



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104402989 A

(43) 申请公布日 2015. 03. 11

(21) 申请号 201410513914. 8

A61P 25/28(2006. 01)

(22) 申请日 2006. 03. 20

A61P 9/10(2006. 01)

(30) 优先权数据

A61P 1/00(2006. 01)

05102171. 5 2005. 03. 18 EP

A61P 1/14(2006. 01)

A61P 1/04(2006. 01)

(62) 分案原申请数据

200680006674. 6 2006. 03. 20

(71) 申请人 诺和诺德公司

地址 丹麦鲍斯韦

(72) 发明人 J·劳 F·Z·多沃尔德

H·斯蒂芬森 P·布洛克

T·K·汉森 K·迈德森

(74) 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专

利商标事务所 11038

代理人 刘晓东

(51) Int. Cl.

C07K 14/605(2006. 01)

A61K 38/26(2006. 01)

A61P 3/10(2006. 01)

A61P 3/04(2006. 01)

A61P 9/12(2006. 01)

A61P 3/06(2006. 01)

权利要求书10页 说明书48页

序列表21页

(54) 发明名称

酰化的 GLP-1 化合物

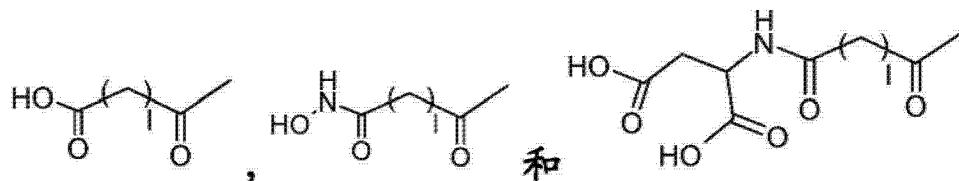
(57) 摘要

本发明涉及长效 GLP-1 化合物及其治疗用途。

t 是 0、1、2、3 或 4，

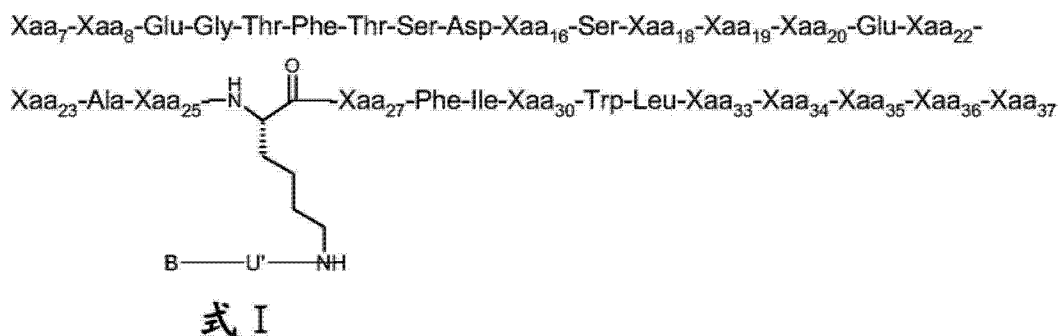
p 是 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22 或 23；

并且其中 B 是选自下列的酸性基团：



其中 1 是 12、13、14、15、16、17、18、19 或 20。

7. GLP-1 类似物，所述的类似物是式 I (SEQ ID No. 2) 的化合物：



其中

Xaa₇ 是 L- 组氨酸、咪唑并丙酰基、α- 羟基- 组氨酸、D- 组氨酸、脱氨基- 组氨酸、2- 氨基- 组氨酸、β- 羟基- 组氨酸、高组氨酸、N^α- 乙酰基- 组氨酸、N^α- 甲酰基- 组氨酸、α- 氟甲基- 组氨酸、α- 甲基- 组氨酸、3- 吡啶丙氨酸、2- 吡啶丙氨酸或 4- 吡啶丙氨酸

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；

Xaa₁₆ 是 Val 或 Leu；

Xaa₁₈ 是 Ser、Lys 或 Arg；

Xaa₁₉ 是 Tyr 或 Gln；

Xaa₂₀ 是 Leu 或 Met；

Xaa₂₂ 是 Gly、Glu 或 Aib；

Xaa₂₃ 是 Gln、Glu、Lys 或 Arg；

Xaa₂₅ 是 Ala 或 Val；

Xaa₂₇ 是 Glu 或 Leu；

Xaa₃₀ 是 Ala、Glu 或 Arg；

Xaa₃₃ 是 Val 或 Lys；

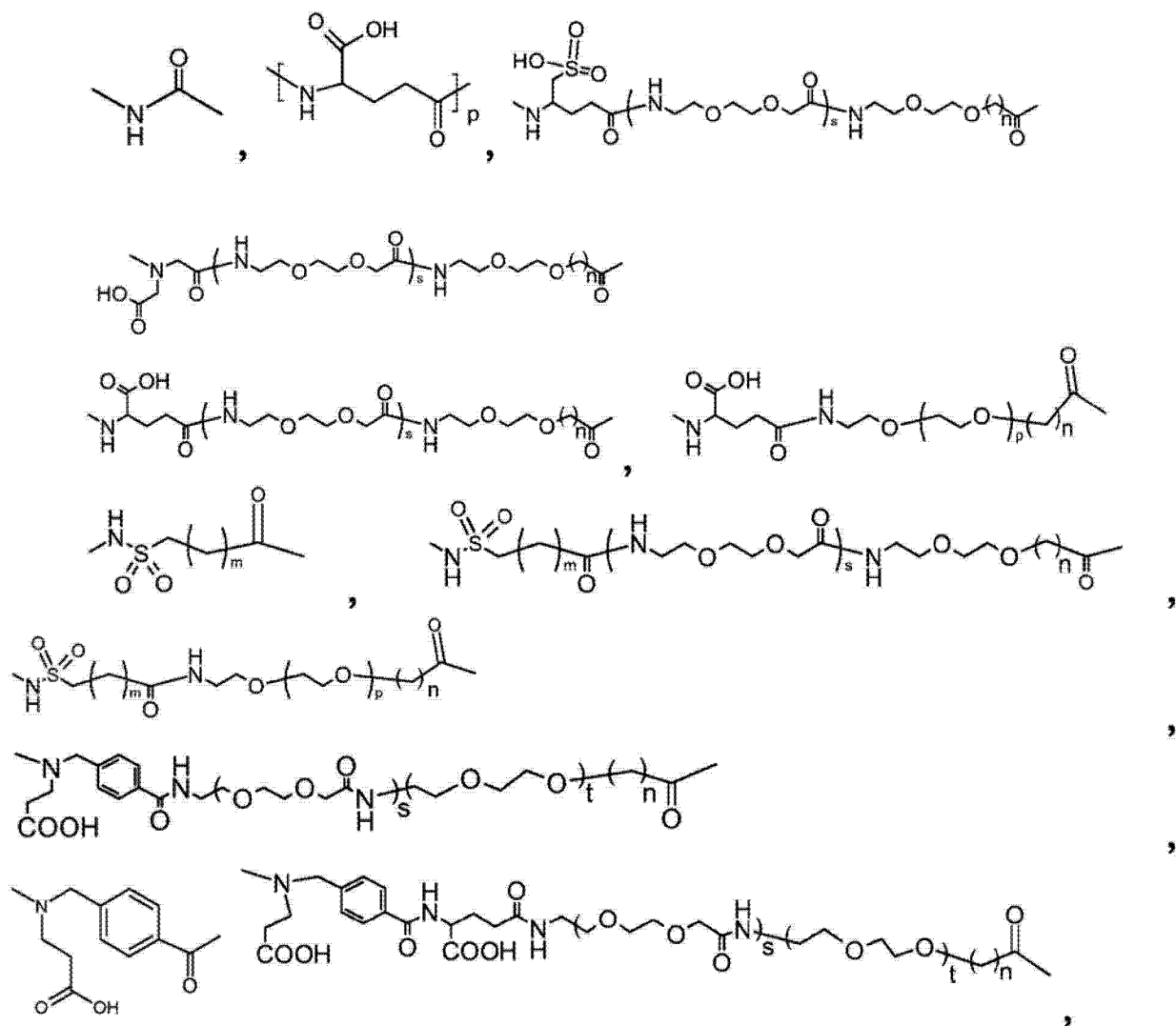
Xaa₃₄ 是 Lys、Glu、Asn 或 Arg；

Xaa₃₅ 是 Gly 或 Aib；

Xaa₃₆ 是 Arg、Gly 或 Lys，或缺失；

Xaa₃₇ 是 Gly、Ala、Glu、Pro、Lys，或缺失；

并且 B 和 U' 一起是酰化的部分，其中 U' 选自



m 是 0、1、2、3、4、5 或 6，

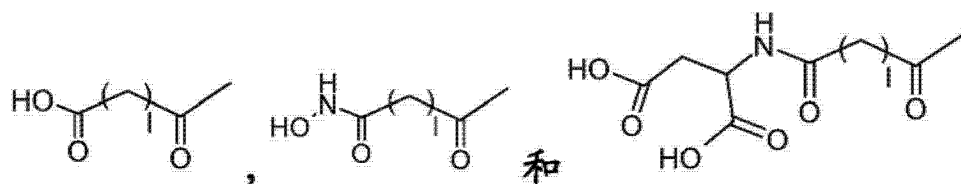
n 是 1、2 或 3，

s 是 0、1、2 或 3，

t 是 0、1、2、3 或 4，

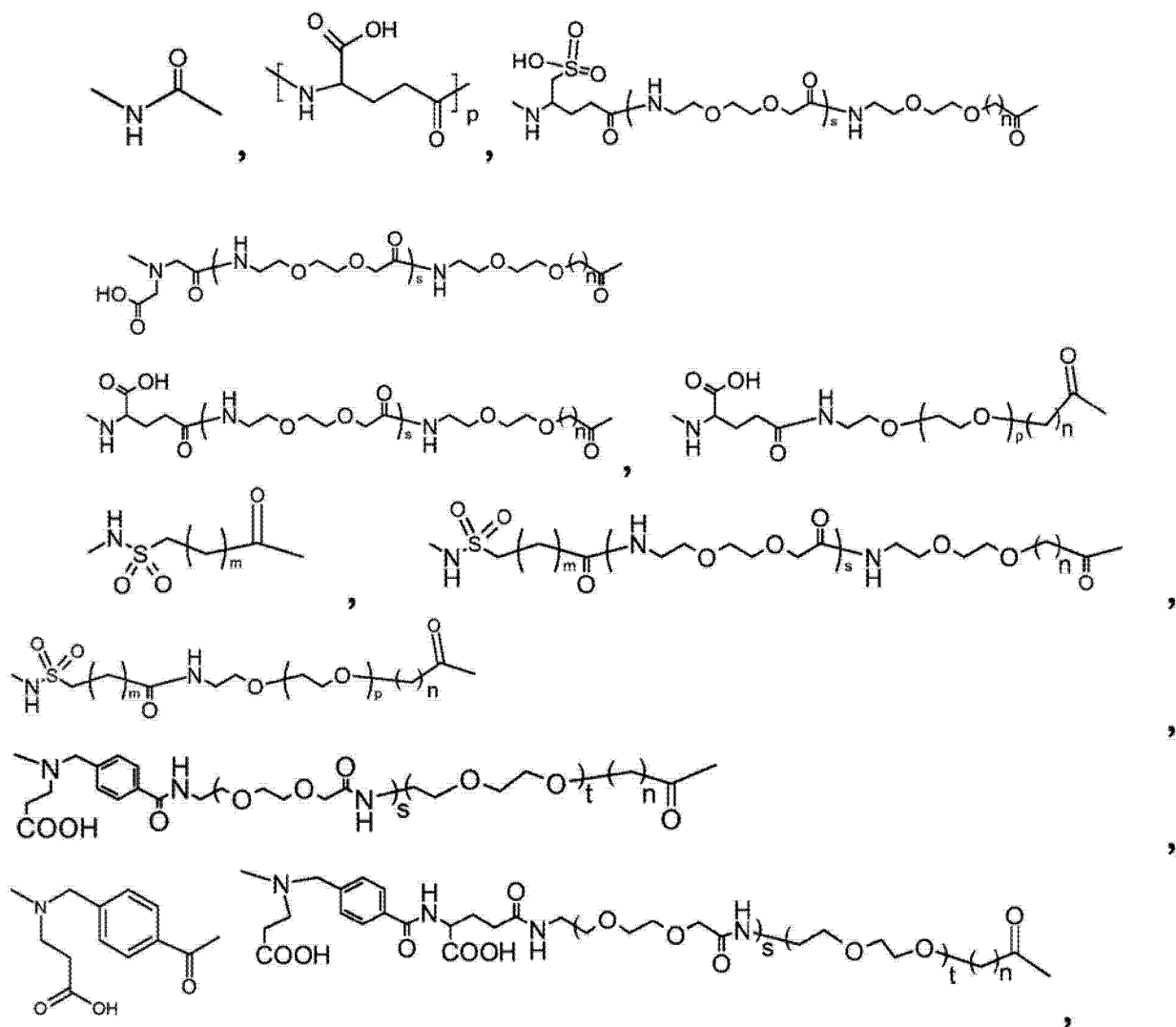
p 是 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22 或 23；

并且其中 B 是选自下列的酸性基团



其中 1 是 12、13、14、15、16、17、18、19 或 20。

8. 根据权利要求 6-7 的 GLP-1 类似物，其中 U' 选自



m 是 2、3、4 或 5,

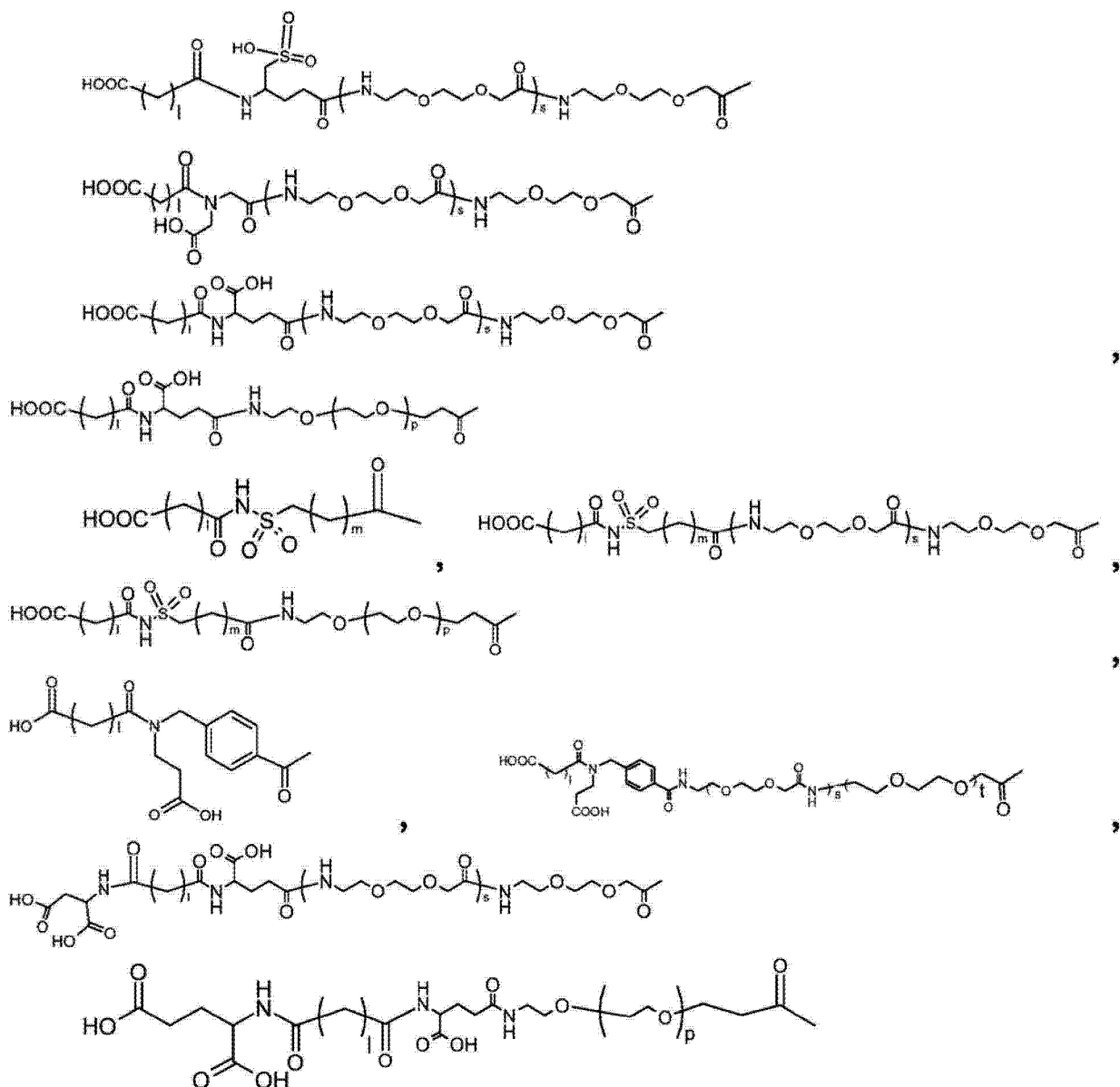
n 是 1 或 2,

s 是 0、1 或 2,

t 是 0、1、2 或 3,

p 是 1、2、3、4、7、11 或 23。

9. 根据权利要求 6-8 的 GLP-1 类似物, 其中 B-U' - 是



其中 l 是 14、15、16、17、18、19 或 20,

p 是 1、2、3、4、7、8、9、10、11 或 12,

s 是 0、1 或 2,

t 是 0 或 1；

m 是 2、3 或 4。

10. 根据权利要求 9 的 GLP-1 类似物, 其中

其中 l 是 14、15、16、17 或 18,

p 是 1、2、3、4 或 11,

s 是 0、1 或 2,

t 是 0 或 1。

11. 根据权利要求 6-10 任一项的 GLP-1 类似物, 其中 s 是 1。

12. 根据权利要求 6-10 任一项的 GLP-1 类似物, 其中 1 是 16。

13. 根据权利要求6-10 任一项的 GLP-1 类似物, 其中 p 是 3 或 4。

14. 根据权利要求 6-10 任一项的 GLP-1 类似物, 其中 n 是 1。

15. 根据权利要求 7-14 任一项的 GLP-1 类似物, 其中

Xaa₇ 是 His 或脱氨基 - 组氨酸;

Xaa₈ 是 Ala、Gly、Val、Leu、Ile、Lys 或 Aib;

Xaa₁₆ 是 Val;

Xaa₁₈ 是 Ser;

Xaa₁₉ 是 Tyr;

Xaa₂₀ 是 Leu;

Xaa₂₂ 是 Gly、Glu 或 Aib;

Xaa₂₃ 是 Gln 或 Glu;

Xaa₂₅ 是 Ala;

Xaa₂₇ 是 Glu;

Xaa₃₀ 是 Ala 或 Glu;

Xaa₃₃ 是 Val;

Xaa₃₄ 是 Lys 或 Arg;

Xaa₃₅ 是 Gly 或 Aib;

Xaa₃₆ 是 Arg 或 Lys;

Xaa₃₇ 是 Gly、酰胺或缺失。

16. 根据权利要求 15 的 GLP-1 类似物, 其中

Xaa₇ 是 His

Xaa₈ 是 Gly 或 Aib;

Xaa₁₆ 是 Val;

Xaa₁₈ 是 Ser;

Xaa₁₉ 是 Tyr;

Xaa₂₀ 是 Leu;

Xaa₂₂ 是 Glu 或 Aib;

Xaa₂₃ 是 Gln;

Xaa₂₅ 是 Ala;

Xaa₂₇ 是 Glu;

Xaa₃₀ 是 Ala;

Xaa₃₃ 是 Val;

Xaa₃₄ 是 Lys 或 Arg;

Xaa₃₅ 是 Gly 或 Aib;

Xaa₃₆ 是 Arg;

Xaa₃₇ 是 Gly。

17. 根据权利要求 1-15 任一项的 GLP-1 类似物, 其中所述的 GLP-1 类似物包含在 GLP-1 (7-37) 序列位置 7 的 N-端 L-组氨酸的修饰。

18. 根据权利要求 17 的 GLP-1 类似物, 其中所述的 GLP-1 类似物包含咪唑并丙酰基⁷、 α -羟基-组氨酸⁷或 N-甲基-组氨酸⁷、D-组氨酸⁷、脱氨基-组氨酸⁷、2-氨基-组氨酸⁷、 β -羟基-组氨酸⁷、高组氨酸⁷、N^a-乙酰基-组氨酸⁷、 α -氟甲基-组氨酸⁷、 α -甲

基-组氨酸⁷、3-吡啶丙氨酸⁷、2-吡啶丙氨酸⁷或4-吡啶丙氨酸⁷。

19. 根据权利要求1-18任一项的GLP-1类似物,其中所述的GLP-1类似物包含用另一种氨基酸残基对GLP-1(7-37)序列位置8的L-丙氨酸的取代。

20. 根据权利要求19的GLP-1类似物,其中所述的GLP-1类似物包含Aib⁸、Gly⁸、Val⁸、Ile⁸、Leu⁸、Ser⁸、Thr⁸、(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。

21. 根据权利要求20的GLP-1类似物,其中所述的GLP-1类似物包含Aib⁸。

22. 根据上述权利要求任一项的GLP-1类似物,其中所述的GLP-1类似物与GLP-1(7-37)(SEQ ID No. 1)比较包含不超过15个已被交换、加入或缺失的氨基酸残基。

23. 根据权利要求22的GLP-1类似物,其中与GLP-1(7-37)(SEQ ID No. 1)比较有不超过10个已被交换、加入或缺失的氨基酸残基。

24. 根据权利要求23的GLP-1类似物,其中所述的GLP-1类似物与GLP-1(7-37)(SEQ ID No. 1)比较包含不超过6个已被交换、加入或缺失的氨基酸残基。

25. 根据任意上述权利要求的GLP-1类似物,其中所述的GLP-1类似物包含不超过3个不是由遗传密码编码的氨基酸残基。

26. 根据上述权利要求任意一项的GLP-1类似物,其中所述的GLP-1类似物只包含一个赖氨酸残基。

27. 根据任意上述权利要求的GLP-1类似物,所述的GLP-1类似物是

Aib⁸, Arg³⁴-GLP-1(7-37),

Aib^{8,22}, Arg³⁴-GLP-1(7-37),

Arg³⁴-GLP-1(7-37),

[3-(4-咪唑基)丙酰基⁷, Arg³⁴]GLP-1-(7-37)肽,

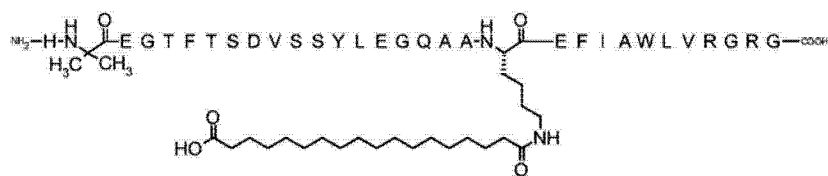
Gly⁸, Arg³⁴-GLP-1(7-37),

Aib⁸, Arg³⁴, Pro³⁷-GLP-1(7-37),

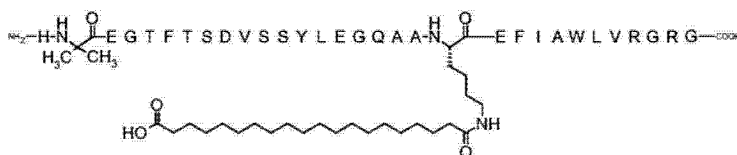
Aib^{8,22,27,30,35}, Arg³⁴, Pro³⁷-GLP-1(7-37)酰胺,

它们都在位置26由B-U'取代。

28. 根据上述权利要求任意一项的化合物,所述的化合物选自



N-ε²⁶-(17-羧基十七烷酰)-[Aib8, Arg34]GLP-1-(7-37)-肽,



N-ε²⁶-(19-羧基十九烷酰)-[Aib8, Arg34]GLP-1-(7-37)-肽,





31. 一种药物组合物,所述的药物组合物包含根据权利要求 1-28 任意一项的化合物和可药用赋形剂。

32. 根据权利要求 31 的药物组合物,所述的药物组合物适合肠胃外施用。

33. 根据权利要求 1-28 任意一项的化合物在制备药物中的用途。

34. 根据权利要求 1-28 任意一项的化合物的用途,其中所述的化合物用于制备治疗或预防高血糖症、2 型糖尿病、葡萄糖耐量降低、1 型糖尿病、肥胖症、高血压、X 综合征、血脂障碍、认知障碍、动脉粥样硬化、心肌梗塞、冠心病和其它心血管疾病、中风、炎性肠综合征、消化不良和胃溃疡的药物。

35. 根据权利要求 1-28 任意一项的化合物的用途,其中所述的化合物用于制备延缓或预防 2 型糖尿病发展的药物。

36. 根据权利要求 1-28 任意一项的化合物的用途,其中所述的化合物用于制备减少食物摄取、减少 β -细胞凋亡、增加 β -细胞功能和 β -细胞量和 / 或恢复 β -细胞的葡萄糖敏感性的药物。

酰化的 GLP-1 化合物

[0001] 本申请是申请日为 2006 年 3 月 20 日、发明名称为“酰化的 GLP-1 化合物”的中国发明专利申请 No. 200680006674.6 的分案申请。

发明领域

[0002] 本发明涉及治疗性肽领域,即涉及新的长效 GLP-1 化合物。

[0003] 发明背景

[0004] 一系列不同方法已经用于修饰胰高血糖素样肽 1 (GLP-1) 化合物的结构以便提供体内更长的作用持续时间。

[0005] WO 96/29342 公开了其中亲本肽激素已经通过在 C- 端氨基酸残基或在 N- 端氨基酸残基引入亲脂性取代物而修饰的肽激素衍生物。

[0006] WO 98/08871 公开了其中亲本肽的至少一个氨基酸残基连接有亲脂性取代物的 GLP-1 衍生物。

[0007] WO 99/43708 公开了具有连接至 C- 端氨基酸残基的亲脂性取代物的 GLP-1 (7-35) 和 GLP-1 (7-36) 衍生物。

[0008] WO 00/34331 公开了酰化的 GLP-1 类似物。

[0009] WO 00/69911 公开了用于注射进患者中的活化的促胰岛素肽,据认为在患者中它们与血液成分反应形成缀合物,从而据说提供体内更长的作用持续时间。

[0010] WO 02/46227 公开了融合至人血清白蛋白以便延长体内半衰期的 GLP-1 和毒蜥外泌肽 -4 类似物。

[0011] 许多糖尿病患者尤其是 2 型糖尿病患者患有所谓的“针 - 恐怖症”,即十分恐惧他们自己注射。在 2 型糖尿病患者中,多数患者使用口服降血糖药治疗,并且自从期望 GLP-1 化合物是这些患者将施用的首选注射产品,对注射的恐惧可能会成为广泛使用这种临床上非常有希望的 GLP-1 化合物的严重障碍。因此,需要开发能够每天施用少于一次,例如每两天或每三天一次优选为每周一次,同时保持可接受的临床特性的新的 GLP-1 化合物。

[0012] 发明概述

[0013] 本发明提供了相对于序列 GLP-1 (7-37) (SEQ ID No1) 在位置 7 和 / 或 8 具有至少一个非 - 蛋白质源性 (non-proteogenic) 氨基酸残基修饰的 GLP-1 类似物,其在位置 26 的赖氨酸残基处用一个部分酰化,并且其中所述的部分包含至少两个酸性基团,其中一个酸性基团在末端连接。

[0014] 本发明还提供了包含根据本发明化合物的药物组合物,以及提供了根据本发明的化合物用于制备治疗疾病的药物的用途。

[0015] 本发明提供了用于增加 GLP-1 类似物在患者中的作用时间的方法,其特征在于在所述 GLP-1 类似物的位置 26 的赖氨酸残基上,用如在任意先前的权利要求中公开的 B-U' 部分酰化所述的 GLP-1 类似物。

[0016] 发明描述

[0017] 在本说明书中,下列术语具有指定的含义:

[0018] 如此处使用的,术语“多肽”和“肽”表示由至少 5 个通过肽键连接的组成氨基酸组成的化合物。组成氨基酸可以来自遗传密码编码的氨基酸并且它们可以是不通过遗传密码编码的天然氨基酸,以及合成的氨基酸。不通过遗传密码编码的天然氨基酸是例如 γ -羧基谷氨酸、鸟氨酸、磷酸丝氨酸、D-丙氨酸和 D-谷氨酰胺。合成氨基酸包括通过化学合成产生的氨基酸,即由遗传密码编码的氨基酸的 D-异构体,例如 D-丙氨酸和 D-亮氨酸、Aib(α -氨基异丁酸)、Abu(α -氨基丁酸)、Tle(叔丁基甘氨酸)、 β -丙氨酸、3-氨基苯甲酸、邻氨基苯甲酸。

[0019] 22 种蛋白质源性氨基酸是:

[0020] 丙氨酸、精氨酸、天冬酰胺、天冬氨酸、半胱氨酸、胱氨酸、谷氨酰胺、谷氨酸、甘氨酸、组氨酸、羟脯氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、赖氨酸、甲硫氨酸、苯丙氨酸、脯氨酸、丝氨酸、苏氨酸、色氨酸、酪氨酸、缬氨酸。

[0021] 因此,非蛋白质源性氨基酸是可以通过肽键整合进肽的部分,但不是蛋白质源性氨基酸。实例是 γ -羧基谷氨酸、鸟氨酸、磷酸丝氨酸、D-氨基酸例如 D-丙氨酸和 D-谷氨酰胺。合成的非蛋白质源性氨基酸包括通过化学合成产生的氨基酸,即通过遗传密码编码的氨基酸的 D-异构体例如 D-丙氨酸和 D-亮氨酸、Aib(α -氨基异丁酸)、Abu(α -氨基丁酸)、Tle(叔丁基甘氨酸)、3-氨基苯甲酸、邻氨基苯甲酸、脱氨基-组氨酸、氨基酸的 β 类似物例如 β -丙氨酸等、D-组氨酸、脱氨基-组氨酸、2-氨基-组氨酸、 β -羟基-组氨酸、高组氨酸(homohistidine)、N^q-乙酰基-组氨酸、 α -氟甲基-组氨酸、 α -甲基-组氨酸、3-吡啶丙氨酸、2-吡啶丙氨酸或 4-吡啶丙氨酸、(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;

[0022] 如此处使用的,涉及多肽的术语“类似物”表示经修饰的肽,其中所述肽的一个或多个氨基酸残基已经由其它氨基酸残基取代和/或其中一个或多个氨基酸残基已经从肽中删减和/或其中一个或多个氨基酸残基已经从肽中删减和或其中一个或多个氨基酸残基已经加入至肽中。这种氨基酸残基的加入或缺失可以在肽的 N-端和/或肽的 C-端发生。通常用一个简单的系统来描述类似物:例如 [Arg³⁴]GLP-1(7-37)Lys 指其中在位置 34 天然存在的赖氨酸已经由精氨酸取代并且其中一个赖氨酸已经加入至末端氨基酸残基,即加至 Gly³⁷ 的 GLP-1(7-37) 类似物。旋光异构体未说明的所有氨基酸应该理解为表示 L-异构体。在本发明的实施方案中,最多 17 个氨基酸已经受到修饰。在本发明的实施方案中,最多 15 个氨基酸已经受到修饰。在本发明的实施方案中,最多 10 个氨基酸已经受到修饰。在本发明的实施方案中,最多 8 个氨基酸已经受到修饰。在本发明的实施方案中,最多 7 个氨基酸已经受到修饰。在本发明的实施方案中,最多 6 个氨基酸已经受到修饰。在本发明的实施方案中,最多 5 个氨基酸已经受到修饰。在本发明的实施方案中,最多 4 个氨基酸已经受到修饰。在本发明的实施方案中,最多 3 个氨基酸已经受到修饰。在本发明的实施方案中,最多 2 个氨基酸已经受到修饰。在本发明的实施方案中,1 个氨基酸受到修饰。

[0023] 如此处使用的,有关肽的术语“衍生物”表示经化学修饰的肽或其类似物,其中至少一个取代基不存在于未经修饰的肽或其类似物中,即表示已经经共价修饰的肽。典型的修饰是酰胺、糖类、烷基、酰基、酯等。GLP-1(7-37) 衍生物的实例是 N^e ²⁶-((4S)-4-(十六烷酰基氨基)-羧基-丁酰基) [Arg³⁴, Lys²⁶]GLP-1-(7-37)。

[0024] 如此处使用的,术语“GLP-1 肽”表示 GLP-1 (7-37) (SEQ ID No1)、GLP-1 (7-37) 类似物、GLP-1 (7-37) 衍生物或 GLP-1 (7-37) 类似物的衍生物。在一个实施方案中, GLP-1 肽是促胰岛素剂。

[0025] 如此处使用的,术语“促胰岛素剂”表示是人 GLP-1 受体激动剂的化合物,即刺激 cAMP 在含有人 GLP-1 受体的合适培养基(在下文中公开一种这样的培养基)中形成的化合物。促胰岛素剂的效力通过从如下面描述的剂量-反应曲线计算 EC_{50} 值测定。

[0026] 将表达克隆的人 GLP-1 受体的幼仓鼠肾 (BHK) 细胞 (BHK-467-12A) 在加入 100IU/mL 青霉素、100 μ g/mL 链霉素、5% 胎牛血清、0.5mg/mL 遗传霉素 G-418 (Life Technologies) 的 DMEM 培养基中生长。在磷酸盐缓冲液中洗涤细胞两次并用 Versene 收获。在缓冲液 1 (20mM HEPES-Na, 10mM EDTA, pH7.4) 中通过用 Ultraturrax 均化从细胞制备质膜。在 4°C 下以 48,000x g 离心匀浆 15 分钟。通过均化使沉淀物悬浮于缓冲液 2 (20mM HEPES-Na, 0.1mM EDTA, pH7.4) 中,随后在 4°C 下以 48,000x g 离心 15 分钟。再次重复洗涤步骤。将最终的沉淀物悬浮于缓冲液 2 中并直接用于检测或在 -80°C 下储存。

[0027] 功能性受体测定法通过测量作为对促胰岛素剂刺激的反应的环磷腺苷 (cAMP) 来完成。形成的 cAMP 通过 AlphaScreen™ cAMP Kit (Perkin Elmer Life Sciences) 定量。孵育在半区 (half-area) 96-孔微量滴定板中在 50 μ L 总体积的缓冲液 3 (50mM Tris-HCl, 5mM HEPES, 10mM $MgCl_2$, pH7.4) 中完成并加入: 1mM ATP、1 μ M GTP、0.5mM 3-异丁基-1-甲基黄嘌呤 (IBMX)、0.01% 吐温 20、0.1% BSA、6 μ g 膜制备物、15 μ g/mL 受体微珠、用 6nM 生物素基-cAMP 预孵育的 20 μ g/mL 供体微珠。将要检测激动剂活性的化合物溶解并稀释于缓冲液 3 中。对每个试验新鲜制备 GTP。将平板在室温下于黑暗中缓慢搅动孵育 3 小时,随后将其在 Fusion™ 仪 (Perkin Elmer Life Sciences) 中计数。使用 Prism v.4.0 用 4 参数 logistic 模型 (GraphPad, Carlsbad, CA) 绘制每种化合物的浓度-反应曲线并估计 EC_{50} 值。

[0028] 如此处使用的,涉及多肽的术语“DPP-IV 保护”指这样一种多肽,该多肽已经经化学修饰以便使所述化合物能够抗血浆肽酶二肽氨基肽酶-4 (DPP-IV)。已知血浆中的 DPP-IV 酶参与多种肽激素如 GLP-1、GLP-2、毒蜥外泌肽-4 等的降解。因此,正在做出相当大的努力来开发易受 DPP-IV 介导的水解作用影响的多肽的类似物和衍生物以便减小 DPP-IV 降解速率。在一个实施方案中,DPP-IV 保护的肽比 GLP-1 (7-37) 或毒蜥外泌肽-4 (1-39) 更能抗 DPP-IV。

[0029] 肽对二肽氨基肽酶 IV 降解的抗性可通过下面的降解测定法测定:

[0030] 在 37°C 下于 100 μ L、0.1M pH7.4 的三乙胺-HCl 缓冲液中,将肽的等分样品 (5nmol) 用相当于 5mU 酶活性的 1 μ L 纯化的二肽氨基肽酶 IV 孵育 10-180 分钟。通过加入 5 μ L 10% 的三氟乙酸终止酶促反应,并使用 HPLC 分析法分离和定量肽降解产物。用于实施该分析的一种方法是:根据 Siegel 等 Regul. Pept. 1999 ;79 :93-102 和 Mentlein 等. Eur. J. Biochem. 1993 ;214 :829-35,将混合物上样至 Vydac C18widepore (30nm 小孔,5 μ m 微粒) 250x4.6mm 柱并使用 0.1% 三氟乙酸中的乙腈线性阶式梯度 (0% 的乙腈 3 分钟,0-24% 的乙腈 17 分钟,24-48% 的乙腈 1 分钟) 以 1ml/分钟的流速将其洗脱。肽和它们的降解产物可通过它们在 220nm (肽键) 或 280nm (芳香族氨基酸) 处的吸光度监控,并通过它们相对于标准品的峰面积积分来定量。在引起少于 10% 的肽受到水解的孵育时间下估计二肽氨基肽酶 IV 水解肽的速率。

[0031] 如此处使用的术语“C₁₋₆-烷基”指具有 1-6 个碳原子的饱和的、分支的、直链或环烷基团。代表性实例包括,但不限于甲基、乙基、正丙基、异丙基、丁基、异丁基、仲丁基、叔丁基、正戊基、异戊基、新戊基、叔戊基、正己基、异己基、环己烷等。

[0032] 如此处使用的,术语“可药用”指适合于正常的药学应用,即在患者中未产生有害事件等。

[0033] 如此处使用的,术语“赋形剂”指通常加入至药物组合物的化合物,例如缓冲剂、张度剂 (tonicity agent)、防腐剂等。

[0034] 如此处使用的,术语“有效量”指与不治疗相比对患者的治疗足够有效的剂量。

[0035] 如此处使用的,术语“药物组合物”指包含活性化合物或其盐加之药物赋形剂(如缓冲剂、防腐剂和任选张度调节剂和/或稳定剂)的产品。因而,药物组合物在本领域也称为药物制剂。

[0036] 如此处使用的,术语“疾病的治疗”指治疗和看护已经患有疾病、病症或障碍的患者。治疗目的是对抗疾病、病症或障碍。治疗包括施用活性化合物以消除或控制疾病、病症或障碍以及减轻与疾病、病症或障碍相关的症状或并发症。

[0037] 在另一方面,本发明涉及同时结合白蛋白和 GLP-1 受体的酰化的 GLP-1 类似物。

[0038] 在另一方面,本发明涉及在存在 2% 白蛋白的情况下,以低于 100nM,优选低于 30nM 的亲和力结合 GLP-1 受体的酰化的 GLP-1 类似物。

[0039] 在另一方面,本发明涉及酰化的 GLP-1 类似物,当存在非常低的浓度(例如 0.005% 至 0.2%)的人白蛋白时的亲和力与存在 2% 的人白蛋白时的亲和力比较时,所述 GLP-1 类似物对 GLP-1 受体的亲和力只是部分地减小。在这些条件下亲和力的改变小于 50 倍,优选小于 30 倍并更优选小于 10 倍。

[0040] 如此处使用的,术语“白蛋白结合部分”表示非共价结合人血清白蛋白的残基。连接至治疗性多肽的白蛋白结合残基通常具有对人血清白蛋白低于 10 μ M 的亲和力并且优选低于 1 μ M。在末端具有酸性基团的含有 4-40 个碳原子的直链和支链亲脂性部分中已知了一系列的白蛋白结合残基。

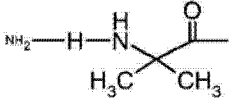
[0041] 如此处使用的,术语“亲水性连接物”表示分开肽和白蛋白结合残基的间隔物,所述的间隔物具有包含至少 5 个非氢原子且其中 30-50% 的这些非氢原子是 N 或 O 的化学部分。

[0042] 如此处使用的,术语“酸性基团”表示在生理 pH 下完全或部分带负电荷的有机化学基团。这种基团的 pKa 值小于 7,优选小于 5。这包括但不限于羧酸、磺酸、磷酸或在生理学 pH 时完全或部分带负电荷的杂环体系。

[0043] 在下面的结构式 II 中,U 部分是可以以两种不同方式连接末端基团 B 和肽中的赖氨酸的氨基的双基(di-radical)。在本发明的实施方案中,式 II 中的 U 与烷基链一端的基团 B 和另一端的肽连接。

[0044] 在下面的式中,连接基团的端键应该认为是连接键并且不以亚甲基结尾,除非另外说明。

[0045] 在下面的式中

[0046]  表示 GLP-1 类似物的 H₂N-His-Aib-N- 端。

[0047] 在一个实施方案中,本发明提供了用含有至少两个游离的酸性化学基团的亲脂性白蛋白结合部分酰化的 GLP-1 类似物,所述的白蛋白结合部分通过非天然的氨基酸连接物连接至位置 26 的赖氨酸残基。

[0048] 在一个实施方案中,术语“游离的酸性化学基团”将理解为具有与此处使用的“酸性基团”相同的含义。

[0049] 在一个实施方案中,本发明提供了酰化的 GLP-1 类似物,其中所述的 GLP-1 类似物通过修饰相对于序列 GLP-1 (7-37) (SEQ ID No1) 的位置 7 和 8 中的至少一个氨基酸残基而对 DPP-IV 是稳定的,并且其中所述的酰化指任选通过非天然氨基酸亲水性连接物连接至位置 26 的赖氨酸残基上的二酸。

[0050] 在本发明的一个实施方案中, GLP-1 类似物在相对于序列 GLP-1 (7-37) (SEQ ID No1) 的位置 7 和 / 或 8 上具有至少一个非蛋白源性氨基酸残基的修饰,其在位置 26 的赖氨酸残基处用一个部分酰化,并且其中所述的部分包含至少两个酸性基团,其中一个酸性基团在末端连接。

[0051] 一个实施方案提供了根据上述实施方案的 GLP-1 类似物,其中在位置 26 处连接的部分含有亲水性连接物。

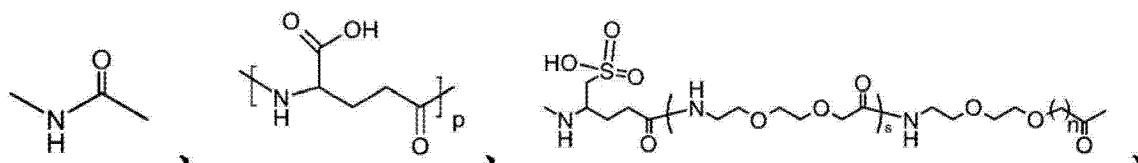
[0052] 一个实施方案提供了根据上述实施方案的 GLP-1 类似物,其中亲水性连接物包含至少 5 个非氢原子,其中 30-50% 的这些非氢原子是 N 或 O。

[0053] 一个实施方案提供了根据上述任意实施方案的 GLP-1 类似物,其中在位置 26 处连接的部分含有通过亲水性连接物与肽隔开的白蛋白结合部分。

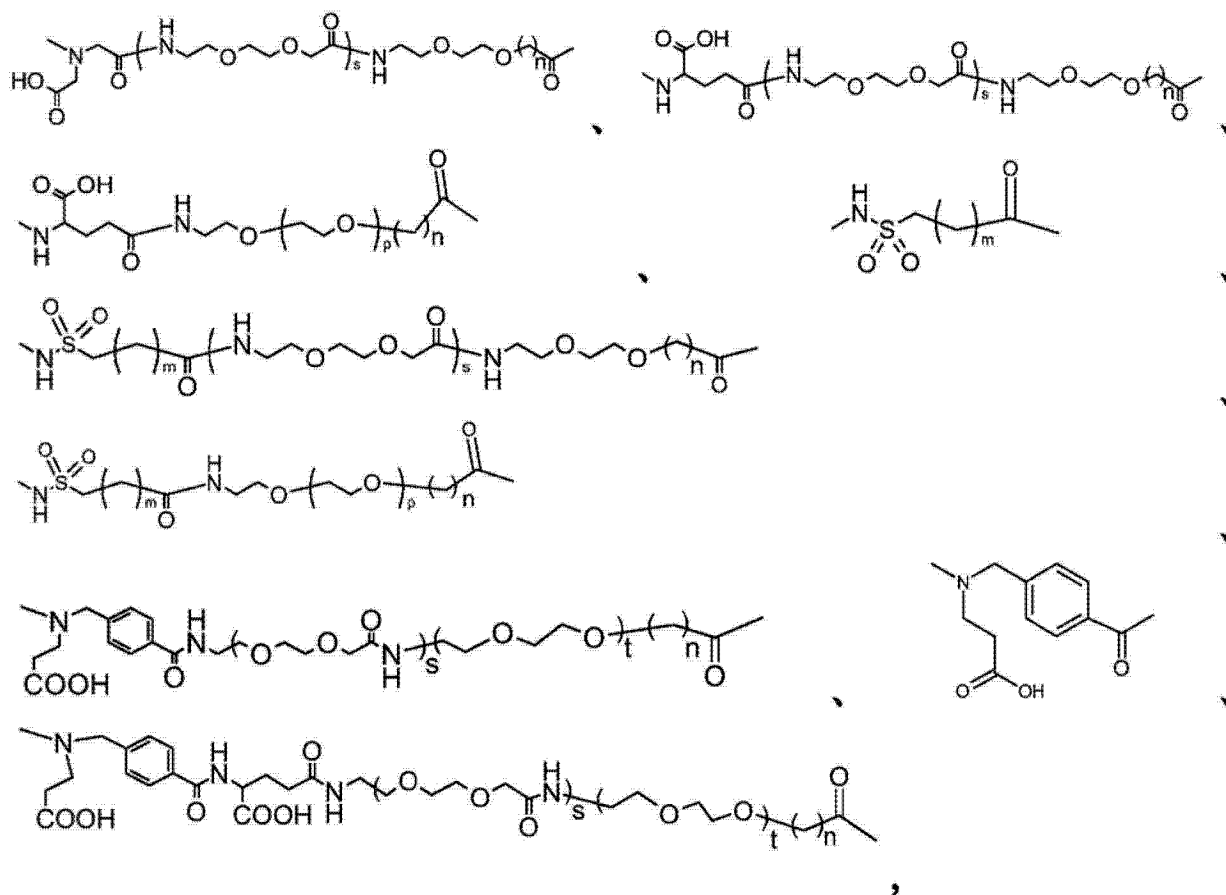
[0054] 一个实施方案提供了根据上述实施方案的 GLP-1 类似物,其中白蛋白结合部分是具有末端酸性基团的含有 4-40 个碳原子的直链或支链亲脂性部分。

[0055] 一个实施方案提供了根据上述任意实施方案的 GLP-1 类似物,其中酰化部分是 B-U', 其中 U' 选自

[0056]



[0057]



[0058] m 是 0、1、2、3、4、5 或 6，

[0059] n 是 1、2 或 3

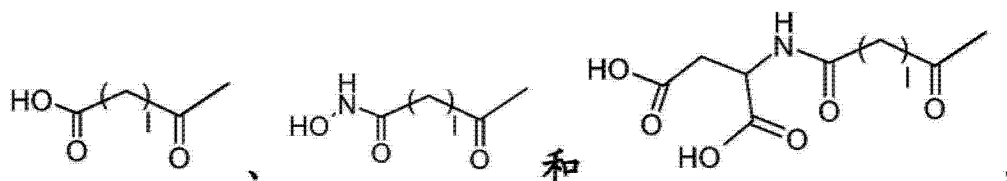
[0060] s 是 0、1、2 或 3，

[0061] t 是 0、1、2、3 或 4

[0062] p 是 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22 或 23；

[0063] 并且其中 B 是选自下列的酸性基团

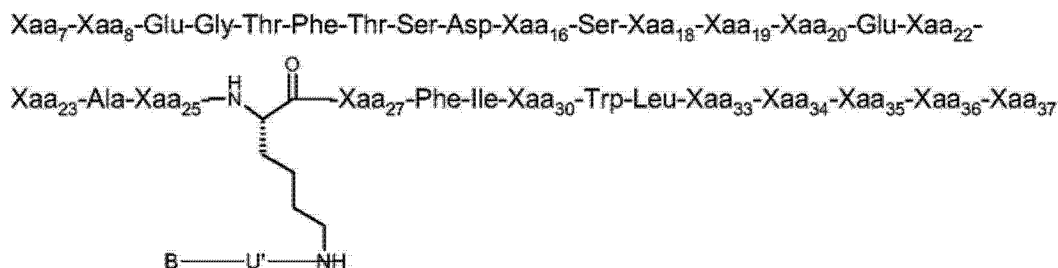
[0064]



[0065] 其中 1 是 12、13、14、15、16、17、18、19 或 20；

[0066] 一个实施方案提供了根据上述任意实施方案的 GLP-1 类似物，其是式 I 化合物 (SEQ ID No. 2)：

[0067]



式 I

[0068] 其中

[0069] Xaa₇ 是 L- 组氨酸、咪唑并丙酰基 (imidazopropionyl)、α- 羟基- 组氨酸、D- 组氨酸、脱氨基- 组氨酸、2- 氨基- 组氨酸、β- 羟基- 组氨酸、高组氨酸、N^α- 乙酰基- 组氨酸、N^α- 甲酰基- 组氨酸、α- 氟甲基- 组氨酸、α- 甲基- 组氨酸、3- 吡啶丙氨酸、2- 吡啶丙氨酸或 4- 吡啶丙氨酸; 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;

[0070] Xaa₁₆ 是 Val 或 Leu ;

[0071] Xaa₁₈ 是 Ser、Lys 或 Arg；

[0072] Xaa₁₉ 是 Tyr 或 Gln ;

[0073] Xaa₂₀ 是 Leu 或 Met ;

[0074] Xaa₂ 是 Gly、Glu 或 Aib；

[0075] Xaa₂₃ 是 Gln、Glu、Lys 或 Arg；

[0076] Xaa₂₅ 是 Ala 或 Val ;

[0077] Xaa₂₇ 是 Leu 或 Glu ;

[0078] Xaa₃₀ 是 Ala、Glu 或 Arg；

[0079] Xaa₃₃ 是 Val 或 Lys ;

[0080] Xaa₃₄ 是 Lys、Glu、Asn 或 Arg；

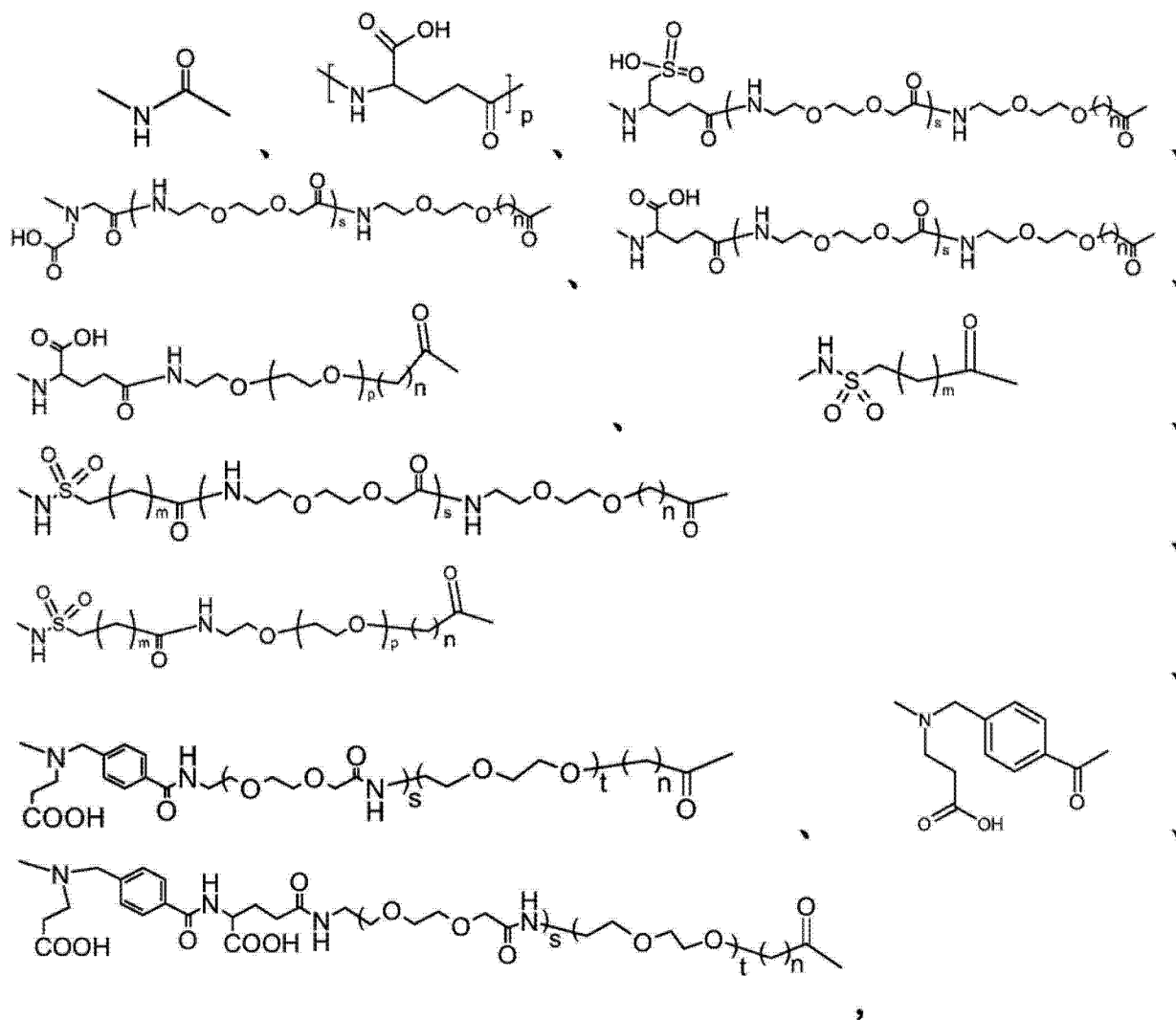
[0081] Xaa₃₅ 是 Gly 或 Aib ;

[0082] Xaa₃₆ 是 Arg、Gly 或 Lys, 或缺失;

[0083] Xaa₃₇ 是 Gly、Ala、Glu、Pro、Lys,或缺失;

[0084] 并且 B 和 U' 一起是酰化部分, 其中 U' 选自

[0085]



[0086] m 是 0、1、2、3、4、5 或 6，

[0087] n 是 1、2 或 3

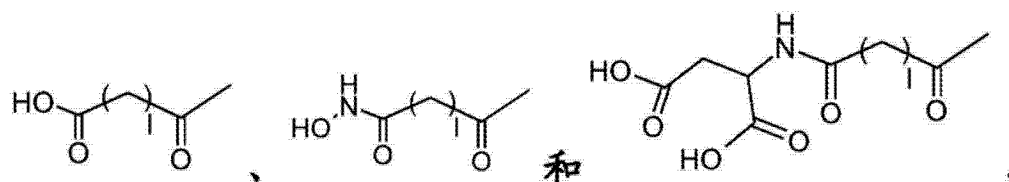
[0088] s 是 0、1、2 或 3，

[0089] t 是 0、1、2、3 或 4

[0090] p 是 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22 或 23；

[0091] 并且其中 B 是选自下列的酸性基团

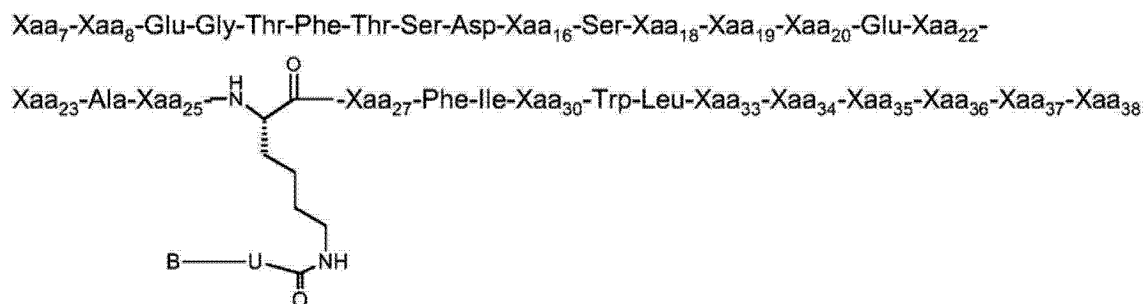
[0092]



