(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 102686607 B
(45)授权公告日 2014.10.29

(21)申请号 201080057056.0
(22)申请日 2010.12.16
(30)优先权数据
09179390.1 2009.12.16 EP
61/288601 2009.12.21 US
(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2012.06.15
(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/EP2010/069932 2010.12.16
(87)PCT国际申请的公布数据
WO2011/080103 EN 2011.07.07
(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 P.W. 加里贝 J. 施佩茨勒 J.T. 科德拉 L. 林德罗特 J. 刘 P. 绍尔贝格
(74)专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司 72001
代理人 林毅斌 郭文洁
(51)Int.Cl.
C07K 14/605(2006.01)
A61K 47/48(2006.01)
(56)对比文件
WO 9943706 A1,1999.09.02,全文,尤其是权利要求书.
WO 9943706 A1,1999.09.02,全文,尤其是权利要求书.
审查员 吴永庆

权利要求书1页 说明书121页
序列表1页

(54)发明名称

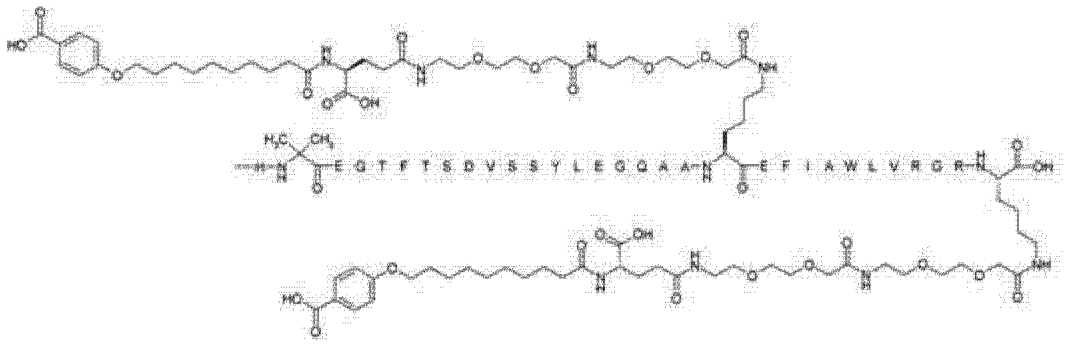
双酰化GLP-1衍生物

(57)摘要

本发明涉及GLP-1类似物的衍生物或其药学上可接受的盐、酰胺或酯,与GLP-1(7-37)相比,所述类似物包含在对应于GLP-1(7-37)(SEQ ID NO:1)的位置37的位置上的第一K残基,在对应于GLP-1(7-37)的位置26的位置上的第二K残基,和最大10个氨基酸修饰,其中第一K残基称为K^{37},第二K残基称为K^{26},所述衍生物包含分别连接到K^{26}和K^{37}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以下的延长部分:Chem.1:HOOC-$(CH_2)_x$-CO-*、Chem.2:HOOC-C_6H_4-O-$(CH_2)_y$-CO-*、Chem.3:R^1-C_6H_4-$(CH_2)_z$-CO-*、Chem.4:HOOC-C_4SH_2-$(CH_2)_w$-CO-*,其中x是范围在6-18的整数,y是范围在3-17的整数,z是范围在1-5的整数,R^1是摩尔质量不高于150Da的基团,w是范围在6-18的整数;前提条件是当延长部分是Chem.1时,所述白蛋白结合部分还包含下式Chem.5的接头:*-NH-$(CH_2)_2$-$(O-(CH_2)_2)_k$-O-$(CH_2)_n$-CO-*,其中k是范围在1-5的整数,n是范围在1-5的整数。本发明也涉及其药学用途,例如用于治疗和/或预防所有形式的糖尿病和相关疾病,以及涉及相应的新肽和侧链中间体。所述衍生物适用于口服给药。

CN 102686607 B

1. 具有以下结构的化合物，或其药学上可接受的盐或酰胺：



。

2. 权利要求 1 的化合物，其具有以下名称：

$N^{\varepsilon 26}$ {2-[2-(2-{2-[2-(2-{(S)-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}，$N^{\varepsilon 37}$-{2-[2-(2-{2-[2-(2-{(S)-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}-[Aib^{8}, Arg^{34}, Lys^{37}] GLP-1(7-37)- 肽。

3. 权利要求 1-2 中任一项的化合物，其用作药物。

4. 权利要求 1-2 中任一项的化合物，其用作用于治疗和 / 或预防高血糖症、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、妊娠期糖尿病和 / 或用于降低 HbA1C 的药物。

5. 权利要求 1-2 中任一项的化合物，其用作用于改善脂质参数，改善 β 细胞功能，和 / 或用于延迟或预防糖尿病进程的药物。

6. 权利要求 1-2 中任一项的化合物，其用作用于治疗和 / 或预防糖尿病相关疾病的药物，其中所述相关疾病选自进食障碍、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。

7. 权利要求 1-2 中任一项的化合物在制备用于治疗和 / 或预防高血糖症、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、妊娠期糖尿病和 / 或用于降低 HbA1C 药物中的用途。

8. 权利要求 1-2 中任一项的化合物在制备用于改善脂质参数，改善 β 细胞功能，和 / 或用于延迟或预防糖尿病进程的药物中的用途。

9. 权利要求 1-2 中任一项的化合物在制备用于治疗和 / 或预防糖尿病相关疾病的药物中的用途，其中所述相关疾病选自进食障碍、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。

双酰化 GLP-1 衍生物

发明领域

[0001] 本发明涉及胰高血糖素样肽 1(Glucagon-Like Peptide，GLP-1) 衍生物及其药学用途，即涉及在位置 26 和 37 酰化的双酰化 GLP-1 衍生物及其药学用途。

[0002] 序列表的结合引用

[0003] 序列表，名称为" SEQUENCE LISTING"，有 584 字节，于 2010 年 11 月 17 日创建并通过引用结合到本文中。

[0004] 发明背景

[0005] Journal of Medicinal Chemistry(2000)，第 43 卷，第 9 期，第 1664-669 页公开了在 $K^{26,34}$ 上双酰化的 GLP-1(7-37) 衍生物——参见表 1。

[0006] WO 98/08871 公开了多种 GLP-1 衍生物，包含在 $K^{26,34}$ 上双酰化的某些衍生物，参见实施例 3、7、17、24、32、33 和 36。利拉鲁肽 (liraglutide)，一种于 2009 年上市的由 Novo Nordisk A/S 生产的每日给药一次的单酰化 GLP-1 衍生物，也公开于 WO 98/08871(实施例 37)。

[0007] WO 99/43706 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 (参见第 148-178 页)。

[0008] WO 2005/027978 公开了多种 GLP-1 衍生物，包括在一个且同一个残基 K^{37} 上双酰化的几种衍生物，参见实施例 8 和 9。

[0009] WO 2009/030738 公开了多种 GLP-1 衍生物，包括在 K^{31}，Dap^{34} 上双酰化的一种衍生物，参见实施例 37。

[0010] Journal of Controlled Release(2010)，第 144 卷，第 10-16 页涉及酰化 exendin-4 类似物并具体公开了一种双酰化 exendin-4($K^{12,27}$- 二 LUA-Exendin-4)(LUA 是月桂酸，C12)。

[0011] WO 06/097537 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 开发的每周给药一次的单酰化 GLP-1 衍生物。

[0012] Angewandte Chemie International Edition 2008，第 47 卷，第 3196-3201 页报道了一类 4-(对碘苯基) 丁酸衍生物的发现和表征，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。

[0013] 发明概述

[0014] 本发明涉及 GLP-1 肽衍生物。

[0015] 所述衍生物在位置 26 的天然赖氨酸、以及在位置 37 取代了天然甘氨酸的赖氨酸上被酰化。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，以及具有远端苯基、苯氧基或噻吩基的脂肪酸，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。与 GLP-1(7-37) 相比，GLP-1 肽可以是具有总数为至多 10 个氨基酸差异的 GLP-1(7-37)(SEQ ID NO :1) 类似物，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。

[0016] 更具体地讲，本发明涉及 GLP-1 类似物的衍生物，与 GLP-1(7-37) 相比，所述类似

物包含在对应于 GLP-1(7-37)(SEQ ID NO :1) 的位置 37 的位置上的第一 K 残基，在对应于 GLP-1(7-37) 的位置 26 的位置上的第二 K 残基，和最大 10 个氨基酸修饰，其中第一 K 残基称为 K^{37}，第二 K 残基称为 K^{26} ；所述衍生物包含分别连接到 K^{26} 和 K^{37} 的两个白蛋白结合部分，其中每个白蛋白结合部分包含选自 Chem. 1、Chem. 2、Chem. 3 和 Chem. 4 的延长部分 ：

[0017] Chem. 1 ：$HOOC-(CH_2)_x-CO-*$

[0018] Chem. 2 ：$HOOC-C_6H_4-O-(CH_2)_y-CO-*$

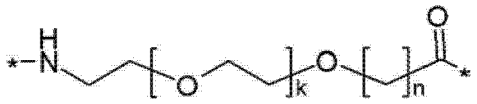
[0019] Chem. 3 ：$R^1-C_6H_4-(CH_2)_z-CO-*$

[0020] Chem. 4 ：$HOOC-C_4SH_2-(CH_2)_w-CO-$，

[0021] 其中 x 是范围在 6-18 的整数，y 是范围在 3-17 的整数，z 是范围在 1-5 的整数，R^1 是摩尔质量不高于 150Da 的基团，w 是范围在 6-18 的整数 ；前提条件是当延长部分是 Chem. 1 时，所述白蛋白结合部分还包含下式 Chem. 5 的接头 ：

[0022] Chem. 5 ：

[0023]



[0024] 其中 k 是范围在 1-5 的整数，n 是范围在 1-5 的整数 ；或其药学上可接受的盐、酰胺或酯。

[0025] 本发明也涉及这样的衍生物，其用作药物，尤其是用于治疗和 / 或预防所有形式的糖尿病和相关疾病，例如进食障碍、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。

[0026] 本发明还涉及呈 GLP-1 肽和侧链形式的中间产物，其涉及某些 GLP-1 肽和本发明衍生物的制备。

[0027] 本发明的衍生物具有生物活性。此外或备选地，它们具有延长的药物动力学特征。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 / 或尤其是口服给药的开发中是重要的。

[0028] 发明描述

[0029] 本发明涉及 GLP-1 肽衍生物。所述衍生物在位置 26 的天然赖氨酸、以及在位置 37 取代了天然甘氨酸的赖氨酸上被酰化。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，以及具有远端或末端苯基、噻吩或苯氧基的脂肪酸，所有基团都任选被取代。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 - 氨基被酰化。与 GLP-1(7-37) 相比，GLP-1 肽可以是具有总共为至多 10 个氨基酸差异的 GLP-1(7-37)(SEQ ID NO :1) 类似物，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。

[0030] 更具体地讲，第一方面，本发明涉及 GLP-1 类似物的衍生物或其药学上可接受的盐、酰胺或酯，与 GLP-1(7-37) 相比，所述类似物包含在对应于 GLP-1(7-37)(SEQ ID NO :1) 的位置 37 的位置上的第一 K 残基，在对应于 GLP-1(7-37) 的位置 26 的位置上的第二 K 残基，和最大 10 个氨基酸修饰，其中第一 K 残基称为 K^{37}，第二 K 残基称为 K^{26} ；所述衍生物包含

分别连接到 K^{26} 和 K^{37} 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 Chem. 1、Chem. 2、Chem. 3 和 Chem. 4 的延长部分：

[0031] Chem. 1：$HOOC-(CH_2)_x-CO-*$

[0032] Chem. 2：$HOOC-C_6H_4-O-(CH_2)_y-CO-*$

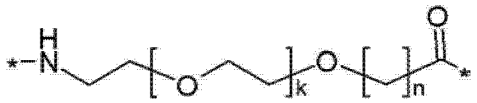
[0033] Chem. 3：$R^1-C_6H_4-(CH_2)_z-CO-*$

[0034] Chem. 4：$HOOC-C_4SH_2-(CH_2)_w-CO-*$

[0035] 其中 x 是范围在 6-18 的整数，y 是范围在 3-17 的整数，z 是范围在 1-5 的整数，R^1 是摩尔质量不高于 150Da 的基团，w 是范围在 6-18 的整数；前提条件是当延长部分是 Chem. 1 时，白蛋白结合部分还包含下式 Chem. 5 的接头：

[0036] Chem. 5：

[0037]



[0038] 其中 k 是范围在 1-5 的整数，n 是范围在 1-5 的整数。

[0039] 因此，第一方面，本发明涉及 GLP-1 类似物的衍生物或其药学上可接受的盐、酰胺或酯，其中与 GLP-1(7-37) 相比，所述 GLP-1 类似物包含在对应于 GLP-1(7-37)(SEQ ID NO：1) 的位置 37 的位置上的第一 K 残基，在对应于 GLP-1(7-37) 的位置 26 的位置上的第二 K 残基，和最大 10 个氨基酸修饰，其中第一 K 残基称为 K^{37}，第二 K 残基称为 K^{26}；所述衍生物包含分别连接到 K^{26} 和 K^{37} 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 Chem. 2、Chem. 3 和 Chem. 4 的延长部分：

[0040] Chem. 2：$HOOC-C_6H_4-O-(CH_2)_y-CO-*$

[0041] Chem. 3：$R^1-C_6H_4-(CH_2)_z-CO-*$

[0042] Chem. 4：$HOOC-C_4SH_2-(CH_2)_w-CO-*$

[0043] 其中 y 是范围在 3-17 的整数，z 是范围在 1-5 的整数，R^1 是摩尔质量不高于 150Da 的基团，w 是范围在 6-18 的整数。

[0044] 第二方面，本发明涉及 GLP-1 类似物的衍生物或其药学上可接受的盐、酰胺或酯，其中与 GLP-1(7-37) 相比，所述 GLP-1 类似物包含在对应于 GLP-1(7-37)(SEQ ID NO：1) 的位置 37 的位置上的第一 K 残基，在对应于 GLP-1(7-37) 的位置 26 的位置上的第二 K 残基，和最大 10 个氨基酸修饰，其中第一 K 残基称为 K^{37}，第二 K 残基称为 K^{26}；所述衍生物包含分别连接到 K^{26} 和 K^{37} 的两个白蛋白结合部分，其中所述白蛋白结合部分包含

[0045] i) 下式 Chem. 1 的延长部分：

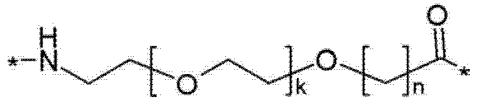
[0046] Chem. 1：$HOOC-(CH_2)_x-CO-*$

[0047] 其中 x 是范围在 6-18 的整数；和

[0048] ii) 下式 Chem. 5 的接头：

[0049] Chem. 5：

[0050]



[0051] 其中 k 是范围在 1-5 的整数，n 是范围在 1-5 的整数。

[0052] 第三方面，本发明涉及 GLP-1 类似物的衍生物或其药学上可接受的盐、酰胺或酯，其中与 GLP-1(7-37) 相比，所述 GLP-1 类似物包含在对应于 GLP-1(7-37)(SEQ ID NO :1) 的位置 37 的位置上的第一 K 残基，在对应于 GLP-1(7-37) 的位置 26 的位置上的第二 K 残基，和最大 10 个氨基酸修饰，其中第一 K 残基称为 K^{37}，第二 K 残基称为 K^{26} ；所述衍生物包含通过接头分别连接到 K^{26} 和 K^{37} 的两个延长部分，其中所述延长部分选自 Chem. 1、Chem. 2、Chem. 3 和 Chem. 4 ：

[0053] Chem. 1 ：$HOOC-(CH_2)_x-CO-*$

[0054] Chem. 2 ：$HOOC-C_6H_4-O-(CH_2)_y-CO-*$

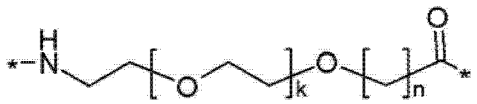
[0055] Chem. 3 ：$R^1-C_6H_4-(CH_2)_z-CO-*$

[0056] Chem. 4 ：$HOOC-C_4SH_2-(CH_2)_w-CO-*$

[0057] 其中 x 是范围在 6-18 的整数，y 是范围在 3-17 的整数，z 是范围在 1-5 的整数，R^1 是摩尔质量不高于 150Da 的基团，w 是范围在 6-18 的整数 ；和所述接头包含 Chem. 5 ：

[0058] Chem. 5 ：

[0059]



[0060] 其中 k 是范围在 1-5 的整数，n 是范围在 1-5 的整数。

[0061] 本发明也涉及呈 GLP-1 类似物形式的中间产物，与 GLP-1(7-37)(SEQ ID NO :1) 相比，所述中间产物包含以下修饰 :(i)(8Aib,31H,34Q,37K) ;(ii)(des7-8,34R,37K,38E) ;(iii)(des7-8,34R,37K) ;(iv)(8Aib,9G,34R,37K) ;(v)(8Aib,23R,34R,37K) ;(vi)(31H,34Q,37K) ;(vii)(9Q,34R,37K) ;(iix)(30E,34R,37K) ;(ix)(34R,37K,38G) ;(x)(34R,36G,37K) ;或 (xi)(34R,37K,38E) ;或其任何类似物的药学上可接受的盐、酰胺或酯。

[0062] 本发明也涉及包含选自以下 Chem. 2c、Chem. 3b 和 Chem. 4b 的延长部分的中间产物 ：

[0063] Chem. 2c ：$HOOC-C_6H_4-O-(CH_2)_y-CO-PG$

[0064] Chem. 3b ：$R^1-C_6H_4-(CH_2)_z-CO-PG$

[0065] Chem. 4b ：$HOOC-C_4SH_2-(CH_2)_w-CO-PG$

[0066] 其中 y 是范围在 3-17 的整数，z 是范围在 1-5 的整数，R^1 是摩尔质量不高于 150Da 的基团，w 是范围在 6-18 的整数，和 *-CO-PG 是活性酯 ；其中，任选，所述延长部分的远端 *-COOH 基团，如果有的话，经官能化为非反应性酯 ；或其药学上可接受的盐、酰胺或酯。

[0067] 最后，本发明也涉及本发明类似物和衍生物的药学用途，尤其是用于治疗和 / 或预防所有形式的糖尿病和相关疾病，例如进食障碍、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。

[0068] 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。

[0069] 化学式中的星号 (*) 表示 i) 连接点，ii) 基团，和 / 或 iii) 非共享电子。

[0070] GLP-1 类似物

[0071] 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。

[0072] 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，依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。

[0073] 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) 中对应于经修饰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) 实际修饰。以下是合适的类似物命名的非限制性实例。

[0074] 本发明衍生物的 GLP-1 类似物的非限制性实例是仅经修饰的类似物，使其包含在对应于 GLP-1(7-37) 的位置 37 的位置上的第一赖氨酸残基。该类似物的氨基酸序列不同于天然 GLP-1 的序列，并且该类似物可称为 K^{37}-GLP-1(7-37)。该名称表示天然 GLP-1 的氨基酸序列，其中位置 37 的甘氨酸已被赖氨酸取代。

[0075] 这个本发明衍生物的 GLP-1 类似物还包含在对应于 GLP-1(7-37) 的位置 26 的位置上的第二赖氨酸残基。因为该类似物的氨基酸序列不同于天然 GLP-1 的序列，所以这样的类似物仍然可称为 K^{37}-GLP-1(7-37)，其中 K^{26} 是根据天然 GLP-1(7-37)，SEQ ID NO :1。

[0076] 因此，K^{37}-GLP-1(7-37) 是指 GLP-1(7-37) 类似物，其中位置 37 的天然存在的甘氨酸已被赖氨酸取代。

[0077] 术语“K^{37}-GLP-1(7-37) 类似物”是指与 GLP-1(7-37) 相比，包含修饰 K^{37} 和至少一个额外修饰的 GLP-1(7-37) 类似物。

[0078] 与 GLP-1(7-37) 相比，构成本发明衍生物部分的 GLP-1 类似物包含在对应于 GLP-1(7-37)(SEQ ID NO :1) 的位置 37 的位置上的第一 K 残基，在对应于 GLP-1(7-37) 的位置 26 的位置上的第二 K 残基，和最大 10 个氨基酸修饰，其中第一 K 残基称为 K^{37}，第二 K 残基称为 K^{26}。换句话说，它是经修饰的 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。这些改变或修饰可独立代表一个或多个氨基酸取代、添加和 / 或缺失。

[0079] 本发明衍生物的类似物的另一个非限制性实例是 [Aib^8, Arg^{34}, Lys^{37}] GLP-1(7-37)，其是指 GLP-1(7-37) 类似物，其中位置 8 的丙氨酸已被 α - 氨基异丁酸 (Aib) 取代，位置 34 的赖氨酸已被精氨酸取代，而位置 37 的甘氨酸已被赖氨酸取代。该类似物也可称为 (8Aib, R34, K37)GLP-1(7-37)。

[0080] 本发明衍生物的类似物的额外非限制性实例是“包含 34E、34Q 或 34R”的类似物，其是指这样的 GLP-1 类似物 :其与 SEQ ID NO :1 相比在对应于天然 GLP-1(SEQ ID NO :1) 的位置 34 的位置上具有谷氨酸 (E)、谷氨酰胺 (Q) 或精氨酸 (R)，并且其可包含更多修饰。

[0081] 本发明衍生物的类似物的再进一步的非限制性实例是 GLP-1(7-37)(SEQ ID NO :1) 的类似物，其可简称为“(8Aib, 31H, 34Q, 37K)”。该命名是指除了这 4 个取代之外、与 SEQ ID NO :1 相同的类似物，即这样的类似物 :其中位置 8 的丙氨酸已被 α - 氨基异丁酸 (Aib) 取代，位置 31 的色氨酸已被组氨酸取代，位置 34 的赖氨酸已被谷氨酰胺取代，位置 37 的甘氨酸已被赖氨酸取代。该类似物与 SEQ ID NO :1 相比不含进一步修饰。

[0082] 本发明衍生物的类似物的再进一步的非限制性实例是包含 des7(或 Des^7)的类似物,其是指 N-端氨基酸组氨酸已缺失的 GLP-1(7-37)类似物。该类似物也可称为 GLP-1(8-37)。

[0083] 同样,涉及 GLP-1(7-37)类似物的(des7+des8);(des7,des8);(des7-8);或(Des^7,Des^8)是指对应于天然 GLP-1 的 2 个 N-端氨基酸组氨酸和丙氨酸的氨基酸已缺失的类似物。该类似物也可称为 GLP-1(9-37)。

[0084] 本发明衍生物的类似物再进一步的非限制性实例是包含 Imp^7 和/或(Aib^8 或 S^8)的类似物,其是指 GLP-1(7-37)类似物,当与天然 GLP-1 相比时,其包含在位置 7 用咪唑丙酸(Imp)取代组氨酸;和/或在位置 8 用 α-氨基异丁酸(Aib)或用丝氨酸取代丙氨酸。

[0085] "包含"某些指定修饰的类似物还可包含与 SEQ ID NO:1 相比进一步的修饰。包含 Imp^7 和/或(Aib^8 或 S^8)并构成本发明衍生物部分的类似物的两个非限制性实例是 Chem.47 和 Chem.58 的肽部分。

[0086] 包含(des7+des8)、Arg34、Lys37 和 Glu38 的 GLP-1(7-37)类似物的非限制性实例如下:[Des^7,Des^8,Arg^{34},Lys^{37}]GLP-1(7-37)-Glu^{38} 肽;和 N^9-{2-[2-(1H-咪唑-4-基)-乙基氨基甲酰基]-2-甲基-丙酰基}[Arg^{34},Lys^{37}]GLP-1(9-37)Glu^{38}-肽。在后一化合物中,天然 GLP-1 N-端的二肽模拟物(His-Ala)通过酰胺键连接到新的 N-端,Glu 9。

[0087] 可用作缺失 N-端氨基酸的一类取代基的合适 His-模拟物或 His-Ala 模拟物,如果有的话,包含杂环、含氮、芳环结构,例如吡啶或咪唑。优选的 His-模拟物或 His-Ala 模拟物是咪唑或吡啶的衍生物,而不是 His 和 His-Ala,在具有游离羧酸基团(carboylic acid group)的取代基的一个实施方案中,其可与肽的 N-端氨基酸的氨基构成酰胺键。术语咪唑是指作为具有类似环结构、但具有不同取代基的一类杂环的咪唑,吡啶亦然。

[0088] 根据以上实例,显而易见的是,可通过氨基酸的全名、它们的首字母代码和/或它们的三字母代码而识别氨基酸残基。这 3 种方式是完全等同的。

[0089] 短语"相当位置"或"对应位置"可用于在经修饰的 GLP-1(7-37)序列中表征相对于天然 GLP-1(7-37)(SEQ ID NO:1)而言的修饰位点,。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例如作为 Needleman-Wunsch 比对的"比对",容易地推断出相当位置或对应位置,以及修饰的编号。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,可使用默认打分矩阵 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。

[0090] 这类比对的实例插入下文中,其中序列 1 号是 SEQ ID NO:1,序列 2 号是其类似物(des7-8,34R,37K,38E):

[0091] #1:GLP-1(7-37)

[0092] #2:GLP-1(7-37)_类似物

[0093] #矩阵:EBLOSUM62

[0094] #空位罚分:10.0

[0095] #延伸罚分:0.5

[0096] # 长度 :32

[0097] # 同一性 : 27/32(84.4%)

[0098] # 相似性 : 28/32(87.5%)

[0099] # 空位 : 3/32(9.4%)

[0100] # 分数 :138.0

[0101] 1 1HAEGTFTSDVSSYLEGQAAKEFIAWLVKGRG- 31

[0102] |||||||||||||||||||||||||||:||.

[0103] 2 1--EGTFTSDVSSYLEGQAAKEFIAWLVRGRKE 30

[0104] 在包含在序列中的非天然氨基酸例如 Imp 和 / 或 Aib 中,或在 His-Ala 模拟物中,为了比对的目的,它们都可用 X 替代。如有必要,X 可在随后用手工校正。

[0105] 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。

[0106] 在一个具体的实施方案中,肽很大程度上或主要由通过酰胺键相互连接的氨基酸组成(例如摩尔质量的至少 50%、60%、70%、80%或至少 90%)。在另一个具体的实施方案中,肽由通过肽键相互连接的氨基酸组成。

[0107] 本发明的肽包含通过肽键连接的至少 5 个组成氨基酸。在具体的实施方案中,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。

[0108] 在具体的实施方案中,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。

[0109] 在额外的具体实施方案中,肽 a) 包含 i)29,ii)30,iii)31,或 iv)32 个氨基酸,或 b) 由 i)29,ii)30,iii)31,或 iv)32 个氨基酸组成。

[0110] 在一个再进一步的具体实施方案中,肽由通过肽键相互连接的氨基酸组成。

[0111] 氨基酸是含有胺基和羧酸基的分子,任选含有一个或多个额外基团,通常称为侧链。

[0112] 术语“氨基酸”包含蛋白质性的氨基酸(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。

[0113] 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,例如 D- 丙氨酸(在下文中有时缩写″ a″,例如在“a8”中,因此这是指 D-Ala^{8}) 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)。

[0114] 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)。

[0115] 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其它生理效应的能力,如本领域已知的那样。例如,可使用本文的实施例 50 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。

[0116] GLP-1 衍生物

[0117] 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。

[0118] 在一个具体的实施方案中，侧链能与白蛋白构成非共价聚集体，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。

[0119] 在具体的实施方案中，侧链具有至少 10 碳原子，或至少 15、20、25、30、35 或至少 40 个碳原子。在进一步具体的实施方案中，侧链还可包括至少 5 个杂原子，尤其是 O 和 N，例如至少 7、9、10、12、15、17 或至少 20 个杂原子，例如至少 1、2 或 3 个 N 原子，和 / 或至少 3、6、9、12 或 15 个 O 原子。

[0120] 在另一个具体的实施方案中，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，所述部分因此可称为延长部分。相对于其与肽的连接点而言，延长部分可以在白蛋白结合部分相反的一端之上或附近。

[0121] 在再进一步的具体的实施方案中，白蛋白结合部分包含介于延长部分和与肽的连接点之间的部分，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。

[0122] 在具体的实施方案中，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。

[0123] 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。额外的或替代的缀合化学包括烷基化、形成酯、或形成酰胺、或与半胱氨酸残基偶联，例如通过马来酰亚胺或卤乙酰胺（例如溴 -/ 氟 -/ 碘 -）偶联。

[0124] 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）。

[0125] 除非另有说明，否则当提及与赖氨酸残基酰化时，理解为与其 ε - 氨基进行。

[0126] 包含与 K^{26} 和 K^{37} 连接（任选通过接头）的两个延长部分的衍生物，可称为在分别对应于 GLP-1(7-37) 的位置 26 和 37 的位置上的赖氨酸残基的 ε - 氨基上被酰化 2 次、双酰化或双重酰化的衍生物。

[0127] 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，根据上下文所用术语就能清楚明白。

[0128] 一方面，每个延长部分包含独立选自以下 Chem. 1、Chem. 2、Chem. 3 和 Chem. 4 的延长部分，或由所述部分组成：

[0129] Chem. 1：$HOOC-(CH_2)_x-CO-*$

[0130] Chem. 2：$HOOC-C_6H_4-O-(CH_2)_y-CO-*$

[0131] Chem. 3：$R^1-C_6H_4-(CH_2)_z-CO-*$

[0132] Chem. 4：$HOOC-C_4SH_2-(CH_2)_w-CO-*$

[0133] 其中 x 是范围在 6-18 的整数，y 是范围在 3-17 的整数，z 是范围在 1-5 的整数，R^1 是摩尔质量不高于 150Da 的基团，w 是范围在 6-18 的整数。

[0134] 在一个实施方案中，*-$(CH_2)_x$-* 是指直链或支链、优选直链的亚烷基，其中 x 是范围在 6-18 的整数。

[0135] 在另一个实施方案中，*-$(CH_2)_y$-* 是指直链或支链、优选直链的亚烷基，其中 y 是范围在 3-17 的整数。

[0136] 在第三实施方案中，*-$(CH_2)_z$-* 是指直链或支链、优选直链的亚烷基，其中 z 是范围在 1-5 的整数。

[0137] 在再一个实施方案中，*-$(CH_2)_w$-* 是指直链或支链、优选直链的亚烷基，其中 w 是范围在 6-18 的整数。

[0138] 另一方面，白蛋白结合部分包含选自以下的延长部分或由所述部分组成：脂肪二酸、以及具有远端（末端）苯基或苯氧基的脂肪酸，这两种基团任选被取代。苯基和 / 或苯氧基的任选取代基的摩尔质量不高于 150Da，优选不高于 125Da，更优选不高于 100Da，甚至更优选不高于 75Da，或最优选不高于 50Da。取代基的实例包括但不限于羧基、羟基、低级直链或支链 C1-C5 烷基例如甲基和叔丁基以及卤素例如碘。

[0139] 为了与 GLP-1 肽连接，脂肪酸的酸基、或脂肪二酸的酸基之一，与 GLP-1 肽中的赖氨酸残基的 ε 氨基形成酰胺键，任选通过接头。

[0140] 术语“脂肪酸”是指具有 4-28 个碳原子的脂族一羧酸，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。

[0141] 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的脂肪酸。因此，脂肪二酸是二羧酸。

[0142] 在一个优选的实施方案中，延长部分选自 HOOC-$(CH_2)_n$-CO-*、HOOC-C_6H_4-O-$(CH_2)_m$-CO-* 和 R^1-C_6H_4-$(CH_2)_p$-CO-*，其中 n 是范围在 8-16 的整数，m 是范围在 7-17 的整数，p 是范围在 1-5 的整数，R^1 是摩尔质量不高于 150Da 的基团。

[0143] 命名按照本领域通常方式进行，例如在上式 *-COOH 以及 HOOC-* 中是指羧基；*-C_6H_4-* 是指亚苯基；*-CO-* 以及 *-OC-* 是指羰基 (O = C < **)；C_6H_5-O-* 是指苯氧基；C_4H_4S 或 C_4SH_4 是指噻吩；和 *-C_4SH_2-* 是指其二基（任何亚噻吩基）。在具体的实施方案中，芳族，例如苯氧基和亚苯基，可以独立地为邻位、间位或对位。在另一个实施方案中，亚噻吩基二基可以是 2,3-；2,4-；或 2,5-。

[0144] 化学物质（例如 R^1 基团）的摩尔质量 (M) 是 1 摩尔物质的质量。摩尔质量的单位是道尔顿，符号是 Da，定义为 1Da = 1g/mol。

[0145] 可根据标准原子量来计算摩尔质量，并且摩尔质量通常列在化学目录中。通过对构成化合物的原子的标准原子量求和并乘以摩尔质量常数 M_u（其等于 1g/mol），就得到化合物的摩尔质量。举例来说，叔丁基 (C_4H_9) 的分子量是 $M(C_4H_9)$ = ([4×12.01]+[9×1.008])×1g/mol = 57Da。

[0146] 标准原子量是由国际纯化学和应用化学联合会 (International Union of Pure and Applied Chemistry，IUPAC) 公布，并在各种教科书、商业目录和挂图中重印。

[0147] 如上所述，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。连接点是在对应于 GLP-1(7-37) 的位置 26 的位置上的天然赖氨酸残基，和已经取代了在对应于 GLP-1(7-37) 的位置 37 的位置上的天然甘氨酸残基的赖氨酸残基。

[0148] 在一个具体的实施方案中，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。

[0149] 在另一个具体的实施方案中，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。

[0150] 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。

[0151] 术语“基本相同”包括因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。

[0152] 就化学化合物例如白蛋白结合部分、延长部分和接头而言，可使用本领域已知的任何合适的计算机程序和 / 或算法来计算相似性和 / 或同一性。

[0153] 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）。

[0154] 合适指纹的实例包括但不限于 UNITY 指纹、MDL 指纹和 / 或 ECFP 指纹，例如 ECFP_6 指纹 (ECFP 代表扩展连接指纹）。

[0155] 在具体的实施方案中，2 个延长部分、2 个接头和 / 或 2 个完整侧链被描述为 a) ECFP_6 指纹；b) UNITY 指纹；和 / 或 c) MDL 指纹。

[0156] 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)。

[0157] 在具体的实施方案中，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％），例如相似性为 1.0(100％）。

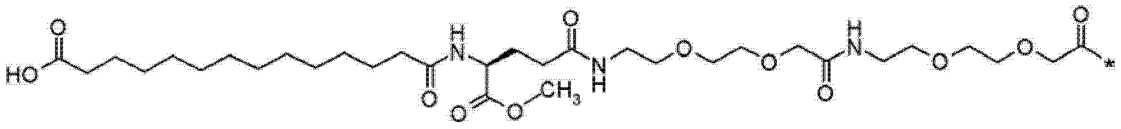
[0158] 可使用程序 SYBYL（可得自 Tripos, 1699South Hanley Road, St. Louis, MO 63144-2319USA）来计算 UNITY 指纹。可使用程序 Pipeline Pilot（可得自 Accelrys Inc., 10188Telesis Court, Suite 100, San Diego, CA 92121, USA）来计算 ECFP_6 和 MDL 指纹。

[0159] 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 Chemistry User Guide, March2008, 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 http://www.tripos.com/data/SYBYL/SYBYL_072505.pdf.。

[0160] 相似性计算的实例插入下文中，其中将 Chem. 23 的完整侧链与其甲酯即谷氨酰胺接头部分的单甲酯 (Chem 23a) 相比：

[0161] Chem. 23a：

[0162]



[0163] 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。

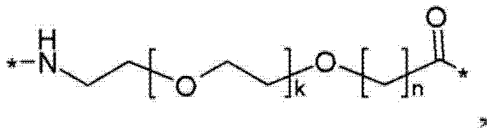
[0164] 在 2 个相同侧链（白蛋白结合部分）的情况下，衍生物可被称为对称。

[0165] 在具体的实施方案中，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。

[0166] 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 ：

[0167] Chem.5 ：

[0168]



[0169] 其中 k 是范围在 1-5 的整数，n 是范围在 1-5 的整数。

[0170] 在一个具体的实施方案中，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 ：

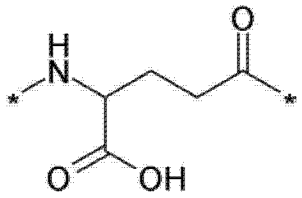
[0171] Chem.5a ：

[0172] *-NH-$(CH_2)_2$-O-$(CH_2)_2$-O-CH_2-CO-*.

[0173] 在另一个具体的实施方案中，本发明衍生物的每个接头还可独立包含第二接头元件，优选 Glu 二基，例如 Chem.6 和 / 或 Chem.7 ：

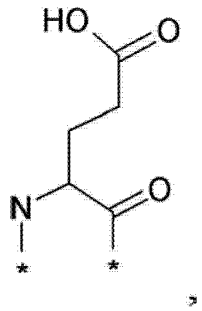
[0174] Chem.6 ：

[0175]



[0176] Chem.7 ：

[0177]



[0178] 其中 Glu 二基可被包括 p 次，其中 p 是范围在 1-3 的整数。

[0179] Chem.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。如上所述，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 - 羧基构成酰胺键。

[0180] Chem.7 也可被称为 α -Glu，或简称为 aGlu，或仅 Glu，因为事实上它是氨基酸谷氨酸的 α 羧基，其在此用于与另一接头元件连接，或与赖氨酸的 ε - 氨基连接。

[0181] 以上 Chem.6 和 Chem.7 结构覆盖了 Glu 的 L- 型以及 D- 型。在具体的实施方案中，Chem.6 和 / 或 Chem.7 独立地呈 a)L- 型，或 b)D- 型。

[0182] 在另一个具体的实施方案中，本发明衍生物的每个接头还可独立包含以下第三接头元件：

[0183] Chem.8：

[0184] *-NH-$(CH_2)_q$-CHR^2-CO-*，

[0185] 其中 q 是范围在 2-12 的整数，R^2 是氢 (H) 或氨基 (NH_2)。

[0186] 在 Chem.8 中，基团 *-$(CH_2)_q$-* 可代表直链或支链、优选直链的亚烷基，其中 q 是范围在 2-12 的整数。

[0187] 在再进一步的具体实施方案中，接头具有 a)5-41 个 C 原子；和 / 或 b)4-28 个杂原子。杂原子的具体的和非限制性的实例是 N 原子和 O 原子。H 原子不是杂原子。

[0188] 或者，接头部分，如果有的话，具有 5-30 个 C 原子，优选 5-25 个 C 原子，更优选 5-20 个 C 原子，或最优选 5-17 个 C 原子。在额外的优选实施方案中，接头部分，如果有的话，具有 4-20 个杂原子，优选 4-18 个杂原子，更优选 4-14 个杂原子，或最优选 4-12 个杂原子。

[0189] 或者，接头包含至少一个 OEG 分子、和 / 或至少一个谷氨酸残基、或更合适地说是相应基团。

[0190] 在一个具体的实施方案中，每个接头都由 1 次 Chem.6 和 2 次 Chem.5 组成，通过酰胺键相互连接并且在所示序列中，接头在其游离氨基端与延长部分的游离羰基连接，并且在其游离羰基端与 GLP-1 类似物的 K^{26} 或 K^{37} 的 ε 氨基连接。

[0191] 在另一个具体的实施方案中，每个接头都由 2 次 Chem.5 和 1 次 Chem.6 组成，通过酰胺键相互连接并且在所示序列中，接头在其游离氨基端与延长部分的游离羰基连接，并且在其游离羰基端与 GLP-1 类似物的 K^{26} 或 K^{37} 的 ε 氨基连接。

[0192] 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所连接的原子序列，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。

[0193] 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），或免疫测定例如 RIA（放免测定）、ELISA（酶联免疫吸附测定）和 LOCI（荧光氧通道免疫测定，Luminescence Oxygen Channeling Immunoasssay）。合适的 RIA 和 ELISA 测定的通用方案可参见例如 WO09/030738，第 116-118 页。优选的测定是本文的实施例 52、55 和 58 中描述的 LOCI 测定。

[0194] 药学上可接受的盐、酰胺或酯

[0195] 本发明的衍生物、类似物和中间产物可以呈药学上可接受的盐、酰胺或酯的形式。

[0196] 盐是由例如碱和酸之间的化学反应而形成，例如 $NH_3+H_2SO_4 \rightarrow (NH_4)_2SO_4$。

[0197] 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。

[0198] 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。

[0199] 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,并且它也可包括在内部酸性氨基酸残基例如Asp和Glu上的游离羧基。

[0200] 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例如His、Arg和Lys上的任何游离氨基。

[0201] 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。

[0202] 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。

[0203] 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生成。

[0204] 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/或侧链中的任何游离或取代的肽氨基。

[0205] 在一个具体的实施方案中,肽或衍生物呈药学上可接受的盐的形式。在另一个具体的实施方案中,衍生物呈药学上可接受的酰胺的形式,优选在肽的C-端具有酰胺基。在再进一步的具体的实施方案中,肽或衍生物呈药学上可接受的酯的形式。

[0206] 中间产物

[0207] 本发明的一类中间产物呈GLP-1类似物的形式,与GLP-1(7-37)(SEQ ID NO:1)相比,其包含以下修饰:(i)(8Aib,31H,34Q,37K);(ii)(des7-8,34R,37K,38E);(iii)(des7-8,34R,37K);(iv)(8Aib,9G,34R,37K);(v)(8Aib,23R,34R,37K);(vi)(31H,34Q,37K);(vii)(9Q,34R,37K);(iix)(30E,34R,37K);(ix)(34R,37K,38G);(x)(34R,36G,37K);或(xi)(34R,37K,38E);或其药学上可接受的盐、酰胺或酯。

[0208] 本发明的另一类中间产物呈白蛋白结合部分、或侧链中间产物的形式,其包含选自Chem.2c、Chem.3b和Chem.4b的延长部分:

[0209] Chem.2c:$HOOC-C_6H_4-O-(CH_2)_y-CO-PG$

[0210] Chem.3b:$R^1-C_6H_4-(CH_2)_z-CO-PG$

[0211] Chem.4b:$HOOC-C_4SH_2-(CH_2)_w-CO-PG$

[0212] 其中y是范围在3-17的整数,z是范围在1-5的整数,R^1是摩尔质量不高于150Da的基团,w是范围在6-18的整数,PG是保护基,优选*-CO-PG是活性酯;其中,任选,延长部分的另一(远端)*-COOH基团,如果有的话,优选也按本领域已知方式被保护,例如经官能化而成为非反应性酯;或其药学上可接受的盐、酰胺或酯。

[0213] 在一个具体的实施方案中,侧链中间产物包含

[0214] a)选自Chem.2、Chem.3和Chem.4的延长部分:

[0215] Chem.2:$HOOC-C_6H_4-O-(CH_2)_y-CO-*$

[0216] Chem.3:$R^1-C_6H_4-(CH_2)_z-CO-*$

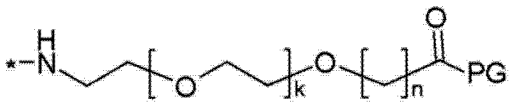
[0217] Chem.4:$HOOC-C_4SH_2-(CH_2)_w-CO-*$

[0218] 其中y是范围在3-17的整数,z是范围在1-5的整数,R^1是摩尔质量不高于150Da的基团,w是范围在6-18的整数;和

[0219] b) 选自 Chem.5b、Chem.6 和 Chem.7 的一个或多个接头：

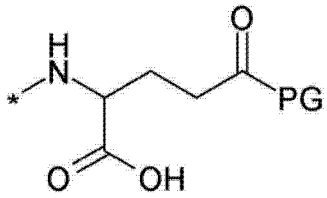
[0220] Chem.5b：

[0221]



[0222] Chem.6a：

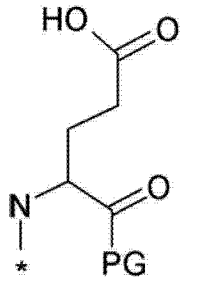
[0223]



和 / 或

[0224] Chem.7a：

[0225]



[0226] 其中 k 是范围在 1-5 的整数，n 是范围在 1-5 的整数；和 PG 是保护基；其中，任选，延长部分的 *-COOH 基团也优选按本领域已知方式被保护，优选经官能化而成为非反应性酯；或其药学上可接受的盐、酰胺或酯。

[0227] 在一个具体的实施方案中，PG 是可逆性赋予化合物例如延长部分非反应性的基团，并且所述基团可被选择性去除。

[0228] PG 基团的非限制性实例是 -OH，或经官能化而成为活性酯的基团，例如但不限于 OPfp、OPnp 和 OSuc。

[0229] 可以按照例如以下文献的教导来选择其它合适的活性酯：M.Bodanszky，″ Principles of Peptide Synthesis″，第 2 版，Springer Verlag，1993。

[0230] 功能特性

[0231] 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，它们具有延长的药物动力学特性。此外或备选地，在第三功能方面，它们对胃肠道酶的降解是稳定的。此外或备选地，在第四功能方面，它们具有高口服生物利用度。

[0232] 生物活性（功效）

[0233] 依据第一功能方面，本发明的衍生物、以及构成 GLP-1 肽（例如 K^{37}-GLP-1(7-37) 或其类似物）具有生物活性或功效。

[0234] 在一个具体的实施方案中，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。

[0235] 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

染的细胞系例如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，在所述测定中使用特异性抗体能更优选捕获cAMP，和/或其中甚至更优选的测定是AlphaScreen cAMP测定，最优选的一种描述于实施例50。

[0236] 术语“半最大有效浓度(EC_{50})”通常是指根据剂量反应曲线引发介于基线和最大值之间一半反应的浓度。EC_{50}用作化合物功效的度量并且代表了所观察到的其最大效果的50％的浓度。

[0237] 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EC_{50}。EC_{50}越低，功效越好。

[0238] 在一个具体的实施方案中，培养基具有以下组成（最终测定浓度）：50mM TRIS-HCl；5mM HEPES；10mM $MgCl_2$，$6H_2O$；150mM NaCl；0.01％吐温；0.1％ BSA；0.5mM IBMX；1mM ATP；1uM GTP；pH7.4。

[0239] 一种替代培养基为：50mM Tris-HCl，1mM EGTA，1.5mM$MgSO_4$，1.7mM ATP，20mM GTP，2mM 3-异丁基-1-甲基黄嘌呤(IBMX)，0.01％吐温20，pH7.4。

[0240] 在一个进一步具体的实施方案中，本发明衍生物的EC_{50}在3000pM或以下，更优选低于2000pM，甚至更优选低于1000pM，或最优选低于500pM。

[0241] 在另一个具体的实施方案中，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。

[0242] 糖尿病性db/db小鼠是合适动物模型的一个实例，在这样的小鼠体内可测定血糖降低效应，例如按照实施例53所述，或按照WO09/030738的实施例43所述。

[0243] 此外或备选地，在对小型猪进行的药效动力学研究中，可测定对由葡萄糖介导的体内胰岛素分泌的效果(IVGTT)，例如按照实施例55所述。

[0244] 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56所述。

[0245] 延长-受体结合/低白蛋白和高白蛋白

[0246] 依据第二功能方面，本发明的衍生物被延长。

[0247] 可按实施例51所述，分别在低和高浓度白蛋白的存在下测定本发明衍生物与GLP-1受体的结合能力。

[0248] 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IC_{50}值。

[0249] 在高白蛋白浓度时IC_{50}值是白蛋白对衍生物与GLP-1受体结合的影响的度量。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IC_{50}值通常高于在低白蛋白时的IC_{50}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。

[0250] 因此，可采用高比率(IC_{50}值（高白蛋白）/IC_{50}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(IC_{50}值（高白蛋白）高，IC_{50}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，IC_{50}（低白蛋白）、IC_{50}（高白蛋白）的满意范围/和高/低比率可因化合物不同而不同，取决于所需用途和使用时的周围环境、以及其它的潜在目标化合物的特性。

[0251] 在一个具体的实施方案中，在 0.005％ HSA（低白蛋白）存在时，GLP-1 受体结合亲和力（IC_{50}）低于 1000.00nM，优选低于 600.00nM，更优选低于 100.00nM，或最优选低于 50.00nM。

[0252] 在高、低白蛋白浓度时检测受体结合的合适测定方法公开于本文的实施例 51。

[0253] 延长－大鼠体内半衰期

[0254] 依据第二功能方面，本发明的衍生物被延长。在一个具体的实施方案中，在经 i.v. 给予大鼠之后测定体内半衰期（$T_{1/2}$）而确定延长。在额外的实施方案中，半衰期为至少 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。

[0255] 在经 i.v. 给予大鼠之后测定体内半衰期的合适测定方法公开于本文的实施例 58。

[0256] 延长－小型猪的体内半衰期

[0257] 依据第二功能方面，本发明的衍生物被延长。在一个具体的实施方案中，在经 i.v. 给予小型猪之后测定体内半衰期（$T_{1/2}$）而确定延长。在额外的实施方案中，半衰期为至少 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。

[0258] 在经 i.v. 给予小型猪之后测定体内半衰期的合适测定方法公开于本文的实施例 54。

[0259] 胃肠道酶的降解

[0260] 依据第三功能方面，本发明的衍生物对一种或多种胃肠道酶降解是稳定的、或被稳定化。

[0261] 胃肠道酶包括但不限于肽链外切酶和肽链内切酶，例如胃蛋白酶、胰蛋白酶、胰凝乳蛋白酶、弹性蛋白酶和羧肽酶。可针对这些胃肠道酶的纯化酶形式、或来自胃肠道系统的提取物形式来检测稳定性。

[0262] 在一个具体的实施方案中，本发明衍生物在大鼠小肠提取物中的体外半衰期（$T_{1/2}$），除以 GLP-1(7-37) 的相应半衰期（$T_{1/2}$），为至少 1，优选高于 1.0，更优选至少 1.2，还更优选至少 2.0，甚至更优选至少 3.0，或最优选至少 4.0。换句话说，对于每种衍生物可定义比率（SI），即定义为目标衍生物在大鼠小肠提取物中的体外半衰期（$T_{1/2}$），除以 GLP-1(7-37) 的相应半衰期（$T_{1/2}$）。

[0263] 测定在大鼠小肠提取物中的体外半衰期的合适测定方法公开于本文的实施例 57。

[0264] 口服生物利用度

[0265] 依据第四功能方面，本发明的衍生物具有高口服生物利用度。

[0266] 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 给予的 GLP-1 衍生物的口服生物利用度也低。

[0267] 因此，本领域需要 GLP-1 衍生物具有改善的口服生物利用度。这样的衍生物可以是供口服给药用的合适候选者，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。

[0268] 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。

[0269] 此外或备选地，这些衍生物具有意想不到的高口服生物利用度，并且同时在低浓

度白蛋白时还与 GLP-1 受体有着高的结合亲和力（即低 IC_{50} 值）。

[0270] 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、以及给予的舒适问题和环境上的考虑。

[0271] 通常，术语生物利用度是指所给予的活性药物成分 (API) 例如本发明衍生物到达体循环而不变的剂量部分。按照定义，当 API 经静脉内给予时，其生物利用度是 100％。然而，当经其它途径（例如口服）给予时，其生物利用度下降（因为不完全吸收和首过代谢）。当计算用于非静脉内给药途径的剂量时，生物利用度的相关知识是基本的。

[0272] 绝对口服生物利用度将口服给药后体循环中的 API 生物利用度（用曲线下面积或 AUC 来评价）与静脉内给药后体相同 API 的生物利用度相比较。这是通过非静脉内给药所吸收的 API 与相同 API 经相应的静脉内给药相比的分数。如果使用不同剂量，则比较必须是经标准化的剂量；因此，各 AUC 通过除以所给予的相应剂量而得以校正。

[0273] 在口服和静脉内给药之后绘制血浆 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。

[0274] 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。

[0275] 已经开发出一种试验，如实施例 52 所述，发现所述试验是口服生物利用度的非常好的预测。根据这一试验，在将 GLP-1 衍生物直接注射到大鼠肠腔内之后，测定其血浆浓度（暴露），并计算 t ＝ 30min 时的血浆浓度 (pmol/l) 除以给药溶液浓度 (umol/l) 的比率。该比率是肠生物利用度的度量，并且证明它与实际口服生物利用度数据具有良好相关性。

[0276] 本发明衍生物的额外的具体实施方案描述于实验部分之前的标题为“具体的实施方案”和“额外的具体的实施方案”章节中。

[0277] 生产工艺

[0278] 诸如 GLP-1(7-37) 和 GLP-1 类似物等肽的生产是本领域众所周知的。

[0279] 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），例如 K^{37}-GLP-1(7-37) 或其类似物或片段，所述技术参见例如 Greene 和 Wuts，“Protective 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 Peptide Synthesis”，W.C.Chan 和 P.D.White 主编，Oxford University Press，2000。

[0280] 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。

[0281] 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：" 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" 。

[0282] 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。

[0283] 药物组合物

[0284] 可按照本领域已知方法制备包含本发明衍生物或其药学上可接受的盐、酰胺或酯、和药学上可接受的赋形剂的药物组合物。

[0285] 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。

[0286] 赋形剂可用于多种目的，例如作为载体、溶媒、稀释剂、片剂助剂、和 / 或用于改善给药、和 / 或活性物质的吸收。

[0287] 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) 。

[0288] 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。

[0289] 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。

[0290] 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，或者由医师或患者加入溶剂和 / 或稀释剂之后使用。

[0291] 水性制剂的 pH 可以是介于 pH 3 和 pH 10 的任何值，例如从约 7.0 至约 9.5 ；或从约 3.0 至约 7.0。

[0292] 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、甘氨酰甘氨酸、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。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、双氯苯双胍已烷、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 0.1mg/ml 至 20mg/ml。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、1,2- 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，例如单糖、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。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。

[0293] 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，其可以是可溶性的，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的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，例如当用输送系统给予含多肽的药物组合物时会阻塞管道、膜或泵。

[0294] 药物组合物可包含一定量的氨基酸基料，其足以在所述组合物贮存期间减少多肽聚集体的形成。术语“氨基酸基料”是指一种或多种氨基酸（例如甲硫氨酸、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。氨基酸基料的任何立体异构体（即 L、D 或其混合物）都可存在。

[0295] 当作为治疗药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砜。可使用甲硫氨酸的任何立体异构体 (L 或 D) 或其组合。

[0296] 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，例如但不限于甲硫氨酸和 EDTA，其保护多肽以免甲硫氨酸氧化，和非离子型表面活性剂，其保护多肽以免冻融或机械剪切相关的聚集。

[0297] 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”是指包含水溶性（亲水性）部分和脂溶性（亲脂性）部分的任何分子或离子。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。

[0298] 药物组合物可包含一种或多种蛋白酶抑制剂，例如 EDTA（乙二胺四乙酸）和 / 或苯甲脒 HCl。

[0299] 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、油性溶媒、蛋白质（例如人血清白蛋白、明胶）、和 / 或两性离子（例如氨基酸例如甜菜碱、牛磺酸、精氨酸、甘氨酸、赖氨酸和组氨酸）。

[0300] 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。

[0301] 所给予的剂量可含有 0.01mg-100mg 的所述衍生物，或 0.01-50mg、或 0.01-20mg、或 0.01-10mg 的所述衍生物。

[0302] 所述衍生物可以药物组合物的形式给予。可将它给予有需要的患者的若干部位，例如局部部位，例如皮肤或粘膜部位；旁路吸收部位，例如动脉内、静脉内或心脏内；和参与吸收的部位，例如皮肤内、皮下、肌肉内或腹内。

[0303] 给药途径可以是例如舌；舌下；口腔含化；口腔；口服；胃内；肠内；鼻腔；肺，例如通过细支气管、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，和给药途径可以是经口服。

[0304] 组合物可以若干剂型给予，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，例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；原位转化溶液剂例如原位胶凝、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。

[0305] 还可将组合物进一步结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。在一个具体的实施方案中，可将组合物通过共价键、疏水键和/或静电引力连接到所述系统。这类结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。

