



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 107108713 A

(43)申请公布日 2017.08.29

(21)申请号 201580055061.0

(22)申请日 2015.10.09

(30)优先权数据

14188421.3 2014.10.10 EP

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2017.04.10

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/EP2015/073372 2015.10.09

(87)PCT国际申请的公布数据

W02016/055610 EN 2016.04.14

(71)申请人 诺和诺德股份有限公司

地址 丹麦鲍斯韦

(72)发明人 S.里德茨-鲁格 U.森斯富斯

T.克鲁塞 J.斯佩茨勒 H.托格森

C.文泽托诺伊 J.F.劳

(74)专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司 72001

代理人 刘辛 罗文锋

(51)Int.Cl.

C07K 14/605(2006.01)

A61K 38/26(2006.01)

A61P 3/04(2006.01)

A61P 3/10(2006.01)

权利要求书19页 说明书119页 附图1页

(54)发明名称

稳定的基于GLP-1的GLP-1/胰高血糖素受体共激动剂

(57)摘要

本申请涉及作为GLP-1/胰高血糖素受体共激动剂的稳定且持久的GLP-1衍生物、其组合物、该GLP-1衍生物在医疗中的用途,并涉及包括向患者施用该GLP-1衍生物的治疗方法,包括糖尿病、肥胖症及相关疾病和病况的治疗。优选的GLP-1衍生物包含由式I氨基酸序列组成的多肽:
Imp-X8-His-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-X16-Ser-X18-Tyr-Leu-Glu-X22-X23-Ala-Ala-X26-X27-Phe-Ile-Ala-Trp-Leu-X33-X34-X35-X36-X37[I],其中,-X8为Ala、Aib、Acb或Gly;-X16为Val、Leu、Ile或Tyr;-X18为Lys或Arg;-X22为Gly、Ala、Glu、Lys、Arg、Ser或Aib;-X23为Gln、Arg或Lys;-X26为Lys或Arg;-X27为Glu或Lys;-X33为Val、Leu或Ile;-X34为Lys或Arg;-X35为Gly、Thr、Lys或不存在;-X36为Ala、Gly、Lys、Ser或不存在;-X37为Gly或不存在;其中所述GLP-1衍生物进一步包含含有亲脂性部分和至少两个

带负电荷的部分的取代基,其中所述带负电荷的部分中的一个在亲脂性部分的远端;其中所述多肽任选地包含C末端酰胺;或其药学上可接受的盐和/或酯。

1. GLP-1衍生物,或其药学上可接受的盐和/或酯,该GLP-1衍生物包含:

(i) 由式I氨基酸序列组成的多肽: Imp-X8-His-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-X16-Ser-X18-Tyr-Leu-Glu-X22-X23-Ala-Ala-X26-X27-Phe-Ile-Ala-Trp-Leu-X33-X34-X35-X36-X37[I],

其中

X8为Ala、Aib、Acb或Gly;

X16为Val、Leu、(Ile) 或Tyr;

X18为Lys或Arg;

X22为Gly、Ala、Glu、Lys、Arg、(Ser) 或(Aib);

X23为Gln、Arg或Lys;

X26为(Lys) 或Arg;

X27为Glu或Lys;

X33为(Val)、Leu或Ile;

X34为Lys或Arg;

X35为Gly、Thr、Lys或不存在;

X36为Ala、Gly、Lys、Ser或不存在;并且

X37为Gly或不存在;以及

(ii) 含有亲脂性部分和至少两个带负电荷的部分的取代基,其中所述带负电荷的部分中的一个在亲脂性部分的远端;

其中所述多肽任选地包含C末端酰胺。

2. 根据权利要求1所述的GLP-1衍生物,其中所述取代基通过所述多肽中选自位置22、23、27、34、35和36的氨基酸位置处的氨基酸残基与所述多肽共价连接。

3. 根据权利要求1所述的GLP-1衍生物,其中与人GLP-1 (SEQ ID NO:1) 相比,所述多肽包含3-15个氨基酸残基修饰。

4. 根据权利要求3所述的GLP-1衍生物,其中所述修饰选自置换、添加和缺失。

5. 根据前述权利要求中任一项所述的GLP-1衍生物,其中

X8为Ala、Aib或Acb;

X22为Ala或Glu;

X35为Gly或Thr;并且

X36为Gly或不存在。

6. 根据权利要求1-4中任一项所述的GLP-1衍生物,其中

X8为Ala、Aib或Acb;

X22为Ala或Glu;

X35为Gly或Thr;或

X36为Gly或不存在。

7. 根据权利要求1-4中任一项所述的GLP-1衍生物,其中X35、X36和X37不存在。

8. 根据权利要求1-4中任一项所述的GLP-1衍生物,其中X36和X37不存在。

9. 根据前述权利要求中任一项所述的GLP-1衍生物,其中所述取代基包含至少三个带负电荷的部分。

10. 根据前述权利要求中任一项所述的GLP-1衍生物,其中所述亲脂性部分包含至少12个碳原子的烷基。

11. 根据权利要求10所述的GLP-1衍生物,其中所述烷基具有12-20个碳原子。

12. 根据权利要求11所述的GLP-1衍生物,其中所述烷基具有14-18个碳原子。

13. 根据权利要求12所述的GLP-1衍生物,其中所述烷基具有16个碳原子。

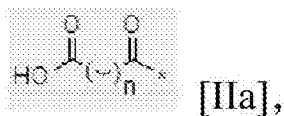
14. 根据前述权利要求中任一项所述的GLP-1衍生物,其中所述取代基与氨基酸的侧链共价连接。

15. 根据权利要求14所述的GLP-1衍生物,其中所述取代基与赖氨酸侧链的氮原子共价连接。

16. 根据前述权利要求中任一项所述的GLP-1衍生物,其中所述取代基包含式II:

$Z_1-Z_2-Z_3-Z_4-Z_5-Z_6-Z_7-Z_8-Z_9-Z_{10}-[II]$,

其中 Z_1 包含式IIa:



其中在式IIa中, n 为6-20,且符号*表示与相邻基团的氮的连接点;

其中 Z_2 、 Z_3 、 Z_4 、 Z_5 、 Z_6 、 Z_7 、 Z_8 、 Z_9 和 Z_{10} 单独地不存在或者为选自Glu、 γ Glu、Gly、Ser、Ala、Thr和Ado的氨基酸;并且

其中 $Z_1-Z_2-Z_3-Z_4-Z_5-Z_6-Z_7-Z_8-Z_9-Z_{10}$ 总共包含至少两个带负电荷的部分。

17. 根据权利要求16所述的GLP-1衍生物,其进一步包含含有选自下组的结构的连接体:

γ Glu- γ Glu-Ado-Ado-;

γ Glu- γ Glu-Ado-Ado- γ Glu-;

γ Glu- γ Glu-Ado- γ Glu- γ Glu-;

γ Glu- γ Glu-Ado- γ Glu-Ado- γ Glu-Ado- γ Glu-;

γ Glu- γ Glu-Ser-Gly-;

γ Glu- γ Glu-Ser-Gly-Glu-Ser-Gly-;

γ Glu- γ Glu- γ Glu-Ado-Ado-;

γ Glu- γ Glu- γ Glu- γ Glu-;

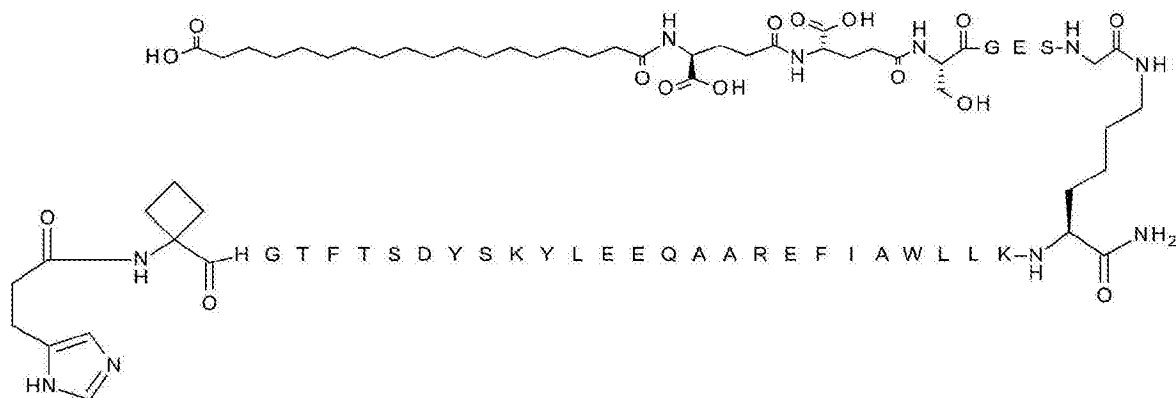
γ Glu-Ado-Ado-;

γ Glu-Ado-Ado- γ Glu- γ Glu-;以及

Gly-Ser-Glu-Gly-Ser- γ Glu- γ Glu-。

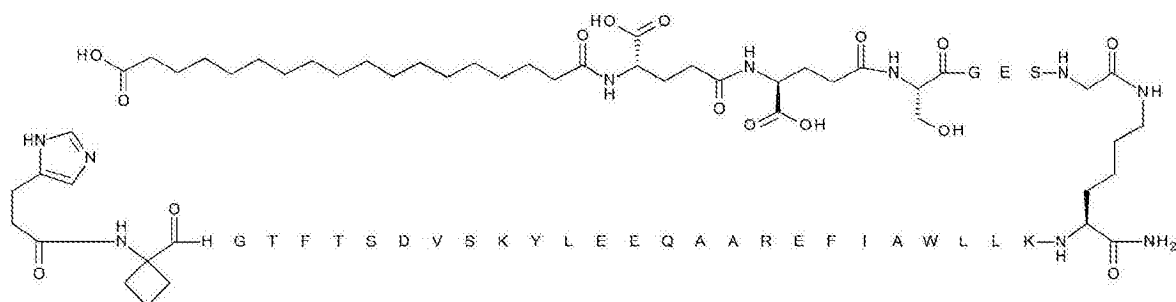
18. 根据权利要求1所述的GLP-1衍生物,其中所述GLP-1衍生物选自:

$N^{\epsilon 35}-[2-[[(2S)-2-[[(2S)-4-羧基-2-[[2-[[(2S)-2-[[(4S)-4-羧基-4-[[(4S)-4-羧基-4-(17-羧基十七酰基氨基) 丁酰基] 氨基] 丁酰基] 氨基]-3-羟基丙酰基] 氨基] 乙酰基] 氨基] 丁酰基] 氨基]-3-羟基丙酰基] 氨基] 乙酰基]-[Imp7, Acb8, His9, Tyr16, Lys18, Glu22, Arg26, Leu33, Lys35]-GLP-1-(7-35)-肽酰胺$



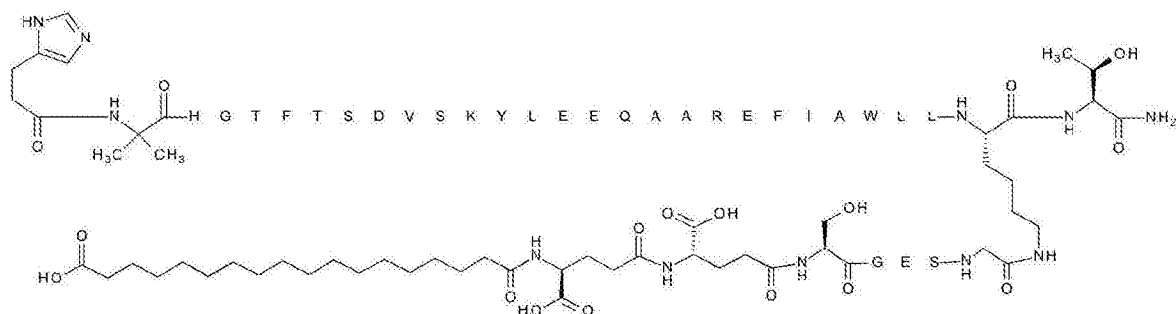
(化学式1)；

$N^{\epsilon 35}$ -[2-[[(2S)-2-[[(2S)-4-羧基-2-[[2-[[(2S)-2-[[(4S)-4-羧基-4-[[(4S)-4-羧基-4-(17-羧基十七酰基氨基) 丁酰基]氨基]丁酰基]氨基]-3-羟基丙酰基]氨基]乙酰基]氨基]丁酰基]氨基]-3-羟基丙酰基]氨基]乙酰基]-[Imp7, Acb8, His9, Lys18, Glu22, Arg26, Leu33, Lys35]-GLP-1-(7-35)-肽酰胺



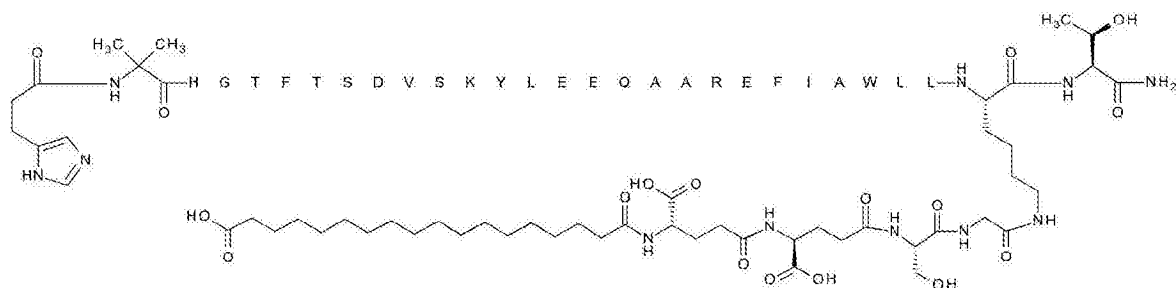
(化学式2)；

$N^{\epsilon 34}$ -[2-[[(2S)-2-[[(2S)-4-羧基-2-[[2-[[(2S)-2-[[(4S)-4-羧基-4-[[(4S)-4-羧基-4-(17-羧基十七酰基氨基) 丁酰基]氨基]丁酰基]氨基]-3-羟基丙酰基]氨基]乙酰基]氨基]丁酰基]氨基]-3-羟基丙酰基]氨基]乙酰基]-[Imp7, Aib8, His9, Lys18, Glu22, Arg26, Leu33, Thr35]-GLP-1-(7-35)-肽酰胺



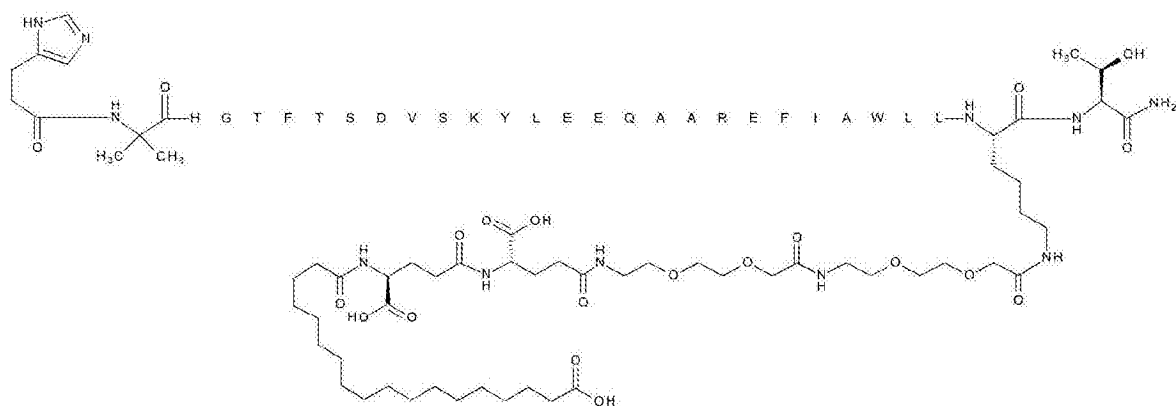
(化学式3)；

$N^{\epsilon 34}$ -[2-[[(2S)-2-[[(4S)-4-羧基-4-[[(4S)-4-羧基-4-(17-羧基十七酰基氨基) 丁酰基]氨基]丁酰基]氨基]-3-羟基丙酰基]氨基]乙酰基]-[Imp7, Aib8, His9, Lys18, Glu22, Arg26, Leu33, Thr35]-GLP-1-(7-35)-肽酰胺



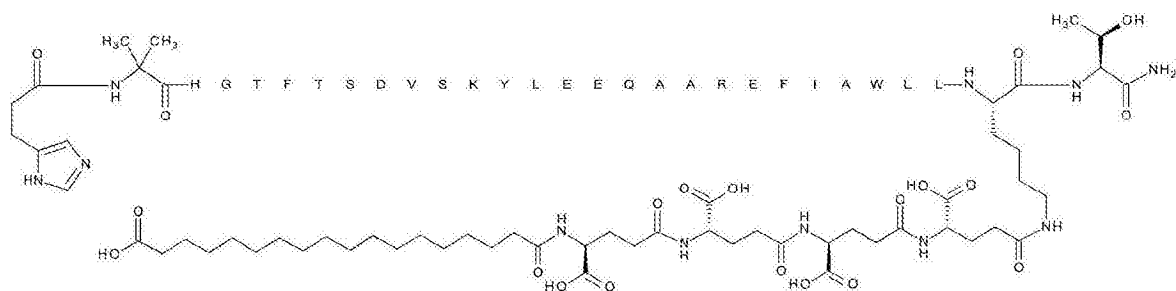
(化学式4)；

N^{ε34}-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[[(4S)-4-羧基-4-[[[(4S)-4-羧基-4-(17-羧基十七酰基氨基)丁酰基]氨基]丁酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基]-[Imp7,Aib8,His9,Lys18,Glu22,Arg26,Leu33,Thr35]-GLP-1-(7-35)-肽酰胺



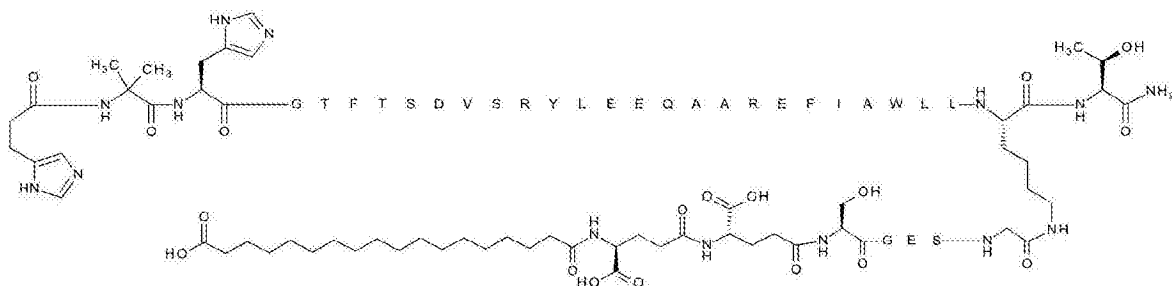
(化学式5)；

N^{ε34}-[(4S)-4-羧基-4-[[[(4S)-4-羧基-4-[[[(4S)-4-羧基-4-[[[(4S)-4-羧基-4-(17-羧基十七酰基氨基)丁酰基]氨基]丁酰基]氨基]丁酰基]氨基]丁酰基]氨基]丁酰基]-[Imp7,Aib8,His9,Lys18,Glu22,Arg26,Leu33,Thr35]-GLP-1-(7-35)-肽酰胺



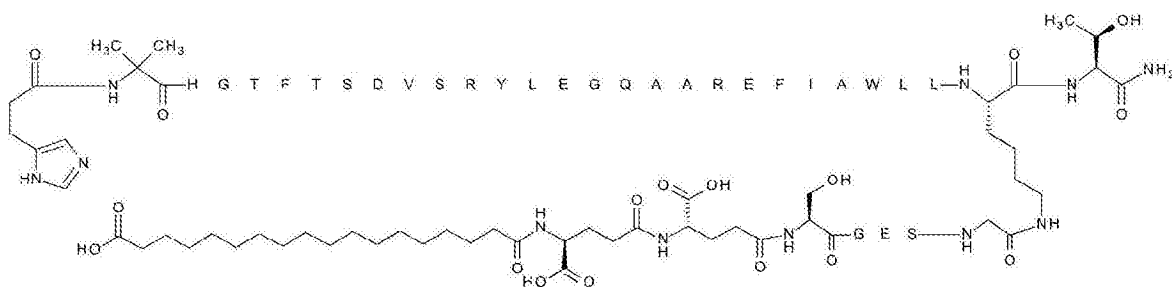
(化学式6)；

N^{ε34}-[2-[[[(2S)-2-[[[(2S)-4-羧基-2-[[2-[[[(2S)-2-[[[(4S)-4-羧基-4-[[[(4S)-4-羧基-4-(17-羧基十七酰基氨基)丁酰基]氨基]丁酰基]氨基]-3-羟基丙酰基]氨基]乙酰基]氨基]丁酰基]氨基]-3-羟基丙酰基]氨基]乙酰基]-[Imp7,Aib8,His9,Arg18,Glu22,Arg26,Leu33,Thr35]-GLP-1-(7-35)-肽酰胺



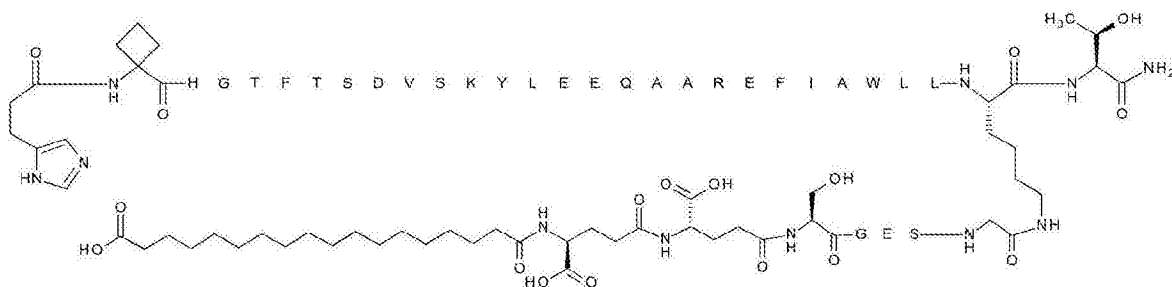
(化学式7)；

$N^{\epsilon 34}$ -[2-[[(2S)-2-[[(2S)-4-羧基-2-[[2-[[(2S)-2-[[(4S)-4-羧基-4-[[(4S)-4-羧基-4-(17-羧基十七酰基氨基) 丁酰基]氨基]丁酰基]氨基]-3-羟基丙酰基]氨基]乙酰基]氨基]丁酰基]氨基]-3-羟基丙酰基]氨基]乙酰基]-[Imp7,Aib8,His9,Arg18,Arg26,Leu33,Thr35]-GLP-1-(7-35)-肽酰胺



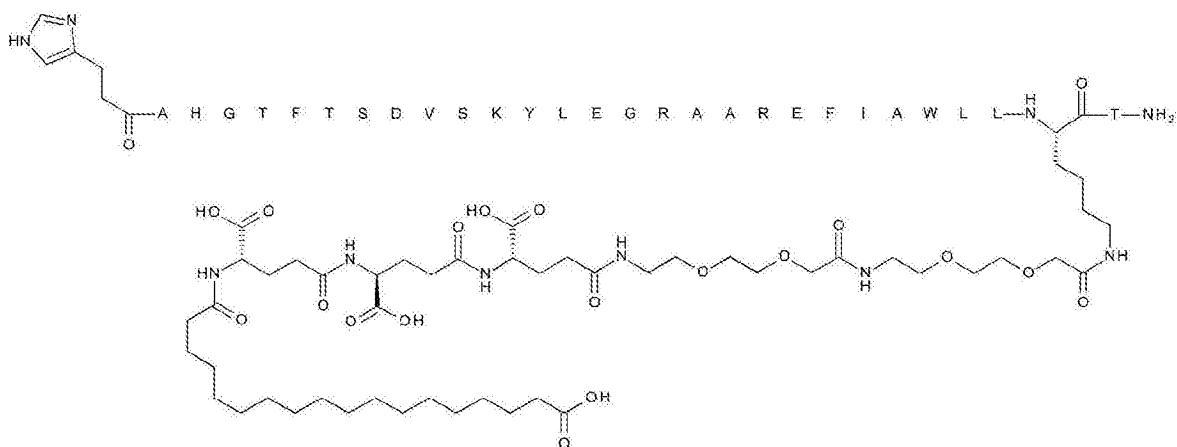
(化学式8)；

$N^{\epsilon 34}$ -[2-[[(2S)-2-[[(2S)-4-羧基-2-[[2-[[(2S)-2-[[(4S)-4-羧基-4-[[(4S)-4-羧基-4-(17-羧基十七酰基氨基) 丁酰基]氨基]丁酰基]氨基]-3-羟基丙酰基]氨基]乙酰基]氨基]丁酰基]氨基]-3-羟基丙酰基]氨基]乙酰基]-[Imp7,Aib8,His9,Lys18,Glu22,Arg26,Leu33,Thr35]-GLP-1-(7-35)-肽酰胺



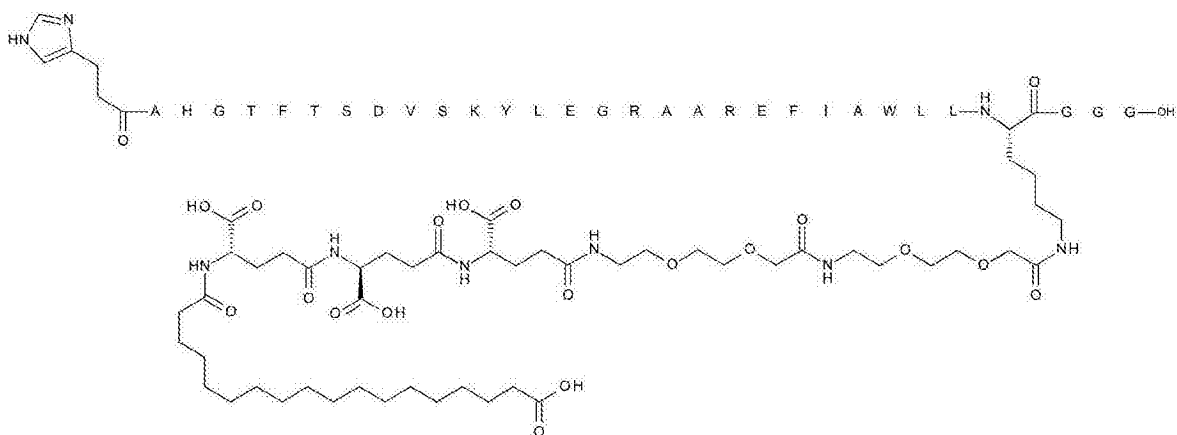
(化学式9)；

$N^{\epsilon 34}$ -[2-[[2-[[2-[[2-[[2-[[(4S)-4-羧基-4-[[(4S)-4-羧基-4-[[(4S)-4-羧基-4-(17-羧基十七酰基氨基) 丁酰基]氨基]丁酰基]氨基]丁酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基]-[Imp7,His9,Lys18,Arg23,Arg26,Leu33,Thr35]-GLP-1-(7-35)-肽酰胺



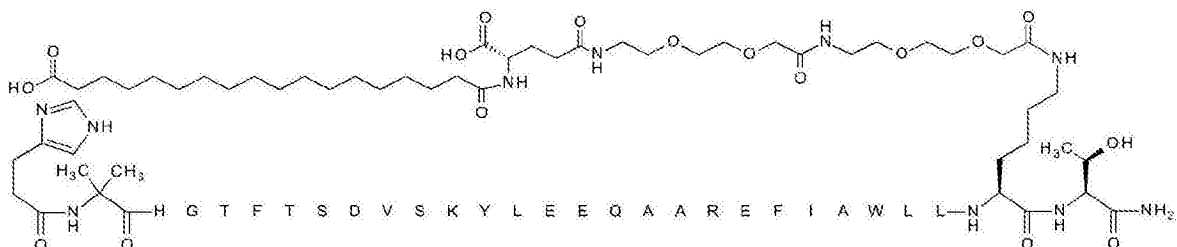
(化学式10)；

$N^{\epsilon 34}$ -[2-[2-[2-[2-[2-[2-[[(4S)-4-羧基-4-[(4S)-4-羧基-4-[(4S)-4-羧基-4-(17-羧基十七酰基氨基)丁酰基]氨基]丁酰基]氨基]丁酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基]-[Imp7,His9,Lys18,Arg23,Arg26,Leu33,Gly36]-GLP-1-(7-37)-肽



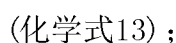
(化学式11)；

$N^{\epsilon 34}$ -[2-[2-[2-[2-[2-[2-[[(4S)-4-羧基-4-(17-羧基十七酰基氨基)丁酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基]-[Imp7,Aib8,His9,Lys18,Glu22,Arg26,Leu33,Thr35]-GLP-1-(7-35)-肽酰胺



(化学式12)；

$N^{\epsilon 22}$ -[(4S)-4-羧基-4-[(4S)-4-羧基-4-[[2-[2-[2-[2-[2-[2-[[(4S)-4-羧基-4-(17-羧基十七酰基氨基)丁酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基]氨基]丁酰基]氨基]丁酰基]-[Imp7,Aib8,His9,Lys18,Lys22,Arg26,Leu33,Gly36]-GLP-1-(7-37)-肽

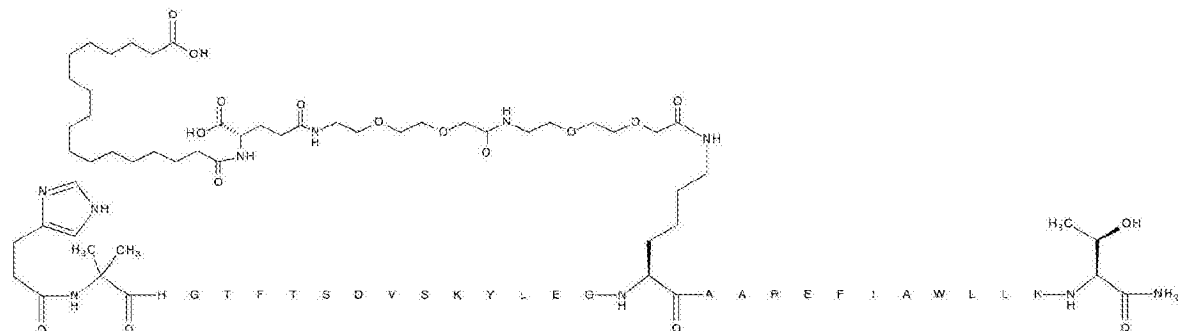


(化学式14)：

(化学式15)；

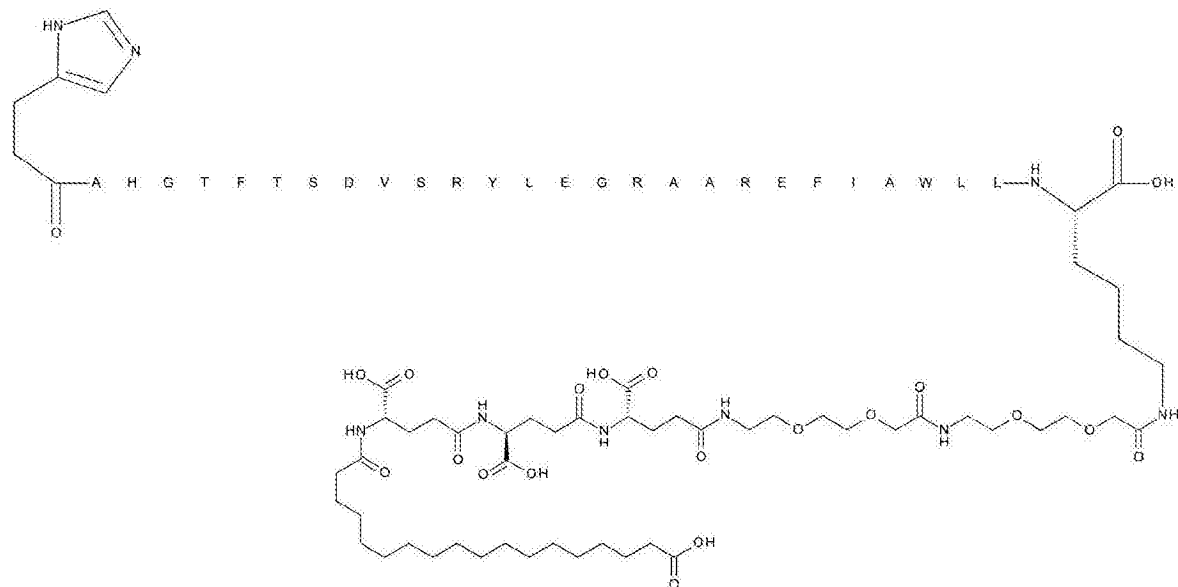
8

Lys23,Arg26,Leu33,Thr35]-GLP-1-(7-35)-肽酰胺



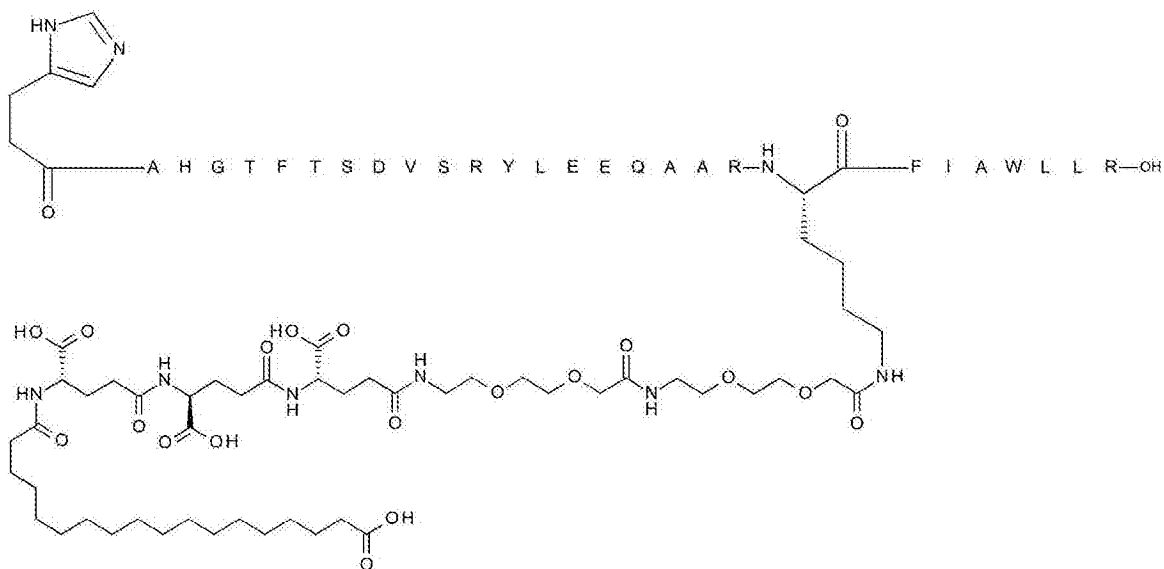
(化学式16)；

$N^{\epsilon 34}$ -[2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[(4S)-4-羧基-4-[[(4S)-4-羧基-4-[[(4S)-4-羧基-4-(17-羧基十七酰基氨基)丁酰基]氨基]丁酰基]氨基]丁酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基]-[Imp7,His9,Arg18,Arg23,Arg26,Leu33]-GLP-1-(7-34)-肽



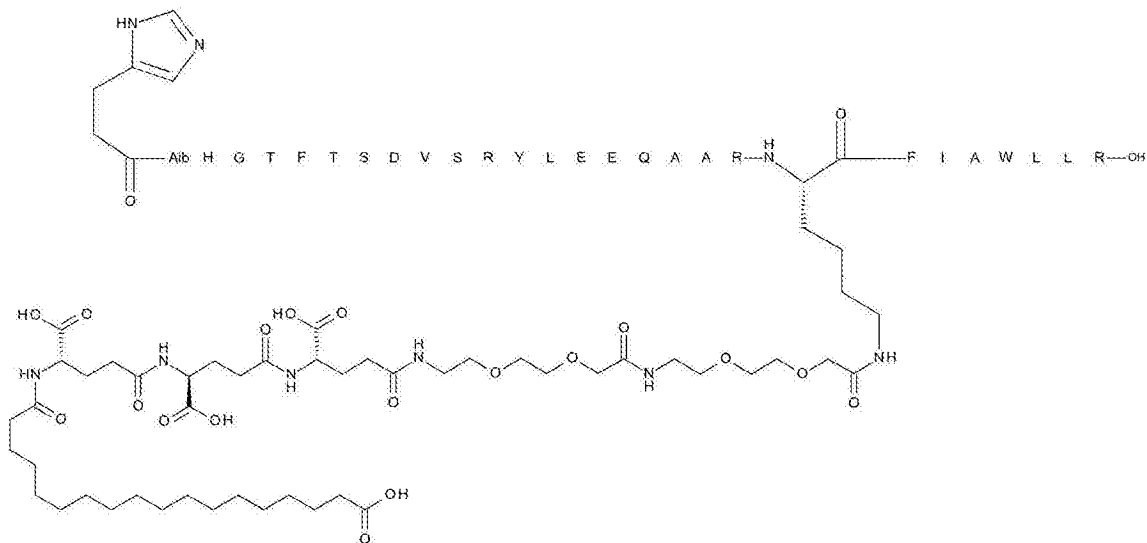
(化学式17)；

$N^{\epsilon 27}$ -[2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[(4S)-4-羧基-4-[[(4S)-4-羧基-4-[[(4S)-4-羧基-4-(17-羧基十七酰基氨基)丁酰基]氨基]丁酰基]氨基]丁酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基]-[Imp7,His9,Arg18,Glu22,Arg26,Lys27,Leu33,Arg34]-GLP-1-(7-34)-肽



(化学式18)；

$N^{\epsilon 27}$ -[2-[2-[2-[2-[2-[2-[(4S)-4-羧基-4-[(4S)-4-羧基-4-[(4S)-4-羧基-4-(17-羧基十七酰基氨基)丁酰基]氨基]丁酰基]氨基]丁酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基]-[Imp7,Aib8,His9,Arg18,Glu22,Arg26,Lys27,Leu33,Arg34]-GLP-1-(7-34)-肽

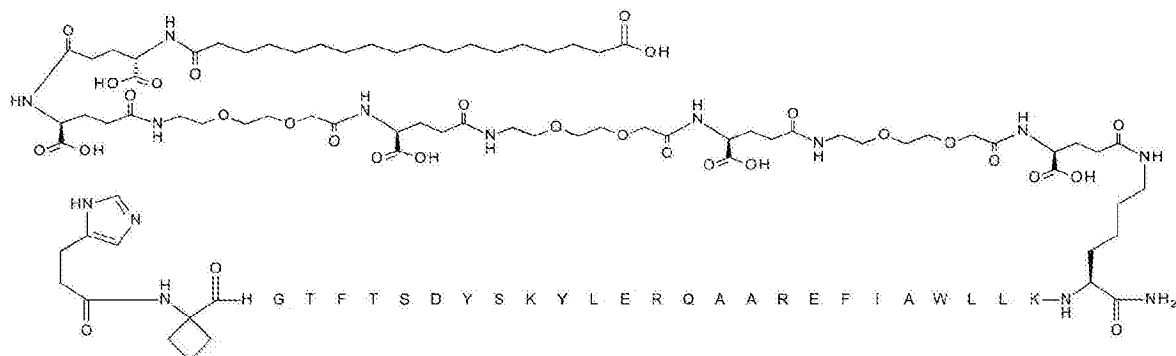


(化学式19)；

$N^{\epsilon 34}$ -[2-[(2S)-2-[(2S)-4-羧基-2-[2-[(2S)-2-[(4S)-4-羧基-4-[(4S)-4-羧基-4-(17-羧基十七酰基氨基)丁酰基]氨基]丁酰基]氨基]-3-羟基丙酰基]氨基]乙酰基]氨基]丁酰基]氨基]-3-羟基丙酰基]氨基]乙酰基]-[Imp7,Aib8,His9,Lys18,Arg23,Arg26,Leu33,Thr35]-GLP-1-(7-35)-肽酰胺

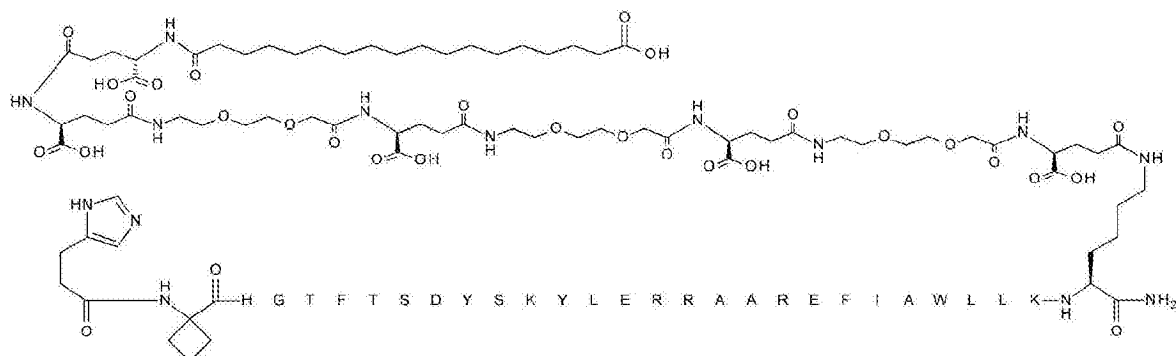


酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基]氨基]丁酰基]-[Imp7,Ac8,His9,Tyr16,Lys18,Arg22,Arg26,Leu33,Lys35]-GLP-1-(7-35)-肽酰胺



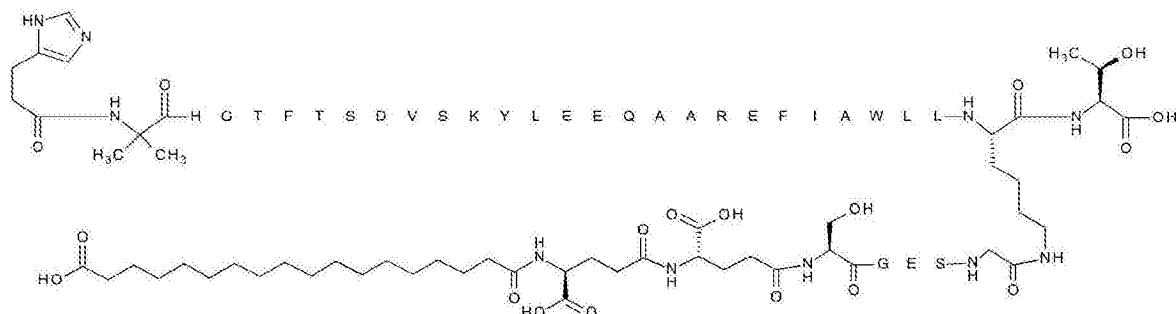
(化学式23)；

$N^{\epsilon 35}$ -[(4S)-4-羧基-4-[[2-[2-[2-[[[(4S)-4-羧基-4-[[2-[2-[2-[[[(4S)-4-羧基-4-[[2-[2-[2-[[[(4S)-4-羧基-4-(17-羧基十七酰基氨基)丁酰基]氨基]丁酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基]氨基]丁酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基]氨基]丁酰基]-[Imp7,Ac8,His9,Tyr16,Lys18,Arg22,Arg23,Arg26,Leu33,Lys35]-GLP-1-(7-35)-肽酰胺



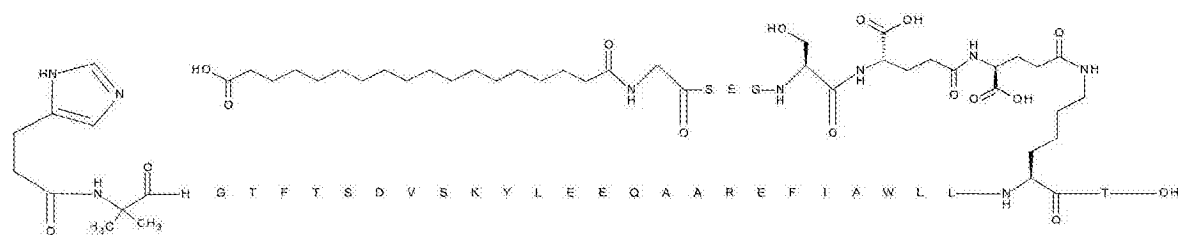
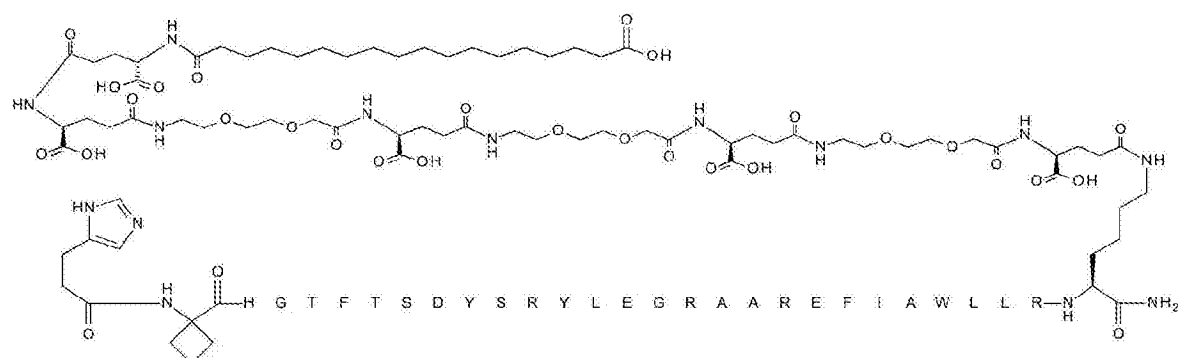
(化学式24)；

$N^{\epsilon 34}$ -[2-[[[(2S)-2-[[[(2S)-4-羧基-2-[[2-[[[(2S)-2-[[[(4S)-4-羧基-4-[[[(4S)-4-羧基-4-(17-羧基十七酰基氨基)丁酰基]氨基]丁酰基]氨基]-3-羟基丙酰基]氨基]乙酰基]氨基]丁酰基]氨基]-3-羟基丙酰基]氨基]乙酰基]-[Imp7,Aib8,His9,Lys18,Glu22,Arg26,Leu33,Thr35]-GLP-1-(7-35)-肽



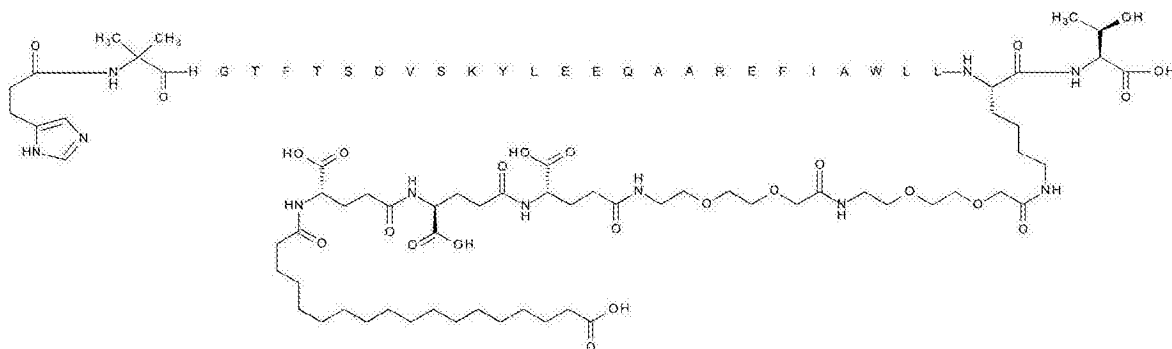
(化学式25)；

$N^{\epsilon 35}$ -[(4S)-4-羧基-4-[[2-[2-[2-[[[(4S)-4-羧基-4-[[2-[2-[2-[[[(4S)-4-羧基-4-[[2-[2-[2-[[[(4S)-4-羧基-4-(17-羧基十七酰基氨基)丁酰基]氨基]丁酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基]氨基]丁酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基]氨基]丁酰基]-[Imp7,Ac8,His9,Tyr16,Lys18,Arg22,Arg26,Leu33,Lys35]-GLP-1-(7-35)-肽酰胺

$$\text{N}^{\epsilon 34}-[(4\text{S})-4\text{-羧基-4-}[[(4\text{S})-4\text{-羧基-4-}[[(2\text{S})-2-[[2-[[(2\text{S})-4\text{-羧基-2-}[[(2\text{S})-2-[[2-(17\text{-羧基十七酰基氨基})\text{乙酰基}]\text{氨基}]-3\text{-羟基丙酰基}]\text{氨基}]\text{丁酰基}]\text{氨基}]\text{乙酰基}]\text{氨基}]-3\text{-羟基丙酰基}]\text{氨基}]\text{丁酰基}]\text{氨基}]\text{丁酰基}]-[\text{Imp7,Aib8,His9,Lys18,Glu22,Arg26,Leu33,Thr35}]\text{-GLP-1-(7-35)-肽}$$

$$\begin{aligned} & \text{N}^{\epsilon 35}-[(4\text{S})-4\text{-羧基-4-}[[2-[2-[2-[(4\text{S})-4\text{-羧基-4-}[[2-[2-[2-[(4\text{S})-4\text{-羧基-4-} \\ & [[2-[2-[2-[(4\text{S})-4\text{-羧基-4-}[(4\text{S})-4\text{-羧基-4-(17-羧基十七酰基氨基)丁酰基]氨基]丁 \\ & 酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基]氨基]丁酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基]氨基]丁 \\ & 酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基]氨基]丁酰基]-[\text{Imp7, Acb8, His9, Tyr16, Arg18,} \\ & \text{Arg23, Arg26, Leu33, Arg34, Lys35}]-\text{GLP-1-(7-35)-肽酰胺} \end{aligned}$$


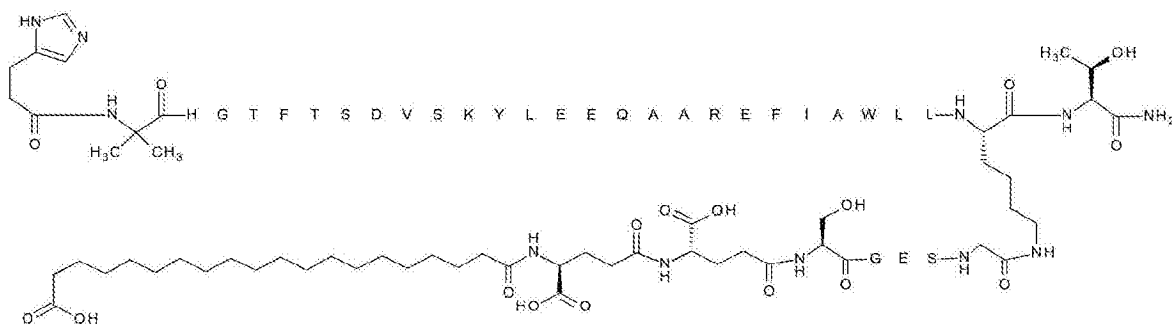
N^{ε34}-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[[(4S)-4-羧基-4-[[(4S)-4-羧基-4-[[(4S)-4-羧基-4-(17-羧基十七酰基氨基) 丁酰基]氨基]丁酰基]氨基]丁酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基]-[Imp7,Aib8,His9,Lys18,Glu22,Arg26,Leu33,Thr35]-

GLP-1-(7-35)-肽



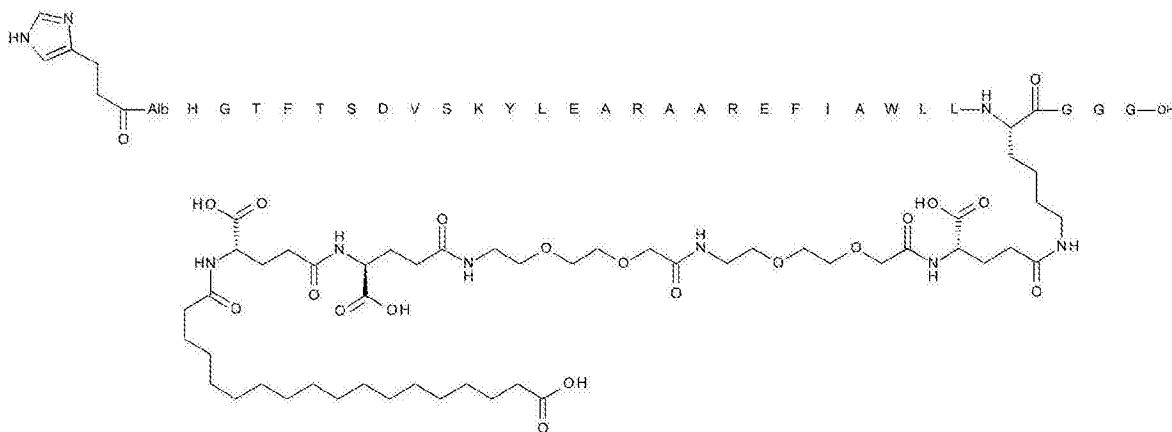
(化学式29)；

$N^{\epsilon 34}$ -[2-[[(2S)-2-[[(2S)-4-羧基-2-[[2-[[(2S)-2-[[(4S)-4-羧基-4-[[(4S)-4-羧基-4-(19-羧基十九酰基氨基) 丁酰基]氨基]丁酰基]氨基]-3-羟基丙酰基]氨基]乙酰基]氨基]丁酰基]氨基]-3-羟基丙酰基]氨基]乙酰基]-[Imp7,Aib8,His9,Lys18,Glu22,Arg26,Leu33,Thr35]-GLP-1-(7-35)-肽酰胺



(化学式30)；

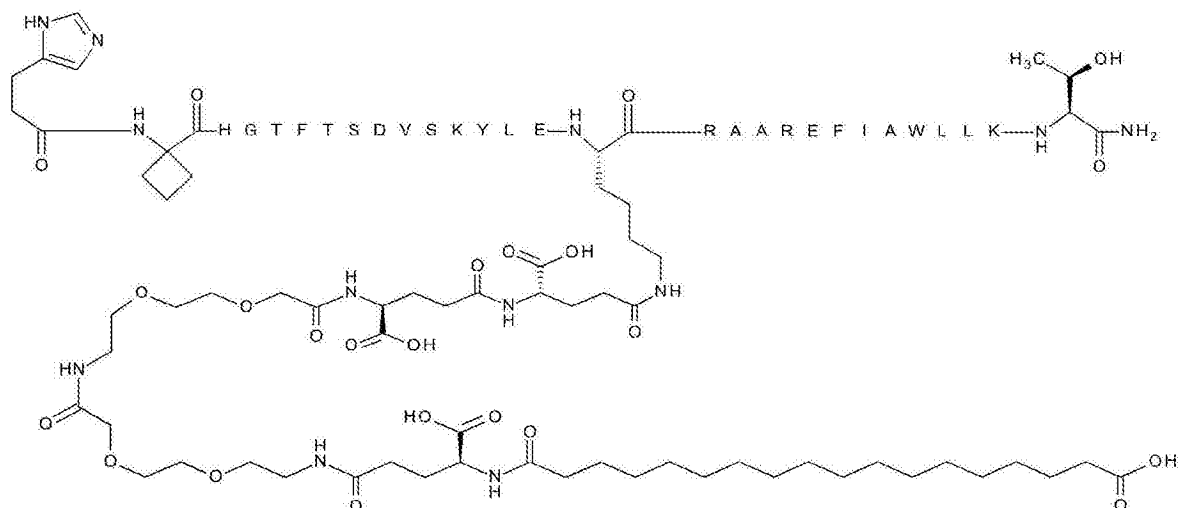
$N^{\epsilon 34}$ -[(4S)-4-羧基-4-[[2-[[2-[[2-[[2-[[2-[[(4S)-4-羧基-4-[[(4S)-4-羧基-4-(17-羧基十七酰基氨基) 丁酰基]氨基]丁酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基]氨基]丁酰基]-[Imp7,Aib8,His9,Lys18,Ala22,Arg23,Arg26,Leu33,Gly36]-GLP-1-(7-37)-肽



(化学式31)；

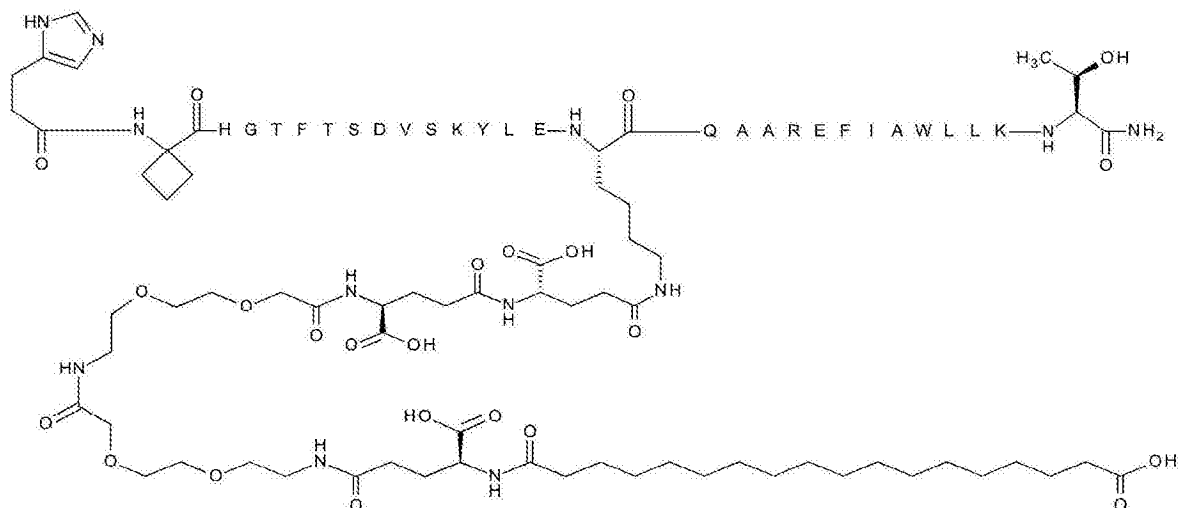
$N^{\epsilon 22}$ -[(4S)-4-羧基-4-[[(4S)-4-羧基-4-[[2-[[2-[[2-[[2-[[2-[[(4S)-4-羧基-4-(17-羧基十七酰基氨基) 丁酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基]氨基]丁酰基]氨基]丁酰基]-[Imp7,Aib8,His9,Lys18,Lys22,Arg23,Arg26,Leu33,

Thr35]-GLP-1-(7-35)-肽酰胺



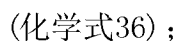
(化学式32)；

$N^{\epsilon 22}$ -[(4S)-4-羧基-4-[[(4S)-4-羧基-4-[[2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[(4S)-4-羧基-4-(17-羧基十七酰基氨基)丁酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基]氨基]丁酰基]氨基]丁酰基]-[Imp7,Acb8,His9,Lys18,Lys22,Arg26,Leu33,Thr35]-GLP-1-(7-35)-肽酰胺

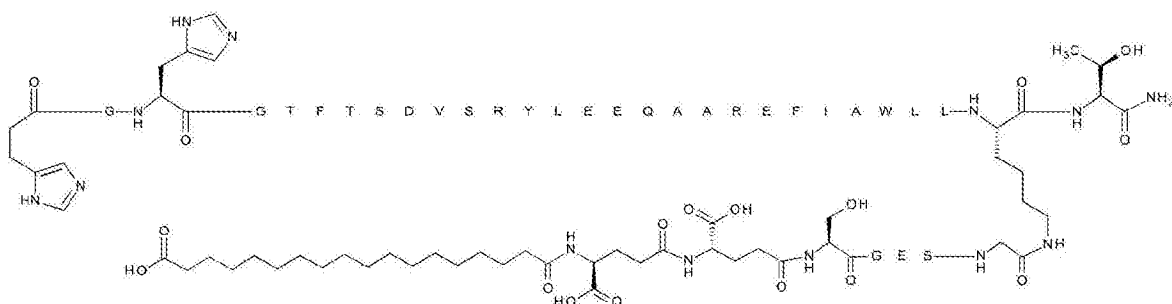


(化学式33)；

$N^{\epsilon 34}$ -[(4S)-4-羧基-4-[[(4S)-4-羧基-4-[[2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[(4S)-4-羧基-4-[[(4S)-4-羧基-4-(17-羧基十七酰基氨基)丁酰基]氨基]丁酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基]氨基]丁酰基]氨基]丁酰基]-[Imp7,Aib8,His9,Lys18,Ala22,Arg26,Leu33,Thr35]-GLP-1-(7-35)-肽酰胺

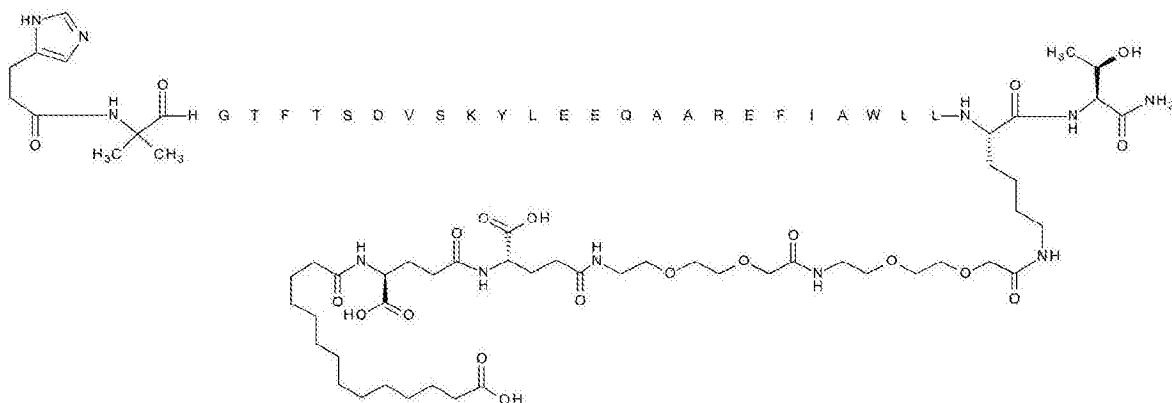


$N^{\epsilon 34}$ -[2-[[(2S)-2-[[(2S)-4-羧基-2-[[2-[[(2S)-2-[[(4S)-4-羧基-4-[[(4S)-4-羧基-4-(17-羧基十七酰基氨基)丁酰基]氨基]丁酰基]氨基]-3-羟基丙酰基]氨基]乙酰基]氨基]丁酰基]氨基]-3-羟基丙酰基]氨基]乙酰基]-[Imp7,Gly8,His9,Arg18,Glu22,Arg26,Leu33,Thr35]-GLP-1-(7-35)-肽酰胺



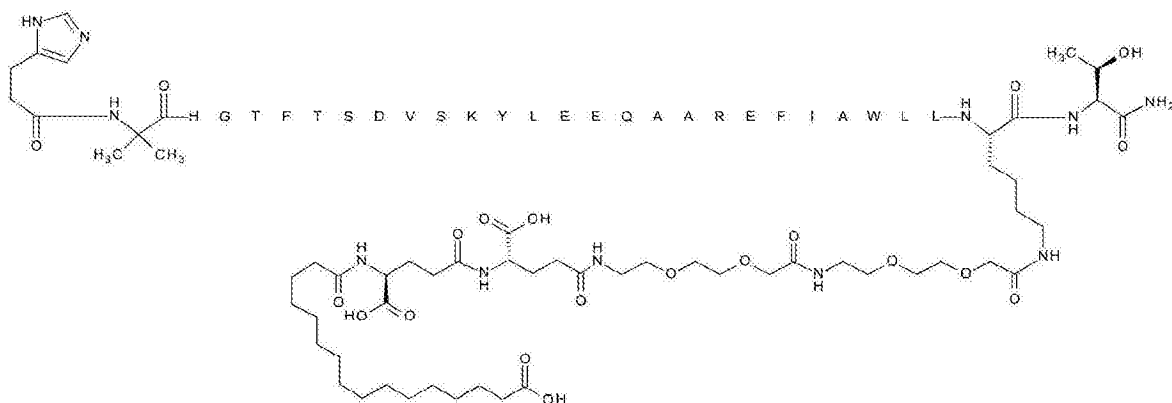
(化学式37)；

$N^{\epsilon 34}$ -[2-[2-[2-[2-[2-[2-[[(4S)-4-羧基-4-[[(4S)-4-羧基-4-(13-羧基十三酰基氨基)丁酰基]氨基]丁酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基]-[Imp7,Aib8,His9,Lys18,Glu22,Arg26,Leu33,Thr35]-GLP-1-(7-35)-肽酰胺



(化学式38)；

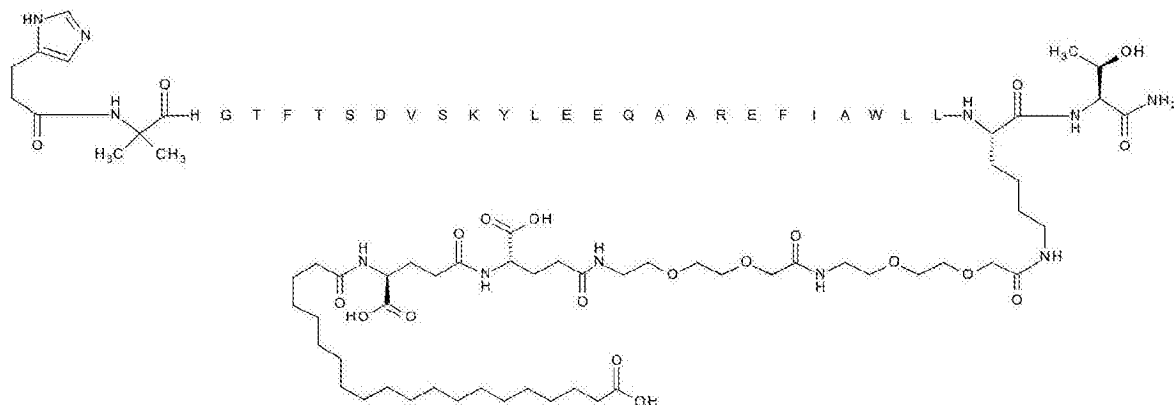
$N^{\epsilon 34}$ -[2-[2-[2-[2-[2-[2-[[(4S)-4-羧基-4-[[(4S)-4-羧基-4-(15-羧基十五酰基氨基)丁酰基]氨基]丁酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基]-[Imp7,Aib8,His9,Lys18,Glu22,Arg26,Leu33,Thr35]-GLP-1-(7-35)-肽酰胺