[0093] 其中 1 是 12、13、14、15、16、17、18、19 或 20；

[0094] 在一个实施方案中，本发明提供了是式 II 化合物 (SEQ ID No. 3) 的化合物；

[0095]



式 II

[0096] 式 II 与如上面实施方案中说明的式 I 一样,其中 B-U 部分代替了 B-U'。不同的只是,相对于 U, U' 整合有羧基,而 U 没有连接的羧基。

[0097] 在式 II 中,每个 Xaa' 具有下列含义:

[0098] Xaa₇ 是 L-组氨酸、D-组氨酸、脱氨基-组氨酸、2-氨基-组氨酸、β-羟基-组氨酸、高组氨酸、N^ε-乙酰基-组氨酸、α-氟甲基-组氨酸、α-甲基-组氨酸、3-吡啶丙氨酸、2-吡啶丙氨酸或 4-吡啶丙氨酸;

[0099] Xaa₈ 是 Ala、Gly、Val、Leu、Ile、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;

[0100] Xaa₁₆ 是 Val 或 Leu;

[0101] Xaa₁₈ 是 Ser、Lys 或 Arg;

[0102] Xaa₁₉ 是 Tyr 或 Gln;

[0103] Xaa₂₀ 是 Leu 或 Met;

[0104] Xaa₂₂ 是 Gly、Glu 或 Aib;

[0105] Xaa₂₃ 是 Gln、Glu、Lys 或 Arg;

[0106] Xaa₂₅ 是 Ala 或 Val;

[0107] Xaa₂₇ 是 Leu 或 Glu;

[0108] Xaa₃₀ 是 Ala、Glu 或 Arg;

[0109] Xaa₃₃ 是 Val 或 Lys;

[0110] Xaa₃₄ 是 Lys、Glu、Asn 或 Arg;

[0111] Xaa₃₅ 是 Gly 或 Aib;

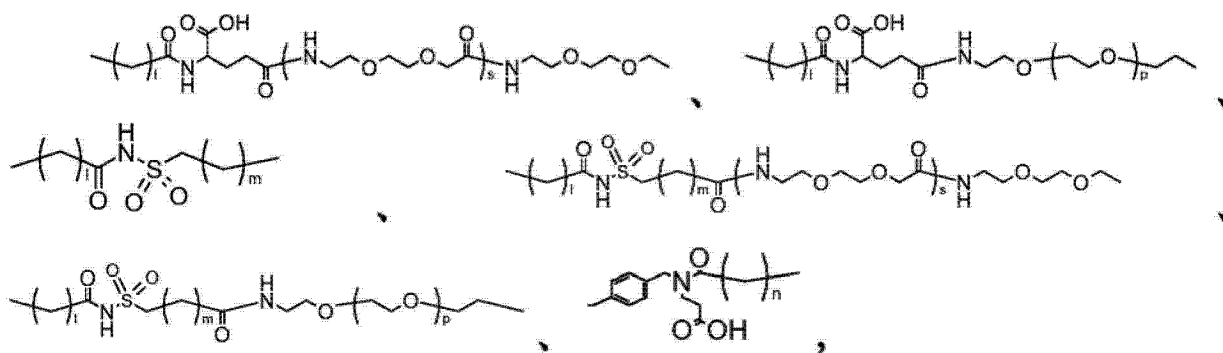
[0112] Xaa₃₆ 是 Arg、Gly 或 Lys,或缺失;

[0113] Xaa₃₇ 是 Gly、Ala、Glu、Pro、Lys,或缺失;

[0114] Xaa₃₈ 是 Lys、Ser、酰胺或缺失;

[0115] 并且其中 U 是间隔物,其选自

[0116]



[0117] 其中 n 是 12、13、14、15、16、17 或 18

[0118] 1 是 12、13、14、15、16、17 或 18，

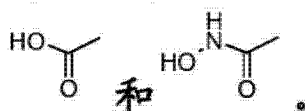
[0119] m 是 0、1、2、3、4、5 或 6，

[0120] s 是 0、1、2 或 3，

[0121] p 是 3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22 或 23；

[0122] 并且其中 B 是选自下列的酸性基团

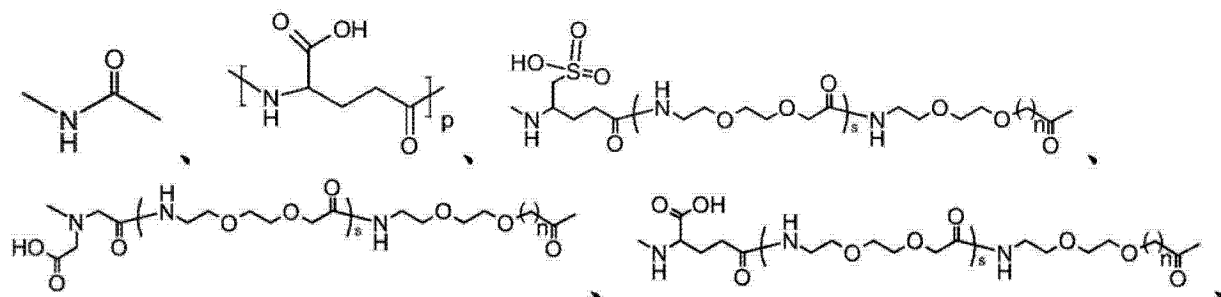
[0123]



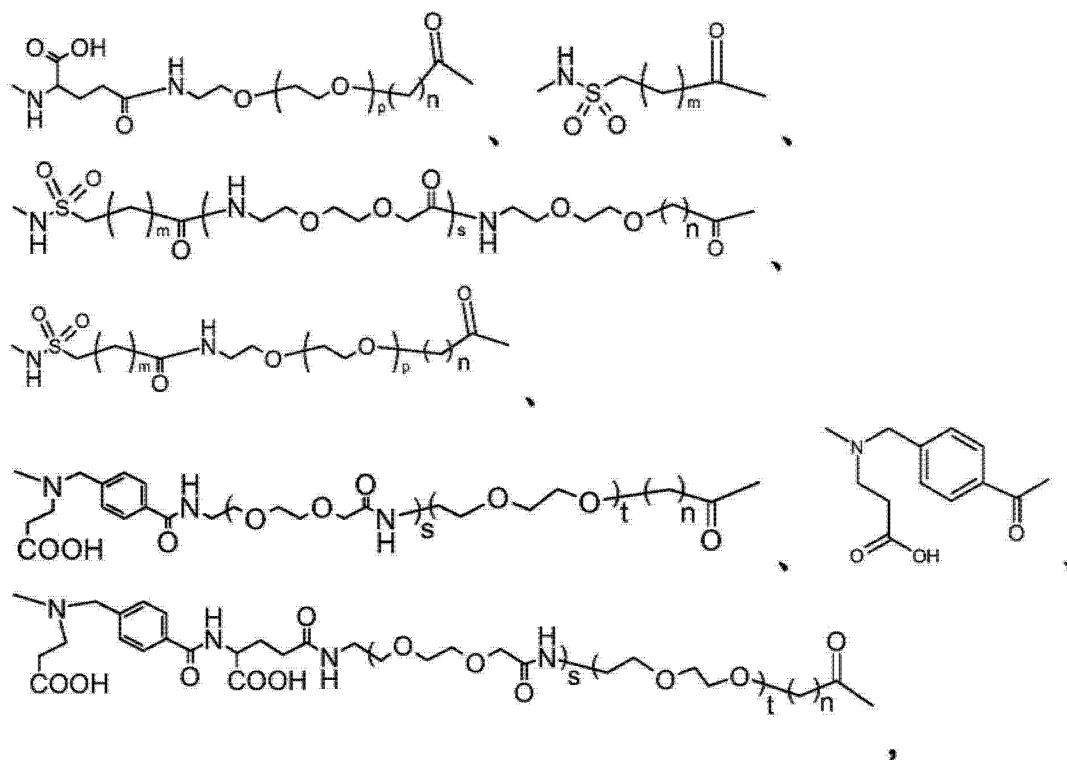
[0124] 在下面的实施方案中，当涉及式 I 中的 U' 时，也应该理解为也指式 II 和 U，唯一的
不同是羧基。

[0125] 一个实施方案提供了根据上述实施方案的 GLP-1 类似物，其中 U' 选自

[0126]



[0127]



[0128] m 是 2、3、4 或 5，

[0129] n 是 1 或 2；

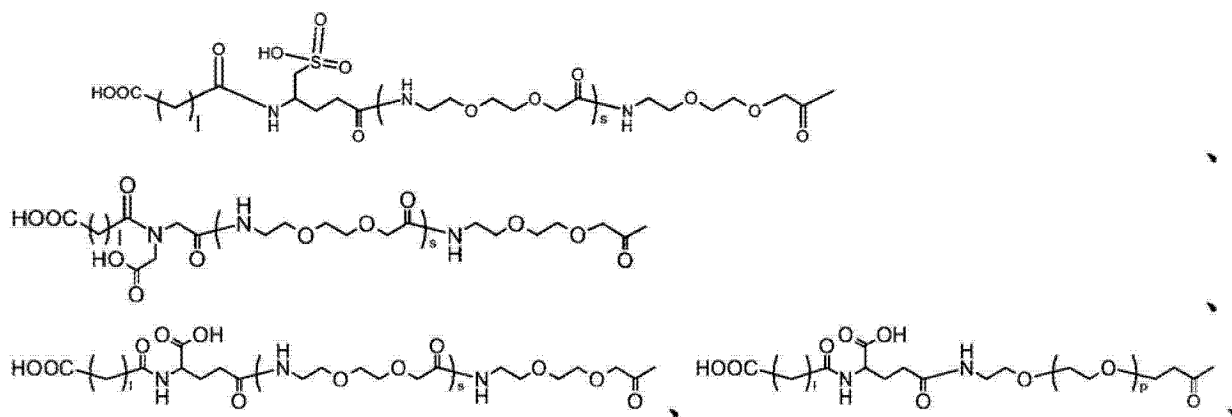
[0130] s 是 0、1 或 2，

[0131] t 是 0、1、2 或 3

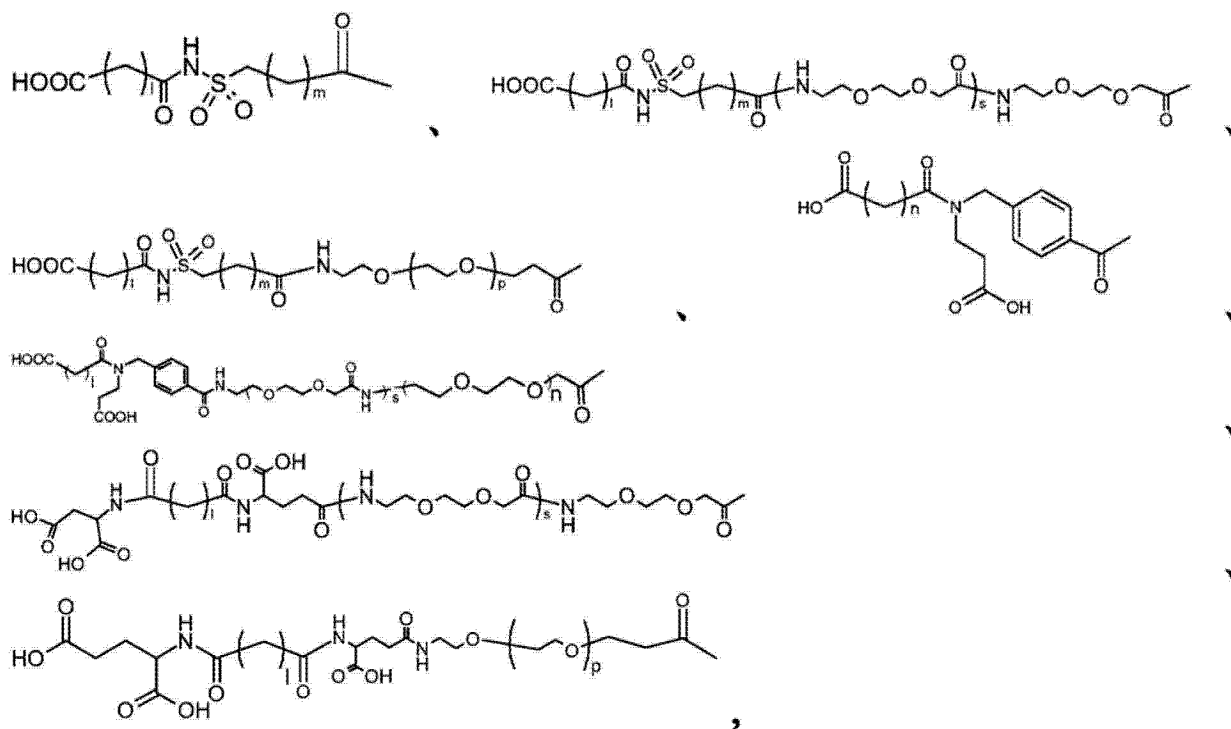
[0132] p 是 1、2、3、4、7、11 或 23

[0133] 一个实施方案提供了根据上述实施方案的 GLP-1 类似物，其中 B-U' - 是

[0134]



[0135]



[0136] 其中 1 是 14、15、16、17、18、19 或 20；

[0137] p 是 1、2、3、4、7、8、9、10、11 或 12。

[0138] s 是 0、1 或 2,

[0139] t 是 0 或 1；

[0140] 根据上述的实施方案,其中

[0141] 其中 1 是 14、15、16、17 或 18

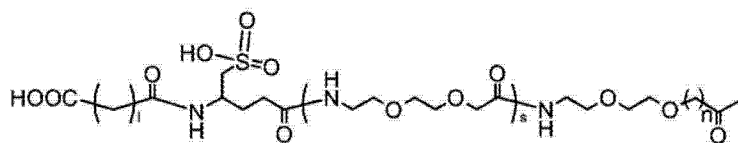
[0142] p 是 1、2、3、4 或 11；

[0143] s 是 0、1 或 2；

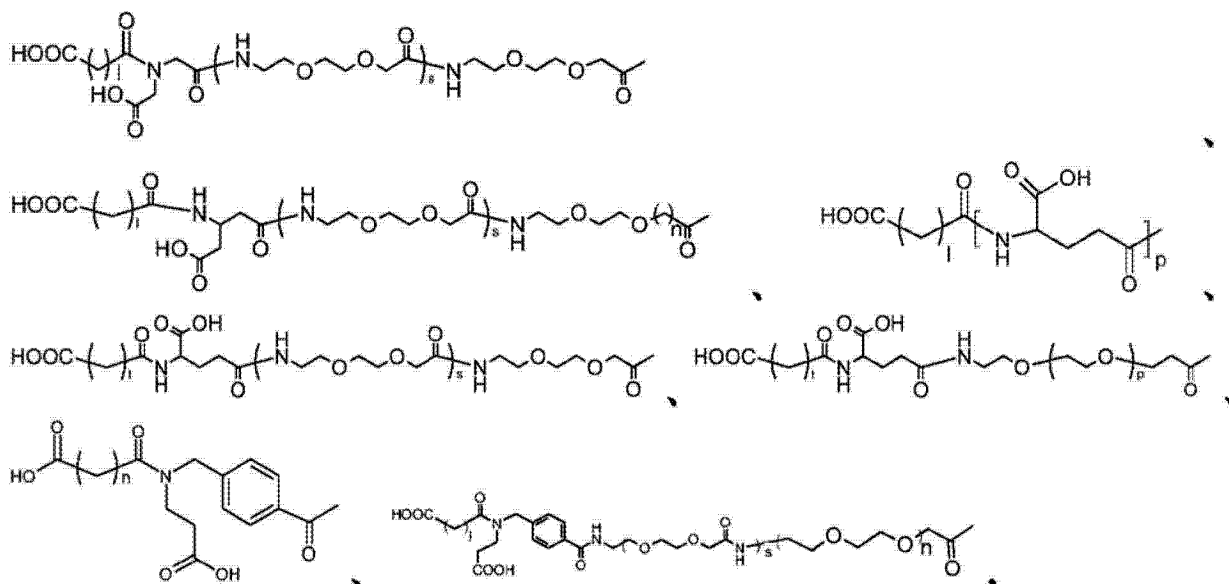
[0144] t 是 0 或 1；

[0145] 一个实施方案提供了根据上述实施方案的 GLP-1 类似物, 其中 B-U' 是

[0146]



[0147]



[0148] 其中 1 是 14、15、16、17、18、19 或 20；

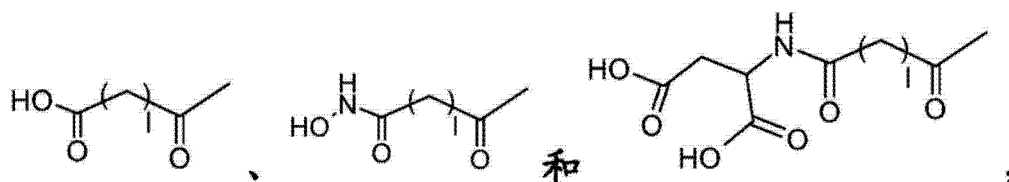
[0149] p 是 1、2、3 或 4。

[0150] s 是 0、1 或 2，

[0151] n 是 0、1 或 2

[0152] 根据上述任意实施方案的实施方案是；其中 B 是

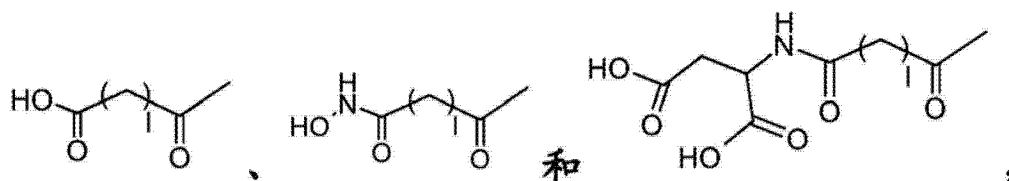
[0153]



[0154] 并且 1 是 14、16、18 或 20；

[0155] 一个实施方案提供了根据上述任意实施方案的 GLP-1 类似物，其中 B 是

[0156]



[0157] 并且 1 是 14、15 或 16。

[0158] 一个实施方案提供了根据上述任意实施方案的 GLP-1 类似物，其中 s 是 1。

[0159] 一个实施方案提供了根据上述任意实施方案的 GLP-1 类似物，其中 n 是 1。

[0160] 一个实施方案提供了根据上述任意实施方案的 GLP-1 类似物，其中 1 是 14、15 或 16；在实施方案中，1 是 17、18、19 或 20。在实施方案中，1 是 15、16 或 17。在实施方案中，1 是 18、19 或 20。在实施方案中 1 是 14。在实施方案中 1 是 16。在实施方案中 1 是 18。在实施方案中 1 是 20。

[0161] 一个实施方案提供了根据上述任意实施方案的 GLP-1 类似物，其中 p 是 1。

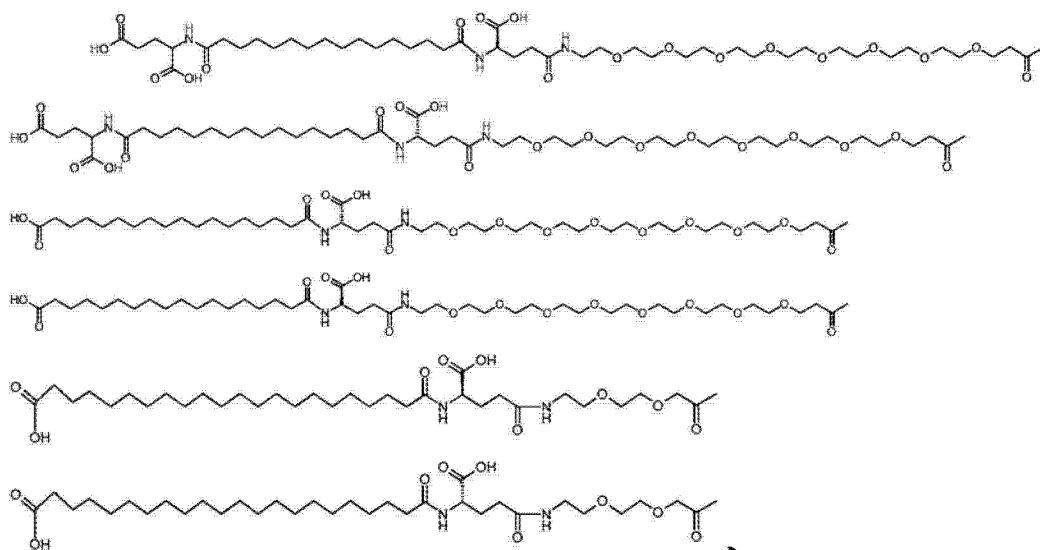
[0162] 一个实施方案提供了根据上述任意实施方案的 GLP-1 类似物，其中 p 是 2。

[0163] 一个实施方案提供了根据上述任意实施方案的 GLP-1 类似物, 其中 p 是 3。

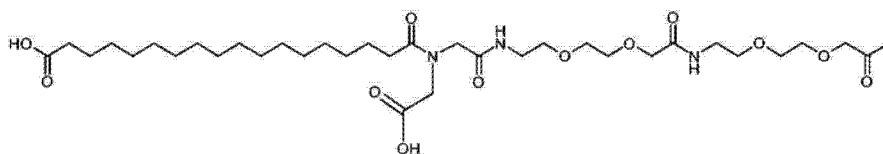
[0164] 一个实施方案提供了根据上述任意实施方案的 GLP-1 类似物, 其中 p 是 4。

[0165] 一个实施方案提供了根据上述任意实施方案的 GLP-1 类似物, 其中 B-U' 是

[0166]

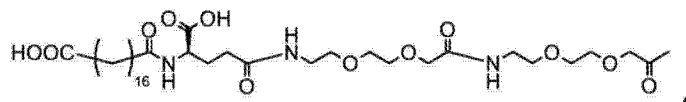


[0167]



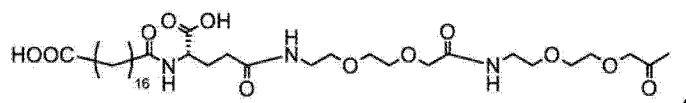
[0168] 一个实施方案提供了根据上述任意实施方案的 GLP-1 类似物, 其中 B-U' 是

[0169]



[0170] 一个实施方案提供了根据上述任意实施方案的 GLP-1 类似物, 其中 B-U' 是

[0171]



[0172] 一个实施方案提供了根据上述式 I 的 GLP-1 类似物, 其中

[0173] Xaa₇ 是 His 或脱氨基-组氨酸；

[0174] Xaa₈ 是 Ala、Gly、Val、Leu、Ile、Lys 或 Aib；

[0175] Xaa₁₆ 是 Val ;

[0176] Xaa₁₈ 是 Ser ;

[0177] Xaa₁₉ 是 Tyr ;

[0178] Xaa₂₀ 是 Leu ;

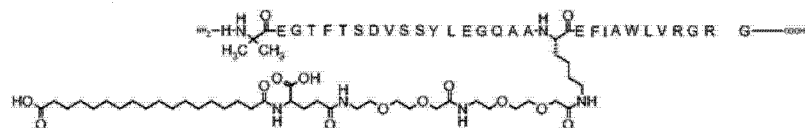
[0179] Xaa₂ 是 Gly、Glu 或 Aib；

[0180] Xaa₂₃ 是 Gln 或 Glu ;

- [0181] Xaa₂₅ 是 Ala ;
- [0182] Xaa₂₇ 是 Glu ;
- [0183] Xaa₃₀ 是 Ala 或 Glu ;
- [0184] Xaa₃₃ 是 Val ;
- [0185] Xaa₃₄ 是 Lys 或 Arg ;
- [0186] Xaa₃₅ 是 Gly 或 Aib ;
- [0187] Xaa₃₆ 是 Arg 或 Lys ;
- [0188] Xaa₃₇ 是 Gly、酰胺或缺失 ;
- [0189] 一个实施方案提供了根据上述式 I 的 GLP-1 类似物,其中
- [0190] Xaa₇ 是 His
- [0191] Xaa₈ 是 Gly 或 Aib ;
- [0192] Xaa₁₆ 是 Val ;
- [0193] Xaa₁₈ 是 Ser ;
- [0194] Xaa₁₉ 是 Tyr ;
- [0195] Xaa₂₀ 是 Leu ;
- [0196] Xaa₂₂ 是 Glu 或 Aib ;
- [0197] Xaa₂₃ 是 Gln ;
- [0198] Xaa₂₅ 是 Ala ;
- [0199] Xaa₂₇ 是 Glu ;
- [0200] Xaa₃₀ 是 Ala ;
- [0201] Xaa₃₃ 是 Val ;
- [0202] Xaa₃₄ 是 Lys 或 Arg ;
- [0203] Xaa₃₅ 是 Gly 或 Aib ;
- [0204] Xaa₃₆ 是 Arg
- [0205] Xaa₃₇ 是 Gly
- [0206] 一个实施方案提供了根据上述实施方案任意之一的 GLP-1 类似物,其中 GLP-1 类似物在 GLP-1 (7-37) 序列位置 7 的 N- 端 L- 组氨酸包含修饰。
- [0207] 一个实施方案提供了根据上述实施方案的 GLP-1 类似物,其中所述的 GLP-1 类似物包括咪唑并丙酰基⁷、 α - 羟基 - 组氨酸⁷ 或 N- 甲基 - 组氨酸⁷、D- 组氨酸⁷、脱氨基 - 组氨酸⁷、2- 氨基 - 组氨酸⁷、 β - 羟基 - 组氨酸⁷、高组氨酸⁷、N ^{α} - 乙酰基 - 组氨酸⁷、 α - 氟甲基 - 组氨酸⁷、 α - 甲基 - 组氨酸⁷、3- 吡啶丙氨酸⁷、2- 吡啶丙氨酸⁷ 或 4- 吡啶丙氨酸⁷。
- [0208] 一个实施方案提供了根据上述实施方案任意之一的 GLP-1 类似物,其中所述的 GLP-1 类似物包含用另一个氨基酸残基对 GLP-1 (7-37) 序列位置 8 的 L- 丙氨酸的取代。
- [0209] 一个实施方案提供了根据上述实施方案的 GLP-1 类似物,其中所述的 GLP-1 类似物包含 Aib⁸、Gly⁸、Val⁸、Ile⁸、Leu⁸、Ser⁸、Thr⁸、(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。
- [0210] 一个实施方案提供了根据上述任意实施方案的 GLP-1 类似物,其中所述的 GLP-1 类似物包含 Aib⁸ ;

