



(12)发明专利



(10)授权公告号 CN 106117343 B

(45)授权公告日 2020.11.03

(21)申请号 201610532169.0

(22)申请日 2012.04.12

(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 106117343 A

(43)申请公布日 2016.11.16

(30)优先权数据
11162087.8 2011.04.12 EP
61/474913 2011.04.13 US

(62)分案原申请数据
201280028724.6 2012.04.12

(73)专利权人 诺沃—诺迪斯克有限公司
地址 丹麦鲍斯韦

(72)发明人 B.维伊佐雷克 J.斯佩茨勒
T.克鲁塞 L.林德罗斯 J.科福德

(74)专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公
司 72001
代理人 任晓华 李唐

(51)Int.Cl.

C07K 14/605(2006.01)

A61K 38/26(2006.01)

A61P 3/00(2006.01)

A61P 3/10(2006.01)

A61P 1/14(2006.01)

A61P 9/00(2006.01)

(56)对比文件

WO 9943706 A1,1999.09.02

CN 101133082 A,2008.02.27

CN 1232470 A,1999.10.20

WO 0007617 A1,2000.02.17

CN 1181760 A,1998.05.13

审查员 梁艳莉

权利要求书6页 说明书100页
序列表1页

(54)发明名称

双酰化GLP-1衍生物

(57)摘要

本发明涉及GLP-1类似物的衍生物,或其药
学可接受的盐、酰胺或酯。本发明还涉及其药
学用途,例如在治疗和/或预防所有形式的糖尿病
和相关疾病中的药学用途,以及对应的新GLP-1
类似物。该衍生物适合用于口服施用。

1. GLP-1类似物的双酰化衍生物,或其药学可接受的盐或C-末端酰胺,

所述类似物包含在对应于GLP-1 (7-37) (SEQ ID NO:1) 的位置27的位置的第一K残基;
在对应于GLP-1 (7-37) 的位置37的位置的第二K残基;和与GLP-1 (7-37) 相比最多10个氨基酸改变;其中所述第一K残基指定为K²⁷,并且所述第二K残基指定为K³⁷;

其中所述类似物是式I的GLP-1类似物:

式I:

Xaa₇-Xaa₈-Glu-Gly-Thr-Xaa₁₂-Thr-Ser-Asp-Xaa₁₆-Ser-Xaa₁₈-Xaa₁₉-Xaa₂₀-Glu-Xaa₂₂-
Xaa₂₃-Xaa₂₄-Xaa₂₅-Xaa₂₆-Lys-Phe-Ile-Xaa₃₀-Xaa₃₁-Leu-Val-Xaa₃₄-Xaa₃₅-Xaa₃₆-Lys-Xaa₃₈-
Xaa₃₉,

其中

Xaa₇是L-组氨酸;

Xaa₈是Ala或Aib;

Xaa₁₂是Phe;

Xaa₁₆是Val;

Xaa₁₈是Ser;

Xaa₁₉是Tyr;

Xaa₂₀是Leu;

Xaa₂₂是Gly或Glu;

Xaa₂₃是Gln或Glu;

Xaa₂₄是Ala;

Xaa₂₅是Ala或Val;

Xaa₂₆是His或Arg;

Xaa₃₀是Ala或Glu;

Xaa₃₁是Trp或His;

Xaa₃₄是Gly、Gln或Arg;

Xaa₃₅是Gly;

Xaa₃₆是Arg;

Xaa₃₈是Glu、Gln或不存在; 并且

Xaa₃₉是Gly或不存在;

所述衍生物具有分别经由接头结合至K²⁷和K³⁷的两个延长部分,其中
所述延长部分选自化学式2和化学式1:

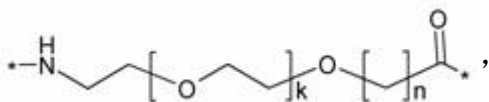
化学式2: $\text{HOOC-C}_6\text{H}_4\text{-O-(CH}_2\text{)}_y\text{-CO-}^*$

化学式1: $\text{HOOC-(CH}_2\text{)}_x\text{-CO-}^*$,

其中x是6-16范围内的整数,并且y是3-17范围内的整数;并且

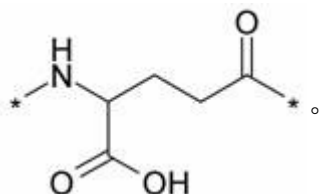
所述接头包含化学式5:

化学式5:

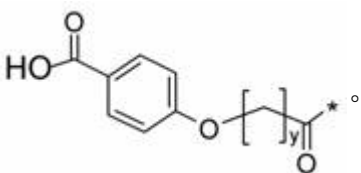


其中k是1-5范围内的整数,并且n是1-5范围内的整数,且所述接头进一步包含化学式6的Glu二基:

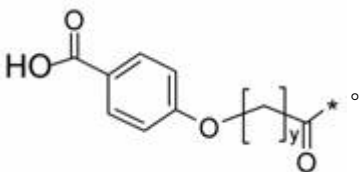
化学式6:



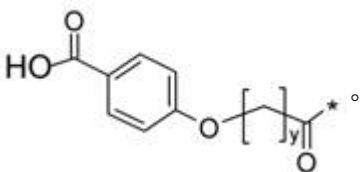
2. 权利要求1的衍生物,其中化学式5被包括m次,其中m是1-10范围内的整数。
3. 权利要求1-2中任一项的衍生物,其中k是1。
4. 权利要求1-2中任一项的衍生物,其中n是1。
5. 权利要求3的衍生物,其中n是1。
6. 权利要求1的衍生物,其中所述Glu二基被包括p次,其中p是1-2范围内的整数。
7. 权利要求1-2、5-6中任一项的衍生物,其中所述接头结合至所述第一或第二K残基的ε氨基。
8. 权利要求3的衍生物,其中所述接头结合至所述第一或第二K残基的ε氨基。
9. 权利要求4的衍生物,其中所述接头结合至所述第一或第二K残基的ε氨基。
10. 权利要求1-2、5-6、和8-9中任一项的衍生物,其中x是12,或者,其中化学式2由化学式2b代表:



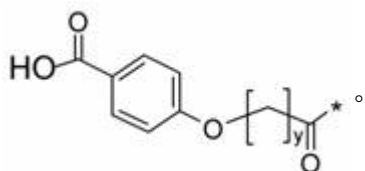
11. 权利要求3的衍生物,其中x是12,或者,其中化学式2由化学式2b代表:



12. 权利要求4的衍生物,其中x是12,或者,其中化学式2由化学式2b代表:



13. 权利要求7的衍生物,其中x是12,或者,其中化学式2由化学式2b代表:



14. 权利要求1-2、5-6、8-9和11-13中任一项的衍生物,其中x是12,或者,y是9-11范围内的整数。

15. 权利要求3的衍生物,其中x是12,或者,y是9-11范围内的整数。

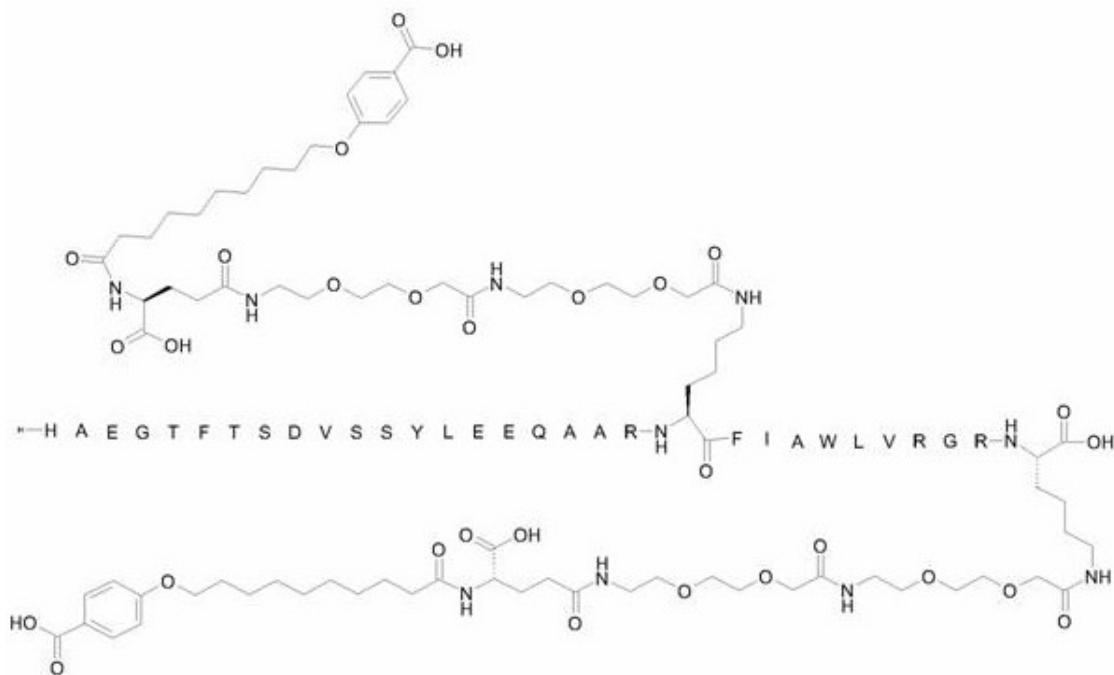
16. 权利要求4的衍生物,其中x是12,或者,y是9-11范围内的整数。

17. 权利要求7的衍生物,其中x是12,或者,y是9-11范围内的整数。

18. 权利要求10的衍生物,其中x是12,或者,y是9-11范围内的整数。

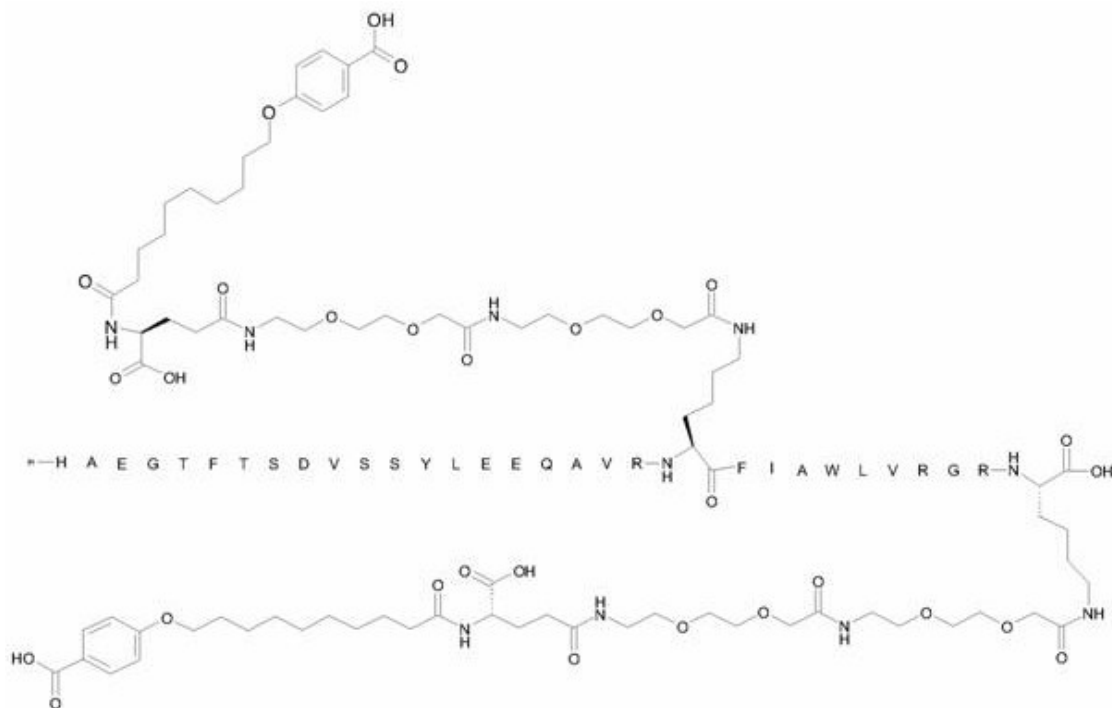
19. 权利要求1-2、5-6、8-9、11-13和15-18中任一项的衍生物;或其药学可接受的盐或C-末端酰胺,所述衍生物选自以下:

$N^{\epsilon 27}$ -[2-[2-[2-[2-[2-[2-[(4S)-4-羧基-4-[10-(4-羧基苯氧基)癸酰基氨基]丁酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基], $N^{\epsilon 37}$ -[2-[2-[2-[2-[2-[2-[(4S)-4-羧基-4-[10-(4-羧基苯氧基)癸酰基氨基]丁酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基]-[Glu²²,Arg²⁶,Lys²⁷,Arg³⁴,Lys³⁷]-GLP-1-(7-37)-肽
化学式50:

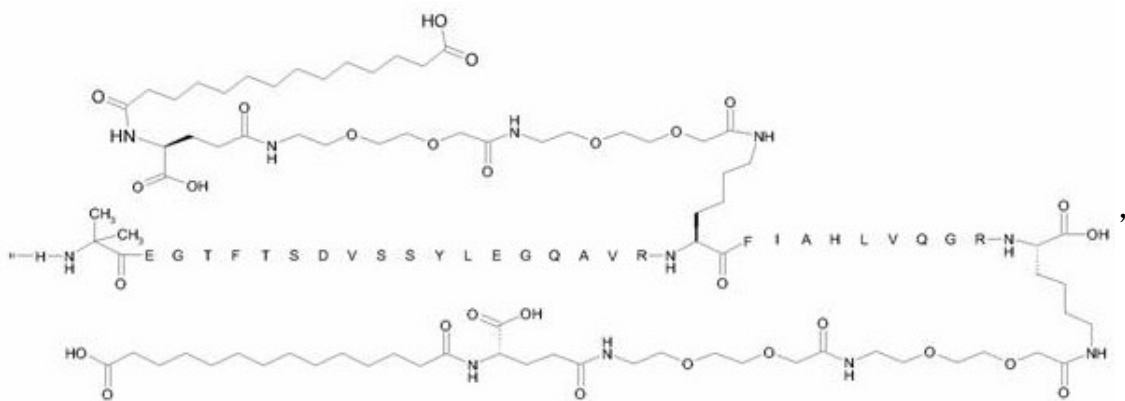


$N^{\epsilon 27}$ -[2-[2-[2-[2-[2-[2-[(4S)-4-羧基-4-[10-(4-羧基苯氧基)癸酰基氨基]丁酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基], $N^{\epsilon 37}$ -[2-[2-[2-[2-[2-[2-[(4S)-4-羧基-4-[10-(4-羧基苯氧基)癸酰基氨基]丁酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基]-[Glu²²,Val²⁵,Arg²⁶,Lys²⁷,Arg³⁴,Lys³⁷]-GLP-1-(7-37)-肽

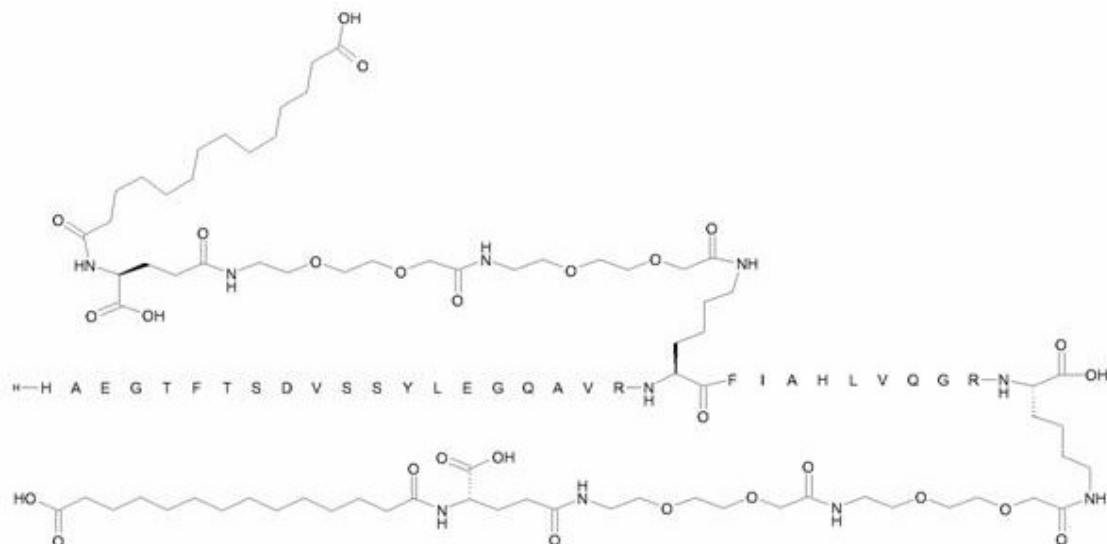
化学式53:



$N^{\epsilon 27}$ -[2-[2-[2-[2-[2-[2-[[(4S)-4-羧基-4-(13-羧基十三酰基氨基)丁酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基], $N^{\epsilon 37}$ -[2-[2-[2-[2-[2-[2-[[(4S)-4-羧基-4-(13-羧基十三酰基氨基)丁酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基]-[Aib⁸, Val²⁵, Arg²⁶, Lys²⁷, His³¹, Gln³⁴, Lys³⁷]-GLP-1-(7-37)-肽
化学式64:

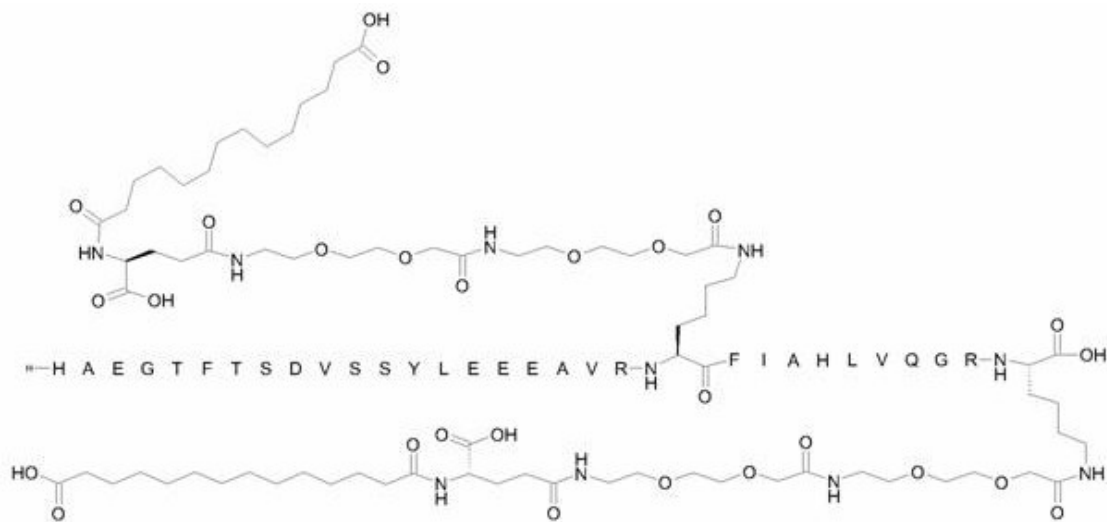


$N^{\epsilon 27}$ -[2-[2-[2-[2-[2-[2-[[(4S)-4-羧基-4-(13-羧基十三酰基氨基)丁酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基], $N^{\epsilon 37}$ -[2-[2-[2-[2-[2-[2-[[(4S)-4-羧基-4-(13-羧基十三酰基氨基)丁酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基]-[Val²⁵, Arg²⁶, Lys²⁷, His³¹, Gln³⁴, Lys³⁷]-GLP-1-(7-37)-肽
化学式65:



$N^{\epsilon 27}$ -[2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[(4S)-4-羧基-4-(13-羧基十三酰基氨基) 丁酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基], $N^{\epsilon 37}$ -[2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[(4S)-4-羧基-4-(13-羧基十三酰基氨基) 丁酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基]-[Glu²², Glu²³, Val²⁵, Arg²⁶, Lys²⁷, His³¹, Gln³⁴, Lys³⁷]-GLP-1-(7-37)-肽, 和

化学式66:



20. 权利要求1的衍生物, 或其药学可接受的盐或C-末端酰胺, 其中所述GLP-1类似物与GLP-1 (7-37) (SEQ ID NO:1) 相比包含以下氨基酸改变:

- (i) 22E, 26R, 27K, 34R, 37K;
- (iv) 22E, 25V, 26R, 27K, 34R, 37K;
- (xv) 8Aib, 25V, 26R, 27K, 31H, 34Q, 37K;
- (xvi) 25V, 26R, 27K, 31H, 34Q, 37K; 和
- (xvii) 22E, 23E, 25V, 26R, 27K, 31H, 34Q, 37K。

21. 权利要求20的衍生物, 其中所述GLP-1类似物与GLP-1 (7-37) (SEQ ID NO:1) 相比,

其氨基酸改变由如(i)、(iv)、(xv)、(xvi)和(xvii)中任一项定义的一组氨基酸改变组成。

22. 权利要求1-21中任一项的衍生物用于制备药物的用途,所述药物用于治疗和/或预防糖尿病,和/或用于延迟或预防糖尿病进程,其中所述糖尿病包括:高血糖症、2型糖尿病、葡萄糖耐量减低、1型糖尿病、非胰岛素依赖性糖尿病、青少年的成人发作型糖尿病(MODY)和妊娠期糖尿病。

双酰化GLP-1衍生物

[0001] 本申请是申请日为2012年04月12日,申请号为201280028724.6,发明名称为“双酰化GLP-1衍生物”的发明专利申请的分案申请。

[0002] 本申请根据37 C.F.R. §1.53 (c) 要求2011年4月13日提交的美国临时专利申请序列号61/474,913的权益,所述申请通过引用整体并入本文。

技术领域

[0003] 本发明涉及胰高血糖素样肽1 (Glucagon-Like Peptide, GLP-1) 类似物的衍生物,更特别地,涉及在肽的K²⁷和另一个K残基上酰化的双酰化GLP-1衍生物及其药学用途。

[0004] 序列表的通过引用并入

[0005] 序列表,名称为“SEQUENCE LISTING”,有568字节,于2012年4月11日创建并通过引用并入本文。

背景技术

[0006] Journal of Medicinal Chemistry (2000), 第43卷, 第9期, 第1664-1669页公开了GLP-1 (7-37) 的衍生物,包括双酰化的某些衍生物。

[0007] WO 98/08871 A1公开了多种GLP-1衍生物,包括双酰化的某些衍生物。利拉鲁肽(liraglutide),一种于2009年由Novo Nordisk A/S上市的每日施用一次的单酰化GLP-1衍生物,也公开于WO 98/08871 A1 (实施例37)。

[0008] WO 99/43706 A1公开了多种单酰化和双酰化的GLP-1衍生物,包括某些K^{26,37}衍生物和某些K^{27,34}衍生物。

[0009] WO 06/097537 A2公开了多种GLP-1衍生物,包括塞马鲁肽(semaglutide) (实施例4),是一种由Novo Nordisk A/S开发的每周施用一次的单酰化GLP-1衍生物。

[0010] Angewandte Chemie International Edition 2008, 第47卷, 第3196-3201页报道了一类4-(对碘苯基)丁酸衍生物发现和表征,据称其表现出同时与小鼠血清白蛋白(MSA)和人血清白蛋白(HSA)的稳定的非共价结合相互作用。

发明内容

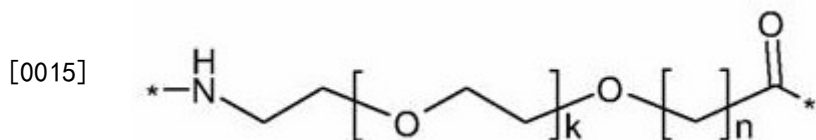
[0011] 本发明涉及GLP-1肽衍生物。

[0012] 所述衍生物在位置27取代天然谷氨酸的赖氨酸、以及在另一个赖氨酸残基上被酰化。侧链是白蛋白结合部分。它们包含延长部分,优选选自脂肪二酸,以及具有远端苯氧基的脂肪酸,所有都任选被取代。脂肪酸或脂肪二酸的羧基被酰化到(任选通过接头)GLP-1肽的赖氨酸残基,优选在其ε-氨基处被酰化。

[0013] 与GLP-1 (7-37) 相比,GLP-1肽可以是具有总数为至多10个氨基酸差异(例如一个或多个添加、一个或多个缺失和/或一个或多个取代)的GLP-1 (7-37) (SEQ ID NO: 1) 类似物。

[0014] 更具体地,本发明涉及GLP-1类似物的衍生物,所述类似物包含在对应于GLP-1 (7-

37) (SEQ ID NO: 1) 的位置27的位置上的第一K残基;在对应于GLP-1 (7-37) 的位置T 的位置上的第二K残基,其中T是7-37范围内除了18和27以外的整数;以及与GLP-1 (7-37) 相比,包含最多10个氨基酸改变;其中所述第一K残基指定为 K^{27} ,且第二K残基指定为 K^T ;所述衍生物包含分别经由接头连接到 K^{27} 和 K^T 的两个白蛋白结合部分,其中各个白蛋白结合部分包含选自 $\text{HOO}-(\text{CH}_2)_x-\text{CO}-*$ 和 $\text{HOO}-(\text{C}_6\text{H}_4)_y-\text{CO}-*$ 的延长部分,其中x是6-16范围内的整数,y是3-17范围内的整数,并且其中接头包含下式化学式5的接头元件:



[0016] 其中k是1-5范围内的整数,n是1-5范围内的整数;或其药学可接受的盐、酰胺或酯。

[0017] 本发明也涉及这样的衍生物,其用作药物,尤其是用于治疗 and/或预防所有形式的糖尿病和相关疾病,诸如进食障碍、心血管疾病、胃肠道疾病、糖尿病并发症、危急病症 (critical illness) 和/或多囊卵巢综合征;和/或用于改善脂质参数,改善 β 细胞功能和/或用于延迟或预防糖尿病进程。

[0018] 本发明还涉及新颖GLP-1类似物形式的中间产物,其涉及用于制备本发明的某些衍生物。

[0019] 本发明的衍生物具有生物活性。此外或备选地,它们具有延长的药代动力学概况。此外或备选地,它们对胃肠道酶的降解具有稳定性。此外或备选地,它们具有高的口服生物利用度。这些性能在下一代GLP-1化合物用于皮下、静脉内和/或尤其是口服施用的开发中是重要的。

[0020] 描述

[0021] 在下文中,希腊字母可用其符号或相应的书写名称代表,例如: α = alpha; β = beta; ϵ = epsilon; γ = gamma; ω = omega; 等。同样,希腊字母 μ 可用“u”代表,例如 μl =ul,或 μM =uM。

[0022] 化学式中的星号(*)表示i) 结合点,ii) 基团,和/或iii) 非共享电子。

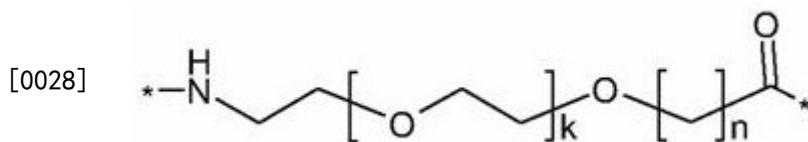
[0023] 在第一个方面,本发明涉及GLP-1类似物的衍生物,所述类似物包含在对应于GLP-1 (7-37) (SEQ ID NO: 1) 的位置27的位置上的第一K残基;在对应于GLP-1 (7-37) 的位置T 的位置上的第二K残基,其中T是7-37范围内除了18和27以外的整数;以及与GLP-1 (7-37) 相比,包含最多10个氨基酸改变;其中所述第一K残基指定为 K^{27} ,且第二K残基指定为 K^T ;所述衍生物包含分别经由接头连接到 K^{27} 和 K^T 的两个白蛋白结合部分,其中所述白蛋白结合部分包含选自化学式1和化学式2的延长部分:

[0024] 化学式1: $\text{HOOC}-(\text{CH}_2)_x-\text{CO}-*$

[0025] 化学式2: $\text{HOOC}-\text{C}_6\text{H}_4-\text{O}-(\text{CH}_2)_y-\text{CO}-*$

[0026] 其中x是6-16范围内的整数,y是3-17范围内的整数,并且接头包含化学式5:

[0027] 化学式5:



[0029] 其中k是1-5范围内的整数,n是1-5范围内的整数;或其药学可接受的盐、酰胺或酯。

[0030] GLP-1 类似物

[0031] 本文所用的术语“GLP-1类似物”或“GLP-1的类似物”是指作为人胰高血糖素样肽-1 (GLP-1 (7-37)) 变体的肽或化合物,其序列作为SEQ ID NO: 1包括在序列表中。具有SEQ ID NO: 1序列的肽也可称为“天然”GLP-1。

[0032] 在序列表中,SEQ ID NO: 1的第一个氨基酸残基(组氨酸)编号为1。然而,在下文中,根据本领域已建立的习惯,该组氨酸残基编号定为7,并且其后的氨基酸残基也随之编号,结尾是37号甘氨酸。因此,通常,本文所涉及到的GLP-1 (7-37) 序列的氨基酸残基编号或位置编号是开始于位置7的His和结束于位置37的Gly的序列。

[0033] 本发明衍生物的GLP-1类似物可根据以下来描述:i) 在天然GLP-1 (7-37) 中对应于经改变的氨基酸残基的氨基酸残基编号(即在天然GLP-1中的对应位置),和ii) 实际改变。以下是合适的类似物命名的非限制性实例。

[0034] 本发明衍生物的GLP-1类似物的非限制性实例是改变的类似物,使其包含在对应于GLP-1 (7-37) 的位置27的位置上的第一赖氨酸残基,以及位置12上的第二赖氨酸残基。该类似物的氨基酸序列否则与天然GLP-1的序列相同,并且该类似物可称为K¹²,K²⁷-GLP-1 (7-37)。该名称表示天然GLP-1的氨基酸序列,其中位置12的苯丙氨酸已被赖氨酸取代,并且位置27的谷氨酸已被赖氨酸取代。

[0035] 当与天然GLP-1 (7-37) (SEQ ID NO: 1) 相比,构成本发明衍生物部分的GLP-1类似物包含最多10个氨基酸改变。换句话说,它是GLP-1 (7-37) 肽,其中与天然GLP-1 (7-37) (SEQ ID NO: 1) 相比,多个氨基酸残基被改变。这些改变可独立代表一个或多个氨基酸取代、添加和/或缺失。

[0036] 以下是适当类似物命名的非限制性实例。

[0037] 例如,类似物[Aib8,Lys22,Val25,Arg26,Lys27,His31,Arg34]-GLP-1-(7-37) 表示以下GLP-1 (7-37) 肽,当与天然GLP-1比较时,其具有以下取代:位置8的丙氨酸被Aib(α-氨基异丁酸)取代,位置22的甘氨酸被赖氨酸取代,位置25的丙氨酸被缬氨酸取代,位置26的赖氨酸被精氨酸取代,位置27的谷氨酸被赖氨酸取代,位置31的色氨酸被组氨酸取代,和位置34的赖氨酸被精氨酸取代。该类似物也可以简单地表示为(8Aib, 22K, 25V, 26R, 27K, 31H, 34R)。

[0038] 作为另一个实例,类似物[Aib8,Lys20,Glu22,Arg26,Lys27,Glu30,Gly34]-GLP-1-(7-34) 表示以下GLP-1 (7-37) 肽,当与天然GLP-1比较时,其被以下所改变:位置8的丙氨酸被Aib取代,位置20的亮氨酸被赖氨酸取代,位置22的甘氨酸被谷氨酸取代,位置26的赖氨酸被精氨酸取代,位置27的谷氨酸被赖氨酸取代,位置30的丙氨酸被谷氨酸取代,位置34的赖氨酸被甘氨酸取代,和通过缺失位置35-36-37的甘氨酸-精氨酸-甘氨酸的C-末端。该类似物也可以简单地表示为(8Aib, 20K, 22E, 26R, 27K, 30E, 34G, des35-37),其中隐

含对GLP-1 (7-37) 的引用,并且“des”表示缺失。

[0039] 作为又进一步实例,包含Glu³⁸和Gly³⁹的类似物是指GLP-1 (7-37) 肽,当与天然GLP-1相比时,其包含(谷氨酸-甘氨酸)二肽添加至GLP-1 (7-37) 的C-末端。该类似物也可以简单地被称为包含(38E, 39G),其中隐含对GLP-1 (7-37) 的引用。

[0040] “包含”某些特定改变的类似物还可包含与SEQ ID NO: 1相比进一步的改变。包含(38E、39G)的类似物的一个非限制性实例是化学式51的肽部分。

[0041] 根据以上实例,显而易见的是,可通过氨基酸残基的全名、它们的首字母代码和/或它们的三字母代码而标识氨基酸残基。这3种方式是完全等同的。

[0042] 表述“相当位置”或“对应位置”可用于在变体GLP-1 (7-37) 序列中表征相对于天然GLP-1 (7-37) (SEQ ID NO: 1) 而言的改变位点。可通过例如简单书写和目测, 和/或使用标准蛋白或肽比对程序诸如作为Needleman-Wunsch比对的“比对”, 容易地推断出相当位置或对应位置, 以及改变的数量。所述算法描述于Needleman, S.B.和Wunsch, C.D., (1970), *Journal of Molecular Biology*, 48: 443-453, 以及Myers和W. Miller 在“Optimal Alignments in Linear Space” *CABIOS (computer applications in the biosciences)* (1988) 4:11-17中的比对程序。为了比对, 可使用默认评分矩阵BLOSUM50和默认特性矩阵(identity matrix), 并且空位的第一残基的罚分可设置在-12, 或优选在-10, 并且空位的额外残基的罚分在-2, 优选在-0.5。

[0043] 这类比对的实例插入下文中,其中序列号1(SEQ_ID_NO_1)是SEQ ID NO: 1,序列号2(ANALOGUE)是其类似物(22K, 26R, 27K, 30E, 34G, des35-37):

[0044] # 比对的序列: 2

[0045] # 1: SEQ ID NO 1

[0046] # 2: 类似物

[0047] # 矩阵: EBLOSUM62

[0048] # 空位扣分: 10.0

[0049] # 延伸罚分: 0.5

[0050] #

[0051] # 长度: 31

[0052] # 同一性: 23/31 (74.2%)

[0053] # 相似性: 25/31 (80.6%)

[0054] # 空位: 3/31 (9.7%)

[0055] # 分数: 117.0

[0056] #

[0057] SEQ_ID_NO_1 1 HAEGTFTSDVSSYLEGQAAKEFIAWLVKGRG 31
|||||||.|.:|.|||.

[0058] 类似物 1 HAEGTFTSDVSSYLEKOAARKFIEWLVG--- 28。

[0059] 在包含在序列中的非天然氨基酸诸如Aib中,为了比对目的,它们都可用X替代。如有必要,X可在随后用手工校正。

[0060] 术语“肽”当用于例如本发明衍生物的GLP-1类似物时,是指包含通过酰胺(或肽)

键相互连接的一系列氨基酸的化合物。

[0061] 本发明的肽包含通过肽键连接的至少5个组成氨基酸。在特定的实施方案中,肽包含至少10、优选至少15、更优选至少20、甚至更优选至少25、或最优选至少28个氨基酸。

[0062] 在特定的实施方案中,肽由至少5个组成氨基酸组成,优选由至少10、至少15、至少20、至少25、或最优选由至少28个氨基酸组成。

[0063] 在额外的特定实施方案中,肽a)由i) 28、ii) 29、iii) 30、iv) 31、v) 32、或vi) 33个氨基酸构成,或b)由 i) 28、ii) 29、iii) 30、iv) 31、v) 32、或vi) 33个氨基酸组成。

[0064] 在再进一步的特定实施方案中,肽由通过肽键相互连接的氨基酸组成。

[0065] 氨基酸是含有胺基和羧酸基,和任选含有一个或多个额外基团,通常称为侧链,的分子。

[0066] 术语“氨基酸”包括蛋白质性的氨基酸(由遗传密码所编码,包括天然氨基酸和标准氨基酸)、以及非蛋白质性(在蛋白质中未发现,和/或在标准遗传密码中未编码)、和合成氨基酸。因此,氨基酸可选自蛋白质性的氨基酸、非蛋白质性的氨基酸、和/或合成氨基酸的组。

[0067] 不由遗传密码所编码的氨基酸的非限制性实例是 γ -羧基谷氨酸、鸟氨酸和磷酸丝氨酸。合成氨基酸的非限制性实例是氨基酸的D-异构体,诸如D-丙氨酸和D-亮氨酸、Aib(α -氨基异丁酸)、 β -丙氨酸和des-氨基-组氨酸(desH,替代名称咪唑丙酸,缩写Imp)。

[0068] 在下文中,并未表明旋光异构体的所有氨基酸都理解为是指L-异构体(除非另有说明)。

[0069] 本发明的GLP-1衍生物和类似物具有GLP-1活性。该术语是指与GLP-1受体结合并起始信号转导途径而导致促胰岛素作用或如本领域已知的其它生理效应的能力。例如,可使用本文的实施例33中所述的测定方法,检测本发明的类似物和衍生物的GLP-1活性。本文实施例34中描述的GLP-1受体结合测定也可用于确定GLP-1活性(低HSA实验)。

[0070] GLP-1 衍生物

[0071] 在GLP-1肽或类似物的情况下,本文所用的术语“衍生物”是指经化学修饰的GLP-1肽或类似物,其中一个或多个取代基已与所述肽共价连接。取代基也可称为侧链。

[0072] 在特定的实施方案中,侧链能与白蛋白形成非共价聚集体,因而促进所述衍生物在血流中循环,并且还具有延长所述衍生物作用时间的效应,这是因为以下事实:GLP-1-衍生物与白蛋白的聚集体仅缓慢分解而释放活性药物成分。因此,取代基或侧链,作为整体,优选是指白蛋白结合部分。

[0073] 在另一个特定的实施方案中,白蛋白结合部分包含与白蛋白结合并因此与延长特别相关的部分,所述部分可称为延长部分。相对于其与肽的结合点而言,延长部分可以在白蛋白结合部分相反的一端之上或附近。

[0074] 在再进一步的特定的实施方案中,白蛋白结合部分包含介于延长部分和与肽的结合点之间的部分,所述部分可称为接头、接头部分、间隔基等。接头可以是任选的,并因此在这种情况下,白蛋白结合部分可与延长部分相同。

[0075] 在特定的实施方案中,白蛋白结合部分和/或延长部分是亲脂的,和/或在生理pH(7.4)时带负电荷。

[0076] 白蛋白结合部分、延长部分或接头可通过酰化而与GLP-1肽的赖氨酸残基共价连

接。

[0077] 在一个优选的实施方案中,在形成酰胺键的条件下,白蛋白结合部分(优选包含延长部分和接头)的活性酯与赖氨酸残基的氨基(优选其 ϵ -氨基)共价连接(该步骤称为酰化)。

[0078] 除非另有说明,否则当提及与赖氨酸残基酰化时,理解为其 ϵ -氨基。

[0079] 包含与第一和第二K残基(例如,与K²⁷和K^T)通过接头连接的两个延长部分的衍生物,可称为,例如分别在GLP-1肽的位置27和T的第一和第二赖氨酸残基的 ϵ -氨基上被酰化2次、双酰化或双重酰化的衍生物。

[0080] 为了本文的目的,术语“白蛋白结合部分”、“延长部分”和“接头”可包括这些分子的未反应及已反应形式。是否是指一种形式或其它形式,根据施用该术语的上下文就能清楚。

[0081] 在一方面,每个延长部分包含独立选自以下化学式1和化学式2的延长部分,或由所述延长部分组成:

[0082] 化学式1: $\text{HOOC}-(\text{CH}_2)_x-\text{CO}-^*$

[0083] 化学式2: $\text{HOOC}-\text{C}_6\text{H}_4-\text{O}-(\text{CH}_2)_y-\text{CO}-^*$

[0084] 其中x是6-16范围内的整数,y是3-17范围内的整数。

[0085] 在一个实施方案中, $^*-(\text{CH}_2)_x-^*$ 是指直链或支链、优选直链的亚烷基,其中x是6-16范围内的整数。

[0086] 在另一个实施方案中, $^*-(\text{CH}_2)_y-^*$ 是指直链或支链、优选直链的亚烷基,其中y是3-17范围内的整数。

[0087] 术语“脂肪酸”是指具有4-28个碳原子的脂族单羧酸,优选它是非支链的,和/或偶数的,并且它可以是饱和或不饱和的。

[0088] 术语“脂肪二酸”是指如上定义的、但在 ω 位置具有额外羧酸基团的脂肪酸。因此,脂肪二酸是二羧酸。

[0089] 命名按照本领域通常方式进行,例如在上式 $^*-\text{COOH}$ 以及 $\text{HOOC}-^*$ 中是指羧基; $^*-\text{C}_6\text{H}_4-^*$ 是指亚苯基; $^*-\text{CO}-^*$ 以及 $^*-\text{OC}-^*$ 是指羰基($\text{O}=\text{C}<^*$); $\text{C}_6\text{H}_5-\text{O}-^*$ 是指苯氧基。在特定的实施方案中,芳族,诸如苯氧基和亚苯基,可以独立地为邻位、间位或对位。

[0090] 如上所解释,本发明的GLP-1衍生物是经双酰化的,即2个白蛋白结合部分与GLP-1肽共价连接。

[0091] 在特定的实施方案中,2个白蛋白结合部分(即完整侧链)是类似的,优选是基本相同的,或者最优选是相同的。

[0092] 在另一个特定的实施方案中,2个延长部分是类似的,优选是基本相同的,或者最优选是相同的。

[0093] 在一个再进一步的具体实施方案中,2个接头是类似的,优选是基本相同的,或者最优选是相同的。

[0094] 术语“基本相同”包括由于以下原因而导致的特性差异:形成一种或多种盐、酯和/或酰胺;优选形成一种或多种盐、甲酯和简单酰胺;更优选形成不超过2种盐、甲酯和/或简单酰胺;甚至更优选形成不超过1种盐、甲酯和/或简单酰胺;或最优选形成不超过1种盐。

[0095] 在化学化合物诸如白蛋白结合部分、延长部分和接头的情况下,可使用本领域已知的任何合适的计算机程序和/或算法来确定相似性和/或同一性。

[0096] 例如,可使用分子指纹适当地测定2个延长部分、2个接头和/或2个完整侧链的相似性。指纹是表示化学结构的一种数学方法(参见例如Chemoinformatics: A textbook, Johann Gasteiger and Thomas Engel (Eds), Wiley-VCH Verlag, 2003)。

[0097] 合适指纹的实例包括但不限于UNITY指纹、MDL指纹和/或ECFP指纹,诸如ECFP_6指纹(ECFP代表扩展连接指纹)。

[0098] 在特定的实施方案中,2个延长部分、2个接头和/或2个完整侧链被表示为a) ECFP_6指纹;b) UNITY指纹;和/或c) MDL指纹。

[0099] Tanimoto系数优选用于计算2种指纹的相似性,无论使用a)、b)或c)。

[0100] 在特定的实施方案中,无论使用a)、b)或c),2个延长部分、2个接头和/或2个完整侧链分别具有的相似性为至少0.5 (50%);优选至少0.6 (60%);更优选至少0.7 (70%),或至少0.8 (80%);甚至更优选至少0.9 (90%);或最优选至少0.99 (99%),诸如相似性为1.0 (100%)。

[0101] 可使用程序SYBYL (可得自Tripos, 1699 South Hanley Road, St. Louis, MO 63144-2319 USA)来计算UNITY指纹。可使用程序Pipeline Pilot (可得自 Accelrys Inc., 10188 Telesis Court, Suite 100, San Diego, CA 92121, USA)来计算ECFP_6和MDL指纹。

[0102] 更多细节可参见例如 J. Chem. Inf. Model. 2008, 48, 542-549; J. Chem.

