



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 104185639 B

(45)授权公告日 2018.06.19

(21)申请号 201380011989.X

(72)发明人 J.C.诺里德

(22)申请日 2013.02.26

(74)专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司 72001

(65)同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 104185639 A

代理人 初明明 庞立志

(43)申请公布日 2014.12.03

(51)Int.Cl.

(30)优先权数据

12157638.3 2012.03.01 EP

C07K 14/605(2006.01)

A61K 38/26(2006.01)

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2014.09.01

(56)对比文件

CN 101983066 A,2011.03.02,

CN 101220088 A,2008.07.16,

CN 101910193 A,2010.12.08,

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/EP2013/053796 2013.02.26

审查员 李谦

(87)PCT国际申请的公布数据

W02013/127779 EN 2013.09.06

(73)专利权人 诺和诺德股份有限公司

权利要求书7页 说明书74页

地址 丹麦鲍斯韦

序列表1页 附图2页

(54)发明名称

GLP-1前体药物

(57)摘要

本发明涉及通式I的GLP-1前体药物:R1-(NHXaa1)-Xaa2-(OHis)-(GLP-1肽)(式I),其中GLP-1肽是GLP-1(8-37)(SEQ ID NO:1)或与GLP-1(8-37)相比最多具有9个氨基酸变化的其类似物,R1是低级烷基,(NHXaa1)是氨基酸,Xaa2是氨基酸,和(OHis)是咪唑-乳酸的基团;或所述前体药物的药学上可接受的盐、酰胺或酯。本发明还涉及通式II的特定GLP-1母体药物:(HOHis)-(GLP-1肽)(式II),以及特定的中间体产物。本发明还涉及通过给予GLP-1前体药物实现通式II:(HOHis)-(GLP-1肽)的有活性的和稳定的GLP-1母体药物在体内释放的方法;以及分别涉及这样的GLP-1前体药物和这样的GLP-1母体药物,其用作药物,尤其是用于治疗和/或预防所有形式的糖尿病和相关疾病。所述前体药物可用于改变药物的PK和/或吸收曲线,例如变为理想的钟形曲线。所述母体药物具有良好生物活性,并且对于DPP-IV降解是稳定的。

1. 通式I的GLP-1化合物或其药学上可接受的盐、酰胺或酯:

$R1-(NHXaa1)-Xaa2-(OHis)-(GLP-1肽)$ (式I)

其中

GLP-1肽是GLP-1 (8-37) (SEQ ID NO: 1) 或与GLP-1 (8-37) (SEQ ID NO: 1) 相比最多具有6个氨基酸变化的其类似物;

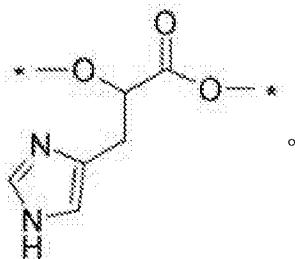
R1是具有1-6个碳原子的直链或支链烷基;

(NHXaa1) 是氨基酸;

Xaa2是氨基酸;和

(OHis) 是下式Chem 1的咪唑-乳酸基团:

Chem. 1:



2. 权利要求1的化合物,其中R1是具有1-6个碳原子的直链烷基。

3. 权利要求1的化合物,其中Xaa2和(OHis)之间的键是酯键。

4. 权利要求1-3中任一项的化合物,其中i) (NHXaa1)和Xaa2之间,和ii) (OHis)和(GLP-1肽)之间的键是酰胺键,和其中R1连接到(NHXaa1)的 α -氨基上。

5. 权利要求1-3中任一项的化合物,其中R1是甲基。

6. 权利要求1-3中任一项的化合物,其中(NHXaa1)是Gly、Val或Ile。

7. 权利要求1-3中任一项的化合物,其中Xaa2是Val。

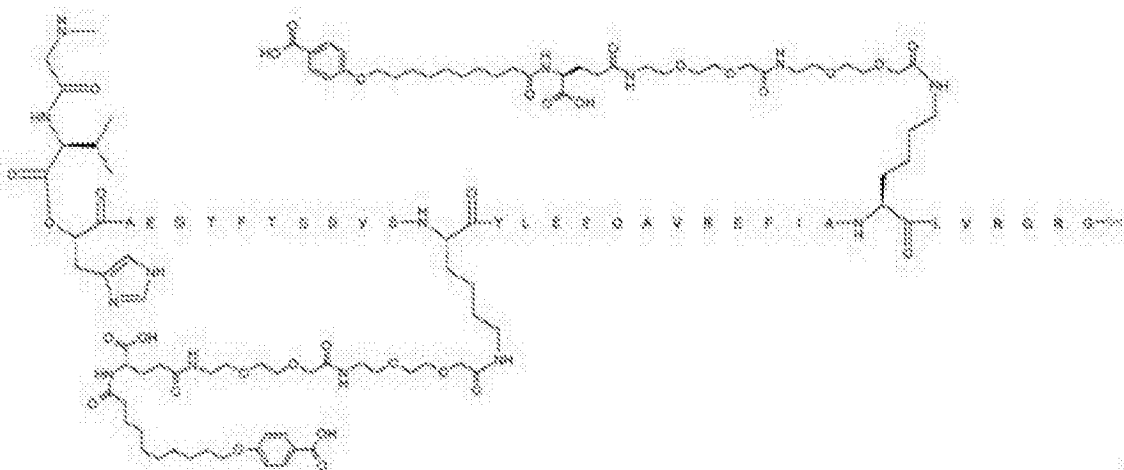
8. 权利要求1-3的化合物,其中所述GLP-1肽是包含至少一个白蛋白结合侧链的衍生物。

9. 权利要求8的化合物,其中所述GLP-1肽是具有以下的衍生物:

i) 连接到位置26或27的一个白蛋白结合侧链;或

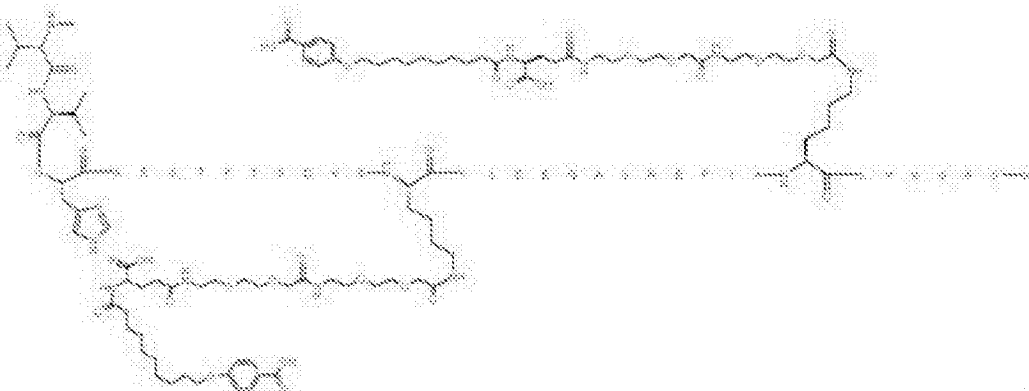
ii) 连接到以下的一个白蛋白结合侧链:a) 位置18和31的每个,b) 位置26和37的每个,或c) 位置18和26的每个;其中所述位置编号是指GLP-1 (8-37) (SEQ ID NO: 1)。

10. 化合物,其选自Chem. 51



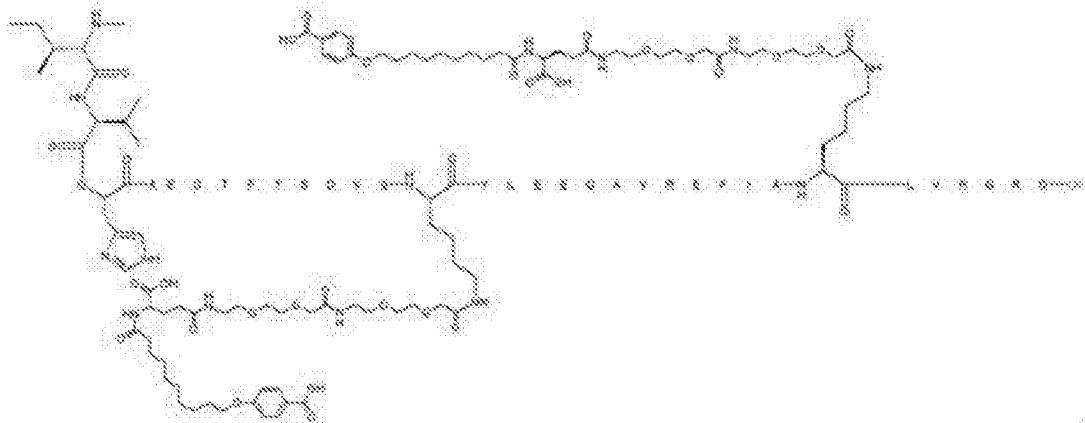
$N^{\epsilon 18}$ -[2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[(4S) -4-羧基-4-[10-(4-羧基苯氧基) 癸酰基氨基]丁酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基], $N^{\epsilon 31}$ -[2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[(4S) -4-羧基-4-[10-(4-羧基苯氧基) 癸酰基氨基]-丁酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基], $N^{\alpha 18}$ - { (2S) -3-(1H-咪唑-4-基) -2-[(2S) -3-甲基-2-[[2-(甲氨基) 乙酰基]氨基]丁酰基]氧基-丙酰基} -[Lys¹⁸, Glu²², Val²⁵, Arg²⁶, Lys³¹, Gln³⁴]-GLP-1-(8-37)-肽,

Chem. 52



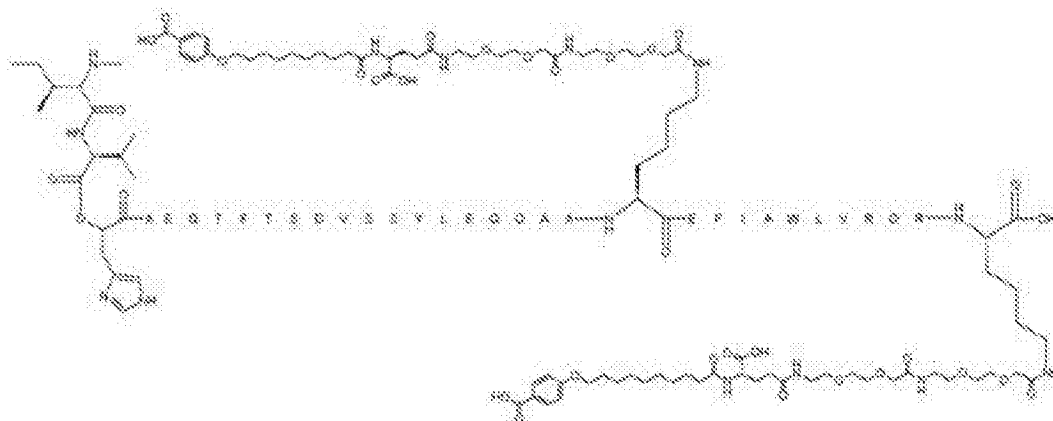
$N^{\epsilon 18}$ -[2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[(4S) -4-羧基-4-[10-(4-羧基苯氧基) 癸酰基氨基]丁酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基], $N^{\epsilon 31}$ -[2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[(4S) -4-羧基-4-[10-(4-羧基苯氧基) 癸酰基氨基]-丁酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基], $N^{\alpha 18}$ -{ (S) -3-(1H-咪唑-4-基) -2-[(S) -3-甲基-2-((S) -3-甲基-2-甲氨基-丁酰基氨基)-丁酰基氧基]-丙酰基} -[Lys¹⁸, Glu²², Val²⁵, Arg²⁶, Lys³¹, Gln³⁴]-GLP-1-(8-37)-肽,

Chem. 53



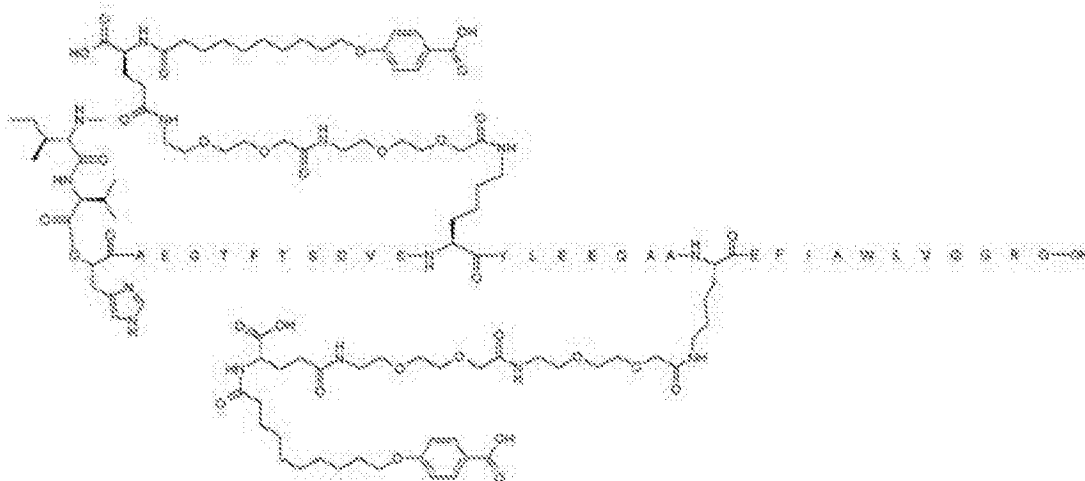
$N^{\epsilon 18}$ -[2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[(4S)-4-羧基-4-[10-(4-羧基苯氧基) 癸酰基氨基] 丁酰基] 氨基] 乙氧基] 乙氧基] 乙酰基] 氨基] 乙氧基] 乙氧基] 乙酰基], $N^{\epsilon 31}$ -[2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[(4S)-4-羧基-4-[10-(4-羧基苯氧基) 癸酰基氨基]-丁酰基] 氨基] 乙氧基] 乙氧基] 乙酰基] 氨基] 乙氧基] 乙氧基] 乙酰基], $N^{\alpha 18}$ -{(S)-3-(1H-咪唑-4-基)-2-[(S)-3-甲基-2-((S)-3-甲基-2-甲氨基-戊酰基氨基)-丁酰基氧基]-丙酰基}-[Lys¹⁸,Glu²²,Val²⁵,Arg²⁶,Lys³¹,Gln³⁴]-GLP-1-(8-37)-肽,

Chem. 54



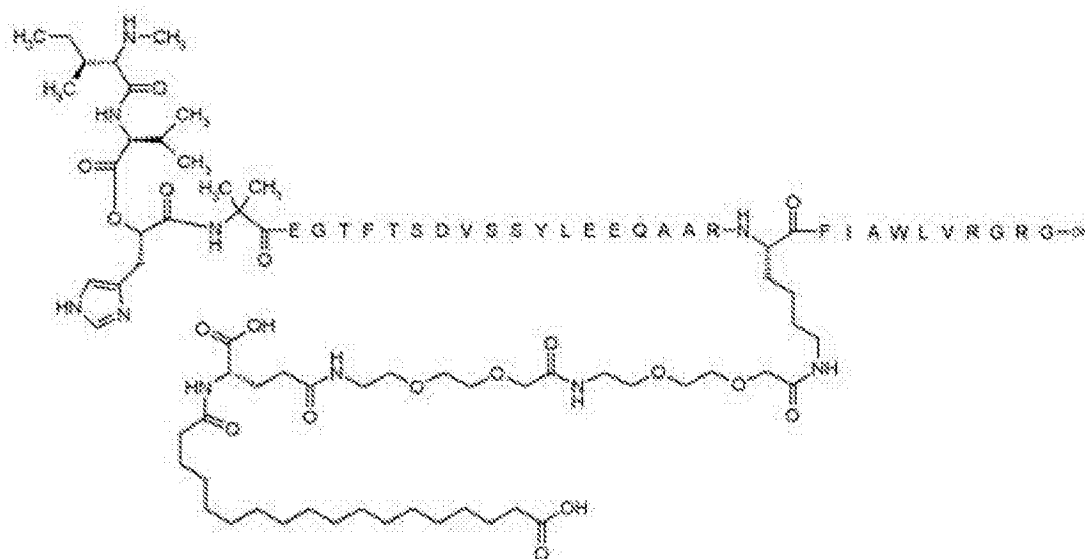
$N^{\epsilon 26}$ -[2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[(4S)-4-羧基-4-[10-(4-羧基苯氧基) 癸酰基氨基] 丁酰基] 氨基] 乙氧基] 乙氧基] 乙酰基] 氨基] 乙氧基] 乙氧基] 乙酰基], $N^{\epsilon 37}$ -[2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[(4S)-4-羧基-4-[10-(4-羧基苯氧基) 癸酰基氨基]-丁酰基] 氨基] 乙氧基] 乙氧基] 乙酰基] 氨基] 乙氧基] 乙氧基] 乙酰基], $N^{\alpha 18}$ -{(S)-3-(1H-咪唑-4-基)-2-[(S)-3-甲基-2-((S)-3-甲基-2-甲氨基-戊酰基氨基)-丁酰基氧基]-丙酰基}-[Arg³⁴, Lys³⁷]-GLP-1-(8-37)-肽,

Chem. 55



$N^{\epsilon 18}$ -[2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[(4S)-4-羧基-4-[10-(4-羧基苯氧基) 癸酰基氨基] 丁酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基], $N^{\epsilon 26}$ -[2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[(4S)-4-羧基-4-[10-(4-羧基苯氧基) 癸酰基氨基]-丁酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基], $N^{\alpha 18}$ -{(S)-3-(1H-咪唑-4-基)-2-[(S)-3-甲基-2-((S)-3-甲基-2-甲氨基-戊酰基氨基)-丁酰基氧基]-丙酰基}-[Lys¹⁸, Glu²², Gln³⁴]-GLP-1-(8-37)-肽,

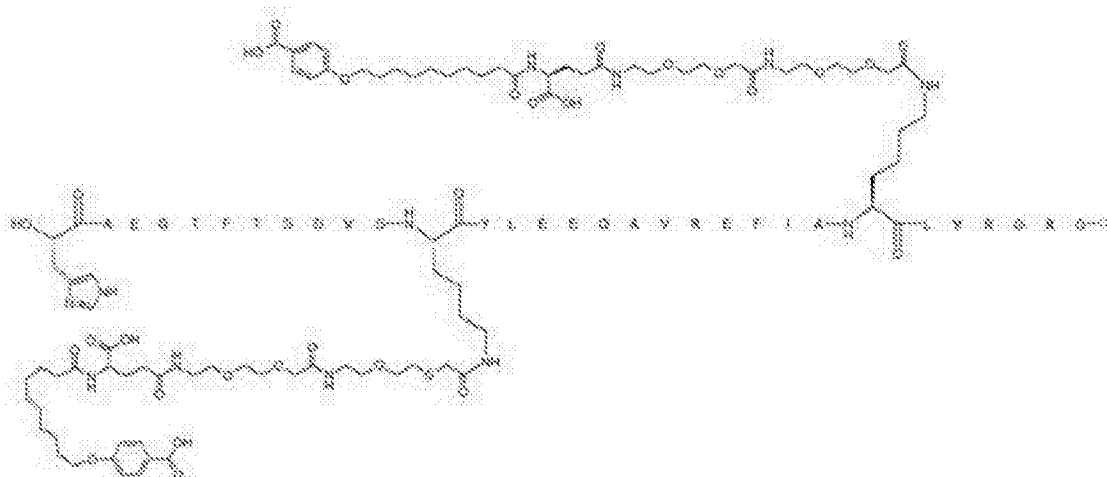
和Chem. 56



$N^{\epsilon 27}$ -[2-(2-{2-[2-(2-{2-[(S)-4-羧基-4-(17-羧基十七酰基氨基) 丁酰基氨基] 乙氧基} 乙氧基] 乙酰基氨基] 乙氧基} 乙氧基] 乙酰基], $N^{\alpha 18}$ -{(S)-3-(1H-咪唑-4-基)-2-[(S)-3-甲基-2-((S)-3-甲基-2-甲氨基-丁酰基氨基)-丁酰基氧基]-丙酰基}-[Aib⁸, Glu²², Arg²⁶, Lys²⁷, Arg³⁴]-GLP-1-(8-37)-肽;

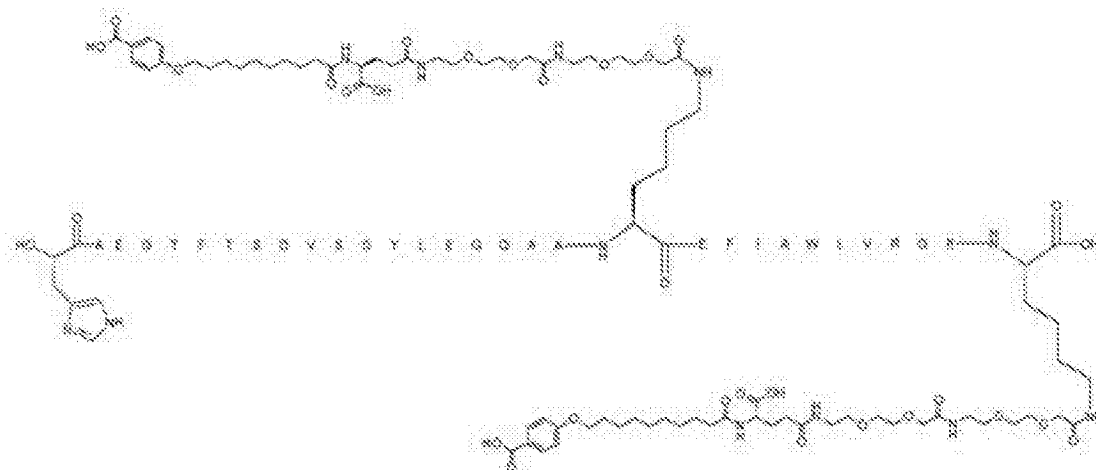
或其药学上可接受的盐、酰胺或酯。

11. 化合物, 其选自Chem. 21



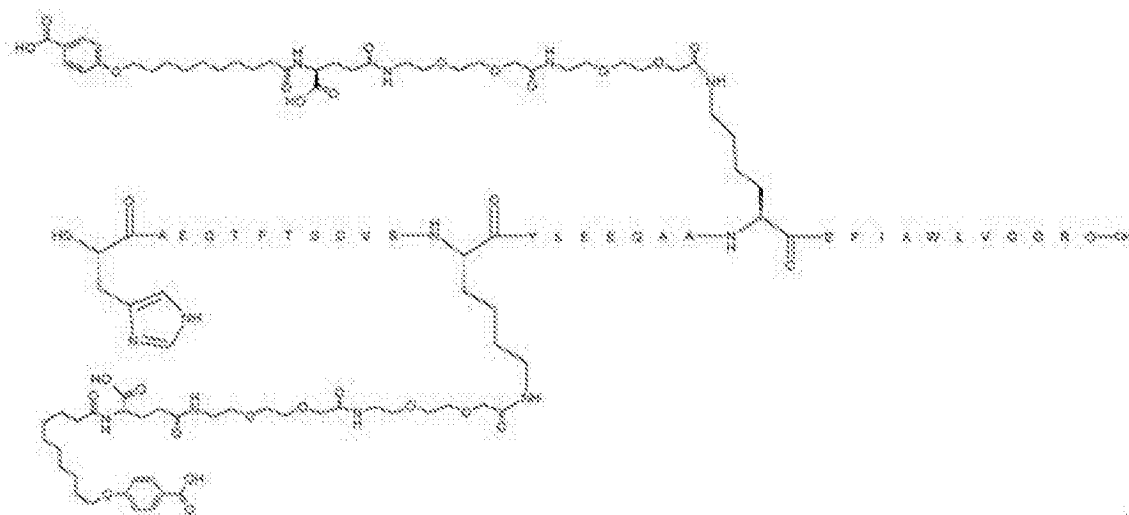
$N^{\epsilon 18}$ -[2-[2-[2-[2-[2-[2-[[(4S)-4-羧基-4-[10-(4-羧基苯氧基)癸酰基氨基]丁酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基], $N^{\epsilon 31}$ -[2-[2-[2-[2-[2-[2-[[(4S)-4-羧基-4-[10-(4-羧基苯氧基)癸酰基氨基]-丁酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基], $N^{\alpha 18}$ -{3-[(2S)-2-羟基-3-(1H-咪唑-4-基)丙酰基]-[Lys¹⁸,Glu²²,Val²⁵,Arg²⁶,Lys³¹,Gln³⁴]-GLP-1-(8-37)-肽,

Chem. 22



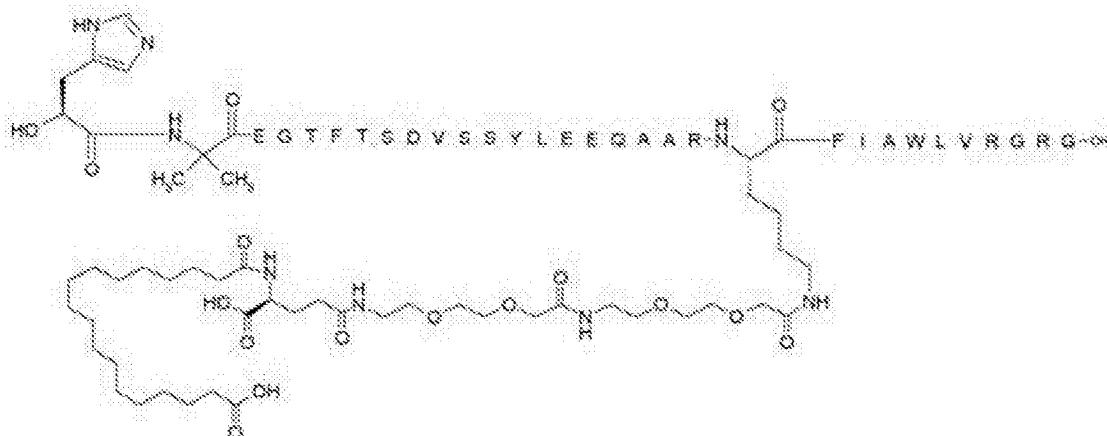
$N^{\epsilon 26}$ -[2-[2-[2-[2-[2-[2-[[(4S)-4-羧基-4-[10-(4-羧基苯氧基)癸酰基氨基]丁酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基], $N^{\epsilon 37}$ -[2-[2-[2-[2-[2-[2-[[(4S)-4-羧基-4-[10-(4-羧基苯氧基)癸酰基氨基]-丁酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基], $N^{\alpha 18}$ -{3-[(2S)-2-羟基-3-(1H-咪唑-4-基)丙酰基]-[Arg³⁴, Lys³⁷]-GLP-1-(8-37)-肽,

Chem. 23



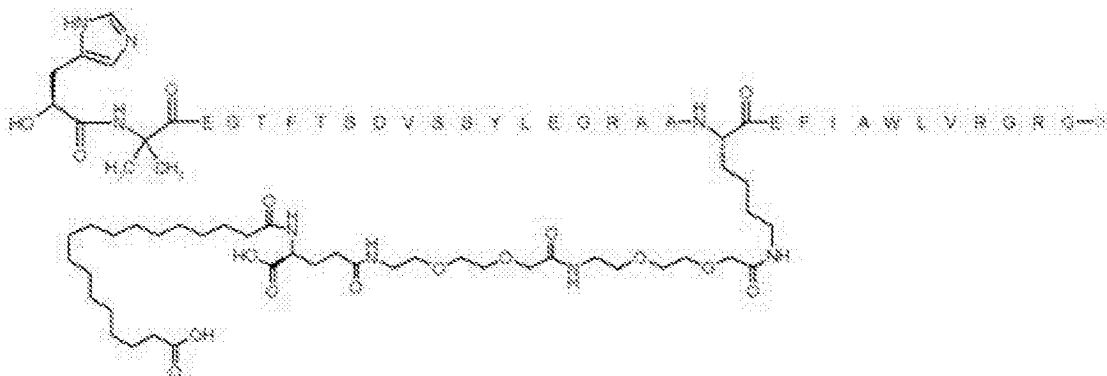
$N^{\epsilon 18}$ -[2-[2-[2-[2-[2-[2-[[(4S)-4-羧基-4-[10-(4-羧基苯氧基)癸酰基氨基]丁酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基], $N^{\epsilon 26}$ -[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[[(4S)-4-羧基-4-[10-(4-羧基苯氧基)癸酰基氨基]-丁酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基], $N^{\alpha 18}$ -{3-[(2S)-2-羟基-3-(1H-咪唑-4-基)丙酰基]-[Lys¹⁸, Glu²², Gln³⁴]-GLP-1-(8-37)-肽,

Chem. 24



$N^{\epsilon 27}$ [(S)-(22,40-二羧基-10,19,24-三氧代-3,6,12,15-四氧杂-9,18,23-三氮杂四十烷-1-酰基)]- $N^{\alpha 18}$ -{3-[(2S)-2-羟基-3-(1H-咪唑-4-基)丙酰基]-[Aib⁸, Glu²², Arg²⁶, Lys²⁷, Arg³⁴]-GLP-1-(8-37)-肽,

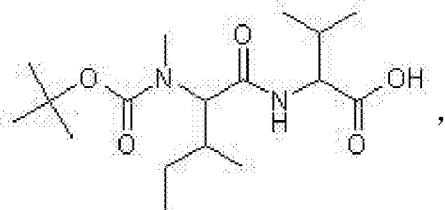
和Chem. 25



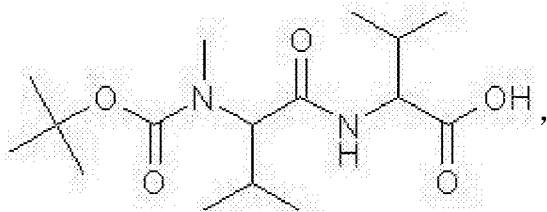
$N^{\epsilon 26}$ [(S)-(22,40-二羧基-10,19,24-三氧代-3,6,12,15-四氧杂-9,18,23-三氮杂四十烷-1-酰基)]- N^{a18} -{3-[(2S)-2-羟基-3-(1H-咪唑-4-基)丙酰基]-[Aib⁸, Arg²³, Arg³⁴]-GLP-1-(8-37)-肽;

或其药学上可接受的盐、酰胺或酯。

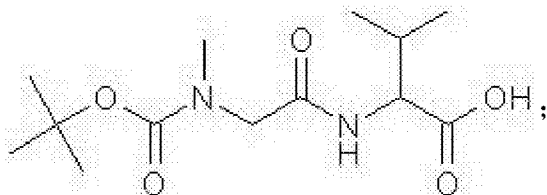
12. 化合物,其选自Chem. 41



Chem. 42



和Chem. 44



或其盐、酰胺或酯。

13. 用作药物的权利要求1-11中任一项的化合物。

14. 权利要求1-11中任一项的化合物在制备用于治疗或预防所有形式的糖尿病和相关疾病、多囊卵巢综合征以及用于改善脂质参数、改善 β 细胞功能、或用于延迟或预防糖尿病进展的药物中的用途。

15. 权利要求14所述的用途,其中所述糖尿病相关疾病包括:进食障碍、心血管疾病、胃肠道疾病、糖尿病并发症、危急病症。

16. 权利要求1-10中任一项的化合物在制备用于施用后实现通式II: (H0His)-(GLP-1肽)的有活性和稳定的母体药物GLP-1化合物或其药学上可接受的盐、酰胺或酯在体内释放的药物中的用途。

GLP-1前体药物

技术领域

[0001] 本发明涉及前体药物,即可在体内经转化而释放活性药物的药物的化学修饰形式。更具体地讲,本发明涉及高血糖素-样肽1 (GLP-1)的前体药物。

[0002] GLP-1是一种肽激素,已经证明它可用于糖尿病的治疗。然而,天然激素在血浆中有非常短的半寿期。多种衍生技术,例如白蛋白结合和PEG化,已经用于延长半寿期。这类延长半寿期的衍生GLP-1化合物的一个实例是利拉鲁肽,一种单酰化GLP-1衍生物,其已被多个卫生当局批准并在多个国家销售用于每天给予一次以治疗2型糖尿病。

[0003] 前体药物可用于例如改变药物的药代动力学(PK)和/或吸收曲线,增强药物的治疗窗。此外它可以用于延长药物的生物半寿期,这是因为在给予后通过体内发生的化学转化反应而延迟其向生物活性药物的转化。

[0004] 序列表通过引用的结合

[0005] 序列表,题为“序列表(SEQUENCE LISTING)”,有561字节,在2013年2月11日创建并通过引用结合到本文中。序列表的SEQ ID NO: 1与天然人GLP-1残基8-37 (GLP-1 (8-37))相同。

[0006] 背景

[0007] 2007年8月,印第安纳大学Arbab De的硕士论文,标题为“Design of peptide-based prodrug chemistry and its application to glucagon-like peptide 1(基于肽的前体药物化学的设计及其在高血糖素-样肽1中的应用)”公开了i.a.,GLP-1酯前体药物的合成,其基于具有羟基-末端延伸而不是N-末端胺的GLP-1肽(参见例如章节D-IV和D-V,3和4类化合物)。

[0008] Peptide Science 2010, 94(4), 448-456 (Arbab De等人)涉及高血糖素-样肽1的基于酯的前体药物的合成和表征。

[0009] US 2011/0065633 A1 公开了i.a., GLP-1的基于酯的前体药物(参见例如实施例4)。

[0010] Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters 2005, (15), 1595-1598 (Santos等人)涉及环化活化的前体药物,更具体地讲涉及对乙酰氨基酚的二肽酯的合成、反应性和毒性。表1显示了在pH 7.4和37°C,对乙酰氨基酚从其二肽酯前体药物中释放的速率常数。对其中Y为甲基的化合物 4k的脚注解释为在37°C反应太快而无法监测。

[0011] Regulatory Peptides 2000, (86), 103-111 (Gallwitz等人)涉及在体外抵抗二肽基肽酶IV降解的GLP-1-类似物。

[0012] Annual Review of Pharmacology and Toxicology 1993, (32), 521-544 (Oliyai和Stella)是改进制剂和递送的肽和蛋白质的前体药物的相关综述文章。

[0013] 概述

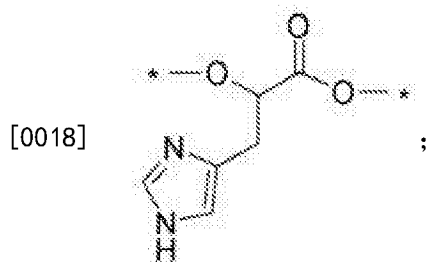
[0014] 本发明涉及促胰岛素肽或肠降血糖素例如GLP-1的前体药物。更具体地讲,它涉及酯前体药物。在酯前体药物中,小肽经由酯键连接至肽药物。酯键可以在肽药物的N-末端,因此该N-末端可以包括羟基。作为实例,肽药物的N-末端氨基酸的 α -氨基可以被修饰成羟

基。依照本发明,小肽延伸的氨基酸也被修饰,例如其N-末端氨基酸可以被N-烷基化修饰。所述小肽优选地是二肽。

[0015] 前体药物在体内经历生物转化的机制是二肽的亲核试剂部分(例如胺亲核试剂)切割酯键,导致形成相应的二酮哌嗪衍生物和母体药物。母体药物可以是药物的稍微修饰形式。例如酯前体药物的母体药物可以是药物的N-末端HO-形式,例如N-末端羟基肽药物。

[0016] 在第一方面,本发明涉及GLP-1前体药物,即以下通式I的化合物: $R1-(NHXaa1)-Xaa2-(OHis)-(GLP-1肽)$ (式I),其中GLP-1肽是GLP-1(8-37)(SEQ ID NO: 1)或与GLP-1(8-37)相比最多具有9个氨基酸变化的其类似物;R1是低级烷基,(NHXaa1)是氨基酸,Xaa2是氨基酸,(OHis)是下式Chem 1的咪唑-乳酸基团:

[0017] Chem. 1:



[0019] 或所述前体药物的药学上可接受的盐、酰胺或酯。

[0020] 在第二方面,本发明涉及相应的母体药物,即Chem. 21、Chem. 22、Chem. 23、Chem. 24和Chem. 25的化合物,其都具有以下通式II: $(HOHis)-(GLP-1肽)$ (式II),其中(HOHis)是对应于Chem 1的(OHis)基团的咪唑-乳酸,如以上第一方面中定义。

[0021] 在第三方面,本发明涉及Boc-NMe-Ile-Val-OH、Boc-NMe-Val-Val-OH、(Boc-NMe-Gly-Val-OH)、以及Chem. 43的化合物。这些是用于合成本发明前体药物的中间体化合物。

[0022] 在第四方面,本发明涉及通过给予本发明的前体药物实现通式II: $(HOHis)-(GLP-1肽)$ 的有活性和稳定的母体药物GLP-1化合物或其药学上可接受的盐、酰胺或酯在体内释放的方法。

[0023] 在第五方面,本发明分别涉及这样的前体药物或这样的药物,它们分别用作药物,尤其是用于治疗 and/或预防所有形式的糖尿病和相关疾病,例如进食障碍、心血管疾病、胃肠道疾病、糖尿病并发症、危急病症(critical illness)和/或多囊卵巢综合征;和/或用于改善脂质参数,改善β细胞功能和/或用于延迟或预防糖尿病进展。

[0024] 本发明的前体药物化合物可用于改变药物的药代动力学曲线和/或吸收曲线,例如增强药物的治疗窗。另外或备选地,它可以改善药物的生物半寿期。母体药物化合物具有生物活性。此外,母体药物本身可以是DPP-IV稳定的。另外或备选地,母体药物本身可以具有延长的生物半寿期。这些性质在开发用于皮下、静脉内和/或尤其口服给予的备选和/或下一代GLP-1化合物中是重要的。