[0306] 组合物也可用于配制控制释放、持续释放、延长释放、延迟释放和/或缓慢释放药物递送系统。

[0307] 胃肠外给药可通过注射器方式，任选笔型注射器，或通过输注泵方式，经皮下、肌内、腹膜内或静脉内注射给予。

[0308] 可以溶液剂、混悬剂或粉剂形式经鼻腔给予组合物；或可以液体或粉末喷雾的形式经肺部给予。

[0309] 透皮给予也是再进一步的选择，例如通过无针注射，从贴剂例如离子电渗贴剂（iontophoretic patch），或通过透黏膜途径，例如经口。

[0310] 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。

[0311] 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，这由暴露给热-机械应力的结果和/或与不稳定界面和表面（例如疏水性表面）相互作用引起。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。

[0312] 术语“化学稳定性”是指多肽结构中的化学（尤其是共价）变化导致形成化学降解产物，其可能与原来的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、在暴露给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。

[0313] 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（二肽酰基肽酶IV）抑制剂、参与糖异生和/或肝糖分解的刺激的肝酶抑制剂、葡萄糖摄取调节剂、调节脂质代谢的化合物例如抗高血脂药例如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-阻滞剂例如阿普洛尔、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）抑制剂例如贝那普

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、钙通道阻滞剂例如硝苯地平、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 - 阻滞剂例如多沙唑嗪、乌拉地尔、哌唑嗪和特拉唑嗪 ;CART(可卡因安非他明调节转录) 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(黑皮质素 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、urocortin 激动剂、β 3 激动剂、oxyntomodulin 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(thyreotropin 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。

[0314] 也可将本发明衍生物的治疗与影响葡萄糖水平和 / 或脂肪稳态例如胃束带或胃旁路的手术联用。

[0315] 药物适应症

[0316] 本发明也涉及用作药物的本发明的衍生物。

[0317] 在具体的实施方案中,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 :

[0318] (i) 预防和 / 或治疗所有形式的糖尿病,例如高血糖症、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 ;

[0319] (ii) 延迟或预防糖尿病进程,例如 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 ;

[0320] (iii) 改善 β 细胞功能,例如减少 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 ;

[0321] (iv) 预防和 / 或治疗认知障碍 ;

[0322] (v) 预防和 / 或治疗进食障碍,例如肥胖症,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 / 或因给予安定药或甾体所致的肥胖症 ;减少胃运动 ;和 / 或延迟胃排空 ;

[0323] (vi) 预防和 / 或治疗糖尿病并发症,例如神经病,包括周围神经病 ;肾病 ;或视网膜病 ;

[0324] (vii) 改善脂质参数,例如预防和 / 或治疗高脂血症,降低血清总脂 ;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 ;增加人血浆中脂蛋白的水平 (Lp(a)) ;在体外和 / 或体内抑制 apo 脂蛋白 a(apo(a)) 的产生 ;

[0325] (iix) 预防和 / 或治疗心血管疾病,例如 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,例如左心室肥大 ;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（atheroschlerosis oblitterens）；舒张功能障碍；和／或收缩功能障碍；

[0326] （ix）预防和／或治疗胃肠道疾病，例如炎性肠综合征；小肠综合征或克罗恩病（Crohn’s disease）；消化不良；和／或胃溃疡；

[0327] （x）预防和／或治疗危急病症，例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罹患菌血症、败血症和／或脓毒性休克的可能性；和／或

[0328] （xi）预防和／或治疗多囊卵巢综合征（PCOS）。

[0329] 在一个具体的实施方案中，所述适应症选自（i）-（iii）和（v）-（iix），例如适应症（i）、（ii）和／或（iii）；或适应症（v）、适应症（vi）、适应症（vii），和／或适应症（iix）。

[0330] 在另一个具体的实施方案中，适应症是（i）。在进一步的具体的实施方案中，适应症是（v）。在再进一步的具体的实施方案中，适应症是（iix）。

[0331] 以下适应症特别优选：2型糖尿病和／或肥胖症。

[0332] 具体的实施方案

[0333] 以下是本发明具体的实施方案：

[0334] 1.GLP-1类似物的衍生物，

[0335] 与GLP-1（7-37）相比，所述类似物包含在对应于GLP-1（7-37）（SEQ ID NO：1）的位置37的位置上的第一K残基，在对应于GLP-1（7-37）的位置26的位置上的第二K残基，和最大10个氨基酸修饰，其中第一K残基称为K^{37}，第二K残基称为K^{26}，

[0336] 所述衍生物包含分别连接到K^{26}和K^{37}的两个白蛋白结合部分，其中

[0337] 所述白蛋白结合部分包含选自Chem.1、Chem.2、Chem.3和Chem.4的延长部分：

[0338] Chem.1：$HOOC-(CH_2)_x-CO-*$

[0339] Chem.2：$HOOC-C_6H_4-O-(CH_2)_y-CO-*$

[0340] Chem.3：$R^1-C_6H_4-(CH_2)_z-CO-*$

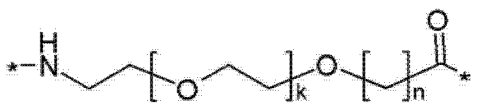
[0341] Chem.4：$HOOC-C_4SH_2-(CH_2)_w-CO-*$

[0342] 其中x是范围在6-18的整数，y是范围在3-17的整数，z是范围在1-5的整数，R^1是摩尔质量不高于150Da的基团，w是范围在6-18的整数；

[0343] 前提条件是当延长部分是Chem.1时，所述白蛋白结合部分还包含下式Chem.5的接头：

[0344] Chem.5：

[0345]



[0346] 其中k是范围在1-5的整数，n是范围在1-5的整数；

[0347] 或其药学上可接受的盐、酰胺或酯。

[0348] 2.实施方案1的衍生物，

[0349] 其中与 GLP-1(7-37) 相比，所述 GLP-1 类似物包含在对应于 GLP-1(7-37)(SEQ ID NO :1) 的位置 37 的位置上的第一 K 残基，在对应于 GLP-1(7-37) 的位置 26 的位置上的第二 K 残基，和最大 10 个氨基酸修饰，其中第一 K 残基称为 K^{37}，第二 K 残基称为 K^{26}，

[0350] 所述衍生物包含分别连接到 K^{26} 和 K^{37} 的两个白蛋白结合部分，其中

[0351] 所述白蛋白结合部分包含选自 Chem. 2、Chem. 3 和 Chem. 4 的延长部分 ：

[0352] Chem. 2 ：$HOOC-C_6H_4-O-(CH_2)_y-CO-*$

[0353] Chem. 3 ：$R^1-C_6H_4-(CH_2)_z-CO-*$

[0354] Chem. 4 ：$HOOC-C_4SH_2-(CH_2)_w-CO-*$

[0355] 其中 y 是范围在 3-17 的整数，z 是范围在 1-5 的整数，R^1 是摩尔质量不高于 150Da 的基团，w 是范围在 6-18 的整数 ；

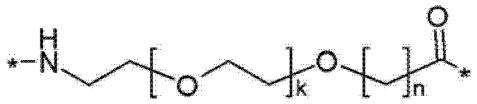
[0356] 或其药学上可接受的盐、酰胺或酯。

[0357] 3. 实施方案 2 的衍生物，其中所述白蛋白结合部分还包含接头。

[0358] 4. 实施方案 3 的衍生物，其中所述接头包含 i)Glu 二基 ；和 / 或 ii) 式 Chem. 5 的接头 ：

[0359] Chem. 5 ：

[0360]

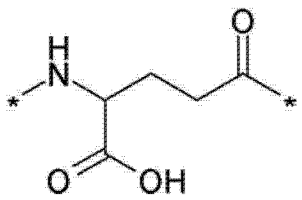


[0361] 其中 k 是范围在 1-5 的整数，n 是范围在 1-5 的整数。

[0362] 5. 实施方案 4 的衍生物，其中所述 Glu 二基选自 Chem. 6 和 / 或 Chem. 7 ：

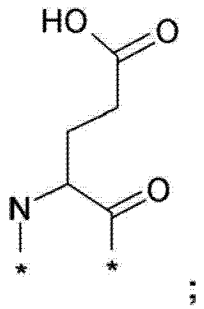
[0363] Chem. 6 ：

[0364]



[0365] Chem. 7 ：

[0366]



[0367] 优选 Chem. 6。

[0368] 6. 实施方案 1 的衍生物，

[0369] 其中与 GLP-1(7-37) 相比，所述 GLP-1 类似物包含在对应于 GLP-1(7-37)(SEQ ID NO :1) 的位置 37 的位置上的第一 K 残基，在对应于 GLP-1(7-37) 的位置 26 的位置上的第

二 K 残基，和最大 10 个氨基酸修饰，其中第一 K 残基称为 K^{37}，第二 K 残基称为 K^{26}，

[0370] 所述衍生物包含分别连接到 K^{26} 和 K^{37} 的两个白蛋白结合部分，其中

[0371] 所述白蛋白结合部分包含

[0372] i) 式 Chem. 1 的延长部分：

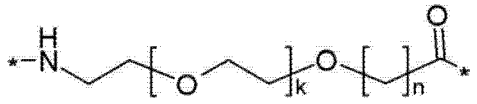
[0373] Chem. 1：$HOOC-(CH_2)_x-CO-*$

[0374] 其中 x 是范围在 6-18 的整数；和

[0375] ii) 式 Chem. 5 的接头：

[0376] Chem. 5：

[0377]



[0378] 其中 k 是范围在 1-5 的整数，n 是范围在 1-5 的整数；

[0379] 或其药学上可接受的盐、酰胺或酯。

[0380] 7. 实施方案 1 的衍生物，

[0381] 其中与 GLP-1(7-37) 相比，所述 GLP-1 类似物包含在对应于 GLP-1(7-37)(SEQ ID NO：1) 的位置 37 的位置上的第一 K 残基，在对应于 GLP-1(7-37) 的位置 26 的位置上的第二 K 残基，和最大 10 个氨基酸修饰，其中第一 K 残基称为 K^{37}，第二 K 残基称为 K^{26}；

[0382] 所述衍生物包含通过接头分别连接到 K^{26} 和 K^{37} 的两个延长部分，其中

[0383] 所述延长部分选自 Chem. 1、Chem. 2、Chem. 3 和 Chem. 4：

[0384] Chem. 1：$HOOC-(CH_2)_x-CO-*$

[0385] Chem. 2：$HOOC-C_6H_4-O-(CH_2)_y-CO-*$

[0386] Chem. 3：$R^1-C_6H_4-(CH_2)_z-CO-*$

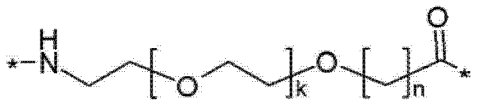
[0387] Chem. 4：$HOOC-C_4SH_2-(CH_2)_w-CO-*$

[0388] 其中 x 是范围在 6-18 的整数，y 是范围在 3-17 的整数，z 是范围在 1-5 的整数，R^1 是摩尔质量不高于 150Da 的基团，w 是范围在 6-18 的整数；和

[0389] 所述接头包含 Chem. 5：

[0390] Chem. 5：

[0391]



[0392] 其中 k 是范围在 1-5 的整数，n 是范围在 1-5 的整数；

[0393] 或其药学上可接受的盐、酰胺或酯。

[0394] 8. 实施方案 1-7 中任一项的衍生物，其中 Chem. 5 是第一接头元件。

[0395] 9. 实施方案 1-8 中任一项的衍生物，其中 k 是 1。

[0396] 10. 实施方案 1-9 中任一项的衍生物，其中 n 是 1。

[0397] 11. 实施方案 1-10 中任一项的衍生物，其中 Chem. 5 被包括 m 次，其中 m 是范围在 1-10 的整数。

[0398] 12. 实施方案 11 的衍生物，其中 m 是范围在 1-6 的整数；优选范围为 1-4；更优选 m 是 1 或 2；或最优选 m 是 2。

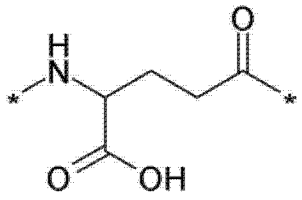
[0399] 13. 实施方案 11-12 中任一项的衍生物，其中当 m 不同于 1 时，所述 Chem. 5 元件通过酰胺键互相连接。

[0400] 14. 实施方案 1-13 中任一项的衍生物，其中所述接头由一个或多个 Chem. 5 元件组成。

[0401] 15. 实施方案 1-13 中任一项的衍生物，其中所述接头还包含第二接头元件；优选 Glu 二基；更优选选自 Chem. 6 和 / 或 Chem. 7：

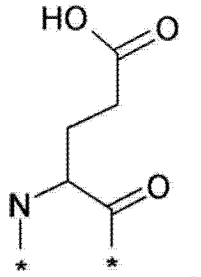
[0402] Chem. 6：

[0403]



[0404] Chem. 7：

[0405]



；

[0406] 最优选 Chem. 6。

[0407] 16. 实施方案 15 的衍生物，其中所述 Glu 二基被包括 p 次，其中 p 是范围在 1-3 的整数。

[0408] 17. 实施方案 16 的衍生物，其中 p 是 1、2 或 3；优选 1 或 2；或最优选 1。

[0409] 18. 实施方案 1-17 中任一项的衍生物，其中所述 Glu 二基是 L-Glu 或 D-Glu 的基团，优选 L-Glu 的基团。

[0410] 19. 实施方案 16-18 中任一项的衍生物，其中所述一个或多个 Glu 二基和所述一个或多个 Chem. 5 元件通过酰胺键相互连接。

[0411] 20. 实施方案 1-19 中任一项的衍生物，其中所述接头包含进一步的接头元件，例如第三接头元件。

[0412] 21. 实施方案 20 的衍生物，其中所述第三接头元件是

[0413] Chem. 8：*-NH-$(CH_2)_q$-CHR^2-CO-*，

[0414] 其中 q 是范围在 2-12 的整数，R^2 是氢 (H)、氨基 (NH_2) 或 C1-C5 低级醇。

[0415] 22. 实施方案 21 的衍生物，其中 q 是 4、6 或 10。

[0416] 23. 实施方案 21-22 中任一项的衍生物，其中 Chem. 8 是氨基己酸、氨基辛酸、氨基十二烷酸或赖氨酸的基团。

[0417] 24. 实施方案 23 的衍生物，其中所述基团化氨基是在 ε 位置。

[0418] 25. 实施方案 1-24 中任一项的衍生物，其中所述接头由 m 次 Chem. 5 和 p 次 Glu 二基组成。

[0419] 26. 实施方案 25 的衍生物，其中 (m,p) 是 (2,2)、(2,1)、(2,3)、(4,1)、(6,1)、(1,0)、(1,1)、(1,2)、(0,1) 或 (0,2)；优选 (2,1)、(2,0)、(1,0)、(1,1)、(0,1) 或 (0,2)；更优选 (2,1)、(2,2) 或 (1,2)；甚至更优选 (1,1) 或 (2,1)；或最优选 (2,1)。

[0420] 27. 实施方案 25-26 中任一项的衍生物，其中 m 次 Chem.5 元件和 p 次 Glu 二基通过酰胺键互相连接。

[0421] 28. 实施方案 21-24 中任一项的衍生物，其中所述接头由 m 次 Chem.5、p 次 Glu 二基和 Chem.8 组成。

[0422] 29. 实施方案 28 的衍生物，其中 (m,p) 是 (2,1) 或 (1,1)；优选 (2,1)。

[0423] 30. 实施方案 28-29 中任一项的衍生物，其中 m 次 Chem.5 元件、p 次 Glu 二基和 Chem.8 元件通过酰胺键互相连接。

[0424] 31. 实施方案 1-30 中任一项的衍生物，其中所述接头和所述延长部分通过酰胺键互相连接。

[0425] 32. 实施方案 1-31 中任一项的衍生物，其中所述接头和所述 GLP-1 类似物通过酰胺键互相连接。

[0426] 33. 实施方案 32 的衍生物，其中所述接头连接到 K^{26} 或 K^{37} 的 ε - 氨基。

[0427] 34. 实施方案 1-33 中任一项的衍生物，其中所述接头具有

[0428] (i)5-41 个 C 原子；优选 5-17 个 C 原子；例如 5、6、11、12 或 17 个 C 原子；例如 5、6 或 12 个 C 原子，或 11 或 17 个 C 原子；或最优选 17 个 C 原子；或

[0429] (ii)5-30 个 C 原子，优选 5-25 个 C 原子，更优选 5-20 个 C 原子，或最优选 5-17 个 C 原子。

[0430] 35. 实施方案 1-34 中任一项的衍生物，其中所述接头具有

[0431] (i)4-28 个杂原子；优选 4-12 个杂原子；例如 4、8 或 12 个杂原子；更优选 8 或 12 个杂原子；或最优选 12 个杂原子；或

[0432] (ii)4-20 个杂原子，优选 4-18 个杂原子，更优选 4-14 个杂原子，或最优选 4-12 个杂原子。

[0433] 36. 实施方案 35 的衍生物，其中所述杂原子是 N 原子和 / 或 O 原子。

[0434] 37. 实施方案 34-36 中任一项的衍生物，其中所述接头具有 1-7 个 N 原子；优选 1-3 个 N 原子；例如 1、2 或 3 个 N 原子；例如 1 或 2 个 N 原子；或最优选 3 个 N 原子。

[0435] 38. 实施方案 34-37 中任一项的衍生物，其中所述接头具有 3-21 个 O 原子；优选 3-9 个 O 原子；例如 3、6 或 9 个 O 原子；例如 3 或 6 个 O 原子；或最优选 9 个 O 原子。

[0436] 39. 实施方案 1-38 中任一项的衍生物，其中所述接头由通过酰胺键相互连接的 2 次 Chem.5 组成，并且在其 *-NH 端与所述延长部分的 *-CO 端连接，和在其 *-CO 端与 GLP-1 类似物的 K^{26} 或 K^{37} 的 ε 氨基连接。

[0437] 40. 实施方案 1-38 中任一项的衍生物，其中所述接头由通过酰胺键相互连接的 4 次 Chem.5 组成，并且在其 *-NH 端与所述延长部分的 *-CO 端连接，和在其 *-CO 端与 GLP-1 类似物的 K^{26} 或 K^{37} 的 ε 氨基连接。

[0438] 41. 实施方案 1-38 中任一项的衍生物，其中所述接头由通过酰胺键相互连接的 2 次 Chem.6 和 2 次 Chem.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 *-CO 端连接，和在其 *-CO 端与 GLP-1 类似物的 K^{26} 或 K^{37} 的 ε 氨基连接。

[0439] 42. 实施方案 1-38 中任一项的衍生物，其中所述接头由通过酰胺键相互连接的 2 次 Chem.5 和 1 次 Chem.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 *-CO 端连接，和在其游离 *-CO 端与 GLP-1 类似物的 K^{26} 或 K^{37} 的 ε 氨基连接。

[0440] 43. 实施方案 1-38 中任一项的衍生物，其中所述接头由通过酰胺键相互连接的 3 次 Chem.6 和 2 次 Chem.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 *-CO 端连接，和在其游离 *-CO 端与 GLP-1 类似物的 K^{26} 或 K^{37} 的 ε 氨基连接。

[0441] 44. 实施方案 1-38 中任一项的衍生物，其中所述接头由通过酰胺键相互连接的 1 次 Chem.6 和 2 次 Chem.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 *-CO 端连接，和在其 *-CO 端与 GLP-1 类似物的 K^{26} 或 K^{37} 的 ε 氨基连接。

[0442] 45. 实施方案 1-38 中任一项的衍生物，其中所述接头由通过酰胺键相互连接的 1 次 Chem.6、1 次 Chem.5 和 1 次 Chem.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 *-CO 端连接，和在其 *-CO 端与 GLP-1 类似物的 K^{26} 或 K^{37} 的 ε 氨基连接。

[0443] 46. 实施方案 1-38 中任一项的衍生物，其中所述接头由通过酰胺键相互连接的 1 次 Chem.6 和 4 次 Chem.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 *-CO 端连接，和在其 *-CO 端与 GLP-1 类似物的 K^{26} 或 K^{37} 的 ε 氨基连接。

[0444] 47. 实施方案 1-38 中任一项的衍生物，其中所述接头由通过酰胺键相互连接的 1 次 Chem.6 和 6 次 Chem.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 *-CO 端连接，和在其 *-CO 端与 GLP-1 类似物的 K^{26} 或 K^{37} 的 ε 氨基连接。

[0445] 48. 实施方案 1-38 中任一项的衍生物，其中所述接头由通过酰胺键相互连接的 1 次 Chem.6 和 1 次 Chem.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 *-CO 端连接，和在其 *-CO 端与 GLP-1 类似物的 K^{26} 或 K^{37} 的 ε 氨基连接。

[0446] 49. 实施方案 1-38 中任一项的衍生物，其中所述接头由通过酰胺键相互连接的 1 次 Chem.5、1 次 Chem.6 和 1 次 Chem.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 *-CO 端连接，和在其 *-CO 端与 GLP-1 类似物的 K^{26} 或 K^{37} 的 ε 氨基连接。

[0447] 50. 实施方案 1-38 中任一项的衍生物，其中所述接头由通过酰胺键相互连接的 1 次 Chem.7 和 2 次 Chem.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 *-CO 端连接，和在其 *-CO 端与 GLP-1 类似物的 K^{26} 或 K^{37} 的 ε 氨基连接。

[0448] 51. 实施方案 1-38 中任一项的衍生物，其中所述接头由 1 次 Chem.5 组成，所述接头在其 *-NH 端与所述延长部分的 *-CO 端连接，和在其 *-CO 端与 GLP-1 类似物的 K^{26} 或 K^{37} 的 ε 氨基连接。

[0449] 52. 实施方案 1-38 中任一项的衍生物，其中所述接头由 1 次 Chem.6 组成，所述接头在其 *-NH 端与所述延长部分的 *-CO 端连接，和在其 *-CO 端与 GLP-1 类似物的 K^{26} 或 K^{37} 的 ε 氨基连接。

[0450] 53. 实施方案 1-38 中任一项的衍生物，其中所述接头由通过酰胺键相互连接的 2 次 Chem.6 组成，所述接头在其 *-NH 端与所述延长部分的 *-CO 端连接，和在其 *-CO 端与 GLP-1 类似物的 K^{26} 或 K^{37} 的 ε 氨基连接。

[0451] 54. 实施方案 1-53 中任一项的衍生物，其中所述接头由通过酰胺键相互连接的 1 次 Chem.6、1 次 Chem.8（其中优选 q 是 10 和 R^2 是 H）、1 次 Chem.6 和 2 次 Chem.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 *-CO 端连接，和在其 *-CO 端与

GLP-1 类似物的 K^{26} 或 K^{37} 的 ε 氨基连接。

[0452] 55. 实施方案 1-54 中任一项的衍生物，其中所述接头由通过酰胺键相互连接的 1 次 Chem. 6、1 次 Chem. 8（其中优选 q 是 4 和 R^2 是 H）、1 次 Chem. 6 和 2 次 Chem. 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 *-CO 端连接，和在其 *-CO 端与 GLP-1 类似物的 K^{26} 或 K^{37} 的 ε 氨基连接。

[0453] 56. 实施方案 1-55 中任一项的衍生物，其中所述接头由通过酰胺键相互连接的 1 次 Chem. 6、1 次 Chem. 8（其中优选 q 是 6 和 R^2 是 H）、1 次 Chem. 6 和 2 次 Chem. 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 *-CO 端连接，和在其 *-CO 端与 GLP-1 类似物的 K^{26} 或 K^{37} 的 ε 氨基连接。

[0454] 57. 实施方案 15-18 中任一项的衍生物，其中所述接头由通过酰胺键相互连接的 1 次 Chem. 6、1 次 Chem. 8（其中优选 q 是 4 和 R^2 是 NH_2）、1 次 Chem. 6 和 2 次 Chem. 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 *-CO 端连接，和在其 *-CO 端与 GLP-1 类似物的 K^{26} 或 K^{37} 的 ε 氨基连接。

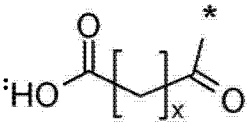
[0455] 58. 实施方案 1-57 中任一项的衍生物，其中所述延长部分是 Chem. 1。

[0456] 59. 实施方案 1-58 中任一项的衍生物，其中 x 是偶数。

[0457] 60. 实施方案 1-59 中任一项的衍生物，其中 x 是范围在 8-16 的整数，例如 8、10、12、14 或 16；或优选范围为 10-14。

[0458] 61. 实施方案 1-60 中任一项的衍生物，其中 x 是 10、12 或 14；优选 14；更优选 10；或最优选 12。

[0459] 62. 实施方案 1-61 中任一项的衍生物，其中 Chem. 1 以 Chem. 1a 表示：

[0460] Chem. 1a：，

[0461] 其中 x 如实施方案 1-61 中的任一项所定义。

[0462] 63. 实施方案 1-57 中任一项的衍生物，其中所述延长部分是 Chem. 2。

[0463] 64. 实施方案 1-63 中任一项的衍生物，其中 y 是奇数。

[0464] 65. 实施方案 1-64 中任一项的衍生物，其中 y 是范围在 7-17 的整数，例如 7、9、11、13、15 或 17；优选 7-15，例如 9、11 或 15。

[0465] 66. 实施方案 1-65、其中 y 是 7、8、9、11 或 15。

[0466] 67. 实施方案 1-66 中任一项的衍生物，其中 y 是 7、9、11 或 15。

[0467] 68. 实施方案 1-67 中任一项的衍生物，其中 y 是 7。

[0468] 69. 实施方案 1-68 中任一项的衍生物，其中 y 是 9。

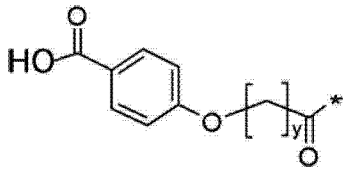
[0469] 70. 实施方案 1-69 中任一项的衍生物，其中 y 是 11。

[0470] 71. 实施方案 1-70 中任一项的衍生物，其中 y 是 15。

[0471] 72. 实施方案 1-71 中任一项的衍生物，其中 Chem. 2 以 Chem. 2a 或 Chem. 2b 表示：

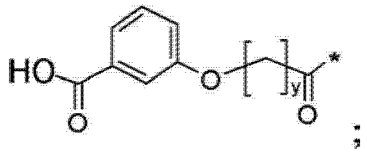
[0472] Chem. 2a：

[0473]



[0474] Chem. 2b：

[0475]



[0476] 优选以 Chem. 2a 表示；

[0477] 其中 y 如实施方案 1-71 中的任一项所定义。

[0478] 73. 实施方案 1-57 中任一项的衍生物，其中所述延长部分是 Chem. 3。

[0479] 74. 实施方案 1-73 中任一项的衍生物，其中 z 是奇数；优选 3。

[0480] 75. 实施方案 1-74 中任一项的衍生物，其中 R^1 是摩尔质量不高于 127Da 的基团。

[0481] 76. 实施方案 1-75 中任一项的衍生物，其中 R^1 是摩尔质量范围为 1-127Da 的基团；优选 1-125Da，更优选 1-100Da，甚至更优选 1-75Da，或最优选 1-50Da。

[0482] 77. 实施方案 1-76 中任一项的衍生物，其中 R^1 是摩尔质量如下的基团：

[0483] (ii) 摩尔质量低于 130Da，优选低于 100Da，更优选低于 75Da，甚至更优选低于 60Da，或最优选低于 50Da；或

[0484] (iii) 摩尔质量低于 40Da，优选低于 30Da，更优选低于 20Da，或最优选低于 15Da。

[0485] 78. 实施方案 1-77 中任一项的衍生物，其中 R^1 是 -H。

[0486] 79. 实施方案 1-78 中任一项的衍生物，其中 R^1 是卤基。

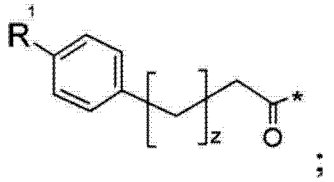
[0487] 80. 实施方案 1-79 中任一项的衍生物，其中 R^1 是 -I。

[0488] 81. 实施方案 1-80 中任一项的衍生物，其中 R^1 是直链或支链 C1-C5 烷基；优选 C1-C4 烷基；更优选甲基；或最优选叔丁基。

[0489] 82. 实施方案 1-81 中任一项的衍生物，其中 Chem. 3 以 Chem. 3a 表示：

[0490] Chem. 3a：

[0491]



[0492] 其中 R^1 和 z 如实施方案 1-81 中的任一项所定义。

[0493] 83. 实施方案 1-57 中任一项的衍生物，其中所述延长部分是 Chem. 4。

[0494] 84. 实施方案 1-83 中任一项的衍生物，其中 w 是偶数。

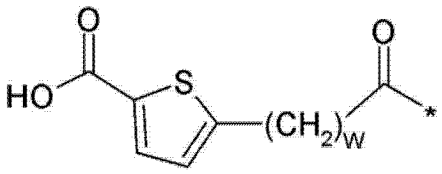
[0495] 85. 实施方案 1-84 中任一项的衍生物，其中 w 是范围在 8-16 的整数；或优选范围为 10-14。

[0496] 86. 实施方案 1-85 中任一项的衍生物，其中 w 是 10、12 或 14；优选 14；更优选 10；或最优选 12。

[0497] 87. 实施方案 1-86 中任一项的衍生物，其中 Chem. 4 以 Chem. 4a 表示：

[0498] Chem. 4a：

[0499]



[0500] 其中 w 如实施方案 1-86 中的任一项所定义。

[0501] 88. 实施方案 1-87 中任一项的衍生物，其中所述 2 个延长部分是基本相同的；例如至少 80％、至少 85％、至少 90％、至少 95％、或至少 99％相同。

[0502] 89. 实施方案 1-88 中任一项的衍生物，其中所述 2 个延长部分的相似性为至少 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，例如相似性为 1.0。

[0503] 90. 实施方案 1-89 中任一项的衍生物，其中所述 2 个接头是基本相同的；例如至少 80％、至少 85％、至少 90％、至少 95％、或至少 99％相同。

[0504] 91. 实施方案 1-90 中任一项的衍生物，其中所述 2 个接头的相似性为至少 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，例如相似性为 1.0。

[0505] 92. 实施方案 1-91 中任一项的衍生物，其中所述 2 个白蛋白结合部分，例如由延长部分和接头组成的 2 个侧链，是基本相同的；例如至少 80％、至少 85％、至少 90％、至少 95％、或至少 99％相同。

[0506] 93. 实施方案 1-92 中任一项的衍生物，其中所述 2 个白蛋白结合部分，例如由延长部分和接头组成的 2 个侧链，具有的相似性为至少 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，例如相似性为 1.0。

[0507] 94. 实施方案 88-93 中任一项的衍生物，其中所比较的 2 个化学结构被表示为指纹，例如 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。

[0508] 95. 实施方案 1-94 中任一项的衍生物，其中通过书写和目测来识别

[0509] a) 对应于 GLP-1(7-37)(SEQ ID NO：1) 的位置 37 和 26 的位置，和 / 或

[0510] b) 与 GLP-1(7-37)(SEQ ID NO：1) 相比的氨基酸修饰的编号。

[0511] 96. 实施方案 1-95 中任一项的衍生物，其中通过使用标准蛋白或肽比对程序而识别

[0512] a) 对应于 GLP-1(7-37)(SEQ ID NO：1) 的位置 37 和 26 的位置，和 / 或

[0513] b) 与 GLP-1(7-37)(SEQ ID NO：1) 相比的氨基酸修饰的编号。

[0514] 97. 实施方案 96 的衍生物，其中所述比对程序是 Needleman-Wunsch 比对。

[0515] 98. 实施方案 96-97 中任一项的衍生物，其中使用默认打分矩阵和默认特性矩阵。

[0516] 99. 实施方案 96-98 中任一项的衍生物，其中所述打分矩阵是 BLOSUM62。

[0517] 100. 实施方案 96-99 中任一项的衍生物，其中空位中第一残基的罚分是 -10（负十）。

[0518] 101. 实施方案 96-100 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）。

[0519] 102. 实施方案 1-101 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。

[0520] 103. 实施方案 1-102 中任一项的衍生物，其中所述氨基酸修饰是在对应于 GLP-1(7-37)(SEQ ID NO:1) 的以下位置上的一个或多个位置：7、8、9、23、30、31、34、36、37 和 38。

[0521] 104. 实施方案 1-103 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，最少 2 个氨基酸修饰；优选在对应于 GLP-1(7-37)(SEQ ID NO:1) 的位置 34 和 37 的每个位置上的最少 2 个氨基酸修饰，和更优选使得在对应于位置 37 的位置上的氨基酸是 K，在对应于位置 34 的位置上的氨基酸不是 K。

[0522] 105. 实施方案 1-104 中任一项的衍生物，其中所述 GLP-1 类似物具有 C- 端酰胺。

[0523] 106. 实施方案 105 的衍生物，其中在对应于位置 34 的位置上的氨基酸是 R 或 Q。

[0524] 107. 实施方案 1-106 中任一项的衍生物，其中所述氨基酸修饰选自以下：(R^{34} 或 Q^{34})、K^{37}、(Des^7 或 Imp^7)、(D-Ala^8、Des^8、Aib^8、G^8 或 S^8)、(Q^9 或 G^9)、R^{23}、E^{30}、H^{31}、G^{36} 和 / 或 (E^{38} 或 G^{38})。

[0525] 108. 实施方案 1-107 中任一项的衍生物，其中所述氨基酸修饰选自以下：(R^{34} 或 Q^{34})、K^{37}、(Des^7 或 Imp^7)、(Des^8 或 Aib^8)、(Q^9 或 G^9)、R^{23}、E^{30}、H^{31}、G^{36} 和 / 或 (E^{38} 或 G^{38})。

[0526] 109. 实施方案 1-108 中任一项的衍生物，其中所述类似物包含 (R^{34} 或 Q^{34}) 和 K^{37}。

[0527] 110. 实施方案 1-109 中任一项的衍生物，其中所述类似物包含 Imp^7 和 / 或 (Aib^8 或 S^8)；优选 Imp^7 和 / 或 Aib^8；更优选 Imp^7；或最优选 Aib^8。

[0528] 111. 实施方案 1-110 中任一项的衍生物，其中所述类似物包含 G^{38} 或 E^{38}，优选 E^{38}。

[0529] 112. 实施方案 1-111 中任一项的衍生物，其中所述类似物包含 Q^9 或 G^9。

[0530] 113. 实施方案 1-112 中任一项的衍生物，其中所述类似物包含 G^{36}。

[0531] 114. 实施方案 1-113 中任一项的衍生物，其中所述类似物包含 H^{31}。

[0532] 115. 实施方案 1-114 中任一项的衍生物，其中所述类似物包含 R^{23}。

[0533] 116. 实施方案 1-115 中任一项的衍生物，其中所述类似物包含 des^7 和 / 或 des^8，优选这两者。

[0534] 117. 实施方案 1-116 中任一项的衍生物，其中 1 个氨基酸在对应于 GLP-1(7-37)(SEQ ID NO:1) 的位置 7 的位置上已缺失。

[0535] 118. 实施方案 1-117 中任一项的衍生物，其中 1 个氨基酸在对应于 GLP-1(7-37)(SEQ ID NO:1) 的位置 8 的位置上已缺失。

[0536] 119. 实施方案 1-118 中任一项的衍生物，其中 2 个氨基酸在对应于 GLP-1(7-37)(SEQ ID NO:1) 的位置 7 和 8 的位置上已缺失。

[0537] 120. 实施方案 1-119 中任一项的衍生物，其是 GLP-1(8-37) 的类似物 (SEQ ID NO:1 的氨基酸 2-31)，与 GLP-1(7-37)(SEQ ID NO:1) 相比具有至多 10、9、8 或 6 个氨基酸修饰。

[0538] 121. 实施方案 1-120 中任一项的衍生物，其是 GLP-1(9-37) 的类似物（分别是 SEQ ID NO:1 的氨基酸 3-31），与 GLP-1(7-37)(SEQ ID NO:1) 相比具有至多 10、9、8 或 6 个氨基酸修饰。

[0539] 122. 实施方案 1-121 中任一项的衍生物，其中所述 GLP-1 类似物对应于 (a) K^{37}-GLP-1(7-37)，(b)K^{37}-GLP-1(8-37)，(c)K^{37}-GLP-1(9-37)，或 (d)(a)-(c) 中任一项的类似物，其与 GLP-1(7-37)(SEQ ID NO :1) 相比具有至多 10、9、8 或 6 个氨基酸修饰。

[0540] 123. 实施方案 1-122 中任一项的衍生物，其中 His 模拟物、而非 His 在对应于 GLP-1(7-37)(SEQ ID NO :1) 的位置 2 的位置上。

[0541] 124. 实施方案 1-123 中任一项的衍生物，其中 His-Ala 模拟物、而非 His-Ala 在对应于 GLP-1(7-37)(SEQ ID NO :1) 的位置 7 和 8 的位置上。

[0542] 125. 实施方案 123-124 中任一项的衍生物，其中所述 His 模拟物或 His-Ala 模拟物包含 a) 咪唑 ；或 b) 吡啶。

[0543] 126. 实施方案 125 的衍生物，其中所述咪唑是咪唑衍生物，其包含 *-CO 端，用于与所述类似物的 N- 端氨基酸的 *-NH 通过形成酰胺键而共价偶联。

[0544] 127. 实施方案 125 的衍生物，其中所述吡啶是吡啶衍生物，其包含 *-CO 端，用于与所述类似物的 N- 端氨基酸的 *-NH 通过形成酰胺键而共价偶联。

[0545] 128. 实施方案 125-127 中任一项的衍生物，其中所述咪唑衍生物是单取代的。

[0546] 129. 实施方案 125-127 中任一项的衍生物，其中所述吡啶衍生物是单取代的。

[0547] 130. 实施方案 125-129 中任一项的衍生物，其中所述咪唑衍生物被包含具有 1-6 个碳原子的低级烷基的羧酸基团在内的基团取代。

[0548] 131. 实施方案 125-129 中任一项的衍生物，其中所述吡啶衍生物被包含具有 1-6 个碳原子的低级烷基的羧酸基团在内的基团取代。

[0549] 132. 实施方案 130-131 中任一项的衍生物，其中所述羧酸基团选自乙酰基 ；和直链或支链丙酰基、丁酰基、戊酰基 ；优选乙酰基。

[0550] 133. 实施方案 1-132 中任一项的衍生物，其中在对应于 GLP-1(7-37)(SEQ ID NO :1) 的位置 8 的位置上的氨基酸残基具有连接在其 N 原子上的 3H- 咪唑 -4- 基 - 乙酰基。

[0551] 134. 实施方案 1-133 中任一项的衍生物，其中在对应于 SEQ IDNO :1 的位置 8 的位置上的氨基酸残基是丙氨酸。

[0552] 135. 实施方案 125-134 中任一项的衍生物，其中所述咪唑被 (甲基氨基甲酰基)-2- 甲基 - 丙酰基、(乙基氨基甲酰基)-2- 甲基 - 丙酰基、(丙基氨基甲酰基)-2- 甲基 - 丙酰基、或 (丁基氨基甲酰基)-2- 甲基 - 丙酰基取代 ；优选被 (乙基氨基甲酰基)-2- 甲基 - 丙酰基取代。

[0553] 136. 实施方案 1-135 中任一项的衍生物，其中在对应于 GLP-1(7-37)(SEQ ID NO :1) 的位置 9 的位置上的氨基酸残基具有连接在其 N 原子上的 {2-[2-(1H- 咪唑 -4- 基)- 乙基氨基甲酰基]-2- 甲基 - 丙酰基 }。

[0554] 137. 实施方案 125-136 中任一项的衍生物，其中所述吡啶被 (甲基氨基甲酰基)-2- 甲基 - 丙酰基、(乙基氨基甲酰基)-2- 甲基 - 丙酰基、(丙基氨基甲酰基)-2- 甲基 - 丙酰基、或 (丁基氨基甲酰基)-2- 甲基 - 丙酰基取代 ；优选被 (甲基氨基甲酰基)-2- 甲基 - 丙酰基取代。

[0555] 138. 实施方案 1-137 中任一项的衍生物，其中在对应于 GLP-1(7-37)(SEQ ID NO :1) 的位置 9 的位置上的氨基酸残基具有连接在其 N 原子上的 [2,2- 二甲基 -3- 氧代 -3-(吡啶 -2- 基甲氨基) 丙酰基]。

[0556] 139. 实施方案 1-138 中任一项的衍生物，其中在对应于 GLP-1 类似物的位置 9 的位置上的氨基酸残基是谷氨酸。

[0557] 140. 实施方案 1-139 中任一项的衍生物，其中所述类似物不含 (H^{31} 和 Q^{34})。

[0558] 141. 实施方案 1-140 中任一项的衍生物，其中所述类似物不含 (des^{7} 和 des^{8}) ；和 / 或不含 His- 模拟物，或 His-Ala 模拟物，其如实施方案 116-140 中的任一项所定义。

[0559] 142. 实施方案 1-141 中任一项的衍生物，其中所述类似物是 GLP-1(7-37) 或 GLP-1(9-37) 的类似物。

[0560] 143. 实施方案 1-142 中任一项的衍生物，其中与 GLP-1(7-37)(SEQ ID NO :1) 相比，所述类似物包含、优选具有以下氨基酸改变或修饰 :i)(34R,37K) ;ii)(8Aib,34R,37K) ; iii)(31H,34Q,37K) ;iv)(des7, des8,34R,37K)，和任选 38E ;或 v)(34R,36G,37K)。

[0561] 144. 实施方案 1-143 中任一项的衍生物，其中所述类似物最多具有 9 个氨基酸修饰。

[0562] 145. 实施方案 1-144 中任一项的衍生物，其中所述类似物最多具有 8 个氨基酸修饰。

[0563] 146. 实施方案 1-145 中任一项的衍生物，其中所述类似物最多具有 7 个氨基酸修饰。

[0564] 147. 实施方案 1-146 中任一项的衍生物，其中所述类似物最多具有 6 个氨基酸修饰。

[0565] 148. 实施方案 1-147 中任一项的衍生物，其中所述类似物最多具有 5 个氨基酸修饰。

[0566] 149. 实施方案 1-148 中任一项的衍生物，其中所述类似物最多具有 4 个氨基酸修饰。

[0567] 150. 实施方案 1-149 中任一项的衍生物，其中所述类似物最多具有 3 个氨基酸修饰。

[0568] 151. 实施方案 1-150 中任一项的衍生物，其中所述类似物最多具有 2 个氨基酸修饰。

[0569] 152. 实施方案 1-151 中任一项的衍生物，其中所述类似物至少具有 2 个氨基酸修饰。

[0570] 153. 实施方案 1-152 中任一项的衍生物，其中所述类似物至少具有 3 个氨基酸修饰。

[0571] 154. 实施方案 1-153 中任一项的衍生物，其中所述类似物至少具有 4 个氨基酸修饰。

[0572] 155. 实施方案 1-154 中任一项的衍生物，其中所述类似物至少具有 5 个氨基酸修饰。

[0573] 156. 实施方案 1-155 中任一项的衍生物，其中所述类似物至少具有 6 个氨基酸修饰。

[0574] 157. 实施方案 1-156 中任一项的衍生物，其中所述类似物至少具有 7 个氨基酸修饰。

[0575] 158. 实施方案 1-157 中任一项的衍生物，其中所述类似物至少具有 8 个氨基酸修

饰。

[0576] 159. 实施方案 1-158 中任一项的衍生物，其中所述类似物至少具有 9 个氨基酸修饰。

[0577] 160. 实施方案 1-159 中任一项的衍生物，其中所述类似物至少具有 10 个氨基酸修饰。

[0578] 161. 实施方案 1-160 中任一项的衍生物，其中所述类似物具有 1 个氨基酸修饰。

[0579] 162. 实施方案 1-161 中任一项的衍生物，其中所述类似物具有 2 个氨基酸修饰。

[0580] 163. 实施方案 1-162 中任一项的衍生物，其中所述类似物具有 3 个氨基酸修饰。

[0581] 164. 实施方案 1-163 中任一项的衍生物，其中所述类似物具有 4 个氨基酸修饰。

[0582] 165. 实施方案 1-164 中任一项的衍生物，其中所述类似物具有 5 个氨基酸修饰。

[0583] 166. 实施方案 1-165 中任一项的衍生物，其中所述类似物具有 6 个氨基酸修饰。

[0584] 167. 实施方案 1-166 中任一项的衍生物，其中所述类似物具有 7 个氨基酸修饰。

[0585] 168. 实施方案 1-167 中任一项的衍生物，其中所述类似物具有 8 个氨基酸修饰。

[0586] 169. 实施方案 1-169 中任一项的衍生物，其中所述类似物具有 9 个氨基酸修饰。

[0587] 170. 实施方案 1-170 中任一项的衍生物，其中所述类似物具有 10 个氨基酸修饰。

[0588] 171. 实施方案 1-171 中任一项的衍生物，其中所述修饰独立地为取代、添加、和 / 或缺失。

[0589] 172. 实施方案 1-172 中任一项的衍生物，其中所述修饰是取代。

[0590] 173. 实施方案 1-173 中任一项的衍生物，其中所述修饰是缺失。

[0591] 174. 实施方案 1-174 中任一项的衍生物，其中所述修饰是添加。

[0592] 175. 实施方案 1-174 中任一项的衍生物，其中通过书写和目测来识别

[0593] a) 对应于 GLP-1(7-37)(SEQ ID NO :1) 的任何指定位置的位置，和 / 或

[0594] b) 与 GLP-1(7-37)(SEQ ID NO :1) 相比的氨基酸修饰的编号。

[0595] 176. 实施方案 1-175 中任一项的衍生物，其中按照实施方案 96-101 中的任一项所述而识别

[0596] a) 对应于 GLP-1(7-37)(SEQ ID NO :1) 的任何指定位置的位置，和 / 或

[0597] b) 与 GLP-1(7-37)(SEQ ID NO :1) 相比的氨基酸修饰的编号。

[0598] 177. 一种选自以下的化合物或其药学上可接受的盐、酰胺或酯 :Chem. 20、Chem. 21、Chem. 22、Chem. 23、Chem. 24、Chem. 25、Chem. 26、Chem. 27、Chem. 28、Chem. 29、Chem. 30、Chem. 31、Chem. 32、Chem. 33、Chem. 34、Chem. 35、Chem. 36、Chem. 37、Chem. 38、Chem. 39、Chem. 40、Chem. 41、Chem. 42、Chem. 43、Chem. 44、Chem. 45、Chem. 46、Chem. 47、Chem. 48、Chem. 49、Chem. 50、Chem. 51、Chem. 52、Chem. 53、Chem. 54、Chem. 55、Chem. 56、Chem. 57、Chem. 58、Chem. 59、Chem. 60、Chem. 61、Chem. 62、Chem. 63、Chem. 64、Chem. 65、Chem. 66、Chem. 67、和 Chem. 68。

[0599] 178. 一种化合物，其因其名称而辨别并选自本文实施例 1-49 化合物的名称列表或其药学上可接受的盐、酰胺或酯。

[0600] 179. 实施方案 178 的化合物，其是实施方案 177 的化合物。

[0601] 180. 实施方案 178 和 179 中任一项的化合物，其是实施方案 1-176 中任一项的衍生物。

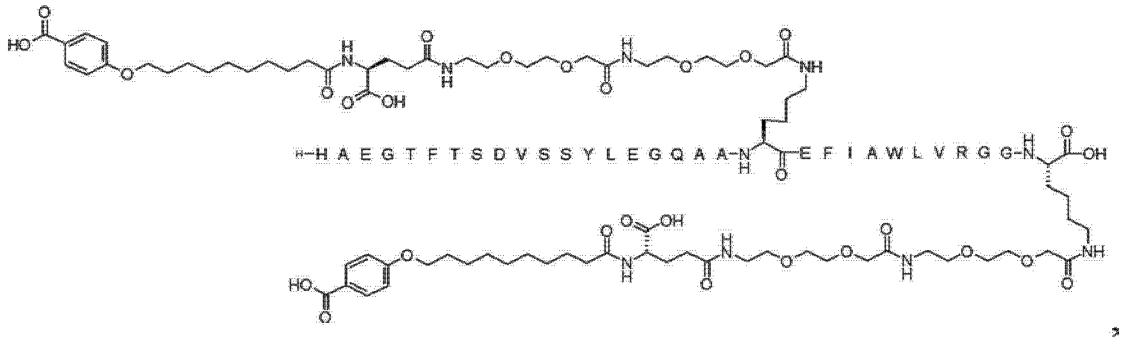
[0602] 181. 实施方案 1-180 中任一项的衍生物或任何这些化合物的药学上可接受的盐、酰胺或酯，所述衍生物选自以下：

[0603] (i)

[0604] $N^{\varepsilon 26}$-[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], $N^{\varepsilon 37}$-[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]-[Arg^{34}, Gly^{36}, Lys^{37}]-GLP-1-(7-37)-肽，

[0605] Chem.62：

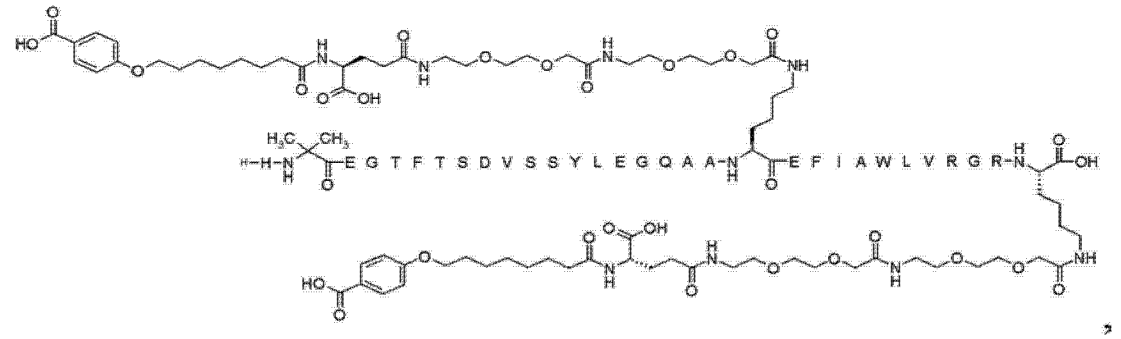
[0606]



[0607] $N^{\varepsilon 26}$-[2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[(4S)-4-羧基-4-[8-(4-羧基苯氧基)辛酰基氨基]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], $N^{\varepsilon 37}$-[2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[(4S)-4-羧基-4-[8-(4-羧基苯氧基)辛酰基氨基]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]-[Aib^{8}, Arg^{34}, Lys^{37}]-GLP-1-(7-37)-肽，

[0608] Chem.58：

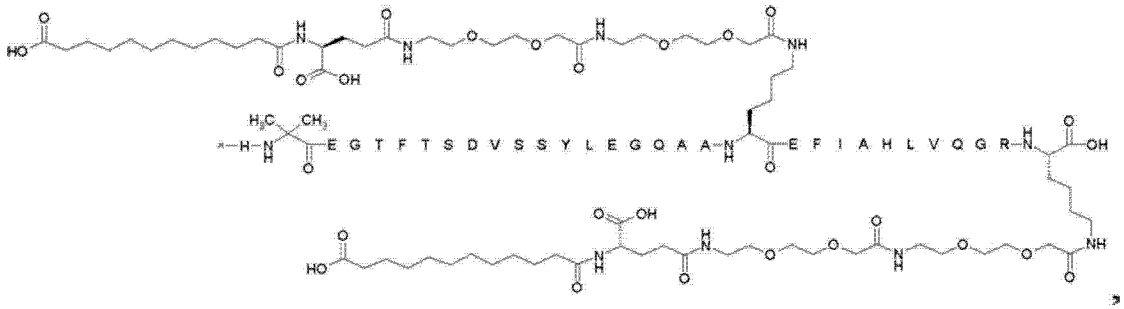
[0609]



[0610] $N^{\varepsilon 26}$-[2-(2-{2-[2-(2-{2-[(S)-4-羧基-4-(11-羧基十一烷酰基氨基)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], $N^{\varepsilon 37}$-[2-(2-{2-[2-(2-{2-[(S)-4-羧基-4-(11-羧基十一烷酰基氨基)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][Aib^{8}, His^{31}, Gln^{34}, Lys^{37}]GLP-1(7-37)-肽，

[0611] Chem.40：

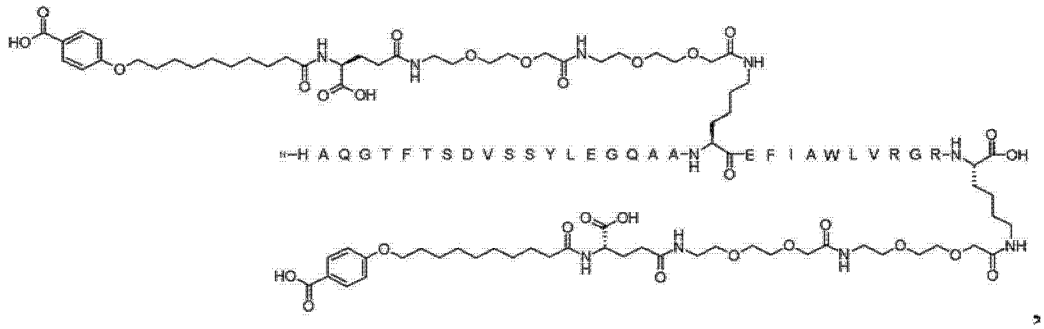
[0612]



[0613] $N^{\varepsilon 26}$-[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], $N^{\varepsilon 37}$-[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]-[Gln^{9}, Arg^{34}, Lys^{37}]-GLP-1-(7-37)-肽,

[0614] Chem.56 :

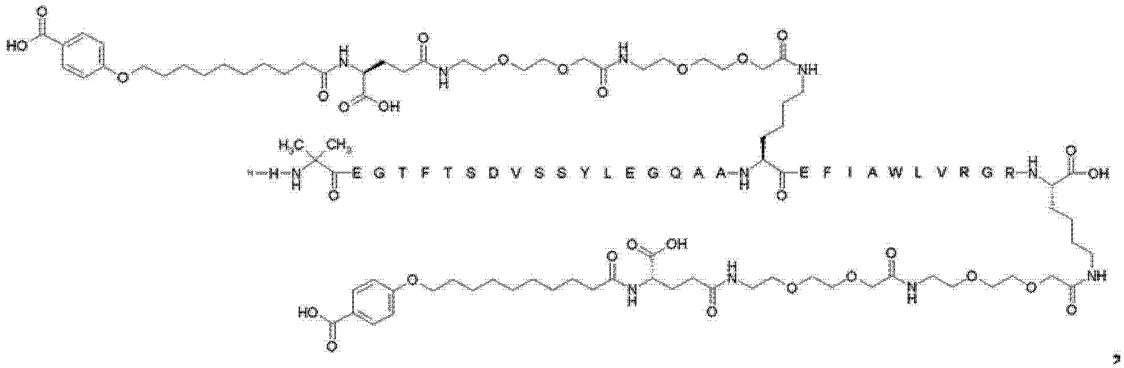
[0615]



[0616] $N^{\varepsilon 26}${2-[2-(2-{2-[2-(2-{(S)-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}, $N^{\varepsilon 37}$-{2-[2-(2-{2-[2-(2-{(S)-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}-[Aib^{8}, Arg^{34}, Lys^{37}]GLP-1(7-37)-肽,

[0617] Chem.21 :

