



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 103857408 B

(45)授权公告日 2017.04.12

(21)申请号 201280037512.4

(22)申请日 2012.06.12

(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 103857408 A

(43)申请公布日 2014.06.11

(30)优先权数据

61/500,027 2011.06.22 US

61/547,360 2011.10.14 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2014.01.27

(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/US2012/042084 2012.06.12

(87)PCT国际申请的公布数据
W02012/177443 EN 2012.12.27

(73)专利权人 印第安那大学科技研究公司
地址 美国印第安那州

(72)发明人 理查德·D·戴玛尔基
大卫·L·斯米利

(74)专利代理机构 北京英赛嘉华知识产权代理
有限责任公司 11204
代理人 王达佐 洪欣

(51)Int.Cl.

A61K 38/26(2006.01)

A61K 38/17(2006.01)

A61K 38/16(2006.01)

A61P 3/10(2006.01)

A61P 3/04(2006.01)

A61P 3/00(2006.01)

审查员 李恩

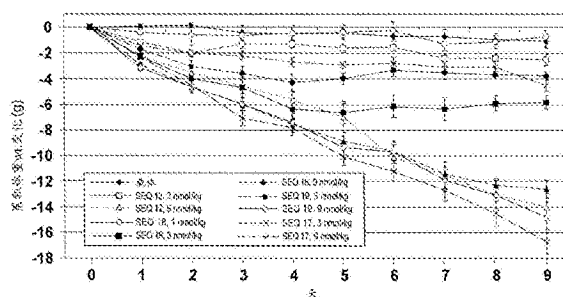
权利要求书2页 说明书52页
序列表12页 附图4页

(54)发明名称

胰高血糖素/GLP-1受体协同激动剂

(57)摘要

本文提供了与天然胰高血糖素相比对GLP-1受体显示活性增强的肽和变体肽。



1. SEQ ID NO:1的变体肽或其药学上可接受的盐,其由通过以下修饰的SEQ ID NO:1的氨基酸序列组成:

- a) 位置2的氨基异丁酸(Aib);
- b) 位置10的Lys,其中所述Lys由C₈-C₂₀烷基链酰化;
- c) 位置16的氨基异丁酸(Aib)或Gln;
- d) 位置18的Ala;
- e) 位置27的Leu或Met;
- f) 位置28的Asp或Asn;
- g) 在羧基末端二肽Lys-γ Glu-酰胺的添加。

2. SEQ ID NO:1的变体肽或其药学上可接受的盐,其由SEQ ID NO:17的氨基酸序列组成。

3. SEQ ID NO:1的变体肽或其药学上可接受的盐,其由SEQ ID NO:12的氨基酸序列组成。

4. 如权利要求1所述的变体肽或其药学上可接受的盐,其中所述烷基通过间隔子共价连接于所述氨基酸。

5. 如权利要求4所述的变体肽或其药学上可接受的盐,其中所述间隔子为氨基酸或二肽。

6. 如权利要求4所述的变体肽或其药学上可接受的盐,其中所述间隔子包含一个或两个酸性残基。

7. 如权利要求1所述的变体肽或其药学上可接受的盐,其中(i)

(对胰高血糖素受体的 EC₅₀)

(对 GLP-1 受体的 EC₅₀)

为20或以下,和/或(ii)其中所述变体肽或其药学上可接受的盐对GLP-1受体所显示的EC₅₀为对胰高血糖素受体的EC₅₀的两倍至十倍。

8. 结合物或其药学上可接受的盐,其由与异源部分结合的权利要求1-7中任一项所述的变体肽组成,其中所述结合物与天然胰高血糖素相比,对GLP-1受体显示增强的活性,并且显示对人类GLP-1受体的选择性为对GIP受体的选择性的至少100倍。

9. 如权利要求8所述的结合物或其药学上可接受的盐,其中所述异源部分包含以下一种或多种:肽、核酸分子、抗体或其片段、聚合物、量子点、小分子、毒素、诊断剂。

10. 如权利要求8所述的结合物或其药学上可接受的盐,其中所述异源部分为肽且所述结合物为融合肽或嵌合肽。

11. 如权利要求10所述的结合物或其药学上可接受的盐,其中所述异源部分包含所述变体肽的位置31上氨基酸的C端方向的具有1-21个氨基酸的延伸。

12. 如权利要求11所述的结合物,其中所述延伸选自:Gly、Glu、Cys、Gly-Gly、Gly-Glu、GPSSGAPPPS(SEQ ID NO:9)或GGPSSGAPPPS(SEQ ID NO:10)。

13. 二聚物或多聚物或其药学上可接受的盐,其包含权利要求1-7中任一项所述的变体肽。

14. 药物组合物,其包含权利要求1-7中任一项所述的变体肽或其药学上可接受的盐,

以及药学上可接受的载剂。

15. 药物组合物,其包含权利要求8所述的结合物或其药学上可接受的盐,以及药学上可接受的载体。

16. 药物组合物,其包含权利要求13所述的二聚物或多聚物或其药学上可接受的盐,以及药学上可接受的载体。

17. 如权利要求14所述的药物组合物,其包含抗糖尿病药剂或抗肥胖药剂。

18. 如权利要求15或16所述的药物组合物,其包含抗糖尿病药剂或抗肥胖药剂。

19. 权利要求1-7中任一项所述的变体肽或其药学上可接受的盐在制备用于治疗糖尿病和肥胖症的药物中的用途。

20. 权利要求8所述的结合物或其药学上可接受的盐在制备用于治疗糖尿病和肥胖症的药物中的用途。

21. 权利要求13所述的二聚物或多聚物或其药学上可接受的盐在制备用于治疗糖尿病和肥胖症的药物中的用途。

22. 权利要求1-7中任一项所述的变体肽或其药学上可接受的盐在制备用于治疗代谢综合征、肝脂肪变性及神经退化性疾病的药物中的用途。

23. 权利要求8所述的结合物或其药学上可接受的盐在制备用于治疗代谢综合征、肝脂肪变性及神经退化性疾病的药物中的用途。

24. 权利要求13所述的二聚物或多聚物或其药学上可接受的盐在制备用于治疗代谢综合征、肝脂肪变性及神经退化性疾病的药物中的用途。

胰高血糖素/GLP-1受体协同激动剂

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求于2011年6月22日提交的美国临时申请第61/500,027号及于2011年10月14日提交的美国临时申请第61/547,360号的优先权,所述申请各自以整体援引方式并入本文。

[0003] 以引用方式并入的电子提交的材料

[0004] 以整体援引方式并入的是与本文同时提交的计算机可读核苷酸/氨基酸序列,并且其标识如下:15千字节ACII(文本)档案,名称为“07012KL_PCT_Sequence_Listing.txt”,于2012年5月25日创建。

背景技术

[0005] 前胰高血糖素原为158个氨基酸的前体多肽,其在不同组织中经加工形成多种不同胰高血糖素原衍生的肽,包括胰高血糖素、胰高血糖素样肽-1(GLP-1)、胰高血糖素样肽-2(GLP-2)以及调酸素(oxyntomodulin; OXM),这些肽参与广泛多种生理功能,包括葡萄糖内稳态、胰岛素分泌、胃排空和肠生长以及调节食物摄取。胰高血糖素为与前胰高血糖素原的氨基酸33至61相对应的29个氨基酸肽,而GLP-1产生为与前胰高血糖素原的氨基酸72至108相对应的37个氨基酸肽。GLP-1(7-36)酰胺或GLP-1(7-37)酸为GLP-1的生物有效形式,其对GLP-1受体显示出基本相等的活性。

[0006] 在低血糖症期间,当血糖含量下降至低于正常值时,胰高血糖素通知肝脏分解糖原并释放葡萄糖,从而使血糖含量向正常水平上升。低血糖症为患有由糖尿病导致的高血糖症(血糖水平升高)的患者中胰岛素疗法的常见副作用。因此,葡萄糖调节中胰高血糖素的最公认的作用为对抗胰岛素的作用并维持血糖水平。

[0007] GLP-1与胰高血糖素相比具有不同的生物活性。其作用包括刺激胰岛素合成及分泌、抑制胰高血糖素分泌及抑制食物摄取。GLP-1已显示降低糖尿病患者的高血糖。Exendin-4,即来自蜥蜴毒液的与GLP-1共享约50%氨基酸一致性的肽,活化GLP-1受体并同样显示降低糖尿病患者的高血糖。

[0008] 还有以下证据,即GLP-1和Exendin-4可减少食物摄取并促进体重减轻,此作用将不仅有益于糖尿病患者而且亦有益于罹患肥胖症的患者。患有肥胖症的患者具有较高的糖尿病、高血压、高脂血症、心血管疾病及肌肉骨骼疾病的风险。

[0009] 发明概述

[0010] 本公开提供了对胰高血糖素受体显示活性、对GLP-1受体显示活性或对胰高血糖素受体和GLP-1受体各自均显示活性的肽和变体肽。在示例性实施方案中,本本所公开的肽和变体肽与天然胰高血糖素相比,对GLP-1受体显示增强的活性。在示例性方面中,肽和变体肽相对于GIP受体,对人类GLP-1受体显示至少100倍的选择性。

[0011] 本公开进一步提供了包含与异源部分结合的本文所述的任何肽和变体肽的结合物。在示例性方面中,异源部分为肽或蛋白质且结合物为融合肽或嵌合肽。在示例性方面中,异源部分为聚合物,例如聚乙二醇。本公开此外提供了包含本文所述的任何肽和变体肽

的二聚物和多聚物。

[0012] 另外,本公开提供了包含本文所述的任何肽和变体肽以及药学可接受的载剂的药物组合物,以及治疗或预防患者的疾病或医学病况(例如代谢综合征、糖尿病、肥胖症、肝脂肪变性、神经退化性疾病、低血糖症)的方法。该方法包括向患者以有效治疗疾病或医学病况的量给予任选调配为药物组合物的本文所公开的肽或变体肽。

[0013] 附图简述

[0014] 图1示出用载体对照或一定剂量的SEQ ID NO:12,17,18或19的肽处理的DIO小鼠的累积体重变化(克)的图,如实例7中所详述的。

[0015] 图2示出用载体对照或一定剂量的SEQ ID NO:12,17,18或19的肽处理的DIO小鼠的基础葡萄糖(mg/dl)的图,如实例7中所详述的。

[0016] 图3A示出用载体对照、利拉鲁肽(Liraglutide;Lira)或一定剂量的SEQ ID NO:17或20的肽处理的肥胖猕猴的累积体重变化(%)的图,如实例8中所详述的。

[0017] 图3B示出用载体对照、利拉鲁肽或一定剂量的SEQ ID NO:17或20的肽处理的肥胖猕猴的累积食物摄取(表示为第0天食物摄取的百分比)的图,如实例8中所详述的。

[0018] 图4示出用载体对照或一定剂量的SEQ ID NO:17的肽处理的糖尿病猕猴的血糖含量(mg/dL)的图,如实例9中所详述的。

[0019] 发明详述

[0020] 定义

[0021] 如本文所用,术语“约”意指比所述值或值的范围大或小10%,但不旨在将任何值或值的范围仅指定为这种较宽泛的定义。之前有术语“约”的各值或值的范围也旨在涵盖所述绝对值或值的范围的实施方案。

[0022] 如本文所用,术语“药学可接受的载剂”包括任何标准医药载剂,诸如磷酸盐缓冲生理盐水溶液、水、乳液(诸如油/水或水/油乳液)及各种类型的湿润剂。该术语也涵盖由美国联邦政府管理机构批准或美国药典(US Pharmacopeia)中所列的用于动物(包括人类)的任何药剂。

[0023] 如本文所用,术语“药学可接受的盐”是指化合物的保留母体化合物的生物活性且在生物学上或其他方面并无不妥之处的盐。本文所公开的许多化合物通过存在氨基和/或羧基或与其类似的基团而能够形成酸和/或碱盐。

[0024] 药学可接受的碱加成盐可由无机和有机碱制备。仅举例而言,衍生自无机碱的盐包括钠盐、钾盐、锂盐、铵盐、钙盐以及镁盐。衍生自有机碱的盐包括(但不限于)伯胺、仲胺以及叔胺的盐。

[0025] 如本文所用,术语“治疗”包括预防特定病症或病况,或减轻与特定病症或病况相关的症状和/或预防或消除所述症状。举例而言,如本文所用,术语“治疗糖尿病”一般会指朝正常水平的方向改变葡萄糖血液水平,并且根据所给定的情形,可包括增加或减少血糖水平。

[0026] 如本文所用,胰高血糖素肽的“有效”量或“治疗有效量”是指肽的无毒但足以提供所需作用的量。举例而言,一种所需作用将为预防或治疗高血糖症(例如,如通过血糖水平更接近正常水平的变化而测量的),或诱发体重减轻/预防体重增加(例如,如通过体重降低而测量的),或预防或减少体重的增加,或使身体脂肪分布标准化。“有效”的量将根据个体

的年龄和一般状况、给药模式等而在个体与个体之间变化。因此，并不总是可指定精确“有效量”。然而，任何个别情况的适当“有效”量可由本领域技术人员使用常规实验确定。

[0027] 术语“胃肠外”意指不通过消化道，而是通过一些其他途径，例如皮下、肌肉内、脊柱内或静脉内。

[0028] 如本文所用，术语“肽”涵盖3个以上氨基酸且通常少于100个氨基酸的链，其中所述氨基酸为天然存在的或编码的或非天然存在的或非编码的氨基酸。非天然存在的氨基酸是指在体内不天然存在而可并入本文所述的肽结构中的氨基酸。如本文所用，“非编码”是指不为任何以下20种氨基酸的L-异构体的氨基酸：Ala、Cys、Asp、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Pro、Gln、Arg、Ser、Thr、Val、Trp、Tyr。如本文所用，“编码”是指为任何以下20种氨基酸的L-异构体的氨基酸：Ala、Cys、Asp、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Pro、Gln、Arg、Ser、Thr、Val、Trp、Tyr。在一些实施方案中，本文所述的肽和变体肽与SEQ ID NO:1 (其长29个氨基酸)具有大致相同的长度，例如长25-35个氨基酸。示例性长度包括长29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49或50个氨基酸。

[0029] 通常，多肽和蛋白具有大于“肽”的长度的聚合物长度。

[0030] 在本申请通篇中，所有通过数字而对特定氨基酸位置的提及(例如位置28)是指天然胰高血糖素(SEQ ID NO:1)中该位置上或其任何类似物中相应氨基酸位置上的氨基酸。举例而言，本文提及“位置28”将意指SEQ ID NO:1的第一氨基酸已删除的胰高血糖素类似物的相应位置27。类似地，本文提及“位置28”将意指SEQ ID NO:1的N端之前添加了一个氨基酸的胰高血糖素类似物的相应位置29。如本文所用，“氨基酸修饰”是指(i) SEQ ID NO:1的氨基酸取代或替换为不同氨基酸(天然存在的或编码的或非编码的或非天然存在的氨基酸)，(ii)添加氨基酸(天然存在的或编码的或非编码的或非天然存在的氨基酸)至SEQ ID NO:1，或(iii)删除SEQ ID NO:1的一或多个氨基酸。

[0031] 关于两个氨基酸序列的“一致性百分比”是指当将两个序列对准以达成最大对应性(例如可引入空隙以用于最佳对准)时，第一序列的匹配(一致于)第二参考序列中的氨基酸的氨基酸数目除以参考序列的长度。

[0032] 氨基酸“修饰”是指插入、删除一个氨基酸或一个氨基酸取代为另一氨基酸。在一些实施方案中，氨基酸取代或替换为保守性氨基酸取代，例如位置2、5、7、10、11、12、13、14、16、17、18、19、20、21、24、27、28或29中一个或多个氨基酸的保守性取代。如本文所用，术语“保守性氨基酸取代”为将一个氨基酸替换为另一具有类似性质(例如尺寸、电荷、疏水性、亲水性和/或芳香性)的氨基酸，并且包括在以下五组之一内的交换：

[0033] I. 小脂族、非极性或非带极性残基：

[0034] Ala、Ser、Thr、Pro、Gly；

[0035] II. 极性、带负电残基及其酰胺及酯：

[0036] Asp、Asn、Glu、Gln、磺基丙氨酸及高磺基丙氨酸；

[0037] III. 极性、带正电残基：

[0038] His、Arg、Lys；鸟氨酸(Orn)

[0039] IV. 大的、脂族、非极性残基：

[0040] Met、Leu、Ile、Val、Cys、正亮氨酸(Nle)、高半胱氨酸

[0041] V.大的、芳族残基:

[0042] Phe、Tyr、Trp、乙酰苯丙氨酸

[0043] 在一些实施方案中,氨基酸取代不为保守性氨基酸取代,例如为非保守性氨基酸取代。

[0044] 如本文所用,术语“带电氨基酸”或“带电残基”是指包含在生理pH值下于水溶液中带负电荷(即去质子化)或带正电荷(即质子化)的侧链的氨基酸。举例而言,带负电氨基酸包括天冬氨酸、谷氨酸、磺基丙氨酸、高磺基丙氨酸以及高谷氨酸,而带正电氨基酸包括精氨酸、赖氨酸以及组氨酸。带电氨基酸包括20种编码氨基酸中的带电氨基酸以及非典型或非天然存在或非编码的氨基酸。

[0045] 如本文所用,术语“酸性氨基酸”是指包含第二酸性部分(除氨基酸的羧酸以外,包括例如羧酸或磺酸基)的氨基酸。

[0046] 如本文所用,术语“酰化氨基酸”是指与酰基的产生方式无关(例如氨基酸并入肽之前酰化或并入肽之后酰化),包含对于天然存在氨基酸而言为非原生的酰基的氨基酸。

[0047] 如本文所用,术语“烷基化氨基酸”是指与烷基的产生方式无关,包含对于天然存在氨基酸而言为非原生的烷基的氨基酸。因此,本公开的酰化氨基酸及烷基化氨基酸为非编码氨基酸。

[0048] 如本文所用,术语分子相对于第二受体、对第一受体的“选择性”是指以下比率:分子于第二受体的EC50除以分子于第一受体的EC50。举例而言,于第一受体具有1nM的EC50且于第二受体具有100nM的EC50的分子具有相对于第二受体、对第一受体100倍的选择性。

[0049] 如本文所用,术语“天然胰高血糖素”是指由SEQ ID NO:1的序列组成的肽,且术语“天然GLP-1”为表示GLP-1 (7-36) 酰胺、GLP-1 (7-37) 酸或那两种化合物的混合物的通用术语。

[0050] 如本文所用,分子的“胰高血糖素效力”或“与天然胰高血糖素相比的效力”是指分子对胰高血糖素受体的EC50除以天然胰高血糖素对胰高血糖素受体的EC50的反比。

[0051] 如本文所用,分子的“GLP-1效力”或“与天然GLP-1相比的效力”是指分子对GLP-1受体的EC50除以天然GLP-1对GLP-1受体的EC50的反比。

[0052] 实施方案

[0053] 本公开提供了对GLP-1受体、对胰高血糖素受体或对GLP-1受体和胰高血糖素受体两者显示活性的肽和变体肽。对此,本公开提供GLP-1受体激动剂肽、胰高血糖素受体激动剂肽及GLP-1/胰高血糖素协同激动剂肽。在示例性实施方案中,本文公开的肽和变体肽与天然人类胰高血糖素(SEQ ID NO:1)相比,对GLP-1受体显示增强的活性或较高的效力。在示例性实施方案中,本公开的肽和变体肽与天然人类GLP-1 (SEQ ID NO:2) 或其活性形式(SEQ ID NO:5和6)之一相比,对GLP-1受体显示较高的效力。在示例性实施方案中,肽和变体肽与天然人类GLP-1相比,对胰高血糖素受体显示较高的效力。在示例性实施方案中,肽和变体肽与天然人类胰高血糖素相比,对胰高血糖素受体显示较高的效力。

[0054] 在示例性实施方案中,本文所述的肽和变体肽相对于天然胰高血糖素或天然GLP-1显示其他性质的改良,诸如较高的稳定性、较高的溶解度、延长的循环半衰期、延迟的作用起始、延长的作用持续时间、减幅的峰值(例如相对降低的平均峰值血浆浓度)以及提高的对蛋白酶(诸如DPP-IV)的抗性。

[0055] 本文所述的肽和变体肽是基于天然人类胰高血糖素的氨基酸序列 (SEQ ID NO: 1), 并且在本文中描述为“肽”、“变体肽”、“胰高血糖素类似物”、“类似物”或“胰高血糖素肽”。应了解, 诸如“类似物”或“变体”或“修饰”的术语涵盖从头合成的肽或蛋白质, 并且不需要执行任何特定修饰步骤。在一些方面中, 本文所述的肽或变体肽包括相对于SEQ ID NO: 1包含1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15个氨基酸修饰、且在一些情况下包含16个以上 (例如17、18、19、20、21、22、23、24、25、26个) 氨基酸修饰的经修饰SEQ ID NO: 1氨基酸序列, 如本文进一步所述。因此, 胰高血糖素类似物和/或胰高血糖素肽的以下描述适于本文公开的任何肽和变体肽, 而与天然人类胰高血糖素 (SEQ ID NO: 1) 与本公开的肽或变体肽之间的相似度无关。

[0056] 预期本文所述的任何肽序列可通过并入另外氨基酸修饰; 例如通过在例如本文所述的位置包括本文所述的任何修饰, 或通过并入保守性取代, 或通过在该位置恢复成天然胰高血糖素氨基酸 (参见SEQ ID NO: 1) 而进一步变化。在示例性实施方案中, 修饰包括例如酰化, 烷基化, 聚乙二醇化, C端截短, 位置1、2、3、7、10、12、15、16、17、18、19、20、21、23、24、27、28和29中一个或多个位置的氨基酸的取代。举例而言, 在本文公开的任何肽序列出于聚乙二醇化目的而包括Cys的情况下, 变体肽可将不同氨基酸用于聚乙二醇化。作为另一实例, 变体肽可在不同位置聚乙二醇化 (例如将现有Cys置换为不同氨基酸、在预定聚乙二醇化位置插入新的Cys且使新的Cys聚乙二醇化)。作为另一实例, 在本文公开的任何肽序列出于酰化目的而包括Lys的情况下, 可使Lys移动至不同位置且使新位置酰化。在本文所述的任何实施方案中, 变体肽可与母体肽在母体肽长度上或母体肽的氨基酸1-29上为例如80%、85%、90%或95%一致的 (例如相比于母体肽, 可并入1、2、3、4或5个额外修饰)。

[0057] 还涵盖了本文公开的任何肽序列的结合物、融合蛋白及多聚物。

[0058] 肽和变体肽的活性

[0059] 对胰高血糖素受体的激动剂活性

[0060] 在示例性实施方案中, 本公开的肽和变体肽对胰高血糖素受体显示约1000 μ M以下 (例如约750 μ M以下、约500 μ M以下、约250 μ M以下、约100 μ M以下、约75 μ M以下、约50 μ M以下、约25 μ M以下、约10 μ M以下、约5 μ M以下或者约1 μ M以下) 的EC₅₀。在示例性实施方案中, 肽和变体肽对于胰高血糖素受体活化显示在纳摩浓度范围内的EC₅₀。举例而言, 本文公开的肽和变体肽对胰高血糖素受体显示约1000nM以下 (例如约750nM以下、约500nM以下、约250nM以下、约100nM以下、约75nM以下、约50nM以下、约25nM以下、约10nM以下、约5nM以下或者约1nM以下) 的EC₅₀。在示例性实施方案中, 肽和变体肽对胰高血糖素受体显示在皮摩浓度范围内的EC₅₀。因此, 在示例性方面中, 肽和变体肽对于胰高血糖素受体活化显示约1000pM以下 (例如约750pM以下、约500pM以下、约250pM以下、约100pM以下、约75pM以下、约50pM以下、约25pM以下、约10pM以下、约5pM以下或者约1pM以下) 的EC₅₀。应了解, 较低EC₅₀指示于受体的较高活性或效力。

[0061] 在一些实施方案中, 本文所述的胰高血糖素类似物对胰高血糖素受体显示约0.001pM以上、约0.01pM以上或者约0.1pM以上的EC₅₀。胰高血糖素受体活化 (胰高血糖素受体活性) 可通过测量过度表达胰高血糖素受体的HEK293细胞中的cAMP诱导的体外测试来测量, 例如分析与编码胰高血糖素受体的DNA和实施例2所述的与cAMP反应性组件连接的荧光素酶基因共转染的HEK293细胞。

[0062] 在示例性实施方案中,本文公开的肽和变体肽相对于天然胰高血糖素对胰高血糖素受体显示约0.001%以上、约0.01%以上、约0.1%以上、约0.5%以上、约1%以上、约5%以上、约10%以上、约20%以上、约30%以上、约40%以上、约50%以上、约60%以上、约75%以上、约100%以上、约125%以上、约150%以上、约175%以上、约200%以上、约250%以上、约300%以上、约350%以上、约400%以上、约450%以上或者约500%或更高的活性(胰高血糖素效力)。在一些实施方案中,本文所述的肽和变体肽相对于天然胰高血糖素对胰高血糖素受体显示约5000%以下或者约10,000%以下的活性。胰高血糖素类似物于受体(相对于该受体的天然配位体)的活性计算为胰高血糖素类似物相对于天然配位体的EC₅₀的反比。

[0063] 在一些实施方案中,肽和变体肽仅对胰高血糖素受体显示显著活性(效力)且对GLP-1受体显示极小活性至无活性。因此,在一些实施方案中,肽和变体肽被视为“纯胰高血糖素受体激动剂”或不被视为“胰高血糖素/GLP-1受体协同激动剂”。在一些实施方案中,这些肽和变体肽对胰高血糖素受体显示本文所述的任何水平的活性或效力,但对GLP-1受体具有显著较低的活性(效力)。在一些实施方案中,胰高血糖素类似物对GLP-1受体显示与对胰高血糖素受体的EC₅₀相比100倍以上的EC₅₀。

[0064] 对GLP-1受体的激动剂活性

[0065] 在示例性实施方案中,肽和变体肽对于GLP-1受体活化显示约1000μM以下(例如约750μM以下、约500μM以下、约250μM以下、约100μM以下、约75μM以下、约50μM以下、约25μM以下、约10μM以下、约5μM以下或者约1μM以下)的EC₅₀。在示例性实施方案中,肽和变体肽对GLP-1受体显示约1000nM以下(例如约750nM以下、约500nM以下、约250nM以下、约100nM以下、约75nM以下、约50nM以下、约25nM以下、约10nM以下、约5nM以下或者约1nM以下)的EC₅₀。在示例性实施方案中,肽和变体肽对GLP-1受体具有在皮摩浓度范围内的EC₅₀。因此,在一些实施方案中,肽和变体肽对于GLP-1受体活化显示约1000pM以下(例如约750pM以下、约500pM以下、约250pM以下、约100pM以下、约75pM以下、约50pM以下、约25pM以下、约10pM以下、约5pM以下或者约1pM以下)的EC₅₀。应理解,较低的EC₅₀指示于受体的较高的活性或效力。

[0066] 在示例性实施方案中,本文所述的肽和变体肽对GLP-1受体显示约0.001pM以上、约0.01pM以上或者约0.1pM以上的EC₅₀。GLP-1受体活化(GLP-1受体活性)可以通过测量过度表达GLP-1受体的HEK293细胞中的cAMP诱导的体外测试来测量,例如分析与编码GLP-1受体的DNA及实例2所述的与cAMP反应性组件连接的荧光素酶基因共转染的HEK293细胞。

[0067] 在一些实施方案中,本公开的肽和变体肽相对于天然GLP-1,对GLP-1受体显示约0.001%以上、约0.01%以上、约0.1%以上、约0.5%以上、约1%以上、约5%以上、约10%以上、约20%以上、约30%以上、约40%以上、约50%以上、约60%以上、约75%以上、约100%以上、约125%以上、约150%以上、约175%以上、约200%以上、约250%以上、约3300%以上、约350%以上、约400%以上、约450%以上或者约500%或更高的活性(GLP-1效力)。在一些实施方案中,本文所述的肽和变体肽相对于天然GLP-1,对GLP-1受体显示约5000%以下或者约10,000%以下的活性。

[0068] 在一些实施方案中,肽和变体肽仅对GLP-1受体显示显著的活性(效力)且对胰高血糖素受体显示极小活性至无活性。在一些实施方案中,肽和变体肽被视为“纯GLP-1受体激动剂”或不被视为“胰高血糖素/GLP-1受体协同激动剂”。在一些实施方案中,这些肽和变

体肽对GLP-1受体显示本文所述的任何水平的活性或效力,但对胰高血糖素受体具有显著较低的活性(效力)。在一些实施方案中,肽和变体肽对胰高血糖素受体显示与对GLP-1受体的EC50相比100倍以上的EC50。

[0069] 对GLP-1受体及胰高血糖素受体的激动剂活性

[0070] 在示例性实施方案中,肽和变体肽对GLP-1受体与胰高血糖素受体两者均显示活性,并且可被视为“胰高血糖素/GLP-1受体协同激动剂”。在示例性实施方案中,肽和变体肽对胰高血糖素受体的活性(例如EC50或相对活性或效力)与其对GLP-1受体的活性(例如EC50或相对活性或效力)有约50倍、约40倍、约30倍、约20倍、约10倍或约5倍以内的不同(更高或更低)。在示例性方面中,肽或变体肽的胰高血糖素效力与其GLP-1效力有约25倍、约20倍、约15倍、约10倍或约5倍以内的不同(更高或更低)。在示例性方面中,肽或变体肽的胰高血糖素效力与其GLP-1效力低约25倍、约20倍、约15倍、约10倍或约5倍以内。

[0071] 在示例性实施方案中,协同激动剂对GLP-1受体与对胰高血糖素受体相比大致等效或相对更有效。举例而言,肽或变体肽对胰高血糖素受体的相对活性或EC50或效力除以肽或变体肽对GLP-1受体的相对活性或EC50或效力的比率小于X或约为X,其中X选自100、75、60、50、40、30、20、15、10或5。在示例性实施方案中,肽或变体肽对胰高血糖素受体的EC50或效力或相对活性除以肽或变体肽对GLP-1受体的EC50或效力或相对活性的比率约为1至小于5(例如约4、约3、约2、约1)。在示例性实施方案中,肽或变体肽对GLP-1受体的EC50或效力或相对活性除以肽或变体肽对胰高血糖素受体的EC50或效力或相对活性的比率小于5(例如约4、约3、约2、约1)。在示例性实施方案中,肽或变体肽的胰高血糖素效力相比于肽或变体肽的GLP-1效力的比率小于Y或约为Y,其中Y选自100、75、60、50、40、30、20、15、10及5。在示例性实施方案中,肽或变体肽的胰高血糖素效力相比于肽或变体肽的GLP-1效力的比率小于5(例如约4、约3、约2、约1)。在一些实施方案中,胰高血糖素类似物对胰高血糖素受体的EC50为对GLP-1受体的EC50的2倍至10倍(例如2倍、3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、10倍)。