[0025] 对于本发明的前体药物,我们已经惊奇而意外地证明,在体外和体内从前体药物到药物的转化反应非常缓慢,而且所得母体药物还具有非常令人满意的效力。换句话说,我们已经证明对于本领域已知的用于延长GLP-1作用持续时间的其它技术而言,本发明前体药物的概念是引人关注的备选概念。

[0026] 附图简述

[0027] 在本申请的附图中：

[0028] 图1是显示本发明前体药物转化为本发明的相应的H0-His7药物的机制的反应示意图(R1、R3和R4是氨基酸侧链,R是低级烷基,肽表示例如GLP-1 (9-37) 或其类似物,k是限制性转化常数, $T_{1/2}$ 是 $\ln 2/k$)；

[0029] 图2显示在小型猪中测定的本发明前体药物和相应的母体药物的PK曲线(菱形表示本文的实施例4的前体药物,方形表示本文的实施例B2.2的母体药物)；和

[0030] 图3显示在小型猪中测定的本发明母体药物的PK曲线(本文的实施例B2.2的母体药物；2只动物,一只用菱形表示,一只用方形表示)。

[0031] 描述

[0032] 在下文中,希腊字母可用其符号或相应的书写名称来代表,例如: α = alpha; β = beta; ϵ = epsilon; γ = gamma; ω = omega;等。另外,希腊字母 μ 可以用“u”代表,例如 μl =ul,或 μM =uM。

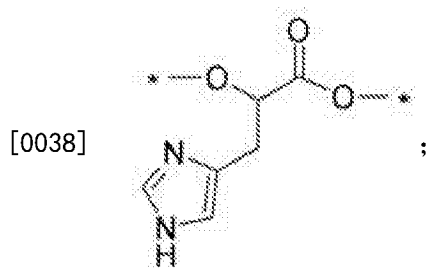
[0033] 化学式中的星号(*)表示i)连接点,ii)基团,和/或iii)非共享电子。

[0034] GLP-1肽和类似物

[0035] 在第一方面,本发明涉及GLP-1肽前体药物,其包含经由酯键连接到GLP-1肽的N-末端的二肽延伸。为此,GLP-1肽的N-末端氨基酸的 α -氨基被羟基置换。二肽延伸的N-末端氨基酸被进一步N-烷基化。

[0036] 更具体地讲,本发明涉及以下通式I的GLP-1化合物(前体药物):R1-(NHXaa1)-Xaa2-(OHis)-(GLP-1肽)(式I),其中GLP-1肽是GLP-1 (8-37) (SEQ ID NO: 1) 或与GLP-1 (8-37) 相比最多具有9个氨基酸变化的其类似物;R1是低级烷基,(NHXaa1) 是氨基酸,Xaa2是氨基酸,(OHis) 是下式Chem 1的 β -咪唑-乳酸基团:

[0037] Chem. 1:



[0039] 或其药学上可接受的盐、酰胺或酯。

[0040] 在背景技术中描述的GLP-1酯前体药物没有二肽延伸的N-末端氨基酸的N-烷基化——它们具有标准的胺基团,或者羟基(在Arnab De的论文中分别称为3和4类)。

[0041] 本发明的GLP-1前体药物在体内经历生物转化的机制(图1所示)是烷基化胺亲核试剂切割酯键,结果形成相应的二酮哌嗪衍生物和母体GLP-1肽药物。该转化自发发生,无需任何其它组分例如酶等,因为这是由前体药物固有的化学不稳定性所致。然而,体内的酯酶在某种程度上可通过酶促切割酯键而进一步增强水解。

[0042] 所得母体GLP-1肽药物的N-末端氨基酸具有羟基,而不是通常的 α -氨基。

[0043] 本发明的前体药物化合物可用于改变药代动力学曲线。理想的PK曲线的一个非限制性实例是,显示母体药物血浆浓度与时间的曲线是钟形(即并非峰形)类型,例如沿着背景部分引用的Oliyai和Stella的图8中的曲线B的线。在一个实施方案中,例如与相应的给

予实验(其中给予相应的母体药物,而不是前体药物)中的母体药物浓度的变化相比,可降低母体药物浓度随时间的变化(在前体药物给予实验中)。这样的实验可在体内或体外进行。在另一个实施方案中,另外或备选地,可以增强药物的治疗窗。可在上述第一实施方案所述的给予实验中测试这一点。为降低与药物在体内的高血浆水平相关的不良事件的发生率和/或严重程度,本文上文给出的PK曲线被认为可能非常有用。

[0044] 另外,或备选地,本发明的前体药物可以改善药物的生物半寿期。

[0045] 另外,或备选地,与无二肽延伸的N-末端氨基酸的N-烷基化的前体药物相比,本发明的前体药物的半寿期惊奇而意外地被极大地改善。

[0046] 另外,或备选地,相应的母体药物具有良好生物活性。

[0047] 另外,或备选地,相应的母体药物具有延长的半寿期。

[0048] 另外,或备选地,相应的母体药物对于DPP-IV的降解而言具有改进的稳定性。DPP-IV(也称为二肽基肽酶-4,或DPP4),并且亦称为腺苷脱氨酶复合蛋白2,是固有的膜糖蛋白和丝氨酸外肽酶,具有多种多样的底物,包括含有脯氨酸或丙氨酸的肽。

[0049] 前体药物是预期以基本无活性形式给予的药理学物质。一旦给予后,前体药物在体内转化为活性药物,其可以称为母体药物。

[0050] 基于肽的药物可例如通过将小肽延伸与其共价连接而转化为前体药物。在具体的实施方案中,将小肽延伸加到所述肽的N-末端。根据小肽连接方式不同,所得前体药物被称为酰胺前体药物或酯前体药物。

[0051] 在肽药物的酰胺前体药物中,小肽延伸和肽母体药物之间的键是酰胺键。

[0052] 在肽药物的酯前体药物中,小肽延伸和肽药物之间的键是酯键。对于所形成的酯键,这两种组分中的一种应当包含游离羟基,另一种应当包含游离羧酸基团。

[0053] 在本发明GLP-1酯前体药物的具体的实施方案中,GLP-1肽(母体药物)的N-末端氨基酸的 α -氨基已被羟基取代。该羟基再与小肽延伸的C-末端羧酸基团反应而形成酯键。

[0054] 作为实例,式Chem. 2a的(OHis)是指其中 α -氨基已被羟基取代的氨基酸His(组氨酸)。该基团与通式I的氨基酸Xaa2的C-末端羧酸基团形成酯键。在式I中,除了R1和(NHXaa1)之间的键之外,所有其它键都称为酰胺键。例如,(OHis)和(GLP-1肽)之间的键是指(OHis)的羧酸基团和GLP-1肽的N-末端氨基酸的 α -氨基之间形成的酰胺键。R1和(NHXaa1)之间的键是指C-N键,更具体是指R1的C(碳原子)和氨基酸(NHXaa1)的 α -氨基的N(氮原子)之间的键。

[0055] 在另一具体的实施方案中,本发明的GLP-1前体药物是GLP-1的缩酚酸肽。缩酚酸肽是其中一个或多个酰胺(*-CONHR-*)键被酯(*-COOR-*)键置换的肽。在本发明GLP-1的缩酚酸肽的具体的实施方案中,一个酰胺键被酯键置换。在另一个具体的实施方案中,该酯键介于置换GLP-1肽(母体药物)的N-末端氨基酸的 α -氨基的 α -羟基和小肽延伸C-末端羧酸基团之间。

[0056] 式I中的R1是低级烷基,其是指具有1-6个碳原子的直链或支链烷基、尤其是直链烷基。在具体的实施方案中,低级烷基是甲基。

[0057] 式I中的(NHXaa1)和Xaa2各自独立地为氨基酸。

[0058] 在(NHXaa1)氨基酸中,NH部分是指该氨基酸的 α -氨基,其氮原子与R1共价结合。因此Xaa1是指该氨基酸的剩余部分,即类型 $R^*>CH-COOH$ 的基团,其中R是指氨基酸侧链。

[0059] 氨基酸是含有胺基和羧酸基团、并且任选含有一个或多个额外基团(通常称为侧链)的分子。

[0060] 术语氨基酸包括蛋白质性的氨基酸(由遗传密码所编码,包括天然氨基酸和标准氨基酸)、以及非蛋白质性的氨基酸(在蛋白质中未发现,和/或在标准遗传密码中未编码)和合成氨基酸。因此,氨基酸可选自蛋白质性的氨基酸、非蛋白质性的氨基酸和/或合成氨基酸。

[0061] 合成氨基酸的非限制性实例是氨基酸的D-异构体。

[0062] 在下文中,未对其说明旋光异构体的所有氨基酸都理解为是指L-异构体。

[0063] 可通过氨基酸残基的全名、它们的单字母代码和/或它们的三字母代码而识别氨基酸残基。这3种方式是完全等同的。

[0064] 术语式I中的GLP-1肽和(GLP-1肽)是指GLP-1(8-37)(SEQ ID NO: 1)或其类似物或衍生物。天然人高血糖素-样肽1具有本文的SEQ ID NO: 1序列,但在N-末端有His残基延伸,由此形成天然人GLP-1(7-37)。本发明的目的参照GLP-1(8-37)(加上强调)的原因是,在式I中7号位置的氨基酸已被指定,即为咪唑-乳酸。Chem. 2a的His的羟基变体是咪唑-乳酸的一个(非限制性)实例。

[0065] 术语“GLP-1类似物”或“GLP-1的类似物”是指其为SEQ ID NO: 1的变体的肽或化合物。对于本文的目的,具有SEQ ID NO: 1序列的肽可称为天然GLP-1(8-37)。

[0066] 换句话说,GLP-1类似物是与天然GLP-1(8-37)(SEQ ID NO: 1)相比,其中许多氨基酸残基已经改变的GLP-1(8-37)肽。这些改变可独立为一个或多个氨基酸取代、添加和/或缺失。

[0067] GLP-1类似物可参考以下来描述:i)对应于已改变的氨基酸残基的天然GLP-1(8-37)中氨基酸残基的编号(即天然GLP-1中的相应位置);和ii)实际改变。

[0068] 在序列表中,SEQ ID NO: 1的第一个氨基酸残基(丙氨酸)编号为1。然而,在下文中,根据本领域已建立的习惯,该丙氨酸残基指定为8,并且其后的氨基酸残基相应编号,结尾是37号甘氨酸。因此,通常,本文所涉及到的GLP-1(8-37)序列的氨基酸残基编号或位置编号是开始于位置8的Ala和结束于位置37的Gly的序列。

[0069] 以下是适当类似物命名的非限制性实例。

[0070] 包含选自以下:8Aib、18K、22E、23R、25V、26R、31K、34R或34Q和/或37K的至少一个氨基酸取代的类似物,是指这样的类似物,当与GLP-1(8-37)(SEQ ID NO: 1)相比时,包含对应于以下至少一个位置的改变:GLP-1(8-37)(SEQ ID NO: 1)的位置8、18、22、23、25、26、31、34和/或37;更准确的说,其改变成位置8的Aib、位置18的赖氨酸、位置22的谷氨酸、位置23的精氨酸、位置25的缬氨酸,位置26的精氨酸、位置31的赖氨酸、位置34的精氨酸或谷氨酰胺、和/或位置37的赖氨酸;也就是说,通过在实际位置上的天然氨基酸的取代(天然氨基酸是SEQ ID NO: 1中所示的氨基酸)。为了良好顺序起见,位置8、18、22、23、25、26、31、34和37是指使用序列表SEQ ID NO: 1中使用的编号的氨基酸编号1、11、15、16、19、24、27和30。

[0071] 使用与以上相同的逻辑,作为GLP-1(8-37)(SEQ ID NO: 1)的变体(34R、37K)的类似物是指与SEQ ID NO: 1相同的GLP-1肽,即天然GLP-1(8-37),除了Lys³⁴已被Arg³⁴取代和Gly³⁷已被Lys³⁷取代之外。

[0072] 在一个具体的实施方案中, GLP-1类似物与GLP-1 (8-37) (SEQ ID NO: 1) 相比具有最多6个氨基酸变化。

[0073] 为了本文的目的, 术语像“包含”和“包括”被认为是开放式术语, 其是指它们不排除潜在相关的另外特征性特性(其可能未被列出)的存在。例如, 当与SEQ ID NO: 1相比时, “包含”某些指定变化的类似物可包含其它变化。这些术语可以被修改为“具有”、“由…组成”或“基本上由…组成”等等, 为了本文的目的, 其被认为是“封闭式”术语, 是指排除相关的另外特征性特性(其可能未被列出)的存在。例如, 当以上提及的类似物“具有”指定变化时, 是指当与SEQ ID NO: 1相比时, 它没有其它变化。

[0074] 术语“相当于…的位置”或“相应的位置”可用于表征GLP-1类似物(或变体)序列相对于天然GLP-1 (8-37) (SEQ ID NO: 1)的位置变化。可通过例如简单书写和目测; 和/或可使用标准蛋白或肽比对程序, 诸如作为Needleman-Wunsch比对的“比对”, 容易地推断出相当的位置或对应的位置以及改变的数量。所述算法描述于Needleman, S.B.和Wunsch, C.D., (1970), Journal of Molecular Biology, 48: 443-453, 以及Myers和W. Miller在“Optimal Alignments in Linear Space” CABIOS (computer applications in the biosciences) (1988) 4:11-17中的比对程序。为了比对, 可使用默认评分矩阵BLOSUM62和默认同一性矩阵(identity matrix), 并且空位的第一残基的罚分可设置在-12, 或优选在-10, 并且空位的另外残基的罚分在-2, 优选在-0.5。

[0075] 这类比对的实例插入在下文中, 其中序列号1是SEQ ID NO: 1, 序列号2是其类似物(34R、37K):

```
# 1: GLP-1(8-37)
# 2: GLP-1(8-37)_类似物
# 矩阵: EBLOSUM62
# 空位_罚分: 10.0
# 延伸_罚分: 0.5
# 长度: 30
[0076] # 同一性: 28/30 (93.3%)
# 相似性: 29/30 (96.7%)
# 空位: 0/30 (0.0%)
# 分数: 142.0
1      1 AEGTFTSDVSSYLEGQAAKEFIAWLVGRG      30
      |||
2      1 AEGTFTSDVSSYLEGQAAKEFIAWLVGRK      30
```

[0077] 在在序列中包含非天然氨基酸的情况下, 为了比对目的, 它们可用例如X替代。如有必要, X可在随后用手工校正。

[0078] 在一个具体的实施方案中, GLP-1肽或式I的(GLP-1肽)是GLP-1衍生物, 即GLP-1 (8-37) (SEQ ID NO: 1)的衍生物, 或SEQ ID NO: 1类似物的衍生物。

[0079] GLP-1衍生物

[0080] 本文用于GLP-1背景下的术语“衍生物”是指经化学修饰的GLP-1 (8-37) 肽(SEQ ID NO: 1)或经化学修饰的SEQ ID NO: 1类似物, 其中一个取代基已与所述肽共价连接。取代基也可称为侧链。

[0081] 在一个具体的实施方案中, 侧链能与白蛋白形成非共价聚集体, 因而促进所述衍

生物在血流中循环,并且还具有延长所述衍生物作用时间的效应,这是因为以下事实:GLP-1-衍生物与白蛋白的聚集体仅缓慢分解而释放活性药物成分。因此,取代基或侧链,作为整体,可被称为白蛋白结合部分。

[0082] 在另一具体的实施方案中,白蛋白结合部分包含与白蛋白结合并因此与延长特别相关的部分。所述部分可因此被称为延长部分。相对于其与肽的结合点而言,延长部分可以在白蛋白结合部分相反的一端或附近。

[0083] 在再一个具体的实施方案中,白蛋白结合部分包含介于延长部分和与肽的结合点之间的部分,所述部分可被称为接头、接头部分、间隔基等。接头可以是任选的,并因此在这种情况下,白蛋白结合部分可与延长部分相同。

[0084] 在具体的实施方案中,白蛋白结合部分和/或延长部分是亲脂的,并且在生理pH(7.4)时可进一步同时含有正电荷和/或负电荷部分。

[0085] 白蛋白结合部分、延长部分或接头可通过酰化与所述肽的赖氨酸残基共价连接。其它的或备选的缀合化学包括烷基化、酯形成、或酰胺形成、或与半胱氨酸残基偶联,例如通过马来酰亚胺或卤代乙酰胺(如溴/氟/碘代)偶联。

[0086] 在一个优选的实施方案中,在形成酰胺键的情况下,白蛋白结合部分(优选包含延长部分和接头)的活性酯与赖氨酸残基的氨基(优选其 ϵ -氨基)共价连接(该步骤被称为酰化)。

[0087] 除非另有说明,否则当提及赖氨酸残基的酰化时,理解为是对其 ϵ -氨基。

[0088] 为了本文的目的,术语“白蛋白结合部分”、“延长部分”和“接头”可包括这些分子的未反应及已反应形式。是否是指一种形式或其它形式,根据使用该术语的上下文是清楚的。

[0089] 在具体的实施方案中,延长部分选自a)脂肪二酸,和b)脂肪酸。

[0090] 为了与所述肽连接,脂肪酸的酸基或脂肪二酸的酸基之一与所述肽的赖氨酸残基的 ϵ -氨基任选经由接头形成酰胺键。

[0091] 术语“脂肪酸”指脂族单羧酸,其具有4-28个碳原子,优选10-22个碳原子,其优选是非支链的,并且其可为饱和或不饱和的。

[0092] 术语“脂肪二酸”指如上所定义、但在 ω 位置有另外的羧酸基团的脂肪酸。因此,脂肪二酸为二羧酸。

[0093] 脂肪二酸可具有末端或远端的苯基或苯氧基,其中所述苯基和苯氧基可被取代。

[0094] 延长部分的非限制性实例是Chem. 3: $\text{HOO-C}_6\text{H}_4\text{-O-(CH}_2)_9\text{-CO-}$;其中优选 HOO-C -基团在对位上。在此,二酸延长部分的末端苯氧基被羧酸基团取代。

[0095] 延长部分的另一非限制性实例是Chem. 7: $\text{HOO-C-(CH}_2)_{16}\text{-CO-}$ 。

[0096] 在具体的实施方案中,白蛋白结合部分,除了延长部分外,还包含接头。接头介于延长部分和肽之间。在另一个具体的实施方案中,接头通过酰化而共价连接在所述肽的赖氨酸残基上,优选连接在所述肽的赖氨酸残基的 ϵ -氨基上。

[0097] 在具体的实施方案中,第一接头元件是8-氨基-3,6-二氧杂辛酸的二基,其可由下式Chem. 4表示:Chem. 4: $\text{* -NH-(CH}_2)_2\text{-O-(CH}_2)_2\text{-O-CH}_2\text{-CO-}$,简称OEG。在另一具体的实施方案中,第二接头元件是Glu的二基,例如 γ -Glu,或简称gGlu,其中氨基酸谷氨酸的 γ 羧基用于与另一接头元件连接,或连接到赖氨酸的 ϵ -氨基上。

[0098] 接头可包括一个或多个第一接头元件和/或一个或多个第二接头元件。接头的非限制性实例是gGlu-2xOEG。在具体的实施方案中,接头的gGlu和2xOEG元件经由酰胺键并且在指定的序列内相互连接,接头在其游离氨基端(显示在左侧)连接到延长部分的游离羰基上,并且在其游离羰基端(显示在右侧)连接到所述肽的赖氨酸残基的 ϵ 氨基上。

[0099] 在具体的实施方案中,至少一个取代基在分别对应于GLP-1 (8-37) 的以下位置中的至少一个处连接到所述肽的赖氨酸残基的 ϵ 氨基:18、26、27、31和/或37。

[0100] 在一个具体的实施方案中,GLP-1肽具有一个取代基,例如其连接到位置26或27,其中所述位置编号是指GLP-1 (8-37)。

[0101] 在另一具体的实施方案中,GLP-1肽具有2个取代基。包括上述酸类型的延长部分的具有2个取代基的GLP-1肽可以称为双酰化GLP-1衍生物。

[0102] 在另外具体的实施方案中,这2个取代基连接到对应于以下的位置上:a) 18和31, b) 26和37,或c) 18和26,其中位置编号是指GLP-1 (8-37)。

[0103] 在又另外具体的实施方案中:

[0104] a) 第一取代基连接到对应于GLP-1 (8-37) 的位置18的位置上和第二取代基连接到对应于GLP-1 (8-37) 的位置31的位置上;b) 第一取代基连接到对应于GLP-1 (8-37) 的位置26的位置上和第二取代基连接到对应于GLP-1 (8-37) 的位置37的位置上;或c) 第一取代基连接到对应于GLP-1 (8-37) 的位置18的位置上和第二取代基连接到对应于GLP-1 (8-37) 的位置26的位置上;其中第一和第二取代基的每个独立地为如本文任何实施方案中定义的取代基。第一和第二取代基优选地是相似、基本相似或相同的。

[0105] 在化学化合物诸如白蛋白结合部分、延长部分和接头的情况下,可使用本领域已知的任何合适的计算机程序和/或算法来确定相似性和/或同一性。

[0106] 例如,可使用分子指纹法适当地测定2个延长部分、2个接头和/或2个完整侧链的相似性。指纹是表示化学结构的一种数学方法(参见例如Chemoinformatics: A textbook, Johann Gasteiger和Thomas Engel (编辑), Wiley-VCH Verlag, 2003)。

[0107] 合适指纹的实例包括但不限于UNITY指纹、MDL指纹和/或ECFP指纹,诸如ECFP_6指纹(ECFP代表扩展连接指纹)。

[0108] 在具体的实施方案中,2个延长部分、2个接头和/或2个完整侧链被表示为a) ECFP_6指纹;b) UNITY指纹;和/或c) MDL指纹。

[0109] Tanimoto系数优选用于计算2种指纹的相似性,无论使用a)、b) 或c)。

[0110] 在具体的实施方案中,无论使用a)、b) 或c), 2个延长部分、2个接头和/或2个完整侧链分别具有的相似性为至少0.5 (50%);优选至少0.6 (60%);更优选至少0.7 (70%),或至少0.8 (80%);甚至更优选至少0.9 (90%);或最优选至少0.99 (99%),诸如相似性为1.0 (100%)。

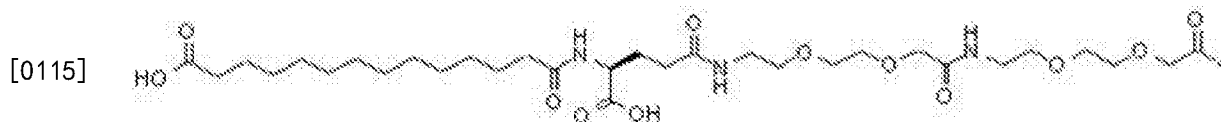
[0111] 可使用程序SYBYL (可得自 Tripos, 1699 South Hanley Road, St.Louis, MO63144-2319 USA) 来计算UNITY 指纹。可使用程序 Pipeline Pilot (可得自 Accelrys Inc., 10188 Telesis Court, Suite 100, San Diego, CA 92121, USA) 来计算ECFP_6 和 MDL指纹。

[0112] 对于更多细节,参见例如J. Chem. Inf. Model. 2008, 48, 542-549;J. Chem. Inf. Comput. Sci. 2004, 44, 170-178;J. Med. Chem. 2004, 47, 2743-2749;J.

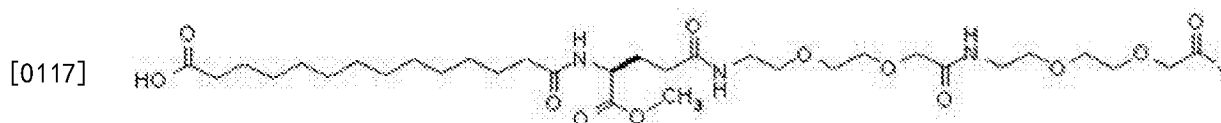
Chem. Inf. Model. 2010, 50, 742-754;以及SciTegic Pipeline Pilot Chemistry Collection: Basic Chemistry User Guide, March 2008, SciTegic Pipeline Pilot Data Modeling Collection, 2008 - 这两者来自Accelrys Software Inc., San Diego, US和指南http://www.tripos.com/tripos_resources/fileroot/pdfs/Unity_111408.pdf和http://www.tripos.com/data/SYBYL/SYBYL_072505.pdf.

[0113] 相似性计算的实例插入在下文中,其中将由C14脂肪二酸形式的延长部分和gGlu-2xOEG接头组成的侧链(Chem. 5)与其甲酯即谷氨酸接头部分的单甲酯(Chem 6)相比:

[0114] Chem. 5:



[0116] Chem. 6:



[0118] 使用a) ECFP_6指纹,相似性为0.798,使用b) UNITY指纹,相似性为0.957;和使用MDL指纹,相似性为0.905。

[0119] 在2个相同侧链(白蛋白结合部分)的情况下,衍生物可被称为对称的。

[0120] 在具体的实施方案中,相似性系数为至少0.80,优选至少0.85,更优选至少0.90,甚至更优选至少0.95,或最优选至少0.99。

[0121] 在第二方面,本发明涉及对应于本发明第一方面的GLP-1肽前体药物化合物的母体GLP-1肽药物。在具体的实施方案中,母体GLP-1肽药物包含Chem. 21、Chem. 22、Chem. 23、Chem. 24和/或Chem. 25的一种或多种化合物,其都是下式II的GLP-1化合物:(HOHis)-(GLP-1肽)(式II),其中(HOHis)、键和(GLP-1肽)都如以上实施方案(涉及第一方面的前体药物)中任一个所定义;或其药学上可接受的盐、酰胺或酯。

[0122] 在另一具体的实施方案中,母体GLP-1肽药物是所需的反应产物,在所述反应中式I的R1-(NHXaa1)的烷基化胺亲核试剂切割式I中的Xaa2和(OHis)之间的酯键,导致形成相应的二酮哌嗪衍生物(作为副产物)和母体GLP-1肽药物(作为所需产物)。

[0123] 在第三方面,本发明涉及Boc-NMe-Ile-Val-OH (Chem. 41)、Boc-NMe-Val-Val-OH (Chem. 42)、Boc-NMe-Gly-Val-OH (Chem. 44)、以及Chem. 43的化合物。这些是用于合成本发明前体药物的中间体二肽化合物。

[0124] 本文公开的化合物(前体药物、母体药物、中间体二肽化合物、GLP-1肽、GLP-1类似物、GLP-1衍生物)可以不同的立体异构体形式存在,所述立体异构体具有相同分子式和键合的原子序列,但仅在其原子空间的三维方向上不同。示例的本发明衍生物的立体异构现象,在实验部分中用标准命名法指出其名称和结构。除非另有说明,否则本发明涉及要求保护的化合物的所有立体异构体形式。

[0125] 可用任何合适方法来测定本发明化合物的血浆浓度。例如,可使用LC-MS(液相色谱-质谱),或免疫测定诸如RIA(放射免疫测定)、ELISA(酶联免疫吸附测定)和LOCI(发光氧通道免疫测定,Luminescence Oxygen Channeling Immunoassay)。合适的RIA和

ELISA测定的通用方案可参见例如W009/030738,第116-118页。优选的测定是WO 2011/080103的实施例52、55和58中描述的LOCI测定。

[0126] 药学上可接受的盐、酰胺或酯

[0127] 本发明的化合物可以呈药学可接受的盐、酰胺或酯的形式。

[0128] 盐是例如由碱和酸之间的化学反应而形成,例如: $2\text{NH}_3 + \text{H}_2\text{SO}_4 \rightarrow (\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 。

[0129] 盐可以是碱式盐、酸式盐,或者这两者都不是(即中性盐)。在水中碱式盐产生氢氧离子,酸式盐产生水合氢离子。

[0130] 盐可以分别与添加的阳离子或阴离子在阴离子基团或阳离子基团之间形成。这些基团可位于GLP-1肽部分内(在其肽部分中,和/或在GLP-1衍生物侧链中,如果有关的话),和/或在肽延伸部分内,例如在式I的(R1-(NHXaa1)-Xaa2)部分内。

[0131] 阴离子基团的非限制性实例包括游离羧基。例如,所述肽通常包括在C-末端的游离羧酸基团,并且它还可以包括在内部酸性氨基酸残基例如Asp和Glu上的游离羧基。

[0132] 阳离子基团的非限制性实例包括在肽的N-末端的游离氨基(如果存在的话)以及内部碱性氨基酸残基例如His、Arg和Lys的任何游离氨基。

[0133] 酯可以是例如通过游离羧酸基团与醇或酚反应而形成,其导致至少一个羟基被烷氧基或芳氧基置换。

[0134] 酯的形成可涉及肽的C-端的游离羧基,和/或侧链的任何游离羧基。

[0135] 酰胺可以是例如通过游离羧酸基团与胺或取代胺反应,或通过游离或取代氨基与羧酸反应而形成。

[0136] 酰胺的形成可涉及肽的C-端的游离羧基、侧链的任何游离羧基、肽的N-端的游离氨基、和/或在肽和/或侧链中的肽的任何游离或取代的氨基。

[0137] 在一个具体的实施方案中,本发明的任何化合物呈药学上可接受的盐的形式。在另一个具体的实施方案中,本发明的任何化合物呈药学上可接受的酰胺的形式,优选在肽的C-端具有酰胺基。在再一个具体的实施方案中,本发明化合物的任一个呈药学上可接受的酯的形式。

[0138] 功能特性

[0139] 在第一功能方面,GLP-1前体药物化合物导致相应母体药物的持续释放并因此延长母体药物的作用持续时间,作为结果,可以测定母体药物的改善的半寿期。优选地,母体药物的PK曲线具有理想的钟形形状。

[0140] 另外或备选地,在第二功能方面,对应于GLP-1前体药物的GLP-1母体药物具有生物活性,即具有GLP-1活性。

[0141] 另外或备选地,在第三功能方面,对应于GLP-1前体药物的GLP-1母体药物对于DPP-IV的降解是稳定的。

[0142] 另外或备选地,在第四功能方面,对应于GLP-1前体药物的GLP-1母体药物具有延长的半寿期。

[0143] 这些性质在用于皮下、静脉内和/或尤其是口服给予的替代和/或下一代GLP-1化合物的开发中是重要的。

[0144] 依据第一功能方面,本发明的GLP-1前体药物化合物具有改进的半寿期。在一个具体的实施方案中,与没有二肽延伸的N-末端氨基酸的N-烷基化的相应的前体药物相比,本

发明的前体药物的半寿期被改善。

[0145] 另外或备选地,在又一个具体的实施方案中,可将本发明的GLP-1前体药物的半寿期与相应的可比较的GLP-1前体药物(其中式I中的R1为H)的半寿期相比。

[0146] 另外或备选地,可使用本领域任何已知方法在体外和/或在体内测定半寿期。合适的测试是本文的实施例7的体外半寿期测试。在实施例7测试的具体的实施方案中,在磷酸盐缓冲液(pH7.4)中测定半寿期。另外或备选地,在另一具体的实施方案中,在血浆中测定半寿期。另外或备选地,在还一个具体的实施方案中,本发明的前体药物具有的半寿期用实施例7的体外方法(缓冲液和/或血浆)测定,其为以上提及的可比较化合物的半寿期的至少2倍。合适的体内测试包括在本文的实施例12中。

[0147] 生物活性-体外效力

[0148] 依据第二功能方面,对应于本发明的GLP-1前体药物的GLP-1母体药物具有生物活性,即具有GLP-1活性。如上所述,GLP-1母体药物是预期由本发明的GLP-1前体药物在体内转化而得到的药物。

[0149] 术语GLP-1活性是指与GLP-1受体结合并引发信号转导途径而导致促胰岛素作用或如本领域已知的其它生理效应的能力。可使用本领域任何已知方法测定GLP-1活性。在具体的实施方案中,本文的实施例8和/或9的体外效力试验可用于测定GLP-1活性。

[0150] 生物活性-在体内药理学

[0151] 另外,或备选地,可如本领域已知在任何合适的动物模型以及在临床试验中在体内测定效力。糖尿病db/db小鼠是合适的动物模型的一个实例,在所述小鼠体内可测定降低血糖的作用,其例如如WO 09/030738的实施例43所述。

[0152] 生物活性-体外效力和受体结合

[0153] 在一个具体的实施方案中,效力和/或活性是指体外效力,即在功能性GLP-1受体测定中的表现,更具体是在表达克隆的人GLP-1受体的细胞系中刺激cAMP形成的能力。

[0154] 可优选如下测定在含有人GLP-1受体的培养基中对cAMP形成的刺激:使用稳定转染的细胞系诸如BHK467-12A (tk-ts13),和/或使用用于测定cAMP的功能性受体测定,例如基于内源形成的cAMP与外源添加的生物素-标记的cAMP之间的竞争,在所述测定中更优选使用特异性抗体捕获cAMP,和/或其中甚至更优选的测定是AlphaScreen cAMP测定,最优选实施例8中描述的测定。

[0155] 术语半最大有效浓度(EC₅₀)通常是指根据剂量反应曲线诱导介于基线和最大值之间一半的反应的浓度。EC₅₀用作化合物效力的量度并且代表了所观察到的其最大效果的50%的浓度。

[0156] 可如上所述地测定本发明化合物的体外效力,尤其是GLP-1母体药物的效力,并测定目标化合物的EC₅₀。EC₅₀越低,效力越好。

[0157] 在一个具体的实施方案中,培养基具有以下组成(最终测定浓度):50 mM TRIS-HCl;5 mM HEPES;10 mM MgCl₂, 6H₂O;150 mM NaCl;0.01% Tween;0.1% BSA;0.5 mM IBMX;1 mM ATP;1 μM GTP;pH 7.4。

[0158] 在另一个具体的实施方案中,GLP-1母体药物对应于EC₅₀的体外效力等于或低于3000 pM,更优选低于2000 pM,甚至更优选低于1000 pM,或最优选低于500 pM。或者所述母体药物对应于EC₅₀的体外效力可以等于或低于300 pM,优选低于250 pM,更优选低于200

pM,甚至更优选低于150 pM,或最优选低于100 pM。

[0159] 一个替代的同样有用的体外效力测定描述于实施例9。在该测定中,母体药物对应于EC₅₀的体外效力可以等于或低于100 pM,优选低于50 pM,更优选低于40 pM,甚至更优选低于35 pM,或最优选低于30 pM;或低于25 pM,优选低于20 pM,更优选低于15 pM,甚至更优选低于10 pM,或最优选低于5 pM。

[0160] 在另一具体的实施方案中,另外或备选地,效力和/或活性是指,在低浓度白蛋白存在下,本发明的化合物、尤其是GLP-1母体药物与GLP-1受体结合的能力,这可以如实施例10中所述进行测定。

[0161] 通常,在低白蛋白浓度下与GLP-1受体的结合应当是尽可能地好,其对应于低IC₅₀值。

[0162] 在一个具体的实施方案中,在0.005% HSA (低白蛋白)存在下,GLP-1受体结合亲和力(IC₅₀) 低于1000.00 nM,优选低于600.00 nM,更优选低于100.00 nM,或最优选低于50.00 nM。

[0163] 生物活性 - 针对DPP-IV降解的稳定性

[0164] 依据第三功能方面,对应于本发明的GLP-1前体药物的GLP-1母体药物对于DPP-IV的降解是稳定的。

[0165] 可使用本领域任何已知方法测定肽化合物对二肽基氨肽酶IV (DPP-IV) 降解的抗性。

[0166] 合适的测定的实例是以下降解测定:将所述肽的等分试样在37℃与等分试样的纯化的二肽基氨肽酶IV在合适的pH7-8的缓冲液中(缓冲液不是白蛋白)孵育4-22小时。通过添加三氟乙酸终止酶反应,肽降解产物经分离并利用HPLC或LC-MS分析来定量。进行这种分析的一种方法是:将混合物施加到Zorbax 300SB-C18 (30 nm孔,5 μm颗粒) 150 X 2.1 mm柱上,并以0.5 ml/分钟的流速用0.1%三氟乙酸中的乙腈的线性梯度洗脱(0% -100%乙腈,在30分钟内)。肽和它们的降解产物可以通过它们在214 nm (肽键)或280 nm (芳族氨基酸)的吸光度来监测,和通过积分它们的峰面积来定量。可通过使用LC-MS确定降解模式,其中可测定分离峰的MS谱。在给定时间时完整/降解化合物的百分率用于估计肽的DPP-IV稳定性。

[0167] 另外或备选地,可以按照本文的实施例11所述测定DPP-IV降解。

[0168] 根据给定时间时完整化合物的百分率,当肽化合物比天然肽稳定10倍时,所述肽化合物可被例如定义为DPP-IV稳定的。在一个具体的实施方案中,当GLP-1化合物比GLP-1 (7-37) (在位置7有N-末端His延伸的SEQ ID NO: 1) 稳定至少10倍时,可以说该GLP-1化合物是DPP-IV稳定的。

[0169] 药代动力学曲线

[0170] 依据第一和第四功能方面,GLP-1母体药物从本发明的GLP-1前体药物的释放是持续的。因此实现延长母体药物的作用持续时间,并且因此可以测定母体药物的改善的半寿期。优选母体药物的PK曲线具有理想的钟形形状。持续释放或延长的(extended)作用持续时间也可称为延长的(prolonged)作用持续时间,和/或延长的效应。可使用本领域已知的任何方法在体外和/或在体内测定这一点。在一个具体的实施方案中,可在大鼠i.v.给予后在体内测定半寿期(T_{1/2}),例如使用WO 2011/080103的实施例58所述的方法。另外,或备选

地,在另一具体的实施方案中,可在小型猪i.v.给予后测定延长作为体内半寿期($T_{1/2}$),例如使用WO 2011/080103的实施例54所述的方法。也可使用这些方法测定本发明的前体药物。在又其它具体的实施方案中,另外或备选地,本发明的前体药物在体内也具有延长的半寿期。可例如使用本文以上提及的任何方法测定这一点。在具体的实施方案中,可与相应的前体药物(其中R1为H)进行比较。优选的测试是本文的实施例12中描述的小型猪i.v. PK实验。

