



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102123723 B

(45) 授权公告日 2016.05.25

(21) 申请号 200980132562.9

(22) 申请日 2009.06.16

(30) 优先权数据

61/073269 2008.06.17 US

61/078168 2008.07.03 US

61/090412 2008.08.20 US

61/177476 2009.05.12 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2011.02.17

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2009/047438 2009.06.16

(87) PCT国际申请的公布数据

W02009/155258 EN 2009.12.23

(73) 专利权人 印第安纳大学研究及科技有限公司

地址 美国印第安纳州

(72) 发明人 R·D·迪马奇 D·L·斯米莱
M·迪马奇 J·查本内 J·戴
J·帕特森 B·C·瓦德

(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司 72001

代理人 李进 李连涛

(51) Int. Cl.

A61K 38/00(2006.01)

(56) 对比文件

CN 1242707 A, 2000.01.26, 说明书第3-11页.

CN 1564828 A, 2005.01.12, 说明书第3-4段(及表格)、第23-26页的表2.

US 2006003935 A1, 2006.01.05, 第16-23, 33-40, 109-115段.

Azizeh B Y et al..Topographical amino acid substitution in position 10 of glucagon leads to antagonists/partial agonists with greater binding differences..《Journal of Medicinal Chemistry》.1996, 第39卷(第13期), 第2449-2455页.

Unson et al..Glucagon antagonists:contribution to binding and activity of the amino-terminal sequence 1-5, position 12, and the putative alpha-helical segment 19-27.《Journal of Biological Chemistry》.1989, 第264卷(第2期), 第789-791页.

Azizeh B Y et al..Pure glucagon antagonists:biological activities and cAMP accumulation using phosphodiesterase inhibitors..《Peptides》.1997, 第18卷(第5期), 第633-641页.

审查员 苗荻

权利要求书2页 说明书122页 附图47页

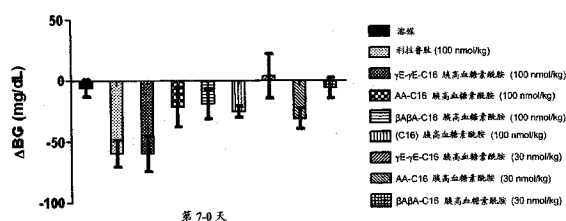
(54) 发明名称

胰高血糖素/GLP-1受体共激动剂

(57) 摘要

本文公开了具有相对于天然胰高血糖素增加的针对胰高血糖素受体效价的经修饰的胰高血糖素肽。通过形成分子内桥或用酰胺基团取代末端羧酸进一步修饰所述胰高血糖素肽,产生表现出胰高血糖素/GLP-1受体共激动剂活性的肽。可通过聚乙二醇化、酰化、烷化、取代羧基末端氨基酸、C-末端截短或添加选自SEQ ID NO:26(GPSSGAPPPS)、SEQ ID NO:27(KRNRNNIA)和SEQ ID NO:28(KRNR)的羧基末端肽来修饰所述多肽,

进一步改进这些高效价胰高血糖素类似物的溶解性和稳定性。



1.由氨基酸序列SEQ ID NO: 1组成的胰高血糖素肽或者其可药用盐,所述胰高血糖素肽具有至多6个氨基酸修饰,其中10位氨基酸是用C4-C30脂肪酸酰化或烷化的赖氨酸,其中所述6个修饰选自:

- a) 1位用DMIA取代,
- b) 2位用dSer或Aib取代,
- c) 16位用Aib或Glu取代,
- d) 20位用Lys取代,
- e) 24位用Cys取代,和
- f) C-末端酰胺,

其中,所述胰高血糖素肽与天然胰高血糖素相比表现出增强的针对GLP-1受体的活性。

2.权利要求1的胰高血糖素肽,其中所述酰基为C8-C24脂肪酸。

3.权利要求1的胰高血糖素肽,其中在所述胰高血糖素肽10位氨基酸和所述酰基或烷基之间存在间隔物。

4.权利要求3的胰高血糖素肽,其中所述间隔物为氨基酸或二肽。

5.权利要求4的胰高血糖素肽,其中所述酰基为C12-C18脂肪酰基。

6.权利要求5的胰高血糖素肽,其中所述酰基为C14或C16。

7.权利要求1的胰高血糖素肽,其中所述胰高血糖素肽与亲水部分共价连接。

8.权利要求7的胰高血糖素肽,其中所述亲水部分为PEG。

9.权利要求1的胰高血糖素肽,其中16位氨基酸为AIB。

10.权利要求1或9的胰高血糖素肽,其中2位氨基酸为AIB。

11.权利要求1的胰高血糖素肽,其中所述肽包含选自SEQ ID NO: 611、SEQ ID NO: 612、SEQ ID NO: 613、SEQ ID NO: 614、SEQ ID NO: 615、SEQ ID NO: 566、SEQ ID NO: 619、SEQ ID NO: 537、SEQ ID NO: 582、SEQ ID NO: 584、SEQ ID NO: 585、SEQ ID NO: 586的序列。

12.包含两个胰高血糖素肽的二聚体,其中至少一个胰高血糖素肽为权利要求1-11中任一项的胰高血糖素肽,它们通过接头彼此键合。

13.包含与缀合物部分连接的权利要求1-11中任一项的胰高血糖素肽的缀合物。

14.包含与第二个肽或多肽融合的权利要求1-11中任一项的胰高血糖素肽的融合蛋白。

15.包含权利要求1-11中任一项的胰高血糖素肽、权利要求12的二聚体、权利要求13的缀合物、权利要求14的融合蛋白或其可药用盐与可药用载体的药物组合物。

16.权利要求15的药物组合物,其进一步包含其它抗糖尿病药物或抗肥胖症药物。

17.权利要求16的药物组合物,其进一步包含胰岛素,磺脲、甲苯磺丁脲、乙酸己脲、甲磺氮草脲、氯磺丙脲、格列甲嗪、格列本脲、格列美脲、格列齐特,氯茴苯酸、瑞格列奈、那格列奈,双胍、二甲双胍、苯乙双胍,噻唑烷二酮、罗格列酮、匹格列酮、曲格列酮、PPAR γ 抑制剂, α 葡萄糖苷酶抑制剂、米格列醇、阿卡波糖,艾塞那肽、普兰林肽,二肽基肽酶-4抑制剂、维格列汀、西格列汀,钠-依赖的葡萄糖转运蛋白1抑制剂,葡萄糖酶激活剂,胰高血糖素受体拮抗剂,果糖1,6-二磷酸酶抑制剂,食欲抑制剂、苯乙胺型刺激剂、苯丁胺、二乙胺苯丙酮、苯二甲吗啉、苄非他明、西布曲明,利莫那班、大麻受体拮抗剂,泌酸调节肽,氟西汀,托吡酯和

苯丁胺、安非拉酮和唑尼沙胺、安非拉酮和纳曲酮,脂肪酶抑制剂、奥里斯特、赛利司他,或GT 389-255。

18. 权利要求15-17中任一项的药物组合物在制备用于治疗糖尿病的药物中的用途。

19. 权利要求15-17中任一项的药物组合物在制备用于减少增重或诱导减重的药物中的用途。

20. 权利要求18或19的用途,其中所述胰高血糖素肽、可药用盐、缀合物、二聚体或融合肽适于与其它抗糖尿病药物或抗肥胖症药物联合给予。

21. 权利要求20的用途,其中所述胰高血糖素肽、可药用盐、缀合物、二聚体或融合肽适于与以下中的一种或多种联合给予:胰岛素,磺脲、甲苯磺丁脲、乙酸己脲、甲磺氮草脲、氯磺丙脲、格列甲脲、格列本脲、格列美脲、格列齐特,氯茴苯酸、瑞格列奈、那格列奈,双胍、二甲双胍、苯乙双胍,噻唑烷二酮、罗格列酮、匹格列酮、曲格列酮、PPAR γ 抑制剂, α 葡萄糖苷酶抑制剂、米格列醇、阿卡波糖,艾塞那肽、普兰林肽,二肽基肽酶-4抑制剂、维格列汀、西格列汀,钠-依赖的葡萄糖转运蛋白1抑制剂,葡糖酶激活剂,胰高血糖素受体拮抗剂,果糖1,6-二磷酸酶抑制剂,食欲抑制剂、苯乙胺型刺激剂、苯丁胺、二乙胺苯丙酮、苯二甲吗啉、苄非他明、西布曲明,利莫那班、大麻受体拮抗剂,泌酸调节肽,氟西汀,托吡酯和苯丁胺、安非拉酮和唑尼沙胺、安非拉酮和纳曲酮,脂肪酶抑制剂、奥里斯特、赛利司他,或GT 389-255。

胰高血糖素/GLP-1受体共激动剂

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求享有以下专利申请的优先权：2008年6月17日提交的美国临时专利申请号61/073,269、2008年7月3日提交的美国临时专利申请号61/078,168、2008年8月20日提交的美国临时专利申请号61/090,412和2009年5月12日提交的美国临时专利申请号61/177,476。每一申请的公开内容以其整体在此明确引作参考。