(化学式39)；

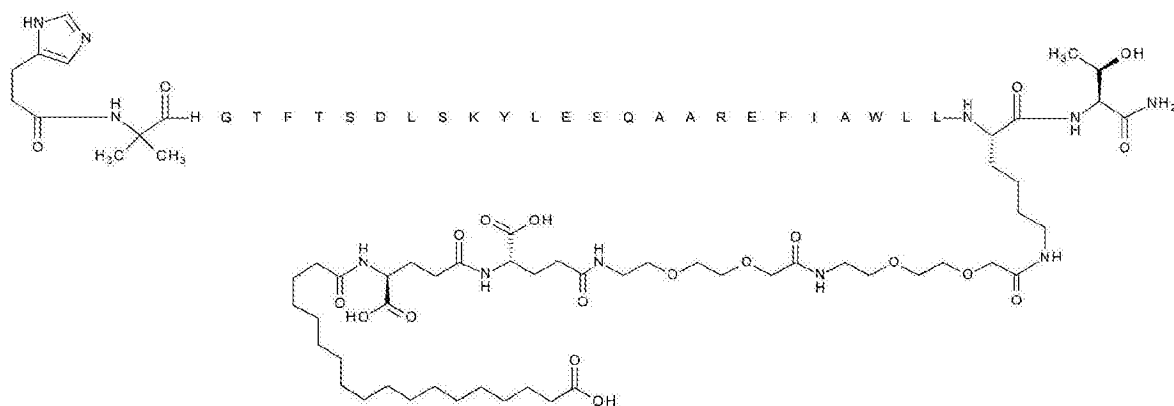
$N^{\epsilon 34}$ -[2-[2-[2-[2-[2-[2-[[(4S)-4-羧基-4-[[(4S)-4-羧基-4-(19-羧基十九酰基氨基)丁酰基]氨基]丁酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基]-[Imp7,Aib8,His9,Lys18,Glu22,Arg26,Leu33,Thr35]-GLP-1-(7-35)-肽酰胺

[Imp7,Aib8,His9,Lys18,Glu22,Arg26,Leu33,Thr35]-GLP-1-(7-35)-肽酰胺



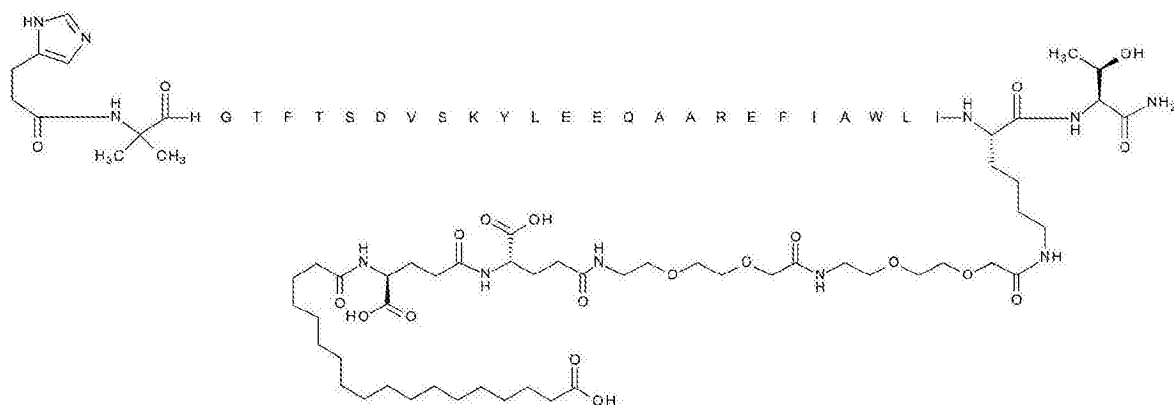
(化学式40)；

$N^{\epsilon 34}$ -[2-[2-[2-[2-[2-[2-[[(4S)-4-羧基-4-[[(4S)-4-羧基-4-(17-羧基十七酰基氨基)丁酰基]氨基]丁酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基]-[Imp7,Aib8,His9,Leu16,Lys18,Glu22,Arg26,Leu33,Thr35]-GLP-1-(7-35)-肽酰胺



(化学式41)；

$N^{\epsilon 34}$ -[2-[2-[2-[2-[2-[2-[[(4S)-4-羧基-4-[[(4S)-4-羧基-4-(17-羧基十七酰基氨基)丁酰基]氨基]丁酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基]-[Imp7,Aib8,His9,Lys18,Glu22,Arg26,Ile33,Thr35]-GLP-1-(7-35)-肽酰胺



(化学式42)；

或其药学上可接受的盐、酰胺和/或酯。

19. 药物组合物,其包含根据前述权利要求中任一项所述的GLP-1衍生物以及一种或多种药学上可接受的赋形剂。

20. 用于治疗疾病的方法,该方法包括向有需要的受试者施用根据权利要求1-18中任一项所述的GLP-1衍生物,其中该疾病选自肥胖症、高血糖症、2型糖尿病、葡萄糖耐量减低和1型糖尿病。

21. GLP-1类似物,或其药学上可接受的盐、酰胺或酯,该GLP-1类似物选自:

[Imp7, Acb8, His9, Tyr16, Lys18, Glu22, Arg26, Leu33, Lys35]-GLP-1-(7-35)-肽酰胺;
[Imp7, Acb8, His9, Lys18, Glu22, Arg26, Leu33, Lys35]-GLP-1-(7-35)-肽酰胺;
[Imp7, Aib8, His9, Lys18, Glu22, Arg26, Leu33, Thr35]-GLP-1-(7-35)-肽酰胺;
[Imp7, Aib8, His9, Arg18, Glu22, Arg26, Leu33, Thr35]-GLP-1-(7-35)-肽酰胺;
[Imp7, Aib8, His9, Arg18, Arg26, Leu33, Thr35]-GLP-1-(7-35)-肽酰胺;
[Imp7, Acb8, His9, Lys18, Glu22, Arg26, Leu33, Thr35]-GLP-1-(7-35)-肽酰胺;
[Imp7, His9, Lys18, Arg23, Arg26, Leu33, Thr35]-GLP-1-(7-35)-肽酰胺;
[Imp7, His9, Lys18, Arg23, Arg26, Leu33, Gly36]-GLP-1-(7-37)-肽;
[Imp7, Aib8, His9, Lys18, Lys22, Arg26, Leu33, Gly36]-GLP-1-(7-37)-肽;
[Imp7, Aib8, His9, Tyr16, Lys18, Glu22, Arg26, Leu33, Lys36]-GLP-1-(7-37)-肽;
[Imp7, Aib8, His9, Lys18, Lys23, Arg26, Leu33, Thr35]-GLP-1-(7-35)-肽酰胺;
[Imp7, Aib8, His9, Tyr16, Lys18, Lys23, Arg26, Leu33, Thr35]-GLP-1-(7-35)-肽酰胺;
[Imp7, His9, Arg18, Arg23, Arg26, Leu33]-GLP-1-(7-34)-肽;
[Imp7, His9, Arg18, Glu22, Arg26, Lys27, Leu33, Arg34]-GLP-1-(7-34)-肽;
[Imp7, Aib8, His9, Arg18, Glu22, Arg26, Lys27, Leu33, Arg34]-GLP-1-(7-34)-肽;
[Imp7, Acb8, His9, Lys18, Arg23, Arg26, Leu33, Thr35]-GLP-1-(7-35)-肽酰胺;
[Imp7, Acb8, His9, Tyr16, Lys18, Glu22, Arg26, Leu33, Lys35]-GLP-1-(7-35)-肽酰胺;
[Imp7, Acb8, His9, Tyr16, Arg18, Glu22, Arg26, Leu33, Arg34, Lys35]-GLP-1-(7-35)-肽酰胺;
[Imp7, Acb8, His9, Tyr16, Lys18, Arg22, Arg26, Leu33, Lys35]-GLP-1-(7-35)-肽酰胺;
[Imp7, Acb8, His9, Tyr16, Lys18, Arg22, Arg23, Arg26, Leu33, Lys35]-GLP-1-(7-35)-肽酰胺;
[Imp7, Aib8, His9, Lys18, Glu22, Arg26, Leu33, Thr35]-GLP-1-(7-35)-肽;
[Imp7, Acb8, His9, Tyr16, Lys18, Arg23, Arg26, Leu33, Lys35]-GLP-1-(7-35)-肽酰胺;
[Imp7, Acb8, His9, Tyr16, Arg18, Arg23, Arg26, Leu33, Arg34, Lys35]-GLP-1-(7-35)-肽酰胺;
[Imp7, Aib8, His9, Lys18, Glu22, Arg26, Leu33, Thr35]-GLP-1-(7-35)-肽酰胺;
[Imp7, Aib8, His9, Lys18, Ala22, Arg23, Arg26, Leu33, Gly36]-GLP-1-(7-37)-肽;
[Imp7, Acb8, His9, Lys18, Lys22, Arg23, Arg26, Leu33, Thr35]-GLP-1-(7-35)-肽酰胺;
[Imp7, Acb8, His9, Lys18, Lys22, Arg26, Leu33, Thr35]-GLP-1-(7-35)-肽酰胺;
[Imp7, Aib8, His9, Lys18, Ala22, Arg26, Leu33, Thr35]-GLP-1-(7-35)-肽酰胺;
[Imp7, Aib8, His9, Arg18, Arg23, Arg26, Leu33, Ala36]-GLP-1-(7-37)-肽;
[Imp7, Aib8, His9, Arg18, Arg23, Arg26, Leu33, Ser36]-GLP-1-(7-37)-肽;
[Imp7, Gly8, His9, Arg18, Glu22, Arg26, Leu33, Thr35]-GLP-1-(7-35)-肽酰胺;
[Imp7, Aib8, His9, Leu16, Lys18, Glu22, Arg26, Leu33, Thr35]-GLP-1-(7-35)-肽酰胺;

以及

[Imp7,Aib8,His9,Lys18,Glu22,Arg26,Ile33,Thr35]-GLP-1-(7-35)-肽酰胺。

稳定的基于GLP-1的GLP-1/胰高血糖素受体共激动剂

[0001] 本发明涉及作为GLP-1/胰高血糖素受体共激动剂(co-agonists)的新型GLP-1衍生物、其组合物及其在医疗中的用途。

[0002] 背景

[0003] 多种胃肠肽激素参与食物摄入和能量平衡的调节(例如,CCK、GLP-1、PYY、生长素释放肽)。近来,已证明肠L细胞中胰高血糖素原基因的产物——泌酸调节肽(Oxm)也在啮齿动物和人类中具有降低食欲的特性。在肥胖人群中进行的为期四周的临床研究证明,反复皮下施用Oxm减少食物摄入并引起显著的体重减轻。由于特异性Oxm受体仍有待发现,已经提示许多生理效应是通过GLP-1和胰高血糖素受体激活来介导的。实际上,Oxm虽然具有比同源配体更低的亲和力和效力,但也结合并激活GLP-1和胰高血糖素受体。最近的几篇论文已经通过构建双重激动剂并在DIO小鼠和敲除小鼠模型中比较体重降低效应,证明了GLP-1/胰高血糖素受体同时靶向的力量。采用平衡的GLP-1/胰高血糖素受体共激动剂治疗导致体重和脂肪量的稳健降低,超过了纯GLP-1受体激动剂导致的降低,并具有与GLP-1受体激动剂相当的葡萄糖控制。相比于用纯GLP-1受体激动剂治疗,用GLP-1/胰高血糖素受体共激动剂治疗后,包括胰岛素、瘦素和脂联素在内的血浆代谢参数的改善更明显。此外,在DIO小鼠中,GLP-1/胰高血糖素受体共激动剂治疗增加脂肪酸氧化并减少肝性脂肪变性。与野生型动物相比,在GLP-1或胰高血糖素受体敲除小鼠中,GLP-1/胰高血糖素受体共激动剂显示了对体重减轻的降低的、但仍然显著的效应,从而支持了GLP-1和胰高血糖素受体的同时激活导致优异的体重减轻这一假设。

[0004] 胰高血糖素受体活化的一种生理效应是通过刺激肝糖原分解和糖异生来增加血糖水平。另外已经显示在啮齿动物和人类中,胰高血糖素受体活化增加了能量消耗并减少了食物摄入。

[0005] 在一项最近的研究中,向16名人类志愿者输注胰高血糖素、GLP-1、胰高血糖素和GLP-1的组合或盐水。在组合组中,进餐期间的能量摄入显著减少(13%),但当单独给予任一激素时能量摄入不受影响。

[0006] 在另一项研究中,在向健康人类志愿者输注GLP-1、胰高血糖素或其组合后测量能量消耗(EE)。该研究表明,胰高血糖素以及胰高血糖素和GLP-1的组合以相似的程度增加EE,而GLP-1则没有效果。胰高血糖素输注伴随着血浆葡萄糖水平的升高,但GLP-1和胰高血糖素的共输注迅速降低了这种偏移。使用对两种受体的鼠受体效力不同的GLP-1/胰高血糖素受体共激动剂肽家族进一步证明了GLP-1受体活性在预防肥胖小鼠中的胰高血糖素受体介导的高血糖症中的重要性。该研究表明,平衡的GLP-1/胰高血糖素受体共激动剂肽表现出对于体重减轻的最佳治疗特性,同时缓和了与胰高血糖素受体活化相关的高血糖症风险。

[0007] 总之,这些研究支持了双重GLP-1和胰高血糖素激动作为治疗肥胖症的潜在靶标这一思路。

[0008] 已经使用胰高血糖素或泌酸调节肽作为起始点获得了绝大多数GLP-1/胰高血糖素受体共激动剂,并且已通过各种氨基酸突变使GLP-1活性得到改善。胰高血糖素具有较差

的物理和化学稳定性,并且对于许多基于胰高血糖素的共激动剂也观察到这一点。

[0009] 因此,仍然需要具有改善的稳定性,包括改善的化学和物理稳定性的GLP-1/胰高血糖素受体共激动剂。

发明内容

[0010] 本发明涉及作为GLP-1/胰高血糖素受体共激动剂的新型稳定且持久的GLP-1衍生物、其组合物、该GLP-1衍生物在医疗中的用途,并涉及包括向患者施用GLP-1衍生物的治疗方法,包括糖尿病、肥胖症及相关疾病和病况的治疗。

[0011] 在一些实施方案中,本发明涉及GLP-1衍生物或其药学上可接受的盐和/或酯,该GLP-1衍生物包含由式I氨基酸序列组成的多肽:

[0012] Imp-X8-His-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-X16-Ser-X18-Tyr-Leu-Glu-X22-X23-Ala-Ala-X26-X27-Phe-Ile-Ala-Trp-Leu-X33-X34-X35-X36-X37[I],

[0013] 其中

[0014] X8为Ala、Aib、Acb或Gly;

[0015] X16为Val、Leu、Ile或Tyr;

[0016] X18为Lys或Arg;

[0017] X22为Gly、Ala、Glu、Lys、Arg、Ser或Aib;

[0018] X23为Gln、Arg或Lys;

[0019] X26为Lys或Arg;

[0020] X27为Glu或Lys;

[0021] X33为Val、Leu或Ile;

[0022] X34为Lys或Arg;

[0023] X35为Gly、Thr、Lys或不存在;

[0024] X36为Ala、Gly、Lys、Ser或不存在;

[0025] X37为Gly或不存在;

[0026] 其中所述GLP-1衍生物进一步包含含有亲脂性部分和至少两个带负电荷的部分的取代基,其中所述带负电荷的部分中的一个在亲脂性部分的远端;

[0027] 其中所述多肽任选地包含C末端酰胺。

[0028] 在一些实施方案中,本发明涉及药物组合物,其包含如前述权利要求中任一项所限定的GLP-1衍生物以及一种或多种药学上可接受的赋形剂。

[0029] 在一些实施方案中,本发明涉及如前述权利要求中任一项所限定的GLP-1衍生物,其用于医疗,如用于治疗或预防肥胖症、高血糖症、2型糖尿病、葡萄糖耐量减低和/或1型糖尿病。

[0030] 在一些实施方案中,本发明涉及如本文所定义的GLP-1类似物形式的中间产物,或其药学上可接受的盐、酰胺或酯。

附图说明

[0031] 图1:淀粉样原纤维形成期间ThT荧光发射的理论S形时程。

[0032] 发明详述

[0033] 本发明提供了包含氨基酸置换和具有带负电荷的部分的取代基的新型GLP-1衍生物,该GLP-1衍生物为GLP-1/胰高血糖素受体共激动剂。如本文所使用的术语“GLP-1/胰高血糖素受体共激动剂”是指激活GLP-1受体和胰高血糖素受体两者的激动剂。具体而言,本发明的GLP-1衍生物包含在GLP-1衍生物的氨基酸序列的位置7的脱氨基组氨酸和位置9的组氨酸的氨基酸置换,该GLP-1衍生物进一步包含具有至少两个负电荷的取代基。在一些实施方案中,提及如本文所使用的GLP-1衍生物中的氨基酸位置是相对于人GLP-1 (7-37) 而言的,其中N末端组氨酸被定义为位置7。

[0034] 在一些实施方案中,本发明的GLP-1衍生物相对于胰高血糖素受体更好地激活GLP-1受体,即该GLP-1衍生物对胰高血糖素受体的EC₅₀值与其对GLP-1受体的EC₅₀之间的比值大于1。在一些实施方案中,本发明的GLP-1衍生物相对于胰高血糖素受体更好地结合GLP-1受体,即该GLP-1衍生物对胰高血糖素受体的IC₅₀值与对GLP-1受体的IC₅₀之间的比值大于1。本文公开的受体试验可用于评估这样的比值。

[0035] 本发明人已发现,本发明的GLP-1衍生物可具有改善的物理稳定性和改善的化学稳定性,同时保留足够的水溶性、受体效力和受体结合。在一些实施方案中,该GLP-1衍生物具有改善的物理稳定性(例如,在用来评估物理稳定性的试验中,该GLP-1衍生物没有显示出原纤维形成(fibrillation)或显示出延迟的原纤维形成,这类试验的实例已在本文中公开)。另外或可替代地,在一些实施方案中,该GLP-1衍生物在药物组合物可接受的pH范围内,如在中性pH或微碱性pH下,具有足够的水溶性。另外或可替代地,在一些实施方案中,该GLP-1衍生物具有改善的化学稳定性,例如,在例如液体组合物如药物组合物中,该GLP-1衍生物的化学降解减少。另外或可替代地,在一些实施方案中,该GLP-1衍生物具有改善的药代动力学特性,即,它们具有例如与人胰高血糖素和/或人GLP-1相比延长的体内半衰期。另外或可替代地,在一些实施方案中,该GLP-1衍生物在皮下施用后引起显著的体重减轻。如本文所述的试验(I)和(II)可用来分别测量本发明的GLP-1衍生物对胰高血糖素和GLP-1受体的活性和亲和力。本发明的GLP-1衍生物在不同pH值下的溶解度可如本文所述进行测量,参见例如功能性质部分。本发明的GLP-1衍生物的物理稳定性可通过如本文试验(III)中所述的方法进行测量。本发明的GLP-1衍生物的化学稳定性可如本文试验(V)中所述进行测量。该GLP-1衍生物的半衰期可通过在诸如小鼠(例如,使用本文试验(IV)中所述的方法)、大鼠或小型猪等物种中的药代动力学研究进行测定。由本发明的GLP-1衍生物引起的体重减轻量可通过对DIO小鼠施用本发明的GLP-1衍生物并将其对体重的影响与单独施用载体相比较来测量。

[0036] 在一些实施方案中,本发明的GLP-1衍生物包含多肽或其药学上可接受的盐、酰胺和/或酯,该多肽由式I氨基酸序列组成:

[0037] Imp-X8-His-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-X16-Ser-X18-Tyr-Leu-Glu-X22-X23-Ala-Ala-X26-X27-Phe-Ile-Ala-Trp-Leu-X33-X34-X35-X36-X37[I],

[0038] 其中

[0039] X8为Ala、Aib、Acb或Gly;

[0040] X16为Val、Leu、Ile或Tyr;

[0041] X18为Lys或Arg;

[0042] X22为Gly、Ala、Glu、Lys、Arg、Ser或Aib;

[0043] X23为Gln、Arg或Lys；

[0044] X26为Lys或Arg；

[0045] X27为Glu或Lys；

[0046] X33为Val、Leu或Ile；

[0047] X34为Lys或Arg；

[0048] X35为Gly、Thr、Lys或不存在；

[0049] X36为Ala、Gly、Lys、Ser或不存在；

[0050] X37为Gly或不存在；

[0051] 其中所述多肽包含含有亲脂性部分和至少两个带负电荷的部分的取代基，其中所述带负电荷的部分中的一个在亲脂性部分的远端。

[0052] 在一些实施方案中，本发明的GLP-1衍生物包含多肽或其药学上可接受的盐、酰胺和/或酯，该多肽由式I氨基酸序列组成：

[0053] Imp-X8-His-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-X16-Ser-X18-Tyr-Leu-Glu-X22-X23-Ala-Ala-X26-X27-Phe-Ile-Ala-Trp-Leu-X33-X34-X35-X36-X37[I]，

[0054] 其中

[0055] X8为Ala、Aib、Acb或Gly；

[0056] X16为Val、Leu、Ile或Tyr；

[0057] X18为Lys或Arg；

[0058] X22为Gly、Ala、Glu、Lys、Arg、Ser或Aib；

[0059] X23为Gln、Arg或Lys；

[0060] X26为Lys或Arg；

[0061] X27为Glu或Lys；

[0062] X33为Val、Leu或Ile；

[0063] X34为Lys或Arg；

[0064] X35为Gly、Thr、Lys或不存在；

[0065] X36为Ala、Gly、Lys、Ser或不存在；

[0066] X37为Gly或不存在；

[0067] 其中所述氨基酸序列在选自位置22、23、27、34、35和36中的一个或多个位置处包含赖氨酸残基；并且

[0068] 其中所述多肽包含含有亲脂性部分和至少两个带负电荷的部分的取代基，其中所述带负电荷的部分中的一个在亲脂性部分的远端，并且其中所述取代基连接在选自位置22、23、27、34、35和36中的一个氨基酸位置处的赖氨酸残基的 ϵ 位置处。

[0069] GLP-1肽及类似物

[0070] 如本文所使用的术语“GLP-1肽”是指人GLP-1或其类似物，人GLP-1的序列作为SEQ ID NO:1包括在序列表中。由SEQ ID NO:1的序列组成的肽在本文中也可简称为“GLP-1”。在一些实施方案中，如本文所使用的术语“人GLP-1”和“GLP-1”是指HAEGTFTSDVSSYLEGQAAKEFIAWLVKGRG (SEQ ID NO:1)。在序列表中，SEQ ID NO:1的第一个氨基酸残基(组氨酸)被指定为第1号。然而，在下文中，根据本领域的惯例，该组氨酸残基被称为第7号，并且对随后的氨基酸残基相应地进行编号，结束于第37号甘氨酸。因此，通常，本

文中任何提及GLP-1 (7-37) 序列的氨基酸残基编号或位置编号是指开始于位置7处的His并结束于位置37处的Gly的序列。

[0071] 本发明衍生物的GLP-1类似物可参照以下两方面来描述：i) 天然GLP-1 (7-37) 中与改变的氨基酸残基相对应的氨基酸残基的编号 (即天然GLP-1中的相应位置)，和ii) 实际改变。

[0072] 换言之，GLP-1类似物是与天然GLP-1 (7-37) (SEQ ID NO:1) 相比许多氨基酸残基已被改变的GLP-1 (7-37) 肽。这些变化可独立地代表一个或多个氨基酸置换、添加和/或缺失。

[0073] 如本文所使用的术语“GLP-1类似物”是指作为GLP-1 (SEQ ID NO:1) 的变体的肽或化合物。此处的式I氨基酸序列是GLP-1类似物的一个例子。术语“GLP-1类似物”和“类似物”在本文中可互换使用。如本文所使用的术语“多肽”，例如与GLP-1衍生物一起使用时，如“GLP-1衍生物的多肽”，可指由如本文所定义的式I氨基酸序列组成的肽。

[0074] 本发明衍生物的GLP-1类似物可参照以下两方面来描述：i) 人GLP-1 (SEQ ID NO:1) 中与经修饰的氨基酸残基相对应的氨基酸残基的编号 (即GLP-1 (SEQ ID NO:1) 中的相应位置)，和ii) 实际修饰。以下是适当的GLP-1类似物命名的非限制性实例。

[0075] 该GLP-1类似物是与人GLP-1 (SEQ ID NO:1) 相比具有多个氨基酸残基修饰的GLP-1肽。这些修饰可以是一个或多个氨基酸置换、添加和/或缺失。例如，“[Imp7,His9]-GLP-1”或“[Imp7,His9]-GLP-1 (7-37) 肽”表示在GLP-1 (SEQ ID NO:1) 中，位置7处的氨基酸已被Imp置换，位置9处的氨基酸已被His置换。类似地，“[Imp7,His9,des36-37]-GLP-1 (7-35) 肽”或“[Imp7,His9,des36-37]-GLP-1”表示在GLP-1 (SEQ ID NO:1) 中，位置7处的氨基酸已被Imp置换，位置9处的氨基酸已被His置换，并且位置36和37处的氨基酸已被删除。

[0076] “包含”某些特定变化的类似物与SEQ ID NO:1相比可包含进一步的变化。在特定的实施方案中，该类似物由特定的变化“组成”或“具有”特定的变化。

[0077] 由以上实例可以明显看出，氨基酸残基可由其全名、其单字母编码和/或其三字母编码来表示。这三种方式完全等效。在一些实施方案中，GLP-1类似物和GLP-1衍生物根据IUPAC-IUB命名法使用标准单字母或三字母编码示出。

[0078] 表述“位置”或“相应位置”可用来参照人GLP-1 (SEQ ID NO:1) 表征GLP-1氨基酸序列中的变化位点。位置以及变化的数目可容易地推算出，例如通过简单的书写和目测。

[0079] 例如在本发明衍生物的GLP-1类似物的语境中所使用的术语“肽”是指包含通过酰胺 (或肽) 键互连的一系列氨基酸的化合物。本发明的GLP-1衍生物包含至少五个通过肽键连接的组成氨基酸。在特定的实施方案中，该肽a) 包含i) 28个、ii) 29个、iii) 30个或iv) 31个氨基酸，或b) 由i) 28个、ii) 29个、iii) 30个或iv) 31个氨基酸组成。在更进一步的特定实施方案中，该肽由通过肽键互连的氨基酸组成。

[0080] 氨基酸是包含氨基和羧基基团的分子。如本文所使用的术语“氨基酸”包括编码氨基酸 (其中有20种标准氨基酸) 以及非编码氨基酸。编码氨基酸是由遗传密码编码的氨基酸 (IUPAC表13AA-1部分, www.chem.qmul.ac.uk/iupac/AminoAcid/AA1n2.html#AA1)。非编码氨基酸既未在天然 (例如人类) 肽和/或蛋白质中发现也并非由标准细胞机制产生 (例如，它们可能已经经历翻译后修饰)。非编码氨基酸的非限制性实例为Aib (α -氨基异丁酸)、脱氨基组氨酸 (3-(咪唑-4-基) 丙酸，别名咪唑并丙酸，简写为Imp) 以及编码氨基酸的D异构体。

在此, Imp被定义为一种氨基酸, 虽然其并不含氨基。

[0081] 在本文中, 未明确说明其光学异构体的肽(例如, GLP-1类似物或GLP-1衍生物)的所有氨基酸应理解为是指L-异构体(除非另有说明)。

[0082] 与人GLP-1 (SEQ ID NO:1) 相比, 所述GLP-1衍生物可在多肽中包含总计至多15个氨基酸修饰(例如, 一个或多个添加、一个或多个缺失和/或一个或多个置换)。在一些实施方案中, 该GLP-1衍生物包含与人GLP-1 (SEQ ID NO:1) 相比含有3-15个氨基酸残基修饰如置换、添加或缺失的多肽。在一些实施方案中, 该GLP-1衍生物包含与人GLP-1 (SEQ ID NO:1) 相比含有至多14个, 如至多13个或至多12个氨基酸残基修饰如置换、添加或缺失的多肽。在一些实施方案中, 该GLP-1衍生物包含与人GLP-1 (SEQ ID NO:1) 相比含有至多11个, 如至多10个或至多9个氨基酸残基修饰如置换、添加或缺失的多肽。在一些实施方案中, 该GLP-1衍生物包含与人GLP-1 (SEQ ID NO:1) 相比含有至多8个, 如至多7个或至多6个氨基酸残基修饰如置换、添加或缺失的多肽。在一些实施方案中, 该GLP-1衍生物包含与人GLP-1 (SEQ ID NO:1) 相比含有至多5个, 如至多4个或至多3个氨基酸残基修饰如置换、添加或缺失的多肽。

[0083] 在一些实施方案中, 所述GLP-1衍生物的多肽由式I氨基酸序列组成:

[0084] Imp-X8-His-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-X16-Ser-X18-Tyr-Leu-Glu-X22-X23-Ala-Ala-X26-X27-Phe-Ile-Ala-Trp-Leu-X33-X34-X35-X36-X37[I],

[0085] 其中

[0086] X8为Ala、Aib、Acb或Gly;

[0087] X16为Val、Leu、Ile或Tyr;

[0088] X18为Lys或Arg;

[0089] X22为Gly、Ala、Glu、Lys、Arg、Ser或Aib;

[0090] X23为Gln、Arg或Lys;

[0091] X26为Lys或Arg;

[0092] X27为Glu或Lys;

[0093] X33为Val、Leu或Ile;

[0094] X34为Lys或Arg;

[0095] X35为Gly、Thr、Lys或不存在;

[0096] X36为Ala、Gly、Lys、Ser或不存在, 或者X36可为天然Arg残基;

[0097] X37为Gly或不存在。

[0098] 在一些实施方案中, 所述多肽包含C末端酸基团, 如羧酸基团。在一些实施方案中, 所述多肽包含C末端酰胺。

[0099] 在一些实施方案中, X8为Ala、Aib、Acb; X22为Ala或Glu; X35为Gly或Thr; 并且/或者X36为Gly或不存在。

[0100] 在一些实施方案中, X8为Ala、Aib、Acb或Gly。在一些实施方案中, X8为Ala、Aib或Acb。

[0101] 在一些实施方案中, X16为Val、Leu、Ile或Tyr。

[0102] 在一些实施方案中, X18为Lys或Arg。

[0103] 在一些实施方案中, X22为Gly、Ala、Glu、Lys、Arg、Ser或Aib。在一些实施方案中,

X22为Gly、Ala或Glu。在一些实施方案中，X22为Lys、Arg、Ser或Aib。在一些实施方案中，X22为Ala或Glu。

[0104] 在一些实施方案中，X23为Gln、Arg或Lys。

[0105] 在一些实施方案中，X26为Lys或Arg。

[0106] 在一些实施方案中，X27为Glu或Lys。

[0107] 在一些实施方案中，X33为Val、Leu或Ile。

[0108] 在一些实施方案中，X34为Lys或Arg。

[0109] 在一些实施方案中，X35为Gly、Thr、Lys或不存在。在一些实施方案中，X35为Gly或Thr。

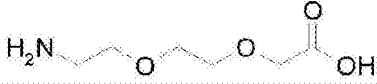
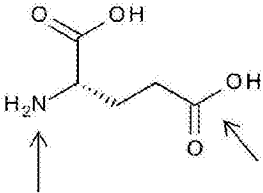
[0110] 在一些实施方案中，X36为Ala、Gly、Lys、Ser或不存在。在一些实施方案中，X36为Ala、Gly或Lys。在一些实施方案中，X36为Gly或不存在。

[0111] 在一些实施方案中，如果X35不存在，则X36和X37也不存在。在一些实施方案中，如果X35不存在，则X36和X37也不存在，并且所述GLP-1衍生物包含C末端羧酸基团。

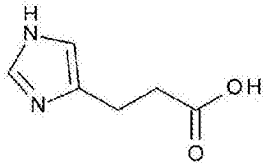
[0112] 在一些实施方案中，如果X36不存在，则X37也不存在。在一些实施方案中，如果X36不存在，则X37也不存在，并且所述GLP-1衍生物包含C末端羧酰胺。

[0113] 本语境中使用的缩写具有以下含义：

[0114]

三字母 编码	单字母编 码	描述
Acb	n/a*	1-氨基环丁甲酸
Acpr	n/a	1-氨基环丙甲酸
Ado	n/a	
Aib	n/a	2-氨基异丁酸
Ala	A	丙氨酸
Asn	N	天冬酰胺
Asp	D	天冬氨酸
Arg	R	精氨酸
Cit	n/a	瓜氨酸
Cys	C	半胱氨酸
Gln	Q	谷氨酰胺
Glu	E	谷氨酸
γ -Glu	n/a	 其中 α-氨基和 γ-羧基在两个相邻残基之间形成酰胺键。
Gly	G	甘氨酸
His	H	组氨酸
Hyp	n/a	4-羟基脯氨酸
Ile	I	异亮氨酸

[0115]

Imp	n/a	 脱氨基组氨酸或脱氨基 His 或脱氨基-组氨酸或(3-(咪唑-4-基)丙酸或咪唑丙酸
Leu	L	亮氨酸
Lys	K	赖氨酸
Met	M	甲硫氨酸
Orn	n/a	鸟氨酸
Phe	F	苯丙氨酸
Pro	P	脯氨酸
Ser	S	丝氨酸
Thr	T	苏氨酸
Tyr	Y	酪氨酸
Trp	W	色氨酸
Val	V	缬氨酸

[0116] *) “n/a”表示不可用。

[0117] 以D-开头接着为三字母编码的氨基酸缩写,如D-Ser、D-His等,是指相应氨基酸的D-对映异构体,例如D-丝氨酸、D-组氨酸等。

[0118] GLP-1衍生物

[0119] 本发明涉及GLP-1衍生物,其为GLP-1类似物的衍生物。如本文在GLP-1类似物的语境中所使用的术语“衍生物”意指经化学修饰的GLP-1类似物,其中一个或多个取代基已共价连接至GLP-1类似物。如本文所使用的术语“取代基”意指替代氢原子的化学部分或基团。该衍生物可包含选自酰胺、碳水化合物、烷基、酰基、酯等的一个或多个修饰。

[0120] 在一些实施方案中,所述取代基通过所述多肽中选自位置22、23、27、34、35和36中的一个氨基酸位置处的氨基酸残基共价连接。在一些实施方案中,该取代基连接在所述多肽中选自位置22、23、27、34、35和36中的一个氨基酸位置处的赖氨酸残基的 ϵ 位置处。

[0121] 在一些实施方案中,所述GLP-1衍生物包含含有亲脂性部分和至少两个带负电荷的部分的取代基,其中所述带负电荷的部分中的一个在亲脂性部分的远端,并且其中所述取代基连接在由式I氨基酸序列组成的多肽中选自位置22、23、27、34、35和36中的一个氨基酸位置上的赖氨酸残基的 ϵ 位置处。

[0122] 如本文所使用的术语“亲脂性部分”意指具有多于6个且少于30个碳原子的脂肪族烃或环状烃部分,其中所述烃部分可包含额外的取代基。

[0123] 如本文所使用的术语“带负电荷的部分”意指可带负电荷的化学部分,例如但不限于氨基酸部分(例如Glu、 γ Glu、Asp或 β -Asp、羧酸、磺酸或四唑部分)。带负电荷的部分的数

目可在生理pH(pH 7.4)下确定。该带负电荷的部分可以是羧酸基团。

[0124] 在一些实施方案中,所述取代基连接至在由式I氨基酸序列组成的多肽中选自位置22、23、27、34、35和36的位置处的氨基酸残基。在一些实施方案中,该取代基连接至在由式I氨基酸序列组成的多肽中的位置34或位置35处的氨基酸残基。

[0125] 在一些实施方案中,所述取代基连接在由式I氨基酸序列组成的多肽中选自位置22、23、27、34、35和36的位置处的赖氨酸残基的 ϵ 氮处。在一些实施方案中,该取代基连接在由式I氨基酸序列组成的多肽中选自位置34和位置35的位置处的赖氨酸残基的 ϵ 氮处。

[0126] 在一些实施方案中,所述取代基包含至少两个带负电荷的部分。在一些实施方案中,该取代基包含三个、四个或五个带负电荷的部分。在一些实施方案中,该取代基包含三个或四个带负电荷的部分。在一些实施方案中,该取代基包含两个至十个带负电荷的部分。

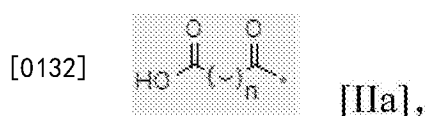
[0127] 在一些实施方案中,所述取代基与白蛋白非共价结合。

[0128] 在一些实施方案中,所述取代基在生理pH,如pH 7.0-8.2、pH7.0-7.7或pH 7.2-7.5,或如pH 7.4下带负电荷。

[0129] 在一些实施方案中,所述取代基包含式II:

[0130] $Z_1-Z_2-Z_3-Z_4-Z_5-Z_6-Z_7-Z_8-Z_9-Z_{10}-[II]$,

[0131] 其中 Z_1 包含式IIa:



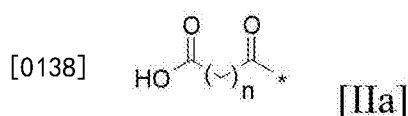
[0133] 其中在式IIa中,n为6-20,并且符号*代表与相邻基团的氮的连接点;

[0134] 其中 Z_2 、 Z_3 、 Z_4 、 Z_5 、 Z_6 、 Z_7 、 Z_8 、 Z_9 和 Z_{10} 单独地不存在,或者为选自Glu、 γ Glu、Gly、Ser、Ala、Thr、Ado的氨基酸;并且

[0135] 其中 $Z_1-Z_2-Z_3-Z_4-Z_5-Z_6-Z_7-Z_8-Z_9-Z_{10}$ 总共包含至少两个带负电荷的部分。

[0136] 在一些实施方案中,所述取代基连接在氨基酸残基的侧链,如GLP-1衍生物的多肽中赖氨酸残基的 ϵ 位置处。

[0137] 在一些实施方案中, Z_1 由式IIa组成:



[0139] 其中n为12至18范围内的整数。在一些实施方案中,式IIa中的n为12、14、16或18。在一些实施方案中,式IIa中的n为16(即 Z_1 为17-羧基十七酰基)。

[0140] 在一些实施方案中,在式II中, $Z_2-Z_3-Z_4-Z_5-Z_6-Z_7-Z_8-Z_9-Z_{10}$ 为连接体,其中 Z_2 、 Z_3 、 Z_4 、 Z_5 、 Z_6 、 Z_7 、 Z_8 、 Z_9 和 Z_{10} 中的每一个单独地为以下氨基酸残基中的任一个:Glu、 γ Glu、Gly、Ser、Ala、Thr和/或Ado;或者残基 Z_2 、 Z_3 、 Z_4 、 Z_5 、 Z_6 、 Z_7 、 Z_8 、 Z_9 和 Z_{10} 中的一个或多个不存在;然而,条件是残基 Z_2 、 Z_3 、 Z_4 、 Z_5 、 Z_6 、 Z_7 、 Z_8 、 Z_9 和 Z_{10} 中的至少两个存在;并且其中 $Z_1-Z_2-Z_3-Z_4-Z_5-Z_6-Z_7-Z_8-Z_9-Z_{10}$ 总共包含至少两个带负电荷的部分。在一些实施方案中, Z_2 、 Z_3 、 Z_4 、 Z_5 、 Z_6 、 Z_7 、 Z_8 、 Z_9 和 Z_{10} 单独地由以下氨基酸残基中的任一个表示:Glu、 γ Glu、Gly、Ser和/或Ado;或者 Z_2 、 Z_3 、 Z_4 、 Z_5 、 Z_6 、 Z_7 、 Z_8 、 Z_9 和 Z_{10} 中的一个或多个不存在;然而,条件是 Z_2 、 Z_3 、 Z_4 、 Z_5 、 Z_6 、 Z_7 、 Z_8 、 Z_9 和 Z_{10} 中的至少两个存在。在一些实施方案中, Z_2 、 Z_3 、 Z_4 、 Z_5 、 Z_6 、 Z_7 、 Z_8 、 Z_9 和 Z_{10} 单独地由以下氨基酸残基中的任一个表示: γ Glu和/或Ado;或者 Z_2 、 Z_3 、 Z_4 、 Z_5 、 Z_6 、 Z_7 、 Z_8 、 Z_9 和 Z_{10} 中的一个

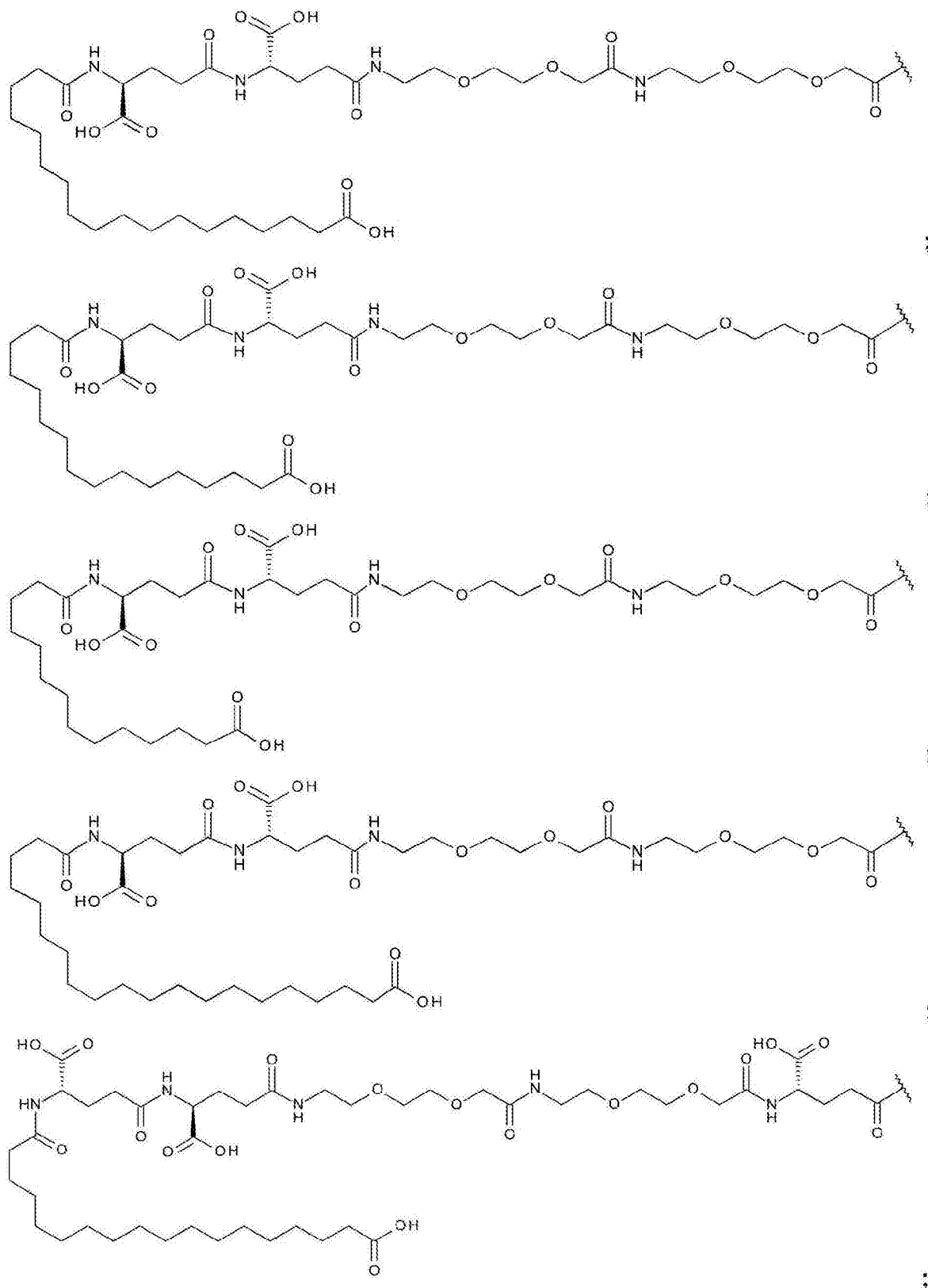
或多个不存在;然而,条件是 Z_2 、 Z_3 、 Z_4 、 Z_5 、 Z_6 、 Z_7 、 Z_8 、 Z_9 和 Z_{10} 中的至少两个存在。在一些实施方案中, Z_2 、 Z_3 、 Z_4 、 Z_5 、 Z_6 、 Z_7 、 Z_8 、 Z_9 和 Z_{10} 中的至少三个存在。在一些实施方案中, Z_2 、 Z_3 、 Z_4 、 Z_5 、 Z_6 、 Z_7 、 Z_8 、 Z_9 和 Z_{10} 中的至少四个存在。在一些实施方案中, Z_2 、 Z_3 、 Z_4 、 Z_5 、 Z_6 、 Z_7 、 Z_8 、 Z_9 和 Z_{10} 中的至少五个存在。在一些实施方案中, Z_2 、 Z_3 、 Z_4 、 Z_5 、 Z_6 、 Z_7 、 Z_8 、 Z_9 和 Z_{10} 中的至少六个存在。在一些实施方案中, Z_2 - Z_3 - Z_4 - Z_5 - Z_6 - Z_7 - Z_8 - Z_9 - Z_{10} -选自: γ Glu- γ Glu-Ado-Ado-、 γ Glu- γ Glu-Ado-Ado- γ Glu-、 γ Glu- γ Glu-Ado- γ Glu- γ Glu-、 γ Glu- γ Glu-Ado- γ Glu-Ado- γ Glu-Ado- γ Glu-、 γ Glu- γ Glu-Ser-Gly-、 γ Glu- γ Glu-Ser-Gly-Glu-Ser-Gly-、 γ Glu- γ Glu- γ Glu--Ado-Ado-、 γ Glu- γ Glu- γ Glu- γ Glu-、 γ Glu-Ado-Ado-、 γ Glu-Ado-Ado- γ Glu- γ Glu-和Gly-Ser-Glu-Gly-Ser- γ Glu- γ Glu-。在一些实施方案中, Z_2 - Z_3 - Z_4 - Z_5 - Z_6 - Z_7 - Z_8 - Z_9 - Z_{10} -为 γ Glu- γ Glu-Ado-Ado-。在一些实施方案中, Z_2 - Z_3 - Z_4 - Z_5 - Z_6 - Z_7 - Z_8 - Z_9 - Z_{10} -为 γ Glu- γ Glu-Ado-Ado- γ Glu-。在一些实施方案中, Z_2 - Z_3 - Z_4 - Z_5 - Z_6 - Z_7 - Z_8 - Z_9 - Z_{10} -为 γ Glu- γ Glu-Ado- γ Glu- γ Glu-。在一些实施方案中, Z_2 - Z_3 - Z_4 - Z_5 - Z_6 - Z_7 - Z_8 - Z_9 - Z_{10} -为 γ Glu- γ Glu-Ado- γ Glu-Ado- γ Glu-Ado- γ Glu-。在一些实施方案中, Z_2 - Z_3 - Z_4 - Z_5 - Z_6 - Z_7 - Z_8 - Z_9 - Z_{10} -为 γ Glu- γ Glu-Ser-Gly-。在一些实施方案中, Z_2 - Z_3 - Z_4 - Z_5 - Z_6 - Z_7 - Z_8 - Z_9 - Z_{10} -为 γ Glu- γ Glu-Ser-Gly-Glu-Ser-Gly-。在一些实施方案中, Z_2 - Z_3 - Z_4 - Z_5 - Z_6 - Z_7 - Z_8 - Z_9 - Z_{10} -为 γ Glu- γ Glu- γ Glu-Ado-Ado-。在一些实施方案中, Z_2 - Z_3 - Z_4 - Z_5 - Z_6 - Z_7 - Z_8 - Z_9 - Z_{10} -为 γ Glu- γ Glu- γ Glu- γ Glu-。在一些实施方案中, Z_2 - Z_3 - Z_4 - Z_5 - Z_6 - Z_7 - Z_8 - Z_9 - Z_{10} -为 γ Glu-Ado-Ado-。在一些实施方案中, Z_2 - Z_3 - Z_4 - Z_5 - Z_6 - Z_7 - Z_8 - Z_9 - Z_{10} -为 γ Glu-Ado-Ado- γ Glu- γ Glu-。在一些实施方案中, Z_2 - Z_3 - Z_4 - Z_5 - Z_6 - Z_7 - Z_8 - Z_9 - Z_{10} -为Gly-Ser-Glu-Gly-Ser- γ Glu- γ Glu-。

[0141] 在一些实施方案中,亲脂性部分(例如 Z_1)包含至少12个碳原子,如12-20个碳原子或14-18个碳原子,或如16个碳原子的烷基。

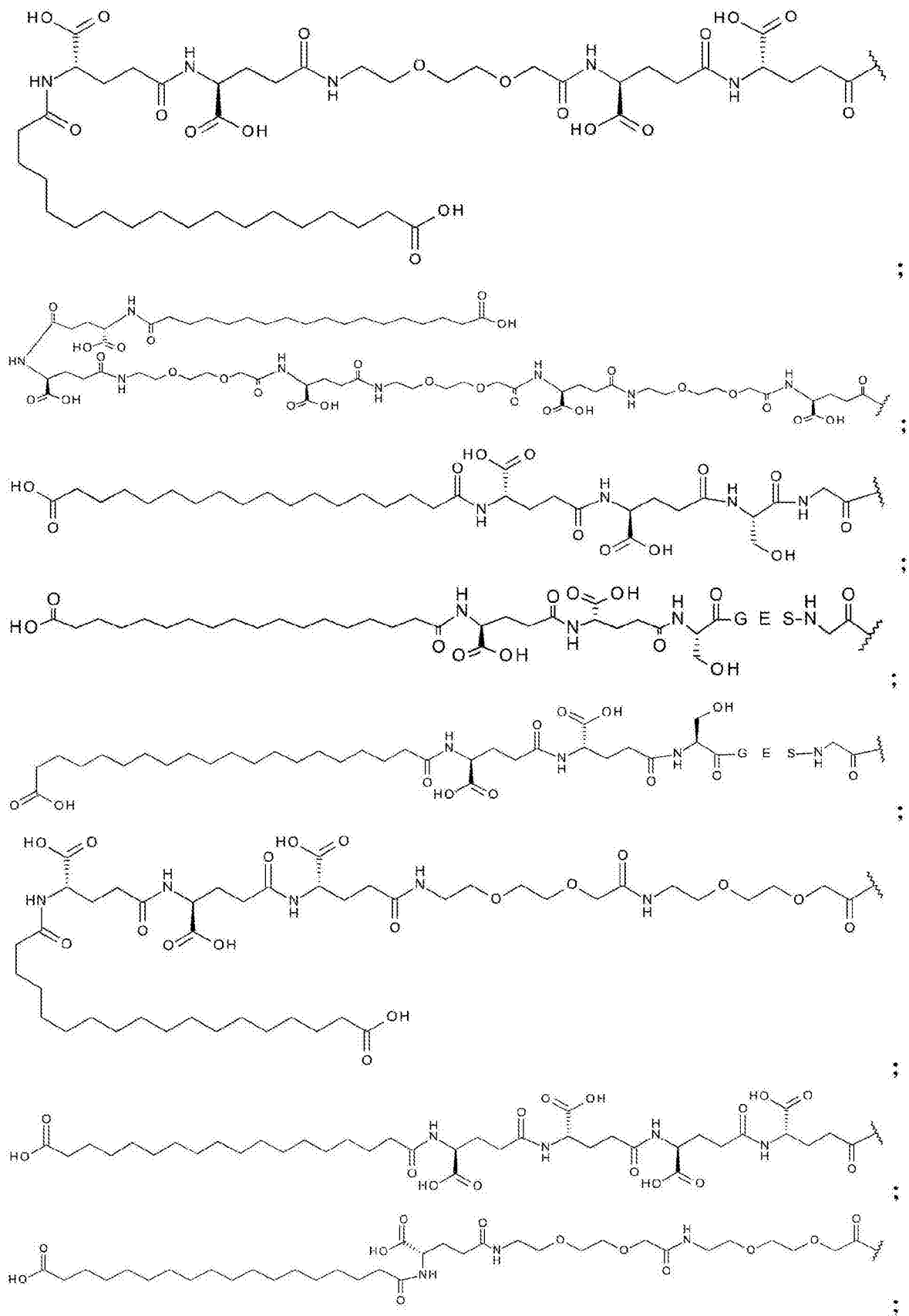
[0142] 在一些实施方案中,所述取代基共价连接至氨基酸的侧链,如赖氨酸侧链的氮原子。

[0143] 在一些实施方案中,所述取代基选自:

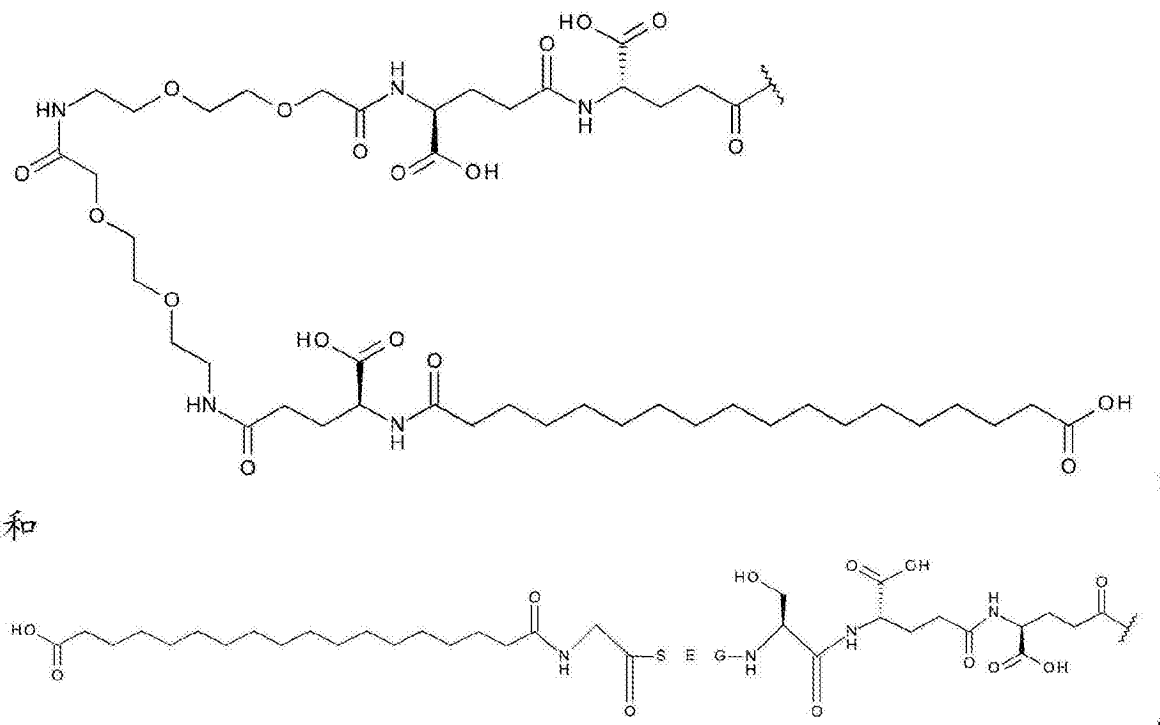
[0144]



[0145]



[0146]

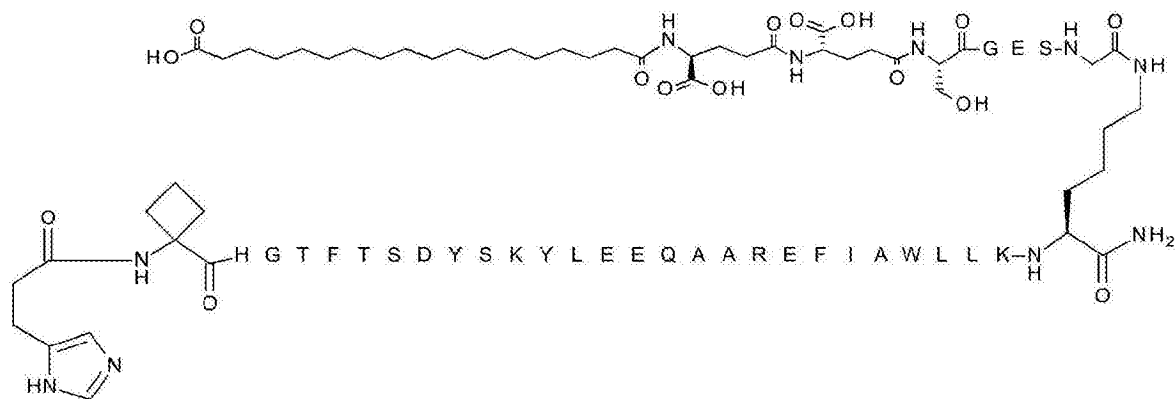


[0147] 该取代基可通过所述取代基的结构式中用波形线标记的羰基共价连接至GLP-1衍生物的多肽,即共价连接至由式I组成的氨基酸序列。

[0148] 在一些实施方案中,所述GLP-1衍生物为

[0149] $N^{\epsilon 35}$ -[2-[[(2S)-2-[[(2S)-4-羧基-2-[[2-[[(2S)-2-[[(4S)-4-羧基-4-[[(4S)-4-羧基-4-(17-羧基十七酰基氨基)丁酰基]氨基]丁酰基]氨基]-3-羟基丙酰基]氨基]乙酰基]氨基]丁酰基]氨基]-3-羟基丙酰基]氨基]乙酰基]-[Imp7,Ac8,His9,Tyr16,Lys18,Glu22,Arg26,Leu33,Lys35]-GLP-1-(7-35)-肽酰胺

[0150]



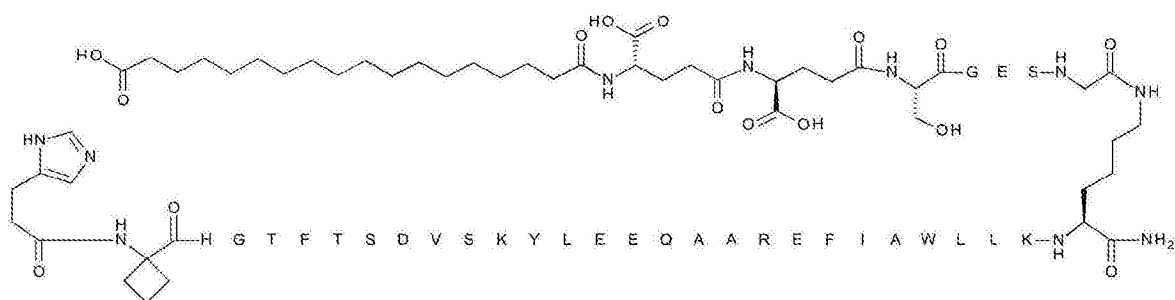
(化学式 1)。

[0151] 在一些实施方案中,所述GLP-1衍生物为

[0152] $N^{\epsilon 35}$ -[2-[[(2S)-2-[[(2S)-4-羧基-2-[[2-[[(2S)-2-[[(4S)-4-羧基-4-[[(4S)-4-羧基-4-(17-羧基十七酰基氨基)丁酰基]氨基]丁酰基]氨基]-3-羟基丙酰基]氨基]乙酰基]氨基]丁酰基]氨基]-3-羟基丙酰基]氨基]乙酰基]-[Imp7,Ac8,His9,Lys18,Glu22,

Arg26,Leu33,Lys35]-GLP-1-(7-35)-肽酰胺

[0153]

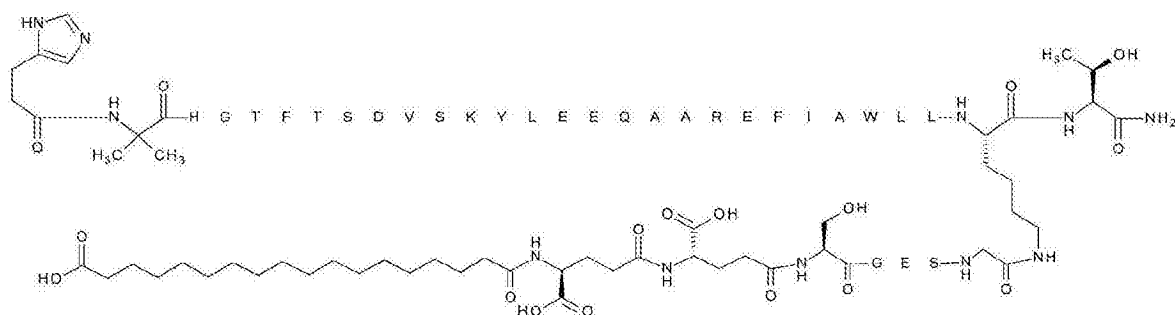


(化学式 2)。

[0154] 在一些实施方案中,所述GLP-1衍生物为

[0155] N^{e34} -[2-[[(2S)-2-[[(2S)-4-羧基-2-[[2-[[(2S)-2-[[(4S)-4-羧基-4-[[(4S)-4-羧基-4-(17-羧基十七酰基氨基)丁酰基]氨基]丁酰基]氨基]-3-羟基丙酰基]氨基]乙酰基]氨基]丁酰基]氨基]-3-羟基丙酰基]氨基]乙酰基]-[Imp7,Aib8,His9,Lys18,Glu22,Arg26,Leu33,Thr35]-GLP-1-(7-35)-肽酰胺

[0156]

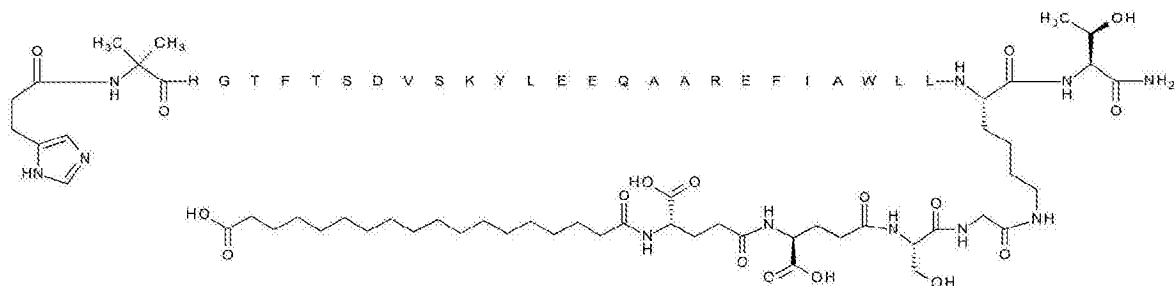


(化学式 3)。

[0157] 在一些实施方案中,所述GLP-1衍生物为

[0158] N^{e34} -[2-[[(2S)-2-[[(4S)-4-羧基-4-[[(4S)-4-羧基-4-(17-羧基十七酰基氨基)丁酰基]氨基]丁酰基]氨基]-3-羟基丙酰基]氨基]乙酰基]-[Imp7,Aib8,His9,Lys18,Glu22,Arg26,Leu33,Thr35]-GLP-1-(7-35)-肽酰胺

[0159]

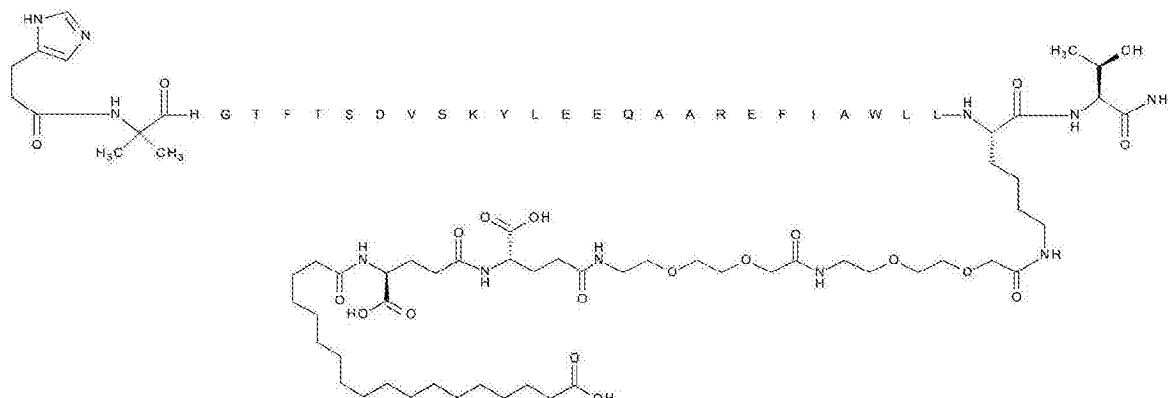


(化学式 4)。

[0160] 在一些实施方案中,所述GLP-1衍生物为

[0161] N^{e34} -[2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[(4S)-4-羧基-4-[[(4S)-4-羧基-4-(17-羧基十七酰基氨基)丁酰基]氨基]丁酰基]氨基]-3-羟基丙酰基]氨基]乙酰基]-[Imp7,Aib8,His9,Lys18,Glu22,Arg26,Leu33,Thr35]-GLP-1-(7-35)-肽酰胺

