 등과 같은 C,H-산성 화합물과 반응하여 알코올(알돌 첨가) 또는 알켄(Knoevenagel 축합)을 수득한다. 이들 반응은 또한 테트라졸을 폴리펩티드에 부착하는데 사용될 수 있다.

효소는 폴리펩티드의 선택적 유도체화를 가능하게 한다. 따라서, 카르복시펩티다제는 아민과 폴리펩티드의 C-말단 카르복시산기로부터 아민을 형성하는데 사용될 수 있다. 트랜스글루타미나제는 아민과 글루타민의 측쇄로부터 새로운 아미드를 형성하는데 사용될 수 있다. 이들 효소반응이 테트라졸-포함 아민으로 수행되는 경우, 본 발명에 청구된 바와 같은 화합물이 될 것이다. 대안으로는, 이들 효소반응은 또한 2차 작용에서 테트라졸-함유 단편의 선택적 공유결합 부착을 가능하게 하는 기능기를 함유하는 아민과 수행될 수 있다. 그러한 기능기는 알데히드, 케톤, 히드록실아민, 알콕실아민, 히드라진, 티올, 아지드, 2-아미노에틸티올, 3-아미노프로필티올, 2-히드록시에틸티올, 3-히드록시프로필티올, 알킨, 알켄, 니트릴, C,H-산성 화합물 또는 테트라졸-함유 단편의 선택적 공유결합을 가능하게 하는 기타 기능기일 수 있다. 하나 또는 여러 개의 이들 기능기를 함유하는 아민의 처리는 폴리펩티드를 생산할 것이고, 이는 선택적으로 유도체화 될 수 있다. 발효에 의하여 비천연 아미노산을 포함하는 단백질을 생산하기 위한 방법이 최근 기술하였다(예컨대 L. Alfonta et al., *J. Am. Chem. Soc.* 2003, 125, 14662-14663; Z. Zhang et al., *Biochemistry*, 2003, 42, 6735-6746). 이 방법은 테트라졸-함유 아미노산이 있는 단백질을 직접적으로 또는 용이한 화학적 유도체화를 가능하게 하는 비천연 아미노산이 있는 단백질을 제조하는데 또한 사용될 수 있다. 이들은, 예컨대, 포르밀기, 케토기, 아지도기, 메르캡토기, 알콕실아미노기, 히드라지노기, 알킨, 알켄, 아릴 이오다이드, 또는 아릴 브로마이드를 함유하는 아미노산일 수 있다. 이후 이들 비천연 아미노산을 함유하는 결과 단백질은 적절한 테트라졸 유도체를 비천연 아미노산의 측쇄에 공유결합하여 테트라졸-함유 단백질

로 전환할 수 있다. 폴리펩티드는 하나 또는 여러 개의 티로신을 포함할 수 있다. 이들은 아릴디아조늄염과의 아조커플링에 의해서 선택적으로 유도체화 될 수 있다. 이 기술은 또한 상기 티로신-함유 폴리펩티드를 테트라졸-함유 아릴디아조늄염과 반응시켜서 본 발명에 따른 화합물을 제조하는데 사용될 수 있다.

다른 관점에서 본 발명은 일반식 (I)의 화합물을 제공한다:



여기서, G, X, 및 Y는 독립적으로

결합, -S-, -O-, -NH-, -(CH₂)₁₋₁₀-, 또는

아릴렌, 하나 이상의 알킬로 선택적으로 치환, 아미노, 시클로알킬, 아릴, 헤테로아릴, 할로젠, 니트로, 저급 알콕시, 히드록시, MeCONH-, 알카노일, 또는 시아노, 또는

헤테로아릴렌, 하나 이상의 알킬로 선택적으로 치환, 아미노, 시클로알킬, 아릴, 헤테로아릴, 할로젠, 니트로, 저급 알콕시, 히드록시, MeCONH-, 알카노일, 또는 시아노를 나타내며,

Z는 결합 또는

-(CH₂)_n-, -O-(CH₂)_n-, -S-(CH₂)_n-, -(OCH₂CH₂)_n-, -(CF₂)_n-, -O-CH₂(CF₂)_n-, -S-CH₂(CF₂)_n-을 나타내는데, 여기서 n은 1 내지 40이고,

A는 -C(=O)-, -O-C(=O)-, -NH-C(=O)-, -C(C=O)NH-S(=O)₂-, -S(=O)₂NH-C(=O)-, -(CH₂)₁₋₅-, -O-(CH₂)₁₋₅-, 또는 -O-(CH₂)₁₋₅-C(=O)-를 나타내고,

Q는 결합 또는

-[NH-(CH₂CH₂O)_m-(CH₂)_p-E-C(=O)]_q-, 또는

-O-(CH₂CH₂O)_m-(CH₂)_p-E-C(=O)-, 또는

-S-(CH₂CH₂O)_m-(CH₂)_p-E-C(=O)-, 여기서 E는 결합, O, S, 또는 NH를 나타내며, m, p, 및 q는 독립적으로 1 내지 40이고,

R은 결합 또는 [-NH(CH₂)₄CH(NH-)-C(=O)-]₁₋₅와 같은 폴리라디칼을 나타내며,

t는 1 내지 40이고, 그리고

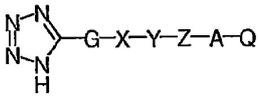
용어 '분자'는 A기 또는 Q기가 공유결합될 수 있는 아미노기 또는 메르캅토기를 포함하는 화합물을 지칭한다.

한 구체예에서 본 발명은 화학식 (I)에 따른 화합물을 제공하는데, 여기서 G, X 및 Y 모두는 결합이다.

다른 구체예에서 본 발명은 화학식 (I)에 따른 화합물을 제공하는데, 여기서 G, X, 및 Y는 모두 -(CH₂)₁₋₁₀-으로부터 선택된다.

다른 구체예에서 본 발명은 화학식 (I)에 따른 화합물을 제공하는데, 여기서 t는 1 이다.

다른 구체예에서, 본 발명은 화학식 (I)에 따른 화합물을 제공을 제공하는데, 여기서



16-(5-테트라졸일)헥사데카노일,

4-[N-(16-{5-테트라졸일}헥사데카노일)술파모일]부티릴,

2-(2-(2-(16-(테트라졸-5-일)(헥사데카노일아미노)에톡시)에톡시)아세틸), 또는

16-(1H-테트라졸-5-일)헥사데칸산[2-(2-{2-(2-카르바모일메톡시에톡시)에틸카르바모일메톡시}에톡시)에틸]아미드이다.

다른 구체예에서 본 발명은 화학식 (I)에 따른 화합물을 제공하는데, 여기서 분자는 리신 잔기의 ε-아미노기를 통하여 R에 공유결합된다.

다른 구체예에서 본 발명은 화학식 (I)에 따른 화합물을 제공하는데, 여기서 분자는 시스테인 잔기의 티올기를 통하여 R에 공유결합된다.

다른 구체예에서 본 발명은 화학식 (I)에 따른 화합물을 제공하는데, 여기서 분자는 치료제이다.

다른 구체예에서 본 발명은 화학식 (I)에 따른 화합물을 제공하는데, 여기서 치료제는 생체중합체이다.

다른 관점에서 본 발명은 화학식 (I)에 따른 화합물을 제공하는데, 여기서 치료제는 폴리펩티드이다.

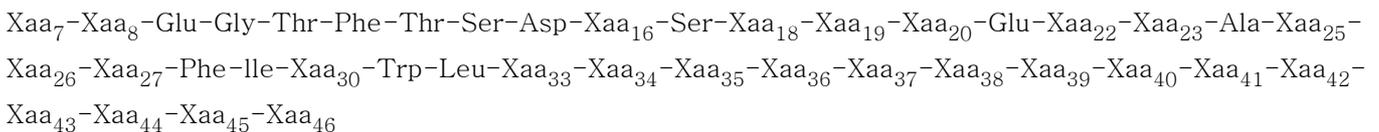
다른 관점에서 본 발명은 화학식 (I)에 따른 화합물을 제공하는데, 여기서 치료제는 소분자 약물이다.

다른 구체예에서 본 발명은 화학식 (I)에 따른 화합물을 제공하는데, 여기서 분자는 인슐린 유도성 펩티드인 폴리펩티드이다.

다른 구체예에서 본 발명은 화학식 (I)에 따른 화합물을 제공하는데, 여기서 폴리펩티드는 GLP-1(7-37) 또는 그것의 변이체이다.

다른 구체예에서 본 발명은 화학식 (I)에 따른 화합물을 제공하는데, 여기서 폴리펩티드는 GLP-1(7-37) 또는 이것의 유사체이다.

다른 구체예에서 본 발명은 화학식 (I)에 따른 화합물을 제공하는데, 여기서 분자는 화학식 (IV)의 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드이다:



화학식 (III) (SEQ ID No: 3)

여기서

Xaa₇는 L-히스티딘, D-히스티딘, 테스아미노-히스티딘, 2-아미노-3-(2-아미노이미다졸-4-일)피로피온산, β-히드록시-히스티딘, 호모히스티딘, N^α-아세틸-히스티딘, α-플루오로메틸-히스티딘, α-메틸-히스티딘, 3-피리딜알라닌, 2-피리딜알라닌 또는 4-피리딜알라닌이고;

Xaa₈는 Ala, Gly, Val, Leu, Ile, Lys, Aib, 1-아미노시클로프로판카르복시산, 1-아미노시클로부탄카르복시산, 1-아미노시클로펜탄카르복시산, 1-아미노시클로헥산카르복시산, 1-아미노시클로헵탄카르복시산, 또는 1-아미노시클로옥탄카르복시산이고;

Xaa₁₆은 Val 또는 Leu이고;

Xaa₁₈은 Ser, Lys, 또는 Arg이고;

Xaa₁₉은 Tyr 또는 Gln이고;

Xaa₂₀은 Leu 또는 Met이고;

Xaa₂₂는 Gly, Glu 또는 Aib이고;

Xaa₂₃은 Gln, Glu, Lys 또는 Arg이고;

Xaa₂₅는 Ala 또는 Val이고;

Xaa₂₆은 Lys, Glu 또는 Arg이고;

Xaa₂₇은 Glu 또는 Leu이고;

Xaa₃₀은 Ala, Glu 또는 Arg이고;

Xaa₃₃은 Val 또는 Lys이고;

Xaa₃₄는 Lys, Glu, Asn 또는 Arg이고;

Xaa₃₅는 Gly 또는 Aib이고;

Xaa₃₆은 Arg, Gly 또는 Lys이고;

Xaa₃₇은 Gly, Ala, Glu, Pro, Lys, 아마이드이거나, 존재하지 않고;

Xaa₃₈은 Lys, Ser, 아마이드이거나, 존재하지 않고;

Xaa₃₉는 Ser, Lys, 아마이드이거나, 존재하지 않고;

Xaa₄₀은 Gly, 아마이드이거나, 존재하지 않고;

Xaa₄₁은 Ala, 아마이드이거나, 존재하지 않고;

Xaa₄₂는 Pro, 아마이드이거나, 존재하지 않고;

Xaa₄₃은 Pro, 아마이드이거나, 존재하지 않고;

Xaa₄₄는 Pro, 아마이드이거나, 존재하지 않고;

Xaa₄₅는 Ser, 아마이드이거나, 존재하지 않고;

Xaa₄₆은 아마이드이거나, 존재하지 않고;

만약 Xaa₃₈, Xaa₃₉, Xaa₄₀, Xaa₄₁, Xaa₄₂, Xaa₄₃, Xaa₄₄, Xaa₄₅ 또는 Xaa₄₆가 존재하지 않으면 각 아미노산 잔기 하류도 또한 존재하지 않는 것을 조건으로 한다.

다른 구체예에서 본 발명은 화학식 (I)에 따른 화합물을 제공하는데, 여기서 분자는 화학식 (V)의 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드이다:

Xaa₇-Xaa₈-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Val-Ser-Xaa₁₈-Tyr-Leu-Glu-Xaa₂₂-Xaa₂₃-Ala-Ala-Xaa₂₆-Glu-Phe-Ile-Xaa₃₀-Trp-Leu-Val-Xaa₃₄-Xaa₃₅-Xaa₃₆-Xaa₃₇-Xaa₃₈

화학식 (IV) (SEQ ID No: 4)

여기서

Xaa₇는 L-히스티딘, D-히스티딘, 테스아미노-히스티딘, 2-아미노히스티딘, β-히드록시-히스티딘, 호모히스티딘, N^α-아세틸-히스티딘, α-플루오로메틸-히스티딘, α-메틸-히스티딘, 3-피리딜알라닌, 2-피리딜알라닌 또는 4-피리딜알라닌 이고;

Xaa₈은 Ala, Gly, Val, Leu, Ile, Lys, Aib, 1-아미노시클로프로판카르복시산, 1-아미노시클로부탄카르복시산, 1-아미노시클로펜탄카르복시산, 1-아미노시클로헥산카르복시산, 1-아미노시클로헵탄카르복시산, 또는 1-아미노시클로옥탄카르복시산이고;

Xaa₁₈은 Ser, Lys, 또는 Arg이고;

Xaa₂₂는 Gly, Glu 또는 Aib이고;

Xaa₂₃은 Gln, Glu, Lys 또는 Arg이고;

Xaa₂₆은 Lys, Glu 또는 Arg이고;

Xaa₃₀은 Ala, Glu 또는 Arg이고;

Xaa₃₄는 Lys, Glu 또는 Arg이고;

Xaa₃₅는 Gly 또는 Aib이고;

Xaa₃₆은 Arg 또는 Lys이고;

Xaa₃₇은 Gly, Ala, Glu 또는 Lys이고;

Xaa₃₈은 Lys, 아미드이거나, 존재하지 않는다.

다른 구체예에서 본 발명은 화학식 (I)에 따른 화합물을 제공하는데, 여기서 분자는 GLP-1(7-35), GLP-1(7-36), GLP-1(7-36)-아미드, GLP-1(7-37), GLP-1(7-38), GLP-1(7-39), GLP-1(7-40), GLP-1(7-41) 또는 이것의 유사체로부터 선택되는 폴리펩티드이다.

다른 구체예에서 본 발명은 화학식 (I)에 따른 화합물을 제공하는데, 여기서 분자는 GLP-1(7-37) (SEQ ID No. 1)에 비교하였을 때 교환되거나, 추가되거나, 또는 제거된 아미노산 잔기를 15개 이하, 또는 GLP-1(7-37) (SEQ ID No. 1)에 비교하였을 때 교환되거나, 추가되거나 또는 제거된 아미노산 잔기를 10개 이하 포함하는 폴리펩티드이다.

다른 구체예에서 본 발명은 화학식 (I)에 따른 화합물을 제공하는데, 여기서 분자는 GLP-1(7-37) (SEQ ID No. 1)에 비교하였을 때 교환되거나, 추가되거나, 또는 제거된 아미노산 잔기를 6개 이하 포함하는 폴리펩티드이다.

다른 구체예에서 본 발명은 화학식 (I)에 따른 화합물을 제공하는데, 여기서 분자는 유전자 코드에 의해 코드화되지 않는 아미노산 잔기가 4개 이하 포함하는 폴리펩티드이다.

다른 구체예에서 본 발명은 화학식 (I)에 따른 화합물을 제공하는데, 여기서 분자는 DPP-IV 보호된 인슐린 유도성 펩티드인 폴리펩티드이다.

다른 구체예에서 본 발명은 화학식 (I)에 따른 화합물을 제공하는데, 여기서 분자는 8번 위치에 Aib 잔기를 포함하는 폴리펩티드이다.

다른 구체예에서 본 발명은 화학식 (I)에 따른 화합물을 제공하는데, 여기서 분자는 GLP1(7-37) 유사체이고, 여기서 상기 폴리펩티드의 7번 위치의 아미노산 잔기는 D-히스티딘, 테스아미노-히스티딘, 2-아미노-3-(2-아미노이미다졸-4-일)프로피온산, β-히드록시-히스티딘, 호모히스티딘, N^α-아세틸-히스티딘, α-플루오로메틸-히스티딘, α-메틸-히스티딘, 3-피리딜알라닌, 2-피리딜알라닌 및 4-피리딜알라닌으로부터 선택된다.

다른 구체예에서 본 발명은 화학식 (I)에 따른 화합물을 제공하는데, 여기서 분자는 Arg³⁴GLP-1(7-37), Lys³⁸Arg^{26,34}GLP-1(7-38), Lys³⁸Arg^{26,34}GLP-1(7-38)-OH, Lys³⁶Arg^{26,34}GLP-1(7-36), Aib^{8,22,35}GLP-1(7-37), Aib^{8,35}GLP-1(7-37), Aib^{8,22}GLP-1(7-37), Aib^{8,22,35}Arg^{26,34}Lys³⁸GLP-1(7-38), Aib^{8,35}Arg^{26,34}Lys³⁸GLP-1(7-38), Aib^{8,22}Arg^{26,34}Lys³⁸GLP-1(7-38), Aib^{8,22,35}Arg^{26,34}Lys³⁸GLP-1(7-38), Aib^{8,35}Arg^{26,34}Lys³⁸GLP-1(7-38), Aib^{8,22,35}Arg²⁶Lys³⁸GLP-1(7-38), Aib^{8,35}Arg²⁶Lys³⁸GLP-1(7-38), Aib^{8,22}Arg²⁶Lys³⁸GLP-1(7-38), Aib^{8,22,35}Arg³⁴Lys³⁸GLP-1(7-38), Aib^{8,35}Arg³⁴Lys³⁸GLP-1(7-38), Aib^{8,22}Arg³⁴Lys³⁸GLP-1(7-38), Aib^{8,22,35}Ala³⁷Lys³⁸GLP-1(7-38), Aib^{8,35}Ala³⁷Lys³⁸GLP-1(7-38), Aib^{8,22}Ala³⁷Lys³⁸GLP-1(7-38), Aib^{8,22,35}Lys³⁷GLP-1(7-37), Aib^{8,35}Lys³⁷GLP-1(7-37) 및 Aib^{8,22}Lys³⁷GLP-1(7-38)으로 구성되는 군으로부터 선택되는 GLP-1(7-37) 유사체이다.

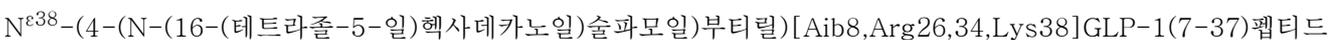
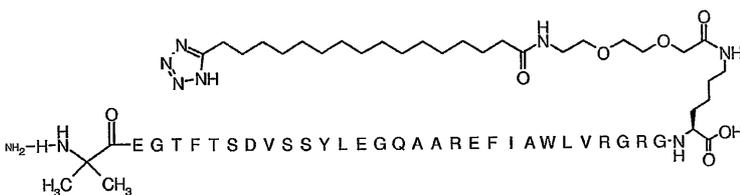
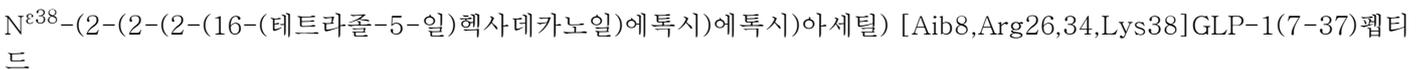
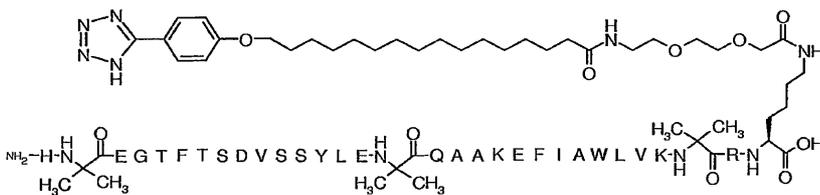
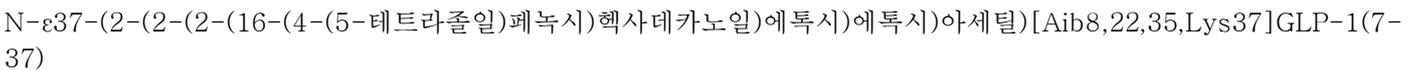
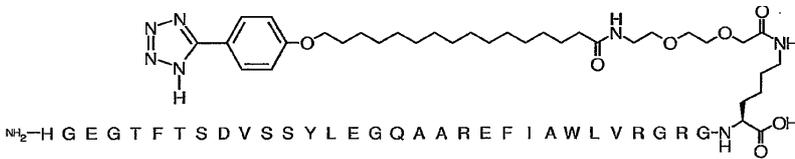
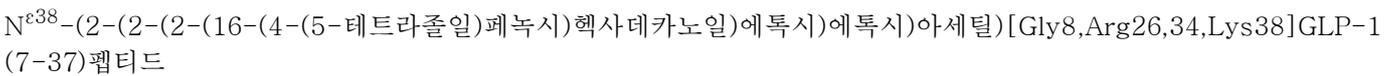
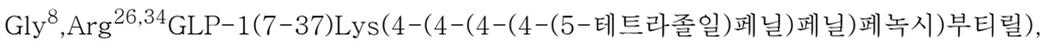
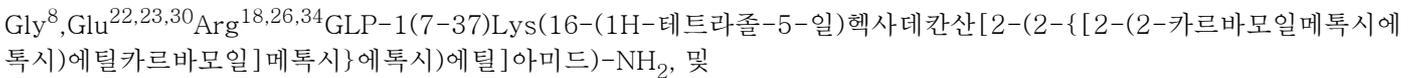
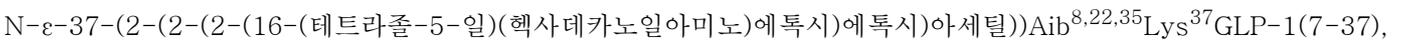
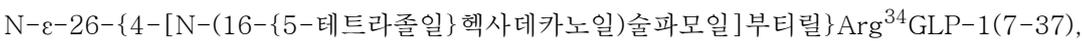
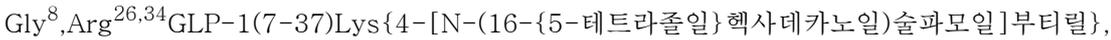
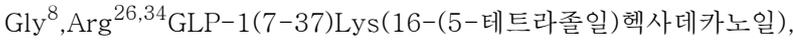
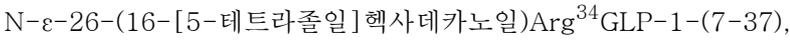
다른 구체예에서 본 발명은 화학식 (I)에 따른 화합물을 제공하는데, 여기서 분자는 아미노산 서열 SEQ ID No:1에 관한 23, 26, 34, 36 또는 38번 위치의 아미노산 잔기를 통하여 R에 부착된 GLP-1(7-37) 또는 이것의 유사체이다.

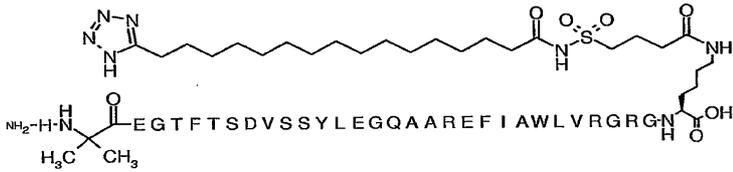
다른 구체예에서 본 발명은 화학식 (I)에 따른 화합물을 제공하는데, 여기서 분자는 엑센딘-4(1-39) 또는 이것의 유사체이다.

한 구체예에서 본 발명은 화학식 (I)에 따른 화합물을 제공하는데, 여기서 분자는 엑센딘-4(1-39)(SEQ ID No. 2)에 비교하였을 때 교환되거나, 추가되거나, 또는 제거된 아미노산 잔기를 12개 이하, 또는 엑센딘-4(1-39)(SEQ ID No. 2)에 비교하였을 때 교환되거나, 추가되거나 또는 제거된 아미노산 잔기를 8개 이하 포함하는 엑센딘-4 유사체이다.

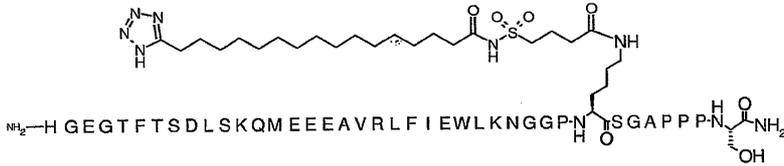
다른 구체예에서 본 발명은 화학식 (I)에 따른 화합물을 제공하는데, 여기서 분자는 ZP-10, 즉 HEGGTFSTDSLKQMEEEAVRLFIEWLKNGGPSSGAPPSKKKKKKK-아미드 (SEQ ID No. 5)이다.

다른 구체예에서 본 발명은 화학식 (I)에 따른 화합물을 제공하는데, 여기서 상기 화합물은 하기 군으로부터 선택된다:

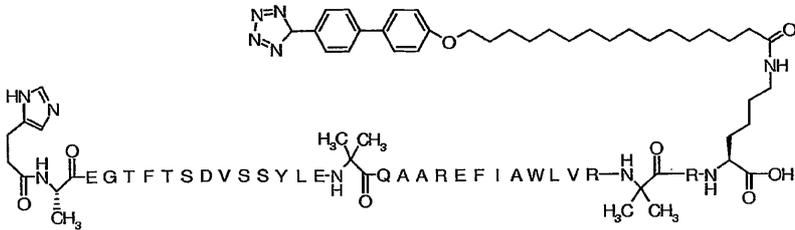




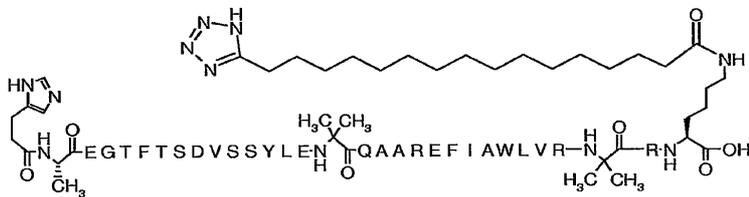
N-ε32-(4-[N-(16-{5-테트라졸일}헥사데카노일)술포모일]부티릴)-[Lys32]액센딘[1-39]펩티드



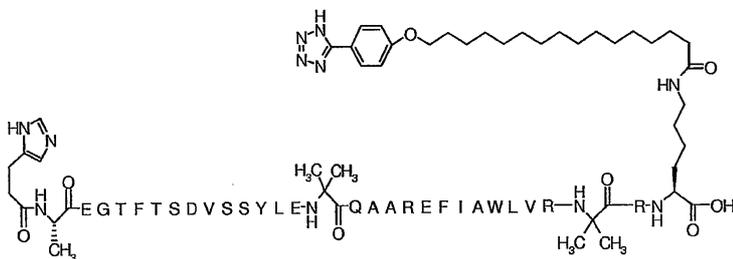
N-ε37-(16-(4'-(테트라졸-5-일)비페닐)-4-일옥시)헥사데카노일[3-(4-이미다졸일)프로피오닐 7,Aib22,35,Arg26,34,Lys37]GLP-1(7-37)펩티드



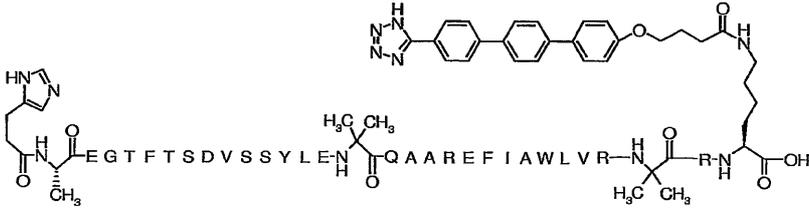
N-ε37-(16-(테트라졸-5-일)헥사데카노일)[3-(4-이미다졸일)프로피오닐 7,Aib22,35,Arg26,34,Lys37]GLP-1(7-37)펩티드



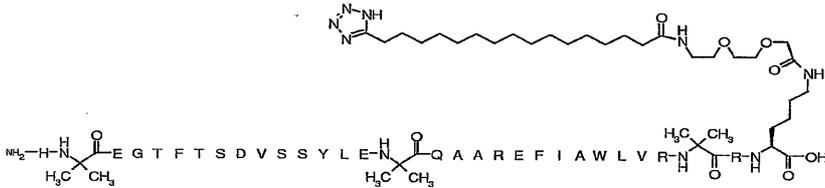
N-ε37-(16-(4-(테트라졸-5-일)페녹시)헥사데카노일)[3-(4-이미다졸일)프로피오닐 7,Aib22,35,Arg26,34,Lys37]GLP-1(7-37)펩티드



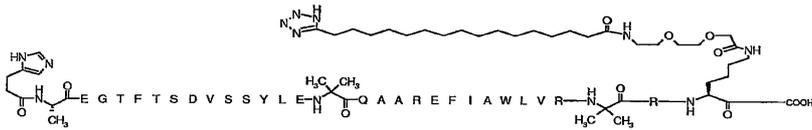
N-ε37-(4-(4-(테트라졸-5-일)[1,1',4',1'']테르페닐-4-일옥시)부티로일)[3-(4-이미다졸일)프로피오닐 7,Aib22,35,Arg26,34,Lys37]GLP-1(7-37)펩티드



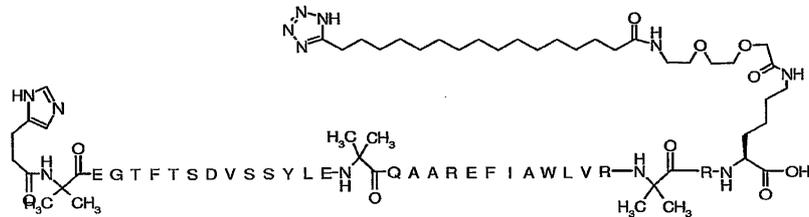
N-ε37-(2-(2-(2-(16-(테트라졸-5-일)헥사데카노일)아미노)에톡시)에톡시)아세틸 [Aib8,22,35,Arg26,34,Lys37] GLP-1(7-37)



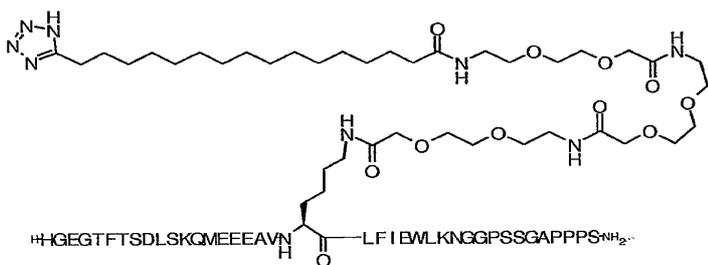
N-ε37-(2-(2-(2-(16-(테트라졸-5-일)(헥사데카노일아미노)에톡시)에톡시)아세틸))[3-(4-이미다졸일)프로피오닐 7,Aib22,35,Arg26,34,Lys37] GLP-1(7-37) 펩티드



N-ε37-(2-(2-(2-(16-(테트라졸-5-일)헥사데카노일)아미노)에톡시)에톡시)아세틸))[3-(4-이미다졸일)프로피오닐 7,Aib8,22,35,Arg26,34,Lys37] GLP-1(7-37) 펩티드

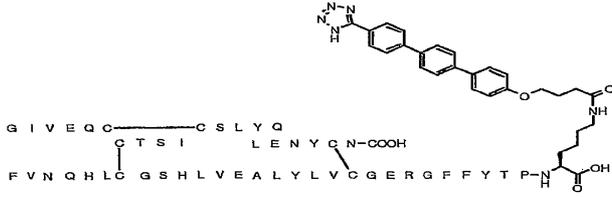


N-ε20-(2-(2-(2-(2-(2-(2-(2-(2-(16-(테트라졸-5-일)헥사데카노일)아미노)에톡시)에톡시)아세틸)아미노)에톡시)아세틸)아미노)에톡시)아세틸)아미노)에톡시)아세틸)아미노)에톡시)아세틸 [Lys20] 엑센딘-4(1-39)아미드

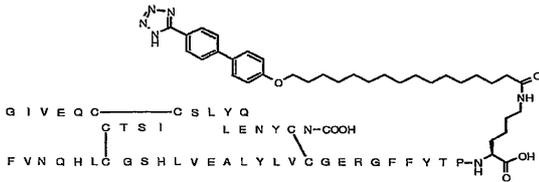


N^εB²⁹-(16-2H-테트라졸-5-일-헥사데카노일)감마-Glu-데스(B30) 인간 인슐린,

N^{B29ε}-4-[4''-(1H-테트라졸-5-일)-[1,1',4',1'']테르페닐-4-일옥시]-부티로일 데스(B30)인슐린



N^{B29ε}-16-[4'-(1H-테트라졸-5-일)-비페닐-4-일옥시]-헥사데카노일 데스(B30) 인슐린



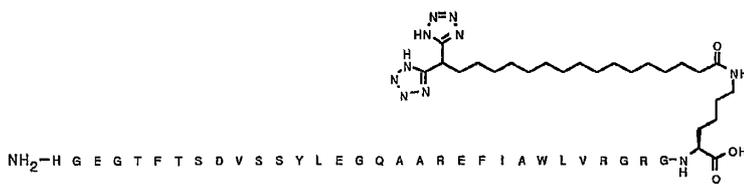
N^{ε37}-16-(4-(4-(5-테트라졸일)페닐)페닐옥시)헥사데카노일-[Gly8,Arg26,34]GLP-1-(7-37)펩티드