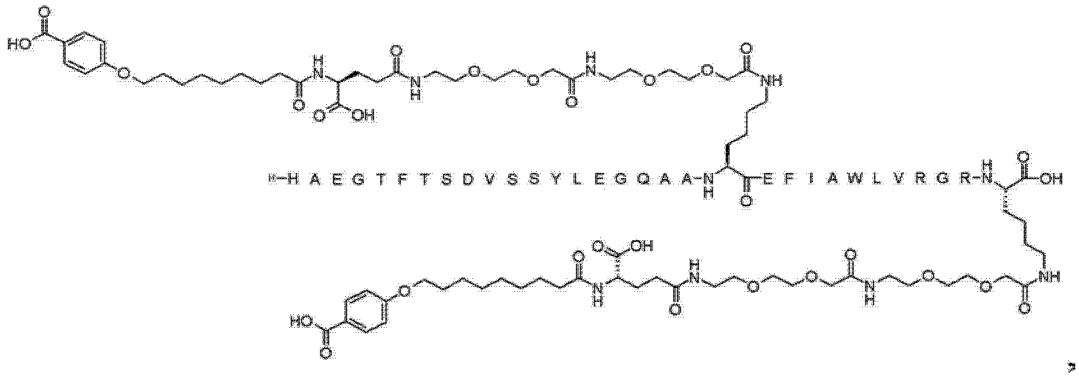
[0618]



[0619] $N^{\varepsilon 26}$-[2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[(4S)-4-羧基-4-[9-(4-羧基苯氧基)壬酰基氨基]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],$N^{\varepsilon 37}$-[2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[(4S)-4-羧基-4-[9-(4-羧基苯氧基)壬酰基氨基]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]-[Arg^{34},Lys^{37}]-GLP-1-(7-37)-肽,

[0620] Chem.63：

[0621]

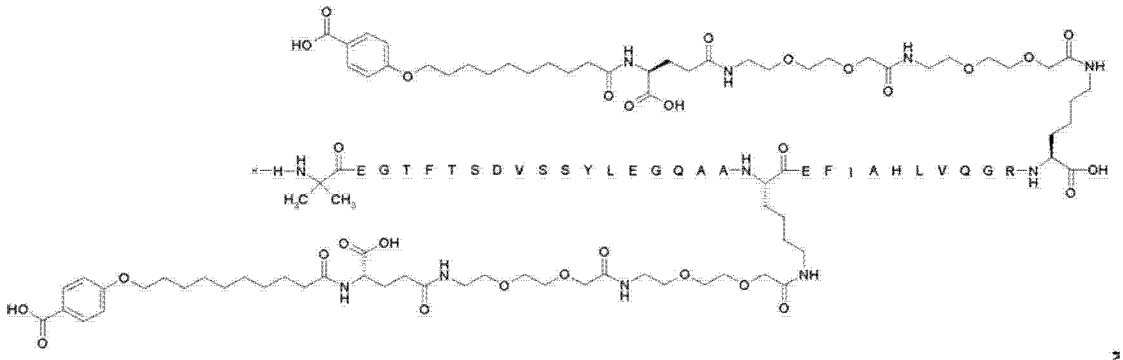


[0622] $N^{\varepsilon 26}$-[2-(2-[2-(2-[2-(2-[4-(10-(4-羧基苯氧基）癸酰基氨基）-4(S)-羧基丁酰基氨基］乙氧基）乙氧基］乙酰基氨基）乙氧基］乙氧基）乙酰基]-

[0623] $N^{\varepsilon 37}$-[2-(2-[2-(2-[2-(2-[4-(10-(4-羧基苯氧基）癸酰基氨基）-4(S)-羧基丁酰基氨基］乙氧基）乙氧基］乙酰基氨基）乙氧基］乙氧基）乙酰基][Aib^{8},His^{31},Gln^{34},Lys^{37}]GLP-1(7-37)-肽，

[0624] Chem.36：

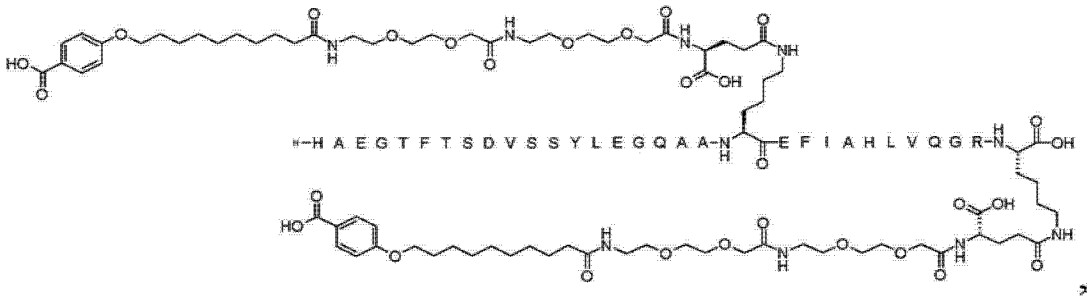
[0625]



[0626] $N^{\varepsilon 26}$-[(4S)-4-羧基-4-[[2-[2-[2-[[2-[2-[2-[10-(4-羧基苯氧基）癸酰基氨基］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]，$N^{\varepsilon 37}$-[(4S)-4-羧基-4-[[2-[2-[2-[[2-[2-[2-[10-(4-羧基苯氧基）癸酰基氨基］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]-[His^{31},Gln^{34},Lys^{37}]-GLP-1-(7-37)-肽，

[0627] Chem.55：

[0628]

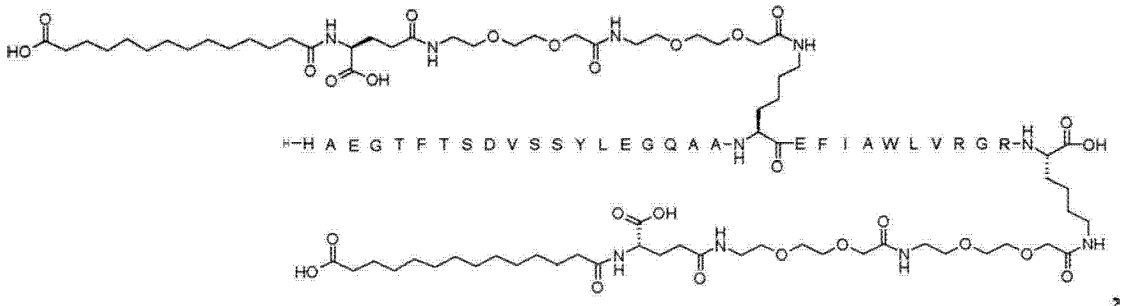


[0629] $N^{\varepsilon 26}$-[2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[(4S)-4-羧基-4-(13-羧基十三烷酰基氨基）丁酰

基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基],$N^{\varepsilon 37}$-[2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[(4S)-4-羧基-4-(13-羧基十三烷酰基氨基)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]-[Arg34,Lys37]-GLP-1-(7-37)-肽,

[0630] Chem.51:

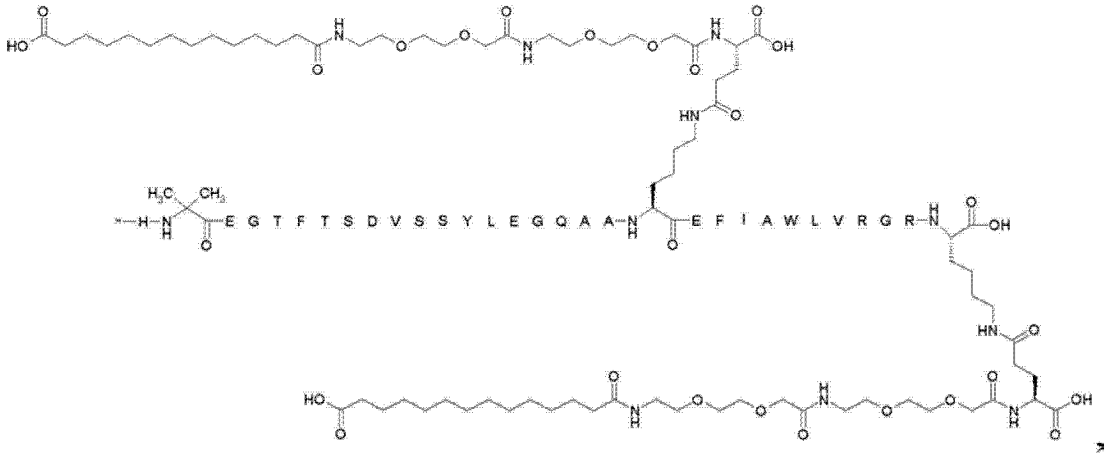
[0631]



[0632] $N^{\varepsilon 26}$-[(S)-4-羧基-4-{2-[2-(2-[2-(2-{2-[(13-羧基十三烷酰基氨基)]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],$N^{\varepsilon 37}$-[(S)-4-羧基-4-{2-[2-(2-[2-(2-{2-[(13-羧基十三烷酰基氨基)]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][Aib^{8},Arg^{34},Lys^{37}]GLP-1(7-37)-肽,

[0633] Chem.44:

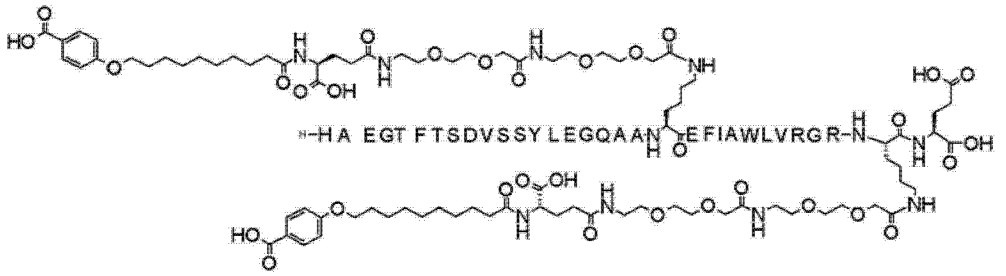
[0634]



[0635] $N^{\varepsilon 26}$-[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],$N^{\varepsilon 37}$-[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]-[Arg^{34},Lys^{37}]-GLP-1-(7-37)-肽酰基-Glu,和

[0636] Chem.64:

[0637]

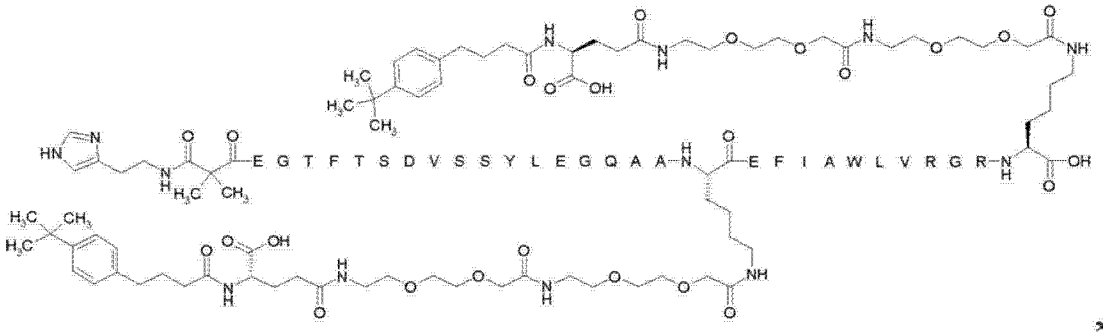


(ii)

[0638] N^{9}-{2-[2-(1H-咪唑-4-基)-乙基氨基甲酰基]-2-甲基丙酰基}-$N^{\varepsilon 26}$-{2-[2-(2-{2-[2-(2-{(S)-4-[4-(4-叔丁基苯基)丁酰基氨基]-4-羧基丁酰基氨基}乙氧基)乙氧基]乙酰基氨基}乙氧基)乙氧基]乙酰基},$N^{\varepsilon 37}$-{2-[2-(2-{2-[2-(2-{(S)-4-[4-(4-叔丁基苯基)丁酰基氨基]-4-羧基丁酰基氨基}乙氧基)乙氧基]乙酰基氨基}乙氧基)乙氧基]乙酰基}[Arg^{34},Lys^{37}]GLP-1(9-37)-肽,

[0639] Chem.46 :

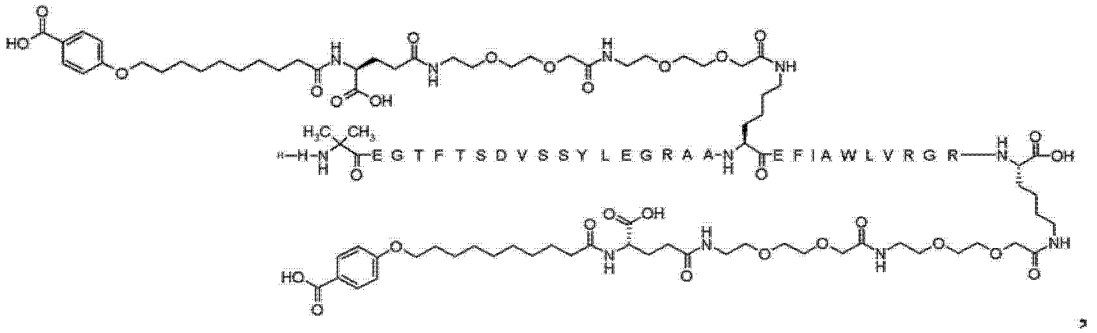
[0640]



[0641] $N^{\varepsilon 26}$-[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],$N^{\varepsilon 37}$-[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]-[Aib^{8},Arg^{23},Arg^{34},Lys^{37}]-GLP-1-(7-37)-肽,

[0642] Chem.50 :

[0643]

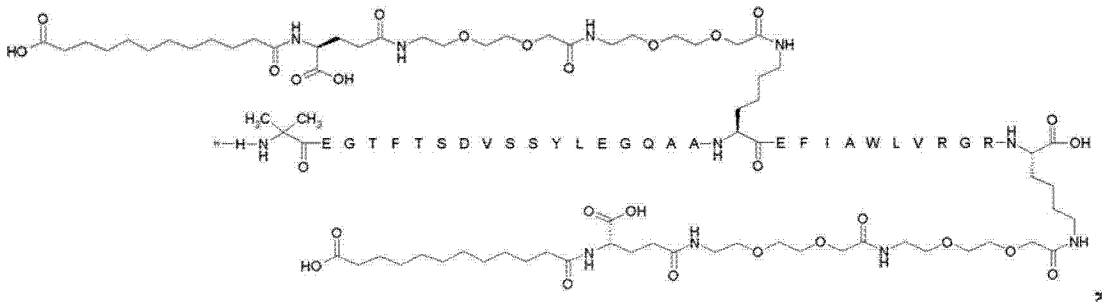


[0644] $N^{\varepsilon 26}$-[2-(2-{2-[2-(2-{2-[(S)-4-羧基-4-(11-羧基十一烷酰基氨基)丁酰基氨基]乙氧基}乙氧基)乙酰基氨基]乙氧基}乙氧基)乙酰基],$N^{\varepsilon 37}$-[2-(2-{2-[2-(2-{2-[(S)-4-羧基-4-(11-羧基十一烷酰基氨基)丁酰基氨基]乙氧

基}乙氧基）乙酰基氨基]乙氧基}乙氧基）乙酰基][Aib^{8},Arg^{34},Lys^{37}]GLP-1(7-37)-肽，

[0645] Chem.24：

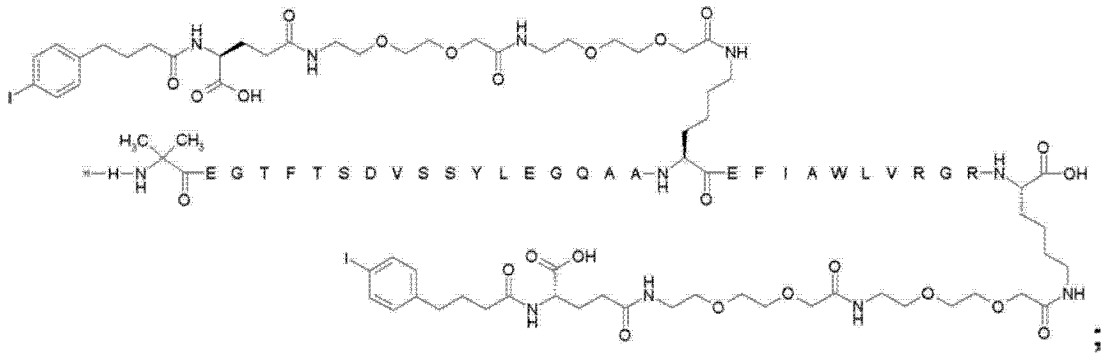
[0646]



[0647] N$^{\varepsilon 26}$-{2-[2-(2-{2-[2-(2-{(S)-4-羧基-4-[4-(4-碘-苯基)-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$^{\varepsilon 37}$-{2-[2-(2-{2-[2-(2-{(S)-4-羧基-4-[4-(4-碘-苯基)-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}[Aib^{8},Arg^{34},Lys^{37}]GLP-1(7-37)-肽，和

[0648] Chem.31：

[0649]

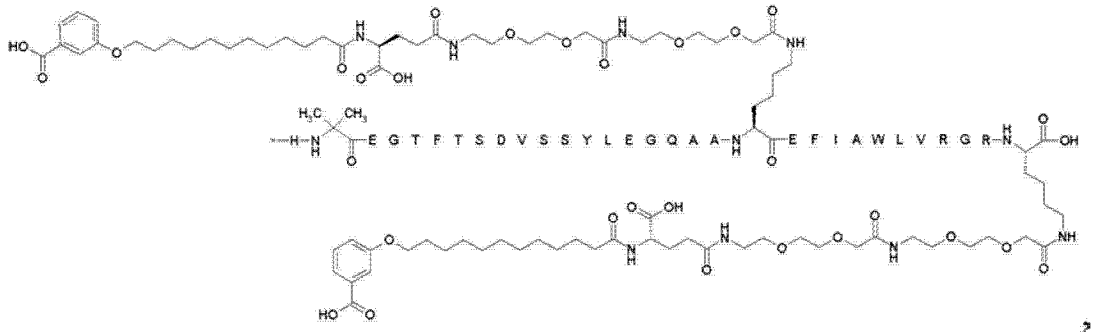


[0650] (iii)

[0651] N$^{\varepsilon 26}$-{2-[2-(2-{2-[2-(2-{(S)-4-羧基-4-[12-(3-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$^{\varepsilon 37}$-{2-[2-(2-{2-[2-(2-{(S)-4-羧基-4-[12-(3-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}[Aib^{8},Arg^{34},Lys^{37}]GLP-1(7-37)-肽，

[0652] Chem.35：

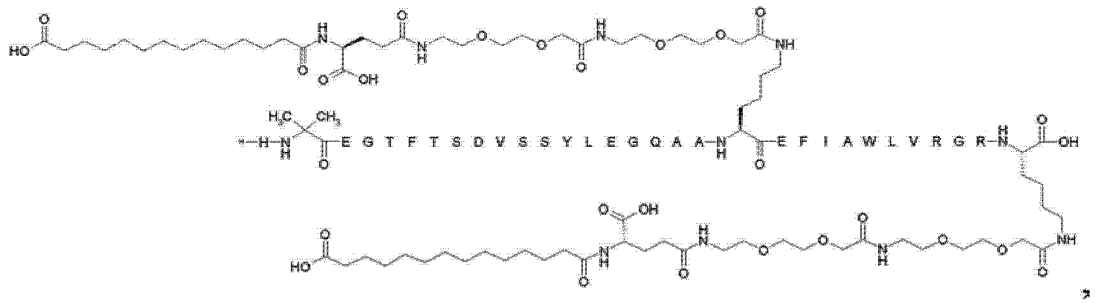
[0653]



[0654] $N^{\varepsilon 26}$-[2-(2-{2-[2-(2-{2-[(S)-4-羧基-4-(13-羧基十三烷酰基氨基)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], $N^{\varepsilon 37}$[2-(2-{2-[2-(2-{2-[(S)-4-羧基-4-(13-羧基十三烷酰基氨基)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][Aib^{8},Arg^{34},Lys^{37}]GLP-1(7-37)-肽,

[0655] Chem.23：

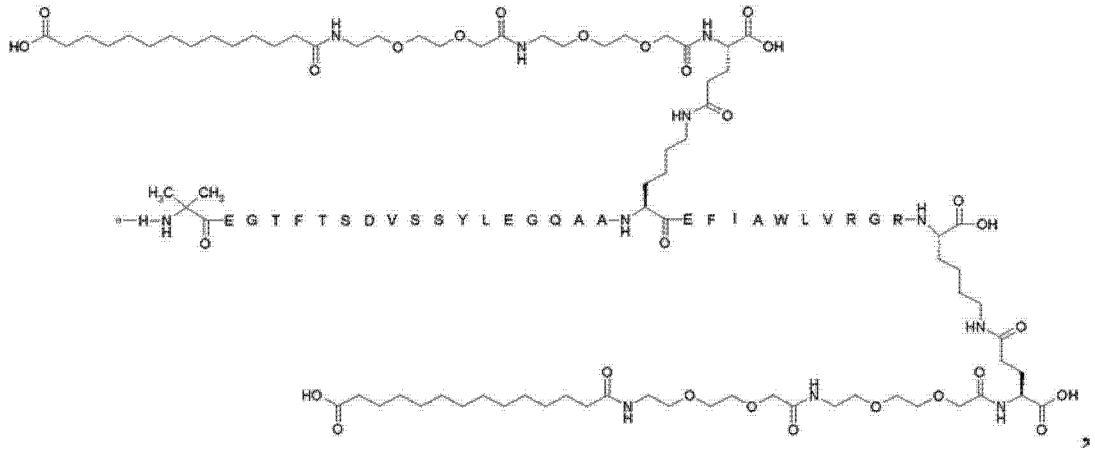
[0656]



[0657] $N^{\varepsilon 26}$-[(S)-4-羧基-4-{2-[2-(2-[2-(2-{2-[(13-羧基十三烷酰基氨基)]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], $N^{\varepsilon 37}$-[(S)-4-羧基-4-{2-[2-(2-[2-(2-{2-[(13-羧基十三烷酰基氨基)]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][Aib^{8},Arg^{34},Lys^{37}]GLP-1(7-37)-肽,

[0658] Chem.44：

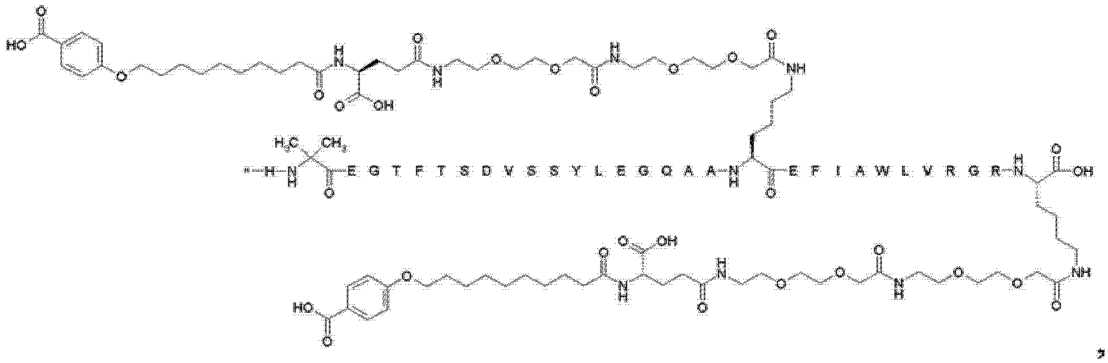
[0659]



[0660] $N^{\varepsilon 26}${2-[2-(2-{2-[2-(2-{(S)-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}, $N^{\varepsilon 37}$-{2-[2-(2-{2-[2-(2-{(S)-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}-[Aib^{8},Arg^{34},Lys^{37}]GLP-1(7-37)-肽,

[0661] Chem.21：

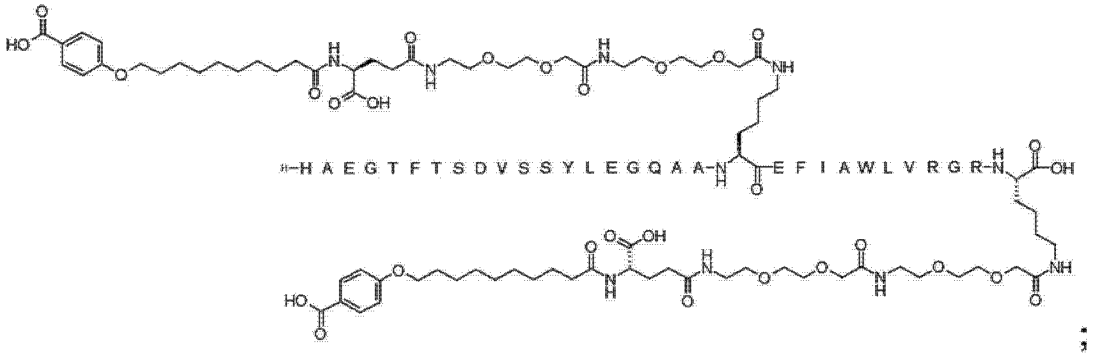
[0662]



[0663] $N^{\varepsilon 26}$-[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],$N^{\varepsilon 37}$-[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]-[Arg^{34},Lys^{37}]-GLP-1-(7-37)-肽,和

[0664] Chem.48:

[0665]

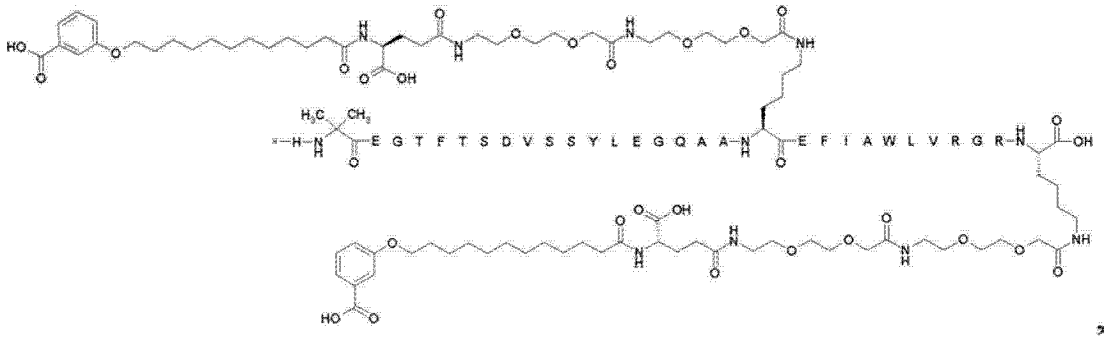


(iv)

[0666] $N^{\varepsilon 26}$-{2-[2-(2-{2-[2-(2-{(S)-4-羧基-4-[12-(3-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},$N^{\varepsilon 37}$-{2-[2-(2-{2-[2-(2-{(S)-4-羧基-4-[12-(3-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}[Aib^{8},Arg^{34},Lys^{37}]GLP-1(7-37)-肽,

[0667] Chem.35:

[0668]

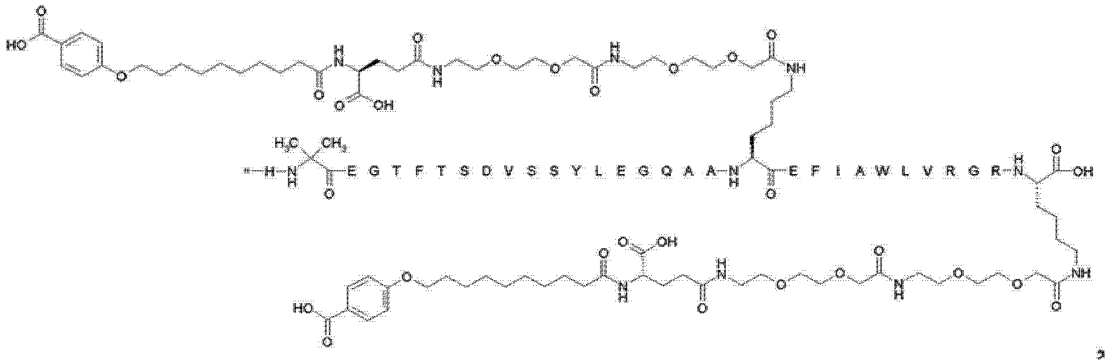


[0669] $N^{\varepsilon 26}${2-[2-(2-{2-[2-(2-{(S)-4-羧基-4-[10-(4-羧基苯氧基)癸酰基氨基]丁酰基氨基}乙氧基)乙氧基]乙酰基氨基}乙氧基)乙氧基]乙酰基},

$N^{\varepsilon 37}$-{2-[2-(2-{2-[2-(2-{(S)-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}-[Aib^{8}, Arg^{34}, Lys^{37}]GLP-1(7-37)-肽,

[0670] Chem.21：

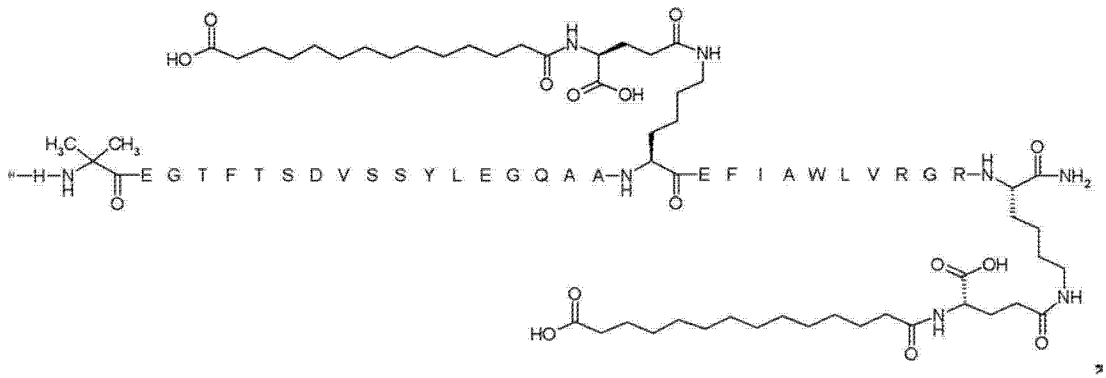
[0671]



[0672] $N^{\varepsilon 26}$-[2-{2-[(S)-4-羧基-4-(13-羧基十三烷酰基氨基)丁酰基氨基]], $N^{\varepsilon 37}$-[2-{2-[(S)-4-羧基-4-(13-羧基十三烷酰基氨基)丁酰基氨基]][Aib^{8},Arg^{34},Lys^{37}]GLP-1(7-37)-肽酰胺,

[0673] Chem.29：

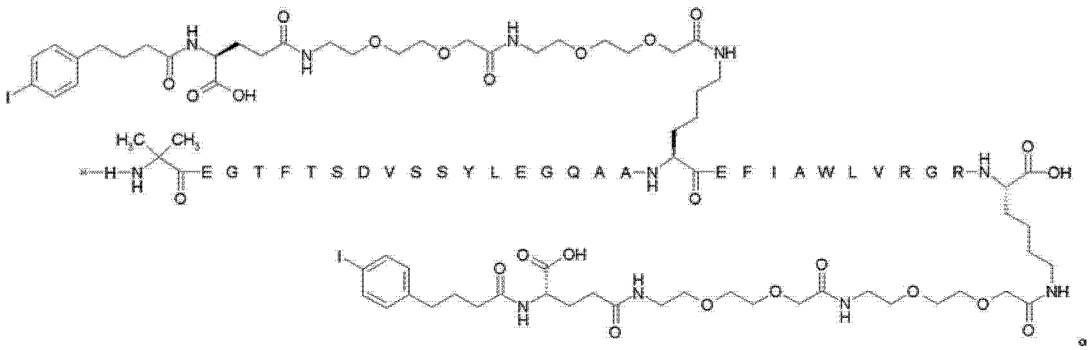
[0674]



[0675] $N^{\varepsilon 26}$-{2-[2-(2-{2-[2-(2-{(S)-4-羧基-4-[4-(4-碘-苯基)-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}, $N^{\varepsilon 37}$-{2-[2-(2-{2-[2-(2-{(S)-4-羧基-4-[4-(4-碘-苯基)-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}[Aib^{8},Arg^{34},Lys^{37}]GLP-1(7-37)-肽,和

[0676] Chem.31：

[0677]



[0678] 182. 实施方案 181 的衍生物，其是 Chem.62 或其药学上可接受的盐、酰胺或酯。

[0679] 183. 实施方案 181 的衍生物，其是 Chem.40 或其药学上可接受的盐、酰胺或酯。

[0680] 184. 实施方案 181 的衍生物，其是 Chem.21 或其药学上可接受的盐、酰胺或酯。

[0681] 185. 实施方案 181 的衍生物，其是 Chem.55 或其药学上可接受的盐、酰胺或酯。

[0682] 186. 实施方案 181 的衍生物，其是 Chem.51 或其药学上可接受的盐、酰胺或酯。

[0683] 187. 实施方案 181 的衍生物，其是 Chem.44 或其药学上可接受的盐、酰胺或酯。

[0684] 188. 实施方案 181 的衍生物，其是 Chem.46 或其药学上可接受的盐、酰胺或酯。

[0685] 189. 实施方案 181 的衍生物，其是 Chem.31 或其药学上可接受的盐、酰胺或酯。

[0686] 190. 实施方案 181 的衍生物，其是 Chem.35 或其药学上可接受的盐、酰胺或酯。

[0687] 191. 实施方案 181 的衍生物，其是 Chem.23 或其药学上可接受的盐、酰胺或酯。

[0688] 192. 实施方案 1-191 中任一项的衍生物，其具有 GLP-1 活性。

[0689] 193. 实施方案 192 的衍生物，其中 GLP-1 活性是指活化 GLP-1 受体的能力。

[0690] 194. 实施方案 193 的衍生物，其中在体外测定中检测 GLP-1 受体的活化，作为 cAMP 产生的功效。

[0691] 195. 实施方案 1-194 中任一项的衍生物，其功效对应于 EC_{50}

[0692] a) 低于 10000pM，更优选低于 5000pM，甚至更优选低于 4000pM，或最优选低于 3000pM；

[0693] b) 在或低于 3000pM，优选低于 3000pM，更优选低于 2500pM，甚至更优选低于 2000pM，或最优选低于 1500pM；

[0694] c) 低于 2000pM，优选低于 1000pM，更优选低于 800pM，甚至更优选低于 600pM，或最优选低于 500pM；

[0695] c) 低于 400pM，优选低于 300pM，更优选低于 200pM，甚至更优选低于 150pM，或最优选低于 100pM；

[0696] d) 低于 80pM，优选低于 60pM，更优选低于 50pM，甚至更优选低于 40pM，或最优选低于 30pM；或其功效对应于 EC_{50}

[0697] e) 小于 10 倍的塞马鲁肽的 EC_{50}，优选小于 8 倍的塞马鲁肽的 EC_{50}，更优选小于 6 倍的塞马鲁肽的 EC_{50}，甚至更优选小于 4 倍的塞马鲁肽的 EC_{50}，或最优选小于 2 倍的塞马鲁肽的 EC_{50}；

[0698] f) 小于 10 倍的利拉鲁肽的 EC_{50}，优选小于 8 倍的利拉鲁肽的 EC_{50}，更优选小于 6 倍的利拉鲁肽的 EC_{50}，甚至更优选小于 4 倍的利拉鲁肽的 EC_{50}，或最优选小于 2 倍的利拉鲁肽的 EC_{50}；或

[0699] g) 小于利拉鲁肽的 EC_{50}，优选小于 0.8 倍的利拉鲁肽的 EC_{50}，更优选小于 0.6 倍的

利拉鲁肽的 EC_{50}，甚至更优选小于 0.5 倍的利拉鲁肽的 EC_{50}，或最优选小于 0.4 倍的利拉鲁肽的 EC_{50} 或就是 0.4 倍的利拉鲁肽的 EC_{50}。

[0700] 196. 实施方案 1-195 中任一项的衍生物，其中对于剂量 - 反应曲线所述功效测定为 EC_{50}，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例如 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，在所述测定中使用特异性抗体能更优选捕获 cAMP，和 / 或其中甚至更优选的测定是 AlphaScreen cAMP 测定，最优选的一种描述于实施例 50。

[0701] 197. 实施方案 1-196 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 (IC_{50})，除以在 0.005％ HSA(低白蛋白) 存在下的 GLP-1 受体结合亲和力 (IC_{50})] 为 :

[0702] a) 至少 0.5，优选至少 1.0，更优选至少 10，甚至更优选至少 20，或最优选至少 30 ;

[0703] b) 至少 40，优选至少 50，更优选至少 60，甚至更优选至少 70，或最优选至少 80 ;

[0704] c) 至少 90，优选至少 100，更优选至少 200，还更优选至少 300，甚至更优选至少 400，或最优选至少 500 ;

[0705] d) 至少 120，优选至少 140，甚至更优选至少 160，或最优选至少 180 ;

[0706] e) 塞马鲁肽比率的至少 20％，优选塞马鲁肽比率的至少 50％，更优选塞马鲁肽比率的至少 75％，或最优选至少等于塞马鲁肽比率 ;或

[0707] f) 至少等于利拉鲁肽的比率，优选利拉鲁肽比率的至少 2 倍，更优选利拉鲁肽比率的至少 3 倍，甚至更优选利拉鲁肽比率的至少 4 倍，或最优选利拉鲁肽比率的至少 5 倍。

[0708] 198. 实施方案 1-197 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 (IC_{50}) 为

[0709] a) 低于 1000.00nM，优选低于 600.00nM，更优选低于 100.00nM，或最优选低于 50.00nM ;或

[0710] b) 低于 20.00nM，优选低于 10.00nM，更优选低于 5.00nM，甚至更优选低于 2.00nM，或最优选低于 1.00nM。

[0711] 199. 实施方案 1-198 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 (IC_{50}) 为

[0712] a) 低于 1100.00nM，优选在或低于 1000.00nM，更优选低于 800.00nM，或最优选低于 600nM ;或

[0713] b) 低于 400.00nM，优选低于 300.00nM，更优选低于 200.00nM，甚至更优选低于 100.00nM，或最优选低于 50.00nM。

[0714] 200. 实施方案 1-199 中任一项的衍生物，其中通过从所述受体中取代 ^{125}I-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。

[0715] 201. 实施方案 1-200 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例如 BHK tk-ts13 来制备所述 GLP-1 受体。

[0716] 202. 实施方案 1-201 中任一项的衍生物，其中测定的所述 IC_{50} 值是从所述受体中取代 50％ ^{125}I-GLP-1 时的浓度。

[0717] 203. 实施方案 1-202 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。

[0718] 204. 实施方案 203 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。

[0719] 205. 实施方案 1-204 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 30min 的剂量校正暴露)，为至少 40，优选至少 50，更优选至少 60，还更优选至少 70，甚至更优选至少 80，或最优选至少 100。

[0720] 206. 实施方案 1-205 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 30min 的剂量校正暴露)，为至少 110，优选至少 120，更优选至少 130，还更优选至少 140，甚至更优选至少 150，或最优选至少 160。

[0721] 207. 实施方案 1-206 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 30min 的剂量校正暴露)，为至少 180，优选至少 190，更优选至少 200，或最优选至少 210。

[0722] 208. 实施方案 1-207 中任一项的衍生物，其中在与 55mg/ml 癸酸钠的混合物中以 1000uM 浓度测定所述 GLP-1 衍生物。

[0723] 209. 实施方案 1-208 中任一项的衍生物，其中使用雄性 Sprague Dawley 大鼠，优选到货时体重为大约 240g。

[0724] 210. 实施方案 1-209 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。

[0725] 211. 实施方案 1-210 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。

[0726] 212. 实施方案 1-211 中任一项的衍生物，其中在空肠的近端部分（十二指肠的 10cm 远端）或在中肠（盲肠的 50cm 近端）给予所述衍生物。

[0727] 213. 实施方案 1-212 中任一项的衍生物，其中用 1ml 注射器，通过导管将 100μl 所述衍生物注射到空肠腔内，再用另一注射器将 200μl 空气推入空肠腔内，然后让其不与导管的连接以防流回到导管中。

[0728] 214. 实施方案 1-213 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 (200ul) 到 EDTA 管，例如在 0、10、30、60、120 和 240min，并在 20 分钟内在 10000G 在 4℃离心 5 分钟。

[0729] 215. 实施方案 1-214 中任一项的衍生物，其中分离血浆 (75ul)，立即冷冻并保存在 -20℃，直到用于分析所述衍生物的血浆浓度。

[0730] 216. 实施方案 1-215 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。

[0731] 217. 实施方案 1-216 中任一项的衍生物，其中所述衍生物在 db/db 小鼠体内能有效降低血糖。

[0732] 218. 实施方案 1-217 中任一项的衍生物，其中所述衍生物在 db/db 小鼠体内能有效降低体重。

[0733] 219. 实施方案 1-218 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。

[0734] 220. 实施方案 1-219 中任一项的衍生物，其中所述 GLP-1 衍生物的剂量是 0.3nmol/kg、1.0nmol/kg、3.0nmol/kg、10nmol/kg、30nmol/kg 和 100nmol/kg，其中 kg 是指小鼠体重。

[0735] 221. 实施方案 1-220 中任一项的衍生物，其中用溶媒经 s.c 治疗对照组、优选用溶解了所述 GLP-1 衍生物的介质，例如使用以下组成 :50mM 磷酸钠，145mM 氯化钠，0.05％吐温 80，pH7.4。

[0736] 222. 实施方案 1-221 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 -1/2h（给药 (t = 0) 之前半小时）以及 1、2、4、8、24、48、72 和 96h。

[0737] 223. 实施方案 1-222 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。

[0738] 224. 实施方案 1-223 中任一项的衍生物，其中

[0739] (i)ED_{50}（体重 (BW)）是以经皮下给予衍生物后 24 小时 BW 的变量（例如降低）达到最大效应的一半时的剂量来计算 ;和 / 或

[0740] (ii)ED_{50}（血糖 (BG)）是以经皮下给予衍生物后 8 小时 AUC（曲线下面积）的变量达到最大效应的一半时的剂量来计算。

[0741] 225. 实施方案 1-224 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限定。

[0742] 226. 实施方案 1-225 中任一项的衍生物，其具有比利拉鲁肽更延长的作用特征。

[0743] 227. 实施方案 226 的衍生物，其中延长是指在例如 db/db 小鼠、大鼠、猪和 / 或优选小型猪等相关动物物种中的体内半衰期 ;其中经以下途径给予所述衍生物 :i)s.c，和 / 或优选，ii)s.c。

[0744] 228. 实施方案 1-227 中任一项的衍生物，其在经 i.v. 给予小型猪后的终末半衰期 ($T_{1/2}$) 为

[0745] 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 ;

[0746] 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 ;

[0747] c) 至少 44 小时，优选至少 55 小时，更优选至少 66 小时，甚至更优选至少 77 小时，或最优选至少 88 小时 ;或

[0748] d) 塞马鲁肽半衰期的至少 0.2 倍，优选塞马鲁肽半衰期的至少 0.4 倍，更优选塞马鲁肽半衰期的至少 0.6 倍，甚至更优选塞马鲁肽半衰期的至少 0.8 倍，或最优选至少等于塞马鲁肽的半衰期。

[0749] 229. 实施方案 228 的衍生物，其中所述小型猪是雄性Göttingen小型猪。

[0750] 230. 实施方案 227-229 中任一项的衍生物，其中所述小型猪是 7-14 月龄，优选体重为 16-35kg。

[0751] 231. 实施方案 227-230 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。

[0752] 232. 实施方案 227-231 中任一项的衍生物，其中在至少 2 周适应之后经 i.v. 给予

所述衍生物。

[0753] 233. 实施方案 227-232 中任一项的衍生物，其中所述动物在给药前禁食大约 18h 并在给药后禁食至少 4h，整个周期内让其随意饮水。

[0754] 234. 实施方案 227-233 中任一项的衍生物，其中将所述 GLP-1 衍生物溶于 50mM 磷酸钠，145mM 氯化钠，0.05％吐温 80，pH7.4 中至合适浓度，优选 20-60nmol/ml.

[0755] 235. 实施方案 227-234 中任一项的衍生物，其中静脉内注射所述衍生物，体积为 1-2nmol/kg。

[0756] 236. 实施方案 1-235 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。

[0757] 237. 实施方案 236 的衍生物，其中所述小型猪是雄性Göttingen小型猪。

[0758] 238. 实施方案 236-237 中任一项的衍生物，其中所述小型猪是 7-14 月龄。

[0759] 239. 实施方案 236-238 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。

[0760] 240. 实施方案 236-239 中任一项的衍生物，其中经 i.v. 或 s.c 在耳后薄层皮肤内给予单剂量，任选在逐渐增加剂量的周期之后。

[0761] 241. 实施方案 236-240 中任一项的衍生物，其中在给药之前，所述动物禁食大约 18h。

[0762] 242. 实施方案 236-241 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给予组，其中所述基线组是 a) 用溶媒治疗，或 b) 未经治疗。

[0763] 243. 实施方案 236-242 中任一项的衍生物，其中所述血浆浓度水平为 3000-80000pM。

[0764] 244. 实施方案 236-243 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)。

[0765] 245. 实施方案 236-244 中任一项的衍生物，其中在 30 秒时段内经 i.v. 给予 0.3g/kg 葡萄糖，并在合适时间点采血样，例如在以下时间点 (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。

[0766] 246. 实施方案 236-245 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。

[0767] 247. 实施方案 236-246 中任一项的衍生物，其中在 t = 0min、以及任选在试验结束时 (t = 60min 或 t = 120min) 测定所述衍生物浓度。

[0768] 248. 实施方案 236-247 中任一项的衍生物，其中用葡萄糖氧化酶方法分析葡萄糖。

[0769] 249. 实施方案 236-248 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度量。

[0770] 250. 实施方案 236-249 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，优选是它的至少 110％，更优选是它的至少 120％，甚至更优选是它的至少 130％，或最优选是它的至少 140％。

[0771] 251. 实施方案 1-250 中任一项的衍生物，与对照（优选溶媒治疗或未经治疗）相比，其导致猪的饲料摄取下降；

[0772] 任选饲料摄取 (0-24h) 可以是溶媒治疗对照的 90％以下，优选 80％以下，更优选 70％以下，甚至更优选 60％以下，或最优选 50％以下；

[0773] 其中饲料摄取 (0-24h) 是指给予所述衍生物或溶媒之后的头 24 小时。

[0774] 252. 实施方案 251 的衍生物，其中所述猪是雌性 Landrace Yorkshire Duroc(LYD) 猪。

[0775] 253. 实施方案 251-252 中任一项的衍生物，其中所述猪是 3 月龄，优选体重 30-35kg。

[0776] 254. 实施方案 251-253 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。

[0777] 255. 实施方案 251-254 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。

[0778] 256. 实施方案 251-255 中任一项的衍生物，其中所述动物随意摄取猪饲料（例如 Svinefoder，Antonio）。

[0779] 257. 实施方案 251-256 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。

[0780] 258. 实施方案 251-257 中任一项的衍生物，其以 0.3、1.0、3.0、10 或 30nmol/kg 浓度给予，优选溶于磷酸缓冲液 (50mM 磷酸盐，0.05％吐温 80，pH 8)，更优选浓度为 12、40、120、400 或 1200nmol/ml。

[0781] 259. 实施方案 251-258 中任一项的衍生物，其中所述磷酸缓冲液用作溶媒。

[0782] 260. 实施方案 251-259 中任一项的衍生物，其中在第一天早晨对所述动物给予单次皮下剂量的衍生物或溶媒（优选剂量体积为 0.025ml/kg)，并且给药后测定食物摄取共 4 天。

[0783] 261. 实施方案 1-260 中任一项的衍生物，其在大鼠小肠提取物中的体外半衰期 ($T_{1/2}$)，除以 GLP-1(7-37) 的相应半衰期 ($T_{1/2}$)，为至少 0.4，优选高于 0.5，更优选高于 1.0，甚至更优选高于 2.0，还更优选高于 3.0，或最优选高于 4.0。

[0784] 262. 实施方案 1-261 中任一项的衍生物，其在大鼠小肠提取物中的体外半衰期 ($T_{1/2}$)，除以 GLP-1(7-37) 的相应半衰期 ($T_{1/2}$)，为高于 5.0，优选高于 6.0，更优选高于 7.0，甚至更优选高于 8.0，还更优选高于 9.0，或最优选高于 10.0。

[0785] 263. 实施方案 261-262 中任一项的衍生物，其中所述大鼠小肠提取物按照实施例 57 所述而制备，将所述衍生物在 37℃孵育 1 小时，滴定 (titrate) 所述提取物浓度，使 GLP-1(7-37) 半衰期范围为 10-20 分钟，例如 1.4ug/ml，所得样品经 UPLC 和 / 或 MALDI-TOF 分析，和 / 或按照实施例 57 所述进行孵育和分析。

[0786] 264. 实施方案 1-263 中任一项的衍生物，其比率 [在大鼠小肠提取物中的体外半衰期 ($T_{1/2}$)，除以 GLP-1(7-37) 在大鼠小肠提取物中的体外半衰期 ($T_{1/2}$)]，为塞马鲁肽相应比率的至少 0.5 倍，优选塞马鲁肽比率的至少 2 倍，更优选塞马鲁肽比率的至少 3 倍，甚至更优选塞马鲁肽比率的至少 5 倍，或最优选塞马鲁肽比率的至少 7 倍。

[0787] 265. 实施方案 1-264 中任一项的衍生物，其比率 [在大鼠小肠提取物中的半衰期 ($T_{1/2}$)，除以 GLP-1(7-37) 在大鼠小肠提取物中的半衰期 ($T_{1/2}$)]，为利拉鲁肽相应比率的至少 0.1 倍，优选利拉鲁肽比率的至少 0.4 倍，更优选利拉鲁肽比率的至少 0.8 倍，甚至更优

选利拉鲁肽比率的至少 1.2 倍，或最优选利拉鲁肽比率的至少 1.5 倍。

[0788] 266. 实施方案 1-265 中任一项的衍生物，其在经 i.v. 给予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。

[0789] 267. 实施方案 1-266 中任一项的衍生物，其在经 i.v. 给予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。

[0790] 268. 实施方案 1-266 中任一项的衍生物，其在经 i.v. 给予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。

[0791] 269. 实施方案 266-268 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 300-600g。

[0792] 270. 实施方案 1-269 中任一项的衍生物，其在经 i.v. 给予大鼠后的体内半衰期 ($T_{1/2}$) 为至少等于塞马鲁肽的半衰期，优选塞马鲁肽半衰期的至少 2 倍，更优选塞马鲁肽半衰期的至少 3 倍，甚至更优选塞马鲁肽半衰期的至少 4 倍，或最优选塞马鲁肽半衰期的至少 5 倍。

[0793] 271. 实施方案 1-270 中任一项的衍生物，其不是实施例 17、21、33、34、35 和 36 的化合物；优选不是 Chem. 36、Chem. 40、Chem. 52、Chem. 53、Chem. 54 和 Chem. 55。

[0794] 272. 实施方案 1-271 中任一项的衍生物，其不是实施例 22、23、27 和 41 的化合物；优选不是 Chem. 41、Chem. 42、Chem. 46 和 Chem. 60。

[0795] 273. 实施例 19 的衍生物；优选 Chem. 38。

[0796] 274. 实施例 10 的衍生物；优选 Chem. 29。

[0797] 275. 呈 GLP-1 类似物形式的中间产物，其与 GLP-1(7-37)(SEQ ID NO:1) 相比包含以下修饰：

[0798] (A)(i)(8Aib,31H,34Q,37K)；(ii)(des7-8,34R,37K,38E)；(iii)(des7-8,34R,37K)；(iv)(8Aib,9G,34R,37K)；(v)(8Aib,23R,34R,37K)；(vi)(31H,34Q,37K)；(vii)(9Q,34R,37K)；(iix)(30E,34R,37K)；(ix)(34R,37K,38G)；(x)(34R,36G,37K)；或 (xi)(34R,37K,38E)；

[0799] 其中所述类似物优选选自 GLP-1(7-37)(SEQ ID NO:1) 的以下类似物：

[0800] (B)(i-a)(8Aib,31H,34Q,37K)；(ii-a)(des7-8,34R,37K,38E)；(iii-a)(des7-8,34R,37K)；(iv-a)(8Aib,9G,34R,37K)；(v-a)(8Aib,23R,34R,37K)；(vi-a)(31H,34Q,37K)；(vii-a)(9Q,34R,37K)；(iix-a)(30E,34R,37K)；(ix-a)(34R,37K,38G)；(x-a)(34R,36G,37K)；(xi-a)(34R,37K,38E)；(xii-a)(7Imp,34R,37K)；(xiii-a)(8Aib,34R,37K)；和 (xiv-a)(34R,37K)；

[0801] 或 (A) 或 (B) 的任何类似物的药学上可接受的盐、酰胺或酯。

[0802] 276. 实施方案 275 的类似物，其中通过书写和目测进行与 GLP-1(7-37)(SEQ ID NO:1) 的比较。

[0803] 277. 实施方案 275 的类似物，其中通过使用标准蛋白或肽比对程序进行与 GLP-1(7-37)(SEQ ID NO:1) 的比较。

[0804] 278. 实施方案的 277 类似物，其中所述比对程序是 Needleman-Wunsch 比对。

[0805] 279. 实施方案 277-278 中任一项的类似物，其中使用默认打分矩阵和默认特性矩阵。

[0806] 280. 实施方案 277-279 中任一项的类似物，其中所述打分矩阵是 BLOSUM62。

[0807] 281. 实施方案 277-280 中任一项的类似物，其中空位中第一残基的罚分是 -10（负十）。

[0808] 282. 实施方案 277-281 中任一项的类似物，其中空位中额外残基的罚分是 -0.5（负零点五）。

[0809] 283. 实施方案 277-282 中任一项的类似物，其具有 GLP-1 活性。

[0810] 284. 实施方案 283 的类似物，其中 GLP-1 活性如实施方案 192-196 所述定义。

[0811] 285. 一种中间产物或其药学上可接受的盐、酰胺或酯，其包含选自 Chem. 2c、Chem. 3b 和 Chem. 4b 的延长部分：

[0812] Chem. 2c：$HOOC-C_6H_4-O-(CH_2)_y-CO-PG$

[0813] Chem. 3b：$R^1-C_6H_4-(CH_2)_z-CO-PG$

[0814] Chem. 4b：$HOOC-C_4SH_2-(CH_2)_w-CO-PG$

[0815] 其中 y 是范围在 3-17 的整数，z 是范围在 1-5 的整数，R^1 是摩尔质量不高于 150Da 的基团，w 是范围在 6-18 的整数，

[0816] 和 *-PG 是保护基；其中，任选，所述延长部分的远端 *-COOH 基团，如果有的话，也被保护。

[0817] 286. 实施方案 285 的中间产物，其中 *-CO-PG 是 i)*-COOH，或 ii) 活性酯。

[0818] 287. 实施方案 286 的中间产物，其中所述活性酯是以下化合物的酯：对硝基苯酚；2,4,5- 三氯苯酚；N- 羟基琥珀酰亚胺；N- 羟基硫代琥珀酰亚胺；3,4- 二氢 -3- 羟基 -1,2,3- 苯并三唑 -4- 酮；5- 氯 -8- 羟基喹啉；N- 羟基 -5- 降冰片烯 -2,3- 二羧酸二酰亚胺；五氟苯酚；对硫代四氟苯酚；N- 羟基邻苯二甲酰亚胺；1- 羟基苯并三唑；1- 羟基 -7- 氮杂苯并三唑；N- 羟基马来酰亚胺；4- 羟基 -3- 硝基苯磺酸；或本领域已知的任何其它活性酯。

[0819] 288. 实施方案 285-287 中任一项的中间产物或其药学上可接受的盐、酰胺或酯，其包含

[0820] a) 选自 Chem. 2、Chem. 3 和 Chem. 4 的延长部分：

[0821] Chem. 2：$HOOC-C_6H_4-O-(CH_2)_y-CO-*$

[0822] Chem. 3：$R^1-C_6H_4-(CH_2)_z-CO-*$

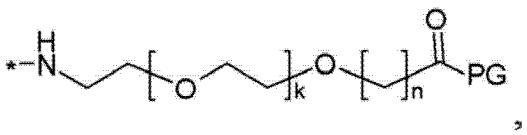
[0823] Chem. 4：$HOOC-C_4SH_2-(CH_2)_w-CO-*$

[0824] 其中 y 是范围在 3-17 的整数，z 是范围在 1-5 的整数，R^1 是摩尔质量不高于 150Da 的基团，w 是范围在 6-18 的整数；和