[0171] 生产方法

[0172] 本发明的GLP-1前体药物和GLP-1母体药物的成分GLP-1肽,例如GLP-1 (8-37) (SEQ ID NO: 1) 及其类似物的生产,是本领域众所周知的。

[0173] 可通过例如经典肽合成,例如固相肽合成,使用t-Boc或Fmoc化学或其它充分建立的技术,产生这些肽,所述技术参见例如Greene和Wuts, "Protective Groups in Organic Synthesis", John Wiley & Sons, 1999, Florencio Zaragoza Dörwald, "Organic Synthesis on solid Phase", Wiley-VCH Verlag GmbH, 2000,和"Fmoc Solid Phase Peptide Synthesis", W.C. Chan和P.D. White编辑, Oxford University Press, 2000。

[0174] 另外,或备选地,它们也可通过重组方法而产生,即通过在允许所述肽表达的条件下,在合适的营养培养基中培养含有编码所述类似物的DNA序列并能表达所述肽的宿主细胞。适于表达这些肽的宿主细胞的非限制性实例是:大肠杆菌(*Escherichia coli*)、酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)以及哺乳动物BHK细胞系或CHO细胞系。

[0175] 可按照例如实验部分所述,生产包含非天然氨基酸和/或共价连接的N-端一肽或二肽模拟物的本发明的那些衍生物。或者参见例如Hodgson等人: "The synthesis of peptides and proteins containing non-natural amino acids", Chemical Society Reviews, 第33卷, 第7期(2004), 第422-430页;和WO 2009/083549 A1,名为"Semi-recombinant preparation of GLP-1 analogues"。

[0176] 可以如本领域公知的那样,例如如实验部分所公开,制备本发明的缩酚酸肽前体药物和成分(HOHis)-(GLP-1肽)母体药物。

[0177] 药物组合物

[0178] 可以如本领域已知的那样,制备包含本发明的GLP-1前体药物或GLP-1母体药物和药学上可接受的赋形剂的药物组合物。

[0179] 术语“赋形剂”广义上是指除了一种或多种活性治疗成分之外的任何成分。赋形剂可以是惰性物质、无活性物质和/或非药物活性物质。

[0180] 赋形剂可用于多种目的,例如作为载体、溶媒、稀释剂、片剂助剂,和/或用于改善活性物质的给予和/或吸收。

[0181] 药物活性成分与各种赋形剂的制剂是本领域已知的,参见例如Remington: The Science and Practice of Pharmacy (例如第 19 版(1995),和任何更新版本)。

[0182] 赋形剂的非限制性实例是:溶剂、稀释剂、缓冲剂、防腐剂、张度调节剂、螯合剂和稳定剂。

[0183] 制剂的实例包括液体制剂,即含水的水性制剂。液体制剂可以是溶液剂或混悬剂。水性制剂通常包含至少50% w/w的水,或至少60%、70%、80%、或甚至至少90% w/w的水。

[0184] 或者,药物组合物可以是固体制剂,例如经冻干或喷雾干燥的组合物,其可直接使

用,或者由医师或患者在使用前向其中加入溶剂和/或稀释剂而使用。

[0185] 水性制剂的pH可以是pH 3至pH 10的任何值,例如约7.0至约9.5;或约3.0至约7.0。

[0186] 药物组合物可包含缓冲剂。缓冲剂可例如选自乙酸钠、碳酸钠、柠檬酸盐、甘氨酸、组氨酸、甘氨酸、赖氨酸、精氨酸、磷酸二氢钠、磷酸氢二钠、磷酸钠和三(羟甲基)-氨基甲烷、N,N-二(羟乙基)甘氨酸、N-三(羟甲基)甲基甘氨酸、苹果酸、琥珀酸盐、马来酸、富马酸、酒石酸、天冬氨酸及其混合物。

[0187] 药物组合物可包含防腐剂。防腐剂可例如选自苯酚、邻甲酚、间甲酚、对甲酚、对羟基苯甲酸甲酯、对羟基苯甲酸丙酯、2-苯氧基乙醇、对羟基苯甲酸丁酯、2-苯乙醇、苯甲醇、氯丁醇和硫柳汞、溴硝丙二醇、苯甲酸、咪唑、氯己定、脱氢醋酸钠、氯甲酚、对羟基苯甲酸乙酯、苄索氯铵、氯苯甘醚(3p-氯苯氧基丙烷-1,2-二醇)及其混合物。防腐剂可以0.1 mg/ml至20 mg/ml的浓度存在。药物组合物可包含等张剂。等张剂可例如选自盐(例如氯化钠)、糖或糖醇、氨基酸(例如甘氨酸、组氨酸、精氨酸、赖氨酸、异亮氨酸、天冬氨酸、色氨酸、苏氨酸)、糖醇(例如甘油、1,2-丙二醇、1,3-丙二醇、1,3-丁二醇)、聚乙二醇(例如PEG400)及其混合物。可使用任何糖,诸如单糖、双糖或多糖或水溶性葡聚糖,包括例如果糖、葡萄糖、甘露糖、山梨糖、木糖、麦芽糖、乳糖、蔗糖、海藻糖、葡聚糖、普鲁兰多糖、糊精、环糊精、 α 和 β HPCD、可溶性淀粉、羟乙基淀粉和羧甲基纤维素-Na。糖醇定义为具有至少一个-OH基团的C4-C8烃并包括例如甘露糖醇、山梨糖醇、肌醇、半乳糖醇、卫矛醇、木糖醇和阿拉伯糖醇。在一个实施方案中,糖醇添加剂是甘露糖醇。

[0188] 药物组合物可包含螯合剂。螯合剂可例如选自乙二胺四乙酸(EDTA)、柠檬酸和天冬氨酸的盐、及其混合物。

[0189] 药物组合物可包含稳定剂。稳定剂可以是例如一种或多种氧化抑制剂、聚集抑制剂、表面活性剂、和/或一种或多种蛋白酶抑制剂。这些各类稳定剂的非限制性实例公开于下文。

[0190] 术语“聚集体形成”是指肽分子间的物理相互作用导致形成寡聚物,其可以保持可溶性,或是从溶液中沉淀下来的大的可见的聚集体。在液体药物组合物贮存期间由多肽形成聚集体可不利地影响所述多肽的生物活性,导致药物组合物治疗功效的损失。此外,聚集体形成可导致其它问题,诸如当用输注系统给予含多肽的药物组合物时会阻塞管道、膜或泵。

[0191] 药物组合物可包含一定量的氨基酸基质,其足以在所述组合物贮存期间减少多肽聚集体形成。术语“氨基酸基质”是指一种或多种氨基酸(诸如甲硫氨酸、组氨酸、咪唑、精氨酸、赖氨酸、异亮氨酸、天冬氨酸、色氨酸、苏氨酸)或其类似物。任何氨基酸都可以其游离碱形式或其盐形式存在。氨基酸基质的任何立体异构体(即L、D或其混合物)都可存在。

[0192] 当作为治疗剂起作用的多肽是包含容易被氧化(甲硫氨酸残基氧化为甲硫氨酸亚砷)的至少一个甲硫氨酸残基的多肽时,可加入甲硫氨酸(或其它含硫氨基酸或氨基酸类似物),以抑制这样的氧化。可使用甲硫氨酸的任何立体异构体(L或D)或其组合。

[0193] 药物组合物可包含选自高分子量聚合物或低分子化合物的稳定剂。稳定剂可例如选自聚乙二醇(例如PEG 3350)、聚乙烯醇(PVA)、聚乙烯吡咯烷酮、羧基-/羟基纤维素或其衍生物(例如HPC、HPC-SL、HPC-L和HPMC)、环糊精、含硫物质例如单硫代甘油、硫乙醇酸和2-

甲巯基乙醇,和不同盐类(例如氯化钠)。药物组合物可包含另外的稳定剂,诸如但不限于甲巯氨酸和EDTA(其保护多肽免于甲巯氨酸氧化),和非离子型表面活性剂(其保护多肽免于与冻融或机械剪切相关的聚集)。

[0194] 药物组合物可包含一种或多种表面活性剂,优选一种表面活性剂、至少一种表面活性剂或2种不同的表面活性剂。术语“表面活性剂”是指由水溶性(亲水性)部分和脂溶性(亲脂性)部分构成的任何分子或离子。表面活性剂可例如选自阴离子型表面活性剂、阳离子型表面活性剂、非离子型表面活性剂和/或两性离子型表面活性剂。

[0195] 药物组合物可包含一种或多种蛋白酶抑制剂,诸如例如EDTA(乙二胺四乙酸)和/或苯甲脒HCl。

[0196] 此外,任选药物组合物的成分包括例如润湿剂、乳化剂、抗氧化剂、填充剂、金属离子、油性溶媒、蛋白质(例如人血清白蛋白、明胶)和/或两性离子(例如氨基酸诸如甜菜碱、牛磺酸、精氨酸、甘氨酸、赖氨酸和组氨酸)。

[0197] 此外,可将药物组合物按照本领域已知方法配制成促胰岛素化合物的口服制剂,例如,使用WO 2008/145728所述的任何一种或多种制剂。

[0198] 所给予的剂量可分别含有0.01 mg - 100 mg的前体药物或药物,或分别0.01-50 mg、或0.01-20mg、或0.01-10 mg的前体药物或药物。

[0199] 所述衍生物可以药物组合物的形式给予。可将它给予于有需要的患者的若干部位,例如局部部位,诸如皮肤或粘膜部位;旁路吸收部位,诸如动脉内、静脉内或心脏内;和参与吸收的部位,诸如皮肤内、皮下、肌肉内或腹内。

[0200] 给予途径可以是例如舌;舌下;含服;口内;口服;胃内;肠内;鼻;肺,诸如通过细支气管、肺泡或其组合;胃肠外、表皮;真皮;透皮;结膜;输尿管;阴道;直肠;和/或眼。组合物可以是口服组合物,且给予途径可以是经口服。

[0201] 组合物可以若干剂型给予,例如作为溶液剂;混悬剂;乳剂;微乳剂;多重乳剂;泡沫剂;药膏剂;糊剂;膏药剂;软膏剂;片剂;包衣片剂;口香糖;冲洗剂;胶囊剂,诸如硬质或软质明胶胶囊剂;栓剂(suppositorium);直肠胶囊剂;滴剂;凝胶剂;喷雾剂;粉剂;气溶胶;吸入剂;滴眼剂;眼用软膏剂;眼用洗剂;阴道栓剂;阴道环;阴道软膏剂;注射用溶液剂;原位转化溶液剂诸如原位胶凝剂、凝固剂、沉淀剂和原位结晶剂;输注用溶液剂;或植入物。

[0202] 组合物可以是片剂(任选包衣)、胶囊剂或口香糖。

[0203] 还可将组合物进一步复合到药物载体或药物递送系统中,例如,为了改善稳定性、生物利用度和/或溶解度。在具体的实施方案中,可将组合物通过共价、疏水和/或静电相互作用连接到所述系统。这类复合的目的是例如减少副作用,实现时间治疗和/或增加患者的依从性。

[0204] 组合物也可用于控制释放、持续释放、延长释放、延迟释放和/或缓慢释放药物递送系统的制剂中。

[0205] 胃肠外给予可借助于注射器任选笔型注射器经皮下、肌内、腹膜内或静脉内注射,或借助于输注泵进行。

[0206] 可以溶液剂、混悬剂或粉剂形式经鼻给予组合物;或其可以液体或粉末喷雾的形式经肺部给予。

[0207] 透皮给予是又另一选择,例如通过无针注射,从贴剂诸如离子电渗贴剂

(iontophoretic patch), 或通过透粘膜途径, 例如含服。

[0208] 组合物可以是稳定的制剂。术语“稳定的制剂”是指具有增加的物理和/或化学稳定性、优选这两者的制剂。一般而言, 制剂在使用和贮存期间必须是稳定的(按照推荐的使用和贮存条件), 直至达到有效期。

[0209] 术语“物理稳定性”是指多肽形成无生物活性的和/或不溶聚集体的趋势, 这由暴露于热-机械应力和/或与不稳定界面和表面(诸如疏水性表面)相互作用而引起。在不同温度中在机械/物理应力(例如, 搅拌)中暴露不同时段之后, 可通过目测和/或通过浊度测量, 评价含水多肽制剂的物理稳定性。或者, 可使用多肽构象状态的分光剂或探针例如硫黄素T或“疏水性贴片”探针评价物理稳定性。

[0210] 术语“化学稳定性”是指多肽结构中的化学(尤其是共价)变化, 其导致形成化学降解产物, 所述化学降解产物与完整多肽相比可能具有降低的生物效力和/或增加的免疫原性效应。可通过在暴露于不同环境条件之后的不同时间点通过测量化学降解产物的量来评价化学稳定性, 例如通过SEC-HPLC和/或RP-HPLC。

[0211] 亦可将用本发明衍生物的治疗与一种或多种另外的药理学活性物质组合, 所述活性物质例如选自抗糖尿病药、抗肥胖症药、食欲调节药、抗高血压药、治疗和/或预防糖尿病所致或相关的并发症的药物以及治疗和/或预防肥胖症所致或相关的并发症和病症的药物。

[0212] 药物适应症

[0213] 本发明还涉及用作药物的本发明的GLP-1前体药物、以及本发明的GLP-1母体药物。

[0214] 在具体的实施方案中, 它们可用于以下药物治疗, 所有无论如何都优选涉及糖尿病:

[0215] (i) 预防和/或治疗所有形式的糖尿病, 诸如高血糖症、2型糖尿病、葡萄糖耐量受损、1型糖尿病、非胰岛素依赖性糖尿病、MODY (青少年的成人发作型糖尿病)、妊娠糖尿病和/或用于降低HbA1C;

[0216] (ii) 延迟或预防糖尿病进展诸如2型糖尿病的进展, 延迟葡萄糖耐量受损(IGT)至胰岛素需要型2型糖尿病的进展, 和/或延迟非胰岛素需要型2型糖尿病至胰岛素需要型2型糖尿病的进展;

[0217] (iii) 改善 β 细胞功能, 诸如减少 β 细胞细胞凋亡, 增加 β 细胞功能和/或 β 细胞的量, 和/或恢复 β 细胞的葡萄糖敏感性;

[0218] (iv) 预防和/或治疗认知障碍;

[0219] (v) 预防和/或治疗进食障碍, 诸如肥胖症, 例如通过减少食物摄取, 降低体重, 抑制食欲, 诱导饱胀感; 治疗或预防暴食症、神经性贪食症和/或因给予精神抑制药或类固醇所致的肥胖症; 减少胃运动; 和/或延迟胃排空;

[0220] (vi) 预防和/或治疗糖尿病并发症, 诸如神经病, 包括周围神经病; 肾病; 或视网膜病;

[0221] (vii) 改善脂质参数, 诸如预防和/或治疗血脂障碍, 降低总血清脂质; 降低HDL; 降低低密度LDL; 降低VLDL; 降低甘油三酯; 降低胆固醇; 增加HDL; 降低人中脂蛋白a (Lp(a))的血浆水平; 在体外和/或体内抑制载脂蛋白a (apo(a))的产生;

[0222] (iix) 预防和/或治疗心血管疾病,诸如X综合征;动脉粥样硬化;心肌梗塞;冠心病;中风、脑缺血;早期心脏病或早期心血管病,诸如左心室肥大;冠状动脉病;原发性高血压;急性高血压急症;心肌病;心功能不全;运动耐受性(exercise tolerance);慢性心力衰竭;心率不齐;心律失常;晕厥(syncopy);动脉粥样硬化;轻度慢性心力衰竭;心绞痛;心脏旁路重闭塞(cardiac bypass reocclusion);间歇性跛行(atherosclerosis obliterans);舒张功能障碍;和/或收缩功能障碍;

[0223] (ix) 预防和/或治疗胃肠道疾病,诸如炎性肠综合征;小肠综合征或克罗恩病(Crohn's disease);消化不良;和/或胃溃疡;

[0224] (x) 预防和/或治疗危急病症,诸如治疗危急病症患者,危急病症多发性肾病(critical illness poly-nephropathy, CIPNP)患者,和/或潜在的CIPNP患者;预防危急病症或CIPNP的发展;预防、治疗和/或治愈患者的全身炎症反应综合征(SIRS);和/或预防或减少患者在留医期间患上菌血症、败血症和/或脓毒性休克的可能性;和/或

[0225] (xi) 预防和/或治疗多囊卵巢综合征(PCOS)。

[0226] 在一个具体的实施方案中,所述适应症选自(i)-(iii)和(v)-(iix),例如适应症(i)、(ii)和/或(iii);或适应症(v)、适应症(vi)、适应症(vii)和/或适应症(iix)。

[0227] 在另一具体的实施方案中,所述适应症是(i)。在另一个具体的实施方案中,适应症是(v)。在再一个具体的实施方案中,适应症是(iix)。

[0228] 以下适应症特别优选:2型糖尿病和/或肥胖症。

[0229] 具体的实施方案

[0230] 以下是本发明具体的实施方案:

[0231] 1. 通式I的GLP-1化合物或其药学上可接受的盐、酰胺或酯:

[0232] $R1-(NHXaa1)-Xaa2-(OHis)-(GLP-1\text{肽})$ (式I)

[0233] 其中

[0234] GLP-1肽是GLP-1(8-37)(SEQ ID NO: 1)或与GLP-1(8-37)(SEQ ID NO: 1)相比最多具有9个氨基酸变化的其类似物;

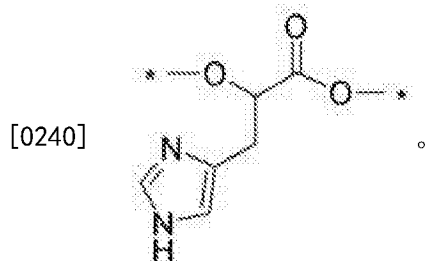
[0235] R1是低级烷基;

[0236] (NHXaa1)是氨基酸;

[0237] Xaa2是氨基酸;和

[0238] (OHis)是下式Chem. 1的咪唑-乳酸基团:

[0239] Chem. 1:



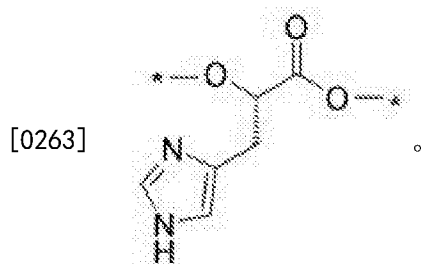
[0241] 2. 实施方案1的化合物,其是GLP-1前体药物。

[0242] 3. 实施方案1和2中任一项的化合物,其是GLP-1酯前体药物。

[0243] 4. 实施方案1-3中任一项的化合物,其是GLP-1的缩酚酸肽。

- [0244] 5. 实施方案1-4中任一项的化合物,其中Xaa2和(OHis)之间的键是酯键。
- [0245] 6. 实施方案1-5中任一项的化合物,其中(NHXaa1)和Xaa2之间的键是酰胺键。
- [0246] 7. 实施方案1-6中任一项的化合物,其中(OHis)和(GLP-1肽)之间的键是酰胺键。
- [0247] 8. 实施方案1-7中任一项的化合物,其中R1连接到(NHXaa1)的 α -氨基上。
- [0248] 9. 实施方案1-8中任一项的化合物,其是N-末端延伸的GLP-1肽。
- [0249] 10. 实施方案1-9中任一项的化合物,其中R1具有1-6个碳原子。
- [0250] 11. 实施方案1-10中任一项的化合物,其中R1是直链烷基。
- [0251] 12. 实施方案1-10中任一项的化合物,其中R1是支链烷基。
- [0252] 13. 实施方案1-11中任一项的化合物,其中R1是甲基。
- [0253] 14. 实施方案1-13中任一项的化合物,其中(NHXaa1)是Gly、Val或Ile。
- [0254] 15. 实施方案1-14中任一项的化合物,其中(NHXaa1)是Gly。
- [0255] 16. 实施方案1-14中任一项的化合物,其中(NHXaa1)是Val。
- [0256] 17. 实施方案1-14中任一项的化合物,其中(NHXaa1)是Ile。
- [0257] 18. 实施方案1-17中任一项的化合物,其中Xaa2不包含N-烷基化氨基酸。
- [0258] 19. 实施方案1-18中任一项的化合物,其中Xaa2是蛋白质性的氨基酸。
- [0259] 20. 实施方案1-19中任一项的化合物,其中Xaa2是 β -支链氨基酸。
- [0260] 21. 实施方案1-20中任一项的化合物,其中Xaa2是Val。
- [0261] 22. 实施方案1-21中任一项的化合物,其中(OHis)具有下式Chem. 2和/或L- β -咪唑乳酸或(2S)-2-羟基-3-(1H-咪唑-4-基)丙酸的名称:

[0262] Chem. 2:



- [0264] 23. 实施方案1-22中任一项的化合物,其中(OHis)连接到GLP-1肽的N-末端上。
- [0265] 24. 实施方案1-23中任一项的化合物,其中所述GLP-1肽是GLP-1 (8-37) (SEQ ID NO: 1)。
- [0266] 25. 实施方案1-23中任一项的化合物,其中所述GLP-1肽是GLP-1 (8-37) (SEQ ID NO: 1)的类似物。
- [0267] 26. 实施方案25的化合物,其中所述类似物与GLP-1 (8-37) (SEQ ID NO: 1)相比具有最多8个、优选7个氨基酸变化。
- [0268] 27. 实施方案25-26中任一项的化合物,其中所述类似物与GLP-1 (8-37) (SEQ ID NO: 1)相比具有最多6个氨基酸变化。
- [0269] 28. 实施方案25-27中任一项的化合物,其中所述类似物与GLP-1 (8-37) (SEQ ID NO: 1)相比具有最多5个氨基酸变化。
- [0270] 29. 实施方案25-28中任一项的化合物,其中所述类似物与GLP-1 (8-37) (SEQ ID NO: 1)相比具有最多4个氨基酸变化。

[0271] 30. 实施方案25-29中任一项的化合物,其中所述类似物与GLP-1 (8-37) (SEQ ID NO: 1)相比具有最多3个氨基酸变化。

[0272] 31. 实施方案25-30中任一项的化合物,其中所述类似物与GLP-1 (8-37) (SEQ ID NO: 1)相比具有最多2个氨基酸变化。

[0273] 32. 实施方案25-31中任一项的化合物,其中所述类似物与GLP-1 (8-37) (SEQ ID NO: 1)相比具有最多1个氨基酸变化。

[0274] 33. 实施方案25-32中任一项的化合物,其中所述类似物与GLP-1 (8-37) (SEQ ID NO: 1)相比具有最少1个氨基酸变化。

[0275] 34. 实施方案25-33中任一项的化合物,其中所述类似物与GLP-1 (8-37) (SEQ ID NO: 1)相比具有最少2个氨基酸变化。

[0276] 35. 实施方案25-34中任一项的化合物,其中所述类似物与GLP-1 (8-37) (SEQ ID NO: 1)相比具有最少3个氨基酸变化。

[0277] 36. 实施方案25-35中任一项的化合物,其中所述类似物与GLP-1 (8-37) (SEQ ID NO: 1)相比具有最少4个氨基酸变化。

[0278] 37. 实施方案25-36中任一项的化合物,其中所述类似物与GLP-1 (8-37) (SEQ ID NO: 1)相比具有最少5个氨基酸变化。

[0279] 38. 实施方案25-37中任一项的化合物,其中所述类似物与GLP-1 (8-37) (SEQ ID NO: 1)相比具有最少6个氨基酸变化。

[0280] 39. 实施方案25-38中任一项的化合物,其中所述类似物与GLP-1 (8-37) (SEQ ID NO: 1)相比具有最少7个氨基酸变化。

[0281] 40. 实施方案25-39中任一项的化合物,其中所述类似物与GLP-1 (8-37) (SEQ ID NO: 1)相比具有最少8个氨基酸变化。

[0282] 41. 实施方案1-40中任一项的化合物,其中所述GLP-1肽a)包含式III的肽;和/或b)是式III的肽,任选地衍生:

[0283] 式III: Xaa₈-Glu-Gly-Thr-Xaa₁₂-Thr-Ser-Asp-Xaa₁₆-Ser-Xaa₁₈-Xaa₁₉-Xaa₂₀-Glu-Xaa₂₂-Xaa₂₃-Ala-Xaa₂₅-Xaa₂₆-Xaa₂₇-Phe-Ile-Xaa₃₀-Xaa₃₁-Leu-Xaa₃₃-Xaa₃₄-Xaa₃₅-Xaa₃₆-Lys-Xaa₃₈,其中

[0284] Xaa₈是Ala、Gly、Val、Leu、Ile、Thr、Ser、Lys、Aib、(1-氨基环丙基)羧酸、(1-氨基环丁基)羧酸、(1-氨基环戊基)羧酸、(1-氨基环己基)羧酸、(1-氨基环庚基)羧酸或(1-氨基环辛基)羧酸;

[0285] Xaa₁₂是Phe或Leu;

[0286] Xaa₁₆是Val或Leu;

[0287] Xaa₁₈是Ser、Val、Lys或Leu;

[0288] Xaa₁₉是Tyr或Gln;

[0289] Xaa₂₀是Leu或Met;

[0290] Xaa₂₂是Gly、Glu或Aib;

[0291] Xaa₂₃是Gln、Glu或Arg;

[0292] Xaa₂₅是Ala或Val;

[0293] Xaa₂₆是Lys或Arg;

- [0294] Xaa₂₇是Lys、Glu或Leu;
- [0295] Xaa₃₀是Ala、Glu或Arg;
- [0296] Xaa₃₁是Trp、Lys或His;
- [0297] Xaa₃₃是Val;
- [0298] Xaa₃₄是Glu、Asn、Gly、Gln、Arg或His;
- [0299] Xaa₃₅是Gly或Aib;
- [0300] Xaa₃₆是Arg或Gly;和
- [0301] Xaa₃₇是Lys、Arg或Gly;和
- [0302] Xaa₃₈是Ser、Gly、Ala、Glu、Pro、Arg或不存在。
- [0303] 42. 实施方案1-41中任一项的化合物,其中所述GLP-1肽包含或具有仅1个或2个Lys。
- [0304] 43. 实施方案41-42中任一项的化合物,其中Xaa₈是Ala或Aib;Xaa₁₂是Phe;Xaa₁₆是Val;Xaa₁₈是Ser或Lys;Xaa₁₉是Tyr;Xaa₂₀是Leu;Xaa₂₂是Gly或Glu;Xaa₂₃是Gln或Arg;Xaa₂₅是Ala或Val;Xaa₂₆是Lys或Arg;Xaa₂₇是Lys或Glu;Xaa₃₀是Ala;Xaa₃₁是Trp或Lys;Xaa₃₃是Val;Xaa₃₄是Gln或Arg;Xaa₃₅是Gly;Xaa₃₆是Arg;Xaa₃₇是Lys或Gly;和Xaa₃₈不存在。
- [0305] 44. 实施方案41-43中任一项的化合物,其中Xaa₈是Ala。
- [0306] 45. 实施方案41-43中任一项的化合物,其中Xaa₈是Aib。
- [0307] 46. 实施方案41-45中任一项的化合物,其中Xaa₁₂是Phe。
- [0308] 47. 实施方案41-46中任一项的化合物,其中Xaa₁₆是Val。
- [0309] 48. 实施方案41-47中任一项的化合物,其中Xaa₁₈是Ser。
- [0310] 49. 实施方案41-47中任一项的化合物,其中Xaa₁₈是Lys。
- [0311] 50. 实施方案41-49中任一项的化合物,其中Xaa₁₉是Tyr。
- [0312] 51. 实施方案41-50中任一项的化合物,其中Xaa₂₀是Leu。
- [0313] 52. 实施方案41-51中任一项的化合物,其中Xaa₂₂是Gly。
- [0314] 53. 实施方案41-51中任一项的化合物,其中Xaa₂₂是Glu。
- [0315] 54. 实施方案41-53中任一项的化合物,其中Xaa₂₃是Gln。
- [0316] 55. 实施方案41-53中任一项的化合物,其中Xaa₂₃是Arg。
- [0317] 56. 实施方案41-55中任一项的化合物,其中Xaa₂₅是Ala。
- [0318] 57. 实施方案41-55中任一项的化合物,其中Xaa₂₅是Val。
- [0319] 58. 实施方案41-57中任一项的化合物,其中Xaa₂₆是Lys。
- [0320] 59. 实施方案41-57中任一项的化合物,其中Xaa₂₆是Arg。
- [0321] 60. 实施方案41-59中任一项的化合物,其中Xaa₂₇是Glu。
- [0322] 61. 实施方案41-59中任一项的化合物,其中Xaa₂₇是Lys。
- [0323] 62. 实施方案41-61中任一项的化合物,其中Xaa₃₀是Ala。
- [0324] 63. 实施方案41-62中任一项的化合物,其中Xaa₃₁是Trp。
- [0325] 64. 实施方案41-62中任一项的化合物,其中Xaa₃₁是Lys。
- [0326] 65. 实施方案41-64中任一项的化合物,其中Xaa₃₃是Val。
- [0327] 66. 实施方案41-65中任一项的化合物,其中Xaa₃₄是Gln。
- [0328] 67. 实施方案41-65中任一项的化合物,其中Xaa₃₄是Arg。

- [0329] 68. 实施方案41-68中任一项的化合物,其中Xaa₃₅是Gly。
- [0330] 69. 实施方案41-68中任一项的化合物,其中Xaa₃₆是Arg。
- [0331] 70. 实施方案41-69中任一项的化合物,其中Xaa₃₇是Gly。
- [0332] 71. 实施方案41-69中任一项的化合物,其中Xaa₃₇是Lys。
- [0333] 72. 实施方案41-71中任一项的化合物,其中Xaa₃₈不存在。
- [0334] 73. 实施方案25-72中任一项的化合物,其中所述类似物,当与GLP-1 (8-37) (SEQ ID NO: 1) 相比时,包含选自以下的至少一个氨基酸取代:8Aib、18K、22E、23R、25V、26R、27K、31K、34R或34Q和/或37K,其中所述位置编号是指GLP-1 (8-37) (SEQ ID NO: 1)。
- [0335] 74. 实施方案25-73中任一项的化合物,其中所述类似物是GLP-1 (8-37) (SEQ ID NO: 1) 的变体(18K、22E、25V、26R、31K、34R)。
- [0336] 75. 实施方案25-73中任一项的化合物,其中所述类似物是GLP-1 (8-37) (SEQ ID NO: 1) 的变体(34R、37K)。
- [0337] 76. 实施方案25-73中任一项的化合物,其中所述类似物是GLP-1 (8-37) (SEQ ID NO: 1) 的变体(18K、22E、34Q)。
- [0338] 77. 实施方案25-73中任一项的化合物,其中所述类似物是GLP-1 (8-37) (SEQ ID NO: 1) 的变体(8Aib、22E、26R、27K、34R)。
- [0339] 78. 实施方案25-73中任一项的化合物,其中所述类似物是GLP-1 (8-37) (SEQ ID NO: 1) 的变体(8Aib、23R、34R)。
- [0340] 79. 实施方案1-78中任一项的化合物,其中GLP-1肽是a) GLP-1 (8-37) (SEQ ID NO: 1) 的衍生物,或b) 如实施方案25-77任一项中定义的类似物的衍生物。
- [0341] 80. 实施方案79的化合物,其中至少一个取代基共价连接到a) 或b) 中定义的肽。
- [0342] 81. 实施方案79-80中任一项的化合物,其中所述取代基是侧链。
- [0343] 82. 实施方案81的化合物,其中所述侧链能够与白蛋白形成非共价聚集体。
- [0344] 83. 实施方案81-82中任一项的化合物,其中所述侧链是白蛋白结合部分。
- [0345] 84. 实施方案83的化合物,其中所述白蛋白结合部分包含延长部分和任选接头。
- [0346] 85. 实施方案83-84中任一项的化合物,其中所述白蛋白结合部分、延长部分或接头通过酰化而共价结合到所述肽的赖氨酸残基上,优选结合到其ε-氨基上。
- [0347] 86. 实施方案84-85中任一项的化合物,其中所述延长部分选自a) 脂肪二酸,和b) 脂肪酸,任选具有末端或远端的苯基或苯氧基,这两者都任选被取代。
- [0348] 87. 实施方案86的化合物,其中所述脂肪酸或脂肪二酸的羧基任选通过接头被酰化到所述肽的赖氨酸残基上,优选在其ε-氨基上。
- [0349] 88. 实施方案85-87中任一项的化合物,其中所述延长部分是
- [0350] Chem. 3: H₂COO-C₆H₄-O-(CH₂)₉-CO-*;其中优选H₂COO-基团在对位上。
- [0351] 89. 实施方案85-87中任一项的化合物,其中所述延长部分是
- [0352] Chem. 7: H₂COO-(CH₂)₁₆-CO-*。
- [0353] 90. 实施方案84-89中任一项的化合物,其中所述白蛋白结合部分,除了延长部分外,还包含接头。
- [0354] 91. 实施方案90的化合物,其中所述接头介于延长部分和所述肽之间。
- [0355] 92. 实施方案91的化合物,其中所述接头通过酰化而共价连接到所述肽的赖氨酸

残基上,优选连接在所述肽的赖氨酸残基的 ϵ 氨基上。

[0356] 93. 实施方案90-92中任一项的化合物,其中所述接头包括一个或多个接头元件。

[0357] 94. 实施方案93的化合物,其中第一接头元件是8-氨基-3,6-二氧杂辛酸的二基,其可用下式Chem. 4表示:

[0358] Chem. 4: $*-\text{NH}-(\text{CH}_2)_2-\text{O}-(\text{CH}_2)_2-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CO}-*$,和/或其可以称为OEG。

[0359] 95. 实施方案93-94中任一项的化合物,其中第二接头元件是Glu例如 γ -Glu或简称gGlu的二基,其中氨基酸谷氨酸的 γ 羧基用于连接到另一接头元件,或连接到赖氨酸的 ϵ -氨基上。

[0360] 96. 实施方案93-95中任一项的化合物,其中所述接头包括一个或多个第一接头元件,和/或一个或多个第二接头元件。

[0361] 97. 实施方案90-96中任一项的化合物,其中所述接头是gGlu-2xOEG。

[0362] 98. 实施方案97的化合物,其中gGlu的 α -氨基与延长部分的羧基形成酰胺键,gGlu的 γ 羧基与OEG的N-末端形成酰胺键,和OEG的C末端与所述肽的赖氨酸残基的 ϵ 氨基形成酰胺键。

[0363] 99. 实施方案80-98中任一项的化合物,其中至少一个取代基分别在对应于GLP-1 (8-37) (SEQ ID NO: 1)的以下至少一个位置的位置上连接到Lys残基的 ϵ 氨基:18、26、27、31和/或37。

[0364] 100. 实施方案99的化合物,其具有连接到位置26或27的1个取代基,其中所述位置编号是指GLP-1 (8-37)。

[0365] 101. 实施方案99的化合物,其具有连接到位置26的1个取代基。

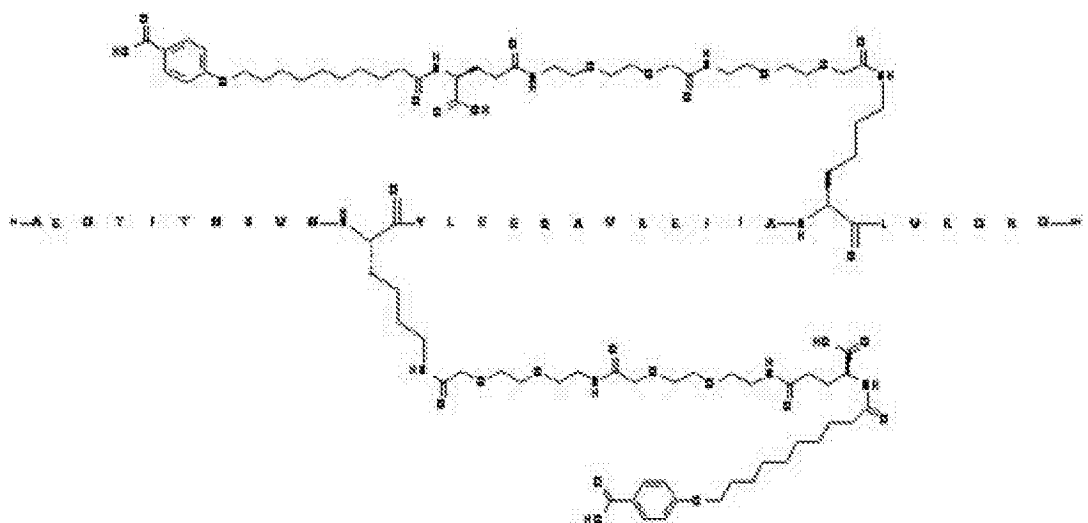
[0366] 102. 实施方案99的化合物,其具有连接到位置27的1个取代基。

[0367] 103. 实施方案99的化合物,其具有连接到以下位置的2个取代基:a) 18和31,b) 26和37,或c) 18和26,其中所述位置编号是指GLP-1 (8-37);其中所述化合物优选具有连接到以下位置的1个取代基:a) 位置18和31中的每个,b) 位置26和37中的每个,或c) 位置18和26中的每个。

[0368] 104. 实施方案1-103中任一项的化合物,其中GLP-1肽选自以下:

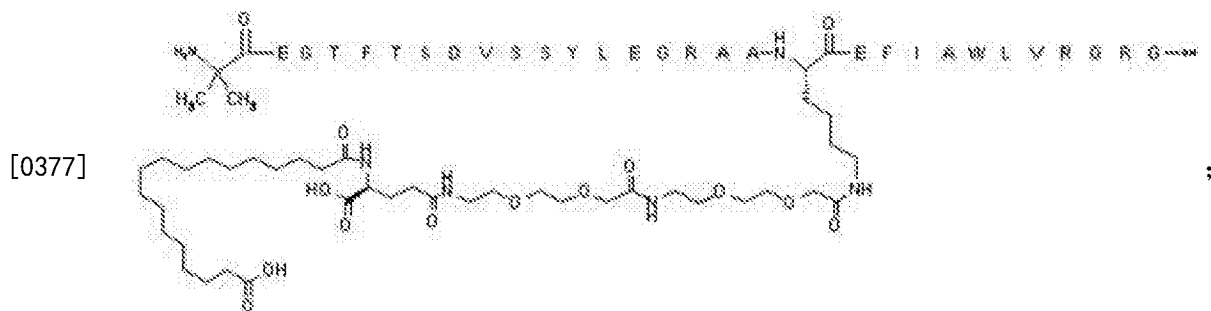
[0369] Chem. 21a:

[0370]



[0371] Chem. 22a:

[0376] Chem. 25a:



[0378] 或其药学上可接受的盐、酰胺或酯。

[0379] 105. 实施方案1-104中任一项的化合物,其具有延长的半寿期,优选在体外或体内的延长的半寿期;例如与相应的比较化合物(其中R1是H)相比。

[0380] 106. 实施方案105的化合物,其中所述前体药物体外半寿期在37℃在以下条件下测定:

[0381] a) 25 mM磷酸盐缓冲液 (pH 7.4); 和/或

[0382] b) 200 μ l 200 mM磷酸盐缓冲液 (pH 7.4) 和800 μ l血浆的溶液;

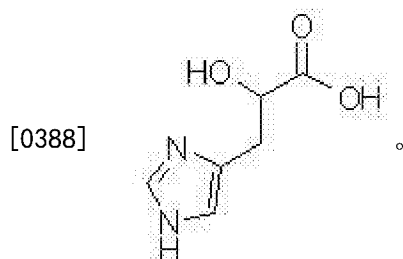
[0383] 和其中可使用任何合适的方法例如UPLC测定所述化合物的浓度。

[0384] 107. 实施方案106的化合物,其中所述前体药物半寿期使用以下方法测定:a) 缓冲液方法和/或b) 血浆方法,例如如实施例7中的一般性描述。

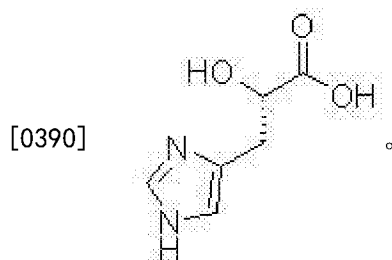
[0385] 108. 实施方案105-107中任一项的化合物,其前体药物半寿期为比较化合物的至少2倍,优选地至少3倍,更优选地至少4倍,甚至更优选地至少5倍,或最优选地至少6倍。

[0386] 109. 实施方案1-108中任一项的化合物,其结构中包含下式II的化合物元件:
(HOHis)-(GLP-1肽) (式II) 和键,其中 (HOHis) 是对应于Chem 1的 (OHis) 基团的咪唑-乳酸,并且GLP-1肽如以上实施方案1-108中任一项的定义,式II的化合物元件具有GLP-1活性。

[0387] 110. 实施方案109的化合物,其中(HOHis)具有下式Chem. 1a:



[0389] 111. 实施方案109的化合物,其中(HOHis)具有下式Chem. 2a:



[0391] 112. 实施方案109-111中任一项的化合物,其中所述化合物元件是GLP-1母体药物。

[0392] 113. 实施方案109-112中任一项的化合物,其中化合物元件的GLP-1活性是指活

化人GLP-1受体的能力。

[0393] 114. 实施方案113的化合物,其中在体外测定中按cAMP生产的效力测量人GLP-1受体的活化。

[0394] 115. 实施方案109-114中任一项的化合物,其中所述化合物元件具有对应于以下EC₅₀的效力:

[0395] a) 低于2000 pM,优选低于1800 pM,更优选低于1600 pM,甚至更优选低于1400 pM,或最优选低于1200 pM;

[0396] c) 低于1000 pM,优选低于800 pM,更优选低于600 pM,甚至更优选低于500 pM,或最优选低于400 pM;或

[0397] d) 低于300 pM,优选低于250 pM,更优选低于200 pM,甚至更优选低于150 pM,或最优选低于100 pM。

[0398] 116. 实施方案114-115中任一项的化合物,其中所述效力按对于在含有人GLP-1受体的培养基中cAMP形成的刺激的EC₅₀测定,优选使用稳定转染的细胞系例如BHK467-12A (tk-ts13),和/或使用用于测定cAMP的功能性受体测定,例如基于内源形成的cAMP与外源添加的生物素-标记的cAMP之间的竞争,在所述测定中更优选使用特异性抗体捕获cAMP,和/或其中甚至更优选的测定是AlphaScreen cAMP测定,最优选描述于实施例8的测定。

[0399] 117. 实施方案114-116中任一项的化合物,其中(式II的化合物元件的EC₅₀值除以式III的相应的比较药物的EC₅₀值)的倒数是至少0.1、优选至少0.2、更优选至少0.3、甚至更优选至少0.4、或最优选至少0.5:

[0400] (His7)-(GLP-1肽)(式III),其中(His7)是指GLP-1(8-37)的位置7的L-His(N-末端His延伸的SEQ ID NO: 1),所述键是酰胺键,和所述GLP-1肽与所述化合物中的相同)。

[0401] 118. 实施方案113的化合物,其中化合物元件的GLP-1活性是指在完整细胞测定中活化人GLP-1受体的能力。

[0402] 119. 实施方案118的化合物,其中所述化合物元件具有对应于以下EC₅₀的效力:

[0403] a) 低于100 pM、优选低于50 pM、更优选低于40 pM、甚至更优选低于35 pM、或最优选低于30 pM;或

[0404] c) 低于25 pM、优选低于20 pM、更优选低于15 pM、甚至更优选低于10 pM、或最优选低于5 pM。

[0405] 120. 实施方案118-119中任一项的化合物,其中通过在报道基因测定中测量人GLP-1受体的反应而确定体外效力,所述测定优选在稳定转染的BHK细胞系中进行,所述细胞系表达人GLP-1受体并含有与启动子和萤火虫萤光素酶(CRE萤光素酶)基因偶联的cAMP反应元件(CRE)的DNA。

[0406] 121. 实施方案120的化合物,其中当人GLP-1受体活化时,导致cAMP的产生,这反过来又导致萤光素酶蛋白的表达,并且其中,当测定孵育完成时,加入萤光素酶的底物(萤光素),所述酶将萤光素转化为氧化萤光素,产生生物发光,其是用于测定的读出。

[0407] 122. 实施方案121的化合物,其中如实施例9所述进行测定。

[0408] 123. 实施方案109-122中任一项的化合物,其中化合物元件的GLP-1活性是指在低白蛋白存在下与人GLP-1受体结合的能力。

[0409] 124. 实施方案123的化合物,在0.005% HSA(低白蛋白)存在下,所述化合物元件

的GLP-1受体结合亲和力(IC₅₀)为

[0410] a) 低于1000 nM,优选低于500 nM,更优选低于100 nM,或最优选低于50 nM;

[0411] b) 低于40 nM,优选低于30.0 nM,更优选低于20.0 nM,甚至更优选低于10.0 nM,或最优选低于5.00 nM;或

[0412] c) 低于5.0 nM,优选低于4.0 nM,更优选低于2.0 nM,甚至更优选低于1.0 nM,或最优选低于0.5 nM。

[0413] 125. 实施方案123-124中任一项的化合物,其中通过从受体中置换¹²⁵I-GLP-1的方式,测定与GLP-1受体的结合亲和力,优选使用SPA结合测定,更优选如实施例10所述。

[0414] 126. 实施方案123-125中任一项的化合物,其中(式II的化合物元件的IC₅₀值除以式III的相应的比较药物的IC₅₀值)的倒数是至少0.1、优选至少0.2、更优选至少0.3、甚至更优选至少0.4、或最优选至少0.5:

[0415] (His7)-(GLP-1肽)(式III),其中(His7)是指在GLP-1(7-37)位置7的L-His(N-末端His延伸的SEQ ID NO: 1),所述键是酰胺键,和所述GLP-1肽与所述化合物中的相同。

[0416] 127. 实施方案109-126中任一项的化合物,其中所述化合物元件对于DPP-IV降解是稳定的。

[0417] 128. 实施方案127的化合物,其具有

[0418] a) 至少1000分钟、优选至少1500分钟、更优选至少2000分钟或最优选至少2500分钟的半寿期;或

[0419] b) 至少3000分钟、或优选至少3500分钟的半寿期;

[0420] 所述半寿期在与DPP-IV加或不加BSA体外孵育后测定,如实施例11中的一般性描述。

[0421] 129. 实施方案1-128中任一项的化合物,其中当经i.v.在小型猪中给予时,导致母体药物的“钟形”PK曲线,例如通常如图2中的方形代表的曲线。

[0422] 130. 化合物,选自Chem. 51、Chem. 52、Chem. 53、Chem. 54、Chem. 55和Chem. 56;或其药学上可接受的盐、酰胺或酯。

[0423] 131. 化合物,优选依据实施方案80,其结构选自实施例1、2、3、4、5和6中所示结构;或其药学上可接受的盐、酰胺或酯。

[0424] 132. 化合物,优选依据实施方案80和/或81中的任一项,其名称选自实施例1、2、3、4、5和6的化合物名称;或其药学上可接受的盐、酰胺或酯。

[0425] 133. 实施方案130-132中任一项的化合物,其是实施方案1-129中任一项定义的化合物。

[0426] 134. 化合物,选自Chem. 30、Chem. 31、Chem. 32、Chem. 33和Chem. 34;或其药学上可接受的盐、酰胺或酯。

[0427] 135. 化合物,优选依据实施方案134,其名称选自实施例1a、1b、2a、3a和6a的化合物名称;或其药学上可接受的盐、酰胺或酯。

[0428] 136. 实施方案134-135中任一项的化合物,其是实施方案1-129中任一项定义的化合物。

[0429] 137. 化合物,选自Chem. 21、Chem. 22、Chem. 23、Chem. 24和Chem. 25;或其药学上可接受的盐、酰胺或酯。

[0430] 138. 实施方案137的化合物,其是GLP-1母体药物。

[0431] 139. 包含选自以下SEQ ID NO: 1类似物的肽序列的化合物:(i) 7H0His、18K、22E、25V、26R、31K、34R;(ii) 7H0His、18K、22E、25V、26R、31K、34R;(iii) 7H0His、34R、37K;(iv) 7H0His、18K、22E、34Q;(v) 7H0His、8Aib、22E、26R、27K、34R;和(vi) 7H0His、8Aib、23R、34R。

[0432] 140. 实施方案139的化合物,其具有选自(i)-(vi)的肽序列。

[0433] 141. 实施方案139-140中任一项的化合物,其是GLP-1 (8-37) SEQ ID NO: 1的类似物。

[0434] 142. 实施方案137-141中任一项的化合物,其具有GLP-1活性,其中GLP-1活性优选如以上实施方案109-126中任一项所定义。

[0435] 143. 实施方案137-142中任一项的化合物,其对于DPP-IV的降解是稳定的。

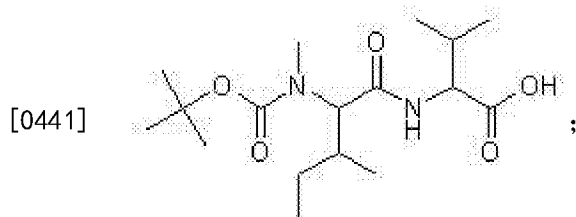
[0436] 144. 实施方案137-143中任一项的化合物,其具有延长的半寿期。

[0437] 145. 化合物,选自Chem. 41 (Boc-NMe-Ile-Val-OH)、Chem. 42 (Boc-NMe-Val-Val-OH)和Chem. 44 (Boc-NMe-Gly-Val-OH);或其盐、酰胺或酯。

[0438] 146. 实施方案145的化合物,其是中间体化合物。

[0439] 147. 实施方案145-146中任一项的化合物,其中Boc-NMe-Ile-Val-OH是指

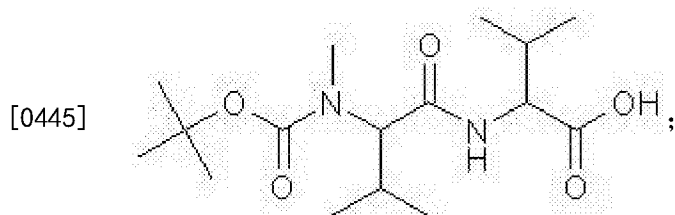
[0440] Chem. 41:



[0442] 或其盐、酰胺或酯。

[0443] 148. 实施方案145-147中任一项的化合物,其中Boc-NMe-Val-Val-OH是指

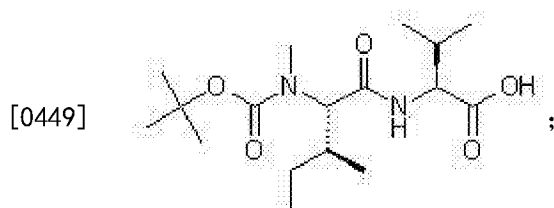
[0444] Chem. 42:



[0446] 或其盐、酰胺或酯。

[0447] 149. 实施方案145-147中任一项的化合物,其中Boc-NMe-Ile-Val-OH是指

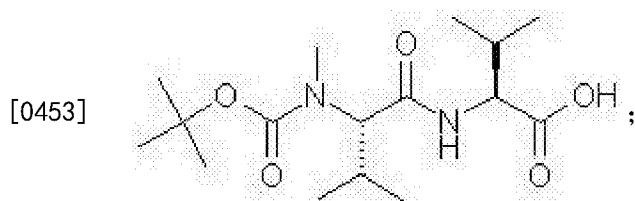
[0448] Chem. 41a:



[0450] 或其盐、酰胺或酯。

[0451] 150. 实施方案145-147中任一项的化合物,其中Boc-NMe-Val-Val-OH是指

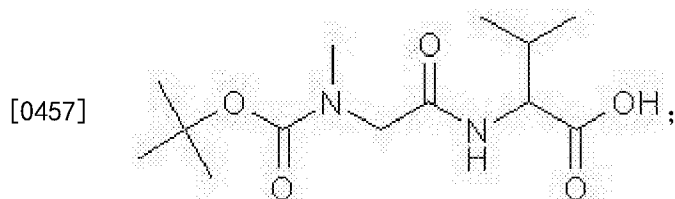
[0452] Chem. 42a:



[0454] 或其盐、酰胺或酯。

[0455] 151. 实施方案145-147中任一项的化合物,其中Boc-NMe-Gly-Val-OH是指

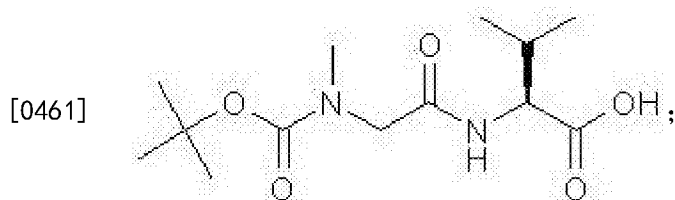
[0456] Chem. 44:



[0458] 或其盐、酰胺或酯。

[0459] 152. 实施方案145-147中任一项的化合物,其中Boc-NMe-Gly-Val-OH是指

[0460] Chem. 44a:

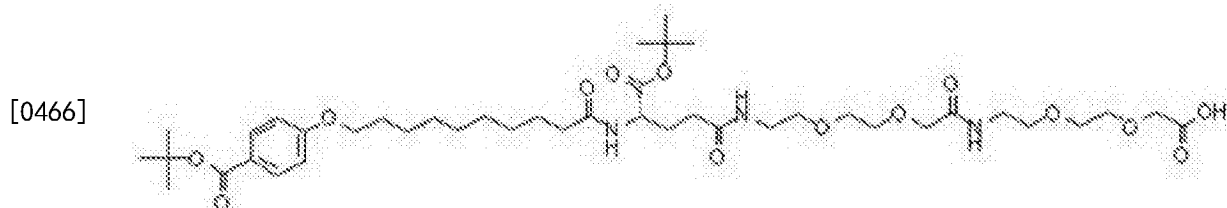


[0462] 或其盐、酰胺或酯。

[0463] 153. 选自以下的化合物:

[0464] 2-[2-[2-[2-[2-[2-[(4S)-5-叔丁氧基-4-[10-(4-叔丁氧基羰基苯氧基)癸酰基氨基]-5-氧代-戊酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]-乙酰基]氨基]乙氧基]乙酸;和

[0465] Chem. 43:



或其药学上可接受的盐、酰胺或酯。

[0467] 154. 实现在体内释放以下通式II的活性和稳定的母体药物GLP-1化合物或其药学上可接受的盐、酰胺或酯的方法:(HOHis)-(GLP-1肽),即通过给予如以上实施方案1-136中任一项定义的其前体药物。

[0468] 155. 实施方案154的方法,其中所述前体药物在体内被转化而释放具有长t_{1/2}的活性药物。

[0469] 156. 用作药物的实施方案1-144中任一项的化合物。

[0470] 157. 实施方案1-144中任一项的化合物,用于治疗和/或预防所有形式的糖尿病和相关疾病,例如进食障碍、心血管疾病、胃肠道疾病、糖尿病并发症、危急病症和/或多囊卵巢综合征;和/或用于改善脂质参数,改善 β 细胞功能,和/或用于延迟或预防糖尿病进展。

[0471] 158. 方法,所述方法用于治疗或预防所有形式的糖尿病和相关疾病,例如进食障碍、心血管疾病、胃肠道疾病、糖尿病并发症、危急病症和/或多囊卵巢综合征;和/或用于改善脂质参数,改善 β 细胞功能,和/或用于延迟或预防糖尿病进展,即通过给予药学活性量的实施方案1-144中任一项的化合物。

[0472] 另外的具体实施方案

[0473] 以下是本发明具体的实施方案:

[0474] 1. 通式I的GLP-1化合物或其药学上可接受的盐、酰胺或酯:

[0475] $R1-(NHXaa1)-Xaa2-(OHis)-(GLP-1\text{肽})$ (式I)

[0476] 其中

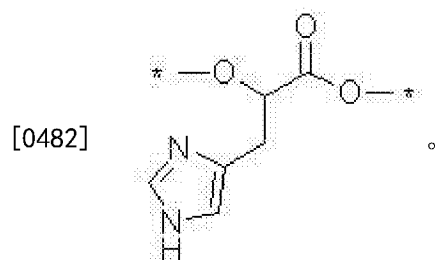
[0477] R1是低级烷基;

[0478] (NHXaa1)是氨基酸;

[0479] Xaa2是氨基酸;和

[0480] (OHis)是下式Chem. 1的咪唑-乳酸基团:

[0481] Chem. 1:



[0483] 2. 实施方案1的化合物,其是GLP-1前体药物。

[0484] 3. 实施方案1和2中任一项的化合物,其是GLP-1酯前体药物。

[0485] 4. 实施方案1-3中任一项的化合物,其是GLP-1的缩酚酸肽。

[0486] 5. 实施方案1-4中任一项的化合物,其中Xaa2和(OHis)之间的键是酯键。

[0487] 6. 实施方案1-5中任一项的化合物,其中(NHXaa1)和Xaa2之间的键是酰胺键。

[0488] 7. 实施方案1-6中任一项的化合物,其中(OHis)和(GLP-1肽)之间的键是酰胺键。

[0489] 8. 实施方案1-7中任一项的化合物,其中R1连接到(NHXaa1)的 α -氨基上。

[0490] 9. 实施方案1-8中任一项的化合物,其是N-末端延伸的GLP-1肽。

[0491] 10. 实施方案1-9中任一项的化合物,其中R1具有1-6个碳原子。

[0492] 11. 实施方案1-10中任一项的化合物,其中R1是直链烷基。

[0493] 12. 实施方案1-10中任一项的化合物,其中R1是支链烷基。

[0494] 13. 实施方案1-11中任一项的化合物,其中R1是甲基。

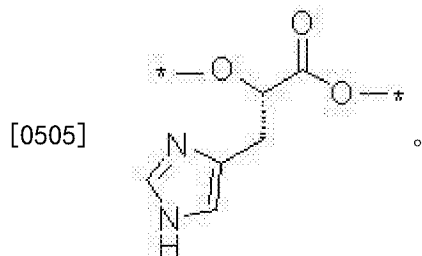
[0495] 14. 实施方案1-13中任一项的化合物,其中(NHXaa1)是Gly、Val或Ile。

[0496] 15. 实施方案1-14中任一项的化合物,其中(NHXaa1)是Gly。

[0497] 16. 实施方案1-14中任一项的化合物,其中(NHXaa1)是Val。

[0498] 17. 实施方案1-14中任一项的化合物,其中(NHXaa1)是Ile。

- [0499] 18. 实施方案1-17中任一项的化合物,其中Xaa2不包含N-烷基化氨基酸。
- [0500] 19. 实施方案1-18中任一项的化合物,其中Xaa2是蛋白质性的氨基酸。
- [0501] 20. 实施方案1-19中任一项的化合物,其中Xaa2是 β -支链氨基酸。
- [0502] 21. 实施方案1-20中任一项的化合物,其中Xaa2是Val。
- [0503] 22. 实施方案1-21中任一项的化合物,其中(OHis)具有下式Chem. 2:
- [0504] Chem. 2:



- [0506] 23. 实施方案1-22中任一项的化合物,其中(OHis)连接到GLP-1肽的N-末端。
- [0507] 24. 实施方案1-23中任一项的化合物,其中GLP-1肽是GLP-1 (8-37) (SEQ ID NO: 1)或其类似物。
- [0508] 25. 实施方案24的化合物,其中所述类似物与GLP-1 (8-37) (SEQ ID NO: 1)相比具有最多6个氨基酸变化。
- [0509] 26. 实施方案24的化合物,其中所述类似物与GLP-1 (8-37) (SEQ ID NO: 1)相比具有最多5个氨基酸变化。
- [0510] 27. 实施方案24的化合物,其中所述类似物与GLP-1 (8-37) (SEQ ID NO: 1)相比具有最多4个氨基酸变化。
- [0511] 28. 实施方案24的化合物,其中所述类似物与GLP-1 (8-37) (SEQ ID NO: 1)相比具有最多3个氨基酸变化。
- [0512] 29. 实施方案24的化合物,其中所述类似物与GLP-1 (8-37) (SEQ ID NO: 1)相比具有最多2个氨基酸变化。
- [0513] 30. 实施方案24的化合物,其中所述类似物与GLP-1 (8-37) (SEQ ID NO: 1)相比具有最多1个氨基酸变化。
- [0514] 31. 实施方案24的化合物,其中所述类似物与GLP-1 (8-37) (SEQ ID NO: 1)相比具有最少1个氨基酸变化。
- [0515] 32. 实施方案24的化合物,其中所述类似物与GLP-1 (8-37) (SEQ ID NO: 1)相比具有最少2个氨基酸变化。
- [0516] 33. 实施方案24的化合物,其中所述类似物与GLP-1 (8-37) (SEQ ID NO: 1)相比具有最少3个氨基酸变化。
- [0517] 34. 实施方案24的化合物,其中所述类似物与GLP-1 (8-37) (SEQ ID NO: 1)相比具有最少4个氨基酸变化。
- [0518] 35. 实施方案24的化合物,其中所述类似物与GLP-1 (8-37) (SEQ ID NO: 1)相比具有最少5个氨基酸变化。
- [0519] 36. 实施方案24的化合物,其中所述类似物与GLP-1 (8-37) (SEQ ID NO: 1)相比具有最少6个氨基酸变化。

[0520] 37. 实施方案24-36中任一项的化合物,其中所述类似物,当与GLP-1 (8-37) (SEQ ID NO: 1) 相比时,包含选自以下的至少一个氨基酸取代:18K、22E、25V、26R、31K、34R或34Q和/或37K,其中所述位置编号是指GLP-1 (8-37)。

[0521] 38. 实施方案24-37中任一项的化合物,其中所述类似物是GLP-1 (8-37) (SEQ ID NO: 1) 的变体(18K、22E、25V、26R、31K、34R)。

[0522] 39. 实施方案24-37中任一项的化合物,其中所述类似物是GLP-1 (8-37) (SEQ ID NO: 1) 的变体(34R、37K)。

[0523] 40. 实施方案24-38中任一项的化合物,其中所述类似物是GLP-1 (8-37) (SEQ ID NO: 1) 的变体(18K、22E、34Q)。

[0524] 41. 实施方案1-23中任一项的化合物,其中GLP-1肽是a) GLP-1 (8-37) (SEQ ID NO: 1) 的衍生物,或b) 如实施方案24-40任一项中定义的类似物的衍生物。

[0525] 42. 实施方案41的化合物,其中至少一个取代基共价连接到a) 或b) 中定义的肽上。

[0526] 43. 实施方案41-42中任一项的化合物,其中所述取代基是侧链。

[0527] 44. 实施方案43的化合物,其中所述侧链能够与白蛋白形成非共价聚集体。

[0528] 45. 实施方案43-44中任一项的化合物,其中所述侧链是白蛋白结合部分。

[0529] 46. 实施方案45的化合物,其中所述白蛋白结合部分包含延长部分和任选接头。

[0530] 47. 实施方案45-46中任一项的化合物,其中所述白蛋白结合部分、延长部分或接头通过酰化而共价结合到所述肽的赖氨酸残基上,优选结合到其 ϵ 氨基上。

[0531] 48. 实施方案46-47中任一项的化合物,其中所述延长部分选自a) 脂肪二酸,和b) 脂肪酸,任选具有末端或远端的苯基或苯氧基,这两者都任选被取代。

[0532] 49. 实施方案48的化合物,其中所述脂肪酸或脂肪二酸的羧基任选通过接头被酰化到所述肽的赖氨酸残基上,优选在其 ϵ -氨基上。

[0533] 50. 实施方案47-49中任一项的化合物,其中所述延长部分是

[0534] Chem. 3: $\text{HOOCC}_6\text{H}_4\text{-O-(CH}_2)_9\text{-CO-*}$;其中优选 $\text{HOOCC}_6\text{H}_4\text{-}$ 基团在对位上。

[0535] 51. 实施方案46-50中任一项的化合物,其中所述白蛋白结合部分,除了延长部分外,还包含接头。

[0536] 52. 实施方案51的化合物,其中所述接头介于延长部分和所述肽之间。

[0537] 53. 实施方案52的化合物,其中所述接头通过酰化而共价连接到所述肽的赖氨酸残基上,优选连接在所述肽的赖氨酸残基的 ϵ 氨基上。

[0538] 54. 实施方案51-53中任一项的化合物,其中所述接头包括一个或多个接头元件。

[0539] 55. 实施方案54的化合物,其中第一接头元件是8-氨基-3,6-二氧杂辛酸的二基,其可由下式Chem. 4表示:

[0540] Chem. 4: $\text{*-(NH-(CH}_2)_2\text{-O-(CH}_2)_2\text{-O-CH}_2\text{-CO-*)}$,和/或其可以称为OEG。

[0541] 56. 实施方案54-55中任一项的化合物,其中第二接头元件是Glu例如 γ -Glu或简称gGlu的二基,其中氨基酸谷氨酸的 γ 羧基用于连接到另一接头元件,或连接到赖氨酸的 ϵ -氨基上。

[0542] 57. 实施方案54-56中任一项的化合物,其中所述接头包括一个或多个第一接头元件,和/或一个或多个第二接头元件。

[0543] 58. 实施方案51-57中任一项的化合物,其中所述接头是gGlu-2xOEG。

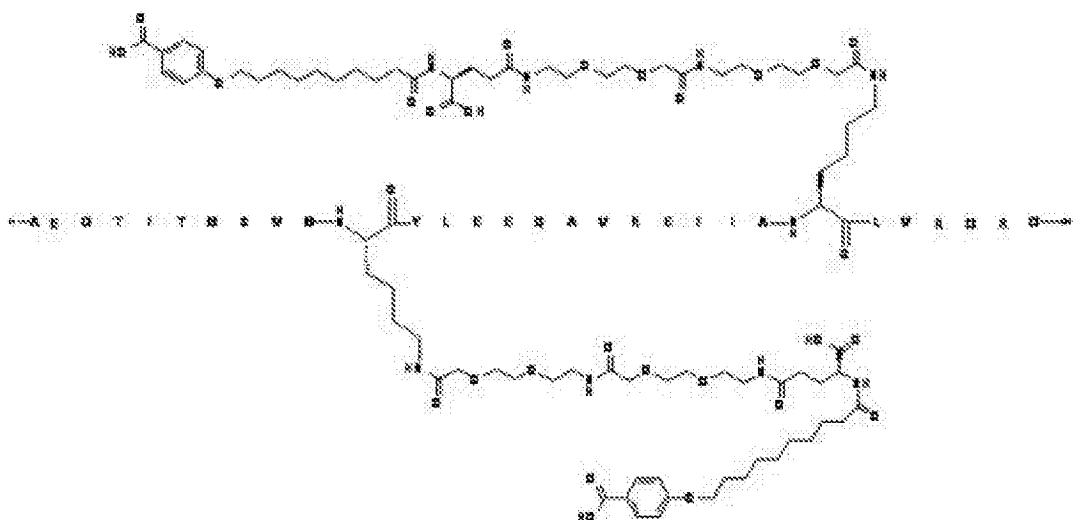
[0544] 59. 实施方案58的化合物,其中gGlu的 α -氨基与延长部分的羧基形成酰胺键,gGlu的 γ 羧基与OEG的N-末端形成酰胺键,和OEG的C末端与所述肽的赖氨酸残基的 ϵ 氨基形成酰胺键。

[0545] 60. 实施方案42-59中任一项的化合物,其中至少一个取代基分别在对应于GLP-1 (8-37) (SEQ ID NO: 1) 的以下至少一个位置的位置上连接到Lys残基的 ϵ 氨基:18、26、31和/或37。

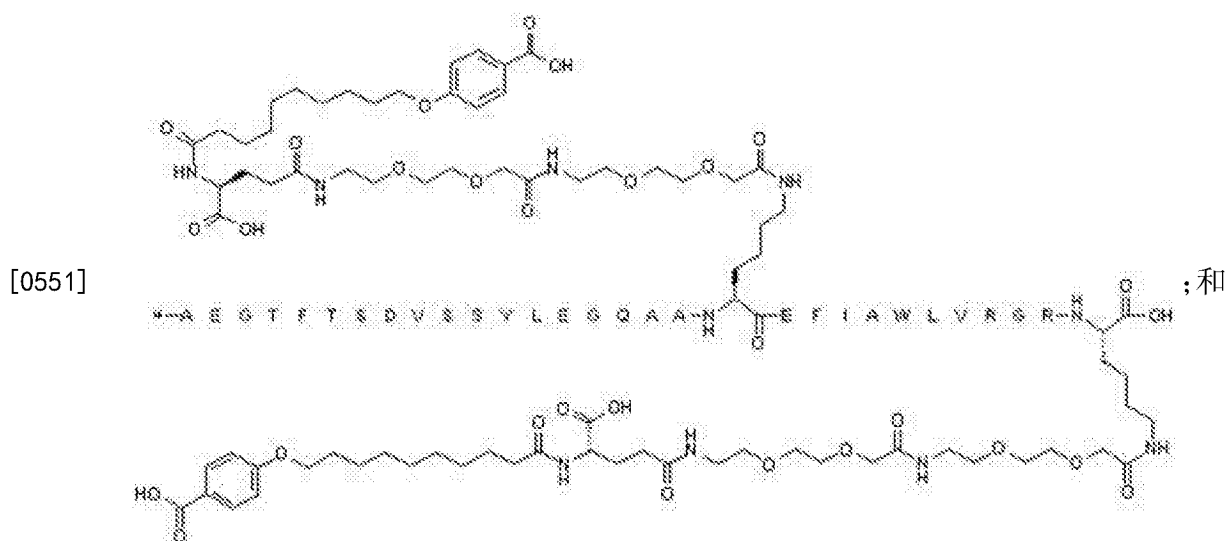
[0546] 61. 实施方案60的化合物,其具有连接到以下位置的2个取代基:a) 18和31,b) 26和37,或c) 18和26,其中所述位置编号是指GLP-1 (8-37);其中所述化合物优选具有连接到以下位置的1个取代基:a) 位置18和31中的每个,b) 位置26和37中的每个,或c) 位置18和26中的每个。

[0547] 62. 实施方案1-61中任一项的化合物,其中GLP-1肽选自以下:

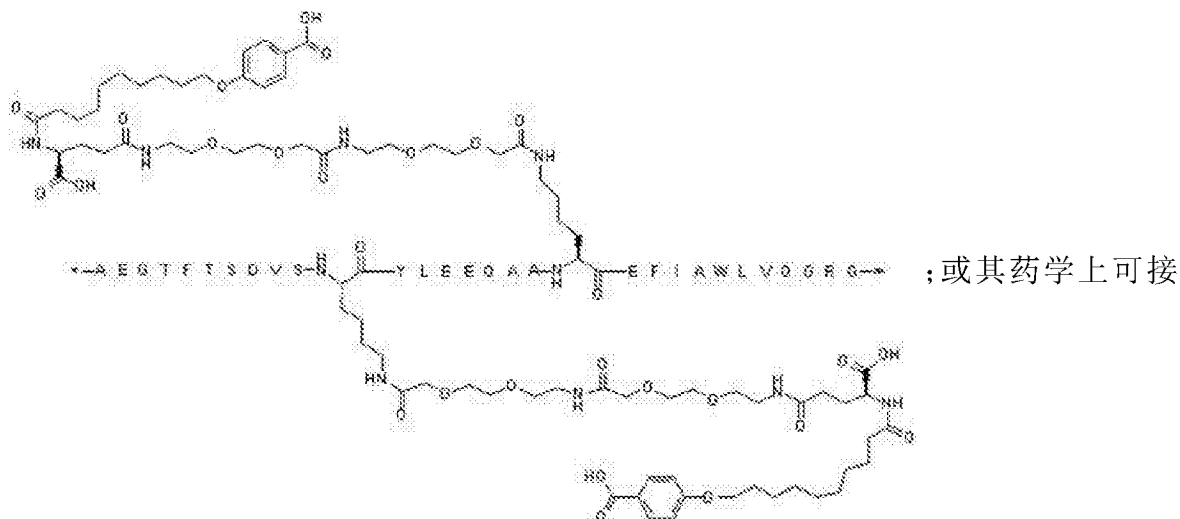
[0548] Chem. 21a:



[0550] Chem. 22a:



[0552] Chem. 23a:



受的盐、酰胺或酯。

[0553] 63. 实施方案1-50中任一项的化合物,其具有延长的半寿期,优选在体外或体内的延长的半寿期;例如与相应的比较化合物(其中R1是H)相比。

[0554] 64. 实施方案63的化合物,其中所述前体药物体外半寿期是在37℃在以下条件下测定:

[0555] a) 25 mM磷酸盐缓冲液(pH 7.4);和/或

[0556] b) 200 u1 200 mM磷酸盐缓冲液(pH 7.4)和800 u1血浆的溶液;

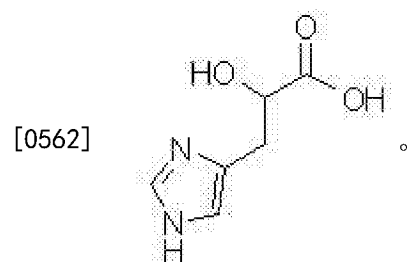
[0557] 和其中可使用任何合适的方法例如UPLC测定所述化合物的浓度。

[0558] 65. 实施方案64的化合物,其中所述前体药物半寿期使用以下方法测定:a) 缓冲液方法和/或b) 血浆方法,例如如实施例7中的一般性描述。

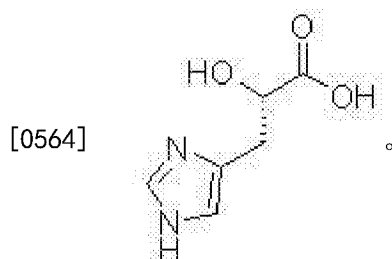
[0559] 66. 实施方案63-65中任一项的化合物,其前体药物半寿期为比较化合物的至少2倍,优选地至少3倍,更优选地至少4倍,甚至更优选地至少5倍,或最优选地至少6倍。

[0560] 67. 实施方案1-66中任一项的化合物,其结构中包含下式II的化合物元件:(HOHis)-(GLP-1肽)(式II)和键,其中(HOHis)是对应于Chem 1的(OHis)基团的咪唑-乳酸,并且GLP-1肽如以上实施方案1-66中任一项定义,式II的化合物元件具有GLP-1活性。

[0561] 68. 实施方案67的化合物,其中(HOHis)具有下式Chem. 1a:



[0563] 69. 实施方案67的化合物,其中(HOHis)具有下式Chem. 2a:



[0565] 70. 实施方案67-69中任一项的化合物,其中所述化合物元件是GLP-1母体药物。

[0566] 71. 实施方案67-70中任一项的化合物,其中化合物元件的GLP-1活性是指活化人GLP-1受体的能力。

[0567] 72. 实施方案71的化合物,其中在体外测定中按cAMP生产的效力测量人GLP-1受体的活化。

[0568] 73. 实施方案67-72中任一项的化合物,其中所述化合物元件具有对应于以下EC₅₀的效力:

[0569] a) 低于2000 pM、优选低于1800 pM、更优选低于1600 pM、甚至更优选低于1400 pM、或最优选低于1200 pM;