N^{ε37}-(4-(4-(4-(4-(5-테트라졸일)페닐)페닐)페녹시)부티릴)[Gly8,Arg26,34]GLP-1-(7-37)펩티드



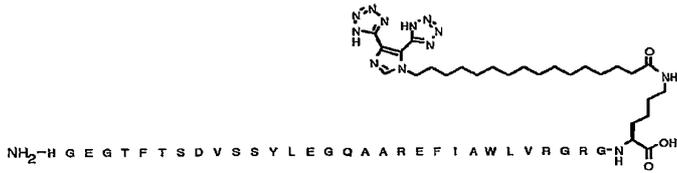
N^{ε37}-(17,17-비스(5-테트라졸일)헵타데카노일)[Gly8,Arg26,34]GLP-1-(7-37)펩티드



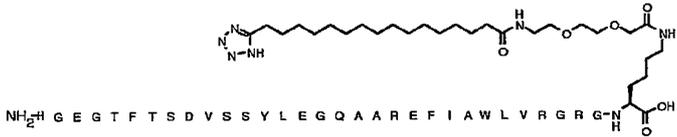
N^{ε37}-(4-(4'-{5-[4-(5-테트라졸일)페닐]-[1,2,4]옥사디아졸-3-일}비페닐-4-일옥시)부티릴)[Gly8,Arg26,34]GLP-1-(7-37)펩티드



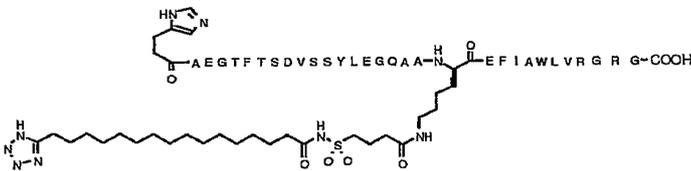
N^{ε37}-(16-(4,5-비스(5-테트라졸일)이미다졸-1-일)헥사데카노일)[Gly8,Arg26,34]GLP-1-(7-37)펩티드



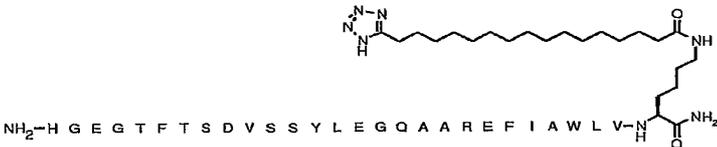
N^ε37-((2-(2-(16-(5-테트라졸일)헥사데카노일아미노)에톡시)에톡시)아세틸)[Gly8,Arg26,34]GLP-1-(7-37)펩티드



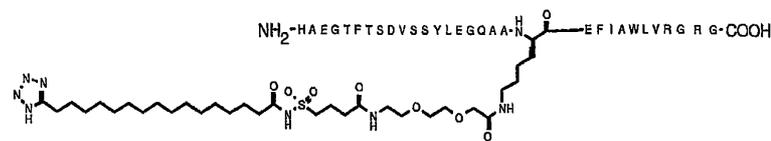
N^ε26-(4-{16-(테트라졸-5-일)헥사데카노일술폰과모일}부티릴)[(3-(4-이미다졸일)프로피오닐7,Arg34]GLP-1-(7-37)펩티드



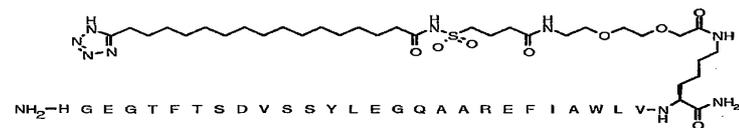
N^ε34-(16-{테트라졸-5-일}헥사데카노일)-[Gly8,Arg26]GLP-1(7-34)펩티드아미드



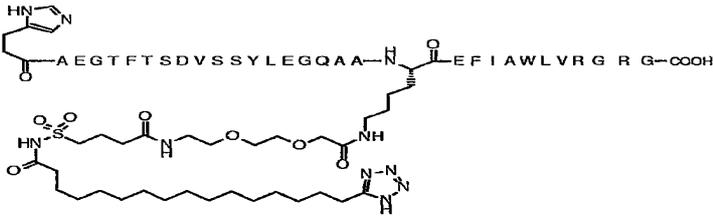
N^ε26-({2-[2-(4-(16-(테트라졸-5-일)헥사데카노일술폰과모일)부티릴아미노)에톡시]에톡시)아세틸)-[Arg34]GLP-1(7-37)펩티드



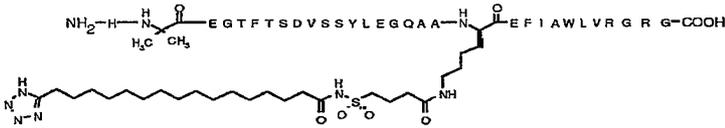
N^ε34-({2-[2-(4-(16-(테트라졸-5-일)헥사데카노일술폰과모일)부티릴아미노)에톡시]에톡시)아세틸)-[Arg26]GLP-1(7-34)펩티드아미드



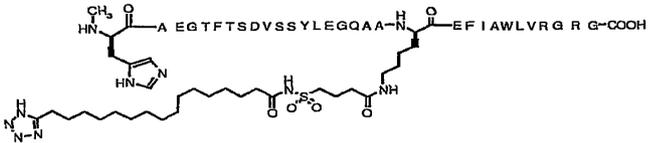
N^ε26-({2-[2-(4-(16-(테트라졸-5-일)헥사데카노일술폰과모일)부티릴아미노)에톡시]에톡시)아세틸)-[(3-(4-이미다졸일)프로피오닐7,Arg34]GLP-1(7-37)펩티드



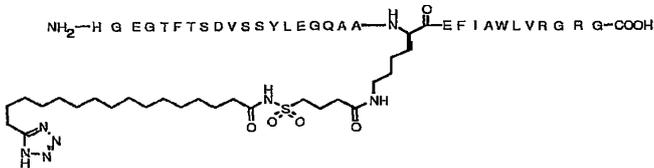
N^ε26-(4-(16-(테트라졸-5-일)헥사데카노일술폰과모일)부틸)-[Aib8,Arg34]GLP-1-(7-37)펩티드



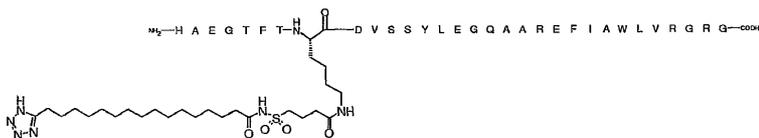
N^α7(Me)N^ε26-(4-(16-(테트라졸-5-일)헥사데카노일술폰과모일)부틸)-[Arg34]GLP-1-(7-37)펩티드



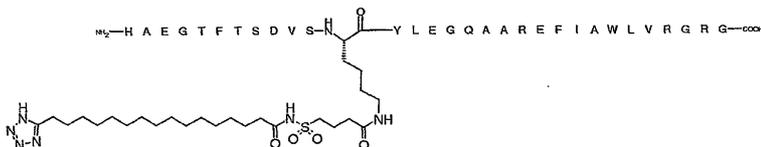
N^ε26-(4-(16-(테트라졸-5-일)헥사데카노일술폰과모일)부틸)-[Gly8,Arg34]GLP-1-(7-37)펩티드



N^ε14-(4-(16-(테트라졸-5-일)헥사데카노일술폰과모일)부틸)-[Lys14;Arg26,34]GLP-1(7-37)펩티드

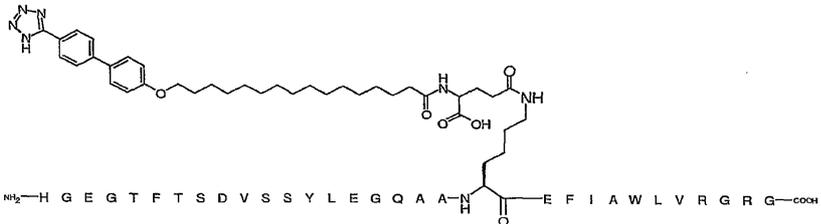
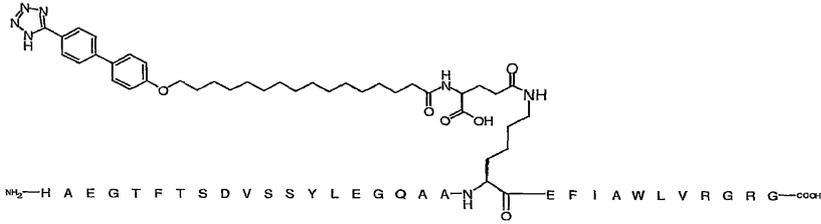
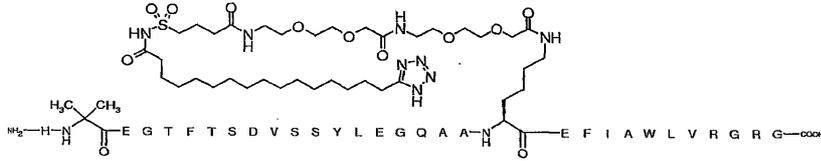


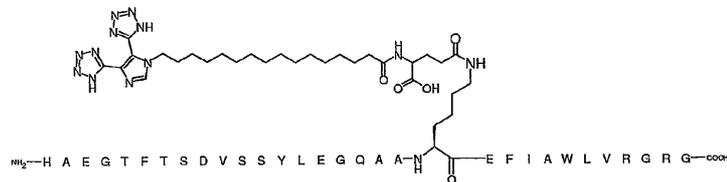
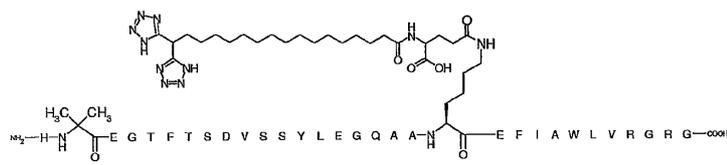
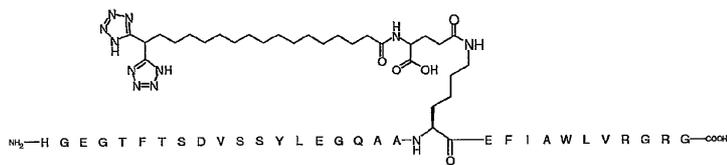
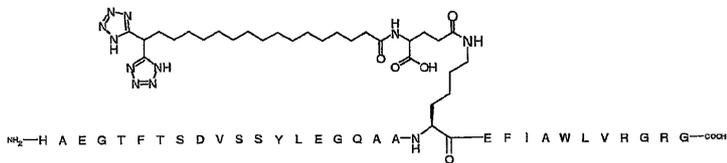
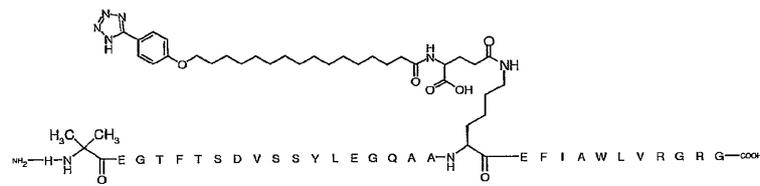
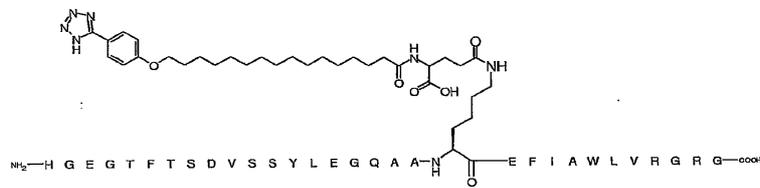
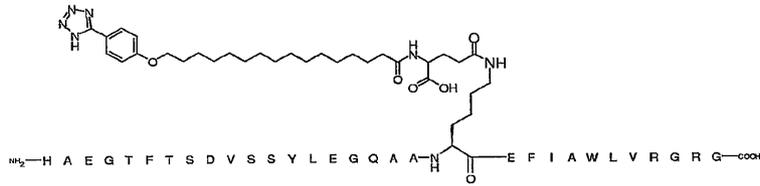
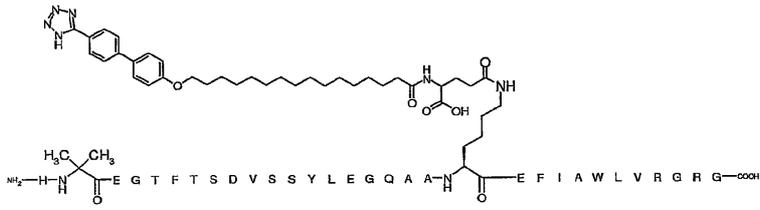
N^ε18-(4-(16-(테트라졸-5-일)헥사데카노일술폰과모일)부틸)-[Lys18;Arg26,34]GLP-1-(7-37)펩티드

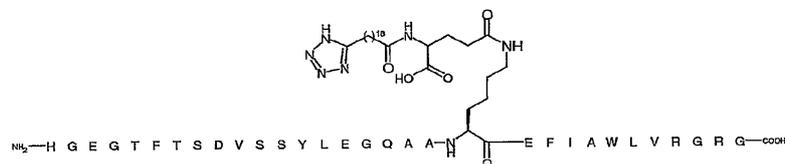
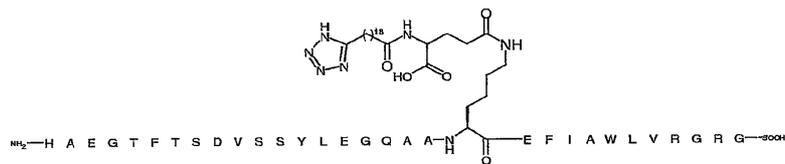
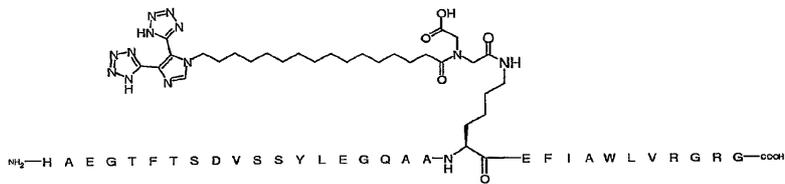
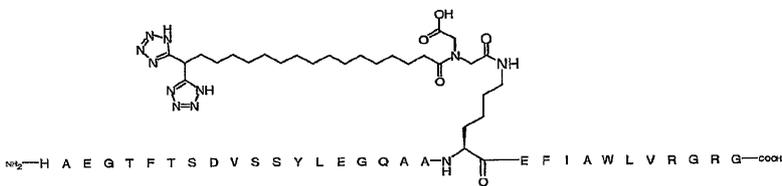
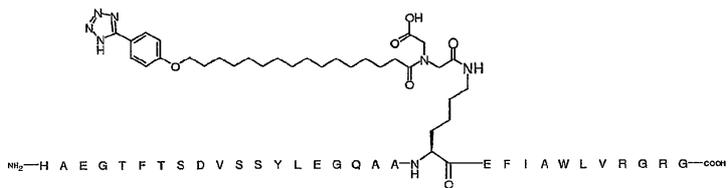
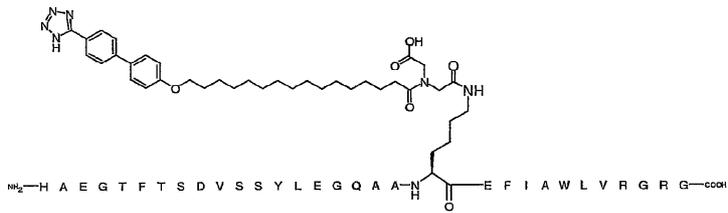
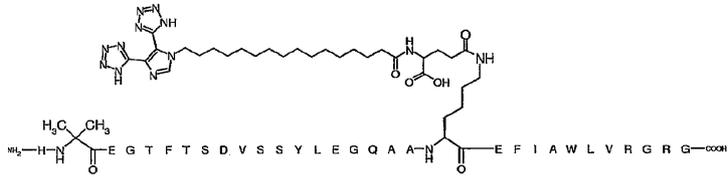
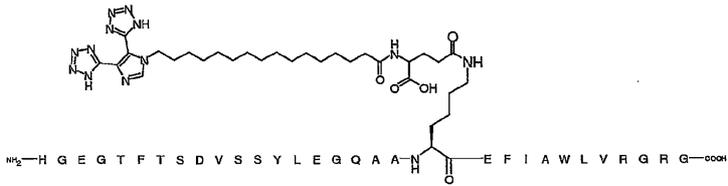


N^ε18-(4-(16-(테트라졸-5-일)헥사데카노일술폰과모일)부틸)-[Gly8;Lys18;Arg26,34]GLP-1-(7-37)펩티드

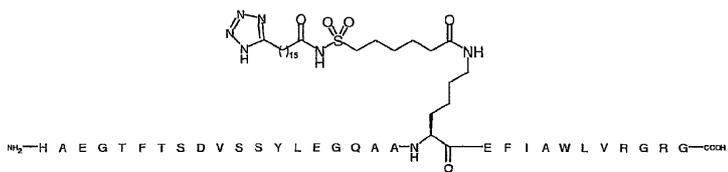
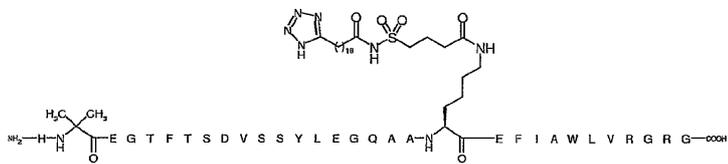
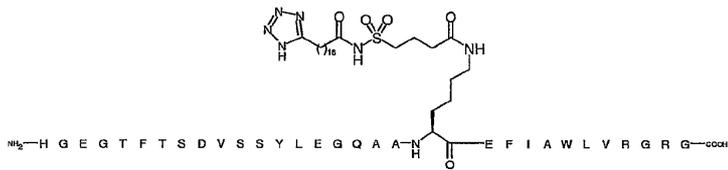
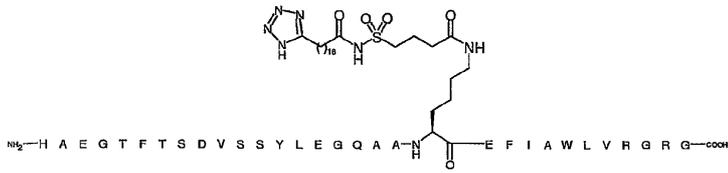
N^ε26-((2-(2-(2-(2-(2-(4-(16-(테트라졸-5-일)헥사데카노일술포모일)부티릴)에톡시)에톡시)아세틸아미노)에톡시)에톡시)아세틸)-[Aib8,Arg34]GLP-1-(7-37)펩티드

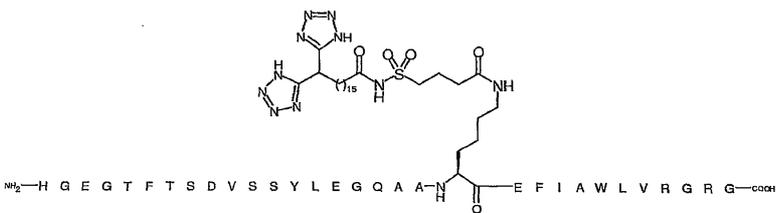
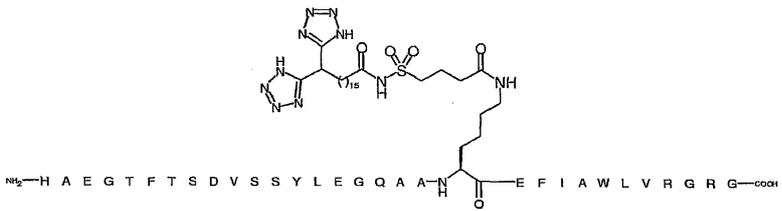
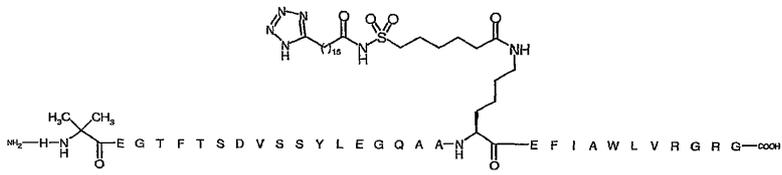
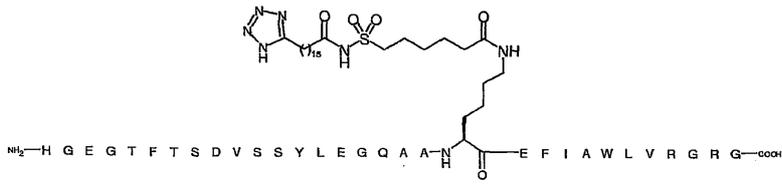


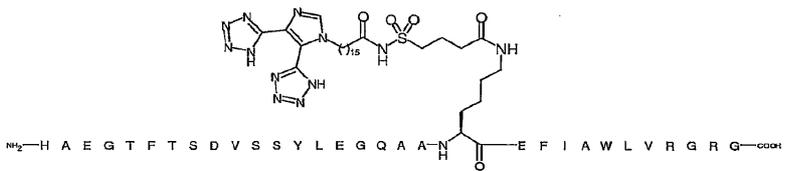
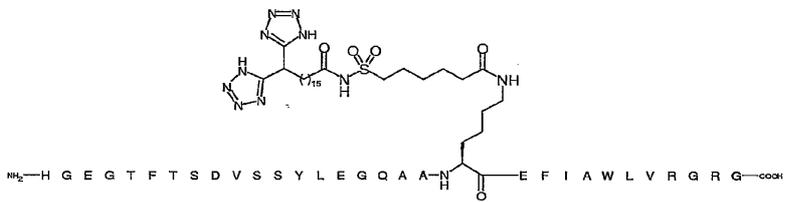
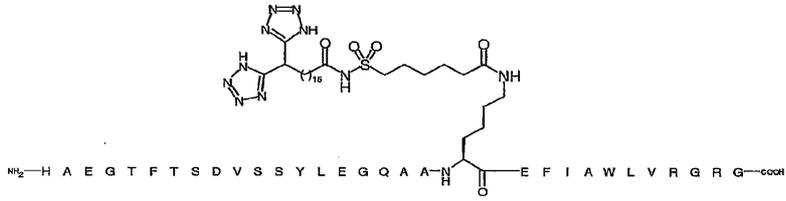
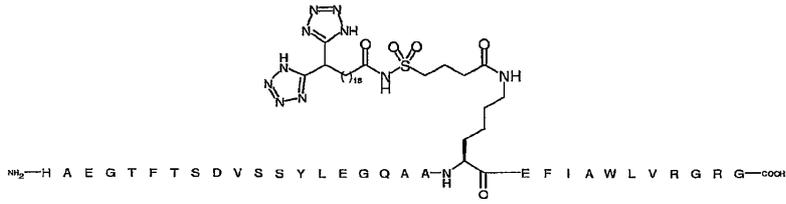


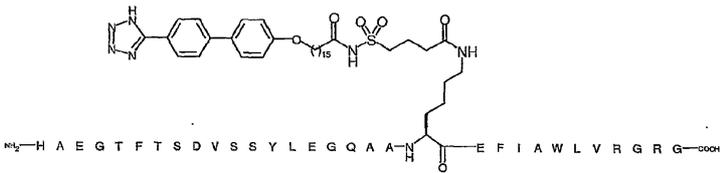
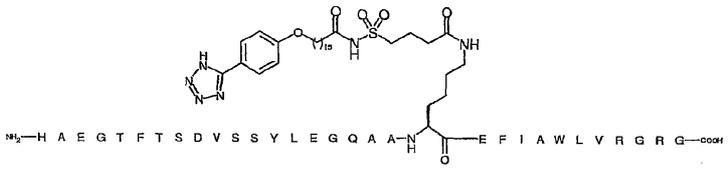
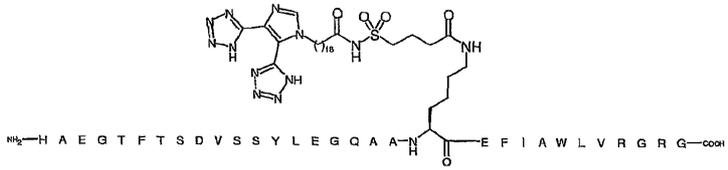
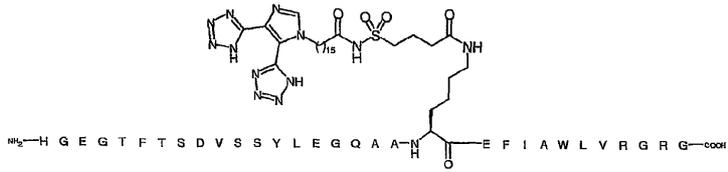


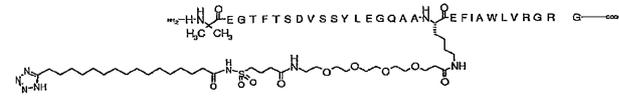
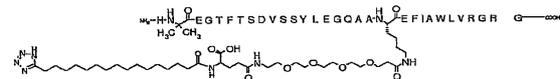
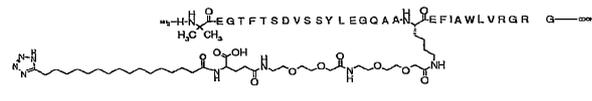
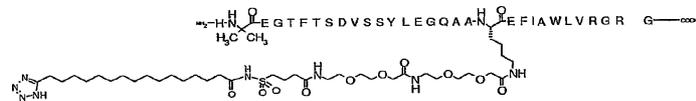
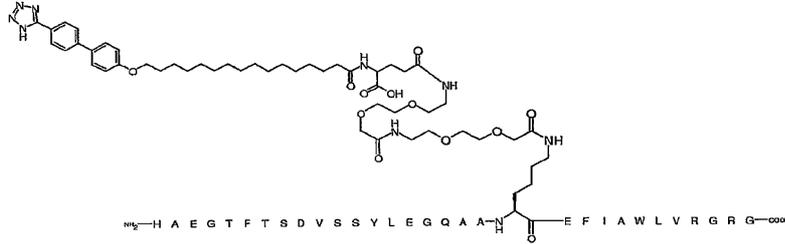
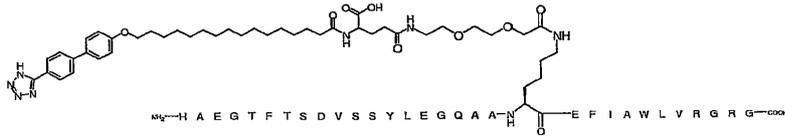
N^ε26-(4-(19-(테트라졸-5-일)노나데카노일술포모일)부티릴)[Arg34]GLP-1-(7-37)펩티드.











또 다른 관점에서 본 발명은 화학식 (I)에 따른 화합물을 제공하는데, 여기서 분자는 인간 성장 호르몬 또는 이것의 유사체이다.

또 다른 관점에서 본 발명은 화학식 (I)에 따른 화합물을 제공하는데, 여기서 분자는 인간 인슐린 또는 이것의 유사체이다.

또 다른 관점에서 본 발명은 화학식 (I)에 따른 화합물을 제공하는데, 여기서 분자는 인자 VII 또는 이것의 유사체이다.

또 다른 관점에서 본 발명은 화학식 (I)에 따른 화합물을 제공하는데, 여기서 분자는 부갑상선 호르몬 또는 이것의 유사체이다.

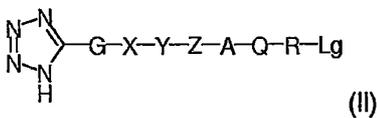
또 다른 관점에서 본 발명은 화학식 (I)에 따른 화합물을 제공하는데, 여기서 분자는 인간 여포자극 호르몬 또는 이것의 유사체이다.

또 다른 구체예에서 본 발명은 화학식 (I)에 따른 화합물을 제공하며, 여기서 분자는 분자량이 100kDa 미만, 50kDa 미만, 또는 10 kDa 미만이다.

다른 관점에서 본 발명은 화학식 (I)에 따른 화합물을 제공하며, 여기서 분자는 혈소판-유도 성장인자(PDGF), 형질변환 성장인자 α (TGF- α), 형질변환 성장인자 β (TGF- β), 상피 성장인자(EGF), 혈관내피 성장인자(VEGF)와 같은 성장인자; 인슐린 성장인자 I(IGF-I), 인슐린 성장인자 II(IGF-II), 에리트로포이에틴(EPO), 트롬보포이에틴(TPO) 또는 안지오프이에틴과 같은 소마토메딘; 인터페론; 프로-우로키나아제; 우로키나아제; 조직 플라스미노겐 활성화제(t-PA); 플라스미노겐 활성화제 저해제 1; 플라스미노겐 활성화제 저해제 2; von Willebrandt 인자; 사이토킨, 예컨대 인터류킨(IL) 1, IL-1Ra, IL-2,

IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-11, IL-12, IL-13, IL-15, IL-16, IL-17, IL-18, IL-20 또는 IL-21과 같은 인터류킨; GM-CSF와 같은 콜로니 자극인자(CFS); 줄기세포 인자, TNF- α , 림프독소- α , 림프독소- β , CD40L, 또는 CD30L과 같은 종양 괴사인자; 프로테아제 저해제 예컨대 아프로티닌; 수퍼옥시드 디스뮤타제, 아스파라기나제, 아르기나제, 아르기닌 데아미나제, 아데노신 데아미나제, 리보뉴클레아제, 카탈라제, 우리카제, 빌리루빈 옥시다아제, 트립신, 파파인, 알칼리성 포스파타제, β -글루코코니다제, 퓨린 뉴클레오시드 포스포릴라제 또는 바트록소빈과 같은 효소; 오피오이드, 예컨대 엔돌핀, 엔케팔린 또는 비천연 오피오이드; 호르몬 또는 뉴로펩티드, 예컨대 칼시토닌, 글루카곤, 가스트린, 아드레노코르티코트로피 호르몬(ACTH), 콜레시스토키닌, 황체형성 호르몬, 고나도트로핀-방출 호르몬, 융모성 생식선자극 호르몬, 코르티코트로핀-방출 인자, 바소프레신, 옥시토신, 항이뇨 호르몬, 갑상선 자극 호르몬, 티로트로핀-방출 호르몬, 릴렉신, 프롤락틴, 펩티드 YY, 뉴로펩티드 Y, 췌장 폴리펩티드, 랩틴, CART(코카인 및 암페타민 조절된 전사), CART 관련 펩티드, 페릴리핀, MC-4와 같은 멜라노코르틴(멜라닌세포-자극 호르몬), 멜라닌-농축 호르몬, 나트륨이뇨 펩티드, 아드레노메둘린, 엔도텔린, 세크레틴, 아밀린, 혈관활성 장 펩티드(VIP), 뇌하수체 아데닐레이트 시클라제 활성화 폴리펩티드(PACAP), 붐베신, 붐베신-유사 펩티드, 티모신, 헤파린-결합 단백질, 가용성 CD4, 시상하부 방출인자, 멜라노토닌; 및 그것의 유도체로 구성되는 군으로부터 선택된다.

또 다른 관점에서 본 발명은 일반식 (II)에 따른 화합물을 제공하며,



여기서 G, X, Y, Z, A, Q, 및 R은 청구범위 제3항에 정의된 기능을 나타내며, Lg는 Cl, Br, I, OH, -OSO₂Me, -OSO₂CF₃, -OTs, -SMe₂⁺, -OSu, -OBt, -OAt, -OPh, 또는 -O(4-NO₂)Ph와 같은 이탈기이다.

또 다른 관점에서 본 발명은 화학식 (I)에 따른 화합물의 합성을 위한 화학식 (II)에 따른 화합물의 사용을 제공한다.

치료 폴리펩티드는 고전적 펩티드 합성, 예컨대, t-Boc 또는 F-Moc 화학, 또는 기타 잘 정립된 기술들을 사용하여 고체상 펩티드 합성에 의해서 제조될 수 있다, 예컨대, Green and Wuts, "Protecting Groups in Organic Synthesis", Jogn Wiley & Sons, 1999을 참조.