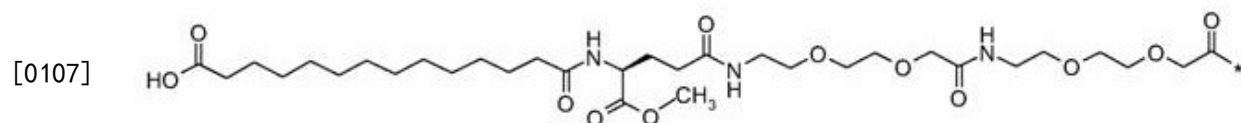
Inf. Comput. Sci. 2004, 44, 170-178; J. Med. Chem. 2004, 47, 2743-2749; J. Chem. Inf. Model. 2010, 50, 742-754; 以及 SciTegic Pipeline Pilot Chemistry Collection: Basic

[0103] Chemistry User Guide, March 2008, SciTegic Pipeline Pilot Data Modeling Collection, 2008 - both from Accelrys Software Inc., San Diego, US, 和指导
http://www.tripos.com/tripos_resources/fileroot/pdfs/Unity_111408.pdf, 和

[0104] http://www.tripos.com/data/SYBYL/SYBYL_072505.pdf。

[0105] 相似性计算的实例插入下文中,其中将化学式66的完整侧链与其甲酯即谷氨酰胺接头部分的单甲酯(化学式66a)相比:

[0106] 化学式66a:



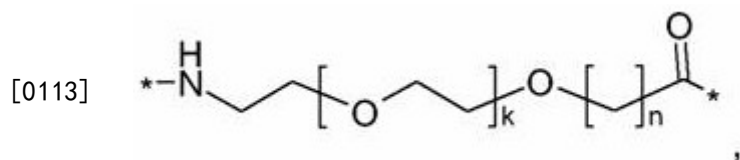
[0108] 使用a) ECFP_6指纹,相似性为0.798,使用b) UNITY指纹,相似性为0.957;和使用MDL指纹,相似性为0.905。

[0109] 在2个相同侧链(白蛋白结合部分)的情况下,衍生物可被称为对称的。

[0110] 在特定的实施方案中,相似性系数为至少0.80,优选至少0.85,更优选至少0.90,甚至更优选至少0.95,或最优选至少0.99。

[0111] 本发明衍生物的2个接头中的每一个可包含以下第一接头元件:

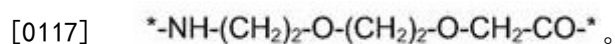
[0112] 化学式5:



[0114] 其中k是1-5范围内的整数,n是1-5范围内的整数。

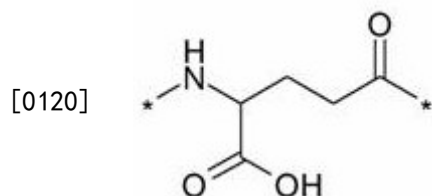
[0115] 在一个特定的实施方案中,当k=1和n=1时,该接头元件可称为OEG,或8-氨基-3,6-二氧杂辛酸的二基,和/或它可被下式代表:

[0116] 化学式5a:

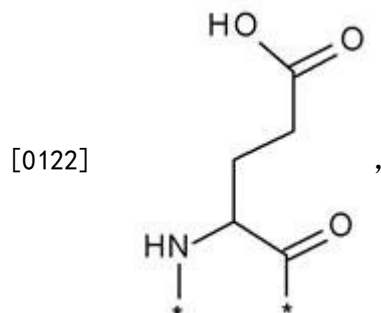


[0118] 在另一个特定的实施方案中,本发明衍生物每个接头可独立包含第二接头元件,优选Glu二基,诸如化学式6和/或化学式7:

[0119] 化学式6:



[0121] 化学式7:



[0123] 其中Glu二基可被包括p次,其中p是1-2范围内的整数。

[0124] 化学式6也可被称为 γ -Glu,或简称为gGlu,因为事实上它是氨基酸谷氨酸的 γ 羧基,其在此可用于与另一接头元件连接,或与赖氨酸的 ϵ -氨基连接。如上所解释,另一接头元件可以是例如另一Glu残基,或OEG分子。Glu的氨基又可与延长部分的羧基、或与例如OEG分子(如果有的话)的羧基、或与例如另一Glu(如果有的话)的 γ -羧基形成酰胺键。

[0125] 化学式7也可被称为 α -Glu,或简称为aGlu,或仅Glu,这是由于以下事实:它是氨基酸谷氨酸的 α 羧基,其在此可用于与另一接头元件连接,或与赖氨酸的 ϵ -氨基连接。

[0126] 以上化学式6和化学式7结构覆盖了Glu的L-型以及D-型。

[0127] 本发明的衍生物可存在不同的立体异构体形式,其具有相同分子式和键合的原子序列,但仅在其原子空间的三维方向上不同。示例的本发明衍生物的立体异构现象,在实验部分中用标准命名法指出其名称和结构。除非另有说明,否则本发明涉及要求保护的衍生物的所有立体异构体形式。

[0128] 可用任何合适方法来测定本发明GLP-1衍生物的血浆浓度。例如,可使用LC-MS(液相色谱-质谱),或免疫测定诸如RIA(放射免疫测定)、ELISA(酶联免疫吸附测定)和

LOCI (荧光氧通道免疫测定, Luminescence Oxygen Channeling Immunoassay)。合适的RIA和ELISA测定的通用方案可参见例如W009/030738, 第116-118页。优选的测定是本文的实施例35、39和40中描述的LOCI测定。

[0129] 药学可接受的盐、酰胺或酯

[0130] 本发明的衍生物和类似物可以呈药学可接受的盐、酰胺或酯的形式。

[0131] 盐是例如由碱和酸之间的化学反应而形成, 例如: $2 \text{NH}_3 + \text{H}_2\text{SO}_4 \rightarrow (\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 。

[0132] 盐可以是碱式盐、酸式盐, 或者这两者都不是(即中性盐)。在水中碱式盐产生氢氧离子, 酸式盐产生水合氢离子。

[0133] 本发明衍生物的盐可以用分别与阴离子基团或阳离子基团反应的添加的阳离子或阴离子来形成。这些基团可位于肽部分内和/或在本发明衍生物的侧链内。

[0134] 本发明衍生物的阴离子基团的非限制性实例包括侧链(如果有的话)以及肽部分中的游离羧基。肽部分通常包括C-端的游离羧酸基团, 并且它也可包括在内部酸性氨基酸残基诸如Asp和Glu上的游离羧基。

[0135] 肽部分的阳离子基团的非限制性实例包括N-端的游离氨基(如果有的话)以及在内部碱性氨基酸残基诸如His、Arg和Lys上的任何游离氨基。

[0136] 本发明衍生物的酯可以是例如通过游离羧酸基团与醇或酚反应而形成, 其导致至少一个羟基被烷氧基或芳氧基取代。

[0137] 酯的形成可涉及肽的C-端的游离羧基, 和/或侧链的任何游离羧基。

[0138] 本发明衍生物的酰胺可以是例如通过游离羧酸基团与胺或取代胺反应, 或通过游离或取代氨基与羧酸反应而形成。

[0139] 酰胺的形成可涉及肽的C-端的游离羧基、侧链的任何游离羧基、肽的N-端的游离氨基、和/或在肽和/或侧链中肽的任何游离或取代的氨基。

[0140] 在一个特定的实施方案中, 肽或衍生物呈药学可接受的盐的形式。在另一个特定的实施方案中, 衍生物呈药学可接受的酰胺的形式, 优选在肽的C-端具有酰胺基。在再进一步的特定的实施方案中, 肽或衍生物呈药学可接受的酯的形式。

[0141] 中间产物

[0142] 在第二个方面, 本发明涉及中间产物。

[0143] 本发明的一类中间产物采用GLP-1类似物的形式, 与GLP-1 (7-37) (SEQ ID NO: 1) 相比, 其包含以下改变: (i) 38Q; 和/或 (ii) 39G; 或其药学可接受的盐、酰胺或酯。

[0144] 以GLP-1类似物形式的本发明的另一个中间产物是与GLP-1 (7-37) (SEQ ID NO: 1) 相比包含、优选具有以下氨基酸改变的类似物, 或其药学可接受的盐、酰胺或酯: (i) 22E, 26R, 27K, 34R, 37K; (ii) 22E, 26R, 27K, 30E, 34R,

- [0145] 36K, 38E, 39G; (iii) 22E, 26R, 27K, 34R, 36K, des37; (iv) 22E, 25V, 26R, 27K, 34R, 37K; (v) 8Aib, 20K, 22E, 26R, 27K, 30E, 34G, des35-37; (vi) 26R, 27K, 30E, 34R, 36K, 38E; (vii) 8Aib, 22K, 25V, 26R, 27K, 31H, 34R; (iix) 8Aib, 22K, 25V, 26R, 27K, 34R, des35-37; (ix) 8Aib, 22K, 25V, 26R, 27K, 34R, des36-37; (x) 26H, 27K, 30E, 34R, 36K, 38E; (xi) 22K, 25V, 26R, 27K, 30E, 34Q; (xii) 25V, 26R, 27K, 30E, 34R, 36K, 38Q; (xiii) 25V, 26R, 27K, 30E, 34Q, 36K, 38E; (xiv) 22K, 26R, 27K, 31H, 34G, des35-37; (xv) 8Aib, 25V, 26R, 27K, 31H, 34Q, 37K; (xvi) 25V, 26R, 27K, 31H, 34Q, 37K; (xvii) 22E, 23E, 25V, 26R, 27K, 31H, 34Q, 37K; (iixx) 8Aib, 12K, 22E, 26R, 27K, 31H, 34Q; (ixx) 8Aib, 22K, 26R, 27K, 31H, 34G, des35-37; (xx) 22E, 26H, 27K, 30E, 34R, 36K, 38E; (xxi) 22E, 24K, 26R, 27K, 31H, 34G, des35-37; (xxii) 25V, 26R, 27K, 34Q, 36K; (xxiii) 22E, 24K, 25V, 26R, 27K, 31H, 34R; (xxiv) 22E, 24K, 25V, 26R, 27K, 34G, des35-37; (xxv) 22E, 24K, 25V, 26R, 27K, 34R; (xxvi) 8Aib, 22E, 24K, 25V, 26R, 27K, 31H, 34Q; 或 (xxvii) 8Aib, 22E, 26R, 27K, 30E, 34R, 36K, 38E, 39G。
- [0146] 25V, 26R, 27K, 31H, 34Q; 或 (xxvii) 8Aib, 22E, 26R, 27K, 30E, 34R, 36K, 38E, 39G。
- [0147] 25V, 26R, 27K, 31H, 34Q; 或 (xxvii) 8Aib, 22E, 26R, 27K, 30E, 34R, 36K, 38E, 39G。

[0148] 功能特性

[0149] 在第一功能方面,本发明的衍生物具有良好功效。此外或备选地,在第二功能方面,它们具有延长的药代动力学特性。此外或备选地,在第三功能方面,它们具有高口服生物利用度。此外或备选地,在第四功能方面,改善了它们的生物物理特性。

[0150] 生物活性(功效)

[0151] 根据第一功能方面,本发明的衍生物、以及构成GLP-1肽本身具有生物活性或功效。

[0152] 在一个特定的实施方案中,功效和/或活性是指体外功效,即在功能性GLP-1受体测定中的表现,更尤其是在表达克隆的人GLP-1受体的细胞系中刺激cAMP形成的能力。

[0153] 可优选在含有人GLP-1受体的培养基中如下测定对cAMP形成的刺激:使用稳定转染的细胞系诸如BHK467-12A (tk-ts13),和/或使用用于测定cAMP的功能性受体测定,例如基于内源形成的cAMP与外源添加的生物素-标记的cAMP之间的竞争,在所述测定中更优选使用特异性抗体捕获cAMP,和/或其中甚至更优选的测定是AlphaScreen cAMP测定,最优选实施例33中描述的测定。

[0154] 术语半最大有效浓度(EC₅₀)通常是指根据剂量反应曲线诱导介于基线和最大值之间一半反应的浓度。EC₅₀用作化合物功效的量度并且代表了所观察到的其最大效果的50%的浓度。

[0155] 可如上所述地测定本发明衍生物的体外功效,并测定目标衍生物的EC₅₀。EC₅₀越低,功效越好。

[0156] 合适的培养基具有以下组成(最终测定浓度):

50mM TRIS-HCl; 5 mM HEPES; 10 mM MgCl₂, 6H₂O; 150 mM NaCl; 0.01% Tween; 0.1% BSA

[0157] ; 0.5 mM IBMX; 1 mM ATP; 1 uM GTP; pH 7.4。

[0158] 本发明的衍生物的EC₅₀等于或低于3500 pM,优选等于或低于3200。EC₅₀可以甚至低于1200pM,优选低于1000pM,甚至更优选低于500pM,或最优选低于200pM。

[0159] 在第一个功能方面的另一个具体实施方案中,功效和/或活性是指在低浓度的白蛋白下结合GLP-1受体的能力。在低白蛋白浓度与GLP-1受体的结合应当是尽可能好的,其

对应于低IC₅₀值。这可以如实施例35中所述进行确定。本发明的衍生物的IC₅₀ (低白蛋白) 等于或低于500 nM, 许多低于100 nM, 或者甚至低于10 nM。

[0160] 在另一个特定的实施方案中, 本发明的衍生物在体内是强效的, 其可在任何合适的动物模型以及在临床试验中按照本领域已知方式来测定。

[0161] 糖尿病db/db小鼠是合适动物模型的一个实例, 在此类小鼠体内可测定血糖降低效应, 例如按照实施例36所述, 或按照W009/030738的实施例43所述。

[0162] 此外或备选地, 在对猪进行的药效动力学研究中, 可测定对体内饲料摄取的效果, 例如按照实施例38所述。

[0163] 延长 - 受体结合/低白蛋白和高白蛋白

[0164] 根据第二功能方面, 本发明的衍生物被延长。

[0165] GLP-1 受体结合

[0166] 在特定实施方案中, 延长是指, 可如实施例34中所述确定, 分别在低和高浓度白蛋白的存在下本发明衍生物与GLP-1受体的结合能力。

[0167] 通常, 在低白蛋白浓度时与GLP-1受体的结合应当尽可能好, 对应于低IC₅₀值。在一个实施方案中, 低白蛋白是指0.005% HSA。在另一个实施方案中, 低白蛋白是指0.001% HSA。

[0168] 在高白蛋白浓度时IC₅₀值是白蛋白对衍生物与GLP-1受体结合的影响的量度。正如所知, GLP-1衍生物也与白蛋白结合。这通常是所需的效果, 其延长它们的血浆寿命。因此, 在高白蛋白时IC₅₀值通常高于在低白蛋白时的IC₅₀值, 对应于与GLP-1受体的结合降低, 这是由与GLP-1受体结合的白蛋白结合竞争所致。

[0169] 因此, 可采用高比率 (IC₅₀值 (高白蛋白) / IC₅₀值 (低白蛋白)), 作为目标衍生物与白蛋白结合良好 (可具有长的半衰期)、并且自身与GLP-1受体也结合良好 (IC₅₀值 (高白蛋白) 高, IC₅₀值 (低白蛋白) 低) 的指示。另一方面, 白蛋白结合可能并非总是满意的, 或者与白蛋白的结合可能变得太强。因此, IC₅₀ (低白蛋白)、IC₅₀ (高白蛋白) 的满意范围/和高/低比率可因化合物不同而不同, 取决于所需用途和此类用途的周围环境、以及其它的潜在目标化合物的特性。

[0170] 在高和低白蛋白浓度时测定受体结合的合适测定方法公开于本文的实施例34。当低白蛋白存在时, 本发明的化合物具有非常良好的受体结合亲和力 (IC₅₀)。平均而言, 实施例34中测试的化合物的IC₅₀ (低白蛋白) 为14 nM。

[0171] 延长 - 大鼠体内半衰期

[0172] 根据第二功能方面, 本发明的衍生物被延长。在一个特定的实施方案中, 延长可以合适地确定为i.v.施用之后大鼠中的体内半衰期 (T_{1/2})。大鼠中的半衰期为至少4小时, 且可以高达10小时或更长。

[0173] 用于测定i.v.施用之后大鼠中的体内半衰期的合适测定方法公开于本文的实施例39。

[0174] 延长 - 小型猪中的体内半衰期

[0175] 根据第二功能方面, 本发明的衍生物被延长。在一个特定的实施方案中, 此外或备选地, 延长可以确定为i.v.施用之后小型猪中的体内半衰期 (T_{1/2})。半衰期为至少12小时, 其可能至少24小时, 至少36小时, 至少48小时, 或至少60小时或甚至更长。

[0176] 用于测定i.v.施用之后小型猪中的体内半衰期的合适测定方法公开于本文的实施例37。

[0177] 口服生物利用度

[0178] 根据第三功能方面,本发明的衍生物具有高口服生物利用度。

[0179] 市售GLP-1衍生物的口服生物利用度非常低。正在开发的用于经i.v.或s.c.施用的GLP-1衍生物的口服生物利用度也低。

[0180] 因此,本领域需要具有改善的口服生物利用度的GLP-1衍生物。这样的衍生物可以是供口服施用用的合适候选者,只要它们的功效一般而言令人满意,和/或只要它们的半衰期一般而言也令人满意即可。

[0181] 本发明人鉴定了一类新型GLP-1衍生物,其具有意想不到的高口服生物利用度,并且同时还具有令人满意的功效和/或半衰期。

[0182] 此外或备选地,这些衍生物具有意想不到的改进的口服生物利用度,并且同时在低浓度白蛋白时还与GLP-1受体具有高结合亲和力(即低IC₅₀值)。

[0183] 为了获取活性药物成分的低的每日口服剂量,这些特征是重要的,为了多种原因,这是期望的,所述原因包括例如生产节约、潜在的安全问题的可能性、以及施用的舒适问题 and 环境上的考虑。

[0184] 通常,术语生物利用度是指所施用的活性药物成分(API)诸如本发明衍生物到达全身循环而不变的剂量部分。按照定义,当API经静脉内施用时,其生物利用度是100%。然而,当经其它途径(诸如口服)施用时,其生物利用度下降(因为降解和/或不完全吸收和首过代谢)。当计算用于非静脉内施用途径的剂量时,生物利用度的相关知识是基本的。

[0185] 绝对口服生物利用度将口服施用后全身循环中的API生物利用度(用曲线下面积或AUC来评价)与静脉内施用后相同API的生物利用度相比较。这是通过非静脉内施用所吸收的API与相同API经相应的静脉内施用相比的分数。如果使用不同剂量,则比较必须是经均一化的剂量;因此,各AUC通过除以所施用的相应剂量而得以校正。

[0186] 在口服和静脉内施用之后绘制血浆API 浓度与时间的曲线。绝对生物利用度(F)是剂量校正的AUC-口服除以AUC-静脉内。

[0187] 本发明衍生物的绝对口服生物利用度高于a) 利拉鲁肽,和/或b) 塞马鲁肽;优选高出至少10%,更优选高出至少20%,甚至更优选高出至少30%,或最优选高出至少40%。在测试口服生物利用度之前,适宜将本发明的衍生物按照本领域已知方法配制成促胰岛素化合物的口服制剂,例如,使用WO 2008/145728所述的任何一种或多种制剂。

[0188] 预测口服生物利用度的合适测试描述在实施例35和40中。根据这些测试,将GLP-1衍生物直接注射到大鼠的肠腔之后和/或口腔填喂大鼠之后,确定其血浆中的浓度(暴露),并且测量GLP-1衍生物在血浆中的随后暴露。

[0189] 生物物理特性

[0190] 根据第四个功能方面,本发明的衍生物具有改善的生物物理特性。这些性质包括但不限于物理稳定性和溶解性。改进的生物物理特性可以是改变的寡聚特性的结果。生物物理特性可以使用蛋白化学的标准生物物理方法来测定。本发明的衍生物的生物物理特性可以适当地与天然GLP-1进行比较。

[0191] 本发明的额外的具体实施方案描述于标题为“特定的实施方案”章节中。

[0192] 生产工艺

[0193] 肽诸如GLP-1 (7-37) 和GLP-1类似物的生产是本领域众所周知的。

[0194] 可通过例如经典肽合成, 例如固相肽合成, 使用t-Boc或Fmoc化学或其它充分建立的技术, 产生本发明衍生物的GLP-1部分(或其片段), 诸如K¹², K²⁷-GLP-1 (7-37) 或其类似物或片段, 所述技术参见例如 **Greene 和 Wuts, "Protective**

[0195] **Groups in Organic Synthesis"**, John Wiley & Sons, 1999, Florencio Zaragoza Dörwald, **"Organic Synthesis on solid Phase"**, Wiley-VCH Verlag GmbH, 2000, 和 **"Fmoc Solid Phase**

[0196] **Peptide Synthesis"**, W.C. Chan 和 P.D. White 编辑, Oxford University Press, 2000。

[0197] 此外或备选地, 它们也可通过重组方法而产生, 即通过在允许所述肽表达的条件下, 在合适的营养培养基中培养含有编码所述类似物的DNA序列并能表达所述肽的宿主细胞。适合表达这些肽的宿主细胞的非限制性实例是: 大肠杆菌 (*Escherichia coli*)、酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 以及哺乳动物BHK细胞系或CHO细胞系。

[0198] 可按例如实验部分所述, 生产包含非天然氨基酸和/或共价连接的N-端一肽或二肽模拟物的本发明的那些衍生物。或参见例如Hodgson等人: "The synthesis of peptides and proteins containing non-natural amino acids", Chemical Society Reviews, 第33卷, 第7期(2004), 第422-430页; 和WO 2009/083549 A1, 名称为 "Semi-recombinant preparation of GLP-1 analogues"。

[0199] 多种本发明衍生物制备方法的具体实例包括在实验部分内。

[0200] 药物组合物

[0201] 可按照本领域已知方法制备包含本发明衍生物或其药学可接受的盐、酰胺或酯、和药学可接受的赋形剂的药物组合物。

[0202] 术语“赋形剂”广义上是指除了活性治疗成分之外的任何成分。赋形剂可以是惰性物质、无活性物质和/或并非药物活性物质。

[0203] 赋形剂可用于多种目的, 例如作为载体、媒介物、稀释剂、片剂助剂、和/或用于改善施用、和/或活性物质的吸收。

[0204] 药物活性成分与不同赋形剂的配制是本领域已知的, 参见例如Remington: The Science and Practice of Pharmacy (例如第19版(1995), 和任何更新版本)。

[0205] 赋形剂的非限制性实例是: 溶剂、稀释剂、缓冲剂、防腐剂、张度调节剂、螯合剂和稳定剂。

[0206] 制剂的实例包括液体制剂, 即含水的水性制剂。液体制剂可以是溶液剂或混悬剂。水性制剂通常包含至少50% w/w的水, 或至少60%、70%、80%、或甚至至少90% w/w的水。

[0207] 或者, 药物组合物可以是固体制剂, 例如经冻干或喷雾干燥的组合物, 其可直接使用, 或者由医师或患者使用前加入溶剂和/或稀释剂而使用。

[0208] 水性制剂的pH可以是pH 3至pH 10的任何值, 例如约7.0至约9.5; 或约3.0至约7.0。

[0209] 药物组合物可包含缓冲剂。缓冲剂可以是例如选自乙酸钠、碳酸钠、柠檬酸、甘氨酸、组氨酸、甘氨酸、赖氨酸、精氨酸、磷酸二氢钠、磷酸氢二钠、磷酸钠和三(羟甲基)-氨基甲烷、N-二(羟乙基)甘氨酸、三(羟甲基)甲基甘氨酸、苹果酸、琥珀酸、马来酸、富

马酸、酒石酸、天冬氨酸及其混合物。

[0210] 药物组合物可包含防腐剂。防腐剂可以是例如选自酚、邻甲酚、间甲酚、对甲酚、对羟基苯甲酸甲酯、对羟基苯甲酸丙酯、2-苯氧基乙醇、对羟基苯甲酸丁酯、2-苯乙醇、苯甲醇、氯丁醇和硫柳汞、溴硝丙二醇、苯甲酸、咪唑烷基脲、双氯苯双胍己烷、脱氢醋酸钠、氯甲酚、对羟基苯甲酸乙酯、苄索氯铵、氯苯甘醚(3p-氯苯氧基丙烷-1,2-二醇)及其混合物。防腐剂浓度可以是0.1 mg/ml至20 mg/ml。

[0211] 药物组合物可包含等张剂。等张剂可以是例如选自盐(例如氯化钠)、糖或糖醇、氨基酸(例如甘氨酸、组氨酸、精氨酸、赖氨酸、异亮氨酸、天冬氨酸、色氨酸、苏氨酸)、糖醇(例如甘油(甘油)、1,2-丙二醇(丙二醇)、1,3-丙二醇、1,3-丁二醇)、聚乙二醇(例如PEG400)及其混合物。可使用任何糖,诸如单糖、双糖或多糖或水溶性葡聚糖,包括例如果糖、葡萄糖、甘露糖、山梨糖、木糖、麦芽糖、乳糖、蔗糖、海藻糖、葡聚糖、支链淀粉、糊精、环糊精、 α 和 β HPCD、可溶性淀粉、羟乙基淀粉和羧甲基纤维素-Na。糖醇定义为具有至少一个-OH基团的C4-C8 烃并包括例如甘露醇、山梨醇、肌醇、半乳糖醇、卫矛醇、木糖醇和阿拉伯糖醇。在一个实施方案中,糖醇添加剂是甘露醇。

[0212] 药物组合物可包含螯合剂。螯合剂可以是例如选自乙二胺四乙酸(EDTA)、柠檬酸和天冬氨酸的盐、及其混合物。药物组合物可包含稳定剂。稳定剂可以是例如一种或多种氧化抑制剂、聚集抑制剂、表面活性剂、和/或一种或多种蛋白酶抑制剂。这些各类稳定剂的非限制性实例公开于下文。

[0213] 术语“聚集体形成”是指多肽分子间的物理相互作用导致形成寡聚物,其可以保持可溶的,或是从溶液中沉淀下来的大的可见的聚集体。在液体药物组合物贮存期间由多肽形成聚集体可不利地影响所述多肽的生物活性,导致药物组合物治疗功效的损失。此外,聚集体形成可导致其它问题,诸如当用输注系统施用含多肽的药物组合物时会阻塞管道、膜或泵。

[0214] 药物组合物可包含一定量的氨基酸基质,其足以在所述组合物贮存期间减少多肽聚集体形成。术语“氨基酸基质”是指一种或多种氨基酸(诸如甲硫氨酸、组氨酸、咪唑、精氨酸、赖氨酸、异亮氨酸、天冬氨酸、色氨酸、苏氨酸)或其类似物。任何氨基酸都可以其游离碱形式或其盐形式存在。氨基酸基质的任何立体异构体(即 L、D或其混合物)都可存在。

[0215] 当作为治疗剂的多肽是包含容易被这样氧化的至少一个甲硫氨酸残基的多肽时,可加入甲硫氨酸(或其它含硫氨基酸或氨基酸类似物),以抑制甲硫氨酸残基氧化为甲硫氨酸亚砷。可使用甲硫氨酸的任何立体异构体(L或D)或其组合。

[0216] 药物组合物可包含选自高分子聚合物或低分子化合物的稳定剂。稳定剂可以是例如选自聚乙二醇(例如PEG 3350)、聚乙烯醇(PVA)、聚乙烯吡咯烷酮、羧基-/羟基纤维素或其衍生物(例如HPC、HPC-SL、HPC-L和HPMC)、环糊精、含硫物质例如单硫代甘油、硫乙醇酸和2-甲硫基乙醇和不同盐类(例如氯化钠)。药物组合物可包含额外的稳定剂,诸如但不限于甲硫氨酸和EDTA,其保护多肽以免于甲硫氨酸氧化,和非离子型表面活性剂,其保护多肽以免于冻融或机械剪切相关的聚集。

[0217] 药物组合物可包含一种或多种表面活性剂,优选一种表面活性剂、至少一种表面活性剂或2种不同的表面活性剂。术语“表面活性剂”是指由水溶性(亲水性)部分和脂溶性(亲脂性)部分构成的任何分子或离子。表面活性剂可以是例如选自阴离子型表面活性剂、

阳离子型表面活性剂、非离子型表面活性剂、和/或两性离子型表面活性剂。

[0218] 药物组合物可包含一种或多种蛋白酶抑制剂,诸如例如EDTA (乙二胺四乙酸)和/或苯甲脒HCl。

[0219] 药物组合物的额外任选成分包括例如润湿剂、乳化剂、抗氧化剂、填充剂、金属离子、油性媒介物、蛋白质(例如人血清白蛋白、明胶)、和/或两性离子(例如氨基酸诸如甜菜碱、牛磺酸、精氨酸、甘氨酸、赖氨酸和组氨酸)。

[0220] 此外,可将药物组合物按照本领域已知方法配制成促胰岛素化合物的口服制剂,例如,使用WO 2008/145728所述的任何一种或多种制剂。

[0221] 所施用的剂量可含有0.01 mg - 100 mg的所述衍生物,或0.01-50 mg、或0.01-20 mg、或0.01-10 mg的所述衍生物。

[0222] 所述衍生物可以药物组合物的形式施用。可将它施用于有需要的患者的若干部位,例如局部部位,诸如皮肤或粘膜部位;旁路吸收部位,诸如动脉内、静脉内或心脏内;和参与吸收的部位,诸如皮肤内、皮下、肌肉内或腹内。

[0223] 施用途径可以是例如舌;舌下;口腔含化;口腔;口服;胃内;肠内;鼻腔;肺,诸如通过细支气管、肺泡或其组合;胃肠外、表皮;真皮;透皮;结膜;输尿管;阴道;直肠;和/或眼内。组合物可以是口服组合物,且施用途径可以是经口服。

[0224] 组合物可以若干剂型施用,例如作为溶液剂;混悬剂;乳剂;微乳剂;多重乳剂;泡沫剂;药膏剂;糊剂;膏药剂;软膏剂;片剂;包衣片剂;口香糖;漱口水;胶囊剂,诸如硬质或软质明胶胶囊剂;栓剂(suppositorium);直肠胶囊剂;滴剂;凝胶剂;喷雾剂;粉剂;气溶胶;吸入剂;滴眼剂;眼用软膏剂;眼用洗剂;阴道栓剂;阴道环;阴道软膏剂;注射用溶液剂;原位转化溶液剂诸如原位胶凝、放置、沉淀、和原位结晶;输注用溶液剂;或植入物。组合物可以是片剂(任选包衣)、胶囊剂或咀嚼剂。

[0225] 还可将组合物进一步复合到药物载体或药物递送系统中,例如,为了改善稳定性、生物利用度和/或溶解度。在一个特定的实施方案中,可将组合物通过共价键、疏水键和/或静电相互作用连接到所述系统。这类复合的目的是例如减少副作用,达到长期治疗和/或增加患者的依从性。

[0226] 组合物也可用于控制释放、持续释放、延长释放、延迟释放和/或缓慢释放药物递送系统的制剂中。

[0227] 胃肠外施用可通过注射器方式,任选笔型注射器,或通过输注泵方式,经皮下、肌肉内、腹膜内或静脉内注射而进行。

[0228] 可以溶液剂、混悬剂或粉剂形式经鼻腔施用组合物;或其可以液体或粉末喷雾的形式经肺部施用。

[0229] 透皮施用也是再进一步的选择,例如通过无针注射,从贴剂诸如离子电渗贴剂(iontophoretic patch),或通过透黏膜途径,例如经口。

[0230] 组合物可以是稳定的制剂。术语“稳定的制剂”是指具有增加的物理和/或化学稳定性、优选这两者的制剂。一般而言,制剂在使用和贮存期间必须是稳定的(按照推荐的使用和贮存条件),直至达到有效期。

[0231] 术语“物理稳定性”是指多肽形成无生物活性的和/或不溶聚集体的趋势,这由暴露于热-机械应力和/或与不稳定界面和表面(诸如疏水性表面)相互作用而引起。可通过目

测和/或通过浊度测量,在不同温度中在机械/物理应力(例如,搅拌)中暴露不同时段之后,评价含水多肽制剂的物理稳定性。或者,可使用多肽构象状态的分光试剂或探针评价物理稳定性,所述试剂或探针例如硫代黄素T或“疏水性贴片”探针。

[0232] 术语“化学稳定性”是指多肽结构中的化学(尤其是共价)变化,其导致形成化学降解产物,其可能与完整多肽相比具有降低的生物功效、和/或增加的免疫原性效应。可通过在不同时间点、在暴露于不同环境条件之后测定化学降解产物的量来评价化学稳定性,例如通过SEC-HPLC和/或RP-HPLC。

[0233] 可将本发明衍生物的治疗与一种或多种额外的药理学活性物质联用,例如选自抗糖尿病药、抗肥胖症药、食欲调节药、抗高血压药、治疗和/或预防糖尿病所致或相关并发症的药物以及治疗和/或预防肥胖症所致或相关并发症和障碍的药物。这些药理学活性物质的实例是:胰岛素、磺脲类、双胍类、美格列奈、葡糖苷酶抑制剂、胰高血糖素拮抗剂、DPP-IV(二肽基肽酶IV)抑制剂、参与糖异生和/或肝糖分解的刺激肝酶抑制剂、葡萄糖摄取调节剂、调节脂质代谢的化合物诸如抗高血脂药例如HMG CoA 抑制剂(他汀类)、胃抑制性多肽(GIP类似物)、减少食物摄取的化合物、RXR 激动剂和作用于 β 细胞的ATP依赖性钾通道的药物;考来烯胺、考来替泊、氯贝丁酯、吉非贝齐、洛伐他汀、普伐他汀、辛伐他汀、普罗布考、右旋甲状腺素、那格列奈、瑞格列奈; β -阻滞剂诸如阿普洛尔、阿替洛尔、噻吗洛尔、吲哚洛尔、普萘洛尔和美托洛尔、ACE(血管紧张素转化酶)抑制剂诸如贝那普利、卡托普利、依那普利、福辛普利、赖诺普利、依那普利、喹那普利和雷米普利、钙通道阻滞剂诸如硝苯地平、非洛地平、尼卡地平、伊拉地平、尼莫地平、地尔氮罩和维拉帕米和 α -阻滞剂诸如多沙唑啉、乌拉地尔、哌唑啉和特拉唑啉;CART(可卡因安非他明调节转录物)激动剂、NPY(神经肽Y)拮抗剂、PYY 激动剂、Y2受体激动剂、Y4受体激动剂、混合型Y2/Y4受体激动剂、MC4(黑皮素4)激动剂、食欲肽拮抗剂、TNF(肿瘤坏死因子)激动剂、CRF(促肾上腺皮质激素释放因子)激动剂、CRF BP(促肾上腺皮质激素释放因子结合蛋白)拮抗剂、尿皮质激素激动剂、 β 3激动剂、胃酸调节素和类似物、MSH(黑素细胞刺激激素)激动剂、MCH(黑素细胞浓缩激素)拮抗剂、CCK(缩胆囊素)激动剂、5-羟色胺重摄取抑制剂、5-羟色胺和去甲肾上腺素重摄取抑制剂、混合型5-羟色胺和去甲肾上腺素能化合物、5HT(5-羟色胺)激动剂、铃蟾肽激动剂、甘丙肽拮抗剂、生长激素、生长激素释放化合物、TRH(甲状腺刺激激素释放激素)激动剂、UCP 2或3(解联蛋白2或3)调节剂、瘦蛋白激动剂、DA 激动剂(溴隐亭、doprexin)、脂肪酶/淀粉酶抑制剂、RXR(类视色素X受体)调节剂、TR β 激动剂;组胺H3拮抗剂、胃抑制性多肽激动剂或拮抗剂(GIP类似物)、胃泌素和胃泌素类似物。

[0234] 也可将本发明衍生物的治疗与影响葡萄糖水平和/或脂肪稳态诸如胃束带或胃旁路的手术联用。

[0235] 药物适应症

[0236] 在第三方面,本发明也涉及用作药物的本发明的衍生物。

[0237] 在特定的实施方案中,本发明的衍生物可用于以下药物治疗,所有无论如何都优选涉及糖尿病:

[0238] (i) 预防和/或治疗所有形式的糖尿病,诸如高血糖症、2型糖尿病、葡萄糖耐量减低、1型糖尿病、非胰岛素依赖性糖尿病、MODY(青少年的成人发作型糖尿病)、妊娠期糖尿病和/或用于降低HbA1C;

[0239] (ii) 延迟或预防糖尿病进程,诸如2型糖尿病的进程,延迟葡萄糖耐量减低(IGT)转为胰岛素需要型2型糖尿病的进程,和/或延迟非胰岛素需要型2型糖尿病转为胰岛素需要型2型糖尿病的进程;

[0240] (iii) 改善 β 细胞功能,诸如减少 β 细胞细胞凋亡,增加 β 细胞功能和/或 β 细胞的量,和/或恢复 β 细胞的葡萄糖敏感性;

[0241] (iv) 预防和/或治疗认知障碍;

[0242] (v) 预防和/或治疗进食障碍,诸如肥胖症,例如通过减少食物摄取,降低体重,抑制食欲,诱导饱胀感;治疗或预防暴食症、神经性贪食症和/或因施用安定药或甾体所致的肥胖症;减少胃运动;和/或延迟胃排空;

[0243] (vi) 预防和/或治疗糖尿病并发症,诸如神经病,包括周围神经病;肾病;或视网膜病;

[0244] (vii) 改善脂质参数,诸如预防和/或治疗高脂血症,降低总血清脂质;降低HDL;降低小密度LDL;降低VLDL;降低甘油三酯;降低胆固醇;增加HDL;降低人血浆中脂蛋白a(Lp(a))的水平;在体外和/或体内抑制载脂蛋白a(apo(a))的产生;

[0245] (iix) 预防和/或治疗心血管疾病,诸如X综合征;动脉粥样硬化;心肌梗塞;冠心病;中风、脑缺血;早期心脏病或早期心血管病,诸如左心室肥大;冠状动脉病;原发性高血压;急性高血压危象;心肌病;心功能不全;锻炼耐受性(exercise tolerance);慢性心力衰竭;心率不齐;心律失常;晕厥(syncopy);动脉粥样硬化;轻度慢性心力衰竭;心绞痛;心脏旁路重闭塞(cardiac bypass reocclusion);间歇性跛行(atherosclerosis obliterans);舒张功能障碍;和/或收缩功能障碍;

[0246] (ix) 预防和/或治疗胃肠道疾病,诸如炎症肠综合征;小肠综合征或克罗恩病(Crohn's disease);消化不良;和/或胃溃疡;

[0247] (x) 预防和/或治疗危急病症,诸如治疗危急病症患者,危急病症多发性肾病(critical illness poly-nephropathy,CIPNP)患者和/或潜在CIPNP患者;预防危急病症或CIPNP的发展;预防、治疗和/或治愈患者的全身炎症反应综合征(SIRS);和/或预防或减少患者在留医期间患有菌血症、败血症和/或脓毒性休克的可能性;和/或

[0248] (xi) 预防和/或治疗多囊卵巢综合征(PCOS)。

[0249] 在一个特定的实施方案中,所述适应症选自(i)-(iii)和(v)-(iix),诸如适应症(i)、(ii)和/或(iii);或适应症(v)、适应症(vi)、适应症(vii),和/或适应症(iix)。

[0250] 在另一个特定的实施方案中,适应症是(i)。在进一步的特定的实施方案中,适应症是(v)。在再进一步的特定的实施方案中,适应症是(iix)。

[0251] 以下适应症特别优选:2型糖尿病和/或肥胖症。

具体实施方式

[0252] 以下是本发明特定的实施方案:

[0253] 1. GLP-1类似物的衍生物,

[0254] 其中GLP-1类似物包含在对应于GLP-1(7-37)(SEQ ID NO: 1)的位置27的位置上的第一K残基;在对应于GLP-1(7-37)的位置T的位置上的第二K残基,其中T是7-37范围内除了18和27以外的整数;以及与GLP-1(7-37)相比,包含最多10个氨基酸改变;其中所述第

—K残基指定为K²⁷,且第二K残基指定为K^T;

[0255] 所述衍生物包含分别经由第一和第二接头分别连接到K²⁷和K^T的第一和第二延长部分,其中

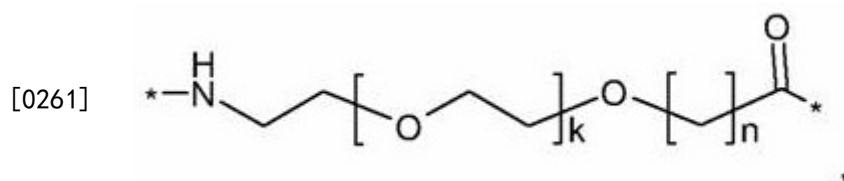
[0256] 第一和第二延长部分选自化学式1和化学式2:

[0257] 化学式1: $\text{HOOC}-(\text{CH}_2)_x-\text{CO}-^*$

[0258] 化学式2: $\text{HOOC}-\text{C}_6\text{H}_4-\text{O}-(\text{CH}_2)_y-\text{CO}-^*$

[0259] 其中x是6-16范围内的整数,y是3-17范围内的整数,并且第一和第二接头包含化学式5:

[0260] 化学式5:



[0262] 其中k是1-5范围内的整数,n是1-5范围内的整数;

[0263] 或其药学可接受的盐、酰胺或酯。

[0264] 2.实施方案1的衍生物,其中T是选自7-37范围内除了18和27以外的整数。

[0265] 3.实施方案1-2中任一项的衍生物,其中T选自7-17、19-26、和28-37范围内的任何整数。

[0266] 4.实施方案1-3中任一项的衍生物,其中T选自7-17的范围。

[0267] 5.实施方案1-4中任一项的衍生物,其中T是12。

[0268] 6.实施方案1-3中任一项的衍生物,其中T选自19-26的范围。

[0269] 7.实施方案1-3和6中任一项的衍生物,其中T选自20、22和24。

[0270] 8.实施方案1-3和6-7中任一项的衍生物,其中T是20。

[0271] 9.实施方案1-3和6-7中任一项的衍生物,其中T是22或24。

[0272] 10.实施方案1-3、6-7和9中任一项的衍生物,其中T是22。

[0273] 11.实施方案1-3、6-7和9中任一项的衍生物,其中T是24。

[0274] 12.实施方案1-3中任一项的衍生物,其中T选自28-37的范围。

[0275] 13.实施方案1-3和12中任一项的衍生物,其中T选自36和37。

[0276] 14.实施方案1-3和12-13中任一项的衍生物,其中T是36。

[0277] 15.实施方案1-3和12中任一项的衍生物,其中T是37。

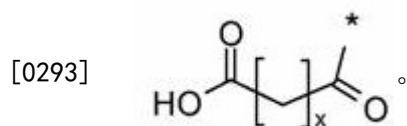
[0278] 16.实施方案1-16中任一项的衍生物,其中通过书写和目测来识别对应于GLP-1 (7-37) (SEQ ID NO: 1)的位置27的位置。

[0279] 17.实施方案1-16中任一项的衍生物,其中通过书写和目测来识别对应于GLP-1 (7-37) (SEQ ID NO: 1)的位置T的位置。

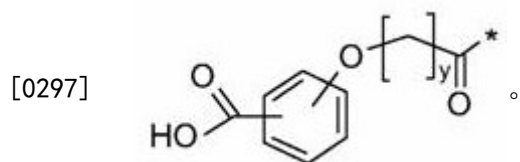
[0280] 18.实施方案1-17中任一项的衍生物,其中通过使用标准蛋白或肽比对程序来识别对应于GLP-1 (7-37) (SEQ ID NO: 1)的位置27的位置。

[0281] 19.实施方案1-18中任一项的衍生物,其中通过使用标准蛋白或肽比对程序来识别对应于GLP-1 (7-37) (SEQ ID NO: 1)的位置T的位置。