[0570] c) 低于1000 pM、优选低于800 pM、更优选低于600 pM、甚至更优选低于500 pM、或最优选低于400 pM;或

[0571] d) 低于300 pM、优选低于250 pM、更优选低于200 pM、甚至更优选低于150 pM、或最优选低于100 pM。

[0572] 74. 实施方案72-73中任一项的化合物,其中效力按对于在含有人GLP-1受体的培养基中cAMP形成的刺激的EC₅₀测定,优选使用稳定转染的细胞系例如BHK467-12A (tk-ts13),和/或使用用于测定cAMP的功能性受体测定,例如基于内源形成的cAMP与外源添加的生物素-标记的cAMP之间的竞争,在所述测定中更优选使用特异性抗体捕获cAMP,和/或其中甚至更优选的测定是AlphaScreen cAMP测定,最优选描述于实施例8的测定。

[0573] 75. 实施方案72-74中任一项的化合物,其中(式II的化合物元件的EC₅₀值除以下式III的相应的比较药物的EC₅₀值)的倒数是至少0.1、优选地至少0.2、更优选地至少0.3、甚至更优选地至少0.4、或最优选地至少0.5:

[0574] (His7)-(GLP-1肽)(式III),其中(His7)是指GLP-1(8-37)的位置7的L-His(N-末端His延伸的SEQ ID NO: 1),所述键是酰胺键,和所述GLP-1肽与所述化合物中的相同。

[0575] 76. 实施方案67-76中任一项的化合物,其中化合物元件的GLP-1活性是指在低白蛋白存在下与人GLP-1受体结合的能力。

[0576] 77. 实施方案76的化合物,在0.005% HSA(低白蛋白)存在下,所述化合物元件的GLP-1受体结合亲和力(IC₅₀)为

[0577] a) 低于1000 nM,优选低于500 nM,更优选低于100 nM,或最优选低于50 nM;

[0578] b) 低于40 nM,优选低于30.0 nM,更优选低于20.0 nM,甚至更优选低于10.0 nM,或最优选低于5.00 nM。

[0579] 78. 实施方案76-77中任一项的化合物,其中通过从受体中置换¹²⁵I-GLP-1的方式,测定与GLP-1受体的结合亲和力,优选使用SPA结合测定,更优选如实施例10所述。

[0580] 79. 实施方案76-78中任一项的化合物,其中(式II的化合物元件的IC₅₀值除以下

式III的相应的比较药物的IC₅₀值)的倒数是至少0.1、优选地至少0.2、更优选地至少0.3、甚至更优选地至少0.4、或最优选地至少0.5:

[0581] (His7)-(GLP-1肽) (式III), 其中(His7)是指GLP-1 (7-37)的位置7的L-His (N-末端His延伸的SEQ ID NO: 1), 所述键是酰胺键, 和所述GLP-1肽与所述化合物中的相同。

[0582] 80. 化合物, 选自Chem. 51、Chem. 52、Chem. 53、Chem. 54和Chem. 55; 或其药学上可接受的盐、酰胺或酯。

[0583] 81. 化合物, 优选依据实施方案80, 其结构选自实施例1、2、3、4和5中所示结构; 或其药学上可接受的盐、酰胺或酯。

[0584] 82. 化合物, 优选依据实施方案80和/或81中的任一项, 其名称选自实施例1、2、3、4和5的化合物名称; 或其药学上可接受的盐、酰胺或酯。

[0585] 83. 实施方案80-82中任一项的化合物, 其是实施方案1-79中任一项定义的化合物。

[0586] 84. 化合物, 选自Chem. 21、Chem. 22和Chem. 23; 或其药学上可接受的盐、酰胺或酯。

[0587] 85. 实施方案84的化合物, 其是GLP-1母体药物。

[0588] 86. 实施方案84-85中任一项的化合物, 其具有GLP-1活性, 其中GLP-1活性优选如以上实施方案67-79中任一项所定义。

[0589] 87. 实施方案84-86中任一项的化合物, 其对于DPP-IV的降解是稳定的。

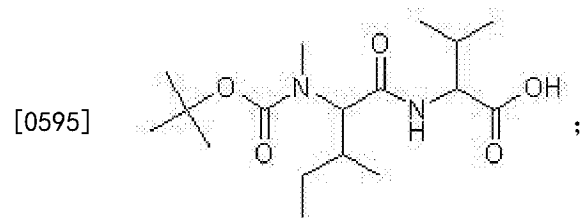
[0590] 88. 实施方案84-87中任一项的化合物, 其具有延长的半寿期。

[0591] 89. 化合物, 选自Boc-NMe-Ile-Val-OH和Boc-NMe-Val-Val-OH; 或其盐、酰胺或酯。

[0592] 90. 权利要求89的化合物, 其是中间体化合物。

[0593] 91. 权利要求89-90中任一项的化合物, 其中Boc-NMe-Ile-Val-OH是指

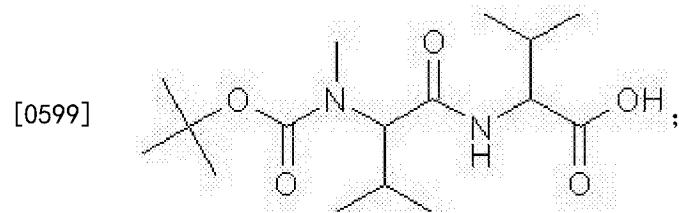
[0594] Chem. 41:



[0596] 或其盐、酰胺或酯。

[0597] 92. 权利要求89-91中任一项的化合物, 其中Boc-NMe-Val-Val-OH是指

[0598] Chem. 42:

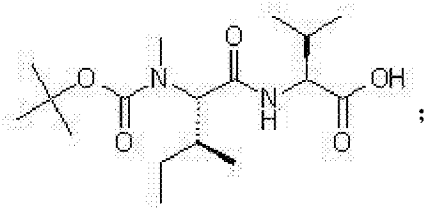


[0600] 或其盐、酰胺或酯。

[0601] 93. 权利要求89-91中任一项的化合物, 其中Boc-NMe-Ile-Val-OH是指

[0602] Chem. 41a:

[0603]

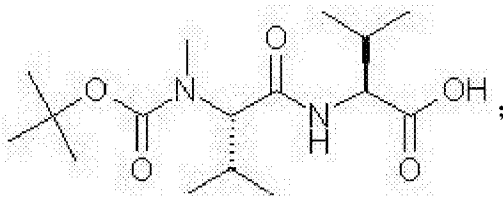


[0604] 或其盐、酰胺或酯。

[0605] 94. 权利要求89-91中任一项的化合物,其中Boc-NMe-Val-Val-OH是指

[0606] Chem. 42a:

[0607]



[0608] 或其盐、酰胺或酯。

[0609] 95. 用作药物的实施方案1-83中任一项的化合物。

[0610] 96. 实施方案1-83中任一项的化合物,用于治疗 and/或预防所有形式的糖尿病和相关疾病,例如进食障碍、心血管疾病、胃肠道疾病、糖尿病并发症、危急病症和/或多囊卵巢综合征;和/或用于改善脂质参数,改善β细胞功能,和/或用于延迟或预防糖尿病进展。

[0611] 97. 方法,所述方法用于治疗或预防所有形式的糖尿病和相关疾病,例如进食障碍、心血管疾病、胃肠道疾病、糖尿病并发症、危急病症和/或多囊卵巢综合征;和/或用于改善脂质参数,改善β细胞功能,和/或用于延迟或预防糖尿病进展,即通过给予药学活性量的实施方案1-83中任一项的化合物。

[0612] 98. 用作药物的实施方案84-88中任一项的化合物。

[0613] 99. 实施方案84-88中任一项的化合物,用于治疗或预防所有形式的糖尿病和相关疾病,例如进食障碍、心血管疾病、胃肠道疾病、糖尿病并发症、危急病症和/或多囊卵巢综合征;和/或用于改善脂质参数,改善β细胞功能,和/或用于延迟或预防糖尿病进展。

[0614] 100. 方法,所述方法用于治疗或预防所有形式的糖尿病和相关疾病,例如进食障碍、心血管疾病、胃肠道疾病、糖尿病并发症、危急病症和/或多囊卵巢综合征;和/或用于改善脂质参数,改善β细胞功能,和/或用于延迟或预防糖尿病进展,即通过给予药学活性量的实施方案84-88中任一项的化合物。

实施例

[0615] 本实验部分开始是缩略语列表,然后是包括合成和表征本发明前体药物和药物的通用方法在内的部分。然后是涉及具体前体药物的制备的多个实施例,最后包括涉及这些前体药物和药物的活性和性质的多个实施例(标题为药理学方法的部分)。

[0616] 所述实施例用于说明本发明。

[0617] 缩略语表

[0618] Aib: α-氨基异丁酸

[0619] API: 活性药物成分

[0620]	AUC:	曲线下面积
[0621]	BG:	血糖
[0622]	BHK	幼仓鼠肾
[0623]	BSA:	牛血清白蛋白
[0624]	BW:	体重
[0625]	Boc:	叔丁氧基羰基
[0626]	BSA:	牛血清白蛋白
[0627]	CAS:	化学文摘服务
[0628]	CDCl ₃ :	氘化氯仿
[0629]	可力丁(collidine):	2,4,6-三甲基吡啶
[0630]	DCM:	二氯甲烷
[0631]	Dde:	1-(4,4-二甲基-2,6-二氧代亚环己基)乙基
[0632]	DesH:	脱-氨基组氨酸(也可称为咪唑丙酸, Imp)
[0633]	DIC:	二异丙基碳二亚胺
[0634]	DIPEA:	二异丙基乙胺
[0635]	DMEM:	Dulbecco氏改良Eagle氏培养基(DMEM)
[0636]	DMSO:	二甲基亚砷
[0637]	DPP-IV:	二肽基肽酶-4
[0638]	EDAC	1-乙基-3-[3-二甲氨基丙基]碳二亚胺盐酸盐
[0639]	EDTA:	乙二胺四乙酸
[0640]	EGTA:	乙二醇四乙酸
[0641]	EtOAc	乙酸乙酯
[0642]	EtOH:	乙醇
[0643]	FCS:	胎牛血清
[0644]	Fmoc:	9-芴基甲氧基羰基
[0645]	HEPES:	4-(2-羟乙基)-1-哌嗪乙磺酸
[0646]	HOAt:	1-羟基-7-氮杂苯并三唑
[0647]	HOBt:	1-羟基苯并三唑
[0648]	HPLC:	高效液相色谱
[0649]	HSA:	人血清白蛋白
[0650]	IBMX:	3-异丁基-1-甲基黄嘌呤
[0651]	Imp:	咪唑丙酸(也称为脱-氨基组氨酸, DesH)
[0652]	i.v.	静脉内
[0653]	ivDde:	1-(4,4-二甲基-2,6-二氧代亚环己基)-3-甲基丁基
[0654]	IVGTT:	静脉内葡萄糖耐受试验
[0655]	LCMS:	液相色谱-质谱
[0656]	LYD:	Landrace Yorkshire Duroc
[0657]	MALDI-MS:	参见MALDI-TOF MS
[0658]	MALDI-TOF MS:	基质-辅助激光解吸/电离飞行时间质谱

[0659]	MeOH:	甲醇
[0660]	MES:	2-(N-吗啉代)乙磺酸
[0661]	Mmt:	4-甲氧基三苯甲基
[0662]	MSNT:	1-(均三甲苯-2-磺酰基)-3-硝基-1,2,4-三唑
[0663]	Mtt:	4-甲基三苯甲基
[0664]	NaOEt:	乙醇钠
[0665]	NMP:	N-甲基吡咯烷酮
[0666]	OEG:	8-氨基-3,6-二氧杂辛酸
[0667]	OtBu:	叔丁酯
[0668]	Pbf:	2,2,4,6,7-五甲基二氢苯并呋喃-5-磺酰基
[0669]	PBS:	磷酸盐缓冲盐水
[0670]	PD:	药效动力学
[0671]	Pen/Strep:	青霉素/链霉素
[0672]	PK:	药代动力学
[0673]	PyBob	六氟磷酸苯并三唑-1-基-氧基三吡咯烷基𬝰
[0674]	RP:	反相
[0675]	RP-HPLC:	反相高效液相色谱
[0676]	RT:	室温
[0677]	Rt:	保留时间
[0678]	s.c.:	经皮下
[0679]	SD:	标准差
[0680]	SEC-HPLC:	大小排阻高效液相色谱
[0681]	SEM:	平均值的标准误差
[0682]	SPA:	闪烁逼近测定
[0683]	SPPS:	固相肽合成
[0684]	TBDMS:	叔丁基二甲基甲硅烷基或叔丁基二甲基甲硅烷
[0685]	TBTU:	(四氟硼酸2-(1H-苯并三唑-1-基)-)-1,1,3,3-四甲基脲 鎓)
[0686]	tBu:	叔丁基
[0687]	TEA:	三乙胺
[0688]	TFA:	三氟乙酸
[0689]	TFE:	三氟乙醇
[0690]	THF:	四氢呋喃
[0691]	TIS:	三异丙基甲硅烷
[0692]	TLC:	薄层色谱
[0693]	TNBS:	三硝基苯磺酸酯
[0694]	Tol	甲苯
[0695]	Tris:	三(羟甲基)氨基甲烷或2-氨基-2-羟甲基-丙烷-1,3-二 醇

- [0696] Trt: 三苯基甲基 (三苯甲基)
- [0697] Tween20: 聚氧乙烯 (20) 脱水山梨醇单月桂酸酯
- [0698] UPLC: 超高效液相色谱
- [0699] 材料与方法
- [0700] 除非另有说明, 否则所有试剂都是试剂级的。
- [0701] 材料
- [0702] L-β-咪唑乳酸, (2S)-2-羟基-3-(1H-咪唑-4-基) 丙酸 (CAS 14403-45-3)
- [0703] H-Val-OMe.HCl, L-缬氨酸甲酯盐酸盐 (CAS 6306-52-1)
- [0704] Fmoc-8-氨基-3,6-二氧杂辛酸 (CAS 166108-71-0)
- [0705] Fmoc-L-谷氨酸1-叔丁酯 (CAS 84793-07-7)
- [0706] 10-(4-叔丁氧基羰基苯氧基) 癸酸 (按照WO 2006/082204的实施例25步骤2所述制备)
- [0707] 化学方法
- [0708] 本部分分为2部分: 部分A涉及通用方法 (制备的通用方法 (A1); 以及检测和表征的通用方法 (A2)), 和部分B, 其中描述了多种具体的中间体化合物 (B1)、母体药物 (B2) 和前体药物 (B3) 的制备和表征。
- [0709] A. 通用方法
- [0710] A1. 制备方法
- [0711] 本部分涉及固相肽合成方法 (SPPS方法, 包括氨基酸脱保护法, 从树脂上裂解肽并纯化的方法), 以及检测和表征所得肽的方法 (LCMS、MALDI 和UPLC方法)。在某些情况下可通过使用在二-肽酰胺键上被在酸性条件下可被裂解的基团 (例如但不限于2-Fmoc-氧基-4-甲氧基苄基或2,4,6-三甲氧基苄基) 保护的二肽, 改进肽的固相合成。在丝氨酸或苏氨酸存在于肽中的情况下, 可使用假脯氨酸二肽 (可得自例如Novabiochem, 另参见W.R. Sampson (1999), J. Pep. Sci. 5, 403)。所用的Fmoc-保护的氨基酸衍生物是以下推荐的标准: Fmoc-Ala-OH、Fmoc-Arg (Pbf) -OH、Fmoc-Asn (Trt) -OH、Fmoc-Asp (OtBu) -OH、Fmoc-Cys (Trt) -OH、Fmoc-Gln (Trt) -OH、Fmoc-Glu (OtBu) -OH、Fmoc-Gly-OH、Fmoc-His (Trt) -OH、Fmoc-Ile-OH、Fmoc-Leu-OH、Fmoc-Lys (Boc) -OH、Fmoc-Met-OH、Fmoc-Phe-OH、Fmoc-Pro-OH、Fmoc-Ser (tBu) -OH、Fmoc-Thr (tBu) -OH、Fmoc-Trp (Boc) -OH、Fmoc-Tyr (tBu) -OH或Fmoc-Val-OH等 (由例如Anaspec, Bachem, Iris Biotech或Novabiochem供应)。如果没有特别指出的话, 使用天然L-型氨基酸。N-端氨基酸在α氨基上被Boc保护 (例如Boc-His (Boc) -OH或Boc-His (Trt) -OH, 对于在N-端具有His的肽)。在使用SPPS的模块白蛋白结合部分连接的情况下, 使用以下适当保护的构建单元 (building block) 诸如但不限于Fmoc-8-氨基-3,6-二氧杂辛酸、Fmoc-氨甲环酸、Fmoc-Glu-OtBu、十八烷二酸单叔丁酯、十九烷二酸单叔丁酯、十四烷二酸单叔丁酯或4-(9-羧基壬氧基) 苯甲酸叔丁酯。以下所述的所有操作都在250-μmol合成规模上进行。
- [0712] 1. 树脂结合的被保护的肽主链的合成
- [0713] 方法: SPPS_A
- [0714] 根据Fmoc策略, 在Applied Biosystems 433肽合成仪上, 以250-μmol规模, 用4倍过量的Fmoc-氨基酸, 使用制造商提供的FastMoc UV方案的修改版本, 合成被保护的肽基树

脂,其中对于每次偶联,先将4当量DIC (1 M/NMP)和4当量HOBt (1 M/NMP)加入到氨基酸小管中,预活化氨基酸10分钟,然后加入到树脂中。当加入活化氨基酸之后,将树脂振荡30分钟,然后加入4当量DIPEA (2 M/NMP)并让反应再持续30分钟。依据制造商的方法,用含20%哌啶的NMP使Fmoc基团脱保护并进行UV监测和2-5次Fmoc保护基团的脱保护反馈环,在某些情况下使用双偶联,即在第一次偶联后,将树脂排干并且活化另一管Fmoc-氨基酸并加入到树脂中。偶联时间为~20分钟,不加入碱(base)。用于肽C-末端酰胺合成的树脂是Rink-酰胺树脂,并且预装载的Wang (例如低载量的Fmoc-Gly-Wang或Fmoc-Lys (Mtt)-wang) 或氯三苯甲基树脂用于具有羧基C-末端的肽。所用的被保护的氨基酸衍生物是标准Fmoc-氨基酸(由例如Anaspec或Novabiochem供应),其在适于ABI433A合成仪的预称重的柱中提供,除了非天然氨基酸例如Fmoc-Aib-OH (Fmoc-氨基异丁酸)之外。N末端氨基酸在 α 氨基上是Fmoc保护或Boc保护的。序列中的赖氨酸的 ϵ 氨基被Mtt、Mmt、Dde、ivDde或Boc保护,这取决于白蛋白结合部分与间隔基的连接方式。在某些情况下可通过使用在二肽酰胺键上被在酸性条件下可裂解的基团(例如但不限于2-Fmoc-氧基-4-甲氧基苄基或2,4,6-三甲氧基苄基)保护的二肽,改进肽的合成。在丝氨酸或苏氨酸存在于肽中的情况下,可使用假脯氨酸二肽(参见例如Novabiochem 2009/2010或更新版本的目录,或W.R. Sampson (1999), J. Pep. Sci. 5, 403)。

[0715] 方法: SPPS_B

[0716] SPPS方法B是指用Fmoc化学在基于微波的Liberty肽合成仪(CEM Corp., North Carolina)上合成受保护的肽基树脂。合适的树脂为预装载的、低载量的Wang树脂,可得自Novabiochem(例如低载量Fmoc-Lys (Mtt)-Wang树脂,0.35 mmol/g)。用5%哌啶/NMP在高达70或75℃下进行Fmoc-脱保护。偶联化学为NMP中的DIC/HOAt。将氨基酸/HOAt溶液(0.3M在NMP中,以3-10倍的摩尔过量)加到树脂中,接着加同样摩尔当量的DIC (0.75M在NMP中)。例如,对于以下规模的反应,每次偶联都使用以下量的0.3M氨基酸/HOAt溶液:规模/ml:0.10 mmol/2.5 ml、0.25 mmol/5 ml、1 mmol/15 ml。偶联时间和温度通常为在高达70或75℃下5分钟。反应规模越大,使用的偶联时间越长,例如10分钟。组氨酸氨基酸在50℃时为双偶联,或者如果前面的氨基酸有空间位阻(例如Aib)时为四偶联。精氨酸氨基酸在室温下偶联25分钟,然后加热到70或75℃达5分钟。某些氨基酸(例如但不限于Aib)为“双偶联”,意即在第一次偶联(例如75℃下5分钟)后,将树脂排干并加入更多试剂(氨基酸、HOAt和DIC),并再次加热混合物(例如75℃下5分钟)。当需要化学修饰赖氨酸侧链时,让赖氨酸作为Lys (Mtt) 被掺入。Mtt基团通过以下除去:用DCM洗涤树脂,让树脂在纯(未稀释)的六氟异丙醇中悬浮20分钟,接着用DCM和NMP洗涤。通过手工合成或通过如上所述在Liberty肽合成仪上的一步或多步自动步骤,进行赖氨酸的化学修饰,其用合适的受保护的构建单元(参见通用方法),任选包括手动偶联。

[0717] 方法: SPPS_P

[0718] SPPS_P在得自Protein Technologies (Tucson, AZ 85714 U.S.A.)的Prelude固相肽合成仪上,以250- μ mol规模进行,使用相对于树脂载量(例如低载量Fmoc-Gly-Wang (0.35 mmol/g))为6倍过量的Fmoc-氨基酸(300 mM在NMP中,含有300 mM HOAt)。用在NMP中的20%哌啶进行Fmoc-脱保护。使用含3 : 3 : 3 : 4的氨基酸/HOAt/DIC/可力丁的NMP,进行偶联。在脱保护与偶联步骤之间进行NMP和DCM顶部洗涤(7 ml, 0.5分钟, 每次2 x 2)。

偶联时间通常为60分钟。某些氨基酸,包括但不限于Fmoc-Arg (Pbf) -OH、Fmoc-Aib-OH或Boc-His (Trt) -OH,被“双偶联”,即在第一次偶联(例如60分钟)后,将树脂排干并加入更多试剂(氨基酸、HOAt、DIC和可力丁),然后让混合物再次反应(例如60分钟)。

[0719] 方法: SC_M2

[0720] N-ε-赖氨酸Mtt保护基团用以下方式去除:用0.5% TFA/DCM处理1次,再用纯(未稀释)六氟异丙醇或六氟异丙醇/DCM (75:25)在室温处理(3次) 15分钟,接着用DCM洗涤5次,再用NMP洗涤5次。将延长部分(相对于树脂为4摩尔当量)溶于NMP。加入活化剂例如TBTU(相对于树脂为3.88摩尔当量)和DIC(相对于树脂为4摩尔当量)并将溶液搅拌15分钟。将溶液加入到树脂中并加入DIPEA(相对于树脂为4摩尔当量)。将树脂在室温下振摇2-24小时。将树脂用NMP洗涤2次,用NMP/DCM (1:1)洗涤2次和用DCM洗涤2次。

[0721] 2. 树脂结合的有或无侧链连接的肽的切割和纯化

[0722] 方法: CP_M1

[0723] 合成后,树脂用DCM洗涤,通过用TFA/TIS/水(95/2.5/2.5或92.5/5/2.5)处理2-3小时将肽从树脂上切割下来,再用乙醚沉淀。将所述肽溶于合适溶剂(例如,30%乙酸)中并通过标准RP-HPLC在C18, 5 μM柱上使用乙腈/水/TFA纯化。通过UPLC和LC-MS方法联用,分析流份,并将合适流份合并和冻干。

[0724] 方法: CP_M2

[0725] 本方法包括以下步骤1-5:

[0726] 步骤1. Fmoc的去除:

[0727] 末端Glu的Fmoc保护基通过以下而去除:用20%哌啶/NMP处理2分钟+ 18分钟,再用NMP洗涤6次。

[0728] 步骤2. Fmoc-Ala-OH的偶联:

[0729] 将Fmoc-Ala-OH(相对于树脂为4摩尔当量)用TBTU(3.8当量)、HOBt(4当量)和DIPEA(4当量)活化10分钟,然后加入到树脂中并偶联2小时或直到阴性TNBS测试(W.S. Hancock, J.E. Battersby, Analytical Biochemistry 1976, 71(1), 260-264)。将树脂用NMP洗涤6次和用DCM洗涤10次。

[0730] 步骤3. ε-Lys Mtt脱保护:

[0731] 2个ε-Lys Mtt保护基通过以下而去除:用0.5 % TFA/DCM处理5分钟,再用纯六氟异丙醇处理15分钟(3次)。将树脂用DCM洗涤6次和用NMP洗涤6次。TNBS测试为阳性。

[0732] 步骤4. 侧链偶联:

[0733] 将双-叔丁基保护的侧链(2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[(4S) -5-叔丁氧基-4-[10-(4-叔丁氧基羰基苯氧基) 癸酰基氨基]-5-氧代-戊酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酸)(相对于树脂为4摩尔当量)溶于NMP并用TBTU(3.8当量)、HOBt(4当量)和DIPEA(4当量)预活化15分钟,然后加入到树脂中并反应2.5小时或直到TNBS测试显示透明的珠子(clear bead)。如上所述地去除Ala8上的N-末端Fmoc。

[0734] 步骤5. L-β-咪唑乳酸偶联:

[0735] 将L-β-咪唑乳酸(相对于树脂为4摩尔当量)溶于NMP并用PyBOB(3.8当量)、HOBt(4当量)和TEA(4当量)活化10分钟,然后加入到树脂中并偶联1.5小时。

[0736] A2. 检测和表征的通用方法

[0737] 1. LC-MS方法

[0738] 方法: LCMS_4

[0739] 在由Waters Acquity UPLC系统和得自Micromass的LCT Premier XE质谱仪组成的装置上进行LCMS_4。洗脱液:A: 0.1%甲酸/水,B: 0.1%甲酸/乙腈。分析在室温下进行如下:通过将适当体积的样品(优选2-10 μ l)注入柱中,所述柱用A和B的梯度洗脱。UPLC条件、检测器设置和质谱仪设置为:柱:Waters Acquity UPLC BEH, C-18,1.7 μ m, 2.1 mm x 50 mm。梯度:线性5%-95%乙腈,在4.0分钟(或8.0分钟)内,以0.4 mL/分钟。检测:214 nm (TUV (可调UV检测器)的模拟输出)。MS离子化模式:API-ES。扫描:100-2000 amu (或500-2000 amu), 步骤0.1 amu。

[0740] 2. UPLC方法

[0741] 方法: B2_1

[0742] 利用配备双波段检测器的Waters UPLC系统进行RP-分析。使用ACQUITY UPLC BEH130, C18, 130 $\text{\AA}$, 1.7 μ m, 2.1 mm x 150 mm柱, 40 °C,收集在214nm和254nm处的紫外检测。将UPLC系统与两个洗脱液贮器连接,所述洗脱液贮器装有:A: 99.95% H₂O, 0.05% TFA;B: 99.95% CH₃CN, 0.05% TFA。使用下列线性梯度:95% A, 5% B至40% A, 60% B,在16分钟内,流速0.40 mL/分钟。

[0743] 方法: B4_1

[0744] 利用配备双波段检测器的Waters UPLC系统进行RP-分析。使用ACQUITY UPLC BEH130, C18, 130 $\text{\AA}$, 1.7 μ m, 2.1 mm x 150 mm柱, 40 °C,收集在214nm和254nm处的紫外检测。将UPLC系统与两个洗脱液贮器连接,所述洗脱液贮器装有:A: 99.95% H₂O, 0.05% TFA;B: 99.95% CH₃CN, 0.05% TFA。使用下列线性梯度:95% A, 5% B至95% A, 5% B,在16分钟内,流速0.40 mL/分钟。

[0745] 方法: B29_1

[0746] 利用配备双波段检测器的Waters UPLC系统进行RP-分析。使用kinetex 1.7 μ m C18, 100A 2.1 x 150 mm柱, 60°C,收集在215nm和254nm处的紫外检测。将UPLC系统与两个洗脱液贮器连接,所述洗脱液贮器装有:A: 90% 水和10% CH₃CN,其含有0.045M (NH₄)₂HPO₄, pH 3.6,B: 20% 2-丙醇, 20% 水和60% CH₃CN。使用下列线性梯度:在2分钟内35% B和65% A,然后在15分钟内35% B, 65% A至65% B, 35% A,然后在3分钟内65% B, 35% A至80% B, 20% A,流速0.5 mL/分钟。

[0747] 方法: UPLC_A

[0748] 利用配备双波段检测器的Waters UPLC系统进行RP-分析。使用ACQUITY UPLC BEH130, C18, 130 $\text{\AA}$, 1.7 μ m, 2.1 mm x 150 mm柱, 40 °C,收集在214nm和254nm处的紫外检测。将UPLC系统与两个洗脱液贮器连接,所述洗脱液贮器装有:A: 99.95% H₂O, 0.05% TFA;B: 99.95% CH₃CN, 0.05% TFA。使用下列线性梯度:在16分钟内63% A, 37% B至53% A, 47% B,流速0.40 mL/分钟,自动进样器温度为37°C。

[0749] 方法: UPLC_B

[0750] 利用配备双波段检测器的Waters UPLC系统进行RP-分析。使用ACQUITY UPLC BEH130, C18, 130 $\text{\AA}$, 1.7 μ m, 2.1 mm x 150 mm柱, 40 °C,收集在214nm和254nm处的紫外检测。将UPLC系统与两个洗脱液贮器连接,所述洗脱液贮器装有:A: 99.95% H₂O, 0.05%

TFA;B: 99.95% CH₃CN, 0.05% TFA。使用下列线性梯度:在16分钟内65% A, 35% B至50% A, 50% B,流速0.40 ml/分钟,自动进样器温度为37℃。

[0751] NMR方法:

[0752] 使用Bruker Avance DPX DPX 400 (400 MHz),用四甲基甲硅烷作为内标,记录质子NMR谱。化学位移(δ)以ppm表示,分裂模式命名如下:s,单峰;d,双重峰;dd,双重双峰;dt,双重三峰;t,三重峰;tt,三重三峰;q,四重峰;quint,五重峰;sext,六重峰;m,多重峰;和br =峰宽。

[0753] B. 具体实施例

[0754] B1. 中间体化合物

[0755] B1.1

[0756] (S)-2-(2-羟基-乙酰基氨基)-3-甲基-丁酸(N-羟基乙酰基-S-缬氨酸)

[0757] 将L-缬氨酸(5.86 g;0.05 mmol)悬浮于无水EtOH (150 mL)。在室温下在1小时内滴加新鲜制备的含NaOEt的EtOH溶液(0.5 M, 100 mL, 1当量),因此缬氨酸溶解为其Na盐。将溶液搅拌另外0.5小时并过滤掉少量未反应的缬氨酸。将溶液蒸发得到缬氨酸的钠盐,为白色粉末。将固体转移至100 mL圆底烧瓶并加入乙醇酸苯甲酯(25 g, 0.15 mol, 3当量),将混合物在85℃搅拌过夜(15小时)。烧瓶中内容物固化为浅黄色固体。加入乙醚(100 mL),将固体充分研磨成精细粉末。过滤并用乙醚洗涤4次,将白色固体真空快速干燥。收率10.1 g (大约100%)。

[0758] 将白色固体转移至烧杯中并溶于50 mL 水,得到非澄清的浅黄色溶液。水相用乙醚萃取2次,以去除潜在的残余乙醇酸苯甲酯,经此,水相变得澄清和浅黄色。水相用过量的(大约20 g, 4.7 meq/g干树脂,相对于所用的L-缬氨酸为大约2当量)预洗涤的Amberlyst 15 (H⁺型)离子交换树脂(Fluka目录号06423)处理并将树脂滤出和用少量水洗涤3次。

[0759] 水相在45℃真空蒸发,得到黄褐色油状物,再将其用甲苯冲洗,以去除残余水。该油状物通过将等分试样溶于EtOAc并添加甲苯,同时研磨而结晶。将所得白色晶体加入到油状物中,其快速结晶得到7.89 g (91%),其中含有一些甲苯。

[0760] 将固体溶于沸腾的EtOAc (25 mL)中并在纸上过滤,以去除某些黑色不溶性杂质。向重新加热的滤液中加入热的甲苯(10-15 mL),冷却后形成无色晶体。将样品在5℃放置过夜,过滤并用EtOAc/Tol、乙醚和庚烷洗涤。所得晶体稍“柔软”和油腻(5.7 g, 65%),可能是因为有些浅褐色油状物共沉淀,所以将一切自EtOAc (25 mL)中重结晶。这样得到浅黄色溶液,冷却后从中形成无色晶体。将所述化合物在玻璃滤器(G3)上分离并用冷的EtOAc、EtOAc/庚烷(1:1)、和庚烷洗涤,然后真空干燥。收率: 5.26 g (60%)。

[0761] NMR方法: ¹H NMR (DMSO-*d*₆): δ 7.11H) 7.11H) 7.47 (d, 1H), 5-6 (br, 1H); 4.22 (d, 1H), 3.87 (d, 2H), 3.35 (br, 1H), 2.11 (m, 1H), 0.86 (d, 3H), 0.82 (d, 3H)。

[0762] B1.2

[0763] (S)-2-[2-(叔丁基-二甲基-甲硅烷基氧基)-乙酰基氨基]-3-甲基-丁酸

[0764] 将来自实施例B1.1的N-羟基乙酰基-S-缬氨酸(1.00 g, 5.74 mmol)溶于NMP (15 mL)中。加入TBDMS (2.40 g, 15.96 mmol, 2.8当量)。分次加入咪唑(2.58 g, 37.9 mmol, 6.6当量),通过在水中冷却而控制溶液温度不超过30℃。在氮气下将澄清的无色溶液在室

温下搅拌过夜。

[0765] 然后将溶液冷却至大约0℃和加入冰水(50 mL),非澄清溶液用乙醚萃取2次(2 x 50 mL)。将乙醚相冷却至-10℃并用冷却的(低于0℃) 1 N HCl、冰水(2 x)和盐水快速洗涤。乙醚相经Na₂SO₄干燥和蒸发,得到无色油状物(大约2.85 g)。将油状物溶于MeOH (40 mL) + THF (13 mL)中并加入含K₂CO₃ (2.15 g, 15.6 mmol)的水(22 mL)溶液。将悬液剧烈搅拌1小时,然后在旋转蒸发器上将其浓缩至大约一半体积,得到澄清无色溶液。该溶液用己烷(3 x 50 mL)萃取以去除任何过量的甲硅烷基试剂。将盐水(45 mL)加入到水相,得到混浊混合物,将其冷却至-10℃并用冷1 M NaHSO₄ (水溶液)仔细地酸化至pH大约4-5。酸化后,形成白色沉淀和CO₂起泡。将悬液在冷却中用乙醚(3 x 50 mL)萃取,合并的乙醚相向用盐水洗涤(2 x)和经Na₂SO₄干燥。蒸发得到产物,为白色固体1.17 g (70%)。

[0766] NMR方法: ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 6.00 (br, 2H); 4.91 (dd, 1H); 4.05 (s, 2H); 2.33 (m, 1H); 0.87 (d, 3H); 0.84 (d, 3H); 0.82 (s, 9H); 0.02 (s, 6H)。

[0767] B1.3

[0768] H₂N-Val-O-氯三苯甲基树脂

[0769] 将16 g 2-氯三苯甲基-树脂(1.5 mmol/g; 24 mmol)在DCM (150 mL)中膨胀45分钟,将DCM排掉。将含Fmoc-Val-OH (16.29 g; 48.0 mmol)和DIPEA (20.54 mL)的DCM (150 mL)的混合物加入到树脂中并将混合物振摇50分钟,然后加入30 mL MeOH以猝灭未反应的树脂。将混合物搅拌另外10分钟,然后将树脂排干和用DCM (150 mL)洗涤1次。将DCM、MeOH和DIPEA的混合物(80:15:5)加入到树脂中并反应10分钟,然后将树脂用DCM洗涤(3 x),再用NMP洗涤(3 x)。

[0770] 通过以下标准条件去除Fmoc基团:20%哌啶/NMP: 2分钟+ 18分钟。树脂再用NMP洗涤(6 x)。标准TNBS-测试为阳性。将树脂用DCM (6 x)和乙醚(2 x)洗涤并干燥。

[0771] B1.4

[0772] (2S)-2-[[(2S)-2-(叔丁氧基羰基氨基)-3-甲基-丁酰基]氨基]-3-甲基-丁酸(Boc-Val-Val-OH)

[0773] 将1/3的来自实施例B1.3的H₂N-Val-O-氯三苯甲基树脂(大约8 mmol)在DCM中膨胀并排干。将Boc-Val-OH (5.52 g, 24 mmol)溶于NMP (50 mL)中并加入HOAt (3.26 g, 24 mmol),再加入DIC (3.66 mL, 24 mmol)。将混合物搅拌10分钟,然后加入到树脂中,并加入另外30 mL NMP。将反应物搅拌2½小时,直到TNBS测试为阴性。将树脂排干并用NMP (4 x 70 mL)和DCM (10 x 70 mL)洗涤,然后用乙醚(1x 100 mL)洗涤。

[0774] 通过用HOAc:TFE:DCM (1:2:7) (100 mL)将树脂处理30分钟,从树脂上切割二肽。将溶剂排干并收集,将树脂用DCM (50 mL)洗涤。合并的滤液加入水(150 mL),分离各层,有机相用Na₂SO₄干燥,过滤后通过蒸发去除溶剂,得到白色粘性泡沫状物。所得产物通过以下而结晶:溶于热的EtOAc (5 mL)中,然后加入热的庚烷(20 mL)并让溶液在5℃冷却2小时而结晶。白色晶体通过过滤而分离,再用EtOAc/庚烷(1:6)和用石油醚(40-60)洗涤。真空干燥后,收率1.79 g (70%)。

[0775] LCMS方法: LCMS₄: Rt: 2.23分钟, 准确质量: 316.200 Da, M/1: 317.03

[0776] NMR方法: ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 6.76 (d, 1H); 5.27 (br. d, 1H); 4.58 (dd, 1H); 3.96 (dd, 1H); 2.25 (m, 1H); 2.07 (m, 1H); 1.44 (s, 9H); 0.92-0.99 (4 x

d, 12H)。

[0777] B1.5

[0778] (2S)-2-[[(2S)-2-[叔丁氧基羰基(甲基)氨基]-3-甲基-戊酰基]氨基]-3-甲基-丁酸(Boc-N-Me-Ile-Val-OH)