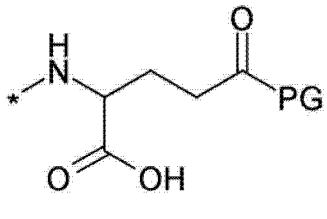
[0825] b) 选自 Chem. 5b、Chem. 6 和 Chem. 7 的接头：

[0826] Chem. 5b：

[0827]

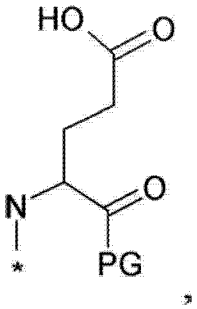


[0828] Chem. 6a：

[0829]  和 / 或

[0830] Chem. 7a :

[0831]



[0832] 其中 k 是范围在 1-5 的整数，n 是范围在 1-5 的整数 ；PG 是保护基 ；其中，任选，所述延长部分的 *-COOH 基团，如果有的话，优选也如本领域已知而被保护，优选经官能化成为非活性酯。

[0833] 289. 实施方案 285-288 中任一项的中间产物，其中所述接头如实施方案 1-57 中的任一项所定义。

[0834] 290. 实施方案 285-289 中任一项的中间产物，其中所述延长部分如实施方案 1-87 中的任一项所定义。

[0835] 291. 一种中间产物或其药学上可接受的盐、酰胺或酯，其包含以下部分，优选由以下部分组成 ：

[0836] a) 选自 Chem. 2、Chem. 3 和 Chem. 4 的延长部分 ：

[0837] Chem. 2 ：$HOOC-C_6H_4-O-(CH_2)_y-CO-*$

[0838] Chem. 3 ：$R^1-C_6H_4-(CH_2)_z-CO-*$

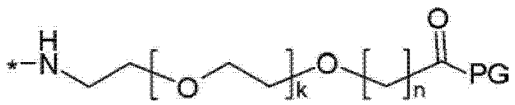
[0839] Chem. 4 ：$HOOC-C_4SH_2-(CH_2)_w-CO-*$

[0840] 其中 y 是范围在 3-17 的整数，z 是范围在 1-5 的整数，R^1 是摩尔质量不高于 150Da 的基团，w 是范围在 6-18 的整数 ；和

[0841] b) 包含 Chem. 5b 的接头 ：

[0842] Chem. 5b ：

[0843]



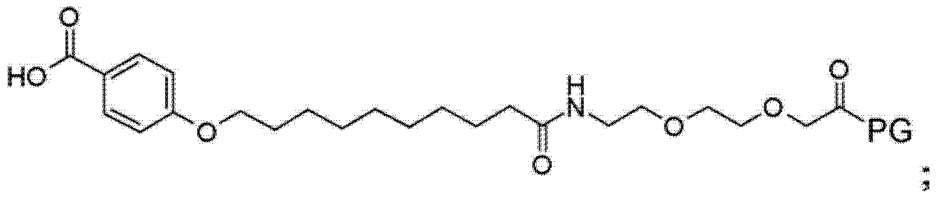
[0844] 其中 k 是范围在 1-5 的整数，n 是范围在 1-5 的整数 ；PG 是保护基 ；

[0845] 其中，任选，所述延长部分的远端 *-COOH 基团，如果有的话，也如本领域已知方式而被保护 ；优选在非活性酯形成之下 ；更优选 i) 醇与大侧链的酯，例如苯酚的酯，其任选被取代 ；或 ii) 支链烷基酯、优选低级烷基酯 ；最优选保护为 OtBu、OBz 等。

[0846] 292. 优选实施方案 285-291 中任一项的中间产物，其选自以下 ：

[0847] Chem. 69 ：

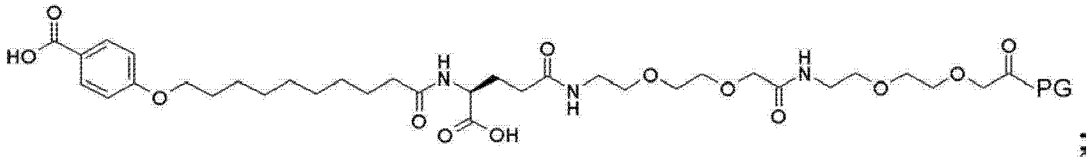
[0848]



;

[0849] Chem. 70 :

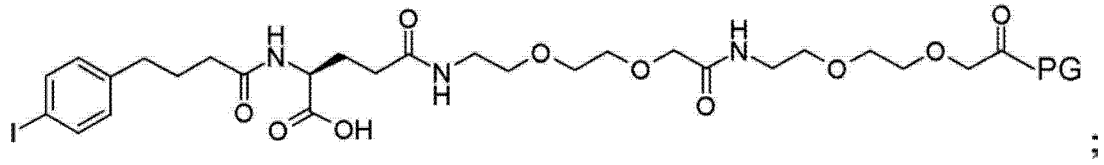
[0850]



;

[0851] Chem. 71 :

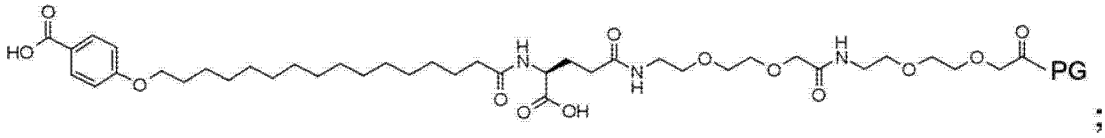
[0852]



;

[0853] Chem. 72 :

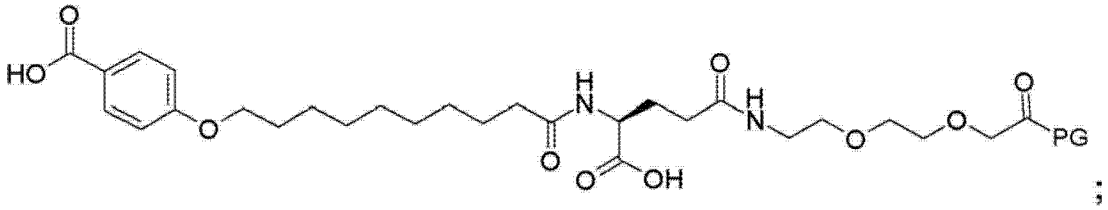
[0854]



;

[0855] Chem. 73 :

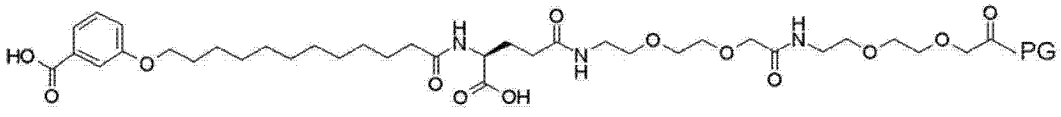
[0856]



;

[0857] Chem. 74 :

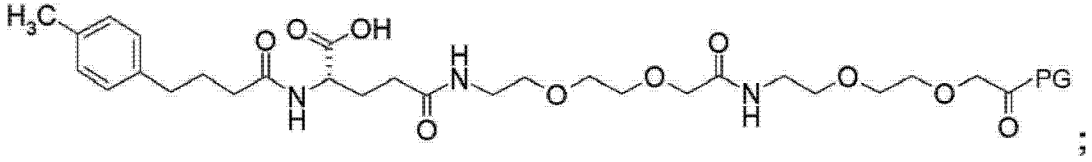
[0858]



;

[0859] Chem. 75 :

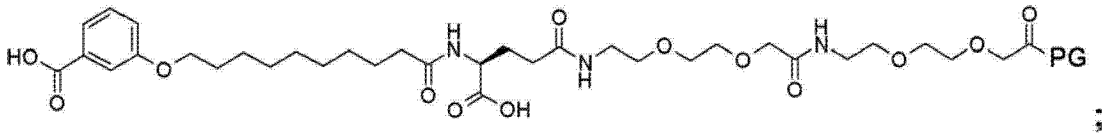
[0860]



;

[0861] Chem. 76 :

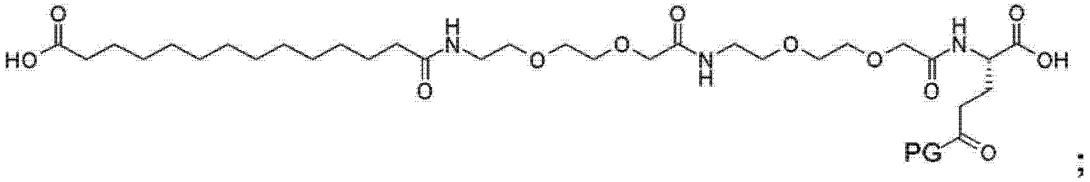
[0862]



;

[0863] Chem. 77 :

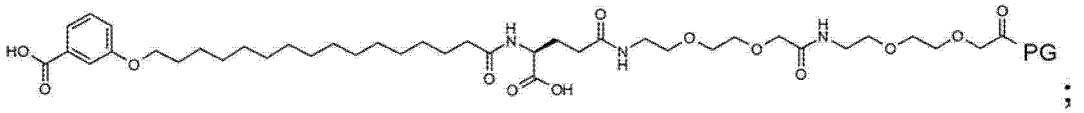
[0864]



;

[0865] Chem. 78 :

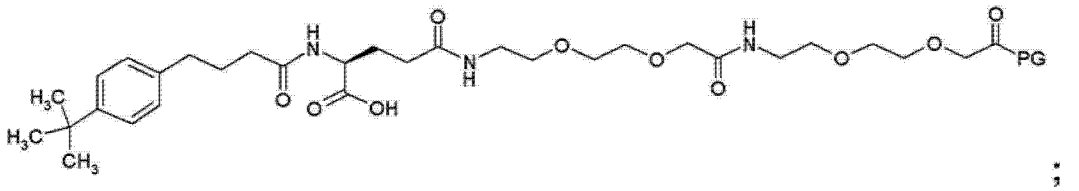
[0866]



;

[0867] Chem. 79 :

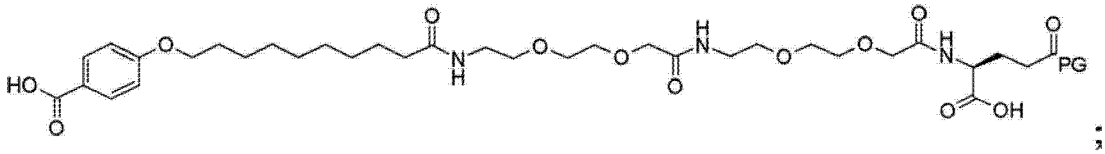
[0868]



;

[0869] Chem. 80 :

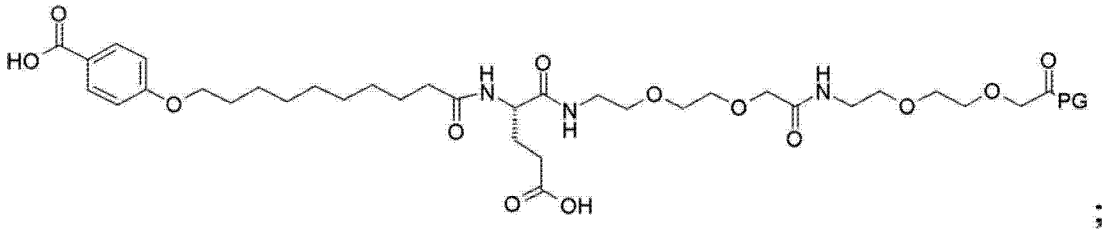
[0870]



;

[0871] Chem. 81 :

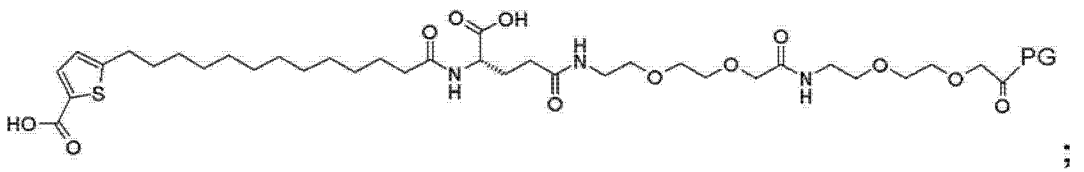
[0872]



;

[0873] Chem. 82 :

[0874]

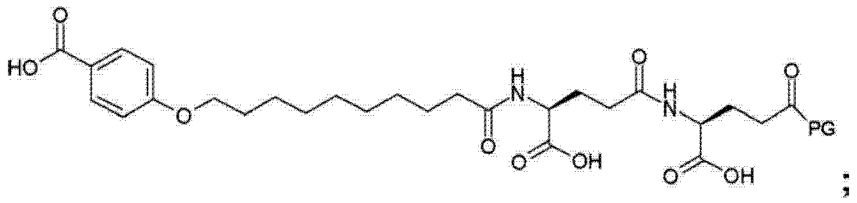


;

[0875] 和

[0876] Chem. 83 :

[0877]



[0878] 其中，任选，所述延长部分的一个或多个 *-COOH 基团、优选远端 *-COOH 基团，也被保护。

[0879] 293. 用作药物的实施方案 1-274 中任一项的衍生物。

[0880] 294. 实施方案 1-274 中任一项的衍生物，用于治疗和 / 或预防所有形式的糖尿病和相关疾病，例如进食障碍、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。

[0881] 295. 实施方案 1-274 中任一项的衍生物在制备用于以下目的的药物中的用途：治疗和 / 或预防所有形式的糖尿病和相关疾病，例如进食障碍、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。

[0882] 296. 一种方法，所述方法用于治疗或预防所有形式的糖尿病和相关疾病，例如进食障碍、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；即通过给予药物活性量的实施方案 1-274 中任一项的衍生物。

[0883] 297. GLP-1 类似物的衍生物或其药学上可接受的盐、酰胺或酯，其包含选自 Chem. 2、Chem. 3 和 Chem. 4 的延长部分：

[0884] Chem. 2：$HOOC-C_6H_4-O-(CH_2)_y-CO-*$

[0885] Chem. 3：$R^1-C_6H_4-(CH_2)_z-CO-*$

[0886] Chem. 4：$HOOC-C_4SH_2-(CH_2)_w-CO-*$

[0887] 其中 x 是范围在 6-18 的整数，y 是范围在 3-17 的整数，z 是范围在 1-5 的整数，R^1 是摩尔质量不高于 150Da 的基团，w 是范围在 6-18 的整数。

[0888] 298. 实施方案 297 的衍生物，其中所述 GLP-1 类似物如实施方案 1-296 中的任一项所定义。

[0889] 299. 实施方案 297-298 中任一项的衍生物，其中所述延长部分如实施方案 1-296 中的任一项所定义。

[0890] 300. 实施方案 297-299 中任一项的衍生物，其还包含接头，优选其如实施方案 1-296 中的任一项所定义。

[0891] 额外具体实施方案

[0892] 以下是本发明的额外具体实施方案：

[0893] 1. GLP-1 类似物的衍生物或其药学上可接受的盐、酰胺或酯，其中所述 GLP-1 类似物是 K^{37}-GLP-1(7-37) 或与 GLP-1(7-37)(SEQ IDNO：1) 相比具有至多 6 个氨基酸残基改变的其类似物，该衍生物具有分别连接到 K^{26} 和 K^{37} 的 2 个白蛋白结合部分，其中所述白蛋白结合部分包含选自 $HOOC-(CH_2)_n-CO-$、$HOOC-C_6H_4-O-(CH_2)_m-CO-$ 和 $R^1-C_6H_4-(CH_2)_p-CO-$ 的延长部

分，其中 n 是范围在 8-16 的整数，m 是范围在 7-17 的整数，p 是范围在 1-5 的整数，R^1 是摩尔质量不高于 150Da 的基团。

[0894] 2. 实施方案 1 的衍生物，其中 n 是偶数。

[0895] 3. 实施方案 2 的衍生物，其中 n 是 8、10、12、14 或 16；优选 10、12 或 14。

[0896] 4. 实施方案 1 的衍生物，其中 m 是奇数。

[0897] 5. 实施方案 4 的衍生物，其中 m 是 7、9、11、13、15 或 17；优选 9、11 或 15；最优选 9。

[0898] 6. 实施方案 1 的衍生物，其中 p 是奇数。

[0899] 7. 实施方案 6 的衍生物，其中 p 是 1、3 或 5，优选 3。

[0900] 8. 实施方案 1 和 4-5 中任一项的衍生物，其中所述 COOH 基团是在间位或对位，优选在对位。

[0901] 9. 实施方案 1-8 中任一项的衍生物，其中 R^1 的摩尔质量不高于 130Da，优选不高于 100Da，更优选不高于 75Da，甚至更优选不高于 60Da，或最优选不高于 50Da。

[0902] 10. 实施方案 1-9 中任一项的衍生物，其中 R^1 的摩尔质量不高于 40Da，优选不高于 30Da，更优选不高于 20Da，或最优选不高于 15Da。

[0903] 11. 实施方案 1-10 中任一项的衍生物，其中 R^1 选自卤素、以及具有 1-5 个 C 原子的直链或支链烷基。

[0904] 12. 实施方案 1 和 6-7 中任一项的衍生物，其中 R^1 是甲基或叔丁基。

[0905] 13. 实施方案 12 的衍生物，其中 R^1 在对位。

[0906] 14. 实施方案 1 和 6-7 中任一项的衍生物，其中 R^1 是 -I。

[0907] 15. 实施方案 14 的衍生物，其中 R^1 在对位。

[0908] 16. 实施方案 1-15 中任一项的衍生物，其中与 GLP-1(7-37)(SEQ ID NO:1) 相比，所述 GLP-1 类似物最多具有 5、优选最多 4、更优选最多 3、或最优选最多 2 个氨基酸改变。

[0909] 17. 实施方案 1-16 中任一项的衍生物，其中所述 GLP-1 类似物具有 C- 端酰胺。

[0910] 18. 实施方案 1-16 中任一项的衍生物或其药学上可接受的盐，其中所述 GLP-1 类似物具有 C- 端 -COOH 基团。

[0911] 19. 实施方案 1-18 中任一项的衍生物，其中与 GLP-1(7-37)(SEQ ID NO:1) 相比，所述 GLP-1 类似物包含至少一个缺失。

[0912] 20. 实施方案 1-19 中任一项的衍生物，其中在所述 GLP-1 类似物 N- 端的一个或两个氨基酸已缺失，使得所述类似物优选包含 des7、des8 或 (des7+des8)；更优选 des7 或 (des7+des8)。

[0913] 21. 实施方案 1-20 中任一项的衍生物，其中与 GLP-1(7-37)(SEQ ID NO:1) 相比，所述 GLP-1 类似物是具有至多 6 个氨基酸残基改变的 GLP-1(8-37) 或 GLP-1(9-37) 的类似物。

[0914] 22. 实施方案 1-21 中任一项的衍生物，其中所述 GLP-1 类似物选自以下：(i) K^{37}-GLP-1(7-37)，(ii) K^{37}-GLP-1(8-37)，(iii) K^{37}-GLP-1(9-37)，或 (iv) 与 GLP-1(7-37)(SEQ ID NO:1) 相比具有至多 6 个氨基酸残基改变的 (i)-(iii) 中任一项的类似物。

[0915] 23. 实施方案 20-21 或 22(ii)-(iv) 中任一项的衍生物，其中 His- 模拟物或 His-Ala 模拟物已添加到新的 N- 端氨基酸上。

[0916] 24. 实施方案 20-23 中任一项的衍生物，其中具有游离羧酸基团的咪唑衍生物已与 N- 端共价偶联，优选通过在游离羧酸基团和 N- 端氨基间形成酰胺键。

[0917] 25. 实施方案 24 的衍生物，其中所述咪唑衍生物是单取代的咪唑。

[0918] 26. 实施方案 25 的衍生物，其中所述咪唑被具有 1-6 个碳原子的低级烷基的羧酸基团取代。

[0919] 27. 实施方案 26 的衍生物，其中所述羧酸基团选自乙酰基；和直链或支链丙酰基、丁酰基、戊酰基；优选乙酰基。

[0920] 28. 实施方案 1-27 中任一项的衍生物，其中在所述 GLP-1 类似物的位置 8 的氨基酸残基具有连接到其 N 原子的 3H- 咪唑 -4- 基 - 乙酰基。

[0921] 29. 实施方案 1-28 中任一项的衍生物，其中在所述 GLP-1 类似物的位置 8 的氨基酸残基是丙氨酸。

[0922] 30. 实施方案 25 的衍生物，其中所述咪唑被（甲基氨基甲酰基）-2- 甲基 - 丙酰基、（乙基氨基甲酰基）-2- 甲基 - 丙酰基、（丙基氨基甲酰基）-2- 甲基 - 丙酰基或（丁基氨基甲酰基）-2- 甲基 - 丙酰基取代。

[0923] 31. 实施方案 30 的衍生物，其中所述咪唑被（甲基氨基甲酰基）-2- 甲基 - 丙酰基、（乙基氨基甲酰基）-2- 甲基 - 丙酰基或（丙基氨基甲酰基）-2- 甲基 - 丙酰基取代，优选被（乙基氨基甲酰基）-2- 甲基 - 丙酰基取代。

[0924] 32. 实施方案 1-31 中任一项的衍生物，其中在所述 GLP-1 类似物的位置 9 的氨基酸残基具有连接到其 N 原子的 {2-[2-(1H- 咪唑 -4- 基）- 乙基氨基甲酰基]-2- 甲基 - 丙酰基 }。

[0925] 33. 实施方案 1-32 中任一项的衍生物，其中在所述 GLP-1 类似物的位置 9 的氨基酸残基是谷氨酸。

[0926] 34. 实施方案 1-33 中任一项的衍生物，其除 37K 外，还包含至少一个以下取代：8Aib；31H；34E，Q，R；和 / 或 38E。

[0927] 35. 实施方案 34 的衍生物，其包含 8Aib.

[0928] 36. 实施方案 34 的衍生物，其包含 34E、34Q 或 34R；优选 34R。

[0929] 37. 实施方案 35 的衍生物，其还包含 34R。

[0930] 38. 实施方案 34 的衍生物，其包含 31H。

[0931] 39. 实施方案 35 的衍生物，其还包含 31H 和 / 或 34Q，优选这两者。

[0932] 40. 实施方案 34 的衍生物，其包含 34R。

[0933] 41. 实施方案 34 的衍生物，其包含 38E。

[0934] 42. 实施方案 37 的衍生物，其还包含 38E。

[0935] 43. 实施方案 1-42 中任一项的衍生物，其中所述 2 个白蛋白结合部分是类似的；优选是基本相同的；或者最优选是相同的。

[0936] 44. 实施方案 1-43 中任一项的衍生物，其中所述 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。

[0937] 45. 实施方案 1-44 中任一项的衍生物，其中所述 2 个白蛋白结合部分，和 / 或 2 个延长部分的百分比同一性为至少 80％，优选至少 85％，更优选至少 90％，或甚至更优选至少 95％，或最优选至少 99％。

[0938] 46. 实施方案 45 的衍生物，其中使用数据建模，用 Tanimoto 相似性系数和 ECFP_6 扩展连接指纹而测定所述百分比同一性。

[0939] 47. 实施方案 1-46 中任一项的衍生物，其中所述白蛋白结合部分分别连接到位置 26 和 37 的赖氨酸残基的 ε 氨基上，通过酰胺键，任选通过接头部分 .

[0940] 48. 实施方案 1-47 中任一项的衍生物，其中所述白蛋白结合部分包含接头部分，其一端通过酰胺键连接到所述延长部分的 CO- 基团，而另一端通过酰胺键分别连接到位置 26 和 37 的赖氨酸残基的 ε 氨基。

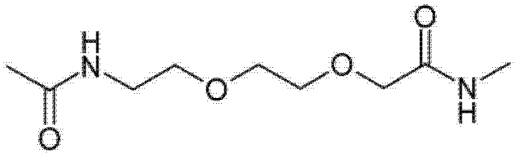
[0941] 49. 实施方案 47-48 中任一项的衍生物，其中所述接头部分具有 5-30 个 C 原子，优选 5-25 个 C 原子，更优选 5-20 个 C 原子，或最优选 5-17 个 C 原子。

[0942] 50. 实施方案 47-49 中任一项的衍生物，其中所述接头部分具有 4-20 个杂原子，优选 4-18 个杂原子，更优选 4-14 个杂原子，或最优选 4-12 个杂原子。

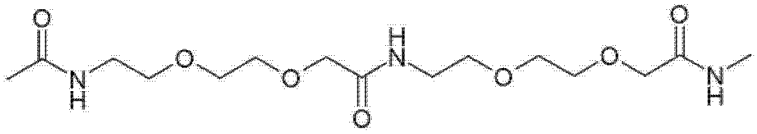
[0943] 51. 实施方案 50 的衍生物，其中所述杂原子是 N- 原子和 / 或 O 原子。

[0944] 52. 实施方案 47-51 中任一项的衍生物，其中所述接头部分选自以下 :

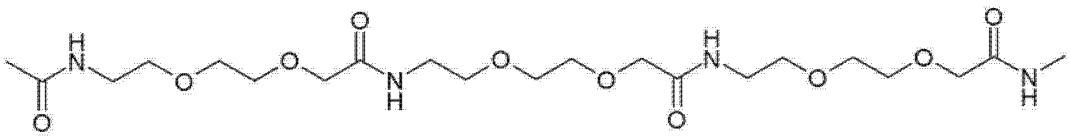
[0945]



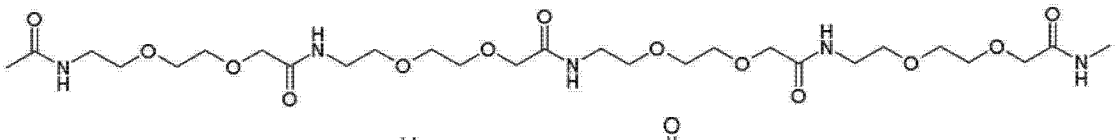
，



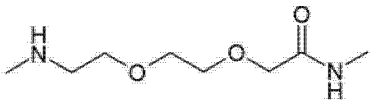
，



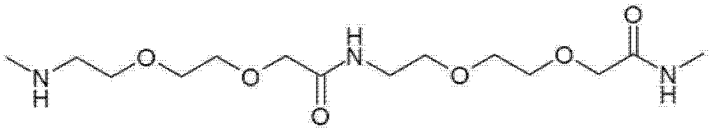
，



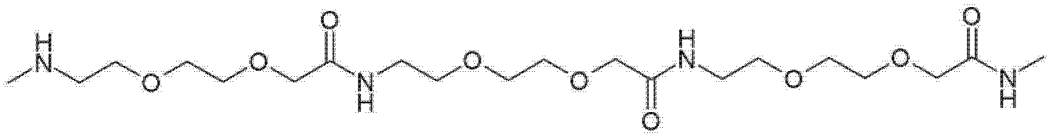
，



，，



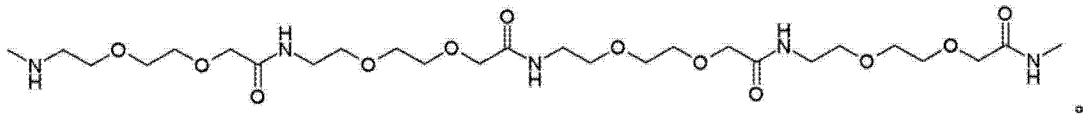
，



，

和

[0946]



[0947] 53. 实施方案 47-52 中任一项的衍生物，其中所述接头部分包含至少一个 OEG 基团和 / 或至少一个 Glu（谷氨酸）基团。

[0948] 54. 实施方案 53 的衍生物，其中所述接头由一个 OEG 基团或一个 Glu 基团组成，其 γ- 羧酸基团优选与赖氨酸残基的 ε 氨基形成酰胺键。

[0949] 55. 实施方案 53 的衍生物，其中所述接头由 2 个 OEG 基团或 2 个 Glu 基团组成，所述基团通过酰胺键相互作用，并因此优选，在 2 个 Glu 基团的情况下，1 个 Glu 的 γ- 羧酸基团与赖氨酸残基的 ε 氨基形成酰胺键，或 - 更优选“和”- 其它 Glu 的 γ- 羧酸基团与第一 Glu 的氨基形成酰胺键。

[0950] 56. 实施方案 53 的衍生物，其中所述接头包含至少一个 OEG 基团和至少一个 Glu 基团，优选各一个，更优选 OEG 基团的羧基端与赖氨酸残基的 ε 氨基形成酰胺键，并且 OEG 基团的氨基端与 Glu 基团的 γ- 羧基形成酰胺键。

[0951] 57. 实施方案 56 的衍生物，其中所述接头由 1 个 Glu 基团和 2 个 OEG 基团组成，优选选自以下 :-Glu-OEG-OEG-、-OEG-Glu-OEG- 和 -OEG-OEG-Glu-，其中最左边基团的氨基与延长部分形成酰胺键，而最右边基团的羧基与赖氨酸残基的 ε 氨基形成酰胺键，优选，在最右端 Glu 基团的情况下，其 γ- 羧基用于该酰胺键。

[0952] 58. 实施方案 1-57 中任一项的衍生物，其功效 (EC_{50}) 在或低于 3000pM，优选低于 3000pM，更优选低于 2500pM，甚至更优选低于 2000pM，或最优选低于 1500pM。

[0953] 59. 实施方案 1-58 中任一项的衍生物，其功效 (EC_{50}) 低于 1000pM，优选低于 800pM，更优选低于 600pM，甚至更优选低于 400pM，或最优选低于 200pM。

[0954] 60. 实施方案 1-59 中任一项的衍生物，其功效 (EC_{50}) 低于 180pM，优选低于 160pM，更优选低于 140pM，甚至更优选低于 120pM，或最优选低于 100pM。

[0955] 61. 实施方案 1-60 中任一项的衍生物，其功效 (EC_{50}) 低于 80pM，优选低于 60pM，更优选低于 50pM，甚至更优选在或低于 40pM，或最优选低于 30pM。

[0956] 62. 实施方案 58-61 中任一项的衍生物，其中在含有人 GLP-1 受体的培养基中将所述功效测定为对 cAMP 形成的刺激，优选使用稳定转染的细胞系例如 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 和外源加入的生物素 - 标记的 cAMP 间的竞争，在所述测定中使用特异性抗体能更优选捕获 cAMP，和 / 或其中甚至更优选的测定是 AlphaScreen cAMP 测定，最优选的一种描述于实施例 50。

[0957] 63. 实施方案 1-62 中任一项的衍生物，其功效 (EC_{50}) 小于塞马鲁肽功效的 10 倍，优选小于塞马鲁肽功效的 8 倍，更优选小于塞马鲁肽功效的 6 倍，甚至更优选小于塞马鲁肽功效的 4 倍，或最优选小于塞马鲁肽功效的 2 倍。

[0958] 64. 实施方案 1-63 中任一项的衍生物，其功效 (EC_{50}) 小于利拉鲁肽功效的 10 倍，优选小于利拉鲁肽功效的 8 倍，更优选小于利拉鲁肽功效的 6 倍，甚至更优选小于利拉鲁肽功效的 4 倍，或最优选小于利拉鲁肽功效的 2 倍。

[0959] 65. 实施方案 1-64 中任一项的衍生物，其功效 (EC_{50}) 小于利拉鲁肽功效，优选小

于利拉鲁肽功效的0.8倍，更优选小于利拉鲁肽功效的0.6倍，甚至更优选小于利拉鲁肽功效的0.5倍，或最优选小于等于利拉鲁肽功效的0.4倍。

[0960] 66. 实施方案1-65中任一项的衍生物，其比率［在2.0％人血清白蛋白(HSA)存在下的GLP-1受体结合亲和力(IC_{50})，除以在0.005％ HSA存在下的GLP-1受体结合亲和力(IC_{50})］，为至少1，优选至少10，更优选至少20，甚至更优选至少30，或最优选至少40。

[0961] 67. 实施方案1-66中任一项的衍生物，其比率［在2.0％人血清白蛋白(HSA)存在下的GLP-1受体结合亲和力(IC_{50})，除以在0.005％ HSA存在下的GLP-1受体结合亲和力(IC_{50})］，为至少50，优选至少60，更优选至少70，甚至更优选至少80，或最优选至少90。

[0962] 68. 实施方案1-67中任一项的衍生物，其比率［在2.0％人血清白蛋白(HSA)存在下的GLP-1受体结合亲和力(IC_{50})，除以在0.005％ HSA存在下的GLP-1受体结合亲和力(IC_{50})］，为至少100，优选至少120，更优选至少140，还更优选至少160，甚至更优选至少180，或最优选至少200。

[0963] 69. 实施方案1-68中任一项的衍生物，其中通过从所述受体中取代^{125}I-GLP-1的能力的方式测定其与GLP-1受体的结合亲和力(IC_{50})，优选以细胞膜的形式提供所述受体，所述细胞膜来自稳定的细胞系，例如转染了人GLP-1受体的BHK tk-ts13；和/或使用SPA结合测定，优选使用SPA-颗粒例如小麦胚芽凝集素SPA珠，结合测定最优选按实施例51所述来进行。

[0964] 70. 实施方案1-69中任一项的衍生物，其比率［在2.0％人血清白蛋白(HSA)存在下的GLP-1受体结合亲和力(IC_{50})，除以在0.005％ HSA存在下的GLP-1受体结合亲和力(IC_{50})］为塞马鲁肽比率的至少20％，优选塞马鲁肽比率的至少50％，更优选塞马鲁肽比率的至少75％，或最优选至少等于塞马鲁肽的比率。

[0965] 71. 实施方案1-70中任一项的衍生物，其比率［在2.0％人血清白蛋白(HSA)存在下的GLP-1受体结合亲和力(IC_{50})，除以在0.005％ HSA存在下的GLP-1受体结合亲和力(IC_{50})］为至少等于利拉鲁肽的比率，优选利拉鲁肽比率的至少2倍，更优选利拉鲁肽比率的至少3倍，甚至更优选利拉鲁肽比率的至少4倍，或最优选利拉鲁肽比率的至少5倍。

[0966] 72. 实施方案1-71中任一项的衍生物，其在大鼠小肠提取物中的体外半衰期($T_{1/2}$)，除以GLP-1(7-37)的相应半衰期($T_{1/2}$)，为高于0.5，优选高于1.0，更优选高于2.0，甚至更优选高于3.0，或最优选高于4.0。

[0967] 73. 实施方案1-72中任一项的衍生物，其在大鼠小肠提取物中的体外半衰期($T_{1/2}$)，除以GLP-1(7-37)的相应半衰期($T_{1/2}$)，为高于5.0，优选高于6.0，更优选高于7.0，或最优选高于8.0。

[0968] 74. 实施方案72-73中任一项的衍生物，其中所述大鼠小肠提取物按照实施例57所述而制备，将所述衍生物在37℃孵育1小时，滴定所述提取物浓度，使GLP-1(7-37)半衰期范围为10-20分钟，例如1.4ug/ml，所得样品经UPLC和/或MALDI-TOF分析，和/或按照实施例57所述进行孵育和分析。

[0969] 75. 实施方案1-74中任一项的衍生物，其比率［在大鼠小肠提取物中的体外半衰期($T_{1/2}$)，除以GLP-1(7-37)在大鼠小肠提取物中的体外半衰期($T_{1/2}$)］，为塞马鲁肽相应比率的至少0.5倍，优选塞马鲁肽比率的至少2倍，更优选塞马鲁肽比率的至少3倍，甚至更优选塞马鲁肽比率的至少5倍，或最优选塞马鲁肽比率的至少7倍。

[0970] 76. 实施方案 1-75 中任一项的衍生物，其比率［在大鼠小肠提取物中的半衰期 ($T_{1/2}$)，除以 GLP-1(7-37) 在大鼠小肠提取物中的半衰期 ($T_{1/2}$)］为利拉鲁肽相应比率的至少 0.1 倍，优选利拉鲁肽比率的至少 0.4 倍，更优选利拉鲁肽比率的至少 0.8 倍，甚至更优选利拉鲁肽比率的至少 1.2 倍，或最优选利拉鲁肽比率的至少 1.5 倍。

[0971] 76. 实施方案 1-75 中任一项的衍生物，其在经 i.v. 给予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。

[0972] 77. 实施方案 1-76 中任一项的衍生物，其在经 i.v. 给予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。

[0973] 78. 实施方案 76-77 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 300-600g。

[0974] 79. 实施方案 1-78 中任一项的衍生物，其在经 i.v. 给予大鼠后的体内半衰期 ($T_{1/2}$) 为至少等于塞马鲁肽的半衰期，优选塞马鲁肽半衰期的至少 2 倍，更优选塞马鲁肽半衰期的至少 3 倍，甚至更优选塞马鲁肽半衰期的至少 4 倍，或最优选塞马鲁肽半衰期的至少 5 倍。

[0975] 80. 实施方案 1-79 中任一项的衍生物，其在经 i.v. 给予小型猪之后的体内半衰期 ($T_{1/2}$) 为至少 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。

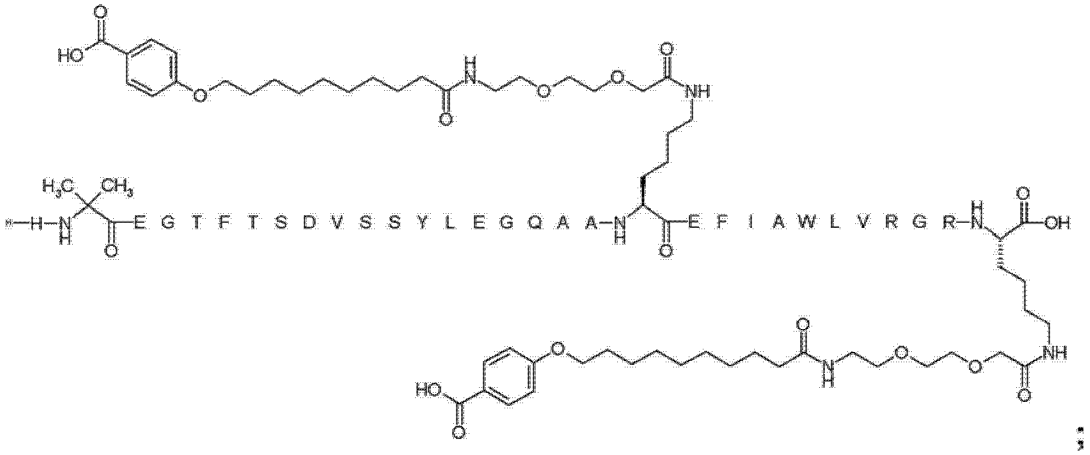
[0976] 81. 实施方案 80 的衍生物，其中所述小型猪是雄性Göttingen小型猪。

[0977] 82. 实施方案 1-81 中任一项的衍生物，其在经 i.v. 给予小型猪后的体内半衰期 ($T_{1/2}$) 为塞马鲁肽半衰期的至少 0.2 倍，优选塞马鲁肽半衰期的至少 0.4 倍，更优选塞马鲁肽半衰期的至少 0.6 倍，甚至更优选塞马鲁肽半衰期的至少 0.8 倍，或最优选至少等于塞马鲁肽的半衰期。

[0978] 83. 一种选自以下的 GLP-1 衍生物：

[0979] (i)$N^{\varepsilon 26}$-[2-(2-{2-[10-(4-羧基苯氧基）癸酰基氨基］乙氧基｝乙氧基）乙酰基]，$N^{\varepsilon 37}$-[2-(2-{2-[10-(4-羧基苯氧基）癸酰基氨基］乙氧基｝乙氧基）乙酰基]-[Aib^{8}，Arg^{34}，Lys^{37}]GLP-1(7-37)-肽：

[0980]

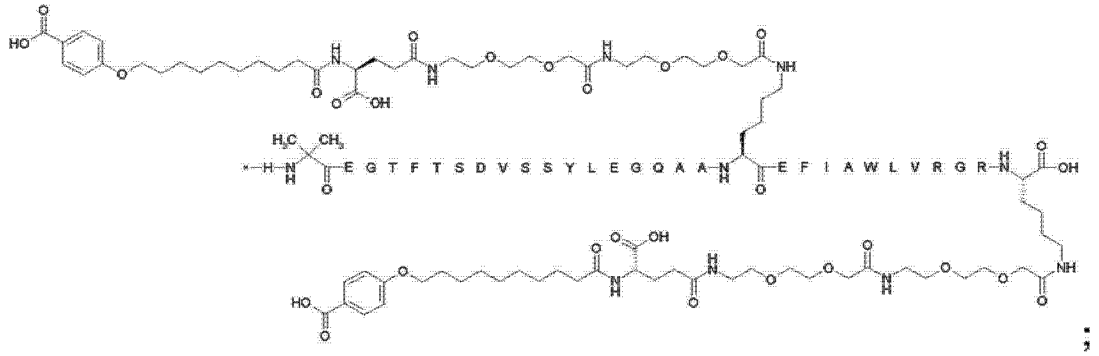


;

[0981] (ii)$N^{\varepsilon 26}$｛2-[2-(2-{2-[2-(2-{(S)-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｝，

$N^{\varepsilon 37}$-{2-[2-(2-{2-[2-(2-{(S)-4-羧基-4-[10-(4-羧基苯氧基)癸烷酰基氨基]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}-[Aib^8, Arg^{34}, Lys^{37}]GLP-1(7-37)-肽：

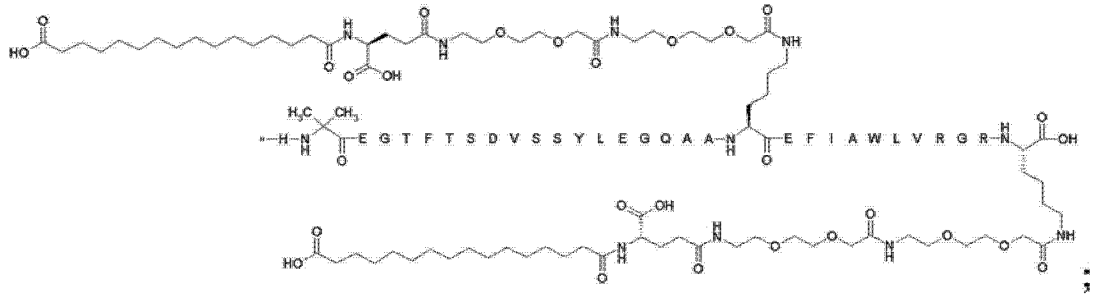
[0982]



；

[0983] (iii)$N^{\varepsilon 26}$-[2-(2-{2-[2-(2-{2-[(S)-4-羧基-4-(15-羧基十五烷酰基氨基)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], $N^{\varepsilon 37}$-[2-(2-{2-[2-(2-{2-[(S)-4-羧基-4-(15-羧基十五烷酰基氨基)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][Aib^8,Arg^{34},Lys^{37}]GLP-1(7-37)-肽：

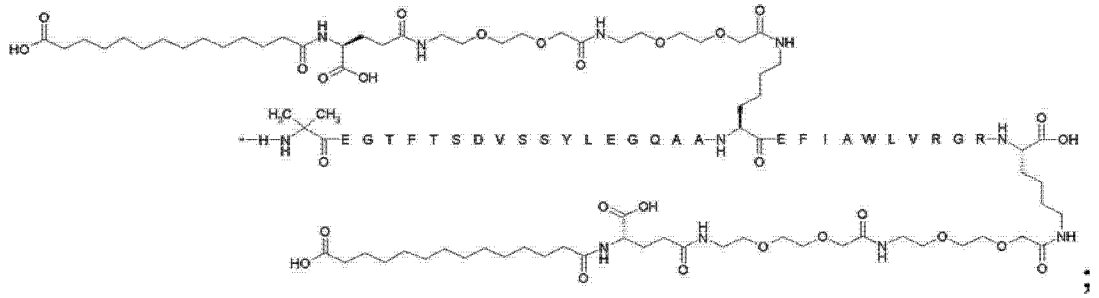
[0984]



；

[0985] (iv)$N^{\varepsilon 26}$-[2-(2-{2-[2-(2-{2-[(S)-4-羧基-4-(13-羧基十三烷酰基氨基)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], $N^{\varepsilon 37}$-[2-(2-{2-[2-(2-{2-[(S)-4-羧基-4-(13-羧基十三烷酰基氨基)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][Aib^8,Arg^{34},Lys^{37}]GLP-1(7-37)-肽：

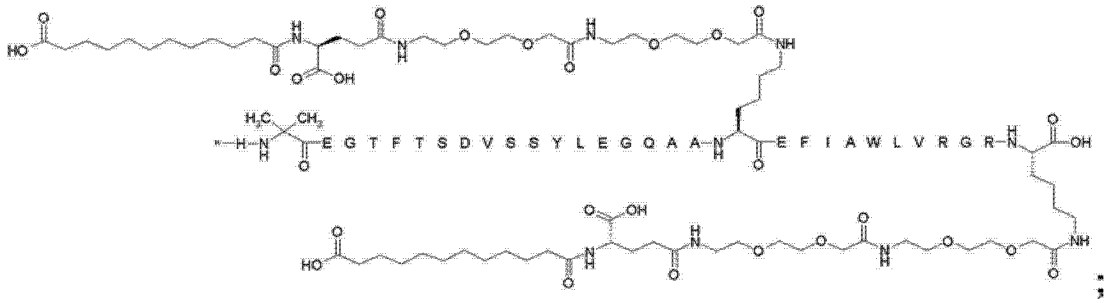
[0986]



；

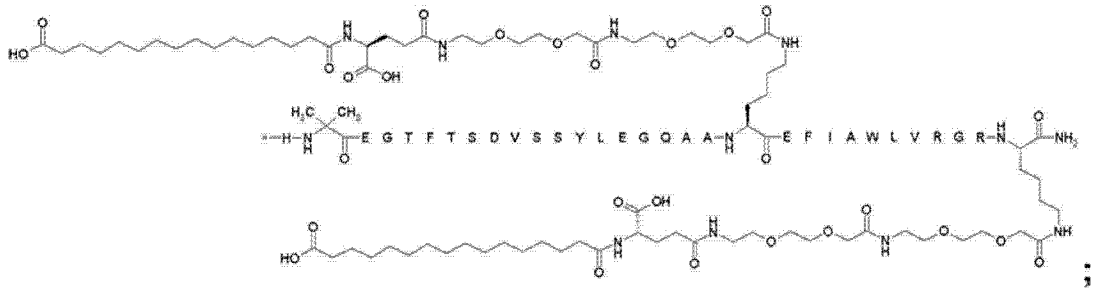
[0987] (v)$N^{\varepsilon 26}$-[2-(2-{2-[2-(2-{2-[(S)-4-羧基-4-(11-羧基十一烷酰基氨基)丁酰基氨基]乙氧基}乙氧基)乙酰基氨基]乙氧基}乙氧基)乙酰基], $N^{\varepsilon 37}$-[2-(2-{2-[2-(2-{2-[(S)-4-羧基-4-(11-羧基十一烷酰基氨基)丁酰基氨基]乙氧基}乙氧基)乙酰基氨基]乙氧基}乙氧基)乙酰基][Aib^8,Arg^{34},Lys^{37}]GLP-1(7-37)-肽：

[0988]



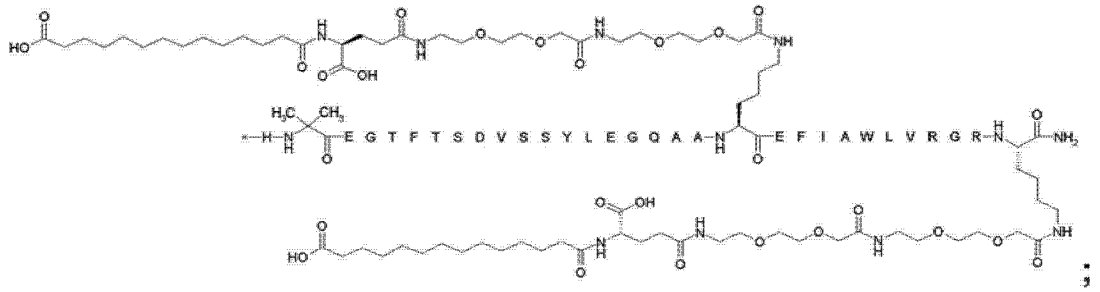
[0989] (vi)$N^{\varepsilon 26}$-[2-(2-{2-[2-(2-{2-[(S)-4-羧基-4-(15-羧基十五烷酰基氨基)丁酰基氨基]乙氧基}乙氧基)乙酰基氨基]乙氧基}乙氧基)乙酰基],$N^{\varepsilon 37}$-[2-(2-{2-[2-(2-{2-[(S)-4-羧基-4-(15-羧基十五烷酰基氨基)丁酰基氨基]乙氧基}乙氧基)乙酰基氨基]乙氧基}乙氧基)乙酰基][Aib^{8},Arg^{34},Lys^{37}]GLP-1(7-37)-肽酰胺：

[0990]



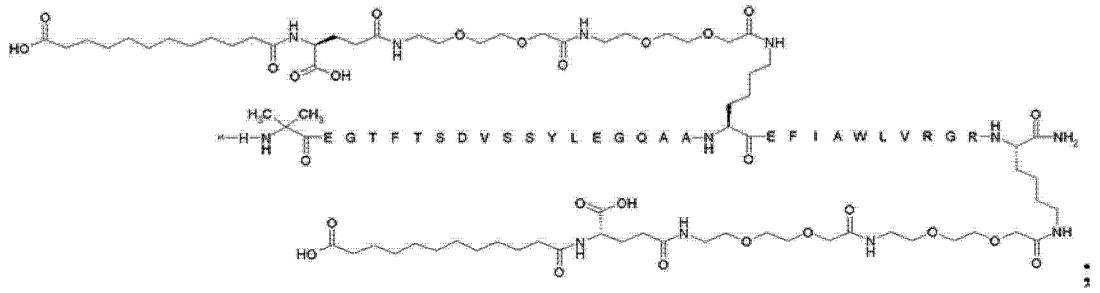
[0991] (vii)$N^{\varepsilon 26}$-[2-(2-{2-[2-(2-{2-[(S)-4-羧基-4-(13-羧基十三烷酰基氨基)丁酰基氨基]乙氧基}乙氧基)乙酰基氨基]乙氧基}乙氧基)乙酰基],$N^{\varepsilon 37}$-[2-(2-{2-[2-(2-{2-[(S)-4-羧基-4-(13-羧基十三烷酰基氨基)丁酰基氨基]乙氧基}乙氧基)乙酰基氨基]乙氧基}乙氧基)乙酰基][Aib^{8},Arg^{34},Lys^{37}]GLP-1(7-37)-肽酰胺：

[0992]



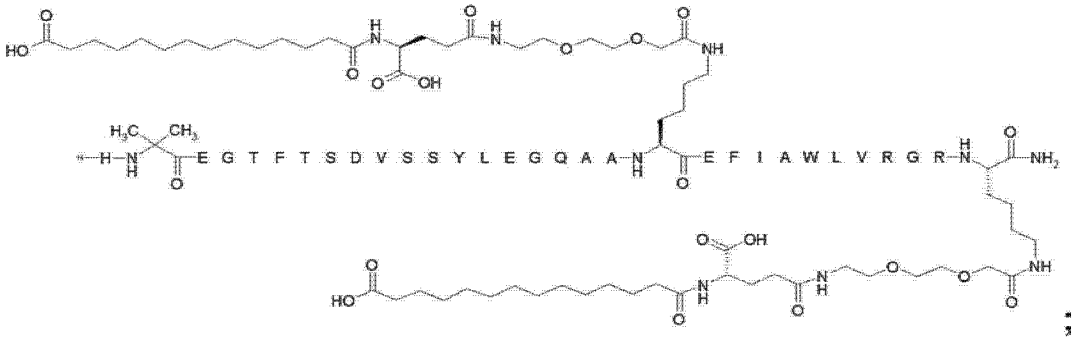
[0993] (iix)$N^{\varepsilon 26}$-[2-(2-{2-[2-(2-{2-[(S)-4-羧基-4-(11-羧基十一烷酰基氨基)丁酰基氨基]乙氧基}乙氧基)乙酰基氨基]乙氧基}乙氧基)乙酰基],$N^{\varepsilon 37}$-[2-(2-{2-[2-(2-{2-[(S)-4-羧基-4-(11-羧基十一烷酰基氨基)丁酰基氨基]乙氧基}乙氧基)乙酰基氨基]乙氧基}乙氧基)乙酰基][Aib^{8},Arg^{34},Lys^{37}]GLP-1(7-37)-肽酰胺：

[0994]



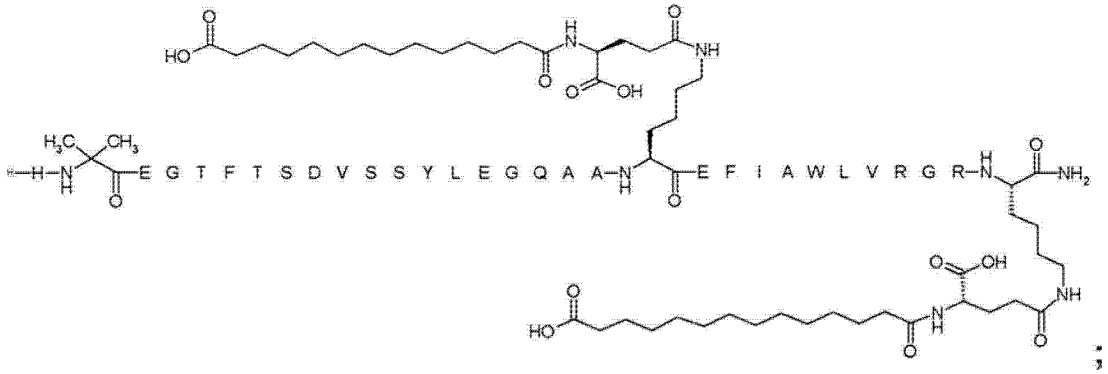
[0995] (ix)$N^{\varepsilon 26}$-[2-[2-(2-{2-[(S)-4-羧基-4-(13-羧基十三烷酰基氨基)丁酰基氨基]乙氧基}乙氧基)乙酰基],$N^{\varepsilon 37}$-[2-[2-(2-{2-[(S)-4-羧基-4-(13-羧基十三烷酰基氨基)丁酰基氨基]乙氧基}乙氧基)乙酰基][Aib^{8},Arg^{34},Lys^{37}]GLP-1(7-37)-肽酰胺：

[0996]



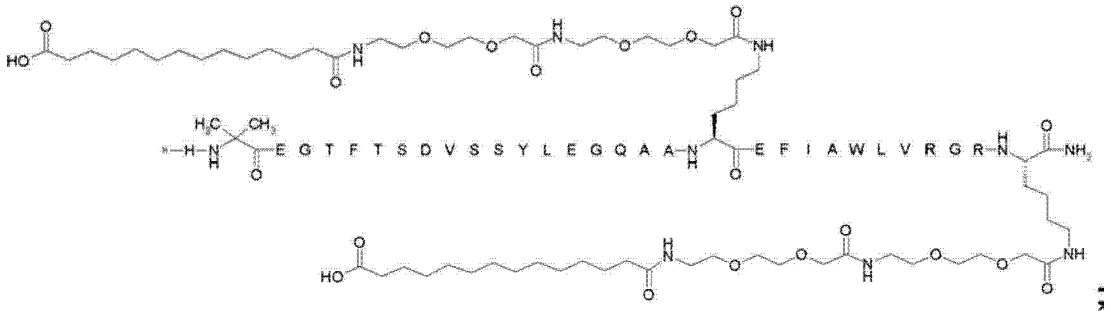
[0997] (x)$N^{\varepsilon 26}$-[2-{2-[(S)-4-羧基-4-(13-羧基十三烷酰基氨基)丁酰基氨基]],$N^{\varepsilon 37}$-[2-{2-[(S)-4-羧基-4-(13-羧基十三烷酰基氨基)丁酰基氨基]][Aib^{8},Arg^{34},Lys^{37}]GLP-1(7-37)-肽酰胺：

[0998]