치료 폴리펩티드는 또한 폴리펩티드를 인코딩하고, 적절한 영양 배지 내에서 펩티드의 발현을 허용하는 조건 하에서 그 폴리펩티드를 발현할 수 있는 DNA 서열을 함유한 숙주세포를 배양하는 단계를 포함하는 방법에 의해 생산될 수 있고, 그 후 결과된 펩티드는 배양으로부터 회수된다.

세포를 배양하는데 사용된 배지는, 적당한 보충물을 함유하는 최소 또는 복합 배지와 같이, 숙주세포를 성장시키는데 적절한 어떠한 종래의 배지도 될 수 있다. 적절한 배지는 시중 공급사로부터 얻을 수 있고, 또는 (예컨대 American Type Culture Collection의 목록에서) 공개된 제조법에 따라 제조될 수 있다. 세포에 의해 생산된 펩티드를 그 후 원심분리 또는 여과에 의해 배지로부터 숙주세포를 분리하는 단계를 포함하는 종래의 과정에 의해 배양 배지로부터 회수할 수 있다. 세포 외 생성물을 위하여, 상청액의 단백질성 성분들은 해당 폴리펩티드의 형태에 따라, 여과, 컬럼 크로마토그래피, 또는 침전, 예컨대 미세여과, 한외여과, 등전위 침전, 다양한 크로마토그래피 과정, 예컨대 이온교환 크로마토그래피, 소수성 상호작용 크로마토그래피, 겔 여과 크로마토그래피, 친화력 크로마토그래피 등에 의한 정제에 의해 분리할 수 있다. 세포 내 또는 세포막간(periplasm) 생성물을 위하여, 배양배지로부터 분리된 세포를 분해 또는 삼투하고, 폴리펩티드 생성물 또는 그것의 전구체를 회수하기 위하여 추출한다.

치료 폴리펩티드를 인코딩하는 DNA 서열은, 예컨대 게놈 또는 cDNA 라이브러리를 제조하고, 표준 기술에 따른 합성올리고뉴클레오티드 프로브를 사용하는 혼성화에 의해 전부 또는 일부의 폴리펩티드를 코드화하는 DNA 서열을 스크리닝함으로써 얻어진, 게놈 또는 cDNA 유래의 것이 적절할 수 있다(예컨대, Sambrook, J, Fritsch, EF and Maniatis, T, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 1989 참조). 폴리펩티드를 인코딩하는 DNA 서열은 또한 확립된 표준방법, 예컨대 Beaucage and Caruthers, Tetrahedron Letters 22 (1981), 1859-1869에 의해 기술된 포스포아미다이트 방법, 또는 Matthes et al., EMBO Journal 3(1984), 801-805에 의해 기술된 방법에 의해 합성하여 제조할 수 있다. DNA 서열은 또한 특정 프라이머를 사용하는 폴리머라제 연쇄반응에 의해, 예컨대 미국특허번호 제4,683,202호 또는 Saiki et al., Science 239 (1988), 487-491에서 기술된 바와 같이 제조할 수 있다.

DNA 서열은 재조합 DNA 과정에 편리하게 적용될 수 있는 어떠한 벡터 내에도 삽입할 수 있고, 벡터의 선택은 종종 그것이 도입될 숙주세포에 의존할 것이다. 따라서, 벡터는 자발적으로 복제하는 벡터, 즉 염색체의 존재로서 존재하는 벡터가 될 수 있고, 그것의 복제는, 예컨대 플라스미드처럼 염색체 복제에 독립적이다. 대안으로서, 벡터는 숙주세포 내로 도입될 때 숙주세포 계놈 내로 통합되어 그 통합된 염색체(들)과 함께 복제되는 것이 될 수 있다.

벡터는 바람직하게는 폴리펩티드를 인코딩하는 DNA 서열이 프로모터와 같은 DNA의 전사에 필요한 추가적 세그먼트에 작동가능하게 연결되는 발현벡터이다. 프로모터는 선택의 숙주세포에서 전사활성을 나타내는 어떠한 DNA 서열도 될 수 있고 숙주세포에 대해 상동성 또는 이종성 단백질을 인코딩하는 유전자로부터 유래될 수 있다. 다양한 숙주세포에서 본 발명의 펩티드를 인코딩하는 DNA의 전사를 지시하는데 적절한 프로모터의 예는 본 분야에 잘 알려져 있다, 예컨대 상기 Sambrook et al. 참조.

펩티드를 인코딩하는 DNA 서열은 또한, 필요한 경우, 적절한 터미네이터, 폴리아데닐화 신호, 전사 인핸서 서열, 및 번역 인핸서 서열에 작동가능하게 연결될 수 있다. 본 발명의 재조합 벡터는 벡터가 문제의 숙주세포에서 복제하도록 하는 DNA 서열을 더 포함할 수 있다.

벡터는 또한 선택가능 마커, 예컨대 숙주세포 내의 결함을 보충하는 생산물의 유전자 또는 약물, 예컨대 암피실린, 카나마이신, 테트라사이클린, 클로람페니콜, 네오마이신, 히그로마이신 또는 메토크렉세이트에 저항성을 부여하는 유전자를 포함한다. 대량생산을 위해서, 선택가능 마커는 바람직하게는 항생제 저항성이 아니다, 예컨대 벡터가 대량생산에 사용될 때 벡터 내의 항생제 저항 유전자는 바람직하게는 절단된다. 벡터로부터 항생제 저항성 유전자를 제거하기 위한 방법은 본 분야에 잘 알려져 있다, 예컨대 여기에 참고문헌으로 포함된 미국특허번호 제6,358,705호를 참조.

본 발명의 모 펩티드를 숙주세포의 분비경로 내로 안내하기 위해, (리더서열, 프리프로서열 또는 프리서열로 또한 알려져 있는) 분비 신호서열이 재조합 벡터 내에 제공될 수 있다. 분비 신호서열은 정확한 관독 프레임으로 펩티드를 인코딩하는 DNA 서열에 결합된다. 분비 신호서열은 통상 펩티드를 인코딩하는 DNA 서열에 대하여 5'에 위치한다. 분비 신호서열은 펩티드와 보통 연합된 것이거나 또는 다른 분비되는 단백질을 인코딩하는 유전자로부터 유래된 것일 수 있다.

본 발명의 펩티드를 코딩하는 DNA 서열, 프로모터 및 선택적으로 터미네이터 및/또는 분비 신호서열을 각각 결합하고, 이들을 복제에 필요한 정보를 포함하는 적절한 벡터 내로 삽입하는데 사용하는 과정은 당업자들에게 잘 알려져 있다 (예컨대, 상기 Sambrook et al.을 참조).

DNA 서열 또는 재조합 벡터가 도입되는 숙주세포는 본 발명의 펩티드를 제조할 수 있는 어떠한 세포도 될 수 있는데, 박테리아, 효모, 균류 및 고등 진핵세포를 포함한다. 본 분야에 잘 알려져 사용되는 적절한 숙주세포의 예는, 제한됨이 없이, 대장균(*E. coli*), 사카로마이시스 세레비시아(*Saccharomyces cerevisiae*), 또는 포유동물 BHK 또는 CHO 세포주이다.

본 발명에 따른 화합물을 포함하는 약학조성물은, 예컨대 Remington's *Pharmaceutical Sciences*, 1985 또는 Remington: *The Science and Practice of Pharmacy*, 제19판, 1995에 기술된 바와 같은 종래기술에 의해 제조될 수 있다.

본 발명의 한가지 목표는 약 0.1 mg/ml 내지 약 25 mg/ml의 농도로 존재하는, 본 발명에 따른 화합물을 포함하는 약학제제를 제공하는 것인데, 여기서 상기 제제는 2.0 내지 10.0의 pH를 가진다. 제제는 완충액 시스템, 보존제(들), 등장성 작용제(들), 킬레이트제(들), 안정화제 및 계면활성제를 더 포함할 수 있다. 본 발명의 한 구체예에서 약학제제는 수성제제, 즉 물을 포함하는 제제이다. 그러한 제제는 전형적으로 용액 또는 현탁액이다. 본 발명의 더 나아간 구체예에서 약학제제는 수성용액이다. 용어 "수성 제제"는 적어도 50%w/w 물을 포함하는 제제로서 정의된다. 마찬가지로, 용어 "수성 용액"은 적어도 50%w/w 물을 포함하는 용액으로서 정의되고, 용어 "수성 현탁액"은 적어도 50%w/w 물을 포함하는 현탁액으로서 정의된다.

또 다른 구체예에 있어서 약학제제는 동결건조 제제이고, 거기에 내과 의사 또는 환자가 사용 전에 용제 및/또는 희석제를 첨가한다.

또 다른 구체예에 있어서 약학제제는 어떠한 사전 용해 없이도 사용할 준비가 된 (예컨대 동결건조 또는 분무건조 된) 건조제제이다.

더 나아가 관점에서 본 발명은 본 발명에 따른 화합물의 수성 용액, 및 완충액을 포함하는 약학제제에 관련되며, 여기서 상기 화합물은 0.1mg/ml 또는 그 이상의 농도로 존재하고, 여기서 상기 제제는 약 2.0 내지 약 10.0의 pH를 가진다.

더 나아가 관점에서 본 발명은 본 발명에 따른 화합물의 수성 용액을 포함하는 약학제제에 관련되며, 여기서 상기 화합물은 0.1mg/ml 또는 그 이상의 농도로 존재하고, 여기서 상기 제제는 약 7.0 내지 약 8.5의 pH를 갖는다.

본 발명의 또 다른 구체예에서 제제의 pH는 2.0, 2.1, 2.2, 2.3, 2.4, 2.5, 2.6, 2.7, 2.8, 2.9, 3.0, 3.1, 3.2, 3.3, 3.4, 3.5, 3.6, 3.7, 3.8, 3.9, 4.0, 4.1, 4.2, 4.3, 4.4, 4.5, 4.6, 4.7, 4.8, 4.9, 5.0, 5.1, 5.2, 5.3, 5.4, 5.5, 5.6, 5.7, 5.8, 5.9, 6.0, 6.1, 6.2, 6.3, 6.4, 6.5, 6.6, 6.7, 6.8, 6.9, 7.0, 7.1, 7.2, 7.3, 7.4, 7.5, 7.6, 7.7, 7.8, 7.9, 8.0, 8.1, 8.2, 8.3, 8.4, 8.5, 8.6, 8.7, 8.8, 8.9, 9.0, 9.1, 9.2, 9.3, 9.4, 9.5, 9.6, 9.7, 9.8, 9.9, 및 10.0으로 구성되는 리스트로부터 선택된다.

본 발명의 더 나아가 구체예에서 완충액은 나트륨 아세테이트, 나트륨 카보네이트, 시트레이트, 글리실글리신, 히스티딘, 글리신, 리신, 아르기닌, 나트륨 이수소 포스페이트, 이나트륨 수소 포스페이트, 나트륨 포스페이트, 및 트리스(히드록시메틸)-아미노메탄, 바이신, 트리신, 말산, 숙시네이트, 말레산, 푸마르산, 타르타르산, 아스파르트산 또는 그것의 혼합물로 구성되는 군으로부터 선택된다. 이들 특정 완충액의 각각은 본 발명의 대안적 구체예를 구성한다.

본 발명의 더 나아가 구체예에서 제제는 약학적으로 허용가능한 보존제를 더 포함한다. 본 발명의 더 나아가 구체예에서 보존제는 페놀, o-크레졸, m-크레졸, p-크레졸, 메틸 p-히드록시벤조에이트, 프로필 p-히드록시벤조에이트, 2-페녹시에탄올, 부틸 p-히드록시벤조에이트, 2-페닐에탄올, 벤질 알코올, 클로로부탄올, 및 티오메로살, 브로노폴, 벤조산, 이미드우레아, 클로로헥시딘, 나트륨 디하이드로아세테이트, 클로로크레졸, 에틸 p-히드록시벤조에이트, 벤제토늄 클로라이드, 클로르페니신 (3p-클로르페녹시프로페인-1,2-디올) 또는 그것의 혼합물로 구성되는 군으로부터 선택된다. 본 발명의 더 나아가 구체예에서 보존제는 0.1 mg/ml 내지 20 mg/ml의 농도로 존재한다. 본 발명의 더 나아가 구체예에서 보존제는 0.1 mg/ml 내지 5 mg/ml의 농도로 존재한다. 본 발명의 더 나아가 구체예에서 보존제는 5 mg/ml 내지 10 mg/ml의 농도로 존재한다. 본 발명의 더 나아가 구체예에서 보존제는 10 mg/ml 내지 20 mg/ml의 농도로 존재한다. 이들 특정 보존제의 각각은 본 발명의 대안적 구체예를 구성한다. 약학조성물 내의 보존제의 사용은 당업자에게 잘 알려져 있다. 편의를 위해 Remington: *The Science and Practice of Pharmacy*, 제19판, 1995가 참조 된다.

본 발명의 더 나아가 구체예에서 제제는 등장제를 더 포함한다. 본 발명의 더 나아가 구체예에서 등장제는 염(예컨대 염화나트륨), 당 또는 당 알코올, 아미노산(예컨대 L-글리신, L-히스티딘, 아르기닌, 리신, 이소류신, 아스파르트산, 트립토판, 트레오닌), 알디톨(예컨대 글리세롤(글리세린), 1,2-프로판디올(프로필렌글리콜), 1,3-프로판디올, 1,3-부탄디올) 폴리 에틸렌글리콜(예컨대 PEG400), 또는 그것의 혼합물로 구성되는 군으로부터 선택된다. 예컨대 과당, 포도당, 만노스, 소르보스, 자일로스, 말토스, 락토오스, 수크로스, 트레할로스, 텍스트란, 폴룰란, 텍스트린, 시클로텍스트린, 가용성 녹말, 히드록시에틸 녹말 및 카르복시메틸셀룰로오스-Na을 포함하는 단당류, 이당류, 또는 다당류, 또는 수용성 글루칸과 같은 어떠한 당도 사용될 수 있다. 한 구체예에서 당 첨가제는 수크로스이다. 당 알코올은 적어도 하나의 --OH 기를 갖는 C4-C8 탄화수소로서 정의되고, 예컨대, 만니톨, 소르비톨, 이노시톨, 갈라시티톨, 돌시톨, 자일리톨, 및 아라비톨을 포함한다. 한 구체예에서 당 알코올 첨가제는 만니톨이다. 상기 언급된 당 또는 당 알코올은 개별적으로 또는 조합으로 사용될 수 있다. 당 또는 당 알코올이 액체 제조에서 가용성이고 본 발명의 방법을 사용하여 달성된 안정화 효과에 나쁜 영향을 주지 않는 한, 사용된 양에 대한 고정된 제한치는 없다. 한 구체예에서, 당 또는 당 알코올 농도는 약 1mg/ml 내지 약 150mg/ml이다. 본 발명의 더 나아가 구체예에서 등장제는 1mg/ml 내지 50mg/ml의 농도로 존재한다. 본 발명의 더 나아가 구체예에서 등장제는 1mg/ml 내지 7mg/ml의 농도로 존재한다. 본 발명의 더 나아가 구체예에서 등장제는 8mg/ml 내지 24mg/ml의 농도로 존재한다. 본 발명의 더 나아가 구체예에서 등장제는 25mg/ml 내지 50mg/ml의 농도로 존재한다. 이들 특정 등장제의 각각은 본 발명의 대안적 구체예를 구성한다. 약학조성물에서 등장제의 사용은 당업자에게 잘 알려져 있다. 편의를 위해서 Remington: *The Science and Practice of Pharmacy*, 제19판, 1995가 참조 된다.

본 발명의 더 나아가 구체예에서 제제는 킬레이트제를 더 포함한다. 본 발명의 더 나아가 구체예에서 킬레이트제는 에틸렌디아민테트라아세트산(EDTA), 시트르산, 및 아스파르트산의 염, 및 그것의 혼합물로부터 선택된다. 본 발명의 더 나아가 구체예에서 킬레이트제는 0.1mg/ml 내지 5mg/ml의 농도로 존재한다. 본 발명의 더 나아가 구체예에서 킬레이트제는 0.1mg/ml 내지 2mg/ml의 농도로 존재한다. 본 발명의 더 나아가 구체예에서 킬레이트제는 2mg/ml 내지 5mg/ml의 농도로 존재한다. 이들 특정 킬레이트제의 각각은 본 발명의 대안적 구체예를 구성한다. 약학조성물에서 킬레이트제의 사용은 당업자들에게 잘 알려져 있다. 편의를 위해서 Remington: *The Science and Practice of Pharmacy*, 제19판, 1995가 참조 된다.

본 발명의 더 나아가 구체에에서 제제는 안정화제를 더 포함한다. 약학조성물에서 안정화제의 사용은 당업자들에게 잘 알려져 있다. 편의를 위해서 Remington: *The Science and Practice of Pharmacy*, 제19판, 1995가 참조 된다.

더 구체적으로, 본 발명의 조성물은 치료적 활성성분들이 액체 약학제제 내에 저장되는 동안 응집체 형성을 보일 수 있는 폴리펩티드를 포함하는 안정화된 액체 약학조성물이다. "응집체 형성"은 가용성으로, 또는 용액으로부터 침전하는 큰 가지적 응집체로서 남아있을 수 있는, 올리고머 형성이 되는, 폴리펩티드 분자 사이의 물리적 상호작용을 의도한다. "저장하는 동안"은 일단 제조된 액체 약학조성물 또는 제제가 환자에게 즉시 투여되지 않는다는 것을 의도한다. 오히려, 제조 후, 그것은 액체 형태로, 냉동 상태로, 또는 액체 형태로 추후 재구성하기 위한 건조 형태 또는 환자에 투여하기에 적절한 기타 형태로 저장을 위해 포장된다. "건조 형태"는 액체 약학조성물 또는 제제가 동결건조(즉, 냉동건조; 예컨대, Williams and Polli (1984) *J. Parenteral Sci. Technol.*, 38: 48-59 참조), 분무건조(Masters (1991) *Spray-Drying Handbook* (제5판; Longman Scientific and Technical, Essez, U.K.), pp. 491-676; Broadhead et al. (1992) *Drug Devel. Ind. Pharm.* 18: 1169-1206; 및 Mumenthaler et al. (1994) *Pharm. Res.* 11: 12-20를 참조), 또는 공기건조(Carpenter and Crowe (1988) *Cryobiology* 25: 459-470; 및 Roser (1991) *Biopharm.* 4: 47-53)에 의해 건조하는 것을 의도한다. 액체 약학조성물의 저장 동안 폴리펩티드에 의한 응집체 형성은 그 폴리펩티드의 생물학적 활성에 부정적으로 영향을 줄 수 있어서, 약학조성물의 치료 효능에 손실을 초래한다. 더 나아가, 응집체 형성은 폴리펩티드-함유 약학조성물이 주입 시스템을 사용하여 투여될 때 관류, 막, 또는 펌프의 막힘과 같은 다른 문제들을 야기할 수 있다.

본 발명의 약학조성물은 조성물의 저장 동안 폴리펩티드에 의한 응집체 형성을 감소시키기에 충분한 양의 아미노산 염기를 더 포함할 수 있다. "아미노산 염기"는 아미노산 또는 아미노산의 조합을 의도하며, 여기서 어떠한 기정 아미노산도 자유염기 형태 또는 염 형태로 존재한다. 아미노산의 조합이 사용되는 경우, 모든 아미노산은 자유염기 형태로 존재할 수 있거나, 모두가 염 형태로 존재할 수 있고, 또는 일부는 자유 염기 형태로 존재하는 반면 다른 것들은 염 형태로 존재할 수 있다. 한 구체에에서, 본 발명의 조성물을 제조하는데 사용된 아미노산은 아르기닌, 리신, 아스파르트산, 및 글루탐산과 같은 하전된 측쇄를 가지는 것들이다. 특정한 아미노산(예컨대 알라닌, 메티오닌, 히스티딘, 이미다졸, 아르기닌, 리신, 이소류신, 아스파르트산, 트립토판, 트레오닌 및 그것의 혼합물)의 어떠한 입체이성체(즉, R- 또는 S-이성체 또는 L-, D- 또는 DL-이성체) 또는 이들 입체이성체의 조합은, 특정 아미노산이 그것의 자유염기 형태 또는 염 형태로 존재하는 한, 본 발명의 약학조성물에 존재할 수 있다. 한 구체에에서 L-입체이성체가 사용되는데, 이는 아미노산의 가장 풍부한 형태를 나타낸다. L-형태는 특정 아미노산에 의존적인 R 또는 S 이성체일 수 있다. 본 발명의 조성물은 또한 이들 아미노산의 유사체와 함께 조제될 수 있다. "아미노산 유사체"는 본 발명의 액체 약학조성물을 저장하는 동안 폴리펩티드에 의한 응집체 형성을 감소하는 바람직한 효과를 야기하는, 자연발생 아미노산의 유도체를 의도한다. 적절한 아르기닌 유사체는 예컨대, 아미노구아니딘, 오르니틴 및 N-모노에틸 L-아르기닌을 포함하고, 적절한 메티오닌 유사체는 S-에틸 호모시스테인 및 S-부틸 호모시스테인을 포함하고, 적절한 시스테인 유사체는 S-메틸-L 시스테인을 포함한다. 다른 아미노산과 같이, 아미노산 유사체는 자유염기 형태 또는 염 형태로 조성물 내에 포함된다. 본 발명의 더 나아가 구체에에서 아미노산 또는 아미노산 유사체가 단백질의 응집을 막거나 지연시키는데 충분한 농도로 사용된다.

본 발명의 더 나아가 구체에에서 메티오닌(또는 다른 황 함유 아미노산 또는 유사 아미노산)은 치료제로서 작용하는 폴리펩티드가, 산화의 영향을 받기 쉬운 적어도 하나의 메티오닌 잔기를 포함하는 폴리펩티드일 때 메티오닌 잔기의 메티오닌 술폭시드로의 산화를 저해하기 위해 첨가될 수 있다. "저해"는 시간경과에 걸쳐서 메티오닌 산화된 종의 최소 축적을 의도한다. 메티오닌 산화의 억제제는 적절한 분자 형태로 폴리펩티드를 더 유지하도록 한다. 메티오닌의 어떠한 입체이성체(L, D 또는 DL 이성체) 또는 그것들의 조합도 사용될 수 있다. 첨가될 양은 메티오닌 술폭시드의 양이 규제관청에 허용가능하도록, 메티오닌 잔기의 산화를 저해하기에 충분한 양이 되어야만 한다. 전형적으로, 이것은 조성물이 약 10% 내지 약 30% 미만의 메티오닌 술폭시드를 포함한다는 것을 의미한다. 일반적으로, 이것은 메티오닌 잔기에 첨가된 메티오닌의 비율을 약 10:1 내지 약 100:1의 범위과 같이 약 1:1 내지 약 1000:1이 되도록 메티오닌을 첨가하여 달성할 수 있다.

본 발명의 더 나아가 구체에에서 제제는 고분자량 중합체 또는 저분자 화합물의 군으로부터 선택된 안정화제를 더 포함한다. 본 발명의 더 나아가 구체에에서 안정화제는 폴리에틸렌 글리콜(예컨대 PEG 3350), 폴리비닐알코올(PVA), 폴리비닐피롤리돈, 카르복시-/히드록시셀룰로오스 또는 그것의 유도체(예컨대 HPC, HPC-SL, HPC-L 및 HPMC), 사이클로덱스트린, 모노티오글리세롤, 티오글리콜산 및 2-메틸티오에탄올과 같은 황 함유 물질, 및 기타 염(예컨대 나트륨 클로라이드)로부터 선택된다. 이들 특이적 안정화제의 각각은 본 발명의 대안적 구체에를 구성한다.

약학조성물은 또한 거기에서 치료적으로 활성인 폴리펩티드의 안정성을 더욱 증가시키는 추가 안정화제를 포함할 수 있다. 본 발명에서 특히 관심있는 안정화제는, 메티오닌 산화로부터 폴리펩티드를 보호하는 메티오닌 및 EDTA, 및 동결-해동 또는 기계적 전단과 연관된 응집으로부터 폴리펩티드를 보호하는 비이온 계면활성제를 포함하나, 이에 한정되지는 않는다.

본 발명의 더 나아간 구체예에서 제제는 계면활성제를 더 포함한다. 본 발명의 더 나아간 구체예에서 계면활성제는 세정제, 에톡실화 캐스터유, 폴리글리콜화 글리세리드, 아세틸화 모노글리세리드, 소르비탄 지방산 에스테르, 폴리옥시프로필렌-폴리옥시에틸렌 블록 중합체(예컨대, Pluronic®F68, 폴록사머 188 및 407, Triton X-100과 같은 폴록사머), 폴리옥시에틸렌 소르비탄 지방산 에스테르, 알킬화 및 알콕실화 유도체와 같은 폴리옥시에틸렌 및 폴리에틸렌 유도체(Tween, 예컨대 Tween-20, Tween-40, Tween-80 및 Brij-35), 모노글리세리드 또는 그것의 에톡실화 유도체, 디글리세리드 또는 그것의 폴리옥시에틸렌 유도체, 알코올, 글리세롤, 레시틴 및 인지질(예컨대, 포스파티딜 세린, 포스파티딜 콜린, 포스파티딜 에탄올아민, 포스파티딜 이노시톨, 디포스파티딜 글리세롤 및 스펅고마이엘린), 인지질의 유도체(예컨대, 디팔미토일 포스파티드산) 및 리소인지질(예컨대, 팔미토일리소포스파티딜-L-세린 및 에탄올아민, 콜린, 세린 또는 트레오닌의 1-아실-sn-글리세로-3-포스페이트 에스테르) 및 알킬, 알콕실(알킬 에스테르), 리소포스파티딜 및 포스파티딜콜린의 알콕시(알킬 에테르)-유도체, 예컨대 리소포스파티딜콜린, 디팔미토일포스파티딜콜린의 라우로일 및 미리스토일 유도체, 및 극성 머리부위, 즉 콜린, 에탄올아민, 포스파티드산, 세린, 트레오닌, 글리세롤, 이노시톨의 변형, 및 양 하전된 DODAC, DOTMA, DCP, BISHOP, 리소포스파티딜세린 및 리소포스파티딜트레오닌, 및 글리세로인지질(예컨대, 세팔린), 글리세로글리코리피드(예컨대, 갈락토피란소이드), 스펅고당지질(예컨대, 세라미드, 강글리오시드), 도데실포스포콜린, 암탐 달갈리소레시틴, 푸시드산 유도체(예컨대 나트륨 타우로-디히드로푸시데이트 등), 장쇄 지방산 및 C6-C12의 그것의 염(예컨대, 올레산 및 카프릴산), 아실카르니틴 및 유도체, 리신, 아르기닌 또는 히스티딘의 N^α-아실화 유도체, 또는 리신 또는 아르기닌의 측쇄 아실화 유도체, 리신, 아르기닌 또는 히스티딘의 어떠한 조합을 포함하는 디펩티드의 N^α-아실화 유도체 및 중성 또는 산성 아미노산, 중성 아미노산 및 두 개의 하전된 아미노산의 어떠한 조합도 포함하는 트리펩티드의 N^α-아실화 유도체, DSS(도쿠세이트 나트륨, CAS 등록번호 [577-11-7]), 도쿠세이트 칼슘, CAS 등록번호 [128-49-4]), 도쿠세이트 칼륨, CAS 등록번호 [7491-09-0]), SDS (나트륨 도데실 술페이트 또는 나트륨 라우릴 술페이트), 나트륨 카프릴레이트, 콜산 또는 그것의 유도체, 담즙산 및 그것의 염 및 글리신 또는 타우린 컨쥬게이트, 우르소데옥시콜산, 나트륨 콜레이트, 나트륨 데옥시콜레이트, 나트륨 타우로콜레이트, 나트륨 글리코콜레이트, N-헥사데실-N,N-디메틸-3-암모니오-1-프로판술포네이트, 음이온성(알킬-아릴-술포네이트) 1가 계면활성제, 쌍성이온 계면활성제 (예컨대 N-알킬-N,N-디메틸암모니오-1-프로판술포네이트, 3-콜아미도-1-프로필디메틸암모니오-1-프로판술포네이트, 양이온성 계면활성제(4차 암모늄 염기)(예컨대 세틸-트리메틸암모늄 브로마이드, 세틸피리디늄 클로라이드), 비-이온성 계면활성제(예컨대, 도데실 β-D-글루코피라노시드), 프로필렌 옥사이드와 에틸렌 옥사이드의 에틸렌디아민에의 순차적 첨가로부터 유래된 사관능성 블록 중합체인 폴록사민(예컨대, Tetronic의 것)으로부터 선택되거나, 또는 계면활성제는 이미다졸린 유도체, 또는 그것의 혼합물의 군으로부터 선택될 수 있다. 이들 특정 계면활성제의 각각은 본 발명의 대안적인 구체예를 구성한다.

약학조성물 내의 계면활성제의 사용은 당업자에게 잘 알려져 있다. 편의를 위해서 Remington: *The Science and Practice of Pharmacy*, 제19판, 1995을 참조.

다른 성분들이 본 발명의 펩티드 약학제제에 존재하는 것이 가능하다. 그러한 추가적 성분은 습윤제, 유화제, 항산화제, 벌크화제, 독성 변경제, 킬레이트제, 금속 이온, 유성 부형제, 단백질(예컨대, 사람 혈청 알부민, 젤라틴 또는 단백질) 및 쌍성이온(예컨대, 베타인, 타우린, 아르기닌, 글리신, 리신 및 히스티딘과 같은 아미노산)을 포함할 수 있다. 그러한 추가적 성분은, 물론, 본 발명의 약학제제의 전반적 안정성에 해롭게 영향을 끼치지 않아야 한다.

본 발명에 따른 화합물을 포함하는 약학조성물은 여러 위치 예컨대, 피부 및 점막 부위와 같은 국소 위치, 동맥, 정맥, 심장 투여와 같은 흡수를 우회하는 위치, 및 피부, 피하, 근육 또는 복부에 투여와 같은 흡수를 수반하는 위치에 그러한 치료를 필요로 하는 환자에게 투여될 수 있다.

본 발명에 따른 약학조성물의 투여는 여러 가지의 투여경로, 예컨대, 혀, 혀밑, 볼, 입, 경구, 위와 창자에, 코, 폐, 예컨대 세기관지 및 폐포 또는 그것의 조합, 상피, 피부, 경피, 질, 직장, 안구, 예컨대 결막, 요관, 및 비경구를 통해서 그러한 치료를 필요로 하는 환자에게 수행될 수 있다.

본 발명의 조성물은 여러 가지의 투약 형태, 예컨대, 용액, 현탁액, 에멀전, 마이크로에멀전, 다중 에멀전, 거품, 고약, 페이스트, 회반죽, 연고, 정제, 코팅된 정제, 린스, 캡슐, 예컨대, 경질 젤라틴 캡슐 및 연질 젤라틴 캡슐, 좌약, 직장 캡슐, 드롭, 젤, 스프레이, 분말, 에어로졸, 흡입제, 안구 드롭, 눈 연고, 눈 린스, 질 페서리, 질 링, 질 연고, 주사 용액, 원위치 변형 용액, 예컨대 원위치 겔화, 원위치 세팅, 원위치 침전화, 원위치 결정화, 주입 용액, 및 임플란트로 투여될 수 있다.

본 발명의 조성물은 화합물의 안정성을 더 증가시키고, 생물학적 이용성을 증가시키거나, 용해도를 증가시키거나, 바람직하지 못한 효과를 감소시키거나, 당업자들에게 잘 알려진 생체리듬치료를 달성하거나, 환자 순응을 증가시키거나, 이들의 조합을 달성하기 위해 더 조제되거나 또는 예컨대 공유적, 소수성 및 정전기적 상호작용을 통하여 약물 담체, 약물 송달 시

스텝 및 진보된 약물 송달 시스템에 부착될 수 있다. 담체, 약물 송달 시스템 및 진보된 약물 송달 시스템의 예는 중합체, 예컨대 셀룰로오스 및 유도체, 다당류, 예컨대 텍스트란 및 유도체, 녹말 및 유도체, 폴리(비닐 알코올), 아크릴레이트 및 메타크릴레이트 중합체, 폴리락트산 및 폴리글리콜산 및 그것의 블록 공중합체, 폴리에틸렌글리콜, 담체 단백질, 예컨대 알부민, 겔, 예컨대, 열겔화 시스템, 예컨대 당업자들에게 잘 알려진 블록 공중합체 시스템, 미셀, 리포솜, 마이크로스피어, 나노입자, 액체 결정 및 그것의 분산, 지질-물 시스템에서 상 거동 분야의 당업자들에게 잘 알려진 L2 상 및 그것의 분산, 중합체 미셀, 다중 에멀전, 자가-유화, 자가-마이크로유화, 사이클로텍스트린 및 그것의 유도체, 및 덴드라이머를 포함하나 이에 제한되지는 않는다.