[0003] 背景

[0004] 前高血糖素原是158个氨基酸的前体多肽，其在不同组织中加工形成多种不同的高血糖素原衍生肽，所述肽包括胰高血糖素、胰高血糖素样肽-1(GLP-1)、胰高血糖素样肽-2(GLP-2)和泌酸调节肽(OXM)，它们涉及多种多样的生理功能，包括葡萄糖动态平衡、胰岛素分泌、胃排空和肠道生长以及摄食调节。胰高血糖素是29个氨基酸的肽，其对应于前高血糖素原的33到61位氨基酸，而产生的GLP-1为对应于前高血糖素原的72到108位氨基酸的37个氨基酸的肽。GLP-1(7-36)酰胺或GLP-1(7-37)酸是GLP-1的生物学有效形式，它们显示出针对GLP-1受体的活性基本上相等。

[0005] 当血糖水平降低到不足以提供身体活动的能量时，出现低血糖症。在成年人或10岁以上的儿童中，除了作为糖尿病治疗的副作用外，低血糖症并不常见，但其可因其它药物或疾病、缺乏激素或酶或者肿瘤而产生。当血糖开始下降时，由胰腺产生的激素胰高血糖素给肝脏发出信号以分解肝糖并释放葡萄糖，导致血糖水平上升到正常水平。因此，胰高血糖素在葡萄糖调节中最公认的作用是抵消胰岛素的作用并维持血糖水平。然而，对于糖尿病患者，胰高血糖素对低血糖症的这种响应可受到削弱，这使得葡萄糖水平更难回到正常范围。

[0006] 低血糖症是危及生命的事件，需要立即就医。给予胰高血糖素是已确定的用于治疗急性低血糖症的施药，其可在给药几分钟内恢复葡萄糖的正常水平。当将胰高血糖素用于急性医学治疗低血糖症时，用稀酸缓冲液溶解胰高血糖素的结晶形式，并肌肉内注射该溶液。尽管该治疗有效，但该方法麻烦，并且对于处于半昏迷的人很危险。因此，需要在相关生理条件下保留或超过母体分子的生物学效能但充分可溶并稳定的胰高血糖素类似物，可将其预先调配为供注射用的溶液。

[0007] 另外，促使糖尿病患者保持接近正常的血糖水平以延迟或预防微血管并发症。实现该目的通常需要加强的胰岛素治疗。在努力实现该目标过程中，医生们遭遇到其糖尿病患者的低血糖症的频率和严重程度大大提高的问题。因此，需要改进的比目前的胰岛素疗法更不可能诱导低血糖症的用于治疗糖尿病的药物和方法。

[0008] GLP-1具有与胰高血糖素相比不同的生物活性。其作用包括刺激胰岛素合成和分泌、抑制胰高血糖素分泌和抑制摄食。业已显示GLP-1在糖尿病患者中减轻高血糖症(高葡萄糖水平)。与GLP-1享有约50%氨基酸同一性的来自蜥蜴毒液的肽毒蜥外泌肽-4，激活GLP-1受体并同样显示减轻糖尿病患者的血糖症。

[0009] 亦有证据表明GLP-1和毒蜥外泌肽-4可降低摄食并促进减重，这种作用不仅仅对糖尿病患者有益，而且对罹患肥胖症的患者亦有益。肥胖症患者具有更高的糖尿病、高血

压、血脂过多症、心血管病和肌骨病的风险。

[0010] 因此,仍需要备选及优选的用于治疗糖尿病和肥胖症的改进的方法。

[0011] 概述

[0012] 如本文所述,提供高效价胰高血糖素激动剂类似物,所述胰高血糖素激动剂类似物亦表现出提高的针对胰高血糖素受体的活性,并在另外的实施方案中,表现出增加的生物物理学稳定性和/或水溶性。另外,根据本发明的另一方面,提供失去天然胰高血糖素的针对胰高血糖素受体相对于针对GLP-1受体的选择性的胰高血糖素激动剂类似物,所述类似物因此表现为这两种受体的共激动剂。在胰高血糖素类似物内所选择的氨基酸修饰可控制类似物针对GLP-1受体相对于针对胰高血糖素受体的相对活性。因此,本发明又一方面提供具有以下性质的胰高血糖素共激动剂类似物:具有针对胰高血糖素受体比GLP-1受体更高的活性;对这两种受体具有大约相等的活性;和具有针对GLP-1受体比胰高血糖素受体更高的活性。可对后一类型的共激动剂进行工程改造以使其对胰高血糖素受体表现出很小或没有活性,但保留与天然GLP-1相同的或比其更高效价的激活GLP-1受体的能力。任何这些类似物亦可包括赋予增加生物物理稳定性和/或水溶性的修饰。

[0013] 对胰高血糖素受体和GLP-1受体显示共激动作用的胰高血糖素类似物在若干应用中有利。首先,利用胰高血糖素治疗低血糖症可过度补偿(overcompensate)低血糖水平并产生过量的血糖水平。若给予胰高血糖素/GLP-1受体共激动剂,则另外的GLP-1刺激可缓冲胰高血糖素激动剂的作用以防止因治疗低血糖症而产生的过量的血糖水平。

[0014] 另外如本文所述,当单独给予或与其它抗糖尿病或抗肥胖症治疗联合给予时,本发明胰高血糖素共激动剂类似物可用于控制高血糖症,或用于诱导减重或防止增重。诱导减重的另一化合物为泌酸调节肽,这是在小肠中发现的天然存在的消化激素(参见Diabetes 2005;54:2390-2395)。泌酸调节肽为37个氨基酸的肽,其含有胰高血糖素的29个氨基酸序列(即SEQ ID NO:1),接着是8个氨基酸的羧基末端延伸SEQ ID NO:27(KRNRNNIA)。尽管本发明涵盖本文所述胰高血糖素类似物可任选与这8个氨基酸的羧基末端延伸(SEQ ID NO:27)连接,但在本发明某些实施方案中,亦明确涵盖缺乏8个邻接羧基氨基酸SEQ ID NO:27的类似物及类似物的用途。

[0015] 可通过氨基酸修饰来改造(customize)化合物以便调节所述肽的GLP-1活性,因此,可裁制(tailor)本发明胰高血糖素类似物以治疗特定病症或疾病。更具体地,本文提供这样的胰高血糖素类似物,其中每一个类似物表现出分别对胰高血糖素受体和GLP-1受体特有的相对活性水平。例如,可对各肽进行修饰以产生以下胰高血糖素肽:相对于天然GLP-1针对GLP-1受体具有从至少约1%(包括至少约1.5%、2%、5%、7%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、75%、100%、125%、150%、175%)到约200%或更高活性的任何活性;和相对于天然胰高血糖素针对胰高血糖素受体具有从至少约1%(包括约1.5%、2%、5%、7%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、75%、100%、125%、150%、175%、200%、250%、300%、350%、400%、450%)到约500%或更高活性的任何活性。在某些实施方案中,本文所述胰高血糖素肽表现出不大于约100%、1000%、10,000%、100,000%或1,000,000%的天然胰高血糖素针对胰高血糖素受体的活性。在某些实施方案中,本文所述胰高血糖素肽表现出不大于约100%、1000%、10,000%、100,000%或1,000,000%的天然GLP-1针对GLP-1受体的活性。天然胰高血糖素的氨基酸序列为SEQ ID NO:1, GLP-1(7-36)酰胺的氨基酸序

列为SEQ ID NO:52, GLP-1(7-37)酸的氨基酸序列为SEQ ID NO:50。在例示性实施方案中, 胰高血糖素肽可表现出天然胰高血糖素针对胰高血糖素受体活性的至少10%和天然GLP-1针对GLP-1受体活性的至少50%, 或天然胰高血糖素针对胰高血糖素受体活性的至少40%和天然GLP-1针对GLP-1受体活性的至少40%, 或天然胰高血糖素针对胰高血糖素受体活性的至少60%和天然GLP-1针对GLP-1受体活性的至少60%。

[0016] 可将胰高血糖素肽针对胰高血糖素受体相对于针对GLP-1受体的选择性阐述为胰高血糖素/GLP-1活性的相对比率(所述肽相对于天然胰高血糖素针对胰高血糖素受体的活性除以所述肽相对于天然GLP-1针对GLP-1受体的活性)。例如, 表现出60%的天然胰高血糖素针对胰高血糖素受体的活性和60%的天然GLP-1针对GLP-1受体的活性的胰高血糖素肽具有1:1的胰高血糖素/GLP-1活性比率。胰高血糖素/GLP-1活性的例示性比率包括约1:1、1.5:1、2:1、3:1、4:1、5:1、6:1、7:1、8:1、9:1或10:1或约1:10、1:9、1:8、1:7、1:6、1:5、1:4、1:3、1:2或1:1.5。举例而言, 10:1的胰高血糖素/GLP-1活性比率表示针对胰高血糖素受体相对于针对GLP-1受体有10倍的选择性。类似地, 10:1的GLP-1/胰高血糖素活性比率表示针对GLP-1受体相对于针对胰高血糖素受体有10倍的选择性。