[0779] 将1/3的来自实施例B1.3的H₂N-Val-O-氯三苯甲基树脂(大约8 mmol)在DCM中膨胀并排干。将Boc-N(Me)Ile-OH (5.88 g, 24 mmol)溶于NMP (50 mL)中并加入HOAt (3.26 g, 24 mmol),再加入DIC (3.66 mL, 24 mmol)。将混合物搅拌10分钟,然后加入到树脂中,并加入另外30 mL NMP。将反应物搅拌2½小时,直到TNBS测试为阴性。将树脂排干并用NMP (4 x 70 mL)和DCM (10 x 70 mL)洗涤,然后用乙醚(1x 100 mL)洗涤。

[0780] 通过用HOAc:TFE:DCM (1:2:7) (100 mL)将树脂处理30分钟,从树脂上切割二肽。将溶剂排干并收集,将树脂用DCM (50 mL)洗涤。合并的滤液加入水(150 mL),分离各层,有机相用Na₂SO₄干燥,通过蒸发去除溶剂,得到白色粘性泡沫状物。所得产物从EtOAc和庚烷重结晶,得到白色晶体。收率1.72 g (63%)。

[0781] LCMS方法: LCMS_4: Rt: 2.85分钟, 准确质量: 344.231 Da;M/1: 345.04

[0782] NMR方法: ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ6.86 (d, 1H);4.53 (br, 1H);4.19 (d, 1H);2.80 (s, 3H);2.24 (m, 1H);2.10 (m, 1H);1.47 (s, 9H);1.05 (m, 1H);0.84-0.97 (4 x d, 12H)。

[0783] B1.6

[0784] (2S)-2-[[2-[叔丁氧基羰基(甲基)氨基]乙酰基]氨基]-3-甲基-丁酸(Boc-N-Me-Gly-Val-OH)

[0785] 将1/3的来自实施例B1.3的H₂N-Val-O-氯三苯甲基树脂(大约8 mmol)在DCM中膨胀并排干。将Boc-N(Me)Gly-OH (4.54 g, 24 mmol)溶于NMP (50 mL)中并加入HOAt (3.26 g, 24 mmol),再加入DIC (3.66 mL, 24 mmol)。将混合物搅拌10分钟,然后加入到树脂中,并加入另外30 mL NMP。将反应物搅拌2½小时,直到TNBS测试为阴性。将树脂排干并用NMP (4 x 70 mL)和DCM (10 x 70 mL)洗涤,然后用乙醚(1x 100 mL)洗涤。

[0786] 通过用HOAc:TFE:DCM (1:2:7) (100 mL)将树脂处理30分钟,从树脂上切割二肽。将溶剂排干并收集,将树脂用DCM (50 mL)洗涤。合并的滤液加入水(150 mL),分离各层,有机相用Na₂SO₄干燥,通过蒸发去除溶剂,得到无色油状物。收率2.35 g (大约100%)。

[0787] LCMS方法: LCMS_4: Rt: 1.93分钟, 准确质量 288.169 Da;M/1: 289.03

[0788] NMR方法: ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ6.91 (br. d, 1H);4.7-4.5 (br, 1H);4.11 (d, 1H);3.80 (d, 1H);2.96 (s, 3H);2.23 (m, 1H);1.46 (s, 9H);0.97 (d, 3H);0.93 (d, 3H)。

[0789] B1.7

[0790] (2S)-2-[[2-(叔丁氧基羰基氨基)乙酰基]氨基]-3-甲基-丁酸(Boc-Gly-Val-OH)

[0791] 将Boc-Gly-OH (5.80 g, 33.11 mmol)、EDAC (6.98 g, 36.4 mmol, 1.1当量)和H-Val-OMe.HCl (4.78 g, 36.4 mmol, 1.1当量)溶于THF (50 mL)中并加入DCM,直到得到澄清溶液。搅拌20分钟后,加入DIPEA (4.89 mL, 28.5 mmol, 2.5当量)并将混合物在室温下搅拌过夜。蒸发溶剂,将残余物溶于EtOAc (100 mL)。有机相用水性KHSO₄ (100 mL, 1 M)洗涤,水相用EtOAc (100 mL)反萃取。合并的有机相用10 % NaHCO₃ (水溶液) (1 x 100

mL) 和盐水 (1 x 100 mL) 洗涤并经MgSO₄干燥。在旋转蒸发器上去除溶剂,得到Boc-Gly-Val-OMe,为浅黄色油状物。收率:8.0 g (84%)。

[0792] 将该油状物溶于THF (150 mL) 中并加入LiOH (100 mL, 1 M)。将反应物在室温下搅拌3小时,然后TLC显示原料完全转化。THF经真空去除,残余的水层通过加入1 M KHSO₄酸化至pH 2-3。产物用EtOAc (100 mL) 萃取2次,合并的EtOAc萃取液用盐水洗涤(x 2),经MgSO₄干燥,过滤并蒸发溶剂,得到Boc-Gly-Val-OH,为澄清油状物,将其静置过夜后变为白色固体(6.78 g, 89%)。

[0793] NMR方法: ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ9.15-9.35 (br., 1H); 7.09 (br d, 1H); 5.64 (br s, 1H); 4.59 (br d, 1H); 3.95 (br d, 1H); 3.84 (br. d, 1H); 2.25 (m, 1H); 1.45 (s, 9H); 0.97 (d, 3H); 0.93 (d, 3H)。

[0794] B1.7a

[0795] (2S)-2-[[(2S)-2-(叔丁氧基羰基(甲基)氨基)-3-甲基-丁酰基]氨基]-3-甲基-丁酸(Boc-N-Me-Val-Val-OH)

[0796] 将实施例B1.3中制备的H₂N-Val-O-氯三苯甲基树脂(~5.4 mmol) 在DCM中膨胀并排干。将Boc-N(Me)Val-OH (5.55 g, 24 mmol) 溶于NMP (50 mL) 并加入HOAt (3.26 g, 24 mmol),再加入DIC (3.66 mL, 24 mmol)。将混合物搅拌10分钟,然后加入到树脂中,并加入另外30 mL NMP。将反应物搅拌2½小时,直到TNBS测试为阴性。将树脂排干并用NMP (4 x 70 mL) 和DCM (10 x 70 mL) 洗涤,再用乙醚(1x 100 mL) 洗涤。

[0797] 通过用HOAc:TFE:DCM (1:2:7) (100 mL) 将树脂处理30分钟,从树脂上切割二肽。将溶剂排干并收集,将树脂用DCM (50 mL) 洗涤。合并的滤液加入水(150 mL),分离各层,有机相用Na₂SO₄干燥,通过蒸发去除溶剂,得到无色油状物。将含有残余NMP的该油状物重溶于EtOAc (40 mL) 中,用水(40 mL) 洗涤3次,有机相经Na₂SO₄干燥15分钟。滤出盐并真空去除溶剂,得到产物,为白色粘性泡沫状物(1.49 g, 84 %)。

[0798] LCMS方法: LCMS_4: Rt: 4.38分钟;准确质量: 330.215 Da;M/1: 331.24

[0799] NMR方法: ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ9.48 (br, 1H), 6.97 (d, 1H), 4.15 (d, 1H), 2.82 (s, 3H), 2.25 (m, 2H), 1.47 (s, 9H), 0.92 (m, 9H), 0.86 (d, 3H)。

[0800] B1.7b

[0801] (2S)-2-[[(2S)-2-(叔丁氧基羰基氨基)-3-甲基-戊酰基]氨基]-3-甲基-丁酸(Boc-Ile-Val-OH)

[0802] 将实施例B1.3中制备的H₂N-Val-O-氯三苯甲基树脂(~5.4 mmol) 在DCM中膨胀并排干。将Boc-Ile-OH (5.55 g, 24 mmol) 溶于NMP (50 mL) 并加入HOAt (3.26 g, 24 mmol),再加入DIC (3.66 mL, 24 mmol)。将混合物搅拌10分钟,然后加入到树脂中,并加入另外30 mL NMP。将反应物搅拌2½小时,直到TNBS测试为阴性。将树脂排干并用NMP (4 x 70 mL) 和DCM (10 x 70 mL) 洗涤,再用乙醚(1x 100 mL) 洗涤。

[0803] 通过用HOAc:TFE:DCM (1:2:7) (100 mL) 将树脂处理30分钟,从树脂上切割二肽。将溶剂排干并收集,将树脂用DCM (50 mL) 洗涤。合并的滤液加入水(150 mL),分离各层,有机相用Na₂SO₄干燥,通过蒸发去除溶剂,得到无色油状物。将含有残余NMP的该油状物重溶于EtOAc (40 mL) 中,用水(40 mL) 洗涤3次,有机相经Na₂SO₄干燥15分钟。滤出盐并真空去除溶

剂,得到产物,为白色粘性泡沫状物(1.79 g, ~100 %)。

[0804] LCMS方法: LCMS_4: Rt: 4.0分钟, 准确质量: 330.215 Da;M/1: 331.24

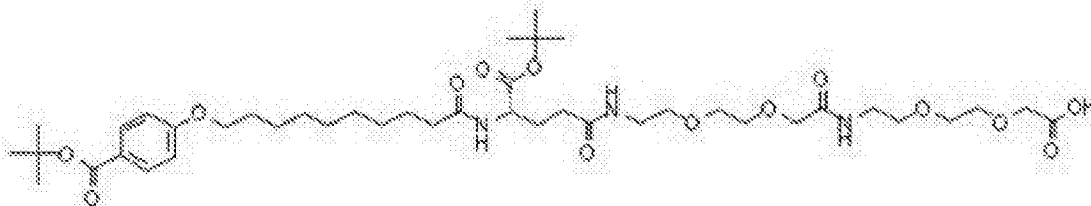
[0805] NMR方法: ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ 8.30 (br, 1H), 6.91 (d, 1H), 5.40 (d, 1H), 4.60 (dd, 1H), 4.03 (t, 1H), 2.25 (m, 1H), 1.81 (br, 1H), 1.54 (br, 1H), 1.43 (s, 9H), 1.14 (m, 1H), 0.97 (d, 3H), 0.92 (m, 9H)。

[0806] B1.8

[0807] 2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[(4S)-5-叔丁氧基-4-[10-(4-叔丁氧基羰基苯氧基) 癸酰基氨基]-5-氧代-戊酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]-乙酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酸

[0808] Chem. 43:

[0809]



[0810] 将2-氯三苯甲基树脂(7.70 g, 1.3 mmol/g, 10 mmol)在DCM中膨胀20分钟。然后加入含Fmoc-OEG-OH (19.27 g, 50 mmol)和DIPEA (8.5 mL)的DCM (100 mL)的混合物并将反应物振摇2小时。将树脂排干并用NMP洗涤(2 x 100 mL)。树脂再用DCM、MeOH和DIPEA的混合物(80:15:5) (2 x 100 mL)处理(每次10分钟)。用NMP (3 x 100 mL)洗涤后,通过标准程序进行Fmoc-脱保护(用20%哌啶/NMP (各100 mL), 2分钟+ 18分钟)。树脂用NMP洗涤6次。

[0811] 将Fmoc-OEG-OH (15.42 g, 40 mmol, 4当量)、HOAt (6.10 g, 40 mmol, 4当量)和DIC (6.10 mL, 40 mmol, 4当量)在DCM/NMP (1:1) (100 mL)中混合并搅拌10分钟,然后将混合物加入到树脂中。15分钟后加入DIPEA (6.85 mL, 40 mmol, 4当量)并将混合物在室温下振摇2小时。

[0812] 将树脂排干,树脂用NMP (6 x 100 mL)洗涤。TNBS测试为阴性。通过标准程序进行Fmoc-脱保护(用20%哌啶/NMP (各100 mL), 2分钟+ 18分钟)。树脂用NMP洗涤6次。

[0813] 将Fmoc-Glu-OtBu (12.70 g, 30 mmol, 3当量)、HOAt: (4.05 g, 30 mmol, 3当量)和DIC (4.58 mL, 30 mmol, 3当量)在DCM/NMP (1:1) (100 mL)中混合并搅拌10分钟,然后将混合物加入到树脂中。15分钟后加入DIPEA (5.14 mL, 30 mmol, 3当量)并将混合物在室温下振摇3小时。将树脂排干,树脂用NMP (6 x 100 mL)洗涤。TNBS测试为阴性。

[0814] 通过标准程序进行Fmoc-脱保护(用20%哌啶/NMP (各100 mL), 2分钟+ 18分钟)。树脂用NMP洗涤6次。

[0815] 将10-(4-叔丁氧基羰基苯氧基) 癸酸(10.94 g, 30 mmol, 3当量)、HOAt: (4.05 g, 30 mmol, 3当量)和DIC (4.58 mL, 30 mmol, 3当量)在DCM/NMP (1:1) (100 mL)中混合并搅拌10分钟,然后将混合物加入到树脂中。将混合物在室温下振摇3小时。TNBS测试为阴性。

[0816] 然后将树脂用TFE (20 mL)和DCM (80 mL)的切割混合物处理2小时,然后将所得溶液倒入250 mL圆底烧瓶。将另一份100 mL切割混合物加入到树脂中,振摇15分钟后,将所得溶液与第一滤液合并。蒸发溶剂,得到6.94 g浅褐色油状物。

[0817] 再将混合物溶于DCM,并通过快速色谱法纯化(梯度: 0-10 % MeOH/ DCM, 流速85 mL/分钟, 120 g硅胶柱)。收率2.40 g (29%)。

[0818] LCMS方法: LCMS_4: Rt: 3.48分钟, 准确质量: 839.478 Da;M/1: 840.56

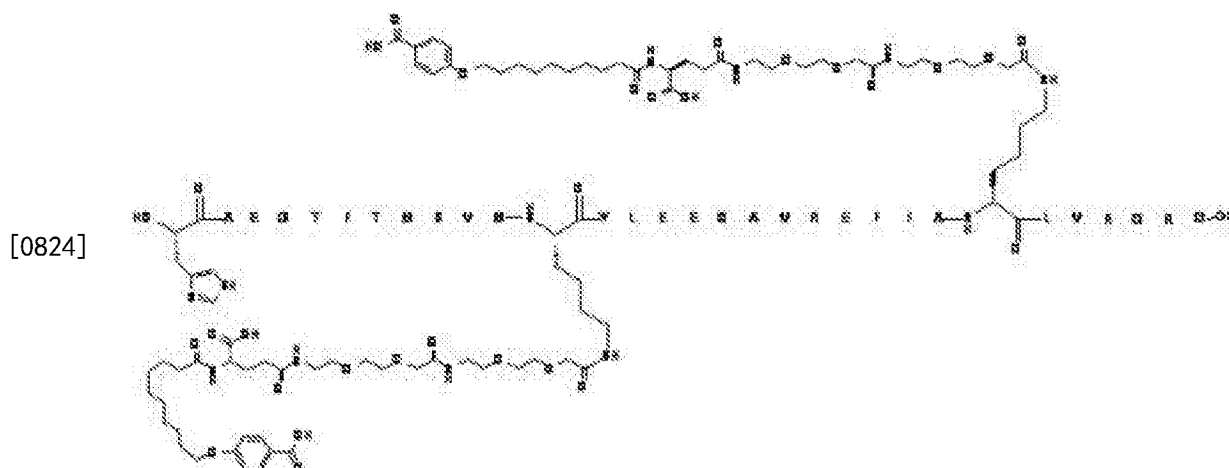
[0819] NMR方法: ^1H -NMR (300 MHz, CDCl_3): δ 7.92 (dm, $J=9.0$ Hz, 2 H); 7.37 (bs, 1 H); 7.03 (bs, 1 H); 6.86 (dm, $J=8.9$ Hz, 2 H); 6.59 (d, $J=7.7$ Hz, 1 H); 4.50-4.37 (m, 1 H); 4.16 (s, 2 H); 4.04-3.93 (m, 4 H); 3.78-3.37 (m, 16 H); 2.36-2.09 (m, 5 H); 2.01-1.84 (m, 1 H); 1.84-1.71 (m, 2 H); 1.69-1.52 (m, 11 H); 1.46 (s, 9 H); 1.43-1.26 (m, 10 H)。

[0820] B2.母体药物

[0821] B2.1

[0822] $\text{N}^{\epsilon 18}$ -[2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[(4S)-4-羧基-4-[10-(4-羧基苯氧基) 癸酰基氨基] 丁酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基], $\text{N}^{\epsilon 31}$ -[2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[(4S)-4-羧基-4-[10-(4-羧基苯氧基) 癸酰基氨基]-丁酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基], $\text{N}^{\alpha 18}$ -{3-[(2S)-2-羟基-3-(1H-咪唑-4-基) 丙酰基]}-[Lys¹⁸,Glu²²,Val²⁵,Arg²⁶,Lys³¹,Gln³⁴]-GLP-1-(8-37)-肽

[0823] Chem. 21:



[0825] 依据通用方法SPPS_P,在Fmoc-Gly Wang LL树脂上合成完全保护的[Lys¹⁸,Glu²²,Val²⁵,Arg²⁶,Lys³¹,Gln³⁴]-GLP-1-(9-37)-肽,在N-末端留下Fmoc保护的谷氨酸残基。

[0826] 依据通用方法:CP_M2进一步处理树脂。

[0827] 所得在树脂上的完全保护的肽用于实施例1、1a、1b、2、2a、3和3a的化合物的合成。

[0828] 依据通用方法CP_M1切割树脂并纯化,并且将含有正确化合物的流份合并和冻干成白色粉末。

[0829] LCMS方法: LCMS_4: Rt: 3.62分钟;准确质量: 4914.495 Da;M/5: 983.74;M/4: 1229.41;M/3: 1639.19

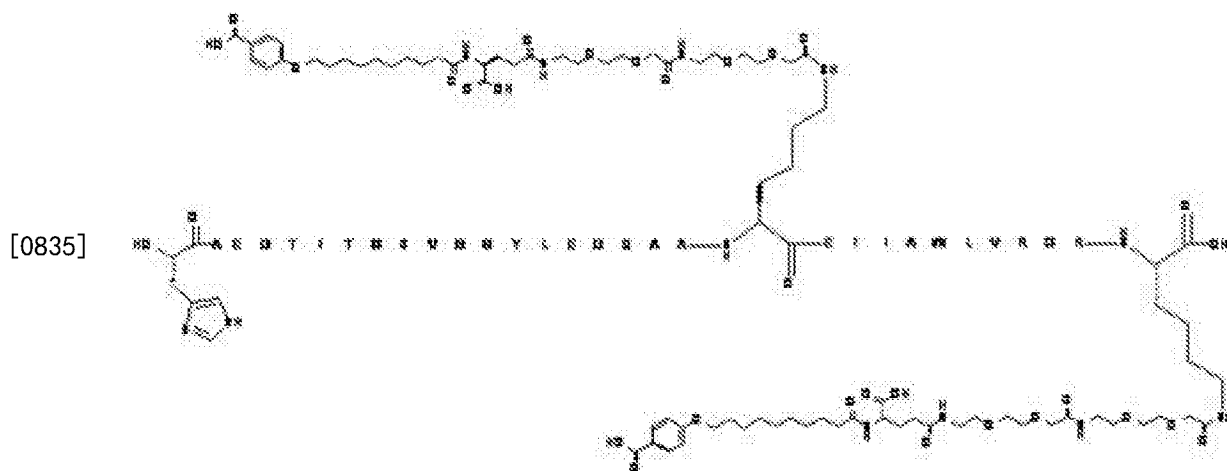
[0830] UPLC方法: B4_1: Rt = 8.42分钟

[0831] UPLC方法: B29_1: Rt = 11.12分钟。

[0832] B2.2

[0833] $\text{N}^{\epsilon 26}$ -[2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[(4S)-4-羧基-4-[10-(4-羧基苯氧基) 癸酰基氨基] 丁酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基], $\text{N}^{\epsilon 37}$ -[2-[2-[2-

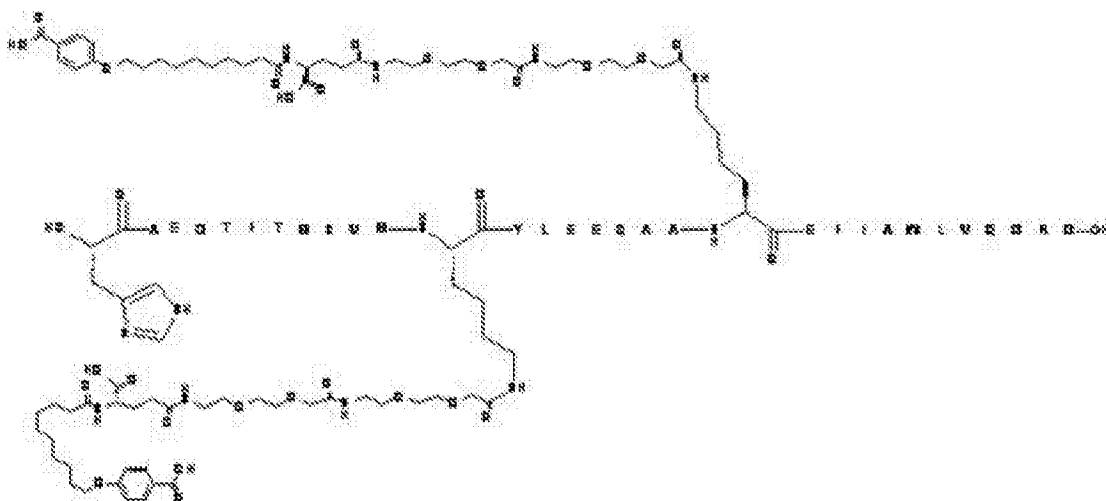
[0834] Chem. 22



[0843] B2.3

[0845] Chem. 23:

[0846]



[0847] 依据通用方法SPPS_B,在Fmoc-Gly Wang LL树脂上合成完全保护的[Lys¹⁸, Glu²², Gln³⁴]-GLP-1-(9-37)-肽,在N-末端留下Fmoc保护的谷氨酸残基。

[0848] 依据通用方法:CP_M2进一步处理树脂。所得完全保护的肽用于实施例5的化合物的合成。

[0849] 依据通用方法CP_M1切割树脂并纯化,并且将含有正确化合物的流份合并和冻干成白色粉末。

[0850] LCMS方法: LCMS_4: Rt: 2.37分钟;准确质量: 4886.384 Da;M/4: 1222.92, M/3: 1630.50

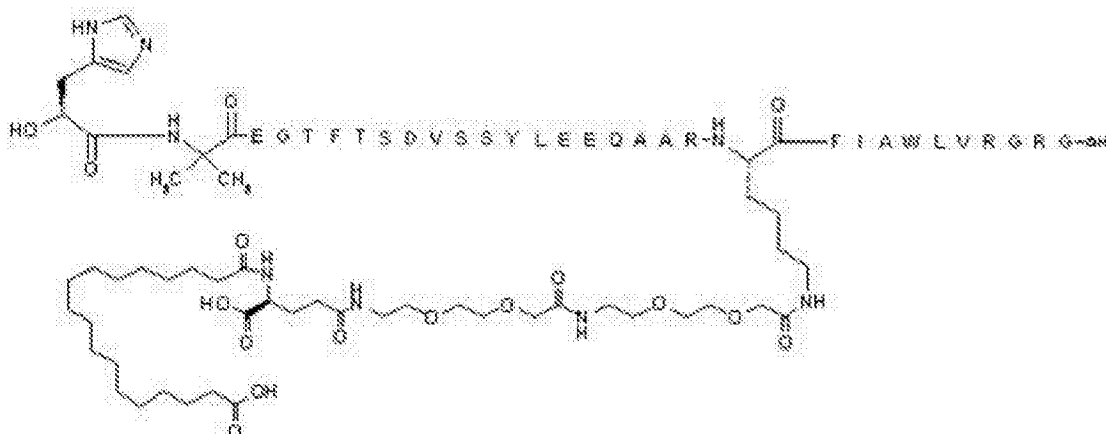
[0851] UPLC方法: B4_1: Rt = 8.93分钟

[0852] UPLC方法: B29_1: Rt = 12.36分钟。

[0853] B2.4

[0854] N^{ε27} [(S)-(22,40-二羧基-10,19,24-三氧代-3,6,12,15-四氧杂-9,18,23-三氮杂四十烷-1-酰基)]-N^{α18}-{3-[(2S)-2-羟基-3-(1H-咪唑-4-基)丙酰基]}-[Aib⁸, Glu²², Arg²⁶, Lys²⁷, Arg³⁴]-GLP-1-(8-37)-肽

[0855] Chem. 24:



[0856]

[0857] 步骤1. 完全保护的肽主链合成

[0858] 依据通用方法SPPS_B,在Fmoc-Gly Wang LL树脂上合成完全保护的[Glu²², Arg²⁶, Lys²⁷, Arg³⁴]-GLP-1-(9-37)-肽,在N-末端留下Fmoc保护的谷氨酸残基。

[0859] 步骤2. ε-Lys Mtt脱保护:

[0860] ϵ -Lys Mtt保护基通过以下而去除：用0.5 % TFA/DCM处理5分钟，再用纯六氟异丙醇处理（3次）15分钟。将树脂用DCM洗涤6次和用NMP洗涤6次。TNBS测试为阳性。

[0861] 步骤3.侧链偶联：

[0862] 将双-叔丁基保护的侧链（17-((S)-1-叔丁氧基羰基-3-{2-[-2-({2-[2-(2,5-二氧代-吡咯烷-1-基氧基羰基甲氧基)乙氧基]乙基氨基甲酰基}甲氧基)乙氧基]乙基氨基甲酰基}丙基氨基甲酰基)十七烷酸叔丁酯)（相对于树脂为4摩尔当量）溶于NMP并用TBTU（3.8当量）、HOBt（4当量）和DIPEA（4当量）预活化15分钟，然后加入到树脂中并反应过夜或直到TNBS测试显示透明的珠子。

[0863] 步骤4. Fmoc的去除：

[0864] 末端Glu上的Fmoc保护基通过以下而去除：用20%哌啶/NMP处理2分钟+ 18分钟，再用NMP洗涤6次。

[0865] 步骤2. Fmoc-Aib-OH的偶联：

[0866] 将Fmoc-Aib-OH（相对于树脂为4摩尔当量）溶于NMP并用Oxyma（4.0当量）、DIC（4当量）活化15分钟，然后加入到树脂中并偶联过夜，直到阴性TNBS测试。将树脂用NMP洗涤6次和用DCM洗涤10次。

[0867] 步骤5. L- β -咪唑乳酸偶联：

[0868] 将L- β -咪唑乳酸（相对于树脂为4摩尔当量）溶于NMP并用PyBOB（3.8当量）、HOBt（4当量）和TEA（4当量）活化10分钟，然后加入到树脂中并偶联1.5小时。将偶联重复3次。

[0869] 依据通用方法CP_M1切割树脂并纯化，并且将含有正确化合物的流份合并和冻干成白色粉末。

[0870] LCMS方法：LCMS_4：Rt：2.25分钟；准确质量：4211.179 Da；M/4：1053.78，M/3：1404.74

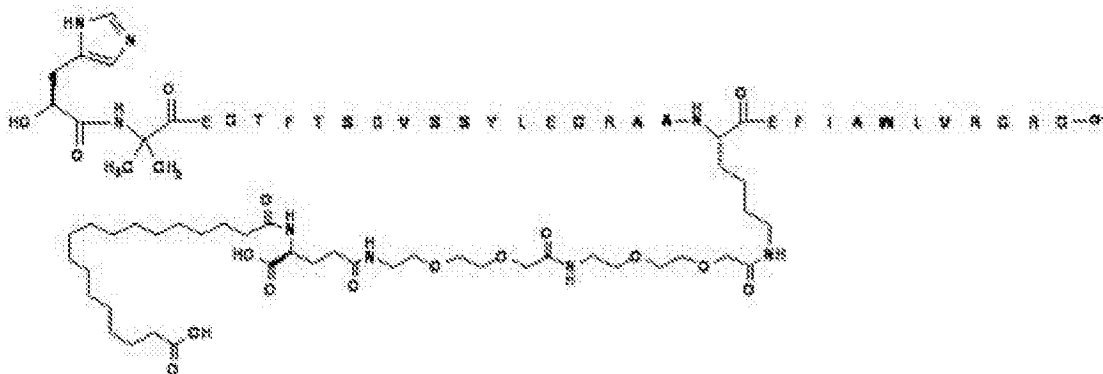
[0871] UPLC方法：B4_1：Rt = 8.73分钟

[0872] UPLC方法：B29_1：Rt = 14.56分钟。

[0873] B2.5

[0874] $N^{\epsilon 26}$ [(S)-(22,40-二羧基-10,19,24-三氧代-3,6,12,15-四氧杂-9,18,23-三氮杂四十烷-1-酰基)]- $N^{\alpha 18}$ -{3-[(2S)-2-羟基-3-(1H-咪唑-4-基)丙酰基]}-[Aib⁸, Arg²³, Arg³⁴]-GLP-1-(8-37)-肽

[0875] Chem. 25:



[0877] 步骤1. 完全保护的肽主链的合成：

[0878] 依据通用方法SPPS_P，在Fmoc-Gly Wang LL树脂上合成完全保护的Aib⁸, Arg²³,

Arg³⁴]-GLP-1-(8-37)-肽,在N-末端留下Fmoc保护的Aib残基。

[0879] 步骤2. Fmoc的去除:

[0880] 末端Glu的Fmoc保护基通过以下而去除:用20%哌啶/NMP处理2分钟+ 18分钟,再用NMP洗涤6次。

[0881] 步骤3. L-β-咪唑乳酸的偶联:

[0882] 将L-β-咪唑乳酸(相对于树脂为4摩尔当量)溶于NMP并用PyBOP (3.8当量), HOBT (4当量)和TEA (4当量)活化10分钟然后加入到树脂中并偶联1.5小时。将偶联重复2次。

[0883] 步骤4. 从树脂上切割:

[0884] 树脂用NMP和DCM洗涤,并通过用TFA/TIS/水(95:2.5:2.5)处理2.5小时将肽从树脂上切割下来,再用乙醚沉淀粗制肽。

[0885] 步骤5.侧链酰化:

[0886] 将粗制肽溶于水中并滴加NaOH (1 N, 水溶液),直到肽全部溶解和pH 10.6。

[0887] 用自动滴定仪,通过加入稀NaOH (0.1 M, 水溶液)将pH在pH 11.3保持恒定。

[0888] 将NHS活化的侧链(WO 2009/083549的实施例7) 17-((S)-1-羧基-3-{2-[2-({2-[2-(2,5-二氧化-吡咯烷-1-基氧基羰基甲氧基)-乙氧基]-乙基氨基甲酰基}-甲氧基)-乙氧基]-乙基氨基甲酰基}-丙基氨基甲酰基)-十七烷酸(1.2当量)侧链溶于DMF并滴加到溶液中。1小时后,通过加入1体积的乙酸猝灭反应混合物。

[0889] 步骤6. 纯化:

[0890] 通过标准RP-HPLC,在C18, 5 μM柱上纯化所述肽,使用乙腈/水/TFA。通过UPLC和LC-MS方法联用分析流份,并将合适流份合并和冻干。

[0891] LCMS方法: LCMS_4: Rt: 2.22分钟;准确质量: 4140.142 Da;M/4: 1036.03, M/3: 1381.36

[0892] UPLC方法: B4_1: Rt = 8.80分钟

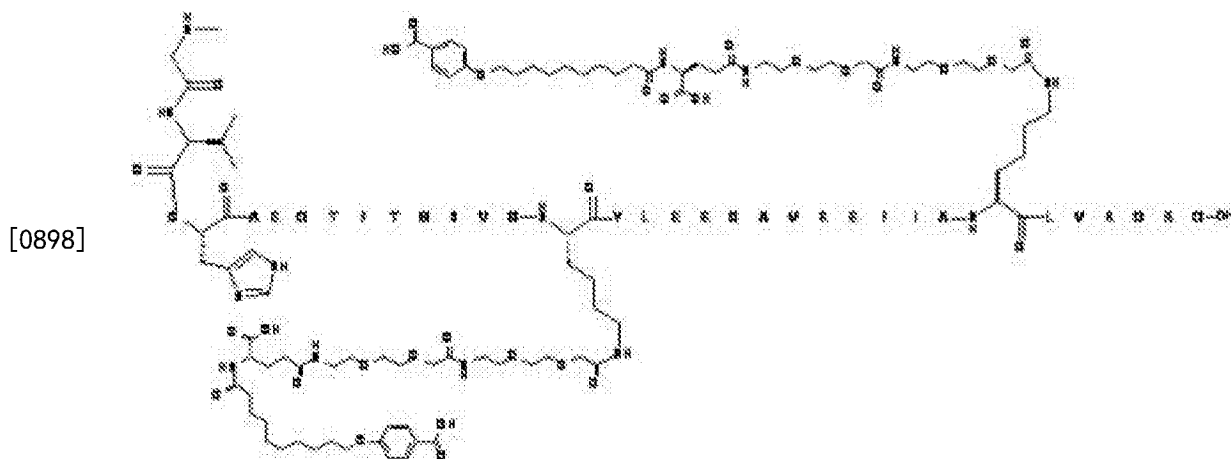
[0893] UPLC方法: B29_1: Rt = 14.76分钟。

[0894] B3. 具体实施例

[0895] 实施例1

[0896] N^{ε18}-[2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[(4S)-4-羧基-4-[10-(4-羧基苯氧基) 癸酰基氨基] 丁酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基], N^{ε31}-[2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[(4S)-4-羧基-4-[10-(4-羧基苯氧基) 癸酰基氨基]-丁酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基], N^{α18}-{(2S)-3-(1H-咪唑-4-基)-2-[(2S)-3-甲基-2-[[2-(甲氨基)乙酰基]氨基]丁酰基]氧基-丙酰基}-[Lys¹⁸,Glu²²,Val²⁵,Arg²⁶,Lys³¹,Gln³⁴]-GLP-1-(8-37)-肽

[0897] Chem. 51:



[0899] 依据通用方法SPPS_P,在Fmoc-Gly Wang LL树脂上合成完全保护的[Lys¹⁸,Glu²²,Val²⁵,Arg²⁶,Lys³¹,Gln³⁴]-GLP-1-(9-37)-肽(即这样的SEQ ID NO: 1:其中Ala⁸缺失,并且位置18、22、25、26、31和34的氨基酸已分别被Lys¹⁸、Glu²²、Val²⁵、Arg²⁶、Lys³¹和Gln³⁴取代),在N-末端留下Fmoc保护的谷氨酸残基。

[0900] 依据通用方法:CP M2进一步处理树脂。

[0901] 对于Boc-NMe-Gly-Val-OH的偶联,将Boc-N-Me-Gly-Val-OH (相对于树脂为6摩尔当量)溶于DCM中。加入MSNT (6当量),再加入甲基咪唑(9当量)。让混合物静置10分钟,然后将其加入到以上制备的树脂中。将树脂振摇4小时,然后排干和用DCM洗涤6次。

[0902] 依据通用方法CP_M1切割树脂并纯化,并且将含有正确化合物的流份合并和冻干成白色粉末。

[0903] LCMS方法: LCMS_4: Rt: 2.05分钟;准确质量: 5082.585 Da;M/5: 1017.75;M/4: 1271.98

[0904] UPLC方法: B4 1: Rt = 8.09分钟

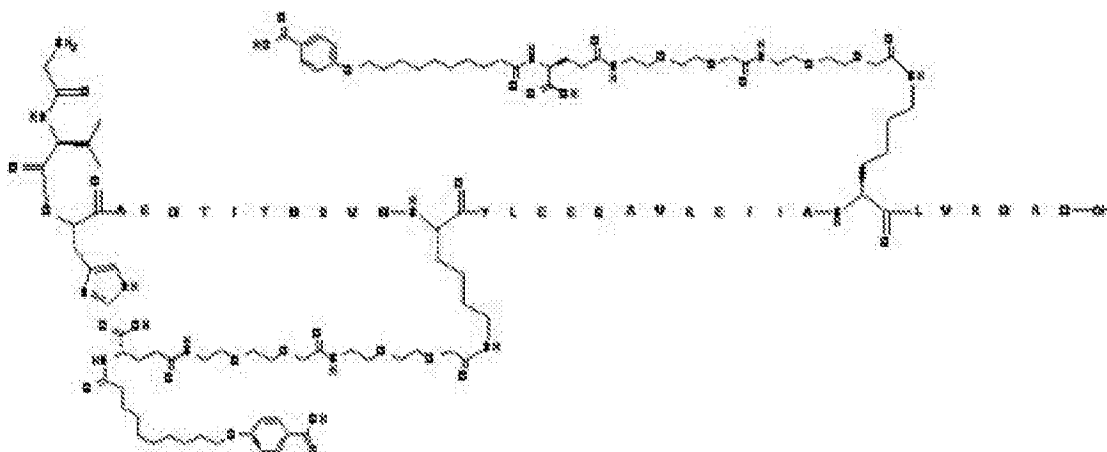
[0905] UPLC方法: B29 1: Rt = 11.20分钟。

[0906] 比较实施例1a

[0907] $N^{\epsilon 18}$ -[2-[2-[2-[[2-[2-[2-[(4S)-4-羧基-4-[10-(4-羧基苯氧基) 癸酰基氨基]丁酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基], $N^{\epsilon 31}$ -[2-[2-[2-[[2-[2-[2-[(4S)-4-羧基-4-[10-(4-羧基苯氧基) 癸酰基氨基]-丁酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基], $N^{\alpha 18}$ -{(2S)-2-[(2S)-2-[(2-氨基乙酰基) 氨基]-3-甲基-丁酰基]氧基-3-(1H-咪唑-4-基) 丙酰基}-}-[Lys¹⁸,Glu²²,Val²⁵,Arg²⁶,Lys³¹,Gln³⁴]-GLP-1-(8-37)-肽

[0908] Chem. 30:

[0909]



[0910] 依据通用方法SPPS_A,在Fmoc-Gly Wang LL树脂上合成完全保护的[Lys¹⁸,Glu²²,Val²⁵,Arg²⁶,Lys³¹,Gln³⁴]-GLP-1-(9-37)-肽(即这样的SEQ ID NO: 1:其中Ala⁸缺失,并且位置18、22、25、26、31和34的氨基酸已分别被Lys¹⁸、Glu²²、Val²⁵、Arg²⁶、Lys³¹和Gln³⁴取代),在N-末端留下Fmoc保护的谷氨酸残基。

[0911] 依据通用方法:CP_M2进一步处理树脂。

[0912] 对于Boc-Gly-Val-OH的偶联,将Boc-Gly-Val-OH(相对于树脂为6摩尔当量)溶于DCM中。加入MSNT(6当量),再加入甲基咪唑(9当量)。让混合物静置10分钟,然后将其加入到以上制备的树脂中。将树脂振摇4小时,然后排干和用DCM洗涤6次。

[0913] 依据标准方法CP_M1切割树脂并纯化,并且将含有正确化合物的流份合并和冻干成白色粉末。

[0914] LCMS方法: LCMS_4: Rt: 2.36分钟;准确质量: 5068.5696 Da;M/5: 1014.97;M/4: 1268.46.