본 발명의 조성물은 예컨대 계측된 용량 흡입기, 건조 분말 흡입기 및 흡입기, 이 장치들은 당업자들에게 잘 알려져 있음, 를 사용하여 화합물의 폐 투여를 위한 고체, 반고체, 분말 및 용액의 제제에 유용하다.

본 발명의 조성물은 제어된, 지속된, 연장된, 지체된, 및 느린 방출 약물 송달 시스템의 조제에 특히 유용하다. 보다 구체적으로, 그러나 이에 한정됨이 없이, 조성물은 당업자들에게 잘 알려진 비경구 제어된 방출 및 지속적 방출 시스템 (양 시스템은 투여 회수를 수 배 감소하게 함)의 조제에 유용하다. 더욱 더 바람직하게는, 피하 투여되는 제어된 방출 및 지속적 방출 시스템이다. 본 발명의 범위를 제한함이 없이, 유용한 제어된 방출 시스템 및 조성물의 예는 하이드로겔, 유성 겔, 액체 결정, 중합체 미셀, 마이크로스피어, 나노입자이다.

본 발명의 조성물에 유용한 제어된 방출 시스템을 제조하기 위한 방법은 결정화, 응축, 공-결정화, 침전, 공-침전, 유상화, 분산, 고압력 균질화, 캡슐화, 분무 건조, 마이크로캡슐화, 코아세르베이션, 상 분리, 마이크로스피어를 제조하기 위한 용매 증발, 압출 및 초입계 액체공정을 포함하나 이에 제한되지는 않는다. Handbook of Pharmaceutical Controlled Release (Wise, D.L., ed. Marcel Dekker, New York, 2000) 및 Drug and the Pharmaceutical Sciences vol. 99: Protein Formulation and Delivery (MacNally, E.J., ed. Marcel Dekker, New York, 2000)가 일반적인 참고가 된다.

비경구 투여는 주사기, 선택적으로 펜-형 주사기를 사용하여 피하, 근육 내, 복막 내 또는 정맥 내 주사에 의하여 수행될 수 있다. 대안으로는, 비경구 투여는 주입 펌프에 의해서 수행될 수 있다. 더 나아가 선택은 코 또는 폐 스프레이 형태로 본 발명에 따른 화합물의 투여를 위한 용액 또는 현탁액이 될 수 있는 조성물이다. 좀 더 나아가 선택으로서, 본 발명의 화합물을 포함하는 약학조성물은 또한 경피 투여, 예컨대 바늘 없는 주사에 의해 또는 패치, 선택적으로 이온토포레시스 패치로, 또는 점막투여, 예컨대 볼 투여에 적합화 될 수 있다.

용어 "안정화된 제제"는 증가된 물리적 안정성, 증가된 화학적 안정성 또는 증가된 물리적 및 화학적 안정성을 가지는 제제를 지칭한다.

여기서 사용된 용어 단백질 제제의 "물리적 안정성"은 단백질이 열-기계적 스트레스 및/또는 소수성 표면과 계면과 같이, 약해지고 있는 계면과 표면과의 상호작용에 노출된 결과, 단백질이 생물학적으로 비활성 및/또는 불용성 단백질의 응집체를 형성하는 경향을 지칭한다. 수성 단백질 제제의 물리적 안정성은 다양한 기간 동안 다른 온도에서 적절한 용기(예컨대 카트리지 또는 약병)에 채워진 제제를 기계적/물리적 스트레스(예컨대 교반)에 노출시킨 후 시각적 조사 및/또는 탁도 측정에 의해 평가된다. 제제의 시각적 조사는 어두운 배경에서 예리한 초점 광으로 수행된다. 제제의 탁도는 예컨대 0 내지 3의 스케일로 (탁도를 보이지 않는 제제는 시각 스코어 0에 해당하고, 일광에서 시각 탁도를 보이는 제제는 시각 스코어 3에 해당한다) 탁도의 정도를 서열화하는 시각 스코어에 의해 특성결정이 된다. 제제가 일광에서 시각 탁도를 나타낼 때, 그것은 단백질 응집에 관하여 물리적 불안정으로 분류된다. 대안으로는, 제제의 탁도는 당업자들에게 잘 알려진 간단한 탁도 측정에 의해 평가될 수 있다. 수성 단백질 제제의 물리적 안정성은 또한 단백질의 형태적 상태의 분광계 또는 프로브를 사용하여 평가될 수 있다. 프로브는 바람직하게는 단백질의 비천연 형태에 우선적으로 결합하는 소분자이다. 단백질 구조의 소분자 분광 프로브의 한 예는 티오플라빈 T이다. 티오플라빈 T는 아밀로이드 소섬유의 검출을 위해 널리 사용되는 형광 염료이다. 아마도 다른 단백질 구성은 물론이고, 소섬유의 존재 하에서, 티오플라빈 T는 약 450nm에서 새로운 여기 최대 값과 소섬유 단백질 형태와 결합할 때 약 482 nm에서 증가된 방출을 일으킨다. 미결합 티오플라빈 T는 파장에서 본질적으로 비형광이다.

다른 소분자들이 천연 상태에서부터 비천연 상태로의 단백질 구조의 변화에 대한 프로브로서 사용될 수 있다. 예컨대 단백질의 노출된 소수성 패치에 우선적으로 결합하는 "소수성 패치" 프로브. 소수성 패치는 일반적으로 그 천연 상태에서 단백질의 3차 구조 내에 묻히지만, 단백질이 펼쳐지거나 또는 변성하기 시작하면서 노출된다. 이들 소분자 분광 프로브의 예는 안트라센, 아크리딘, 페난트롤린 등과 같은 방향족, 소수성 염료이다. 기타 분광 프로브는 페닐알라닌, 류신, 이소류신, 메티오닌, 및 발린, 등과 같은 소수성 아미노산의 코발트 금속 복합체와 같은 금속-아미노산 복합체이다.

여기서 사용된 용어 단백질 제제의 "화학적 안정성"은 천연 단백질 구조에 비교하였을 때 더 적은 생물학적 효능의 잠재성 및/또는 증가된 면역원 성질의 잠재성을 지니는 화학적 분해 생성물의 형성에 이르는 단백질 구조에서의 화학적 공유 변화를 말한다. 다양한 화학적 분해 생성물은 천연 단백질의 형태와 성질 및 단백질이 노출되는 환경에 따라 형성될 수 있다. 화학적 분해의 제거는 아마도 완전히 회피할 수 없고 증가하는 양의 화학적 분해 산물은 당업자에 의해 잘 알려져 있는 바와 같이 단백질 제제의 저장 및 사용 동안 종종 관찰된다. 대부분의 단백질은 탈아미드화하는 경향이 있는데, 이 과정에서 글루타민 또는 아스파라긴 잔기 내의 측쇄 아미드기가 가수분해되어 유리 카르복시산을 형성한다. 다른 분해경로는 고분자량 변형 생성물의 형성을 수반하는데, 여기서 두 개 이상의 단백질 분자는 공유결합으로 연결된 다이머, 올리고머 및 중합체 분해 생성물의 형성에 이르는 트랜스아미드화 및/또는 디설피드 상호작용을 통해 공유결합으로 서로서로 연결된다 (*Stability of Protein Pharmaceuticals*, Ahem. T.J. & Manning M.C., Plenum Press, New York 1992). (예컨대 메티오닌 잔기의) 산화가 화학적 분해의 다른 변종으로서 언급될 수 있다. 단백질 제제의 화학적 안정성은 다른 환경조건에 노출된 후 (분해 생성물의 형성은 예컨대 상승하는 온도에 의해 종종 가속화될 수 있다) 다양한 시점에서 화학적 분해 생성물의 양을 측정하여 평가할 수 있다. 각각의 개별 분해 생성물의 양은 다양한 크로마토그래피 기술(예컨대 SEC-HPLC 및/또는 RP-HPLC)을 사용하여 분자 크기 및/또는 전하에 따른 분해 생성물의 분리에 의해 종종 결정된다.

따라서, 상기에 요약된 바와 같이, "안정화된 제제"는 증가된 물리적 안정성, 증가된 화학적 안정성 또는 증가된 물리적 및 화학적 안정성을 지닌 제제를 지칭한다. 일반적으로, 제제는 만료일이 도달할 때까지 (추천되는 사용 및 저장 조건에 따른) 사용 및 저장 동안에 안정해야만 한다.

본 발명의 한 구체예에서 본 발명에 따른 화합물을 포함하는 약학제제는 6주 이상의 사용 및 3년 이상의 저장 동안 안정하다.

본 발명의 다른 구체예에 있어서 본 발명에 따른 화합물을 포함하는 약학제제는 4주 이상의 사용 및 3년 이상의 저장 동안 안정하다.

본 발명의 더 나아간 구체예에서 본 발명에 따른 화합물을 포함하는 약학제제는 4주 이상의 사용 및 2년 이상의 저장 동안 안정하다.

본 발명의 보다 더 나아간 구체예에서 화합물을 포함하는 약학제제는 2주의 사용 및 2년 이상의 저장 동안 안정하다.

다른 관점에서 본 발명은 약제의 제조를 위한 본 발명에 따른 화합물의 사용에 관련된다.

본 발명의 한 구체예에서 본 발명에 따른 화합물, 여기서 치료제는 고혈당증, 제2형 당뇨병, 손상된 포도당 내성, 제1형 당뇨병, 비만, 고혈압, 증후군 X, 고지혈증, 독성 혈액량과다증과 연관된 질환, 인지장애, 동맥경화, 심근경색, 관상동맥성 심장질환, 뇌졸중, 및 기타 심혈관질환, 염증성 장 증후군, 소화불량, 및 위궤양의 치료 및 예방용 약제의 제조에 사용되는 GLP-1 펩티드이다.

본 발명의 다른 구체예에서 본 발명에 따른 화합물, 여기서 치료제는 제2형 당뇨병에서 질환 진행을 지체 또는 방지하기 위한 약제의 제조에 사용되는 GLP-1 펩티드이다.

본 발명의 다른 구체예에서 본 발명에 따른 화합물, 여기서 치료제는 음식 섭취를 감소, β -세포의 세포자살을 감소, β -세포 기능 및 β -세포 질량을 증가, β -세포 재생을 자극, 및/또는 β -세포에 대한 포도당 민감성을 회복하기 위한 약제의 제조에 사용되는 GLP-1 펩티드이다.

다른 구체예에 있어서 본 발명은 본 발명에 따른 화합물의 사용에 관련되는데, 여기서 치료제는 소장 증후군, 염증성 장 증후군 또는 Crohns 질환 치료용 약제의 제조를 위한 GLP-2이다.

다른 구체예에 있어서 본 발명은 본 발명에 따른 화합물의 사용에 관련되는데, 여기서 치료제는 고혈당증, 제1형 당뇨병, 제2형 당뇨병 또는 β -세포 결핍 치료용 약제의 제조를 위한 인슐린 펩티드이다.

본 발명에 따른 화합물로 치료는 또한 예컨대 항당뇨제, 항비만제, 식욕조절제, 항고혈압제, 당뇨병에 기인하거나 그와 연관된 합병증의 치료 및/또는 예방을 위한 약제 및 비만에 기인하거나 그와 연관된 합병증 및 질환의 치료 및/또는 예방을 위한 약제로부터 선택된, 제2의 또는 보다 약리학적으로 활성인 물질과 조합될 수 있다. 이들 약리학적으로 활성인 물질의 예는: 인슐린, GLP-1 작용제, 술폰닐유레아, 비구아니드, 메글리티니드, 글루코시다제 저해제, 글루카곤 길항제, DPP-IV

(디펩티딜 펩티다아제-IV) 저해제, 포도당 신합성 및/또는 글리코젠 분해의 자극에 수반된 간 효소의 저해제, 포도당 섭취 조절제, HMG CoA 저해제(스타틴)로서의 항고지혈증제와 같은 지질대사를 변경하는 화합물, 음식물 섭취를 줄이는 화합물, RXR 작용제 및 β -세포의 ATP-의존성 칼륨채널에 작용하는 작용제; 콜레스티라민, 콜레스티폴, 클로피브레이트, 겐피프로질, 로바스타틴, 프라바스타틴, 심바스타틴, 프로부콜, 텍스트로티록신, 네데글리니드, 레파글리니드; 알프레놀롤, 아테놀롤, 티몰롤, 핀돌롤, 프로프라놀롤 및 메토프롤롤과 같은 β -차단제, 벤나제프릴, 캅토프릴, 에날라프릴, 포시노프릴, 리시노프릴, 알라트리오프릴, 퀴나프릴 및 라미프릴과 같은 ACE(안지오텐신 전환효소) 저해제, 니페디핀, 펠로디핀, 니카르디핀, 이스라디핀, 니모디핀, 딜티아젠펜 및 베라파밀과 같은 칼슘채널 차단제, 및 독사조신, 우라피딜, 프라조신 및 테라조신과 같은 α -차단제; CART(코카인 암페타민 조절된 전사) 작용제, NPY(뉴로펩티드 Y) 길항제, MC4(멜라노코르틴 4) 작용제, 오렉신 길항제, TNF(중양 괴사인자) 작용제, CRF(코르티코트로핀 방출인자) 작용제, CRF BP(코르티코트로핀 방출인자 결합 단백질) 작용제, 우로코르틴 작용제, β 3 작용제, MSH(멜라닌세포-자극 호르몬) 작용제, MCH(멜라닌세포-농축 호르몬) 길항제, CCK(콜레시스토키닌) 작용제, 세로토닌 재흡수 저해제, 세로토닌 및 노르아드레날린 재흡수 저해제, 혼합된 세로토닌 및 노르아드레날린성 화합물, 5HT(세로토닌) 작용제, 볼베신 작용제, 갈라닌 길항제, 성장 호르몬, 성장 호르몬 방출 화합물, TRH(티레오토로핀 방출호르몬) 작용제, UCP 2 또는 3(비결합 단백질 2 또는 3) 조절제, 렙틴 작용제, DA 작용제(브로모크립틴, 도프렉신), 리파제/아밀라제 저해제, RXR(레티노이드 X 수용체) 조절제, TR β 작용제; 히스타민 H3 길항제, 가스트린 및 가스트린 유사체이다.

본 발명에 따른 화합물과 하나 이상의 상기 언급된 화합물 및 선택적으로 하나 이상의 더 나아간 약리학적으로 활성인 물질과의 어떠한 적절한 조합도 본 발명의 범위 내에 있는 것으로 간주 된다는 것을 이해해야 한다.

본 발명은 다음 실시예에 의해 더 예증되지만, 보호범위를 제한하는 것으로 해석되지 않아야 한다. 전기 설명과 하기 실시예에 개시된 특징들은, 양자가 개별적으로 그리고 그것의 어떠한 조합으로도, 발명을 다양한 형태로 실현하는데 중요할 수 있다.

실시예

실시예에서 다음 용어가 하기 일반적 의미를 지니도록 의도된다:

Boc: tert-부틸옥시카르보닐

Bt: 1-벤조트리아졸일

DBU: 1,8-디아자비시클로[5.4.0]언텍-7-엔

DCM: 디클로로메탄, 메틸렌클로라이드

Dde: 1-(4,4-디메틸-2,6-디옥소시클로헥실리덴)에틸

DIC: 디이소프로필카르보디이미드

DMA: N,N-디메틸아세트아미드

DMF: N,N-디메틸포름아미드

DMSO: 디메틸설폭사이드

DMAP: 4-디메틸아미노피리딘

DMPU: 1,3-디메틸테트라히드로피리딘-2-원

EDC 또는 EDAC: N-에틸-N'-(3-디메틸아미노프로필)카르보디이미드 히드록로라이드

Fmoc : 9-플루오레닐메톡시카르보닐

HBTU: 2-(1H-벤조트리아졸-1-일-)-1,1,3,3-테트라메틸우로늄 헥사플루오로포스페이트

HOAt: 3-히드록시-3H-[1,2,3]트리아졸로[4,5-b]피리딘,4-아자-3-히드록시벤조트리아졸

HOBt: N-히드록시벤조트리아졸,1-히드록시벤조트리아졸

HONSu: N-히드록시숙신이미드

NMP: N-메틸피롤리돈

HPLC: 고성능 액체 크로마토그래피

Pmc: 2,2,5,7,8-펜타메틸크로만-6-술포닐

r.t.: 실온

Su: 숙신이미드

TIS: 트라이소프로필실레인

Trt: 트리틸,트리페닐메틸

Ts: 톨루엔술포닐

TSTU: O-(1-숙신이미드)-N,N,N',N'-테트라메틸우로늄 헥사플루오로포스페이트

DIEA: 디이소프로필에틸아민

H₂O: 물

CH₃CN: 아세토니트릴

OtBu: tert 부틸 에스테르

tBu: tert 부틸

Trt: 트리페닐메틸

Pmc: 2,2,5,7,8-펜타메틸-크로만-6-술포닐

Dde: 1-(4,4-디메틸-2,6-디옥소사이클로헥실리덴)에틸

DCM: 디클로로메테인

TFA: 트리플루오로아세트산

Et₂O: 디에틸에테르

NMR 스펙트럼이 Bruker 300 MHz 및 400 MHz 장치에서 기록하였다. HPLC-MS는 Perkin Elmer 장치(API 100)에서 수행하였다.

Merck-Hitachi(Hibar™ RT 250-4, Lichrosorb™ RP 18, 5.0μm, 4.0 x 250mm, 구배용출, 30분 이내 물 내의 20% 내지 80% 아세토니트릴, 1.0ml/분, 254nm에서 검출) 및 Waters(Symmetry™, C18, 3.5μm, 3.0 x 150mm, 구배용출, 15분 이내 물 내의 5% 내지 90% 아세토니트릴, 1.0ml/분, 214nm에서 검출)사의 HPLC 시스템을 사용하였다.

더 나아가, 기술된 하기 HPLC 방법 h8이 사용되는 경우:

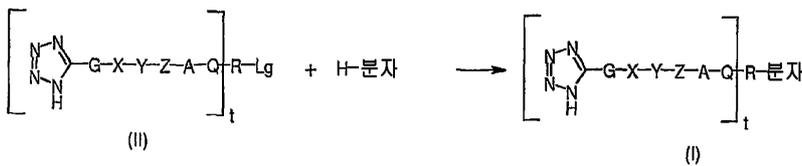
역위상 분석을 218TP54 4.6mm x 150mm C-18 실리카 컬럼에서 214, 254, 276 및 301nm에서의 UV 검출을 사용하여 수행하였고, 이것은 42°C에서 1 ml/분으로 용출하였다. 컬럼을 5% 아세트니트릴, 85% 물 및 물 내의 0.5% 트리플루오로 아세트산의 10% 용액으로 평형유지 하였고, 5% 아세트니트릴, 85% 물 및 0.5% 트리플루오로아세트산의 10% 용액 내지 90% 아세트니트릴의 0.5% 트리플루오로아세트산의 10% 용액으로부터의 평형구배에 의해서 15분간 용출하였다.

더 나아가, 기술된 하기 HPLC 방법 A가 사용되는 경우:

RP-분석이 Waters 996 다이오드 어레이 검출기에 적합화된 Waters 2690 시스템을 사용하여 수행하였다. UV 검출을 218TP54 4.6mm x 250mm 5µC-18 실리카 컬럼(The Separations Group, Hesperia)상에서 214, 254, 276, 및 301nm에서 수집하였으며, 이것을 42°C에서 1ml/분으로 용출하였다. 컬럼을 물(0.1%) 내의 TFA의 수성용액 내의 5% 아세트니트릴(+ 0.1% TFA)로 평형유지 하였다. 주입 후, 샘플을 물(0.1%) 내의 TFA의 수성용액 내의 0% 내지 90% 아세트니트릴의 구배에 의해서 50분간 용출하였다.

일반과정 (A)

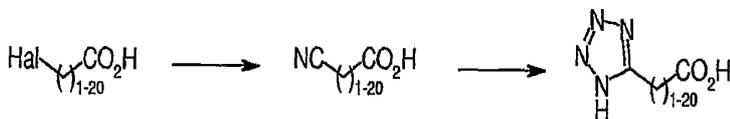
본 발명에 따른 화학식 (I)의 화합물은 일반과정 (A)에 의하여 제조될 수 있다:



혈장내 연장된 반감기를 필요로 하고 적절한 용매(물, 알코올, DMF, DMSO, DMPU, 또는 그것의 혼합물) 내에 용해되는 적어도 하나의 아실화가능 아미노기를 포함하는 분자 및 용액 또는 DMF 또는 DMSO 내의 (II) 현탁액을 첨가한다. 혼합물을 실온에서 교반하여 반응의 진행 후 HPLC을 수행한다. 만약 반응이 너무 천천히 진행되면 촉매적 용량의 DMAP가 첨가될 수 있다. 생산물은 전체 반응 혼합물의 예비 HPLC에 의해 분리된다.

일반과정 (B)

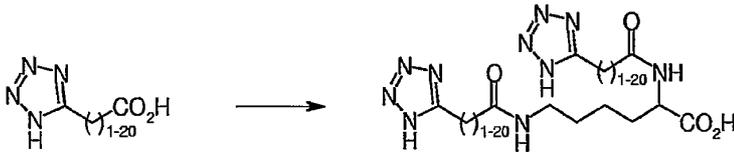
본 발명에 따른 화학식 (II)의 화합물을 일반과정 (B)에 의하여 제조할 수 있다:



ω-할로알칸산 또는 에스테르는 니트릴로의 완전한 전환이 발생할 때까지 DMF, DMSO, 아세톤, 또는 알코올과 같은 적절한 용매 내의 약간 과다의 NaCN 또는 KCN로 처리된다. 반응 후 1H NMR에 의한 샘플을 분석한다. 결과된 ω-시아노알칸산 또는 에스테르를 물과의 희석 및 AcOEt 또는 DCM과의 추출에 의해 분리된다. (1H NMR에 의해 결정된 바와 같이) 모든 개시물질이 소비될 때까지 140°C에서 DMF 내의 AcOH 및 NEt₃의 존재하에서 NaN₃과 그 ω-시아노알칸산 또는 에스테르의 처리는 대응 ω-(5-테트라졸일)알칸산 또는 에스테르를 산출한다. 에스테르의 경우, 물과 알코올의 혼합물 내에서 과다의 NaOH 또는 KOH와의 처리에 의해서 산으로 전환된다. 알코올의 증발 및 묽은 수성 HCl의 첨가는 ω-(5-테트라졸일)알칸산을 산출하며, 이는 여과에 의해 분리될 수 있다. 대안으로는, 일반과정 (B)는 또한 산 대신에 ω-할로 알칸 에스테르와 함께 수행될 수 있다. 결과된 ω-(5-테트라졸일)알칸 에스테르의 대응 산으로의 비누화 반응은 물과 에탄올의 혼합물 내의 과다의 KOH 또는 NaOH와의 처리에 의해 수행될 수 있다.

일반과정 (C)

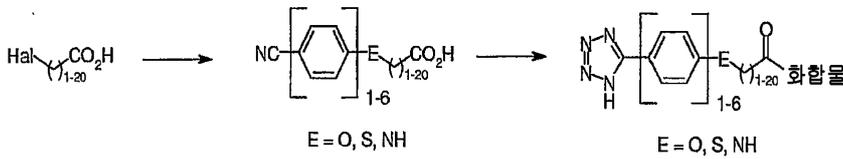
본 발명에 따른 화학식 (II)의 화합물은 일반과정 (C)에 의하여 제조될 수 있다:



ω -(5-테트라졸일)알칸산은 아실 할라이드 또는 N-히드록시숙신이미딜 에스테르로 전환하고, 그리고나서 리신 메틸 에스테르에 커플링된다. 결과된 생산물의 비누화 반응은 N,N'-비스(ω -(5-테트라졸일)알칸노일)리신을 산출한다.

일반과정 (D)

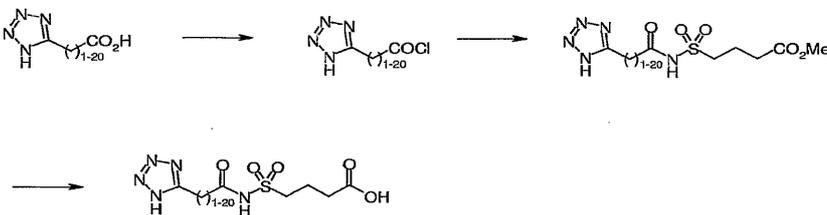
본 발명에 따른 화학식 (II)의 화합물은 일반과정 (D)에 의하여 제조될 수 있다:



ω -할로알칸산 또는 에스테르는 아릴 또는 헤테로아릴에테르, -티오에테르, 또는 -아민으로의 완전한 전환이 발생할 때까지, DMF, DMSO, 아세톤, 또는 알코올과 같은 적절한 용매 내의 K_2CO_3 또는 DBU와 같은 염기의 존재하에서 시아노페놀, 시아노티오펜올, 디시아노페놀, 시아노비페닐올, 시아노테르페닐올, 시아노아닐린, 시아노히드록시헤테로아렌, 또는 적어도 하나의 시아노기 및 하나의 아렌- 또는 헤테로아렌-부착 히드록시기를 포함하는 관련된 시약으로 처리된다. 반응 후 1H NMR에 의한 샘플을 분석한다. 결과된 ω -아릴옥시-, ω -아릴티오-, 또는 ω -아릴아미노알칸산 또는 에스테르를 물과의 희석 및 AcOEt 또는 DCM과의 추출에 의해서 분리한다. (1H NMR에 의해 결정된 바와 같이) 모든 개시물질을 소비될 때까지 $140^\circ C$ 에서 DMF 내의 AcOH 및 NEt_3 의 존재하에서 NaN_3 과 이 생산물의 처리는 대응 ω -(5-테트라졸일)아릴옥시-, ω -(5-테트라졸일)아릴티오-, 또는 ω -(5-테트라졸일)아릴아미노알칸산 또는 에스테르를 산출한다. 에스테르의 경우, 물과 알코올의 혼합물 내의 과다의 NaOH 또는 KOH와의 처리에 의해서 산으로 전환된다. 알코올의 증발 및 묽은 수성 HCl의 첨가는 ω -(5-테트라졸일)아릴 기능화된 알칸산을 산출하며, 이는 여과에 의해 분리될 수 있다.

일반과정 (E)

본 발명에 따른 화학식 (II)의 화합물은 일반과정 (E)에 의하여 제조될 수 있다:



ω -(5-테트라졸일)알칸산 또는 관련산은 아실 할라이드로 전환하고, 그리고나서 DCM 또는 DCE와 같은 적절한 용매 내의 4-(술포모일)부티르산 메틸 에스테르 및 DMAP로 처리된다. 결과된 4-(N-(ω -(5-테트라졸일)알카노일)술포모일)부티르산 메틸 에스테르는 물과 메탄올의 혼합물 내의 과다의 KOH 또는 NaOH와의 처리에 의해서 대응 산으로 비누화된다.

일반과정 (F): 고체상 합성, 정제 및 펩티드 및 유도체화 펩티드의 특성규명:

펩티드를 NMP에서 HBTU 중재 커플링 및 Fmoc 보호기의 탈보호의 UV 모니터링을 사용하는 제조사 공급 FastMoc UV 프로토콜을 사용하여 0.25mmol 스케일에서 Applied Biosystems 433A 펩티드 합성기에서 Fmoc 전략을 사용하여

Fmoc 보호된 Rink 아미드 수지 (Novabiochem), Fmoc 보호된 Wang 수지, 또는 클로로트리틸 수지 상에서 합성하였다. 사용된 보호된 아미노산 유도체는 Fmoc-Aib-OH(Fmoc-아미노이소부티르산)과 같은 비천연 아미노산은 예외로 하는 ABI 433A 합성기에 대해 적절한 사전 계량된 카트리지 내에 공급된 표준 Fmoc-아미노산(Anaspec)이었다.

미정제 수지 부착 보호된 펩티드 상의 특정 리신 잔기에 측쇄와 링커의 부착은 히드라진과의 선택적 탈보호가 뒤 따르는 자동화 합성 동안에 Fmoc-Lys(Dde)-OH의 혼입에 의하여 특정 위치에서 수행하였다.

Dde-보호의 제거를 위한 과정. 수지(0.25mmol)를 수동 진탕/여과 장치에 위치시키고, NMP(20ml, 2x12분) 내의 2% 히드라진으로 처리하여 DDE기를 제거하고, NMP(4x20ml)로 세척하였다.

리신 잔기에 측쇄 부착을 위한 과정.

아미노산(수지에 대하여 4몰 당량)을 NMP(10ml)에 용해하였다. HOBt(수지에 대하여 4몰 당량) 및 디이소프로필카르보디이미드(수지에 대하여 4몰 당량)를 첨가하고 용액을 15분 동안 교반하였다. 용액을 수지에 첨가하고 DIPEA(수지에 대하여 4몰 당량)를 첨가하였다. 수지를 실온에서 24시간 진탕하였다. 수지를 NMP(2x20ml), NMP/DCM (1:1; 2x20ml) 및 DCM(2x20ml)으로 세척하였다.

Fmoc-보호를 제거하기 위한 과정: 수지(0.25 mmol)를 수동 진탕장치의 필터 플라스크내에 위치시키고, NMP/DCM(1:1)(2x20ml)으로 처리하여, NMP(20ml), NMP 내의 20% 피페리딘의 용액(3x20ml, 10분 썩)으로 처리하였다. 수지는 NMP(2x20ml), NMP/DCM (1:1)(2x20ml) 및 DCM(2x20ml)으로 세척하였다.

수지로부터 펩티드를 절단하기 위한 과정:

펩티드를 실온에서 180분간 TFA, 물, 및 트리이소프로필실레인(95:2.5:2.5)의 혼합물과 함께 교반하고 수지로부터 절단하였다. 절단 혼합물을 여과하고 여과액은 질소 스트림에 의해 오일로 농축하였다. 미정제 펩티드를 45ml 디에틸 에테르로 이 오일로부터 침전하고, 45ml 디에틸 에테르로 세 번 세척하였다.

정제: 미정제 펩티드를 5 μ C-18 실리카로 충전된 25mm x 250mm 컬럼에서 준-에비 HPLC에 의해서 정제하였다.

건조 후, 미정제 펩티드를 5ml 50% 아세트산 H₂O에 용해하고 20ml까지 H₂O로 희석하여 컬럼에 주입하였고, 그리고 나서 이것을 40°C에서 50분 동안 0.1% TFA 10ml/분 내의 40% 내지 60% CH₃CN의 구배로 용출하였다. 펩티드 포함 분획들을 수집하였다. 정제된 펩티드를 용출물의 물과의 희석 후 동결건조하였다. 최종 산물을 분석 RP-HPLC(보유 시간)에 의해 그리고 LCMS에 의해 특성규명 하였다.

RP-HPLC 분석은 214nm에서 UV 검출 및 42°C에서 1ml/분에서 용출된 Vydac 218TP54 4.6mm x 250mm 5 μ C-18 실리카 컬럼(The Separations Group, Hesperia, USA)을 사용하여 수행하였다. 두 가지 다른 용출 조건은 다음과 같았다:

A1: 농축 H₂SO₄로 pH 2.5까지 조정하였던 0.1M (NH₄)₂SO₄로 구성되는 완충액으로의 컬럼의 평형 및 50분간 동일한 완충액 내의 0% 내지 60% CH₃CN의 구배에 의한 용출.

B1: 0.1% TFA/H₂O로 컬럼의 평형 및 50분간 0% CH₃CN/0.1% TFA/H₂O 내지 60% CH₃CN/0.1% TFA/H₂O의 구배에 의한 용출.

B6: 0.1% TFA/H₂O로 컬럼의 평형 및 50분간 0% CH₃CN/0.1% TFA/H₂O 내지 90% CH₃CN/0.1% TFA/H₂O의 구배에 의한 용출.

LCMS은 Hewlett Packard 시리즈 1100 G1312A 빈 펌프, Hewlett Packard 시리즈 1100 컬럼 구획, Hewlett Packard 시리즈 1100 G1315A DAD 다이오드 어레이 검출기, Hewlett Packard 시리즈 1100 MSD 및 HP Chemstation 소프트웨어에 의해 제어되는 Sedere 75 증발성 광 산란 검출기로 구성되는 셋업에서 수행하였다. HPLC 펌프는 다음의 두 용출제 저장소에 연결된다:

A: 물 내의 10mM NH₄OH

B: 90% 아세트니트릴 내의 10mM NH₄OH.

분석은 적절한 부피의 샘플(바람직하게는 20 μ l)을 A와 B의 구배로 용출되는 컬럼 위에 주입하여 23°C에서 수행하였다. 사용된 HPLC 조건, 검출기 세팅 및 질량 분광계 세팅은 다음의 표에 제시된다.