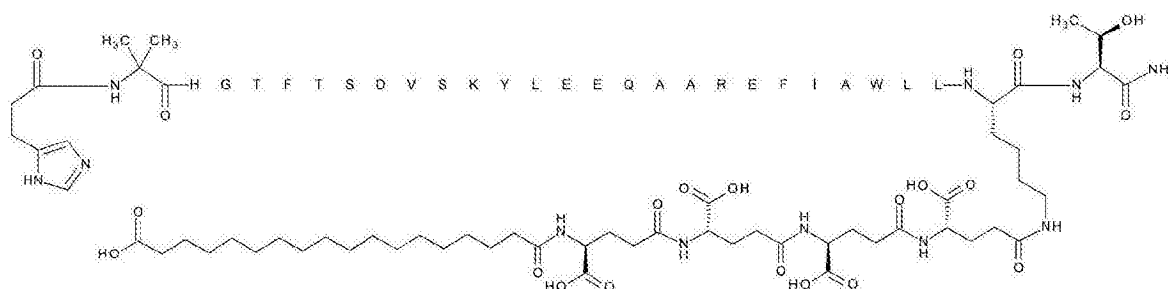
基氨基]丁酰基]氨基]丁酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基]-[Imp7,Aib8,His9,Lys18,Glu22,Arg26,Leu33,Thr35]-GLP-1-(7-35)-肽酰胺
[0162]



(化学式 5)。

[0163] 在一些实施方案中,所述GLP-1衍生物为

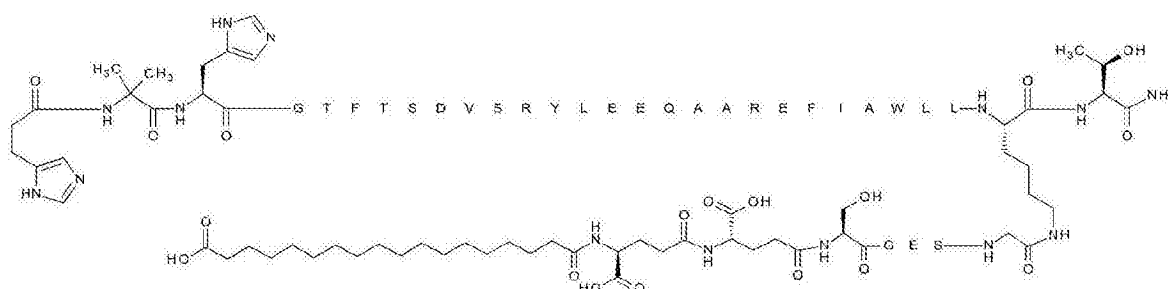
[0164] $N^{\epsilon 34}$ -[(4S)-4-羧基-4-[[(4S)-4-羧基-4-[[(4S)-4-羧基-4-[[(4S)-4-羧基-4-(17-羧基十七酰基氨基)丁酰基]氨基]丁酰基]氨基]丁酰基]氨基]丁酰基]-[Imp7,Aib8,His9,Lys18,Glu22,Arg26,Leu33,Thr35]-GLP-1-(7-35)-肽酰胺
[0165]



[0166] (化学式 6)。

[0167] 在一些实施方案中,所述GLP-1衍生物为

[0168] $N^{\epsilon 34}$ -[2-[[(2S)-2-[[(2S)-4-羧基-2-[[2-[[(2S)-2-[[(4S)-4-羧基-4-[[(4S)-4-羧基-4-(17-羧基十七酰基氨基)丁酰基]氨基]丁酰基]氨基]-3-羟基丙酰基]氨基]乙酰基]氨基]丁酰基]氨基]-3-羟基丙酰基]氨基]乙酰基]-[Imp7,Aib8,His9,Arg18,Glu22,Arg26,Leu33,Thr35]-GLP-1-(7-35)-肽酰胺
[0169]

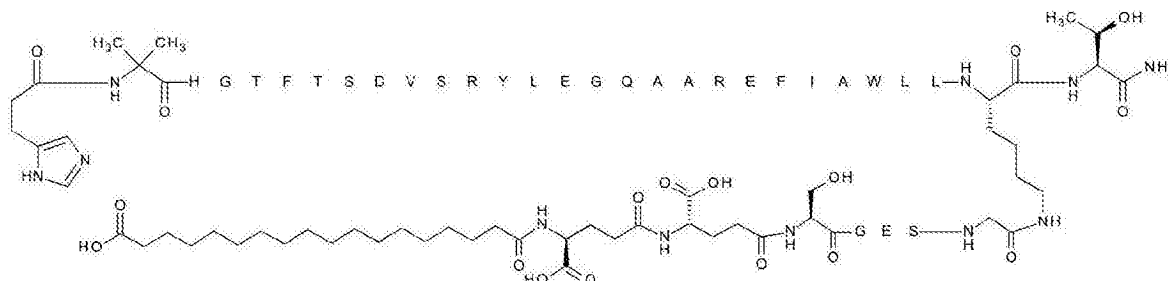


(化学式 7)。

[0170] 在一些实施方案中,所述GLP-1衍生物为

[0171] $N^{\epsilon 34}$ -[2-[[(2S)-2-[[(2S)-4-羧基-2-[[2-[[(2S)-2-[[(4S)-4-羧基-4-[[(4S)-4-羧基-4-(17-羧基十七酰基氨基)丁酰基]氨基]丁酰基]氨基]-3-羟基丙酰基]氨基]乙酰基]氨基]丁酰基]氨基]-3-羟基丙酰基]氨基]乙酰基]-[Imp7,Aib8,His9,Arg18,Arg26,Leu33,Thr35]-GLP-1-(7-35)-肽酰胺

[0172]

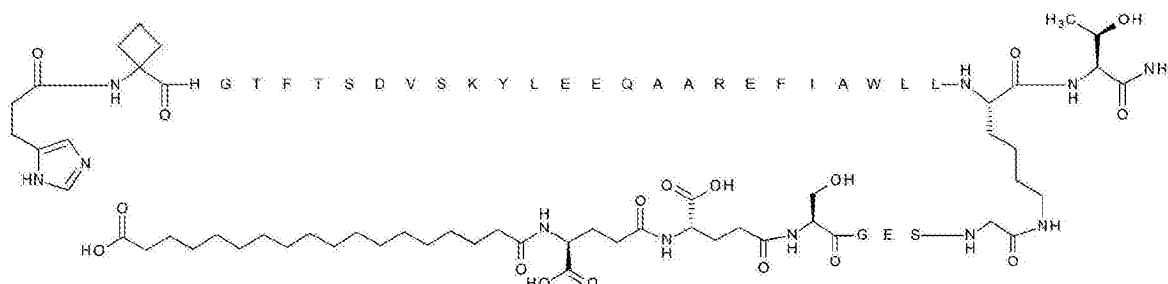


(化学式 8)。

[0173] 在一些实施方案中,所述GLP-1衍生物为

[0174] $N^{\epsilon 34}$ -[2-[[(2S)-2-[[(2S)-4-羧基-2-[[2-[[(2S)-2-[[(4S)-4-羧基-4-[[(4S)-4-羧基-4-(17-羧基十七酰基氨基)丁酰基]氨基]丁酰基]氨基]-3-羟基丙酰基]氨基]乙酰基]氨基]丁酰基]氨基]-3-羟基丙酰基]氨基]乙酰基]-[Imp7,Acb8,His9,Lys18,Glu22,Arg26,Leu33,Thr35]-GLP-1-(7-35)-肽酰胺

[0175]

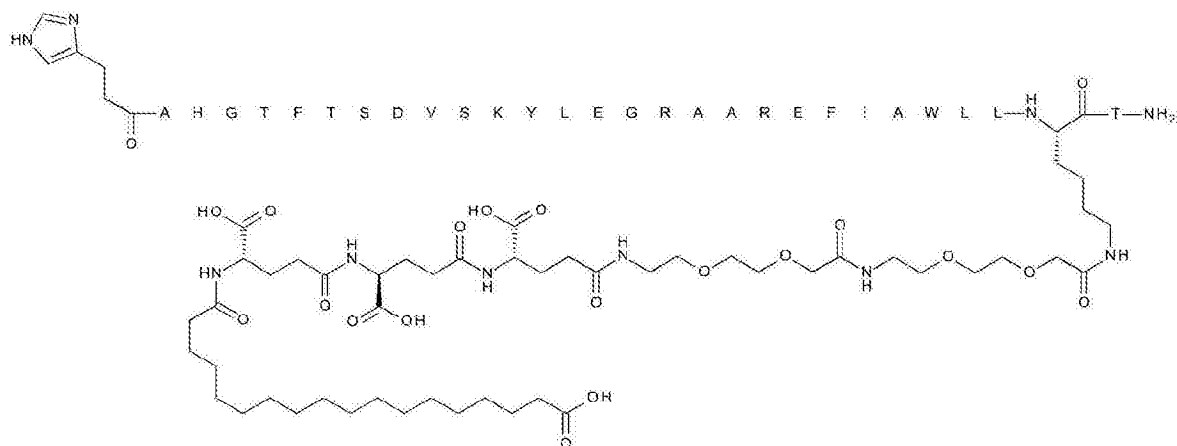


(化学式 9)。

[0176] 在一些实施方案中,所述GLP-1衍生物为

[0177] $N^{\epsilon 34}$ -[2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[(4S)-4-羧基-4-[[(4S)-4-羧基-4-[[(4S)-4-羧基-4-(17-羧基十七酰基氨基)丁酰基]氨基]丁酰基]氨基]丁酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]-[Imp7,His9,Lys18,Arg23,Arg26,Leu33,Thr35]-GLP-1-(7-35)-肽酰胺

[0178]

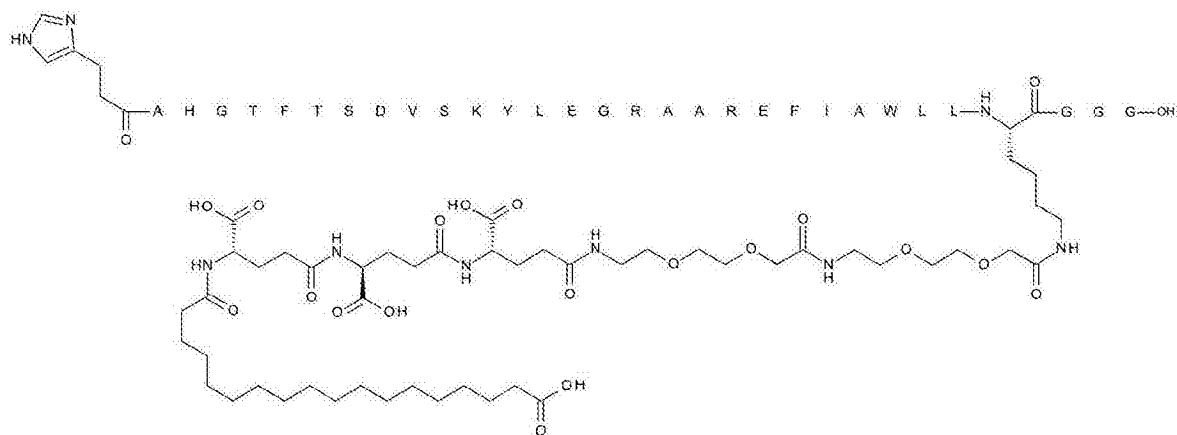


(化学式 10)。

[0179] 在一些实施方案中,所述GLP-1衍生物为

[0180] $N^{\epsilon 34}$ -[2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[(4S) -4-羧基-4-[[(4S) -4-羧基-4-[[(4S) -4-羧基-4-(17-羧基十七酰基氨基) 丁酰基] 氨基] 丁酰基] 氨基] 丁酰基] 氨基] 乙氧基] 乙氧基] 乙酰基] 氨基] 乙氧基] 乙氧基] 乙酰基]-[Imp7, His9, Lys18, Arg23, Arg26, Leu33, Gly36]-GLP-1-(7-37)-肽

[0181]

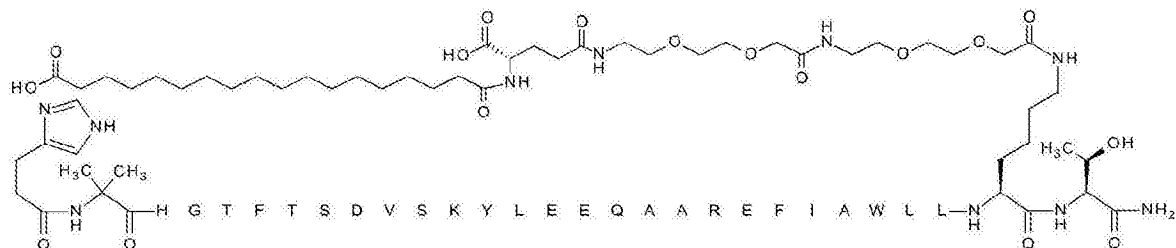


(化学式 11)。

[0182] 在一些实施方案中,所述GLP-1衍生物为

[0183] $N^{\epsilon 34}$ -[2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[(4S) -4-羧基-4-(17-羧基十七酰基氨基) 丁酰基] 氨基] 乙氧基] 乙氧基] 乙酰基] 氨基] 乙氧基] 乙氧基] 乙酰基]-[Imp7, Aib8, His9, Lys18, Glu22, Arg26, Leu33, Thr35]-GLP-1-(7-35)-肽酰胺

[0184]

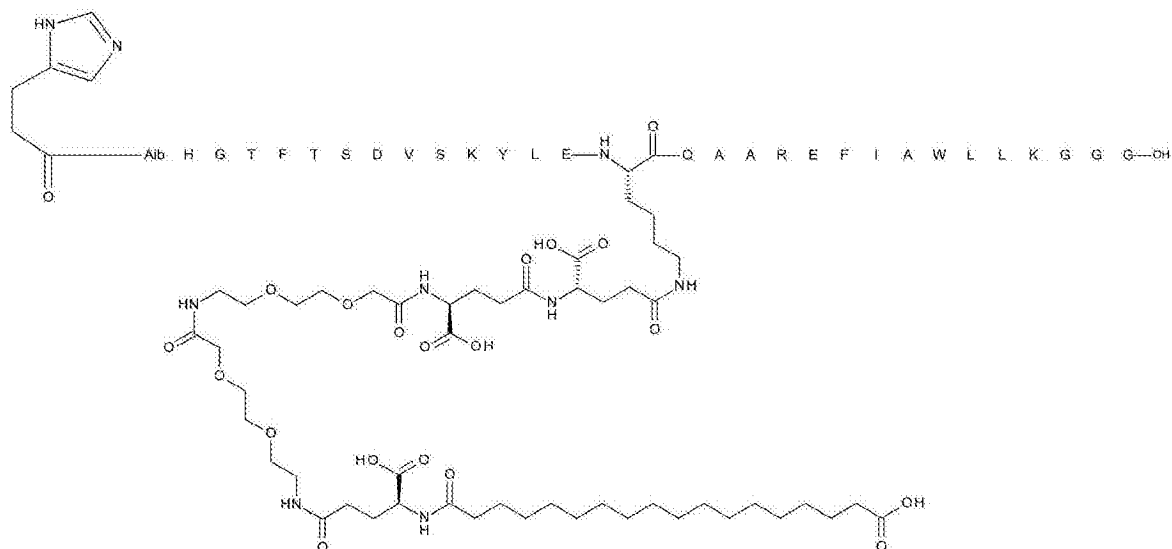


(化学式 12)。

[0185] 在一些实施方案中,所述GLP-1衍生物为

[0186] $N^{\epsilon 22}$ -[(4S)-4-羧基-4-[[(4S)-4-羧基-4-[[2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[(4S)-4-羧基-4-(17-羧基十七酰基氨基)丁酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基]氨基]丁酰基]氨基]丁酰基]-[Imp7,Aib8,His9,Lys18,Lys22,Arg26,Leu33,Gly36]-GLP-1-(7-37)-肽

[0187]

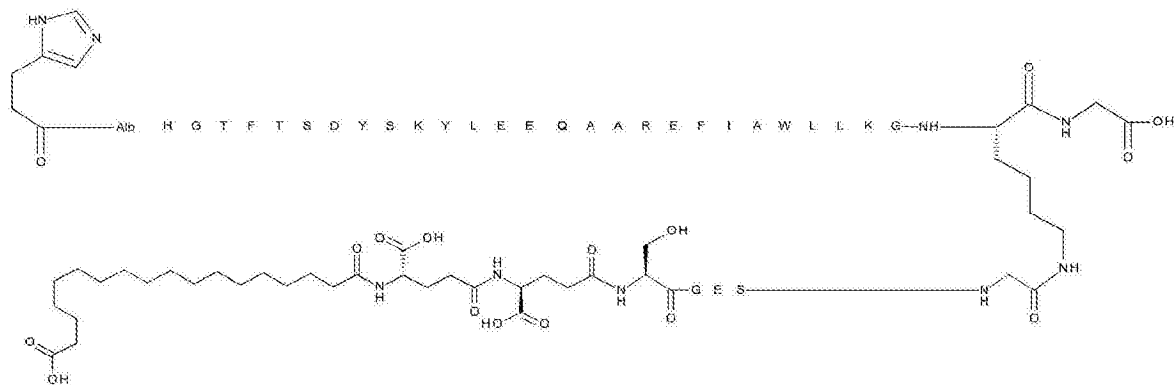


(化学式 13)。

[0188] 在一些实施方案中,所述GLP-1衍生物为

[0189] $N^{\epsilon 36}$ -[2-[[(2S)-2-[[(2S)-4-羧基-2-[[2-[[(2S)-2-[[(4S)-4-羧基-4-[[(4S)-4-羧基-4-(17-羧基十七酰基氨基)丁酰基]氨基]丁酰基]氨基]-3-羟基丙酰基]氨基]乙酰基]氨基]丁酰基]氨基]-3-羟基丙酰基]氨基]乙酰基]-[Imp7,Aib8,His9,Tyr16,Lys18,Glu22,Arg26,Leu33,Lys36]-GLP-1-(7-37)-肽

[0190]

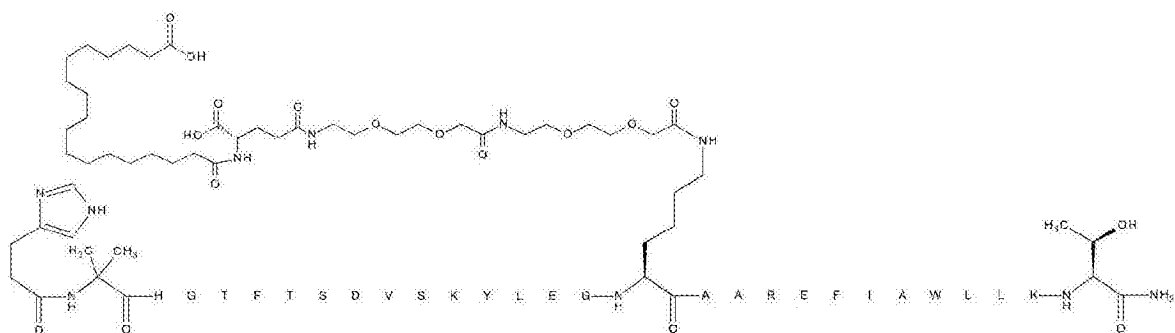


(化学式 14)。

[0191] 在一些实施方案中,所述GLP-1衍生物为

[0192] N^{e23} -[2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[(4S)-4-羧基-4-(17-羧基十七酰基氨基)丁酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基]-[Imp7,Aib8,His9,Lys18,Lys23,Arg26,Leu33,Thr35]-GLP-1-(7-35)-肽酰胺

[0193]

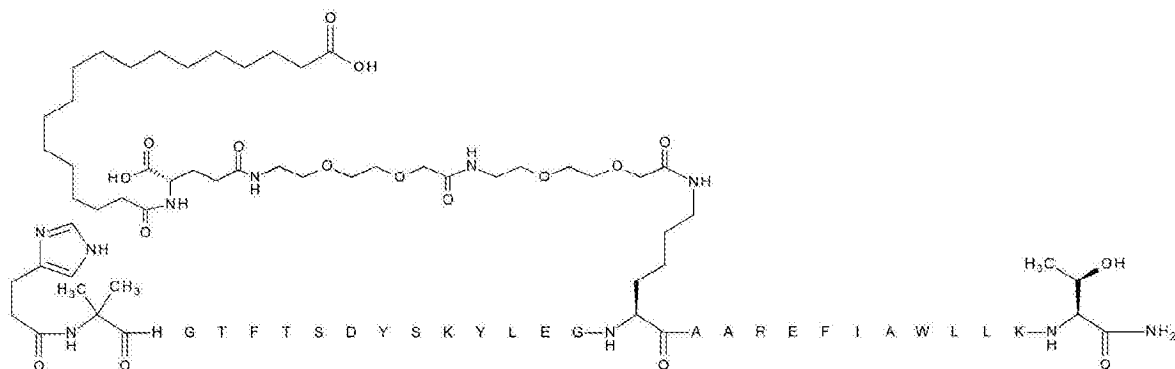


(化学式 15)。

[0194] 在一些实施方案中,所述GLP-1衍生物为

[0195] N^{e23} -[2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[(4S)-4-羧基-4-(17-羧基十七酰基氨基)丁酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基]-[Imp7,Aib8,His9,Tyr16,Lys18,Lys23,Arg26,Leu33,Thr35]-GLP-1-(7-35)-肽酰胺

[0196]

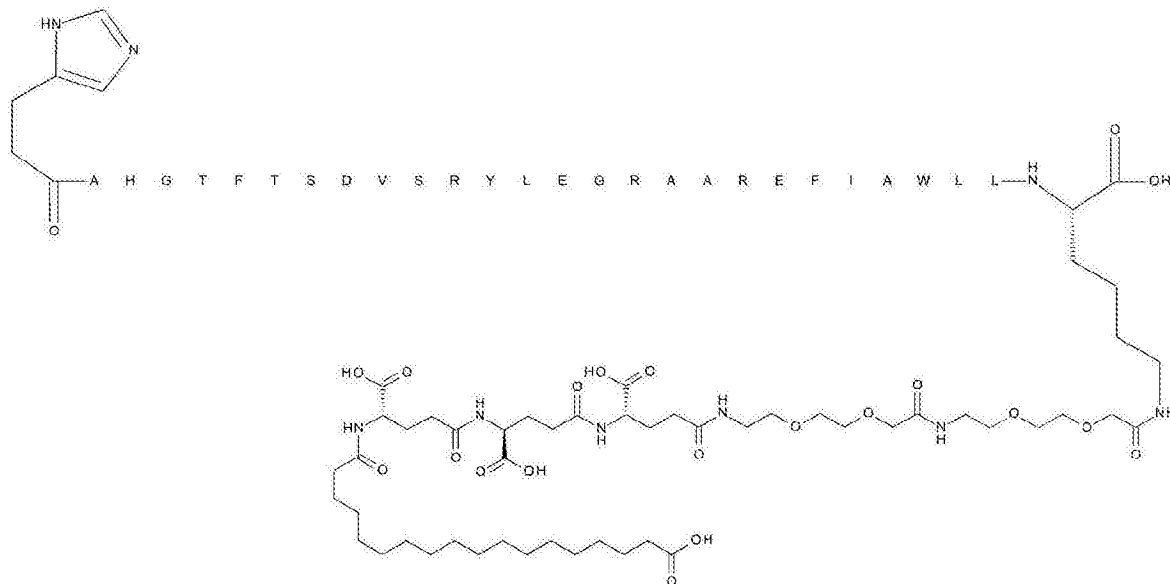


(化学式 16)。

[0197] 在一些实施方案中,所述GLP-1衍生物为

[0198] $N^{\epsilon 34}$ -[2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[(4S) -4-羧基-4-[[(4S) -4-羧基-4-[[(4S) -4-羧基-4-(17-羧基十七酰基氨基) 丁酰基] 氨基] 丁酰基] 氨基] 丁酰基] 氨基] 乙氧基] 乙氧基] 乙酰基] 氨基] 乙氧基] 乙氧基] 乙酰基]-[Imp7, His9, Arg18, Arg23, Arg26, Leu33]-GLP-1-(7-34)-肽

[0199]

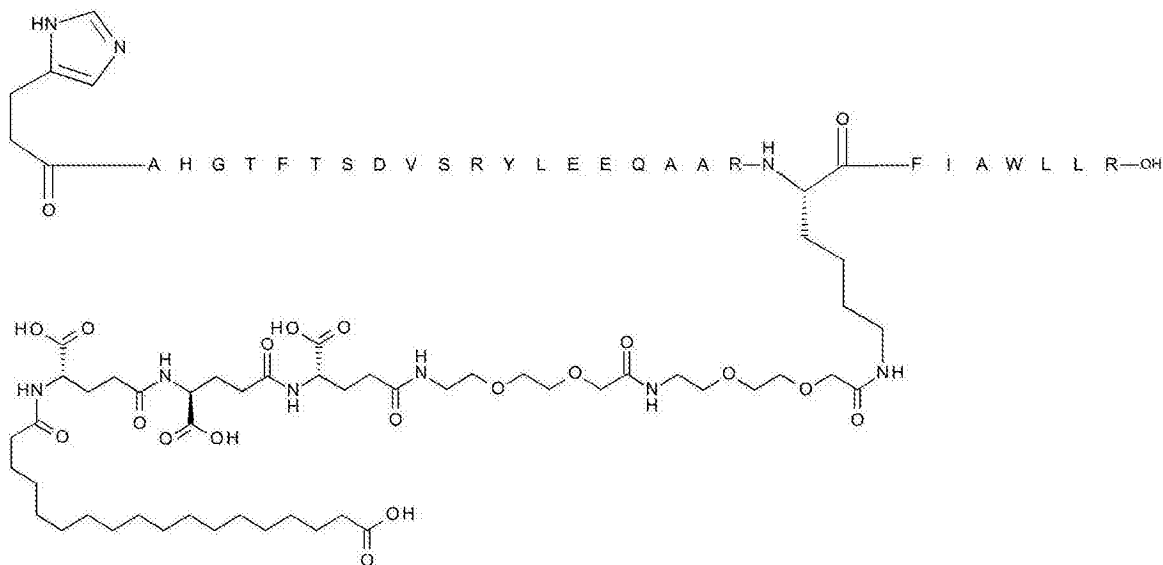


(化学式 17)。

[0200] 在一些实施方案中,所述GLP-1衍生物为

[0201] $N^{\epsilon 27}$ -[2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[(4S) -4-羧基-4-[[(4S) -4-羧基-4-[[(4S) -4-羧基-4-(17-羧基十七酰基氨基) 丁酰基] 氨基] 丁酰基] 氨基] 丁酰基] 氨基] 乙氧基] 乙氧基] 乙酰基] 氨基] 乙氧基] 乙氧基] 乙酰基]-[Imp7, His9, Arg18, Glu22, Arg26, Lys27, Leu33, Arg34]-GLP-1-(7-34)-肽

[0202]

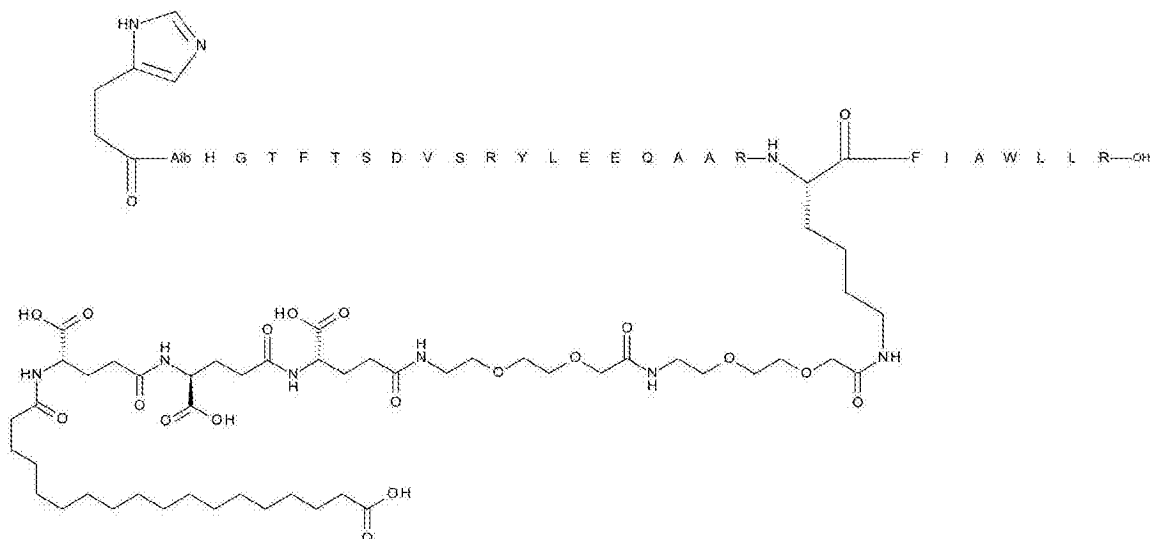


(化学式 18)。

[0203] 在一些实施方案中,所述GLP-1衍生物为

[0204] $N^{\epsilon 27}$ -[2-[2-[2-[2-[2-[2-[[(4S) -4-羧基-4-[[(4S) -4-羧基-4-[[(4S) -4-羧基-4-(17-羧基十七酰基氨基) 丁酰基] 氨基] 丁酰基] 氨基] 丁酰基] 氨基] 乙氧基] 乙氧基] 乙酰基] 氨基] 乙氧基] 乙氧基] 乙酰基]-[Imp7,Aib8,His9,Arg18,Glu22,Arg26,Lys27,Leu33,Arg34]-GLP-1-(7-34)-肽

[0205]

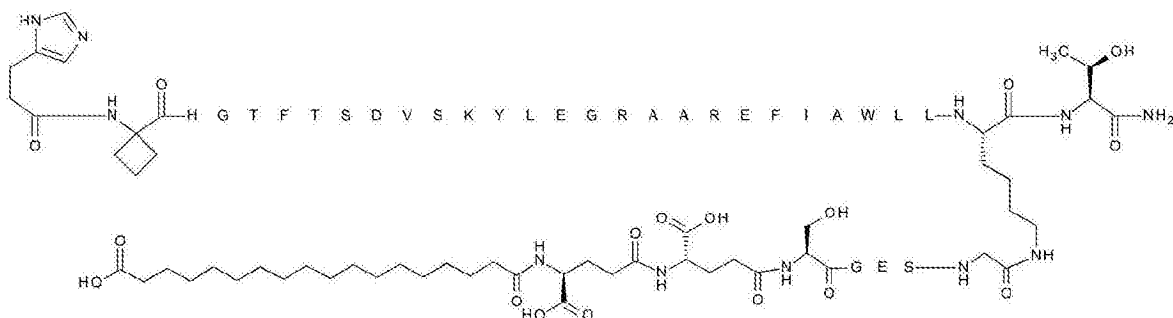


(化学式 19)。

[0206] 在一些实施方案中,所述GLP-1衍生物为

[0207] $N^{\epsilon 34}$ -[2-[[(2S) -2-[[(2S) -4-羧基-2-[[2-[[(2S) -2-[[(4S) -4-羧基-4-[[(4S) -4-羧基-4-(17-羧基十七酰基氨基) 丁酰基] 氨基] 丁酰基] 氨基]-3-羟基丙酰基] 氨基] 乙酰基] 氨基] 丁酰基] 氨基]-3-羟基丙酰基] 氨基] 乙酰基]-[Imp7,Acb8,His9,Lys18,Arg23,Arg26,Leu33,Thr35]-GLP-1-(7-35)-肽酰胺

[0208]

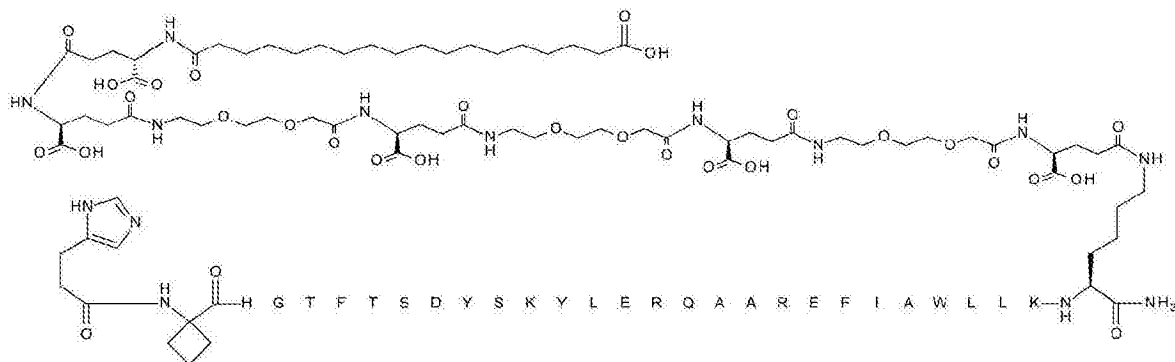


(化学式 20)。

[0209] 在一些实施方案中,所述GLP-1衍生物为

[0210] $N^{\epsilon 35}$ -[(4S) -4-羧基-4-[[2-[2-[2-[[(4S) -4-羧基-4-[[2-[2-[2-[[(4S) -4-羧基-4-[[2-[2-[2-[[(4S) -4-羧基-4-(17-羧基十七酰基氨基) 丁酰基] 氨基] 丁酰基] 氨基] 乙氧基] 乙氧基] 乙酰基] 氨基] 丁酰基] 氨基] 乙氧基] 乙氧基] 乙酰基] 氨基] 丁酰基] 氨基] 乙氧基] 乙氧基] 乙酰基] 氨基] 丁酰基]-[Imp7,Acb8,His9,Tyr16,Lys18,Glu22,Arg26,Leu33,Lys35]-GLP-1-(7-35)-肽酰胺

[0217]

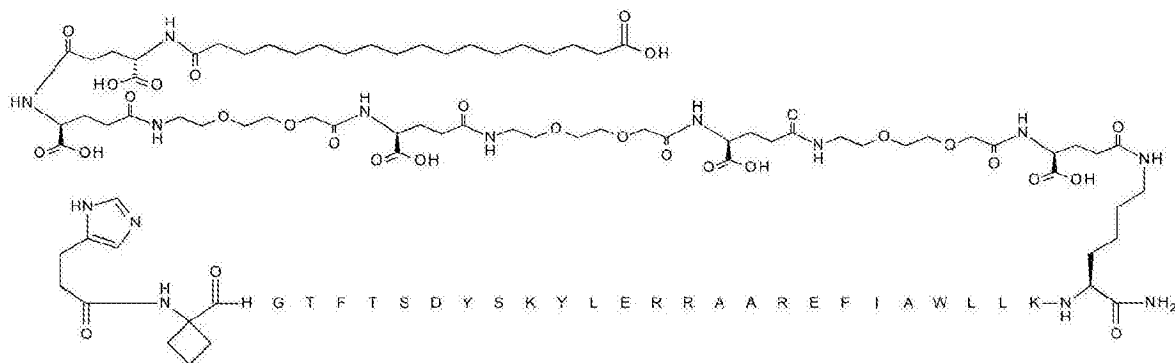


(化学式 23)。

[0218] 在一些实施方案中,所述GLP-1衍生物为

[0219] $N^{\epsilon 35}$ -[(4S)-4-羧基-4-[[2-[2-[2-[[[(4S)-4-羧基-4-[[2-[2-[2-[[[(4S)-4-羧基-4-[[2-[2-[2-[[[(4S)-4-羧基-4-(17-羧基十七酰基氨基)丁酰基]氨基]丁酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基]氨基]丁酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基]氨基]丁酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基]氨基]丁酰基]-[Imp7,Acb8,His9,Tyr16,Lys18,Arg22,Arg23,Arg26,Leu33,Lys35]-GLP-1-(7-35)-肽酰胺

[0220]

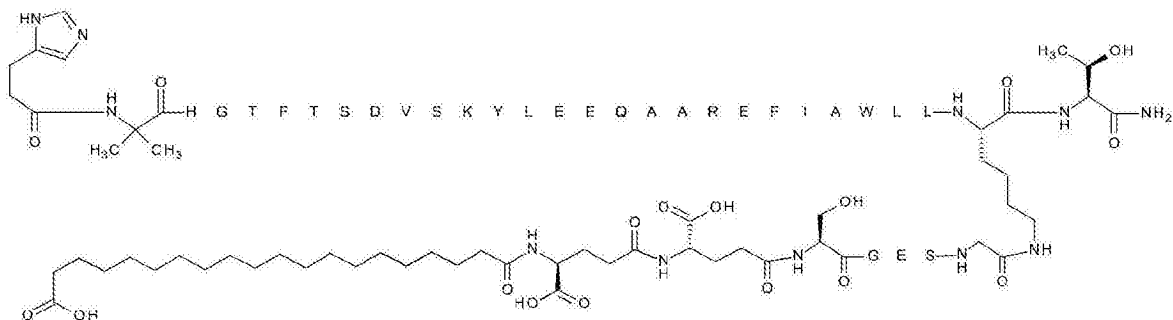


(化学式 24)。

[0221] 在一些实施方案中,所述GLP-1衍生物为

[0222] $N^{\epsilon 34}$ -[2-[[[(2S)-2-[[[(2S)-4-羧基-2-[[2-[[[(2S)-2-[[[(4S)-4-羧基-4-[[[(4S)-4-羧基-4-(17-羧基十七酰基氨基)丁酰基]氨基]丁酰基]氨基]-3-羟基丙酰基]氨基]乙酰基]氨基]丁酰基]氨基]-3-羟基丙酰基]氨基]乙酰基]-[Imp7,Aib8,His9,Lys18,Glu22,Arg26,Leu33,Thr35]-GLP-1-(7-35)-肽

[0239]

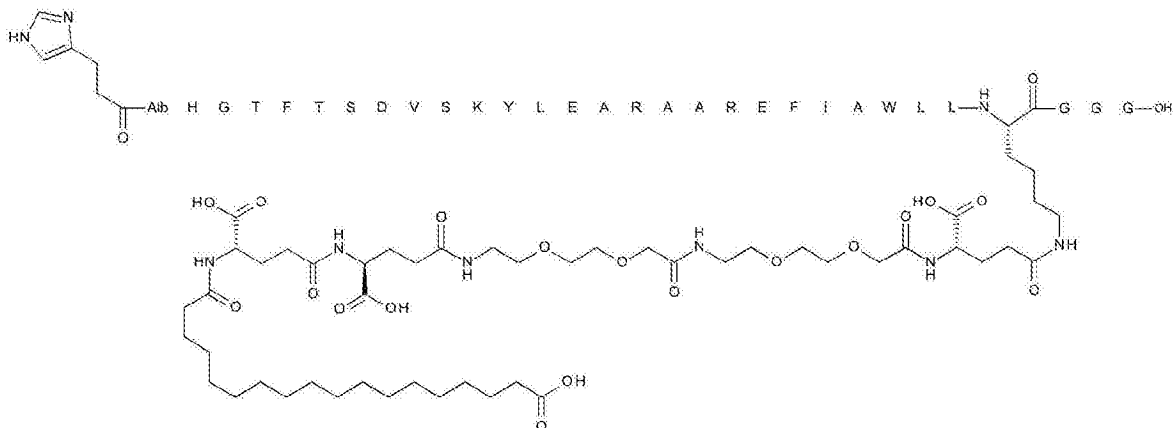


(化学式 30)。

[0240] 在一些实施方案中,所述GLP-1衍生物为

[0241] $N^{\epsilon 34}$ -[(4S)-4-羧基-4-[[2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[4S)-4-羧基-4-[[4S)-4-羧基-4-(17-羧基十七酰基氨基)丁酰基]氨基]丁酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基]氨基]丁酰基]-[Imp7,Aib8,His9,Lys18,Ala22,Arg23,Arg26,Leu33,Gly36]-GLP-1-(7-37)-肽

[0242]

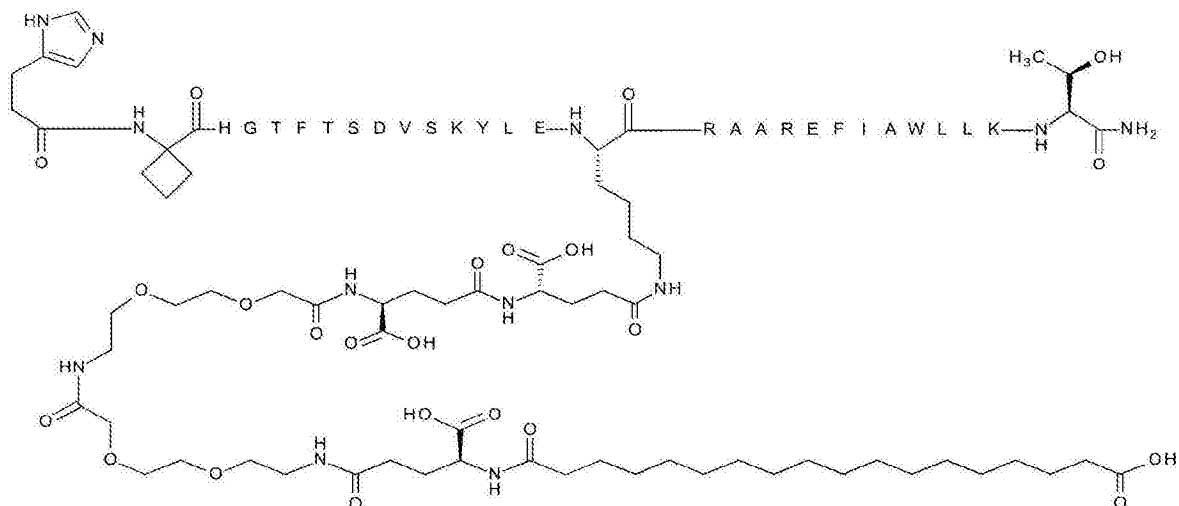


(化学式 31)。

[0243] 在一些实施方案中,所述GLP-1衍生物为

[0244] $N^{\epsilon 22}$ -[(4S)-4-羧基-4-[[4S)-4-羧基-4-[[2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[4S)-4-羧基-4-(17-羧基十七酰基氨基)丁酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基]氨基]丁酰基]氨基]丁酰基]-[Imp7,Aib8,His9,Lys18,Lys22,Arg23,Arg26,Leu33,Thr35]-GLP-1-(7-35)-肽酰胺

[0245]

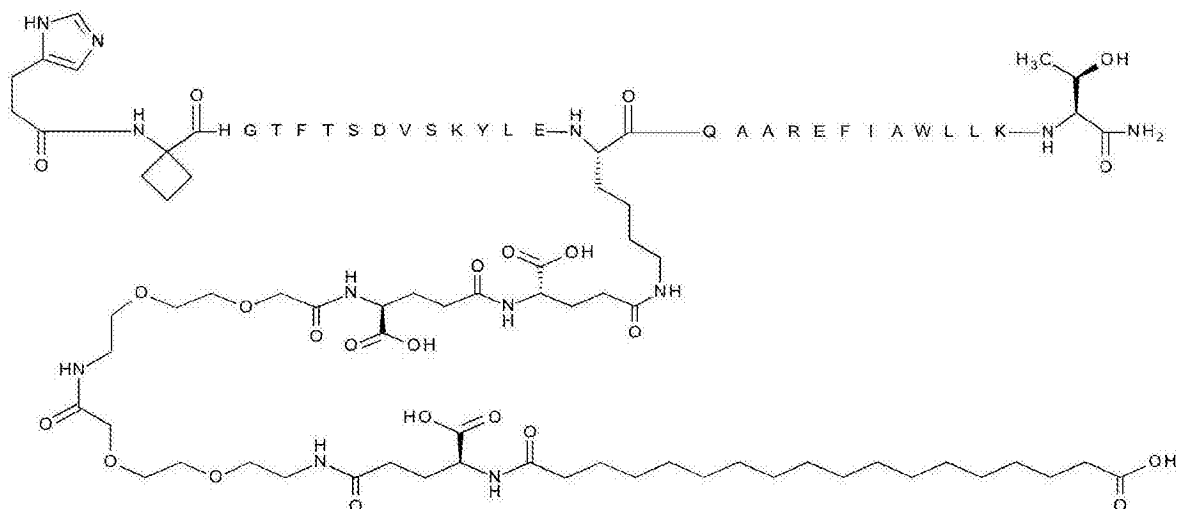


(化学式 32)。

[0246] 在一些实施方案中,所述GLP-1衍生物为

[0247] N^{e22} -[(4S)-4-羧基-4-[[[(4S)-4-羧基-4-[[2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[[(4S)-4-羧基-4-(17-羧基十七酰基氨基)丁酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基]氨基]丁酰基]氨基]丁酰基]-[Imp7, Acb8, His9, Lys18, Lys22, Arg26, Leu33, Thr35]-GLP-1-(7-35)-肽酰胺

[0248]

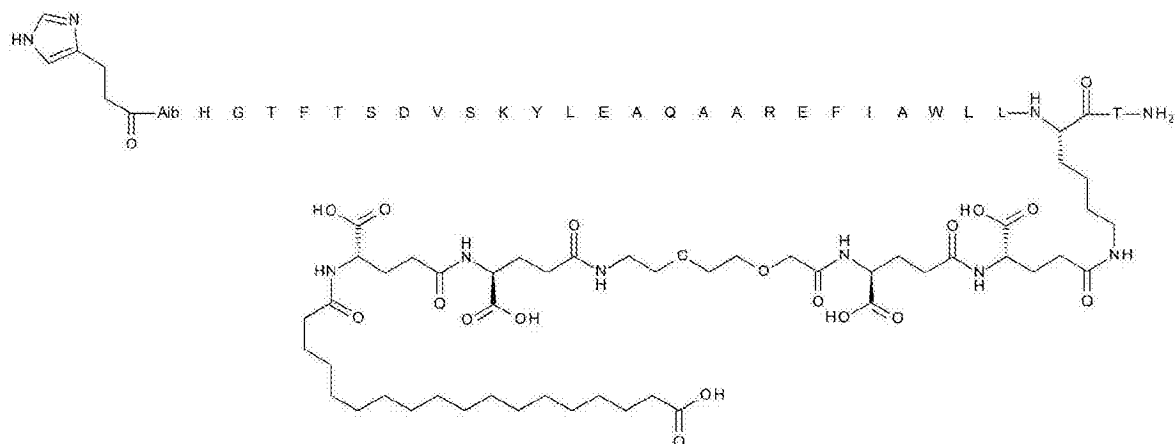


(化学式 33)。

[0249] 在一些实施方案中,所述GLP-1衍生物为

[0250] N^{e34} -[(4S)-4-羧基-4-[[[(4S)-4-羧基-4-[[2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[[(4S)-4-羧基-4-(17-羧基十七酰基氨基)丁酰基]氨基]丁酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基]氨基]丁酰基]氨基]丁酰基]-[Imp7, Aib8, His9, Lys18, Ala22, Arg26, Leu33, Thr35]-GLP-1-(7-35)-肽酰胺

[0251]

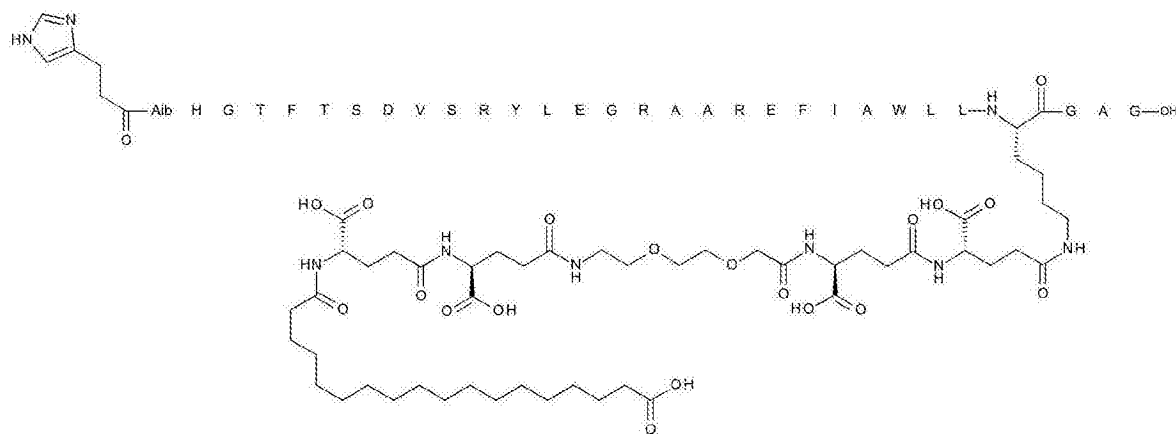


(化学式 34)。

[0252] 在一些实施方案中,所述GLP-1衍生物为

[0253] $N^{\epsilon 34}$ -[(4S)-4-羧基-4-[[(4S)-4-羧基-4-[[2-[2-[2-[[(4S)-4-羧基-4-[[(4S)-4-羧基-4-(17-羧基十七酰基氨基)丁酰基]氨基]丁酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基]氨基]丁酰基]氨基]丁酰基]-[Imp7,Aib8,His9,Arg18,Arg23,Arg26,Leu33,Ala36]-GLP-1-(7-37)-肽

[0254]

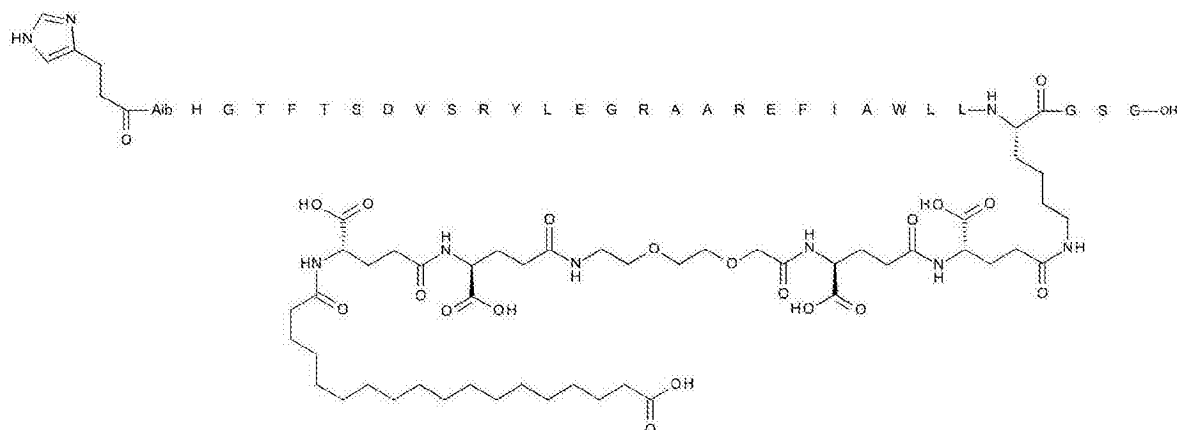


(化学式 35)。

[0255] 在一些实施方案中,所述GLP-1衍生物为

[0256] $N^{\epsilon 34}$ -[(4S)-4-羧基-4-[[(4S)-4-羧基-4-[[2-[2-[2-[[(4S)-4-羧基-4-[[(4S)-4-羧基-4-(17-羧基十七酰基氨基)丁酰基]氨基]丁酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基]氨基]丁酰基]氨基]丁酰基]-[Imp7,Aib8,His9,Arg18,Arg23,Arg26,Leu33,Ser36]-GLP-1-(7-37)-肽

[0257]

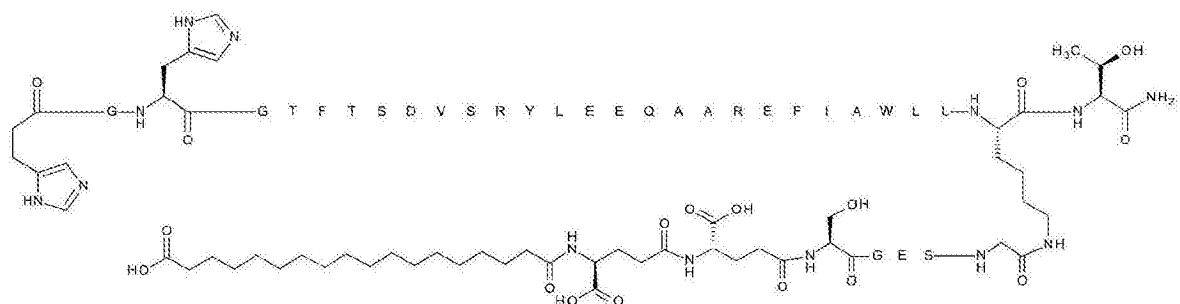


(化学式 36)。

[0258] 在一些实施方案中,所述GLP-1衍生物为

[0259] $N^{\epsilon 34}$ -[2-[[(2S)-2-[[(2S)-4-羧基-2-[[2-[[(2S)-2-[[(4S)-4-羧基-4-[[(4S)-4-羧基-4-(17-羧基十七酰基氨基)丁酰基]氨基]丁酰基]氨基]-3-羟基丙酰基]氨基]乙酰基]氨基]丁酰基]氨基]-3-羟基丙酰基]氨基]乙酰基]-[Imp7,Gly8,His9,Arg18,Glu22,Arg26,Leu33,Thr35]-GLP-1-(7-35)-肽酰胺

[0260]

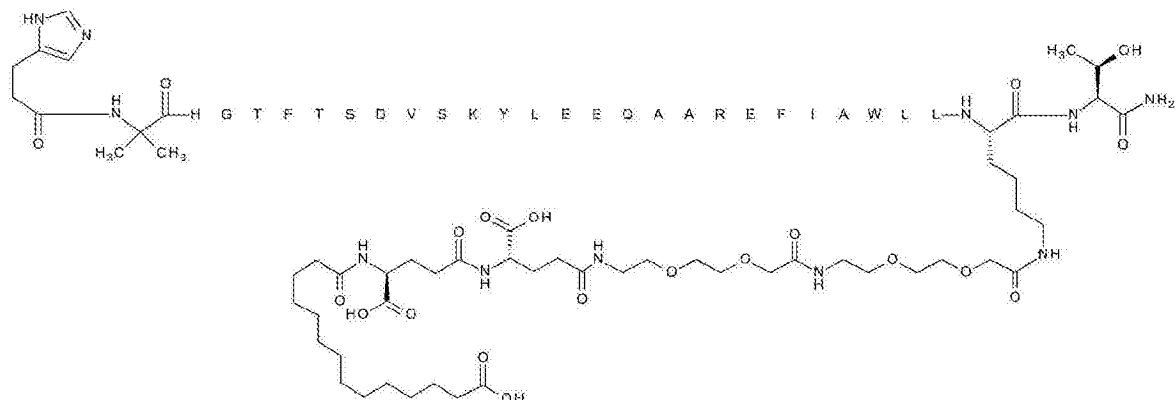


(化学式 37)。

[0261] 在一些实施方案中,所述GLP-1衍生物为

[0262] $N^{\epsilon 34}$ -[2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[(4S)-4-羧基-4-[[(4S)-4-羧基-4-(13-羧基十三酰基氨基)丁酰基]氨基]丁酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基]-[Imp7,Aib8,His9,Lys18,Glu22,Arg26,Leu33,Thr35]-GLP-1-(7-35)-肽酰胺

[0263]

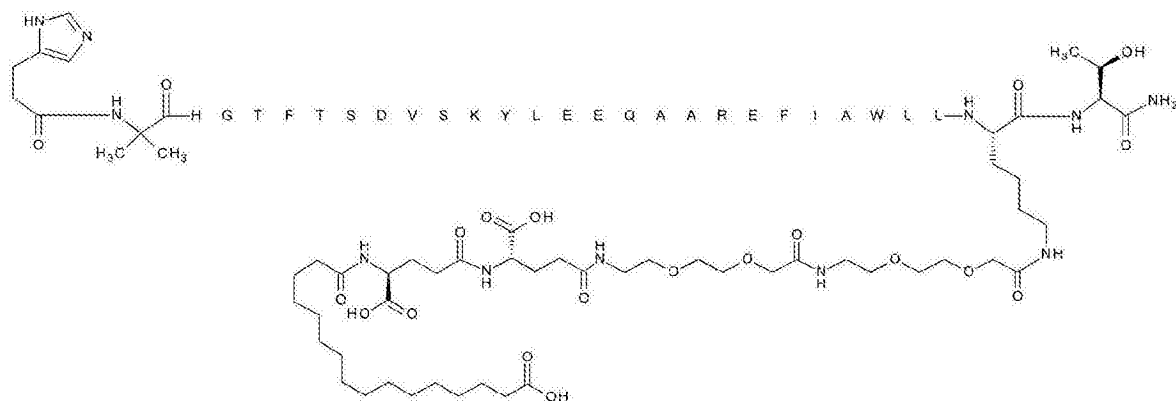


(化学式 38)。

[0264] 在一些实施方案中,所述GLP-1衍生物为

[0265] $N^{\epsilon 34}$ -[2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[(4S)-4-羧基-4-[[(4S)-4-羧基-4-(15-羧基十五酰基氨基) 丁酰基] 氨基] 丁酰基] 氨基] 乙氧基] 乙氧基] 乙酰基] 氨基] 乙氧基] 乙氧基] 乙酰基]-[Imp7,Aib8,His9,Lys18,Glu22,Arg26,Leu33,Thr35]-GLP-1-(7-35)-肽酰胺

[0266]



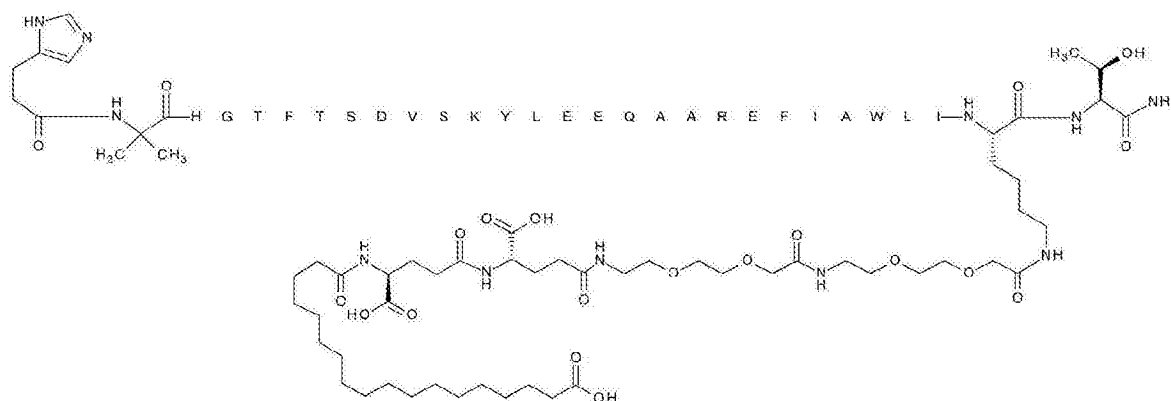
(化学式 39)。

[0267] 在一些实施方案中,所述GLP-1衍生物为

[0268] $N^{\epsilon 34}$ -[2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[(4S)-4-羧基-4-[[(4S)-4-羧基-4-(19-羧基十九酰基氨基) 丁酰基] 氨基] 丁酰基] 氨基] 乙氧基] 乙氧基] 乙酰基] 氨基] 乙氧基] 乙氧基] 乙酰基]-[Imp7,Aib8,His9,Lys18,Glu22,Arg26,Leu33,Thr35]-GLP-1-(7-35)-肽酰胺

[illegible][illegible]

[0275]



(化学式 42)。

[0276] GLP-1类似物的衍生物的制备

[0277] 本发明的衍生物可通过以下描述的方法制备。

[0278] SPPS通用方法

[0279] 欲使用的Fmoc保护的氨基酸衍生物可以是推荐的标准物：由例如Anaspec、Bachem、Iris Biotech或NovabioChem提供的Fmoc-Ala-OH、Fmoc-Arg (Pbf)-OH、Fmoc-Asn (Trt)-OH、Fmoc-Asp (OtBu)-OH、Fmoc-Cys (Trt)-OH、Fmoc-Gln (Trt)-OH、Fmoc-Glu (OtBu)-OH、Fmoc-Gly-OH、Fmoc-His (Trt)-OH、Fmoc-Ile-OH、Fmoc-Leu-OH、Fmoc-Lys (BOC)-OH、Fmoc-Met-OH、Fmoc-Phe-OH、Fmoc-Pro-OH、Fmoc-Ser (tBu)-OH、Fmoc-Thr (tBu)-OH、Fmoc-Trp (BOC)-OH、Fmoc-Tyr (tBu)-OH、Fmoc-Val-OH、Fmoc-Lys (Mtt)-OH或Fmoc-Lys (Alloc)-OH。3-(N-1-三苯甲基-咪唑-4-基)-丙酸用于并入Imp。

[0280] 可在来自Protein Technologies (Tucson, AZ 85714 U.S.A.)的Prelude固相肽合成仪上利用基于Fmoc的化学方法进行SPPS。用于制备C-端羧酸的合适的树脂是预负载氨基酸的Wang树脂，如Fmoc-Thr (tBu)-Wang树脂 (低负载量, 0.35mmol/g)。在取代基连接至C-端赖氨酸的情况下，合适的树脂为预负载的Fmoc-Lys (Mtt)-Wang。用于制备C-端肽酰胺的合适的树脂为H-Rink Amide-ChemMatrix树脂 (例如负载0.52nmol/g) 或Rink Amide AM聚苯乙烯树脂 (Novabiochem, 例如负载0.62nmol/g) 等。使用含20%哌啶的NMP实现Fmoc脱保护。通过使用DIC/HOAt/可力丁或者含有或不含可力丁的DIC/Oxyma Pure, 经过或不经预活化, 或通过使用DEPbt (3-(二乙氧基磷酰氧基)-1,2,3-苯并三嗪-4(3H)-酮)/DIPEA抑制偶联过程中例如His的差向异构化 (epimerization), 来进行肽偶联。将氨基酸/HOAt或氨基酸/Oxyma Pure溶液 (在NMP中0.3M/0.3M, 3-10倍摩尔过量) 添加至该树脂, 随后添加相同摩尔当量的DIC (在NMP中3M), 随后添加可力丁 (在NMP中3M)。例如, 对于以下规模的反应, 每次偶联可使用以下量的0.3M氨基酸/HOAt溶液: 规模/mL, 0.05mmol/1.5mL、0.10mmol/3.0mL、0.25mmol/7.5mL。

[0281] 如果使用Fmoc-Lys (Mtt)-OH, 则如下除去Mtt基团: 用HFIP/DCM (75:25) 洗涤树脂 (2×2min), 用DCM洗涤, 并将树脂悬浮在HFIP/DCM (75:25) 中 (2×20min), 随后在可能将取代基引入到赖氨酸部分的ε位置处之前洗涤。

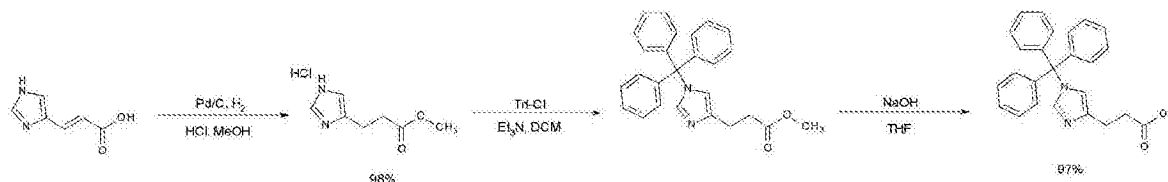
[0282] 如果使用Fmoc-Lys (Alloc)-OH, 则可如下除去Alloc基团: 在一种或多种清除剂组合, 例如吗啉 (6.0当量) 和/或二甲基硼烷络合物 (18.0当量) 的存在下, 用Pd (PPh₃)₄ (0.02当

量)处理树脂(30min)。然后分别用MeOH、NMP或DMF和IPA(异丙醇)洗涤树脂,然后可在赖氨酸部分的 ϵ -位置处引入取代基。

[0283] Imp(脱氨基His(Trt)-OH)的合成

[0284] 可在三步法中由尿刊酸合成Imp(脱氨基His),得到具有三苯甲基保护的Imp游离酸(脱氨基His(Trt)-OH)(参见下列方案)。

[0285]



[0286] 提供了使用三步法合成的示例性Imp:

[0287] 步骤1:将碳载钯(10%,150g,1.41mol)添加至尿刊酸(1,1.01kg,7.33mol)在MeOH(5.50L)、水(5.50L)和35% HCl (752mL,8.59mol)中的溶液中,并将所得混合物在常压下氢化4天。通过 ^1H NMR监测反应的转化。完成后滤出催化剂,并将滤液蒸发至干。将残余物再溶解于MeOH(7.00L)中,并添加 HCl 在MeOH中的2.2M溶液(500mL),并在 45°C 下搅拌16小时。通过蒸发至干来除去溶剂。添加MeOH(10.0L)和在MeOH(1.00L)中的 HCl (47.0g),并在 45°C 下搅拌过夜。将混合物蒸发至干以得到呈灰白色固体的纯3-(1H-咪唑-4-基)-丙酸甲酯盐酸盐(2)。产量:1.37kg(98%)。 ^1H NMR(300MHz, MeOD-d_4) δ 7.40-7.28(m,10H);7.19-7.07(m,6H);6.55(s,1H);3.63(s,3H);2.94-2.83(m,2H);2.71-2.62(m,2H)。

