



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102325539 A

(43) 申请公布日 2012. 01. 18

(21) 申请号 200980157317. 3

(51) Int. Cl.

(22) 申请日 2009. 12. 18

A61K 38/00 (2006. 01)

A61K 38/28 (2006. 01)

(30) 优先权数据

61/139210 2008. 12. 19 US

61/144271 2009. 01. 13 US

61/187556 2009. 06. 16 US

(85) PCT申请进入国家阶段日

2011. 08. 18

(86) PCT申请的申请数据

PCT/US2009/068745 2009. 12. 18

(87) PCT申请的公布数据

W02010/071807 EN 2010. 06. 24

(71) 申请人 印第安纳大学研究及科技有限公司

地址 美国印第安纳州

(72) 发明人 R·D·迪马基 寇宾宾

(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公

司 72001

代理人 李进 李炳爱

权利要求书 15 页 说明书 160 页 附图 19 页

(54) 发明名称

基于酰胺的胰高血糖素超家族肽前药

(57) 摘要

本发明提供胰高血糖素超家族肽的前药制剂,其中通过使二肽经由酰胺键与胰高血糖素超家族连接来修饰胰高血糖素超家族肽。本文公开的前药具有延长的半寿期,并且在生理条件下通过由化学不稳定性驱动的非酶促反应转化为活性形式。

1. 一种前药,所述前药包含以下结构:

A-B-Q;

其中 Q 为胰高血糖素超家族肽;

A 为氨基酸或羧酸;

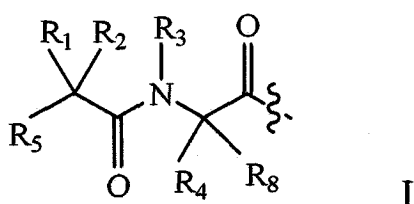
B 为通过 A-B 与 Q 的胺之间的酰胺键与 Q 连接的 N-烷基化氨基酸;

其中 A、B 或 A-B 与之连接的 Q 的氨基酸为非编码氨基酸,另外其中在生理条件下,在 PBS 中, A-B 自 Q 的化学裂解半寿期 ($t_{1/2}$) 为至少约 1 小时 - 约 1 周。

2. 权利要求 1 的前药,其中在生理条件下,在 PBS 中 A-B 自 Q 的裂解半寿期不超过在包含 DPP-IV 蛋白酶的溶液中 A-B 自 Q 的裂解半寿期的 2 倍。

3. 权利要求 2 的前药,其中包含 DPP-IV 蛋白酶的溶液是血清。

4. 权利要求 1-3 中任一项的前药,其中 A-B 包含以下结构:



其中

R_1 、 R_2 、 R_4 和 R_8 独立选自 H、 C_1 - C_{18} 烷基、 C_2 - C_{18} 烯基、(C_1 - C_{18} 烷基)OH、(C_1 - C_{18} 烷基)SH、(C_2 - C_3 烷基)SCH₃、(C_1 - C_4 烷基)CONH₂、(C_1 - C_4 烷基)COOH、(C_1 - C_4 烷基)NH₂、(C_1 - C_4 烷基)NHC(NH₂⁺)NH₂、(C_0 - C_4 烷基)(C_3 - C_6 环烷基)、(C_0 - C_4 烷基)(C_2 - C_5 杂环基)、(C_0 - C_4 烷基)(C_6 - C_{10} 芳基) R_7 、(C_1 - C_4 烷基)(C_3 - C_9 杂芳基)和 C_1 - C_{12} 烷基 (W_1) C_1 - C_{12} 烷基,其中 W_1 为选自 N、S 和 O 的杂原子,或者 R_1 和 R_2 与它们所连接的原子一起形成 C_3 - C_{12} 环烷基或芳基;或者 R_4 和 R_8 与它们所连接的原子一起形成 C_3 - C_6 环烷基;

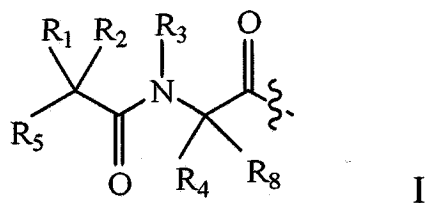
R_3 选自 C_1 - C_{18} 烷基、(C_1 - C_{18} 烷基)OH、(C_1 - C_{18} 烷基)NH₂、(C_1 - C_{18} 烷基)SH、(C_0 - C_4 烷基)(C_3 - C_6) 环烷基、(C_0 - C_4 烷基)(C_2 - C_5 杂环基)、(C_0 - C_4 烷基)(C_6 - C_{10} 芳基) R_7 和 (C_1 - C_4 烷基)(C_3 - C_9 杂芳基),或者 R_4 和 R_3 与它们所连接的原子一起形成 4、5 或 6 元杂环;

R_5 为 NHR₆ 或 OH;

R_6 为 H、 C_1 - C_8 烷基,或者 R_6 和 R_2 与它们所连接的原子一起形成 4、5 或 6 元杂环;和

R_7 选自 H 和 OH。

5. 权利要求 1-3 中任一项的前药,其中 A-B 包含以下结构:



其中

R_1 、 R_2 、 R_4 和 R_8 独立选自 H、 C_1 - C_{18} 烷基、 C_2 - C_{18} 烯基、(C_1 - C_{18} 烷基)OH、(C_1 - C_{18} 烷基)SH、(C_2 - C_3 烷基)SCH₃、(C_1 - C_4 烷基)CONH₂、(C_1 - C_4 烷基)COOH、(C_1 - C_4 烷基)NH₂、(C_1 - C_4 烷基)NHC(NH₂⁺)NH₂、(C_0 - C_4 烷基)(C_3 - C_6 环烷基)、(C_0 - C_4 烷基)(C_2 - C_5 杂环基)、(C_0 - C_4 烷基)(C_6 - C_{10} 芳基) R_7 、(C_1 - C_4 烷基)(C_3 - C_9 杂芳基)和 C_1 - C_{12} 烷基 (W_1) C_1 - C_{12} 烷基,其中 W_1 为选自 N、S 和

0 的杂原子,或者 R_1 和 R_2 与它们所连接的原子一起形成 C_3-C_{12} 环烷基;或者 R_4 和 R_8 与它们所连接的原子一起形成 C_3-C_6 环烷基;

R_3 选自 C_1-C_{18} 烷基、 $(C_1-C_{18} \text{ 烷基})OH$ 、 $(C_1-C_{18} \text{ 烷基})NH_2$ 、 $(C_1-C_{18} \text{ 烷基})SH$ 、 $(C_0-C_4 \text{ 烷基})$ (C_3-C_6) 环烷基、 $(C_0-C_4 \text{ 烷基})$ (C_2-C_5 杂环基)、 $(C_0-C_4 \text{ 烷基})$ (C_6-C_{10} 芳基) R_7 和 $(C_1-C_4 \text{ 烷基})$ (C_3-C_9 杂芳基),或者 R_4 和 R_3 与它们所连接的原子一起形成 4、5 或 6 元杂环;

R_5 为 NHR_6 或 OH ;

R_6 为 H 、 C_1-C_8 烷基,或者 R_6 和 R_2 与它们所连接的原子一起形成 4、5 或 6 元杂环;和

R_7 选自氢、 C_1-C_{18} 烷基、 C_2-C_{18} 烯基、 $(C_0-C_4 \text{ 烷基})CONH_2$ 、 $(C_0-C_4 \text{ 烷基})COOH$ 、 $(C_0-C_4 \text{ 烷基})NH_2$ 、 $(C_0-C_4 \text{ 烷基})OH$ 和卤素。

6. 权利要求 4 或 5 的前药,其中所述胰高血糖素超家族肽是胰高血糖素相关肽。

7. 权利要求 4 或 6 的前药,其中

R_1 和 R_8 独立地为 H 或 C_1-C_8 烷基;

R_2 和 R_4 独立选自 H 、 C_1-C_8 烷基、 C_2-C_8 烯基、 $(C_1-C_4 \text{ 烷基})OH$ 、 $(C_1-C_4 \text{ 烷基})SH$ 、 $(C_2-C_3 \text{ 烷基})SCH_3$ 、 $(C_1-C_4 \text{ 烷基})CONH_2$ 、 $(C_1-C_4 \text{ 烷基})COOH$ 、 $(C_1-C_4 \text{ 烷基})NH_2$ 、 $(C_1-C_4 \text{ 烷基})NHC(NH_2^+)$ NH_2 、 $(C_0-C_4 \text{ 烷基})$ (C_3-C_6 环烷基)、 $(C_0-C_4 \text{ 烷基})$ (C_2-C_5 杂环基)、 $(C_0-C_4 \text{ 烷基})$ (C_6-C_{10} 芳基) R_7 和 $CH_2(C_3-C_9 \text{ 杂芳基})$,或者 R_1 和 R_2 与它们所连接的原子一起形成 C_3-C_{12} 环烷基或芳基;

R_5 为 NHR_6 ;和

R_6 为 H 或 C_1-C_8 烷基。

8. 权利要求 5 或 6 的前药,其中

R_1 和 R_8 独立地为 H 或 C_1-C_8 烷基;

R_2 和 R_4 独立选自 H 、 C_1-C_8 烷基、 C_2-C_8 烯基、 $(C_1-C_4 \text{ 烷基})OH$ 、 $(C_1-C_4 \text{ 烷基})SH$ 、 $(C_2-C_3 \text{ 烷基})SCH_3$ 、 $(C_1-C_4 \text{ 烷基})CONH_2$ 、 $(C_1-C_4 \text{ 烷基})COOH$ 、 $(C_1-C_4 \text{ 烷基})NH_2$ 、 $(C_1-C_4 \text{ 烷基})NHC(NH_2^+)$ NH_2 、 $(C_0-C_4 \text{ 烷基})$ (C_3-C_6 环烷基)、 $(C_0-C_4 \text{ 烷基})$ (C_2-C_5 杂环基)、 $(C_0-C_4 \text{ 烷基})$ (C_6-C_{10} 芳基) R_7 和 $CH_2(C_3-C_9 \text{ 杂芳基})$,或者 R_1 和 R_2 与它们所连接的原子一起形成 C_3-C_{12} 环烷基;

R_3 为 C_1-C_{18} 烷基;

R_5 为 NHR_6 ;

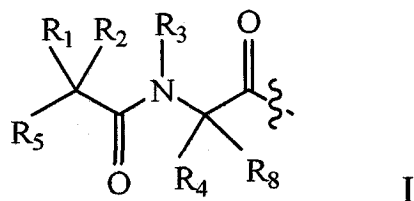
R_6 为 H 或 C_1-C_8 烷基;和

R_7 选自氢、 C_1-C_{18} 烷基、 C_2-C_{18} 烯基、 $(C_0-C_4 \text{ 烷基})CONH_2$ 、 $(C_0-C_4 \text{ 烷基})COOH$ 、 $(C_0-C_4 \text{ 烷基})NH_2$ 、 $(C_0-C_4 \text{ 烷基})OH$ 和卤素。

9. 权利要求 1-8 中任一项的前药,其中所述伯胺为 Q 的 N 端氨基酸的 α 氨基。

10. 权利要求 9 的前药,其中在生理条件下,在 PBS 中, $A-B-Q$ 的 $t_{1/2}$ 为约 1 小时。

11. 权利要求 10 的前药,其中 $A-B$ 包含以下结构:



其中

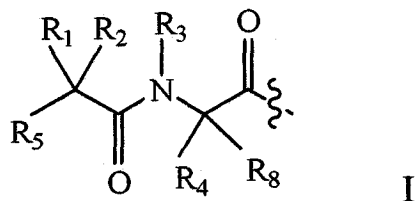
R_1 和 R_2 独立地为 C_1-C_{18} 烷基或芳基;或者 R_1 和 R_2 通过 $-(CH_2)_p-$ 连接,其中 p 为 2-9;

R_3 为 C_1-C_{18} 烷基;

R_4 和 R_8 各自为氢 ; 和

R_5 为胺。

12. 权利要求 10 的前药, 其中 A-B 包含以下结构 :



其中

R_1 和 R_2 独立地为 C_1 - C_{18} 烷基或 $(C_0$ - C_4 烷基) $(C_6$ - C_{10} 芳基) R_7 ; 或者 R_1 和 R_2 通过 $-(CH_2)_p$ - 连接, 其中 p 为 2-9 ;

R_3 为 C_1 - C_{18} 烷基 ;

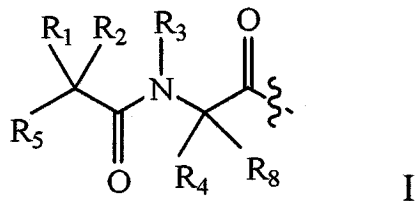
R_4 和 R_8 各自为氢 ;

R_5 为 NH_2 ; 和

R_7 选自氢、 C_1 - C_{18} 烷基、 C_2 - C_{18} 烯基、 $(C_0$ - C_4 烷基) $CONH_2$ 、 $(C_0$ - C_4 烷基) $COOH$ 、 $(C_0$ - C_4 烷基) NH_2 、 $(C_0$ - C_4 烷基) OH 和卤素。

13. 权利要求 9 的前药, 其中在生理条件下, 在 PBS 中, A-B-Q 的 $t_{1/2}$ 介于约 6- 约 24 小时之间。

14. 权利要求 13 的前药, 其中 A-B 包含以下结构 :



其中 R_1 和 R_2 独立选自氢、 C_1 - C_{18} 烷基和芳基, 或者 R_1 和 R_2 通过 $-(CH_2)_p$ - 连接, 其中 p 为 2-9 ;

R_3 为 C_1 - C_{18} 烷基, 或者 R_3 和 R_4 与它们所连接的原子一起形成 4-12 元杂环 ;

R_4 和 R_8 独立选自氢、 C_1 - C_8 烷基和芳基 ; 和

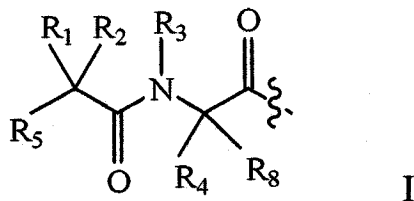
R_5 为胺 ;

前提条件是 R_1 和 R_2 两者不为氢, 且前提条件是 R_4 或 R_8 之一为氢。

15. 权利要求 9 的前药, 其中在生理条件下, 在 PBS 中, A-B-Q 的 $t_{1/2}$ 为约 12- 约 72 小时。

16. 权利要求 15 的前药, 其中在生理条件下, 在 PBS 中, A-B-Q 的 $t_{1/2}$ 为约 12- 约 24 小时。

17. 权利要求 15 或 16 中任一项的前药, 其中 A-B 包含以下结构 :



其中

R_1 和 R_2 独立选自氢、 C_1 - C_{18} 烷基、 $(C_1$ - C_{18} 烷基)OH、 $(C_1$ - C_4 烷基) NH_2 和 $(C_0$ - C_4 烷基) $(C_6$ - C_{10} 芳基) R_7 , 或者 R_1 和 R_2 通过 $(CH_2)_p$ 连接, 其中 p 为 2-9;

R_3 为 C_1 - C_{18} 烷基, 或者 R_3 和 R_4 与它们所连接的原子一起形成 4-12 元杂环;

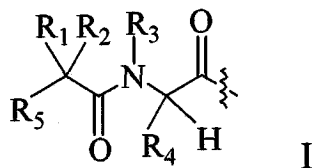
R_4 和 R_8 独立选自氢、 C_1 - C_8 烷基和 $(C_0$ - C_4 烷基) $(C_6$ - C_{10} 芳基) R_7 ;

R_5 为 NH_2 ; 和

R_7 选自 H、 C_1 - C_{18} 烷基、 C_2 - C_{18} 烯基、 $(C_0$ - C_4 烷基) $CONH_2$ 、 $(C_0$ - C_4 烷基) $COOH$ 、 $(C_0$ - C_4 烷基) NH_2 、 $(C_0$ - C_4 烷基)OH 和 卤素;

前提条件是 R_1 和 R_2 两者不为氢, 且前提条件是 R_4 或 R_8 中的至少一个为氢。

18. 权利要求 17 的前药, 其中 A-B 包含以下结构:



其中

R_1 和 R_2 独立选自氢、 C_1 - C_8 烷基和 $(C_1$ - C_4 烷基) NH_2 , 或者 R_1 和 R_2 通过 $(CH_2)_p$ 连接, 其中 p 为 2-9;

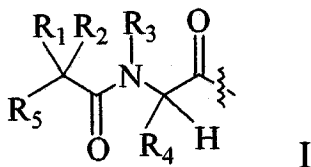
R_3 为 C_1 - C_8 烷基, 或者 R_3 和 R_4 与它们所连接的原子一起形成 4-6 元杂环;

R_4 选自氢和 C_1 - C_8 烷基; 和

R_5 为 NH_2 ;

前提条件是 R_1 和 R_2 两者不为氢。

19. 权利要求 18 的前药, 其中 A-B 包含以下结构:



其中

R_1 和 R_2 独立选自氢、 C_1 - C_8 烷基和 $(C_1$ - C_4 烷基) NH_2 ;

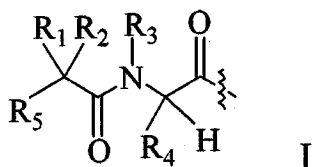
R_3 为 C_1 - C_6 烷基;

R_4 为氢; 和

R_5 为 NH_2 ;

前提条件是 R_1 和 R_2 两者不为氢。

20. 权利要求 17 的前药, 其中 A-B 包含以下结构:



其中

R_1 和 R_2 独立选自氢、 C_1 - C_8 烷基、 $(C_1$ - C_4 烷基) NH_2 , 或者 R_1 和 R_2 通过 $(CH_2)_p$ 连接, 其中 p 为 2-9;

R_3 为 C_1 - C_8 烷基;

R_4 为 $(C_0-C_4 \text{ 烷基}) (C_6-C_{10} \text{ 芳基}) R_7$;

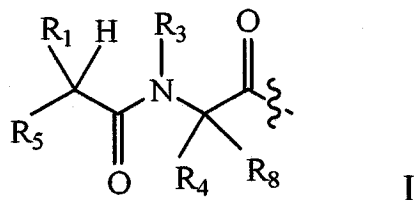
R_5 为 NH_2 ; 和

R_7 选自氢、 C_1-C_8 烷基和 $(C_0-C_4 \text{ 烷基}) OH$;

前提条件是 R_1 和 R_2 两者不为氢。

21. 权利要求 9 的前药, 其中在生理条件下, 在 PBS 中, A-B-Q 的 $t_{1/2}$ 为约 72- 约 168 小时。

22. 权利要求 21 的前药, 其中 A-B 包含以下结构:



其中 R_1 选自氢、 C_1-C_8 烷基和芳基;

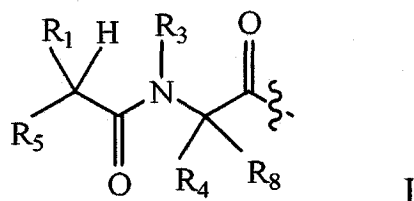
R_3 为 C_1-C_{18} 烷基;

R_4 和 R_8 各自为氢; 和

R_5 为胺或 N- 取代胺或羟基;

前提条件是如果 R_1 为烷基或芳基, 则 R_1 和 R_5 与它们所连接的原子一起形成 4-11 元杂环。

23. 权利要求 21 的前药, 其中 A-B 包含以下结构:



其中 R_1 选自氢、 C_1-C_8 烷基和 $(C_0-C_4 \text{ 烷基}) (C_6-C_{10} \text{ 芳基}) R_7$;

R_3 为 C_1-C_{18} 烷基;

R_4 和 R_8 各自为氢;

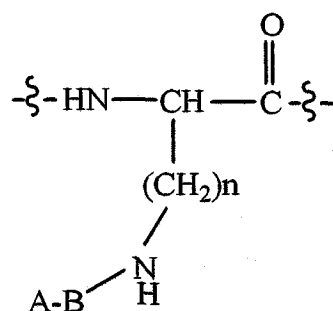
R_5 为 NHR_6 或 OH ;

R_6 为 H、 C_1-C_8 烷基, 或者 R_6 和 R_1 与它们所连接的原子一起形成 4、5 或 6 元杂环; 和

R_7 选自氢、 C_1-C_{18} 烷基、 C_2-C_{18} 烯基、 $(C_0-C_4 \text{ 烷基}) CONH_2$ 、 $(C_0-C_4 \text{ 烷基}) COOH$ 、 $(C_0-C_4 \text{ 烷基}) NH_2$ 、 $(C_0-C_4 \text{ 烷基}) OH$ 和卤素;

前提条件是如果 R_1 为烷基或 $(C_0-C_4 \text{ 烷基}) (C_6-C_{10} \text{ 芳基}) R_7$, 则 R_1 和 R_5 与它们所连接的原子一起形成 4-11 元杂环。

24. 权利要求 1-8 中任一项的前药, 其中所述伯胺为 Q 的内部氨基酸的侧链氨基, 所述内部氨基酸包含下式 V 结构:

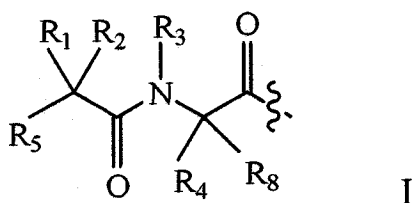


其中

n 为选自 1-4 的整数。

25. 权利要求 24 的前药, 其中在生理条件下, 在 PBS 中, A-B-Q 的 $t_{1/2}$ 为约 1 小时。

26. 权利要求 25 的前药, 其中 A-B 包含以下结构:



其中

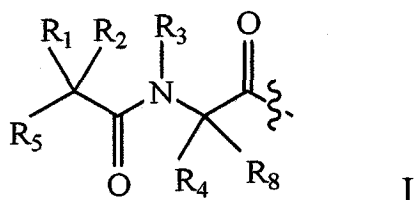
R_1 和 R_2 独立地为 $\text{C}_1\text{--C}_8$ 烷基或芳基; 或者 R_1 和 R_2 通过 $-(\text{CH}_2)_p-$ 连接, 其中 p 为 2-9;

R_3 为 $\text{C}_1\text{--C}_{18}$ 烷基;

R_4 和 R_8 各自为氢; 和

R_5 为胺。

27. 权利要求 25 的前药, 其中 A-B 包含以下结构:



其中

R_1 和 R_2 独立地为 $\text{C}_1\text{--C}_8$ 烷基或 $(\text{C}_0\text{--C}_4 \text{ 烷基})(\text{C}_6\text{--C}_{10} \text{ 芳基})\text{R}_7$; 或者 R_1 和 R_2 通过 $-(\text{CH}_2)_p-$ 连接, 其中 p 为 2-9;

R_3 为 $\text{C}_1\text{--C}_{18}$ 烷基;

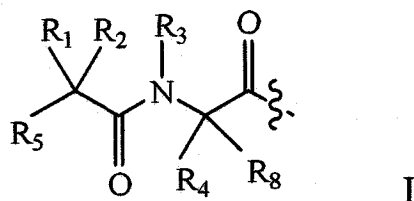
R_4 和 R_8 各为氢;

R_5 为 NH_2 ; 和

R_7 选自氢、 $\text{C}_1\text{--C}_{18}$ 烷基、 $\text{C}_2\text{--C}_{18}$ 烯基、 $(\text{C}_0\text{--C}_4 \text{ 烷基})\text{CONH}_2$ 、 $(\text{C}_0\text{--C}_4 \text{ 烷基})\text{COOH}$ 、 $(\text{C}_0\text{--C}_4 \text{ 烷基})\text{NH}_2$ 、 $(\text{C}_0\text{--C}_4 \text{ 烷基})\text{OH}$ 和卤素。

28. 权利要求 24 的前药, 其中在生理条件下, 在 PBS 中, A-B-Q 的 $t_{1/2}$ 介于约 6- 约 24 小时之间。

29. 权利要求 28 的前药, 其中 A-B 包含以下结构:



其中 R_1 和 R_2 独立选自氢、 C_1 - C_8 烷基和芳基, 或者 R_1 和 R_2 通过 $-(CH_2)_p-$ 连接, 其中 p 为 2-9;

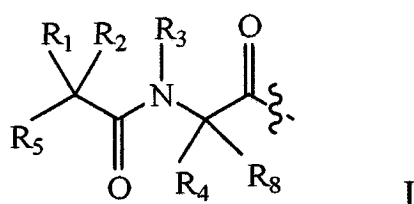
R_3 为 C_1 - C_{18} 烷基, 或者 R_3 和 R_4 与它们所连接的原子一起形成 4-12 元杂环;

R_4 和 R_8 独立地为 C_1 - C_{18} 烷基或芳基; 和

R_5 为胺或 N-取代胺;

前提条件是 R_1 和 R_2 两者不为氢, 且前提条件是 R_4 或 R_8 之一为氢。

30. 权利要求 28 的前药, 其中 A-B 包含以下结构:



其中 R_1 和 R_2 独立选自氢、 C_1 - C_8 烷基和 $(C_0$ - C_4 烷基) $(C_6$ - C_{10} 芳基) R_7 , 或者 R_1 和 R_2 通过 $-(CH_2)_p-$ 连接, 其中 p 为 2-9;

R_3 为 C_1 - C_{18} 烷基, 或者 R_3 和 R_4 与它们所连接的原子一起形成 4-12 元杂环;

R_4 和 R_8 独立地为氢、 C_1 - C_{18} 烷基或 $(C_0$ - C_4 烷基) $(C_6$ - C_{10} 芳基) R_7 ;

R_5 为 NHR_6 ;

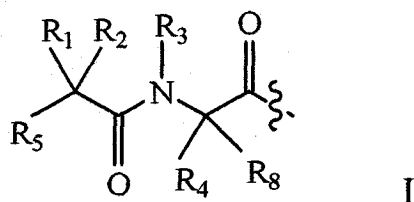
R_6 为 H 或 C_1 - C_8 烷基, 或者 R_6 和 R_2 与它们所连接的原子一起形成 4、5 或 6 元杂环; 和

R_7 选自氢、 C_1 - C_{18} 烷基、 C_2 - C_{18} 烯基、 $(C_0$ - C_4 烷基) $CONH_2$ 、 $(C_0$ - C_4 烷基) $COOH$ 、 $(C_0$ - C_4 烷基) NH_2 、 $(C_0$ - C_4 烷基) OH 、卤素;

前提条件是 R_1 和 R_2 两者不为氢, 且前提条件是 R_4 或 R_8 中的至少一个为氢。

31. 权利要求 24 的前药, 其中在生理条件下, 在 PBS 中, A-B-Q 的 $t_{1/2}$ 为约 72- 约 168 小时。

32. 权利要求 31 的前药, 其中 A-B 包含以下结构:



其中 R_1 和 R_2 独立选自氢、 C_1 - C_{18} 烷基和芳基;

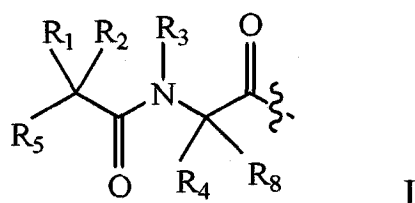
R_3 为 C_1 - C_{18} 烷基;

R_4 和 R_8 各自为氢; 和

R_5 为胺或 N-取代胺或羟基;

前提条件是如果 R_1 和 R_2 两者独立地为烷基或芳基, 则 R_1 或 R_2 两者之一通过 $-(CH_2)_p-$ 与 R_5 连接, 其中 p 为 2-9。

33. 权利要求 31 的前药, 其中 A-B 包含以下结构:



I

其中 R_1 和 R_2 独立选自氢、 C_1-C_{18} 烷基和 $(C_0-C_4$ 烷基) $(C_6-C_{10}$ 芳基) R_7 ;

R_3 为 C_1-C_{18} 烷基;

R_4 和 R_8 各自为氢;

R_5 为 NHR_6 或 OH ;

R_6 为 H 或 C_1-C_8 烷基, 或者 R_6 和 R_1 与它们所连接的原子一起形成 4、5 或 6 元杂环; 和

R_7 选自氢、 C_1-C_{18} 烷基、 C_2-C_{18} 烯基、 $(C_0-C_4$ 烷基) $CONH_2$ 、 $(C_0-C_4$ 烷基) $COOH$ 、 $(C_0-C_4$ 烷基) NH_2 和 $(C_0-C_4$ 烷基) OH ;

前提条件是如果 R_1 和 R_2 两者独立地为烷基或 $(C_0-C_4$ 烷基) $(C_6-C_{10}$ 芳基) R_7 , 则 R_1 或 R_2 两者之一通过 $(CH_2)_p$ 与 R_5 连接, 其中 p 为 2-9。

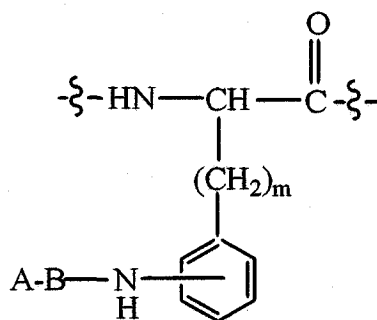
34. 权利要求 24-33 中任一项的前药, 其中式 V 氨基酸位于 Q 相当于天然胰高血糖素 (SEQ ID NO:701) 的 12、16、17、18、20、28 或 29 位的位置上。

35. 权利要求 1-8 中任一项的前药, 其中所述伯胺为 Q 的芳族氨基酸的芳基上的取代基。

36. 权利要求 35 的前药, 其中所述芳族氨基酸为 Q 的内部氨基酸。

37. 权利要求 35 或 36 的前药, 其中所述芳族氨基酸选自氨基 - Phe、氨基 - 萘基丙氨酸、氨基色氨酸、氨基 - 苯基 - 甘氨酸、氨基 - 高苯丙氨酸和氨基酪氨酸。

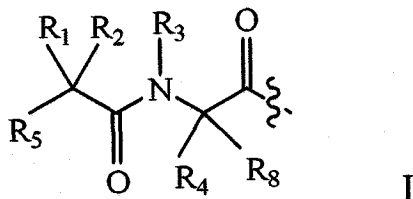
38. 权利要求 35 或 36 的前药, 其中所述芳族氨基酸包含下式 III 的结构:



其中 m 为 0-3 的整数。

39. 权利要求 35-38 中任一项的前药, 其中在生理条件下, 在 PBS 中, $A-B-Q$ 的 $t_{1/2}$ 为约 1 小时。

40. 权利要求 39 的前药, 其中 $A-B$ 包含以下结构:



I

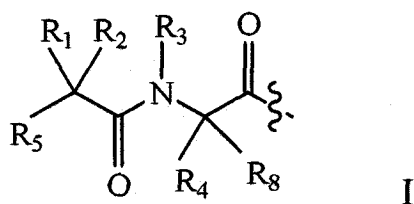
其中 R_1 和 R_2 独立地为 C_1-C_{18} 烷基或芳基;

R_3 为 C_1-C_{18} 烷基, 或者 R_3 和 R_4 与它们所连接的原子一起形成 4-12 元杂环;

R_4 和 R_8 独立选自氢、 C_1 - C_{18} 烷基和芳基 ; 和

R_5 为胺或羟基。

41. 权利要求 39 的前药, 其中 A-B 包含以下结构 :



其中 R_1 和 R_2 独立地为 C_1 - C_{18} 烷基或 (C_0 - C_4 烷基) (C_6 - C_{10} 芳基) R_7 ;

R_3 为 C_1 - C_{18} 烷基, 或者 R_3 和 R_4 与它们所连接的原子一起形成 4-12 元杂环 ;

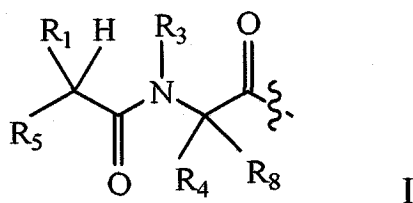
R_4 和 R_8 独立选自氢、 C_1 - C_{18} 烷基和 (C_0 - C_4 烷基) (C_6 - C_{10} 芳基) R_7 ;

R_5 为 NH_2 或 OH ; 和

R_7 选自氢、 C_1 - C_{18} 烷基、 C_2 - C_{18} 烯基、(C_0 - C_4 烷基) $CONH_2$ 、(C_0 - C_4 烷基) $COOH$ 、(C_0 - C_4 烷基) NH_2 、(C_0 - C_4 烷基) OH 和卤素。

42. 权利要求 35-38 的前药, 其中在生理条件下, 在 PBS 中, A-B-Q 的 $t_{1/2}$ 介于约 6- 约 24 小时之间。

43. 权利要求 42 的前药, 其中 A-B 包含以下结构 :



其中

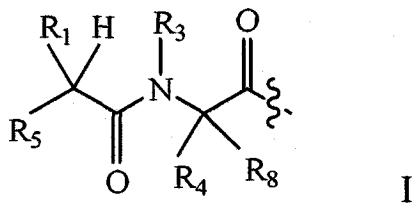
R_1 选自氢、 C_1 - C_{18} 烷基和芳基, 或者 R_1 和 R_2 通过 $-(CH_2)_p-$ 连接, 其中 p 为 2-9 ;

R_3 为 C_1 - C_{18} 烷基, 或者 R_3 和 R_4 与它们所连接的原子一起形成 4-6 元杂环 ;

R_4 和 R_8 独立选自氢、 C_1 - C_{18} 烷基和芳基 ; 和

R_5 为胺或 N- 取代胺。

44. 权利要求 42 的前药, 其中 A-B 包含以下结构 :



其中

R_1 选自氢、 C_1 - C_{18} 烷基、(C_1 - C_{18} 烷基) OH 、(C_1 - C_4 烷基) NH_2 和 (C_0 - C_4 烷基) (C_6 - C_{10} 芳基) R_7 ;

R_3 为 C_1 - C_{18} 烷基, 或者 R_3 和 R_4 与它们所连接的原子一起形成 4-6 元杂环 ;

R_4 和 R_8 独立选自氢、 C_1 - C_{18} 烷基和 (C_0 - C_4 烷基) (C_6 - C_{10} 芳基) R_7 ;

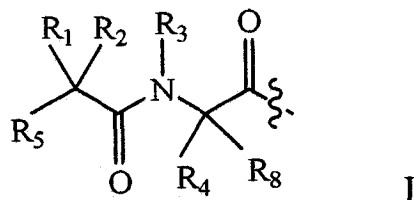
R_5 为 NHR_6 ;

R_6 为 H、 C_1-C_8 烷基, 或者 R_6 和 R_1 与它们所连接的原子一起形成 4、5 或 6 元杂环; 和

R_7 选自氢、 C_1-C_{18} 烷基、 C_2-C_{18} 烯基、 $(C_0-C_4$ 烷基) $CONH_2$ 、 $(C_0-C_4$ 烷基) $COOH$ 、 $(C_0-C_4$ 烷基) NH_2 、 $(C_0-C_4$ 烷基) OH 和卤素。

45. 权利要求 35-38 的前药, 其中在生理条件下, 在 PBS 中, A-B-Q 的 $t_{1/2}$ 为约 72- 约 168 小时。

46. 权利要求 45 的前药, 其中 A-B 包含以下结构:



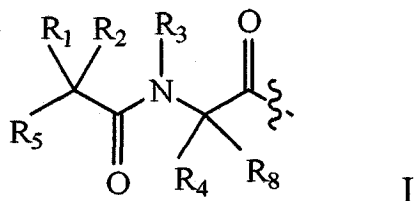
其中 R_1 和 R_2 独立选自氢、 C_1-C_8 烷基和芳基;

R_3 为 C_1-C_{18} 烷基, 或者 R_3 和 R_4 与它们所连接的原子一起形成 4-6 元杂环;

R_4 和 R_8 各自为氢; 和

R_5 选自胺、N-取代胺和羟基。

47. 权利要求 45 的前药, 其中 A-B 包含以下结构:



其中 R_1 和 R_2 独立选自氢、 C_1-C_8 烷基、 $(C_1-C_4$ 烷基) $COOH$ 和 $(C_0-C_4$ 烷基) $(C_6-C_{10}$ 芳基) R_7 , 或者 R_1 和 R_5 与它们所连接的原子一起形成 4-11 元杂环;

R_3 为 C_1-C_{18} 烷基, 或者 R_3 和 R_4 与它们所连接的原子一起形成 4-6 元杂环;

R_4 为氢或与 R_3 形成 4-6 元杂环;

R_8 为氢;

R_5 为 NHR_6 或 OH ;

R_6 为 H 或 C_1-C_8 烷基, 或者 R_6 和 R_1 与它们所连接的原子一起形成 4、5 或 6 元杂环; 和

R_7 选自氢、 C_1-C_{18} 烷基、 C_2-C_{18} 烯基、 $(C_0-C_4$ 烷基) $CONH_2$ 、 $(C_0-C_4$ 烷基) $COOH$ 、 $(C_0-C_4$ 烷基) NH_2 、 $(C_0-C_4$ 烷基) OH 和卤素。

48. 权利要求 35-47 中任一项的前药, 其中所述氨基取代的芳族氨基酸位于 Q 相当于天然胰高血糖素 (SEQ ID NO: 701) 的 10、13、22 或 25 位的位置上。

49. 前述权利要求中任一项的前药, 其还包含与所述前药共价连接的亲水部分。

50. 权利要求 49 的前药, 其中所述亲水部分是聚乙二醇。

51. 权利要求 50 的前药, 其中所述聚乙二醇与 A-B 共价连接。

52. 权利要求 50 的前药, 其中所述聚乙二醇在 Q 相当于天然胰高血糖素 (SEQ ID NO: 701) 的 16、17、20、21、24 或 29 位的位置上或 C 端氨基酸上与 Q 共价连接。

53. 前述权利要求中任一项的前药, 还包含与氨基酸侧链共价连接的酰基或烷基。

54. 权利要求 53 的前药, 其中所述酰基或烷基与 A-B 共价连接。

55. 权利要求 53 的前药,其中所述酰基或烷基共价连接至 Q 相当于天然胰高血糖素 (SEQ ID NO :701) 10 位的位置。

56. 权利要求 1-55 中任一项的前药,其中 Q 包含与天然胰高血糖素 (SEQ ID NO :701) 有至少 50% 同一性的氨基酸序列,其保持相当于 SEQ ID NO :701 氨基酸 12-29 的氨基酸的 α 螺旋构象。

57. 权利要求 1-56 中任一项的前药,其中 Q 包含以下氨基酸序列:

具有 1-3 个氨基酸修饰的 X1-X2-Gln-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Lys-Tyr-Leu-Asp-Ser-Arg-Arg-Ala-Gln-Asp-Phe-Val-Gln-Trp-Leu-Met-Z (SEQ ID NO :839),

其中 X1 和 / 或 X2 为降低胰高血糖素肽被二肽基肽酶 IV (DPP-IV) 切割的敏感性的非天然 (与 SEQ ID NO :701 相比) 氨基酸,

其中 Z 选自 -COOH、-Asn-COOH、Asn-Thr-COOH 和 Y-COOH,其中 Y 为 1-2 氨基酸,和

其中 (1) 内酰胺桥连接 i 位上的氨基酸和 i+4 位上的氨基酸的侧链,其中 i 为 12、16、20 或 24,或 (2) 胰高血糖素肽 16、20、21 和 24 位上的 1、2、3 个或所有氨基酸被 α , α -二取代氨基酸取代;

和其中 Q 具有胰高血糖素激动剂活性。

58. 权利要求 1-56 之一的前药,其中 Q 包含 SEQ ID NO :701 的氨基酸序列,且包含:

至少一种选自以下的氨基酸修饰:

28 位上的 Asn 被带电荷的氨基酸取代;

28 位上的 Asn 被选自以下的带电荷的氨基酸取代:Lys、Arg、His、Asp、Glu、半胱磺酸和高半胱磺酸;

在 28 位上被 Asn、Asp 或 Glu 取代;

在 28 位上被 Asp 取代;

在 28 位上被 Glu 取代;

29 位上的 Thr 被带电荷的氨基酸取代;

29 位上的 Thr 被选自以下的带电荷的氨基酸取代:Lys、Arg、His、Asp、Glu、半胱磺酸和高半胱磺酸;

在 29 位上被 Asp、Glu 或 Lys 取代;

在 29 位上被 Glu 取代;

在 29 位后插入 1-3 个带电荷的氨基酸;

在 29 位后插入 Glu 或 Lys;

在 29 位后插入 Gly-Lys 或 Lys-Lys;或其组合;

和至少一种选自以下的氨基酸修饰:A 组或 B 组,或其组合;

其中 A 组为选自以下的氨基酸修饰:15 位上的 Asp 被 Glu 取代和 16 位上的 Ser 被 Thr 或 AIB 取代;和

其中 B 组为选自以下的氨基酸修饰:

1 位上的 His 被降低胰高血糖素肽对被二肽基肽酶 IV (DPP-IV) 切割的敏感性的非天然氨基酸取代,

2 位上的 Ser 被降低胰高血糖素肽对被二肽基肽酶 IV (DPP-IV) 切割的敏感性的非天然氨基酸取代,

10 位上的 Tyr 被 Phe 或 Val 取代；
12 位上的 Lys 被 Arg 取代；
20 位上的 Gln 被 Ala 或 AIB 取代；
21 位上的 Asp 被 Glu 取代；
24 位上的 Gln 被 Ala 或 AIB 取代；
27 位的 Met 被 Leu 或 Nle 取代；
27-29 位上的氨基酸缺失；
28-29 位上的氨基酸缺失；
29 位上的氨基酸缺失；
或其组合；

且其中 Q 具有胰高血糖素激动剂活性。

59. 权利要求 1-56 中任一项的前药,其中 Q 包含具有以下修饰的 SEQ ID NO:701 的胰高血糖素相关肽:

(a) 赋予 GIP 激动剂活性的 1 位上的氨基酸修饰,

(b) (1) 在 i 和 i+4 位上的氨基酸侧链之间或在 j 和 j+3 位上的氨基酸侧链之间的内酰胺桥,其中 i 为 12、13、16、17、20 或 24,其中 j 为 17,或 (2) 类似物的 16、20、21 和 24 位上的 1、2、3 个或所有氨基酸被 α , α -二取代氨基酸取代,

(c) 在 27、28 和 29 位中的 1、2 个或全部上的氨基酸修饰,和

(d) 1-6 个其它氨基酸修饰,

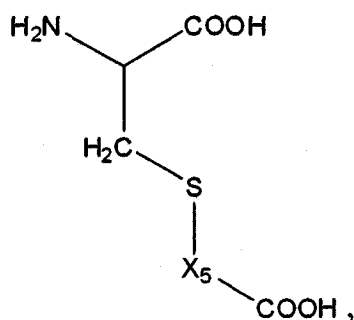
其中类似物对 GIP 受体活化的 EC₅₀ 为约 10nM 以下。

60. 权利要求 1-56 中任一项的前药,其中 Q 包含 SEQ ID NO:55 的序列或 SEQ ID NO:55 的类似物,其中所述类似物因选自 1、2、3、5、7、10、11、13、14、17、18、19、21、24、27、28 和 29 位的 1-3 个氨基酸修饰而不同于 SEQ ID NO:55,其中所述胰高血糖素肽具有天然 GLP-1 对 GLP-1 受体的活性的至少 20%。

61. 权利要求 1-56 中任一项的前药,其中 Q 包含因不超过 10 个氨基酸修饰而不同于 SEQ ID NO:701 的氨基酸,所述修饰包括被 AIB 在 16、20、21 和 / 或 24 位上的一个或多个氨基酸取代,以及使被二肽基肽酶 IV 切割的敏感性得到降低的 1 和 / 或 2 位上的氨基酸修饰,其中所述胰高血糖素肽具有天然 GLP-1 对 GLP-1 受体的活性的至少 20%。

62. 权利要求 1-56 中任一项的前药,其中 Q 包含 SEQ ID NO:1342 的序列或其氧基衍生物,且其中 Q 具有胰高血糖素拮抗剂活性。

63. 权利要求 1-56 中任一项的前药,其中 Q 包含如下修饰的天然胰高血糖素的氨基酸序列:通过缺失 SEQ ID NO:701N 端的 2-5 个氨基酸残基,和用谷氨酸、高谷氨酸、 β -高谷氨酸、半胱氨酸的磺酸衍生物或具有以下结构的半胱氨酸的烷基羧酸衍生物取代 SEQ ID NO:701 的 9 位上的天冬氨酸残基:



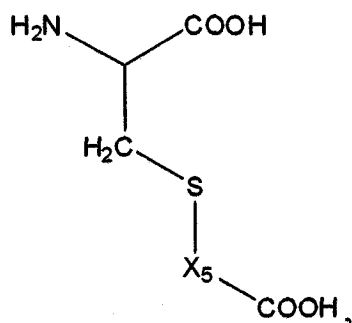
其中 X_5 为 C_1 - C_4 烷基、 C_2 - C_4 烯基或 C_2 - C_4 炔基,且其中 Q 具有胰高血糖素拮抗剂活性。

64. 权利要求 1-56 中任一项的前药,其中 Q 包含 A-B-C 的通用结构,其中 A 选自:

- (i) 苯基乳酸 (PLA);
- (ii) PLA 的氧基衍生物;
- (iii) 2-6 个氨基酸的肽,其中该肽的 2 个连续氨基酸通过酯键或醚键连接;

B 表示 SEQ ID NO:701 的氨基酸 i-26,其中 i 为 3、4、5、6 或 7,任选包含一种或多种选自以下的氨基酸修饰:

(iv) 9 位 (按照 SEQ ID NO:701 的氨基酸编号) 上的 Asp 被 Glu、Cys 的磺酸衍生物、高谷氨酸、 β -高谷氨酸或具有以下结构的半胱氨酸的烷基羧酸衍生物取代:



其中 X_5 为 C_1 - C_4 烷基、 C_2 - C_4 烯基或 C_2 - C_4 炔基;

(v) 10、20 和 24 位 (按照 SEQ ID NO:701 的氨基酸编号) 上的一个或两个氨基酸被通过酯、醚、硫醚、酰胺或烷基胺键与酰基或烷基共价连接的氨基酸取代;

(vi) 16、17、20、21 和 24 位 (按照 SEQ ID NO:701 的氨基酸编号) 上的一个或两个氨基酸被选自以下的氨基酸取代:Cys、Lys、鸟氨酸、高半胱氨酸和乙酰基-苯丙氨酸 (Ac-Phe),其中所述氨基酸与亲水部分共价连接;

(vii) 15 位 (按照 SEQ ID NO:701 的编号) 上的 Asp 被半胱磺酸、谷氨酸、高谷氨酸和高半胱磺酸取代;

(viii) 16 位 (按照 SEQ ID NO:701 的编号) 上的 Ser 被半胱磺酸、谷氨酸、高谷氨酸和高半胱磺酸取代;

(ix) 按照 SEQ ID NO:701 的氨基酸编号,16、20、21 和 24 位中的一个或多个被 AIB 取代;和 C 选自:

- (x) X;
- (xi) X-Y;
- (xii) X-Y-Z;和
- (xiii) X-Y-Z-R10,

其中 X 为 Met、Leu 或 Nle ;Y 为 Asn 或带电荷的氨基酸 ;Z 为 Thr、Gly、Cys、Lys、鸟氨酸 (Orn)、高半胱氨酸、乙酰基苯丙氨酸 (Ac-Phe) 或带电荷的氨基酸 ;其中 R10 选自 SEQ ID NO :1319-1321 和 1353 ;和

(xiv) (x)-(xiii) 中的任一种,其中 C 端羧酸被酰胺置换 ;

且其中 Q 具有胰高血糖素拮抗剂活性。

65. 权利要求 1-56 中任一项的前药,其中 Q 包含 SEQ ID NO :1451 的序列或氧基衍生物,其中 SEQ ID NO :1451 的 4 和 7 位、7 和 11 位、11 和 15 位、15 和 19 位或 19 和 23 位上的氨基酸通过内酰胺桥连接,且其中 Q 具有胰高血糖素拮抗剂活性和 GLP-1 激动剂活性。

66. 权利要求 1-56 中任一项的前药,其中 Q 包含以下肽,其含有 : (1) 分子内桥、或 α , α -二取代氨基酸、或 16 位 (按照 SEQ ID NO :701 的编号) 上的酸性氨基酸或其组合, (2) 替换 C 端羧酸的 C 端酰胺或酯,和 (3) A-B-C 的通用结构,

其中 A 选自

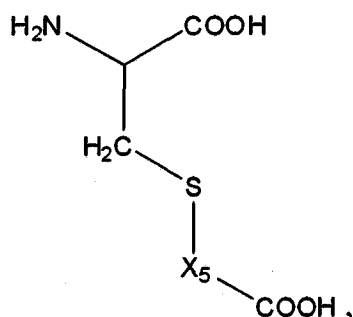
(i) PLA ;

(ii) PLA 的氧基衍生物 ;和

(iii) 2-6 个氨基酸的肽,其中该肽的 2 个连续氨基酸通过酯键或醚键连接 ;

其中 B 表示 SEQ ID NO :701 的氨基酸 p-26,其中 p 为 3、4、5、6 或 7,任选包含一种或多种选自以下的氨基酸修饰 :

(iv) 9 位 (按照 SEQ ID NO :701 的氨基酸编号) 上的 Asp 被 Glu、Cys 的磺酸衍生物、高谷氨酸、 β -高谷氨酸或具有以下结构的半胱氨酸的烷基羧酸衍生物取代 :



其中 X_5 为 C_1 - C_4 烷基、 C_2 - C_4 烯基或 C_2 - C_4 炔基 ;

(v) 10、20 和 24 位 (按照 SEQ ID NO :701 的氨基酸编号) 上的一个或两个氨基酸被通过酯、醚、硫醚、酰胺或烷基胺键与酰基或烷基共价连接的氨基酸取代 ;

(vi) 16、17、20、21 和 24 位 (按照 SEQ ID NO :701 的氨基酸编号) 上的一个或两个氨基酸被选自以下的氨基酸取代 :Cys、Lys、鸟氨酸、高半胱氨酸和乙酰基-苯丙氨酸 (Ac-Phe), 其中所述氨基酸与亲水部分共价连接 ;

(vii) 15 位 (按照 SEQ ID NO :701 的编号) 上的 Asp 被半胱磺酸、谷氨酸、高谷氨酸和高半胱磺酸取代 ;

(viii) 16 位 (按照 SEQ ID NO :701 的编号) 上的 Ser 被半胱磺酸、谷氨酸、高谷氨酸和高半胱磺酸取代 ;

(ix) 17 位上的 Arg 被 Gln 置换、18 位上的 Arg 被 Ala 置换、21 位上的 Asp 被 Glu 置换、23 位上的 Val 被 Ile 置换和 24 位上的 Gln 被 Ala 置换 (按照 SEQ ID NO :701 的氨基酸编号) ;

(x) 16 位上的 Ser 被 Glu 置换、20 位上的 Gln 被 Glu 置换或 24 位上的 Gln 被 Glu 置换 (按照 SEQ ID NO:701 的氨基酸编号) ;

其中 C 选自 :

(vii) X ;

(viii) X-Y ;

(ix) X-Y-Z ;

(x) X-Y-Z-R10 ;

其中 X 为 Met、Leu 或 Nle ; Y 为 Asn 或带电荷的氨基酸 ; Z 为 Thr、Gly、Cys、Lys、鸟氨酸 (Orn)、高半胱氨酸、乙酰基苯丙氨酸 (Ac-Phe) 或带电荷的氨基酸 ; 其中 R10 选自 SEQ ID NO:1421、1426、1427 和 1450 ;

且其中 Q 具有胰高血糖素拮抗剂活性和 GLP-1 激动剂活性。

67. 前述权利要求中任一项的前药, 其中 A 为呈 D- 立体化学构型的氨基酸。

68. 权利要求 1-55 中任一项的前药, 其中 Q 选自 SEQ ID NO:1-564、566-570、573-575、577、579-580、585-612、616、618-632、634-642、647、657-684、701-732、801-878、883-919、1001-1262、1301-1371、1401-1518、1701-1708、1710、1711、1731-1734、1738、1740、1741、1745 和 1747-1776。

69. 一种无菌药物组合物, 其包含权利要求 1-68 中任一项的前药和药学上可接受的载体。

70. 一种治疗高血糖症或糖尿病的方法, 所述方法包括给予有效量的权利要求 69 的药物组合物。

71. 一种抑制食欲、减少体重增加或引起体重减轻的方法, 所述方法包括给予有效量的权利要求 69 的药物组合物。

72. 一种在有需要的患者中引起肠道暂时麻痹的方法, 所述方法包括给予有效量的权利要求 69 的药物组合物。

73. 一种治疗或预防有需要的患者的低血糖症的方法, 所述方法包括给予有效量的权利要求 69 的药物组合物。

74. 权利要求 70-73 中任一项的方法, 所述方法还包括给予第二治疗剂。

75. 权利要求 74 的方法, 其中所述第二治疗剂是胰高血糖素相关肽或第二前药。

基于酰胺的胰高血糖素超家族肽前药

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求保护以下专利申请的优先权：2008 年 12 月 19 日提交的美国临时专利申请号 61/139,210、2009 年 1 月 13 日提交的美国临时专利申请号 61/144,271 和 2009 年 6 月 16 日提交的美国临时专利申请号 61/187,556。各申请的公开内容均通过引用以其整体明确结合到本文中。

[0003] 背景发明

[0004] 基于肽的药物是十分有效的药物，其作用持续时间相对较短，治疗指数可变。本公开内容涉及基于肽的前药，其中对前药衍生物进行设计以延迟起效并延长药物半寿期。起效延迟是有利的，因为允许前药在其活化前进行全身分布。因此，给予前药排除了在给药时由峰值活性引起的并发症，并提高母体药物的治疗指数。

[0005] 肽和蛋白质激动剂的受体识别和后续加工是许多基于肽和蛋白质的药物降解的主要途径。因此肽药物与其受体结合将引起生物刺激，但同时也将通过肽或蛋白质的酶促降解，引起肽 / 蛋白质诱导的药理作用的随后钝化。按照本公开内容，可根据抑制前药被相应受体识别的策略来制备延长肽或蛋白质的生物学半寿期的前药。

[0006] 本文公开的前药最终将以化学方法转化成可被受体识别的结构，其中这种化学转变的速度将决定起效时间和体内生物作用的持续时间。在本申请中公开的分子设计取决于分子内的化学反应，该反应不依赖其它的化学添加剂或酶。

[0007] 前胰高血糖素原是 158 个氨基酸的前体多肽，其在不同组织中加工形成许多不同的胰高血糖素原衍生的肽，包括参与包括葡萄糖稳态、胰岛素分泌、胃排空和肠生长以及食物摄取的调节在内的各种生理功能的胰高血糖素 (SEQ ID NO:701)、胰高血糖素样肽 -1 (GLP-1；如 SEQ ID NO:703 和 SEQ ID NO:704 提供的氨基酸 7-36)、胰高血糖素样肽 -2 (GLP-2；SEQ ID NO:708) 和泌酸调节肽 (OXM；SEQ ID NO:706)。

[0008] 胰高血糖素是 29 个氨基酸的肽，其相当于前胰高血糖素原的氨基酸 33-61，而产生的 GLP-1 为 37 个氨基酸肽，相当于前胰高血糖素原的氨基酸 72-108。GLP-1 (7-36) 酰胺 (SEQ ID NO:704；C 端为精氨酸酰胺) 或 GLP-1 (7-37) 酸 (SEQ ID NO:703；C 端为甘氨酸) 是 GLP-1 的生物学上的有效形式，在 GLP-1 受体上具有基本相等的活性。

[0009] 胰高血糖素是用于重度低血糖症急性治疗的救生药物。据报告，泌酸调节肽具有抑制食欲和减轻体重的药理能力。用 GLP-1 受体激动剂或稳定的 GLP-1 类似物的临床研究证实，肽的这个家族为 II 型糖尿病的有效治疗物。另外，从本质上讲，它可能比胰岛素疗法更安全，因为它的葡萄糖依赖作用从而排除了低血糖症的可能性。结构 - 活性关系研究显示，这三种肽 (胰高血糖素、GLP-1 和泌酸调节肽) 每一种的 N 端组氨酸对于完整作用尤其重要，而且 N 端延伸形式严重削弱生物学效价。

[0010] 已知在结构上类似于胰高血糖素和 GLP-1 并具有相似活性的其它肽。例如，毒蛇外泌肽 -4 是存在于希拉毒蛇 (Gila monster) 唾液中的肽，其在结构上像 GLP-1，并与胰高血糖素和 GLP-1 一样，增加胰岛素释放。

[0011] 另外，肠抑胃肽 (GIP) 亦称葡萄糖依赖性促胰岛素肽，是激素的促胰液素家族的

成员。GIP 来源于由 GIP 基因编码的 153 个氨基酸的前蛋白,并作为有生物活性的 42 个氨基酸肽 (SEQ ID NO:707) 循环。GIP 基因在小肠以及唾液腺中表达,并且是胃酸分泌的弱抑制剂。除其在胃中的抑制作用以外,在葡萄糖存在下,当以生理剂量给予时,GIP 通过胰岛 β 细胞增加胰岛素释放。一般认为,GIP 作为刺激胰腺胰岛素释放的肠因子起作用,可在保持葡萄糖稳态中发挥生理作用。

[0012] 骨钙蛋白 (SEQ ID NO:709) 是存在于骨和牙质中的非胶原蛋白。它由成骨细胞分泌,并被认为是矿化和钙离子稳态中起一定作用。据报告,骨钙蛋白在机体内起激素作用,引起胰腺中的 β 细胞释放更多的胰岛素,同时指导脂肪细胞释放激素脂连蛋白,这增加了对胰岛素的敏感性。

[0013] 与诸如骨钙蛋白、GIP、胰高血糖素、GLP-1 和泌酸调节肽等生物活性肽的治疗应用有关的一个缺点是其在血浆中的半寿期极短 (胰高血糖素和 GLP-1 为约 2 分钟)。因此,为了获得适当的血糖控制,需要长时间地连续给予天然胰高血糖素相关肽。胰高血糖素和 GLP-1 相关肽短的半寿期是被二肽基肽酶 IV (DPP-IV) 快速降解所引起的,该酶在第二和第三氨基酸之间切割。这种切割不仅仅使天然肽失活,而且在胰高血糖素和 GLP-1 的情况下,在其相应的受体方面,缩短形式可能是功能性拮抗剂。因此,存在对疗效较久的 GIP、胰高血糖素、GLP-1 和泌酸调节肽以及相关肽的变体的需要,以实现这些药物作用机制的全部治疗潜力。

[0014] 发明概述

[0015] 按照一些实施方案,提供选自以下的生物活性多肽的前药衍生物:胰高血糖素、毒蜥外泌肽-4、GLP-1、GLP-2、GIP、血管活性肠肽 (VIP)、垂体腺苷酸环化酶激活多肽 27 (PACAP-27)、组氨酸甲硫氨酸肽 (PHM)、泌酸调节肽、促胰液素、骨钙蛋白、生长激素释放激素以及前述活性多肽的类似物、衍生物和缀合物。前药衍生物包含通过酰胺键与生物活性多肽的活性部位共价连接的二肽前药元件。在一些实施方案中,二肽在干扰生物活性多肽与其相应的受体或辅因子相互作用的能力的位置上与生物活性多肽共价结合。在一些实施方案中,二肽前药元件与生物活性肽的氨基端连接。随后在生理条件下和在缺乏酶活性时除去二肽,恢复多肽的全部活性。

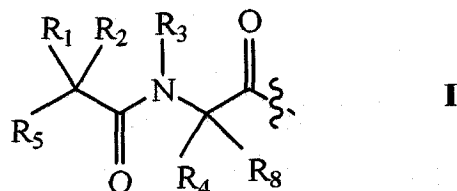
[0016] 在一些实施方案中,提供具有 A-B-Q 通用结构的前药。在这个实施方案中,Q 为选自胰高血糖素超家族肽的生物活性肽,包括胰高血糖素相关肽、骨钙蛋白以及上述生物活性肽的类似物、衍生物和缀合物;A-B 表示通过酰胺键与生物活性肽连接的二肽前药。更具体地讲,在一些实施方案中,A 为氨基酸或羧酸,B 为 N-烷基化氨基酸,其通过在 (A-B 中的) B 的羧基和 Q 的胺之间形成酰胺键与 Q 连接。此外,在一些实施方案中,A、B 或 A-B 与之连接的 Q 的氨基酸是非编码氨基酸,且在生理条件下,在 PBS 中,A-B 自 Q 的化学裂解在约 1 小时 - 约 720 小时内完成至少约 90%。在另一个实施方案中,在生理条件下,在 PBS 中,A-B 自 Q 的化学裂解在约 1 小时或约 1 周之内完成至少约 50%。

[0017] 在一些实施方案中,选择 A 和 B 以抑制 A-B 二肽从 Q 上被哺乳动物血清中存在的酶的酶促切割。在一些实施方案中,选择 A 和 / 或 B 使得在生理条件下在 PBS 中,A-B 自 Q 的裂解半寿期不超过在包含 DPP-IV 蛋白酶的溶液中 A-B 自 Q 的裂解半寿期的 2 倍 (即与在酶不存在的相同条件相比,在存在 DPP-IV 蛋白酶和生理条件下,A-B 自 Q 的裂解发生的速度不大于 2 倍)。在一些实施方案中,A 和 / 或 B 为 D 立体异构体构型的氨基酸。在一些

示例性的实施方案中, A 为 D 立体异构体构型的氨基酸, 而 B 为 L 立体异构体构型的氨基酸。在一些示例性的实施方案中, A 为 L 立体异构体构型的氨基酸, 而 B 为 D 立体异构体构型的氨基酸。在一些示例性的实施方案中, A 为 D 立体异构体构型的氨基酸, B 为 D 立体异构体构型的氨基酸。

[0018] 在一些实施方案中, 二肽前药元件 (A-B) 包含具有下式 I 通用结构的化合物:

[0019]



[0020] 其中

[0021] R_1 、 R_2 、 R_4 和 R_8 独立选自 H、 C_1 - C_{18} 烷基、 C_2 - C_{18} 烯基、(C_1 - C_{18} 烷基)OH、(C_1 - C_{18} 烷基)SH、(C_2 - C_3 烷基)SCH₃、(C_1 - C_4 烷基)CONH₂、(C_1 - C_4 烷基)COOH、(C_1 - C_4 烷基)NH₂、(C_1 - C_4 烷基)NHC(NH₂⁺)NH₂、(C_0 - C_4 烷基)(C_3 - C_6 环烷基)、(C_0 - C_4 烷基)(C_2 - C_5 杂环基 (heterocyclic))、(C_0 - C_4 烷基)(C_6 - C_{10} 芳基) R_7 、(C_1 - C_4 烷基)(C_3 - C_9 杂芳基)和 C_1 - C_{12} 烷基 (W_1) C_1 - C_{12} 烷基, 其中 W_1 为选自 N、S 和 O 的杂原子, 或者 R_1 和 R_2 与它们所连接的原子一起形成 C_3 - C_{12} 环烷基或芳基; 或 R_4 和 R_8 与它们所连接的原子一起形成 C_3 - C_6 环烷基;

[0022] R_3 选自 C_1 - C_{18} 烷基、(C_1 - C_{18} 烷基)OH、(C_1 - C_{18} 烷基)NH₂、(C_1 - C_{18} 烷基)SH、(C_0 - C_4 烷基)(C_3 - C_6) 环烷基、(C_0 - C_4 烷基)(C_2 - C_5 杂环基)、(C_0 - C_4 烷基)(C_6 - C_{10} 芳基) R_7 和 (C_1 - C_4 烷基)(C_3 - C_9 杂芳基), 或者 R_4 和 R_3 与它们所连接的原子一起形成 4、5 或 6 元杂环;

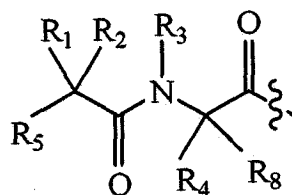
[0023] R_5 为 NHR₆ 或 OH;

[0024] R_6 为 H、 C_1 - C_8 烷基, 或者 R_6 和 R_2 与它们所连接的原子一起形成 4、5 或 6 元杂环; 和

[0025] R_7 选自 H 和 OH。

[0026] 在另一个实施方案中, 二肽前药元件 (A-B) 包含具有下式 I 通用结构的化合物:

[0027]



[0028] 其中

[0029] R_1 、 R_2 、 R_4 和 R_8 独立选自 H、 C_1 - C_{18} 烷基、 C_2 - C_{18} 烯基、(C_1 - C_{18} 烷基)OH、(C_1 - C_{18} 烷基)SH、(C_2 - C_3 烷基)SCH₃、(C_1 - C_4 烷基)CONH₂、(C_1 - C_4 烷基)COOH、(C_1 - C_4 烷基)NH₂、(C_1 - C_4 烷基)NHC(NH₂⁺)NH₂、(C_0 - C_4 烷基)(C_3 - C_6 环烷基)、(C_0 - C_4 烷基)(C_2 - C_5 杂环基)、(C_0 - C_4 烷基)(C_6 - C_{10} 芳基) R_7 、(C_1 - C_4 烷基)(C_3 - C_9 杂芳基)和 C_1 - C_{12} 烷基 (W_1) C_1 - C_{12} 烷基, 其中 W_1 为选自 N、S 和 O 的杂原子, 或者 R_1 和 R_2 与它们所连接的原子一起形成 C_3 - C_{12} 环烷基; 或者 R_4 和 R_8 与它们所连接的原子一起形成 C_3 - C_6 环烷基;

[0030] R_3 选自 C_1 - C_{18} 烷基、(C_1 - C_{18} 烷基)OH、(C_1 - C_{18} 烷基)NH₂、(C_1 - C_{18} 烷基)SH、(C_0 - C_4 烷基)(C_3 - C_6) 环烷基、(C_0 - C_4 烷基)(C_2 - C_5 杂环基)、(C_0 - C_4 烷基)(C_6 - C_{10} 芳基) R_7 和 (C_1 - C_4 烷

基)(C₃-C₉ 杂芳基),或者 R₄ 和 R₃ 与它们所连接的原子一起形成 4、5 或 6 元杂环;

[0031] R₅ 为 NHR₆ 或 OH;

[0032] R₆ 为 H、C₁-C₈ 烷基,或者 R₆ 和 R₁ 与它们所连接的原子一起形成 4、5 或 6 元杂环;和

[0033] R₇ 选自氢、C₁-C₁₈ 烷基、C₂-C₁₈ 烯基、(C₀-C₄ 烷基)CONH₂、(C₀-C₄ 烷基)COOH、(C₀-C₄ 烷基)NH₂、(C₀-C₄ 烷基)OH 和卤素。

[0034] 如上所述,在一些方面提供具有 A-B-Q 通用结构的前药,其中 Q 为胰高血糖素超家族肽(例如胰高血糖素相关肽、生长激素释放激素(GHRH;SEQ ID NO:719)、血管活性肠肽(VIP;SEQ ID NO:720)、垂体腺苷酸环化酶激活多肽 27(PACAP-27;SEQ ID NO:721)、组氨酸甲硫氨酸肽(PHM;SEQ ID NO:722)或促胰液素(SEQ ID NO:723)和/或其类似物、衍生物和缀合物)。胰高血糖素超家族肽可具有共同的结构特征,包括但不限于 N 端氨基酸内的同源物和/或 C 端部分内的 α 螺旋结构。一般认为 C 端通常起受体结合作用,而 N 端通常起受体信号转导作用。N 端部分和 C 端部分中的少数氨基酸在胰高血糖素超家族成员中十分保守,例如 His1、Gly4、Phe6、Phe22、Val23、Trp25 和 Leu26,这些位置上的氨基酸在氨基酸侧链上具有同一性、保守取代或相似性。在一些实施方案中,Q 为胰高血糖素相关肽,例如胰高血糖素(SEQ ID NO:701)、泌酸调节肽(SEQ ID NO:706)、毒蛇外泌肽-4(SEQ ID NO:718)、胰高血糖素样肽-1(GLP-1)(如 SEQ ID NO:703 和 707 提供的氨基酸 7-37)、胰高血糖素样肽-2(GLP-2)(SEQ ID NO:708)、GIP(SEQ ID NO:707)或前述肽的类似物、衍生物和缀合物。在一些实施方案中,Q 作为胰高血糖素相关肽包含以下氨基酸序列,其在天然肽的长度范围内(或在相当于胰高血糖素的位置的范围内,参见例如图 10)与天然胰高血糖素、天然泌酸调节肽、天然毒蛇外泌肽-4、天然(7-37)GLP-1、天然 GLP-2 或天然 GIP 的相应序列,有至少约 40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90% 或 95% 同一性。在其它实施方案中,胰高血糖素超家族肽(Q)包含天然胰高血糖素、天然毒蛇外泌肽-4、天然(7-37)GLP-1、天然 GLP-2、天然 GHR、天然 VIP、天然 PACAP-27、天然 PHM、天然泌酸调节肽、天然促胰液素或天然 GIP 的氨基酸序列,其具有多达 1、2、3、4、5、6、7、8、9 或 10 个氨基酸修饰。在另外的实施方案中,Q 包含作为两个或更多个天然胰高血糖素相关肽序列的嵌合体的氨基酸序列。在一些实施方案中,Q 包含与天然胰高血糖素(SEQ ID NO:701)有至少约 50% 同一性的氨基酸序列,其保持相当于 SEQ ID NO:701 的氨基酸 12-29 的氨基酸的 α 螺旋构象。

[0035] Q 可以是本领域已知的胰高血糖素超家族肽中的任一种,包括例如本领域已知的任何胰高血糖素相关肽,本文通过非限制性实例公开了其中的一些。各种 GLP-1 类似物是本领域已知的,而且按照现有发明属于胰高血糖素相关肽,参见例如 WO 2008023050、WO2007030519、WO 2005058954、WO 2003011892、WO 2007046834、WO 2006134340、WO 2006124529、WO 2004022004、WO2003018516、WO 2007124461,各自通过引用以其关于其 GLP-1 类似物或衍生物每个序列或化学式公开内容的整体结合到本文中。在某些实施方案中,Q 为本文详述的第 1、2、3、4 或 5 类胰高血糖素相关肽。在本文所述实施方案的任一个中,Q 为 SEQ ID NO:1-684、701-742、801-919、1001-1262、1301-1371、1401-1518、1701-1776 和 1801-1921 中的任一个。

[0036] 虽然二肽前药(例如 A-B)可在干扰 Q 的活性的任何位置上与 Q 连接,但是本文公

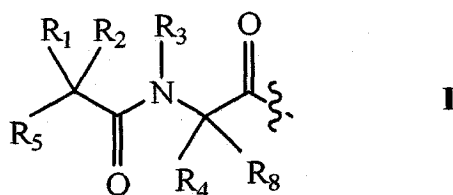
开的实施方案说明了适于 A-B 连接的位置的实例。如果本文参照天然胰高血糖素序列 (SEQ ID NO :701) 中的位置来为位置编号命名,则胰高血糖素类似物或其它胰高血糖素超家族肽中的相应位置可通过比对来确定。参见例如图 10,图中显示某些胰高血糖素超家族肽的比对。例如,基于天然胰高血糖素的 24 位相当于 (7-37)GLP-1 的 24 位。

[0037] 在某些实施方案中,胰高血糖素超家族肽可包含包括但不限于以下的 C 端或 C 端氨基酸序列:COOH、CONH₂、GPSSGAPPPS (SEQ ID NO :710)、GPSSGAPPPS-CONH₂ (SEQ ID NO :711)、泌酸调节肽羧基端突出端、KRNRNIA (SEQ ID NO :714) 或 KGKKNDWKHNITQ (SEQ ID NO :713)。另外,下文对胰高血糖素超家族肽的 C 端氨基酸序列作进一步的详述。

[0038] 在其它方面,Q 包含骨钙蛋白 (SEQ ID NO :709) 或在天然肽的长度范围内与天然骨钙蛋白有至少约 40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90% 或 95% 同一性的氨基酸序列。Q 可包含骨钙蛋白的类似物,其与天然骨钙蛋白相比有多达 1、2、3、4、5、6、7、8、9 或 10 个氨基酸修饰。在此外的其它方面,Q 包含生长激素释放激素 (GHRH) (SEQ ID NO :719) 或在天然肽的长度范围内与天然 GHRH 有至少约 40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90% 或 95% 同一性的氨基酸序列。Q 可包含 GHRH 的类似物,其与天然 GHRH 相比有多达 1、2、3、4、5、6、7、8、9 或 10 个氨基酸修饰。在一些实施方案中,Q 可以是本领域已知的骨钙蛋白或 GHRH 的任何类似物。

[0039] 在又一个实施方案中,提供具有 A-B-Q 通用结构的前药,其中 Q 为胰高血糖素超家族肽、骨钙蛋白或其类似物、衍生物或缀合物,A-B 包含以下通过结构:

[0040]



[0041] 其中 R₁ 和 R₈ 独立选自 H 和 C₁-C₈ 烷基;

[0042] R₂ 和 R₄ 独立选自 H、C₁-C₈ 烷基、C₂-C₈ 烯基、(C₁-C₄ 烷基)OH、(C₁-C₄ 烷基)SH、(C₂-C₃ 烷基)SCH₃、(C₁-C₄ 烷基)CONH₂、(C₁-C₄ 烷基)COOH、(C₁-C₄ 烷基)NH₂、(C₁-C₄ 烷基)NHC(NH₂)⁺NH₂、(C₀-C₄ 烷基)(C₃-C₆ 环烷基)、(C₀-C₄ 烷基)(C₆-C₁₀ 芳基)R₇、CH₂(C₅-C₉ 杂芳基),或者 R₁ 和 R₂ 与它们所连接的原子一起形成 C₃-C₆ 环烷基;

[0043] R₃ 选自 C₁-C₈ 烷基、(C₁-C₄ 烷基)OH、(C₁-C₄ 烷基)NH₂、(C₁-C₄ 烷基)SH、(C₃-C₆) 环烷基,或者 R₄ 和 R₃ 与它们所连接的原子一起形成 5 或 6 元杂环;

[0044] R₅ 为 NHR₆ 或 OH;

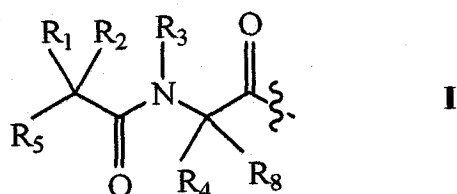
[0045] R₆ 为 H,或者 R₆ 和 R₂ 与它们所连接的原子一起形成 5 或 6 元杂环;和

[0046] R₇ 选自 H 和 OH。

[0047] 前提条件是如果 R₄ 和 R₃ 与它们所连接的原子一起形成 5 或 6 元杂环,则 R₁ 和 R₂ 两者都不为 H。

[0048] 在其它实施方案中,提供具有 A-B-Q 通用结构的前药,其中 Q 为胰高血糖素超家族肽、骨钙蛋白或其类似物、衍生物或缀合物,A-B 包含以下通过结构:

[0049]



[0050] 其中

[0051] R_1 和 R_8 独立地为 H 或 C_1-C_8 烷基；

[0052] R_2 和 R_4 独立选自 H、 C_1-C_8 烷基、 C_2-C_8 烯基、 $(C_1-C_4$ 烷基)OH、 $(C_1-C_4$ 烷基)SH、 $(C_2-C_3$ 烷基)SCH₃、 $(C_1-C_4$ 烷基)CONH₂、 $(C_1-C_4$ 烷基)COOH、 $(C_1-C_4$ 烷基)NH₂、 $(C_1-C_4$ 烷基)NHC(NH₂⁺)NH₂、 $(C_0-C_4$ 烷基)(C_3-C_6 环烷基)、 $(C_0-C_4$ 烷基)(C_2-C_5 杂环基)、 $(C_0-C_4$ 烷基)(C_6-C_{10} 芳基)、 R_7 和 CH₂(C_3-C_9 杂芳基)，或者 R_1 和 R_2 与它们所连接的原子一起形成 C_3-C_{12} 环烷基；

[0053] R_3 选自 C_1-C_8 烷基、 $(C_1-C_4$ 烷基)OH、 $(C_1-C_4$ 烷基)NH₂、 $(C_1-C_4$ 烷基)SH、 (C_3-C_6) 环烷基，或者 R_4 和 R_3 与它们所连接的原子一起形成 5 或 6 元杂环；

[0054] R_5 为 NHR₆ 或 OH；

[0055] R_6 为 H、 C_1-C_8 烷基，或者 R_6 和 R_2 与它们所连接的原子一起形成 5 或 6 元杂环；和

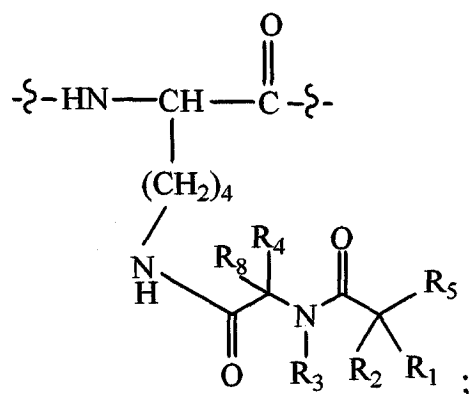
[0056] R_7 选自氢、 C_1-C_{18} 烷基、 C_2-C_{18} 烯基、 $(C_0-C_4$ 烷基)CONH₂、 $(C_0-C_4$ 烷基)COOH、 $(C_0-C_4$ 烷基)NH₂、 $(C_0-C_4$ 烷基)OH、卤素，

[0057] 前提条件是如果 R_4 和 R_3 与它们所连接的原子一起形成 5 或 6 元杂环，则 R_1 和 R_2 两者都不为 H。

[0058] 在一些实施方案中，Q 为选自以下的肽：生长激素释放激素 (GHRH；SEQ ID NO：719)、血管活性肠肽 (VIP；SEQ ID NO：720)、垂体腺苷酸环化酶激活多肽 27 (PACAP-27；SEQ ID NO：721)、组氨酸甲硫氨酸肽 (PHM；SEQ ID NO：722) 或促胰液素 (SEQ ID NO：723)、胰高血糖素 (SEQ ID NO：701)、毒蛇外泌肽 -4 (SEQ ID NO：718)、胰高血糖素样肽 -1 (GLP-1) (如 SEQ ID NO：703 和 704 提供的氨基酸 7-37)、胰高血糖素样肽 -2 (GLP-2) (SEQ ID NO：708)、GIP (SEQ ID NO：707) 或上述肽的类似物、衍生物和缀合物。在一些实施方案中，Q 为胰高血糖素相关肽。

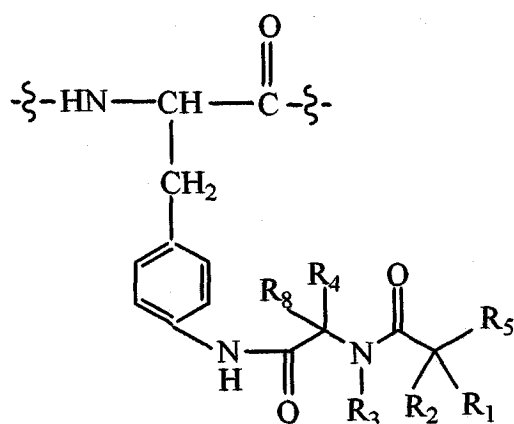
[0059] 在另一个实施方案中，提供胰高血糖素超家族肽或骨钙蛋白或者其类似物、衍生物或缀合物的前药类似物，其中前药部分 (A-B) 在 Q 序列中的一个或多个内部氨基酸残基上 (例如在相当于天然胰高血糖素 (SEQ ID NO：701) 的 12、16、17、18、20、28 或 29 位的位置上) 与 Q 共价连接。例如，在某些实施方案中，前药部分 (A-B) 在 Q 的 20 位上与取代的 Lys 直接连接或通过接头连接。在这类实施方案中，Q 可包含在 20 位 (相对于天然胰高血糖素序列) 上的包含以下结构的取代：

[0060]



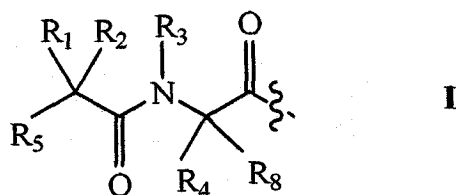
[0061] 在其它实施方案中,前药部分(A-B)直接或通过接头与22位上的取代的氨基-Phe连接。在这类实施方案中,Q可包含在22位(相对于天然胰高血糖素序列)上的包含以下结构的取代:

[0062]



[0063] 或者或另外地,前药部分(A-B)直接或通过接头与Q的氨基端连接,其中A-B包含以下结构:

[0064]



[0065] 其中R₁和R₈独立选自H和C₁-C₈烷基;

[0066] R₂和R₄独立选自H、C₁-C₈烷基、C₂-C₈烯基、(C₁-C₄烷基)OH、(C₁-C₄烷基)SH、(C₂-C₃烷基)SCH₃、(C₁-C₄烷基)CONH₂、(C₁-C₄烷基)COOH、(C₁-C₄烷基)NH₂、(C₁-C₄烷基)NHC(NH₂)⁺NH₂、(C₀-C₄烷基)(C₃-C₆环烷基)、(C₀-C₄烷基)(C₆-C₁₀芳基)R₇、CH₂(C₅-C₉杂芳基),或者R₁和R₂与它们所连接的原子一起形成C₃-C₆环烷基;

[0067] R₃选自C₁-C₈烷基、(C₁-C₄烷基)OH、(C₁-C₄烷基)NH₂、(C₁-C₄烷基)SH、(C₃-C₆)环烷基,或者R₄和R₃与它们所连接的原子一起形成5或6元杂环;

[0068] R₅为NHR₆或OH;

[0069] R₆为H,或者R₆和R₂与它们所连接的原子一起形成5或6元杂环;和

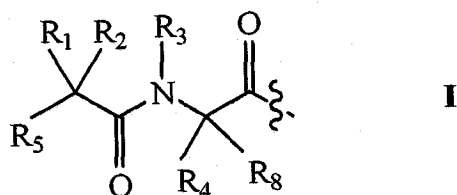
[0070] R₇选自H和OH,

[0071] 前提条件是如果R₄和R₃与它们所连接的原子一起形成5或6元杂环,则R₁和R₂

各自都不为 H。

[0072] 在其它实施方案中,前药部分 (A-B) 直接或通过接头与 Q 的氨基端连接,其中 A-B 包含以下结构:

[0073]



[0074] 其中

[0075] R_1 和 R_8 独立地为 H 或 C_1-C_8 烷基;

[0076] R_2 和 R_4 独立选自 H、 C_1-C_8 烷基、 C_2-C_8 烯基、 $(C_1-C_4$ 烷基)OH、 $(C_1-C_4$ 烷基)SH、 $(C_2-C_3$ 烷基)SCH₃、 $(C_1-C_4$ 烷基)CONH₂、 $(C_1-C_4$ 烷基)COOH、 $(C_1-C_4$ 烷基)NH₂、 $(C_1-C_4$ 烷基)NHC(NH₂⁺)NH₂、 $(C_0-C_4$ 烷基)(C_3-C_6 环烷基)、 $(C_0-C_4$ 烷基)(C_2-C_5 杂环基)、 $(C_0-C_4$ 烷基)(C_6-C_{10} 芳基) R_7 和 CH₂(C_3-C_9 杂芳基),或者 R_1 和 R_2 与它们所连接的原子一起形成 C_3-C_{12} 环烷基;

[0077] R_3 选自 C_1-C_8 烷基、 $(C_1-C_4$ 烷基)OH、 $(C_1-C_4$ 烷基)NH₂、 $(C_1-C_4$ 烷基)SH、 (C_3-C_6) 环烷基,或者 R_4 和 R_3 与它们所连接的原子一起形成 5 或 6 元杂环;

[0078] R_5 为 NHR₆ 或 OH;

[0079] R_6 为 H、 C_1-C_8 烷基,或者 R_6 和 R_2 与它们所连接的原子一起形成 5 或 6 元杂环;和

[0080] R_7 选自氢、 C_1-C_{18} 烷基、 C_2-C_{18} 烯基、 $(C_0-C_4$ 烷基)CONH₂、 $(C_0-C_4$ 烷基)COOH、 $(C_0-C_4$ 烷基)NH₂、 $(C_0-C_4$ 烷基)OH、卤素,

[0081] 前提条件是如果 R_4 和 R_3 与它们所连接的原子一起形成 5 或 6 元杂环,则 R_1 和 R_2 两者都不为 H。

[0082] 在一些实施方案中,只有一个前药部分与 Q 连接。例如,在这类实施方案中,如果前药部分 (A-B) 在 N 端与 Q 连接,则无前药部分 (A-B) 与 Q 序列的内部氨基酸残基连接,反之亦然。在一些实施方案中,2 个或 3 个前药部分在例如 N 端和在一个或多个内部位点上与 Q 连接。

[0083] 附图简述

[0084] 图 1 图示一周一次腹膜内注射 15 或 70nmol/kg 剂量的胰高血糖素类似物的饮食引起的肥胖症 (DIO) 小鼠的体重变化。在最初注射下列物质后,每天给小鼠称重 (N = 8): 仅溶媒 ▼、15nmol/kg (▷) 或 70nmol/kg (►) 的胰高血糖素超家族肽 A (“肽 A”)、或肽 A 的前药衍生物,其中二肽通过酰胺键与肽 A 的 N 端连接,其中所述二肽为 Aib⁻¹Pro⁰ (按 15nmol/kg (○) 或 70nmol/kg (●) 给予)、Aib⁻¹dPro⁰ (按 70nmol/kg 给予 (◇))、Lys⁻¹Sar⁰ (按 70nmol/kg 给予 (◆))、dAla⁻¹Pro⁰ (按 70nmol/kg 给予 (◄)) 或 Ac-Aib⁻¹Pro⁻¹ (按 70nmol/kg 给予 (■))。

[0085] 图 2 图示一周一次腹膜内注射 0.5、3、15 或 70nmol/kg 剂量的仅溶媒 (◆)、肽 A (按 0.5 ▲、3 ►、15 ▼ 或 70 ◄ nmol/kg/天) 或 Lys⁻¹Sar⁰-肽 A (按 0.5 △、3 ▷、15 ▽ 或 70 ◁ nmol/kg/天) 的饮食引起的肥胖症 (DIO) 小鼠的体重变化。

[0086] 图 3 图示先注射胰高血糖素相关肽然后注射葡萄糖溶液的 DIO 小鼠 (N = 8) 的血

糖水平 (mg/dL)。在 -60 分钟时间点给小鼠腹膜内注射仅溶媒 (▲) 或 15 或 70nmol/kg 剂量的下列化合物之一：

[0087] (A) 肽 A (按 15 ◁ 或 70 ◀ nmol/kg/天)，

[0088] (B) Lys⁻¹ Sar⁰ 肽 A (按 15 ▷ 或 70 ► nmol/kg/天)，或

[0089] (C) dLys⁻¹ Sar⁰ 肽 A (按 15 □ 或 70 ■ nmol/kg/天)。

[0090] 在 0 分钟时间点按 1.5g/kg 体重的剂量注射包含 25% (v/v) 葡萄糖的盐溶液。在 -60、0、15、30、60 和 120 分钟时间点测量血糖水平。

[0091] 图 4 图示先注射胰高血糖素相关肽然后注射葡萄糖溶液的 DIO 小鼠 (N = 8) 的血糖水平 (mg/dL)。在 -15 分钟时间点给小鼠腹膜内注射仅溶媒 (▼) 或 2nmol/kg 剂量的下列化合物之一：

[0092] (A) Lys⁻¹ Sar⁰ 肽 A (■)，

[0093] (B) Lys⁻¹ (X), Sar⁰ 肽 A (▲)，(X 表示与 Lys 侧链连接的 1K PEG 链)

[0094] (C) Lys⁻¹ (Y), Sar⁰ 肽 A (◆)，(Y 表示与 Lys 侧链连接的叔丁基甘氨酸)

[0095] (D) dLys⁻¹ Sar⁰ 肽 A (►)。

[0096] 在 0 分钟时间点按 1.5g/kg 体重的剂量注射包含 25% (v/v) 葡萄糖的盐溶液。在 -15、0、15、30、60 和 120 分钟时间点测量血糖水平。

[0097] 图 5 图示先注射胰高血糖素相关肽然后注射葡萄糖溶液的 DIO 小鼠 (N = 8) 的血糖水平 (mg/dL)。在 -15 分钟时间点给小鼠腹膜内注射溶媒 (▼)、20nmol/kg 剂量的 dLys⁻¹ Sar⁰ 肽 A (►) 或 0.67nmol/kg 剂量的下列化合物之一：

[0098] (A) Lys⁻¹ Sar⁰ 肽 A (■)，

[0099] (B) Lys⁻¹ (X), Sar⁰ 肽 A (▲)，(X 表示与 Lys 侧链连接的 1K PEG 链)

[0100] (C) Lys⁻¹ (Y), Sar⁰ 肽 A (◆)，(Y 表示与 Lys 侧链连接的叔丁基甘氨酸)。

[0101] 在 0 分钟时间点按 1.5g/kg 体重的剂量注射包含 25% (v/v) 葡萄糖的盐溶液。在 -15、0、15、30、60 和 120 分钟时间点测量血糖水平。

[0102] 图 6 图示先注射胰高血糖素相关肽然后注射葡萄糖溶液的 DIO 小鼠 (N = 8) 的血糖水平 (mg/dL)。在 -60 分钟时间点给小鼠腹膜内注射仅溶媒 (▼) 或 15 或 70nmol/kg 剂量的下列化合物之一：

[0103] (A) 肽 A (按 15 △ 或 70 ▲ nmol/kg/天)，

[0104] (B) dLys⁻¹ Sar⁰ 肽 A (按 15 □, 或 70 ■ nmol/kg/天)，或

[0105] (C) Lys⁻¹ Sar⁰ 肽 A (按 15 ▷ 或 70 ► nmol/kg/天)。

[0106] 在 0 分钟时间点和 24 小时后按 1.5g/kg 体重的剂量注射包含 25% (v/v) 葡萄糖的盐溶液 (参见图 7)。在相对于葡萄糖溶液的第一次给予 (即 0 分钟时间点) 的 -60、0、15、30、60 和 120 分钟时间点测量指示血糖水平。

[0107] 图 7 图示在 -60 分钟时间点腹膜内注射仅溶媒 (▼) 或 15 或 70nmol/kg 剂量的下列化合物之一的 DIO 小鼠 (N = 8) 的血糖水平 (mg/dL)：

[0108] (A) 肽 A (按 15 △ 或 70 ▲ nmol/kg/天)，

[0109] (B) dLys⁻¹ Sar⁰ 肽 A (按 15 ◇ 或 70 ▽ nmol/kg/天)，或

[0110] (C) Lys⁻¹ Sar⁰ 肽 A (按 15 ◆, 或 70 ■ nmol/kg/天)。

[0111] 在 0 分钟时间点和 24 小时后按 1.5g/kg 体重的剂量注射包含 25% (v/v) 葡萄糖的盐溶液。在相对于第二次葡萄糖溶液的 24 小时给予的 0、15、30、60 和 120 分钟时间点测量指示血糖水平。

[0112] 图 8 提供表明按 15 或 70nmol/kg 剂量腹膜内注射所示化合物的 DIO 小鼠 (N = 8) 的体重减轻数据。在给予化合物后 7 天测定指示体重。

[0113] 图 9A-B 图示 DIO 小鼠 (n = 8) 中的血糖 (BG) 水平 (mg/dL)。在用按 1.5g/kg 体重注射的含 25% 葡萄糖的盐溶液攻击前 24、8、4 或 1 小时 (如图中所示), 给小鼠腹膜内注射仅溶媒或前药肽。在相对于用葡萄糖溶液攻击的 0、15、30、60 和 120 分钟时间点测量指示血糖水平。图 9A 显示给予 Lys⁻¹Sar⁰ 肽 A (即包含 Lys⁻¹-Sar⁰ 前药元件) 后的血糖水平。图 9B 显示给予 dLys⁻¹Sar⁰ 肽 A (即包含 D-Lys⁻¹-Sar⁰ 前药元件) 后的血糖水平。

[0114] 图 10 提供各种胰高血糖素超家族肽或其相关片段的氨基酸序列的比对。所提供的氨基酸序列为 GHRH (SEQ ID NO : 719)、PHI (SEQ ID NO : 722)、VIP (SEQ ID NO : 720)、PACAP-27 (SEQ ID NO : 721)、毒蜥外泌肽-4 (SEQ ID NO : 718)、GLP-1 (SEQ ID NO : 703)、胰高血糖素 (SEQ ID NO : 701)、泌酸调节肽 (SEQ ID NO : 706)、GIP (SEQ ID NO : 707)、GLP-2 (SEQ ID NO : 708) 和促胰液素 (SEQ ID NO : 724)。

[0115] 图 11 图示皮下注射单剂量的仅溶媒或 10nmol/kg 下列化合物之一的 DIO 小鼠 (9 组, 每组 8 只小鼠) 的血糖水平 (mg/dL) :

[0116] (A) 胰高血糖素超家族肽 C (“肽 C”),

[0117] (B) dK-Sar- 肽 C,

[0118] (C) dK-Gly (N- 己基) - 胰高血糖素超家族肽 B (“肽 B”), 或

[0119] (D) dK-F (N-Me) - 肽 C。

[0120] 小鼠为 5.5 月龄, 已进行高脂饮食大约 2 个月。在注射后 0、2、4、24 和 72 小时测得血糖水平。

[0121] 图 12 图示皮下注射单剂量的仅溶媒或 10nmol/kg 下列化合物之一的 DIO 小鼠 (9 组, 每组 8 只小鼠) 的体重变化 :

[0122] (A) 肽 C,

[0123] (B) dK-Sar- 肽 C,

[0124] (C) dK-Gly (N- 己基) - 肽 B, 或

[0125] (D) dK-F (N-Me) - 肽 C。

[0126] 小鼠为 5.5 月龄, 已进行高脂饮食约 2 个月。在一周长的研究期间监测食物摄取和脂肪量。

[0127] 图 13A 和图 13B 表示采用 GLP- 受体萤光素酶测定法测定的 20% 人血浆中 dK-Gly (N- 己基) - 肽 B (图 13A) 和 dK-Sar- 肽 C (图 13B) 的受体结合活性。

[0128] 图 14 图示皮下注射单剂量的 3、10 或 30nmol/kg 仅溶媒或下列化合物之一的 DIO 小鼠 (n = 8) 的体重变化 :

[0129] (A) 肽 C,

[0130] (B) dLys⁻¹Sar⁰ 肽 C, 或

[0131] (C) dLys⁻¹ Gly (N- 己基) ⁰ 肽 B。

[0132] 在研究的第 1、3、5 和 7 天测量体重。小鼠为 5 月龄, 初始平均体重 31.2g, 已进行

普通食物饮食 (chow diet) 约 5 个月。

[0133] 图 15A-C 图示皮下注射单剂量的 3、10 或 30nmol/kg 仅溶媒或下列化合物之一的 DIO 小鼠 ($n = 8$) 的血糖 (BG) 水平 (mg/dL) :

[0134] (A) 肽 C,

[0135] (B) dLys⁻¹Sar⁰ 肽 C, 或

[0136] (C) dLys⁻¹Gly(N-己基)⁰ 肽 B。

[0137] 在第 1 天 (图 15A)、第 3 天 (图 15B) 和第 5 天 (图 15C) 腹膜内获得指示血糖水平。小鼠为 5 月龄, 已进行普通食物饮食约 5 个月。

[0138] 发明详述

[0139] 定义

[0140] 在描述和要求保护本发明时, 可根据下文给出的定义使用下列术语。

[0141] 本文使用的术语“前药”的定义是在显示其全部药理作用之前经过化学修饰的任何化合物。

[0142] 本文使用的术语“氨基酸”包括既含氨基官能团又含羧基官能团的任何分子, 其中氨基和羧基官能团连接在同一碳 (α 碳) 上。 α 碳任选可具有一个或两个其它的有机取代基。氨基酸可用其三字母码、一字母码或在一些情况下用其侧链的名称来命名。例如, 包含与 α 碳连接的环己烷基的非天然氨基酸称为“环己烷”或“环己基”。对本公开内容而言, 在未说明其立体化学的情况下, 对氨基酸的命名旨在包括 L 型或 D 型氨基酸或外消旋混合物。然而, 在氨基酸通过其三字母码命名并包括上标数字 (即 Lys⁻¹) 的情况下, 这种命名旨在说明天然 L 型氨基酸, 而 D 型氨基酸可通过在三字母码前加上小写字母 d 和上标数字来指定 (即 dLys⁻¹)。

[0143] 本文使用的术语“羟酸”是指已经修饰用羟基置换 α 碳氨基的氨基酸。

[0144] 本文使用的术语“非编码氨基酸”包括不是任何下列 20 种氨基酸的 L- 异构体的任何氨基酸: Ala、Cys、Asp、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Pro、Gln、Arg、Ser、Thr、Val、Trp、Tyr。