컬럼: Waters Xterra MS C-18 X 3 mm id 5 μ m

구배: 1.5ml/분에서 6.5분간 5% 내지 100% 아세트니트릴 선형구배

검출: 210nm(DAD로부터 유사체 출력)

ELS: ELS로부터 유사체 출력

MS: 이온화 모드 API-ES. Scan 100 내지 1000amu 단계 0.1amu.

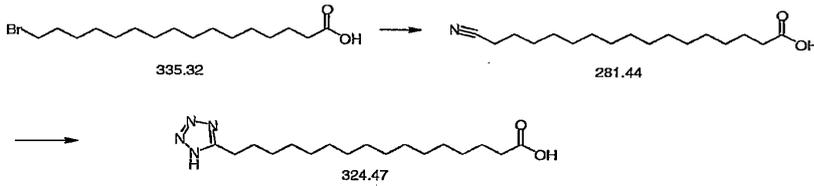
전형적 과정:

수지(Fmoc-Gly-Wang 수지, 0.6mmol/g Novabiochem 0.25mmole)가 제조사 지침에 따라서 ABI 433A 장치에서 기초 서열을 생산하도록 사용되었다. 수지(0.25 mmole)를 수동 진탕/여과 장치에 위치하였고 Dde기를 제거하기 위하여 NMP 내의 2% 히드라진(2x12분 2x20ml)으로 처리하였다. 수지를 NMP(4x20ml)로 세척하였다. Fmoc-8-아미노-3,6-디옥사 옥탄산(Neosystem FA03202)(수지에 대하여 4몰 당량)을 NMP/DCM(1:1, 20ml)에 용해하였다. HOBt(수지에 대하여 4 몰 당량) 및 DIC(수지에 대하여 4몰 당량)를 첨가하고 용액을 15분간 교반하였다. 용액을 수지에 첨가하고 DIPEA(수지에 대하여 4몰 당량)를 첨가하였다. 수지를 실온에서 24시간 진탕하였다. 수지를 NMP(4x20ml)로 세척하였다. NMP 내의 20% 피페리딘 용액(3x20ml, 각각 10분)을 진탕하는 동안 수지에 첨가하였다. 수지는 NMP(4x20ml)으로 세척하였다. 16-(테트라졸-5-일)헥사데카노일-ONSu 에스테르(수지에 대하여 4몰 당량)를 NMP(20ml)에 용해하였다. 용액을 수지에 첨가하고 DIPEA(수지에 대하여 4몰 당량)를 첨가하였다. 수지를 실온에서 24시간 진탕하였다. 수지는 NMP(2x20ml), NMP/DCM(1:1)(2x20ml) 및 DCM(2x20ml)으로 세척하였다. 펩티드를 실온에서 180분간 TFA, 물, 및 트리이소프로필 실레인(95:2.5:2.5; 15ml)과 함께 교반하여 수지로부터 절단하였다. 절단 혼합물을 여과하고 여과물은 진공상태에서 오일로 농축하였다. 비정제 펩티드를 45ml 디에틸 에테르로 이 오일로부터 침전하였고, 45ml 디에틸 에테르로 세 번 세척하였다. 비정제 펩티드를 7 μ C-18 실리카로 충전된 20mm x 250mm 컬럼의 예비 HPLC로 정제하였다. 비정제 펩티드를 물 내의 5ml 50% 아세트산에 용해하고, H₂O로 20ml까지 희석하여, 컬럼에 주입하고, 그리고 나서 40°C에서 50분간 40 내지 60% (0.1% TFA가 있는 물 내의 CH₃CN) 10 ml/분의 구배로 용출하였다. 펩티드 포함 분획들을 수집하였다. 정제된 펩티드를 용출물의 물과의 희석 후 동결건조하였다.

인간 GLP-1 수용기를 발현하는 세포막에 결합하는 방사성 리간드

결합 에세이는 인간 GLP-1 수용기를 포함하는 정제된 세포막과 함께 수행하였다. 수용기 포함 세포막은 안정하게 발현하는 BHK tk-ts 13 세포로부터 정제하였다. 막은 에세이 완충액(50mM HEPES, 5mM EGTA, 5mM MgCl₂, 0.005% Tween20, pH =7.4)으로 0.2mg/ml의 단백질의 최종농도까지 희석하고 0.3% PEI로 사전 코팅된 96-웰 마이크로타이터에 배분하였다. 0.05nM [¹²⁵I]GLP-I, 증가하는 농도의 비표지된 리간드, 및 다른 HSA 농도(0.005%, 0.05%, 및 2%)의 존재하에서 막들을 30°C에서 2시간 동안 배양하였다. 배양 후, 비부착 리간드는 얼음 냉기 에세이 완충액과의 2X100 μ l 세척이 뒤따르는 진공-다기관을 통한 여과에 의하여 부착된 리간드로부터 분리하였다. 필터는 RT에서 밤새 건조하고, 천공하여, γ -카운터로 정량하였다.

실시에 1. 16-(5-테트라졸일)헥사데칸산



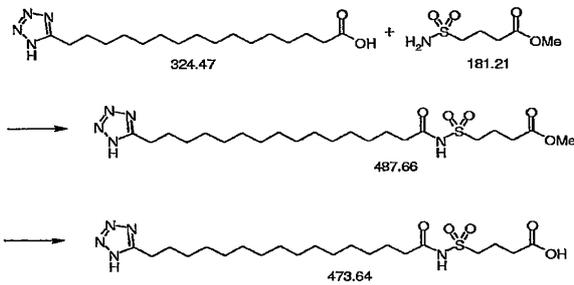
16-브로모헥사데칸산(16.61g, 49.5mmol), DMSO(150ml), NaCN(12.5g, 255mmol), 및 NaI(1.92g, 12.8mmol)의 혼합물을 120℃에서 20시간 동안 교반하였다. 혼합물을 실온까지 냉각하고, 그리고 나서 물(1.7l) 및 농축된 HCl(30ml)의 교반 혼합물 내로 부었다. 물(100ml)로 세척. 결과된 현탁액을 밤새 실온에서 교반했다. 생산물을 여과하고, 물(2x100ml)로 세척하여, 고체를 MeCN(90ml 및 50ml)으로부터 두 번 재결정화 하였다. 10.1g(72%)의 16-시아노헥사데칸산을 획득하였다.

$^1\text{H NMR}$ (DMSO) δ 1.20-1.39(m, 22H), 1.50(m, 4H), 2.18(t, J = 7Hz, 2H), 2.48(t, J = 7Hz, 2H), 11.95(s, 1H).

이 생산물을 DMF(150ml), AcOH(10.0ml, 174.8mmol), NEt_3 (25ml, 180mmol), 및 NaN_3 (11.83 g, 182 mmol)과 혼합하고, 그 혼합물을 $^1\text{H NMR}$ 에 의한 전환을 하는 동안 120℃에서 80시간 동안 교반하였다. 혼합물을 감압하에서 농축하고, 잔류 물(250ml) 및 농축 HCl(25ml)을 첨가하였다. 산성 혼합물을 실온에서 2 일간 교반하고, 여과하여, 고체는 MeCN(대략 300ml)으로부터 재결정화 하였다. 7.60g(65%)의 타이틀 화합물을 얻었다.

$^1\text{H NMR}$ (DMSO) δ 1.24(m, 22H), 1.48(m, 2H), 1.68(m, 2H), 2.18(t, J = 7Hz, 2H), 2.84(t, J = 7Hz, 2H), 11.95(s, 1H)

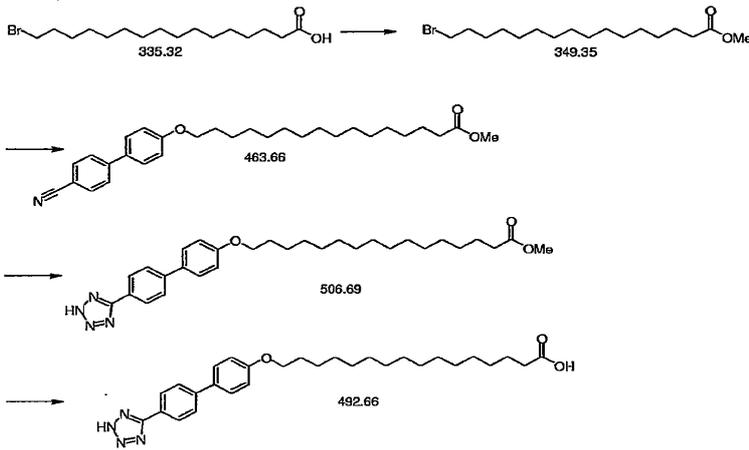
실시에 2. 4-(N-(16-(5-테트라졸일)헥사데카노일)술포모일)부티르산



DCM(40ml) 내의 16-(5-테트라졸일)헥사데칸산(3.25g, 10.0mmol) 현탁액에 옥살릴 클로라이드(1.2ml, 14.0mmol)를 첨가하였다. 혼합물을 실온에서 42시간 동안 교반하고 농축하여, PhMe와 한 번 공증발하고, DCM(35ml) 내의 메틸 4-술포모일 부티레이트(1.66g 9.16mmol) 용액을 잔류물에 첨가한 후, DMAP(3.67g, 30.0mmol)을 첨가하였다. 이중성 혼합물을 실온에서 6.5시간 동안 교반하고 나서, 농축하였다. 잔류물에 물(50ml)과 1N HCl(50ml)의 혼합물을 첨가하고, 결과된 혼합물을 실온에서 5일간 교반했다. 생산물을 여과하고 물(100ml)로 세척하고, MeCN(25ml)으로부터 재결정화 하여 1.84g(41%)의 N-아실술포아미드 메틸 에스테르를 산출하였다. MeOH(15ml)내의 이 에스테르(1.06g, 2.17mmol)에 물(1.5 ml) 내의 NaOH(0.38g, 9.5mmol, 4.4 eq) 용액을 첨가하였다. 실온에서 1.5시간 동안 교반한 후, 혼합물을 물(80ml)과 1N HCl(20ml)의 혼합물 내로 부었다. 혼합물을 3시간 동안 교반하고, 여과하여, 그 생산물을 감압하에서 건조하였다. 1.09g(100%)의 타이틀 화합물을 얻었다.

$^1\text{H NMR}$ (DMSO) δ 1.24(m, 20H), 1.49(m, 4H), 1.69(m, 2H), 1.85(m, 2H), 2.27(t, J = 7 Hz, 2H), 2.39(t, J = 7Hz, 2H), 2.86(t, J = 7Hz, 2H), 3.38(m, 2H), 11.59(s, 1H).

실시에 3. 16-(4'-(5-테트라졸일)비페닐-4-일옥시)헥사데칸산



16-브로모헥사데칸산 메틸 에스테르:

16-브로모헥사데칸산(15.5g, 46.2mmol), MeOH(100ml), PhMe(30ml), 트리메틸오르토포르메이트(30ml), 및 폴리스티렌-부착 벤젠술폰산(3.6g)의 혼합물을 55℃에서 교반했다. 69시간 후 혼합물을 셀라이트를 통하여 여과하고, 여과물을 농축하여 16.85g의 오일을 산출하였다(100% 수율).

(4'-시아노비페닐-4-일옥시)헥사데칸산 메틸 에스테르:

16-브로모헥사데칸산 메틸 에스테르(4.86g, 13.9mmol), MeCN(20ml), 4-시아노-4'-히드록시비페닐(3.16g, 16.2mmol), 및 K₂CO₃(2.45g, 17.7mmol)의 혼합물을 82℃에서 교반했다. 17시간 후, 포화 수성 NaHCO₃(150ml)을 첨가하고, 생산물을 여과하여, 물로 세척하고, 끓는 MeCN(대략 80ml)으로부터 재결정화 하였다. 감압하의 여과 및 건조로 5.40g(84%)의 무색 바늘로서의 (4'-시아노비페닐-4-일옥시)헥사데칸산 메틸 에스테르를 산출하였다.

16-(4'-(5-테트라졸일)비페닐-4-일옥시)헥사데칸산 메틸 에스테르:

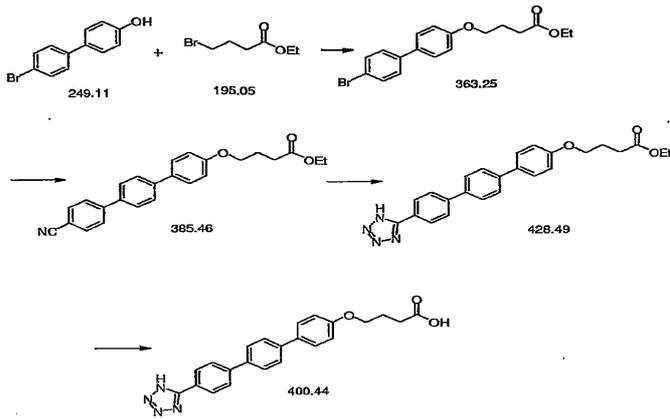
(4'-시아노비페닐-4-일옥시)헥사데칸산 메틸 에스테르(2.75g, 5.93mmol), DMF(7.0ml), NEt₃(4.0ml, 28.9mmol), AcOH(1.75ml, 29.1mmol), 및 NaN₃(2.50g, 38.5mmol)의 혼합물을 140℃에서 교반했다. 17시간 후, 물(50ml)과 1N HCl(50ml)을 첨가하고, 농축 HCl(대략 2ml)로 산성화 했다. 생산물을 여과하고, MeCN/PhMe(대략 60 + 60ml)으로부터 재결정화 하였다. 감압하에서 여과 및 건조는 2.87g(96%)의 16-(4'-(5-테트라졸일)비페닐-4-일옥시)헥사데칸산 메틸 에스테르를 산출하였다.

16-(4'-(5-테트라졸일)비페닐-4-일옥시)헥사데칸산:

16-(4'-(5-테트라졸일)비페닐-4-일옥시)헥사데칸산 메틸 에스테르 (2.87g, 5.66mmol), MeOH(30ml), 및 물(2.0ml) 내의 NaOH(1.51g, 37.8mmol) 용액의 혼합물을 70℃에서 교반했다. 4일 후, 물(100ml)과 1N HCl(50ml)을 첨가하고, 생산물을 여과하여, 물로 세척하고, MeCN/PhMe과 공증발한 후, 감압하에서 건조하였다. 2.68g(96%)의 16-(4'-(5-테트라졸일)비페닐-4-일옥시)헥사데칸산을 얻었다.

¹H NMR (DMSO) δ 1.20-1.50(m, 24H), 1.72(m, 2H), 2.18(t, J = 7Hz, 2H), 4.02(t, J = 6Hz, 2H), 7.04(d, J = 8Hz, 2H), 7.71(d, J = 8Hz, 2H), 7.87(d, J = 8Hz, 2H), 8.09(d, J = 8Hz, 2H), 11.95(br s, 1H).

실시예 4. 4-(4-(5-테트라졸일)-[1,1',4',1'']-테르페닐-4"-일옥시)부티르산



4-(4'-브로모비페닐-4-일옥시)부티르산 에틸 에스테르:

4-(4-브로모페닐)페놀(3.74g, 15.0mmol), MeCN(20ml), 에틸 4-브로모부티레이트(4.42g, 22.7mmol), 및 K₂CO₃ (3.12g, 22.6mmol)의 혼합물을 80°C에서 교반했다. 16시간 후, 물(100ml)과 1N HCl(40ml)을 첨가하고, 생산물을 추출하여(3 x AcOEt), 혼합된 추출물을 염수(2x)로 세척하고, 건조하여(MgSO₄), 농축하였다. 잔류물은 EtOH(40ml)로부터 재결정화하여 4.35g(80%)의 무색 판으로서의 4-(4'-브로모비페닐-4-일옥시)부티르산 에틸 에스테르를 산출하였다. .

4-(4-시아노-[1,1',4',1'']-테르페닐-4"-일옥시)부티르산 에틸 에스테르:

톨루엔(30ml) 및 EtOH(20ml) 내의 4-(4'-브로모비페닐-4-일옥시)부티르산 에틸 에스테르(2.03g, 5.59mmol)에 트리페닐포스핀(0.17g, 0.65mmol), 4-시아노페닐보르산(1.23g, 8.37mmol), Pd(OAc)₂(65mg, 0.29mmol), 및 물(10ml) 내의 Na₂CO₃(2.33g, 22.0mmol) 용액을 첨가하였다. 혼합물을 70°C(오일-욕 온도)에서 교반했다. 66시간 후, 물(100ml)과 1N HCl(50ml)을 첨가하고 생산물을 추출하였다(3xDCM). 혼합된 추출물을 물로 세척하고 나서, 포화 수성 NaHCO₃로 세척하고, 건조하여 농축해서 2.33g의 갈색 고체를 산출하였는데, 이것을 뜨거운 EtOH로 세척하고 감압하에서 건조하여 0.81g(38%)의 4-(4-시아노-[1,1',4',1'']-테르페닐-4"-일옥시)부티르산 에틸 에스테르를 산출하였다. 에탄올 세척으로부터 더 많은 생산물(0.48g, 22%)을 침전하였다.

4-(4-(5-테트라졸일)-[1,1',4',1'']-테르페닐-4"-일옥시)부티르산 에틸 에스테르:

4-(4-시아노-[1,1',4',1'']-테르페닐-4"-일옥시)부티르산 에틸 에스테르(1.29g, 3.35mmol), DMF(4.0ml), NEt₃(2.3ml, 16.6mmol), AcOH(1.0ml, 16.7mmol), 및 NaN₃(1.32g, 20.3mmol)의 혼합물을 140°C에서 교반했다. 20시간 후, 물(50ml)과 1N HCl(50ml)을 첨가하고, 생산물을 여과에 의해 분리하여, 뜨거운 MeCN으로 세척하고, 감압하에서 건조하여 1.16g(81%)의 갈색고체로서의 4-(4-(5-테트라졸일)-[1,1',4',1'']-테르페닐-4"-일옥시)부티르산 에틸 에스테르를 산출하였다.

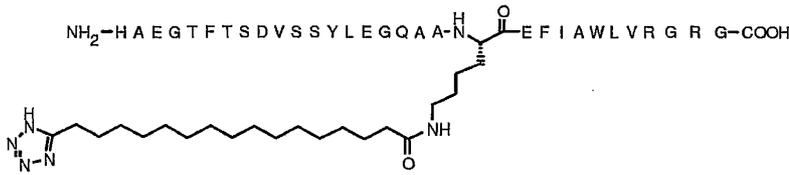
4-(4-(5-테트라졸일)-[1,1',4',1'']-테르페닐-4"-일옥시)부티르산:

4-(4-(5-테트라졸일)-[1,1',4',1'']-테르페닐-4"-일옥시)부티르산 에틸 에스테르(1.16g, 2.71mmol), EtOH(10ml), NaOH(0.75g, 18.8mmol), 및 물(1.5ml)의 이중성 혼합물을 80°C에서 교반했다. 18시간 후, 물(50ml)과 1N HCl(50ml)을 첨가했다. 0.5시간 동안 교반한 후 생산물을 여과하고, 물로 세척한 후, 고체를 MeCN 및 PhMe과 공증발하여 0.79g(73%)의 옅은갈색 분말로서의 4-(4-(5-테트라졸일)-[1,1',4',1'']-테르페닐-4"-일옥시)부티르산을 산출하였다.

¹H NMR (DMSO)δ 1.98 (quint, J = 7Hz, 2H), 2.41(t, J = 7Hz, 2H), 4.03(t, J = 7Hz, 2H), 7.04(d, J = 8Hz, 2H), 7.69 (d, J = 8Hz, 2H), 7.77(d, J = 8Hz, 2H), 7.85(d, J = 8Hz, 2H), 7.98 (d, J = 8Hz, 2H), 8.14(d, J = 8Hz, 2H), 12.19(br s, 1H).

실시예 5

N-ε-26-(16-[5-테트라졸일]헥사데카노일)Arg³⁴GLP-1-(7-37)

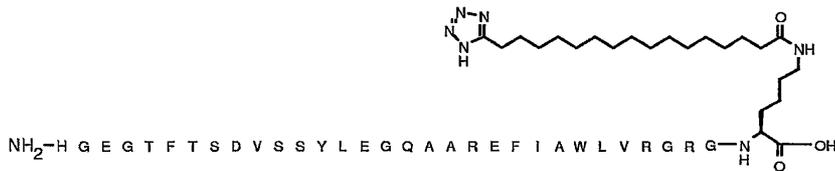


본 화합물은 용액 내의 비보호된 Arg³⁴GLP-1-(7-37)펩티드의 16-[5-테트라졸일]헥사데칸산(실시예 1)과의 아실화에 의해 제조하였다. 16-[5-테트라졸일]헥사데칸산의 숙신이미딜 에스테르는 그 산(29mg)을 THF(0.9ml), DIPEA(17μl), 및 TSTU(30mg)과 혼합하고 그 결과된 혼합물을 실온에서 1시간 동안 교반하여 제조하였다. Arg³⁴GLP-1-(7-37) (0.33g, 30% 순수)를 물(5ml)과 DIPEA(50μl)에 용해하였고, 숙신이미딜 에스테르(0.3ml) 용액을 첨가하였다. 실온에서 20분간 교반한 후, 과다한 숙신이미딜 에스테르를 과다한 글리신의 첨가에 의해 억제하고, 생산물은 예비 HPLC에 의해 정제하였다. 38mg의 타이틀 화합물을 얻었다.

HPLC:(방법 B6): RT=9.36분(100%)

LCMS:m/z = 1231(MH₃³⁺). (MH₃³⁺)에 대한 계산치: 1231

실시예 6 Gly⁸Arg^{26,34}GLP-1(7-37)Lys(16-(5-테트라졸일)헥사데카노일)



Gly⁸Arg^{26,34}GLP-1-(7-37)를 표준 Fmoc-방법론 및 시작 수지로서 Fmoc-Lys(Boc)-트리틸 폴리스티렌(0.88g, 로당: 0.79mmol/g)을 사용하는 433A 펩티드 합성기에서 제조하였다. 예비 HPLC에 의한 정제 후 25mg의 Gly⁸Arg^{26,34}GLP-1(7-37) 펩티드를 얻었다.

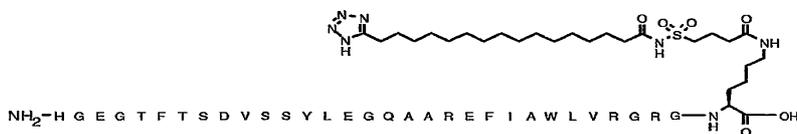
타이틀 화합물은 실시예 5에서 기술된 바와 같이 16-(5-테트라졸일)헥사데칸산(23mg)과의 Gly⁸Arg^{26,34}GLP-1(7-37) 펩티드(25mg)의 아실화에 의해서 제조하였다. 14.6mg의 타이틀 화합물을 얻었다.

HPLC:(방법 B6): RT= 9.02분(99%)

LCMS:m/z = 1279(MH₃³⁺). (MH₃³⁺)에 대한 계산치: 1279

실시예 7

Gly⁸,Arg^{26,34}GLP-1(7-37)Lys{4-[N-(16-{5-테트라졸일}헥사데카노일)술포모일]부티릴}펩티드



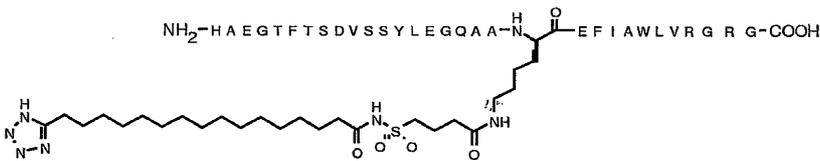
타이틀 화합물은 {4-[N-(16-{5-테트라졸일}헥사데카노일)술포모일]부티르산 (21mg; 실시예 2) 및 Gly⁸Arg^{26,34}GLP-1(7-37)(25mg)으로부터 실시예 6과 같이 제조하였다. 1.5mg의 타이틀 화합물을 얻었다.

HPLC:(방법 B6): RT= 9.05분(95%)

LCMS:m/z = 1328(MH₃³⁺). (MH₃³⁺)에 대한 계산치: 1328

실시예 8

N-ε-26-{4-[N-(16-{5-테트라졸일}헥사데카노일)술포모일]부티릴}Arg³⁴GLP-1(7-37)



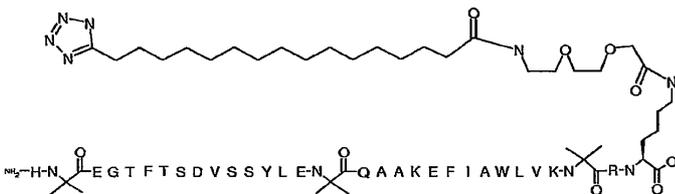
이 화합물은 {4-[N-(16-{5-테트라졸일}헥사데카노일)술포모일]부티르산 (21mg; 실시예 2) 및 Arg³⁴GLP-1(7-37)펩티드(0.3g, 30% 순수)로부터 실시예 5와 같이 제조하였다. 10.1mg의 타이틀 화합물을 얻었다.

HPLC:(방법 B6): RT= 9.35분(94%)

LCMS:m/z = 1281(MH₃³⁺). (MH₃³⁺)에 대한 계산치: 1281

실시예 9

N-ε-37-(2-(2-(2-(16-(테트라졸-5-일)(헥사데카노일아미노)에톡시)에톡시)아세틸))Aib^{8,22,35}Lys³⁷GLP-1(7-37)



"전형적 과정"에 기술된 대로 제조하였다.

HPLC:(방법 B6): RT = 31.8분(98%), (방법 A1): RT = 41.5분

LCMS:m/z = 988.7 (MH₄⁴⁺), 1317.8 (MH₃³⁺). (MH)⁺에 대한 계산치: 3949.6

실시예 10

인간 성장 호르몬(100mg, hGH)을 H₂O(6ml), DIEA(7.5μl), 및 NMP(6ml)에 용해하여 0°C로 냉각하였다. NMP(100μl) 내에 용해된 16-(테트라졸-5-일)헥사데카노일-ONSu(3.5mg, 2eq)를 첨가하였다. 반응 혼합물을 1시간 동안 교반하고, 이온교환 크로마토그래피에 의해 정제하였다.

140번 또는 145번 위치가 모노아실화된 hGH의 정제

비정제 반응 혼합물을 50mM Tris pH 8.5 내에서 5번 희석하고 Mono Q 컬럼에 가하였다. 6ml 비정제 반응 혼합물의 정제를 위해서, Amersham Pharmacia사의 10ml 10/10 Mono Q 컬럼을 사용하였다. 본래의, 30/45/70 위치에 모노아실화된, 140/145 위치에 모노아실화된, 디아실화된, 그리고 트리아실화된 hGH를 분리하기 위해 1000 CV 구배를 사용하였다. 트리아실화된 hGH의 용출 직후, 이합체 hGH를 용출하기 위해 가파른 구배를 사용하였다. 용출 완충액으로서 50mM Tris, 2M NaCl, pH 8.5를 사용하였다. 정제는 4°C에서 수행하였다.

용출 후, 모노아실화된 hGH(피크 2)를 포함하는 분획들은 모아서 YM10 필터를 구비한 Amicon을 사용하여 후속적으로 한외여과 하였다. 세척 완충액은 50mM 암모늄카보네이트 pH 8.0이었다. 한외여과 후, 아실화된 단백질을 동결건조 하였다.

펩티드 맵핑에 의해 특정규명되는 다섯 개의 명료한 피크를 나타내는 A280nm 및 A254nm를 묘사하는 크로마토그램:

피크 1은 본래 hGH를 포함한다,

피크 2는 38 또는 45 또는 70번 위치에서 모노아실화된 hGH를 포함한다,

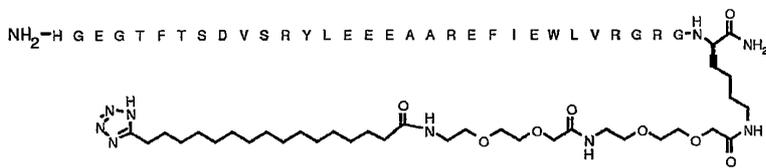
피크 3은 140 또는 145번 위치에서 모노아실화된 hGH를 포함한다,

피크 4는 디아실화된 hGH를 포함한다,

피크 5는 트리아실화된 hGH를 포함한다.

실시예 11

Gly⁸,Glu^{22,23,30}Arg^{18,26,34}GLP-1(7-37)Lys(16-(1H-테트라졸-5-일)헥사데칸산[2-(2-{[2-(2-카르바모일메톡시에톡시)에틸카르바모일]메톡시}에톡시)에틸]아미드)-NH₂



"전형적 과정"에 기술된 대로 제조하였다.

HPLC:(방법 B6): RT = 30.283분(96%)

LCMS:m/z = 1441.8 (MH₃)³⁺. (MH₃³⁺)에 대한 계산치: 1439.6

실시예 12

Gly⁸,Arg^{26,34}GLP-1(7-37)Lys(4-(4-(4-(4-(5-테트라졸일)페닐)페닐)페녹시)부틸릴)

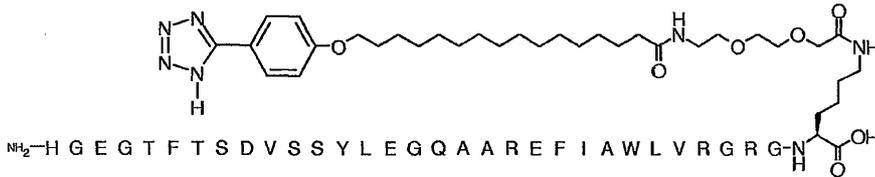


"전형적 과정"에 기술된 대로 제조하였다.

HPLC: (방법 B4): RT= 10.89분(100%)

LCMS:m/z = 1304(MH₃)³⁺. (MH₃)³⁺ 에 대한 계산치: 1304

N^ε38-(2-(2-(2-(16-(4-(5-테트라졸일)페녹시)헥사데카노일)에톡시)에톡시)아세틸)[Gly8,Arg26,34,Lys38]GLP-1(7-37)펩티드



[Gly8,Arg26,34,Lys38]GLP-1-(7-37)펩티드를 표준 Fmoc 방법론의 사용 및 개시 수지로서 2-클로로트리틸 클로라이드 수지(0.400g, 로딩: 1.4mmol/g)를 사용하여 Advanced Chemtech APEX 348 펩티드 합성기에서 제조하였다. Lys38 은 Fmoc-Lys(ivDde)-OH로 보호하였다.

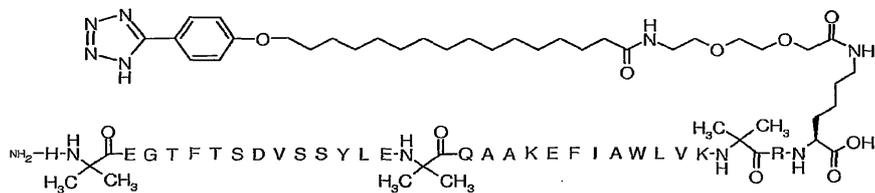
IvDde는 60분간 NMP내의 3% 히드라진 및 3% 피페리딘으로 제거하였다. 타이틀 화합물을 N-Fmoc(2-(2-아미노에톡시)에톡시)아세트산(0.56mmol)과의 아실화에 의해서 제조하고, 그 후 Fmoc기를 제거하고 0.62mmol의 16-(4-(5-테트라졸일)페녹시)헥사데칸산으로 아실화 하였다. 지지체로부터 절단 후, 펩티드를 예비 HPLC (구배용출 0 내지 5분 = 30% MeCN, 5 내지 40분 = 30 내지 65% MeCN; Xterra prep. Ms C18)에 의해 정제하였다.

RT = 26.1분

Maldi:m/z = 4071; 계산치: 4069.6

실시예 13.

N-ε37-(2-(2-(2-(16-(4-(5-테트라졸일)페녹시)헥사데카노일)에톡시)에톡시)아세틸)[Aib8,22,35,Lys37]GLP-1(7-37)



[Aib8,22,35,Lys37]GLP-1(7-37)펩티드를 표준 Fmoc 방법론의 사용 및 개시 수지로서 2-클로로트리틸 클로라이드 수지(0.400g, 로딩: 1.4mmol/g)를 사용하여 Advanced Chemtech APEX 348 펩티드 합성기에서 제조하였다. Lys37은 Fmoc-Lys(ivDde)-OH로 보호하였다.