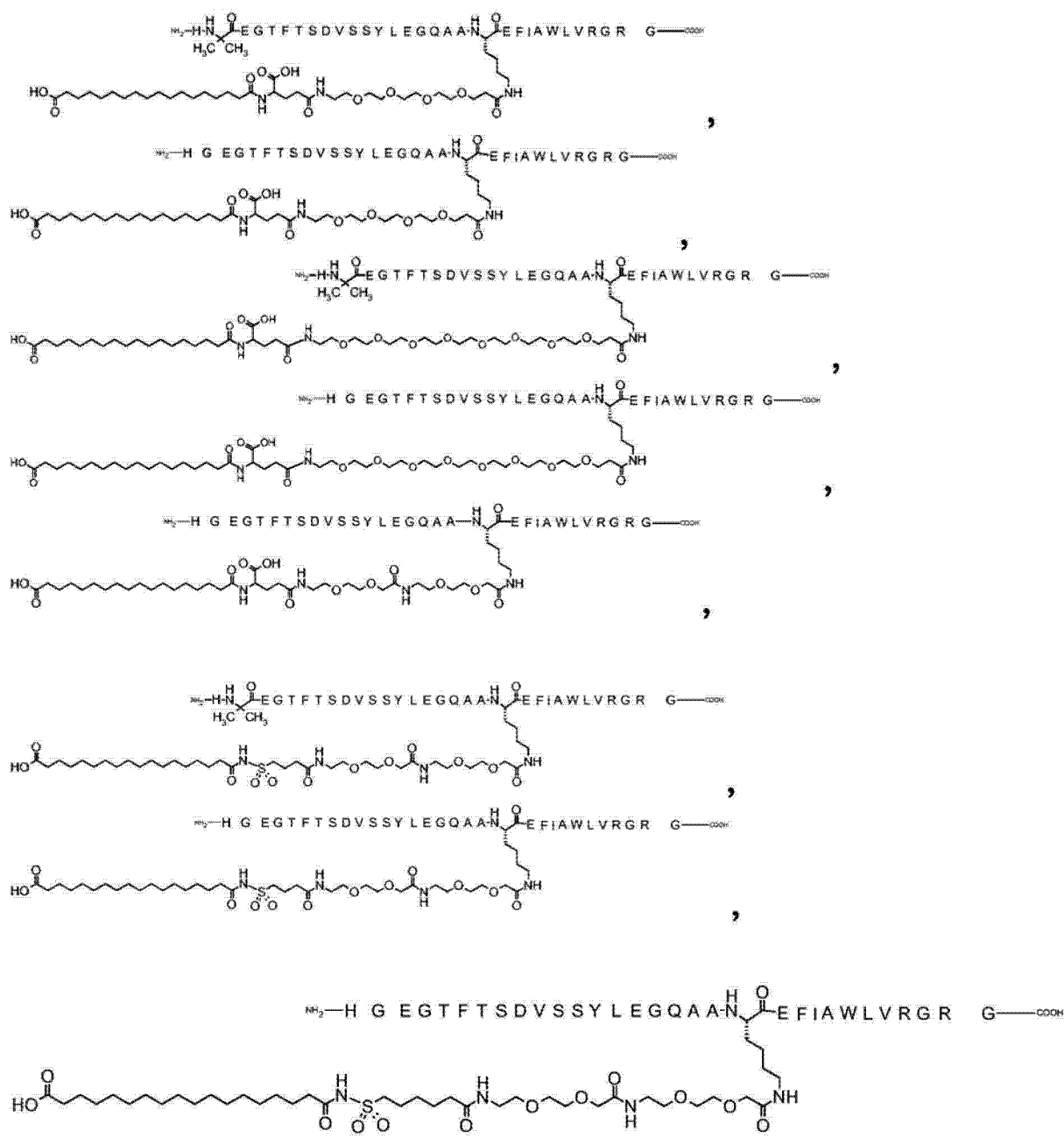
[0232] N- ϵ^{26} -(4-[N-(2-羧乙基)-N-(15-羧基十五烷酰基)氨基]甲基}苯甲酰)[Arg34]GLP-1-(7-37),

[0233]

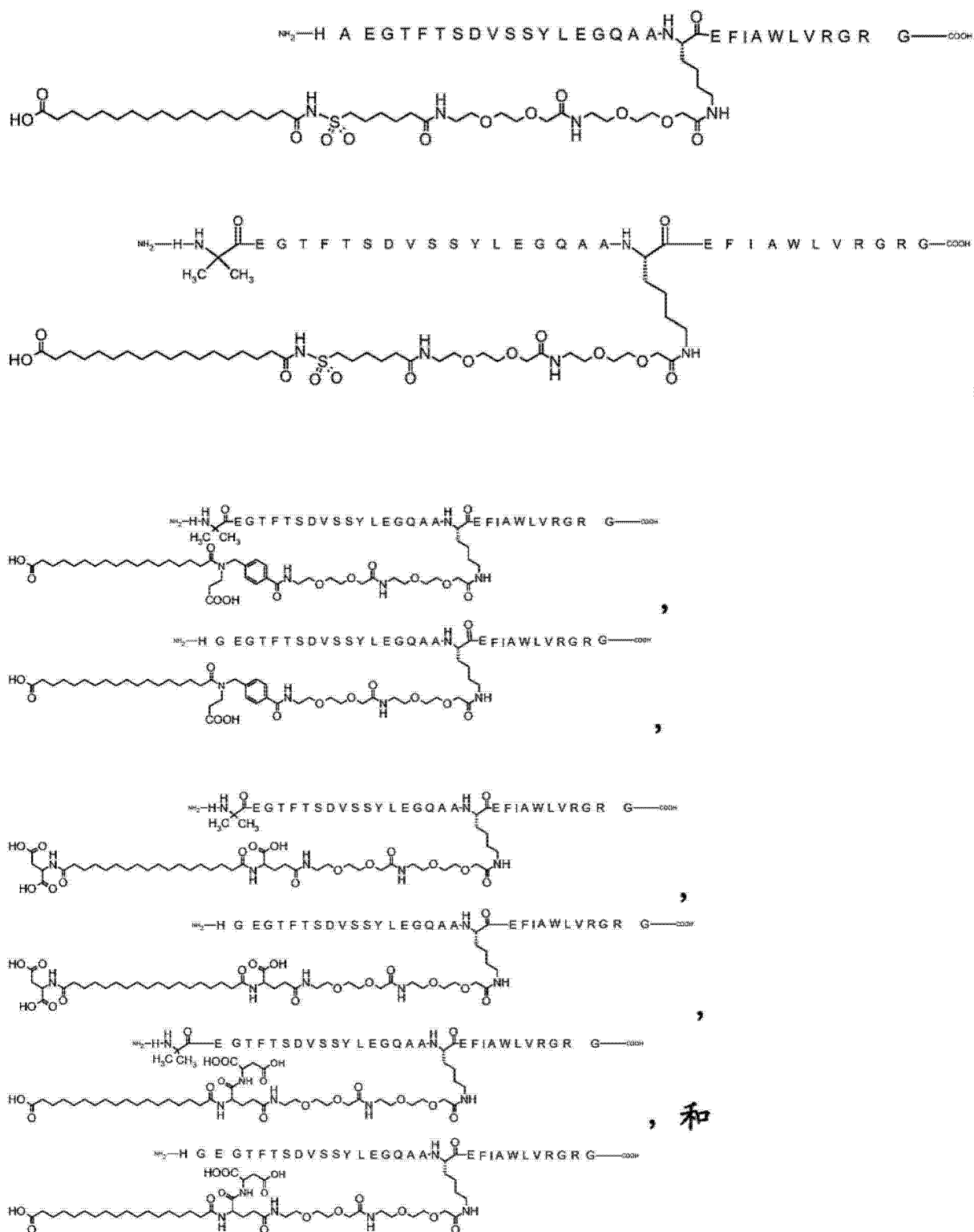


[0234] N- ϵ^{26} -[2-(2-[2-(2-[2-(2-[4-(17-羧基十七烷酰基氨基)-4(S)-羧基丁酰基氨基]乙氧基)乙氧基]乙氧基)乙氧基]乙氧基)[Aib8,Arg34]GLP-1-(7-37)肽,

[0235]



[0236]



[0237] 一个实施方案提供了用于增加 GLP-1 类似物在患者中的作用时间的方法,其特征
 在于在所述 GLP-1 类似物的位置 26 处的赖氨酸残基上,用如在上述任意实施方案中公开的
 B-U 部分酰化所述的 GLP-1 类似物。

[0238] 一个实施方案提供了用于增加 GLP-1 类似物在患者中的作用时间达到多于约 40
 个小时的方法,其特征在于修饰 GLP-1 (7-37) 肽或其类似物位置 7 和 8 处的至少一个氨基
 酸残基,并且在所述 GLP-1 类似物位置 26 处的赖氨酸残基上,用如上述任意实施方案中公
 开的 B-U' - 部分酰化所述 GLP-1 类似物。

[0239] 一个实施方案提供了药物组合物,所述的药物组合物包含根据上述实施方案任意之一的化合物和可药用赋形剂。

[0240] 一个实施方案提供了根据上述实施方案的药物组合物,其适合肠胃外施用。

[0241] 一个实施方案提供了根据上述实施方案任意之一的化合物的用途,用于制备药物。

[0242] 一个实施方案提供了根据上述实施方案任意之一的化合物用于制备药物的用途,所述的药物用于治疗或预防高血糖症、2 型糖尿病、葡萄糖耐量降低、1 型糖尿病、肥胖症、高血压、X 综合征、血脂障碍 (dyslipidemia)、认知障碍、动脉粥样硬化、心肌梗塞、冠心病和其它心血管疾病、中风、炎性肠综合征 (inflammatory bowel syndrome)、消化不良和胃溃疡。

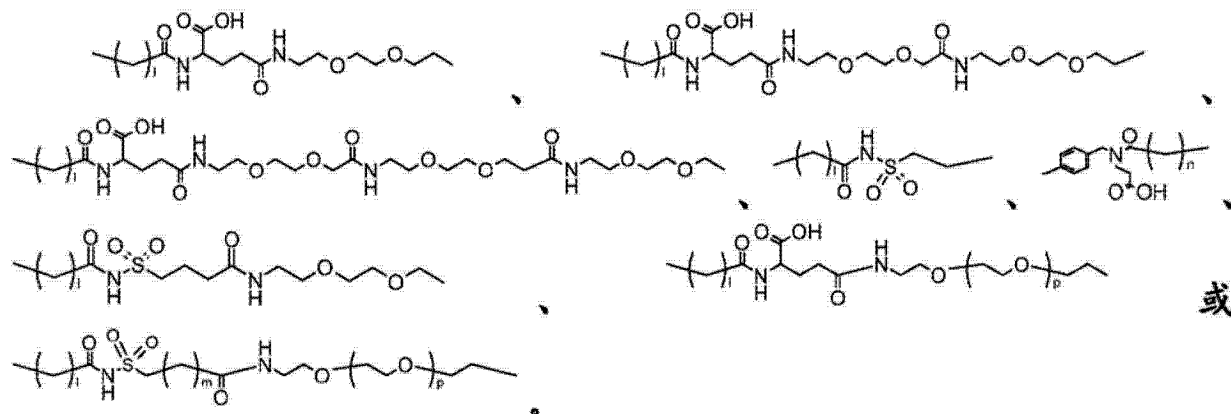
[0243] 一个实施方案提供了根据上述实施方案任意之一的化合物的用途,用于制备用于延缓或预防 2 型糖尿病的疾病发展的药物。

[0244] 一个实施方案提供了根据上述实施方案任意之一的化合物的用途,用于制备用于降低食物摄取、降低 β -细胞凋亡、增加 β -细胞功能和 β -细胞量和 / 或恢复 β -细胞的葡萄糖敏感性的药物。

[0245] 在一个实施方案中,本发明提供了根据上述实施方案的化合物,其中所述的 GLP-1 类似物是连接至连接物 B-U' 的 Aib⁸, Arg³⁴-GLP-1 (7-37) 或 Aib^{8,22}, Arg³⁴-GLP-1 (7-37) ;

[0246] 在式 II 的一个实施方案中, B-U 表示

[0247]



[0248] 其中 l 是 14、15 或 16 ;

[0249] n 是 15、16、17 或 18 ;

[0250] p 是 3、7、11 或 24。

[0251] 在实施方案中,本发明提供了根据上述实施方案任意之一的化合物,其中所述的二酸包括二羧酸。

[0252] 在实施方案中,本发明提供了根据上述实施方案任意之一的化合物,其中酰化基团包括直链或支链的烷烃 α , ω -二羧酸。

[0253] 在实施方案中,本发明提供了根据上述实施方案的化合物,其中酰化基团包含结构 $\text{HOO}-(\text{CH}_2)_n\text{CO}-$, 其中 n 是 12-20。

[0254] 在实施方案中,本发明提供了根据上述实施方案的化合物,其中酰化基团包含选自 $\text{HOO}-(\text{CH}_2)_{14}\text{CO}-$ 、 $\text{HOO}-(\text{CH}_2)_{15}\text{CO}-$ 、 $\text{HOO}-(\text{CH}_2)_{16}\text{CO}-$ 、 $\text{HOO}-(\text{CH}_2)_{17}\text{CO}-$ 和

H₂COO-(CH₂)₁₈CO- 的结构。

[0255] 在实施方案中,本发明提供了根据上述实施方案的化合物,其中酰化基团包含结构 H₂COO-(CH₂)₁₆CO-。

[0256] 本发明的另一目标是提供含有根据本发明的化合物的药物制剂,所述的化合物以 0.1mg/ml 至 25mg/ml 的浓度存在,并且其中所述的制剂具有 3.0 至 9.0 的 pH。该制剂可进一步包含缓冲系统、防腐剂、张度剂、螯合剂、稳定剂和表面活性剂。在本发明的一个实施方案中,药物制剂是含水制剂,即包含水的制剂。这种制剂通常是溶液或悬液。在本发明的进一步实施方案中,该药物制剂是含水溶液。术语“含水制剂”定义为含有至少 50% w/w 水的制剂。同样,术语“含水溶液”定义为含有至少 50% w/w 水的溶液,并且术语“含水悬液”定义为含有至少 50% w/w 水的悬液。

[0257] 在另一个实施方案中,药物制剂是一种冻干制剂,在使用前医师或患者加入溶剂和 / 或稀释液至其中。

[0258] 在另一个实施方案中,药物制剂是不需任何预先溶解的即用型干燥制剂(例如冰冷干燥或喷雾干燥)。

[0259] 在另一方面,本发明涉及含有根据本发明的化合物的含水溶液以及缓冲剂的药物制剂,其中所述的化合物以 0.1mg/ml 或 0.1mg/ml 以上的浓度存在,并且其中所述的制剂 pH 为约 3.0 至约 9.0。

[0260] 在本发明的另一个实施方案中,制剂的 pH 为约 7.0 至约 9.5。在本发明的另一个实施方案中,制剂的 pH 为约 3.0 至约 7.0。在本发明的另一个实施方案中,制剂的 pH 为约 5.0 至约 7.5。在本发明的另一个实施方案中,制剂的 pH 为约 7.5 至约 9.0。在本发明的另一个实施方案中,制剂的 pH 为约 7.5 至约 8.5。在本发明的另一个实施方案中,制剂的 pH 为约 6.0 至约 7.5。在本发明的另一个实施方案中,制剂的 pH 为约 6.0 至约 7.0。在另一个实施方案中,药物制剂为 8.0 至 8.5。

[0261] 在本发明的进一步实施方案中,缓冲剂选自乙酸钠、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-二(羟乙基)甘氨酸、N-(羟甲基)甲基甘氨酸、苹果酸、琥珀酸盐、马来酸、富马酸、酒石酸、天门冬氨酸或其混合物。这些特定缓冲剂的每一种构成本发明的一个备选实施方案。

[0262] 在本发明的进一步实施方案中,制剂进一步包含可药用防腐剂。在本发明的进一步实施方案中,防腐剂选自苯酚、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-苯氧乙醇、对羟基苯甲酸丁酯、2-苯基乙醇、苄醇、氯丁醇和硫柳汞(thiomerosal)、溴硝丙二醇、苯甲酸、咪唑、氯己啶、脱氢醋酸钠、氯甲酚、对羟基苯甲酸乙酯、苄索氯铵、氯苯甘醚(3对-氯苯氧基丙烷-1,2-二醇)或其混合物。在一个实施方案中,防腐剂是苯酚或间甲酚。在本发明的进一步实施方案中,防腐剂以 0.1mg/ml 至 20mg/ml 的浓度存在。在本发明的进一步实施方案中,防腐剂以 0.1mg/ml 至 5mg/ml 的浓度存在。在本发明的进一步实施方案中,防腐剂以 5mg/ml 至 10mg/ml 的浓度存在。在本发明的进一步实施方案中,防腐剂以 10mg/ml 至 20mg/ml 的浓度存在。这些特定防腐剂的每一种构成了本发明的一个备选实施方案。防腐剂在药物组合物中的使用是技术人员熟知的。为方便起见,可参考 Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 19th edition, 1995。

[0263] 在本发明的进一步实施方案中,制剂进一步包含等渗剂。在本发明的进一步实施方案中,等渗剂选自盐(如氯化钠)、糖或糖醇、氨基酸(如L-甘氨酸、L-组氨酸、精氨酸、赖氨酸、异亮氨酸、天门冬氨酸、色氨酸、苏氨酸)、糖醇(如丙三醇(甘油)、1,2-丙二醇(丙二醇)、1,3-丙二醇、1,3-丁二醇)聚乙二醇(如PEG400)或其混合物。在一个实施方案中,等渗剂是丙二醇。可以使用任何糖例如单糖、二糖或多糖,或者水溶性葡聚糖,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、右旋糖酐、支链淀粉、糊精、环糊精、可溶性淀粉、羟乙基淀粉和羧甲基纤维素钠。在一个实施方案中,糖添加剂是蔗糖。糖醇定义为具有至少一个-OH基团的C4-C8碳氢化合物并包括例如甘露醇、山梨醇、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,糖醇添加剂是甘露醇。上面提及的糖或糖醇可以独立地或组合使用。使用剂量无限制,只要糖或糖醇可溶解于液体制剂并且对使用本发明方法达到的稳定效应无不利影响。在一个实施方案中,糖或糖醇的浓度在约1mg/ml和约150mg/ml之间。在本发明的进一步实施方案中,等渗剂以1mg/ml至50mg/ml的浓度存在。在本发明的进一步实施方案中,等渗剂以1mg/ml至7mg/ml的浓度存在。在本发明的实施方案中,等渗剂以5mg/ml至7mg/ml的浓度存在。在本发明的进一步实施方案中,等渗剂以8mg/ml至24mg/ml的浓度存在。在本发明的进一步实施方案中,等渗剂以25mg/ml至50mg/ml的浓度存在。这些特定等渗剂的每一种构成了本发明的一个备选实施方案。等渗剂在药物组合物中的使用是技术人员熟知的。为了方便起见,可参考Remington:The Science and Practice of Pharmacy, 19th edition, 1995。

[0264] 在本发明的进一步实施方案中,制剂进一步包含螯合剂。在本发明的进一步实施方案中,螯合剂选自乙二胺四乙酸(EDTA)、柠檬酸和天门冬氨酸的盐及其混合物。在本发明的进一步实施方案中,螯合剂以0.1mg/ml至5mg/ml的浓度存在。在本发明的进一步实施方案中,螯合剂以0.1mg/ml至2mg/ml的浓度存在。在本发明的进一步实施方案中,螯合剂以2mg/ml至5mg/ml的浓度存在。这些特定的螯合剂的每一种构成了本发明的一个备选实施方案。螯合剂在药物组合物中的使用是技术人员熟知的。为了方便起见,可参考Remington:The Science and Practice of Pharmacy, 19th edition, 1995。

[0265] 在本发明的进一步实施方案中,制剂进一步包含稳定剂。稳定剂在药物组合物中的使用是技术人员熟知的。为了方便起见,可参考Remington:The Science and Practice of Pharmacy, 19th edition, 1995。

[0266] 更特别地,本发明组合物是稳定的液体药物组合物,该液体药物组合物的治疗活性成分包括在液体药物制剂存储过程中可能会显示出聚集体形成的多肽。“聚集体形成”旨在指导致寡聚物形成的多肽分子之间的物理相互作用,所述的寡聚物可保持可溶,或者是从溶液中沉淀出的大的可见聚集体。“在存储过程中”意指已经制备的、未立即施用给受试者的液体药物组合物或制剂。而且,在制备后,将其以液体形式、冰冻状态或干燥形式包装存储用于随后将其重构为适合施用于受试者的液体形式或其它形式。“干燥形式”意指液体药物组合物或制剂通过冷冻干燥(即,冻干法;见例如Williams和Polli(1984) J. Parenteral Sci. Technol. 38:48-59)、喷雾干燥(见Masters (1991) Spray-Drying Handbook (5th ed; Longman Scientific and Technical, Essex, U.K.), pp. 491-676; Broadhead等(1992) Drug Devel. Ind. Pharm. 18:1169-1206;和Mumenthaler等(1994) Pharm. Res. 11:12-20)或风干(Carpenter和Crowe(1988) Cryobiology 25:459-470;和

Roser(1991 年)Biopharm. 4:47-53) 而干燥。在液体药物组合物存储过程中多肽的聚集体形成可能会不利地影响所述多肽的生物活性,导致药物组合物的治疗效果丧失。而且,当采用输注系统施用含有多肽的药物组合物时,聚集体形成可引起其它问题例如输液管、膜或泵阻塞。

[0267] 本发明的药物组合物可以进一步包含足够用来减少在组合物存储过程中多肽聚集体形成的量的氨基酸碱。“氨基酸碱”意指氨基酸或氨基酸组合,其中任何给定氨基酸是以其游离碱形式或其盐形式存在。如果使用氨基酸的组合,所有的氨基酸可以以它们的游离碱形式存在,全部可以以它们的盐形式存在,或者一些可以以它们的游离碱形式存在而其它以它们的盐形式存在。在一个实施方案中,制备本发明组合物中使用的氨基酸是那些具有携带电荷的侧链的氨基酸,例如精氨酸、赖氨酸、天门冬氨酸和谷氨酸。特定氨基酸(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、苏氨酸及其混合物)的任何立体异构体(即 L、D 或其混合物)或这些立体异构体的组合可存在于本发明的药物组合物中,只要该特定氨基酸以其游离碱形式或其盐形式存在。在一个实施方案中,使用 L- 立体异构体。本发明组合物也可以使用这些氨基酸的类似物制备。“氨基酸类似物”意指天然存在的氨基酸的衍生物,所述的氨基酸衍生物引起减少在本发明液体药物组合物存储过程中的多肽聚集体形成的期望效果。合适的精氨酸类似物包括,例如氨基胍、鸟氨酸和 N- 单乙基 L- 精氨酸,合适的甲硫氨酸类似物包括乙硫氨酸和丁硫氨酸(buthionine),以及合适的半胱氨酸类似物包括 S- 甲基 -L 半胱氨酸。如同其它氨基酸一样,氨基酸类似物以它们的游离碱形式或它们的盐形式整合进组合物。在本发明的进一步实施方案中,氨基酸或氨基酸类似物以足以防止或延迟蛋白质聚集的浓度使用。

[0268] 在本发明的进一步实施方案中,当作为治疗剂的多肽包含至少一种易于氧化的甲硫氨酸残基时,可以加入甲硫氨酸(或其它含硫的氨基酸或氨基酸类似物)以抑制甲硫氨酸残基氧化为甲硫氨酸亚砷。“抑制”意指随着时间的过去甲硫氨酸氧化种类的最小限度的积聚。抑制甲硫氨酸氧化导致多肽更多地保持以其正常的分子形式存在。可以使用甲硫氨酸的任何立体异构体(L 或 D)或其组合。加入的量应该是足以抑制甲硫氨酸残基氧化的量,这样甲硫氨酸亚砷的量对管理机构是可接受的。通常,这意味着该组合物包含不多于约 10% - 约 30% 的甲硫氨酸亚砷。通常,这可以通过加入甲硫氨酸而使得加入的甲硫氨酸与甲硫氨酸残基的比率为约 1:1- 约 1000:1,例如 10:1- 约 100:1 来实现。

[0269] 在本发明的进一步实施方案中,所述的制剂进一步包含选自高分子量聚合物或低分子量化合物的稳定剂。在本发明的进一步实施方案中,稳定剂选自聚乙二醇(如 PEG3350)、聚乙烯醇(PVA)、聚乙烯吡咯烷酮、羧基-/羟基纤维素或其衍生物(如 HPC、HPC-SL、HPC-L 和 HPMC)、环糊精、含硫的物质如单硫代甘油(monothioglycerol)、巯基乙酸和 2- 甲硫基乙醇以及不同的盐(例如氯化钠)。这些特定稳定剂的每一种构成了本发明的一个备选实施方案。

[0270] 药物组合物还可以包含额外的稳定剂,该稳定剂进一步增强其中的治疗活性多肽的稳定性。本发明特别重要的稳定剂包括(但不限于)使多肽免于甲硫氨酸氧化的甲硫氨酸和 EDTA,以及使多肽免于与冻融或机械剪切力相关的聚集的非离子型表面活性剂。

[0271] 在本发明的进一步实施方案中,制剂进一步包含表面活性剂。在本发明的另一个实施方案中,所述的药物组合物包含两种不同的表面活性剂。如此处使用的,术语“表面活

性剂”指由水溶性（亲水性）部分（头部）和脂溶性（亲脂性）部分组成的任何分子或离子。表面活性剂优选在界面处积聚，其亲水性部分朝向水（亲水相）而亲脂部分朝向油-或疏水相（即玻璃、空气、油等）。表面活性剂开始形成胶束时的浓度称为临界胶束浓度或CMC。此外，表面活性剂降低了液体的表面张力。表面活性剂也称为两亲化合物。术语“去垢剂”通常是表面活性剂的同义词。

[0272] 阴离子表面活性剂可以选自：鹅去氧胆酸、鹅去氧胆酸钠盐、胆酸、脱氢胆酸、脱氧胆酸、脱氧胆酸甲酯、洋地黄皂甙、毛地黄毒苷配基、N, N- 二甲基十二烷胺 N- 氧化物、多库酯钠、甘氨酸去氧胆酸钠、甘氨酸水合物、甘氨酸脱氧胆酸一水合物、甘氨酸脱氧胆酸钠盐、甘氨酸脱氧胆酸钠盐、葡糖石胆酸 3- 硫酸二钠盐、葡糖石胆酸乙酯、N- 十二烷酰肌氨酸钠盐、N- 十二烷酰肌氨酸钠盐、N- 十二烷酰肌氨酸、N- 十二烷酰肌氨酸、十二烷基硫酸锂、Lugol、1- 辛烷磺酸钠盐、1- 辛烷磺酸钠盐、1- 丁烷磺酸钠、1- 癸烷磺酸钠、1- 十二烷磺酸钠、1- 庚烷磺酸钠、1- 庚烷磺酸钠、1- 壬烷磺酸钠、1- 丙烷磺酸钠一水合物、2- 溴乙烷磺酸钠、胆酸钠水合物、牛或羊胆汁、胆酸钠水合物、络胆酸钠盐、脱氧胆酸钠、十二烷基硫酸钠、十二烷基硫酸钠、己烷磺酸钠、辛基硫酸钠、戊烷磺酸钠、牛磺胆酸钠、牛磺鹅去氧胆酸钠盐、牛磺脱氧胆酸钠盐一水合物、牛磺石胆酸 3- 硫酸二钠盐、牛熊脱氧胆酸钠盐、**Trizma[®]** 十二烷基硫酸盐、DSS（多库酯钠，CAS 注册号 [577-11-7]）、多库酯钙，CAS 注册号 [128-49-4]）、多库酯钾，CAS 注册号 [7491-09-0]）、SDS（十二烷基硫酸钠或月桂基硫酸钠）、十二烷基磷酸胆碱（FOS- 胆碱 -12）、癸基磷酸胆碱（FOS- 胆碱 -10）、壬基磷酸胆碱（FOS- 胆碱 -9）、二棕榈酰基磷脂酸、辛酸钠和 / 或熊果脱氧胆酸。

[0273] 阳离子表面活性剂可以选自：烷基三甲基溴化铵、苯扎氯铵、苯扎氯铵、苄基二甲基十六烷基氯化铵、苄基二甲基十四烷基氯化铵、苄基三甲基四氯碘酸铵、二甲基双十八烷基溴化铵、十二烷基乙基二甲基溴化铵、十二烷基三甲基溴化铵、十二烷基三甲基溴化铵、乙基十六烷基二甲基溴化铵、十六烷基三甲基溴化铵、十六烷基三甲基溴化铵、聚氧乙烯 (10)-N- 牛油 -1, 3- 二氨基丙烷、通佐溴胺和 / 或三甲基（十四烷基）溴化铵。