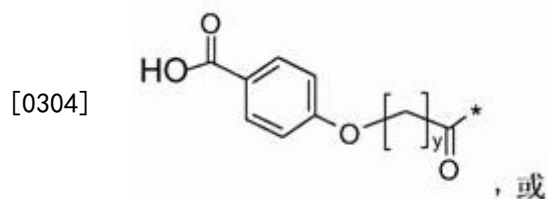
- [0282] 20. 实施方案19的衍生物, 其中所述比对程序是Needleman-Wunsch比对。
- [0283] 21. 实施方案19-20中任一项的衍生物, 其中使用默认评分矩阵和默认特性矩阵。
- [0284] 22. 实施方案19-21中任一项的衍生物, 其中所述评分矩阵是BLOSUM62。
- [0285] 23. 实施方案19-22中任一项的衍生物, 其中空位中第一残基的罚分是 -10 (负十)。
- [0286] 24. 实施方案19-23中任一项的衍生物, 其中空位中额外残基的罚分是 -0.5 (负零点五)。
- [0287] 25. 实施方案1-24中任一项的衍生物, 其中所述类似物除第一和第二K残基之外不含K残基。
- [0288] 26. 实施方案1-25中任一项的衍生物, 其中延长部分是化学式1。
- [0289] 27. 实施方案1-26中任一项的衍生物, 其中x是偶数。
- [0290] 28. 实施方案1-27中任一项的衍生物, 其中x是12。
- [0291] 29. 实施方案1-28中任一项的衍生物, 其中化学式1由化学式1a代表:
- [0292] 化学式1a:



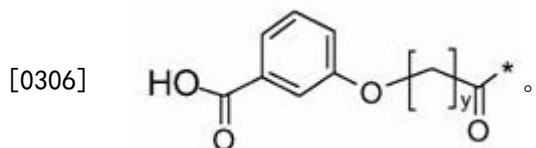
- [0294] 30. 实施方案1-25中任一项的衍生物, 其中延长部分是化学式2。
- [0295] 31. 实施方案1-25和30中任一项的衍生物, 其中化学式2由化学式2a代表:
- [0296] 化学式2a:



- [0298] 32. 实施方案1-25和30-31中任一项的衍生物, 其中y是奇数。
- [0299] 33. 实施方案1-25和30-32中任一项的衍生物, 其中y是9-11范围内的整数。
- [0300] 34. 实施方案1-25和30-33中任一项的衍生物, 其中y是9。
- [0301] 35. 实施方案1-25和30-33中任一项的衍生物, 其中y是11。
- [0302] 36. 实施方案1-25和30-35中任一项的衍生物, 其中化学式2由化学式2b或化学式2c代表:
- [0303] 化学式2b:



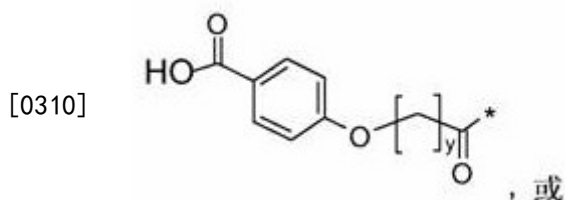
- [0305] 化学式2c:



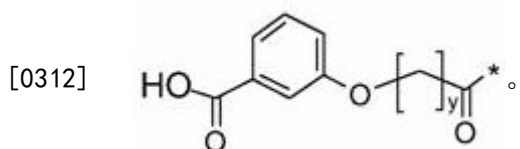
[0307] 37. 实施方案1-25和30-35中任一项的衍生物, 其中化学式2由化学式2b代表。

[0308] 38. 实施方案31-35中任一项的衍生物, 其中化学式2a由化学式2b或化学式2c代表:

[0309] 化学式2b:



[0311] 化学式2c:



[0313] 39. 实施方案31-35和38中任一项的衍生物, 其中化学式2a由化学式2b代表。

[0314] 40. 实施方案1-39中任一项的衍生物, 其中化学式5是第一接头元件。

[0315] 41. 实施方案1-40中任一项的衍生物, 其中k是1。

[0316] 42. 实施方案1-41中任一项的衍生物, 其中n是1。

[0317] 43. 实施方案1-42中任一项的衍生物, 其中化学式5被包括m次, 其中m是1-10范围内的整数。

[0318] 44. 实施方案43的衍生物, 其中所述m是2。

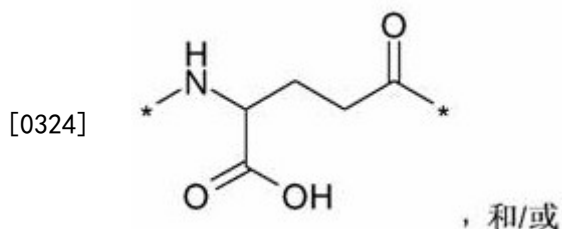
[0319] 45. 实施方案43-44中任一项的衍生物, 其中当m不是1时, 所述化学式5元件经由酰胺键互相连接。

[0320] 46. 实施方案1-45中任一项的衍生物, 其中所述接头进一步包含第二接头元件。

[0321] 47. 实施方案46的衍生物, 其中所述第二接头元件是Glu二基。

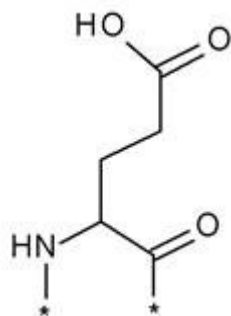
[0322] 48. 实施方案46-47中任一项的衍生物, 其中所述第二接头元件选自化学式6 和/或 化学式7:

[0323] 化学式6:



[0325] 化学式7:

[0326]



- [0327] 49. 实施方案48的衍生物, 其中所述第二接头元件是化学式6。
- [0328] 50. 实施方案46-49中任一项的衍生物, 其中Glu二基被包括p次, 其中p是1-2范围内的整数。
- [0329] 51. 实施方案50的衍生物, 其中p是1。
- [0330] 52. 实施方案50的衍生物, 其中p是2。
- [0331] 53. 实施方案46-52中任一项的衍生物, 其中所述Glu二基是L-Glu的基团。
- [0332] 54. 实施方案46-53中任一项的衍生物, 其中一个或多个Glu二基和一个或多个化学式5元件经由酰胺键相互连接。
- [0333] 55. 实施方案46-54中任一项的衍生物, 其中所述接头由m次化学式5和p次Glu二基组成。
- [0334] 56. 实施方案55的衍生物, 其中(m,p)是(2,2)或(2,1)。
- [0335] 57. 实施方案56的衍生物, 其中(m,p)是(2,1)。
- [0336] 58. 实施方案55-57中任一项的衍生物, 其中m次化学式5元件和p次Glu二基经由酰胺键互相连接。
- [0337] 59. 实施方案1-58中任一项的衍生物, 其中所述接头和所述延长部分经由酰胺键互相连接。
- [0338] 60. 实施方案1-59中任一项的衍生物, 其中所述接头和所述GLP-1类似物经由酰胺键互相连接。
- [0339] 61. 实施方案1-60中任一项的衍生物, 其中所述接头连接到第一或第二K残基的 ϵ -氨基。
- [0340] 62. 实施方案1-61中任一项的衍生物, 其中所述接头具有5-41个C原子。
- [0341] 63. 实施方案1-62中任一项的衍生物, 其中所述接头具有17或22个C原子。
- [0342] 64. 实施方案1-63中任一项的衍生物, 其中所述接头具有17个C原子。
- [0343] 65. 实施方案1-63中任一项的衍生物, 其中所述接头具有22个C原子。
- [0344] 66. 实施方案1-65的衍生物, 其中所述接头具有4-28个杂原子。
- [0345] 67. 实施方案1-66中任一项的衍生物, 其中所述接头具有12或16个杂原子。
- [0346] 68. 实施方案1-67中任一项的衍生物, 其中所述接头具有12个杂原子。
- [0347] 69. 实施方案1-67中任一项的衍生物, 其中所述接头具有16个杂原子。
- [0348] 70. 实施方案66-70中任一项的衍生物, 其中所述杂原子是N-和/或O-原子。
- [0349] 71. 实施方案1-70中任一项的衍生物, 其中所述接头具有1-7个N原子。
- [0350] 72. 实施方案1-71中任一项的衍生物, 其中所述接头具有3或4个N原子。
- [0351] 73. 实施方案1-72中任一项的衍生物, 其中所述接头具有3个N原子。

- [0352] 74. 实施方案1-72中任一项的衍生物,其中所述接头具有4个N原子。
- [0353] 75. 实施方案1-74中任一项的衍生物,其中所述接头具有3-21个O原子。
- [0354] 76. 实施方案1-75中任一项的衍生物,其中所述接头具有9或12个O原子。
- [0355] 77. 实施方案1-76中任一项的衍生物,其中所述接头具有9个O原子。
- [0356] 78. 实施方案1-76中任一项的衍生物,其中所述接头具有12个O原子。
- [0357] 79. 实施方案1-78中任一项的衍生物,其中所述接头由经由酰胺键相互连接的2次化学式6和2次化学式5组成,并且在所示序列中所述接头在其*-NH端与所述延长部分的*-C0端连接,和在其*-C0端与GLP-1类似物的K²⁷或K^T的ε氨基连接。
- [0358] 80. 实施方案1-78中任一项的衍生物,其中所述接头由经由酰胺键相互连接的2次化学式5和1次化学式6组成,并且在所示序列中所述接头在其*-NH端与所述延长部分的*-C0端连接,和在其游离*-C0端与GLP-1类似物的K²⁷或K^T的ε氨基连接。
- [0359] 81. 实施方案1-78中任一项的衍生物,其中所述接头由经由酰胺键相互连接的1次化学式6和2次化学式5组成,并且在所示序列中所述接头在其*-NH端与所述延长部分的*-C0端连接,和在其*-C0端与GLP-1类似物的K²⁷或K^T的ε氨基连接。
- [0360] 82. 实施方案1-78中任一项的衍生物,其中所述接头由经由酰胺键相互连接的1次化学式6、2次化学式5和1次化学式6组成,并且在所示序列中所述接头在其*-NH端与所述延长部分的*-C0端连接,和在其*-C0端与GLP-1类似物的K²⁷或K^T的ε氨基连接。
- [0361] 83. 实施方案1-82中任一项的衍生物,其中所述两个延长部分基本相同。
- [0362] 84. 实施方案1-83中任一项的衍生物,其中所述两个延长部分a) 至少80%、b) 至少85%、c) 至少90%、d) 至少95%或e) 至少99%相同。
- [0363] 85. 实施方案1-83中任一项的衍生物,其中所述两个延长部分具有a) 至少0.5; b) 至少0.6; c) 至少0.7, d) 至少0.8; e) 至少0.9; 或f) 至少0.99的相似性。
- [0364] 86. 实施方案1-85中任一项的衍生物,其中所述两个延长部分具有1.0的相似性。
- [0365] 87. 实施方案1-86中任一项的衍生物,其中所述两个接头基本相同。
- [0366] 88. 实施方案1-87中任一项的衍生物,其中所述两个接头具有至少0.5的相似性。
- [0367] 89. 实施方案1-88中任一项的衍生物,其中所述两个接头具有a) 至少0.6; b) 至少0.7, c) 至少0.8; d) 至少0.9; 或e) 至少0.99的相似性。
- [0368] 90. 实施方案1-89中任一项的衍生物,其中所述两个接头具有1.0的相似性。
- [0369] 91. 实施方案1-90中任一项的衍生物,其中所述两个白蛋白结合剂,诸如由延长部分和接头组成的两条侧链,基本相同。
- [0370] 92. 实施方案1-91中任一项的衍生物,其中所述两个白蛋白结合剂,诸如由延长部分和接头组成的两条侧链, a) 至少80%、b) 至少85%、c) 至少90%、d) 至少95%、或e) 至少99%相同。
- [0371] 93. 实施方案1-92中任一项的衍生物,其中所述两个白蛋白结合剂,诸如由延长部分和接头组成的两条侧链,具有 a) 至少0.5; b) 至少0.6; c) 至少0.7, d) 至少0.8; e) 至少0.9; 或f) 至少0.99的相似性。
- [0372] 94. 实施方案1-92中任一项的衍生物,其中所述两个白蛋白结合剂,诸如由延长部分和接头组成的两条侧链,具有1.0的相似性。
- [0373] 95. 实施方案83-94中任一项的衍生物,其中待比较的2个化学结构被表示为指纹。

[0374] 96. 实施方案95的衍生物, 其中所述指纹是a) ECFP₆ 指纹; b) UNITY指纹; 和/或 c) MDL指纹。

[0375] 97. 实施方案95-96中任一项的衍生物, 其中优选使用Tanimoto系数来计算2个指纹的相似性或同一性。

[0376] 98. 实施方案1-97中任一项的衍生物, 其中通过书写和目测来识别与GLP-1 (7-37) (SEQ ID NO: 1) 相比的氨基酸改变的数量。

[0377] 99. 实施方案1-98中任一项的衍生物, 其中通过使用标准蛋白或肽比对程序来识别与GLP-1 (7-37) (SEQ ID NO: 1) 相比的氨基酸改变的数量。

[0378] 100. 实施方案99的衍生物, 其中所述比对程序是Needleman-Wunsch比对。

[0379] 101. 实施方案99-100中任一项的衍生物, 其中使用默认评分矩阵和默认特性矩阵。

[0380] 102. 实施方案99-101中任一项的衍生物, 其中所述评分矩阵是BLOSUM62。

[0381] 103. 实施方案99-102中任一项的衍生物, 其中空位中第一残基的罚分是 -10 (负十)。

[0382] 104. 实施方案99-103中任一项的衍生物, 其中空位中额外残基的罚分是 -0.5 (负零点五)。

[0383] 105. 实施方案1-104中任一项的衍生物, 其中所述氨基酸改变是在对应于GLP-1 (7-37) (SEQ ID NO: 1) 的以下位置的一个或多个位置: 8、12、20、22、23、24、25、26、27、30、31、34、35、36、37、38和39。

[0384] 106. 实施方案1-105中任一项的衍生物, 其中所述类似物包含至少一个以下变化: Aib⁸、K¹²、K²⁰、E²²或K²²、E²³、K²⁴、V²⁵、R²⁶或H²⁶、K²⁷、E³⁰、H³¹、G³⁴或R³⁴或Q³⁴、Des³⁵、K³⁶或Des³⁶、K³⁷或Des³⁷、E³⁸或Q³⁸、和/或 G³⁹。

[0385] 107. 实施方案1-106中任一项的衍生物, 其中所述第二K残基是K¹²且其中所述类似物, 除了变化K²⁷, 进一步包含i) 选自G³⁴、R³⁴、和Q³⁴的变化, 和ii) 选自R²⁶和H²⁶的变化。

[0386] 108. 实施方案1-106中任一项的衍生物, 其中所述第二K残基是K²⁰且其中所述类似物, 除了变化K²⁷, 进一步包含i) 选自G³⁴、R³⁴、和Q³⁴的变化, 和ii) 选自R²⁶和H²⁶的变化。

[0387] 109. 实施方案1-106中任一项的衍生物, 其中所述第二K残基是K²²且其中所述类似物, 除了变化K²⁷, 进一步包含i) 选自G³⁴、R³⁴、和Q³⁴的变化, 和ii) 选自R²⁶和H²⁶的变化。

[0388] 110. 实施方案1-106中任一项的衍生物, 其中所述第二K残基是K²⁴且其中所述类似物, 除了变化K²⁷, 进一步包含i) 选自G³⁴、R³⁴、和Q³⁴的变化, 和ii) 选自R²⁶和H²⁶的变化。

[0389] 111. 实施方案1-106中任一项的衍生物, 其中所述第二K残基是K³⁶且其中所述类似物, 除了变化K²⁷, 进一步包含i) 选自G³⁴、R³⁴、和Q³⁴的变化, 和ii) 选自R²⁶和H²⁶的变化。

[0390] 112. 实施方案1-106中任一项的衍生物, 其中所述第二K残基是K³⁷且其中所述类似物, 除了变化K²⁷, 进一步包含i) 选自G³⁴、R³⁴、和Q³⁴的变化, 和ii) 选自R²⁶和H²⁶的变化。

[0391] 113. 实施方案1-112中任一项的衍生物, 其中所述类似物包含至少一个以下变化: Aib⁸、E²²、E²³、V²⁵、E³⁰、H³¹、Des³⁵、Des³⁶、Des³⁷、E³⁸或Q³⁸、和/或 G³⁹。

[0392] 114. 实施方案1-113中任一项的衍生物, 其中所述类似物包含Aib⁸。

[0393] 115. 实施方案1-114中任一项的衍生物, 其中所述类似物包含E²²。

[0394] 116. 实施方案1-115中任一项的衍生物, 其中所述类似物包含E²³。

- [0395] 117. 实施方案1-116中任一项的衍生物,其中所述类似物包含V²⁵。
- [0396] 118. 实施方案1-117中任一项的衍生物,其中所述类似物包含E³⁰。
- [0397] 119. 实施方案1-118中任一项的衍生物,其中所述类似物包含H³¹。
- [0398] 120. 实施方案1-119中任一项的衍生物,其中所述类似物包含Des³⁷。
- [0399] 121. 实施方案120的衍生物,其中所述类似物包含Des³⁶。
- [0400] 122. 实施方案121中任一项的衍生物,其中所述类似物包含Des³⁵。
- [0401] 123. 实施方案1-119中任一项的衍生物,其中所述类似物包含E³⁸或Q³⁸。
- [0402] 124. 实施方案123的衍生物,其中所述类似物包含Q³⁸。
- [0403] 125. 实施方案123的衍生物,其中所述类似物包含E³⁸。
- [0404] 126. 实施方案123-125中任一项的衍生物,其中所述类似物包含G³⁹。
- [0405] 127. 实施方案122的衍生物,其是GLP-1 (7-34) (SEQ ID NO: 1的氨基酸1-28) 的衍生物。
- [0406] 128. 实施方案121的衍生物,其是GLP-1 (7-35) (SEQ ID NO: 1的氨基酸1-29) 的衍生物。
- [0407] 129. 实施方案120的衍生物,其是GLP-1 (7-36) (SEQ ID NO: 1的氨基酸1-30) 的衍生物。
- [0408] 130. 实施方案1-119中任一项的衍生物,其是GLP-1 (7-37) (SEQ ID NO: 1的氨基酸1-31) 的衍生物。
- [0409] 131. 实施方案123-125中任一项的衍生物,其是GLP-1 (7-38) (SEQ ID NO: 1的氨基酸1-31,加1个C-末端添加的氨基酸残基) 的衍生物。
- [0410] 132. 实施方案126中任一项的衍生物,其是GLP-1 (7-39) (SEQ ID NO: 1的氨基酸1-31,加两个C-末端添加的氨基酸残基) 的衍生物。
- [0411] 133. 实施方案1-132中任一项的衍生物,其中所述类似物具有最多9个氨基酸改变。
- [0412] 134. 实施方案1-132中任一项的衍生物,其中所述类似物具有最多8个氨基酸改变。
- [0413] 135. 实施方案1-132中任一项的衍生物,其中所述类似物具有最多7个氨基酸改变。
- [0414] 136. 实施方案1-132中任一项的衍生物,其中所述类似物具有最多6个氨基酸改变。
- [0415] 137. 实施方案1-132中任一项的衍生物,其中所述类似物具有最多5个氨基酸改变。
- [0416] 138. 实施方案1-132中任一项的衍生物,其中所述类似物具有最多4个氨基酸改变。
- [0417] 139. 实施方案1-132中任一项的衍生物,其中所述类似物具有最多3个氨基酸改变。
- [0418] 140. 实施方案1-132中任一项的衍生物,其中所述类似物具有最多2个氨基酸改变。
- [0419] 141. 实施方案1-132中任一项的衍生物,其中所述类似物具有最多1个氨基酸改

变。

[0420] 142. 实施方案1-140中任一项的衍生物, 其中所述类似物具有最少1个氨基酸改变。

[0421] 143. 实施方案1-139中任一项的衍生物, 其中所述类似物具有最少2个氨基酸改变。

[0422] 144. 实施方案1-138中任一项的衍生物, 其中所述类似物具有最少3个氨基酸改变。

[0423] 145. 实施方案1-137中任一项的衍生物, 其中所述类似物具有最少4个氨基酸改变。

[0424] 146. 实施方案1-136中任一项的衍生物, 其中所述类似物具有最少5个氨基酸改变。

[0425] 147. 实施方案1-135中任一项的衍生物, 其中所述类似物具有最少6个氨基酸改变。

[0426] 148. 实施方案1-134中任一项的衍生物, 其中所述类似物具有最少7个氨基酸改变。

[0427] 149. 实施方案1-133中任一项的衍生物, 其中所述类似物具有最少8个氨基酸改变。

[0428] 150. 实施方案1-132中任一项的衍生物, 其中所述类似物具有最少9个氨基酸改变。

[0429] 151. 实施方案1-132中任一项的衍生物, 其中所述类似物具有1个氨基酸改变。

[0430] 152. 实施方案1-132中任一项的衍生物, 其中所述类似物具有2个氨基酸改变。

[0431] 153. 实施方案1-132中任一项的衍生物, 其中所述类似物具有3个氨基酸改变。

[0432] 154. 实施方案1-132中任一项的衍生物, 其中所述类似物具有4个氨基酸改变。

[0433] 155. 实施方案1-132中任一项的衍生物, 其中所述类似物具有5个氨基酸改变。

[0434] 156. 实施方案1-132中任一项的衍生物, 其中所述类似物具有6个氨基酸改变。

[0435] 157. 实施方案1-132中任一项的衍生物, 其中所述类似物具有7个氨基酸改变。

[0436] 158. 实施方案1-132中任一项的衍生物, 其中所述类似物具有8个氨基酸改变。

[0437] 159. 实施方案1-132中任一项的衍生物, 其中所述类似物具有9个氨基酸改变。

[0438] 160. 实施方案1-132中任一项的衍生物, 其中所述类似物具有10个氨基酸改变。

[0439] 161. 实施方案1-160中任一项的衍生物, 其中所述一个或多个改变是独立地取代、添加和/或缺失。

[0440] 162. 实施方案1-161中任一项的衍生物, 其中所述类似物包含式I的GLP-1类似物:

式I: Xaa₇-Xaa₈-Glu-Gly-Thr-Xaa₁₂-Thr-Ser-Asp-Xaa₁₆-Ser-Xaa₁₈-Xaa₁₉-Xaa₂₀-

[0441] Glu-Xaa₂₂-Xaa₂₃-Xaa₂₄-Xaa₂₅-Xaa₂₆-Lys-Phe-Ile-Xaa₃₀-Xaa₃₁-Leu-Val-Xaa₃₄-Xaa₃₅-Xaa₃₆-Xaa₃₇-Xaa₃₈-Xaa₃₉, 其中

[0442] Xaa₇是L-组氨酸、咪唑并丙酰基、 α -羟基-组氨酸、D-组氨酸、脱氨基-组氨酸、2-氨基-组氨酸、 β -羟基-组氨酸、高组氨酸、N^α-乙酰基-组氨酸、N^α-甲酰基-组氨酸、 α -氟甲基-组氨酸、 α -甲基-组氨酸、3-吡啶基丙氨酸、2-吡啶基丙氨酸、或4-吡啶基丙氨酸;

[0443] Xaa₈是Ala、Gly、Val、Leu、Ile、Thr、Ser、Lys、Aib、(1-氨基环丙基)甲酸、(1-氨基

环丁基) 甲酸、(1-氨基环戊基) 甲酸、(1-氨基环己基) 甲酸、(1-氨基环庚基) 甲酸或(1-氨基环辛基) 甲酸;

[0444] Xaa₁₂是Lys或Phe;

[0445] Xaa₁₆是Val或Leu;

[0446] Xaa₁₈是Ser、Arg、Asn、Gln、或Glu;

[0447] Xaa₁₉是Tyr或Gln;

[0448] Xaa₂₀是Leu、Lys、或Met;

[0449] Xaa₂₂是Gly、Glu、Lys、或Aib;

[0450] Xaa₂₃是Gln、Glu、或Arg;

[0451] Xaa₂₄是Ala或Lys;

[0452] Xaa₂₅是Ala或Val;

[0453] Xaa₂₆是Val、His、或Arg;

[0454] Xaa₃₀是Ala、Glu、或Arg;

[0455] Xaa₃₁是Trp或His;

[0456] Xaa₃₄是Glu、Asn、Gly、Gln、或Arg;

[0457] Xaa₃₅是Gly、Aib、或不存在;

[0458] Xaa₃₆是Arg、Gly、Lys、或不存在;

[0459] Xaa₃₇是Gly、Ala、Glu、Pro、Lys、Arg、或不存在;

[0460] Xaa₃₈是Ser、Gly、Ala、Glu、Gln、Pro、Arg、或不存在;且

[0461] Xaa₃₉是Gly或不存在。

[0462] 163. 实施方案162的衍生物, 其中所述类似物是式I的GLP-1类似物。

[0463] 164. 实施方案162-163中任一项的衍生物, 其中式I的肽是GLP-1 (7-37) (SEQ ID NO: 1) 的类似物。

[0464] 165. 实施方案162-164中任一项的衍生物, 其中如果Xaa₃₈不存在, 则Xaa₃₉也不存在。

[0465] 166. 实施方案162-165中任一项的衍生物, 其中如果Xaa₃₇不存在, 则Xaa₃₈和Xaa₃₉也不存在。

[0466] 167. 实施方案162-166中任一项的衍生物, 其中如果Xaa₃₆不存在, 则Xaa₃₇、Xaa₃₈和Xaa₃₉也不存在。

[0467] 168. 实施方案162-167中任一项的衍生物, 其中如果Xaa₃₅不存在, 则Xaa₃₆、Xaa₃₇、Xaa₃₈和Xaa₃₉也不存在。

[0468] 169. 实施方案162-168中任一项的衍生物, 其中Xaa₇是His; Xaa₈是Ala或Aib; Xaa₁₂是Lys或Phe; Xaa₁₆是Val; Xaa₁₈是Ser; Xaa₁₉是Tyr; Xaa₂₀是Leu或Lys; Xaa₂₂是Glu、Gly或Lys; Xaa₂₃是Gln或Glu; Xaa₂₄是Ala或Lys; Xaa₂₅是Ala或Val; Xaa₂₆是His或Arg; Xaa₃₀是Ala或Glu; Xaa₃₁是Trp或His; Xaa₃₄是Gly、Gln或Arg; Xaa₃₅是Gly或不存在; Xaa₃₆是Arg、Lys或不存在; Xaa₃₇是Gly、Lys、或不存在; Xaa₃₈是Glu或Gln; 且Xaa₃₉是Gly或不存在。

[0469] 170. 实施方案162-169中任一项的衍生物, 其中Xaa₇是His。

[0470] 171. 实施方案162-170中任一项的衍生物, 其中Xaa₈是Ala。

[0471] 172. 实施方案162-170中任一项的衍生物, 其中Xaa₈是Aib。

- [0472] 173. 实施方案162-172中任一项的衍生物, 其中Xaa₁₂是Lys。
- [0473] 174. 实施方案162-172中任一项的衍生物, 其中Xaa₁₂是Phe。
- [0474] 175. 实施方案162-174中任一项的衍生物, 其中Xaa₁₆是Val。
- [0475] 176. 实施方案162-175中任一项的衍生物, 其中Xaa₁₈是Ser。
- [0476] 177. 实施方案162-176中任一项的衍生物, 其中Xaa₁₉是Tyr。
- [0477] 178. 实施方案162-177中任一项的衍生物, 其中Xaa₂₀是Leu。
- [0478] 179. 实施方案162-177中任一项的衍生物, 其中Xaa₂₀是Lys。
- [0479] 180. 实施方案162-179中任一项的衍生物, 其中Xaa₂₂是Glu。
- [0480] 181. 实施方案162-179中任一项的衍生物, 其中Xaa₂₂是Gly。
- [0481] 182. 实施方案162-179中任一项的衍生物, 其中Xaa₂₂是Lys。
- [0482] 183. 实施方案162-182中任一项的衍生物, 其中Xaa₂₃是Gln。
- [0483] 184. 实施方案162-182中任一项的衍生物, 其中Xaa₂₃是Glu。
- [0484] 185. 实施方案162-184中任一项的衍生物, 其中Xaa₂₄是Ala。
- [0485] 186. 实施方案162-184中任一项的衍生物, 其中Xaa₂₄是Lys。
- [0486] 187. 实施方案162-186中任一项的衍生物, 其中Xaa₂₅是Ala。
- [0487] 188. 实施方案162-186中任一项的衍生物, 其中Xaa₂₅是Val。
- [0488] 189. 实施方案162-188中任一项的衍生物, 其中Xaa₂₆是His。
- [0489] 190. 实施方案162-188中任一项的衍生物, 其中Xaa₂₆是Arg。
- [0490] 191. 实施方案162-190中任一项的衍生物, 其中Xaa₃₀是Ala。
- [0491] 192. 实施方案162-190中任一项的衍生物, 其中Xaa₃₀是Glu。
- [0492] 193. 实施方案162-192中任一项的衍生物, 其中Xaa₃₁是Trp。
- [0493] 194. 实施方案162-192中任一项的衍生物, 其中Xaa₃₁是His。
- [0494] 195. 实施方案162-194中任一项的衍生物, 其中Xaa₃₄是Gly。
- [0495] 196. 实施方案162-194中任一项的衍生物, 其中Xaa₃₄是Gln。
- [0496] 197. 实施方案162-194中任一项的衍生物, 其中Xaa₃₄是Arg。
- [0497] 198. 实施方案162-197中任一项的衍生物, 其中Xaa₃₅是Gly。
- [0498] 199. 实施方案162-198中任一项的衍生物, 其中Xaa₃₅不存在。
- [0499] 200. 实施方案162-199中任一项的衍生物, 其中Xaa₃₆是Arg。
- [0500] 201. 实施方案162-199中任一项的衍生物, 其中Xaa₃₆是Lys。
- [0501] 202. 实施方案162-199中任一项的衍生物, 其中Xaa₃₆不存在。
- [0502] 203. 实施方案162-202中任一项的衍生物, 其中Xaa₃₇是Gly。
- [0503] 204. 实施方案162-202中任一项的衍生物, 其中Xaa₃₇是Lys。
- [0504] 205. 实施方案162-202中任一项的衍生物, 其中Xaa₃₇不存在。
- [0505] 206. 实施方案162-205中任一项的衍生物, 其中Xaa₃₈是Glu。
- [0506] 207. 实施方案162-205中任一项的衍生物, 其中Xaa₃₈是Gln。
- [0507] 208. 实施方案162-205中任一项的衍生物, 其中Xaa₃₈不存在。
- [0508] 209. 实施方案162-208中任一项的衍生物, 其中Xaa₃₉是Gly。
- [0509] 210. 实施方案162-208中任一项的衍生物, 其中Xaa₃₉不存在。
- [0510] 211. 实施方案1-210中任一项的衍生物, 其中所述衍生物与GLP-1 (7-37) (SEQ ID

NO:1) 相比包含以下氨基酸改变: (i) 22E, 26R,

- [0511] 27K, 34R, 37K; (ii) 22E, 26R, 27K, 30E, 34R, 36K, 38E, 39G; (iii) 22E, 26R, 27K, 34R, 36K, des37; (iv) 22E, 25V, 26R, 27K, 34R, 37K; (v) 8Aib, 20K, 22E, 26R, 27K, 30E, 34G, des35-37; (vi) 26R, 27K, 30E, 34R, 36K, 38E; (vii) 8Aib, 22K, 25V, 26R, 27K, 31H, 34R; (iix) 8Aib, 22K, 25V, 26R, 27K, 34R, des35-37; (ix) 8Aib, 22K, 25V, 26R, 27K, 34R, des36-37; (x) 26H, 27K, 30E, 34R, 36K, 38E; (xi) 22K, 25V, 26R, 27K, 30E, 34Q; (xii) 25V, 26R, 27K, 30E, 34R, 36K, 38Q; (xiii) 25V, 26R, 27K, 30E, 34Q, 36K, 38E; (xiv) 22K, 26R, 27K, 31H, 34G, des35-37; (xv) 8Aib, 25V, 26R, 27K, 31H, 34Q, 37K; (xvi) 25V, 26R, 27K, 31H, 34Q, 37K; (xvii) 22E, 23E, 25V, 26R, 27K, 31H, 34Q, 37K; (iixx) 8Aib, 12K, 22E, 26R, 27K, 31H, 34Q; (ixx) 8Aib, 22K, 26R, 27K, 31H, 34G, des35-37; (xx) 22E, 26H, 27K, 30E, 34R, 36K, 38E; (xxi) 22E, 24K, 26R, 27K, 31H, 34G, des35-37; (xxii) 25V, 26R, 27K, 34Q, 36K; (xxiii) 22E, 24K, 25V, 26R, 27K, 31H, 34R; (xxiv) 22E, 24K, 25V, 26R, 27K, 34G, des35-37; (xxv) 22E, 24K, 25V, 26R, 27K, 34R; (xxvi) 8Aib, 22E, 24K, 25V, 26R, 27K, 31H, 34Q; 或 (xxvii) 8Aib, 22E, 26R, 27K, 30E, 34R, 36K, 38E, 39G。
- [0512] 22E, 24K, 26R, 27K, 31H, 34G, des35-37; (xxii) 25V, 26R, 27K, 34Q, 36K; (xxiii) 22E, 24K, 25V, 26R, 27K, 31H, 34R; (xxiv) 22E, 24K, 25V, 26R, 27K, 34G, des35-37; (xxv) 22E, 24K, 25V, 26R, 27K, 34R; (xxvi) 8Aib, 22E, 24K, 25V, 26R, 27K, 31H, 34Q; 或 (xxvii) 8Aib, 22E,
- [0513] 26R, 27K, 30E, 34R, 36K, 38E, 39G。

[0514] 212. 实施方案211的衍生物, 其中所述类似物具有如(i) - (xxvii) 中任一项定义的一组氨基酸改变。

[0515] 213. 选自下列的化合物: 化学式50、化学式51、化学式52、化学式53、化学式54、化学式55、化学式56、化学式57、化学式58、化学式59、化学式60、化学式61、化学式62、化学式63、化学式64、化学式65、化学式66、化学式67、化学式68、化学式69、化学式70、化学式71、化学式72、化学式73、化学式74、化学式75、化学式76、化学式77、化学式78、化学式79、化学式80和化学式81; 或其药学可接受的盐、酰胺或酯。

[0516] 214. 实施方案213的化合物, 其是根据实施方案1-212中任一项所述的化合物。

[0517] 215. 一种化合物, 其特征在于其名称, 且选自本文实施例1-32化合物的各名称列表或其药学可接受的盐、酰胺或酯。

[0518] 216. 实施方案215的化合物, 其是根据实施方案1-214中任一项所述的化合物。

[0519] 217. 实施方案1-216中任一项的衍生物, 其具有GLP-1活性。

[0520] 218. 实施方案217的衍生物, 其中GLP-1活性是指活化人GLP-1受体的能力。

[0521] 219. 实施方案217的衍生物, 其中在体外测定中测定人GLP-1受体的活化。

[0522] 220. 实施方案217-219中任一项的衍生物, 其中测定人GLP-1受体的活化作为cAMP产生的功效。

[0523] 221. 实施方案217-220中任一项的衍生物, 其功效对应于以下EC₅₀

[0524] a) 低于10000 pM, 更优选低于5000 pM, 甚至更优选低于4000 pM, 或最优选低于3000 pM;

[0525] b) 低于2000 pM, 优选低于1500 pM, 更优选低于1200 pM, 甚至更优选低于1000 pM, 或最优选低于500 pM;

[0526] c) 低于400 pM, 优选低于300 pM, 更优选低于200 pM, 甚至更优选低于150 pM, 或最优选低于100 pM; 或

[0527] d) 低于80 pM, 优选低于60 pM, 更优选低于40 pM, 甚至更优选低于30 pM, 或最优

选低于20 pM。

[0528] 222.实施方案217-221中任一项的衍生物,其中对于剂量-反应曲线,功效测定为EC₅₀,显示在含有人GLP-1受体的培养基中cAMP的剂量依赖性形成。

[0529] 223.实施方案219-222中任一项的衍生物,其中稳定转染的细胞系诸如BHK467-12A (tk-ts13)。

[0530] 224.实施方案219-223中任一项的衍生物,其中用于测定cAMP的功能性受体测定。

[0531] 225.实施方案219-224中任一项的衍生物,其中所述测定基于内源形成的cAMP与外源添加的生物素-标记的cAMP之间的竞争。

[0532] 226.实施方案219-225中任一项的衍生物,在所述测定中使用特异性抗体捕获cAMP。

[0533] 227.实施方案219-226中任一项的衍生物,其中所述测定是AlphaScreen cAMP测定。

[0534] 228.实施方案219-227中任一项的衍生物,其中所述测定描述于实施例33。

[0535] 229.实施方案217-228中任一项的衍生物,其中所述人GLP-1受体的活化被测量为在低白蛋白浓度存在的情况下与受体结合的能力,其中所述低白蛋白浓度为0.005% HSA,或优选0.001% HSA。

[0536] 230.实施方案217-229中任一项的衍生物,其比率[在2.0% HSA (高白蛋白)存在下的GLP-1受体结合亲和力(IC₅₀),除以在0.001% HSA (低白蛋白)存在下的GLP-1受体结合亲和力(IC₅₀)]为:

[0537] a) 至少 1.0,更优选至少 10,甚至更优选至少 25,或最优选至少 50;

[0538] b) 至少 60,优选至少 70,更优选至少 80,甚至更优选至少 90,或最优选至少 100;

[0539] c) 至少 125,优选至少 150,更优选至少 200,仍更优选至少 250,甚至更优选至少 400,或最优选至少 500;或

[0540] d) 至少 600,优选至少 800,甚至更优选至少 900,或最优选至少 1000。

[0541] 231.实施方案217-230中任一项的衍生物,在0.001% HSA (低白蛋白)存在下其GLP-1受体结合亲和力(IC₅₀)为

[0542] a) 低于1000 nM,优选低于750 nM,更优选低于500 nM,或最优选低于400 nM; 或

[0543] b) 低于300 nM,优选低于250 nM,更优选低于200 nM,或最优选低于100 nM; 或

[0544] c) 低于50.0 nM,优选低于15.0 nM,更优选低于10.0 nM,甚至更优选低于5.0 nM,或最优选低于1.0 nM

[0545] d) 低于0.80 nM,优选低于0.60 nM,更优选低于0.40 nM,甚至更优选低于0.30 nM,或最优选低于0.20 nM。

[0546] 232.实施方案217-231中任一项的衍生物,在2.0% HSA (高白蛋白)存在下其GLP-1受体结合亲和力(IC₅₀)为

[0547] a) 低于1000 nM,更优选低于900 nM,或最优选低于800 nM; 或

[0548] b) 低于500 nM,优选低于400 nM,更优选低于300 nM,甚至更优选低于150 nM,或最优选低于50.0 nM。

[0549] 166.实施方案217-232中任一项的衍生物,其中通过从所述受体中取代¹²⁵I-GLP-1

的方式测定与GLP-1受体的结合亲和力。

[0550] 233. 实施方案217-232中任一项的衍生物,其中使用SPA结合测定。

[0551] 234. 实施方案217-233中任一项的衍生物,其中使用稳定转染的细胞系来制备所述GLP-1受体。

[0552] 235. 实施方案217-234中任一项的衍生物,其中使用仓鼠细胞系,优选幼仓鼠肾细胞系诸如BHK tk-ts13。

[0553] 236. 实施方案229-235中任一项的衍生物,其中所述IC₅₀值测定为从所述受体中取代50% ¹²⁵I-GLP-1的浓度。

[0554] 237. 实施方案1-236中任一项的衍生物,其口服生物利用度、优选绝对口服生物利用度,高于塞马鲁肽。

[0555] 238. 实施方案 237的衍生物,其中在大鼠体内测量口服生物利用度。

[0556] 239. 实施方案237-239中任一项的衍生物,其中口服生物利用度被测量为直接注射到肠腔之后的血浆暴露。

[0557] 240. 实施方案237-239中任一项的衍生物,其中在将所述衍生物溶液注入大鼠空肠后30分钟所测的所述衍生物的血浆浓度(pM),除以注射溶液浓度(μM)(在30 min的剂量校正暴露),为a) 至少 39,b) 至少 40;c) 至少 60;d) 至少 80;e) 至少 100;f) 至少 125;或g) 至少 150。

[0558] 241. 实施方案237-240中任一项的衍生物,其中在将所述衍生物溶液注入大鼠空肠后30分钟所测的所述衍生物的血浆浓度(pM),除以注射溶液浓度(μM)(在30 min的剂量校正暴露),为a) 至少 160,b) 至少 180,c) 至少 200,或d) 至少 250。

[0559] 242. 实施方案237-241中任一项的衍生物,其中在与55 mg/ml癸酸钠的混合物中以1000 uM浓度测定所述GLP-1衍生物。

[0560] 243. 实施方案237-242中任一项的衍生物,其中使用雄性Sprague Dawley大鼠。

[0561] 244. 实施方案237-243中任一项的衍生物,其中大鼠到达时体重为大约 240 g。

[0562] 245. 实施方案237-244中任一项的衍生物,其中所述大鼠在所述实验之前禁食大约 18小时。

[0563] 246. 实施方案237-245中任一项的衍生物,其中在禁食后和在空肠注射所述衍生物之前,对所述大鼠进行常规麻醉。

[0564] 247. 实施方案237-246中任一项的衍生物,其中在空肠的近端部分(十二指肠的10 cm远端)或在中肠(盲肠的50 cm近端)施用所述衍生物。

[0565] 248. 实施方案237-247中任一项的衍生物,其中用注射器,通过导管将100 μl所述衍生物注射到空肠腔内,再用另一注射器将200 μl空气推入空肠腔内,然后让其与导管的连接以防流回到导管中。

[0566] 249. 实施方案237-248中任一项的衍生物,其中在所需时间间隔从尾静脉采集血液样品(200 ul)到EDTA管,诸如在时间0、10、30、60、120和240 min,并在20分钟内在10000G在4℃离心5分钟。

[0567] 250. 实施方案237-249中任一项的衍生物,其中分离血浆(例如,75ul),立即冷冻并保存在-20℃,直到分析所述衍生物的血浆浓度。

[0568] 251. 实施方案 237-250中任一项的衍生物,其中使用LOCI(发光氧通道免疫测

定, Luminescent Oxygen Channeling Immunoassay) 来分析所述衍生物的血浆浓度。

[0569] 252. 实施方案1-251中任一项的衍生物, 其中所述衍生物在db/db小鼠体内有效降低血糖。

[0570] 253. 实施方案1-252中任一项的衍生物, 其中所述衍生物在db/db小鼠体内有效降低体重。

[0571] 254. 实施方案252-253中任一项的衍生物, 其中用合适剂量范围的所述GLP-1衍生物经s.c. 治疗db/db小鼠, 并在合适的间隔测量血糖和/或体重。

[0572] 255. 实施方案252-254中任一项的衍生物, 其中所述GLP-1衍生物的剂量是0.3 nmol/kg、1.0 nmol/kg、3.0 nmol/kg、10 nmol/kg、30 nmol/kg和100 nmol/kg, 其中kg是指小鼠体重。

[0573] 256. 实施方案252-255中任一项的衍生物, 其中用媒介物经s.c. 治疗对照组, 优选溶解了所述GLP-1衍生物的培养基, 例如使用以下组成: 50mM磷酸钠, 145 mM 氯化钠, 0.05%吐温80, pH 7.4。

[0574] 257. 实施方案252-256中任一项的衍生物, 其中测量血糖, 和/或给小鼠称体重, 时间是 $-\frac{1}{2}h$ (给药($t=0$)之前半小时) 以及时间1、2、4和8h。

[0575] 258. 实施方案252-257中任一项的衍生物, 其中用葡萄糖氧化酶方法测定葡萄糖浓度。

[0576] 259. 实施方案252-258中任一项的衍生物, 其中

[0577] (i) ED_{50} (体重(BW)) 计算为以经皮下施用衍生物后8小时 Δ (例如降低) BW达到最大效应的一半的剂量; 和/或

[0578] (ii) ED_{50} (血糖(BG)) 计算为以经皮下施用衍生物后8小时和/或24小时 Δ (例如降低) BG的AUC (曲线下面积) 达到最大效应的一半的剂量。