[0288] 步骤2:将三苯甲基氯(Trt-OH)(2.04Kg,7.33mol)添加至上述产物(2,1.37kg,7.20mol)在无水DCM中的溶液(25.2L)中,并添加 Et_3N (2.62L,18.7mol)。将混合物在 23°C 下搅拌过夜。将所得溶液用水(15.0L)洗涤,用DCM(2.50L)再次萃取水相。将合并的有机相用10%柠檬酸水溶液(10.0L)洗涤,并再次用DCM(2.50L)萃取水相。将合并的有机相用水(10.0L)洗涤,并再次用DCM(2.50L)萃取水相。将合并的有机相经无水硫酸镁干燥并蒸发至干,以得到呈白色固体的3-(1-三苯甲基-1H-咪唑-4-基)-丙酸甲酯(3)。

[0289] 步骤3:将 NaOH (570g,14.3mol)的水(5.00L)溶液添加至上述酯(3)在THF中的溶液(20.0L)中;将所得混合物在 23°C 下搅拌过夜。将柠檬酸水溶液(10%,15.0L)添加至残余物中,并用DCM($3 \times 5.00\text{L}$)萃取混合物。将合并的有机萃取物用水($2 \times 5.00\text{L}$)洗涤,经无水硫酸镁干燥并蒸发以得到结晶物质。将残余物悬浮于DCM(2.50L)中并添加环己烷(10.0L)。过滤固体,将固体用环己烷(7.00L)洗涤。产物含有0.34%的副产物,因此将该固体悬浮于MeOH(20.0L)中并过滤。将固体风干并再溶解于回流的DCM(10.0L)中,并通过蒸发除去溶剂。将固体均质化以得到呈白色粉末的标题产物(4)。产量:2679.2g(97%)。 ^1H NMR谱(300MHz, CDCl_3) δ 10.49(bs,1H);7.48(s,1H);7.41-7.28(m,9H);7.18-7.05(m,6H);6.60(s,1H);2.93-2.81(m,2H);2.77-2.65(m,2H)。LC-MS纯度:100%(ELSD)。LC-MS R_t (Kinetex C18,4.6mm $\times$ 50mm, MeCN/水20:80至100:0+0.1%FA):2.82min。LC-MS m/z :383.2($\text{M}+\text{H}$) $^+$ 。m.p.:190-191 $^\circ\text{C}$ 。UPLC纯度:99.74%(214nm)。UPLC R_t (Acquity UPLC BEHC18,1.7 μm , 2.1 $\times$ 150mm, 40°C , MeCN/水05:95至100:0+0.05%TFA,6min):2.512min。内毒素水平: $<0.06\text{EU/mL}$ (使用1mg化合物在10%水性DMSO中的溶液通过Limulus Amebocyte Lysate PYROGENT Plus试验进行估计)。

[0290] 取代基的连接

[0291] 可通过上述Prelude肽合成仪,使用适当保护的结构单元,如上述标准氨基酸、Fmoc-8-氨基-3,6-二氧杂辛酸和Fmoc-Glu-OtBu,在分步过程中引入取代基。可使用结构单元,例如但不限于十八烷二酸单叔丁酯,来实现脂肪酸部分的引入。在每个偶联步骤后,可使用过量的乙酸酐和可力丁(>10当量)对未反应的肽中间体加帽。

[0292] 在每个偶联步骤后,可使用过量的乙酸酐和可力丁(>10当量)对未反应的肽中间体加帽。

[0293] 使用Mtt保护的赖氨酸(Fmoc-Lys(Mtt)-OH)、Alloc保护的赖氨酸(Fmoc-Lys(Alloc)-OH)或ivDde基团保护的赖氨酸(Fmoc-Lys(ivDde)-OH)来实现取代基向赖氨酸的 ϵ -氮上的引入。可通过偶联氨基酸Fmoc-Glu-OtBu来实现取代基中 γ Glu部分的并入。

[0294] 可使用延长的偶联时间(1x 6小时)来实现取代基中每一部分的引入,随后用乙酸酐或备选地用乙酸/DIC/HOAt/可力丁加帽。

[0295] 从树脂上切割

[0296] 在合成后,用DCM洗涤树脂,并通过用TFA/TIPS/水(95/2.5/2.5)或TFA/EDT(1,2-乙二硫醇)/水(90/5/5)处理2-3小时从树脂上切下肽,随后用Et₂O(二乙醚)或IPE(二异丙醚)沉淀。然后用所使用的溶剂洗涤沉淀物。

[0297] 纯化和定量

[0298] 将粗肽在60℃下在水和MeCN的适当混合物如水/MeCN(4:1)或水/AcOH(1:1)中溶解1小时,并在包含C8-或C18-硅胶的柱上通过反相制备型HPLC(Waters Deltaprep 4000或Gilson)进行纯化。利用在包含0.1%TFA的水中逐渐增加的MeCN梯度进行洗脱。通过分析型HPLC或UPLC检查相关级分。混合并减压浓缩包含纯目标肽的级分。可使用另一梯度,例如含有0.05M NH₄HCO₃,来引入额外的纯化步骤。分析(HPLC、LCMS)所得到的溶液,并使用化学发光氮特异性HPLC检测器(Antek 8060HPLC-CLND)或通过测量280nm处的UV吸光度来对产物(即衍生物)进行定量。将产物分装到玻璃小瓶中。小瓶用Millipore玻璃纤维预过滤器封盖。冷冻干燥得到呈白色固体的肽三氟乙酸盐。

[0299] 在一些实施方案中,可通过柱离子交换,例如使用在MeCN中的NaOAc,使肽三氟乙酸盐变成钠盐。或者,可通过柱色谱法,例如使用含有0.05M NH₄HCO₃的梯度,使肽三氟乙酸盐变成铵盐,随后冷冻干燥并悬浮于水中。在一些实施方案中,然后通过添加1M NaOH(根据碱性/酸性残基的当量)使悬浮液变澄清而使肽变成钠盐。最后,可通过冷冻干燥分离肽钠盐。

[0300] 中间产物

[0301] 在一些实施方案中,本发明涉及选自下组的GLP-1类似物形式的中间产物,或其药学上可接受的盐:

[0302] [Imp7,Ac8,His9,Tyr16,Lys18,Glu22,Arg26,Leu33,Lys35]-GLP-1-(7-35)-肽酰胺;

[0303] [Imp7,Ac8,His9,Lys18,Glu22,Arg26,Leu33,Lys35]-GLP-1-(7-35)-肽酰胺;

[0304] [Imp7,Aib8,His9,Lys18,Glu22,Arg26,Leu33,Thr35]-GLP-1-(7-35)-肽酰胺;

[0305] [Imp7,Aib8,His9,Arg18,Glu22,Arg26,Leu33,Thr35]-GLP-1-(7-35)-肽酰胺;

[0306] [Imp7,Aib8,His9,Arg18,Arg26,Leu33,Thr35]-GLP-1-(7-35)-肽酰胺;

- [0307] [Imp7, Acb8, His9, Lys18, Glu22, Arg26, Leu33, Thr35]-GLP-1-(7-35)-肽酰胺;
- [0308] [Imp7, His9, Lys18, Arg23, Arg26, Leu33, Thr35]-GLP-1-(7-35)-肽酰胺;
- [0309] [Imp7, His9, Lys18, Arg23, Arg26, Leu33, Gly36]-GLP-1-(7-37)-肽;
- [0310] [Imp7, Aib8, His9, Lys18, Lys22, Arg26, Leu33, Gly36]-GLP-1-(7-37)-肽;
- [0311] [Imp7, Aib8, His9, Tyr16, Lys18, Glu22, Arg26, Leu33, Lys36]-GLP-1-(7-37)-肽;
- [0312] [Imp7, Aib8, His9, Lys 18, Lys23, Arg26, Leu33, Thr35]-GLP-1-(7-35)-肽酰胺;
- [0313] [Imp7, Aib8, His9, Tyr16, Lys18, Lys23, Arg26, Leu33, Thr35]-GLP-1-(7-35)-肽酰胺;
- [0314] [Imp7, His9, Arg18, Arg23, Arg26, Leu33]-GLP-1-(7-34)-肽;
- [0315] [Imp7, His9, Arg18, Glu22, Arg26, Lys27, Leu33, Arg34]-GLP-1-(7-34)-肽;
- [0316] [Imp7, Aib8, His9, Arg18, Glu22, Arg26, Lys27, Leu33, Arg34]-GLP-1-(7-34)-肽;
- [0317] [Imp7, Acb8, His9, Lys18, Arg23, Arg26, Leu33, Thr35]-GLP-1-(7-35)-肽酰胺;
- [0318] [Imp7, Acb8, His9, Tyr16, Lys18, Glu22, Arg26, Leu33, Lys35]-GLP-1-(7-35)-肽酰胺;
- [0319] [Imp7, Acb8, His9, Tyr16, Arg18, Glu22, Arg26, Leu33, Arg34, Lys35]-GLP-1-(7-35)-肽酰胺;
- [0320] [Imp7, Acb8, His9, Tyr16, Lys18, Arg22, Arg26, Leu33, Lys35]-GLP-1-(7-35)-肽酰胺;
- [0321] [Imp7, Acb8, His9, Tyr16, Lys18, Arg22, Arg23, Arg26, Leu33, Lys35]-GLP-1-(7-35)-肽酰胺;
- [0322] [Imp7, Aib8, His9, Lys18, Glu22, Arg26, Leu33, Thr35]-GLP-1-(7-35)-肽;
- [0323] [Imp7, Acb8, His9, Tyr16, Lys18, Arg23, Arg26, Leu33, Lys35]-GLP-1-(7-35)-肽酰胺;
- [0324] [Imp7, Acb8, His9, Tyr16, Arg18, Arg23, Arg26, Leu33, Arg34, Lys35]-GLP-1-(7-35)-肽酰胺;
- [0325] [Imp7, Aib8, His9, Lys18, Glu22, Arg26, Leu33, Thr35]-GLP-1-(7-35)-肽酰胺;
- [0326] [Imp7, Aib8, His9, Lys18, Ala22, Arg23, Arg26, Leu33, Gly36]-GLP-1-(7-37)-肽;
- [0327] [Imp7, Acb8, His9, Lys18, Lys22, Arg23, Arg26, Leu33, Thr35]-GLP-1-(7-35)-肽酰胺;
- [0328] [Imp7, Acb8, His9, Lys18, Lys22, Arg26, Leu33, Thr35]-GLP-1-(7-35)-肽酰胺;
- [0329] [Imp7, Aib8, His9, Lys18, Ala22, Arg26, Leu33, Thr35]-GLP-1-(7-35)-肽酰胺;
- [0330] [Imp7, Aib8, His9, Arg18, Arg23, Arg26, Leu33, Ala36]-GLP-1-(7-37)-肽;
- [0331] [Imp7, Aib8, His9, Arg18, Arg23, Arg26, Leu33, Ser36]-GLP-1-(7-37)-肽;
- [0332] [Imp7, Gly8, His9, Arg18, Glu22, Arg26, Leu33, Thr35]-GLP-1-(7-35)-肽酰胺;
- [0333] [Imp7, Aib8, His9, Leu16, Lys18, Glu22, Arg26, Leu33, Thr35]-GLP-1-(7-35)-肽酰胺;以及
- [0334] [Imp7, Aib8, His9, Lys18, Glu22, Arg26, Ile33, Thr35]-GLP-1-(7-35)-肽酰胺。
- [0335] 在一些实施方案中,本发明涉及选自下组的GLP-1类似物形式的中间产物,或其药学上可接受的盐:

- [0336] [Imp7, Acb8, His9, Tyr16, Lys18, Glu22, Arg26, Leu33, Lys35]-GLP-1-(7-35)-肽酰胺;
- [0337] [Imp7, Acb8, His9, Lys18, Glu22, Arg26, Leu33, Lys35]-GLP-1-(7-35)-肽酰胺;
- [0338] [Imp7, Aib8, His9, Lys18, Glu22, Arg26, Leu33, Thr35]-GLP-1-(7-35)-肽酰胺;
- [0339] [Imp7, Aib8, His9, Arg18, Glu22, Arg26, Leu33, Thr35]-GLP-1-(7-35)-肽酰胺;
- [0340] [Imp7, Aib8, His9, Arg18, Arg26, Leu33, Thr35]-GLP-1-(7-35)-肽酰胺;
- [0341] [Imp7, Acb8, His9, Lys18, Glu22, Arg26, Leu33, Thr35]-GLP-1-(7-35)-肽酰胺;
- [0342] [Imp7, His9, Lys18, Arg23, Arg26, Leu33, Thr35]-GLP-1-(7-35)-肽酰胺;
- [0343] [Imp7, His9, Lys18, Arg23, Arg26, Leu33, Gly36]-GLP-1-(7-37)-肽;
- [0344] [Imp7, Aib8, His9, Lys18, Lys22, Arg26, Leu33, Gly36]-GLP-1-(7-37)-肽;
- [0345] [Imp7, Aib8, His9, Tyr16, Lys18, Glu22, Arg26, Leu33, Lys36]-GLP-1-(7-37)-肽;
- [0346] [Imp7, Aib8, His9, Lys18, Lys23, Arg26, Leu33, Thr35]-GLP-1-(7-35)-肽酰胺;
- [0347] [Imp7, Aib8, His9, Tyr16, Lys18, Lys23, Arg26, Leu33, Thr35]-GLP-1-(7-35)-肽酰胺;
- [0348] [Imp7, His9, Arg18, Arg23, Arg26, Leu33]-GLP-1-(7-34)-肽;
- [0349] [Imp7, His9, Arg18, Glu22, Arg26, Lys27, Leu33, Arg34]-GLP-1-(7-34)-肽;
- [0350] [Imp7, Aib8, His9, Arg18, Glu22, Arg26, Lys27, Leu33, Arg34]-GLP-1-(7-34)-肽;
- [0351] [Imp7, Acb8, His9, Lys18, Arg23, Arg26, Leu33, Thr35]-GLP-1-(7-35)-肽酰胺;
- [0352] [Imp7, Acb8, His9, Tyr16, Lys18, Glu22, Arg26, Leu33, Lys35]-GLP-1-(7-35)-肽酰胺;
- [0353] [Imp7, Acb8, His9, Tyr16, Arg18, Glu22, Arg26, Leu33, Arg34, Lys35]-GLP-1-(7-35)-肽酰胺;
- [0354] [Imp7, Acb8, His9, Tyr16, Lys18, Arg22, Arg26, Leu33, Lys35]-GLP-1-(7-35)-肽酰胺;
- [0355] [Imp7, Acb8, His9, Tyr16, Lys18, Arg22, Arg23, Arg26, Leu33, Lys35]-GLP-1-(7-35)-肽酰胺;
- [0356] [Imp7, Aib8, His9, Lys18, Glu22, Arg26, Leu33, Thr35]-GLP-1-(7-35)-肽;
- [0357] [Imp7, Acb8, His9, Tyr16, Lys18, Arg23, Arg26, Leu33, Lys35]-GLP-1-(7-35)-肽酰胺;
- [0358] [Imp7, Acb8, His9, Tyr16, Arg18, Arg23, Arg26, Leu33, Arg34, Lys35]-GLP-1-(7-35)-肽酰胺;
- [0359] [Imp7, Aib8, His9, Lys18, Glu22, Arg26, Leu33, Thr35]-GLP-1-(7-35)-肽酰胺;
[Imp7, Aib8, His9, Lys18, Ala22, Arg23, Arg26, Leu33, Gly36]-GLP-1-(7-37)-肽;
- [0360] [Imp7, Acb8, His9, Lys18, Lys22, Arg23, Arg26, Leu33, Thr35]-GLP-1-(7-35)-肽酰胺;
- [0361] [Imp7, Acb8, His9, Lys18, Lys22, Arg26, Leu33, Thr35]-GLP-1-(7-35)-肽酰胺;
- [0362] [Imp7, Aib8, His9, Lys18, Ala22, Arg26, Leu33, Thr35]-GLP-1-(7-35)-肽酰胺;
- [0363] [Imp7, Aib8, His9, Arg18, Arg23, Arg26, Leu33, Ala36]-GLP-1-(7-37)-肽;
- [0364] [Imp7, Aib8, His9, Arg18, Arg23, Arg26, Leu33, Ser36]-GLP-1-(7-37)-肽;

[0365] [Imp7,Gly8,His9,Arg18,Glu22,Arg26,Leu33,Thr35]-GLP-1-(7-35)-肽酰胺;

[0366] [Imp7,Aib8,His9,Leu16,Lys18,Glu22,Arg26,Leu33,Thr35]-GLP-1-(7-35)-肽酰胺;以及

[0367] [Imp7,Aib8,His9,Lys18,Glu22,Arg26,Ile33,Thr35]-GLP-1-(7-35)-肽酰胺。

[0368] 本发明的GLP-1衍生物可通过以下分步合成法来制备,其包括(i)中间GLP-1类似物的制备,随后是(ii)取代基的连接。该方法的步骤(i)可通过利用如实验部分中描述的标准固相合成法使用保护的氨基酸来完成;在从树脂上切下后,该GLP-1类似物可使用如本文实验部分中描述的制备型HPLC进行纯化以得到中间产物。或者,该方法的步骤(i),即中间产物的制备,可使用如W02009/083549中描述的半重组合成法来进行。该方法的步骤(ii),即取代基连接至中间产物上以产生最终产物,以及取代基本身的制备,可使用W02009/083549中描述的方法来实现。

[0369] 药学上可接受的盐、酰胺或酯

[0370] 本发明的衍生物或中间产物可以是药学上可接受的盐、酰胺或酯的形式。盐是例如通过碱与酸之间的化学反应形成的,例如: $2\text{NH}_3 + \text{H}_2\text{SO}_4 \rightarrow (\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 。盐可以是碱式盐、酸式盐或者它可以两者都不是(即中性盐)。在水中,碱式盐产生氢氧根离子而酸式盐产生水合氢离子。

[0371] 本发明的衍生物或中间产物的盐可分别通过在阴离子基团或阳离子基团之间添加阳离子或阴离子来形成。这些基团可以位于本发明的衍生物或中间产物的肽部分中和/或取代基中。

[0372] 本发明的衍生物或中间产物的阴离子基团的非限制性实例包括在取代基中(如果存在的话)以及在肽部分中的游离羧基。该肽部分通常包括在内部酸性氨基酸残基如Asp和Glu处的游离羧基。

[0373] 肽部分中的阳离子基团的非限制性实例包括N-端处的游离氨基(如果存在的话)以及内部碱性氨基酸残基如His、Arg和Lys的任何游离氨基。

[0374] 本发明的衍生物或中间产物的酯可以例如通过游离羧酸基团与醇或苯酚的反应来形成,该反应导致至少一个羟基被烷氧基或芳氧基替代。酯的形成可涉及肽的C-端处的游离羧基和/或取代基中的任何游离羧基。

[0375] 本发明的类似物或衍生物的酰胺可以例如通过游离羧酸基团与胺或取代胺的反应或通过游离或取代的氨基与羧酸的反应来形成。

[0376] 酰胺的形成可涉及肽的C-端处的游离羧基、取代基中的任何游离羧基、肽的N-端处的游离氨基和/或肽和/或取代基中肽的任何游离或取代的氨基。

[0377] 在当前的语境中,术语“药学上可接受的盐”旨在表示对患者无害的盐。这样的盐包括药学上可接受的酸加成盐、药学上可接受的金属盐、铵盐和烷基化的铵盐。酸加成盐包括无机酸和有机酸的盐。

[0378] 在一些实施方案中,所述肽为药学上可接受的盐的形式。在一些实施方案中,所述肽为药学上可接受的酰胺的形式,优选在肽的C-端具有酰胺基团。在一些实施方案中,所述肽为药学上可接受的酯的形式。

[0379] 功能性质

[0380] 本发明的GLP-1衍生物能够结合并激活GLP-1受体和胰高血糖素受体两者。换言之

之,本发明的GLP-1衍生物既是胰高血糖素受体的激动剂又是GLP-1受体的激动剂,在本文中也称为“GLP-1/胰高血糖素受体共激动剂”。在一些实施方案中,本发明的GLP-1衍生物为GLP-1和胰高血糖素受体激动剂,如通过它们对这两种受体的效力所反映出的。

[0381] 在一些实施方案中,所述GLP-1衍生物对GLP-1受体的EC₅₀值低于对胰高血糖素受体的EC₅₀值。

[0382] 另外或可替代地,在一些实施方案中,所述GLP-1衍生物是化学稳定的、物理稳定的且可溶的,例如,所述GLP-1衍生物的化学稳定性、物理稳定性和溶解性使得所述GLP-1衍生物在液体药物组合物中具有足够的储存稳定性。

[0383] 另外或可替代地,在一些实施方案中,例如与人GLP-1 (SEQ ID NO:1) 或人胰高血糖素相比,所述GLP-1衍生物对胰高血糖素受体具有良好的受体结合和效力。

[0384] 另外或可替代地,在一些实施方案中,例如与人GLP-1 (SEQ ID NO:1) 或人胰高血糖素相比,所述GLP-1衍生物对GLP-1受体具有良好的受体结合和效力。

[0385] 另外或可替代地,在一些实施方案中,所述GLP-1衍生物具有改善的药代动力学性质。

[0386] 另外或可替代地,在一些实施方案中,例如与人GLP-1 (SEQ ID NO:1) 或人胰高血糖素相比,所述GLP-1衍生物是持久的 (protracted) 衍生物。

[0387] 受体结合和效力

[0388] 本发明的衍生物为GLP-1/胰高血糖素受体共激动剂,即,既是GLP-1受体激动剂又是胰高血糖素受体激动剂。

[0389] 受体激动剂可被定义为与受体结合并引发天然配体的典型响应的肽 (例如GLP-1衍生物)。因此,例如,“GLP-1受体激动剂”可被定义为能够与人GLP-1受体结合并能够完全或部分地将其激活的化合物。类似地,如本文所使用的术语“胰高血糖素受体激动剂”可被定义为能够与胰高血糖素受体结合并能够完全或部分地将其激活的化合物。天然配体的典型响应可以是细胞内信号转导途径的完全或部分激活,如腺苷酸环化酶的激活和细胞内cAMP水平的升高,从而介导如本领域已知的生理效应。例如,术语“GLP-1受体活性”是指与GLP-1受体结合并引发信号转导途径从而导致促胰岛素作用或本领域已知的其他生理效应的能力。

[0390] 可使用本文描述的试验 (I) (a) 或试验 (II) (a) 测试本发明的衍生物或类似物的GLP-1受体活性,或使用本文描述的试验 (I) (b) 或试验 (II) (b) 测试本发明的衍生物或类似物的胰高血糖素受体活性。在一些实施方案中,如本文所使用的术语“受体活性”是指受体激动剂的作用。

[0391] 在一些实施方案中,如本文所使用的术语“胰高血糖素受体”意指人胰高血糖素受体。在一些实施方案中,如本文所使用的术语“GLP-1受体”意指人GLP-1受体。

[0392] 生物活性-体外亲和力和效力

[0393] 在一些实施方案中,如本文所使用的术语“亲和力”或“受体结合”是指体外受体结合亲和力,即在GLP-1受体结合亲和力试验和胰高血糖素受体结合亲和力试验中的表现,更具体地是指与人GLP-1受体和人胰高血糖素受体结合的能力。人GLP-1受体的结合亲和力可在结合试验中,例如在稳定表达人GLP-1受体的BHK细胞系的细胞膜上测量。放射性标记的GLP-1与受体结合并可被化合物 (例如GLP-1衍生物) 竞争性地置换。其余的结合的放射性配

体可通过添加与细胞膜结合的闪烁亲近测定 (SPA) 珠子来测定, 并且当放射性接近珠子时产生光, 对该光进行测量并将其作为该化合物的体外结合亲和力的量度。用于测定结合亲和力的试验的一个非限制性实例在本文试验 (II) 中描述。人胰高血糖素受体的结合亲和力可在结合亲和力试验中, 例如在稳定表达人胰高血糖素受体的BHK细胞系的细胞膜上测量。放射性标记的胰高血糖素与受体结合并可被化合物 (例如GLP-1衍生物) 竞争性地置换。其余的结合的放射性配体可通过添加与细胞膜结合的闪烁亲近测定 (SPA) 珠子来测定, 并且当放射性接近珠子时产生光, 对该光进行测量并将其作为该化合物的体外结合亲和力的量度。

[0394] 术语半数最大抑制浓度 (IC_{50}) 通常是指置换放射性配体结合的50%的特异性结合的竞争化合物的浓度, 参照剂量应答曲线, 其对应于基线与最大值之间的一半。 IC_{50} 用作化合物的结合亲和力的量度, 并且是观察到其最大结合的50%时的浓度。

[0395] 本发明的GLP-1衍生物的体外结合可以如上所述以及根据测定的所述肽的 IC_{50} 来确定。 IC_{50} 值越低, 结合亲和力越好。

[0396] 在一些实施方案中, 使用本文试验 (II) (a) 中描述的方法测定, 所述GLP-1衍生物对GLP-1受体的体外结合亲和力对应于等于或低于100nM、更优选低于10nM、更优选低于5nM或最优选低于1nM的 IC_{50} 。

[0397] 使用本文试验 (II) (b) 中描述的方法测定, 所述GLP-1衍生物对胰高血糖素受体的体外结合亲和力可对应于等于或低于100nM或低于50nM或低于10nM的 IC_{50} 。

[0398] 在一些实施方案中, 效力和/或活性是指体外效力, 即在功能性GLP-1受体试验和胰高血糖素受体试验中的表现, 更具体地是指激活人GLP-1受体和人胰高血糖素受体的能力。人GLP-1受体的响应可在报告基因试验中, 例如在BHK细胞系中测量, 该BHK细胞系稳定表达人GLP-1受体并且包含偶联至启动子的cAMP响应元件 (CRE) 的DNA以及萤火虫萤光素酶 (CRE萤光素酶) 的基因。当由于GLP-1受体的激活而产生cAMP时, 这转而导致萤光素酶被表达。萤光素酶表达可通过添加萤光素来测定, 萤光素可被该酶转化成氧化萤光素并产生生物发光, 对该生物发光进行测量并将其作为体外受体效力的量度。用于测定受体效力的试验的一个非限制性实例在本文试验 (I) 中描述。人胰高血糖素受体的响应可在报告基因试验中, 例如在BHK细胞系中测量, 该BHK细胞系稳定表达人胰高血糖素受体并且包含偶联至启动子的cAMP响应元件 (CRE) 的DNA以及萤火虫萤光素酶 (CRE萤光素酶) 的基因。当由于胰高血糖素受体的激活而产生cAMP时, 这转而导致萤光素酶被表达。萤光素酶表达可通过添加萤光素来测定, 萤光素可被该酶转化成氧化萤光素并产生生物发光, 对该生物发光进行测量并将其作为体外受体效力的量度。

[0399] 术语半数最大有效浓度 (EC_{50}) 通常是指参照剂量响应曲线, 诱导基线与最大值之间的一半的响应的浓度。 EC_{50} 用作化合物 (例如GLP-1衍生物) 的效力的量度, 并且是观察到其最大效应的50%时的浓度。

[0400] 本发明的GLP-1衍生物的体外受体效力可以如上所述以及根据测定的所述肽的 EC_{50} 来确定。 EC_{50} 值越低, 效力越好。

[0401] GLP-1/胰高血糖素受体共激动剂

[0402] GLP-1/胰高血糖素受体共激动剂可被定义为能够激活GLP-1受体和胰高血糖素受体两者的肽。本发明的衍生物对GLP-1受体具有低于1nM的 EC_{50} 并且对胰高血糖素受体具有

低于10nM的EC₅₀。在一些实施方案中,本发明的衍生物对GLP-1受体具有低于100pM的EC₅₀并且对胰高血糖素受体具有低于100pM的EC₅₀;或者对GLP-1受体具有低于50pM的EC₅₀并且对胰高血糖素受体具有低于100pM的EC₅₀;或者对GLP-1受体具有低于10pM的EC₅₀并且对胰高血糖素受体具有低于50pM的EC₅₀。可如本文试验(I)所述测定EC₅₀。

[0403] 在一些实施方案中,所述GLP-1衍生物对GLP-1受体的EC₅₀值低于对胰高血糖素受体的EC₅₀值。在一些实施方案中,该GLP-1衍生物对胰高血糖素受体的EC₅₀值与对GLP-1受体的EC₅₀之间的比值在100至250的范围内,例如在50至100的范围内、在20至50的范围内、在10至20的范围内或在1至10的范围内。在一些实施方案中,该GLP-1衍生物对胰高血糖素受体的EC₅₀值与对GLP-1受体的EC₅₀之间的比值在50至100的范围内。在一些实施方案中,该GLP-1衍生物对胰高血糖素受体的EC₅₀值与对GLP-1受体的EC₅₀之间的比值在20至50的范围内。在一些实施方案中,该GLP-1衍生物对胰高血糖素受体的EC₅₀值与对GLP-1受体的EC₅₀之间的比值在10至20的范围内。在一些实施方案中,该GLP-1衍生物对胰高血糖素受体的EC₅₀值与对GLP-1受体的EC₅₀之间的比值在1至10的范围内。在一些实施方案中,根据本文所述的试验(I) (a) 测定对GLP-1受体的EC₅₀。在一些实施方案中,根据本文所述的试验(I) (b) 测定对胰高血糖素受体的EC₅₀。

[0404] 所述GLP-1衍生物对胰高血糖素受体的效力(EC₅₀)可低于10nM或低于1nM或100pM或低于10pM。在一些实施方案中,该GLP-1衍生物对胰高血糖素受体的EC₅₀<10nM。在一些实施方案中,该GLP-1衍生物对胰高血糖素受体的EC₅₀<1nM。在一些实施方案中,该GLP-1衍生物对胰高血糖素受体的EC₅₀<100pM。在一些实施方案中,该GLP-1衍生物对胰高血糖素受体的EC₅₀<10pM。

[0405] 本发明的GLP-1衍生物对GLP-1受体的EC₅₀可低于1nM或低于100pM或低于50pM或低于10pM。在一些实施方案中,该GLP-1衍生物对GLP-1受体的EC₅₀低于100pM。在一些实施方案中,该GLP-1衍生物对GLP-1受体的EC₅₀低于50pM。在一些实施方案中,该GLP-1衍生物对GLP-1受体的EC₅₀低于10pM。

[0406] 本发明的GLP-1衍生物对GLP-1受体的效力,即EC₅₀,可根据本文描述的试验(I) (a) 来测定。本发明的GLP-1衍生物对胰高血糖素受体的效力,即EC₅₀,可根据本文描述的试验(I) (b) 来测定。

[0407] 本发明的衍生物对GLP-1受体具有低于35nM的IC₅₀并且对胰高血糖素受体具有低于150nM的IC₅₀。可如本文试验(II)所述测定IC₅₀。

[0408] 在一些实施方案中,所述GLP-1衍生物对GLP-1受体的IC₅₀值低于对胰高血糖素受体的IC₅₀值。在一些实施方案中,该GLP-1衍生物对胰高血糖素受体的IC₅₀值与对GLP-1受体的IC₅₀之间的比值在1至5的范围内,例如在5至10的范围内、在10至15的范围内、在15至25的范围内;或例如在25至100的范围内,或在100以上。

[0409] 生物活性-体内药理学

[0410] 在一些实施方案中,本发明的GLP-1衍生物在体内是强效的,这可以如本领域所知在任何合适的动物模型以及临床试验中测定。

[0411] 饮食诱导的肥胖(DIO)小鼠是合适的动物模型的一个例子,并且可在该模型中在亚慢性给药期间评估对体重、食物摄入和葡萄糖耐量的影响。可在这样的小鼠体内测定对体重和血糖的影响。可通过单独饲养动物并对每天消耗的食物进行称重来评估食物摄入。

该模型也可用于通过进行口服或腹膜内葡萄糖耐量试验 (OGTT或IPGTT) 来评估对葡萄糖耐量的影响。通过对半禁食的动物经口或腹膜内施用葡萄糖负荷并随后测量血糖长达三小时来进行这些试验。

[0412] 药代动力学谱

[0413] 例如与人GLP-1或人胰高血糖素相比,本发明的GLP-1衍生物可具有改善的药代动力学性质,如延长的终末半衰期。优选地,本发明的GLP-1衍生物具有适合于每天给药一次或更少的药代动力学性质。

[0414] 本发明的GLP-1衍生物的药代动力学性质可在药代动力学 (PK) 研究中在体内适当地进行测定。进行这样的研究来评价随着时间的推移,药物化合物在体内如何被吸收、分布并消除,以及这些过程如何影响化合物在体内的浓度。

[0415] 在药物开发的发现和临床前阶段,可使用诸如小鼠、大鼠、猴、犬或猪等动物模型来进行这种表征。这些模型中的任一种均可用于测试本发明的GLP-1衍生物的药代动力学性质。

[0416] 在这类研究中,通常以相关药物组合物的形式对动物静脉内 (i.v.)、皮下 (s.c.) 或经口 (p.o.) 施用单剂量的药物。在给药后的预定时间点抽取血样,并用相关的定量试验分析样品的药物浓度。基于这些测量,绘制研究的化合物的时间-血浆浓度曲线,并对数据进行所谓的非房室药代动力学分析。

[0417] 对于大多数化合物,当在半对数图中绘制时,血浆-浓度曲线的末端部分将是线性的,表明在初始吸收和分布后,药物以恒定的分数速率 (fractional rate) 从体内去除。该速率 (λ_z 或 λ_z) 等于该图末端部分的斜率的负数。由此速率,也可以按 $t_{1/2} = \ln(2) / \lambda_z$ 计算出终末半衰期 (例如,参见 Johan Gabrielsson 和 Daniel Weiner: Pharmacokinetics and Pharmacodynamic Data Analysis. Concepts & Applications, 第三版, Swedish Pharmaceutical Press, Stockholm (2000))。

[0418] 在静脉内给药后可测定清除率,并将其定义为剂量 (D) 除以血浆浓度-时间曲线上的曲线下面积 (AUC) (Rowland, M 和 Tozer TN: Clinical Pharmacokinetics: Concepts and Applications, 第三版, 1995 Williams Wilkins)。

[0419] 在新药物化合物的评价中,终末半衰期和/或清除率的估计与给药方案的评价有关,并且是药物开发中的重要参数。

[0420] 药代动力学谱-在大鼠体内的半衰期

[0421] 所述GLP-1衍生物的药代动力学性质可在静脉内和皮下给药后以大鼠体内的终末半衰期 ($T_{1/2}$) 来测定。在一些实施方案中,该GLP-1衍生物的终末半衰期为至少1小时,优选至少3小时,优选至少4小时,更优选至少5小时,或最优选至少6小时。

[0422] 药代动力学谱-在小鼠体内的半衰期

[0423] 本发明的GLP-1衍生物与人GLP-1或人胰高血糖素相比可具有改善的药代动力学性质。优选地,本发明的GLP-1衍生物具有适合于每天给药一次或更少的药代动力学性质。

[0424] 在一些实施方案中,该GLP-1衍生物的药代动力学性质可在静脉内和皮下给药后以小鼠体内的终末半衰期 ($T_{1/2}$) 来测定。在一些实施方案中,该GLP-1衍生物的终末半衰期为至少1小时,优选至少3小时,优选至少4小时,更优选至少5小时,或最优选至少6小时。用于测定该GLP-1衍生物在小鼠中皮下给药后的终末半衰期的合适的试验在本文的试验 (IV)

中描述。

[0425] 药代动力学谱-在小型猪体内的半衰期

[0426] 本发明的GLP-1衍生物与hGLP-1相比可具有改善的药代动力学性质,并且优选地适合于每天一次或每周一次给药。在一些实施方案中,该GLP-1衍生物的药代动力学性质可在静脉内给药后以小型猪体内的终末半衰期($T_{1/2}$)来测定,例如,如下文所述。

[0427] 在一些实施方案中,该GLP-1衍生物在小型猪中的终末半衰期为至少5小时,优选至少10小时,更优选至少15小时,或最优选至少20小时。

[0428] 本研究的目的是确定该GLP-1衍生物在静脉内施用于小型猪后的体内药代动力学性质。这在药代动力学(PK)研究中完成,除其他参数外,测定所述衍生物的终末半衰期和清除率。终末半衰期延长和清除率降低意味着研究的化合物从体内消除得较慢。对于GLP-1衍生物,这必然导致药理学效应的延长的持续时间。

[0429] 本研究使用从Ellegaard **Göttingen** Minipigs (Dalmose, Denmark) 获得的大约7-14个月龄且重约16-35kg的雌性**Göttingen**小型猪。这些小型猪或者单独饲养(有永久性导管的猪)或者成群饲养,并且严格地每天一次或两次饲以SDS小型猪饮食(Special Diets Services, Essex, UK)。

[0430] 在一些研究中,在至少2周的适应后,在每只动物的尾侧腔静脉或颅侧腔静脉中植入两根永久性中心静脉导管。术后使动物恢复1周,随后用于重复的药代动力学研究,该研究在连续的GLP-1衍生物给药之间具有合适的洗脱期。在其他研究中,使动物适应1周,此后将其用于重复的药代动力学研究,该研究在连续的GLP-1衍生物给药之间具有合适的洗脱期。在每次给药时,在这些猪的一根耳静脉中装配有venflon,通过该venflon进行衍生物给药。通过颈静脉或颅侧腔静脉的静脉穿刺进行血液采样。

[0431] 这些动物或者不禁食,或者在给药前禁食约18h及给药后禁食0至4h,但在整个过程中能随意饮水。

[0432] 通常将该GLP-1衍生物溶解在50mM磷酸钠、145mM氯化钠、0.05%吐温80(pH 7.4)中达到通常为20-60nmol/ml的浓度。通过一根导管或通过venflon给予该化合物的静脉内注射(体积通常对应于2-3nmol/kg,例如0.1ml/kg),并在给药后长达13天内在预定的时间点采集血样(优选通过另一根导管或通过静脉穿刺)。将血样(例如0.8ml)收集在具有EDTA缓冲液(8mM)的管中(有时加入500KIU/ml血液的抑肽酶),随后在4℃和1942G下离心10分钟。将血浆移液到干冰上的Micronic管中,并在-20℃下保存,直至使用合适的定量试验如ELISA或LC-MS对各GLP-1衍生物的血浆浓度进行分析。

[0433] 基于这些测量,绘制研究的化合物的时间-血浆浓度曲线,并利用WinNonlin v.5.0或Phoenix v.6.2(Pharsight Inc., Mountain View, CA, USA)或其他用于PK分析的相关软件对数据进行所谓的非房室药代动力学分析。对于大多数化合物,当在半对数图中绘制时,血浆浓度曲线的末端部分将是线性的,表明在初始分布后,药物以恒定的分数速率从体内去除。该速率(λ_z 或 λ_z)等于该图末端部分的斜率的负数。由此速率,也可以按 $t_{1/2} = \ln(2) / \lambda_z$ 计算出终末半衰期(例如,参见Johan Gabrielsson和Daniel Weiner: Pharmacokinetics and Pharmacodynamic Data Analysis. Concepts & Applications, 第三版, Swedish Pharmaceutical Press, Stockholm (2000))。清除率被定义为剂量(D)除以血浆浓度-时间曲线上的曲线下面积(AUC) (Rowland, M和Tozer TN: Clinical

Pharmacokinetics: Concepts and Applications, 第三版, 1995 Williams Wilkins)。

[0434] 当如上所述在小型猪中测试本发明的化合物时, 观察到显著延长的体内半衰期。

[0435] 物理稳定性

[0436] 肽可经历多种物理状态的变化。肽在特定的一组条件下可由于缺乏溶解性而沉淀, 例如由于因pH变化引起的氨基酸侧链上的相斥电荷的中和。另一个物理变化是淀粉样原纤维的形成, 其涉及向富含 β -折叠的大分子纤维结构的构象变化。其他大分子结构可由于聚集由较少的系统结构重复来形成。在后两种情况下, 最终可观察到作为沉淀物的肽物质。事实上, 这些物理变化可在一定程度上相互关联, 例如与相对于pH的溶解度和原纤维形成相关 [Schmittschmitt和Scholtz, Protein Science, 12, 10, 2374-2378, 2003]。此外, 仅通过目测很难区分这些现象, 因此这些变化的结果往往用通用术语“沉淀物”来描述。

[0437] 物理状态的其他变化包括以溶液中肽含量的损失形式观察到的表面吸附, 以及从液体溶液到凝胶的变化。然而, 当其在药物注射剂中储存期间以及在使用时, 不管其性质或凝胶的形成如何, 观察到沉淀物是一个问题。

[0438] 如本文所使用的术语衍生物或组合物的“物理稳定性”是指由于肽和/或蛋白质(即本文的GLP-1衍生物)暴露于热机械应力和/或与去稳定的界面和表面如疏水表面和界面相互作用所导致的, 该肽和/或蛋白质形成无生物活性的和/或不可溶的该肽和/或蛋白质的聚集物的趋势。水性肽和/或蛋白质组合物的物理稳定性通过在不同温度下将填充在合适的容器(例如药筒或小瓶)中的组合物暴露于机械/物理应力(例如搅动)下不同的时间段后借助于目测和/或浊度测量来评价。组合物的目测在暗背景的锐聚焦光下进行。组合物的浊度由对浑浊度进行分级的目测评分来表征, 例如0到3的标度(未显示出浊度的组合物对应于目测评分0, 而在日光下显示出可视浊度的组合物对应于目测评分3)。当组合物在日光下显示出可视浊度时, 可因蛋白质聚集而将组合物划分为物理不稳定的。或者, 组合物的浊度可通过技术人员公知的简单的浊度测量来评估。水性肽和/或蛋白质组合物的物理稳定性也可通过使用该肽和/或蛋白质构象状态的光谱试剂或探针来评估。该探针优选为优先结合该肽和/或蛋白质的非天然构象体的小分子。肽和/或蛋白质结构的小分子光谱探针的一个实例为硫代黄素T。硫代黄素T是一种已被广泛用于检测淀粉样原纤维的荧光染料。在存在原纤维又或许是其他肽和/或蛋白质构型的情况下, 当硫代黄素T与原纤维肽和/或蛋白质形式结合时可引起约450nm处的新的激发最大值和约482nm处的增强的发射。未结合的硫代黄素T在这些波长处基本无荧光。

[0439] 其他小分子可用作肽和/或蛋白质结构从天然状态到非天然状态变化的探针。例如, 优先结合肽和/或蛋白质中暴露的疏水小片的“疏水小片”探针。疏水小片通常隐藏在天然状态下的肽和/或蛋白质的三级结构内, 但在肽和/或蛋白质开始解折叠或变性时暴露出来。这些小分子光谱探针的实例为芳香族疏水染料, 例如葱、吡啶、菲咯啉等。

[0440] 衍生物的物理稳定性可通过本文描述的试验(III), 即ThT原纤维形成试验中的回收率和/或滞后时间来确定。在一些实施方案中, 物理稳定的衍生物在本文描述的试验(III)中具有高于70%的回收率和/或多于7小时的滞后时间。

[0441] 在一些实施方案中, 该衍生物在ThT原纤维形成试验, 如本文描述的试验(III)中具有高于70%的回收率。在一些实施方案中, 该衍生物在ThT原纤维形成试验, 如本文描述的试验(III)中具有高于90%, 例如高于95%或高于98%的回收率。在一些实施方案中, 该

衍生物在ThT原纤维形成试验,如本文描述的试验(III)中具有约100%的回收率。

[0442] 在一些实施方案中,该衍生物在ThT原纤维形成试验,如本文描述的试验(III)中具有多于7小时,例如多于20小时或多于45小时的滞后时间。

[0443] 在一些实施方案中,该GLP-1衍生物在ThT原纤维形成试验中具有高于70%的回收率。在一些实施方案中,该GLP-1衍生物在ThT原纤维形成试验中具有高于90%的回收率。在一些实施方案中,该GLP-1衍生物在ThT原纤维形成试验中具有约100%的回收率。在一些实施方案中,该GLP-1衍生物在ThT原纤维形成试验中具有多于7小时的滞后时间。在一些实施方案中,该GLP-1衍生物在ThT原纤维形成试验中具有多于20小时的滞后时间。在一些实施方案中,该GLP-1衍生物在ThT原纤维形成试验中具有45小时或更久的滞后时间。在一些实施方案中,该ThT原纤维形成试验是本文描述的试验(III)。

[0444] 化学稳定性

[0445] 当与本文的衍生物或组合物结合使用时,术语“化学稳定性”和“化学稳定的”是指肽结构的化学共价变化,其导致具有可能较低的生物效力和/或可能升高的免疫原性质的化学降解产物形成。各种化学降解产物可根据天然肽的类型和性质以及该肽所暴露的环境而形成。化学降解的消除最可能无法完全避免,并且在延长的储存期间通常观察到逐渐增加的化学降解产物量。多数肽倾向于脱酰胺,在此过程中谷氨酰胺酰基或天冬酰胺酰基残基中的侧链酰胺基团水解形成游离羧酸。其他降解途径包括高分子量转化产物的形成,其中两个或更多个肽分子通过转酰胺基作用和/或二硫键相互作用彼此共价结合,导致共价结合的二聚体、寡聚体和聚合物降解产物的形成(Stability of Protein Pharmaceuticals,Ahern.T.J.&Manning M.C.,Plenum Press,New York 1992)。(例如甲硫氨酸残基的)氧化可作为化学降解的另一种变型而提及。含有天冬酰胺或天冬氨酸的肽可倾向于通过中间体天冬酰亚胺的形成而异构化,产生相应的异天冬氨酸异构体,其中D-和L-异构体均可形成。该天冬酰亚胺中间体也可导致D-天冬氨酸异构体的形成。(Formulation Consideration for Proteins Susceptible to Asparagine Deamidation and Aspartate Isomerization,Wakankar和Borchardt,Journal of Pharmaceutical Sciences,2006,Vol.95,no.11,p 2321)。最后,肽也可经历水解裂解,其中通过肽键的水解切下肽片段或单个氨基酸。

[0446] 组合物的化学稳定性可通过在暴露于不同的环境条件后在不同的时间点测量化学降解产物的量来评估(降解产物的形成通常可通过例如升高温度来加速)。每种单独的降解产物的量通常通过使用不同的色谱技术(例如SE-HPLC和/或RP-UPLC)根据分子大小和/或电荷分离降解产物来测定。

[0447] 因此,如上文所概述的,“稳定化的组合物”是指具有提升的物理稳定性、提升的化学稳定性或提升的物理和化学稳定性的组合物。一般来说,组合物在使用和储存期间(按照推荐的使用和储存条件)必须稳定,直至达到失效期。

[0448] 衍生物的化学稳定性可通过本文描述的试验(V)中对化学降解的测定来测量。在一些实施方案中,该衍生物在化学稳定性试验中具有少于14%的降解。在一些实施方案中,该GLP-1衍生物在化学稳定性试验中具有少于13%的降解。在一些实施方案中,该GLP-1衍生物在化学稳定性试验中具有少于12%的降解。在一些实施方案中,该GLP-1衍生物在化学稳定性试验中具有少于10%的降解。在一些实施方案中,该GLP-1衍生物在化学稳定性试验

中具有少于9%的降解。在一些实施方案中,该GLP-1衍生物在化学稳定性试验中具有少于7%的降解。在一些实施方案中,该GLP-1衍生物在化学稳定性试验中具有少于5%的降解。在一些实施方案中,该GLP-1衍生物在化学稳定性试验中具有少于3%的降解。在一些实施方案中,该GLP-1衍生物在化学稳定性试验中具有少于2%的降解。在一些实施方案中,该GLP-1衍生物在化学稳定性试验中具有少于1%的降解。在一些实施方案中,该化学稳定的衍生物具有少于5%,例如少于4%、少于3%或少于2%的化学降解,其中所述化学降解可通过本文描述的试验(V)来测定。

[0449] 溶解度

[0450] 本发明的GLP-1衍生物可以是可溶的,并且例如具有至少0.1mmol/l,如至少0.2mmol/l、至少0.5mmol/l或至少2mmol/l的溶解度。本发明的GLP-1衍生物可以是可溶的,并且在例如10mM磷酸盐水溶液中,具有例如至少4mmol/l,如至少8mmol/l、至少10mmol/l或至少15mmol/l的溶解度。

[0451] 本发明的GLP-1衍生物在pH 7.0-8.2,如pH 7.0-7.7或pH 7.2-7.5的pH范围内可以是可溶的,或在pH 7.4下例如在10mM磷酸盐水溶液中是可溶的。具体而言,本发明的GLP-1衍生物在pH 7.0-8.2的pH范围内可以是可溶的,并在例如10mM磷酸盐水溶液中具有至少0.1mmol/l的溶解度。

[0452] 在一些实施方案中,所述GLP-1衍生物的溶解度是在室温下,例如20-25℃。在一些实施方案中,所述GLP-1衍生物的溶解度是在低温下,例如4-10℃、4-8℃或4-5℃。

[0453] 在当前的语境中,如果没有另外说明,术语“可溶的”、“溶解度”、“可溶于水溶液中”、“水溶性”、“可溶于水的”、“水溶性的”、“水溶度”和“水溶解度”是指化合物在水中或在盐的水溶液或缓冲水溶液中,例如在10mM磷酸盐溶液或在包含其他化合物的水溶液中以及例如在室温下的溶解度。溶解度可使用以下试验进行评估。

[0454] 依赖于pH的溶解度试验

[0455] 肽和蛋白质的溶解度依赖于溶液的pH。通常,蛋白质或肽在其等电点(pI)时或接近等电点时沉淀,在等电点时其净电荷为零。在低pH下(即低于pI时),蛋白质和肽通常带正电荷,而在高于pI的pH下,它们带负电荷。

[0456] 治疗性肽如果在给定的pH下以足够的浓度可溶,则是有利的,这适合于配制稳定的药物产品,也适合于对患者施用该药物产品,例如通过皮下注射。

[0457] 如下所述确定溶解度-pH曲线:制备制剂或肽的水溶液,并通过添加HCl和NaOH将等份调节至所需范围内的pH值。将这些样品在室温下平衡2-4天。随后将样品离心分离。取出每个样品的一小份进行反相HPLC分析以测定蛋白质在溶液中的浓度。在离心分离后测量每个样品的pH,并相对于测得的pH绘出每种蛋白质的浓度。

[0458] DPP-IV稳定性

[0459] 在一些实施方案中,所述GLP-1衍生物为DPPIV保护的化合物。在一些实施方案中,所述GLP-1衍生物为DPPIV稳定化的化合物。

[0460] DPP-IV稳定性可使用以下试验进行测定:在37℃下,在添加有0.005%吐温20的HEPES缓冲液中,将10μM的肽与DPP-IV(2μg/ml)一式两份地温育。在该实验中,使用人GLP-1作为阳性对照。在3、15、30、60、120和240min时取样品的等份,并加入三倍体积的乙醇以终止反应。通过LC-MS分析样品的亲本肽。根据一级动力学将数据绘图,并将稳定性报告为半

衰期。

[0461] 组合

[0462] 在一些实施方案中,本发明涉及与一种或多种附加的治疗活性化合物如GLP-1化合物或与胰岛素化合物组合的本发明的GLP-1衍生物。在一些实施方案中,本发明的GLP-1衍生物与GLP-1化合物组合。在一些实施方案中,本发明的GLP-1衍生物与胰岛素化合物组合。

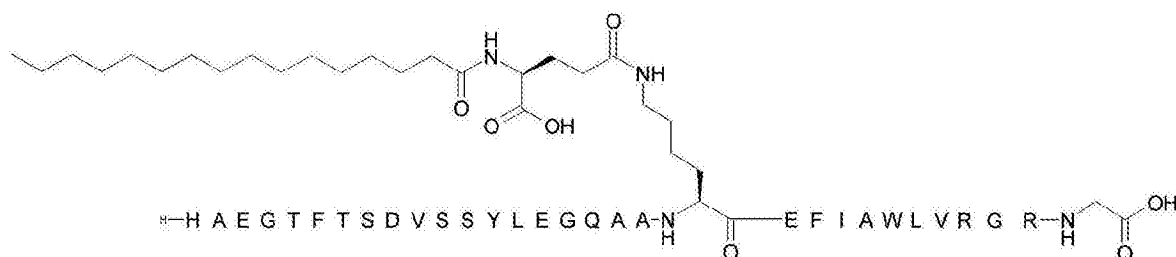
[0463] 如本文所使用的,“GLP-1化合物”是能够激活GLP-1受体而例如不激活胰高血糖素受体的化合物。

[0464] 如本文所使用的,“胰岛素化合物”是能够激活胰岛素受体的化合物。

[0465] 在一些实施方案中,该组合的GLP-1化合物选自:

[0466] N-ε26-((S)-4-羧基-4-十六酰基氨基-丁酰基) [Arg34]GLP-1-(7-37):

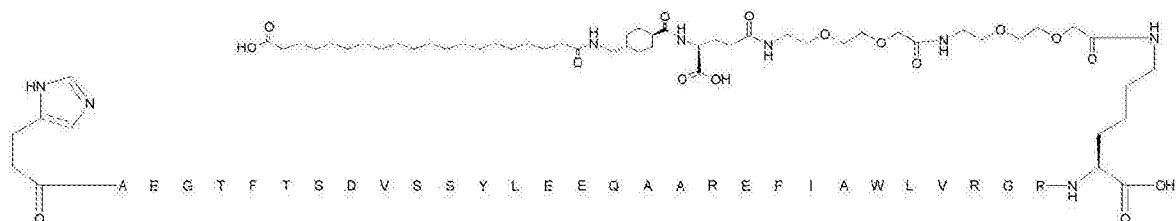
[0467]



(化合物 G1) :

[0468] N-ε37-[2-(2-[2-(2-[2-(2-[S]-4-羧基-4-({反式-4-[(19-羧基十九酰基氨基)甲基]环己烷羰基)氨基)丁酰基氨基]乙氧基}乙氧基)乙酰基氨基]乙氧基)乙氧基)乙酰基][脱氨基His7,Glu22,Arg26,Arg34,Lys37]GLP-1-(7-37)：

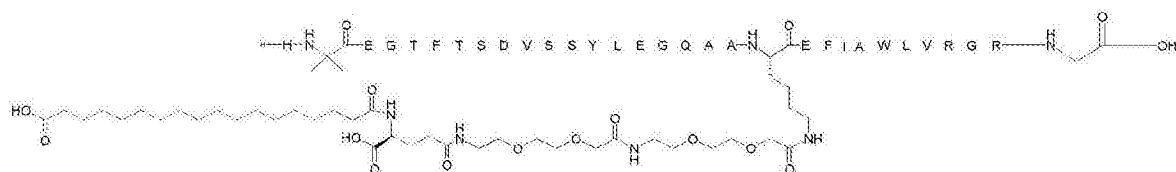
[0469]



(化合物 G2) :

[0470] N-ε26-[2-(2-{2-[2-(2-{2-[(S)-4-羧基-4-(17-羧基十七酰基氨基)丁酰基氨基]乙氧基)乙氧基)乙酰基氨基]乙氧基)乙氧基)乙酰基][Aib8,Arg34]GLP-1-(7-37):

[0471]

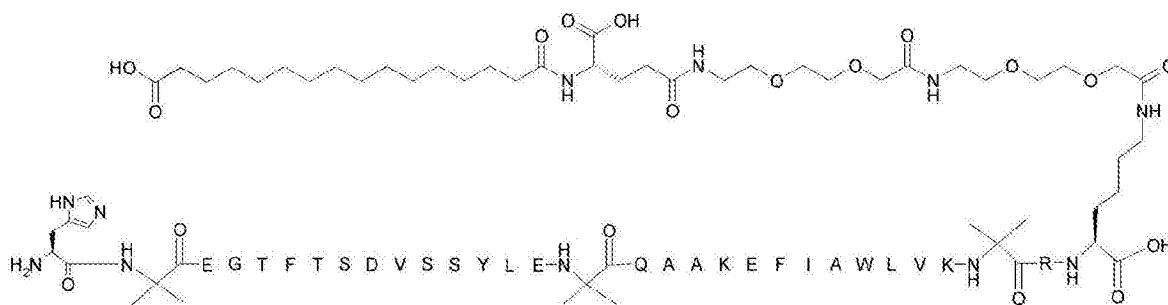


(化合物 G3) :

[0472] N-ε37-[2-(2-[2-(2-(2-{(S)-4-羧基-4-(15-羧基-十五酰基氨基)-丁酰基氨基]-乙氧基)-乙氧基)-乙酰基氨基]-乙氧基)-乙氧基)-乙酰基][Aib8,22,35,Lys37]GLP-

1-(7-37) :

[0473]

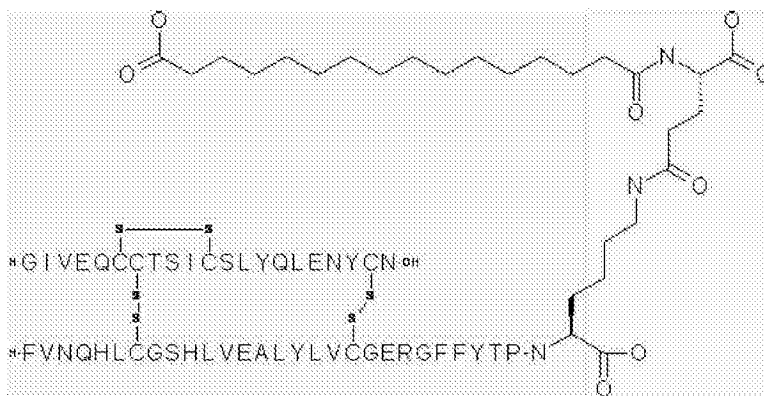


(化合物 G4) ;

[0474] 及其药学上可接受的盐、酰胺、烷基化合物或酯。

[0475] 在一些实施方案中,该组合的胰岛素化合物为:N-ε-B29-[(S)-4-羧基-4-(15-羧基十五酰基氨基) 丁酰基]desB30人胰岛素:

[0476]



(化合物 G5) 。

[0477] 药物组合物

[0478] 在一些实施方案中,本发明涉及包含本发明衍生物和一种或多种药学上可接受的赋形剂的药物组合物。在一些实施方案中,该组合物适合于肠胃外给药,例如皮下、肌肉内或静脉内给药。如本文所使用的术语“药物组合物”意指包含活性化合物或其盐以及药用赋形剂如缓冲剂、防腐剂和任选的张度调节剂和/或稳定剂的产品。因此,在本领域内药物组合物也称为药物制剂。本文中术语“药物组合物”、“组合物”和“制剂”可互换地使用。

[0479] 包含本发明衍生物的药物组合物可通过常规技术来制备,例如,如Remington's Pharmaceutical Sciences,1985或Remington:The Science and Practice of Pharmacy,第19版,1995中所述。

[0480] 在一些实施方案中,本发明涉及包含本发明衍生物的药物组合物,其中所述GLP-1衍生物以约0.01mg/mL至约25mg/mL,例如约0.05mg/mL至约5mg/mL和约0.1mg/mL至约2mg/mL的浓度存在,并且其中所述组合物具有2.0至10.0的pH。该药物组合物可包含本发明的衍生物,其中所述GLP-1衍生物以约0.01mg/mL至约50mg/mL的浓度存在,并且其中所述组合物具有2.0至10.0的pH。

[0481] 在一些实施方案中,该药物组合物包含本发明衍生物的水溶液和缓冲液,其中所述GLP-1衍生物以0.01mg/mL或以上的浓度存在,并且其中所述组合物具有约2.0至约10.0

的pH。在一些实施方案中,该药物组合物包含本发明衍生物的水溶液和缓冲液,其中所述GLP-1衍生物以0.01 mg/mL或以上的浓度存在,并且其中所述组合物具有约6.5至约8.5的pH。

[0482] 在一些实施方案中,本发明的组合物具有约2.0至约10.0的pH。在一些实施方案中,该组合物具有约6.5至约8.5的pH。在一些实施方案中,该组合物具有约7.0至约8.5,例如约7.2至约8.2的pH。

[0483] 该组合物可进一步包含缓冲体系、防腐剂、等张剂、螯合剂、稳定剂和表面活性剂。在一些实施方案中,该药物组合物是含水组合物,即包含水的组合物。这样的组合物通常是溶液或悬浮液。在本发明的一些实施方案中,该药物组合物是水溶液。术语“含水组合物”被定义为包含至少50%w/w的水的组合物。同样地,术语“水溶液”被定义为包含至少50%w/w的水的溶液。在一些实施方案中,该组合物包含非水性有机溶剂。

[0484] 在一些实施方案中,该药物组合物是冷冻干燥的组合物,在使用前例如由医生或患者向其中加入溶剂和/或稀释剂。

[0485] 在一些实施方案中,该药物组合物是不经任何预先溶解而随时可用的干燥组合物(例如冷冻干燥的或喷雾干燥的)。

[0486] 在一些实施方案中,本发明涉及包含本发明衍生物和一种或多种其他活性成分如GLP-1、胰岛素或其类似物和/或衍生物的组合物。在一些实施方案中,本发明涉及包含本发明衍生物和GLP-1或其类似物和/或衍生物的组合物。在一些实施方案中,本发明涉及包含本发明衍生物和胰岛素或其类似物和/或衍生物的组合物。包含本发明衍生物与一种或多种其他活性成分的组合物可被称为“共制剂”。在一些实施方案中,这样的共制剂是物理稳定且/或化学稳定的组合物。

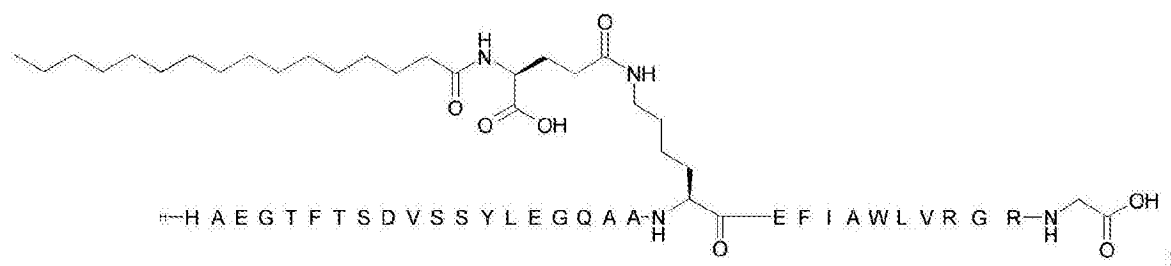
[0487] 本发明的衍生物在中性pH下可溶的事实可允许提供含胰岛素的共制剂,并导致更稳定的血糖水平和降低的低血糖发作次数,以及降低的糖尿病相关并发症的风险。

[0488] 本文所使用的术语“赋形剂”意指通常添加到药物组合物中的化学化合物,例如缓冲剂、张度剂、防腐剂等。

[0489] 在一些实施方案中,所述药物组合物进一步包含一种或多种附加的治疗活性化合物或物质。在一些实施方案中,该附加的治疗活性化合物为GLP-1化合物或胰岛素化合物。在一些实施方案中,该附加的治疗活性化合物为GLP-1化合物。在一些实施方案中,该附加的治疗活性化合物为胰岛素化合物。在一些实施方案中,该GLP-1化合物选自:N-ε26-(S)-4-羧基-4-十六酰基氨基-丁酰基) [Arg34]GLP-1-(7-37)

[0490] (化合物G1):

[0491]

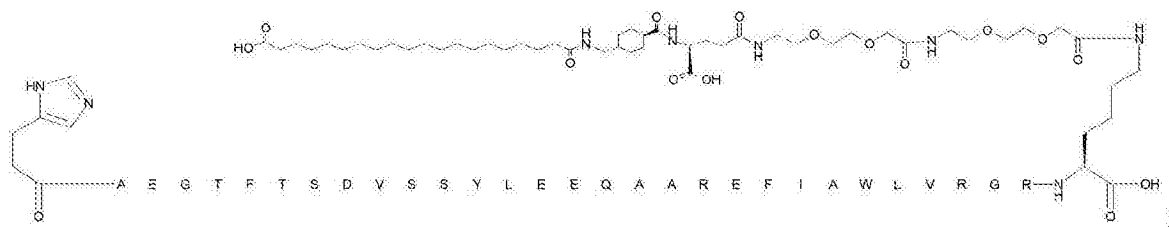


[0492] N-ε37-[2-(2-{2-[2-(2-{2-[(S)-4-羧基-4-((反式-4-[(19-羧基十九酰基氨基)

甲基]环己烷羰基]氨基)丁酰基氨基]乙氧基}乙氧基)乙酰基氨基]乙氧基}乙氧基)乙酰基
基][脱氨基His7,Glu22,Arg26,Arg34,Lys37]GLP-1-(7-37)

[0493] (化合物G2):

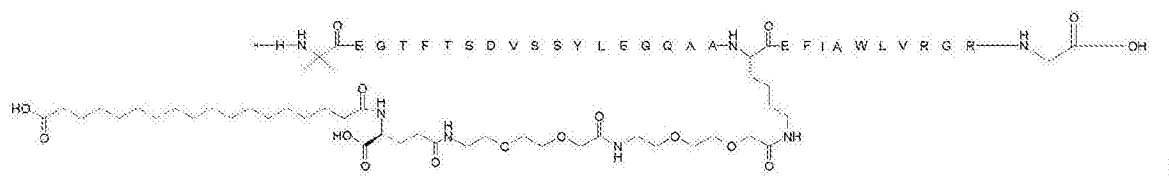
[0494]



[0495] N-ε26-[2-(2-{2-[2-(2-{2-[(S)-4-羧基-4-(17-羧基十七酰基氨基)丁酰基氨基]乙氧基}乙氧基)乙酰基氨基]乙氧基}乙氧基)乙酰基][Aib8,Arg34]GLP-1-(7-37)

[0496] (化合物G3):

[0497]