[0915] UPLC方法: B4_1: Rt = 9.35分钟

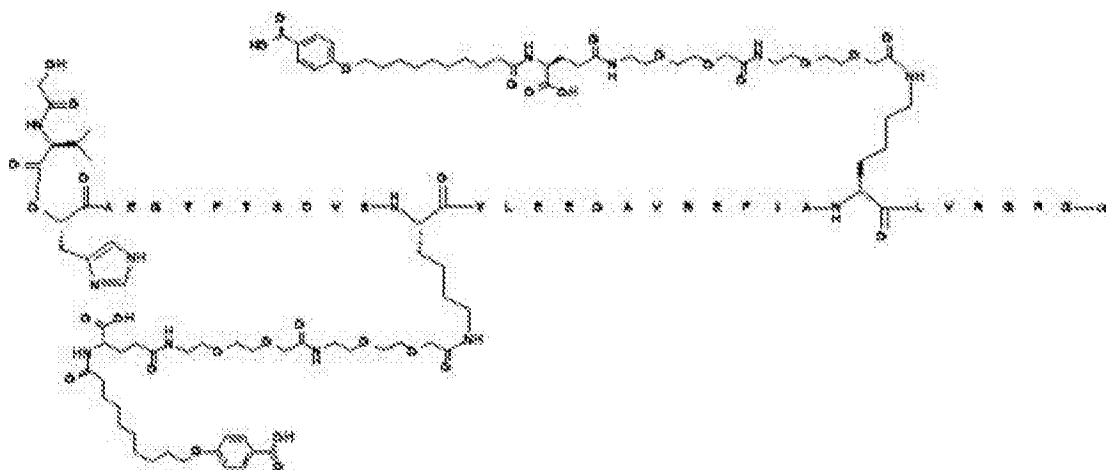
[0916] UPLC方法: B29_1: Rt = 9.10分钟

[0917] 比较实施例1b

[0918] N^{ε18}-[2-[2-[2-[[2-[2-[2-[(4S)-4-羧基-4-[10-(4-羧基苯氧基)癸酰基氨基]丁酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基], N^{ε31}-[2-[2-[2-[[2-[2-[2-[(4S)-4-羧基-4-[10-(4-羧基苯氧基)癸酰基氨基]-丁酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基], N^{α18}-{(2S)-2-[(2S)-2-[(2-羟基乙酰基)氨基]-3-甲基-丁酰基]氧基-3-(1H-咪唑-4-基)丙酰基}-[Lys¹⁸,Glu²²,Val²⁵,Arg²⁶,Lys³¹,Gln³⁴]-GLP-1-(8-37)-肽。

[0919] Chem. 31:

[0920]



[0921] 依据通用方法SPPS_A,在Fmoc-Gly Wang LL树脂上合成完全保护的[Lys¹⁸,Glu²²,Val²⁵,Arg²⁶,Lys³¹,Gln³⁴]-GLP-1-(9-37)-肽(即这样的SEQ ID NO: 1:其中Ala⁸缺失,并且位置18、22、25、26、31和34的氨基酸已分别被Lys¹⁸、Glu²²、Val²⁵、Arg²⁶、Lys³¹和Gln³⁴取代),在N-末端留下Fmoc保护的谷氨酸残基。

[0922] 依据通用方法:CP_M2进一步处理树脂。

[0923] 对于tBuMe₂SiOCH₂-C(O)-Val-OH的偶联,将(S)-2-[2-(叔丁基-二甲基-甲硅烷基氧基)-乙酰基氨基]-3-甲基-丁酸(相对于树脂为6摩尔当量)溶于DCM中。加入MSNT(6当量),再加入甲基咪唑(9当量)。让混合物静置10分钟,然后将其加入到以上制备的树脂中。将树脂振荡4小时,然后排干和用DCM洗涤6次。

[0924] 依据通用方法CP_M1切割树脂并纯化,并且将含有正确化合物的流份合并和冻干成白色粉末。

[0925] LCMS方法: LCMS_4: Rt: 3.67分钟;准确质量: 5071.569 Da;M/4: 1268.71;M/3: 1692.23

[0926] UPLC方法: B4_1: Rt = 8.69分钟

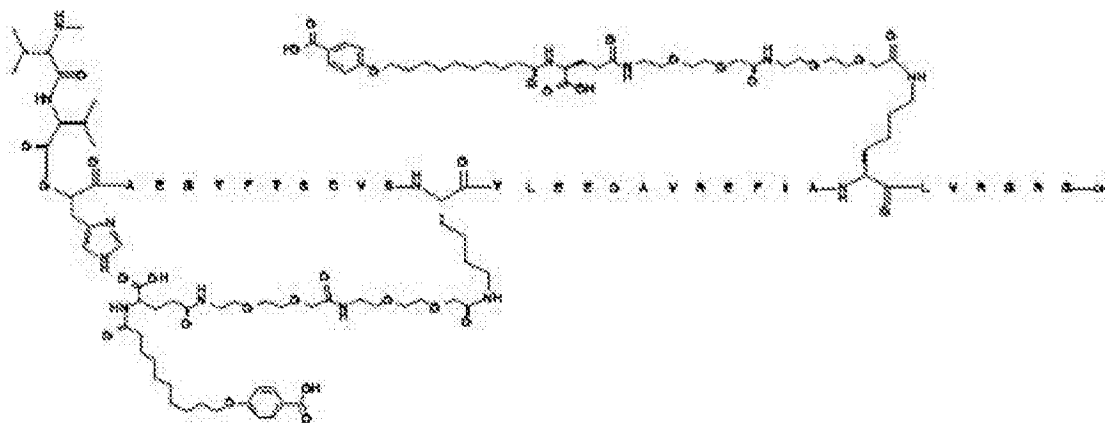
[0927] UPLC方法: B29_1: Rt = 9.51分钟。

[0928] 实施例2

[0929] N^{ε18}-[2-[2-[2-[[2-[2-[2-[(4S)-4-羧基-4-[10-(4-羧基苯氧基)癸酰基氨基]丁酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基], N^{ε31}-[2-[2-[2-[[2-[2-[2-[(4S)-4-羧基-4-[10-(4-羧基苯氧基)癸酰基氨基]-丁酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基], N^{α18}-{(S)-3-(1H-咪唑-4-基)-2-[(S)-3-甲基-2-((S)-3-甲基-2-甲氨基-丁酰基氨基)-丁酰基氧基]-丙酰基}-[Lys¹⁸,Glu²²,Val²⁵,Arg²⁶,Lys³¹,Gln³⁴]-GLP-1-(8-37)-肽

[0930] Chem. 52:

[0931]



[0932] 依据标准方法SPPS_P,在Fmoc-Gly Wang LL树脂上合成完全保护的[Lys¹⁸,Glu²²,Val²⁵,Arg²⁶,Lys³¹,Gln³⁴]-GLP-1-(9-37)-肽(即这样的SEQ ID NO: 1:其中Ala⁸缺失,并且位置18、22、25、26、31和34的氨基酸已分别被Lys¹⁸、Glu²²、Val²⁵、Arg²⁶、Lys³¹和Gln³⁴取代),在N-末端留下Fmoc保护的谷氨酸残基。

[0933] 依据通用方法:CP_M2进一步处理树脂。

[0934] 对于Boc-N-Me-Val-Val-OH的偶联,将Boc-N-Me-Val-Val-OH(相对于树脂为6摩尔当量)溶于DCM中。加入MSNT(6当量),再加入甲基咪唑(9当量)。让混合物静置10分钟,然后将其加入到以上制备的树脂中。将树脂振摇4小时,然后排干和用DCM洗涤6次。

[0935] 依据通用方法CP_M1切割树脂并纯化,并且将含有正确化合物的流份合并和冻干成白色粉末。

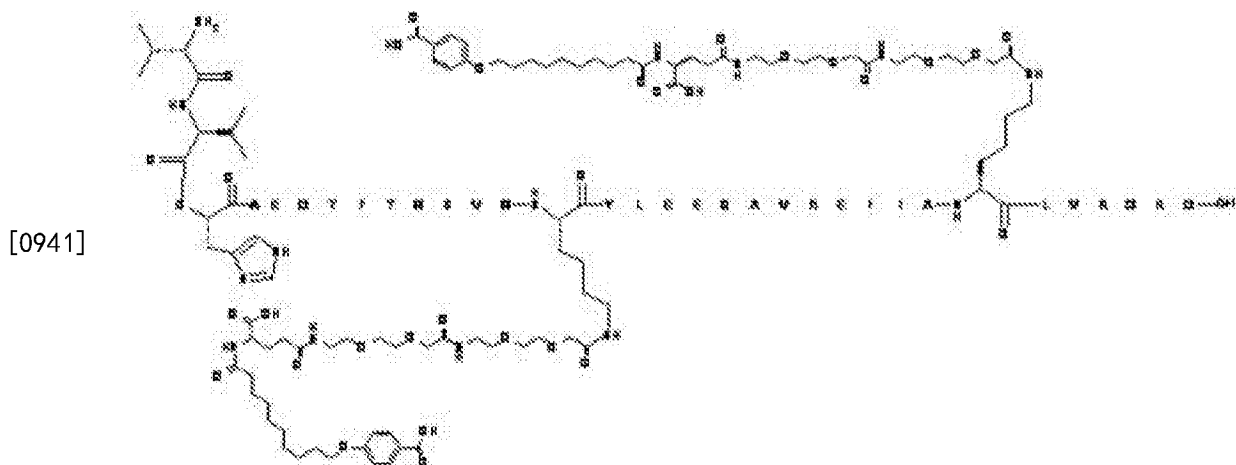
[0936] LCMS方法: LCMS_4: Rt: 2.12分钟;准确质量: 5124.632 Da;M/5: 1025.93;M/4: 1282.15

[0937] UPLC方法: B4_1: Rt = 8.07分钟。

[0938] 比较实施例2a

[0939] N^{ε18}-[2-[2-[2-[[2-[2-[2-[(4S)-4-羧基-4-[10-(4-羧基苯氧基)癸酰基氨基]丁酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基], N^{ε31}-[2-[2-[2-[[2-[2-[2-[(4S)-4-羧基-4-[10-(4-羧基苯氧基)癸酰基氨基]-丁酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基], N^{α18}-{(2S)-2-[(2S)-2-[(2S)-2-氨基-3-甲基-丁酰基]氨基]-3-甲基-丁酰基]氧基-3-(1H-咪唑-4-基)丙酰基}-[Lys¹⁸,Glu²²,Val²⁵,Arg²⁶,Lys³¹,Gln³⁴]-GLP-1-(8-37)-肽

[0940] Chem. 32:



[0942] 依据通用方法SPPS_B,在Fmoc-Gly Wang LL树脂上合成完全保护的[Lys¹⁸,Glu²²,Val²⁵,Arg²⁶,Lys³¹,Gln³⁴]-GLP-1-(9-37)-肽(即这样的SEQ ID NO: 1:其中Ala⁸缺失,并且位置18、22、25、26、31和34的氨基酸已分别被Lys¹⁸、Glu²²、Val²⁵、Arg²⁶、Lys³¹和Gln³⁴取代),在N-末端留下Fmoc保护的谷氨酸残基。

[0943] 依据通用方法:CP M2进一步处理树脂。

[0944] 对于Boc-Val-Val-OH的偶联,将Boc-Val-Val-OH (相对于树脂为6摩尔当量)溶于DCM中。加入MSNT (6当量),再加入甲基咪唑(9当量)。让混合物静置10分钟,然后将其加入到以上制备的树脂中。将树脂振摇4小时,然后排干和用DCM洗涤6次。

[0945] 依据通用方法CP_M1切割树脂并纯化,并且将含有正确化合物的流份合并和冻干成白色粉末。

[0946] LCMS方法: LCMS_4: Rt: 2.05分钟;准确质量: 5110.617 Da;M/5: 1023.37;M/4: 1278.99

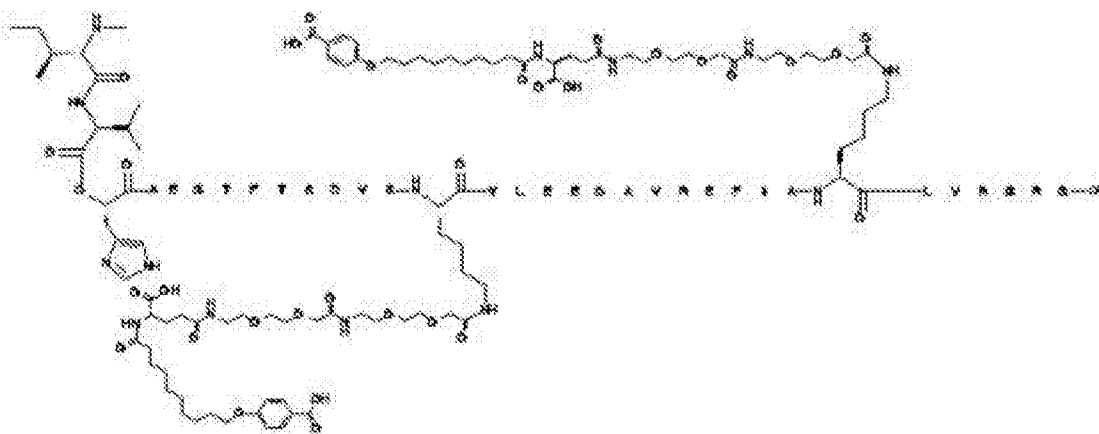
[0947] UPLC方法: B2 1: Rt = 12.41分钟

[0948] UPLC方法: B29 1: Rt = 11.13分钟。

[0949] 实施例3

[0950] $N^{\epsilon 18}$ -[2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[(4S)-4-羧基-4-[10-(4-羧基苯氧基) 癸酰基氨基] 丁酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基], $N^{\epsilon 31}$ -[2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[(4S)-4-羧基-4-[10-(4-羧基苯氧基) 癸酰基氨基]-丁酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基], $N^{\alpha 18}$ -{(S)-3-(1*H*-咪唑-4-基)-2-[(S)-3-甲基-2-((S)-3-甲基-2-甲氨基-戊酰基氨基)-丁酰基氧基]-丙酰基)}-[Lys¹⁸,Glu²²,Val²⁵,Arg²⁶,Lys³¹,Gln³⁴]-GLP-1-(8-37)-肽

[0951] Chem. 53:



[0953] 依据通用方法SPPS_P,在Fmoc-Gly Wang LL树脂上合成完全保护的[Lys¹⁸,Glu²²,Val²⁵,Arg²⁶,Lys³¹,Gln³⁴]-GLP-1-(9-37)-肽(即这样的SEQ ID NO: 1:其中Ala⁸缺失,并且位置18、22、25、26、31和34的氨基酸已分别被Lys¹⁸、Glu²²、Val²⁵、Arg²⁶、Lys³¹和Gln³⁴取代),在N-末端留下Fmoc保护的谷氨酸残基。

[0954] 依据通用方法:CP M2进一步处理树脂。

[0955] 对于Boc-N-Me-Ile-Val-OH的偶联,将Boc-N-Me-Ile-Val-OH (相对于树脂为6摩尔当量)溶于DCM中。加入MSNT (6当量),再加入甲基咪唑(9当量)。让混合物静置10分钟,然后将其加入到以上制备的树脂中。将树脂振摇4小时,然后排干和用DCM洗涤6次。

[0956] 依据通用方法CP_M1切割树脂并纯化,并且将含有正确化合物的流份合并和冻干成白色粉末。

[0957] LCMS方法: LCMS_4: Rt: 2.05分钟;准确质量: 5140.666 Da;M/5: 1028.97;M/4: 1286.00

[0958] UPLC方法: B2 1: $R_t = 12.37$ 分钟

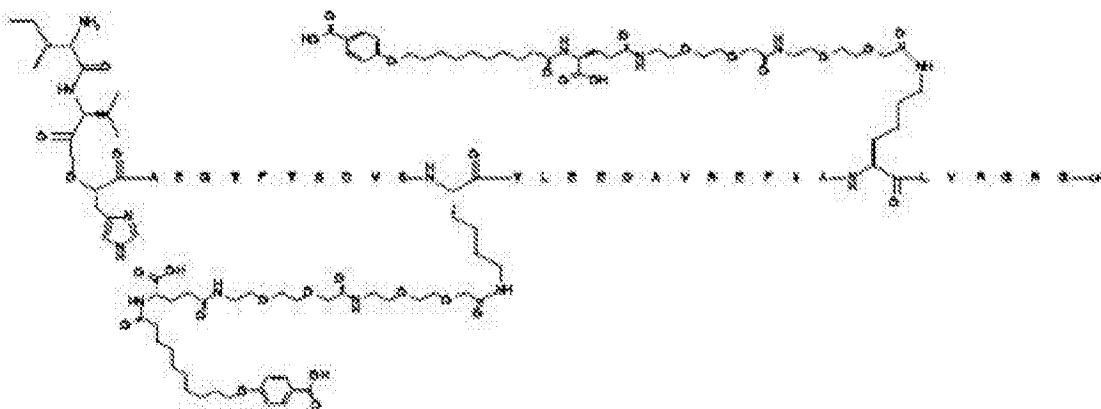
[0959] UPLC方法: B29 1: Rt = 11.22分钟。

[0960] 比较实施例3a

[0961] $N^{\epsilon 18}$ -[2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[(4S)-4-羧基-4-[10-(4-羧基苯氧基) 癸酰基氨基] 丁酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基], $N^{\epsilon 31}$ -[2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[(4S)-4-羧基-4-[10-(4-羧基苯氧基) 癸酰基氨基]-丁酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基], $N^{\alpha 18}$ -{(S)-2-[(S)-2-((S)-2-氨基-3-甲基-戊酰基氨基)-3-甲基-丁酰基氧基]-3-(1*H*-咪唑-4-基)-丙酰基}-[Lys¹⁸,Glu²²,Val²⁵,Arg²⁶,Lys³¹,Gln³⁴]-GLP-1-(8-37)-肽

[0962] Chem. 33:

[0963]



[0964] 依据标准方法SPPS_P,在Fmoc-Gly Wang LL树脂上合成完全保护的[Lys¹⁸,Glu²²,Val²⁵,Arg²⁶,Lys³¹,Gln³⁴]-GLP-1-(9-37)-肽(即这样的SEQ ID NO: 1:其中Ala⁸缺失,并且位置18、22、25、26、31和34的氨基酸已分别被Lys¹⁸、Glu²²、Val²⁵、Arg²⁶、Lys³¹和Gln³⁴取代),在N-末端留下Fmoc保护的谷氨酸残基。

[0965] 依据通用方法:CP_M2进一步处理树脂。

[0966] 对于Boc-Ile-Val-OH的偶联,将Boc-Ile-Val-OH (相对于树脂为6摩尔当量)溶于DCM中。加入MSNT (6当量),再加入甲基咪唑(9当量)。让混合物静置10分钟,然后将其加入到以上制备的树脂中。将树脂振摇4小时,然后排干和用DCM洗涤6次。

[0967] 依据通用方法CP_M1切割树脂并纯化,并且将含有正确化合物的流份合并和冻干成白色粉末。

[0968] LCMS方法: LCMS_4: Rt: 2.10分钟;准确质量: 5124.632 Da;M/5: 1025.93;M/4: 1282.15

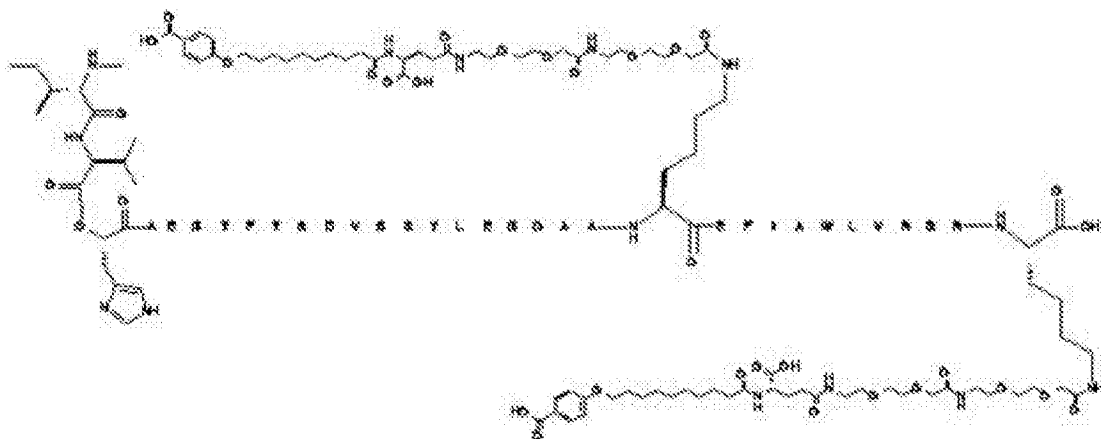
[0969] UPLC方法: B4_1: Rt = 8.07分钟。

[0970] 实施例4

[0971] N^{ε26}-[2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[(4S)-4-羧基-4-[10-(4-羧基苯氧基) 癸酰基氨基] 丁酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基], N^{ε37}-[2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[(4S)-4-羧基-4-[10-(4-羧基苯氧基) 癸酰基氨基]-丁酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基], N^{α18}-{(S)-3-(1H-咪唑-4-基)-2-[(S)-3-甲基-2-((S)-3-甲基-2-甲氨基-戊酰基氨基)-丁酰基氧基]-丙酰基}-[Arg³⁴, Lys³⁷]-GLP-1-(8-37)-肽

[0972] Chem. 54:

[0973]



[0974] 依据通用方法SPPS_P,在Fmoc-Lys (Mtt) Wang LL树脂上合成完全保护的[Arg³⁴, Lys³⁷]-GLP-1-(9-37)-肽(即这样的SEQ ID NO: 1:其中Ala⁸缺失,并且位置34和37的氨基酸已分别被Arg³⁴和Lys³⁷取代),对于赖氨酸位置使用Fmoc-Lys (Mtt) -OH,在N-末端留下Fmoc保护的谷氨酸残基。

[0975] 依据通用方法:CP_M2进一步处理树脂。

[0976] 对于Boc-NMe-Ile-Val-OH的偶联,将Boc-N-Me-Ile-Val-OH (相对于树脂为6摩尔当量)溶于DCM中。加入MSNT (6当量),再加入甲基咪唑(9当量)。让混合物静置10分钟,然后将其加入到以上制备的树脂中。将树脂振摇4小时,然后排干和用DCM洗涤6次。

[0977] 依据通用方法CP_M1切割树脂并纯化,并且将含有正确化合物的流份合并和冻干成白色粉末。

[0978] LCMS方法: LCMS_4: Rt: 2.23分钟;准确质量: 5098.584 Da;M/5: 1020.99;M/4: 1275.98

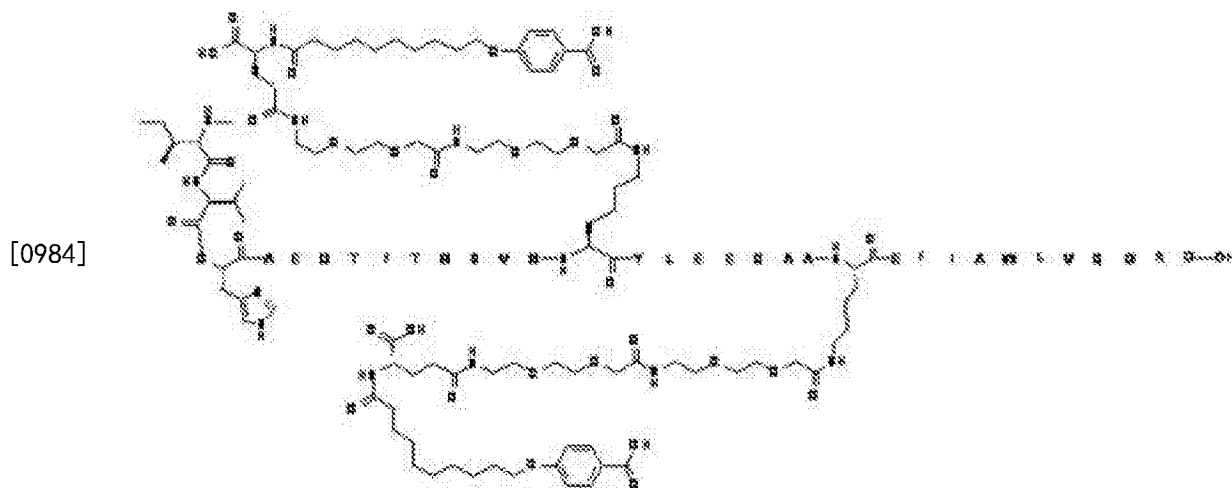
[0979] UPLC方法: B4_1: Rt = 9.485分钟

[0980] UPLC方法: B29_1: Rt = 13.070分钟。

[0981] 实施例5

[0982] N^{e18}-[2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[(4S) -4-羧基-4-[10-(4-羧基苯氧基) 癸酰基氨基] 丁酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基], N^{e26}-[2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[(4S) -4-羧基-4-[10-(4-羧基苯氧基) 癸酰基氨基]-丁酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基], N^{q18}-{(S) -3-(1H-咪唑-4-基) -2-[(S) -3-甲基-2-((S) -3-甲基-2-甲氨基-戊酰基氨基)-丁酰基氧基]-丙酰基}-[Lys¹⁸, Glu²², Gln³⁴]-GLP-1-(8-37)-肽

[0983] Chem. 55:



[0985] 依据通用方法SPPS_P,在Fmoc-Lys (Mtt) Wang LL树脂上合成完全保护的[Lys¹⁸, Glu²², Gln³⁴]-GLP-1-(9-37)-肽(即这样的SEQ ID NO: 1:其中Ala⁸缺失,并且位置18、22和34的氨基酸已分别被Lys¹⁸、Glu²²和Gln³⁴取代),对于赖氨酸位置使用Fmoc-Lys (Mtt) -OH,在N-末端留下Fmoc保护的谷氨酸残基。

[0986] 依据通用方法:CP_M2进一步处理树脂。

[0987] 对于Boc-NMe-Ile-Val-OH的偶联,将Boc-N-Me-Ile-Val-OH (相对于树脂为6摩尔

当量)溶于DCM中。加入MSNT (6当量),再加入甲基咪唑(9当量)。让混合物静置10分钟,然后将其加入到以上制备的树脂中。将树脂振摇4小时,然后排干和用DCM洗涤6次。

[0988] 依据通用方法CP_M1切割树脂并纯化,并且将含有正确化合物的流份合并和冻干成白色粉末。

[0989] LCMS方法: LCMS_4: Rt: 2.30分钟;准确质量: 5112.552 Da;M/5: 1023.78;M/4: 1279.71

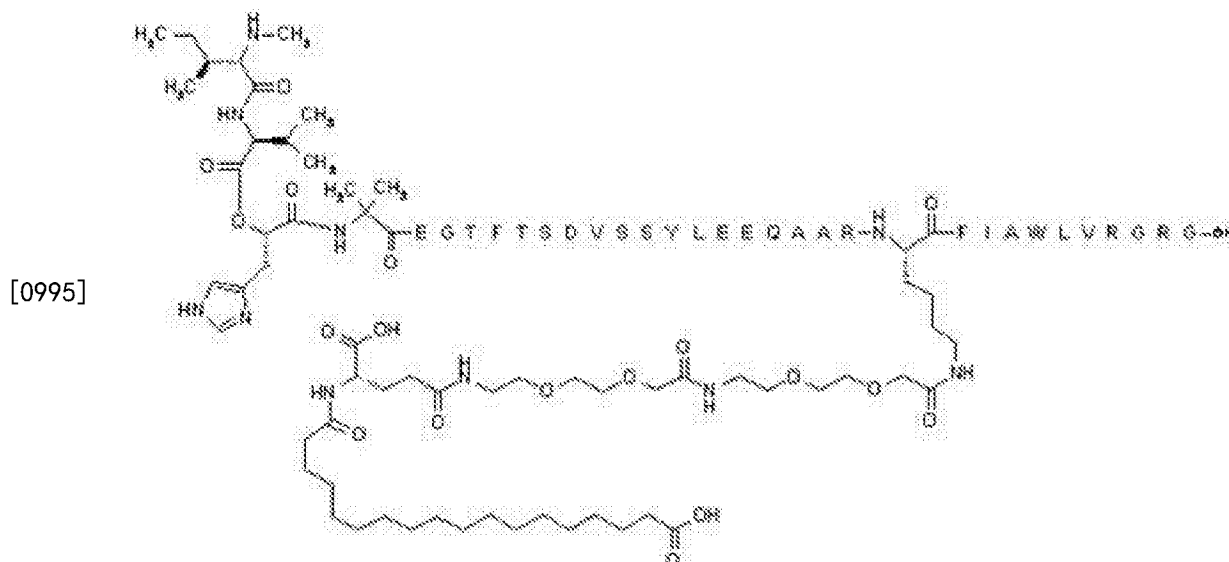
[0990] UPLC方法: B4_1: Rt = 11.05分钟

[0991] UPLC (方法: B29_1): Rt = 19.60分钟。

[0992] 实施例6

[0993] $N^{\epsilon 27}$ -[2-(2-{2-[2-(2-{2-[(S)-4-羧基-4-(17-羧基十七酰基氨基)丁酰基氨基]乙氧基}乙氧基)乙酰基氨基]乙氧基}乙氧基)乙酰基], N^{a18} -{(S)-3-(1H-咪唑-4-基)-2-[(S)-3-甲基-2-((S)-3-甲基-2-甲氨基-丁酰基氨基)-丁酰基氧基]-丙酰基}-[Aib⁸, Glu²², Arg²⁶, Lys²⁷, Arg³⁴]GLP-1-(8-37)-肽

[0994] Chem. 56:



[0996] 依据标准方法SPPS_B,在Fmoc-Gly Wang LL树脂上合成完全保护的[Glu²², Arg²⁶, Lys²⁷, Arg³⁴]-GLP-1-(9-37)-肽(即这样的SEQ ID NO: 1:其中Ala⁸缺失,并且位置22、26、27和34的氨基酸已分别被Glu²²、Arg²⁶、Lys²⁷和Arg³⁴取代),在N-末端留下Fmoc保护的谷氨酸残基。合成的最后部分按照以下步骤进行:

[0997] 步骤1. Fmoc的去除:

[0998] 末端Glu的Fmoc保护基通过以下而去除:用20%哌啶/NMP处理2分钟+ 18分钟,再用NMP洗涤6次。

[0999] 步骤2. Fmoc-Aib-OH的偶联:

[1000] 将Fmoc-Aib-OH (相对于树脂为4摩尔当量)用TBTU (3.8当量)、HOBT (4当量)和DIPEA (4当量)活化10分钟,然后加入到树脂中并偶联2 h或直到阴性TNBS测试(W.S. Hancock, J.E. Battersby, Analytical Biochemistry 1976, 71(1), 260-264)。将树脂用NMP洗涤6次和用DCM洗涤10次。

[1001] 步骤3. ϵ -Lys Mtt 脱保护:

[1016] 依据通用方法SPPS_B,在Fmoc-Gly Wang LL树脂上合成完全保护的[Lys¹⁸,Glu²²,Val²⁵,Arg²⁶,Lys³¹,Gln³⁴]-GLP-1-(9-37)-肽(即这样的SEQ ID NO: 1;其中Ala⁸缺失,并且位置18、22、25、26、31和34的氨基酸已分别被Lys¹⁸、Glu²²、Val²⁵、Arg²⁶、Lys³¹和Gln³⁴取代),在N-末端留下Fmoc保护的谷氨酸残基。合成的最后部分按照以下步骤进行:

[1017] 步骤1. Fmoc的去除:

[1018] 末端Glu的Fmoc保护基通过以下而去除:用20%哌啶/NMP处理2分钟+ 18分钟,再用NMP洗涤6次。

[1019] 步骤2. Fmoc-Aib-OH的偶联:

[1020] 将Fmoc-Aib-OH (相对于树脂为4摩尔当量)用TBTU (3.8当量)、HOBt (4当量)和DIPEA (4当量)活化10分钟,然后加入到树脂中并偶联2小时或直到阴性TNBS测试(W.S. Hancock, J.E. Battersby, Analytical Biochemistry 1976, 71(1), 260-264)。将树脂用NMP洗涤6次和用DCM洗涤10次。

[1021] 步骤3. ϵ -Lys Mtt 脱保护:

[1022] ϵ -Lys Mtt保护基通过以下而去除:用0.5 % TFA/DCM处理5分钟,再用纯六氟异丙醇处理(3次)15分钟。将树脂用DCM洗涤6次和用NMP洗涤6次。TNBS测试为阳性。

[1023] 步骤4.侧链偶联:

[1024] 将双-叔丁基保护的侧链(2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[(4S)-5-叔丁氧基-4-[(18-叔丁氧基-18-氧代-十八酰基)氨基]-5-氧代-戊酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酸)(US 2010317057 A1, 参见例如实施例4) (相对于树脂为4摩尔当量)溶于NMP并用TBTU (3.8当量)、HOBt (4当量)和DIPEA (4当量)预活化15分钟,然后加入到树脂中并反应2.5小时或直到TNBS测试显示透明的珠子。如上所述地去除Aib8上的N-末端Fmoc。

[1025] 步骤5. L- β -咪唑乳酸偶联:

[1026] 将L- β -咪唑乳酸(相对于树脂为4摩尔当量)溶于NMP并用PyBOB (3.8当量)、HOBt (4当量)和TEA (4当量)活化10分钟,然后加入到树脂中并偶联1.5小时。

[1027] 对于Boc-NH-Ile-Val-OH的偶联,将Boc-NH-Ile-Val-OH (相对于树脂为6摩尔当量)溶于DCM中。加入MSNT (6当量),再加入甲基咪唑(9当量)。让混合物静置10分钟,然后将其加入到以上制备的树脂中。将树脂振摇4小时,然后排干和用DCM洗涤6次。

[1028] 依据通用方法CP_M1切割树脂并纯化,并且将含有正确化合物的流份合并和冻干成白色粉末。

[1029] LCMS方法: LCMS_4: Rt: 2.68分钟;准确质量: 4423.332 Da;M/5: 885.66;M/4: 1106.82;M/3: 1475.77

[1030] UPLC方法: B4_1: Rt = 8.55分钟

[1031] UPLC方法: B29_1: Rt = 12.52分钟。

[1032] 药理学方法

[1033] 实施例7:前体药物的体外半寿期

[1034] 本实施例的目的是测试本发明GLP-1前体药物的体外半寿期(T_{1/2}),与概念上不同的前体药物相比。在下文描述了2种体外方法,即在缓冲液中进行的方法和在血浆中进行的方法。

[1035] 缓冲液方法

[1036] 缓冲液: 25 mM磷酸盐 (离子强度: 154 mM, pH 7.4, 在37℃)

[1037] 将 $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (1.95 g, 12.5 mmol) 和NaCl (2.61 g, 44.7 mmol) 溶于millipore水 (大约450 mL) 并在大约20℃用浓NaOH和1 M NaOH调节至pH=7.44。加水至500.00 mL。

[1038] 将待测化合物溶于缓冲液至浓度为1.0 mg/mL并在37℃孵育。以合适间隔采集样品, 并且通过表1所示的UPLC方法, 通过比较两个相应峰的曲线下面积, 评价随时间的变化形成的母体药物相对于前体药物的%。这些UPLC方法描述于上文通用实验部分 (UPLC_A和UPLC_B)。

[1039] 根据拟合至 $\ln(\% \text{前体药物}(Y))$ 与时间(t)的曲线的线的斜率计算前体药物的半寿期($T_{1/2}$), 如下:

Math. 1: $Y = -\alpha t + k$

[1040] Math. 2: $T_{1/2} = \ln(2)/\alpha$ 。

[1041] 血浆方法

[1042] 缓冲液: 200 mM磷酸盐, pH 7.4, 在37℃

[1043] 将 $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (15.61 g, 100 mmol) 溶于milliQ水 (大约450 mL) 并在大约20℃用浓NaOH (水溶液) 和1 M NaOH (水溶液) 调节至pH=7.44。加水至500.00 mL。

[1044] 血清: 小型猪血清, 肝素-血浆

[1045] 从小型猪中抽取新鲜血液到9 mL LH锂肝素Vacuette管 (得自Greiner bio-one, 目录号455084)。在冰上冷却后, 将其离心 (10分钟, 4℃, 3000 rpm/1942G), 分离上清液并保存在-18℃备用。