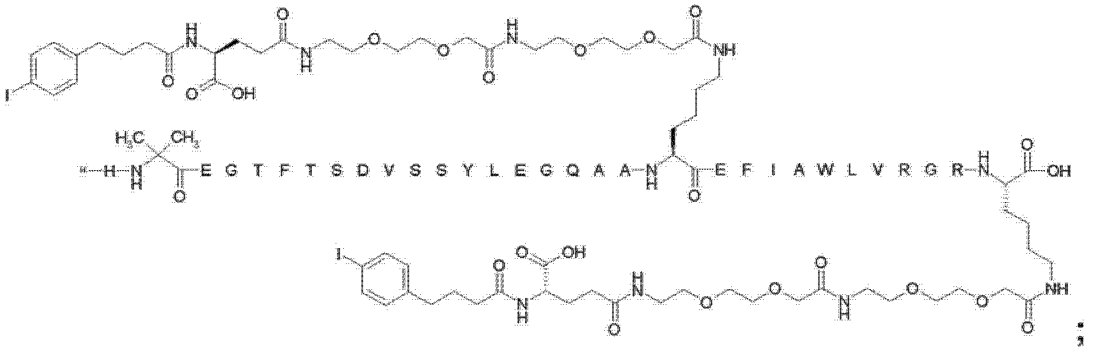
[0999] (xi)$N^{\varepsilon 26}$-(2-{2-[2-(2-{2-[2-(13-羧基-十三烷酰基氨基)乙氧基]乙氧基}乙酰基氨基)乙氧基]乙氧基}乙酰基),$N^{\varepsilon 37}$-(2-{2-[2-(2-{2-[2-(13-羧基-十三烷酰基氨基)乙氧基]乙氧基}乙酰基氨基)乙氧基]乙氧基}乙酰基)[Aib^{8},Arg^{34},Lys^{37}]GLP-1(7-37)-肽酰胺：

[1000]



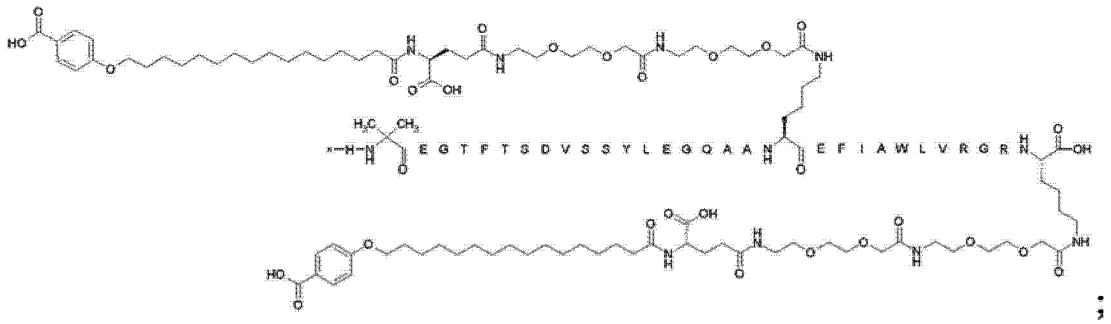
[1001] (xii)$N^{\varepsilon 26}$-{2-[2-(2-{2-[2-(2-{(S)-4-羧基-4-[4-(4-碘-苯基)-丁酰基氨基]-丁酰基氨基}-乙氧基)-乙氧基]-乙酰基氨基}-乙氧基)-乙氧基]-乙酰基},$N^{\varepsilon 37}$-{2-[2-(2-{2-[2-(2-{(S)-4-羧基-4-[4-(4-碘-苯基)-丁酰基氨基]-丁酰基氨基}-乙氧基)-乙氧基]-乙酰基氨基}-乙氧基)-乙氧基]-乙酰基}[Aib^8,Arg^{34},Lys^{37}]GLP-1(7-37)-肽：

[1002]



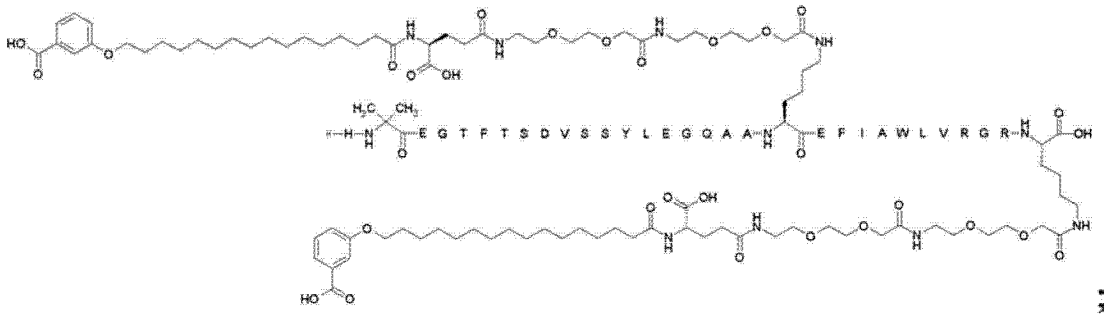
[1003] (xiii)$N^{\varepsilon 26}$-{2-[2-(2-{2-[2-(2-{(S)-4-羧基-4-[16-(4-羧基苯氧基)十六烷酰基氨基]丁酰基氨基}乙氧基)乙氧基]乙酰基氨基}乙氧基)乙氧基]乙酰基},$N^{\varepsilon 37}$-{2-[2-(2-{2-[2-(2-{(S)-4-羧基-4-[16-(4-羧基苯氧基)十六烷酰基氨基]丁酰基氨基}乙氧基)乙氧基]乙酰基氨基}乙氧基)乙氧基]乙酰基}-[Aib^8,Arg^{34},Lys^{37}]GLP-1(7-37)-肽：

[1004]



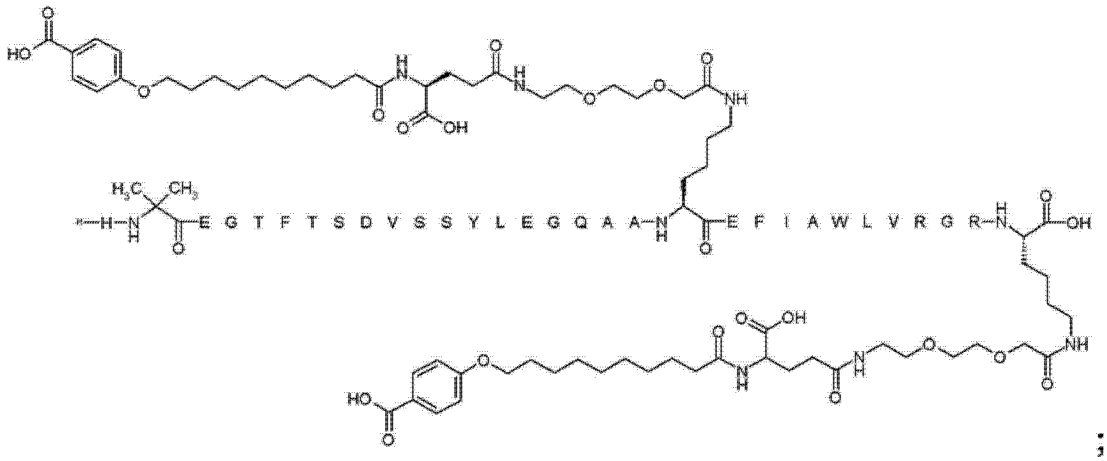
[1005] (xiv)$N^{\varepsilon 26}$-{2-[2-(2-{2-[2-(2-{(S)-4-羧基-4-[16-(3-羧基苯氧基)十六烷酰基氨基]丁酰基氨基}乙氧基)乙氧基]乙酰基氨基}乙氧基)乙氧基]乙酰基},$N^{\varepsilon 37}$-{2-[2-(2-{2-[2-(2-{(S)-4-羧基-4-[16-(3-羧基苯氧基)十六烷酰基氨基]丁酰基氨基}乙氧基)乙氧基]乙酰基氨基}乙氧基)乙氧基]乙酰基}-[Aib^8,Arg^{34},Lys^{37}]GLP-1(7-37)-肽：

[1006]



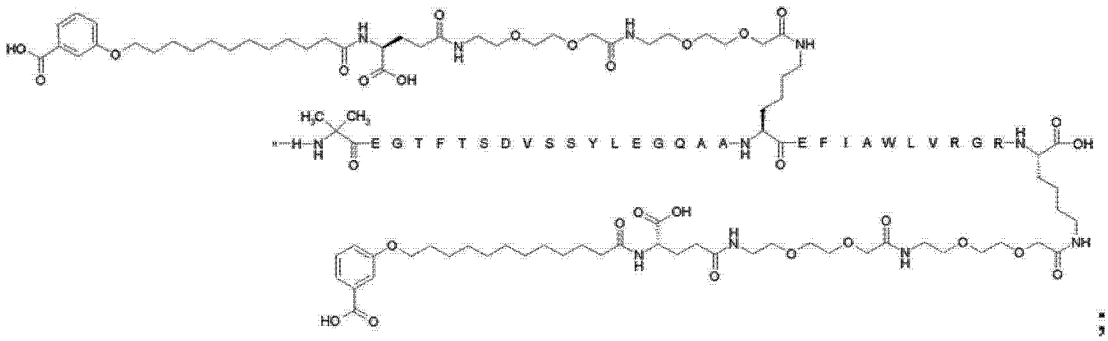
[1007] (xv)$N^{\varepsilon 26}$-{2-[2-(2-{(S)-4-羧基-4-[10-(4-羧基苯氧基)癸酰基氨基]丁酰基氨基}乙氧基)-乙氧基]乙酰基},$N^{\varepsilon 37}$-{2-[2-(2-{(S)-4-羧基-4-[10-(4-羧基苯氧基)癸酰基氨基]-丁酰基氨基}乙氧基)乙氧基]乙酰基}[Aib^{8},Arg^{34},Lys^{37}]GLP-1(7-37)-肽：

[1008]



[1009] (xvi)$N^{\varepsilon 26}$-{2-[2-(2-{2-[2-(2-{(S)-4-羧基-4-[12-(3-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},$N^{\varepsilon 37}$-{2-[2-(2-{2-[2-(2-{(S)-4-羧基-4-[12-(3-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}[Aib^{8},Arg^{34},Lys^{37}]GLP-1(7-37)-肽：

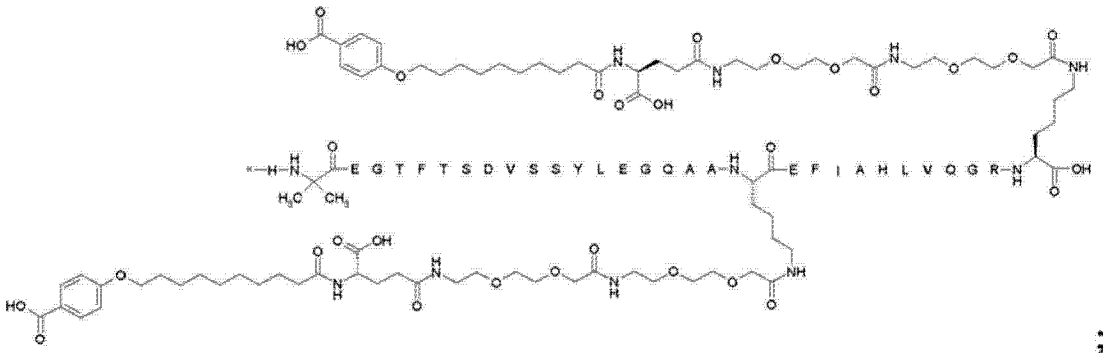
[1010]



[1011] (xvii)$N^{\varepsilon 26}$-[2-(2-[2-(2-[2-(2-[4-(10-(4-羧基苯氧基)癸酰基氨基)-4(S)-羧基丁酰基氨基]乙氧基)乙氧基]乙酰基氨基)乙氧基]乙氧基)乙酰基]-

[1012] $N^{\varepsilon 37}$-[2-(2-[2-(2-[2-(2-[4-(10-(4-羧基苯氧基)癸酰基氨基)-4(S)-羧基丁酰基氨基]乙氧基)乙氧基]乙酰基氨基)乙氧基]乙氧基)乙酰基][Aib^{8},His^{31},Gln^{34},Lys^{37}]GLP-1(7-37)-肽：

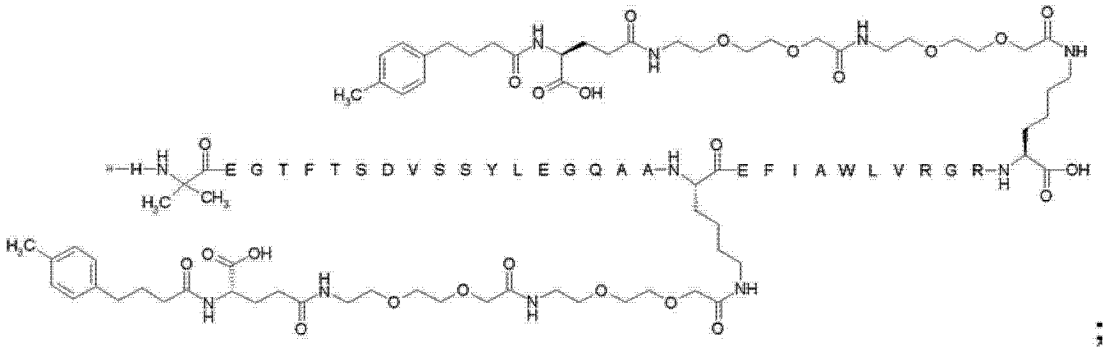
[1013]



;

[1014] (iixx)$N^{\varepsilon 26}$-{2-[2-(2-{2-[2-(2-{(S)-4-羧基-4-[4-(4-甲基苯基)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},$N^{\varepsilon 37}$-{2-[2-(2-{2-[2-(2-{(S)-4-羧基-4-[4-(4-甲基苯基)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}[Aib^8, Arg^{34}, Lys^{37}]GLP-1(7-37)-肽：

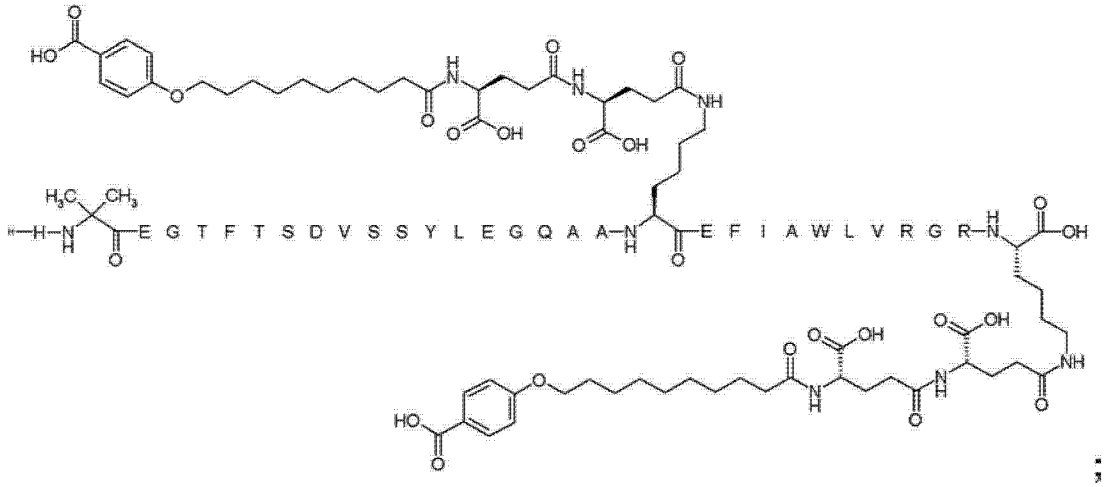
[1015]



;

[1016] (ixx)$N^{\varepsilon 26}$-((S)-4-羧基-4-{(S)-4-羧基-4-[10-(4-羧基苯氧基)-癸酰基氨基]丁酰基氨基}丁酰基),$N^{\varepsilon 37}$-((S)-4-羧基-4-{(S)-4-羧基-4-[10-(4-羧基苯氧基)-癸酰基氨基]丁酰基氨基}丁酰基)[Aib^8, Arg^{34}, Lys^{37}]GLP-1(7-37)-肽：

[1017]

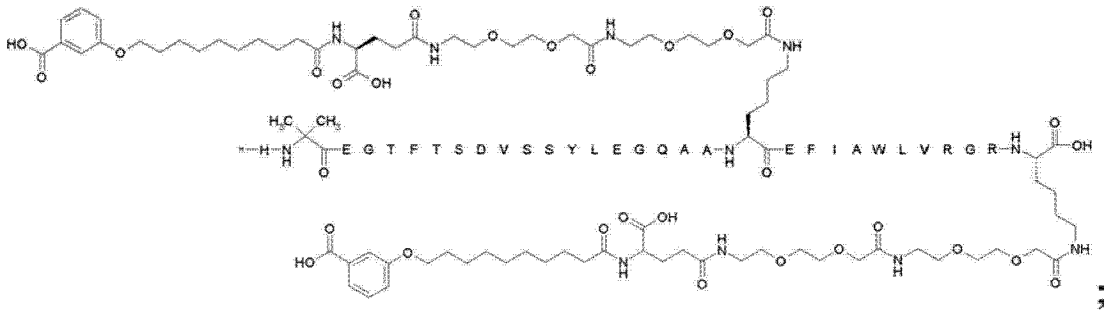


;

[1018] (xx)$N^{\varepsilon 26}$-{2-[2-(2-{2-[2-(2-{4-羧基-4-[10-(3-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},$N^{\varepsilon 37}$-{2-[2-(2-{2-[2-(2-{4-羧基-4-[10-(3-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｝[Aib^{8}, Arg^{34}, Lys^{37}]GLP-1(7-37)-肽：

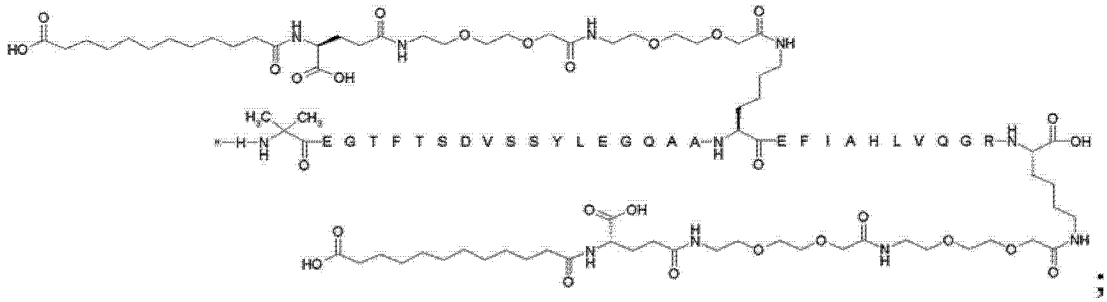
[1019]



；

[1020] (xxi)$N^{\varepsilon 26}$-[2-(2-{2-[2-(2-{2-[(S)-4-羧基-4-(11-羧基十一烷酰基氨基）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］，$N^{\varepsilon 37}$-[2-(2-{2-[2-(2-{2-[(S)-4-羧基-4-(11-羧基十一烷酰基氨基）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][Aib^{8}, His^{31}, Gln^{34}, Lys^{37}]GLP-1(7-37)-肽：

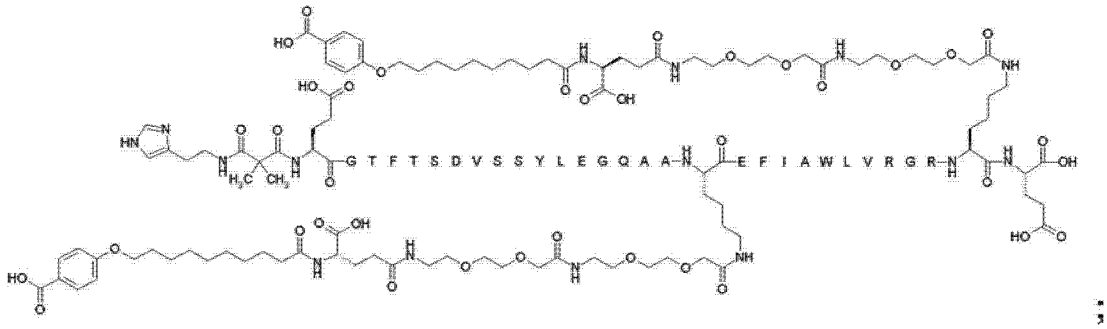
[1021]



；

[1022] (xxii)N^{9}-{2-[2-(1H-咪唑-4-基）乙基氨基甲酰基]-2-甲基丙酰基}，$N^{\varepsilon 26}$-{2-[2-(2-{2-[2-(2-{(S)-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}，$N^{\varepsilon 37}$-{2-[2-(2-{2-[2-(2-{(S)-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}[Arg^{34},Lys^{37}]GLP-1(9-37)Glu^{38}-肽：

[1023]

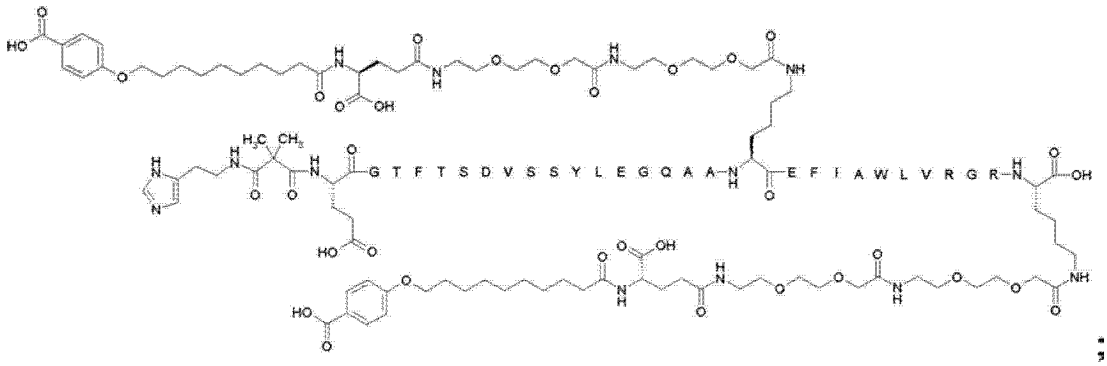


；

[1024] (xxiii)N^{9}-{2-[2-(1H-咪唑-4-基）乙基氨基甲酰基]-2-甲基丙酰基}-$N^{\varepsilon 26}$-{2-[2-(2-{2-[2-(2-{(S)-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}，$N^{\varepsilon 37}$-{2-[2-(2-{2-[2-(2-{(S)-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}[Arg^{34},Lys^{37}]GLP-1(9-37)-肽：

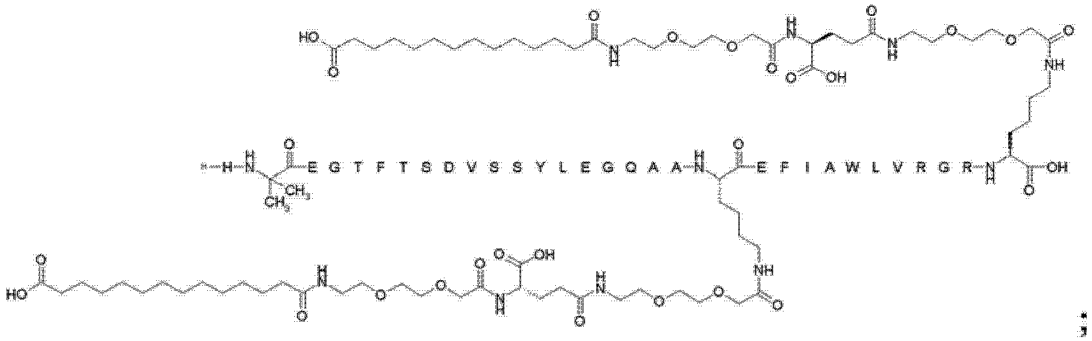
[1025]



；

[1026] (xxiv)N$^{\varepsilon 26}$-{2-[2-(2-{(S)-4-羧基-4-[2-(2-{2-[(13-羧基十三烷酰基氨基)]乙氧基}乙氧基)乙酰基氨基]丁酰基氨基}乙氧基)乙氧基]乙酰基},N$^{\varepsilon 37}$-{2-[2-(2-{(S)-4-羧基-4-[2-(2-{2-[(13-羧基十三烷酰基氨基)]乙氧基}乙氧基)乙酰基氨基]丁酰基氨基}乙氧基)乙氧基]乙酰基}-[Aib^{8},Arg^{34},Lys^{37}]GLP-1(7-37)-肽：

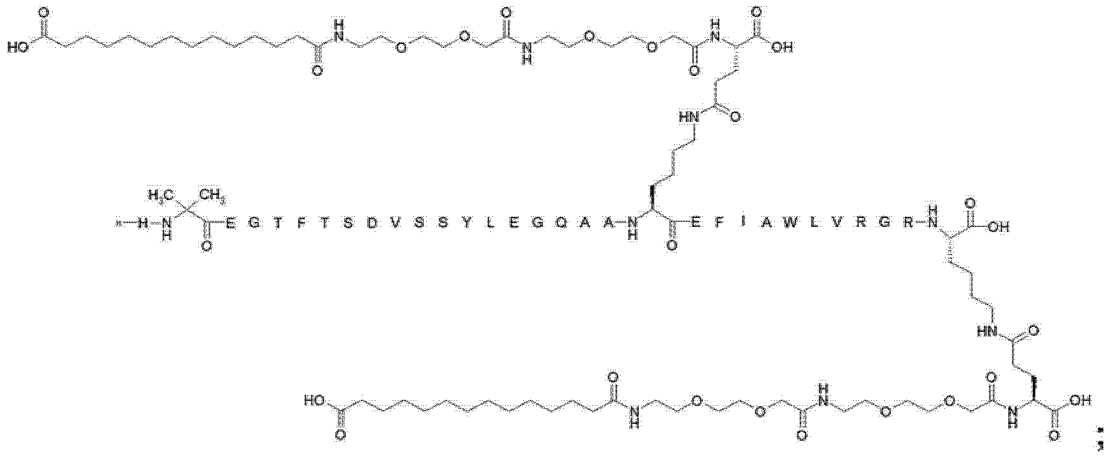
[1027]



；

[1028] (xxv)N$^{\varepsilon 26}$-[(S)-4-羧基-4-{2-[2-(2-[2-(2-{2-[(13-羧基十三烷酰基氨基)]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$^{\varepsilon 37}$-[(S)-4-羧基-4-{2-[2-(2-[2-(2-{2-[(13-羧基十三烷酰基氨基)]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][Aib^{8},Arg^{34},Lys^{37}]GLP-1(7-37)-肽：

[1029]

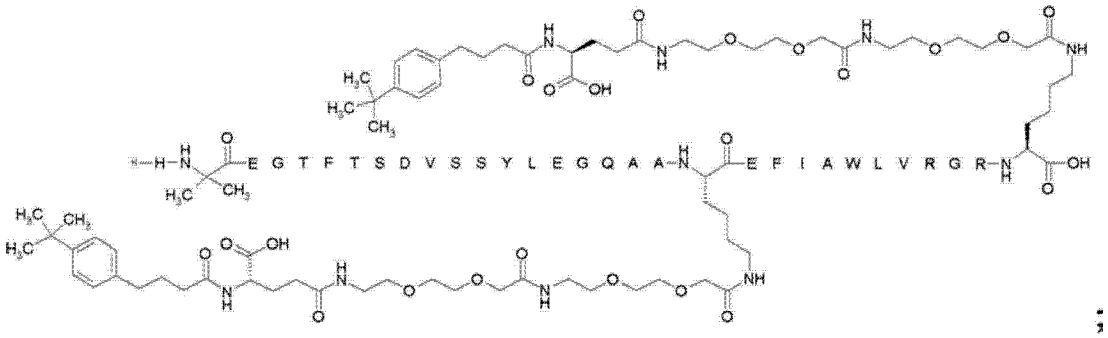


；

[1030] (xxvi)N$^{\varepsilon 26}$-{2-[2-(2-{2-[2-(2-{(S)-4-[4-(4-叔丁基-苯基)-丁酰基氨

基]-4-羧基-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$^{\varepsilon 37}$-{2-[2-(2-{2-[2-(2-{(S)-4-[4-(4-叔丁基-苯基)-丁酰基氨基]-4-羧基-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}[Aib^{8},Arg^{34},Lys^{37}]GLP-1(7-37)-肽：

[1031]

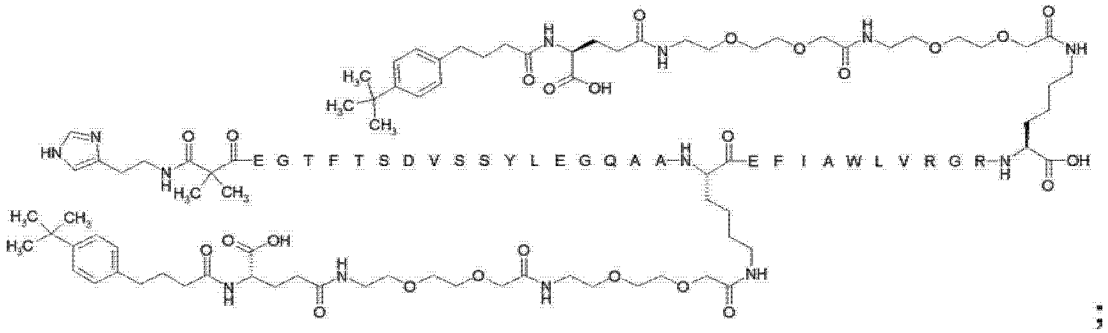


；

[1032] 和

[1033] (xxvii)N^{9}-{2-[2-(1H-咪唑-4-基)-乙基氨基甲酰基]-2-甲基丙酰基}-N$^{\varepsilon 26}$-{2-[2-(2-{2-[2-(2-{(S)-4-[4-(4-叔丁基苯基)丁酰基氨基]-4-羧基丁酰基氨基}乙氧基)乙氧基]乙酰基氨基}乙氧基)乙氧基]乙酰基},N$^{\varepsilon 37}$-{2-[2-(2-{2-[2-(2-{(S)-4-[4-(4-叔丁基苯基)丁酰基氨基]-4-羧基丁酰基氨基}乙氧基)乙氧基]乙酰基氨基}乙氧基)乙氧基]乙酰基}[Arg^{34},Lys^{37}]GLP-1(9-37)-肽：

[1034]



；

[1035] 或衍生物(i)-(xxvii)中任一项的药学上可接受的盐、酰胺或酯。

[1036] 84.用作药物的实施方案1-83中任一项的衍生物。

[1037] 85.实施方案1-83中任一项的衍生物，用于治疗和/或预防所有形式的糖尿病和相关疾病，例如进食障碍、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。

[1038] 86.实施方案1-83中任一项的衍生物在制备用于以下目的的药物中的用途：治疗和/或预防所有形式的糖尿病和相关疾病，例如进食障碍、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。

[1039] 87.一种方法，所述方法用于治疗或预防所有形式的糖尿病和相关疾病，例如进食障碍、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；即通过给予药物活性量的实施方案1-83中任一项的衍生物。

实施例

[1040] 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）。

[1041] 所述实施例用于说明本发明。

[1042] 缩略语

[1043] 以下缩略语用于下文，按照字母顺序排列：

[1044] Aib：氨基异丁酸（α-氨基异丁酸）

[1045] API：活性药物成分

[1046] AUC：曲线下面积

[1047] BG：血糖

[1048] BHK 幼仓鼠肾

[1049] BW：体重

[1050] Bom：苄氧基甲基

[1051] Boc：叔丁氧基羰基

[1052] BSA：牛血清白蛋白

[1053] Bzl：苄基

[1054] Clt：2-氯三苯甲基

[1055] 可力丁 (collidine)： 2,4,6-三甲基吡啶

[1056] DCM：二氯甲烷

[1057] Dde：1-(4,4-二甲基-2,6-二氧代亚环己基）乙基

[1058] DIC：二异丙基碳二亚胺

[1059] DIPEA：二异丙基乙胺

[1060] DMAP：4-二甲氨基吡啶

[1061] DMEM：Dulbecco 氏改良 Eagle 氏培养基 (DMEM)

[1062] EDTA：乙二胺四乙酸

[1063] EGTA：乙二醇四乙酸

[1064] FCS：胎牛血清

[1065] Fmoc：9-芴基甲氧基羰基

[1066] HATU：六氟合磷酸 (O-(7-氮杂苯并三唑-1-基)-1,1,3,3-四甲基脲鎓）

[1067] HBTU：六氟合磷酸 (2-(1H-苯并三唑-1-基-)-1,1,3,3-四甲基脲鎓）

[1068] HEPES：4-(2-羟乙基)-1-哌嗪乙磺酸

[1069] HFIP 1,1,1,3,3,3-六氟-2-丙醇或六氟异丙醇

[1070] HOAt：1-羟基-7-氮杂苯并三唑

[1071] HOBt：1-羟基苯并三唑

[1072] HPLC：高效液相色谱

[1073] HSA：人血清白蛋白

[1074] IBMX：3-异丁基-1-甲基黄嘌呤

[1075] Imp：咪唑丙酸（也称为 des-氨基组氨酸，DesH)

[1076] i.v. 静脉内

[1077] ivDde：1-(4,4-二甲基-2,6-二氧代亚环己基)-3-甲基丁基

[1078] IVGTT：静脉内葡萄糖耐受试验

[1079] LCMS： 液相色谱-质谱

[1080] LYD： Landrace Yorkshire Duroc

[1081] MALDI-MS：参见 MALDI-TOF MS

[1082] MALDI-TOF MS：基质-辅助激光解吸/电离飞行时间质谱

[1083] MeOH： 甲醇

[1084] Mmt： 4-甲氧基三苯甲基

[1085] Mtt： 4-甲基三苯甲基

[1086] NMP： N-甲基吡咯烷酮

[1087] OBz： 苯甲酰基酯

[1088] OEG： 8-氨基-3,6-二氧杂辛酸

[1089] OPfp： 五氟苯氧基

[1090] OPnp： 对硝基苯氧基

[1091] OSu： O-琥珀酰亚胺基酯（羟基琥珀酰亚胺酯）

[1092] OSuc： 2,5-二氧代-吡咯烷-1-基

[1093] OtBu： 叔丁酯

[1094] Pbf： 2,2,4,6,7-五甲基二氢苯并呋喃-5-磺酰基

[1095] PBS： 磷酸缓冲盐水

[1096] PD： 药效动力学

[1097] Pen/Strep：青霉素/链霉素

[1098] PK： 药物动力学

[1099] RP： 反相

[1100] RP-HPLC：反相高效液相色谱

[1101] RT： 室温

[1102] Rt： 保留时间

[1103] s.c.：经皮下

[1104] SD： 标准差

[1105] SEC-HPLC：大小排阻高效液相色谱

[1106] SEM： 均值的标准误差

[1107] SPA： 闪烁接近测定

[1108] SPPS：固相肽合成

[1109] tBu： 叔丁基

[1110] TFA： 三氟乙酸

[1111] TIS： 三异丙基硅烷

[1112] TLC： 薄层色谱

[1113] Tos： 甲苯磺酰基（或 pare-甲苯磺酰基）

[1114] Tris：三（羟甲基）氨基甲烷或 2-氨基-2-羟甲基-丙烷-1,3-二醇

[1115] Trt：三苯基甲基或三苯甲基

[1116] Trx：氨甲环酸

[1117] UPLC：超高效液相色谱

[1118] 制备方法

[1119] A. 通用方法

[1120] 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酰基树脂连接的情况下，连接可以是模块 (modular)，使用 SPPS 和适当保护的结构单元 (building block) 例如但不限于 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- 羧基壬氧基) 苯甲酸叔丁酯。

[1121] 1. 树脂结合的肽的合成

[1122] SPPS 方法 A

[1123] SPPS 方法 A 是指被保护的肽酰基树脂的合成，使用 Fmoc 化学，在 Applied Biosystems 433 肽合成仪 (也称为 ABI433A 合成仪) 上，规模为 0.25mmol 或 1.0mmol，使用制造商的 FastMoc UV 方案，其采用在 NMP 中的 HBTU 或 HATU 介导的偶联，和 UV 监测 Fmoc 保护基的脱保护。

[1124] 合成肽酰胺所用的原料树脂是合适的 Rink-Amide 树脂 (对于肽酰胺)，或 (对于具有羧基 C- 端的肽) 合适的 Wang 树脂或合适的氯三苯甲基树脂。合适的树脂是例如由 Novabiochem 市售的。

[1125] SPPS 方法 B

[1126] SPPS 方法 B 是指被保护的肽酰基树脂的合成，使用 Fmoc 化学，在基于微波的 Liberty 肽合成仪 (CEM Corp.，North Carolina) 上。合适的树脂是来自 Novabiochem 的预先装载的低载量 Wang 树脂 (例如，低载量 Fmoc-Lys(Mtt)-Wang 树脂，0.35mmol/g)。Fmoc- 脱保护用 5％哌啶的 NMP，在至多 70 或 75℃。偶联化学是 DIC/HOAt 的 NMP。将氨基酸 /HOAt 溶液 (0.3M/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，0.10mmol/2.5ml、0.25mmol/5ml、1mmol/15ml。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 10min。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 25min，然后加热到 70 或 75℃达 5min。某些氨基酸，例如但不限于 Aib，是“双偶联”，是指第一偶联（例如 5min，75℃）之后，树脂被排干并加入更多试剂（氨基酸，HOAt 和 DIC），所得混合物再次加热（例如 5min，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）六氟异丙醇过 20 分钟，再用 DCM 和 NMP 洗涤，除去 Mtt 基团。可通过手动合成（参见 SPPS 方法 D）或通过在如上所述的 Liberty 肽合成仪上的一个或多个自动化步骤，使用被适当保护的结构单元（参见通用方法），任选包括手动偶联，进行赖氨酸的化学修饰。

[1127] SPPS 方法 D

[1128] SPPS 方法 D 是指被保护的肽酰基树脂的合成，使用手动 Fmoc 化学。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 0.25mmol。偶联化学是 DIC/HOAt/collidine 的 NMP，4-10 倍摩尔过量。偶联条件是在室温下 1-6h。Fmoc- 脱保护进行如下：用 20-25％哌啶的 NMP (3x20ml，各 10min)，再用 NMP 洗涤 (4x20mL)。Dde- 或 ivDde- 脱保护进行如下：用 2％肼的 NMP(2x20ml，各 10min)，再用 NMP 洗涤 (4x20ml)。Mtt- 或 Mmt- 脱保护进行如下：用 2％ TFA 和 2-3％ TIS 的 DCM(5x20ml，各 10min)，再用 DCM(2x20ml)，10％ MeOH 和 5％ DIPEA 的 DCM(2x20ml) 和 NMP(4x20ml) 洗涤，或者通过用净六氟异丙醇 (5x20ml，各 10min) 处理，再通过如上洗涤。可将白蛋白结合部分和 / 或接头与肽连接，即通过树脂结合的肽的酰化或在未经保护的肽溶液中酰化（参见下述途径）。在将白蛋白结合部分和 / 或接头与被保护的肽酰基树脂连接的情况下，连接可以是模块，使用 SPPS 和适当保护的结构单元（参见通用方法）。

[1129] 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例如十八烷二酸单 -(2,5- 二氧代 - 吡咯烷 -1- 基）酯 (Ebashi 等 EP511600，4 摩尔等量，相对于树脂结合的肽）溶于 NMP(25mL)，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。

[1130] 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、10ml)。加入活化剂例如 HOBt(4 摩尔等量，相对于树脂）和 DIC(4 摩尔等量，相对于树脂）并将溶液搅拌 15min。将溶液加入到树脂中并加入 DIPEA(4 摩尔等量，相对于树脂）。将树脂在室温下振摇 2-24 小时。树脂用 NMP(2x20ml)、NMP/DCM(1 ： 1，2x20ml) 和 DCM(2x20ml) 洗涤。

[1131] 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例如十八烷二酸单 -(2,5- 二氧代 - 吡咯烷 -1- 基）酯 (Ebashi 等 EP511600，1-1.5 摩尔等量，相对于肽）溶于有机溶剂例如乙腈、THF、DMF、DMSO 或溶于水 / 有机溶剂的混合物 (1-2ml) 中，并向肽的水溶液 (10-20ml) 中加入 10 摩尔等量的 DIPEA。在保护基在白蛋白结合残基例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、水和三异丙基硅烷的混合物 (90 ： 5 ： 5) 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。

[1132] SPPS 方法 E

[1133] SPPS 方法 E 是指通过 Fmoc 化学的肽合成，在来自 Protein Technologies(Tucson，AZ 85714U.S.A.）的 Prelude 固相肽合成仪上。合适的树脂是来自 Novabiochem 的预先装载的低载量 Wang 树脂（例如，低载量 fmoc-Lys(Mtt)-Wang 树脂，0.35mmol/g)。Fmoc- 脱保护用 25％哌啶的 NMP，2x10min。偶联化学是 DIC/HOAt/collidine 的 NMP。将氨基酸 /

HOAt 溶液 (0.3M/NMP,摩尔过量 3-10 倍）加入到树脂中,再加入等摩尔的 DIC(3M/NMP) 和 collidine(3M/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,0.10mmol/2.5ml、0.25mmol/5ml。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”,是指第一偶联（例如,60min) 之后,树脂被排干并加入更多试剂（氨基酸、HOAt、DIC 和 collidine),并让所得混合物再次反应（例如,60min)。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) 中过 3x 10 分钟,再用 DCM、20％哌啶和 NMP 洗涤,除去 Mtt 基团。可通过手动合成（参见 SPPS 方法 D) 或通过在如上所述的 Prelude 肽合成仪上的一个或多个自动化步骤,使用被适当保护的结构单元（参见通用方法),进行赖氨酸的化学修饰。

[1134] 2. 从树脂上裂解肽并纯化

[1135] 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（例如 30％乙酸）中并通过标准 RP-HPLC,在 C18,5μM 柱上纯化,使用乙腈 / 水 /TFA。通过 UPLC,MALDI 和 LCMS 方法的组合来分析流份,并将合适流份合并和冻干。

[1136] 3. 检测和表征的方法

[1137] LCMS 方法

[1138] LCMS 方法 1(LCMS1)

[1139] 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。

[1140] 洗脱液 :

[1141] A :0.1％三氟乙酸 / 水

[1142] B :0.1％三氟乙酸 / 乙腈

[1143] 柱 :Zorbax 5u,300SB-C3,4.8x50mm

[1144] 梯度 :25％ -95％乙腈,在 15min 内

[1145] LCMS 方法 2(LCMS2)

[1146] 从 Perkin Elmer Series 200HPLC 系统中洗脱之后,使用 Perkin Elmer Sciex API 3000 质谱仪来鉴定样品质量。

[1147] 洗脱液 :

[1148] A :0.05％三氟乙酸 / 水

[1149] B :0.05％三氟乙酸 / 乙腈

[1150] 柱 :Waters Xterra MS C-18X 3mm id 5μm

[1151] 梯度 :5％ -90％乙腈,在 7.5min 内,流速 1.5ml/min

[1152] LCMS 方法 3(LCMS3)

[1153] 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。

[1154] 洗脱液：

[1155] A：0.1％三氟乙酸／水

[1156] B：0.1％三氟乙酸／乙腈

[1157] 柱：Phenomenex，Jupiter C450X4.60mm id 5μm

[1158] 梯度：10％ -90％ B，在 7.5min 内，流速 1.0ml/min

[1159] LCMS 方法 4(LCMS4)

[1160] 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：

[1161] A：0.1％甲酸／水

[1162] B：0.1％甲酸／乙腈

[1163] 通过将合适体积（优选 2-10μl）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。

[1164] UPLC 条件、检测器设置和质谱仪设置为：

[1165] 柱：Waters Acquity UPLC BEH，C-18，1.7μm，2.1mmx50mm

[1166] 梯度：线性 5％ -95％乙腈，在 4.0min（或者 8.0min）内，流速 0.4ml/min

[1167] 检测：214nm（类似于从 TUV（可调的 UV 检测器）输出）

[1168] MS 电离方式：API-ES

[1169] 扫描：100-2000amu（或者 500-2000amu），步骤 0.1amu

[1170] UPLC 和 HPLC 方法

[1171] 方法 05B51

[1172] 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，1.7um，2.1mmx150mm 柱，40℃，采集 214nm 和 254nm 处的紫外检测结果。

[1173] 将 UPLC 系统连接到含有以下成分的 2 个洗脱液池：

[1174] A：0.2M Na_2SO_4，0.04M H_3PO_4，10％ CH_3CN(pH3.5)

[1175] B：70％ CH_3CN，30％ H_2O

[1176] 使用以下线性梯度：60％ A，40％ B 至 30％ A，70％ B，在 8 分钟内，流速 0.40ml/min。

[1177] 方法 05 B7 1

[1178] 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，2.1mmx150mm 柱，40℃，采集 214nm 和 254nm 处的紫外检测结果。

[1179] 将 UPLC 系统连接到含有以下成分的 2 个洗脱液池：

[1180] A：0.2M Na_2SO_4，0.04M H_3PO_4，10％ CH_3CN(pH3.5)

[1181] B：70％ CH_3CN，30％ H_2O

[1182] 使用以下线性梯度：80％ A，20％ B 至 40％ A，60％ B，在 8 分钟内，流速 0.40ml/min。

[1183] 方法 04 A2 1

[1184] 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，2.1mmx150mm 柱，40℃，采集 214nm 和 254nm 处的紫外检测结果。

[1185] 将 UPLC 系统连接到含有以下成分的 2 个洗脱液池：

[1186] A：90％ H_2O，10％ CH_3CN，0.25M 碳酸氢铵

[1187] B：70％ CH_3CN，30％ H_2O

[1188] 使用以下线性梯度：90％ A，10％ B 至 60％ A，40％ B，在 16 分钟内，流速 0.40ml/min。

[1189] 方法 04_A3_1

[1190] 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，2.1mmx150mm 柱，40℃，采集 214nm 和 254nm 处的紫外检测结果。

[1191] 将 UPLC 系统连接到含有以下成分的 2 个洗脱液池：

[1192] A：90％ H_2O，10％ CH_3CN，0.25M 碳酸氢铵

[1193] B：70％ CH_3CN，30％ H_2O

[1194] 使用以下线性梯度：75％ A，25％ B 至 45％ A，55％ B，在 16 分钟内，流速 0.40ml/min。

[1195] 方法 04_A4_1

[1196] 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，2.1mmx150mm 柱，40℃，采集 214nm 和 254nm 处的紫外检测结果。

[1197] 将 UPLC 系统连接到含有以下成分的 2 个洗脱液池：

[1198] A：90％ H_2O，10％ CH_3CN，0.25M 碳酸氢铵

[1199] B：70％ CH_3CN，30％ H_2O

[1200] 使用以下线性梯度：65％ A，35％ B 至 25％ A，65％ B，在 16 分钟内，流速 0.40ml/min。

[1201] 方法 08_B2_1

[1202] 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，2.1mmx150mm 柱，40℃，采集 214nm 和 254nm 处的紫外检测结果。

[1203] 将 UPLC 系统连接到含有以下成分的 2 个洗脱液池：

[1204] A：99.95％ H_2O，0.05％ TFA

[1205] B：99.95％ CH_3CN，0.05％ TFA

[1206] 使用以下线性梯度：95％ A，5％ B 至 40％ A，60％ B，在 16 分钟内，流速 0.40ml/min。

[1207] 方法 08_B4_1

[1208] 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，2.1mmx150mm 柱，40℃，采集 214nm 和 254nm 处的紫外检测结果。

[1209] 将 UPLC 系统连接到含有以下成分的 2 个洗脱液池 :

[1210] A :99.95% H_2O,0.05% TFA

[1211] B :99.95% CH_3CN,0.05% TFA

[1212] 使用以下线性梯度 :95% A,5% B 至 95% A,5% B,在 16 分钟内,流速 0.40ml/min。

[1213] 方法 05_B10_1

[1214] UPLC(方法 05_N10_1) :使用配置有双波段检测器的 WatersUPLC 系统进行 RP- 分析。使用 ACQUITY UPLC BEH130, C18,130Å, 1.7um,2.1mmx150mm 柱,40℃,采集 214nm 和 254nm 处的紫外检测结果。

[1215] 将 UPLC 系统连接到含有以下成分的 2 个洗脱液池 :

[1216] A :0.2M Na_2SO_4,0.04M H_3PO_4,10% CH_3CN(pH3.5)

[1217] B :70% CH_3CN,30% H_2O

[1218] 使用以下线性梯度 :40% A,60% B 至 20% A,80% B,在 8 分钟内,流速 0.40ml/min。

[1219] 方法 01_A4_2

[1220] 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 Symmetry 300C18,5um,3.9mmx150mm 柱,42℃,采集 214nm 和 254nm 处的紫外检测结果。

[1221] 将 HPLC 系统连接到含有以下成分的 3 个洗涤液池 :

[1222] A :100% H_2O, B :100% CH_3CN, C :1% 三氟乙酸 /H_2O.

[1223] 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 1.0ml/min。

[1224] 方法 09_B2_1

[1225] 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,2.1mmx150mm 柱,40℃,采集 214nm 和 254nm 处的紫外检测结果。

[1226] 将 UPLC 系统连接到含有以下成分的 2 个洗脱液池 :

[1227] A :99.95% H_2O,0.05% TFA ;B :99.95% CH_3CN,0.05% TFA.

[1228] 使用以下线性梯度 :95% A,5% B 至 40% A,60% B,在 16 分钟内,流速 0.40ml/min。

[1229] 方法 09_B4_1

[1230] 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,2.1mmx150mm 柱,40℃,采集 214nm 和 254nm 处的紫外检测结果。

[1231] 将 UPLC 系统连接到含有以下成分的 2 个洗脱液池 :A :99.95% H_2O,0.05% TFA ;B : 99.95% CH_3CN,0.05% TFA.

[1232] 使用以下线性梯度 :95% A,5% B 至 5% A,95% B,在 16 分钟内,流速 0.40ml/min。

[1233] 方法 05_B8_1

[1234] 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 BEH130, C18,130Å, 1.7um,2.1mmx150mm 柱,40℃,采集 214nm 和

254nm 处的紫外检测结果。

[1235] 将 UPLC 系统连接到含有以下成分的 2 个洗脱液池 :A :0.2MNa$_2$SO$_4$,0.04M H$_3$PO$_4$,10% CH$_3$CN(pH3.5) ;B :70% CH$_3$CN,30% H$_2$O.

[1236] 使用以下线性梯度 :50% A,50% B 至 20% A,80% B,在 8 分钟内,流速 0.40ml/min。

[1237] 方法 10_B14_1

[1238] UPLC(方法 10_B14_1) :使用配置有双波段检测器的 WatersUPLC 系统进行 RP- 分析。使用 ACQUITY UPLC BEH130, C18,130Å, 1.7um,2.1mmx150mm 柱,50℃,采集 214nm 和 254nm 处的紫外检测结果。

[1239] 将 UPLC 系统连接到含有以下成分的 2 个洗脱液池 :A :99.95% H$_2$O,0.05% TFA ;B :99.95% CH$_3$CN,0.05% TFA.

[1240] 使用以下线性梯度 :70% A,30% B 至 40% A,60% B,在 12 分钟内,流速 0.40ml/min。

[1241] 方法 04_A6_1

[1242] UPLC(方法 04_A6_1) :使用配置有双波段检测器的 WatersUPLC 系统进行 RP- 分析。使用 ACQUITY UPLC BEH130, C18,130Å, 1.7um,2.1mmx150mm 柱,40℃,采集 214nm 和 254nm 处的紫外检测结果。

[1243] 将 UPLC 系统连接到含有以下成分的 2 个洗脱液池 :A :10mMTRIS,15mM 硫酸铵,80% H$_2$O,20%,pH7.3 ;B :80% CH$_3$CN,20% H$_2$O。使用以下线性梯度 :95% A,5% B 至 10% A,90% B,在 16 分钟内,流速 0.35ml/min。

[1244] 方法 01_R4_1

[1245] 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 3mmx150mm 3.5umC-18Symmetry 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%) 的水的线性梯度洗脱,在 15 分钟内,流速 1ml/min。

[1246] MALDI-MS 方法

[1247] 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)。使用 α- 氰基 -4- 羟基肉桂酸的基质。

[1248] NMR 方法

[1249] 使用 Brucker Avance DPX 300(300MHz),用四甲基硅烷作为内标,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 ;quart,四重峰 ;quint,五重峰 ;m,多重峰 ;和 br = 宽。

[1250] B. 中间体的合成

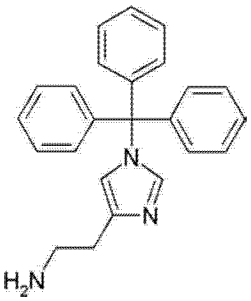
[1251] 1. 脂肪二酸的单酯的合成

[1252] 将 C12,C14,C16 和 C18 的二酸与含 Boc- 酸酐,DMAP 和叔丁醇的甲苯回流过夜,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。

[1253] 2.2-(1- 三苯甲基 -1H- 咪唑 -4- 基)- 乙胺的合成

[1254] Chem. 13 :

[1255]



[1256] 将含组胺二盐酸盐 (20.47g ;0.111mol) 和三乙胺 (48mL ;0.345mol) 的纯甲醇 (400mL) 在室温下搅拌 10min。在 30min 内,在 0℃,滴加含三氟乙酸乙酯 (14.6mL ;0.122mol) 的甲醇 (30mL)。反应混合物在室温下搅拌 3.5 小时,然后将其真空蒸发至干。将所得残余物溶于二氯甲烷 (450mL) 并加入三乙胺 (31mL ;0.222mol)。然后分次加入三苯甲基氯 (34.1g ;0.122mol),所得混合物在室温下搅拌过夜。将氯仿 (400mL) 和水 (600mL) 倒入反应混合物。分离水层和用氯仿 (3x400mL) 萃取。合并的有机层经无水硫酸镁干燥。除去溶剂,所得浅褐色固体与己烷 (1000mL) 一起研磨。悬浮液经过滤得到 2,2,2- 三氟 -N-[2-(1- 三苯甲基 -1H- 咪唑 -4- 基)- 乙基]- 乙酰胺,为白色固体。

[1257] 得率 :45.54g(91%)。

[1258] ^{1}H NMR 谱 (300MHz, $CDCl_3$, δ_H) :8.44(bs,1H) ;7.43(s,1H) ;7.41-7.33(m,9H) ;7.19-7.10(m,6H) ;6.65(s,1H) ;3.66(q, J = 5.9Hz,2H) ;2.79(t, J = 5.9Hz,2H)。

[1259] 将上述酰胺 (45.54g ;0.101mmol) 溶于四氢呋喃 (1000mL) 和甲醇 (1200mL)。加入氢氧化钠 (20.26g ;0.507mol) 水溶液 (500mL)。所得混合物在室温下搅拌 2 小时并将其真空浓缩。所得残余物在氯仿 (1200mL) 和水 (800mL) 之间分离。水层用氯仿 (3x 400mL) 萃取。合并有机层和经无水硫酸镁干燥。蒸发溶剂后得到褐色油状物,将其真空干燥 3 天,得到标题产物,为浅褐色固体。

[1260] 得率 :32.23g(90%)。

[1261] 总得率 :82%。

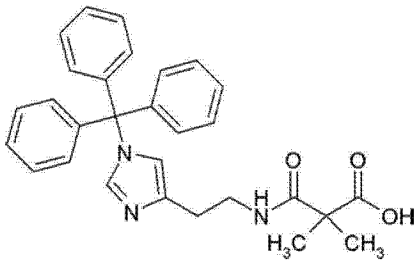
[1262] M.p. :111-113℃ .