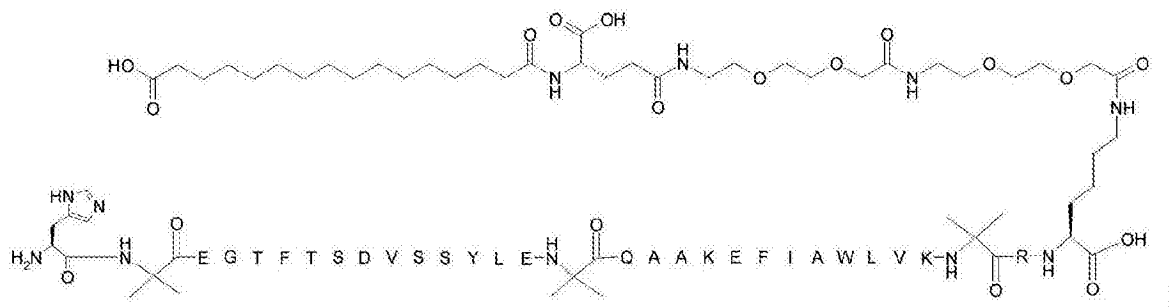


[0498] 和

[0499] N-ε37-[2-(2-{2-[2-(2-{2-[(S)-4-羧基-4-(15-羧基-十五酰基氨基)-丁酰基氨基]-乙氧基}-乙氧基)-乙酰基氨基]-乙氧基}-乙氧基)-乙酰基][Aib8,22,35,Lys37]GLP-1-(7-37)

[0500] (化合物G4):

[0501]

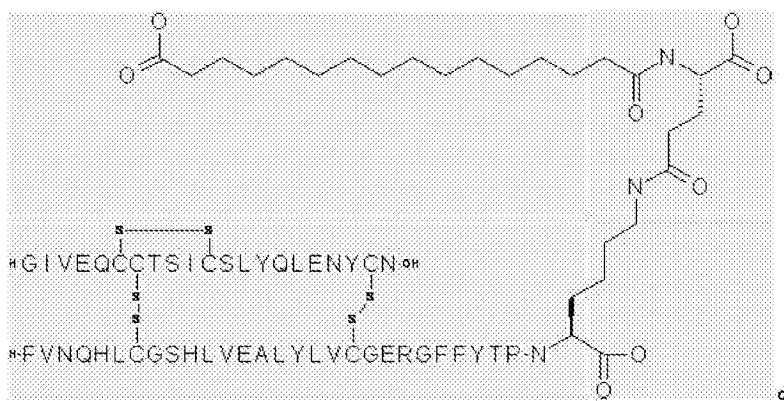


[0502] 及其药学上可接受的盐、酰胺、烷基化合物或酯。

[0503] 在一些实施方案中,所述胰岛素化合物为N-ε-B29-[(S)-4-羧基-4-(15-羧基十五酰基氨基)丁酰基]desB30人胰岛素

[0504] (化合物G5):

[0505]



[0506] 在一些实施方案中,所述药物组合物是单位剂型的形式,其包含约0.01mg至约1000mg,例如约0.1mg至约500mg、约0.5mg至约5mg,例如约0.5mg至约200mg如前述任一实施方案定义的GLP-1衍生物。

[0507] 在一些实施方案中,所述药物组合物适合于肠胃外给药。

[0508] 药物施用

[0509] 本发明的衍生物可肠胃外施用于患者。该衍生物的给药途径可以是肌肉内(IM)、皮下(SC)或静脉内(IV)。推荐由医生选择欲施用给患者的包含本发明衍生物的组组合物的剂量。

[0510] 肠胃外给药可借助于注射器,任选地借助于笔式注射器,通过皮下、肌肉内、腹膜内或静脉内注射来进行。在一些实施方案中,包含本发明衍生物的组合物可在用于施用胰高血糖素的即用型笔式装置中使用。或者,肠胃外给药可借助于输注泵来进行。在一些实施方案中,包含本发明衍生物的组合物可在用于施用胰高血糖素的泵中使用。肠胃外给药可以是经鼻给药。作为另一选择,包含本发明衍生物的胰高血糖素制剂也可适用于经皮给药,例如通过无针注射或经由贴剂,任选地经由离子电渗贴剂,或经粘膜给药,例如颊部给药。

[0511] 当在根据本发明的方法中使用,本发明的衍生物或组组合物的典型剂量在每天约0.0001至约1mg/kg体重的范围内,优选地在约0.001至约1mg/kg体重的范围内,更优选地在约0.005至约0.02mg/kg体重的范围内。如上所述,本发明的衍生物可与一种或多种附加的治疗活性化合物或物质联合给药或施用,并且合适的附加化合物或物质可选自例如抗糖尿病剂、抗高血脂剂、抗肥胖剂、抗高血压剂和用于治疗由糖尿病引起或与之相关的并发症的药剂。

[0512] 合适的抗糖尿病剂包括胰岛素、胰岛素衍生物或类似物、GLP-1(胰高血糖素样肽-1)衍生物或类似物[例如WO 98/08871(Novo Nordisk A/S)中公开的那些,或其他GLP-1类似物,如艾塞那肽(Byetta,Eli Lilly/Amylin;AVE0010,Sanofi-Aventis)、他泊鲁肽(Roche)、阿必鲁肽(Syncria,GlaxoSmithKline)、度拉糖肽(Trulicity,Eli Lilly)]、糊精、糊精类似物(例如Symlin/普兰林肽)以及口服活性降血糖剂。

[0513] 在任选地与上文所公开的一种或多种附加的治疗活性化合物或物质联合施用本发明的GLP-1衍生物的情况下,出于与治疗或预防肥胖症或超重相关的目的,即与减少或预防过度肥胖相关的目的,与旨在实现体重减轻或预防体重增长的手术干预相结合地,例如与肥胖症治疗手术干预相结合地进行这种施用可能是相关的。常用的肥胖症治疗外科技术的实例包括但不限于以下技术:垂直遮断胃成形术(也称为“胃缝折术”),其中将一部分胃

缝折以创建充当新胃的较小的前胃囊；束胃带术，例如使用可调节的束胃带系统（例如 Swedish Adjustable Gastric Band (SAGB)、LAP-BAND™或MIDband™），其中使用可由患者调节大小的弹性体（例如硅酮）带来创建充当新胃的小前胃囊；以及胃旁路术，例如“Roux-en-Y”旁路术，其中使用订合器（stapler）装置创建小胃囊，并将其连接至远端小肠，小肠的上部以Y形构型重新连接。

[0514] 本发明的GLP-1衍生物的施用（任选地与上文公开的一种或多种附加的治疗活性化合物联合）可在进行所述的肥胖症治疗手术干预前进行一段时期和/或在其后进行一段时间。在很多情况下，在已经进行肥胖症治疗手术干预后开始施用本发明的化合物可能是优选的。

[0515] 本发明的GLP-1衍生物和本文定义的抗肥胖剂或抗糖尿病剂可同时或依次施用。各药剂可以单一剂型提供，其中该单一剂型包含两种化合物，或者以套装药盒（kit-of-parts）形式提供，该套装药盒包含本发明GLP-1衍生物的制剂作为第一单位剂型以及抗肥胖剂或抗糖尿病剂的制剂作为第二单位剂型。本说明书全文凡提到第一或第二或第三等单位剂型时，均不表示优选的给药顺序，而仅仅是出于方便的目的。

[0516] 本发明GLP-1衍生物的制剂和抗肥胖剂或抗糖尿病剂的制剂的“同时”给药意味着以单一剂型施用化合物或以不超过15分钟、优选不超过10分钟、更优选不超过5分钟、更优选不超过2分钟的时间间隔先施用第一药剂随后再施用第二药剂。任一种药剂均可先施用。

[0517] “依次”给药意味着以大于15分钟的时间间隔先施用第一药剂随后再施用第二药剂。两种单位剂型中的任一种均可先施用。优选地，两种产品通过同一个静脉通路进行注射。

[0518] 正如已表明的，在上文公开的所有治疗方法或适应症中，本发明的GLP-1衍生物均可单独施用。然而，也可以与一种或多种附加的治疗活性化合物联合依次或同时施用。

[0519] 在根据本发明的方法中使用本发明的化合物，例如GLP-1衍生物的典型剂量在每天约0.0001至约100mg/kg体重的范围内，优选约0.001至约10mg/kg体重，更优选每天约0.001至约5mg/kg体重，例如每天约0.001至约10mg/kg体重或每天约0.001至约5mg/kg体重，以一个或多个剂量施用，例如1至3剂。准确的剂量将取决于给药的频率和方式，所治疗的患者的性别、年龄、体重和总体状况，所治疗的病况的性质和严重程度，待治疗的任何伴发病，以及本领域技术人员显而易见的其他因素。

[0520] 本发明的化合物包含被认为适合以比例如每天一次更长的时间间隔来施用的化合物，因此，适当配制的本发明化合物可适合于通过合适的给药途径，例如本文公开的途径之一，例如每周两次或每周一次给药。

[0521] 如上所述，本发明的化合物可与一种或多种附加的治疗活性化合物或物质联合给药或施用，并且合适的附加化合物或物质可选自例如抗糖尿病剂、抗高血脂剂、抗肥胖剂、抗高血压剂和用于治疗由糖尿病引起或与之相关的并发症的药剂。

[0522] 药物适应症

[0523] 在一些实施方案中，本发明涉及用于医疗的如本文定义的GLP-1衍生物，任选地与一种或多种附加的治疗活性化合物组合。

[0524] 如本文所使用的，术语化合物例如GLP-1衍生物的“治疗有效量”是指足以治愈、减轻或部分抑制给定疾病和/或其并发症的临床表现的量。足以实现此效果的量被定义为“治

疗有效量”。出于每种目的的有效量将取决于疾病或损伤的严重程度,以及受试者的体重和总体状况。应当理解,适当剂量的确定可利用常规实验,通过构建数值矩阵并测试该矩阵中的不同点来完成,所有这些都在受过训练的医生或兽医的普通技术水平之内。

[0525] 如本文所使用的术语“治疗”、“处理”及其他变化形式是指出于对抗病况如疾病或病症的目的对患者的处置和照护。这些术语旨在包括针对患者所患有的给定病况的全范围的处理,例如施用所述的活性化合物以减轻其症状或并发症,延迟疾病、病症或病况的进展,治愈或消除疾病、病症或病况,和/或预防病况,其中预防应理解为出于对抗疾病、病况或病症的目的对患者的处置和照护,并且包括施用所述的活性化合物以预防症状或并发症的发作。待治疗的患者优选为哺乳动物,特别是人类,但其他动物如犬、猫、牛、马、绵羊、山羊或猪的治疗也在本发明的范围内。

[0526] 术语“糖尿病”包括1型糖尿病、2型糖尿病、妊娠糖尿病(妊娠期间)和其他导致高血糖症的状况。该术语用于代谢失调,此时胰腺产生不足量的胰岛素或机体的细胞不能适当地响应胰岛素从而阻止细胞吸收葡萄糖。结果是葡萄糖在血液中积累。

[0527] 1型糖尿病,也称为胰岛素依赖型糖尿病(IDDM)和青少年糖尿病,是由 β -细胞破坏引起的,通常导致胰岛素绝对缺乏。

[0528] 2型糖尿病,也称为非胰岛素依赖型糖尿病(NIDDM)和成年型糖尿病,伴有主要的胰岛素抵抗从而胰岛素相对缺乏,和/或胰岛素分泌缺陷为主伴有胰岛素抵抗。

[0529] 如本文所使用的术语“血糖正常(euglycaemia)”意指血液中的葡萄糖浓度正常。也称为正常血糖(normoglycaemia)。

[0530] 术语“肥胖”意味着过量的脂肪组织。当能量摄入超过能量消耗时,过量的卡路里储存在脂肪组织中,并且如果此净正平衡延续,则导致肥胖,即体重平衡有两个组成要素,并且任一侧(摄入或消耗)的异常均可导致肥胖。在此语境中,肥胖最佳地被视作带来健康风险的任何程度的过量脂肪组织。正常个体和肥胖个体之间的区别仅可近似估计,但由肥胖带来的健康风险可能是随着脂肪组织增加的连续过程。然而,在本发明的语境中,体重指数(BMI=以千克为单位的体重除以以米为单位的身高的平方)大于25的个体将被视为肥胖的。

[0531] 在一些实施方案中,本发明涉及用于治疗肥胖症或预防超重的如本文定义的GLP-1衍生物。在一些实施方案中,本发明涉及用于减少食物摄入的如本文定义的GLP-1衍生物。在一些实施方案中,本发明涉及用于增加能量消耗的如本文定义的GLP-1衍生物。在一些实施方案中,本发明涉及用于减轻体重的如本文定义的GLP-1衍生物。在一些实施方案中,本发明涉及用于调节食欲的如本文定义的GLP-1衍生物。在一些实施方案中,本发明涉及用于诱发饱腹感的如本文定义的GLP-1衍生物。在一些实施方案中,本发明涉及用于预防成功减重后的体重反弹的如本文定义的GLP-1衍生物。在一些实施方案中,本发明涉及用于治疗与超重或肥胖相关的疾病或状况的如本文定义的GLP-1衍生物。在一些实施方案中,本发明涉及用于治疗贪食症(bulimia)的如本文定义的GLP-1衍生物。在一些实施方案中,本发明涉及用于治疗暴食症(binge-eating)的如本文定义的GLP-1衍生物。

[0532] 在一些实施方案中,本发明涉及用于治疗动脉粥样硬化的如本文定义的GLP-1衍生物。在一些实施方案中,本发明涉及用于治疗高血压的如本文定义的GLP-1衍生物。在一些实施方案中,本发明涉及用于治疗血脂异常的如本文定义的GLP-1衍生物。在一些实施方

案中,本发明涉及用于治疗冠心病的如本文定义的GLP-1衍生物。在一些实施方案中,本发明涉及用于治疗肝脂肪变性(hepatic steatosis)的如本文定义的GLP-1衍生物。

[0533] 在一些实施方案中,本发明涉及用于治疗2型糖尿病的如本文定义的GLP-1衍生物。在一些实施方案中,本发明涉及用于治疗葡萄糖耐量减低的如本文定义的GLP-1衍生物。在一些实施方案中,本发明涉及用于延迟或预防2型糖尿病疾病进展的如本文定义的GLP-1衍生物。在一些实施方案中,本发明涉及用于延迟从葡萄糖耐量减低(IGT)到2型糖尿病的进展的如本文定义的GLP-1衍生物。在一些实施方案中,本发明涉及用于延迟从2型糖尿病到需胰岛素型糖尿病的进展的如本文定义的GLP-1衍生物。

[0534] 在一些实施方案中,本发明涉及一种治疗肥胖症、预防超重、减少食物摄入、增加能量消耗、减轻体重、调节食欲、诱发饱腹感、预防成功减重后的体重反弹、治疗与超重或肥胖相关的疾病或状况、治疗贪食症或治疗暴食症的方法,其包括向有需要的患者施用有效量的如本文定义的GLP-1衍生物,任选地与一种或多种附加的治疗活性化合物组合。

[0535] 在一些实施方案中,本发明涉及一种治疗动脉粥样硬化、高血压、血脂异常、冠心病或肝脂质沉着症的方法,其包括向有需要的患者施用有效量的如本文定义的GLP-1衍生物,任选地与一种或多种附加的治疗活性化合物组合。

[0536] 在一些实施方案中,本发明涉及一种治疗2型糖尿病、治疗葡萄糖耐量减低、延迟从葡萄糖耐量减低(IGT)到2型糖尿病的进展、延迟从2型糖尿病到需胰岛素型糖尿病的进展的方法,其包括向有需要的患者施用有效量的如本文定义的GLP-1衍生物,任选地与一种或多种附加的治疗活性化合物组合。

[0537] 在一些实施方案中,本发明涉及如本文定义的GLP-1衍生物在制备药物中的用途。在一些实施方案中,本发明涉及如前述任一实施方案定义的GLP-1衍生物在制备用于治疗或预防肥胖症、高血糖症、2型糖尿病、葡萄糖耐量减低和1型糖尿病的药物中的用途。

[0538] 本发明的实施方案

[0539] 可以通过以下非限制性实施方案进一步描述本发明:

[0540] 1. 一种GLP-1衍生物,或其药学上可接受的盐和/或酯,该GLP-1衍生物包含由式I氨基酸序列组成的多肽:

[0541] Imp-X8-His-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-X16-Ser-X18-Tyr-Leu-Glu-X22-X23-Ala-Ala-X26-X27-Phe-Ile-Ala-Trp-Leu-X33-X34-X35-X36-X37[I],

[0542] 其中

[0543] X8为Ala、Aib、Acb或Gly;

[0544] X16为Val、Leu、Ile或Tyr(或者,X16为Val、Leu或Tyr);

[0545] X18为Lys或Arg;

[0546] X22为Gly、Ala、Glu、Lys、Arg、Ser或Aib(或者,X22为Gly、Ala、Glu、Lys、Arg或Ser);

[0547] X23为Gln、Arg或Lys;

[0548] X26为Lys或Arg(或者,X26为Arg);

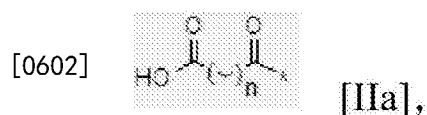
[0549] X27为Glu或Lys;

[0550] X33为Val、Leu或Ile(或者,X33为Leu或Ile);

[0551] X34为Lys或Arg;

- [0552] X35为Gly、Thr、Lys或不存在；
- [0553] X36为Ala、Gly、Lys、Ser或不存在(或者,X36为Arg)；
- [0554] X37为Gly或不存在；
- [0555] 其中所述GLP-1衍生物进一步包含含有亲脂性部分和至少两个带负电荷的部分的取代基,其中所述带负电荷的部分中的一个在亲脂性部分的远端；
- [0556] 其中所述多肽任选地包含C末端酰胺。
- [0557] 2.根据实施方案1所述的GLP-1衍生物,其中所述取代基通过所述多肽中选自位置22、23、27、34、35和36中的一个氨基酸位置处的氨基酸残基共价连接。
- [0558] 3.根据实施方案1所述的GLP-1衍生物,其中所述取代基连接在所述多肽中选自位置22、23、27、34、35和36中的一个氨基酸位置处的赖氨酸残基的 ϵ 位置处。
- [0559] 4.根据前述任一实施方案所述的GLP-1衍生物,其中所述多肽包含C末端酸基团,如羧酸基团。
- [0560] 5.根据前述任一实施方案所述的GLP-1衍生物,其中所述多肽包含C末端酰胺。
- [0561] 6.根据前述任一实施方案所述的GLP-1衍生物,其中与人GLP-1 (SEQ ID NO:1)相比,所述多肽具有3-15个氨基酸残基修饰,如置换、添加或缺失。
- [0562] 7.根据前述任一实施方案所述的GLP-1衍生物,其中与人GLP-1 (SEQ ID NO:1)相比,所述多肽具有最多14个,如最多13个或最多12个氨基酸残基修饰,如置换、添加或缺失。
- [0563] 8.根据前述任一实施方案所述的GLP-1衍生物,其中与人GLP-1 (SEQ ID NO:1)相比,所述多肽具有最多11个,如最多10个或最多9个氨基酸残基修饰,如置换、添加或缺失。
- [0564] 9.根据前述任一实施方案所述的GLP-1衍生物,其中与人GLP-1 (SEQ ID NO:1)相比,所述多肽具有最多8个,如最多7个或最多6个氨基酸残基修饰,如置换、添加或缺失。
- [0565] 10.根据前述任一实施方案所述的GLP-1衍生物,其中与人GLP-1 (SEQ ID NO:1)相比,所述GLP-1衍生物包含在所述多肽中的最多5个氨基酸残基修饰,如置换、添加或缺失。
- [0566] 11.根据前述任一实施方案所述的GLP-1衍生物,其中
- [0567] X8为Ala、Aib、Acb；
- [0568] X22为Ala或Glu；
- [0569] X35为Gly或Thr；并且/或者
- [0570] X36为Gly或不存在。
- [0571] 12.根据前述任一实施方案所述的GLP-1衍生物,其中X8为Ala、Aib、Acb或Gly。
- [0572] 13.根据前述任一实施方案所述的GLP-1衍生物,其中X8为Ala、Aib或Acb。
- [0573] 14.根据前述任一实施方案所述的GLP-1衍生物,其中X16为Val、Leu、Ile或Tyr。
- [0574] 15.根据前述任一实施方案所述的GLP-1衍生物,其中X18为Lys或Arg。
- [0575] 16.根据前述任一实施方案所述的GLP-1衍生物,其中X22为Gly、Ala、Glu、Lys、Arg、Ser或Aib。
- [0576] 17.根据前述任一实施方案所述的GLP-1衍生物,其中X22为Gly、Ala或Glu。
- [0577] 18.根据前述任一实施方案所述的GLP-1衍生物,其中X22为Lys、Arg、Ser或Aib。
- [0578] 19.根据前述任一实施方案所述的GLP-1衍生物,其中X22为Ala或Glu。
- [0579] 20.根据前述任一实施方案所述的GLP-1衍生物,其中X23为Gln、Arg或Lys。
- [0580] 21.根据前述任一实施方案所述的GLP-1衍生物,其中X26为Lys或Arg。

- [0581] 22. 根据前述任一实施方案所述的GLP-1衍生物,其中X27为Glu或Lys。
- [0582] 23. 根据前述任一实施方案所述的GLP-1衍生物,其中X33为Val、Leu或Ile。
- [0583] 24. 根据前述任一实施方案所述的GLP-1衍生物,其中X34为Lys或Arg。
- [0584] 25. 根据前述任一实施方案所述的GLP-1衍生物,其中X35为Gly、Thr、Lys或不存在。
- [0585] 26. 根据前述任一实施方案所述的GLP-1衍生物,其中X35为Gly或Thr。
- [0586] 27. 根据前述任一实施方案所述的GLP-1衍生物,其中X36为Ala、Gly、Lys、Ser或不存在。
- [0587] 28. 根据前述任一实施方案所述的GLP-1衍生物,其中X36为Ala、Gly或Lys。
- [0588] 29. 根据前述任一实施方案所述的GLP-1衍生物,其中X36为Gly或不存在。
- [0589] 30. 根据前述任一实施方案所述的GLP-1衍生物,其中如果X35不存在,则X36和X37也不存在。
- [0590] 31. 根据前述任一实施方案所述的GLP-1衍生物,其中如果X36不存在,则X37也不存在。
- [0591] 32. 根据前述任一实施方案所述的GLP-1衍生物,其中如果X35不存在,则X36和X37也不存在,并且所述GLP-1衍生物包含C末端羧酸基团。
- [0592] 33. 根据前述任一实施方案所述的GLP-1衍生物,其中如果X36不存在,则X37也不存在。
- [0593] 34. 根据前述任一实施方案所述的GLP-1衍生物,其中如果X36不存在,则X37也不存在,并且所述GLP-1衍生物包含C末端羧酰胺。
- [0594] 35. 根据前述任一实施方案所述的GLP-1衍生物,其中所述取代基包含至少三个带负电荷的部分。
- [0595] 36. 根据前述任一实施方案所述的GLP-1衍生物,其中所述亲脂性部分包含至少12个碳原子,如12-20个碳原子或14-18个碳原子,或如16个碳原子的烷基。
- [0596] 37. 根据前述任一实施方案所述的GLP-1衍生物,其中所述取代基共价连接至氨基酸的侧链,如赖氨酸侧链的氮原子。
- [0597] 38. 根据前述任一实施方案所述的GLP-1衍生物,其中所述取代基连接至所述多肽中选自位置22、23、27、34、35和36的位置处的氨基酸残基。
- [0598] 39. 根据前述任一实施方案所述的GLP-1衍生物,其中所述取代基连接在所述多肽中选自位置34和35的氨基酸位置处的赖氨酸残基的ε位置处。
- [0599] 40. 根据前述任一实施方案所述的GLP-1衍生物,其中所述取代基包含式II:
- [0600] $Z_1-Z_2-Z_3-Z_4-Z_5-Z_6-Z_7-Z_8-Z_9-Z_{10}-[II],$
- [0601] 其中Z₁包含式IIa:



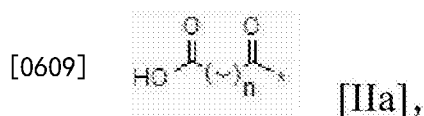
- [0603] 其中在式IIa中,n为6-20,并且符号*表示与相邻基团的氮的连接点;
- [0604] 其中Z₂、Z₃、Z₄、Z₅、Z₆、Z₇、Z₈、Z₉和Z₁₀单独地不存在,或者为选自Glu、γ Glu、Gly、Ser、Ala、Thr、Ado的氨基酸;并且

[0605] 其中 $Z_1-Z_2-Z_3-Z_4-Z_5-Z_6-Z_7-Z_8-Z_9-Z_{10}$ 总共包含至少两个带负电荷的部分。

[0606] 41. 根据前述任一实施方案所述的GLP-1衍生物, 其中所述取代基包含式II:

[0607] $Z_1-Z_2-Z_3-Z_4-Z_5-Z_6-Z_7-Z_8-Z_9-Z_{10}-[II]$,

[0608] 其中 Z_1 包含式IIa:



[0610] 其中在式IIa中, n 为6-20, 并且符号*表示与相邻基团的氮的连接点;

[0611] 其中 $Z_2, Z_3, Z_4, Z_5, Z_6, Z_7, Z_8, Z_9$ 和 Z_{10} 单独地不存在, 或者为选自Glu、 γ Glu、Gly、Ser、Ala、Thr、Ado的氨基酸; 并且

[0612] 其中所述取代基连接在所述多肽的赖氨酸残基的 ϵ 位置处; 并且

[0613] 其中 $Z_1-Z_2-Z_3-Z_4-Z_5-Z_6-Z_7-Z_8-Z_9-Z_{10}$ 总共包含至少两个带负电荷的部分。

[0614] 42. 根据前述任一实施方案所述的GLP-1衍生物, 其中所述取代基包含三个、四个或五个带负电荷的部分。

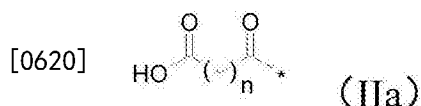
[0615] 43. 根据前述任一实施方案所述的GLP-1衍生物, 其中所述取代基包含三个或四个带负电荷的部分。

[0616] 44. 根据前述任一实施方案所述的GLP-1衍生物, 其中所述取代基包含三个带负电荷的部分。

[0617] 45. 根据前述任一实施方案所述的GLP-1衍生物, 其中所述取代基与白蛋白非共价结合。

[0618] 46. 根据前述任一实施方案所述的GLP-1衍生物, 其中所述取代基在生理pH下带负电荷。

[0619] 47. 根据前述任一实施方案所述的GLP-1衍生物, 其中 Z_1 由式IIa组成;



[0621] 其中 n 为在12至18范围内的整数。

[0622] 48. 根据前述任一实施方案所述的GLP-1衍生物, 其中式IIa中的 n 为12、14、16或18。

[0623] 49. 根据前述任一实施方案所述的GLP-1衍生物, 其中式IIa中的 n 为16 (即 Z_1 为17-羧基十七酰基)。

[0624] 50. 根据前述任一实施方案所述的GLP-1衍生物, 其中在式II中, $Z_2-Z_3-Z_4-Z_5-Z_6-Z_7-Z_8-Z_9-Z_{10}$ 为连接体, 其中 $Z_2, Z_3, Z_4, Z_5, Z_6, Z_7, Z_8, Z_9$ 或 Z_{10} 中的每一个单独地为以下氨基酸残基中的任一个: Glu、 γ Glu、Gly、Ser、Ala、Thr和/或Ado; 或者残基 $Z_2, Z_3, Z_4, Z_5, Z_6, Z_7, Z_8, Z_9$ 或 Z_{10} 中的一个或多个不存在; 然而, 条件是残基 $Z_2, Z_3, Z_4, Z_5, Z_6, Z_7, Z_8, Z_9$ 或 Z_{10} 中的至少两个存在; 并且其中 $Z_1-Z_2-Z_3-Z_4-Z_5-Z_6-Z_7-Z_8-Z_9-Z_{10}$ 总共包含至少三个带负电荷的部分。

[0625] 51. 根据前述任一实施方案所述的GLP-1衍生物, 其中 $Z_2, Z_3, Z_4, Z_5, Z_6, Z_7, Z_8, Z_9$ 和 Z_{10} 单独地为以下氨基酸残基中的任一个: Glu、 γ Glu、Gly、Ser和/或Ado; 或者残基 Z^2 至 Z^{10} 中的一个或多个不存在; 然而, 条件是残基 Z^2 至 Z^{10} 中的至少两个存在。

[0626] 52. 根据前述任一实施方案所述的GLP-1衍生物, 其中 $Z_2, Z_3, Z_4, Z_5, Z_6, Z_7, Z_8, Z_9$ 和

Z₁₀单独地为以下氨基酸残基中的任一个：γ Glu和/或Ado；或者残基Z₂、Z₃、Z₄、Z₅、Z₆、Z₇、Z₈、Z₉或Z₁₀中的一个或多个不存在；然而，条件是Z₂、Z₃、Z₄、Z₅、Z₆、Z₇、Z₈、Z₉或Z₁₀中的至少两个存在。

[0627] 53. 根据前述任一实施方案所述的GLP-1衍生物，其中残基Z₂、Z₃、Z₄、Z₅、Z₆、Z₇、Z₈、Z₉或Z₁₀中的至少三个存在。

[0628] 54. 根据前述任一实施方案所述的GLP-1衍生物，其中残基Z₂、Z₃、Z₄、Z₅、Z₆、Z₇、Z₈、Z₉或Z₁₀中的至少四个存在。

[0629] 55. 根据前述任一实施方案所述的GLP-1衍生物，其中残基Z₂、Z₃、Z₄、Z₅、Z₆、Z₇、Z₈、Z₉或Z₁₀中的至少五个存在。

[0630] 56. 根据前述任一实施方案所述的GLP-1衍生物，其中残基Z₂、Z₃、Z₄、Z₅、Z₆、Z₇、Z₈、Z₉或Z₁₀中的至少六个存在。

[0631] 57. 根据前述任一实施方案所述的GLP-1衍生物，其中在式II中，Z₂-Z₃-Z₄-Z₅-Z₆-Z₇-Z₈-Z₉-Z₁₀-为包含选自下组的结构的连接体：

[0632] γ Glu-γ Glu-Ado-Ado-；

[0633] γ Glu-γ Glu-Ado-Ado-γ Glu-；

[0634] γ Glu-γ Glu-Ado-γ Glu-γ Glu-；

[0635] γ Glu-γ Glu-Ado-γ Glu-Ado-γ Glu-Ado-γ Glu-；

[0636] γ Glu-γ Glu-Ser-Gly-；

[0637] γ Glu-γ Glu-Ser-Gly-Glu-Ser-Gly-；

[0638] γ Glu-γ Glu-γ Glu-Ado-Ado-；

[0639] γ Glu-γ Glu-γ Glu-γ Glu-；

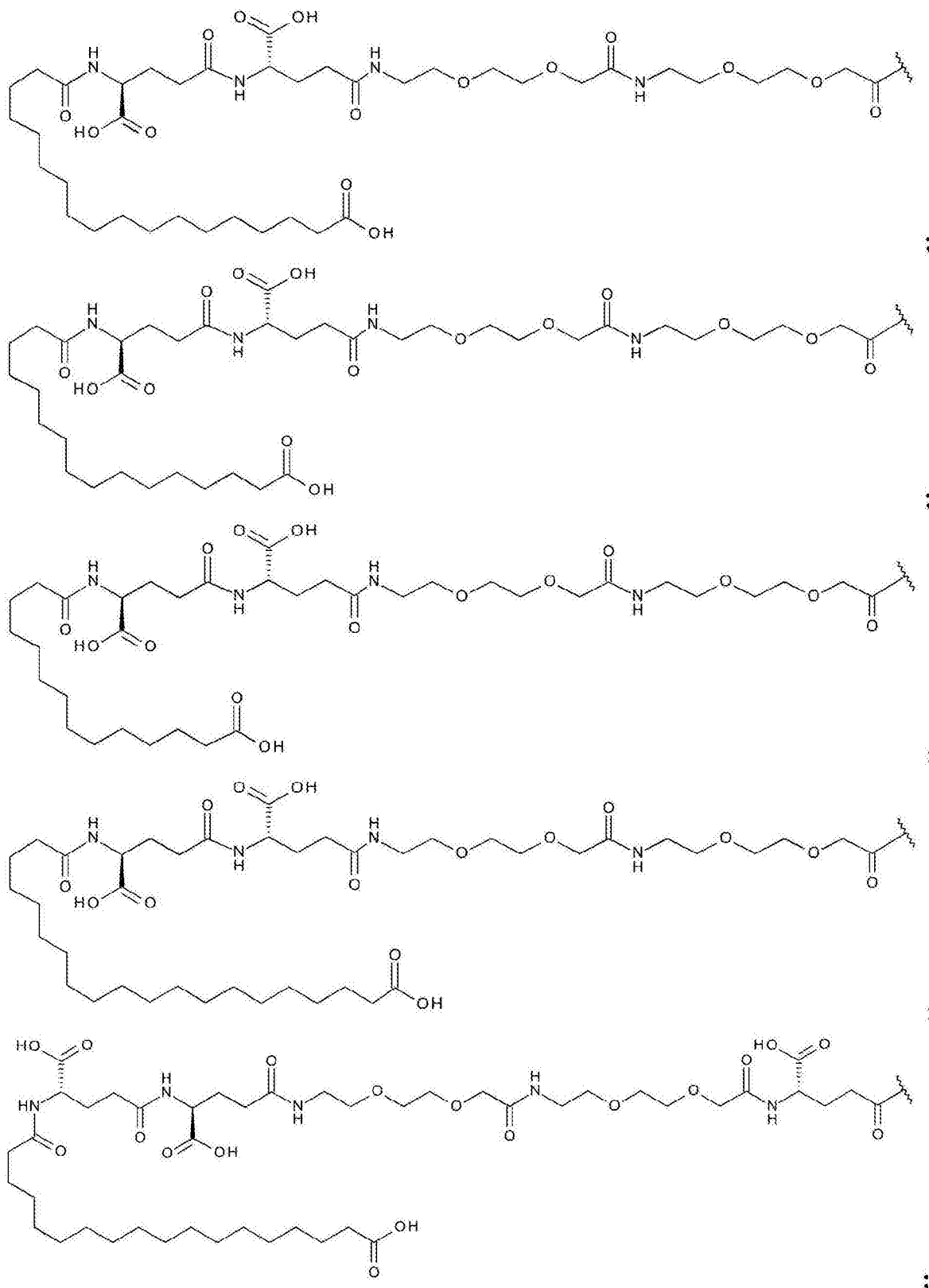
[0640] γ Glu-Ado-Ado-；

[0641] γ Glu-Ado-Ado-γ Glu-γ Glu-；

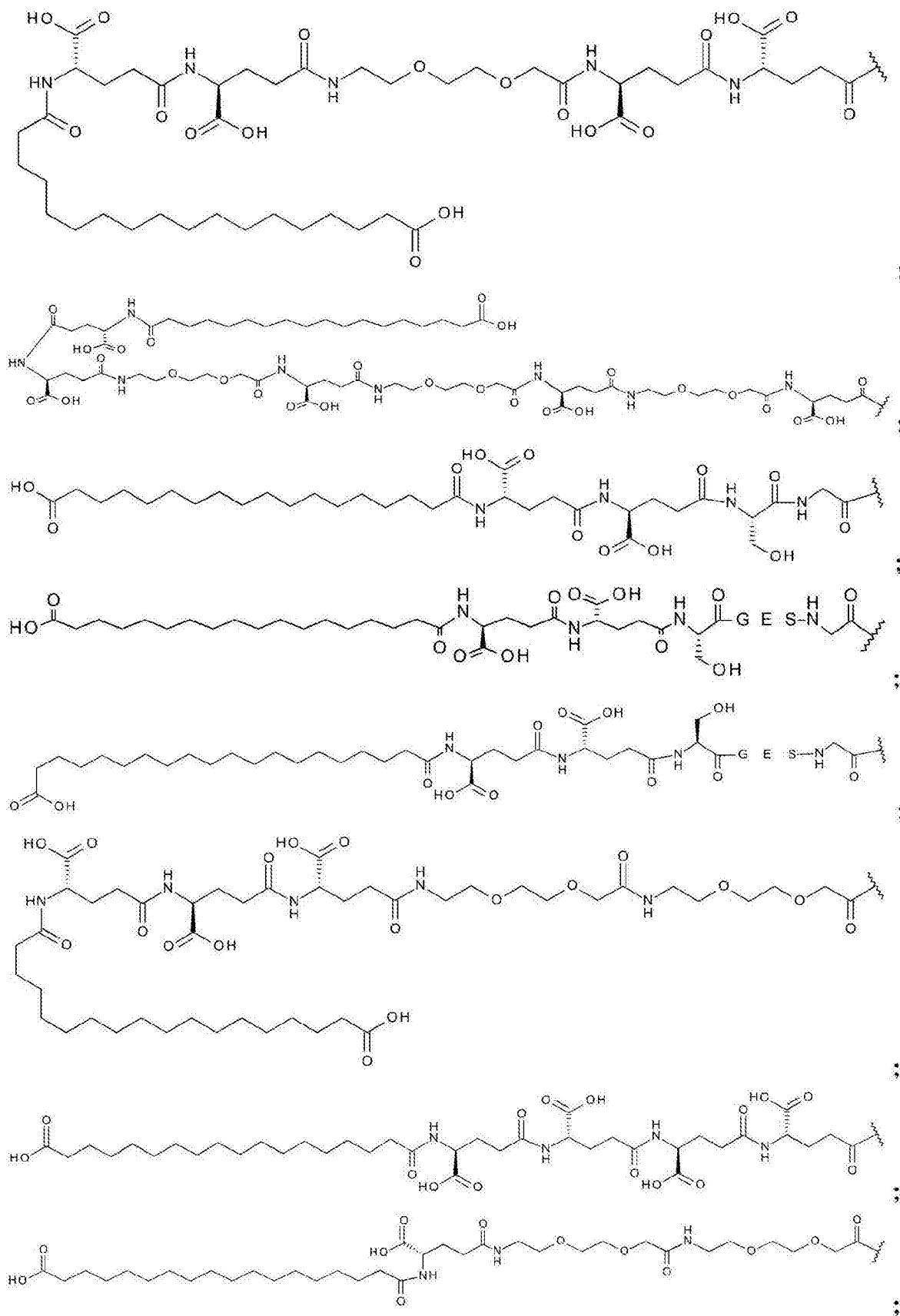
[0642] Gly-Ser-Glu-Gly-Ser-γ Glu-γ Glu-。

[0643] 58. 根据前述任一实施方案所述的GLP-1衍生物，其中所述取代基选自：

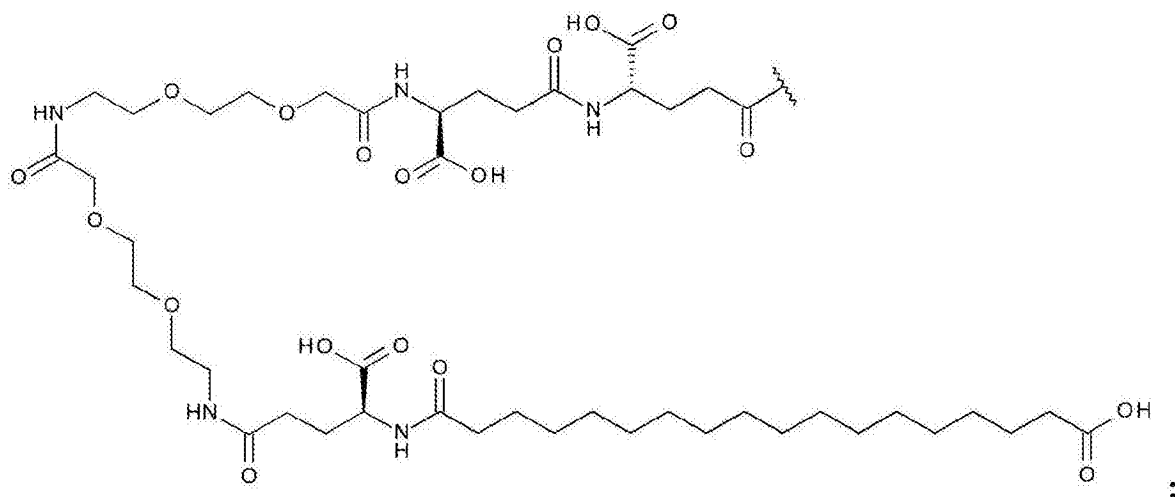
[0644]



[0645]

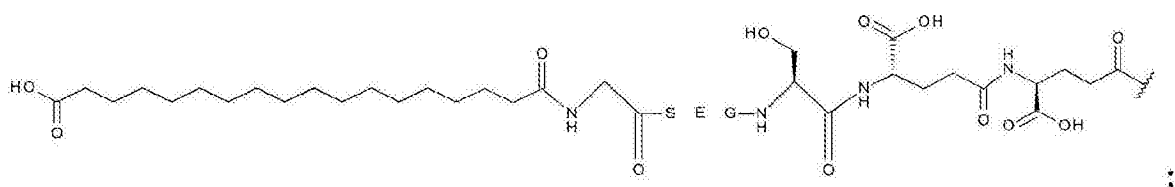


[0646]



[0647] 以及

[0648]

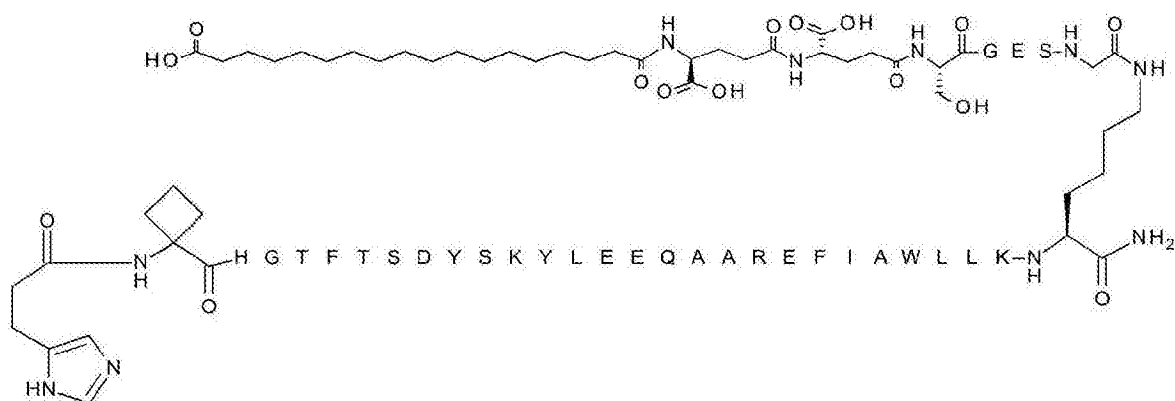


[0649] 并且其中所述取代基可通过所述取代基的结构式中用波形线标记的羰基与所述多肽共价连接。

[0650] 59. 根据前述任一实施方案所述的GLP-1衍生物, 其中所述GLP-1衍生物选自:

[0651] $N^{\epsilon 35}$ -[2-[[(2S)-2-[[(2S)-4-羧基-2-[[2-[[(2S)-2-[[(4S)-4-羧基-4-[[(4S)-4-羧基-4-(17-羧基十七酰基氨基) 丁酰基] 氨基] 丁酰基] 氨基]-3-羟基丙酰基] 氨基] 乙酰基] 氨基] 丁酰基] 氨基]-3-羟基丙酰基] 氨基] 乙酰基]-[Imp7, Acb8, His9, Tyr16, Lys18, Glu22, Arg26, Leu33, Lys35]-GLP-1-(7-35)-肽酰胺

[0652]

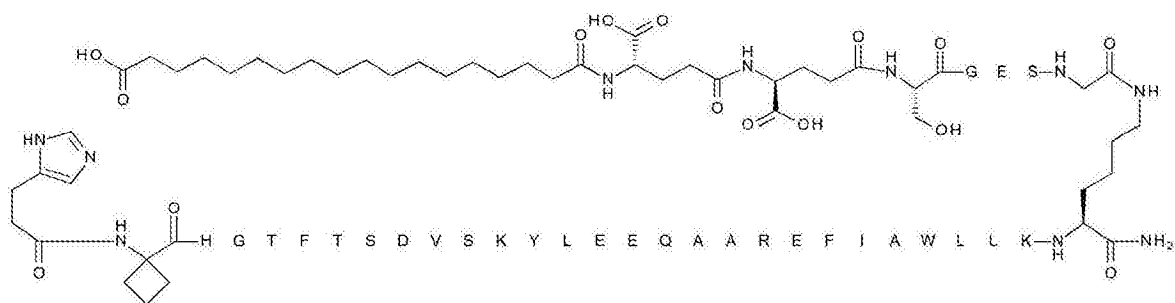


(化学式 1) ;

[0653] $N^{\epsilon 35}$ -[2-[[(2S)-2-[[(2S)-4-羧基-2-[[2-[[(2S)-2-[[(4S)-4-羧基-4-[[(4S)-4-羧基-4-(17-羧基十七酰基氨基) 丁酰基] 氨基] 丁酰基] 氨基]-3-羟基丙酰基] 氨基] 乙酰基] 氨基] 丁酰基] 氨基]-3-羟基丙酰基] 氨基] 乙酰基]-[Imp7, Acb8, His9, Lys18, Glu22,

Arg26,Leu33,Lys35]-GLP-1-(7-35)-肽酰胺

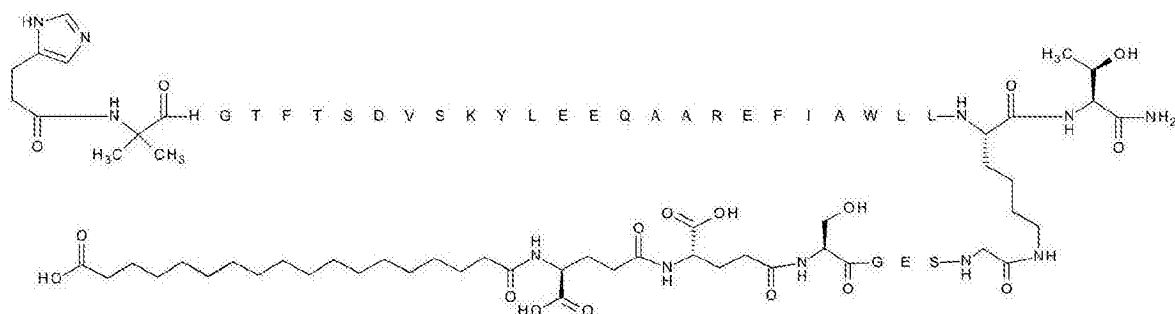
[0654]



(化学式 2) ;

[0655] N^{c34} -[2-[[(2S)-2-[[(2S)-4-羧基-2-[[2-[[(2S)-2-[[(4S)-4-羧基-4-[[(4S)-4-羧基-4-(17-羧基十七酰基氨基) 丁酰基] 氨基] 丁酰基] 氨基]-3-羟基丙酰基] 氨基] 乙酰基] 氨基] 丁酰基] 氨基]-3-羟基丙酰基] 氨基] 乙酰基]-[Imp7,Aib8,His9,Lys18,Glu22,Arg26,Leu33,Thr35]-GLP-1-(7-35)-肽酰胺

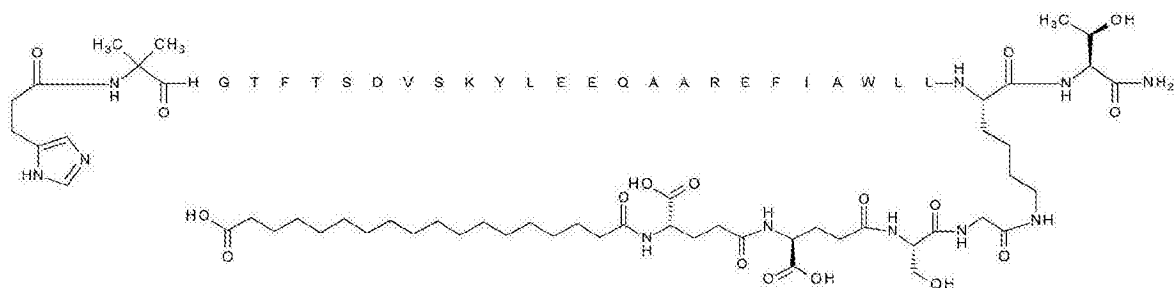
[0656]



(化学式 3) ;

[0657] N^{c34} -[2-[[(2S)-2-[[(4S)-4-羧基-4-[[(4S)-4-羧基-4-(17-羧基十七酰基氨基) 丁酰基] 氨基] 丁酰基] 氨基]-3-羟基丙酰基] 氨基] 乙酰基]-[Imp7,Aib8,His9,Lys18,Glu22,Arg26,Leu33,Thr35]-GLP-1-(7-35)-肽酰胺

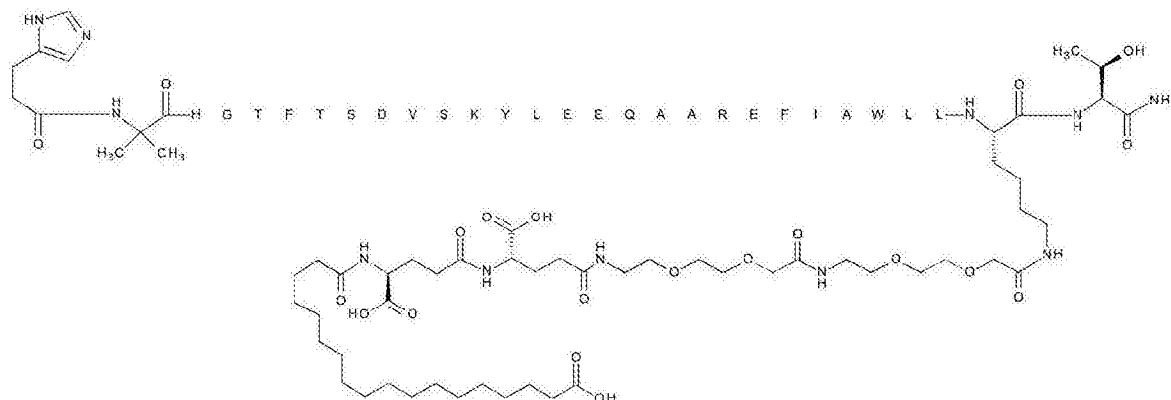
[0658]



(化学式 4) ;

[0659] N^{c34} -[2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[(4S)-4-羧基-4-[[(4S)-4-羧基-4-(17-羧基十七酰基氨基) 丁酰基] 氨基] 丁酰基] 氨基] 乙氧基] 乙氧基] 乙酰基] 氨基] 乙氧基] 乙氧基] 乙酰基]-[Imp7,Aib8,His9,Lys18,Glu22,Arg26,Leu33,Thr35]-GLP-1-(7-35)-肽酰胺

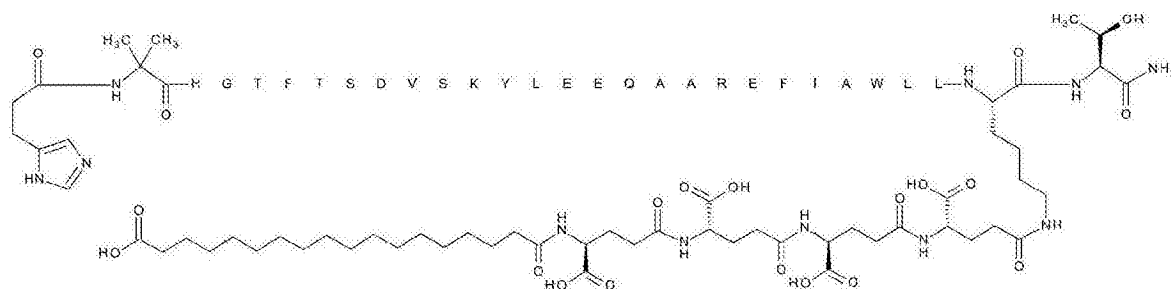
[0660]



(化学式 5) ;

[0661] $N^{\epsilon 34}$ -[(4S)-4-羧基-4-[[(4S)-4-羧基-4-[[(4S)-4-羧基-4-[[(4S)-4-羧基-4-(17-羧基十七酰基氨基)丁酰基]氨基]丁酰基]氨基]丁酰基]氨基]丁酰基]-[Imp7,Aib8, His9,Lys18,Glu22,Arg26,Leu33,Thr35]-GLP-1-(7-35)-肽酰胺

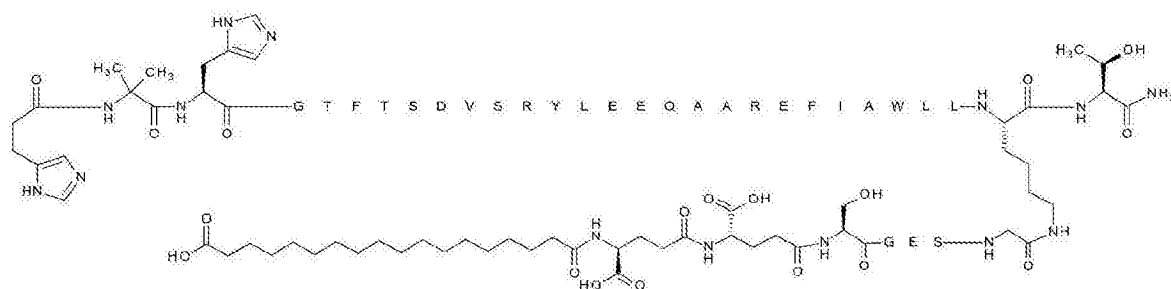
[0662]



(化学式 6) ;

[0663] $N^{\epsilon 34}$ -[2-[[(2S)-2-[[(2S)-4-羧基-2-[[2-[[(2S)-2-[[(4S)-4-羧基-4-[[(4S)-4-羧基-4-(17-羧基十七酰基氨基)丁酰基]氨基]丁酰基]氨基]-3-羟基丙酰基]氨基]乙酰基]氨基]丁酰基]氨基]-3-羟基丙酰基]氨基]乙酰基]-[Imp7,Aib8,His9,Arg18,Glu22, Arg26,Leu33,Thr35]-GLP-1-(7-35)-肽酰胺

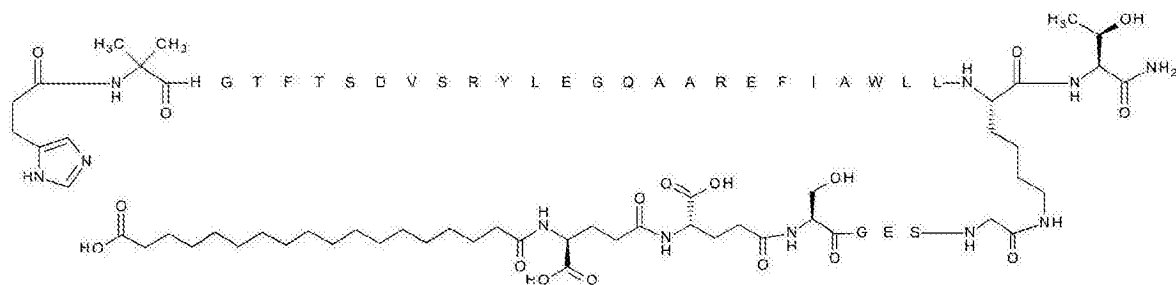
[0664]



(化学式 7) ;

[0665] $N^{\epsilon 34}$ -[2-[[(2S)-2-[[(2S)-4-羧基-2-[[2-[[(2S)-2-[[(4S)-4-羧基-4-[[(4S)-4-羧基-4-(17-羧基十七酰基氨基)丁酰基]氨基]丁酰基]氨基]-3-羟基丙酰基]氨基]乙酰基]氨基]丁酰基]氨基]-3-羟基丙酰基]氨基]乙酰基]-[Imp7,Aib8,His9,Arg18,Arg26, Leu33,Thr35]-GLP-1-(7-35)-肽酰胺

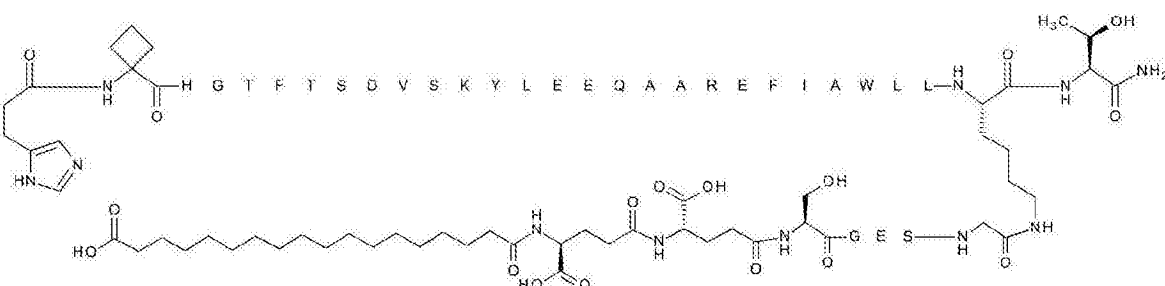
[0666]



(化学式 8) ;

[0667] $N^{\epsilon 34}$ -[2-[[(2S)-2-[[(2S)-4-羧基-2-[[2-[[(2S)-2-[[(4S)-4-羧基-4-[[(4S)-4-羧基-4-(17-羧基十七酰基氨基) 丁酰基] 氨基] 丁酰基] 氨基]-3-羟基丙酰基] 氨基] 乙酰基] 氨基] 丁酰基] 氨基]-3-羟基丙酰基] 氨基] 乙酰基]-[Imp7, Acb8, His9, Lys18, Glu22, Arg26, Leu33, Thr35]-GLP-1-(7-35)-肽酰胺

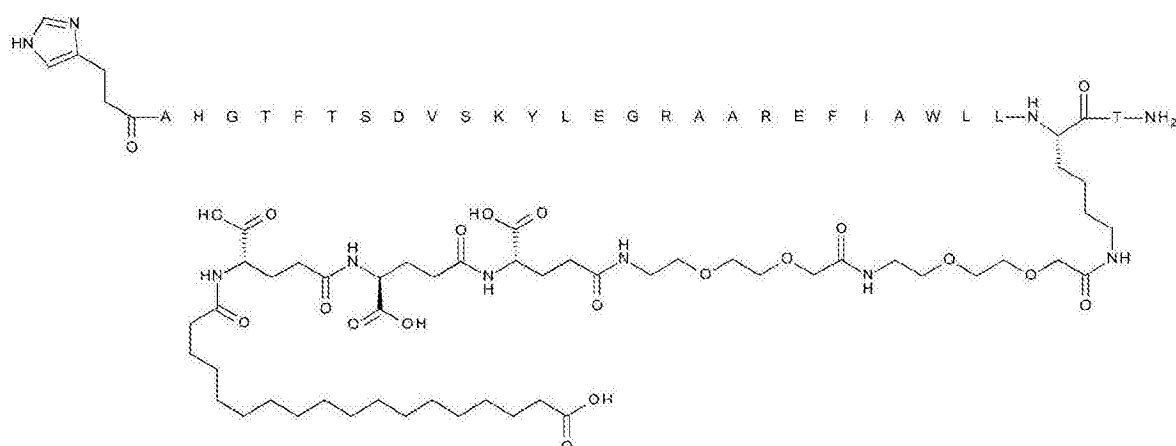
[0668]



[0669] (化学式 9) ;

[0670] $N^{\epsilon 34}$ -[2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[(4S)-4-羧基-4-[[(4S)-4-羧基-4-[[(4S)-4-羧基-4-(17-羧基十七酰基氨基) 丁酰基] 氨基] 丁酰基] 氨基] 丁酰基] 氨基] 乙氧基] 乙氧基] 乙酰基] 氨基] 乙氧基] 乙氧基] 乙酰基]-[Imp7, His9, Lys18, Arg23, Arg26, Leu33, Thr35]-GLP-1-(7-35)-肽酰胺

[0671]

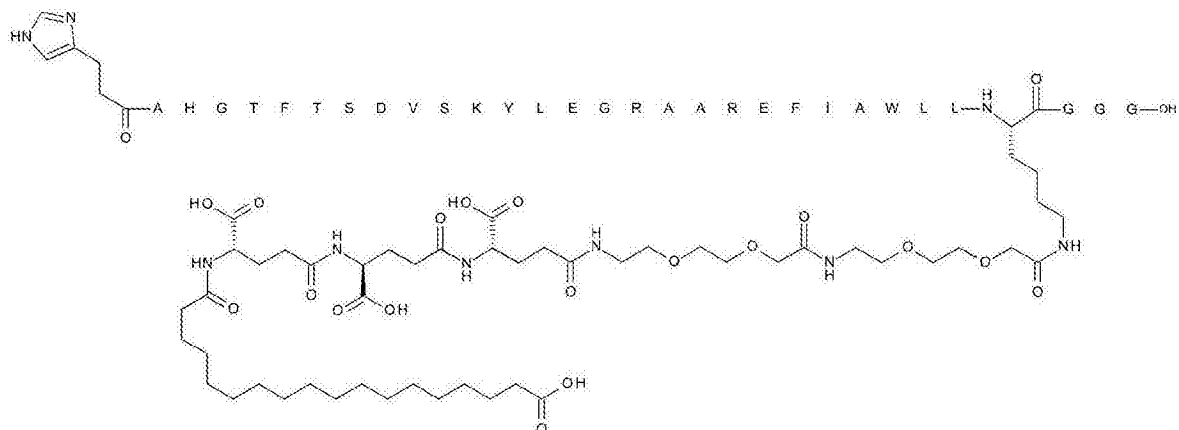


(化学式 10) ;

[0672] $N^{\epsilon 34}$ -[2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[(4S)-4-羧基-4-[[(4S)-4-羧基-4-[[(4S)-4-羧基-4-(17-羧基十七酰基氨基) 丁酰基] 氨基] 丁酰基] 氨基] 丁酰基] 氨基] 乙氧基] 乙氧基] 乙酰基]

基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基]-[Imp7,His9,Lys18,Arg23,Arg26,Leu33,Gly36]-GLP-1-(7-37)-肽

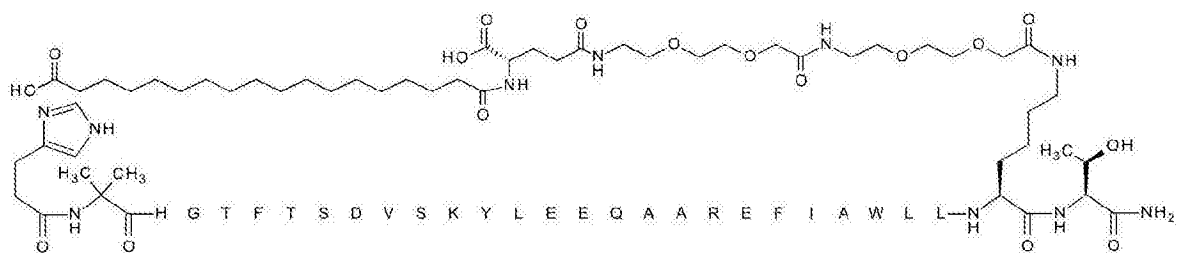
[0673]



(化学式 11) ;

[0674] $N^{\epsilon 34}$ -[2-[2-[2-[2-[2-[2-[[(4S)-4-羧基-4-(17-羧基十七酰基氨基)丁酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]-[Imp7,Aib8,His9,Lys18,Glu22,Arg26,Leu33,Thr35]-GLP-1-(7-35)-肽酰胺

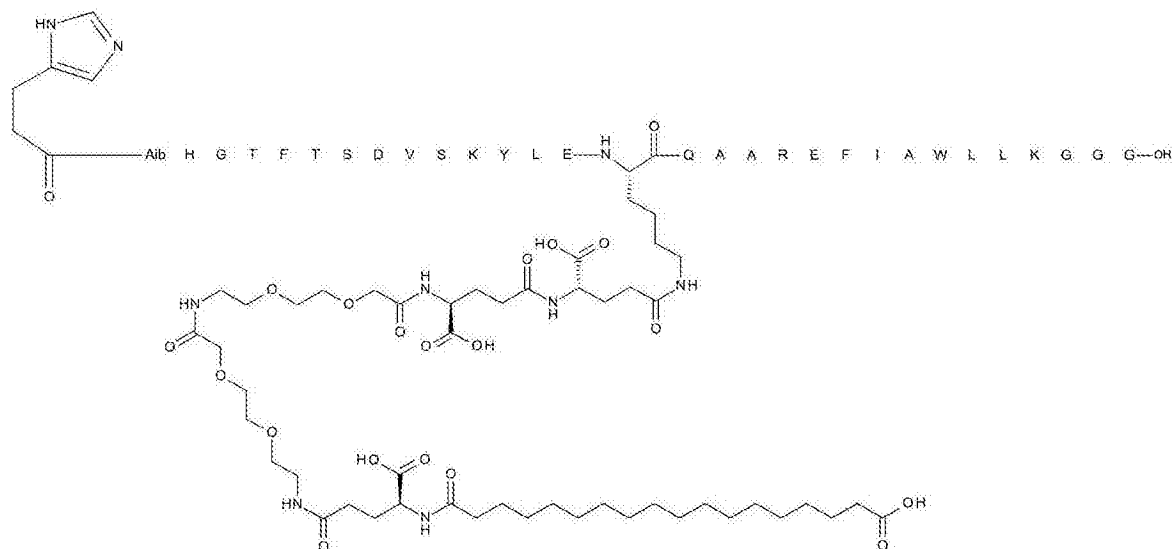
[0675]