[0072] 在示例性实施方案中,肽主要为胰高血糖素激动剂且对胰高血糖素受体比对GLP-1受体相对更有效(例如肽对胰高血糖素受体与GLP-1受体相比有效5倍以上)。举例而言,肽或变体肽对GLP-1受体的相对活性或效力或EC50除以肽或变体肽对胰高血糖素受体的相对活性或效力或EC50的比率小于V或约为V,其中V选自100、75、60、50、40、30、20、15、10或5。在一些实施方案中,肽或变体肽的GLP-1效力相比于肽或变体肽的胰高血糖素效力的比率小于W或约为W,其中W选自100、75、60、50、40、30、20、15、10及5。在一些实施方案中,肽或变体肽对GLP-1受体显示天然GLP-1的活性的至少0.1% (例如约0.5%以上、约1%以上、约5%以上、约10%以上或更高) (GLP-1效力),并且对胰高血糖素受体显示天然胰高血糖素的活性的至少0.1% (例如约0.5%以上、约1%以上、约5%以上、约10%以上或更高) (胰高血糖素效力)。

[0073] 对GIP受体的活性

[0074] 除了对胰高血糖素受体和/或GLP-1受体具有活性外,在一些方面中,本文所述的肽和变体肽也对GIP受体显示低激动剂活性。在这样的方面中,这样的肽和变体肽优选对于GLP-1受体的选择性相对于GIP受体为至少100倍。

[0075] 然而,在其他方面中,肽或变体肽对GIP受体显示明显活性,例如类似物对GIP受体

的EC50与其对GLP-1受体的EC50的不同小于约50倍,任选地,其中类似物的GIP效力在该类似物的GLP-1效力的约50倍以内。在示例性实施方案中,肽对于GIP受体活化活性显示约1 μ M以下、或100nM以下、或约75、50、25、10、8、6、5、4、3、2或1nM以下的EC50。应理解,较低的EC50指示于受体的较高的活性或效力。在一些实施方案中,本文所述的肽和变体肽对GIP受体显示约0.001nM、0.01nM或0.1nM的EC50。在一些实施方案中,本文所述的肽和变体肽对GIP受体显示不超过约100nM的EC50。受体活化可通过测量过度表达该受体的HEK293细胞中的cAMP诱导的体外测试来测量,例如分析与编码该受体的DNA及实例2所述的与cAMP反应性组件连接的荧光素酶基因共转染的HEK293细胞。

[0076] 在一些实施方案中,本文公开的肽和变体肽相对于天然GIP,对GIP受体显示至少约0.1%、1%、10%、50%、100%、150%或200%或更高的活性(GIP效力)。在一些实施方案中,本文所述的肽和变体肽相对于天然GIP,对GIP受体显示不超过1000%、10,000%、100,000%或1,000,000%的活性。胰高血糖素肽于受体(相对于该受体的天然配位体)的活性(效力)计算为该肽相对于天然配位体的EC50的反比。

[0077] 因此,本发明的一方面提供了对胰高血糖素受体及GIP受体两者均显示活性的肽和变体肽(“胰高血糖素/GIP协同激动剂”)。在一些实施方案中,肽对GIP受体的EC50与其对胰高血糖素受体的EC50的不同小于约50倍、40倍、30倍或20倍(更高或更低)。在一些实施方案中,肽的GIP效力与其胰高血糖素效力的不同小于约500倍、450倍、400倍、350倍、300倍、250倍、200倍、150倍、100倍、75倍、50倍、25倍、20倍、15倍、10倍或5倍(更高或更低)。在一些实施方案中,GLP-1活性例如通过位置7上的氨基酸修饰、位置27或28上氨基酸的氨基酸C端方向的删除、或其组合而显著降低或破坏。

[0078] 在本公开的可替代方面中,本公开的肽和变体肽例如由于位置3上Gln的氨基酸修饰而于GLP-1和GIP受体显示活性,但对胰高血糖素受体不显示显著活性(“GIP/GLP-1协同激动剂”)。举例而言,该位置上的用酸性、碱性或疏水性氨基酸(谷氨酸、鸟氨酸、正亮氨酸)的取代降低了胰高血糖素活性。在其他方面中,肽和变体肽于胰高血糖素、GIP及GLP-1受体各自均显示活性(“胰高血糖素/GIP/GLP-1三重激动剂”)。举例而言,在这些后者方面的任一方面中,肽对GIP受体的EC50与其对GLP-1受体的EC50的不同小于约50倍、40倍、30倍或20倍(更高或更低)。在一些实施方案中,肽的GIP效力与其GLP-1效力的不同小于约25倍、20倍、15倍、10倍或5倍(更高或更低)。在一些实施方案中,这些肽对胰高血糖素受体具有天然胰高血糖素的活性的约10%以下,例如约1-10%,或约0.1-10%,或高于约0.1%但低于约10%。

[0079] 结合物的活性

[0080] 在一些实施方案中,如上文所述,本文所述的肽和变体肽对胰高血糖素受体显示活性或效力和/或对GLP-1受体显示活性和/或对GIP受体显示活性,并且当该肽或变体肽为结合物的一部分(例如结合于异源部分,例如亲水性部分,如聚乙二醇)时,与该肽或变体肽不为结合物的一部分时相比,该肽或变体肽显示较低的活性(即,更低的效力或更高的EC50)。在一些方面中,肽或变体肽在不为结合物的一部分时对胰高血糖素受体和/或GLP-1受体所显示的效力为该肽或变体肽为结合物的一部分时的效力的约10倍或更高。在一些方面中,肽或变体肽在未结合时对胰高血糖素受体和/或GLP-1受体所显示的效力为该肽或变体肽在结合时的效力的约10倍、约15倍、约20倍、约25倍、约30倍、约35倍、约40倍、约45倍、

约50倍、约100倍或甚至更高倍数。

[0081] 胰高血糖素类似物的结构

[0082] 酰化

[0083] 根据一些实施方案,胰高血糖素类似物包含酰化氨基酸(例如非编码酰化氨基酸(例如包含对于天然存在的氨基酸而言为非原生的酰基的氨基酸))。在一些实施方案中,酰化氨基酸使胰高血糖素类似物具有以下性质中的一种或多种:(i)延长的循环半衰期、(ii)延迟的作用起始、(iii)延长的作用持续时间、(iv)提高的对蛋白酶(诸如DPP-IV)的抗性,以及(v)于GLP-1和胰高血糖素受体中之一或两者的更加的效力。如本文所示,酰化胰高血糖素类似物与相应未酰化胰高血糖素类似物相比,于胰高血糖素和GLP-1受体不显示降低的活性。相反,在一些情况下,酰化胰高血糖素类似物实际上于GLP-1和胰高血糖素受体显示增加的活性。因此,酰化胰高血糖素类似物的效力与胰高血糖素类似物的未酰化形式相当(若未增强)。

[0084] 根据一个实施方案,胰高血糖素类似物出于延长循环半衰期和/或延迟作用起始和/或延长作用持续时间和/或提高对诸如DPP-IV的蛋白酶的抗性的目的,包含通过酯、硫酯或酰胺键联而与胰高血糖素类似物连接的酰基。

[0085] 酰化可在胰高血糖素类似物内的任何位置上进行,包括以下任何位置:位置1-29、第29氨基酸的C端方向位置(例如位置30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47等、C端延伸内的位置或在C端上的氨基酸),条件是胰高血糖素和/或GLP-1活性得到保留(若未增强)。非限制性实例包括位置5、7、10、11、12、13、14、16、17、18、19、20、21、24、27、28或29。在示例性实施方案中,胰高血糖素类似物在选自以下的一或多个位置包含酰化氨基酸:9、10、12、16及20。在示例性实施方案中,胰高血糖素类似物在选自以下的一或多个位置包含酰化氨基酸:10、12及16。在示例性实施方案中,胰高血糖素类似物在选自以下的一或多个位置包含酰化氨基酸:9、10、12、16及20。在示例性实施方案中,胰高血糖素类似物在一或多个位置10和12包含酰化氨基酸。在示例性实施方案中,胰高血糖素类似物在位置12包含酰化氨基酸。在示例性实施方案中,胰高血糖素类似物包含C端延伸且在选自以下的一或多个位置包含酰化氨基酸:9、10、12、16、20及37-43(例如40)。在特定实施方案中,酰化发生于胰高血糖素类似物的位置10,并且胰高血糖素类似物缺乏分子内桥键,例如共价分子内桥键(例如内酰胺桥键)。这样的缺乏分子内桥键的酰化胰高血糖素类似物与缺乏共价分子内桥键的相应未酰化类似物相比以及与在除位置10以外的位置酰化的缺乏分子内桥键的相应类似物相比,于GLP-1和胰高血糖素受体显示增强的活性。如本文所示,位置10上的酰化甚至可使对胰高血糖素受体具有极低活性的胰高血糖素类似物转化成于胰高血糖素及GLP-1受体两者均具有活性的胰高血糖素类似物。因此,发生酰化的位置可改变胰高血糖素类似物的总体活性谱。

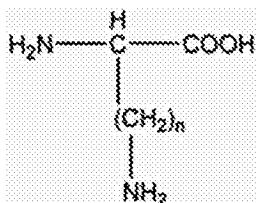
[0086] 在一些实施方案中,胰高血糖素类似物在连接亲水性部分的相同氨基酸位置酰化,或在不同氨基酸位置酰化。非限制性实例包括在位置10酰化及在胰高血糖素类似物的C端部分中一个或多个位置(例如位置24、28或29、C端延伸内或在C端(例如通过添加C端Cys))聚乙二醇化。

[0087] 酰基可直接共价连接于胰高血糖素类似物的氨基酸,或通过间隔子间接共价连接于胰高血糖素类似物的氨基酸,其中该间隔子位于胰高血糖素类似物的氨基酸与酰基之

间。

[0088] 在特定方面中,胰高血糖素类似物经修饰以通过对胰高血糖素类似物的氨基酸侧链的胺、羟基或硫醇进行直接酰化而包含酰基。在一些实施方案中,酰化位于胰高血糖素类似物的位置10、20、24或29。对此,酰化胰高血糖素类似物可包含氨基酸序列SEQ ID NO:1,或其包含一或多个本文所述的氨基酸修饰的经修饰的氨基酸序列,并且该类似物的位置10、20、24及29上至少一个氨基酸被修饰成包含侧链胺、羟基或硫醇的任何氨基酸。在一些特定实施方案中,胰高血糖素类似物的直接酰化通过位置10上氨基酸的侧链胺、羟基或硫醇进行。

[0089] 在一些实施方案中,包含侧链胺的氨基酸为式I的氨基酸:



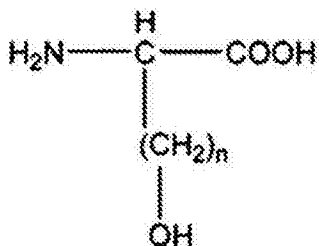
[0090]

其中 $n=1$ 至 4

[式 I]

[0091] 在一些示例性实施方案中,式I的氨基酸为其中 n 为4 (Lys) 或 n 为3 (Orn) 的氨基酸。

[0092] 在其他实施方案中,包含侧链羟基的氨基酸为式II的氨基酸:



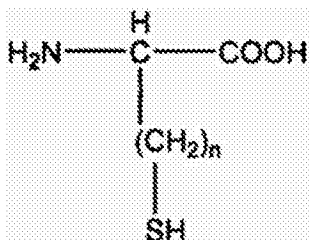
[0093]

其中 $n=1$ 至 4

[式 II]

[0094] 在一些示例性实施方案中,式II的氨基酸为其中 n 为1的氨基酸 (Ser) 。

[0095] 在其他实施方案中,包含侧链硫醇的氨基酸为式III的氨基酸:



[0096]

其中 $n=1$ 至 4

[式 III]

[0097] 在一些示例性实施方案中,式III的氨基酸为其中n为1的氨基酸(Cys)。

[0098] 在其他实施方案中,包含侧链胺、羟基或硫醇的氨基酸为包含式I、式II或式III的相同结构的二取代氨基酸,但与式I、式II或式III的氨基酸的 α 碳结合的氢被第二侧链置换。

[0099] 在一些实施方案中,酰化胰高血糖素在类似物与酰基之间包含间隔子。在一些实施方案中,胰高血糖素类似物共价结合于间隔子,该间隔子共价结合于酰基。

[0100] 在一些实施方案中,间隔子为包含侧链胺、羟基或硫醇的氨基酸,或包含含有侧链胺、羟基或硫醇的氨基酸的二肽或三肽。间隔子所连接的氨基酸可为包含允许连接于间隔子的部分的任何氨基酸(例如单重或双重 α 取代的氨基酸)。举例而言,包含侧链 NH_2 、 $-\text{OH}$ 或 COOH 的氨基酸(例如Lys、Orn、Ser、Asp或Glu)为适合的。对此,酰化胰高血糖素类似物可包含氨基酸序列SEQ ID NO:1,或其包含一或多个本文所述的氨基酸修饰的经修饰的氨基酸序列,并且位置10、20、24及29上至少一个氨基酸被修饰成包含侧链胺、羟基或羧酸酯基的任何氨基酸。

[0101] 在一些实施方案中,间隔子为包含侧链胺、羟基或硫醇的氨基酸,或包含含有侧链胺、羟基或硫醇的氨基酸的二肽或三肽。

[0102] 当酰化通过间隔子的胺基而发生,酰化可通过氨基酸的 α 胺或侧链胺发生。在 α 胺酰化的情况下,间隔子的氨基酸可为任何氨基酸。举例而言,间隔子的氨基酸可为疏水性氨基酸,例如Gly、Ala、Val、Leu、Ile、Trp、Met、Phe、Tyr、6-氨基己酸、5-氨基戊酸、7-氨基庚酸以及8-氨基辛酸。或者,间隔子的氨基酸可为酸性残基,例如Asp、Glu、高谷氨酸、高磺基丙氨酸、磺基丙氨酸、 γ -谷氨酸。

[0103] 在间隔子的氨基酸的侧链胺酰化的情况下,间隔子的氨基酸为包含侧链胺的氨基酸,例如式I的氨基酸(例如Lys或Orn)。在此情况下,间隔子的氨基酸的 α 胺和侧链胺两者均可被酰化,使得胰高血糖素类似物被二酰化。本发明的实施方案包括这样的二酰化分子。

[0104] 当酰化通过间隔子的羟基发生时,氨基酸或二肽或三肽的一个氨基酸可为式II的氨基酸。在一特定示例性实施方案中,氨基酸为Ser。

[0105] 当酰化通过间隔子的硫醇基发生时,氨基酸或二肽或三肽的一个氨基酸可为式III的氨基酸。在一特定示例性实施方案中,氨基酸为Cys。

[0106] 在一些实施方案中,间隔子为亲水性双官能间隔子。在某些实施方案中,亲水性双官能间隔子包含两个以上的反应性基团,例如胺、羟基、硫醇及羧基或其任何组合。在某些实施方案中,亲水性双官能间隔子包含羟基和羧酸酯。在其他实施方案中,亲水性双官能间隔子包含胺基和羧酸酯。在其他实施方案中,亲水性双官能间隔子包含硫醇基和羧酸酯。在特定实施方案中,间隔子包含氨基聚(烷氧基)羧酸酯。对此,间隔子可包含例如 $\text{NH}_2(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n(\text{CH}_2)_m\text{COOH}$,其中m为1至6的任何整数且n为2至12的任何整数,诸如8-氨基3,6-二氧杂辛酸,其可购自Peptides International, Inc. (Louisville, KY)。

[0107] 在一些实施方案中,间隔子为疏水性双官能间隔子。疏水性双官能间隔子本领域已知。参见例如Bioconjugate Techniques, G.T. Hermanson (Academic Press, San Diego, CA, 1996), 其以整体援引方式并入本文。在某些实施方案中,疏水性双官能间隔子包含两个以上的反应性基团,例如胺、羟基、硫醇及羧基或其任何组合。在某些实施方案中,疏水性双官能间隔子包含羟基和羧酸酯。在其他实施方案中,疏水性双官能间隔子包含胺基和羧酸酯。

在其他实施方案中,疏水性双官能间隔子包含硫醇基和羧酸酯。包含羧酸酯和羟基或硫醇基的适合疏水性双官能间隔子在本领域已知,并且包括例如8-羟基辛酸和8-巯基辛酸。

[0108] 在一些实施方案中,双官能间隔子不为在羧酸酯基之间包含具有1-7个碳原子的未支化亚甲基的二羧酸。在一些实施方案中,双官能间隔子为在羧酸酯基之间包含具有1-7个碳原子的未支化亚甲基的二羧酸。

[0109] 在特定实施方案中,间隔子(例如氨基酸、二肽、三肽、亲水性双官能间隔子或疏水性双官能间隔子)长3至10个原子(例如6至10个原子(例如6、7、8、9或10个原子))。在更特定的实施方案中,间隔子长约3至10个原子(例如6至10个原子)且酰基为C12至C18脂肪酰基,例如C14脂肪酰基、C16脂肪酰基,使得间隔子与酰基的总长度为14至28个原子,例如约14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27或28个原子。在一些实施方案中,间隔子与酰基的长度为17至28(例如19至26、19至21)个原子。

[0110] 根据某些前述的实施方案,双官能间隔子可为包含长3至10个原子的氨基酸主链(例如6-氨基己酸、5-氨基戊酸、7-氨基庚酸和8-氨基辛酸)的合成或天然存在的氨基酸(包括但不限于本文所述那些氨基酸中任一种)。或者,间隔子可为具有长3至10个原子(例如6至10个原子)的肽主链的二肽或三肽间隔子。二肽或三肽间隔子的每一氨基酸可与该二肽或三肽的其他氨基酸相同或不同,且可独立地选自:天然存在或编码和/或非编码或非天然存在的氨基酸,包括例如天然存在的氨基酸(Ala、Cys、Asp、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Pro、Arg、Ser、Thr、Val、Trp、Tyr)的任何D或L异构体,或选自以下的非天然存在或非编码的氨基酸的任何D或L异构体: β -丙氨酸(β -Ala)、N- α -甲基-丙氨酸(Me-Ala)、氨基丁酸(Abu)、 γ -氨基丁酸(γ -Abu)、氨基己酸(ϵ -Ahx)、氨基异丁酸(Aib)、氨基甲基吡咯羧酸、氨基哌啶羧酸、氨基丝氨酸(Ams)、氨基四氢吡喃-4-羧酸、精氨酸N-甲氧基-N-甲基酰胺、 β -天冬氨酸(β -Asp)、氮杂环丁烷羧酸、3-(2-苯并噻唑基)丙氨酸、 α -叔丁基甘氨酸、2-氨基-5-脲基-正戊酸(瓜氨酸,Cit)、 β -环己基丙氨酸(Cha)、乙酰胺基甲基-半胱氨酸、二氨基丁酸(Dab)、二氨基丙酸(Dpr)、二羟基苯丙氨酸(DOPA)、二甲基噻唑烷(DMTA)、 γ -谷氨酸(γ -Glu)、高丝氨酸(Hse)、羟脯氨酸(Hyp)、异亮氨酸N-甲氧基-N-甲基酰胺、甲基-异亮氨酸(MeIle)、六氢异烟酸(Isn)、甲基-亮氨酸(MeLeu)、甲基-赖氨酸、二甲基-赖氨酸、三甲基-赖氨酸、甲醇基脯氨酸、甲硫氨酸-亚砷(Met(O))、甲硫氨酸-砷(Met(O₂))、正亮氨酸(Nle)、甲基-正亮氨酸(Me-Nle)、正缬氨酸(Nva)、鸟氨酸(Orn)、对氨基苯甲酸(PABA)、青霉素(Pen)、甲基苯丙氨酸(MePhe)、4-氯苯丙氨酸(Phe(4-Cl))、4-氟苯丙氨酸(Phe(4-F))、4-硝基苯丙氨酸(Phe(4-NO₂))、4-氰基苯丙氨酸((Phe(4-CN))、苯基甘氨酸(Phg)、哌啶基丙氨酸、哌啶基甘氨酸、3,4-去氢脯氨酸、吡咯烷基丙氨酸、肌氨酸(Sar)、硒半胱氨酸(Sec)、O-苄基-磷酸丝氨酸、4-氨基-3-羟基-6-甲基庚酸(Sta)、4-氨基-5-环己基-3-羟基戊酸(ACHPA)、4-氨基-3-羟基-5-苯基戊酸(AHPPA)、1,2,3,4,-四氢-异喹啉-3-羧酸(Tic)、四氢吡喃甘氨酸、噻吩基丙氨酸(Thi)、O-苄基-磷酸酪氨酸、O-磷酸酪氨酸、甲氧基酪氨酸、乙氧基酪氨酸、O-(双-二甲基氨基-膦酸基)-酪氨酸、硫酸酪氨酸四丁基胺、甲基-缬氨酸(MeVal)及烷基化3-巯基丙酸。

[0111] 在一些实施方案中,间隔子包含总体负电荷,例如包含一个或两个带负电的氨基酸。在一些实施方案中,二肽不是一般结构A-B的任何二肽,其中A选自Gly、Gln、Ala、Arg、Asp、Asn、Ile、Leu、Val、Phe及Pro,其中B选自Lys、His、Trp。在一些实施方案中,二肽间隔子

选自:Ala-Ala、 β -Ala- β -Ala、Leu-Leu、Pro-Pro、 γ -氨基丁酸- γ -氨基丁酸、Glu-Glu及 γ -Glu- γ -Glu。

[0112] 在一些示例性实施方案中,胰高血糖素类似物经修饰以通过对间隔子的胺、羟基或硫醇进行酰化而包含酰基,该间隔子连接于位置10、20、24或29的氨基酸的侧链或胰高血糖素类似物的C端氨基酸。

[0113] 在更特定实施方案中,酰基连接于胰高血糖素类似物的位置10的氨基酸且间隔子与酰基的长度为14至28个原子。在一些方面中,位置10的氨基酸为式I的氨基酸(例如Lys)或与式I相关的二取代氨基酸。在更特定实施方案中,胰高血糖素类似物缺乏分子内桥键,例如共价分子内桥键。胰高血糖素类似物例如可为包含一或多个 α , α -二取代氨基酸(例如AIB)以使类似物的 α 螺旋稳定的胰高血糖素类似物。

[0114] 通过胺、羟基及硫醇的肽酰化的适合方法在本领域已知。参见例如实施例19(通过胺进行酰化的方法),Miller,Biochem Biophys Res Commun 218:377-382(1996); Shimohigashi和Stammer,Int J Pept Protein Res 19:54-62(1982);及Previero等人,Biochim Biophys Acta 263:7-13(1972)(通过羟基进行酰化的方法);以及San和Silvius,J Pept Res 66:169-180(2005)(通过硫醇进行酰化的方法);Bioconjugate Chem. "Chemical Modifications of Proteins:History and Applications"第1,2-12页(1990);Hashimoto等人,Pharmaceutical Res. "Synthesis of Palmitoyl Derivatives of Insulin and their Biological Activity"第6卷,第2期,第171-176页(1989)。

[0115] 酰化氨基酸的酰基可具有任何大小,例如任何长度的碳链,且可为直链或支链的。在一些特定实施方案中,酰基为C4至C30脂肪酸。举例而言,酰基可为以下任一种:C4脂肪酸、C6脂肪酸、C8脂肪酸、C10脂肪酸、C12脂肪酸、C14脂肪酸、C16脂肪酸、C18脂肪酸、C20脂肪酸、C22脂肪酸、C24脂肪酸、C26脂肪酸、C28脂肪酸或C30脂肪酸。在一些实施方案中,酰基为C8至C20脂肪酸,例如C14脂肪酸或C16脂肪酸。

[0116] 在一可替代的实施方案中,酰基为胆汁酸。胆汁酸可为任何适合胆汁酸,包括但不限于胆酸、鹅脱氧胆酸、脱氧胆酸、石胆酸、牛磺胆酸、甘胆酸及胆固醇酸。

[0117] 在一些实施方案中,胰高血糖素类似物包含通过胰高血糖素类似物酰化长链烷烃而酰化的氨基酸。在特定方面中,长链烷烃包含与胰高血糖素类似物的羧基或其活化形式反应的胺、羟基或硫醇基(例如十八胺、十四醇和十六烷硫醇)。胰高血糖素类似物的羧基或其活化形式可为胰高血糖素类似物的氨基酸(例如谷氨酸、天冬氨酸)的侧链的一部分或可为类似物主链的一部分。

[0118] 在某些实施方案中,胰高血糖素类似物经修饰以通过连接于胰高血糖素类似物的间隔子酰化长链烷烃而包含酰基。在特定方面中,长链烷烃包含与间隔子的羧基或其活化形式反应的胺、羟基或硫醇基。包含羧基或其活化形式的适合间隔子描述于本文中且包括例如双官能间隔子,例如氨基酸、二肽、三肽、亲水性双官能间隔子以及疏水性双官能间隔子。

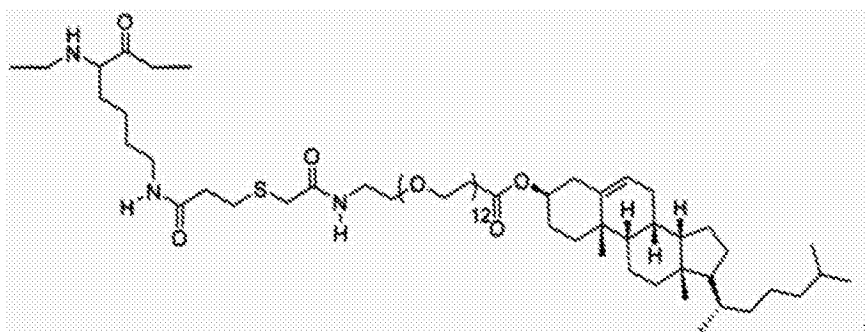
[0119] 如本文所用,术语“羧基的活化形式”是指具有通式R(C=O)X的羧基,其中X为离去基且R为胰高血糖素类似物或间隔子。举例而言,羧基的活化形式可包括但不限于酰基氯、酸酐及酯。在一些实施方案中,活化羧基为具有N-羟基丁二酰亚胺酯(NHS)离去基的酯。

[0120] 关于其中长链烷烃由胰高血糖素类似物或间隔子酰化的这些方面,长链烷烃可具

有任何大小且可包含任何长度的碳链。长链烷烃可为直链或支链的。在某些方面中,长链烷烃为C4至C30烷烃。举例而言,长链烷烃可为C4烷烃、C6烷烃、C8烷烃、C10烷烃、C12烷烃、C14烷烃、C16烷烃、C18烷烃、C20烷烃、C22烷烃、C24烷烃、C26烷烃、C28烷烃或C30烷烃中任一种。在一些实施方案中,长链烷烃包含C8至C20烷烃,例如C14烷烃、C16烷烃或C18烷烃。

[0121] 此外,在一些实施方案中,胰高血糖素类似物的胺、羟基或硫醇基被胆固醇酸酰化。在特定实施方案中,胰高血糖素类似物通过烷基化去-氨基Cys间隔子(即烷基化3-巯基丙酸间隔子)连接于胆固醇酸。烷基化去-氨基Cys间隔子可为例如包含十二乙二醇部分的去-氨基-Cys间隔子。在一个实施方案中,胰高血糖素类似物包含以下结构:

[0122]



[0123] 本文所述的酰化胰高血糖素类似物可经进一步修饰以包含亲水性部分。在一些特定实施方案中,亲水性部分可包含聚乙二醇(PEG)链。亲水性部分的并入可通过适合方式而实现,诸如本文所述的任何方法。对此,酰化胰高血糖素类似物可包含包括本文所述的任何修饰的SEQ ID NO:1,其中类似物的位置10、20、24及29上氨基酸中至少一个包含酰基且位置16、17、21、24或29、C端延伸内位置上的氨基酸或C端氨基酸中至少一个被修饰成Cys、Lys、Orn、homo-Cys或Ac-Phe,且该氨基酸的侧链共价结合于亲水性部分(例如PEG)。在一些实施方案中,酰基任选地通过包含Cys、Lys、Orn、homo-Cys或Ac-Phe的间隔子连接于位置10,且亲水性部分在位置24上的Cys残基处并入。

[0124] 或者,酰化胰高血糖素类似物可包含间隔子,其中该间隔子同时被酰化和修饰以包含亲水性部分。适合的间隔子的非限制性实例包括包含一或多个选自Cys、Lys、Orn、homo-Cys和Ac-Phe的氨基酸的间隔子。

[0125] 烷基化

[0126] 根据一些实施方案,胰高血糖素类似物包含烷基化氨基酸(例如非编码烷基化氨基酸(例如包含对于天然存在的氨基酸而言为非原生的烷基的氨基酸))。不受限于任何特定理论,确信胰高血糖素类似物的烷基化实现与胰高血糖素类似物的酰化类似(若非相同)的作用,例如延长的循环半衰期、延迟的作用起始、延长的作用持续时间、提高的对蛋白酶(诸如DPP-IV)的抗性以及增加的于GLP-1和胰高血糖素受体的效力。

[0127] 烷基化可在胰高血糖素类似物内的任何位置上进行,包括本文描述为用于酰化的位点的任何位置,包括但不限于以下任何位置:氨基酸位置1-29、第29残基的C端方向的氨基酸位置(例如30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47等、C端延伸内的位置或在C端),条件是胰高血糖素活性或GLP-1活性得到保留。非限制性实例包括位置5、7、10、11、12、13、14、16、17、18、19、20、21、24、27、28或29。在示例性实施方案中,胰高血糖素类似物在选自以下的一个或多个位置包含烷基化氨基酸:9、10、12、16及20。在示例性实施方案中,胰高血糖素类似物在选自以下的一个或多个位置包含烷基化氨基酸:10、12及