[0145] “二肽”是 α 氨基酸或 α 羟酸通过肽键与另一个氨基酸连接的结果。

[0146] 本文使用的不存在任何其它指称的术语“化学裂解”包括导致共价化学键断裂的非酶促反应。

[0147] “生物活性多肽”是指能够在体外和 / 或体内施加生物作用的多肽。

[0148] 本文使用的“酰化的”氨基酸是包含对天然存在的氨基酸而言是非天然的酰基的氨基酸, 与其制备方法无关。产生酰化氨基酸和酰化肽的示例性方法是本领域已知的, 该方法包括在加入肽前使氨基酸酰化或在肽合成之后接着对肽进行化学酰化。在一些实施方案中, 酰基导致肽具有一种或多种以下性质: (i) 循环中的半寿期延长, (ii) 起效延迟, (iii) 作用持续时间延长, (iv) 对蛋白酶 (例如 DPP-IV) 的抗性改进, 和 (v) 对胰高血糖素超家族肽和 / 或骨钙蛋白肽受体的效价提高。

[0149] 本文使用的“烷基化的”氨基酸是包含对天然存在的氨基酸而言是非天然的烷基的氨基酸, 与其制备方法无关。产生烷基化氨基酸和烷基化肽的示例性方法是本领域已知的, 该方法包括在加入肽前使氨基酸烷基化或在肽合成之后接着对肽进行化学烷基化。在不固守任何特定理论的情况下, 据信肽的烷基化将获得与肽的酰化相似 (如果不是相同

的话)的作用,例如循环中的半寿期延长、起效延迟、作用持续时间延长、对蛋白酶(例如 DPP-IV)的抗性改进和对胰高血糖素超家族肽和/或骨钙蛋白肽受体的效价提高。

[0150] 本文所用的对肽的一般提及意在包括具有修饰的氨基端和羧基端的肽。例如,标明标准氨基酸的氨基酸序列意在包括 N 端和 C 端上的标准氨基酸以及 N 端上相应的羧酸和/或经修饰包含替换末端羧酸的酰胺基的相应的 C 端氨基酸。

[0151] 本文使用的术语“药学上可接受的载体”包括任何标准的药用载体,例如磷酸缓冲盐溶液、水、乳液(例如油/水或水/油乳液)和各种类型的润湿剂。该术语还包括美国联邦政府管理机构批准或美国药典录入的用于动物(包括人)的任何物质。

[0152] 本文使用的术语“药学上可接受的盐”是指保留母体化合物的生物活性的化合物的盐,该盐在生物学或其它方面无不良性。本文公开的许多化合物能够通过氨基和/或羧基或其类似基团的存在而形成酸式盐和/或碱式盐。

[0153] 可由无机和有机碱制备药学上可接受的碱加成盐。仅作为实例,由无机碱得到的盐包括钠盐、钾盐、锂盐、铵盐、钙盐和镁盐。由有机碱得到的盐包括但不限于伯胺、仲胺和叔胺的盐。

[0154] 可由无机和有机酸制备药学上可接受的酸加成盐。由无机酸得到的盐包括盐酸、氢溴酸、硫酸、硝酸、磷酸等的盐。由有机酸得到的盐包括乙酸、丙酸、乙醇酸、丙酮酸、草酸、苹果酸、丙二酸、琥珀酸、马来酸、富马酸、酒石酸、柠檬酸、苯甲酸、肉桂酸、扁桃酸、甲磺酸、乙磺酸、对甲苯磺酸、水杨酸等的盐。

[0155] 本文使用的术语“治疗”包括预防特定的病症或病况,或减轻特定病症或病况的相关症状和/或防止或消除所述症状。例如,本文使用的术语“治疗糖尿病”总的来说是指保持葡萄糖血液水平接近正常水平,并可根据既定情况,包括提高或降低血糖水平。

[0156] 本文使用的“有效的”量或“治疗有效量”的前药是指无毒但足量的前药以提供所需效果。例如一种所需要的作用会是预防或治疗高血糖症。“有效”量在受试者之间不同,这取决于个体的年龄和一般状况、给药方式等。因此,并非总是能规定确切的“有效量”。然而,在任何个体情况下,本领域普通技术人员采用常规实验可确定合适的“有效”量。

[0157] 术语“胃肠外”意指不通过消化道但通过某些其它途径,例如皮下、肌内、脊柱内或静脉内。

[0158] 本文使用的术语“同一性”涉及两个或更多个序列之间的相似性。同一性通过将相同的残基数除以残基总数再将结果乘以 100 得到百分比来衡量。因此,2 个完全相同的序列具有 100% 同一性,而彼此相比下具有氨基酸缺失、添加或取代的 2 个序列的同一性程度较低。本领域技术人员应认识到的是,若干计算机程序,例如运用诸如 BLAST(基本的局部比对搜索工具(Basic Local Alignment Search Tool),Altschul 等(1993)J. Mol. Biol. 215: 403-410)等算法的计算机程序可用于测定序列同一性。

[0159] 术语“胰高血糖素相关肽”是指以下肽,其对在胰高血糖素、GLP-1、GLP-2 和 GIP 受体中的任一种或多种具有生物活性(作为激动剂或拮抗剂),并且包含与天然胰高血糖素、天然泌酸调节肽、天然毒蜥外泌肽-4、天然 GLP-1、天然 GLP-2 或天然 GIP 中的至少一种具有至少 40% 序列同一性(例如 45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%)的氨基酸序列。除非另有说明,否则任何对胰高血糖素相关肽中的氨基酸位置的提及(例如关于前药部分、缀合物部分、亲水聚合物、酰化或烷基化的连接)是指与天然胰高

血糖素氨基酸序列 (SEQ ID NO :701) 对应的位置。

[0160] 术语“胰高血糖素超家族肽”是指在其 N 端区和 C 端区在结构上相关的一组肽 (参见例如 Sherwood 等, *Endocrine Reviews* 21 :619-670 (2000))。该组的成员包括所有的胰高血糖素相关肽以及生长激素释放激素 (GHRH ;SEQ ID NO :719)、血管活性肠肽 (VIP ;SEQ ID NO :720)、垂体腺苷酸环化酶激活多肽 27 (PACAP-27 ;SEQ ID NO :721)、组氨酸异亮氨酸肽 (PHI)、组氨酸甲硫氨酸肽 (PHM ;SEQ ID NO :722)、促胰液素 (SEQ ID NO :723), 以及与天然肽相比具有多达 1、2、3、4、5、6、7、8、9 或 10 个氨基酸修饰的类似物、衍生物或缀合物。这类肽优选保持与胰高血糖素受体超家族的受体相互作用 (激动剂或拮抗剂) 的能力。除非另有说明, 否则任何对胰高血糖素超家族肽的氨基酸位置的提及 (例如关于前药部分、缀合物部分、亲水聚合物、酰化或烷基化的连接) 是指与天然胰高血糖素氨基酸序列 (SEQ ID NO :701) 对应的位置, 参见图 10 关于代表性胰高血糖素超家族肽的比对。

[0161] 术语“GLP-1 激动剂”是指采用经证实的体外模型测定法通过 cAMP 产生测定的刺激 GLP-1 受体活性的化合物, 该方法为例如已公布的国际专利申请号 WO 2007/056362 (2007 年 5 月 18 日公布) 的实施例 13 中描述的方法, 该申请的公开内容在此通过引用明确结合到本申请中。

[0162] 本文使用的术语“天然 GLP-1”是表示 GLP-1 (7-36) 酰胺 (由 SEQ ID NO :704 的序列组成)、GLP-1 (7-37) 酸 (由 SEQ ID NO :703 的序列组成) 或这两种化合物的混合物的通用术语。本文使用的对“GLP-1”的一般提及在不存在任何其它指称时意指天然 GLP-1。

[0163] 本文使用的术语“胰高血糖素肽”是表示 SEQ ID NO :701 的天然胰高血糖素肽以及相对于天然胰高血糖素序列具有一种或多种氨基酸修饰的修饰衍生物的通用术语, 该修饰任选包括但不限于在 1、2、5、7、8、10、12、13、14、16、17、18、24、28 和 29 位氨基酸上的取代。总的来讲, 所有提及具体氨基酸位置的编号 (例如 28 位) 是指在天然胰高血糖素 (SEQ ID NO :701) 的该位置上或在其任何类似物的相应氨基酸位置上的氨基酸。例如, 提及“28 位”可表示 SEQ ID NO :701 的第一个氨基酸已缺失的胰高血糖素类似物相应的 27 位。同样的, 提及“28 位”可表示在 SEQ ID NO :701 的 N 端前已加入一个氨基酸的胰高血糖素类似物相应的 29 位。

[0164] 本文使用的术语“GLP-1 肽”是表示天然 GLP-1 以及相对于天然 GLP-1 序列具有一种或多种氨基酸修饰的修饰衍生物的通用术语。

[0165] 本文使用的氨基酸“修饰”是指氨基酸的取代、添加或缺失, 包括被任何通常存在于人蛋白质中的 20 种氨基酸以及非常见的或非天然存在的氨基酸取代或者添加任何所述氨基酸。非常见氨基酸的商用来源包括 Sigma-Aldrich (Milwaukee, WI), ChemPep Inc. (Miami, FL) 和 Genzyme Pharmaceuticals (Cambridge, MA)。非常见氨基酸可购自商业供应商、从头合成、或者由天然存在的氨基酸进行化学修饰或衍生化。氨基酸修饰包括氨基酸与缀合物部分 (例如亲水聚合物) 的连接、氨基酸的酰化、烷基化和 / 或其它化学衍生化。

[0166] 本文使用的氨基酸“取代”是指一个氨基酸残基被不同的氨基酸残基置换。

[0167] 本文使用的术语“保守氨基酸取代”在此定义为在下列 5 组之一内的互换:

[0168] I. 小的脂族非极性或略有极性的残基:

[0169] Ala、Ser、Thr、Pro、Gly;

[0170] II. 极性带负电荷的残基及其酰胺:

[0171] Asp、Asn、Glu、Gln；

[0172] III. 极性带正电荷的残基：

[0173] His、Arg、Lys、鸟氨酸 (Orn)；

[0174] IV. 大的脂族非极性残基：

[0175] Met、Leu、Ile、Val、Cys、正亮氨酸 (Nle)、高半胱氨酸；

[0176] V. 大的芳族残基：

[0177] Phe、Tyr、Trp、乙酰基苯丙氨酸。

[0178] 本文使用的术语“嵌合体 2 (Chimera 2)”是指天然胰高血糖素氨基酸序列 (SEQ ID NO:701) 中包含下列修饰的胰高血糖素肽：17 位的 Gln、18 位的 Ala、20 位的 Lys、21 位的 Glu、23 位的 Ile 和 24 位的 Ala 以及 C 端酰胺。

[0179] 本文使用的通用术语“聚乙二醇链”或“PEG 链”是指呈支链或直链的环氧乙烷和水的缩聚物的混合物，用通式 $H(OCH_2CH_2)_kOH$ 表示，其中 k 至少为 9。在缺乏任何更多描述的情况下，该术语意在包括平均总分子量选自 500-80,000 道尔顿的乙二醇聚合物。“聚乙二醇链”或“PEG 链”与数字后缀联用表示其大致的平均分子量。例如，PEG-5,000 (5k PEG) 是指总的平均分子量为约 5,000 道尔顿的聚乙二醇链。

[0180] 本文使用的术语“聚乙二醇化的”和类似术语是指已通过将聚乙二醇链与化合物连接由其天然状态进行修饰的化合物。“聚乙二醇化多肽”是具有与多肽共价结合的 PEG 链的多肽。

[0181] 本文使用的“接头”是使两个独立的实体彼此结合的键、分子或分子群。接头可为两个实体提供最佳间隔，或者还可提供使两个实体彼此分隔的不稳定连接。不稳定连接包括光可裂解基团、酸不稳定部分、碱不稳定部分和酶可切割基团。

[0182] 本文使用的“二聚体”是包含通过接头彼此共价结合的 2 个亚基的复合体。术语二聚体在缺乏任何限定性语言下使用时，既包括同二聚体又包括异二聚体。同二聚体包含 2 个相同的亚基，而异二聚体包含 2 个不同的亚基，然而 2 个亚基彼此大致相似。

[0183] 本文使用的术语“ C_1-C_n 烷基”（其中 n 可为 1-6）表示具有一个至指定数目的碳原子的支链或直链烷基。通常 C_1-C_6 烷基包括但不限于甲基、乙基、正丙基、异丙基、丁基、异丁基、仲丁基、叔丁基、戊基、己基等。

[0184] 本文使用的术语“ C_2-C_n 烯基”（其中 n 可为 2-6）表示具有 2 个至指定数目的碳原子和至少一个双键的烯属不饱和支链或直链基团。这类基团的实例包括但不限于 1-丙烯基、2-丙烯基 ($-CH_2-CH=CH_2$)、1,3-丁二烯基 ($-CH=CHCH=CH_2$)、1-丁烯基 ($-CH=CHCH_2CH_3$)、己烯基、戊烯基等。

[0185] 术语“ C_2-C_n 炔基”（其中 n 可为 2-6）是指具有 2-n 个碳原子和至少一个三键的不饱和支链或直链基团。这类基团的实例包括但不限于 1-丙炔基、2-丙炔基、1-丁炔基、2-丁炔基、1-戊炔基等。

[0186] 本文使用的术语“芳基”是指具有一个或两个芳环的单环或二环碳环系统，包括但不限于苯基、萘基、四氢萘基、茚满基、茚基等。通过指明碳存在的数目来表示芳环的大小和取代基或连接基团的存在情况。例如，术语“(C_1-C_3 烷基) (C_6-C_{10} 芳基)”是指通过 1-3 元烷基链与母体部分连接的 6-10 元芳基。

[0187] 本文使用的术语“杂芳基”是指含有一个或两个芳环并在芳环中含有至少一个氮、

氧或硫原子的单环或二环环系。通过指明碳存在的数目来表示杂芳环的大小和取代基或连接基团的存在情况。例如,术语“(C₁-C_n 烷基)(C₅-C₆ 杂芳基)”是指通过 1-“n”元烷基链与母体部分连接的 5 或 6 元杂芳基。

[0188] 本文使用的术语“杂烷基”是指在结构骨架中含有指定碳原子数和至少一个杂原子的直链或支链烃。对于本文的目的,合适的杂原子包括但不限于 N、S 和 O。

[0189] 本文使用的术语“卤素”是指氟、氯、溴和碘中的一个或多个成员。

[0190] 本文使用的术语“带电荷的氨基酸”是指包含在生理 pH 下,在水溶液中带负电荷的(即脱质子化的)或带正电荷的(即质子化的)侧链的氨基酸。例如带负电荷的氨基酸包括天冬氨酸、谷氨酸、半胱氨酸、高半胱氨酸和高谷氨酸,而带正电荷的氨基酸包括精氨酸、赖氨酸和组氨酸。带电荷的氨基酸包括人蛋白质中常见的 20 种氨基酸以及非典型或非天然存在的氨基酸中的带电荷氨基酸。

[0191] 本文使用的术语“酸性氨基酸”是指包含第二酸性部分(即不是所有氨基酸具有的 α 羧基)的氨基酸,所示第二酸性部分包括例如羧酸基团或磺酸基团。

[0192] 本文使用的没有其它指称的术语“患者”意在包括任何温血脊椎驯养动物(包括例如但不限于家畜、马、猫、狗和其它宠物)、哺乳动物和人。

[0193] 实施方案

[0194] 本公开内容描述了可用于治疗诸如糖尿病、肥胖症等疾病的生物活性多肽的前药衍生物的制剂。更具体地讲,将本文公开的前药配制成延长母体生物活性肽或蛋白质的半寿期,同时允许前药随后通过非酶促降解机制激活。理想的前药在生理条件(例如 pH 7.2 和 37℃)下应可溶于水,它的粉末形式在长期贮存中应是稳定的。它还应该是免疫沉默的,与母体药物相比应具有低活性。在一些实施方案中,前药显示的活性应不超过母体药物活性的 10%。在一些实施方案中,与母体药物相比,前药显示的活性小于约 10%、小于约 5%、约 1%或小于约 1%。此外,前药注射到体内时应在规定时间内定量地转化成活性药物。如本文所公开的一样,本申请人提供了产生满足每一个这些目标的选自胰高血糖素超家族肽(包括胰高血糖素相关肽和骨钙蛋白以及这类多肽的类似物、衍生物和缀合物)的已知生物活性多肽的前药的一般技术。

[0195] 更具体地讲,提供包含胰高血糖素超家族肽的序列的化学上可逆的前药,所述胰高血糖素超家族肽包括例如胰高血糖素相关肽或骨钙蛋白或其类似物、衍生物或缀合物,并经修饰以具有通过酰胺键与所述肽共价结合的二肽前药元件。二肽前药元件与胰高血糖素超家族肽的活性部位共价连接抑制多肽的活性直到二肽前药元件裂解。在一些实施方案中,提供在生理条件下“非酶活化半寿期”(t_{1/2}) 介于约 1 至约 720 小时之间的前药。本文公开的生理条件意在包括温度约为 35-40℃ 且 pH 为约 7.0-约 7.4,更通常包括 pH 为 7.2-7.4 且温度为 36-38℃。

[0196] 有利的是,裂解速率以及前药由此激活,取决于二肽前药元件的结构和立体化学结构。本文公开的前药最终在化学上转化成被药物的天然受体识别的结构,其中这种化学转变的速度决定体内生物作用的起效时间和持续时间。在本申请中公开的分子设计取决于分子内的化学反应,该反应不依赖其它化学添加剂或酶。转化速度受二肽取代基的化学性质和在生理条件下二肽取代基的裂解所控制。由于生理 pH 和温度被严密控制在严格限定的范围内,因此从前药向药物的转化速度具有高的患者内和患者间再现性。

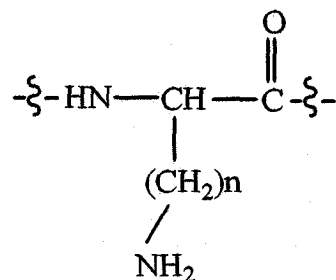
[0197] 提供本文公开的前药,由于该前药呈前药形式持续至少约 1 小时和在一些实施方案中大于约 20 小时,因此其具有延长的半寿期。在一些实施方案中,前药的半寿期为约 1、6、8、12、20、24、48 或 72 小时。在一些实施方案中,前药的半寿期为约 100 小时或更长,包括长达约 168、336、504、672 或 720 小时的半寿期,并且其在生理条件通过由固有的化学不稳定性驱动的非酶促反应转化成活性形式。在一些实施方案中,前药的非酶活化 $t_{1/2}$ 时间介于 1-100 小时之间,更通常介于 12 和 72 小时之间,例如介于 12 和 48 小时之间和介于 48 和 72 小时之间,而在一些实施方案中,在磷酸盐缓冲溶液(例如 PBS)中在 37°C 和 pH 7.2 下将前药温育而测得的 $t_{1/2}$ 介于 24-48 小时之间。在另一个实施方案中,前药的非酶活化 $t_{1/2}$ 时间介于 1 和 6 小时之间,例如约 1 小时、约 2 小时、约 3 小时、约 4 小时、约 5 小时或约 6 小时。在另一个实施方案中,前药的非酶活化 $t_{1/2}$ 时间介于 6 和 24 小时之间。运用公式 $t_{1/2} = 0.693/k$, 其中 'k' 为前药降解的一级速率常数,来计算各种前药的半寿期。在一些实施方案中,前药的活化在酰胺键连接的二肽裂解和形成二酮哌嗪或二酮吗啉并释放出活性多肽药物之后发生。已经证实由天然的非编码和/或合成氨基酸组成的特定二肽在生理条件下有利于分子内分解以释放出活性多肽。

[0198] 按照一些实施方案,提供包含结构 A-B-Q 的胰高血糖素超家族肽或骨钙蛋白或者其类似物、衍生物或缀合物的前药。在这个实施方案中, Q 为肽, A 为氨基酸或羧酸, B 为 N-烷基化氨基酸。在一些实施方案中,胰高血糖素超家族肽是胰高血糖素相关肽。A 和 B 一起表示通过 A-B 和 Q 的胺之间形成酰胺键与 Q 连接的二肽前药元件。在一些实施方案中, A、B 或 A-B 与之连接的 Q 的氨基酸中的至少一个是非编码氨基酸。此外,在一些实施方案中,选择这样的二肽前药元件,其中在生理条件下,在 PBS 中, A-B 自 Q 的化学裂解在约 1 小时 - 约 720 小时内完成至少约 90%。在又一个实施方案中,选择这样的二肽的氨基酸,其中在生理条件下和在 PBS 中, A-B 自 Q 的裂解半寿期不超过在包含 DPP-IV 蛋白酶的溶液(包括例如人血清)中 A-B 自 Q 的裂解半寿期的 2-5 倍。

[0199] 按照一些实施方案, Q 的脂族氨基(例如伯胺),包括例如 N 端胺或氨基酸侧链的氨基,通过二肽前药元件经由酰胺键共价连接而被修饰。在一些实施方案中,二肽前药元件直接或通过连接部分与存在于 Q 的氨基酸的侧链氨基连接。在一些实施方案中,连接部分包含携带胺的酰基或烷基。在一些实施方案中,提供包含与胰高血糖素超家族肽的 10 或 20 位的氨基酸共价连接的酰基或烷基的胰高血糖素超家族肽,例如胰高血糖素相关肽,其中酰基或烷基还包含通过酰胺键与酰基或烷基连接的二肽前药元件。例如,实施方案考虑直接或通过连接基团与 Q 的氨基连接的前药,且酰基或烷基直接或通过连接部分与前药连接。

[0200] 在一些实施方案中,二肽前药元件与氨基酸侧链直接连接,其中氨基酸具有以下通用结构:

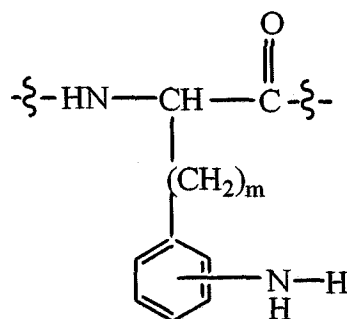
[0201]



[0202] 其中 n 为 1-4 的整数。

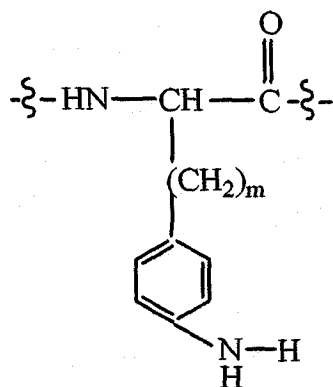
[0203] 或者,二肽前药元件可与存在于芳族氨基酸的芳环上的氨基取代基连接,所述芳族氨基酸包括例如选自氨基-Phe、氨基-萘基(naphthyl)丙氨酸、氨基色氨酸、氨基-苯基-甘氨酸、氨基-高苯丙氨酸和氨基酪氨酸的芳族氨基酸。在一些实施方案中,二肽前药元件与具有以下通用结构的氨基酸的芳族氨基连接:

[0204]



[0205] 其中 m 为 0-3 的整数。在一些实施方案中,二肽前药元件与具有以下通用结构的氨基酸的 4-氨基连接:

[0206]



[0207] 其中 m 为 0-3 的整数。在一些实施方案中,二肽前药元件与赖氨酸的侧链氨基或 4-氨基苯丙氨酸的芳族氨基连接(取代生物活性肽的天然苯丙氨酸或酪氨酸残基)。在一些实施方案中,二肽前药元件与包括胰高血糖素相关肽或骨钙蛋白或者其类似物、衍生物或缀合物在内的胰高血糖素超家族肽的内部氨基酸上存在的伯胺连接。

[0208] 在一些实施方案中,二肽前药元件具有通用结构 A-B,其中 A 为氨基酸或羟酸,B 为 N-烷基化氨基酸,其可通过酰胺键与这类肽的伯氨基结合以产生肽的相应前药。在一些实施方案中,胰高血糖素超家族肽是胰高血糖素相关肽。在一些实施方案中,选择这样的 A 和 B 使得当 A-B 二肽通过酰胺键与这类肽的伯胺结合时,在生理条件下,在 PBS 中,A-B 自肽的化学裂解在约 1 小时-约 720 小时内完成至少约 90%。在一些实施方案中,A 和 / 或 B 为

D 立体异构体构型的氨基酸。在一些示例性的实施方案中, A 为 D 立体异构体构型的氨基酸, 而 B 为 L 立体异构体构型的氨基酸。在一些示例性的实施方案中, A 为 L 立体异构体构型的氨基酸, 而 B 为 D 立体异构体构型的氨基酸。在一些示例性的实施方案中, A 为 D 立体异构体构型的氨基酸, 而 B 为 D 立体异构体构型的氨基酸。

[0209] 按照一些实施方案, 可修饰二肽前药元件以包含亲水部分。在一些实施方案中, 亲水部分是聚乙二醇链。按照一些实施方案, 40k 或更大的聚乙二醇链与二肽前药元件的 A 或 B 氨基酸的侧链共价结合。在另一个实施方案中, 二肽前药元件另外或备选地被脂肪酸或胆汁酸或其盐 (例如 C4-C30 脂肪酸、C8-C24 脂肪酸、胆酸)、C4-C30 烷基、C8-C24 烷基或包含胆汁酸类固醇部分的烷基酰化或烷基化。或者, 二肽前药元件可与贮存蛋白质 (例如葡聚糖或大的 PEG 分子 (大于或等于 80,000 道尔顿)) 连接, 贮存蛋白质用作使前药隔离在注射部位直到二肽裂解释放出活性生物活性肽为止。在下面有关胰高血糖素相关肽的部分描述了二肽前药的其它修饰。

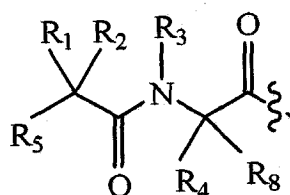
[0210] 将二肽前药元件设计成根据分子内的化学反应而裂解, 该反应不依赖其它化学添加剂或酶。更具体地讲, 在一些实施方案中, 选择抵抗存在于哺乳动物血清的肽酶 (包括例如二肽基肽酶 IV (DPP-IV)) 切割的二肽结构。因此, 在一些实施方案中, 与缺乏蛋白酶下进行的反应相比, 在血清蛋白酶存在下利用生理条件进行反应时, 二肽前药元件自生物活性肽的裂解速率不显著提高 (例如大于 2X)。因此, 在生理条件下, A-B 在 PBS 中自生物活性肽裂解的半寿期不大于 A-B 在包含 DPP-IV 蛋白酶的溶液中自生物活性蛋白裂解的半寿期的 2、3、4 或 5 倍。在一些实施方案中, 包含 DPP-IV 蛋白酶的溶液是血清, 更具体地讲是哺乳动物血清, 包括人血清。

[0211] 按照一些实施方案, 二肽前药元件的 A 或 B 或者 A-B 与之连接的胰高血糖素超家族肽的氨基酸是非编码氨基酸。在一些实施方案中, 氨基酸“B”是 N-烷基化的, 但并非脯氨酸。在一些实施方案中, 氨基酸 B 的 N-烷基化基团为 C₁-C₁₈ 烷基, 而在一些实施方案中为 C₁-C₆ 烷基。

[0212] 按照一些实施方案, 包含本文公开的二肽前药元件的胰高血糖素超家族肽的前药衍生物, 可与蛋白酶抑制剂 (包括特定的 DPP-IV 抑制剂 (例如 Januvia[®], Merck&Co, Inc)) 共同给予, 作为延迟前药活化的方法。在这个实施方案中, 选择前药元件的氨基酸, 使得二肽为 DPP-IV 切割的可接受底物。在一些实施方案中, 胰高血糖素超家族肽是胰高血糖素相关肽。可以单独的组合物给予蛋白酶抑制剂, 或者可将前药和蛋白酶抑制剂配成单一组合物。如果以单独的组合物给予, 则通常在给予前药 1-5 小时、1-2 小时、30 分钟或 10 分钟以内给予蛋白酶抑制剂。在一些实施方案中, 两种单独的组合物紧接着相继给予。

[0213] 在一些实施方案中, 二肽前药元件具有下式 I 的通用结构:

[0214]



[0215] 其中

[0216] R₁、R₂、R₄ 和 R₈ 独立选自 H、C₁-C₁₈ 烷基、C₂-C₁₈ 烯基、(C₁-C₁₈ 烷基)OH、(C₁-C₁₈ 烷基)

SH、(C₂-C₃ 烷基)SCH₃、(C₁-C₄ 烷基)CONH₂、(C₁-C₄ 烷基)COOH、(C₁-C₄ 烷基)NH₂、(C₁-C₄ 烷基)NHC(NH₂⁺)NH₂、(C₀-C₄ 烷基)(C₃-C₆ 环烷基)、(C₀-C₄ 烷基)(C₂-C₅ 杂环基)、(C₀-C₄ 烷基)(C₆-C₁₀ 芳基)R₇、(C₁-C₄ 烷基)(C₃-C₉ 杂芳基)和 C₁-C₁₂ 烷基(A)(W₁)C₁-C₁₂ 烷基,其中 W₁ 为选自 N、S 和 O 的杂原子,或者 R₁ 和 R₂ 与它们所连接的原子一起形成 C₃-C₁₂ 环烷基或芳基;或者 R₄ 和 R₈ 与它们所连接的原子一起形成 C₃-C₆ 环烷基;

[0217] R₃ 选自 C₁-C₁₈ 烷基、(C₁-C₁₈ 烷基)OH、(C₁-C₁₈ 烷基)NH₂、(C₁-C₁₈ 烷基)SH、(C₀-C₄ 烷基)(C₃-C₆ 环烷基)、(C₀-C₄ 烷基)(C₂-C₅ 杂环基)、(C₀-C₄ 烷基)(C₆-C₁₀ 芳基)R₇ 和 (C₁-C₄ 烷基)(C₃-C₉ 杂芳基),或者 R₄ 和 R₃ 与它们所连接的原子一起形成 4、5 或 6 元杂环;

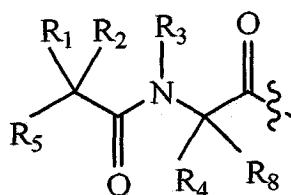
[0218] R₅ 为 NHR₆ 或 OH;

[0219] R₆ 为 H、C₁-C₈ 烷基,或者 R₆ 和 R₂ 与它们所连接的原子一起形成 4、5 或 6 元杂环;和

[0220] R₇ 选自 H 和 OH。

[0221] 在其它实施方案中,二肽前药元件具有下式 I 的通用结构:

[0222]



[0223] 其中

[0224] R₁、R₂、R₄ 和 R₈ 独立选自 H、C₁-C₁₈ 烷基、C₂-C₁₈ 烯基、(C₁-C₁₈ 烷基)OH、(C₁-C₁₈ 烷基)SH、(C₂-C₃ 烷基)SCH₃、(C₁-C₄ 烷基)CONH₂、(C₁-C₄ 烷基)COOH、(C₁-C₄ 烷基)NH₂、(C₁-C₄ 烷基)NHC(NH₂⁺)NH₂、(C₀-C₄ 烷基)(C₃-C₆ 环烷基)、(C₀-C₄ 烷基)(C₂-C₅ 杂环基)、(C₀-C₄ 烷基)(C₆-C₁₀ 芳基)R₇、(C₁-C₄ 烷基)(C₃-C₉ 杂芳基)和 C₁-C₁₂ 烷基(W₁)C₁-C₁₂ 烷基,其中 W₁ 为选自 N、S 和 O 的杂原子,或者 R₁ 和 R₂ 与它们所连接的原子一起形成 C₃-C₁₂ 环烷基;或者 R₄ 和 R₈ 与它们所连接的原子一起形成 C₃-C₆ 环烷基;

[0225] R₃ 选自 C₁-C₁₈ 烷基、(C₁-C₁₈ 烷基)OH、(C₁-C₁₈ 烷基)NH₂、(C₁-C₁₈ 烷基)SH、(C₀-C₄ 烷基)(C₃-C₆ 环烷基)、(C₀-C₄ 烷基)(C₂-C₅ 杂环基)、(C₀-C₄ 烷基)(C₆-C₁₀ 芳基)R₇ 和 (C₁-C₄ 烷基)(C₃-C₉ 杂芳基),或者 R₄ 和 R₃ 与它们所连接的原子一起形成 4、5 或 6 元杂环;

[0226] R₅ 为 NHR₆ 或 OH;

[0227] R₆ 为 H、C₁-C₈ 烷基,或者 R₆ 和 R₁ 与它们所连接的原子一起形成 4、5 或 6 元杂环;和

[0228] R₇ 选自氢、C₁-C₁₈ 烷基、C₂-C₁₈ 烯基、(C₀-C₄ 烷基)CONH₂、(C₀-C₄ 烷基)COOH、(C₀-C₄ 烷基)NH₂、(C₀-C₄ 烷基)OH 和卤素。

[0229] 在一些实施方案中, R₈ 为 H, R₅ 为 NHR₆。

[0230] 在一些实施方案中,二肽前药元件具有式 I 的结构,其中

[0231] R₁ 和 R₈ 独立地为 H 或 C₁-C₈ 烷基;

[0232] R₂ 和 R₄ 独立选自 H、C₁-C₈ 烷基、C₂-C₈ 烯基、(C₁-C₄ 烷基)OH、(C₁-C₄ 烷基)SH、(C₂-C₃ 烷基)SCH₃、(C₁-C₄ 烷基)CONH₂、(C₁-C₄ 烷基)COOH、(C₁-C₄ 烷基)NH₂、(C₁-C₄ 烷基)NHC(NH₂⁺)NH₂、(C₀-C₄ 烷基)(C₃-C₆ 环烷基)、(C₀-C₄ 烷基)(C₂-C₅ 杂环基)、(C₀-C₄ 烷基)(C₆-C₁₀ 芳基)

R_7 和 CH_2 ($\text{C}_3\text{-C}_9$ 杂芳基), 或者 R_1 和 R_2 与它们所连接的原子一起形成 $\text{C}_3\text{-C}_{12}$ 环烷基或芳基;

[0233] R_5 为 NHR_6 ; 和

[0234] R_6 为 H 或 $\text{C}_1\text{-C}_8$ 烷基。

[0235] 在其它实施方案中, 二肽前药元件具有式 I 的结构, 其中

[0236] R_1 和 R_8 独立地为 H 或 $\text{C}_1\text{-C}_8$ 烷基;

[0237] R_2 和 R_4 独立选自 H、 $\text{C}_1\text{-C}_8$ 烷基、 $\text{C}_2\text{-C}_8$ 烯基、 $(\text{C}_1\text{-C}_4 \text{ 烷基})\text{OH}$ 、 $(\text{C}_1\text{-C}_4 \text{ 烷基})\text{SH}$ 、 $(\text{C}_2\text{-C}_3 \text{ 烷基})\text{SCH}_3$ 、 $(\text{C}_1\text{-C}_4 \text{ 烷基})\text{CONH}_2$ 、 $(\text{C}_1\text{-C}_4 \text{ 烷基})\text{COOH}$ 、 $(\text{C}_1\text{-C}_4 \text{ 烷基})\text{NH}_2$ 、 $(\text{C}_1\text{-C}_4 \text{ 烷基})\text{NHC}(\text{NH}_2^+)$ NH_2 、 $(\text{C}_0\text{-C}_4 \text{ 烷基})$ ($\text{C}_3\text{-C}_6$ 环烷基)、 $(\text{C}_0\text{-C}_4 \text{ 烷基})$ ($\text{C}_2\text{-C}_5$ 杂环基)、 $(\text{C}_0\text{-C}_4 \text{ 烷基})$ ($\text{C}_6\text{-C}_{10}$ 芳基) R_7 和 CH_2 ($\text{C}_3\text{-C}_9$ 杂芳基), 或者 R_1 和 R_2 与它们所连接的原子一起形成 $\text{C}_3\text{-C}_{12}$ 环烷基;

[0238] R_3 为 $\text{C}_1\text{-C}_{18}$ 烷基;

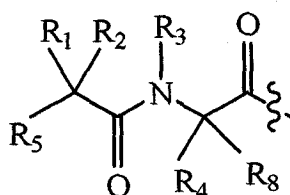
[0239] R_5 为 NHR_6 ;

[0240] R_6 为 H 或 $\text{C}_1\text{-C}_8$ 烷基; 和

[0241] R_7 选自氢、 $\text{C}_1\text{-C}_{18}$ 烷基、 $\text{C}_2\text{-C}_{18}$ 烯基、 $(\text{C}_0\text{-C}_4 \text{ 烷基})\text{CONH}_2$ 、 $(\text{C}_0\text{-C}_4 \text{ 烷基})\text{COOH}$ 、 $(\text{C}_0\text{-C}_4 \text{ 烷基})\text{NH}_2$ 、 $(\text{C}_0\text{-C}_4 \text{ 烷基})\text{OH}$ 和卤素。

[0242] 按照本公开内容形成的前药的半寿期取决于二肽前药元件的取代基、取代基的位置和取代基所连接的氨基酸。例如, 前药可包含胰高血糖素超家族肽, 其中二肽前药元件通过胰高血糖素超家族蛋白质 N 端氨基酸的 α 氨基连接。在这个实施方案中, $t_{1/2}$ 为例如约 1 小时的前药包含具有以下结构的二肽前药元件:

[0243]



[0244] 其中

[0245] R_1 和 R_2 独立地为 $\text{C}_1\text{-C}_{18}$ 烷基或芳基; 或者 R_1 和 R_2 通过 $-(\text{CH}_2)_p$ 连接, 其中 p 为 2-9;

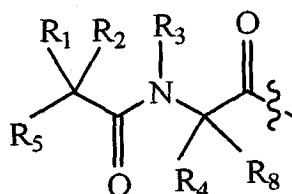
[0246] R_3 为 $\text{C}_1\text{-C}_{18}$ 烷基;

[0247] R_4 和 R_8 各自为氢; 和

[0248] R_5 为胺。

[0249] 在其它实施方案中, $t_{1/2}$ 为例如约 1 小时的前药包含具有以下结构的二肽前药元件:

[0250]



[0251] 其中

[0252] R_1 和 R_2 独立地为 $\text{C}_1\text{-C}_{18}$ 烷基或 $(\text{C}_0\text{-C}_4 \text{ 烷基})$ ($\text{C}_6\text{-C}_{10}$ 芳基) R_7 ; 或者 R_1 和 R_2 通过 $-(\text{CH}_2)_p$ 连接, 其中 p 为 2-9;

[0253] R_3 为 C_1 - C_{18} 烷基；

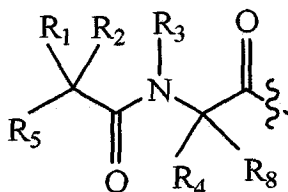
[0254] R_4 和 R_8 各自为氢；

[0255] R_5 为 NH_2 ；和

[0256] R_7 选自氢、 C_1 - C_{18} 烷基、 C_2 - C_{18} 烯基、 $(C_0$ - C_4 烷基) $CONH_2$ 、 $(C_0$ - C_4 烷基) $COOH$ 、 $(C_0$ - C_4 烷基) NH_2 、 $(C_0$ - C_4 烷基) OH 和卤素。

[0257] 此外，具有与胰高血糖素超家族肽的 N 端 α 氨基酸连接的二肽前药元件且 $t_{1/2}$ 为例如介于约 6- 约 24 小时之间的前药，包含具有以下结构的二肽前药元件：

[0258]



[0259] 其中 R_1 和 R_2 独立选自氢、 C_1 - C_{18} 烷基和芳基，或者 R_1 和 R_2 通过 $(CH_2)_p$ 连接，其中 p 为 2-9；

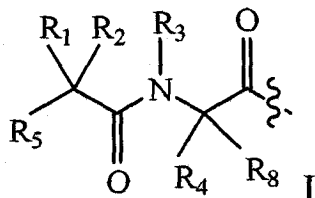
[0260] R_3 为 C_1 - C_{18} 烷基，或者 R_3 和 R_4 与它们所连接的原子一起形成 4-12 元杂环；

[0261] R_4 和 R_8 独立选自氢、 C_1 - C_8 烷基和芳基；且 R_5 为胺；

[0262] 前提条件是 R_1 和 R_2 两者不为氢，且前提条件是 R_4 或 R_8 之一为氢。

[0263] 在一些实施方案中，具有与胰高血糖素超家族肽的 N 端 α 氨基酸连接的二肽前药元件且 $t_{1/2}$ 为例如介于约 12- 约 72 小时之间或在一些实施方案中介于约 12- 约 48 小时之间的前药，包含具有以下结构的二肽前药元件：

[0264]



[0265] 其中 R_1 和 R_2 独立选自氢、 C_1 - C_{18} 烷基、 $(C_1$ - C_{18} 烷基) OH 、 $(C_1$ - C_4 烷基) NH_2 和 $(C_0$ - C_4 烷基) $(C_6$ - C_{10} 芳基) R_7 ，或者 R_1 和 R_2 通过 $(CH_2)_p$ 连接，其中 p 为 2-9；

[0266] R_3 为 C_1 - C_{18} 烷基，或者 R_3 和 R_4 与它们所连接的原子一起形成 4-12 元杂环；

[0267] R_4 和 R_8 独立选自氢、 C_1 - C_8 烷基和 $(C_0$ - C_4 烷基) $(C_6$ - C_{10} 芳基) R_7 ；

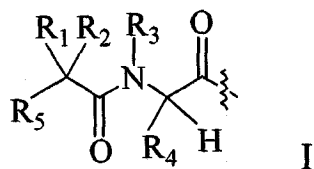
[0268] R_5 为 NH_2 ；和

[0269] R_7 选自 H、 C_1 - C_{18} 烷基、 C_2 - C_{18} 烯基、 $(C_0$ - C_4 烷基) $CONH_2$ 、 $(C_0$ - C_4 烷基) $COOH$ 、 $(C_0$ - C_4 烷基) NH_2 、 $(C_0$ - C_4 烷基) OH 和卤素；

[0270] 前提条件是 R_1 和 R_2 两者不为氢，且前提条件是 R_4 或 R_8 中的至少一个为氢。

[0271] 在一些实施方案中，具有与胰高血糖素超家族肽的 N 端氨基酸连接的二肽前药元件且 $t_{1/2}$ 为例如介于约 12- 约 72 小时之间，或在一些实施方案中介于约 12- 约 48 小时之间的前药，包含具有以下结构的二肽前药元件：

[0272]



[0273] 其中 R_1 和 R_2 独立选自氢、 C_1 - C_8 烷基和 $(C_1$ - C_4 烷基) NH_2 , 或者 R_1 和 R_2 通过 $(CH_2)_p$ 连接, 其中 p 为 2-9;

[0274] R_3 为 C_1 - C_8 烷基, 或者 R_3 和 R_4 与它们所连接的原子一起形成 4-6 元杂环;

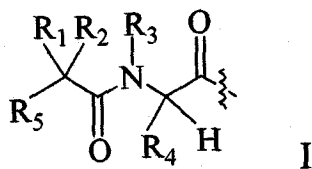
[0275] R_4 选自氢和 C_1 - C_8 烷基; 和

[0276] R_5 为 NH_2 ;

[0277] 前提条件是 R_1 和 R_2 两者不为氢。

[0278] 在其它实施方案中, 具有与胰高血糖素超家族肽的 N 端氨基酸连接的二肽前药元件且 $t_{1/2}$ 为例如介于约 12- 约 72 小时之间, 或在一些实施方案中介于约 12- 约 48 小时之间的前药, 包含具有以下结构的二肽前药元件:

[0279]



[0280] 其中

[0281] R_1 和 R_2 独立选自氢、 C_1 - C_8 烷基和 $(C_1$ - C_4 烷基) NH_2 ;

[0282] R_3 为 C_1 - C_6 烷基;

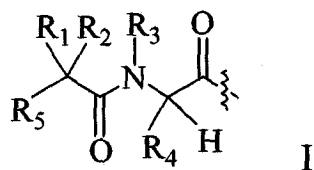
[0283] R_4 为氢; 和

[0284] R_5 为 NH_2 ;

[0285] 前提条件是 R_1 和 R_2 两者不为氢。

[0286] 在一些实施方案中, 具有与胰高血糖素超家族肽的 N 端氨基酸连接的二肽前药元件且 $t_{1/2}$ 为例如介于约 12- 约 72 小时之间, 或在一些实施方案中介于约 12- 约 48 小时之间的前药, 包含具有以下结构的二肽前药元件:

[0287]



[0288] 其中

[0289] R_1 和 R_2 独立选自氢和 C_1 - C_8 烷基、 $(C_1$ - C_4 烷基) NH_2 , 或者 R_1 和 R_2 通过 $(CH_2)_p$ 连接, 其中 p 为 2-9;

[0290] R_3 为 C_1 - C_8 烷基;

[0291] R_4 为 $(C_0$ - C_4 烷基) $(C_6$ - C_{10} 芳基) R_7 ;

[0292] R_5 为 NH_2 ; 和

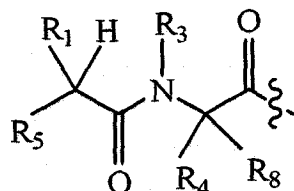
[0293] R_7 选自氢、 C_1 - C_8 烷基和 $(C_0$ - C_4 烷基) OH ;

[0294] 前提条件是 R_1 和 R_2 两者不为氢。

[0295] 在一些实施方案中,胰高血糖素超家族肽是胰高血糖素相关肽。在这些实施方案中的任一个中,胰高血糖素超家族肽是 SEQ ID NO:1-684、701-731、801-919、1001-1262、1301-1371、1401-1518、1701-1776 和 1801-1921 中的任一个。

[0296] 另外,提供具有与胰高血糖素超家族肽的 N 端 α 氨基酸连接的二肽前药元件且 $t_{1/2}$ 为例如约 72- 约 168 小时的前药,其中所述二肽前药元件具有以下结构:

[0297]



[0298] 其中 R_1 选自氢、 C_1 - C_8 烷基和芳基;

[0299] R_3 为 C_1 - C_{18} 烷基;

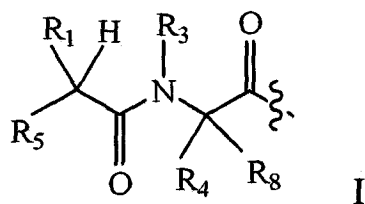
[0300] R_4 和 R_8 各自为氢;和

[0301] R_5 为胺或 N- 取代胺或羟基;

[0302] 前提条件是,如果 R_1 为烷基或芳基,则 R_1 和 R_5 与它们所连接的原子一起形成 4-11 元杂环。

[0303] 在一些实施方案中,二肽前药元件具有以下结构:

[0304]



[0305] 其中 R_1 选自氢、 C_1 - C_8 烷基和 $(C_0$ - C_4 烷基) $(C_6$ - C_{10} 芳基) R_7 ;

[0306] R_3 为 C_1 - C_{18} 烷基;

[0307] R_4 和 R_8 各自为氢;

[0308] R_5 为 NHR_6 或 OH ;

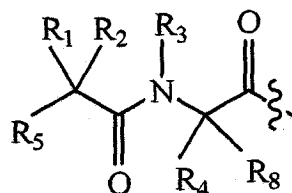
[0309] R_6 为 H、 C_1 - C_8 烷基,或者 R_6 和 R_1 与它们所连接的原子一起形成 4、5 或 6 元杂环;和

[0310] R_7 选自氢、 C_1 - C_{18} 烷基、 C_2 - C_{18} 烯基、 $(C_0$ - C_4 烷基) $CONH_2$ 、 $(C_0$ - C_4 烷基) $COOH$ 、 $(C_0$ - C_4 烷基) NH_2 、 $(C_0$ - C_4 烷基) OH 和卤素;

[0311] 前提条件是,如果 R_1 为烷基或 $(C_0$ - C_4 烷基) $(C_6$ - C_{10} 芳基) R_7 ,则 R_1 和 R_5 与它们所连接的原子一起形成 4-11 元杂环。在一些实施方案中,胰高血糖素超家族肽是胰高血糖素相关肽。

[0312] 在一些实施方案中,二肽前药元件与胰高血糖素超家族肽的内部氨基酸的侧链胺连接。在这个实施方案中, $t_{1/2}$ 为例如约 1 小时的前药具有以下结构:

[0313]



[0314] 其中

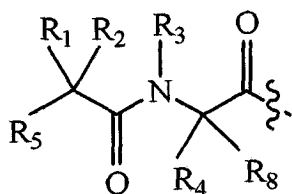
[0315] R_1 和 R_2 独立地为 C_1 - C_8 烷基或芳基；或者 R_1 和 R_2 通过 $(CH_2)_p$ 连接，其中 p 为 2-9；

[0316] R_3 为 C_1 - C_{18} 烷基；

[0317] R_4 和 R_8 各自为氢；且 R_5 为胺。

[0318] 在一些实施方案中， $t_{1/2}$ 为例如约 1 小时的前药具有以下结构：

[0319]



[0320] 其中

[0321] R_1 和 R_2 独立地为 C_1 - C_8 烷基或 $(C_0$ - C_4 烷基) $(C_6$ - C_{10} 芳基) R_7 ；或者 R_1 和 R_2 通过 $-(CH_2)_p-$ 连接，其中 p 为 2-9；

[0322] R_3 为 C_1 - C_{18} 烷基；

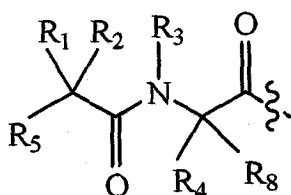
[0323] R_4 和 R_8 各自为氢；

[0324] R_5 为 NH_2 ；和

[0325] R_7 选自氢、 C_1 - C_{18} 烷基、 C_2 - C_{18} 烯基、 $(C_0$ - C_4 烷基) $CONH_2$ 、 $(C_0$ - C_4 烷基) $COOH$ 、 $(C_0$ - C_4 烷基) NH_2 、 $(C_0$ - C_4 烷基) OH 和卤素。

[0326] 此外， $t_{1/2}$ 为例如介于约 6-约 24 小时之间且具有与内部氨基酸侧链连接的二肽前药元件的前药，包含具有以下结构的二肽前药元件：

[0327]



[0328] 其中 R_1 和 R_2 独立选自氢、 C_1 - C_8 烷基和芳基，或者 R_1 和 R_2 通过 $-(CH_2)_p$ 连接，其中 p 为 2-9；

[0329] R_3 为 C_1 - C_{18} 烷基，或者 R_3 和 R_4 与它们所连接的原子一起形成 4-12 元杂环；

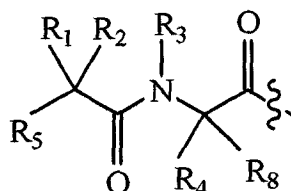
[0330] R_4 和 R_8 独立地为 C_1 - C_{18} 烷基或芳基；和

[0331] R_5 为胺或 N -取代胺；

[0332] 前提条件是 R_1 和 R_2 两者不为氢，且前提条件是 R_4 或 R_8 之一为氢。

[0333] 在一些实施方案中， $t_{1/2}$ 为例如介于约 12-约 72 小时之间，或在一些实施方案中介于约 12-约 48 小时之间，且具有与内部氨基酸侧链连接的二肽前药元件的前药，包含具有以下结构的二肽前药元件：

[0334]



[0335] 其中 R_1 和 R_2 独立选自氢、 C_1 - C_8 烷基和 $(C_0$ - C_4 烷基) $(C_6$ - C_{10} 芳基) R_7 , 或者 R_1 和 R_2 通过 $-(CH_2)_p-$ 连接, 其中 p 为 2-9;

[0336] R_3 为 C_1 - C_{18} 烷基, 或者 R_3 和 R_4 与它们所连接的原子一起形成 4-12 元杂环;

[0337] R_4 和 R_8 独立地为氢、 C_1 - C_{18} 烷基或 $(C_0$ - C_4 烷基) $(C_6$ - C_{10} 芳基) R_7 ;

[0338] R_5 为 NHR_6 ;

[0339] R_6 为 H 或 C_1 - C_8 烷基, 或者 R_6 和 R_2 与它们所连接的原子一起形成 4、5 或 6 元杂环;

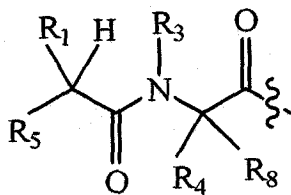
和

[0340] R_7 选自氢、 C_1 - C_{18} 烷基、 C_2 - C_{18} 烯基、 $(C_0$ - C_4 烷基) $CONH_2$ 、 $(C_0$ - C_4 烷基) $COOH$ 、 $(C_0$ - C_4 烷基) NH_2 、 $(C_0$ - C_4 烷基) OH 和卤素;

[0341] 前提条件是 R_1 和 R_2 两者不为氢, 且前提条件是 R_4 或 R_8 中的至少一个为氢。在一些实施方案中, 胰高血糖素超家族肽是胰高血糖素相关肽。

[0342] 另外, 提供 $t_{1/2}$ 为例如约 72-约 168 小时且具有与胰高血糖素超家族肽的内部氨基酸侧链连接的二肽前药元件的前药, 其中所述二肽前药元件具有以下结构:

[0343]



[0344] 其中 R_1 和 R_2 独立选自氢、 C_1 - C_{18} 烷基和芳基;

[0345] R_3 为 C_1 - C_{18} 烷基;

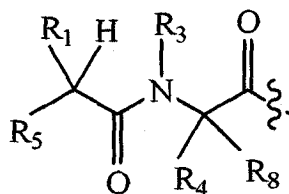
[0346] R_4 和 R_8 各自为氢; 和

[0347] R_5 为胺或 N-取代胺或羟基;

[0348] 前提条件是, 如果 R_1 和 R_2 两者独立地为烷基或芳基, 则 R_1 或 R_2 两者之一通过 $(CH_2)_p$ 与 R_5 连接, 其中 p 为 2-9。

[0349] 在一些实施方案中, 提供 $t_{1/2}$ 为例如约 72-约 168 小时且具有与胰高血糖素超家族肽的内部氨基酸侧链连接的二肽前药元件的前药, 其中所述二肽前药元件具有以下结构:

[0350]



[0351] 其中 R_1 选自氢、 C_1 - C_{18} 烷基和 $(C_0$ - C_4 烷基) $(C_6$ - C_{10} 芳基) R_7 ;

[0352] R_3 为 C_1 - C_{18} 烷基;

[0353] R_4 和 R_8 各自为氢;

[0354] R_5 为 NHR_6 或 OH ;

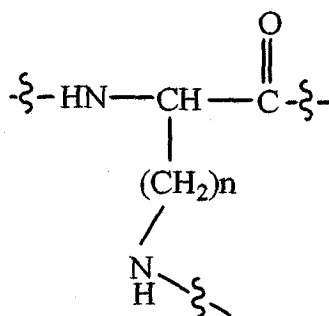
[0355] R_6 为 H 或 C_1-C_8 烷基, 或者 R_6 和 R_1 与它们所连接的原子一起形成 4、5 或 6 元杂环;
和

[0356] R_7 选自氢、 C_1-C_{18} 烷基、 C_2-C_{18} 烯基、 $(C_0-C_4$ 烷基) $CONH_2$ 、 $(C_0-C_4$ 烷基) $COOH$ 、 $(C_0-C_4$ 烷基) NH_2 、 $(C_0-C_4$ 烷基) OH 和卤素;

[0357] 前提条件是, 如果 R_1 和 R_2 两者独立地为烷基或 $(C_0-C_4$ 烷基) $(C_6-C_{10}$ 芳基) R_7 , 则 R_1 或 R_2 两者之一通过 $(CH_2)_p$ 与 R_5 连接, 其中 p 为 2-9。在一些实施方案中, 胰高血糖素超家族肽是胰高血糖素相关肽。在这些实施方案中的任一个中, 胰高血糖素超家族肽为 SEQ ID NO: 1-684、701-731、801-919、1001-1262、1301-1371、1401-1518、1701-1776 和 1801-1921 中的任一个。

[0358] 在一些实施方案中, 二肽前药元件与胰高血糖素超家族肽的内部氨基酸的侧链胺连接, 其中所述内部氨基酸包含下式 II 的结构:

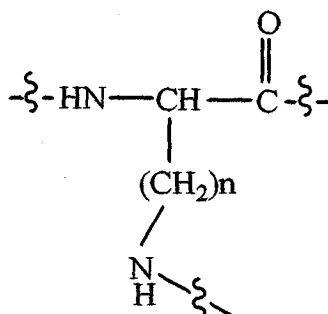
[0359]



[0360] 其中

[0361] n 为选择 1-4 的整数。在一些实施方案中, n 为 3 或 4, 而在一些实施方案中, 所述内部氨基酸是赖氨酸。在一些实施方案中, 二肽前药元件与位于胰高血糖素超家族肽的 12、16、17、18、20、28 或 29 位上的氨基酸侧链的伯胺连接。在一些实施方案中, 12、16、17、18、20、28 或 29 位氨基酸包含下式 II 的结构:

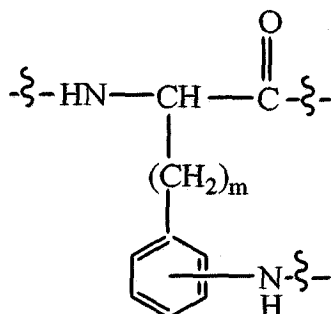
[0362]



[0363] 其中 n 为选自 1-4 的整数, 且二肽前药元件通过酰胺键与氨基酸侧链连接。在一些实施方案中, n 为 4, 且氨基酸位于 20 位。在一些实施方案中, 胰高血糖素超家族肽是胰高血糖素相关肽。

[0364] 在又一个实施方案中, 二肽前药元件通过存在于芳族氨基酸芳基的胺与胰高血糖素超家族肽连接。在一些实施方案中, 芳族氨基酸是胰高血糖素超家族肽的内部氨基酸, 然而, 芳族氨基酸也可以是 N 端氨基酸。在一些实施方案中, 胰高血糖素超家族肽是胰高血糖

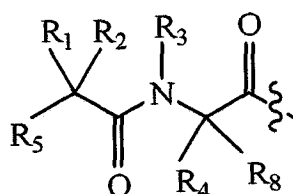
素相关肽。在一些实施方案中,芳族氨基酸选自氨基-Phe、氨基-萘基丙氨酸、氨基色氨酸、氨基-苯基-甘氨酸、氨基-高苯丙氨酸和氨基酪氨酸。在一些实施方案中,与二肽前药元件形成酰胺键的伯胺位于芳基的对位。在一些实施方案中,芳族胺包含下式 III 的结构:



[0366] 其中 m 为 1-3 的整数。

[0367] 对于其中二肽前药元件通过存在于芳族氨基酸的芳基上的胺与胰高血糖素超家族肽连接的实施方案, $t_{1/2}$ 为例如约 1 小时的前药具有以下的二肽结构:

[0368]



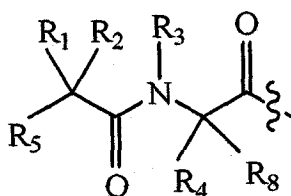
[0369] 其中 R_1 和 R_2 独立地为 C_1 - C_{18} 烷基或芳基;

[0370] R_3 为 C_1 - C_{18} 烷基,或者 R_3 和 R_4 与它们所连接的原子一起形成 4-12 元杂环;

[0371] R_4 和 R_8 独立选自氢、 C_1 - C_{18} 烷基和芳基;且 R_5 为胺或羟基。

[0372] 在一些实施方案中,二肽前药元件通过存在于芳族氨基酸的芳基上的胺与胰高血糖素超家族肽连接, $t_{1/2}$ 为例如约 1 小时的前药具有以下的二肽结构:

[0373]



[0374] 其中 R_1 和 R_2 独立地为 C_1 - C_{18} 烷基或 $(C_0$ - C_4 烷基) $(C_6$ - C_{10} 芳基) R_7 ;

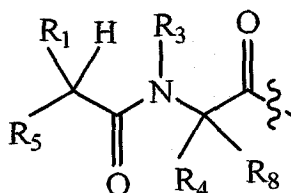
[0375] R_3 为 C_1 - C_{18} 烷基,或者 R_3 和 R_4 与它们所连接的原子一起形成 4-12 元杂环;

[0376] R_4 和 R_8 独立选自氢、 C_1 - C_{18} 烷基和 $(C_0$ - C_4 烷基) $(C_6$ - C_{10} 芳基) R_7 ;

[0377] R_5 为 NH_2 或 OH ;和

[0378] R_7 选自氢、 C_1 - C_{18} 烷基、 C_2 - C_{18} 烯基、 $(C_0$ - C_4 烷基) $CONH_2$ 、 $(C_0$ - C_4 烷基) $COOH$ 、 $(C_0$ - C_4 烷基) NH_2 、 $(C_0$ - C_4 烷基) OH 和卤素。在一些实施方案中,胰高血糖素超家族肽是胰高血糖素相关肽。此外,提供具有通过芳族氨基酸连接的二肽前药元件且 $t_{1/2}$ 为例如约 6- 约 24 小时的前药,其中所述二肽包含以下结构:

[0379]



[0380] 其中

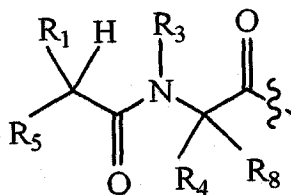
[0381] R_1 选自氢、 C_1 - C_{18} 烷基和芳基, 或者 R_1 和 R_2 通过 $-(CH_2)_p$ 连接, 其中 p 为 2-9;

[0382] R_3 为 C_1 - C_{18} 烷基, 或者 R_3 和 R_4 与它们所连接的原子一起形成 4-6 元杂环;

[0383] R_4 和 R_8 独立选自氢、 C_1 - C_{18} 烷基和芳基; 且 R_5 为胺或 N-取代胺。

[0384] 在一些实施方案中, 提供具有通过芳族氨基酸连接的二肽前药元件且 $t_{1/2}$ 为例如约 6- 约 24 小时的前药, 其中所述二肽包含以下结构:

[0385]



[0386] 其中

[0387] R_1 选自氢、 C_1 - C_{18} 烷基、 $(C_1$ - C_{18} 烷基)OH、 $(C_1$ - C_4 烷基) NH_2 和 $(C_0$ - C_4 烷基)(C_6 - C_{10} 芳基) R_7 ;

[0388] R_3 为 C_1 - C_{18} 烷基, 或者 R_3 和 R_4 与它们所连接的原子一起形成 4-6 元杂环;

[0389] R_4 和 R_8 独立选自氢、 C_1 - C_{18} 烷基和 $(C_0$ - C_4 烷基)(C_6 - C_{10} 芳基) R_7 ;

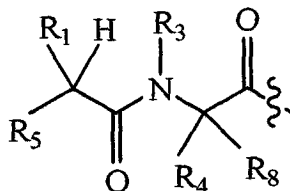
[0390] R_5 为 NHR_6 ;

[0391] R_6 为 H、 C_1 - C_8 烷基, 或者 R_6 和 R_1 与它们所连接的原子一起形成 4、5 或 6 元杂环; 和

[0392] R_7 选自氢、 C_1 - C_{18} 烷基、 C_2 - C_{18} 烯基、 $(C_0$ - C_4 烷基) $CONH_2$ 、 $(C_0$ - C_4 烷基) $COOH$ 、 $(C_0$ - C_4 烷基) NH_2 、 $(C_0$ - C_4 烷基)OH 和卤素。

[0393] 另外, 提供具有通过芳族氨基酸连接的二肽前药元件且 $t_{1/2}$ 为例如约 72- 约 168 小时的前药, 其中所述二肽包含以下结构:

[0394]



[0395] 其中 R_1 和 R_2 独立选自氢、 C_1 - C_8 烷基和芳基;

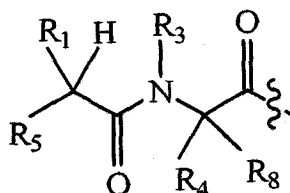
[0396] R_3 为 C_1 - C_{18} 烷基, 或者 R_3 和 R_4 与它们所连接的原子一起形成 4-6 元杂环;

[0397] R_4 和 R_8 各自为氢; 和

[0398] R_5 选自胺、N-取代胺和羟基。

[0399] 在一些实施方案中, 提供具有通过芳族氨基酸连接的二肽前药元件且 $t_{1/2}$ 为例如约 72- 约 168 小时的前药, 其中所述二肽包含以下结构:

[0400]



[0401] 其中 R_1 和 R_2 独立选自氢、 C_1 - C_8 烷基、 $(C_1-C_4 \text{ 烷基})COOH$ 和 $(C_0-C_4 \text{ 烷基}) (C_6-C_{10} \text{ 芳基}) R_7$, 或者 R_1 和 R_5 与它们所连接的原子一起形成 4-11 元杂环;

[0402] R_3 为 C_1 - C_{18} 烷基, 或者 R_3 和 R_4 与它们所连接的原子一起形成 4-6 元杂环;

[0403] R_4 为氢或与 R_3 形成 4-6 元杂环;

[0404] R_8 为氢;

[0405] R_5 为 NHR_6 或 OH ;

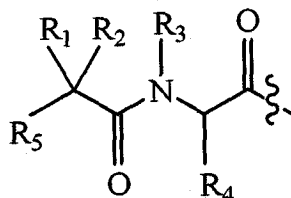
[0406] R_6 为 H 或 C_1 - C_8 烷基, 或者 R_6 和 R_1 与它们所连接的原子一起形成 4、5 或 6 元杂环; 和

[0407] R_7 选自氢、 C_1 - C_{18} 烷基、 C_2 - C_{18} 烯基、 $(C_0-C_4 \text{ 烷基})CONH_2$ 、 $(C_0-C_4 \text{ 烷基})COOH$ 、 $(C_0-C_4 \text{ 烷基})NH_2$ 、 $(C_0-C_4 \text{ 烷基})OH$ 和卤素。

[0408] 在一些实施方案中, 二肽前药元件通过作为芳族氨基酸的芳基取代基存在的伯胺与芳族氨基酸连接, 其中所述芳族氨基酸位于胰高血糖素超家族肽的 10、13、22 或 25 位 (根据胰高血糖素的编号, 参见例如图 10) 上。在一些实施方案中, 连接二肽前药元件的芳族氨基酸位于胰高血糖素超家族肽的 22 位。

[0409] 按照一些实施方案, 二肽前药元件在包括例如胰高血糖素相关肽或骨钙蛋白及其类似物、衍生物和缀合物在内的胰高血糖素超家族肽的 N 端胺处连接, 其中所述二肽前药元件包含以下结构:

[0410]



[0411] 其中 R_1 选自 H 和 C_1 - C_8 烷基;

[0412] R_2 和 R_4 独立选自 H 、 C_1 - C_8 烷基、 C_2 - C_8 烯基、 $(C_1-C_4 \text{ 烷基})OH$ 、 $(C_1-C_4 \text{ 烷基})SH$ 、 $(C_2-C_3 \text{ 烷基})SCH_3$ 、 $(C_1-C_4 \text{ 烷基})CONH_2$ 、 $(C_1-C_4 \text{ 烷基})COOH$ 、 $(C_1-C_4 \text{ 烷基})NH_2$ 、 $(C_1-C_4 \text{ 烷基})NHC(NH_2^+)$ 、 $(C_0-C_4 \text{ 烷基}) (C_3-C_6 \text{ 环烷基})$ 、 $(C_0-C_4 \text{ 烷基}) (C_6-C_{10} \text{ 芳基}) R_7$ 、 $CH_2 (C_5-C_9 \text{ 杂芳基})$, 或者 R_1 和 R_2 与它们所连接的原子一起形成 C_3 - C_6 环烷基;

[0413] R_3 选自 C_1 - C_8 烷基、 (C_3-C_6) 环烷基, 或者 R_4 和 R_3 与它们所连接的原子一起形成 5 或 6 元杂环;

[0414] R_5 为 NHR_6 或 OH ;

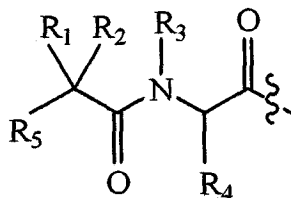
[0415] R_6 为 H , 或者 R_6 和 R_2 与它们所连接的原子一起形成 5 或 6 元杂环; 和

[0416] R_7 选自 H 和 OH 。在一些实施方案中, R_1 为 H 或 C_1 - C_8 烷基, R_2 选自 H 、 C_1 - C_6 烷基、 CH_2OH 、 $(C_1-C_4 \text{ 烷基})NH_2$ 、 $(C_3-C_6 \text{ 环烷基})$ 和 $CH_2 (C_6 \text{ 芳基}) R_7$, 或者 R_6 和 R_2 与它们所连接的原子一起形成 5 元杂环, R_3 为 C_1 - C_6 烷基, R_4 选自 H 、 C_1 - C_4 烷基、 (C_3-C_6) 环烷基、 $(C_1-C_4 \text{ 烷基})$

OH、(C₁-C₄ 烷基)SH 和 (C₀-C₄ 烷基)(C₆ 芳基)R₇, 或者 R₃ 和 R₄ 与它们所连接的原子一起形成 5 元杂环。在又一个实施方案中, R₃ 为 CH₃, R₅ 为 NHR₆, 而在备选的另一实施方案中, R₃ 和 R₄ 与它们所连接的原子一起形成 5 元杂环, 而 R₅ 为 NHR₆。

[0417] 按照另一个实施方案, 二肽前药元件在包括例如胰高血糖素相关肽或骨钙蛋白及其类似物、衍生物和缀合物在内的胰高血糖素超家族肽的 N 端胺处连接, 其中所述二肽前药元件包含以下结构:

[0418]



[0419] 其中 R₁ 选自 H 和 C₁-C₈ 烷基;

[0420] R₂ 和 R₄ 独立选自 H、C₁-C₈ 烷基、C₂-C₈ 烯基、(C₁-C₄ 烷基)OH、(C₁-C₄ 烷基)SH、(C₂-C₃ 烷基)SCH₃、(C₁-C₄ 烷基)CONH₂、(C₁-C₄ 烷基)COOH、(C₁-C₄ 烷基)NH₂、(C₁-C₄ 烷基)NHC(NH₂⁺)NH₂、(C₀-C₄ 烷基)(C₃-C₆ 环烷基)、(C₀-C₄ 烷基)(C₆-C₁₀ 芳基)R₇、CH₂(C₅-C₉ 杂芳基), 或者 R₁ 和 R₂ 与它们所连接的原子一起形成 C₃-C₆ 环烷基;

[0421] R₃ 选自 C₁-C₈ 烷基、(C₃-C₆) 环烷基, 或者 R₄ 和 R₃ 与它们所连接的原子一起形成 5 或 6 元杂环;

[0422] R₅ 为 NHR₆ 或 OH;

[0423] R₆ 为 H, 或者 R₆ 和 R₂ 与它们所连接的原子一起形成 5 或 6 元杂环; 和

[0424] R₇ 选自氢、C₁-C₁₈ 烷基、C₂-C₁₈ 烯基、(C₀-C₄ 烷基)CONH₂、(C₀-C₄ 烷基)COOH、(C₀-C₄ 烷基)NH₂、(C₀-C₄ 烷基)OH 和卤素。在一些实施方案中, R₁ 为 H 或 C₁-C₈ 烷基, R₂ 选自 H、C₁-C₈ 烷基、CH₂OH、(C₁-C₄ 烷基)NH₂、(C₃-C₆ 环烷基)和 CH₂(C₆ 芳基)R₇, 或者 R₆ 和 R₂ 与它们所连接的原子一起形成 5 元杂环, R₃ 为 C₁-C₆ 烷基, 而 R₄ 选自 H、C₁-C₄ 烷基、(C₃-C₆) 环烷基、(C₁-C₄ 烷基)OH、(C₁-C₄ 烷基)SH 和 (C₀-C₄ 烷基)(C₆ 芳基)R₇, 或者 R₃ 和 R₄ 与它们所连接的原子一起形成 5 元杂环。在又一个实施方案中, R₃ 为 CH₃, R₅ 为 NHR₆, 而在备选的另一实施方案中, R₃ 和 R₄ 与它们所连接的原子一起形成 5 元杂环, 而 R₅ 为 NHR₆。

[0425] 在一些实施方案中, Q 为 SEQ ID NO: 1-684、701-731、801-919、1001-1262、1301-1371、1401-1518、1701-1776 和 1801-1921 中的任一个。

[0426] 胰高血糖素相关肽

[0427] 在某些方面, 本公开内容涉及胰高血糖素相关肽 (作为所示基团“Q”的部分)。术语胰高血糖素相关肽是指对胰高血糖素、GLP-1、GLP-2 和 GIP 受体中的任一种或多种具有生物活性 (作为激动剂或拮抗剂) 并且包含以下氨基酸序列的肽, 所述氨基酸序列与天然胰高血糖素、天然泌酸调节肽、天然毒蜥外泌肽-4、天然 GLP-1、天然 GLP-2 或天然 GIP 中的至少一种有至少 40% 序列同一性 (例如 45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%)。要了解的是, 考虑胰高血糖素相关肽所有可能的活性亚类, 例如以下肽, 其对胰高血糖素或 GLP-1 或 GIP 受体中的任一种或多种具有生物活性 (作为激动剂或拮抗剂), 以及与各个所列天然肽具有序列同一性的所有可能子集, 例如, 包含在天然胰高血糖素的长度范围内与天然胰高血糖素具有至少 40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、

75%、80%、85%、90%或95%序列同一性的氨基酸序列。在本发明的一些实施方案中,胰高血糖素相关肽是具有胰高血糖素受体激动剂活性、GIP 受体激动剂活性、胰高血糖素受体 / GLP-1 受体共激动剂 (co-agonist) 活性、胰高血糖素受体拮抗剂活性或胰高血糖素受体拮抗剂和 GLP-1 受体激动剂活性的肽。在一些实施方案中,肽保持分子 C 端一半的 α 螺旋构象。在一些实施方案中,肽保持参与受体相互作用或信号转导的位置,例如胰高血糖素的 3 位,或 (1-37) GLP-1 的 7、10、12、13、15 或 17 位。因此,胰高血糖素相关肽可为可以为第 1 类、第 2 类、第 3 类、第 4 类和 / 或第 5 类的肽,本文还将进一步描述各类肽。

[0428] 按照一些实施方案,二肽前药元件可通过酰胺键与之前于以下国际申请号中公开的任何生物活性化合物连接:PCT/US2008/08608(2008 年 1 月 3 日提交)、PCT/US2008/053857(2008 年 2 月 13 日提交)、PCT/US2009/47437(2009 年 6 月 16 日提交)、PCT/US2009/47438(2009 年 6 月 16 日提交)、PCT/US2009/47447(2009 年 6 月 16 日提交)、PCT/US2008/080973(2008 年 10 月 23 日提交)和 PCT/US2008/081333(2008 年 10 月 27 日提交),其公开内容本文通过引用明确结合到本申请中。在一些示例性的实施方案中,本文公开的二肽前药元件可通过 N 端胺与 PCT/US2008/08608、PCT/US2008/053857、PCT/US2009/47437、PCT/US2009/47438、PCT/US2009/47447、PCT/US2008/08097 和 PCT/US2008/081333 中公开的生物活性肽连接,或者可与所公开的任何生物活性肽 20 位上的赖氨酸的侧链氨基或与取代所公开的任何生物活性肽 22 位上的氨基酸的 4-氨基苯丙氨酸的芳族氨基连接。在一些示例性的实施方案中,本文公开的二肽前药元件通过酰胺键与 PCT/US2008/08608、PCT/US2008/053857、PCT/US2009/47437、PCT/US2009/47438 和 PCT/US2009/47447、PCT/US2008/08097 和 PCT/US2008/081333 公开的生物活性肽的 N 端胺连接。在一些实施方案中,胰高血糖素超家族肽为 SEQ ID NO:1-684、701-731、801-919、1001-1262、1301-1371、1401-1518、1701-1776 和 1801-1921 中的任一个。

[0429] 修饰

[0430] 胰高血糖素相关肽可包括具有修饰的天然胰高血糖素氨基酸序列 (SEQ ID NO: 701)。在示例性实施方案中,与天然胰高血糖素序列相比,胰高血糖素相关肽可包含共 1 个、多达 2 个、多达 3 个、多达 4 个、多达 5 个、多达 6 个、多达 7 个、多达 8 个、多达 9 个或多达 10 个氨基酸修饰,例如保守或非保守取代。在某些方面,本文所述的修饰和取代在胰高血糖素相关肽内的特定位置上进行,其中位置的编号与胰高血糖素 (SEQ ID NO: 701) 的编号相当。在一些实施方案中,1、2、3、4 或 5 个非保守取代在 2、5、7、10、11、12、13、14、17、18、19、20、21、24、27、28 或 29 位中的任何位置上进行,且多达 5 个另外的保守取代在任何这些位置上进行。在一些实施方案中,1、2 或 3 个氨基酸修饰在 1-16 位的氨基酸上进行,而 1、2 或 3 个氨基酸修饰在 17-26 位的氨基酸上进行。在一些实施方案中,这类胰高血糖素相关肽在与天然胰高血糖素相应的位置上保留至少 22、23、24、25、26、27 或 28 个天然存在的氨基酸 (例如与天然存在的胰高血糖素相比具有 1-7、1-5 或 1-3 个修饰)。

[0431] DPP-IV 抗性

[0432] 在一些实施方案中,胰高血糖素相关肽在 1 或 2 位上包含修饰以降低对被二肽基肽酶 IV 切割的敏感性。更具体地讲,在一些实施方案中,胰高血糖素相关肽 (例如选自图 10 的胰高血糖素相关肽) 的 1 位被选自以下的氨基酸取代:D-组氨酸、 α , α -二甲基咪唑 (imidazole) 乙酸 (DMIA)、N-甲基组氨酸、 α -甲基组氨酸、咪唑乙酸、脱氨基组氨酸、羟

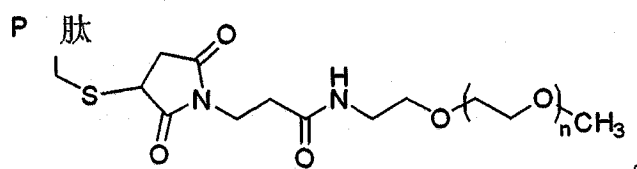
基-组氨酸、乙酰基-组氨酸和高组氨酸。更具体地讲,在一些实施方案中,胰高血糖素相关肽的 2 位被选自以下的氨基酸取代: D-丝氨酸、D-丙氨酸、缬氨酸、甘氨酸、N-甲基丝氨酸和氨基异丁酸。在一些实施方案中,胰高血糖素相关肽 2 位不是 D-丝氨酸。

[0433] 亲水部分

[0434] 在一些实施方案中,胰高血糖素相关肽(例如第 1 类胰高血糖素相关肽、第 2 类胰高血糖素相关肽、第 3 类胰高血糖素相关肽、第 4 类胰高血糖素相关肽或第 5 类胰高血糖素相关肽)与亲水部分连接(共价结合)。亲水部分可在用来使蛋白质与活化聚合物分子反应的任何合适的条件下与胰高血糖素相关肽连接。可采用本领域已知的任何方法,包括通过酰化、还原烷基化、迈克尔加成(Michael addition)、巯基烷基化或通过 PEG 部分上的反应基(例如醛、氨基、酯、巯基、 α -卤代乙酰基、马来酰亚胺基或胍基)与目标化合物上的反应基(例如醛、氨基、酯、巯基、 α -卤代乙酰基、马来酰亚胺基或胍基)进行的其它化学选择性缀合/连接方法。可用于将水溶性聚合物与一个或多个蛋白质连接的活化基团包括而限于砷、马来酰亚胺、硫氢基、巯基、三氟甲磺酸基、三氟乙磺酸基、氮丙烯(aziridine)、环氧乙烷和 5-吡啶基。如果通过还原烷基化与肽连接,则所选择的聚合物应具有单一活性醛,使得聚合程度受到控制。参见例如 Kinstler 等, *Adv. Drug. Delivery Rev.* 54:477-485(2002); Roberts 等, *Adv. Drug Delivery Rev.* 54:459-476(2002); 以及 Zalipsky 等, *Adv. Drug. Delivery Rev.* 16:157-182(1995)。

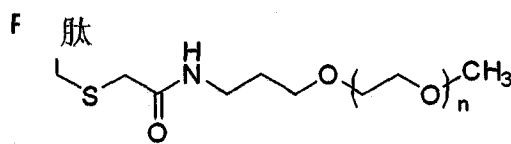
[0435] 对于第 1-3 类的胰高血糖素相关肽,可用于将水溶性聚合物与一个或多个蛋白质连接的其它活化基团包括 α -卤代酰基(例如 α -碘乙酸、 α -溴乙酸、 α -氯乙酸)。在其中胰高血糖素相关肽是第 1 类、第 2 类或第 3 类胰高血糖素相关肽的一些实施方案中,在迈克尔加成反应中,将包含巯基的氨基酸用马来酰亚胺活化的 PEG 修饰得到如下所示的包含硫醚键的聚乙二醇化肽:

[0436]



[0437] 在其它实施方案中,在亲核取代反应中,将第 1 类、第 2 类或第 3 类胰高血糖素相关肽的氨基酸的巯基用卤代乙酰基活化的 PEG 修饰得到如下所示的包含硫醚键的聚乙二醇化肽:

[0438]



[0439] 合适的亲水部分包括聚乙二醇(PEG)、聚丙二醇、聚氧乙烯化多元醇(例如 POG)、聚氧乙烯化山梨醇、聚氧乙烯化葡萄糖、聚氧乙烯化甘油(POG)、聚氧化烯、聚乙二醇丙醛、乙二醇/丙二醇共聚物、聚乙二醇单甲醚、一-(C1-C10)烷氧基-聚乙二醇或芳氧基-聚乙二醇、羧甲基纤维素、聚缩醛、聚乙烯醇(PVA)、聚乙烯吡咯烷酮、聚-1,3-二氧杂环戊烷、

聚-1,3,6-三噁烷、乙烯/马来酸酐共聚物、聚(β -氨基酸)(均聚物或无规共聚物)、聚(n-乙烯基吡咯烷酮)聚乙二醇、聚丙二醇均聚物(PPG)和其它聚环氧烷、聚环氧丙烷/环氧乙烷共聚物、肠菌酸(colonic acid)或其它多糖聚合物、菲可(Ficoll)或葡聚糖及其混合物。葡聚糖为葡萄糖亚基的多糖聚合物,主要由 α 1-6键连接。可获得许多分子量范围的葡聚糖,例如约1kD-约100kD,或约5、10、15或20kD-约20、30、40、50、60、70、80或90kD。

[0440] 在一些实施方案中,亲水部分是在所述胰高血糖素相关肽16、17、21、24、29、40位中的一个或多个位置的氨基酸残基侧链上、在C端突出端内或在C端氨基酸上共价连接的聚乙二醇(PEG)链或其它水溶性聚合物。在一些实施方案中,在该位置上的天然氨基酸被具有适于与亲水部分交联的侧链的氨基酸取代以利于亲水部分与肽的键合。示例性的氨基酸包括Cys、Lys、Orn、高半胱氨酸或乙酰基苯丙氨酸(Ac-Phe)。在其它实施方案中,将经修饰包含亲水基团的氨基酸加至肽的C端。

[0441] 根据一些实施方案,亲水部分(例如聚乙二醇链)的分子量选自约500-约40,000道尔顿。在一些实施方案中,聚乙二醇链的分子量选自约500-约5,000道尔顿或约1,000-约5,000道尔顿。在另一个实施方案中,亲水部分(例如聚乙二醇链)的分子量为约10,000-约20,000道尔顿。在其它示例性的实施方案中,亲水部分(例如聚乙二醇链)的分子量为约20,000-约40,000道尔顿。

[0442] 考虑了直链或支链亲水聚合物。缀合物的所得制备物可以是基本单分散性的或多分散性的,且可具有每个肽约0.5、0.7、1、1.2、1.5或2个聚合物部分。

[0443] 酰化

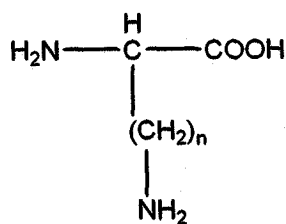
[0444] 在一些实施方案中,对胰高血糖素相关肽(例如第1类胰高血糖素相关肽、第2类胰高血糖素相关肽、第3类胰高血糖素相关肽、第4类胰高血糖素相关肽、第4类胰高血糖素相关肽或第5类胰高血糖素相关肽)进行修饰以包含酰基。例如,胰高血糖素相关肽可以是第1类、第2类或第3类中的一种,并且可包含对天然存在的氨基酸而言是非天然的酰基。酰化可在胰高血糖素相关肽内的任何位置(包括1-29位中的任一个)上、C端突出端内的位置或C端氨基酸上进行,前提条件是酰化时保持未酰化胰高血糖素相关肽所具有的活性。例如,如果未酰化肽具有胰高血糖素激动剂活性,则酰化肽保持胰高血糖素激动剂活性。同样,例如如果未酰化肽具有胰高血糖素拮抗剂活性,则酰化肽保持胰高血糖素拮抗剂活性。例如,如果未酰化肽具有GLP-1激动剂活性,则酰化肽保持GLP-1激动剂活性。非限制性实例包括在5、7、10、11、12、13、14、16、17、18、19、20、21、24、27、28或29位(按照野生型胰高血糖素的氨基酸编号)上的酰化。对于第1类、第2类和第3类胰高血糖素相关肽,酰化可发生在5、7、10、11、12、13、14、16、17、18、19、20、21、24、27、28、29、30、37、38、39、40、41、42或43位(按照野生型胰高血糖素的氨基酸编号)中的任一个上。酰基可直接与胰高血糖素相关肽的氨基酸共价连接,或通过间隔基间接与胰高血糖素相关肽的氨基酸共价连接,其中间隔基位于胰高血糖素相关肽的氨基酸和酰基之间。胰高血糖素相关肽可在亲水部分连接的同一氨基酸位置上或在不同的氨基酸位置上酰化。非限制性实例包括10位(按照野生型胰高血糖素的氨基酸编号)上的酰化,和在胰高血糖素肽C端部分的一个或多个位置上(例如24、28或29位)(按照野生型胰高血糖素的氨基酸编号)、在C端突出端内或在C端(例如通过加入C端Cys)聚乙二醇化。

[0445] 在本发明的一个具体方面,通过直接酰化胰高血糖素相关肽的氨基酸侧链的胺、

羟基或巯基,对胰高血糖素相关肽进行修饰以包含酰基。在一些实施方案中,通过氨基酸的侧链胺、羟基或巯基直接酰化胰高血糖素相关肽。在一些实施方案中,酰化位于 10、20、24 或 29 位(按照野生型胰高血糖素的氨基酸编号)上。在这个方面,酰化胰高血糖素相关肽可包含 SEQ ID NO:701 的氨基酸序列,或包含一种或多种本文所述氨基酸修饰的该序列的修饰氨基酸序列,其中 10、20、24 和 29 位(按照野生型胰高血糖素的氨基酸编号)上的至少一个氨基酸被修饰成包含侧链胺、羟基或巯基的任何氨基酸。在本发明的一些具体实施方案中,通过 10 位(按照野生型胰高血糖素的氨基酸编号)上的氨基酸侧链胺、羟基或巯基直接酰化胰高血糖素相关肽。

[0446] 在一些实施方案中,包含侧链胺的氨基酸为下式 I 的氨基酸:

[0447]



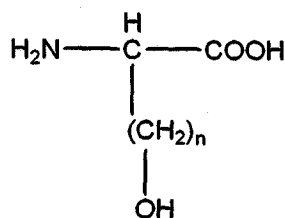
其中 $n = 1-4$

[式 I]

[0448] 在一些示例性的实施方案中,式 I 氨基酸为其中 n 为 4(Lys) 或 n 为 3(Orn) 的氨基酸。

[0449] 在其它实施方案中,包含侧链羟基的氨基酸为下式 II 的氨基酸:

[0450]



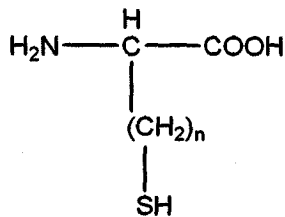
其中 $n = 1-4$

[式 II]

[0451] 在一些示例性的实施方案中,式 II 氨基酸为其中 n 为 1 的氨基酸 (Ser)。

[0452] 在又一些实施方案中,包含侧链巯基的氨基酸为下式 III 的氨基酸:

[0453]



其中 $n = 1-4$

[式 III]

[0454] 在一些示例性的实施方案中,式 III 氨基酸为其中 n 为 1 的氨基酸 (Cys)。

[0455] 在其中胰高血糖素相关肽是第 1 类、第 2 类或第 3 类胰高血糖素相关肽的又一些实施方案中,包含侧链胺、羟基或巯基的氨基酸是包含式 I、式 II 或式 III 的相同结构的双取代氨基酸,只是与式 I、式 II 或式 III 氨基酸的 α 碳结合的氢被第二侧链置换。

[0456] 在本发明的一些实施方案中,酰化胰高血糖素相关肽在肽和酰基之间包含间隔基。在一些实施方案中,胰高血糖素相关肽与间隔基共价结合,间隔基与酰基共价结合。在一些示例性的实施方案中,通过间隔基的胺、羟基或巯基的酰化而对胰高血糖素相关肽进行修饰以包含酰基,该间隔基与胰高血糖素相关肽的 10、20、24 或 29 位 (按照野生型胰高血糖素的氨基酸编号) 氨基酸的侧链或 C 端氨基酸连接。间隔基与之连接的氨基酸可以是包含允许连接间隔基的部分的任何氨基酸。例如,包含侧链 $-\text{NH}_2$ 、 $-\text{OH}$ 或 $-\text{COOH}$ 的氨基酸 (例如 Lys、Orn、Ser、Asp 或 Glu) 为适宜的。同样,对于第 1 类、第 2 类和第 3 类胰高血糖素相关肽,包含侧链 $-\text{NH}_2$ 、 $-\text{OH}$ 或 $-\text{COOH}$ 的氨基酸 (例如单个或双重 α -取代氨基酸) (例如 Lys、Orn、Ser、Asp 或 Glu) 为适宜的。在这个方面,酰化胰高血糖素相关肽可包含 SEQ ID NO:701 的氨基酸序列,或包含一种或多种本文所述氨基酸修饰的该序列的修饰氨基酸序列,其中 10、20、24 和 29 位 (按照野生型胰高血糖素的氨基酸编号) 上的至少一个氨基酸被修饰成包含侧链胺、羟基或羧基 (carboxylate) 的任何氨基酸。

[0457] 在一些实施方案中,间隔基是包含侧链胺、羟基或巯基的氨基酸,或包含含有侧链胺、羟基或巯基的氨基酸的二肽或三肽。在一些实施方案中,氨基酸间隔基不是 γ -Glu。在一些实施方案中,二肽间隔基不是 γ -Glu- γ -Glu。

[0458] 当酰化通过间隔基氨基酸的胺基进行时,酰化可通过该氨基酸的 α 胺或侧链胺进行。在其中 α 胺被酰化的情况下,间隔基氨基酸可以是任何氨基酸。例如,间隔基氨基酸可以是疏水氨基酸,例如 Gly、Ala、Val、Leu、Ile、Trp、Met、Phe、Tyr。在其中胰高血糖素相关肽是第 1 类、第 2 类或第 3 类胰高血糖素相关肽的一些实施方案中,间隔基氨基酸可以是例如疏水氨基酸,例如 Gly、Ala、Val、Leu、Ile、Trp、Met、Phe、Tyr、6-氨基己酸、5-氨基戊酸、7-氨基庚酸、8-氨基辛酸。或者,间隔基氨基酸可以是酸性残基,例如 Asp 和 Glu。在其中间隔基氨基酸的侧链胺被酰化的情况下,间隔基氨基酸是包含侧链胺的氨基酸,例如式 I 氨基酸 (例如 Lys 或 Orn)。在这种情况下,可能间隔基氨基酸的 α 胺和侧链胺两者均被酰化,使得胰高血糖素肽被二酰化。本发明的实施方案包括这类二酰化分子。

[0459] 当酰化通过间隔基氨基酸的羟基进行时,该氨基酸或者二肽或三肽的氨基酸之一可以是式 II 氨基酸。在一个具体的示例性实施方案中,氨基酸是 Ser。

[0460] 当酰化通过间隔基氨基酸的巯基进行时,该氨基酸或者二肽或三肽的氨基酸之一可以是式 III 氨基酸。在一个具体的示例性实施方案中,氨基酸是 Cys。

[0461] 在一些实施方案中,间隔基包含亲水双官能间隔基。在一个具体的实施方案中,间隔基包含氨基聚(烷氧基)羧酸。在这个方面,间隔基可包含例如 $\text{NH}_2(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n(\text{CH}_2)_m\text{COOH}$, 其中 m 为 1-6 的任何整数, n 为 2-12 的任何整数,例如可购自 Peptides International, Inc. (Louisville, KY) 的 8-氨基-3,6-二氧杂辛酸。

[0462] 在仅与第 1 类、第 2 类和第 3 类胰高血糖素相关肽有关的一些实施方案中,间隔基包含亲水双官能间隔基。在某些实施方案中,与第 1 类、第 2 类或第 3 类胰高血糖素相关肽连接的亲水双官能间隔基包含两个或更多个反应基,例如胺、羟基、巯基和羧基或其任何组

合。在某些实施方案中,与第1类、第2类或第3类胰高血糖素相关肽连接的亲水双官能间隔基包含羟基和羧基。在其它实施方案中,与第1类、第2类或第3类胰高血糖素相关肽连接的亲水双官能间隔基包含胺基和羧基。在其它实施方案中,与第1类、第2类或第3类胰高血糖素相关肽连接的亲水双官能间隔基包含巯基和羧基。

[0463] 在其中胰高血糖素相关肽是第1类、第2类或第3类胰高血糖素相关肽的一些实施方案中,间隔基为疏水双官能间隔基。疏水双官能间隔基是本领域已知的。参见例如 *Bioconjugate Techniques*, G. T. Hermanson (Academic Press, San Diego, CA, 1996), 通过引用以其整体结合到本文中。在某些实施方案中,与第1类、第2类或第3类胰高血糖素相关肽连接的疏水双官能间隔基包含两个或更多个反应基,例如胺、羟基、巯基和羧基或其任何组合。在某些实施方案中,与第1类、第2类或第3类胰高血糖素相关肽连接的疏水双官能间隔基包含羟基和羧基。在其它实施方案中,与第1类、第2类或第3类胰高血糖素相关肽连接的疏水双官能间隔基包含胺基和羧基。在其它实施方案中,与第1类、第2类或第3类胰高血糖素相关肽连接的疏水双官能间隔基包含巯基和羧基。包含羧基和羟基或巯基的合适的疏水双官能间隔基是本领域已知的,包括例如 8-羟基辛酸和 8-巯基辛酸。

[0464] 在一些实施方案中,与第1类、第2类或第3类胰高血糖素相关肽连接的双官能间隔基不是在羧酸基之间包含 1-7 个碳原子的无支链亚甲基的二羧酸。在一些实施方案中,与第1类、第2类或第3类胰高血糖素相关肽连接的双官能间隔基是在羧酸基之间包含 1-7 个碳原子的无支链亚甲基的二羧酸。

[0465] 在其中胰高血糖素相关肽是第1类、第2类或第3类胰高血糖素相关肽的具体实施方案中,间隔基(例如氨基酸、二肽、三肽、亲水双官能间隔基或疏水双官能间隔基)的长度为 3-10 个原子,例如 6-10 个原子(例如 6、7、8、9 或 10 个原子)。在其中胰高血糖素相关肽是第1类、第2类或第3类胰高血糖素相关肽的更具体实施方案中,间隔基的长度为约 3-10 个原子(例如 6-10 个原子),且酰基为 C12-C18 脂肪酰基,例如 C14 脂肪酰基、C16 脂肪酰基,使得间隔基和酰基的总长度为 14-28 个原子,例如约 14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27 或 28 个原子。在其中胰高血糖素相关肽是第1类、第2类或第3类胰高血糖素相关肽的一些实施方案中,间隔基和酰基的长度为 17-28(例如 19-26、19-21) 个原子。

[0466] 按照其中胰高血糖素相关肽是第1类、第2类或第3类胰高血糖素相关肽的某些实施方案,双官能间隔基可以是合成或天然存在的氨基酸(包括但不限于本文所述的任何氨基酸),其包含长度为 3-10 个原子的氨基酸主链(例如 6-氨基己酸、5-氨基戊酸、7-氨基庚酸和 8-氨基辛酸)。或者,与第1类、第2类或第3类胰高血糖素相关肽连接的间隔基可以是肽主链长度为 3-10 个原子(例如 6-10 个原子)的二肽或三肽间隔基。与第1类、第2类或第3类胰高血糖素相关肽连接的二肽或三肽间隔基的每个氨基酸,可与二肽或三肽的其它氨基酸相同或不同,并且可独立选自:天然存在的和/或非天然存在的氨基酸,包括例如天然存在氨基酸(Ala、Cys、Asp、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Pro、Arg、Ser、Thr、Val、Trp、Tyr)的任何 D 或 L 异构体,或选自以下的非天然存在氨基酸的任何 D 或 L 异构体: β -丙氨酸(β -Ala)、N- α -甲基-丙氨酸(Me-Ala)、氨基丁酸(Abu)、 γ -氨基丁酸(γ -Abu)、氨基己酸(ϵ -Ahx)、氨基异丁酸(Aib)、氨基甲基吡咯甲酸、氨基哌啶甲酸、氨基丝氨酸(Ams)、氨基四氢吡喃-4-甲酸、精氨酸 N-甲氧基-N-甲基酰胺、 β -天