[0579] 260. 实施方案252-259中任一项的衍生物, 其中存在S形剂量-反应关系, 优选具有明确的最大反应定义。

[0580] 261. 实施方案1-260中任一项的衍生物, 其具有比利拉鲁肽更延长的作用概况。

[0581] 262. 实施方案261的衍生物, 其中延长是指在相关动物物种中的体内半衰期。

[0582] 263. 实施方案261-262中任一项的衍生物, 其中所述动物是a) db/db小鼠、b) 大鼠、c) 猪、和/或、d) 小型猪。

[0583] 264. 实施方案263的衍生物, 其中所述动物是小型猪。

[0584] 265. 实施方案261-264中任一项的衍生物, 其中经以下途径施用所述衍生物: i) s.c., 和/或, ii) i.v.。

[0585] 266. 实施方案1-265中任一项的衍生物, 其中经i.v. 施用所述衍生物。

[0586] 267. 实施方案1-266中任一项的衍生物, 其在经i.v. 施用于小型猪后的终末半衰期($T_{1/2}$) 为

[0587] a) 至少 12小时, 优选至少 24小时, 更优选至少 36小时, 甚至更优选至少 48小时, 或最优选至少 60小时;

[0588] b) 至少 7小时, 优选至少 16小时, 更优选至少 24小时, 甚至更优选至少 30小时, 或最优选至少 40小时;

[0589] c) 至少 50小时, 优选至少 60小时, 更优选至少 70小时, 甚至更优选至少 80小

时,或最优选至少 90小时。

[0590] 268.实施方案264-267中任一项的衍生物,其中所述小型猪是雄性Göttingen小型猪。

[0591] 269.实施方案267-268中任一项的衍生物,其中所述小型猪是7-14月龄。

[0592] 270.实施方案267-269中任一项的衍生物,其中所述小型猪的体重是16-35 kg。

[0593] 271.实施方案267-270中任一项的衍生物,其中将所述小型猪单独饲养和每天喂食1次或2次,优选用SDS小型猪饲料。

[0594] 272.实施方案267-271中任一项的衍生物,其中在至少2周适应之后经i.v.给药所述衍生物。

[0595] 273.实施方案267-272中任一项的衍生物,其中所述动物在给药前禁食大约 18 h并在给药后禁食至少4 h,整个周期内让其随意饮水。

[0596] 274.实施方案267-273中任一项的衍生物,其中将所述GLP-1衍生物溶于50 mM磷酸钠, 145 mM 氯化钠, 0.05%吐温80, pH 7.4中至合适浓度,优选20-60 nmol/ml。

[0597] 275.实施方案267-275中任一项的衍生物,其中静脉内注射所述衍生物,体积对应于1-2 nmol/kg。

[0598] 276.实施方案1-275中任一项的衍生物,其导致猪的饲料摄取下降。

[0599] 277.实施方案276的衍生物,其中与对照相比,所述摄取下降,所述对照优选用媒介物治疗或未经治疗。

[0600] 278.实施方案276-277中任一项的衍生物,其中

[0601] 饲料摄取 (0-24h) 是

[0602] a) 相对于媒介物治疗的对照,90%或以下, b) 优选80% 或以下, c) 更优选70%或以下, d) 甚至更优选60%或以下,或e) 最优选50%或以下。

[0603] 279.实施方案276-278中任一项的衍生物,其中饲料摄取 (0-24h) 是指施用所述衍生物或媒介物之后的前24小时。

[0604] 280.实施方案276-279中任一项的衍生物,其中所述猪是雌性Landrace Yorkshire Duroc (LYD) 猪。

[0605] 281.实施方案276-280中任一项的衍生物,其中所述猪是3月龄。

[0606] 282.实施方案276-281中任一项的衍生物,其中所述猪的体重30-35 kg。

[0607] 283.实施方案276-282中任一项的衍生物,其中将所述动物分组饲养1-2周,让其适应。

[0608] 284.实施方案276-283中任一项的衍生物,其中在实验期间,将所述动物放置在单独围栏中,从周一早晨到周五下午,以测定个体的食物摄取。

[0609] 285.实施方案276-284中任一项的衍生物,其中所述动物随意摄取猪饲料(诸如Svinefoder, Antonio)。

[0610] 286.实施方案276-285中任一项的衍生物,其中通过每15分钟记录饲料重量而在线监测食物摄取,优选使用Mpigwin系统。

[0611] 287.实施方案276-286中任一项的衍生物,其以0.3、1.0、3.0、10或30 nmol/kg浓度给药。

[0612] 288.实施方案276-287中任一项的衍生物,其溶于磷酸缓冲液(50 mM磷酸盐,145

mM 氯化钠, 0.05%吐温80, pH 8), 优选浓度为12、40、120、400或1200 nmol/ml。

[0613] 289. 实施方案276-288中任一项的衍生物, 其中所述磷酸缓冲液用作媒介物。

[0614] 290. 实施方案276-289中任一项的衍生物, 其中在第一天早晨对所述动物给药单次皮下剂量的衍生物或媒介物(优选剂量体积为0.025 ml/kg), 并且给药后测定食物摄取共4天。

[0615] 291. 实施方案1-290中任一项的衍生物, 其在经i.v.施用大鼠后的体内半衰期($T_{1/2}$)为a) 至少4小时, b) 至少6小时, c) 至少8小时, 或d) 至少10小时。

[0616] 292. 实施方案1-291中任一项的衍生物, 其在经i.v.施用大鼠后的体内半衰期($T_{1/2}$)为a) 至少12小时, b) 至少15小时, c) 至少18小时, 或d) 至少20小时。

[0617] 293. 实施方案1-292中任一项的衍生物, 其在经i.v.施用大鼠后的体内半衰期($T_{1/2}$)为a) 至少24小时, b) 至少26小时, 或c) 至少30小时。

[0618] 294. 实施方案291-294中任一项的衍生物, 其中所述大鼠是雄性Sprague Dawley大鼠, 其体重约400g。

[0619] 294. 实施方案238-294中任一项的衍生物, 对于所述衍生物, 测定从时间30至180 min的剂量校正(即, 除以注射衍生物的以pmol计的剂量)的血浆暴露曲线(即以pM计的血浆中的浓度相比于时间)的AUC(即, 结果以(min x pM / pmol)或简单以min/L表示)。

[0620] 295. 实施方案294的衍生物, 其中所述剂量校正的血浆暴露曲线的AUC是

[0621] a) 至少50, 优选至少100, 或更优选至少150 min/L;

[0622] b) 至少200, 优选至少250, 更优选至少300, 或最优选至少320 min/L; 或

[0623] c) 塞马鲁肽的相应AUC值的至少1.5倍, 优选至少2倍, 更优选至少3倍, 或最优选至少4倍。

[0624] 296. 实施方案1-295中任一项的衍生物, 其中在大鼠体内测量口服生物利用度, 作为直接注射到肠腔之后的血浆暴露。

[0625] 297. 实施方案296的衍生物, 随遇所述衍生物, 测定从时间30至180 min的剂量校正(即, 除以施用衍生物的以pmol计的剂量)的血浆暴露曲线(即以pM计的血浆中的浓度相比于时间)的AUC(即, 结果可以以(min x pM / pmol)或简单以min/L表示)。

[0626] 298. 实施方案297的衍生物, 其中所述剂量校正的血浆暴露曲线的AUC是

[0627] a) 至少10, 优选至少20, 或更优选至少30 min/L;

[0628] b) 至少40, 优选至少50, 更优选至少60, 或最优选至少70 min/L; 或

[0629] c) 塞马鲁肽的相应AUC值的至少1.5倍, 优选至少2倍, 更优选至少3倍, 或最优选至少4倍。

[0630] 299. 实施方案294-298中任一项的衍生物, 其中所述GLP-1衍生物在250 mg/ml N-[8-(2-羟基苯甲酰基)氨基]辛酸钠(SNAC)的溶液中以约1000 μ M的浓度进行测试。

[0631] 300. 实施方案294-299中任一项的衍生物, 其中使用雄性Sprague Dawley大鼠, 优选到达时体重为大约240 g。

[0632] 301. 实施方案294-300中任一项的衍生物, 其中所述大鼠在所述实验之前禁食大约18小时。

[0633] 302. 实施方案294-301中任一项的衍生物, 其中分别在禁食后和在空肠注射或口服喂养所述衍生物之前, 对所述大鼠进行常规麻醉。

[0634] 303. 实施方案294-302中任一项的衍生物,其中对于注射到肠腔中,将所述衍生物施用于空肠的近端部分(十二指肠的10 cm远)或中肠(盲肠的50 cm近),优选空肠的近端部分。

[0635] 304. 实施方案294-303中任一项的衍生物,其中用1 ml注射器,通过导管将100 μ l所述衍生物注射到空肠腔内,再用另一注射器将200 μ l空气推入空肠腔内,然后让其与导管的连接以防流回到导管中。

[0636] 305. 实施方案294-304中任一项的衍生物,其中在所需时间间隔从尾静脉采集血液样品(200 μ l)到EDTA管,诸如在时间0、10、30、60、120和240 min,并在20分钟内以10000G在4℃离心5分钟。

[0637] 306. 实施方案294-305中任一项的衍生物,其中分离血浆(例如,75 μ l),立即冷冻并保存在-20℃,直到分析所述衍生物的血浆浓度。

[0638] 307. 实施方案294-306中任一项的衍生物,其中使用LOCI (发光氧通道免疫测定, Luminescent Oxygen Channeling Immunoassay) 来分析所述衍生物的血浆浓度。

[0639] 308. 以GLP-1类似物的形式的中间产物,其与GLP-1(7-37) (SEQ ID NO:1)相比包含以下变化:(i) 38Q;和/或(ii) 39G;或其药学可接受的盐、酰胺或酯。

[0640] 309. 实施方案308的GLP-1类似物,其包含(38E, 39G)。

[0641] 310. 以GLP-1类似物的形式的中间产物,或其药学可接受的盐、酰胺或酯,其与GLP-1(7-37) (SEQ ID NO:1)相比包含以下氨基酸改变: (i) 22E, 26R,

[0642] 27K, 34R, 37K; (ii) 22E, 26R, 27K, 30E, 34R, 36K, 38E, 39G; (iii) 22E, 26R, 27K, 34R, 36K, des37; (iv) 22E, 25V, 26R, 27K, 34R, 37K; (v) 8Aib, 20K, 22E, 26R, 27K, 30E, 34G, des35-37; (vi) 26R, 27K, 30E, 34R, 36K, 38E; (vii) 8Aib, 22K, 25V, 26R, 27K, 31H, 34R; (viii) 8Aib, 22K, 25V, 26R, 27K, 34R, des35-37; (ix) 8Aib, 22K, 25V, 26R, 27K, 34R, des36-37; (x) 26H, 27K, 30E, 34R, 36K, 38E; (xi) 22K, 25V, 26R, 27K, 30E, 34Q; (xii) 25V, 26R, 27K, 30E, 34R, 36K, 38Q; (xiii) 25V, 26R, 27K, 30E, 34Q, 36K, 38E; (xiv) 22K, 26R, 27K, 31H, 34G, des35-37; (xv) 8Aib, 25V, 26R, 27K, 31H, 34Q, 37K; (xvi) 25V, 26R, 27K, 31H, 34Q, 37K; (xvii) 22E, 23E, 25V, 26R, 27K, 31H, 34Q, 37K; (xviii) 8Aib, 12K, 22E, 26R, 27K, 31H, 34Q; (ixx) 8Aib, 22K, 26R, 27K, 31H, 34G, des35-37; (xx) 22E, 26H, 27K, 30E, 34R, 36K, 38E; (xxi) 22E, 24K, 26R, 27K, 31H, 34G, des35-37; (xxii) 25V, 26R, 27K, 34Q, 36K; (xxiii) 22E, 24K, 25V, 26R, 27K, 31H, 34R; (xxiv) 22E, 24K, 25V, 26R, 27K, 34G, des35-37; (xxv) 22E, 24K, 25V, 26R, 27K, 34R; (xxvi) 8Aib, 22E, 24K, 25V, 26R, 27K, 31H, 34Q; 或 (xxvii) 8Aib, 22E, 26R, 27K, 30E, 34R, 36K, 38E, 39G。

[0645] 311. 实施方案310的GLP-类似物,其具有如(i)-(xxvii)中任一项定义的一组氨基酸改变。

[0646] 312. 根据实施方案1-307中任一项的衍生物,其用作药物。

[0647] 313. 根据实施方案1-307中任一项的衍生物,其用于治疗 and/或预防所有形式的糖尿病和相关疾病,诸如进食障碍、心血管疾病、胃肠道疾病、糖尿病并发症、危急病症和/或多囊卵巢综合征;和/或用于改善脂质参数,改善 β 细胞功能,和/或用于延迟或预防糖尿病进程。

[0648] 314.通过施用药物活性量的根据实施方案1-307中任一项的衍生物而治疗或预防所有形式的糖尿病和相关疾病;和/或改善脂质参数,改善 β 细胞功能,和/或延迟或预防糖尿病进程的方法,所述相关疾病诸如进食障碍、心血管疾病、胃肠道疾病、糖尿病并发症、危急病症和/或多囊卵巢综合征。

[0649] 以下是本发明额外具体实施方案:

[0650] 1.GLP-1类似物的衍生物;或其药学可接受的盐、酰胺或酯,

[0651] 所述类似物包含在对应于GLP-1 (7-37) (SEQ ID NO: 1)的位置27的位置上的第一K残基;在对应于GLP-1 (7-37)的位置T 的位置上的第二K残基,其中T是7-37范围内除了18和27以外的整数;以及与GLP-1 (7-37)相比,包含最多10个氨基酸改变;其中所述第一K残基指定为 K^{27} ,且第二K残基指定为 K^T ;

[0652] 所述衍生物包含分别连接到 K^{27} 和 K^T 的两个白蛋白结合部分,其中

[0653] 所述白蛋白结合部分包含选自化学式1和化学式2的延长部分:

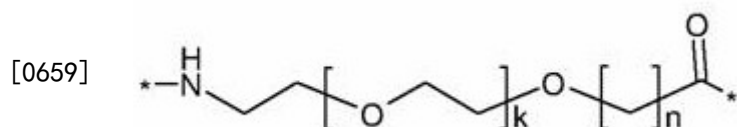
[0654] 化学式1: $\text{HOOC}-(\text{CH}_2)_x-\text{CO}-^*$

[0655] 化学式2: $\text{HOOC}-\text{C}_6\text{H}_4-\text{O}-(\text{CH}_2)_y-\text{CO}-^*$

[0656] 其中x是6-18范围内的整数,y是3-17范围内的整数;

[0657] 前提条件是当延长部分是化学式1时,所述白蛋白结合部分还包含下式化学式5的接头:

[0658] 化学式5:



[0660] 其中k是1-5范围内的整数,n是1-5范围内的整数。

[0661] 2.实施方案1的衍生物;或其药学可接受的盐、酰胺或酯,

[0662] 其中所述GLP-1类似物包含在对应于GLP-1 (7-37) (SEQ ID NO: 1)的位置27的位置上的第一K残基;在对应于GLP-1 (7-37)的位置T 的位置上的第二K残基,其中T是7-37范围内除了18和27以外的整数;以及与GLP-1 (7-37)相比,包含最多10个氨基酸改变;其中所述第一K残基指定为 K^{27} ,且第二K残基指定为 K^T ;

[0663] 所述衍生物包含分别连接到 K^{27} 和 K^T 的两个白蛋白结合部分,其中

[0664] 所述白蛋白结合部分包含化学式2的延长部分:

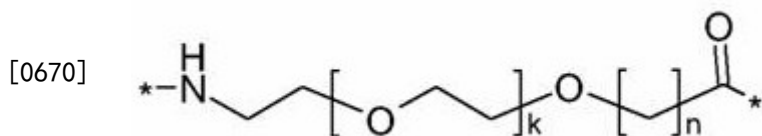
[0665] 化学式2: $\text{HOOC}-\text{C}_6\text{H}_4-\text{O}-(\text{CH}_2)_y-\text{CO}-^*$

[0666] 其中y是3-17范围内的整数。

[0667] 3.上述实施方案中任一项的衍生物,其中所述白蛋白结合部分进一步包含接头。

[0668] 4.上述实施方案中任一项的衍生物,其中所述接头包含i) Glu二基;和/或ii) 式化学式5的接头:

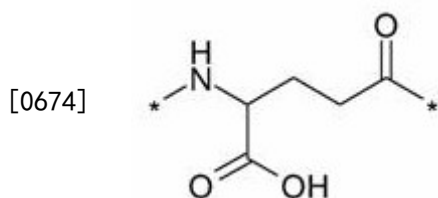
[0669] 化学式5:



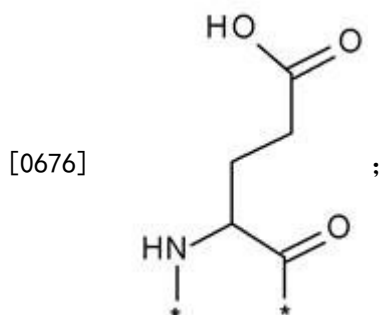
[0671] 其中k是1-5范围内的整数,且n是1-5范围内的整数。

[0672] 5. 上述实施方案中任一项的衍生物,其中所述Glu二基选自化学式6和/或化学式7:

[0673] 化学式6:



[0675] 化学式7:



[0677] 优选化学式6。

[0678] 6. 上述实施方案中任一项的衍生物;或其药学可接受的盐、酰胺或酯,

[0679] 其中所述GLP-1类似物包含在对应于GLP-1 (7-37) (SEQ ID NO: 1) 的位置27的位置上的第一K残基;在对应于GLP-1 (7-37) 的位置T 的位置上的第二K残基,其中T是7-37范围内除了18和27以外的整数;以及与GLP-1 (7-37) 相比,包含最多10个氨基酸改变;其中所述第一K残基指定为K²⁷,且第二K残基指定为K^T;

[0680] 所述衍生物包含分别连接到K²⁷和K^T的两个白蛋白结合部分,其中

[0681] 所述白蛋白结合部分包含:

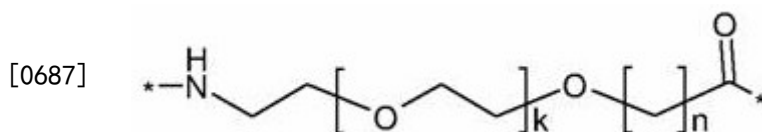
[0682] i) 式化学式1的延长部分:

[0683] 化学式1: $\text{HOOC}-(\text{CH}_2)_x-\text{CO}-^*$

[0684] 其中x是6-18范围内的整数;且

[0685] ii) 式化学式5的接头:

[0686] 化学式5:



[0688] 其中k是1-5范围内的整数,n是1-5范围内的整数。

[0689] 7. 上述实施方案中任一项的衍生物;或其药学可接受的盐、酰胺或酯,

[0690] 其中所述GLP-1类似物包含在对应于GLP-1 (7-37) (SEQ ID NO: 1)的位置27的位置上的第一K残基;在对应于GLP-1 (7-37)的位置T 的位置上的第二K残基,其中T是7-37范围内除了18和27以外的整数;以及与GLP-1 (7-37) 相比,包含最多10个氨基酸改变;其中所述第一K残基指定为K²⁷,且第二K残基指定为K^T;

[0691] 所述衍生物包含分别经由接头连接到K²⁷和K^T的两个延长部分,其中

[0692] 所述延长部分选自化学式1和化学式2:

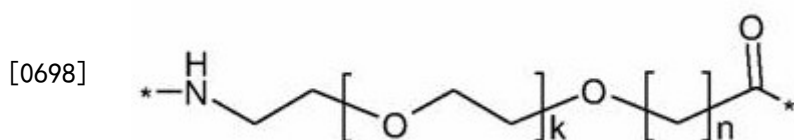
[0693] 化学式1: $\text{HOOC}-(\text{CH}_2)_x-\text{CO}-^*$

[0694] 化学式2: $\text{HOOC}-\text{C}_6\text{H}_4-\text{O}-(\text{CH}_2)_y-\text{CO}-^*$

[0695] 其中x是6-18范围内的整数,y是3-17范围内的整数;且

[0696] 接头包含化学式5:

[0697] 化学式5:



[0699] 其中k是1-5范围内的整数,n是1-5范围内的整数。

[0700] 8. 上述实施方案中任一项的衍生物,其中T是选自7-37范围内除了18和27以外的整数。

[0701] 9. 上述实施方案中任一项的衍生物,其中T选自7-17、19-26和28-37范围内的任何整数。

[0702] 10. 上述实施方案中任一项的衍生物,其中T选自7-17的范围。

[0703] 11. 上述实施方案中任一项的衍生物,其中T是12。

[0704] 12. 上述实施方案中任一项的衍生物,其中T选自19-26的范围。

[0705] 13. 上述实施方案中任一项的衍生物,其中T选自20、22和24。

[0706] 14. 上述实施方案中任一项的衍生物,其中T是20。

[0707] 15. 上述实施方案中任一项的衍生物,其中T是22或24。

[0708] 16. 上述实施方案中任一项的衍生物,其中T是22。

[0709] 17. 上述实施方案中任一项的衍生物,其中T是24。

[0710] 18. 上述实施方案中任一项的衍生物,其中T选自28-37的范围。

[0711] 19. 上述实施方案中任一项的衍生物,其中T选自36和37。

[0712] 20. 上述实施方案中任一项的衍生物,其中T是36。

[0713] 21. 上述实施方案中任一项的衍生物,其中T是37。

[0714] 22. 上述实施方案中任一项的衍生物,其中通过书写和目测来识别对应于GLP-1 (7-37) (SEQ ID NO: 1)的位置27的位置。

[0715] 23. 上述实施方案中任一项的衍生物,通过书写和目测来识别对应于GLP-1 (7-37) (SEQ ID NO: 1)的位置T的位置。

[0716] 24. 上述实施方案中任一项的衍生物,其中通过使用标准蛋白或肽比对程序来识别对应于GLP-1 (7-37) (SEQ ID NO: 1)的位置27的位置。

[0717] 25. 上述实施方案中任一项的衍生物,其中通过使用标准蛋白或肽比对程序来识

别对应于GLP-1 (7-37) (SEQ ID NO: 1)的位置T的位置。

[0718] 26. 上述实施方案中任一项的衍生物, 其中所述比对程序是Needleman-Wunsch比对。

[0719] 27. 上述实施方案中任一项的衍生物, 其中使用默认评分矩阵和默认特性矩阵。

[0720] 28. 上述实施方案中任一项的衍生物, 其中所述评分矩阵是BLOSUM62。

[0721] 29. 上述实施方案中任一项的衍生物, 其中空位中第一残基的罚分是 -10 (负十)。

[0722] 30. 上述实施方案中任一项的衍生物, 其中空位中额外残基的罚分是 -0.5 (负零点五)。

[0723] 31. 上述实施方案中任一项的衍生物, 其中所述类似物除第一和第二K残基之外不含K残基。

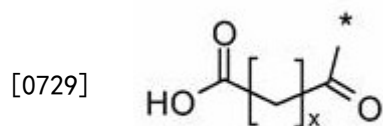
[0724] 32. 上述实施方案中任一项的衍生物, 其中延长部分是化学式1。

[0725] 33. 上述实施方案中任一项的衍生物, 其中x是偶数。

[0726] 34. 上述实施方案中任一项的衍生物, 其中x是12。

[0727] 35. 上述实施方案中任一项的衍生物, 其中化学式1由化学式1a代表:

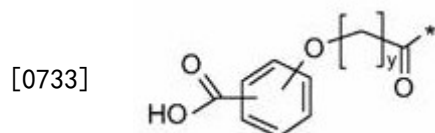
[0728] 化学式1a:



[0730] 其中x如上述实施方案中任一项所定义。

[0731] 36. 上述实施方案中任一项的衍生物, 其中延长部分是化学式2, 优选化学式2a:

[0732] 化学式2a:



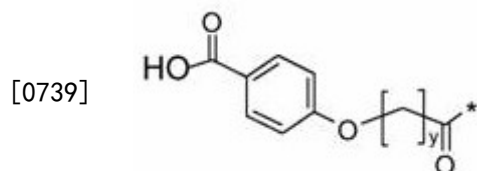
[0734] 其中y如上述实施方案中任一项所定义。

[0735] 37. 上述实施方案中任一项的衍生物, 其中y是奇数。

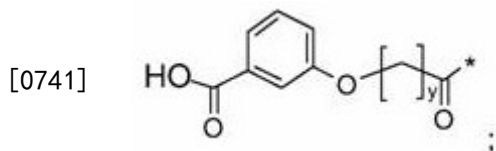
[0736] 38. 上述实施方案中任一项的衍生物, 其中y是9。

[0737] 39. 上述实施方案中任一项的衍生物, 其中化学式2由化学式2b或化学式2c代表:

[0738] 化学式2b:



[0740] 化学式2c:

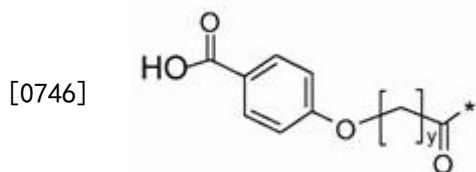


[0742] 优选由化学式2b代表；

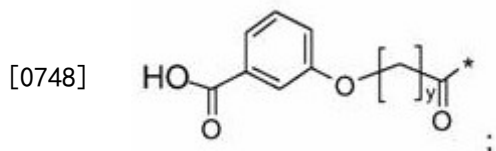
[0743] 其中y如上述实施方案中任一项所定义。

[0744] 39a. 上述实施方案中任一项的衍生物，其中化学式2a由化学式2b或化学式2c代表：

[0745] 化学式2b：



[0747] 化学式2c：



[0749] 优选由化学式2b代表；

[0750] 其中y如上述实施方案中任一项所定义。

[0751] 40. 上述实施方案中任一项的衍生物，其包含化学式5。

[0752] 41. 上述实施方案中任一项的衍生物，其中所述化学式5是第一个接头元件。

[0753] 42. 上述实施方案中任一项的衍生物，其中k是1。

[0754] 43. 上述实施方案中任一项的衍生物，其中n是1。

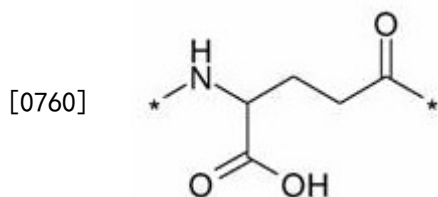
[0755] 44. 上述实施方案中任一项的衍生物，其中化学式5被包括m次，其中m是1-10范围内的整数。

[0756] 45. 上述实施方案中任一项的衍生物，其中m是2。

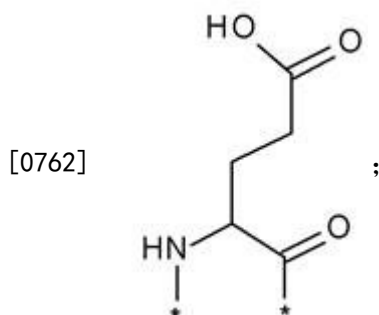
[0757] 46. 上述实施方案中任一项的衍生物，其中当m不是1时，所述化学式5元件经由酰胺键互相连接。

[0758] 47. 上述实施方案中任一项的衍生物，其中所述接头进一步包含第二个接头元件；优选Glu二基；更优选选自化学式6和/或化学式7：

[0759] 化学式6：



[0761] 化学式7：



[0763] 最优选化学式6。

[0764] 48. 上述实施方案中任一项的衍生物, 其中所述Glu二基被包括p次, 其中p是1-2范围内的整数。

[0765] 49. 上述实施方案中任一项的衍生物, 其中p是1。

[0766] 50. 上述实施方案中任一项的衍生物, 其中p是2。

[0767] 51. 上述实施方案中任一项的衍生物, 其中所述Glu二基是L-Glu的基团。

[0768] 52. 上述实施方案中任一项的衍生物, 其中一个或多个Glu二基和所述一个或多个化学式5元件经由酰胺键相互连接。

[0769] 53. 上述实施方案中任一项的衍生物, 其中所述接头由m次化学式5和p次Glu二基组成。

[0770] 54. 上述实施方案中任一项的衍生物, 其中(m, p)是(2, 2)或(2, 1), 优选(2, 1)。

[0771] 55. 上述实施方案的衍生物, 其中m次化学式5元件和p次Glu二基经由酰胺键互相连接。

[0772] 56. 上述实施方案中任一项的衍生物, 其中所述接头和所述延长部分经由酰胺键互相连接。

[0773] 57. 上述实施方案中任一项的衍生物, 其中所述接头和所述GLP-1类似物经由酰胺键互相连接。

[0774] 58. 上述实施方案中任一项的衍生物, 其中所述接头连接到第一或第二K残基的ε-氨基。

[0775] 59. 上述实施方案中任一项的衍生物, 其中所述接头具有5-41个C原子; 优选17或22个C原子。

[0776] 60. 上述实施方案中任一项的衍生物, 其中所述接头具有17个C原子。

[0777] 61. 上述实施方案中任一项的衍生物, 其中所述接头具有22个C原子。

[0778] 62. 上述实施方案的衍生物, 其中所述接头具有4-28个杂原子; 优选12或16个杂原子。

[0779] 63. 上述实施方案中任一项的衍生物, 其中所述接头具有12个杂原子。

[0780] 64. 上述实施方案中任一项的衍生物, 其中所述接头具有16个杂原子。

[0781] 65. 上述实施方案中任一项的衍生物, 其中所述杂原子是N原子和/或O原子。

[0782] 66. 上述实施方案中任一项的衍生物, 其中所述接头具有1-7个N原子; 优选3或4个N原子。

[0783] 67. 上述实施方案中任一项的衍生物, 其中所述接头具有3个N原子。

[0784] 68. 上述实施方案中任一项的衍生物, 其中所述接头具有4个N原子。

[0785] 69. 上述实施方案中任一项的衍生物, 其中所述接头具有3-21个O原子; 优选9 或12个O原子。

[0786] 70. 上述实施方案中任一项的衍生物, 其中所述接头具有9个O原子。

[0787] 71. 上述实施方案中任一项的衍生物, 其中所述接头具有12个O原子。

[0788] 72. 上述实施方案中任一项的衍生物, 其中所述接头由经由酰胺键相互连接的2次化学式6和2次化学式5组成, 并且在所示序列中所述接头在其*-NH端与所述延长部分的*-C0端连接, 和在其*-C0端与GLP-1类似物的K²⁷或K^T的ε氨基连接。

[0789] 73. 上述实施方案中任一项的衍生物, 其中所述接头由经由酰胺键相互连接的2次化学式5和1次化学式6组成, 并且在所示序列中所述接头在其*-NH端与所述延长部分的*-C0端连接, 和在其游离*-C0端与GLP-1类似物的K²⁷或K^T的ε氨基连接。

[0790] 74. 上述实施方案中任一项的衍生物, 其中所述接头由经由酰胺键相互连接的1次化学式6和2次化学式5组成, 并且在所示序列中所述接头在其*-NH端与所述延长部分的*-C0端连接, 和在其*-C0端与GLP-1类似物的K²⁷或K^T的ε氨基连接。

[0791] 75. 上述实施方案中任一项的衍生物, 其中所述接头由经由酰胺键相互连接的1次化学式6、2次化学式5和1次化学式6组成, 并且在所示序列中所述接头在其*-NH端与所述延长部分的*-C0端连接, 和在其*-C0端与GLP-1类似物的K²⁷或K^T的ε氨基连接。

[0792] 76. 上述实施方案中任一项的衍生物, 其中所述两个延长部分基本相同; 诸如至少80%、至少85%、至少90%、至少95%或至少99%相同。

[0793] 77. 上述实施方案中任一项的衍生物, 其中所述两个延长部分具有至少0.5; 优选至少0.6; 更优选至少0.7或至少0.8; 甚至更优选至少0.9; 或最优选至少0.99的相似性, 诸如1.0的相似性。

[0794] 78. 上述实施方案中任一项的衍生物, 其中所述两个接头具有至少0.5; 优选至少0.6; 更优选至少0.7或至少0.8; 甚至更优选至少0.9; 或最优选至少0.99的相似性, 诸如1.0的相似性。

[0795] 79. 上述实施方案中任一项的衍生物, 其中所述两个白蛋白结合剂, 诸如由延长部分和接头组成的两条侧链, 基本相同; 诸如至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、或至少99%相同。

[0796] 80. 上述实施方案中任一项的衍生物, 其中所述两个白蛋白结合剂, 诸如由延长部分和接头组成的两条侧链, 具有至少0.5; 优选至少0.6; 更优选至少0.7或至少0.8; 甚至更优选至少0.9; 或最优选至少0.99的相似性, 诸如1.0的相似性。

[0797] 81. 上述实施方案中任一项的衍生物, 其中待比较的2个化学结构被表示为指纹, 诸如a) ECFP_6指纹; b) UNITY指纹; 和/或c) MDL指纹; 和其中对于a)、b) 和c) 中的每一项, 优选使用Tanimoto系数来计算2个指纹的相似性或同一性。

[0798] 82. 上述实施方案中任一项的衍生物, 其中通过书写和目测来识别与GLP-1 (7-37) (SEQ ID NO: 1) 相比的氨基酸改变的数量。

[0799] 83. 上述实施方案中任一项的衍生物, 其中通过使用标准蛋白或肽比对程序来识别与GLP-1 (7-37) (SEQ ID NO: 1) 相比的氨基酸改变的数量。

[0800] 84. 上述实施方案中任一项的衍生物, 其中所述比对程序是Needleman-Wunsch比对。

- [0801] 85. 上述实施方案中任一项的衍生物, 其中使用默认评分矩阵和默认特性矩阵。
- [0802] 86. 上述实施方案中任一项的衍生物, 其中所述评分矩阵是BLOSUM62。
- [0803] 87. 上述实施方案中任一项的衍生物, 其中空位中第一残基的罚分是 -10 (负十)。
- [0804] 88. 上述实施方案中任一项的衍生物, 其中空位中额外残基的罚分是 -0.5 (负零点五)。
- [0805] 89. 上述实施方案中任一项的衍生物, 其中一种或多种所述氨基酸改变是在对应于GLP-1 (7-37) (SEQ ID NO: 1) 的以下位置的一个或多个位置: 8、12、20、22、23、24、25、26、27、30、31、34、35、36、37、38、和39。
- [0806] 90. 上述实施方案中任一项的衍生物, 其中所述类似物包含至少一个以下变化: Aib⁸、K¹²、K²⁰、E²²或K²²、E²³、K²⁴、V²⁵、R²⁶或H²⁶、K²⁷、E³⁰、H³¹、G³⁴或R³⁴或Q³⁴、Des³⁵、K³⁶或Des³⁶、K³⁷或Des³⁷、E³⁸或Q³⁸、和/或G³⁹。
- [0807] 91. 上述实施方案中任一项的衍生物, 其中所述第二K残基是K¹²且其中所述类似物, 除了变化K²⁷, 进一步包含i) 选自G³⁴和Q³⁴的变化, 和ii) 选自R²⁶和H²⁶的变化。
- [0808] 92. 上述实施方案中任一项的衍生物, 其中所述第二K残基是K²⁰且其中所述类似物, 除了变化K²⁷, 进一步包含i) 选自G³⁴和Q³⁴的变化, 和ii) 选自R²⁶和H²⁶的变化。
- [0809] 93. 上述实施方案中任一项的衍生物, 其中所述第二K残基是K²²且其中所述类似物, 除了变化K²⁷, 进一步包含i) 选自G³⁴和Q³⁴的变化, 和ii) 选自R²⁶和H²⁶的变化。
- [0810] 94. 上述实施方案中任一项的衍生物, 其中所述第二K残基是K²⁴且其中所述类似物, 除了变化K²⁷, 进一步包含i) 选自G³⁴和Q³⁴的变化, 和ii) 选自R²⁶和H²⁶的变化。
- [0811] 95. 上述实施方案中任一项的衍生物, 其中所述第二K残基是K³⁶且其中所述类似物, 除了变化K²⁷, 进一步包含i) 选自G³⁴和Q³⁴的变化, 和ii) 选自R²⁶和H²⁶的变化。
- [0812] 96. 上述实施方案中任一项的衍生物, 其中所述第二K残基是K³⁷且其中所述类似物, 除了变化K²⁷, 进一步包含i) 选自G³⁴和Q³⁴的变化, 和ii) 选自R²⁶和H²⁶的变化。
- [0813] 97. 上述实施方案中任一项的衍生物, 其中所述类似物包含至少一个以下变化: Aib⁸、E²²、E²³、V²⁵、E³⁰、H³¹、Des³⁵、Des³⁶、Des³⁷、E³⁸或Q³⁸、和/或G³⁹。
- [0814] 98. 上述实施方案中任一项的衍生物, 其中所述类似物包含 Aib⁸。
- [0815] 99. 上述实施方案中任一项的衍生物, 其中所述类似物包含 E²²。
- [0816] 100. 上述实施方案中任一项的衍生物, 其中所述类似物包含 E²³。
- [0817] 101. 上述实施方案中任一项的衍生物, 其中所述类似物包含 V²⁵。
- [0818] 102. 上述实施方案中任一项的衍生物, 其中所述类似物包含 E³⁰。
- [0819] 103. 上述实施方案中任一项的衍生物, 其中所述类似物包含 H³¹。
- [0820] 104. 上述实施方案中任一项的衍生物, 其中所述类似物包含 Des³⁵。
- [0821] 105. 上述实施方案中任一项的衍生物, 其中所述类似物包含 Des³⁶。
- [0822] 106. 上述实施方案中任一项的衍生物, 其中所述类似物包含 Des³⁷。
- [0823] 107. 上述实施方案中任一项的衍生物, 其中所述类似物包含 E³⁸或Q³⁸, 优选Q³⁸, 或更优选E³⁸。
- [0824] 108. 上述实施方案中任一项的衍生物, 其中所述类似物包含 G³⁹。
- [0825] 109. 上述实施方案中任一项的衍生物, 其中所述类似物包含 Des³⁵、Des³⁶, 和

Des³⁷。

[0826] 110. 上述实施方案中任一项的衍生物,其中所述类似物包含 Des³⁶和Des³⁷。

[0827] 111. 上述实施方案中任一项的衍生物,其是GLP-1 (7-34) (SEQ ID NO: 1的氨基酸1-28)的衍生物。

[0828] 112. 上述实施方案中任一项的衍生物,其是GLP-1 (7-35) (SEQ ID NO: 1的氨基酸1-29)的衍生物。

[0829] 113. 上述实施方案中任一项的衍生物,其是GLP-1 (7-36) (SEQ ID NO: 1的氨基酸1-30)的衍生物。

[0830] 114. 上述实施方案中任一项的衍生物,其是GLP-1 (7-37) (SEQ ID NO: 1的氨基酸1-31)的衍生物。

[0831] 115. 上述实施方案中任一项的衍生物,其是GLP-1 (7-38) (SEQ ID NO: 1的氨基酸1-31,加1个C-末端添加的氨基酸残基)的衍生物。

[0832] 116. 上述实施方案中任一项的衍生物,其是GLP-1 (7-39) (SEQ ID NO: 1的氨基酸1-31,加两个C-末端添加的氨基酸残基)的衍生物。

[0833] 117. 上述实施方案中任一项的衍生物,其中所述类似物具有最多10个氨基酸改变。

[0834] 118. 上述实施方案中任一项的衍生物,其中所述类似物具有最多9个氨基酸改变。

[0835] 119. 上述实施方案中任一项的衍生物,其中所述类似物具有最多8个氨基酸改变。

[0836] 120. 上述实施方案中任一项的衍生物,其中所述类似物具有最多7个氨基酸改变。

[0837] 121. 上述实施方案中任一项的衍生物,其中所述类似物具有最多6个氨基酸改变。

[0838] 122. 上述实施方案中任一项的衍生物,其中所述类似物具有最多5个氨基酸改变。

[0839] 123. 上述实施方案中任一项的衍生物,其中所述类似物具有最多4个氨基酸改变。

[0840] 124. 上述实施方案中任一项的衍生物,其中所述类似物具有最多3个氨基酸改变。

[0841] 125. 上述实施方案中任一项的衍生物,其中所述类似物具有最多2个氨基酸改变。

[0842] 126. 上述实施方案中任一项的衍生物,其中所述类似物具有最多1个氨基酸改变。

[0843] 127. 上述实施方案中任一项的衍生物,其中所述类似物具有最少1个氨基酸改变。

[0844] 128. 上述实施方案中任一项的衍生物,其中所述类似物具有最少2个氨基酸改变。

[0845] 129. 上述实施方案中任一项的衍生物,其中所述类似物具有最少3个氨基酸改变。

[0846] 130. 上述实施方案中任一项的衍生物,其中所述类似物具有最少4个氨基酸改变。

[0847] 131. 上述实施方案中任一项的衍生物,其中所述类似物具有最少5个氨基酸改变。

[0848] 132. 上述实施方案中任一项的衍生物,其中所述类似物具有最少6个氨基酸改变。

[0849] 133. 上述实施方案中任一项的衍生物,其中所述类似物具有最少7个氨基酸改变。

[0850] 134. 上述实施方案中任一项的衍生物,其中所述类似物具有最少8个氨基酸改变。

[0851] 135. 上述实施方案中任一项的衍生物,其中所述类似物具有最少9个氨基酸改变。

[0852] 136. 上述实施方案中任一项的衍生物,其中所述类似物具有最少10个氨基酸改变。

- [0853] 137. 上述实施方案中任一项的衍生物, 其中所述类似物具有1个氨基酸改变。
- [0854] 138. 上述实施方案中任一项的衍生物, 其中所述类似物具有2个氨基酸改变。
- [0855] 139. 上述实施方案中任一项的衍生物, 其中所述类似物具有3个氨基酸改变。
- [0856] 140. 上述实施方案中任一项的衍生物, 其中所述类似物具有4个氨基酸改变。
- [0857] 141. 上述实施方案中任一项的衍生物, 其中所述类似物具有5个氨基酸改变。
- [0858] 142. 上述实施方案中任一项的衍生物, 其中所述类似物具有6个氨基酸改变。
- [0859] 143. 上述实施方案中任一项的衍生物, 其中所述类似物具有7个氨基酸改变。
- [0860] 144. 上述实施方案中任一项的衍生物, 其中所述类似物具有8个氨基酸改变。
- [0861] 145. 上述实施方案中任一项的衍生物, 其中所述类似物具有9个氨基酸改变。
- [0862] 146. 上述实施方案中任一项的衍生物, 其中所述类似物具有10个氨基酸改变。
- [0863] 147. 上述实施方案中任一项的衍生物, 其中一个或多个所述改变是独立地取代、添加和/或缺失。
- [0864] 148. 上述实施方案中任一项的衍生物, 其中所述类似物
- [0865] a) 包含式I的GLP-1类似物; 和/或b) 是式I的GLP-1类似物:

式I: Xaa₇-Xaa₈-Glu-Gly-Thr-Xaa₁₂-Thr-Ser-Asp-Xaa₁₆-Ser-Xaa₁₈-Xaa₁₉-Xaa₂₀-

- [0866] Glu-Xaa₂₂-Xaa₂₃-Xaa₂₄-Xaa₂₅-Xaa₂₆-Lys-Phe-Ile-Xaa₃₀-Xaa₃₁-Leu-Val-Xaa₃₄-Xaa₃₅-Xaa₃₆-
Xaa₃₇-Xaa₃₈-Xaa₃₉, 其中

- [0867] Xaa₇是L-组氨酸、咪唑并丙酰基、 α -羟基-组氨酸、D-组氨酸、脱氨基-组氨酸、2-氨基-组氨酸、 β -羟基-组氨酸、高组氨酸、N^d-乙酰基-组氨酸、N^d-甲酰基-组氨酸、 α -氟甲基-组氨酸、 α -甲基-组氨酸、3-吡啶基丙氨酸、2-吡啶基丙氨酸、或4-吡啶基丙氨酸;
- [0868] Xaa₈是Ala、Gly、Val、Leu、Ile、Thr、Ser、Lys、Aib、(1-氨基环丙基) 甲酸、(1-氨基环丁基) 甲酸、(1-氨基环戊基) 甲酸、(1-氨基环己基) 甲酸、(1-氨基环庚基) 甲酸或(1-氨基环辛基) 甲酸;
- [0869] Xaa₁₂是Lys或Phe;
- [0870] Xaa₁₆是Val或Leu;
- [0871] Xaa₁₈是Ser、Arg、Asn、Gln、或Glu;
- [0872] Xaa₁₉是Tyr或Gln;
- [0873] Xaa₂₀是Leu、Lys、或Met;
- [0874] Xaa₂₂是Gly、Glu、Lys、或Aib;
- [0875] Xaa₂₃是Gln、Glu、或Arg;
- [0876] Xaa₂₄是Ala或Lys;
- [0877] Xaa₂₅是Ala或Val;
- [0878] Xaa₂₆是Val、His、或Arg;
- [0879] Xaa₃₀是Ala、Glu、或Arg;
- [0880] Xaa₃₁是Trp或His;
- [0881] Xaa₃₄是Glu、Asn、Gly、Gln、或Arg;
- [0882] Xaa₃₅是Gly、Aib、或不存在;
- [0883] Xaa₃₆是Arg、Gly、Lys、或不存在;
- [0884] Xaa₃₇是Gly、Ala、Glu、Pro、Lys、Arg、或不存在;