16.在示例性实施方案中,胰高血糖素类似物在选自以下的一个或多个位置包含烷基化氨基酸:9、10、12、16及20。在示例性实施方案中,胰高血糖素类似物在一个或多个位置10和12包含烷基化氨基酸。在示例性实施方案中,胰高血糖素类似物在位置12包含烷基化氨基酸。在示例性实施方案中,胰高血糖素类似物包含C端延伸且在选自以下的一个或多个位置包含烷基化氨基酸:9、10、12、16、20以及37-43(例如40)。烷基可直接共价连接于胰高血糖素类似物的氨基酸,或通过间隔子间接共价连接于胰高血糖素类似物的氨基酸,其中该间隔子定位于胰高血糖素类似物的氨基酸与烷基之间。胰高血糖素类似物可在连接亲水性部分的相同氨基酸位置烷基化,或在不同氨基酸位置烷基化。非限制性实例包括在位置10烷基化以及在胰高血糖素类似物的C端部分中一个或多个位置(例如位置24、28或29、C端延伸内或在C端(例如通过添加C端Cys))而聚乙二醇化。

[0128] 在特定方面中,胰高血糖素类似物经修饰以通过对胰高血糖素类似物的氨基酸的侧链的胺、羟基或硫醇进行直接烷基化而包含烷基。在一些实施方案中,烷基化位于胰高血糖素类似物的位置10、20、24或29。对此,烷基化胰高血糖素类似物可包含氨基酸序列SEQ ID NO:2,或其包含一个或多个本文所述的氨基酸修饰的经修饰的氨基酸序列,其中位置10、20、24以及29上至少一个氨基酸被修饰成包含侧链胺、羟基或硫醇的任何氨基酸。在一些特定实施方案中,胰高血糖素类似物的直接烷基化通过位置10上氨基酸的侧链胺、羟基或硫醇而发生。

[0129] 在一些实施方案中,包含侧链胺的氨基酸为式I的氨基酸。在一些示例性实施方案中,式I的氨基酸为其中n为4(Lys)或n为3(Orn)的氨基酸。

[0130] 在其他实施方案中,包含侧链羟基的氨基酸为式II的氨基酸。在一些示例性实施方案中,式II的氨基酸为其中n为1的氨基酸(Ser)。

[0131] 在其他实施方案中,包含侧链硫醇的氨基酸为式III的氨基酸。在一些示例性实施方案中,式III的氨基酸为其中n为1的氨基酸(Cys)。

[0132] 在其他实施方案中,包含侧链胺、羟基或硫醇的氨基酸为包含式I、式II或式III的相同结构的二取代氨基酸,但与式I、式II或式III的氨基酸的 α 碳结合的氢被第二侧链替代。

[0133] 在一些实施方案中,烷基化胰高血糖素类似物在类似物与烷基之间包含间隔子。在一些实施方案中,胰高血糖素类似物共价结合于间隔子,该间隔子共价结合于烷基。在一些示例性实施方案中,胰高血糖素类似物经修饰以通过对间隔子的胺、羟基或硫醇进行烷基化而包含酰基,该间隔子连接于胰高血糖素类似物的位置10、20、24或29上的氨基酸的侧链。间隔子所连接的氨基酸可为包含允许连接于间隔子的部分的任何氨基酸。举例而言,包含侧链 NH_2 、 $-\text{OH}$ 或 COOH 的氨基酸(例如Lys、Orn、Ser、Asp或Glu)为适合的。对此,烷基化胰高血糖素类似物可包含含有一个或多个本文所述的氨基酸修饰的经修饰的氨基酸序列SEQ ID NO:1,其中位置10、20、24及29上至少一个氨基酸被修饰成包含侧链胺、羟基或羧酸酯的任何氨基酸。

[0134] 在一些实施方案中,间隔子为包含侧链胺、羟基或硫醇的氨基酸,或包含含侧链胺、羟基或硫醇的氨基酸的二肽或三肽。

[0135] 当烷基化通过间隔子的胺基而发生,烷基化可通过氨基酸的 α 胺或侧链胺而发生。在 α 胺被烷基化的情况下,间隔子的氨基酸可为任何氨基酸。举例而言,间隔子的氨基酸

可为疏水性氨基酸,例如Gly、Ala、Val、Leu、Ile、Trp、Met、Phe、Tyr、6-氨基己酸、5-氨基戊酸、7-氨基庚酸以及8-氨基辛酸。或者,间隔子的氨基酸可为酸性残基(例如Asp和Glu),条件是烷基化在酸性残基的 α 胺上发生。在间隔子的氨基酸的侧链胺被烷基化的情况下,间隔子的氨基酸为包含侧链胺的氨基酸,例如式I的氨基酸(例如Lys或Orn)。在该情况下,间隔子的氨基酸的 α 胺和侧链胺两者均可能被烷基化,使得胰高血糖素类似物被二烷基化。本发明的实施方案包括这样的二烷基化分子。

[0136] 当烷基化通过间隔子的羟基而发生,氨基酸或二肽或三肽的一个氨基酸可为式II的氨基酸。在特定示例性实施方案中,氨基酸为Ser。

[0137] 当烷基化通过间隔子的硫醇基而发生,氨基酸或二肽或三肽的一个氨基酸可为式III的氨基酸。在特定示例性实施方案中,氨基酸为Cys。

[0138] 在一些实施方案中,间隔子为亲水性双官能间隔子。在某些实施方案中,亲水性双官能间隔子包含两个以上的反应性基团,例如胺、羟基、硫醇和羧基或其任何组合。在某些实施方案中,亲水性双官能间隔子包含羟基和羧酸酯。在其他实施方案中,亲水性双官能间隔子包含胺基和羧酸酯。在其他实施方案中,亲水性双官能间隔子包含硫醇基和羧酸酯。在特定实施方案中,间隔子包含氨基聚(烷氧基)羧酸酯。对此,间隔子可包含例如 $\text{NH}_2(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n(\text{CH}_2)_m\text{COOH}$,其中 m 为1至6的任何整数且 n 为2至12的任何整数,诸如8-氨基3,6-二氧杂辛酸,其可购自Peptides International, Inc. (Louisville, KY)。

[0139] 在一些实施方案中,间隔子为疏水性双官能间隔子。在某些实施方案中,疏水性双官能间隔子包含两个以上的反应性基团,例如胺、羟基、硫醇及羧基或其任何组合。在某些实施方案中,疏水性双官能间隔子包含羟基和羧酸酯。在其他实施方案中,疏水性双官能间隔子包含胺基和羧酸酯。在其他实施方案中,疏水性双官能间隔子包含硫醇基和羧酸酯。包含羧酸酯和羟基或硫醇基的适合疏水性双官能间隔子在本领域已知,并且包括例如8-羟基辛酸和8-巯基辛酸。

[0140] 在特定实施方案中,间隔子(例如氨基酸、二肽、三肽、亲水性双官能间隔子或疏水性双官能间隔子)长3至10个原子(例如6至10个原子(例如6、7、8、9或10个原子))。在更特定实施方案中,间隔子长约3至10个原子(例如6至10个原子)且烷基为 C_{12} 至 C_{18} 烷基,例如 C_{14} 烷基、 C_{16} 烷基,使得间隔子与烷基的总长度为14至28个原子,例如约14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27或28个原子。在一些实施方案中,间隔子与烷基的长度为17至28(例如19至26、19至21)个原子。

[0141] 根据某些前述实施方案,双官能间隔子可为包含长3至10个原子的氨基酸主链(例如6-氨基己酸、5-氨基戊酸、7-氨基庚酸以及8-氨基辛酸)的合成或非天然存在或非编码的氨基酸。或者,间隔子可为具有长3至10个原子(例如6至10个原子)的肽主链的二肽或三肽间隔子。二肽或三肽间隔子可由天然存在或编码和/或非编码或非天然存在的氨基酸(包括例如本文教导的任何氨基酸)构成。在一些实施方案中,间隔子包含总体负电荷,例如包含一个或两个带负电的氨基酸。在一些实施方案中,二肽间隔子选自: Ala-Ala 、 $\beta\text{-Ala-}\beta\text{-Ala}$ 、 Leu-Leu 、 Pro-Pro 、 γ -氨基丁酸- γ -氨基丁酸以及 γ -Glu- γ -Glu。

[0142] 通过胺、羟基和硫醇的肽烷基化的适合方法在本领域已知。举例而言,Williamson醚合成可用于在胰高血糖素类似物的羟基与烷基之间形成醚键联。此外,肽与烷基卤化物的亲核取代反应可产生醚、硫醚或胺基键联中任一种。

[0143] 烷基化胰高血糖素类似物的烷基可具有任何大小,例如任何长度的碳链,且可为直链或支链的。在一些实施方案中,烷基为C4至C30烷基。举例而言,烷基可为C4烷基、C6烷基、C8烷基、C10烷基、C12烷基、C14烷基、C16烷基、C18烷基、C20烷基、C22烷基、C24烷基、C26烷基、C28烷基或C30烷基中任一种。在一些实施方案中,烷基为C8至C20烷基,例如C14烷基或C16烷基。

[0144] 在一些特定实施方案中,烷基包含胆汁酸(例如胆酸、鹅脱氧胆酸、脱氧胆酸、石胆酸、牛磺胆酸、甘胆酸以及胆固醇酸)的类固醇部分。

[0145] 在本发明的一些实施方案中,胰高血糖素类似物包含通过使亲核性长链烷烃与胰高血糖素类似物反应而烷基化的氨基酸,其中该胰高血糖素类似物包含适于亲核性取代的离去基。在特定方面中,长链烷烃的亲核性基团包含胺、羟基或硫醇基(例如十八胺、十四醇以及十六烷硫醇)。胰高血糖素类似物的离去基可为氨基酸的侧链的一部分或可为肽主链的一部分。适合的离去基包括例如N-羟基丁二酰亚胺、卤素以及磺酸酯。

[0146] 在某些实施方案中,胰高血糖素类似物被修饰以通过使亲核性长链烷烃与连接于胰高血糖素类似物的间隔子反应而包含烷基,其中该间隔子包含离去基。在特定方面中,长链烷烃包含胺、羟基或硫醇基。在某些实施方案中,包含离去基的间隔子可为还包含适合离去基的本文所述的任何间隔子,例如氨基酸、二肽、三肽、亲水性双官能间隔子以及疏水性双官能间隔子。

[0147] 关于本公开的其中长链烷烃被胰高血糖素类似物或间隔子烷基化的这些方面,长链烷烃可具有任何大小且可包含任何长度的碳链。长链烷烃可为直链或支链的。在某些方面中,长链烷烃为C4至C30烷烃。举例而言,长链烷烃可为C4烷烃、C6烷烃、C8烷烃、C10烷烃、C12烷烃、C14烷烃、C16烷烃、C18烷烃、C20烷烃、C22烷烃、C24烷烃、C26烷烃、C28烷烃或C30烷烃中任一种。在一些实施方案中,长链烷烃包含C8至C20烷烃,例如C14烷烃、C16烷烃或C18烷烃。

[0148] 此外,在一些实施方案中,烷基化可在胰高血糖素类似物与胆固醇部分之间发生。举例而言,胆固醇的羟基可替换长链烷烃上的离去基以形成胆固醇-胰高血糖素类似物产物。

[0149] 本文所述的烷基化胰高血糖素类似物可经进一步修饰以包含亲水性部分。在一些特定实施方案中,亲水性部分可包含聚乙二醇(PEG)链。亲水性部分的并入可通过适合方式而实现,诸如本文所述的任何方法。对此,烷基化胰高血糖素类似物可包含一个或多个本文所述的氨基酸修饰的经修饰的SEQ ID NO:1,其中位置10、20、24以及29上的氨基酸中至少一个包含烷基且位置16、17、21、24或29、C端延伸内位置上的氨基酸或C端氨基酸中至少一个被修饰成Cys、Lys、Orn、homo-Cys或Ac-Phe,且该氨基酸的侧链共价结于亲水性部分(例如PEG)。在一些实施方案中,烷基任选地通过包含Cys、Lys、Orn、homo-Cys或Ac-Phe的间隔子连接于位置10,且亲水性部分在位置24上的Cys残基处并入。

[0150] 或者,烷基化胰高血糖素类似物可包含间隔子,其中该间隔子同时被烷基化和修饰以包含亲水性部分。适合间隔子的非限制性实例包括包含一个或多个选自Cys、Lys、Orn、homo-Cys以及Ac-Phe的氨基酸的间隔子。

[0151] α 螺旋和 α 螺旋促进氨基酸的稳定化

[0152] 不受限于任何特定理论,本文所述的胰高血糖素类似物包含螺旋结构,例如 α 螺

旋。在一些实施方案中,胰高血糖素类似物包含使 α 螺旋结构稳定的氨基酸。因此,在一些方面中,胰高血糖素类似物包含一个或多个 α 螺旋促进氨基酸。如本文所用,术语“ α 螺旋促进氨基酸”是指向 α 螺旋作为其中一部分的胰高血糖素类似物的该 α 螺旋提供增加的稳定性的氨基酸。 α 螺旋促进氨基酸在本领域已知。参见例如Lyu等人,Proc Natl Acad Sci U.S.A.88:5317-5320 (1991);Branden和Tooze,Introduction to Protein Structure, Garland Publishing, New York, NY, 1991; Fasman, Prediction of Protein Structure and the Principles of Protein Conformation, Fasman编, Plenum, NY, 1989)。用于本文目的的适合的 α 螺旋促进氨基酸包括但不限于:丙氨酸、正缬氨酸、正亮氨酸、 α 氨基丁酸、 α -氨基异丁酸、亮氨酸、异亮氨酸、缬氨酸等。在一些实施方案中, α 螺旋促进氨基酸为作为天然存在的蛋白质中得到的 α 螺旋的一部分的任何氨基酸,例如Leu、Phe、Ala、Met、Gly、Ile、Ser、Asn、Glu、Asp、Lys、Arg。

[0153] 在一些实施方案中, α 螺旋促进氨基酸向 α 螺旋提供比甘氨酸或丙氨酸更大的稳定性。在一些实施方案中, α 螺旋促进氨基酸为 α,α 二取代氨基酸。

[0154] α 螺旋: α 螺旋促进氨基酸的位置

[0155] 在一些实施方案中,胰高血糖素类似物包含与天然胰高血糖素 (SEQ ID NO:1) 类似的氨基酸序列,并且该胰高血糖素类似物包含至少一个 α 螺旋促进氨基酸。在一些实施方案中, α 螺旋促进氨基酸位于位置12至29中任一个(根据天然胰高血糖素 (SEQ ID NO:1) 的编号)。在一些实施方案中,胰高血糖素类似物包含经修饰的氨基酸序列SEQ ID NO:1且例如在位置12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29中一个或多个上包含至少一个 α 螺旋促进氨基酸。在一些实施方案中,胰高血糖素类似物在位置16、17、20及21中一个、两个、三个或全部上包含 α 螺旋促进氨基酸。

[0156] α 螺旋: α,α 二取代氨基酸

[0157] 在一些实施方案中, α 螺旋促进氨基酸为 α,α 二取代氨基酸。在特定实施方案中, α,α 二取代氨基酸包含各自结于 α 碳的 R^1 和 R^2 ,其中 R^1 和 R^2 各自独立地选自任选被羟基、酰胺、硫醇、卤基取代的C1-C4烷基,或 R^1 和 R^2 与它们所连接的 α 碳一起形成环(例如C3-C8环)。在一些实施方案中, R^1 和 R^2 各自选自:甲基、乙基、丙基和正丁基,或 R^1 与 R^2 一起形成环辛烷或环庚烷(例如1-氨基环辛烷-1-羧酸)。在一些实施方案中, R^1 与 R^2 相同。在一些实施方案中, R^1 与 R^2 不同。在某些方面中, R^1 和 R^2 各自为C1-C4烷基。在一些方面中, R^1 和 R^2 各自为C1或C2烷基。在一些实施方案中, R^1 和 R^2 各自为甲基,使得 α,α 二取代氨基酸为 α -氨基异丁酸(AIB)。

[0158] 在一些方面中,本文所述的胰高血糖素类似物包含一个或多个 α,α 二取代氨基酸且胰高血糖素类似物明确缺乏共价分子内桥键(例如内酰胺),因为该 α,α 二取代氨基酸能够在不存在共价桥键的情况下使 α 螺旋稳定。在一些方面中,胰高血糖素类似物在C端(位置12-29附近)包含一个或多个 α,α 二取代氨基酸。在一些实施方案中,胰高血糖素类似物的位置16、17、18、19、20、21、24、28或29中一个、两个、三个、四个或更多个被 α,α 二取代氨基酸取代,该 α,α 二取代氨基酸例如氨基异丁酸(AIB),被选自甲基、乙基、丙基及正丁基的相同或不同基团二取代的氨基酸,或被环辛烷或环庚烷二取代的氨基酸(例如1-氨基环辛烷-1-羧酸)。举例而言,位置16的AIB的取代可在不存在分子内桥键(例如非共价分子内桥键(例如盐桥)或共价分子内桥键(例如内酰胺))的情况下增强GLP-1活性。在一些实施方案中,位置16、20、21或24中一个、两个、三个或更多个被AIB取代。在特定实施方案中,与天然人类胰

高血糖素 (SEQ ID NO:1) 的位置2、16相对应的氨基酸中之一或两者被诸如AIB的 α,α -二取代氨基酸取代。

[0159] 根据一些实施方案,缺乏分子内桥键的胰高血糖素类似物在氨基酸位置12-29内包含一个或多个用 α,α -二取代氨基酸的取代且在胰高血糖素类似物的位置10上包含共价连接于氨基酸的侧链的酰基或烷基。在特定实施方案中,酰基或烷基不是天然存在于氨基酸上。在某些方面中,酰基或烷基于位置10上的氨基酸而言为非原生的。这样的缺乏分子内桥键的酰化或烷基化胰高血糖素肽与未酰化的对应肽相比,于GLP-1和胰高血糖素受体显示增强的活性。于GLP-1和胰高血糖素受体的活性的进一步增强可通过在酰基或烷基与类似物位置10上的氨基酸的侧链之间并入间隔子来酰化之缺乏分子内桥键的胰高血糖素肽而实现。在本文中进一步描述并入或未并入间隔子的酰化和烷基化。

[0160] α 螺旋:分子内桥键

[0161] 在一些实施方案中, α 螺旋促进氨基酸为通过分子内桥键而与胰高血糖素类似物的另一氨基酸连接的氨基酸。在这样的实施方案中,通过分子内桥键而连接的这两个氨基酸各自被视为 α 螺旋促进氨基酸。在一些实施方案中,胰高血糖素类似物包含一个或两个分子内桥键。在一些特定实施方案中,胰高血糖素类似物包含一个分子内桥键与至少一个其他 α 螺旋促进氨基酸(例如 α,α -二取代氨基酸)的组合。

[0162] 在一些实施方案中,分子内桥键为通过非共价键连接胰高血糖素类似物的两个部分的桥键,所述非共价键包括例如范德华相互作用、氢键、离子键、疏水相互作用、偶极-偶极相互作用等。对此,在某些方面中,胰高血糖素类似物包含非共价分子内桥键。在一些实施方案中,非共价分子内桥键为盐桥。

[0163] 在一些实施方案中,分子内桥键为通过共价键连接类似物的两个部分的桥键。对此,在某些方面中,胰高血糖素类似物包含共价分子内桥键。

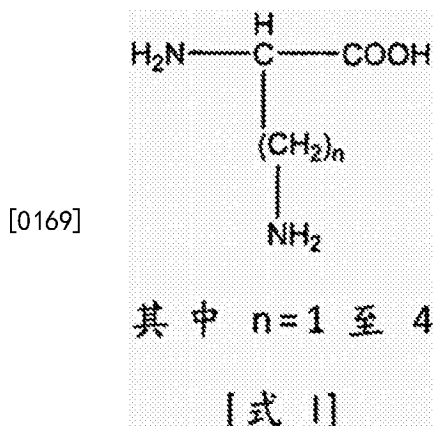
[0164] 在一些实施方案中,分子内桥键(例如非共价分子内桥键、共价分子内桥键)形成于间隔3个氨基酸的两个氨基酸(例如位置*i*及*i*+4上的氨基酸)之间,其中*i*为12至25的任何整数(例如12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24及25)。更特定地,氨基酸对12与16、16与20、20与24或24与28(其中*i*=12、16、20或24的氨基酸对)的侧链彼此连接,因此使胰高血糖素 α 螺旋稳定。或者,*i*可为17。在一些特定实施方案中,胰高血糖素类似物在氨基酸17与21之间包含分子内桥键。在一些特定实施方案中,胰高血糖素类似物在位置16与20或12与16上的氨基酸之间包含分子内桥键且在位置17与21上的氨基酸之间包含第二分子内桥键。本文涵盖包含一个或多个分子内桥键的胰高血糖素类似物。在位置*i*和*i*+4上的氨基酸由分子内桥键连接的特定实施方案中,连接子的大小为约8个原子或约7-9个原子。

[0165] 在其他实施方案中,分子内桥键形成于间隔两个氨基酸的两个氨基酸(例如位置*j*和*j*+3上的氨基酸)之间,其中*j*为12至26的任何整数(例如12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25及26)。在一些特定实施方案中,*j*为17。在位置*j*和*j*+3上的氨基酸由分子内桥键连接的特定实施方案中,连接子的大小为约6个原子或约5至7个原子。

[0166] 在其他实施方案中,分子内桥键形成于间隔6个氨基酸的两个氨基酸(例如位置*k*和*k*+7上的氨基酸)之间,其中*k*为12至22的任何整数(例如12、13、14、15、16、17、18、19、20、21及22)。在一些特定实施方案中,*k*为12、13或17。在示例性实施方案中,*k*为17。

[0167] α 螺旋:分子内桥键中涉及之氨基酸

[0168] 能够结合(共价或非共价地)以形成六原子连接桥键的氨基酸配对的实例包括Orn与Asp、Glu与式I的氨基酸(其中n为2)以及高谷氨酸与式I的氨基酸(其中n为1),其中式I为:



[0170] 能够结合以形成七原子连接桥键的氨基酸配对的实例包括Orn-Glu(内酰胺环); Lys-Asp(内酰胺);或Homoser-Homoglu(内酯)。可形成八原子连接子的氨基酸配对的实例包括Lys-Glu(内酰胺);Homolys-Asp(内酰胺);Orn-Homoglu(内酰胺);4-氨基Phe-Asp(内酰胺);或Tyr-Asp(内酯)。可形成九原子连接子的氨基酸配对的实例包括Homolys-Glu(内酰胺);Lys-Homoglu(内酰胺);4-氨基Phe-Glu(内酰胺);或Tyr-Glu(内酯)。这些氨基酸的任何侧链可额外被其他化学基团取代,只要 α 螺旋的三维结构不被破坏。本领域普通技术人员可设想会产生类似大小和所需作用的稳定化结构的替代配对或替代氨基酸类似物,包括经化学修饰的衍生物。举例而言,高半胱氨酸-高半胱氨酸二硫桥键长6个原子且可经进一步修饰以提供所需作用。

[0171] 甚至在无共价键联时,上述氨基酸配对(或本领域普通技术人员可设想的类似配对)可通过非共价键,例如通过形成盐桥或氢键相互作用而向 α 螺旋提供附加的稳定性。因此,盐桥可于以下之间形成:Orn与Glu;Lys与Asp;高丝氨酸与高谷氨酸;Lys与Glu;Asp与Arg;Homo-lys与Asp;Orn与高谷氨酸;4-氨基Phe与Asp;Tyr与Asp;Homo-Lys与Glu;Lys与Homo-Glu;4-氨基Phe与Glu;或Tyr与Glu。在一些实施方案中,类似物在任何以下氨基酸对之间包含盐桥:Orn与Glu;Lys与Asp;Lys与Glu;Asp与Arg;Homo-Lys与Asp;Orn与高谷氨酸;Homo-Lys与Glu;及Lys与Homo-Glu。盐桥亦可形成于其他带相反电荷侧链的对之间。参见例如Kallenbach等人,Role of the Peptide Bond in Protein Structure and Folding, The Amide Linkage:Structural Significance in Chemistry,Biochemistry,and Materials Science,John Wiley&Sons,Inc.(2000)。

[0172] 在一些实施方案中,非共价分子内桥键为疏水性桥键。根据一个实施方案,类似物的 α 螺旋通过在位置j和j+3或i和i+4上并入疏水性氨基酸而稳定化。举例而言,i可为Tyr且i+4可为Val或Leu;i可为Phe且i+4可为Met;或i可为Phe且i+4可为Ile。应理解,出于本文的目的,上述氨基酸配对可反转,使得位置i上的所指氨基酸可替代地位于i+4,而i+4氨基酸可位于i位置。还应理解,j和j+3可形成适合的氨基酸配对。

[0173] α 螺旋:共价分子内桥键

[0174] 在一些实施方案中,共价分子内桥键为内酰胺环或内酰胺桥键。内酰胺环的大小可根据氨基酸侧链的长度而变化,且在一个实施方案中,内酰胺通过将鸟氨酸的侧链与天

冬氨酸侧链连接而形成。内酰胺桥键及其制备方法在本领域已知。参见例如Houston, Jr. 等人, *J Peptide Sci* 1:274-282 (2004) 及本文的实施例1。在一些实施方案中, 类似物包含经修饰的序列SEQ ID NO:1和i与i+4之间的内酰胺桥键, 其中i如上文所定义。在一些实施方案中, 胰高血糖素类似物包含两个内酰胺桥键: 一个在位置16与20上的氨基酸之间且另一个在位置17与21上的氨基酸之间。在一些实施方案中, 胰高血糖素类似物包含一个内酰胺桥键和一个盐桥。其他示例性实施方案在本文中描述于称为“实施例”的部分中。其他示例性实施方案包括任选具有内酰胺桥键的以下配对: 位置12上的Glu与位置16上的Lys; 位置12上的原生Lys与位置16上的Glu; 位置16上的Glu与位置20上的Lys; 位置16上的Lys与位置20上的Glu; 位置20上的Glu与位置24上的Lys; 位置20上的Lys与位置24上的Glu; 位置24上的Glu与位置28上的Lys; 位置24上的Lys与位置28上的Glu。

[0175] 在一些实施方案中, 共价分子内桥键为内酯。制备内酯桥键的适合的方法在本领域已知。参见例如Sheehan等人, *J Am Chem Soc* 95:875-879 (1973)。

[0176] 在一些方面中, 烯烃置换作用用于使用全烃交联系统使类似物的 α 螺旋的一个或两个转角交联。在此情况下, 胰高血糖素类似物在j和j+3或i和i+4位置包含带有不同长度的烯烃侧链且配置成R或S立体化学的 α -甲基化氨基酸。在一些实施方案中, 烯烃侧链包含 $(CH_2)_n$, 其中n为1至6的任何整数。在一些实施方案中, n对于8个原子的交联长度为3。在一些实施方案中, n对于6个原子的交联长度为2。包含烯烃交联的示例性胰高血糖素类似物在本文中描述为SEQ ID NO:17。形成这样的分子内桥键的适合方法描述于本领域中。参见例如Schafmeister等人, *J. Am. Chem. Soc.* 122:5891-5892 (2000), 以及Walensky等人, *Science* 305:1466-1470 (2004)。在可替代的实施方案中, 类似物包含位于相邻螺旋转角上的O-烯丙基Ser残基, 所述残基通过钨催化的闭环置换作用而桥接在一起。这样的交联程序描述于例如Blackwell等人, *Angew, Chem., Int. Ed.* 37:3281-3284 (1998) 中。

[0177] 在特定方面中, 使用已广泛用作半胱氨酸的肽模拟物的非天然硫醇-二丙氨酸, 即羊毛硫氨酸, 用于交联 α 螺旋的一个转角。基于羊毛硫氨酸的环化的适合方法在本领域已知。参见例如Matteucci等人, *Tetrahedron Letters* 45:1399-1401 (2004); Mayer等人, *J. Peptide Res.* 51:432-436 (1998); Polinsky等人, *J. Med. Chem.* 35:4185-4194 (1992); Osapay等人, *J. Med. Chem.* 40:2241-2251 (1997); Fukase等人, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* 65:2227-2240 (1992); Harpp等人, *J. Org. Chem.* 36:73-80 (1971); Goodman和Shao, *Pure Appl. Chem.* 68:1303-1308 (1996); 以及Osapay和Goodman, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* 1599-1600 (1993)。

[0178] 在一些实施方案中, 位置i和i+7上两个Glu残基之间的 α, ω -二氨基烷烃系链(例如1,4-二氨基丙烷和1,5-二氨基戊烷)用于使类似物的 α 螺旋稳定。这样的系链导致形成长9个原子以上的桥键, 这取决于二氨基烷烃系链的长度。产生用这样的系链交联的肽的适合方法描述于本领域中。参见例如Phelan等人, *J. Am. Chem. Soc.* 119:455-460 (1997)。

[0179] 在其他实施方案中, 二硫桥键用于交联类似物的 α 螺旋的一个或两个转角。或者, 其中一个或两个硫原子被亚甲基替换而产生电子等排大环化的经修饰的二硫桥键用于使类似物的 α 螺旋稳定。用二硫桥键或基于硫的环化来修饰肽的适合方法描述于例如Jackson等人, *J. Am. Chem. Soc.* 113:9391-9392 (1991) 以及Rudinger和Jost, *Experientia* 20:570-571 (1964) 中。

[0180] 在其他实施方案中,类似物的 α 螺旋通过位于j和j+3或i和i+4的两个His残基或His与Cys对结合金属原子而稳定化。金属原子可为例如Ru(III)、Cu(II)、Zn(II)或Cd(II)。这样的基于金属结合的 α 螺旋稳定化的方法在本领域已知。参见例如Andrews和Tabor, Tetrahedron 55:11711-11743 (1999); Ghadiri等人, J. Am. Chem. Soc. 112:1630-1632 (1990); 以及Ghadiri等人, J. Am. Chem. Soc. 119:9063-9064 (1997)。

[0181] 类似物的 α 螺旋可替代地通过其他肽环化方法而稳定化,所述方法评述于Davies, J. Peptide. Sci. 9:471-501 (2003)中。 α 螺旋可通过形成酰胺桥键、硫醚桥键、硫酯桥键、脲桥键、氨基甲酸酯桥键、磺酰胺桥键等而稳定化。举例而言,可在C端与Cys残基的侧链之间形成硫酯桥键。或者,可通过具有硫醇的氨基酸(Cys)和具有羧酸的氨基酸(例如Asp、Glu)的侧链形成硫酯。在另一方法中,交联剂(诸如二羧酸,例如辛二酸(辛烷二酸)等)可在氨基酸侧链的两个官能团(诸如游离氨基、羟基、硫醇基及其组合)之间引入连接。