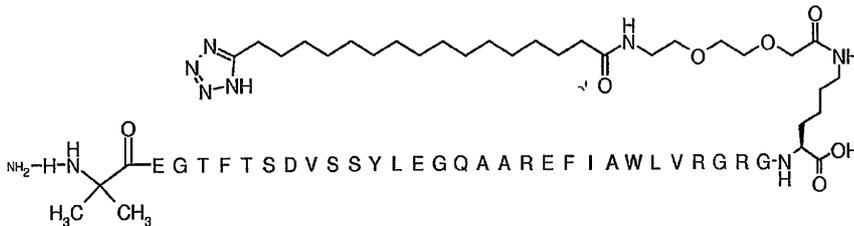
IvDde는 60분간 NMP내의 3% 히드라진 및 3% 피페리딘으로 제거하였다. 이 탈보호 후, 수지-부착 펩티드를 N-Fmoc (2-(2-아미노에톡시)에톡시)아세트산 (0.59mmol)으로 아실화 하고, 그 후 Fmoc기를 제거하고 0.62mmol의 16-(4-(5-테트라졸일)페녹시)헥사데칸산으로 아실화 하였다. 펩티드를 지지체로부터 절단하고(90% TFA, 5% Tis, 2% 티오아니솔, 3% 물, 2시간), Et₂O로 침전하여, 동결건조하고, 예비 HPLC(구배용출 0 내지 5분 = 30% MeCN, 5 내지 40분 = 30 내지 65% MeCN; Xterra prep. Ms C18)에 의해 정제하였다.

RT = 26.85분

Maldi:m/z = 4042. 계산치: 4040.7

실시예 14.

N^ε38-(2-(2-(2-(16-(테트라졸-5-일)헥사데카노일)에톡시)에톡시)아세틸) [Aib8,Arg26,34,Lys38]GLP-1(7-37)펩티드



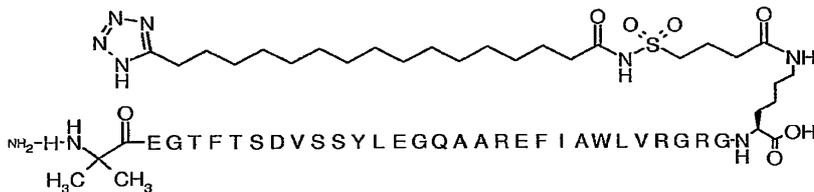
[Aib8,Arg26,34,Lys38]GLP-1(7-37)펩티드를 표준 Fmoc 방법론의 사용 및 개시 수지로서 2-클로로트리틸 클로라이드 수지(0.150g, 로딩: 1.4mmol/g)를 사용하여 Advanced Chemtech APEX 348 펩티드 합성기에서 제조하였다. Lys38은 Fmoc-Lys(ivDde)-OH로 보호하였다.

IvDde는 60분간 NMP내의 3% 히드라진 및 3% 피페리딘으로 제거하였다. 이 탈보호 후, 수지-부착 펩티드를 N-Fmoc (2-(2-아미노에톡시)에톡시)아세트산(0.35mmol)으로 아실화 하고, 그 후 Fmoc기를 제거하여 0.32mmol의 16-(5-테트라졸일)헥사데칸산으로 아실화 하였다. 펩티드를 지지체로부터 절단하고(90% TFA, 5% Tis, 2% 티오아니솔, 3% 물, 2시간), Et₂O로 침전하여, 동결건조하고, 예비 HPLC(구배용출 0 내지 5분 = 80% A, 20% B; 5 내지 45분 내지 40% A, 60% B; A: 물 + 0.1% TFA; B: MeCN + 0.07% TFA)에 의해 정제하였다.

LCMS: 4005. 계산치: 4005.6

실시예 15.

N^ε38-(4-(N-(16-(테트라졸-5-일)헥사데카노일)술파모일)부티릴)[Aib8,Arg26,34,Lys38]GLP-1(7-37)펩티드



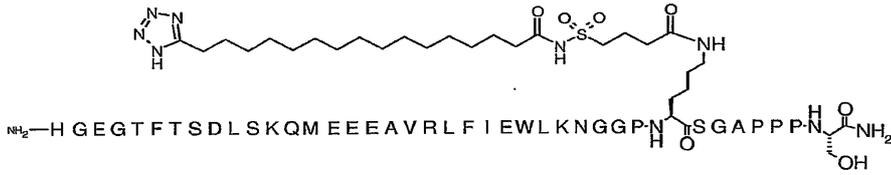
타이틀 화합물을 실시예 6과 같이 제조하였다. 8mg의 타이틀 화합물을 얻었다.

RT: 32분.

Maldi:m/z = 4007. 계산치: 4009

실시예 16.

N-ε32-(4-[N-(16-{5-테트라졸일}헥사데카노일)술파모일]부티릴)-[Lys32]액센딘[1-39]펩티드

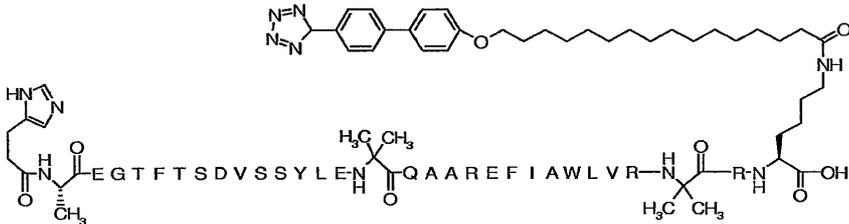


[Lys32]액센딘[1-39]펩티드를 표준 Fmoc 방법론의 사용 및 개시 수지로서 2-클로로트리틸 클로라이드 수지(0.150g, 로딩: 1.4mmol/g)를 사용하여 Advanced Chemtech APEX 348 펩티드 합성기에서 제조하였다. Lys38은 Fmoc-Lys(ivDde)-OH로 보호하였다.

IvDde 보호는 60분간 NMP내의 3% 히드라진 및 3% 피페리딘으로 제거하였다. 이 탈보호 후, 수지-부착 펩티드를 N-Fmoc(2-(2-아미노에톡시)에톡시)아세트산 (0.35mmol)으로 아실화 하고, 그 후 Fmoc기를 제거하고 0.32mmol의 4-(16-(5-테트라졸일)헥사데카노일)술포마일부티르산으로 아실화 하였다. 펩티드를 지지체로부터 절단하고(90% TFA, 5% Tis, 2% 티오아니솔, 3% 물, 2시간), Et₂O로 침전하여, 동결건조하고, 예비 RP-HPLC(구배용출 0 내지 5분: 80% A, 20% B; 5 내지 45분 내지 40% A, 60% B; A: 물 + 0.1% TFA; B: MeCN + 0.07% TFA)에 의해 정제하였다.

실시예 17

N-ε37-(16-(4'-(테트라졸-5-일)비페닐)-4-일옥시)헥사데카노일[3-(4-이미다졸일)프로피오닐 7,Aib22,35,Arg26,34,Lys37]GLP-1(7-37)펩티드



[3-(4-이미다졸일)프로피오닐 7,Aib22,35,Arg26,34,Lys37]GLP-1(7-37)펩티드를 표준 Fmoc 방법론의 사용 및 개시 수지로서 Fmoc-Lys(Boc)-트리틸 폴리스티렌(0.51g, 로딩: 0.50mmol/g)를 사용하여 433A 펩티드 합성기에서 제조하였다. 예비 HPLC에 의한 정제 후 159mg의 [3-(4-이미다졸일)프로피오닐 7,Aib22,35,Arg26,34,Lys37]GLP-1(7-37)펩티드를 얻었다.

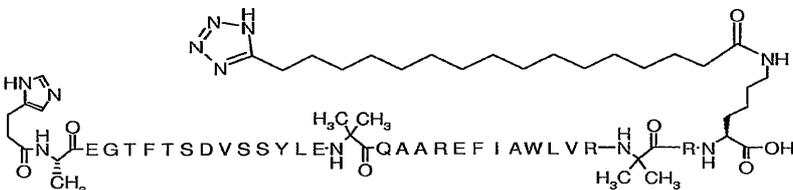
타이틀 화합물을 실시예 5에 기술된 바와 같이 16-(4'-(테트라졸-5-일)비페닐)-4-일옥시)헥사데칸산(10mg)으로 [3-(4-이미다졸일)프로피오닐 7,Aib22,35,Arg26,34,Lys37]GLP-1(7-37)펩티드(18mg)를 아실화하여 제조하였다. 4.74mg의 타이틀 화합물을 얻었다.

HPLC:(방법 B6): RT = 38.4분(97%)

LCMS:m/z = 1333.7 (MH₃³⁺). (MH₃³⁺)에 대한 계산치: 1334.2

실시예 18

N-ε37-(16-(테트라졸-5-일)헥사데카노일)[3-(4-이미다졸일)프로피오닐 7,Aib22,35,Arg26,34,Lys37]GLP-1(7-37)



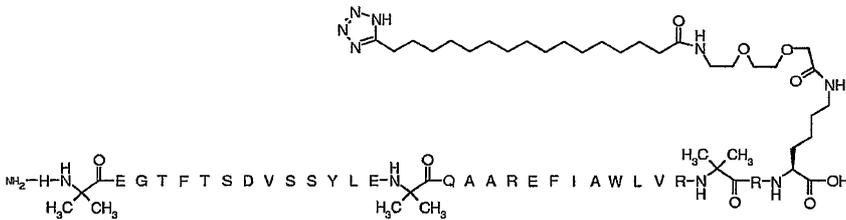
타이틀 화합물을 실시예 5에 기술된 바와 같이 (4-(4-(테트라졸-5-일)[1,1',4',1'']테르페닐-4-일옥시)부티르산(8.0mg)으로 [3-(4-이미다졸일)프로피오닐7]Aib22,35,Arg26,34,Lys37]GLP-1(7-37)펩티드(18mg)를 아실화하여 제조하였다. 0.83mg의 타이틀 화합물을 얻었다.

HPLC:(방법 B6): RT = 31.9분(100%)

LCMS:m/z = 1303.3 (MH₃³⁺). (MH₃³⁺)에 대한 계산치: 1303.1

실시예 21

N-ε37-(2-(2-(2-(16-(테트라졸-5-일)헥사데카노일)아미노)에톡시)에톡시)아세틸)[Aib8,22,35,Arg26,34,Lys37]GLP-1(7-37)



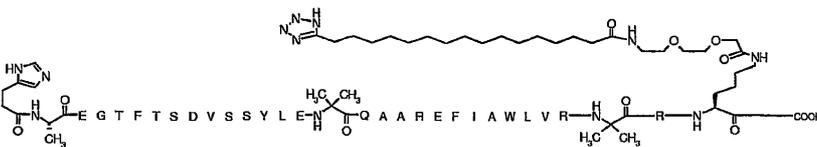
특정 리신 잔기에 링커 및 측쇄의 부착은 Fmoc-보호의 제거용 과정으로 DDE-Lys(FMOC)-2-Cl-트리틸 수지에서 수행하고, 그 후 리신 잔기에 측쇄를 부착하기 위한 과정 및 Dde-보호를 제거하기 위한 과정을 수행하였다. 그 후 N-말단에 펩티드를 합성하여, 수지로부터 펩티드를 절단하고 정제하는 것을 수행하였다.

HPLC:(방법 B6): RT = 32.0분(100%)

LCMS:m/z = 1336.2 (MH₃³⁺). (MH₃³⁺)에 대한 계산치: 1335.9

실시예 22

N-ε37-(2N-ε37-(2-(2-(2-(16-(테트라졸-5-일)헥사데카노일)아미노)에톡시)에톡시)아세틸))[3-(4-이미다졸일)프로피오닐7,Aib22,35,Arg26,34,Lys37]GLP-1(7-37)펩티드



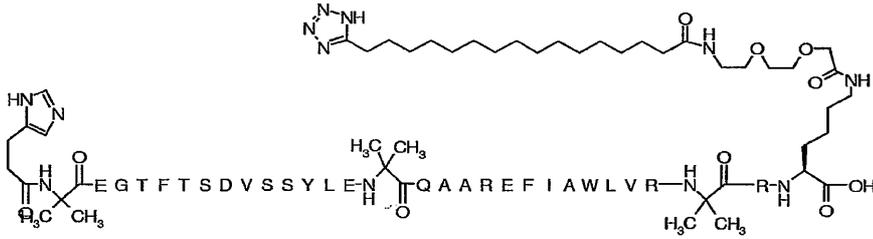
이 화합물은 실시예 21에 기술된 바와 같이 제조하였다.

HPLC:(방법 B6): RT = 32.8분(99%)

LCMS:m/z = 1326.3 (MH₃³⁺). (MH₃³⁺)에 대한 계산치: 1326.2

실시예 23.

N-ε37-(2-(2-(2-(16-(테트라졸-5-일)헥사데카노일)아미노)에톡시)에톡시)아세틸)[3-(4-이미다졸일)프로피오닐7,Aib8,22,35,Arg26,34,Lys37]GLP-1(7-37)펩티드



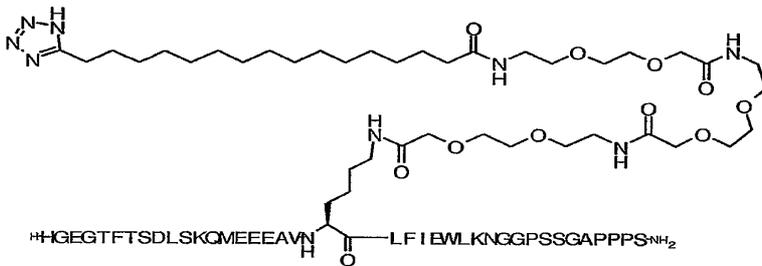
이 화합물은 실시예 21에 기술된 바와 같이 제조하였다.

HPLC:(방법 B6): RT = 33.0분(100%)

LCMS:m/z = 1330.9 (MH₃³⁺). (MH₃³⁺)에 대한 계산치: 1330.9

실시예 24

N-ε20-(2-(2-(2-(2-(2-(2-(2-(2-(16-(테트라졸-5-일)헥사데카노일아미노아미노)에톡시)에톡시)아세틸아미노)에톡시)에톡시)아세틸아미노)에톡시)에톡시)아세틸)[Lys20]액센딘-4(1-39)아미드



비정제 수지 부착 보호된 펩티드의 특정 리신 잔기에 링커 및 측쇄의 부착은 자동화 합성동안 Fmoc-Lys(Mtt)-OH의 혼입에 의해서 특정 위치에서 수행하고, 노란색이 사라질 때까지(1 시간 후) DCM내의 1% TFA 및 1% TIS로 보호된 펩티드 수지의 작업순차적 처리로 선택적 탈보호를 수행하였다. 이것은 그 후 DMF로 광범위한 세척을 하고, 실시예 21에 기술된 바와 같이 스페이서 및 측쇄의 부착을 하여, 수지로부터 펩티드를 절단하고, 정제하였다.

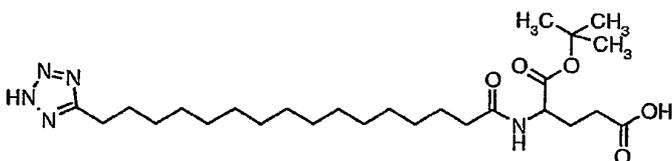
HPLC:(방법 B6): RT = 31.1분(100%)

LCMS:m/z = 1634.3 (MH₃³⁺). (MH₃³⁺)에 대한 계산치: 1634.5

실시예 25 (일반과정 A, 인간 테스B30 인슐린을 사용하는 아실화)

N^εB29-(16-2H-테트라졸-5-일-헥사데카노일)감마-Glu-테스(B30) 인간 인슐린

1단계: 2-(16-2H-테트라졸-5-일-헥사데카노일아미노)펜탄디오익산1-tert-부틸 에스테르의 합성

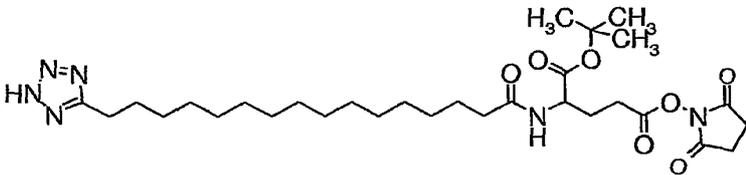


16-(2H-테트라졸-5-일)헥사데칸산(433mg, 1.3mmol)을 톨루엔(5 mL) 및 2,2-디메톡시프로판(2mL, 16mmol) 내에서 수 분간 가열하여 환류시켰다. 용매를 진공상태에서 제거하였다. 에틸 아세테이트(10mL)를 첨가하고, N-(3-디메틸아미

노프로필)-N'-에틸카르보디이미드 히드로클로라이드(359mg, 1.87mmol) 및 1히드록시벤조트리아졸(281mg, 2mmol)을 그 후 첨가하였다. 반응은 실온에서 30분간 교반하고, L-글루탐산 α tert-부틸-감마 벤질 디에스테르 히드로클로라이드(661mg, 2mmol), 디소프로필아민(0.34mL, 2mmol), 및 에틸 아세테이트(4mL)의 혼합물을 첨가하였다. 혼합물을 실온에서 밤새 교반했다. 반응을 에틸 아세테이트(50mL) 및 물(50mL) 사이에 분배하였다. 유기상을 건조하고(Na₂SO₄), 용매를 진공상태에서 제거하였다. 비정제 2-(16-2H-테트라졸-5-일-헥사데카노일아미노)펜탄디오익산 5-벤질 에스테르 1-tert-부틸 에스테르를 0.1% TFA를 포함하는 아세토니트릴/물 60 내지 90% 구배를 사용하여 C-18 RP-HPLC 5cm x 20cm, 20ml/분 흐름에서 정제하였다. 2-(16-2H-테트라졸-5-일-헥사데카노일아미노)펜타디오익산 5-벤질 에스테르 1-tert-부틸 에스테르를 포함하는 분획을 수집하고, 용매를 진공상태에서 제거하였다. 잔류물을 에틸 아세테이트(10mL)에 재용해하고, 활성화된 숯(200mg)상의 팔라듐을 첨가하여, 혼합물을 수소환경(1 atm) 하에서 3시간 동안 교반했다. 혼합물을 여과하고, 용매를 진공상태에서 제거하여 2-(16-2H-테트라졸-5-일-헥사데카노일아미노)펜탄디오익산 1-tert-부틸 에스테르(100 mg)를 산출하였다.

HPLC-MS:m/z = 511;Rt = 4.17분

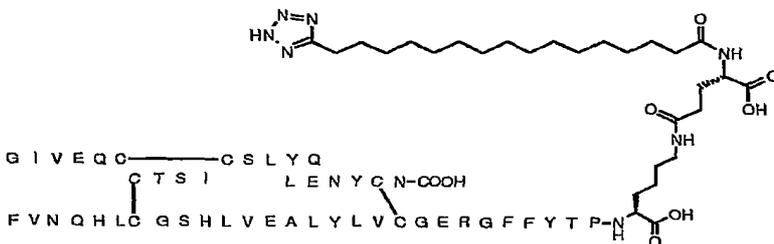
2단계: 2-(16-2H-테트라졸-5-일-헥사데카노일아미노)펜탄디오익산 1-tert-부틸 에스테르 5-(2,5-디옥소피롤리딘-1-일) 에스테르의 합성



2-(16-2H-테트라졸-5-일-헥사데카노일아미노)-펜탄디오익산 1-tert-부틸 에스테르(100mg, 0.19mmol)를 THF (10mL)에서 용해하였다. 혼합물을 얼음 욕탕으로 냉각하였다. 디소프로필에틸아민(0.041mL, 0.24mmol) 및 O-(N-숙신이미딜)-N,N,N',N'-테트라메틸우로늄 테트라플루오로보레이트(71mg, 0.24mmol)를 첨가하였다. 혼합물을 0°C에서 질소하에서 교반했다. 30분 후, 얼음 냉각을 제거하고 혼합물을 추가 3시간 동안 교반했다. 용매를 진공상태에서 제거하고, 그 뒤 톨루엔과 함께 잔류물의 공증발을 행했다. 비정제 생산물을 에틸 아세테이트(30mL)에 용해하고, 물(2x20mL)로 세척하여, 혼합된 수성상을 에틸 아세테이트(30mL)로 한번 추출하였다. 혼합된 유기상을 건조하고(Na₂SO₄), 용매를 진공상태에서 제거하여 추가적 정제됨이 없이 다음 단계에 사용하였던 타이틀 화합물(83mg)을 산출하였다.

HPLC-MS:m/z = 607;Rt= 4.73분

3 단계: N^{B29}-(16-2H-테트라졸-5-일-헥사데카노일)감마-Glu-테스(B30) 인간 인슐린의 합성



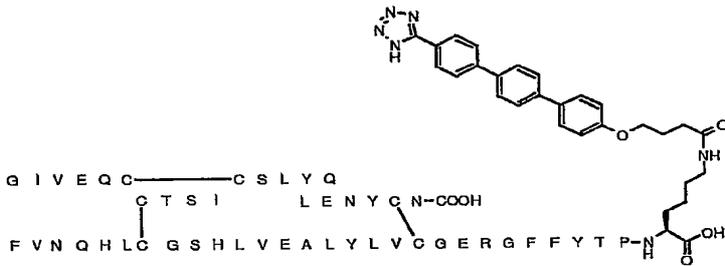
A1B1 BocBoc 테스(B30)인슐린 (Kurtzhals P; Havelund S; Jonassen I; Kiehr B; Larsen UD; Ribel U; Markussen J, *Biochemical Journal*, 1995, 312, 725-731) (0.2g, 0.034mmol)을 DMSO(3mL)에 용해하였다. 트리에틸아민(0.047mL, 0.34mmol) 및 DMSO(1mL) 내의 2-(16-2H-테트라졸-5-일-헥사데카노일아미노)펜탄디오익산 1-tert-부틸 에스테르 5-(2,5-디옥소-피롤리딘-1-일) 에스테르(58mg, 0.096mmol)의 용액을 첨가하고, 혼합물을 실온에서 1시간 동안 진탕하였다. 혼합물을 얼음욕탕(DMSO 빙결)으로 냉각하고, 물(10mL)을 첨가하여, 동결된 혼합물을 녹도록 허용하였다. pH를 1N HCl로 5.2로 조정하였다. 생산물을 5°C에서 1시간 동안 침전하도록 허용하였다. 침전물을 원심분리에 의해서 분리하고 30분간 TFA(10mL)으로 처리하였다. 이 용액을 얼음-냉각된 디에틸에테르(40mL)에 붓고, 비정제 생산물을 원심분리에 의해 분리하여 0.1% TFA를 포함하는 아세토니트릴/물 25-45% 구배를 사용하는 C-18 RP-HPLC 5m x 20cm, 20ml/

분 흐름에서 정제하였다. 생산물을 포함하는 분획들을 통합하고 동결건조 하였다. 동결건조된 물질에 물(7.2mL)을 첨가하고 pH를 1N 및 0.1N NaOH와 함께 8.98으로 조정하였다. pH를 0.1N HCl과 함께 5.2 내지 5.5로 다시금 조정하였다. 침전물을 원심분리에 의해 분리하고, 동결건조하여 타이틀 화합물을 생산하였다.

HPLC-MS:m/[sum] = 1536(m/4), 1229(m/5), 1024(m/6); Rt = 3.47분

실시예 26.

N^{B29ε}-4-[4'-(1H-테트라졸-5-일)-[1,1',4',1'']테르페닐-4-일옥시]-부티로일 데스(B30)인슐린

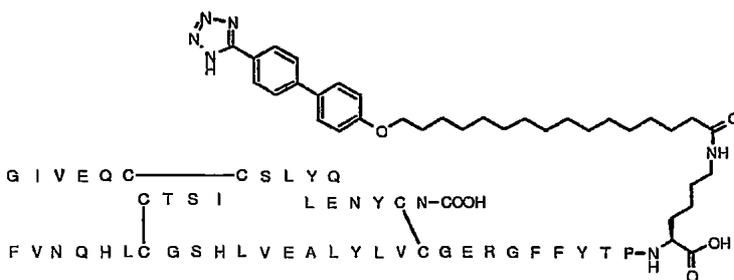


4-(4-(5-테트라졸일)-[1,1',4',1'']-테르페닐-4"-일옥시)부티르산(166mg, 0.42mmol)을 DMF(2ml)에 현탁하고 TSTU (150mg, 0.50mmol) 및 DIEA(85μl, 0.50mmol)으로 처리하였다. 혼합물을 밤새 교반하였다. 용매를 진공상태에서 제거하고 잔류물을 에틸 아세테이트 및 0.1M HCl 사이에 분배하였다. 유기상/현탁액을 여과하고, 고체상은 에테르로 세척하여, 진공상태에서 건조하여 활성화된 4-(4-(5-테트라졸일)-[1,1',4',1'']-테르페닐-4"-일옥시)부티르산, 164mg를 제공하였다. 데스(B30) 인간 인슐린(100mg, 0.018mmol)을 실온에서 100mM Na₂CO₃(1.3ml, pH 10.2)에 용해하였다. 활성화된 4-(4-(5-테트라졸일)-[1,1',4',1'']-테르페닐-4"-일옥시)부티르산(10 mg, 0.022mmol)을 DMSO(1.3ml)에 용해하고 인슐린 용액에 첨가하였다. 30분 후, 0.2M 메틸아민(0.1ml)을 첨가하였다. pH를 1M HCl과 함께 5.5로 조정하고, 등전점 침전물을 원심분리에 의해 수집하여, 진공상태에서 건조하였다. 커플링 생산물은 75% (RP-HPLC, C4 컬럼; 완충액 A: 0.1% TFA-물 내의 10% MeCN, 완충액 B: 0.1 % TFA-물 내의 80% MeCN; 구배 16분간 20% 내지 90% B)이었다.

N^{B29ε}-4-[4'-(1H-테트라졸-5-일)[1,1',4',1'']테르페닐-4-일옥시]부티로일 데스(B30) 인슐린을 C4-컬럼의 RP-HPLC, 완충액 A: 20% EtOH + 0.1% TFA, 완충액 B: 80% EtOH + 0.1% TFA; 구배 15 내지 60% B, 그 후 C4-컬럼의 HPLC, 완충액 A: 20% EtOH pH 7.3 내의 10mM Tris + 15mM 암모늄 술페이트, 완충액 B: 80% EtOH, 구배 15 내지 60% B에 의해 정제하였다. 수집된 분획을 70% 아세트니트릴 + 0.1% TFA을 구비한 Sep-Pak에서 탈염하고, 암모니아의 첨가에 의해 중화하여, 동결건조 하였다. 비최적화 산물은 8mg(7%)이었다. HPLC에 의해 평가된 순도는 >98% 이었다. LCMS 6088, C₂₇₆H₃₉₄N₆₈O₇₇S₆은 6089을 요구한다.

실시예 27.

N^{B29ε}-16-[4'-(1H-테트라졸-5-일)-비페닐-4-일옥시]-헥사데카노일 데스(B30) 인슐린



16-(4'-(5-테트라졸일)비페닐-4-일옥시)헥사데칸산(309mg, 0.63mmol)을 DMF(4ml)내에 현탁하고, TSTU(227mg, 0.75mmol) 및 DIEA(127μl, 0.75mmol)으로 처리하였다. 혼합물을 밤새 교반하였다. 용매를 진공상태에서 제거하고 잔류

물을 에틸 아세테이트 및 0.1M HCl 사이에 분배하였다. 유기상/현탁액을 여과하고, 고체상은 에테르로 세척하여, 진공상태에서 건조해서 활성화된 16-(4'-(5-테트라졸일)비페닐-4-일옥시)헥사데칸산, 290mg을 제공하였다. 데스(B30) 인간 인슐린(100mg, 0.018mmol)을 실온에서 100mM Na₂CO₃ (1.3ml, pH 10.2)내에 용해하였다. 활성화된 16-(4'-(5-테트라졸일)비페닐-4-일옥시)헥사데칸산(12mg, 0.022mmol)을 DMSO(1.3ml)에 용해하고, 인슐린 용액에 첨가하였다. 30분 후, 0.2M 메틸아민(0.1ml)을 첨가하였다. pH를 1M HCl과 함께 5.5로 조정하고, 등전점 침전물을 원심분리에 의해 수집하여, 진공상태에서 건조하였다. 커플링 생산물은 37% (RP-HPLC, C4 컬럼; 완충액 A: 0.1% TFA-물 내의 10% MeCN, 완충액 B: 0.1 % TFA-물 내의 80% MeCN; 구배 16분간 20% 내지 90% B)이었다.

N^{B29ε}-16-[4'-(1H-테트라졸-5-일)비페닐-4-일옥시]헥사데카노일 데스(B30) 인슐린을 C4-컬럼의 RP-HPLC, 완충액 A: 20% EtOH + 0.1% TFA, 완충액 B: 80% EtOH + 0.1% TFA; 구배 15 내지 60% B, 그 후 C4-컬럼의 HPLC, 완충액 A: 20% EtOH pH 7.3 내의 10mM Tris + 15mM 암모늄 술페이트, 완충액 B: 80% EtOH, 구배 15 내지 60% B에 의해 정제하였다. 수집된 분획을 70% 아세토니트릴 + 0.1% TFA를 구비한 Sep-Pak에서 탈염하고, 암모니아의 첨가에 의해 중화하여, 동결건조 하였다. 비최적화 산물은 5mg(7%)이었다. HPLC에 의해 평가된 순도는 >98% 이었다. LCMS 6180, C₂₇₆H₃₉₄N₆₈O₇₇S₆은 6181을 요구한다.

HPLC-방법 B4:

A: 아세토니트릴

B: 물

D: 물 내의 1.0% TFA

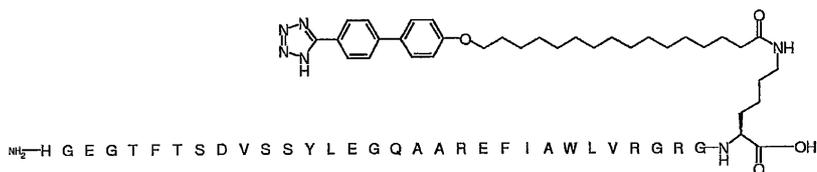
구배: 5 → 95% A, 15분, 1.0ml/분

Symmetry 300, C18, 5μm, 3.9 x 150mm 컬럼

컬럼 오븐 온도 = 42°C; 214nm에서 검출.

실시에 28.

N^{ε37}-16-(4-(4-(5-테트라졸일)페닐)페닐옥시)헥사데카노일)-[Gly8,Arg26,34]GLP-1(7-37)펩티드



타이틀 화합물을 16-(4-(4-(5-테트라졸일)페닐)페닐옥시)헥사데칸산 및 [Gly8,Arg26,34]GLP-1-(7-37)펩티드 (25mg)로부터 실시에 6과 같이 제조하였다. 6.1mg의 타이틀 생산물을 얻었다.

HPLC (방법 B4): RT = 13.07분(94%)

LCMS:m/z = 1335 (MH₃³⁺). (MH₃³⁺)에 대한 계산치: 1334

실시에 29.

N^{ε37}-(4-(4-(4-(4-(5-테트라졸일)페닐)페닐)페닐)부티릴)[Gly8,Arg26,34]GLP-1-(7-37)펩티드



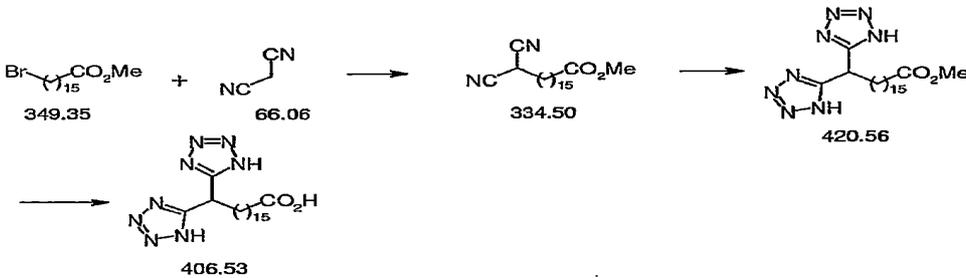
타이틀 화합물을 4-(4-(4-(4-(5-테트라졸일)페닐)페닐)페녹시)부티르산 및 [Gly8,Arg26,34]GLP-1-(7-37)펩티드 (30mg)로부터 실시예 6과 같이 제조하였다. 3.8 mg의 타이틀 생산물을 얻었다.

HPLC(방법 B4): RT = 10.84분(86%)

LCMS:m/z = 1303 (MH_3^{3+}). (MH_3^{3+})에 대한 계산치: 1303

실시예 30.