[1263] ^{1}H NMR 谱 (300MHz, $CDCl_3$, δ_H) :7.39(d, J = 1.3,1H) ;7.38-7.32(m,9H) ;7.20-7.12(m,6H) ;6.61(s,1H) ;3.00(t, J = 6.6Hz,2H) ;2.70(t, J = 6.5Hz,2H) ;1.93(bs,2H)。

[1264] 3.2,2- 二甲基 -N-[2-(1- 三苯甲基 -1H- 咪唑 -4- 基)- 乙基]- 丙酰胺酸的合成

[1265] Chem. 14 :

[1266]



[1267] 将米氏酸 (Meldrum's acid)(5.52g,38.3mmol)、碳酸钾 (26.5g,191mmol) 和甲基碘 (7.15mL,115mmol) 的乙腈 (75mL) 混合物在密封管中在 75℃加热 7 小时。将所得混合物冷却至室温,用二氯甲烷 (300mL) 稀释,过滤,滤液经真空蒸发至干。加入乙酸乙酯 (75mL)、己烷 (75mL) 和水 (50mL) 并分离各相。有机层用 10%硫代硫酸钠水溶液 (50mL) 和水 (50mL) 洗涤 ;经无水硫酸镁干燥和真空除去溶剂,得到 2,2,5,5- 四甲基 -[1,3] 二噁烷 -4,6- 二酮,为白色固体。

[1268] 得率 :6.59g(79%)。

[1269] R_F(SiO_2,氯仿 / 乙酸乙酯,98 ： 2) :0.60.

[1270] ^{1}H NMR 谱 (300MHz, $CDCl_3$, δ_H) :1.76(s,6H) ;1.65(s,6H)。

[1271] 在 50min 内,在 75℃,将如上所述制备的 2-(1- 三苯甲基 -1H- 咪唑 -4- 基)- 乙胺 (5.00g,14.2mmol) 溶液和含三乙胺 (9.86mL,70.7mmol) 的甲苯 (80mL) 滴加到上述二酮化合物 (3.65g,21.2mmol) 的甲苯 (40mL) 溶液中。所得混合物在该温度中再搅拌 3 小时 (直到在 TLC 上检测到开始的胺),再将其蒸发至干。将所得残余物重溶于氯仿 (300mL) 并用 10%柠檬酸水溶液 (200mL) 洗涤。水相用氯仿 (2x60mL) 萃取 ;合并氯仿相,经无水硫酸镁干燥和真空除去溶剂。所得残余物与热氯仿 (140mL) 一起研磨 ;加入己烷 (70mL) 并将所得悬浮液在室温下搅拌过夜。滤出固体,用氯仿 / 己烷混合物 (1 ： 1,2x50mL) 洗涤并真空干燥,得到标题化合物。

[1272] 得率 :6.73g(88%)。

[1273] M.p. :161-162℃ .

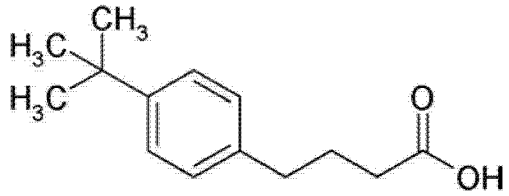
[1274] R_F(SiO_2,氯仿 / 甲醇,85 ： 15) :0.40.

[1275] ^{1}H NMR 谱 (300MHz, DMSO-d_6, δ_H) :12.45(bs,1H) ;7.66(t, J = 5.1Hz,1H) ;7.57-7.31(m,9H) ;7.26(s,1H) ;7.20-7.02(m,6H) ;6.66(s,1H) ;3.25(m,2H) ;2.57(t, J = 7.3Hz,2H) ;1.21(s,6H)。

[1276] 4.4-(4- 叔丁基 - 苯基)- 丁酸的合成

[1277] Chem.15 :

[1278]



[1279] 将氯化铝粉末 (80.0g,600mmol) 分次加入到叔丁基苯 (40.0g,300mmol) 和琥珀酸酐 (26.7g,267mmol) 和 1,1,2,2- 四氯乙烷 (100mL) 的搅拌混合物中。在所有氯化铝都加入后,将所得混合物倒入冰 (500mL) 和浓盐酸 (100mL) 的混合物中。分离有机层,用水 (500mL) 洗涤并蒸馏掉溶剂。将固体残余物溶于热 15%碳酸钠水溶液 (1000mL),过滤,冷却,所得酸用盐酸 (酸化至 pH = 1) 沉淀。粗制酸经过滤,风干并从苯 (500mL) 中重结晶,得到 4-(4- 叔丁基 - 苯基)-4- 氧代 - 丁酸,为无色晶体。

[1280] 得率 :36.00g(58%)。

[1281] M.p. :117-120℃ .

[1282] ^{1}H NMR 谱 (300MHz, $CDCl_3$, δ_H) :7.93(dm, J = 8.3Hz,2H) ;7.48(dm, J = 8.3Hz,

2H) ;3.30(t, J = 6.6Hz,2H) ;2.81(t, J = 6.6Hz,2H) ;1.34(s,9H)。

[1283] 将上述酸 (36.0g,154mmol)、氢氧化钾 (25.8g,462mmol)、水合肼 (20mL,400mmol) 和乙二醇 (135mL) 的混合物回流 3 小时,然后蒸馏直到蒸气温度升至 196-198℃。再回流 14 小时之后,让所得混合物稍微冷却,然后倒入冷水 (200mL)。所得混合物用浓盐酸酸化 (至 pH = 1) 和用二氯甲烷 (2x400mL) 萃取。合并有机萃取液,经无水硫酸镁干燥,真空除去溶剂,所得残余物通过柱色谱法纯化 (硅胶 60A,0.060-0.200mm ;洗脱液 :己烷 / 乙酸乙酯 10 : 1-6 : 1),得到标题化合物,为灰白色固体。

[1284] 得率 :16.25g(48%)。

[1285] M.p. :59-60℃ .

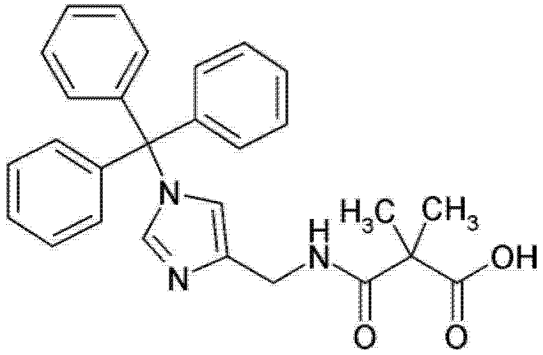
[1286] R_F(SiO_2, 乙酸乙酯) :0.60.

[1287] ^{1}H NMR 谱 (300MHz, $CDCl_3$, δ_H) :7.31(dm, J = 8.1Hz,2H) ;7.12(dm, J = 8.1Hz, 2H) ;2.64(t, J = 7.6Hz,2H) ;2.38(t, J = 7.4Hz,2H) ;1.96(m,2H) ;1.31(s,9H)。

[1288] 5.2,2- 二甲基 -N-(1- 三苯甲基 -1H- 咪唑 -4- 基甲基)- 丙酰胺酸的合成

[1289] Chem.16 :

[1290]



[1291] 将羟胺盐酸盐 (15.9g,229mmol) 加入到 4(5)- 咪唑甲醛 (20.0g,209mmol) 和碳酸钠 (12.1g,114mmol) 的水 (400mL) 溶液中,所得溶液在室温下搅拌过夜。所得混合物蒸发至 100mL 并在冰浴中冷却。通过过滤分离所得固体,滤液浓缩至 40mL。冷却至 0℃之后,得到另一份晶体。合并所得固体 (23g) 并从乙醇 (大约 160mL) 中重结晶,得到咪唑 -4(5)- 甲醛肟,为无色晶体。

[1292] 得率 :15.98g(69%)。

[1293] ^{1}H NMR 谱 (300MHz, 丙 酮 -d_3+D_2O, δ_H) :7.78(bs,1H) ;7.74(d, J = 0.9Hz,1H) ; 7.43(s,1H)。

[1294] 在 0℃,在氩气下,将乙酰氯 (51.0mL,718mmol) 滴加到甲醇 (670mL) 中。30min 之后,除去冷却浴,加入上述肟 (16.0g,144mmol),再加入披钯碳 (5wt%,6.1g)。所得混合物在大气压下氢化 17 小时,然后将其通过硅藻土 (Celite) 过滤并蒸发溶剂,得到纯 4-(氨基甲基)- 咪唑二盐酸盐,为无色晶体。

[1295] 得率 :23.92g(98%)。

[1296] ^{1}H NMR 谱 (300MHz, D_2O, δ_H) :8.72(s,1H) ;7.60(s,1H) ;4.33(s,2H)。

[1297] 将上述含胺的二盐酸盐 (18.9g ;111mmol) 和三乙胺 (93mL ;667mmol) 的甲醇 (1000mL) 在室温下搅拌 10min。在 40min 内,在 0℃,滴加含三氟乙酸乙酯 (13.3mL ; 111mmol) 的甲醇 (30mL)。反应混合物在室温下搅拌 18 小时,然后将其真空蒸发至干。所

得残余物溶于无水二氯甲烷(2000mL)并加入三乙胺(31mL;222mmol)。然后加入三苯甲基氯(31.6g;113mmol),所得混合物在室温下搅拌过夜。将氯仿(1000mL)和水(1000mL)倒入反应混合物中。分离水层和用氯仿(2x300mL)萃取。合并的有机层经无水硫酸镁干燥。除去溶剂,将所得浅褐色固体与己烷(1000mL)一起研磨。悬浮液经过滤得到2,2,2-三氟-N-(1-三苯甲基-1H-咪唑-4-基甲基)-乙酰胺,为白色固体。

[1298] 得率:46.59g(96%)。

[1299] R_F(SiO_2,二氯甲烷/甲醇95:5):0.35.

[1300] ^1H NMR谱(300MHz,DMSO-d_6,δ_H):9.77(t,J=5.7Hz,1H);7.47-7.34(m,9H);7.33(d,J=1.5Hz,1H);7.13-7.03(m,6H);6.80(d,J=0.8Hz,1H);4.25(d,J=5.7Hz,2H)。

[1301] 将上述酰胺(46.6g;107mmol)溶于四氢呋喃(600mL)和乙醇(310mL)中。加入含氢氧化钠(21.4g;535mmol)的水溶液(85mL)。混合物在室温下搅拌5小时,然后将其真空浓缩。所得残余物在氯仿(1600mL)和水(800mL)之间分离。水层用氯仿(4x200mL)萃取。合并有机层并经无水硫酸镁干燥。蒸发溶剂后得到(1-三苯甲基-1H-咪唑-4-基)-甲胺,为灰白色固体。

[1302] 得率:36.30g(100%)。

[1303] ^1H NMR谱(300MHz,$CDCl_3$,δ_H):7.38(d,J=1.3,1H);7.36-7.30(m,9H);7.18-7.10(m,6H);6.69(m,1H);3.77(s,2H);1.80(bs,2H)。

[1304] 在45min内,在75℃,将上述胺(10.0g,29.5mmol)和三乙胺(20.5mL,147mmol)的甲苯(220mL)溶液滴加到2,2,5,5-四甲基-[1,3]二噁烷-4,6-二酮(3.65g,21.2mmol)的甲苯(80mL)溶液中。所得混合物在该温度中再搅拌3小时(直到在TLC上检测到开始的胺),再将其蒸发至干。将所得残余物重溶于氯仿(500mL)并用10%柠檬酸水溶液(300mL)洗涤。水相用氯仿(100mL)萃取;合并氯仿相,用水(150mL)洗涤,经无水硫酸镁干燥和真空除去溶剂。所得残余物通过快速柱色谱法纯化(硅胶Fluka 60,二氯甲烷/甲醇98:2至9:1)并从氯仿/己烷混合物中结晶,得到标题化合物,为浅褐色晶体。

[1305] 得率:9.80g(73%)。

[1306] M.p.:174-175℃.

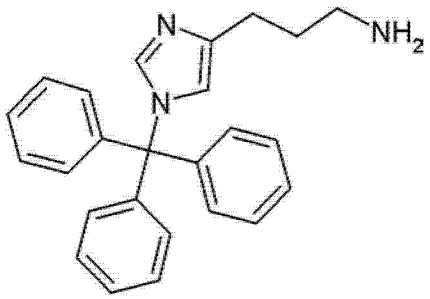
[1307] R_F(SiO_2,氯仿/甲醇,85:15):0.35.

[1308] ^1H NMR谱(300MHz,$CDCl_3$,δ_H):8.45(t,J=5.8Hz,1H);7.53(s,1H);7.40-7.28(m,9H);7.14-7.01(m,6H);6.84(s,1H);4.39(d,J=5.8Hz,2H);1.44(s,6H)。

[1309] 6.3-(1-三苯甲基-1H-咪唑-4-基)-丙胺的合成

[1310] Chem.17:

[1311]



[1312] 在 1 小时内，将含 3-(1- 三苯甲基 -4- 咪唑基) 丙酸乙酯 (93.0g，223mmol) 的四氢呋喃 / 乙醚 (1 ： 1，100mL) 滴加到氢化铝锂 (17.0g，446mmol) 的悬浮液中。所得混合物回流 3 小时，再在冰 / 水冷却下用水 (100mL)，20％氢氧化钠 (100mL) 和水 (100mL) 处理，过滤，所得固体用四氢呋喃洗涤。有机相经无水碳酸钾干燥，过滤和蒸发，得到 3-(1- 三苯甲基 -4- 咪唑基) 丙醇，为白色固体。

[1313] 得率 ：68.0g(82％)。

[1314] M.p. ：127-129℃ .

[1315] ^{1}H NMR 谱 (300MHz，$CDCl_3$，δ_H) ：7.40-7.24(m，10H) ；7.17-7.06(m，6H) ；6.55(s，1H) ；3.72(t，J ＝ 5.3Hz，2H) ；2.68(t，J ＝ 6.6Hz，2H) ；1.86(m，2H)。

[1316] 在 1 小时内，在 0 ℃，将甲烷磺酰氯 (8mL，104mmol) 滴加到上述醇 (32.0g，86.8mmol) 的二氯甲烷 (400mL) 和三乙胺 (15.5mL) 的溶液中。所得混合物无需冷却而再搅拌 1hr ；然后将其用 5％碳酸氢钠洗涤并经无水硫酸镁干燥。在 30℃真空蒸发二氯甲烷，残余油状甲磺酸酯直接用于下一步骤。

[1317] 得率 ：31.2g(80％)。

[1318] ^{1}H NMR 谱 (300MHz，$CDCl_3$，δ_H) ：7.37-7.30(m，10H) ；7.16-7.09(m，6H) ；6.58(s，1H) ；4.24(t，J ＝ 6.3Hz，2H) ；2.96(s，3H) ；2.67(m，2H) ；2.10(m，2H)。

[1319] 将上述甲磺酸酯 (30.0g，67mmol)、邻苯二甲酰亚胺钾 (18.0g，100mmol)、碘化钠 (4.0g，26.7mmol) 和二甲基甲酰胺 (200mL) 的混合物在环境温度下搅拌过夜，然后用水 (2L) 和苯 (2L) 处理。有机相经无水硫酸镁干燥，过滤并蒸发溶剂，得到残余物，将其从苯中重结晶得到 1- 三苯甲基 -4-(3- 苯二酰亚胺丙基) 咪唑，为白色固体。

[1320] 得率 ：17.2g(52％)。

[1321] M.p. ：211-214℃ .

[1322] ^{1}H NMR 谱 (300MHz，$CDCl_3$，δ_H) ：7.83(m，2H) ；7.72(m，2H) ；7.39-7.27(m，10H) ；7.18-7.07(m，6H) ；6.60(d，J ＝ 0.9Hz，1H) ；3.72(t，J ＝ 7.4Hz，2H) ；2.60(t，J ＝ 7.5Hz，2H) ；1.99(m，2H)。

[1323] 在 60℃，将上述咪唑衍生物 (26.6g，53.5mmol) 溶于乙醇 (300mL) 和四氢呋喃 (150mL) 中，加入水合肼 (50g，1mol) 并将所得溶液回流 6 小时，然后在 70℃加热过夜。所得固体经过滤除去，滤液用 25％氨水溶液 (2.5l) 和二氯甲烷 (2.5L) 处理。有机层经无水碳酸钾干燥并蒸发，得到残余物，将其通过柱色谱法在硅胶上纯化 (Fluka 60，氨 / 甲醇饱和的氯仿)，得到标题化合物，为白色固体。

[1324] 得率 ：14.2g(72％)。

[1325] M.p. ：112-113℃ .

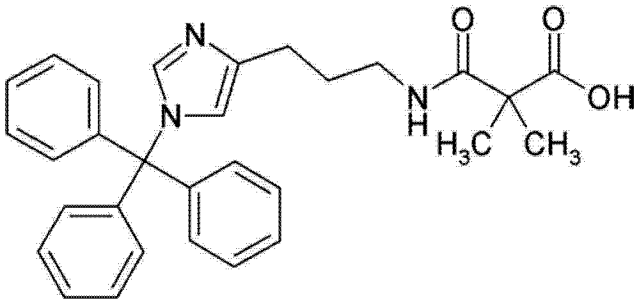
[1326] R_F(SiO_2，氨 / 甲醇饱和的氯仿 9 ： 1) ：0.30.

[1327] ^{1}H NMR 谱 (300MHz，$CDCl_3$，δ_H) ：7.37-7.28(m，10H) ；7.18-7.09(m，6H) ；6.53(d，J ＝ 1.3Hz，1H) ；2.74(t，J ＝ 6.9Hz，2H) ；2.59(t，J ＝ 7.4Hz，2H) ；1.95(bs，2H) ；1.78(m，2H)。

[1328] 7.2，2- 二甲基 -N-[3-(1- 三苯甲基 -1H- 咪唑 -4- 基)- 丙基]- 丙酰胺酸的合成

[1329] Chem.18 ：

[1330]



[1331] 让 2- 氯三苯甲基氯树脂 (2.3g,3.0mmol) 在 DCM 中膨胀 20min 并过滤。将二甲基丙二酸 (2 当量 ;6.0mmol ;793mg) 溶于 DCM ： DMF 1 ： 1(10mL) 并加入到树脂中,再加入 DIPEA(6 当量 ;18.0mmol ;3.14mL) 和 DCM(10mL)。树脂在室温下振摇过夜。过滤树脂并用 DCM ： MeOH ： DIPEA(17 ： 2 ： 1)、DCM、NMP og DCM(每次 2x25mL) 洗涤。让树脂在 DMF 中膨胀 20min 并过滤。加入 HOAt(3 当量 ;9.0mmol ;1.23g)、DIC(3 当量 ;9.0mmol ;1.40mL) 和 DMF(25mL),将树脂在室温下振摇 90min。过滤树脂并加入 3-(1- 三苯甲基 -1H- 咪唑 -4- 基)- 丙胺 (1.8 当量 ;5.40mmol ;1.84g)、DIPEA(4 当量 ;6.0mmol ;2.09mL) 和 DMF(10mL)。将树脂振摇 2 天。过滤树脂并用 NMP(5x20mL) 和 DCM(10x20mL) 洗涤。将 2,2,2- 三氟乙醇 / 二氯甲烷 1 ： 1(20mL) 加入到树脂中并将其振摇 2 小时。树脂用 2,2,2- 三氟乙醇 / 二氯甲烷 1 ： 1(10mL) 洗涤,收集合并的滤液并真空浓缩,得到标题化合物。

[1332] 得率 :600mg(41％)。

[1333] LCMS4 :m/z ＝ 482(M+1)

[1334] UPLC (方法 02B44) :Rt ＝ 8.07min

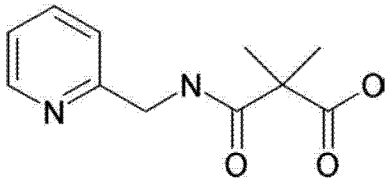
[1335] 1H NMR 谱 (300MHz,DMSO-d_6, δ_H) :7.36-7.44(9H,m),7.07-7.12(6H,m),6.62(1H,s),3.02-3.09(2H,q),2.38-2.43(2H,t),1.61-1.69(2H,m),1.26(6H,s)。

[1336] 8.2,2- 二甲基 -N-[3-(1- 三苯甲基 -1H- 咪唑 -4- 基)- 丙基]- 丙酰胺酸的合成

[1337] 2,2- 二甲基 -N- 吡啶 -2- 基甲基丙酰胺酸的合成

[1338] Chem.19 :

[1339]



[1340] 让氯三苯甲基氯树脂 (2.3g,3.0mmol) 在 DCM 中膨胀 20min 并过滤。将二甲基丙二酸 (2 当量 ;6.0mmol ;793mg) 溶于 DCM ： NMP 1 ： 1(10mL) 并加入到树脂中,再加入 DIPEA(6 当量 ;18.0mmol ;3.14mL) 和 DCM(10mL)。树脂在室温下振摇过夜。过滤树脂并用 DCM ： MeOH ： DIPEA(17 ： 2 ： 1)、DCM、NMP og DCM(每次 2x25mL) 洗涤。让树脂在 NMP 中膨胀 20min 并过滤。加入 HOAt(3 当量 ;9.0mmol ;1.23g)、DIC(3 当量 ;9.0mmol ;1.40mL) 和 NMP(25mL),将树脂在室温下振摇 90min。过滤树脂并加入 2-(氨基甲基) 吡啶 (2 当量 ;6mmol ;659mg)、DIPEA(4 当量 ;6.0mmol ;2.09mL) 和 NMP(10mL)。将树脂振摇过夜。过滤树脂并用 NMP(5x20mL) 和 DCM(10x20mL) 洗涤。将 TFA/TIS/ 水 (95 ： 2.5 ： 2.5 ;30mL) 加入到树脂中并将其振摇 1 小时,过滤和真空浓缩,得到标题化合物。

[1341] 得率 :600mg(41％)。

[1342] LCMS4 :m/z = 223(M+1)

[1343] UPLC(方法 08_B4_1) :Rt = 1.79min

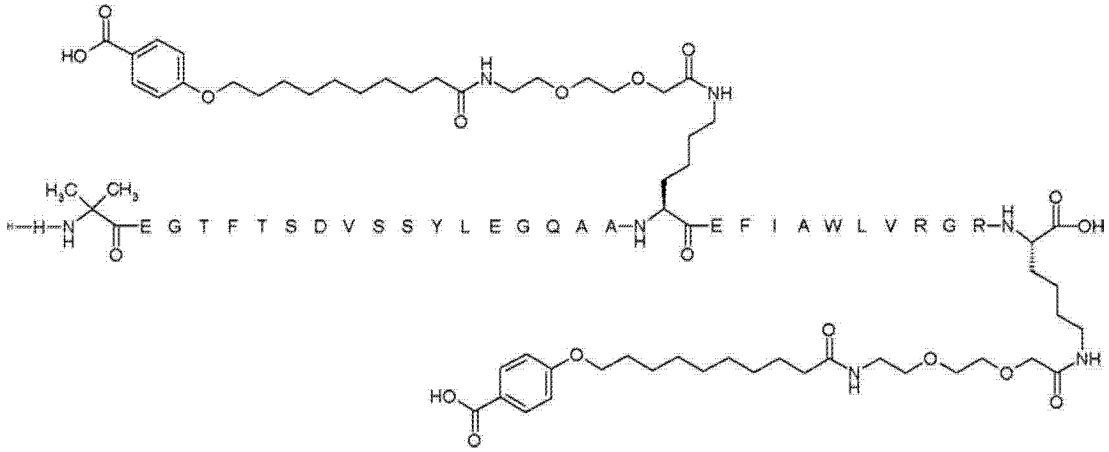
[1344] B. 本发明化合物的合成

[1345] 实施例 1

[1346] $N^{\varepsilon 26}$-[2-(2-{2-[10-(4- 羧基苯氧基) 癸酰基氨基] 乙氧基 } 乙氧基) 乙酰基], $N^{\varepsilon 37}$-[2-(2-{2-[10-(4- 羧基苯氧基) 癸酰基氨基] 乙氧基 } 乙氧基) 乙酰基]-[Aib^{8}, Arg^{34}, Lys^{37}]GLP-1(7-37)- 肽

[1347] Chem. 20 :

[1348]



[1349] 制备方法 :SPPS 方法 B, 开始于低载量 Fmoc-Lys(Mtt)-Wang 树脂。Fmoc-Lys(Mtt)-OH 用于位置 26,Boc-His(trt)-OH 用于位置 7。Mtt 用 HFIP 除去, 然后采用双偶联法, 在 Liberty 肽合成仪上将 8-(9- 芴基甲氧基羰基 - 氨基)-3,6- 二氧杂辛酸 (购自 Iris Biotech) 和 4-(9- 羧基 - 壬氧基)- 苯甲酸叔丁酯 (按照 WO 2006/082204 实施例 25, 步骤 2 所述而制备) 偶联。

[1350] UPLC(方法 04_A3_1) :10.51min

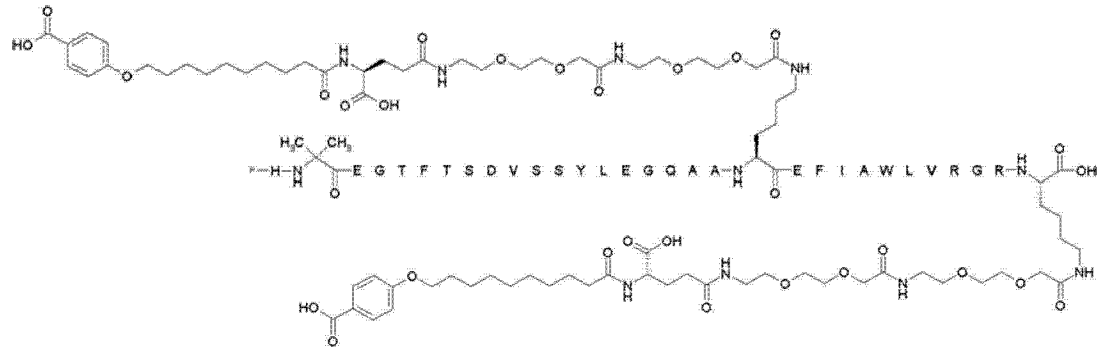
[1351] LCMS4 :m/z = 1085.2$(M+4H)^{4+}$, 1447.3$(M+3H)^{3+}$

[1352] 实施例 2

[1353] $N^{\varepsilon 26}${2-[2-(2-{2-[2-(2-{(S)-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 }, $N^{\varepsilon 37}$-{2-[2-(2-{2-[2-(2-{(S)-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 }-[Aib^{8}, Arg^{34}, Lys^{37}] GLP-1(7-37)- 肽

[1354] Chem. 21 :

[1355]



[1356] 制备方法:SPPS 方法 B，开始于低载量 Fmoc-Lys(Mtt)-Wang 树脂。Fmoc-Lys(Mtt)-OH 用于位置 26，Boc-His(Trt)-OH 用于位置 7。Mtt 用 HFIP 除去，，然后采用双偶联法，在 Liberty 肽合成仪上将 8-(9- 芴基甲氧基羰基 - 氨基)-3,6- 二氧杂辛酸（购自 Iris Biotech)、Fmoc-Glu-OtBu 和 4-(9- 羧基 - 壬氧基)- 苯甲酸叔丁酯（按照 WO2006/082204 实施例 25，步骤 2 所述而制备）偶联。

[1357] UPLC(方法 04_A3_1) :7.19min

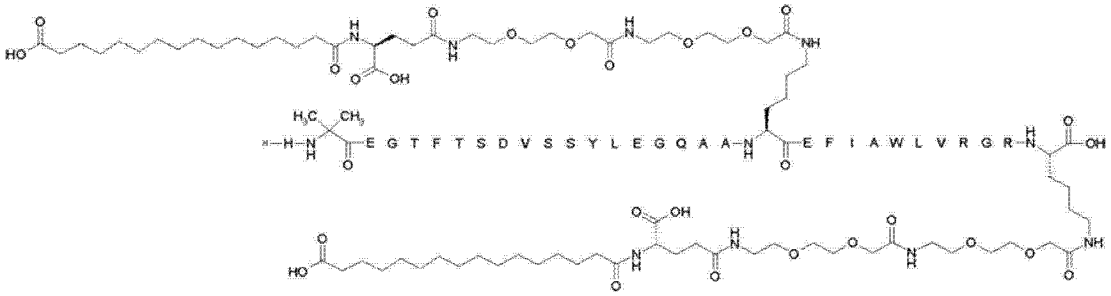
[1358] LCMS4 :m/z = 978.5(M+5H)$^{5+}$，1222.8(M+4H)$^{4+}$1630.1(M+3H)$^{3+}$

[1359] 实施例 3

[1360] $N^{\varepsilon 26}$-[2-(2-{2-[2-(2-{2-[(S)-4- 羧基 -4-(15- 羧基十五烷酰基氨基）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］，$N^{\varepsilon 37}$-[2-(2-{2-[2-(2-{2-[(S)-4- 羧基 -4-(15- 羧基十五烷酰基氨基）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][Aib^{8},Arg^{34},Lys^{37}]GLP-1(7-37)- 肽

[1361] Chem.22 :

[1362]



[1363] 制备方法 :在 Lys(Mtt)-Wang 树脂上合成所述肽，载量为 0.35mmol/g。在 Liberty 合成仪上，使用与 DIC/HOAt 的 5 分钟单偶联，在至多 70℃下，在微波条件下进行合成，组氨酸除外，后者在最多 50℃偶联 20 分钟。所有氨基酸都用标准保护基保护起来，要酰化的赖氨酸（在此情况下是 Lys26) 除外，后者用 Mtt 保护。用含 5％哌啶的 NMP，在 50℃下 3 分钟进行脱保护。合成完成之后，将 N- 端用 10 当量 Boc- 碳酸酯和 10 当量 DIPEA 封闭 30 分钟。通过用净（未经稀释的）六氟异丙醇处理 20 分钟将 Mtt 去除，并使用与上述使用 Fmoc-8- 氨基 -3,6- 二氧杂辛酸，Fmoc-Glu-OBut 和十六烷二酸单叔丁酯的相同方案，在 Liberty 上逐步构建侧链。所述肽用 TFA/ 水 /TIS(95 ： 2.5 ： 2.5) 裂解 2 小时并通过用二乙醚沉淀而分离。通过制备型 HPLC，在填装有 5u 或 7u C18 硅胶的 20mmx250mm 柱上纯化粗制肽。所述肽溶于 5ml 50％乙酸并用 H_2O 稀释至 20ml 并注射到柱中，再在 50min 内，在 40℃用含 40-60％ CH_3CN 的 0.1％ TFA 梯度洗脱 10ml/min。收集含肽流份并通过 MALDI 和

UPLC 评价其纯度。洗脱液用水稀释之后，将纯化的肽冻干。

[1364] 经 MALDI-MS 证实，理论分子量为 4844.6。

[1365] UPLC（方法 08_B4_1）：Rt 9.50min

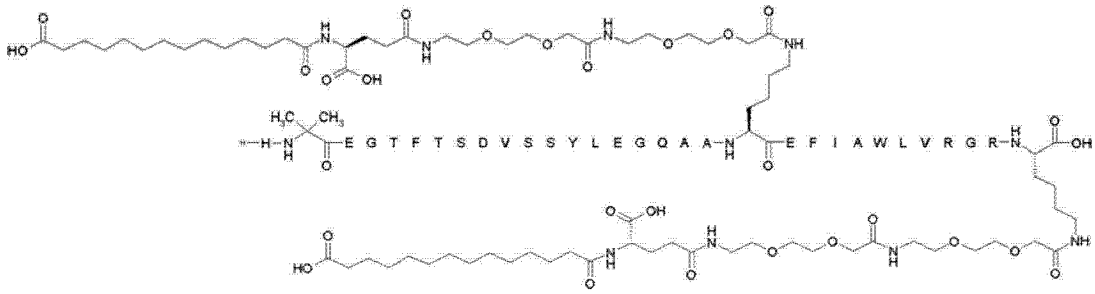
[1366] UPLC（方法 04_A3_1）：Rt 11.23min

[1367] 实施例 4

[1368] $N^{\varepsilon 26}$-[2-(2-{2-[2-(2-{2-[(S)-4- 羧 基 -4-(13- 羧 基 十 三 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]，$N^{\varepsilon 37}$[2-(2-{2-[2-(2-{2-[(S)-4- 羧基 -4-(13- 羧基十三烷酰基氨基）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][Aib^{8},Arg^{34},Lys^{37}]GLP-1(7-37)- 肽

[1369] Chem. 23：

[1370]



[1371] 制备方法：除了在侧链中使用十四烷二酸单叔丁酯之外，如同实施例 3。

[1372] 经 MALDI-MS 证实，理论分子量为 4788.5。

[1373] UPLC（方法 08_B4_1）：Rt 8.74min

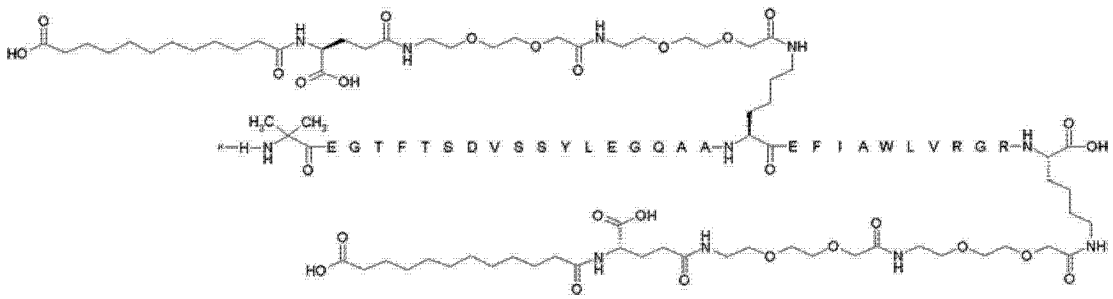
[1374] UPLC（方法 04_A3_1）：Rt 9.39min

[1375] 实施例 5

[1376] $N^{\varepsilon 26}$-[2-(2-{2-[2-(2-{2-[(S)-4- 羧 基 -4-(11- 羧 基 十 一 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]，$N^{\varepsilon 37}$[2-(2-{2-[2-(2-{2-[(S)-4- 羧基 -4-(11- 羧基十一烷酰基氨基）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][Aib^{8},Arg^{34},Lys^{37}]GLP-1(7-37)- 肽

[1377] Chem. 24：

[1378]



[1379] 制备方法：除了在侧链中使用十二烷二酸单叔丁酯之外，如同实施例 3。

[1380] 经 MALDI-MS 证实，理论分子量 4732.4。

[1381] UPLC（方法 08_B4_1）：Rt 8.19min

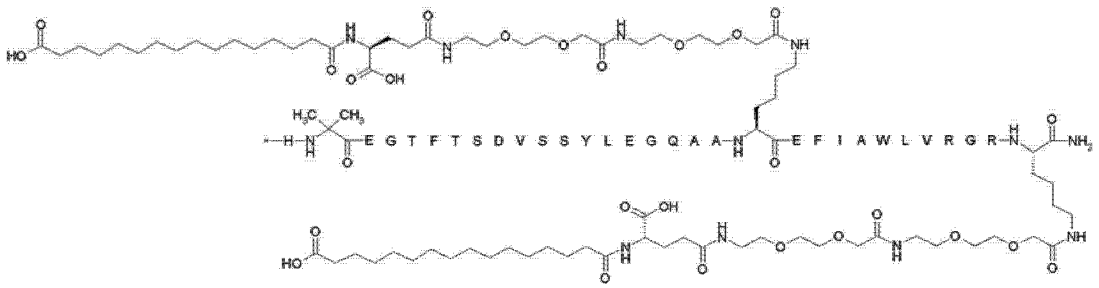
[1382] UPLC（方法 04_A3_1）：Rt 8.17min

[1383] 实施例 6

[1384] $N^{\varepsilon 26}$-[2-(2-{2-[2-(2-{2-[(S)-4-羧基-4-(15-羧基十五烷酰基氨基)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],$N^{\varepsilon 37}$[2-(2-{2-[2-(2-{2-[(S)-4-羧基-4-(15-羧基十五烷酰基氨基)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][Aib^{8},Arg^{34},Lys^{37}]GLP-1(7-37)-肽酰胺

[1385] Chem.25：

[1386]



[1387] 制备方法：除了所用树脂是 Tentagel S RAM，载量为 0.24mmol/g 以及在位置 26 和 37 上都使用 Fmoc-Lys(Mtt) 之外，如同实施例 3。

[1388] 经 MALDI-MS 证实，理论分子量为 4843.6。

[1389] UPLC(方法 08_B4_1)：Rt 9.43min

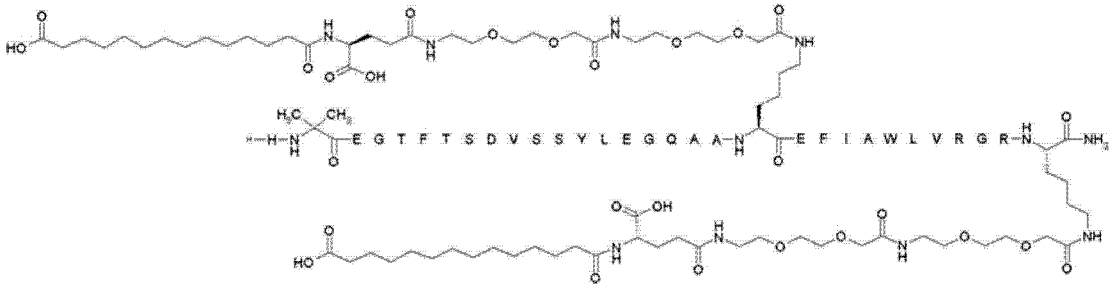
[1390] UPLC(方法 04_A3_1)：Rt 11.88min

[1391] 实施例 7

[1392] $N^{\varepsilon 26}$-[2-(2-{2-[2-(2-{2-[(S)-4-羧基-4-(13-羧基十三烷酰基氨基)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],$N^{\varepsilon 37}$-[2-(2-{2-[2-(2-{2-[(S)-4-羧基-4-(13-羧基十三烷酰基氨基)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][Aib^{8},Arg^{34},Lys^{37}]GLP-1(7-37)-肽酰胺

[1393] Chem.26：

[1394]



[1395] 制备方法：除了在侧链中使用十四烷二酸单叔丁酯之外，如同实施例 6。

[1396] 经 MALDI-MS 证实，理论分子量是 4787.5。

[1397] UPLC(方法 08_B4_1)：Rt 8.72min

[1398] UPLC(方法 04_A3_1)：Rt 9.98min

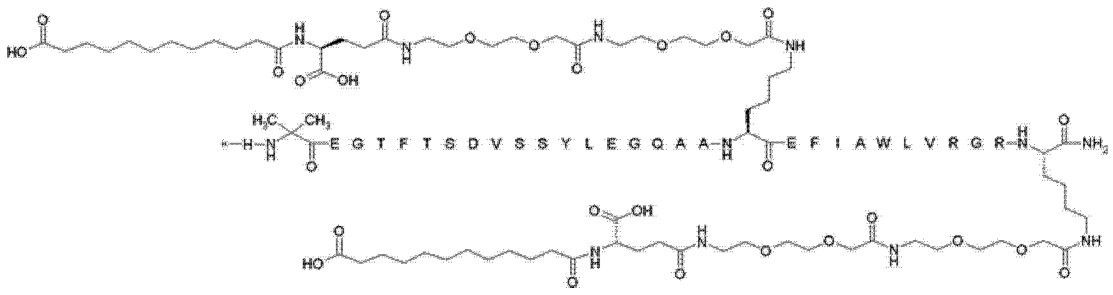
[1399] 实施例 8

[1400] $N^{\varepsilon 26}$-[2-(2-{2-[2-(2-{2-[(S)-4-羧基-4-(11-羧基十一烷酰基氨基)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],

$N^{\varepsilon 37}$[2-(2-{2-[2-(2-{2-[(S)-4-羧基-4-(11-羧基十一烷酰基氨基)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][Aib^8,Arg^{34},Lys^{37}]GLP-1(7-37)-肽酰胺

[1401] Chem.27：

[1402]



[1403] 制备方法：除了在侧链中使用十二烷二酸单叔丁酯之外，如同实施例6。

[1404] 经MALDI-MS证实，理论分子量为4731.4。

[1405] UPLC(方法08_B4_1)：Rt 8.16min

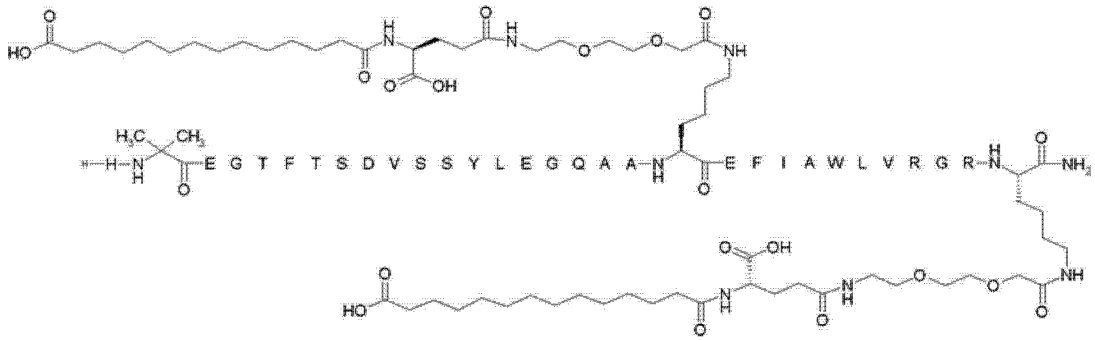
[1406] UPLC(方法04_A3_1)：Rt 8.83min

[1407] 实施例9

[1408] $N^{\varepsilon 26}$[2-[2-(2-{2-[(S)-4-羧基-4-(13-羧基十三烷酰基氨基)丁酰基氨基]乙氧基}乙氧基)乙酰基],$N^{\varepsilon 37}$-[2-[2-(2-{2-[(S)-4-羧基-4-(13-羧基十三烷酰基氨基)丁酰基氨基]乙氧基}乙氧基)乙酰基][Aib^8,Arg^{34},Lys^{37}]GLP-1(7-37)-肽酰胺

[1409] Chem.28：

[1410]



[1411] 制备方法：如同实施例7。

[1412] 经MALDI-MS证实，理论分子量为4497.2。

[1413] UPLC(方法08_B4_1)：Rt 8.85min

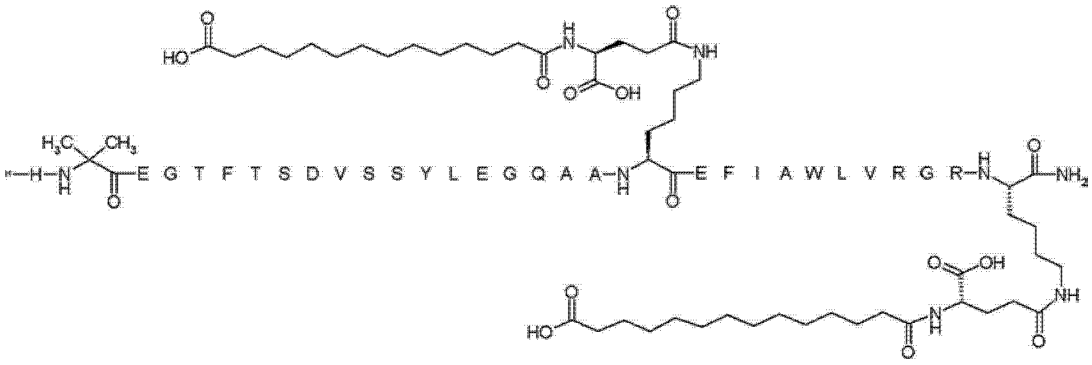
[1414] UPLC(方法04_A3_1)：Rt 10.27min

[1415] 实施例10

[1416] $N^{\varepsilon 26}$-[2-{2-[(S)-4-羧基-4-(13-羧基十三烷酰基氨基)丁酰基氨基]]，$N^{\varepsilon 37}$-[2-{2-[(S)-4-羧基-4-(13-羧基十三烷酰基氨基)丁酰基氨基]][Aib^8,Arg^{34},Lys^{37}]GLP-1(7-37)-肽酰胺

[1417] Chem.29：

[1418]



[1419] 制备方法：如同实施例 7。

[1420] 经 MALDI-MS 证实，理论分子量为 4206.8。

[1421] UPLC（方法 08_B4_1）：Rt 9.04min

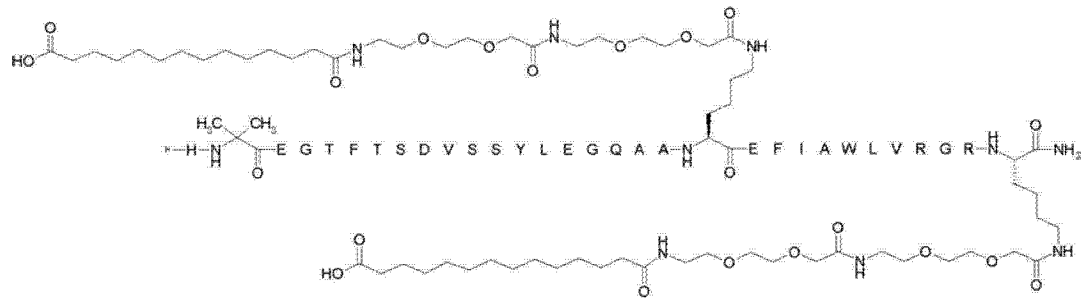
[1422] UPLC（方法 04_A31）：Rt 10.68min

[1423] 实施例 11

[1424] $N^{\varepsilon 26}$-(2-{2-[2-(2-{2-[2-(13- 羧基 - 十三烷酰基氨基）乙氧基］乙氧基｝乙酰基氨基）乙氧基］乙氧基｝乙酰基），$N^{\varepsilon 37}$-(2-{2-[2-(2-{2-[2-(13- 羧基 - 十三烷酰基氨基）乙氧基］乙氧基｝乙酰基氨基）乙氧基］乙氧基｝乙酰基）[Aib^{8}, Arg^{34}, Lys^{37}] GLP-1(7-37)- 肽酰胺

[1425] Chem. 30：

[1426]



[1427] 制备方法：如同实施例 7。

[1428] 经 MALDI-MS 证实，理论分子量为 4529.2。

[1429] UPLC（方法 08_B4_1）：Rt 9.07min

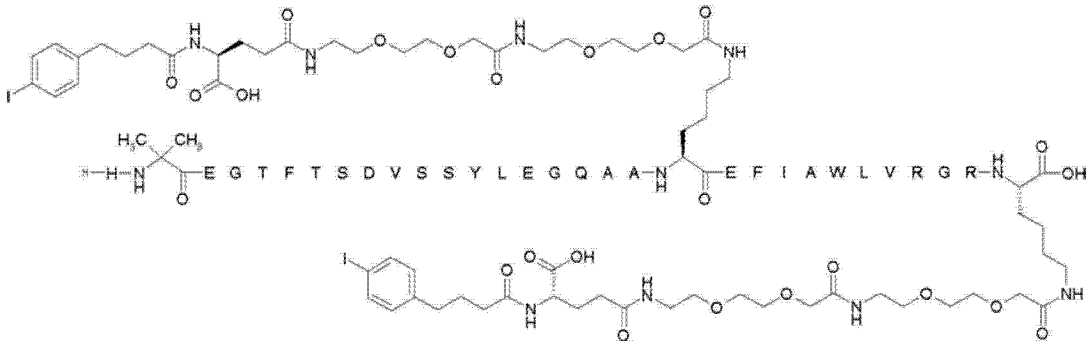
[1430] UPLC（方法 04_A3_1）：Rt 13.31min

[1431] 实施例 12

[1432] $N^{\varepsilon 26}$-{2-[2-(2-{2-[2-(2-{(S)-4- 羧基 -4-[4-(4- 碘 - 苯基）- 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｝，$N^{\varepsilon 37}$-{2-[2-(2-{2-[2-(2-{(S)-4- 羧基 -4-[4-(4- 碘 - 苯基）- 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｝[Aib^{8}, Arg^{34}, Lys^{37}] GLP-1(7-37)- 肽

[1433] Chem. 31：

[1434]



[1435] 制备方法:SPPS 方法 B,使用 SPPS 方法 D,将 8-(9- 芴基甲氧基羰基 - 氨基)-3,6- 二氧杂辛酸(购自 Iris Biotech),4-(4- 碘苯基)丁酸(购自 Aldrich)和 Fmoc-Glu-OtBu 偶联。

[1436] UPLC(方法 04_A4_1) :Rt = 8.54min

[1437] UPLC(方法 01_A4_2) :Rt = 10.23min

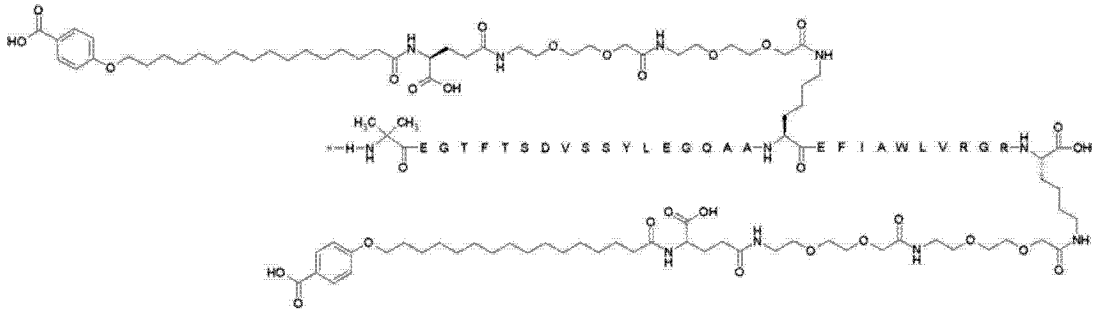
[1438] LCMS4 :Rt = 2.4min,m/z = 971(m/5)1213(m/44)1617(m/3)

[1439] 实施例 13

[1440] $N^{\varepsilon 26}$-{2-[2-(2-{2-[2-(2-{(S)-4- 羧基 -4-[16-(4- 羧基苯氧基)十六烷酰基氨基]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},$N^{\varepsilon 37}$-{2-[2-(2-{2-[2-(2-{(S)-4- 羧基 -4-[16-(4- 羧基苯氧基)十六烷酰基氨基]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}-[Aib^8,Arg^{34},Lys^{37}]GLP-1(7-37)- 肽

[1441] Chem.32 :

[1442]



[1443] 制备方法:SPPS 方法 B。终产物通过分析型 UPLC 和 LC-MS 来表征,除了乙酸酐加帽步骤是在以下氨基酸偶联之后进行之外 :Trp31,Ala25,Tyr19,Phe12 和 Aib8($2^1/_2$min,65℃,用含 1N 乙酸酐的 NMP)。可按照 WO07128817 实施例 17 所述来制备 4-(15- 羧基 - 十五烷氧基)苯甲酸叔丁酯。

[1444] UPLC(方法 08_B4_1) :Rt = 11.272min

[1445] UPLC(方法 05_B10_1) :Rt = 7.319min

[1446] LCMS4 :Rt = 2.37min,m/z = 5054.48,计算 MW = 5056.82

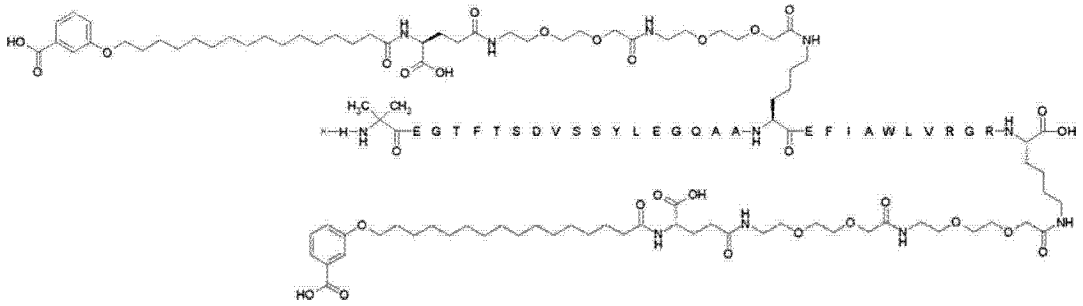
[1447] 实施例 14

[1448] $N^{\varepsilon 26}$-{2-[2-(2-{2-[2-(2-{(S)-4- 羧基 -4-[16-(3- 羧基苯氧基)十六烷酰基氨基]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},$N^{\varepsilon 37}$-{2-[2-(2-{2-[2-(2-{(S)-4- 羧基 -4-[16-(3- 羧基苯氧基)十六烷酰基氨基]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｝-[Aib^{8}, Arg^{34}, Lys^{37}] GLP-1(7-37)-肽

[1449] Chem.33：

[1450]



[1451] 3-羟基-苯甲酸叔丁酯的制备

[1452] 将3-羟基苯甲酸(55.0g,400mmol)，二碳酸二叔丁酯(178g,820mmol)，高氯酸镁(0.89g,4.0mmol)和无水硝基甲烷(750mL)的混合物在40℃搅拌96小时。加入乙酸乙酯(800mL)，有机层用5％碳酸氢钠水溶液(1500mL)洗涤。有机溶液经无水硫酸镁干燥，然后真空蒸发。所得残余物进行柱色谱法(硅胶Fluka 60，己烷/乙酸乙酯8：1)，得到标题化合物，为白色固体。

[1453] 得率：9.07g(12％)

[1454] M.p.：94-96℃

[1455] 1H NMR谱(300MHz，CDCl3，δ_H(dH))：7.61-7.53(m,2H)；7.29(t，J＝8.1Hz,1H)；7.05(m,1H)；6.06(bs,1H)；1.59(s,9H)。

[1456] 16-溴-十六烷酸甲酯的制备

[1457] 将16-溴-十六烷酸(6.0g)溶于MeOH(35mL)，甲苯(100mL)和原甲酸三甲酯(20mL)中，然后加入来自Fluka的Amberlyst 15(1.4g)。所得混合物在55℃搅拌16h。所得混合物蒸发至干并在真空下干燥16h，得到7.7g。将所得残余物悬浮于MeOH(约50mL)并搅拌约1/2h。与DCM(30mL)一起搅拌1/2h之后，滤出amberlyst 15。滤液浓缩以除去DCM，然后将澄清溶液冷却并加入更多MeOH(大约20mL，共约40mL)。将烧瓶冷却，更多晶体沉淀下来，搅拌30min之后，滤出晶体并用冷MeOH洗涤。所得白色晶体在真空下干燥，得到5.61g。

[1458] 3-(15-甲氧基羰基-十五烷氧基)-苯甲酸叔丁酯的制备

[1459] 将3-羟基-苯甲酸叔丁酯(1.79g)溶于MeCN 75ml，然后加入溴-十六烷酸甲酯(3.22g)，再加入K_2CO_3(2.5g)。将反应物在80℃搅拌3天。过滤反应混合物。蒸发滤液，将所得残余物溶于EtOAc 100ml，EtOAc层用100ml盐水洗涤2次。有机层经$MgSO_4$干燥，过滤并通过蒸发除去溶剂，得到4.165g(98％)。

[1460] 3-(15-羧基-十五烷氧基)-苯甲酸叔丁酯的制备

[1461] 将3-(15-甲氧基羰基-十五烷氧基)-苯甲酸叔丁酯(4.165g)溶于50ml THF和50ml MeOH中。加入水(10mL)，再加入LiOH(0.565g,13.5mmol)。反应物在室温下16h。蒸发反应混合物，将所得残余物溶于EtOAC 150ml，再加入水80ml和20ml 1N HCl。分离各层，有机层经$MgSO_4$干燥，过滤并通过蒸发除去溶剂，得到白色固体化合物(3.91g,97％)。

[1462] 制备方法：SPPS方法B和以类似于实施例1的方式使用3-(15-羧基-十五烷氧

基)-苯甲酸叔丁酯。终产物通过分析型 UPLC 和 LC-MS 来表征,除了乙酸酐加帽步骤是在以下氨基酸偶联之后进行之外 :Trp31,Ala25,Tyr19,Phe12 和 Aib8(2$^{1}/_{2}$min,65℃,用含 1N 乙酸酐的 NMP)。