[0182] DPP-IV抗性肽

[0183] 在一些实施方案中,胰高血糖素类似物在位置1或2上或在位置1和2两者上包含使胰高血糖素类似物实现对二肽基肽酶IV(DPP IV)裂解的抗性的氨基酸。在一些实施方案中,胰高血糖素类似物在位置1上包含选自以下的氨基酸:D-组氨酸、去氨基组氨酸、羟基-组氨酸、乙酰基-组氨酸、高组氨酸、N-甲基组氨酸、 α -甲基组氨酸、咪唑乙酸或 α , α -二甲基咪唑乙酸(DMIA)。在一些实施方案中,胰高血糖素类似物在位置2上包含选自以下的氨基酸:D-丝氨酸、D-丙氨酸、缬氨酸、甘氨酸、N-甲基丝氨酸、N-甲基丙氨酸或 α 氨基异丁酸。在一些实施方案中,胰高血糖素类似物在位置2上包含使胰高血糖素类似物实现对DPP IV的抗性的氨基酸,并且使胰高血糖素类似物实现对DPP IV的抗性的氨基酸不为D-丝氨酸。

[0184] 在一些方面中,包含使胰高血糖素类似物实现对DPP IV的抗性的氨基酸的胰高血糖素类似物还包含使胰高血糖素C端部分中存在的 α 螺旋稳定(例如通过位置“i”与“i+4”,例如12与16、16与20或20与24上的氨基酸之间的共价键)的氨基酸修饰。在一些实施方案中,该共价键为位置16上的谷氨酸与位置20上的赖氨酸之间的内酰胺桥键。在一些实施方案中,该共价键为除内酰胺桥键以外的分子内桥键。举例而言,适合的共价结合方法包括以下中任一种或多种:烯烃置换作用、基于羊毛硫氨酸的环化、二硫桥键或经修饰的含硫的桥键的形成、使用 α , ω -二氨基烷烃系链、金属原子桥键的形成以及其他肽环化手段。

[0185] 位置1的修饰

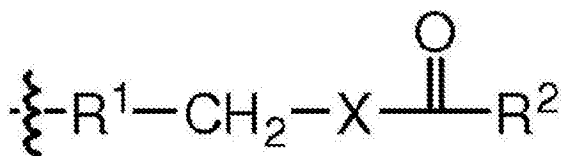
[0186] 在一些特定实施方案中,胰高血糖素类似物包含(a)位置1上的His被大芳族氨基酸的氨基酸取代,以及(b)使分子C端部分(例如位置12-29附近)中的该 α 螺旋稳定的分子内桥键。在特定实施方案中,位置1上的氨基酸被Tyr、Phe、Trp、氨基-Phe、硝基-Phe、氯-Phe、磺基-Phe、4-吡啶基-Ala、甲基-Tyr或3-氨基Tyr替代。在一些实施方案中,分子内桥键为本文所述的分子内桥键中任一种。在一些方面中,分子内桥键位于由三个插入氨基酸隔开的两个氨基酸的侧链之间,即在氨基酸i与i+4的侧链之间。在一些实施方案中,分子内桥键为内酰胺桥键。在一些实施方案中,胰高血糖素类似物在位置1上包含大芳族氨基酸且在类似物的位置16与20上的氨基酸之间包含内酰胺桥键。在一些方面中,这样的胰高血糖素类似物还包含一个或多个(例如两个、三个、四个、五个或更多个)本文所述的其他修饰。举例而言,胰高血糖素类似物可包含替代C端羧酸酯的酰胺。此外,在一些实施方案中,这样的胰高血糖素类似物还包含以下一个或多个:位置17上的大脂族氨基酸、位置18上的含咪唑的氨

基酸以及位置19上的带正电的氨基酸。在一些实施方案中,包含位置1上的修饰和分子内桥键的胰高血糖素类似物在位置17-19上还包含氨基酸序列Ile-His-Gln。这样的修饰可在不破坏胰高血糖素类似物对GLP-1受体和胰高血糖素受体的活性的情况下进行。在一些实施方案中,胰高血糖素类似物额外包含酰化或烷基化氨基酸残基。

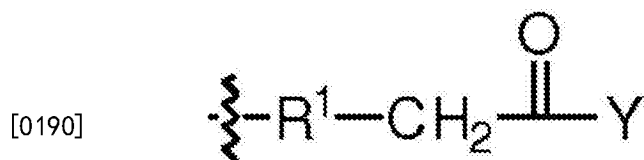
[0187] 位置3的修饰

[0188] 在一些实施方案中,将SEQ ID NO:1的第三个氨基酸(Gln3)取代为酸性、碱性或疏水性氨基酸残基,并且这样的修饰使胰高血糖素受体活性降低。在一些实施方案中,酸性、碱性或疏水性氨基酸为谷氨酸、鸟氨酸、正亮氨酸。在一些方面中,用这些残基之一的修饰使得胰高血糖素类似物显示显著降低或破坏的胰高血糖素受体活性。在一些方面中,被例如谷氨酸、鸟氨酸或正亮氨酸取代的胰高血糖素类似物对胰高血糖素受体具有天然胰高血糖素活性的约10%以下,例如约1-10%或约0.1-10%,或高于约0.1%但低于约10%,同时对GLP-1受体显示GLP-1活性的至少20%。在一些实施方案中,胰高血糖素类似物显示天然胰高血糖素活性的约0.5%、约1%或约7%,同时对GLP-1受体显示GLP-1活性的至少20%。

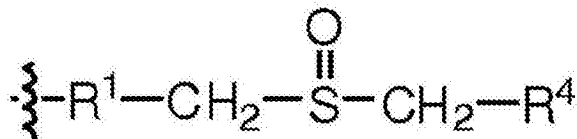
[0189] 在一些实施方案中,在不显著损失对胰高血糖素受体的活性的情况下,并且在一些情况下,在增强胰高血糖素受体活性的情况下,在胰高血糖素类似物的SEQ ID NO:1位置3上的谷氨酰胺被谷氨酰胺类似物取代。在一些实施方案中,谷氨酰胺类似物为包含结构I、II或III的侧链的天然存在或非天然存在或非编码的氨基酸:



结构 I



结构 II



结构 III

[0191] 其中R¹为C₀₋₃烷基或C₀₋₃杂烷基;R²为NHR⁴或C₁₋₃烷基;R³为C₁₋₃烷基;R⁴为H或C₁₋₃烷基;X为NH、O或S;且Y为NHR⁴、SR³或OR³。在一些实施方案中,X为NH或Y为NHR⁴。在一些实施方案中,R¹为C₀₋₂烷基或C₁杂烷基。在一些实施方案中,R²为NHR⁴或C₁烷基。在一些实施方案中,

R⁴为H或C¹烷基。在示例性实施方案中,提供包含结构I的侧链的氨基酸,其中R¹为CH₂-S,X为NH且R²为CH₃(乙酰胺基甲基-半胱氨酸,C(Acm));R¹为CH₂,X为NH且R²为CH₃(乙酰胺基二氨基丁酸,Dab(Ac));R¹为C₆烷基,X为NH,R²为NHR⁴且R⁴为H(氨基甲酰基二氨基丙酸,Dap(urea));或R¹为CH₂-CH₂,X为NH且R²为CH₃(乙酰胺基鸟氨酸,Orn(Ac))。在示例性实施方案中,提供包含结构II的侧链的氨基酸,其中R¹为CH₂,Y为NHR⁴且R⁴为CH₃(甲基谷氨酰胺,Q(Me))。在示例性实施方案中,提供包含结构III的侧链的氨基酸,其中R¹为CH₂且R⁴为H(甲硫氨酸-亚砷,M(O))。在特定实施方案中,位置3上的氨基酸被Dab(Ac)取代。举例而言,胰高血糖素激动剂可包含于2009年6月16日提交的国际专利申请第PCT/US2009/047438号的序列表的SEQ ID NO:595、SEQ ID NO:601、SEQ ID NO:603、SEQ ID NO:604、SEQ ID NO:605以及SEQ ID NO:606的经修饰氨基酸序列,该申请以整体援引方式并入本文,其中这些氨基酸序列如本文进一步描述的那样修饰,例如经修饰以包含至少三个α螺旋促进氨基酸,经修饰以包含(i)位置10上的酰化或烷基化氨基酸、(ii)位置16上的α螺旋促进氨基酸、(iii)位置17和/或18上的脂族氨基酸,以及(iv)位于位置27的C端方向的至少一个带电氨基酸,以及任选地经进一步修饰;经修饰以在胰高血糖素类似物的相应位置上包含Exendin-4(SEQ ID NO:8)的氨基酸18-24中的至少三个氨基酸。

[0192] 位置7的修饰

[0193] 在一些实施方案中,胰高血糖素类似物包含在位置7上具有氨基酸修饰的经修饰的SEQ ID NO:1。在一些方面中,SEQ ID NO:1位置7上的氨基酸(Thr)被大脂族氨基酸取代,例如Ile、Leu、Ala等。确信这样的修饰显著降低胰高血糖素类似物对GLP-1受体的活性。

[0194] 位置15的修饰

[0195] 在一些实施方案中,胰高血糖素类似物包含在位置15上具有提高稳定性的氨基酸修饰的经修饰的SEQ ID NO:1。在一些方面中,SEQ ID NO:1位置15上的氨基酸被删除或被谷氨酸、高谷氨酸、磺基丙氨酸或高磺基丙氨酸。这样的修饰减少类似物随时间的降解或裂解,尤其在酸性或碱性缓冲液中,例如pH值在5.5至8范围内的缓冲液。在一些实施方案中,包含该修饰的胰高血糖素类似物在25℃下24小时后保留原始类似物的至少75%、80%、90%、95%、96%、97%、98%或99%。

[0196] 位置16的修饰

[0197] 根据一个实施方案,提供具有增强的效力并任选具有改进的溶解度和稳定性的胰高血糖素类似物。在一个实施方案中,增强的胰高血糖素和GLP-1效力由天然胰高血糖素(SEQ ID NO:1)位置16上的氨基酸修饰提供。作为非限制性实例,这样的增强的效力可通过将位置16上天然存在的丝氨酸取代为谷氨酸或取代为另一具有长度为4个原子的侧链的带负电的氨基酸,或者取代为谷氨酸、高谷氨酸或高磺基丙氨酸或者具有含至少一个杂原子(例如N、O、S、P)的侧链且侧链长度为约4(或3-5)个原子的带电氨基酸中任一种来提供。在一些实施方案中,胰高血糖素类似物包含经修饰的SEQ ID NO:1,其包含位置16上的Ser被选自谷氨酸、谷氨酰胺、高谷氨酸、高磺基丙氨酸、苏氨酸或甘氨酸的氨基酸的取代。在一些方面中,位置16上的丝氨酸残基被选自谷氨酸、谷氨酰胺、高谷氨酸和高磺基丙氨酸的氨基酸取代。在一些特定方面中,位置16上的丝氨酸残基被谷氨酸或其保守性取代(例如Exendin-4氨基酸)取代。

[0198] 在可替代的实施方案中,胰高血糖素类似物包含经修饰的SEQ ID NO:1序列,其通

过用Thr或AIB或如上所述的另一 α 螺旋促进氨基酸取代位置16上的Ser而修饰。在一些实施方案中, α 螺旋促进氨基酸与j+3或i+4上的氨基酸形成非共价分子内桥键。

[0199] 位置17-18上的修饰

[0200] 在一些实施方案中,胰高血糖素类似物包含经修饰的SEQ ID NO:1,其中位置17和18上的二碱性Arg-Arg位点被消除。不受限于任何特定理论,确信在一些实施方案中,该二碱性位点的消除提高了胰高血糖素类似物的体内效能。在一些方面中,胰高血糖素类似物在此通过用非碱性的氨基酸、例如脂族氨基酸来取代SEQ ID NO:1的位置17和18上的氨基酸之一者或两者而修饰。在一些实施方案中,位置17或18上的氨基酸之一被删除,或在位置17与18之间插入氨基酸。在一些实施方案中,位置17上的Arg被本文所述的另一氨基酸取代,例如Gln、包含亲水性部分的氨基酸、 α 螺旋促进氨基酸。在一些实施方案中, α 螺旋促进氨基酸与j+3或i+4上的氨基酸形成非共价分子内桥键。在一些实施方案中,位置18上的Arg被本文所述的另一氨基酸取代。在示例性方面中,位置18上的氨基酸为 α,α 二取代氨基酸,例如AIB。在一些方面中,位置18上的氨基酸为小脂族氨基酸,例如Ala。在一些方面中,位置18上的氨基酸为小脂族氨基酸,例如Ala,且位置17上的Arg保持未修饰。

[0201] 位置20的修饰

[0202] 对GLP-1受体的增强的活性也由位置20上的氨基酸修饰提供。在一些实施方案中,位置20上的谷氨酰胺被上文所述的 α 螺旋促进氨基酸,例如AIB取代。在一些实施方案中, α 螺旋促进氨基酸与j-3或i-4上的氨基酸形成非共价分子内桥键。在一些特定实施方案中,该氨基酸为具有带电荷或能够氢结且长至少约5(或约4-6)个原子的侧链的亲水性氨基酸,例如赖氨酸、瓜氨酸、精氨酸或鸟氨酸,且任选地与位置16上的另一 α 螺旋促进氨基酸(例如带负电的氨基酸)形成盐桥。在一些特定方面中,这样的修饰减少了通过Gln的去酰胺化而发生的降解,且在一些实施方案中,增加了胰高血糖素类似物对GLP-1受体的活性。在一些方面中,位置20上的氨基酸为Glu或Lys或AIB。

[0203] 位置21、23、24以及28上的修饰

[0204] 在一些实施方案中,位置21和/或位置24通过使用 α 螺旋促进氨基酸的取代而修饰。在一些实施方案中, α 螺旋促进氨基酸与j-3或i-4上的氨基酸形成非共价分子内桥键。在一些方面中, α 螺旋促进氨基酸为AIB。

[0205] 在示例性实施方案中,位置23上的氨基酸为Ile。

[0206] 在示例性方面中,位置28上的氨基酸为 α,α 二取代氨基酸,例如AIB。

[0207] 带电的C端

[0208] 在一些实施方案中,胰高血糖素类似物通过在类似物的C端部分中引入带电氨基酸的氨基酸取代和/或添加而修饰。在一些实施方案中,这样的修饰增强了稳定性和溶解度。如本文所用,术语“带电氨基酸”或“带电残基”是指包含在生理pH值下于水溶液中带负电荷(即去质子化)或带正电荷(即质子化)的侧链的氨基酸。在一些方面中,引入带电氨基酸修饰的这些氨基酸取代和/或添加位于SEQ ID NO:1位置27的C端方向位置。在一些实施方案中,在C端部分内(例如位置27的C端方向位置)引入一个、两个或三个(且在一些情况下多于三个)带电氨基酸。根据一些实施方案中,位置28和/或29上的天然氨基酸被带电氨基酸取代,和/或在其他实施方案中,也向类似物的C端添加一个至三个带电氨基酸。在示例性实施方案中,带电氨基酸中的一个、两个或全部带负电荷。在一些实施方案中,带负电氨基

酸为天冬氨酸、谷氨酸、磺基丙氨酸、高磺基丙氨酸或高谷氨酸。在一些方面中,这些修饰增加溶解度,例如当在25℃下24小时后测量时,在约5.5至8的指定pH值(例如pH 7)下,提供相对于天然胰高血糖素至少2倍、5倍、10倍、15倍、25倍、30倍或更多倍的溶解度。

[0209] C端截短

[0210] 根据一些实施方案,本文所公开的胰高血糖素类似物通过使C端截短一个或两个氨基酸残基而修饰。如本文所示,这样的经修饰的胰高血糖素肽对胰高血糖素受体和GLP-1受体保留类似活性和效力。对此,胰高血糖素肽可包含天然胰高血糖素类似物(SEQ ID NO: 1)的氨基酸1-27或1-28,任选地具有本文所述的任何其他修饰。

[0211] 电中性C端

[0212] 在一些实施方案中,胰高血糖素类似物包含经修饰的SEQ ID NO:1,其中C端氨基酸的羧酸被电中性基团如酰胺或酯替代。不受限于任何特定理论,在某些方面中,这样的修饰增加了胰高血糖素类似物对GLP-1受体的活性。因此,在一些实施方案中,胰高血糖素类似物为酰胺化的肽,使得C端残基包含替代氨基酸的 α 羧酸酯的酰胺。如本文所用,对肽或类似物的一般性提及旨在涵盖具有经修饰的氨基端、羧基端或氨基端和羧基端两者的肽。举例而言,包含替代末端羧酸的酰胺基的氨基酸链旨在由表示标准氨基酸的氨基酸序列涵盖。

[0213] 其他修饰

[0214] 在一些实施方案中,胰高血糖素类似物另外或可替代地包含以下氨基酸修饰:

[0215] (i) 位置2上的Ser被Ala的取代;

[0216] (ii) 位置10上的Tyr被Val或Phe或Trp的取代;

[0217] (iii) 位置12上的Lys被Arg的取代;

[0218] (iv) 位置17上的Arg被Gln或小脂族氨基酸(例如Ala)或大脂族氨基酸(例如Ile)的取代;

[0219] (v) 位置18上的Arg被小脂族氨基酸(例如Ala)或含咪唑的氨基酸(例如His)的取代;

[0220] (vi) 位置19上的Ala被带正电氨基酸(例如Gln)的取代;

[0221] (vii) 位置23上的Val被Ile的取代,以及

[0222] (viii) 位置29上的Thr被Gly或Gln的取代。

[0223] 在一些实施方案中,胰高血糖素类似物的稳定性通过修饰位置27上的甲硫氨酸(例如通过取代为亮氨酸或正亮氨酸)而增加。这样的修饰可减少氧化降解。稳定性也可通过修饰位置20或24或28上的Gln(例如通过取代为Ala、Ser、Thr或AIB)而增加。这样的修饰可减少通过Gln去酰胺化而发生的降解。稳定性可通过修饰位置21上的Asp(例如通过取代为另一酸性残基,例如Glu)而增加。这样的修饰可减少通过Asp脱水形成环状丁二酰亚胺中间物、然后异构化成异天冬氨酸而发生的降解。

[0224] 在一些实施方案中,本文所述的胰高血糖素类似物被糖基化、酰胺化、羧化、磷酸化、酯化、N-酰化、通过例如二硫桥键的环化,或转化为盐(例如酸加成盐、碱加成盐),和/或任选地二聚化、多聚化或聚合或结合。

[0225] 本文所述的任何修饰(包括例如增加或降低胰高血糖素受体活性并增加GLP-1受体活性的修饰)可单独或组合地应用。增加GLP-1受体活性的修饰的组合可提供比单独采用

任何这样的修饰更高的GLP-1活性。

[0226] 示例性实施方案

[0227] 本公开提供包含与天然人类胰高血糖素的结构类似的结构且与天然人类胰高血糖素相比显示对GLP-1受体的激动剂活性增强的肽。胰高血糖素通常具有天然GLP-1对GLP-1受体的活性的约1%，而GLP-1通常具有天然胰高血糖素对胰高血糖素受体的活性的小于约0.01%。因此，本公开的肽显示天然GLP-1对GLP-1受体的活性的大于1%。在示例性实施方案中，本公开的肽显示天然GLP-1对GLP-1受体的活性的大于5%或约5%、大于10%或约10%、大于15%或约15%、大于20%或约20%、大于25%或约25%、大于30%或约30%、大于35%或约35%、大于40%或约40%、大于45%或约45%、大于50%或约50%、大于55%或约55%、大于60%或约60%、大于65%或约65%、大于70%或约70%、大于75%或约75%、大于80%或约80%、大于85%或约85%、大于90%或约90%或大于95%或约95%。在示例性方面中，本公开的肽显示大于天然GLP-1的对GLP-1受体的活性。因此，在示例性方面中，本公开的肽显示天然GLP-1对GLP-1受体的活性的大于100%或约100%。在示例性方面中，本公开的肽显示天然GLP-1对GLP-1受体的活性的大于150%或约150%、大于200%或约200%、大于250%或约250%、大于300%或约300%、大于350%或约350%、大于400%或约400%、大于450%或约450%、大于500%或约500%、大于550%或约550%、大于600%或约600%、大于650%或约650%、大于700%或约700%、大于750%或约750%、大于800%或约800%、大于850%或约850%、大于900%或约900%、大于950%或约950%或大于1,000%或约1,000%。

[0228] 在示例性实施方案中，肽包含氨基酸序列SEQ ID NO:12。

[0229] 在示例性实施方案中，肽包含氨基酸序列SEQ ID NO:13。

[0230] 在示例性实施方案中，肽包含氨基酸序列SEQ ID NO:14。

[0231] 在示例性实施方案中，肽包含氨基酸序列SEQ ID NO:15。

[0232] 在示例性实施方案中，肽包含氨基酸序列SEQ ID NO:16且显示相对于GIP受体，对人类GLP-1受体至少100倍的选择性。

[0233] 在示例性实施方案中，肽包含氨基酸序列SEQ ID NO:17。

[0234] 本公开进一步提供包含与本文所公开的肽之一的氨基酸序列高度类似的氨基酸序列的变体肽。在示例性实施方案中，本公开的变体肽包含与SEQ ID NO:12-17中任一个的肽的氨基酸序列的氨基酸1-29至少80%、85%、90%或95%一致的氨基酸序列，其中该变体肽保留母体肽对GLP-1受体、胰高血糖素受体及GIP受体的活性（例如显示相对于GIP受体，对人类GLP-1受体至少100倍的选择性），并任选地，至少1%的GLP-1效力；或其中该肽对GIP受体的EC50与其对GLP-1受体的EC50的不同小于100倍）。在示例性实施方案中，本公开的变体肽显示对人类GLP-1受体的选择性为对GIP受体的选择性的至少100倍。

[0235] 在示例性实施方案中，本公开的变体肽包含基于本公开的肽的氨基酸序列的氨基酸序列，但在一或多个氨基酸位置上不同，所述氨基酸位置包括但不限于位置1、位置2、位置3、位置7、位置10、位置12、位置15、位置16、位置17、位置18、位置20、位置21、位置23、位置24、位置27、位置28、位置29。在示例性方面中，变体肽可包含相对于母体肽的保守性取代，可包含本文所述的任何氨基酸修饰，或可包含恢复成在天然胰高血糖素序列（SEQ ID NO:1）的该位置上存在的氨基酸的氨基酸修饰。在示例性方面中，本公开的变体肽包含基于本

公开的肽的氨基酸序列的氨基酸序列,但以下列方式中一种或多种而不同:

[0236] a) 该变体肽包含酰化氨基酸或烷基化氨基酸;

[0237] b) 酰化氨基酸或烷基化氨基酸被天然胰高血糖素 (SEQ ID NO:1) 在该位置上的相应氨基酸或天然氨基酸的保守性取代替代,并任选地在不同位置引入新的酰化或烷基化氨基酸;

[0238] c) 该变体肽包含共价连接于亲水性部分的氨基酸;

[0239] d) 共价连接于亲水性部分的氨基酸被天然胰高血糖素 (SEQ ID NO:1) 在该位置上的相应氨基酸替代,并任选地在不同位置引入新的共价连接于亲水性部分的氨基酸;

[0240] e) 该变体肽的C端氨基酸包含替代C端 α 羧酸酯的C端酰胺;

[0241] f) 位置1至29中任一位置上的氨基酸被天然胰高血糖素 (SEQ ID NO:1) 在该位置上的相应氨基酸替代;

[0242] g) 或其任何组合。

[0243] 关于任何前述变体肽,在示例性实施方案中,该变体肽包含与位置16、17、21、24、29、C端延伸内的位置或C端上的氨基酸共价连接的亲水性部分。在示例性方面中,变体肽包含与亲水性部分共价连接的Cys、Lys、Orn、高半胱氨酸及Ac-Phe,任选地,其中该Cys、Lys、Orn、高半胱氨酸或Ac-Phe位于该变体肽的位置16、17、21、24、29、C端延伸内的位置或C端。在示例性方面中,亲水性部分为聚乙二醇。

[0244] 在示例性方面中,变体肽任选地在位置10上包含酰化或烷基化氨基酸。在示例性方面中,变体肽包含含C8至C20烷基链、C12至C18烷基链或C14或C16烷基链的酰化或烷基化氨基酸。在示例性方面中,变体肽包含为式I、式II或式III的酰化或烷基化氨基酸的酰化或烷基化氨基酸,任选地,其中该式I的氨基酸为Lys。

[0245] 在示例性方面中,本公开的变体肽包含酰化或烷基化氨基酸,其中酰基或烷基通过间隔子共价连接于氨基酸,任选地,其中该间隔子为氨基酸或二肽。在示例性实施方案中,间隔子包含一个或两个酸性残基。

[0246] 在任何前述示例性实施方案中,任何本公开的肽或变体肽显示(对胰高血糖素受体的EC50)/(对GLP-1受体的EC50)为约20或20以下(例如20、19、18、17、16、15、14、13、12、11、10、9、8、7、6、5、4、3、2、1、0.5、0.25、0.10、0.05、0.025、0.01、0.001)。

[0247] 在任何前述示例性实施方案中,任何本公开的肽或变体肽显示(对胰高血糖素受体的EC50)/(对GLP-1受体的EC50)大于20(例如21、25、30、40、50、60、70、80、90、100、250、500、750、1000或1000以上)。

[0248] 在任何前述示例性实施方案中,任何本公开的肽或变体肽显示的对GLP-1受体的EC50为对胰高血糖素受体的EC50的两倍至十倍(例如3、4、5、6、7、8、9倍)。

[0249] 排除

[0250] 在示例性实施方案中,以下肽中任一个从本文所述的胰高血糖素类似物排除,不过包含一个或多个如本文所述的对其的进一步修饰且显示所需GLP-1或协同激动剂活性的任何以下肽、药物组合物、试剂盒及使用这样的化合物的治疗方法可包括在本发明中:具有[Arg12]取代且具有C端酰胺的SEQ ID NO:1的肽;具有[Arg12,Lys20]取代且具有C端酰胺的SEQ ID NO:1的肽;具有[Arg12,Lys24]取代且具有C端酰胺的SEQ ID NO:1的肽;具有[Arg12,Lys29]取代且具有C端酰胺的SEQ ID NO:1的肽;具有[Glu9]取代的SEQ ID NO:1的

肽;缺失His1、具有[Glu9,Glu16,Lys29]取代和C端酰胺的SEQ ID NO:1的肽;具有[Glu9,Glu16,Lys29]取代且具有C端酰胺的SEQ ID NO:1的肽;具有通过内酰胺桥键连接的[Lys13,Glu17]取代且具有C端酰胺的SEQ ID NO:1的肽;具有通过内酰胺桥键连接的[Lys17,Glu21]取代且具有C端酰胺的SEQ ID NO:1的肽;缺失His1、具有通过内酰胺桥键连接的[Glu20,Lys24]取代的SEQ ID NO:1的肽。在一些实施方案中,胰高血糖素类似物不为任何以下所公开的任何肽:于2009年2月19日提交且于2010年8月26日公开为W0 2010/096052的国际专利申请第PCT/US2009/034448号;于2009年12月18日提交且于2010年8月26日公开为W0 2010/096142的国际专利申请第PCT/US2009/068678号;于2009年6月16日提交且于2009年12月23日公开为W0 2009/155258的国际专利申请第PCT/US2009/047438号;于2008年2月13日申请且于2008年8月21日公开为W0 2008/101017的国际专利申请第PCT/US2008/053857号;于2010年12月9日提交的国际专利申请第PCT/US2010/059724号;于2009年6月16日提交且于2010年1月28日公开为W02010/011439的国际专利申请第PCT/US2009/047447号;于2010年6月16日提交且于2010年12月23日公开为W02010/148089的国际专利申请第PCT/US2010/38825号;于2011年1月26日提交国际专利申请第PCT/US2011/022608号;以及于2010年12月22日提交的美国临时申请第61/426,285号;这些各自以整体援引方式并入本文。在一些实施方案中,胰高血糖素类似物不包括位置29之后与C端连接的序列KRNRNNIA的全部或一部分,例如KRNR。

[0251] 制备肽的方法

[0252] 本公开的胰高血糖素类似物可通过本领域已知的方法获得。从头合成肽的适合方法描述于:例如Chan等人,Fmoc Solid Phase Peptide Synthesis,Oxford University Press,Oxford,United Kingdom,2005;Peptide and Protein Drug Analysis,Reid,R.编,Marcel Dekker,Inc.,2000;Epitope Mapping,Westwood等人编,Oxford University Press,Oxford,United Kingdom,2000;以及美国专利第5,449,752号。

[0253] 此外,在本公开的类似物不包含任何非编码或非天然氨基酸的情况下,胰高血糖素类似物可使用编码该类似物的氨基酸序列的核酸、使用标准重组方法而重组制造。参见例如Sambrook等人,Molecular Cloning:A Laboratory Manual.第3版,Cold Spring Harbor Press,Cold Spring Harbor,NY 2001;以及Ausubel等人,Current Protocols in Molecular Biology,Green Publishing Associates and John Wiley&Sons,NY,1994。

[0254] 在一些实施方案中,本公开的胰高血糖素类似物被分离。在一些实施方案中,本公开的胰高血糖素类似物被纯化。应认识到,“纯度”为相对术语,且不必解释为绝对纯度或绝对富集或绝对选择。在一些方面中,纯度为至少或约50%,为至少或约60%,为至少或约70%,为至少或约80%,为至少或约90%(例如至少约91%或约91%,至少约92%或约92%,至少约93%或约93%,至少约94%或约94%,至少约95%或约95%,至少约96%或约96%,至少约97%或约97%,至少约98%或约98%,至少约99%或约99%,或为约100%。

[0255] 在一些实施方案中,本文所述的肽是由公司商业合成的,所述公司例如Synpep (Dublin,CA)、Peptide Technologies Corp. (Gaithersburg,MD)以及Multiple Peptide Systems (San Diego,CA)。为此,所述肽可为合成、重组、分离和/或纯化的。