[0274] 非离子表面活性剂可以选自：BigCHAP、双（聚乙二醇双[咪唑基羰基]）、嵌段共聚物如聚氧化乙烯 / 聚氧化丙烯嵌段共聚物例如泊洛沙姆、泊洛沙姆 -188 和 泊洛沙姆 -407、**Brij[®] 35、Brij[®] 56、Brij[®] 72、**

Brij[®] 76、Brij[®] 92V、Brij[®] 97、Brij[®] 58P、Cremophor[®] EL、 十二乙二醇单十二烷基醚、N- 癸酰 -N- 甲基葡糖胺、n- 十二烷酰 -N- 甲基葡糖胺、烷基 - 多聚葡萄糖苷、乙氧化蓖麻油、七乙二醇单癸基醚、七乙二醇单十二烷基醚、七乙二醇单十四烷基醚、六乙二醇单十二烷基醚、六乙二醇单十六烷基醚、六乙二醇单十八烷基醚、六乙二醇单十四烷基醚、Igepal CA-630、Igepal CA-630、甲基 -6-O-(N- 庚基氨基甲酰)-β-D- 吡喃葡萄糖苷、九乙二醇单十二烷基醚、N- 壬酰 -N- 甲基葡糖胺、N- 壬酰 -N- 甲基葡糖胺、八乙二醇单癸基醚、八乙二醇单十二烷基醚、八乙二醇单十六烷基醚、八乙二醇单十八烷基醚、八乙二醇单十四烷基醚、辛基 -β-D- 吡喃葡萄糖苷、五乙二醇单癸基醚、五乙二醇单十二烷基醚、五乙二醇单十六烷基醚、五乙二醇单己基醚、五乙二醇单十八烷基醚、五乙二醇单辛基醚、聚乙二醇二缩水甘油醚、聚乙二醇醚 W-1、聚氧乙烯 10 十三烷基醚、聚氧乙烯 100 硬脂酸酯、聚氧乙烯 20 异十六烷基醚、聚氧乙烯

20 油基醚、聚氧乙烯 40 硬脂酸酯、聚氧乙烯 50 硬脂酸酯、聚氧乙烯 8 硬脂酸酯、聚氧乙烯双（咪唑基羰基）、聚氧乙烯 25 丙二醇硬脂酸酯、来自 Quillaja bark 的 Saponin、

Span® 20、Span® 40、Span® 60、Span® 65、Span® 80、Span® 85、

Tergitol (15-S-12 型)、Tergitol (15-S-30 型)、Tergitol (15-S-5 型)、Tergitol (15-S-7 型)、Tergitol (15-S-9 型)、Tergitol (NP-10 型)、Tergitol (NP-4 型)、Tergitol (NP-40 型)、Tergitol (NP-7 型)、Tergitol (NP-9 型)、十四烷基-β-D-麦芽苷、四乙二醇单癸基醚、四乙二醇单十二烷基醚、四乙二醇单十四烷基醚、三乙二醇单癸基醚、三乙二醇单十二烷基醚、三乙二醇单十六烷基醚、三乙二醇单辛基醚、三乙二醇单十四烷基醚、Triton CF-21、Triton CF-32、Triton DF-12、Triton DF-16、Triton GR-5M、Triton QS-15、Triton QS-44、Triton X-100、Triton X-102、Triton X-15、Triton X-151、Triton X-200、Triton X-207、**Triton® X-100、Triton® X-114、Triton® X-165 溶液、**

Triton® X-305 溶液、Triton® X-405、Triton®

X-45、Triton® X-705-70、TWEEN® 20、TWEEN® 40、TWEEN® 60、TWEEN®

6、TWEEN® 65、TWEEN® 80、TWEEN® 81、TWEEN® 85、四丁酚醛、鞘磷脂（神经鞘磷脂）和鞘糖脂类（神经酰胺、神经节苷酯）、磷脂和 / 或正十一烷基 β-D-吡喃葡萄糖苷。

[0275] 两性离子表面活性剂可以选自：CHAPS、CHAPSO、3-（癸基二甲基铵）丙磺酸内盐、3-（十二烷基二甲基铵）丙磺酸内盐、3-（十二烷基二甲基铵）丙磺酸内盐、3-（N，N-二甲基十四烷基铵）丙磺酸盐、3-（N，N-二甲基十八烷基铵）丙磺酸盐、3-（N，N-二甲基辛基铵）丙磺酸内盐、3-（N，N-二甲基十六烷基铵）丙磺酸盐、N-烷基-N，N-二甲基铵-1-丙磺酸盐、3-胆酰胺-1-丙基二甲基铵-1-丙磺酸盐、十二烷基磷酸胆碱、肉豆蔻酰溶血磷脂酰胆碱、Zwittergent3-12（N-十二烷基-N，N-二甲基-3-铵基-1-丙磺酸盐）、Zwittergent3-10（3-（癸基二甲基铵）丙磺酸内盐）、Zwittergent3-08（3-（辛基二甲基铵）丙磺酸盐）、甘油磷脂类（卵磷脂、脑磷脂、磷脂酰丝氨酸）、甘油糖脂类（吡喃半乳糖苷）、溶血磷脂酰胆碱和磷脂酰胆碱的烷基、烷氧基（烷基酯）、烷氧基（烷基醚）-衍生物，例如溶血磷脂酰胆碱、二棕榈酰磷脂酰胆碱的月桂酰和肉豆蔻酰衍生物，以及极性头基团的修饰物，即胆碱、乙醇胺、磷脂酸、丝氨酸、苏氨酸、甘油、肌醇、溶血磷脂酰丝氨酸和溶血磷脂酰苏氨酸）、酰基肉毒碱及其衍生物、赖氨酸、精氨酸或组氨酸的 N^β-酰化的衍生物，或者赖氨酸或精氨酸的侧链酰化的衍生物，包含赖氨酸、精氨酸或组氨酸和中性或酸性氨基酸任意组合的二肽的 N^β-酰化的衍生物，包含中性氨基酸和两个带电荷氨基酸的任意组合的三肽的 N^β-酰化的衍生物，或者表面活性剂可选自咪唑啉衍生物、长链脂肪酸及其盐 C₆-C₁₂（例如油酸和辛酸）、N-十六烷基-N，N-二甲基-3-铵-1-丙磺酸盐、阴离子型（烷基-芳基-磺酸酯）单价表面活性剂、棕榈酰溶血磷脂-L-丝氨酸、溶血磷脂（例如乙醇胺、胆碱、丝氨酸或苏氨酸的 1-酰基-sn-甘油-3-磷酸酯）或其混合物。

[0276] 如此处使用的，术语“烷基-多聚葡萄糖苷”涉及由一个或多个糖苷部分（例如麦芽糖苷、糖类等）取代的直链或支链的 C₅₋₂₀-烷基、-链烯基或-炔基链。这些烷基-多聚葡萄糖苷的实施方案包括 C₆₋₁₈-烷基-多聚葡萄糖苷。这些烷基-多聚葡萄糖苷的特定实

施方案包括偶数碳链例如 C_6 、 C_8 、 C_{10} 、 C_{12} 、 C_{14} 、 C_{16} 、 C_{18} 和 C_{20} 烷基链。糖苷部分的特定实施方案包括吡喃糖苷、吡喃葡萄糖苷、麦芽糖苷、麦芽三糖苷和蔗糖。在本发明的一个实施方案中,少于 6 个的糖苷部分连接至烷基基团。在本发明的一个实施方案中,少于 5 个的糖苷部分连接至烷基基团。在本发明的一个实施方案中,少于 4 个的糖苷部分连接至烷基基团。在本发明的一个实施方案中,少于 3 个的糖苷部分连接至烷基基团。在本发明的一个实施方案中,少于 2 个的糖苷部分连接至烷基基团。烷基-多聚葡萄糖苷的特定实施方案是烷基葡萄糖苷如正癸基 β -D-吡喃葡萄糖苷、癸基 β -D-吡喃麦芽糖苷、十二烷基 β -D-吡喃葡萄糖苷、正十二烷基 β -D-麦芽糖苷、正十二烷基 β -D-麦芽糖苷、正十二烷基 β -D-麦芽糖苷、十四烷基 β -D-吡喃葡萄糖苷、癸基 β -D-麦芽糖苷、十六烷基 β -D-麦芽糖苷、癸基 β -D-麦芽三糖苷、十二烷基 β -D-麦芽三糖苷、十四烷基 β -D-麦芽三糖苷、十六烷基 β -D-麦芽三糖苷、正十二烷基-蔗糖、正癸基-蔗糖、蔗糖单癸酸酯、蔗糖单月桂酸酯、蔗糖单十四酸酯,以及蔗糖单棕榈酸酯。

[0277] 表面活性剂在药物组合物中的使用是技术人员熟知的。为了方便起见,可参考 Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 19th edition, 1995。

[0278] 在本发明的进一步实施方案中,所述的制剂还包括蛋白酶抑制剂例如 EDTA (乙二胺四乙酸) 和苯脲 HCl,但也可以使用其它可商业获得的蛋白酶抑制剂。蛋白酶抑制剂的使用在含有蛋白酶酶原的药物组合物中是特别有用的,以便抑制自身催化。

[0279] 其它成分可以存在于本发明的肽药物制剂中。这些额外的成分可以包括湿润剂、乳化剂、抗氧化剂、填充剂、张力调节剂、螯合剂、金属离子、油质载体、蛋白质(例如人血清白蛋白、明胶或蛋白质)以及两性离子(例如,氨基酸如甜菜碱、牛磺酸、精氨酸、甘氨酸、赖氨酸和组氨酸)。当然,这些额外成分不应该不利地影响本发明药物制剂的整体稳定性。

[0280] 含有根据本发明化合物的药物组合物可以在多个位点施用给需要这种治疗的患者,例如在局部位点(如皮肤和粘膜位点)、在不经吸收的位点(如在动脉、静脉、心脏施用)、以及在涉及吸收的位点(如在皮肤、皮下、肌肉或腹部施用)。

[0281] 根据本发明的药物组合物的施用可以通过多种给药途径施用给需要这种治疗的患者,例如舌、舌下、口颊、口中、经口、在胃和肠内、鼻、肺(如通过细支气管和肺泡或它们的组合)、表皮、真皮、经皮肤、阴道、直肠、眼(例如通过结膜)、输尿管和肠胃外施用。

[0282] 本发明组合物可以以多种剂型施用,例如作为溶液剂、混悬剂、乳剂、微乳剂、复合型乳剂、泡沫剂、油膏剂、糊剂、硬膏剂、软膏剂、片剂、包衣片剂、冲洗剂、胶囊剂(例如硬明胶胶囊剂和软明胶胶囊剂)、栓剂、直肠用胶囊剂、滴剂、凝胶剂、喷雾剂、粉剂、气溶胶、吸入剂、滴眼剂、眼膏剂、眼用冲洗剂、阴道栓剂、阴道环、阴道软膏剂、注射溶液、原位转化溶液(例如原位凝胶化、原位固定、原位沉淀、原位结晶)、输注液和埋植剂施用。

[0283] 本发明组合物可以进一步例如通过共价、疏水性和静电相互作用混合进或连接至药物载体、药物递送系统和高级药物递送系统以便进一步增强本发明化合物的稳定性、提高生物利用率、增强溶解性、降低不利效应、达到本领域那些技术人员熟知的定时治疗(chronotherapy),以及增强患者顺应性或它们的任意组合。载体、药物递送系统和高级药物递送系统的实例包括(但不限于)聚合物(如纤维素及其衍生物)、多糖(如葡聚糖及其衍生物、淀粉及其衍生物)、聚(乙烯醇)、丙烯酸酯和甲基丙烯酸聚合物、聚乳酸和聚乙醇酸及它们的嵌段共聚体、聚乙二醇、载体蛋白(如白蛋白)、凝胶如热凝胶系统

(thermogelling system), 如本领域那些技术人员熟知的嵌段共聚体系统、胶束、脂质体、微球体、纳米微粒、液晶及其分散体 (dispersion)、L2 相及其分散体, 脂-水系统的相行为领域中的那些技术人员熟知的高分子胶束、复合型乳剂、自乳化、自微乳化、环糊精和其衍生物, 以及树状分子。

[0284] 本发明组合物可用于制备用于肺部施用本发明化合物的固体、半固体、粉末和溶液, 所述的肺部施用是使用例如定量吸入器、干粉吸入器和喷雾器来进行, 所有这些装置是本领域那些技术人员熟知的。

[0285] 本发明组合物特别可用于制备控制释放、持续释放、延长释放、阻释和缓释药物递送系统。更特别地, 但不作为限制, 组合物可用于制备本领域那些技术人员熟知的肠胃外控制释放系统和持续释放系统 (这两个系统都导致施用量减少许多倍)。甚至更特别地是, 组合物可用于制备经皮下施用的可控制释放系统和持续释放系统。无意于限制本发明领域, 有用的控制释放系统和组合物的实例是水凝胶、油性凝胶、液晶、高分子微团、微球、纳米微粒。

[0286] 生产可用于本发明组合物的控制释放系统的方法包括 (但不限于) 结晶、浓缩、共结晶、沉淀、共沉淀、乳化、分散、高压匀化、胶囊化、喷雾干燥、微胶囊化、凝聚、相分离、溶剂蒸发产生微球、挤出 (extrusion) 和超临界流体过程 (supercritical fluid process)。一般参考 Handbook of Pharmaceutical Controlled Release (Wise, D. L., ed. Marcel Dekker, New York, 2000) 和 Drug and the Pharmaceutical Sciences vol. 99: Protein Formulation and Delivery (MacNally, E. J., ed. Marcel Dekker, New York, 2000)。

[0287] 肠胃外施用可以用注射器, 任选笔式注射器通过皮下、肌肉、腹膜内或静脉内注射来实施。备选地, 肠胃外施用可以通过输注泵实施。进一步的选择是, 可以以鼻或肺液体或粉末喷雾形式施用本发明化合物的溶液或混悬剂或粉剂的组合物。作为更进一步的选择, 含有本发明化合物的药物组合物也能够适合例如通过无针注射或通过药贴, 任选离子导入药贴 (iontophoretic patch) 经皮肤施用, 或者经粘膜 (如口腔) 施用。

[0288] 本发明化合物可以使用适合肺部药物递送的任何已知类型的装置, 在载体中作为溶液、混悬剂或干粉剂通过肺部途径施用。这些装置的实例包括 (但不限于) 用于肺部药物递送的三种通用型气溶胶发生器, 并且可以包括喷射雾化器或超声波雾化器、定量吸入器或干粉吸入器 (参见 Yu J, Chien YW. Pulmonary drug delivery: Physiologic and mechanistic aspects. Crit Rev Ther Drug Carr Sys 14(4) (1997) 395-453)。

[0289] 基于标准化的测试方法学, 将粒子的气体动力学直径 (d_a) 定义为单位密度 ($1\text{g}/\text{cm}^3$) 的参考标准球形粒子的几何等效直径。在最简单的情形中, 对于球形微粒, d_a 作为相对密度的平方根函数与基准直径 (d) 相关, 如 Modifications to this relationship occur for non-spherical particles 中描述 (参见 Edwards DA, Ben-Jebria A, Langer R. Recent advances in pulmonary drug delivery using large, porous inhaled particles. J Appl Physiol 84(2) (1998) 379-385)。

[0290] 术语“MMAD”和“MMEAD”是本领域已充分描述和已知的 (参见 Edwards DA, Ben-Jebria A, Langer R and represents a measure of the median value of an aerodynamic particle size distribution. Recent advances in pulmonary drug delivery using large, porous inhaled particles. J Appl Physiol 84(2)

(1998)379-385)。质量中值直径 (MMAD) 和质量中值有效直径 (MMEAD) 可以交换使用, 是统计参数, 并且经验地描述气溶胶粒子大小 (该大小与它们在肺中沉积的潜力相关), 不依赖于实际形状、大小或密度 (参见 Edwards DA, Ben-Jebria A, Langer R. Recent advances in pulmonary drug delivery using large, porous inhaled particles. J Appl Physiol 184(2) (1998) 379-385)。MMAD 通常用碰撞器 (测量粒子在气体中的惯性行为的装置) 测量计算。

[0291] 在进一步的实施方案中, 制剂可以通过任何已知的雾化技术 (例如喷雾技术) 而雾化, 以达到气溶胶粒子的 MMAD 小于 $10\ \mu\text{m}$, 更优选 $1-5\ \mu\text{m}$, 并且最优选 $1-3\ \mu\text{m}$ 。优选的粒子大小是基于递送药物进肺深部 (在那里蛋白质得以最佳吸收) 的最有效大小 (参见 Edwards DA, Ben-Jebria A, Langer A, Recent advances in pulmonary drug delivery using large, porous inhaled particles. J Appl Physiol 184(2) (1998) 379-385)。

[0292] 含有本发明化合物的肺用制剂在肺深部沉积可任选通过使用吸入技术的改变形式进一步优化, 所述的吸入技术的改变形式是例如 (但不限于): 缓慢吸入气流 (例如 30L/分钟)、屏气和定时释放 (breath holding and timing of actuation)。

[0293] 术语“稳定制剂”指具有增加的物理稳定性、增加的化学稳定性或增加的物理和化学稳定性的制剂。

[0294] 如此处使用的术语蛋白制剂的“物理稳定性”指该蛋白由于其暴露于热-机械应力下和/或与失稳的界面和表面 (如疏水表面和界面) 相互作用而形成生物学上失活的和/或不可溶的蛋白聚集物的倾向性。含水的蛋白质制剂的物理稳定性可通过在不同的温度下将置于合适容器 (如药筒或小瓶) 中的制剂暴露于机械/物理应力 (如搅动) 下多个时间段后通过视觉检查和/或浊度测量来评估。制剂的视觉检查在具有黑色背景的强聚焦光下进行。制剂的浊度通过视觉打分评定混浊程度等级来表征, 如以 0-3 的等级来表征 (未显示混浊的制剂对应视觉打分 0, 而在日光下显示可见的混浊的制剂对应视觉打分 3)。当制剂在日光下显示可见的混浊度时, 将蛋白分类为关于蛋白聚集是物理不稳定的。备选地, 制剂的浊度可通过技术人员熟知的简单浊度测量法评估。含水蛋白质制剂的物理学稳定性也可以通过使用光谱剂 (spectroscopic agent) 或蛋白质构象状态的探针来评估。该探针优选为优先结合蛋白质的非天然构象异构体的小分子。蛋白质结构的小分子光谱探针 (spectroscopic probe) 的一个实例是硫磺素 T。硫磺素 T 是已经广泛用于检测淀粉样蛋白原纤维的荧光染料。在有原纤维, 或许也有其它蛋白质构象的情况下, 硫磺素 T 在结合原纤维蛋白质形式时在约 450nm 处产生新的激发极大值并且在约 482nm 处发射增强。未结合的硫磺素 T 在这些波长下基本上是无荧光的。

[0295] 其它小分子可以用作蛋白质结构改变 (从天然到非天然状态) 的探针。例如, 优选结合蛋白质的暴露的疏水片 (hydrophobic patch) 的“疏水片”探针。疏水片通常是包埋于天然态蛋白的三级结构中, 但当蛋白开始去折叠或变性时其变为暴露在外。这些小分子、光谱探针的实例是芳香的、疏水染料如 anthracene、吡啶、二氮杂菲等。其它光谱探针是金属-氨基酸络合物例如疏水氨基酸如苯丙氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、甲硫氨酸和缬氨酸等的钴金属络合物。

[0296] 如此处使用的术语, 蛋白质制剂的“化学稳定性”指蛋白结构中的化学共价变化, 其中所述的这种变化导致具有较于天然蛋白结构潜在较小的生物学效力和/或潜在增加

的免疫原特性的化学降解产物的形成。

[0297] 可以形成多种化学降解产物,这取决于天然蛋白质的类型和性质以及该蛋白质暴露的环境。化学降解的消除几乎不可能完全实现并且在存储和使用蛋白质制剂过程中通常可见化学降解产物的量增加,这是本领域技术人员熟知的。多数蛋白质易于脱酰胺作用,即谷氨酰胺或天冬酰胺残基中的侧链酰胺基水解形成游离的羧酸的过程。其它降解途径包括高分子量的转化产物的形成,其中两个或多个蛋白分子通过转酰胺基作用和 / 或二硫化物相互作用共价地彼此结合导致形成共价结合二聚体、寡聚体和多聚体降解产物 (Stability of Protein Pharmaceuticals, Ahern. T. J. & Manning M. C., Plenum Press, New York 1992)。氧化 (例如甲硫氨酸残基的氧化) 可认为是化学降解的另一种变体。蛋白制剂的化学稳定性可通过在其暴露于不同的环境条件 (降解产物的形成通常可通过例如增加温度来加速) 下后,在多个时间点测量化学降解产物的量来评估。每种单独的降解产物的量通常可根据分子大小和 / 或电荷,使用多种色谱技术 (如 SEC-HPLC 和 / 或 RP-HPLC) 而分离降解产物测定。

[0298] 因此,按上面描述,“经稳定的制剂”指具有增强的物理学稳定性、增强的化学稳定性或增强的物理和化学稳定性的制剂。通常,制剂在使用和存储过程中 (根据建议的使用和存储条件) 必须是稳定的,直到达到有效期满。

[0299] 在本发明的一个实施方案中,含有本发明化合物的药物制剂在 6 周以上的使用和 3 年以上的存储中是稳定的。

[0300] 在本发明的另一个实施方案中,含有本发明化合物的药物制剂在 4 周以上的使用和 3 年以上的存储中是稳定的。

[0301] 在本发明进一步的实施方案中,含有本发明化合物的药物制剂在 4 周以上的使用和 2 年以上的存储中是稳定的。

[0302] 在本发明进一步的实施方案中,含有本发明化合物的药物制剂在 2 周以上的使用和 2 年以上的存储中是稳定的。

[0303] 在另一方面,本发明涉及根据本发明的化合物用于制备药物的用途。

[0304] 在一个实施方案中,根据本发明的化合物用于制备治疗或预防高血糖、2 型糖尿病、葡萄糖耐量降低、1 型糖尿病、肥胖症、高血压、X 综合征、血脂障碍、认知障碍、动脉粥样硬化、心肌梗塞、中风、冠心病和其它心血管疾病、炎性肠综合征、消化不良和胃溃疡的药物。

[0305] 在另一个实施方案中,根据本发明的化合物用于制备延缓或预防 2 型糖尿病的疾病发展的药物。

[0306] 在另一个实施方案中,根据本发明的化合物用于制备减少食物摄取、减少 β -细胞凋亡、增加 β -细胞功能和 β -细胞量和 / 或恢复 β -细胞的葡萄糖敏感性的药物。

[0307] 使用根据本发明化合物的治疗也可以与另一种或多种药理活性物质组合,所述的药理活性物质例如选自抗糖尿病药、减肥药、食欲调节剂、抗高血压药、用于治疗 and / 或预防由糖尿病引发或与其相关的并发症的制剂以及用于治疗 and / 或预防由肥胖症引发或与其相关的并发症和障碍的制剂。这些药理活性物质的实例是:胰岛素、磺脲类、双胍、氯茴苯酸类、葡萄糖苷酶抑制剂、胰高血糖素拮抗剂、DPP-IV (二肽基肽酶-IV) 抑制剂、涉及刺激糖异生和 / 或糖原分解的肝脏酶的抑制剂、葡萄糖摄取调节剂、调节脂类代谢的化

合物如抗高血脂药剂如 HMG CoA 抑制剂（他汀类药物）、胃抑制性多肽（GIP 类似物）、降低食物摄取的化合物、RXR 激动剂和作用于 β 细胞的 ATP 依赖性钾通道的制剂；考来烯胺、考来替泊、安妥明、吉非贝齐、洛伐他汀、普伐他汀、辛伐他汀、普罗布考、右甲状腺素、neteglinide、瑞格列奈； β 阻滞剂如烯丙心安、氨酰心安、噻吗心安、吲哚心安、蔡心安和甲氧乙心安、ACE（血管紧张素转化酶）抑制剂如贝那普利、卡托普利、恩纳普利、福森普利、赖诺普利、alatriopril、喹那普利和雷米普利、钙通道阻滞剂如硝苯吡啶、二氯苯吡啶、硝苯苳吡啶、依拉地平、尼莫地平、地尔硫卓和维拉帕米，以及 α 阻滞剂如多沙唑嗪、哌胺甲尿啶、哌唑嗪和特拉唑嗪；CART（可卡因安非他明调节的转录物）激动剂、NPY（神经肽 Y）拮抗剂、PYY 激动剂、PYY2 激动剂、PYY4 激动剂、混合的 PYY2/PYY4 激动剂、MC4（黑皮质素 4）激动剂、阿立新拮抗剂、TNF（肿瘤坏死因子）激动剂、CRF（促皮质素释放因子）激动剂、CRF BP（促皮质素释放因子结合蛋白）拮抗剂、urocortin 激动剂、 $\beta 3$ 激动剂、MSH（黑素细胞 - 刺激激素）激动剂、MCH（黑素细胞收缩激素）拮抗剂、CCK（胆囊收缩素）激动剂、血清素重吸收抑制剂、血清素和去甲肾上腺素重吸收抑制剂、经混合的血清素和去甲肾上腺素化合物、5HT（血清素）激动剂、蛙皮素激动剂、神经节肽拮抗剂、生长激素、生长激素释放化合物、TRH（促甲状腺激素释放激素）激动剂、UCP2 或 3（解偶联蛋白 2 或 3）调节剂、瘦素激动剂、DA 激动剂（溴隐停、doprexin）、脂肪酶 / 淀粉酶抑制剂、RXR（视黄醇类 X 受体）调节剂、TR β 激动剂；组胺 H3 拮抗剂、胃抑制性多肽激动剂或拮抗剂（GIP 类似物）、胃泌素和胃泌素类似物。

[0308] 使用根据本发明化合物的治疗还可以与外科手术（即影响葡萄糖水平和 / 或脂质体内平衡的外科手术）例如胃囊带术或胃旁路术联合。

[0309] 应该理解的是，根据本发明的化合物与一种或多种上面提及的化合物，以及任选一种或多种其它药理活性物质的任何合适的组合可以认为是在本发明范围内。

[0310] 本发明通过下面的实施例来进一步阐述，然而，所述的实施例不应理解为限制本专利保护的范围。在前面描述和下列实施例中公开的特征（个别地和它们的任何组合）可以是用于以其不同形式实现本发明的材料。

实施例

[0311] 使用的缩写：

[0312] r. t : 室温

[0313] DIPEA : 二异丙基乙胺

[0314] H_2O : 水

[0315] CH_3CN : 乙腈

[0316] DMF : N, N- 二甲基甲酰胺

[0317] HBTU : 2-(1H- 苯并三唑 -1- 基)-1, 1, 3, 3- 四甲基脲六氟磷酸

[0318] Fmoc : 9H- 芴 -9- 基甲氧基羰基

[0319] Boc : 叔丁氧羰基

[0320] OtBu : 叔丁酯

[0321] tBu : 叔丁基

[0322] Trt : 三苯甲基

- [0323] Pmc :2, 2, 5, 7, 8- 五甲基 - 苯并二氢吡喃 -6- 磺酰基
- [0324] Dde :1-(4, 4- 二甲基 -2, 6- 二氧环亚己基) 乙基
- [0325] ivDde :1-(4, 4- 二甲基 -2, 6- 二氧环亚己基)-3- 甲基丁基
- [0326] Mtt :4- 甲基三苯甲基
- [0327] Mmt :4- 甲氧基三苯甲基
- [0328] DCM :二氯甲烷
- [0329] TIS :三异丙基硅烷)
- [0330] TFA :三氟乙酸
- [0331] Et₂O :乙醚
- [0332] NMP :1- 甲基 - 吡咯烷 -2- 酮
- [0333] DIPEA :二异丙基乙胺
- [0334] HOAt :1- 羟基 -7- 氮杂苯并三唑
- [0335] HOBt :1- 羟基苯并三唑
- [0336] DIC :二异丙基碳二亚胺
- [0337] A :结合树脂的肽的合成。