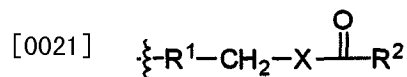
[0017] 根据一个实施方案, 提供增加效价和任选改进溶解性和稳定性的胰高血糖类似物。在一个实施方案中, 通过天然胰高血糖素(SEQ ID NO:1)的16位氨基酸修饰来提供提高的胰高血糖素效价。作为非限制性实例, 所述提高效价可通过用以下氨基酸取代天然存在的16位的丝氨酸来提供: 谷氨酸; 或另一具有长4个原子的侧链的带负电荷的氨基酸; 或作为备选以下氨基酸中的任何一种: 谷氨酰胺、高谷氨酸或高半胱氨酸或具有含至少一个杂原子(例如N、O、S、P)的侧链并具有长约4(或3-5)个原子的侧链的带电荷的氨基酸。在一个实施方案中, 提高效价的胰高血糖素激动剂包含肽SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7或SEQ ID NO:5的胰高血糖素激动剂类似物。根据一个实施方案, 提供相对于野生型胰高血糖素具有提高的针对胰高血糖素受体的效价的胰高血糖素类似物蛋白质, 其中所述肽包含序列SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9或SEQ ID NO:10, 其中所述胰高血糖素肽保留其相对于GLP-1受体对胰高血糖素受体的选择性。

[0018] 可通过3位氨基酸修饰来降低、保持或提高胰高血糖素受体活性, 例如取代3位天然存在的谷氨酰胺。在一个实施方案中, 用酸性、碱性或疏水氨基酸(谷氨酸、鸟氨酸、正亮氨酸)取代3位氨基酸显示大大降低或破坏胰高血糖素受体活性。用例如谷氨酸、鸟氨酸或正亮氨酸取代的类似物具有天然胰高血糖素针对胰高血糖素受体活性的约10%或更小, 例如约1-10%或约0.1-10%或大于约0.1%但小于约10%, 同时表现出GLP-1针对GLP-1受体活性的至少20%。例如, 本文所述例示性类似物具有约0.5%、约1%或约7%的天然胰高血糖素活性, 同时表现出GLP-1针对GLP-1受体活性的至少20%。

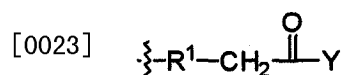
[0019] 在另一实施方案中, 胰高血糖素肽3位天然存在的谷氨酰胺可被谷氨酰胺类似物取代而基本上不损失针对胰高血糖素受体的活性, 在某些情况下还提高胰高血糖素受体活性。例如, 在3位包含谷氨酰胺类似物的胰高血糖素肽可表现出约5%、约10%、约20%、约50%或约85%或更大的天然胰高血糖素(例如SEQ ID NO:1)针对胰高血糖素受体的活性。在某些实施方案中, 在3位包含谷氨酰胺类似物的胰高血糖素肽, 相比于具有与包含谷氨酰胺类似物的肽相同的氨基酸序列但有3位修饰的氨基酸的对应胰高血糖素肽(例如SEQ ID

NO:601或SEQ ID NO:602),可表现出约20%、约50%、约75%、约100%、约200%或约500%或更大的针对胰高血糖素受体的活性。在某些实施方案中,在3位包含谷氨酰胺类似物的胰高血糖素肽表现出提高的针对胰高血糖素受体的活性,但该提高的活性不大于天然胰高血糖素活性的或不大于具有与包含谷氨酰胺类似物的肽相同的氨基酸序列但有3位修饰的氨基酸的对应胰高血糖素肽活性的1000%、10,000%、100,000%或1,000,000%。

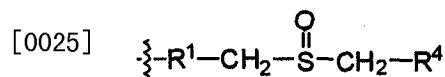
[0020] 在某些实施方案中,谷氨酰胺类似物为天然存在的或非天然存在的氨基酸,所述氨基酸包含结构I、II或III侧链:



[0022] 结构I



[0024] 结构II



[0026] 结构III

[0027] 其中 R^1 为 C_{0-3} 烷基或 C_{0-3} 杂烷基; R^2 为 NHR^4 或 C_{1-3} 烷基; R^3 为 C_{1-3} 烷基; R^4 为H或 C_{1-3} 烷基; X 为NH、O或S;和 Y 为 NHR^4 、 SR^3 或 OR^3 。在某些实施方案中, X 为NH或 Y 为 NHR^4 。在某些实施方案中, R^1 为 C_{0-2} 烷基或 C_1 杂烷基。在某些实施方案中, R^2 为 NHR^4 或 C_1 烷基。在某些实施方案中, R^4 为H或 C_1 烷基。在例示性实施方案中,提供包含结构I侧链的氨基酸,其中: R^1 为 $\text{CH}_2\text{-S}$, X 为NH, R^2 为 CH_3 (乙酰氨基甲基-半胱氨酸,C(Acm)); R^1 为 CH_2 , X 为NH, R^2 为 CH_3 (乙酰基二氨基丁酸,Dab(Ac)); R^1 为 C_0 烷基, X 为NH, R^2 为 NHR^4 , R^4 为H(氨基甲酰二氨基丙酸,Dap(脲));或 R^1 为 $\text{CH}_2\text{-CH}_2$, X 为NH, R^2 为 CH_3 (乙酰鸟氨酸,Orn(Ac))。在例示性实施方案中,提供包含结构II侧链的氨基酸,其中 R^1 为 CH_2 , Y 为 NHR^4 , R^4 为 CH_3 (甲基谷氨酰胺,Q(Me));在例示性实施方案中,提供包含结构III侧链的氨基酸,其中 R^1 为 CH_2 , R^4 为H(甲硫氨酸-亚砷,M(O));在特定实施方案中,3位氨基酸被Dab(Ac)取代。例如,胰高血糖素激动剂可包括氨基酸序列SEQ ID NO:595、SEQ ID NO:601、SEQ ID NO:603、SEQ ID NO:604、SEQ ID NO:605和SEQ ID NO:606。

[0028] 在另一实施方案中,提供相对于天然胰高血糖素肽提高或保留针对胰高血糖素受体的效价但亦大大提高针对GLP-1受体活性的胰高血糖类似物素。胰高血糖素通常具有约1%的天然-GLP-1针对GLP-1受体的活性,但GLP-1通常具有小于约0.01%的天然胰高血糖素针对胰高血糖素受体的活性。通过用电中性基团(例如酰胺或酯)取代C-末端氨基酸的羧酸,来提供提高的针对GLP-1受体的活性。在一个实施方案中,这些胰高血糖素类似物包含序列SEQ ID NO:20,其中所述羧基末端氨基酸具有取代在天然氨基酸上发现的羧酸基团的酰胺基团。这些胰高血糖素类似物对胰高血糖素和GLP-1受体二者都具有强活性,因此用作这两种受体的共激动剂。根据一个实施方案,提供以下胰高血糖素和GLP-1受体共激动剂,其中所述肽包含序列SEQ ID NO:20,其中28位氨基酸为Asn或Lys,29位氨基酸为Thr-酰胺。

[0029] 通过稳定胰高血糖素C-末端部分的 α -螺旋结构(大约12-29位氨基酸)亦提供提高的针对GLP-1受体的活性,所述稳定通过在由三个间插氨基酸分开的两个氨基酸(即“i”位氨基酸和“i+4”位氨基酸,其中i为12和25之间的任何整数)侧链之间、在由两个间插氨基酸

分开的两个氨基酸(即“j”位氨基酸和“j+3”位氨基酸,其中j为12和27之间的任何整数)侧链之间、或在由六个间插氨基酸分开的两个氨基酸(即“k”位氨基酸和“k+7”位氨基酸,其中k为12和22之间的任何整数)侧链之间,形成分子内桥来实现。在例示性实施方案中,所述桥或接头长度为约8(或约7-9)个原子,并在12和16位或16和20位或20和24位或24和28位氨基酸侧链之间形成。这些氨基酸侧链可通过非共价键例如氢键或离子相互作用例如形成盐桥或通过共价键互相连接。

[0030] 根据一个实施方案,提供包含胰高血糖素肽SEQ ID NO:20的胰高血糖素激动剂,其中在位于12、20或28位赖氨酸残基和位于16或24位谷氨酸残基的侧链之间形成内酰胺环,其中其侧链参与形成内酰胺环的这两个胰高血糖素肽氨基酸彼此由三个间插氨基酸分隔开。根据一个实施方案,荷有内酰胺的胰高血糖素类似物包含选自以下的氨基酸序列:SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:17和SEQ ID NO:18。在一个实施方案中,荷有内酰胺的肽的羧基末端氨基酸包含取代末端羧酸的酰胺基团或酯基团。在一个实施方案中,SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:13和SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:17和SEQ ID NO:18胰高血糖素肽,进一步包含与以下序列的羧基末端共价结合的另外的氨基酸:SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:17或SEQ ID NO:18。在另一实施方案中,提供这样的胰高血糖素肽,其包含选自SEQ ID NO:66、SEQ ID NO:67、SEQ ID NO:68和SEQ ID NO:69的序列,并进一步包含与SEQ ID NO:66、SEQ ID NO:67、SEQ ID NO:68和SEQ ID NO:69的羧基末端共价结合的另外的氨基酸。在一个实施方案中,28位氨基酸为天冬酰胺或赖氨酸,29位氨基酸为苏氨酸。

[0031] 在某些特定实施方案中,通过形成共价分子内桥而不是内酰胺桥来实现胰高血糖素激动剂肽C-末端部分的 α 螺旋结构的稳定。例如,用于稳定 α 螺旋的合适的共价键合方法(即形成共价分子内桥的手段)包括以下中的任何一种或多种:烯烃歧化、基于羊毛硫氨酸的环化、二硫桥或经修饰的含硫桥形成、利用 α 、 ω -二氨基烷烃系链(tether)、形成金属-原子桥和其它肽环化手段。