冬氨酸 (β -Asp)、氮杂环丁烷甲酸、3-(2- 苯并噻唑基) 丙氨酸、 α -叔丁基甘氨酸、2- 氨基-5- 脲基正戊酸 (瓜氨酸, Cit)、 β - 环己基丙氨酸 (Cha)、乙酰氨基甲基- 半胱氨酸、二氨基丁酸 (Dab)、二氨基丙酸 (Dpr)、二羟基苯丙氨酸 (DOPA)、二甲基噻唑烷 (DMTA)、 γ - 谷氨酸 (γ -Glu)、高丝氨酸 (Hse)、羟脯氨酸 (Hyp)、异亮氨酸 N- 甲氧基-N- 甲基酰胺、甲基- 异亮氨酸 (MeIle)、4- 哌啶甲酸 (Isn)、甲基- 亮氨酸 (MeLeu)、甲基- 赖氨酸、二甲基- 赖氨酸、三甲基- 赖氨酸、甲醇基脯氨酸 (methanoprolin)、甲硫氨酸- 亚砷 (Met(O))、甲硫氨酸- 砷 (Met(O₂))、正亮氨酸 (Nle)、甲基- 正亮氨酸 (Me-Nle)、正缬氨酸 (Nva)、鸟氨酸 (Orn)、对氨基苯甲酸 (PABA)、青霉胺 (penicillamine, Pen)、甲基苯丙氨酸 (MePhe)、4- 氯苯丙氨酸 (Phe(4-Cl))、4- 氟苯丙氨酸 (Phe(4-F))、4- 硝基苯丙氨酸 (Phe(4-NO₂))、4- 氰基苯丙氨酸 ((Phe(4-CN))、苯甘氨酸 (Phg)、哌啶基丙氨酸、哌啶基甘氨酸、3,4- 脱氢脯氨酸、吡咯烷基丙氨酸、肌氨酸 (Sar)、硒代半胱氨酸 (Sec)、0- 苄基- 磷酸丝氨酸、4- 氨基-3- 羟基-6- 甲基庚酸 (Sta)、4- 氨基-5- 环己基-3- 羟基戊酸 (ACHPA)、4- 氨基-3- 羟基-5- 苯基戊酸 (AHPPA)、1,2,3,4, - 四氢- 异喹啉-3- 甲酸 (Tic)、四氢吡喃甘氨酸、噻吩基丙氨酸 (Thi)、0- 苄基- 磷酸酪氨酸、0- 磷酸酪氨酸、甲氧基酪氨酸、乙氧基酪氨酸、0-(双- 二甲基氨基- 膦酰基)- 酪氨酸、酪氨酸硫酸四丁胺、甲基- 缬氨酸 (MeVal)、1- 氨基-1- 环己烷甲酸 (Acx)、氨基戊酸、 β - 环丙基- 丙氨酸 (Cpa)、炔丙基甘氨酸 (Prg)、烯丙基甘氨酸 (Alg)、2- 氨基-2- 环己基- 丙酸 (2-Cha)、叔丁基甘氨酸 (Tbg)、乙烯基甘氨酸 (Vg)、1- 氨基-1- 环丙烷甲酸 (Acp)、1- 氨基-1- 环戊烷甲酸 (Acpe) 和烷基化 3- 巯基丙酸。

[0467] 在其中胰高血糖素相关肽是第 1 类、第 2 类或第 3 类胰高血糖素相关肽的一些实施方案中, 间隔基包含总的负电荷, 例如包含一个或两个带负电荷的氨基酸。在其中胰高血糖素相关肽是第 1 类、第 2 类或第 3 类胰高血糖素相关肽的一些实施方案中, 二肽不是通用结构 A-B 的任何二肽, 其中 A 选自 Gly、Gln、Ala、Arg、Asp、Asn、Ile、Leu、Val、Phe、和 Pro, 其中 B 选自 Lys、His、Trp。在其中胰高血糖素相关肽是第 1 类、第 2 类或第 3 类胰高血糖素相关肽的一些实施方案中, 二肽间隔基选自: Ala-Ala、 β -Ala- β -Ala、Leu-Leu、Pro-Pro、 γ - 氨基丁酸- γ - 氨基丁酸和 γ -Glu- γ -Glu。

[0468] 在其中胰高血糖素相关肽是第 1 类、第 2 类或第 3 类胰高血糖素相关肽的本发明的一些实施方案中, 通过由胰高血糖素相关肽酰化长链烷烃而对胰高血糖素相关肽进行修饰以包含酰基。在其中胰高血糖素相关肽是第 1 类、第 2 类或第 3 类胰高血糖素相关肽的具体方面, 长链烷烃包含与胰高血糖素相关肽的羧基或其活化形式反应的胺、羟基或巯基 (例如十八胺、十四醇和十八硫醇)。第 1 类、第 2 类或第 3 类胰高血糖素相关肽的羧基或其活化形式可以是胰高血糖素相关肽氨基酸 (例如谷氨酸、天冬氨酸) 的侧链的组成部分或可以是肽主链的组成部分。

[0469] 在某些实施方案中, 通过由与胰高血糖素肽连接的间隔基酰化长链烷烃而对第 1 类、第 2 类或第 3 类胰高血糖素相关肽进行修饰以包含酰基。在具体的方面, 长链烷烃包含与间隔基的羧基或其活化形式反应的胺、羟基或巯基。本文描述了包含羧基或其活化形式的合适间隔基, 其包括例如双官能间隔基, 例如氨基酸、二肽、三肽、亲水双官能间隔基和疏水双官能间隔基。

[0470] 本文使用的术语“羧基的活化形式”是指具有通式 R(C=O)X 的羧基, 其中 X 为离去基团, R 为胰高血糖素相关肽或间隔基。例如, 羧基的活化形式可包括但不限于酰氯、酐

和酯。在一些实施方案中,活化羧基为具有 N- 羟基琥珀酰亚胺 (NHS) 离去基团的酯。

[0471] 有关本发明的这些方面 (其中长链烷烃被第 1 类、第 2 类或第 3 类胰高血糖素相关肽或间隔基酰化), 长链烷烃可为任何大小, 并且可包含任何碳链长度。长链烷烃可以是直链或支链。在其中胰高血糖素相关肽是第 1 类、第 2 类或第 3 类胰高血糖素相关肽的某些方面, 长链烷烃是 C4-C30 烷烃。例如, 长链烷烃可以是 C4 烷烃、C6 烷烃、C8 烷烃、C10 烷烃、C12 烷烃、C14 烷烃、C16 烷烃、C18 烷烃、C20 烷烃、C22 烷烃、C24 烷烃、C26 烷烃、C28 烷烃或 C30 烷烃中的任一种。在其中胰高血糖素相关肽是第 1 类、第 2 类或第 3 类胰高血糖素相关肽的一些实施方案中, 长链烷烃包含 C8-C20 烷烃, 例如 C14 烷烃、C16 烷烃或 C18 烷烃。

[0472] 同样, 在其中胰高血糖素相关肽是第 1 类、第 2 类或第 3 类胰高血糖素相关肽的一些实施方案中, 胰高血糖素相关肽的胺、羟基或巯基用胆固醇酸 (cholesterol acid) 酰化。在一个具体的实施方案中, 第 1 类、第 2 类或第 3 类胰高血糖素相关肽通过烷基化脱氨基 Cys 间隔基 (即烷基化 3- 巯基丙酸间隔基) 与胆固醇酸连接。

[0473] 通过胺、羟基和巯基进行肽酰化的合适方法是本领域已知的。参见例如 Miller, Biochem Biophys Res Commun 218 :377-382(1996) ;Shimohigashi 和 Stammer, Int J Pept Protein Res 19 :54-62(1982) ;及 Previero 等, Biochim Biophys Acta 263 :7-13(1972) (关于通过羟基酰化的方法); 及 San 和 Silvius, J Pept Res 66 :169-180(2005) (关于通过巯基酰化的方法); Bioconjugate Chem. " Chemical Modifications of Proteins: History and Applications " 第 1 页, 2-12(1990) ;Hashimoto 等, Pharmacuetical Res. " Synthesis of Palmitoyl Derivatives of Insulin and their Biological Activity" 第 6 卷, 第 2 期第 171-176 页 (1989)。

[0474] 酰化胰高血糖素相关肽的酰基可以是任何大小, 例如任何长度的碳链, 并可以是直链或支链。在本发明的一些具体实施方案中, 酰基为 C4-C30 脂肪酸。例如, 酰基可以是 C4 脂肪酸、C6 脂肪酸、C8 脂肪酸、C10 脂肪酸、C12 脂肪酸、C14 脂肪酸、C16 脂肪酸、C18 脂肪酸、C20 脂肪酸、C22 脂肪酸、C24 脂肪酸、C26 脂肪酸、C28 脂肪酸或 C30 脂肪酸中的任一种。在一些实施方案中, 酰基为 C8-C20 脂肪酸, 例如 C14 脂肪酸或 C16 脂肪酸。

[0475] 在一个备选实施方案中, 酰基为胆汁酸。胆汁酸可以是任何合适的胆汁酸, 包括但不限于胆酸、鹅脱氧胆酸、脱氧胆酸、石胆酸、牛磺胆酸、甘氨酸胆酸和胆固醇酸。

[0476] 还可对本文所述酰化胰高血糖素相关肽进行进一步修饰以包含亲水部分。在一些具体实施方案中, 亲水部分可包含聚乙二醇 (PEG) 链。亲水部分的掺入可通过任何合适的方法完成, 例如本文所述的任何方法。在这个方面, 酰化胰高血糖素相关肽可包含 SEQ ID NO :701, 包括本文所述的任何修饰, 其中在 10、20、24 和 29 位 (按照野生型胰高血糖素的氨基酸编号) 上的至少一个氨基酸包含酰基, 且在 16、17、21、24 或 29 位 (按照野生型胰高血糖素的氨基酸编号) 上的至少一个氨基酸、C 端突出端内的位置或 C 端氨基酸被修饰成 Cys、Lys、Orn、高半胱氨酸或 Ac-Phe, 并且氨基酸的侧链与亲水部分 (例如 PEG) 共价结合。在一些实施方案中, 酰基任选通过包含 Cys、Lys、Orn、高半胱氨酸或 Ac-Phe 的间隔基与 10 位 (按照野生型胰高血糖素的氨基酸编号) 连接, 并且亲水部分掺入到 24 位的 Cys 残基上。

[0477] 或者, 酰化胰高血糖素相关肽可包含间隔基, 其中间隔基既是酰化的, 又被修饰成包含亲水部分。合适间隔基的非限制性实例包括含有一个或多个选自 Cys、Lys、Orn、高半

胱氨酸和 Ac-Phe 的氨基酸的间隔基。

[0478] 烷基化

[0479] 按照一些实施方案,胰高血糖素相关肽,例如第 1 类胰高血糖素相关肽、第 2 类胰高血糖素相关肽、第 3 类胰高血糖素相关肽、第 4 类胰高血糖素肽或第 5 类胰高血糖素相关肽,被修饰成包含通过醚、硫醚或氨基键与胰高血糖素相关肽连接的烷基,以延长循环半寿期和 / 或延迟起效和 / 或延长作用持续时间和 / 或改进对蛋白酶 (例如 DPP-IV) 的抗性。在其中胰高血糖素相关肽是第 1 类、第 2 类或第 3 类胰高血糖素相关肽的示例性实施方案中,胰高血糖素相关肽包含对于天然存在的氨基酸来说是非天然的烷基。

[0480] 烷基化可在胰高血糖素相关肽内的任何位置上进行,包括 1-29 位中的任一个、C 端突出端内的位置或 C 端氨基酸,前提条件是保持胰高血糖素相关肽对胰高血糖素、GLP-1 或其它胰高血糖素相关肽受体的激动剂或拮抗剂活性。在一些实施方案中,如果未烷基化肽具有胰高血糖素激动剂活性,则烷基化肽保持胰高血糖素激动剂活性。在其它实施方案中,如果未烷基化肽具有胰高血糖素拮抗剂活性,则烷基化肽保持胰高血糖素拮抗剂活性。在一些实施方案中,如果未烷基化肽具有 GLP-1 激动剂活性,则烷基化肽保持 GLP-1 激动剂活性。非限制性实例包括在 5、7、10、11、12、13、14、16、17、18、19、20、21、24、27、28 或 29 位 (按照野生型胰高血糖素的氨基酸编号) 上的烷基化。对于第 1 类、第 2 类和第 3 类胰高血糖素相关肽,烷基化可发生在 5、7、10、11、12、13、14、16、17、18、19、20、21、24、27、28、29、30、37、38、39、40、41、42 或 43 位 (按照野生型胰高血糖素的氨基酸编号) 上。烷基可直接与胰高血糖素相关肽的氨基酸共价连接,或通过间隔基间接与胰高血糖素相关肽的氨基酸共价连接,其中间隔基位于胰高血糖素相关肽的氨基酸和烷基之间。胰高血糖素相关肽可在亲水部分连接的同一氨基酸位置上烷基化,或在不同的氨基酸位置上烷基化。非限制性实例包括 10 位 (按照野生型胰高血糖素的氨基酸编号) 上的烷基化并且在胰高血糖素相关肽的 C 端部分的一个或多个位置上聚乙二醇化,例如 24、28 或 29 位 (按照野生型胰高血糖素的氨基酸编号)、在 C 端突出端内或在 C 端上 (例如通过加入 C 端 Cys)。

[0481] 在本发明的一个具体方面,通过对胰高血糖素相关肽的氨基酸侧链的胺、羟基或巯基直接烷基化而修饰胰高血糖素相关肽以包含烷基。在一些实施方案中,通过氨基酸的侧链胺、羟基或巯基对胰高血糖素相关肽直接烷基化。在一些实施方案中,烷基化在 10、20、24 或 29 位 (按照野生型胰高血糖素的氨基酸编号) 上进行。在这个方面,烷基化胰高血糖素相关肽可包含 SEQ ID NO:701 的氨基酸序列,或包含一种或多种本文所述的氨基酸修饰的该序列的修饰氨基酸序列,其中 10、20、24 和 29 位 (按照野生型胰高血糖素的氨基酸编号) 上的至少一个氨基酸被修饰成包含侧链胺、羟基或巯基的任何氨基酸。在本发明的一些具体实施方案中,通过 10 位 (按照野生型胰高血糖素的氨基酸编号) 上氨基酸的侧链胺、羟基或巯基进行胰高血糖素相关肽的直接烷基化。

[0482] 在一些实施方案中,包含侧链胺的氨基酸是式 I 氨基酸。在一些示例性的实施方案中,式 I 氨基酸是其中 n 为 4 (Lys) 或 n 为 3 (Orn) 的氨基酸。

[0483] 在其它实施方案中,包含侧链羟基的氨基酸是式 II 氨基酸。在一些示例性的实施方案中,式 II 氨基酸是其中 n 为 1 的氨基酸 (Ser)。

[0484] 在又一些实施方案中,包含侧链巯基的氨基酸是式 III 氨基酸。在一些示例性的实施方案中,式 III 氨基酸是其中 n 为 1 的氨基酸 (Cys)。

[0485] 在其中胰高血糖素相关肽是第 1 类、第 2 类或第 3 类胰高血糖素相关肽的又一些实施方案中,包含侧链胺、羟基或巯基的氨基酸是包含式 I、式 II 或式 III 的相同结构的双取代氨基酸,只是与式 I、式 II 或式 III 氨基酸的 α 碳结合的氢被第二侧链置换。

[0486] 在本发明的一些实施方案中,烷基化胰高血糖素相关肽包含肽和烷基之间的间隔基。在一些实施方案中,胰高血糖素相关肽与间隔基共价结合,间隔基与烷基共价结合。在一些示例性的实施方案中,胰高血糖素相关肽通过间隔基的胺、羟基或巯基的烷基化被修饰成包含烷基,所述间隔基与在胰高血糖素相关肽的 10、20、24 或 29 位(按照野生型胰高血糖素的氨基酸编号)上的氨基酸的侧链连接。间隔基与之连接的氨基酸可以是包含允许与间隔基连接的部分的任何氨基酸。对于第 1 类、第 2 类和第 3 类胰高血糖素相关肽,间隔基与之连接的氨基酸可以是包含允许与间隔基连接的部分的任何氨基酸(例如单一 α -取代氨基酸或 α , α -双取代氨基酸)。例如,包含侧链 $-\text{NH}_2$ 、 $-\text{OH}$ 或 $-\text{COOH}$ 的氨基酸(例如 Lys、Orn、Ser、Asp 或 Glu)为适宜的。在这个方面,烷基化胰高血糖素相关肽可包含 SEQ ID NO:701 的氨基酸序列,或包含一种或多种本文所述的氨基酸修饰的该序列的修饰氨基酸序列,其中 10、20、24 和 29 位(按照野生型胰高血糖素的氨基酸编号)上的至少一个氨基酸被修饰成包含侧链胺、羟基或羧基的任何氨基酸。

[0487] 在一些实施方案中,间隔基是包含侧链胺、羟基或巯基的氨基酸或包含含有侧链胺、羟基或巯基的氨基酸的二肽或三肽。在一些实施方案中,氨基酸间隔基不是 γ -Glu。在一些实施方案中,二肽间隔基不是 γ -Glu- γ -Glu。

[0488] 当烷基化通过间隔基的氨基酸的胺基进行时,烷基化可通过该氨基酸的 α 胺或侧链胺进行。在 α 胺被烷基化的情况下,间隔基氨基酸可以是任何氨基酸。例如,间隔基氨基酸可以是疏水氨基酸,例如 Gly、Ala、Val、Leu、Ile、Trp、Met、Phe、Tyr。或者,间隔基氨基酸可以是酸性残基,例如 Asp 和 Glu。在其中胰高血糖素相关肽是第 1 类、第 2 类或第 3 类胰高血糖素相关肽的示例性实施方案中,间隔基氨基酸可以是疏水氨基酸,例如 Gly、Ala、Val、Leu、Ile、Trp、Met、Phe、Tyr、6-氨基己酸、5-氨基戊酸、7-氨基庚酸、8-氨基辛酸。或者,与第 1 类、第 2 类或第 3 类胰高血糖素相关肽连接的间隔基氨基酸可以是酸性残基,例如 Asp 和 Glu,前提条件是烷基化在酸性残基的 α 胺上进行。在间隔基氨基酸的侧链胺被烷基化的情况下,间隔基氨基酸是包含侧链胺的氨基酸,例如式 I 氨基酸(例如 Lys 或 Orn)。在这种情况下,可能间隔基氨基酸的 α 胺和侧链胺两者均被烷基化,使得胰高血糖素肽被二烷基化。本发明的实施方案包括这类二烷基化分子。

[0489] 当烷基化通过间隔基氨基酸的羟基进行时,该氨基酸或间隔基的多个氨基酸之一可以是式 II 氨基酸。在一个具体的示例性实施方案中,氨基酸是 Ser。

[0490] 当烷基化通过间隔基氨基酸的巯基进行时,该氨基酸或间隔基的多个氨基酸之一可以是式 III 氨基酸。在一个具体的示例性实施方案中,氨基酸是 Cys。

[0491] 在一些实施方案中,间隔基包含亲水双官能间隔基。在一个具体的实施方案中,间隔基包含氨基聚(烷氧基)羧酸。在这个方面,间隔基可包含例如 $\text{NH}_2(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n(\text{CH}_2)_m\text{COOH}$, 其中 m 为 1-6 的任何整数, n 为 2-12 的任何整数,例如可购自 Peptides International, Inc. (Louisville, KY) 的 8-氨基-3,6-二氧杂辛酸。

[0492] 在其中胰高血糖素相关肽是第 1 类、第 2 类或第 3 类胰高血糖素相关肽的一些实施方案中,间隔基是亲水双官能间隔基。在某些实施方案中,与第 1 类、第 2 类或第 3 类胰

高血糖素相关肽连接的亲水双官能间隔基包含两个或更多个反应基,例如胺、羟基、巯基和羧基或其任何组合。在某些实施方案中,与第1类、第2类或第3类胰高血糖素相关肽连接的亲水双官能间隔基包含羟基和羧基。在其它实施方案中,与第1类、第2类或第3类胰高血糖素相关肽连接的亲水双官能间隔基包含胺基和羧基。在其它实施方案中,与第1类、第2类或第3类胰高血糖素相关肽连接的亲水双官能间隔基包含巯基和羧基。

[0493] 在一些实施方案中,与第1类、第2类或第3类胰高血糖素相关肽连接的间隔基是疏水双官能间隔基。在某些实施方案中,与第1类、第2类或第3类胰高血糖素相关肽连接的疏水双官能间隔基包含两个或更多个反应基,例如胺、羟基、巯基和羧基或其任何组合。在某些实施方案中,与第1类、第2类或第3类胰高血糖素相关肽连接的疏水双官能间隔基包含羟基和羧基。在其它实施方案中,与第1类、第2类或第3类胰高血糖素相关肽连接的疏水双官能间隔基包含胺基和羧基。在其它实施方案中,与第1类、第2类或第3类胰高血糖素相关肽连接的疏水双官能间隔基包含巯基和羧基。包含羧基和羟基或巯基的合适的疏水双官能间隔基是本领域已知的,包括例如 8-羟基辛酸和 8-巯基辛酸。

[0494] 在其中胰高血糖素相关肽是第1类、第2类或第3类胰高血糖素相关肽的具体实施方案中,间隔基(例如氨基酸、二肽、三肽、亲水双官能间隔基或疏水双官能间隔基)长度为 3-10 个原子(例如 6-10 个原子(例如 6、7、8、9 或 10 个原子))。在更具体的实施方案中,与第1类、第2类或第3类胰高血糖素相关肽连接的间隔基的长度为约 3-10 个原子(例如 6-10 个原子),且烷基为 C12-C18 烷基,例如 C14 烷基、C16 烷基,使得间隔基和烷基的总长度为 14-28 个原子,例如约 14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27 或 28 个原子。在其中胰高血糖素相关肽是第1类、第2类或第3类胰高血糖素相关肽的一些实施方案中,间隔基和烷基的长度为 17-28(例如 19-26、19-21) 个原子。

[0495] 按照其中胰高血糖素相关肽是第1类、第2类或第3类胰高血糖素相关肽的某些前述实施方案,双官能间隔基可以是合成或非天然存在的氨基酸,其包含长为 3-10 个原子的氨基酸主链(例如 6-氨基己酸、5-氨基戊酸、7-氨基庚酸和 8-氨基辛酸)。或者,与第1类、第2类或第3类胰高血糖素相关肽连接的间隔基可以是具有长度为 3-10 个原子(例如 6-10 个原子)的肽主链的二肽或三肽间隔基。与第1类、第2类或第3类胰高血糖素相关肽连接的二肽或三肽间隔基可由天然存在的和/或非天然存在的氨基酸组成,所述氨基酸包括例如本文教导的任何氨基酸。在其中胰高血糖素相关肽是第1类、第2类或第3类胰高血糖素相关肽的一些实施方案中,间隔基包含总的负电荷,例如包含一个或两个带负电荷的氨基酸。在其中胰高血糖素相关肽是第1类、第2类或第3类胰高血糖素相关肽的一些实施方案中,二肽间隔基选自: α -Ala-Ala、 β -Ala- β -Ala、Leu-Leu、Pro-Pro、 γ -氨基丁酸- γ -氨基丁酸和 γ -Glu- γ -Glu。在一些实施方案中,二肽间隔基不是 γ -Glu- γ -Glu。

[0496] 通过胺、羟基和巯基使肽烷基化的合适方法是本领域已知的。例如,可采用威廉逊醚合成法(Williamson ether synthesis)在胰高血糖素相关肽和烷基之间形成醚键。同样,肽与烷基卤的亲核取代反应可产生醚、硫醚或氨基键中的任一种。

[0497] 烷基化胰高血糖素相关肽的烷基可以是任何大小,例如任何长度的碳链,并且可以是直链或支链。在本发明的一些实施方案中,烷基是 C4-C30 烷基。例如,烷基可以是 C4 烷基、C6 烷基、C8 烷基、C10 烷基、C12 烷基、C14 烷基、C16 烷基、C18 烷基、C20 烷基、C22 烷基、C24 烷基、C26 烷基、C28 烷基或 C30 烷基中的任一种。在一些实施方案中,烷基是 C8-C20

烷基,例如 C14 烷基或 C16 烷基。

[0498] 在一些具体实施方案中,烷基包含胆汁酸类固醇部分,例如胆酸、鹅脱氧胆酸、脱氧胆酸、石胆酸、牛磺胆酸、甘氨酸胆酸和胆固醇酸。

[0499] 在其中胰高血糖素相关肽是第 1 类、第 2 类或第 3 类胰高血糖素相关肽的本发明的一些实施方案中,通过使亲核长链烷烃与胰高血糖素相关肽反应来修饰胰高血糖素相关肽以包含烷基,其中胰高血糖素相关肽包含适于亲核取代的离去基团。在其中胰高血糖素相关肽是第 1 类、第 2 类或第 3 类胰高血糖素相关肽的具体方面,长链烷烃的亲核基团包括胺、羟基或巯基(例如十八胺、十四醇和十六硫醇)。第 1 类、第 2 类或第 3 类胰高血糖素相关肽的离去基团可以是氨基酸侧链的组成部分,或者可以是肽主链的组成部分。合适的离去基团包括例如 N-羟基琥珀酰亚胺、卤素和磺酸酯。

[0500] 在某些实施方案中,通过使亲核长链烷烃与连接胰高血糖素相关肽的间隔基反应来修饰第 1 类、第 2 类或第 3 类胰高血糖素相关肽以包含烷基,其中间隔基包含离去基团。在其中胰高血糖素相关肽是第 1 类、第 2 类或第 3 类胰高血糖素相关肽的具体方面,长链烷烃包含胺、羟基或巯基。在其中胰高血糖素相关肽是第 1 类、第 2 类或第 3 类胰高血糖素相关肽的某些实施方案中,包含离去基团的间隔基可以是本文论述的任何间隔基,例如还包含合适离去基团的氨基酸、二肽、三肽、亲水双官能间隔基和疏水双官能间隔基。

[0501] 有关其中胰高血糖素相关肽是第 1 类、第 2 类或第 3 类胰高血糖素相关肽且长链烷烃被胰高血糖素相关肽或间隔基烷基化的本发明的这些方面,长链烷烃可为任何大小,并且可包含任何碳链长度。长链烷烃可以是直链或支链。在某些方面,长链烷烃是 C4-C30 烷烃。例如长链烷烃可以是 C4 烷烃、C6 烷烃、C8 烷烃、C10 烷烃、C12 烷烃、C14 烷烃、C16 烷烃、C18 烷烃、C20 烷烃、C22 烷烃、C24 烷烃、C26 烷烃、C28 烷烃或 C30 烷烃中的任一种。在其中胰高血糖素相关肽是第 1 类、第 2 类或第 3 类胰高血糖素相关肽的一些实施方案中,长链烷烃包含 C8-C20 烷烃,例如 C14 烷烃、C16 烷烃或 C18 烷烃。

[0502] 同样,在其中胰高血糖素相关肽是第 1 类、第 2 类或第 3 类胰高血糖素相关肽的一些实施方案中,烷基化可发生在胰高血糖素相关肽和胆固醇部分之间。例如,胆固醇的羟基可置换长链烷烃上的离去基团以形成胆固醇-胰高血糖素肽产物。

[0503] 可对本文所述的烷基化胰高血糖素相关肽进行进一步修饰以包含亲水部分。在一些具体实施方案中,亲水部分可包含聚乙二醇(PEG)链。亲水部分的掺入可通过任何合适的方法完成,例如本文所述的任何方法。在这个方面,烷基化胰高血糖素相关肽可包含 SEQ ID NO:701,或包含一种或多种本文所述的氨基酸修饰的该序列的修饰氨基酸序列,其中 10、20、24 和 29 位(按照野生型胰高血糖素的氨基酸编号)上的至少一个氨基酸包含烷基,16、17、21、24 和 29 位上的至少一个氨基酸、C 端突出端内的位置或 C 端氨基酸被修饰成 Cys、Lys、Orn、高半胱氨酸或 Ac-Phe,并且氨基酸的侧链与亲水部分(例如 PEG)共价结合。在一些实施方案中,烷基任选通过包含 Cys、Lys、Orn、高半胱氨酸或 Ac-Phe 的间隔基与 10 位(按照野生型胰高血糖素的氨基酸编号)连接,并且亲水部分掺入 24 位的 Cys 残基上。

[0504] 或者,烷基化胰高血糖素相关肽可包含间隔基,其中间隔基既是烷基化的,又被修饰成包含亲水部分。合适间隔基的非限制性实例包括含有一个或多个选自 Cys、Lys、Orn、高半胱氨酸和 Ac-Phe 的氨基酸的间隔基。

[0505] α 螺旋结构的稳定性

[0506] 在一些实施方案中,在 2 个氨基酸侧链间形成分子内桥以稳定胰高血糖素相关肽的羧基端部分(例如氨基酸 12-29(按照野生型胰高血糖素的氨基酸编号))的三维结构。2 个氨基酸侧链可通过氢键合、离子相互作用(例如形成盐桥)或通过共价键彼此连接。

[0507] 在一些实施方案中,在相距 3 个氨基酸的 2 个氨基酸之间形成分子内桥,例如, i 和 $i+4$ 位上的氨基酸,其中 i 为按照野生型胰高血糖素的氨基酸编号的 12 和 25 之间的任何整数(例如 12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24 和 25)。更具体地讲,按照野生型胰高血糖素的氨基酸编号,12 和 16、16 和 20、20 和 24 或 24 和 28 的氨基酸对(其中 $i = 12$ 、16、20 或 24 的氨基酸对)的侧链彼此连接,从而稳定胰高血糖素 α 螺旋。或者 i 可为 17。

[0508] 在其中在 i 和 $i+4$ 位上的氨基酸通过分子内桥连接的一些具体实施方案中,接头的大小为约 8 个原子或约 7-9 个原子。

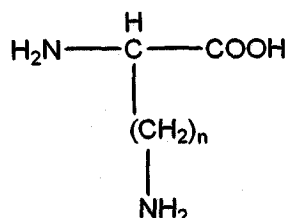
[0509] 在其它实施方案中,在相距 2 个氨基酸的 2 个氨基酸之间形成分子内桥,例如,在 j 和 $j+3$ 位上的氨基酸,其中 j 为按照野生型胰高血糖素的氨基酸编号在 12 和 26 之间的任何整数(例如 12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25 和 26)。在一些具体实施方案中, j 为 17。

[0510] 在其中在 j 和 $j+3$ 位上的氨基酸通过分子内桥连接的一些具体实施方案中,接头的大小为约 6 个原子,或约 5-7 个原子。

[0511] 在又一些实施方案中,在相距 6 个氨基酸的 2 个氨基酸之间形成分子内桥,例如,在 k 和 $k+7$ 位上的氨基酸,其中 k 为按照野生型胰高血糖素的氨基酸编号的 12 和 22 之间的任何整数(例如 12、13、14、15、16、17、18、19、20、21 和 22)。在一些具体实施方案中, k 为 12、13 或 17。在一个示例性的实施方案中, k 为 17。

[0512] 能够共价结合形成 6- 原子连接桥的氨基酸配对的实例包括 Orn 和 Asp、Glu 和式 I 氨基酸(其中 n 为 2)、高谷氨酸和式 I 氨基酸(其中 n 为 1),其中式 I 为:

[0513]



其中 $n = 1-4$

[式 I]

[0514] 能够共价结合形成 7- 原子连接桥的氨基酸配对的实例包括 Orn-Glu(内酰胺环)、Lys-Asp(内酰胺)或高丝氨酸-高谷氨酸(内酯)。可形成 8- 原子接头的氨基酸配对的实例包括 Lys-Glu(内酰胺)、高赖氨酸-Asp(内酰胺)、Orn-高谷氨酸(内酰胺)、4-氨基 Phe-Asp(内酰胺)或 Tyr-Asp(内酯)。可形成 9- 原子接头的氨基酸配对的实例包括高赖氨酸-Glu(内酰胺)、Lys-高谷氨酸(内酰胺)、4-氨基 Phe-Glu(内酰胺)或 Tyr-Glu(内酯)。这些氨基酸的任何侧链还可被其它化学基团取代,只要 α 螺旋的三维结构不被破坏。本领域普通技术人员可以预期能够产生具有类似大小和所需效果的稳定结构的备选配对或备选氨基酸类似物,包括化学修饰衍生物。例如高半胱氨酸-高半胱氨酸二硫桥长为 6 个原子,且可被进一步修饰以提供所需效果。即使无共价键,上述氨基酸配对或本领域普通

技术人员可以预期的类似配对,也可通过非共价键(例如形成盐桥或氢键相互作用)为 α 螺旋提供额外的稳定性。

[0515] 内酰胺环的大小可随氨基酸侧链的长度而改变,而在一些实施方案中,通过赖氨酸氨基酸的侧链与谷氨酸侧链连接形成内酰胺。进一步的示例性实施方案(按照野生型胰高血糖素的氨基酸编号)包括任选具有内酰胺桥的下列配对:12 位上的 Glu 与 16 位上的 Lys、12 位上的天然 Lys 与 16 位上的 Glu、16 位上的 Glu 与 20 位上的 Lys、16 位上的 Lys 与 20 位上的 Glu、20 位上的 Glu 与 24 位上的 Lys、20 位上的 Lys 与 24 位上的 Glu、24 位上的 Glu 与 28 位上的 Lys、24 位上的 Lys 与 28 位上的 Glu。或者,内酰胺环中的酰胺键的顺序可以反转(例如内酰胺环可在 Lys12 和 Glu16 的侧链之间或者在 Glu12 和 Lys16 之间形成)。

[0516] 可以利用内酰胺桥以外的分子内桥稳定胰高血糖素相关肽的 α 螺旋。在一些实施方案中,分子内桥为疏水桥。在这种情况下,分子内桥任选介于作为胰高血糖素相关肽 α 螺旋疏水面的组成部分的 2 个氨基酸的侧链间。例如,由疏水桥连接的氨基酸之一可以是 10、14 和 18 位(按照野生型胰高血糖素的氨基酸编号)上的氨基酸。

[0517] 在一个具体方面,利用全烃交联系统,采用烯烃复分解使胰高血糖素相关肽的 α 螺旋的一个或两个转角交联。在这种情况下,胰高血糖素相关肽可包含这样的 α -甲基化氨基酸,其携带不同长度的烯烃侧链并且在 i 和 $i+4$ 位或 $i+7$ 位排列成 R 或 S 立体化学结构。例如,烯烃侧可包含 $(CH_2)_n$,其中 n 为 1-6 之间的任何整数。在一些实施方案中,对于 8 个原子长的交联, n 为 3。本领域记载了形成这类分子内桥的合适方法。参见例如 Schafmeister 等, *J. Am. Chem. Soc.* 122 :5891-5892(2000) 和 Walensky 等, *Science* 305 :1466-1470(2004)。或者,胰高血糖素肽可包含邻近螺旋转角的 O-烯丙基 Ser 残基,其通过钨催化的闭环复分解桥接在一起。这种交联方法参见例如 Blackwell 等, *Angew. Chem., Int. Ed.* 37 :3281-3284(1998)。

[0518] 在另一个具体的方面,非天然硫代二丙氨酸(thio-dialanine)氨基酸、羊毛硫氨酸(其被广泛用作胱氨酸的肽模拟物)的使用,被用来交联 α 螺旋的一个转角。基于羊毛硫氨酸的环化的合适方法是本领域已知的。参见例如 Matteucci 等, *Tetrahedron Letters* 45 :1399-1401(2004);Mayer 等, *J. Peptide Res.* 51 :432-436(1998);Polinsky 等, *J. Med. Chem.* 35 :4185-4194(1992);Osapay 等, *J. Med. Chem.* 40 :2241-2251(1997);Fukase 等, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* 65 :2227-2240(1992);Harpp 等, *J. Org. Chem.* 36 :73-80(1971);Goodman 和 Shao, *Pure Appl. Chem.* 68 :1303-1308(1996);及 Osapay 和 Goodman, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* 1599-1600(1993)。

[0519] 在一些实施方案中,位于 i 和 $i+7$ 位上的 2 个 Glu 残基之间的 α, ω -二氨基烷烃连接物(tether)(例如 1,4-二氨基丙烷和 1,5-二氨基戊烷)用来稳定胰高血糖素肽的 α 螺旋。这类连接物导致长为 9 个原子以上的桥的形成,这取决于二氨基烷烃连接物的长度。本领域记载了产生与这类连接物交联的肽的合适方法。参见例如 Phelan 等, *J. Am. Chem. Soc.* 119 :455-460(1997)。

[0520] 在本发明的又一个实施方案中,使用二硫桥使胰高血糖素相关肽的 α 螺旋的一个或两个转角交联。或者,其中一个或两个硫原子被亚甲基置换而导致等排大环化的修饰二硫桥,被用来稳定胰高血糖素相关肽的 α 螺旋。用二硫桥或基于硫的环化修饰肽的合

适方法参见例如 Jackson 等, J. Am. Chem. Soc. 113 :9391-9392(1991) 和 Rudinger 和 Jost, Experientia 20 :570-571(1964)。

[0521] 在又一个实施方案中,胰高血糖素相关肽的 α 螺旋通过金属原子与位于 i 和 $i+4$ 位的 2 个 His 残基或 His 和 Cys 对结合而稳定。金属原子可以是例如 Ru(III)、Cu(II)、Zn(II) 或 Cd(II)。基于金属结合稳定 α 螺旋的这类方法是本领域已知的。参见例如 Andrews 和 Tabor, Tetrahedron 55 :11711-11743(1999); Ghadiri 等, J. Am. Chem. Soc. 112 :1630-1632(1990); 以及 Ghadiri 等, J. Am. Chem. Soc. 119 :9063-9064(1997)。

[0522] 胰高血糖素相关肽的 α 螺旋或者可以通过肽环化的其它方法而稳定,所述方法见综述 Davies, J. Peptide. Sci. 9 :471-501(2003)。 α 螺旋可通过形成酰胺桥、硫醚桥、硫酯桥、脲桥、氨基甲酸酯桥、磺酰胺桥等而稳定。例如,可在 C 端和 Cys 残基的侧链之间形成硫酯桥。或者,可通过具有巯基(Cys)和羧酸(例如 Asp、Glu)的氨基酸的侧链形成硫酯。在另一种方法中,交联剂(例如软木酸(辛二酸)等二羧酸)可在氨基酸侧链的 2 个官能团(例如游离氨基、羟基、巯基及其组合)之间引入连接。

[0523] 按照一些实施方案,通过将疏水氨基酸掺入 i 和 $i+4$ 位来稳定胰高血糖素相关肽的 α 螺旋。例如, i 可为 Tyr, $i+4$ 可为 Val 或 Leu; i 可为 Phe, $i+4$ 可为 Cys 或 Met; i 可为 Cys, $i+4$ 可为 Met; 或者 i 可为 Phe, $i+4$ 可为 Ile。应当理解的是,对于本文的目的,上述氨基酸配对可以反过来,使得 i 位上给出的氨基酸或者可位于 $i+4$ 位上,而 $i+4$ 氨基酸则可位于 i 位上。

[0524] 按照本发明的其它实施方案,其中胰高血糖素相关肽是具有胰高血糖素激动剂活性、GIP 激动剂活性、胰高血糖素拮抗剂和 GLP-1 活性的肽,通过在胰高血糖素相关肽的 C 端部分(根据野生型胰高血糖素氨基酸的编号,在氨基酸 12-29 的附近)掺入(通过氨基酸取代或插入)一个或多个稳定 α 螺旋的氨基酸,来稳定 α 螺旋。在一个具体的实施方案中,稳定 α 螺旋的氨基酸为 α , α -双取代氨基酸,包括但不限于以下中的任一种:氨基异丁酸(AIB)、被选自甲基、乙基、丙基和正丁基的相同或不同基团取代或者被环辛烷或环庚烷(例如 1-氨基环辛烷-1-甲酸)双取代的氨基酸。在一些实施方案中,在胰高血糖素相关肽 16、17、18、19、20、21、24 或 29 位中的 1、2、3、4 或更多个位置被 α , α -双取代氨基酸取代。在一个具体的实施方案中,16、20、21 和 24 位中的 1、2、3 个或全部被 AIB 取代。

[0525] 缀合物

[0526] 本公开内容还包括缀合物,其中胰高血糖素相关肽(例如第 1 类胰高血糖素相关肽、第 2 类胰高血糖素相关肽、第 3 类胰高血糖素相关肽、第 4 类胰高血糖素相关肽或第 5 类胰高血糖素相关肽)任选通过共价结合并任选通过接头与缀合物部分连接。可通过共价化学键、物理力如静电、氢、离子、范德瓦尔斯或疏水或亲水相互作用来实现连接。还可以采用各种非共价偶联系统,包括生物素-抗生物素蛋白、配体/受体、酶/底物、核酸/核酸结合蛋白、脂质/脂质结合蛋白、细胞黏着分子配偶体;或任何结合配偶体或其彼此具有亲和力的片段。

[0527] 胰高血糖素相关肽可经由使肽的靶定氨基酸残基与有机衍生化剂反应而通过直接共价连接与缀合物部分连接,所述有机衍生化剂能够与这些靶定氨基酸的所选侧链或者 N 端或 C 端残基反应。肽或缀合物部分上的反应基包括例如醛、氨基、酯、巯基、 α -卤代乙酰基、马来酰亚胺基或肼基。衍生化剂包括例如马来酰亚胺基苯甲酰基磺基琥珀酰亚胺酯

(通过半胱氨酸残基缀合)、N-羟基琥珀酰亚胺(通过赖氨酸残基)、戊二醛、琥珀酸酐或本领域已知的其它衍生剂。或者,缀合物部分可通过中间载体例如多糖或多肽载体与肽间接连接。多糖载体的实例包括氨基葡聚糖。合适多肽载体的实例包括聚赖氨酸、聚谷氨酸、聚天冬氨酸、其共聚物和这些氨基酸和其它氨基酸(例如丝氨酸)的混合聚合物,以在所得的负载载体上提供所需要的溶解度性质。

[0528] 最常见的是将半胱氨酰基残基与 α -卤代乙酸酯(和相应的胺)(例如氯乙酸或氯乙酰胺)反应,得到羧甲基衍生物或羧基酰胺基甲基衍生物。半胱氨酰基残基还通过与以下试剂反应而衍生化:溴三氟丙酮、 α -溴- β -(5-咪唑基)丙酸、氯乙酰基磷酸(chloroacetyl phosphate)、N-烷基马来酰亚胺、3-硝基-2-吡啶基二硫化物、甲基 2-吡啶基二硫化物、对氟汞苯甲酸、2-氯汞-4-硝基酚或氯-7-硝基苯并-2-噁-1,3-二唑。

[0529] 通过在 pH 5.5-7.0 下与焦碳酸二乙酯反应来衍生化组氨酰基残基,因为这种试剂对组氨酰基侧链相对具有特异性。还可使用对溴苯甲酰甲基溴;该反应优选在 pH 6.0 下于 0.1M 二甲胂酸钠中进行。

[0530] 使赖氨酰基和氨基端残基与琥珀酸酐或其它羧酸酐反应。用这些试剂的衍生化具有逆转赖氨酰基残基的电荷的作用。用于衍生化含有 α -氨基的残基的其它合适试剂包括亚氨酸酯,例如甲基吡啶亚胺甲酯、磷酸吡哆醛、吡哆醛、氯硼氢化物(chloroborohydride)、三硝基苯磺酸、邻甲基异脲、2,4-戊二酮和转氨酶催化的与乙醛酸的反应。

[0531] 通过与一种或若干种常用试剂(其中有苯乙二醛、2,3-丁二酮、1,2-环己二酮和茚三酮)反应,来修饰精氨酰基残基。精氨酸残基的衍生化需要该反应在碱性条件下进行,因为胍官能团的 pK_a 高。此外,这些试剂可与赖氨酸的基团以及精氨酸 ϵ -氨基反应。

[0532] 可对酪氨酰基残基进行特异修饰,其中特别关注的是通过与芳族重氮化合物或四硝基甲烷反应而将光谱标记引入酪氨酰基残基。N-乙酰基咪唑和四硝基甲烷分别最常用于形成 O-乙酰基酪氨酰基类和 3-硝基衍生物。

[0533] 通过与碳二亚胺($R-N=C=N-R'$)反应而选择性地修饰羧基侧基(天冬氨酰基或谷氨酰基),其中 R 和 R' 为不同的烷基,例如 1-环己基-3-(2-吗啉基-4-乙基)碳二亚胺或 1-乙基-3-(4-氮鎓-4,4-二甲基戊基)碳二亚胺。此外,天冬氨酰基和谷氨酰基残基通过与铵离子反应而转化成天冬酰胺和谷氨酰胺残基。

[0534] 其它修饰包括脯氨酸和赖氨酸的羟基化、丝氨酰基或苏氨酰基残基的羟基的磷酸化、赖氨酸、精氨酸和组氨酸侧链的 α -氨基的甲基化(T. E. Creighton, *Proteins: Structure and Molecular Properties*, W. H. Freeman & Co., San Francisco, 第 79-86 页(1983))、天冬酰胺或谷氨酰胺的脱酰胺基化、N 端胺的乙酰化和 / 或 C 端羧基的酰胺化或酯化。

[0535] 共价修饰的另一种类型包括使糖苷与肽化学或酶促偶联。糖可与 (a) 精氨酸和组氨酸, (b) 游离羧基, (c) 游离巯基(例如半胱氨酸的巯基), (d) 游离羟基(例如丝氨酸、苏氨酸或羟脯氨酸的游离羟基), (e) 芳族残基(例如酪氨酸或色氨酸的芳族残基)或 (f) 谷氨酰胺的酰胺基连接。这些方法可参见 1987 年 9 月 11 日公布的 W087/05330, 以及 Aplin 和 Wriston, *CRC Crit. Rev. Biochem.*, 第 259-306 页(1981)。

[0536] 可与本文所述的任何胰高血糖素相关肽连接的示例性缀合物部分包括但不限于

异源肽或多肽（包括例如血浆蛋白）、靶向剂，免疫球蛋白或其部分（例如可变区、CDR 或 Fc 区）、诊断标记（例如放射性同位素、荧光团或酶标记）、聚合物（包括水溶性聚合物）或其它治疗或诊断剂。在一些实施方案中，提供包含本发明的胰高血糖素相关肽和血浆蛋白的缀合物，其中血浆蛋白选自白蛋白、运铁蛋白、血纤蛋白原和球蛋白。在一些实施方案中，缀合物的血浆蛋白部分是白蛋白或运铁蛋白。在一些实施方案中，接头包含长为 1- 约 60 个原子、或 1-30 个原子或更长、2-5 个原子、2-10 个原子、5-10 个原子或 10-20 个原子的链。在一些实施方案中，链原子均为碳原子。在一些实施方案中，接头主链的链原子选自 C、O、N 和 S。可根据其预期的溶解性（亲水性）选择链原子和接头，以便提供更易溶解的缀合物。在一些实施方案中，接头提供受到存在于靶组织或器官或细胞中的酶或其它催化剂或水解条件的切割 / 裂解的官能团。在一些实施方案中，接头的长度足够长以降低位阻的可能性。如果接头是共价键或肽键且缀合物是多肽，则整个缀合物可以是融合蛋白。这类肽基接头可为任何长度。示例性接头的长度为约 1-50 个氨基酸、5-50、3-5、5-10、5-15 或 10-30 个氨基酸。或者，这类融合蛋白可通过本领域普通技术人员已知的重组遗传工程方法产生。

[0537] 如上所述，在一些实施方案中，胰高血糖素相关肽是缀合的，例如与免疫球蛋白或其部分（例如可变区、CDR 或 Fc 区）融合。已知的免疫球蛋白 (Ig) 类型包括 IgG、IgA、IgE、IgD 或 IgM。Fc 区为 Ig 重链的 C 端区，其负责与实现活性（例如环化（其导致半寿期延长）、依赖抗体的细胞毒性 (ADCC) 和依赖补体的细胞毒性 (CDC) 的 Fc 受体结合。

[0538] 例如，按照某些定义，人 IgG 重链 Fc 区从 Cys226 延伸到重链的 C 端。“铰链区”一般从人 IgG1 的 Glu216 延伸到 Pro230（其它 IgG 同种型的铰链区可通过比对参与半胱氨酸结合的半胱氨酸来与 IgG1 序列比对）。IgG 的 Fc 区包括 2 个恒定结构域 CH2 和 CH3。人 IgGFc 区的 CH2 结构域通常从氨基酸 231 延伸至氨基酸 341。人 IgG Fc 区的 CH3 结构域通常从氨基酸 342 延伸至 447。所提及的免疫球蛋白或免疫球蛋白片段或区的氨基酸编号，均以 Kabat 等, 1991, Sequences of Proteins of Immunological Interest, U. S. Department of Public Health, Bethesda, Md 为基础。在一个相关的实施方案中，Fc 区可包含一个或多个除 CH1 以外的免疫球蛋白重链的天然或修饰恒定区，例如 IgG 和 IgA 的 CH2 区和 CH3 区或 IgE 的 CH3 和 CH4 区。

[0539] 合适的缀合物部分包括包含 FcRn 结合位点的免疫球蛋白序列的部分。FcRn，一种补救受体 (salvage receptor)，负责环化免疫球蛋白并将其再输回血液循环中。根据 X 射线晶体学描述了结合 FcRn 受体的 IgG Fc 部分的区域 (Burmeister 等, 1994, Nature 372 : 379)。Fc 与 FcRn 的主要接触区域接近 CH2 和 CH3 结构域的连接处。Fc-FcRn 接触点均在单一 Ig 重链内。主要的接触位点包括 CH2 结构域的氨基酸残基 248、250-257、272、285、288、290-291、308-311 和 314 以及 CH3 结构域的氨基酸残基 385-387、428 和 433-436。

[0540] 一些缀合物部分可包括或不包括 Fc γ R 结合位点。Fc γ R 负责 ADCC 和 CDC。与 Fc γ R 直接接触的 Fc 区内位置的实例为氨基酸 234-239（下铰链区）、氨基酸 265-269（B/C 环）、氨基酸 297-299（C' /E 环）和氨基酸 327-332（F/G）环 (Sondermann 等, Nature 406 : 267-273, 2000)。IgE 的下铰链区也涉及 FcRI 结合 (Henry 等, Biochemistry 36, 15568-15578, 1997)。参与 IgA 受体结合的残基参见 Lewis 等 (J Immunol. 175 : 6694-701, 2005)。参与 IgE 受体结合的氨基酸残基参见 Sayers 等 (J Biol Chem. 279(34) : 35320-5, 2004)。

[0541] 可对免疫球蛋白的 Fc 区进行氨基酸修饰。这类变体 Fc 区在 Fc 区的 CH3 结构域（残基 342-447）中包含至少一个氨基酸修饰和 / 或在 Fc 区的 CH2 结构域（残基 231-341）中包含至少一个氨基酸修饰。据信赋予 FcRn 增加的亲和力的突变包括 T256A、T307A、E380A 和 N434A (Shields 等, 2001, J. Biol. Chem. 276 :6591)。其它突变可降低 Fc 区与 Fc γ RI、Fc γ RIIA、Fc γ RIIB 和 / 或 Fc γ RIIIA 的结合而又不显著降低对 FcRn 的亲和力。例如, Fc 区 297 位的 Asn 被 Ala 或其它氨基酸取代剔除了十分保守的 N-糖基化位点, 并可导致免疫原性降低同时 Fc 区的半寿期延长, 以及与 Fc γ R 的结合降低 (Routledge 等, 1995, Transplantation 60 :847; Friend 等, 1999, Transplantation 68 :1632; Shields 等, 1995, J. Biol. Chem. 276 :6591)。可进行降低与 Fc γ R 结合的 IgG1 的 233-236 位的氨基酸修饰 (Ward 和 Ghetie, 1995, Therapeutic Immunology 2 :77 以及 Armour 等, 1999, Eur. J. Immunol. 29 :2613)。一些示例性的氨基酸取代可参见美国专利 7,355,008 和 7,381,408, 各自通过引用以其整体结合到本文中。

[0542] rPEG

[0543] 在一些实施方案中, 本发明的缀合物包含胰高血糖素超家族肽, 包括与辅助肽融合的胰高血糖素相关肽、骨钙蛋白以及上述生物活性肽的类似物、衍生物和缀合物, 所述辅助肽能够形成类似于化学 PEG (例如重组 PEG (rPEG) 分子) 的延伸构象, 例如国际专利申请公布号 WO2009/023270 和美国专利申请公布号 US2008/0286808 中描述的辅助肽。rPEG 分子不是聚乙二醇。在一些方面, rPEG 分子是包含一个或多个甘氨酸、丝氨酸、谷氨酸、天冬氨酸、丙氨酸或脯氨酸的多肽。在一些方面, rPEG 是均聚物, 例如聚甘氨酸、聚丝氨酸、聚谷氨酸、聚天冬氨酸、聚丙氨酸或聚脯氨酸。在其它实施方案中, rPEG 包含重复的两种类型的氨基酸, 例如聚 (Gly-Ser)、聚 (Gly-Glu)、聚 (Gly-Ala)、聚 (Gly-Asp)、聚 (Gly-Pro)、聚 (Ser-Glu) 等。在一些方面, rPEG 包含三种不同类型的氨基酸, 例如聚 (Gly-Ser-Glu)。在具体的方面, rPEG 延长胰高血糖素超家族肽或骨钙蛋白的半寿期。在一些方面, rPEG 包含净的正电荷或净的负电荷。在一些方面, rPEG 缺乏二级结构。在一些实施方案中, rPEG 的长度大于或等于 10 个氨基酸, 而在一些实施方案中, 长度为约 40- 约 50 个氨基酸。在一些方面, 辅助肽通过肽键或蛋白酶切割位点与本发明肽的 N 端或 C 端融合, 或者插入本发明肽的环中。在一些方面, rPEG 包含亲和和标签或与大于 5kDa 的 PEG 连接。在一些实施方案中, rPEG 赋予本发明肽增加的流体动力学半径、血清半寿期、蛋白酶抗性 or 溶解度, 而在一些方面赋予该肽降低的免疫原性。

[0544] 融合肽 -C 端突出端

[0545] 在某些实施方案中, 胰高血糖素相关肽可包含包括但不限于以下的 C 端或 C 端氨基酸序列 :COOH、CONH₂、GPSSGAPPPS (SEQ ID NO :710)、GPSSGAPPPS-CONH₂ (SEQ ID NO :711)、泌酸调节肽羧基端突出端、KRNRRNIA (SEQ ID NO :714) 或 KGKKNWKNITQ (SEQ ID NO :713)。例如, 毒蜥外泌肽 -4 末端 10 个氨基酸 (即 SEQ ID NO :710 (GPSSGAPPPS) 的序列), 与本公开内容的第 1 类胰高血糖素相关肽、第 2 类胰高血糖素相关肽、第 3 类胰高血糖素相关肽、第 4 类胰高血糖素相关肽或第 5 类胰高血糖素相关肽的羧基端连接。

[0546] 引起体重减轻的另一种化合物是泌酸调节肽, 一种存在于小肠中的天然存在的消化激素 (参见 Diabetes 2005 ;54 :2390-2395)。泌酸调节肽是一种 37 个氨基酸的肽 (SEQ ID NO :706), 含有胰高血糖素的 29 个氨基酸序列接着 SEQ ID NO :714 (KRNRRNIA) 的 8- 氨

基羧基端突出端。因此,在一些实施方案中,提供还包含 SEQ ID NO:714 序列的羧基端突出端或具有序列 KRNR 的 4-氨基酸突出端的胰高血糖素相关肽的前药衍生物。

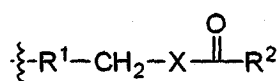
[0547] 3 位的胰高血糖素修饰

[0548] 可对本文所述的第 1-3 类的胰高血糖素相关肽的 3 位(按照野生型胰高血糖素的氨基酸编号)进行修饰以保持或提高对胰高血糖素受体的活性。

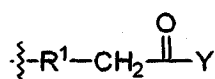
[0549] 在其中胰高血糖素相关肽是第 1 类、第 2 类或第 3 类胰高血糖素相关肽的一些实施方案中,对胰高血糖素受体活性的保持或提高可通过用谷氨酰胺类似物修饰 3 位的 Gln 来实现。例如在 3 位包含谷氨酰胺类似物的第 1 类、第 2 类或第 3 类胰高血糖素相关肽对胰高血糖素受体的活性,可显示为天然胰高血糖素 (SEQ ID NO:701) 活性的约 5%、约 10%、约 20%、约 50% 或约 85% 或更多。在一些实施方案中,在 3 位包含谷氨酰胺类似物的第 1 类、第 2 类或第 3 类胰高血糖素相关肽对胰高血糖素受体的活性,可显示为除 3 位的修饰氨基酸以外与包含谷氨酰胺类似物的肽具有相同氨基酸序列 () 的相应胰高血糖素肽活性的约 20%、约 50%、约 75%、约 100%、约 200% 或约 500% 或更多。在一些实施方案中,在 3 位上包含谷氨酰胺类似物的第 1 类、第 2 类或第 3 类胰高血糖素相关肽对胰高血糖素受体的活性提高,但是提高的活性小于天然胰高血糖素或以下相应胰高血糖素相关肽的活性的 1000%、10,000%、100,000% 或 1,000,000%,所述相应胰高血糖素相关肽除 3 位的修饰氨基酸以外与包含谷氨酰胺类似物的肽具有相同氨基酸序列。

[0550] 在一些实施方案中,谷氨酰胺类似物是包含以下结构 I、II 或 III 的侧链的天然存在的或非天然存在的氨基酸:

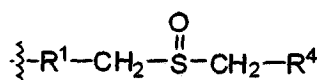
[0551]



结构 I



结构 II



结构 III

[0552] 其中 R^1 为 C_{0-3} 烷基或 C_{0-3} 杂烷基; R^2 为 NHR^4 或 C_{1-3} 烷基; R_3 为 C_{1-3} 烷基; R^4 为 H 或 C_{1-3} 烷基; X 为 NH、O 或 S; 而 Y 为 NHR^4 、 SR^3 或 OR^3 。在一些实施方案中, X 为 NH 或 Y 为 NHR^4 。在一些实施方案中, R^1 为 C_{0-2} 烷基或 C_1 杂烷基。在一些实施方案中, R^2 为 NHR^4 或 C_1 烷基。在一些实施方案中, R^4 为 H 或 C^1 烷基。在其中胰高血糖素相关肽是第 1 类、第 2 类或第 3 类胰高血糖素相关肽的示例性实施方案中,提供包含结构 I 的侧链的氨基酸,其中, R^1 为 CH_2-S , X 为 NH, R^2 为 CH_3 (乙酰氨基甲基-半胱氨酸, C(Acm)); R^1 为 CH_2 , X 为 NH, R^2 为 CH_3 (乙酰基二氨基丁酸, Dab(Ac)); R^1 为 C_0 烷基, X 为 NH, R^2 为 NHR^4 , R^4 为 H (氨基甲酰基二氨基丙酸, Dap(脲)); 或者 R^1 为 CH_2-CH_2 , X 为 NH, R^2 为 CH_3 (乙酰基鸟氨酸, Orn(Ac))。在示例性的实施方案中,提供包含结构 II 的侧链的氨基酸,其中 R^1 为 CH_2 , Y 为 NHR^4 , R_4 为 CH_3 (甲基谷氨酰胺, Q(Me)); 在示例性的实施方案中,提供包含结构 III 的侧链的氨基酸,其中 R^1 为 CH_2 ,

R⁴ 为 H(甲硫氨酸 - 亚砷, M(O)); 在具体实施方案中, 3 位的氨基酸被 Dab(Ac) 取代。

[0553] 二聚体

[0554] 对于第 1 类、第 2 类和第 3 类胰高血糖素相关肽, 胰高血糖素相关肽可以是包含至少 2、3 或更多种通过接头结合的肽的二聚体、三聚体或更高级次的多聚体的组成部分, 其中至少一种或两种肽是胰高血糖素相关肽。二聚体可以是同二聚体或异二聚体。在一些实施方案中, 接头选自双官能巯基交联剂和双官能胺交联剂。在某些实施方案中, 接头是 PEG, 例如 5kDa PEG、20kDa PEG。在一些实施方案中, 接头是二硫键。例如, 二聚体的每个单体可包含 Cys 残基 (例如位于末端或内部的 Cys), 且每个 Cys 残基的硫原子都参与二硫键的形成。在本发明的一些方面, 单体通过末端氨基酸 (例如 N 端或 C 端)、通过内部氨基酸或通过至少一个单体的末端氨基酸和至少一个其它单体的内部氨基酸连接。在具体的方面, 单体不通过 N 端氨基酸连接。在一些方面, 多聚体的单体以“尾对尾 (tail-to-tail)”的方向连接在一起, 其中每个单体的 C 端氨基酸连接在一起。缀合物部分可与本文所述任何胰高血糖素相关肽 (包括二聚体、三聚体或更高级次的多聚体) 共价连接。

[0555] 胰高血糖素相关肽的制备方法

[0556] 本文公开的胰高血糖素相关肽 (及前药) 可通过标准合成方法、重组 DNA 技术或制备肽和融合蛋白的任何其它方法制备。虽然通过标准重组 DNA 技术无法表达某些非天然氨基酸, 但其制备技术是本领域已知的。除标准肽化学反应以外, 适用时, 包含非肽部分的本发明化合物可通过标准有机化学反应合成。

[0557] 下面详细描述了胰高血糖素相关肽的类别。根据上文详述的前药化合物的胰高血糖素相关肽部分 (Q), 描述了有关涉及第 1、2、3、4 和 5 类胰高血糖素相关肽修饰的公开内容的各个部分。因此, 根据胰高血糖素相关肽类别描述的结构元件是 Q 的结构元件, 然后对其进行进一步的修饰以产生如上所述的前药化合物。

[0558] 第 1 类胰高血糖素相关肽

[0559] 在某些实施方案中, 胰高血糖素相关肽是第 1 类胰高血糖素相关肽, 其描述于本文以及国际专利申请号 PCT US2009/47437 (2009 年 6 月 16 日提交)、国际专利申请公布号 WO 2008/086086 (2008 年 7 月 17 日公布) 和美国临时申请号 61/090, 415 描述的, 这些文献的内容通过引用以其整体结合到本文中。

[0560] 以下部分提及的有关第 1 类胰高血糖素相关肽的生物序列 (SEQ ID NO:801-915) 相当于国际专利申请号 PCT US2009/47437 的 SEQ ID NO:1-115。

[0561] 活性

[0562] 第 1 类胰高血糖素肽相对于天然胰高血糖素肽 (SEQ ID NO:801) 保持胰高血糖素受体活性。例如, 胰高血糖素肽可保持天然胰高血糖素活性的至少 10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、75% 活性、80% 活性、85% 活性或 90% (按胰高血糖素肽对比胰高血糖素的 EC₅₀ 的反比例计算, 例如采用实施例 5 中概述的测定法通过 cAMP 产生来测量)。在一些实施方案中, 与胰高血糖素相比, 第 1 类胰高血糖素相关肽具有相同和较大的活性 (按与本文术语“效价”相同的含义使用)。在一些实施方案中, 本文所述胰高血糖素肽的活性不超过天然胰高血糖素肽活性的约 100%、1000%、10,000%、100,000% 或 1,000,000%。

[0563] 当例如采用实施例 5 的测定法测定过表达胰高血糖素受体的 HEK293 细胞中诱导的 cAMP 时, 本文所述的任何第 1 类胰高血糖素相关肽对人胰高血糖素受体显示的 EC₅₀ 可

为约 100nM、75nM、50nM、40nM、30nM、20nM、10nM、5nM、1nM 或更小。通常与未聚乙二醇化肽相比,聚乙二醇化肽可具有较高的 EC₅₀。例如,本文所述的第 1 类胰高血糖素相关肽当未聚乙二醇化时,对胰高血糖素受体显示的活性可为天然胰高血糖素 (SEQ ID NO:801) 对胰高血糖素受体的活性的至少 20% (例如至少 30%、至少 40%、至少 50%、至少 60%、至少 75%、至少 80%、至少 90%、至少 95%、至少 98%、至少 99%、100%、150%、200%、400%、500% 或更多)。在某些实施方案中,在缺乏亲水部分时,本文所述的第 1 类胰高血糖素相关肽显示天然胰高血糖素对胰高血糖素受体的标示活性%,但是在包含亲水部分时,显示降低的天然胰高血糖素对胰高血糖素受体的活性%。例如,本文所述的第 1 类胰高血糖素相关肽在聚乙二醇化时,显示对胰高血糖素受体的活性可以是天然胰高血糖素活性的至少 2% (例如至少 3%、至少 4%、至少 5%、至少 6%、至少 7%、至少 8%、至少 9% 或至少 10%。在一些实施方案中,本文所述的第 1 类胰高血糖素相关肽可具有任何上述标示活性,但不超过天然胰高血糖素对胰高血糖素受体的活性的 1000%、10,000%、100,000% 或 1,000,000%。

[0564] 在一些实施方案中,第 1 类胰高血糖素相关肽显示对 GLP-1 受体的活性小于天然 GLP-1 的约 5%、4%、3%、2% 或 1%,和 / 或对胰高血糖素受体的选择性为对 GLP-1 受体的约 5 倍、10 倍或 15 倍。例如,在一些实施方案中,第 1 类胰高血糖素相关肽显示对 GLP-1 受体的活性小于天然 GLP-1 的 5%,并且对胰高血糖素受体的选择性为对 GLP-1 受体的 5 倍。

[0565] 改进的溶解性

[0566] 天然胰高血糖素在水溶液中,特别是在生理 pH 下溶解性差,随时间推移而趋于聚集和沉淀。相比之下,在 pH 6 和 8 之间或 6 和 9 之间 (例如在 pH 7 下) 于 25°C 24 小时后,与天然胰高血糖素相比,第 1 类胰高血糖素相关肽在一些实施方案中具有至少 2 倍、5 倍或甚至更高的溶解性。

[0567] 因此,在一些实施方案中,与 His-Ser-Gln-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Lys-Tyr-Leu-Asp-Ser-Arg-Arg-Ala-Gln-Asp-Phe-Val-Gln-Trp-Leu-Met-Asn-Thr (SEQ ID NO:801) 的野生型肽相比,第 1 类胰高血糖素相关肽被修饰以改进在水溶液中、特别是在 pH 约 5.5- 约 8.0 范围内肽的溶解性,同时保持天然肽的生物活性。

[0568] 例如,通过将亲水部分与肽连接,可进一步改进本文所述的任何第 1 类胰高血糖素相关肽的溶解性。这类基团的引入还延长作用持续时间,例如正如通过循环半寿期延长所测得的一样。本文对亲水部分进行了进一步的描述。

[0569] 用带电荷的残基修饰

[0570] 在一些实施方案中,通过用选自赖氨酸、精氨酸、组氨酸、天冬氨酸和谷氨酸的带电荷的氨基酸取代天然未带电荷的氨基酸,或者通过将带电荷的氨基酸添加至肽的氨基端或羧基端,而向第 1 类胰高血糖素相关肽中增加电荷来提高溶解性。

[0571] 按照一些实施方案,由于以下事实所致第 1 类胰高血糖素相关肽具有改进的溶解性,所述事实即通过将带电荷的氨基酸引入肽的 C 端部分 (在一些实施方案中为 SEQ ID NO:801 的 27 位 C 端的位置) 的氨基酸取代和 / 或添加,来修饰肽。任选可将 1、2 或 3 个带电荷的氨基酸引入 C 端部分内,在一些实施方案中引入 C 端至 27 位。按照一些实施方案,28 和 / 或 29 位的天然氨基酸被带电荷的氨基酸取代,和 / 或将 1-3 个带电荷的氨基酸例如在 27 位、28 或 29 位后加到肽的 C 端。在示例性的实施方案中,1、2、3 个或所有带电荷的氨基酸带有负电荷。在其它实施方案中,1、2、3 个或所有带电荷的氨基酸带有正电荷。

[0572] 在具体的示例性实施方案中,第1类胰高血糖素相关肽可包含任一种或两种以下的修饰:N28被E取代;N28被D取代;T29被D取代;T29被E取代;在27、28或29位后插入E;在27、28或29位后插入D。例如D28E29、E28E29、E29E30、E28E30、D28E30。

[0573] 按照一个示例性的实施方案,第1类胰高血糖素相关肽包含SEQ ID NO:811的氨基酸序列或其类似物,该类似物与天然胰高血糖素或其胰高血糖素激动剂类似物相比,含有1-3个另外的氨基酸修饰(本文针对胰高血糖素激动剂所述的)。SEQ ID NO:811表示修饰的第1类胰高血糖素相关肽,其中天然蛋白质28位上的天冬酰胺残基被天冬氨酸取代。在另一个示例性实施方案中,第1类胰高血糖素相关肽包含SEQ ID NO:838的氨基酸序列,其中天然蛋白质28位上的天冬酰胺残基被谷氨酸取代。其它示例性的实施方案包括SEQ ID NO:824、825、826、833、835、836和837的第1类胰高血糖素相关肽。

[0574] 用带电荷的氨基酸取代在28和/或29位上通常存在的氨基酸,和/或第1类胰高血糖素相关肽的羧基端添加1-2个带电荷的氨基酸,提高胰高血糖素肽在生理相关pH(即pH约6.5-约7.5)下在水溶液中的溶解性和稳定性达至少5倍和差不多30倍。因此,在约5.5和8之间的给定pH(例如pH7),在25℃下24小时后测量时,一些实施方案的第1类胰高血糖素肽保持胰高血糖素活性,并且相对于天然胰高血糖素显示至少2倍、5倍、10倍、15倍、25倍、30倍或更高的溶解性。

[0575] 可对第1类胰高血糖素相关肽进行仍使之保持胰高血糖素活性的其它修饰,例如保守取代,本文将进一步描述该修饰。

[0576] 改进的稳定性

[0577] 任何的第1类胰高血糖素肽另外可显示改进的稳定性和/或降低的降解,例如在25℃下24小时后保持至少95%的起始肽。在pH5.5-8的范围内,本文公开的任何第1类胰高血糖素相关肽另外可显示改进的稳定性,例如在25℃下24小时后,保持至少75%、80%、90%、95%、96%、97%、98%或99%的起始肽。在一些实施方案中,本发明的第1类胰高血糖素相关肽显示改进的稳定性,使得在至少20℃(例如21℃、22℃、23℃、24℃、25℃、26℃、至少27.5℃、至少30℃、至少35℃、至少40℃、至少50℃)和小于100℃、小于85℃、小于75℃或小于70℃的温度下,在溶液中约一周或多周(例如约2周、约4周、约1个月、约2个月、约4个月、约6个月、约8个月、约10个月、约12个月)后,通过紫外(UV)检测器在280nm下可检出至少75%(例如至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、大于95%、多达100%)的肽浓度或小于约25%(例如小于20%、小于15%、小于10%、小于5%、4%、3%、2%、1%、低至0%)的降解肽。第1类胰高血糖素相关肽可包括改变其药学性质的其它修饰,例如提高效价、延长循环半寿期、延长存放期、降低沉淀或聚集和/或减少降解,例如贮存后裂解或化学修饰的发生减少。

[0578] 在进一步的示例性实施方案中,可通过修饰SEQ ID NO:801的15位上的氨基酸对任何前述的第1类胰高血糖素相关肽进行另外修饰,以改进稳定性,从而降低肽尤其在酸性或碱性缓冲液中随时间发生的降解。在示例性的实施方案中,15位上的Asp被Glu、高谷氨酸、半胱磺酸或高半胱磺酸取代。

[0579] 或者,可通过修饰SEQ ID NO:801的16位上的氨基酸对本文所述的任何第1类胰高血糖素相关肽进行其它修饰以改进稳定性。在示例性的实施方案中,16位上的Ser被Thr或AIB取代,或本文所述的有关提高对胰高血糖素受体的效价的第1类胰高血糖素相关

肽的任何氨基酸取代。这类修饰降低在 Asp15-Ser16 之间的肽键的裂解。

[0580] 在一些实施方案中,可通过修饰 20、21、24 或 27 位上的任何 1、2、3 或全部 4 个氨基酸,来对本文所述的任何第 1 类胰高血糖素相关肽进行进一步修饰,以降低不同氨基酸位置上的降解。示例性的实施方案包括 20 位的 Gln 被 Ser、Thr、Ala 或 AIB 取代、21 位上的 Asp 被 Glu 取代、24 位的 Gln 被 Ala 或 AIB 取代、27 位上的 Met 被 Leu 或 Nle 取代。甲硫氨酸的除去或取代降低因甲硫氨酸氧化所引起的降解。Gln 或 Asn 的除去或取代降低因 Gln 或 Asn 的脱酰胺基化而引起的降解。Asp 的除去或取代,降低通过 Asp 脱水形成环状琥珀酰亚胺中间体接着异构化为异天冬氨酸而产生的降解。

[0581] 效价提高

[0582] 按照另一个实施方案,提供对胰高血糖素受体的效价提高的第 1 类胰高血糖素相关肽,其中所述肽包含天然胰高血糖素 (SEQ ID NO :801) 16 位上的氨基酸修饰。作为非限制性实例,可如下来提供这种提高的效价:通过用谷氨酸或用另一种具有长为 4 个原子的侧链的带负电荷的氨基酸、或谷氨酰胺、高谷氨酸或高半胱氨酸中的任一种、或具有含有至少一个杂原子(例如 N、O、S、P)的侧链且侧链长为约 4(或 3-5)个原子的带电荷的氨基酸,取代 16 位上的天然存在的丝氨酸。16 位上的丝氨酸被谷氨酸取代提高对胰高血糖素受体的胰高血糖素活性至少 2 倍、4 倍、5 倍和多达 10 倍以上。在一些实施方案中,第 1 类胰高血糖素相关肽相对于 GLP-1 受体保持对胰高血糖素受体的选择性,例如至少 5 倍、10 倍或 15 倍的选择性。

[0583] DPP-IV 抗性

[0584] 在一些实施方案中,在 1 或 2 位对本文所公开的第 1 类胰高血糖素肽进行进一步修饰以降低对被二肽基肽酶 IV 切割的敏感性。更具体地讲,在一些实施方案中,第 1 类胰高血糖素相关肽的 1 位和 / 或 2 位被本文所述的 DPP-IV 抗性氨基酸取代。在一些实施方案中,类似物肽的 2 位被氨基异丁酸取代。在一些实施方案中,类似物肽的 2 位被选自 D-丝氨酸、D-丙氨酸、甘氨酸、N-甲基丝氨酸和 ϵ -氨基丁酸的氨基酸取代。在另一个实施方案中,第 1 类胰高血糖素相关肽的 2 位被选自 D-丝氨酸、甘氨酸和氨基异丁酸的氨基酸取代。在一些实施方案中,2 位上的氨基酸不是 D-丝氨酸。

[0585] 在对胰高血糖素肽 1 位和 / 或 2 位上的氨基酸修饰时降低的胰高血糖素活性,可通过稳定胰高血糖素肽 C 端部分中的 α 螺旋结构(氨基酸 12-29 附近)而恢复。正如本文进一步描述的一样,可通过例如形成共价或非共价分子内桥(例如“i”和“i+4”位氨基酸侧链间的内酰胺桥,其中 i 为 12-25 的整数)、12-29 位附近的氨基酸被 α 螺旋稳定性氨基酸(例如 α , α -二取代氨基酸)取代和 / 或插入,来稳定 α 螺旋结构。

[0586] 3 位上的修饰

[0587] 可通过氨基酸 3 位(按照野生型胰高血糖素的氨基酸编号)的修饰,例如 3 位天然存在的谷氨酰胺被酸性、碱性或疏水氨基酸取代,来降低胰高血糖素受体活性。例如 3 位被谷氨酸、鸟氨酸或正亮氨酸取代大大降低或破坏胰高血糖素受体活性。

[0588] 如本文所述,可通过用谷氨酰胺类似物修饰 3 位上的 Gln,实现对胰高血糖素受体活性保持或提高。例如,胰高血糖素激动剂可包含 SEQ ID NO :863、SEQ ID NO :869、SEQ ID NO :870、SEQ ID NO :871、SEQ ID NO :872、SEQ ID NO :873 和 SEQ ID NO :874 的氨基酸序列。

[0589] 用 C 端酰胺和酯提高 GLP-1 活性

[0590] 用电中性基团（例如酰胺或酯）置换 C 端氨基酸的羧酸，来提供增加的对 GLP-1 受体活性。相反地，保留肽 C 端的天然羧酸保持第 1 类胰高血糖素相关肽对胰高血糖素受体相比于对 GLP-1 受体相对较高的选择性（例如前者是后者的约 5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19 或 20 倍）。

[0591] 其它修饰和组合

[0592] 可对第 1 类胰高血糖素相关肽进行其它修饰，这可进一步提高溶解性和 / 或稳定性和 / 或胰高血糖素活性。第 1 类胰高血糖素相关肽还可包含基本上不影响溶解性或稳定性且基本上不降低胰高血糖素活性的其它修饰。在示例性的实施方案中，与天然胰高血糖素序列相比，第 1 类胰高血糖素相关肽可包含共多达 11、或多达 12、或多达 13、或多达 14 个氨基酸修饰。例如，可在 2、5、7、10、11、12、13、14、17、18、19、20、21、24、27、28 或 29 位中的任一个上进行保守或非保守取代、添加或缺失。

[0593] 第 1 类胰高血糖素相关肽的示例性修饰包括但不限于：

[0594] (a) 非保守取代、保守取代、添加或缺失，同时保持至少部分胰高血糖素激动剂活性，例如 2、5、7、10、11、12、13、14、16、17、18、19、20、21、24、27、28 或 29 位中的一个或多个上的保守取代；10 位上的 Tyr 被 Val 或 Phe 取代；12 位上的 Lys 被 Arg 取代；这些位置的一个或多个被 Ala 取代；

[0595] (b) 29 和 / 或 28 位和任选 27 位上的氨基酸缺失，同时保持至少部分胰高血糖素激动剂活性；

[0596] (c) 15 位上的天冬氨酸的修饰，例如被谷氨酸、高谷氨酸、半胱磺酸或高半胱磺酸取代，这可降低降解；或 16 位上的丝氨酸的修饰，例如被苏氨酸、AIB、谷氨酸的取代，或被另一种具有长为 4 个原子的侧链的带负电荷的氨基酸，或者被谷氨酰胺、高谷氨酸或高半胱磺酸中的任一个取代，这同样可降低因 Asp15-Ser16 键裂解而引起的降解；

[0597] (d) 如本文所述，例如在 16、17、20、21、24、29、40 位上或在 C 端氨基酸上添加亲水部分（例如水溶性聚合物聚乙二醇），这可提高溶解性和 / 或延长半寿期；

[0598] (e) 27 位上的甲硫氨酸的修饰，例如通过用亮氨酸或正亮氨酸取代而降低氧化降解；

[0599] (f) 20 或 24 位的 Gln 的修饰，例如通过用 Ser、Thr、Ala 或 AIB 取代来降低通过 Gln 的脱酰胺基化而产生的降解；

[0600] (g) 21 位上的 Asp 的修饰，例如通过用 Glu 取代而降低通过 Asp 的脱水形成环状琥珀酰亚胺中间体接着异构化为异天冬氨酸而产生的降解；

[0601] (h) 如本文所述改进对 DPP-IV 切割的抗性的 1 或 2 位上的修饰，任选与分子内桥组合，例如“i”和“i+4”位之间的内酰胺桥，其中 i 为 12-25 的整数，例如 12、16、20、24；

[0602] (i) 如本文所述使胰高血糖素肽酰化或烷基化，这可提高对胰高血糖素受体和 / 或 GLP-1 受体的活性，延长循环中的半寿期和 / 或延长作用持续时间和 / 或延迟起效，任选与加入亲水部分组合，另外或备选地，任选与选择性降低对 GLP-1 肽的活性的修饰组合，例如 7 位上的 Thr 的修饰，例如 7 位上的 Thr 被缺乏羟基的氨基酸（例如 Abu 或 Ile）取代；缺失氨基酸 C 端至 27 位上的氨基酸（例如缺失 28 和 29 位的一个或两个氨基酸，产生长为 27 或 28 个氨基酸的肽）；

- [0603] (j) 本文所述的 C 端突出端；
- [0604] (k) 本文所述的同二聚化或异二聚化；和
- [0605] (a)-(k) 的组合。
- [0606] 在一些实施方案中，第 1 类胰高血糖素相关肽的示例性修饰包括至少一种选自 A 组的氨基酸修饰和一种或多种选自 B 组和 / 或 C 组的氨基酸修饰，
- [0607] 其中 A 组为：
- [0608] 28 位上的 Asn 被带电荷的氨基酸取代；
- [0609] 28 位上的 Asn 被选自 Lys、Arg、His、Asp、Glu、半胱磺酸和高半胱磺酸的带电荷的氨基酸取代；
- [0610] 在 28 位上被 Asn、Asp 或 Glu 取代；
- [0611] 在 28 位上被 Asp 取代；
- [0612] 在 28 位上被 Glu 取代；
- [0613] 29 位上的 Thr 被带电荷的氨基酸取代；
- [0614] 29 位上的 Thr 被选自 Lys、Arg、His、Asp、Glu、半胱磺酸和高半胱磺酸的带电荷的氨基酸取代；
- [0615] 在 29 位上被 Asp、Glu 或 Lys 取代；
- [0616] 在 29 位上被 Glu 取代；
- [0617] 在 29 位之后插入 1-3 个带电荷的氨基酸；
- [0618] 在 29 位之后插入 Glu 或 Lys；
- [0619] 在 29 位之后插入 Gly-Lys 或 Lys-Lys；
- [0620] 或其组合；
- [0621] 其中 B 组为：
- [0622] 15 位上的 Asp 被 Glu 取代；
- [0623] 16 位上的 Ser 被 Thr 或 AIB 取代；
- [0624] 和其中 C 组为：
- [0625] 1 位上的 His 被降低胰高血糖素肽对被二肽基肽酶 IV (DPP-IV) 切割的敏感性的非天然氨基酸取代，
- [0626] 2 位上的 Ser 被降低胰高血糖素肽对被二肽基肽酶 IV (DPP-IV) 切割的敏感性的非天然氨基酸的取代，
- [0627] 12 位上的 Lys 被 Arg 取代；
- [0628] 20 位上的 Gln 被 Ser、Thr、Ala 或 AIB 取代；
- [0629] 21 位上的 Asp 被 Glu 取代；
- [0630] 24 位上的 Gln 被 Ser、Thr、Ala 或 AIB 取代；
- [0631] 27 位上的 Met 被 Leu 或 Nle 取代；
- [0632] 27-29 位上的氨基酸的缺失；
- [0633] 28-29 位上的氨基酸的缺失；
- [0634] 29 位上的氨基酸的缺失；
- [0635] 或其组合。
- [0636] 在示例性的实施方案中，12 位上的 Lys 被 Arg 取代。在其它示例性的实施方案中，

29 和 / 或 28 位、且任选 27 位上的氨基酸缺失。

[0637] 在一些具体实施方案中,胰高血糖素肽包含 (a) 赋予 DPP-IV 抗性的 1 和 / 或 2 位上的氨基酸修饰,例如在 1 位被 DMIA 取代,或在 2 位被 AIB 取代, (b) 12-29 位内 (例如 16 和 20 位) 的分子内桥,或 16、20、21 和 24 位上的氨基酸被 α , α -二取代氨基酸的一次或多次取代,任选 (c) 例如通过 24、29 位上的 Cys 或 C 端氨基酸与亲水部分 (例如 PEG) 连接,任选 (d) 在 27 位上用例如 Nle 取代 Met 的氨基酸修饰,任选 (e) 20、21 和 24 位上降低降解的氨基酸修饰,以及任选 (f) 与 SEQ ID NO:820 连接。在某些实施方案中,如果胰高血糖素肽与 SEQ ID NO:820 连接,则 29 位上的氨基酸是 Thr 或 Gly。在其它具体实施方案中,胰高血糖素肽包含 (a) Asp28Glu29、或 Glu28Glu29、或 Glu29Glu30、或 Glu28Glu30 或 Asp28Glu30, 和任选 (b) 16 位上用例如 Thr 或 AIB 取代 Ser 的氨基酸修饰,和任选 (c) 27 位上用例如 Nle 取代 Met 的氨基酸修饰,和任选 (d) 20、21 和 24 位上降低降解的氨基酸修饰。在一个具体实施方案中,胰高血糖素肽是 T16、A20、E21、A24、Nle27、D28、E29。

[0638] 在一些实施方案中,第 1 类胰高血糖素相关肽包含以下氨基酸序列:

[0639] X1-X2-Gln-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Lys-Tyr-Leu-Asp-Ser-Arg-Arg-Ala-Gln-Asp-Phe-Val-Gln-Trp-Leu-Met-Z (SEQ ID NO:839), 其中具有 1-3 个氨基酸修饰,

[0640] 其中 X1 和 / 或 X2 是降低胰高血糖素肽对被二肽基肽酶 IV (DPP-IV) 切割的敏感性 (或增加对二肽基肽酶 IV 的抗性) 的非天然氨基酸,

[0641] 其中 Z 选自 -COOH (天然存在的 C 端羧基)、-Asn-COOH、Asn-Thr-COOH 和 Y-COOH, 其中 Y 为 1-2 个氨基酸,和

[0642] 其中分子内桥 (优选共价键) 连接 i 位上的氨基酸和 i+4 位上的氨基酸的侧链, 其中 i 为 12、16、20 或 24。

[0643] 在一些实施方案中,分子内桥是内酰胺桥。在一些实施方案中,SEQ ID NO:839 的 i 和 i+4 位上的氨基酸是 Lys 和 Glu,例如 Glu16 和 Lys20。在一些实施方案中,X1 选自: D-His、N-甲基-His、 α -甲基-His、咪唑乙酸、脱氨基-His、羟基-His、乙酰基-His、高组氨酸和 α , α -二甲基咪唑乙酸 (DMIA)。在其它实施方案中,X2 选自: D-Ser、D-Ala、Gly、N-甲基-Ser、Val 和 α -氨基异丁酸 (AIB)。在一些实施方案中,胰高血糖素肽在 16、17、20、21、24、29、40 位上、C 端突出端内的任何氨基酸或 C 端氨基酸处与亲水部分共价连接。在示例性的实施方案中,该亲水部分与这些位置任一个的 Lys、Cys、Orn、高半胱氨酸或乙酰基-苯丙氨酸残基共价连接。示例性的亲水部分包括例如分子量为约 1,000 道尔顿-约 40,000 道尔顿或约 20,000 道尔顿-约 40,000 道尔顿的聚乙二醇 (PEG)。

[0644] 在其它实施方案中,第 1 类胰高血糖素相关肽包含下列氨基酸序列:

[0645] X1-X2-Gln-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Lys-Tyr-Leu-Asp-Ser-Arg-Arg-Ala-Gln-Asp-Phe-Val-Gln-Trp-Leu-Met-Z (SEQ ID NO:839),

[0646] 其中 X1 和 / 或 X2 是降低胰高血糖素肽对被二肽基肽酶 IV (DPP-IV) 切割的敏感性 (或增加对二肽基肽酶 IV 的抗性) 的非天然氨基酸,

[0647] 其中胰高血糖素肽 16、20、21 和 24 位中的 1、2、3、4 或更多个被 α , α -二取代氨基酸取代,和

[0648] 其中 Z 选自 -COOH (天然存在的 C 端羧基)、-Asn-COOH、Asn-Thr-COOH 和 Y-COOH,

其中 Y 为 1-2 个氨基酸。

[0649] 前述第 1 类胰高血糖素相关肽或类似物的示例性的其它氨基酸修饰包括 7 位上的 Thr 被缺乏羟基的氨基酸（例如氨基丁酸（Abu）、Ile）取代，任选组合包含与酰基或烷基共价连接（任选通过间隔基）的侧链的氨基酸的取代或添加（所述酰基或烷基对天然存在的氨基酸来说是非天然的），12 位上的 Lys 被 Arg 取代；15 位上的 Asp 被 Glu 取代；16 位上的 Ser 被 Thr 或 AIB 取代；20 位上的 Gln 被 Ser、Thr、Ala 或 AIB 取代；21 位上的 Asp 被 Glu 取代；24 位上的 Gln 被 Ser、Thr、Ala 或 AIB 取代；27 位上的 Met 被 Leu 或 Nle 取代；28 位上的 Asn 被带电荷的氨基酸取代；28 位上的 Asn 被选自 Lys、Arg、His、Asp、Glu、半胱磺酸和高半胱磺酸的带电荷的氨基酸取代；在 28 位上被 Asn、Asp 或 Glu 取代；在 28 位上被 Asp 取代；在 28 位上被 Glu 取代；29 位上的 Thr 被带电荷的氨基酸取代；29 位上的 Thr 被选自 Lys、Arg、His、Asp、Glu、半胱磺酸和高半胱磺酸的带电荷的氨基酸取代；在 29 位上被 Asp、Glu 或 Lys 取代；在 29 位上被 Glu 取代；在 29 位之后插入 1-3 个带电荷的氨基酸；在 30 位上（即在 29 位后）插入 Glu 或 Lys；任选具有 Lys 在 31 位的插入；SEQ ID NO:820 添加至 C 端，任选其中 29 位上的氨基酸是 Thr 或 Gly；共价连接亲水部分的氨基酸的取代或添加；或其组合。

[0650] 提高胰高血糖素受体活性、保持部分胰高血糖素受体活性、提高溶解性、提高稳定性或降低降解的提及第 1 类胰高血糖素激动剂的上述任何修饰，可单独或组合用于第 1 类胰高血糖素肽。因此，可制备以下第 1 类胰高血糖素相关肽，其保持至少 20% 天然胰高血糖素对胰高血糖素受体的活性，并且在 pH 介于 6 和 8 或介于 6 和 9 之间（例如 pH 7）在至少 1mg/mL 的浓度下是可溶解的，以及任选在 25℃ 下 24 小时后保持至少 95% 的起始肽（例如 5% 或更少的起始肽被降解或切割）。或者可制备高效价第 1 类胰高血糖素肽，其显示天然胰高血糖素对胰高血糖素受体的活性的至少约 100%、125%、150%、175%、200%、250%、300%、350%、400%、450%、500%、600%、700%、800%、900% 或 10 倍以上，并且任选在 pH 介于 6 和 8 或介于 6 和 9 之间（例如 pH 7）在至少 1mg/mL 的浓度下是可溶解的，以及任选在 25℃ 下 24 小时后保持至少 95% 的起始肽（例如 5% 或更少的起始肽被降解或切割）。在一些实施方案中，本文所述第 1 类胰高血糖素肽可对胰高血糖素受体显示至少任何所示的相对活性水平但不超过天然胰高血糖素对胰高血糖素受体的活性的 10,000%、100,000% 或 1,000,000%。

[0651] 第 1 类胰高血糖素相关肽实施方案的实例

[0652] 按照一些实施方案，通过 28 和 / 或 29 位上的天然氨基酸被带负电荷的氨基酸（例如天冬氨酸或谷氨酸）取代、任选添加带负电荷的氨基酸（例如天冬氨酸或谷氨酸）至肽的羧基端，来修饰 SEQ ID NO:801 的天然胰高血糖素肽。在一个备选的实施方案中，通过 29 位上的天然氨基酸被带正电荷的氨基酸（例如赖氨酸、精氨酸或组氨酸）取代、任选添加一个或两个带正电荷的氨基酸（例如赖氨酸、精氨酸或组氨酸）至肽的羧基端，来修饰 SEQ ID NO:801 的天然胰高血糖素肽。按照一些实施方案，提供溶解性和稳定性得到提高的胰高血糖素类似物，其中所述类似物包含 SEQ ID NO:834 的氨基酸序列，前提条件是 28 或 29 位上的至少一个氨基酸被酸性氨基酸取代和 / 或另外的酸性氨基酸被加至 SEQ ID NO:834 的羧基端上。在一些实施方案中，酸性氨基酸独立选自 Asp、Glu、半胱磺酸和高半胱磺酸。

[0653] 按照一些实施方案，提供溶解性和稳定性得到提高的胰高血糖素激动剂，其中所

述激动剂包含 SEQ ID NO :833 的氨基酸序列,其中 27、28 或 29 位上的至少一个氨基酸被非天然氨基酸残基取代(即存在于所述类似物 27、28 或 29 位上的至少一个氨基酸是不同于存在于 SEQ ID NO :801 相应位置上的氨基酸的酸性氨基酸)。按照一些实施方案,提供包含 SEQ ID NO :833 的序列的胰高血糖素激动剂,前提条件是如果 28 位上的氨基酸是天冬酰胺且 29 位上的氨基酸是苏氨酸,则肽还包含添加至胰高血糖素肽的羧基端的 1-2 个独立选自 Lys、Arg、His、Asp 或 Glu 的氨基酸。

[0654] 据报告,可修饰天然胰高血糖素肽的某些位置而同时保持至少一些母体肽的活性。因此,本申请人预期,位于 SEQ ID NO :811 肽的 2、5、7、10、11、12、13、14、16、17、18、19、20、21、24、27、28 或 29 位上的一个或多个氨基酸,可被不同于天然胰高血糖素肽中存在的氨基酸取代,并仍保持母体胰高血糖素肽的增加的效价、生理 pH 稳定性和生物活性。例如,按照一些实施方案,将存在于天然肽 27 位上的甲硫氨酸残基更换成亮氨酸或正亮氨酸以防止肽的氧化降解。

[0655] 在一些实施方案中,提供 SEQ ID NO :833 的胰高血糖素类似物,其中 1-6 个选自该类似物的 1、2、5、7、10、11、12、13、14、16、17、18、19、20、21 或 24 位上的氨基酸不同于 SEQ ID NO :801 的相应氨基酸。按照另一个实施方案,提供 SEQ ID NO :833 的胰高血糖素类似物,其中 1-3 个选自该类似物的 1、2、5、7、10、11、12、13、14、16、17、18、19、20、21 或 24 位上的氨基酸不同于 SEQ ID NO :801 的相应氨基酸。在另一个实施方案中,提供 SEQ ID NO :807、SEQ ID NO :808 或 SEQ ID NO :834 的胰高血糖素类似物,其中 1-2 个选自该类似物的 1、2、5、7、10、11、12、13、14、16、17、18、19、20、21 或 24 位上的氨基酸不同于 SEQ ID NO :801 的相应氨基酸,而在又一个实施方案中,与天然序列(SEQ ID NO :801)中存在的氨基酸相比,这 1-2 个不同的氨基酸表示保守氨基酸取代。在一些实施方案中,提供 SEQ ID NO :811 或 SEQ ID NO :813 的胰高血糖素肽,其中该胰高血糖素肽还包含 1、2 或 3 个在选自 2、5、7、10、11、12、13、14、16、17、18、19、20、21、24、27 或 29 的位置上的氨基酸取代。在一些实施方案中,2、5、7、10、11、12、13、14、16、17、18、19、20、27 或 29 位上的取代是保守氨基酸取代。

[0656] 在一些实施方案中,提供包含 SEQ ID NO :801 的类似物肽的胰高血糖素激动剂,其中所述类似物因 2 位上的氨基酸不是丝氨酸且因酸性氨基酸取代了 28 或 29 位上的天然氨基酸或者酸性氨基酸被加至 SEQ ID NO :801 的肽的羧基端,而不同于 SEQ ID NO :801。在一些实施方案中,酸性氨基酸是天冬氨酸或谷氨酸。在一些实施方案中,提供 SEQ ID NO :809、SEQ ID NO :812、SEQ ID NO :813 或 SEQ ID NO :832 的胰高血糖素类似物,其中所述类似物因 2 位上的取代而不同于母体分子。更具体地讲,该类似物肽的 2 位被选自 D-丝氨酸、丙氨酸、D-丙氨酸、甘氨酸、n-甲基丝氨酸和氨基异丁酸的氨基酸取代。

[0657] 在另一个实施方案中,提供包含 SEQ ID NO :801 的类似物肽的胰高血糖素激动剂,其中所述类似物因 1 位上的氨基酸不是丝氨酸且因酸性氨基酸取代了 28 或 29 位上的天然氨基酸或者酸性氨基酸被加至 SEQ ID NO :801 的肽的羧基端上,而不同于 SEQ ID NO :801。在一些实施方案中,酸性氨基酸是天冬氨酸或谷氨酸。在一些实施方案中,提供 SEQ ID NO :809、SEQ ID NO :812、SEQ ID NO :813 或 SEQ ID NO :832 的胰高血糖素类似物,其中该类似物因 1 位上的取代而不同于母体分子。更具体地讲,该类似物肽的 1 位被选自 DMIA、D-组氨酸、脱氨基组氨酸、羟基-组氨酸、乙酰基-组氨酸和高组氨酸的氨基酸取代。

[0658] 按照一些实施方案,修饰的胰高血糖素肽包含选自 SEQ ID NO :809、SEQ ID NO :

812、SEQ ID NO:813 和 SEQ ID NO:832 的序列。在又一个实施方案中,提供包含 SEQ ID NO:809、SEQ ID NO:812、SEQ ID NO:813 或 SEQ ID NO:832 的序列的胰高血糖素肽,该序列还包含 1-2 个加至 SEQ ID NO:809、SEQ ID NO:812、SEQ ID NO:813 或 SEQ ID NO:832 的 C 端的氨基酸,其中额外的氨基酸独立选自 Lys、Arg、His、Asp、Glu、半胱氨酸或高半胱氨酸。在一些实施方案中,加至羧基端的额外氨基酸选自 Lys、Arg、His、Asp 或 Glu,或者在又一个实施方案中,额外的氨基酸是 Asp 或 Glu。