17,17-비스(5-테트라졸일)헵타데칸산



17,17-디시아노헵타데칸산 메틸 에스테르:

MeCN(20ml) 내의 16-브로모헵타데칸산 메틸 에스테르(1.40g, 4.0mmol)에 말로노디니트릴(1.01g, 15.3mmol) 및 K_2CO_3 (0.92g, 6.64mmol)을 첨가하였다. 혼합물을 80°C에서 18.5시간 동안 교반하였다. 물(50ml) 및 1N HCl(50ml)을 첨가하고, 생산물을 AcOEt으로 추출하였다. 혼합된 추출물을 염수로 세척하고, MgSO_4 상에서 건조하여, 감압하에서 농축하였다. 1.87g(100%)의 오일을 얻었고, 이를 일정 시간 후 완전히 재결정화 하였다.

^1H NMR(DMSO- d_6): δ 1.24(m, 22H), 1.36-1.55(m, 4H), 1.96(m, 2H), 2.28(t, J = 7Hz, 2H), 3.57(s, 3H), 4.80(t, J = 7Hz, 1 H).

17,17-비스(5-테트라졸일)헵타데칸산 메틸 에스테르:

17,17-디시아노헵타데칸산 메틸 에스테르(2.25g, 6.73mmol)에 DMF(12ml), AcOH(4.1ml, 68.3mmol), NEt_3 (9.0ml, 64.9mmol), 및 NaN_3 (5.25g, 80.8mmol)를 첨가하였다. 결과된 혼합물을 140°C에서 19시간 동안 교반하였다. 물(90ml) 및 1N HCl(60ml)를 첨가하고, 혼합물을 농축된 염산의 첨가에 의해서 산화하였다. 고체를 여과제거 하고, 물로 세척하여, 뜨거운 메탄올로부터 재결정화 하여 1.70g(60%)의 고체로서의 타이틀 화합물을 산출하였다.

^1H NMR(DMSO- d_6): δ 1.21(br s, 24H), 1.51(m, 2H), 2.19(m, 2H), 2.28(t, J = 7Hz, 2H), 3.57(s, 3H), 4.94(t, J = 7Hz, 1H).

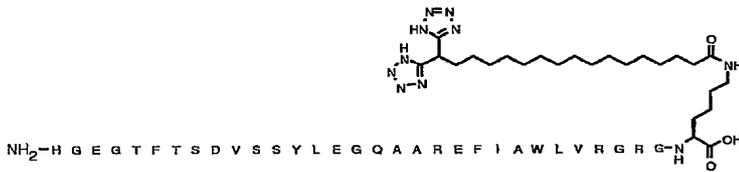
17,17-비스(5-테트라졸일)헵타데칸산:

17,17-비스(5-테트라졸일)헵타데칸산 메틸 에스테르(1.70g, 4.04mmol)를 MeOH(40ml)에 용해하고, 물(3ml) 내의 NaOH(1.17g, 29mmol) 용액을 첨가하였다. 실온에서 19시간 동안 교반 후, 어떠한 개시 에스테르도 ¹H NMR에 의해 검출될 수 없었고, 혼합물을 물(130ml)과 1N HCl(50ml)의 혼합물로 희석하였다. 생산물을 여과에 의해 분리하고, 물로 세척하여, 끓는 MeCN(40ml)으로부터 재결정화하여 0.53g(32%)의 고체로서의 타이틀 화합물을 산출하였다. 모 용액으로부터 더 많은 생산물(0.39 g)을 얻을 수 있었다. 총 수율: 0.92g, 56%.

¹H NMR (DMSO-d₆):δ 1.21(m, 24H), 1.48(m, 2H), 2.18(m, 4H), 4.94(t, J= 7Hz, 1H).

실시예 31.

N^ε37-(17,17-비스(5-테트라졸일)헵타데카노일)[Gly8,Arg26,34]GLP-1-(7-37)펩티드



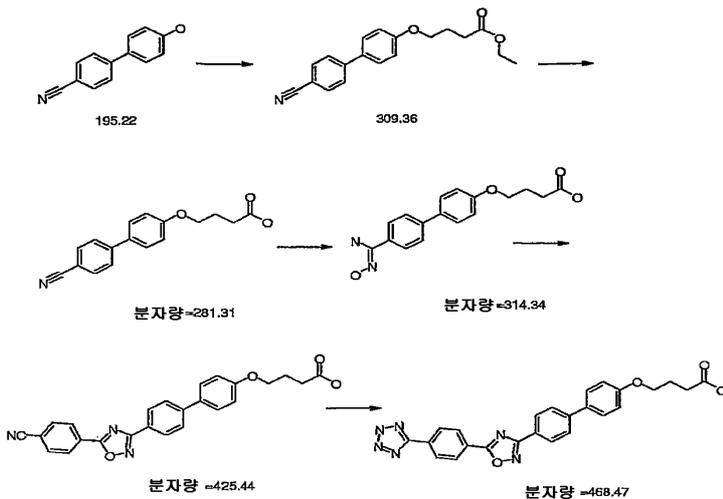
타이틀 화합물을 17,17-비스(5-테트라졸일)헵타데칸산 및 [Gly8,Arg26,34]GLP-1-(7-37)펩티드(45mg)로부터 실시예 6과 같이 제조하였다. 12.5mg의 타이틀 화합물을 얻었다.

HPLC(방법 B4): RT = 11.37분(91%)

LCMS:m/z = 1306 (MH₃³⁺), 1959 (MH₂²⁺). (MH₃³⁺)에 대한 계산치: 1306

실시예 32.

N^ε37-(4-(4'-{5-[4-(5-테트라졸일)페닐]-[1,2,4]옥사디아졸-3-일}비페닐-4-일옥시)부티르산



4'-시아노-4-히드록시비페닐(4.0g, 20.5mmol), MeCN(30ml), 에틸 4-브로모부티레이트(3.75ml, 5.11g, 26.2mmol), 및 K₂CO₃(3.86g, 27.9mmol)의 혼합물을 85°C에서 교반하였다. 20시간 후, 물(150ml)을 첨가하고, 생산물을 AcOEt으로 추출하였다. 혼합된 추출물은 염수로 세척하고, MgSO₄상에서 건조하여, 농축하여 6.91g(100%)의 오일로서의 4-(4'-시아노비페닐-4-일옥시)부티르산 에틸 에스테르를 산출하였다.

THF(50ml) 내의 4-(4'-시아노비페닐-4-일옥시)부티르산 에틸 에스테르(3.78g, 12.7mmol)의 용액에 물(1.5ml) 내의 NaOH(1.0g, 25mmol)의 용액을 첨가하였다. 혼합물을 실온에서 1.5시간 동안 그리고 나서 67°C에서 3시간 동안 교반하였다. 더 많은 물(1ml) 내의 NaOH(1g)를 첨가하고 실온에서의 교반이 15시간 동안 이어졌다. MeOH(10ml)를 첨가하고, 실온에서 1.5시간 동안 교반 후 혼합물을 물(150ml)로 희석하여, 농축 수성 HCl(6.6ml)으로 산화하였다. 생산물을 여과에 의해 분리하고, 물(대략 20ml)로 세척하였다. 고체를 MeCN(50ml)에 현탁하고, 반응되도록 가열하여(용해 없음), 실온으로 냉각하도록 허용하였다. 감압하의 여과 및 건조는 2.70g(76%)의 무색 고체로서의 4-(4'-시아노비페닐-4-일옥시)부티르산을 산출하였다.

4-(4'-시아노비페닐-4-일옥시)부티르산(2.70g, 9.60mmol), EtOH(10ml), THF(15ml), K₂CO₃(3.35g, 24.2mmol), 및 히드록실아민 히드록로라이드(1.50g, 21.6mmol)의 혼합물을 실온에서 3.5일간, 그리고 나서 80°C에서 24시간 동안 교반하였다. 물(100ml)과 1N HCl(50ml)를 첨가하고, 생산물은 여과하여 분리하여, 물로 세척하였다. 고체를 MeCN(70ml)에 현탁하고, 반응되도록 가열하여, 밤새 실온에 보전하고, 여과제거하여서, 감압하에 건조하여 3.23g(100%)의 4-(4'-(N'-히드록시카르밤이미도일)비페닐-4-일옥시)부티르산을 산출하였다.

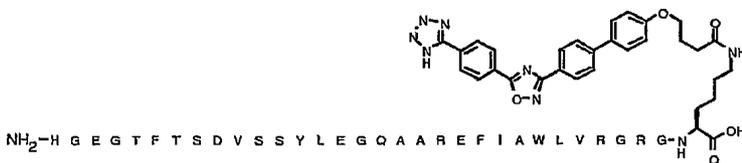
디옥세인(10ml) 내의 4-시아노벤조일 클로라이드(2.29g, 13.8mmol) 용액을 디옥세인(50ml) 및 피리딘(2.5ml, 31.6mmol) 내의 4-(4'-(N'-히드록시카르밤이미도일)비페닐-4-일옥시)부티르산(3.23g, 9.6mmol) 현탁액에 첨가하였다. 혼합물을 실온에서 4시간 교반하고, 그리고 나서 22시간 동안 100°C까지 가열하였다. 혼합물을 그것의 본래 부피의 반까지 농축하고, 물(100ml)로 희석하여, 농축 염산(3ml)으로 산성화하였다. 생산물은 여과에 의해 분리하고, 물(50ml)로 희석하였다. 고체를 MeCN(70ml)에 현탁하고, 가열하여 반응하여, 냉각되도록 허용하고, 여과제거하여, 감압하에서 건조하여 3.17g(54%)의 고체로서의 4-(4'-{5-[4-시아노페닐]-[1,2,4]옥사디아졸-3-일}비페닐-4-일옥시)부티르산을 산출하였다.

4-(4'-{5-[4-시아노페닐]-[1,2,4]옥사디아졸-3-일}비페닐-4-일옥시)부티르산(3.17g, 7.45mmol), DMF(15ml), AcOH(2.25ml, 37.5mmol), NEt₃(5.0ml, 36mmol), 및 NaN₃(2.89g, 44.5mmol)의 혼합물을 140°C에서 교반하였다. 24시간 후, 물(150ml) 및 농축 염산(6ml)을 첨가하였다. 생산물을 여과에 의해 분리하고, 물로 세척하여, MeCN(100ml)에 재현탁하여, 반응되도록 가열하여 (그것을 완전하게 용해하지 않는다), 균질화하고, 실온으로 냉각하도록 허용하였다. 여과로 2.50g(72%)의 고체로서의 4-(4'-{5-[4-(5-테트라졸일)페닐]-[1,2,4]옥사디아졸-3-일}비페닐-4-일옥시)부티르산을 산출하였다.

¹H NMR (DMSO-d₆): δ 1.98(m, 2H), 2.41 (t, J = 7 Hz, 2H), 4.06(t, J = 7 Hz, 2H), 7.07(d, J = 8 Hz, 2H), 7.72(d, J = 8 Hz, 2H), 7.88(d, J = 8Hz, 2H), 8.16(d, J = 8Hz, 2H), 8.32(d, J = 8Hz, 2H), 8.41 (d, J = 8Hz, 2H).

실시예 33.

N^ε37-(4-(4'-{5-[4-(5-테트라졸일)페닐]-[1,2,4]옥사디아졸-3-일}비페닐-4-일옥시)부티릴)[Gly8,Arg26,34]GLP-1-(7-37)펩티드



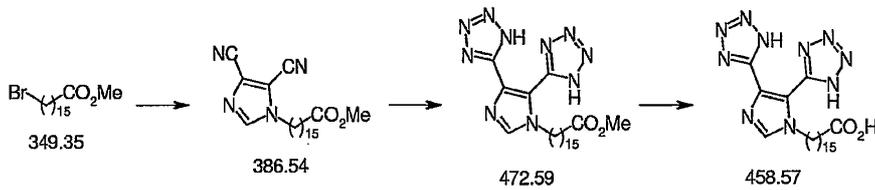
타이틀 화합물을 4-(4'-{5-[4-(5-테트라졸일)페닐]-[1,2,4]옥사디아졸-3-일}비페닐-4-일옥시)부티르산 및 [Gly8,Arg26,34]GLP-1-(7-37)펩티드(60mg)로부터 실시예 6과 같이 제조하였다. 1.8mg의 타이틀 화합물을 얻었다.

HPLC(방법 B4): RT = 11.2분 (99%)

LCMS: m/z = 1326 (MH₃³⁺). (MH₃³⁺)에 대한 계산치: 1326

실시예 34

16-(4,5-비스(5-테트라졸일)이미다졸-1-일)헥사데칸산



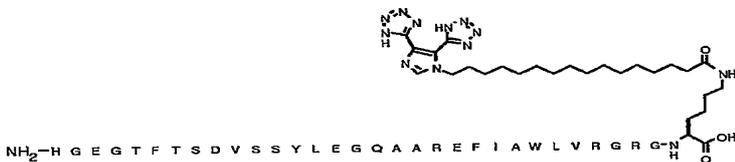
16-브로모헥사데칸산 메틸 에스테르(3.50g, 10.02mmol), 4,5-디시아노이미다졸(1.52g, 12.87mmol), MeCN(30ml), 및 K₂CO₃(1.95g, 14.1mmol)의 혼합물을 80°C에서 66시간 동안 교반하였다.

물(100ml) 및 1N HCl(40ml)를 첨가하고, 생산물을 AcOEt으로 두 번 추출하였다. 혼합된 추출물을 염수로 세척하고, MgSO₄상에서 건조하여, 감압하에서 농축하였다. MeOH(10ml)로부터 재결정화로 3.41g(88%)의 무색 고체로서의 16-(4,5-디시아노이미다졸-1-일)헥사데칸산 메틸 에스테르를 산출하였다. 16-(4,5-디시아노이미다졸-1-일)헥사데칸산 메틸 에스테르(3.86g, 10mmol), DMF(8ml), AcOH(6.2ml, 103mmol), NEt₃ (13.8ml, 100mmol), 및 NaN₃(7.98g, 123mmol)의 혼합물을 140°C에서 교반하였다. 20시간 후 DMF(9ml)을 더 첨가하였다. 44시간 후 물(100ml)을 첨가하고, 농축 염산(대략 12ml)으로 산성화 하였다. 생산물을 여과제거하고, 물로 세척하여, MeCN(100ml) 내에 재현탁하고, 반송하도록 가열한 후 (완전한 용해 없음), 냉각하도록 허용하였다. 감압하에서 여과 및 건조로 4.57g(97%)의 갈색 고체로서의 16-(4,5-비스(5-테트라졸일)이미다졸-1-일)헥사데칸산을 산출하였다. 이 고체(4.57g, 9.67mmol)는 MeOH(50ml) 및 물(10ml) 내의 NaOH(4.01g, 100mmol) 용액과 혼합하였다. 결과된 투명한 용액을 60°C에서 22시간 동안 교반하고, 물(400ml) 및 농축 염산(12M, 20ml)의 교반 혼합물에 부었다. 고체는 여과제거하고, 물로 세척하여, MeCN(150ml) 내에 재현탁하고, 반송하도록 가열한 후, 실온에서 밤새 있도록 허용하였다. 감압하에서 여과 및 건조로 3.71g(84%)의 갈색 고체로서의 타이틀 화합물을 산출하였다.

¹H NMR (DMSO-d₆): δ 1.20(m, 22H), 1.48(m, 2H), 1.65(m, 2H), 2.19(t, J= 7Hz, 2H), 4.24(t, J= 7Hz, 2H), 8.38(s, 1H).

실시예 35.

N^{ε37}-(16-(4,5-비스(5-테트라졸일)이미다졸-1-일)헥사데카노일)[Gly8,Arg26,34]GLP-1-(7-37)펩티드



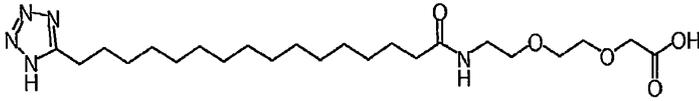
타이틀 화합물을 16-(4,5-비스(5-테트라졸일)이미다졸-1-일)헥사데칸산 및 [Gly8,Arg26,34]GLP-1-(7-37)펩티드 (60mg)로부터 실시예 6과 같이 제조하였다. 8mg의 타이틀 화합물을 얻었다.

HPLC(방법 B4): RT = 11.61분(98%)

LCMS:m/z = 1323 (MH₃³⁺). (MH₃³⁺)에 대한 계산치: 1323

실시예 xxx.

(2-(2-(16-(5-테트라졸일)헥사데카노일아미노)에톡시)에톡시)아세트산

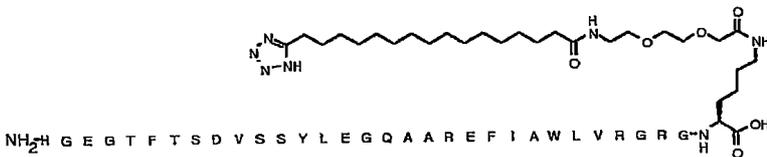


디클로로메탄 내의 2-클로로트리틸 클로라이드 수지(2g; 가교된 폴리스티렌) 현탁액에 디클로로메탄 (15ml) 내의 (2-(2-(9H-플루오렌-9-일메톡시카르보닐아미노)에톡시)에톡시)아세트산(0.55g, 1.43mmol) 용액을 첨가하고, 그리고나서 디클로로메탄(7ml) 내의 DIPEA(0.65ml)을 첨가하였다. 실온에서 20분간 교반 후, 메탄올(2ml)을 첨가하고, 교반을 10분간 지속하였다. 수지를 여과하고, 디클로로메탄으로 두 번, DMF로 한 번 세척하였다. 수지를 DMF(2 x 10분) 내의 피페리딘 20%-용액으로 처리하고, DMF 및 디클로로메탄으로 광범위하게 세척하였다. 디클로로메탄(25ml) 내의 16-(5-테트라졸일)헥사데칸산(1.0g, 3.08mmol), 3-히드록시-3,4-디히드로-1,2,3-벤조트리아진-4-원(0.49g, 3.0mmol), 및 EDC (0.58g, 3.03mmol)의 용액을 수지에 첨가하고, 혼합물을 60시간 동안 진탕하였다. 수지를 그리고나서 DMF, 디클로로메탄 및 메탄올로 광범위하게 세척하고, 트리플루오로아세트산 및 디클로로메탄(25:75;부피)의 혼합물에 현탁하였다. 0.5 시간 후, 수지를 여과하고, 디클로로메탄으로 헹구고, 혼합된 여과물은 농축하여, 잔류물을 MeCN으로부터 재결정화하여 0.26g의 타이틀 화합물을 산출하였다.

¹H NMR (DMSO-d₆): δ 1.23(m, 22H), 1.46(m, 2H), 1.67(m, 2H), 2.04(t, J= 7Hz, 2H), 2.85(t, J= 7Hz, 2H), 3.18(m, 2H), 3.38(m, 2H), 3.51(m, 2H), 3.58(m, 2H), 4.01(s, 2H).

실시예 36.

N^ε37-((2-(2-(16-(5-테트라졸일)헥사데카노일아미노)에톡시)에톡시)아세트[³⁷Gly8,Arg26,34]GLP-1-(7-37)펩티드



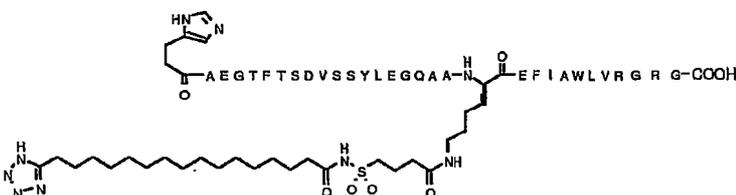
타이틀 화합물을 (2-(2-(16-(5-테트라졸일)헥사데카노일아미노)에톡시)에톡시)아세트산 및 [Gly8,Arg26,34]GLP-1-(7-37)펩티드(85mg)로부터 실시예 6과 같이 제조하였다. 28mg의 타이틀 화합물을 얻었다.

HPLC(방법 B4): RT = 11.35분(95%)

LCMS: m/z = 1327 (MH₃³⁺). (MH₃³⁺)에 대한 계산치: 1327

실시예 37.

N^ε26-(4-{16-(테트라졸-5-일)헥사데카노일술포모일}부틸)[(3-(4-이미다졸일)프로피오닐7,Arg34]GLP-1-(7-37)펩티드



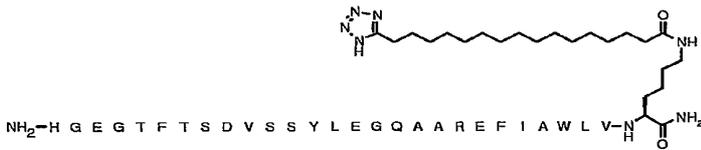
이 화합물은 4-(16-(5-테트라졸일)헥사데카노일아미노술포닐)부티르산 및 [(3-(4-이미다졸일)프로피오닐,Arg34] GLP-1-(7-37)펩티드(50mg)로부터 실시예 5와 같이 제조하였다. 13.3mg의 타이틀 화합물을 얻었다.

HPLC(방법 B4): RT = 11.61분(98%)

LCMS:m/z = 1276 (MH₃³⁺). (MH₃³⁺)에 대한 계산치: 1276

실시예 38.

N^ε34-(16-{테트라졸-5-일}헥사데카노일)-[Gly8,Arg26]GLP-1(7-34)펩티드아미드



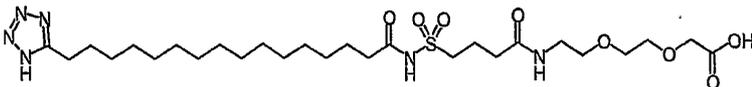
타이틀 화합물이 16-(5-테트라졸일)헥사데칸산 및 [Gly8,Arg26] GLP-1(7-34)펩티드아미드(50mg)로부터 실시예 5와 같이 제조하였다. 17mg의 타이틀 화합물을 얻었다.

HPLC(방법 B4):RT = 12.53분 (100%)

LCMS: m/z = 1136 (MH₃³⁺). (MH₃³⁺)에 대한 계산치: 1136

실시예 39.

(2-(2-(4-(16-(5-테트라졸일)헥사데카노일아미노술포닐)부티릴아미노)에톡시)에톡시)아세트산

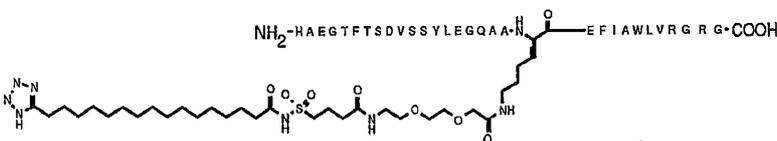


이 화합물은 2-클로로트리틸 염화물 수지 상에서 (2-(2-(16-(5-테트라졸일)헥사데카노일아미노)에톡시)에톡시)아세트산의 합성에 대해 기술된 바와 같이 제조하였다.

¹H NMR (DMSO-d₆): δ 1.23(m, 22H), 1.49(m, 2H), 1.68(m, 2H), 1.85(m, 2H), 2.23(m, 4H), 2.85(t, J = 7Hz, 2H), 3.19(m, 2H), 3.35(m, 4H), 3.52(m, 2H), 3.59(m, 2H), 4.01(s, 2H), 7.91(br t, J= 6Hz, 1H), 11.55 (br s, 1H).

실시예 40.

N^ε26-({2-[2-(4-(16-(테트라졸-5-일)헥사데카노일술포모일)부티릴아미노)에톡시]에톡시)아세틸)-[Arg34]GLP-1(7-37)펩티드



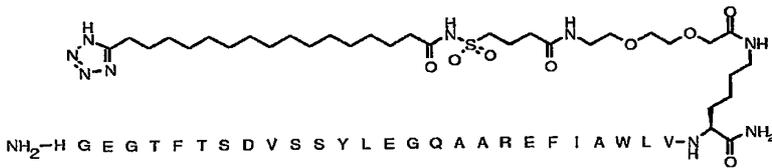
타이틀 화합물을 (2-(2-(4-(16-(5-테트라졸일)헥사데카노일아미노술포닐)부틸릴아미노)에톡시)에톡시)아세트산 및 [Arg34]GLP-1-(7-37)펩티드(350mg)로부터 실시예 6과 같이 제조하였다. 35mg의 타이틀 생산물을 얻었다.

HPLC(방법 B4): RT = 11.63분(99%)

LCMS:m/z = 1329 (MH₃³⁺). (MH₃³⁺)에 대한 계산치: 1329

실시예 41.

N^ε34-({2-[2-(4-(16-(테트라졸-5-일)헥사데카노일술포모일)부틸릴아미노)에톡시]에톡시}아세틸)-[Arg26]GLP-1(7-34)펩티드아미드



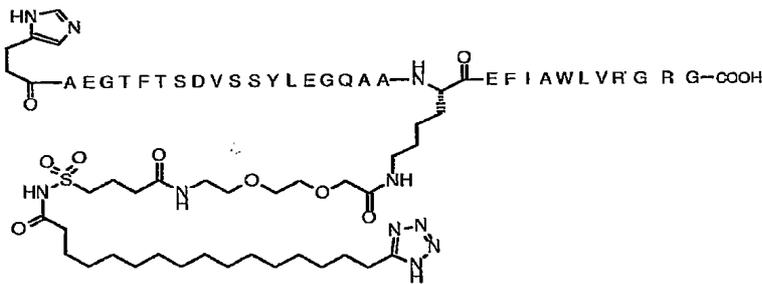
타이틀 화합물을 (2-(2-(4-(16-(5-테트라졸일)헥사데카노일아미노술포닐)부틸릴아미노)에톡시)에톡시)아세트산 및 [Arg26]GLP-1-(7-34)펩티드(40mg)로부터 실시예 6과 같이 제조하였다. 6.5mg의 타이틀 화합물을 얻었다.

HPLC(방법 B4): RT = 12.44분(100%)

LCMS:m/z = 1234 (MH₃³⁺). (MH₃³⁺)에 대한 계산치: 1234

실시예 42.

N^ε26-({2-[2-(4-(16-(테트라졸-5-일)헥사데카노일술포모일)부틸릴아미노)에톡시]에톡시}아세틸)-[(3-(4-이미다졸일)프로피오닐)7,Arg34]GLP-1(7-37)펩티드



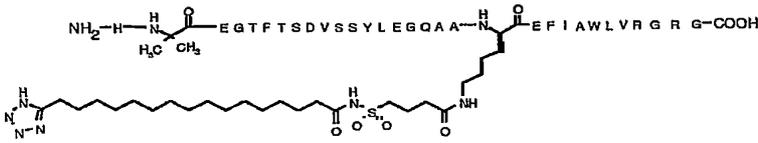
타이틀 화합물을 (2-(2-(4-(16-(5-테트라졸일)헥사데카노일아미노술포닐)부틸릴아미노)에톡시)에톡시)아세트산 및 [(3-(4-이미다졸일)프로피오닐)7,Arg34]GLP-1-(7-37)펩티드(27mg)로부터 실시예 6과 같이 제조하였다. 9.5mg의 타이틀 화합물을 얻었다.

HPLC (방법 B4): RT = 11.85분(96%)

LCMS:m/z = 1324 (MH₃³⁺). (MH₃³⁺)에 대한 계산치: 1324

실시예 43.

N^ε26-(4-(16-(테트라졸-5-일)헥사데카노일술포닐)부티릴)-[Aib8,Arg34]GLP-1-(7-37)펩티드



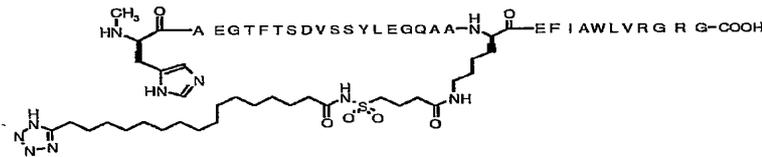
타이틀 화합물을 (4-(16-(5-테트라졸일)헥사데카노일아미술포닐)부티르산 및 [Aib8,Arg34]GLP-1-(7-37)펩티드 (50mg)로부터 실시예 6과 같이 제조하였다. 18.4mg의 타이틀 화합물을 얻었다.

HPLC(방법 B4): RT = 11.87분 (95%)

LCMS:m/z = 1285 (MH₃³⁺). (MH₃³⁺)에 대한 계산치: 1285

실시예 44.

N^α7(Me)N^ε26-(4-(16-(테트라졸-5-일)헥사데카노일술포닐)부티릴)-[Arg34]GLP-1-(7-37)펩티드



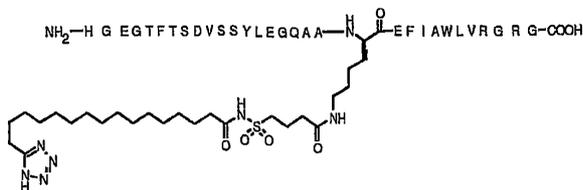
타이틀 화합물을 (4-(16-(5-테트라졸일)헥사데카노일아미노술포닐)부티르산 및 N^α7(Me)[Arg34]GLP-1-(7-37)펩티드 (35mg)로부터 실시예 6과 같이 제조하였다. 2.5mg의 타이틀 화합물을 얻었다.

HPLC(방법 B4): RT = 11.76분(96%)

LCMS:m/z = 1286 (MH₃³⁺). (MH₃³⁺)에 대한 계산치: 1285

실시예 45.

N^ε26-(4-(16-(테트라졸-5-일)헥사데카노일술포닐)부티릴)-[Gly8,Arg34]GLP-1-(7-37)펩티드



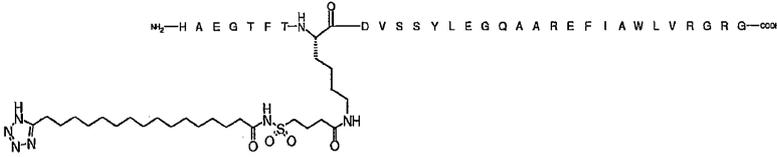
타이틀 화합물을 (4-(16-(5-테트라졸일)헥사데카노일아미노술포닐)부티르산 및 [Gly8,Arg34]GLP-1-(7-37)펩티드 (15mg)로부터 실시예 6과 같이 제조하였다. 3.2mg의 타이틀 화합물을 얻었다.

HPLC(방법 B4): RT = 11.74분(95%)

LCMS:m/z = 1276 (MH₃³⁺). (MH₃³⁺)에 대한 계산치: 1276

실시예 46.

$N^{\epsilon 14}$ -(4-(16-(테트라졸-5-일)헥사데카노일술포닐)부티릴)[Lys14,Arg26,34]GLP-1(7-37) 펩티드



타이틀 화합물을 4-(16-(5-테트라졸일)헥사데카노일아미노술포닐)부티르산 및 [Lys14;Arg26,34]GLP-1-(7-37)펩티드(65mg)로부터 실시예 6과 같이 제조하였다. 19mg의 타이틀 화합물을 얻었다.

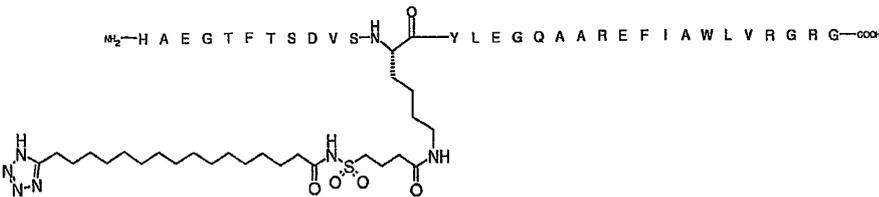
HPLC (방법 B4): RT = 11.54분(98%)

LCMS:m/z = 1304 (MH_3^{3+}). (MH_3^{3+})에 대한 계산치: 1304

상기 기술된 과정으로 제조하도록 계획된 화합물은:

실시예 47.

$N^{\epsilon 18}$ -(4-(16-(테트라졸-5-일)헥사데카노일술포닐)부티릴)[Lys18;Arg26,34]GLP-1-(7-37)펩티드



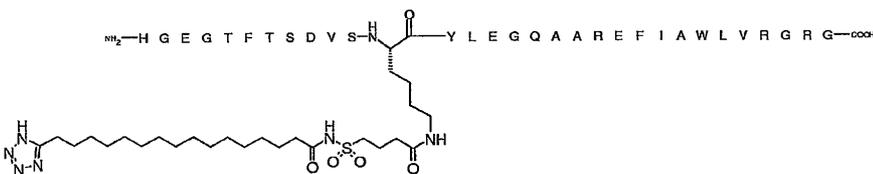
타이틀 화합물을 4-(16-(5-테트라졸일)헥사데카노일아미노술포닐)부티르산 및 [Lys18;Arg26,34]GLP-1-(7-37) 펩티드(80mg)로부터 실시예 6과 같이 제조하였다. 14.5mg의 타이틀 화합물을 얻었다.