[0032] 还通过在保留所需活性的位置引入一个或多个 α 、 α -二取代氨基酸来稳定胰高血糖素肽的 α -螺旋结构(大约12-29位氨基酸),从而提供提高的针对GLP-1受体的活性。在某些方面,以该方式中无目的地引入分子内桥例如盐桥或共价键来实现稳定 α -螺旋。本文可将所述肽看作缺乏分子内桥的肽。在特定方面,通过引入一个或多个 α 、 α -二取代氨基酸而不引入共价分子内桥(例如内酰胺桥、二硫桥)来实现稳定 α -螺旋。本文可将所述肽看作缺乏共价分子内桥的肽。在某些实施方案中,胰高血糖素肽的16、17、18、19、20、21、24或29位中的一个、二个、三个、四个或更多个位置被 α 、 α -二取代氨基酸取代。例如,在缺乏盐桥或内酰胺时用氨基异丁酸(AIB)取代胰高血糖素肽的16位来提高GLP-1活性。在某些实施方案中,16、20、21或24位中的一个、二个、三个或更多个位置被AIB取代。

[0033] 通过将酰基或烷基添加到肽的10位氨基酸的侧链,来提供缺乏分子内桥(例如共价分子内桥)的胰高血糖素类似物肽的提高了的针对GLP-1和胰高血糖素受体的活性。在某些方面,所述酰基或烷基并非天然存在于氨基酸上。在特定方面,所述酰基或烷基对任何天然存在的氨基酸为非天然的。在某些实施方案中,酰基为脂肪酰基,例如C4-C30脂肪酰基。例如,本文提供的缺乏共价分子内桥的胰高血糖素类似物肽包含16位AIB和共价连接到10位

Lys残基的C14、C16或C18脂肪酰基。亦提供包含2和16位AIB和共价连接到10位Lys残基的C14、C16或C18脂肪酰基的缺乏分子内桥(例如共价分子内桥)的胰高血糖素类似物肽。所述缺乏分子内桥(例如共价分子内桥)的酰化的胰高血糖素类似物肽可被聚乙二醇化,其如本文进一步所述。

[0034] 可通过在酰基或烷基和10位氨基酸侧链之间引入间隔物,来实现进一步提高缺乏分子内桥(例如分子内桥)的酰化的胰高血糖素类似物肽的GLP-1活性和胰高血糖素活性。根据某些实施方案,所述间隔物(例如氨基酸、二肽、三肽、亲水双官能间隔物或疏水双官能间隔物)长度为3-10个原子(例如6-10个原子)。按照某些特定实施方案,间隔物和酰基或烷基的总长为14-28个原子,例如17-28、19-26个原子、19-21个原子。用于提高缺乏分子内桥(例如共价分子内桥)的酰化或烷化肽的GLP-1活性和胰高血糖素活性的合适的间隔物如本文进一步所述。

[0035] 例如,本文提供与SEQ ID NO:1相差不超过10个氨基酸修饰(包含酰基或烷基)的非天然胰高血糖素肽,其中酰基或烷基与间隔物连接,间隔物与胰高血糖素肽的10位氨基酸侧链连接,其中当所述胰高血糖素肽缺乏亲水部分(例如PEG)时,所述胰高血糖素肽表现出至少20%(例如至少30%、至少40%、至少50%、至少60%、至少75%、至少80%、至少90%、至少95%、至少98%、至少99%、约100%、约150%、约200%、约400%、约500%或更高)的天然GLP-1针对GLP-1受体的活性。在某些实施方案中,当所述胰高血糖素肽缺乏亲水部分(例如PEG)时,其表现出至少0.5%(例如至少1%、至少2%、至少3%、至少4%、至少5%、至少10%、至少20%)的天然胰高血糖素针对胰高血糖素受体的活性。在某些实施方案中,上述胰高血糖素肽可表现出任何上述活性并且不大于天然胰高血糖素针对胰高血糖素受体活性的1000%、10,000%、100,000%或1,000,000%。在某些实施方案中,上述胰高血糖素肽可表现出任何上述活性并且不大于天然GLP-1针对GLP-1受体活性的1000%、10,000%、100,000%或1,000,000%。

[0036] 通过20位氨基酸修饰亦提供提高的针对GLP-1受体的活性。在一个实施方案中,用其它亲水氨基酸取代20位谷氨酰胺,所述其它亲水氨基酸具有带电荷或具有形成氢键能力的侧链,所述侧链长度为至少约5(或约4-6)个原子,所述氨基酸例如赖氨酸、瓜氨酸、精氨酸或鸟氨酸。

[0037] 可单独施用或联合施用提高或降低胰高血糖素受体活性并提高GLP-1受体活性的任何上述修饰。联合提高GLP-1受体活性的修饰可比单独采用任何一种所述修饰提供更高的GLP-1活性。例如,本发明提供:包含16位、20位和C-末端羧酸基团修饰的胰高血糖素类似物,其任选含16和20位氨基酸之间的共价键;包含16位和C-末端羧酸基团修饰的胰高血糖素类似物;包含16和20位修饰的胰高血糖素类似物,其任选含16和20位氨基酸之间的共价键;和包含20位和C-末端羧酸基团修饰的胰高血糖素类似物;它们任选前提为12位氨基酸不是Arg;或任选前提为9位氨基酸不是Glu。

[0038] 本文所述1或2位的其它修饰可提高肽对二肽基肽酶IV(DPP-IV)裂解的抗性。例如,2位氨基酸可为被D-丝氨酸、D-丙氨酸、缬氨酸、甘氨酸、N-甲基丝氨酸、N-甲基丙氨酸或氨基异丁酸取代。作为备选或除此之外,1位氨基酸可被以下氨基酸取代:D-组氨酸、去氨基组氨酸、羧基-组氨酸、乙酰基-组氨酸、高组氨酸、N-甲基组氨酸、 α -甲基组氨酸、咪唑乙酸或 α , α -二甲基咪唑乙酸(DMIA)。

[0039] 观察到2位修饰(例如2位AIB)并在某些情况下1位修饰可降低胰高血糖素活性,有时是显著降低;意想不到的,胰高血糖素活性的这种降低可通过稳定胰高血糖素C-末端部分的 α -螺旋来恢复,所述稳定例如通过“i”和“i+4”(例如12和16、16和20或20和24)位氨基酸之间的共价键来实现。在某些实施方案中,该共价键为16位谷氨酸和20位赖氨酸之间的内酰胺桥。在某些实施方案中,该共价键为分子内桥而不是内酰胺桥。例如,合适的共价键合方法包括以下任何一种或多种:烯烃歧化、基于羊毛硫氨酸的环化、二硫桥或经修饰的含硫桥形成、使用 α 、 ω -二氨基烷烃系链、形成金属-原子桥及其它肽环化手段。

[0040] 用芳香族大氨基酸(例如Tyr)非保守性取代1位His的胰高血糖素肽对GLP-1活性可保留,前提为经由分子内桥稳定 α -螺旋,例如通过“i”和“i+4”位(例如12和16、16和20或20和24)氨基酸之间的共价键来形成分子内桥。在某些实施方案中,该共价键为16位谷氨酸和20位赖氨酸之间的内酰胺桥。在某些实施方案中,该共价键为除内酰胺桥之外的分子内桥。例如,合适的共价键合方法包括以下任何一种或多种:烯烃歧化、基于羊毛硫氨酸的环化、二硫桥或经修饰的含硫桥形成、使用 α 、 ω -二氨基烷烃系链、形成金属-原子桥及其它肽环化手段。

[0041] 在又一例示性实施方案中,可进一步修饰任何前述化合物以改进稳定性,其可通过修饰SEQ ID NO:1的15位氨基酸来减少所述肽随时间的降解(尤其是在酸性或碱性缓冲液中)来实现。

[0042] 在另一实施方案中,可通过让亲水部分与所述肽共价连接来增加本文公开的胰高血糖素肽的溶解性。在一个实施方案中,亲水部分为聚乙二醇(PEG)链,其任选在C-末端延伸内的16、17、21、24、29位中的一处或多处或在C-末端氨基酸处与肽连接。在某些实施方案中,该位置的天然氨基酸被具有适于与亲水部分交联的侧链的氨基酸取代,以促进亲水部分与肽的连接。在其它实施方案中,将经修饰以包含亲水基团的氨基酸在C-末端氨基酸处添加到肽中。在一个实施方案中,所述肽共激动剂包含选自以下的序列:SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:17、SEQ ID NO:18和SEQ ID NO:19,其中所述胰高血糖素肽的16、17、21或24位中的一个位置的氨基酸残基的侧链进一步包含具有选自约500-约40,000道尔顿范围的分子量的聚乙二醇链。在一个实施方案中,聚乙二醇链具有选自约500-约5,000道尔顿范围的分子量。在另一实施方案中,聚乙二醇链具有约10,000-约20,000 道尔顿的分子量。在另外例示性实施方案中,聚乙二醇链具有约20,000-约40,000道尔顿的分子量。