[1463] UPLC(方法 08_B4_1) :Rt = 11.201min

[1464] UPLC(方法 05_B10_1) :Rt = 8.622min

[1465] LCMS4 :Rt = 2.37min,m/z = 1011.88(m/5) ;1664.32(m/4) ;5053.28

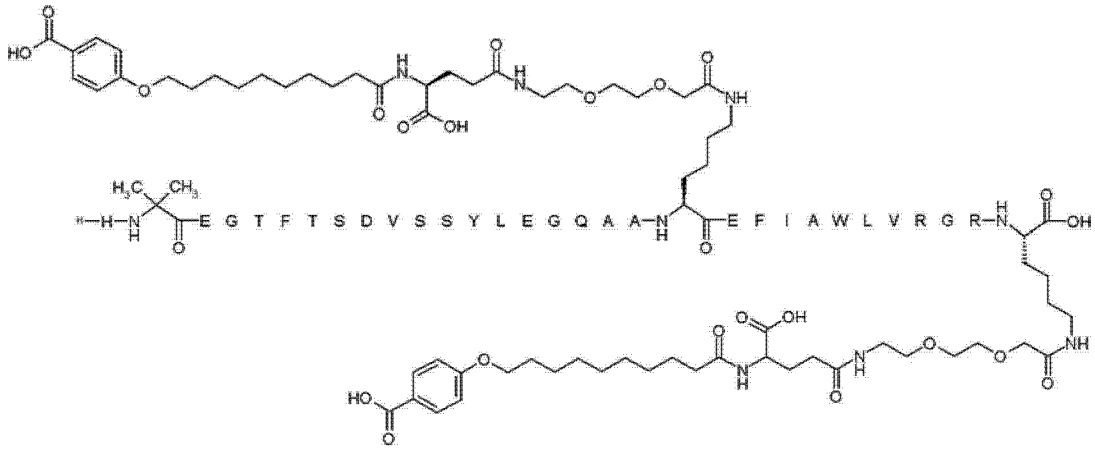
[1466] 计算 MW = 5056.82

[1467] 实施例 15

[1468] $N^{\varepsilon 26}$-{2-[2-(2-{(S)-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},$N^{\varepsilon 37}$-{2-[2-(2-{(S)-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}[Aib^{8},Arg^{34},Lys^{37}]GLP-1(7-37)-肽

[1469] Chem.34 :

[1470]



[1471] 制备方法 :SPPS 方法 B,开始于低载量 Fmoc-Lys(Mtt)-Wang 树脂。Fmoc-Lys(Mtt)-OH 用于位置 26,Boc-His(Trt)-OH 用于位置 7。Mtt 用 HFIP 除去,然后采用 SPPS 方法 D,将 8-(9-芴基甲氧基羰基-氨基)-3,6-二氧杂辛酸(购自 Iris Biotech)、Fmoc-Glu-OtBu 和 4-(9-羧基-壬氧基)-苯甲酸叔丁酯(按照 WO 2006/082204 实施例 25,步骤 2 所述而制备)偶联。

[1472] UPLC(方法 08_B4_1) :Rt = 8.8min

[1473] UPLC(方法 04_A3_1) :Rt = 9.6min

[1474] LCMS4 :4598.0

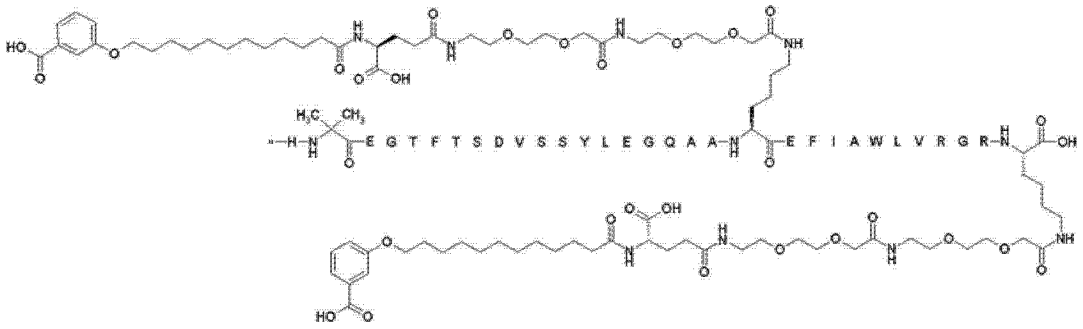
[1475] 计算 MW = 4598.2

[1476] 实施例 16

[1477] $N^{\varepsilon 26}$-{2-[2-(2-{2-[2-(2-{(S)-4-羧基-4-[12-(3-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},$N^{\varepsilon 37}$-{2-[2-(2-{2-[2-(2-{(S)-4-羧基-4-[12-(3-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}[Aib^{8},Arg^{34},Lys^{37}]GLP-1(7-37)-肽

[1478] Chem.35 :

[1479]



[1480] 制备方法 :SPPS 方法 B。以类似于 3-(15- 羧基 - 十五烷氧基)- 苯甲酸叔丁酯的所述方式,使用 12- 溴 - 十二烷酸,制备 3-(11- 羧基 - 十一烷氧基)- 苯甲酸叔丁酯。终产物通过分析型 UPLC 和 LC-MS 来表征,除了乙酸酐加帽步骤是在以下氨基酸偶联之后进行之外 :Trp31,Ala25,Tyr19,Phe12 和 Aib8(2$^{1}/_{2}$min,65℃,用含 1N 乙酸酐的 NMP)

[1481] UPLC(方法 08_B4_1) :Rt = 9.449min

[1482] LCMS4 :Rt = 2.37min,m/z = m/z :1011.88(m/4) ;1264.32(m/3) ;4942.24

[1483] 计算 MW = 4944.608

[1484] 实施例 17

[1485] $N^{\varepsilon 26}$-[2-(2-[2-(2-[2-(2-[4-(10-(4- 羧基苯氧基) 癸酰基氨基)-4(S)- 羧基丁酰基氨基] 乙氧基) 乙氧基] 乙酰基氨基) 乙氧基] 乙氧基) 乙酰基]-

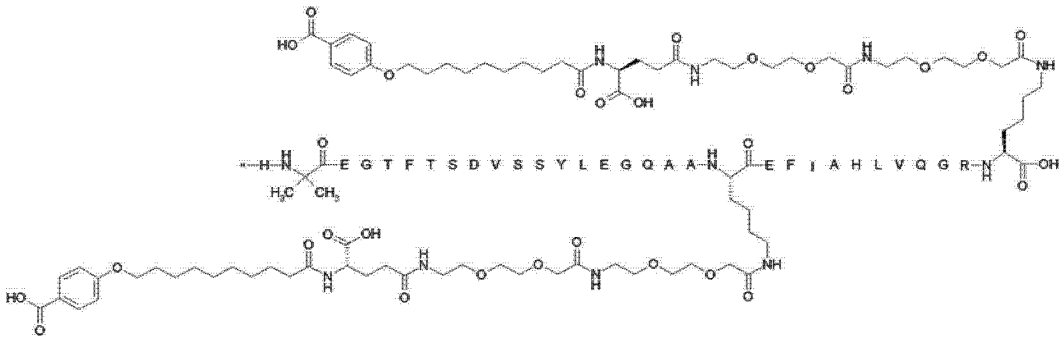
[1486] $N^{\varepsilon 37}$-[2-(2-[2-(2-[2-(2-[4-(10-(4- 羧基苯氧基) 癸酰基氨基)-

[1487] 4(S)- 羧基丁酰基氨基] 乙氧基) 乙氧基] 乙酰基氨基)

[1488] 乙氧基] 乙氧基) 乙酰基][Aib^{8},His^{31},Gln^{34},Lys^{37}]GLP-1(7-37)- 肽

[1489] Chem.36 :

[1490]



[1491] 制备 :SPPS 方法 A,开始于低载量 Fmoc-Lys(Mtt)-Wang 树脂。Fmoc-Lys(Mtt)-OH 用于位置 26,Boc-His(trt)-OH 用于位置 7。Mtt 用 HFIP 除去,然后使用 SPPS 方法 A,将 8-(9- 芴基甲氧基羰基 - 氨基)-3,6- 二氧杂辛酸 (购自 Iris Biotech) 偶联 2 次,再与 Fmoc-Glu-OtBu 和 4-(9- 羧基 - 壬氧基)- 苯甲酸叔丁酯 (按照 WO 2006/082204 实施例 25,步骤 2 所述而制备) 偶联。

[1492] UPLC(方法 05_B5_1) :Rt = 4.95min(92%)

[1493] LCMS4 :m/z = 4011,计算值 = 4011

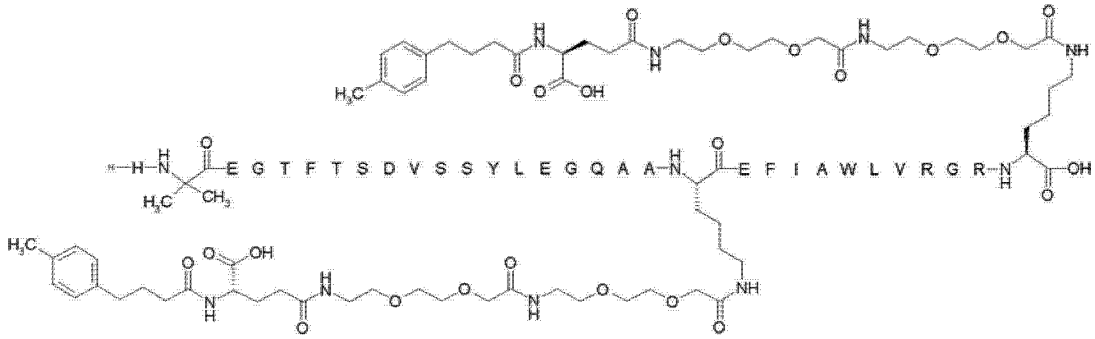
[1494] 实施例 18

[1495] $N^{\varepsilon 26}$-{2-[2-(2-{2-[2-(2-{(S)-4- 羧基 -4-[4-(4- 甲基苯基) 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 },

$N^{\varepsilon 37}$-{2-[2-(2-{2-[2-(2-{(S)-4-羧基-4-[4-(4-甲基苯基)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}[Aib^{8},Arg^{34},Lys^{37}]GLP-1(7-37)-肽

[1496] Chem.37：

[1497]



[1498] 制备：SPPS 方法 B，采用 SPPS 方法 D，将 8-(9-芴基甲氧基羰基-氨基)-3,6-二氧杂辛酸（购自 Iris Biotech）、4-(4-甲基苯基)丁酸（购自 ABCR）和 Fmoc-Glu-OtBu 偶联。

[1499] UPLC（方法 01_B4_1）：Rt = 9.93min

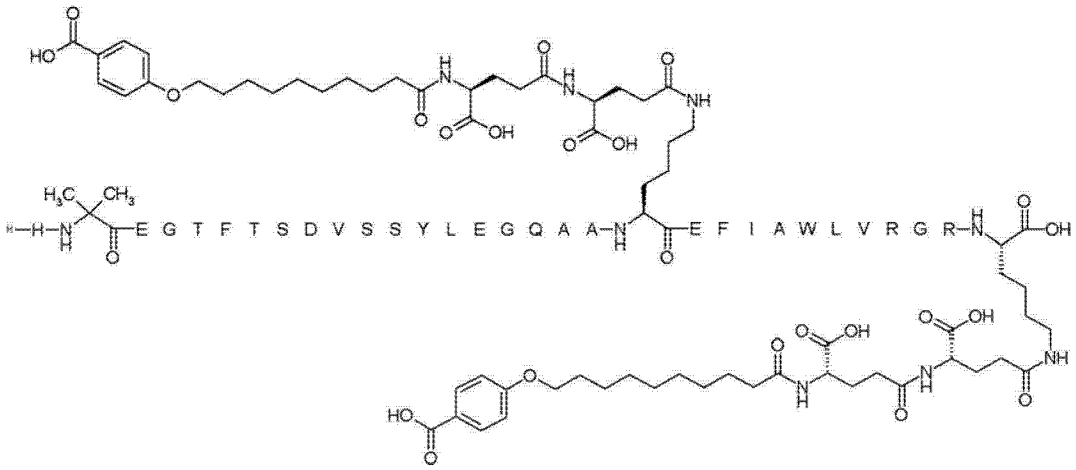
[1500] LCMS4：Rt = 2.44min，m/z = 926(m/5)1157(m/4)1543(m/3)

[1501] 实施例 19

[1502] $N^{\varepsilon 26}$-((S)-4-羧基-4-{(S)-4-羧基-4-[10-(4-羧基苯氧基)-癸酰基氨基]丁酰基氨基}丁酰基)，$N^{\varepsilon 37}$-((S)-4-羧基-4-{(S)-4-羧基-4-[10-(4-羧基苯氧基)-癸酰基氨基]丁酰基氨基}丁酰基)[Aib^{8},Arg^{34},Lys^{37}]GLP-1(7-37)-肽

[1503] Chem.38：

[1504]



[1505] 制备：SPPS 方法 B，开始于低载量 Fmoc-Lys(Mtt)-Wang 树脂。Fmoc-Lys(Mtt)-OH 用于位置 26，Boc-His(Trt)-OH 用于位置 7。Mtt 用 HFIP 除去，然后采用 SPPS 方法 D，将 Fmoc-Glu-OtBu 和 4-(9-羧基-壬氧基)-苯甲酸叔丁酯（按照 WO 2006/082204 实施例 25，步骤 2 所述而制备）偶联。

[1506] UPLC（方法 08_B4_1）：Rt = 8.6min

[1507] UPLC（方法 04_A3_1）：Rt = 7.9min

[1508] LCMS4 :4565.0

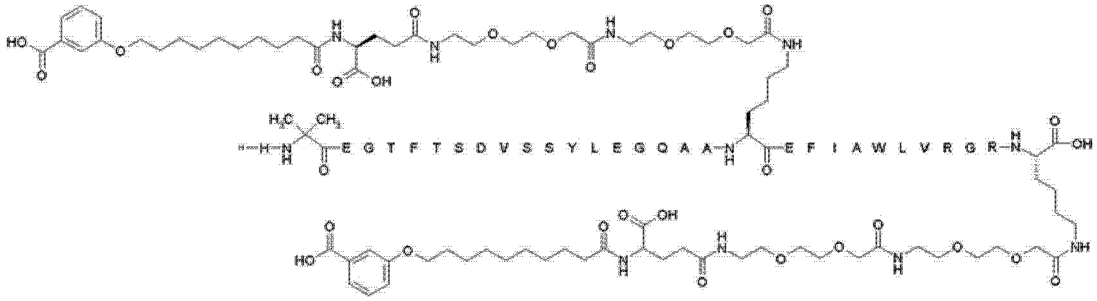
[1509] 计算 MW = 4566.1

[1510] 实施例 20

[1511] $N^{\varepsilon 26}$-{2-[2-(2-{2-[2-(2-{4- 羧 基 -4-[10-(3- 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 }, $N^{\varepsilon 37}$-{2-[2-(2-{2-[2-(2-{4- 羧基 -4-[10-(3- 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 }[Aib^{8},Arg^{34},Lys^{37}]GLP-1(7-37)- 肽

[1512] Chem.39 :

[1513]



[1514] 3-(9- 羧基 - 壬氧基) 苯甲酸叔丁酯的制备

[1515] 将 3- 羟基 - 苯甲酸叔丁酯 (3g) 溶于乙腈 (50mL)。加入含来自 Aldrich 的 10- 溴癸酸甲酯 (4.1g) 的乙腈 (20mL),然后用乙腈 (30mL) 洗涤容器。加入碳酸钾,所得混合物在氮气下回流大约 18h。将反应物冷却并蒸发至干。所得残余物溶于 AcOEt(80mL) 和水 (30mL) 中并萃取。水相用 AcOEt(30mL) 洗涤,合并的有机相用水 (50mL)、饱和 NaCl(30mL) 洗涤并经 MgSO4 干燥,滤液在真空下浓缩,得到白色固体 (5.8g)。所得残余物溶于 DCM(15mL) 并加入庚烷 (大约 60mL),将所得溶液浓缩至大约 30mL。搅拌 30min 之后,开始形成晶体,将溶液用冰冷却。滤出晶体并用冷庚烷洗涤,真空干燥,得到 4.13g(71%)3-(9- 甲氧基羰基 - 壬氧基)- 苯甲酸叔丁酯。

[1516] 将所得晶体溶于 THF(30mL) 并加入 1N NaOH(11mL)。将浑浊溶液搅拌 16h。反应混合物经浓缩除去大部分 THF,剩余水溶液用 AcOEt(50mL) 萃取。用大约 12mL 1N HCl 将水溶液的 pH 调至 1-2,水相用 AcOEt(25mL) 萃取。合并的有机相用水洗涤,经 $MgSO_4$ 干燥,过滤并浓缩,得到白色半结晶固体 (3.97g)。LCMS2 :401(M+23),H-NMR(400MHz,$CDCl_3$) :7.56(d,1H),7.50(m,1H),7.26-7.32(m,1H),7.05(dd,1H),3.99(t,2H),2.35(t,2H),1.75-1.82(m,2H),1.62-1.65(m,2H),1.59(s,9H),1.42-1.47(m,2H),1.33(br,8H)。

[1517] 制 备 方 法 :SPPS 方 法 B, 开 始 于 低 载 量 Fmoc-Lys(Mtt)-Wang 树 脂。Fmoc-Lys(Mtt)-OH 用于位置 26,Boc-His(trt)-OH 用于位置 7。Mtt 用 HFIP 除去,然后采用双偶联法,在 Liberty 肽合成仪上将 8-(9- 芴基甲氧基羰基 - 氨基)-3,6- 二氧杂辛酸 (购自 Iris Biotech)、Fmoc-Glu-OtBu 和 3-(9- 羧基 - 壬氧基)- 苯甲酸叔丁酯偶联。

[1518] UPLC(方法 04_A4_1) :10.01min

[1519] UPLC(方法 08_B4_1) :8.81min

[1520] LCMS4 :m/z = 978.5$(M+5H)^{5+}$,1222.8$(M+4H)^{4+}$,1630.1$(M+3H)^{3+}$

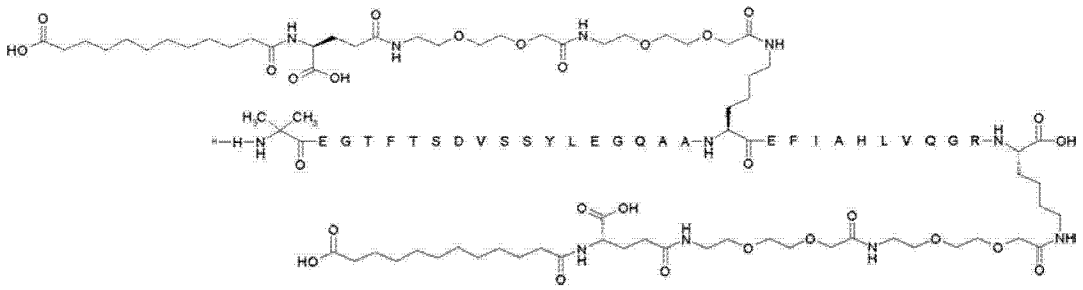
[1521] 实施例 21

[1522] $N^{\varepsilon 26}$-[2-(2-{2-[2-(2-{2-[(S)-4- 羧 基 -4-(11- 羧 基 十 一 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］，$N^{\varepsilon 37}$-[2-(2-{2-[2-(2-{2-[(S)-4-羧基-4-(11-羧基十一烷酰基氨基）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][Aib^{8}, His^{31}, Gln^{34}, Lys^{37}]GLP-1(7-37)-肽

[1523] Chem.40：

[1524]



[1525] 制备方法：如同实施例5。

[1526] 经MALDI证实，理论分子量为4655.2。

[1527] UPLC（方法08_B4_1）：Rt＝7.72min

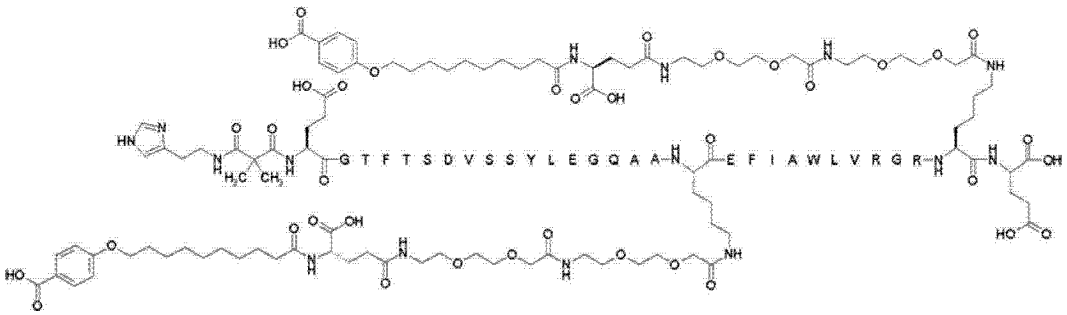
[1528] UPLC（方法04_A3_1）：Rt＝5.70min

[1529] 实施例22

[1530] N^{9}-{2-[2-(1H-咪唑-4-基）乙基氨基甲酰基]-2-甲基丙酰基}，$N^{\varepsilon 26}$-{2-[2-(2-{2-[2-(2-{(S)-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}，$N^{\varepsilon 37}$-{2-[2-(2-{2-[2-(2-{(S)-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}[Arg^{34},Lys^{37}]GLP-1(9-37)Glu^{38}-肽

[1531] Chem.41：

[1532]



[1533] 制备：SPPS方法B。使用与Aib氨基酸的同样偶联条件，将2,2-二甲基-N-[2-(1-三苯甲基-1H-咪唑-4-基）-乙基]-丙酰胺酸偶联。采用SPPS方法D，将8-(9-芴基甲氧基羰基-氨基）-3,6-二氧杂辛酸（购自Iris Biotech）、Fmoc-Glu-OtBu和4-(9-羧基-壬氧基）-苯甲酸叔丁酯（按照WO 2006/082204实施例25，步骤2所述而制备）偶联。

[1534] UPLC（方法04_A3_1）：Rt＝9.32min.

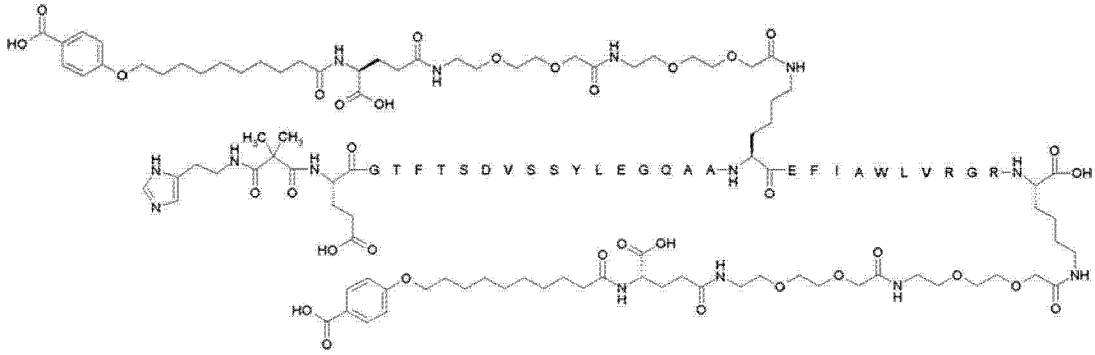
[1535] LCMS4：Rt＝2.29min.，m/z＝1669(m/3)，1252(m/4)，1001(m/5)

[1536] 实施例23

[1537] N^{9}-{2-[2-(1H-咪唑-4-基)乙基氨基甲酰基]-2-甲基丙酰基}-$N^{\varepsilon 26}$-{2-[2-(2-{2-[2-(2-{(S)-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}，$N^{\varepsilon 37}$-{2-[2-(2-{2-[2-(2-{(S)-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}[Arg^{34},Lys^{37}]GLP-1(9-37)-肽

[1538] Chem.42：

[1539]



[1540] 制备：SPPS方法B，使用与Aib氨基酸的同样偶联条件，将2,2-二甲基-N-[2-(1-三苯甲基-1H-咪唑-4-基)-乙基]-丙酰胺酸偶联。采用SPPS方法D，将8-(9-芴基甲氧基羰基-氨基)-3,6-二氧杂辛酸（购自Iris Biotech）、Fmoc-Glu-OtBu和4-(9-羧基-壬氧基)-苯甲酸叔丁酯（按照WO 2006/082204实施例25，步骤2所述而制备）偶联。

[1541] UPLC(方法08_B4_1(TFA))：Rt = 8.81min

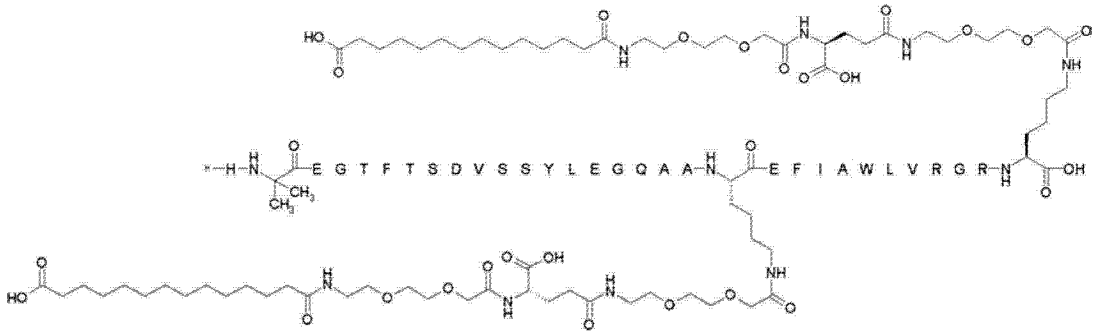
[1542] LCMS4：Rt = 2.29min，m/z = 1625(m/3)，1219(m/4)，975(m/5)

[1543] 实施例24

[1544] $N^{\varepsilon 26}$-{2-[2-(2-{(S)-4-羧基-4-[2-(2-{2-[(13-羧基十三烷酰基氨基)]乙氧基}乙氧基)乙酰基氨基]丁酰基氨基}乙氧基)乙氧基]乙酰基}，$N^{\varepsilon 37}$-{2-[2-(2-{(S)-4-羧基-4-[2-(2-{2-[(13-羧基十三烷酰基氨基)]乙氧基}乙氧基)乙酰基氨基]丁酰基氨基}乙氧基)乙氧基]乙酰基}-[Aib^{8},Arg^{34},Lys^{37}]GLP-1(7-37)-肽

[1545] Chem.43：

[1546]



[1547] 制备：SPPS方法B，开始于低载量Fmoc-Lys(Mtt)-Wang树脂。Fmoc-Lys(Mtt)-OH用于位置26，Boc-His(trt)-OH用于位置7。Mtt用HFIP手工除去，然后采用双偶联法，在Liberty肽合成仪上将8-(9-芴基甲氧基羰基-氨基)-3,6-二氧杂辛酸（购自Iris Biotech）、Fmoc-Glu-OtBu和十四烷二酸(tetradecanedioc)偶联。理论分子量经MALDI-MS

证实。

[1548] UPLC(方法 08_B4_1):Rt = 8.6min

[1549] UPLC(方法 04_A3_1):Rt = 9.7min

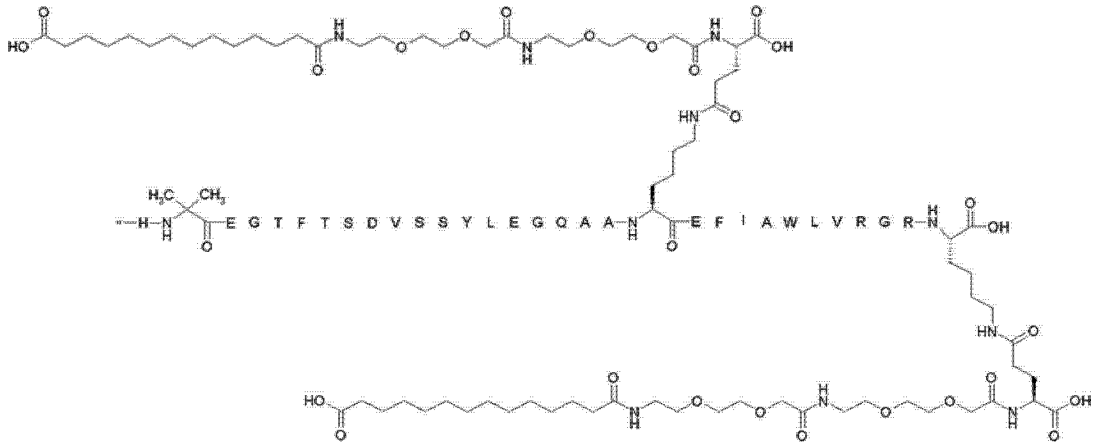
[1550] MALDI-MS:4788

[1551] 实施例 25

[1552] $N^{\varepsilon 26}$-[(S)-4-羧基-4-{2-[2-(2-[2-(2-{2-[(13-羧基十三烷酰基氨基)]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],$N^{\varepsilon 37}$-[(S)-4-羧基-4-{2-[2-(2-[2-(2-{2-[(13-羧基十三烷酰基氨基)]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][Aib^{8},Arg^{34},Lys^{37}]GLP-1(7-37)-肽

[1553] Chem.44:

[1554]



[1555] 制备:SPPS 方法 B,开始于低载量 Fmoc-Lys(Mtt)-Wang 树脂。Fmoc-Lys(Mtt)-OH 用于位置 26,Boc-His(trt)-OH 用于位置 7。Mtt 用 HFIP 手工除去,然后采用双偶联法,在 Liberty 肽合成仪上将 8-(9-芴基甲氧基羰基-氨基)-3,6-二氧杂辛酸(购自 Iris Biotech)、Fmoc-Glu-OtBu 和十四烷二酸(tetradecanedioc)偶联。理论分子量经 MALDI-MS 证实。

[1556] UPLC(方法 08_B4_1):Rt = 8.8min

[1557] UPLC(方法 04_A3_1):Rt = 10min

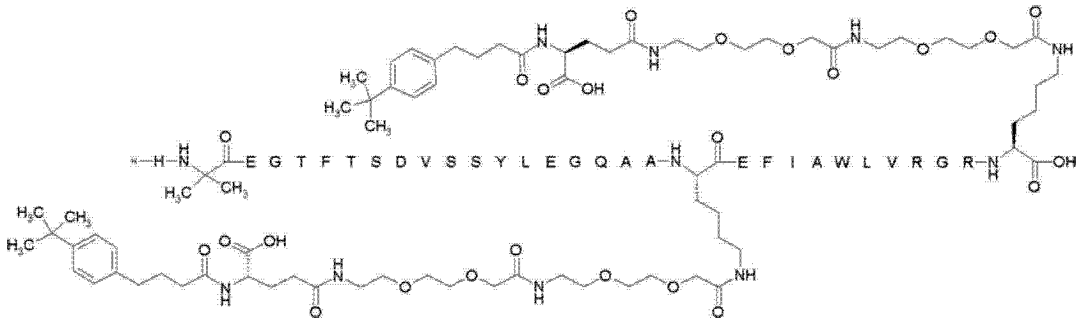
[1558] MALDI-MS:4787

[1559] 实施例 26

[1560] $N^{\varepsilon 26}$-{2-[2-(2-{2-[2-(2-{(S)-4-[4-(4-叔丁基-苯基)-丁酰基氨基]-4-羧基-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},$N^{\varepsilon 37}$-{2-[2-(2-{2-[2-(2-{(S)-4-[4-(4-叔丁基-苯基)-丁酰基氨基]-4-羧基-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}[Aib^{8},Arg^{34},Lys^{37}]GLP-1(7-37)-肽

[1561] Chem.45:

[1562]



[1563] 制备:SPPS 方法 B,采用 SPPS 方法 D,将 8-(9- 芴基甲氧基羰基 - 氨基)-3,6- 二氧杂辛酸(购自 Iris Biotech)、4-(4- 叔丁基苯基)丁酸和 Fmoc-Glu-OtBu 偶联。

[1564] UPLC(方法 08_B4_1):Rt = 9.07min

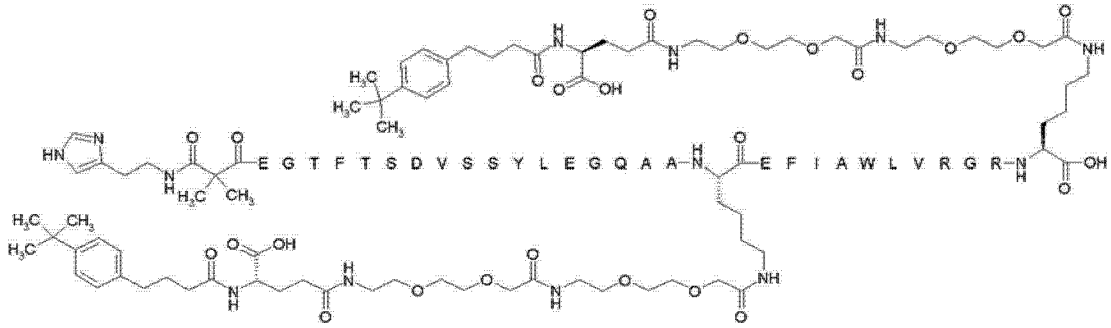
[1565] LCMS4:Rt = 2.29min,m/z = 943(m/5)1179(m/4)1571(m/3)

[1566] 实施例 27

[1567] N^{9}-{2-[2-(1H- 咪唑 -4- 基)- 乙基氨基甲酰基]-2- 甲基丙酰基}-$N^{\varepsilon 26}$-{2-[2-(2-{2-[2-(2-{(S)-4-[4-(4- 叔丁基苯基)丁酰基氨基]-4- 羧基丁酰基氨基}乙氧基)乙氧基]乙酰基氨基}乙氧基)乙氧基]乙酰基},$N^{\varepsilon 37}$-{2-[2-(2-{2-[2-(2-{(S)-4-[4-(4- 叔丁基苯基)丁酰基氨基]-4- 羧基丁酰基氨基}乙氧基)乙氧基]乙酰基氨基}乙氧基)乙氧基]乙酰基}[Arg^{34},Lys^{37}]GLP-1(9-37)- 肽

[1568] Chem.46:

[1569]



[1570] 制备:SPPS 方法 B,使用与 Fmoc-Aib 氨基酸的同样偶联条件,将 2,2- 二甲基 -N-[2-(1- 三苯甲基 -1H- 咪唑 -4- 基)- 乙基]- 丙酰胺酸偶联。采用 SPPS 方法 D,将 8-(9- 芴基甲氧基羰基 - 氨基)-3,6- 二氧杂辛酸(购自 Iris Biotech)、Fmoc-Glu-OtBu 和 4-(4- 叔丁基苯基)丁酸偶联。

[1571] UPLC(方法 04_A4_1):Rt = 10.56min

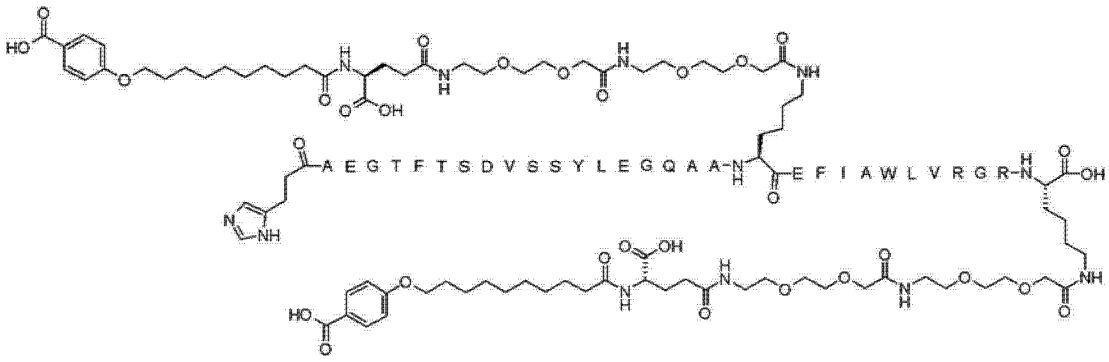
[1572] LCMS4:Rt = 2.40min。m/z = 940(m/5),1174(m/4),1565(m/3)

[1573] 实施例 28

[1574] $N^{\varepsilon 26}$-[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],$N^{\varepsilon 37}$-[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]-[Imp^{7},Arg^{34},Lys^{37}]-GLP-1-(7-37)- 肽

[1575] Chem.47:

[1576]



[1577] 制备方法 :SPPS 方法 B

[1578] LCMS4 :Rt :2.22min, m/z :4859.5 ;1214.9(M+4H)$^{4+}$;1619.8(M+3H)$^{3+}$

[1579] UPLC(方法 :08_B4_1) :Rt = 8.88min

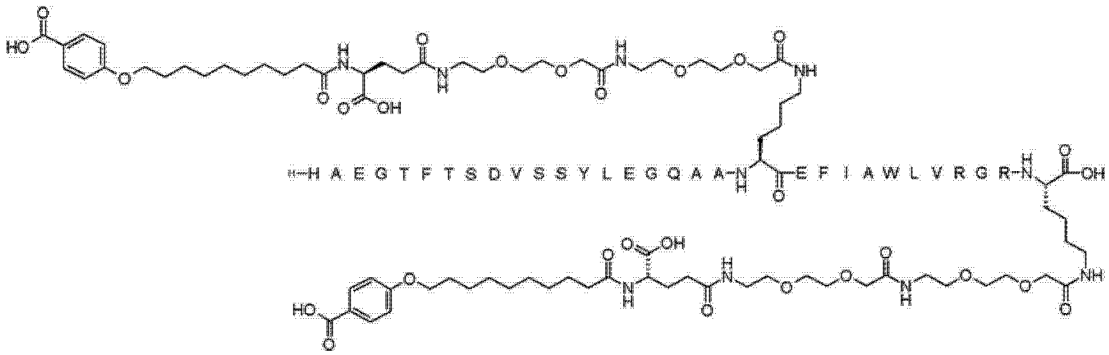
[1580] UPLC(方法 :04_A3_1) :Rt = 9.28min

[1581] 实施例 29

[1582] $N^{\varepsilon 26}$-[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],$N^{\varepsilon 37}$-[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]-[Arg^{34},Lys^{37}]-GLP-1-(7-37)- 肽

[1583] Chem. 48 :

[1584]



[1585] 制备方法 :SPPS 方法 B

[1586] UPLC(方法 05_B5_1) :Rt = 5.75min

[1587] UPLC(方法 08_B2_1) :Rt = 13.09min

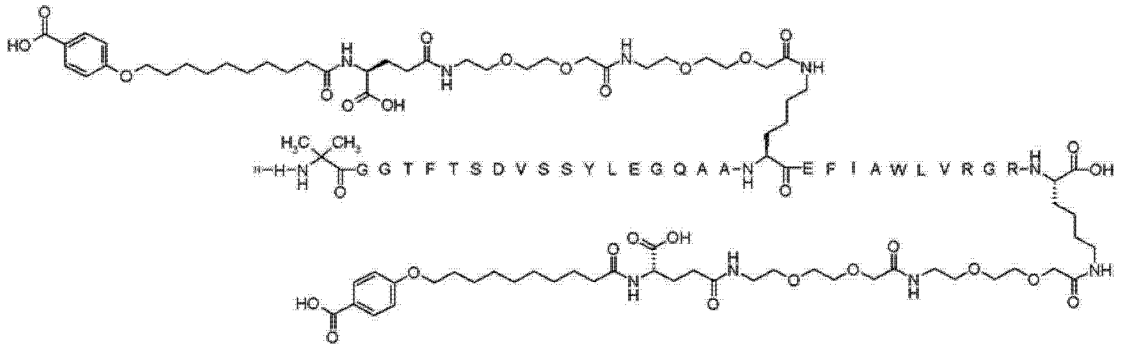
[1588] LCMS4(M/5)+1 = 976 ;(M/4)+1 = 1219 ; 准确量 = 4874

[1589] 实施例 30

[1590] $N^{\varepsilon 26}$-[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],$N^{\varepsilon 37}$-[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]-[Aib8, Gly9, Arg34, Lys37]-GLP-1-(7-37)- 肽

[1591] Chem. 49 :

[1592]



[1593] 制备方法 :SPPS 方法 A

[1594] UPLC(方法 09_B2_1) :Rt = 13.20min

[1595] UPLC(方法 05_B5_1) :Rt = 6.05min

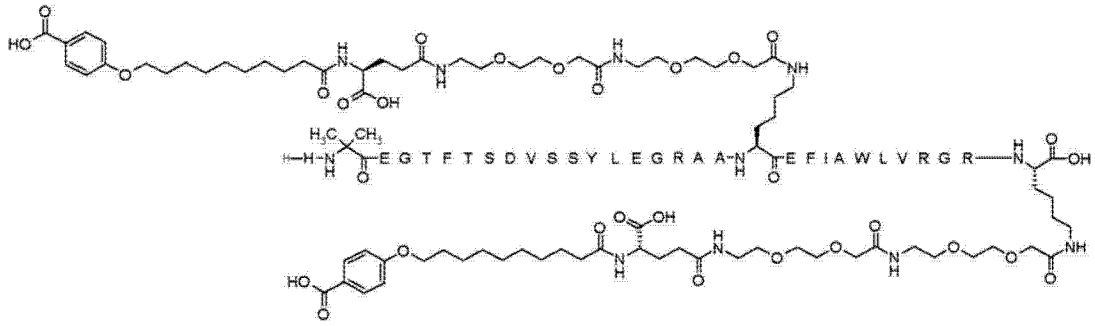
[1596] LCMS4 :(M/5)+1 = 964 ;(M/4)+1 = 1204 ;准确量= 4816

[1597] 实施例 31

[1598] $N^{\varepsilon 26}$-[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], $N^{\varepsilon 37}$-[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]-[Aib^{8}, Arg^{23}, Arg^{34}, Lys^{37}]-GLP-1-(7-37)- 肽

[1599] Chem.50 :

[1600]



[1601] 制备方法 :SPPS 方法 B

[1602] LCMS4 :Rt = 2.12min, m/z :4916.0

[1603] UPLC(方法 :08_B2_1) :Rt = 12.59min

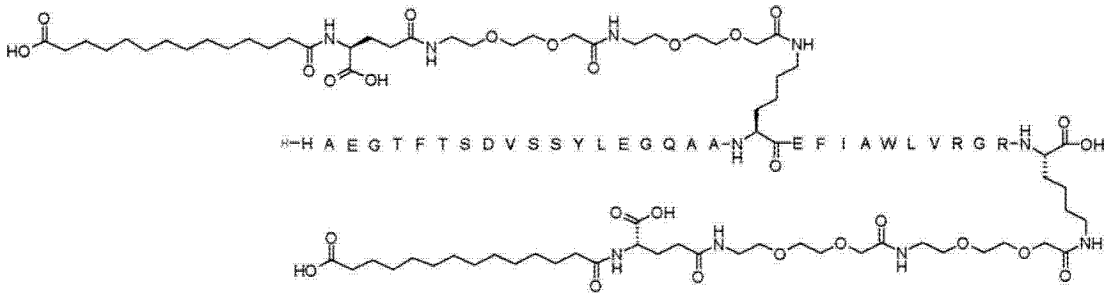
[1604] UPLC(方法 :04_A3_1) :Rt = 10.57min

[1605] 实施例 32

[1606] $N^{\varepsilon 26}$-[2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[(4S)-4- 羧基 -4-(13- 羧基十三烷酰基氨基) 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], $N^{\varepsilon 37}$-[2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[(4S)-4- 羧基 -4-(13- 羧基十三烷酰基氨基) 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]-[Arg34, Lys37]-GLP-1-(7-37)- 肽

[1607] Chem.51 :

[1608]



[1609] 制备方法 :SPPS 方法 B

[1610] LCMS4 :Rt = 2.12min, m/z :4774.4

[1611] UPLC(方法 :09_B2_1) :Rt = 12.87min

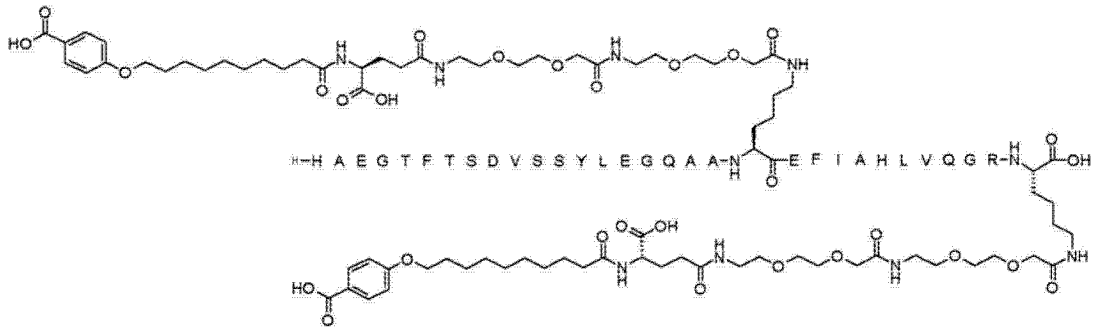
[1612] UPLC(方法 :04_A3_1) :Rt = 8.86min

[1613] 实施例 33

[1614] $N^{\varepsilon 26}$-[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], $N^{\varepsilon 37}$-[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]-[His^{31}, Gln^{34}, Lys^{37}]-GLP-1-(7-37)- 肽

[1615] Chem.52 :

[1616]



[1617] 制备方法 :SPPS 方法 B

[1618] LCMS4 :Rt := 1.92min, m/z :4797.3 ;M/4 :1199.8 ;M/3 :1599.4

[1619] UPLC(方法 :09_B4_1) :Rt = 8.12min

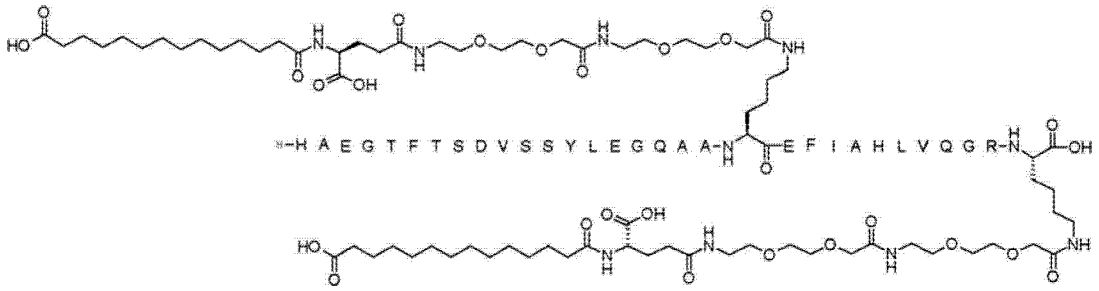
[1620] UPLC(方法 :05_B8_1) :Rt = 2.03min

[1621] 实施例 34

[1622] $N^{\varepsilon 26}$-[2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[(4S)-4- 羧基 -4-(13- 羧基十三烷酰基氨基) 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], $N^{\varepsilon 37}$-[2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[(4S)-4- 羧基 -4-(13- 羧基十三烷酰基氨基) 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]-[His^{31}, Gln^{34}, Lys^{37}]-GLP-1-(7-37)- 肽

[1623] Chem.53 :

[1624]



[1625] 制备方法 :SPPS 方法 B

[1626] LCMS4 :Rt = 1.99min, m/z :4697.0

[1627] UPLC(方法 :09_B2_1)Rt = 12.20min

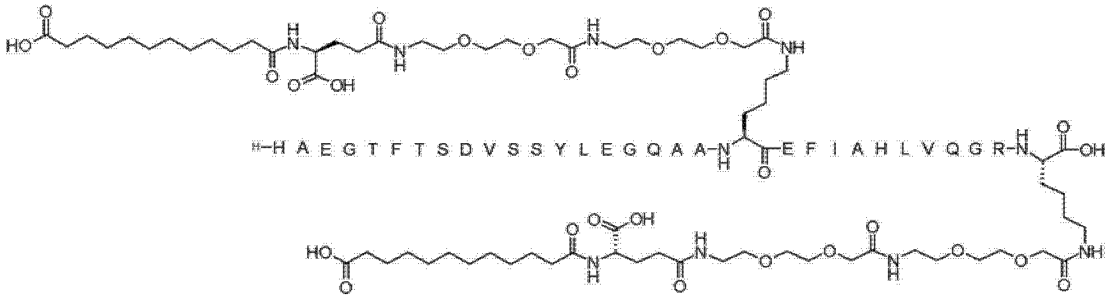
[1628] UPLC(方法 :05_B5_1) :Rt = 5.31min

[1629] 实施例 35

[1630] $N^{\varepsilon 26}$-[2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[(4S)-4- 羧基 -4-(11- 羧基十一烷酰基氨基) 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], $N^{\varepsilon 37}$-[2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[(4S)-4- 羧基 -4-(11- 羧基十一烷酰基氨基) 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]-[His^{31}, Gln^{34}, Lys^{37}]-GLP-1-(7-37)- 肽

[1631] Chem.54 :

[1632]



[1633] 制备方法 :SPPS 方法 B

[1634] LCMS4 :Rt = 1.89min, m/z :4641.2

[1635] UPLC(方法 :09_B2_1) :Rt = 11.2min

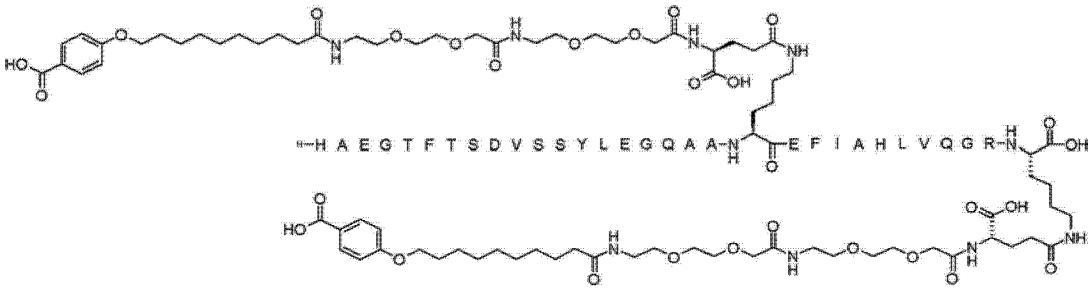
[1636] UPLC(方法 :05_B5_1) :Rt = 4.00min

[1637] 实施例 36

[1638] $N^{\varepsilon 26}$-[(4S)-4- 羧基 -4-[[2-[2-[2-[[2-[2-[2-[10-(4- 羧基苯氧基) 癸酰基氨基] 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], $N^{\varepsilon 37}$-[(4S)-4- 羧基 -4-[[2-[2-[2-[[2-[2-[2-[10-(4- 羧基苯氧基) 癸酰基氨基] 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]-[His^{31}, Gln^{34}, Lys^{37}]-GLP-1-(7-37)- 肽

[1639] Chem.55 :

[1640]



[1641] 制备方法 :SPPS 方法 B

[1642] LCMS4 :Rt :1.97min, m/z :4797.3 ;M/4 :1199.8 ;M/3 :1599.4

[1643] UPLC(方法 :09_B4_1) :Rt = 8.24min

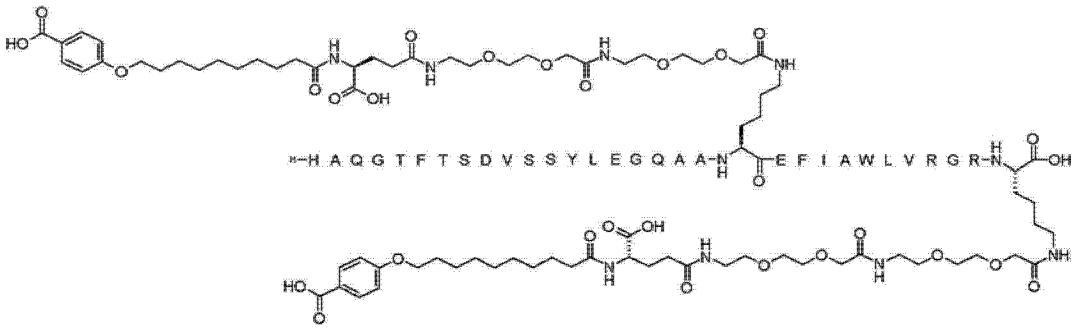
[1644] UPLC(方法 :05_B8_1) :Rt = 2.88min

[1645] 实施例 37

[1646] $N^{\varepsilon 26}$-[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], $N^{\varepsilon 37}$-[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]-[Gln^{9}, Arg^{34}, Lys^{37}]-GLP-1-(7-37)- 肽

[1647] Chem.56 :

[1648]



[1649] 制备方法 :SPPS 方法 B

[1650] LCMS4 :Rt = 1.06min, m/z :4873.3

[1651] UPLC(方法 :09_B2_1) :Rt = 13.18min

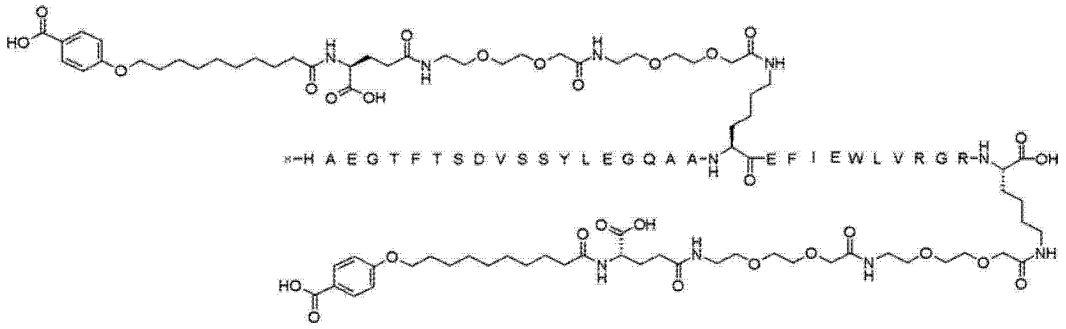
[1652] UPLC(方法 :05_B5_1) :Rt = 6.40min

[1653] 实施例 38

[1654] $N^{\varepsilon 26}$-[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], $N^{\varepsilon 37}$-[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]-[Glu^{30}, Arg^{34}, Lys^{37}]-GLP-1-(7-37)- 肽

[1655] Chem.57 :

[1656]



[1657] 制备方法 :SPPS 方法 B

[1658] LCMS4 :Rt = 2.13min, m/z :4932.7

[1659] UPLC(方法 :09_B2_1) :Rt = 13.39min

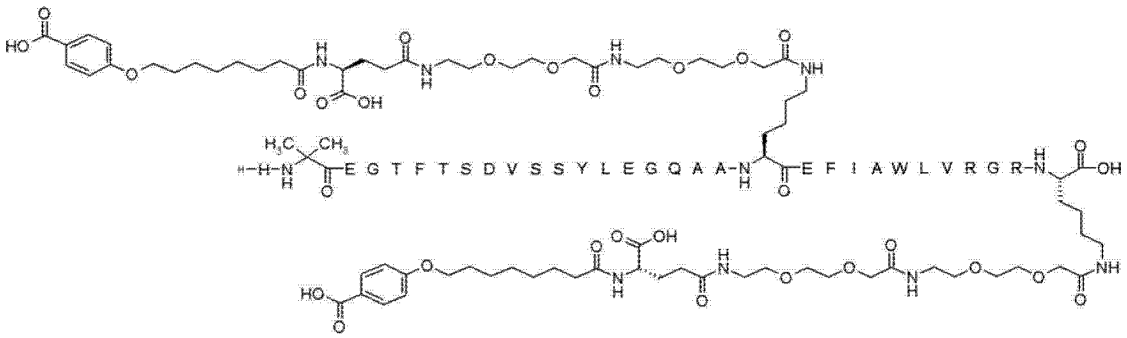
[1660] UPLC(方法 :04_A3_1) :Rt = 8.20min

[1661] 实施例 39

[1662] $N^{\varepsilon 26}$-[2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[(4S)-4- 羧基 -4-[8-(4- 羧基苯氧基) 辛酰基氨基] 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],$N^{\varepsilon 37}$-[2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[(4S)-4- 羧基 -4-[8-(4- 羧基苯氧基) 辛酰基氨基] 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]-[Aib^{8},Arg^{34},Lys^{37}]-GLP-1-(7-37)- 肽