- [0885] Xaa₃₈是Ser、Gly、Ala、Glu、Gln、Pro、Arg、或不存在；且
- [0886] Xaa₃₉是Gly或不存在。
- [0887] 149. 上述实施方案中任一项的衍生物，其中式I的肽是GLP-1 (7-37) (SEQ ID NO: 1)的类似物。
- [0888] 150. 上述实施方案中任一项的衍生物，其中如果Xaa₃₈不存在，则Xaa₃₉也不存在。
- [0889] 151. 上述实施方案中任一项的衍生物，其中如果Xaa₃₇不存在，则Xaa₃₈和Xaa₃₉也不存在。
- [0890] 152. 上述实施方案中任一项的衍生物，其中如果Xaa₃₆不存在，则Xaa₃₇、Xaa₃₈和Xaa₃₉也不存在。
- [0891] 153. 上述实施方案中任一项的衍生物，其中如果Xaa₃₅不存在，则Xaa₃₆、Xaa₃₇、Xaa₃₈和Xaa₃₉也不存在。
- [0892] 154. 上述实施方案中任一项的衍生物，其中Xaa₇是His；Xaa₈是Ala或Aib；Xaa₁₂是Lys或Phe；Xaa₁₆是Val；Xaa₁₈是Ser；Xaa₁₉是Tyr；Xaa₂₀是Leu或Lys；Xaa₂₂是Glu、Gly或Lys；Xaa₂₃是Gln或Glu；Xaa₂₄是Ala或Lys；Xaa₂₅是Ala或Val；Xaa₂₆是His或Arg；Xaa₃₀是Ala或Glu；Xaa₃₁是Trp或His；Xaa₃₄是Gly、Gln或Arg；Xaa₃₅是Gly或不存在；Xaa₃₆是Arg、Lys或不存在；Xaa₃₇是Gly、Lys、或不存在；Xaa₃₈是Glu或Gln；且Xaa₃₉是Gly或不存在。
- [0893] 154a. 上述实施方案中任一项的衍生物，其中Xaa₇是His。
- [0894] 154b. 上述实施方案中任一项的衍生物，其中Xaa₈是Ala。
- [0895] 154b1. 上述实施方案中任一项的衍生物，其中Xaa₈是Aib。
- [0896] 154c. 上述实施方案中任一项的衍生物，其中Xaa₁₂是Lys。
- [0897] 154d. 上述实施方案中任一项的衍生物，其中Xaa₁₂是Phe。
- [0898] 154e. 上述实施方案中任一项的衍生物，其中Xaa₁₆是Val。
- [0899] 154f. 上述实施方案中任一项的衍生物，其中Xaa₁₈是Ser。
- [0900] 154g. 上述实施方案中任一项的衍生物，其中Xaa₁₉是Tyr。
- [0901] 154h. 上述实施方案中任一项的衍生物，其中Xaa₂₀是Leu。
- [0902] 154i. 上述实施方案中任一项的衍生物，其中Xaa₂₀是Lys。
- [0903] 154j. 上述实施方案中任一项的衍生物，其中Xaa₂₂是Glu。
- [0904] 154k. 上述实施方案中任一项的衍生物，其中Xaa₂₂是Gly。
- [0905] 154l. 上述实施方案中任一项的衍生物，其中Xaa₂₂是Lys。
- [0906] 154m. 上述实施方案中任一项的衍生物，其中Xaa₂₃是Gln。
- [0907] 154n. 上述实施方案中任一项的衍生物，其中Xaa₂₃是Glu。
- [0908] 154o. 上述实施方案中任一项的衍生物，其中Xaa₂₄是Ala。
- [0909] 154p. 上述实施方案中任一项的衍生物，其中Xaa₂₄是Lys。
- [0910] 154q. 上述实施方案中任一项的衍生物，其中Xaa₂₅是Ala。
- [0911] 154r. 上述实施方案中任一项的衍生物，其中Xaa₂₅是Val。
- [0912] 154s. 上述实施方案中任一项的衍生物，其中Xaa₂₆是His。
- [0913] 154t. 上述实施方案中任一项的衍生物，其中Xaa₂₆是Arg。
- [0914] 154u. 上述实施方案中任一项的衍生物，其中Xaa₃₀是Ala。
- [0915] 154v. 上述实施方案中任一项的衍生物，其中Xaa₃₀是Glu。

- [0916] 154x. 上述实施方案中任一项的衍生物, 其中Xaa₃₁是Trp。
- [0917] 154y. 上述实施方案中任一项的衍生物, 其中Xaa₃₁是His。
- [0918] 154z. 上述实施方案中任一项的衍生物, 其中Xaa₃₄是Gly。
- [0919] 154aa. 上述实施方案中任一项的衍生物, 其中Xaa₃₄是Gln。
- [0920] 154ab. 上述实施方案中任一项的衍生物, 其中Xaa₃₄是Arg。
- [0921] 154ac. 上述实施方案中任一项的衍生物, 其中Xaa₃₅是Gly。
- [0922] 154ad. 上述实施方案中任一项的衍生物, 其中Xaa₃₅不存在。
- [0923] 154ae. 上述实施方案中任一项的衍生物, 其中Xaa₃₆是Arg。
- [0924] 154af. 上述实施方案中任一项的衍生物, 其中Xaa₃₆是Lys。
- [0925] 154ag. 上述实施方案中任一项的衍生物, 其中Xaa₃₆不存在。
- [0926] 154ah. 上述实施方案中任一项的衍生物, 其中Xaa₃₇是Gly。
- [0927] 154ai. 上述实施方案中任一项的衍生物, 其中Xaa₃₇是Lys。
- [0928] 154aj. 上述实施方案中任一项的衍生物, 其中Xaa₃₇不存在。
- [0929] 154ak. 上述实施方案中任一项的衍生物, 其中Xaa₃₈是Glu。
- [0930] 154al. 上述实施方案中任一项的衍生物, 其中Xaa₃₈是Gln。
- [0931] 154am. 上述实施方案中任一项的衍生物, 其中Xaa₃₈不存在。
- [0932] 154an. 上述实施方案中任一项的衍生物, 其中Xaa₃₉是Gly。
- [0933] 154ao. 上述实施方案中任一项的衍生物, 其中Xaa₃₉不存在。
- [0934] 155. 上述实施方案中任一项的衍生物, 其中所述类似物与GLP-1 (7-37) (SEQ ID NO: 1) 相比包含, 优选具有以下氨基酸改变:

(i) 22E, 26R, 27K, 34R, 37K; (ii) 22E, 26R, 27K, 30E, 34R, 36K, 38E, 39G;

- (iii) 22E, 26R, 27K, 34R, 36K, des37; (iv) 22E, 25V, 26R, 27K, 34R, 37K; (v) 8Aib, 20K, 22E, 26R, 27K, 30E, 34G, des35-37; (vi) 26R, 27K, 30E, 34R, 36K, 38E; (vii) 8Aib, 22K, 25V, 26R, 27K, 31H, 34R; (viii) 8Aib, 22K, 25V, 26R, 27K, 34R, des35-37; (ix) 8Aib, 22K, 25V, 26R, 27K, 34R, des36-37; (x) 26H, 27K, 30E, 34R, 36K, 38E; (xi) 22K, 25V, 26R, 27K, 30E, 34Q; (xii) 25V, 26R, 27K, 30E, 34R, 36K, 38Q; (xiii) 25V, 26R, 27K, 30E, 34Q, 36K, 38E;
- [0935] (xiv) 22K, 26R, 27K, 31H, 34G, des35-37; (xv) 8Aib, 25V, 26R, 27K, 31H, 34Q, 37K; (xvi) 25V, 26R, 27K, 31H, 34Q, 37K; (xvii) 22E, 23E, 25V, 26R, 27K, 31H, 34Q, 37K; (iixx) 8Aib, 12K, 22E, 26R, 27K, 31H, 34Q; (ixx) 8Aib, 22K, 26R, 27K, 31H, 34G, des35-37; (xx) 22E, 26H, 27K, 30E, 34R, 36K, 38E; (xxi) 22E, 24K, 26R, 27K, 31H, 34G, des35-37; (xxii) 25V, 26R, 27K, 34Q, 36K; (xxiii) 22E, 24K, 25V, 26R, 27K, 31H, 34R; (xxiv) 22E, 24K, 25V, 26R, 27K, 34G, des35-37; (xxv) 22E, 24K, 25V, 26R, 27K, 34R; 或 (xxvi) 8Aib, 22E, 24K, 25V,
- [0936] 26R, 27K, 31H, 34Q。

[0937] 156. 化合物; 或其药学可接受的盐、酰胺或酯, 所述化合物优选根据上述实施方案中任一项, 选自下列: 化学式50、化学式51、化学式52、化学式53、化学式54、化学式55、化学式56、化学式57、化学式58、化学式59、化学式60、化学式61、化学式62、化学式63、化学式64、化学式65、化学式66、化学式67、化学式68、化学式69、化学式70、化学式71、化学式72、化学式73、化学式74、化学式75、化学式76、化学式77、化学式78和化学式79。

[0938] 157. 一种化合物, 或其药学可接受的盐、酰胺或酯, 所述化合物优选根据上述实

施方案中任一项,其特征在于其名称,且选自本文实施例1-30化合物的各名称列表。

[0939] 158.上述实施方案中任一项的衍生物,其具有GLP-1活性。

[0940] 159.上述实施方案中任一项的衍生物,其中所述GLP-1活性是指活化人GLP-1受体的能力。

[0941] 160.上述实施方案中任一项的衍生物,其中在体外测定中测定人GLP-1受体的活化,作为cAMP产生的功效。

[0942] 161.上述实施方案中任一项的衍生物,其功效对应于以下EC₅₀

[0943] a) 低于10000 pM,更优选低于5000 pM,甚至更优选低于4000 pM,或最优选低于3000 pM;

[0944] b) 低于2000 pM,优选低于1500 pM,更优选低于1200 pM,甚至更优选低于1000 pM,或最优选低于500 pM;

[0945] c) 低于400 pM,优选低于300 pM,更优选低于200 pM,甚至更优选低于150 pM,或最优选低于100 pM;或

[0946] d) 低于80 pM,优选低于60 pM,更优选低于40 pM,甚至更优选低于30 pM,或最优选低于20 pM。

[0947] 162.上述实施方案中任一项的衍生物,其中对于剂量-反应曲线,功效测定为EC₅₀,显示在含有人GLP-1受体的培养基中cAMP的剂量依赖性形成,优选使用稳定转染的细胞系诸如BHK467-12A (tk-ts13),和/或使用用于测定cAMP的功能性受体测定,例如基于内源形成的cAMP与外源添加的生物素-标记的cAMP之间的竞争,在所述测定中更优选使用特异性抗体捕获cAMP,和/或其中甚至更优选的测定是AlphaScreen cAMP测定,最优选描述于实施例31的测定。

[0948] 163. 上述实施方案中任一项的衍生物,其比率[在2.0% HSA (高白蛋白)存在下的GLP-1受体结合亲和力(IC₅₀),除以在0.005% HSA (低白蛋白)存在下的GLP-1受体结合亲和力(IC₅₀)]为:

[0949] a) 至少 1.0,更优选至少 10,甚至更优选至少 25,或最优选至少 50;

[0950] b) 至少 60,优选至少 70,更优选至少 80,甚至更优选至少 90,或最优选至少 100;

[0951] c) 至少 125,优选至少 150,更优选至少 200,仍更优选至少 250,甚至更优选至少 400,或最优选至少 500;或

[0952] d) 至少 600,优选至少 800,甚至更优选至少 900,或最优选至少 1000。

[0953] 164.上述实施方案中任一项的衍生物,在0.005% HSA (低白蛋白)存在下其GLP-1受体结合亲和力(IC₅₀)为

[0954] a) 低于1000 nM,优选低于750 nM,更优选低于500 nM,或最优选低于100 nM;或

[0955] b) 低于50.0 nM,优选低于15.0 nM,更优选低于10.0 nM,甚至更优选低于5.0 nM,或最优选低于1.0 nM。

[0956] 165.上述实施方案中任一项的衍生物,在2.0% HSA (高白蛋白)存在下其GLP-1受体结合亲和力(IC₅₀)为

[0957] a) 低于1100 nM,优选低于1000 nM,更优选低于900 nM,或最优选低于600 nM;或

[0958] b) 低于500 nM,优选低于350 nM,更优选低于200 nM,甚至更优选低于100 nM,或

最优选低于50.0 nM。

[0959] 166. 上述实施方案中任一项的衍生物,其中通过从所述受体中取代¹²⁵I-GLP-1的方式测定与GLP-1受体的结合亲和力,优选使用SPA结合测定。

[0960] 167. 上述实施方案中任一项的衍生物,其中使用稳定转染的细胞系,优选仓鼠细胞系,更优选幼仓鼠肾细胞系诸如BHK tk-ts13来制备所述GLP-1受体。

[0961] 168. 上述实施方案中任一项的衍生物,其中所述IC₅₀值测定为从所述受体中取代50% ¹²⁵I-GLP-1的浓度。

[0962] 169. 上述实施方案中任一项的衍生物,其口服生物利用度,优选绝对口服生物利用度,高于塞马鲁肽。

[0963] 170. 上述实施方案中任一项的衍生物,其中在大鼠体内测量口服生物利用度,作为直接注射到肠腔之后的血浆暴露。

[0964] 171. 上述实施方案中任一项的衍生物,其中在将所述衍生物溶液注入大鼠空肠后30分钟所测的所述衍生物的血浆浓度(pM),除以注射溶液浓度(μM)(在30 min的剂量校正暴露),为至少 39,或至少 40;优选至少 60;更优选至少 80;仍更优选至少 100;甚至更优选至少 125;或最优选至少 150。

[0965] 172. 上述实施方案中任一项的衍生物,其中在将所述衍生物溶液注入大鼠空肠后30分钟所测的所述衍生物的血浆浓度(pM),除以注射溶液浓度(μM)(在30 min的剂量校正暴露),为至少 160,优选至少 180,更优选至少 200,或最优选至少 250。

[0966] 173. 上述实施方案中任一项的衍生物,其中在与55 mg/ml癸酸钠的混合物中以1000 μM浓度测定所述GLP-1衍生物。

[0967] 174. 上述实施方案中任一项的衍生物,其中使用雄性Sprague Dawley大鼠,优选到达时体重为大约 240 g。

[0968] 175. 上述实施方案中任一项的衍生物,其中所述大鼠在所述实验之前禁食大约18小时。

[0969] 176. 上述实施方案中任一项的衍生物,其中在禁食后和在空肠注射所述衍生物之前,对所述大鼠进行常规麻醉。

[0970] 177. 上述实施方案中任一项的衍生物,其中在空肠的近端部分(十二指肠的10 cm远)或在中肠(盲肠的50 cm近)施用所述衍生物。

[0971] 178. 上述实施方案中任一项的衍生物,其中用注射器,通过导管将100 μl所述衍生物注射到空肠腔内,再用另一注射器将200 μl空气推入空肠腔内,然后让其与导管的连接以防流回到导管中。

[0972] 179. 上述实施方案中任一项的衍生物,其中在所需时间间隔从尾静脉采集血液样品(200 μl)到EDTA管,诸如在时间0、10、30、60、120和240 min,并在20分钟内以10000G在4℃离心5分钟。

[0973] 180. 上述实施方案中任一项的衍生物,其中分离血浆(例如,75μl),立即冷冻并保存在-20℃,直到分析所述衍生物的血浆浓度。

[0974] 181. 上述实施方案中任一项的衍生物,其中使用LOCI(发光氧通道免疫测定, Luminescent Oxygen Channeling Immunoassay)来分析所述衍生物的血浆浓度。

[0975] 182. 上述实施方案中任一项的衍生物,其中所述衍生物在db/db小鼠体内有效降

低血糖。

[0976] 183. 上述实施方案中任一项的衍生物, 其中所述衍生物在db/db小鼠体内有效降低体重。

[0977] 184. 上述实施方案中任一项的衍生物, 其中用合适剂量范围的所述GLP-1衍生物经s.c. 治疗db/db小鼠, 并在合适的间隔测量血糖和/或体重。

[0978] 185. 上述实施方案中任一项的衍生物, 其中所述GLP-1衍生物的剂量是0.3 nmol/kg、1.0 nmol/kg、3.0 nmol/kg、10 nmol/kg、30 nmol/kg和100 nmol/kg, 其中kg是指小鼠体重。

[0979] 186. 上述实施方案中任一项的衍生物, 其中用媒介物经s.c. 治疗对照组、优选溶解了所述GLP-1衍生物的培养基, 例如使用以下组成: 50mM磷酸钠, 145 mM 氯化钠, 0.05%吐温80, pH 7.4。

[0980] 187. 上述实施方案中任一项的衍生物, 其中测量血糖, 和/或给小鼠称体重, 时间是 $-\frac{1}{2}h$ (施用($t=0$)之前半小时)以及时间1、2、4和8h。

[0981] 188. 上述实施方案中任一项的衍生物, 其中用葡萄糖氧化酶方法测定葡萄糖浓度。

[0982] 189. 上述实施方案中任一项的衍生物, 其中

[0983] (i) ED_{50} (体重(BW)) 计算为经皮下施用衍生物后8小时 Δ (例如降低) BW达到最大效应的一半的剂量; 和/或

[0984] (ii) ED_{50} (血糖(BG)) 计算为经皮下施用衍生物后8小时和/或24小时 Δ (例如降低) BG 的AUC (曲线下面积) 达到最大效应的一半的剂量。

[0985] 190. 上述实施方案中任一项的衍生物, 其中存在S形剂量-反应关系, 优选具有明确的最大反应定义。

[0986] 191. 上述实施方案中任一项的衍生物, 其具有比利拉鲁肽更延长的作用概况。

[0987] 192. 上述实施方案中任一项的衍生物, 其中延长是指在相关动物物种诸如db/db小鼠、大鼠、猪和/或优选小型猪中的体内半衰期; 其中经以下途径施用所述衍生物: i) s.c., 和/或, ii) i.v.; 优选, ii) i.v.。

[0988] 193. 上述实施方案中任一项的衍生物, 其在经i.v. 施用于小型猪后的终末半衰期($T_{1/2}$) 为

[0989] a) 至少 12小时, 优选至少 24小时, 更优选至少 36小时, 甚至更优选至少 48小时, 或最优选至少 60小时;

[0990] b) 至少 7小时, 优选至少 16小时, 更优选至少 24小时, 甚至更优选至少 30小时, 或最优选至少 40小时;

[0991] c) 至少 50小时, 优选至少 60小时, 更优选至少 70小时, 甚至更优选至少 80小时, 或最优选至少 90小时。

[0992] 194. 上述实施方案中任一项的衍生物, 其中所述小型猪是雄性Göttingen小型猪。

[0993] 195. 上述实施方案中任一项的衍生物, 其中所述小型猪是7-14月龄, 且优选体重为16-35 kg。

[0994] 196. 上述实施方案中任一项的衍生物, 其中将所述小型猪单独饲养且每天喂食1

次或2次,优选用SDS小型猪饲料。

[0995] 197. 上述实施方案中任一项的衍生物,其中在适应至少2周之后经i.v.施用所述衍生物。

[0996] 198. 上述实施方案中任一项的衍生物,其中所述动物在给药前禁食大约 18 h并在给药后禁食至少4 h,整个周期内让其随意饮水。

[0997] 199. 上述实施方案中任一项的衍生物,其中将所述GLP-1衍生物溶于50 mM磷酸钠, 145 mM 氯化钠, 0.05%吐温80, pH 7.4中至合适浓度,优选20-60 nmol/ml。

[0998] 200. 上述实施方案中任一项的衍生物,其中静脉内注射所述衍生物,体积对应于1-2 nmol/kg。

[0999] 201. 上述实施方案中任一项的衍生物,其在小型猪中增加葡萄糖所刺激的胰岛素分泌。

[1000] 202. 上述实施方案中任一项的衍生物,其中所述小型猪是雄性Göttingen小型猪。

[1001] 203. 上述实施方案中任一项的衍生物,其中所述小型猪是7-14月龄。

[1002] 204. 上述实施方案中任一项的衍生物,其中将所述小型猪在单独围栏中饲养,每日饲喂1次或2次,优选用SDS小型猪饲料。

[1003] 205. 上述实施方案中任一项的衍生物,其中经i.v.或s.c.在耳后薄层皮肤内施用单剂量,任选在逐渐增加剂量的周期之后。

[1004] 206. 上述实施方案中任一项的衍生物,其中在施用之前,所述动物禁食大约 18 h。

[1005] 207. 上述实施方案中任一项的衍生物,其中测试基线组和对应于2-6个不同血浆浓度水平的多个衍生物施用组,其中所述基线组是a)用媒介物治疗,或b)未经治疗。

[1006] 208. 上述实施方案中任一项的衍生物,其中所述血浆浓度水平为3000-80000 pM。

[1007] 209. 上述实施方案中任一项的衍生物,其中进行1小时或2小时静脉内葡萄糖耐受试验(IVGTT)。

[1008] 210. 上述实施方案中任一项的衍生物,其中在30秒时段内经i.v.给予0.3 g/kg葡萄糖,并在合适时间点采血样,诸如在以下时间点(t=0对应于葡萄糖推注):-10、-5、0、2、5、10、15、20、25、30、40、50、60、70、80、90、100、110、120分钟。

[1009] 211. 上述实施方案中任一项的衍生物,其中测定所述衍生物、葡萄糖和胰岛素的血浆浓度。

[1010] 212. 上述实施方案中任一项的衍生物,其中在t= 0 min、以及任选在试验结束时(t=60 min或t=120 min)测定所述衍生物浓度。

[1011] 213. 上述实施方案中任一项的衍生物,其中用葡萄糖氧化酶方法分析葡萄糖。

[1012] 214. 上述实施方案中任一项的衍生物,其中计算胰岛素曲线下面积(AUC胰岛素)并用作胰岛素分泌的量度。

[1013] 215. 上述实施方案中任一项的衍生物,其中对于其至少一个 浓度,AUC胰岛素高于基线AUC胰岛素,优选至少其110%,更优选至少其120%,甚至更优选至少其130%或最优选至少其140%。

[1014] 216. 上述实施方案中任一项的衍生物,与对照(优选媒介物治疗或未经治疗)相比,其导致猪的饲料摄取下降;

[1015] 任选饲料摄取(0-24h)可以是媒介物治疗对照的90%或以下,优选80%或以下,更优选70%或以下,甚至更优选60%或以下,或最优选50%或以下;

[1016] 其中饲料摄取(0-24h)是指施用所述衍生物或媒介物之后的前24小时。

[1017] 217. 上述实施方案中任一项的衍生物,其中所述猪是雌性Landrace Yorkshire Duroc (LYD)猪。

[1018] 218. 上述实施方案中任一项的衍生物,其中所述猪是3月龄,优选体重30-35 kg。

[1019] 219. 上述实施方案中任一项的衍生物,其中将所述动物分组饲养1-2周,让其适应。

[1020] 220. 上述实施方案中任一项的衍生物,其中在实验期间,将所述动物放置在单独围栏中,从周一早晨到周五下午,以测定个体的食物摄取。

[1021] 221. 上述实施方案中任一项的衍生物,其中所述动物随意摄取猪饲料(诸如Svinefoder, Antonio)。

[1022] 222. 上述实施方案中任一项的衍生物,其中通过每15分钟记录饲料重量而在线监测食物摄取,优选使用Mpigwin系统。

[1023] 223. 上述实施方案中任一项的衍生物,其以0.3、1.0、3.0、10或30 nmol/kg给予,优选溶于磷酸缓冲液(50 mM磷酸盐,145 mM 氯化钠,0.05%吐温80, pH 8),更优选浓度为12、40、120、400或1200 nmol/ml。

[1024] 224. 上述实施方案中任一项的衍生物,其中所述磷酸缓冲液用作媒介物。

[1025] 225. 上述实施方案中任一项的衍生物,其中在第一天早晨对所述动物给药单次皮下剂量的衍生物或媒介物(优选剂量体积为0.025 ml/kg),并且给药后测定食物摄取共4天。

[1026] 226. 上述实施方案中任一项的衍生物,其在经i.v.施用大鼠后的体内半衰期($T_{1/2}$)为至少4小时,优选至少6小时,甚至更优选至少8小时,或最优选至少10小时。

[1027] 227. 上述实施方案中任一项的衍生物,其在经i.v.施用大鼠后的体内半衰期($T_{1/2}$)为至少12小时,优选至少15小时,甚至更优选至少18小时,或最优选至少20小时。

[1028] 228. 上述实施方案中任一项的衍生物,其在经i.v.施用大鼠后的体内半衰期($T_{1/2}$)为至少24小时,优选至少26小时,或最优选至少30小时。

[1029] 229. 上述实施方案中任一项的衍生物,其中所述大鼠是雄性Sprague Dawley大鼠,其体重为约400g。

[1030] 230. 以GLP-1类似物的形式的中间产物;或其药学可接受的盐、酰胺或酯,所述中间产物与GLP-1(7-37) (SEQ ID NO:1)相比包含以下变化:(i) 38Q;和/或(ii) 39G。

[1031] 231. 实施方案230的GLP-1类似物,其包含(38E, 39G)。

[1032] 232. 以GLP-1类似物的形式的中间产物,或其药学可接受的盐、酰胺或酯,其与GLP-1(7-37) (SEQ ID NO:1)相比包含,优选具有以下氨基酸改变:

(i) 22E, 26R, 27K, 34R, 37K; (ii) 22E, 26R, 27K, 30E, 34R, 36K, 38E, 39G; (iii) 22E, 26R, 27K, 34R, 36K, des37; (iv) 22E, 25V, 26R, 27K, 34R, 37K; (v) 8Aib, 20K, 22E, 26R, 27K, 30E, 34G, des35-37; (vi) 26R, 27K, 30E, 34R, 36K, 38E; (vii) 8Aib, 22K, 25V, 26R, 27K, 31H, 34R; (viii) 8Aib, 22K, 25V, 26R, 27K, 34R, des35-37; (ix) 8Aib, 22K, 25V, 26R, 27K, 34R, des36-37; (x) 26H, 27K, 30E, 34R, 36K, 38E; (xi) 22K, 25V, 26R, 27K, 30E, 34Q; (xii) 25V, 26R, 27K, 30E, 34R, 36K, 38Q; (xiii) 25V, 26R, 27K, 30E, 34Q, 36K, 38E; (xiv) 22K, 26R, 27K, 31H, 34G, des35-37; (xv) 8Aib, 25V, 26R, 27K, 31H, 34Q, 37K; (xvi) 25V, 26R, 27K, 31H, 34Q, 37K; (xvii) 22E, 23E, 25V, 26R, 27K, 31H, 34Q, 37K; (iixx) 8Aib, 12K, 22E, 26R, 27K, 31H, 34Q; (ixx) 8Aib, 22K, 26R, 27K, 31H, 34G, des35-37; (xx) 22E, 26H, 27K, 30E, 34R, 36K, 38E; (xxi) 22E, 24K, 26R, 27K, 31H, 34G, des35-37; (xxii) 25V, 26R, 27K, 34Q, 36K; (xxiii) 22E, 24K, 25V, 26R, 27K, 31H, 34R; (xxiv) 22E, 24K, 25V, 26R, 27K, 34G, des35-37; (xxv) 22E, 24K, 25V, 26R, 27K, 34R; 或 (xxvi) 8Aib, 22E, 24K, 25V, 26R, 27K, 31H, 34Q。

[1036] 233. 上述实施方案中任一项的衍生物,其用作药物。

[1037] 234. 根据上述实施方案中任一项的衍生物,其用于治疗 and/或预防所有形式的糖尿病和相关疾病,诸如进食障碍、心血管疾病、胃肠道疾病、糖尿病并发症、危急病症 and/或多囊卵巢综合征;和/或用于改善脂质参数,改善 β 细胞功能,和/或用于延迟或预防糖尿病进程。

[1038] 235. 通过施用药物活性量的根据上述实施方案中任一项的衍生物而治疗或预防所有形式的糖尿病和相关疾病;和/或改善脂质参数,改善 β 细胞功能,和/或延迟或预防糖尿病进程的方法,所述相关疾病诸如进食障碍、心血管疾病、胃肠道疾病、糖尿病并发症、危急病症 and/或多囊卵巢综合征。

[1039] 以下是本发明的仍进一步具体实施方案:

[1040] 1. GLP-1类似物的衍生物;或其药学可接受的盐、酰胺或酯,

[1041] 所述类似物包含在对应于GLP-1 (7-37) (SEQ ID NO: 1)的位置27的位置上的第一K残基;在对应于GLP-1 (7-37)的位置T 的位置上的第二K残基,其中T是7-37范围内除了18和27以外的整数;以及与GLP-1 (7-37)相比,包含最多10个氨基酸改变;其中所述第一K残基指定为K²⁷,且第二K残基指定为K^T;

[1042] 所述衍生物包含分别经由接头连接到K²⁷和K^T的两个延长部分,其中

[1043] 延长部分选自化学式1和化学式2:

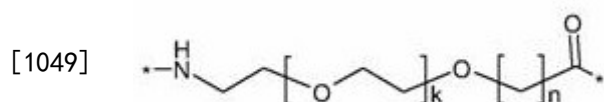
[1044] 化学式1: $\text{HOOC}-(\text{CH}_2)_x-\text{CO}-^*$

[1045] 化学式2: $\text{HOOC}-\text{C}_6\text{H}_4-\text{O}-(\text{CH}_2)_y-\text{CO}-^*$

[1046] 其中x是 6-18范围内的整数,且y是3-17范围内的整数;且

[1047] 接头包含化学式5:

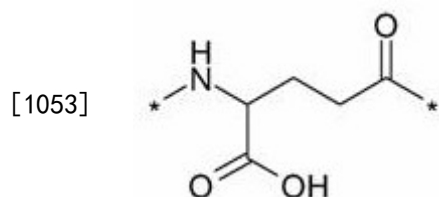
[1048] 化学式5:



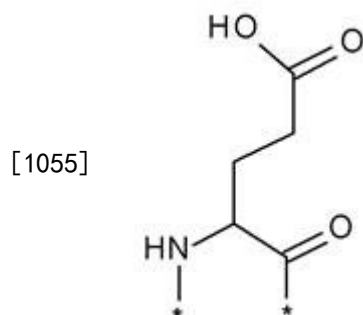
[1050] 其中k是1-5范围内的整数,且n是1-5范围内的整数。

[1051] 2.实施方案1的衍生物,其中所述接头进一步包含选自化学式6、和/或化学式7的Glu二基:

[1052] 化学式6:



[1054] 化学式7:



[1056] 3.上述实施方案中任一项的衍生物,其中所述接头结合于第一或第二个K残基的ε氨基。

[1057] 4.上述实施方案中任一项的衍生物,其中T是12、20、22、24、36、或37。

[1058] 5.上述实施方案中任一项的衍生物,其中所述类似物除第一和第二K残基之外不含K残基。

[1059] 6.上述实施方案中任一项的衍生物,其中x是12。

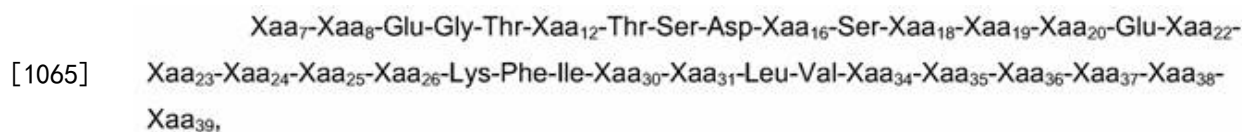
[1060] 7.上述实施方案中任一项的衍生物,其中y是9。

[1061] 8.上述实施方案中任一项的衍生物,其中k是1。

[1062] 9.上述实施方案中任一项的衍生物,其中n是1。

[1063] 10.上述实施方案中任一项的衍生物,其中所述类似物包含式I的GLP-1类似物:

[1064] 式I:



[1066] 其中

[1067] Xaa₇是L-组氨酸、咪唑并丙酰基、α-羟基-组氨酸、D-组氨酸、脱氨基-组氨酸、2-氨基-组氨酸、β-羟基-组氨酸、高组氨酸、N^α-乙酰基-组氨酸、N^α-甲酰基-组氨酸、α-氟甲基-组氨酸、α-甲基-组氨酸、3-吡啶基丙氨酸、2-吡啶基丙氨酸、或4-吡啶基丙氨酸;

[1068] Xaa₈是Ala、Gly、Val、Leu、Ile、Thr、Ser、Lys、Aib、(1-氨基环丙基)甲酸、(1-氨基环丁基)甲酸、(1-氨基环戊基)甲酸、(1-氨基环己基)甲酸、(1-氨基环庚基)甲酸或(1-氨基环辛基)甲酸;

[1069] Xaa₁₂是Lys或Phe;

- [1070] Xaa₁₆是Val或Leu;
- [1071] Xaa₁₈是Ser、Arg、Asn、Gln、或Glu;
- [1072] Xaa₁₉是Tyr或Gln;
- [1073] Xaa₂₀是Leu、Lys、或Met;
- [1074] Xaa₂₂是Gly、Glu、Lys、或Aib;
- [1075] Xaa₂₃是Gln、Glu、或Arg;
- [1076] Xaa₂₄是Ala或Lys;
- [1077] Xaa₂₅是Ala或Val;
- [1078] Xaa₂₆是Val、His、或Arg;
- [1079] Xaa₃₀是Ala、Glu、或Arg;
- [1080] Xaa₃₁是Trp或His;
- [1081] Xaa₃₄是Glu、Asn、Gly、Gln、或Arg;
- [1082] Xaa₃₅是Gly、Aib、或不存在;
- [1083] Xaa₃₆是Arg、Gly、Lys、或不存在;
- [1084] Xaa₃₇是Gly、Ala、Glu、Pro、Lys、Arg、或不存在;
- [1085] Xaa₃₈是Ser、Gly、Ala、Glu、Gln、Pro、Arg、或不存在;且
- [1086] Xaa₃₉是Gly或不存在。
- [1087] 11. 上述实施方案中任一项的化合物;或其药学可接受的盐、酰胺或酯,所述化合物选自:化学式50、化学式51、化学式52、化学式53、化学式54、化学式55、化学式56、化学式57、化学式58、化学式59、化学式60、化学式61、化学式62、化学式63、化学式64、化学式65、化学式66、化学式67、化学式68、化学式69、化学式70、化学式71、化学式72、化学式73、化学式74、化学式75、化学式76、化学式77、化学式78、和化学式79。
- [1088] 12. 以GLP-1类似物的形式的中间产物;或其药学可接受的盐、酰胺或酯,所述中间产物与GLP-1 (7-37) (SEQ ID NO:1) 相比包含以下变化:(i) 38Q;和/或(ii) 39G。
- [1089] 13. 实施方案1-11中任一项的衍生物,其用作药物。
- [1090] 14. 实施方案1-11中任一项的衍生物,其用于治疗 and/或预防所有形式的糖尿病和相关疾病,诸如进食障碍、心血管疾病、胃肠道疾病、糖尿病并发症、危急病症和/或多囊卵巢综合征;和/或用于改善脂质参数,改善β细胞功能,和/或用于延迟或预防糖尿病进程。
- [1091] 15. 通过施用药物活性量的实施方案1-11中任一项的衍生物而治疗或预防所有形式的糖尿病和相关疾病;和/或改善脂质参数,改善β细胞功能,和/或延迟或预防糖尿病进程的方法,所述相关疾病诸如进食障碍、心血管疾病、胃肠道疾病、糖尿病并发症、危急病症和/或多囊卵巢综合征。

实施例

[1092] 本实验部分开始是缩略语列表,然后是包括合成和表征本发明类似物和衍生物的通用方法在内的部分。然后是涉及具体GLP-1衍生物的制备的多个实施例,最后包括涉及这些类似物和衍生物的活性和性质的多个实施例(标题为药理学方法的部分)。

[1093] 所述实施例用于说明本发明。

[1094] 缩略语

- [1095] 以下缩略语用于下文,按照字母顺序排列:
- [1096] Aib:氨基异丁酸(α -氨基异丁酸)
- [1097] API:活性药物成分
- [1098] AUC:曲线下面积
- [1099] BG:血糖
- [1100] BHK幼仓鼠肾
- [1101] BW:体重
- [1102] Boc:叔丁氧基羰基
- [1103] BSA:牛血清白蛋白
- [1104] 可力丁(collidine):2,4,6-三甲基吡啶
- [1105] DCM:二氯甲烷
- [1106] Dde:1-(4,4-二甲基-2,6-二氧代亚环己基)乙基
- [1107] DIC:二异丙基碳二亚胺
- [1108] DIPEA:二异丙基乙胺
- [1109] DMAP:4-二甲氨基吡啶
- [1110] DMEM:Dulbecco氏改良Eagle氏培养基(DMEM)
- [1111] EDTA:乙二胺四乙酸
- [1112] EGTA:乙二醇四乙酸
- [1113] FCS:胎牛血清
- [1114] Fmoc:9-芴基甲氧基羰基
- [1115] HATU:(0-(7-氮杂苯并三唑-1-基)-1,1,3,3-四甲基脲鎓六氟磷酸盐)
- [1116] HBTU:(2-(1H-苯并三唑-1-基)-1,1,3,3-四甲基脲鎓六氟磷酸盐)
- [1117] HEPES:4-(2-羟乙基)-1-哌嗪乙磺酸
- [1118] HFIP:1,1,1,3,3,3-六氟-2-丙醇或六氟异丙醇
- [1119] HOAt:1-羟基-7-氮杂苯并三唑
- [1120] HOBt:1-羟基苯并三唑
- [1121] HPLC:高效液相色谱
- [1122] HSA:人血清白蛋白
- [1123] IBMX:3-异丁基-1-甲基黄嘌呤
- [1124] Imp:咪唑丙酸(也称为des-氨基组氨酸, DesH)
- [1125] i.v. 静脉内
- [1126] ivDde:1-(4,4-二甲基-2,6-二氧代亚环己基)-3-甲基丁基
- [1127] IVGTT:静脉内葡萄糖耐受试验
- [1128] LCMS:液相色谱-质谱
- [1129] LYD:Landrace Yorkshire Duroc
- [1130] MALDI-MS:参见MALDI-TOF MS
- [1131] MALDI-TOF MS:基质-辅助激光解吸/电离飞行时间质谱
- [1132] MeOH:甲醇
- [1133] Mmt:4-甲氧基三苯甲基

- [1134] Mtt:4-甲基三苯甲基
- [1135] NMP:N-甲基吡咯烷酮
- [1136] OBz:苯甲酰基酯
- [1137] OEG:8-氨基-3,6-二氧杂辛酸
- [1138] OtBu:叔丁酯
- [1139] PBS:磷酸缓冲盐水
- [1140] PD:药效动力学
- [1141] Pen/Strep:青霉素/链霉素
- [1142] PK:药代动力学
- [1143] RP:反相
- [1144] RP-HPLC:反相高效液相色谱
- [1145] RT:室温
- [1146] Rt:保留时间
- [1147] s.c.:经皮下
- [1148] SD:标准偏差
- [1149] SEC-HPLC:大小排阻高效液相色谱
- [1150] SEM:平均值的标准误差
- [1151] SPA:闪烁接近测定
- [1152] SPPS:固相肽合成
- [1153] tBu:叔丁基
- [1154] TFA:三氟乙酸
- [1155] TIS:三异丙基甲硅烷
- [1156] Tris:三(羟甲基)氨基甲烷或2-氨基-2-羟基甲基-丙烷-1,3-二醇
- [1157] Trt:三苯基甲基或三苯甲基
- [1158] Trx:氨甲环酸
- [1159] UPLC:超高效液相色谱。
- [1160] 制备方法
- [1161] A.通用方法

[1162] 本部分涉及固相肽合成方法(SPPS方法,包括氨基酸脱保护法,从树脂上裂解肽并纯化的方法),以及检测和表征所得肽的方法(LCMS、MALDI和UPLC方法)。在某些情况下可通过使用在二-肽酰胺键上被在酸性条件下可裂解的基团(例如但不限于2-Fmoc-氧基-4-甲氧基苄基或2,4,6-三甲氧基苄基)保护的二肽,而改善肽的固相合成。在丝氨酸或苏氨酸存在于肽中的情况下,可使用假脯氨酸二肽(可得自例如Novabiochem,另参见W.R. Sampson (1999), J. Pep. Sci., 5, 403)。所用的被保护的氨基酸衍生物是标准Fmoc-氨基酸(由例如以下供应:Anaspec, IRIS或Novabiochem)。N-端氨基酸在 α 氨基上被Boc保护(例如Boc-His(Boc)-OH或Boc-His(Trt)-OH,对于在N-端具有His的肽)。序列中赖氨酸的 ϵ 氨基可以用Mtt、Mmt、Dde、ivDde或Boc来保护,取决于白蛋白结合部分和间隔基的连接路线。可通过树脂结合的肽的酰化或通过在未保护肽溶液中酰化而将白蛋白结合部分和/或接头与肽连接。在白蛋白结合部分和/或接头与受保护的肽基树脂连接的情况下,连接可以是模块的

(modular), 使用SPPS和适当保护的构建嵌段 (building block) 诸如但不限于Fmoc-Oeg-OH (Fmoc-8-氨基-3,6-二氧杂辛酸)、Fmoc-Trx-OH (Fmoc-氨甲环酸)、Fmoc-Glu-OtBu、十八烷二酸单叔丁酯、十九烷二酸单叔丁酯或4-(9-羧基壬基氧基) 苯甲酸叔丁酯。

[1163] 1. 树脂结合的肽的合成

[1164] SPPS方法B

[1165] SPPS方法B是指使用Fmoc化学, 在基于微波的Liberty肽合成仪 (CEM Corp., North Carolina) 上合成被保护的肽基树脂。合适的树脂是获自Novabiochem的预先装载的低载量Wang树脂 (例如, 低载量Fmoc-Lys (Mtt) -Wang树脂, 0.35 mmol/g)。Fmoc-脱保护用5%哌啶的NMP溶液, 在至多70或75℃。偶联化学是DIC/HOAt的NMP溶液。将氨基酸/HOAt溶液 (0.3 M/NMP, 摩尔过量3-10倍) 加入到树脂中, 再加入等摩尔的DIC (0.75M/NMP)。例如, 每次偶联使用以下量的0.3M 氨基酸/HOAt溶液, 用于以下规模的反应: 规模/ml, 0.10 mmol/2.5 ml、0.25 mmol/5 ml、1 mmol/15 ml。偶联时间和温度通常是5分钟, 至多70或75℃。使用更长的偶联时间, 用于更大规模的反应, 例如 10 min。组氨酸氨基酸在50℃双偶联, 或者如果先前的氨基酸被空间阻碍则是四偶联 (例如Aib)。精氨酸氨基酸在室温下偶联25 min, 然后加热到70或75℃达5 min。某些氨基酸, 诸如但不限于Aib, 是“双偶联的”, 是指第一偶联 (例如5 min, 75℃) 之后, 树脂被排干并加入更多试剂 (氨基酸、HOAt和DIC), 将混合物再次加热 (例如5 min, 75℃)。当希望赖氨酸侧链的化学修饰时, 将赖氨酸掺入作为Lys (Mtt)。通过用DCM洗涤树脂并将树脂悬浮于净 (未稀释的) 六氟异丙醇持续20分钟, 再用DCM和NMP洗涤, 而除去Mtt基团。通过手动合成 (参见SPPS方法D) 或通过如上所述的Liberty肽合成仪上的一个或多个自动化步骤, 使用被适当保护的构建嵌段 (参见通用方法), 任选包括手动偶联, 进行赖氨酸的化学修饰。