[0338] 使用制造商提供的 FastMoc UV 方法, 在 Applied Biosystems433 肽合成仪上根据 Fmoc 策略合成 0.25mmol 或 1.0mmol 量级的经保护的肽酰树脂, 所述的 FastMoc UV 方法采用在 NMP(N- 甲基吡咯烷酮) 中的 HBTU(2-(1H- 苯并三唑 -1- 基)-1, 1, 3, 3- 四甲基脲六氟磷酸) 或 HATU(0-(7- 氮杂苯并三唑 -1- 基)-1, 1, 3, 3- 四甲基脲六氟磷酸) 介导的偶联, 并且 UV 监控 Fmoc 保护基团的去保护。用于合成 GLP-1 肽酰胺的起始树脂是 Rink-Amide 树脂并且 Wang 或氯三苯甲基树脂用于具有羧基 C 端的 GLP-1 肽。除了非天然的氨基酸例如 Fmoc-Aib-OH(Fmoc- 氨基异丁酸) 以外, 使用的经保护的氨基酸衍生物是在适合用于 ABI433A 合成仪的预称量筒中提供的标准 Fmoc- 氨基酸(由例如 Anaspec 或 Novabiochem 提供)。N 端氨基酸在 α 氨基处用 Boc 保护(例如将 Boc-His(Boc)OH 用于 N 端具有 His 的肽)。位置 26 的赖氨酸的 ε 氨基用 Mtt、Mmt、Dde、ivDde 或 Boc 保护, 这取决于连接白蛋白结合部分和间隔物的方式。肽的合成在一些情况中可以通过利用在二肽酰胺键上用酸性条件下能够切割的基团保护的二肽来改善, 所述的基团例如是但不限于 2-Fmoc- 氧 -4- 甲氧苄基或 2, 4, 6- 三甲氧苄基。在肽中存在丝氨酸或苏氨酸的情况中, 可以使用假脯氨酸(pseudoproline) 二肽(见例如 Novobiochem2002/2003 或更新版本的目录, 或 W. R. Sampson(1999), J. Pep. Sci. 5, 403)。

[0339] 除去 ivDde 或 Dde- 保护的方法。

[0340] 将树脂(0.25mmol) 置于一个手动振荡器/过滤装置中并用 N- 甲基吡咯烷酮中的 2% 胍(20ml, 2×12 分钟) 处理以除去 Dde 或 ivDde 基团并用 N- 甲基吡咯烷酮(4×20ml) 洗涤。

[0341] 除去 Mtt 或 Mmt- 保护的方法。

[0342] 将树脂(0.25mmol) 置于手动振荡器/过滤装置中并用 DCM 中的 2% TFA 和 2-3% TIS 处理(20ml, 5-10 分钟, 重复 6-12 次) 以除去 Mtt 或 Mmt 基团, 并用 DCM(2×20ml)、DCM 中的 10% MeOH 和 5% DIPEA(2×20ml) 和 N- 甲基吡咯烷酮(4×20ml) 洗涤。

[0343] 将侧链连接至赖氨酸残基的方法。

[0344] 白蛋白结合残基(式 I 的 B-U- 侧链)可以通过使用标准酰化剂(例如但不限于 DIC、HOBt/DIC、HOAt/DIC 或 HBTU)酰化至结合树脂的肽上或在溶液中酰化至未受保护的肽上而连接至 GLP-1。

[0345] 连接至结合树脂的肽上:

[0346] 路径 I

[0347] 将活化的(活化酯或对称酸酐)白蛋白结合残基(式 I 的 B-U- 侧链)例如十八烷二酸单-(2,5- 二氧-吡咯烷-1-基)酯(Ebashi 等, EP511600, 相对于结合树脂的肽 4 摩尔当量)溶解于 NMP(25mL)中,在室温下加入至树脂并摇动过夜。过滤反应混合物并用 NMP、二氯甲烷、2- 丙醇、甲醇和乙醚仔细洗涤树脂。

[0348] 路径 II

[0349] 将白蛋白结合残基(式 I 的 B-U- 侧链)溶解于 N- 甲基吡咯烷酮/二氯甲烷(1:1, 10ml)中。加入活化试剂例如羟基苯并三唑(HOBt)(相对于树脂 4 摩尔当量)和二异丙基碳二亚胺(相对于树脂 4 摩尔当量)并搅拌溶液 15 分钟。将该溶液加入至树脂中并加入二异丙基乙胺(相对于树脂 4 摩尔当量)。将树脂在室温下摇动 2-24 小时。用 N- 甲基吡咯烷酮(2×20ml)、N- 甲基吡咯烷酮/二氯甲烷(1:1)(2×20ml)和二氯甲烷(2×20ml)洗涤树脂。

[0350] 路径 III

[0351] 将活化的(活化酯或对称酸酐)白蛋白结合残基(式 I 的 B-U- 侧链)例如十八烷二酸单-(2,5- 二氧-吡咯烷-1-基)酯(Ebashi 等, EP511600, 相对于 GLP-1 肽 1-1.5 摩尔当量)溶解于有机溶剂例如乙腈、THF、DMF、DMSO 或水/有机溶剂的混合物(1-2ml)中,并与 10 摩尔当量的 DIPEA 一起加入至水中的肽溶液(10-20ml)中。在保护基团位于白蛋白结合残基例如叔丁基的情形中, O/N 冻干反应混合物并然后将分离的肽粗产物去保护-在叔丁基的情形中,将肽溶解于三氟乙酸、水和三异丙基甲硅烷的混合物(90:5:5)中。30 分钟后,在真空中蒸发该混合物并且使用制备级 HPLC 纯化肽终产物。

[0352] 除去 Fmoc- 保护的方法:将树脂(0.25mmol)置于手动振荡器的滤瓶中并用 N- 甲基吡咯烷酮/二氯甲烷(1:1)(2×20ml)和 N- 甲基吡咯烷酮(1×20ml)、N- 甲基吡咯烷酮中的 20%哌啶溶液(3×20ml,每次 10 分钟)处理。用 N- 甲基吡咯烷酮(2×20ml)、N- 甲基吡咯烷酮/二氯甲烷(1:1)(2×20ml)和二氯甲烷(2×20ml)洗涤树脂。

[0353] 用于将肽从树脂裂解的方法:

[0354] 通过用三氟乙酸、水和三异丙基硅烷(95:2.5:2.5 至 92:4:4)的混合物在室温下搅拌 180 分钟将肽从树脂裂解。过滤裂解混合物并通过氮气流将滤出液浓缩为油状产物。用 45ml 乙醚从油状产物中沉淀出肽粗产物并用 45ml 乙醚洗涤 1 至 3 次。

[0355] 纯化:将肽粗产物在装填有 5 μ 或 7 μ C-18 硅石的 20mm×250mm 柱上通过半制备 HPLC 纯化。根据肽使用一个或两个纯化系统。

[0356] TFA:干燥后,将肽粗产物溶解于 5ml50%乙酸 H₂O 中并用 H₂O 将其稀释成 20ml 并注入柱中,随后在 40℃下 50 分钟内将该柱用 0.1% TFA 中的 40-60%的 CH₃CN 梯度以 10ml/分钟洗脱。收集含有肽的级分。用水稀释洗脱物后冻干纯化的肽。

[0357] 硫酸铵:用经浓 H₂SO₄ 调节至 pH2.5 的 0.05M(NH₄)₂SO₄ 中的 40% CH₃CN 平衡柱子。干燥后,将肽粗产物溶解于 5mlH₂O 中 50%的乙酸中并用 H₂O 稀释至 20ml 并注入柱中,随后

在 40℃ 下 50 分钟内将该柱用 0.05M(NH₄)₂SO₄ 中的 40-60% 的 CH₃CN 梯度以 10ml/ 分钟洗脱。收集含有肽的级分并用 3 倍体积的 H₂O 稀释, 并且使其通过已经用 0.1% TFA 平衡了的 **Sep-Pak[®]** C18 筒 (Waters part. #:51910)。随后用含有 0.1% TFA 的 70% CH₃CN 将其洗脱并在用水稀释洗脱物后通过冻干来分离纯化的肽。

[0358] 获得的终产物通过分析型 RP-HPLC (保留时间) 和 LCMS 鉴定。

[0359] RP-HPLC 分析用 214nm 下的 UV 检测和在 42℃ 下以 1ml/ 分钟洗脱的 Vydac218TP544. 6mm×250mm5 μ C-18 硅柱 (The Separations Group, Hesperia, USA) 进行。使用两种不同的洗脱条件:

[0360] A1: 在用浓 H₂SO₄ 调节至 pH2.5 的 0.1M(NH₄)₂SO₄ 组成的缓冲液中平衡该柱, 并用相同缓冲液中的 0% -60% 的 CH₃CN 梯度洗脱 50 分钟。

[0361] B1: 用 0.1% TFA/H₂O 平衡该柱并用 0% CH₃CN/0.1% TFA/H₂O 至 60% CH₃CN/0.1% TFA/H₂O 的梯度洗脱 50 分钟。

[0362] B6: 用 0.1% TFA/H₂O 平衡该柱并用 0% CH₃CN/0.1% TFA/H₂O 至 90% CH₃CN/0.1% TFA/H₂O 的梯度洗脱 50 分钟。

[0363] 备选地, RP-HPLC 分析用 214nm 下的 UV 检测和在 42℃ 下以 1ml/ 分钟洗脱的 Symmetry300, 3.6mm×150mm, 3.5 μ C-18 硅柱 (Waters) 进行。

[0364] B4: 用 0.05% TFA/H₂O 平衡该柱并用 5% CH₃CN/0.05% TFA/H₂O 至 95% CH₃CN/0.05% TFA/H₂O 的梯度洗脱 15 分钟。

[0365] 使用了下列仪器:

[0366] LCMS 在由 Sciex API100Single quadropole 质谱仪、Perkin Elmer 系列 200Quard 泵、Perkin Elmer 系列 200 自动采样器、Applied Biosystems785AUV 检测器、Sedex75 蒸发光散射检测器组成的装置上进行

[0367] 仪器控制和数据采集由在 Windows2000 计算机上运行的 Sciex Sample 控制软件完成。

[0368] HPLC 泵连接至两个洗脱液贮液器, 贮液器含有:

[0369] A: 水中 0.05% 的三氟乙酸

[0370] B: 乙腈中 0.05% 的三氟乙酸

[0371] 在室温下, 通过注射适宜量样品 (优选为 20 μ l) 至经乙腈梯度洗脱的柱上进行分析。

[0372] 使用的 HPLC 条件、检测器设置和质谱仪设置在下表中给出。

[0373] 柱: Waters Xterra MS C-18X3mm id5 μ m

[0374] 梯度:: 在 7.5 分钟内以 1.5ml/ 分钟进行的 5% -90% 的乙腈线性梯度

[0375] 检测: 210nm (从 DAD 模拟输出)

[0376] ELS (从 ELS 模拟输出), 40℃

[0377] MS 离子化模式 API-ES

[0378] 备选地, LCMS 在由 Hewlett Packard 系列 1100G1312A Bin Pump、Hewlett Packard 系列 1100 柱室、Hewlett Packard 系列 1100G1315A DAD 二极管阵列检测器、Hewlett Packard 系列 1100MSD 和由 HP Chemstation 软件控制的 Sedex75 蒸发光散射检测器组成

的装置中进行。HPLC 泵连接至两个洗脱液贮液器,所述的贮液器含有:

[0379] A:水中的 10mM NH_4OH

[0380] B:90%乙腈中的 10mM NH_4OH

[0381] 分析在 23℃下,通过注射适宜量样品(优选为 20 μl)至柱上,用 A 和 B 梯度洗脱该柱来进行。

[0382] 使用的 HPLC 条件、检测器设置和质谱仪设置在下表中给出。

[0383] 柱 Waters Xterra MS C-18X3mm id5 μm

[0384] 梯度在 6.5 分钟内以 1.5ml/分钟进行的 5% -100%的乙腈线性梯度

[0385] 检测 210nm(从 DAD 模拟输出)

[0386] ELS(从 ELS 模拟输出)

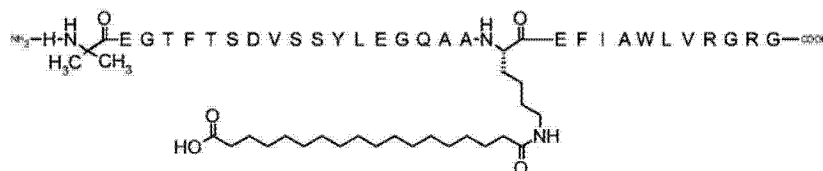
[0387] MS 离子化模式 API-ES。扫描 100-1000amu 步长为 0.1amu

[0388] 结合表达人 GLP-1 受体的质膜的放射性配体

[0389] 结合测定法用含有人 GLP-1 受体的经纯化的质膜进行。含有受体的质膜从稳定表达的 BHK tk-ts13 细胞纯化。将膜在检测缓冲液(50mM HEPES、5mM EGTA、5mM MgCl_2 、0.005%吐温 20, pH = 7.4)中稀释至终浓度为 0.2mg/ml 的蛋白质并将其分配至用 0.3% PEI 预包被的 96 孔微量滴定板中。膜与 0.05nM [^{125}I]GLP-1、浓度渐增的未标记配体和不同 HSA 浓度(0.005%、0.05%和 2%)在 30℃下孵育 2 小时。孵育后,通过多头抽真空装置过滤使未结合的配体与结合的配体分离,随后用 2×100 μl 冰冷的测定缓冲液洗涤。将滤出液在 RT 下过夜干燥,取出(punch out)并在 γ -计数器中定量。

[0390] 实施例 1

[0391]



[0392] N- ϵ ²⁶-(17-羧基十七烷酰)-[Aib8, Arg34]GLP-1-(7-37)-肽根据制造商的说明书,在 ABI433A 机器上用树脂(Fmoc-Gly-NovaSynTGT, 0.22mmol/g Novabiochem 0.25mmole)产生一级序列。除在位置 26 处使用的残基(FmocLys(ivDde)-OH, Novabiochem)外,所有的保护基团都是酸不稳定性,使得该赖氨酸特定地去保护而不是任何其它赖氨酸。

[0393] 方法

[0394] 将树脂(0.09mmol)置于手动振荡器/过滤装置中并用 N-甲基吡咯烷酮中的 4% 肼(4×10 分钟, 4×4ml)处理以除去 ivDde 基团。用 N-甲基吡咯烷酮(3×4ml)洗涤树脂。将十八烷二酸单-(2,5-二氧-吡咯烷酮-1-基)酯(相对于树脂 4mol 当量)溶解于 DMF(4ml)中。将该溶液加入至树脂并加入二异丙基乙胺(相对于树脂 8mol 当量)。在室温下摇动树脂 24 小时。用 N-甲基吡咯烷酮(4×4ml)和 DCM(4×4ml)洗涤树脂。在室温下,通过用三氟乙酸、水及三异丙基硅烷的混合物(92.5:5.0:2.54ml)搅拌 180 分钟将肽从树脂裂解。过滤裂解混合物并用 40ml 乙醚沉淀出肽粗产物并用 45ml 乙醚将其洗涤 3 次。在装填有 7 μC -18 硅石的 20mm×250mm 柱上通过制备级 HPLC 纯化该肽粗产物。将肽粗产

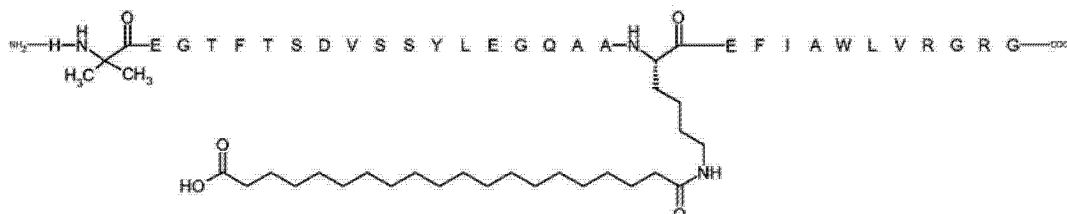
物溶解于 5ml 水中 50% 乙酸中, 用 H_2O 稀释至 20ml 并将其注射至柱上, 随后将该柱在 RT 下用 25-65% 的梯度 (在含有 0.1% TFA 的水中的 CH_3CN) 以 20ml/ 分钟洗脱 40 分钟。收集含有肽的级分。用水稀释洗脱物后冻干纯化的肽。

[0395] HPLC(方法 B4):RT = 9.94 分钟 (91%)

[0396] LCMS : $m/z = 1232$ (MH_3^{3+}) 计算值 (MH_3^{3+}) = 1232

[0397] 实施例 2

[0398]



[0399] N-ε²⁶-(19-羧基十九烷酰)-[Aib8, Arg34]GLP-1-(7-37)-肽

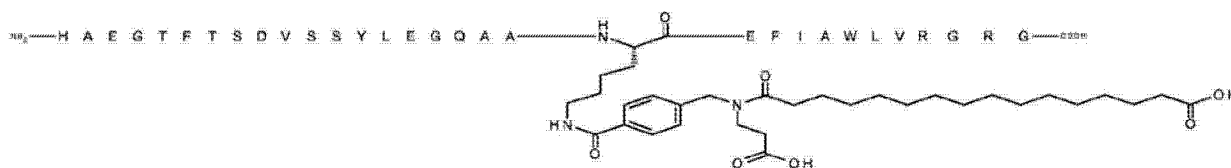
[0400] 如实施例 1 并依照“合成法”制备。

[0401] HPLC(方法B4):RT = 10.42 分钟 (91%)

[0402] LCMS : $m/z = 1242$ (MH_3^{3+}) 计算值 (MH_3^{3+}) = 1242

[0403] 实施例 3

[0404]



[0405] N-ε²⁶-(4-[N-(2-羧乙基)-N-(15-羧基十五烷酰)氨基]甲基)苯甲酰)
[Arg34]GLP-1-(7-37)-肽

[0406] 加入 DIPEA (7 μ l) 和 O-(1-琥珀酰亚胺基)-N,N,N',N'-四甲基脲六氟磷酸 (TSTU, 17mg, 56 μ l) 至 THF (1ml) 中的 4-(N-(2-(叔丁氧基羰基)乙基)-N-(15-(叔丁氧基羰基)十五烷酰)氨基)苯甲酸 (36mg, 60 μ mol) 溶液中。在室温下搅拌 1 小时后, 用 THF (1ml) 稀释该混合物, 并且加入 1ml 得到的溶液至水 (5ml) 中的 [Arg34]GLP-1-(7-37) 肽 (约 100mg) 和 DIPEA (103 μ l) 溶液中。在 0.5h 后, 加入更多的 THF-酰化剂溶液 (0.4ml)。在室温下搅拌总共 1.5h 后, 过滤反应混合物并应用于制备级 HPLC (35-55% MeCN/55-35% 水 / 含有 1% TFA 的 10% 水的梯度洗脱)。合并含有期望产物的级分并冻干。然后在室温下用 25ml TFA 和水的混合物 (95/5vol) 处理产物 15 分钟, 将其浓缩, 并通过 HPLC 再次纯化。得到了 15.4mg 标题化合物。

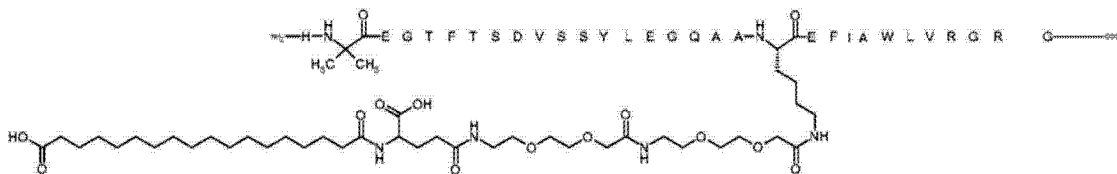
[0407] HPLC(方法 B4): RT = 9.41 分钟 (99%)

[0408] LCMS : $m/z = 1287 (MH_3^{3+})$ 。计算值 (MH_3^{3+}) : 1287

[0409] 实施例 4

[0410] N-ε²⁶-[2-(2-[2-(2-[2-(2-[4-(17-羧基十七烷酰氨基)-4(S)-羧基丁酰基氨基]乙氧基)乙氧基]乙酰氨基)乙氧基]乙氧基)乙酰基][Aib8,Arg34]GLP-1-(7-37)肽。

[0411]



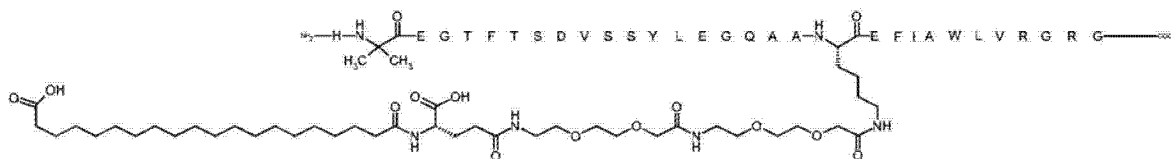
[0412] 通过标准的Fmoc-固相肽合成制备 [Aib8,Arg34]GLP-1-(7-37)-肽并通过制备级 HPLC 纯化。将 [Aib8,Arg34]GLP-1-(7-37)-肽溶解于水 (15ml) 中并加入 DIPEA (50u1)。将 17-((S)-1-叔丁氧基羰基-3-{2-[2-({2-[2-(2,5-二氧吡咯烷-1-基氧基羰基甲氧基)乙氧基]乙基氨基甲酰}甲氧基)乙氧基]乙基氨基甲酰}丙基氨基甲酰)十七烷酸叔丁酯 (21mg) 溶解于 2:1 的乙腈/水 (1.5ml) 中并且分批加入。通过 HPLC 监控该反应。当不再发现有 [Aib8, Arg34]GLP-1-(7-37)-肽时,将反应混合物 O/N 冻干。将 10ml 90% TFA/5% TIS/5% 水加入至分离的化合物中并保持反应混合物 2 小时,将其在真空中蒸发,并与庚烷共蒸发。将剩余的油状产物溶解于含有 1% NH₃-aq 的 15ml 水中并通过制备级 HPLC 纯化以产生标题化合物。

[0413] HPLC (方法 B4): RT = 9.60 分钟 (100%)

[0414] LCMS: m/z = 1372 (MH₃³⁺)。计算值 (MH₃³⁺): 1372

[0415] 实施例 5

[0416]



[0417] N-ε²⁶-[2-(2-[2-(2-[2-(2-[4-(19-羧基十九烷酰氨基)-4(S)-羧基丁酰基氨基]乙氧基)乙氧基]乙氧基)乙氧基]乙氧基)乙氧基] [Aib8,Arg34]GLP-1-(7-37) 肽。

[0418] 根据下列方法制备肽:A. 将在Fmoc-Gly-Wang树脂 (0.66mmol/g Novabiochem) 上合成的 0.25mmol 量的结合树脂的肽用于根据制造商的说明书在 ABI433A 机器上产生一级序列。除在位置 26 处使用残基 (FmocLys(Mtt)-OH, Novabiochem) 对酸超级敏感外,所有的保护基团都是对酸敏感的,使得该赖氨酸而不是任何其它赖氨酸能特定地去保护。

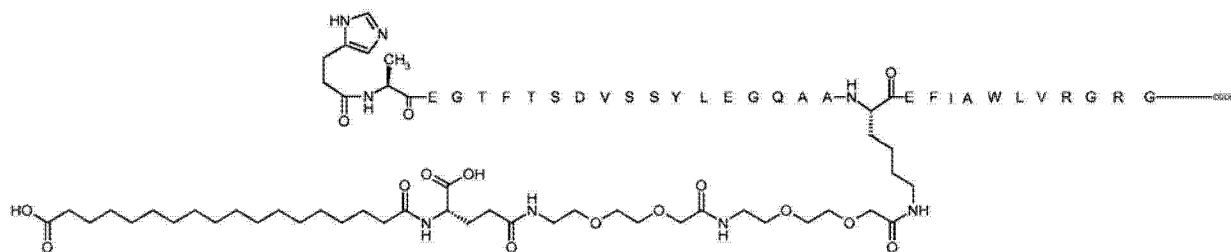
[0419] 除去 Mtt- 保护的方法。将树脂 (0.25mmol) 置于手动振荡器/过滤装置中并用 DCM 中的 2% TFA、3% TIS (20ml, 5-10 分钟, 重复 6-12 次) 处理以除去 Mtt 基团并用 DMF 洗涤。继续用方法合成将侧链连接至赖氨酸残基上,按照路径 II, 使用适当方法除去 Fmoc- 保护。根据该方法进行最终的去保护、HPLC- 纯化和 HPLC 及 LC-MS 分析。

[0420] HPLC (方法 B6): RT = 34.56 分钟 (100%)

[0421] LCMS: m/z = 1381.8 (MH₃³⁺)。计算值 (M+H⁺): 4142.7

[0422] 实施例 6

[0423]



[0424] N-ε²⁶-[2-(2-[2-(2-[2-(2-[4-(17-羧基十七烷酰氨基)-4(S)-羧基丁酰基氨基]乙氧基)乙氧基]乙酰氨基)乙氧基]乙氧基)乙酰基][3-(4-咪唑基)丙酰基 7, Arg34]GLP-1-(7-37) 肽

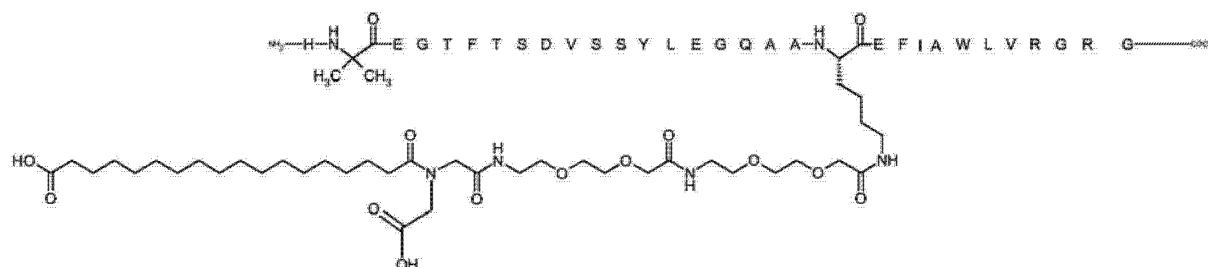
[0425] 如实施例 5 并依照“合成法”制备。

[0426] HPLC(方法 B6):RT = 32.89 分钟(100%)

[0427] LCMS:m/z = 1362.3(MH₃³⁺)。计算值(M+H⁺):4085.6

[0428] 实施例 7

[0429]



[0430] N-ε²⁶-[2-(2-[2-(2-[2-(2-[4-(17-羧基十七烷酰氨基)-(羧甲基-氨基)乙酰氨基]乙氧基)乙氧基]乙酰氨基)乙氧基]乙氧基)乙酰基][Aib8, Arg34]GLP-1-(7-37) 肽

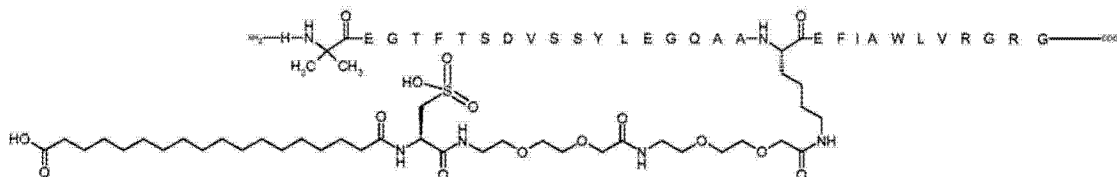
[0431] 如实施例 5 并依照“合成法”制备。

[0432] HPLC(方法 B6):RT = 32.67 分钟(100%)

[0433] LCMS:m/z = 1367.3(MH₃³⁺)。计算值(M+H⁺):4100.6

[0434] 实施例 8

[0435]



[0436] N-ε²⁶-[2-(2-[2-(2-[2-(2-[4-(17-羧基十七烷酰氨基)-3(S)-磺丙酰基氨基]乙氧基)乙氧基]乙酰氨基)乙氧基]乙氧基)乙酰基][Aib8, Arg34]GLP-1-(7-37) 肽