[0256] 结合物

[0257] 本发明进一步提供包含与异源部分结合的本文所述的一种或多种胰高血糖素类

似物的结合物,其中该结合物与天然胰高血糖素相比,显示对GLP-1受体的活性增强,且显示对人类GLP-1受体的选择性为对GIP受体的选择性的至少100倍。如本文所用,术语“异源部分”与术语“结合物部分”同义且是指与本文所述的胰高血糖素类似物不同的任何分子(化学或生物化学、天然存在或非编码)。可与本文所述的任何类似物连接的示例性结合物部分包括但不限于异源肽或多肽(包括例如血浆蛋白质)、靶向剂、免疫球蛋白或其部分(例如可变区、CDR或Fc区)、诊断标记(诸如放射性同位素、荧光团或酶标记)、聚合物(包括水溶性聚合物)或其他治疗剂或诊断剂。在一些实施方案中,提供包含本发明的类似物和血浆蛋白的结合物,其中血浆蛋白选自白蛋白、转铁蛋白、纤维蛋白原及球蛋白。在一些实施方案中,结合物的血浆蛋白部分为白蛋白或转铁蛋白。在一些实施方案中,结合物包含一种或多种本文所述的胰高血糖素类似物及以下的一种或多种:肽(其不同于本文所述的胰高血糖素和/或GLP-1受体活性胰高血糖素类似物)、多肽、核酸分子、抗体或其片段、聚合物、量子点、小分子、毒素、诊断剂、碳水化合物、氨基酸。

[0258] 在一些实施方案中,异源部分为不同于本文所述的胰高血糖素和/或GLP-1受体活性类似物的肽,并且结合物为融合肽或嵌合肽。在一些实施方案中,异源部分为1-21个氨基酸的肽延伸。在特定实施方案中,该延伸连接于胰高血糖素类似物的C端,例如连接于位置29上的氨基酸。

[0259] 在一些特定方面中,该延伸为单个氨基酸或二肽。在特定实施方案中,该延伸包含选自以下的氨基酸:带电氨基酸(例如带负电氨基酸(例如Glu)、带正电氨基酸)、包含亲水性部分的氨基酸。在一些方面中,该延伸为Gly、Glu、Cys、Gly-Gly、Gly-Glu。

[0260] 在一些实施方案中,该延伸包含氨基酸序列SEQ ID NO:9(GPSSGAPPPS)、SEQ ID NO:10(GGPSSGAPPPS)、SEQ ID NO:8(KRNRNIA)或SEQ ID NO:11(KRNR)。在特定实施方案中,该氨基酸序列通过胰高血糖素类似物的C端氨基酸,例如位置29上的氨基酸连接。在一些实施方案中,氨基酸序列SEQ ID NO:13-16通过肽键结合于胰高血糖素类似物的氨基酸29。在一些特定实施方案中,胰高血糖素类似物位置29上的氨基酸为Gly且该Gly融合于氨基酸序列SEQ ID NO:8-11之一。

[0261] 在一些实施方案中,异源部分为聚合物。在一些实施方案中,聚合物选自:聚酰胺、聚碳酸酯、聚亚烷基及其衍生物(包括聚亚烷基二醇、聚环氧烷、聚对苯二甲酸亚烷基酯)、丙烯酸酯和甲基丙烯酸酯的聚合物(包括聚(甲基丙烯酸甲酯)、聚(甲基丙烯酸乙酯)、聚(甲基丙烯酸丁酯)、聚(甲基丙烯酸异丁酯)、聚(甲基丙烯酸己酯)、聚(甲基丙烯酸异癸酯)、聚(甲基丙烯酸月桂酯)、聚(甲基丙烯酸苯酯)、聚(丙烯酸甲酯)、聚(丙烯酸异丙酯)、聚(丙烯酸异丁酯)及聚(丙烯酸十八烷酯))、聚乙烯基聚合物(包括聚乙烯醇、聚乙烯醚、聚乙烯酯、聚乙烯基卤化物、聚(乙酸乙烯酯)及聚乙烯基吡咯烷酮)、聚乙交酯、聚硅氧烷、聚氨酯及其共聚物、纤维素(包括烷基纤维素、羟烷基纤维素、纤维素醚、纤维素酯、硝化纤维素、甲基纤维素、乙基纤维素、羟丙基纤维素、羟丙基甲基纤维素、羟丁基甲基纤维素、乙酸纤维素、丙酸纤维素、乙酸丁酸纤维素、乙酸邻苯二甲酸纤维素、羧乙基纤维素、三乙酸纤维素及硫酸纤维素钠盐)、聚丙烯、聚亚乙基(包括聚(乙二醇)、聚(环氧乙烷)及聚(对苯二甲酸亚乙酯))及聚苯乙烯。

[0262] 在一些方面中,聚合物为可生物降解聚合物,包括合成可生物降解聚合物(例如乳酸和乙醇酸的聚合物、聚酸酐、聚(原)酯、聚氨酯、聚(丁酸)、聚(戊酸)及聚(丙交酯-共己内

酯)),及天然可生物降解聚合物(例如藻酸盐和其他多醣,包括葡聚糖和纤维素、胶原蛋白、其化学衍生物(取代、添加化学基团(例如烷基、亚烷基)、羟基化、氧化及本领域技术人员常规进行的其他修饰)、白蛋白及其他亲水性蛋白(例如玉米蛋白和其他醇溶谷蛋白及疏水性蛋白)),以及它们的任何共聚物或混合物。一般而言,这些物质通过酶水解或体内暴露于水、通过表面或整体侵蚀而降解。

[0263] 在一些方面中,聚合物为生物粘性聚合物,诸如由H.S.Sawhney,C.P.Pathak和J.A.Hubbell于Macromolecules,1993,26,581-587(其所的教示并入本文中)中描述的生物侵蚀性水凝胶、聚透明质酸、酪蛋白、明胶、明胶蛋白、聚酸酐、聚丙烯酸、藻酸盐、几丁聚醣、聚(甲基丙烯酸甲酯)、聚(甲基丙烯酸乙酯)、聚(甲基丙烯酸丁酯)、聚(甲基丙烯酸异丁酯)、聚(甲基丙烯酸己酯)、聚(甲基丙烯酸异癸酯)、聚(甲基丙烯酸月桂酯)、聚(甲基丙烯酸苯酯)、聚(丙烯酸甲酯)、聚(丙烯酸异丙酯)、聚(丙烯酸异丁酯)及聚(丙烯酸十八烷酯)。

[0264] 在一些实施方案中,聚合物为水溶性聚合物或亲水性聚合物。亲水性聚合物在本文中进一步描述于“亲水性部分”。适合的水溶性聚合物在本领域已知,并且包括例如聚乙炔基吡咯烷酮、羟丙基纤维素(HPC;Klucel)、羟丙基甲基纤维素(HPMC;Methocel)、硝化纤维素、羟丙基乙基纤维素、羟丙基丁基纤维素、羟丙基戊基纤维素、甲基纤维素、乙基纤维素(Ethocel)、羟乙基纤维素、各种烷基纤维素及羟烷基纤维素、各种纤维素醚、乙酸纤维素、羧甲基纤维素、羧甲基纤维素钠、羧甲基纤维素钙、乙酸乙烯酯/巴豆酸共聚物、聚甲基丙烯酸羟烷基酯、甲基丙烯酸羟甲酯、甲基丙烯酸共聚物、聚甲基丙烯酸、聚甲基丙烯酸甲酯、顺丁烯二酸酐/甲基乙烯基醚共聚物、聚乙烯醇、钠和钙聚丙烯酸、聚丙烯酸、酸性羧基聚合物、羧基聚亚甲基、羧基乙烯基聚合物、聚氧乙烯聚氧丙烯共聚物、聚甲基乙烯基醚共-顺丁烯二酸酐、羧甲基酰胺、甲基丙烯酸钾二乙烯基苯共聚物、聚氧乙二醇、聚环氧乙烷及其衍生物、盐和组合。

[0265] 在特定实施方案中,聚合物为聚烷二醇,包括例如聚乙二醇(PEG)。

[0266] 在一些实施方案中,异源部分为碳水化合物。在一些实施方案中,碳水化合物为单醣(例如葡萄糖、半乳糖、果糖)、二醣(例如蔗糖、乳糖、麦芽糖)、寡醣(例如棉籽糖、水苏糖)、多醣(淀粉、淀粉酶、淀粉果胶、纤维素、几丁质、愈创聚葡萄糖、昆布糖、木聚糖、甘露聚糖、岩藻聚糖、半乳甘露聚糖)。

[0267] 在一些实施方案中,异源部分为脂质。在一些实施方案中,脂质为脂肪酸、二十碳烯酸、前列腺素、白三烯、血栓素、N-酰基乙醇胺、甘油脂质(例如单取代、二取代、三取代甘油)、甘油磷脂(例如磷脂酰胆固醇、磷脂酰肌醇、磷脂酰乙醇胺、磷脂酰丝氨酸)、神经脂质(例如神经胺醇、神经酰胺)、固醇脂质(例如类固醇、胆固醇)、异戊烯醇脂质、醣脂或聚酮、油、蜡、胆固醇、固醇、脂溶性维生素、单甘油酯、二甘油酯、三甘油酯、磷脂。

[0268] 在一些实施方案中,异源部分通过非共价或共价结合而连接于本公开的类似物。在某些方面中,异源部分通过连接子而连接于本公开的类似物。连接可通过共价化学键、物理力(诸如静电、氢、离子、范德华)或者疏水性或亲水性相互作用来实现。可使用多种非共价偶合系统,包括生物素-抗生物素蛋白、配体/受体、酶/底物、核酸/核酸结合蛋白、脂质/脂质结合蛋白、细胞粘附分子伴侣(partener);或其彼此具有亲和力的任何结合伴侣或片段。

[0269] 在一些实施方案中,通过使类似物的靶标氨基酸残基与能够与这些靶标氨基酸的

所选侧链或N端或C端残基反应的有机衍生剂反应来使胰高血糖素类似物通过直接共价键联而连接于结合物部分。类似物或结合物部分上的反应性基团包括例如醛、氨基、酯、硫醇、 α -卤代乙酰基、顺丁烯二酰亚胺基或胍基。衍生剂包括例如顺丁烯二酰亚胺基苯甲酰基磺基丁二酰亚胺酯(通过半胱氨酸残基结合)、N-羟基丁二酰亚胺(通过赖氨酸残基)、戊二醛、丁二酸酐或本领域已知的其他试剂。或者,结合物部分可经一个过中间载体,诸如多肽或多肽载体间接连接于类似物。多肽载体的实例包括氨基葡聚糖。适合的多肽载体的实例包括聚赖氨酸、聚谷氨酸、聚天冬氨酸、其共聚物,以及这些氨基酸与其他(例如丝氨酸)的混合聚合物,从而向所得的负载载体赋予所需的溶解度性质。

[0270] 最通常使半胱氨酸残基与 α -卤代乙酸盐(及相应的胺)(诸如氯乙酸、氯乙酰胺)反应以得到羧甲基或羧酰氨基甲基衍生物。半胱氨酸残基也通过与溴三氟丙酮、 α -溴- β -(5-咪唑基)丙酸、氯乙酰基磷酸酯、N-烷基顺丁二酰亚胺、3-硝基-2-吡啶基二硫化物、甲基2-吡啶基二硫化物、对氯汞基苯甲酸酯、2-氯汞基-4-硝基苯酚或氯-7-硝基苯并-2-氧杂-1,3-二唑反应而衍生化。

[0271] 组氨酸残基通过与二乙基焦碳酸酯在pH 5.5-7.0下反应而衍生化,因为该试剂对组氨酸侧链相对具特异性。对溴苯甲酰甲基溴也是可用的;该反应优选在0.1M二甲胍酸钠中在pH 6.0下进行。

[0272] 赖氨酸残基和氨基端残基与丁二酸酐或其他羧酸酐反应。用这些试剂衍生化具有逆转赖氨酸残基电荷的作用。用于衍生化含 α -氨基的残基的其他适合的试剂包括酰亚胺酯,诸如甲基吡啶亚胺甲酯、磷酸吡哆醛、吡哆醛、氯硼氢化物、三硝基苯磺酸、O-甲基异脲、2,4-戊二酮及转氨酶催化的与乙醛酸酯的反应。

[0273] 精氨酸残基通过与一种或多种常规试剂反应而修饰,所述试剂有苯基乙二醛、2,3-丁二酮、1,2-环己二酮及茚三酮。精氨酸残基的衍生化由于胍官能团的高pKa而需要反应在碱性条件下进行。此外,这些试剂可与赖氨酸的基团以及精氨酸 ϵ -氨基反应。

[0274] 可进行对酪氨酸残基的特定修饰,其中特别关注通过与芳族重氮化合物或四硝基甲烷反应而将光谱标记引入酪氨酸残基中。最通常使用N-乙酰基咪唑和四硝基甲烷来分别形成O-乙酰基酪氨酸物质和3-硝基衍生物。

[0275] 羧基侧基(天冬氨酸残基或谷氨酸残基)通过与碳二亚胺($R-N=C=N-R'$)反应来选择性修饰,其中R与R'为不同的烷基,诸如1-环己基-3-(2-咪唑基-4-乙基)碳二亚胺或1-乙基-3-(4-氮阳离子-4,4-二甲基戊基)碳二亚胺。此外,天冬氨酸残基和谷氨酸残基通过与铵离子反应而转化为天冬酰胺残基和谷氨酰胺残基。

[0276] 其他修饰包括脯氨酸和赖氨酸的羟基化;丝氨酸或苏氨酸残基的羟基的磷酸化;赖氨酸、精氨酸和组氨酸侧链的 α -氨基的甲基化(T.E.Creighton, *Proteins: Structure and Molecular Properties*, W.H.Freeman&Co., San Francisco, 第79-86页(1983));天冬酰胺或谷氨酰胺的去酰胺化;N端胺的乙酰化;和/或C端羧基的酰胺化或酯化。

[0277] 另一类型的共价修饰包括糖苷与类似物的化学或酶结合。糖可连接于(a)精氨酸和组氨酸,(b)游离羧基,(c)游离巯基,诸如半胱氨酸的游离巯基,(d)游离羟基,诸如丝氨酸、苏氨酸或羟脯氨酸的游离羟基,(e)芳族残基,诸如酪氨酸或色氨酸的芳族残基,或(f)谷氨酰胺的酰胺基。这些方法描述于1987年9月11日公开的W087/05330以及Aplin和Wriston, *CRC Crit.Rev.Biochem.*, 第259-306页(1981)中。

[0278] 在一些实施方案中,胰高血糖素类似物通过胰高血糖素类似物的氨基酸的侧链与异源部分之间的共价键联而结合于异源部分。在一些实施方案中,胰高血糖素类似物通过位置16、17、21、24或29、C端延伸内的位置或C端氨基酸或这些位置的组合之上的氨基酸的侧链而结合于异源部分。在一些方面中,共价连接于异源部分的氨基酸(例如包含异源部分的氨基酸)为Cys、Lys、Orn、homo-Cys或Ac-Phe,且该氨基酸的侧链共价键结于异源部分。

[0279] 在一些实施方案中,结合物包含连接胰高血糖素类似物与异源部分的连接子。在一些方面中,连接子包含1至约60个原子、或1至30个原子或更长、2至5个原子、2至10个原子、5至10个原子或10至20个原子长的链。在一些实施方案中,链原子全部为碳原子。在一些实施方案中,连接子的主链中的链原子选自C、O、N及S。链原子和连接子可根据其预期溶解性(亲水性)进行选择以提供更可溶的结合物。在一些实施方案中,连接子提供可由靶标组织或器官或细胞中存在的酶或其他催化剂或水解条件裂解的官能团。在一些实施方案中,连接子的长度足够长以减少位阻的可能。若连接子为共价键或肽键且结合物为多肽,则整个结合物可为融合蛋白。这样的肽基连接子可为任何长度。示例性连接子长约1至50个氨基酸,长5至50个、3至5个、5至10个、5至15个或10至30个氨基酸。这样的融合蛋白可替代地通过本领域普通技术人员已知的重组基因工程方法制造。

[0280] 结合物:Fc融合体

[0281] 如上所述,在一些实施方案中,使类似物结合,例如融合于免疫球蛋白或其部分(例如可变区、CDR或Fc区)。已知类型的免疫球蛋白(Ig)包括IgG、IgA、IgE、IgD或IgM。Fc区为Ig重链的C端区,其负责结合执行诸如再循环(产生延长的半衰期)、抗体依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC)及补体依赖性细胞毒性(CDC)的活性的Fc受体。

[0282] 举例而言,根据一些定义,人类IgG重链Fc区自Cys226伸展至重链的C端。“铰链区”通常自人类IgG1的Glu216延伸至Pro230(其他IgG同型的铰链区可通过对准半胱氨酸结合所涉及的半胱氨酸而与IgG1序列比对)。IgG的Fc区包括两个恒定域CH2和CH3。人类IgG Fc区的CH2域通常自氨基酸231延伸至氨基酸341。人类IgG Fc区的CH3域通常自氨基酸342延伸至447。提及免疫球蛋白或免疫球蛋白片段或区的氨基酸编号均基于Kabat等人1991, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, U.S. Department of Public Health, Bethesda, Md.在相关实施方案中,Fc区可包含一个或多个来自免疫球蛋白重链的除CH1以外的天然或经修饰的恒定区,例如IgG和IgA的CH2和CH3区,或IgE的CH3和CH4区。

[0283] 适合的结合物部分包括免疫球蛋白序列中包括FcRn结合位点的部分。补救受体FcRn负责免疫球蛋白的再循环并使其返回至血液循环中。IgG的Fc部分中结合FcRn受体的区已基于X射线结晶学进行了描述(Burmeister等人1994, *Nature* 372:379)。Fc与FcRn的主要接触区在CH2与CH3的接点附近。Fc-FcRn接触全部在单一Ig重链内。主要接触位点包括CH2域的氨基酸残基248、250-257、272、285、288、290-291、308-311和314以及CH3域的氨基酸残基385-387、428和433-436。

[0284] 一些结合物部分可包括或可不包括Fc γ R结合位点。Fc γ R负责ADCC和CDC。Fc区内与Fc γ R直接接触的位置的实例为氨基酸234-239(下铰链区)、氨基酸265-269(B/C环)、氨基酸297-299(C'/E环)及氨基酸327-332(F/G)环(Sondermann等人, *Nature* 406:267-273, 2000)。还已发现IgE的下铰链区涉及FcRI结合(Henry等人, *Biochemistry* 36, 15568-15578, 1997)。IgA受体结合所涉及的残基描述于Lewis等人(*J Immunol.* 175:6694-701,

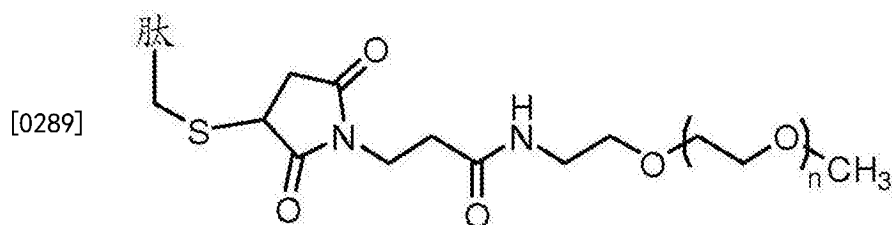
2005)。IgE受体结合所涉及的氨基酸残基描述于Sayers等人(J Biol Chem.279(34):35320-5,2004)。

[0285] 可对免疫球蛋白的Fc区进行氨基酸修饰。这样的变异型Fc区包含Fc区CH3域(残基342-447)中至少一个氨基酸修饰和/或Fc区CH2域(残基231-341)中至少一个氨基酸修饰。确信使对FcRn的亲合力增加的突变包括T256A、T307A、E380A及N434A(Shields等人2001, J.Biol.Chem.276:6591)。其他突变可减弱Fc区与Fc γ RI、Fc γ RIIA、Fc γ RIIB和/或Fc γ RIIIA的结合而不显著减弱对FcRn的亲合力。举例而言,Fc区位置297上的Asn取代为Ala或另一氨基酸移除了高度保守的N-糖基化位点且可产生降低的免疫原性并同时延长Fc区的半衰期,以及减弱与Fc γ R的结合(Routledge等人1995,Transplantation 60:847;Friend等人1999,Transplantation 68:1632;Shields等人1995,J.Biol.Chem.276:6591)。已进行使与Fc γ R的结合减弱的IgG1位置233-236上的氨基酸修饰(Ward和Ghetie 1995, Therapeutic Immunology 2:77以及Armour等人1999,Eur.J.Immunol.29:2613)。一些示例性氨基酸取代描述于美国专利7,355,008和7,381,408,所述专利各自以整体援引方式并入本文。

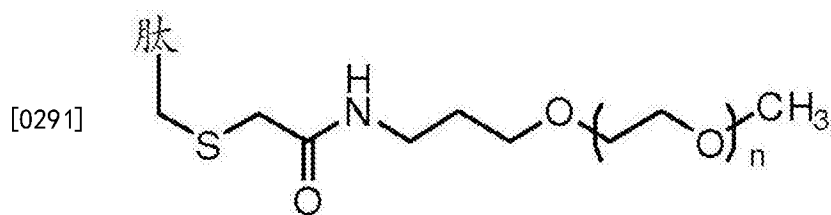
[0286] 结合物:亲水性部分

[0287] 本文所述的胰高血糖素类似物可经进一步修饰以改进其在水溶液中于生理pH值下的溶解度和稳定性,同时保留相对于天然胰高血糖素的高生物活性。可在用于使蛋白与活化的聚合物分子反应的任何适合条件下将诸如PEG基团的亲水性部分连接于类似物。可使用本领域已知的任何方式,包括通过酰化、还原烷基化、迈克尔加成、硫醇烷基化或通过PEG部分上的反应性基团(例如醛、氨基、酯、硫醇、 α -卤代乙酰基、顺丁烯二酰亚胺基或肼基)与靶标化合物上的反应性基团(例如醛、氨基、酯、硫醇、 α -卤代乙酰基、顺丁烯二酰亚胺基或肼基)的其他化学选择性结合/连接方法。可用于连接水溶性聚合物与一种或多种蛋白的活化基团包括但不限于砒、顺丁烯二酰亚胺、巯基、硫醇、三氟甲磺酸酯、三氟乙磺酸酯、氮杂环丙烷、环氧乙烷、5-吡啶基及 α -卤化酰基(例如 α -碘乙酸、 α -溴乙酸、 α -氯乙酸)。若通过还原烷基化而连接于类似物,则所选聚合物应具有单一还原性醛以使聚合度得到控制。参见例如Kinstler等人,Adv.Drug.Delivery Rev.54:477-485(2002);Roberts等人,Adv.Drug Delivery Rev.54:459-476(2002);以及Zalipsky等人,Adv.Drug Delivery Rev.16:157-182(1995)。

[0288] 在特定方面中,类似物中具有硫醇的氨基酸残基经诸如PEG的亲水性部分修饰。在一些实施方案中,硫醇在迈克尔加成反应中经顺丁烯二酰亚胺活化的PEG修饰以产生包含以下所示的硫醚键联的聚乙二醇化类似物:



[0290] 在一些实施方案中,硫醇在亲核取代反应中经卤代乙酰基活化的PEG修饰以产生包含以下所示的硫醚键联的聚乙二醇化类似物:



[0292] 适合亲水性部分包括聚乙二醇 (PEG)、聚丙二醇、聚氧乙基化多元醇 (例如 POG)、聚氧乙基化山梨糖醇、聚氧乙基化葡萄糖、聚氧乙基化甘油 (POG)、聚氧亚烷基、聚乙二醇丙醛、乙二醇/丙二醇的共聚物、单甲氧基-聚乙二醇、单-(C1-C10) 烷氧基-或芳氧基-聚乙二醇、羧甲基纤维素、聚缩醛、聚乙烯醇 (PVA)、聚乙烯基吡咯烷酮、聚-1,3-二氧戊环、聚-1,3,6-三氧杂环己烷、乙烯/顺丁烯二酸酐共聚物、聚(β-氨基酸) (均聚物或无规共聚物)、聚(正乙烯基吡咯烷酮) 聚乙二醇、聚丙二醇均聚物 (PPG) 及其他聚环氧烷、聚环氧丙烷/环氧乙烷共聚物、结肠酸或其他多糖聚合物、聚蔗糖 (Ficoll) 或葡聚糖及其混合物。葡聚糖为葡萄糖亚单元的多糖聚合物, 主要由α1-6键连接。葡聚糖可以许多分子量范围获得, 例如约1kD至约100kD, 或约5、10、15或20kD至约20、30、40、50、60、70、80或90kD。涵盖了线性或支化聚合物。所得的结合物制剂可基本上为单分散性或多分散性的, 并且每个类似物可具有约0.5、0.7、1、1.2、1.5或2个聚合物部分。

[0293] 在一些实施方案中, 胰高血糖素类似物通过胰高血糖素类似物的氨基酸的侧链与亲水性部分之间的共价键联而结合于亲水性部分。在一些实施方案中, 胰高血糖素类似物通过位置16、17、21、24或29、C端延伸内的位置或C端氨基酸或这些位置的组合之上的氨基酸的侧链而结合于亲水性部分。在一些方面中, 共价连接于亲水性部分的氨基酸 (例如包含亲水性部分的氨基酸) 为Cys、Lys、Orn、homo-Cys或Ac-Phe, 且该氨基酸的侧链共价键结于亲水性部分 (例如PEG)。

[0294] 结合物:rPEG

[0295] 在一些实施方案中, 本发明的结合物包含融合于能够形成与化学PEG类似的延伸构形的辅助类似物 (例如重组PEG (rPEG) 分子) 的具有胰高血糖素和/或GLP-1激动剂活性的类似物, 所述辅助类似物例如国际专利申请公开第W02009/023270号和美国专利申请公开第US20080286808号中所述的那些。在一些方面中, rPEG分子为包含甘氨酸、丝氨酸、谷氨酸、天冬氨酸、丙氨酸或脯氨酸中一种或多种的多肽。在一些方面中, rPEG为均聚物, 例如聚甘氨酸、聚丝氨酸、聚谷氨酸、聚天冬氨酸、聚丙氨酸或聚脯氨酸。在其他实施方案中, rPEG包含两种类型的重复氨基酸, 例如聚(Gly-Ser)、聚(Gly-Glu)、聚(Gly-Ala)、聚(Gly-Asp)、聚(Gly-Pro)、聚(Ser-Glu)等。在一些方面中, rPEG包含三种不同类型的氨基酸, 例如聚(Gly-Ser-Glu)。在特定方面中, rPEG使胰高血糖素和/或GLP-1激动剂类似物的半衰期增加。在一些方面中, rPEG包含净正电荷或净负电荷。在一些方面中, rPEG缺乏二级结构。在一些实施方案中, rPEG的长度大于或等于10个氨基酸, 且在一些实施方案中, 长度为约40至约50个氨基酸。在一些方面中, 辅助肽通过肽键或蛋白酶裂解位点而融合于本发明类似物的N端或C端, 或插入本发明类似物的环中。在一些方面中, rPEG包含亲和力标签或连接于大于5kDa的PEG。在一些实施方案中, rPEG使本发明的类似物具有增加的流体动力学半径、血清半衰期、蛋白酶抗性 or 溶解度, 且在一些方面中使类似物具有降低的免疫原性。

[0296] 结合物:多聚物

[0297] 本发明进一步提供本文所公开的类似物的多聚物或二聚物,包括均多聚物、杂多聚物或均二聚物或杂二聚物。两个或更多个类似物可使用本领域技术人员已知的标准连接剂和程序而连接在一起。举例而言,可通过使用双官能硫醇交联剂和双官能胺交联剂在两个肽之间形成二聚物,尤其对于已被半胱氨酸、赖氨酸鸟氨酸、高半胱氨酸或乙酰基苯丙氨酸残基取代的类似物。二聚物可为均二聚物或者可为杂二聚物。在某些实施方案中,连接两个(或更多个)类似物的连接子为PEG,例如5kDa PEG、20kDa PEG。在一些实施方案中,连接子为二硫键。举例而言,二聚物的各单体可包含Cys残基(例如末端或内部定位的Cys)且各Cys残基的硫原子参与二硫键的形成。在一些方面中,单体通过末端氨基酸(例如N端或C端)、通过内部氨基酸或通过至少一个单体的末端氨基酸及至少一个其他单体的内部氨基酸而连接。在特定方面中,单体不通过N端氨基酸连接。在一些方面中,多聚物的单体以“尾对尾”方向连接在一起,其中各单体的C端氨基酸连接在一起。

[0298] 药物组合物、用途及试剂盒

[0299] 盐

[0300] 在一些实施方案中,胰高血糖素类似物为盐形式,例如药学上可接受的盐。如本文所用,术语“药学上可接受的盐”是指化合物的保留母体化合物的生物活性且在生物学上或其他方面并不是不期望的盐。这样的盐可在类似物的最终分离和纯化期间原位制备,或通过使游离碱官能团与适合酸反应而单独制备。本文所公开的许多化合物凭借存在氨基和/或羧基或与其类似的基团而能够形成酸和/或碱盐。

[0301] 药学上可接受的酸加成盐可由无机和有机酸制备。典型的酸加成盐包括但不限于乙酸盐、己二酸盐、藻酸盐、柠檬酸盐、天冬氨酸盐、苯甲酸盐、苯磺酸盐、硫酸氢盐、硫酸氢钠、丁酸盐、樟脑酸盐、樟脑磺酸盐、二葡萄糖酸盐、甘油磷酸盐、半硫酸盐、庚酸盐、己酸盐、反丁烯二酸盐、盐酸盐、氢溴酸盐、氢碘酸盐、2-羟基乙烷磺酸盐(乙磺酸盐)、乳酸盐、顺丁烯二酸盐、甲烷磺酸盐、烟碱酸盐、2-萘磺酸盐、草酸盐、棕榈酸盐、果胶酸盐、过硫酸盐、3-苯基丙酸盐、苦味酸盐、特戊酸盐、丙酸盐、丁二酸盐、硫酸盐、酒石酸盐、硫氰酸盐、磷酸盐、谷氨酸盐、碳酸氢盐、对苯磺酸盐以及十一烷酸盐。衍生自无机酸的盐包括盐酸、氢溴酸、硫酸、硝酸、磷酸及其类似物。衍生自有机酸的盐包括乙酸、三氟乙酸、丙酸、乙醇酸、丙酮酸、草酸、苹果酸、丙二酸、丁二酸、顺丁烯二酸、反丁烯二酸、酒石酸、柠檬酸、苯甲酸、肉桂酸、杏仁酸、甲烷磺酸、乙烷磺酸、对苯磺酸、水杨酸及其类似物。可用于形成药学上可接受的酸加成盐的酸的实例包括例如无机酸,例如盐酸、氢溴酸、硫酸及磷酸;以及有机酸,例如草酸、顺丁烯二酸、丁二酸及柠檬酸。