[0043] 在另一实施方案中,可通过氨基酸取代和/或添加来改进任何前述胰高血糖素类似物的溶解性,所述氨基酸取代和/或添加将带电荷的氨基酸引入到肽的C-末端部分,优选在SEQ ID NO:1的27位的C-末端位置。任选在C-末端部分(优选27位的C-末端处)内引入一个、两个或三个带电荷的氨基酸。根据一个实施方案,28和/或29位的天然氨基酸被带电荷的氨基酸取代,和/或在另一实施方案中,亦可将1-3个带电荷的氨基酸添加到肽的C-末端。在例示性实施方案中,一个、两个或所有带电荷的氨基酸为带负电荷。可对胰高血糖素肽进行使其仍保留胰高血糖素活性的另外的修饰,例如保守性取代。在一个实施方案中,提供SEQ ID NO:20肽的类似物,其中该类似物与SEQ ID NO:20的区别在于17-26位的1-2个氨基酸取代,在一个实施方案中,所述类似物与SEQ ID NO:20肽的区别在于20位的氨基酸取代。

[0044] 根据某些实施方案,通过截短C-末端的一个或两个氨基酸残基来修饰本文公开的

胰高血糖素肽。如本文所述,所述修饰的胰高血糖素肽保留针对胰高血糖素受体和GLP-1受体的相似的活性和效价。在这点上,胰高血糖素肽可包含天然胰高血糖素肽(SEQ ID NO:1)的1-27或1-28位氨基酸,任选含本文所述的任何另外的修饰。

[0045] 根据一个实施方案,通过将第二肽添加到胰高血糖素肽的羧基末端来修饰本文公开的胰高血糖素肽,所述第二肽例如SEQ ID NO:26、SEQ ID NO:27或SEQ ID NO:28。在一个实施方案中,具有选自以下的肽序列的胰高血糖素肽通过肽键与第二肽共价连接:SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:17、SEQ ID NO:18、SEQ ID NO:19、SEQ ID NO:66、SEQ ID NO:67、SEQ ID NO:68和SEQ ID NO:69,其中所述第二肽包含选自SEQ ID NO:26、SEQ ID NO:27和SEQ ID NO:28的序列。在另一实施方案中,在包含C-末端延伸的胰高血糖素肽中,天然胰高血糖素肽的29位的苏氨酸被甘氨酸取代。具有29位甘氨酸取代苏氨酸并包含SEQ ID NO:26羧基末端延伸的胰高血糖素类似物,与经修饰以包含SEQ ID NO:26羧基末端延伸的天然胰高血糖素相比,针对GLP-1受体的效价为4倍。通过在18位用丙氨酸取代天然精氨酸可进一步提高针对GLP-1受体的效价。

[0046] 可修饰任何本文公开的胰高血糖素肽以包含酰基或烷基,例如C4-C30酰基或烷基。在某些方面,所述酰基或烷基对任何天然存在的氨基酸为非天然。酰化或烷化可提高循环中的胰高血糖素肽的半衰期。酰化或烷化可有利地推迟针对胰高血糖素受体和/或GLP-1受体的作用起始和/或延长作用时间,和/或改进对蛋白酶例如DPP-IV的抗性。如本文所述,酰化后即使不是大大提高也是保持胰高血糖素肽针对胰高血糖素受体和GLP-1受体的活性。另外,酰化的胰高血糖素肽与未酰化的胰高血糖素肽形式相比,即使效价不是大大提高也是相当。胰高血糖素肽可在亲水部分所连接的同一个氨基酸位置酰化或烷化,或在不同的氨基酸位置酰化或烷化。在某些实施方案中,本发明提供经修饰以包含共价连接到胰高血糖素肽10位氨基酸的酰基或烷基的胰高血糖素肽。胰高血糖素肽可进一步包含在胰高血糖素肽的10位氨基酸与酰基或烷基之间的间隔物。在某些实施方案中,酰基为脂肪酸或胆汁酸或其盐,例如C4-C30脂肪酸、C8-C24脂肪酸、胆酸、C4-C30烷基、C8-C24烷基或包含胆汁酸的类固醇部分的烷基。所述间隔物为具有用于连接酰基或烷基的合适的活性基团的任何部分。在例示性实施方案中,间隔物包含氨基酸、二肽、三肽、亲水双官能间隔物或疏水双官能间隔物。在某些实施方案中,间隔物选自:Trp、Glu、Asp、Cys和包含 $\text{NH}_2(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n(\text{CH}_2)_m\text{COOH}$ 的间隔物,其中m为从1到6的任何整数,n为从2到12的任何整数。所述酰化或烷化的胰高血糖素肽亦可进一步包含亲水部分(任选聚乙二醇)。任何前述胰高血糖素肽可包含两个酰基或两个烷基或其组合。

[0047] 因此,提供亦表现出改进溶解性和/或稳定性的本文所揭示的高效价的胰高血糖素类似物或胰高血糖素共激动剂类似物。例示性高效价胰高血糖素类似物表现出天然胰高血糖素针对胰高血糖素受体活性的至少约200%,并任选在pH 6和8之间或6和9之间或7和9之间(例如pH 7)以至少1mg/mL的浓度可溶,任选在25°C 24小时后保留至少95%的原始肽(例如5%或更少的原始肽被降解或裂解)。举例而言,例示性胰高血糖素共激动剂类似物表现出大于约40%或大于约60%的针对胰高血糖素受体和GLP-1受体(以约1:3和3:1之间的比率或约1:2和2:1之间的比率)的活性,任选在pH 6和8之间或6和9之间或7和9之间(例如pH 7)以至少1mg/mL的浓度可溶,并任选在25°C 24小时后保留至少95%的原始肽。另一例示

性胰高血糖素共激动剂类似物表现出约175%或更高的天然胰高血糖素针对胰高血糖素受体的活性和约20%或更小的天然GLP-1针对GLP-1受体的活性,任选在pH 6和8之间或6和9之间或7和9之间(例如pH 7)以至少1mg/mL的浓度可溶,并任选在25°C 24小时后保留至少95%的原始肽。再一例示性胰高血糖素共激动剂类似物表现出约10%或更小的天然胰高血糖素针对胰高血糖素受体的活性和至少约20%的天然GLP-1针对GLP-1受体的活性,任选在pH 6和8之间或6和9之间或7和9之间(例如pH 7)以至少1mg/mL的浓度可溶,并任选在25°C 24小时后保留至少95%的原始肽。再一例示性胰高血糖素共激动剂类似物表现出约10%或更小但高于0.1%、0.5%或1%的天然胰高血糖素针对胰高血糖素受体的活性和至少约50%、60%、70%、80%、90%或100%或更高的天然GLP-1针对GLP-1受体的活性,任选在pH 6和8之间或6和9之间或7和9之间(例如pH 7)以至少1mg/mL的浓度可溶,并任选在25°C 24小时后保留至少95%的原始肽。在某些实施方案中,胰高血糖素肽表现出不大于约100%、1000%、10,000%、100,000%或1,000,000%的天然GLP-1针对GLP-1受体的活性。在某些实施方案中,所述胰高血糖素类似物在天然胰高血糖素的对应位置保留至少22、23、24、25、26、27或28个天然存在的氨基酸(例如相对于天然存在的胰高血糖素具有1-7、1-5或1-3个修饰)。

[0048] 尽管包含一个或多个本文所述另外修饰的表现出所需GLP-1或共激动剂活性的任以下肽、使用所述化合物的药物组合物、药盒和治疗方法可包括在本发明中,但以下肽中的任何一种不包括在本发明化合物中:含[Arg12]取代并含C-末端酰胺的SEQ ID NO:1肽;含[Arg12、Lys20]取代并含C-末端酰胺的SEQ ID NO:1肽;含[Arg12、Lys24]取代并含C-末端酰胺的SEQ ID NO:1肽;含[Arg12、Lys29]取代并含C-末端酰胺的SEQ ID NO:1肽;含[Glu9]取代的SEQ ID NO:1肽;丢失His1、含[Glu9、Glu16、Lys29]取代并含C-末端酰胺的SEQ ID NO:1肽;含[Glu9、Glu16、Lys29]取代并含C-末端酰胺的SEQ ID NO:1肽;含经由内酰胺桥连接的[Lys13、Glu17]取代并含C-末端酰胺的SEQ ID NO:1肽;含经由内酰胺桥连接的[Lys17、Glu21]取代并含C-末端酰胺的SEQ ID NO:1肽;丢失His1、含经由内酰胺桥连接的[Glu20、Lys24]取代的SEQ ID NO:1肽。