HPLC(방법 B4): RT = 9.11분(100%)

LCMS:m/z = 1304(MH_3^{3+}) (MH_3^{3+})에 대한 계산치: 1304

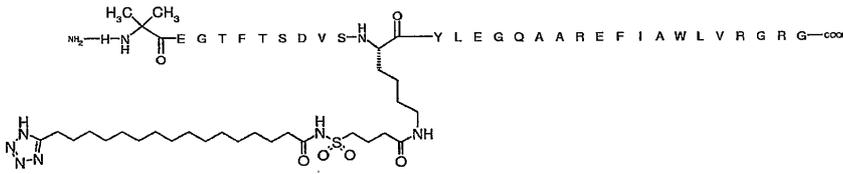
실시예 48.

$N^{\epsilon 18}$ -(4-(16-(테트라졸-5-일)헥사데카노일술포닐)부티릴)[Gly8;Lys18;Arg26,34]GLP-1-(7-37)펩티드



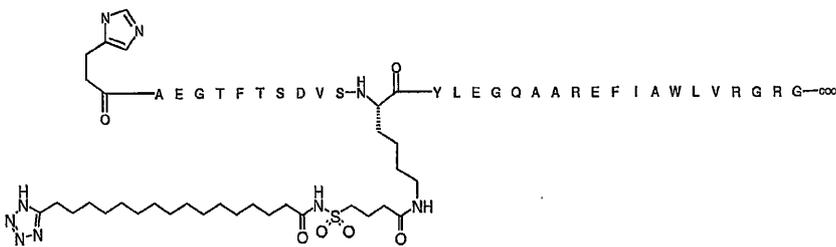
실시예 49.

N^ε18-(4-(16-(테트라졸-5-일)헥사데카노일술포모일)부티릴)[Aib8,Lys18;Arg26,34]GLP-1-(7-37)펩티드



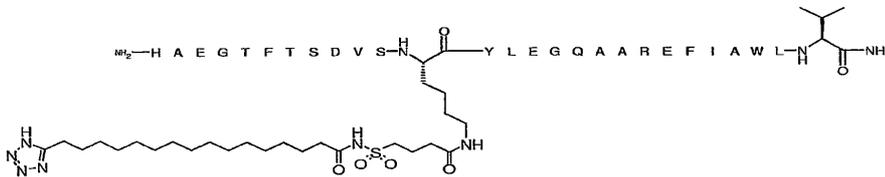
실시예 50.

N^ε18-(4-(16-(테트라졸-5-일)헥사데카노일술포모일)부티릴)[3-(4-이미다졸일)피로피오닐7[Lys18;Arg26,34]GLP-1-(7-37)펩티드



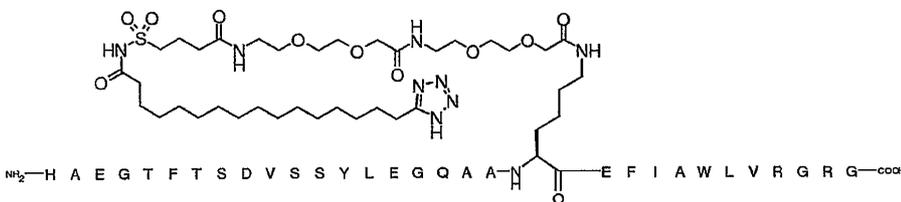
실시예 51

N^ε18-(4-(16-(테트라졸-5-일)헥사데카노일술포모일)부티릴)[Lys18;Arg26]GLP-1-(7-33)펩티드



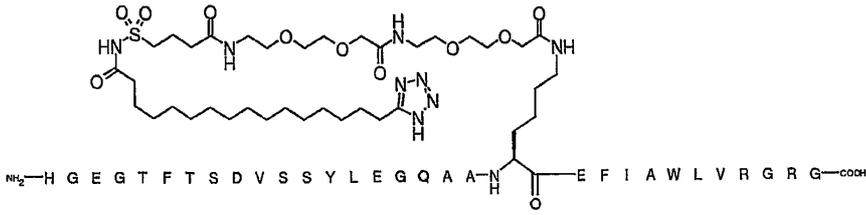
실시예 52.

N^ε26-((2-(2-(2-(2-(2-(4-(16-(테트라졸-5-일)헥사데카노일술포모일)부티릴)에톡시)에톡시)아세틸아미노)에톡시)에톡시)아세틸)-[Arg34]GLP-1-(7-37)펩티드



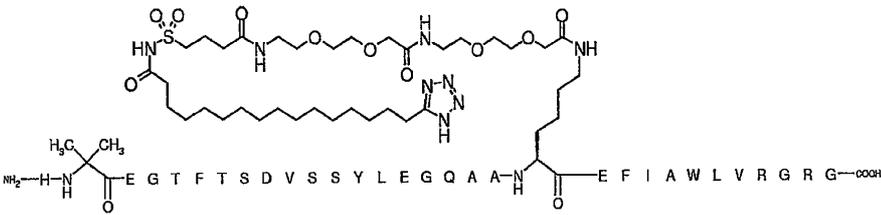
실시예 53.

N^ε26-((2-(2-(2-(2-(2-(4-(16-(테트라졸-5-일)헥사데카노일술포모일)부티릴)에톡시)에톡시)아세틸아미노)에톡시)에톡시)아세틸)[Gly8,Arg34]GLP-1-(7-37) 펩티드



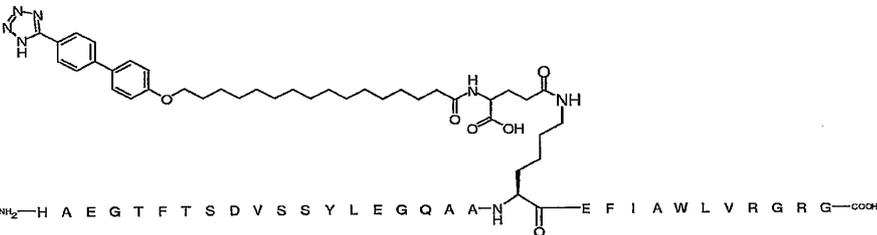
실시예 54.

N^{26} -((2-(2-(2-(2-(2-(4-(16-(테트라졸-5-일)헥사데카노일술폰과모일)부틸릴)에톡시)에톡시)아세틸아미노)에톡시)에톡시)아세틸)-[Aib8,Arg34]GLP-1-(7-37)펩티드



실시예 55.

N^{26} -(4-(16-(4-(4-(5-테트라졸일)페닐)페닐옥시)헥사데카노일아미노)-(4S)-4-카르복시부틸릴)-[Arg34]GLP-1-(7-37)펩티드

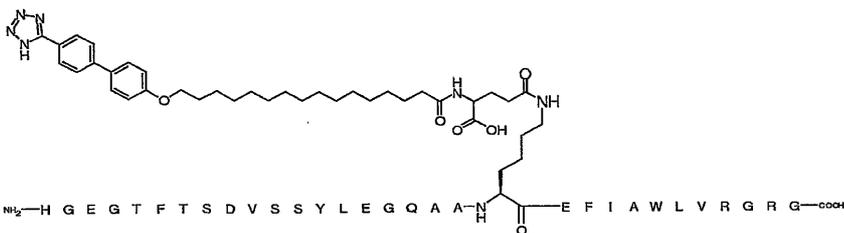


타이틀 화합물을 4-(16-(4-(4-(5-테트라졸일)페닐)페닐옥시)헥사데카노일아미노)-(4S)-4-tert-부톡시카르보닐부틸릴 및 [Arg34]GLP-1-(7-37)펩티드(75mg)로부터 실시예 6과 같이 제조하였다. 6.9mg의 타이틀 화합물을 얻었다.

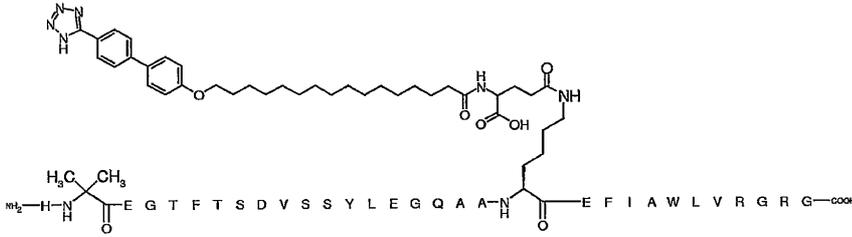
HPLC(방법 B4): RT = 10.57분(100%)

LCMS:m/z = 1330 (MH_3^{3+}). (MH_3^{3+})에 대한 계산치: 1330

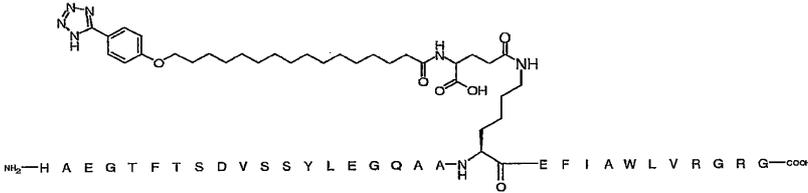
실시예 56.



실시예 57.



실시예 58. N ϵ 26-(4-(16-[4-(1H-테트라졸-5-일)페녹시]헥사데카노일아미노)-(4S)-4-카르복시부티릴)-[Arg34]GLP-1-(7-37)-펩티드

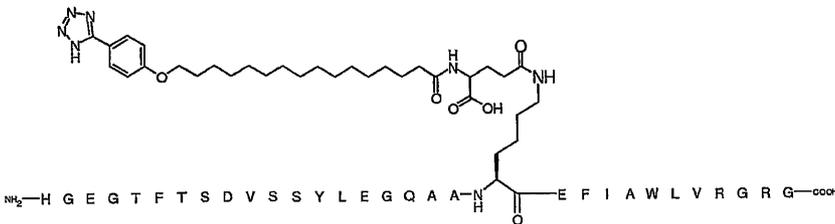


타이틀 화합물을 (4-(16-[4-(1H-테트라졸-5-일)페녹시]헥사데카노일아미노)-(4S)-4-tert-부톡시카르보닐부티르산 및 [Arg34]GLP-1-(7-37)펩티드로부터 실시예 6과 같이 제조하였다. 1.6mg의 타이틀 화합물을 얻었다.

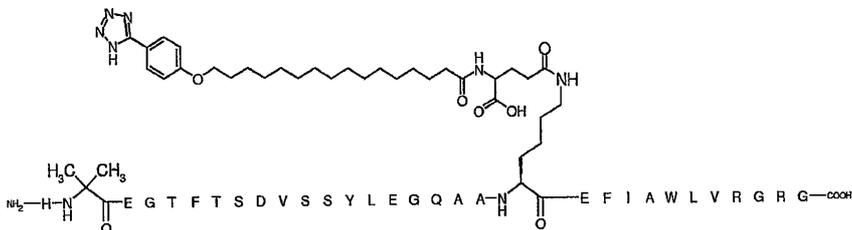
HPLC (방법 B4): RT = 9.96분(100%)

LCMS:m/z = 1305 (MH₃³⁺). (MH₃³⁺)에 대한 계산치: 1305

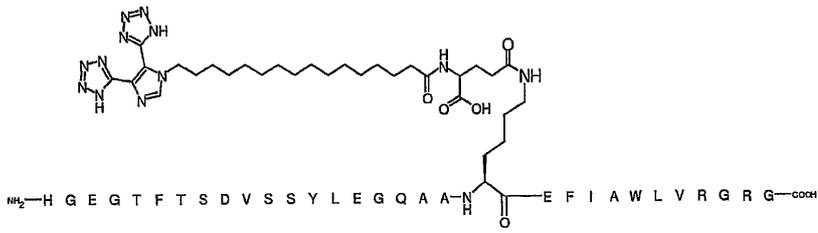
실시예 59.



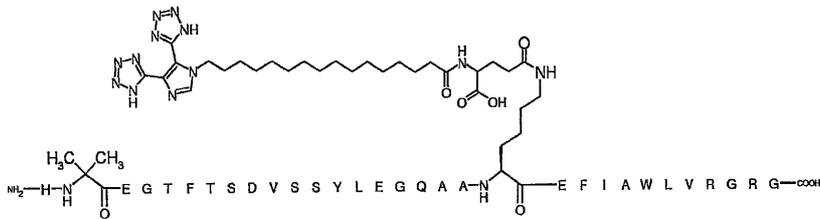
실시예 60.



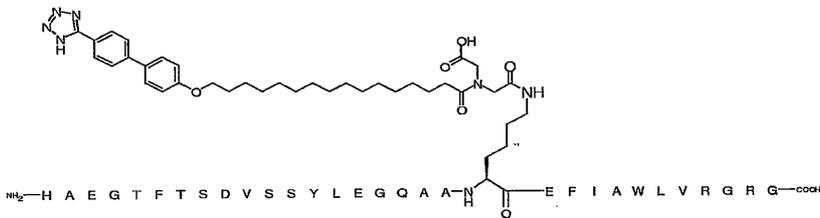
실시예 61. N ϵ 26-{4-[17,17-비스-(1-H-테트라졸-5-일)헵타데카노일아미노]-(4S)-4-카르복시부티릴)-[Arg34]GLP-1-(7-37)-펩티드



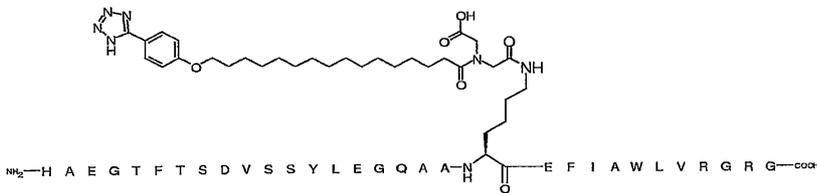
실시예 66



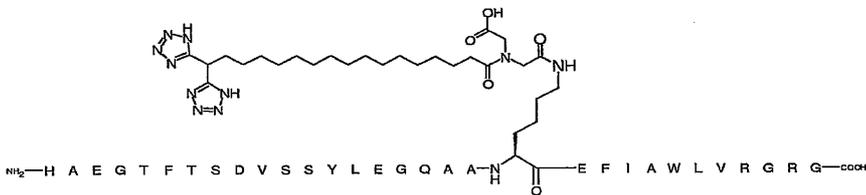
실시예 67



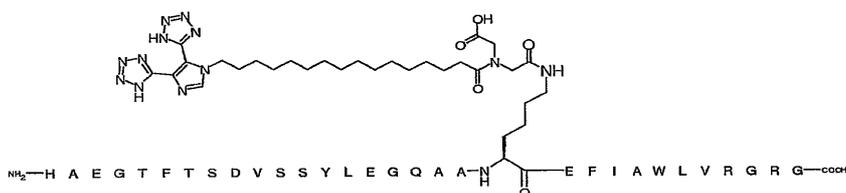
실시예 68.



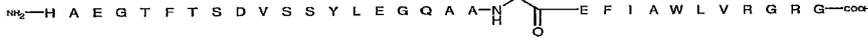
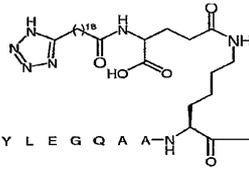
실시예 69.



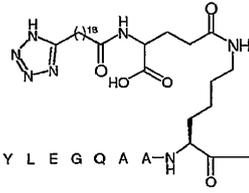
실시예 70.



실시예 71.

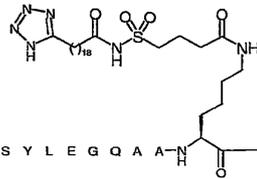


실시예 72.

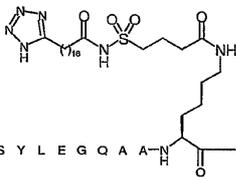


실시예 73.

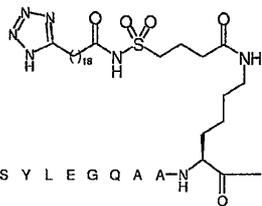
$\text{N}^{\epsilon 26}\text{-}(4\text{-}(19\text{-}(\text{테트라졸-5-일})\text{노나데카노일술폰과모일})\text{부티릴})[\text{Arg}34]\text{GLP-1-(7-37)}\text{펩티드}$



실시예 74.

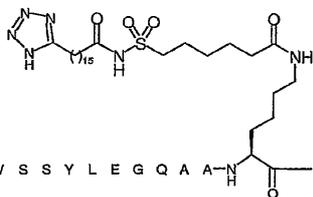


실시예 75.



실시예 76.

$\text{N}^{\epsilon 26}\text{-}(6\text{-}(16\text{-}[1\text{H-테트라졸-5-일}] \text{헥사데카노일})\text{술폰과모일}\text{헥사노일})[\text{Arg}34]\text{GLP-1-(7-37)}$

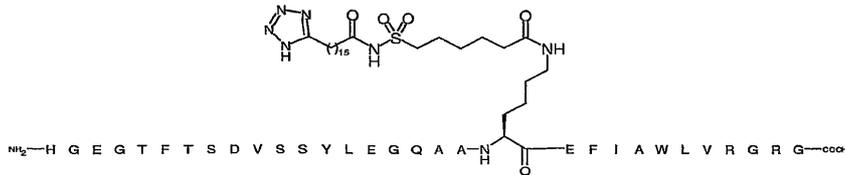


타이틀 화합물을 (6-{16-[1H-테트라졸-5-일]헥사데카노일}술포모일)헥산산 및 [Arg34]GLP-1-(7-37)펩티로부터 실시예 6과 같이 제조하였다. 67.5mg의 타이틀 화합물을 얻었다.

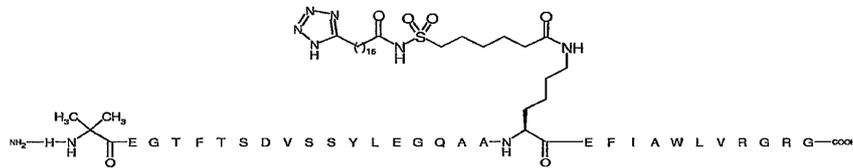
HPLC(방법 B4): RT = 11.08분(98%)

LCMS:m/z = 1290 (MH₃³⁺). (MH₃³⁺)에 대한 계산치: 1290

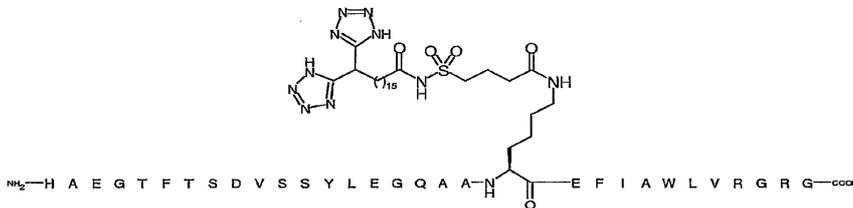
실시예 77.



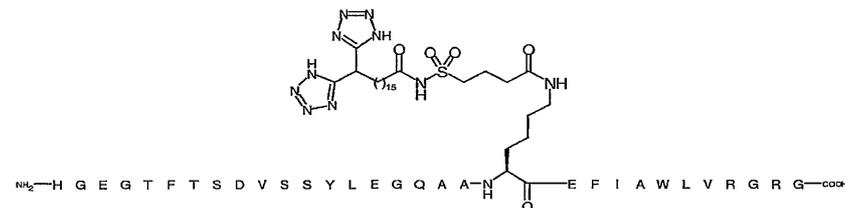
실시예 78.



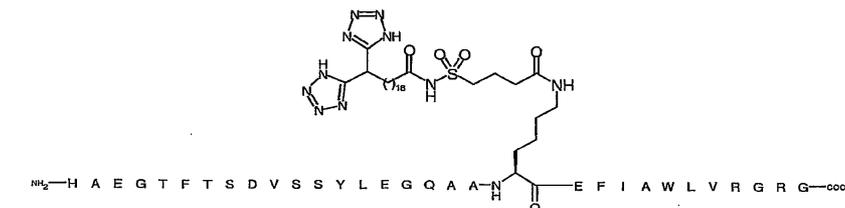
실시예 79.



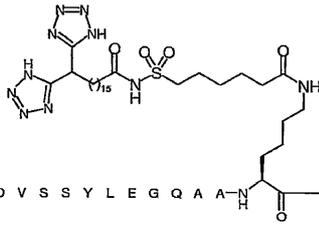
실시예 80.



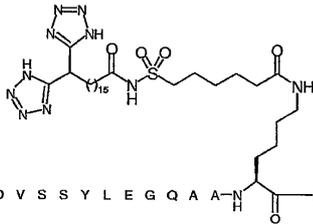
실시예 81.



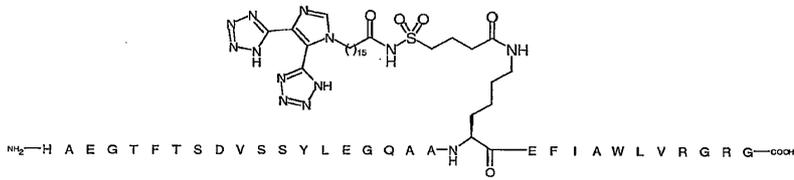
실시예 82.



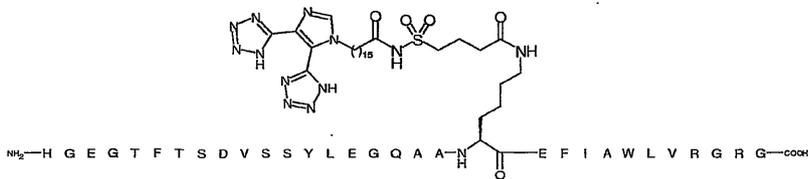
실시예 83.



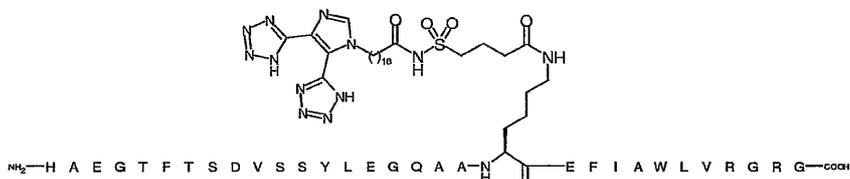
실시예 84.



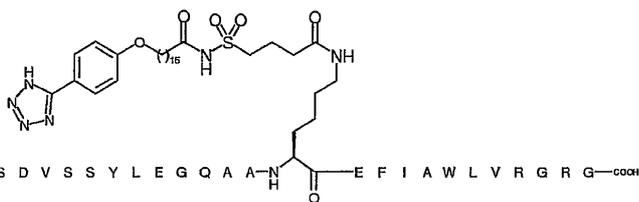
실시예 85.



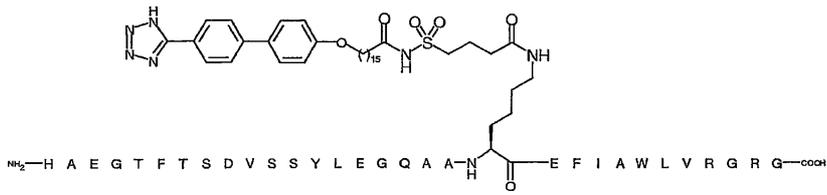
실시예 86.



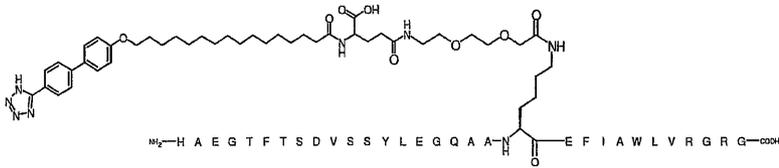
실시예 87.



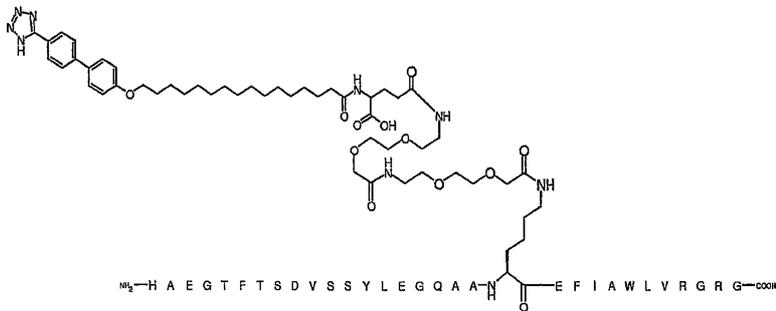
실시예 88.



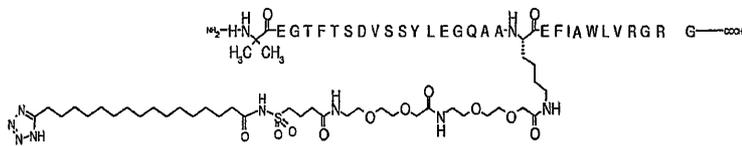
실시예 89.



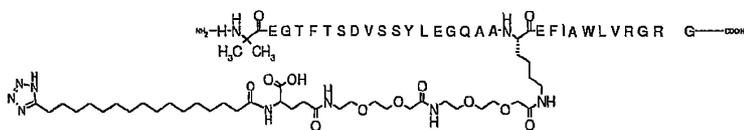
실시예 90.



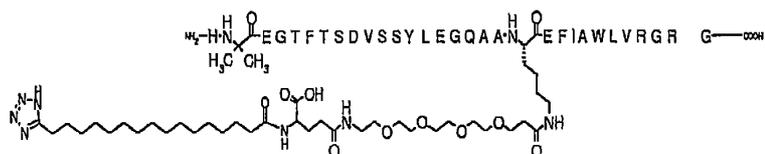
실시예 91.



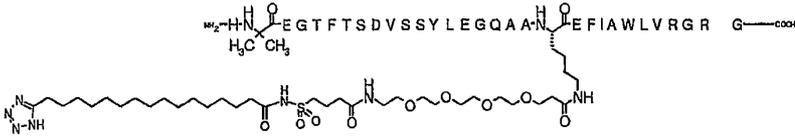
실시예 92.



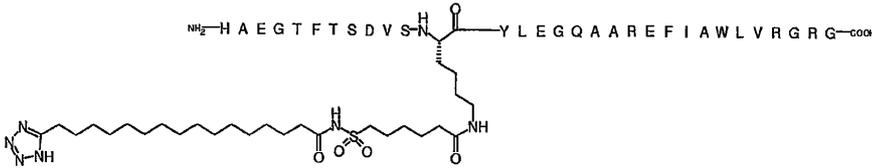
실시예 93.



실시예 94.



실시에 95. N^ε18-(6-{16-[1H-테트라졸-5-일]헥사데카노일술포모일}헥사노일)[Arg26,34,Lys18]GLP-1-(7-37)-펩티드



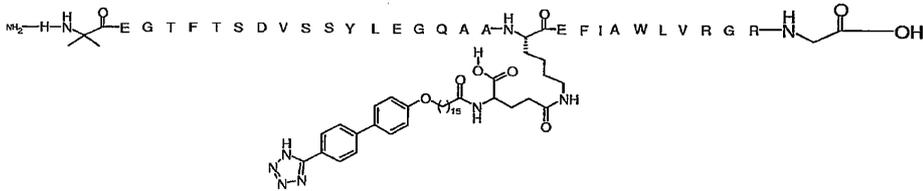
타이틀 화합물을 18-(6-{16-[1H-테트라졸-5-일]헥사데카노일술포모일}헥산산 및 [Arg26,34,Lys18]GLP-1-(7-37)-펩티드로부터 실시에 6과 같이 제조하였다. 26.3mg의 타이틀 화합물을 얻었다.

HPLC(방법 B4): RT = 10.83분(98.3%)

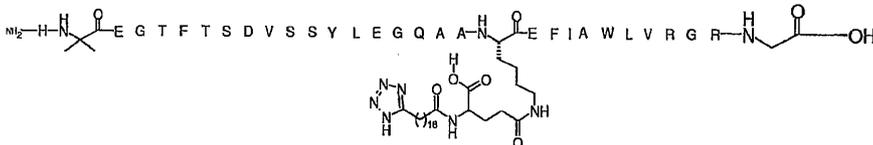
LCMS:m/z = 1313 (MH₃³⁺). (MH₃³⁺)에 대한 계산치: 1313

상기 과정에 따라서 다음 화합을 제조하였다:

N^ε26-[4(S)-4-(16-{4-[4-(1-H-테트라졸-5-일)페닐]페녹시}헥사데카노일아미노)-4-카르복시부티릴][Aib8,Arg34]GLP-1(7-37)



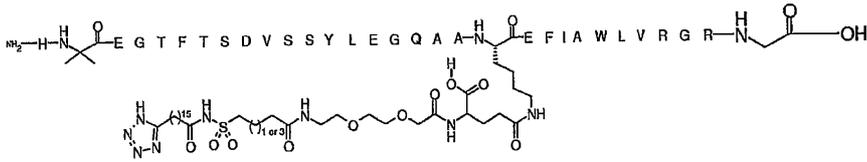
N^ε26-[4(S)-4-(19-(1-H-테트라졸-5-일)노나데카노일아미노)-4-카르복시부티릴][Aib8,Arg34]GLP-1(7-37)



N^ε26-[4(S)-4-(2-(2-(2-(4-(N-(16-(1-H-테트라졸-5-일)헥사데카노일)술포모일)부티릴아미노)에톡시)에톡시)아세틸아미노)-4-카르복시부티릴][Aib8,Arg34]GLP-1(7-37)

또는

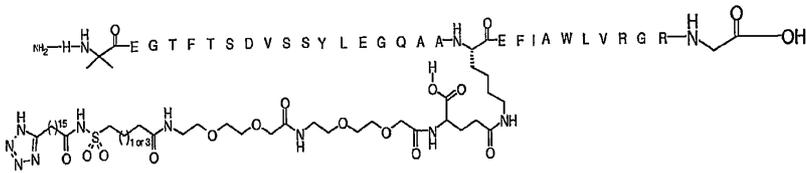
N^ε26-[4(S)-4-(2-(2-(2-(6-(N-(16-(1-H-테트라졸-5-일)헥사데카노일)술포모일)헥사노일아미노)에톡시)에톡시)아세틸아미노)-4-카르복시부티릴][Aib8,Arg34]GLP-1(7-37)



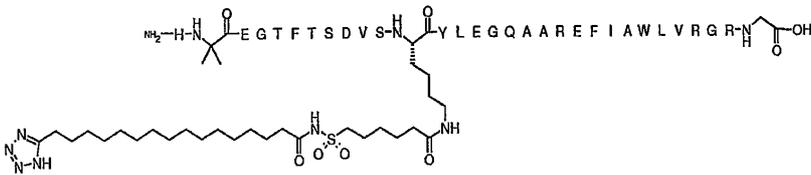
N^ε26-[4(S)-4-(2-(2-(2-(2-(2-(2-(4-(N-(16-(1-H-테트라졸-5-일)헥사데카노일)술폰아미노)부티릴아미노)에톡시)에톡시)아세틸아미노)에톡시)에톡시)아세틸아미노)-4-카르복시부티릴][Aib8,Arg34]GLP-1(7-37)

또는

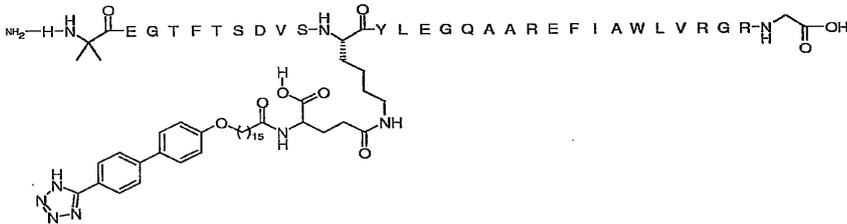
N^ε26-[4(S)-4-(2-(2-(2-(2-(2-(2-(6-(N-(16-(1-H-테트라졸-5-일)헥사데카노일)술폰아미노)헥사노일아미노)에톡시)에톡시)아세틸아미노)에톡시)에톡시)아세틸아미노)-4-카르복시부티릴][Aib8,Arg34]GLP-1(7-37)



N^ε18-6-(16-[1-H-테트라졸-5-일]헥사데카노일술폰아미노)헥사노일[Aib8,Arg26,34]GLP-1(7-37)



N^ε18-[4(S)-4-(16-{4-[4-(1-H-테트라졸-5-일)페닐]페녹시}헥사데카노일아미노)-4-카르복시부티릴][Aib8,Arg26,34]GLP-1(7-37)



산업상 이용 가능성

본 발명에 따른 화합물은 고혈당증, 제2형 당뇨병, 손상된 포도당 내성, 제1형 당뇨병, 비만, 고혈압, 증후군 X, 고지혈증, 독성 혈액량과다증과 연관된 질환, 인지장애, 동맥경화, 심근경색, 관상동맥성 심장질환, 뇌졸중, 및 기타 심혈관질환, 염증성 장 증후군, 소화불량, 및 위궤양과 같은 질환의 치료 및 예방용 약제에 사용될 수 있다.