[1166] SPPS方法D

[1167] SPPS方法D是指使用手动Fmoc化学合成被保护的肽基树脂。这通常用于将接头和侧链与肽主链连接起来。使用以下条件, 合成规模为0.25 mmol。偶联化学是DIC/HOAt/collidine的NMP溶液, 4-10倍摩尔过量。偶联条件是在室温下1-6 h。Fmoc-脱保护进行如下: 用20-25%哌啶的NMP溶液 (3 x 20 ml, 各10 min), 再用NMP洗涤 (4 x 20 mL)。Dde-或ivDde-脱保护进行如下: 用2%胍的NMP溶液 (2 x 20 ml, 各10 min), 再用NMP洗涤 (4 x 20 ml)。Mtt-或Mmt-脱保护进行如下: 用2% TFA和2-3% TIS的DCM溶液 (5 x 20 ml, 各10 min), 再用DCM (2 x 20 ml), 10% MeOH和5% DIPEA的DCM溶液 (2 x 20 ml) 和NMP (4 x 20 ml) 洗涤, 或者通过用净六氟异丙醇 (5 x 20 ml, 各10 min) 处理, 再通过如上洗涤。可通过树脂结合的肽的酰化或在未经保护的肽溶液中酰化 (参见以下途径) 将白蛋白结合部分和/或接头与肽连接。在将白蛋白结合部分和/或接头与被保护的肽基树脂连接的情况下, 连接可以是模块的, 其使用SPPS和适当保护的构建嵌段 (参见通用方法)。

[1168] 与树脂结合的肽的连接- 路线I: 将活化 (活性酯或对称酸酐) 白蛋白结合部分或接头诸如十八烷二酸单-(2,5-二氧代-吡咯烷-1-基) 酯 (Ebashi等 EP511600, 相对于树脂结合的肽的4摩尔当量) 溶于NMP (25 mL), 加入到树脂中并在室温下振摇过夜。过滤反应混合物并用NMP、DCM、2-丙醇、甲醇和乙醚彻底洗涤树脂。

[1169] 与树脂结合的肽的连接- 路线II: 将白蛋白结合部分溶于NMP/DCM (1:1、10 ml)。加入活化剂诸如HOBt (相对于树脂的4摩尔当量) 和DIC (相对于树脂的4摩尔当量) 并将溶

液搅拌15 min。将溶液加入到树脂中并加入DIPEA（相对于树脂的4摩尔当量）。将树脂在室温下振摇2-24小时。树脂用NMP（2 x 20 ml）、NMP/DCM（1:1, 2 x 20ml）和DCM（2 x 20 ml）洗涤。

[1170] 在溶液中与肽的连接 - 路线III:将活化（活性酯或对称酸酐）白蛋白结合部分或接头诸如十八烷二酸单-（2,5-二氧化-吡咯烷-1-基）酯（Ebashi等 EP511600, 相对于肽的1-1.5摩尔当量）溶于有机溶剂诸如乙腈、THF、DMF、DMSO或溶于水/有机溶剂的混合物（1-2 ml）中,并向肽的水溶液（10-20ml）中加入10摩尔当量的DIPEA。在保护基在白蛋白结合残基诸如叔丁基上的情况下,将反应混合物冻干过夜,以后再对分离粗制肽脱保护。在叔丁基保护基的情况下,通过将肽溶于三氟乙酸、水和三异丙基甲硅烷的混合物（90:5:5）中而进行脱保护。30min后,所得混合物经真空蒸发,粗制肽通过制备型HPLC纯化,如后所述。

[1171] SPPS方法E

[1172] SPPS方法E是指在来自Protein Technologies（Tucson, AZ 85714 U.S.A.）的Prelude 固相肽合成仪上通过Fmoc化学合成肽。合适的树脂是获自Novabiochem的预先装载的低载量Wang树脂（例如,低载量fmoc-Lys（Mtt）-Wang树脂, 0.35 mmol/g）。Fmoc-脱保护用25%哌啶的NMP溶液, 2 x 10 min。偶联化学是DIC/HOAt/collidine的NMP溶液。将氨基酸/HOAt溶液（0.3 M/NMP, 摩尔过量3-10倍）加入到树脂中,再加入等摩尔的DIC（3 M/NMP）和collidine（3 M/NMP）。例如,每次偶联使用以下量的0.3M 氨基酸/HOAt溶液,用于以下规模的反应:规模/ml, 0.10 mmol/2.5 ml、0.25 mmol/5 ml。偶联时间通常是60分钟。某些氨基酸,包括但不限于精氨酸、Aib或组氨酸,是“双偶联的”,是指第一偶联（例如,60 min）之后,树脂被排干并加入更多试剂（氨基酸、HOAt、DIC和collidine）,并让混合物再次反应（例如,60 min）。某些氨基酸和脂肪酸衍生物,包括但不限于Fmoc-OEG-OH、Fmoc-Trx-OH、Fmoc-Glu-OtBu、十八烷二酸单叔丁酯、十九烷二酸单叔丁酯、或4-（9-羧基壬基氧基）苯甲酸叔丁酯,偶联延长的时间,例如 6小时。当希望赖氨酸侧链的化学修饰时,将赖氨酸掺入作为Lys（Mtt）。通过用DCM洗涤树脂并将树脂悬浮于六氟异丙醇/DCM（75:25）中持续3 x 10分钟,再用DCM、20%哌啶和NMP洗涤,除去Mtt基团。通过手动合成（参见SPPS方法D）或通过如上所述的Prelude肽合成仪上的一个或多个自动化步骤,使用被适当保护的构建嵌段（参见通用方法）,进行赖氨酸的化学修饰。

[1173] 2. 从树脂上裂解肽并纯化

[1174] 合成之后,树脂用DCM洗涤,并通过用TFA/TIS/水（95/2.5/2.5或92.5/5/2.5）处理2-3小时,再用二乙醚沉淀,将肽从树脂上裂解下来。将肽溶于合适的溶剂（诸如例如30%乙酸）中并通过标准RP-HPLC,在C18, 5 μ M柱上使用乙腈/水/TFA纯化。通过UPLC, MALDI和LCMS方法的组合来分析级分,并将合适级分合并和冻干。

[1175] 3. 检测和表征的方法

[1176] LCMS方法

[1177] LCMS方法1（LCMS1）

[1178] 从Agilent 1200 Series HPLC系统中洗脱之后,使用Agilent Technologies LC/MSD TOF（G1969A）质谱仪来鉴定样品质量。用Agilent蛋白证实软件计算蛋白质谱的去卷积。

[1179] 洗脱液:

- [1180] A: 0.1% 三氟乙酸/水
- [1181] B: 0.1% 三氟乙酸/乙腈
- [1182] 柱:Zorbax 5u, 300SB-C3, 4.8x50mm
- [1183] 梯度:25% - 95 %乙腈,在15 min内。
- [1184] LCMS方法2 (LCMS2)
- [1185] 从Perkin Elmer Series 200 HPLC系统中洗脱之后,使用Perkin Elmer Sciex API 3000质谱仪来鉴定样品质量。
- [1186] 洗脱液:
- [1187] A: 0.05% 三氟乙酸/水
- [1188] B: 0.05% 三氟乙酸/乙腈
- [1189] 柱:Waters Xterra MS C-18 X 3 mm id 5 μ m
- [1190] 梯度:5% - 90 %乙腈,在7.5 min内,流速1.5ml/min。
- [1191] LCMS方法3 (LCMS3)
- [1192] 从Waters Alliance HT HPLC系统中洗脱之后,使用Waters Micromass ZQ质谱仪来鉴定样品质量。
- [1193] 洗脱液:
- [1194] A: 0.1% 三氟乙酸/水
- [1195] B: 0.1% 三氟乙酸/乙腈
- [1196] 柱:Phenomenex, Jupiter C4 50 X 4.60 mm id 5 μ m
- [1197] 梯度:10% - 90% B,在7.5 min内,流速1.0 ml/min。
- [1198] LCMS方法4 (LCMS4)
- [1199] 在由Waters Acquity UPLC系统和LCT Premier XE质谱仪(来自Micromass)组成的装置上进行LCMS4。将UPLC泵连接到含有以下成分的2个洗脱液池:
- [1200] A: 0.1% 甲酸/水
- [1201] B: 0.1% 甲酸/乙腈
- [1202] 通过将合适体积(优选2-10 μ l)的样品注射到柱中,用A和B的梯度洗脱,在室温下进行分析。
- [1203] UPLC条件、检测器设置和质谱仪设置为:
- [1204] 柱:Waters Acquity UPLC BEH, C-18, 1.7 μ m, 2.1mm x 50mm
- [1205] 梯度:线性5% - 95%乙腈,在4.0 min (或者8.0 min)内,流速0.4ml/min
- [1206] 检测:214 nm (类似于从TUV (可调的UV 检测器)输出)
- [1207] MS电离方式:API-ES
- [1208] 扫描:100-2000 amu (或者500-2000 amu), 步骤0.1 amu。
- [1209] UPLC和HPLC方法
- [1210] 方法05_B5_1
- [1211] UPLC (方法05_B5_1):使用配置有双波段检测器的Waters UPLC系统进行RP-分析。使用ACQUITY UPLC BEH130, C18, 130Å, 1.7 μ m, 2.1 mm x 150 mm柱, 40°C,采集214nm和254nm处的紫外检测结果。
- [1212] 将UPLC系统连接到含有以下成分的2个洗脱液池:

[1213] A: 0.2 M Na₂SO₄, 0.04 M H₃PO₄, 10 % CH₃CN (pH 3.5)

[1214] B: 70 % CH₃CN, 30 % H₂O

[1215] 使用以下线性梯度:60 % A, 40 % B至30 % A, 70 % B,在8分钟内,流速0.40 ml/min。

[1216] 方法05_B7_1

[1217] UPLC (方法05_B7_1):使用配置有双波段检测器的Waters UPLC系统进行RP-分析。使用ACQUITY UPLC BEH130, C18, 130Å, 1.7um, 2.1 mm x 150 mm柱, 40℃,采集214nm和254nm处的紫外检测结果。

[1218] 将UPLC系统连接到含有以下成分的2个洗脱液池:

[1219] A: 0.2 M Na₂SO₄, 0.04 M H₃PO₄, 10 % CH₃CN (pH 3.5)

[1220] B: 70 % CH₃CN, 30 % H₂O

[1221] 使用以下线性梯度:80 % A, 20 % B至40 % A, 60 % B,在8分钟内,流速0.40 ml/min。

[1222] 方法04_A2_1

[1223] UPLC (方法04_A2_1):使用配置有双波段检测器的Waters UPLC系统进行RP-分析。使用ACQUITY UPLC BEH130, C18, 130Å, 1.7um, 2.1 mm x 150 mm柱, 40℃,采集214nm和254nm处的紫外检测结果。

[1224] 将UPLC系统连接到含有以下成分的2个洗脱液池:

[1225] A: 90 % H₂O, 10 % CH₃CN, 0.25 M碳酸氢铵

[1226] B: 70 % CH₃CN, 30 % H₂O

[1227] 使用以下线性梯度:90 % A, 10 % B至60 % A, 40 % B,在16分钟内,流速0.40 ml/min。

[1228] 方法04_A3_1

[1229] UPLC (方法04_A3_1):使用配置有双波段检测器的Waters UPLC系统进行RP-分析。使用ACQUITY UPLC BEH130, C18, 130Å, 1.7um, 2.1 mm x 150 mm柱, 40℃,采集214nm和254nm处的紫外检测结果。

[1230] 将UPLC系统连接到含有以下成分的2个洗脱液池:

[1231] A: 90 % H₂O, 10 % CH₃CN, 0.25 M碳酸氢铵

[1232] B: 70 % CH₃CN, 30 % H₂O

[1233] 使用以下线性梯度:75 % A, 25 % B至45 % A, 55 % B,在16分钟内,流速0.40 ml/min。

[1234] 方法04_A4_1

[1235] UPLC (方法04_A4_1):使用配置有双波段检测器的Waters UPLC系统进行RP-分析。使用ACQUITY UPLC BEH130, C18, 130Å, 1.7um, 2.1 mm x 150 mm柱, 40℃,采集214nm和254nm处的紫外检测结果。

[1236] 将UPLC系统连接到含有以下成分的2个洗脱液池:

[1237] A: 90 % H₂O, 10 % CH₃CN, 0.25 M碳酸氢铵

[1238] B: 70 % CH₃CN, 30 % H₂O

[1239] 使用以下线性梯度:65 % A, 35 % B至25 % A, 65 % B,在16分钟内,流速0.40

ml/min。

[1240] 方法08_B2_1

[1241] UPLC (方法08_B2_1):使用配置有双波段检测器的Waters UPLC系统进行RP-分析。使用ACQUITY UPLC BEH130, C18, 130Å, 1.7um, 2.1 mm x 150 mm柱, 40℃,采集214nm和254nm处的紫外检测结果。

[1242] 将UPLC系统连接到含有以下成分的2个洗脱液池:

[1243] A: 99.95%H₂O, 0.05% TFA

[1244] B: 99.95% CH₃CN, 0.05% TFA

[1245] 使用以下线性梯度:95 % A, 5 % B至40 % A, 60 % B,在16分钟内,流速0.40 ml/min。

[1246] 方法08_B4_1

[1247] UPLC (方法08_B4_1):使用配置有双波段检测器的Waters UPLC系统进行RP-分析。使用ACQUITY UPLC BEH130, C18, 130Å, 1.7um, 2.1 mm x 150 mm柱, 40℃,采集214nm和254nm处的紫外检测结果。

[1248] 将UPLC系统连接到含有以下成分的2个洗脱液池:

[1249] A: 99.95%H₂O, 0.05% TFA

[1250] B: 99.95% CH₃CN, 0.05% TFA

[1251] 使用以下线性梯度:95 % A, 5 % B至95 % A, 5 % B,在16分钟内,流速0.40 ml/min。

[1252] 方法05_B10_1

[1253] UPLC (方法05_B10_1):使用配置有双波段检测器的Waters UPLC系统进行RP-分析。使用ACQUITY UPLC BEH130, C18, 130 Å, 1.7 um, 2.1 mm x 150 mm柱, 40℃,采集214nm和254nm处的紫外检测结果。

[1254] 将UPLC系统连接到含有以下成分的2个洗脱液池:

[1255] A: 0.2 M Na₂SO₄, 0.04 M H₃PO₄, 10 % CH₃CN (pH 3.5)

[1256] B: 70 % CH₃CN, 30 % H₂O

[1257] 使用以下线性梯度:40 % A, 60 % B至20 % A, 80 % B,在8分钟内,流速0.40 ml/min。

[1258] 方法01_A4_2

[1259] UPLC (方法01_A4_2):使用配置有waters 996二极管阵列检测器的Waters 600S系统进行RP-分析。使用Symmetry300 C18, 5 um, 3.9 mm x 150 mm柱, 42℃,采集214nm和254nm处的紫外检测结果。将HPLC系统连接到含有以下成分的3个洗涤液池:A: 100 % H₂O, B: 100 % CH₃CN, C: 1% 三氟乙酸/H₂O。使用以下线性梯度:90 % A, 5 % B, 5 %C至0 % A, 95 % B, 5% C,在15分钟内,流速1.0 ml/min。

[1260] 方法09_B2_1

[1261] UPLC (方法09_B2_1):使用配置有双波段检测器的Waters UPLC系统进行RP-分析。使用ACQUITY UPLC BEH130, C18, 130Å, 1.7um, 2.1 mm x 150 mm柱, 40℃,采集214nm和254nm处的紫外检测结果。将UPLC系统连接到含有以下成分的2个洗脱液池:A: 99.95 % H₂O, 0.05 % TFA;B: 99.95 % CH₃CN, 0.05 % TFA。使用以下线性梯度:95 % A,

5 % B至40 % A, 60 % B,在16分钟内,流速0.40 ml/min。

[1262] 方法09_B4_1

[1263] UPLC (方法09_B4_1):使用配置有双波段检测器的Waters UPLC系统进行RP-分析。使用ACQUITY UPLC BEH130, C18, 130Å, 1.7um, 2.1 mm x 150 mm柱, 40℃,采集214nm和254nm处的紫外检测结果。将UPLC系统连接到含有以下成分的2个洗脱液池:A: 99.95 % H₂O, 0.05 % TFA;B: 99.95 % CH₃CN, 0.05 % TFA。使用以下线性梯度:95 % A, 5 % B至5 % A, 95 % B,在16分钟内,流速0.40 ml/min。

[1264] 方法05_B8_1

[1265] UPLC (方法05_B8_1):使用配置有双波段检测器的Waters UPLC系统进行RP-分析。使用ACQUITY UPLC BEH ShieldRP18, 1.7um, 2.1 mm x 150 mm柱, 40℃,采集214nm和254nm处的紫外检测结果。将UPLC系统连接到含有以下成分的2个洗脱液池:A: 0.2 M Na₂SO₄, 0.04 M H₃PO₄, 10% CH₃CN (pH 3.5);B: 70% CH₃CN, 30% H₂O。使用以下线性梯度:50% A, 50% B至20% A, 80% B,在8分钟内,流速0.40 ml/min。

[1266] 方法10_B14_1

[1267] UPLC (方法10_B14_1):使用配置有双波段检测器的Waters UPLC系统进行RP-分析。使用ACQUITY UPLC BEH130, C18, 130Å, 1.7um, 2.1 mm x 150 mm柱, 50℃,采集214nm和254nm处的紫外检测结果。将UPLC系统连接到含有以下成分的2个洗脱液池:A: 99.95 %H₂O, 0.05 % TFA;B: 99.95 % CH₃CN, 0.05 % TFA。使用以下线性梯度:70 % A, 30 % B至40 % A, 60 % B,在12分钟内,流速0.40 ml/min。

[1268] 方法04_A6_1

[1269] UPLC (方法04_A6_1):使用配置有双波段检测器的Waters UPLC系统进行RP-分析。使用ACQUITY UPLC BEH130, C18, 130Å, 1.7um, 2.1 mm x 150 mm柱, 40℃,采集214nm和254nm处的紫外检测结果。将UPLC系统连接到含有以下成分的2个洗脱液池:A: 10 mM TRIS, 15 mM硫酸铵, 80% H₂O, 20 %, pH 7.3;B: 80 % CH₃CN, 20 % H₂O。使用以下线性梯度:95 % A, 5 % B至10 % A, 90 % B,在16分钟内,流速0.35 ml/min。

[1270] 方法01_B4_1

[1271] HPLC (方法01_B4_1):在配置有Waters 996二极管阵列检测器的Waters 600S系统进行RP-分析。使用Waters 3 mm x 150 mm 3.5um C-18 Symmetry 柱采集紫外检测结果。将柱加热到42℃并用5-95%乙腈, 90-0%水和5% 三氟乙酸(1.0%)/水的线性梯度洗脱,在15分钟内,流速1 ml/min。

[1272] 方法04_A7_1

[1273] UPLC (方法04_A7_1): 使用配置有双波段检测器的Waters UPLC系统进行RP-分析。使用ACQUITY UPLC BEH130, C18, 130 Å, 1.7 um, 2.1 mm x 150 mm柱, 40℃,采集214nm和254nm处的紫外检测结果。将UPLC系统连接到含有以下成分的2个洗脱液池:A: 10 mM TRIS, 15 mM磷酸铵, 80% H₂O, 20%, pH 7.3; B: 80% CH₃CN, 20% H₂O。使用以下线性梯度:95% A, 5% B至40% A, 60% B,在16分钟内,流速0.40 ml/min。

[1274] 方法05_B9_1

[1275] UPLC (方法05_B9_1): 使用配置有双波段检测器的Waters UPLC系统进行RP-分析。使用ACQUITY UPLC BEH130, C18, 130 Å, 1.7 um, 2.1 mm x 150 mm柱, 40℃,采集

214nm和254nm处的紫外检测结果。将UPLC系统连接到含有以下成分的2个洗脱液池:A: 0.2 M Na₂SO₄, 0.04 M H₃PO₄, 10 %CH₃CN (pH 3.5); B: 70% CH₃CN, 30% H₂O。使用以下线性梯度:70% A, 30% B至20% A, 80% B,在8分钟内,流速0.40 ml/min。

[1276] 方法10_B12_1

[1277] UPLC (方法10_B12_1): 使用配置有双波段检测器的Waters UPLC系统进行RP-分析。使用ACQUITY UPLC BEH ShieldRP18, 1.7 μ m, 2.1 mm x 150 mm柱, 50°C,采集214nm和254nm处的紫外检测结果。将UPLC系统连接到含有以下成分的2个洗脱液池:A: 99.95% H₂O, 0.05% TFA; B: 99.95% CH₃CN, 0.05% TFA。使用以下线性梯度:50% A, 50% B至0% A, 100% B,在16分钟内,流速0.40 ml/min。

[1278] 方法04_A9_1

[1279] UPLC (方法04_A9_1):使用配置有双波段检测器的Waters UPLC系统进行RP-分析。使用ACQUITY UPLC BEH Shield RP18, C18, 1.7 μ m, 2.1 mm x 150 mm柱, 60°C,采集214nm和254nm处的紫外检测结果。将UPLC系统连接到含有以下成分的2个洗脱液池:A: 200 mM Na₂SO₄ + 20 mM Na₂HPO₄ + 20mM NaH₂PO₄/90%H₂O / 10%CH₃CN, pH 7.2; B: 70% CH₃CN, 30% H₂O。使用以下步梯度:90% A, 10% B至80% A, 20% B,在3分钟内,80%A, 20% B至50% A, 50% B,在17分钟内,流速0.40 ml/min。

[1280] MALDI-MS方法

[1281] 用基质辅助激光解吸和电离飞行时间质谱测定分子量,记录在Microflex或Autoflex (Bruker)上。使用 α -氰基-4-羟基肉桂酸的基质。

[1282] NMR方法

[1283] 使用Brucker Avance DPX 300 (300 MHz),用四甲基甲硅烷作为内标,记录质子NMR谱。化学位移(δ)表示为ppm,分裂模式命名如下:s,单峰;d,双重峰;dd,双重双分裂峰;dt,双重三分裂峰;t,三重峰;tt,三重三分裂峰;q,四重峰;quint,五重峰;sext,六重峰;m,多重峰;和br = 宽。

[1284] B. 中间体的合成

[1285] 1. 脂肪二酸的单酯的合成

[1286] 将C12、C14、C16和C18二酸与Boc-酸酐、DMAP和叔丁醇的甲苯溶液回流过夜,主要得到叔丁基单酯。检查之后所获得的是单酸、二酸和二酯的混合物。通过洗涤、短硅胶塞过滤和结晶而进行纯化。

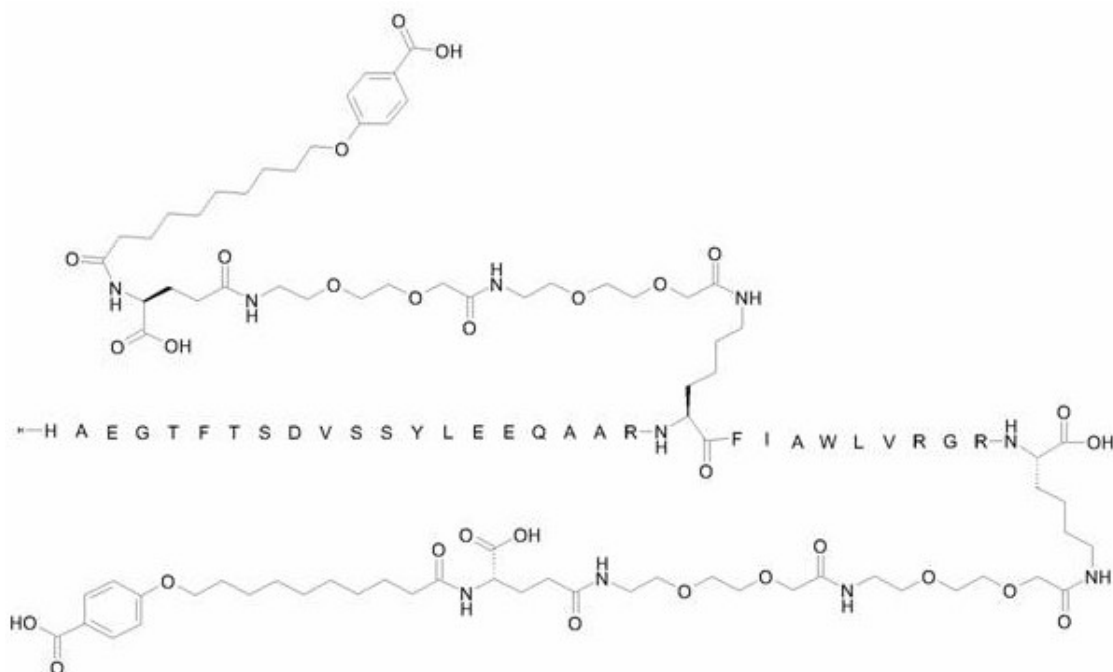
[1287] B. 本发明化合物的合成

[1288] 实施例1

[1289] N^{ε27}-[2-[2-[2-[[2-[2-[2-[(4S)-4-羧基-4-[10-(4-羧基苯氧基)癸酰基氨基]丁酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基],N^{ε37}-[2-[2-[2-[[2-[2-[2-[(4S)-4-羧基-4-[10-(4-羧基苯氧基)癸酰基氨基]丁酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基]-[Glu²²,Arg²⁶,Lys²⁷,Arg³⁴,Lys³⁷]-GLP-1-(7-37)-肽

[1290] 化学式50:

[1291]



[1292] 制备方法: SPPS方法B

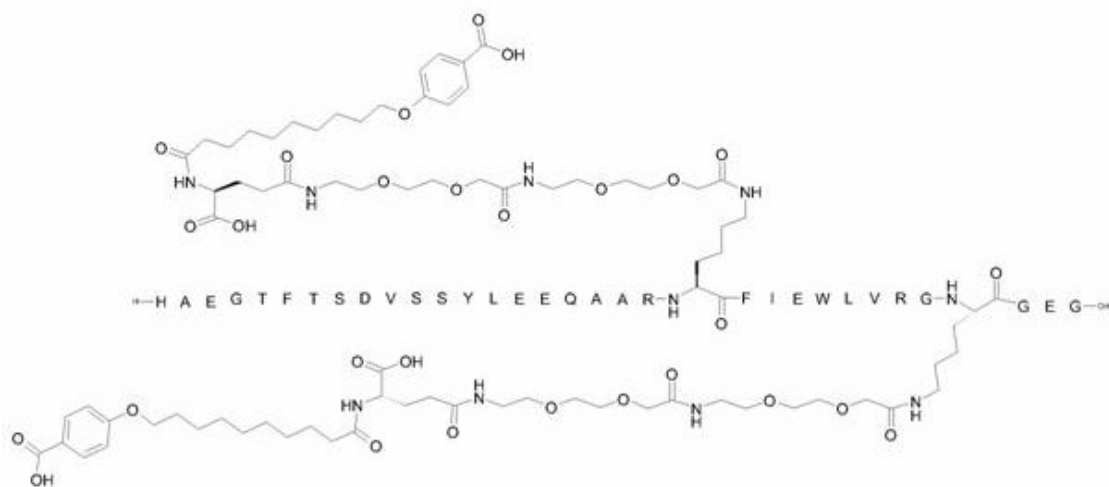
[1293] UPLC (方法09_B2_1): $R_t = 12.4 \text{ min}$ [1294] UPLC (方法: 04_A3_1): $R_t = 8.3 \text{ min}$.[1295] LCMS4: $R_t = 2.0 \text{ min}$, $m/z = 1659 \text{ (m/3)}$, 1244 (m/4) , 996 (m/5)

[1296] 实施例2

[1297] $\text{N}^{\epsilon 27}$ -[2-[2-[2-[[2-[2-[2-[(4S)-4-羧基-4-[10-(4-羧基苯氧基)癸酰基氨基]丁酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基], $\text{N}^{\epsilon 36}$ -[2-[2-[2-[[2-[2-[2-[(4S)-4-羧基-4-[10-(4-羧基苯氧基)癸酰基氨基]丁酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基]-[Glu²², Arg²⁶, Lys²⁷, Glu³⁰, Arg³⁴, Lys³⁶]-GLP-1-(7-37)-肽基-Glu-Gly

[1298] 化学式51:

[1299]



[1300] 制备方法: SPPS方法B

[1301] UPLC (方法09_B2_1): $R_t = 13.1 \text{ min}$

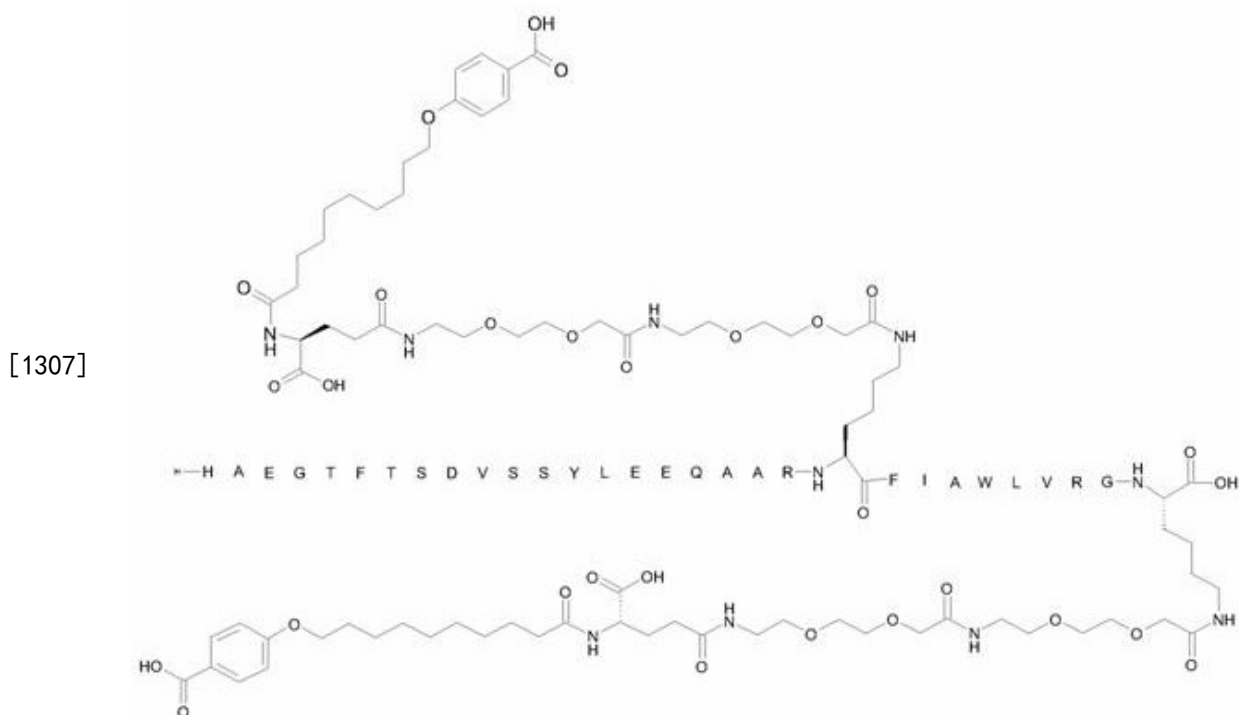
[1302] UPLC (方法04_A7_1): Rt = 6.3 min。

[1303] LCMS4: Rt = 2.1 min, m/z = 1707 (m/3), 1280 (m/4), 1025 (m/5)

[1304] 实施例3

[1305] N^ε²⁷-[2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[(4S)-4-羧基-4-[10-(4-羧基苯氧基) 癸酰基氨基] 丁酰基] 氨基] 乙氧基] 乙氧基] 乙酰基] 氨基] 乙氧基] 乙氧基] 乙酰基], N^ε³⁶-[2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[(4S)-4-羧基-4-[10-(4-羧基苯氧基) 癸酰基氨基] 丁酰基] 氨基] 乙氧基] 乙氧基] 乙酰基] 氨基] 乙氧基] 乙氧基] 乙酰基]-[Glu²², Arg²⁶, Lys²⁷, Arg³⁴, Lys³⁶], des-Gly37-GLP-1-(7-36)-肽

[1306] 化学式52:



[1308] 制备方法: SPPS方法B

[1309] UPLC (方法09_B2_1): Rt = 13.3 min

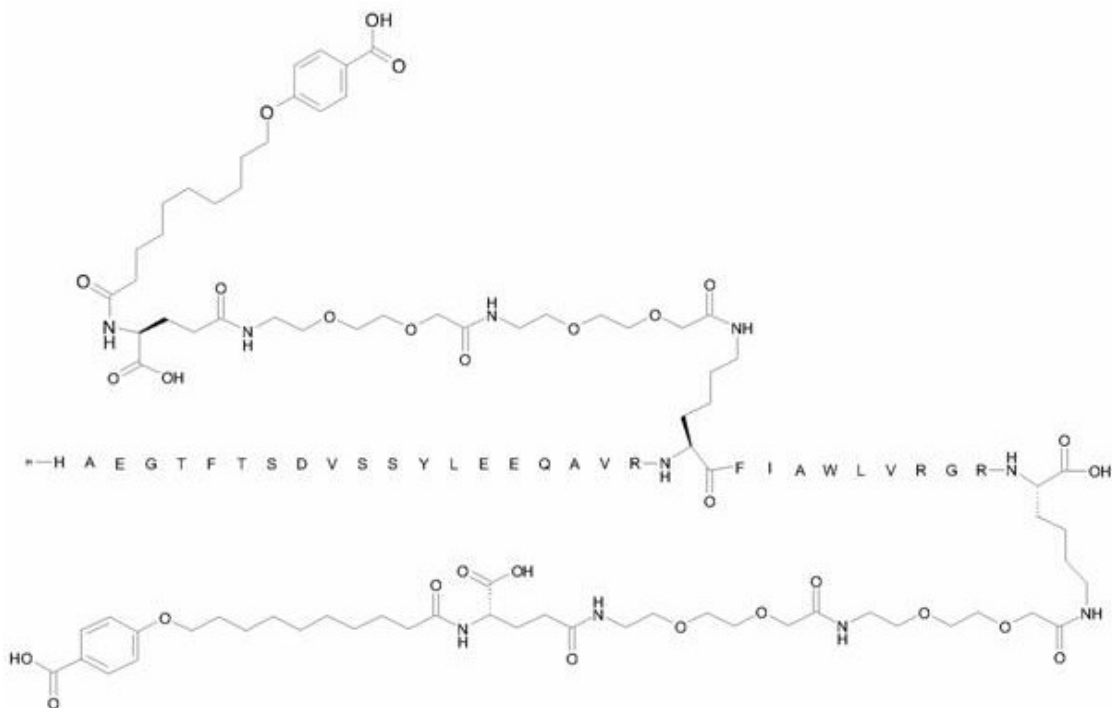
[1310] UPLC (方法05_B5_1): Rt = 6.5 min。

[1311] LCMS4: Rt = 2.3 min, m/z = 1607 (m/3), 1205 (m/4), 964 (m/5)

[1312] 实施例4

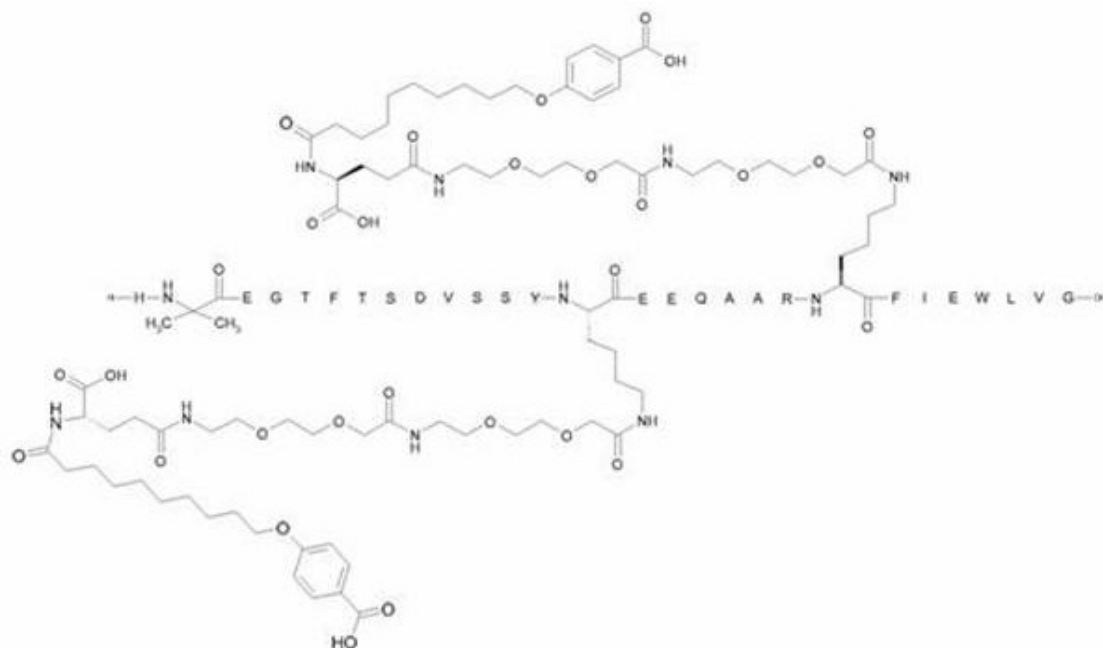
[1313] N^ε²⁷-[2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[(4S)-4-羧基-4-[10-(4-羧基苯氧基) 癸酰基氨基] 丁酰基] 氨基] 乙氧基] 乙氧基] 乙酰基] 氨基] 乙氧基] 乙氧基] 乙酰基], N^ε³⁷-[2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[(4S)-4-羧基-4-[10-(4-羧基苯氧基) 癸酰基氨基] 丁酰基] 氨基] 乙氧基] 乙氧基] 乙酰基] 氨基] 乙氧基] 乙氧基] 乙酰基]-[Glu²², Val²⁵, Arg²⁶, Lys²⁷, Arg³⁴, Lys³⁷]-GLP-1-(7-37)-肽

[1314] 化学式53:



[1322] 化学式54:

[1323]



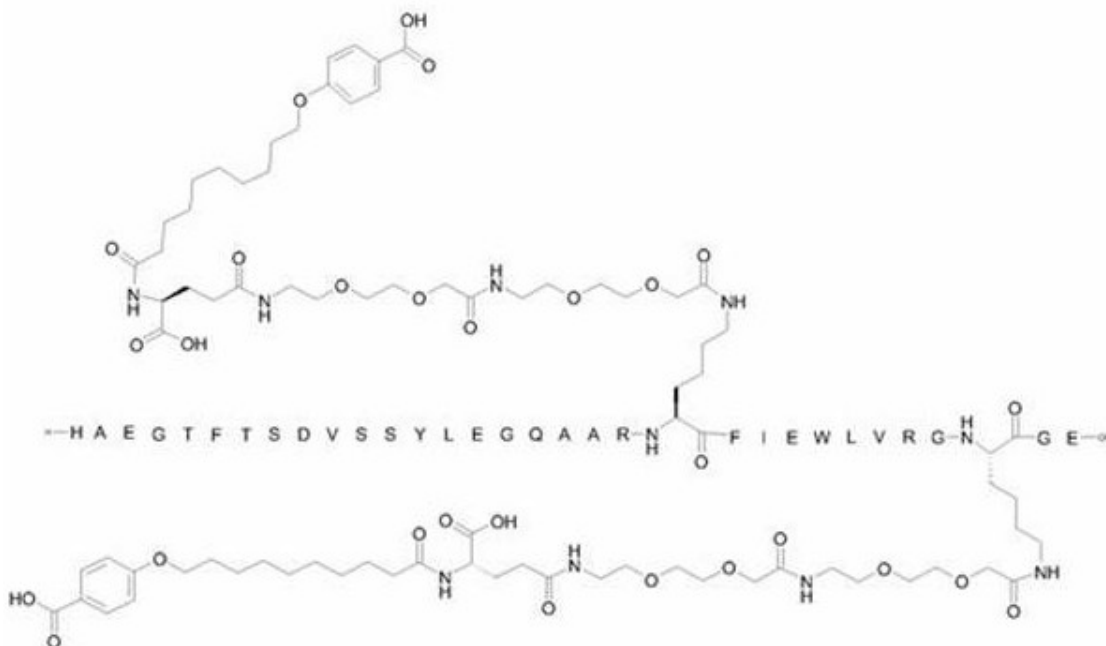
[1324] 制备方法: SPPS方法B

[1325] UPLC (方法08_B4_1): $R_t = 9.02 \text{ min}$ [1326] UPLC (方法04_A6_1): $R_t = 4.61 \text{ min}$.[1327] LCMS4: $R_t = 2.17 \text{ min}$, $m/z = 1540 (m/3)$, $1155 (m/4)$

[1328] 实施例6

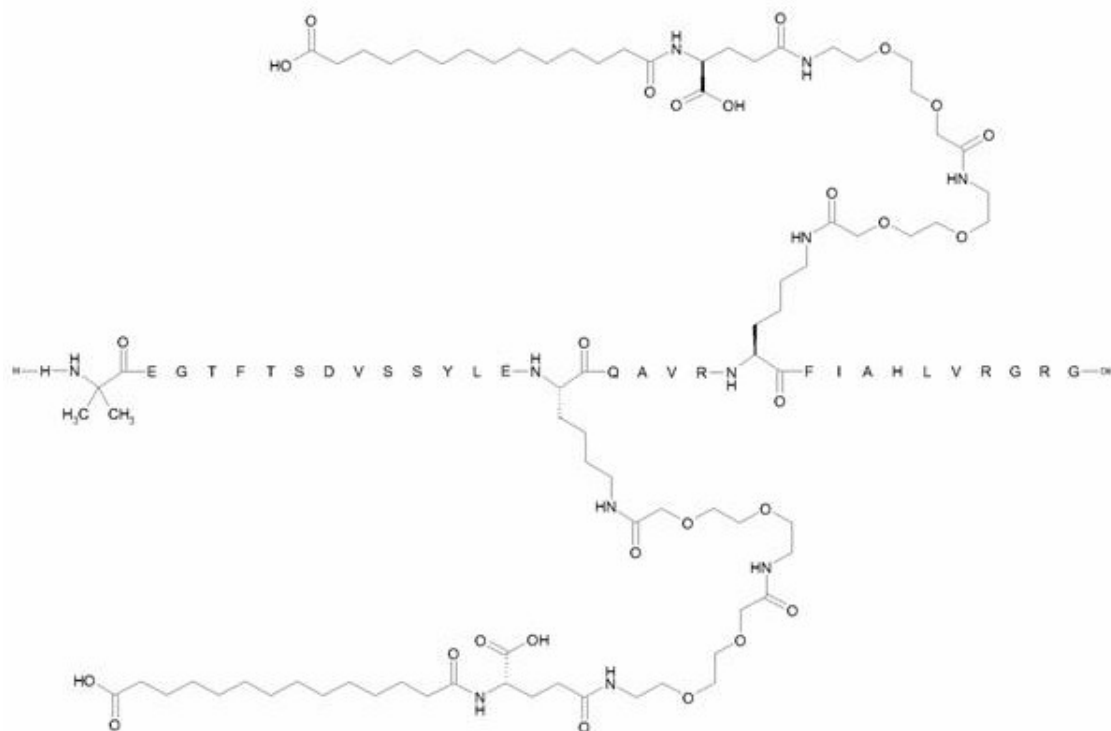
[1329] $N^{\epsilon 27}$ -[2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[(4S)-4-羧基-4-[10-(4-羧基苯氧基) 癸酰基氨基] 丁酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基], $N^{\epsilon 36}$ -[2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[(4S)-4-羧基-4-[10-(4-羧基苯氧基) 癸酰基氨基] 丁酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基]-[Arg²⁶, Lys²⁷, Glu³⁰, Arg³⁴, Lys³⁶]-GLP-1-(7-37)-肽基-Glu

[1330] 化学式55:



[1338] 化学式56:

[1339]



[1340] 制备方法:SPPS方法B

[1341] LCMS2: Rt = 4.00 min, m/z = 1599 (m/3), 1199 (m/4)

[1342] UPLC (方法08_B4_1): Rt = 7.83 min

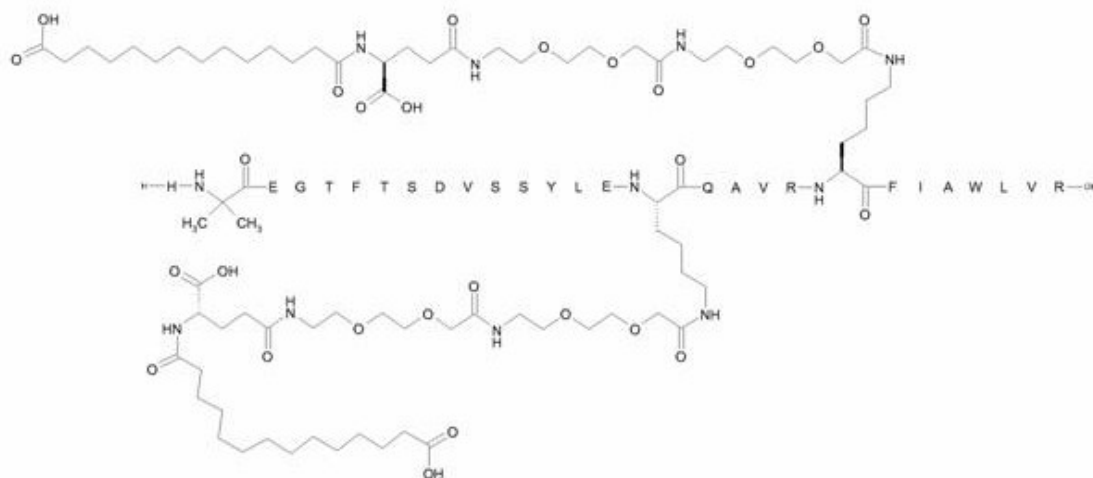
[1343] UPLC (方法05_B9_1): Rt = 7.45 min。

[1344] 实施例8

[1345] N^{ε22}-[2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[(4S)-4-羧基-4-(13-羧基十三酰基氨基) 丁酰基] 氨基] 乙氧基] 乙氧基] 乙酰基] 氨基] 乙氧基] 乙氧基] 乙酰基], N^{ε27}-[2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[(4S)-4-羧基-4-(13-羧基十三酰基氨基) 丁酰基] 氨基] 乙氧基] 乙氧基] 乙酰基] 氨基] 乙氧基] 乙氧基] 乙酰基]-[Aib⁸, Lys²², Val²⁵, Arg²⁶, Lys²⁷, Arg³⁴]-GLP-1-(7-34)-肽

[1346] 化学式57:

[1347]



[1348] 制备方法:SPPS方法B

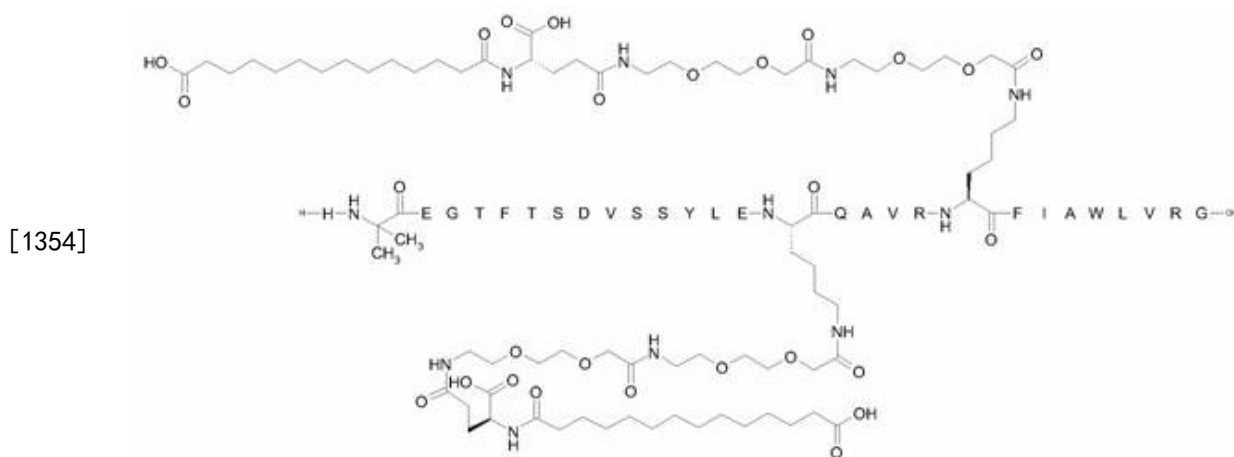
[1349] UPLC (方法10_B12_1): Rt = 8.92 min。

[1350] LCMS4: Rt = 2.58 min, m/z = 1525 (m/3), 1144 (m/4), 915 (m/5)

[1351] 实施例9

[1352] $N^{\epsilon 22}$ -[2-[2-[2-[2-[2-[2-[[(4S)-4-羧基-4-(13-羧基十三酰基氨基) 丁酰基] 氨基] 乙氧基] 乙氧基] 乙酰基] 氨基] 乙氧基] 乙氧基] 乙酰基], $N^{\epsilon 27}$ -[2-[2-[2-[2-[2-[2-[[(4S)-4-羧基-4-(13-羧基十三酰基氨基) 丁酰基] 氨基] 乙氧基] 乙氧基] 乙酰基] 氨基] 乙氧基] 乙氧基] 乙酰基]-[Aib8,Lys22,Val25,Arg26,Lys27,Arg34]-GLP-1-(7-35)-肽

[1353] 化学式58:



[1355] 制备方法:SPPS方法E

[1356] 通过MALDI-MS证实4628 Da的理论分子量

[1357] UPLC (方法09_B4_1): Rt = 9.29 min

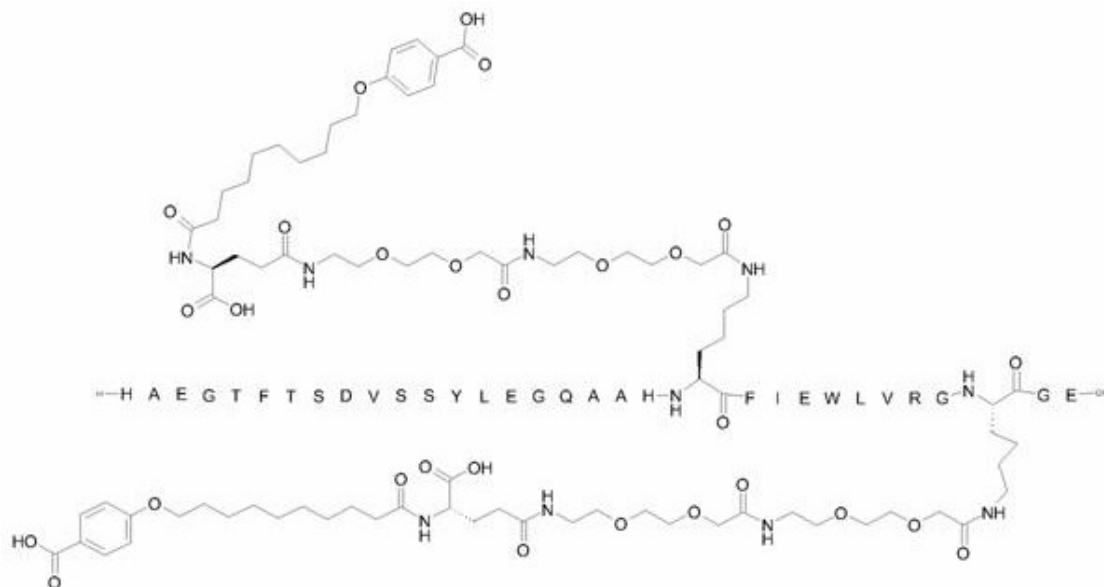
[1358] UPLC (方法04_A6_1): Rt = 6.49 min。

[1359] 实施例10

[1360] $N^{\epsilon 27}$ -[2-[2-[2-[2-[2-[2-[[(4S)-4-羧基-4-[10-(4-羧基苯氧基) 癸酰基氨基] 丁酰基] 氨基] 乙氧基] 乙氧基] 乙酰基] 氨基] 乙氧基] 乙氧基] 乙酰基], $N^{\epsilon 36}$ -[2-[2-[2-[2-[2-[2-[[(4S)-4-羧基-4-[10-(4-羧基苯氧基) 癸酰基氨基] 丁酰基] 氨基] 乙氧基] 乙氧基] 乙酰基] 氨基] 乙氧基] 乙氧基] 乙酰基]-[His²⁶,Lys²⁷,Glu³⁰,Arg³⁴,Lys³⁶]-GLP-1-(7-37)-肽基-Glu

[1361] 化学式59:

[1362]



[1363] 制备方法:SPPS方法B

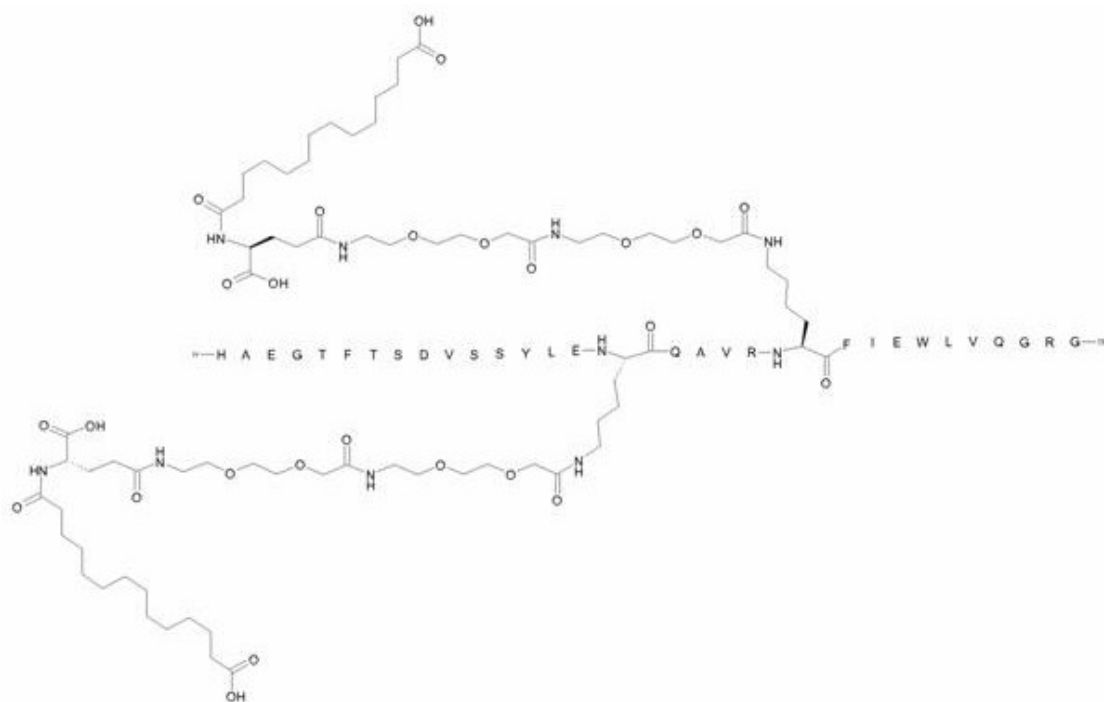
[1364] UPLC (方法08_B2_1): $R_t = 12.9 \text{ min}$ [1365] UPLC (方法05_B5_1): $R_t = 5.5 \text{ min}$.[1366] LCMS4: $R_t = 2.2 \text{ min}$, $m/z = 1657 (m/3)$, $1243 (m/4)$, $995 (m/5)$

[1367] 实施例11

[1368] $N^{\epsilon 22}$ -[2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[(4S)-4-羧基-4-(13-羧基十三酰基氨基)丁酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基], $N^{\epsilon 27}$ -[2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[(4S)-4-羧基-4-(13-羧基十三酰基氨基)丁酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基]-[Lys²², Val²⁵, Arg²⁶, Lys²⁷, Glu³⁰, Gln³⁴]-GLP-1-(7-37)-肽

[1369] 化学式60:

[1370]



[illegible]

[1392] 化学式63:

[1394] 制备方法:SPPS方法B

[1395] UPLC (方法08_B4_1): $R_t = 8.5 \text{ min}$

[1396] UPLC (方法05_B7_1): $R_t = 8.8 \text{ min}$ 。

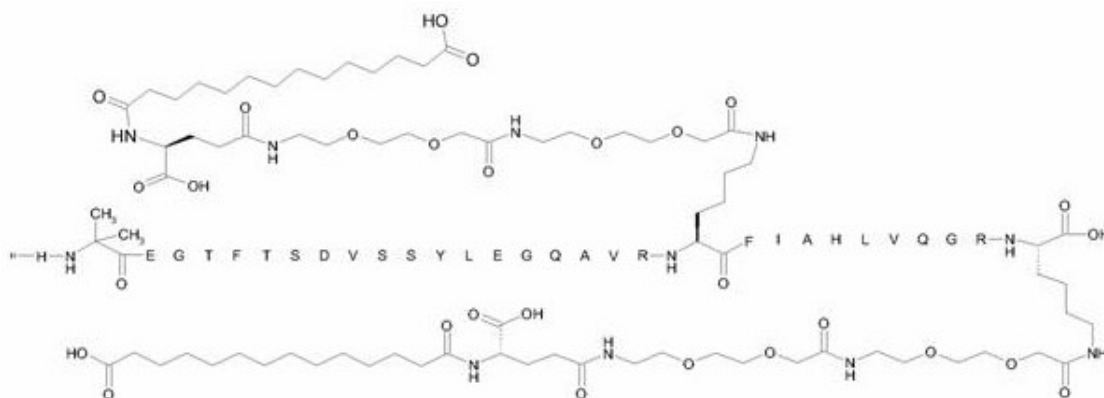
[1397] LCMS4: $R_t = 2.1 \text{ min}$, $m/z = 1462 \text{ (m/3)}$, 1097 (m/4) , 878 (m/5)

[1398] 实施例15

[1399] $N^{\epsilon 27}$ -[2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[(4S)-4-羧基-4-(13-羧基十三酰基氨基) 丁酰基] 氨基] 乙氧基] 乙氧基] 乙酰基] 氨基] 乙氧基] 乙氧基] 乙酰基], $N^{\epsilon 37}$ -[2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[(4S)-4-羧基-4-(13-羧基十三酰基氨基) 丁酰基] 氨基] 乙氧基] 乙氧基] 乙酰基] 氨基] 乙氧基] 乙氧基] 乙酰基]-[Aib⁸, Val²⁵, Arg²⁶, Lys²⁷, His³¹, Gln³⁴, Lys³⁷]-GLP-1-(7-37)-肽

[1400] 化学式64:

[1401]



[1402] 制备方法:SPPS方法B

[1403] UPLC (方法08_B4_1): $R_t = 8.3 \text{ min}$

[1404] UPLC (方法05_B9_1): $R_t = 7.1 \text{ min}$ 。

[1405] LCMS4: $R_t = 2.1 \text{ min}$, $m/z = 1589 \text{ (m/3)}$, 1192 (m/4) , 954 (m/5)

[1406] 实施例16

[1407] $N^{\epsilon 27}$ -[2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[(4S)-4-羧基-4-(13-羧基十三酰基氨基) 丁酰基] 氨基] 乙氧基] 乙氧基] 乙酰基] 氨基] 乙氧基] 乙氧基] 乙酰基], $N^{\epsilon 37}$ -[2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[(4S)-4-羧基-4-(13-羧基十三酰基氨基) 丁酰基] 氨基] 乙氧基] 乙氧基] 乙酰基] 氨基] 乙氧基] 乙氧基] 乙酰基]-[Val²⁵, Arg²⁶, Lys²⁷, His³¹, Gln³⁴, Lys³⁷]-GLP-1-(7-37)-肽

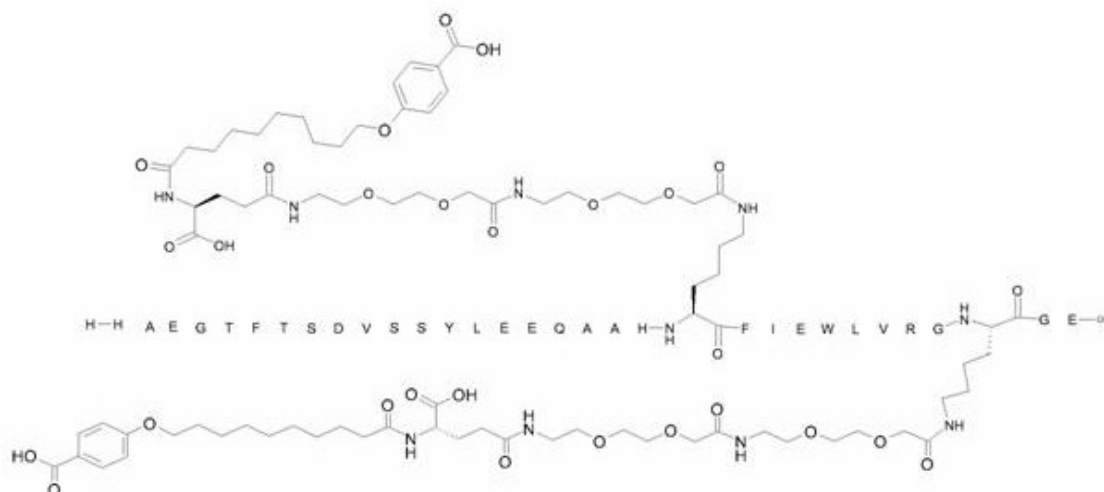
[1408] 化学式65:





[1447] 化学式70:

[1448]



[1449] 制备方法:SPPS方法B

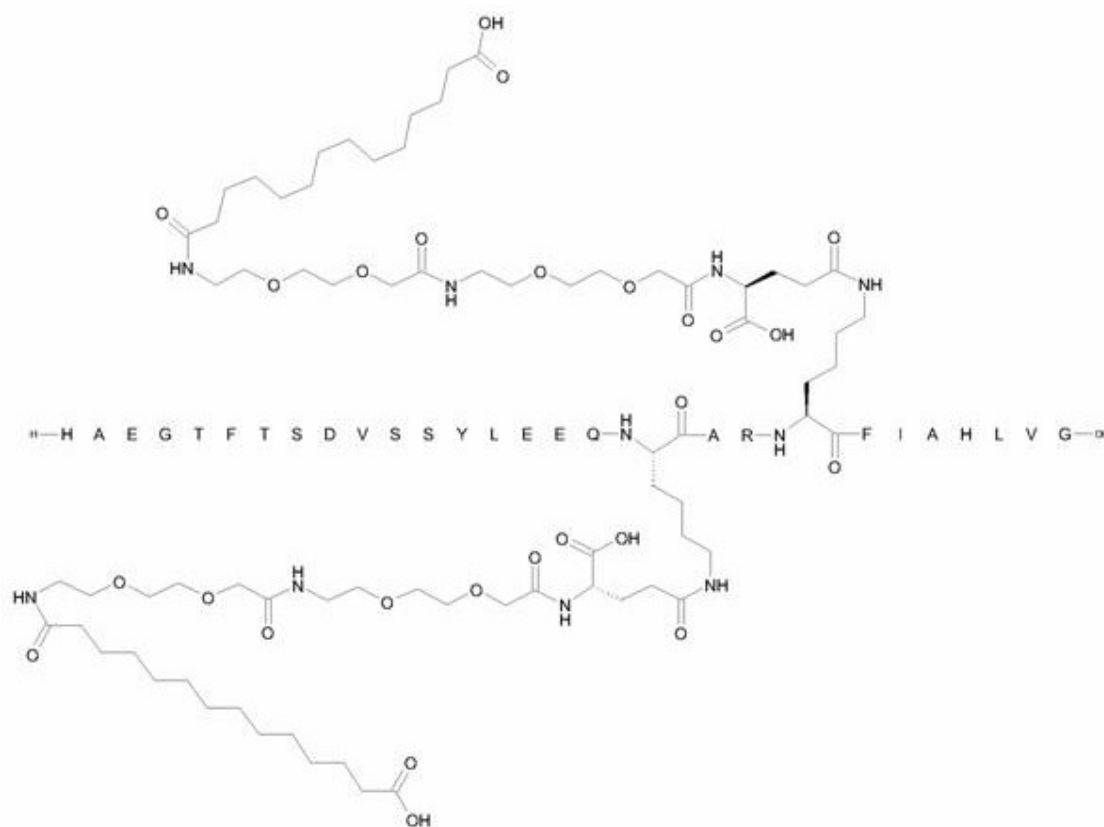
[1450] UPLC (方法09_B4_1): $R_t = 8.4$ min[1451] UPLC (方法04_A6_1): $R_t = 9.3$ min。[1452] LCMS4: $R_t = 2.2$ min, $m/z = 1681$ (m/3), 1261 (m/4), 1009 (m/5)

[1453] 实施例22

[1454] $N^{\epsilon 24}$ -[(4S)-4-羧基-4-[[2-[2-[2-[[2-[2-[2-(13-羧基十三酰基氨基)乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]氨基]丁酰基], $N^{\epsilon 27}$ -[(4S)-4-羧基-4-[[2-[2-[2-[[2-[2-[2-(13-羧基十三酰基氨基)乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基]氨基]丁酰基]-[Glu²², Lys²⁴, Arg²⁶, Lys²⁷, His³¹, Gly³⁴]-GLP-1-(7-34)-肽

[1455] 化学式71:

[1456]



[1457] 制备方法:SPPS方法B

[1458] UPLC (方法09_B4_1): $R_t = 8.17 \text{ min}$

[1459] UPLC (方法04_A6_1): $R_t = 4.65 \text{ min.}$

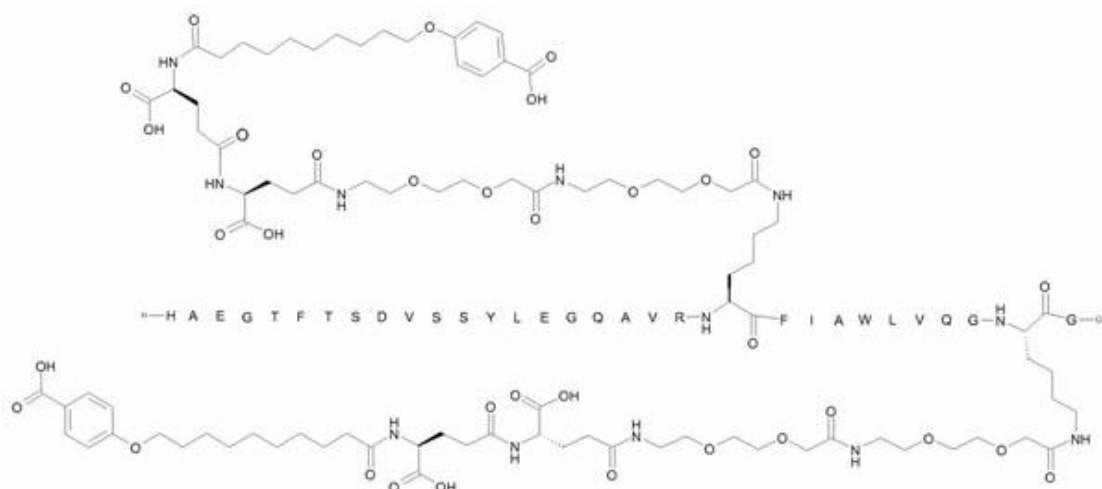
[1460] LCMS4: $R_t = 1.98 \text{ min, m/z} = 1481 \text{ (m/3), } 1111 \text{ (m/4)}$

[1461] 实施例23

[1462] $N^{\epsilon 27}$ -[2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[(4S)-4-羧基-4-[[(4S)-4-羧基-4-[10-(4-羧基苯氧基) 癸酰基氨基] 丁酰基] 氨基] 丁酰基] 氨基] 乙氧基] 乙氧基] 乙酰基] 氨基] 乙氧基] 乙氧基] 乙酰基], $N^{\epsilon 36}$ -[2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[(4S)-4-羧基-4-[[(4S)-4-羧基-4-[10-(4-羧基苯氧基) 癸酰基氨基] 丁酰基] 氨基] 丁酰基] 氨基] 乙氧基] 乙氧基] 乙酰基] 氨基] 乙氧基] 乙氧基] 乙酰基]-[Val²⁵, Arg²⁶, Lys²⁷, Gln³⁴, Lys³⁶]-GLP-1-(7-37)-肽

[1463] 化学式72:

[1464]



[1465] 制备方法:SPPS方法B

[1466] UPLC (方法08_B4_1): $R_t = 8.82 \text{ min}$

[1467] UPLC (方法05_B5_1): $R_t = 6.10 \text{ min.}$

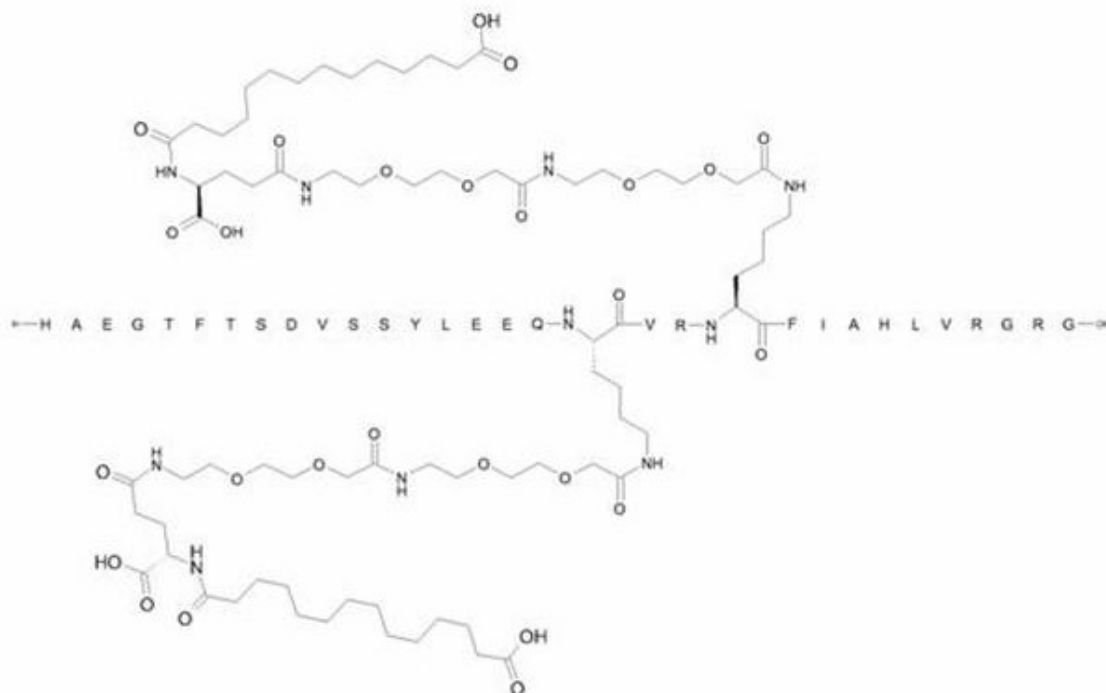
[1468] LCMS4: $R_t = 2.37 \text{ min, m/z} = 1687 \text{ (m/3), } 1266 \text{ (m/4), } 1013 \text{ (m/5)}$

[1469] 实施例24

[1470] $N^{\epsilon 24}$ -[2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[(4S)-4-羧基-4-(13-羧基十三酰基氨基) 丁酰基] 氨基] 乙氧基] 乙氧基] 乙酰基] 氨基] 乙氧基] 乙氧基] 乙酰基], $N^{\epsilon 27}$ -[2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[(4S)-4-羧基-4-(13-羧基十三酰基氨基) 丁酰基] 氨基] 乙氧基] 乙氧基] 乙酰基] 氨基] 乙氧基] 乙氧基] 乙酰基]-[Glu²², Lys²⁴, Val²⁵, Arg²⁶, Lys²⁷, His³¹, Arg³⁴]-GLP-1-(7-37)-肽

[1471] 化学式73:

[1472]



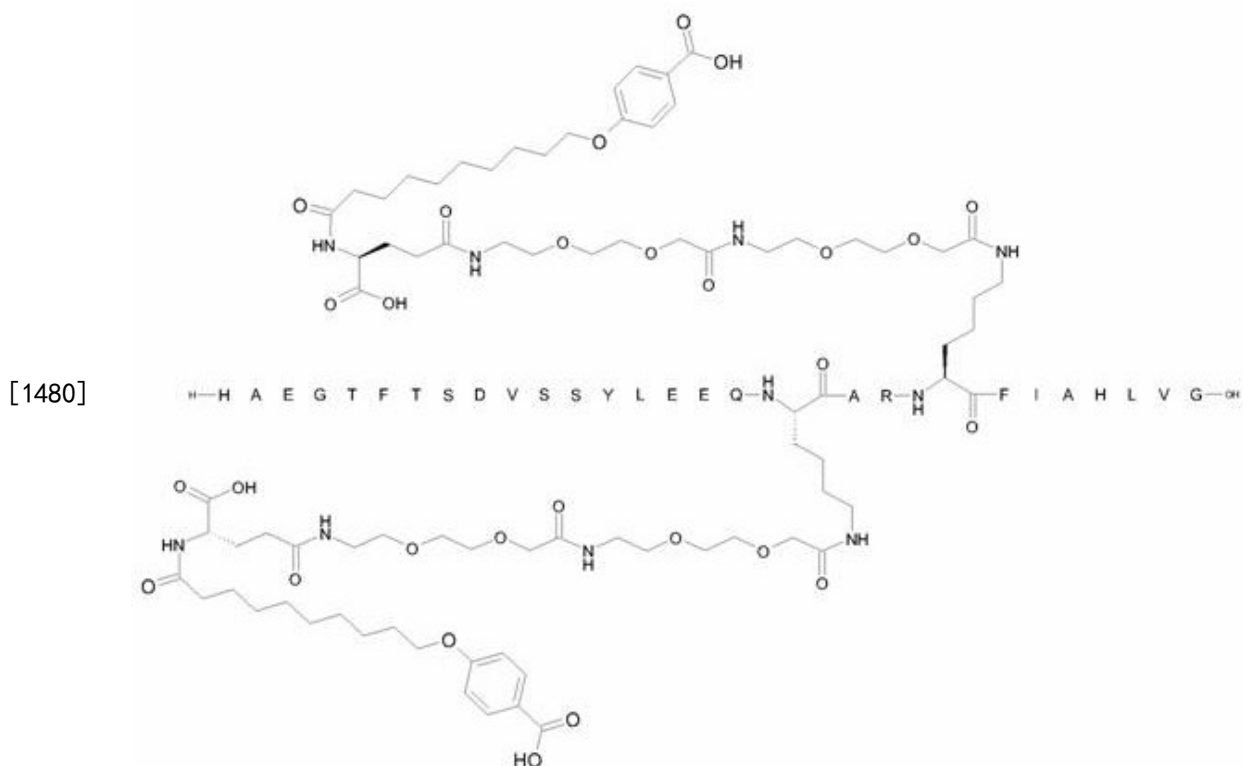
[1473] 制备方法:SPPS方法B

[1474] UPLC (方法08_B4_1): $R_t = 7.52$ min[1475] UPLC (方法04_A9_1): $R_t = 10.35$ min。[1476] LCMS4: $R_t = 1.92$ min, $m/z = 1613$ (m/3), 1210 (m/4), 968 (m/5), 807 (m/6)

[1477] 实施例25

[1478] $N^{\epsilon 24}$ -[2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[(4S)-4-羧基-4-[10-(4-羧基苯氧基) 癸酰基氨基] 丁酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基], $N^{\epsilon 27}$ -[2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[(4S)-4-羧基-4-[10-(4-羧基苯氧基) 癸酰基氨基] 丁酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基]-[Glu²², Lys²⁴, Arg²⁶, Lys²⁷, His³¹, Gly³⁴]-GLP-1-(7-34)-肽

[1479] 化学式74:



[1481] 制备方法:SPPS方法B

[1482] UPLC (方法08_B4_1): $R_t = 8.01 \text{ min}$

[1483] UPLC (方法04_A9_1): $R_t = 8.00 \text{ min.}$

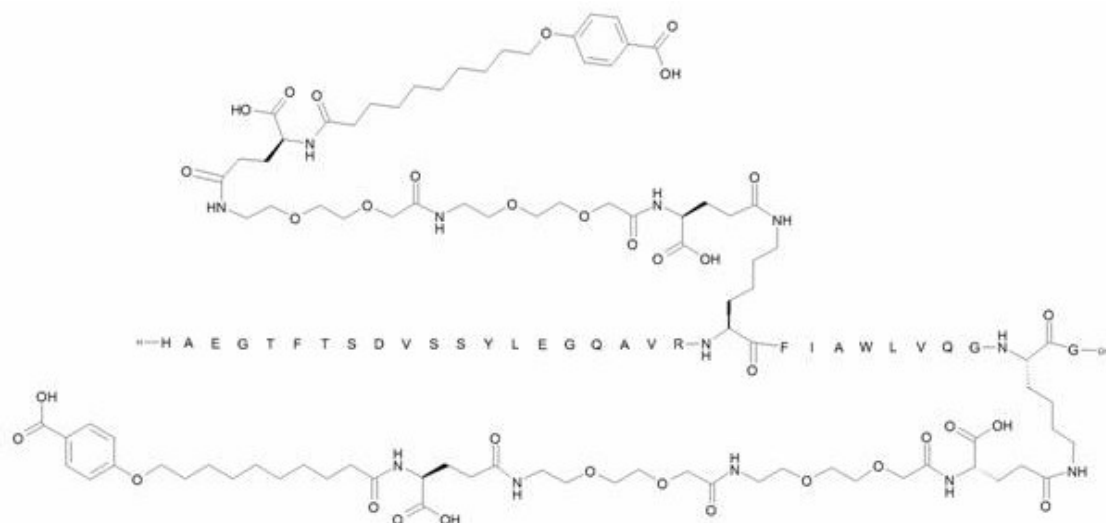
[1484] LCMS4: $R_t = 2.08 \text{ min}$, $m/z = 1513 \text{ (m/3)}, 1135 \text{ (m/4)}, 908 \text{ (m/5)}$

[1485] 实施例26

[1486] $N^{\epsilon 27}$ -[(4S)-4-羧基-4-[[2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[[(4R)-4-羧基-4-[10-(4-羧基苯氧基)癸酰基氨基]丁酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基]氨基]丁酰基], $N^{\epsilon 36}$ -[(4S)-4-羧基-4-[[2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[[(4R)-4-羧基-4-[10-(4-羧基苯氧基)癸酰基氨基]丁酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基]氨基]丁酰基)]-[Val²⁵, Arg²⁶, Lys²⁷, Gln³⁴, Lys³⁶]-GLP-1-(7-37)-肽

[1487] 化学式75:

[1488]



[1489] 制备方法:SPPS方法B

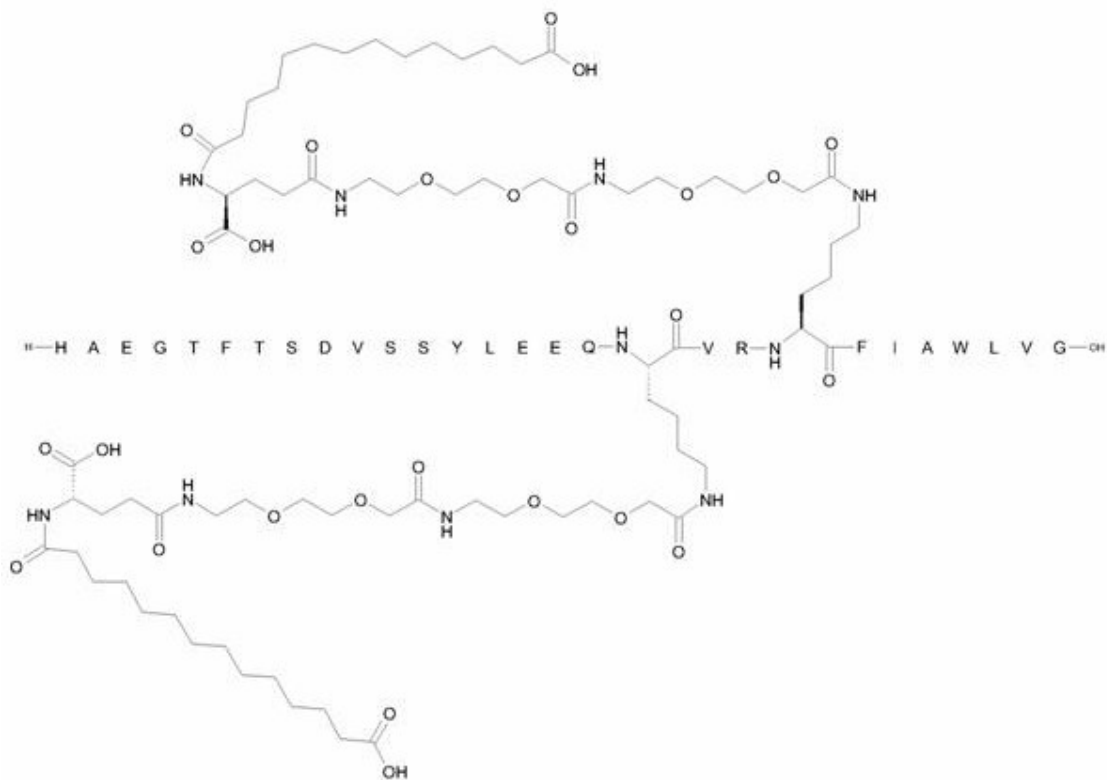
[1490] UPLC (方法09_B4_1): $R_t = 8.96$ min[1491] UPLC (方法05_B5_1): $R_t = 6.54$ min[1492] UPLC (方法04_A6_1): $R_t = 5.69$ min。[1493] LCMS4: m/z : $R_t = 3.07$ min, $m/z = 1687$ (m/3), 1266 (m/4), 1013 (m/5)

[1494] 实施例27

[1495] $N^{\epsilon 24}$ -[2-[2-[2-[2-[2-[2-[[(4S)-4-羧基-4-(13-羧基十三酰基氨基) 丁酰基] 氨基] 乙氧基] 乙氧基] 乙酰基] 氨基] 乙氧基] 乙氧基] 乙酰基], $N^{\epsilon 27}$ -[2-[2-[2-[2-[2-[2-[[(4S)-4-羧基-4-(13-羧基十三酰基氨基) 丁酰基] 氨基] 乙氧基] 乙氧基] 乙酰基] 氨基] 乙氧基] 乙氧基] 乙酰基]-[Glu²², Lys²⁴, Val²⁵, Arg²⁶, Lys²⁷, Gly³⁴]-GLP-1-(7-34)-肽

[1496] 化学式76:

[1497]



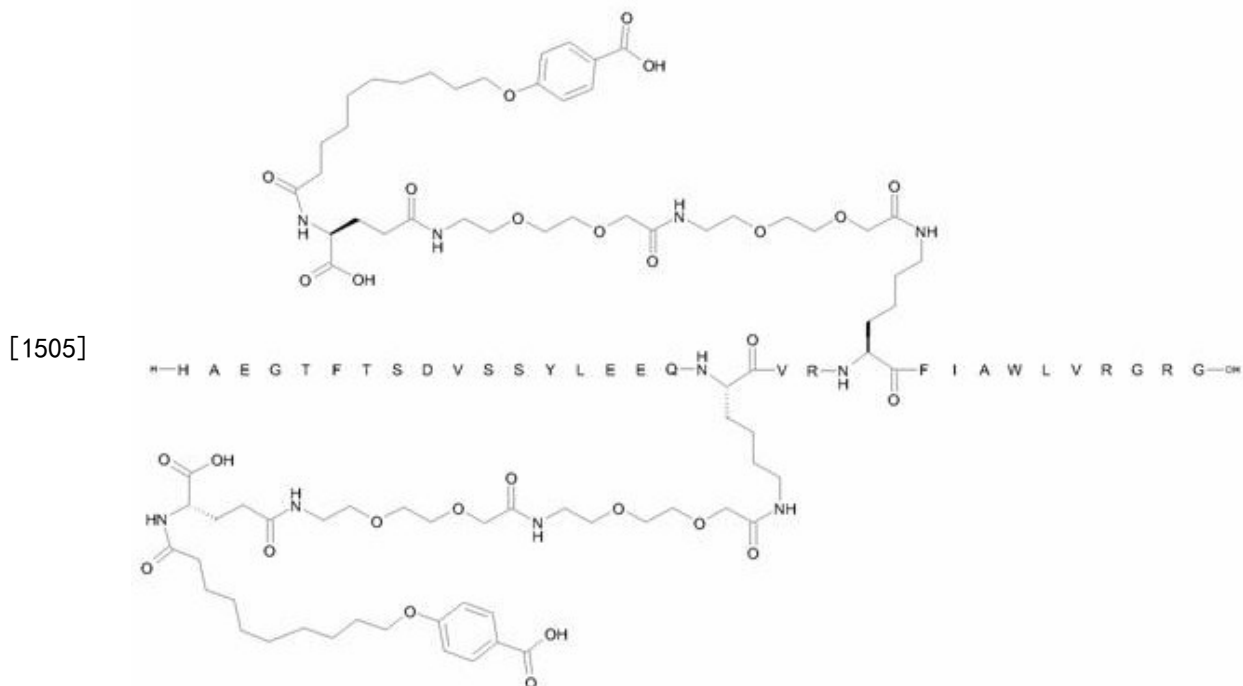
[1498] 制备方法:SPPS方法B

[1499] UPLC (方法09_B4_1): $R_t = 9.25$ min[1500] UPLC (方法04_A6_1): $R_t = 6.01$ min。[1501] **LCMS4: $R_t = 3.31$ min, $m/z = 1506$ (m/3), 1130 (m/4), 4520 (m/5)**

[1502] 实施例28

[1503] $N^{\epsilon 24}$ -[2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[(4S)-4-羧基-4-[10-(4-羧基苯氧基) 癸酰基氨基] 丁酰基] 氨基] 乙氧基] 乙氧基] 乙酰基] 氨基] 乙氧基] 乙氧基] 乙酰基], $N^{\epsilon 27}$ -[2-[2-[2-[2-[2-[2-[[(4S)-4-羧基-4-[10-(4-羧基苯氧基) 癸酰基氨基] 丁酰基] 氨基] 乙氧基] 乙氧基] 乙酰基] 氨基] 乙氧基] 乙氧基] 乙酰基]-[Glu²², Lys²⁴, Val²⁵, Arg²⁶, Lys²⁷, Arg³⁴]-GLP-1-(7-37)-肽

[1504] 化学式77:



[1506] 制备方法: SPPS方法B

[1507] UPLC (方法08 B4 1): $R_t = 8.19$ min

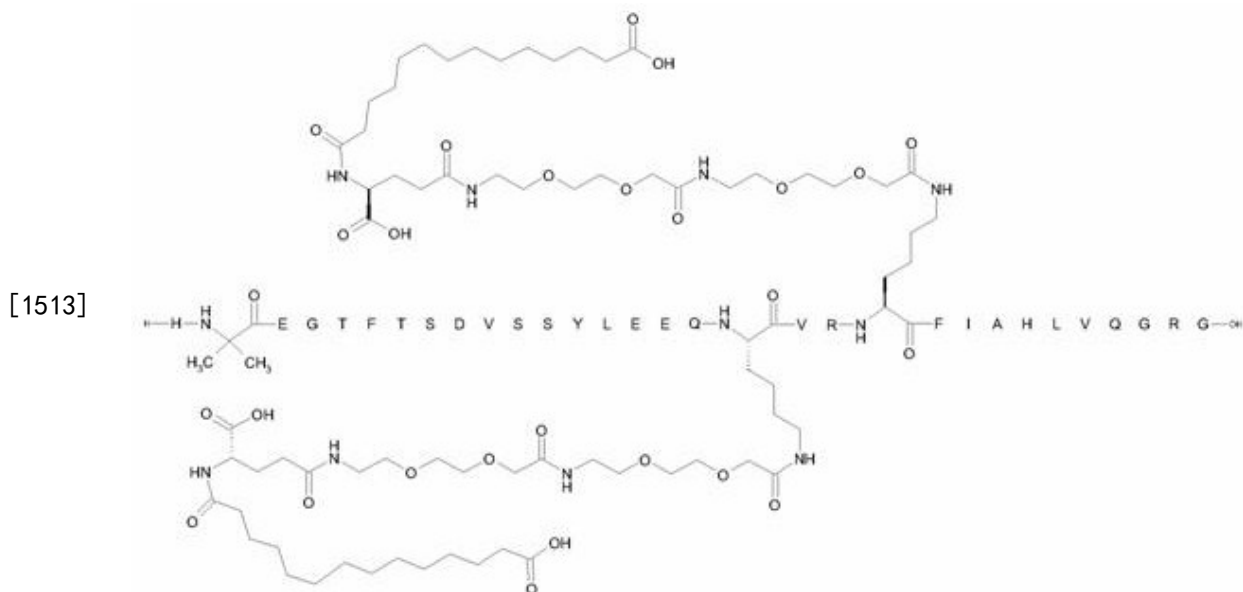
[1508] UPLC (方法04 A6 1): $R_t = 5.24$ min.