[0049] 根据一个实施方案,提供包含本文公开的任何新型胰高血糖素肽和可药用稀释剂、载体或赋形剂的药物组合物,所述新型胰高血糖素肽优选无菌并优选以至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%的纯度水平。所述组合物可含有至少A浓度的胰高血糖素肽,其中A为0.001mg/ml、0.01mg/ml、0.1mg/ml、0.5mg/ml、1mg/ml、2mg/ml、3mg/ml、4mg/ml、5mg/ml、6mg/ml、7mg/ml、8mg/ml、9mg/ml、10mg/ml、11mg/ml、12mg/ml、13mg/ml、14mg/ml、15mg/ml、16mg/ml、17mg/ml、18mg/ml、19mg/ml、20mg/ml、21mg/ml、22mg/ml、23mg/ml、24mg/ml、25mg/ml或更高。在其它实施方案中,所述组合物可含有至多B浓度的胰高血糖素肽,其中B为30mg/ml、25mg/ml、24mg/ml、23mg/ml、22mg/ml、21mg/ml、20mg/ml、19mg/ml、18mg/ml、17mg/ml、16mg/ml、15mg/ml、14mg/ml、13mg/ml、12mg/ml、11mg/ml、10mg/ml、9mg/ml、8mg/ml、7mg/ml、6mg/ml、5mg/ml、4mg/ml、3mg/ml、2mg/ml、1mg/ml或0.1mg/ml。在某些实施方案中,组合物可含有从A到B mg/ml浓度范围的胰高血糖素肽,例如0.001-30.0mg/ml。在一个实施方案中,药物组合物包含已灭菌的水溶液并任选储存在各种容器中。可根据一个实施方案使用本发明化合物,以制备即用于注射的预制溶液。在其它实施方案中,药物组合物包含冻干粉。药物组合物可进一步作为药盒的一部分包装,所述药盒包括

用于将组合物给予患者的一次性器械。容器或药盒可标明储存在环境室温或冷冻温度。

[0050] 根据一个实施方案,提供用预制本发明胰高血糖素肽水性组合物快速提高葡萄糖水平或治疗低血糖症的方法。所述方法包括给予有效量的包含本发明新型经修饰的胰高血糖素肽水溶液的步骤。在一个实施方案中,胰高血糖素肽在胰高血糖素肽的21或24位聚乙二醇化,PEG链具有约500-约5,000道尔顿的分子量。在一个实施方案中,将经修饰的胰高血糖素溶液预包装在用于将组合物给予罹患低血糖症的患者装置中。

[0051] 根据一个实施方案,提供调节胰岛素依赖患者的血糖水平的改进的方法。所述方法包括给予治疗有效量的胰岛素控制糖尿病及给予治疗有效量的本发明新型经修饰的胰高血糖素肽用于防止低血糖症的步骤,其中所述给予步骤彼此在12小时内进行。在一个实施方案中,胰高血糖素肽和胰岛素作为单一组合物同时给予,其中胰高血糖素肽用具有选自约5,000-约40,000道尔顿范围分子量的PEG链聚乙二醇化。

[0052] 在另一实施方案中,提供用于诱导肠道临时麻痹的方法。所述方法包括将一种或多种本文公开的胰高血糖素肽给予患者的步骤。

[0053] 亦称为代谢综合征X、胰岛素抗性综合征或雷文综合征的代谢综合征,是影响超过5千万美国人的疾病。代谢综合征的特征通常为以下风险因子中的至少三个或更多的聚类:(1)腹部肥胖症(在腹部内或周围过多的脂肪组织);(2)致动脉粥样硬化异常脂血症(血液脂肪病,包括增加动脉壁斑块聚积的高甘油三酯、低HDL胆固醇和高LDL胆固醇);(3)血压升高;(4)胰岛素抗性或葡萄糖耐受;(5)血栓前状态(例如血液中高纤维蛋白原或纤溶酶原激活物抑制剂-1);和(6)前炎性状态(例如血液中的C-活性蛋白升高)。其它风险因子可包括老龄、激素失衡和遗传易感性。

[0054] 代谢综合征与冠心病及与血管斑块聚积有关的其它疾病风险的增加有关,所述其它疾病例如中风和外周性血管病(又称为动脉粥样硬化心血管病(ASCVD))。代谢综合征患者可从其早期阶段的胰岛素抵抗状态发展到具有进一步增加的ASCVD风险的充分发展的II型糖尿病。并非意欲依附任何特定理论,但胰岛素抗性、代谢综合征和血管病之间的关系可涉及一种或多种同时发生的致病机制,包括胰岛素-刺激的血管舒张受损、由于增加氧化应激而产生的胰岛素抗性相关的NO可利用性降低和源自脂肪细胞的激素例如脂连蛋白异常(Lteif和Mather,Can.J.Cardiol.20(suppl.B):66B-76B(2004))。

[0055] 根据2001年的美国国家胆固醇教育计划成人治疗组指南(National Cholesterol Education Program Adult Treatment Panel)(ATP III),同一个体的任何以下三个特征满足代谢综合征标准:(a)腹部肥胖(男性腰围超过102cm,女性超过88cm);(b)血清甘油三酯(150mg/dl或以上);(c)HDL胆固醇(男性中40mg/dl或更低,女性中50mg/dl或更低);(d)血压(130/85或更高);和(e)禁食血糖(110mg/dl或以上)。根据世界卫生组织(WHO),具有高胰岛素水平(禁食血糖升高或仅餐后葡萄糖升高)并且至少以下两条标准的个体满足代谢综合征的标准:(a)腹部肥胖(腰臀比率大于0.9,身体质量指数至少30kg/m²或腰围测量超过37英寸);(b)胆固醇组显示至少150mg/dl的甘油三酯水平或低于35mg/dl的HDL胆固醇;(c)140/90或更高的血压或在接受高血压治疗)。(Mathur,Ruchi,“Metabolic Syndrome(代谢综合征)”Shiel,Jr.,William C.编辑,MedicineNet.com,2009年5月11日)。

[0056] 为本文目的,如果个体满足2001年美国国家胆固醇教育计划成人治疗组指南或WHO提出的标准中的任一个或两者都满足,那么认为该个体罹患代谢综合征。

[0057] 不依附任何特定理论,本文所述胰高血糖素肽用于治疗代谢综合征。因此,本发明提供在受试者中预防或治疗代谢综合征或降低其一个、二个、三个或更多个风险因子的方法,所述方法包括给予受试者有效防止或治疗代谢综合征或其风险因子的量的本文所述胰高血糖素肽。

[0058] 非酒精性脂肪肝病(NAFLD)指从单纯脂肪肝(脂肪变性)到非酒精性脂肪性肝炎(NASH)到肝硬化(不可逆的晚期肝瘢痕化)的广谱肝脏疾病。NAFLD的所有阶段都在肝脏细胞(肝细胞)中聚积脂肪(脂肪浸润)。单纯脂肪肝是某种脂肪、甘油三酯类型在肝脏细胞中异常聚积但肝脏细胞无炎症或瘢痕化。在NASH中,脂肪聚积与肝脏不同程度的炎症(肝炎)和瘢痕化(纤维化)有关。炎症性细胞可破坏肝脏细胞(肝细胞坏死)。术语“脂肪性肝炎”和“脂肪坏死”中的脂肪性(steato)指脂肪浸润,肝炎指肝脏炎症,坏死指肝脏细胞受破坏。NASH可最终导致肝脏瘢痕化(纤维化),然后是不可逆的晚期瘢痕化(肝硬化)。由NASH引起的肝硬化是NAFLD疾病谱的最后和最严重的阶段。(Mendler,Michel,“Fatty Liver: Nonalcoholic Fatty Liver Disease(NAFLD)and Nonalcoholic Steatohepatitis(NASH)(脂肪肝:非酒精性脂肪肝病(NAFLD)和非酒精性脂肪性肝炎(NASH),”Schoenfield,Leslie J.主编,MedicineNet.com,2005年8月29日)。

[0059] 酒精性肝病或酒精诱导的肝病包括与过量消耗酒精有关或由其引起的三种病理上不同的肝脏疾病:脂肪肝(脂肪变性)、慢性或急性肝炎和肝硬化。酒精性肝炎可从温和的肝炎(用异常实验室检测仅为疾病的指标)变化到严重的肝脏机能失调并有并发症例如黄疸病(由胆红素滞留(bilirubin retention)引起的黄皮肤)、肝性脑病(由肝脏衰竭引起的神经机能障碍)、腹水(腹部的流体聚积)、食管静脉曲张出血(食管的静脉曲张)、异常血液凝结和昏迷。酒精性肝炎在组织学上具有肝细胞气球样变性、中性粒细胞炎症及有时马洛里小体(细胞中间体丝状蛋白异常聚集)的特征外观。肝硬化的解剖特征在于肝脏上广泛的结节与纤维化联合出现。(Worman,Howard J.,“Alcoholic Liver Disease(酒精性肝病)”,哥伦比亚大学医学中心网站)。

[0060] 不依附任何特定理论,本文所述胰高血糖素肽用于治疗酒精性肝病、NAFLD或其任何阶段,包括例如脂肪变性、脂肪性肝炎、肝炎、肝脏炎症、NASH、肝硬化或并其发症。因此,本发明提供在受试者中预防或治疗酒精性肝病、NAFLD或其任何阶段的方法,所述方法包括给予受试者有效预防或治疗酒精性肝病、NAFLD或其阶段的量的本文所述胰高血糖素肽。所述治疗方法包括降低以下中的一种、二种、三种或更多种:肝脏脂肪含量、肝硬化的发生率或进展、肝细胞癌的发生率、炎症指征例如异常肝酶水平(例如天冬氨酸氨基转移酶AST和/或丙氨酸氨基转移酶ALT或LDH)、升高的血清铁蛋白、升高的血清胆红素和/或纤维化指征例如升高的TGF- β 水平。在优选实施方案中,将胰高血糖素肽用于治疗其进展超过单纯脂肪肝(脂肪变性)并表现出炎症或肝炎指征的患者。所述方法可导致例如AST和/或ALT水平降低。