[1046] 将100 nmol待测化合物溶于200 μL 缓冲液中, 加入到800 μL 血浆 (经离心) 并在37℃下孵育。以合适间隔将样品 (50 μL) 倒入150 μL 无水EtOH中。快速搅拌后, 将样品离心并将上清液转移至UPLC管 (10 μL 注射)。

[1047] 通过UPLC评价随时间的变化形成的母体药物相对于前体药物的%, 并计算半寿期, 在缓冲液方法下这两者都以与上述相同的方式进行。

[1048] 所得半寿期见下表1。用于比较, 天然GLP-1 (7-37) (SEQ ID NO: 1的His7变体) 在缓冲液中的 $T_{1/2}$ 为13分钟 (0.2小时)。

[1049] 表1

[1050]	实施例化合物编号	缓冲液中的 T _{1/2} (小时)	血浆中的 T _{1/2} (小时)
	1	9.6	3.6
	1a	1.5	n.d.
	1b	0.65	n.d.
	2*	42.5	27.5
	2a	10.5	4.6
	3	38.5	25.6
	3a*	7.5	5.0
	4*	58.9	27.9
	5*	37.9	32.2
	6	45.6	35.4
	6a	11.0	7.6

[1051] * 对于这些化合物,使用UPLC方法UPLC_B。对于所有其它化合物,使用UPLC_A。

[1052] n.d.:未测定。

[1053] 表1的结果显示在缓冲液的体外系统中,本发明的前体药物(实施例1、2、3和6)与相应的概念上不同的前体药物相比(分别与实施例1a和1b、2a、3a和6a相比)具有明显改善的半寿期。在血浆中证实了这一点(实施例2、3和6,分别与实施例2a、3a和6a相比)。

[1054] 这证明对于从前体药物向药物的转化并使之长而言,在体外我们可以控制转化常数k(比较图1)。

[1055] 实施例8:药物的体外效力(AlphaScreen, 膜)

[1056] 本实施例的目的是在体外测试例如本发明前体药物的GLP-1母体药物的活性或效力。

[1057] 如下所述地测定实施例B2.1、B2.2和B2.3的母体GLP-1药物的效力,即根据在含有表达人GLP-1受体的膜的培养基中环AMP(cAMP)形成的刺激。

[1058] 原理

[1059] 来自表达人GLP-1受体的稳定转染的细胞系BHK467-12A(tk-ts13)的纯化的质膜,用目标GLP-1药物刺激,并且使用来自Perkin Elmer Life Sciences的AlphaScreen™ cAMP测定试剂盒来测量cAMP产生的功效。AlphaScreen测定的基本原理是内源cAMP和外源添加的生物素-cAMP之间的竞争。cAMP的捕获通过使用缀合至受体珠的特异性抗体来实现。

[1060] 细胞培养和膜的制备

[1061] 选择稳定转染的细胞系和高表达克隆用于筛选。在5% CO₂下,细胞在DMEM,5%FCS,1% Pen/Strep(青霉素/链霉素)和优选0.5(或1.0 mg/ml)选择标记G418中培养。

[1062] 约80%汇合的细胞用PBS洗涤2次,并且用Versene(乙二胺四乙酸四钠盐的水溶液)收获,在1000 rpm离心5 min并去除上清液。其它步骤都在冰上进行。将细胞沉淀物通过Ultrathurax在10 ml缓冲液1(20 mM Na-HEPES, 10 mM EDTA, pH=7.4)中均质20-30秒钟,在20,000 rpm离心15分钟并且将沉淀重悬浮于10 ml缓冲液2(20 mM Na-HEPES, 0.1 mM EDTA, pH=7.4)中。将悬浮液均质20-30秒,并且在20,000 rpm离心15分钟。将悬浮在缓冲液2中、均质和离心重复一次,并且将膜重悬浮于缓冲液2中。确定蛋白浓度并将膜储存

在-80℃备用。

[1063] 在平底96孔板中进行测定 (Costar目录号: 3693)。每孔的终体积为50 μ l。

[1064] 溶液和试剂

[1065] 来自Perkin Elmer Life Sciences的AlphaScreen cAMP测定试剂盒 (目录号 6760625M); 含有抗cAMP受体珠 (10 U/ μ l)、链霉抗生物素供体珠 (10 U/ μ l) 和生物素化-cAMP (133 U/ μ l)。

[1066] AlphaScreen缓冲液, pH=7.4: 50 mM TRIS-HCl (Sigma, 目录号: T3253); 5 mM HEPES (Sigma, 目录号: H3375); 10 mM $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ (Merck, 目录号: 5833); 150 mM NaCl (Sigma, 目录号: S9625); 0.01% Tween (Merck, 目录号: 822184)。使用前将以下加入到AlphaScreen缓冲液中 (标示终浓度): BSA (Sigma, 目录号 A7906): 0.1%; IBMX (Sigma, 目录号 I5879): 0.5 mM; ATP (Sigma, 目录号 A7699): 1 mM; GTP (Sigma, 目录号 G8877): 1 μ M。

[1067] cAMP标准 (测定中的稀释因子= 5): cAMP溶液: 5 μ L 5 mM cAMP-储液+ 495 μ L AlphaScreen缓冲液。

[1068] 制备cAMP标准以及待测的GLP-1药物在AlphaScreen缓冲液中的合适稀释系列, 例如以下8个浓度的GLP-1化合物: 10^{-7} 、 10^{-8} 、 10^{-9} 、 10^{-10} 、 10^{-11} 、 10^{-12} 、 10^{-13} 和 10^{-14} M, 和从例如 10^{-6} 至 3×10^{-11} cAMP的系列。

[1069] 膜/受体珠

[1070] 从hGLP-1/ BHK 467-12A细胞制备膜, 浓度优选为6 μ g/孔 (或者3 μ g/孔), 对应于 0.6 mg/ml (每孔使用的膜量可能变化)

[1071] “无膜”: 在AlphaScreen缓冲液中的受体珠 (优选最终15 μ g/ml, 或者最终2单位/孔)

[1072] “6 (或者3) μ g/孔的膜”: 在AlphaScreen缓冲液中的膜 + 受体珠 (最终15 μ g/ml, 或者最终2单位/孔)

[1073] 将“无膜”的等分试样 (10 μ l) 加入到cAMP标准 (每孔重复两次) 和阳性对照和阴性对照

[1074] 将“6 (或者3) μ g/孔的膜”的等分试样 (10 μ l) 加入到GLP-1药物 (每孔重复两次或三次)。

[1075] 阳性对照: 10 μ l “无膜” + 10 μ l AlphaScreen缓冲液

[1076] 阴性对照: 10 μ l “无膜” + 10 μ l cAMP储液 (50 μ M)

[1077] 由于珠子对直接光敏感, 所以任何操作都在黑暗中 (尽可能暗) 或在绿光下进行。所有稀释在冰上进行。

[1078] 程序

[1079] 1. 制备AlphaScreen缓冲液。

[1080] 2. 将GLP-1药物/cAMP标准在AlphaScreen缓冲液中溶解和稀释。

[1081] 3. 通过混合链霉抗生物素供体珠 (2单位/孔) 和生物素化的cAMP (1.2单位/孔) 而制备供体珠溶液, 并且在黑暗中以室温下孵育20-30分钟。

[1082] 4. 将cAMP/GLP-1药物加入到板中: 10 μ l/孔。

[1083] 5. 制备膜/受体珠溶液, 并且将其加入到板中: 10 μ l /孔。

[1084] 6. 添加供体珠:30 μ l/孔。

[1085] 7. 将板包在铝箔中,并且在室温下在摇床上孵育3小时(非常慢)。

[1086] 8. 在AlphaScreen上计数-每块板在计数前在AlphaScreen中预孵育3分钟。

[1087] 结果

[1088] EC₅₀ [nM]值使用Graph-Pad Prism软件(版本5)进行计算并示于下表2。

[1089] 如有需要,相对于GLP-1的倍数变化可计算为EC₅₀ (GLP-1) / EC₅₀ (药物) - 3693.2。

[1090] 表2

实施例化合物编号	体外效力(EC ₅₀ /pM)
B2.1	100
比较化合物	50
(PCT/EP2011/069738 的实施例 75)	
B2.2	460
比较化合物	180
(WO 2011/080103 的实施例 29)	
B2.3	1300
比较化合物	220
(PCT/EP2011/069738 的实施例 38)	

[1092] 表2的结果证实所测的所有药物都具有令人满意的体外效力。与比较药物相比,对于本发明的药物,观察到稍微降低的效力,然而这是预料中的,并不令人气馁,并且绝不损害这些药物的预期用途。

[1093] 实施例9: 药物的体外效力(CRE荧光素酶;全细胞)

[1094] 本实施例的目的是测试例如本发明前体药物的GLP-1母体药物的活性或效力。体外效力是在全细胞测定中人GLP-1受体活化的度量。该方法是实施例8的方法的替代方法。

[1095] 如下所述地测定实施例B2.4和B2.5的母体GLP-1药物的效力。

[1096] 原理

[1097] 通过在报道基因测定中测量人GLP-1受体的反应来确定体外效力。所述测定在稳定转染的BHK细胞系中进行,所述细胞系表达人GLP-1受体并含有与启动子和萤火虫荧光素酶(CRE荧光素酶)基因偶联的cAMP反应元件(CRE)的DNA。当人GLP-1受体活化时,导致cAMP的产生,这反过来又导致荧光素酶蛋白的表达。当测定孵育完成时,加入荧光素酶的底物(萤光素),所述酶将萤光素转化为氧化萤光素,产生生物发光。测量所述发光用于测定的读出。

[1098] 为了试验所述衍生物与白蛋白的结合,如有需要,可在血清白蛋白不存在时以及在相当高浓度的血清白蛋白(1.0%最终测定浓度)存在时进行测定。在血清白蛋白存在时体外效力EC₅₀值的增加表明对血清白蛋白的亲合力并且代表了在动物模型中预测试底物的延长的药代动力学曲线的方法。

[1099] 细胞培养和制备

[1100] 本测定中使用的细胞(克隆FCW467-12A/KZ10-1)是BHK细胞,以BHKTS13为亲本细

胞系。所述细胞源自克隆 (FCW467-12A), 其表达人GLP-1受体并且通过进一步用CRE荧光素酶转染而建立, 以获得现有克隆。

[1101] 将细胞在5% CO₂在细胞培养基中培养。将其分成等分试样并贮存于液氮中。每次测定之前, 取出一份等分试样并在PBS中洗涤2次, 然后以所需浓度悬浮在测定特定的缓冲液中。对于96孔板, 制备悬液至终浓度为 5×10^3 细胞/孔。

[1102] 材料

[1103] 以下化学品用于测定: Pluronic F-68 (10%) (Gibco 2404)、人血清白蛋白 (HSA) (Sigma A9511)、卵白蛋白 (Sigma A5503)、DMEM w/o酚红 (Gibco 11880-028)、1 M Hepes (Gibco 15630)、Glutamax 100x (Gibco 35050) 和steadylite plus (PerkinElmer 6016757)。

[1104] 细胞培养基由含有10% FBS (胎牛血清; Invitrogen 16140-071)、1 mg/ml G418 (Invitrogen 15140-122)、240 nM MTX (甲氨蝶呤; Sigma M9929) 和1% pen/strep (青霉素/链霉素; Invitrogen 15140-122) 的DMEM培养基组成。

[1105] 测定培养基由DMEM w/o酚红、10mM Hepes和1x Glutamax组成。1%测定缓冲液由含2%卵白蛋白、0.2% Pluronic F-68和2 % HAS的测定培养基组成。0%测定缓冲液由含2%卵白蛋白和0.2% Pluronic F-68的测定培养基组成。

[1106] 程序

[1107] 1) 将细胞储液在37°C水浴中融化。

[1108] 2) 将细胞在PBS中洗涤3次。

[1109] 3) 对细胞进行计数并在测定培养基中调节至 5×10^3 细胞/50 μ l (1×10^5 细胞/ml)。将50 μ l的细胞等分试样转移至测定板的各孔中。

[1110] 4) 将测试化合物和参考化合物的储液在0%测定缓冲液中稀释至浓度0.2 μ M, 用于0% HSA CRE荧光素酶测定, 和在1%测定缓冲液中稀释至浓度0.2 μ M, 用于1% HSA CRE荧光素酶测定。将化合物稀释10倍, 得到以下浓度: 2×10^{-7} M、 2×10^{-8} M、 2×10^{-9} M、 2×10^{-10} M、 2×10^{-11} M、 2×10^{-12} M、 2×10^{-13} M和 2×10^{-14} M。

[1111] 5) 将50 μ l的化合物或空白的等分试样从稀释板转移到测定板。以以下终浓度测试化合物: 1×10^{-7} M、 1×10^{-8} M、 1×10^{-9} M、 1×10^{-10} M、 1×10^{-11} M、 1×10^{-12} M、 1×10^{-13} M和 1×10^{-14} M。

[1112] 6) 将测定板在5% CO₂温箱中在37°C下孵育3小时。

[1113] 7) 将测定板从温箱中取出并在室温下放置15分钟。

[1114] 8) 将100 μ l steadylite plus试剂的等分试样加入到测定板的各孔中 (试剂是光敏的)。

[1115] 9) 各测定板都用铝箔覆盖以避光并在室温下振摇30分钟。

[1116] 10) 各测定板在Packard TopCount NXT仪上读数。

[1117] 计算和结果

[1118] 将来自TopCount仪的数据转移到GraphPad Prism软件。该软件进行非线性回归 (log (激动剂) vs反应)。通过该软件计算并以pM报告的EC₅₀值, 示于下表3。

[1119] 每个样品测定最少两次重复。所报告的值是重复测定的平均值。

[1120] 表3:

	实施例化合物编号	体外效力(EC_{50} /pM)
		0% HSA
[1121]	B2.4	4.0
	B2.5	31
	基准化合物	25
(PCT/EP2011/069738 的实施例 38)		

[1122] 表3的结果证实所测的两种药物具有令人满意的体外效力,通常与基准化合物不分上下。

[1123] 实施例10: GLP-1受体结合

[1124] 本实验的目的是测试本发明前体药物的GLP-1母体药物的受体结合活性。受体结合是母体药物对人GLP-1受体的亲和力的度量。如下所述地测试实施例B2.1、B2.2、B2.3、B2.4和B2.5的母体GLP-1药物。

[1125] 原理

[1126] 在竞争性结合测定中测量GLP-1药物对人GLP-1受体的受体结合。在这类测定中,标记的配体(在此例中为 125 I-GLP-1)与受体结合。以系列浓度将每种药物加入到含有人GLP-1受体的分离的膜上,并监测标记配体的置换。受体结合报告为从受体中置换半数标记配体的浓度, IC_{50} 值。

[1127] 为了在白蛋白存在时测试药物与受体的结合,可在非常低浓度的血清白蛋白(优选最大0.001%最终测定浓度(或者0.005% - 对应于其在示踪物中的残余量)中、以及在相当高浓度的血清白蛋白(2.0%最终测定浓度)存在时进行测定。在血清白蛋白存在时 IC_{50} 值的增加表明对血清白蛋白的亲合力并且代表了在动物模型中预测测试底物的延长的药代动力学曲线的方法。

[1128] 材料

[1129] 以下化学品用于测定:人血清白蛋白(HSA) (Sigma A1653)、DMEM w/o酚红(Gibco 11880-028)、Pen/strep (Invitrogen 15140-122)、G418 (Invitrogen 10131-027)、1 M HEPES (Gibco 15630)、EDTA (Invitrogen 15575-038)、PBS (Invitrogen 14190-094)、胎牛血清 (Invitrogen 16140-071)、EGTA、 $MgCl_2$ (Merck 1.05832.1000)、Tween 20 (Amresco 0850C335)、SPA颗粒(小麦胚芽凝集素(WGA) SPA珠, Perkin Elmer RPNQ0001)、 $[^{125}I]$ -GLP-1-(7-36) NH_2 (内部生产的)、OptiPlate™-96 (Packard 6005290)。

[1130] 缓冲液1由20 mM Na-HEPES加上10 mM EDTA组成并且调节pH至7.4。缓冲液2由20 mM Na-HEPES加上0.1 mM EDTA组成并且调节pH至7.4。测定缓冲液由50 mM HEPES补充有5 mM EGTA、5 mM $MgCl_2$ 、0.005% Tween 20组成并且调节pH至7.4。8%白蛋白储液由以8% (w/v) 溶于测定缓冲液的HAS组成。0.02%白蛋白储液由以0.02% (w/v) 溶于测定缓冲液的HAS组成。

[1131] 细胞培养和膜的制备

[1132] 物种(体外): 仓鼠

[1133] 生物终点: 受体结合

[1134] 测定方法: SPA

[1135] 受体: GLP-1受体

[1136] 细胞系: BHK tk-ts13

[1137] 本测定中使用的细胞(克隆FCW467-12A)是BHK细胞,以BHKTs13为亲本细胞系。所述细胞表达人GLP-1受体。

[1138] 细胞在5% CO₂在DMEM、10%胎牛血清、1% Pen/Strep (青霉素/链霉素)和1.0 mg/ml选择标记G418中培养。为了进行膜制备,将细胞生长至大约80%汇合。细胞在磷酸盐缓冲盐水中洗涤2次并收获,例如用Versene (乙二胺四乙酸四钠盐的水溶液)收获,例如在1000 rpm快速离心5分钟,去除上清液。将细胞沉淀物保持在冰上。将细胞沉淀物通过ULTRA-THURAX™分散器在合适量的缓冲液1 (例如10 ml或10-20 ml)中均质20-30秒钟。均质液在例如20,000 rpm离心15分钟。将沉淀物重悬浮(均质的)于合适量(例如10 ml或10-20 ml)的缓冲液2中,并如上所述地离心。该步骤再重复一次。将所得沉淀物重悬浮于缓冲液2中并测定蛋白浓度。将膜分成等分试样并贮存于-80℃。

[1139] 程序

[1140] 对于SPA结合测定,将测试化合物、膜、SPA-颗粒和[¹²⁵I]-GLP-1 (7-36) NH₂在测定缓冲液中稀释。将25 μl (微升)测试化合物加入到Optiplate。加入缓冲液(含有0.005% HAS的“低白蛋白”实验) (50 μl)。加入5-10 μg 蛋白/样品 (50μl),对应于0.1 - 0.2 mg 蛋白/ml (优选对于每种膜制剂进行优化)。以0.5 mg/孔 (50 μl)的量添加SPA颗粒(小麦胚芽凝集素SPA珠, Perkin Elmer, #RPNQ0001)。用[¹²⁵I]-GLP-1 (7-36) NH₂ (终浓度0.06 nM,对应于49.880 DPM, 25μl)开始孵育。用PlateSealer将板密封,并且在30℃下孵育120分钟,同时摇动。将板进行离心(1500 rpm,10分钟)并在Topcounter中计数。优选按照以下程序:

[1141] 1. 对于受体结合测定,在低HSA (0.005%)存在时,将50 μl测定缓冲液加入到测定板各孔中。测定继续用步骤3。

[1142] 2. 对于受体结合测定,在高HSA (2%)存在时,将50 μl 8%白蛋白储液加入到测定板各孔中。测定继续用步骤3。

[1143] 3. 系列稀释测试化合物,得到以下浓度:8x10⁻⁷ M、8x10⁻⁸ M、8x10⁻⁹ M、8x10⁻¹⁰ M、8x10⁻¹¹ M、8x10⁻¹² M和8x10⁻¹³ M。将25 μl加入到测定板的合适孔中。

[1144] 4. 将细胞膜等分试样融化并稀释至它们的工作浓度。将50 μl加入到测定板各孔中。

[1145] 5. 以20 mg/ml,将WGA SPA珠悬浮于测定缓冲液中。将悬液在测定缓冲液中稀释至10 mg/ml,立即加入到测定板中。将50 μl加入到测定板各孔中。

[1146] 6. 通过将25 μl 480 pM [¹²⁵I]-GLP-1-(7-36) NH₂溶液加入到测定板各孔中,开始孵育。保留25 μl等分试样用于测定总计数/孔。

[1147] 7. 将测定板在30℃孵育2小时。

[1148] 8. 将测定板离心10分钟。

[1149] 9. 将测定板在Packard TopCount NXT仪上读数。

[1150] 计算

[1151] 将来自TopCount仪的数据转移到GraphPad Prism软件。该软件对重复测定值进行平均并进行非线性回归。通过该软件计算IC₅₀值并以nM报告。

[1152] 结果

[1153] 结果见下表4。

[1154] 表4

	实施例化合物编号	受体结合
		低白蛋白 (IC ₅₀ /nM)
[1155]	B2.1	4.42
	比较化合物(PCT/EP2011/069738 的实施例 75)	0.68
	B2.2	14.8
	比较化合物(WO 2011/080103 的实施例 29)	1.90
	B2.3	28
	比较化合物(PCT/EP2011/069738 的实施例 38)	5.80
	B2.4	0.09
	B2.5	0.22

[1156] 表4的结果证实所测的所有药物都具有令人满意的生物活性,测定为在低浓度白蛋白存在时与GLP-1受体的结合。当与比较药物(如果合适的话)相比时,对于本发明的某些药物,观察到稍微降低的活性,然而这是预料中的,并不令人气馁,绝不损害这些药物的预期用途。

[1157] 实施例11: 对DPP-IV降解的抗性

[1158] 本实验的目的是测定二肽基肽酶-4 (DPP-IV) 对本发明前体药物的母体药物的降解。

[1159] 如下所述地测试了实施例B2.1的母体GLP-1药物的稳定性。

[1160] 缓冲液

[1161] HEPES缓冲液 (50 mM HEPES缓冲液,含有0.005 %Tween 20, pH 7.4)

[1162] 10 ml 1 M HEPES + 100 μ l 10 %Tween 20,调节至pH 7.4并添加MilliQ水200 mL稀释

[1163] 储液

[1164] 含BSA的母体GLP-1药物的储液

[1165] 1.0 mM/HEPES缓冲液0.1 % BSA (Sigma目录号A9418)

[1166] 不含BSA的母体GLP-1药物的储液

[1167] 1.0 mM/hepes缓冲液pH 7.4

[1168] DPP-IV的储液

[1169] DPP-IV是重组二肽基肽酶, R&D Systems, 目录号1180-SE

[1170] 50 μ l DPP-IV (0.2 mg/mL), 25 mM MES, 0.7 M NaCl, pH 5.0

[1171] DPP-IV的工作溶液

[1172] 将200 μ l 25 mM TRIS pH 8.0加入到储液管(DPP-IV浓度40 μ g/mL)。

[1173] 临用之前:将210 μ l (40 μ g/ml)加入210 μ l 50 mM HEPES (DPP-IV浓度20 μ g/mL)

[1174] 孵育

[1175] 各板的预孵育

[1176] 最少30分钟, 37℃, 用600 μ l 0.1%卵白蛋白。然后在4℃放置过夜并用50 mM HEPES洗涤。

[1177] 实验之前

[1178] 最少150分钟, 用HEPES缓冲液, 在37℃

[1179] 盘

[1180] Costar 96-半深孔 (cci-3957)

[1181] 总孵育体积

[1182] 300 μ L

[1183] 孵育所有

[1184] 267 μ L 50 HEPES缓冲液 T ÷ 150分钟

[1185] 3 μ L化合物 (1.0 mM) $\pm$ BSA T ÷ 150分钟

[1186] 30 μ L工作酶溶液 T ÷ 0分钟

[1187] 孵育时间

[1188] 1- 30- 60- 120- 180和1440分钟 (37℃)

[1189] 孵育终止

[1190] 通过将25 μ l样品移入150 μ l冷却的1% TFA/EtOH中而终止反应。将样品收集到v-形96孔板 (聚丙烯, Costar 3957), (目录号cci-3957))。封闭样品并保持在冰上, 直到分析。

[1191] 分析

[1192] 在非包被的96孔板 (聚丙烯, WATERS编号186002643) 中上清液的LC-MS分析

[1193] 将样品在50%乙腈 (1%甲酸) (20 μ L + 80 μ L) 中稀释5倍并用UPLC-MS分析。

[1194] 结果

[1195] 不含BSA的结果见下表5, 含BSA的结果见下表6。

[1196] 表5: 母体GLP-1肽药物的浓度与时间 (不含BSA)

[1197]	时间(t)/分钟	ln (浓度)
	1440	4.45
	183	4.64
	120	4.50
	60	4.63
	32	4.59
	1.0	4.61

[1198] 表6: 母体GLP-1肽药物的浓度与时间 (含BSA)

	时间(t)/分钟	ln (浓度)
	1440	4.47
	183	4.58
[1199]	120	4.40
	60	4.58
	32	4.61
	1.0	4.61

[1200] 根据总离子计数,测定母体GLP-1药物和经DPP-IV切割的药物的量,并且根据拟合至ln (%母体GLP-1药物) (Y)与时间(t)的曲线的线性测定 $T_{1/2}$,如下:

	Math 3:	$Y(t) = +\alpha t + k$
	Math 4:	$T_{1/2} = \ln 2 / \alpha$
[1201]	$T_{1/2}$ (+BSA):	3466 分钟
	$T_{1/2}$ (+ 0.001% BSA):	2311 分钟

[1202] 实施例12: 在小型猪中的药代动力学研究

[1203] 对于从前体药物向药物的转化并使之长而言,本文的实施例7提供了在体外我们可以控制转化常数k (比较图1)的证据。

[1204] 将在体内的其它反应/机制加诸于其上,使图变得更复杂,例如清除率。

[1205] 本研究的目的是:在经i.v.给予小型猪之后,测定本发明的前体药物(实施例4)和相应的母体药物(实施例B2.2)的体内的药代动力学(PK)曲线,例如它们在体内时间的延长以及它们作用时间的延长。这在PK研究中进行,其中测定目标化合物的终末半寿期。终末半寿期通常是指在最初的分布期之后测定的某一血浆浓度减半所花费的时间。

[1206] 研究中使用3只雌性Göttingen小型猪,得自Ellegaard Göttingen小型猪(Dalmoose, Denmark),大约6-8月龄,体重大约16-21 kg (前体药物猪16.8 kg, 药物猪21.3和21.1 kg)。将小型猪单独圈养并用SDS小型猪饲料(Special Diets Services, Essex, UK)每天限制性喂食1次。

[1207] 适应至少2周之后,在每个动物中在尾侧腔静脉中植入永久中心静脉导管。

[1208] 动物在施药前大约18小时和施药后0-4小时禁食,但在整个周期中随意饮水。

[1209] 将实施例4的前体药物和实施例B2.2的相应的药物溶于50 mM磷酸钠、145 mM氯化钠、0.05%聚山梨酯80、pH 7.4至合适的浓度(例如169.6 nmol/ml,对于前体药物)。通过导管给予静脉内注射(对于前体药物,体积对应于8 nmol/kg,对于化合物药物,体积对应于3 nmol/kg),在施药后12天在预定时间点采集血液样品。将血液样品(对于药物为0.8 ml,对于前体药物为1.5 ml)采集到EDTA缓冲液(8mM)中,然后在4℃以1942G离心10分钟。离心后,将前体药物血浆转移ASAP到微型管中:300 μ l用于分析相应的GLP-1化合物和snap-冷冻ASAP (干冰)。离心后,将药物血浆吸取到在干冰上的微型管中,并且保持在-20℃直到使用ELISA或类似基于抗体的测定法例如LOCI或LC-MS分析各自GLP-1化合物的血浆浓度。个体血浆浓度-时间曲线通过在WinNonlin v. 5.0或Phoenix v. 6.2 (Pharsight Inc., Mountain View, CA, USA)或用于PK分析的其它相关软件中的非区室模型进行分析,并绘

制血浆浓度 (pM) 对时间 (h) 的曲线, 参见图2和3。另外, 如果可能的话, 测定所得的终末半寿期 (调和平均值/h)。

[1210] 结果

[1211] 半寿期结果见下表7。

[1212] 对于在实验期间转化的前体药物化合物, 我们在前体药物研究中已经估计了药物的表观终末半寿期。因为我们无法将数据拟合到模型, 所以我们无法预测曲线的最末端部分。因此所观察到的68小时的半寿期是根据所观察的钟形曲线形式而估计的, 所述曲线形式是一系列复杂平衡的产物。单个数据无法拟合到两区室模型, 因为过多的参数化 (over parameterisation) (与统计材料相比, 两个多变量)。

[1213] 表7: 母体GLP-1肽药物在体内的终末半寿期 (调和平均值)

实施例化合物编号	终末半寿期(调和平均值/h)
[1214] 4	相应药物的表观终末半寿期: 68 h (估计值)
B2.2	37h

[1215] 本实施例证实, 与前体药物向药物的转化常数k相比, 对于 (前体药物和药物) 的清除反应, 转化常数 K_c 非常低 (比较图1)。

[1216] 因此, 本实施例构成了在体内的前体药物概念的证据。

[1217] 值得注意的是, 作为结果, 我们得到药物的理想的钟形曲线, 即改善的血浆水平曲线, 而没有高的起始血浆浓度 (在该情况下我们将会冒着进入毒性水平的风险)。使用前体药物的优化剂量, 钟形血浆水平曲线在相关治疗窗内允许达到更长持续的药效动力学效应。

[1218] 图2显示在小型猪中测定的前体药物和母体药物的PK曲线 (菱形表示前体药物测定, 方形表示母体药物测定)。

[1219] 图3显示给予的母体药物本身 (非前体药物) 的PK曲线。当与图2的PK曲线相比时, 我们发现了差异: 图3是类似于前体药物的曲线, 而不是理想的钟形。

[1220] 尽管本发明的某些特征已经在本文中进行了说明和描述, 但是许多修改、替换、改变和等同物现在对于本领域普通技术人员而言将会发生。因此, 应当理解, 所附权利要求旨在覆盖落在本发明的真实精神内的所有此类修改和改变。

序列表

<110> Novo Nordisk A/S

<120> GLP-1 前体药物

<130> 8409.204-W0

<160> 1

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 30

<212> PRT

[0001] <213> 智人

<220>

<221> 母体肽

<222> (1).. (30)

<223> GLP-1 (8-37)

<400> 1

Ala Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Gly Gln
1 5 10 15

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

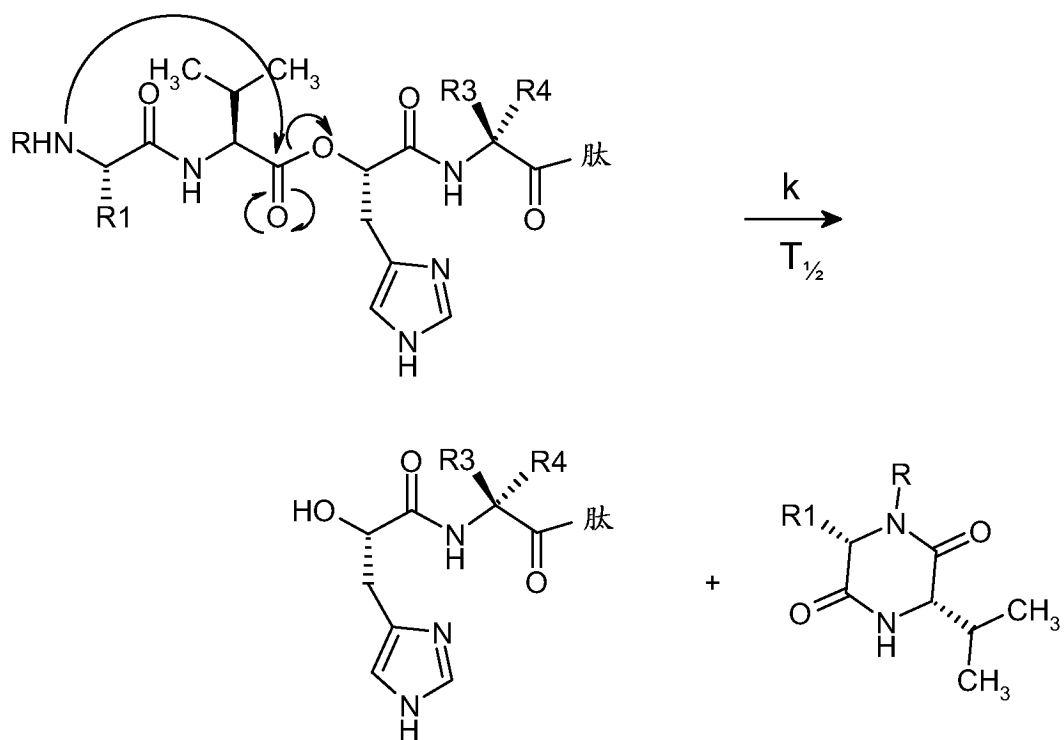


图 1

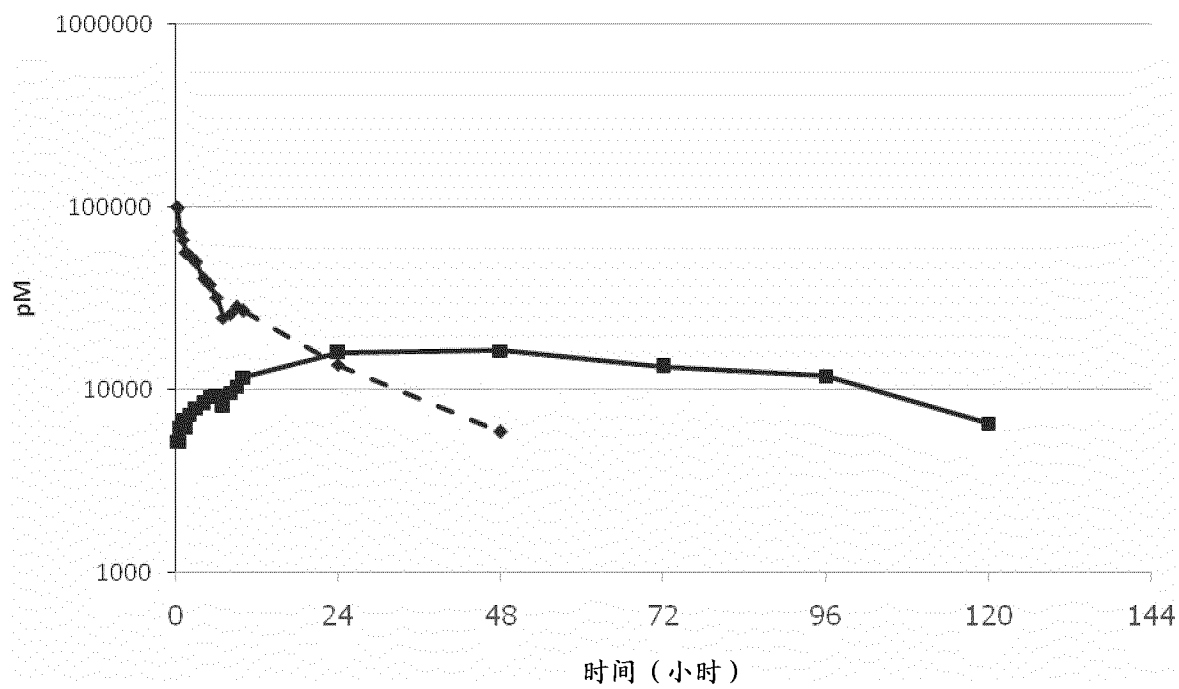


图 2

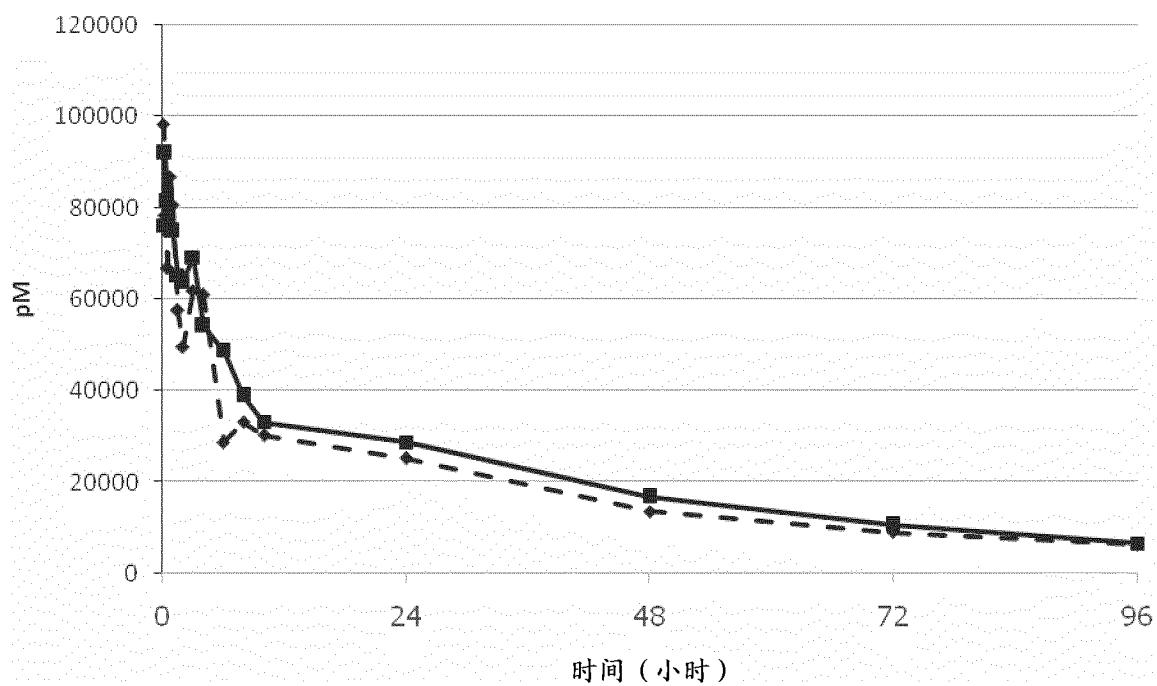


图 3