[1663] Chem.58 :

[1664]



[1665] 制备方法 :SPPS 方法 B

[1666] LCMS4 :Rt :1.93min, m/z :4832.4 ;M/4 :1208.5 ;M/3 :1611.0

[1667] UPLC(方法 09B41) :Rt = 8.10min

[1668] UPLC(方法 04_A3_1) :Rt = 8.15min

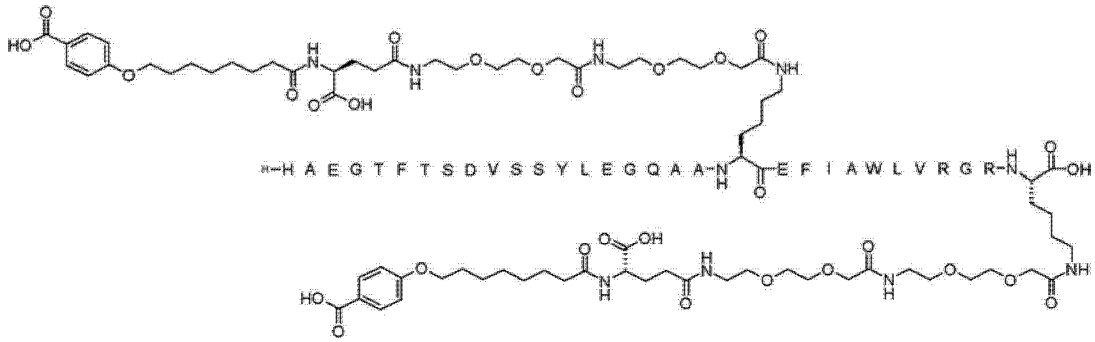
[1669] UPLC(方法 05_B5_1) :Rt = 5.30min

[1670] 实施例 40

[1671] $N^{\varepsilon 26}$-[2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[(4S)-4- 羧基 -4-[8-(4- 羧基苯氧基) 辛酰基氨基] 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],$N^{\varepsilon 37}$-[2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[(4S)-4- 羧基 -4-[8-(4- 羧基苯氧基) 辛酰基氨基] 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]-[Arg^{34},Lys^{37}]-GLP-1-(7-37)- 肽

[1672] Chem.59 :

[1673]



[1674] 制备方法 :SPPS 方法 B

[1675] LCMS4 :Rt :1.92min, m/z :4818.4 ;M/4 :1205.0 ;M/3 :1606.7

[1676] UPLC(方法 09_B4_1) :Rt = 8.06min

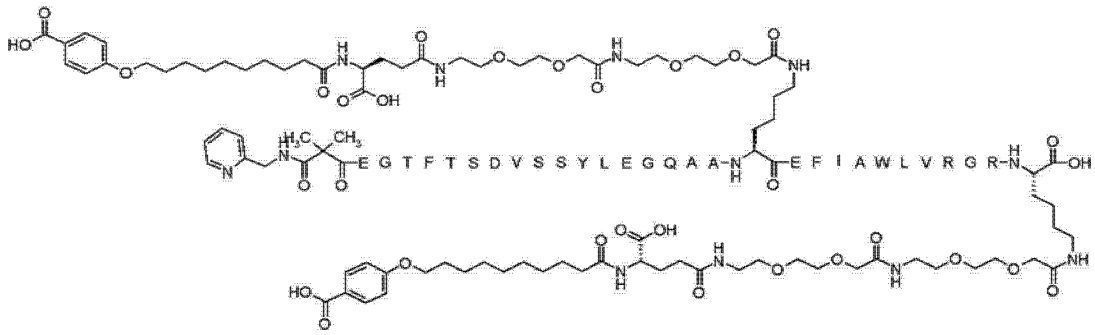
[1677] UPLC(方法 04_A3_1) :Rt = 8.02min

[1678] 实施例 41

[1679] N{9}-[2,2- 二甲基 -3- 氧代 -3-(吡啶 -2- 基甲氨基) 丙酰基], $N^{\varepsilon 26}$-[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], $N^{\varepsilon 37}$-[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]-[Arg^{34}, Lys^{37}]-GLP-1-(9-37)- 肽

[1680] Chem.60 :

[1681]



[1682] 制备方法 :SSPS 方法 B。使用与前述实施例中的 2,2- 二甲基 -N-[2-(1- 三苯甲基 -1H- 咪唑 -4- 基)- 乙基]- 丙酰胺酸的同样偶联条件, 将 2,2- 二甲基 -N- 吡啶 -2- 基甲基 - 丙酰胺酸偶联。采用 SPPS 方法 D, 将 Fmoc-Glu-OtBu 和 4-(9- 羧基 - 壬氧基)- 苯甲酸叔丁酯 (按照 WO2006/082204 实施例 25, 步骤 2 所述而制备)。

[1683] UPLC(方法 08_B4_1) :Rt = 8.98min

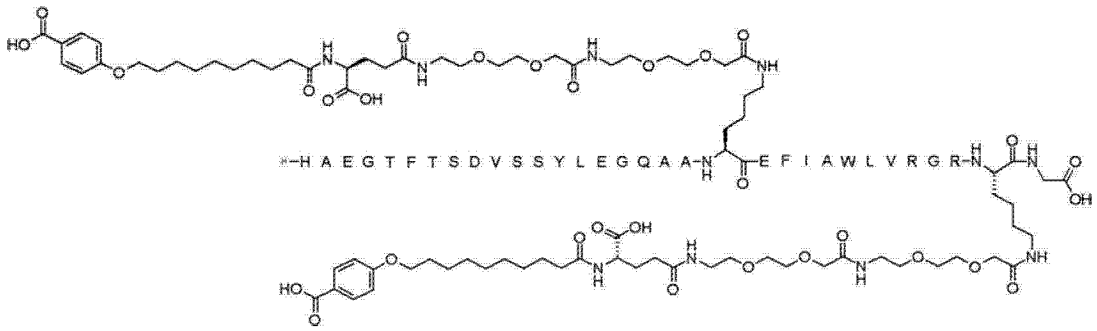
[1684] LCMS4 :Rt = 2.23min。m/z = 1624(m/3), 1218(m/4)

[1685] 实施例 42

[1686] $N^{\varepsilon 26}$-[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], $N^{\varepsilon 37}$-[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]-[Arg^{34}, Lys^{37}]-GLP-1-(7-37)- 肽酰基 -Gly

[1687] Chem.61 :

[1688]



[1689] 制备方法 :SSPS 方法 B

[1690] LCMS4 :Rt :2.05min, m/z :4931.5 ;M/4 :1233.3 ;M/3 :1644.4

[1691] UPLC(方法 09_B4_1) :Rt = 8.52min

[1692] UPLC(方法 05_B5_1) :Rt = 5.18min

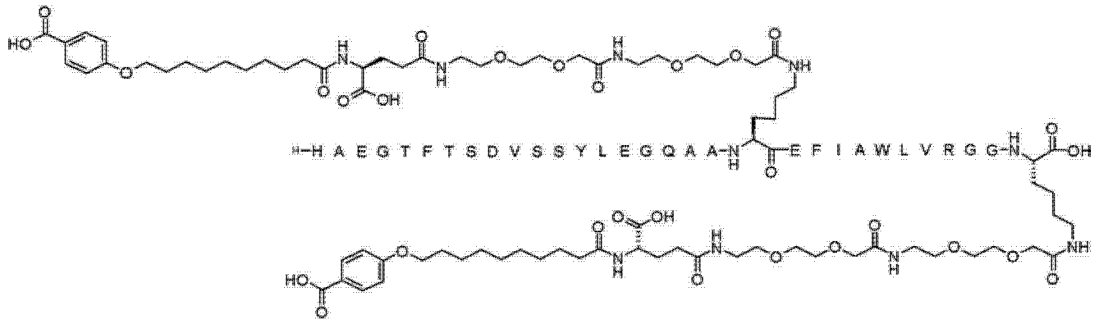
[1693] UPLC(方法 04_A3_1) :Rt = 9.24min

[1694] 实施例 43

[1695] $N^{\varepsilon 26}$-[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], $N^{\varepsilon 37}$-[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]-[Arg^{34}, Gly^{36}, Lys^{37}]-GLP-1-(7-37)- 肽

[1696] Chem.62 :

[1697]



[1698] 制备方法 :SSPS 方法 B

[1699] LCMS4 :Rt :2.18min, m/z :4775.3 ;M/4 :1194.5 ;M/3 :1592.4

[1700] UPLC(方法 :09_B4_1) :Rt = 9.01min

[1701] UPLC(方法 :04_A3_1) :Rt = 9.60min

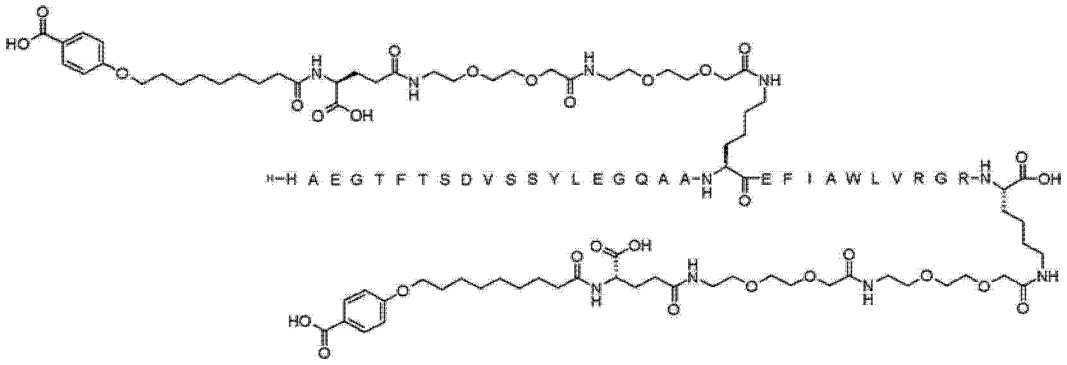
[1702] UPLC(方法 :05_B5_1) :Rt = 5.88min

[1703] 实施例 44

[1704] $N^{\varepsilon 26}$-[2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[(4S)-4- 羧基 -4-[9-(4- 羧基苯氧基) 壬酰基氨基] 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], $N^{\varepsilon 37}$-[2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[(4S)-4- 羧基 -4-[9-(4- 羧基苯氧基) 壬酰基氨基] 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]-[Arg^{34}, Lys^{37}]-GLP-1-(7-37)- 肽

[1705] Chem.63 :

[1706]



[1707] 制备方法 :SSPS 方法 B

[1708] LCMS4 :Rt :2.03min, m/z :4846.4 ;M/4 :1212.3 ;M/3 :1616.1

[1709] UPLC(方法 :09_B4_1) :Rt = 8.27min

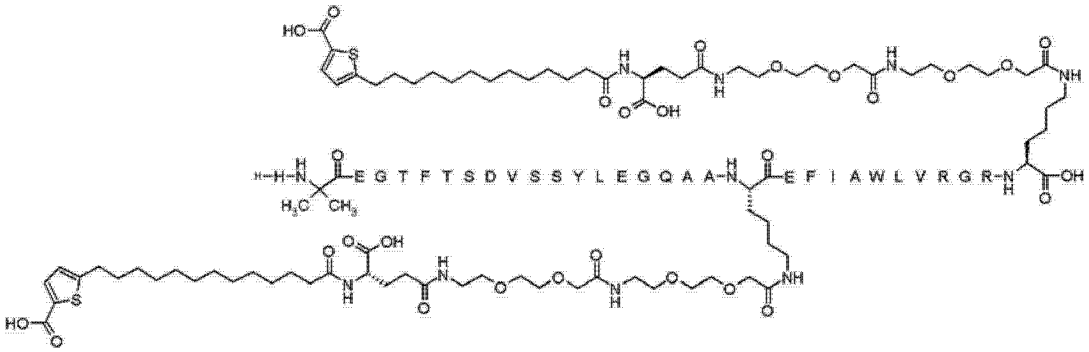
[1710] UPLC(方法 :05_B5_1) :Rt = 5.09min

[1711] 实施例 45

[1712] $N^{\varepsilon 26}$-[2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[(4S)-4- 羧基 -4-[13-(5- 羧基噻吩 -2- 基) 十三烷酰基氨基] 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], $N^{\varepsilon 37}$-[2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[(4S)-4- 羧基 -4-[13-(5- 羧基噻吩 -2- 基) 十三烷酰基氨基] 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]-[Aib^{8}, Arg^{34}, Lys^{37}]-GLP-1-(7-37)- 肽

[1713] Chem.64 :

[1714]



[1715] 制备方法 :SSPS 方法 B。采用 SSPS 方法 D 方法, 在 Liberty 合成仪上将 8-(9- 芴基甲氧基羰基 - 氨基)-3,6- 二氧杂辛酸 (购自 Iris Biotech)、Fmoc-Glu-OtBu 和 5-(12- 羧基 - 十二烷基)- 噻吩 -2- 羧酸叔丁酯 (按照 WO07128815 的实施例 6 所述而制备) 偶联。

[1716] UPLC(方法 08_B4_1) :Rt = 9.87min

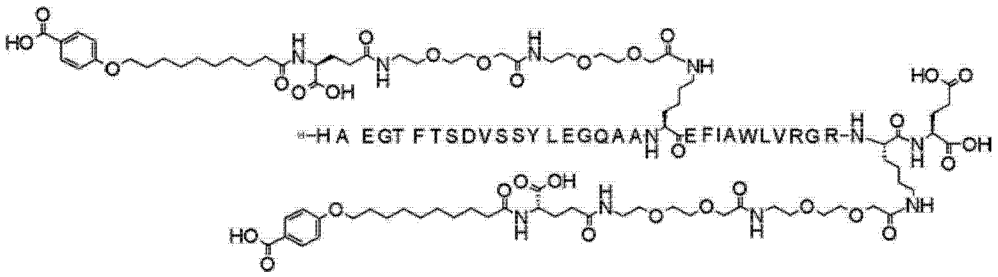
[1717] LCMS4 :m/z = 1651(m/3), 1239(m/4), 991(m/5)

[1718] 实施例 46

[1719] $N^{\varepsilon 26}$-[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], $N^{\varepsilon 37}$-[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]-[Arg^{34}, Lys^{37}]-GLP-1-(7-37)- 肽酰基 -Glu

[1720] Chem.65 :

[1721]



[1722] 制备方法 :SPPS 方法 A

[1723] UPLC(方法 10_B14_1) :Rt = 6.54min

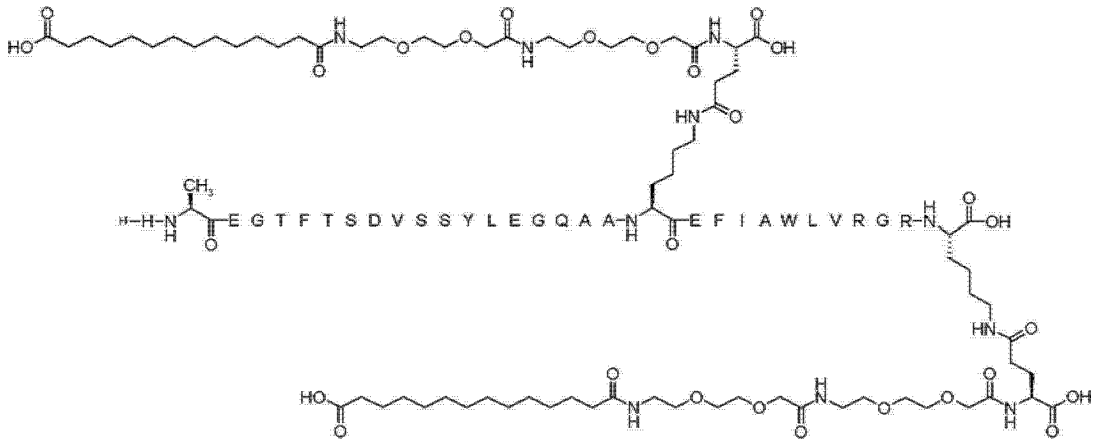
[1724] LCMS4 :(M/5)+1 = 1001 ;(M/4)+1 = 1251 ;准确量= 5003.5

[1725] 实施例 47

[1726] $N^{\varepsilon 26}$-[(4S)-4- 羧基 -4-[[2-[2-[2-[[2-[2-[2-(13- 羧基十三烷酰基氨基) 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],$N^{\varepsilon 37}$-[(4S)-4- 羧基 -4-[[2-[2-[2-[[2-[2-[2-(13- 羧基十三烷酰基氨基) 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]-[Arg^{34}, Lys^{37}]-GLP-1-(7-37)- 肽

[1727] Chem.66 :

[1728]



[1729] 制备方法 :SSPS 方法 B

[1730] UPLC(方法 :09_B4_1) :Rt = 8.76min.

[1731] UPLC(方法 :04_A6_1) :Rt = 6.02min.

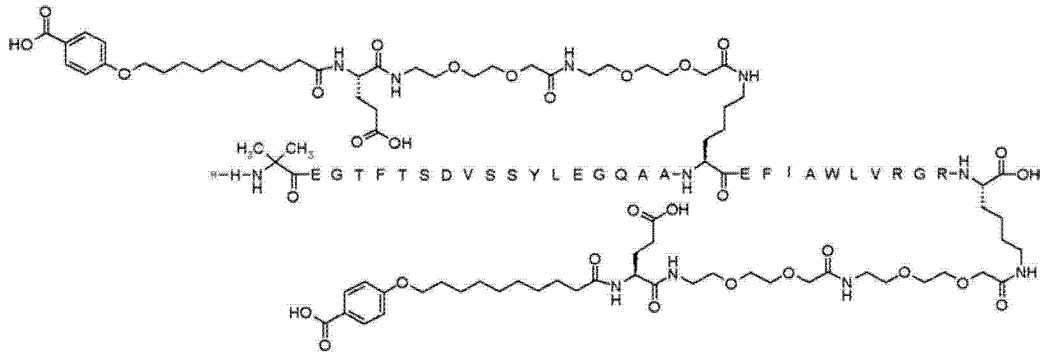
[1732] LCMS4 :Rt = 2.12min。m/z :4775 ;M/4 = 1194 ;M/5 = 955

[1733] 实施例 48

[1734] $N^{\varepsilon 26}$-[2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[(2S)-4- 羧基 -2-[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], $N^{\varepsilon 37}$-[2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[(2S)-4- 羧基 -2-[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]-[Aib^{8}, Arg^{34}, Lys^{37}]-GLP-1-(7-37)- 肽

[1735] Chem.67 :

[1736]



[1737] 制备方法 :SSPS 方法 B

[1738] UPLC(方法 :08_B2_1) :Rt = 13.193min

[1739] UPLC(方法 :05_B5_1) :Rt = 6.685min

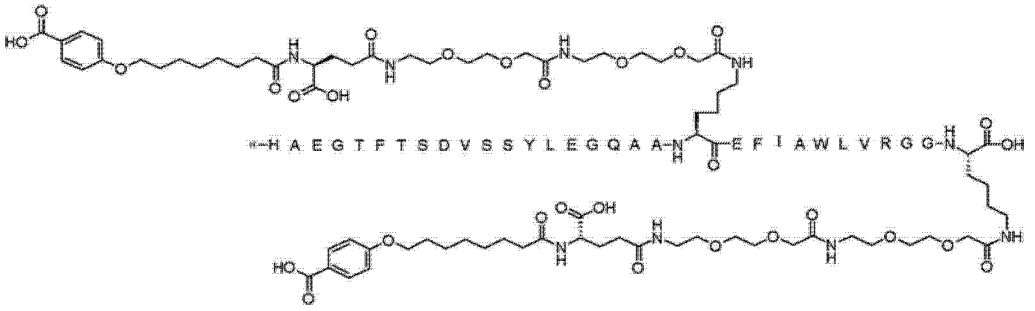
[1740] LCMS4 :m/z :4887 ;m/3 :1630 ;m/4 :1222 ;m/5 :978

[1741] 实施例 49

[1742] $N^{\varepsilon 26}$-[2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[(4S)-4- 羧基 -4-[8-(4- 羧基苯氧基) 辛酰基氨基] 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],$N^{\varepsilon 37}$-[2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[(4S)-4- 羧基 -4-[8-(4- 羧基苯氧基) 辛酰基氨基] 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]-[Arg34, Gly36, Lys37]-GLP-1-(7-37)- 肽

[1743] Chem.68 :

[1744]



[1745] 制备方法 :SSPS 方法 B

[1746] LCMS4 :Rt :2.07min, m/z :4719.2 ;M/4 :1180.5 ;M/3 :1573.7

[1747] UPLC (方法 :08_B4_1) :Rt = 8.45min

[1748] UPLC (方法 :05_B5_1) :Rt = 5.19min

[1749] 药理学方法

[1750] 实施例 50 :体外功效

[1751] 本实施例的目的在于在体外测试 GLP-1 衍生物的活性或功效。

[1752] 实施例 1-49 的 GLP-1 衍生物的功效如下测定, 即在含有表达人 GLP-1 受体的膜的培养基中对环 AMP(cAMP) 形成的刺激。

[1753] 原理

[1754] 用目标 GLP-1 类似物或衍生物刺激来自表达人 GLP-1 受体的、稳定转染的细胞系 BHK467-12A(tk-ts13) 的纯化质膜, 并使用 AlphaScreenTM cAMP 测定试剂盒 (Perkin Elmer Life Sciences) 来测定 cAMP 产生的效力。AlphaScreen 测定的基本原理是内源 cAMP 和外

源加入的生物素 -cAMP 之间的竞争。通过使用与受体珠缀合的特异性抗体，来进行对 cAMP 的捕获。

[1755] 细胞培养和膜的制备

[1756] 选择稳定转染的细胞系和高表达克隆，用于筛选。在 5％ CO_2 中，在 DMEM、5％ FCS、1％ Pen/Strep（青霉素 / 链霉素）和 0.5mg/ml 选择标记 G418 中培养细胞。

[1757] 大约 80％汇合的细胞用 PBS 洗涤 2 次并用 Versene（乙二胺四乙酸四钠盐的水溶液）收获，再在 1000rpm 离心 5min，除去上清液。额外步骤均在冰上进行。细胞沉淀在 10ml 缓冲液 1(20mM Na-HEPES，10mM EDTA，pH ＝ 7.4) 中通过 Ultrathurax 匀浆 20-30 秒钟，在 20,000rpm 离心 15min，将沉淀物重悬于 10ml 缓冲液 2(20mM Na-HEPES，0.1mM EDTA，pH ＝ 7.4)。悬浮液匀浆 20-30 秒钟并在 20,000rpM 离心 15min。在缓冲液 2 中悬浮、匀浆和离心的过程重复一次，然后将膜重悬于缓冲液 2。测定蛋白浓度并将膜贮存于 -80℃，直到使用。

[1758] 测定在平底 1/2- 面积的 96 孔板 (Costar 目录号 :3693) 中进行。每孔的终体积为 50μl。

[1759] 溶液和试剂

[1760] 来自 Perkin Elmer Life Sciences 的 AlphaScreen cAMP 测定试剂盒（目录号：6760625M)；含有抗 cAMP 受体珠 (10U/μl)，链霉抗生物素供体珠 (10U/μl) 和生物素化 -cAMP(133U/μl)。

[1761] AlphaScreen 缓冲液，pH ＝ 7.4 :50mM TRIS-HCl(Sigma，目录号 :T3253) ;5mM HEPES(Sigma，目录号 :H3375) ;10mM MgCl2，$6H_2O$(Merck，目录号 :5833) ;150mM NaCl(Sigma，目录号 :S9625) ;0.01％吐温 (Merck，目录号 :822184)。使用之前，将以下成分加入到 AlphaScreen 缓冲液中（终浓度按照指示）:BSA(Sigma，目录号 A7906) :0.1％；IBMX(Sigma，目录号 I5879) :0.5mM ;ATP(Sigma，目录号 A7699) :1mM ;GTP(Sigma，目录号 G8877) :1uM。

[1762] cAMP 标准（测定中的稀释倍数＝ 5) :cAMP 溶液 :5μL 5mMcAMP- 储液 +495μL AlphaScreen 缓冲液。

[1763] 在 AlphaScreen 缓冲液中制备 cAMP 标准以及待测 GLP-1 类似物或衍生物的合适稀释系列，例如，以下 8 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，以及例如 10-6 至 3x10-11cAMP 系列。

[1764] 膜 / 受体珠

[1765] 使用 hGLP-1/BHK 467-12A 膜 ;6μg/ 孔相当于 0.6mg/ml（每孔的膜用量可不同）

[1766] “无膜”:在 AlphaScreen 缓冲液中受体珠 (15μg/ml 终）

[1767] “6μg/ 孔的膜”:膜 + 受体珠 (15μg/ml 终）在 AlphaScreen 缓冲液中

[1768] 将 10μl”无膜”加入到 cAMP 标准（每孔一式两份）和阳性及阴性对照中

[1769] 将 10μl “6μg/ 孔的膜”加入到 GLP-1 和类似物（每孔一式两份 / 一式三份）

[1770] 阳性对照 :10μl”无膜”+10μl AlphaScreen 缓冲液

[1771] 阴性对照 :10μl”无膜”+10μl cAMP 储液 (50μM)

[1772] 因为珠子对直射光敏感，所以任何处理都在避光处（尽可能黑暗）或绿光中进行。所有稀释都在冰上进行。

[1773] 步骤

[1774] 1. 制备 AlphaScreen 缓冲液。

[1775] 2. 在 AlphaScreen 缓冲液中溶解和稀释 GLP-1/ 类似物 /cAMP 标准。

[1776] 3. 制备供体珠溶液并在室温下孵育 30min。

[1777] 4. 将 cAMP/GLP-1/ 类似物加入到板中 :10μl/ 孔。

[1778] 5. 制备膜 / 受体珠溶液并将其加入到板中 :10μl/ 孔。

[1779] 6. 加供体珠 :30μl/ 孔。

[1780] 7. 用铝箔包板并在室温下在摇床上孵育 3 小时 (非常缓慢)。

[1781] 8. 在 AlphaScreen 上计数 - 将各板在 AlphaScreen 中预孵育 3 分钟,然后计数。

[1782] 结果

[1783] 使用 Graph-Pad Prism 软件 (第 5 版) 计算 EC_{50}[pM] 值。

[1784] 证实所有衍生物的体外功效。43 种衍生物具有良好的体外功效,相应的 EC_{50} 为 2000pM 或以下 ;42 种衍生物甚至更强效,其 EC_{50} 为 1000pM 或以下 ;35 种衍生物具有更进一步改善的功效,相应的 EC_{50} 为 500pM 或以下 ;19 种衍生物非常强效,相应的 EC_{50} 为 200pM 或以下 ;和 10 种衍生物具有非常好的功效,相应的 EC_{50} 为 100pM 或以下。

[1785] 为了比较,Journal of Medicinal Chemistry(2000),第 43 卷,第 9 期,第 1664-669 页的表 1 中的第 13 号化合物 (在 $K^{26,34}$ 酰化并具有双 -C12- 二酸的 GLP-1(7-37)) 具有体外功效,相应的 EC_{50} 为 1200pM。

[1786] 如有必要,可计算相对于 GLP-1 的倍数变化 EC_{50}(GLP-1)/EC_{50}(类似物)-3693.2.

[1787] 实施例 51 :GLP-1 受体结合

[1788] 本实验的目的是研究 GLP-1 受体与 GLP-1 衍生物的结合,以及白蛋白的存在如何潜在地影响结合。这可在下述体外实验中进行。

[1789] 实施例 1-49 的 GLP-1 衍生物与人 GLP-1 受体的结合亲和力测定如下 :即通过测定它们从受体中取代 ^{125}I-GLP-1 的能力。利拉鲁肽和塞马鲁肽可包括在内,作为参比化合物。为了测定衍生物与白蛋白的结合,用低浓度白蛋白 (0.005% - 相当于其在示踪剂 (tracer) 中的残余量)、以及用高浓度白蛋白 (加入 2.0%) 进行测定。结合亲和力 IC_{50} 的变化表明目标肽与白蛋白结合,因此在动物模型中预测目标肽的潜在延长的药物动力学特征。

[1790] 条件

[1791] 物种 (体外) :仓鼠

[1792] 生物终点 :受体结合

[1793] 测定方法 :SPA

[1794] 受体 :GLP-1 受体

[1795] 细胞系 :BHK tk-ts13

[1796] 细胞培养和膜的纯化

[1797] 选择稳定转染的细胞系和高表达克隆,用于筛选。在 5% CO_2 中,在 DMEM、5% FCS、1% Pen/Strep(青霉素 / 链霉素) 和 1.0mg/ml 选择标记 G418 中培养细胞。

[1798] 细胞 (大约 80% 汇合) 用 PBS 洗涤 2 次并用 Versene(乙二胺四乙酸四钠盐的水溶液) 收获,再通过在 1000rpm 离心 5min 而分离它们。在后续步骤中细胞 / 细胞沉淀必须尽可能保持在冰上。细胞沉淀在合适量的缓冲液 1(取决于细胞量,例如 10ml) 中用 Ultrathurax 匀浆 20-30 秒钟。匀浆在 20000rpm 离心 15 分钟。沉淀物重悬 (匀浆) 于 10ml 缓冲液 2

中并再次离心。该步骤再重复一次。所得沉淀物重悬于缓冲液 2 中，并测定蛋白浓度。将膜贮存于 -80℃。

[1799] 缓冲液 1 ：20mM Na-HEPES+10mM EDTA，pH7.4

[1800] 缓冲液 2 ：20mM Na-HEPES+0.1mM EDTA，pH7.4

[1801] 结合测定 ：

[1802] SPA ：

[1803] 将试验化合物、膜、SPA- 颗粒和 [^{125}I]]-GLP-1(7-36)NH_2 在测定缓冲液中稀释。将 25ul（微升）试验化合物加入到 Optiplate 中。加入 HSA（含 2％ HSA 的“高白蛋白”实验）、或缓冲液（含 0.005％ HSA 的“低白蛋白”实验）(50ul)。加入 5-10ug 蛋白 / 样品 (50ul)，相当于 0.1-0.2mg 蛋白 /ml（对于每次膜制备而言优选是最佳的）。加入 SPA- 颗粒（小麦胚芽凝集素 SPA 珠，Perkin Elmer，#RPNQ0001)，加入量为 0.5mg/ 孔 (50ul)。孵育开始于 [^{125}I]-GLP-1]-(7-36)NH_2（终浓度 0.06nM，相当于 49.880DPM，25ul)。将各板用 PlateSealer 密封并在 30℃孵育 120 分钟，同时振摇。将各板离心 (1500rpm，10min) 并在 Topcounter 中计数。

[1804] 测定缓冲液 ：

[1805] 50mM HEPES

[1806] 5mM EGTA

[1807] 5mM MgCl2

[1808] 0.005％吐温 20

[1809] pH7.4

[1810] HSA 是 SIGMA A1653。

[1811] 计算

[1812] 从曲线中读出 IC_{50} 值作为从受体中取代 50％的 ^{125}I-GLP-1 的浓度，并测定 [(IC_{50}/nM) 高 HSA]/[(IC_{50}/nM) 超低 HSA] 的比率。

[1813] 通常，在低白蛋白浓度时与 GLP-1 受体的结合应当尽可能好，这对应于低 IC_{50} 值。

[1814] 在高白蛋白浓度时 IC_{50} 值是白蛋白对衍生物与 GLP-1 受体结合的影响的度量。正如所知，GLP-1 衍生物也与白蛋白结合。这通常是所需的效应，其延长它们的血浆寿命。因此，在高白蛋白时 IC_{50} 值通常高于在低白蛋白时的 IC_{50} 值，对应于与 GLP-1 受体的结合降低，这是由与 GLP-1 受体结合竞争的白蛋白结合所致。。

[1815] 因此，可采用高比率 (IC_{50} 值（高白蛋白）/IC_{50} 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 (IC_{50} 值（高白蛋白）高，IC_{50} 值（低白蛋白）低）的指示。

[1816] 结果

[1817] 得到以下结果，其中“比率”是指 [(IC_{50}/nM) 高 HSA]/[(IC_{50}/nM) 低 HSA]) ：

[1818] 除了 2 种衍生物之外，所有衍生物的比率都高于 1.0 ；40 种衍生物高于 10 ；34 种衍生物高于 25 ；22 种衍生物高于 50 ；12 种衍生物高于 100 ；和 3 种衍生物的比率高于 250。

[1819] 而且，就 IC_{50}（低白蛋白）而言，所有衍生物的 IC_{50}（低白蛋白）都低于 600nM ；除了 1 种之外，所有都低于 500nM ；46 种衍生物低于 100nM ；44 种衍生物低于 50.00nM ；34 种衍生物低于 10.00nM ；23 种衍生物低于 5.00nM ；和 7 种衍生物低于 1.00nM。

[1820] 最后，就 IC_{50}（高白蛋白）而言，所有衍生物的 IC_{50}（高白蛋白）都在 1000.00nM 或以下；46 种衍生物低于 1000.00nM；39 种衍生物低于 500.00nM；7 种衍生物低于 100.00nM；和 4 种衍生物低于 50.00nM。

[1821] 实施例 52：口服生物利用度的评价

[1822] 本实验的目的是评价 GLP-1 衍生物的口服生物利用度。

[1823] 最终，在大鼠体内研究了将实施例 2，15-17，21，25，32，36-39 和 42-48 的 GLP-1 衍生物直接注射到肠腔后的血浆暴露，如下所述。

[1824] 在 55mg/ml 癸酸钠溶液中测定 1000uM 浓度的 GLP-1 衍生物。

[1825] 到货时体重大约 240g 的 32 只雄性 Sprague Dawley 大鼠得自 Taconic(Denmark)，通过简单随机化使其接受不同的治疗，每组 4 只大鼠。实验之前，让大鼠禁食大约 18 小时并对其进行常规麻醉 (Hypnorm/Dormicum)。

[1826] 在空肠的近端部分（十二指肠的 10cm 远端）或在中肠（盲肠的 50cm 近端）给予 GLP-1 衍生物。将 10cm 长的 PE50 导管插入空肠，向前至少 1.5cm 插入空肠，并在给药之前通过在远离末端处用 3/0 缝合线绑扎在肠和导管周围而固定，以防渗漏或导管位移。将导管放置，无需注射器和针头，并将 2ml 盐水给予腹部，然后用伤口夹闭合切口。

[1827] 用 1ml 注射器，通过导管将 100μl 各 GLP-1 衍生物注入空肠腔内。然后用另一注射器将 200μl 空气推入空肠腔内，以“冲洗”导管。该注射器不与导管的连接以防流回到导管中。

[1828] 在所需时间间隔（通常时间是 0，10，30，60，120 和 240min）从尾静脉采集血液样品 (200ul) 到 EDTA 管并在 20 分钟内，在 4℃离心 5 分钟，10000G。将血浆 (75ul) 分离到 Micronic 管，立即冷冻并保存在 -20℃，直到用于使用 LOCI（发光氧通道免疫测定）分析各 GLP-1 衍生物的血浆浓度，这大致按照以下文献所描述的胰岛素测定：Poulsen 和 Jensen 在 Journal of Biomolecular Screening 2007，第 12 卷，第 240-247 页中。供体珠用链霉抗生物素包被，而受体珠与能识别肽的 mid-/C- 端表位的单克隆抗体缀合。将对其 N- 端具有特异性的另一单克隆抗体生物素化。将这 3 种反应物与分析物混合并构成 2 位点的免疫复合物。复合物发光，从供体珠中释放单线态氧原子，将其导入受体珠并触发化学发光，所述光在 Envision 读板器上测量。光量与化合物浓度成比例。

[1829] 血液采样之后，在麻醉下将大鼠处死并打开腹腔，以证实导管放置正确。

[1830] 随时间变化测定平均 (n = 4) 血浆浓度 (pmol/l)。每次治疗都计算血浆浓度 (pmol/l) 除以给药溶液浓度（μmol/l）的比率，对于 t = 30min（将化合物注射到空肠中过 30 分钟后），评价结果（在 30min 时的剂量校正暴露），作为肠生物利用度的替代测定。剂量 - 校正暴露已经证明与实际生物利用度密切相关。

[1831] 得到以下结果，其中在 30min 时的剂量 - 校正暴露是指（将化合物注射到空肠中过 30 分钟后的血浆浓度 (pM)），除以（给药溶液中化合物的浓度（μM））：

[1832] 所有衍生物在 30min 时的剂量 - 校正暴露均高于 40；17 种高于 50，14 种高于 70；11 种高于 100；6 种高于 125；和 2 种衍生物高于 150。

[1833] 为了比较，Journal of Medicinal Chemistry(2000)，第 43 卷，第 9 期，第 1664-669 页的表 1 中 13 号化合物（用双 -C12- 二酸在 $K^{26,34}$ 上酰化的 (GLP-1(7-37)) 在 30min 的剂量 - 校正暴露低于 40，而塞马鲁肽在 30min 的剂量 - 校正暴露在低于 40 的同样范围内。

[1834] 实施例 53 :对血糖和体重的效应

[1835] 本研究的目的是在糖尿病设置 (in a diabetic setting) 中证实 GLP-1 衍生物对血糖 (BG) 和体重 (BW) 的效应。

[1836] 在剂量 - 反应研究中,在肥胖的糖尿病小鼠模型 (db/db 小鼠) 中测试实施例 2,4-5,17 和 29 的 GLP-1 衍生物,如下所述。

[1837] 本研究使用 50 只 db/db 小鼠 (Taconic, Denmark),从出生开始饲喂饲料 NIH31(NIH 31M 啮齿饲料,购自 Taconic Farms, Inc., US,参见 www.taconic.com),年龄 7-9 周。让小鼠随意接近标准饲料 (例如 Altromin 1324, Brogaarden, Gentofte, Denmark) 和自来水并保持在 24℃。在 1-2 周适应之后,连续 2 天 2 次评价基础血糖 (即在 9am)。将具有最低血糖值的 8 只小鼠排除在实验之外。根据平均血糖值,选择剩余的 42 只小鼠进行进一步实验并分为血糖水平相匹配的 7 组 (n = 6)。在实验中,在 5 天的持续时间中使用小鼠至多 4 次。末次实验之后,对小鼠处以安乐死。

[1838] 7 组接受治疗如下 :

[1839] 1 :溶媒, s.c.

[1840] 2 :GLP-1 衍生物,0.3nmol/kg, s.c.

[1841] 3 :GLP-1 衍生物,1.0nmol/kg, s.c.

[1842] 4 :GLP-1 衍生物,3.0nmol/kg, s.c.

[1843] 5 :GLP-1 衍生物,10nmol/kg, s.c.

[1844] 6 :GLP-1 衍生物,30nmol/kg, s.c.

[1845] 7 :GLP-1 衍生物,100nmol/kg, s.c.

[1846] 溶媒 :50mM 磷酸钠,145mM 氯化钠,0.05% 吐温 80, pH7.4。

[1847] 将 GLP-1 衍生物溶于溶媒中至浓度为 0.05、0.17、0.5、1.7、5.0 和 17.0nmol/ml。动物经 s.c 接受剂量体积 6ml/kg(即 300μl 每 50g 小鼠)。

[1848] 给药当天,在给小鼠称体重之后,在 -1/2h(8.30am) 评价血糖。在大约 9am(0 时) 给予 GLP-1 衍生物。给药当天在 1、2、4 和 8h(10am、11am、1pm 和 5pm) 评价血糖。

[1849] 在随后几天,在 24、48、72 和 96h,在给药之后 (即在第 2、3、4、5 天的 9am) 评价血糖。每天在给小鼠称体重之后进行血糖采样。

[1850] 在数字称上给单个小鼠称体重。

[1851] 用于测量血糖的样品采自有意识小鼠的尾尖毛细血管。将 10μl 血采集到肝素化毛细管中并移至 500μl 葡萄糖缓冲液 (EKF 系统溶液, Eppendorf, Germany) 中。采用葡萄糖氧化酶方法 (葡萄糖分析仪 Biosen5040, EKF Diagnostic, GmbH, Barleben, Germany) 测定葡萄糖浓度。将样品在室温下保存至多 1h,直至分析。如果分析必须推迟的话,将样品在 4℃保存最多 24h。

[1852] ED_{50} 是达到最大效应的一半的剂量,以 nmol/kg 计。该值是根据衍生物降低体重的能力以及降低血糖的能力而计算的,说明如下。

[1853] 体重的 ED_{50} 是以经皮下给予衍生物后 24 小时对 BW 的变量达到最大效应的一半时的剂量来计算。例如,如果 24 小时后体重的最大减少为 4.0g,则 ED_{50} 体重就是 24 小时后体重的减少为 2.0g 时的剂量,以 nmol/kg 计。该剂量 (ED_{50} 体重) 可从剂量 - 反应曲线中读出。

[1854] 血糖的 ED_{50} 是以经皮下给予所述类似物后 8 小时对 AUC 的变量 BG 达到最大效应的一半时的剂量来计算。

[1855] ED_{50} 值仅可当存在合适的 S 形剂量 - 反应关系并有最大反应的明确限定时才可计算。因此，如果不是这样的话，就要在不同剂量范围重测目标衍生物，直到获得 S 形剂量 - 反应关系。

[1856] 得到以下结果 :

[1857] 所测衍生物对血糖和体重具有预期效果（在这两种情况下都降低）。此外，得到 S 形剂量 - 反应曲线，能分别计算血糖和体重的 ED_{50} 值，如上所述。

[1858] 实施例 54 :在小型猪中的半衰期

[1859] 本研究的目的是经 i.v. 给予小型猪之后测定 GLP-1 衍生物的体内延长，即其作用时间的延长。这是在药物动力学 (PK) 研究中进行，其中测定目标衍生物的终末半衰期。终末半衰期通常是指在初始分布期之后测得的某种血浆浓度减半所需的时段。

[1860] 得自 Ellegaard Göttingen Minipigs(Dalmose, Denmark) 的大约 7-14 月龄、体重大约 16-35kg 的雄性Göttingen小型猪用于研究。将小型猪单独饲养并每天 1 次或 2 次限制性饲喂 SDS 小型猪饲料 (Special Diets Services, Essex, UK)。在至少 2 周适应之后，将 2 根永久性中央静脉导管插入各动物的尾侧或颅侧的腔静脉。术后让动物恢复 1 周，然后用于重复的药物动力学研究，在两次给药之间给予合适的洗出期 (wash-out period)。

[1861] 动物在给药前禁食大约 18h 并在给药后禁食至少 4h，但整个周期内都让其随意饮水。

[1862] 将实施例 2、4-5、16-17、25、29 和 39 的 GLP-1 衍生物溶于 50mM 磷酸钠，145mM 氯化钠，0.05％吐温 80，pH 7.4 中，通常浓度为 20-60nmol/ml。通过一根导管，静脉内注射（体积通常相当于 1-2nmol/kg，例如 0.033ml/kg) 所述化合物，然后在预定时间点采血，直到给药后 13 天（优选通过另一根导管）。将血液样品（例如 0.8ml) 采集到 EDTA 缓冲液 (8mM) 中，然后在 4℃和 1942G 离心 10 分钟。将血浆移液至干冰上的 Micronic 管中，并在 -20℃保存，直到使用 ELISA 或类似的基于抗体的测定或 LC-MS，对相应的 GLP-1 化合物的血浆浓度进行分析。通过无房室模型，在 WinNonlin v.5.0(Pharsight Inc., Mountain View, CA, USA) 中分析个体血浆浓度 - 时间曲线，并测定所得终末半衰期（调和平均值）。

[1863] 结果

[1864] 除了 1 种衍生物之外，所有所测衍生物的半衰期均为至少 12 小时，6 种的半衰期为至少 24 小时，5 种的半衰期为至少 36 小时，3 种的半衰期为至少 48 小时，和 2 种的半衰期为至少 60 小时。

[1865] 实施例 55 :对葡萄糖介导的胰岛素分泌的影响

[1866] 本实施例的目的是测试 GLP-1 衍生物对葡萄糖介导的胰岛素分泌的影响。

[1867] 这在Göttingen小型猪中进行，使用静脉内葡萄糖耐受试验 (IVGTT)。

[1868] 7-14 月龄的雄性Göttingen小型猪 (Ellegaard Göttingen小型猪 A/S, Dalmose, Denmark) 用于研究。在适应期间和实验期间将动物在单独围栏中饲养。在至少 2 周适应之后，将 2 根永久性中央静脉导管插入各动物的尾侧或颅侧的腔静脉。术后让动物恢复 1 周，然后用于重复研究，在两次给药之间给予合适的洗出期。

[1869] 每天 1-2 次给猪限制性喂食 SDS 小型猪饲料 (Special Diets Services, Essex, UK)

并让其随意饮水。

[1870] 在单剂量之后或在逐渐增加剂量（以避免急性高剂量的副作用）的时期之后，测试 GLP-1 衍生物的效果。经 i.v. 或 s.c 在耳后薄层皮肤内给予 GLP-1 衍生物。

[1871] 对于每种所测 GLP-1 衍生物，都有溶媒治疗（或未经治疗的）基线组和对应于 2-6 个不同血浆浓度水平的 2-6 个 GLP-1 剂量组，其水平通常约在 3000-80000pM(n = 5-8)。

[1872] 对于每种 GLP-1 衍生物，进行 1 或 2 小时的静脉内葡萄糖耐受试验。实验之前让猪禁食大约 18h。检查中央静脉导管是开放的，然后采集 2 份基线血液样品。在 0 分钟采样之后，在 30 秒的时段内，经 i.v. 给予 0.3g/kg 葡萄糖（葡萄糖 500g/L，SAD）并用 20ml 无菌的 0.9％ NaCl 冲洗导管。通常在相对于葡萄糖推注的以下时间点采集血液样品：-10、-5、0、2、5、10、15、20、25、30、40、50、60、70、80、90、100、110、120 分钟，并且在每次血液采样之后都用含有 10U/ml 肝素的 4ml 无菌的 0.9％ NaCl 冲洗导管。将用于衍生物的胰岛素、葡萄糖和血浆浓度的血液样品移至包被有 EDTA 的管中。在 1 小时内将各管贮存在湿冰中，直到离心 (4℃，3000rpm，10min)，将血浆移液到干冰上的 Micronic 管中并在 -20℃贮存，直到分析。根据 GLP-1 衍生物半衰期，在 t = 0min、或在 t = 0min 和在试验结束时 (t = 60min 或 t = 120min) 测定血浆浓度。采用葡萄糖氧化酶方法，根据制造商的使用指南，用含 10μL 血浆的 500μL 缓冲液 (EBIO plus 自动分析器和溶液，Eppendorf，Germany) 分析葡萄糖。采用合适的免疫测定（例如 LOCI，参见例如 Journal of Biomolecular Screening 2007，第 12 卷，第 240-247 页）分析胰岛素。用 ELISA 或类似的基于抗体的测定或 LC-MS 来分析 GLP-1 衍生物的血浆浓度。

[1873] 对每次研究，都计算胰岛素曲线下面积 (AUC 胰岛素）并用作胰岛素分泌的度量。使用单侧 ANOVA 或其它合适的统计学分析，将不同剂量组与相应的溶媒 / 基线组进行比较。也可计算 AUC 胰岛素的 EC50。

[1874] 实施例 56：对饲料摄取的影响

[1875] 本实验的目的是研究 GLP-1 衍生物对猪的饲料摄取的影响。这是在如下所述的药效动力学 (PD) 研究中进行，其中在给予单剂量 GLP-1 衍生物后的 1、2、3 和 4 天测量饲料摄取，并与溶媒治疗对照组进行比较。

[1876] 使用雌性 Landrace Yorkshire Duroc(LYD) 猪，大约 3 月龄，体重大约 30-35kg(n = 3-4/ 组）。在适应动物设施期间，将动物分组饲喂 1-2 周。在实验期间，将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。在适应期间和实验期间的所有时间，让动物随意进食猪饲料 (Svinefoder，Antonio)。通过每 15 分钟记录饲料重量而在线监测食物摄取。所用系统是 Mpigwin(Ellegaard Systems，Faaborg，Denmark)。

[1877] 将 GLP-1 衍生物溶于磷酸缓冲液 (50mM 磷酸盐，0.05％吐温 80，pH8)，浓度为 12、40、120、400 或 1200nmol/ml，对应于剂量 0.3、1、3、10 或 30nmol/kg。磷酸缓冲液用作溶媒。在第 1 天早晨，动物接受皮下单次给予 GLP-1 衍生物或溶媒（给予体积 0.025ml/kg)，再在给药后测定饲料摄取达 4 天。在每次实验的最后一天，在给药后 4 天，从已麻醉动物的心脏采集用于测定 GLP-1 衍生物的血浆暴露的血液样品。然后，用心脏内过量给予戊巴比妥对动物处以安乐死。用 ELISA 或类似的基于抗体的测定来分析 GLP-1 衍生物的血浆含量。

[1878] 在第 4 天计算饲料摄取，为平均值 ±SEM 24h 食物摄取。

[1879] 在第 4 天，使用单侧 -ANOVA 或双侧 -ANOVA 的重复测定，然后用 Bonferroni 事后

检验，进行溶媒组与 GLP-1 衍生物组的 24 小时饲料摄取的统计学比较。

[1880] 实施例 57 :针对肠道酶降解的稳定性

[1881] 本实施例的目的是测试针对肠道酶降解的稳定性。GLP-1(7-37) 用于该测定，作为一种标准。

[1882] 测试所有实施例的化合物，实施例 4、6、8、34-35 和 49 的化合物除外。

[1883] 肠道内最强的蛋白水解活性是来自胰腺并包含丝氨酸内肽酶、胰蛋白酶、胰凝乳蛋白酶和弹性蛋白酶以及若干种类的羧肽酶。

[1884] 如下所述，开发并采用了用来自大鼠小肠提取物的测定。

[1885] 来自大鼠小肠的提取物

[1886] 从大鼠制备小肠并用 8ml 的 150mM NaCl，20mM Hepes pH7.4 冲洗。将溶液在 4,600rpm 在用 75006445 转子的 Heraeus Multifuge 3S-R 离心机中离心 15min。取出上清液并通过 0.22μm Millipore MillexGV PVDF 膜过滤。将几只动物的滤液合并以平均个体差异。

[1887] 通过 Bradford 测定（参见例如 Analytical Biochemistry(1976)，第 72 卷，第 248-254 页，和 Analytical Biochemistry(1996)，第 236 卷，第 302-308v) 检测所得提取物的蛋白含量。

[1888] 降解测定

[1889] 将 2.5nmol 待测衍生物与体积为 250μl 的肠道提取物在 37℃孵育 1 小时。在 20mM Hepes(pH7.4) 存在下测定肠道样品。在小规模实验中测定肠道提取物的浓度，使 GLP-1(7-37) 半衰期 ($t^1/_2$) 的范围为 10-20 分钟。小肠提取物的使用浓度为 1.4μg/ml。将除肠道提取物之外的所有成分都混合并在 37℃预温 10 分钟。加入肠道提取物之后，立即采集 50μl 样品并与等体积的 1％三氟乙酸 (TFA) 混合。在 15、30 和 60 分钟之后采集更多样品。

[1890] 样品分析

[1891] UPLC 分析

[1892] 10μl 样品通过 UPLC 进行分析，使用 Waters Acquity 系统，用 BEH C181.7μm 2.1x50mm 柱和含 0.1％ TFA 和 0.07％ TFA 的乙腈的 30 至 65％的梯度，在 5 分钟内，流速为 0.6ml/min。减去基线之后，在 214nm 波长处记录的 HPLC 色谱图中测定完整化合物的峰积分。

[1893] MALDI-TOF 分析

[1894] 将 1μl 各样品移至 Bruker/EppendorfPAC HCCA 384MALDI 靶。用 Bruker Autoflex 基质辅助激光解吸和电离飞行时间 (MALDI-TOF) 质谱仪，用预定的方法“PAC_measure”，用 500-5000Da 的扩大的检测范围，以及预定的标定方法“PAC_calibrate”，进行分析。

[1895] 数据分析

[1896] 将 HPLC 色谱图的峰积分针对时间作图。通过使用 SigmaPlot 9.0 软件拟合数据和用于 2- 参数指数式衰减的公式，计算相应化合物的半衰期。

[1897] 对于所测试的每种化合物，计算相对半衰期（相对 $T_{1/2}$)，为目标化合物的半衰期 ($T_{1/2}$)，除以以相同方式测得的 GLP-1(7-37) 的半衰期 ($T_{1/2}$)。

[1898] 结果

[1899] 已知化合物利拉鲁肽和塞马鲁肽的相对半衰期分别为 4.8 和 1.2。

[1900] 除 1 种化合物外，所测的本发明所有 GLP-1 衍生物的相对半衰期为至少 1 ；31 种的相对半衰期为至少 2 ；和 10 种的半衰期为至少 5。

[1901] 实施例 58 ：大鼠的药物动力学

[1902] 本实施例的目的是研究在大鼠体内的半衰期。

[1903] 如下所述，用 10 种本发明的 GLP-1 衍生物（本发明实施例 2、4-5、16-17、25、29、36、39 和 43 的化合物），在大鼠体内进行药物动力学研究。塞马鲁肽可包括在内，用于比较。体重 400-600g 的同龄雄性 Sprague Dawley 大鼠得自 Taconic(Denmark)，通过体重简单随机化将其分组治疗，每组大约 3-6 只大鼠，使各组的所有动物具有类似体重。

[1904] 将 GLP-1 衍生物（大约 6nmole/ml）溶于 50mM 磷酸钠，145mM 氯化钠，0.05％吐温 80，pH7.4。通过插入右颈静脉的导管给予静脉内注射 (1.0ml/kg) 化合物。在给药后 5 天从舌下静脉采血样。将血液样品 (200μl) 采集到 EDTA 缓冲液 (8mM) 中，然后在 4℃和 10000G 离心 5 分钟。将血浆样品保存在 -20℃，直到分析各 GLP-1 化合物的血浆浓度。

[1905] 用发光氧通道免疫测定法 (LOCI) 测定 GLP-1 化合物的血浆浓度，通常按照以下文献所描述的胰岛素测定 ：Poulsen 和 Jensen，Journal of Biomolecular Screening 2007，第 12 卷，第 240-247 页。供体珠用链霉抗生物素包被，而受体珠与能识别肽的 mid-/C- 端表位的单克隆抗体缀合。将对其 N- 端具有特异性的另一单克隆抗体生物素化。将这 3 种反应物与分析物混合并构成 2 位点的免疫复合物。复合物发光，从供体珠中释放单线态氧原子，将其导入受体珠并触发化学发光，所述光在 Envision 读板器上测量。光量与化合物浓度成比例。

[1906] 使用 WinNonlin(ver.5.0，Pharsight Inc.，Mountain View，CA，USA) 分析血浆浓度 - 时间曲线，并用来自各动物的个体血浆浓度 - 时间曲线计算半衰期 ($T_{1/2}$)。

[1907] 结果

[1908] 塞马鲁肽的半衰期为 4 小时。

[1909] 所测的所有 10 种本发明衍生物的半衰期为至少 4 小时，除 1 种外的所有的半衰期为至少 8 小时，7 种的半衰期为至少 12 小时，6 种的半衰期为至少 16 小时，3 种的半衰期为至少 24 小时。

[1910] 尽管在本文中已经说明和描述了本发明的某些特征，但是许多修改、取代、变化和等同方案对于本领域普通技术人员来说将会发生。因此，可以理解，所附权利要求书可视为涵盖所有这样的修改和变化，因为都落入本发明的真实精神内。

[0001]

CPCH1261340P 序 列 表

<110> 诺沃—诺迪斯克有限公司

<120> 双酰化 GLP-1 衍生物

<130> 8067.204-WO

<160> 1

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1
<211> 31
<212> PRT
<213> 人(Homo sapiens)

<220>
<221> 肽
<222> (1)..(31)
<223> GLP-1(7-37)

<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