[0659] 在另一个实施方案中,胰高血糖素肽包含 SEQ ID NO:7 的序列或其胰高血糖素激动剂类似物。在一些实施方案中,肽包含选自 SEQ ID NO:808、SEQ ID NO:810、SEQ ID NO:811、SEQ ID NO:812 和 SEQ ID NO:813 的序列。在另一个实施方案中,肽包含选自 SEQ ID NO:808、SEQ ID NO:810 和 SEQ ID NO:811 的序列。在一些实施方案中,胰高血糖素肽包含 SEQ ID NO:808、SEQ ID NO:810 和 SEQ ID NO:811 的序列,该序列还包含加至胰高血糖素肽 C 端的选自 Asp 和 Glu 的额外氨基酸。在一些实施方案中,胰高血糖素肽包含 SEQ ID NO:811 或 SEQ ID NO:813 的序列,而在又一个实施方案中,胰高血糖素肽包含 SEQ ID NO:811 的序列。

[0660] 按照一些实施方案,提供包含选自以下的修饰胰高血糖素肽的胰高血糖素激动剂:

[0661] $\text{NH}_2\text{-His-Ser-Gln-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Lys-Tyr-Leu-Xaa-Ser-Arg-Arg-Ala-Gln-Asp-Phe-Val-Gln-Trp-Leu-Xaa-Xaa-Xaa-R}$ (SEQ ID NO:834)、

[0662] $\text{NH}_2\text{-His-Ser-Gln-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Lys-Tyr-Leu-Asp-Ser-Arg-Arg-Ala-Gln-Asp-Phe-Val-Gln-Trp-Leu-Met-Asp-Thr-R}$ (SEQ ID NO:811) 和

[0663] $\text{NH}_2\text{-His-Ser-Gln-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Xaa-Tyr-Leu-Glu-Ser-Arg-Arg-Ala-Gln-Asp-Phe-Val-Gln-Trp-Leu-Met-Asp-Thr-R}$ (SEQ ID NO:813)

[0664] 其中 15 位上的 Xaa 为 Asp、Glu、半胱氨酸、高谷氨酸或高半胱氨酸,28 位上的 Xaa 为 Asn 或酸性氨基酸,29 位上的 Xaa 为 Thr 或酸性氨基酸,且 R 为酸性氨基酸、COOH 或 CONH_2 ,前提条件是酸性氨基酸残基存在于 28、29 或 30 位之一上。在一些实施方案中,R 为 COOH,而在另一个实施方案中,R 为 CONH_2 。

[0665] 本公开内容还包括胰高血糖素融合肽,其中第二肽与胰高血糖素肽的 C 端融合以提高胰高血糖素肽的稳定性和溶解性。更具体地讲,融合胰高血糖素肽可包含胰高血糖素激动剂类似物,该类似物包含胰高血糖素肽 $\text{NH}_2\text{-His-Ser-Gln-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Lys-Tyr-Leu-Xaa-Ser-Arg-Arg-Ala-Gln-Asp-Phe-Val-Gln-Trp-Leu-Xaa-Xaa-Xaa-R}$ (SEQ ID NO:834),其中 R 为酸性氨基酸或化学键和连接胰高血糖素肽的羧基端氨基酸的 SEQ ID NO:820(GPSSGAPPPS)、SEQ ID NO:821(KRNRNIA) 或 SEQ ID NO:822(KRNR) 的氨基酸序列。在一些实施方案中,胰高血糖素肽选自 SEQ ID NO:833、SEQ ID NO:807 或 SEQ ID NO:808,其还包含与胰高血糖素肽的羧基端氨基酸连接的 SEQ ID NO:820(GPSSGAPPPS)、SEQ ID NO:821(KRNRNIA) 或 SEQ ID NO:822(KRNR) 氨基酸序列。在一些实施方案中,胰高血糖素融合肽包含 SEQ ID NO:802、SEQ ID NO:803、SEQ ID NO:804、SEQ ID NO:805 和 SEQ ID NO:806 或其胰高血糖素激动剂类似物,其还包含与胰高血糖素肽的氨基酸 29 连接的 SEQ ID NO:820(GPSSGAPPPS)、SEQ ID NO:821(KRNRNIA) 或 SEQ ID NO:822(KRNR) 的氨基酸序列。按照一些实施方案,融合肽还包含与 16、17、21、24、29 位上、C 端突出端内的

氨基酸连接或在 C 端氨基酸上连接的 PEG 链,其中所述 PEG 链选自 500-40,000 道尔顿的范围。在一些实施方案中,SEQ ID NO:820(GPSSGAPPPS)、SEQ ID NO:821(KRNRNIA)或 SEQ ID NO:822(KRNR)的氨基酸序列通过肽键与胰高血糖素肽的氨基酸 29 结合。在一些实施方案中,胰高血糖素融合肽的胰高血糖素肽部分包含选自 SEQ ID NO:810、SEQ ID NO:811 和 SEQ ID NO:813 的序列。在一些实施方案中,胰高血糖素融合肽的胰高血糖素肽部分包含 SEQ ID NO:811 或 SEQ ID NO:813 的序列,其中 PEG 链分别在 21、24、29 位上、在 C 端突出端内或在 C 端氨基酸上连接。

[0666] 在另一个实施方案中,融合肽的胰高血糖素肽序列包含 SEQ ID NO:811 的序列,还包含与胰高血糖素肽的氨基酸 29 连接的 SEQ ID NO:820(GPSSGAPPPS)、SEQ ID NO:821(KRNRNIA)或 SEQ ID NO:822(KRNR)的氨基酸序列。在一些实施方案中,胰高血糖素融合肽包含选自 SEQ ID NO:824、SEQ ID NO:825 和 SEQ ID NO:826 的序列。通常本发明的融合肽可具有带有标准羧酸基的 C 端氨基酸。然而,还包括其中 C 端氨基酸具有取代羧酸的酰胺的那些序列的类似物作为实施方案。按照一些实施方案,融合胰高血糖素肽包含选自 SEQ ID NO:810、SEQ ID NO:811 和 SEQ ID NO:813 的胰高血糖素激动剂类似物,还包含与胰高血糖素肽氨基酸 29 连接的 SEQ ID NO:823(GPSSGAPPPS-CONH₂)的氨基酸序列。

[0667] 可进一步修饰本发明的胰高血糖素激动剂以提高肽在水溶液中的溶解性和稳定性并同时保持胰高血糖素肽的生物活性。按照一些实施方案,预期在一个或多个选自 SEQ ID NO:811 的肽或其胰高血糖素激动剂类似物的 16、17、20、21、24 和 29 位的位置上引入亲水基团,提高 pH 稳定胰高血糖素类似物的溶解性和稳定性。更具体地讲,在一些实施方案中,对 SEQ ID NO:810、SEQ ID NO:811、SEQ ID NO:813 或 SEQ ID NO:832 的胰高血糖素肽进行修饰以包含一个或多个与存在于胰高血糖素肽 21 和 24 位上的氨基酸侧链共价连接的亲水基团。

[0668] 按照一些实施方案,对 SEQ ID NO:811 的胰高血糖素肽进行修饰以含有一个或多个在 16、17、20、21、24 和 / 或 29 位上取代的氨基酸,其中天然氨基酸被具有适于与亲水部分(包括例如 PEG)交联的侧链的氨基酸取代。天然肽可被天然存在的氨基酸或合成的(非天然存在的)氨基酸取代。合成的或非天然存在的氨基酸是指不是体内天然存在的但仍然可掺入本文所述肽结构的氨基酸。

[0669] 在一些实施方案中,提供 SEQ ID NO:810、SEQ ID NO:811 或 SEQ ID NO:813 的胰高血糖素激动剂,其中对天然胰高血糖素肽序列进行修饰以在天然序列的 16、17、21、24、29 位的至少一个上、在 C 端突出端内或在 C 端氨基酸上含有天然存在的或合成的氨基酸,其中氨基酸取代物还包含亲水部分。在一些实施方案中,取代位于 21 或 24 位,而在又一个实施方案中,亲水部分是 PEG 链。在一些实施方案中,SEQ ID NO:811 的胰高血糖素肽被至少一个半胱氨酸残基取代,其中半胱氨酸残基的侧链被巯基反应试剂进一步修饰,所述试剂包括例如马来酰亚胺基、乙烯基砜、2-吡啶基巯基、卤代烷基和卤代酰基。这些巯基反应试剂可含有羧基、酮基、羟基和醚基以及其它亲水部分,例如聚乙二醇单元。在一个备选实施方案中,天然胰高血糖素肽被赖氨酸取代,并且使用胺反应试剂例如羧酸的活性酯(琥珀酰亚胺基、酐等)或亲水部分(例如聚乙二醇)的醛,对取代的赖氨酸残基的侧链进行进一步修饰。在一些实施方案中,胰高血糖素肽选自 SEQ ID NO:814、SEQ ID NO:815、SEQ ID NO:816、SEQ ID NO:817、SEQ ID NO:818 和 SEQ ID NO:819。

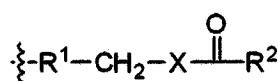
[0670] 按照一些实施方案,聚乙二醇化胰高血糖素肽包含两条或更多条与胰高血糖素肽共价结合的聚乙二醇链,其中胰高血糖素链的总分子量为约 1,000-约 5,000 道尔顿。在一些实施方案中,聚乙二醇化胰高血糖素激动剂包含 SEQ ID NO:806 的肽,其中 PEG 链与 21 位和 24 位上的氨基酸残基共价连接,且其中 2 条 PEG 链总的分子量为约 1,000-约 5,000 道尔顿。在另一个实施方案中,聚乙二醇化胰高血糖素激动剂包含 SEQ ID NO:806 的肽,其中 PEG 链与 21 位和 24 位上的氨基酸残基共价连接,且其中 2 条 PEG 链总的分子量为约 5,000-约 20,000 道尔顿。

[0671] 聚乙二醇链可呈直链的形式或可以是支链。按照一些实施方案,聚乙二醇链具有选自约 500-约 40,000 道尔顿的平均分子量。在一些实施方案中,聚乙二醇链具有选自约 500-约 5,000 道尔顿的分子量。在另一个实施方案中,聚乙二醇链的分子量为约 20,000-约 40,000 道尔顿。

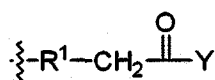
[0672] 可对任何上述胰高血糖素肽进行进一步修饰以胰高血糖素肽 C 端部分(氨基酸位置 12-29)内包含共价或非共价分子内桥或 α 螺旋稳定性氨基酸。按照一些实施方案,除在 16、20、21 或 24 位(或其组合)上被 α, α -二取代氨基酸(例如 AIB)的氨基酸取代以外,胰高血糖素肽还包含任一种或多种上述修饰。按照另一个实施方案,除胰高血糖素肽 16 和 20 位上的氨基酸的侧链间的分子内桥(例如内酰胺)以外,胰高血糖素肽还包含任一种或多种上述修饰。

[0673] 按照一些实施方案,胰高血糖素肽包含 SEQ ID NO:877 的氨基酸序列,其中 3 位上的 Xaa 为包含以下结构 I、II 或 III 的侧链的氨基酸:

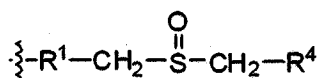
[0674]



结构 I



结构 II



[0675] 结构 III

[0676] 其中 R^1 为 C_{0-3} 烷基或 C_{0-3} 杂烷基; R^2 为 NHR^4 或 C_{1-3} 烷基; R^3 为 C_{1-3} 烷基; R^4 为 H 或 C_{1-3} 烷基; X 为 NH、O 或 S;而 Y 为 NHR^4 、 SR^3 或 OR^3 。在一些实施方案中, X 为 NH 或 Y 为 NHR^4 。在一些实施方案中, R^1 为 C_{0-2} 烷基或 C_1 杂烷基。在一些实施方案中, R^2 为 NHR^4 或 C_1 烷基。在一些实施方案中, R^4 为 H 或 C^1 烷基。在示例性的实施方案中,提供包含结构 I 的侧链的氨基酸,其中, R^1 为 CH_2-S , X 为 NH, R^2 为 CH_3 (乙酰氨基甲基-半胱氨酸, C(Acm)); R^1 为 CH_2 , X 为 NH, R^2 为 CH_3 (乙酰基二氨基丁酸, Dab(Ac)); R^1 为 C_0 烷基, X 为 NH, R^2 为 NHR^4 , R^4 为 H(氨基甲酰基二氨基丙酸, Dap(脲));或者 R^1 为 CH_2-CH_2 , X 为 NH, R^2 为 CH_3 (乙酰基鸟氨酸, Orn(Ac))。在示例性的实施方案中,提供包含结构 II 的侧链的氨基酸,其中 R^1 为 CH_2 , Y 为 NHR^4 , R^4 为 CH_3 (甲基谷氨酰胺, Q(Me));在示例性的实施方案中,提供包含结构 III 的侧链的氨基酸,其中, R^1 为 CH_2 , R^4 为 H(甲硫氨酸-亚砷, M(O));在具体的实施方案中,3 位

上的氨基酸被 Dab (Ac) 取代。例如,胰高血糖素激动剂可包含 SEQ ID NO :863、SEQ ID NO :869、SEQ ID NO :871、SEQ ID NO :872、SEQ ID NO :873 和 SEQ ID NO :874 的氨基酸序列。

[0677] 在某些实施方案中,胰高血糖素肽是 SEQ ID NO :877 的胰高血糖素肽的类似物。在具体的方面,该类似物包含任何上述的氨基酸修饰,包括但不限于:28 位上的 Asn 被带电荷的氨基酸取代;28 位上的 Asn 被选自 Lys、Arg、His、Asp、Glu、半胱氨酸和高半胱氨酸的带电荷的氨基酸取代;在 28 位上被 Asn、Asp 或 Glu 取代;在 28 位上被 Asp 取代;在 28 位上被 Glu 取代;29 位上的 Thr 被带电荷的氨基酸取代;29 位上的 Thr 被选自 Lys、Arg、His、Asp、Glu、半胱氨酸和高半胱氨酸的带电荷的氨基酸取代;在 29 位上被 Asp、Glu 或 Lys 取代;在 29 位上被 Glu 取代;在 29 位之后插入 1-3 个带电荷的氨基酸;在 29 位之后插入 Glu 或 Lys;在 29 位之后插入 Gly-Lys 或 Lys-Lys;及其组合。

[0678] 在某些实施方案中,SEQ ID NO :877 的胰高血糖素肽的类似物在 16、20、21 和 24 位中的 1、2、3 或所有位置上包含 α , α -二取代氨基酸,例如 AIB。

[0679] 在某些实施方案中,SEQ ID NO :877 的胰高血糖素肽的类似物包含一种或多种以下修饰:1 位上的 His 被降低胰高血糖素肽对被二肽基肽酶 IV (DPP-IV) 切割的敏感性的非天然氨基酸取代、2 位上的 Ser 被降低胰高血糖素肽对被二肽基肽酶 IV (DPP-IV) 切割的敏感性的非天然氨基酸的取代、7 位上的 Thr 被缺乏羟基的氨基酸(例如 Abu 或 Ile)取代;10 位上的 Tyr 被 Phe 或 Val 取代;12 位上的 Lys 被 Arg 取代;15 位上的 Asp 被 Glu 取代、16 位上的 Ser 被 Thr 或 AIB 取代、20 位上的 Gln 被 Ala 或 AIB 取代、21 位上的 Asp 被 Glu 取代、24 位上的 Gln 被 Ala 或 AIB 取代、27 位上的 Met 被 Leu 或 Nle 取代、27-29 位上的氨基酸的缺失、28-29 位上的氨基酸的缺失、29 位上的氨基酸的缺失;SEQ ID NO :820 的氨基酸序列加至 C 端,其中 29 位上的氨基酸是 Thr 或 Gly;或其组合。

[0680] 按照具体的实施方案,胰高血糖素肽包含 SEQ ID NO :862-867 和 869-874 中的任何氨基酸序列。

[0681] 在某些实施方案中,包含 SEQ ID NO :877 的胰高血糖素肽的类似物包含与 16、17、20、21、24 和 29 位上任一个的氨基酸或在 C 端氨基酸上共价连接的亲水部分,例如 PEG。

[0682] 在某些实施方案中,包含 SEQ ID NO :877 的胰高血糖素肽的类似物包含含有与酰基或烷基共价连接(任选通过间隔基)的侧链的氨基酸,所述酰基或烷基对天然存在的氨基酸来说是非天然的。在一些实施方案中,酰基为 C4-C30 脂肪酰基。在其它实施方案中,烷基为 C4-C30 烷基。在具体的方面,酰基或烷基与 10 位上的氨基酸的侧链共价连接。在一些实施方案中,7 位上的氨基酸为 Ile 或 Abu。

[0683] 胰高血糖素激动剂可以是包含 SEQ ID NO :801-919 中的任何氨基酸序列的肽,任选具有保持胰高血糖素激动剂活性的多达 1、2、3、4、或 5 种其它修饰。在某些实施方案中,胰高血糖素激动剂包含 SEQ ID NO :859-919 的任何氨基酸。

[0684] 第 2 类胰高血糖素相关肽

[0685] 在某些实施方案中,胰高血糖素相关肽是第 2 类胰高血糖素相关肽,其描述于本文和国际专利申请号 PCT US2009/47447 (2009 年 6 月 16 日提交)、美国临时申请号 61/090,448 和美国申请号 61/151,349,该申请的内容通过引用以其整体结合。

[0686] 以下部分提及的涉及第 2 类胰高血糖素相关肽的生物序列 (SEQ ID NO :1001-1262) 相当于国际专利申请号 PCT US2009/47447 的 SEQ ID NO :1-262。

[0687] 活性

[0688] 天然胰高血糖素不会激活 GIP 受体,并且通常具有天然 -GLP-1 对 GLP-1 受体的活性的约 1%。本文所述天然胰高血糖素序列的修饰产生第 2 类胰高血糖素相关肽,其可显示等于或好于天然胰高血糖素 (SEQ ID NO:1001) 活性的有效胰高血糖素活性、等于或好于天然 GIP (SEQ ID NO:1004) 活性的有效 GIP 活性和 / 或等于或好于天然 GLP-1 的活性的有效 GLP-1 活性。在这一方面,正如本文进一步描述的一样,第 2 类胰高血糖素相关肽可以是胰高血糖素 /GIP 共激动剂、胰高血糖素 /GIP/GLP-1 三重激动剂 (tri-agonist)、GIP/GLP-1 共激动剂或 GIP 激动剂胰高血糖素肽之一。

[0689] 在一些实施方案中,本文所述的第 2 类胰高血糖素相关肽对 GIP 受体活化活性的 EC50 为约 100nM 或更少,或约 75、50、25、10、8、6、5、4、3、2 或 1nM 或更少。在一些实施方案中,第 2 类胰高血糖素相关肽对胰高血糖素受体活化的 EC50 为约 100nM 或更少,或约 75、50、25、10、8、6、5、4、3、2 或 1nM 或更少。在一些实施方案中,第 2 类胰高血糖素相关肽对 GLP-1 受体活化的 EC50 为约 100nM 或更少,或约 75、50、25、10、8、6、5、4、3、2 或 1nM 或更少。可通过测量在过表达受体的 HEK293 细胞中诱导的 cAMP 的体外测定法,来测定受体活化,例如,如本文实施例 5 中所述,测定用编码受体的 DNA 和与 cAMP 反应性组分连接的萤光素酶基因共转染的 HEK293 细胞。

[0690] 在一些实施方案中,与天然 GIP 相比 (GIP 效价),第 2 类胰高血糖素相关肽对 GIP 受体显示至少约 0.1%、0.2%、0.3%、0.4%、0.5%、0.6%、0.7%、0.8%、0.9%、1%、5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、75%、100%、125%、150%、175% 或 200% 或更高的活性。在一些实施方案中,与天然 GIP 相比,本文所述胰高血糖素肽对 GIP 受体显示不超过 1000%、10,000%、100,000% 或 1,000,000% 的活性。在一些实施方案中,与天然胰高血糖素相比 (胰高血糖素效价),第 2 类胰高血糖素相关肽对胰高血糖素受体显示至少约 1%、5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、75%、100%、125%、150%、175%、200%、250%、300%、350%、400%、450% 或 500% 或更高的活性。在一些实施方案中,与天然胰高血糖素相比,本文所述胰高血糖素肽对胰高血糖素受体显示不超过 1000%、10,000%、100,000% 或 1,000,000% 的活性。在一些实施方案中,与天然 GLP-1 相比 (GLP-1 效价),第 2 类胰高血糖素相关肽对 GLP-1 受体显示至少约 0.1%、0.2%、0.3%、0.4%、0.5%、0.6%、0.7%、0.8%、0.9%、1%、5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、75%、100%、125%、150%、175% 或 200% 或更高的活性。在一些实施方案中,与天然 GLP-1 相比,本文所述胰高血糖素肽对 GLP-1 受体显示不超过 1000%、10,000%、100,000% 或 1,000,000% 的活性。第 2 类胰高血糖素相关肽相对于受体的天然配体对受体的活性,根据第 2 类胰高血糖素相关肽相对于天然配体的 EC50 的反比例计算。

[0691] 在一些实施方案中,第 2 类胰高血糖素相关肽对胰高血糖素受体和 GIP 受体两者均具有活性 (“胰高血糖素 /GIP 共激动剂”)。与 GIP 受体相比,这些第 2 类胰高血糖素相关肽失去天然胰高血糖素对胰高血糖素受体的选择性。在一些实施方案中,第 2 类胰高血糖素相关肽对 GIP 受体的 EC50,与其对胰高血糖素受体的 EC50 相差 (高于或低于) 小于约 50 倍、40 倍、30 倍或 20 倍。在一些实施方案中,第 2 类胰高血糖素相关肽的 GIP 效价与其胰高血糖素效价相差 (高于或低于) 小于约 500 倍、450 倍、400 倍、350 倍、300 倍、250 倍、200 倍、150 倍、100 倍、75 倍、50 倍、25 倍、20 倍、15 倍、10 倍或 5 倍。在一些实施方案中,第

2 类胰高血糖素相关肽对 GIP 受体的 EC50 除以第 2 类胰高血糖素相关肽对胰高血糖素受体的 EC50 的比率, 小于约 100、75、60、50、40、30、20、15、10 或 5。在一些实施方案中, 对 GIP 受体的 EC50 除以对胰高血糖素受体的 EC50 的比率为约 1 或小于约 1 (例如约 0.01、0.013、0.0167、0.02、0.025、0.03、0.05、0.067、0.1、0.2)。在一些实施方案中, 第 2 类胰高血糖素相关肽的 GIP 效价与第 2 类胰高血糖素相关肽的胰高血糖素效价相比的比率小于约 500、450、400、350、300、250、200、150、100、75、60、50、40、30、20、15、10 或 5。在一些实施方案中, 对 GIP 受体的效价除以对胰高血糖素受体的效价的比率为约 1 或小于约 1 (例如约 0.01、0.013、0.0167、0.02、0.025、0.03、0.05、0.067、0.1、0.2)。在一些实施方案中, GLP-1 活性被显著降低或破坏, 例如通过 7 位上的氨基酸修饰、氨基酸 C 端至 27 或 28 位上的氨基酸缺失得到 27-氨基酸肽或 28-氨基酸肽, 或其组合。

[0692] 另一方面, 第 2 类胰高血糖素相关肽对胰高血糖素、GIP 和 GLP-1 受体具有活性 (“胰高血糖素 /GIP/GLP-1 三重激动剂”)。与 GLP-1 和 GIP 受体两者相比, 这些第 2 类胰高血糖素相关肽失去天然胰高血糖素对胰高血糖素受体的选择性。在一些实施方案中, 第 2 类胰高血糖素相关肽对 GIP 受体的 EC50 与其对胰高血糖素和 GLP-1 受体的相应 EC50 相差 (高于或低于) 小于约 50 倍、40 倍、30 倍或 20 倍。在一些实施方案中, 第 2 类胰高血糖素相关肽的 GIP 效价与其胰高血糖素和 GLP-1 效价相差 (高于或低于) 小于约 500 倍、450 倍、400 倍、350 倍、300 倍、250 倍、200 倍、150 倍、100 倍、75 倍、50 倍、25 倍、20 倍、15 倍、10 倍或 5 倍。在一些实施方案中, 三重激动剂对 GIP 受体的 EC50 除以三重激动剂对 GLP-1 受体的 EC50 的比率, 小于约 100、75、60、50、40、30、20、15、10 或 5。在一些实施方案中, 对 GIP 受体的 EC50 除以对 GLP-1 受体的 EC50 的比率为约 1 或小于约 1 (例如约 0.01、0.013、0.0167、0.02、0.025、0.03、0.05、0.067、0.1、0.2)。在一些实施方案中, 三重激动剂的 GIP 效价与三重激动剂的 GLP-1 效价相比的比率小于约 100、75、60、50、40、30、20、15、10 或 5。在一些实施方案中, 对 GIP 受体的效价除以对 GLP-1 受体的效价的比率为约 1 或小于约 1 (例如约 0.01、0.013、0.0167、0.02、0.025、0.03、0.05、0.067、0.1、0.2)。在相关的实施方案中, 三重激动剂对 GIP 受体的 EC50 除以三重激动剂对胰高血糖素受体的 EC50 的比率小于约 100、75、60、50、40、30、20、15、10 或 5。在一些实施方案中, 对 GIP 受体的 EC50 除以对胰高血糖素受体的 EC50 的比率为约 1 或小于约 1 (例如约 0.01、0.013、0.0167、0.02、0.025、0.03、0.05、0.067、0.1、0.2)。在一些实施方案中, 三重激动剂的 GIP 效价与三重激动剂的胰高血糖素效价相比的比率, 小于约 500、450、400、350、300、250、200、150、100、75、60、50、40、30、20、15、10 或 5。在一些实施方案中, 对 GIP 受体的效价除以对胰高血糖素受体的效价的比率为约 1 或小于约 1 (例如约 0.01、0.013、0.0167、0.02、0.025、0.03、0.05、0.067、0.1、0.2)。在一些实施方案中, 三重激动剂对 GLP-1 受体的 EC50 除以三重激动剂对胰高血糖素受体的 EC50 的比率, 小于约 100、75、60、50、40、30、20、15、10 或 5。在一些实施方案中, 对 GLP-1 受体的 EC50 除以对胰高血糖素受体的 EC50 的比率为约 1 或小于约 1 (例如约 0.01、0.013、0.0167、0.02、0.025、0.03、0.05、0.067、0.1、0.2)。在一些实施方案中, 三重激动剂的 GLP-1 效价与三重激动剂的胰高血糖素效价相比的比率小于约 100、75、60、50、40、30、20、15、10 或 5。在一些实施方案中, 对 GLP-1 受体的效价除以对胰高血糖素受体的效价的比率为约 1 或小于约 1 (例如约 0.01、0.013、0.0167、0.02、0.025、0.03、0.05、0.067、0.1、0.2)。

[0693] 在另一方面,第2类胰高血糖素相关肽对GLP-1和GIP受体具有活性,但其中胰高血糖素活性例如通过3位上的氨基酸的修饰而被显著降低或破坏(“GIP/GLP-1共激动剂”)。例如在该位置上被酸性、碱性或水水氨基酸(谷氨酸、鸟氨酸、正亮氨酸)取代,降低胰高血糖素活性。在一些实施方案中,胰高血糖素肽对GIP受体的EC50与其对GLP-1受体的EC50相差(高于或低于)小于约50倍、40倍、30倍或20倍。在一些实施方案中,第2类胰高血糖素相关肽的GIP效价与其GLP-1效价相差(高于或低于)小于约25倍、20倍、15倍、10倍或5倍。在一些实施方案中,这些第2类胰高血糖素相关肽具有天然胰高血糖素对胰高血糖素受体的活性的约10%或更少,例如约1-10%或约0.1-10%或大于约0.1%但小于约10%。在一些实施方案中,第2类胰高血糖素相关肽对GIP受体的EC50除以第2类胰高血糖素相关肽对GLP-1受体的EC50的比率,小于约100、75、60、50、40、30、20、15、10或5,但不小于1。在一些实施方案中,第2类胰高血糖素相关肽的GIP效价与第2类胰高血糖素相关肽的GLP-1效价相比的比率小于约100、75、60、50、40、30、20、15、10或5,但不小于1。

[0694] 在又一方面,第2类胰高血糖素相关肽对GIP受体具有活性,其中胰高血糖素和GLP-1活性例如通过3位上的氨基酸用Glu修饰和7位用Ile修饰而被显著降低或破坏(“GIP激动剂胰高血糖素肽”)。在一些实施方案中,这些第2类胰高血糖素相关肽具有天然胰高血糖素对胰高血糖素受体的活性的约10%以下,例如约1-10%或约0.1-10%或大于约0.1%、0.5%或1%但小于约1%、5%或10%。在一些实施方案中,这些第2类胰高血糖素相关肽还具有天然GLP-1对GLP-1受体的活性的约10%以下,例如约1-10%或约0.1-10%或大于约0.1%、0.5%或1%但小于约1%、5%或10%。

[0695] 在一些实施方案中,如果第2类胰高血糖素相关肽不是聚乙二醇化的,则第2类胰高血糖素相关肽对于GIP受体活化的EC50约为4、2、1nM或更低,或者类似物具有天然GIP对GIP受体的活性的至少约1%、2%、3%、4%或5%。在相关的实施方案中,未聚乙二醇化的第2类胰高血糖素相关肽对于GLP-1受体活化的EC50约为4、2、1nM或更低,或者具有天然GLP-1对GLP-1受体的活性的至少约1%、2%、3%、4%或5%。在其它相关的实施方案中,未聚乙二醇化的第2类胰高血糖素相关肽对于胰高血糖素受体活化的EC50约为4、2、1nM或更低,或者至少为天然胰高血糖素对胰高血糖素受体的活性的约5%、10%、15%或20%。在一些实施方案中,未聚乙二醇化的第2类胰高血糖素相关肽具有小于天然胰高血糖素对胰高血糖素受体的活性的约1%。在其它实施方案中,未聚乙二醇化的第2类胰高血糖素相关肽具有小于天然GLP-1对GLP-1受体的活性的约10%、5%或1%。

[0696] 在其中第2类胰高血糖素相关肽与亲水部分(例如PEG)连接的实施方案中,对一种或多种受体的相对EC50可更高,例如约10倍更高。例如,聚乙二醇化类似物对于GIP受体活化的EC50约为10nM或更少,或者第2类胰高血糖素相关肽具有天然GIP对GIP受体的活性的至少约0.1%、0.2%、0.3%、0.4%或0.5%。在相关的实施方案中,聚乙二醇化第2类胰高血糖素相关肽对于GLP-1受体活化的EC50约为10nM或更少,或者具有天然GLP-1对GLP-1受体的活性的至少约0.1%、0.2%、0.3%、0.4%或0.5%。在其它相关的实施方案中,聚乙二醇化第2类胰高血糖素相关肽对于胰高血糖素受体活化的EC50约为10nM或更少,或者为天然胰高血糖素对胰高血糖素受体的活性的至少约0.5%、1%、1.5%或2%。在一些实施方案中,第2类胰高血糖素相关肽具有小于约1%的天然胰高血糖素对胰高血糖

素受体的活性。在其它实施方案中,第2类胰高血糖素相关肽具有小于天然 GLP-1 对 GLP-1 受体活性的约 10%、5%或 1%。

[0697] 修饰

[0698] 本文公开的有关第2类胰高血糖素相关肽的修饰允许操作胰高血糖素 (SEQ ID NO:1001) 以产生 GIP 活性、胰高血糖素活性和 / 或 GLP-1 活性得到提高的胰高血糖素肽。本文公开的有关第2类胰高血糖素相关肽的其它修饰延长所得肽的半寿期、提高溶解性或提高稳定性。本文公开的有关第2类胰高血糖素相关肽的更多其它修饰对活性无影响,或者可以进行而又不破坏所需要的一种或多种活性。可单独或组合使用用作相同目的(例如提高 GIP 活性)的有关第2类胰高血糖素相关肽的任何组合。可单独或组合使用赋以改进性质的有关第2类胰高血糖素相关肽的单一组合或成套组合,例如 GIP 和 / 或 GLP-1 活性提高可与半寿期延长组合。在相关的实施方案中,1、2、3、4、5、6或更多种氨基酸修饰可以是非保守取代、添加或缺失。在一些实施方案中,1、2、3、4、5、6或更多种氨基酸修饰可以是保守取代。

[0699] 影响 GIP 活性的修饰

[0700] 通过 1 位上的氨基酸修饰,对 GIP 受体的活性得到提高。例如,1 位上的 His 被任选为 Tyr、Phe、Trp、氨基 -Phe、硝基 -Phe、氯 -Phe、磺基 -Phe、4-吡啶基 -Ala、甲基 -Tyr 或 3-氨基 Tyr 的大的芳族氨基酸取代。1 位上的 Tyr 与稳定相当于氨基酸 12-29 区域的内的 α 螺旋的组合,提供激活 GIP 受体以及 GLP-1 受体和胰高血糖素受体的第2类胰高血糖素相关肽。可通过例如形成共价或非共价分子内桥,或者 12-29 位附近的氨基酸用 α 螺旋稳定性氨基酸(例如 α , α -二取代氨基酸)的取代和 / 或插入来稳定 α 螺旋结构。

[0701] 通过 27 和 / 或 28 位上和任选 29 位上的氨基酸修饰,对 GIP 受体的活性也得到提高。例如,27 位上的 Met 被大的脂族氨基酸(任选为 Leu)取代,28 位上的 Asn 被小的脂族氨基酸(任选为 Ala)取代,和 29 位上的 Thr 被小的脂族氨基酸(任选为 Gly)取代。与那些位置的天然 MNT 序列相比,27-29 位上被 LAG 取代,使 GIP 活性得到提高。

[0702] 通过 12 位上的氨基酸修饰,对 GIP 受体的活性也得到提高。例如,12 位被大的脂族非极性氨基酸(任选为 Ile)取代。

[0703] 通过 17 和 / 或 18 位上的氨基酸修饰,对 GIP 受体的活性也得到提高。例如,17 位被极性残基(任选 Gln)取代,18 位被小的脂族氨基酸(任选为 Ala)取代。与在那些位置上的天然 RR 序列相比,17 和 18 位上用 QA 取代使 GIP 活性得到提高。

[0704] 通过允许在 12-29 位上的氨基酸侧链之间形成分子内桥的修饰,使对 GIP 受体的活性得到提高。例如,可通过在 i 和 i+4 位上的 2 个氨基酸的侧链之间、或在 j 和 j+3 位之间、或在 k 和 k+7 位之间的共价键,来形成分子内桥。在示例性的实施方案中,分子内桥介于 12 和 16 位、16 和 20 位、20 和 24 位、24 和 28 位或 17 和 20 位之间。在其它实施方案中,在这些位置上的带正电荷和带负电荷的氨基酸之间可形成非共价相互作用,例如盐桥。

[0705] 可单独或组合使用本文所述的提高 GIP 受体活性的任何修饰。与仅采用任一种这类修饰相比,提高 GIP 受体活性的修饰的组合一般提供更高的 GIP 活性。

[0706] 影响胰高血糖素活性的修饰

[0707] 在一些实施方案中,通过天然胰高血糖素 (SEQ ID NO:1001) 的 16 位上的氨基酸修饰,胰高血糖素效价得到提高。作为非限制性实例,可通过用以下氨基酸取代 16 位上的

天然存在的丝氨酸来获得这种效价的提高；谷氨酸或另一种具有长为 4 个原子的侧链的带负电荷的氨基酸；或者谷氨酰胺、高谷氨酸或高半胱氨酸中的任一种；或具有含有至少一个杂原子（例如 N、O、S、P）的侧链且侧链长为约 4（或 3-5）个原子的带电荷的氨基酸。在一些实施方案中，胰高血糖素肽保持其对胰高血糖素受体相对于 GLP-1 受体的原有的选择性。

[0708] 可通过 3 位上的氨基酸修饰，例如用酸性、碱性或疏水氨基酸取代 3 位上的天然存在的谷氨酰胺，来降低胰高血糖素受体活性。例如 3 位上用谷氨酸、鸟氨酸或正亮氨酸的取代大大降低或破坏胰高血糖素受体活性。

[0709] 如本文所述，3 位上的 Gln 用谷氨酰胺类似物修饰可实现对胰高血糖素受体的活性保持或提高。例如，胰高血糖素激动剂可包含 SEQ ID NOs:1243-1248、1250、1251 和 1253-1256 中任一个的氨基酸序列。

[0710] 通过稳定胰高血糖素肽或其类似物 C 端部分的 α 螺旋结构（氨基酸 12-29）的修饰，恢复通过 1 和 2 位上的氨基酸修饰而降低的胰高血糖素活性。例如，可在 i 和 i+4 位上的 2 个氨基酸的侧链之间、或在 j 和 j+3 位之间、或在 k 和 k+7 位之间的共价键而形成分子内桥。在其它实施方案中，在这些位置上的带正电荷和带负电荷的氨基酸之间可形成非共价相互作用，例如盐桥。在另外的其它实施方案中，将一个或多个 α ， α -二取代氨基酸在保持所需活性的位置上插入或取代入该 C 端部分（氨基酸 12-29）。例如 16、20、21 或 24 位上的 1、2、3 或所有 4 个位置用 α ， α -二取代氨基酸（例如 AIB）取代。

[0711] 影响 GLP-1 活性的修饰

[0712] 通过将 C 端氨基酸的羧酸用电中性基团（例如酰胺或酯）置换，对 GLP-1 受体的活性得到提高。

[0713] 正如本文进一步描述的一样，通过稳定胰高血糖素 C 端部分的 α 螺旋结构（氨基酸 12-29 附近），对 GLP-1 受体的活性也得到提高，例如通过在 2 个氨基酸的侧链之间形成分子内桥，或 12-29 位附近的氨基酸用 α 螺旋稳定性氨基酸（例如 α ， α -二取代氨基酸）的取代和 / 或插入。在示例性的实施方案中，12 和 16、13 和 17、16 和 20、17 和 21、20 和 24 或 24 和 28 的氨基酸对（其中 i = 12、16、20 或 24 的氨基酸对）的侧链彼此连接从而稳定胰高血糖素 α 螺旋。在一些实施方案中，桥或接头长约为 8（或约 7-9）个原子，特别是当桥介于 i 和 i+4 位之间时。在一些实施方案中，桥或接头长约为 6（或约 5-7）个原子，特别是当桥位于 j 和 j+3 位之间时。

[0714] 在一些实施方案中，如下形成分子内桥：(a) 用谷氨酸或用另一种具有长为 4 个原子的侧链的带负电荷的氨基酸、或用谷氨酰胺、高谷氨酸或高半胱氨酸中的任一种、或用具有含有至少一个杂原子（例如 N、O、S、P）的侧链且侧链长为约 4（或 3-5）个原子的带电荷氨基酸，取代 16 位上的天然存在的丝氨酸，和 (b) 用含有带电或具有氢键能力的侧链，且长度至少为约 5（或约 4-6）个原子的另一种亲水氨基酸（例如赖氨酸、瓜氨酸、精氨酸或鸟氨酸），取代 20 位上的天然存在的谷氨酰胺。16 和 20 位上的这类氨基酸的侧链可形成盐桥或可共价连接。在一些实施方案中，2 个氨基酸彼此结合形成内酰胺环。

[0715] 在一些实施方案中，通过形成不是内酰胺桥的分子内桥来实现胰高血糖素肽 C 端部分的 α 螺旋结构的稳定。例如，合适的共价键合方法包括以下中的任一种或多种：烯烃复分解、基于羊毛硫氨酸的环化、二硫桥或修饰的含硫桥形成、 α ， ω -二氨基烷烃连接物的

使用、金属-原子桥的形成,并且使用肽环化的其它方法稳定 α 螺旋。

[0716] 在另外的其它实施方案中,将一个或多个 α , α -二取代氨基酸在保持所需活性的位置上插入或取代入该 C 端部分(氨基酸 12-29)。例如 16、20、21 或 24 位上的 1、2、3 或所有 4 个位置用 α , α -二取代氨基酸(例如 AIB)取代。

[0717] 如本文所述通过 20 位上的氨基酸修饰,使对 GLP-1 受体的活性得到提高。

[0718] 通过将 GPSSGAPPPS(SEQ ID NO:1095) 或 XGPSSGAPPPS(SEQ ID NO:1096) 加至 C 端,使对 GLP-1 受体的活性得到提高。如本文所述,通过修饰 18、28 或 29 位或者 18 和 29 位上的氨基酸,可进一步提高这类类似物的 GLP-1 活性。

[0719] 通过将 10 位上的氨基酸修饰成大的芳族氨基酸残基(任选 Trp),GLP-1 效价得到进一步的适度提高。

[0720] 如本文所述,例如通过 7 位上的氨基酸修饰,使对 GLP-1 受体的活性降低。

[0721] 可通过丙氨酸取代 18 位上的天然精氨酸进一步提高对 GLP-1 受体的效价。

[0722] 可单独或组合使用提高 GLP-1 受体活性的上述有关第 2 类胰高血糖素相关肽的任何修饰。与仅采用任一种这类修饰相比,提高 GLP-1 受体活性的修饰的组合一般提供更高的 GLP-1 活性。例如,本发明提供包含在 16 位、20 位和 C 端羧酸基上的修饰、任选在 16 和 20 位上的氨基酸之间具有共价键的胰高血糖素肽;包含在 16 位和 C 端羧酸基上的修饰的胰高血糖素肽;包含在 16 和 20 位上的修饰、任选在 16 和 20 位上的氨基酸之间具有共价键的胰高血糖素肽;以及包含在 20 位上的和 C 端羧酸基上的修饰的胰高血糖素肽。

[0723] 改进 DPP-IV 抗性的修饰

[0724] 1 和 / 或 2 位上的修饰可提高肽对二肽基肽酶 IV(DPP-IV) 切割的抗性。例如,1 位和 / 或 2 位可用本文所述的 DPP-IV 抗性氨基酸取代。在一些实施方案中,2 位上的氨基酸被 N-甲基丙氨酸取代。

[0725] 观察发现,在 2 位上的修饰(例如 2 位上的 AIB)以及某些情况下在 1 位上的修饰(例如 1 位上的 DMIA),可降低胰高血糖素活性,有时显著地降低;出乎意料的是,胰高血糖素活性的这种降低可通过稳定胰高血糖素 C 端部分的 α 螺旋结构(氨基酸 12-29 附近)(例如,如本文所述,通过在 2 个氨基酸的侧链之间形成共价键)而恢复。在一些实施方案中,共价键介于“i”和“i+4”位,或“j”和“j+3”位的氨基酸之间,例如介于 12 和 16 位、16 和 20 位、20 和 24 位、24 和 28 位或 17 和 20 位之间。在示例性的实施方案中,这种共价键是介于 16 位上的谷氨酸和 20 位上的赖氨酸之间的内酰胺桥。在一些实施方案中,这种共价键是本文所述内酰胺桥以外的分子内桥。

[0726] 降低降解的修饰

[0727] 在进一步的示例性实施方案中,可通过修饰 SEQ ID NO:1001 的 15 和 / 或 16 位上的氨基酸以降低肽尤其在酸性或碱性缓冲液中随时间的降解,来对任何第 2 类胰高血糖素相关肽进行进一步修饰以改进稳定性。这类修饰降低 Asp15-Ser16 肽键的裂解。在示例性的实施方案中,15 位上的氨基酸修饰是缺失或 Asp 被谷氨酸、高谷氨酸、半胱磺酸或高半胱磺酸取代。在其它示例性的实施方案中,16 位上的氨基酸修饰是缺失或 Ser 被 Thr 或 AIB 取代。在其它示例性的实施方案中,16 位上的 Ser 被谷氨酸、或被另一种具有长为 4 个原子的侧链的带负电荷的氨基酸、或者被谷氨酰胺、高谷氨酸或高半胱磺酸中的任一种取代。

[0728] 在一些实施方案中,存在于天然肽 27 位上的甲硫氨酸残基例如通过缺失或取代

而被修饰。这类修饰可防止肽的氧化降解。在一些实施方案中,27 位上的 Met 被亮氨酸、异亮氨酸或正亮氨酸取代。在一些具体实施方案中,27 位上的 Met 被亮氨酸或正亮氨酸取代。

[0729] 在一些实施方案中,20 和 / 或 24 位上的 Gln 例如通过缺失或取代而被修饰。这类修饰可降低通过 Gln 的脱酰氨基化而发生的降解。在一些实施方案中,20 和 / 或 24 位上的 Gln 被 Ser、Thr、Ala 或 AIB 取代。在一些实施方案中,20 和 / 或 24 位上的 Gln 被 Lys、Arg、Orn 或瓜氨酸取代。

[0730] 在一些实施方案中,21 位上的 Asp 例如通过缺失或取代而被修饰。这类修饰可降低通过 Asp 脱水形成环状琥珀酰亚胺中间体接着异构化为异天冬氨酸而发生的降解。在一些实施方案中,21 位被 Glu、高谷氨酸或高半胱氨酸取代。在一些具体实施方案中,21 位被 Glu 取代。

[0731] α 螺旋结构的稳定

[0732] 第 2 类胰高血糖素相关肽 C 端部分的 α 螺旋结构 (氨基酸 12-29 附近) 的稳定使 GLP-1 和 / 或 GIP 活性提高,并且恢复因 1 和 / 或 2 位上的氨基酸修饰而降低的胰高血糖素活性。可通过例如形成共价或非共价分子内桥或者用 α 螺旋稳定性氨基酸 (例如 α , α -二取代氨基酸) 取代和 / 或插入 12-29 位附近的氨基酸来稳定 α 螺旋结构。可按照本文所述实现 GIP 激动剂的 α 螺旋结构的稳定。

[0733] 酰化和烷基化

[0734] 如本文所述,按照一些实施方案,对本文公开的胰高血糖素肽进行修饰以包含酰基或烷基,例如对天然存在的氨基酸来说是非天然的酰基或烷基。酰化或烷基化可延长循环中的胰高血糖素肽的半寿期。酰化或烷基化可有利地延迟起效和 / 或延长对胰高血糖素和 / 或 GLP-1 受体的作用持续时间和 / 或改进对蛋白酶 (例如 DPP-IV) 的抗性和 / 或提高溶解性。酰化后可维持胰高血糖素肽对胰高血糖素和 / 或 GLP-1 和 / 或 GIP 受体的活性。在一些实施方案中,酰化胰高血糖素肽的效价与未酰化形式的胰高血糖素肽相当。如本文所述,第 2 类胰高血糖素相关肽可在与亲水部分连接的相同氨基酸位置上或在不同的氨基酸位置上酰化或烷基化。

[0735] 在一些实施方案中,本发明提供被修饰成包含与胰高血糖素肽 10 位上的氨基酸共价连接的酰基或烷基的胰高血糖素肽。胰高血糖素肽可还包含介于胰高血糖素肽 10 位上的氨基酸和酰基或烷基之间的间隔基。在一些实施方案中,酰基为脂肪酸或胆汁酸或其盐,例如 C4-C30 脂肪酸、C8-C24 脂肪酸、胆酸、C4-C30 烷基、C8-C24 烷基或包含胆汁酸的类固醇部分的烷基。间隔基是具有连接酰基或烷基的合适反应基的任何部分。在示例性的实施方案中,间隔基包括氨基酸、二肽、三肽、亲水双官能或疏水双官能间隔基。在一些实施方案中,间隔基选自: Trp、Glu、Asp、Cys 和包含 $\text{NH}_2(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n(\text{CH}_2)_m\text{COOH}$ 的间隔基,其中 m 为 1-6 的任何整数, n 为 2-12 的任何整数。这类酰化或烷基化胰高血糖素肽还可包含亲水部分,任选聚乙二醇。任何前述的胰高血糖素肽可包含 2 个酰基或 2 个烷基或其组合。

[0736] 缀合物和融合物

[0737] GIP 激动剂可任选通过共价键合和任选通过接头与本文所述的缀合物部分连接。

[0738] 在其它实施方案中,第二肽为 XGPSSGAPPPS (SEQ ID NO:1096),其中 X 选自 20 种普通氨基酸之一,例如谷氨酸、天冬氨酸或甘氨酸。在一些实施方案中, X 表示还包含与该

氨基酸的侧链共价连接的亲水部分的氨基酸（例如 Cys）。这类 C 端突出端提高溶解性并可改进 GIP 或 GLP-1 活性。在其中胰高血糖素肽还包含羧基端突出端的一些实施方案中，突出端的羧基端氨基酸终止于酰胺基或酯基而不是羧酸。

[0739] 在一些实施方案中，例如，在包含 C 端突出端的胰高血糖素肽中，天然胰高血糖素肽的 29 位上的苏氨酸被甘氨酸置换。例如，具有甘氨酸取代 29 位上的苏氨酸并包含 GPSSGAPPPS (SEQ ID NO:1095) 的 C 端突出端的胰高血糖素肽对 GLP-1 受体的效价，是修饰成包含相同的 C 端突出端的天然胰高血糖素的 4 倍。这种 T29G 取代可与本文公开的其它修饰联用以提高胰高血糖素肽对 GLP-1 受体的亲和力。例如，T29G 取代可与 S16E 和 N20K 氨基酸取代组合，任选与 16 和 20 氨基酸之间的内酰胺桥和任选与本文所述 PEG 链的添加组合。

[0740] 在一些实施方案中，将氨基酸加至 C 端，所加入的氨基酸选自谷氨酸、天冬氨酸和甘氨酸。

[0741] 提高溶解性的修饰

[0742] 在另一个实施方案中，通过将带电荷的氨基酸引入肽的 C 端部分（优选在 SEQ ID NO:1001 的 27 位 C 端的位置）的氨基酸取代和 / 或添加，可改进任何胰高血糖素肽的溶解性。任选可将 1、2 或 3 个带电荷的氨基酸引入 C 端部分内，优选 C 端至 27 位。在一些实施方案中，28 和 / 或 29 位上的天然氨基酸被一个或两个带电荷的氨基酸取代，和 / 或在又一个实施方案中，将 1-3 个带电荷的氨基酸加入肽的 C 端上。在示例性的实施方案中，1、2 或所有带电荷的氨基酸带有负电荷。在一些实施方案中，带有负电荷的（酸性氨基酸）是天冬氨酸或谷氨酸。

[0743] 可对胰高血糖素肽进行仍使之保持 GIP 活性（和任选 GLP-1 活性和 / 或胰高血糖素活性）的其它修饰，例如保守取代。

[0744] 其它修饰

[0745] 提高或降低 GIP 活性、提高或降低胰高血糖素受体活性及提高 GLP-1 受体活性的上述有关第 2 类肽的任何修饰可单独或组合使用。上述有关第 2 类胰高血糖素相关肽的任何修饰还可与赋予其它所需性质的本文所述有关第 2 类胰高血糖素相关肽的其它修饰组合，所述性质例如增加的溶解性和 / 或稳定性和 / 或作用持续时间。或者，上述有关第 2 类胰高血糖素相关肽的任何修饰可与本文所述的有关第 2 类胰高血糖素相关肽的其它修饰组合，所述修饰基本上不影响溶解性或稳定性或活性。示例性的修饰包括但不限于：

[0746] (A) 例如通过将 1、2、3 或更多个带电荷的氨基酸引入天然胰高血糖素的 C 端部分，优选引入位于 27 位 C 端的位置，来改进溶解性。可通过例如在 28 或 29 位上用带电荷的氨基酸取代天然氨基酸，或者通过例如在 27、28 或 29 位后加入带电荷的氨基酸，来引入这类带电荷的氨基酸。在示例性的实施方案中，1、2、3 个或所有带电荷的氨基酸带有负电荷。在其它实施方案中，1、2、3 个或所有带电荷的氨基酸带有正电荷。在约 5.5 和 8 之间的给定 pH（例如 pH 7），在 25℃ 下 24 小时后测量时，这类修饰提高溶解性，例如与天然胰高血糖素相比，提供至少 2 倍、5 倍、10 倍、15 倍、25 倍、30 倍或更大的溶解性。

[0747] (B) 通过例如在肽的 16、17、20、21、24 或 29 位上、C 端突出端内或 C 端氨基酸上，加入本文所述的亲水部分（例如聚乙二醇链），来提高溶解性和延长作用持续时间或循环中的半寿期。

[0748] (C) 通过本文所述的胰高血糖素肽的酰化或烷基化, 来提高溶解性和 / 或延长作用持续时间或循环中的半寿期和 / 或延迟起效;

[0749] (D) 通过经本文所述的 1 或 2 位的氨基酸修饰引入抗二肽基肽酶 IV (DPP IV) 切割的抗性, 来延长作用持续时间或循环中的半寿期。

[0750] (E) 通过修饰 15 位上的 Asp, 例如通过缺失或用谷氨酸、高谷氨酸、半胱磺酸或高半胱磺酸取代, 来提高稳定性。这类修饰可降低在 pH 5.5-8 的范围内的降解或裂解, 例如在 25°C 下 24 小时后保持至少 75%、80%、90%、95%、96%、97%、98% 或 99%、多达 100% 的起始肽。这类修饰降低在 Asp15-Ser16 之间的肽键的裂解。

[0751] (F) 通过修饰 16 位上的 Ser, 例如通过用 Thr 或 AIB 取代, 来提高稳定性。这类修饰还降低在 Asp15-Ser16 之间的肽键的裂解。

[0752] (G) 通过修饰 27 位上的甲硫氨酸, 例如通过用亮氨酸或正亮氨酸取代, 来提高稳定性。这类修饰可降低氧化降解。还可通过修饰 20 或 24 位上的 Gln, 例如通过用 Ser、Thr、Ala 或 AIB 取代, 来提高稳定性。这类修饰可降低通过 Gln 的脱酰氨基化而发生的降解。可通过修饰 21 位上的 Asp, 例如通过用 Glu 取代, 来提高稳定性。这类修饰可降低通过 Asp 脱水形成环状琥珀酰亚胺中间体接着异构化为异天冬氨酸而发生的降解。

[0753] (H) 基本上不影响活性的非保守或保守取代、添加或缺失, 例如在 2、5、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、24、27、28 或 29 位中的一个或多个位置上的保守取代; 一个或多个这些位置被 Ala 取代; 在 27、28 或 29 位中的一个或多个氨基酸缺失; 或氨基酸 29 的缺失, 任选与 C 端酰胺或酯替换 C 端羧酸基组合; 12 位上的 Lys 被 Arg 取代; 10 位上的 Tyr 被 Val 或 Phe 取代;

[0754] 通过将 GPSSGAPPPS (SEQ ID NO: 1095) 加到 C 端上提供聚乙二醇化后活性的保持。

[0755] 可对天然胰高血糖素肽的一些位置进行修饰, 同时保持母体肽的至少一些活性。因此, 本申请人预期, 位于 2、5、10、11、12、13、14、17、18、19、20、21、24、27、28 或 29 位上的一个或多个氨基酸可被不同于天然胰高血糖素肽中存在的氨基酸取代, 并且仍保持对胰高血糖素受体的活性。

[0756] 在一些实施方案中, 18 位被选自 Ala、Ser 或 Thr 的氨基酸取代。在一些实施方案中, 20 位上的氨基酸被 Ser、Thr、Lys、Arg、Orn、瓜氨酸或 AIB 取代。在一些实施方案中, 21 位被 Glu、高谷氨酸或高半胱磺酸取代。在一些实施方案中, 胰高血糖素肽包含选自 16、17、18、20、21、23、24、27、28 和 29 位中的 1-10 个氨基酸修饰。在示例性的实施方案中, 修饰是选自 Gln17、Ala18、Glu21、Ile23、Ala24、Val27 和 Gly29 中的一个或多个氨基酸取代。在一些实施方案中, 选自 17-26 位的 1-2 个氨基酸不同于母体肽。在其它实施方案中, 选自 17-22 位的 1-2 个氨基酸不同于母体肽。在另外的其它实施方案中, 修饰为 Gln17、Ala18、Glu21、Ile23 和 Ala24。

[0757] 在一些实施方案中, 将一个或多个氨基酸加至胰高血糖素肽的羧基端上。氨基酸通常选自 20 种普通氨基酸之一, 而在一些实施方案中, 氨基酸具有替换天然氨基酸的羧酸的酰胺基。在示例性的实施方案中, 所添加的氨基酸选自谷氨酸和天冬氨酸和甘氨酸。

[0758] 不破坏活性的其它修饰包括 W10 或 R20。

[0759] 在一些实施方案中, 通过截短 C 端达 1 或 2 个氨基酸残基来修饰本文公开的第 2 类胰高血糖素相关肽, 却仍保持对胰高血糖素、GLP-1 和 / 或 GIP 受体的相似活性和效价。

在这一方面,29 和 / 或 28 位上的氨基酸可缺失。

[0760] 示例性的实施方案

[0761] 按照本发明的一些实施方案,具有 GIP 激动剂活性的胰高血糖素 (SEQ ID NO : 1001) 的类似物包含 SEQ ID NO : 1001,其具有 : (a) 赋予 GIP 激动剂活性的 1 位上的氨基酸修饰, (b) 稳定类似物 C 端部分的 α 螺旋结构 (氨基酸 12-29) 的修饰,和 (c) 任选 1-10 (例如 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10) 个其它的氨基酸修饰。在一些实施方案中,类似物具有天然 GIP 对 GIP 受体的活性的至少约 1% 或本文所述的对 GIP 受体的任何其它活性水平。

[0762] 在某些实施方案中,稳定 α 螺旋结构的修饰是提供或引入分子内桥的修饰,所述分子内桥包括例如共价分子内桥,例如本文所述的任何共价分子内桥。在一些实施方案中,共价分子内桥是内酰胺桥。这些实施方案的类似物的内酰胺桥可以是本文所述的内酰胺桥。参见例如在“ α 螺旋结构的稳定”部分中的内酰胺桥的教导。例如,内酰胺桥可以是在 i 和 i+4 位上的氨基酸侧链之间或在 j 和 j+3 位上的氨基酸侧链之间的内酰胺桥,其中 i 为 12、13、16、17、20 或 24,其中 j 为 17。在某些实施方案中,内酰胺桥可介于 16 和 20 位上的氨基酸之间,其中 16 和 20 位上的氨基酸之一被 Glu 取代,而 16 和 20 位上的另一个氨基酸被 Lys 取代。

[0763] 在备选的实施方案中,稳定 α 螺旋结构的修饰是在类似物的 16、20、21 和 24 位上引入 1、2、3 或 4 个 α , α -二取代氨基酸。在一些实施方案中, α , α -二取代氨基酸为 AIB。在某些方面, α , α -二取代氨基酸 (例如 AIB) 位于 20 位,且 16 位上的氨基酸被带正电荷的氨基酸 (例如本文描述的式 IV 氨基酸) 取代。式 IV 氨基酸可以是高赖氨酸、Lys、Orn 或 2,4-二氨基丁酸 (Dab)。

[0764] 在本发明的具体方面,1 位上的氨基酸修饰是 His 被没有咪唑侧链的氨基酸 (例如大的芳族氨基酸 (例如 Tyr)) 取代。

[0765] 在某些方面,胰高血糖素的类似物包含在 27、28 和 29 位上的 1、2 个或全部位置上的氨基酸修饰。例如 27 位上的 Met 可被大的脂族氨基酸 (任选 Leu) 取代、28 位上的 Asn 可被小的脂族氨基酸 (任选 Ala) 取代、29 位上的 Thr 可被小的脂族氨基酸 (任选 Gly) 取代或前述修饰的 2 种或 3 种的组合。在具体的实施方案中,胰高血糖素的类似物包含 27 位上的 Leu、28 位上的 Ala 和 29 位上的 Gly 或 Thr。

[0766] 在本发明的某些实施方案中,胰高血糖素的类似物包含位于 29 位氨基酸 C 端的 1-21 个氨基酸的突出端。例如,突出端可包含 SEQ ID NO : 1095 或 1096 的氨基酸序列。另外或备选地,胰高血糖素的类似物可包含其中突出端的 1-6 个氨基酸是带正电荷的氨基酸的突出端。带正电荷的氨基酸可以是式 IV 氨基酸,包括但不限于 Lys、高赖氨酸、Orn 和 Dab。

[0767] 在一些实施方案中,胰高血糖素的类似物如本文所述地酰化或烷基化。例如,在有或没有间隔基的情况下,酰基或烷基可在类似物的 10 或 40 位上与胰高血糖素的类似物连接,正如本文进一步描述的一样。另外或备选地,可将类似物修饰成包含本文进一步描述的亲水部分。此外,在一些实施方案中,类似物包含下列修饰的任一种或组合 :

[0768] (a) 2 位上的 Ser 被 D-Ser、Ala、D-Ala、Gly、N-甲基-Ser、AIB、Val 或 α -氨基-N-丁酸取代 ;

[0769] (b) 10 位上的 Tyr 被 Trp、Lys、Orn、Glu、Phe 或 Val 取代 ;

[0770] (c) 酰基与 10 位上的 Lys 连接 ;

[0771] (d) 12 位上的 Lys 被 Arg 或 Ile 取代；
[0772] (e) 16 位上的 Ser 被 Glu、Gln、高谷氨酸、高半胱磺酸、Thr、Gly 或 AIB 取代；
[0773] (f) 17 位上的 Arg 被 Gln 取代；
[0774] (g) 18 位上的 Arg 被 Ala、Ser、Thr 或 Gly 取代；
[0775] (h) 20 位上的 Gln 被 Ser、Thr、Ala、Lys、瓜氨酸、Arg、Orn 或 AIB 取代；
[0776] (i) 21 位上的 Asp 被 Glu、高谷氨酸、高半胱磺酸取代；
[0777] (j) 23 位上的 Val 被 Ile 取代；
[0778] (k) 24 位上的 Gln 被 Asn、Ser、Thr、Ala 或 AIB 取代；
[0779] (l) 以及在 2、5、9、10、11、12、13、14、15、16、8、19、20、21、24、27、28 和 29 位中的任何位置上的保守取代。

[0780] 在示例性的实施方案中，具有 GIP 激动剂活性的胰高血糖素 (SEQ ID NO :1001) 的类似物包含下列修饰：

[0781] (a) 赋予 GIP 激动剂活性的 1 位上的氨基酸修饰，
[0782] (b) 在 i 和 i+4 位上的氨基酸侧链之间或在 j 和 j+3 位上的氨基酸侧链之间的内酰胺桥，其中 i 为 12、13、16、17、20 或 24，其中 j 为 17，
[0783] (c) 在 27、28 和 29 位中的 1、2 个或全部位置上的氨基酸修饰，例如在 27 和 / 或 28 位上的氨基酸修饰，和
[0784] (d) 1-9 个或 1-6 个其它氨基酸修饰，例如 1、2、3、4、5、6、7、8 或 9 个其它氨基酸修饰，

[0785] 且类似物对 GIP 受体活化的 EC₅₀ 为约 10nM 或更小。

[0786] 这些实施方案的类似物的内酰胺桥可以是本文所述的内酰胺桥。参见例如在“ α 螺旋结构的稳定”部分下的内酰胺桥的教导。例如内酰胺桥可介于 16 和 20 位上的氨基酸之间，其中 16 和 20 位上的氨基酸之一被 Glu 取代，而 16 和 20 位上的另一个氨基酸被 Lys 取代。

[0787] 按照这些实施方案，类似物可包含例如 SEQ ID NO :1005-1094 中任一个的氨基酸序列。

[0788] 在其它示例性的实施方案中，具有 GIP 激动剂活性的胰高血糖素 (SEQ ID NO :1001) 的类似物包含下列修饰：

[0789] (a) 赋予 GIP 激动剂活性的 1 位上的氨基酸修饰，
[0790] (b) 类似物 16、20、21 和 24 位上的 1、2、3 个或所有氨基酸被 α ， α -二取代氨基酸取代，
[0791] (c) 在 27、28 和 29 位中的 1、2 个或全部位置上的氨基酸修饰，例如在 27 和 / 或 28 位上的氨基酸修饰，和
[0792] (d) 1-9 个或 1-6 个其它的氨基酸修饰，例如 1、2、3、4、5、6、7、8 或 9 个其它的氨基酸修饰，

[0793] 且类似物对 GIP 受体活化的 EC₅₀ 约为 10nM 或更小。

[0794] 这些实施方案的类似物的 α ， α -二取代氨基酸可以是任何 α ， α -二取代氨基酸，包括但不限于氨基异丁酸 (AIB)、被选自甲基、乙基、丙基和正丁基的相同或不同基团或者被环辛烷或环庚烷（例如 1-氨基环辛烷 -1- 甲酸）二取代的氨基酸。在某些实施方案

中, α, α -二取代氨基酸为 AIB。在某些实施方案中, 20 位上的氨基酸被 α, α -二取代氨基酸 (例如 AIB) 取代。

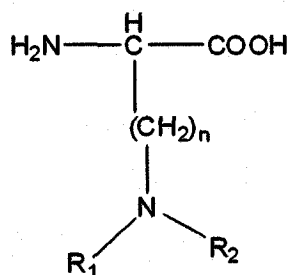
[0795] 按照这些实施方案, 类似物可包含例如 SEQ ID NO:1099-1141、1144-1164、1166-1169 和 1173-1178 中任一个的氨基酸序列。

[0796] 在另外的其它示例性的实施方案中, 具有 GIP 激动剂活性的胰高血糖素 (SEQ ID NO:1001) 的类似物包含下列修饰:

[0797] (a) 赋予 GIP 激动剂活性的 1 位上的氨基酸修饰,

[0798] (b) 16 位上的 Ser 用下式 IV 的氨基酸进行的氨基酸取代:

[0799]



[式 IV],

[0800] 其中 n 为 1-16、或 1-10、或 1-7、或 1-6、或 2-6, R_1 和 R_2 各自独立选自 H、 C_1 - C_{18} 烷基、(C_1 - C_{18} 烷基)OH、(C_1 - C_{18} 烷基) NH_2 、(C_1 - C_{18} 烷基)SH、(C_0 - C_4 烷基)(C_3 - C_6 环烷基)、(C_0 - C_4 烷基)(C_2 - C_5 杂环基)、(C_0 - C_4 烷基)(C_6 - C_{10} 芳基) R_7 和 (C_1 - C_4 烷基)(C_3 - C_9 杂芳基), 其中 R_7 为 H 或 OH, 式 IV 氨基酸的侧链包含游离氨基,

[0801] (c) 20 位上的 Gln 用 α, α -二取代氨基酸进行的氨基酸取代,

[0802] (d) 在 27、28 和 29 位中的 1、2 或全部位置上的氨基酸修饰, 例如在 27 和 / 或 28 位上的氨基酸修饰, 和

[0803] (e) 1-9 个或 1-6 个其它氨基酸修饰, 例如 1、2、3、4、5、6、7、8 或 9 个其它氨基酸修饰,

[0804] 且类似物对 GIP 受体活化的 EC_{50} 约为 10nM 或更小。

[0805] 这些实施方案的类似物的式 IV 氨基酸可以是任何氨基酸, 例如式 IV 氨基酸, 其中 n 为 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15 或 16。在某些实施方案中, n 为 2、3、4 或 5, 在此情况下, 氨基酸分别为 Dab、Orn、Lys 或高赖氨酸。

[0806] 这些实施方案的类似物的 α, α -二取代氨基酸可以是任何 α, α -二取代氨基酸, 包括但不限于氨基异丁酸 (AIB)、被选自甲基、乙基、丙基和正丁基的相同或不同基团或者被环辛烷或环庚烷 (例如 1-氨基环辛烷-1-甲酸) 二取代的氨基酸。在某些实施方案中, α, α -二取代氨基酸为 AIB。

[0807] 按照这些实施方案, 类似物可包含例如 SEQ ID NO:1099-1165 中任一个的氨基酸序列。

[0808] 在另外的其它示例性的实施方案中, 具有 GIP 激动剂活性的胰高血糖素 (SEQ ID NO:1001) 的类似物包含:

[0809] (a) 赋予 GIP 激动剂活性的 1 位上的氨基酸修饰, 和

[0810] (b) 位于 29 位氨基酸 C 端的约 1-约 21 个氨基酸的突出端, 其中突出端的至少一

个氨基酸是酰化或烷基化的,

[0811] 其中类似物对 GIP 受体活化的 EC₅₀ 约为 10nM 或更小。

[0812] 在一些实施方案中,酰化或烷基化氨基酸为式 I、式 II 或式 III 的氨基酸。在更具体的实施方案中,式 I 的氨基酸为 Dab、Orn、Lys 或高赖氨酸。此外,在一些实施方案中,约 1- 约 21 个氨基酸的突出端包含以下氨基酸序列:GPSSGAPPPS(SEQ ID NO:1095) 或 XGPSSGAPPPS(SEQ ID NO:1096),其中 X 为任何氨基酸;或者 GPSSGAPPPK(SEQ ID NO:1170) 或 XGPSSGAPPPK(SEQ ID NO:1171) 或 XGPSSGAPPPSK(SEQ ID NO:1172),其中 X 为 Gly 或小的脂族或非极性或略有极性的氨基酸。在一些实施方案中,约 1- 约 21 个氨基酸可包含以下序列,其与 SEQ ID NO:1095、1096、1170、1171 或 1172 相比含有一个或多个保守取代。在一些实施方案中,酰化或烷基化氨基酸位于 C 端突出类似物的 37、38、39、40、41、42 或 43 位上。在某些实施方案中,酰化或烷基化氨基酸位于 C 端突出类似物的 40 位上。

[0813] 在一些实施方案中,具有 GIP 激动剂活性的类似物还包含在 27、28 和 29 位中的 1、2 个或全部位置上的氨基酸修饰,例如在 27 和 / 或 28 位上的氨基酸修饰。

[0814] 在上述示例性实施方案的任一个中,赋予 GIP 激动剂活性的 1 位上的氨基酸修饰可以是 His 被没有咪唑侧链的氨基酸取代。1 位上的氨基酸修饰可以是例如 His 被大的芳族氨基酸取代。在一些实施方案中,大的芳族氨基酸是本文所述任何大的芳族氨基酸,包括例如 Tyr。

[0815] 此外,有关上述示例性的实施方案,在 27、28 和 29 位中的 1、2 个或所有位置上的氨基酸修饰可以是本文所述这些位置上的任何修饰。例如,27 位上的 Met 可被大的脂族氨基酸(任选 Leu)取代、28 位上的 Asn 可被小的脂族氨基酸(任选 Ala)取代和 / 或 29 位上的 Thr 可被小的脂族氨基酸(任选 Gly)取代。或者,类似物可包含在 27 和 / 或 28 位上的这类氨基酸修饰。

[0816] 上述示例性实施方案的类似物可还包含 1-9 个或 1-6 个另外的其它氨基酸修饰,例如 1、2、3、4、5、6、7、8 或 9 个另外的氨基酸修饰,例如本文所述的提高或降低对 GIP、GLP-1 和胰高血糖素受体中的任一种的活性、提高溶解性、改进作用持续时间或循环中的半寿期、延迟起效或提高稳定性的任何修饰。类似物可还包含例如 12 位上的氨基酸修饰,任选被 Ile 取代;和 / 或 17 和 18 位上的氨基酸修饰,任选在 17 位上用 Q 和 18 位上用 A 取代;和 / 或将 GPSSGAPPPS(SEQ ID NO:1095) 或 XGPSSGAPPPS(SEQ ID NO:1096),或者与 SEQ ID NO:1095 或 1096 相比含有一个或多个保守取代的序列添加至 C 端。类似物可包含一种或多种下列修饰:

[0817] (i) 2 位上的 Ser 被 D-Ser、Ala、D-Ala、Gly、N- 甲基 -Ser、AIB、Val 或 α - 氨基 -N- 丁酸取代;

[0818] (ii) 10 位上的 Tyr 被 Trp、Lys、Orn、Glu、Phe 或 Val 取代;

[0819] (iii) 酰基与 10 位上的 Lys 连接;

[0820] (iv) 12 位上的 Lys 被 Arg 取代;

[0821] (v) 16 位上的 Ser 被 Glu、Gln、高谷氨酸、高半胱氨酸、Thr、Gly 或 AIB 取代;

[0822] (vi) 17 位上的 Arg 被 Gln 取代;

[0823] (vii) 18 位上的 Arg 被 Ala、Ser、Thr 或 Gly 取代;

[0824] (viii) 20 位上的 Gln 被 Ala、Ser、Thr、Lys、瓜氨酸、Arg、Orn 或 AIB 取代;

[0825] (ix) 21 位上的 Asp 被 Glu、高谷氨酸、高半胱氨酸取代；

[0826] (x) 23 位上的 Val 被 Ile 取代；

[0827] (xi) 24 位上的 Gln 被 Asn、Ala、Ser、Thr 或 AIB 取代；和

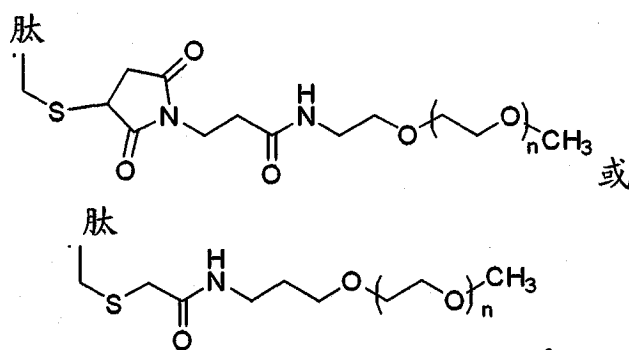
[0828] (xii) 在 2、5、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、24、27、28 和 29 位中的任一个上的保守取代。

[0829] 在一些实施方案中，类似物包含修饰 (i)-(xii) 的组合。另外或备选地，类似物可包含 3 位上的氨基酸修饰（例如 Gln 用 Glu 进行的氨基酸取代），其中类似物具有小于 1% 的胰高血糖素对胰高血糖素受体的活性。另外或备选地，类似物可包含 7 位上的氨基酸修饰（例如 Thr 用没有羟基的氨基酸（例如 Abu 或 Ile）进行的氨基酸取代），其中类似物具有小于约 10% 的 GLP-1 对 GLP-1 受体的活性。

[0830] 至于示例性的实施方案，类似物可与亲水部分共价连接。在一些实施方案中，类似物在 16、17、20、21、24、29、40 位或 C 端的任何氨基酸上与亲水部分共价连接。在某些实施方案中，类似物包含 C 端突出端（例如 SEQ ID NO:1095 的氨基酸序列）并添加包含亲水部分的氨基酸，使得亲水部分与类似物在 40 位上共价连接。

[0831] 在一些实施方案中，亲水部分与类似物的 Lys、Cys、Orn、高半胱氨酸或乙酰基-苯丙氨酸共价连接。Lys、Cys、Orn、高半胱氨酸或乙酰基-苯丙氨酸可以是对胰高血糖素序列 (SEQ ID NO:1001) 而言是天然的氨基酸或者可以是置换 SEQ ID NO:1001 的天然氨基酸的氨基酸。在其中亲水部分与 Cys 连接的一些实施方案中，与亲水部分的连接可包含以下结构：

[0832]



[0833] 对于包含亲水部分的类似物，亲水部分可以是本文所述的任何亲水部分。参见例如在“亲水部分的连接”部分下的教导。在一些实施方案中，亲水部分是聚乙二醇 (PEG)。在某些实施方案中，PEG 的分子量为约 1,000 道尔顿 - 约 40,000 道尔顿，例如约 20,000 道尔顿 - 约 40,000 道尔顿。

[0834] 至于示例性的实施方案，类似物可包含其中侧链与酰基或烷基（例如对天然存在的氨基酸来说是非天然的酰基或烷基）共价连接的修饰氨基酸。酰化或烷基化类似物可与“酰化和烷基化”部分所述的酰化或烷基化肽一致。在一些实施方案中，酰基为 C4-C30 脂肪酰基，例如 C10 脂肪酰基或烷基、C12 脂肪酰基或烷基、C14 脂肪酰基或烷基、C16 脂肪酰基或烷基、C18 脂肪酰基或烷基、C20 酰基或烷基或 C22 酰基或烷基。酰基或烷基可与类似物的任何氨基酸共价连接，包括但不限于 10 或 40 位上的氨基酸或 C 端氨基酸。在某些实施方案中，类似物包含 C 端突出端（例如 SEQ ID NO:1095 的氨基酸序列）并添加包含酰基或烷基的氨基酸，使得酰基或烷基在 40 位上与类似物共价连接。在一些实施方案中，酰基

或烷基与式 I、式 II 或式 III 的氨基酸（例如 Lys 残基）侧链共价连接。酰基或烷基可与对胰高血糖素序列（SEQ ID NO:1001）而言是天然的氨基酸共价连接，或者可与添加至 SEQ ID NO:1001 序列或添加至后接 SEQ ID NO:1095 的 SEQ ID NO:1001 序列（在 N 端或 C 端上）的氨基酸连接，或者可与置换天然氨基酸（例如 SEQ ID NO:1001 的 10 位上的 Tyr）的氨基酸连接。

[0835] 在其中类似物包含酰基或烷基的上述示例性实施方案中，类似物可按本文所述通过间隔基与酰基或烷基连接。间隔基的长度可为例如 3-10 个原子，并且可为例如氨基酸（例如 6-氨基己酸、本文所述的任何氨基酸）、二肽（例如 Ala-Ala、 β Ala- β Ala、Leu-Leu、Pro-Pro、 γ Glu- γ Glu）、三肽或亲水或疏水双官能间隔基。在某些方面，间隔基和酰基或烷基的总长度为约 14-约 28 个原子。在一些实施方案中，氨基酸间隔基不是 γ -Glu。在一些实施方案中，二肽间隔基不是 γ -Glu- γ -Glu。

[0836] 在另外的示例性实施方案中，具有 GIP 激动剂活性的胰高血糖素的类似物包含 SEQ ID NO:1227、1228、1229 或 1230 中的任一个的氨基酸序列，其还包含下列修饰：

[0837] (a) 任选赋予 GIP 激动剂活性的 1 位上的氨基酸修饰，

[0838] (b) 位于 29 位氨基酸 C 端的约 1-约 21 个氨基酸的突出端，其中突出端的至少一个氨基酸是酰化或烷基化的，和

[0839] (d) 多达 6 个其它氨基酸修饰，

[0840] 其中类似物对 GIP 受体活化的 EC₅₀ 约为 10nM 或更小。

[0841] 在一些方面，酰化或烷基化氨基酸为式 I、式 II 或式 III 的氨基酸。在更具体的实施方案中，式 I 的氨基酸为 Dab、Orn、Lys 或高赖氨酸。同样，在一些实施方案中，约 1-约 21 个氨基酸包含以下氨基酸序列：GPSSGAPPPS (SEQ ID NO:1095) 或 XGPSSGAPPPS (SEQ ID NO:1096)，其中 X 为任何氨基酸；或者 GPSSGAPPPK (SEQ ID NO:1170) 或 XGPSSGAPPPK (SEQ ID NO:1171) 或 XGPSSGAPPPSK (SEQ ID NO:1172)，其中 X 为 Gly 或小的脂族或非极性或略有极性的氨基酸。在一些实施方案中，约 1-约 21 个氨基酸可包含以下序列，其与 SEQ ID NO:1095、1096、1170、1171 或 1172 相比，含有一个或多个保守取代。在一些实施方案中，酰化或烷基化氨基酸位于 C 端突出类似物的 37、38、39、40、41、42 或 43 位上。在某些实施方案中，酰化或烷基化氨基酸位于 C 端突出类似物的 40 位上。

[0842] 在上述示例性实施方案的任一个中，赋予 GIP 激动剂活性的 1 位上的氨基酸可为没有咪唑侧链的氨基酸。1 位上的氨基酸可以为例如大的芳族氨基酸。在一些实施方案中，大的芳族氨基酸是本文所述大的芳族氨基酸中的任一种，包括例如 Tyr。

[0843] 上述示例性实施方案的类似物可还包含 1-6 个其它氨基酸修饰，例如，本文所述提高或降低对 GIP、GLP-1 和胰高血糖素受体中的任一种的活性、提高溶解性、改进作用持续时间或循环中的半寿期、延迟起效或提高稳定性的任何修饰。

[0844] 在某些方面，上述示例性实施方案所述的胰高血糖素类似物还包含在 27、28 和 29 位中的 1、2 个或全部位置上的氨基酸修饰。这些位置上的修饰可以是本文所述的有关这些位置的任何修饰。例如，有关 SEQ ID NO:1227、1228、1229 或 1230，27 位可被大的脂族氨基酸（例如 Leu、Ile 或正亮氨酸）或 Met 取代；28 位可被另一种小的脂族氨基酸（例如 Gly 或 Ala）或 Asn 取代；和 / 或 29 位可被另一种小的脂族氨基酸（例如 Ala 或 Gly）或 Thr 取代。或者，类似物可包含在 27 和 / 或 28 位上的这类氨基酸修饰。

[0845] 类似物可还包含一种或多种下列其它修饰：

[0846] (i) 2 位上的氨基酸为 D-Ser、Ala、D-Ala、Gly、N- 甲基 -Ser、AIB、Val 或 α - 氨基 -N- 丁酸中的任一种；

[0847] (ii) 10 位上的氨基酸为 Tyr、Trp、Lys、Orn、Glu、Phe 或 Val；

[0848] (iii) 酰基与 10 位上的 Lys 连接；

[0849] (iv) 12 位上的氨基酸为 Ile、Lys 或 Arg；

[0850] (v) 16 位上的氨基酸为 Ser、Glu、Gln、高谷氨酸、高半胱氨酸、Thr、Gly 或 AIB 中的任一种；

[0851] (vi) 17 位上的氨基酸为 Gln 或 Arg；

[0852] (vii) 18 位上的氨基酸为 Ala、Arg、Ser、Thr 或 Gly 中的任一种；

[0853] (viii) 20 位上的氨基酸为 Ala、Ser、Thr、Lys、瓜氨酸、Arg、Orn 或 AIB 或另一种 α ， α - 二取代氨基酸中的任一种；

[0854] (ix) 21 位上的氨基酸为 Glu、Asp、高谷氨酸、高半胱氨酸中的任一种；

[0855] (x) 23 位上的氨基酸为 Val 或 Ile；

[0856] (xi) 24 位上的氨基酸为 Gln、Asn、Ala、Ser、Thr 或 AIB 中的任一个；和

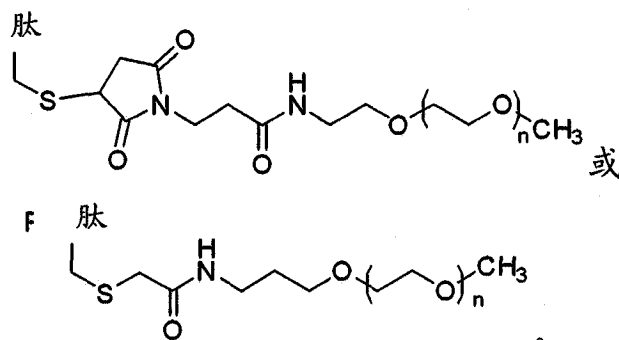
[0857] (xii) 在 2、5、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、24、27、28 和 29 位中的任一个上的一个或多个保守取代。

[0858] 在一些实施方案中，类似物包含修饰 (i)-(xii) 的组合。备选或另外地，类似物可包含 3 位上的氨基酸修饰（例如 Gln 用 Glu 进行的氨基酸取代），其中类似物具有小于 1% 的胰高血糖素对胰高血糖素受体的活性。备选或另外地，类似物可包含 7 位上的氨基酸修饰（例如 Thr 用没有羟基的氨基酸（例如 Abu 或 Ile）进行的氨基酸取代），其中类似物具有小于约 10% 的 GLP-1 对 GLP-1 受体的活性。

[0859] 至于示例性的实施方案，类似物可与亲水部分共价连接。在一些实施方案中，类似物在 16、17、20、21、24、29、40 位或 C 端氨基酸中的任一个上与亲水部分共价连接。在某些实施方案中，类似物包含与类似物在 24 位上共价连接的亲水部分。

[0860] 在一些实施方案中，亲水部分与类似物的 Lys、Cys、Orn、高半胱氨酸或乙酰基 - 苯丙氨酸共价连接。Lys、Cys、Orn、高半胱氨酸或乙酰基 - 苯丙氨酸可以是对 SEQ ID NO：1001、1227、1228、1229 或 1230 而言是天然的氨基酸，或者可以是取代氨基酸。在其中亲水部分与 Cys 连接的一些实施方案中，连接可包含以下结构：

[0861]



[0862] 对于包含亲水部分的类似物，亲水部分可以是本文所述的任何亲水部分。参见例如在“亲水部分的连接”部分下的教导。在一些实施方案中，亲水部分是聚乙二醇 (PEG)。

在某些实施方案中,PEG 的分子量为约 1,000 道尔顿 – 约 40,000 道尔顿,例如约 20,000 道尔顿 – 约 40,000 道尔顿。

[0863] 至于示例性的实施方案,类似物可包含其中侧链与酰基或烷基共价连接的 C 端突出端内的修饰氨基酸。酰化或烷基化类似物可以与“酰化和烷基化”部分所述的酰化或烷基化肽一致。在一些实施方案中,酰基为 C4-C30 脂肪酰基,例如 C10 脂肪酰基或烷基、C12 脂肪酰基或烷基、C14 脂肪酰基或烷基、C16 脂肪酰基或烷基、C18 脂肪酰基或烷基、C20 酰基或烷基或 C22 酰基或烷基。酰基或烷基可与类似物的任何氨基酸共价连接,包括但不限于 10 或 40 位上的氨基酸或 C 端氨基酸。在一些实施方案中,酰基或烷基与式 I、式 II 或式 III 的氨基酸(例如 Lys 残基)侧链共价连接。酰基或烷基与对 SEQ ID NO:1001、1227、1228、1229 或 1230 而言是天然的氨基酸共价连接,或者可与取代氨基酸连接。酰基或烷基与对 SEQ ID NO:1095、1096、1171 或 1172 而言是天然的氨基酸共价连接,或者可与取代氨基酸连接。

[0864] 在其中类似物包含酰基或烷基的上述示例性实施方案中,类似物可按本文所述通过间隔基与酰基或烷基连接。间隔基的长度可为例如 3-10 个原子,并且可为例如氨基酸(例如 6-氨基己酸、本文所述的任何氨基酸)、二肽(例如 Ala-Ala、 β Ala- β Ala、Leu-Leu、Pro-Pro、 γ Glu- γ Glu)、三肽或者亲水或疏水双官能间隔基。在某些方面,间隔基和酰基或烷基的总长度为约 14-约 28 个原子。在一些实施方案中,氨基酸间隔基不是 γ -Glu。在一些实施方案中,二肽间隔基不是 γ -Glu- γ -Glu。

[0865] 在一些非常具体的实施方案中,本发明的类似物包含选自以下的氨基酸序列: SEQ ID NOs:1099-1141、1144-1164、1166、1192-1207、1209-1221 和 1223,或者 1167-1169、1173-1178 和 1225。

[0866] 此外,本发明类似物的具体实例包括但不限于表 1-3 中提及的任何类似物。

[0867] 在另外的示例性实施方案中,具有 GIP 激动剂活性的胰高血糖素的类似物包含酰基或烷基(例如对于天然存在的氨基酸而言是非天然的酰基或烷基),其中酰基或烷基与间隔基连接,其中 (i) 间隔基与该类似物 10 位上的氨基酸侧链连接;或 (ii) 该类似物包含位于 29 位氨基酸 C 端的 1-21 个氨基酸的突出端,且间隔基与相当于与 SEQ ID NO:1001 相对的 37-43 位之一的氨基酸侧链连接,其中该类似物对 GIP 受体活化的 EC50 约为 10nM 或更小。

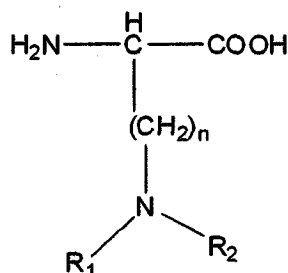
[0868] 在这类实施方案中,类似物可包含 SEQ ID NO:1001 的氨基酸序列,其具有 (i) 赋予 GIP 激动剂活性的 1 位上的氨基酸修饰, (ii) 在 27、28 和 29 位中的 1、2 个或所有位置上的氨基酸修饰, (iii) 下列中的至少一种:

[0869] (A) 类似物在 i 和 i+4 位上的氨基酸侧链之间或在 j 和 j+3 位上的氨基酸侧链之间包含内酰胺桥,其中 i 为 12、13、16、17、20 或 24,其中 j 为 17;

[0870] (B) 在类似物 16、20、21 和 24 位上的 1、2、3 个或所有氨基酸被 α , α -二取代氨基酸取代;或

[0871] (C) 类似物包含 (i) 16 位上的 Ser 用下式 IV 的氨基酸进行的氨基酸取代:

[0872]



[式 IV],

[0873] 其中 n 为 1-7, 其中 R_1 和 R_2 各自独立选自 H 、 C_1 - C_{18} 烷基、 $(\text{C}_1$ - C_{18} 烷基)OH、 $(\text{C}_1$ - C_{18} 烷基) NH_2 、 $(\text{C}_1$ - C_{18} 烷基)SH、 $(\text{C}_0$ - C_4 烷基)(C_3 - C_6) 环烷基、 $(\text{C}_0$ - C_4 烷基)(C_2 - C_5 杂环基)、 $(\text{C}_0$ - C_4 烷基)(C_6 - C_{10} 芳基) R_7 和 $(\text{C}_1$ - C_4 烷基)(C_3 - C_9 杂芳基), 其中 R_7 为 H 或 OH , 式 IV 氨基酸的侧链包含游离氨基; 和 (ii) 20 位上的 Gln 用 α , α -二取代氨基酸进行的氨基酸取代。

[0874] 和 (iv) 多达 6 个其它氨基酸修饰。

[0875] 这些实施方案的类似物的 α , α -二取代氨基酸可以是任何 α , α -二取代氨基酸, 包括但不限于氨基异丁酸 (AIB)、被选自甲基、乙基、丙基和正丁基的相同或不同基团或者被环辛烷或环庚烷 (例如 1-氨基环辛烷-1-甲酸) 二取代的氨基酸。在某些实施方案中, α , α -二取代氨基酸为 AIB。

[0876] 这些实施方案的类似物的式 IV 氨基酸可以是任何氨基酸, 例如, 式 IV 氨基酸, 其中 n 为 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15 或 16。在某些实施方案中, n 为 2、3、4 或 5, 在此情况下, 氨基酸为分别 Dab 、 Orn 、 Lys 或高赖氨酸。

[0877] 在上述示例性实施方案的任一个中, 赋予 GIP 激动剂活性的 1 位上的氨基酸修饰可以是 His 被没有咪唑侧链的氨基酸取代。1 位上的氨基酸修饰可以为例如 His 被大的芳族氨基酸取代。在一些实施方案中, 大的芳族氨基酸是本文所述大的芳族氨基酸中的任一种, 包括例如 Tyr 。

[0878] 此外, 有关上述示例性的实施方案, 在 27、28 和 29 位中的 1、2 个或所有位置上的氨基酸修饰可以是本文所述的这些位置上的任何修饰。例如, 27 位上的 Met 可被大的脂族氨基酸 (任选 Leu) 取代, 28 位上的 Asn 可被小的脂族氨基酸 (任选 Ala) 取代, 和 / 或 29 位上的 Thr 可被小的脂族氨基酸 (任选 Gly) 取代。或者, 类似物可包含在 27 和 / 或 28 位上的这类氨基酸修饰。

[0879] 上述示例性实施方案的类似物可还包含 1-9 个或 1-6 个另外的其它氨基酸修饰, 例如 1、2、3、4、5、6、7、8 或 9 个其它的氨基酸修饰, 例如, 本文所述的提高或降低对 GIP、GLP-1 和胰高血糖素受体中的任一种的活性、提高溶解性、改进作用持续时间或循环中的半寿期、延迟起效或提高稳定性的任何修饰。类似物可还包含例如 12 位上的氨基酸修饰 (任选被 Ile 取代), 和 / 或 17 和 18 位上的氨基酸修饰 (任选在 17 位被 Q 取代和 18 位上被 A 取代), 和 / 或将 GPSSGAPPPS (SEQ ID NO:1095) 或 XGPSSGAPPPS (SEQ ID NO:1096)、或与 SEQ ID NO:1095 或 1096 相比含有一个或多个保守取代的序列添加至 C 端。类似物可包含一种或多种下列修饰:

[0880] (i) 2 位上的 Ser 被 D-Ser 、 Ala 、 D-Ala 、 Gly 、 N-甲基-Ser 、 AIB 、 Val 或 α -氨基-N-丁酸取代;

[0881] (ii) 10 位上的 Tyr 被 Trp 、 Lys 、 Orn 、 Glu 、 Phe 或 Val 取代;

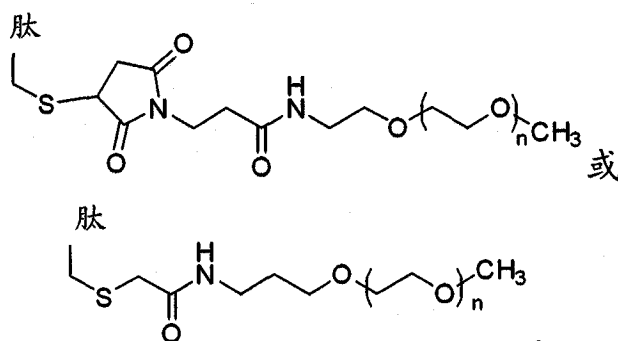
- [0882] (iii) 酰基与 10 位上的 Lys 连接；
 [0883] (iv) 12 位上的 Lys 被 Arg 取代；
 [0884] (v) 16 位上的 Ser 被 Glu、Gln、高谷氨酸、高半胱磺酸、Thr、Gly、Lys 或 AIB 取代；
 [0885] (vi) 17 位上的 Arg 被 Gln 取代；
 [0886] (vii) 18 位上的 Arg 被 Ala、Ser、Thr 或 Gly 取代；
 [0887] (viii) 20 位上的 Gln 被 Ala、Ser、Thr、Lys、瓜氨酸、Arg、Orn 或 AIB 取代；
 [0888] (ix) 21 位上的 Asp 被 Glu、高谷氨酸、高半胱磺酸取代；
 [0889] (x) 23 位上的 Val 被 Ile 取代；
 [0890] (xi) 24 位上的 Gln 被 Asn、Ala、Ser、Thr 或 AIB 取代；和
 [0891] (xii) 在 2、5、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、24、27、28 和 29 位中的任一个上的保守取代。

[0892] 在一些实施方案中，类似物包含修饰 (i)-(xii) 的组合。备选或另外地，类似物可包含 3 位上的氨基酸修饰（例如 Gln 用 Glu 进行的氨基酸取代），其中类似物具有小于 1% 的胰高血糖素对胰高血糖素受体的活性。备选或另外地，类似物可包含 7 位上的氨基酸修饰（例如 Thr 用没有羟基的氨基酸（例如 Abu 或 Ile）进行的氨基酸取代）、氨基酸 C 端至 27 或 28 位上的氨基酸缺失（得到 27 个氨基酸的肽或 28 个氨基酸的肽）或其组合，其中类似物具有小于约 10% 的 GLP-1 对 GLP-1 受体的活性。

[0893] 至于示例性的实施方案，类似物可与亲水部分共价连接。在一些实施方案中，类似物与亲水部分在 16、17、20、21、24、29、40 位或 C 端的任何氨基酸上共价连接。在某些实施方案中，类似物包含 C 端突出端（例如 SEQ ID NO:1095 的氨基酸序列）并添加包含亲水部分的氨基酸，使得亲水部分与类似物在 40 位上共价连接。

[0894] 在一些实施方案中，亲水部分与类似物的 Lys、Cys、Orn、高半胱氨酸或乙酰基-苯丙氨酸共价连接。Lys、Cys、Orn、高半胱氨酸或乙酰基-苯丙氨酸可以是对胰高血糖素序列 (SEQ ID NO:1001) 而言是天然的氨基酸，或者可以是置换 SEQ ID NO:1001 的天然氨基酸的氨基酸。在其中亲水部分与 Cys 连接的一些实施方案中，与亲水部分的连接可包含以下结构：

[0895]



[0896] 对于包含亲水部分的类似物，亲水部分可以是本文所述的任何亲水部分。参见例如在“亲水部分的连接”部分下的教导。在一些实施方案中，亲水部分是聚乙二醇 (PEG)。在某些实施方案中，PEG 的分子量为约 1,000 道尔顿 - 约 40,000 道尔顿，例如约 20,000 道尔顿 - 约 40,000 道尔顿。

[0897] 在其中类似物包含通过间隔基与类似物连接的酰基或烷基的示例性实施方案中, 间隔基可以是本文所述的任何间隔基。间隔基的长度可为例如 3-10 个原子, 并且可为例如氨基酸 (例如 6-氨基己酸、本文所述的任何氨基酸)、二肽 (例如 Ala-Ala、 β Ala- β Ala、Leu-Leu、Pro-Pro、 γ Glu- γ Glu)、三肽或亲水或疏水双官能间隔基。在某些方面, 间隔基和酰基或烷基的总长度为约 14- 约 28 个原子。在一些实施方案中, 氨基酸间隔基不是 γ -Glu。在一些实施方案中, 二肽间隔基不是 γ -Glu- γ -Glu。