[1509] LCMS4: Rt = 3.22 min, m/z = 1663 (m/3), 1247 (m/4), 998 (m/5), 832 (m/6)

[1510] 实施例29

[1511] $N^{\epsilon 24}$ -[2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[(4S)-4-羧基-4-(13-羧基十三酰基氨基) 丁酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基], $N^{\epsilon 27}$ -[2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[(4S)-4-羧基-4-(13-羧基十三酰基氨基) 丁酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基]-[Aib⁸, Glu²², Lys²⁴, Val²⁵, Arg²⁶, Lys²⁷, His³¹, Gln³⁴]-GLP-1-(7-37)-肽

[1512] 化学式78:



[1514] 制备方法:SPPS方法B

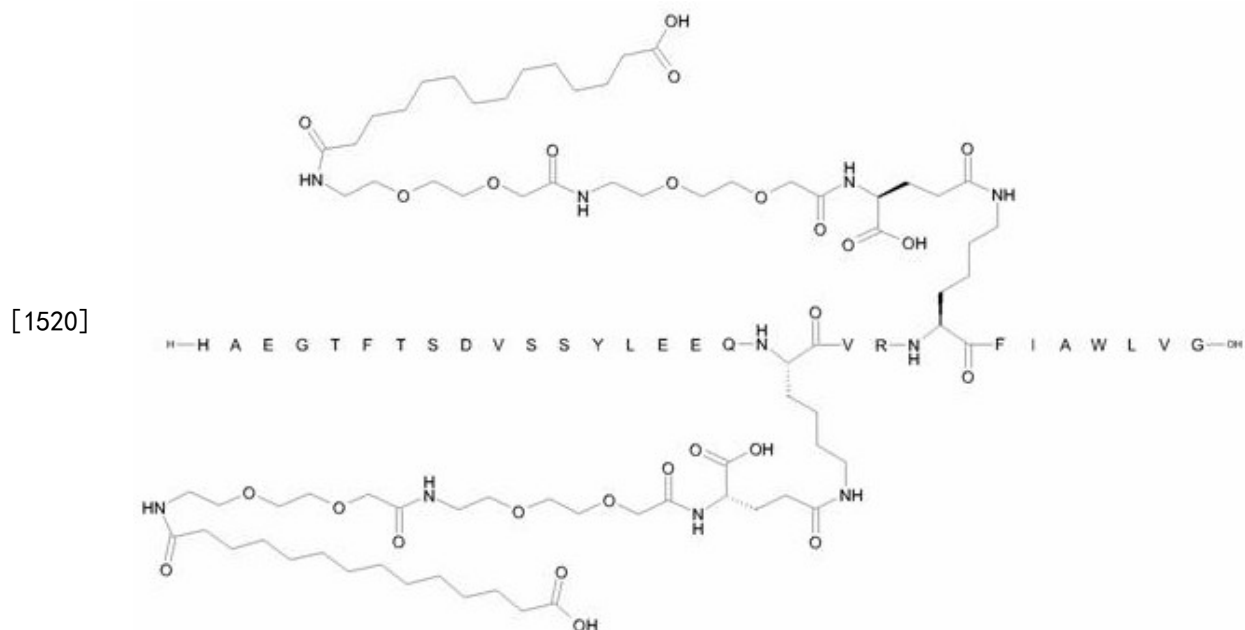
[1515] UPLC (方法08_B4_1): Rt = 7.79 min

[1516] UPLC (方法04_A6_1): Rt = 4.87 min。

[1517] 实施例30

[1518] $N^{\epsilon 24}$ -[(4S)-4-羧基-4-[[2-[2-[2-[[2-[2-[2-(13-羧基十三酰基氨基)乙氧基]乙氧基]乙氧基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]氨基]丁酰基], $N^{\epsilon 27}$ -[(4S)-4-羧基-4-[[2-[2-[2-[[2-[2-[2-(13-羧基十三酰基氨基)乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]氨基]丁酰基]-[Glu²², Lys²⁴, Val²⁵, Arg²⁶, Lys²⁷, Gly³⁴]-GLP-1-(7-34)-肽

[1519] 化学式79:



[1521] 制备方法:SPPS方法B

[1522] UPLC (方法08_B4_1): Rt = 9.33 min

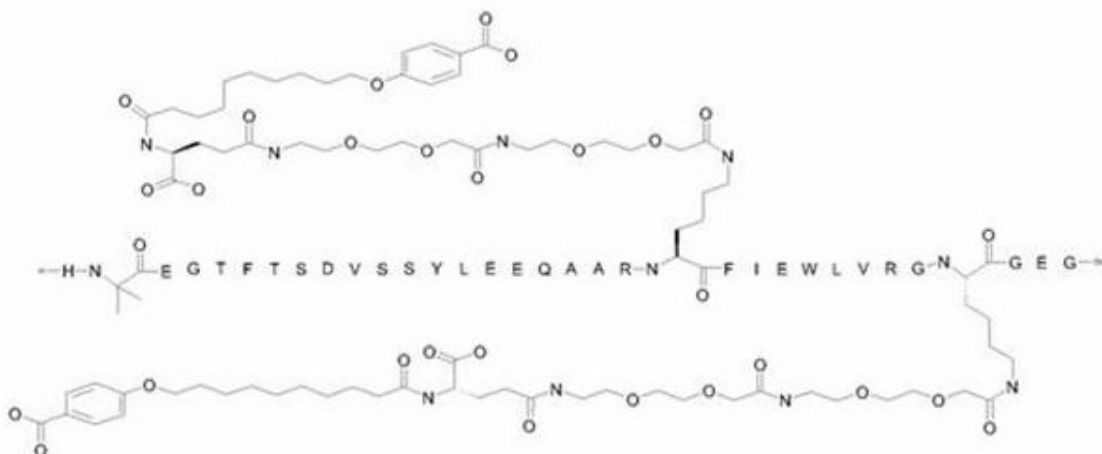
[1523] UPLC (方法04_A6_1): Rt = 6.13 min。

[1524] LCMS4: Rt = 2.98 min, m/z = 1506 (m/3), 1130 (m/4), 904 (m/5)

[1525] 实施例31

[1526] $N^{\epsilon 27}$ -[2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[(4S)-4-羧基-4-[10-(4-羧基苯氧基)癸酰基氨基]丁酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙氧基], $N^{\epsilon 36}$ -[2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[(4S)-4-羧基-4-[10-(4-羧基苯氧基)癸酰基氨基]丁酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]-[Aib⁸, Glu²², Arg²⁶, Lys²⁷, Glu³⁰, Arg³⁴, Lys³⁶]-GLP-1-(7-37)-肽基-Glu-Gly

[1527] 化学式80:



[1529] 制备方法: SPPS方法B

[1530] UPLC (方法09 B4 1): $R_t = 8.58$ min

[1531] UPLC (方法10 B29 1): Rt = 10.6 min

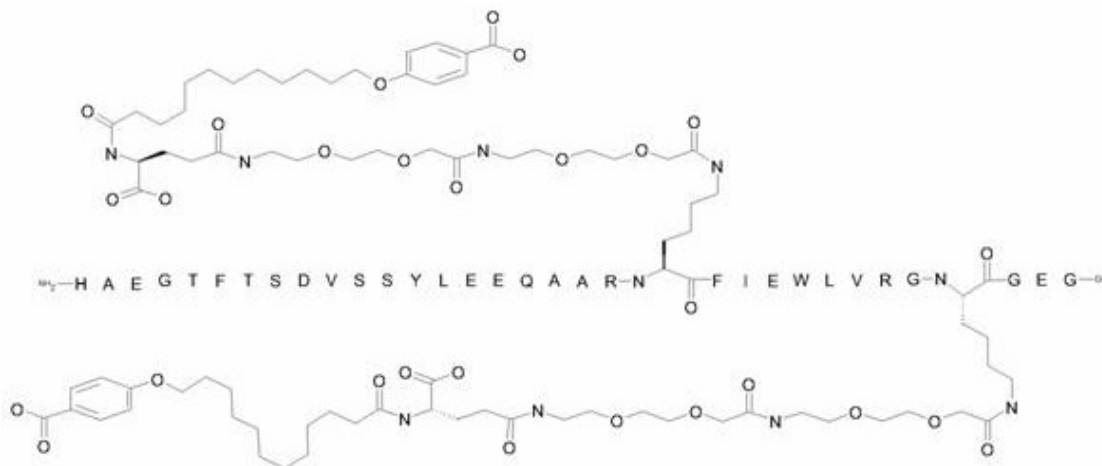
[1532] UPLC (方法04 A6 1): $R_t = 4.43$ min.

[1533] LCMS4: Rt = 3.72min; m/3: 1712; m/4: 1284; m/5: 1028

[1534] 实施例32

[1535] N^{ε27}-[2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[(4S)-4-羧基-4-[12-(4-羧基苯氧基) 十二烷酰基氨基] 丁酰基] 氨基] 乙氧基] 乙氧基] 乙酰基] 氨基] 乙氧基] 乙氧基] 乙酰基], N^{ε36}-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[[(4S)-4-羧基-4-[12-(4-羧基苯氧基) 十二烷酰基氨基] 丁酰基] 氨基] 乙氧基] 乙氧基] 乙酰基] 氨基] 乙氧基] 乙氧基] 乙酰基]-[Glu²², Arg²⁶, Lys²⁷, Glu³⁰, Arg³⁴, Lys³⁶]-GLP-1-(7-37)-肽基-Glu-Gly

[1536] 化学式81:



[1538] 制备方法: SPPS方法B

[1539] UPLC (方法09 B4 1): $R_t = 9.19$ min

[1540] UPLC (方法10 B29 1): $R_t = 13.73$ min

[1541] UPLC (方法04 A6 1): $R_t = 5.40$ min.

[1542] LCMS4: Rt = 2.44 min; m/3: 1726; m/4: 1294; m/5:1036

[1543] 药理学方法

[1544] 实施例33: 体外功效

[1545] 本实施例的目的是在体外测试GLP-1衍生物的活性或功效。。

[1546] 实施例1-32的GLP-1衍生物的功效如下所述进行测定,即,测定为在含有表达人GLP-1受体的膜的培养基中刺激环AMP (cAMP) 的形成。

[1547] 原理

[1548] 来自表达人GLP-1受体的稳定转染的细胞系BHK467-12A (tk-ts13) 的纯化的质膜用目标GLP-1类似物或衍生物刺激,并且cAMP产生的功效使用来自Perkin Elmer Life Sciences的AlphaScreen™ cAMP测定试剂盒进行测量。AlphaScreen测定的基本原理是内源cAMP和外源添加的生物素-cAMP之间的竞争。cAMP的捕获通过使用缀合至受体珠粒的特异性抗体来实现。

[1549] 细胞培养和膜的制备

[1550] 选择稳定转染的细胞系和高表达克隆用于筛选。细胞生长在5% CO₂下在DMEM, 5% FCS, 1% Pen/Strep (青霉素/链霉素) 和0.5 mg/ml选择标记G418中。

[1551] 在约80%汇合的细胞用PBS洗涤2次,并且用Versene (乙二胺四乙酸四钠盐的水溶液) 收获,以1000 rpm离心5 min,并且去除上清液。额外步骤都在冰上进行。将细胞沉淀物通过Ultrathurax在10 ml缓冲液1 (20 mM Na-HEPES, 10 mM EDTA, pH=7.4) 中均质化20-30 s,以20,000 rpm离心15 min,并且将沉淀再悬浮于10 ml缓冲液2 (20 mM Na-HEPES, 0.1 mM EDTA, pH=7.4) 中。将悬浮液均质化20-30 s,并且以20,000 rpm离心15 min。将悬浮在缓冲液2中、均质化和离心重复一次,并且将膜重悬浮于缓冲液2中。确定蛋白浓度并将膜储存在-80℃下直至使用。

[1552] 在平底96孔板中进行该测定 (Costar目录号:3693)。每孔的终体积为50 μl。

[1553] 溶液和试剂

[1554] 来自Perkin Elmer Life Sciences的AlphaScreen cAMP测定试剂盒 (目录号: 6760625M); 含抗cAMP受体珠粒 (10 U/μl), 链霉亲和素供体珠粒 (10 U/μl) 和生物素化的cAMP (133 U/μl)。

[1555] AlphaScreen缓冲液, pH=7.4: 50 mM TRIS-HCl (Sigma, 目录号: T3253); 5 mM HEPES (Sigma, 目录号: H3375); 10 mM MgCl₂, 6H₂O (Merck, 目录号: 5833); 150 mM NaCl (Sigma, 目录号: S9625); 0.01%吐温 (Merck, 目录号: 822184)。在使用之前将以下添加至AlphaScreen缓冲液中 (表示的终浓度): BSA (Sigma, 目录号A7906): 0.1%; IBMX (Sigma, 目录号I5879): 0.5 mM; ATP (Sigma, 目录号A7699): 1 mM; GTP (Sigma, 目录号G8877): 1 μM。

[1556] cAMP标准品 (在测定中的稀释系数= 5): cAMP溶液: 5 μL的5 mM cAMP-储存物 + 495 μL AlphaScreen缓冲液。

[1557] 制备cAMP标准品以及待测试的GLP-1类似物或衍生物在AlphaScreen缓冲液中的合适稀释系列,例如,以下八个浓度的GLP-1化合物: 10⁻⁷、10⁻⁸、10⁻⁹、10⁻¹⁰、10⁻¹¹、10⁻¹²、10⁻¹³ 和10⁻¹⁴M, 和从 (例如) 10⁻⁶至3x10⁻¹¹ cAMP的系列。

[1558] 膜/受体珠粒

[1559] 从hGLP-1/ BHK 467-12A细胞制备膜, 6 μg/孔的浓度对应于0.6 mg/ml (每孔使用的膜量可能变化)

[1560] “无膜”:AlphaScreen缓冲液中的受体珠粒(最终15 μ g/ml)

[1561] “6 μ g/孔膜”:AlphaScreen缓冲液中的膜+受体珠粒(最终15 μ g/ml)

[1562] 将“无膜”的等分试样(10 μ l)添加至cAMP标准品(一式两份孔中的每孔)和阳性对照和阴性对照

[1563] 将“6 μ g/孔膜”的等分试样(10 μ l)添加至GLP-1和类似物(一式两份或一式三份孔中的每孔)。

[1564] 阳性对照:10 μ l “无膜”+ 10 μ l AlphaScreen缓冲液。

[1565] 阴性对照:10 μ l “无膜”+ 10 μ l cAMP储存溶液(50 μ M)

[1566] 由于珠粒对于直接光敏感,所以任何操作都在黑暗中(尽可能暗)或在绿光下进行。所有稀释在冰上进行。

[1567] 程序

[1568] 1.制备AlphaScreen缓冲液。

[1569] 2.将GLP-1/类似物/cAMP标准品溶解并稀释在AlphaScreen缓冲液中。

[1570] 3.通过混合链霉亲和素供体珠粒(2单位/孔)和生物素化的cAMP(1.2单位/孔)而制备供体珠粒溶液,并且在黑暗中以室温下孵育20-30 min。

[1571] 4. 将cAMP/GLP-1/类似物添加至板:10 μ l/孔。

[1572] 5.制备膜/受体珠粒溶液,并且将其添加至板:10 μ l/孔。

[1573] 6.添加供体珠粒:30 μ l/孔。

[1574] 7.将板包裹在铝箔中,并且在RT下在摇床上孵育3小时(非常慢)。

[1575] 8.在AlphaScreen上计数 - 每块板在计数前在AlphaScreen中预孵育3分钟。

[1576] 结果

[1577] EC₅₀ [pM]值使用Graph-Pad Prism软件(版本5)进行计算,并且显示在下表1中。体外证实所有衍生物的功效。

[1578] 表1:体外功效

[1579]

实施例化合物编号	EC ₅₀ /pM
1	26
2	43
3	62
4	143
5	468
6	96
7	9
8	159
9	242
10	214
11	81
12	41
13	79
14	42
15	5
16	21
17	17
18	3025
19	52
20	67
21	52
22	1178
23	140
24	70
25	380
26	200
27	835
28	68
29	40
30	3000
31	37
32	76

[1580] 测试化合物的平均体外功效 (EC₅₀平均值) 为340 pM。大部分衍生物具有对应于低于1200 pM的EC₅₀的良好体外功效。

[1581] 用于比较, Journal of Medicinal Chemistry (2000), vol. 43, no. 9, p. 1664-669的表1中化合物编号13 (在K^{26,34}被双-C12-二酸酐化的GLP-1 (7-37)) 具有对应于1200 pM的EC₅₀的体外功效。

[1582] 实施例34: GLP-1受体结合

[1583] 本实验的目的是研究GLP-1衍生物对GLP-1受体的结合, 以及该结合如何潜在地受白蛋白的存在的影响。这如下所述在体外实验中进行。

[1584] 实施例1-32的GLP-1衍生物与人GLP-1受体的结合亲和力通过它们从受体置换¹²⁵I-GLP-1的能力来测量。为了测试衍生物与白蛋白的结合, 用低浓度的白蛋白 (0.001% - 对应于其残留量的示踪剂) 以及用高浓度的白蛋白 (添加的2.0%) 进行该测定。结合亲和力IC₅₀的转换表明目标肽结合至白蛋白, 并且因此预测在动物模型中目标肽的潜在延迟的药代动力学概况。

[1585] 条件

[1586] 物种 (体外): 仓鼠

[1587] 生物终点: 受体结合

[1588] 测定方法: SPA

[1589] 受体: GLP-1受体

[1590] 细胞系: BHK tk-ts13。

[1591] 细胞培养和膜纯化

[1592] 选择稳定转染的细胞系和高表达克隆用于筛选。细胞生长在5% CO₂下在DMEM, 10% FCS, 1% Pen/Strep (青霉素/链霉素) 和1.0 mg/ml选择标记G418中。

[1593] 将细胞 (约80%汇合) 用PBS洗涤2次, 并且用Versene (乙二胺四乙酸四钠盐的水溶液) 收获, 其后它们通过以1000 rpm离心5 min进行分离。在随后的步骤中细胞/细胞沉淀必须尽可能保持在冰上。将细胞沉淀在合适量的缓冲液1 (取决于细胞的量, 但例如10 ml) 中用Ultrathurrax均质化20-30秒。将匀浆以20000 rpm离心15分钟。将沉淀在10 ml缓冲液2中重新悬浮 (均质化), 并且重新离心。该步骤再重复一次。将获得的沉淀再悬浮于缓冲液2中, 并且确定蛋白浓度。将膜储存在-80℃。

[1594] 缓冲液1: 20 mM Na-HEPES + 10 mM EDTA, pH 7.4

[1595] 缓冲液2: 20 mM Na-HEPES + 0.1 mM EDTA, pH 7.4。

[1596] 结合测定:

[1597] SPA:

[1598] 将试验化合物、膜、SPA-颗粒和 [¹²⁵I]-GLP-1 (7-36) NH₂ 稀释在测定缓冲液中。将50 ul (微升) HSA (含有2% HSA的“高白蛋白”实验) 或缓冲液 (含有0.001% HSA的“低白蛋白”实验) 添加至Optiplate, 并且添加25 ul测试化合物。添加对应于0.1 - 0.2 mg蛋白/ml的5-10 ug膜蛋白/样品 (50 ul) (优选对于每种膜制剂进行优化)。以0.5 mg/孔 (50 ul) 的量添加SPA颗粒 (Wheatgerm凝集素SPA珠粒, Perkin Elmer, #RPNQ0001)。用 [¹²⁵I]-GLP-1]-(7-36) NH₂ (终浓度0.06 nM, 对应于49.880 DPM, 25 ul) 开始孵育。用PlateSealer将板密封, 并且在30℃下孵育120分钟, 同时摇动。将板进行离心 (1500 rpm, 10 min), 并且在Topcounter中计数。

[1599] 测定缓冲液:

50 mM HEPES
5 mM EGTA
5 mM MgCl_2
[1600] 0.005% Tween 20
pH 7.4
HSA 为 SIGMA A1653

[1601] 计算

[1602] 从曲线读出 IC_{50} 值,其作为从受体置换50%的 ^{125}I -GLP-1的浓度,并且确定 $[(\text{IC}_{50}/\text{nM}) \text{高HSA}] / [(\text{IC}_{50}/\text{nM}) \text{低HSA}]$ 的比值。

[1603] 通常,在低白蛋白浓度与GLP-1受体的结合应当是尽可能好的,其对应于低 IC_{50} 值。

[1604] 在高白蛋白浓度的 IC_{50} 值是白蛋白对衍生物与GLP-1受体的结合的影响的量度。如已知,GLP-1衍生物也结合白蛋白。这是通常期望的效果,其延长它们在血浆中的寿命。因此,在高白蛋白的 IC_{50} 值将通常高于在低白蛋白的 IC_{50} 值,其对应于减小的与GLP-1受体的结合,其由白蛋白竞争与GLP-1受体的结合所引起。

[1605] 因此,高比值(IC_{50} 值(高白蛋白) / IC_{50} 值(低白蛋白))可以被视为表明目标衍生物良好结合白蛋白(可能具有长半衰期),并且本身也良好结合GLP-1受体(IC_{50} 值(高白蛋白)是高的,并且 IC_{50} 值(低白蛋白)是低的)。

[1606] 结果

[1607] 获得以下结果,其中“比值”是指 $[(\text{IC}_{50}/\text{nM}) \text{高HSA}] / [(\text{IC}_{50}/\text{nM}) \text{低HSA}]$:

[1608] 表2:受体结合亲和力

[1609]

实施例化合物编号	IC ₅₀ /nM (低 HSA)	IC ₅₀ /nM (高 HSA)	比值
1	0.19	42	219
2	0.39	320	821
3	0.29	29	101
4	0.15	33	217
5	5.68	446	79
6	0.50	123	246
7	0.12	21	174
8	1.41	80	57
9	0.38	60	157
10	6.49	452	70
11	0.23	213	926
12	0.16	72	453
13	0.25	201	804
14	1.45	443	306
15	0.19	29	155
16	0.20	25	127
17	0.45	174	387
18	373	789	2,1
19	2.38	143	60
20	0.19	333	1752
21	1.57	256	163
22	9.31	812	87
23	0.85	40	47
24	2.74	50	18
25	10.9	39	3,5
26	0.38	54	143
27	10.3	>1000	97
28	0.20	29	144
29	3.95	363	92
30	7.44	>1000	134
31	0.35	220	629
32	0.18	369	2050

[1610] 平均比值非常好(约300)。大部分衍生物具有超过50的比值。

[1611] 此外,关于IC₅₀(低白蛋白),测试的化合物的平均IC₅₀为14 nM,并且大部分衍生物

低于15.0 nM。

[1612] 最后,关于IC₅₀(高白蛋白),大部分衍生物具有低于900nM 的IC₅₀(高白蛋白)。

[1613] 用于比较,Journal of Medicinal Chemistry (2000), vol. 43, no. 9, p. 1664-669的表1中化合物编号13(在K^{26,34}被双-C12-二酸酐化的GLP-1(7-37))具有51.3的比值,17.7 nM的IC₅₀(低白蛋白)和908 nM的IC₅₀(高白蛋白)。

[1614] 实施例35: 口服生物利用度的估计 - 大鼠中肠道注射(癸酸盐)

[1615] 本实验的目的是估计GLP-1衍生物的口服生物利用度。

[1616] 为此,如下所述,在大鼠中在体内研究在实施例2-17和19-22的GLP-1衍生物直接注射到肠腔后在血浆中的暴露。

[1617] 将GLP-1衍生物在55 mg/ml癸酸钠的溶液以1000 uM的浓度进行测试。

[1618] 具有约240 g的到达后体重的雄性Sprague Dawley大鼠获得自Taconic (Denmark),并且通过简单随机化分配到不同治疗中,4只大鼠/每组。大鼠在实验前禁食约18小时,并且进行全身麻醉(Hypnorm/Dormicum)。

[1619] 将GLP-1衍生物施用于空肠的近端部分(十二指肠的10 cm远)或中肠(盲肠的50 cm近)。将10 cm长的PE50导管插入空肠,向前至少1.5 cm进入空肠,并在给药前通过结扎在肠道周围进行保护,其中导管在尖端的3/0远端缝合以防止泄漏或导管移位。放置导管而不用注射器和针头,并且将2 ml盐水施用于腹部,然后用伤口夹闭合切口。

[1620] 将100 µl各GLP-1衍生物用1 ml注射器通过导管注入空肠腔。随后,用另一个注射器将200 µl空气推入空肠腔以“冲洗”导管。使该注射器保持连接到导管,以防止回流到导管中。

[1621] 以所需时间间隔(通常为时间0、10、30、60、120 和240 min)将血液样品(200 µl)从尾静脉收集到EDTA管中,并且在4℃下在20分钟内以10000G离心5分钟。将血浆(75µl)分离到微型管,立即冷冻,并保存在-20℃,直到通常如Journal of Biomolecular Screening 2007, vol. 12, p. 240-247中Poulsen和Jensen对于测定胰岛素所述用LOCI (Luminescent Oxygen Channeling Immunoassay,发光氧通道免疫测定)分析相应GLP-1衍生物的血浆浓度。供体珠粒用链霉亲和素包被,而受体珠粒用识别肽的中-/C-末端表位的单克隆抗体缀合。将对于N-末端特异性的另一种单克隆抗体生物素化。将三种反应物与分析物组合并形成双位的免疫复合物。复合物的发光从供体珠粒释放单线态氧,所述单线态氧通过通道进入受体珠粒,并且触发化学发光,所述化学发光在Envision板读数器中测量。光的量与化合物的浓度成比例。

[1622] 在采集血液之后,将大鼠在麻醉下处死,打开腹部以确认正确的导管放置。

[1623] 将平均(n=4)血浆浓度(pmol/l)确定为时间的函数。对于每种处理计算血浆浓度(pmol/l)除以给药溶液浓度(µmol/l)的比值,并且将t = 30 min(将化合物注射在空肠中之后30分钟)的结果评估(在30 min的剂量校正暴露)为肠道生物利用度的替代量度。已经显示剂量校正暴露与实际生物利用度显著相关。

[1624] 获得以下结果,其中在30 min的剂量校正暴露是指(将化合物注射在空肠中之后30分钟的血浆浓度(pM))除以(化合物在给药溶液中的浓度(µM)):

[1625] 表3:在30 min的剂量校正暴露

[1626]	实施例化合物编号	在30 min的 剂量校正暴露
	2	98
	3	67
	4	39
	5	124
	6	93
	7	99
	8	86
	9	65
	10	187
	11	66
	12	68
	13	126
	14	121
	15	98
	16	115
	17	168
	19	61
	20	123
	21	140
	22	275

[1627] 所有衍生物都具有超过38的在30 min的剂量校正暴露。

[1628] 用于比较, Journal of Medicinal Chemistry (2000), vol. 43, no. 9, p. 1664-669的表1中化合物编号13 (在K^{26,34}被双-C12-二酸酐化的GLP-1 (7-37)) 具有38 的在30 min的剂量校正暴露。

[1629] 实施例36: 对血糖和体重的影响

[1630] 本研究的目的是验证在糖尿病设置中GLP-1衍生物对血糖 (BG) 和体重 (BW) 的影响。

[1631] 如下所述, 在肥胖糖尿病小鼠模型 (db/db小鼠) 中在剂量-响应研究中测试GLP- 1衍生物。

[1632] 将从出生开始用膳食NIH31 (NIH 31M啮齿类动物膳食, 商业获得自Taconic Farms, Inc., US, 参见www.taconic.com) 喂养的db/db小鼠 (Taconic, Denmark) 在7-9周龄招入研究中。小鼠自由获取标准食物 (例如, Altromin 1324, Brogaarden, Gentofte, Denmark) 和自来水, 并保持在24 °C。适应1-2周后, 在连续两天 (即在9 am) 评估两次基础血糖。具有最低血糖值的小鼠被排除在实验之外。基于平均血糖值, 剩下小鼠被选择用于进一

步实验并分配到具有匹配的血糖水平的7组 (n=6)。在实验中以48小时的持续时间和持续多达4次使用小鼠。最后一次实验后对小鼠实施安乐死。

[1633] 七组如下接受处理:

[1634] 1: 媒介物, s.c.

[1635] 2: GLP-1衍生物, 0.3 nmol/kg, s.c.

[1636] 3: GLP-1衍生物, 1.0 nmol/kg, s.c.

[1637] 4: GLP-1衍生物, 3.0 nmol/kg, s.c.

[1638] 5: GLP-1衍生物, 10 nmol/kg, s.c.

[1639] 6: GLP-1衍生物, 30 nmol/kg, s.c.

[1640] 7: GLP-1衍生物, 100 nmol/kg, s.c.

[1641] 媒介物: 50mM磷酸钠, 145 mM氯化钠, 0.05%吐温80, pH 7.4。

[1642] 在媒介物中将GLP-1衍生物溶解至0.05、0.17、0.5、1.7、5.0和17.0 nmol/ml的浓度。将6 ml/kg的剂量-体积(即, 300 μ l/每50 g小鼠) s.c.给药于动物。

[1643] 在给药当天, 在时间 $-1/2$ h (8.30 am) 评估血糖, 在此之前将小鼠称重。在约9 am (时间0) 给药GLP-1衍生物。在给药当天, 在时间1、2、4 和8 h (10 am、11 am、1 pm 和5 pm) 评估血糖。在8 h血液取样之后, 对小鼠进行称重。

[1644] 在接下来的日子, 在时间给药后24和48 (即, 在第2天和第3天的9 am) 评估血糖。每天, 在血糖采样之后对小鼠进行称重。

[1645] 将小鼠分别以数字体重称重。

[1646] 从有意识的小鼠的尾尖毛细管获得样品, 用于测量血糖。将10 μ l血液收集到肝素化的毛细管中, 并转移到500 μ l葡萄糖缓冲液 (EKF系统溶液, Eppendorf, Germany)。使用葡萄糖氧化酶方法 (葡萄糖分析仪Biosen 5040, EKF Diagnostic, GmbH, Barleben, Germany) 测量葡萄糖浓度。将样品在室温下保持长达1 h, 直到分析。如果分析必须被推迟, 则样品保存在4 $^{\circ}$ C下最多24 h。

[1647] ED₅₀是以nmol /kg计的产生半数最大效应的剂量。基于衍生物降低体重的能力以及降低血糖的能力计算该值, 如下面所解释。

[1648] 对于体重的ED₅₀计算为产生在皮下施用衍生物之后8小时对 Δ BW的半数最大效应的剂量。例如, 如果8小时之后的体重的最大减少为2.0 g, 那么ED₅₀体重将是产生8小时之后的体重减少1.0 g的以nmol/kg计的剂量。该剂量 (ED₅₀体重) 可以从剂量响应曲线读出。

[1649] 对于血糖的ED₅₀计算为产生在皮下施用类似物之后8小时和/或24小时对AUC Δ BG的半数最大效应的剂量。

[1650] 如果适当的S形剂量-响应关系存在最大响应的明确定义, 则可以只计算ED₅₀值。因此, 如果不是这样, 则可以在不同的剂量范围内重新测试目标衍生物, 以观察是否获得S形剂量-响应关系。

[1651] 实施例37: 小型猪中的半衰期

[1652] 本研究的目的是确定在i.v.施用于小型猪之后GLP-1衍生物的体内延迟, 即它们作用时间的延长。这在药代动力学 (PK) 研究中进行, 其中确定目标衍生物的终末半衰期。终末半衰期一般是指在初始分布阶段之后测量的达到一定血浆浓度的一半所需的时间期间。

[1653] 本研究使用的雄性Göttingen小型猪获得自约7-14个月龄并且称重约为16-35

kg 的Ellegaard Göttingen小型猪 (Dalmose, Denmark)。该小型猪单独圈养,并且用SDS小型猪膳食(Special Diets Services, Essex, UK)限制地每天一次或两次喂养。适应至少2周之后,在每个动物中在尾侧腔静脉或颈侧腔静脉中植入两个永久中心静脉导管。允许所述动物在手术后恢复1周,并且然后用于在连续GLP-1衍生物给药之间的合适洗脱期重复药代动力学研究。

[1654] 动物在给药前禁食约18 h和给药后禁食0至4 h,但在整个期间随意饮水。

[1655] 将GLP-1衍生物溶解在50mM磷酸钠,145 mM氯化钠,0.05%吐温80,pH 7.4中至通常20-60 nmol/ml的浓度。通过一个导管给予化合物的静脉内注射(对应于通常1-2 nmol/kg、例如0.033ml/kg的体积),并且在预定时间点直至给药后13天(优选通过其他导管)采集血液。将血液样品(例如0.8 ml)收集在EDTA缓冲液(8mM)中,然后在4℃以1942G离心10分钟。将血浆吸取到在干冰上的微型管中,并且保持在-20℃直到使用ELISA或类似基于抗体的测定法或LC-MS分析各自GLP-1化合物的血浆浓度。个体血浆浓度-时间曲线通过Phoenix WinNonLin ver.6.2. (Pharsight Inc., Mountain View, CA, USA)中的非区室模型进行分析,并且确定获得的终末半衰期(调和平均值)。

[1656] 结果

[1657] 测试实施例2的衍生物,并且其具有87小时的半衰期。

[1658] 用于比较,Journal of Medicinal Chemistry (2000), vol. 43, no. 9, p. 1664-669的表1中化合物编号13(在K^{26,34}被双-C12-二酸酐化的GLP-1(7-37))具有5小时的半衰期。

[1659] 实施例38: 对食物摄取的影响

[1660] 本实验的目的是研究在猪中GLP-1衍生物对食物摄取的影响。这在如下文所述的药效动力学(PD)研究中进行,其中与媒介物处理的对照组相比,在施用单次剂量的GLP-1衍生物之后1至4天测量食物摄取。

[1661] 使用约3个月龄、称重为约30-35kg的雌性Landrace Yorkshire Duroc (LYD)猪(n=3-4/每组)。在适应动物设施过程中,将动物圈养在一个组中约1周。在实验期间过程中,在用于测量个体食物摄取的给药之前至少2天和整个实验过程中,将动物置于单个围栏中。在适应和实验期间两者过程中,动物始终自由食用猪饲料(Svinefoder Danish Top)。通过每15分钟记录饲料重量而在线监测食物摄取。使用的系统是Mpigwin (Ellegaard Systems, Faaborg, Denmark)。

[1662] 将GLP-1衍生物以对应于0.3、1、3、10 或30 nmol/kg的剂量的12、40、120、400 或1200 nmol/ml的浓度溶解在磷酸盐缓冲液(50mM磷酸钠,145 mM氯化钠,0.05%吐温80,pH 7.4)中。磷酸盐缓冲液充当媒介物。在第1天早晨用单次皮下剂量的GLP-1衍生物或媒介物(剂量体积0.025 ml/kg)给药于动物,并且在给药后测量食物摄取1-4天。在每个研究的最后一天,在给药后1-4天,从麻醉动物的心脏采集血液样品,用于测量GLP-1衍生物的血浆暴露。其后用心内过量的戊巴比妥使动物安乐死。使用ELISA或类似的基于抗体的测定或LC-MS分析该GLP-1衍生物的血浆含量。

[1663] 在实验的每一天,将食物摄取计算为平均值± SEM 24 h食物摄取。使用两因素ANOVA重复量度和随后的Bonferroni后检验进行媒介物相比于GLP-1衍生物组中24小时食物摄取的统计比较。

[1664] 实施例10的化合物以3 nmol/kg的剂量进行测试,并且在该剂量下没有看到对食物摄取的影响。实施例2的化合物以3 nmol/kg的剂量进行测试,并且显示在实验的两天食物摄取的显著减少(在第1天的23%和在第2天的35%)。

[1665] 实施例39: 大鼠中的药代动力学

[1666] 本实施例的目的是在大鼠中研究体内半衰期。

[1667] 如下所述,用实施例2、10、17-18、和31的GLP-1衍生物进行在大鼠中的体内药代动力学研究。包括塞马鲁肽用于比较。

[1668] 具有约400 g的体重的年龄相同的雄性Sprague Dawley大鼠获得自Taconic (Denmark),并且通过对体重简单随机化分配到治疗中,约4只大鼠/每组,所以每个组中的所有动物都具有类似体重。

[1669] 将GLP-1衍生物(约6 nmol/ml)溶解在50mM磷酸钠,145 mM氯化钠,0.05%吐温80, pH 7.4中。通过植入在右颈静脉的导管给予化合物的静脉内注射(1.0 ml/kg)。在给药后,从舌下静脉取样血液,持续5天。将血液样品(200 μ l)收集在EDTA缓冲液(8mM)中,然后在4 $^{\circ}$ C以10000G离心5分钟。将血浆样品保持在-20 $^{\circ}$ C,直到分析相应的GLP-1化合物的血浆浓度。

[1670] 通常如Journal of Biomolecular Screening 2007, vol. 12, p. 240-247中 Poulsen和Jensen对于测定胰岛素所述,用发光氧通道免疫测定(Luminescent Oxygen Channeling Immunoassay (LOCI))确定GLP-1衍生物的血浆浓度。供体珠粒用链霉亲和素包被,而受体珠粒用识别肽的中-/C-末端表位的单克隆抗体缀合。将对于N-末端特异性的另一种单克隆抗体生物素化。将三种反应物与分析物组合并形成双位的免疫复合物。复合物的发光从供体珠粒释放单线态氧,所述单线态氧通过通道进入受体珠粒,并且触发化学发光,所述化学发光在Envision板读数器中测量。光的量与化合物的浓度成比例。

[1671] 血浆浓度-时间曲线使用Phoenix WinNonLin ver.6.2, Pharsight Inc., Mountain View, CA, USA)进行分析,并且使用来自各动物的个体血浆浓度-时间曲线计算半衰期($T_{1/2}$)。

[1672] 结果

[1673] 在相同设置(但是,其中n=8)中测试的塞马鲁肽的半衰期为11小时。

[1674] 表4:大鼠中的半衰期

[1675]	实施例化合物编号	$t_{1/2}$ / h
	2	26
	10	23
	17	10
	18	10
	31	19

[1676] 本发明的测试衍生物具有与塞马鲁肽类似或更好的半衰期。

[1677] 实施例40: 口服生物利用度的估计 - 大鼠中肠道注射和口腔填喂(SNAC)

[1678] 本实验的目的是估计GLP-1衍生物在大鼠模型中的口服生物利用度。简而言之,通过肠道注射(至肠)和口腔填喂(至胃)施用N-[8-(2-羟基苯甲酰基)氨基]辛酸钠(SNAC)中

GLP-1衍生物的液体溶液,并且测量GLP-1衍生物在血浆中的随后暴露。

[1679] 通过将SNAC (12.5 g)溶解在高纯度实验室水(MilliQ) (50.0 ml)中而制备SNAC的250 mg/ml储存溶液。用1 N NaOH(水溶液)将pH调节至约8.5。

[1680] 通过将所需量的各自GLP-1衍生物溶解在SNAC储存溶液中而制备在250 mg/ml SNAC中具有约1000 μ M (800-1200 μ M)的GLP-1衍生物的溶液。通过本领域现有状态的方法诸如CLND-HPLC(用于HPLC的化学发光氮检测)在施用前确定GLP-1衍生物的浓度。

[1681] 具有约240 g的到达后体重的32只雄性Sprague Dawley大鼠获得自Taconic (Denmark),并且通过简单随机化分配到不同治疗中,8只大鼠/每组。所有大鼠在实验前在栅栏上禁食,持续约18小时。

[1682] 对于肠道注射,在实验当天,将大鼠进行全身麻醉(Hypnorm/Dormicum),并且在整个实验过程中维持麻醉。将实施例5-7的GLP-1衍生物施用于空肠的近端部分(十二指肠的10 cm远)。将10 cm长的PE50导管插入空肠,向前至少1.5 cm进入空肠,并在给药前通过结扎在肠道周围进行保护。此外,导管在尖端的3/0远端缝合以防止泄漏或导管移位。放置导管而不用注射器和针头,并且将2 ml盐水施用于腹部,然后用伤口夹闭合切口。

[1683] 将100 μ l各GLP-1衍生物的SNAC溶液用1 ml注射器通过导管注入空肠腔。随后,用另一个注射器将200 μ l空气推入空肠腔以“冲洗”导管。使该注射器保持连接到导管,以防止回流到导管中。

[1684] 以所需时间间隔(通常为时间0、30、60、120 和180 min)将血液样品(200 μ l)从尾静脉收集到EDTA管中。

[1685] 对于口腔填喂,动物在整个实验过程中有意识。

[1686] 通过口腔填喂将GLP-1衍生物的100 μ l SNAC溶液直接施用到胃。

[1687] 以所需时间间隔(通常为时间0、30、60、120 和180 min)将血液样品(200 μ l)从舌下丛收集到EDTA管中。

[1688] 所有获得的血液样品保持在冰上,并且并且在4°C下在20分钟内以10000G离心5分钟。将血浆(75 μ l)分离到微型管,立即冷冻,并保存在-20°C,直到通常如Journal of Biomolecular Screening 2007, vol. 12, p. 240-247中Poulsen和Jensen对于测定胰岛素所述用LOCI (Luminescent Oxygen Channeling Immunoassay,发光氧通道免疫测定)分析相应GLP-1衍生物的血浆浓度。供体珠粒用链霉亲和素包被,而受体珠粒用识别肽的中-/C-末端表位的单克隆抗体缀合。将对于N-末端特异性的另一种单克隆抗体生物素化。将三种反应物与分析物组合并形成双位的免疫复合物。复合物的发光从供体珠粒释放单线态氧原子,所述单线态氧原子通过通道进入受体珠粒,并且触发化学发光,所述化学发光在Envision板读数器中测量。光的量与化合物的浓度成比例。

[1689] 在采集血液之后,将大鼠在麻醉下处死,打开肠道注射大鼠的腹部以确认正确的导管放置。

[1690] 将平均(n=8)血浆浓度(pmol/l)确定为时间的函数。将从时间30至180 (min)的血浆暴露(pmol/l)相比于时间曲线的AUC进行剂量校正,即除以给药溶液中衍生物的量(剂量)(pmol)。如此剂量校正的从时间30-180 min的血浆暴露的AUC(具有单位min \times pM / pmol = min/L)用作生物利用度的替代量度 - 关于它们在大鼠模型中的吸收对衍生物排序的量度。

[1691] 尽管本发明的某些特征已经在本文中进行了说明和描述,但是许多修改、替换、改变和等同物现在对于本领域普通技术人员是想到的。因此,应当理解,所附权利要求旨在覆盖落在本发明的真实精神内的所有此类修改和改变。

序列表

[0001] <110> Novo Nordisk A/S
<120> 双酰化GLP-1衍生物
<130> 8326.204-W0
<160> 1
<170> PatentIn version 3.5
<210> 1
<211> 31
<212> PRT
<213> 智人

<220>
<221> mat_肽
<222> (1)..(31)

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

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