(化学式 12) ;

[0676] $N^{\epsilon 22}$ -[(4S)-4-羧基-4-[[(4S)-4-羧基-4-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[[(4S)-4-羧基-4-(17-羧基十七酰基氨基)丁酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]-[Imp7,Aib8,His9,Lys18,Lys22,Arg26,Leu33,Gly36]-GLP-1-(7-37)-肽

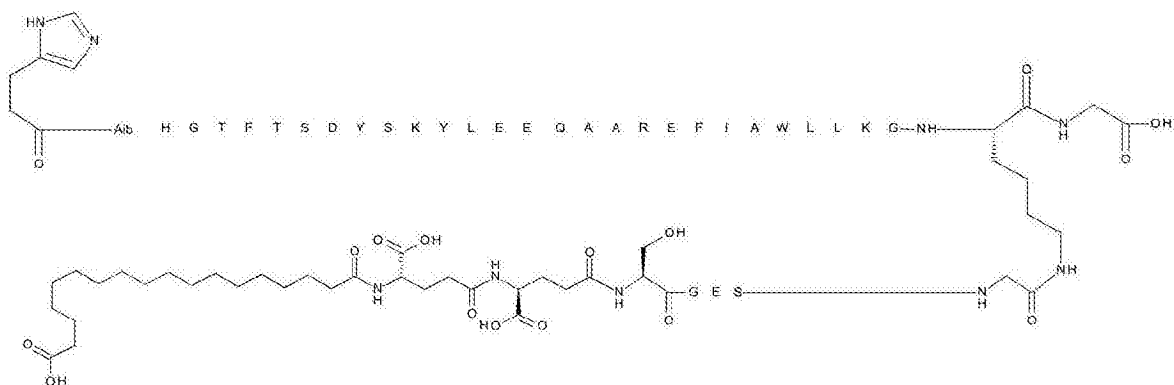
[0677]



(化学式 13) ;

[0678] $N^{\epsilon 36}$ -[2-[[(2S)-2-[[(2S)-4-羧基-2-[[2-[[(2S)-2-[[(4S)-4-羧基-4-[[(4S)-4-羧基-4-(17-羧基十七酰基氨基)丁酰基]氨基]丁酰基]氨基]-3-羟基丙酰基]氨基]乙酰基]氨基]丁酰基]氨基]-3-羟基丙酰基]氨基]乙酰基]-[Imp7,Aib8,His9,Tyr16,Lys18,Glu22,Arg26,Leu33,Lys36]-GLP-1-(7-37)-肽

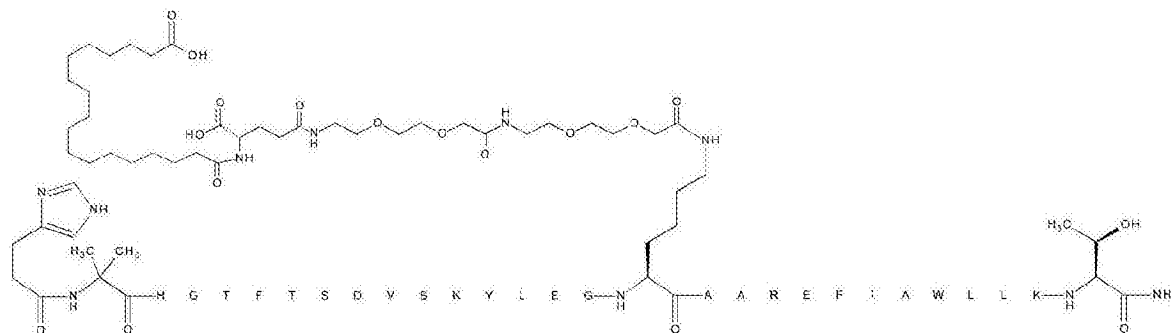
[0679]



(化学式 14) ;

[0680] $N^{\epsilon 23}$ -[2-[2-[2-[2-[2-[2-[[(4S)-4-羧基-4-(17-羧基十七酰基氨基)丁酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基]-[Imp7,Aib8,His9,Lys18,Lys23,Arg26,Leu33,Thr35]-GLP-1-(7-35)-肽酰胺

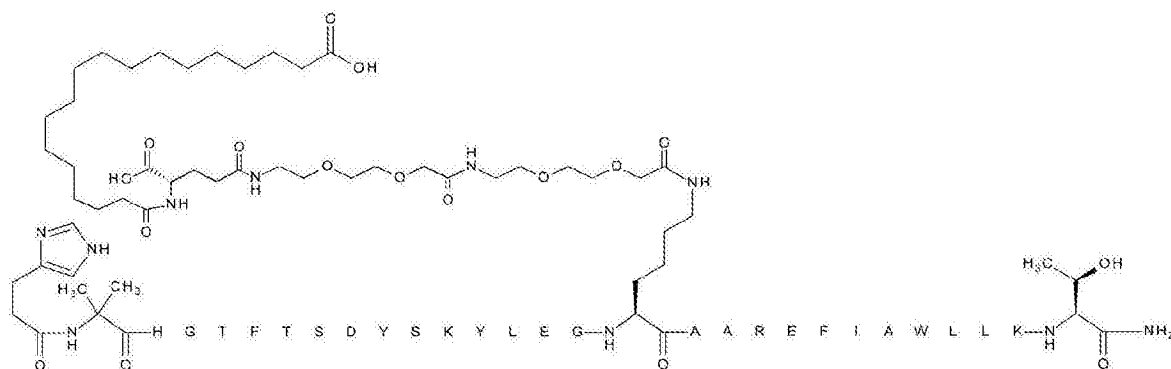
[0681]



(化学式 15) ;

[0682] $N^{\epsilon 23}$ -[2-[2-[2-[2-[2-[2-[[(4S)-4-羧基-4-(17-羧基十七酰基氨基) 丁酰基] 氨基] 乙氧基] 乙氧基] 乙酰基] 氨基] 乙氧基] 乙氧基] 乙酰基]-[Imp7,Aib8,His9,Tyr16,Lys18,Lys23,Arg26,Leu33,Thr35]-GLP-1-(7-35)-肽酰胺

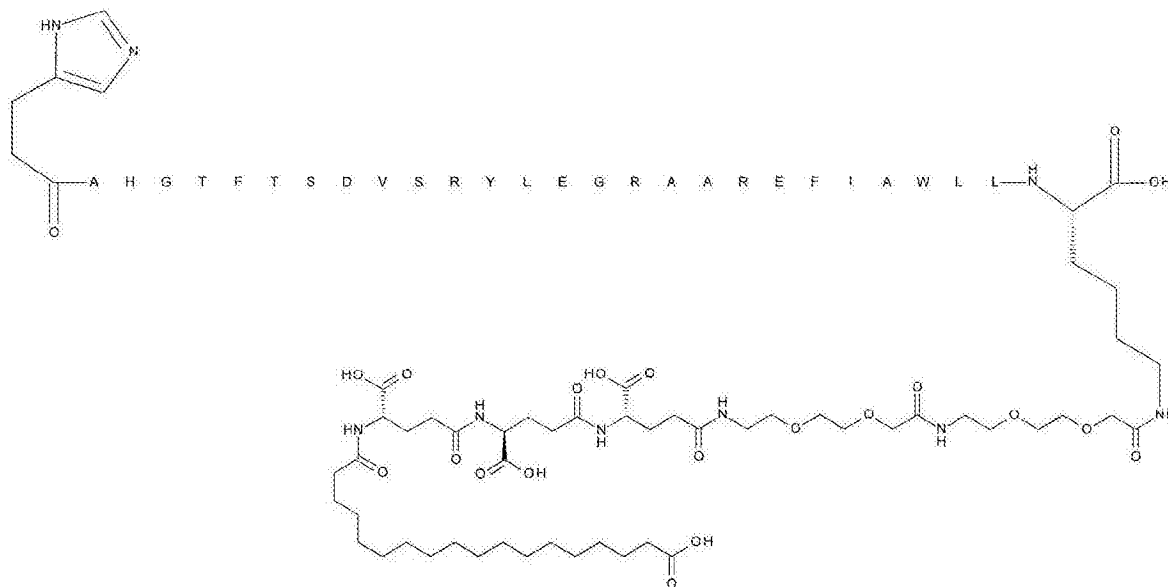
[0683]



(化学式 16) ;

[0684] $N^{\epsilon 34}$ -[2-[2-[2-[2-[2-[2-[[(4S)-4-羧基-4-[[(4S)-4-羧基-4-[[(4S)-4-羧基-4-(17-羧基十七酰基氨基) 丁酰基] 氨基] 丁酰基] 氨基] 丁酰基] 氨基] 乙氧基] 乙氧基] 乙酰基] 氨基] 乙氧基] 乙氧基] 乙酰基]-[Imp7,His9,Arg18,Arg23,Arg26,Leu33]-GLP-1-(7-34)-肽

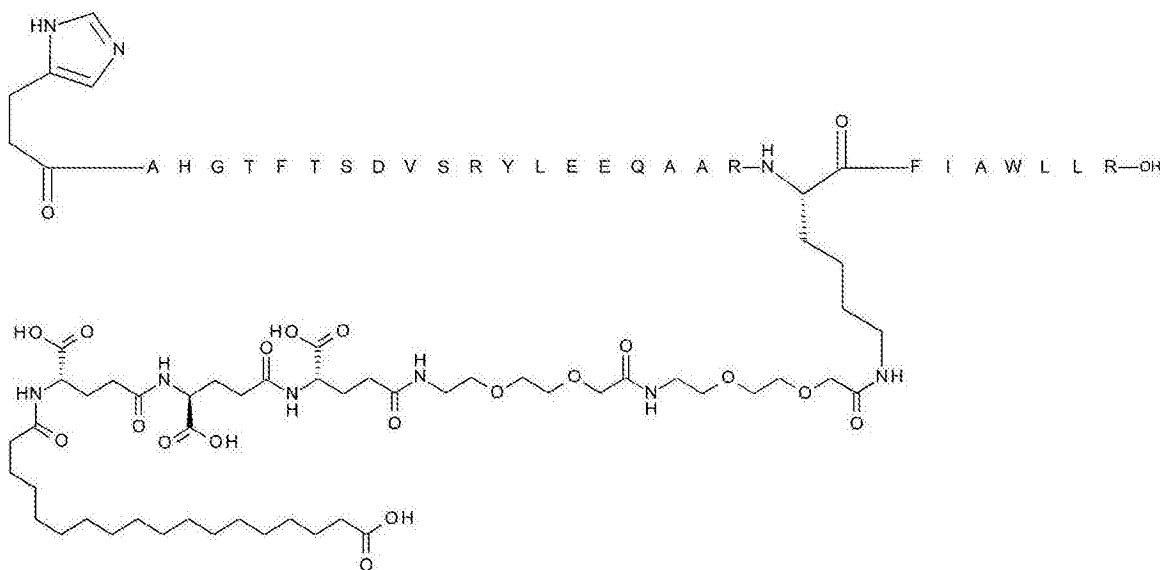
[0685]



(化学式 17) ;

[0686] N^{c27} -[2-[2-[2-[2-[2-[2-[[(4S)-4-羧基-4-[[(4S)-4-羧基-4-[[(4S)-4-羧基-4-(17-羧基十七酰基氨基) 丁酰基] 氨基] 丁酰基] 氨基] 丁酰基] 氨基] 乙氧基] 乙氧基] 乙酰基] 氨基] 乙氧基] 乙氧基] 乙酰基]-[Imp7, His9, Arg18, Glu22, Arg26, Lys27, Leu33, Arg34]-GLP-1-(7-34)-肽

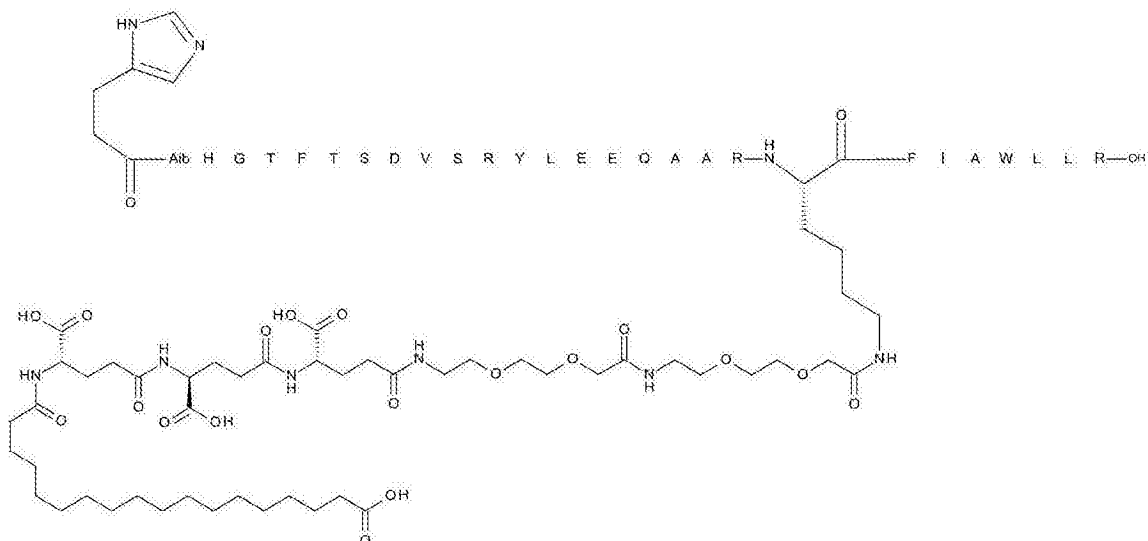
[0687]



(化学式 18) ;

[0688] N^{c27} -[2-[2-[2-[2-[2-[2-[[(4S)-4-羧基-4-[[(4S)-4-羧基-4-[[(4S)-4-羧基-4-(17-羧基十七酰基氨基) 丁酰基] 氨基] 丁酰基] 氨基] 丁酰基] 氨基] 乙氧基] 乙氧基] 乙酰基] 氨基] 乙氧基] 乙氧基] 乙酰基]-[Imp7, Aib8, His9, Arg18, Glu22, Arg26, Lys27, Leu33, Arg34]-GLP-1-(7-34)-肽

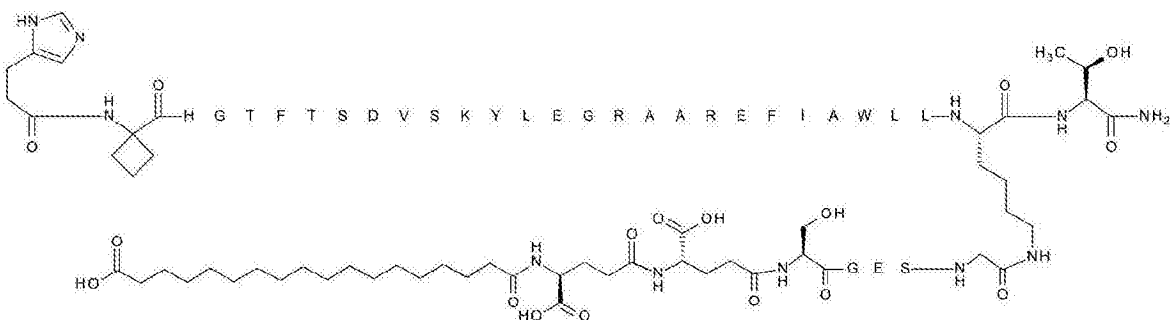
[0689]



(化学式 19) ;

[0690] $N^{\epsilon 34}$ -[2-[[(2S)-2-[[(2S)-4-羧基-2-[[2-[[(2S)-2-[[(4S)-4-羧基-4-[[(4S)-4-羧基-4-(17-羧基十七酰基氨基)丁酰基]氨基]丁酰基]氨基]-3-羟基丙酰基]氨基]乙酰基]氨基]丁酰基]氨基]-3-羟基丙酰基]氨基]乙酰基]-[Imp7,Ac8,His9,Lys18,Arg23,Arg26,Leu33,Thr35]-GLP-1-(7-35)-肽酰胺

[0691]



(化学式 20) ;

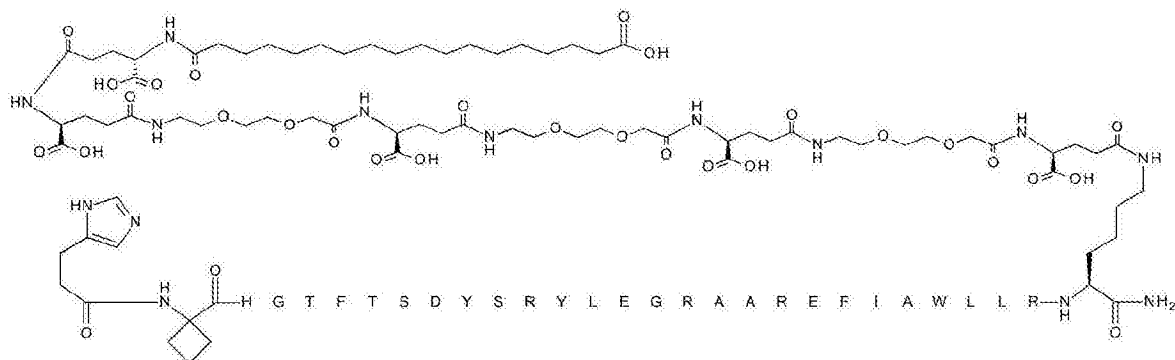
[0692] $N^{\epsilon 35}$ -[(4S)-4-羧基-4-[[2-[[2-[[2-[[(4S)-4-羧基-4-[[2-[[2-[[2-[[(4S)-4-羧基-4-[[2-[[2-[[2-[[(4S)-4-羧基-4-[[(4S)-4-羧基-4-[[(4S)-4-羧基-4-(17-羧基十七酰基氨基)丁酰基]氨基]丁酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基]氨基]丁酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基]氨基]丁酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基]氨基]丁酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基]氨基]丁酰基]-[Imp7,Ac8,His9,Tyr16,Lys18,Glu22,Arg26,Leu33,Lys35]-GLP-1-(7-35)-肽酰胺

[0694] N^ε³⁵-[(4S)-4-羧基-4-[[2-[2-[2-[[(4S)-4-羧基-4-[[2-[2-[2-[[(4S)-4-羧基-4-[[2-[2-[2-[[(4S)-4-羧基-4-[[2-[2-[2-[[(4S)-4-羧基-4-(17-羧基十七酰基氨基)丁酰基]氨基]丁酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基]氨基]丁酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基]氨基]丁酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基]氨基]丁酰基]-[Imp7,Acb8,His9,Tyr16,Arg18,Glu22,Arg26,Leu33,Arg34,Lys35]-GLP-1-(,7-35)-肽酰胺

[illegible]

[0696] N^ε³⁵-[(4S)-4-羧基-4-[[2-[2-[2-[[(4S)-4-羧基-4-[[2-[2-[2-[[(4S)-4-羧基-4-[[2-[2-[2-[[(4S)-4-羧基-4-[[2-[2-[2-[[(4S)-4-羧基-4-(17-羧基十七酰基氨基)丁酰基]氨基]丁酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基]氨基]丁酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基]氨基]丁酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基]氨基]丁酰基]-[Imp7,Acb8,His9,Tyr16,Lys18,Arg22,Arg26,Leu33,Lys35]-GLP-1-(7-35)-肽酰胺

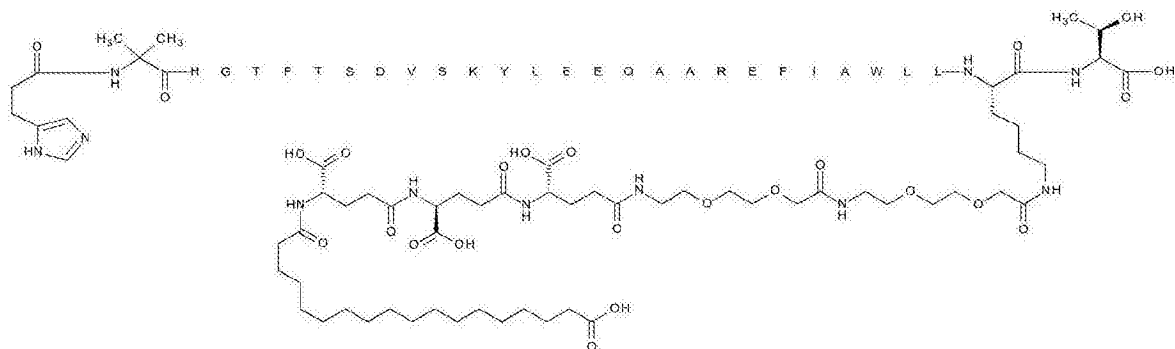
[0708]



(化学式 28) ;

[0709] $N^{\epsilon 34}$ -[2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[(4S)-4-羧基-4-[[(4S)-4-羧基-4-[[(4S)-4-羧基-4-(17-羧基十七酰基氨基) 丁酰基] 氨基] 丁酰基] 氨基] 丁酰基] 氨基] 乙氧基] 乙氧基] 乙酰基] 氨基] 乙氧基] 乙氧基] 乙酰基]-[Imp7,Aib8,His9,Lys18,Glu22,Arg26,Leu33,Thr35]-GLP-1-(7-35)-肽

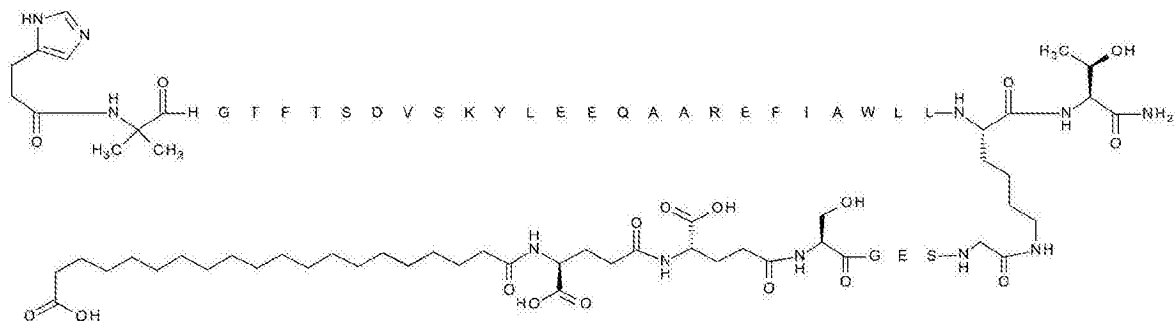
[0710]



(化学式 29) ;

[0711] $N^{\epsilon 34}$ -[2-[[(2S)-2-[[(2S)-4-羧基-2-[[2-[[(2S)-2-[[(4S)-4-羧基-4-[[(4S)-4-羧基-4-(19-羧基十九酰基氨基) 丁酰基] 氨基] 丁酰基] 氨基]-3-羟基丙酰基] 氨基] 乙酰基] 氨基] 丁酰基] 氨基]-3-羟基丙酰基] 氨基] 乙酰基]-[Imp7,Aib8,His9,Lys18,Glu22,Arg26,Leu33,Thr35]-GLP-1-(7-35)-肽酰胺

[0712]

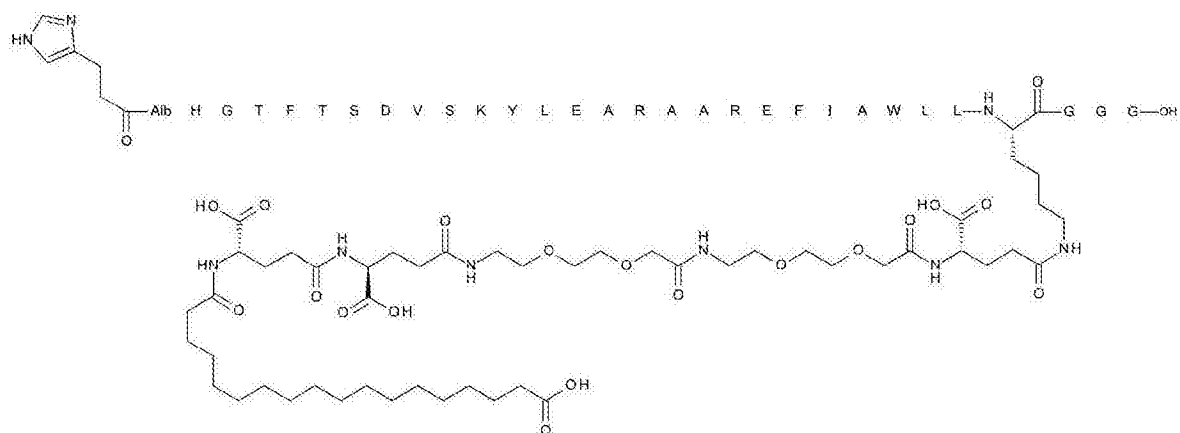


(化学式 30) ;

[0713] $N^{\epsilon 34}$ -[(4S)-4-羧基-4-[[2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[(4S)-4-羧基-4-[[(4S)-4-羧基-4-(17-羧基十七酰基氨基) 丁酰基] 氨基] 丁酰基] 氨基] 乙氧基] 乙氧基] 乙酰基] 氨基] 乙氧基]

基]乙氧基]乙酰基]氨基]丁酰基]-[Imp7,Aib8,His9,Lys18,Ala22,Arg23,Arg26,Leu33,Gly36]-GLP-1-(7-37)-肽

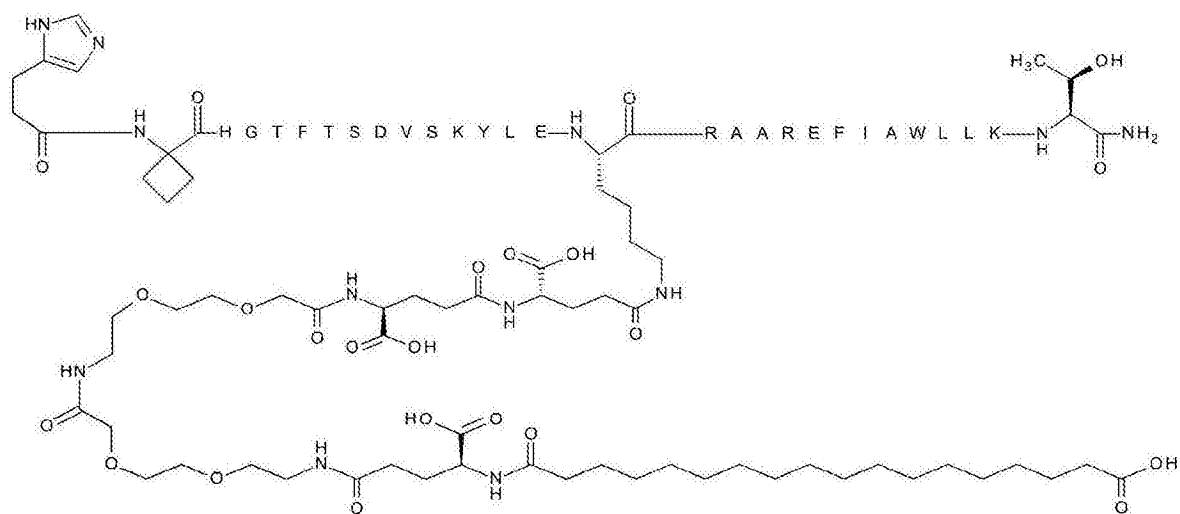
[0714]



(化学式 31) ;

[0715] N^{e22} -[(4S)-4-羧基-4-[[(4S)-4-羧基-4-[[2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[(4S)-4-羧基-4-(17-羧基十七酰基氨基) 丁酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基]氨基]丁酰基]氨基]丁酰基]-[Imp7,Aib8,His9,Lys18,Lys22,Arg23,Arg26,Leu33,Thr35]-GLP-1-(7-35)-肽酰胺

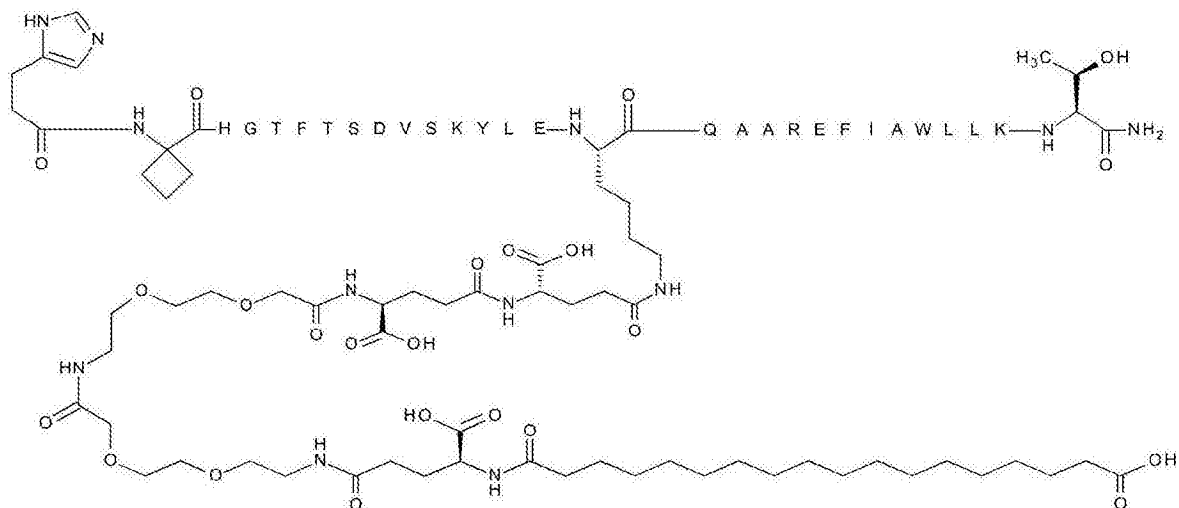
[0716]



(化学式 32) ;

[0717] N^{e22} -[(4S)-4-羧基-4-[[(4S)-4-羧基-4-[[2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[(4S)-4-羧基-4-(17-羧基十七酰基氨基) 丁酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基]氨基]丁酰基]氨基]丁酰基]-[Imp7,Aib8,His9,Lys18,Lys22,Arg26,Leu33,Thr35]-GLP-1-(7-35)-肽酰胺

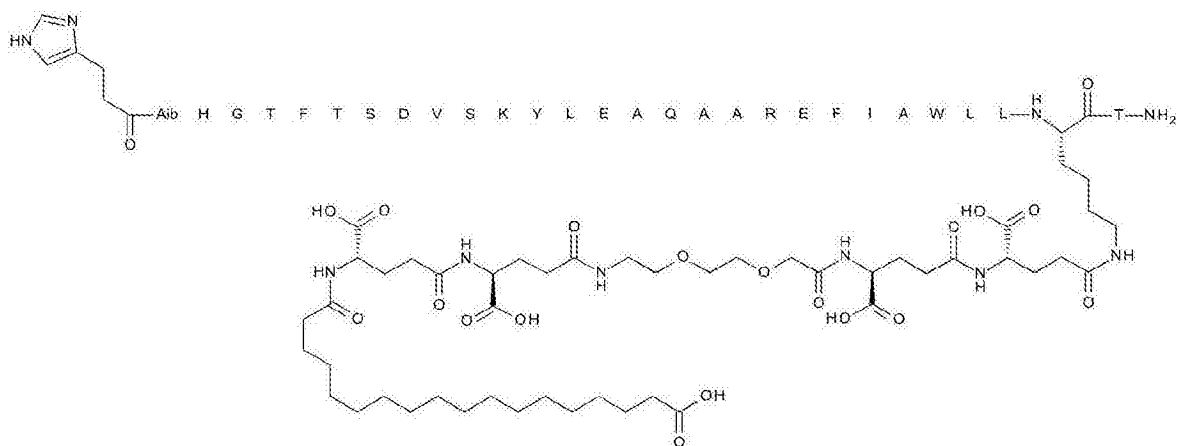
[0718]



(化学式 33) ;

[0719] $N^{\epsilon 34}$ -[(4S)-4-羧基-4-[[[(4S)-4-羧基-4-[[2-[2-[2-[[[(4S)-4-羧基-4-[[[(4S)-4-羧基-4-(17-羧基十七酰基氨基)丁酰基]氨基]丁酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基]氨基]丁酰基]氨基]丁酰基]-[Imp7,Aib8,His9,Lys18,Ala22,Arg26,Leu33,Thr35]-GLP-1-(7-35)-肽酰胺

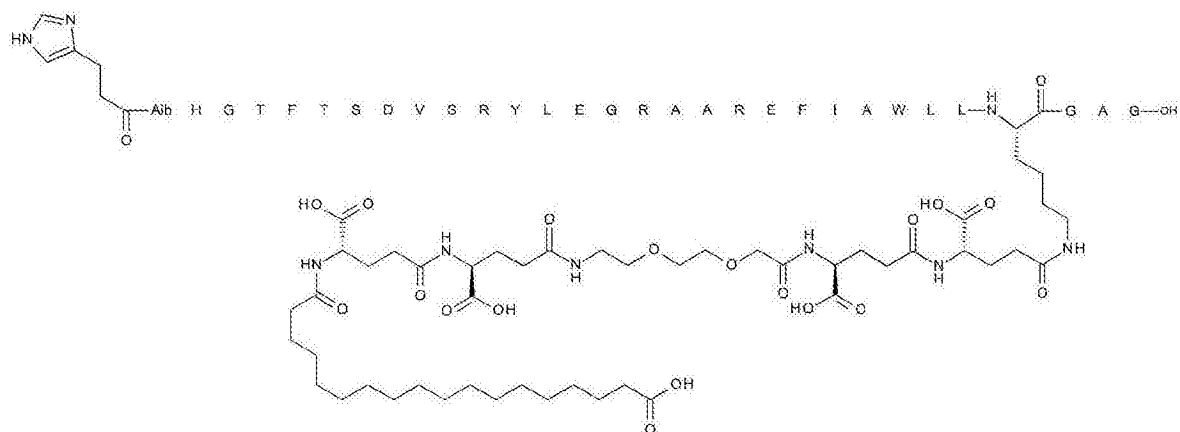
[0720]



(化学式 34) ;

[0721] $N^{\epsilon 34}$ -[(4S)-4-羧基-4-[[[(4S)-4-羧基-4-[[2-[2-[2-[[[(4S)-4-羧基-4-[[[(4S)-4-羧基-4-(17-羧基十七酰基氨基)丁酰基]氨基]丁酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基]氨基]丁酰基]氨基]丁酰基]-[Imp7,Aib8,His9,Arg18,Arg23,Arg26,Leu33,Ala36]-GLP-1-(7-37)-肽

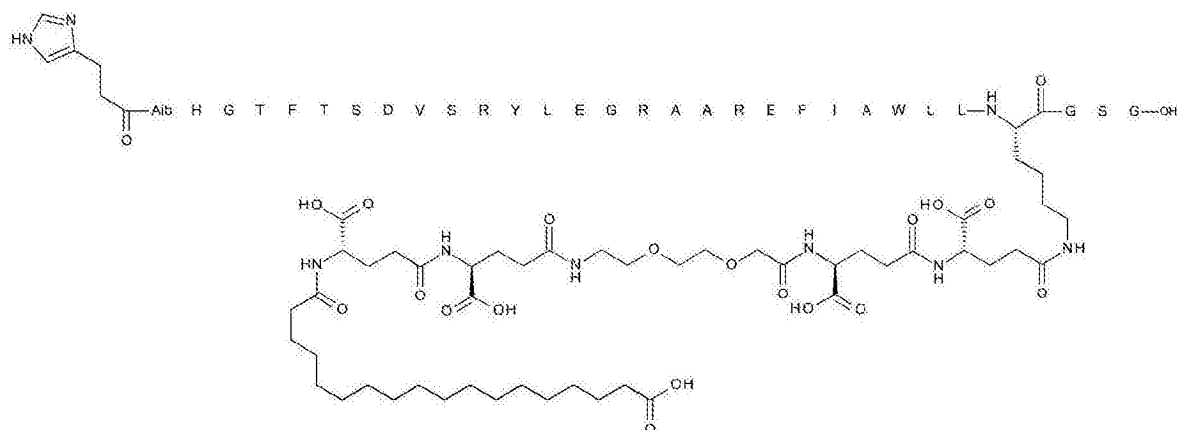
[0722]



(化学式 35) ;

[0723] N^{e34} -[(4S)-4-羧基-4-[[(4S)-4-羧基-4-[[2-[2-[2-[[(4S)-4-羧基-4-[[(4S)-4-羧基-4-(17-羧基十七酰基氨基)丁酰基]氨基]丁酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基]氨基]丁酰基]氨基]丁酰基]-[Imp7,Aib8,His9,Arg18,Arg23,Arg26,Leu33,Ser36]-GLP-1-(7-37)-肽

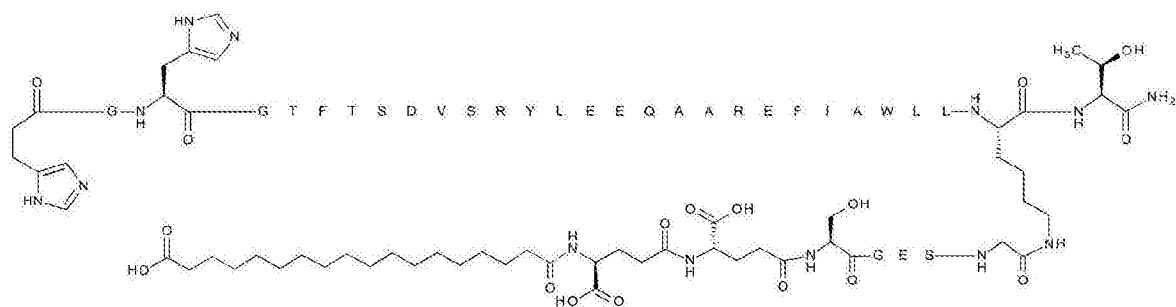
[0724]



(化学式 36) ;

[0725] N^{e34} -[2-[[(2S)-2-[[(2S)-4-羧基-2-[[2-[[(2S)-2-[[(4S)-4-羧基-4-[[(4S)-4-羧基-4-(17-羧基十七酰基氨基)丁酰基]氨基]丁酰基]氨基]-3-羟基丙酰基]氨基]乙酰基]氨基]丁酰基]氨基]-3-羟基丙酰基]氨基]乙酰基]-[Imp7,Gly8,His9,Arg18,Glu22,Arg26,Leu33,Thr35]-GLP-1-(7-35)-肽酰胺

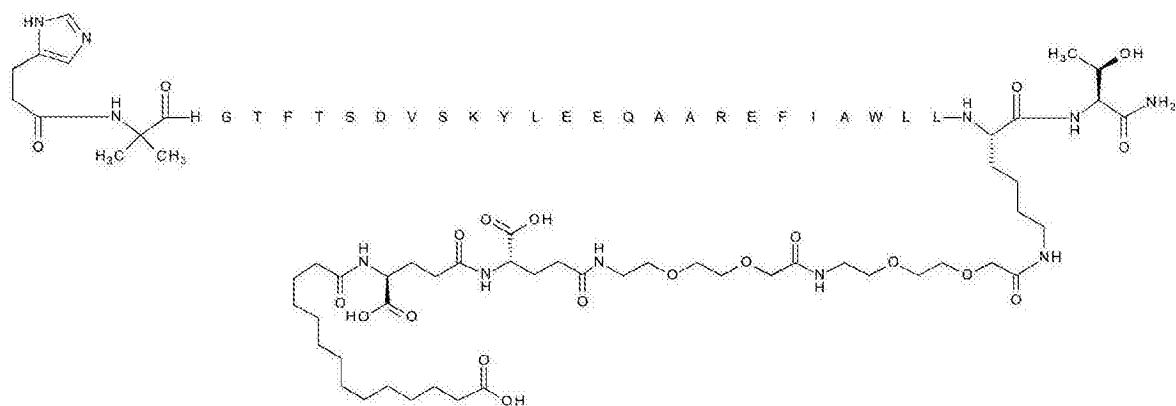
[0726]



(化学式 37) ;

[0727] $N^{\epsilon 34}$ -[2-[2-[2-[2-[2-[2-[[(4S)-4-羧基-4-[[(4S)-4-羧基-4-(13-羧基十三酰基氨基) 丁酰基]氨基]丁酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基]-[Imp7,Aib8,His9,Lys18,Glu22,Arg26,Leu33,Thr35]-GLP-1-(7-35)-肽酰胺

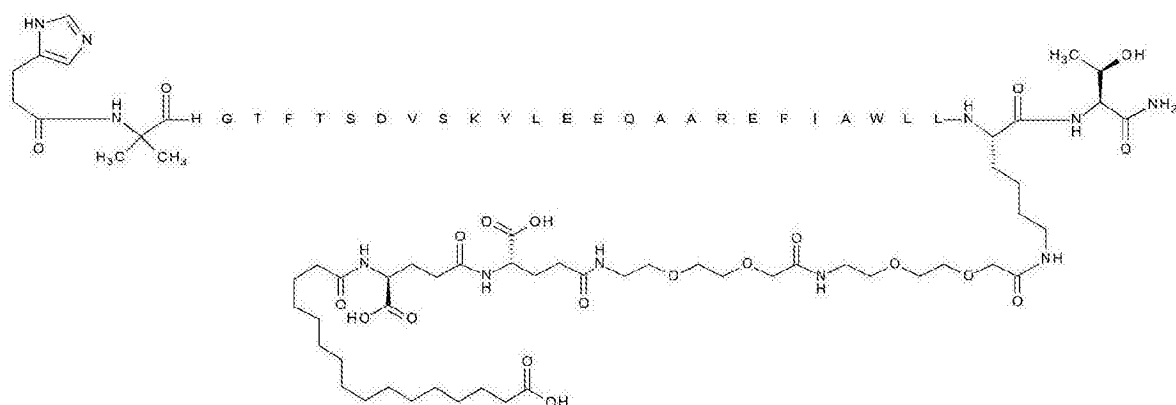
[0728]



(化学式 38) ;

[0729] $N^{\epsilon 34}$ -[2-[2-[2-[2-[2-[2-[[(4S)-4-羧基-4-[[(4S)-4-羧基-4-(15-羧基十五酰基氨基) 丁酰基]氨基]丁酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基]-[Imp7,Aib8,His9,Lys18,Glu22,Arg26,Leu33,Thr35]-GLP-1-(7-35)-肽酰胺

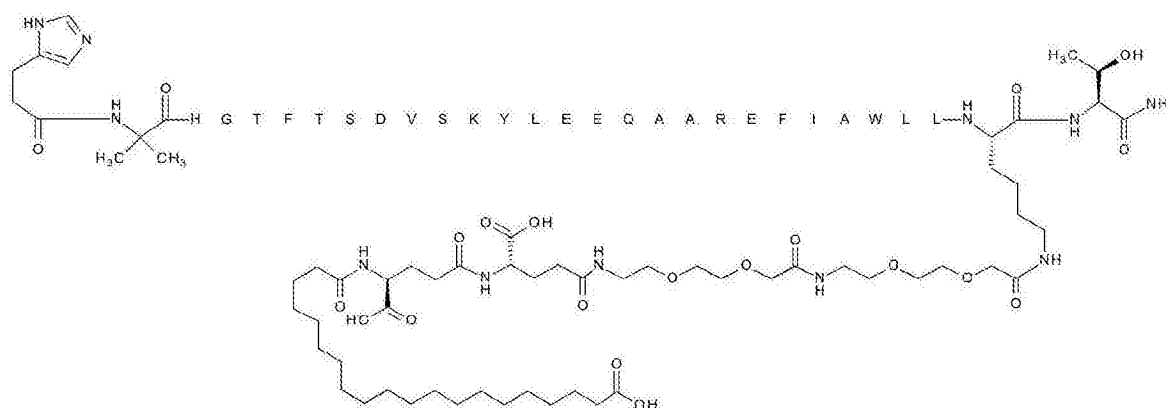
[0730]



(化学式 39) ;

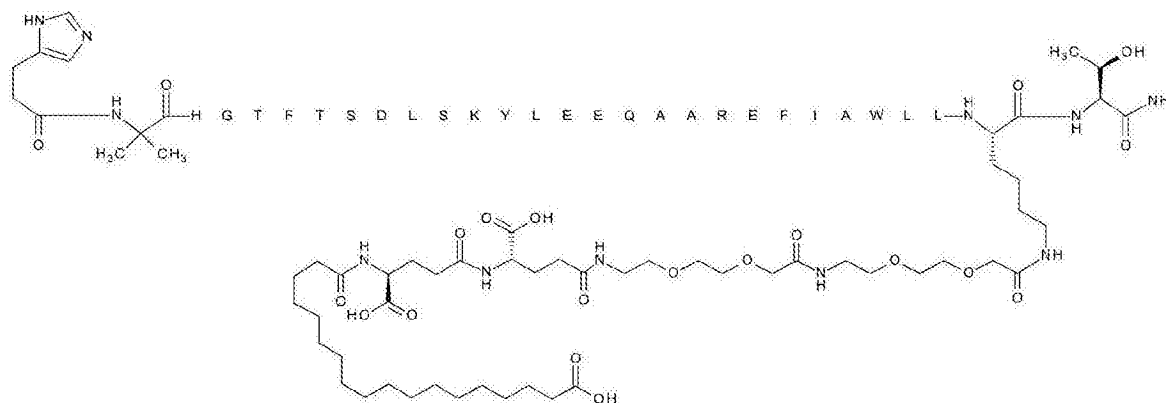
[0731] $N^{\epsilon 34}$ -[2-[2-[2-[2-[2-[2-[[(4S)-4-羧基-4-[[(4S)-4-羧基-4-(19-羧基十九酰基氨基) 丁酰基]氨基]丁酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基]-[Imp7,Aib8,His9,Lys18,Glu22,Arg26,Leu33,Thr35]-GLP-1-(7-35)-肽酰胺

基]-[Imp7,Aib8,His9,Lys18,Glu22,Arg26,Leu33,Thr35]-GLP-1-(7-35)-肽酰胺
[0732]



(化学式 40) ;

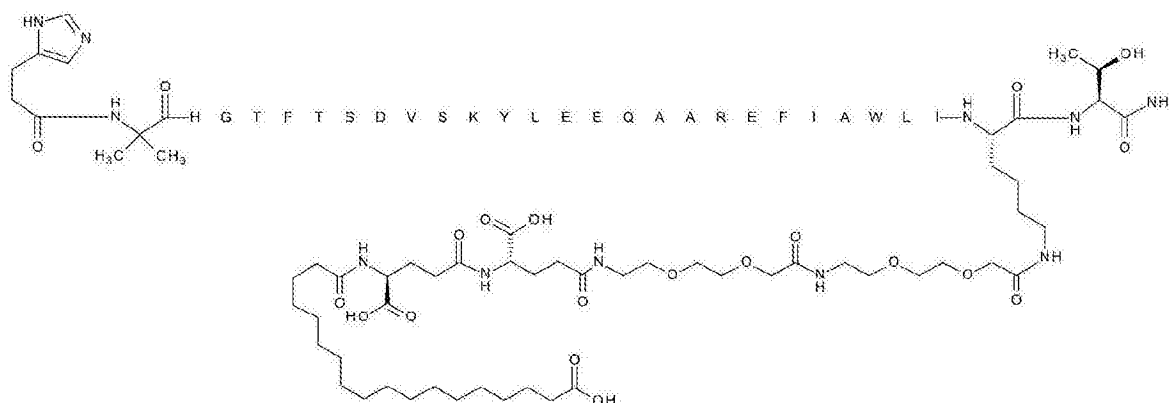
[0733] N^{e34} -[2-[2-[2-[2-[2-[2-[[(4S)-4-羧基-4-[[(4S)-4-羧基-4-(17-羧基十七酰基氨基) 丁酰基] 氨基] 丁酰基] 氨基] 乙氧基] 乙氧基] 乙酰基] 氨基] 乙氧基] 乙氧基] 乙酰基]-[Imp7,Aib8,His9,Leu16,Lys18,Glu22,Arg26,Leu33,Thr35]-GLP-1-(7-35)-肽酰胺
[0734]



(化学式 41) ;

[0735] N^{e34} -[2-[2-[2-[2-[2-[2-[[(4S)-4-羧基-4-[[(4S)-4-羧基-4-(17-羧基十七酰基氨基) 丁酰基] 氨基] 丁酰基] 氨基] 乙氧基] 乙氧基] 乙酰基] 氨基] 乙氧基] 乙氧基] 乙酰基]-[Imp7,Aib8,His9,Lys18,Glu22,Arg26,Ile33,Thr35]-GLP-1-(7-35)-肽酰胺

[0736]



(化学式 42)。

[0737] 60. 根据前述任一实施方案所述的GLP-1衍生物, 其中所述GLP-1衍生物为所述GLP-1衍生物的药学上可接受的盐、酰胺和/或酯的形式。

[0738] 61. 根据前述任一实施方案所述的GLP-1衍生物, 其中所述多肽包含C末端酰胺。

[0739] 62. 根据前述任一实施方案所述的GLP-1衍生物, 其中所述GLP-1衍生物为所述GLP-1衍生物的药学上可接受的盐的形式。

[0740] 63. 根据前述任一实施方案所述的GLP-1衍生物, 其中所述GLP-1衍生物为所述GLP-1衍生物的酯的形式。

[0741] 64. 根据前述任一实施方案所述的GLP-1衍生物, 其中所述GLP-1衍生物是胰高血糖素受体的激动剂和GLP-1受体的激动剂。

[0742] 65. 根据前述任一实施方案所述的GLP-1衍生物, 其中所述GLP-1衍生物对胰高血糖素受体的EC₅₀值与对GLP-1受体的EC₅₀之间的比值在100至250的范围内, 如50至100的范围内, 20至50的范围内, 10至20的范围内, 或1至10的范围内。

[0743] 66. 根据前述任一实施方案所述的GLP-1衍生物, 其中所述GLP-1衍生物对胰高血糖素受体的EC₅₀值与对GLP-1受体的EC₅₀之间的比值在50至100的范围内。

[0744] 67. 根据前述任一实施方案所述的GLP-1衍生物, 其中所述GLP-1衍生物对胰高血糖素受体的EC₅₀值与对GLP-1受体的EC₅₀之间的比值在20至50的范围内。

[0745] 68. 根据前述任一实施方案所述的GLP-1衍生物, 其中所述GLP-1衍生物对胰高血糖素受体的EC₅₀值与对GLP-1受体的EC₅₀之间的比值在10至20的范围内。

[0746] 69. 根据前述任一实施方案所述的GLP-1衍生物, 其中所述GLP-1衍生物对胰高血糖素受体的EC₅₀值与对GLP-1受体的EC₅₀之间的比值在1至10的范围内。

[0747] 70. 根据前述任一实施方案所述的GLP-1衍生物, 其中所述GLP-1衍生物对胰高血糖素受体的EC₅₀值与对GLP-1受体的EC₅₀之间的比值在1至10的范围内。

[0748] 71. 根据前述任一实施方案所述的GLP-1衍生物, 其中所述GLP-1衍生物对胰高血糖素受体的EC₅₀ < 10nM。

[0749] 72. 根据前述任一实施方案所述的GLP-1衍生物, 其中所述GLP-1衍生物对胰高血糖素受体的EC₅₀ < 1nM。

[0750] 73. 根据前述任一实施方案所述的GLP-1衍生物, 其中所述GLP-1衍生物对胰高血糖素受体的EC₅₀ < 100pM。

[0751] 74. 根据前述任一实施方案所述的GLP-1衍生物, 其中所述GLP-1衍生物对胰高血糖素受体的 $EC_{50} < 10pM$ 。

[0752] 75. 根据前述任一实施方案所述的GLP-1衍生物, 其中所述GLP-1衍生物对GLP-1受体的 $EC_{50} < 100pM$ 。

[0753] 76. 根据前述任一实施方案所述的GLP-1衍生物, 其中所述GLP-1衍生物对GLP-1受体的 $EC_{50} < 50pM$ 。

[0754] 77. 根据前述任一实施方案所述的GLP-1衍生物, 其中所述GLP-1衍生物对GLP-1受体的 $EC_{50} < 10pM$ 。

[0755] 78. 根据前述任一实施方案所述的GLP-1衍生物, 其中所述GLP-1衍生物对GLP-1受体的 EC_{50} 值低于对胰高血糖素受体的 EC_{50} 值。

[0756] 79. 根据前述任一实施方案所述的GLP-1衍生物, 其中所述对GLP-1受体的 EC_{50} 根据此处描述的试验(I) (a) 来确定。

[0757] 80. 根据前述任一实施方案所述的GLP-1衍生物, 其中所述对胰高血糖素受体的 EC_{50} 根据此处描述的试验(I) (b) 来确定。

[0758] 81. 根据前述任一实施方案所述的GLP-1衍生物, 其中所述GLP-1衍生物对胰高血糖素受体的 IC_{50} 值与对GLP-1受体的 IC_{50} 之间的比值在1至5的范围内, 如5至10的范围内, 10至15的范围内, 15至25的范围内, 或25至100的范围内, 或例如超过100。

[0759] 82. 根据前述任一实施方案所述的GLP-1衍生物, 其中所述GLP-1衍生物对胰高血糖素受体的 IC_{50} 值与对GLP-1受体的 IC_{50} 之间的比值在5至10的范围内。

[0760] 83. 根据前述任一实施方案所述的GLP-1衍生物, 其中所述GLP-1衍生物对胰高血糖素受体的 IC_{50} 值与对GLP-1受体的 IC_{50} 之间的比值在10至15的范围内。

[0761] 84. 根据前述任一实施方案所述的GLP-1衍生物, 其中所述GLP-1衍生物对胰高血糖素受体的 IC_{50} 值与对GLP-1受体的 IC_{50} 之间的比值在15至25的范围内。

[0762] 85. 根据前述任一实施方案所述的GLP-1衍生物, 其中所述GLP-1衍生物对胰高血糖素受体的 IC_{50} 值与对GLP-1受体的 IC_{50} 之间的比值在25至100的范围内。

[0763] 86. 根据前述任一实施方案所述的GLP-1衍生物, 其中所述GLP-1衍生物对胰高血糖素受体的 IC_{50} 值与对GLP-1受体的 IC_{50} 之间的比值超过100。

[0764] 87. 根据前述任一实施方案所述的GLP-1衍生物, 其中所述对GLP-1受体的 IC_{50} 根据此处描述的试验(II) (a) 来确定。

[0765] 88. 根据前述任一实施方案所述的GLP-1衍生物, 其中所述对胰高血糖素受体的 IC_{50} 根据此处描述的试验(II) (b) 来确定。

[0766] 89. 根据前述任一实施方案所述的GLP-1衍生物, 其中所述GLP-1衍生物在ThT原纤维形成试验中具有超过70%的回收率。

[0767] 90. 根据前述任一实施方案所述的GLP-1衍生物, 其中所述GLP-1衍生物在ThT原纤维形成试验中具有超过90%的回收率。

[0768] 91. 根据前述任一实施方案所述的GLP-1衍生物, 其中所述GLP-1衍生物在ThT原纤维形成试验中具有约100%的回收率。

[0769] 92. 根据前述任一实施方案所述的GLP-1衍生物, 其中所述GLP-1衍生物在ThT原纤维形成试验中具有超过7小时的滞后时间。

[0770] 93.根据前述任一实施方案所述的GLP-1衍生物,其中所述GLP-1衍生物在ThT原纤维形成试验中具有超过20小时的滞后时间。

[0771] 94.根据前述任一实施方案所述的GLP-1衍生物,其中所述GLP-1衍生物在ThT原纤维形成试验中具有45小时或更长的滞后时间。

[0772] 95.根据前述任一实施方案所述的GLP-1衍生物,其中所述ThT原纤维形成试验是此处描述的试验(III)。

[0773] 96.根据前述任一实施方案所述的GLP-1衍生物,其中所述GLP-1衍生物在化学稳定性试验中具有少于14%的降解。

[0774] 97.根据前述任一实施方案所述的GLP-1衍生物,其中所述GLP-1衍生物在化学稳定性试验中具有少于13%的降解。

[0775] 98.根据前述任一实施方案所述的GLP-1衍生物,其中所述GLP-1衍生物在化学稳定性试验中具有少于12%的降解。

[0776] 99.根据前述任一实施方案所述的GLP-1衍生物,其中所述GLP-1衍生物在化学稳定性试验中具有少于10%的降解。

[0777] 100.根据前述任一实施方案所述的GLP-1衍生物,其中所述GLP-1衍生物在化学稳定性试验中具有少于9%的降解。

[0778] 101.根据前述任一实施方案所述的GLP-1衍生物,其中所述GLP-1衍生物在化学稳定性试验中具有少于7%的降解。

[0779] 102.根据前述任一实施方案所述的GLP-1衍生物,其中所述GLP-1衍生物在化学稳定性试验中具有少于5%的降解。

[0780] 103.根据前述任一实施方案所述的GLP-1衍生物,其中所述GLP-1衍生物在化学稳定性试验中具有少于3%的降解。

[0781] 104.根据前述任一实施方案所述的GLP-1衍生物,其中所述GLP-1衍生物在化学稳定性试验中具有少于2%的降解。

[0782] 105.根据前述任一实施方案所述的GLP-1衍生物,其中所述GLP-1衍生物在化学稳定性试验中具有少于1%的降解。

[0783] 106.根据前述任一实施方案所述的GLP-1衍生物,其中所述化学稳定性试验是此处描述的试验(V)。

[0784] 107.根据前述任一实施方案所述的GLP-1衍生物,其中所述GLP-1衍生物是DPPIV保护的化合物。

[0785] 108.根据前述任一实施方案所述的GLP-1衍生物,其中所述GLP-1衍生物是DPPIV稳定化的化合物。

[0786] 109.根据前述任一实施方案所述的GLP-1衍生物,其中所述GLP-1衍生物是所述GLP-1衍生物的药学上可接受的盐和/或酯的形式。

[0787] 110.一种药物组合物,其包含如前述任一实施方案限定的GLP-1衍生物和一种或多种药学上可接受的赋形剂。

[0788] 111.如前述任一实施方案限定的药物组合物,其进一步包含一种或多种附加的治疗活性化合物或物质。

[0789] 112.如前述任一实施方案限定的药物组合物,其中所述附加的治疗活性化合物是

GLP-1化合物或胰岛素化合物。

[0790] 113. 如前述任一实施方案限定的药物组合物, 其中所述附加的治疗活性化合物是GLP-1化合物。

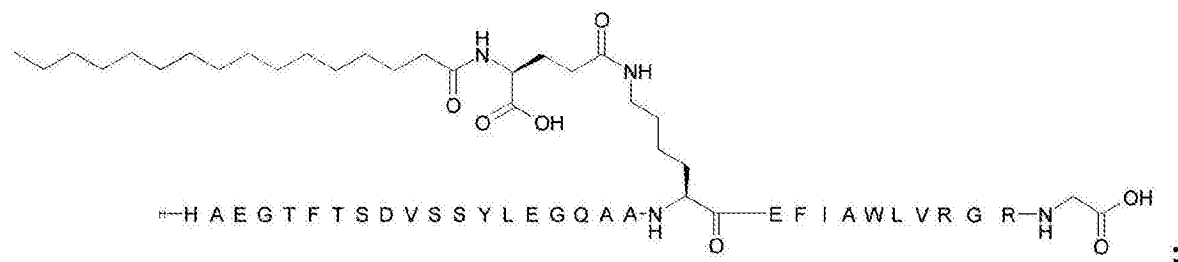
[0791] 114. 如前述任一实施方案限定的药物组合物, 其中所述附加的治疗活性化合物是胰岛素化合物。

[0792] 115. 如前述任一实施方案限定的药物组合物, 其中所述GLP-1化合物选自:

[0793] N-ε26-(S)-4-羧基-4-十六酰基氨基-丁酰基 [Arg34]GLP-1-(7-37)

[0794] (化合物G1):

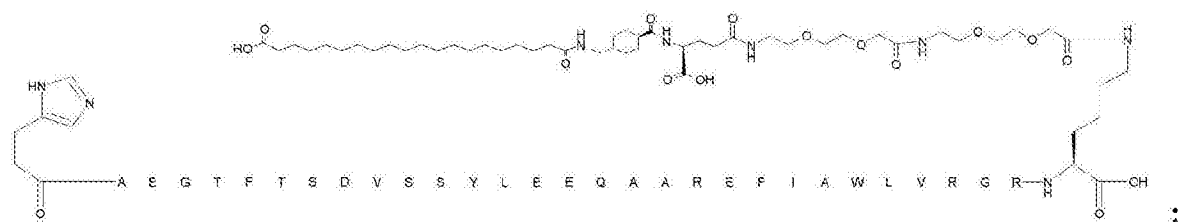
[0795]



[0796] N-ε37-[2-(2-{2-[2-(2-{2-[(S)-4-羧基-4-((反式-4-[(19-羧基十九酰基氨基)甲基]环己烷羰基)氨基)丁酰基氨基]乙氧基}乙氧基)乙酰基氨基]乙氧基}乙氧基)乙酰基] [脱氨基His7,Glu22,Arg26,Arg34,Lys37]GLP-1-(7-37)

[0797] (化合物G2):

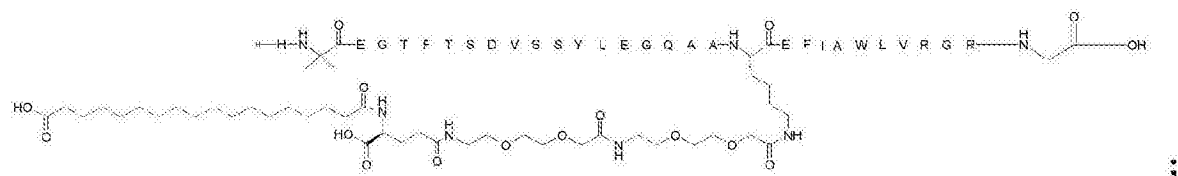
[0798]



[0799] N-ε26-[2-(2-{2-[2-(2-{2-[(S)-4-羧基-4-(17-羧基十七酰基氨基)丁酰基氨基]乙氧基}乙氧基)乙酰基氨基]乙氧基}乙氧基)乙酰基] [Aib8,Arg34]GLP-1-(7-37)

[0800] (化合物G3):

[0801]

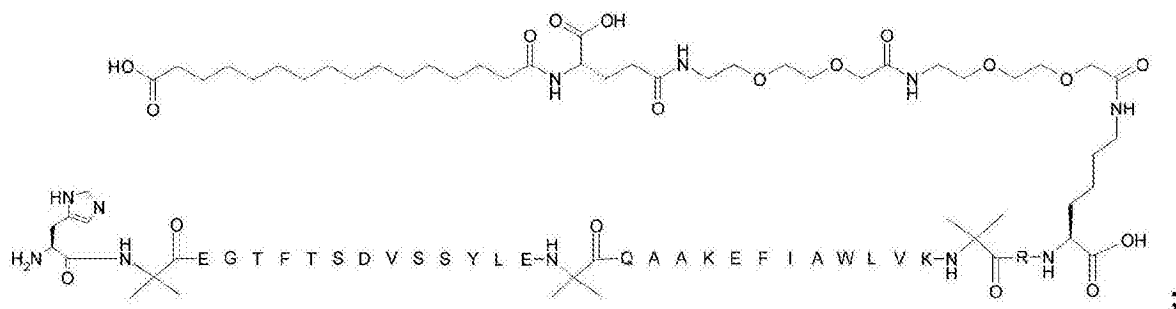


[0802] 和

[0803] N-ε37-[2-(2-{2-[2-(2-{2-[(S)-4-羧基-4-(15-羧基-十五酰基氨基)-丁酰基氨基]-乙氧基}-乙氧基)-乙酰基氨基]-乙氧基}-乙氧基)-乙酰基] [Aib8,22,35,Lys37]GLP-1-(7-37)

[0804] (化合物G4):

[0805]

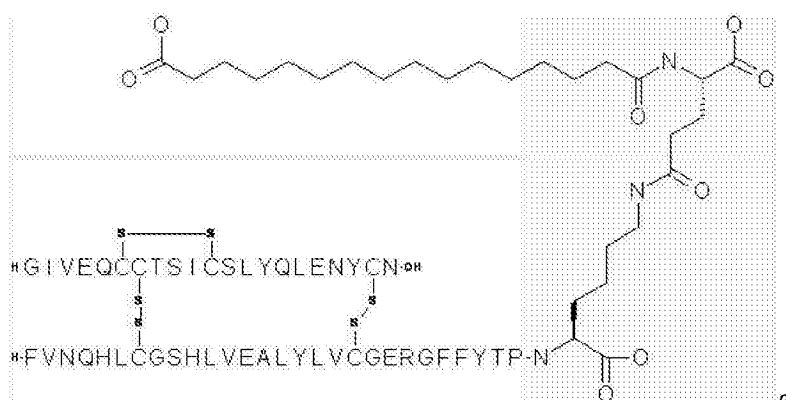


[0806] 及其药学上可接受的盐、酰胺、烷基化合物或酯。

[0807] 116. 如前述任一实施方案限定的药物组合物, 其中所述胰岛素化合物是N-ε-B29-[(S) -4-羧基-4-(15-羧基十五酰基氨基) 丁酰基]desB30人胰岛素

[0808] (化合物G5) :

[0809]



[0810] 117. 如前述任一实施方案限定的药物组合物, 其为单位剂型, 包含约0.01mg至约1000mg, 如约0.1mg至约500mg, 约0.5mg至约5mg, 例如约0.5mg至约200mg如前述任一实施方案限定的GLP-1衍生物。