[0898] 酰基或烷基是本文所述的任何酰基或烷基, 例如对于天然存在的氨基酸是非天然的酰基或烷基。在一些实施方案中, 酰基或烷基是 C4-C30 脂肪酰基, 例如 C10 脂肪酰基或烷基、C12 脂肪酰基或烷基、C14 脂肪酰基或烷基、C16 脂肪酰基或烷基、C18 脂肪酰基或烷基、C20 酰基或烷基、或 C22 酰基或烷基、或 C4-C30 烷基。在具体的实施方案中, 酰基是 C12-C18 脂肪酰基 (例如 C14 或 C16 脂肪酰基)。

[0899] 在一些实施方案中, 类似物的 29 位氨基酸 C 端约 1- 约 21 个氨基酸的突出端包含以下氨基酸序列: GPSSGAPPPS (SEQ ID NO: 1095) 或 XGPSSGAPPPS (SEQ ID NO: 1096), 其中 X 为任何氨基酸; 或者 GPSSGAPPPK (SEQ ID NO: 1170) 或 XGPSSGAPPPK (SEQ ID NO: 1171) 或 XGPSSGAPPPSK (SEQ ID NO: 1172), 其中 X 为 Gly 或小的脂族或非极性或略有极性的氨基酸。在一些实施方案中, 约 1- 约 21 个氨基酸可包含以下序列, 其与 SEQ ID NO: 1095、1096、1170、1171 或 1172 相比, 含有一个或多个保守取代。在一些实施方案中, 酰化或烷基化氨基酸位于 C 端突出类似物的 37、38、39、40、41、42 或 43 位上。在某些实施方案中, 酰化或烷基化氨基酸位于 C 端突出类似物的 40 位上。

[0900] GIP 激动剂可以是这样的肽, 其包含任何氨基酸序列 (例如 SEQ ID NO: 1005-1094) 的氨基酸序列, 任选具有多达 1、2、3、4 或 5 个保持 GIP 激动剂活性的其它修饰。在某些实施方案中, GIP 激动剂包含 SEQ ID NO: 1099-1262 中任一个的氨基酸。

[0901] 第 3 类胰高血糖素相关肽

[0902] 在某些实施方案中, 胰高血糖素相关肽是第 3 类胰高血糖素相关肽, 其描述于本文和国际专利申请号 PCT/US2009/47438 (2009 年 6 月 16 日提交)、国际专利申请公布号 WO 2008/101017 (2008 年 8 月 21 日公布) 和美国临时申请号 61/090, 412 和美国申请号 61/177, 476, 该文献的内容通过引用以其整体结合。

[0903] 以下部分提及的涉及第 3 类胰高血糖素相关肽的一些生物序列 (SEQ ID NO: 1-656) 相当于国际专利申请号 PCT/US2009/47438 中的 SEQ ID NO: 1-656。

[0904] 活性

[0905] 第 3 类胰高血糖素相关肽可以是这样的肽, 其对胰高血糖素受体显示活性提高, 和在又一个实施方案中具有提高的生物物理稳定性和 / 或水溶性。另外, 在一些实施方案中, 第 3 类胰高血糖素相关肽失去天然胰高血糖素对胰高血糖素受体对比 GLP-1 受体的选择性, 因此表示这两种受体的共激动剂。第 3 类胰高血糖素相关肽内选定的氨基酸修饰可以控制肽对 GLP-1 受体对比胰高血糖素受体的相对活性。因此, 第 3 类胰高血糖素相关肽可以是与 GLP-1 受体相比对胰高血糖素受体具有较高活性的胰高血糖素 /GLP-1 共激动剂、对两种受体具有大致相同的活性的胰高血糖素 /GLP-1 共激动剂或者与胰高血糖素受体相比对 GLP-1 受体具有较高活性的胰高血糖素 /GLP-1 共激动剂。可将后一类别的共激动剂进行改造以便显示对胰高血糖素受体几乎没有或没有活性, 而且与天然 GLP-1 相比保持以

相同或更好的效价激活 GLP-1 受体的能力。这些共激动剂的任一种还可包括赋予生物物理稳定性和 / 或水溶性得到提高的修饰。

[0906] 可对第 3 类胰高血糖素相关肽进行修饰以产生这样的胰高血糖素肽, 其对 GLP-1 受体具有相对于天然 GLP-1 的至少约 1% (包括至少约 1.5%、2%、5%、7%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、75%、100%、125%、150%、175%) 至约 200% 或更高的活性, 以及对胰高血糖素受体具有相对于天然胰高血糖素的至少约 1% (包括约 1.5%、2%、5%、7%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、75%、100%、125%、150%、175%、200%、250%、300%、350%、400%、450%) 至约 500% 或更高的活性。天然胰高血糖素的氨基酸序列是 SEQ ID NO :1, GLP-1 (7-36) 酰胺的氨基酸序列是 SEQ ID NO :52, 而 GLP-1 (7-37) 酸的氨基酸序列是 SEQ ID NO :50。在示例性的实施方案中, 第 3 类胰高血糖素相关肽可具有天然胰高血糖素对胰高血糖素受体活性的至少 10% 和天然 GLP-1 对 GLP-1 受体活性的至少 50%, 或者天然胰高血糖素对胰高血糖素受体活性的至少 40% 和天然 GLP-1 对 GLP-1 受体活性的至少 40%, 或者天然胰高血糖素对胰高血糖素受体活性的至少 60% 和天然 GLP-1 对 GLP-1 受体活性的至少 60%。

[0907] 第 3 类胰高血糖素相关肽对胰高血糖素受体相对于 GLP-1 受体的选择性可表示为胰高血糖素 /GLP-1 活性的相对比率 (该肽对胰高血糖素受体相对于天然胰高血糖素的活性, 除以该肽对 GLP-1 受体相对于天然 GLP-1 的活性)。例如, 具有天然胰高血糖素对胰高血糖素受体活性的 60% 和天然 GLP-1 对 GLP-1 受体活性的 60% 的第 3 类胰高血糖素相关肽, 具有 1 : 1 的胰高血糖素 /GLP-1 活性比率。胰高血糖素 /GLP-1 活性的示例性比率包括约 1 : 1、1.5 : 1、2 : 1、3 : 1、4 : 1、5 : 1、6 : 1、7 : 1、8 : 1、9 : 1 或 10 : 1, 或者约 1 : 10、1 : 9、1 : 8、1 : 7、1 : 6、1 : 5、1 : 4、1 : 3、1 : 2 或 1 : 1.5。例如, 10 : 1 的胰高血糖素 /GLP-1 活性比率表示对胰高血糖素受体的选择性 10 倍于对 GLP-1 受体的选择性。同样, 10 : 1 的 GLP-1 / 胰高血糖素活性比率表示对 GLP-1 受体的选择性 10 倍于对胰高血糖素受体的选择性。

[0908] 在一些实施方案中, 第 3 类胰高血糖素相关肽具有天然胰高血糖素对胰高血糖素受体的活性的约 10% 以下, 例如约 1-10% 或约 0.1-10% 或大于约 0.1% 但小于约 10%, 同时具有 GLP-1 对 GLP-1 受体的活性的至少 20%。例如, 本文所述的示例性的第 3 类胰高血糖素相关肽具有天然胰高血糖素活性的约 0.5%、约 1% 或约 7%, 同时具有 GLP-1 对 GLP-1 受体的活性的至少 20%。

[0909] 第 3 类胰高血糖素相关肽可以是对胰高血糖素受体或 GLP-1 受体或两种受体的活性得到提高或降低的胰高血糖素肽。第 3 类胰高血糖素相关肽可以是对胰高血糖素受体相对于 GLP-1 受体的选择性发生改变的胰高血糖素肽。

[0910] 因此, 提供溶解性和 / 或稳定性也得到提高的本文公开的高效价第 3 类胰高血糖素相关肽。示例性的高效价第 3 类胰高血糖素相关肽具有天然胰高血糖素对胰高血糖素受体活性的至少约 200%, 任选在 pH 6 和 8 之间、或 6 和 9 之间、或 7 和 9 之间 (例如 pH 7), 在至少 1mg/mL 的浓度下是可溶的, 任选在 25°C 下 24 小时后, 保持至少 95% 的起始肽 (例如 5% 或更少的起始肽被降解或切割)。再举例来说, 示例性的第 3 类胰高血糖素相关肽对胰高血糖素和 GLP-1 受体两者具有大于约 40% 或大于约 60% 的活性 (按约 1 : 3 和 3 : 1 之间、或约 1 : 2 和 2 : 1 之间的比率), 任选在 pH 6 和 8 之间、或 6 和 9 之间、或 7 和 9 之间

(例如 pH 7), 在至少 1mg/mL 的浓度下是可溶的, 且任选在 25°C 下 24 小时后保持至少 95% 的起始肽。另一种示例性的第 3 类胰高血糖素相关肽具有天然胰高血糖素对胰高血糖素受体活性的约 175% 以上和天然 GLP-1 对 GLP-1 受体活性的约 20% 以下, 任选在 pH 6 和 8 之间、或 6 和 9 之间、或 7 和 9 之间 (例如 pH 7), 在至少 1mg/mL 的浓度下是可溶的, 且任选在 25°C 下 24 小时后保持至少 95% 的起始肽。又一种示例性的第 3 类胰高血糖素相关肽具有天然胰高血糖素对胰高血糖素受体活性的约 10% 以下和天然 GLP-1 对 GLP-1 受体活性的至少约 20%, 任选在 pH 6 和 8 之间、或 6 和 9 之间、或 7 和 9 之间 (例如 pH 7), 在至少 1mg/mL 的浓度下是可溶的, 且任选在 25°C 下 24 小时后保持至少 95% 的起始肽。又一种示例性的第 3 类胰高血糖素相关肽具有天然胰高血糖素在胰高血糖素受体上的活性的约 10% 或以下但高于 0.1%、0.5% 或 1% 和天然 GLP-1 在 GLP-1 受体上的活性的至少约 50%、60%、70%、80%、90% 或 100% 或以上, 任选在 pH 6 和 8 之间、或 6 和 9 之间、或 7 和 9 之间 (例如 pH 7), 在至少 1mg/mL 的浓度下是可溶的, 且任选在 25°C 下 24 小时后保持至少 95% 的起始肽。在一些实施方案中, 这类第 3 类胰高血糖素相关肽在天然胰高血糖素的相应位置上保持至少 22、23、24、25、26、27 或 28 个天然存在的氨基酸 (例如相对于天然存在的胰高血糖素具有 1-7、1-5 或 1-3 个修饰)。

[0911] 影响胰高血糖素活性的修饰

[0912] 通过天然胰高血糖素 (SEQ ID NO:1) 的 16 位上的氨基酸修饰使对胰高血糖素受体的活性得到提高。在一些实施方案中, 第 3 类胰高血糖素相关肽是胰高血糖素激动剂, 其相对于 His-Ser-Gln-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Lys-Tyr-Leu-Asp-Ser-Arg-Arg-Ala-Gln-Asp-Phe-Val-Gln-Trp-Leu-Met-Asn-Thr (SEQ ID NO:1) 的野生型肽已经修饰以提高该肽对胰高血糖素受体的效价。根据在已证实的体外模型测定法中其刺激 cAMP 合成的能力 (参见实施例 5), 天然胰高血糖素 (SEQ ID NO:1) 的正常存在的 16 位丝氨酸可被选出的酸性氨基酸取代, 以提高胰高血糖素的效价。更具体地讲, 这种取代提高类似物对胰高血糖素受体效价至至少 2 倍、4 倍、5 倍和多达 10 倍以上。这种取代还提高类似物对 GLP-1 受体的活性至天然胰高血糖素的至少 5 倍、10 倍或 15 倍, 但保持对胰高血糖素受体优于 GLP-1 受体的选择性。

[0913] 作为非限制性实例, 可通过用谷氨酸或另一种具有长为 4 个原子的侧链的带负电荷的氨基酸、或用谷氨酰胺、高谷氨酸或高半胱氨酸中的任一种、或具有含有至少一个杂原子 (例如 N、O、S、P) 的侧链且侧链长为约 4 (或 3-5) 个原子的带电荷氨基酸取代 16 位上的天然存在的丝氨酸, 来得到这种提高的效价。按照一些实施方案, 天然胰高血糖素的 16 位上的丝氨酸残基被选自谷氨酸、谷氨酰胺、高谷氨酸、高半胱氨酸、苏氨酸或甘氨酸的氨基酸取代。按照一些实施方案, 天然胰高血糖素的 16 位上的丝氨酸残基被选自谷氨酸、谷氨酰胺、高谷氨酸和高半胱氨酸的氨基酸取代, 而在一些实施方案中, 丝氨酸残基被谷氨酸取代。

[0914] 在一些实施方案中, 效价提高的第 3 类胰高血糖素相关肽包含 SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7 的肽或 SEQ ID NO:5 的胰高血糖素激动剂类似物。按照一些实施方案, 提供与野生型胰高血糖素相比对胰高血糖素受体的效价提高的第 3 类胰高血糖素相关肽, 其中该肽包含 SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9 或 SEQ ID NO:10 的序列, 其中该胰高血糖素肽保持其相对于 GLP-1 受体的对

胰高血糖素受体的选择性。在一些实施方案中,对胰高血糖素受体的特异性提高的第3类胰高血糖素相关肽包含 SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10 的肽或其胰高血糖素激动剂类似物,其中羧基端氨基酸保持其天然羧酸基。按照一些实施方案,第3类胰高血糖素相关肽包含 $\text{NH}_2\text{-His-Ser-Gln-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Lys-Tyr-Leu-Asp-Glu-Arg-Arg-Ala-Gln-Asp-Phe-Val-Gln-Trp-Leu-Met-Asn-Thr-COOH}$ (SEQ ID NO:10) 的序列,其中与天然胰高血糖素相比,通过实施例5的体外 cAMP 测定法测得,该肽对胰高血糖素受体的效价提高至约5倍。

[0915] 通过3位上的氨基酸修饰,例如3位上天然存在的谷氨酰胺的取代,可降低、维持或提高胰高血糖素受体活性。在一些实施方案中,已经证实3位上的氨基酸被酸性、碱性或疏水氨基酸(谷氨酸、鸟氨酸、正亮氨酸)取代大大降低或破坏胰高血糖素受体活性。被例如谷氨酸、鸟氨酸或正亮氨酸取代的类似物具有天然胰高血糖素对胰高血糖素受体活性的约10%或以下,例如约1-10%或约0.1-10%或大于约0.1%但小于约10%,同时具有 GLP-1 对 GLP-1 受体活性的至少20%。例如,本文所述示例性类似物具有天然胰高血糖素活性的约0.5%、约1%或约7%,同时具有 GLP-1 对 GLP-1 受体活性的至少20%。具体地讲,可对本文所述的任何第3类胰高血糖素相关肽(包括胰高血糖素类似物、胰高血糖素激动剂类似物、胰高血糖素共激动剂和胰高血糖素/GLP-1 共激动剂分子),进行修饰以含有3位上的修饰,例如 Gln 被 Glu 取代,从而产生具有高选择性的肽,例如对 GLP-1 受体的选择性10倍于对胰高血糖素受体的选择性相比。

[0916] 在另一个实施方案中,任何第3类胰高血糖素肽的天然存在的3位上的谷氨酰胺可被谷氨酰胺类似物取代而又不实质性损失对胰高血糖素受体的活性,和在一些情况下,如本文所述,胰高血糖素受体活性得到提高。在具体的实施方案中,3位上的氨基酸被 Dab(Ac) 取代。例如,胰高血糖素激动剂可包含 SEQ ID NO:595、SEQ ID NO:601、SEQ ID NO:603、SEQ ID NO:604、SEQ ID NO:605 和 SEQ ID NO:606 的氨基酸序列。

[0917] 观察发现,2位上的修饰(例如2位上的 AIB)以及某些情况下1位上的修饰可降低胰高血糖素活性。可如下恢复这种胰高血糖素活性的降低:通过稳定胰高血糖素 C 端部分的 α 螺旋,例如通过本文所述方法,例如通过“i”和“i+4”位上的氨基酸侧链之间(例如12和16、16和20或20和24)的共价键。在一些实施方案中,这种共价键是16位上的谷氨酸和20位上的赖氨酸之间的内酰胺桥。在一些实施方案中,这种共价键是内酰胺桥以外的分子内桥。例如,合适的共价键合方法包括任一种或多种烯烃复分解、基于羊毛硫氨酸的环化、二硫桥或修饰的含硫桥形成、 α, ω -二氨基烷烃连接物的使用、金属-原子桥的形成和肽环化的其它方法。

[0918] 影响 GLP-1 活性的修饰

[0919] 通过将 C 端氨基酸的羧酸用电中性基团(例如酰胺或酯)置换,使对 GLP-1 受体的活性得到提高。在一些实施方案中,这些第3类胰高血糖素相关肽包含 SEQ ID NO:20 的序列,其中羧基端氨基酸具有酰胺基,替换存在于天然氨基酸中的羧酸基。这些第3类胰高血糖素相关肽对胰高血糖素和 GLP-1 受体两者具有强活性,因此用作对两种受体的共激动剂。按照一些实施方案,第3类胰高血糖素相关肽是胰高血糖素和 GLP-1 受体共激动剂,其中该肽包含 SEQ ID NO:20 的序列,其中28位上的氨基酸是 Asn 或 Lys,而29位上的氨基酸是 Thr-酰胺。

[0920] 通过稳定胰高血糖素 C 端部分的 α 螺旋（例如残基 12-29 附近）的修饰使对 GLP-1 受体的活性得到提高。

[0921] 在一些实施方案中，这类修饰允许在这样的两个氨基酸的侧链之间形成分子内桥，所述两个氨基酸被 3 个间插氨基酸（即“i”位上的氨基酸和“i+4”位上的氨基酸，其中 i 为 12 和 25 间的任何整数）、被 2 个间插氨基酸（即“j”位上的氨基酸和“j+3”位上的氨基酸，其中 j 为 12 和 27 之间的任何整数）或被 6 个间插氨基酸（即“k”位上的氨基酸和“k+7”位上的氨基酸，其中 k 为 12 和 22 之间的任何整数）间隔开。在示例性的实施方案中，桥或接头的长度为约 8（或约 7-9）个原子，且在 12 和 16 位上、或在 16 和 20 位上、或在 20 和 24 位上或在 24 和 28 位上的氨基酸的侧链之间形成。2 个氨基酸侧链可通过非共价键（例如氢键结合、离子相互作用，例如形成盐桥）或通过共价键彼此连接。

[0922] 按照一些实施方案，第 3 类胰高血糖素相关肽具有胰高血糖素/GLP-1 受体共激动剂活性，且包含选自 SEQ ID NO:11、47、48 和 49 的氨基酸序列。在一些实施方案中，侧链彼此共价结合，而在一些实施方案中，2 个氨基酸彼此结合形成内酰胺环。

[0923] 按照一些实施方案，第 3 类胰高血糖素相关肽包含 SEQ ID NO:45，其中在选自氨基酸对 12 和 16、16 和 20、20 和 24 或 24 和 28 的氨基酸对的侧链之间形成至少一个内酰胺环。在一些实施方案中，第 3 类胰高血糖素相关肽包含 SEQ ID NO:20 的胰高血糖素肽类似物，其中该肽包含在 12 和 16 位的氨基酸之间或在 16 和 20 位的氨基酸之间形成的分子内内酰胺桥。在一些实施方案中，第 3 类胰高血糖素相关肽包含 SEQ ID NO:20 的序列，其中在 12 和 16 位的氨基酸之间、在 16 和 20 位的氨基酸之间或在 20 和 24 位的氨基酸之间形成分子内内酰胺桥，且 29 位上的氨基酸是甘氨酸，其中 SEQ ID NO:29 的序列与 SEQ ID NO:20 的 C 端氨基酸连接。在又一个实施方案中，28 位上的氨基酸是天冬氨酸。

[0924] 在一些具体实施方案中，通过形成不是内酰胺桥的分子内桥实现第 3 类胰高血糖素相关肽 C 端部分的 α 螺旋结构的稳定。例如，合适的共价键合方法包括以下方法中的一种或多种：烯烃复分解、基于羊毛硫氨酸的环化、二硫桥或修饰的含硫桥形成、 α ， ω -二氨基烷烃连接物的使用、金属-原子桥的形成和用于稳定 α 螺旋的肽环化的其它方法。

[0925] 此外，可在保持所需活性的位置上有目的地引入一个或多个 α ， α -二取代氨基酸，通过稳定胰高血糖素肽 C 端部分（氨基酸 12-29 附近）中的 α 螺旋结构而实现对 GLP-1 受体的活性提高。在本文中这类肽可视为没有分子内桥的肽。在一些方面，以无需引入分子内桥（例如盐桥）或共价键的这种方式实现 α 螺旋的稳定。在一些实施方案中，胰高血糖素肽的 16、17、18、19、20、21、24 或 29 位中的 1、2、3、4 或更多个被 α ， α -二取代氨基酸取代。例如，在缺乏盐桥或内酰胺时，第 3 类胰高血糖素相关肽的 16 位用氨基异丁酸 (AIB) 的取代提高 GLP-1 活性。在一些实施方案中，16、20、21 或 24 位中的 1、2、3 或更多个被 AIB 取代。

[0926] 通过 20 位上的氨基酸修饰可达到对 GLP-1 受体的活性提高。在一些实施方案中，将 20 位上的谷氨酰胺用具有以下侧链的另一种亲水氨基酸（例如赖氨酸、瓜氨酸、精氨酸或鸟氨酸）置换，所述侧链带有电荷或具有氢键合能力且长度至少为约 5（或约 4-6）个原子。

[0927] 在包含 SEQ ID NO:26 的 C 端突出端的第 3 类胰高血糖素相关肽中已证实对 GLP-1 受体的活性提高。按本文所述，通过修饰 18、28 或 29 位上或者 18 和 29 位上的氨基酸，可

进一步提高包含 SEQ ID NO :26 的这类第 3 类胰高血糖素相关肽的 GLP-1 活性。

[0928] 通过将 10 位上的氨基酸修饰为 Trp 可使 GLP-1 效价进一步适当提高。

[0929] 与仅采用这类修饰的任一种相比,提高 GLP-1 受体活性的修饰的组合可提供更高的 GLP-1 活性。例如,第 3 类胰高血糖素相关肽可包含 16 位、20 位和 C 端羧酸基上的修饰,任选在 16 和 20 位上的氨基酸之间具有共价键;可包含 16 位和 C 端羧酸基上的修饰;可包含 16 和 20 位上的修饰,任选在 16 和 20 位上的氨基酸之间具有共价键;或可包含 20 位和 C 端羧酸基上的修饰;任选前提条件是 12 位上的氨基酸不是 Arg;或者任选前提条件是 9 位的氨基酸不是 Glu。

[0930] 影响溶解性的修饰

[0931] 亲水部分的添加

[0932] 可对第 3 类胰高血糖素相关肽进行进一步修饰以改进肽在生理 pH 下在水溶液中的溶解性和稳定性,同时保持相对于天然胰高血糖素高的生物活性。本文所述亲水部分可如本文所进一步论述地与第 3 类胰高血糖素相关肽连接。

[0933] 按照一些实施方案,预期在包含 SEQ ID NO :9 或 SEQ ID NO :10 的第 3 类胰高血糖素相关肽的 17、21 和 24 位上引入亲水基团,改进高效价胰高血糖素类似物在具有生理 pH 的溶液中的溶解性和稳定性。这类基团的引入还延长作用持续时间,例如正如通过循环中半寿期延长所测得的一样。

[0934] 在一些实施方案中,第 3 类胰高血糖素相关肽包含选自以下的序列:SEQ ID NO :11、SEQ ID NO :12、SEQ ID NO :13、SEQ ID NO :14、SEQ ID NO :15、SEQ ID NO :16、SEQ ID NO :17、SEQ ID NO :18 和 SEQ ID NO :19,其中所述第 3 类胰高血糖素相关肽的 16、17、21 或 24 位之一上的氨基酸残基侧链,还包含分子量选自约 500-约 40,000 道尔顿的聚乙二醇链。在一些实施方案中,聚乙二醇链具有选自约 500-约 5,000 道尔顿的分子量。在另一个实施方案中,聚乙二醇链的分子量为约 10,000-约 20,000 道尔顿。在更多的其它示例性实施方案中,聚乙二醇链的分子量为约 20,000-约 40,000 道尔顿。

[0935] 合适的亲水部分包括本领域已知的任何水溶性聚合物,包括本文所述亲水部分、PEG 的均聚物或共聚物和 PEG 的一甲基取代的聚合物 (mPEG)。按照一些实施方案,亲水基团包含聚乙烯 (PEG) 链。更具体地讲,在一些实施方案中,第 3 类胰高血糖素相关肽包含 SEQ ID NO :6 或 SEQ ID NO :7 的序列,其中 PEG 链与第 3 类胰高血糖素相关肽 21 和 24 位上存在的氨基酸侧链共价连接,且第 3 类胰高血糖素相关肽的羧基端氨基酸具有羧酸基。按照一些实施方案,聚乙二醇链具有选自约 500-约 10,000 道尔顿范围的平均分子量。

[0936] 按照一些实施方案,聚乙二醇化第 3 类胰高血糖素相关肽包含与第 3 类胰高血糖素相关肽共价结合的两条或更多条聚乙二醇链,其中胰高血糖素链总的分子量为约 1,000-约 5,000 道尔顿。在一些实施方案中,聚乙二醇化胰高血糖素激动剂包含由 SEQ ID NO :5 或 SEQ ID NO :5 的胰高血糖素激动剂类似物组成的肽,其中 PEG 链与 21 位和 24 位上的氨基酸残基共价连接,且其中 2 条 PEG 链总的分子量为约 1,000-约 5,000 道尔顿。

[0937] 带电荷的 C 端

[0938] 可例如通过向 SEQ ID NO :20 的胰高血糖素肽 C 端部分 (优选在位于 27 位 C 端的位置) 引入 1、2、3 或更多个带电荷的氨基酸,进一步改进包含 SEQ ID NO :20 的第 3 类胰高血糖素相关肽的溶解性。可通过例如在 28 或 29 位上用带电荷的氨基酸取代天然氨基酸,

或者通过例如在 27、28 或 29 位后加入带电荷的氨基酸,来引入这类带电荷的氨基酸。在示例性的实施方案中,1、2、3 个或所有带电荷的氨基酸带有负电荷。可对第 3 类胰高血糖素相关肽进行仍使其保持胰高血糖素活性的其它修饰,例如保守取代。在一些实施方案中,提供 SEQ ID NO:20 的第 3 类胰高血糖素相关肽的类似物,其中该类似物因 17-26 位上的 1-2 个氨基酸取代而不同于 SEQ ID NO:20,而在一些实施方案中,该类似物因 20 位上的氨基酸取代而不同于 SEQ ID NO:20 的肽。

[0939] 酰化 / 烷基化

[0940] 按照一些实施方案,对胰高血糖素肽进行修饰以包含酰基或烷基,例如 C4-C30 酰基或烷基。在一些方面,酰基或烷基不是天然存在于氨基酸上。在具体的方面,酰基或烷基对任何天然存在的氨基酸而言是非天然的。酰化或烷基化可延长循环中的半寿期和 / 或延迟起效和 / 或延长作用持续时间和 / 或改进对蛋白酶 (例如 DPP-IV) 的抗性。酰化后即使不是显著提高,也保持第 3 类胰高血糖素相关肽对胰高血糖素受体和 GLP-1 受体的活性。此外,即使不是显著提高,酰化类似物的效价也与未酰化形式的第 3 类胰高血糖素相关肽相当。

[0941] 在一些实施方案中,本发明提供被修饰成包含与胰高血糖素肽 10 位上的氨基酸共价连接的酰基或烷基的第 3 类胰高血糖素相关肽。胰高血糖素肽在第 3 类胰高血糖素相关肽的 10 位上的氨基酸和酰基或烷基之间还可包含间隔基。任何前述的第 3 类胰高血糖素相关肽可包含 2 个酰基或 2 个烷基或其组合。

[0942] 在本发明的一个具体方面,酰化的第 3 类胰高血糖素相关肽包含 SEQ ID NO:534-544 和 546-549 中任一个的氨基酸序列。

[0943] C 端截短

[0944] 在一些实施方案中,通过截短或缺失胰高血糖素肽的 C 端的 1 或 2 个氨基酸 (即 29 和 / 或 28 位),对本文所述的第 3 类胰高血糖素相关肽进行进一步修饰而不影响对胰高血糖素和 GLP-1 受体的活性和 / 或效价。在这一方面,第 3 类胰高血糖素相关肽可包含天然胰高血糖素肽 (SEQ ID NO:1) 的氨基酸 1-27 或 1-28,任选具有本文所述的一种或多种修饰。

[0945] 在一些实施方案中,截短的第 3 类胰高血糖素相关肽包含 SEQ ID NO:550 或 SEQ ID NO:551。在另一个实施方案中,截短的胰高血糖素激动剂肽包含 SEQ ID NO:552 或 SEQ ID NO:553。

[0946] C 端突出端

[0947] 按照一些实施方案,通过将第二肽 (例如 SEQ ID NO:26、SEQ ID NO:27 或 SEQ ID NO:28) 添加至胰高血糖素肽的羧基端,来修饰本文公开的第 3 类胰高血糖素相关肽。在一些实施方案中,具有选自 SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:17、SEQ ID NO:18、SEQ ID NO:19、SEQ ID NO:66、SEQ ID NO:67、SEQ ID NO:68 和 SEQ ID NO:69 的序列的第 3 类胰高血糖素相关肽,通过肽键与第二肽共价结合,其中第二肽包含选自 SEQ ID NO:26、SEQ ID NO:27 和 SEQ ID NO:28 的序列。在又一个实施方案中,在包含 C 端突出端的第 3 类胰高血糖素相关肽中,天然胰高血糖素肽 29 位上的苏氨酸被甘氨酸置换。具有甘氨酸取代 29 位上的苏氨酸且包含 SEQ ID NO:26 的羧基端突出端的第 3 类胰高血糖素相关肽,对 GLP-1 受体的效价是修饰成包含

SEQ ID NO:26 的羧基端突出端的天然胰高血糖素的 4 倍。通过丙氨酸取代 18 位上的天然精氨酸可进一步提高对 GLP-1 受体的效价。

[0948] 因此,第 3 类胰高血糖素相关肽可具有 SEQ ID NO:27 (KRNRNNIA) 或 SEQ ID NO:28 的羧基端突出端。按照一些实施方案,包含 SEQ ID NO:33 或 SEQ ID NO:20 的第 3 类胰高血糖素相关肽,还包含与胰高血糖素肽的氨基酸 29 连接的 SEQ ID NO:27 (KRNRNNIA) 或 SEQ ID NO:28 的氨基酸序列。更具体地讲,第 3 类胰高血糖素相关肽包含选自 SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:14 和 SEQ ID NO:15 的序列,其还包含与胰高血糖素肽的氨基酸 29 连接的 SEQ ID NO:27 (KRNRNNIA) 或 SEQ ID NO:28 的氨基酸序列。更具体地讲,胰高血糖素肽包含选自 SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:17、SEQ ID NO:18、SEQ ID NO:66、SEQ ID NO:67、SEQ ID NO:68、SEQ ID NO:69、SEQ ID NO:55 和 SEQ ID NO:56 的序列,该序列还包含与第 3 类胰高血糖素相关肽的氨基酸 29 连接的 SEQ ID NO:26 (GPSSGAPPPS) 或 SEQ ID NO:29 的氨基酸序列。在一些实施方案中,第 3 类胰高血糖素相关肽包含 SEQ ID NO:64 的序列。

[0949] 其它修饰

[0950] 可单独或组合使用提高或降低胰高血糖素受体活性和提高 GLP-1 受体活性的本文所述有关第 3 类胰高血糖素相关肽的任何修饰。与仅采用这类修饰的任一种相比,提高 GLP-1 受体活性的修饰的组合一般提供更高的 GLP-1 活性。上述任何修饰还可与本文所述的赋予其它所需性质的有关第 3 类胰高血糖素相关肽的其它修饰组合,所述性质为例如提高的溶解性和 / 或稳定性和 / 或延长的作用持续时间。或者,上述任何修饰可与本文所述的基本上不影响溶解性或稳定性或活性的有关第 3 类胰高血糖素相关肽的其它修饰组合。示例性的修饰包括但不限于:

[0951] (A) 改进溶解性,例如通过将 1、2、3 或更多个带电荷的氨基酸引入天然胰高血糖素的 C 端部分,优选在位于 27 位 C 端的位置。可通过例如在 28 或 29 位上用带电荷的氨基酸取代天然氨基酸、或者通过例如在 27、28 或 29 位后加入带电荷的氨基酸,来引入这类带电荷的氨基酸。在示例性的实施方案中,1、2、3 个或所有带电荷的氨基酸带有负电荷。在其它实施方案中,1、2、3 个或所有带电荷的氨基酸带有正电荷。这类修饰提高溶解性,例如在约 5.5 和 8 之间的给定 pH (例如 pH 7),在 25°C 下 24 小时后测量时,提供相对于天然胰高血糖素的至少 2 倍、5 倍、10 倍、15 倍、25 倍、30 倍或更高倍的溶解性。

[0952] (B) 通过例如在肽的 16、17、20、21、24 或 29 位或在 C 端氨基酸上加入本文所述的亲水部分 (例如聚乙二醇链),来提高溶解性和延长作用持续时间或循环中的半寿期。

[0953] (C) 通过 15 位上的天冬氨酸的修饰,例如通过缺失或被谷氨酸、高谷氨酸、半胱磺酸或高半胱磺酸取代来提高稳定性。这类修饰可在 5.5-8 范围的 pH 内,尤其在酸性或碱性缓冲液中降低降解或裂解,例如在 25°C 下 24 小时后,保持至少 75%、80%、90%、95%、96%、97%、98% 或 99% 的起始肽。

[0954] (D) 通过 27 位上甲硫氨酸的修饰,例如通过用亮氨酸或正亮氨酸取代,来提高稳定性。这类修饰可降低氧化降解。还可通过 20 或 24 位上的 Gln 修饰,例如通过用 Ser、Thr、Ala 或 AIB 取代,来提高稳定性。这类修饰可降低通过 Gln 的脱酰氨基化而发生的降解。可通过 21 位上的 Asp 修饰,例如通过用 Glu 取代,来提高稳定性。这类修饰可降低通

过 Asp 脱水形成环状琥珀酰亚胺中间体接着异构化为异天冬氨酸而发生的降解。

[0955] (E) 通过将 1 或 2 位上的氨基酸用本文所述的 DPP-IV 抗性氨基酸修饰并且包括将 2 位上的氨基酸用 N-甲基-丙氨酸修饰,来提高对二肽基肽酶 IV(DPP-IV) 切割的抗性。

[0956] (F) 不影响活性的保守或非保守取代、添加或缺失,例如在 2、5、7、10、11、12、13、14、16、17、18、19、20、21、24、27、28 或 29 位中的一个或多个上的保守取代;在 27、28 或 29 位中的一个或多个的缺失;或氨基酸 29 的缺失,任选与替换 C 端羧酸基的 C 端酰胺或酯组合;

[0957] (G) 按本文所述添加 C 端突出端;

[0958] (H) 按本文所述,例如通过胰高血糖素肽的酰化或烷基化,延长循环中的半寿期和/或延长作用持续时间和/或延迟起效;

[0959] (I) 本文所述的同二聚化或异二聚化。

[0960] 其它修饰包括 1 位上的 His 被大的芳族氨基酸(例如 Tyr、Phe、Trp 或氨基-Phe)取代;2 位上的 Ser 被 Ala 取代;10 位上的 Tyr 被 Val 或 Phe 取代;12 位上的 Lys 被 Arg 取代;15 位上的 Asp 被 Glu 取代;16 位上的 Ser 被 Thr 或 AIB 取代。

[0961] 包含 1 位上的 His 被大的芳族氨基酸(例如 Tyr)非保守取代的具有 GLP-1 活性的第 3 类胰高血糖素相关肽可保持 GLP-1 活性,前提条件是通过分子内桥(例如本文所述的任何分子内桥)来稳定 α 螺旋。

[0962] 缀合物和融合物

[0963] 第 3 类胰高血糖素相关肽可任选通过共价键合和任选通过接头与缀合物部分连接。

[0964] 第 3 类胰高血糖素相关肽还可以是其中第二肽或多肽与末端(例如第 3 类胰高血糖素相关肽的羧基端)融合的融合肽或融合蛋白的组成部分。

[0965] 更具体地讲,融合的第 3 类胰高血糖素相关肽可包含 SEQ ID NO:55、SEQ ID NO:9 或 SEQ ID NO:10 的胰高血糖素激动剂,其还包含与胰高血糖素肽的氨基酸 29 连接的 SEQ ID NO:26(GPSSGAPPPS)、SEQ ID NO:27(KRNRNNIA)或 SEQ ID NO:28(KRNR)的氨基酸序列。在一些实施方案中,SEQ ID NO:26(GPSSGAPPPS)、SEQ ID NO:27(KRNRNNIA)或 SEQ ID NO:28(KRNR)的氨基酸序列通过肽键与第 3 类胰高血糖素相关肽的氨基酸 29 结合。申请人发现,在包含毒蜥外泌肽-4 的 C 端突出端肽(例如 SEQ ID NO:26 或 SEQ ID NO:29)的第 3 类胰高血糖素相关肽融合肽中,29 位上的天然苏氨酸残基被甘氨酸取代显著提高 GLP-1 受体活性。这种氨基酸取代可与本文公开的关于第 3 类胰高血糖素相关肽的其它修饰联用,以提高胰高血糖素类似物对 GLP-1 受体的亲和力。例如,T29G 取代可与 S16E 和 N20K 氨基酸取代、任选与氨基酸 16 和 20 之间的内酰胺桥和任选与本文所述的 PEG 链的添加组合。在一些实施方案中,第 3 类胰高血糖素相关肽包含 SEQ ID NO:64 的序列。在一些实施方案中,胰高血糖素融合肽的第 3 类胰高血糖素相关肽部分选自 SEQ ID NO:55、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4 和 SEQ ID NO:5,其中当存在于 17、21、24 位或 C 端氨基酸或在 21 和 24 两者上时,PEG 链选自 500-40,000 道尔顿的范围。更具体地讲,在一些实施方案中,第 3 类胰高血糖素相关肽区段选自 SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8 和 SEQ ID NO:63,其中 PEG 链选自 500-5,000 的范围。在一些实施方案中,第 3 类胰高血糖素相关肽是包含 SEQ ID NO:55 和 SEQ ID NO:65 的序列的融合肽,其中 SEQ ID NO:65 的肽与 SEQ ID NO:55 的

羧基端连接。

[0966] 按照一些实施方案, SEQ ID NO:10 的第 3 类胰高血糖素相关肽的其它化学修饰, 使 GLP-1 受体效价提高到其中对胰高血糖素和 GLP-1 受体的相对活性几乎相等的点。因此, 在一些实施方案中, 第 3 类胰高血糖素相关肽包含含有替换存在于天然氨基酸上的羧酸基的酰胺基的末端氨基酸。可如下调整第 3 类胰高血糖素相关肽对相应的胰高血糖素和 GLP-1 受体的相对活性: 通过对第 3 类胰高血糖素相关肽进行进一步修饰, 以产生这样的类似物, 其具有天然胰高血糖素对胰高血糖素受体活性的约 40% - 约 500% 或更多和天然 GLP-1 对 GLP-1 受体活性的约 20% - 约 200% 或更多, 例如提高至胰高血糖素对 GLP-1 受体的正常活性的 50 倍、100 倍以上。在一些实施方案中, 本文所述胰高血糖素肽具有天然胰高血糖素对胰高血糖素受体活性的高达约 100%、1000%、10,000%、100,000% 或 1,000,000%。在一些实施方案中, 本文所述胰高血糖素肽具有天然 GLP-1 对 GLP-1 受体活性的高达约 100%、1000%、10,000%、100,000% 或 1,000,000%。

[0967] 示例性的实施方案

[0968] 按照一些实施方案, 提供包含 SEQ ID NO:55 的序列的胰高血糖素类似物, 其中所述类似物因 1-3 个选自 1、2、3、5、7、10、11、13、14、17、18、19、21、24、27、28 和 29 位的氨基酸而不同于 SEQ ID NO:55, 其中所述胰高血糖素肽具有天然 GLP-1 对 GLP-1 受体活性的至少 20%。

[0969] 按照一些实施方案, 提供包含以下序列的胰高血糖素 /GLP-1 受体共激动剂:

[0970] $\text{NH}_2\text{-His-Ser-Gln-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Lys-Tyr-Leu-Xaa-Xaa-Arg-Arg-Ala-Xaa-Asp-Phe-Val-Xaa-Trp-Leu-Met-Xaa-Xaa-R}$ (SEQ ID NO:33), 其中 15 位上的 Xaa 选自以下氨基酸: Asp、Glu、半胱氨酸、高谷氨酸和高半胱氨酸, 16 位上的 Xaa 选自以下氨基酸: Ser、Glu、Gln、高谷氨酸和高半胱氨酸, 20 位上的 Xaa 为 Gln 或 Lys, 24 位上的 Xaa 为 Gln 或 Glu, 28 位上的 Xaa 为 Asn、Lys 或酸性氨基酸, 29 位上的 Xaa 为 Thr、Gly 或酸性氨基酸, 而 R 为 COOH 或 CONH_2 , 前提条件是如果 16 位为丝氨酸, 则 20 位为 Lys, 或者如果 16 位为丝氨酸, 则 24 位为 Glu 且 20 位或 28 位两者之一为 Lys。在一些实施方案中, 胰高血糖素 /GLP-1 受体共激动剂包含 SEQ ID NO:33 的序列, 其中 28 位上的氨基酸为天冬氨酸, 29 位上的氨基酸为谷氨酸。在另一个实施方案中, 28 位上的氨基酸为天然天冬酰胺, 29 位上的氨基酸为甘氨酸且 SEQ ID NO:29 或 SEQ ID NO:65 的氨基酸序列与 SEQ ID NO:33 的羧基端共价连接。

[0971] 在一些实施方案中, 提供包含 SEQ ID NO:33 的序列的共激动剂, 其中另外的酸性氨基酸被添加至肽的羧基端。在又一个实施方案中, 胰高血糖素类似物的羧基端氨基酸具有替换天然氨基酸的羧酸基的酰胺。在一些实施方案中, 胰高血糖素类似物包含选自以下的序列: SEQ ID NO:40、SEQ ID NO:41、SEQ ID NO:42、SEQ ID NO:43 和 SEQ ID NO:44。

[0972] 按照一些实施方案, 提供 SEQ ID NO:33 的胰高血糖素肽类似物, 其中所述类似物因 1-3 个选自 1、2、3、5、7、10、11、13、14、17、18、19、21 和 27 位的氨基酸而不同于 SEQ ID NO:33, 前提条件是如果 16 位上的氨基酸为丝氨酸, 则或者 20 位为赖氨酸, 或者在 24 位上的氨基酸与 20 位或 28 位上的氨基酸之间形成内酰胺桥。按照一些实施方案, 该类似物因选自 1、2、3、21 和 27 位的 1-3 个氨基酸而不同于 SEQ ID NO:33。在一些实施方案中, SEQ ID NO:33 的胰高血糖素肽类似物因 1-2 个选自 1、2、3、5、7、10、11、13、14、17、18、19、21 和

27 位的氨基酸而不同于该序列,或者在一些实施方案中,因选自 1、2、3、5、7、10、11、13、14、17、18、19、21 和 27 位的单个氨基酸而不同于该序列,前提条件是如果 16 位上的氨基酸为丝氨酸,则或者 20 位为赖氨酸,或者在 24 位上的氨基酸与 20 位或 28 位上的氨基酸之间形成内酰胺桥。

[0973] 按照另一个实施方案,提供包含序列 NH₂-His-Ser-Xaa-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Lys-Tyr-Leu-Xaa-Xaa-Arg-Arg-Ala-Xaa-Asp-Phe-Val-Xaa-Trp-Leu-Met-Xaa-Xaa-R (SEQ ID NO :53) 的有相对选择性的 GLP-1 受体激动剂,其中 3 位上的 Xaa 选自以下氨基酸 :Glu、Orn 或 Nle,15 位上的 Xaa 选自以下氨基酸 :Asp、Glu、半胱磺酸、高谷氨酸和高半胱磺酸,16 位上的 Xaa 选自以下氨基酸 :Ser、Glu、Gln、高谷氨酸和高半胱磺酸,20 位上的 Xaa 为 Gln 或 Lys,24 位上的 Xaa 为 Gln 或 Glu,28 位上的 Xaa 为 Asn、Lys 或酸性氨基酸,29 位上的 Xaa 为 Thr、Gly 或酸性氨基酸,R 为 COOH、CONH₂、SEQ ID NO :26 或 SEQ ID NO :29,前提条件是如果 16 位为丝氨酸,则 20 位为 Lys,或者如果 16 位为丝氨酸,则 24 位为 Glu 且 20 位或 28 位两者之一为 Lys。在一些实施方案中,3 位上的氨基酸为谷氨酸。在一些实施方案中,28 和 / 或 29 位上取代的酸性氨基酸是天冬氨酸或谷氨酸。在一些实施方案中,胰高血糖素肽 (包括共激动剂肽) 包含 SEQ ID NO :33 的序列,其还包含被添加至肽的羧基端的另外酸性氨基酸。在又一个实施方案中,胰高血糖素类似物的羧基端氨基酸具有替换天然氨基酸的羧基的酰胺。

[0974] 按照一些实施方案,提供包含选自以下的修饰胰高血糖素肽的胰高血糖素 /GLP-1 受体共激动剂 :NH₂-His-Ser-Gln-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Lys-Tyr-Leu-Xaa-Xaa-Arg-Arg-Ala-Xaa-Asp-Phe-Val-Xaa-Trp-Leu-Met-Xaa-Xaa-R (SEQ ID NO :34), 其中 15 位上的 Xaa 选自以下氨基酸 :Asp、Glu、半胱磺酸、高谷氨酸和高半胱磺酸,16 位上的 Xaa 选自以下氨基酸 :Ser、Glu、Gln、高谷氨酸和高半胱磺酸,20 位上的 Xaa 为 Gln 或 Lys,24 位上的 Xaa 为 Gln 或 Glu,28 位上的 Xaa 为 Asn、Asp 或 Lys,R 为 COOH 或 CONH₂,29 位上的 Xaa 为 Thr 或 Gly,R 为 COOH、CONH₂、SEQ ID NO :26 或 SEQ ID NO :29,前提条件是如果 16 位为丝氨酸,则 20 位为 Lys,或者如果 16 位为丝氨酸,则 24 位为 Glu 且 20 位或 28 位两者之一为 Lys。在一些实施方案中,R 为 CONH₂,15 位上的 Xaa 为 Asp,16 位上的 Xaa 选自以下氨基酸 :Glu、Gln、高谷氨酸和高半胱磺酸,20 和 24 位上的 Xaa 各为 Gln,28 位上的 Xaa 为 Asn 或 Asp,29 位上的 Xaa 为 Thr。在一些实施方案中,15 和 16 位上的 Xaa 各为 Glu,20 和 24 位上的 Xaa 各为 Gln,28 位上的 Xaa 为 Asn 或 Asp,29 位上的 Xaa 为 Thr,R 为 CONH₂。

[0975] 据报告,可对天然胰高血糖素肽的某些位置进行修饰而同时保持母体肽的至少一些活性。因此,申请人预期,位于肽 SEQ ID NO :11 的 2、5、7、10、11、12、13、14、17、18、19、20、21、24、27、28 或 29 位上的一个或多个氨基酸,可被不同于天然胰高血糖素肽中存在的氨基酸取代,而仍保持对胰高血糖素受体的活性。在一些实施方案中,将存在于天然肽 27 位上的甲硫氨酸残基更换成亮氨酸或正亮氨酸以防止肽的氧化降解。在另一个实施方案中,20 位上的氨基酸被 Lys、Arg、Orn 或瓜氨酸 (Citrulline) 取代和 / 或 21 位被 Glu、高谷氨酸或高半胱磺酸取代。

[0976] 在一些实施方案中,提供 SEQ ID NO :20 的胰高血糖素类似物,其中 1-6 个选自类似物的 1、2、5、7、10、11、13、14、17、18、19、21、27、28 或 29 位的氨基酸不同于 SEQ ID NO :1 相应的氨基酸,前提条件是如果 16 位上的氨基酸为丝氨酸,则 20 位为 Lys,或者如果 16 位

为丝氨酸,则 24 位为 Glu 且 20 位或 28 位两者之一为 Lys。按照另一个实施方案,提供 SEQ ID NO:20 的胰高血糖素类似物,其中 1-3 个选自类似物的 1、2、5、7、10、11、13、14、17、18、19、20、21、27、28 或 29 位的氨基酸不同于 SEQ ID NO:1 相应的氨基酸。在另一个实施方案中,提供 SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9 或 SEQ ID NO:11 的胰高血糖素类似物,其中 1-2 个选自类似物的 1、2、5、7、10、11、13、14、17、18、19、20 或 21 位的氨基酸不同于 SEQ ID NO:1 相应的氨基酸,而在又一个实施方案中,与天然胰高血糖素序列 (SEQ ID NO:1) 中存在的氨基酸相比,1-2 个不同的氨基酸表示保守氨基酸取代。在一些实施方案中,提供 SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:14 或 SEQ ID NO:15 的胰高血糖素肽,其中胰高血糖素肽还包含选自 2、5、7、10、11、13、14、17、18、19、20、21、27 或 29 位的位置上的 1、2 或 3 个氨基酸取代。在一些实施方案中,2、5、7、10、11、13、14、16、17、18、19、20、21、27 或 29 位上的取代为保守氨基酸取代。

[0977] 按照一些实施方案,提供包含 SEQ ID NO 33 序列的变体的胰高血糖素 /GLP-1 受体共激动剂,其中分别选自变体的 16、17、18、20、21、23、24、27、28 和 29 位的 1-10 个氨基酸不同于 SEQ ID NO:1 相应的氨基酸。按照一些实施方案,提供 SEQ ID NO 33 的序列的变体,其中变体因一个或多个选自 Gln17、Ala18、Glu21、Ile23、Ala24、Val27 和 Gly29 的氨基酸取代而不同于 SEQ ID NO:33。按照一些实施方案,提供包含 SEQ ID NO 33 序列的变体的胰高血糖素 /GLP-1 受体共激动剂,其中选自变体 17-26 位的 1-2 个氨基酸不同于 SEQ ID NO:1 相应的氨基酸。按照一些实施方案,提供 SEQ ID NO 33 的序列的变体,其中变体因选自 Gln17、Ala18、Glu21、Ile23 和 Ala24 的氨基酸取代而不同于 SEQ ID NO:33。按照一些实施方案,提供 SEQ ID NO 33 的序列的变体,其中变体因 18 位上的氨基酸取代而不同于 SEQ ID NO:33,其中取代的氨基酸选自 Ala、Ser、Thr 和 Gly。按照一些实施方案,提供 SEQ ID NO 33 的序列的变体,其中变体因 18 位的 Ala 的氨基酸取代而不同于 SEQ ID NO:33。SEQ ID NO:55 包括这类变异。在另一个实施方案中,提供包含 SEQ ID NO 33 序列的变体的胰高血糖素 /GLP-1 受体共激动剂,其中选自变体 17-22 位的 1-2 个氨基酸不同于 SEQ ID NO:1 相应的氨基酸,而在又一个实施方案中,提供 SEQ ID NO 33 的变体,其中变体因 20 和 21 位上的 1 或 2 个氨基酸取代而不同于 SEQ ID NO:33。按照一些实施方案,提供包含以下序列的胰高血糖素 /GLP-1 受体共激动剂:

[0978] NH₂-His-Ser-Gln-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Lys-Tyr-Leu-Xaa-Xaa-Arg-Arg-Ala-Xaa-Xaa-Phe-Val-Xaa-Trp-Leu-Met-Xaa-Xaa-R (SEQ ID NO:51), 其中 15 位上的 Xaa 为 Asp、Glu、半胱氨酸、高谷氨酸或高半胱氨酸,16 位上的 Xaa 为 Ser、Glu、Gln、高谷氨酸或高半胱氨酸,20 位上的 Xaa 为 Gln、Lys、Arg、Orn 或瓜氨酸,21 位上的 Xaa 为 Asp、Glu、高谷氨酸或高半胱氨酸,24 位上的 Xaa 为 Gln 或 Glu,28 位上的 Xaa 为 Asn、Lys 或酸性氨基酸,29 位上的 Xaa 为 Thr 或酸氨基酸,R 为 COOH 或 CONH₂。在一些实施方案中,R 为 CONH₂。按照一些实施方案,提供包含 SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:47、SEQ ID NO:48 或 SEQ ID NO:49 的变体的胰高血糖素 /GLP-1 受体共激动剂,其中变体因 20 位上的氨基酸取代而不同于所述序列。在一些实施方案中,氨基酸取代选自 Lys、Arg、Orn 或瓜氨酸对 20 位的取代。

[0979] 在一些实施方案中,提供包含 SEQ ID NO:34 的类似物肽的胰高血糖素激动剂,其中该类似物因 2 位上具有不是丝氨酸的氨基酸而不同于 SEQ ID NO:34。在一些实施方案

中,丝氨酸残基被氨基异丁酸、D-丙氨酸取代,而在一些实施方案中,丝氨酸残基被氨基异丁酸取代。这类修饰抑制被二肽基肽酶 IV 的切割而同时保持母体化合物的固有效价(例如母体化合物效价的至少 75%、80%、85%、90%、95%或更高)。在一些实施方案中,例如通过将 1、2、3 或更多个带电荷的氨基酸引入天然胰高血糖素的 C 端部分、优选在位于 27 位 C 端的位置上,使类似物的溶解性得到提高。在示例性的实施方案中,1、2、3 个或所有带电荷的氨基酸带有负电荷。在另一个实施方案中,类似物还包含取代 28 或 29 位上的天然氨基酸的酸性氨基酸或添加至 SEQ ID NO:34 肽的羧基端的酸性氨基酸。

[0980] 在一些实施方案中,在 1 或 2 位上对本文公开的胰高血糖素类似物进行进一步修饰以降低对被二肽基肽酶 IV 切割的敏感性。在一些实施方案中,提供 SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:14 或 SEQ ID NO:15 的胰高血糖素类似物,其中该类似物因 2 位上的取代而不同于母体分子,并且对二肽基肽酶 IV 切割的敏感性降低(即抗性)。更具体地讲,在一些实施方案中,类似物肽的 2 位被选自以下的氨基酸取代:D-丝氨酸、D-丙氨酸、缬氨酸、氨基正丁酸、甘氨酸、N-甲基丝氨酸和氨基异丁酸。在一些实施方案中,类似物肽的 2 位被选自以下的氨基酸取代:D-丝氨酸、D-丙氨酸、甘氨酸、N-甲基丝氨酸和氨基异丁酸。在另一个实施方案中,类似物肽的 2 位被选自以下的氨基酸取代:D-丝氨酸、甘氨酸、N-甲基丝氨酸和氨基异丁酸。在一些实施方案中,2 位上的氨基酸不是 D-丝氨酸。在一些实施方案中,胰高血糖素肽包含 SEQ ID NO:21 或 SEQ ID NO:22 的序列。

[0981] 在一些实施方案中,提供 SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:14 或 SEQ ID NO:15 的胰高血糖素类似物,其中该类似物因 1 位上的取代而不同于母体分子,且对二肽基肽酶 IV 切割的敏感性降低(即抗性)。更具体地讲,类似物肽的 1 位被选自以下的氨基酸取代:D-组氨酸、 α , α -二甲基咪唑乙酸(DMIA)、N-甲基组氨酸、 α -甲基组氨酸、咪唑乙酸、脱氨基组氨酸、羟基-组氨酸、乙酰基-组氨酸和高组氨酸。在另一个实施方案中,提供包含 SEQ ID NO:34 的类似物肽的胰高血糖素激动剂,其中该类似物因 1 位上的氨基酸不是丝氨酸而不同于 SEQ ID NO:34。在一些实施方案中,例如通过将 1、2、3 或更多个带电荷的氨基酸引入天然胰高血糖素的 C 端部分、优选在位于 27 位 C 端的位置上,使类似物的溶解性得到提高。在示例性的实施方案中,1、2、3 个或所有带电荷的氨基酸带有负电荷。在另一个实施方案中,类似物还包含取代 28 或 29 位上的天然氨基酸的酸性氨基酸或添加至 SEQ ID NO:34 肽的羧基端的酸性氨基酸。在一些实施方案中,酸性氨基酸是天冬氨酸或谷氨酸。

[0982] 在一些实施方案中,胰高血糖素/GLP-1 受体共激动剂包含 SEQ ID NO:20 的序列,其还包含 1 个氨基酸的额外羧基端突出端或选自 SEQ ID NO:26、SEQ ID NO:27 和 SEQ ID NO:28 的肽。在其中单一氨基酸添加至 SEQ ID NO:20 的羧基端的实施方案中,氨基酸通常选自 20 种普通氨基酸之一,而在一些实施方案中,额外羧基端氨基酸具有替换天然氨基酸的羧酸的酰胺基团。在一些实施方案中,额外氨基酸选自谷氨酸、天冬氨酸和甘氨酸。

[0983] 在一个备选的实施方案中,提供胰高血糖素/GLP-1 受体共激动剂,其中肽包含谷氨酸残基和赖氨酸残基的侧链之间形成的至少一个内酰胺环,其中谷氨酸残基和赖氨酸残基被 3 个氨基酸间隔开来。在一些实施方案中,携带内酰胺的胰高血糖素肽的羧基端氨基酸具有替换天然氨基酸的羧酸的酰胺基。更具体地讲,在一些实施方案中,提供包含选自以

下的修饰胰高血糖素肽的胰高血糖素和 GLP-1 共激动剂：

[0984] $\text{NH}_2\text{-His-Ser-Gln-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Lys-Tyr-Leu-Asp-Glu-Arg-Arg-Ala-Gln-Asp-Phe-Val-Gln-Trp-Leu-Met-Xaa-Xaa-R}$ (SEQ ID NO :66)

[0985] $\text{NH}_2\text{-His-Ser-Gln-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Lys-Tyr-Leu-Asp-Glu-Arg-Arg-Ala-Lys-Asp-Phe-Val-Gln-Trp-Leu-Met-Xaa-Xaa-R}$ (SEQ ID NO :67)

[0986] $\text{NH}_2\text{-His-Ser-Gln-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Lys-Tyr-Leu-Asp-Ser-Arg-Arg-Ala-Lys-Asp-Phe-Val-Glu-Trp-Leu-Met-Xaa-Xaa-R}$ (SEQ ID NO :68)

[0987] $\text{NH}_2\text{-His-Ser-Gln-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Lys-Tyr-Leu-Asp-Ser-Arg-Arg-Ala-Gln-Asp-Phe-Val-Glu-Trp-Leu-Met-Lys-Xaa-R}$ (SEQ ID NO :69)

[0988] $\text{NH}_2\text{-His-Ser-Gln-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Lys-Tyr-Leu-Asp-Glu-Arg-Arg-Ala-Lys-Asp-Phe-Val-Glu-Trp-Leu-Met-Asn-Thr-R}$ (SEQ ID NO :16)

[0989] $\text{NH}_2\text{-His-Ser-Gln-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Lys-Tyr-Leu-Asp-Glu-Arg-Arg-Ala-Gln-Asp-Phe-Val-Glu-Trp-Leu-Met-Lys-Thr-R}$ (SEQ ID NO :17)

[0990] $\text{NH}_2\text{-His-Ser-Gln-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Lys-Tyr-Leu-Asp-Glu-Arg-Arg-Ala-Lys-Asp-Phe-Val-Glu-Trp-Leu-Met-Lys-Thr-R}$ (SEQ ID NO :18)

[0991] 其中 28 位上的 Xaa = Asp 或 Asn, 29 位上的 Xaa 为 Thr 或 Gly, R 选自 COOH 、 CONH_2 、谷氨酸、天冬氨酸、甘氨酸、SEQ ID NO :26、SEQ ID NO :27 和 SEQ ID NO :28, 且内酰胺桥形成于 SEQ ID NO :66 的 12 位上的 Lys 和 16 位上的 Glu 之间、于 SEQ ID NO :67 的 16 位上的 Glu 和 20 位上的 Lys 之间、于 SEQ ID NO :68 的 20 位上的 Lys 和 24 位上的 Glu 之间、于 SEQ ID NO :69 的 24 位上的 Glu 和 28 位上的 Lys 之间、于 SEQ ID NO :16 的 12 位上的 Lys 和 16 位上的 Glu 之间以及 20 位上的 Lys 和 24 位上的 Glu 之间、于 SEQ ID NO :17 的 12 位上的 Lys 和 16 位上的 Glu 之间以及 24 位上的 Glu 和 28 位上的 Lys 之间、以及于 SEQ ID NO :18 的 16 位上的 Glu 和 20 位上的 Lys 之间以及 24 位上的 Glu 和 28 位上的 Lys 之间。在一些实施方案中, R 选自 COOH 、 CONH_2 、谷氨酸、天冬氨酸、甘氨酸, 28 位上的氨基酸为 Asn, 29 位上的氨基酸为苏氨酸。在一些实施方案中, R 为 CONH_2 , 28 位上的氨基酸为 Asn, 29 位上的氨基酸为苏氨酸。在另一个实施方案中, R 选自 SEQ ID NO :26、SEQ ID NO :29 和 SEQ ID NO :65, 29 位上的氨基酸为甘氨酸。

[0992] 在又一个实施方案中, 胰高血糖素 /GLP-1 受体共激动剂选自 SEQ ID NO :11、SEQ ID NO :12、SEQ ID NO :13、SEQ ID NO :14、SEQ ID NO :15、SEQ ID NO :16、SEQ ID NO :17 和 SEQ ID NO :18, 其中肽还包含 1 个氨基酸的额外羧基端突出端或选自 SEQ ID NO :26、SEQ ID NO :27 和 SEQ ID NO :28 的肽。在一些实施方案中, 末端突出端包含 SEQ ID NO :26、SEQ ID NO :29 或 SEQ ID NO :65 的序列且胰高血糖素肽包含 SEQ ID NO :55 的序列。在一些实施方案中, 胰高血糖素 /GLP-1 受体共激动剂包含 SEQ ID NO :33 的序列, 其中 16 位上的氨基酸为谷氨酸, 20 位上的氨基酸为赖氨酸, 28 位上的氨基酸为天冬酰胺, 而 SEQ ID No :26 或 SEQ ID NO :29 的氨基酸序列与 SEQ ID NO :33 的羧基端连接。

[0993] 在其中单一氨基酸添加至 SEQ ID NO :20 的羧基端的实施方案中, 氨基酸通常选自 20 种普通氨基酸之一, 而在一些实施方案中, 氨基酸具有替换天然氨基酸的羧酸的酰胺基。在一些实施方案中, 额外氨基酸选自谷氨酸和天冬氨酸和甘氨酸。在其中胰高血糖素激动剂类似物还包含羧基端突出端的实施方案中, 突出端的羧基端氨基酸在一些实施方案中终

止于酰胺基或酯基而不是羧酸。

[0994] 在另一个实施方案中,胰高血糖素/GLP-1受体共激动剂包含序列: $\text{NH}_2\text{-His-Ser-Gln-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Lys-Tyr-Leu-Asp-Glu-Arg-Arg-Ala-Gln-Asp-Phe-Val-Gln-Trp-Leu-Met-Asn-Thr-Xaa-CONH}_2$ (SEQ ID NO:19), 其中 30 位的 Xaa 表示任何氨基酸。在一些实施方案中, Xaa 选自 20 种普通氨基酸之一, 而在一些实施方案中, 氨基酸为谷氨酸、天冬氨酸或甘氨酸。可通过使 PEG 链与 SEQ ID NO:19 的 17、21、24 或 30 位上的氨基酸侧链共价连接, 进一步提高该肽的溶解性。在又一个实施方案中, 肽包含选自 SEQ ID NO:26、SEQ ID NO:27 和 SEQ ID NO:28 的肽的额外羧基端突出端。按照一些实施方案, 胰高血糖素/GLP-1受体共激动剂包含 SEQ ID NO:30、SEQ ID NO:31 和 SEQ ID NO:32 的序列。

[0995] 可对 SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:17、SEQ ID NO:18、SEQ ID NO:19 和 SEQ ID NO:64 的胰高血糖素序列的内部进行其它的位点特异性修饰, 以得到具有可变程度的 GLP-1 激动作用 (agonism) 的胰高血糖素激动剂组。因此, 制备并表征了对各种受体具有几乎相同的体外效价的肽。同样, 已鉴定并表征了对两种受体中的每一种具有 10 倍选择性提高的效价的肽。如上所述, 16 位上的丝氨酸残基被谷氨酸取代提高天然胰高血糖素对胰高血糖素和 GLP-1 受体两者的效价, 但是对胰高血糖素受体保持约 10 倍的选择性。另外通过用谷氨酸取代 3 位上的天然谷氨酰胺 (SEQ ID NO:22) 得到对 GLP-1 受体具有约 10 倍选择性的胰高血糖素类似物。

[0996] 通过在肽的 16、17、21 和 24 位上引入亲水基团, 或者通过在胰高血糖素/GLP-1共激动剂肽羧基端添加单个修饰的氨基酸 (即修饰成包含亲水基团的氨基酸), 可进一步提高胰高血糖素/GLP-1共激动剂肽在生理 pH 下在水溶液中的溶解性, 同时保持相对于天然胰高血糖素的高生物活性。按照一些实施方案, 亲水基团包含聚乙烯 (PEG) 链。更具体地讲, 在一些实施方案中, 胰高血糖素肽包含 SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:17 或 SEQ ID NO:18 的序列, 其中 PEG 链与胰高血糖素肽的 16、17、21、24、29 位氨基酸侧链或 C 端氨基酸共价连接, 前提条件是如果肽包含 SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:12 或 SEQ ID NO:13, 则聚乙二醇链与 17、21 或 24 位上的氨基酸残基共价结合, 如果肽包含 SEQ ID NO:14 或 SEQ ID NO:15, 则聚乙二醇链与 16、17 或 21 位上的氨基酸残基共价结合, 和如果肽包含 SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:17 或 SEQ ID NO:18, 则聚乙二醇链与 17 或 21 位上的氨基酸残基共价结合。

[0997] 在一些实施方案中, 胰高血糖素肽包含 SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:12 或 SEQ ID NO:13 的序列, 其中 PEG 链与胰高血糖素肽的 17、21、24 位氨基酸侧链或 C 端氨基酸共价连接, 且肽的羧基端具有氨基酸替换天然氨基酸的羧基的酰胺基。在一些实施方案中, 胰高血糖素/GLP-1受体共激动剂肽包含选自 SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:17、SEQ ID NO:18 和 SEQ ID NO:19 的序列, 其中 PEG 链与胰高血糖素肽的 SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:13 和 SEQ ID NO:19 的 17、21 或 24 位; 或者 SEQ ID NO:14 和 SEQ ID NO:15 的 16、17 或 21 位; 或者 SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:17 和 SEQ ID NO:18 的 17 或 21 位上的氨基酸侧链共价连接。在另一个实施方案中, 胰高血糖

素/GLP-1受体共激动剂肽包含SEQ ID NO:11或SEQ ID NO:19的序列,其中PEG链与胰高血糖素肽的17、21或24位氨基酸侧链或C端氨基酸共价连接。

[0998] 按照一些实施方案,并遵从前述段落描述的条件限制,对胰高血糖素共激动剂肽进行修饰以含有一个或多个在16、17、21、24或29位或C端氨基酸的氨基酸取代,其中天然氨基酸被具有适于与亲水部分(包括例如PEG)交联的侧链的氨基酸取代。天然肽可被天然存在的氨基酸或合成的(非天然存在的)氨基酸取代。合成的或非天然存在的氨基酸是指体内不是天然存在然而却可掺入本文所述肽结构的氨基酸。或者,可将具有适于与亲水部分(包括例如PEG)交联的侧链的氨基酸添加至本文公开的任何胰高血糖素类似物的羧基端。按照一些实施方案,在胰高血糖素/GLP-1受体共激动剂肽中,在选自16、17、21、24或29的位置上进行氨基酸取代,用选自赖氨酸、半胱氨酸、鸟氨酸、高半胱氨酸和乙酰基苯丙氨酸的氨基酸置换天然氨基酸,其中取代的氨基酸还包含与氨基酸的侧链共价结合的PEG链。在一些实施方案中,对选自SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:17、SEQ ID NO:18和SEQ ID NO:19的胰高血糖素肽进行进一步修饰,以包含与胰高血糖素肽17或21位上的氨基酸侧链共价连接的PEG链。在一些实施方案中,聚乙二醇化胰高血糖素/GLP-1受体共激动剂还包含SEQ ID NO:26、SEQ ID NO:27或SEQ ID NO:29的序列。

[0999] 在另一个实施方案中,胰高血糖素肽包含SEQ ID NO:55或SEQ ID NO:56的序列,其还包含与SEQ ID NO:55或SEQ ID NO:56的C端氨基酸连接的SEQ ID NO:26、SEQ ID NO:29或SEQ ID NO:65的C端突出端,并任选还包含与肽的17、18、21、24或29位氨基酸侧链或C端氨基酸共价连接的PEG链。在另一个实施方案中,胰高血糖素肽包含SEQ ID NO:55或SEQ ID NO:56的序列,其中PEG链与胰高血糖素肽的21或24位上的氨基酸侧链共价连接,且该肽还包含SEQ ID NO:26或SEQ ID NO:29的C端突出端。

[1000] 在另一个实施方案中,胰高血糖素肽包含SEQ ID NO:55、SEQ ID NO:33或SEQ ID NO:34的序列,其中将额外氨基酸添加至SEQ ID NO:33或SEQ ID NO:34的羧基端,且PEG链与所添加的氨基酸的侧链共价连接。在又一个实施方案中,聚乙二醇化胰高血糖素类似物还包含与SEQ ID NO:33或SEQ ID NO:34的C端氨基酸连接的SEQ ID NO:26或SEQ ID NO:29的C端突出端。在另一个实施方案中,胰高血糖素肽包含SEQ ID NO:19的序列,其中PEG链与胰高血糖素肽30位上的氨基酸侧链共价连接,且该肽还包含与SEQ ID NO:19的C端氨基酸连接的SEQ ID NO:26或SEQ ID NO:29的C端突出端。

[1001] 聚乙二醇链可以是直链的形式,或者可以是支链。按照一些实施方案,聚乙二醇链具有选自约500-约10,000道尔顿范围的平均分子量。在一些实施方案中,聚乙二醇链具有选自约1,000-约5,000道尔顿范围的平均分子量范围。在一个备选的实施方案中,聚乙二醇链具有选自约10,000-约20,000道尔顿范围的平均分子量。按照一些实施方案,聚乙二醇化胰高血糖素肽包含两条或更多条与胰高血糖素肽共价结合的聚乙二醇链,其中胰高血糖素链总的分子量为约1,000-约5,000道尔顿。在一些实施方案中,聚乙二醇化胰高血糖素激动剂包含由SEQ ID NO:5或SEQ ID NO:5的胰高血糖素激动剂类似物组成的肽,其中PEG链与21位和24位上的氨基酸残基共价连接,且其中2条PEG链总的分子量为约1,000-约5,000道尔顿。

[1002] 在某些示例性的实施方案中,胰高血糖素肽包含具有多达10个氨基酸修饰的SEQ

ID NO:1 的氨基酸序列,并且包含酰化或烷基化的 10 位氨基酸。在一些实施方案中,10 位上的氨基酸被 C4-C30 脂肪酸酰化或烷基化。在某些方面,10 位上的氨基酸包含对天然存在的氨基酸来说是非天然的酰基或烷基。

[1003] 在某些实施方案中,包含酰化或烷基化的 10 位氨基酸的胰高血糖素肽包含稳定化的 α 螺旋。因此,在某些方面,胰高血糖素肽包含本文所述的酰基或烷基和分子内桥,例如,在 i 位上的氨基酸和 $i+4$ 位的氨基酸的侧链间的共价分子内桥(例如内酰胺桥),其中 i 为 12、16、20 或 24。备选或另外地,胰高血糖素肽包含本文所述的酰基或烷基,且胰高血糖素肽的 16、20、21 和 / 或 24 位中的 1、2、3 或更多个被 α, α -二取代氨基酸(例如 AIB)取代。在一些情况下,非天然胰高血糖素肽包含 16 位上的 Glu 和 20 位上的 Lys,其中任选内酰胺桥连接 Glu 与 Lys,且任选胰高血糖素肽还包含一种或多种选自以下的修饰:17 位上的 Gln、18 位上的 Ala、21 位上的 Glu、23 位上的 Ile 和 24 位上的 Ala。

[1004] 此外,在其中胰高血糖素肽包含酰化或烷基化的 10 位氨基酸的任何实施方案中,胰高血糖素肽可还包含替换 C 端 α 羧酸的 C 端酰胺。

[1005] 在一些实施方案中,包含本文所述的酰基或烷基的胰高血糖素肽还包含 1 位、2 位或 1 和 2 位上的氨基酸取代,其中氨基酸取代获得 DPP-IV 蛋白酶抗性。例如,1 位上的 His 可被选自以下的氨基酸取代:D-组氨酸、 α, α -二甲基咪唑乙酸(DMIA)、N-甲基组氨酸、 α -甲基组氨酸、咪唑乙酸、脱氨基组氨酸、羟基-组氨酸、乙酰基-组氨酸和高组氨酸。备选或另外地,2 位上的 Ser 可被选自以下的氨基酸取代:D-丝氨酸、丙氨酸、D-丙氨酸、缬氨酸、甘氨酸、N-甲基丝氨酸、N-甲基丙氨酸和氨基异丁酸。在一些实施方案中,2 位上的氨基酸不是 D-丝氨酸。

[1006] 包含如本文所述酰化或烷基化的 10 位氨基酸的胰高血糖素肽可包含基本上与 SEQ ID NO:1 有关的任何氨基酸序列。例如,胰高血糖素肽包含具有多达 10 个氨基酸修饰(例如 0、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10 个修饰)的 SEQ ID NO:1。在某些实施方案中,酰化或烷基化胰高血糖素肽的氨基酸序列与 SEQ ID NO:1 的同一性大于 25%(例如与 SEQ ID NO:1 的同一性大于 30%、35%、40%、50%、60%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或几乎 100%)。在某些具体的实施方案中,胰高血糖素肽是包含具有本文所述酰化或烷基化的 10 位氨基酸的 SEQ ID NO:55 的胰高血糖素肽。胰高血糖素肽可以是 SEQ ID NO:55(55 具有 1 或 2 个氨基酸修饰)、2-4、9-18、20、23-25、33、40-44、53、56、61、62、64、66-514 和 534 中的任一个。

[1007] 这些实施方案的酰基或烷基可以是本文所述的任何酰基或烷基。例如酰基可为 C4-C30(例如 C8-C24)脂肪酰基,烷基可为 C4-C30(例如 C8-C24)烷基。

[1008] 酰基或烷基与之连接的氨基酸可以是本文所述的任何氨基酸,例如式 I(例如 Lys)、式 II 和式 III 中任一个的氨基酸。

[1009] 在一些实施方案中,酰基或烷基与 10 位上的氨基酸直接连接。在一些实施方案中,酰基或烷基通过间隔基与 10 位上的氨基酸连接,例如长度为 3-10 个原子的间隔基,例如氨基酸或二肽。本文描述了用于连接酰基或烷基的合适间隔基。

[1010] 按照一些实施方案,第 3 类胰高血糖素相关肽可以是本文所述的任何前述第 3 类胰高血糖素相关肽的类似物,该类似物对 GIP 受体具有激动剂活性。类似物在胰高血糖素受体、GLP-1 受体和 GIP 受体上的活性水平、对这些受体中每一种的效价和对这些受体中每

一种的选择性可与本文所述第 2 类胰高血糖素相关肽的教导一致。参见第 2 类胰高血糖素相关肽部分标题为“活性”的小节的教导。

[1011] 在本发明的一些实施方案中,提供胰高血糖素肽的类似物,该类似物对 GIP 受体具有激动剂活性。在某些实施方案中,类似物包含具有至少一个氨基酸修饰(任选多达 15 个氨基酸修饰)的 SEQ ID NO:1 的氨基酸序列和类似物 29 位氨基酸 C 端的 1-21 个氨基酸的突出端。

[1012] 在某些方面,类似物包含至少一个氨基酸修饰和多达 15 个氨基酸修饰(例如 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15 个氨基酸修饰,多达 10 个氨基酸修饰)。在某些实施方案中,类似物包含至少一个氨基酸修饰至多达 10 个氨基酸修饰和其它保守氨基酸修饰。本文描述了保守氨基酸修饰。

[1013] 在一些方面,至少一个氨基酸修饰为类似物 C 端部分提供稳定的 α 螺旋结构。本文描述了获得稳定的 α 螺旋结构的修饰。参见例如标题为 α 螺旋的稳定 / 分子内桥 (Stabilization of the alpha helix/Intramolecular bridges) 部分下的教导。在一些方面,类似物包含类似物的 2 个氨基酸侧链之间的分子内桥(例如共价分子内桥、非共价分子内桥)。在某些方面,分子内桥连接 i 和 i+4 位上的氨基酸侧链,其中 i 为 12、13、16、17、20 或 24。在其它方面,分子内桥连接 j 和 j+3 位上的氨基酸侧链,其中 j 为 17,或者连接 k 和 k+7 位上的氨基酸侧链,其中 k 为 12 和 22 之间的任何整数。在某些实施方案中,分子内桥是共价分子内桥,例如内酰胺桥。在具体的方面,内酰胺桥连接 16 和 20 位上的氨基酸侧链。在具体方面,16 和 20 位上的一个氨基酸是带正电荷的氨基酸,另一个是带负电荷的氨基酸。例如,类似物可包含连接 16 位上的 Glu 和 20 位上的 Lys 的侧链的内酰胺桥。在其它方面,带负电荷的氨基酸和带正电荷的氨基酸形成盐桥。在这种情况下,分子内桥是非共价分子内桥。

[1014] 在具体方面,提供稳定的 α 螺旋的氨基酸修饰是 SEQ ID NO:1 的氨基酸用 α , α -二取代氨基酸插入或取代。本文描述了用于稳定 α 螺旋的合适的 α , α -二取代氨基酸,其包括例如 AIB。在一些方面,SEQ ID NO:1 的 16、20、21 和 24 位上的 1、2、3 或更多个氨基酸被 α , α -二取代氨基酸(例如 AIB)取代。在具体的实施方案中,16 位上的氨基酸为 AIB。

[1015] 对 GIP 受体具有激动剂活性的类似物可包含其它修饰,例如本文所述的任何修饰。例如,氨基酸修饰可提高或降低对 GLP-1 受体和胰高血糖素受体中的一种或两种的活性。氨基酸修饰可提高肽的稳定性,例如,提高对 DPP-IV 蛋白酶降解的抗性、稳定氨基酸 15 和 16 之间的键。氨基酸修饰可提高肽的溶解性和 / 或改变类似物对 GIP、胰高血糖素和 GLP-1 受体中任一种的作用时间。任何这些修饰类型的组合可存在于对 GIP 受体具有激动剂活性的类似物中。

[1016] 因此,在一些方面,类似物包含具有以下一种或多种修饰或其保守氨基酸取代的 SEQ ID NO:1 的氨基酸序列:17 位上的 Gln、18 位上的 Ala、21 位上的 Glu、23 位上的 Ile 和 24 位上的 Ala 或 Cys。在一些方面,类似物包含替换 C 端 α 羧基的 C 端酰胺。在某些实施方案中,类似物包含 1 位、2 位或 1 和 2 位上的氨基酸取代,该取代获得 DPP-IV 蛋白酶抗性。本文描述了合适的氨基酸取代。例如,1 位上的 DMIA 和 / 或 2 位上的 d-Ser 或 AIB。在一些实施方案中,2 位上的氨基酸不是 D-丝氨酸。

[1017] 另外或备选地,类似物可包含以下修饰中的一种或其组合:(a)2位上的Ser被Ala取代;(b)3位上的Gln被Glu或谷氨酰胺类似物取代;(c)7位上的Thr被Ile取代;(d)10位上的Tyr被Trp或包含对天然存在的氨基酸来说是非天然的酰基或烷基的氨基酸取代;(e)12位上的Lys被Ile取代;(f)15位上的Asp被Glu取代;(g)16位上的Ser被Glu取代;(h)20位上的Gln被Ser、Thr、Ala、AIB取代;(i)24位上的Gln被Ser、Thr、Ala、AIB取代;(j)27位上的Met被Leu或Nle取代;(k)29位上的Asn被带电荷的氨基酸(任选Asp或Glu)取代;和(l)29位上的Thr被Gly或带电荷的氨基酸(任选Asp或Glu)取代。

[1018] 在某些方面,类似物不包含1位上的氨基酸修饰,该修饰提供GIP激动剂活性。在一些方面,1位上的氨基酸不是大的芳族氨基酸,例如Tyr。在一些实施方案中,1位上的氨基酸为包含咪唑环的氨基酸,例如His、His的类似物。在某些实施方案中,类似物不是美国专利申请号61/151,349公开的任何化合物。在某些方面,类似物包含SEQ ID NO:657-669中任一个的氨基酸序列。

[1019] 至于对GIP受体具有激动剂活性的类似物,该类似物包含1-21个氨基酸(例如5-19、7-15、9-12个氨基酸)的突出端。类似物的突出端可包含任何氨基酸序列,前提条件是突出端为1-21个氨基酸。在一些方面,突出端为7-15个氨基酸,而在其它方面,突出端为9-12个氨基酸。在一些实施方案中,突出端包含(i)SEQ ID NO:26或674的氨基酸序列,(ii)与SEQ ID NO:26或674的氨基酸序列具有高的序列同一性(例如至少80%、85%、90%、95%、98%、99%)的氨基酸序列,或(iii)具有一种或多种保守氨基酸修饰的(i)或(ii)的氨基酸序列。

[1020] 在一些实施方案中,突出端的至少一个氨基酸是酰化或烷基化的。包含酰基或烷基的氨基酸可位于类似物突出端的任何位置上。在某些实施方案中,突出端的酰化或烷基化氨基酸位于类似物的37、38、39、40、41或42位(按照SEQ ID NO:1的编号)之一上。在某些实施方案中,酰化或烷基化氨基酸位于类似物的40位上。

[1021] 在示例性的实施方案中,酰基或烷基是对天然存在的氨基酸来说是非天然的酰基或烷基。例如,酰基或烷基可为C4-C30(例如C12-C18)脂肪酰基或C4-C30(例如C12-C18)烷基。酰基或烷基可为本文所论述的任何酰基或烷基。

[1022] 在一些实施方案中,酰基或烷基例如通过氨基酸的侧链与氨基酸直接连接。在其它实施方案中,酰基或烷基通过间隔基(例如氨基酸、二肽、三肽、亲水双官能间隔基、疏水双官能间隔基)与氨基酸连接。在某些方面,间隔基长度为3-10个原子。在一些实施方案中,氨基酸间隔基不是 γ -Glu。在一些实施方案中,二肽间隔基不是 γ -Glu- γ -Glu。

[1023] 此外,在示例性的实施方案中,酰基或烷基与之连接的氨基酸可以是本文所述的任何氨基酸,包括例如式I、式II或式III的氨基酸。被酰化或烷基化的氨基酸可为例如Lys。本文描述了合适的包含酰基或烷基的氨基酸以及合适的酰基和烷基。参见例如标题为酰化和烷基化部分下的教导。

[1024] 在其它实施方案中,突出端的1-6个氨基酸(例如1-2、1-3、1-4、1-5个氨基酸)为带正电荷的氨基酸,例如式IV氨基酸,例如Lys。本文使用的术语“带正电荷的氨基酸”是指天然存在的或非天然存在的任何氨基酸,其包含在生理pH下在其侧链原子上的正电荷。在某些方面,带正电荷的氨基酸位于37、38、39、40、41、42和43位的任何位置上。在具体的实施方案中,带正电荷的氨基酸位于40位上。

[1025] 在其它情况下,突出端是本文所述的酰化或烷基化的,并包含 1-6 个本文所述带正电荷的氨基酸。

[1026] 在另外的其它实施方案中,对 GIP 受体具有激动剂活性的类似物包含 (i) 具有至少一个氨基酸修饰的 SEQ ID NO:1, (ii) 位于类似物 29 位 C 端的 1-21 个氨基酸(例如 5-18、7-15、9-12 个氨基酸)的突出端,和 (iii) 包含对天然存在的氨基酸来说是非天然的酰基或烷基的氨基酸,其位于 C 端突出端以外(例如在 1-29 位任一个上)。在一些实施方案中,类似物包含 10 位上的酰化或烷基化氨基酸。在具体方面,酰基或烷基为 C4-C30 脂肪酰基或 C4-C30 烷基。在一些实施方案中,酰基或烷基通过间隔基(例如氨基酸、二肽、三肽、亲水双官能间隔基、疏水双官能间隔基)连接。在某些方面,类似物包含稳定 α 螺旋的氨基酸修饰,例如 16 位上的 Glu 和 20 位上的 Lys 之间的盐桥,或在 16、20、21 和 24 位中任 1、2、3 或更多个上的 α , α -二取代氨基酸。在具体的方面,类似物还包含赋予 DPP-IV 蛋白酶抗性的氨基酸修饰,例如 1 位上的 DMIA、2 位上的 AIB。本文考虑了包含其它氨基酸修饰的类似物。

[1027] 在某些实施方案中,具有 GIP 受体活性的类似物具有天然 GIP 对 GIP 受体活性的至少 0.1% (例如至少 0.5%、1%、2%、5%、10%、15% 或 20%)。在一些实施方案中,类似物对 GIP 受体的活性大于天然 GIP 对 GIP 受体活性的 20% (例如大于 50%、大于 75%、大于 100%、大于 200%、大于 300%、大于 500%)。在一些实施方案中,类似物对 GLP-1 和胰高血糖素受体的一种或两种具有可观的激动剂活性。在一些方面,对这些受体(GIP 受体和 GLP-1 受体和/或胰高血糖素受体)的选择性在 1000 倍以内。例如,具有 GIP 受体活性的类似物对 GLP-1 受体的选择性可小于对 GIP 受体和/或胰高血糖素受体的选择性的 500 倍、100 倍、50 倍以内、25 倍以内、15 倍以内、10 倍以内。

[1028] 在具体方面,类似物包含 SEQ ID NO:657-669 中任一个的结构。

[1029] 按照一些实施方案,第 3 类胰高血糖素相关肽包含含有以下修饰的天然胰高血糖素的氨基酸序列(SEQ ID NO:1):2 位上的 AIB、3 位上的 Glu、10 位上的 Lys、16 位上的 Glu、17 位上的 Gln、18 位上的 Ala、20 位上的 Lys、21 位上的 Glu、23 位上的 Ile、24 位上的 Ala; 其中 10 位上的 Lys 用 C14 或 C16 脂肪酸酰化,且其中 C 端羧酸用酰胺置换。在一个具体实施方案中,这种第 3 类胰高血糖素相关肽通过其 N 端氨基酸与二肽 D-Lys- 肌氨酸连接。

[1030] 按照一些实施方案,第 3 类胰高血糖素相关肽包含 SEQ ID NO:70-514、517-534 或 554 中任一个的氨基酸序列,基本上由或由 SEQ ID NO:70-514、517-534 或 554 中任一个的氨基酸序列组成,任选具有多达 1、2、3、4 或 5 个保持 GLP-1 激动剂和/或胰高血糖素激动剂活性的其它修饰。在某些实施方案中,第 3 类胰高血糖素相关肽包含 SEQ ID NO:562-684 和 1701-1776 中任一个的氨基酸。在一些实施方案中,第 3 类胰高血糖素相关肽包含 SEQ ID NO:1801-1921 中任一个的氨基酸序列。

[1031] 第 4 类胰高血糖素相关肽

[1032] 在某些实施方案中,胰高血糖素相关肽是第 4 类胰高血糖素相关肽(参见例如国际(PCT)专利申请号 PCT/US2008/080973,通过引用以其整体结合到本文中)。

[1033] 下面部分提及的所有生物序列(SEQ ID NO:1301-1371)对应于国际专利申请号 PCT/US2008/080973 的 SEQ ID NO:1-71。

[1034] 活性

[1035] 按照一些实施方案,提供第4类胰高血糖素相关肽(下称“第4类肽”)。在某些方面,提供具有胰高血糖素拮抗剂活性的第4类肽。胰高血糖素拮抗剂可用于需要抑制胰高血糖素激动作用的任何情况下。最直接和明显的用途是用于在治疗中以降低血糖,其中胰高血糖素拮抗作用已在高血糖症临床前模型中得到证实。可以对胰高血糖素拮抗剂进行进一步修饰以改进化合物的生物物理稳定性和/或水溶性,同时保持母体化合物的拮抗剂活性。在某些方面,第4类肽定义为纯胰高血糖素拮抗剂。

[1036] 术语“胰高血糖素拮抗剂”是指抵消胰高血糖素活性或阻止胰高血糖素功能的化合物。例如,胰高血糖素拮抗剂抑制胰高血糖素对胰高血糖素受体获得的最大反应达至少60%(例如至少70%抑制)和优选至少80%。在一些实施方案中,胰高血糖素拮抗剂抑制胰高血糖素对胰高血糖素受体获得的最大反应达至少90%。在一个具体的实施方案中,胰高血糖素拮抗剂抑制胰高血糖素对胰高血糖素受体获得的最大反应达100%。另外,浓度约1 μ M的胰高血糖素拮抗剂显示小于约20%的由胰高血糖素对胰高血糖素受体获得的最大激动剂活性。在一些实施方案中,胰高血糖素拮抗剂具有小于约10%的由胰高血糖素对胰高血糖素受体获得的最大激动剂活性。在一个具体的实施方案中,胰高血糖素拮抗剂具有小于约5%的由胰高血糖素对胰高血糖素受体获得的最大激动剂活性。在又一个具体的实施方案中,胰高血糖素拮抗剂具有0%的由胰高血糖素对胰高血糖素受体获得的最大激动剂活性。

[1037] “纯胰高血糖素拮抗剂”是以下胰高血糖素拮抗剂,其采用已验证的体外模型测定法(参见例如PCT/US2008/080973)由cAMP产生测定的不会对胰高血糖素或GLP-1受体活性产生任何检测得到的激活。例如,纯胰高血糖素拮抗剂具有小于约5%(例如小于约4%、小于约3%、小于约2%、小于约1%、约0%)的由胰高血糖素对胰高血糖素受体获得的最大激动剂活性,并且具有小于约5%(例如小于约4%、小于约3%、小于约2%、小于约1%和约0%)的由GLP-1对GLP-1受体获得的最大激动剂活性。

[1038] 因此,在一些方面,提供具有纯胰高血糖素拮抗剂活性的第4类肽。按照一些实施方案,如体外测定法中通过cAMP产生所测定,当胰高血糖素受体同时与0.8nM的胰高血糖素和胰高血糖素拮抗剂接触时,胰高血糖素拮抗剂具有降低胰高血糖素受体胰高血糖素诱导的cAMP产生达最大至少50%的活性。在一些实施方案中,胰高血糖素拮抗剂降低胰高血糖素受体胰高血糖素诱导的cAMP产生达至少80%的最大量。

[1039] 据信第4类肽适于之前描述的有关胰高血糖素拮抗剂的任何用途。因此,本文所述第4类肽可用于治疗高血糖症或治疗胰高血糖素高血水平或高血糖水平引起的其它代谢病。按照一些实施方案,待用本文公开的第4类肽治疗的患者是驯养动物,而在另一个实施方案中,待治疗的患者是人。研究表明糖尿病患者中,缺乏胰高血糖素抑制部分通过加快糖原分解而引起餐后高血糖症。在促生长素抑制素诱导的胰高血糖素抑制存在或不存在时,在口服葡萄糖耐量试验(OGTT)期间对血糖的分析表明,有较高胰高血糖素水平的受试者中的葡萄糖显著增加。因此,本发明的第4类肽可用于治疗高血糖症,并且预期可用于治疗各种类型的糖尿病,包括胰岛素依赖性的或非胰岛素依赖性的I型糖尿病、II型糖尿病或妊娠糖尿病,并减轻糖尿病的并发症,包括肾病、视网膜病变和血管病。

[1040] 在一些实施方案中,毒蜥外泌肽-4的末端10个氨基酸(即SEQ ID NO:1319的序列(GPSSGAPPPS))与第4类肽的羧基端连接。预期这些融合蛋白具有抑制食欲和引起体重

减轻/保持体重的药理活性。按照一些实施方案,可对本文公开的第4类肽进行进一步修饰,以包含与SEQ ID NO:1342的第4类肽的氨基酸24连接的SEQ ID NO:1319的氨基酸序列(GPSSGAPPPS),并给予个体以引起体重减轻或有助于保持体重。更具体地讲,第4类肽包含选自以下的序列:SEQ ID NO:1302、SEQ ID NO:1303、SEQ ID NO:1304、SEQ ID NO:1305、SEQ ID NO:1306、SEQ ID NO:1307、SEQ ID NO:1308、SEQ ID NO:1336、SEQ ID NO:1339、SEQ ID NO:1340、SEQ ID NO:1341、SEQ ID NO:1342、SEQ ID NO:1343和SEQ ID NO:1344,并且还包含与第4类肽的氨基酸24连接的SEQ ID NO:1319的氨基酸序列(GPSSGAPPPS),用于抑制食欲和引起体重减轻/保持体重。在一些实施方案中,给予的第4类肽包含SEQ ID NO:1346或SEQ ID NO:1347的序列。

[1041] 预期降低食欲或促进体重减轻的这类方法可用于减轻体重、防止体重增加或治疗各种诱因的肥胖症(包括药物引起的肥胖症)并减轻与肥胖症相关的并发症包括血管病(冠状动脉疾病、中风、外周血管病、缺血再灌注等)、高血压、II型糖尿病发病、高脂血症和肌骨病。

[1042] 本发明的第4类肽可单独或与其它抗糖尿病药或减肥药组合给予。本领域已知的或正在研究中的抗糖尿病药包括胰岛素;磺脲类,例如甲苯磺丁脲(甲糖宁(Orinase))、醋酸己脲(戴美乐(Dymelor))、妥拉磺脲(妥拉磺脲片剂(Tolinase))、氯磺丙脲(特泌胰(Diabinese))、格列吡嗪(利糖妥片(Glucotrol))、格列本脲(达安宁(Diabetas)、优降糖(Micronase)、达安辽(Glynase))、格列美脲(亚莫利(Amaryl))或格列齐特(达美康(Diamicon));氯茴苯酸类,例如瑞格列奈(repaglinide)(Prandin)或那格列奈(nateglinide)(Starlix);双胍类,例如二甲双胍(格华止(Glucophage))或苯乙双胍;噻唑烷二酮类,例如罗格列酮(文迪雅(Avandias))、吡格列酮(pioglitazone)(Actos)或曲格列酮(瑞如林(Rezulin))或其它PPAR γ 抑制剂;抑制碳水化合物消化的 α 葡萄糖苷酶抑制剂,例如米格列醇(德赛天(Glyset))、阿卡波糖(阿卡糖(Precose)/拜糖平(Glucobay));艾塞那肽(百泌达(Byetta))或普兰林肽;二肽基肽酶-4(DPP-4)抑制剂,例如维格列汀或西格列汀;SGLT(钠依赖性葡萄糖转运蛋白1)抑制剂;或FBP酶(果糖1,6-二磷酸酶)抑制剂。

[1043] 本领域已知的或正在研究中的减肥药包括食欲抑制药,包括苯乙胺型兴奋剂、芬特明(任选与芬氟拉明或右芬氟拉明一起)、安非拉酮(Tenuate[®])、苯甲曲秦(Prelu-2[®]、Bontril[®])、苄非他明(Didrex[®])、西布曲明(Meridia[®]、Reductil[®]);利莫纳班(Acomplia[®]);其它大麻素受体拮抗剂;泌酸调节肽;盐酸氟西汀(Prozac);Qnexa(托吡酯和芬特明);Excalia(安非他酮和唑尼沙胺)或Contrave(安非他酮和纳曲酮);或类似于赛尼可(奥利司他)或西替司他(亦称ATL-962)的脂肪酶抑制剂或GT 389-255。

[1044] 还可将本发明的第4类肽给予患有分解代谢性消瘦(catabolic wasting)的患者。据估计,一半以上的癌症患者经历分解代谢性消瘦,其特征不在于非刻意的进行性体重减轻、衰弱和体脂肪和肌肉水平低下。该综合征在AIDS患者中同样普遍,并还可存在于细菌病和寄生虫病、类风湿性关节炎和肠、肝、肺和心的慢性疾病中。分解代谢性消瘦通常与食欲缺乏有关,并可表现为老化病况或身体创伤的结果。分解代谢性消瘦是一种降低生命质量、使基本状况恶化的症状,并且是死亡的主要原因。申请人预期,可将本文公开的第4类肽给予患者以治疗分解代谢性消瘦。