[0302] 碱加成盐也可在水杨酸来源的最终分离和纯化期间原位制备或通过使含羧酸的部分与适合的碱(诸如药学上可接受的金属阳离子的氢氧化物、碳酸盐或碳酸氢盐)或与氨或有机伯、仲或叔胺反应来制备。药学上可接受的盐包括但不限于基于碱金属或碱土金属的阳离子,诸如锂盐、钠盐、钾盐、钙盐、镁盐和铝盐及其类似物,以及无毒季氨和胺阳离子,包括铵、四甲基铵、四乙基铵、甲基铵、二甲基铵、三甲基铵、三乙基铵、二乙基铵和乙基铵,等。适用于形成碱加成盐的其他典型有机胺包括例如乙二胺、乙醇胺、二乙醇胺、哌啶、哌嗪等。衍生自有机碱的盐包括但不限于伯胺、仲胺和叔胺的盐。

[0303] 此外,可用本发明的类似物以低碳烷基卤化物(诸如甲基、乙基、丙基以及丁基的氯化物、溴化物和碘化物);长链卤化物(诸如癸基、月桂基、肉豆蔻基以及硬脂基的氯化物、

溴化物和碘化物)；芳烷基卤化物(如苄基和苯乙基的溴化物)等形式来季铵化含碱性氮的基团。由此获得水或油可溶性或可分散性产物。

[0304] 制剂

[0305] 根据一些实施方案,提供了药物组合物,其中该组合物包含本公开的胰高血糖素类似物或其药学上可接受的盐和药学上可接受的载体。药物组合物可包含任何药学上可接受的成分,包括例如酸化剂、添加剂、吸附剂、气雾剂推进剂、排气剂、碱化剂、防结块剂、抗凝剂、抗微生物防腐剂、抗氧化剂、杀菌剂、基质、粘合剂、缓冲剂、螯合剂、包衣剂、着色剂、干燥剂、清洁剂、稀释剂、消毒剂、崩解剂、分散剂、溶解增强剂、染料、润肤剂、乳化剂、乳液稳定剂、填充剂、成膜剂、增味剂、调味剂、流动增强剂、胶凝剂、造粒剂、保湿剂、润滑剂、黏膜粘附剂、软膏基质、软膏、油性载体、有机基质、糖锭基质、颜料、塑化剂、抛光剂、防腐剂、掩蔽剂、皮肤渗透剂、增溶剂、溶剂、稳定剂、栓剂基质、表面活性剂、表面活性剂(surfactants)、悬浮剂、甜味剂、治疗剂、增稠剂、张力剂、毒性剂、增粘剂、吸水剂、水可混溶共溶剂、水软化剂或湿润剂。

[0306] 在一些实施方案中,药物组合物包含以下组分中任一种或其组合:阿拉伯胶、乙酰舒泛钾(acesulfame potassium)、柠檬酸乙酰三丁酯、柠檬酸乙酰三乙酯、琼脂、白蛋白、酒精、脱水酒精、变性酒精、稀酒精、油桐酸、藻酸、脂族聚酯、氧化铝、氢氧化铝、硬脂酸铝、淀粉果胶、 α -直链淀粉、抗坏血酸、抗坏血酸棕榈酸酯、阿斯巴甜、注射用抑菌水、膨润土、膨润土糊剂、氯苄烷铵、苄索氯铵、苯甲酸、苄醇、苯甲酸苄酯、溴硝丙二醇、丁基化羟基甲氧苯、丁基化羟基甲苯、羟苯甲酸丁酯、羟苯甲酸丁酯钠、藻酸钙、抗坏血酸钙、碳酸钙、环己氨磺酸钙、无水磷酸氢钙、脱水磷酸氢钙、磷酸钙、丙酸钙、硅酸钙、山梨酸钙、硬脂酸钙、硫酸钙、半水合硫酸钙、菜籽油、卡波姆、二氧化碳、羧甲基纤维素钙、羧甲基纤维素钠、 β -胡萝卜素、角叉菜胶、蓖麻油、氢化蓖麻油、阳离子乳化蜡、乙酸纤维素、乙酸邻苯二甲酸纤维素、乙基纤维素、微晶纤维素、粉状纤维素、硅酸化微晶纤维素、羧甲基纤维素钠、鲸蜡硬脂醇、溴化十六基三甲铵、鲸蜡醇、氯己定、氯丁醇、氯甲酚、胆固醇、乙酸氯己定、葡萄糖酸氯己定、盐酸氯己定、氯二氟乙烷(HCFC)、氯二氟甲烷、氯氟烃(CFC)氯苯氧基乙醇、氯二甲苯酚、玉米糖浆固体、无水柠檬酸、柠檬酸单水合物、可可脂、着色剂、玉米油、棉籽油、甲酚、间甲酚、邻甲酚、对甲酚、交联羧甲基纤维素钠、交联聚维酮、环己烷氨基磺酸、环糊精、葡萄糖结合剂、糊精、右旋糖、无水右旋糖、重氮烷基咪唑脒、邻苯二甲酸二丁酯、癸二酸二丁酯、二乙醇胺、邻苯二甲酸二乙酯、二氟乙烷(HFC)、二甲基- β -环糊精、环糊精型化合物(诸如Captisol®)、二甲醚、邻苯二甲酸二甲酯、依地酸二钾、依地酸二钠、磷酸氢二钠、多库酯钙、多库酯钾、多库酯钠、没食子酸十二烷酯、溴化十二烷基三甲基铵、依地酸钙二钠、依地酸、乙葡胺、乙醇、乙基纤维素、没食子酸乙酯、月桂酸乙酯、乙基麦芽醇、油酸乙酯、羟苯甲酸乙酯、羟苯甲酸乙酯钾、羟苯甲酸乙酯钠、乙基香草素、果糖、液体果糖、研磨果糖、无热原质果糖、粉状果糖、反丁烯二酸、明胶、葡萄糖、液体葡萄糖、饱和植物脂肪酸的甘油酯混合物、甘油、山萘酸甘油酯、单油酸甘油酯、单硬脂酸甘油酯、自乳化单硬脂酸甘油酯、棕榈基硬脂酸甘油酯、甘氨酸、二醇、四氢呋喃聚乙二醇醚、瓜尔胶、七氟丙烷(HFC)、溴化十六烷基三甲基铵、高果糖浆、人类血清白蛋白、烃(HC)、稀盐酸、II型氢化植物油、羟乙基纤维素、2-羟乙基- β -环糊精、羟丙基纤维素、低取代羟丙基纤维素、2-羟丙基- β -环糊精、羟丙基甲基纤维素、羟丙基甲基纤维素邻苯二甲酸酯、咪唑烷脒、甾胺脂、离子交换剂、铁氧化物、异丙醇、肉豆蔻酸异

丙酯、棕榈酸异丙酯、等张生理盐水、高岭土、乳酸、乳糖醇、乳糖、羊毛脂、羊毛脂醇、无水羊毛脂、卵磷脂、硅酸镁铝、碳酸镁、常态碳酸镁、无水碳酸镁、碱式碳酸镁、氢氧化镁、月桂基硫酸镁、氧化镁、硅酸镁、硬脂酸镁、三硅酸镁、无水三硅酸镁、苹果酸、麦芽、麦芽醇、麦芽醇溶液、麦芽糊精、麦芽酚、麦芽糖、甘露糖醇、中链三甘油酯、葡甲胺、薄荷脑、甲基纤维素、甲基丙烯酸甲酯、油酸甲酯、羟苯甲酸甲酯、羟苯甲酸甲酯钾、羟苯甲酸甲酯钠、微晶纤维素和羧甲基纤维素钠、矿物油、轻质矿物油、矿物油和羊毛脂醇、油、橄榄油、单乙醇胺、蒙脱土、没食子酸辛酯、油酸、棕榈酸、石蜡、花生油、石蜡油、石蜡油和羊毛脂醇、医药用釉料、苯酚、液化苯酚、苯氧基乙醇、苯氧基丙醇、苯乙醇、乙酸苯汞、硼酸苯汞、硝酸苯汞、波拉克林、波拉克林钾、帕洛沙姆、葡聚糖、聚乙二醇、聚环氧乙烷、聚丙烯酸酯、聚乙烯-聚氧丙烯嵌段聚合物、聚甲基丙烯酸酯、聚氧乙烯烷基醚、聚氧乙烯蓖麻油衍生物、聚氧乙烯山梨糖醇脂肪酸酯、聚氧乙烯硬脂酸酯、聚乙烯醇、聚乙烯基吡咯烷酮、藻酸钾、苯甲酸钾、碳酸氢钾、硫酸氢钾、氯化钾、柠檬酸钾、无水柠檬酸钾、磷酸氢钾、偏亚硫酸氢钾、磷酸二氢钾、丙酸钾、山梨酸钾、普维酮、丙醇、丙酸、碳酸丙二酯、丙二醇、丙二醇海藻酸酯、没食子酸丙酯、羟苯甲酸丙酯、羟苯甲酸丙酯钾、羟苯甲酸丙酯钠、硫酸鱼精蛋白、菜籽油、林格氏溶液、糖精、糖精铵、糖精钙、糖精钠、葵花籽油、皂土、血清蛋白质、芝麻油、胶态硅石、胶态二氧化硅、藻酸钠、抗坏血酸钠、苯甲酸钠、碳酸氢钠、亚硫酸氢钠、氯化钠、无水柠檬酸钠、脱水柠檬酸钠、氯化钠、环己氨磺酸钠、依地酸钠、十二烷基硫酸钠、月桂基硫酸钠、偏亚硫酸氢钠、磷酸钠、磷酸氢钠、磷酸二氢钠、无水磷酸钠、丙酸钠、山梨酸钠、淀粉乙醇酸钠、硬脂基反丁烯二酸钠、亚硫酸钠、山梨酸、脱水山梨糖醇酯(脱水山梨糖醇脂肪酸酯)、山梨糖醇、70%山梨糖醇溶液、大豆油、鲸蜡、淀粉、玉米淀粉、马铃薯淀粉、预胶凝化淀粉、可灭菌玉米淀粉、硬脂酸、纯化硬脂酸、硬脂醇、蔗糖、糖、可压缩糖、调味糖、糖丸、转化糖、蔗糖-转化糖聚合物(Sugartab)、日落黄FCF、合成石蜡、滑石、酒石酸、酒石黄、四氟乙烷(HFC)、可可油、硫柳汞、二氧化钛、 α -生育酚、生育酚乙酸酯、酸式琥珀酸 α -生育酚酯、 β -生育酚、 δ -生育酚、 γ -生育酚、黄芪胶、三乙酰甘油、柠檬酸三丁酯、三乙醇胺、柠檬酸三乙酯、三甲基- β -环糊精、溴化三甲基十四烷铵、tris缓冲液、依地酸三钠、香草素、I型氢化植物油、水、软水、硬水、无二氧化碳水、无热原质水、注射用水、吸入用无菌水、注射用无菌水、灌洗用无菌水、蜡、阴离子乳化蜡、棕榈蜡、阳离子乳化蜡、鲸蜡酯蜡、微晶蜡、非离子乳化蜡、栓剂蜡、白蜡、黄蜡、白石蜡油、羊毛脂、三仙胶、木糖醇、玉米蛋白、丙酸锌、锌盐、硬脂酸锌或以下文献中的任何赋形剂:Handbook of Pharmaceutical Excipients,第三版,A.H.Kibbe(Pharmaceutical Press,London,UK,2000),该文献以整体援引方式并入本文。以整体援引方式并入本文的Remington's Pharmaceutical Sciences,第十六版,E.W.Martin(Mack Publishing Co.,Easton,Pa.,1980)公开了用于配制药学上可接受的组合物的各种组分及其已知的制备技术。除非任何常规药剂与药物组合物不兼容,否则涵盖其在药物组合物中的用途。补充活性成分也可并入组合物中。

[0307] 在一些实施方案中,前述组分可以以任何浓度(诸如至少A)存在于药物组合物中,其中A为0.0001%w/v、0.001%w/v、0.01%w/v、0.1%w/v、1%w/v、2%w/v、5%w/v、10%w/v、20%w/v、30%w/v、40%w/v、50%w/v、60%w/v、70%w/v、80%w/v或90%w/v。在一些实施方案中,前述组分可以以任何浓度(诸如至多B)存在于药物组合物中,其中B为90%w/v、80%w/v、70%w/v、60%w/v、50%w/v、40%w/v、30%w/v、20%w/v、10%w/v、5%w/v、2%w/v

v、1%w/v、0.1%w/v、0.001%w/v或0.0001%。在其他实施方案中,前述组分可以以任何浓度范围(诸如约A至约B)存在于药物组合物中。在一些实施方案中,A为0.0001%且B为90%。

[0308] 药物组合物可经配制以实现生理上相容的pH值。在一些实施方案中,根据制剂和给药途径,药物组合物的pH值可为至少5、至少5.5、至少6、至少6.5、至少7、至少7.5、至少8、至少8.5、至少9、至少9.5、至少10或至少10.5直至且包括pH 11。在某些实施方案中,药物组合物可包含缓冲剂以实现生理上相容的pH值。缓冲剂可包括能够在所需pH值下缓冲的任何化合物,诸如磷酸盐缓冲液(例如)、三乙醇胺、Tris、N,N-二羟乙基甘氨酸、TAPS、N-三(羟甲基)甲基甘氨酸、HEPES、TES、MOPS、PIPES、二甲胂酸盐、MES等。在某些实施方案中,缓冲液的浓度为至少0.5mM、至少1mM、至少5mM、至少10mM、至少20mM、至少30mM、至少40mM、至少50mM、至少60mM、至少70mM、至少80mM、至少90mM、至少100mM、至少120mM、至少150mM或至少200mM。在一些实施方案中,缓冲液的浓度不超过300mM(例如至多200mM、至多100mM、至多90mM、至多80mM、至多70mM、至多60mM、至多50mM、至多40mM、至多30mM、至多20mM、至多10mM、至多5mM、至多1mM)。

[0309] 给药途径

[0310] 以下对给药途径的论述仅用于说明示例性实施方案且不应以任何方式解释为限制范围。

[0311] 适于经口给药的制剂可由以下组成:(a)液体溶液,诸如溶解于诸如水、生理盐水或橙汁的稀释剂中的有效量的本发明类似物;(b)胶囊、药囊、片剂、糖锭剂和锭剂,各自含有预定量的活性成分,形式为固体或颗粒;(c)散剂;(d)于适当液体中的悬浮液;以及(e)适合的乳液。液体制剂可包括稀释剂,诸如水和醇,例如乙醇、苄醇和聚乙二醇,其添加有或未添加药学上可接受的表面活性剂。胶囊形式可为普通硬壳或软壳明胶型,其含有例如表面活性剂、润滑剂以及惰性填充剂,诸如乳糖、蔗糖、磷酸钙和玉米淀粉。片剂形式可包括以下一种或多种:乳糖、蔗糖、甘露糖醇、玉米淀粉、马铃薯淀粉、藻酸、微晶纤维素、阿拉伯胶、明胶、瓜尔胶、胶态二氧化硅、交联羧甲基纤维素钠、滑石、硬脂酸镁、硬脂酸钙、硬脂酸锌、硬脂酸及其他赋形剂、着色剂、稀释剂、缓冲剂、崩解剂、湿润剂、防腐剂、调味剂及其他药理学上相容的赋形剂。糖锭剂形式可包含于调味剂(通常为蔗糖)及阿拉伯胶或黄芪胶中的本发明类似物,以及香锭剂(pastilles)包含于惰性基质(诸如明胶和甘油)或蔗糖及阿拉伯胶、乳液、凝胶等中的本发明类似物,另外含有本领域已知的赋形剂。

[0312] 本公开的类似物单独或与其他适合组分组合可通过肺部给药来递送,并且可制备成气雾剂制剂以便通过吸入而给药。这些气雾剂制剂可置于加压可接受的推进剂(诸如二氯二氟甲烷、丙烷、氮气等)中。它们也可配制成用于非加压制剂的药物,诸如于喷雾器或雾化器中。这样的喷雾制剂也可用于喷射黏膜。在一些实施方案中,将类似物配制成粉末掺合物或微粒或纳米颗粒。适合的肺部制剂在本领域已知。参见例如Qian等人,Int J Pharm 366:218-220(2009);Adjei和Garren,Pharmaceutical Research,7(6):565-569(1990);Kawashima等人,J Controlled Release 62(1-2):279-287(1999);Liu等人,Pharm Res 10(2):228-232(1993);国际专利申请公开第W0 2007/133747号和第W0 2007/141411号。

[0313] 适于胃肠外给药的制剂包括水性和非水性等张无菌注射溶液,其可含有抗氧化剂、缓冲剂、抑菌剂及使配制剂与预定接受者的血液等张的溶质;以及水性和非水性无菌悬浮液,其可包括悬浮剂、增溶剂、增稠剂、稳定剂及防腐剂。术语“胃肠外”意谓不通过消化

道,而是通过一些其他途径,诸如皮下、肌肉内、脊柱内或静脉内。本公开的类似物可于药学载剂中与生理上可接受的稀释剂一起给药,该药学载剂例如无菌液体或液体混合物,包括水、生理盐水、右旋糖水溶液及相关糖溶液、醇(诸如乙醇或十六烷醇)、二醇(诸如丙二醇或聚乙二醇)、二甲亚砜、甘油、缩酮(诸如2,2-二甲基-1,3-二氧戊环-4-甲醇)、醚、聚(乙二醇) 400、油、脂肪酸、脂肪酸酯或甘油酯或乙酰化脂肪酸甘油酯,其添加有或未添加药学上可接受的表面活性剂,诸如皂类或清洁剂、悬浮剂(诸如果胶、卡波姆、甲基纤维素、羟丙基甲基纤维素或羧甲基纤维素)或乳化剂及其他药学佐剂。

[0314] 可用于胃肠外制剂的油包括矿油、动物、植物或合成油。油的特定实例包括花生油、大豆油、芝麻油、棉籽油、玉米油、橄榄油、石蜡油及矿物油。用于胃肠外制剂的适合的脂肪酸包括油酸、硬脂酸及异硬脂酸。油酸乙酯和肉豆蔻酸异丙酯为适合的脂肪酸酯的实例。

[0315] 适用于胃肠外制剂的皂类包括脂肪碱金属盐、铵盐及三乙醇胺盐,并且适合的清洁剂包括(a)阳离子清洁剂,诸如二甲基二烷基卤化铵和烷基吡啶卤化物,(b)阴离子清洁剂,诸如磺酸烷酯、芳酯和烯炔酯、硫酸烷酯、烯炔酯、醚酯和单甘油酯、以及磺基丁二酸酯,(c)非离子清洁剂,诸如脂肪胺氧化物、脂肪酸烷醇酰胺以及聚氧乙烯聚丙烯共聚物,(d)两性清洁剂,诸如烷基-β-氨基丙酸酯和2-烷基-咪唑啉季铵盐,以及(e)其混合物。

[0316] 胃肠外配制剂可于单位剂量或多剂量密封容器(诸如安瓿和小瓶)中提供,且可储存于冷冻干燥(冻干)条件下,仅需要在临使用前添加无菌液体赋形剂,例如注射用水。临时注射溶液和悬浮液可由本领域已知种类的无菌粉末、颗粒及锭剂制备。

[0317] 可注射制剂基于本发明。用于可注射组合物的有效药学载剂的要求为本领域普通技术人员公知的(参见例如Pharmaceutics and Pharmacy Practice, J.B. Lippincott Company, Philadelphia, PA, Banker和Chalmers编,第238-250页(1982),以及ASHP Handbook on Injectable Drugs, Toissel,第4版,第622-630页(1986))。

[0318] 另外,本发明的类似物可通过与多种基质(诸如乳化基质或水溶性基质)混合而制备成用于直肠给药的栓剂。适于阴道给药的制剂可提供为子宫托、卫生棉塞、乳膏、凝胶、糊剂、泡沫体或喷雾剂配方,其除活性成分外还含有诸如本领域已知为适当的载剂。

[0319] 本领域技术人员应理解,除上述药物组合物外,本发明的类似物也可配制成包合复合物,诸如环糊精包合复合物,或脂质体。

[0320] 剂量

[0321] 确信本发明的类似物可用于治疗其中胰高血糖素受体激动作用、GLP-1受体激动作用或胰高血糖素受体/GLP-1受体协同激动作用发挥作用的疾病或医学病况。出于本公开的目的,所给药的本公开的类似物的量或剂量应足以于个体或动物体中在合理时间框内实现例如治疗或预防反应。举例而言,本公开的类似物的剂量应在自给药时间开始约1至4分钟、1至4小时或1至4周或更长,例如5至20周或更久的时段内足以刺激cAMP自如本文所述的细胞分泌或足以降低哺乳动物的血糖含量、脂肪含量、食物摄取量或体重。在某些实施方案中,该时段可甚至更长。剂量将由本公开的特定类似物的功效和动物(例如人类)的状况以及待治疗动物(例如人类)的体重决定。

[0322] 许多用于测定给药剂量的测试在本领域已知。出于本文的目的,以下测定可用于确定向哺乳动物给药的起始剂量,所述测定包括比较当向在一组各自给予不同剂量的类似物的哺乳动物中的哺乳动物给药指定剂量的本公开的类似物后血糖水平降低的程度。当给

药某一剂量后血糖水平降低的程度可通过本领域已知的方法来分析,所述方法包括例如本文实例4中所述的方法。

[0323] 本公开的类似物的剂量也可通过可能伴随本公开特定类似物的给药的任何不良反应的存在、性质及程度来确定。通常,主治医师将考虑多种因素来决定用于治疗单个患者的本公开的类似物的剂量,所述因素例如年龄、体重、一般健康状况、饮食、性别、待给药的本公开的类似物、给药途径及所治疗的病况的严重性。例如但不旨在限制本发明,本公开的类似物的剂量可为约0.0001至约1g/每公斤所治疗的个体的体重/天,约0.0001至约0.001g/每公斤体重/天,或约0.01mg至约1g/公斤体重/天。

[0324] 在一些实施方案中,药物组合物包含适于向患者给药的纯度水平的本文所公开的任何类似物。在一些实施方案中,类似物具有至少约90%、约91%、约92%、约93%、约94%、约95%、约96%、约97%、约98%或约99%的纯度水平,以及药学上可接受的稀释剂、载剂或赋形剂。在一些方面中,药物组合物包含浓度为至少A的本公开的类似物,其中A为约0.001mg/ml、约0.01mg/ml、约0.1mg/ml、约0.5mg/ml、约1mg/ml、约2mg/ml、约3mg/ml、约4mg/ml、约5mg/ml、约6mg/ml、约7mg/ml、约8mg/ml、约9mg/ml、约10mg/ml、约11mg/ml、约12mg/ml、约13mg/ml、约14mg/ml、约15mg/ml、约16mg/ml、约17mg/ml、约18mg/ml、约19mg/ml、约20mg/ml、约21mg/ml、约22mg/ml、约23mg/ml、约24mg/ml、约25mg/ml或更高。在一些实施方案中,药物组合物包含浓度为至多B的类似物,其中B为约30mg/ml、约25mg/ml、约24mg/ml、约23mg/ml、约22mg/ml、约21mg/ml、约20mg/ml、约19mg/ml、约18mg/ml、约17mg/ml、约16mg/ml、约15mg/ml、约14mg/ml、约13mg/ml、约12mg/ml、约11mg/ml、约10mg/ml、约9mg/ml、约8mg/ml、约7mg/ml、约6mg/ml、约5mg/ml、约4mg/ml、约3mg/ml、约2mg/ml、约1mg/ml或约0.1mg/ml。在一些实施方案中,组合物可含有浓度范围为A至B mg/ml的类似物,例如约0.001至约30.0mg/ml。

[0325] 靶向形式

[0326] 本领域普通技术人员会容易地理解,本公开的类似物可以以任何数量的方式而修饰,以使得本公开的类似物的治疗或预防功效通过该修饰而增加。举例而言,本公开的类似物可直接或通过连接子间接结合于靶向部分。将化合物(例如本文所述的胰高血糖素类似物)与靶向部分进行结合的实践在本领域已知。参见例如Wadhwa等人,J Drug Targeting, 3,111-127 (1995)以及美国专利第5,087,616号。如本文所用,术语“靶向部分”是指特异性识别并结合于细胞表面受体的任何分子或药剂,以使得靶向部分引导本公开的类似物递送至表面上表达该受体(胰高血糖素受体、GLP-1受体)的细胞群。靶向部分包括但不限于抗体或其片段、肽、激素、生长因子、细胞激素及结合细胞表面受体(例如上皮生长因子受体(EGFR)、T细胞受体(TCR)、B细胞受体(BCR)、CD28、血小板衍生生长因子受体(PDGF)、烟碱乙酰胆碱受体(nAChR)等)的任何其他天然或非天然配体。如本文所用,“连接子”为使两个单独实体彼此结合的键、分子或分子基团。连接子可提供两个实体的最佳间隔或可进一步供应允许两个实体彼此隔开的不稳定键联。不稳定键联包括光可裂解基团、酸不稳定性部分、碱不稳定性部分及酶可裂解基团。在一些实施方案中,术语“连接子”是指桥接本公开的类似物与靶向部分的任何药剂或分子。本领域普通技术人员认识到,本公开的类似物上的本公开类似物的功能所不必需的位点为连接连接子和/或靶向部分的理想位点,条件是连接子和/或靶向部分在连接于本公开的类似物后不干扰本公开类似物的功能,即刺激cAMP自

细胞分泌、治疗糖尿病或肥胖症的能力。

[0327] 控释制剂

[0328] 或者,本文所述的胰高血糖素类似物可被修饰成储库形式,以使得本公开类似物释放至待给药的身内的方式对于时间和体内位置为受控的(参见例如美国专利第4,450,150号)。本公开的类似物的储库形式可为例如包含本公开类似物和多孔或无孔物质(诸如聚合物)的可植入组合物,其中本公开的类似物由该物质封装或扩散于该物质中和/或由无孔物质的降解而扩散。然后,将储库植入体内所需位置,且本公开的类似物以预定速率自植入物释放。

[0329] 在某些方面中,药物组合物经修饰以具有任何类型的体内释放谱。在一些方面中,药物组合物为即释、控释、缓释、延释、迟释或双相释放制剂。配制用于控释的肽的方法在本领域已知。参见例如Qian等人,J Pharm 374:46-52 (2009)以及国际专利申请公开第W0 2008/130158号;第W02004/033036号;第W02000/032218号;和第W0 1999/040942号。

[0330] 本文组合物可进一步包含例如胶束或脂质体或一些其他封装形式,或可以以延释形式给药以提供延长的储存和/或递送作用。所公开的药物组合物可根据任何方案给药,该方案包括例如每天(每天1次、每天2次、每天3次、每天4次、每天5次、每天6次)、每两天一次、每三天一次、每四天一次、每五天一次、每六天一次、每周一次、每两周一次、每三周一次、每月一次或每两月一次。

[0331] 组合

[0332] 本文所述的胰高血糖素类似物可单独或与其他旨在治疗或预防本文所述的任何疾病或医学病况的治疗剂组合给药。举例而言,本文所述的胰高血糖素类似物可与(同时或依次)抗糖尿病药剂或抗肥胖药剂共给药。本领域已知或正在研究的抗糖尿病剂包括胰岛素、瘦素、肽YY (PYY)、胰腺肽 (PP)、纤维母细胞生长因子21 (FGF21)、Y2Y4受体激动剂、磺酰脲(诸如甲苯磺酰丁脲 (Orinase)、乙酰苯磺酰环己脲 (Dymelor)、甲磺氮草脲 (Tolinase)、氯磺丙脲 (Diabinese)、格列吡嗪 (Glucotrol)、格列苯脲 (Diabeta、Micronase、Glynase)、格列美脲 (Amaryl) 或格列齐特 (Diamicron);美格列奈,诸如瑞格列奈 (Prandin) 或那格列奈 (Starlix);双胍,诸如二甲双胍 (Glucophage) 或苯乙双胍;噻唑烷二酮,诸如罗格列酮 (Avandia)、比格列酮 (Actos) 或曲格列酮 (Rezulin),或其他PPAR γ 抑制剂;抑制碳水化合物消化的 α 葡萄糖苷酶抑制剂,诸如米格列醇 (Glyset)、阿卡波糖 (Precose/Glucobay);艾塞那肽 (Byetta) 或普兰林肽;二肽基肽酶-4 (DPP-4) 抑制剂,诸如维达列汀或西他列汀;SGLT (钠依赖性葡萄糖转运体1) 抑制剂;葡萄糖激酶活化因子 (GKA);胰高血糖素受体拮抗剂 (GRA);或FBPase (果糖1,6-双磷酸酯酶) 抑制剂。

[0333] 本领域已知或正在研究的抗肥胖药剂包括食欲抑制剂,包括苯乙胺型刺激物、苯丁胺(任选与氯苯丙胺或右芬氟拉明)、二乙胺苯丙酮 (**Tenuate[®]**)、苯二甲吗啉 (**Prelu-2[®]**、**Bontril[®]**)、苄非他明 (**Didrex[®]**)、西布曲明 (**Meridia[®]**、**Reductil[®]**);利莫那班 (**Acomplia[®]**)、其他大麻受体拮抗剂;胃泌酸调节素 (oxyntomodulin);盐酸氟西汀 (Prozac);Qnexa (托吡酯与苯丁胺)、Excalia (安非他酮与唑尼沙胺) 或Contrave (安非他酮与纳曲酮);或脂肪酶抑制剂,其类似于XENICAL (Orlistat) 或Cetilistat (也称为ATL-962) 或GT 389-255。

[0334] 在一些实施方案中,本文所述的肽与用于治疗非酒精性脂肪肝病或NASH的药剂共给药。用于治疗非酒精性脂肪肝病的药剂包括熊脱氧胆酸(也称为Actigall、URSO及Ursodiol)、二甲双胍(Glucophage)、罗格列酮(Avandia)、安妥明、吉非罗齐、多粘菌素B及甜菜碱。