[0811] 118. 如前述任一实施方案限定的药物组合物, 其适合于肠胃外给药。

[0812] 119. 如前述任一实施方案限定的GLP-1衍生物, 其用于医疗。

[0813] 120. 如前述任一实施方案限定的GLP-1衍生物, 其用于预防和/或治疗2型糖尿病和/或肥胖症。

[0814] 121. 如前述任一实施方案限定GLP-1衍生物, 其用于治疗或预防肥胖症、高血糖症、2型糖尿病、葡萄糖耐量减低和/或1型糖尿病。

[0815] 122. 如前述任一实施方案限定的GLP-1衍生物, 其用于治疗或预防肥胖症。

[0816] 123. 如前述任一实施方案限定的GLP-1衍生物, 其用于治疗或预防高血糖症、2型糖尿病、葡萄糖耐量减低和/或1型糖尿病。

[0817] 124. 如前述任一实施方案限定的GLP-1衍生物, 其用于治疗或预防肥胖症或预防超重, 减少食物摄入, 增加能量消耗, 调节食欲, 诱发饱腹感, 预防成功减重后的体重反弹, 治疗与超重或肥胖相关的疾病或状态, 治疗贪食症, 和/或治疗暴食症。

[0818] 125. 如前述任一实施方案限定的GLP-1衍生物, 其用于治疗或预防2型糖尿病, 治疗葡萄糖耐量减低, 延迟或预防2型糖尿病的疾病进展, 延迟从葡萄糖耐量减低(IGT)到2型糖尿病的进展, 和/或延迟从2型糖尿病到需胰岛素型糖尿病的进展。

[0819] 126. 如前述任一实施方案限定的GLP-1衍生物, 其用于治疗或预防动脉粥样硬化、

高血压、血脂异常、冠心病和/或肝脂质沉着症。

[0820] 127. 根据前述任一实施方案所使用的GLP-1衍生物,其中所述GLP-1衍生物与一种或多种附加的治疗活性化合物联合施用。

[0821] 128. 一种预防和/或治疗2型糖尿病和/或肥胖症的方法,其包括向有需要的患者施用治疗有效量的如前述任一实施方案限定的GLP-1衍生物。

[0822] 129. 一种治疗肥胖症或预防超重的方法,其包括向有需要的患者施用有效量的如前述任一实施方案限定的GLP-1衍生物,任选地与一种或多种附加的治疗活性化合物组合。

[0823] 130. 一种治疗肥胖症、预防超重、减少食物摄入、增加能量消耗、减轻体重、调节食欲、诱发饱腹感、预防成功减重后的体重反弹、治疗与超重或肥胖相关的疾病或状况、治疗贪食症和/或治疗暴食症的方法,其包括向有需要的患者施用有效量的如前述任一实施方案限定的GLP-1衍生物,任选地与一种或多种附加的治疗活性化合物组合。

[0824] 131. 一种治疗或预防2型糖尿病、葡萄糖耐量减低、延迟或预防2型糖尿病的疾病进展、延迟从葡萄糖耐量减低(IGT)到2型糖尿病的进展和/或延迟从2型糖尿病到需胰岛素型糖尿病的进展的方法,其包括向有需要的患者施用有效量的如前述任一实施方案限定的GLP-1衍生物,任选地与一种或多种附加的治疗活性化合物组合。

[0825] 132. 一种治疗或预防动脉粥样硬化、治疗高血压、治疗血脂异常、治疗冠心病和/或治疗肝脂质沉着症的方法,其包括向有需要的患者施用有效量的如前述任一实施方案限定的GLP-1衍生物,任选地与一种或多种附加的治疗活性化合物组合。

[0826] 133. 根据前述任一实施方案所述的治疗方法,其中所述GLP-1衍生物与一种或多种附加的治疗活性化合物联合施用。

[0827] 134. 如前述任一实施方案限定的GLP-1衍生物在制备药物中的用途。

[0828] 135. 如前述任一实施方案限定的GLP-1衍生物在制备用于治疗或预防肥胖症、高血糖症、2型糖尿病、葡萄糖耐量减低和1型糖尿病的药物中的用途。

[0829] 136. 一种GLP-1类似物,其选自:

[0830] [Imp7,Ac8,His9,Tyr16,Lys18,Glu22,Arg26,Leu33,Lys35]-GLP-1-(7-35)-肽酰胺;

[0831] [Imp7,Ac8,His9,Lys18,Glu22,Arg26,Leu33,Lys35]-GLP-1-(7-35)-肽酰胺;

[0832] [Imp7,Aib8,His9,Lys18,Glu22,Arg26,Leu33,Thr35]-GLP-1-(7-35)-肽酰胺;

[0833] [Imp7,Aib8,His9,Arg18,Glu22,Arg26,Leu33,Thr35]-GLP-1-(7-35)-肽酰胺;

[0834] [Imp7,Aib8,His9,Arg18,Arg26,Leu33,Thr35]-GLP-1-(7-35)-肽酰胺;

[0835] [Imp7,Ac8,His9,Lys18,Glu22,Arg26,Leu33,Thr35]-GLP-1-(7-35)-肽酰胺;

[0836] [Imp7,His9,Lys18,Arg23,Arg26,Leu33,Thr35]-GLP-1-(7-35)-肽酰胺;

[0837] [Imp7,His9,Lys18,Arg23,Arg26,Leu33,Gly36]-GLP-1-(7-37)-肽;

[0838] [Imp7,Aib8,His9,Lys18,Lys22,Arg26,Leu33,Gly36]-GLP-1-(7-37)-肽;

[0839] [Imp7,Aib8,His9,Tyr16,Lys18,Glu22,Arg26,Leu33,Lys36]-GLP-1-(7-37)-肽;

[0840] [Imp7,Aib8,His9,Lys18,Lys23,Arg26,Leu33,Thr35]-GLP-1-(7-35)-肽酰胺;

[0841] [Imp7,Aib8,His9,Tyr16,Lys18,Lys23,Arg26,Leu33,Thr35]-GLP-1-(7-35)-肽酰胺;

[0842] [Imp7,His9,Arg18,Arg23,Arg26,Leu33]-GLP-1-(7-34)-肽;

- [0843] [Imp7,His9,Arg18,Glu22,Arg26,Lys27,Leu33,Arg34]-GLP-1-(7-34)-肽;
[0844] [Imp7,Aib8,His9,Arg18,Glu22,Arg26,Lys27,Leu33,Arg34]-GLP-1-(7-34)-肽;
[0845] [Imp7,Acb8,His9,Lys18,Arg23,Arg26,Leu33,Thr35]-GLP-1-(7-35)-肽酰胺;
[0846] [Imp7,Acb8,His9,Tyr16,Lys18,Glu22,Arg26,Leu33,Lys35]-GLP-1-(7-35)-肽酰胺;
[0847] [Imp7,Acb8,His9,Tyr16,Arg18,Glu22,Arg26,Leu33,Arg34,Lys35]-GLP-1-(7-35)-肽酰胺;
[0848] [Imp7,Acb8,His9,Tyr16,Lys18,Arg22,Arg26,Leu33,Lys35]-GLP-1-(7-35)-肽酰胺;
[0849] [Imp7,Acb8,His9,Tyr16,Lys18,Arg22,Arg23,Arg26,Leu33,Lys35]-GLP-1-(7-35)-肽酰胺;
[0850] [Imp7,Aib8,His9,Lys18,Glu22,Arg26,Leu33,Thr35]-GLP-1-(7-35)-肽;
[0851] [Imp7,Acb8,His9,Tyr16,Lys18,Arg23,Arg26,Leu33,Lys35]-GLP-1-(7-35)-肽酰胺;
[0852] [Imp7,Acb8,His9,Tyr16,Arg18,Arg23,Arg26,Leu33,Arg34,Lys35]-GLP-1-(7-35)-肽酰胺;
[0853] [Imp7,Aib8,His9,Lys18,Glu22,Arg26,Leu33,Thr35]-GLP-1-(7-35)-肽酰胺;
[0854] [Imp7,Aib8,His9,Lys18,Ala22,Arg23,Arg26,Leu33,Gly36]-GLP-1-(7-37)-肽;
[0855] [Imp7,Acb8,His9,Lys18,Lys22,Arg23,Arg26,Leu33,Thr35]-GLP-1-(7-35)-肽酰胺;
[0856] [Imp7,Acb8,His9,Lys18,Lys22,Arg26,Leu33,Thr35]-GLP-1-(7-35)-肽酰胺;
[0857] [Imp7,Aib8,His9,Lys18,Ala22,Arg26,Leu33,Thr35]-GLP-1-(7-35)-肽酰胺;
[0858] [Imp7,Aib8,His9,Arg18,Arg23,Arg26,Leu33,Ala36]-GLP-1-(7-37)-肽;
[0859] [Imp7,Aib8,His9,Arg18,Arg23,Arg26,Leu33,Ser36]-GLP-1-(7-37)-肽;
[0860] [Imp7,Gly8,His9,Arg18,Glu22,Arg26,Leu33,Thr35]-GLP-1-(7-35)-肽酰胺;
[0861] [Imp7,Aib8,His9,Leu16,Lys18,Glu22,Arg26,Leu33,Thr35]-GLP-1-(7-35)-肽酰胺;以及
[0862] [Imp7,Aib8,His9,Lys18,Glu22,Arg26,Ile33,Thr35]-GLP-1-(7-35)-肽酰胺;
[0863] 或其药学上可接受的盐。

实施例

[0864] 参照以下实施例进一步阐述本发明,这些实施例绝非旨在限制所请求保护的本发明的范围。

[0865] 缩写列表

- [0866] BOC: 叔丁氧羰基
[0867] DCM: 二氯甲烷
[0868] DIC: 二异丙基碳二亚胺
[0869] Fmoc: 9-芴基甲氧羰基
[0870] HFIP 1,1,1,3,3,3-六氟-2-异丙醇

- [0871] HOAt: 1-羟基-7-氮杂苯并三唑
[0872] HPLC: 高效液相色谱法
[0873] LCMS: 液相色谱质谱法
[0874] MeCN: 乙腈
[0875] Mtt: 4-甲基三苯甲基
[0876] NMP: N-甲基吡咯烷酮
[0877] Oxyrna Pure: 氰基-肟基-乙酸乙酯
[0878] Pbf: 2,2,4,6,7-五甲基二氢苯并呋喃-5-磺酰基
[0879] RP: 反相
[0880] RP-HPLC: 反相高效液相色谱法
[0881] RT: 室温
[0882] Rt: 保留时间
[0883] SPPS: 固相肽合成
[0884] TFA: 三氟乙酸
[0885] TIPS: 三异丙基硅烷
[0886] Trt: 三苯甲基
[0887] UPLC: 超高效液相色谱法
[0888] 10EE: 10的幂(例如“10EE (X)”是指数字10的(X)次幂,或
[0889] 简写为数字10^(X),即5×10EE3为5×10³)

[0890] 通用方法

[0891] 该部分涉及用于合成树脂结合的肽的方法(SPPS法,包括氨基酸脱保护方法,从树脂上切下肽的方法及其纯化方法),以及用于检测和表征所得到的肽的方法(LCMS和UPLC法)。

[0892] 基本上根据下述通用程序来制备、纯化和分析本文实施例1-42中的化合物。

[0893] SPPS通用方法

[0894] 使用的Fmoc保护的氨基酸衍生物是推荐的标准物:由例如Anaspec、Bachem、Iris Biotech或NovabioChem提供的Fmoc-Ala-OH、Fmoc-Arg (Pbf) -OH、Fmoc-Asn (Trt) -OH、Fmoc-Asp (OtBu) -OH、Fmoc-Cys (Trt) -OH、Fmoc-Gln (Trt) -OH、Fmoc-Glu (OtBu) -OH、Fmoc-Gly-OH、Fmoc-His (Trt) -OH、Fmoc-Ile-OH、Fmoc-Leu-OH、Fmoc-Lys (Boc) -OH、Fmoc-Met-OH、Fmoc-Phe-OH、Fmoc-Pro-OH、Fmoc-Ser (tBu) -OH、Fmoc-Thr (tBu) -OH、Fmoc-Trp (BOC) -OH、Fmoc-Tyr (tBu) -OH、Fmoc-Val-OH和Fmoc-Lys (Mtt) -OH或Fmoc-Lys (Alloc) -OH。使用3-(N-1-三苯甲基-咪唑-4-基)-丙酸并入N末端Imp。

[0895] 使用Mtt保护的赖氨酸(Fmoc-Lys (Mtt) -OH) 或Alloc保护的赖氨酸(Fmoc-Lys (Alloc) -OH) 来实现取代基向赖氨酸的ε-氮上的引入。使用经适当保护的结构单元如Fmoc-8-氨基-3,6-二氧杂辛酸、Fmoc-Glu-OtBu以及上述经保护的标准氨基酸用于取代基的引入。使用单叔丁基化二酸如18-叔丁氧基-18-氧代-十八烷酸来实现脂肪酸部分的引入。

[0896] 在来自Protein Technologies (Tucson, AZ 85714 U.S.A.) 的Prelude固相肽合成仪上以100或250-μmol的规模进行SPPS。使用Rink Amide AM聚苯乙烯树脂(Novabiochem, 负载例如0.62mmol/g) 或预负载的Wang树脂(例如Novabiochem) 作为固体支持物。使用含

20%哌啶的NMP进行Fmoc脱保护。在NMP中,使用与树脂相比过量的氨基酸/Oxyma Pure®/DIC/可力丁(100μmol规模:10:9:9:9;250μmol规模:7:6:6:6)的混合物进行偶联。或者,可使用DEPbt(3-(二乙氧基磷酰氧基)-1,2,3-苯并三嗪-4(3H)-酮)/DIPEA用于偶联过程中例如His的差向异构化的抑制。在脱保护与偶联步骤之间进行NMP和DCM顶部洗涤(5-7ml, 0.5min,各2×2)。偶联时间通常为60分钟。一些氨基酸,包括但不限于Fmoc-Arg(Pbf)-OH、Fmoc-Aib-OH或Boc-His(Trt)-OH,以及包含取代基的结构单元,是“双偶联的”,意指在第一次偶联(例如60min)后,排出树脂并添加更多的试剂(氨基酸、(HOAt或Oxyma Pure®)、DIC和可力丁),并使混合物再次反应(例如60min)。

[0897] 如果使用Fmoc-Lys(Mtt)-OH,则如下除去Mtt基团:用HFIP/DCM(75:25)洗涤树脂(2×2min),用DCM洗涤,并将树脂悬浮在HFIP/DCM(75:25)中(2×20min),随后依次用哌啶/NMP(20:80)、DCM(1×)、NMP(1×)、DCM(1×)、NMP(1×)洗涤。

[0898] 如果使用Fmoc-Lys(Alloc)-OH,则可如下除去Alloc基团:在一种或多种清除剂组合,例如吗啉(6.0当量)和/或二甲基硼烷络合物(18.0当量)的存在下,用Pd(PPh₃)₄(0.02当量)处理树脂(30min)。然后分别用MeOH、NMP或DMF和IPA(异丙醇)洗涤树脂,然后可在赖氨酸部分的ε-位置处引入取代基。

[0899] 从树脂上切割

[0900] 在合成后,用DCM洗涤树脂,并通过用TFA/TIPS/水(95/2.5/2.5)或TFA/EDT(1,2-乙二硫醇)/水(90/5/5)处理2-3小时从树脂上切下肽,随后用Et₂O(二乙醚)或IPE(二异丙醚)沉淀。用所使用的溶剂洗涤沉淀物。

[0901] 纯化和定量

[0902] 将粗肽在60℃下在水和MeCN的适当混合物如水/MeCN(4:1)或水/AcOH(1:1)中溶解1小时,并在包含C8-或C18-硅胶的柱上通过反相制备型HPLC(Waters Deltaprep 4000或Gilson)进行纯化。利用在包含0.1%TFA的水中逐渐增加的MeCN梯度进行洗脱。通过分析型HPLC或UPLC检查相关级分。合并并减压浓缩包含纯目标肽的级分。可使用另一梯度,例如含有0.05M NH₄HCO₃,来引入额外的纯化步骤。分析(HPLC、LCMS)所得到的溶液,并使用化学发光氮特异性HPLC检测器(Antek 8060HPLC-CLND)或通过测量280nm处的UV吸光度来对产物进行定量。将产物分装到玻璃小瓶中。小瓶用Millipore玻璃纤维预过滤器封盖。冷冻干燥得到呈白色固体的肽三氟乙酸盐。

[0903] 可通过柱离子交换,例如使用在MeCN中的NaOAc,使肽三氟乙酸盐变成钠盐。或者,可通过柱色谱法,例如用含有0.05M NH₄HCO₃的梯度,使肽三氟乙酸盐变成铵盐,随后冷冻干燥并悬浮于水中。通过添加1M NaOH(根据碱性/酸性残基的当量)使悬浮液变澄清而使肽变成钠盐。最后,可通过冷冻干燥分离肽钠盐。

[0904] 检测和表征方法

[0905] LCMS法

[0906] 方法:LCMS01

[0907]

系统	LC-系统: Waters Acquity UPLC 柱: Waters Acquity UPLC BEH, C-18, 1.7 μ m, 2.1mm $\times$ 50mm 检测器: Waters (Micromass) LCT Premier XE
检测器设置	电离方法: ES 扫描范围: 500 – 2000 amu 运行模式: W 模式 正/负: 正离子模式

[0908]

	锥电压: 50 V 扫描时间: 1.0 s
条件	线性梯度: 5%到 95% B 梯度运行时间: 4.0 分钟 总运行时间: 7.0 分钟 流速: 0.4 ml/min 柱温: 40°C
洗脱剂	溶剂 A: 99.90% MQ-水, 0.1%甲酸 溶剂 B: 99.90%乙腈, 0.1%甲酸 溶剂 C: NA
结果说明和确认	测得质量为化合物的实测质量 测得 M/z 为化合物的实测分子离子 (M+z)/z 计算质量为预期化合物的分子量

[0909] 方法:LCMS13

[0910]

系统	系统：Waters Acquity UPLC SQD 2000 柱：Acquity UPLC BEH 1.7 μ C18 100 Å 2.1 $\times$ 100 mm 检测器：UV：PDA，SQD 2000
检测器设置	电离方法：ES+ 扫描范围：500-2000 锥电压：60 V 扫描时间：0.5 s
条件	线性梯度：10%到 90% B 梯度运行时间：3 min 总运行时间：4 min 流速：0.3 ml/min 柱温：40°C PDA：210-400 nm
洗脱剂	溶剂 A：99.90% H ₂ O，0.1% TFA 溶剂 B：99.90% CH ₃ CN，0.1% TFA 溶剂 C：NA
结果说明和确认	测得质量为化合物的实测质量 测得 M/z 为化合物的实测分子离子 (M+z)/z 计算质量为预期化合物的分子量

[0911] UPLC法

[0912] 方法:UPLC02

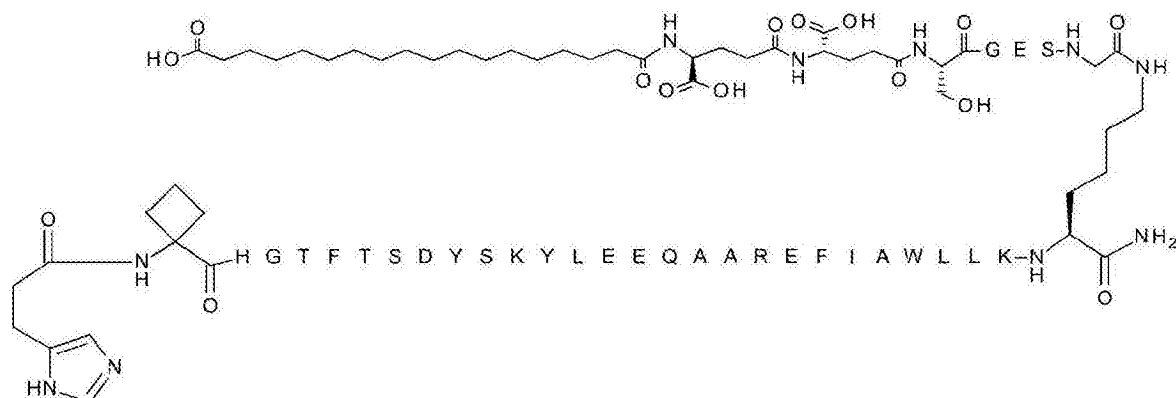
[0913]

系统	系统：Waters Acquity UPLC 系统 柱：ACQUITY UPLC BEH C18, 1.7 μ m, 2.1 mm $\times$ 150 mm 柱 检测器：Waters Acquity TUV 检测器
检测器设置	214nm 和 254nm
条件	线性梯度：5%到 95% B 梯度运行时间：16 分钟 流速：0.40 ml/min 固定 柱温：40°C
洗脱液	溶剂 A：99.95%水，0.05%三氟乙酸 溶剂 B：99.95%乙腈，0.05%三氟乙酸

[0914] 实施例1

[0915] N^{e35}-[2-[[(2S)-2-[[(2S)-4-羧基-2-[[2-[[(2S)-2-[[(4S)-4-羧基-4-[[(4S)-

4-羧基-4-(17-羧基十七酰基氨基)丁酰基]氨基]丁酰基]氨基]-3-羟基丙酰基]氨基]乙酰基]氨基]丁酰基]氨基]-3-羟基丙酰基]氨基]乙酰基]-[Imp7,Ac8,His9,Tyr16,Lys18,Glu22,Arg26,Leu33,Lys35]-GLP-1-(7-35)-肽酰胺
[0916]



(化学式 1)

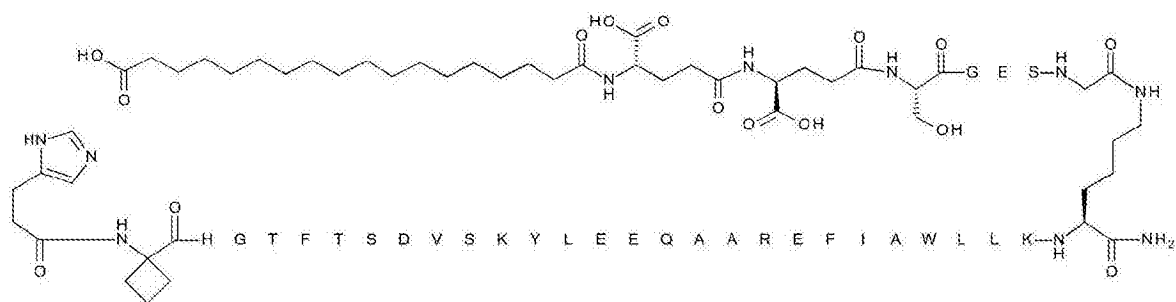
[0917] UPLC02:Rt=8.7min

[0918] LCMS01:计算m/1=4423;实测m/3=1475;实测m/4=1107;实测m/5=886

[0919] 实施例2

[0920] $N^{\epsilon 35}$ -[2-[[(2S)-2-[[(2S)-4-羧基-2-[[2-[[(2S)-2-[[(4S)-4-羧基-4-[[(4S)-4-羧基-4-(17-羧基十七酰基氨基)丁酰基]氨基]丁酰基]氨基]-3-羟基丙酰基]氨基]乙酰基]氨基]丁酰基]氨基]-3-羟基丙酰基]氨基]乙酰基]-[Imp7,Ac8,His9,Lys18,Glu22,Arg26,Leu33,Lys35]-GLP-1-(7-35)-肽酰胺

[0921]



(化学式 2)

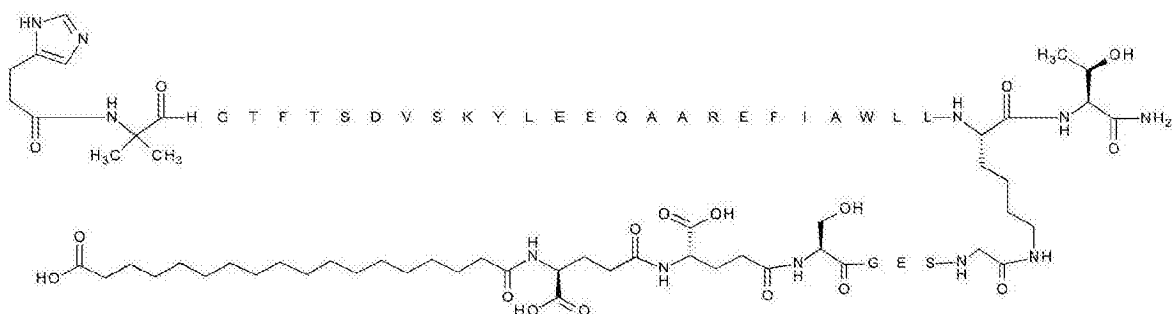
[0922] UPLC02:Rt=8.3

[0923] LCMS01:Rt=2.2min;计算m/1=4359;实测m/1=4359;实测m/3=1453;实测m/4=1091;实测m/5=873

[0924] 实施例3

[0925] $N^{\epsilon 34}$ -[2-[[(2S)-2-[[(2S)-4-羧基-2-[[2-[[(2S)-2-[[(4S)-4-羧基-4-[[(4S)-4-羧基-4-(17-羧基十七酰基氨基)丁酰基]氨基]丁酰基]氨基]-3-羟基丙酰基]氨基]乙酰基]氨基]丁酰基]氨基]-3-羟基丙酰基]氨基]乙酰基]-[Imp7,Aib8,His9,Lys18,Glu22,Arg26,Leu33,Thr35]-GLP-1-(7-35)-肽酰胺

[0926]



[0927] (化学式 3)

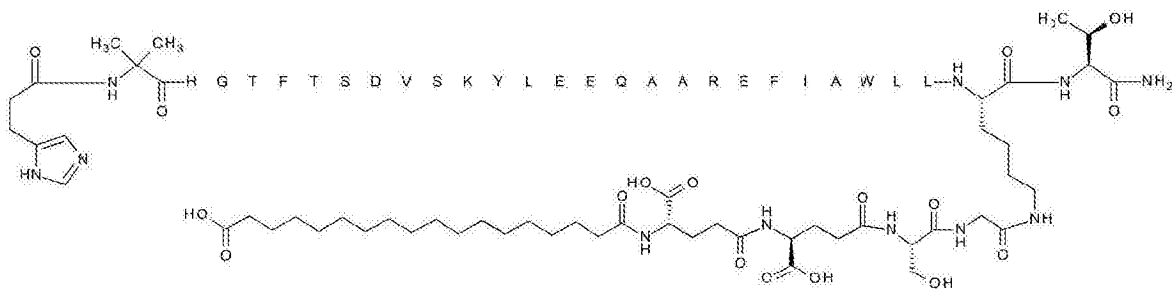
[0928] UPLC02:Rt=8.8min

[0929] LCMS01:Rt=2.3分钟;计算m/1=4320;实测m/1=4320;实测m/3=1441;实测m/4=1081;实测m/5=865

[0930] 实施例4

[0931] N^{e34} -[2-[[(2S)-2-[[(4S)-4-羧基-4-[[(4S)-4-羧基-4-(17-羧基十七酰基氨基)丁酰基]氨基]丁酰基]氨基]-3-羟基丙酰基]氨基]乙酰基]-[Imp7,Aib8,His9,Lys18,Glu22,Arg26,Leu33,Thr35]-GLP-1-(7-35)-肽酰胺

[0932]



(化学式 4)

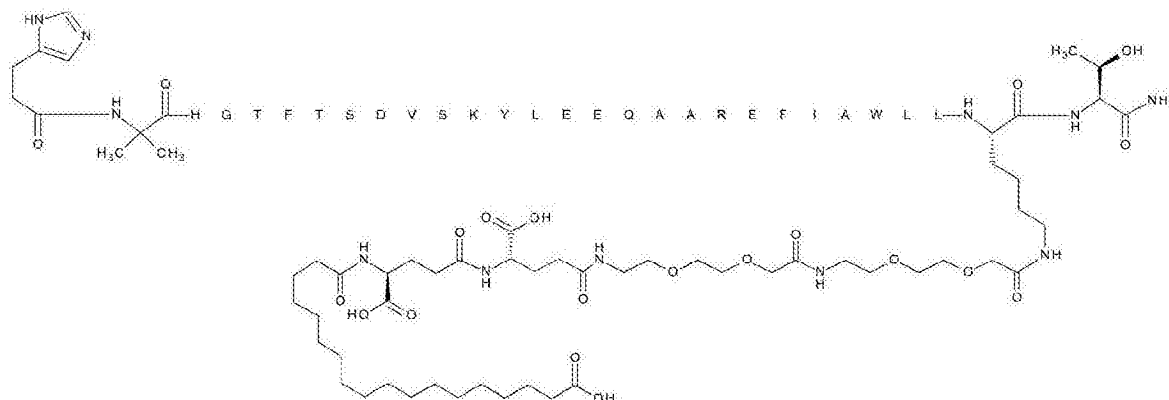
[0933] UPLC02:Rt=9.1min

[0934] LCMS01:Rt=2.3min;计算m/1=4046;实测m/3=1350;实测m/4=1012;实测m/5=810;实测m/z=4047;

[0935] 实施例5

[0936] N^{e34} -[2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[(4S)-4-羧基-4-[[(4S)-4-羧基-4-(17-羧基十七酰基氨基)丁酰基]氨基]丁酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基]-[Imp7,Aib8,His9,Lys18,Glu22,Arg26,Leu33,Thr35]-GLP-1-(7-35)-肽酰胺

[0937]



(化学式 5)

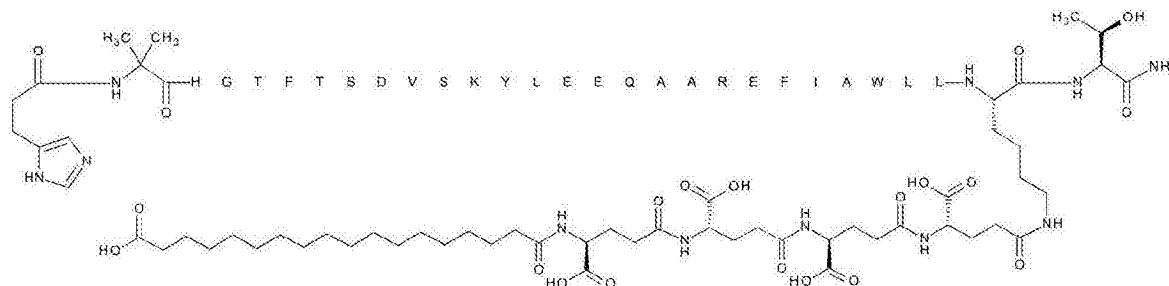
[0938] UPLC02:Rt=9.0min

[0939] LCMS01:RT=2.3min;计算m/1=4193;实测m/3=1398;实测m/4=1049;实测m/5=839;实测m/z=4193;

[0940] 实施例6

[0941] N^{e34}-[(4S)-4-羧基-4-[[(4S)-4-羧基-4-[[(4S)-4-羧基-4-[[(4S)-4-羧基-4-(17-羧基十七酰基氨基)丁酰基]氨基]丁酰基]氨基]丁酰基]氨基]丁酰基]-[Imp7,Aib8,His9,Lys18,Glu22,Arg26,Leu33,Thr35]-GLP-1-(7-35)-肽酰胺

[0942]



(化学式 6)

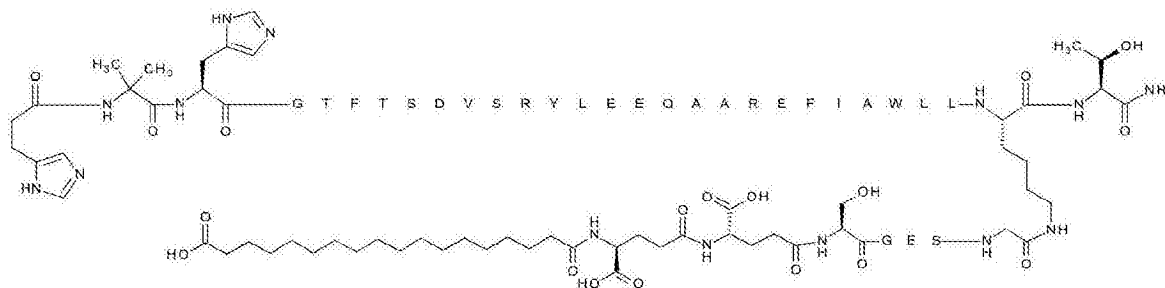
[0943] UPLC02:Rt=9.0min

[0944] LCMS01:RT=2.3min;计算m/1=4161;实测m/3=1388;实测m/4=1041;实测m/5=833;实测m/z=4162

[0945] 实施例7

[0946] N^{e34}-[2-[[(2S)-2-[[(2S)-4-羧基-2-[[2-[[(2S)-2-[[(4S)-4-羧基-4-[[(4S)-4-羧基-4-(17-羧基十七酰基氨基)丁酰基]氨基]丁酰基]氨基]-3-羟基丙酰基]氨基]乙酰基]氨基]丁酰基]氨基]-3-羟基丙酰基]氨基]乙酰基]-[Imp7,Aib8,His9,Arg18,Glu22,Arg26,Leu33,Thr35]-GLP-1-(7-35)-肽酰胺

[0947]



(化学式 7)

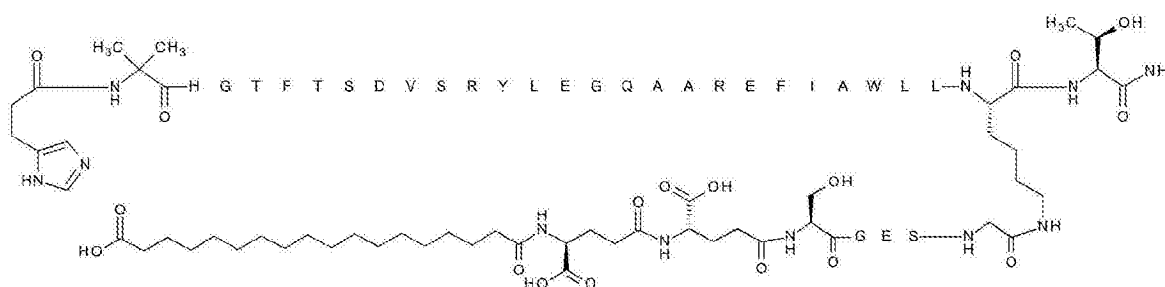
[0948] UPLC02:Rt=8.9min

[0949] LCMS01:Rt=2.3min;计算m/1=4348;实测m/1=4348;实测m/3=1449;实测m/4=1087;实测m/5=870

[0950] 实施例8

[0951] N^{ε34}-[2-[[(2S)-2-[[(2S)-4-羧基-2-[[2-[[(2S)-2-[[(4S)-4-羧基-4-[[(4S)-4-羧基-4-(17-羧基十七酰基酰基) 丁酰基]氨基]丁酰基]氨基]-3-羟基丙酰基]氨基]乙酰基]氨基]丁酰基]氨基]-3-羟基丙酰基]氨基]乙酰基]-[Imp7,Aib8,His9,Arg18,Arg26,Leu33,Thr35]-GLP-1-(7-35)-肽酰胺

[0952]



(化学式 8)

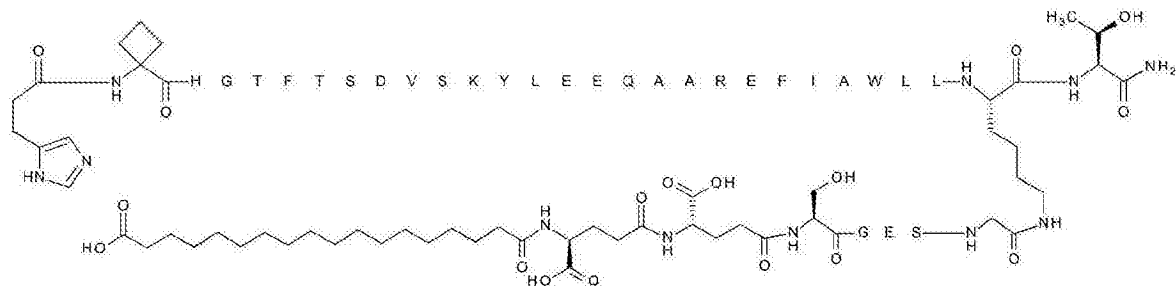
[0953] UPLC02:Rt=9.0min

[0954] LCMS01; Rt=2.3min; 计算m/1=4276; 实测m/1=4276; 实测m/3=1426; 实测m/4=1070; 实测m/5=856

[0955] 实施例9

[0956] $\text{N}^{\epsilon 34}$ -[2-[[(2S)-2-[[(2S)-4-羧基-2-[[2-[[(2S)-2-[[(4S)-4-羧基-4-[[(4S)-4-羧基-4-(17-羧基十七酰基氨基) 丁酰基]氨基]丁酰基]氨基]-3-羟基丙酰基]氨基]乙酰基]氨基]丁酰基]氨基]-3-羟基丙酰基]氨基]乙酰基]-[Imp7, Acb8, His9, Lys18, Glu22, Arg26, Leu33, Thr35]-GLP-1-(7-35)-肽酰胺

[0957]



(化学式 9)

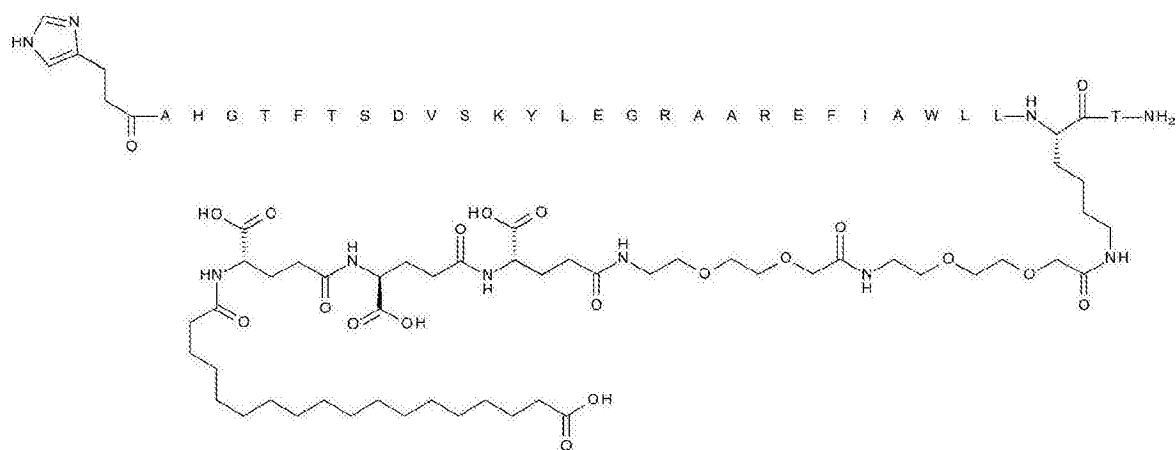
[0958] UPLC02:Rt=8.9min

[0959] LCMS01:Rt=2.3min;计算m/1=4332;实测m/1=4332;实测m/3=1445;实测m/4=1084;实测m/5=867

[0960] 实施例10

[0961] $N^{\epsilon 34}$ -[2-[2-[2-[2-[2-[2-[[(4S)-4-羧基-4-[[(4S)-4-羧基-4-[[(4S)-4-羧基-4-(17-羧基十七酰基氨基)丁酰基]氨基]丁酰基]氨基]丁酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基]-[Imp7,His9,Lys18,Arg23,Arg26,Leu33,Thr35]-GLP-1-(7-35)-肽酰胺

[0962]



(化学式 10)

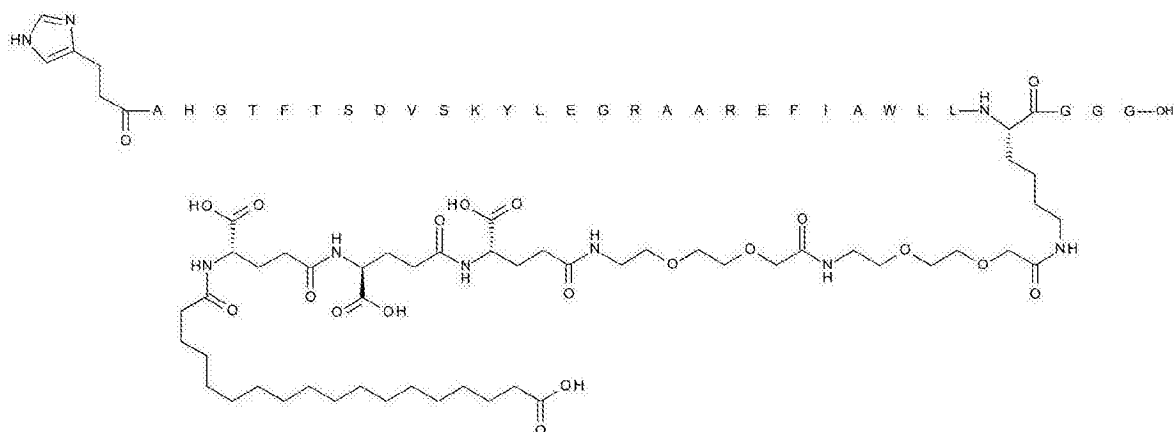
[0963] UPLC02:Rt=8.6min

[0964] LCMS13:Rt=2.3min;计算m/1=4264;实测m/3=1422;实测m/4=1067

[0965] 实施例11

[0966] $N^{\epsilon 34}$ -[2-[2-[2-[2-[2-[2-[[(4S)-4-羧基-4-[[(4S)-4-羧基-4-[[(4S)-4-羧基-4-(17-羧基十七酰基氨基)丁酰基]氨基]丁酰基]氨基]丁酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基]-[Imp7,His9,Lys18,Arg23,Arg26,Leu33,Gly36]-GLP-1-(7-37)-肽

[0967]



(化学式 11)

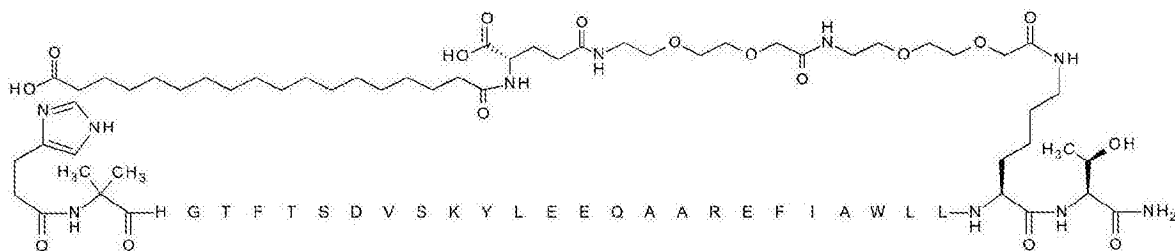
[0968] UPLC02:Rt=8.7min

[0969] LCMS13:Rt=2.3min;计算m/1=4335;实测m/3=1445;实测m/4=1084

[0970] 实施例12

[0971] $N^{\epsilon 34}$ -[2-[2-[2-[2-[2-[2-[[(4S)-4-羧基-4-(17-羧基十七酰基氨基)丁酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基]-[Imp7,Aib8,His9,Lys18,Glu22,Arg26,Leu33,Thr35]-GLP-1-(7-35)-肽酰胺

[0972]



(化学式 12)

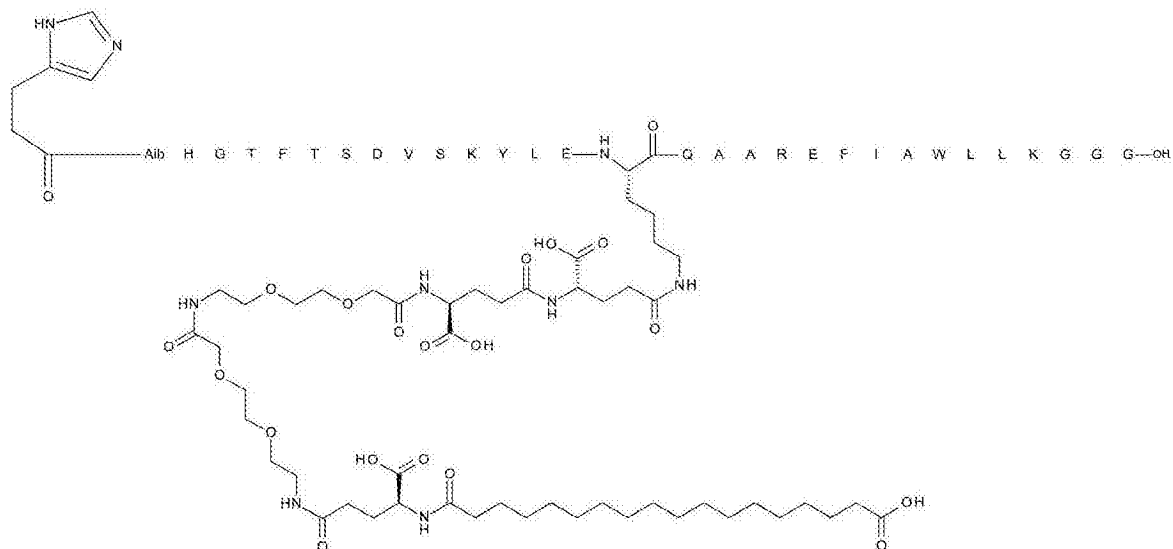
[0973] UPLC02:Rt=9.3min

[0974] LCMS01:Rt=2.3min;计算m/1=4064;实测m/1=4064;实测m/3=1356;实测m/4=1017

[0975] 实施例13

[0976] $N^{\epsilon 22}$ -[(4S)-4-羧基-4-[[(4S)-4-羧基-4-[[2-[2-[2-[2-[2-[2-[[(4S)-4-羧基-4-(17-羧基十七酰基氨基)丁酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基]氨基]丁酰基]氨基]丁酰基]-[Imp7,Aib8,His9,Lys18,Lys22,Arg26,Leu33,Gly36]-GLP-1-(7-37)-肽

[0977]



(化学式 13)

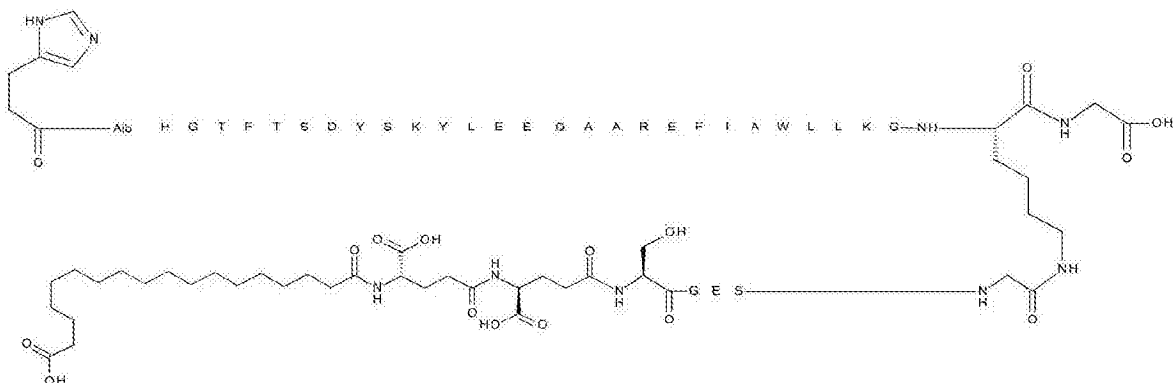
[0978] UPLC02:Rt=8.4min

[0979] LCMS01:Rt=2.2min;计算m/1=4392;实测m/1=4392;实测m/3=1465;实测m/4=1099

[0980] 实施例14

[0981] $N^{\epsilon 36}$ -[2-[[(2S)-2-[[(2S)-4-羧基-2-[[2-[[(2S)-2-[[(4S)-4-羧基-4-[[(4S)-4-羧基-4-(17-羧基十七酰基氨基)丁酰基]氨基]丁酰基]氨基]-3-羟基丙酰基]氨基]乙酰基]氨基]丁酰基]氨基]-3-羟基丙酰基]氨基]乙酰基]-[Imp7,Aib8,His9,Tyr16,Lys18,Glu22,Arg26,Leu33,Lys36]-GLP-1-(7-37)-肽

[0982]



(化学式 14)

[0983] UPLC02:Rt=8.2min

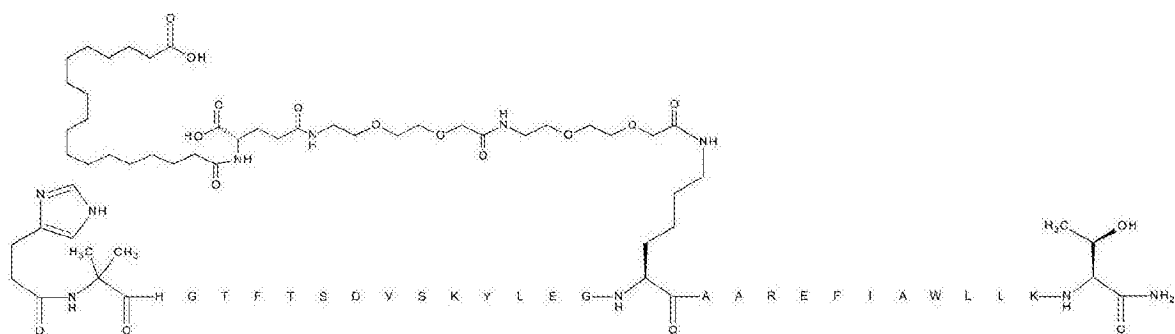
[0984] LCMS01:Rt=2.1min;计算m/1=4526;实测m/1=4526;实测m/3=1510;实测m/4=1133

[0985] 实施例15

[0986] $N^{\epsilon 23}$ -[2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[(4S)-4-羧基-4-(17-羧基十七酰基氨基)丁酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基]-[Imp7,Aib8,His9,Lys18,

Lys23,Arg26,Leu33,Thr35]-GLP-1-(7-35)-肽酰胺

[0987]



(化学式 15)

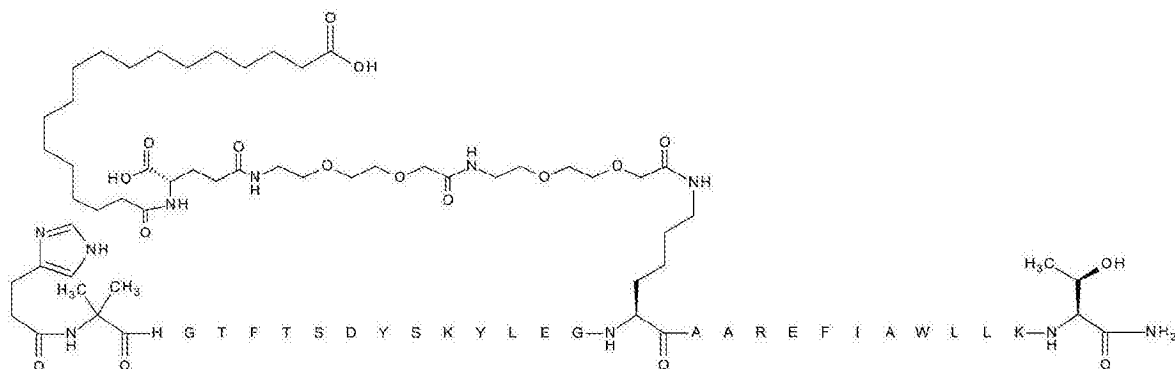
[0988] UPLC02:Rt=8.8min

[0989] LCMS01:Rt=2.3min;计算m/1=3992;实测m/1=3992;实测m/3=1332;实测m/4=999

[0990] 实施例16

[0991] $N^{\epsilon 23}$ -[2-[2-[2-[2-[2-[2-[(4S)-4-羧基-4-(17-羧基十七酰基氨基)丁酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]-[Imp7,Aib8,His9,Tyr16,Lys18,Lys23,Arg26,Leu33,Thr35]-GLP-1-(7-35)-肽酰胺

[0992]



(化学式 16)

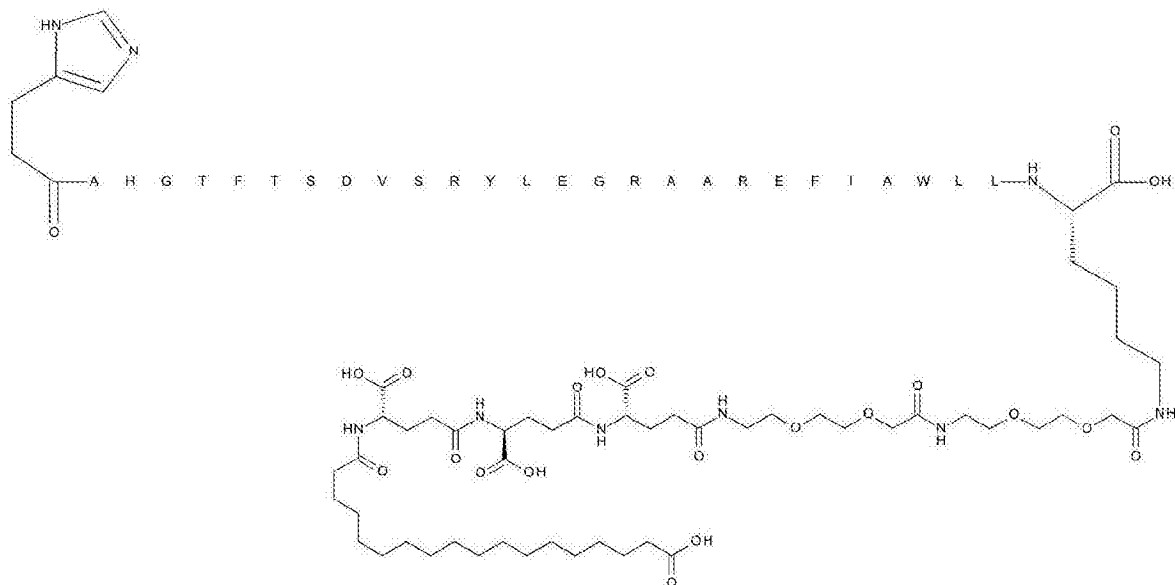
[0993] UPLC02:Rt=8.6min

[0994] LCMS01:Rt=2.3min;计算m/1=4056;实测m/1=4055;实测m/3=1353;实测m/4=1015

[0995] 实施例17

[0996] $N^{\epsilon 34}$ -[2-[2-[2-[2-[2-[2-[(4S)-4-羧基-4-[(4S)-4-羧基-4-[(4S)-4-羧基-4-(17-羧基十七酰基氨基)丁酰基]氨基]丁酰基]氨基]丁酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]-[Imp7,His9,Arg18,Arg23,Arg26,Leu33]-GLP-1-(7-34)-肽

[0997]



(化学式 17)

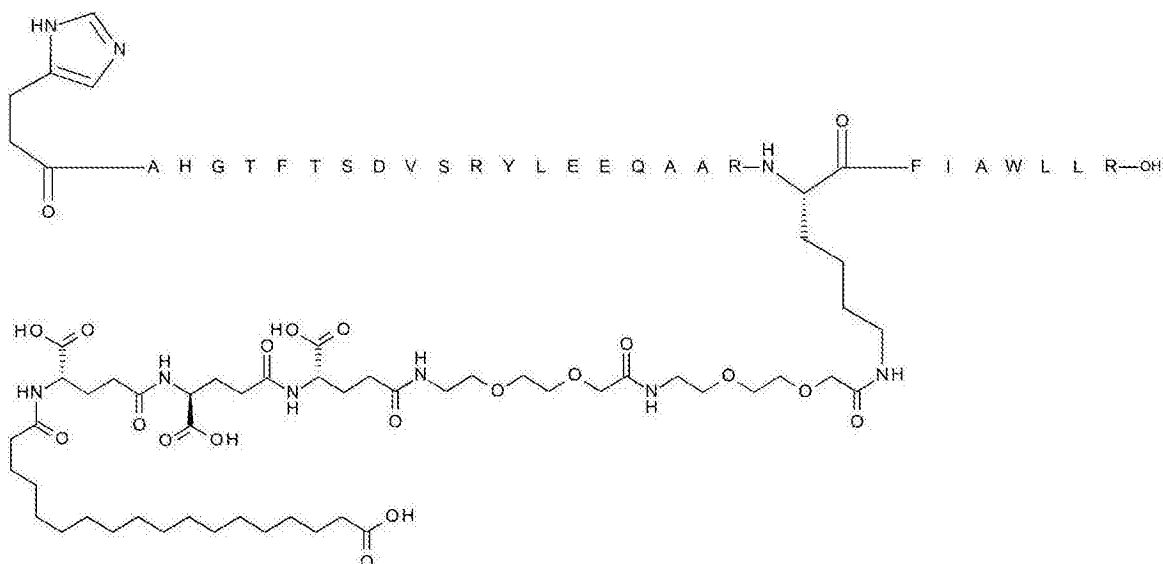
[0998] UPLC02:Rt=9.5min

[0999] LCMS01:Rt=2.9min;计算m/1=4192;实测m/1=4192;实测m/3=1398;实测m/4=1049

[1000] 实施例18

[1001] N^{e27}-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[[(4S)-4-羧基-4-[[(4S)-4-羧基-4-[[(4S)-4-羧基-4-(17-羧基十七酰基氨基)丁酰基]氨基]丁酰基]氨基]丁酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基]-[Imp7,His9,Arg18,Glu22,Arg26,Lys27,Leu33,Arg34]-GLP-1-(7-34)-肽

[1002]



(化学式 18)

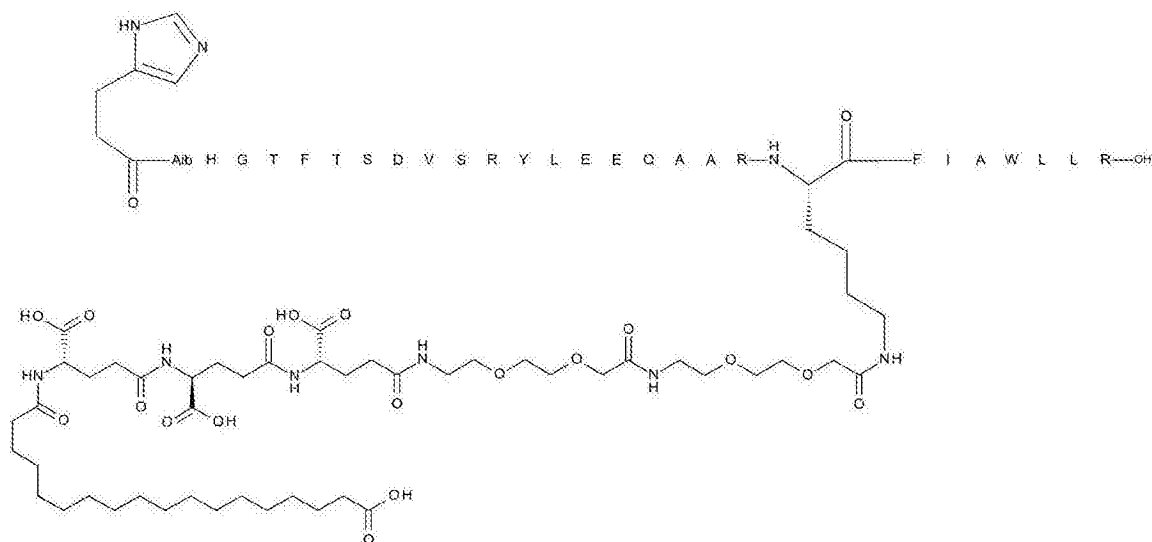
[1003] UPLC02:Rt=8.7min

[1004] LCMS01:Rt=2.1min;计算m/1=4263;实测m/3=1422;实测m/4=1067;实测m/5=853

[1005] 实施例19

[1006] N^{ε27}-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[(4S)-4-羧基-4-[[(4S)-4-羧基-4-[[(4S)-4-羧基-4-(17-羧基十七酰基氨基)丁酰基]氨基]丁酰基]氨基]丁酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基]-[Imp7,Aib8,His9,Arg18,Glu22,Arg26,Lys27,Leu33,Arg34]-GLP-1-(7-34)-肽

[1007]



(化学式 19)

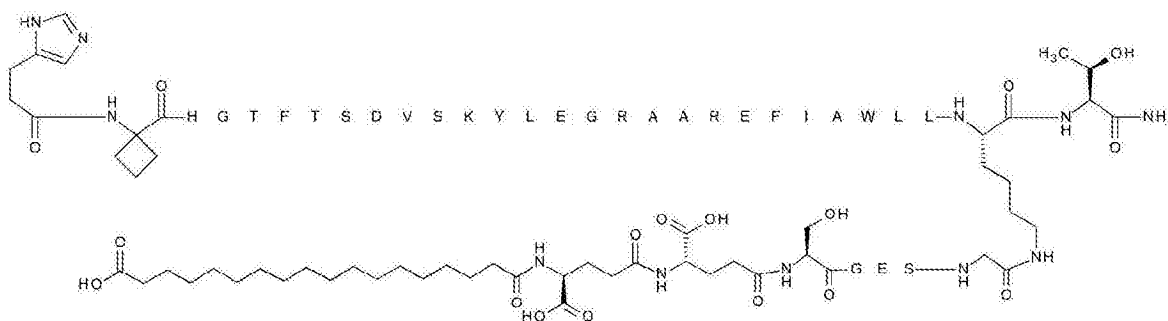
[1008] UPLC02:Rt=8.7min

[1009] LCMS01:Rt=2.2min;计算m/1=4277;实测m/3=1426;实测m/4=1070;实测m/5=856

[1010] 实施例20

[1011] N^{ε34}-[2-[[(2S)-2-[[(2S)-4-羧基-2-[2-[[(2S)-2-[[(4S)-4-羧基-4-[[(4S)-4-羧基-4-(17-羧基十七酰基氨基)丁酰基]氨基]丁酰基]氨基]-3-羟基丙酰基]氨基]乙酰基]氨基]丁酰基]氨基]-3-羟基丙酰基]氨基]乙酰基]-[Imp7,Acb8,His9,Lys18,Arg23,Arg26,Leu33,Thr35]-GLP-1-(7-35)-肽酰胺

[1012]



(化学式 20)

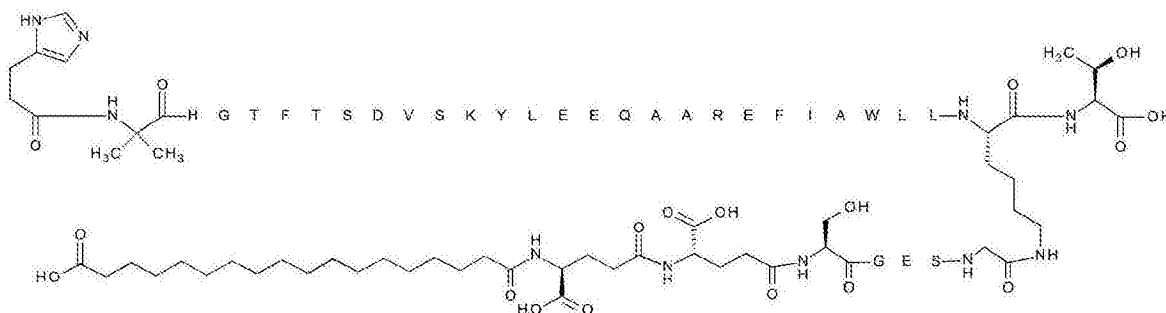
[1013] UPLC02:Rt=8.6min

978

[1034] 实施例25

[1035] $N^{\epsilon 34}$ -[2-[[(2S)-2-[[(2S)-4-羧基-2-[[2-[[(2S)-2-[[(4S)-4-羧基-4-[[(4S)-4-羧基-4-(17-羧基十七酰基氨基)丁酰基]氨基]丁酰基]氨基]-3-羟基丙酰基]氨基]乙酰基]氨基]丁酰基]氨基]-3-羟基丙酰基]氨基]乙酰基]-[Imp7,Aib8,His9,Lys18,Glu22,Arg26,Leu33,Thr35]-GLP-1-(7-35)-肽

[1036]



(化学式 25)

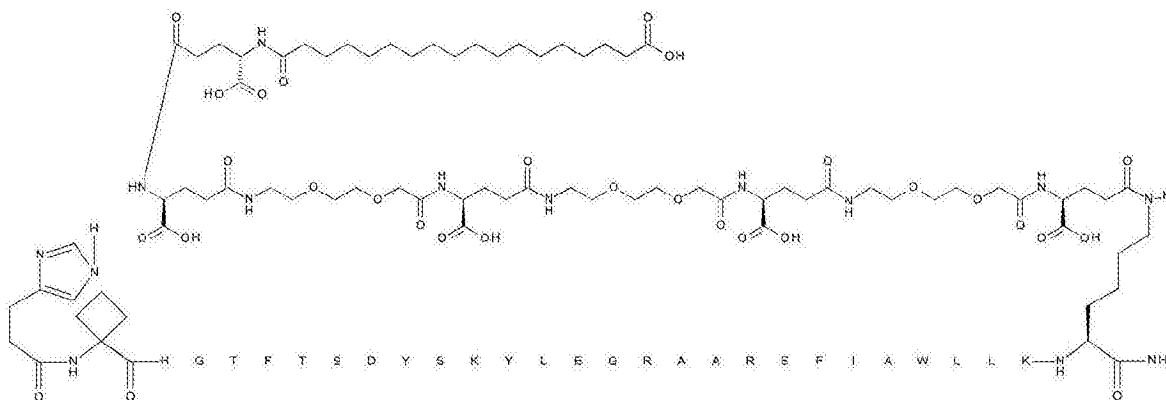
[1037] UPLC02:Rt=9.0min

[1038] LCMS01:Rt=2.2min;计算m/1=4321;实测m/3=1441;实测m/4=1081;实测m/5=865

[1039] 实施例26

[1040] $N^{\epsilon 35}$ -[(4S)-4-羧基-4-[[2-[2-[2-[[(4S)-4-羧基-4-[[2-[2-[2-[[(4S)-4-羧基-4-[[2-[2-[2-[[(4S)-4-羧基-4-[[(4S)-4-羧基-4-(17-羧基十七酰基氨基)丁酰基]氨基]丁酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基]氨基]丁酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基]氨基]丁酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基]氨基]丁酰基]-[Imp7,Aib8,His9,Tyr16,Lys18,Arg23,Arg26,Leu33,Lys35]-GLP-1-(7-35)-肽酰胺