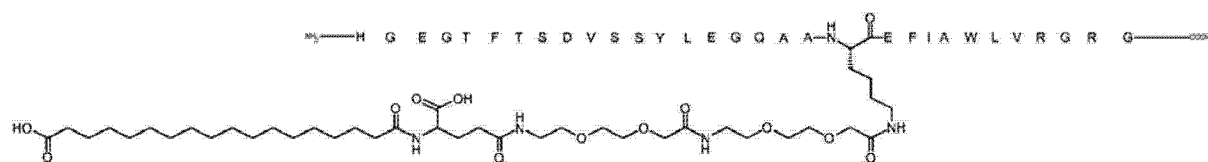
[0437] 如实施例 5 并依照“合成法”制备。

[0438] HPLC(方法 B6):RT = 32.04 分钟(100%)

[0439] LCMS:m/z = 1379.8(MH₃³⁺)。计算值(M+H⁺):4136.7

[0440] 实施例 9

[0441]



[0442] N-ε²⁶-[2-(2-[2-(2-[2-(2-[4-(17-羧基十七烷酰氨基)-4(S)-羧基丁酰基氨基]乙氧基)乙氧基]乙酰氨基)乙氧基]乙氧基)乙酰基][Gly8, Arg34]GLP-1-(7-37) 肽。

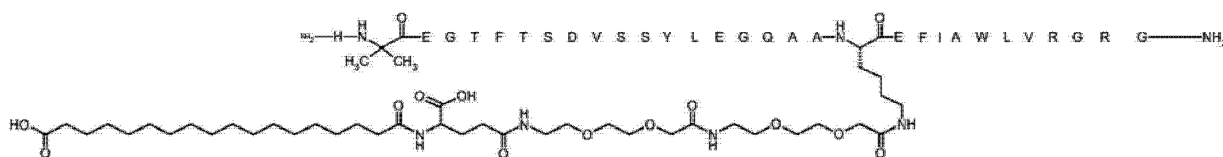
[0443] 使用购自 Advanced Chemtech 的 Apex396, 通过 Fmoc-固相肽合成从 150mg 2-氯三苯甲基氯树脂 (1.4mmol/g) 开始制备 [Gly8, Arg34]GLP-1(7-37) 肽。将位置 26 的 Lys 残基保护为 Lys(ivDde), 同时其它氨基酸的官能侧链用标准的对酸敏感的保护基保护。在 NMP 中使用 3% 胍 / 3% 哌啶将 Lys 残基去保护 1 小时。然后, 使用 DIC/HOAt 将 2 单位的 8-氨基-3,6-二氧辛酸、γ-谷氨酸和十八烷二酸偶联至连接树脂的肽上。最后用 TFA/TIS/H₂O/ 苯甲硫醚 (90/5/3/2) 使肽去保护并从树脂裂解。通过 LC-MS 分离肽。

[0444] HPLC : 在 46% 乙腈处洗脱

[0445] MALDI : 4087 (MH⁺)

[0446] 实施例 10

[0447]



[0448] N-ε²⁶-[2-(2-[2-(2-[2-(2-[4-(17-羧基十七烷酰基氨基)-4(S)-羧基丁酰基氨基]乙氧基)乙氧基]乙酰氨基)乙氧基]乙氧基)乙酰基][Aib8, Arg34]GLP-1-(7-37) 酰胺

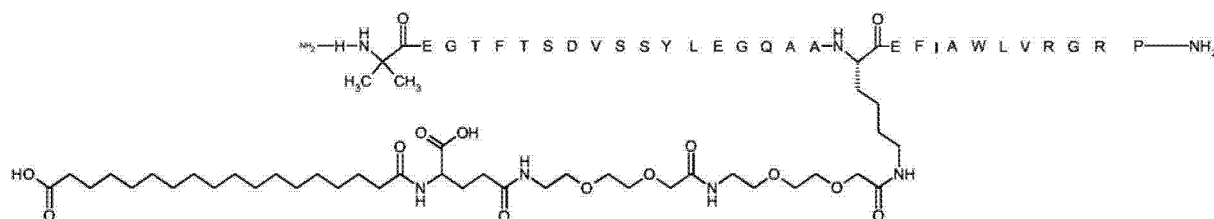
[0449] 使用购自 Advanced Chemtech 的 Apex396, 通过 Fmoc-固相肽合成从 200mg Tentagel RAM S 树脂 (0.26mmol/g) 开始制备 [Aib8, 34]GLP-1(7-37) 酰胺。将位置 26 的 Lys 残基保护为 Lys(ivDde), 同时其它氨基酸的官能侧链用标准的对酸敏感的保护基保护。在 NMP 中使用 3% 胍 / 3% 哌啶将 Lys 残基去保护 1 小时。然后, 使用 DIC/HOAt 将 2 单位的 8-氨基-3,6-二氧辛酸、γ-谷氨酸、十八烷二酸偶联至连接树脂的肽上。最后使用 TFA/TIS/H₂O/ 苯甲硫醚 (90/5/3/2) 将肽去保护并从树脂裂解。通过 LC-MS 分离肽。

[0450] HPLC : 在 49% 乙腈处洗脱

[0451] MALDI : 4114 (MH⁺)

[0452] 实施例 11

[0453]



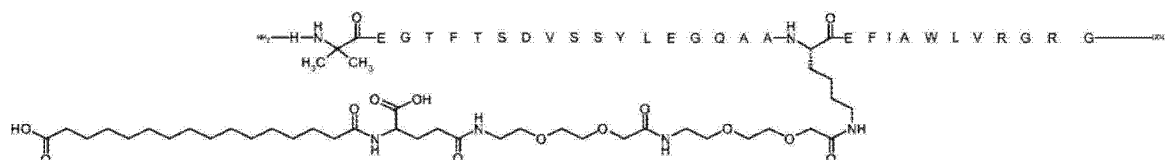
[0454] N- ϵ^{26} -[2-(2-[2-(2-[2-(2-[4-(17-羧基十七烷酰基氨基)-4(S)-羧基丁酰基氨基]乙氧基)乙氧基]乙氧基)乙氧基]乙氧基)乙氧基][Aib8, Arg34, Pro37]GLP-1-(7-37) 酰胺肽在 Rink 酰胺树脂 (0.70mmol/g Novabiochem) 上制备, 或如实施例 5 并依照“合成法”制备。

[0455] HPLC(方法 B6): RT = 32.13 分钟 (100%) (方法 A1): RT = 44.33 分钟 (98.4%)

[0456] LCMS: m/z = 1385.3 (MH_3^{3+})。计算值 ($M+H^+$): 4153.8

[0457] 实施例 12

[0458]



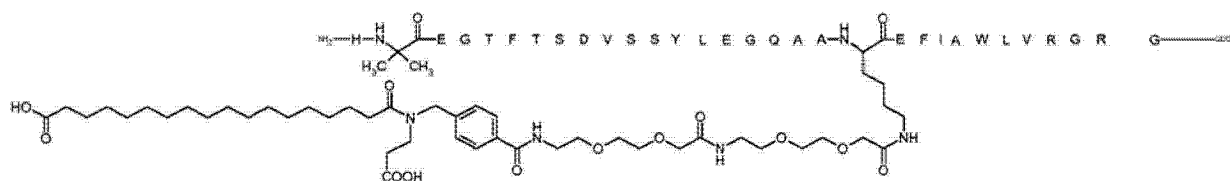
[0459] Aib⁸, Lys²⁶(N- ϵ^{26} -[2-(2-[2-(2-[2-(2-[4-(十五烷酰基氨基)-4-羧基丁酰基氨基]乙氧基)乙氧基]乙氧基)乙氧基]乙氧基)乙氧基]乙氧基)), Arg³⁴)GLP-1H(7-37)-OH

[0460] HPLC(方法 B6): RT = 30.41 分钟

[0461] LCMS: m/z = 1362.9 (MH_3^{3+}) 计算值 (M^+) = 4085.61

[0462] 实施例 13

[0463]



[0464] N- ϵ^{26} -[2-(2-[2-(2-[2-(2-[4-([N-(2-羧乙基)-N-(17-羧基十七烷酰)氨基]甲基)苯甲酰)氨基]乙氧基)乙氧基]乙氧基)乙氧基]乙氧基)乙氧基][Aib8, Arg34]GLP-1(7-37)

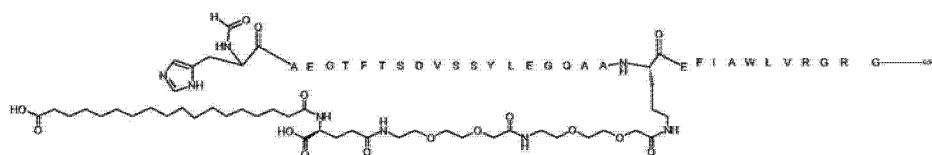
[0465] 使用购自 Advanced Chemtech 的 Apex396, 通过 Fmoc-固相肽合成从 150mg 2-氯三苯甲基氯树脂 (1.4mmol/g) 开始制备 [Aib8, Arg34]GLP-1(7-37) 肽。将位置 26 的 Lys 残基保护为 Lys(ivDde), 同时其它氨基酸的官能侧链用标准的对酸敏感的保护基保护。在 NMP 中使用 3% 胍 / 3% 哌啶将 Lys 残基去保护 1 小时。使用 DIC/HOAt 将 2 单位的 8-氨基-3,6-二氧辛酸和 4{[(2-叔丁氧基羰基-乙基)-(17-叔丁氧基羰基-十七烷酰)-氨基]-甲基}-苯甲酸偶联至连接树脂的肽上。最后使用 TFA/TIS/H₂O/ 苯甲硫醚 (90/5/3/2) 将肽去保护并从树脂裂解。通过制备级 LC-MS 分离肽。

[0466] HPLC: 在 52% 乙腈处洗脱

[0467] MALDI: 4191 (MH^+)

[0468] 实施例 14

[0469]



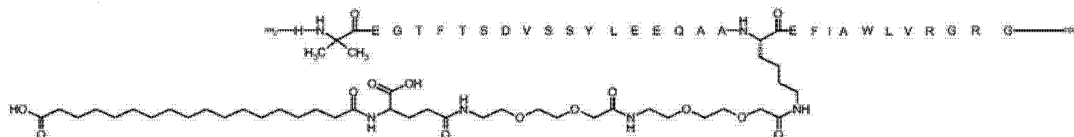
[0470] N- α^7 -甲酰基, N- ϵ^{26} -[2-(2-[2-(2-[2-(2-[4-(17-羧基十七烷酰氨基)-4(S)-羧基丁酰基氨基]乙氧基)乙氧基]乙酰氨基)乙氧基]乙氧基)乙酰基][Arg³⁴]GLP-1-(7-37)-肽

[0471] HPLC(方法 B6): RT = 32.6 分钟

[0472] LCMS: m/z = 1377.3 (MH₃³⁺) 计算值 (M⁺) = 4128.0

[0473] 实施例 15

[0474]



[0475] N- ϵ^{26} 26-[2-(2-[2-(2-[2-(2-[4-(17-羧基十七烷酰氨基)-4(S)-羧基丁酰基氨基]乙氧基)乙氧基]乙酰氨基)乙氧基]乙氧基)乙酰基][Aib8, Glu22, Arg34]GLP-1-(7-37) 肽。

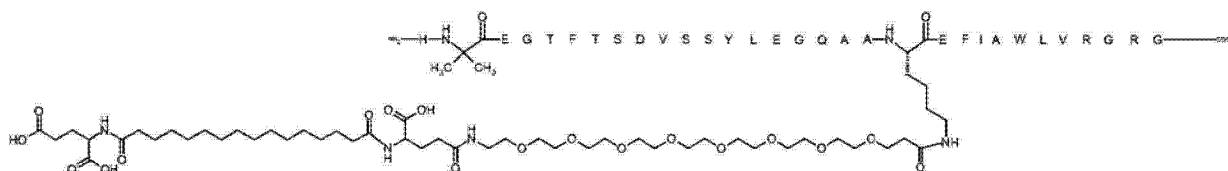
[0476] 使用购自 Advanced Chemtech 的 Apex396, 通过 Fmoc-固相肽合成从 150mg Fmoc-Gly-Wang 树脂 (0.66mmol/g) 开始制备 [Aib8, Glu22, Arg34]GLP-1(7-37) 肽。将位置 26 的 Lys 残基保护为 Lys (Mtt), 同时其它氨基酸的官能侧链用标准的对酸敏感的保护基保护。在 DCM 中使用 2% TFA/2% TIS 将 Lys 残基去保护 4×5 分钟。使用 DIC/HOAt 将 2 单位的 8-氨基-3,6-二氧辛酸、γ-谷氨酸和十八烷酸叔丁酯偶联至连接树脂的肽上。最后使用 TFA/TIS/H₂O/ 苯甲硫醚 (90/5/3/2) 将肽去保护并从树脂裂解。通过 LC-MS 分离肽。

[0477] HPLC: 在 50% 乙腈处洗脱

[0478] MALDI: 4187 (MH⁺)

[0479] 实施例 16

[0480]



[0481] N- ϵ^{26} {3-[2-(2-{2-[2-(2-[2-(2-[4-(15-(N-((S)-1,3-二羧基丙基)氨基甲酰)十五烷酰氨基)-(S)-4-羧基丁酰基氨基]乙氧基)乙氧基]乙氧基}乙氧基)乙氧基]乙氧基}乙氧基)乙氧基]丙酰基}[Aib8, Arg34]GLP-1-(7-37)-肽

[0482] 方法和分析

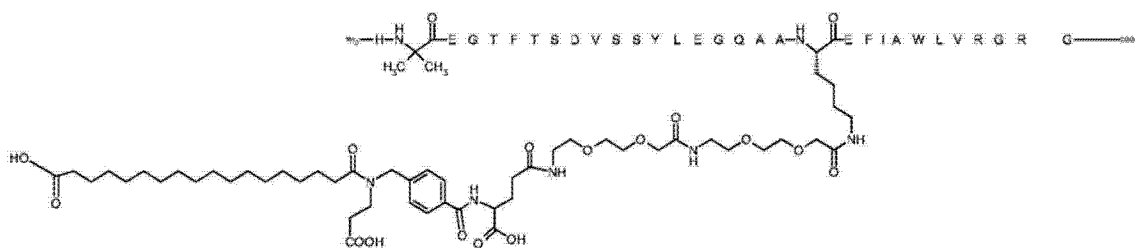
[0483] 如实施例 3 并依照“合成法”制备。

[0484] HPLC(方法 B4): RT = 10.29 分钟 (92%)

[0485] LCMS: m/z = 1450 (MH₃³⁺)。计算值 (MH₃³⁺): 1450

[0486] 实施例 17

[0487]



[0488] N-ε²⁶-[2-(2-[2-(2-[2-(2-[4-{{N-(2-羧乙基)-N-(17-羧基十七烷酰)氨基}甲基}苯甲酰)氨基](4(S)-羧基丁酰基氨基)乙氧基)乙氧基]乙酰氨基)乙氧基]乙酰基][Aib8, Arg34]GLP-1(7-37)

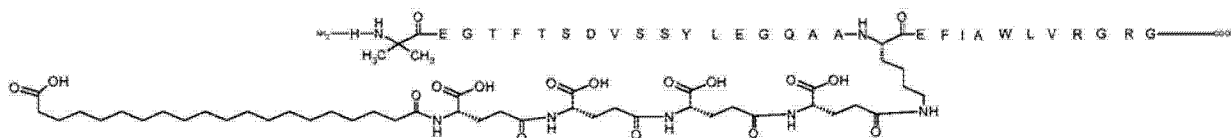
[0489] 使用购自 Advanced Chemtech 的 Apex396, 通过 Fmoc-固相肽合成从 150mg Fmoc-Gly-Wang 树脂 (0.66mmol/g) 开始制备 [Aib8, Arg34]GLP-1(7-37) 肽。将位置 26 的 Lys 残基保护为 Lys(Mtt), 同时其它氨基酸的官能侧链用标准的对酸敏感的保护基保护。在 DCM 中用 2% TFA/2% TIS 将 Lys 残基保护 4×5 分钟。用 DIC/HOAt 将 2 单位的 8-氨基-3,6-二氧辛酸、γ-谷氨酸和 4{[(2-叔丁氧基羰基-乙基)-(17-叔丁氧基羰基-十七烷酰)-氨基]-甲基}-苯甲酸偶联至连接树脂的肽上。最后使用 TFA/TIS/H₂O/ 苯甲硫醚 (90/5/3/2) 将肽去保护并从树脂裂解。通过制备级 HPLC 分离肽。

[0490] HPLC :在 51% 乙腈处洗脱

[0491] MALDI :4320 (MH⁺)

[0492] 实施例 18

[0493]



[0494] N-ε²⁶-{(S)-4-羧基-4-((S)-4-羧基-4-((S)-4-羧基-4-((S)-4-羧基-4-(19-羧基十九烷酰氨基)丁酰基氨基)丁酰基氨基)丁酰基氨基)丁酰基氨基} [Aib8, Arg34]GLP-1-(7-37)

[0495] 在 Liberty Microwave 肽合成仪 (CEM 公司) 上用 Fmoc 化学合成该肽。该合成在载荷为 0.66mmol/g 的 Gly-Wang 树脂 (Novabiochem) 上进行, 使用 4 倍过量的氨基酸和 DIC/HOAt 用于偶联。N-端组氨酸是 Boc-保护的并且要修饰的赖氨酸是 Mtt-保护的。在合成肽的主链后, 在 DCM 中用 3% 的 TFA 除去 Mtt 基团并用标准肽合成方法在 Liberty 上构建侧链。在最后的步骤中, 将脂肪二酸作为单叔丁酯加入。

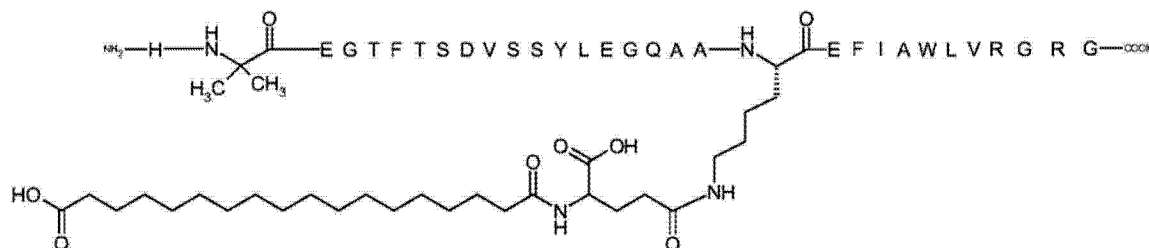
[0496] 在用 TFA/TIS/ 水 (95:2.5:2.5) 裂解后, 通过加入 DIPEA 将肽溶解于 50% 乙腈中并且在室温下通过 7.8×300mm X-Terra Prep MS C1810 μm 柱将其在 Waters LC-MS 系统上纯化。在 30% CH₃CN/0.08% TFA 下 5 分钟后 (4ml/ 分钟), 用 30 至 70% 的 CH₃CN 线性梯度洗脱该柱 40 分钟。收集含有期望化合物的级分并通过测量 280nm 下的 UV 吸光度来测定洗脱液中肽的浓度 (假定酪氨酸和色氨酸的摩尔消光系数分别为 1280 和 3690)。通过 MALDI 确定性质和纯度。在浓度测定后, 将洗脱液以等份分配进可容纳期望量的管形瓶中并通过真空离心干燥。

[0497] HPLC :在 52% 乙腈处洗脱

[0498] MALDI :4239 (MH+)

[0499] 实施例 19

[0500]



[0501] N-ε²⁶-(17-羧基十七烷酰氨基)-4(S)-羧基丁酰基-[Aib8,

[0502] Arg34]GLP-1-(7-37)-肽

[0503] 方法和分析

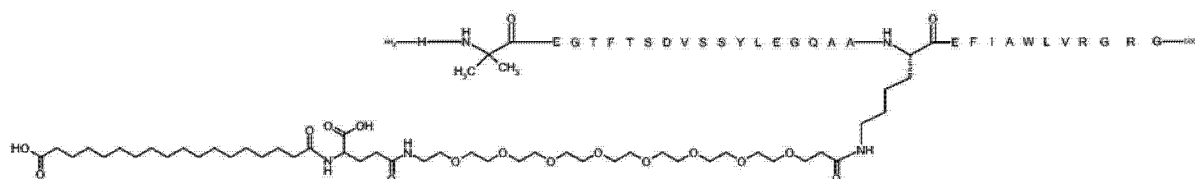
[0504] 如实施例 4 并依照“合成法”制备。

[0505] HPLC(方法 B4): RT = 9.64 分钟 (97%)

[0506] LCMS :m/z := 1276 (MH₃³⁺), 计算值 (MH₃³⁺) 为 1276

[0507] 实施例 20

[0508]



[0509] N-ε²⁶-{3-[2-(2-{2-[2-(2-{2-[2-(2-[4-(17-羧基十七烷酰氨基)-4(S)-羧基丁酰基氨基]乙氧基)乙氧基]乙氧基}乙氧基)乙氧基]乙氧基}乙氧基)乙氧基]丙酰基}[Aib8,Arg34]GLP-1-(7-37)-肽。

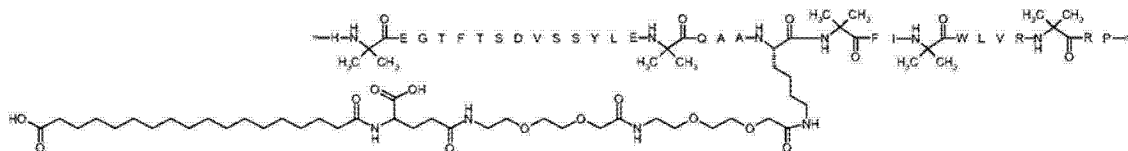
[0510] LCMS* :m/z := 1417(MH₃³⁺), 计算值 (MH₃³⁺) 为 1417

[0511] *HPLC(在 42℃下使用 5--->80%乙腈、85--->10%水和 10%的 1.0%三氟乙酸溶液的线性梯度以 0.5mL/分钟洗脱 50 分钟。UV 检测在 Symmetry300, 5um, 3.9mm×150mm C-18 硅柱上于 214nm 下进行)

[0512] 方法 B4) :Rt = 32.09 分钟 (95%)

[0513] 实施例 21

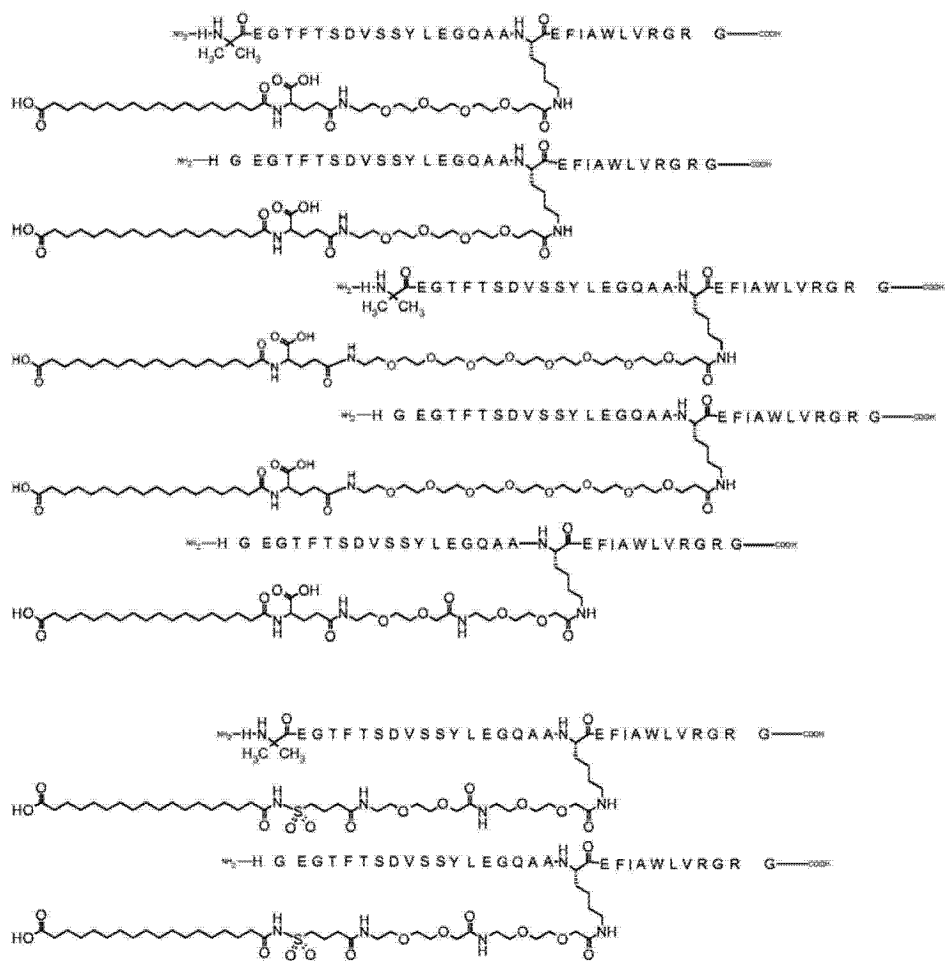
[0514]



[0515] N-ε²⁶-{2-(2-(2-(2-[2-(2-(4-(17-羧基十七烷酰氨基)-4-羧基丁酰基氨基)乙氧基)乙氧基]乙酰基)乙氧基)乙氧基)乙酰基))-[Aib^{8, 22, 27, 30, 35}, Arg³⁴, Pro³⁷, Lys²⁶] GLP-1 (7-37) 酰胺

[0516] HPLC(方法 B6):RT = 35.0 分钟

[0517] LCMS :m/z = 1394.0 (MH₃³⁺) 计算值 (M⁺) = 4180.0



[0529]



[0532] 效力和作用持续时间在 db/db 小鼠中测量。

[0533] 8-10 周大的雄性 db/db 小鼠购自丹麦的 Taconic。从到达开始,在标准条件但是在 24℃ 下圈养小鼠。每个笼子放置 10 只小鼠直到用于试验,所述的小鼠在正常时:光循环(在上午 6 时开始光照)下能够自由摄取标准食物(Altromin, Brogaarden APS, 丹麦)和自来水。每周将小鼠用于 1 次试验,进行 3 周。之后,让小鼠安乐死。

[0534] 在 1 周的适应期后,通过从小鼠的尾部顶端毛细血管取样来测量血糖。简而言之,将 5 μ l 血液取样于肝素化的玻璃毛细管中并立即混悬于 1.5ml Eppendorf 管中的 250 μ l EBIO 缓冲液(Eppendorf, 德国)中。血糖浓度在 EBIO Plus 自动分析仪(Eppendorf, 德国)上通过葡萄糖氧化酶法测量。

[0535] 血糖的截断值是 10mM。当评估小鼠时,基本上是,参与试验的所有 42 只小鼠具有大于 10mM 的血糖值,而且小鼠之间的差异很小。因此,如果许多小鼠没有严重的糖尿病(尽管某些是),试验的开始时间应该延迟一周并且应该测量新的基础血糖值。

[0536] 基于基础血糖值,将小鼠分为 7 组($n = 6$),与组的平均血糖值匹配。

[0537] 在测定基础血糖值的当天,如上面描述的测定早晨值并测定每只小鼠的基础体重。在 0 时,在颈部的颈背皮下施用化合物(剂量为约 300 μ l/50g 小鼠)。

[0538] 然后测量一直到 48 小时的血糖值(在 1、3、6、24 和 48 小时)并测定最后的体重。

[0539] 将所有数据输入 Graphpad Prism 中计算平均血糖和平均 Δ 体重。

[0540] 本发明的一个方面是制备适合每周施用一次的,具有延长的血浆半衰期的 GLP-1 类似物/衍生物。药物动力学特性可以如下面描述地在迷你猪或家猪中评估。

[0541] 每周施用一次的 GLP-1 类似物的药物动力学筛选

[0542] 用于鉴定适合每周施用一次的候选物的 GLP-1 类似物的药物动力学筛选在这样的候选物上进行,所述候选物根据该筛选方案显示了十分有效的降低糖尿病小鼠模型(db/db 小鼠)中的葡萄糖的潜力,并且随后在 db/db 小鼠模型中具有 48 小时或更长的持续时间。