[0335] 在一些实施方案中,本文所述的肽与用于治疗神经退化性疾病(例如帕金森氏病)的药剂共给药。此外,抗帕金森氏病药剂在本领域已知,并且包括但不限于左旋多巴、卡比多巴、抗胆碱能药物、溴隐亭、普拉克索及罗匹尼罗、金刚烷胺及雷沙吉兰。

[0336] 鉴于前述内容,本发明进一步提供了额外包含这些其他治疗剂之一的药物组合物和试剂盒。该额外的治疗剂可与本公开的类似物同时或依次给药。在一些方面中,类似物在额外的治疗剂之前给药,而在其他方面中,类似物在额外的治疗剂之后给药。

[0337] 用途

[0338] 预期本文所述的胰高血糖素类似物和相关药物组合物可用于治疗疾病或医学病况,在所述疾病或医学病况中,例如对胰高血糖素受体、GLP-1受体或该两种受体的活性的缺乏为该疾病或医学病况发作和/或进展的因素。因此,本发明提供治疗或预防患者的疾病或医学病况的方法,其中该疾病或医学病况为其中GLP-1受体活化和/或胰高血糖素受体活化的缺乏与该医学病况的疾病的发作和/或进展相关的医学病况的疾病。所述方法包括向患者以有效治疗或预防疾病或医学病况的量提供基于任何本文所述类似物的类似物。

[0339] 在一些实施方案中,疾病或医学病况为代谢综合征。代谢综合征(也称为代谢综合征X、胰岛素抗性综合征或Reaven综合征)为影响超过5千万美国人的病症。代谢综合征的特征通常在于簇集至少三种以上的以下风险因素:(1)腹部肥胖(腹部内或周围脂肪组织过多),(2)致动脉粥样硬化血脂异常(血脂失调,包括高三甘油酯、低HDL胆固醇及高LDL胆固醇,其增强动脉壁中斑块的积累),(3)血压升高,(4)胰岛素抗性或葡萄糖耐受不良,(5)血栓前状态(例如血液中高纤维蛋白原或纤溶酶原活化因子抑制剂-1),以及(6)促发炎状态(例如血液中C反应性蛋白升高)。其他风险因素可包括老化、激素失衡及遗传素因。

[0340] 代谢综合征与冠心病和与血管斑块积累相关的其他病症的风险增加相关,例如中风和外周血管疾病,称为粥样动脉硬化心血管病(ASCVD)。患有代谢综合征的患者可自处于早期的胰岛素抗性状态发展成完全成熟的II型糖尿病,并且ASCVD的风险进一步增加。不旨在受限于任何特定理论,胰岛素抗性、代谢综合征及血管疾病之间的关系可以涉及一种或多种共同发病机制,包括胰岛素刺激的血管舒张障碍、由氧化应力增强所导致的胰岛素抗性相关性NO可用性降低,以及脂肪细胞衍生激素(诸如脂联素)异常(Lteif和Mather, Can. J. Cardiol. 20 (增刊B):66B-76B (2004))。

[0341] 根据2001国家胆固醇教育计划成人治疗组(ATP III),在同一个体中任何三种以下性状符合代谢综合征的标准:(a)腹部肥胖(男性腰围超过102cm,而女性腰围超过88cm);(b)血清三甘油酯(150mg/dl或更高);(c)HDL胆固醇(男性40mg/dl更低,而女性50mg/dl或更低);(d)血压(130/85或更高);以及(e)空腹血糖(110mg/dl或更高)。根据世界卫生组织(WHO),具有高胰岛素水平(单独的空腹血糖升高或餐后葡萄糖升高)和至少两种以下标准的个体符合代谢综合征的标准:(a)腹部肥胖(腰臀比大于0.9、身体质量指数为至少30kg/m²。或腰部测量值超过37英寸);(b)胆固醇检查(cholesterol panel)显示三甘油酯水平为至少150mg/dl或HDL胆固醇低于35mg/dl;(c)血压为140/90或更高,或正在治疗高血压)。

(Mathur,Ruchi,“Metabolic Syndrome,”Shiel,Jr.编,William C.,MedicineNet.com,2009年5月11日)。

[0342] 出于本文的目的,如果个体符合2001国家胆固醇教育计划成人治疗组或WHO所述的标准中任一个或两个标准,则该个体视为罹患代谢综合征。

[0343] 不受限于任何特定理论,本文所述的肽适用于治疗代谢综合征。因此,本发明提供了预防或治疗个体的代谢综合征或减少其一种、两种、三种或更多种风险因素的方法,其包括向该个体以有效预防或治疗代谢综合征或其风险因素的量提供本文所述的类似物。

[0344] 在一些实施方案中,该方法治疗高血糖医学病况。在某些方面中,高血糖医学病况为糖尿病、I型糖尿病、II型糖尿病或胰岛素依赖性或非胰岛素依赖性妊娠期糖尿病。在一些方面中,该方法通过减少糖尿病之一种或多种并发症(包括肾病变、视网膜病变及血管疾病)来治疗高血糖医学病况。

[0345] 在一些方面中,疾病或医学病况为肥胖症。在一些方面中,肥胖症为药物诱发的肥胖症。在一些方面中,该方法通过预防或减少体重增加或增加患者的体重减轻来治疗肥胖症。在一些方面中,该方法通过降低食欲、减少食物摄取、降低患者体内脂肪水平或降低食物移动穿过胃肠系统的速率来治疗肥胖症。

[0346] 因为肥胖症与其他疾病的发作或进展相关,所以治疗肥胖症的方法还可用于减少与肥胖症相关的并发症的方法,所述并发症包括血管疾病(冠心病、中风、外周血管疾病、缺血再灌注等)、高血压、II型糖尿病发作、高脂血症及肌肉骨骼疾病。本发明因此提供治疗或预防这些肥胖症相关性并发症的方法。

[0347] 在一些实施方案中,疾病或医学病况为非酒精性脂肪肝病(NAFLD)。NAFLD是指广谱肝脏疾病,范围自单纯脂肪肝(脂肪变性)至非酒精性脂肪变性肝炎(NASH)至肝硬化(肝脏的不可逆晚期瘢痕形成)。NAFLD的所有病期均共同具有在肝脏细胞(肝细胞)中的脂肪累积(脂肪浸润)。单纯脂肪肝为某类型的脂肪、三甘油酯在肝脏细胞中异常累积,但无发炎或瘢痕形成。在NASH中,脂肪累积与不同程度的肝脏发炎(肝炎)和瘢痕形成(纤维化)相关。发炎性细胞可破坏肝脏细胞(肝细胞坏死)。在术语“脂肪变性肝炎”和“脂肪变性坏死”中,脂肪变性是指脂肪浸润,肝炎是指肝脏中的炎症,并且坏死是指经破坏的肝脏细胞。NASH可最终导致肝脏瘢痕形成(纤维化)且接着导致不可逆晚期瘢痕形成(肝硬化)。由NASH导致的肝硬化为NAFLD谱内的最后且最严重的病期。(Mendler,Michel,“Fatty Liver:Nonalcoholic Fatty Liver Disease (NAFLD) and Nonalcoholic Steatohepatitis (NASH)”,Schoenfield 编,Leslie J.,MedicineNet.com,2005年8月29日)。

[0348] 酒精性肝病或酒精诱发的肝病涵盖与酒精过度消费相关或由酒精过度消费引起的三种病理不同的肝病:脂肪肝(脂肪变性)、慢性或急性肝炎及肝硬化。酒精性肝炎的范围可为轻度肝炎(具有仅指示疾病的异常实验室测试)至伴有并发症的重度肝功能异常,所述并发症诸如黄疸病(由胆红素滞留引起的黄色皮肤)、肝性脑病变(由肝衰竭引起的神经功能异常)、腹水(腹部中的体液累积)、出血性食道静脉曲张(食道中的静脉曲张)、凝血异常及昏迷。在组织学上,酒精性肝炎具有伴有肝细胞胀大性退化的特征性外观、伴随嗜中性白血球且有时伴随马洛里小体(Mallory body)(细胞中间丝蛋白的异常聚集)的发炎。肝硬化在解剖学上的特征在于肝脏中与纤维化组合的广泛结节。(Worman,Howard J.,“Alcoholic Liver Disease”,Columbia University Medical Center网站)。

[0349] 不受限于任何特定理论,本文所述的类似物可用于治疗酒精性肝病、NAFLD或其任何病期,包括例如肝硬化、脂肪变性肝炎、肝炎、肝脏发炎、NASH、肝硬化或其并发症。因此,本发明提供预防或治疗个体的酒精性肝病、NAFLD或其任何病期的方法,其包括向个体以有效预防或治疗酒精性肝病、NAFLD或其任何病期的量提供本文所述的类似物。这样的治疗方法包括以下中一种、两种、三种或更多种的降低:肝脏脂肪含量、肝硬化的发生率或进展、肝细胞癌的发生率、发炎征象,例如异常肝酶水平(例如天冬氨酸转氨酶AST和/或丙氨酸转氨酶ALT或LDH)、血清铁蛋白升高、血清胆红素升高,和/或纤维化征象,例如TGF- β 水平升高。在优选的实施方案中,肽用于治疗发展至超过单纯脂肪肝(脂肪变性)且显示发炎或肝炎征象的患者。这样的方法可导致例如AST和/或ALT含量降低。

[0350] GLP-1和exendin-4已显示具有一些神经保护作用。本发明还提供本文所述的胰高血糖素类似物在治疗神经退化性疾病中的用途,所述神经退化性疾病包括但不限于阿兹海默氏病,帕金森氏病,多发性硬化症,肌萎缩性侧索硬化,其他脱髓鞘相关病症,老年性痴呆,皮质下痴呆,动脉硬化性痴呆,AIDS相关性痴呆或其他痴呆,中枢神经系统癌症,外伤性脑损伤,脊髓损伤,中风或脑缺血,脑血管炎,癫痫、亨廷顿氏病,妥瑞氏综合征(Tourette's syndrome),格林巴利综合征(Guillain Barresyndrome),威尔森氏病,匹克氏病,神经炎炎症性病症,脑炎,病毒、真菌或细菌起源的脑脊髓炎或脑膜炎,或其他中枢神经系统感染,朊病毒疾病,小脑性共济失调,小脑退化,脊髓小脑退化综合征,弗里德里希共济失调(Friedreichs ataxia),共济失调微血管扩张症、脊髓发育不良、进行性核上麻痹,肌张力不全,肌痉挛,震颤,色素性视网膜炎,纹状体黑质变性,粒线体脑肌病,神经性蜡脂样褐质病,肝性脑病变、肾性脑病变、代谢性脑病变、毒素诱发的脑病变以及辐射诱发的脑损伤。

[0351] 在一些实施方案中,疾病或医学病况为低血糖症。在一些实施方案中,患者为糖尿病患者且低血糖症由胰岛素给药诱发。在特定方面中,方法包括提供本发明类似物与胰岛素的组合以使得类似物缓冲推注给药胰岛素的低血糖作用。

[0352] 在一些实施方案中,胰高血糖素类似物与在医院设置中向非糖尿病患者(例如接受胃肠外营养或总胃肠外营养的患者)胃肠外给药营养物结合使用。非限制性实例包括手术患者、昏迷患者、消化道疾病患者或无功能胃肠道,例如由于手术移除、吸收能力阻断或障碍、克罗恩氏病、溃疡性结肠炎、胃肠道阻塞、胃肠道瘘、急性胰腺炎、肠缺血、胃肠大手术、某些先天性胃肠道异常、长期腹泻或由手术导致的短肠综合征、休克患者和经历愈合过程的患者通常接受胃肠外给药碳水化合物连同脂质、电解质、矿物质、维生素和氨基酸的各种组合。胰高血糖素类似物和胃肠外营养组合物可在相同时间、不同时间、彼此之前或之后给药,条件是胰高血糖素类似物在胃肠外营养组合物正被消化时发挥所需生物作用。举例而言,胃肠外营养物可每天给予1次、2次或3次,而胰高血糖素类似物每隔一天一次、每周三次、每周两次、每周一次、每2周一次、每3周一次或每月一次给予。

[0353] 如本文所用,术语“治疗”和“预防”以及以其为词干的用语不必表示100%或完全治疗或预防。相反,存在本领域普通技术人员认为具有潜在效益或治疗效果的不同程度的治疗或预防。在此方面,本发明的方法可提供以任何水平治疗或预防哺乳动物的疾病或医学病况的任何量。此外,由该方法提供的治疗或预防可包括治疗或预防该疾病或医学病况的一种或多种病况或症状。举例而言,关于治疗肥胖症的方法,在一些实施方案中,该方法实现患者的食物摄取或脂肪水平的降低。此外,出于本文的目的,“预防”可涵盖延迟疾病或

其症状或病况的发作。

[0354] 关于上述治疗方法,患者为任何宿主。在一些实施方案中,宿主为哺乳动物。如本文所用,术语“哺乳动物”是指哺乳纲的任何脊椎动物,包括但不限于单孔类动物、有袋类动物及胎盘类动物中任一种。在一些实施方案中,哺乳动物为啮齿目哺乳动物(诸如小鼠及仓鼠)及兔形目(order Logomorpha)哺乳动物(诸如兔)中之一。在某些实施方案中,哺乳动物来自食肉目,包括猫科动物(猫)和犬科动物(狗)。在某些实施方案中,哺乳动物来自偶蹄目(包括牛科动物(奶牛)和猪科动物(猪))或奇蹄目(order Perssodactyla)(包括马科动物(马))。在一些情况下,哺乳动物为灵长目、四足猴类或猴类(猴)或类人猿目(人类及猿)。在特定实施方案中,哺乳动物为人类。

[0355] 试剂盒

[0356] 根据一个实施方案,本公开的胰高血糖素类似物可作为试剂盒的一部分来提供。因此,在一些实施方案中,提供用于向有需要的患者给予胰高血糖素类似物(例如胰高血糖素激动剂肽)的试剂盒,其中该试剂盒包括如本文所述的胰高血糖素类似物。

[0357] 在一个实施方案中,试剂盒具有用于向患者给药胰高血糖素组合物的装置,例如注射器针、笔式装置、喷射注射器或其他无针注射器。试剂盒可替代地或额外地包括一个或多个容器,例如小瓶、管、瓶、单隔室的或多隔室的预填充注射器、药筒、输注泵(外用或可植入)、喷射注射器、预填充笔式装置等,任选地包括冻干形式或水溶液形式的胰高血糖素类似物。在一些实施方案中,试剂盒包括使用说明书。根据一个实施方案,试剂盒的装置为气雾剂分配装置,其中组合物预包装在该气雾剂装置内。在另一实施方案中,试剂盒包括注射器和针,且在一个实施方案中,无菌胰高血糖素组合物预包装在该注射器内。

[0358] 给出以下实施例仅用于说明本发明,且不得以任何方式限制其范围。

实施例

[0359] 实施例1

[0360] 合成胰高血糖素的肽片段

[0361] 材料:

[0362] 除非另外规定,否则本文在实例中所述的所有肽均经酰胺化。

[0363] MBHA树脂(在肽合成期间使用4-甲基二苯甲基胺聚苯乙烯树脂。MBHA树脂,100-180目,1%DVB交联聚苯乙烯;负载量0.7-1.0mmol/g)、经Boc保护且经Fmoc保护的氨基酸购自Midwest Biotech。在Applied Biosystem 430A肽合成仪上使用经Boc保护的氨基酸进行固相肽合成。使用Applied Biosystems 433型肽合成仪进行经Fmoc保护的氨基酸的合成。

[0364] 肽合成(Boc氨基酸/HF裂解):

[0365] 在Applied Biosystem 430A型肽合成仪上进行这些类似物的合成。通过依次添加氨基酸至含有2mmol经Boc保护的氨基酸的筒柱中构建合成肽。具体地,使用经Boc DEPBT活化的单偶合进行该合成。在偶合步骤结束时,用TFA处理肽基树脂以移除N端Boc保护基。将其用DMF反复洗涤,且对所需数目的偶合步骤重复该重复循环。组装后,通过20%哌啶处理移除侧链保护,即Fmoc,并使用DIC进行酰化。整个合成结束时的肽基树脂通过使用DCM而干燥,并且用无水HF将肽自树脂裂解。

[0366] 对于内酰胺化,选择正交保护基以用于Glu和Lys(例如Glu(Fm)、Lys(Fmoc))。在移

除保护基之后且在HF裂解之前,如先前所述进行环化(参见例如国际专利申请公开第W02008/101017号)。

[0367] 肽基树脂的HF处理

[0368] 用无水HF处理肽基树脂,这通常产生约350mg (约50%产率)的粗制除保护的肽。具体地,将肽基树脂(30mg至200mg)置于氟化氢(HF)反应容器中进行裂解。添加500 μ L对甲酚至该容器中作为碳阳离子去除剂。将容器连接至HF系统且浸入甲醇/干冰混合物中。将容器用真空泵抽真空且蒸馏10ml HF至反应容器中。这种肽基树脂与HF的反应混合物在0℃下搅拌一小时,之后建立真空且将HF快速抽空(10-15min)。小心移除容器且用约35ml乙醚填充以使肽沉淀,并且萃取对甲酚和由HF处理产生的小分子有机保护基。利用铁氟龙(teflon)过滤器过滤该混合物且重复两次以移除全部的过量甲酚。弃去该滤液。沉淀的肽溶解于约20ml 10%乙酸(水溶液)中。收集含有所需肽的这种滤液且冻干。

[0369] 在以下条件下进行溶解的粗制肽的分析型HPLC分析[4.6 $\times$ 30mm Xterra C8, 1.50mL/min, 220nm, A缓冲液0.1%TFA/10%CAN, B缓冲液0.1%TFA/100%CAN, 梯度经15分钟为5-95%B]。萃取物用水稀释两倍且加载至2.2 $\times$ 25cm Vydac C4制备型逆相柱上且在Waters HPLC系统上使用乙腈梯度洗脱(A缓冲液为0.1%TFA/10%CAN, B缓冲液为0.1%TFA/10%CAN且梯度经120分钟为0-100%B, 流速为15.00mL/min)。经纯化的肽的HPLC分析显示纯度大于95%且使用电喷雾电离质谱分析来证实肽的特性。

[0370] 肽酰化

[0371] 如下制备酰化肽。使用CS Bio 4886肽合成仪或Applied Biosystems 430A肽合成仪在固体负载树脂上合成肽。如Schnolzer等人, Int. J. Peptide Protein Res. 40:180-193 (1992)所述那样使用原位中和化学。对于酰化肽,将待酰化的靶标氨基酸残基(例如相对于SEQ ID NO:3的氨基酸位置编号的位置10)取代为N ϵ -FMOC赖氨酸残基。用20%哌啶于DMF中的溶液处理完成的N端BOC保护肽30分钟移除了FMOC/甲酰基。通过在DMF/DIEA中偶合10倍摩尔过量的经FMOC保护的间隔子氨基酸(例如FMOC-Glu-OtBu)或酰基链(例如CH₃(CH₂)₁₄-COOH)和PyBOP或DEPBT偶合试剂来实现与游离 ϵ -氨基Lys残基的偶合。随后移除间隔子氨基酸的FMOC基团,接着重复与酰基链的偶合。最终用100%TFA的处理使任何侧链保护基和N端BOC基团被移除。将肽树脂用5%DIEA/DMF中和,干燥,接着使用HF/对甲酚95:5在0℃下于一小时内自支撑物裂解。乙醚萃取后,使用5%HAc溶液来使粗制肽溶剂化。接着通过ESI-MS验证溶液的样品含有正确分子量的肽。通过使用线性梯度10%CH₃CN/0.1%TFA至0.1%TFA于100%CH₃CN中的RP-HPLC来纯化正确的肽。Vydac C1822mm $\times$ 250mm蛋白柱用于纯化。酰化肽类似物通常由20:80的缓冲液比率而完全洗脱。将各部分汇集在一起且在分析型RP-HPLC上检查纯度。冻干纯的馏分,产生白色固体肽。

[0372] 如果肽包含内酰胺桥键和待酰化的靶标残基,则在向肽主链添加该氨基酸后如上所述那样来进行酰化。

[0373] 肽聚乙二醇化

[0374] 对于肽聚乙二醇化,使40kDa甲氧基聚(乙二醇)碘乙酰胺(NOF)与摩尔当量的肽于使用使肽和PEG两者溶解成澄清溶液所需的最少量的溶剂(对于使用2-3mg肽的反应通常少于2mL)的7M脲、50mM Tris-HCl缓冲液中反应。在室温下剧烈搅拌4-6小时,并通过分析型RP-HPLC对反应进行分析。聚乙二醇化产物随停留时间减少而表现得与起始物质不同。于

Vydac C4柱上利用与初始肽纯化所用类似的条件进行纯化。洗脱在约50:50的缓冲液比率下发生。得到纯聚乙二醇化肽的馏分并冻干。产率高于50%，根据反应而变。

[0375] 使用质谱的分析

[0376] 使用具有标准ESI离子源的Sciex API-III电喷雾四极质谱仪获得质谱。所用电离条件如下：ESI为正离子模式；离子喷雾电压3.9kV；孔口电位60V。所用雾化气体和气帘为流速为0.9L/min的氮气。质谱以每步0.5Th和2msec停留时间自600汤姆逊(Thompson)记录至1800汤姆逊。将样品(约1mg/mL)溶解于含1%乙酸的50%乙腈水溶液中，并通过外部注射泵以5μL/min的速率引入。

[0377] 当通过ESI MS在PBS溶液中分析肽时，首先使用含有0.6μL C4树脂的ZipTip固相萃取尖端根据制造商提供的说明使其脱盐(Millipore Corporation, Billerica, MA, 参见万维网的Millipore网站millipore.com/catalogue.nsf/docs/C5737)。

[0378] 高效液相层析(HPLC)分析

[0379] 使用高效液相层析(HPLC)和MALDI分析于磷酸盐缓冲生理盐水(PBS)缓冲液(pH 7.2)中用这些粗制肽进行初步分析以获得其相对转化率的近似值。将粗制肽样品以1mg/mL的浓度溶解于PBS缓冲液中。将1mL所得溶液储存于1.5mL HPLC小瓶中，然后将该小瓶密封并于37℃孵育。以不同时间间隔取出100μL的等份部分，冷却至室温且由HPLC进行分析。

[0380] 使用Beckman系统金层析系统，使用UV检测器在214nm进行HPLC分析。在150mm×4.6mm C18Vydac柱上进行HPLC分析。流速为1mL/min。溶剂A含有于蒸馏水中的0.1%TFA，且溶剂B含有于90%CH₃CN中的0.1%TFA。采用线性梯度(15分钟内40%至70%B)。收集数据且使用峰值简单层析(Peak Simple Chromatography)软件进行分析。

[0381] 水解的初始速率用于测量各前药解离的速率常数。前药和药物的浓度分别根据它们的峰面积进行估算。通过将前药在不同时间间隔处的浓度的对数绘图来测定前药的一阶解离速率常数。该图的斜率给出速率常数‘k’。接着通过使用式 $t_{1/2} = .693/k$ 来计算各种前药降解的半衰期。

[0382] 实施例2

[0383] 合成Seq ID No.17的肽

[0384] 使用Fmoc/t-Bu化学通过固相来合成肽seq ID no.17。对于该肽的制备，将0.5g 2-氯三苯甲基-树脂(100-200目，1.18mmol/g)(GL Biochem)首先通过与0.8当量(eq.) Fmoc-Gln(Trt)-OH、相对于氨基酸4当量的二异丙基乙胺(DIPEA)于无水DCM(二氯甲烷)中一起孵育2小时而衍生化。接着在肽多合成仪APEX396(Advanced Biotech)上进行肽序列组装。将所有氨基酸以0.5M浓度溶解于DMF(N,N-二甲基甲酰胺)中。用相对于树脂游离氨基的6倍过量的活化氨基酸进行酰化反应60分钟。对于Aib2、Aib16、Asp15、His1进行双重酰化。氨基酸用等摩尔量的HATU(2-(1H-7-氮杂苯并三唑-1-基)-1,1,3,3-四甲基六氟磷酸脒；于DMF中的0.5M溶液)和2倍摩尔过量的DIEA(N,N-二异丙基乙胺；于NMP(1-甲基-2-吡咯烷酮)中的2M溶液)活化。

[0385] 侧链保护基为：叔丁基用于Asp和Glu、Ser、Thr及Tyr；三苯甲基用于Asn、Gln及His；叔丁氧基-羰基用于Lys、Trp；且2,2,4,6,7-五甲基二氢苯并呋喃-5-磺酰基用于Arg；在合成中使用Boc-His(Trt)-OH。

[0386] 在侧链上待衍生化的位置10上的赖氨酸以Lys(Alloc)形式并入。组装结束时，移

除Alloc保护基,并且通过使用HBTU(4eq.; (O-苯并三唑-1-基-N,N,N',N'-四甲基六氟磷酸脲)和作为活化剂的DIPEA(8eq.)缩合两个 γ -羧基谷氨酸残基(4eq.)和棕榈酸(4eq.)来完成合成。

[0387] 合成结束时,用25mL裂解混合物,即88%三氟乙酸(TFA)、5%苯酚、2%三异丙基硅烷及5%水,在室温下单独处理无水肽树脂2小时。过滤树脂且缩减溶液体积,接着添加至冷甲基叔丁醚中以使肽沉淀。离心后,用新鲜的冷甲基叔丁醚洗涤肽微球以移除有机去除剂。该过程重复两次。干燥最终的微球,再悬浮于H₂O、20%乙腈中且冻干。

[0388] 通过使用制备型Waters XBridge C18(50×150mm,5 μ m)并使用(A)于水中的0.1%TFA和(B)于乙腈中的0.1%TFA作为洗脱液的逆相HPLC对粗制肽进行纯化。在Waters Chromatograph上,用BEH130,C18Acquity,1.7 μ m柱,2.1×100mm(Waters),于45℃下,使用H₂O、0.1%TFA(A)和CH₃CN、0.1%TFA(B)作为溶剂,进行分析型UPLC。经纯化的肽通过电喷雾质谱在Waters SQ检测器上进行表征。

[0389] 实施例3

[0390] 在基于萤火虫荧光素酶的报告分析中测量各肽诱导cAMP的能力。所诱导的cAMP产生与同胰高血糖素或GLP-1受体结合的胰高血糖素片段成正比。该生物分析采用分别与胰高血糖素或GLP-1受体以及连接于cAMP反应性组件的荧光素酶基因共转染的HEK293细胞。

[0391] 细胞通过在补充有0.25%牛生长血清(HyClone,Logan,UT)的Dulbecco改良最低必需培养基(Invitrogen,Carlsbad,CA)中培养16小时为进行血清剥夺,然后在37℃、5%CO₂下于96孔聚D-赖氨酸涂覆的“Biocoat”板(BD Biosciences, San Jose, CA)中与胰高血糖素片段的连续稀释液一起孵育5小时。在孵育结束时,向各孔中添加100 μ L LucLite发光底物试剂(Perkin Elmer, Wellesley, MA)。短暂地振荡板,在黑暗中孵育10分钟,并在MicroBeta-1450液体闪烁计数器(Perkin-Elmer, Wellesley, MA)上测量光输出。通过使用Origin软件(OriginLab, Northampton, MA)计算有效50%浓度(EC₅₀)。

[0392] 实施例4

[0393] 使用稳定表达人类GLP-1R、GCGR或GIPR的中国仓鼠卵巢细胞(CHO-K1)测定SEQ ID NO.17的肽的体外激动剂效能。GLP-1R和GCGR稳定细胞系同基因池由Invitrogen™使用其Jump-In™靶向整合技术来产生,而稳定CHO/GIPR细胞系通过经典克隆和转染技术(随机整合)通过有限稀释进行克隆选择来产生。使用DiscoverX Hithunter™ cAMP XS+分析试剂盒(目录号90-0075L),根据试剂盒说明书,在体外测试肽在各种细胞系中刺激cAMP产生的相对能力。通过非线性回归分析4参数曲线拟合,用GraphPad Prism 4软件(GraphPad Software, San Diego, CA),通过将发光值相对于肽剂量来绘图,从而计算肽50%有效浓度(EC₅₀)。

[0394] 实施例5

[0395] 基本上如实施例1或2所述的那样制备具有如序列表所述的氨基酸序列的肽,随后基本上如实施例3或4所述的那样测试对胰高血糖素受体和GLP-1受体的每一受体的体外激动剂活性。在一些情况下,还测试对GIP受体的体外激动剂活性。结果示于下表1中。

[0396]

表 1

SEQ ID NO:	序列	EC50 (nM), 对胰高血糖素受体	EC50 (nM), 对 GLP-1 受体	EC50 (nM), 对 GIP 受体
12	HaibQGTFSTSDK(γ -Glu- γ -Glu-C16)SKYLDaibRAAQDFVQWLMDTK γ -Glu-酰胺	0.010	0.003	12.763
13	HaibQGTFSTSDYSKYLDERRAaibEFVC(40K-TE PEG)WLLDTK γ E-酰胺	2.806	0.567	139.639
14	HsQGTFSTSDK(γ -Glu-C16)SKYLDERA γ QDFVQWLMDTK γ -Glu-酰胺	0.003	0.003	976
15	HaibQGTFSTSDK(γ -Glu- γ -Glu-C16)SKYLDaibRAAQDFVQWLMomDTKQ-酸	0.006	0.005	1.901
16	HaibQGTFSTSDK(γ -Glu- γ -Glu-C16)SKYLDaibRAAQDFVQWLLDTKQ-酸	0.015	0.019	1.038
17	H aib QGTFSTSD K(γ -Glu- γ -Glu-C16) SKYLD aib RAAQDFVQWLMNTK γ -Glu-酰胺	0.11	0.075	> 2000

使用实施例 3 的程序获得 SEQ ID No.12-16 的肽的 EC₅₀ 值。使用实施例 4 的程序获得 SEQ ID NO 17 的肽的 EC₅₀ 值。

[0397] 如表1所示,许多肽显示对GLP-1受体的EC50在纳摩尔浓度或皮摩尔浓度范围内。

[0398] 实施例6

[0399] 将饮食诱发性肥胖症(DIO)小鼠分成每组八只小鼠的组,并且测定各组的最初平均体重。每天一次向各组的小鼠皮下注射一定剂量的肽或载体对照,持续一周。该研究中测试的肽为SEQ ID NO:12-16的肽。对于所测试的每个肽,所给予的剂量在1nmol/kg与10nmol/kg之间变化。在整个测试期中定期测定体重、身体组成、食物摄取和血糖水平。