[1041]



(化学式 26)

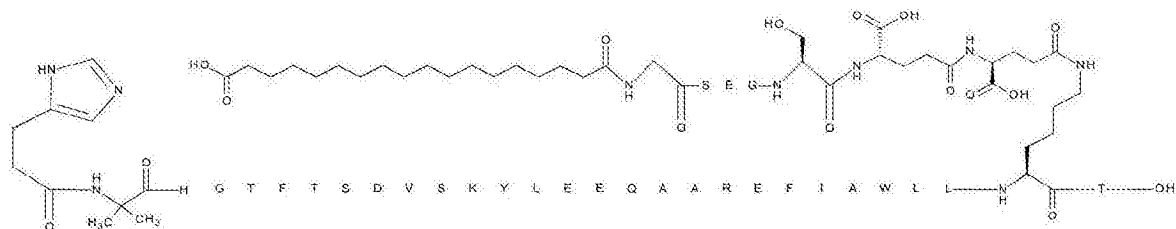
[1042] UPLC02:Rt=8.1min

[1043] LCMS01:RT=2.2min;计算m/1=4784;实测m/3=1596;实测m/4=1197;实测m/5=958;实测m/z=4785

[1044] 实施例27

[1045] $N^{\epsilon 34}$ -[(4S)-4-羧基-4-[[(4S)-4-羧基-4-[[(2S)-2-[[2-[[(2S)-4-羧基-2-[[(2S)-2-[[2-(17-羧基十七酰基氨基)乙酰基]氨基]-3-羟基丙酰基]氨基]丁酰基]氨基]乙酰基]氨基]-3-羟基丙酰基]氨基]丁酰基]氨基]丁酰基]-[Imp7,Aib8,His9,Lys18,Glu22,Arg26,Leu33,Thr35]-GLP-1-(7-35)-肽

[1046]



(化学式 27)

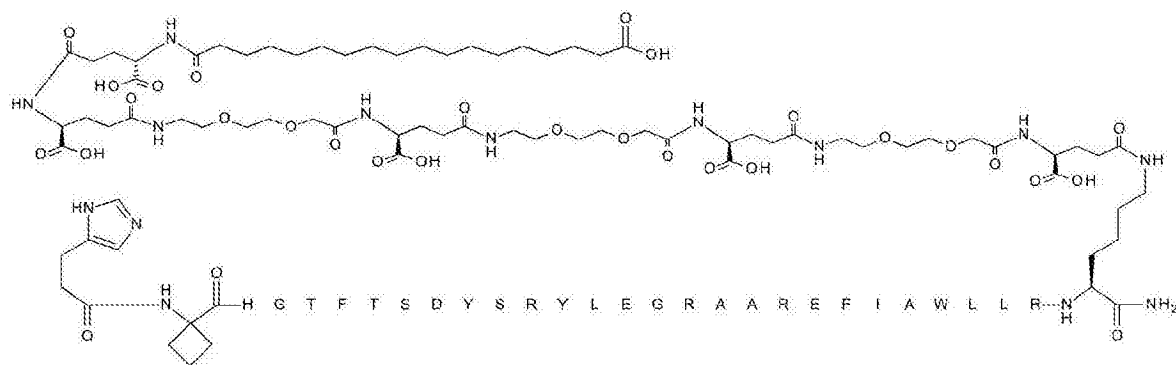
[1047] UPLC02:Rt=9.06min

[1048] LCMS01:Rt=2.3min;计算m/1=4321;实测m/3=1441;实测m/4=1081;实测m/5=865

[1049] 实施例28

[1050] $N^{\epsilon 35}$ -[(4S)-4-羧基-4-[[2-[2-[2-[[(4S)-4-羧基-4-[[2-[2-[2-[[(4S)-4-羧基-4-[[2-[2-[2-[[(4S)-4-羧基-4-[[(4S)-4-羧基-4-(17-羧基十七酰基氨基)丁酰基]氨基]丁酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基]氨基]丁酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基]氨基]丁酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基]氨基]丁酰基]-[Imp7,Aib8,His9,Tyr16,Arg18,Arg23,Arg26,Leu33,Arg34,Lys35]-GLP-1-(7-35)-肽酰胺

[1051]



(化学式 28)

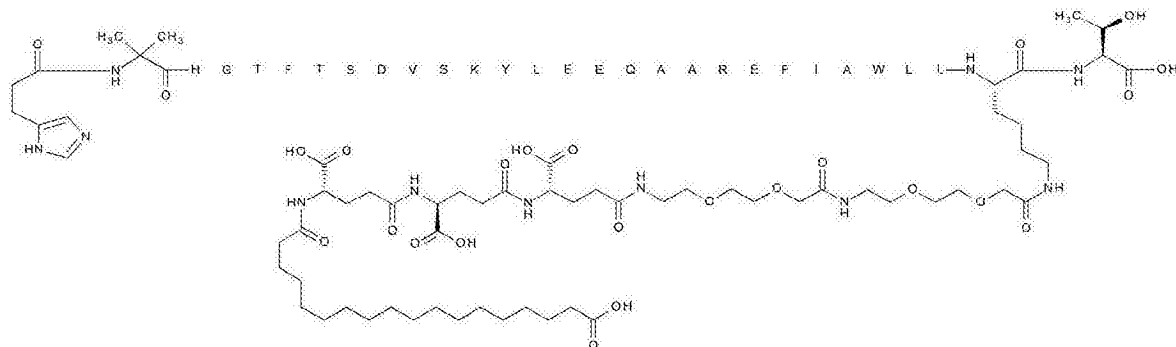
[1052] UPLC02:Rt=8.3min

[1053] LCMS01:Rt=2.3min;计算m/1=4840;实测m/4=1211;实测m/5=969

[1054] 实施例29

[1055] $N^{\epsilon 34}$ -[2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[(4S)-4-羧基-4-[[(4S)-4-羧基-4-[[(4S)-4-羧基-4-(17-羧基十七酰基氨基)丁酰基]氨基]丁酰基]氨基]丁酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基]-[Imp7,Aib8,His9,Lys18,Glu22,Arg26,Leu33,Thr35]-GLP-1-(7-35)-肽

[1056]



(化学式 29)

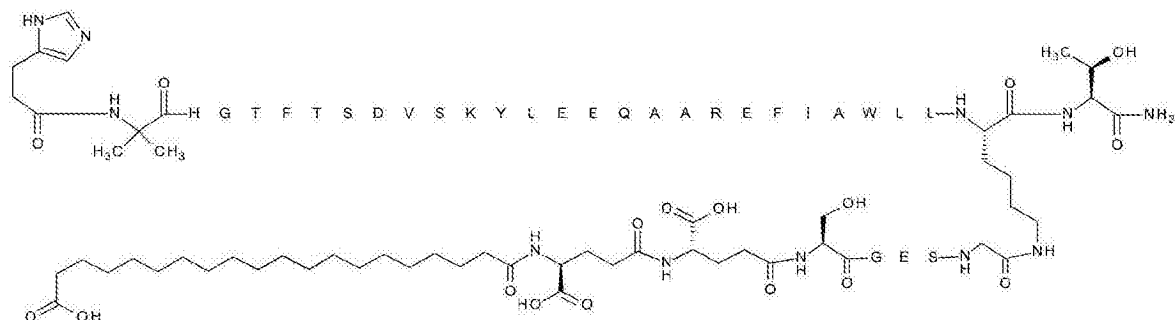
[1057] UPLC02:Rt=9.05min

[1058] LCMS01:Rt=2.2min;计算m/1=4323;实测m/3=1442;实测m/4=1082;实测m/5=866

[1059] 实施例30

[1060] $N^{\epsilon 34}$ -[2-[[(2S)-2-[[(2S)-4-羧基-2-[[2-[[(2S)-2-[[(4S)-4-羧基-4-[[(4S)-4-羧基-4-(19-羧基十九酰基氨基)丁酰基]氨基]丁酰基]氨基]-3-羟基丙酰基]氨基]乙酰基]氨基]丁酰基]氨基]-3-羟基丙酰基]氨基]乙酰基]-[Imp7,Aib8,His9,Lys18,Glu22,Arg26,Leu33,Thr35]-GLP-1-(7-35)-肽酰胺

[1061]



(化学式 30)

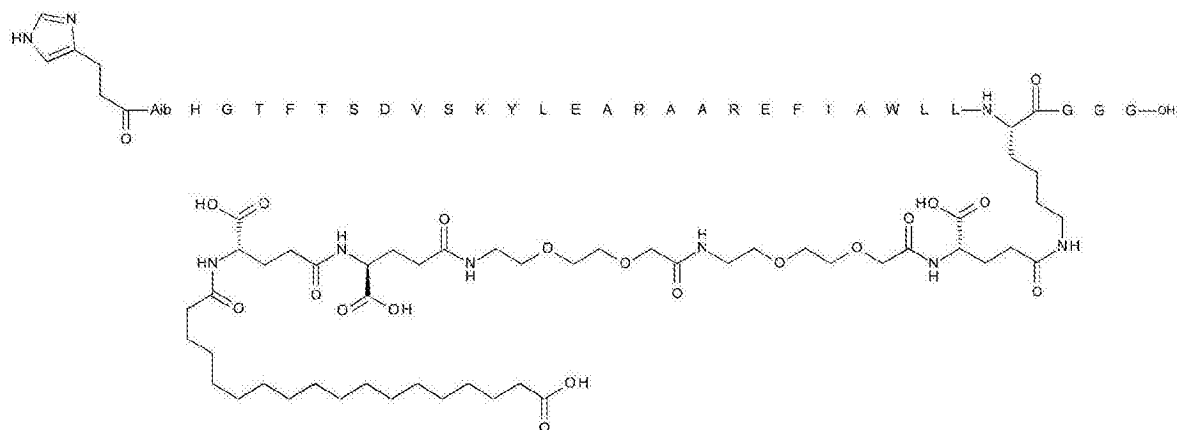
[1062] UPLC02:Rt=9.3min

[1063] LCMS01:Rt=3.0min;计算m/1=4348;实测m/1=4348;实测m/3=1450;实测m/4=1088

[1064] 实施例31

[1065] $N^{\epsilon 34}$ -[(4S)-4-羧基-4-[[2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[(4S)-4-羧基-4-[[(4S)-4-羧基-4-(17-羧基十七酰基氨基)丁酰基]氨基]丁酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基]氨基]丁酰基]-[Imp7,Aib8,His9,Lys18,Ala22,Arg23,Arg26,Leu33,Gly36]-GLP-1-(7-37)-肽

[1066]



(化学式 31)

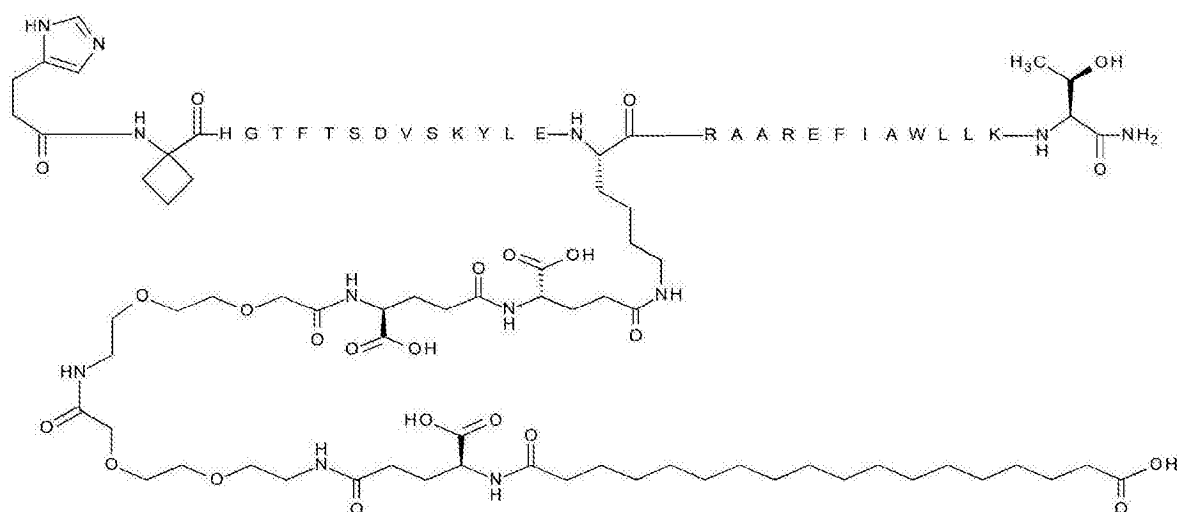
[1067] UPLC02:Rt=8.4min

[1068] LCMS13:Rt=2.3min; 计算m/1=4363; 实测m/3=1455; 实测m/4=1 091

[1069] 实施例32

[1070] N^{22} -[(4S)-4-羧基-4-[[[(4S)-4-羧基-4-[[2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[[(4S)-4-羧基-4-(17-羧基十七酰基氨基)丁酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基]氨基]丁酰基]氨基]丁酰基]-[Imp7, Acb8, His9, Lys18, Lys22, Arg23, Arg26, Leu33, Thr35]-GLP-1-(7-35)-肽酰胺

[1071]



(化学式 32)

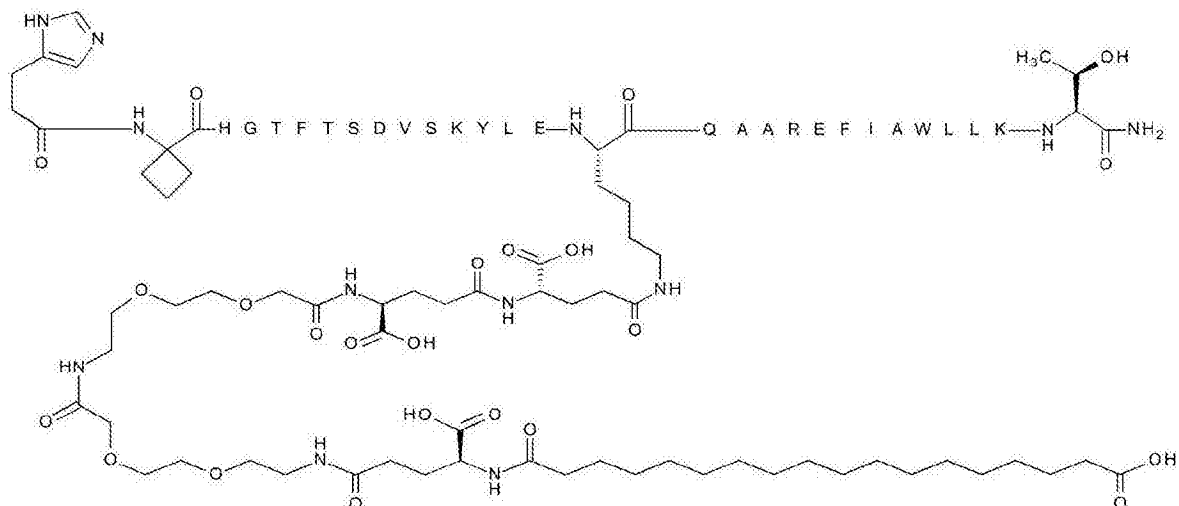
[1072] UPLC02:Rt=8.6min

[1073] LCMS13:Rt=2.1min; 计算m/1=4361; 实测m/4=1091; 实测m/5=873

[1074] 实施例33

[1075] N^{22} -[(4S)-4-羧基-4-[[[(4S)-4-羧基-4-[[2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[[(4S)-4-羧基-4-(17-羧基十七酰基氨基)丁酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基]氨基]丁酰基]氨基]丁酰基]-[Imp7, Acb8, His9, Lys18, Lys22, Arg26, Leu33, Thr35]-GLP-1-(7-35)-肽酰胺

[1076]



(化学式 33)

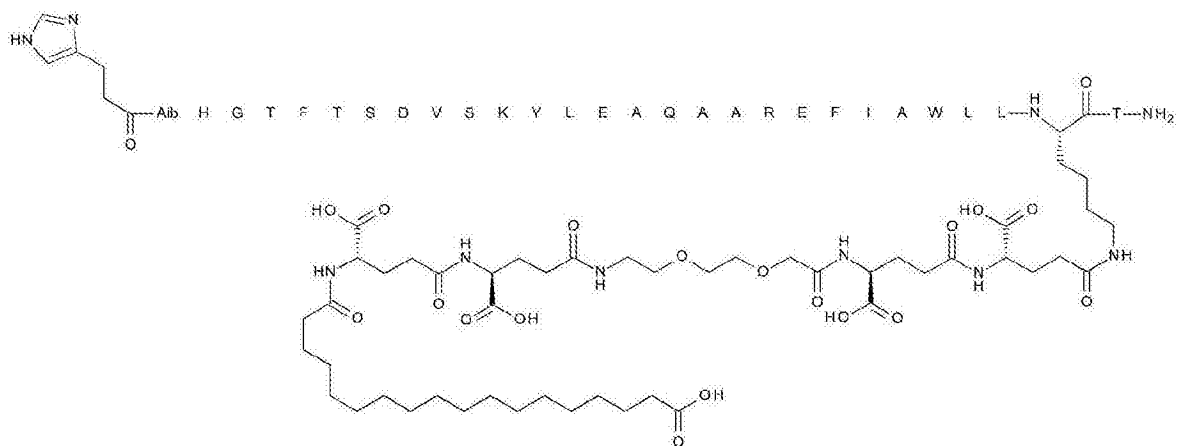
[1077] UPLC02:Rt=8.3min

[1078] LCMS13:Rt=2.2min;计算m/1=4333;实测m/3=1445;实测m/4=1084;实测m/5=867

[1079] 实施例34

[1080] $N^{\epsilon 34}$ -[(4S)-4-羧基-4-[[[(4S)-4-羧基-4-[[2-[2-[2-[[[(4S)-4-羧基-4-[[[(4S)-4-羧基-4-(17-羧基十七酰基氨基)丁酰基]氨基]丁酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基]氨基]丁酰基]氨基]丁酰基]-[Imp7,Aib8,His9,Lys18,Ala22,Arg26,Leu33,Thr35]-GLP-1-(7-35)-肽酰胺

[1081]



(化学式 34)

[1082] UPLC02:Rt=8.9min

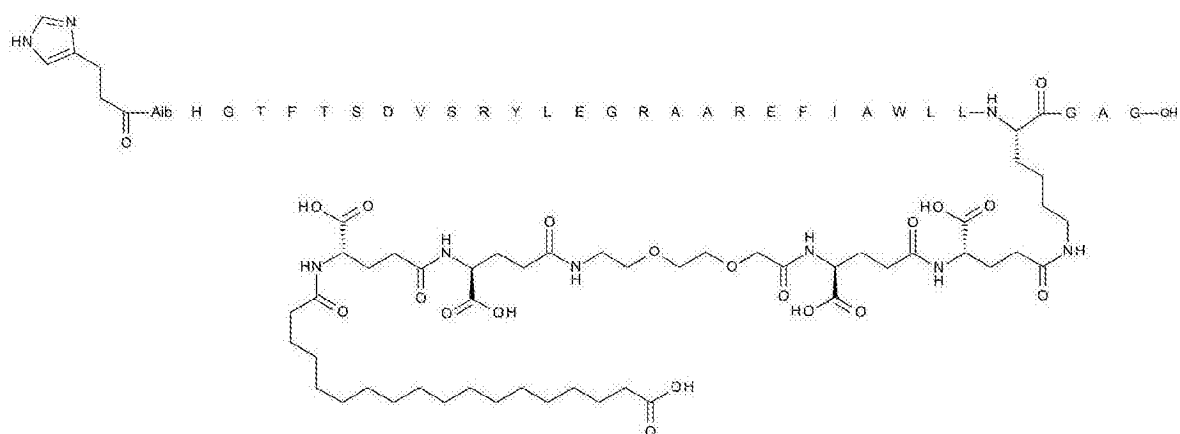
[1083] LCMS13:Rt:=2.4min;计算m/1=4248;实测m/3=1417

[1084] 实施例35

[1085] $N^{\epsilon 34}$ -[(4S)-4-羧基-4-[[[(4S)-4-羧基-4-[[2-[2-[2-[[[(4S)-4-羧基-4-[[[(4S)-4-羧基-4-(17-羧基十七酰基氨基)丁酰基]氨基]丁酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基]氨基]丁酰基]氨基]丁酰基]-[Imp7,Aib8,His9,Arg18,Arg23,Arg26,Leu33,Ala36]-GLP-1-

(7-37)-肽

[1086]



(化学式 35)

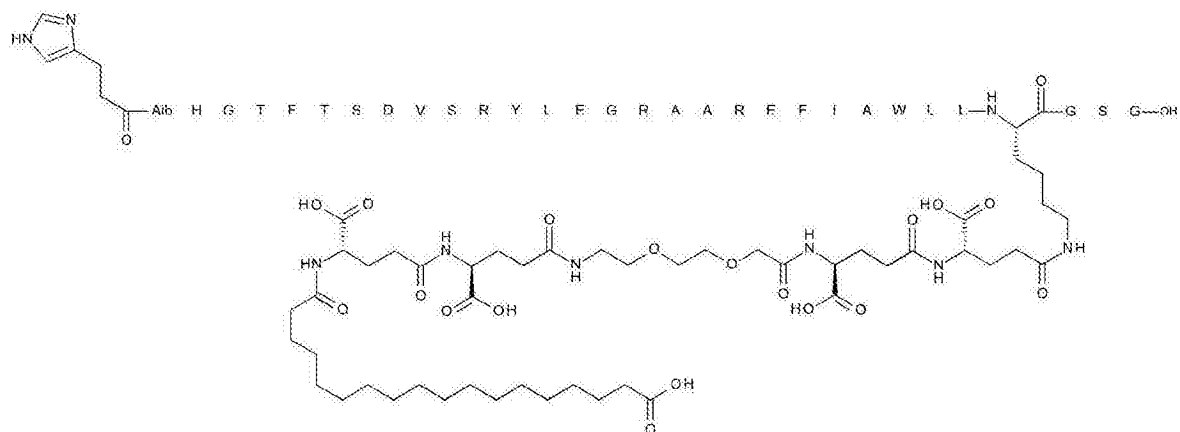
[1087] UPLC02:Rt=9.8min

[1088] LCMS13:Rt=2.3min;计算m/1=4375;实测m/3=1459;实测m/4=1095

[1089] 实施例36

[1090] $N^{\epsilon 34}$ -[(4S)-4-羧基-4-[[(4S)-4-羧基-4-[[2-[2-[2-[[(4S)-4-羧基-4-[[(4S)-4-羧基-4-(17-羧基十七酰基氨基)丁酰基]氨基]丁酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基]氨基]丁酰基]氨基]丁酰基]-[Imp7,Aib8,His9,Arg18,Arg23,Arg26,Leu33,Ser36]-GLP-1-(7-37)-肽

[1091]



(化学式 36)

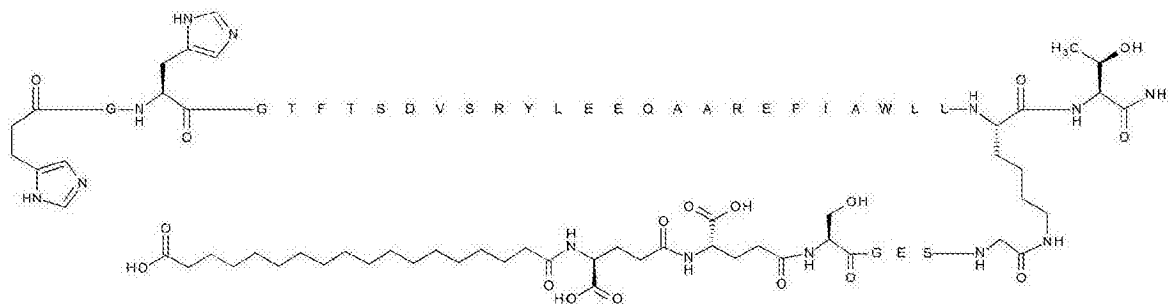
[1092] UPLC02:Rt=9.7min

[1093] LCMS13:Rt=2.3min;计算m/1=4391;实测m/3=1465;实测m/4=1099

[1094] 实施例37

[1095] $N^{\epsilon 34}$ -[2-[[(2S)-2-[[(2S)-4-羧基-2-[[2-[[(2S)-2-[[(4S)-4-羧基-4-[[(4S)-4-羧基-4-(17-羧基十七酰基氨基)丁酰基]氨基]丁酰基]氨基]-3-羟基丙酰基]氨基]乙酰基]氨基]丁酰基]氨基]-3-羟基丙酰基]氨基]乙酰基]-[Imp7,Gly8,His9,Arg18,Glu22,Arg26,Leu33,Thr35]-GLP-1-(7-35)-肽酰胺

[1096]



(化学式 37)

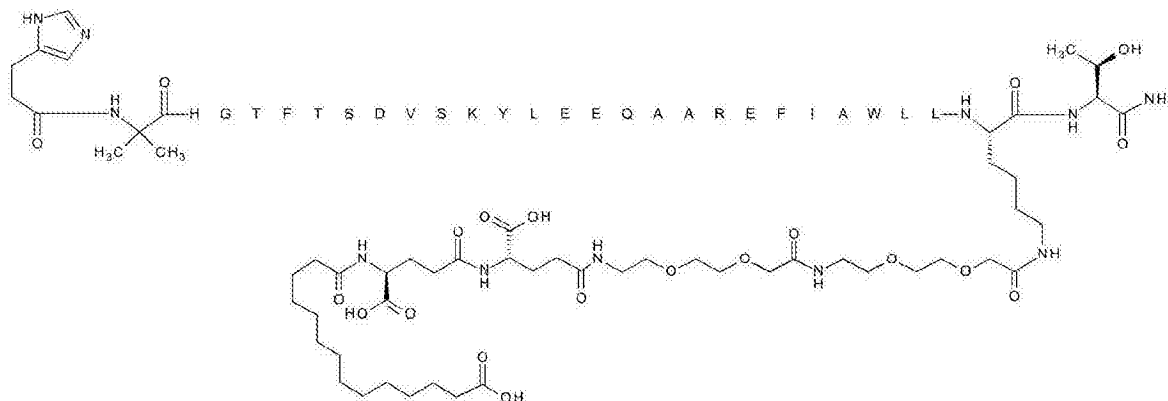
[1097] UPLC02:Rt=9.0min

[1098] LCMS01:Rt=2.2min;计算m/1=4320;实测m/3=1441;实测m/4=1081;实测m/5=865

[1099] 实施例38

[1100] N^ε³⁴-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[[(4S)-4-羧基-4-[[(4S)-4-羧基-4-(13-羧基十三酰基氨基) 丁酰基] 氨基] 丁酰基] 氨基] 乙氧基] 乙氧基] 乙酰基] 氨基] 乙氧基] 乙氧基] 乙酰基]-[Imp7,Aib8,His9,Lys18,Glu22,Arg26,Leu33,Thr35]-GLP-1-(7-35)-肽酰胺

[1101]



(化学式 38)

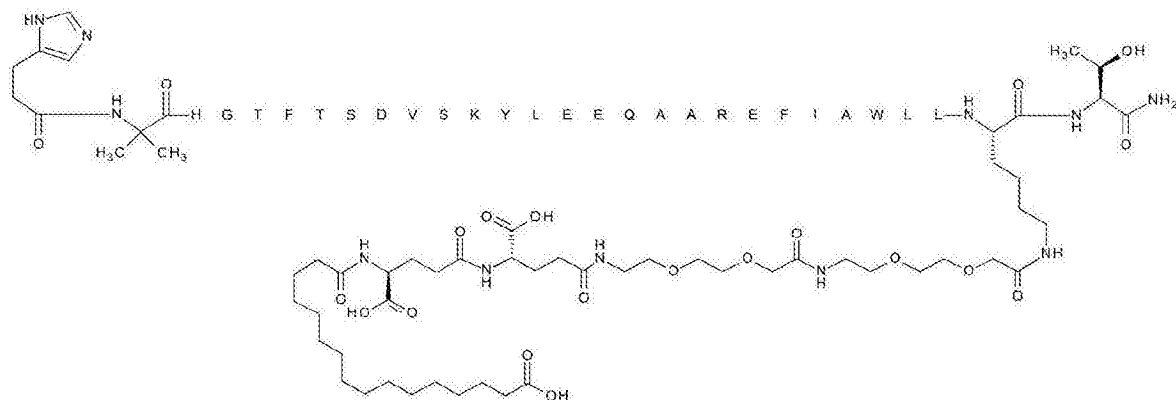
[1102] UPLC02:Rt=8.7min

[1103] LCMS01:Rt=2.1min;计算m/1=4137;实测m/3=1380;实测m/4=1035;实测m/5=828

[1104] 实施例39

[1105] N^ε³⁴-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[[(4S)-4-羧基-4-[[(4S)-4-羧基-4-(15-羧基十五酰基氨基) 丁酰基] 氨基] 丁酰基] 氨基] 乙氧基] 乙氧基] 乙酰基] 氨基] 乙氧基] 乙氧基] 乙酰基]-[Imp7,Aib8,His9,Lys18,Glu22,Arg26,Leu33,Thr35]-GLP-1-(7-35)-肽酰胺

[1106]



(化学式 39)

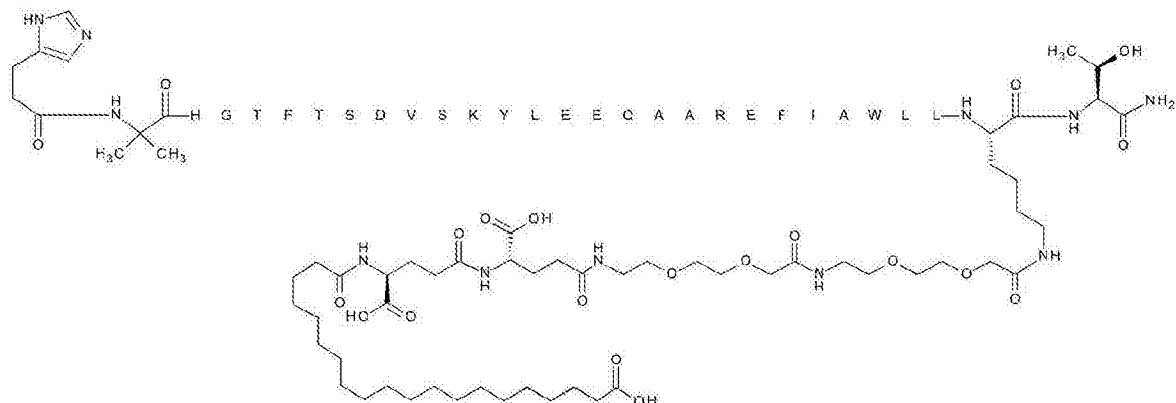
[1107] UPLC02:Rt=9.8min

[1108] LCMS01:Rt=2.2min;计算m/1=4165;实测m/3=1389;实测m/4=1042;实测m/5834

[1109] 实施例40

[1110] N^{ε34}-[2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[(4S)-4-羧基-4-[[(4S)-4-羧基-4-(19-羧基十九酰基氨基) 丁酰基] 氨基] 丁酰基] 氨基] 乙氧基] 乙氧基] 乙酰基] 氨基] 乙氧基] 乙氧基] 乙酰基]-[Imp7,Aib8,His9,Lys18,Glu22,Arg26,Leu33,Thr35]-GLP-1-(7-35)-肽酰胺

[1111]



(化学式 40)

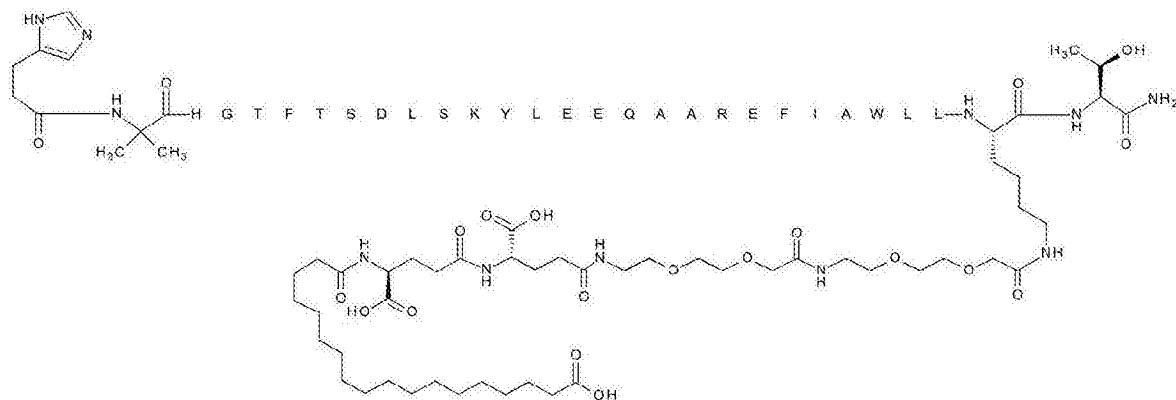
[1112] UPLC02:Rt=9.0min

[1113] LCMS01:Rt=2.4min;计算m/1=4221;实测m/3=1408;实测m/4=1056;实测m/5=845

[1114] 实施例41

[1115] N^{ε34}-[2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[(4S)-4-羧基-4-[[(4S)-4-羧基-4-(17-羧基十七酰基氨基) 丁酰基] 氨基] 丁酰基] 氨基] 乙氧基] 乙氧基] 乙酰基] 氨基] 乙氧基] 乙氧基] 乙酰基]-[Imp7,Aib8,His9,Leu16,Lys18,Glu22,Arg26,Leu33,Thr35]-GLP-1-(7-35)-肽酰胺

[1116]



(化学式 41)

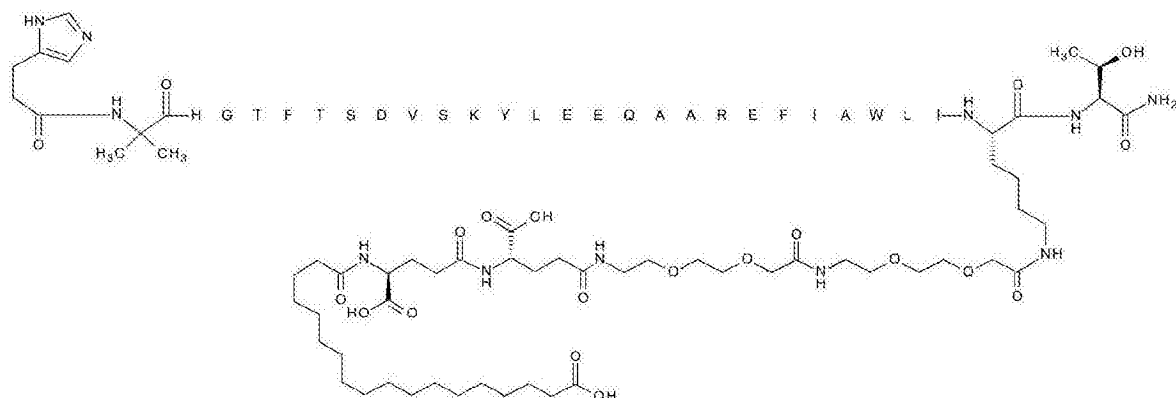
[1117] UPLC02:Rt=10.1min

[1118] LCMS01:Rt=2.5min;计算m/1=4207;实测m/3=1403;实测m/4=1053;实测m/5=842

[1119] 实施例42

[1120] N^{ε34}-[2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[(4S)-4-羧基-4-[[(4S)-4-羧基-4-(17-羧基十七酰基氨基)丁酰基]氨基]丁酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基]-[Imp7,Aib8,His9,Lys18,Glu22,Arg26,Ile33,Thr35]-GLP-1-(7-35)-肽酰胺

[1121]



(化学式 42)

[1122] UPLC02:Rt=9.9min

[1123] LCMS01:Rt=2.5min;计算m/1=4193;实测m/3=1398;实测m/4=1049;实测m/5=839

[1124] 试验(I):GLP-1和胰高血糖素受体效力

[1125] 该实施例的目的是测试本发明的GLP-1衍生物在体外的活性或效力。该体外效力分别是全细胞试验中人GLP-1受体(GLP-1R)或胰高血糖素受体(胰高血糖素R)激活的量度。

[1126] 原理

[1127] 通过在报告基因试验中分别测量人GLP-1或胰高血糖素受体激活的细胞响应来测定体外效力。该试验在BHK细胞系中进行,该BHK细胞系稳定表达人GLP-1受体或人胰高血糖素受体并且包含偶联至启动子的cAMP响应元件(CRE)的DNA以及萤火虫萤光素酶(CRE萤光

素酶)的基因。当人GLP-1或胰高血糖素受体分别被激活时,其导致cAMP的产生,这转而导致萤光素酶蛋白质得到表达。当试验温育完成时,添加萤光素酶底物(萤光素),并且该酶将萤光素转化为氧化萤光素并产生生物发光。测量该生物发光作为该试验的读出。

[1128] (a) GLP-1受体激活

[1129] 细胞培养和制备

[1130] 在该试验中使用的细胞(克隆FCW467-12A/KZ10-1)是以BHKTS13为亲代细胞系的BHK细胞。该细胞源自表达人GLP-1受体的克隆(FCW467-12A),并通过用CRE萤光素酶进一步转染获得当前的克隆来建立。

[1131] 在含有10%FBS、1×GlutaMAX、1mg/ml G418、240nM MTX(氨甲喋呤)和1%pen/strep(青霉素/链霉素)的DMEM培养基中在5%CO₂下培养细胞。将细胞等分并储存在液氮中。在每次试验前,取出等份并在以所需浓度悬浮于测定培养基中之前在PBS中洗涤三次。对于96孔板,使悬浮液具有5×10⁴个细胞/孔的最终浓度。

[1132] 材料

[1133] 在该试验中使用以下化学品:Pluronic F-68(10%)(Gibco 2404)、卵清蛋白(Sigma A5503)、不含酚红的DMEM(Gibco 11880-028)、1M Hepes(Gibco 15630)、Glutamax 100×(Gibco 35050)和steady-lite plus(PerkinElmer 6016757)。测定培养基由不含酚红的DMEM、10mM Hepes、1×GlutaMAX、2%卵清蛋白和0.2%Pluronic F-68组成。

[1134] 程序

[1135] 将细胞储备液在37℃水浴中解冻。将细胞在PBS中洗涤三次。对细胞进行计数,并在测定培养基中调整至5×10⁴个细胞/50μl(1×10⁵个细胞/ml)。将50μl等份的细胞转移至测定板的每个孔中。将测试化合物的储备液和参考化合物在测定培养基中稀释至0.2μM的浓度。将化合物稀释10倍以得到以下浓度:2×10⁻⁶M、2×10⁻⁷M、2×10⁻⁸M;2×10⁻⁹M、2×10⁻¹⁰M、2×10⁻¹¹M、2×10⁻¹²M和2×10⁻¹³M。对于每种化合物,还包括空白测定培养基对照。

[1136] 将50μl等份的化合物或空白从稀释板转移到测定板。在以下最终浓度下测试化合物:1×10⁻⁶M、1×10⁻⁷M、1×10⁻⁸M;1×10⁻⁹M、1×10⁻¹⁰M、1×10⁻¹¹M和1×10⁻¹²M以及1×10⁻¹³M。

[1137] 将测定板在5%CO₂培养箱中在37℃下温育3h。将该测定板从培养箱中取出并使其在室温下静置15min。将100μl等份的steady-lite plus试剂添加至该测定板的每个孔中(试剂是光敏性的)。每个测定板均覆盖有铝箔以使其避光,并在室温下振摇30min。在Perkin Elmer TopCount NXT仪器中读取每个测定板。

[1138] 计算

[1139] 将来自TopCount仪器的数据转移至GraphPad Prism软件。该软件进行非线性回归(log(激动剂)相对响应-可变斜率(四个参数))。通过该软件计算EC₅₀值并以pM为单位报告。

[1140] (b) 胰高血糖素受体激活

[1141] 细胞培养和制备

[1142] 在该试验中使用的细胞(克隆pLJ6'-4-25)是以BHK570为亲代细胞系的表达CRE萤光素酶基因的BHK细胞(克隆BHK/KZ10-20-48),并通过用人胰高血糖素受体进一步转染来

建立 (pHZ-1载体中的克隆pLJ6')。

[1143] 在含有10%FBS、1×GlutaMAX、1mg/ml G418、240nM MTX(氨甲喋呤)和1%pen/strep(青霉素/链霉素)的DMEM培养基中在5%CO₂下培养细胞。将细胞等分并储存在液氮中。在每次试验前,取出等份并在以所需浓度悬浮于测定培养基中之前在PBS中洗涤三次。对于96孔板,使悬浮液具有5×10³个细胞/孔的最终浓度。

[1144] 材料

[1145] 在该试验中使用以下化学品:Pluronic F-68 (10%) (Gibco 2404)、卵清蛋白 (Sigma A5503)、不含酚红的DMEM (Gibco 11880-028)、1M HEPES (Gibco 15630)、Glutamax 100× (Gibco 35050)和steadylite plus (PerkinElmer 6016757)。测定培养基由不含酚红的DMEM、10mM HEPES、1×GlutaMAX、2%卵清蛋白和0.2%Pluronic F-68组成。

[1146] 程序

[1147] 将细胞储备液在37℃水浴中解冻。将细胞在PBS中洗涤三次。对细胞进行计数,并在测定培养基中调整至5×10³个细胞/50μl (1×10⁵个细胞/ml)。将50μl等份的细胞转移至测定板的每个孔中。

[1148] 将测试化合物的储备液和参考化合物在测定培养基中稀释至0.2μM的浓度。将化合物稀释10倍以得到以下浓度:2×10⁻⁶M、2×10⁻⁷M、2×10⁻⁸M;2×10⁻⁹M、2×10⁻¹⁰M、2×10⁻¹¹M、2×10⁻¹²M和2×10⁻¹³M。对于每种化合物,还包括空白测定培养基对照。

[1149] 将50μl等份的化合物或空白从稀释板转移到测定板。在以下最终浓度下测试化合物:1×10⁻⁶M、1×10⁻⁷M、1×10⁻⁸M;1×10⁻⁹M、1×10⁻¹⁰M、1×10⁻¹¹M和1×10⁻¹²M以及1×10⁻¹³M。

[1150] 将测定板在5%CO₂培养箱中在37℃下温育3h。将该测定板从培养箱中取出并使其在室温下静置15min。将100μl等份的steadylite plus试剂添加至该测定板的每个孔中(试剂是光敏性的)。每个测定板均覆盖有铝箔以使其避光,并在室温下振摇30min。在Perkin Elmer TopCount NXT仪器中读取每个测定板。

[1151] 计算

[1152] 将来自TopCount仪器的数据转移至GraphPad Prism软件。该软件进行非线性回归(log(激动剂) vs 响应-可变斜率(四个参数))。通过该软件计算EC₅₀值并以pM为单位报告。

[1153] 试验(II):GLP-1和胰高血糖素受体结合

[1154] 该试验的目的是测试本发明的GLP-1衍生物的体外受体结合活性。

[1155] (a) GLP-1受体结合

[1156] GLP-1受体 (GLP-1R) 结合是衍生物对人GLP-1受体的亲和力的量度。

[1157] 原理

[1158] 使用竞争性结合(置换与麦胚凝集素(WGA)闪烁亲近测定(SPA)珠缔合的细胞膜中表达的GLP-1受体结合的 [¹²⁵I]-GLP-1)来测定每种衍生物的GLP-1受体结合。将每种衍生物以一系列浓度添加至包含人GLP-1受体的分离的膜中,并监测标记的放射性配体的置换。受体结合被报告为半数标记的配体从受体上被置换时的浓度,即IC₅₀值。

[1159] 材料

[1160] 在该试验中使用以下化学品:不含酚红的MEM (Gibco 11880-028)、Pen/strep

(Invitrogen 15140-122)、G418 (Invitrogen 10131-027)、1M Hepes (Gibco15630)、EDTA (Invitrogen 15575-038)、PBS (Invitrogen14190-094)、胎牛血清 (Invitrogen 16140-071)、EGTA、MgCl₂ (Merck1.05832.1000)、吐温20 (Amresco 0850C335)、SPA颗粒 (麦胚凝集素(WGA) SPA珠, Perkin Elmer RPNQ0001)、[¹²⁵I]-GLP-1]-(7-36)NH₂ (内部生产)、OptiPlate™-96 (Perkin Elmer)。

[1161] 缓冲液1由20mM Na-HEPES加10mM EDTA组成,并且将pH调节至7.4。缓冲液2由20mM Na-HEPES加0.1mM EDTA组成,并且将pH调节至7.4。测定缓冲液由补充有5mM EGTA、5mM MgCl₂、0.005%吐温20的50mM HEPES组成,并且将pH调节至7.4。0.02%白蛋白储备液由以0.02% (w/v) 溶解于测定缓冲液中的HSA组成。

[1162] 细胞培养和膜制备

[1163] 在该试验中使用的细胞 (克隆FCW467-12A) 是以BHKTS 13为亲代细胞系的BHK细胞。该细胞表达人GLP-1受体。

[1164] 使细胞在5% CO₂下在DMEM、10%胎牛血清、1%Pen/Strep (青霉素/链霉素) 和1.0mg/ml选择标记G418中生长。为了制备膜,使细胞生长至约80%汇合。将细胞在磷酸盐缓冲盐水中洗涤两次并收获。利用短暂的离心将细胞沉淀,并将该细胞沉淀物保持在冰上。用ULTRA-THURRAX分散仪器将细胞沉淀物在适量的缓冲液1 (例如10ml) 中均化20-30秒。将该匀浆离心15分钟。将沉淀物重悬 (均化) 于10ml缓冲液2中并离心。将该步骤再重复一次。将得到的沉淀物重悬于缓冲液2中并测定蛋白质浓度。将该膜等分并储存在-80℃下。

[1165] 程序

[1166] 1. 对于受体结合试验,将50μl测定缓冲液添加至测定板的每个孔中。

[1167] 2. 连续稀释测试化合物以得到以下浓度:8×10EE-7M、8×10EE-8M、8×10EE-9M、8×10EE-10M、8×10EE-11M、8×10EE-12M和8×10EE-13M。将25μl添加至该测定板的合适的孔中。

[1168] 3. 将细胞膜等份解冻并稀释至其工作浓度。将50μl添加至该测定板的每个孔中。

[1169] 4. 使WGA SPA珠以20mg/ml悬浮在测定缓冲液中。在临添加至该测定板之前,将该悬浮液在测定缓冲液中稀释至10mg/ml。将50μl添加至该测定板的每个孔中。

[1170] 5. 通过将25μl的480pM的 [¹²⁵I]-GLP-1]-(7-36)NH₂溶液添加至该测定板的每个孔中启动温育。保留25μl等份用于测量总计数/孔。

[1171] 6. 将该测定板在30℃下温育2h。

[1172] 7. 将该测定板离心10min。

[1173] 8. 在Perkin Elmer TopCount NXT仪器中读取该测定板。

[1174] 计算

[1175] 将来自TopCount仪器的数据转移至GraphPad Prism软件。该软件将重复测定的值取平均并进行非线性回归。通过该软件计算IC₅₀值并以nM为单位报告。

[1176] (b) 胰高血糖素受体结合

[1177] 胰高血糖素受体 (胰高血糖素R) 结合活性是衍生物对人胰高血糖素受体的亲和力的量度。

[1178] 原理

[1179] 使用竞争性结合 (置换与麦胚凝集素 (WGA) 闪烁亲近测定 (SPA) 珠缔合的细胞膜中

表达的胰高血糖素受体结合的 $[^{125}\text{I}]$ -胰高血糖素)来测定每种衍生物的胰高血糖素受体结合。将每种衍生物以一系列浓度添加至包含人胰高血糖素受体的分离的膜中,并监测标记的配体的置换。受体结合被报告为半数标记的配体从受体上被置换时的浓度,即 IC^{50} 值。

[1180] 材料

[1181] 在该试验中使用以下化学品:含Glutamax的DMEM(Gibco61965-026)、Pen/strep(Invitrogen 15140-122)、G418(Invitrogen10131-027)、Versene(Gibco 15040)、1M HEPES(Gibco 15630)、PBS(Invitrogen 14190-094)、胎牛血清(Invitrogen 16140-071)、 MgCl_2 (Merck 1.05832.1000)、EDTA(Invitrogen 15575-038)、 CaCl_2 (Sigma,C5080)、吐温20(Amresco 0850C335)、卵清蛋白(Sigma A5503)、SPA颗粒(麦胚凝集素(WGA) SPA珠, Perkin Elmer RPNQ0001)、 $[^{125}\text{I}]$ -胰高血糖素(内部生产)、OptiPlateTM-96(Packard 6005290)。

[1182] HME缓冲液由25mM HEPES、2mM MgCl_2 和1mM EDTA组成,并且将pH调节至7.4。测定缓冲液由补充有5mM MgCl_2 、1mM CaCl_2 、0.02%吐温20和0.1%卵清蛋白的50mM HEPES组成,并且将pH调节至7.4。

[1183] 细胞培养和膜制备

[1184] 在该试验中使用的细胞(克隆BHK hGCGR A3*25)是用包含编码人胰高血糖素受体的cDNA的表达质粒稳定转染的BHK细胞。

[1185] 使细胞在5% CO_2 下在DMEM、10%胎牛血清、1%Pen/Strep(青霉素/链霉素)和1.0mg/ml选择标记G418中生长。为了制备膜,使细胞生长至约80%汇合。将细胞在磷酸盐缓冲盐水中洗涤两次并收获。利用短暂的离心将细胞沉淀,并将该细胞沉淀物保持在冰上。通过添加约5ml HME缓冲液将细胞裂解,通过移液混合,并在液氮中急冻。快速解冻并添加HME缓冲液至10ml。用ULTRA-THURAX分散仪器将细胞沉淀物均化20-30秒。将该匀浆在20,000 $\times G$ 、4℃下离心10分钟。将沉淀物重悬(均化)于1-2ml的HME缓冲液中。测定蛋白质浓度。将该膜等分并在液氮中急冻并储存在-80℃下。

[1186] 程序

[1187] 1.对于受体结合试验,将50 μl 测定缓冲液添加至测定板的每个孔中。

[1188] 2.连续稀释测试化合物以得到以下浓度: $8 \times 10\text{EE}-7\text{M}$ 、 $8 \times 10\text{EE}-8\text{M}$ 、 $8 \times 10\text{EE}-9\text{M}$ 、 $8 \times 10\text{EE}-10\text{M}$ 、 $8 \times 10\text{EE}-11\text{M}$ 、 $8 \times 10\text{EE}-12\text{M}$ 和 $8 \times 10\text{EE}-13\text{M}$ 。将25 μl 添加至该测定板的合适的孔中。

[1189] 3.将细胞膜等份解冻并稀释至其工作浓度。将50 μl 添加至该测定板的每个孔中。

[1190] 4.使WGA SPA珠以20mg/ml悬浮在测定缓冲液中。在临添加至该测定板之前,将该悬浮液在测定缓冲液中稀释至10mg/ml。将50 μl 添加至该测定板的每个孔中。

[1191] 5.通过将25 μl 的480pM的 $[^{125}\text{I}]$ -胰高血糖素溶液添加至该测定板的每个孔中启动温育。保留25 μl 等份用于测量总计数/孔。

[1192] 6.将该测定板在25℃下温育2h。

[1193] 7.将该测定板在1500rpm下离心10min。

[1194] 8.在Perkin Elmer TopCount NXT仪器中读取该测定板。

[1195] 计算

[1196] 将来自TopCount仪器的数据转移至GraphPad Prism软件。该软件将重复测定的值

取平均并进行非线性回归。通过该软件计算IC⁵⁰值并以nM为单位报告。

[1197] 试验(III):用于评估肽组合物的物理稳定性的ThT原纤维形成试验

[1198] 该试验的目的是评估本发明的GLP-1衍生物在水溶液中的物理稳定性。

[1199] 肽的低物理稳定性可导致淀粉样原纤维的形成,经观察其在样品中为有序、线状大分子结构,其最终可导致凝胶形成。这在传统上通过目测样品进行测量。然而,这种测量方式非常主观且取决于观察者。因此,小分子指示剂探针的应用要有利得多。硫代黄素T(ThT)就是这样的探针,并且在与原纤维结合时具有不同的荧光特征[Naiki等人(1989) Anal.Biochem.177,244-249;LeVine(1999) Methods.Enzymol.309,274-284]。

[1200] 可通过具有以下表达的S形曲线描述原纤维形成的时程[Nielsen等人(2001) Biochemistry 40,6036-6046]:

[1201]
$$F = f_i + m_f t + \frac{f_f + m_f t}{1 + e^{-[(t-t_0)/\tau]}}$$
 方程式 (1)

[1202] 此处,如图1中所示,F为时间t时的ThT荧光。常数t₀为达到最大荧光的50%所需的时间。描述原纤维形成的两个重要参数是通过t₀-2τ计算的滞后时间和表观速率常数k_{app} 1/τ。

[1203] 肽的部分折叠中间体的形成被认为是原纤维形成的一般启动机制。这些中间体中的少数成核形成模板,进一步的中间体可组装到该模板上并继续发生原纤维形成。滞后时间对应于核临界质量累加时的时间间隔,而表观速率常数为原纤维自身形成的速率。

[1204] 样品在每次试验前新鲜制备。每种样品组合物在图例中描述。使用适量的浓NaOH和HCl将样品的pH调节至所需值。将硫代黄素T添加至来自在H₂O中的储备溶液的样品中直至1μM的最终浓度。

[1205] 将200μl的样品等份(在10mM HEPES缓冲液pH 7.5中250μM GLP-1衍生物)置于96孔微量滴定板(Packard OptiPlate™-96,白色聚苯乙烯)中。通常,将每种样品(对应于一种测试条件)的四份或八份重复品置于一列孔中。将该板用Scotch Pad(Qiagen)密封。

[1206] 在Fluoroskan Ascent FL荧光酶标仪(Thermo LabSystems)中进行给定温度下的温育、振摇以及ThT荧光发射的测量。将温度调节至37℃。在振幅为1mm、调节至960rpm的定轨振摇下温育该板。利用通过444nm滤光片的激发以及测量通过485nm滤光片的发射来进行荧光测量。

[1207] 通过在试验温度下温育板10min启动每次运行。每20分钟测量该板一段期望的时间。每次测量之间,如所述对该板进行振摇并加热。

[1208] 完成ThT试验后,将每种样品的四份或八份重复品合并,并在18℃下以20000rpm离心30分钟。将上清液通过0.22μm滤器过滤,并将等份转移至HPLC小瓶中。

[1209] 使用合适的标准物作为参照,通过反相HPLC测定初始样品中和经过滤的上清液中肽的浓度。将经过滤的样品的浓度占初始样品浓度的百分比分数报告为回收率。

[1210] 将测量点以Microsoft Excel格式保存以供进一步处理,并使用GraphPad Prism进行曲线绘制和拟合。可忽略在不存在原纤维时来自ThT的背景发射。数据点通常为四份或八份样品的平均值,并示出标准误差线。只有在同一个实验中(即同一板上的样品)获得的数据才显示在同一个图中,以确保实验之间的原纤维形成的相对量度。

[1211] 数据集可针对方程式(1)进行拟合。然而,原纤维形成前的滞后时间可通过目测该

曲线以确定ThT荧光显著增加到背景水平以上时的时间点来评估。

[1212] 试验(IV):在小鼠中的药代动力学谱

[1213] 该试验的目的是评估本发明的GLP-1衍生物在小鼠中的药代动力学谱。

[1214] 可在正常雄性c57/BL6小鼠(体重约30克)($n=12$,例如在每个时间点(例如: $t=0.25、0.5、1、3、6、10、24、30$ 和48小时)提供3只小鼠)中检测GLP-1衍生物的药代动力学谱。测试化合物可以以10nmol/kg的皮下单剂量进行给药。

[1215] 可使用ELISA/LOCI试验或LCMS测定GLP-1衍生物的血浆水平。可使用基于PC的软件Phoenix(来自Pharsight,Certara的WinNonLin 6.3版)确定化合物的药代动力学计算值,如半衰期($T_{1/2}$)、最大浓度(C_{max})和最大浓度时间(T_{max})。

[1216] 试验(V):化学稳定性评估

[1217] 该试验的目的是评估本发明的GLP-1衍生物在水溶液中的化学稳定性。

[1218] GLP-1衍生物的化学稳定性可通过RP-UPLC分离和UV检测进行研究。将冻干的样品溶解在pH 8.6的8mM磷酸盐缓冲液中,随后使用HCl调节至pH 7.3,达到333 μ M的最终浓度。将样品在5 $^{\circ}$ C和37 $^{\circ}$ C下温育14天,随后进行RP-UPLC分析。纯度被定义为每个色谱图中主峰面积相对于所有积分峰的总面积的百分比。37 $^{\circ}$ C下14天后的纯度损失(本文中也称为化学降解)被确定为5 $^{\circ}$ C和37 $^{\circ}$ C下温育的样品之间的纯度差值除以在5 $^{\circ}$ C下温育14天后样品的纯度。

[1219] 使用在50 $^{\circ}$ C和0.4mL/min的流速下运行的Waters BEH1302.1mm $\times$ 150mm,1.7 μ m柱,并使用由A:在MQ-水中的0.05%TFA,和B:在乙腈中的0.05%TFA组成的流动相系统来进行RP-UPLC分析。在215nm处进行UV检测。用于大多数样品的典型梯度分布显示如下。

[1220] 用于RP-UPLC分析的典型梯度分布:

[1221]

时间(min)	%B
注射	20
30	60
31	99
37	99
39	20
40	20
45	20

[1222] 对于一些相比于大多数衍生物在基本不同的保留时间时洗脱的个别衍生物,对梯度分布作出一些调整以便更好地能够进行样品间的纯度评估比较。

[1223] 实施例44和表2呈现了使用试验(V)得到的信息。

[1224] 实施例43:GLP-1衍生物的受体效力、受体结合和物理稳定性

[1225] 根据本文试验(I)、(II)和(III)中描述的方法测定本发明选择的GLP-1衍生物的GLP-1和胰高血糖素受体效力(EC_{50})和亲和力(IC_{50})及物理稳定性。试验(III)在pH 7.5下进行。结果示于表1中。

[1226] 表1.在THT试验中评估的GLP-1衍生物对人GLP-1和胰高血糖素受体的 EC_{50} 和 IC_{50} 值及其物理稳定性。

[1227]

以下实施例 编号的化合 物	EC50 GLP-1R [pM]	IC50 GLP-1R [nM]	EC50 胰高血 糖素受 体[pM]	IC50 胰高血 糖素受 体[nM]	ThT 试验 pH 7.5: 滞后时间[h]	ThT 试验 pH 7.5: 回收率[%]
实施例 1	5.7	0.7	117.0	16.0	45.0	100.0
实施例 2	2.0	0.1	163.0	43.9	45.0	100.0
实施例 3	5.0	0.4	40.7	3.2	45.0	94.0
实施例 4	7.0	0.2	45.0	4.3	45.0	100.0

[1228]

实施例 5	5.2	0.5	120.3	4.3	45.0	101.7
实施例 6	7.0	0.3	44.0	4.2	45.0	100.0
实施例 7	6.0	0.5	60.0	3.8	45.0	106.0
实施例 8	17.0	0.9	143.0	8.9	45.0	100.0
实施例 9	5.0	0.1	40.0	4.1	45.0	100.0
实施例 10	8.0	1.0	229.0	25.9	45.0	100.0
实施例 11		0.9		69.5	45.0	106.0
实施例 12	6.0	0.7	83.0	20.3	45.0	100.0
实施例 13		0.5		56.0	45.0	100.0
实施例 14		3.2		31.1	2.7	43.0
实施例 15		1.9		80.2	45.0	50.0
实施例 16		13.1		51.0	45.0	50.0
实施例 17		19.0		43.4	0.0	89.0
实施例 18	8.0	2.2	1290.0	126.0	45.0	56.0
实施例 19	7.0	2.9	143.0	21.2	45.0	75.0
实施例 20	12.0	0.3	28.0	7.2	45.0	100.0
实施例 21	3.0	1.4	78.0	6.9	45.0	100.0
实施例 22	3.0	0.9	71.0	5.6	11.7	94.0
实施例 23	7.0	2.3	84.0	11.7	13.3	53.0
实施例 24	8.0	1.8	54.0	8.6	45.0	100.0
实施例 25		6.9		18.8	45.0	100.0
实施例 26	16.0	7.3	222.5	22.5	45.0	102.0
实施例 27	5.5	2.3	84.5	11.9	45.0	100.0
实施例 28	18.5	6.8	225.5	36.7	45.0	86.5
实施例 29		4.6		28.1	45.0	100.0
实施例 30	5.0	0.4	111.0	6.0	45.0	94.0
实施例 31	2.2	0.3	39.4	3.7	45.0	101.7
实施例 32		0.2		14.1		
实施例 33		0.2		17.9		
实施例 34	3.0	0.6	21.0	1.7	45.0	100.0
实施例 35	3.0	1.0	248.0	18.8	45.0	95.0
实施例 36	6.0	1.7	158.0	11.4	45.0	100.0
实施例 37	8.0	3.2	459.1	9.6	45.0	100.0
实施例 38	12.0	1.5	52.6	3.7		
实施例 39	60.7	1.3	46.1	4.0		
实施例 40	62.9	0.4	917.4	10.1		
实施例 41	14.7	1.1	54.2	5.1		
实施例 42	18.3	0.2	105.6	11.8		

[1229] 表1的结果表明GLP-1衍生物是GLP-1/胰高血糖素受体共激动剂。此外,该结果表

明,大多数GLP-1衍生物显示出在ThT原纤维形成试验中根据滞后时间和/或回收率评估的意料之外的高物理稳定性。

[1230] 实施例44:GLP-1衍生物的化学稳定性

[1231] 根据本文试验(V)中描述的方法来确定本发明选择的GLP-1衍生物的化学稳定性。试验(V)在pH7.3下进行。结果示于表2中。

[1232] 表2.GLP-1/胰高血糖素受体共激动剂的化学稳定性。数据显示了在37°C下在磷酸盐缓冲液(pH7.3)中温育超过14天后的化学降解%。

以下实施例编号 的化合物	化学稳定性: 在 37°C 下超过 14 天的化学 降解 [%]
实施例 1	1.5
实施例 3	-0.3
实施例 4	0.2
实施例 5	0.4
实施例 6	0.1
[1233] 实施例 7	0.0
实施例 8	1.6
实施例 9	0.2
实施例 10	2.0
实施例 12	4.4
实施例 20	0.4
实施例 21	1.6
实施例 24	2.2
实施例 31	0.1

[1234] 表2中的结果表明,GLP-1/胰高血糖素受体共激动剂出乎意料地具有良好至极优的化学稳定性。

[1235] 尽管本文已说明并描述了本发明的某些特征,但本领域普通技术人员现将想到多种修改、替代、改变和等效项。因此,应当理解,随附的权利要求旨在涵盖落在本发明的真实精神内的所有这类修改和改变。

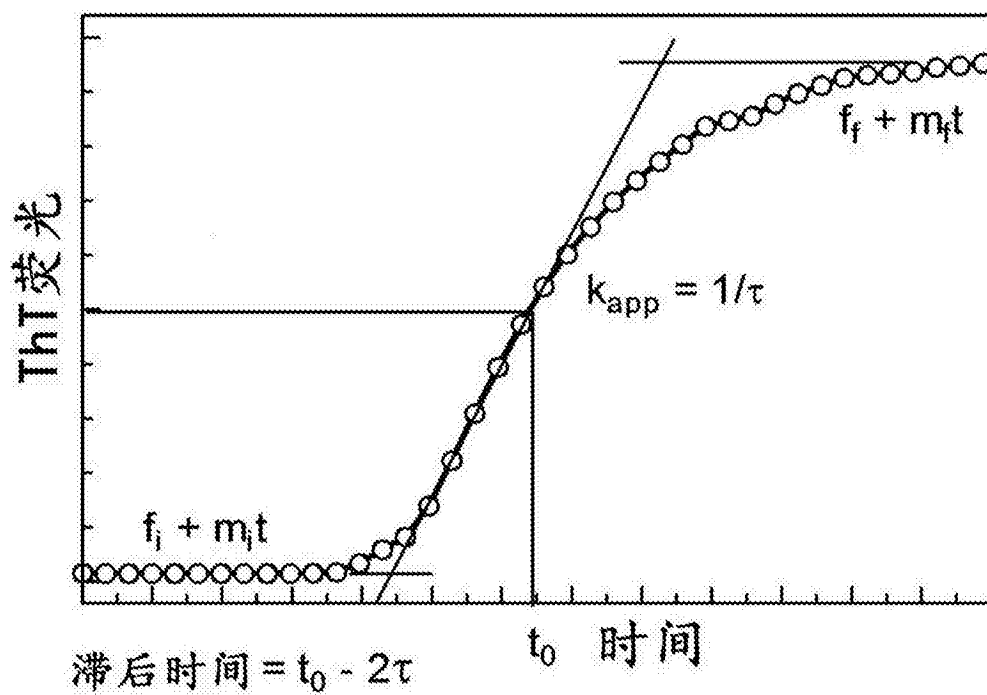


图1