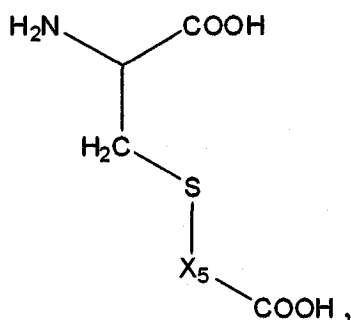
[1045] 可配制包含本文公开的第 4 类肽的药物组合物,并可采用本领域技术人员已知的标准药理学上可接受的载体和给药途径给予患者。因此,本公开内容还包括包含一种或多种本文公开的第 4 类肽以及药理学上可接受的载体的药物组合物。药物组合物可包含作为唯一的药用活性组分的第 4 类肽,或者第 4 类肽可与一种或多种其它的活性剂组合。按照一些实施方案,提供包含本发明的第 4 类肽和激活 GLP-1 受体的化合物(例如 GLP-1、GLP-1 类似物、毒蜥外泌肽-4 类似物或其衍生物)的组合物。按照一些实施方案,提供包含本发明的第 4 类肽和胰岛素或胰岛素类似物的组合物。或者,可提供包含 SEQ ID NO:1342 的序列(其还包括与 SEQ ID NO:1342 的氨基酸 24 连接的 SEQ ID NO:1319 的氨基酸序列(GPSSGAPPS))和抗肥胖肽的组合物,提供用于引起体重减轻或防止体重增加。合适的抗肥胖肽包括美国专利 5,691,309、6,436,435 或美国专利申请 20050176643 公开的抗肥胖肽,包括但不限于 GLP-1、GIP(肠抑胃肽)、MP1、PYY、MC-4、瘦蛋白(Leptin)。

[1046] 第 4 类肽结构

[1047] 在一些实施方案中,提供第 4 类胰高血糖素相关肽,其中 9 位(胰高血糖素的 9 位,SEQ ID NO:1301)上正常存在的天冬氨酸被谷氨酸或半胱氨酸型衍生物取代。更具体地讲,在一些方面,第一个氨基酸缺失(脱-His)和 9 位的天冬氨酸用谷氨酸取代,产生第 4 类肽。具有取代胰高血糖素 9 位氨基酸的磺酸取代基的第 4 类胰高血糖素相关肽表现类似于羧酸型氨基酸,但在物理性质(例如溶解性)方面具有少许关键性的差异。当在常规脱-His、Glu9 第 4 类肽中取代 9 位上的等排谷氨酸时,高半胱氨酸(hCysSO₃)保持部分拮抗剂和弱的激动剂。

[1048] 在一些实施方案中,提供这样的第 4 类肽,其中头 2-5 个氨基酸被移除,且 9 位(按照 SEQ ID NO:1301 的编号)被 hCys(SO₃)、高谷氨酸、β-高谷氨酸或具有以下结构的半胱氨酸的烷基羧酸衍生物置换,得到作为高特异性、有效且不沾染激动剂性质的激素拮抗剂起作用的化合物:

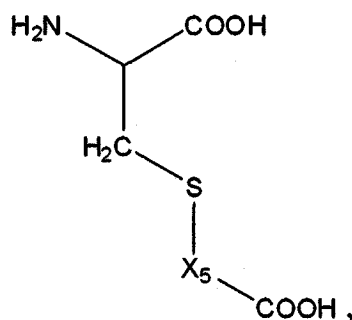
[1049]



[1050] 其中 X₅ 为 C₁-C₄ 烷基、C₂-C₄ 烯基或 C₂-C₄ 炔基。

[1051] 按照一些实施方案,包含与 SEQ ID NO:1301 的野生型序列相比通过如下修饰的胰高血糖素肽的第 4 类肽:从 N 端缺失 2-5 个氨基酸残基并且使天然蛋白质 9 位上的天冬氨酸残基用谷氨酸、高谷氨酸、β-高谷氨酸、半胱氨酸的磺酸衍生物或具有以下结构的半胱氨酸的烷基羧酸衍生物取代:

[1052]



[1053] 其中 X_5 为 $\text{C}_1\text{-C}_4$ 烷基、 $\text{C}_2\text{-C}_4$ 烯基或 $\text{C}_2\text{-C}_4$ 炔基。

[1054] 在一个具体实施方案中,包含从 N 端缺失 2-5 个氨基酸残基且取代天然胰高血糖素的 9 位 Asp 的第 4 类肽,通过多达 3 个氨基酸修饰进一步修饰。备选或另外地,第 4 类肽可包含 1、2 或 3 个保守氨基酸修饰。或者,第 4 类肽可包含一种或多种选自以下的氨基酸修饰:

[1055] A. 第 4 类肽的 10、20 和 24 位(按照 SEQ ID NO:1301 的氨基酸编号)上的一个或两个氨基酸或 N 端或 C 端氨基酸,被通过酯、醚、硫醚、酰胺或烷基胺键与酰基或烷基共价连接的氨基酸取代;

[1056] B. 第 4 类肽的 16、17、20、21 和 24 位(按照 SEQ ID NO:1301 的氨基酸编号)上的一个或两个氨基酸或 N 端或 C 端氨基酸,被选自以下的氨基酸取代:Cys、Lys、鸟氨酸、高半胱氨酸和乙酰基-苯丙氨酸(Ac-Phe),其中所述氨基酸与亲水部分共价结合;

[1057] C. 添加与亲水部分共价结合的氨基酸至第 4 类肽的 N 端或 C 端;

[1058] D. 15 位(按照 SEQ ID NO:1301 的编号)上的 Asp 被半胱磺酸、谷氨酸、高谷氨酸和高半胱磺酸取代;

[1059] E. 16 位(按照 SEQ ID NO:1301 的编号)上的 Ser 被半胱磺酸、谷氨酸、高谷氨酸和高半胱磺酸取代;

[1060] F. 按照 SEQ ID NO:1301 的氨基酸编号,16、20、21 和 24 位中的一个或多个 AIB 被取代;

[1061] G. 按照 SEQ ID NO:1301 的编号,29 位上的氨基酸或 28 和 29 位上的氨基酸的缺失;

[1062] H. 28 位上的 Asn 和 29 位上的 Thr(按照 SEQ ID NO:1301 的氨基酸编号)中的各个或两个被带电荷的氨基酸取代;和/或在 SEQ ID NO:1301 的 C 端添加 1-2 个带电荷的氨基酸;

[1063] I. 27 位(按照 SEQ ID NO:1301 的编号)的 Met 被 Leu 或正亮氨酸取代;

[1064] J. 将具有 SEQ ID NO:19-21 和 53 中任一个的氨基酸序列的肽添加至 SEQ ID NO:1301 的 C 端;其中 29 位(按照 SEQ ID NO:1301 的编号)上的 Thr 为 Thr 或 Gly;和

[1065] K. C 端羧酸用酰胺或酯置换。

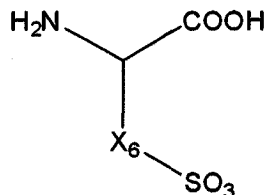
[1066] 在一个具体的实施方案中,第 4 类肽包含上述 A、B 或 C 的氨基酸修饰或其组合。在又一个具体的实施方案中,除 A、B、和/或 C 的氨基酸修饰以外,第 4 类肽还包含上述 D-K 中任一个的氨基酸修饰或其组合。

[1067] 在一些实施方案中,第 4 类肽包含胰高血糖素肽,其中头 5 个氨基酸已从 N 端除去,余留的 N 端氨基被羟基(“PLA6 类似物”)置换,产生 SEQ ID NO:1339 的肽。申请人发

现,在头 5 个氨基酸缺失和 9 位谷氨酸(相对于天然胰高血糖素)被取代的第 4 类肽类似物中,苯基-乳酸取代苯丙氨酸进一步提高那些第 4 类肽类似物的效价。

[1068] 在一些实施方案中,通过用以下通用结构的氨基酸取代 4 位(天然胰高血糖素的 9 位)上的天冬氨酸残基,来进一步修饰 SEQ ID NO:1339 的第 4 类肽:

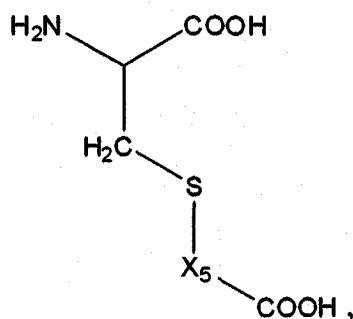
[1069]



[1070] 其中 X_6 为 C_1 - C_3 烷基、 C_2 - C_3 烯基(alkene)或 C_2 - C_3 炔基,在一些实施方案中, X_6 为 C_1 - C_3 烷基,而在另一个实施方案中, X_6 为 C_2 烷基。在一些实施方案中,第 4 类肽包含胰高血糖素肽,其中头 5 个氨基酸已从 N 端除去,且 4 位(天然胰高血糖素的 9 位)上的天冬氨酸残基已被半胱磺酸或高半胱磺酸取代。在一些实施方案中,第 4 类肽包含含有选自以下氨基酸序列的胰高血糖素肽:SEQ ID NO:1339、SEQ ID NO:1307 和 SEQ ID NO:1308。在一些实施方案中,第 4 类肽包含包含选自 SEQ ID NO:1308 的氨基酸序列,其中 4 位的氨基酸为高半胱磺酸。

[1071] 在另一个实施方案中,通过用谷氨酸、高谷氨酸、 β -高谷氨酸或具有以下结构的半胱氨酸的烷基羧酸衍生物取代 4 位(天然胰高血糖素的 9 位)上的天冬氨酸残基,来进一步修饰 SEQ ID NO:1339 的第 4 类肽:

[1072]



[1073] 其中 X_5 为 C_1 - C_4 烷基、 C_2 - C_4 烯基或 C_2 - C_4 炔基。在一个具体的实施方案中, X_5 为 C_1 或 C_2 烷基。

[1074] 然而,申请人发现,在用 PLA 取代脱 1-5 位胰高血糖素类似物(即头 5 个氨基酸缺失的胰高血糖素类似物)中的 N 端苯丙氨酸的情况下,不需要对 4 位(天然胰高血糖素的 9 位)上的天然天冬氨酸残基进行进一步取代来产生具有纯拮抗作用的类似物。按照现有技术的教导,即必需取代 4 位上的天然天冬氨酸残基以产生胰高血糖素(2-29)类似物的高亲和力的有效拮抗剂,这个结果是出乎意料的。PLA 取代的使用改进 Asp9 类似物的相对效价至与 Glu9 和 hCys(SO₃H)9 类似物的效价相当的点。

[1075] 苯丙氨酸残基用其它苯丙氨酸类似物(包括 3,4-2F-苯丙氨酸(3,4-2F-Phe)、2-萘基丙氨酸(2-Nal)、N-酰基-苯丙氨酸(Ac-Phe)、 α -甲基氢化肉桂酸(MCA)和苄基丙二酸(BMA))的取代不如 PLA 取代一样有效。

[1076] 在 6 位(按照天然胰高血糖素的氨基酸编号)以外的位点(包括 4 和 5 位)上取

代的 PLA 显示,与具有略延伸的 N 端的胰高血糖素类似物相比, PLA6 类似物是相当更有效的拮抗剂。本发明还包括其中 N 端氨基是被酰化和烷基化“O-端”肽取代的类似物。

[1077] 此外, PLA6 取代不仅提高拮抗剂的效价,而且还在聚乙二醇化中起决定性作用。可对 PLA6 类似物进行选择性聚乙二醇化而又不恢复胰高血糖素激动作用。不存在 PLA 取代时,类似物的聚乙二醇化出乎意料地诱导胰高血糖素激动作用。在聚乙二醇化 PLA6 类似物中不存在这种胰高血糖素激动作用。研究了包括 3、6 和 19 位(天然胰高血糖素的 8、11 和 19 位)和 N 端氨基酸残基在内的用于聚乙二醇化的若干位点。在一些实施方案中,聚乙二醇化位于 19 位(天然胰高血糖素的 24 位),因为该位点显示最有效和选择性的胰高血糖素拮抗作用。

[1078] 在一些实施方案中,第 4 类肽包含 A-B-C 的通用结构,其中 A 选自:

[1079] (i) 苯基乳酸 (PLA);

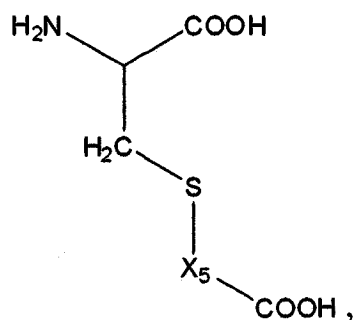
[1080] (ii) PLA 的氧基衍生物;

[1081] (iii) 2-6 个氨基酸的肽,其中肽的 2 个连续氨基酸通过酯键或醚键连接;

[1082] B 表示 SEQ ID NO:1301 的氨基酸 i-26,其中 i 为 3、4、5、6 或 7,任选包含一种或多种选自以下的氨基酸修饰:

[1083] (iv) 9 位(按照 SEQ ID NO:1301 的氨基酸编号)上的 Asp 被 Glu、Cys 的磺酸衍生物、高谷氨酸、β-高谷氨酸或具有以下结构的半胱氨酸的烷基羧酸衍生物取代:

[1084]



[1085] 其中 X_5 为 C_1 - C_4 烷基、 C_2 - C_4 烯基或 C_2 - C_4 炔基。

[1086] (v) 10、20 和 24 位(按照 SEQ ID NO:1301 的氨基酸编号)上的一个或两个氨基酸被通过酯、醚、硫醚、酰胺或烷基胺键与酰基或烷基共价连接的氨基酸取代;

[1087] (vi) 16、17、20、21 和 24 位(按照 SEQ ID NO:1301 的氨基酸编号)上的一个或两个氨基酸被选自以下的氨基酸取代: Cys、Lys、鸟氨酸、高半胱氨酸和乙酰基-苯丙氨酸 (Ac-Phe), 其中所述氨基酸与亲水部分共价连接;

[1088] (vii) 15 位(按照 SEQ ID NO:1301 的编号)上的 Asp 被半胱磺酸、谷氨酸、高谷氨酸和高半胱磺酸取代;

[1089] (viii) 16 位(按照 SEQ ID NO:1301 的编号)上的 Ser 被半胱磺酸、谷氨酸、高谷氨酸和高半胱磺酸取代;

[1090] (ix) 按照 SEQ ID NO:1301 的氨基酸编号, 16、20、21 和 24 位上的一个或多个被 AIB 取代;

[1091] 和 C 选自:

[1092] (x) X;

[1093] (xi) X-Y ;

[1094] (xii) X-Y-Z ;和

[1095] (xiii) X-Y-Z-R10,

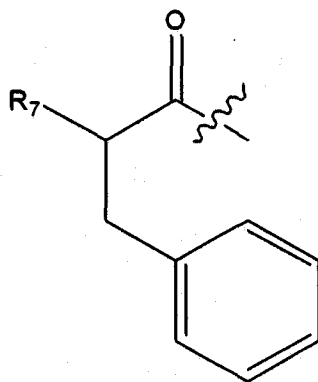
[1096] 其中 X 为 Met、Leu 或 Nle ;Y 为 Asn 或带电荷的氨基酸 ;Z 为 Thr、Gly、Cys、Lys、鸟氨酸 (Orn)、高半胱氨酸、乙酰基苯丙氨酸 (Ac-Phe) 或带电荷的氨基酸 ;其中 R10 选自 SEQ ID NO :1319-1321 和 1353 ;和

[1097] (xiv) (x)-(xiii) 中的任一个,其中 C 端羧酸被酰胺置换。

[1098] 在一个具体方面,第 4 类肽包含 PLA 的氧基衍生物。本文使用的“PLA 的氧基衍生物”是指包含 PLA 修饰结构的化合物,其中羟基被 O-R₁₁ 置换,其中 R₁₁ 为化学部分。在这一方面,PLA 的氧基衍生物可为例如 PLA 的酯或 PLA 的醚。

[1099] 制备 PLA 的氧基衍生物的方法是本领域已知的。例如,如果氧基衍生物为 PLA 的酯,则可通过使 PLA 的羟基与带有亲核体的羰基反应而形成酯。亲核体可以是任何合适的亲核体,包括但不限于胺或羟基。因此,PLA 的酯可包含下式 IV 的结构 :

[1100]



式 IV

[1101] 其中 R7 为 PLA 的羟基与带有亲核体的羰基反应时形成的酯。

[1102] 携带亲核体 (其与 PLA 的羟基反应形成酯) 的羰基可为例如羧酸、羧酸衍生物或羧酸的活性酯。羧酸衍生物可以是但不限于酰氯、酸酐、酰胺、酯或腈。羧酸的活性酯可为例如 N- 羟基琥珀酰亚胺 (NHS)、甲苯磺酸酯 (Tos)、碳二亚胺或六氟磷酸盐。在一些实施方案中,碳二亚胺为 1,3- 二环己基碳二亚胺 (DCC)、1,1' - 羰基二咪唑 (CDI)、1- 乙基-3-(3- 二甲基氨基丙基) 碳二亚胺盐酸盐 (EDC) 或 1,3- 二异丙基碳二亚胺 (DICD)。在一些实施方案中,六氟磷酸盐选自六氟磷酸苯并三唑-1-基-氧基-三(二甲基氨基)磷 (BOP)、六氟磷酸苯并三唑-1-基-氧基三吡咯烷基磷 (PyBOP)、六氟磷酸 2-(1H-7- 氮杂苯并三唑-1-基)-1,1,3,3- 四甲基脲鎓 (HATU) 和六氟磷酸 o- 苯并三唑-N,N',N'- 四甲基-脲鎓 (HBTU)。

[1103] 从与羟基 (例如 PLA 的羟基) 反应制备醚的方法也是本领域已知的。例如,PLA 的羟基可与卤代烷基或甲苯磺酸化烷基醇反应形成醚键。

[1104] 一般来讲,R₁₁ 的化学部分是不会降低第 4 类肽的活性的部分。在一些实施方案中,化学部分提高第 4 类肽的活性、稳定性和 / 或溶解性。

[1105] 在一个具体的实施方案中,通过含氧键 (例如通过酯或醚键) 与 PLA 结合的化学

部分为聚合物（例如聚亚烷基二醇）、糖类、氨基酸、肽或脂质，例如脂肪酸或类固醇。

[1106] 在一个具体的实施方案中，化学部分为氨基酸，其任选为肽的组成部分，使得式 IV 为酯肽。在这一方面，PLA 可位于第 4 类肽的 N 端氨基酸残基以外的位置上，使得第 4 类肽包含 PLA 残基 N 端的一个或多个（例如 1、2、3、4、5、6 或更多个）氨基酸。例如，第 4 类肽可包含 n 位上的 PLA，其中 n 为第 4 类肽的 2、3、4、5 或 6 位。

[1107] PLA 残基 N 端的氨基酸可为合成的或天然存在的。在一个具体的实施方案中，作为 PLA N 端的氨基酸是天然存在的氨基酸。在一些实施方案中，作为 PLA N 端的氨基酸是天然胰高血糖素的 N 端氨基酸。例如，第 4 类肽可在 N 端包含 SEQ ID NO:1354-1358 中任一个的氨基酸序列，其中 PLA 通过酯键与苏氨酸连接：

[1108]

SEQ ID NO: 1354	His-Ser-Gln-Gly-Thr-PLA
SEQ ID NO: 1355	Ser-Gln-Gly-Thr-PLA
SEQ ID NO: 1356	Gln-Gly-Thr-PLA
SEQ ID NO: 1357	Gly-Thr-PLA
SEQ ID NO: 1358	Thr-PLA

[1109] 在一个备选的实施方案中，一个或多个 N 端氨基酸可被天然胰高血糖素的氨基酸以外的氨基酸取代。例如，如果第 4 类肽包含 PLA 作为 5 或 6 位上的氨基酸，则 1 位和 / 或 2 位上的氨基酸可为降低对二肽基肽酶 IV 切割敏感性的氨基酸。更具体地讲，在一些实施方案中，第 4 类肽的 1 位为选自以下的氨基酸：D- 组氨酸、 α ， α - 二甲基咪唑乙酸 (DMIA)、N- 甲基组氨酸、 α - 甲基组氨酸、咪唑乙酸、脱氨基组氨酸、羟基 - 组氨酸、乙酰基 - 组氨酸和高组氨酸。更具体地讲，在一些实施方案中，拮抗剂肽的 2 位为选自以下的氨基酸：D- 丝氨酸、D- 丙氨酸、缬氨酸、甘氨酸、N- 甲基丝氨酸、N- 甲基丙氨酸和氨基异丁酸 (AIB)。另外，例如，如果第 4 类肽包含 PLA 作为 4、5 或 6 位的氨基酸，则与天然胰高血糖素的天然谷氨酰胺残基相比，第 4 类肽 3 位的氨基酸可为谷氨酸。在本发明的一个实例性实施方案中，第 4 类肽在 N 端包含 SEQ ID NO:1359-1361 中任一个的氨基酸序列。

[1110] 对于包含式 IV 化合物的第 4 类肽，聚合物可以为任何聚合物，前提条件是其可与 PLA 的羟基反应。聚合物可以是天然或正常包含携带亲核体的羰基的聚合物。或者，聚合物可以是衍生化成包含携带羰基的羰基的聚合物。聚合物可以是以下任一种的衍生化聚合物：聚酰胺；聚碳酸酯；聚亚烷基和其衍生物，包括聚亚烷基二醇、聚环氧烷、聚对苯二甲酸亚烷基酯；丙烯酸酯和甲基丙烯酸酯的聚合物，包括聚（甲基丙烯酸甲酯）、聚（甲基丙烯酸乙酯）、聚（甲基丙烯酸丁酯）、聚（甲基丙烯酸异丁酯）、聚（甲基丙烯酸己酯）、聚（甲基丙烯酸异癸酯）、聚（甲基丙烯酸月桂酯）、聚（甲基丙烯酸苯酯）、聚（丙烯酸甲酯）、聚（丙烯酸异丙酯）、聚（丙烯酸异丁酯）和聚（丙烯酸十八酯）；聚乙烯聚合物，包括聚乙烯醇、聚乙烯醚、聚乙烯酯、聚卤乙烯、聚（乙酸乙烯酯）和聚乙烯吡咯烷酮；聚乙交酯；聚硅氧烷；聚氨酯及其共聚物；纤维素，包括烷基纤维素、羟基烷基纤维素、纤维素醚、纤维素酯、硝基纤维素、甲基纤维素、乙基纤维素、羟丙基纤维素、羟丙基甲基纤维素、羟丁基甲基纤维素、乙酸纤维素、丙酸纤维素、乙酸丁酸纤维素、乙酸邻苯二甲酸纤维素、羧乙基纤维素、三乙酸纤维素和硫酸纤维素钠盐；聚丙烯；聚乙烯，包括聚（乙二醇）、聚（环氧乙烷）

和聚(对苯二甲酸乙酯)以及聚苯乙烯。

[1111] 聚合物可以是生物可降解聚合物,包括合成的生物可降解聚合物(例如乳酸和乙醇酸的聚合物、聚酐、聚原酸酯、聚氨酯、聚(丁酸)(poly(butic acid))、聚(戊酸)和(丙交酯-己内酯)共聚物)和天然生物可降解聚合物(例如藻酸盐和其它多糖,包括葡聚糖和纤维素、胶原、其化学衍生物(诸如烷基、亚烷基等化学基团的取代、添加;羟基化、氧化和本领域技术人员按常规进行的其它修饰)、白蛋白和其它亲水蛋白质(例如玉米醇溶蛋白和其它谷醇溶蛋白和疏水蛋白质))以及其任何共聚物或混合物。总的说来,这些材料通过酶促水解或体内暴露于水、通过表面或整体侵蚀而降解。

[1112] 聚合物可以是生物黏附聚合物,例如生物蚀解的水凝胶(参见 H. S. Sawhney, C. P. Pathak 和 J. A. Hubbell, 载于 *Macromolecules*, 1993, 26, 581-587, 其教导结合到本文中)、聚透明质酸、酪蛋白、明胶、明胶蛋白、聚酐、聚丙烯酸、藻酸盐、脱乙酰壳多糖、聚(甲基丙烯酸甲酯)、聚(甲基丙烯酸乙酯)、聚(甲基丙烯酸丁酯)、聚(甲基丙烯酸异丁酯)、聚(甲基丙烯酸己酯)、聚(甲基丙烯酸异癸酯)、聚(甲基丙烯酸月桂酯)、聚(甲基丙烯酸苯酯)、聚(丙烯酸甲酯)、聚(丙烯酸异丙酯)、聚(丙烯酸异丁酯)和聚(丙烯酸十八酯)。

[1113] 在一些实施方案中,聚合物是水溶性聚合物。合适的水溶性聚合物是本领域已知的,包括例如聚乙烯吡咯烷酮、羟丙基纤维素(HPC;Klucel)、羟丙基甲基纤维素(HPMC;Methocel)、硝基纤维素、羟丙基乙基纤维素、羟丙基丁基纤维素、羟丙基戊基纤维素、甲基纤维素、乙基纤维素(Ethocel)、羟乙基纤维素、各种烷基纤维素和羟基烷基纤维素、各种纤维素醚、乙酸纤维素、羧甲基纤维素、羧甲基纤维素钠、羧甲基纤维素钙、乙酸乙烯酯/巴豆酸共聚物、聚-甲基丙烯酸羟烷基酯、甲基丙烯酸羟甲酯、甲基丙烯酸共聚物、聚甲基丙烯酸、聚甲基丙烯酸甲酯、马来酸酐/甲基乙烯基醚共聚物、聚乙烯醇、聚丙烯酸钠和聚丙烯酸钙、聚丙烯酸、酸性羧基聚合物、羧基聚亚甲基、羧基乙烯基聚合物、聚氧乙烯聚氧丙烯共聚物、甲基乙烯基醚-马来酸酐共聚物、羧基甲基酰胺、甲基丙烯酸钾二乙烯基苯共聚物、聚氧化亚乙基二醇、聚环氧乙烷及其衍生物、盐和组合。

[1114] 在一个具体的实施方案中,聚合物为聚亚烷基二醇,包括例如聚乙二醇(PEG)。

[1115] 糖可以是任何糖,前提条件是其包含或被制成包含具有 α 离去基团的羰基。例如,糖可以是被衍生化以包含具有 α 离去基团的羰基的糖。在这一方面,糖可以是衍生化形式的单糖(例如葡萄糖、半乳糖、果糖)、二糖(例如蔗糖、乳糖、麦芽糖)、寡糖(例如棉子糖、水苏糖)、多糖(淀粉、淀粉酶、支链淀粉、纤维素、壳多糖、胍胍质、昆布多糖、木聚糖、甘露聚糖、岩藻多糖、半乳甘露聚糖)。

[1116] 对于包含式 IV 化合物的第 4 类肽,脂质可以是包含具有 α 离去基团的羰基的任何脂质。例如,脂质可以是被衍生化以包含羰基的脂质。在这一方面,脂质可以是脂肪酸的衍生物(例如 C4-C30 脂肪酸、类二十烷酸、前列腺素、白三烯、血栓烷、N-酰基乙醇胺)、甘油脂质(例如一取代、二取代、三取代甘油)、甘油磷脂(例如磷脂酰胆碱、磷脂酰肌醇、磷脂酰乙醇胺、磷脂酰丝氨酸)、鞘脂(例如鞘氨醇、神经酰胺)、甾醇脂质(例如类固醇、胆固醇)、异戊烯醇脂质、糖脂质(saccharolipid)或聚酮化合物、油、蜡、胆固醇、甾醇、脂溶性维生素、甘油一酯、甘油二酯、甘油三酯、磷脂。

[1117] 在一些实施方案中,R7 的分子量为约 100kDa 以下,例如约 90kDa 以下、约 80kDa 以

下、约 70kDa 以下、约 60kDa 以下、约 50kDa 以下、约 40kDa 以下。因此, R7 的分子量可为约 35kDa 以下、约 30kDa 以下、约 25kDa 以下、约 20kDa 以下、约 15kDa 以下、约 10kDa 以下、约 5kDa 以下或约 1kDa。

[1118] 在一个备选的实施方案中, 第 4 类肽包含 2-6 个氨基酸的肽作为 A, 其中肽的 2 个连续氨基酸通过酯键或醚键连接。酯键或醚键可介于例如氨基酸 2 和 3、3 和 4、4 和 5 或 5 和 6 之间。任选可通过包括与聚合物(例如亲水聚合物)的连接在内的与另一个化学部分的共价连接、烷基化或酰化, 对肽进行进一步修饰。

[1119] 对于包含通用结构 A-B-C 的第 4 类肽, B 表示天然胰高血糖素的氨基酸, 例如, SEQ ID NO:1301 的 i-26, 其中 i 为 3、4、5、6 或 7, 任选包含一种或多种氨基酸修饰。在一个具体的实施方案中, B 表示任选进一步修饰的 SEQ ID NO:1301 的氨基酸 7-26。

[1120] 在一些实施方案中, B 被多达 3 个氨基酸修饰所修饰。例如, 表示 SEQ ID NO:1301 的天然氨基酸序列的 B 被一个或多个保守氨基酸修饰所修饰。

[1121] 在另一个实施方案中, B 包含选自本文所述的 (iv)-(ix) 的一种或多种氨基酸修饰。在一个具体的实施方案中, B 包含氨基酸修饰 (v) 和 (vi) 中的一个或两个。在另一个具体的实施方案中, 除 (v) 和 (vi) 以外, B 还包含选自 (iv)、(vii)、(viii) 和 (ix) 的氨基酸修饰中的一个或组合。

[1122] 在另一个具体的实施方案中, 第 4 类肽在 C 端上包含一个或多个带电荷的氨基酸。例如, Y 和 / 或 Z 可以是带电荷的氨基酸, 例如 Lys、Arg、His、Asp 和 Glu。在又一个实施方案中, 第 4 类肽在 Z 的 C 端包含 1-2 个带电荷的氨基酸(例如 Lys、Arg、His、Asp 和 Glu)。在一个具体方面, 后接 1-2 个带电荷的氨基酸的 Z 不含 R10。

[1123] 在一些实施方案中, 如本文所述, 第 4 类肽包含与第 4 类肽的氨基酸残基共价结合的亲水部分。例如, 按照 SEQ ID NO:1301 的编号, 第 4 类肽可包含与 1、16、20、21 或 24 位上的氨基酸共价连接的亲水部分。在另一个实施方案中, 亲水部分与第 4 类肽的 C 端氨基酸(其在某些情况下为 Z 的 C 端的 1 或 11 个氨基酸)连接。在又一个实施方案中, 如果 A 为 PLA、PLA-Phe 或 PLA-Thr-Phe, 则亲水部分与 PLA 连接, 其中 PLA 被修饰成包含亲水部分。在另一个实施方案中, 包含亲水部分的氨基酸被加至第 4 类肽的 N 端或 C 端。在另一个实施方案中, 第 4 类肽包含本文所述的酰基或烷基。例如, 按照 SEQ ID NO:1301 的编号, 酰化或烷基化可发生在 10、20 或 24 位上的氨基酸侧链以外。在一个备选的实施方案中, 酰化或烷基化发生在第 4 类肽的 C 端氨基酸(其在某些情况下为 Z 的 C 端的 1 或 11 个氨基酸)的侧链以外。在又一个实施方案中, 如果 A 为 PLA、PLA-Phe 或 PLA-Thr-Phe, 则 PLA 被修饰成包含酰基或烷基。

[1124] 示例性的实施方案

[1125] 第 4 类肽可包含任何合成的或天然存在的氨基酸, 前提条件是肽的至少 2 个连续氨基酸通过酯键或醚键连接。在一个具体的实施方案中, 肽包含天然胰高血糖素的氨基酸。例如, 肽可包含天然胰高血糖素(SEQ ID NO:1301) 的 j-6, 其中 j 为 1、2、3、4 或 5。或者, 肽可包含以 SEQ ID NO:1301 的 N 端为基础具有一种或多种氨基酸修饰的氨基酸序列。1 位和 / 或 2 位上的氨基酸为降低对二肽基肽酶 IV 切割敏感性的氨基酸。例如, 肽可在第 4 类肽的 1 位包含选自以下的氨基酸: D-组氨酸、 α , α -二甲基咪唑乙酸(DMIA)、N-甲基组氨酸、 α -甲基组氨酸、咪唑乙酸、脱氨基组氨酸、羟基-组氨酸、乙酰基-组氨酸和高组氨酸。

更具体地讲,在一些实施方案中,拮抗剂肽的 2 位为选自以下的氨基酸:D- 丝氨酸、D- 丙氨酸、缬氨酸、甘氨酸、N- 甲基丝氨酸、N- 甲基丙氨酸和氨基异丁酸 (AIB)。此外,例如第 4 类肽 3 位的氨基酸可以是谷氨酸,与天然胰高血糖素的天然谷氨酰胺残基相对。因此,第 4 类肽可包含以下的氨基酸序列:

[1126] Xaa₁-Xaa₂-Xaa₃-Thr-Gly-Phe (SEQ ID NO:1368);

[1127] Xaa₂-Xaa₃-Thr-Gly-Phe (SEQ ID NO:1369);或

[1128] Xaa₃-Thr-Gly-Phe (SEQ ID NO:1370);

[1129] 其中 Xaa₁ 选自:His、D- 组氨酸、 α , α -二甲基咪唑乙酸 (DMIA)、N- 甲基组氨酸、 α - 甲基组氨酸、咪唑乙酸、脱氨基组氨酸、羟基-组氨酸、乙酰基-组氨酸和高组氨酸;Xaa₂ 选自:Ser、D- 丝氨酸、D- 丙氨酸、缬氨酸、甘氨酸、N- 甲基丝氨酸、N- 甲基丙氨酸和氨基异丁酸 (AIB);而 Xaa₃ 为 Gln 或 Glu。

[1130] 本发明还包括其中第 4 类肽的 C 端氨基酸具有取代存在于天然氨基酸上的羧酸基的酰胺基的实施方案。

[1131] 在其中第 4 类肽是聚乙二醇化的一些实施方案中,第 4 类肽包含截短的胰高血糖素肽,准确地讲是其中“N 端”氨基酸是 PLA(苯基-乳酸)的 6-29 肽。这类胰高血糖素衍生物具有独特的优点。它们是具有天然 N 端苯丙氨酸的肽更有效的肽,并且抑制由聚乙二醇化导致的任何胰高血糖素激动作用,这用天然苯丙氨酸观察不到。最后,虽然现有的文献确定 9 位上天然天冬氨酸的取代是拮抗剂活性所需要的,但是申请人发现了在 PLA⁶-(6-29) 胰高血糖素类似物中不再需要这种取代的出乎意料的结果。

[1132] 在一些实施方案中,第 4 类肽的氨基酸被至少一个半胱氨酸残基取代,其中半胱氨酸残基的侧链被巯基反应试剂进一步修饰,所述试剂包括例如马来酰亚胺基、乙烯砜、2- 吡啶基巯基、卤代烷基和卤代酰基。这些巯基反应试剂可含有羧基、酮基、羟基和醚基以及其它亲水部分,例如聚乙二醇单元。在一个备选的实施方案中,第 4 类肽的氨基酸被赖氨酸取代,且取代的赖氨酸残基的侧链使用胺反应试剂进一步修饰,例如羧酸的活性酯(琥珀酰亚胺基、酐等)或亲水部分(例如聚乙二醇)的醛。按照一些实施方案,相当于天然肽的 12 位的赖氨酸残基被精氨酸取代,且在相当于天然肽的 1、16、17、20、21、24 或 29 位氨基酸之一处插入单个赖氨酸取代,或者将赖氨酸加至第 4 类肽的 N 端或 C 端。

[1133] 在另一个实施方案中,将相当于天然肽的 27 位的甲硫氨酸残基改变为亮氨酸或正亮氨酸以防止肽的氧化降解。

[1134] 在一些实施方案中,通过截短或缺失胰高血糖素肽的 C 端的一个或两个氨基酸(即截短天然胰高血糖素 29 位或 28 和 29 位上的氨基酸),将本文所述第 4 类肽进一步修饰而又不影响对胰高血糖素受体的活性和/或效价。在这一方面,本文所述第 4 类肽例如可基本由或由具有导致本文所述第 4 类肽的活性的一个或多个修饰的天然胰高血糖素肽 (SEQ ID NO:1301) 氨基酸 1-27、1-28、2-27、2-28、3-27、3-28、4-27、4-28、5-27、5-28、6-27 或 6-28 组成。

[1135] 本发明公开的第 4 类肽还包括已知对胰高血糖素肽的功能不是决定性的位置上的氨基酸取代。在一些实施方案中,取代为选自 SEQ ID NO:1339 的 2、5、6、7、8、9、12、13、14、15、16、19、22、23 或 24 位中的 1、2 或 3 个上的保守氨基酸取代。在一些实施方案中,第 4 类肽包含 SEQ ID NO:1342 的衍生物肽,其中胰高血糖素肽还包含相对于 SEQ ID NO:1342

在选自 2、5、6、8、9、12、13 和 14 位的 1-3 个氨基酸位置上的其它氨基酸取代。在一些实施方案中,在 SEQ ID NO:1342 的 2、5、6、8、9、12、13 和 14 位上的取代为保守氨基酸取代。在一些实施方案中,相当于天然肽的 16、17、20、21、24 或 29 位的氨基酸,更具体地讲在 21 和 / 或 24 位上的氨基酸,被半胱氨酸或赖氨酸取代,其中 PEG 链与取代的半胱氨酸或赖氨酸残基共价连接。

[1136] 按照一些实施方案,修饰的第 4 类肽包含与肽共价结合的两条或更多条聚乙二醇链,其中胰高血糖素链的总分子量为约 1,000- 约 5,000 道尔顿。在一些实施方案中,聚乙二醇化第 4 类肽包含选自 SEQ ID NO:1312 和 SEQ ID NO:1322 的肽,其中所述肽包含在 11 和 19 位上与氨基酸连接的聚乙二醇链,且 2 条 PEG 链的总的分子量为约 1,000- 约 5,000 道尔顿。

[1137] 按照一些实施方案,提供包含选自以下的修饰胰高血糖素肽的第 4 类肽:

[1138] R_1 -Phe-Thr-Ser-Xaa-Tyr-Ser-Xaa-Tyr-Leu-Xaa-Xaa-Arg-Arg-Ala-Gln-Asp-Phe-Val-Gln-Trp-Leu-Xaa-Asn-Thr- R_2 (SEQ ID NO:1309),

[1139] R_1 -Phe-Thr-Ser-Xaa-Tyr-Ser-Xaa-Tyr-Leu-Asp-Ser-Arg-Arg-Ala-Gln-Xaa-Phe-Val-Gln-Trp-Leu-Xaa-Asn-Thr- R_2 (SEQ ID NO:1310),

[1140] R_1 -Phe-Thr-Ser-Xaa-Tyr-Ser-Xaa-Tyr-Leu-Asp-Ser-Arg-Arg-Ala-Gln-Asp-Phe-Val-Xaa-Trp-Leu-Xaa-Asn-Thr- R_2 (SEQ ID NO:1311) 和

[1141] R_1 -Phe-Thr-Ser-Xaa-Tyr-Ser-Xaa-Tyr-Leu-Asp-Ser-Arg-Arg-Ala-Gln-Xaa-Phe-Val-Xaa-Trp-Leu-Xaa-Asn-Thr- R_2 (SEQ ID NO:1312), 其中 4 位上的 Xaa = 天冬氨酸、谷氨酸、半胱氨酸或高半胱氨酸, 7 位上的 Xaa = Lys 或 Arg, 10 位上的 Xaa 为天冬氨酸、半胱氨酸、谷氨酸、高谷氨酸和高半胱氨酸; 11 位上的 Xaa 为 Ser、Lys、Cys、Orn、高半胱氨酸或乙酰基苯丙氨酸, 16 位上的 Xaa 为 Asp、Lys、Cys、Orn、高半胱氨酸或乙酰基苯丙氨酸, 19 位上的 Xaa 为 Gln、Lys、Cys、Orn、高半胱氨酸和乙酰基苯丙氨酸, 22 位上的 Xaa = Met、Leu 或 Nle, R_1 为 OH 或 NH_2 , R_2 为 COOH 或 $CONH_2$, 其中肽在 SEQ ID NO:1309 的 11 位上、在 SEQ ID NO:1310 的 16 位上、在 SEQ ID NO:1311 的 19 位上和 SEQ ID NO:1312 的 16 和 19 位上聚乙二醇化, 前提条件是如果 4 位上的 Xaa = 天冬氨酸, 则 R_1 为 OH。按照一些实施方案, 肽包含 SEQ ID NO:1309、SEQ ID NO:1310 或 SEQ ID NO:1311 的序列, 其中 R_1 为 OH, R_2 为 $CONH_2$ 。在一些实施方案中, 肽包含 SEQ ID NO:1309、SEQ ID NO:1310 或 SEQ ID NO:1311 的序列, 其中 R_1 为 OH, R_2 为 $CONH_2$, 4 位上的氨基酸为天冬氨酸, 而在又一个实施方案中, 这类肽包含含有 SEQ ID NO:1319 序列的羧基端突出端。

[1142] 按照一些实施方案, 肽包含选自以下的序列: SEQ ID NO:1309、SEQ ID NO:1310、SEQ ID NO:1313、SEQ ID NO:1314 和 SEQ ID NO:1316, 其中肽在 SEQ ID NO:1309 和 SEQ ID NO:1313 的 11 位上聚乙二醇化, 在 SEQ ID NO:1310 的 16 位上聚乙二醇化, 以及在 SEQ ID NO:1310 和 SEQ ID NO:1314 的 19 位上聚乙二醇化。在一些实施方案中, 胰高血糖素激动剂包含 SEQ ID NO:1313 或 SEQ ID NO:1314 的肽。在一些实施方案中, 本文公开的第 4 类肽的 C 端氨基酸具有替换天然氨基酸上存在的羧基的酰胺基。按照一些实施方案, 第 4 类肽包含 SEQ ID NO:1318 的序列。

[1143] 按照一些实施方案, 提供第 4 类肽, 其中血浆蛋白质与肽的氨基酸侧链共价连接以改进胰高血糖素肽的溶解性、稳定性和 / 或药代动力学。例如, 血清白蛋白可与本文提供

的第 4 类肽共价结合。在一些实施方案中,血浆蛋白质与相当于天然胰高血糖素肽 16、17、20、21、24 或 29 位的氨基酸共价结合。更具体地讲,在一些实施方案中,血浆蛋白质与相当于天然胰高血糖素肽的 16 或 24 位的氨基酸结合,其中第 4 类肽包含以下序列:SEQ ID NO:1303、SEQ ID NO:1304、SEQ ID NO:1305、SEQ ID NO:1306、SEQ ID NO:1307、SEQ ID NO:1308、SEQ ID NO:1309、SEQ ID NO:1311、SEQ ID NO:1312、SEQ ID NO:1322、SEQ ID NO:1323、SEQ ID NO:1324、SEQ ID NO:1325、SEQ ID NO:1326、SEQ ID NO:1327、SEQ ID NO:1328、SEQ ID NO:1336 和 SEQ ID NO:1339。在一些实施方案中,第 4 类肽包含选自以下的肽:SEQ ID NO:1309、SEQ ID NO:1310、SEQ ID NO:1311 和 SEQ ID NO:1312。

[1144] 按照一些实施方案,提供第 4 类肽,其中表示免疫球蛋白分子的 Fc 部分的线性氨基酸序列已与本文公开的第 4 类肽的氨基酸侧链共价连接,以改进胰高血糖素肽的溶解性、稳定性和 / 或药代动力学。例如,表示免疫球蛋白分子的 Fc 部分的氨基酸序列可共价结合至 SEQ ID NO:1307、SEQ ID NO:1339 胰高血糖素肽或其胰高血糖素类似物的 11、12、15、16、19、21 或 24 位。在一些实施方案中,Fc 肽共价结合至 SEQ ID NO:1306、SEQ ID NO:1307、SEQ ID NO:1308 或 SEQ ID NO:1336 第 4 类肽的 11 或 19 位。Fc 部分通常从 IgG 中分离,但是得自任何免疫球蛋白的 Fc 肽片段应起等同作用。在一些实施方案中,胰高血糖素肽选自 SEQ ID NO:1303、SEQ ID NO:1304、SEQ ID NO:1305、SEQ ID NO:1307、SEQ ID NO:1308 和 SEQ ID NO:1339,其中 Fc 部分连接至与天然胰高血糖素肽 16、17、20、21、24 或 29 位相对应的位置。在一些实施方案中,第 4 类肽包含选自 SEQ ID NO:1309、SEQ ID NO:1310、SEQ ID NO:1311 和 SEQ ID NO:1312 的胰高血糖素肽,其中 Fc 肽分别与位于 SEQ ID NO:1309、SEQ ID NO:1310、SEQ ID NO:1311 的 11、16 或 19 位和 SEQ ID NO:1312 的 11 和 19 两个位置的氨基酸侧链结合。

[1145] 在本发明的某些实施方案中,第 4 类肽包含 SEQ ID NOs:1362、1364-1367 和 1371 中任一个的氨基酸序列。

[1146] 改进溶解性的修饰

[1147] 可对第 4 类肽进行进一步修饰以改进肽在生理 pH 下在水溶液中的溶解性,同时在一些方面保持胰高血糖素拮抗剂活性。在天然肽的 1、16、17、20、21、24 和 29 位的相应位置上或在 C 端引入亲水基团,可改进所得的第 4 类肽在具有生理 pH 的溶液中的溶解性,同时保持母体化合物拮抗剂活性。因此,在一些实施方案中,本发明公开的第 4 类肽被进一步修饰以包含一个或多个亲水基团,所述基团与相当于天然胰高血糖素肽 1、16、17、20、21、24 和 29 位氨基酸的氨基酸或 N 端或 C 端氨基酸的侧链共价连接。在又一个实施方案中,相当于天然胰高血糖素肽 16 和 24 位氨基酸的氨基酸侧链与亲水基团共价结合,而在一些实施方案中,亲水基团为聚乙二醇 (PEG)。

[1148] 申请人还发现,天然胰高血糖素可通过在其羧基端引入电荷而被修饰,以提高肽的溶解性同时保持肽的激动剂性质。提高的溶解性允许在中性 pH 附近制备和保存胰高血糖素溶液。在相对中性的 pH(例如 pH 约 6.0-约 8.0) 下配制胰高血糖素溶液改进第 4 类肽的长期稳定性。

[1149] 此外,申请人预期,可对本文公开的第 4 类肽进行类似修饰以提高其在相对中性 pH(例如 pH 约 6.0-约 8.0) 下在水溶液中的溶解性,同时保持母体蛋白质的拮抗剂性质。因此,本发明的一些实施方案涉及 SEQ ID NO:1339 的第 4 类肽,其已通过用带电荷的氨基

酸取代天然不带电荷的氨基酸或将带电荷的氨基酸添加至羧基端,相对于野生型胰高血糖素 (SEQ ID NO:1301) 的 6-29 位存在的天然氨基酸进行进一步修饰,从而将电荷添加至该肽中。按照一些实施方案,SEQ ID NO:1339 的第 4 类肽的 1-3 个不带电荷的天然氨基酸用带电荷的氨基酸置换。在一些实施方案中,带电荷的氨基酸选自赖氨酸、精氨酸、组氨酸、天冬氨酸和谷氨酸。更具体地讲,申请人发现,用带电荷的氨基酸取代相当于天然胰高血糖素相应的 28 和 / 或 29 位上的正常存在氨基酸,和 / 或在第 4 类肽的羧基端上添加 1-2 个带电荷的氨基酸,提高在生理相关的 pH (即 pH 约 6.5- 约 7.5) 下在水溶液中第 4 类肽的溶解性和稳定性。因此,预期本文公开的第 4 类肽的这类修饰特别在范围约 5.5- 约 8.0 的 pH 下对在水溶液中的溶解性具有类似的影响,同时保持母体肽的生物活性。

[1150] 按照一些实施方案,如下修饰 SEQ ID NO:1339 的第 4 类肽:通过用带负电荷的氨基酸 (例如天冬氨酸或谷氨酸) 取代在相当于天然胰高血糖素相应的 28 和 / 或 29 位上的天然氨基酸,并任选将带负电荷的氨基酸 (例如天冬氨酸或谷氨酸) 添加至肽的羧基端。在一个备选的实施方案中,如下修饰 SEQ ID NO:1339 的第 4 类肽:通过用带正电荷的氨基酸 (例如赖氨酸、精氨酸或组氨酸) 取代相当于天然胰高血糖素相应的 29 位上的天然氨基酸,并任选将一个或两个带正电荷的氨基酸 (例如赖氨酸、精氨酸或组氨酸) 添加至肽的羧基端。按照一些实施方案,提供溶解性和稳定性得到提高的第 4 类肽,其中该肽包含 SEQ ID NO:1341 的氨基酸序列,前提条件是 SEQ ID NO:1341 的 23 或 24 位上的至少一个氨基酸被酸性氨基酸取代,和 / 或将另外的酸性氨基酸加至 SEQ ID NO:1341 的羧基端。在一些实施方案中,酸性氨基酸独立选自 Asp、Glu、半胱氨酸和高半胱氨酸。

[1151] 按照一些实施方案,提供溶解性和稳定性得到提高的第 4 类肽,其中拮抗剂包含 SEQ ID NO:1341、SEQ ID NO:1342、SEQ ID NO:1343 或 SEQ ID NO:1344 的氨基酸序列,其中 23 或 24 位上的至少一个氨基酸被非天然氨基酸残基取代 (即类似物 23 或 24 位上存在的至少一个氨基酸是酸性氨基酸,其不同于 SEQ ID NO:1307 相应位置上存在的氨基酸)。按照一些实施方案,提供包含 SEQ ID NO:1341 或 1342 序列的胰高血糖素激动剂,前提条件是如果 23 位的氨基酸是天冬酰胺且 24 位上的氨基酸是苏氨酸,则肽还包含独立选自 Lys、Arg、His、Asp 或 Glu 的 1-2 个氨基酸,其被添加至第 4 类肽的羧基端。

[1152] 在另一个实施方案中,可通过将亲水部分与 11、12、15、16、19 或 24 位上的氨基酸残基共价连接来改进 SEQ ID NO:1342 的第 4 类肽的溶解性,而在一些实施方案中,亲水部分与 11、16 或 19 位上的氨基酸连接,而在又一个实施方案中,亲水部分与氨基酸 19 连接。在一些实施方案中,亲水部分为血浆蛋白质或免疫球蛋白的 Fc 部分,而在一个备选的实施方案中,亲水部分为亲水烃链。在一些实施方案中,亲水部分为聚乙二醇,具有选自约 1,000- 约 5,000 道尔顿范围的分子量。在另一个实施方案中,亲水部分为聚乙二醇,分子量为至少约 20,000 道尔顿。在一些实施方案中,聚乙烯修饰的第 4 类肽包含 SEQ ID NO:1309、SEQ ID NO:1310、SEQ ID NO:1311、SEQ ID NO:1312、SEQ ID NO:1343、SEQ ID NO:1344 或 SEQ ID NO:1345 的氨基酸序列。

[1153] 改进稳定性的修饰

[1154] 天然胰高血糖素 15-16 位上的 Asp-Ser 序列被鉴定为唯一不稳定的二肽,其导致天然激素在水性缓冲液中提早进行化学裂解。例如,当在 0.01N HCl 中于 37°C 保持 2 周时,超过 50% 的天然胰高血糖素可裂解成片段。2 条释放出的裂解肽 1-15 和 16-29 没有胰高

血糖素样生物活性,因此表示对胰高血糖素及其相关类似物的水性预制剂的限制。观察到天然胰高血糖素肽 15 位的 Asp 用 Glu 进行选择化学取代几乎消除 15-16 肽键的化学裂解。

[1155] 因此,预期可对本发明的第 4 类肽进行类似修饰以降低其在水性缓冲液中对提前化学裂解的易感性。按照一些实施方案,可通过将位于天然胰高血糖素肽 15 位的天然天冬氨酸用选自半胱氨酸、谷氨酸、高谷氨酸和高半胱氨酸的氨基酸置换,从而对本文所述第 4 类肽进行进一步修饰以提高其在水溶液中的稳定性。按照一些实施方案,SEQ ID NO:1339 的第 4 类肽 10 位上的天冬氨酸残基可被选自半胱氨酸、谷氨酸、高谷氨酸和高半胱氨酸的氨基酸取代,而在一些实施方案中,SEQ ID NO:1339 的 10 位上的天然天冬氨酸被谷氨酸置换。按照一些实施方案,提供在水溶液中稳定性得到改进的第 4 类肽,其中拮抗剂包含选自 SEQ ID NO:1336、SEQ ID NO:1340 和 SEQ ID NO:1342 的序列。在又一个实施方案中,第 4 类肽被酰胺化。

[1156] 按照一些实施方案,通过用谷氨酸、半胱氨酸、高谷氨酸或高半胱氨酸取代 16 位(按照天然胰高血糖素的编号)上的丝氨酸,也可实现通过降低本文所述第 4 类肽的降解而提高稳定性。在一个具体的实施方案中,16 位(按照天然胰高血糖素序列编号)上的丝氨酸被谷氨酸置换。在一个更具体的方面,包含这类修饰的第 4 类肽包含 C 端羧酸,并且未被酰胺化。

[1157] 按照一些实施方案,提供包含选自以下的胰高血糖素肽的第 4 类肽:SEQ ID NO:1307、SEQ ID NO:1336、SEQ ID NO:1339、SEQ ID NO:1340、SEQ ID NO:1341、SEQ ID NO:1342、SEQ ID NO:1343 和 SEQ ID NO:1344,其通过与天然胰高血糖素肽 11、12、15、16、19 和 / 或 24 位相应的位置上的一个或多个其它氨基酸取代而进一步修饰,其中所述氨基酸取代包括用具有适于与亲水部分(包括例如 PEG)交联的侧链的氨基酸的取代。肽可被天然存在的氨基酸或合成的(非天然存在的)氨基酸取代。合成的或非天然存在的氨基酸是指不是体内天然存在的,然而可掺入本文所述肽结构的氨基酸。在一些实施方案中,提供第 4 类肽,其中该肽包含 SEQ ID NO:1307、SEQ ID NO:1336、SEQ ID NO:1339、SEQ ID NO:1340、SEQ ID NO:1341、SEQ ID NO:1342、SEQ ID NO:1343 和 SEQ ID NO:1344 的序列,且还包含结合至天然胰高血糖素肽相应的 21 或 24 位的聚乙二醇链。在又一个实施方案中,对第 4 类肽的 C 端进行修饰以用酰胺基置换羧酸基。

[1158] 融合肽和缀合物

[1159] 本公开内容还包括第 4 类肽融合肽,其中第二肽与第 4 类肽的 C 端融合。更具体地讲,融合肽可包含 SEQ ID NO:1344 的第 4 类肽,其还包含与第 4 类肽的 C 端氨基酸连接的 SEQ ID NO:1319(GPSSGAPPPS)、SEQ ID NO:1320(Lys Arg Asn Arg Asn Asn Ile Ala) 或 SEQ ID NO:1321(Lys Arg Asn Arg) 的氨基酸序列。在一些实施方案中,SEQ ID NO:1319 的氨基酸序列(GPSSGAPPPS)通过肽键与 SEQ ID NO:1342 的第 4 类肽的氨基酸 24 连接。在另一个实施方案中,融合肽包含 SEQ ID NO:1307、SEQ ID NO:1336、SEQ ID NO:1339、SEQ ID NO:1340、SEQ ID NO:1341 或 SEQ ID NO:1343 的第 4 类肽,其还包含与第 4 类肽的氨基酸 24 连接的 SEQ ID NO:1319 的氨基酸序列(GPSSGAPPPS)。在另一个实施方案中,融合肽包含 SEQ ID NO:1307、SEQ ID NO:1336、SEQ ID NO:1337、SEQ ID NO:1338、SEQ ID NO:1339、SEQ ID NO:1341 或 SEQ ID NO:1343 的第 4 类肽,该肽还包含与第 4 类肽的氨基酸 24

连接的 SEQ ID NO:1320、SEQ ID NO:1321 或 SEQ ID NO:1353 的氨基酸序列。在一些实施方案中,第 4 类肽融合肽包含选自 SEQ ID NO:1346 和 SEQ ID NO:1347 的序列。在又一个实施方案中,对融合肽的 C 端进行修饰以用酰胺基置换羧酸基。

[1160] 在一些实施方案中,提供第 4 类肽融合肽,其中融合肽的第 4 类肽部分选自 SEQ ID NO:1303、SEQ ID NO:1304、SEQ ID NO:1305、SEQ ID NO:1306、SEQ ID NO:1307、SEQ ID NO:1308、SEQ ID NO:1309、SEQ ID NO:1311、SEQ ID NO:1312、SEQ ID NO:1313、SEQ ID NO:1314、SEQ ID NO:1315、SEQ ID NO:1310、SEQ ID NO:1316、SEQ ID NO:1317、SEQ ID NO:1318 和 SEQ ID NO:1339,SEQ ID NO:1319 的序列与第 4 类肽部分的羧基端融合,且其中如果 PEG 链存在,则选自 500-40,000 道尔顿的范围。更具体地讲,在一些实施方案中,第 4 类肽区段选自 SEQ ID NO:1313、SEQ ID NO:1314、SEQ ID NO:1315、SEQ ID NO:1316、SEQ ID NO:1346 和 SEQ ID NO:1347,其中 PEG 链选自约 500-约 5,000 道尔顿,更具体地讲,在一些实施方案中,PEG 链约为 1,000 道尔顿。在又一个实施方案中,对 C 端进行修饰以用酰胺基置换羧酸基。

[1161] 第 4 类肽可另外包含添加至羧基端的 1-2 个带电荷的氨基酸。在其中将 1-2 个带电荷的氨基酸添加至 SEQ ID NO:1344 的羧基端的一些实施方案中,所述氨基酸是带负电荷的氨基酸,包括例如谷氨酸和天冬氨酸。在一些实施方案中,第 4 类肽包含 SEQ ID NO:1342 的序列,其中相当于天然胰高血糖素肽相应的 27 和 28 位的至少一个包含选自天冬氨酸和谷氨酸的氨基酸,且其中 SEQ ID NO:1342 被任选修饰以包括加至羧基端的添加的 1-2 个带负电荷的氨基酸。在一些实施方案中,带负电荷的氨基酸是谷氨酸或天冬氨酸。

[1162] 本文公开的第 4 类肽可与其它活性剂(包括例如胰岛素)组合,以治疗特征在于胰高血糖素活性过度的疾病或病况。在一些实施方案中,可与胰岛素联合给予已被修饰成与分子量大于 10,000 道尔顿的 PEG 链共价结合的第 4 类肽,以助于维持稳定的糖尿病患者的血糖水平。本公开内容的第 4 类肽可与胰岛素一起作为单一组合物共同给予、作为单独的溶液同时给予,或者,胰岛素和第 4 类肽可按彼此不同的时间给予。在一些实施方案中,包含胰岛素的组合物和包含第 4 类肽的组合物彼此在 12 小时内给予。第 4 类肽与所给予的胰岛素的确切比率将部分取决于测定的患者的胰高血糖素水平,并可通过常规实验测定。

[1163] 二聚体肽

[1164] 本公开内容还包括本文公开的修饰第 4 类肽的多聚体。两条或更多条修饰的第 4 类肽可使用标准连接剂和本领域技术人员已知的方法连接在一起。例如,通过使用双官能巯基交联剂和双官能胺交联剂在两条修饰的第 4 类肽之间形成二聚体,特别是对于(例如在 11、16 或 19 位上)被半胱氨酸、赖氨酸、鸟氨酸、高半胱氨酸或乙酰基苯丙氨酸残基取代的第 4 类肽(例如 SEQ ID NO:1309、SEQ ID NO:1310、SEQ ID NO:1311 和 SEQ ID NO:1312)。二聚体可以是同二聚体,或者可以是异二聚体。在一些实施方案中,二聚体在独立选自 SEQ ID NO:1308、SEQ ID NO:1309、SEQ ID NO:1310、SEQ ID NO:1311、SEQ ID NO:1312、SEQ ID NO:1345、SEQ ID NO:1346 或 SEQ ID NO:1347 的 2 条第 4 类肽之间形成,其中 2 条肽通过与每条肽的 11 位、每条肽的 16 位或每条肽的 19 位或其任何组合连接的接头彼此连接。在一些实施方案中,键是各个第 4 类肽的 Cys11 与 Cys11 或 Cys19 与 Cys19 或 Cys11 与 Cys19 残基之间的二硫键。

[1165] 类似地,可在独立选自 SEQ ID NO:1303、SEQ ID NO:1304、SEQ ID NO:1305、SEQ

ID NO:1306、SEQ ID NO:1307、SEQ ID NO:1308、SEQ ID NO:1309、SEQ ID NO:1310、SEQ ID NO:1311、SEQ ID NO:1312、SEQ ID NO:1336、SEQ ID NO:1337、SEQ ID NO:1338、SEQ ID NO:1339 和 SEQ ID NO:1342 的 2 条第 4 类肽之间形成二聚体,其中在独立选自相对于天然胰高血糖素肽的 16、21 和 24 位的氨基酸位置之间形成键。

[1166] 按照一些实施方案,提供包含 2 条第 4 类肽(各自包含 SEQ ID NO:1346 的序列)的第 4 类肽二聚体,其中 2 个拮抗剂通过 25 位的氨基酸经二硫键彼此连接。在另一个实施方案中,提供包含 2 条第 4 类肽(各自包含 SEQ ID NO:1347 的序列)的第 4 类肽二聚体,其中 2 个拮抗剂通过 35 位的氨基酸经二硫键彼此连接。在一些实施方案中,由 SEQ ID NO:1346 和 SEQ ID NO:1347 的第 4 类肽形成二聚体,其中 10 位的氨基酸为谷氨酸。

[1167] 在一些实施方案中,二聚体包含选自以下的第 4 类肽融合肽的同二聚体:SEQ ID NO:1307、SEQ ID NO:1308、SEQ ID NO:1336、SEQ ID NO:1337、SEQ ID NO:1340、SEQ ID NO:1339、NO:1340、SEQ ID NO:1341、SEQ ID NO:1342 和所述第 4 类肽的药学上可接受的盐。按照一些实施方案,提供包含通过接头与第二第 4 类肽结合的第一第 4 类肽的二聚体,其中二聚体的第一肽和第二肽独立选自 SEQ ID NO:1307、SEQ ID NO:1308、SEQ ID NO:1336、SEQ ID NO:1337、SEQ ID NO:1339、SEQ ID NO:1340、SEQ ID NO:1341 和 SEQ ID NO:1342 及所述胰高血糖素多肽的药学上可接受的盐。在另一个实施方案中,二聚体的第一和第二第 4 类肽独立选自 SEQ ID NO:1307、SEQ ID NO:1308、SEQ ID NO:1336 和 SEQ ID NO:1339。

[1168] 在另一个实施方案中,二聚体包含选自以下的第 4 类肽的同二聚体:SEQ ID NO:1323、SEQ ID NO:1324、SEQ ID NO:1325、SEQ ID NO:1326、SEQ ID NO:1327、SEQ ID NO:1328、SEQ ID NO:1329、SEQ ID NO:1330、SEQ ID NO:1331。在另一个实施方案中,提供第 4 类肽二聚体,其中二聚体的第一肽和第二肽包含独立选自 SEQ ID NO:1323、SEQ ID NO:1324、SEQ ID NO:1325、SEQ ID NO:1326、SEQ ID NO:1327 和 SEQ ID NO:1328 的氨基酸序列。在另一个实施方案中,二聚体包含选自 SEQ ID NO:1309、SEQ ID NO:1311 和 SEQ ID NO:1312 的第 4 类肽的同二聚体,其中该肽还包含与胰高血糖素肽的 11 或 19 位共价结合的聚乙二醇链。

[1169] 第 4 类胰高血糖素相关肽可包含 SEQ ID NO:1301-1371 中任一个的氨基酸序列,任选具有多达 1、2、3、4 或 5 个保持胰高血糖素拮抗剂活性的另外修饰。

[1170] 第 5 类胰高血糖素相关肽

[1171] 在某些实施方案中,胰高血糖素相关肽为第 5 类胰高血糖素相关肽(参见例如国际(PCT)专利申请号 PCT/US2008/081333,通过引用以其整体结合到本文中)。

[1172] 以下部分提及的所有生物序列(SEQ ID NO:1401-1518)相当于国际专利申请号 PCT/US2008/081333 的 SEQ ID NO:1-118。

[1173] 活性

[1174] 在某些方面,第 5 类胰高血糖素相关肽(下称“第 5 类肽”)可以是胰高血糖素拮抗剂/GLP-1 激动剂。在需要抑制胰高血糖素激动作用同时也需要刺激 GLP-1 活性的任何环境下,使用胰高血糖素拮抗剂/GLP-1 激动剂。例如,胰高血糖素拮抗剂活性结合 GLP-1 刺激可用于糖尿病的治疗,其中在高血糖症临床前模型中已证实胰高血糖素拮抗作用引起血糖降低且 GLP-1 活性与胰岛素产生有关。还已知显示 GLP-1 活性的化合物可用于治疗肥

胖症和防止体重增加。

[1175] 在某些方面,据信第5类肽适于之前对其它胰高血糖素拮抗剂/GLP-1激动剂描述的任何用途。已分别表明这两种活性是治疗代谢综合征(具体地讲是糖尿病和肥胖症)十分需要的性质。胰高血糖素拮抗剂活性可用于需要抑制胰高血糖素激动作用的任何环境。GLP-1激动作用的存在还抑制胰高血糖素由胰腺的内源性分泌,同时刺激胰岛素合成和分泌。两种药理作用以协同方式起作用从而使异常代谢正常化。因此,第5类肽可用于治疗高血糖症,或者治疗由胰高血糖素高血水平或高血糖水平引起的其它代谢病。按照一些实施方案,待使用胰高血糖素拮抗剂/GLP-1激动剂例如本文所公开的第5类肽治疗的患者是驯养动物,而在另一个实施方案中,待治疗的患者是人。研究表明糖尿病患者中缺乏胰高血糖素抑制部分通过加快糖原分解而引起餐后高血糖症。在促生长素抑制素诱导的胰高血糖素抑制存在或不存在时,在口服葡萄糖耐量试验(OGTT)期间对血糖的分析表明,有较高胰高血糖素水平的受试者中的葡萄糖显著增加。因此,胰高血糖素拮抗剂/GLP-1激动剂或本文所述的第5类肽可用于治疗高血糖症,并且预期可用于治疗各种类型的糖尿病,包括胰岛素依赖性的或非胰岛素依赖性的I型糖尿病、II型糖尿病或妊娠糖尿病,并减轻糖尿病的并发症,包括肾病、视网膜病变和血管病。

[1176] 预期降低食欲或促进体重减轻的这类方法可用于减轻体重、防止体重增加或治疗各种诱因的肥胖症(包括药物引起的肥胖症)并减轻与肥胖症相关的并发症包括血管病(冠状动脉疾病、中风、外周血管病、缺血再灌注等)、高血压、II型糖尿病发病、高脂血症和肌骨病。

[1177] 可配制包含第5类肽的药物组合物,并采用本领域技术人员已知的标准药学上可接受的载体和给药途径给予患者。因此,本公开内容还包括包含一种或多种本文所公开的第5类肽以及药学上可接受的载体的药物组合物。药物组合物可包含第5类肽作为唯一的药用活性组分,或第5类肽可与一种或多种其它的活性剂组合。按照一些实施方案,提供包含第5类肽和胰岛素或胰岛素类似物的组合物。或者,可提供包含 SEQ ID NO:1415 或 SEQ ID NO:1451 的序列和抗肥胖症肽的组合物,提供用于引起体重减轻或防止体重增加,所述序列还包含与 SEQ ID NO:1415 或 SEQ ID NO:1451 的氨基酸24连接的 SEQ ID NO:1421(GPSSGAPPPS)或 SEQ ID NO:1450 的氨基酸序列。合适的抗肥胖症肽包括美国专利 5,691,309、6,436,435 或美国专利申请 20050176643 公开的抗肥胖症肽。

[1178] 第5类肽结构

[1179] 按照一些实施方案,提供包含胰高血糖素肽的第5类肽,所述胰高血糖素肽已如下修饰:通过缺失N端的头1-5个氨基酸残基(例如第1个氨基酸、头2个氨基酸、头3个氨基酸、头4个氨基酸、头5个氨基酸),并例如通过选自12和16、16和20、20和24及24和28(相当于天然胰高血糖素肽序列)的氨基酸对的侧链经氢键合或离子相互作用(例如形成盐桥)或通过共价键彼此连接,而稳定化合物C端部分的 α 螺旋结构(按照野生型胰高血糖素 SEQ ID NO:1401 的氨基酸编号的12-29位氨基酸附近)。或者,稳定残基12-29附近的 α 螺旋通过在保持所需活性的位置上引入一个或多个 α , α -二取代氨基酸而实现。在一些实施方案中,第5类肽或其类似物的16、17、18、19、20、21、24或29位(按照野生型胰高血糖素的氨基酸编号)中的1、2、3、4或更多个被 α , α -二取代氨基酸取代。例如,在盐桥或内酰胺不存在时,用氨基异丁酸(AIB)取代第5类肽或其类似物的16位(按照野生

型胰高血糖素的氨基酸编号)提供稳定的 α 螺旋。在一些实施方案中,16、20、21 或 24 位(按照野生型胰高血糖素的氨基酸编号)中的 1、2、3 或更多个被 AIB 取代。

[1180] 按照一些实施方案,提供第 5 类肽,其中该肽具有由天然 GLP-1 对 GLP-1 受体获得的最大激动作用的至少 80%,并且如体外测定法中通过 cAMP 产生测定,具有降低对胰高血糖素受体的最大胰高血糖素诱导的 cAMP 产生达至少约 50%的胰高血糖素拮抗剂活性。在一些实施方案中,第 5 类肽具有天然 GLP-1 对 GLP-1 受体的活性的至少 90%,并具有降低对胰高血糖素受体的最大胰高血糖素诱导的 cAMP 产生达至少约 80%的胰高血糖素拮抗剂活性。

[1181] 按照一些实施方案,第 5 类肽包含 SEQ ID NO:1402 的衍生物肽,其中该肽相对于 SEQ ID NO:1402 还包含在选自 1、2、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、19、22 和 24 位的 1-3 个氨基酸位置上的氨基酸取代,具有天然 GLP-1 对 GLP-1 受体的活性的至少 90%,并具有降低对胰高血糖素受体的最大胰高血糖素诱导的 cAMP 产生达至少约 80%的胰高血糖素拮抗剂活性。

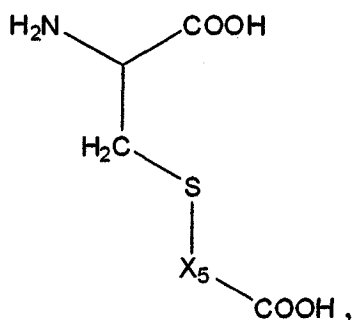
[1182] 在一些实施方案中,通过例如形成共价或非共价分子内桥,或者用稳定 α 螺旋的氨基酸(例如 α , α -二取代氨基酸)在 12-29 位附近取代和/或插入氨基酸,来稳定第 5 类肽 C 端部分的 α 螺旋结构(在按照野生型胰高血糖素的氨基酸编号的氨基酸 12-29 附近)。在一些实施方案中,第 5 类肽或其类似物 16、17、18、19、20、21、24 或 29 位(按照野生型胰高血糖素的氨基酸编号)中的 1、2、3、4 或更多个被 α , α -二取代氨基酸例如氨基异丁酸(AIB)取代。例如,在盐桥或内酰胺不存在时,第 5 类肽或其类似物的 16 位(按照野生型胰高血糖素的氨基酸编号)用氨基异丁酸(AIB)的取代提供稳定的 α 螺旋。

[1183] 在一些实施方案中,第 5 类肽包含 SEQ ID NO:1415 或 SEQ ID NO:1451,更具体地讲,包含选自以下的序列:SEQ ID NO:1405、SEQ ID NO:1406、SEQ ID NO:1407、SEQ ID NO:1408、SEQ ID NO:1409、SEQ ID NO:1416、SEQ ID NO:1417、SEQ ID NO:1418、SEQ ID NO:1419、SEQ ID NO:1422、SEQ ID NO:1423、SEQ ID NO:1424 和 SEQ ID NO:1425。在又一个实施方案中,第 5 类肽包含 SEQ ID NO:1415 或 SEQ ID NO:1451 的衍生物肽,其中该肽相对于 SEQ ID NO:1415 或 SEQ ID NO:1451 在选自 1、2、5、6、8、9、12、13 和 14 位的 1-3 个氨基酸位置上还包含氨基酸取代。在一些实施方案中,1、2、5、6、8、9、12、13 和 14 位的取代是保守氨基酸取代。在一些实施方案中,SEQ ID NO:1405 或 SEQ ID NO:1406 的 24 位上的苏氨酸被甘氨酸取代。

[1184] 按照一些实施方案,第 5 类肽表示肽的进一步修饰,其中除 N 端缺失以外,对天然胰高血糖素肽 6 位的苯丙氨酸进行修饰以例如包含替换 N 端氨基的羟基。在又一个实施方案中,C 端氨基酸的天然羧酸被电中性基团(例如酰胺或酯)置换。

[1185] 按照一些实施方案,制备了第 5 类肽,其中天然胰高血糖素的头 3-5 个氨基酸缺失;相对于天然胰高血糖素肽,9 位的氨基酸被选自谷氨酸、高谷氨酸、 β -高谷氨酸、半胱氨酸的磺酸衍生物或具有以下结构的半胱氨酸的烷基羧酸衍生物的氨基酸取代:

[1186]



[1187] 其中 X_5 为 $\text{C}_1\text{-C}_4$ 烷基、 $\text{C}_2\text{-C}_4$ 烯基或 $\text{C}_2\text{-C}_4$ 炔基；并且例如通过相对于天然胰高血糖素肽，在氨基酸 12 和 16 的侧链之间或在氨基酸 16 和 20 之间形成内酰胺桥，来稳定胰高血糖素 C 端部分的 α 螺旋结构（按照野生型胰高血糖素的氨基酸编号在氨基酸 12-29 的附近）。整个本公开内容详细描述了能够共价结合形成 7 原子连接桥的氨基酸配对的实例。在一些实施方案中，半胱氨酸的磺酸衍生物是半胱磺酸或高半胱磺酸。

[1188] 在一些实施方案中，提供包含选自 SEQ ID NO:1405、SEQ ID NO:1406、SEQ ID NO:1407 或 SEQ ID NO:1408 的氨基酸序列的第 5 类肽，其中所述肽包含在 SEQ ID NO:1405 的氨基酸 7 和 11 的侧链之间、SEQ ID NO:1406 的 11 和 15 之间、在 SEQ ID NO:1407 的 15 和 19 位之间及在 SEQ ID NO:1408 的 19 和 24 位之间形成的内酰胺环，各个所述序列被进一步修饰以包含与肽共价结合的亲水部分。更具体地讲，在一些实施方案中，每种携带内酰胺的第 5 类肽通过聚乙二醇链的共价连接而被修饰。例如，对于包含 SEQ ID NO:1405 的第 5 类肽，该肽在选自 12、15、16、19 和 24 的位置上聚乙二醇化；对于包含 SEQ ID NO:1406 的第 5 类肽，该肽在选自 12、16、19 和 24 的位置上聚乙二醇化；对于包含 SEQ ID NO:1407 的第 5 类肽，该肽在选自 11、12、16 和 24 的位置上聚乙二醇化；对于包含 SEQ ID NO:1408 的第 5 类肽，该肽在选自 11、12、15 和 16 的位置上聚乙二醇化。按照一些实施方案，提供包含 SEQ ID NO:1447 或 SEQ ID NO:1448 的第 5 类肽，其中该肽相对于 SEQ ID NO:1447 或 SEQ ID NO:1448 序列在选自 12、16、19 和 24 的位置上聚乙二醇化。在又一个实施方案中，通过将 SEQ ID NO:1421 的序列添加至肽的羧基端来对 SEQ ID NO:1447 或 SEQ ID NO:1448 的肽进行进一步修饰。

[1189] 如上所详述，在某些方面，提供第 5 类肽，其中天然胰高血糖素的头 5 个氨基酸缺失，N 端氨基酸（苯丙氨酸）的氨基被羟基置换（即第一个氨基酸是苯基-乳酸），且选自 12 和 16、16 和 20、20 和 24 及 24 和 28 位的一个或多个氨基酸对的侧链彼此连接，从而稳定第 5 类肽 α 螺旋。

[1190] 按照一些实施方案，提供包含 SEQ ID NO:1402 的序列的第 5 类肽，该序列因 SEQ ID NO:1402 的 11 位（按照天然胰高血糖素的氨基酸编号为 16 位）上的丝氨酸残基被选自谷氨酸、谷氨酰胺、高谷氨酸、高半胱磺酸、苏氨酸或甘氨酸的氨基酸取代而被修饰。按照一些实施方案，SEQ ID NO:1402 的 11 位上的丝氨酸残基被选自谷氨酸、谷氨酰胺、高谷氨酸和高半胱磺酸的氨基酸取代，而在一些实施方案中，丝氨酸残基被谷氨酸取代。按照一些实施方案，第 5 类肽包含 SEQ ID NO:1438 的序列。

[1191] 在一些实施方案中，提供第 5 类肽，其中在 2 个氨基酸侧链之间形成分子内桥以稳定 SEQ ID NO:1402 肽的羧基端的三维结构。更具体地讲，选自 SEQ ID NO:1402 的氨基酸对 7 和 11、11 和 15、15 和 19 或 19 和 23 的一个或多个氨基酸的侧链彼此连接，从而稳定 C

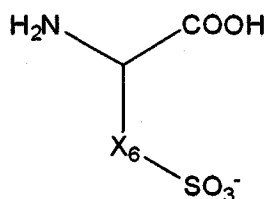
端部分的 α 螺旋。2 个侧链可通过氢键合、离子相互作用（例如形成盐桥）或通过共价键彼此连接。按照一些实施方案，接头的大小为 7-9 个原子，而在一些实施方案中，接头的大小为 8 个原子。在一些实施方案中，第 5 类肽选自 SEQ ID NO:1405、SEQ ID NO:1406、SEQ ID NO:1407 和 SEQ ID NO:1408。在一些实施方案中，第 5 类肽的 C 端氨基酸具有取代存在于天然氨基酸上的羧酸基的酰胺基。

[1192] 按照一些实施方案，提供第 5 类肽，其中类似物包含 SEQ ID NO:1409 的氨基酸序列。在一些实施方案中，通过在肽的侧链之间形成共价键来稳定 SEQ ID NO:1409 肽的羧基端的三维结构。在一些实施方案中，2 个氨基酸侧链彼此结合形成内酰胺环。内酰胺环的大小可随氨基酸侧链的长度变化，而在一些实施方案中，内酰胺通过赖氨酸氨基酸的侧链与谷氨酸侧链连接而形成。在一些实施方案中，第 5 类肽的 C 端氨基酸具有取代存在于天然氨基酸上的羧酸基的酰胺基。

[1193] 酰胺键在内酰胺环中的顺序可以是反转的（例如内酰胺环可在 Lys12 和 Glu16 侧链之间或者在 Glu 12 和 Lys16 之间形成）。按照一些实施方案，提供 SEQ ID NO:1409 的胰高血糖素类似物，其中至少一个内酰胺环在选自 SEQ ID NO:1409 的氨基酸对 7 和 11、11 和 15、15 和 19 或 19 和 23 的氨基酸对侧链之间形成。在一些实施方案中，提供第 5 类肽，其中肽包含 SEQ ID NO:1410 的序列，所述序列还包含在 SEQ ID NO:1410 的 7 和 11 位的氨基酸之间、或 11 和 15 位的氨基酸之间、或 15 和 19 位的氨基酸之间形成的分子内内酰胺桥。在一些实施方案中，提供第 5 类肽，其中肽包含 SEQ ID NO:1411 的序列，所述序列还包含在 SEQ ID NO:1411 的 7 和 11 位的氨基酸之间、或 11 和 15 位的氨基酸之间形成的分子内内酰胺桥。在一些实施方案中，第 5 类肽包含 SEQ ID NO:1417 的序列。

[1194] 提供包含 SEQ ID NO:1405 的衍生物的另外的第 5 类肽，其中 SEQ ID NO:1405 的 10 位（天然胰高血糖素的 15 位）上的天冬氨酸被谷氨酸、以下通用结构的氨基酸取代：

[1195]



[1196] 其中 X_6 为 C_1 - C_3 烷基、 C_2 - C_3 烯烷基或 C_2 - C_3 炔基，在一些实施方案中， X_6 为 C_1 - C_3 烷基，而在另一个实施方案中， X_6 为 C_2 烷基。在一些实施方案中，提供 SEQ ID NO:1409 的第 5 类肽衍生物，其中 SEQ ID NO:1409 的 10 位（天然胰高血糖素的 15 位）被选自谷氨酸、半胱磺酸、高半胱磺酸和高谷氨酸的氨基酸取代。在又一个实施方案中，SEQ ID NO:1409 的 10 位被选自半胱磺酸或高半胱磺酸的氨基酸取代。在一些实施方案中，提供 SEQ ID NO:1406、SEQ ID NO:1407 或 SEQ ID NO:1408 的第 5 类肽衍生物，其中 SEQ ID NO:1406、SEQ ID NO:1407 或 SEQ ID NO:1408 的 10 位被选自谷氨酸、半胱磺酸、高半胱磺酸和高谷氨酸的氨基酸取代。在一些实施方案中，第 5 类肽的 C 端氨基酸具有取代存在于天然氨基酸上的羧酸基的酰胺基。

[1197] 在一些实施方案中，第 5 类肽的氨基酸被至少一个半胱氨酸残基取代，其中半胱

氨酸残基的侧链被巯基反应试剂进一步修饰,所述试剂包括例如马来酰亚胺基、乙烯砜、2-吡啶基巯基、卤代烷基和卤代酰基。这些巯基反应试剂可含有羧基、酮基、羟基和醚基以及其它亲水部分,例如聚乙二醇单元。在一个备选的实施方案中,第5类肽的氨基酸被赖氨酸取代,且取代的赖氨酸残基的侧链使用胺反应试剂进一步修饰,所述试剂为例如羧酸的活性酯(琥珀酰亚胺基、酐等)或亲水部分(例如聚乙二醇)的醛。按照一些实施方案,相当于SEQ ID NO:1405肽7位的赖氨酸残基被精氨酸取代,且单个赖氨酸取代被插入相当于SEQ ID NO:1405的12、15、16、19和24位的氨基酸之一中。

[1198] 在另一个实施方案中,将相当于本文所公开第5类肽的22位的甲硫氨酸残基转变为亮氨酸或正亮氨酸以防止肽的氧化降解。

[1199] 此外在一些方面,第5类肽在已知对胰高血糖素类似物的功能不是决定性的位置上还包含氨基酸取代。在一些实施方案中,取代为在选自2、5、6、7、8、9、12、13、14、15、16、19、22、23或24的1、2或3个位置上的保守氨基酸取代。在一些实施方案中,相当于天然胰高血糖素肽16、17、20、21、24或29位,更具体地讲相对于天然胰高血糖素的21和/或24位上的氨基酸被半胱氨酸或赖氨酸取代,其中PEG链与取代的半胱氨酸或赖氨酸残基共价连接。

[1200] 按照一些实施方案,提供包含由SEQ ID NO:1409组成的序列的第5类肽,其在相当于肽的11、12、15、16、19和/或24位的位置上被一个或多个其它氨基酸取代(包括例如被半胱氨酸取代),从而被进一步修饰,其中氨基酸取代包含具有适于与亲水部分(包括例如PEG)交联的侧链的氨基酸。天然胰高血糖素可被天然存在的氨基酸或合成的(非天然存在的)氨基酸取代。合成的或非天然存在的氨基酸是指不是体内天然存在的,然而可掺入本文所述肽结构的氨基酸。在一些实施方案中,提供第5类肽,其中肽包含SEQ ID NO:1409的序列并且还包含结合至肽的16或19位的聚乙二醇链。在又一个实施方案中,对胰高血糖素类似物的C端进行修饰以用酰胺基置换羧酸基。

[1201] 按照一些实施方案,提供包含选自以下的胰高血糖素类似物的第5类肽:

[1202] R_1 -Phe-Thr-Ser-Xaa-Tyr-Ser-Lys-Tyr-Leu-Xaa-Glu-Arg-Arg-Ala-Gln-Asp-Phe-Val-Gln-Trp-Leu-Xaa-Asn-Thr- R_2 (SEQ ID NO:1439)

[1203] R_1 -Phe-Thr-Ser-Xaa-Tyr-Ser-Lys-Tyr-Leu-Asp-Glu-Arg-Arg-Ala-Gln-Xaa-Phe-Val-Gln-Trp-Leu-Xaa-Asn-Thr- R_2 (SEQ ID NO:1413),

[1204] R_1 -Phe-Thr-Ser-Xaa-Tyr-Ser-Lys-Tyr-Leu-Asp-Glu-Arg-Arg-Ala-Gln-Asp-Phe-Val-Xaa-Trp-Leu-Xaa-Asn-Thr- R_2 (SEQ ID NO:1414) 和

[1205] R_1 -Phe-Thr-Ser-Xaa-Tyr-Ser-Lys-Tyr-Leu-Asp-Glu-Arg-Arg-Ala-Gln-Xaa-Phe-Val-Xaa-Trp-Leu-Xaa-Asn-Thr- R_2 (SEQ ID NO:1412), 其中4位上的Xaa=天冬氨酸、谷氨酸、半胱氨酸或高半胱氨酸,10位上的Xaa=Asp、Glu、半胱氨酸、高谷氨酸和高半胱氨酸,16位上的Xaa为Asp、Cys、Orn、高半胱氨酸或乙酰基苯丙氨酸,19位上的Xaa为Gln、Cys、Orn、高半胱氨酸和乙酰基苯丙氨酸,22位上的Xaa=Met、Leu或Nle, R_1 为OH或NH₂, 而 R_2 为Gly Pro SerSer Gly Ala Pro Pro Pro Ser (SEQ ID NO:1421)、Gly Pro Ser Ser GlyAla Pro Pro Pro Ser Xaa (SEQ ID NO:1450; 其中Xaa为Cys、Orn、高半胱氨酸或乙酰基苯丙氨酸)、COOH或CONH₂, 其中肽任选在SEQ ID NO:1413的16位上、SEQ ID NO:1414的19位上和SEQ ID NO:1412的16和19位上聚乙二醇化。在一些实施方案中, SEQ ID NO:

1412-1414 和 1439 的 24 位上的 Thr 被 Gly 取代。按照一些实施方案,肽包含 SEQ ID NO:13 或 SEQ ID NO:1414 的序列,其中 R_1 为 OH。按照一些实施方案,肽包含 SEQ ID NO:1413 或 SEQ ID NO:1414 的序列,其中 R_1 为 OH, R_2 为 CONH_2 。按照一些实施方案,肽包含 SEQ ID NO:1413 或 SEQ ID NO:1414 的序列,其中 R_1 为 OH, R_2 为 CONH_2 , 24 位上的苏氨酸被甘氨酸取代。

[1206] 在一些实施方案中,通过在相应的氨基酸位置上取代天然胰高血糖素残基,而对第 5 类肽进行进一步修饰以包含天然 GLP-1 的一个或多个氨基酸。例如,第 5 类肽可包含在 2、3、17、18、21、23 和 24 位(按照天然胰高血糖素的氨基酸编号)中任一个上的一个或多个氨基酸取代。在一个具体的实施方案中,第 5 类肽通过一个或多个以下氨基酸取代而被修饰:Ser2 被 Ala 置换、Gln3 被 Glu 置换、Arg17 被 Gln 置换、18 位上的 Arg 被 Ala 置换、21 位上的 Asp 被 Glu 置换、23 位上的 Val 被 Ile 置换、24 位上的 Gln 被 Ala 置换(氨基酸位置与天然胰高血糖素序列一致)。在一个具体的实施方案中,通过用 Ala 置换 Ser2 且用 Glu 置换 Gln3(按照天然胰高血糖素的氨基酸编号)来修饰第 5 类肽。在另一个具体的实施方案中,用所有以下氨基酸取代修饰第 5 类肽:Arg17 被 Gln 置换,18 位上的 Arg 被 Ala 置换、21 位上的 Asp 被 Glu 置换、23 位上的 Val 被 Ile 置换和 24 位上的 Gln 被 Ala 置换(按照天然胰高血糖素的氨基酸编号)。在又一个具体的实施方案中,对第 5 类肽进行修饰以刚好包含在 21 位(按照 SEQ ID NO:1401 的编号)上的 Glu。因此,第 5 类肽可包含 SEQ ID NO:1460-1470、1473-1478、1480-1488、1490-1496、1503、1504、1506 和 1514-1518 中任一个的氨基酸序列。

[1207] 本文还提供第 5 类肽或其缀合物,其包含:(1)通过本文所述方法(例如通过分子内桥、或掺入一个或多个 α , α -二取代氨基酸、或 16 位(按照 SEQ ID NO:1401 的编号)上的酸性氨基酸或其组合)而稳定的 α 螺旋;(2)替换 C 端羧酸的 C 端酰胺或酯,和 (3) A-B-C 的通用结构,

[1208] 其中 A 选自

[1209] (i) 苯基乳酸 (PLA);

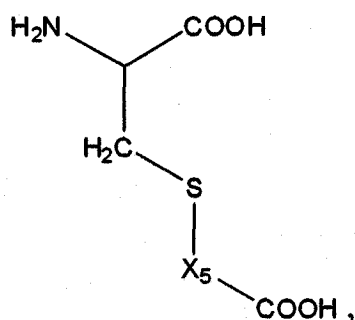
[1210] (ii) PLA 的氧基衍生物;和

[1211] (iii) 2-6 个氨基酸的肽,其中该肽的 2 个连续氨基酸通过酯键或醚键连接;

[1212] 其中 B 表示 SEQ ID NO:1401 的氨基酸 p-26,其中 p 为 3、4、5、6 或 7,任选包含一种或多种本文所述的氨基酸修饰,包括例如对第 5 类肽所述的任何修饰。例如一种或多种修饰可选自:

[1213] (iv) 9 位(按照 SEQ ID NO:1401 的氨基酸编号)上的 Asp 被 Glu、Cys 的磺酸衍生物、高谷氨酸、 β -高谷氨酸或具有以下结构的半胱氨酸的烷基羧酸衍生物取代:

[1214]



[1215] 其中 X_5 为 C_1-C_4 烷基、 C_2-C_4 烯基或 C_2-C_4 炔基；

[1216] (v) 10、20 和 24 位（按照 SEQ ID NO:1401 的氨基酸编号）上的一个或两个氨基酸被通过酯、醚、硫醚、酰胺或烷基胺键与酰基或烷基共价连接的氨基酸取代；

[1217] (vi) 16、17、20、21 和 24 位（按照 SEQ ID NO:1401 的氨基酸编号）上的一个或两个氨基酸被选自 Cys、Lys、鸟氨酸、高半胱氨酸和乙酰基-苯丙氨酸 (Ac-Phe) 的氨基酸取代，其中所述氨基酸与亲水部分共价连接；

[1218] (vii) 15 位（按照 SEQ ID NO:1401 的编号）上的 Asp 被半胱磺酸、谷氨酸、高谷氨酸和高半胱磺酸取代；

[1219] (viii) 16 位（按照 SEQ ID NO:1401 的编号）上的 Ser 被半胱磺酸、谷氨酸、高谷氨酸和高半胱磺酸取代；

[1220] (ix) 17 位上的 Arg 被 Gln 置换、18 位上的 Arg 被 Ala 置换、21 位上的 Asp 被 Glu 置换、23 位上的 Val 被 Ile 置换，和 24 位上的 Gln 被 Ala 置换（按照 SEQ ID NO:1401 的氨基酸编号）；

[1221] (x) 16 位上的 Ser 被 Glu 置换、20 位上的 Gln 被 Glu 置换或 24 位上的 Gln 被 Glu 置换（按照 SEQ ID NO:1401 的氨基酸编号）；

[1222] 其中 C(A-B-C 通用结构的) 选自：

[1223] (vii) X；

[1224] (viii) X-Y；

[1225] (ix) X-Y-Z；

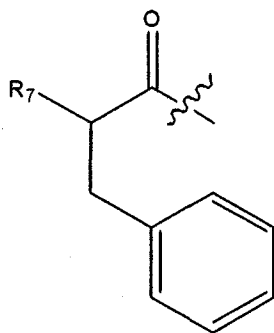
[1226] (x) X-Y-Z-R10；

[1227] 其中 X 为 Met、Leu 或 Nle；Y 为 Asn 或带电荷的氨基酸；Z 为 Thr、Gly、Cys、Lys、鸟氨酸 (Orn)、高半胱氨酸、乙酰基苯丙氨酸 (Ac-Phe) 或带电荷的氨基酸；其中 R10 选自 SEQ ID NO:1421、1426、1427 和 1450。

[1228] 在一个具体方面，肽包含 PLA 的氧基衍生物。本文使用的“PLA 的氧基衍生物”是指包含 PLA 修饰结构的化合物，其中羟基被 O- R_{11} 置换，其中 R_{11} 为化学部分。在这一方面，PLA 的氧基衍生物可为例如 PLA 的酯或 PLA 的醚。

[1229] 制备 PLA 的氧基衍生物的方法是本领域已知的。例如，如果氧基衍生物为 PLA 的酯，则可通过使 PLA 的羟基与带有亲核体的羰基反应而形成酯。亲核体可以是任何合适的亲核体，包括但不限于胺或羟基。因此，PLA 的酯可包含下式 IV 的结构：

[1230]



式 IV

[1231] 其中 R7 为 PLA 的羟基与带有亲核体的羰基反应时形成的酯。

[1232] 携带亲核体的羰基（其与 PLA 的羟基反应形成酯）可为例如羧酸、羧酸衍生物或羧酸的活性酯。羧酸衍生物可以是但不限于酰氯、酸酐、酰胺、酯或腈。羧酸的活性酯可为例如 N-羟基琥珀酰亚胺 (NHS)、甲苯磺酸酯 (Tos)、碳二亚胺或六氟磷酸盐。在一些实施方案中，碳二亚胺为 1,3-二环己基碳二亚胺 (DCC)、1,1'-羰基二咪唑 (CDI)、1-乙基-3-(3-二甲基氨基丙基) 碳二亚胺盐酸盐 (EDC) 或 1,3-二异丙基碳二亚胺 (DICD)。在一些实施方案中，六氟磷酸盐选自六氟磷酸苯并三唑-1-基-氧基-三(二甲基氨基)磷 (BOP)、六氟磷酸苯并三唑-1-基-氧基三吡咯烷基磷 (PyBOP)、六氟磷酸 2-(1H-7-氮杂苯并三唑-1-基)-1,1,3,3-四甲基脲鎓 (HATU) 和六氟-磷酸 o-苯并三唑-N,N,N',N'-四甲基-脲鎓 (HBTU)。

[1233] 与羟基（例如 PLA 的羟基）反应制备醚的方法也是本领域已知的。例如，PLA 的羟基可与卤代烷基或甲苯磺酸化烷基醇反应形成醚键。

[1234] 在一个具体的实施方案中，通过含氧键（例如通过酯或醚键）与 PLA 结合的化学部分为聚合物（例如聚亚烷基二醇）、糖、氨基酸、肽或脂质，例如脂肪酸或类固醇。

[1235] 在一个具体的实施方案中，化学部分为氨基酸，其任选为肽的组成部分，使得式 IV 为酯肽。在这一方面，PLA 可位于肽的 N 端氨基酸残基以外的位置上，使得肽包含 PLA 残基 N 端的一个或多个（例如 1、2、3、4、5、6 或更多个）氨基酸。例如，肽可包含 n 位上的 PLA，其中 n 为肽的 2、3、4、5 或 6 位。

[1236] PLA 残基 N 端的氨基酸可为合成的或天然存在的。在一个具体的实施方案中，作为 PLA N 端的氨基酸是天然存在的氨基酸。在一些实施方案中，作为 PLA N 端的氨基酸是天然胰高血糖素的 N 端氨基酸。例如，肽在 N 端可包含 SEQ ID NO:1452-1456 中任一个的氨基酸序列，其中 PLA 通过酯键与苏氨酸连接：

[1237]

SEQ ID NO: 1452	His-Ser-Gln-Gly-Thr-PLA
SEQ ID NO: 1453	Ser-Gln-Gly-Thr-PLA
SEQ ID NO: 1454	Gln-Gly-Thr-PLA
SEQ ID NO: 1455	Gly-Thr-PLA
SEQ ID NO: 1456	Thr-PLA

[1238] 在一个备选的实施方案中，一个或多个 N 端氨基酸可被天然胰高血糖素的氨基酸以外的氨基酸取代。例如，如果肽包含 PLA 作为 5 或 6 位上的氨基酸，则 1 位和 / 或 2 位上