[0400] 为更好地测定这些肽对血糖水平的影响,用db/db小鼠进行第二次实验。在该实验中,将db/db小鼠分成每组八只小鼠的组,并且测定各组的最初平均体重。向各组的小鼠皮下注射单剂量的SEQ ID NO:12-16之一的肽,其中该剂量在3nmole/kg与30nmole/kg范围内。在整个测试期中定期测定体重、身体组成、食物摄取和血糖水平。

[0401] 实施例7

[0402] 在保持高脂肪饮食16周且最初体重为约47g的饮食诱发性肥胖症(DIO)小鼠中确认本发明的某些肽的体内作用。每天一次向小鼠给予载体对照或一定剂量的肽,持续9天。该研究中测试的肽包括SEQ ID NO:12的肽、SEQ ID NO:17的肽、SEQ ID NO:18的肽及SEQ ID NO:19的肽。各肽的剂量不同——SEQ ID NO:12、17及19的各肽以3nmol/kg或9nmol/kg的剂量给予,而SEQ ID NO:18的肽以1nmol/kg、3nmol/kg或9nmol/kg的剂量给予。研究的每一天测量累积体重变化(以克计)且结果示于图1中。数据表示为平均值±SEM。

[0403] 该研究中测试的各肽显示体重降低作用。以3nmol/kg剂量或9nmol/kg剂量给予肽的各组小鼠在早在研究的第1天即显示体重降低(与载体治疗的小鼠相比)。在研究的第9天,给予3nmol/kg的SEQ ID NO:12的肽的小鼠显示约5.3%体重降低,而给予9nmol/kg剂量的SEQ ID NO:12的肽的小鼠显示约29.8%体重减轻。在研究的第9天,给予3nmol/kg的SEQ ID NO:17的肽的小鼠显示约9.6%体重降低,而给予9nmol/kg的SEQ ID NO:17的肽的小鼠显示约35.5%体重减轻。在研究的第9天,给予3nmol/kg的SEQ ID NO:18的肽的小鼠显示约12.3%体重降低,而给予9nmol/kg的SEQ ID NO:18的肽的小鼠显示约26.8%体重减轻。在研究的第9天,给予3nmol/kg的SEQ ID NO:19的肽的小鼠显示约8.1%体重降低,而给予9nmol/kg的SEQ ID NO:19的肽的小鼠显示约31.5%体重减轻。

[0404] 除累积体重变化外,还测量DIO小鼠的周围葡萄糖水平。如图2所示,给予3nmol/kg或9nmol/kg剂量的SEQ ID NO:18的肽的小鼠显示到第4天周围葡萄糖显著降低(与载体相比为-29%; $P<0.05$)。给予9nmol/kg的SEQ ID NO:19的肽的小鼠显示在第4天葡萄糖水平降低约40%(相比于载体对照小鼠; $P<0.05$)、在第7天葡萄糖水平降低约39%(相比于载体对照小鼠; $P<0.05$)以及第9天葡萄糖水平降低约26%(相比于载体对照小鼠; $P<0.05$)。

[0405] 给予9nmol/kg的SEQ ID NO:17的肽的小鼠显示在第4天和第7天葡萄糖水平降低约48%(相比于载体对照小鼠; $P<0.05$)、在第9天葡萄糖水平降低约45%(相比于载体对照小鼠; $P<0.05$)。给予3nmol/kg的SEQ ID NO:17的肽的小鼠显示在第7天葡萄糖水平降低约28%(相比于载体对照小鼠; $P<0.05$)以及第9天葡萄糖水平降低约19%(相比于载体对照小鼠; $P<0.05$)。

[0406] 实施例8

[0407] 通过每天一次给予载体对照、市售产品(利拉鲁肽)、SEQ ID NO:20的肽或SEQ ID NO:17的肽持续21天,在肥胖猕猴中确认本发明的肽的体内作用。利拉鲁肽以20μg/kg的剂量皮下给予,而SEQ ID NO:17和SEQ ID NO:20的肽以3μg/kg的剂量皮下给予。所有肽在猕猴体内具有相当的药代动力学($t_{1/2}$ 为约10小时)和类似的血浆蛋白结合(>98%)。测量体

重和食物摄取。

[0408] 如图3A所示,给予SEQ ID NO:17的肽的肥胖猴与利拉鲁肽和SEQ ID NO:20的肽相比,显示优异的体重减轻(与基线和载体相比为-1.2kg, $P<0.05$)。

[0409] 用利拉鲁肽($-13.1\pm 1.9\%$)或用SEQ ID NO:17的肽($-25.7\%\pm 3.2\%$,相对于利拉鲁肽, $P<0.05$)治疗后,观察到食物摄取显著减少(图3B中表示为相对于基线的变化%)。一周洗出后,用SEQ ID NO:17的肽治疗的动物再次获得在长期治疗期间减轻的大部分体重(第28天)。在图3A和3B中,数据表示为平均值 $\pm$ SEM。^{*}相对于载体 $P<0.05$,[^]SEQ ID NO:17的肽相对于利拉鲁肽 $P<0.05$ 。

[0410] 实施例9

[0411] 在年龄为16-26岁且平均体重为约22kg的糖尿病猕猴($n=7$)中测试本发明的肽的体内作用。向年龄为16-26岁且平均体重为约22kg的糖尿病猕猴($n=7$)给予载体对照、 $10\mu\text{g/kg}$ 皮下剂量的利拉鲁肽或 $1\mu\text{g/kg}$ 皮下剂量的SEQ ID NO:17的肽,持续10天。

[0412] 在研究期间测量体重,并且发现在治疗期内于这些动物中未观察到体重影响。

[0413] 在各治疗结束时,首先测量空腹血糖(FBG),接着进行膳食耐测量试(MTT)以评估葡萄糖耐受性。如图4所示,用SEQ ID NO:17的肽治疗的糖尿病猴显示FBG显著降低($120\pm 20\text{mg/mL}$ 对 $158\pm 15\text{mg/mL}$,SEQ ID NO:17的肽对载体(-25%), $P<0.05$;图4)。此外,用SEQ ID NO:17的肽治疗的猴显示与载体对照猴相比在MTT期间的葡萄糖耐受性提高(图4)。数据在图4中表示为平均值 $\pm$ SEM。^{*}相对于载体 $P<0.05$ 。

[0414] 本文所引用的包括公开、专利申请和专利在内的所有文献以援引方式并入本文,程度如同各文献个别地且明确地指示以援引方式并入且其全文在本文中阐明。

[0415] 除非本文另有指示或与上下文明显冲突,否则在描述本发明的上下文中(尤其在以下权利要求的上下文中),术语“一(a/an)”和“该(the)”及类似指示物的使用解释为涵盖单数和复数。除非另外说明,否则术语“包含(comprising)”、“具有”、“包括(including)”及“含有(containing)”解释为开放式术语(即表示“包括但不限于”)。

[0416] 除非本文另有指示,否则本文中引述值的范围仅旨在用作个别地提及属于该范围内的每一单独值以及各端点的缩写方法,并且每一单独值以及端点并入本说明书中,如同其在本文中个别地引述。

[0417] 除非本文另有指示或以其他方式与上下文明显冲突,否则本文所述的所有方法可以任何适合的次序执行。除非另有声明,否则本文提供的任何及所有实例或示例性用语(例如“诸如”)的使用仅旨在更好地说明本发明且并不对本发明的范围施加限制。本说明书的用语均不应解释为指示任何未主张的要素为实施本发明所必需的。

[0418] 本文描述了本发明的优选实施方案,包括本发明人已知的用于实施本发明的最佳方式。这些优选实施方案的变化在本领域普通技术人员阅读前述描述后变得显而易见。本发明人预期技术人员适当时采用这样的变化,并且本发明人预期以与本文具体说明不同的其他方式实施本发明。因此,当适用法律允许时,本发明包括随附权利要求所引述的主题的所有修改和等同物。此外,除非本文另有指示或以其他方式与上下文明显冲突,否则本发明涵盖了上述要素以其所有可能变化形式的任何组合。

序列表

<110> DiMarchi, Richard
 <120> 胰高血糖素/GLP-1受体协同激动剂
 <130> 31135/46342 PCT
 <150> US-61/500,027
 <151> 2011-06-22
 <150> US-61/547,360
 <151> 2011-10-14
 <160> 22
 <170> PatentIn version 3.5
 <210> 1
 <211> 29
 <212> PRT
 <213> 人类

<220>
 <221> MISC 特征
 <223> 天然人类胰高血糖素

[0001]

<400> 1
 His Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Ser
 1 5 10 15

Arg Arg Ala Gln Asp Phe Val Gln Trp Leu Met Asn Thr
 20 25

<210> 2
 <211> 37
 <212> PRT
 <213> 人类

<220>
 <221> MISC 特征
 <223> GLP-1

<400> 2

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

Ser Ser Tyr Leu Glu Gly Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu
 20 25 30

Val Lys Gly Arg Gly
35

<210> 3
<211> 33
<212> PRT
<213> 人类

<220>
<221> MISC 特征
<223> GLP-2

<400> 3

His Ala Asp Gly Ser Phe Ser Asp Glu Met Asn Thr Ile Leu Asp Asn
1 5 10 15

Leu Ala Ala Arg Asp Phe Ile Asn Trp Leu Ile Gln Thr Lys Ile Thr
20 25 30

Asp

[0002]

<210> 4
<211> 37
<212> PRT
<213> 人类

<220>
<221> MISC 特征
<223> 胃酸调节素

<400> 4

His Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Ser
1 5 10 15

Arg Arg Ala Gln Asp Phe Val Gln Trp Leu Met Asp Thr Lys Arg Asn
20 25 30

Arg Asn Asn Ile Ala
35

<210> 5
<211> 30
<212> PRT
<213> 人类

<220>
 <221> MISC_特征
 <223> GLP1 (7-36 amide)

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (30)..(30)
 <223> C-端酰胺化

<400> 5

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

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

<210> 6
 <211> 31
 <212> PRT
 <213> 人类

[0003]

<220>
 <221> MISC_特征
 <223> GLP-1 (7-37 acid)

<400> 6

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

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

<210> 7
 <211> 39
 <212> PRT
 <213> 希拉毒蜥

<220>
 <221> MISC_特征
 <223> Exendin-4

<400> 7

His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Gln Met Glu Glu
 1 5 10 15

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

Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser
35

<210> 8
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<400> 8

Lys Arg Asn Arg Asn Asn Ile Ala
1 5

<210> 9
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

[0004] <220>
<223> 合成肽

<400> 9

Gly Pro Ser Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser
1 5 10

<210> 10
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<400> 10

Gly Gly Pro Ser Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser
1 5 10

<210> 11
<211> 4
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

$\langle 220 \rangle$

<223> 合成肽

<220>

<221> MOD_RES

<222> (2)..(2)

<223> Xaa是AIB

<220>

<221> MOD_RES

<222> (20)..(20)

<223> Xaa是AIB

<220>

<221> MISC_特征

<222> (24)..(24)

<223> 与PEG共价结合

<220>

<221> MISC_特征

<222> (31)..(31)

<223> Xaa是 γ -Glu

<220>

<221> MISC_特征

<222> (31)..(31)

<223> C-端酰胺化

[0006]

<400> 13

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

Arg Arg Ala Xaa Glu Phe Val Cys Trp Leu Leu Asp Thr Lys Xaa
20 25 30

<210> 14

<211> 31

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成肽

<220>

<221> MOD_RES

<222> (2)..(2)

<223> D-Ser

<220>

<221> MISC_特征

<222> (10)..(10)

<223> 经由 γ -Glu间隔子与C16脂肪酰基酰胺化

<220>
 <221> MISC_特征
 <222> (31)..(31)
 <223> Xaa是 γ -Glu

<220>
 <221> MISC_特征
 <222> (31)..(31)
 <223> C-端酰胺化

<400> 14

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

Arg Ala Ala Gln Asp Phe Val Gln Trp Leu Leu Asp Thr Lys Xaa
 20 25 30

<210> 15
 <211> 31
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成肽

[0007]

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (2)..(2)
 <223> Xaa是AIB

<220>
 <221> MISC_特征
 <222> (10)..(10)
 <223> 经由 γ -Glu- γ -Glu间隔子与C16脂肪酰基酰胺化

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (16)..(16)
 <223> Xaa是AIB

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (27)..(27)
 <223> Xaa是蛋氨酸亚砷

<400> 15

His Xaa Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Lys Ser Lys Tyr Leu Asp Xaa
 1 5 10 15

Arg Ala Ala Gln Asp Phe Val Gln Trp Leu Xaa Asp Thr Lys Gln
 20 25 30

<210> 16
 <211> 31
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成肽

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (2)..(2)
 <223> Xaa是AIB

<220>
 <221> MISC_特征
 <222> (10)..(10)
 <223> 经由 γ -Glu- γ -Glu间隔子与C16脂肪酰基酰胺化

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (16)..(16)
 <223> Xaa是AIB

<400> 16

[0008] His Xaa Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Lys Ser Lys Tyr Leu Asp Xaa
 1 5 10 15

Arg Ala Ala Gln Asp Phe Val Gln Trp Leu Leu Asp Thr Lys Gln
 20 25 30

<210> 17
 <211> 31
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成肽

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (2)..(2)
 <223> Xaa是AIB

<220>
 <221> MISC_特征
 <222> (10)..(10)
 <223> 经由 γ -Glu- γ -Glu间隔子与C16脂肪酰基酰胺化

<220>
 <221> MOD_RES

<222> (16).. (16)

<223> Xaa是AIB

<220>

<221> MOD_RES

<222> (31).. (31)

<223> Xaa是 γ -Glu

<220>

<221> MISC_特征

<222> (31).. (31)

<223> C-端酰胺化

<400> 17

His Xaa Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Lys Ser Lys Tyr Leu Asp Xaa
1 5 10 15

Arg Ala Ala Gln Asp Phe Val Gln Trp Leu Met Asn Thr Lys Xaa
20 25 30

<210> 18

<211> 29

<212> PRT

<213> 人工序列

[0009]

<220>

<223> 合成肽

<220>

<221> MISC_特征

<222> (2).. (2)

<223> Xaa是AIB

<220>

<221> MISC_特征

<222> (10).. (10)

<223> 经由 γ -Glu- γ -Glu间隔子与C16脂肪酰基酰胺化

<220>

<221> MISC_特征

<222> (29).. (29)

<223> C-端酰胺化

<400> 18

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

Arg Ala Ala Gln Asp Phe Val Gln Trp Leu Met Asp Thr
20 25

<210> 19
 <211> 29
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成肽

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (2)..(2)
 <223> D-Ser

<220>
 <221> MISC_特征
 <222> (10)..(10)
 <223> Acylated with a C16 fatty acyl group via γ -Glu spacer

<220>
 <221> MISC_特征
 <222> (29)..(29)
 <223> C-端酰胺化

<400> 19

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

[0010]

Arg Ala Ala Gln Asp Phe Val Gln Trp Leu Leu Asp Thr
 20 25

<210> 20
 <211> 31
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成肽

<220>
 <221> MISC_特征
 <222> (2)..(2)
 <223> Xaa是AIB

<220>
 <221> MISC_特征
 <222> (10)..(10)
 <223> 经由 γ -Glu- γ -Glu间隔子与C16脂肪酰基酰胺化

<220>
 <221> MISC_特征
 <222> (16)..(16)
 <223> Xaa is AIB

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (31).. (31)
 <223> D-Glu

<400> 20

His	Xaa	Gln	Gly	Thr	Phe	Thr	Ser	Asp	Lys	Ser	Lys	Tyr	Leu	Asp	Xaa
1				5					10					15	

Arg	Ala	Ala	Gln	Asp	Phe	Val	Gln	Trp	Leu	Met	Lys	Thr	Lys	Glu
			20				25						30	

<210> 21
 <211> 31
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成肽

<220>
 <221> MISC_特征
 <223> 利拉鲁肽

[0011]

<220>
 <221> MISC_特征
 <222> (20).. (20)
 <223> 经由 γ -Glu间隔子与C16脂肪酰基酰胺化

<400> 21

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

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

<210> 22
 <211> 32
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成肽

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (2).. (2)
 <223> Xaa是AIB

<220>
 <221> MISC_特征
 <222> (10)..(10)
 <223> 经由 γ -Glu- γ -Glu间隔子与C16脂肪酰基酰胺化

 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (16)..(16)
 <223> Xaa是AIB

 [0012] <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (28)..(28)
 <223> Xaa是Orn

 <400> 22

 His Xaa Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Lys Ser Lys Tyr Leu Asp Xaa
 1 5 10 15

 Arg Ala Ala Gln Asp Phe Val Gln Trp Leu Met Xaa Asp Thr Lys Gln
 20 25 30

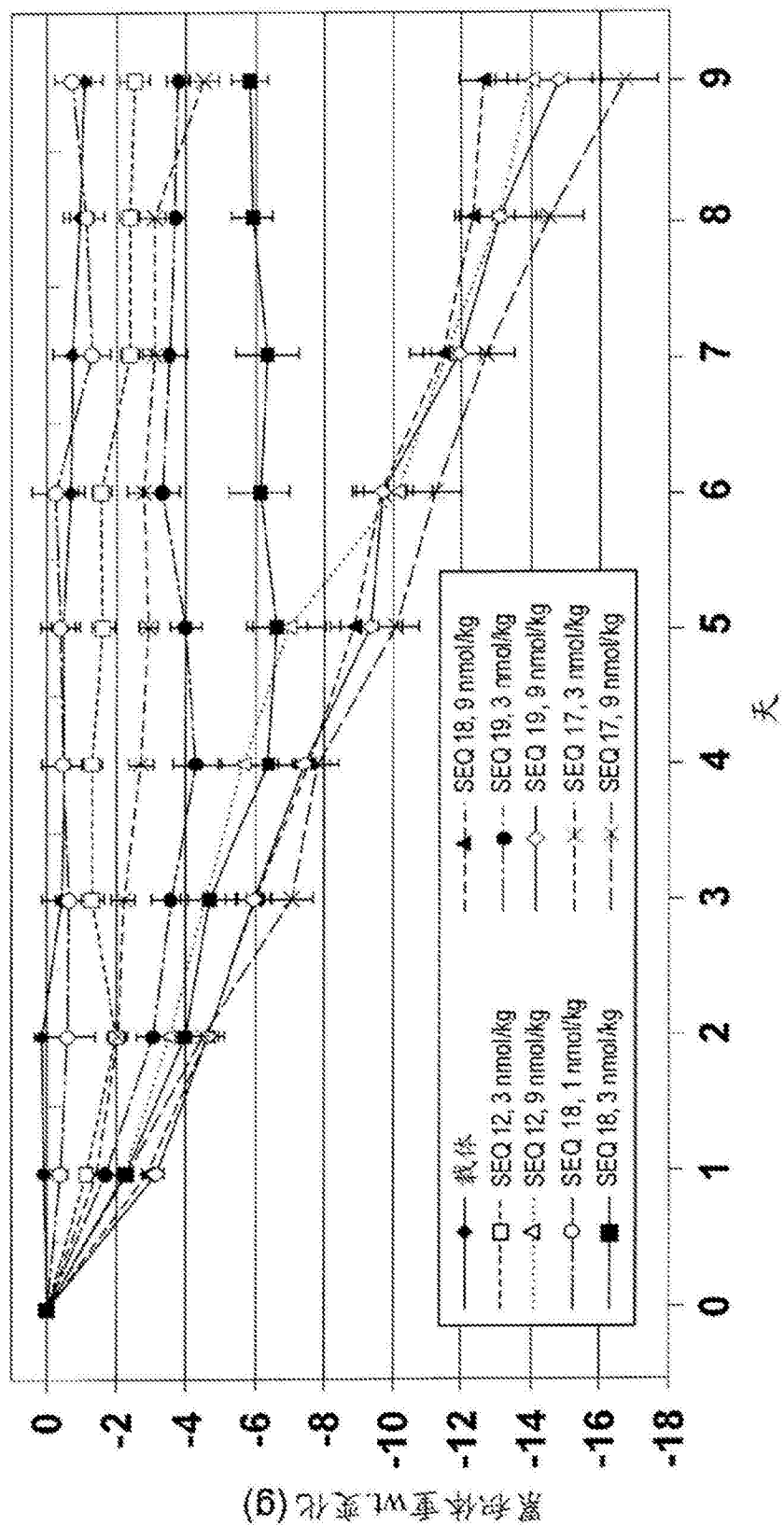


图1

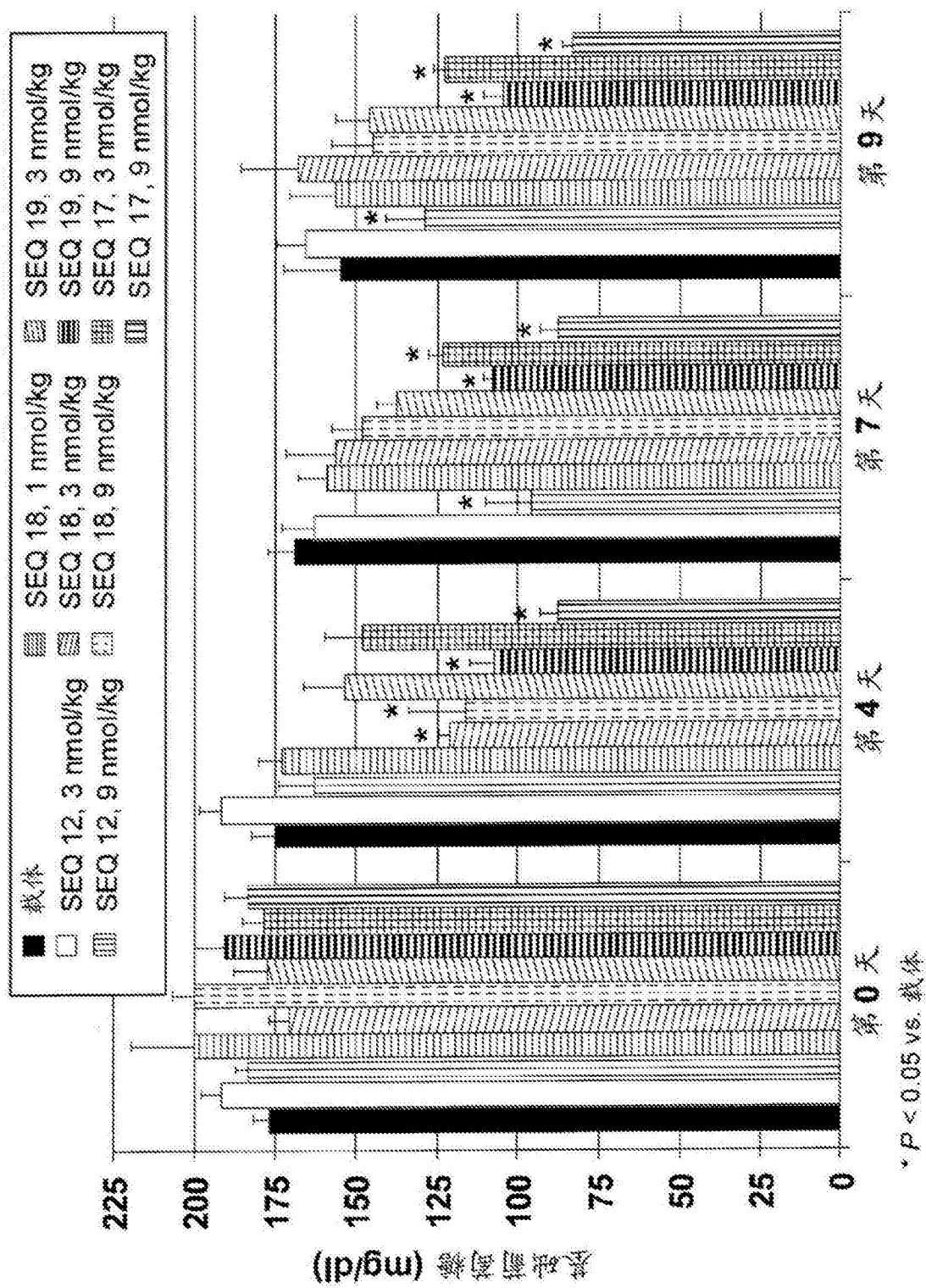


图2

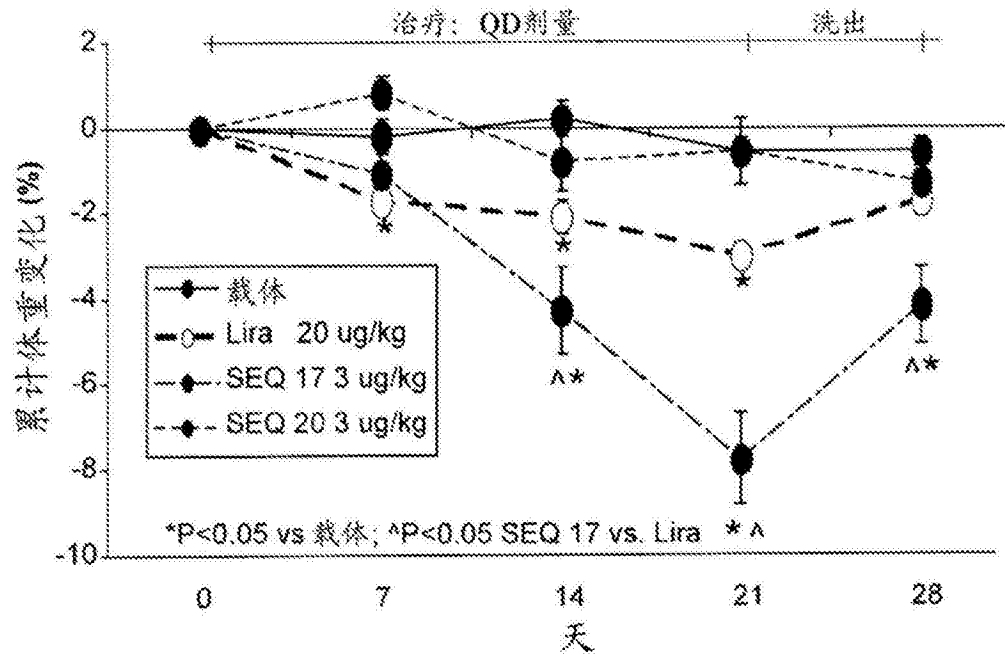


图3A

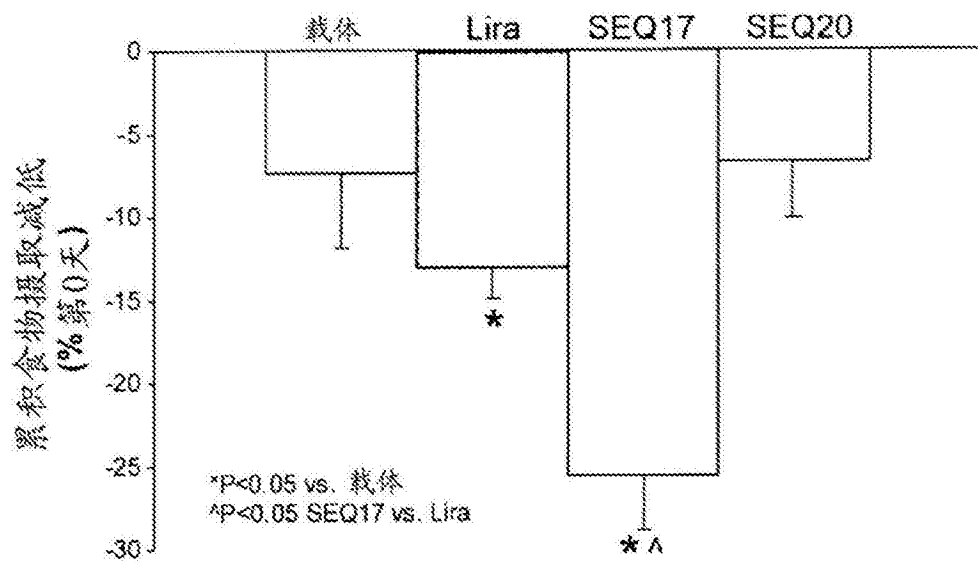


图3B

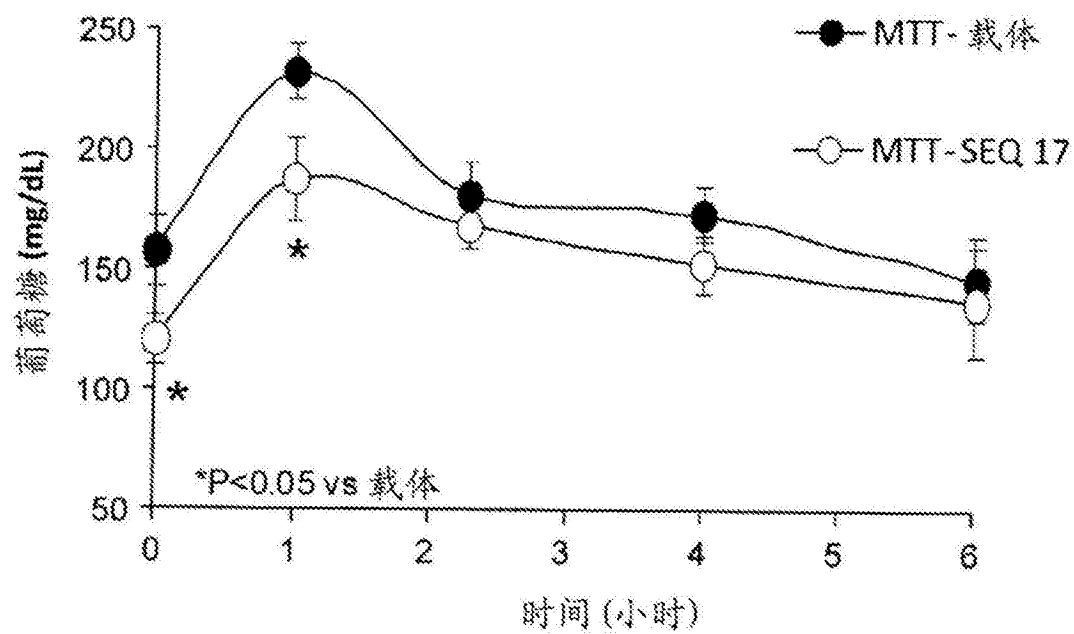


图4