[0061] 在再一实施方案中,提供治疗高血糖症的方法或减少增重或诱导减重的方法,所述方法涉及给予包含本发明胰高血糖素肽的有效量的水溶液。在一个实施方案中,任一种方法包括给予有效量的包含选自以下的胰高血糖素激动剂的组合物:SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:17、SEQ ID NO:18和SEQ ID NO:19。在另一实施方案中,所述方法包括给予有效量的包含胰高血糖

素激动剂的组合物,其中所述胰高血糖素激动剂包含选自以下的胰高血糖素肽:SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:17、SEQ ID NO:18、SEQ ID NO:19、SEQ ID NO:66、SEQ ID NO:67、SEQ ID NO:68和SEQ ID NO:69,其中胰高血糖素肽的29位氨基酸通过肽键与第二肽结合,所述第二肽包含序列SEQ ID NO:26、SEQ ID NO:27或SEQ ID NO:28。在另外的实施方案中,提供涉及同时给予常规剂量或低剂量胰岛素和本发明胰高血糖素肽的治疗糖尿病的方法。亦提供用本发明胰高血糖素肽治疗糖尿病而不同时给予胰岛素的方法。

[0062] 本发明再一方面提供用于治疗高血糖症的新型方法和用于降低食欲或促进体重减轻的新型方法,所述方法涉及给予激活胰高血糖素受体和GLP-1受体二者的胰高血糖素/GLP-1共激动剂分子(包括其可药用盐)。与单用GLP-1激动比较,激动(即激活)胰高血糖素和GLP-1受体二者在治疗高血糖症中提供出意想不到的改进。因此,加上胰高血糖素激动提供出意想不到的相加作用或协同作用或其它意想不到的临床益处。所述方法涵盖给予常规剂量胰岛素、低剂量胰岛素或不给予胰岛素。与单用GLP-1激动比较,胰高血糖素受体激动亦在促进减重或防止增重中具有意想不到的有益作用。

[0063] 例示性胰高血糖素/GLP-1共激动剂分子包括:本发明胰高血糖素肽、激活GLP-1和胰高血糖素受体二者的GLP-1类似物、胰高血糖素和GLP-1的融合体或胰高血糖素类似物和GLP-1类似物的融合体或其化学修饰衍生物。或者,可在给予激活GLP-1受体的化合物(例如GLP-1类似物、毒蜥外泌肽-4类似物或其衍生物)的同时给予激活胰高血糖素受体的化合物。本发明亦涵盖同时给予胰高血糖素激动剂类似物与GLP-1激动剂类似物。

[0064] 所述用于治疗高血糖症和/或用于降低食欲或促进体重减轻的方法包括给予含12位修饰(例如Arg12)并任选与16和/或20位修饰组合的胰高血糖素类似物。本发明方法亦包括给予包含分子内桥的胰高血糖素类似物,所述分子内桥位于12和29位氨基酸区内由三个间插氨基酸分开的两个氨基酸侧链之间,所述两个氨基酸例如12和16位、13和17位(例如Lys13 Glu17或Glu13 Lys17)、16和20位、17和21位(例如Lys17 Glu21或Glu17 Lys21)、20和24位或24和28位氨基酸,任选前提为9位氨基酸不是Glu,并任选包括C-末端酰胺或酯。

[0065] 根据一个实施方案,不包括在所述胰高血糖素/GLP-1共激动剂分子中的是现有技术中已知用于所述方法的任何胰高血糖素类似物或GLP-1类似物。美国专利号6,864,069中阐述作为GLP-1激动剂和胰高血糖素拮抗剂的用于治疗糖尿病的另一实施方案肽,亦排除在胰高血糖素/GLP-1共激动剂分子之外。在另一实施方案中,不包括胰高血糖素拮抗剂治疗糖尿病的用途,例如在Unson等,J. Biol. Chem., 264:789-794(1989),Ahn等,J. Med. Chem., 44:3109-3116(2001)和Sapse等,Mol. Med., 8(5):251-262(2002)中所述的拮抗剂。在另一实施方案中,泌酸调节肽或含有泌酸调节肽的8个C-末端氨基酸(SEQ ID NO:27)的胰高血糖素类似物亦排除在胰高血糖素/GLP-1共激动剂分子之外。

[0066] 预期所述用于治疗高血糖症的所述方法可用于多种类型的高血糖症,包括糖尿病、I型糖尿病、II型糖尿病或妊娠期糖尿病、胰岛素依赖性或非胰岛素依赖性糖尿病,并降低包括肾病、视网膜病和血管病在内的糖尿病并发症。预期将用于降低食欲或促进减重的所述方法用于减轻体重、防止增重或治疗各种原因的肥胖症,包括药物诱导的肥胖症,并用于减少与肥胖症有关的并发症,所述并发症包括血管病(冠状动脉疾病、中风、外周性血管病、缺血-再灌等)、高血压、II型糖尿病发作、血脂过多症和肌骨病。

[0067] 本文所述所有治疗方法、药物组合物、药盒和其它类似的实施方案涵盖的是,术语胰高血糖素类似物的使用涵盖其所有可药用盐或酯。

[0068] 附图简述

[0069] 图1为代表胰高血糖素Cys²¹马来酰亚胺基PEG_{5k}在37℃分别孵育24、48、72、96、144和166小时的稳定性的条线图。

[0070] 图2表示从胰高血糖素Cys²¹马来酰亚胺基PEG_{5k}在pH 5时于37℃分别孵育24、72或144小时的产生自HPLC分析的数据。

[0071] 图3表示显示胰高血糖素类似物对受体介导的cAMP的诱导的数据。更具体地,图3A比较了胰高血糖素类似物E16,K20●、E15,E16▲、E16,K20▼、E15,E16◀、E16▶和Gluc-NH₂■对胰高血糖素受体的诱导。

[0072] 图4A和4B表示显示胰高血糖素类似物对受体介导的cAMP的诱导的数据。更具体地,图4A比较了胰高血糖素类似物Gluc-NH₂●、E16Gluc-NH₂▲、E3,E16 Gluc-NH₂▼、Orn3,E16 Gluc-NH₂◀和Nle3,E16 Gluc-NH₂▶相对于天然胰高血糖素■对胰高血糖素受体的诱导。而图4B比较了胰高血糖素类似物Gluc-NH₂●、E16 Gluc-NH₂▲、E3,E16Gluc-NH₂▼、Orn3,E16 Gluc-NH₂◀和Nle3,E16 Gluc-NH₂▶相对于天然GLP-1■对GLP-1受体的诱导。

[0073] 图5A和5B表示显示胰高血糖素类似物对受体介导的cAMP的诱导的数据。更具体地,图5A比较了胰高血糖素类似物(E16,K20Gluc-NH₂●(5nM,储液)、E15,E16 Gluc-NH₂▲(5nM,储液)、E16,K20Gluc-NH₂▼(10nM,储液)、E15,E16 Gluc-NH₂◀(10nM,储液)和E16 Gluc-NH₂▶)相对于胰高血糖素-NH₂(■)对胰高血糖素受体的诱导,而图5B比较了胰高血糖素类似物(E16,K20 Gluc-NH₂●、E15,E16Gluc-NH₂▲和E16 Gluc-NH₂▶)相对于GLP-1(■)和胰高血糖素-NH₂(□)对GLP-1受体的诱导。

[0074] 图6A和6B表示显示胰高血糖素类似物对受体介导的cAMP的诱导的数据。更具体地,图6A比较了胰高血糖素类似物(Gluc-NH₂●、K12E16-NH₂内酰胺▲、E16K20-NH₂内酰胺▼、K20E24-NH₂内酰胺◀和E24K28-NH₂内酰胺▶)相对于胰高血糖素(■)对胰高血糖素受体的诱导,而图6B比较了胰高血糖素类似物(Gluc-NH₂●、K12E16-NH₂内酰胺▲、E16K20-NH₂内酰胺▼、K20E24-NH₂内酰胺◀和E24K28-NH₂内酰胺▶)相对于GLP-1(■)对GLP-1受体的诱导。

[0075] 图7A和7B表示显示胰高血糖素类似物对受体介导的cAMP的诱导的数据。更具体地,图7A比较了胰高血糖素类似物(Gluc-NH₂●、E16 Gluc-NH₂▲、K12,E16 Gluc-NH₂内酰胺▼、E16,K20Gluc-NH₂◀和E16,K20 Gluc-NH₂内酰胺▶)相对于胰高血糖素(■)对胰高血糖素受体的诱导,而图7B比较了胰高血糖素类似物(Gluc-NH₂●、E16Gluc-NH₂▲、K12,E16 Gluc-NH₂内酰胺▼、E16,K20 Gluc-NH₂◀和E16,K20 Gluc-NH₂内酰胺▶)相对于GLP-1(■)对GLP-1受体的诱导。

[0076] 图8A-8F表示显示胰高血糖素类似物针对胰高血糖素受体(图8A,8C和8E)或GLP-1受体(图8B,8C和8F)的对受体介导cAMP的诱导的数据,其中hE=高谷氨酸,hC=高半胱氨酸。