的氨基酸可为降低对二肽基肽酶 IV 切割敏感性的氨基酸。更具体地讲,在一些实施方案中,肽的 1 位为选自以下的氨基酸: D- 组氨酸、 α , α - 二甲基咪唑乙酸 (DMIA)、N- 甲基组氨酸、 α - 甲基组氨酸、咪唑乙酸、脱氨基组氨酸、羟基 - 组氨酸、乙酰基 - 组氨酸和高组氨酸。更具体地讲,在一些实施方案中,拮抗剂 / 激动剂肽的 2 位为选自以下的氨基酸: D- 丝氨酸、D- 丙氨酸、缬氨酸、甘氨酸、N- 甲基丝氨酸、N- 甲基丙氨酸和氨基异丁酸 (AIB)。此外,例如,如果肽包含 PLA 作为 4、5 或 6 位上的氨基酸,则与天然胰高血糖素的天然谷氨酰胺残基相对,肽的 3 位的氨基酸可以是谷氨酸。在本发明的一个实例性实施方案中,肽在 N 端包含 SEQ ID NO: 1457-1459 中任一个的氨基酸序列。

[1239] 对于包含式 IV 化合物的肽,聚合物可以是任何聚合物,前提条件是其可与 PLA 的羟基反应。聚合物可以是天然或正常包含携带亲核体的羰基的聚合物。或者,聚合物可以是衍生化成包含携带羰基的羰基的聚合物。聚合物可以是以下任一种的衍生化聚合物: 聚酰胺; 聚碳酸酯; 聚亚烷基和其衍生物,包括聚亚烷基二醇、聚环氧烷、聚对苯二甲酸亚烷基酯; 丙烯酸酯和甲基丙烯酸酯的聚合物,包括聚(甲基丙烯酸甲酯)、聚(甲基丙烯酸乙酯)、聚(甲基丙烯酸丁酯)、聚(甲基丙烯酸异丁酯)、聚(甲基丙烯酸己酯)、聚(甲基丙烯酸异癸酯)、聚(甲基丙烯酸月桂酯)、聚(甲基丙烯酸苯酯)、聚(丙烯酸甲酯)、聚(丙烯酸异丙酯)、聚(丙烯酸异丁酯)和聚(丙烯酸十八酯); 聚乙烯聚合物,包括聚乙烯醇、聚乙烯醚、聚乙烯酯、聚卤乙烯、聚(乙酸乙烯酯)和聚乙烯吡咯烷酮; 聚乙交酯; 聚硅氧烷; 聚氨酯及其共聚物; 纤维素,包括烷基纤维素、羟基烷基纤维素、纤维素醚、纤维素酯、硝基纤维素、甲基纤维素、乙基纤维素、羟丙基纤维素、羟丙基甲基纤维素、羟丁基甲基纤维素、乙酸纤维素、丙酸纤维素、乙酸丁酸纤维素、乙酸邻苯二甲酸纤维素、羧乙基纤维素、三乙酸纤维素和硫酸纤维素钠盐; 聚丙烯; 聚乙烯,包括聚(乙二醇)、聚(环氧乙烷)和聚(对苯二甲酸乙酯)及聚苯乙烯。

[1240] 聚合物可以是生物可降解聚合物,包括合成的生物可降解聚合物(例如乳酸和乙醇酸的聚合物、聚酐、聚原酸酯、聚氨酯、聚(丁酸)、聚(戊酸)和(丙交酯-己内酯)共聚物)和天然生物可降解聚合物(例如藻酸盐和其它多糖,包括葡聚糖和纤维素、胶原、其化学衍生物(诸如烷基、亚烷基等化学基团的取代、添加; 羟基化、氧化和本领域技术人员按常规进行的其它修饰)、白蛋白和其它亲水蛋白质(例如玉米醇溶蛋白和其它谷醇溶蛋白和疏水蛋白质))以及其任何共聚物或混合物。总的说来,这些材料通过酶促水解或体内暴露于水、通过表面或整体侵蚀而降解。

[1241] 聚合物可以是生物黏附聚合物,例如生物蚀解的水凝胶(参见 H. S. Sawhney, C. P. Pathak 和 J. A. Hubbell, 载于 *Macromolecules*, 1993, 26, 581-587, 其教导结合到本文中)、聚透明质酸、酪蛋白、明胶、明胶蛋白、聚酐、聚丙烯酸、藻酸盐、脱乙酰壳多糖、聚(甲基丙烯酸甲酯)、聚(甲基丙烯酸乙酯)、聚(甲基丙烯酸丁酯)、聚(甲基丙烯酸异丁酯)、聚(甲基丙烯酸己酯)、聚(甲基丙烯酸异癸酯)、聚(甲基丙烯酸月桂酯)、聚(甲基丙烯酸苯酯)、聚(丙烯酸甲酯)、聚(丙烯酸异丙酯)、聚(丙烯酸异丁酯)和聚(丙烯酸十八酯)。

[1242] 在一些实施方案中,聚合物是水溶性聚合物。合适的水溶性聚合物是本领域已知的,包括例如聚乙烯吡咯烷酮、羟丙基纤维素 (HPC; KluCel)、羟丙基甲基纤维素 (HPMC; Methocel)、硝基纤维素、羟丙基乙基纤维素、羟丙基丁基纤维素、羟丙基戊基纤维素、甲基

纤维素、乙基纤维素 (Ethocel)、羟乙基纤维素、各种烷基纤维素和羟基烷基纤维素、各种纤维素醚、乙酸纤维素、羧甲基纤维素、羧甲基纤维素钠、羧甲基纤维素钙、乙酸乙烯酯 / 巴豆酸共聚物、聚 - 甲基丙烯酸羟烷基酯、甲基丙烯酸羟甲酯、甲基丙烯酸共聚物、聚甲基丙烯酸、聚甲基丙烯酸甲酯、马来酸酐 / 甲基乙烯基醚共聚物、聚乙烯醇、聚丙烯酸钠和聚丙烯酸钙、聚丙烯酸、酸性羧基聚合物、羧基聚亚甲基、羧基乙烯基聚合物、聚氧乙烯聚氧丙烯共聚物、甲基乙烯基醚 - 马来酸酐共聚物、羧基甲基酰胺、甲基丙烯酸钾二乙烯基苯共聚物、聚氧化亚乙基二醇、聚环氧乙烷及其衍生物、盐和组合。

[1243] 在一个具体的实施方案中, 聚合物是聚亚烷基二醇, 包括例如聚乙二醇 (PEG)。

[1244] 糖可以是任何糖, 前提条件是其包含或被制成包含具有 α 离去基团的羰基。例如, 糖可以是被衍生化以包含具有 α 离去基团的羰基的糖。在这一方面, 糖可以是衍生化形式的单糖 (例如葡萄糖、半乳糖、果糖)、二糖 (例如蔗糖、乳糖、麦芽糖)、寡糖 (例如棉子糖、水苏糖)、多糖 (淀粉、淀粉酶、支链淀粉、纤维素、壳多糖、胍胍质、昆布多糖、木聚糖、甘露聚糖、岩藻多糖、半乳甘露聚糖)。

[1245] 脂质可以是包含具有 α 离去基团的羰基的任何脂质。例如, 脂质可以是被衍生化以包含羰基的脂质。在这一方面, 脂质可以是脂肪酸的衍生物 (例如 C4-C30 脂肪酸、类二十烷酸、前列腺素、白三烯、血栓烷、N- 酰基乙醇胺)、甘油脂质 (例如一取代、二取代、三取代甘油)、甘油磷脂 (例如磷脂酰胆碱、磷脂酰肌醇、磷脂酰乙醇胺、磷脂酰丝氨酸)、鞘脂 (例如鞘氨醇、神经酰胺)、甾醇脂质 (例如类固醇、胆固醇)、异戊烯醇脂质、糖脂质或聚酮化合物、油、蜡、胆固醇、甾醇、脂溶性维生素、甘油一酯、甘油二酯、甘油三酯、磷脂。

[1246] 在一些实施方案中, R7 的分子量为约 100kDa 以下, 例如约 90kDa 以下、约 80kDa 以下、约 70kDa 以下、约 60kDa 以下、约 50kDa 以下、约 40kDa 以下。因此, R7 的分子量可为约 35kDa 以下、约 30kDa 以下、约 25kDa 以下、约 20kDa 以下、约 15kDa 以下、约 10kDa 以下、约 5kDa 以下或约 1kDa。

[1247] 在一个备选的实施方案中, 包含 A-B-C 通用结构的肽包含 2-6 个氨基酸的肽作为 A, 其中 A 肽的 2 个连续氨基酸通过酯键或醚键连接。酯键或醚键可介于例如氨基酸 2 和 3、3 和 4、4 和 5 或 5 和 6 之间。任选可通过包括与聚合物 (例如亲水聚合物) 的连接在内的与另一个化学部分的共价连接、烷基化或酰化, 来对 A 肽进行进一步修饰。

[1248] 在一个具体的实施方案中, 包含 PLA 的上述第 5 类肽被修饰成包含 PLA 的氧基衍生物, 例如 PLA 的酯或 PLA 的醚。例如, 第 5 类肽可包含 SEQ ID NO: 1402、1405-1420、1422-1425、1432-1436、1438、1439、1445、1446 和 1451 中任一个的氨基酸序列, 其中 PLA 通过酯键或醚键与氨基酸、肽、聚合物、酰基或烷基连接。氨基酸、肽、聚合物、酰基或烷基可以是任何本文所述那些。在 PLA 通过酯键与氨基酸或肽连接的情况下, 第 5 类肽可视为酯肽。

[1249] 此外, 在另一个具体的实施方案中, 没有 PLA 的上述第 5 类肽被修饰成在 7 位 (按照天然胰高血糖素的编号) 氨基酸 N 端的 2 个连续氨基酸之间包含至少一个酯键或醚键。在一个具体的实施方案中, 第 5 类肽在 2 个连续氨基酸之间包含至少一个酯键或醚键。在一个更具体的实施方案中, 第 5 类肽包含 SEQ ID NO: 1401N 端的 6 个氨基酸, 且 N 端 6 个氨基酸中的 2 个连续氨基酸通过酯键或醚键连接。

[1250] A 肽可包含任何合成的或天然存在的氨基酸, 前提条件是至少 2 个连续氨基酸通过酯键或醚键连接。在一个具体的实施方案中, A 肽包含天然胰高血糖素的氨基酸。1 位和

/ 或 2 位上的氨基酸可为降低对二肽基肽酶 IV 切割敏感性的氨基酸。例如, A 肽在 1 位可包含选自以下的氨基酸: D- 组氨酸、 α , α -二甲基咪唑乙酸 (DMIA)、N- 甲基组氨酸、 α - 甲基组氨酸、咪唑乙酸、脱氨基组氨酸、羟基- 组氨酸、乙酰基- 组氨酸和高组氨酸。更具体地讲, 在一些实施方案中, A 肽的 2 位为选自以下的氨基酸: D- 丝氨酸、D- 丙氨酸、缬氨酸、甘氨酸、N- 甲基丝氨酸、N- 甲基丙氨酸和氨基异丁酸 (AIB)。此外, 例如, A 肽 3 位的氨基酸可为谷氨酸, 与天然胰高血糖素的天然谷氨酰胺残基相对。因此, A-B-C 通用结构的肽可包含以下氨基酸序列:

[1251] Xaa₁-Xaa₂-Xaa₃-Thr-Gly-Phe (SEQ ID NO:1507);

[1252] Xaa₂-Xaa₃-Thr-Gly-Phe (SEQ ID NO:1508); 或

[1253] Xaa₃-Thr-Gly-Phe (SEQ ID NO:1509);

[1254] 其中 Xaa₁ 选自: His、D- 组氨酸、 α , α -二甲基咪唑乙酸 (DMIA)、N- 甲基组氨酸、 α - 甲基组氨酸、咪唑乙酸、脱氨基组氨酸、羟基- 组氨酸、乙酰基- 组氨酸和高组氨酸; Xaa₂ 选自: Ser、D- 丝氨酸、D- 丙氨酸、缬氨酸、甘氨酸、N- 甲基丝氨酸、N- 甲基丙氨酸和氨基异丁酸 (AIB); Xaa₃ 为 Gln 或 Glu。

[1255] 在一些实施方案中, B 被多达 3 个氨基酸修饰。例如, 表示 SEQ ID NO:1401 的天然氨基酸序列的 B 被一个或多个保守氨基酸修饰所修饰。

[1256] 在另一个实施方案中, B 包含一种或多种选自本文所述 (iv)-(x) 的氨基酸修饰。在一个具体的实施方案中, B 包含氨基酸修饰 (v) 和 (vi) 的一个或两个。在又一个具体的实施方案中, 除 (v) 和 (vi) 以外, B 还包含选自 (iv)、(vii)、(viii)、(ix) 和 (x) 的氨基酸修饰的一个或组合。

[1257] 如本文所述, 包含通用结构 A-B-C 的肽可在 C 端上包含一个或多个带电荷的氨基酸例如作为本文所述的 Y 和 / 或 Z。备选或另外地, 如果 C 包含 X-Y-Z, 则包含通用结构 A-B-C 的肽可另外包含 Z 的 C 端的 1-2 个带电荷的氨基酸。带电荷的氨基酸可为例如 Lys、Arg、His、Asp 和 Glu 之一。在一个具体的实施方案中, Y 为 Asp。

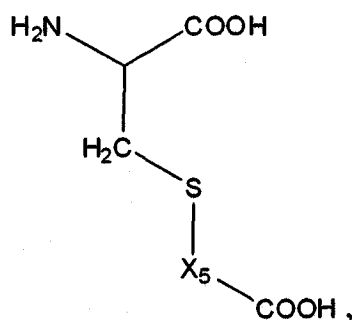
[1258] 在一些实施方案中, 包含通用结构 A-B-C 的肽包含亲水部分, 其与包含通用结构 A-B-C 的肽的 1、16、20、21 或 24 位 (按照 SEQ ID NO:1401 的氨基酸编号) 上的氨基酸残基或者 N 端或 C 端残基共价结合。在一个具体的实施方案中, 亲水部分与包含通用结构 A-B-C 的肽的 Cys 残基连接。在这一方面, 天然胰高血糖素 (SEQ ID NO:1401) 的 16、21、24 或 29 位上的氨基酸可被 Cys 残基取代。或者, 例如, 如果包含通用结构 A-B-C 的肽包含 C 端突出端, 则可将包含亲水部分的 Cys 残基添加至包含通用结构 A-B-C 的肽的 C 端作为 30 位或作为 40 位 (按照 SEQ ID NO:1401 的氨基酸编号的位置)。或者, 亲水部分可通过 PLA 的羟基部分与包含通用结构 A-B-C 的肽的 PLA 连接。亲水部分可以是本文所述的任何亲水部分, 包括例如聚乙二醇。

[1259] 在一个具体方面, 包含通用结构 A-B-C 的肽包含通过掺入分子内桥而稳定的 α 螺旋。在一些实施方案中, 分子内桥是内酰胺桥。内酰胺桥可介于 9 和 12 位的氨基酸、12 和 16 位的氨基酸、16 和 20 位的氨基酸、20 和 24 位的氨基酸或 24 和 26 位的氨基酸之间 (按照 SEQ ID NO:1401 的氨基酸编号)。在一个具体的实施方案中, 12 和 16 位或 16 和 20 位 (按照 SEQ ID NO:1401 的氨基酸编号) 上的氨基酸通过内酰胺桥连接。考虑内酰胺桥的其它位置。

[1260] 另外或备选地,包含通用结构 A-B-C 的肽可在例如 16、20、21 或 24 位(按照 SEQ ID NO:1401 的氨基酸编号)的任一个上包含 α , α 二取代氨基酸。在一些实施方案中, α , α 二取代氨基酸为 AIB。在一个具体方面,AIB 位于 16 位(按照 SEQ ID NO:1401 的编号)上。

[1261] 备选或另外地,可对包含通用结构 A-B-C 的肽进行修饰以在 16 位(按照 SEQ ID NO:1401 的编号)上包含酸性氨基酸,该修饰提高 α 螺旋的稳定性。在一些实施方案中,酸性氨基酸是包含侧链磺酸或侧链羧酸的氨基酸。在一个更具体的实施方案中,酸性氨基酸选自 Glu、Asp、高谷氨酸、Cys 的磺酸衍生物、半胱磺酸、高半胱磺酸、Asp 和具有以下结构的 Cys 的烷基化衍生物:

[1262]



[1263] 其中 X_5 为 C_1 - C_4 烷基、 C_2 - C_4 烯基或 C_2 - C_4 炔基。

[1264] 在一个具体的实施方案中,第 5 类肽可包含 SEQ ID NO:1460-1470、1473-1478、1480-1488、1490-1496、1503、1504、1506 和 1514-1518 中任一个的氨基酸序列,或者包含以下中任一个的氨基酸序列:表 13 的肽 2-6、表 14 的肽 1-8 和表 15 的肽 2-6、8 和 9。

[1265]

表 13: 内酰胺、Cex 胰高血糖素(6-39)肽与胰高血糖素拮抗剂和 GLP-1 激动剂活性

			GLP-1 EC ₅₀ (nM)	Glu IC ₅₀ (nM)
1	E9, K12,E16	FTSEYSKYLDERRAQDFVQWLMNTGPSSGAPPPS	1451	762
2	E9, K12E16(内酰胺)	FTSEYSKYLDERRAQDFVQWLMNTGPSSGAPPPS	63	2008
3	E9, E16K20(内酰胺)	FTSEYSKYLDERRAKDFVQWLMNTGPSSGAPPPS	36	42
4	D9, K12E16(内酰胺)	FTSDYSKYLDERRAQDFVQWLMNTGPSSGAPPPS	118.7	828
5	[PLA6, E9, K12E16(内酰胺)	PLA-TSEYSKYLDERRAQDFVQWLMNTGPSSGAPPPS	6	72
6	[PLA6, E9, E16K20(内酰胺)]	PLA-TSEYSKYLDERRAKDFVQWLMNTGPSSGAPPPS	20	20

[1266]

表 14: 内酰胺胰高血糖素(1-29、2-29、4-29 和 6-29)肽及其胰高血糖素拮抗剂和 GLP-1 激动剂活性
(PA = 部分拮抗剂)

		GLP-1 EC50 (nM)	胰高血糖素 IC50 (nM)
	胰高血糖素 HSQGTFTSDYSKYLDSRRAQDFVQWLMT		0.2~1.0*
	GLP-1 (氨基酸 1-30) HAEGTFTSDVSSYLEGQAAKEFIAWIVKGR	0.02~0.1	
1	[PLA6, D9, E16K20(内酰胺), D28]G(6-29) PLA TSDYSKYLDERRAKDFVQWLMDT	5~25	10~30
2	[PLA6, D9, K12E16(内酰胺), D28]G(6-29) PLA TSDYSKYLDERRAQDFVQWLMDT	177	63
3	[PLA6, D9, E16, K20E24(内酰胺), D28]G(6-29) PLA TSDYSKYLDERRAKDFVEWLMDT	239	74
4	[PLA6, D9, E16, E24K28(内酰胺)]G(6~29) PLA TSDYSKYLDERRAQDFVEWLMT	289	22
5	[E9, E16K20(内酰胺), D28]G(4~29) GTFTSEYSKYLDERRAKDFVQWLMDT	151	10~30
6	[E9, E16K20(内酰胺), D28]G(2~29) SQGTFTSEYSKYLDERRAKDFVQWLMDT	203	49 (PA)
7	[A2E3, E16K20(内酰胺), D28]G(2~29) AEGTFTSEYSKYLDERRAKDFVQWLMDT	175	63
8	[A2E3, E16K20(内酰胺), D28]G(1~29) HAEGTFTSEYSKYLDERRAKDFVQWLMDT	0.2	130 (PA)
9	ANK2 (Bayer 肽) HSQGTFTSDY ARYLDARRAREFIKWL VRGRG	0.28	激动剂

*对胰高血糖素受体的 EC50

[1267]

表 15: 混合型激动剂/拮抗剂的特征

胰高血糖素 (6-CEX) 类似物				
1	E9, K12, E16	FTSEYSKYLDERRAQDFVQWLMNTGPSSGAPPPS	1451	762
2	E9, K12E16(内酰胺)	FTSEYSKYLDERRAQDFVQWLMNTGPSSGAPPPS	63	2008
3	E9, E16K20(内酰胺)	FTSEYSKYLDERRAKDFVQWLMNTGPSSGAPPPS	36	42
4	D9, K12E20(内酰胺)	FTSDYSKYLDERRAQDFVQWLMNTGPSSGAPPPS	18	828
5	[PLA6, E9, K12E20(内酰胺)]	PLA-TSEYSKYLDERRAQDFVQWLMNTGPSSGAPPPS	6	72
6	[PLA6, E9, E16K20(内酰胺)]	PLA-TSEYSKYLDERRAKDFVQWLMNTGPSSGAPPPS	20	20

胰高血糖素 D⁹(6-29)类似物

			GLP-1 EC50 (nM)	胰高血糖素 IC50 (nM)
7	PLA 6, D9, D28	PLA-TSDYSKYLDERRAQDFVQWLMDT	-700	tbd
8	PLA6, D9, K12E20(内酰胺)	PLA-TSDYSKYLDERRAQDFVQWLMDT	21	13
9	PLA6, D9, E16K20(内酰胺)	PLA-TSDYSKYLDERRAKDFVQWLMDT	4	6

[1268] 在一些实施方案中, 包含通用结构 A-B-C 的肽是第 5 类肽。在一个具体的实施方案中, 肽具有天然 GLP-1 对 GLP-1 受体获得的最大激动作用的至少约 50%, 以及具有对天然

胰高血糖素对于胰高血糖素受体获得的最大反应的至少约 50% 抑制。在另一个具体的实施方案中, 肽具有天然 GLP-1 对 GLP-1 受体获得的最大激动作用的至少约 55%、至少约 60%、至少约 70%、至少约 80%、至少约 90%、至少约 95% 或约 100%。备选或另外地, 肽可具有对天然胰高血糖素对于胰高血糖素受体获得的最大反应的至少约 55%、至少约 60%、至少约 70%、至少约 80%、至少约 90%、至少约 95% 或约 100% 抑制。

[1269] 在一些实施方案中, 提供具有第 5 类肽或其缀合物的肽, 其包含:

[1270] (1) 赋予胰高血糖素拮抗剂活性的修饰, 包括但不限于:

[1271] (a) 6 位的 Phe 被 PLA 取代 (按照野生型胰高血糖素的氨基酸编号), 任选从野生型胰高血糖素的 N 端缺失 1-5 个氨基酸; 或

[1272] (b) 从野生型胰高血糖素的 N 端缺失 2-5 个氨基酸; 任选野生型胰高血糖素 9 位上的 Asp 被谷氨酸、高谷氨酸或半胱氨酸的磺酸衍生物取代 (按照野生型胰高血糖素的氨基酸编号); 和

[1273] (2) 赋予 GLP-1 激动剂活性的修饰, 包括但不限于:

[1274] (a) 在野生型胰高血糖素的氨基酸 12-29 内, 例如在 16、17、18、19、20、21、24 或 29 位 (按照野生型胰高血糖素的氨基酸编号) 中的 1、2、3、4 或更多个上, α , α -二取代氨基酸的插入或取代; 或

[1275] (b) 在野生型胰高血糖素的氨基酸 12-29 内引入分子内桥, 例如盐桥或内酰胺桥或另一种类型的共价键; 或

[1276] (c) 在 2、3、17、18、21、23 或 24 位 (按照天然胰高血糖素的氨基酸编号) 中的一个或多个上的氨基酸被 GLP-1 的相应氨基酸取代, 例如 Ser2 被 Ala 置换、Gln3 被 Glu 置换、Arg17 被 Gln 置换、18 位上的 Arg 被 Ala 置换、21 位上的 Asp 被 Glu 置换、23 位上的 Val 被 Ile 置换和 / 或 24 位上的 Gln 被 Ala 置换; 或

[1277] (d), 稳定氨基酸 12-29 位 (按照野生型胰高血糖素的氨基酸编号) 附近的 α 螺旋结构的其它修饰;

[1278] 和

[1279] (3) 提高 GLP-1 激动剂活性的其它修饰, 例如

[1280] (a) C 端酰胺或酯替换 C 端羧酸;

[1281] 和任选

[1282] (4) 一种或多种下列修饰:

[1283] (a) 例如在 N 端, 或在 6、16、17、20、21、24、29、40 位或在 C 端氨基酸上, 与亲水部分 (例如聚乙二醇) 共价连接; 和 / 或

[1284] (b) 酰化或烷基化; 和任选

[1285] (5) 一种或多种下列的其它修饰:

[1286] (a) 氨基酸与 N 端 (例如 1-5 个氨基酸与 N 端) 的共价连接, 任选通过酯键与 6 位 (按照野生型胰高血糖素的编号) 上的 PLA 共价连接, 任选连同例如本文所述改进抗 DPP-IV 切割的抗性的 1 或 2 位上的修饰;

[1287] (b) 29 和 / 或 28 位以及任选 27 位 (按照野生型胰高血糖素的编号) 上的氨基酸缺失;

[1288] (c) 氨基酸与 C 端共价连接;

[1289] (d) 同时保持所需活性的非保守取代、保守取代、添加或缺失,例如在 2、5、7、10、11、12、13、14、16、17、18、19、20、21、24、27、28 或 29 位中的一个或多个上的保守取代、10 位上的 Tyr 被 Val 或 Phe 取代、12 位上的 Lys 被 Arg 取代、这些位置中的一个或多个被 Ala 取代;

[1290] (e) 15 位上的天冬氨酸的修饰,例如被谷氨酸、高谷氨酸、半胱磺酸或高半胱磺酸取代,这可降低降解;或 16 位上的丝氨酸的修饰,例如通过苏氨酸、AIB、谷氨酸或具有长为 4 个原子的侧链的另一种带负电荷氨基酸的取代,或者用谷氨酰胺、高谷氨酸或高半胱磺酸中的任一种的取代,这同样也可降低由于 Asp15-Ser16 键的裂解所致的降解;

[1291] (f) 27 位的甲硫氨酸的修饰,例如通过用亮氨酸或正亮氨酸取代来降低氧化降解;

[1292] (g) 20 或 24 位上的 Gln 的修饰,例如通过用 Ala 或 AIB 取代来降低由 Gln 的脱酰胺基化而产生的降解;

[1293] (h) 21 位上的 Asp 的修饰,例如通过用 Glu 取代以降低由于 Asp 脱水形成环状琥珀酰亚胺中间体接着异构化成异天冬氨酸而产生的降解;

[1294] (j) 本文所述同二聚化或异二聚化;和

[1295] (k) 上述的组合。

[1296] 要理解的是,同一类别中的任何修饰可组合在一起和/或不同类别的修饰组合。例如,(1)(a)的修饰可与(2)(a)和(3)组合;(1)(a)可与(2)(b)(例如内酰胺桥或盐桥)和(3)组合;(1)(a)可与(2)(c)和(3)组合;(1)(b)可与(2)(a)和(3)组合;(1)(b)可与(2)(b)(例如内酰胺桥或盐桥)和(3)组合;(1)(b)可与(2)(c)和(3)组合;上述任一种可与(4)(a)和/或(4)(b)组合;和前述任一种可与(5)(a)-(5)(k)的任一种组合。

[1297] 在示例性的实施方案中, α , α -二取代氨基酸 AIB 在 16、20、21 或 24 位(按照野生型胰高血糖素的氨基酸编号)的 1、2、3 或全部位置上进行取代。

[1298] 在示例性的实施方案中,分子内桥是盐桥。

[1299] 在其它的示例性实施方案中,分子内桥为共价键,例如内酰胺桥。在一些实施方案中,内酰胺桥位于 9 和 12 位的氨基酸、12 和 16 位的氨基酸、16 和 20 位的氨基酸、20 和 24 位的氨基酸或 24 和 26 位的氨基酸之间(按照 SEQ ID NO:1401 的氨基酸编号)。在示例性的实施方案中,在 6、10、20 或 24 位或者在 N 端或 C 端上酰化或烷基化(按照野生型胰高血糖素 SEQ ID NO:1401 的氨基酸编号)。

[1300] 在示例性的实施方案中,修饰包括:

[1301] (i) 15 位(按照 SEQ ID NO:1401 的编号)上的 Asp 被半胱磺酸、谷氨酸、高谷氨酸和高半胱磺酸取代;

[1302] (ii) 16 位(按照 SEQ ID NO:1401 的编号)上的 Ser 被半胱磺酸、谷氨酸、高谷氨酸和高半胱磺酸取代;

[1303] (iii) 28 位上的 Asn 被带电荷的氨基酸取代;

[1304] (iv) 28 位上的 Asn 被选自 Lys、Arg、His、Asp、Glu、半胱磺酸和高半胱磺酸的带电荷的氨基酸取代;

[1305] (v) 在 28 位上被 Asn、Asp 或 Glu 取代;

[1306] (vi) 在 28 位上被 Asp 取代;

- [1307] (vii) 在 28 位上被 Glu 取代；
- [1308] (viii) 29 位上的 Thr 被带电荷的氨基酸取代；
- [1309] (ix) 29 位上的 Thr 被选自 Lys、Arg、His、Asp、Glu、半胱磺酸和高半胱磺酸的带电荷的氨基酸取代；
- [1310] (x) 在 29 位上被 Asp、Glu 或 Lys 取代；
- [1311] (xi) 在 29 位上被 Glu 取代；
- [1312] (xii) 在 29 位后插入 1-3 个带电荷的氨基酸；
- [1313] (xiii) 在 29 位后插入 Glu 或 Lys；
- [1314] (xiv) 在 29 位后插入 Gly-Lys 或 Lys-Lys；
- [1315] 或其组合。
- [1316] 上述提高 GLP-1 受体激动剂活性、胰高血糖素受体拮抗剂活性、肽溶解性和 / 或肽稳定性的任何修饰可单独或组合应用。
- [1317] 提高稳定性的修饰
- [1318] 按照一些实施方案,可对本文所公开的第 5 类肽进行进一步的修饰,以包括与第 5 类肽羧基端氨基酸(24 位)连接的 SEQ ID NO:1421(GPSSGAPPPS) 或 SEQ ID NO:1450 的氨基酸序列,并给予个体以引起体重减轻或有助于保持体重。更具体地讲,第 5 类肽包含选自以下的序列:SEQ ID NO:1405、SEQ ID NO:1406、SEQ ID NO:1407、SEQ ID NO:1408、SEQ ID NO:1409、SEQ ID NO:1412、SEQ ID NO:1413、SEQ ID NO:1414、SEQ ID NO:1416、SEQ ID NO:1417、SEQ ID NO:1418、SEQ ID NO:1419、SEQ ID NO:1422、SEQ ID NO:1423、SEQ ID NO:1424 和 SEQ ID NO:1425,并还包含与肽或第 5 类肽的羧基端氨基酸(24 位)连接的 SEQ ID NO:1421(GPSSGAPPPS) 或 SEQ ID NO:1450 的氨基酸序列,用于抑制食欲和引起体重减轻 / 保持体重。在一些实施方案中,所给予的肽或第 5 类肽包含选自 SEQ ID NO:1416、SEQ ID NO:1417、SEQ ID NO:1418 和 SEQ ID NO:1419 的序列,其还包含与第 5 类肽的羧基端氨基酸(24 位)连接的 SEQ ID NO:1421(GPSSGAPPPS) 的氨基酸序列。在一些实施方案中,方法包括给予包含 SEQ ID NO:1445 或 SEQ ID NO:1446 的序列的肽或第 5 类肽。
- [1319] 因此,预期可对本文所公开的第 5 类肽进行类似修饰以降低其在水性缓冲液中对提前化学裂解的易感性。按照一些实施方案,通过用选自半胱磺酸、谷氨酸、高谷氨酸和高半胱磺酸的氨基酸置换位于天然胰高血糖素相应的 15 位上的天然天冬氨酸,可对本文所述的第 5 类肽进行进一步修饰,以提高其在水溶液中的稳定性。按照一些实施方案,SEQ ID NO:1405、SEQ ID NO:1406、SEQ ID NO:1407 或 SEQ ID NO:1408 的第 5 类肽的 10 位上的天冬氨酸残基,可被选自半胱磺酸、谷氨酸、高谷氨酸和高半胱磺酸的氨基酸取代,而在一些实施方案中,SEQ ID NO:1405、SEQ ID NO:1406、SEQ ID NO:1407 或 SEQ ID NO:1408 的 10 位上的天然天冬氨酸被谷氨酸置换。按照一些实施方案,提供在水溶液中稳定性得到提高的第 5 类肽,其中拮抗剂包含 SEQ ID NO:1409 的修饰序列,其中修饰包括用 Glu 取代 SEQ ID NO:1409 的 10 位上的 Asp。在一些实施方案中,提供包含选自 SEQ ID NO:1422、SEQ ID NO:1423、SEQ ID NO:1424 和 SEQ ID NO:1425 的序列的第 5 类肽。在一些实施方案中,第 5 类肽被酰胺化。
- [1320] 天然胰高血糖素 15-16 位上的 Asp-Ser 序列被鉴定为唯一不稳定的二肽,其导致天然激素在水性缓冲液中提早化学裂解。例如,当于 37°C 保持在 0.01N HCl 中 2 周时,超

过 50% 的天然胰高血糖素可被裂解成片段。2 条释放的裂解肽 1-15 和 16-29 没有胰高血糖素样生物活性, 因此表示对胰高血糖素及其相关类似物的水性预制剂的限制。观察到天然胰高血糖素 15 位上的 Asp 被 Glu 选择性化学取代几乎消除了 15-16 肽键的化学裂解。

[1321] 在再进一步的示例性实施方案中, 通过对相当于天然胰高血糖素 15 或 16 位的氨基酸进行修饰以降低尤其在酸性或碱性缓冲液中肽随时间发生的降解, 可对任何前述化合物进行进一步修饰以提高稳定性。

[1322] 提高溶解性的修饰

[1323] 在某些方面, 可对第 5 类肽进行进一步修饰以改进肽在生理 pH 下在水溶液中的溶解性, 同时保持胰高血糖素拮抗剂和 GLP-1 激动剂活性。在相当于 SEQ ID NO:1405 的肽的 12、15、16、19 和 24 位的位置上、或在 SEQ ID NO:1406 的肽的 12、16、19 或 24 位上引入亲水基团, 可改进所得的肽在具有生理 pH 的溶液中的溶解性, 同时保持母体化合物胰高血糖素拮抗剂和 GLP 激动剂活性。因此, 在一些实施方案中, 本发明公开的第 5 类肽被进一步修饰, 以包含在相当于 SEQ ID NO:1405 或 SEQ ID NO:1406 肽的氨基酸 12、15、16、19 和 24 位的氨基酸侧链共价连接的一个或多个亲水基团。在又一个实施方案中, 相当于 SEQ ID NO:1405 或 SEQ ID NO:1406 的氨基酸 16 和 19 位的氨基酸侧链与亲水基团共价结合, 而在一些实施方案中, 亲水基团为聚乙二醇 (PEG)。

[1324] 第 5 类胰高血糖素相关肽可通过在其羧基端引入电荷而被修饰, 以提高肽的溶解性同时保持肽的激动剂性质。提高的溶解性允许在接近中性 pH 下制备并保存胰高血糖素溶液。在相对中性的 pH (例如 pH 约 6.0-约 8.0) 下配制胰高血糖素溶液提高第 5 类肽的长期稳定性。

[1325] 申请人预期, 在某些情况下, 可对本文所公开的第 5 类肽进行类似修饰以提高其在相对中性 pH (例如 pH 约 6.0-约 8.0) 下在水溶液中的溶解性, 同时保持胰高血糖素拮抗剂和 GLP-1 活性。因此, 一些实施方案涉及 SEQ ID NO:1405、SEQ ID NO:1406、SEQ ID NO:1407 或 SEQ ID NO:1408 的胰高血糖素拮抗剂 /GLP-1, 其已通过用带电荷的氨基酸取代天然不带电荷的氨基酸、或将带电荷的氨基酸添加至羧基端, 来对相对于野生型胰高血糖素 (SEQ ID NO:1401) 6-29 位存在的天然氨基酸进一步修饰, 以将电荷加至肽中。按照一些实施方案, 将本文所公开的第 5 类肽的 1-3 个不带电荷的天然氨基酸用带电荷的氨基酸置换。在一些实施方案中, 带电荷的氨基酸选自赖氨酸、精氨酸、组氨酸、天冬氨酸和谷氨酸。更具体地讲, 申请人发现, 用带电荷的氨基酸取代相当于 28 和 / 或 29 位 (相对于天然胰高血糖素) 的正常存在的氨基酸、和 / 或在肽的羧基端添加 1-2 个带电荷的氨基酸, 提高第 5 类肽在生理相关的 pH (即 pH 约 6.5-约 7.5) 下在水溶液中的溶解性和稳定性。因此, 预期第 5 类肽的这类修饰特别在范围约 5.5-约 8.0 的 pH 下对水溶液中的溶解性具有类似的作用, 同时保持母体肽的生物活性。

[1326] 按照一些实施方案, 如下对 SEQ ID NO:1405、SEQ ID NO:1406、SEQ ID NO:1407 或 SEQ ID NO:1408 的第 5 类肽进行修饰: 通过用带负电荷的氨基酸 (例如天冬氨酸或谷氨酸) 取代那些序列 23 和 / 或 24 位上的天然氨基酸, 并任选将带负电荷的氨基酸 (例如天冬氨酸或谷氨酸) 添加至肽的羧基端。在一个备选的实施方案中, 通过用带正电荷的氨基酸 (例如赖氨酸、精氨酸或组氨酸) 取代 SEQ ID NO:1405、SEQ ID NO:1406、SEQ ID NO:1407 或 SEQ ID NO:1408 的 24 位上的天然氨基酸, 且任选将一个或两个带正电荷的氨基酸

(例如赖氨酸、精氨酸或组氨酸)添加至肽的羧基端,来对包含 SEQ ID NO:1405、SEQ ID NO:1406、SEQ ID NO:1407 或 SEQ ID NO:1408 的第 5 类肽进行修饰。按照一些实施方案,提供溶解性和稳定性得到改进的第 5 类肽,其中类似物包含 SEQ ID NO:1415 或 SEQ ID NO:1451 的氨基酸序列,前提条件是 SEQ ID NO:1415 或 SEQ ID NO:1451 的 23 或 24 位上的至少一个氨基酸被酸性氨基酸取代和 / 或另外的酸性氨基酸被添加至 SEQ ID NO:1415 或 SEQ ID NO:1451 的羧基端。在一些实施方案中,酸性氨基酸独立选自 Asp、Glu、半胱氨酸和高半胱氨酸。

[1327] 按照一些实施方案,提供溶解性和稳定性得到提高的第 5 类肽,其中拮抗剂包含 SEQ ID NO:1416、SEQ ID NO:1417、SEQ ID NO:1418 或 SEQ ID NO:1419 的氨基酸序列。按照一些实施方案,提供包含 SEQ ID NO:1416 或 SEQ ID NO:1417 的序列的胰高血糖素激动剂。在一些实施方案中,第 5 类肽包含 SEQ ID NO:1420 的序列。

[1328] 按照一些实施方案,提供包含 SEQ ID NO:1415 或 SEQ ID NO:1451 的序列的第 5 类肽。在一些实施方案中,SEQ ID NO:1415 或 SEQ ID NO:1451 的 4 位为天冬氨酸、谷氨酸、高谷氨酸、半胱氨酸或高半胱氨酸,而在一些实施方案中,4 位为天冬氨酸、谷氨酸、半胱氨酸或高半胱氨酸,而在又一个实施方案中,SEQ ID NO:1415 或 SEQ ID NO:1451 的 4 位为天冬氨酸或谷氨酸,而在一些实施方案中,SEQ ID NO:1415 或 SEQ ID NO:1451 的 4 位为天冬氨酸。在一些实施方案中,提供包含 SEQ ID NO:1415 或 SEQ ID NO:1451 的序列的第 5 类肽,其中 SEQ ID NO:1415 的 4 位为天冬氨酸,SEQ ID NO:1415 的 10 位为谷氨酸。在又一个实施方案中,SEQ ID NO:1415 或 SEQ ID NO:1451 的 C 端氨基酸被修饰以用电中性基团(例如酰胺或酯)置换天然羧酸基。

[1329] 第 5 类肽融合物

[1330] 在又一个实施方案中,本文所述的第 5 类肽的羧基端氨基酸与包含选自 SEQ ID NO:1421、1426、1427 和 1450 的序列的第二肽共价结合。例如,在一些实施方案中,SEQ ID NO:1415、SEQ ID NO:1451、SEQ ID NO:1405、SEQ ID NO:1406、SEQ ID NO:1407、SEQ ID NO:1408、SEQ ID NO:1412、SEQ ID NO:1413、SEQ ID NO:1414、SEQ ID NO:1416、SEQ ID NO:1417、SEQ ID NO:1418、SEQ ID NO:1419、SEQ ID NO:1422、SEQ ID NO:1423、SEQ ID NO:1424 和 SEQ ID NO:1425 的第 5 类肽,与包含选自 SEQ ID NO:1421 (GPSSGAPPPS)、SEQ ID NO:1426 (KRNRNIA)、SEQ ID NO:1427 (KRNR) 和 SEQ ID NO:1450 (GPSSGAPPPSX) 的序列的第二肽共价结合。

[1331] 在一些实施方案中,提供包含独立选自以下的 2 个序列的第 5 类肽二聚体:SEQ ID NO:1405、SEQ ID NO:1406、SEQ ID NO:1407、SEQ ID NO:1408、SEQ ID NO:1409、SEQ ID NO:1422、SEQ ID NO:1423、SEQ ID NO:1424 和 SEQ ID NO:1425,其还包含与第 5 类肽的羧基端氨基酸连接的 SEQ ID NO:1421 (GPSSGAPPPS) 的氨基酸序列。

[1332] 在一些实施方案中,通过肽的 C 端的一个或两个氨基酸的截短或缺失(即截短天然胰高血糖素 29 位或 28 和 29 位上的氨基酸),来对第 5 类肽进行进一步修饰。优选截短不影响第 5 类肽的活性(例如胰高血糖素拮抗作用 /GLP-1 激动作用)。

[1333] 第 5 类肽缀合物

[1334] 还提供第 5 类肽的缀合物,其中胰高血糖素肽任选通过共价键结合和任选通过接头与缀合物部分连接。

[1335] 在其中第 5 类肽包含聚乙二醇链的那些实施方案,聚乙二醇链可以是直链形式,或者可以是支链。按照一些实施方案,聚乙二醇链具有选自约 500- 约 10,000 道尔顿的平均分子量。在一些实施方案中,聚乙二醇链具有选自约 1,000- 约 5,000 道尔顿的平均分子量。在一些实施方案中,聚乙二醇链具有选自约 1,000- 约 5,000 道尔顿的平均分子量。在一些实施方案中,聚乙二醇链的平均分子量选自约 1,000- 约 2,000 道尔顿。在一些实施方案中,聚乙二醇链的平均分子量为约 1,000 道尔顿。

[1336] 在一些实施方案中,聚乙二醇化第 5 类肽包含由 SEQ ID NO:1415 或 SEQ ID NO:1451 序列的组成的肽,其中聚乙二醇链与选自 SEQ ID NO:1415 或 SEQ ID NO:1451 的 11、12、15、16、19 和 24 位的氨基酸连接,且 PEG 链的分子量为约 1,000- 约 5,000 道尔顿。在一些实施方案中,聚乙二醇化第 5 类肽包含由 SEQ ID NO:1415 或 SEQ ID NO:1451 的序列组成的肽,其中聚乙二醇链与 SEQ ID NO:1415 或 SEQ ID NO:1451 的 16 或 19 位上的氨基酸连接,且 PEG 链的分子量为约 1,000- 约 5,000 道尔顿。在又一个实施方案中,修饰的第 5 类肽包含与肽共价结合的两条或更多条聚乙二醇链,其中胰高血糖素链的总分子量为约 1,000- 约 5,000 道尔顿。在一些实施方案中,第 5 类肽包含 SEQ ID NO:1415 或 SEQ ID NO:1451 的序列,其中聚乙二醇链与 SEQ ID NO:1415 或 SEQ ID NO:1451 的 16 和 19 位上的氨基酸连接,且 2 条 PEG 链的总的分子量为约 1,000- 约 5,000 道尔顿。

[1337] 第 5 类胰高血糖素相关肽可包含 SEQ ID NO:1401-1518 中任一个的氨基酸序列,任选具有多达 1、2、3、4 或 5 个另外的保持胰高血糖素拮抗剂和 GLP-1 激动剂活性的修饰。

[1338] 使用方法

[1339] 胰高血糖素超家族肽

[1340] 总的来讲,可将包含胰高血糖素超家族肽或胰高血糖素相关肽(例如第 1、2、3、4 或 5 类肽)的前药用于已将胰高血糖素超家族肽和胰高血糖素相关肽用于的任何目的(参见例如上述详情)。例如,所公开的生物活性肽前药类似物被认为适于之前针对其相应母体生物活性肽描述的任何用途。因此,本文所述的胰高血糖素相关肽前药类似物可用于治疗低血糖症、高血糖症、糖尿病或由高/低胰高血糖素血液水平或高/低血糖水平引起的其它代谢病。按照一些实施方案,待使用本文公开的前药治疗的患者是驯养动物,而在另一个实施方案中,待治疗的患者是人。

[1341] 在一些实施方案中,前药用于降低或抑制食欲、降低食物摄取、引起体重减轻或有助于保持体重。预期降低食欲或促进体重减轻的这类方法可用于减轻体重、防止体重增加或治疗各种诱因的肥胖症(包括药物引起的肥胖症)并减轻与肥胖症相关的并发症包括血管病(冠状动脉疾病、中风、外周血管病、缺血再灌注等)、高血压、II 型糖尿病发病、高脂血症和肌骨病。

[1342] 在其它实施方案中,在医院环境下,前药与胃肠外给予非糖尿病患者(例如接受胃肠外营养或全胃肠外营养的患者)的营养物联用。非限制性实例包括手术患者、昏迷患者、消化道疾病患者或胃肠道无功能患者(例如由于手术切除、阻塞或吸收能力受损、克罗恩氏病(Crohn's disease)、溃疡性结肠炎、胃肠道梗阻、胃肠道痿、急性胰腺炎、肠缺血、胃肠大手术、某些先天性胃肠道异常、长期腹泻或手术所致的短肠综合征造成)、中风患者和经历常接受胃肠外给予碳水化合物以及脂质、电解质、矿物质、维生素和氨基酸的各种组合的治愈过程的患者。可以在同一时间、在不同时间、在彼此之前或之后给予胰高血糖素超家

族肽前药和胃肠外营养组合物,条件是胰高血糖素超家族肽前药在胃肠外营养组合物正被消化的时候发挥所需要的生物作用。例如,可每天给予胃肠外营养 1、2 或 3 次,而每隔一天一次、一周三次、一周两次、一周一次、每两周一次、每三周一次或一月一次给予胰高血糖素超家族肽前药。

[1343] 代谢综合征,亦称代谢综合征 X、胰岛素抵抗综合征或 Reaven 氏综合征,是一种累及超过 5 千万美国人的病症。代谢综合征的特征通常为集中了以下风险因子的至少三种或更多种:(1) 腹部肥胖(在腹部或腹部周围脂肪组织过量),(2) 致动脉粥样化的血脂障碍(atherogenic dyslipidemia)(血脂障碍,包括促进动脉壁斑蓄积的高甘油三酯、低 HDL 胆固醇和高 LDL 胆固醇),(3) 血压升高,(4) 胰岛素抵抗或葡萄糖耐受不良,(5) 血栓前状态(例如血液中的高血纤蛋白原或纤溶酶原激活物抑制剂-1),以及(6) 促炎性状态(例如血液中的 C 反应蛋白升高)。其它风险因子可包括老化、激素失衡和遗传倾向。

[1344] 代谢综合征与冠心病和与血管斑蓄积相关的其它病症(例如中风和外周血管病,称为动脉粥样硬化性心血管疾病(ASCVD))的风险增加有关。代谢综合征患者可由其早期的胰岛素抵抗状态发展成全面的 II 型糖尿病并伴有 ASCVD 风险增加。在非旨在受任何特殊理论的束缚的情况下,胰岛素抵抗、代谢综合征和血管病间的关系可包括一种或多种同时存在的致病机制,包括胰岛素刺激的血管舒张受损、由氧化应激升高所致胰岛素抵抗相关的 NO 可得性降低和脂肪细胞衍生激素(例如脂连蛋白)异常(Lteif 和 Mather, Can. J. Cardiol. 20(增刊 B):66B-76B(2004))。

[1345] 按照 2001 National Cholesterol Education Program Adult Treatment Panel I(ATP III)(2001 国家胆固醇教育计划成人治疗组),具有任何三种下列特征的同一个体符合代谢综合征标准:(a) 腹部肥胖(男性腰围超过 102cm,女性超过 88cm);(b) 血清甘油三酯(150mg/dl 以上);(c) HDL 胆固醇(男性 40mg/dl 以下,女性 50mg/dl 以下);(d) 血压(130/85 以上);和(e) 空腹血糖(110mg/dl 以上)。按照世界卫生组织(WHO),具有高胰岛素水平(空腹血糖升高或餐后仅葡萄糖升高)的个体,具有下列至少两个标准时符合代谢综合征的标准:(a) 腹部肥胖(腰/臀比大于 0.9、体重指数至少 30kg/m² 或腰围超过 37 英寸);(b) 甘油三酯水平为至少 150mg/dl 或 HDL 胆固醇低于 35mg/dl 的胆固醇组;(c) 血压 140/90 以上或高血压治疗中)。(Mathur, Ruchi, "Metabolic Syndrome," 主编 Shiel, Jr., William C., MedicineNet.com, 2009 年 5 月 11 日)。

[1346] 对于本文的目的,如果个体符合 2001 国家胆固醇教育计划成人治疗组或 WHO 设立的一个或两个标准,则该个体被视为患有代谢综合征。

[1347] 在不受任何特殊理论的束缚的情况下,本文所述的胰高血糖素肽可用于治疗代谢综合征。因此,本发明提供预防或治疗受试者的代谢综合征或降低其 1、2、3 或更多种风险因子的方法,所述方法包括按预防或治疗代谢综合征或其风险因子的有效量将本文所述的胰高血糖素肽给予受试者。

[1348] 非酒精性脂肪肝病(NAFLD)是指从单纯性脂肪肝(脂肪变性)到非酒精性脂肪性肝炎(NASH)到肝硬化(不可逆转的晚期肝瘢痕形成)的大范围的肝病。在肝脏细胞(肝细胞)中,NAFLD 的全部阶段都具有共同的脂肪蓄积(脂肪浸润)。单纯性脂肪肝是在无炎症或瘢痕形成的肝细胞中某种类型的脂肪、甘油三酯异常蓄积。在 NASH 中,脂肪蓄积与肝脏的不同程度的炎症(肝炎)和瘢痕形成(纤维变性)有关。炎性细胞可破坏肝细胞(肝

细胞坏死)。术语“脂肪性肝炎”和“脂肪坏死”中,脂肪 (steato) 是指脂肪浸润,肝炎是指肝脏炎症,坏死是指受破坏的肝细胞。NASH 最终可导致肝的瘢痕形成 (纤维变性) 接着不可逆的晚期瘢痕形成 (肝硬化)。由 NASH 引起的肝硬化是 NAFLD 范围中最后和最严重的阶段。(Mendler, Michel, “Fatty Liver :Nonalcoholic Fatty Liver Disease (NAFLD) and Nonalcoholic Steatohepatitis (NASH),” 主编 Schoenfield, Leslie J., MedicineNet.com, 2005 年 8 月 29 日)。

[1349] 酒精性肝病或酒精诱发性肝病包括与过度消耗酒精有关或由过度消耗酒精引起的 3 种病理学上独特的肝病:脂肪肝 (脂肪变性)、慢性或急性肝炎和肝硬化。酒精性肝炎的范围可从轻度肝炎 (其中实验室试验异常结果仅表明疾病) 到重度肝功能障碍,其具有并发症例如黄疸 (由胆红素潴留引起皮肤发黄)、肝性脑病 (由肝衰竭引起的神经功能障碍)、腹水 (腹部液体蓄积)、出血性食管静脉曲张 (食管曲张的静脉)、凝血异常和昏迷。从组织学上看,酒精性肝炎具有肝细胞气球样变性的特征性外观、具有嗜中性粒细胞且有时有马洛里小体 (细胞中间丝蛋白的异常聚集) 的炎症。肝硬化的解剖学特征在于肝中伴有纤维变性的广泛分布的结节。(Worman, Howard J., “Alcoholic Liver Disease”, Columbia University Medical Center website)。

[1350] 在不受任何特殊理论的束缚的情况下,本文所述的第 2 类和第 3 类胰高血糖素相关肽可用于治疗酒精性肝病、NAFLD 或其任何病期,包括例如脂肪变性、脂肪性肝炎、肝炎、肝脏炎症、NASH、肝硬化或其并发症。因此,本发明提供预防或治疗受试者的酒精性肝病、NAFLD 或其任何病期的方法,所述方法包括以预防或治疗酒精性肝病、NAFLD 或其病期的有效量将本文所述的第 2 类或第 3 类胰高血糖素肽给予受试者。这类治疗方法包括减轻 / 降低以下中的 1、2、3 种或更多种:肝脂肪含量、肝硬化的发病率或进程、肝细胞癌的发病率、炎症体征例如肝酶水平异常 (例如天冬氨酸转氨酶 AST 和 / 或丙氨酸转氨酶 ALT 或 LDH)、血清铁蛋白升高、血清胆红素升高和 / 或纤维变性迹象,例如 TGF- β 水平升高。在优选的实施方案中,第 2 类或第 3 类胰高血糖素肽被用来治疗发展超出单纯性脂肪肝 (脂肪变性) 并显示炎症或肝炎体征的患者。这类方法可导致例如 AST 和 / 或 ALT 水平降低。

[1351] GLP-1 和毒蜥外泌肽 -4 已被证实具有某些神经保护作用。本发明还提供胰高血糖素超家族肽在治疗神经变性疾病中的用途,包括但不限于阿尔茨海默氏病 (Alzheimer's disease)、帕金森病 (Parkinson's disease)、多发性硬化、肌萎缩性侧索硬化、其它脱髓鞘相关病症、老年性痴呆、皮层下痴呆、动脉硬化性痴呆、AIDS 相关痴呆或其它痴呆、中枢神经系统癌、创伤性脑损伤、脊髓损伤、中风或脑缺血、脑血管炎、癫痫、亨廷顿舞蹈病 (Huntington's disease)、图雷特综合征 (Tourette's Syndrome)、格 - 巴综合征 (Guillain Barre syndrome)、肝豆状核变性 (Wilson's disease)、皮克病 (Pick's Disease)、神经炎性病症、病毒、真菌或细菌源性脑炎、脑脊髓炎或脑膜炎或者其它中枢神经系统感染、朊病毒疾病、小脑共济失调、小脑变性、脊髓小脑变性综合征、弗里德赖希共济失调 (Friedreich's ataxia)、共济失调性毛细血管扩张症、脊柱肌营养不良 (spinal dysmyotrophy)、进行性核上性麻痹、张力失常、肌痉挛状态、震颤、视网膜色素变性、纹状体黑质变性、线粒体脑肌病、神经元蜡样脂褐质沉积症、肝性脑病、肾性脑病、代谢性脑病、毒素诱发性脑病和放射诱发性脑损伤。

[1352] 因此,本发明提供预防或治疗受试者的神经变性疾病或减少其 1、2、3 种或更多

种风险因子的方法,所述方法包括以预防或治疗神经变性性疾病或其风险因子的有效量将本文所述的胰高血糖素肽给予受试者。

[1353] 本发明的治疗方法包括采用任何标准给药途径(包括胃肠外,例如静脉内、腹膜内、皮下或肌内、鞘内、透皮、直肠、口服、鼻内或通过吸入),将本文公开的前药给予患者的步骤。在一些实施方案中,皮下或肌内给予组合物,任选给入贮库或作为缓释组合物的组成部分。

[1354] 组合物和组合

[1355] 本发明的前药可单独给予或可与第二药剂(例如抗糖尿病药或减肥药)组合给予。在一些方面,与第二前药或胰高血糖素超家族成员(包括例如胰高血糖素相关肽)组合给予前药。在某些实施方案中,前药与抗糖尿病药组合给予,抗糖尿病药包括但不限于胰岛素;磺脲类,例如甲苯磺丁脲(甲糖宁(Orinase))、醋酸己脲(戴美乐(Dymelor))、妥拉磺脲(妥拉磺脲片剂(Tolinase))、氯磺丙脲(特泌胰(Diabinese))、格列吡嗪(利糖妥片(Glucotrol))、格列本脲(达安宁(Diabeta)、优降糖(Micronase)、达安辽(Glynase))、格列美脲(亚莫利(Amaryl))或格列齐特(达美康(Diamicron));氯茴苯酸类,例如瑞格列奈(repaglinide)(Prandin)或那格列奈(nateglinide)(Starlix);双胍类,例如二甲双胍(格华止(Glucophage))或苯乙双胍;噻唑烷二酮类,例如罗格列酮(文迪雅(Avandia))、吡格列酮(pioglitazone)(Actos)或曲格列酮(瑞如林(Rezulin))或其它PPAR γ 抑制剂;抑制碳水化合物消化的 α 葡萄糖苷酶抑制剂,例如米格列醇(德赛天(Glyset))、阿卡波糖(阿卡糖(Precose)/拜糖平(Glucobay));艾塞那肽(百泌达(Byetta))或普兰林肽;二肽基肽酶-4(DPP-4)抑制剂,例如维格列汀或西格列汀;SGLT(钠依赖性葡萄糖转运蛋白1)抑制剂;或FBP酶(果糖1,6-二磷酸酶)抑制剂。

[1356] 本领域已知的或正在研究中的减肥药包括但不限于食欲抑制药,包括苯乙胺型兴奋剂、芬特明(任选与芬氟拉明或右芬氟拉明一起)、安非拉酮(Tenuate[®])、苯甲曲索(Prelu-2[®], Bontril[®])、苄非他明(Didrex[®])、西布曲明(Meridia[®], Reductil[®]);利莫纳班(Acomplia[®])、其它大麻素受体拮抗剂;泌酸调节肽;盐酸氟西汀(Prozac);Qnexa(托吡酯和芬特明)、Excalia(安非他酮和唑尼沙胺)或Contrave(安非他酮和纳曲酮);或类似于赛尼可(奥利司他)或西替司他(亦称ATL-962)的脂肪酶抑制剂或GT 389-255。

[1357] 还可将本发明的前药给予患有分解代谢性消瘦的患者。据估计,一半以上的癌症患者经历分解代谢性消瘦,其特征在于非刻意的进行性体重减轻、衰弱和体脂肪和肌肉水平低。该综合征在AIDS患者中同样普遍,并还可存在于细菌病和寄生虫病、类风湿性关节炎和肠、肝、肺和心的慢性疾病中。分解代谢性消瘦通常与食欲缺乏有关,并可表现为老化病况或身体创伤的结果。分解代谢性消瘦是一种降低生命质量、使基本状况恶化的症状,并且是死亡的主要原因。

[1358] 可配制包含本文公开的前药的药物组合物,并采用本领域技术人员已知的标准药理学上可接受的载体和给药途径给予患者。因此,本公开内容还包括包含一种或多种本文公开的前药或其药学上可接受的盐以及药学上可接受的载体的药物组合物。在一些实施方案中,药物组合物包含在pH约4.0-约7.0磷酸盐缓冲系统中浓度为1mg/ml的前药。药物组合物可包含前药作为唯一的药用活性组分,或者前药可与一种或多种其它的活性剂组

合。按照一些实施方案,提供包含本发明前药的组合物。或者,可提供包含前药和抗肥胖肽的组合物,以供用于引起体重减轻或防止体重增加。合适的抗肥胖肽包括美国专利 5,691,309、6,436,435 或美国专利申请 20050176643 公开的抗肥胖肽。

[1359] 按照一些实施方案,提供包含任何本文公开的新的前药和药学上可接受的稀释剂、载体或赋形剂的药物组合物,所述前药优选是无菌的,并优选为至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98% 或 99% 的纯度水平。这类组合物可含有本文公开的生物活性肽前药衍生物,其中所得到的活性肽存在的浓度为至少 0.5mg/ml、1mg/ml、2mg/ml、3mg/ml、4mg/ml、5mg/ml、6mg/ml、7mg/ml、8mg/ml、9mg/ml、10mg/ml、11mg/ml、12mg/ml、13mg/ml、14mg/ml、15mg/ml、16mg/ml、17mg/ml、18mg/ml、19mg/ml、20mg/ml、21mg/ml、22mg/ml、23mg/ml、24mg/ml、25mg/ml 或更高。这类组合物可含有本文公开的第 1、2 或 3 类的生物活性肽前药衍生物,其中所得到的活性肽存在的浓度为至少 A,其中 A 为 0.001mg/ml、0.01mg/ml、0.1mg/ml、0.5mg/ml、1mg/ml、2mg/ml、3mg/ml、4mg/ml、5mg/ml、6mg/ml、7mg/ml、8mg/ml、9mg/ml、10mg/ml、11mg/ml、12mg/ml、13mg/ml、14mg/ml、15mg/ml、16mg/ml、17mg/ml、18mg/ml、19mg/ml、20mg/ml、21mg/ml、22mg/ml、23mg/ml、24mg/ml、25mg/ml 或更高。在其它实施方案中,这类组合物可含有浓度至多为 B 的第 1、2 或 3 类的活性肽,其中 B 为 30mg/ml、25mg/ml、24mg/ml、23mg/ml、22mg/ml、21mg/ml、20mg/ml、19mg/ml、18mg/ml、17mg/ml、16mg/ml、15mg/ml、14mg/ml、13mg/ml、12mg/ml、11mg/ml、10mg/ml、9mg/ml、8mg/ml、7mg/ml、6mg/ml、5mg/ml、4mg/ml、3mg/ml、2mg/ml、1mg/ml 或 0.1mg/ml。在一些实施方案中,组合物可含有浓度范围为 A-B mg/ml 的第 1、2 或 3 类胰高血糖素相关肽,例如 0.001-30.0mg/ml。在一些实施方案中,药物组合物包含已灭菌的并任选保存在各种容器中的水溶液。按照一些实施方案,本发明的化合物可用来制备即刻可用于注射的预制溶液。在其它实施方案中,药物组合物包含冻干粉。药物组合物可被进一步包装作为药盒的组成部分,药盒包括用于将组合物给予患者的一次性装置。可给容器或药盒贴标签以保存在周围室温下或在冷冻温度下。

[1360] 所有本文所述的治疗方法、药物组合物、药盒和其它类似实施方案都考虑前药化合物包括其所有药学上可接受的盐。

[1361] 在一些实施方案中,提供具有将前药组合物给予患者的装置的药盒。药盒可另包括各种容器,例如小瓶、管、瓶等。优选药盒还可包括使用说明书。按照一些实施方案,药盒的装置是气溶胶分散装置,其中将组合物包装在气溶胶装置内。在另一个实施方案中,药盒包含注射器和针,而在一些实施方案中,将前药组合物包装在注射器内。

[1362] 第 1、2 和 3 类胰高血糖素相关肽的药物制剂

[1363] 按照一些实施方案,提供药物组合物,其中所述组合物包含本公开内容的胰高血糖素肽或其药学上可接受的盐和药学上可接受的载体。药物组合物可包含任何药学上可接受的成分,包括例如酸化剂、添加剂、吸附剂、气溶胶抛射剂、排气剂、碱化剂、防结块剂、抗凝血剂、抗微生物防腐剂、抗氧化剂、抗菌剂、基料、粘合剂、缓冲剂、螯合剂、包衣剂、着色剂、干燥剂、洗涤剂、稀释剂、消毒剂、崩解剂、分散剂、促溶剂、染料、软化剂、乳化剂、乳液稳定剂、填充剂、成膜剂、增味剂、矫味剂、促流动剂、胶凝剂、成粒剂、湿润剂、润滑剂、黏膜黏着剂、软膏基料、软膏、油性溶媒、有机基料、锭剂基料、色素、增塑剂、磨光剂、防腐剂、掩蔽剂、皮肤渗透剂、增溶剂、溶剂、稳定剂、栓剂基料、表面活性剂、表面活化剂、助悬剂、甜味

剂、治疗剂、增稠剂、张度剂、毒性剂、增粘剂、吸水剂、水溶性共溶剂、水软化剂或润湿剂。

[1364] 在一些实施方案中,药物组合物包含下列组分中的任一种或组合:阿拉伯树胶、乙酰舒泛钾、柠檬酸乙酰基三丁酯、柠檬酸乙酰基三乙酯、琼脂、白蛋白、醇、无水醇、变性醇、稀释醇、油桐酸、藻酸、脂族聚酯、氧化铝、氢氧化铝、硬脂酸铝、支链淀粉、 α -直链淀粉、抗坏血酸、抗坏血酸棕榈酸酯、阿司帕坦、抑菌注射用水、皂土、皂土乳浆、苯扎氯铵、苜蓿氯铵、苯甲酸、苯甲醇、苯甲酸苄酯、溴硝丙二醇、丁羟茴醚、丁羟甲苯、对羟基苯甲酸丁酯、对羟基苯甲酸丁酯钠、藻酸钙、抗坏血酸钙、碳酸钙、环己氨基磺酸钙、无水磷酸氢钙、脱水磷酸氢钙、三碱式磷酸钙、丙酸钙、硅酸钙、山梨酸钙、硬脂酸钙、硫酸钙、硫酸钙半水合物、低芥酸菜子油、卡波姆、二氧化碳、羧甲基纤维素钙、羧甲基纤维素钠、 β -胡萝卜素、角叉菜胶、蓖麻油、氢化蓖麻油、阳离子乳化蜡、醋酸纤维素、醋酸邻苯二甲酸纤维素、乙基纤维素、微晶纤维素、粉状纤维素、硅化微晶纤维素、羧甲基纤维素钠、十六醇十八醇混合物、溴化十六烷基三甲铵、鲸蜡醇、氯己定、三氯叔丁醇、氯甲酚、胆固醇、醋酸氯己定、葡糖酸氯己定、盐酸氯己定、一氯二氟乙烷(HCFC)、一氯二氟甲烷、含氯氟烃(CFC)、氯苯氧乙醇、氯二甲酚、淀粉糖浆干粉、无水柠檬酸、柠檬酸一水合物、可可脂、着色剂、玉米油、棉籽油、甲酚、间甲酚、邻甲酚、对甲酚、交联羧甲基纤维素钠、交聚维酮、环拉酸、环糊精、葡萄糖结合剂、糊精、葡萄糖、无水葡萄糖、二偶氮烷基脲、邻苯二甲酸二丁酯、癸二酸二丁酯、二乙醇胺、邻苯二甲酸二乙酯、二氟乙烷(HFC)、二甲基- β -环糊精、环糊精型化合物(例如Captisol®)、二甲醚、邻苯二甲酸二甲酯、依地酸二钾、依地酸二钠、磷酸氢二钠、多库酯钙、多库酯钾、多库酯钠、没食子酸十二酯、溴化十二烷基三甲铵、依地酸钙二钠、依地酸(edtic acid)、乙葡胺、乙醇、乙基纤维素、没食子酸乙酯、月桂酸乙酯、乙基麦芽酚、油酸乙酯、对羟基苯甲酸乙酯、对羟基苯甲酸乙酯钾、对羟基苯甲酸乙酯钠、乙基香草醛、果糖、液体果糖、磨碎果糖、无热原果糖、粉状果糖、富马酸、明胶、葡萄糖、液体葡萄糖、饱和植物脂肪酸的甘油酯混合物、甘油、山嵛酸甘油酯、单油酸甘油酯、单硬脂酸甘油酯、自乳化单硬脂酸甘油酯、棕榈酰硬脂酸甘油酯(glyceryl palmitostearate)、甘氨酸、二醇类、glycofurol、瓜尔胶、七氟丙烷(HFC)、溴化十六烷基三甲铵、高果糖浆、人血清白蛋白、烃类(HC)、稀盐酸、II型氢化植物油、羟乙基纤维素、2-羟乙基- β -环糊精、羟丙基纤维素、低取代羟丙基纤维素、2-羟丙基- β -环糊精、羟丙基甲基纤维素、邻苯二甲酸羟丙基甲基纤维素、咪脲、甾萜脂、离子交换剂、氧化铁、异丙醇、肉豆蔻酸异丙酯、棕榈酸异丙酯、等渗盐水、高岭土、乳酸、乳糖醇、乳糖、羊毛脂、羊毛脂醇、无水羊毛脂、卵磷脂、硅酸镁铝、碳酸镁、正常碳酸镁、无水碳酸镁、碱式碳酸镁、氢氧化镁、十二烷基硫酸镁、氧化镁、硅酸镁、硬脂酸镁、三硅酸镁、无水三硅酸镁、苹果酸、麦芽、麦芽糖醇、麦芽糖醇溶液、麦芽糖糊精、麦芽酚、麦芽糖、甘露醇、中链甘油三酯、葡甲胺、薄荷醇、甲基纤维素、甲基丙烯酸甲酯、油酸甲酯、对羟基苯甲酸甲酯、对羟基苯甲酸甲酯钾、对羟基苯甲酸甲酯钠、微晶纤维素和羧甲基纤维素钠、矿物油、轻质矿物油、矿物油和羊毛脂醇、油、橄榄油、单乙醇胺、蒙脱石、没食子酸辛酯、油酸、棕榈酸、石蜡、花生油、矿脂、矿脂和羊毛脂醇、药用釉料、苯酚、液化苯酚、苯氧乙醇、苯氧丙醇、苯基乙醇、醋酸苯汞、硼酸苯汞、硝酸苯汞、波尔阿克林林、波尔阿克林林钾、泊洛沙姆、聚葡萄糖、聚乙二醇、聚氧化乙烯、聚丙烯酸脂、聚乙烯-聚氧丙烯-嵌段聚合物、聚甲基丙烯酸酯、聚氧乙烯烷基醚、聚氧乙烯蓖麻油衍生物、聚氧乙烯山梨糖醇脂肪酸酯、聚氧乙烯硬脂酸酯、聚乙烯醇、聚乙烯吡咯烷酮、藻酸钾、苯甲酸钾、碳酸氢钾、亚硫酸氢钾、氯化钾、柠檬酸钾、

无水柠檬酸钾、磷酸氢钾、焦亚硫酸钾、磷酸二氢钾、丙酸钾、山梨酸钾、聚维酮、丙醇、丙酸、碳酸丙烯、丙二醇、藻酸丙二醇酯、没食子酸丙酯、对羟基苯甲酸丙酯、对羟基苯甲酸丙酯钾、对羟基苯甲酸丙酯钠、硫酸鱼精蛋白、菜子油、林格氏液、糖精、糖精铵、糖精钙、糖精钠、红花油、皂石、血清蛋白、芝麻油、胶态硅石、胶态二氧化硅、藻酸钠、抗坏血酸钠、苯甲酸钠、碳酸氢钠、亚硫酸氢钠、氯化钠、无水柠檬酸钠、脱水柠檬酸钠、氯化钠、环拉酸钠、依地酸钠、十二烷基硫酸钠、月桂基硫酸钠、焦亚硫酸钠、磷酸氢二钠、磷酸二氢钠、磷酸三钠、无水丙酸钠、丙酸钠、山梨酸钠、羟乙酸淀粉钠、硬脂酰醇富马酸钠、亚硫酸钠、山梨酸、山梨坦酯（山梨坦脂肪酯）、山梨糖醇、70%山梨糖醇溶液、大豆油、鲸蜡、淀粉、玉米淀粉、马铃薯淀粉、预胶凝淀粉、灭菌玉米淀粉、硬脂酸、纯的硬脂酸、硬脂醇、蔗糖、糖、可压糖、细纹理碎糖（confectioner's sugar）、糖球、转化糖、蔗糖-转化糖聚合物（Sugartab）、夕照黄 FCF、合成石蜡、滑石粉、酒石酸、酒石黄、四氟乙烷（HFC）、可可油、硫柳汞、二氧化钛、 α -生育酚、醋酸维生素 E、琥珀酸 α -维生素 E、 β -生育酚、 δ -生育酚、 γ -生育酚、西黄蓍胶、三醋精、柠檬酸三丁酯、三乙醇胺、柠檬酸三乙酯、三甲基- β -环糊精、溴化三甲基十四烷基铵、tris 缓冲液、依地酸三钠、香草醛、I 型氢化植物油、水、软水、硬水、无二氧化碳水、无热原水、注射用水、吸入用无菌水、无菌注射用水、冲洗用无菌水、蜡、阴离子乳化蜡、巴西棕榈蜡、阳离子乳化蜡、十六烷基酯蜡、微晶蜡、非离子乳化蜡、栓剂蜡、白蜡、黄蜡、白矿脂、羊毛脂、黄原胶、木糖醇、玉米醇溶蛋白、丙酸锌、锌盐、硬脂酸锌或以下文献中的任何赋形剂：Handbook of Pharmaceutical Excipients, 第 3 版, A. H. Kibbe (Pharmaceutical Press, London, UK, 2000), 其通过引用以其整体全部。Remington's Pharmaceutical Sciences, 第 16 版, E. W. Martin (Mack Publishing Co., Easton, Pa., 1980) (其通过引用以其整体结合) 公开了各种用于配制药学上可接受的组合物的各种组分及其已知的制备技术。除非任何常规物质与药物组合物不相容, 否则考虑其在药物组合物中的用途。还可将补充活性成分掺入组合物中。

[1365] 可将本文公开的药物制剂设计成如下所述的短效、速释、长效或缓释制剂。还可配制药物制剂以便即释、控释或缓释。本发明的组合物可还包含例如微团或脂质体, 或一些其它的胶囊化形式, 或可以延长释放形式给予, 从而提供长期保存和 / 或递送效果。可按任何方案给予所公开的药物制剂, 包括例如每日 (每天 1 次、每天 2 次、每天 3 次、每天 4 次、每天 5 次、每天 6 次)、每两天、每 3 天、每 4 天、每 5 天、每 6 天、每周、每两周、每三周、每月或每两月一次。

[1366] 在一些实施方案中, 前述组分可以任何浓度存在于药物组合物中, 例如至少 A, 其中 A 为 0.0001% w/v、0.001% w/v、0.01% w/v、0.1% w/v、1% w/v、2% w/v、5% w/v、10% w/v、20% w/v、30% w/v、40% w/v、50% w/v、60% w/v、70% w/v、80% w/v 或 90% w/v。在一些实施方案中, 前述组分可以任何浓度存在于药物组合物中, 例如至多 B, 其中 B 为 90% w/v、80% w/v、70% w/v、60% w/v、50% w/v、40% w/v、30% w/v、20% w/v、10% w/v、5% w/v、2% w/v、1% w/v、0.1% w/v、0.001% w/v 或 0.0001%。在其它实施方案中, 前述组分可以任何浓度范围存在于药物组合物中, 例如约 A- 约 B。在一些实施方案中, A 为 0.0001%, B 为 90%。

[1367] 可配制药物组合物以达到生理上相容的 pH。在一些实施方案中, 药物组合物的 pH 可为至少 5、至少 5.5、至少 6、至少 6.5、至少 7、至少 7.5、至少 8、至少 8.5、至少 9、至少

9.5、至少 10 或至少 10.5 直到且包括 pH 11, 这取决于剂型和给药途径。在某些实施方案中, 药物组合物可包含缓冲剂以达到生理上相容的 pH。缓冲剂可包括能够在所需要的 pH 中缓冲的任何化合物, 例如磷酸盐缓冲液 (例如 PBS)、三乙醇胺、Tris、N-二(羟乙基)甘氨酸、TAPS、曲辛、HEPES、TES、MOPS、PIPES、卡可基酸盐、MES 等。在某些实施方案中, 缓冲液的浓度为至少 0.5mM、至少 1mM、至少 5mM、至少 10mM、至少 20mM、至少 30mM、至少 40mM、至少 50mM、至少 60mM、至少 70mM、至少 80mM、至少 90mM、至少 100mM、至少 120mM、至少 150mM 或至少 200mM。在一些实施方案中, 缓冲液的浓度不超过 300mM (例如至多 200mM、至多 100mM、至多 90mM、至多 80mM、至多 70mM、至多 60mM、至多 50mM、至多 40mM、至多 30mM、至多 20mM、至多 10mM、至多 5mM、至多 1mM)。

[1368] 本文公开的前药化合物可通过标准合成方法、重组 DNA 技术或任何制备肽和融合蛋白的其它方法制备。虽然某些非天然的氨基酸无法通过标准重组 DNA 技术表达, 但是其制备技术是本领域已知的。除标准肽化学反应以外, 适用时, 包括非肽部分的本发明的化合物可通过标准有机化学反应合成。

实施例

[1369] 通用聚乙二醇化方案: (Cys-马来酰亚胺基)

[1370] 通常, 将含有 Cys 的胰高血糖素相关肽溶于磷酸缓冲盐溶液 (5-10mg/ml), 加入 0.01 亚甲基二胺四乙酸 (总体积的 10-15%)。加入过量的 (2 倍) 马来酰亚胺基甲氧基 PEG 试剂 (Dow), 将反应物在室温下搅拌, 同时通过高效液相层析法 (HPLC) 监测反应进程。8-24 小时后, 使反应混合物酸化, 以梯度方式使用 0.1% 四氟乙酸 (TFA) / 乙腈, 加样至制备型反相柱进行纯化。合并合适的流分后冻干, 得到所需要的聚乙二醇化衍生物。

[1371] 实施例 1

[1372] 模型肽上二肽裂解半寿期 (PBS 中) 的测定

[1373] 使用模型六肽 (HSRGTF-NH₂; SEQ ID NO: 715) 作为模型以测定通过酰胺键与六肽连接的各种二肽的半寿期。在肽合成仪上装配该六肽。为了证实合成的完整性和可延伸 N 端的可得性, 结合肽的树脂通过氢氟酸 (HF) 裂解并进行分析。然后将 Boc-保护的肌氨酸和赖氨酸相继引入结合肽的树脂上以产生肽 A (二肽 + 模型肽)。肽 A 用 HF 裂解并通过制备型 HPLC 纯化。

[1374] 利用 HPLC 的制备型纯化

[1375] 在硅基 1x 25cm Vydac C18 (粒径 5 μ, 孔径大小 300Å) 柱上, 采用 HPLC 分析进行纯化。所采用的仪器为: Waters Associates 600 型泵、注射器 717 型和 UV 检测器 486 型。全部样品采用 230nm 波长。A 溶剂含有 10% CH₃CN/0.1% TFA/蒸馏水, B 溶剂含有 0.1% TFA/CH₃CN。采用线性梯度 (0-100% B, 2 小时内)。流速为 10mL/分钟, 流分大小为 4mL。通常从约 150mg 粗制肽中得到 30mg 纯的肽 (收率约 20%)。

[1376] 将肽 A 按 1mg/mL 浓度溶于磷酸缓冲盐溶液 (PBS) 缓冲液 (pH 7.4) 中。然后在水浴中于 37°C 温育。在不同的时间点 (5 小时、8 小时、24 小时、31 小时、47 小时) 收集分析样品, 用相同体积的 0.1% TFA 淬灭。采用 HPLC 监测裂解反应。数据通过液相层析-质谱法 (LC-MS) 进行定量监测, 并通过 HPLC Peak Simple Chromatography 软件进行定量分析, 得到前药修饰物的保留时间和相对峰面积。

[1377] 采用质谱法进行分析

[1378] 质谱采用具有标准电子喷雾电离 (ESI) 离子源的 Sciex API-III 电喷雾四极质谱仪获得。使用的电离条件如下: ESI 为正离子模式; 离子喷雾电压, 3.9kV; 喷孔电位, 60V。所使用的喷雾气和气帘气 (curtain gas) 为氮气, 流速 0.9L/ 分钟。以每步 0.5Th 和 2msec 停留时间由 600-1800Thompsons (Th) 记录质谱。将样品 (约 1mg/mL) 溶于含 1% 乙酸的 50% 乙腈水溶液中, 并通过外部注射泵以 5 μ L/ 分钟速率引入。

[1379] 如果在 PBS 溶液中通过 ESI-MS 对肽进行分析, 则按照生产商的说明书 (Millipore Corporation, Billerica, MA, 参见 <http://www.millipore.com/catalogue.nsf/docs/C5737>), 使用装有 0.6 μ LC4 树脂的 ZipTip 固相提取头 (extraction tip), 先对肽进行脱盐。

[1380] 采用 HPLC 进行分析

[1381] 采用 214nm 下的 UV 检测器和 150mm x 4.6mm C8Vydac 柱, 使用 Beckman System Gold Chromatography 系统进行 HPLC 分析。流速为 1mL/ 分钟。A 溶剂含有 0.1% TFA/ 蒸馏水, B 溶剂含有 0.1% TFA/90% CH₃CN。采用线性梯度 (0% -30% B, 10 分钟内)。采集数据, 并应用 Peak Simple Chromatography 软件进行分析。

[1382] 采用裂解的初速度以测定相应前药的解离速率常数。由其峰面积估算各不同收集时间的前药和药物的浓度, 分别为 'a' 和 'b' (参见表 1)。通过对不同时间间隔的前药浓度的对数作图求出前药的一级解离速率常数。该图的斜率给出速率常数 'k'。然后运用公式 $t_{1/2} = 0.693/k$ 计算出各种前药降解的半寿期。

[1383] 表 1. PBS 中 A 肽 (lys-sar-HSRGTF-NH₂) 裂解的 HPLC 和 LC-MS 数据

[1384]

	5 小时		8 小时		24 小时		31 小时		47 小时	
HPLC 峰	a	b	a	b	a	b	a	b	a	b
保留时间 (分钟)	4.3	4.8	4.2	4.7	4.3	4.8	4.3	4.8	4.3	4.8
分子量	702	902	702	902	702	902	702	902	702	902
相对峰 面积(%)	26.5	73.5	28.9	71.1	28.8	71.2	77.7	22.3	90.0	10.0

[1385] 运用公式 $t_{1/2} = 0.693/k$ 计算各种前药降解的半寿期, 计算出模型肽 HSRGTF-NH₂ (SEQ ID NO: 715) 上 lys-sar 组合的半寿期为 14.0 小时。

[1386] 实施例 2

[1387] D- 模型肽上二肽裂解半寿期 (血浆中) 的测定

[1388] 使用另一种模型六肽 (dHdTdRGdTdF-NH₂ SEQ ID NO: 716) 作为测定血浆中二肽组合的半寿期的模型。使用 D 氨基酸防止模型肽除前药裂解以外的其它酶促切割。通过自动合成仪合成六肽。为了证实适当延伸的 N 端可用于前药修饰, 结合肽的树脂用 HF 裂解以检查有效性。然后将 Boc- 保护的肌氨酸和赖氨酸相继引入结合肽的树脂。肽 B (二肽 +d- 模型肽) 用 HF 裂解, 并通过制备型 HPLC 纯化。

[1389] 采用 HPLC 进行制备型纯化

[1390] 在硅基 1x 25cm Vydac C18(粒径 5 μ , 孔径大小 300Å) 柱上, 采用 HPLC 分析进行纯化。所采用的仪器为: Waters Associates 600 型泵, 注射器 717 型, UV 检测器 486 型。全部样品采用 230nm 波长。A 溶剂含有 10% CH₃CN/0.1% TFA/ 蒸馏水, B 溶剂含有 0.1% TFA/CH₃CN。采用线性梯度 (0-100% B, 2 小时内)。流速为 10mL/ 分钟, 流分大小为 4mL。通常从约 150mg 粗制肽获得 30mg 纯的肽 (收率约 20%)。

[1391] 将肽 B 以 2mg/mL 的浓度溶于血浆 (pH 7.4) 中。然后在 37°C 水浴中温育。在不同的时间点 (5 小时、11 小时、24 小时、32 小时、48 小时) 收集分析样品。样品用 10 倍体积的 0.1% TFA/ACN 处理后, 以 3000rpm 离心。收集上清液, 用相同体积的 0.1% TFA/H₂O 稀释。采用 HPLC 监测裂解反应。通过 LC-MS 定量监测数据, 并通过 HPLC Peak Simple Chromatography 软件进行定量分析, 得到保留时间和相对峰面积。

[1392] 采用质谱法进行分析

[1393] 采用具有标准 ESI 离子源的 Sciex API-III 电喷雾四极质谱仪得到质谱。使用的电离条件如下: ESI 为正离子模式; 离子喷雾电压, 3.9kV; 喷孔电位, 60V。所使用的喷雾气和气帘气为氮气, 流速 0.9L/ 分钟。自 600-1800Thompsons 以每步 0.5Th 和 2msec 停留时间记质谱录。将样品 (约 1mg/mL) 溶于含 1% 乙酸的 50% 乙腈水溶液中, 并通过外部注射泵以 5 μ L/ 分钟速率引入。

[1394] 采用 HPLC 进行分析

[1395] 采用 214nm 下的 UV 检测器和 150mm x 4.6mm C8Vydac 柱, 使用 Beckman System Gold Chromatography 系统进行 HPLC 分析。流速为 1mL/ 分钟。A 溶剂含有 0.1% TFA/ 蒸馏水, B 溶剂含有 0.1% TFA/90% CH₃CN。采用线性梯度 (0% -30% B, 10 分钟内)。采集数据, 并应用 Peak Simple Chromatography 软件进行分析。

[1396] 采用裂解的初速度以测定相应前药的解离速率常数。由其峰面积估算各个不同收集时间的前药和药物的浓度, 分别为 'a' 和 'b' (参见表 2)。通过对不同时间间隔的前药浓度的对数作图求出前药的一级解离速率常数。该图的斜率给出速率常数 'k'。然后运用公式 $t_{1/2} = 0.693/k$ 计算出各种前药降解的半寿期。

[1397] 表 2. 血浆中 B 肽 (lys-sar-dHdTDRGdTdF-NH₂) 裂解的 HPLC 和 LC-MS 数据

[1398]

	5 小时		11 小时		24 小时		32 小时		48 小时	
HPLC 峰	a	b	a	b	a	b	a	b	a	b
保留时间 (分钟)	5.7	6.2	5.8	6.3	5.7	6.2	5.7	6.2	5.7	6.2
分子量	702	902	702	902	702	902	702	902	702	902
相对峰面 积(%)	17.0	83.0	29.2	70.8	60.2	39.8	54.0	46.0	27.6	72.4

[1399] 然后运用公式 $t_{1/2} = 0.693/k$ 计算出各种前药降解的半寿期。运用该公式, 测出血浆中 D- 模型肽 dHdTDRGdTdF-NH₂ (SEQ ID NO: 716) 上 Lys-Sar 组合的半寿期为 18.6 小

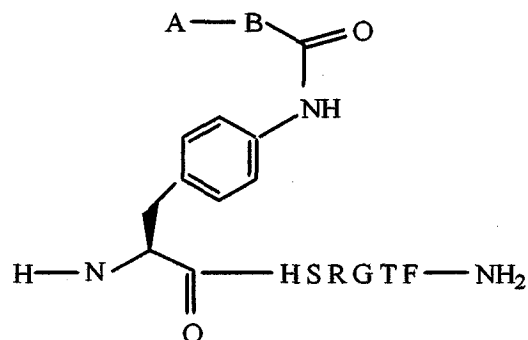
时。

[1400] 实施例 3

[1401] 采用实施例 1 中所述方法,测定了与模型六肽 (HSRGTF-NH₂;SEQ ID NO:715) 连接的各种其它二肽的裂解半寿期。这些实验中得到的数据见表 3 和表 4。

[1402] 表 3. PBS 中与模型六肽 N 端对氨基 -Phe 的侧链连接的二肽 A-B 的裂解

[1403]



化合物	A (氨基酸)	B (氨基酸)	t _{1/2}
1	F	P	58 小时
2	羟基-F	P	327 小时
3	d-F	P	20 小时
4	d-F	d-P	39 小时
5	G	P	72 小时
6	羟基-G	P	603 小时
7	L	P	62 小时
8	叔-L	P	200 小时
9	S	P	34 小时
10	P	P	97 小时
11	K	P	33 小时
12	dK	P	11 小时
13	E	P	85 小时
14	Sar	P	约 1000 小时
15	Aib	P	69 分钟
16	羟基-Aib	P	33 小时
17	环己烷	P	6 分钟
18	G	G	无裂解

[1404]

19	羟基-G	G	无裂解
20	S	N-甲基-Gly	4.3 小时
21	K	N-甲基-Gly	5.2 小时
22	Aib	N-甲基-Gly	7.1 分钟
23	羟基-Aib	N-甲基-Gly	1.0 小时

[1405] 表 4. PBS 中与模型六肽 (X_1 -S R G T F-NH₂ (SEQ ID NO :732)) 1 位上的可变氨基酸 (X_1) 连接的二肽 A-B 的裂解

[1406] NH₂-A-B- X_1 -S R G T F-NH₂

[1407]

化合物	A (氨基酸)	B (氨基酸)	X_1 (氨基酸)	$t_{1/2}$
1	F	P	H	无裂解
2	羟基-F	P	H	无裂解
3	G	P	H	无裂解
4	羟基-G	P	H	无裂解
5	A	P	H	无裂解
6	C	P	H	无裂解
7	S	P	H	无裂解
8	P	P	H	无裂解
9	K	P	H	无裂解
10	E	P	H	无裂解
11	脱氢 V	P	H	无裂解
12	P	d-P	H	无裂解
13	d-P	P	H	无裂解
14	Aib	P	H	32 小时
15	Aib	d-P	H	20 小时
16	Aib	P	d-H	16 小时
17	环己基-	P	H	5 小时
18	环丙基-	P	H	10 小时
19	N-Me-Aib	P	H	>500 小时
20	α,α -二乙基-Gly	P	H	46 小时

[1408]

21	羟基-Aib	P	H	61 小时
22	Aib	P	A	58 小时
23	Aib	P	N-甲基-His	30 小时
24	Aib	N-甲基-Gly	H	49 分钟
25	Aib	N-乙基-Gly	H	10 分钟
26	Aib	氮杂环丁烷-2-甲酸	H	>500 小时
27	G	N-甲基-Gly	H	104 小时
28	羟基-G	N-甲基-Gly	H	149 小时
29	G	N-乙基-Gly	H	70 小时
30	dK	N-甲基-Gly	H	27 小时
31	dK	N-甲基-Ala	H	14 小时
32	dK	N-甲基-Phe	H	57 小时
33	K	N-甲基-Gly	H	14 小时
34	F	N-甲基-Gly	H	29 小时
35	S	N-甲基-Gly	H	17 小时
36	P	N-甲基-Gly	H	181 小时

[1409] 实施例 4

[1410] 胰高血糖素和 GLP-1 类似物的合成

[1411] 为了研究制备胰高血糖素和 GLP-1 的生物活性衍生物的可能性,合成了大量的肽类似物。这里简单描述了该标准方法,有关详情见后。

[1412] 材料:

[1413] PAM 树脂 (PAM 树脂为 OCH_2 - 苯基乙酰氨基甲基 - 聚苯乙烯 -1% 二乙烯基苯共聚物)、(100-180 目,1% DVB 交联的聚苯乙烯;载荷 0.7-1.0mmol/g), Boc 保护的氨基酸和 Fmoc 保护的氨基酸购自 Midwest Biotech。其它试剂例如 α -羟基-酸 (苯基乳酸和乙醇酸) 购自 Aldrich。使用 Boc 保护的氨基酸在 Applied Biosystem 430A 肽合成仪上进行固相肽合成。采用 Applied Biosystems 433 型肽合成仪进行 Fmoc 保护的氨基酸合成。采用类似的方法,在烧结的反应容器中进行酯肽的手工合成 (Schnolzer, M. 等 (1992) Int J Pept Protein Res 40(3-4):180-193)。

[1414] 肽合成 (Boc 氨基酸 /HF 裂解):

[1415] 这些类似物的合成在 Applied Biosystem 430A 型肽合成仪上进行。通过相继添加氨基酸来构建合成肽,通过将 1.9mmol (3.8mL 的 0.5M 溶液) 3-(二乙氧基-磷酸基氧基)-3H- 苯并 [d][1,2,3] 三嗪-4-酮 (DEPBT) 的 DMF 溶液加入含有 2mmol Boc 保护的氨基酸的柱体中,来产生每种氨基酸的活性酯。通过将氮气通往柱体使氨基酸溶解。将 1mL N, N'-二异丙基乙胺加入柱体中促使酯形成。将该溶液转移到含有 0.2mmol 与 PAM 树脂连

接的 C 端残基的反应容器中, 涡旋混合若干次, 使之与树脂偶联 10 分钟。洗涤除去未反应的试剂后, 通过用三氟乙酸 (TFA) 处理 5 分钟除去 N 端 Boc 保护基。树脂用 DMF 洗涤, 重复循环所需要的步骤次数直至装配成链。在合成结束时 (通常 30 个氨基酸), 反应容器含有约 1.2-1.5g 保护的肽基 -PAM 树脂。树脂用二甲基甲酰胺 (DMF) 洗涤多次, 用三氟乙酸处理除去最后的 t-Boc 保护基, 最后再用 DMF、二氯甲烷 (DCM) 洗涤若干次后干燥。

[1416] 将肽基 - 树脂用无水 HF 处理 (所述方法将在本部分之后详述), 这通常得到约 350mg (收率约 50%) 粗制的脱保护肽。

[1417] 肽合成 (Fmoc 氨基酸 /HF 裂解):

[1418] 在选择有位点上用几个氨基酸手工进行该合成方案。在该研究中, 仅使用 Fmoc 氨基酸来合成内部丝氨酸前药作为更广泛的合成策略的组成部分。在这一点上要注意的是, 虽然将 Fmoc 化学法用于合成, 但是肽总是在 PAM 树脂上制备, 这需要 HF 处理以将肽从固相支持体上裂解。这些肽的收率与较早前 Boc/PAM 合成中所述的大致一样。

[1419] 按前述部分所述方法进行合成。在偶联步骤结束时, 肽基 - 树脂用 20% 哌啶处理除去 N 端 Fmoc 保护基。重复用 DMF 洗涤, 重复该重复循环达所需要的偶联步骤次数。在整个合成结束时, 使用 DCM 将肽基 - 树脂干燥, 并用无水 HF 将肽从树脂上裂解。

[1420] 酯肽合成 (氨基酸酯形成)

[1421] 在这种情况下, 肽基 - 树脂具有 α -羟基 -N 端突出端而不是 N 端胺, 且酰化在 α -羟基上进行。该反应比酰胺键形成的反应需要更长的时间, 因为与胺相比, 羟基是较弱的亲核体。反应时间通常为 12 小时。

[1422] 最初, 通过将 1mmol (0.155mL 二异丙基碳二亚胺 (DIC) 加入柱体中来形成每种氨基酸的活性酯, 该柱体装有含 2mmol Boc 保护的氨基酸残基的 2mL DCM 溶液。使该柱体冷却至 10°C 达 10 分钟后, 将 0.9mmol (244mg) 二甲基氨基吡啶 (DMAP) 加入柱体中加快酯形成。将该混合物转移到装有肽在其之上合成的肽基 - 树脂的反应容器中。搅拌反应容器 12 小时。

[1423] 用 DCM 使肽基 - 树脂干燥, 并继续所需肽的合成。在整个合成结束时, 用 DCM 使肽基 - 树脂干燥, 最后用无水 HF 处理, 得到所需要的肽。

[1424] N 端羟基肽合成 (α -羟基 -N 端突出端)

[1425] 在该反应中, 使肽基 - 树脂的游离胺与 α -羧酸反应形成 α -羟基 -N 端突出端。在这一方面, 使用这两种 α -羧酸, 即乙醇酸 (OH- 甘氨酸) 和苯基乳酸 (OH- 苯丙氨酸)。这些合成也可手工进行。通过加入 α -羧酸来构建肽后, 通过将 0.9mmol DEPBT (270mg) 加到柱体中来产生 α -羧酸的活性酯, 该柱体装有含 1mmol Boc 保护的残基的 2mL DMF 溶液。将 DIEA (N,N-二异丙基乙胺, 0.5mL) 加入柱体中加快酯形成。将该混合物转移到装有肽在其之上合成的肽基 - 树脂的反应容器中。反应时间为 6 小时。

[1426] 用 DCM 使肽基 - 树脂干燥, 并继续所需肽的合成。在整个合成结束时, 肽基 - 树脂用 DCM 干燥, 通过无水 HF 裂解, 得到游离肽。

[1427] 肽基 - 树脂的 HF 处理

[1428] 将肽基 - 树脂 (30mg-200mg) 放入用于裂解的氟化氢 (HF) 反应容器中。将 500 μ L 对甲酚加入容器中作为碳鎓离子清除剂。将容器与 HF 系统连接, 并浸于甲醇 / 干冰混合物中。容器用真空汞抽真空, 将 10mL HF 馏入反应容器中。将该肽基 - 树脂和 HF 的反应混

合物于 0℃ 搅拌 1 小时,之后抽真空,并快速使 HF 蒸发 (10-15 分钟)。小心取出容器,充入约 35mL 乙醚使肽沉淀后,萃取对甲酚和由 HF 处理产生的小分子有机保护基。将该混合物用特氟隆过滤器过滤,重复 2 次以除去全部过量的甲酚。弃去该滤液。将沉淀的肽溶于约 20mL 10% 乙酸 (水溶液) 中。收集这种含有所需要的肽的滤液后冻干。