[0543] 初步的筛选

[0544] 药物动力学筛选的第一部分由皮下施用 2nmol/kg 的单次剂量给重 8-12kg 的三只迷你猪组成。在施用剂量前、注射后 0.5、1、2、4、6、8、12、24、48、72、96 和 120 小时,抽取每只动物的血样。使用 pH 调节至 7.4 的特定稳定缓冲液来稳定所有血样以防止 GLP-1 类似物的酶降解,所述的稳定缓冲液由 EDTA(二钠)0.18M、Aprotinin15000KIE/ml、Val-Pyr0.30mM 组成。通过离心(4℃,10 分钟,1270G(4000rpm))收集每种经稳定的血样的血浆,并通过 ELISA 测定法分析 GLP-1 类似物的含量。三种不同的 ELISA 检测法用于血浆分析:使用抗体组合 F1/Ra2135,以 35pM 的检测限度(LOD)和 35-30000pM 动态分析范围检测 N 端完整的 7-37GLP-1 分子和 N 端经酶促降解的 9-37GLP-1 分子两者的“Total 测定法”。使用抗体组合 F1/Mab26.1 的“Intact 测定法”。该检测法只检测 N 端完整的 7-37GLP-1 分子。LOD 是 35pM 并且动态分析范围是 35-30000pM。使用抗体组合 F1/GLP162-3F15 的“Aib-intact 检测法”。该检测法检测 GLP-1 分子的 Aib 稳定的 N 端,使得能够检测稳定的 GLP-1 类似物。LOD 是 45pM 并且动态分析范围是 45-30000pM。

[0545] 所有的血浆浓度-时间曲线通过非房室模型分析来进行药物动力学分析。如果数

据允许则计算下列药物动力学参数： $t_{\max}$ 、 $C_{\max}$ 、AUC、AUC/Dose、 $AUC_{\% \text{ Extrapol}}$ 、 λ_z 、 $t_{1/2}$ 、CL/F、 V_z /F 和 MRT。

[0546] 第二次筛选

[0547] 药物动力学筛选的第二部分在具有 60–70 小时或更长的初始终末半衰期的那些化合物上进行。这次筛选由静脉内和皮下施用单次剂量 2nmol/kg 给迷你猪组成，每种施用途径 6 只。在静脉内和皮下施用后，血液取样时间分别从 0–120 小时延长至 0–432 和 0–504 小时。这样作是为了增加药物动力学参数评估值（尤其是终末半衰期、AUC 和推导出的参数清除率以及分布容量）的精确度和准确度，并且是为了评估皮下施用后的生物利用率。

[0548] GLP-1 (AIB8-INTACT) 测定法

[0549] 该测定法是将分析物与捕获物和检测抗体同时孵育的双位点测定法。用即用型化学发光底物使信号最大化。

[0550] 该测定法既不识别内源性 GLP-1 (7–37) 也不识别经 DPPIV 裂解的 GLP-1 (9–37)。

[0551] GLP-1 测定法的参照血浆

[0552] 0- 血浆从空腹动物的无缬氨酸 Pyrrolidide 和抑肽酶的混合 EDTA 血浆制备。将混合的 EDTA 血浆在 37°C 下孵育 4 小时以除去痕量的 GLP-1 并在孵育后加入缬氨酸 Pyrrolidide 和抑肽酶。

[0553] 缓冲液

[0554] 包被缓冲液

[0555] PBS 用作包被缓冲液：调节至 pH7.4 的 10mM 磷酸钠和 145mM 氯化钠。

[0556] 洗涤缓冲液

[0557] 含有 0.05% (v/v) 吐温 20 的 PBS

[0558] 测定缓冲液

[0559] 含有 0.05% (v/v) 吐温 20、10g/LBSA 和 10mg/L 抗 TNP 的 PBS。

[0560] 链霉抗生物素蛋白缓冲液

[0561] 含有额外的 0.5M NaCl 的洗涤缓冲液。

[0562] 底物

[0563] 即用型底物 SuperSignal ELISA Femto (Pierce, cat. no. 37075)。

[0564] 标准品

[0565] 标准品从 0113-0000-0217 的 25 μ M 储液制备。将该肽系列稀释进参照血浆中产生具有 30000–10000–3333–1111–370–123–41 和 0pM 的终浓度的标准品。在 -20°C 下将标准品以 100 μ L 等份存储于 Micronic 试管中。

[0566] 测定法步骤

[0567] 在 4°C 下用 PBS 中 100 μ L 5 μ g/mL 的单克隆抗体 GLPb1-7F1 包被 Crystal2000 微量滴定板 (black) 过夜。

[0568] 在自动化平板洗涤器 (SkanWasher, Skatron) 中用洗涤缓冲液洗涤平板 5 次并让其保持至少 30 分钟，用洗涤缓冲液封闭剩余的位点。

[0569] 将 20 μ L 样品或标准品加入至每个孔中（一式两份），随后立即加入 100 μ L 检测缓冲液中 1 μ g/mL 的生物素化 GLP162-3F15。在室温下将该板在平板振荡器上孵育 2 小时，随后如先前描述的进行 5 次洗涤循环。

[0570] 加入 100 μ L 链霉抗生物素蛋白-过氧化物酶溶液 (KPL, 编码为 14-30-00, 1:20000 于链霉抗生物素蛋白缓冲液中) 至每个孔中并在室温下于平板振荡器上孵育 1 小时。如先前描述的洗涤平板并在倒空后加入 100 μ L SuperSignal femto。将该板置于振荡器中 1 分钟并在 Orion Luminometer (Berthold) 中测量。将数据传送到 MultiCalc 并使用加权的 4PL 方法计算标准曲线。从标准曲线计算样品浓度。GLP-1 (TOTAL) 测定法

[0571] 该检测法是将分析物与捕获物和检测抗体同时孵育的双位点测定法。该测定法识别 N-端裂解直至 GLP-1 (12-37) 的 GLP-1。

[0572] 缓冲液

[0573] 包被缓冲液

[0574] 将 PBS 用作包被缓冲液:调节至 pH7.4 的 10mM 磷酸钠和 145mM 氯化钠。

[0575] 洗涤缓冲液

[0576] 含有 0.05% (v/v) 吐温 20 的 PBS

[0577] 测定缓冲液

[0578] 含有 0.05% (v/v) 吐温 20、10g/L BSA 和 10mg/L 抗 TNP 的 PBS。

[0579] 链霉抗生物素蛋白缓冲液

[0580] 含有额外的 0.5M NaCl 的洗涤缓冲液。

[0581] 底物

[0582] 即用型底物 TMB (KemEnTec code4380A)

[0583] 终止缓冲液

[0584] 4M H_3PO_4

[0585] 标准品

[0586] 标准品从 0113-0000-0217 的 25 μ M 储液制备。将该肽系列稀释进参照血浆中产生具有 30000-10000-3333-1111-370-123-41 和 0pM 的终浓度的标准品。在 -20°C 下将标准品以 100 μ L 的等份存储于 Micronic 试管中。

[0587] 检测法步骤

[0588] 在 4°C 下用 PBS 中 100 μ L 5 μ g/mL 的单克隆抗体 GLPb1-7F1 包被 Maxisorp 微量滴定板 (NUNC) 过夜。

[0589] 在自动化平板洗涤器 (SkanWasher, Skatron) 中用洗涤缓冲液洗涤平板 5 次并让其保持至少 30 分钟,用洗涤缓冲液封闭剩余的位点。

[0590] 将 20 μ L 样品或标准品加入至每个孔中,随后立即加入 100 μ L 检测缓冲液中 1 μ g/mL 的生物素化 Ra2135。在室温下将板在平板振荡器上孵育 2 小时,随后如先前描述地进行 5 次洗涤循环。

[0591] 将 100 μ L 链霉抗生物素蛋白-过氧化物酶溶液 (Amersham Biosciences code RPN4401V, 1:8000 于检测缓冲液) 加入至每个孔中并在室温下于平板振荡器上孵育 1 小时。如先前描述的洗涤平板并且在倒空后加入 100 μ L TMB 并在 5 分钟后用 100 μ L H_3PO_4 终止。

[0592] 在 Victor Multilabel Reader (Wallac) 中测量平板。将数据传送到 MultiCalc 并使用加权的 4PL 方法计算标准曲线。从标准曲线计算样品浓度。

[0593] 活体实验方法、血浆分析和药物动力学分析与“初步的筛选”中描述的一样。

[0594] 药物配制:

- [0595] 本发明化合物可以如下配制：
- [0596] 实施例 4 的化合物 6.25mg/ml
- [0597] 丙二醇 14.0mg/ml
- [0598] 苯酚 5.5mg/ml
- [0599] 磷酸盐缓冲液 pH 8.15
- [0600] 任选地，化合物在制备之前如 PCT/EP2005/055946 中描述的可用热和 / 或碱处理。

[0001]

序列表

<110> Novo Nordisk A/S
 <120> 酰化的GLP-1化合物
 <130> 7140-204-WO
 <140> PCT/EP2006/060855
 <141> 2006-03-20
 <150> EP05102171.5
 <151> 2006-03-18
 <160> 43
 <170> PatentIn version 3.3
 <210> 1
 <211> 31
 <212> PRT
 <213> 智人
 <400> 1
 His Ala Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Gly
 1 5 10 15
 Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly Arg Gly
 20 25 30
 <210> 2
 <211> 31
 <212> PRT
 <213> 人工的
 <220>
 <223> 合成的构建体
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (1)..(1)
 <223> 位置1的Xaa是L-组氨酸, 咪唑并丙酰基,
 α-羟基-组氨酸, D-组氨酸, 脱氨基-组氨酸,
 2-氨基-组氨酸, β-羟基-组氨酸, 高组氨酸,
 Nα-乙酰基-组氨酸, Nα-甲酰基-组氨酸, α-
 氨基-组氨酸, α-甲基-组氨酸, 3-吡啶基丙氨酸,
 2-吡啶基丙氨酸 或 4-吡啶基丙氨酸
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (2)..(2)
 <223> 位置2的Xaa 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.
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (10)..(10)
 <223> 位置10的Xaa是 Val 或 Leu;
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (12)..(12)
 <223> 位置12的Xaa 是 Ser, Lys 或 Arg
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (13)..(13)

[0002]

<223> 位置13的Xaa是 Tyr 或 Gln
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (14)..(14)
 <223> 位置14的Xaa是 Leu 或 Met
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (16)..(16)
 <223> 位置16的Xaa是 Gly, Glu 或 Aib
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (17)..(17)
 <223> 位置17的Xaa是 Gln, Glu, Lys 或 Arg
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (19)..(19)
 <223> 位置19的Xaa是 Ala 或 Val
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (20)..(20)
 <223> 位置20的Lys是取代的
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (21)..(21)
 <223> 位置21的Xaa是 Glu 或 Leu
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (24)..(24)
 <223> 位置24的Xaa是 Ala, Glu 或 Arg
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (27)..(27)
 <223> 位置27的Xaa是 Val 或 Lys
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (28)..(28)
 <223> 位置28的Xaa是 Lys, Glu, Asn 或 Arg
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (29)..(29)
 <223> 位置29的Xaa是 Gly 或 Aib
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (30)..(30)
 <223> 位置30的Xaa是 Arg, Gly 或 Lys, 或缺失
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (31)..(31)
 <223> 位置31的Xaa是 Gly, Ala, Glu, Pro, Lys, 或缺失
 <400> 2
 Xaa Xaa Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Xaa Ser Xaa Xaa Xaa Glu Xaa
 1 5 10 15
 Xaa Ala Xaa Lys Xaa Phe Ile Xaa Trp Leu Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 20 25 30
 <210> 3
 <211> 32
 <212> PRT
 <213> 人工的

[0003]

<220>
<223> 合成的构建体

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(1)
<223> 位置1的Xaa是 L-组氨酸, D-组氨酸,
脱氨基-组氨酸, 2-氨基组氨酸, β -羟基-组氨酸,
高组氨酸, N α -乙酰基-组氨酸,
 α -氟甲基-组氨酸, α -甲基-组氨酸,
3-吡啶基丙氨酸, 2-吡啶基丙氨酸 或 4-吡啶基丙氨酸.

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (2)..(2)
<223> 位置2的Xaa是 Ala, Gly, Val, Leu, Ile, 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.

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (10)..(10)
<223> 位置10的Xaa是 Val 或 Leu;

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (12)..(12)
<223> 位置12的Xaa是 Ser, Lys 或 Arg

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (13)..(13)
<223> 位置13的Xaa是 Tyr 或 Gln

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (14)..(14)
<223> 位置14的Xaa是 Leu 或 Met

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (16)..(16)
<223> 位置16的Xaa是 Gly, Glu 或 Aib

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (17)..(17)
<223> 位置17的Xaa是 Gln, Glu, Lys 或 Arg

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (19)..(19)
<223> 位置19的Xaa是 Ala 或 Val

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (20)..(20)
<223> 位置20的Lys是取代的

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (21)..(21)
<223> 位置21的Xaa是 Glu 或 Leu

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (24)..(24)
<223> 位置24的Xaa是 Ala, Glu 或 Arg

<220>

[0004]

<221> MISC_FEATURE
 <222> (27)..(27)
 <223> 位置27的Xaa是 Val 或 Lys

 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (28)..(28)
 <223> 位置28的Xaa是 Lys, Glu, Asn 或 Arg

 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (29)..(29)
 <223> 位置29的Xaa是 Gly 或 Aib

 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (30)..(30)
 <223> 位置30的Xaa是 Arg, Gly 或 Lys, 或缺失

 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (31)..(31)
 <223> 位置31的Xaa是 Gly, Ala, Glu, Pro, Lys, 或缺失

 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (32)..(32)
 <223> 位置32的Xaa是Lys, Ser, 酰胺 或缺失

 <400> 3

 Xaa Xaa Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Xaa Ser Xaa Xaa Xaa Glu Xaa
 1 5 10 15

 Xaa Ala Xaa Lys Xaa Phe Ile Xaa Trp Leu Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 20 25 30

 <210> 4
 <211> 31
 <212> PRT
 <213> 人工的

 <220>
 <223> 合成的

 <220>
 <221> VARIANT
 <222> (2)..(2)
 <223> Xaa 是 aib

 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (20)..(20)
 <223> 位置20的Lys是取代的

 <400> 4

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

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

 <210> 5
 <211> 31
 <212> PRT
 <213> 人工的

 <220>
 <223> 合成的构建体

[0005]

<220>
<221> VARIANT
<222> (2)..(2)
<223> Xaa 是 aib

<220>
<221> MOD_RES
<222> (20)..(20)
<223> 位置20的Lys是取代的

<400> 5

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

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

<210> 6
<211> 31
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 合成的构建体

<220>
<221> MOD_RES
<222> (20)..(20)
<223> 位置20的Lys是取代的

<400> 6

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

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

<210> 7
<211> 31
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 合成的构建体

<220>
<221> VARIANT
<222> (2)..(2)
<223> Xaa 是 aib

<220>
<221> MOD_RES
<222> (20)..(20)
<223> 位置20的Lys是取代的

<400> 7

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

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

<210> 8
<211> 31

[0006]

<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 合成的构建体

<220>
<221> VARIANT
<222> (2)..(2)
<223> Xaa 是 aib

<220>
<221> MOD_RES
<222> (20)..(20)
<223> 位置20的Lys是取代的

<400> 8

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

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

<210> 9
<211> 31
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 合成的构建体

<220>
<221> MOD_RES
<222> (20)..(20)
<223> 位置20的Lys是取代的

<400> 9

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

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

<210> 10
<211> 31
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 合成的构建体

<220>
<221> VARIANT
<222> (2)..(2)
<223> Xaa 是 aib

<220>
<221> MOD_RES
<222> (20)..(20)
<223> 位置20的Lys是取代的

<400> 10

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

[0007]

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

<210> 11
<211> 31
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 合成的

<220>
<221> MOD RES
<222> (20)..(20)
<223> 位置20的Lys是取代的

<400> 11

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

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

<210> 12
<211> 31
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 合成的构建体

<220>
<221> MOD RES
<222> (20)..(20)
<223> 位置20的Lys是取代的

<400> 12

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

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

<210> 13
<211> 31
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 合成的构建体

<220>
<221> VARIANT
<222> (2)..(2)
<223> Xaa 是 aib

<220>
<221> MOD RES
<222> (20)..(20)
<223> 位置20的Lys是取代的

<400> 13

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

[0008]

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

<210> 14
<211> 31
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 合成的

<220>
<221> MOD_RES
<222> (20)..(20)
<223> 位置20的Lys是取代的

<400> 14

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

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

<210> 15
<211> 31
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 合成的构建体

<220>
<221> MOD_RES
<222> (20)..(20)
<223> 位置20的Lys是取代的

<400> 15

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

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

<210> 16
<211> 31
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 合成的构建体

<220>
<221> MOD_RES
<222> (20)..(20)
<223> 位置20的Lys是取代的

<400> 16

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

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

[0009]

<210> 17
<211> 31
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 合成的构建体

<220>
<221> VARIANT
<222> (2)..(2)
<223> Xaa 是 aib

<220>
<221> MOD_RES
<222> (20)..(20)
<223> 位置20的Lys是取代的

<400> 17

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

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

<210> 18
<211> 31
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 合成的构建体

<220>
<221> VARIANT
<222> (2)..(2)
<223> Xaa 是 aib

<220>
<221> MOD_RES
<222> (20)..(20)
<223> 位置20的Lys是取代的

<400> 18

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

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

<210> 19
<211> 31
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 合成的构建体

<220>
<221> MOD_RES
<222> (20)..(20)
<223> 位置20的Lys是取代的

<400> 19

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

[0010]

1	5	10	15
Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Arg Gly Arg Gly			
	20	25	30
<210>	20		
<211>	31		
<212>	PRT		
<213>	人工的		
<220>			
<223>	合成的构建体		
<220>			
<221>	VARIANT		
<222>	(2)..(2)		
<223>	Xaa 是 aib		
<220>			
<221>	MOD_RES		
<222>	(20)..(20)		
<223>	位置20的Lys是取代的		
<400>	20		
His Xaa Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Gly			
1	5	10	15
Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Arg Gly Arg Gly			
	20	25	30
<210>	21		
<211>	31		
<212>	PRT		
<213>	人工的		
<220>			
<223>	合成的构建体		
<220>			
<221>	MOD_RES		
<222>	(20)..(20)		
<223>	位置20的Lys是取代的		
<400>	21		
His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Gly			
1	5	10	15
Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Arg Gly Arg Gly			
	20	25	30
<210>	22		
<211>	31		
<212>	PRT		
<213>	人工的		
<220>			
<223>	合成的构建体		
<220>			
<221>	VARIANT		
<222>	(2)..(2)		
<223>	Xaa 是 aib		
<220>			
<221>	MOD_RES		

[0011]

<222> (20)..(20)
<223> 位置20的Lys是取代的

<400> 22
His Xaa Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Gly
1 5 10 15

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

<210> 23
<211> 31
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 合成的构建体

<220>
<221> MOD RES
<222> (20)..(20)
<223> 位置20的Lys是取代的

<400> 23
His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Gly
1 5 10 15

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

<210> 24
<211> 31
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 合成的构建体

<220>
<221> VARIANT
<222> (2)..(2)
<223> Xaa 是 aib

<220>
<221> MOD RES
<222> (20)..(20)
<223> 位置20的Lys是取代的

<400> 24
His Xaa Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Gly
1 5 10 15

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

<210> 25
<211> 31
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 合成的构建体

<220>

[0012]

<221> VARIANT
 <222> (1)..(1)
 <223> 位置1的Xaa是3-(4-咪唑基)丙酰基

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (20)..(20)
 <223> 位置20的Lys是取代的

<400> 25

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

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

<210> 26
 <211> 31
 <212> PRT
 <213> 人工的

<220>
 <223> 合成的构建体

<220>
 <221> VARIANT
 <222> (2)..(2)
 <223> Xaa 是 aib

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (20)..(20)
 <223> 位置20的Lys是取代的

<400> 26

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

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

<210> 27
 <211> 31
 <212> PRT
 <213> 人工的

<220>
 <223> 合成的构建体

<220>
 <221> VARIANT
 <222> (2)..(2)
 <223> Xaa 是 aib

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (20)..(20)
 <223> 位置20的Lys是取代的

<400> 27

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

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

[0013]

<210> 28
<211> 31
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 合成的构建体

<220>
<221> VARIANT
<222> (2)..(2)
<223> Xaa 是 aib

<220>
<221> MOD_RES
<222> (20)..(20)
<223> 位置20的Lys是取代的

<400> 28

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

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

<210> 29
<211> 31
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 合成的构建体

<220>
<221> VARIANT
<222> (2)..(2)
<223> Xaa 是 aib

<220>
<221> MOD_RES
<222> (20)..(20)
<223> 位置20的Lys是取代的

<400> 29

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

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

<210> 30
<211> 31
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 合成的

<220>
<221> VARIANT
<222> (2)..(2)
<223> Xaa 是 aib

<220>
<221> MOD_RES
<222> (20)..(20)

[0014]

<223> 位置20的Lys是取代的

<400> 30

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

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

<210> 31

<211> 31

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 合成的

<220>

<221> VARIANT

<222> (1)..(1)

<223> 位置1的Xaa 是 N-alpha-甲酰基-组氨酸

<220>

<221> MOD_RES

<222> (20)..(20)

<223> 位置20的Lys是取代的

<400> 31

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

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

<210> 32

<211> 31

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 合成的

<220>

<221> VARIANT

<222> (2)..(2)

<223> Xaa 是 aib

<220>

<221> MOD_RES

<222> (20)..(20)

<223> 位置20的Lys是取代的

<400> 32

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

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

<210> 33

<211> 31

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

[0015]

<223> 合成的

<220>

<221> VARIANT

<222> (2)..(2)

<223> Xaa 是 aib

<220>

<221> MOD RES

<222> (20)..(20)

<223> 位置20的Lys是取代的

<400> 33

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

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

<210> 34

<211> 31

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 合成的

<220>

<221> VARIANT

<222> (2)..(2)

<223> Xaa 是 aib

<220>

<221> MOD RES

<222> (20)..(20)

<223> 位置20的Lys是取代的

<400> 34

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

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

<210> 35

<211> 31

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 合成的

<220>

<221> VARIANT

<222> (2)..(2)

<223> Xaa 是 aib

<220>

<221> MOD RES

<222> (20)..(20)

<223> 位置20的Lys是取代的

<400> 35

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

[0016]

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

<210> 36
<211> 31
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 合成的

<220>
<221> VARIANT
<222> (2)..(2)
<223> Xaa 是 aib

<220>
<221> MOD_RES
<222> (20)..(20)
<223> 位置20的Lys是取代的

<400> 36

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

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

<210> 37
<211> 31
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 合成的

<220>
<221> VARIANT
<222> (2)..(2)
<223> Xaa 是 aib

<220>
<221> MOD_RES
<222> (20)..(20)
<223> 位置20的Lys是取代的

<400> 37

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

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

<210> 38
<211> 31
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 合成的

<220>
<221> VARIANT
<222> (2)..(2)
<223> Xaa 是 aib

[0017]

<220>
<221> VARIANT
<222> (16)..(16)
<223> Xaa 是 aib

<220>
<221> MOD_RES
<222> (20)..(20)
<223> 位置20的Lys是取代的

<220>
<221> VARIANT
<222> (21)..(21)
<223> Xaa 是 aib

<220>
<221> VARIANT
<222> (24)..(24)
<223> Xaa 是 aib

<220>
<221> VARIANT
<222> (29)..(29)
<223> Xaa 是 aib

<400> 38

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

Gln Ala Ala Lys Xaa Phe Ile Xaa Trp Leu Val Arg Xaa Arg Pro
20 25 30

<210> 39
<211> 31
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 合成的

<220>
<221> VARIANT
<222> (2)..(2)
<223> Xaa 是 aib

<220>
<221> MOD_RES
<222> (20)..(20)
<223> 位置20的Lys是取代的

<400> 39

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

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

<210> 40
<211> 31
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 合成的

<220>
<221> VARIANT

[0018]

<222> (2)..(2)
 <223> Xaa 是 aib

 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (20)..(20)
 <223> 位置20的Lys是取代的

 <400> 40
 His Xaa Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Gly
 1 5 10 15

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

 <210> 41
 <211> 31
 <212> PRT
 <213> 人工的

 <220>
 <223> 合成的

 <220>
 <221> VARIANT
 <222> (1)..(1)
 <223> 位置1的Xaa 是 N- α -甲酰基-组氨酸

 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (20)..(20)
 <223> 位置20的Lys是取代的

 <400> 41
 Xaa Ala Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Gly
 1 5 10 15

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

 <210> 42
 <211> 31
 <212> PRT
 <213> 人工的

 <220>
 <223> 合成的

 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (1)..(1)
 <223> 位置1的Xaa 是 HIS 或 脱氨基-组氨酸

 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (2)..(2)
 <223> 位置2的Xaa是 Ala, Gly, Val, Leu, Ile, Lys, Aib

 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (10)..(10)
 <223> 位置10的Xaa 是 Val

 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (12)..(12)
 <223> 位置12的Xaa 是 Ser

[0019]

```

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (13)..(13)
<223> 位置13的Xaa 是 Tyr

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (14)..(14)
<223> 位置14的Xaa 是 Leu

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (16)..(16)
<223> 位置16的Xaa 是 Gly, Glu 或 Aib

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (17)..(17)
<223> 位置17的Xaa 是 Gln 或 Glu

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (19)..(19)
<223> 位置19的Xaa 是 Ala

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (20)..(20)
<223> 位置20的Lys是取代的

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (21)..(21)
<223> 位置21的Xaa是 Glu

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (24)..(24)
<223> 位置24的Xaa是 Ala 或 Glu

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (27)..(27)
<223> 位置27的Xaa是 Val

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (28)..(28)
<223> 位置28的Xaa是 Lys 或 Arg

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (29)..(29)
<223> 位置29的Xaa是 Gly 或 Aib

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (30)..(30)
<223> 位置30的Xaa是 Arg 或 Lys

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (31)..(31)
<223> 位置31的Xaa是 Gly, 酰胺 或缺失

<400> 42
Xaa Xaa Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Xaa Ser Xaa Xaa Xaa Glu Xaa
1          5          10          15

Xaa Ala Xaa Lys Xaa Phe Ile Xaa Trp Leu Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
20          25          30

<210> 43

```

[0020]

<211> 31
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 合成的

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1).. (1)
<223> 位置1的Xaa 是 HIS

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (2).. (2)
<223> 位置2的Xaa是 Gly 或 Aib

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (10).. (10)
<223> 位置10的Xaa 是 Val

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (12).. (12)
<223> 位置12的Xaa 是 Ser

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (13).. (13)
<223> 位置13的Xaa 是 Tyr

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (14).. (14)
<223> 位置14的Xaa 是 Leu

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (16).. (16)
<223> 位置16的Xaa 是 Glu 或 Aib

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (17).. (17)
<223> 位置17的Xaa 是 Gln

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (19).. (19)
<223> 位置19的Xaa 是 Ala

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (20).. (20)
<223> 位置20的Lys是取代的

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (21).. (21)
<223> 位置21的Xaa是 Glu

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (24).. (24)
<223> 位置24的Xaa是 Ala

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (27).. (27)
<223> 位置27的Xaa是 Val

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (28).. (28)

[0021]

<223> 位置28的Xaa是 Lys 或 Arg

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (29).. (29)
<223> 位置29的Xaa是 Gly 或 Aib

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (30).. (30)
<223> 位置30的Xaa是 Arg

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (31).. (31)
<223> 位置31的Xaa是 Gly

<400> 43

Xaa	Xaa	Glu	Gly	Thr	Phe	Thr	Ser	Asp	Xaa	Ser	Xaa	Xaa	Xaa	Glu	Xaa
1				5					10					15	

Xaa	Ala	Xaa	Lys	Xaa	Phe	Ile	Xaa	Trp	Leu	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	
			20					25						30	