[1429] 采用质谱法进行分析

[1430] 采用具有标准 ESI 离子源的 Sciex API-III 电喷雾四极质谱仪获得质谱。使用的电离条件如下:ESI 为正离子模式;离子喷雾电压,3.9kV;喷孔电位,60V。所使用的喷雾气和气帘气为氮气,流速 0.9L/分钟。以每步 0.5Th 和 2msec 停留时间由 600-1800Thompsons 记录质谱。将样品 (约 1mg/mL) 溶于含 1% 乙酸的 50% 乙腈水溶液中,并通过外部注射泵以 5 μ L/分钟速率引入。

[1431] 如果在 PBS 溶液中通过 ESI-MS 对肽进行分析,则按照生产商的说明书 (Millipore Corporation, Billerica, MA, 参见 Millipore 的万维网网址 millipore.com/catalogue.nsf/docs/C5737),使用装有 0.6 μ LC4 树脂的 ZipTip 固相提取头,先对肽进行脱盐。

[1432] 高效液相层析法 (HPLC) 分析:

[1433] 在磷酸缓冲盐溶液 (PBS) 缓冲液 (pH, 7.2) 中采用高效液相层析法 (HPLC) 和 MALDI 分析,对这些粗制肽大致的相对转化速率进行了初步分析。将粗制肽样品以 1mg/mL 的浓度溶于 PBS 缓冲液中。将 1mL 所得溶液保存在 1.5mL HPLC 小瓶中,然后密闭,并于 37℃ 温育。在不同的时间间隔取出 100 μ L 的等分量,冷却至室温后通过 HPLC 分析。

[1434] 使用在 214nm 下的 UV 检测器,采用 Beckman 系统 Gold Chromatography 系统进行了 HPLC 分析。HPLC 分析在 150mm x 4.6mm C18 Vydac 柱上进行。流速为 1mL/分钟。A 溶剂含有 0.1% TFA/蒸馏水, B 溶剂含有 0.1% TFA/90% CH₃CN。采用线性梯度 (40% -70% B, 15 分钟内)。采集数据,并应用 Peak Simple Chromatography 软件进行分析。

[1435] 最初的水解速度用来测定相应前药解离的速率常数。分别由其峰面积估算前药和药物的浓度。通过对不同时间间隔的前药浓度的对数作图求出前药的一级解离速率常数。该图的斜率给出速率常数 'k'。然后运用公式 $t_{1/2} = 0.693/k$ 计算出各种前药降解的半寿期。

[1436] 采用 HPLC 进行制备型纯化

[1437] 一旦鉴定出显示适当 $t_{1/2}$ 的前药时,便对前药进行纯化。采用 HPLC 分析法在硅基 1x 25cm Vydac C18 (5 μ 粒径, 300Å^o 孔径大小) 柱上进行纯化。所采用的仪器为: Waters Associates 600 型泵, 注射器 717 型, UV 检测器 486 型。全部样品都使用 214nm 的波长。A 溶剂含有 10% CH₃CN/0.1% TFA/蒸馏水, B 溶剂含有 0.1% TFA/CH₃CN。采用线性梯度 (0-100% B, 2 小时内)。流速为 1.2mL/分钟, 流分大小为 6mL。通常从约 350mg 粗制肽得到 80mg 的纯肽 (收率约 23%)。

[1438] 实施例 5

[1439] 生物测定实验设计:用于 cAMP 检测的基于萤光素酶的报告基因测定法

[1440] 在基于萤火虫萤光素酶的报告基因测定法中测定了各胰高血糖素和 GLP-1 类似物或前药诱导 cAMP 的能力。诱导的 cAMP 产生与其受体结合的胰高血糖素或 GLP-1 成正比。生物测定法采用 HEK293 细胞,其分别共转染有胰高血糖素或 GLP-1 受体,以及与 cAMP 效应元件连接的萤光素酶基因。

[1441] 通过在补充了 0.25 % 牛生长血清 (Bocine Growth Serum) (HyClone, Logan, UT) 的 Dulbecco 极限必需培养基 (Dulbecco Minimum Essential Medium) (Incitrogen, Carlsbad, CA) 中培养 16 小时使细胞耗尽血清, 然后在 96 孔聚-D-赖氨酸包被的“Biocoat”板 (BD Biosciences, San Jose, CA) 中, 与 GLP-1 类似物或前药的系列稀释液于 37℃、5 % CO₂ 温育 5 小时。在温育结束时, 将 100 μL LucLite 发光底物试剂 (Pekin Elmer, Wellesley, MA) 加入各孔中。避光将板短暂震荡温育 10 分钟, 在 MicroBeta-1450 液体闪烁计数器 (Perkin-Elmer, Wellesley, MA) 上测定光输出量。运用 Origin 软件 (OriginLab, Northampton, MA) 计算有效的 50% 浓度 (EC₅₀)。

[1442] 实施例 6

[1443] 胰高血糖素相关肽基于酰胺的前药的生物活性

[1444] I) GLP-1

[1445] 在肽合成仪上装配 C²⁴GLP-1 (7-36) 肽 (HAEGTFTSDVSSYLEGQAAKEFICWLVKGR; SEQ ID NO: 717)。为了证实适当延伸的 N 端可用于前药修饰, 用 HF 裂解小比例的肽结合的树脂以检查合成的有效性。合成肽的质量为 3329.8 道尔顿。用实施例 5 中所述的 GLP-1-受体萤光素酶测定法测定 GLP-1 的受体结合活性。

[1446] II) 将二肽加至 GLP 的 N 端

[1447] 使二肽与胰高血糖素或 GLP-1 的 N 端共价连接以研究分子内环化和通过二酮哌嗪 (DKP) 形成而裂解的差异趋向性。

[1448] 无生物活性的二肽突出的 GLP-1 和胰高血糖素类似物随着 DKP 的形成在酰胺键裂解时转化成活性肽药物。可用肌氨酸 (Sar) 或脯氨酸作为 GLP-1 类似物 A-B 二肽中的氨基酸 ‘B’ 进行相同的转化。通过对式 I 二肽第一 (A) 和第二 (B) 氨基酸 α 碳上的取代基进行化学修饰, 来预测不同半寿期的前药。例如, 将包含脯氨酸和氨基-异丁酸 (Aib) 的二肽前药元件相继引入 C²⁴GLP (SEQ ID NO: 717) 中, 因此第一肽称为 Aib⁻¹-P⁰, C²⁴GLP (7-36), 其中肽的第一个氨基酸 (氨基酸 “Xaa⁻¹”) 为氨基-异丁酸, 第二氨基酸 (氨基酸 “Xaa⁰”) 为脯氨酸。下文中提及的所有肽将具有相同的系统命名。在氨基酸用在三字母氨基酸码后的上标位置数字来命名时, 每种合成化合物的立体化学结构都为 L-异构体, 除非另有说明。如较早前所述, 肽通过固相合成进行合成制备。合成通过 ESI-MS 分析 (3479.9 Da) 得到证实。

[1449] III) GLP-前药聚乙二醇化

[1450] 聚乙二醇化是一种保护肽并降低肽被肾清除的有益方法。因此, 对于下述实验, 通过迈克尔反应, 经由马来酰亚胺基-官能化 40k Da PEG, 在 Aib⁻¹-P⁰, C²⁴GLP (7-36) 的 24-Cys 的 -SH 基团上使前药 Aib⁻¹-P⁰, C²⁴GLP (7-36) 聚乙二醇化。聚乙二醇化胰高血糖素相关肽称为 40k PEG-Aib⁻¹-P⁰, C²⁴GLP (7-36)。该聚乙二醇化肽通过制备型 HPLC 纯化, 并通过 MALDI-TOF-MS (44000-46000, 宽峰) 证实。

[1451] IV) PBS 中的 GLP-1 活性

[1452] 为了研究可能形成的 DKP 和同时再生的母体药物, 将 40k PEG-Aib⁻¹-P⁰, C²⁴GLP (7-36) 在 PBS 缓冲液中于 37℃ 温育约 10 天。在不同的时间点上 (30 小时、54 小时、168 小时、240 小时) 收集样品。为研究二肽前药在通过 DKP 形成而裂解之后恢复的 GLP-1 活性, 采用生物测定法分析了所有收集的样品。更具体地讲, 用实施例 5 所述的 GLP-受体萤光素酶测定法测定了 GLP 前药的受体结合活性。

[1453] 表 5. PBS 中 40k PEG-Aib⁻¹-P⁰, C²⁴GLP (7-36) 在不同时间点的生物测定数据
[1454]

	GLP-STD	GLP-pro-30h	GLP-pro-54h	GLP-pro-168h	GLP-pro-240h
EC ₅₀ %	0. 20902	1. 2079	0. 75357	0. 37388	0. 31436
EC ₅₀ %/STD 比率	1	17. 31%	27. 74%	55. 90%	66. 49%

[1455] 然后,应用公式 $t_{1/2} = 0. 693/k$ 计算母体药物 40k PEG-Aib⁻¹-P⁰, C²⁴GLP (7-36) 在血浆中降解的半寿期,确定为 140 小时。

[1456] V) 血浆中 GLP-1 活性

[1457] 为了研究可能形成的 DKP 和同时再生的母体药物,将 dLys⁻¹-Sar⁰, C²⁴GLP (7-36) 在血浆中于 37℃温育约 30 小时。在不同时间点 (1 小时、12 小时、30 小时) 收集样品。为了研究二肽自 GLP-1 通过 DKP 形成而裂解后恢复的活性,采用生物测定法分析了所有收集的样品。更具体地讲,用实施例 5 所述的 GLP- 受体萤光素酶测定法测定了 GLP 前药的受体结合活性。

[1458] 表 6. 血浆中 dLys⁻¹-Sar⁰, C²⁴GLP (7-36) 在不同时间点的生物测定数据
[1459]

	GLP-STD	GLP-pro-1h	GLP-pro-10h	GLP-pro-30h
EC50%	0. 02039	0. 13933	0. 03948	0. 0233
EC ₅₀ %/STD 比率	1	14. 63%	51. 75%	87. 51%

[1460] 然后应用公式 $t_{1/2} = 0. 693/k$ 计算出母体药物 dLys⁻¹-Sar⁰, C²⁴GLP (7-36) 在血浆中降解的半寿期,确定为约 10 小时。

[1461] 实施例 7

[1462] 小鼠中胰高血糖素超家族肽前药的体内作用

[1463] 给饮食引起的肥胖症 (DIO) 小鼠腹膜内注射胰高血糖素超家族肽 (SEQ ID NO : 1-684、1701-1776、1801-1921), 一周剂。在最初注射下列物质后,每天给小鼠 (N = 8) 称重: 仅溶媒或约 0. 5nmol/kg、3nmol/kg、10nmol/kg、15nmol/kg 或 70nmol/kg 的胰高血糖素超家族肽,或胰高血糖素超家族肽的前药衍生物,其中二肽通过酰胺键与胰高血糖素超家族肽的 N 端连接,其中所述二肽为 Aib⁻¹Pro⁰、Aib⁻¹dPro⁰、Lys⁻¹Sar⁰、dAla⁻¹Pro⁰、Ac-Aib⁻¹Pro⁰、Lys⁻¹(X) Sar⁰(X 表示与 Lys 侧链连接的 1K PEG 链)、Lys⁻¹(Y) Sar⁰(Y 表示与 Lys 侧链连接的叔丁基甘氨酸)、dLys⁻¹Sar⁰、dLys⁻¹Gly (N- 己基)⁰ 或 dLys⁻¹F (N-Me)⁰ (按约 0. 5nmol/kg、3nmol/kg、10nmol/kg、15nmol/kg 或 70nmol/kg 给予)。在 0 分钟时间点,按 1. 5g/kg 体重的剂量注射包含 25% (v/v) 葡萄糖的盐溶液。在 -60 分钟、0 分钟、15 分钟、30 分钟、60 分钟和 120 分钟时间点测量血糖水平。在第 0 和 1 天测定了体重、食物摄取、血糖和体成分。

[1464] 实施例 8

[1465] 在给予胰高血糖素类似物的小鼠中诱导的体重减轻

[1466] 给饮食引起的肥胖症 (DIO) 小鼠腹膜内注射一周一次 15 或 70nmol/kg 剂量的胰高血糖素类似物。在最初注射下列物质后,每天给小鼠 (N = 8) 称重:仅溶媒▼;胰高血糖素超家族肽 A (“肽 A”), 15nmol/kg (▷) 或 70nmol/kg (▶);或其中二肽通过酰胺键与肽 A 的 N 端连接的肽 A 的前药衍生物,其中所述二肽为 Aib⁻¹Pro⁰ (按 15nmol/kg (○) 或 70nmol/kg (●) 给予)、Aib⁻¹dPro⁰ (按 70nmol/kg 给予 (◇))、Lys⁻¹Sar⁰ (按 70nmol/kg 给予 (◆))、dAla⁻¹Pro⁰ (按 70nmol/kg 给予 (◀)) 或 Ac-Aib⁻¹Pro⁰ (按 70nmol/kg 给予 (■))。实验结果见图 1。注意:化合物 Ac-Aib⁻¹Pro⁰ 肽 A 不能够裂解形成二酮哌嗪,但该化合物显示超出对溶媒所观察到的某种活性水平。据推测这是由低残留的前药活性所致。肽 A 是胰高血糖素的聚乙二醇化类似物,其包含相对于天然胰高血糖素 (SEQ ID NO:701) 的 7 个取代、C 端酰胺和用马来酰亚胺-官能化 40k Da PEG 进行的聚乙二醇化。

[1467] 图 2 图示饮食引起的肥胖症 (DIO) 小鼠的体重变化,将该小鼠腹膜内一周一次注射 0.5、3、15 或 70nmol/kg 剂量的仅溶媒 (◆)、肽 A (按 0.5 ▲、3 ▶、15 ▼ 或 70 ◀ nmol/kg/天) 或 Lys⁻¹Sar⁰ 肽 A (按 0.5 △、3 ▷、15 ▽ 或 70 ◁ nmol/kg/天)。在所有剂量下,两种药物似乎产生类似的作用,因此由加入二肽前药元件得到的益处似乎极微。这很可能是由于二肽的酶促切割和所给前药的快速活化所引起的。

[1468] 实施例 9

[1469] 使用胰高血糖素前药类似物进行的葡萄糖耐量试验

[1470] 给饮食引起的肥胖症 (DIO) 小鼠 (N = 8) 腹膜内注射 15 或 70nmol/kg 剂量的下列肽之一:

[1471] (A) 肽 A (按 15 ◁ 或 70 ◀ nmol/kg 天),

[1472] (B) Lys⁻¹Sar⁰ 肽 A (按 15 ▷ 或 70 ▶ nmol/kg/天), 或

[1473] (C) dLys⁻¹Sar⁰ 肽 A (按 15 □ 或 70 ■ nmol/kg/天)。

[1474] 在 0 分钟时间点,按 1.5g/kg 体重的剂量注射包含 25% (v/v) 葡萄糖的盐溶液。在 -60 分钟、0 分钟、15 分钟、30 分钟、60 分钟和 120 分钟时间点测量血糖水平。图 3 表示该实验的数据。

[1475] 图 4 图示在 -15 分钟时间点腹膜内注射仅溶媒 (▼) 或 2nmol/kg 剂量的下列化合物之一的 DIO 小鼠 (N = 8) 血糖水平 (mg/dL):

[1476] (A) Lys⁻¹Sar⁰ 肽 A (■),

[1477] (B) Lys⁻¹(X), Sar⁰ 肽 A (▲), (X 表示与 Lys 侧链连接的 1K PEG 链)

[1478] (C) Lys⁻¹(Y), Sar⁰ 肽 A (◆), (Y 表示与 Lys 侧链连接的叔丁基甘氨酸),

[1479] (D) dLys⁻¹Sar⁰ 肽 A (▶)。

[1480] 在 0 分钟时间点按 1.5g/kg 体重的剂量注射包含 25% (v/v) 葡萄糖的盐溶液。在 -15 分钟、0 分钟、15 分钟、30 分钟、60 分钟和 120 分钟时间点测量血糖水平。

[1481] 图 5 图示在先注射胰高血糖素相关肽然后注射葡萄糖溶液的 DIO 小鼠 (N = 8) 中的血糖水平 (mg/dL)。在 -15 分钟时间点给小鼠腹膜内注射溶媒 (▼)、20nmol/kg 剂量的 dLys⁻¹Sar⁰ 肽 A (▶) 或 0.67nmol/kg 剂量的下列化合物之一:

[1482] (A) Lys⁻¹Sar⁰ 肽 A (■),

[1483] (B) Lys⁻¹(X), Sar⁰ 肽 A(▲), (X 表示与 Lys 侧链连接的 1K PEG 链),

[1484] (C) Lys⁻¹(Y), Sar⁰ 肽 A(◆), (Y 表示与 Lys 侧链连接的叔丁基甘氨酸)。

[1485] 图 3-5 的数据表明, Lys⁻¹, Sar⁰ 二肽当与 N 端连接时不起前药元件的作用。然而修饰二肽的氨基酸, 特别是 D-氨基酸 (dLys⁻¹) 的取代保持化合物无活性 (据推测由于防止酶促切割引起)。然后, 前药将根据二肽前药元件的结构和立体化学结构和亲核体强度而被激活。如图 5 所示, 即使在高得多的剂量下 (20nmol/kg 剂量与 0.67nmol/kg 剂量相比), dLys⁻¹Sar⁰ 肽 A 也提供前药作用。

[1486] 实施例 10

[1487] 在 -60 分钟时间点, 给饮食引起的肥胖症 (DIO) 小鼠 (N = 8) 腹膜内注射 15 或 70nmol/kg 剂量的下列化合物之一:

[1488] (A) 肽 A(按 15 △或 70 ▲ nmol/kg/天),

[1489] (B) dLys⁻¹Sar⁰ 肽 A(按 15 □或 70 ■ nmol/kg/天), 或

[1490] (C) Lys⁻¹Sar⁰ 肽 A(按 15 ▷或 70 ► nmol/kg/天)。

[1491] 在 0 分钟和 24 小时, 按 1.5g/kg 体重的剂量, 腹膜内注射含 25% 葡萄糖的盐水。在 -60、0、15、30、60 和 120 时间点测量血糖水平。在第 0 和 1 天测量了体重、食物摄取、血糖和体成分, 其中每组 N = 8 只 DIO 小鼠, 初始平均体重为 55g。图 6 图示在 -60 分钟时间点腹膜内注射仅溶媒 (▼) 或 15 或 70nmol/kg 剂量的上述化合物的 DIO 小鼠 (N = 8) 的血糖水平 (mg/dL)。

[1492] 在 0 分钟时间点和 24 小时后, 按 1.5g/kg 体重的剂量注射包含 25% (v/v) 葡萄糖的盐溶液。在相对于第一次给予葡萄糖溶液 (即 0 分钟时间点) 的 -60 分钟、0 分钟、15 分钟、30 分钟、60 分钟和 120 分钟时间点上, 测量了标示的血糖水平。

[1493] 图 7 图示在 -60 分钟时间点腹膜内注射仅溶媒 (▼) 或 15 或 70nmol/kg 剂量的下列化合物之一的 DIO 小鼠 (N = 8) 的血糖水平 (mg/dL):

[1494] (A) 肽 A(按 15 △或 70 ▲ nmol/kg/天),

[1495] (B) dLys⁻¹Sar⁰ 肽 A(按 15 ◇或 70 ∇ nmol/kg/天), 或

[1496] (C) Lys⁻¹Sar⁰ 肽 A(按 15 ◆或 70 ■ nmol/kg/天)。

[1497] 在 0 分钟时间点和 24 小时后按 1.5g/kg 体重的剂量注射包含 25% (v/v) 葡萄糖的盐溶液。在相对于 24 小时给予第二次葡萄糖溶液的 0 分钟、15 分钟、30 分钟、60 分钟和 120 分钟时间点上, 测量了标示的血糖水平。

[1498] 图 8 显示腹膜内注射 15 或 70nmol/kg 剂量的所示化合物的 DIO 小鼠 (N = 8) 的体重减轻。在给予化合物后 7 天测定了标示体重。

[1499] 实施例 11

[1500] 在按 1.5g/kg 体重注射含 25% 葡萄糖的盐水进行葡萄糖攻击前 24、8、4 或 1 小时, 给饮食引起的肥胖症 (DIO) 小鼠 (N = 8) 腹膜内注射仅溶媒或 15nmol/kg 剂量的前药肽。在相对于用葡萄糖溶液攻击的 0、15、30、60 和 120 分钟时间点上, 测定了标示的血糖水平。研究结果见图 9, 图中表明与溶媒对照相比, Lys⁻¹Sar⁰ 肽 A(图 9A) 和 dLys⁻¹Sar⁰ 肽 A(图 9B) 两者降低血糖升高。两种前药结果间的比较表明, 相对于前药已循环的时间, 起始血糖控制的效率之间的差异。在给予“d”立体异构体的小鼠中, 当在攻击前 1 小时给予前药时, 血糖的起始控制 (即早期时间点) 不佳, 当在攻击很早之前给予时较好 (例如当前药在 8 和 24

小时时间点给予时起始控制最好)。该研究支持这样的结论:与包含“1”立体异构体的前药相比,包含“d”立体异构体的前药在较长的时期内保持无活性形式。

[1501] 实施例 12

[1502] 按照下列方法,合成了胰高血糖素超家族肽 B(“肽 B”)和胰高血糖素超家族肽 C(“肽 C”)的 3 种前药:

[1503] 1) dK-Sar-肽 C,其中 dK 为 Lys 的 D 同工型, Sar 为肌氨酸,肽 C 为包含相对于天然胰高血糖素 (SEQ ID NO:701) 有 8 个取代、C 端酰胺并用碘乙酰基-官能化 40k Da PEG 聚乙二醇化的胰高血糖素类似物。

[1504] 采用固相肽合成法装配肽序列。在最后一个残基 His 偶联和脱去保护后,使肽结合的树脂在室温下与 5 倍过量的含 Boc-肌氨酸、DEPBT 和 DIEA 的 DMF 溶液反应 6 小时。通过茚三酮试验监测反应。完成偶联后,树脂于是用 DMF 和 DCM 洗涤 3 次。通过 TFA 除去 Boc 保护。树脂用 DCM、DMF 洗涤后用 DIEA 中和。在室温下,使树脂结合的肽与 5 倍 Boc-dLys、DEPBT 和 DIEA 进一步反应过夜。然后树脂用 TFA 处理除去 Boc 保护,并用 DCM、DMF 洗涤。最后,树脂用含 20% 哌啶的 DMF 处理除去 ²⁵Trp 上的甲酰基后,真空干燥。通过与 HF 于 4℃ 反应 1 小时最终使肽裂解后,用无水乙醚沉淀。过滤后,使肽溶于含 20% 乙腈 (MeCN) 的水中,并冻干成粉末。肽用制备型 HPLC 纯化 (C5 柱;流速 10ml/分钟;缓冲液 A:含 10% MeCN 和 0.1% TFA 的水;缓冲液 B:0.1% TFA/ACN;线性梯度 B% 0-40% (0-80 分钟))。化合物通过 ESI-MS 得到证实 (3612.8 道尔顿)。

[1505] 所得肽通过碘乙酰基-官能化 40k Da PEG 在 24-Cys 巯基上聚乙二醇化。将肽于 4℃ 溶于 4M 脲/50nM Tris 缓冲液 (pH 6.6) 中过夜。聚乙二醇化肽用制备型 HPLC 纯化,通过 MALDI-TOF-MS 证实了结构特征 (44000-46000, 宽峰)。

[1506] 2) dK-Gly(N-己基)-肽 B,其中 dK 为 Lys 的 D-同工型, Gly(N-己基)为 N-己基-甘氨酸,肽 B 为包含相对于天然胰高血糖素 (SEQ ID NO:701) 有 8 个取代、C 端酰胺和马来酰亚胺-官能化 40k Da PEG 聚乙二醇化的胰高血糖素类似物。

[1507] 采用固相肽合成法装配肽序列。使肽结合的树脂在室温下与 5 倍过量的含溴乙酸、DIC 和 HOBT 的 DMF 反应 2 小时。在显示阴性茚三酮试验结果后,于是将树脂用 DMF 和 DCM 洗涤 3 次。然后在室温下,使树脂与 10 倍过量的含正己胺和 DIEA 的 DMF 反应过夜。在室温下,使树脂结合的肽与 5 倍 Boc-dLys、DEPBT 和 DIEA 进一步反应过夜。树脂然后用 DMF 和 DCM 洗涤 3 次。在室温下使树脂结合的肽与 5 倍 Boc-dLys、DEPBT 和 DIEA 进一步反应 24 小时。将树脂用 TFA 处理除去 Boc 保护后,用 DCM 和 DMF 洗涤。最后,树脂用含 20% 哌啶的 DMF 处理除去 ²⁵Trp 上的甲酰基后,真空干燥。通过与 HF 于 4℃ 反应 1 小时,最终使肽裂解,并使用无水乙醚沉淀。过滤后使用 20% MeCN 的水溶液将肽再次溶解,并冻干成粉末。肽用制备型 HPLC 纯化 (C5 柱;流速 10ml/分钟;A 缓冲液为含 10% MeCN 和 0.1% TFA 的水;B 缓冲液 0.1% TFA/MeCN;线性梯度 B%:0-40% (0-80 分钟))。化合物通过 ESI-MS 得到证实,质量为 3677.0 道尔顿。

[1508] 所得肽用马来酰亚胺-官能化 40k Da PEG 在 24-Cys 巯基上聚乙二醇化。将肽于 4℃ 溶于 4M 脲/50nM Tris 缓冲液 (pH 6.6) 中过夜。聚乙二醇化肽用制备型 HPLC 纯化,通过 MALDI-TOF-MS 证实了结构特征 (44000-46000, 宽峰)。

[1509] dK-F(N-Me)-肽 C,其中 dK 为 Lys 的 D-同工型, F(N-Me) 为 N-甲基-Phe,肽 C 为

包含相对于天然胰高血糖素 (SEQ ID NO:701) 有 8 个取代、C 端酰胺和用碘乙酰基 - 官能化 40kDa PEG 聚乙二醇化的胰高血糖素类似物。采用固相肽合成法装配肽序列。在室温下, 使肽结合的树脂与 5 倍过量的 N- 甲基苯基丙氨酸、DEPBT 和 DIEA 的 DMF 溶液反应 6 小时。在显示阴性茚三酮试验结果后, 树脂于是用 DMF 和 DCM 洗涤 3 次。树脂然后用 TFA 处理除去 Boc 保护, 用 DCM 和 DMF 洗涤, 并用 DIEA 中和。在室温下, 使树脂结合的肽与 5 倍 Boc-dLys、DEPBT 和 DIEA 进一步反应过夜。树脂然后用 TFA 处理除去 Boc 保护后, 用 DCM 和 DMF 洗涤。最后, 树脂用 20% 哌啶的 DMF 溶液处理除去 ²⁵Trp 上的甲酰基后, 真空干燥。在 4℃ 下使用 HE 达 1 小时最终使肽裂解, 并用无水乙醚沉淀。过滤后, 用 20% MeCN 的水溶液使肽再次溶解, 并冻干成粉末。肽用制备型 HPLC 纯化。HPLC 条件: C5 柱; 流速 10ml/ 分钟; A 缓冲液为含 10% MeCN 和 0.1% TFA 的水; B 缓冲液 0.1% TFA/MeCN; 线性梯度 B%: 0-40% (0-80 分钟); 在约 33% B 时收集 PEG- 胰岛素或类似物。所需化合物通过 ESI-MS 得到证实, 质量为 3701.0 道尔顿。

[1510] 所得肽通过碘乙酰基 - 官能化的 40k Da PEG 在 24-Cys 巯基上聚乙二醇化。将肽于 4℃ 溶于 4M 脲 / 50mM Tris 缓冲液 (pH 6.6) 中过夜。聚乙二醇化肽用制备型 HPLC 纯化, 通过 MALDI-TOF-MS 证实了结构特征 (44000-46000, 宽峰)。

[1511] 采用类似方法合成包含与 SEQ ID NO:1-684、701-731、801-919、1001-1262、1301-1371、1401-1518、1701-1776 和 1801-1921 中任一个连接的 dLys-N- 甲基 - 甘氨酸、dLys-N- 己基 - 甘氨酸和 dLys-N- 甲基 - 苯丙氨酸的前药。

[1512] 实施例 13

[1513] 测试了实施例 12 所述的 3 种前药在饮食引起的肥胖症 (DIO) 小鼠 (品系: C57B16) 中的体内作用。给 9 组每组 8 只小鼠 (初始平均体重为 44.5g) 皮下注射仅溶媒或 10nmol/kg 实施例 12 的前药肽或母体肽 (缺乏二肽前药部分的非前药形式)。小鼠为 5.5 月龄, 接受高脂饮食达约 2 个月。注射后 0、2、4、24 和 72 小时, 测定血糖水平 (图 11)。注射后监测体重一周, 并在第 0、1、3、5 和 7 天测量, 其中第 0 天为注射日 (图 12)。在一周长的研究期间还监测了食物摄取和脂肪量。

[1514] 与接受溶媒对照的小鼠相比, 接受母体肽、含 dK-Sar 的前药或 dK-Gly (N- 己基) 前药的小鼠体重随研究进程稳定下降。正如预期的一样, 接受母体肽的体重减轻最大, 这就表明以较高剂量给予前药可达到与母体肽相同的效果。

[1515] 母体肽的血糖水平变化 (第 7 天 - 第 0 天水平) 最大, 但与溶媒对照相比, dK-Sar 和 dK-Gly (N- 己基) 前药也产生明显的下降。

[1516] 实施例 14

[1517] DKP 形成的速率受二肽前药 A-B 氨基酸 'B' 的侧链和 / 或 α - 胺的取代的调节。表 7 表示使用得自实施例 12 的 dK-Sar 和 dK-Gly (N- 己基)、dK-F (N-Me) 前药时 DKP 形成的速率。

[1518] 表 7. DKP 形成速率的调节

[1519]

dK-B-胰高血糖素超家族肽		
二肽前药的氨基酸“B”	t _{1/2} (h)	胰高血糖素超家族肽
Gly-N(Me)	27	肽 C
Gly-N(己基)	14	肽 B
Phe-N(Me)	60	肽 C

[1520] 实施例 15

[1521] 采用实施例 5 中所述的 GLP-受体萤光素酶测定法,测定了下列肽和前药在 20% 人血浆中随时间变化的受体结合活性:

[1522] (A) GLP-1 (SEQ ID NO:703),

[1523] (B) 肽 C,

[1524] (C) dLys⁻¹Sar⁰ 嵌合体肽 C, 或

[1525] (D) dLys⁻¹Gly(N-己基)⁰ 肽 B。

[1526] 如表 8 所示, dLys⁻¹Sar⁰ 和 dLys⁻¹Gly(N-己基)⁰ 前药的活性随时间逐渐提高, 在 48 小时内与天然 GLP-1 的相当 (图 13A 和 13B)。

[1527] 表 8. 时间对前药向活性药物的转化的作用

[1528]

	0 小时 *	24 小时	48 小时	72 小时
肽 C	100%	77.3%	77.3%	81.0%
dLys ⁻¹ Sar ⁰ 肽 C	5.7%	104.5%	287.5%	246.4%
dLys ⁻¹ Gly(N-己基) ⁰ 肽 B	21.1%	122.0%	277.2%	254.1%

[1529] *5 小时温育测定

[1530] 实施例 16

[1531] 给瘦型饮食引起的肥胖症小鼠 (N = 14, 品系: C57B16WT)) 一周一次皮下注射 3、10 或 30nmol/kg 剂量的溶媒或下列化合物之一:

[1532] (A) 肽 C,

[1533] (B) dLys⁻¹Sar⁰ 肽 C, 或

[1534] (C) dLys⁻¹Gly(N-己基)⁰ 肽 B。

[1535] 小鼠的平均起始体重为 31.2g, 并在第 1、3、5 和 7 天称重。在 1、3 和 5 天时腹膜内测得血糖水平。小鼠约 5 月龄, 并饲喂普通食物饮食达约 5 个月。

[1536] 研究结果见图 14-15。图 14 描述显示第 1、3、5 和 7 天 DIO 小鼠的体重变化的曲线图。图 15 描述显示第 1 天 (图 15A)、第 3 天 (图 15B) 和第 5 天 (图 15C) 的血糖水平的曲线图。

作为前药的函数的体重变化
接受一周一次可变剂量(15 和 70 nmol/kg)的 DIO 小鼠

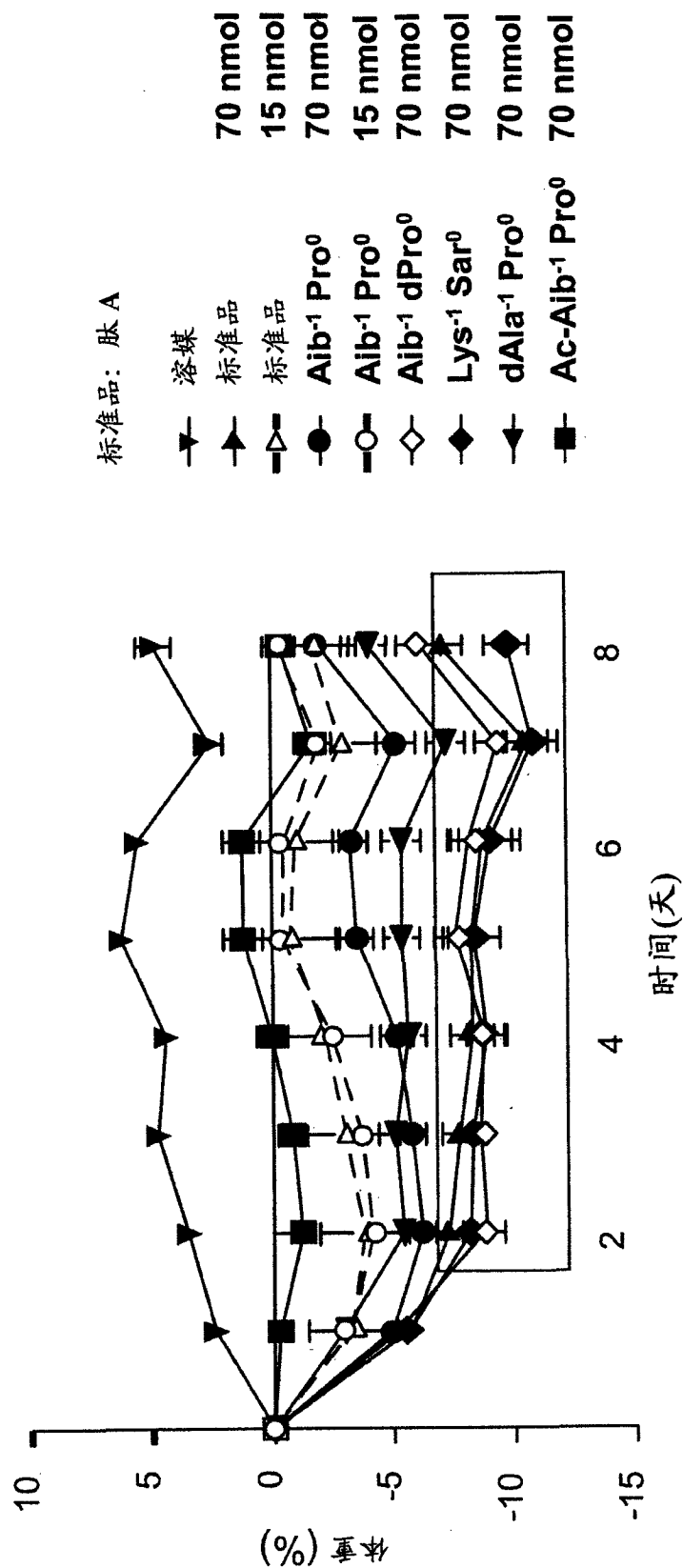


图 1

作为前药浓度的函数的体重变化
接受一周一次可变剂量(0.5、3、15、70 nmol/kg)的DIO小鼠

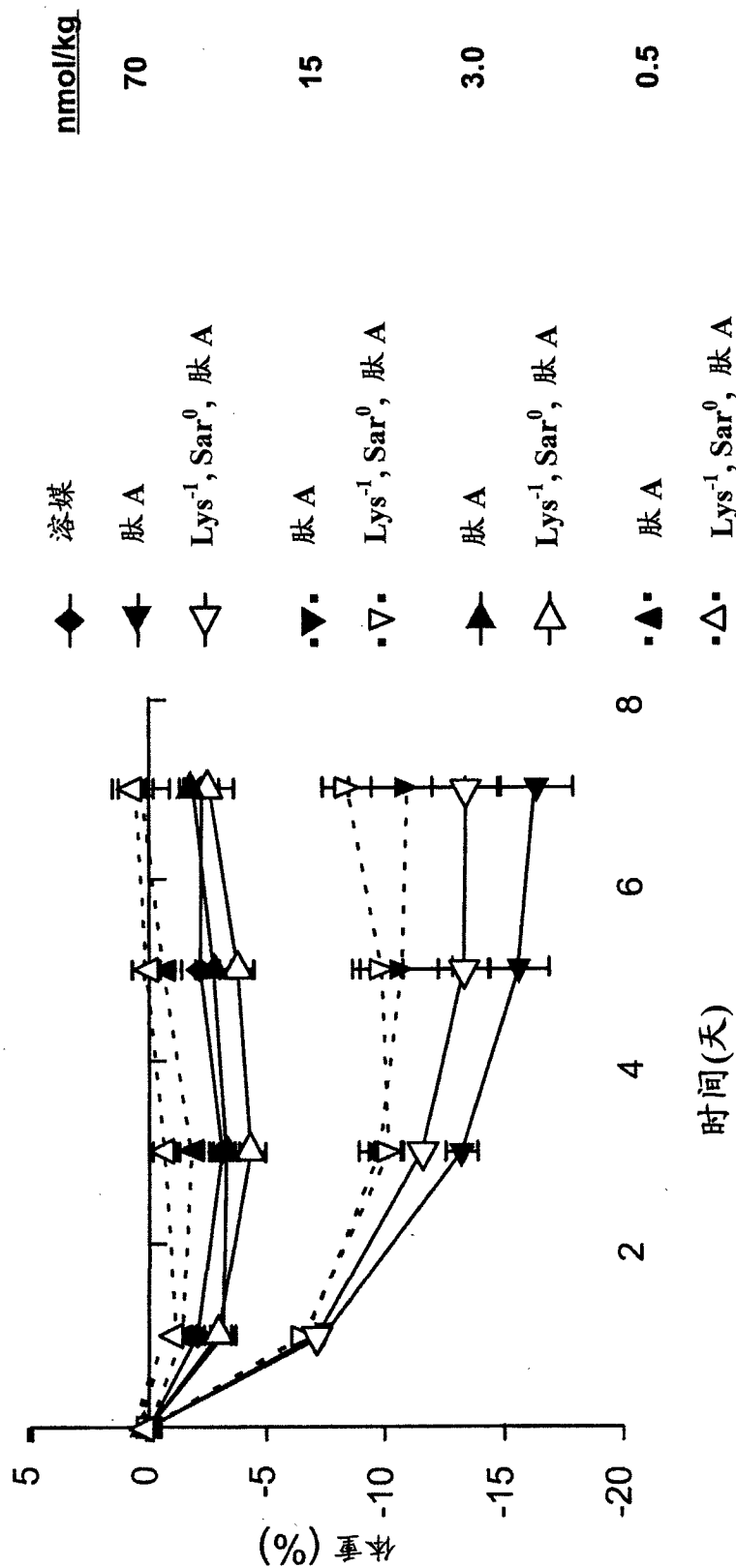


图 2

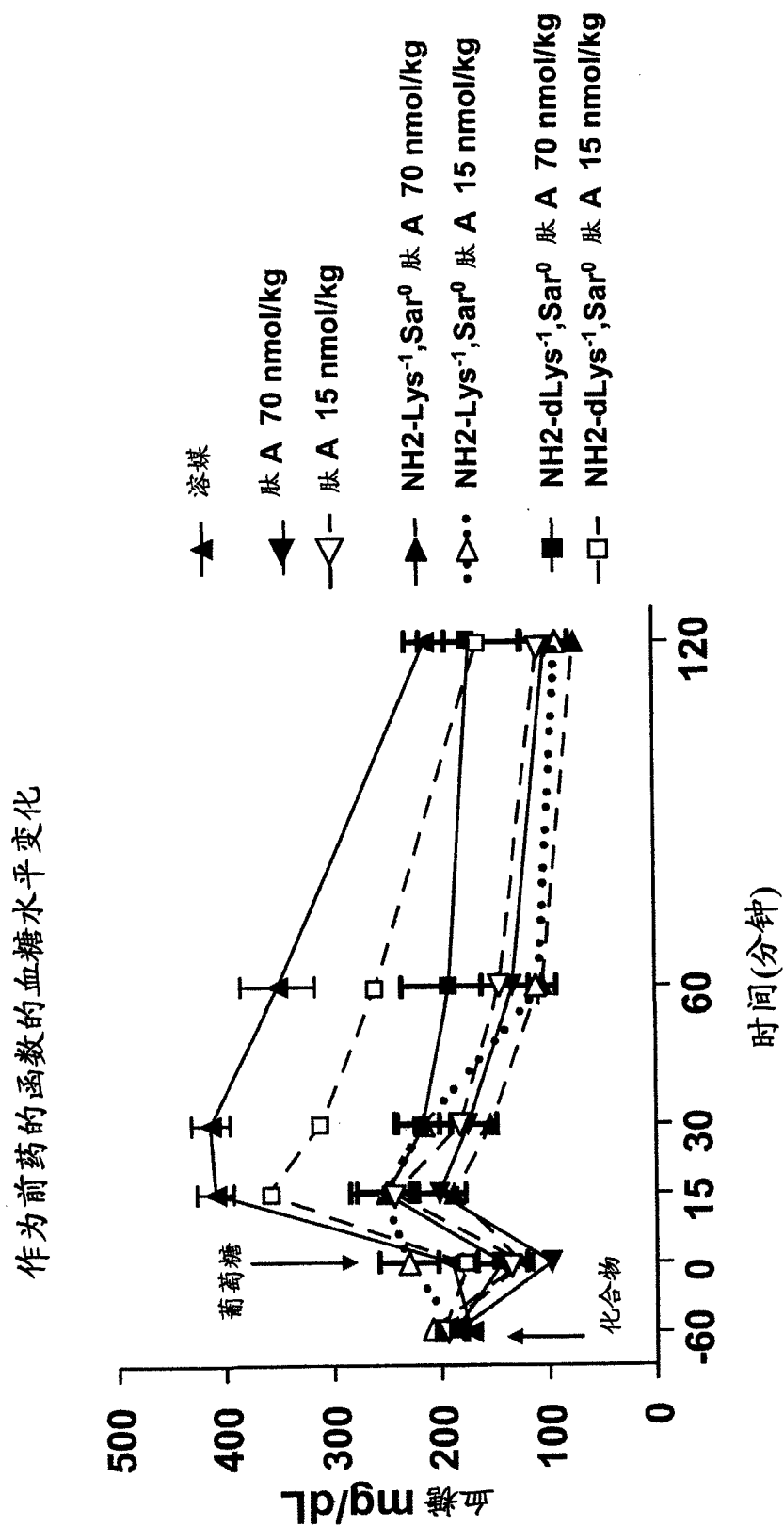


图 3

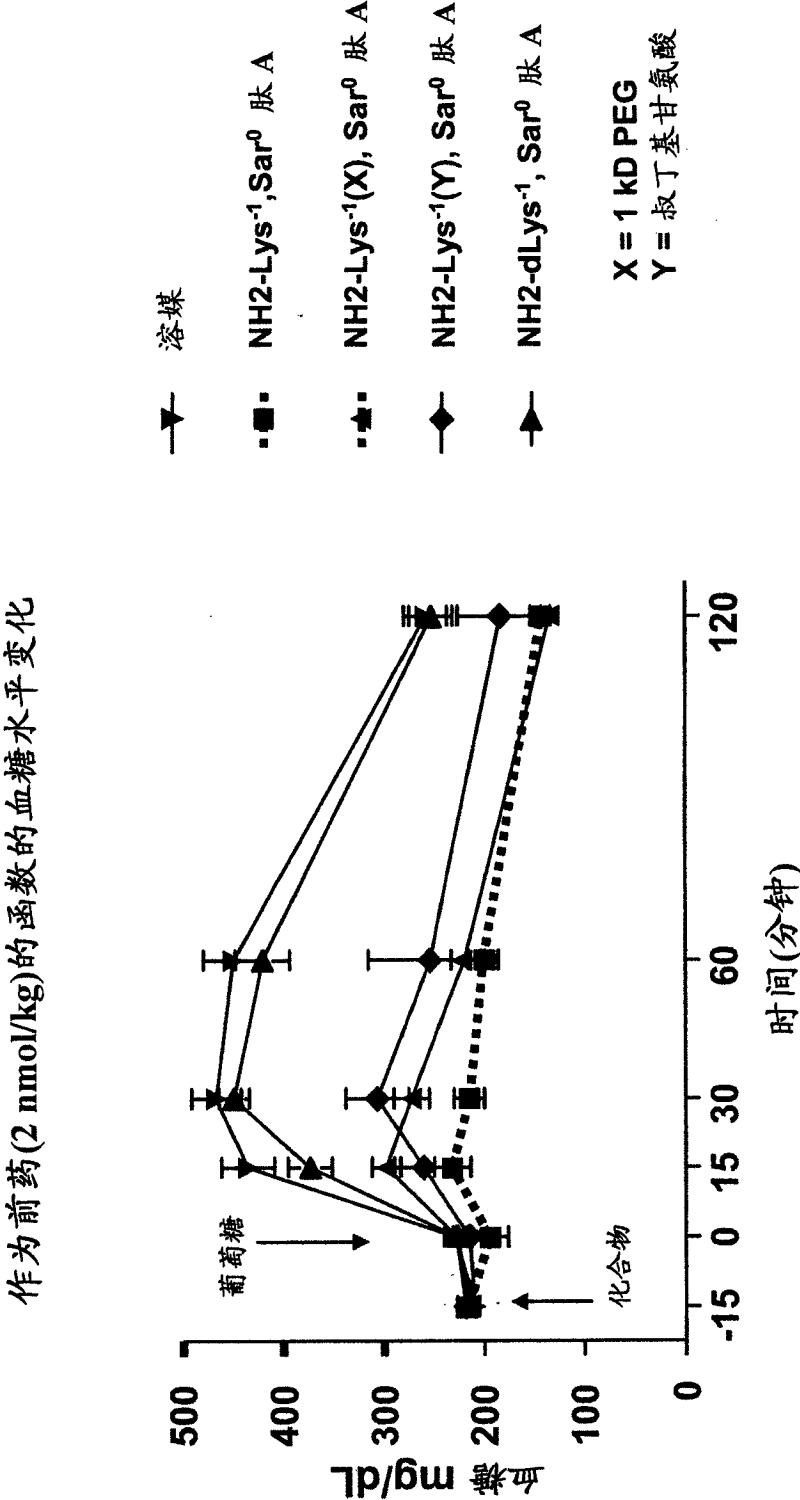


图 4

作为前药(0.67 或 20 nmol/kg)的函数的血糖水平变化

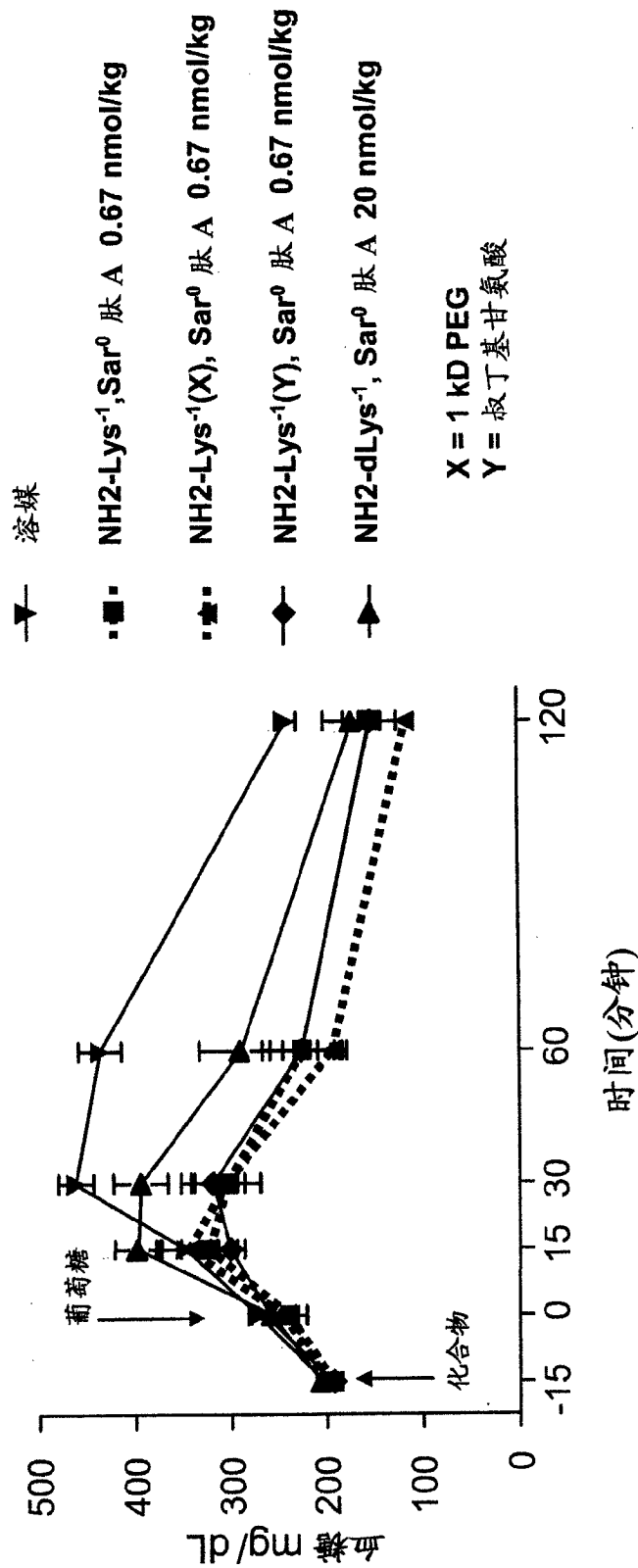


图 5

作为前药(15 和 70 nmol/kg)的函数的血糖水平变化

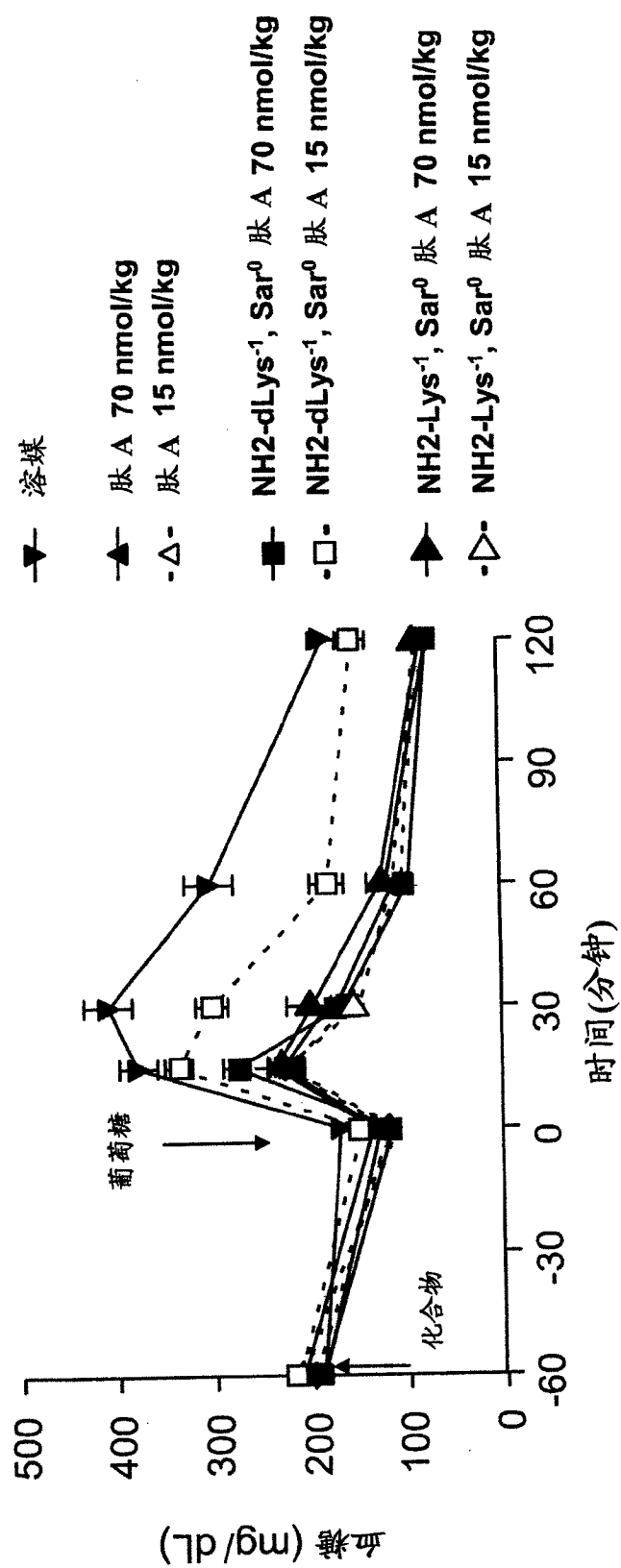


图 6

作为前药(15 和 70 nmol/kg)的函数的血糖水平变化

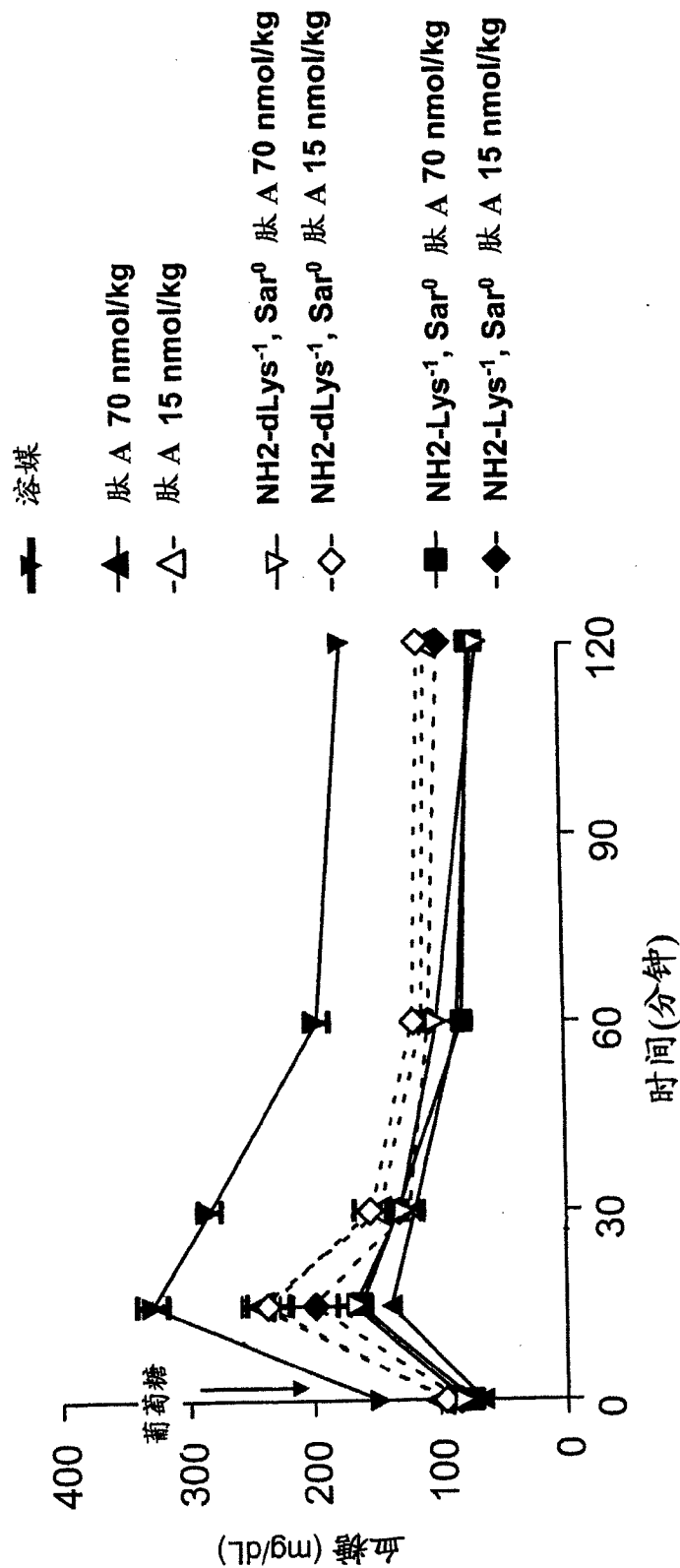


图 7

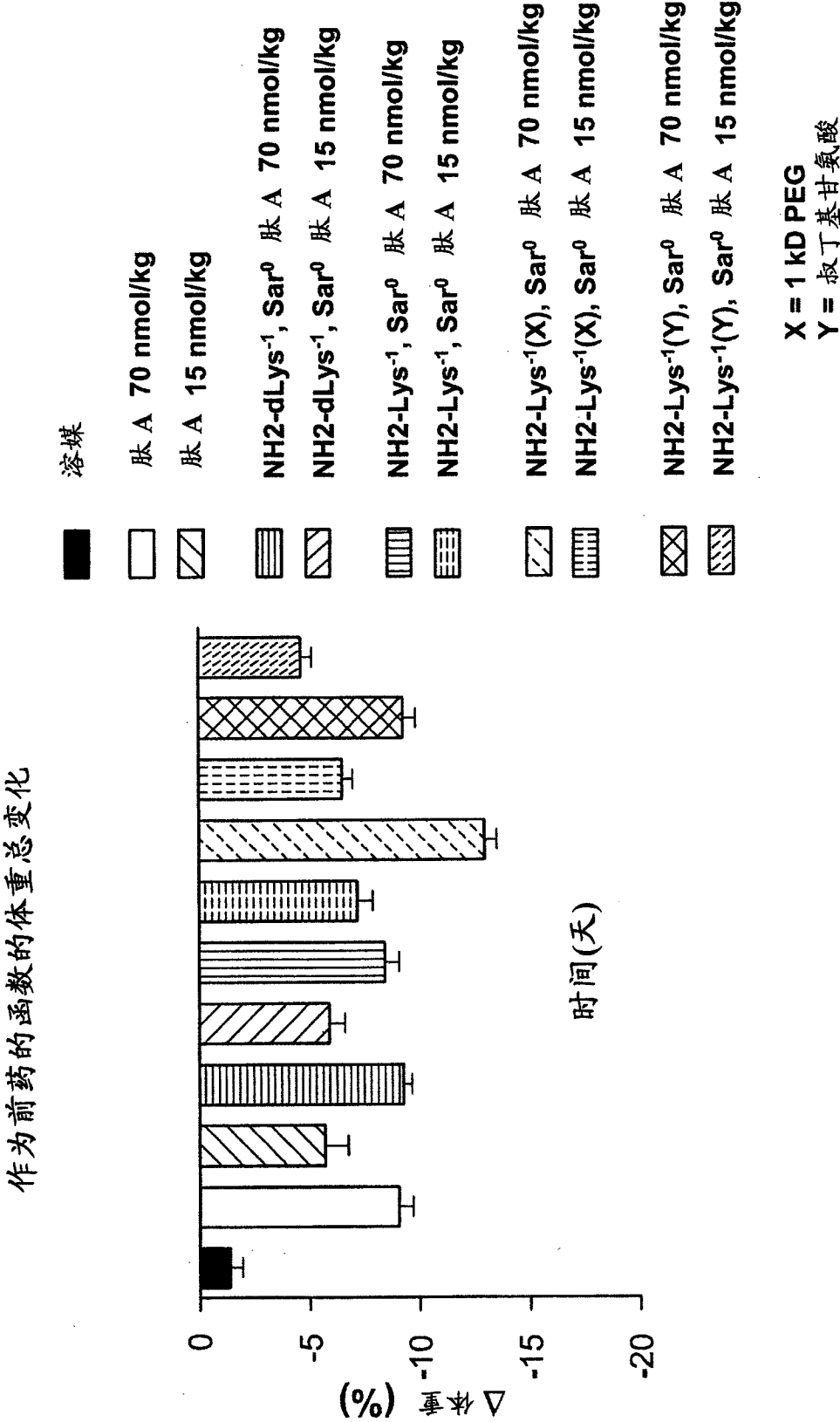


图 8

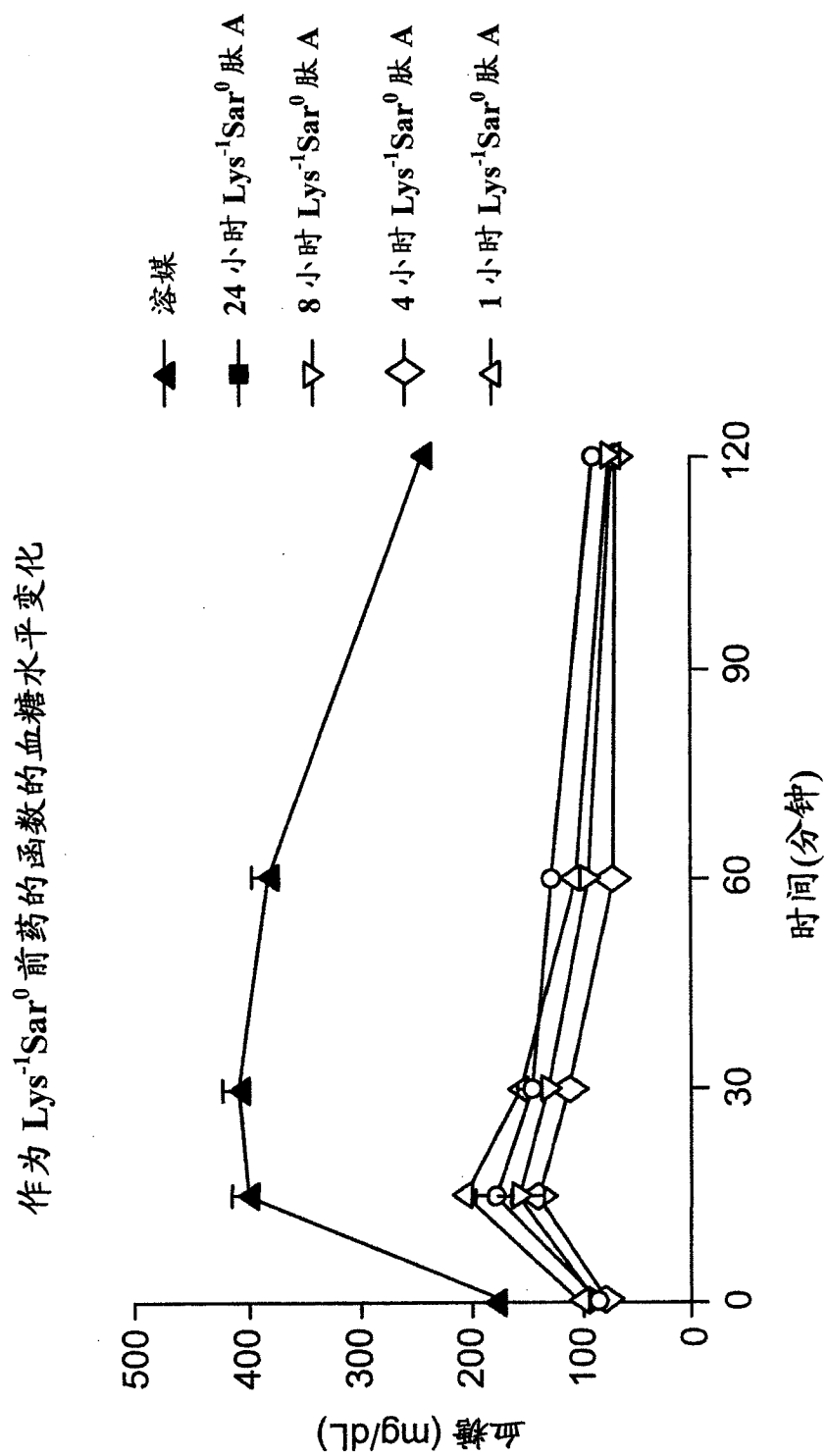


图 9A

作为 dLys⁻¹Sar⁰ 前药的函数的血糖水平变化

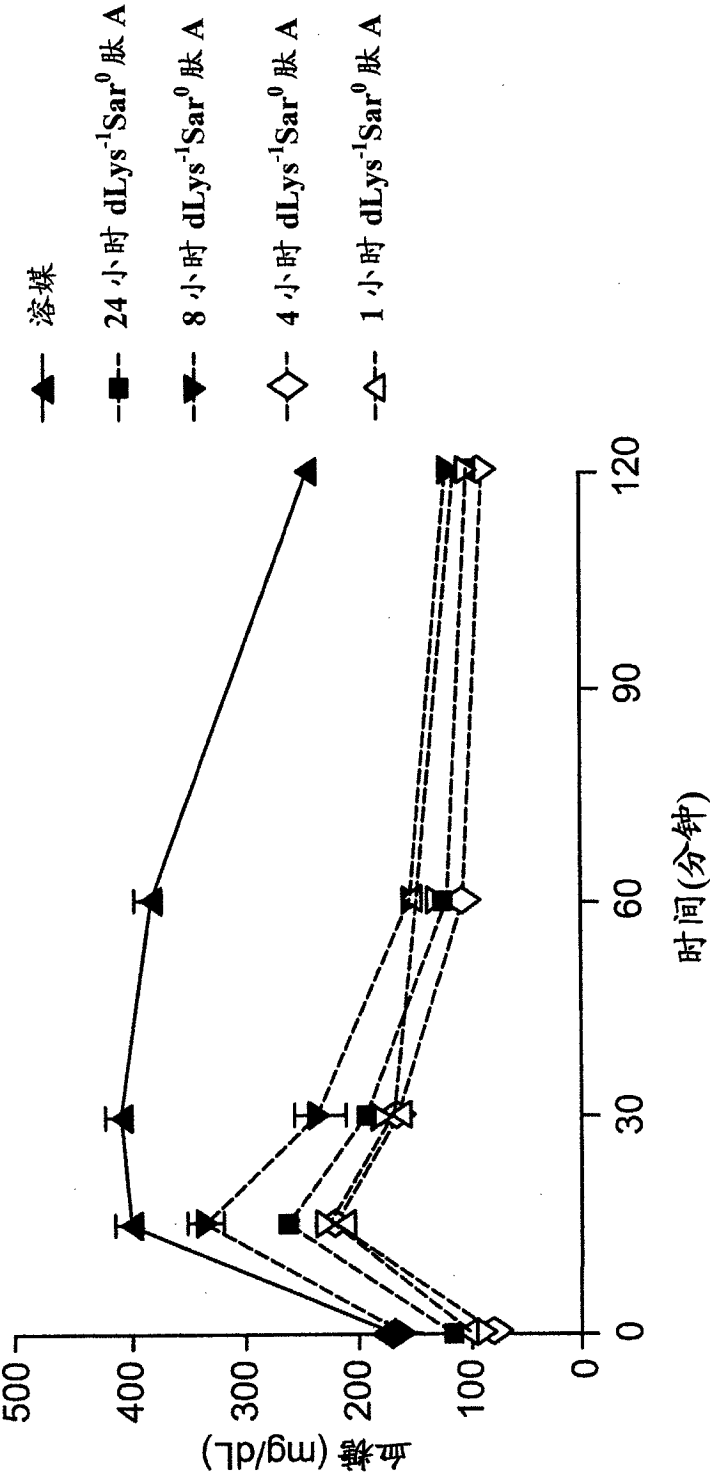


图 9B

胰高血糖素超家族肽的氨基酸序列比对

GHRH	YADAIFTNSYRKVLGQLSARKLLQDIMSR-----	29
PHI	HADGVFTSDFSKLLGQLSAKKYLESLM-----	27
VIP	HSDAVFTDNYTRLRKQMAVKKYLSILN-----	28
PACAP-38	HSDGIFTDSYSRYRKQMAVKKYLA AVL-----	27
毒蜥外泌肽-4	HGEGTFTSDL SKQMEEEAVRLFIEWLKNGGPPSGAPPS----	39
GLP-1	HAEGTFTSDVSSYLEGQAAKEFIAWLVKGRG-----	31
胰高血糖素	HSQGTFTSDYSKYLD SRRRAQDFVQWLMNT-----	29
泌酸调节肽	HSQGTFTSDYSKYLD SRRRAQDFVQWLMNTKRNRN NIA-----	37
GIP	YAEGTFTSDYSIAMDKIHQQDFVNWLLAQKGKNDWKHNITQ	42
GLP-2	HADGSFSD E MNTIIDNLAARDFINWLIQTKITD-----	33
促胰液素	HSDGTFTSEL S RLREGARLQRLLQGLV-----	27

图 10

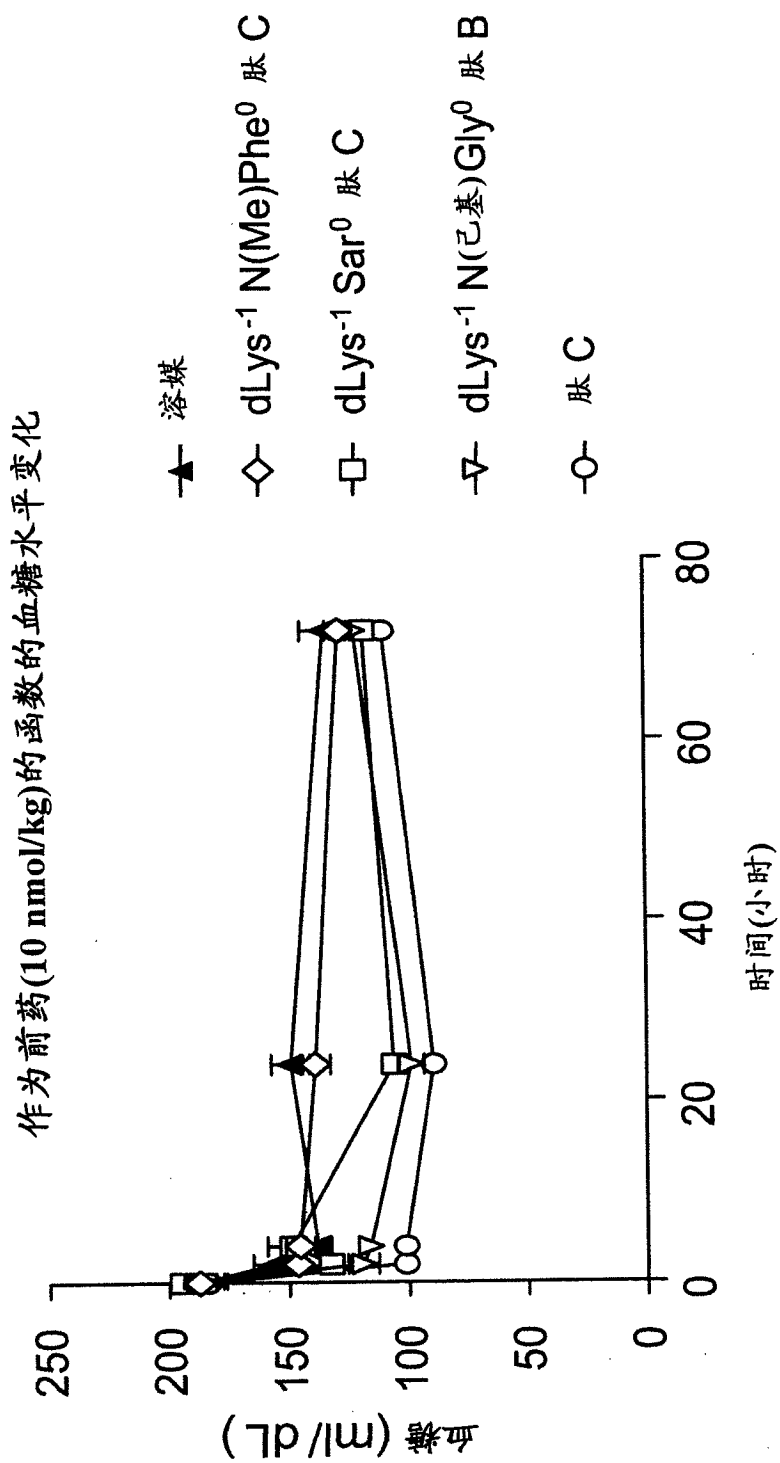


图 11

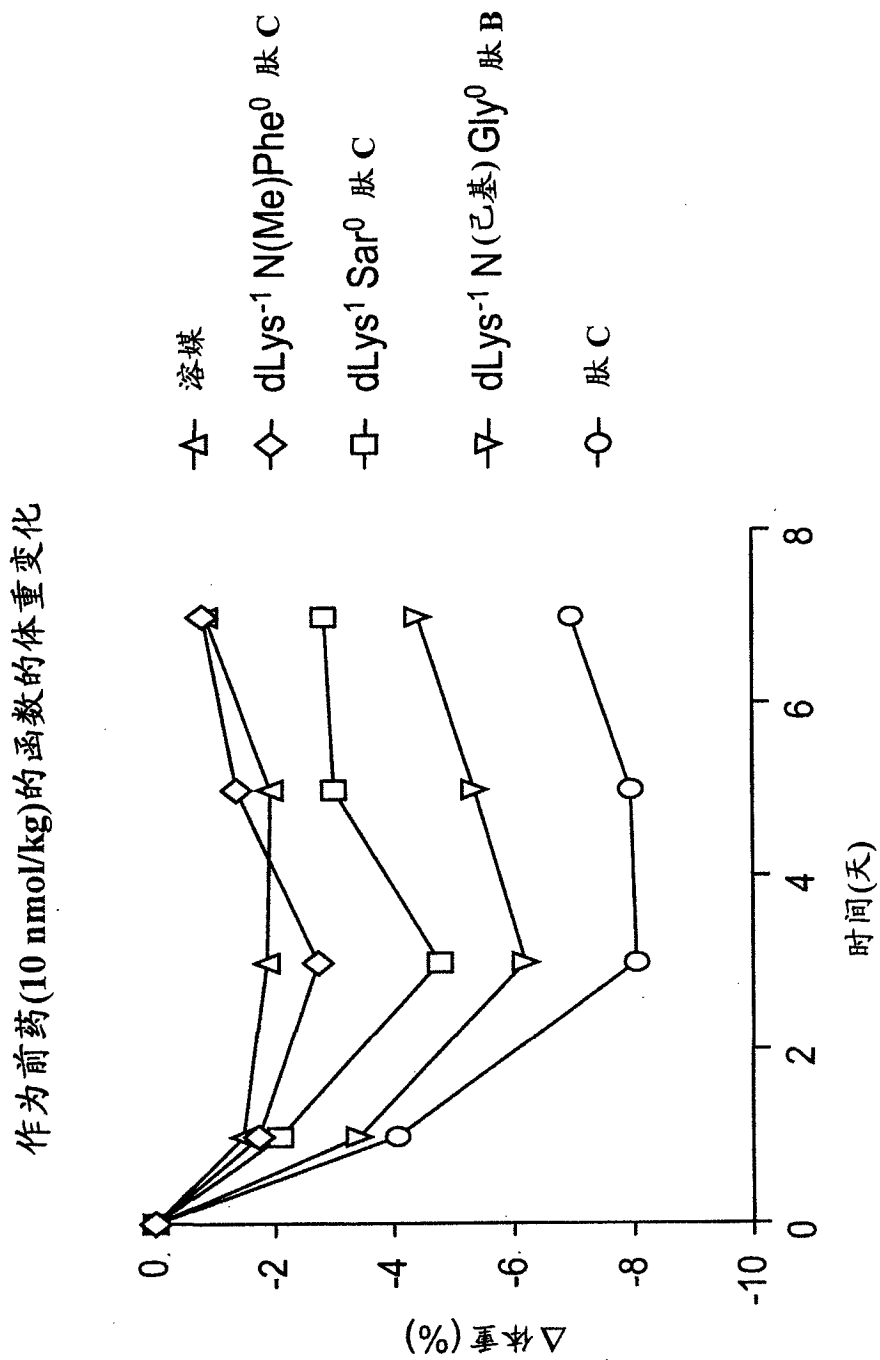


图 12

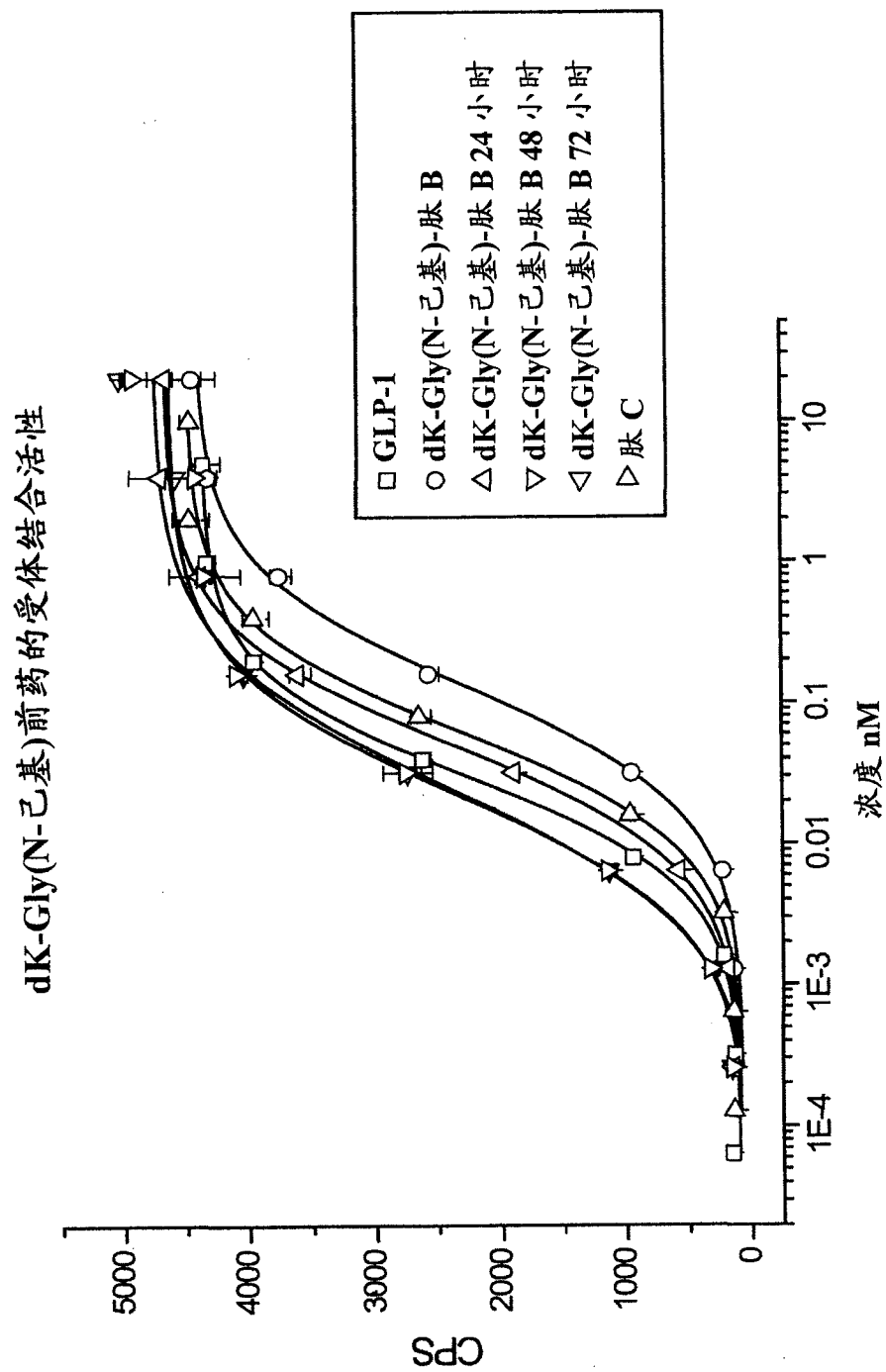


图 13A

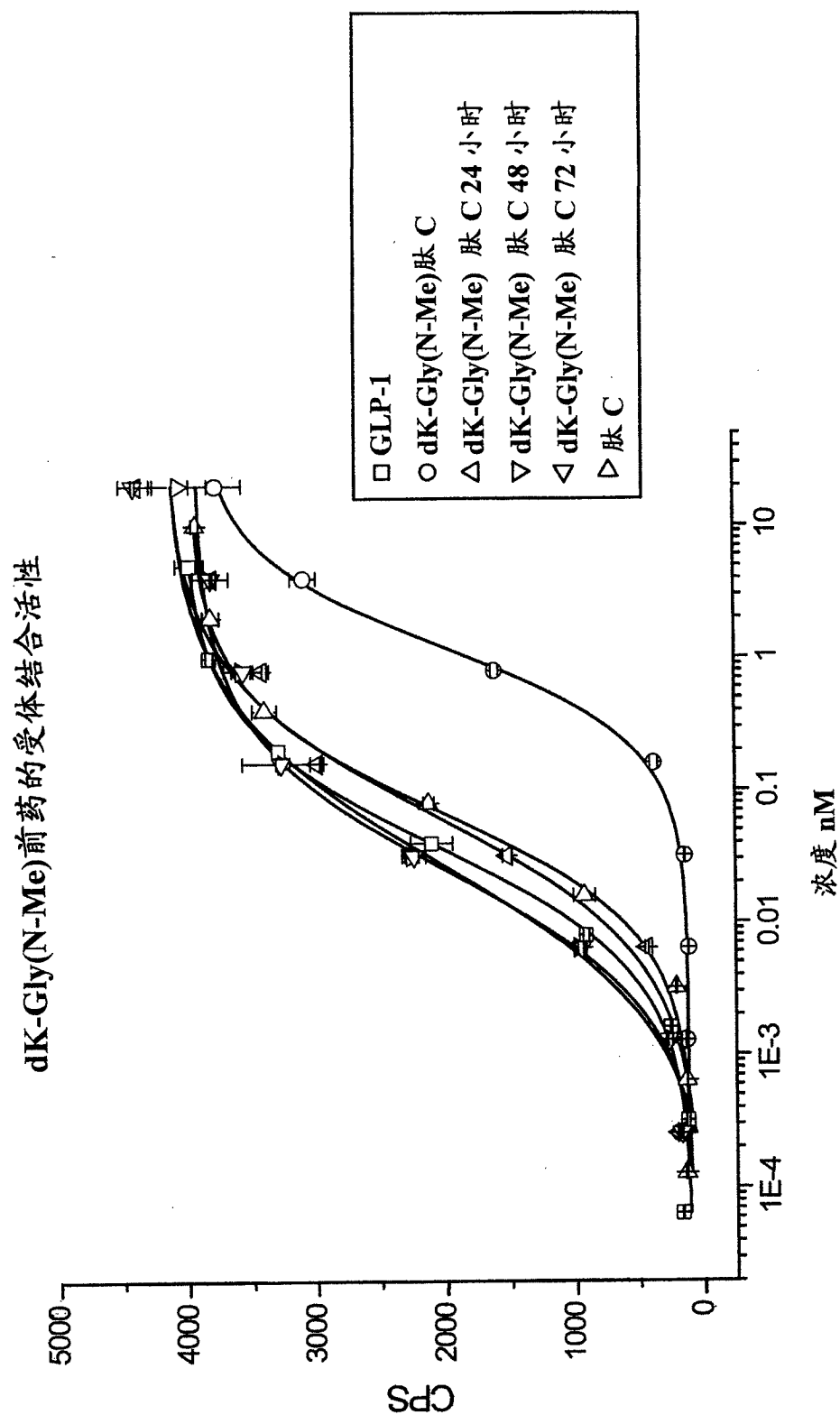


图 13B

作为前药和前药浓度的函数的体重变化

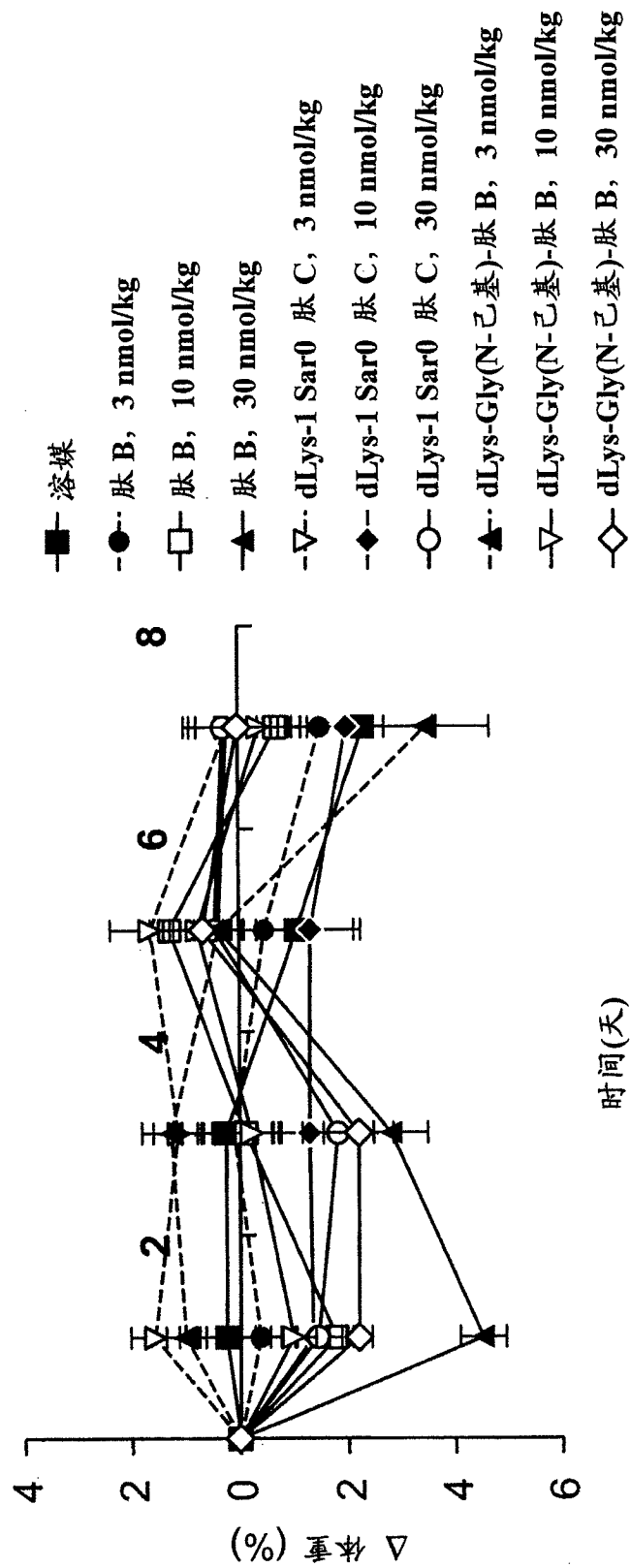


图 14

第 1 天时作为前药和前药浓度的函数的血糖水平

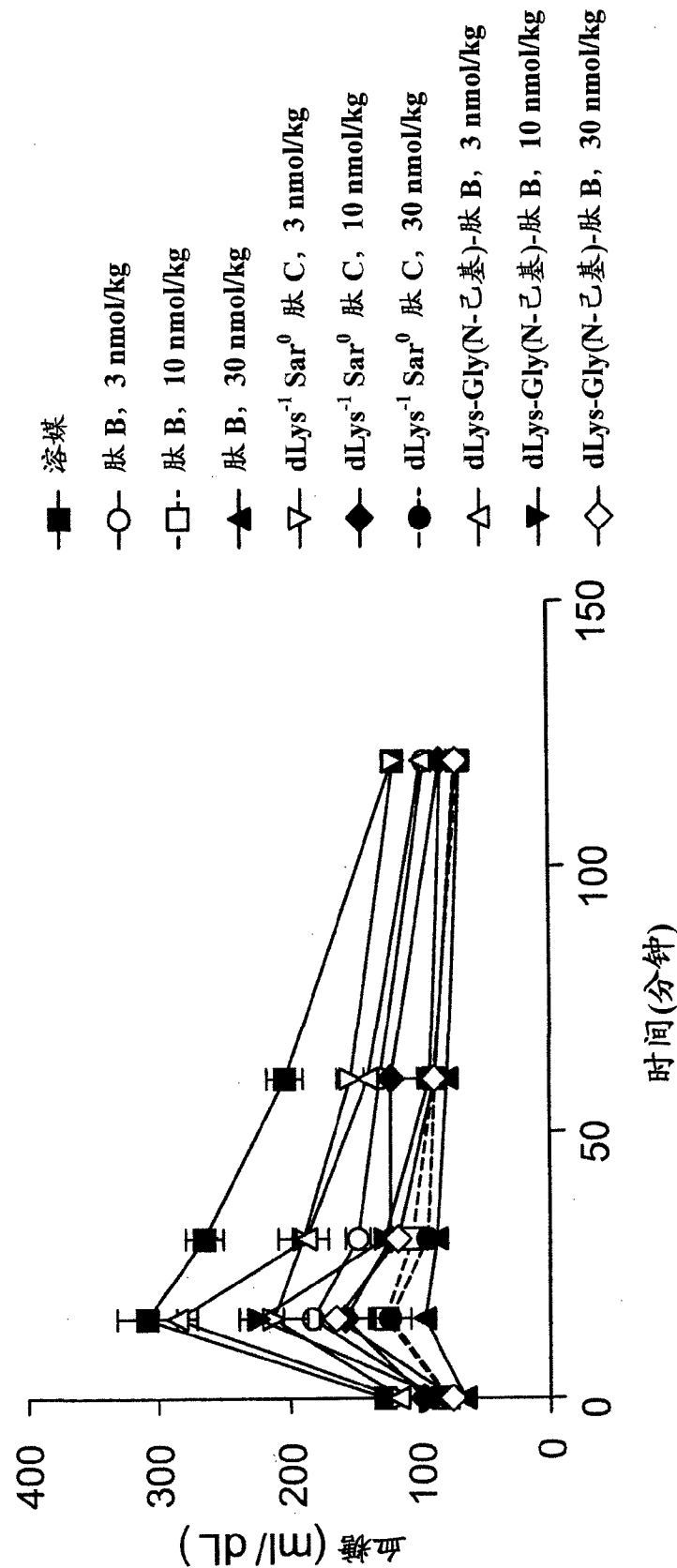


图 15A

第3天时作为前药和前药浓度的函数的血糖水平

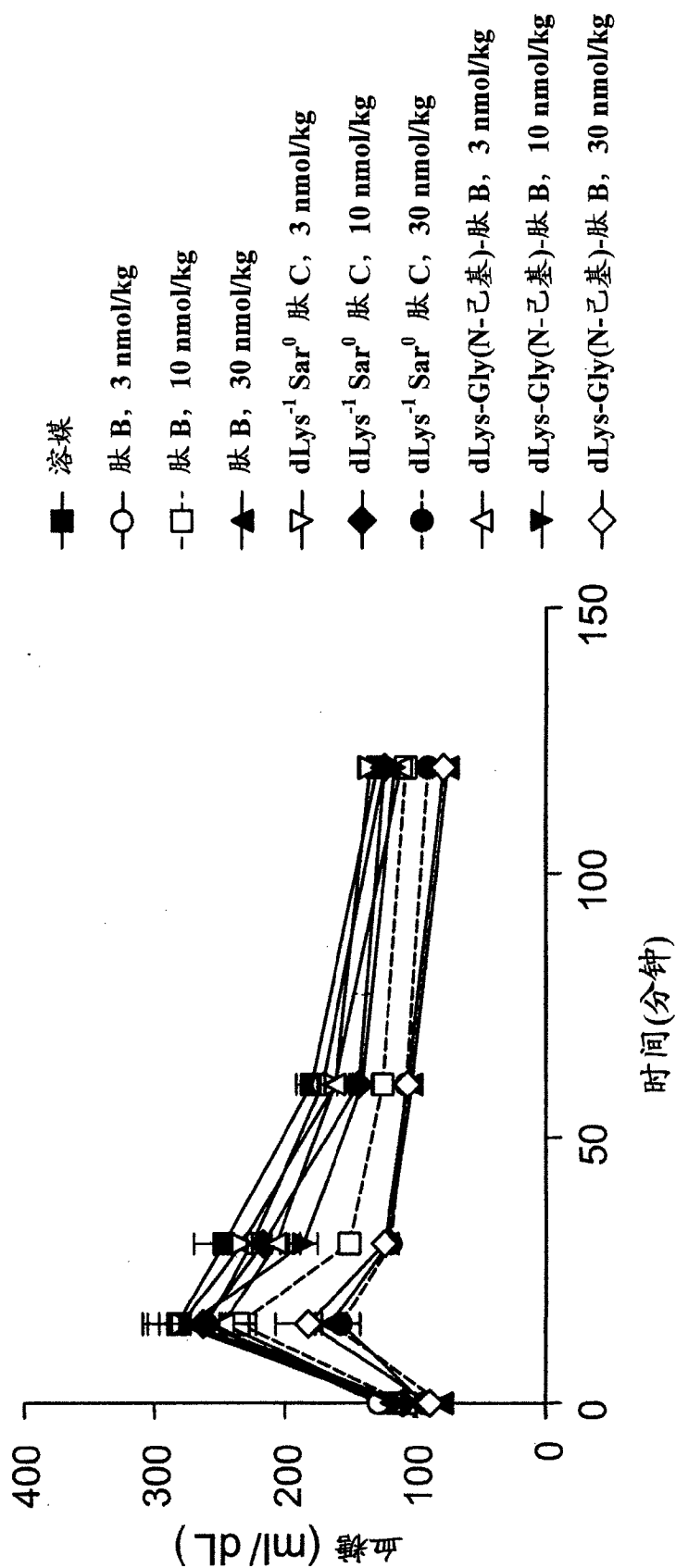


图 15B

第 5 天时作为前药和前药浓度的函数的血糖水平

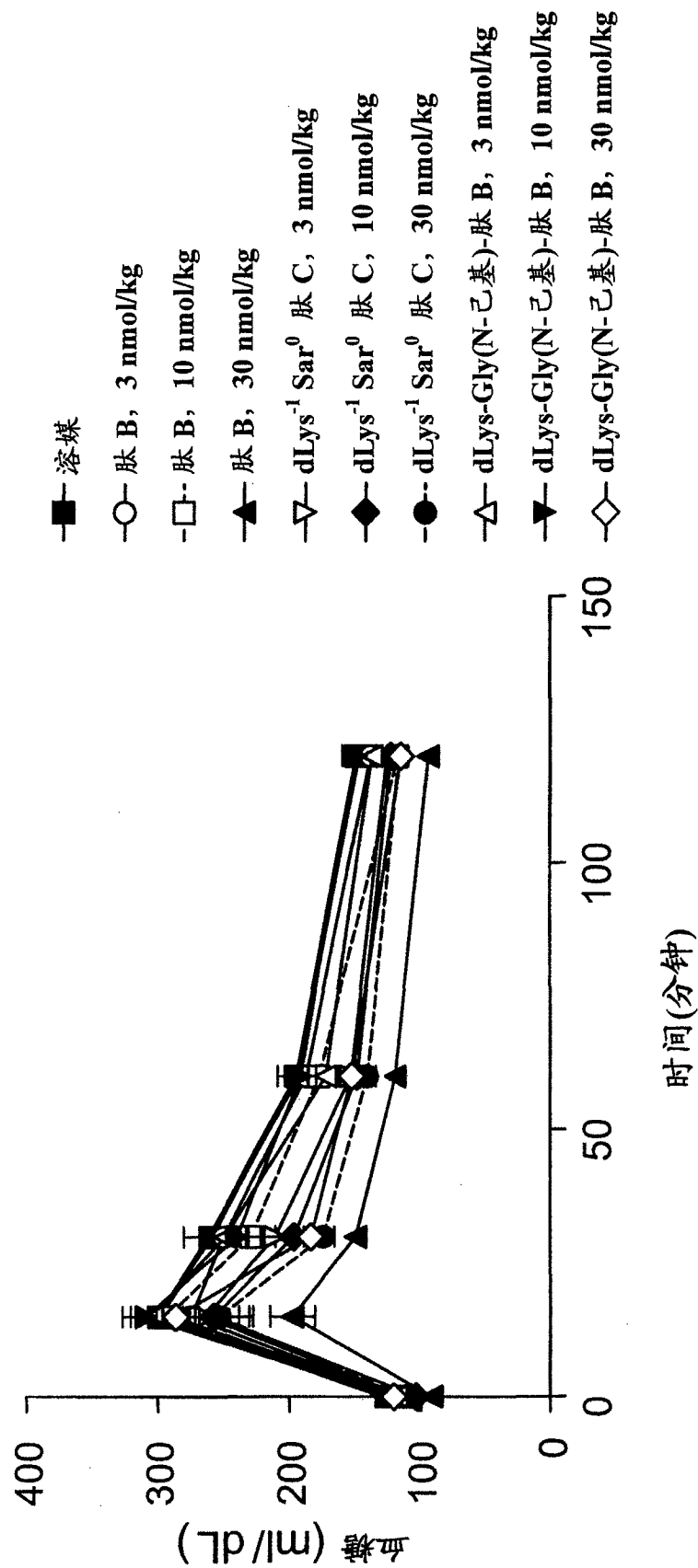


图 15C