[0077] 图9A和9B:表示显示GLP(17-26)胰高血糖素类似物对受体介导的cAMP的诱导的数据,其中天然胰高血糖素(SEQ ID NO:1)的17-26位氨基酸被天然GLP-1(SEQ ID NO:50)的17-26位氨基酸取代。更具体地,图9A比较了由指定的GLP(17-26)胰高血糖素类似物对胰高

血糖素受体的诱导,图9B比较了指定的GLP(17-26)胰高血糖素类似物对GLP-1受体的诱导。

[0078] 图10A-E:提供显示本发明胰高血糖素肽在用标示量的各化合物皮下注射的小鼠中诱导减重的能力的体内数据的图表。图10A-10E中所列胰高血糖素肽的序列标识符如下,对于图10A:嵌合体2 Aib2 C24 40K PEG(SEQ ID NO:486)、Aib2 C24嵌合体240K内酰胺(SEQ ID NO:504)和Aib2 E16 K20 Gluc-NH2 Lac 40K(SEQ ID NO:528);对于图10B:Aib2 C24 Chi 2内酰胺40K(SEQ ID NO:504)、DMIA1 C24 Chi 2内酰胺40K(SEQ ID NO:505)、嵌合体2 DMIA1 C24 40K(SEQ ID NO:519)和嵌合体2 Aib2 C24 40K(SEQ ID NO:486),其中序列末尾的数字标明所用剂量,为70或350nmol/kg;对于图10C:AIB2 w/内酰胺C24 40K(SEQ ID NO:504)、AIB2 E16 K20w/内酰胺C24 40K(SEQ ID NO:528)、DMIA1 E16 K20 w/内酰胺C24 40K(SEQ ID NO:510)、DMIA1 E16 K20 w/内酰胺CEX 40K(SEQ ID NO:513)和DMIA1 E16 K20 w/o内酰胺CEX 40K(SEQ ID NO:529);对于图10D:AIB2 w内酰胺C24 40K(SEQ ID NO:504)、AIB2 E16 K20 w内酰胺C24 40K (SEQ ID NO:528)、DMIA1 E16 K20 w内酰胺C24 40K(SEQ ID NO:510)和DMIA1 E16 K20 w内酰胺/Cex C24 40K(SEQ ID NO:513),其中序列末尾的数字标明所用剂量,为14或70nmol/kg/周;对于图10E:AIB2 w/o内酰胺C24 40K(SEQ ID NO:486)、Chi 2 AIB2 C24 CEX 40K(SEQ ID NO:533)、AIB2 E16 A18 K20 C24 40K(SEQ ID NO:492)、AIB2 w/o内酰胺CEX G29 C40 40K(SEQ ID NO:488)、AIB2 w/o内酰胺CEX C40 C41-2(SEQ ID NO:532)、AIB2 w/o内酰胺CEX C24 C40-2(SEQ ID NO:531)和AIB2 w/o内酰胺C24 60K(SEQ ID NO:498),其中标明40K或60K表示与胰高血糖素肽连接的聚乙烯链的分子量。

[0079] 图11-13为提供显示酰化的胰高血糖素肽在用标示量的化合物皮下注射的小鼠中诱导减重(图11)、降低摄食(图12)和降低血糖水平(图13)的能力的体内数据的图表。

[0080] 图14A和14B表示显示胰高血糖素类似物分别对胰高血糖素受体和GLP-1受体介导的cAMP的诱导的数据。

[0081] 图15表示在用2nmol/kg以下物质治疗的DIO小鼠中给予肽后15分钟用葡萄糖攻击作为时间(分钟)的函数的血糖(mg/dL)的图表:仅用溶媒(三角形)、嵌合体-2 AIB²,K¹⁰-C8 Cys²⁴-40kD PEG(空心方框)或嵌合体-2 AIB²,K¹⁰-C16 Cys²⁴-40kD PEG(倒三角)。

[0082] 图16表示在用20nmol/kg以下物质治疗的DIO小鼠中给予肽后15分钟用葡萄糖攻击作为时间(分钟)的函数的血糖(mg/dL)的图表:仅用溶媒(三角形)、嵌合体-2 AIB²,K¹⁰-C8 Cys²⁴-40kD PEG(空心方框)或嵌合体-2 AIB²,K¹⁰-C16 Cys²⁴-40kD PEG(倒三角)。

[0083] 图17表示在用70nmol/kg以下物质治疗的DIO小鼠中给予肽后15分钟用葡萄糖攻击作为时间(分钟)的函数的血糖(mg/dL)的图表:仅用溶媒(倒三角形)、嵌合体-2 AIB²,K¹⁰-C8 Cys²⁴-40kD PEG(空心三角形)、嵌合体-2 AIB²,K¹⁰-C16 Cys²⁴-40kD PEG(菱形)或嵌合体-2 AIB²,Cys²⁴-40kD PEG(空心方框)。

[0084] 图18表示在用70nmol/kg以下物质治疗的DIO小鼠中给予肽后24小时用葡萄糖攻击作为时间(分钟)的函数的血糖(mg/dL)的图表:仅用溶媒(倒三角形)、嵌合体-2 AIB²,K¹⁰-C8 Cys²⁴-40kD PEG(空心三角形)、嵌合体-2 AIB²,K¹⁰-C16 Cys²⁴-40kD PEG(菱形)或嵌合体-2 AIB²,Cys²⁴-40kD PEG(空心方框)。

[0085] 图19表示在用15或70nmol/kg以下物质治疗的DIO小鼠中作为时间(天)的函数的体重变化(%)的图表:仅用溶媒(实线菱形);嵌合体-2AIB²,Cys²⁴-40kD PEG(15nmol/kg,虚

线空心菱形;70nmol/kg,实线空心三角形);嵌合体-2 AIB²,K¹⁰-C8 Cys²⁴-40kD PEG (15nmol/kg,虚线实心三角形;70nmol/kg,实线实心三角形);嵌合体-2 AIB²,K¹⁰-C16 Cys²⁴-40kD Peg(15nmol/kg,虚线倒三角;70nmol/kg;实线倒三角)。

[0086] 图20表示在每周一次(QW)注射10、20、40或80nmol/kg肽AK¹⁰-C₁₄或20nmol/kg嵌合体-2 AIB² K¹⁰-C8 Cys²⁴-40kD或溶媒对照后14天小鼠的体重的总变化(%)图表。

[0087] 图21表示在葡萄糖注射之前24小时用10、20、40或80nmol/kg肽A K¹⁰-C₁₄或20nmol/kg嵌合体-2 AIB² K¹⁰-C8 Cys²⁴-40kD或溶媒对照注射的小鼠对葡萄糖注射的响应的血糖水平(mg/dL)图表。

[0088] 图22表示用溶媒对照、利拉鲁肽(Liraglutide)、(C16)胰高血糖素酰胺、γE-γE-C16胰高血糖素酰胺、AA-C16胰高血糖素酰胺或βABA-C16胰高血糖素酰胺以所示剂量注射的小鼠的体重的总变化(%)的图表。

[0089] 图23表示在研究的第7天测量的用溶媒对照、利拉鲁肽、(C16)胰高血糖素酰胺、γE-γE-C16胰高血糖素酰胺、AA-C16胰高血糖素酰胺或βABA-C16胰高血糖素酰胺以所示剂量注射的小鼠的脂肪量(g)的图表。

[0090] 图24表示用溶媒对照、利拉鲁肽、(C16)胰高血糖素酰胺、γE-γE-C16胰高血糖素酰胺、AA-C16胰高血糖素酰胺或βABA-C16胰高血糖素酰胺以所示剂量注射的小鼠的血糖变化(mg/dL;第7天水平减去第0天水平)的图表。

[0091] 图25表示肽X-PEG或肽Y-PEG在含或不含10%TFE的10mM磷酸盐(pH 5.9)中作为波长(nm)函数的平均残基椭圆率(ellipticity)的图表。

[0092] 图26表示因响应胰高血糖素、GLP-1、肽X、肽X-PEG、肽Y或肽Y-PEG结合胰高血糖素受体(左)或GLP-1受体(右)而产生的% cAMP作为肽浓度(nM)函数的图表。

[0093] 图27表示证明在用溶媒对照、肽X-PEG或肽Y-PEG治疗一周的饮食诱导的肥胖小鼠中对A)体重、B)脂肪量、C)摄食和D)禁食血糖水平的体内影响的图表集。更具体地,图27A表示作为时间(天)的函数的%体重变化(BW)的图表,图27B表示在第7天测量的脂肪量的%变化(与初始脂肪量测量值比较)的图表,图27C表示在第7天测量的研究过程中总摄食(g)的图表,图27D表示第7天测量的血糖(mg/dL)变化(与初始血糖水平比较)的图表。

[0094] 图28表示证明在用不同剂量(nmol/kg/周)的肽X-PEG(图28A和28B)或肽Y-PEG(图28C和28D)治疗的小鼠中对体重(图28A和28C)和禁食血糖水平(图28B和28D)的体内影响的图表集。

[0095] 图29表示显示在用溶媒对照、肽X-PEG或肽Y-PEG治疗一个月的饮食诱导肥胖的小鼠中对A)体重(BW)、B)身体脂肪量、C)总摄食、D)能量消耗、E)呼吸商、F)活动能力、G)禁食血糖、H)葡萄糖耐受和I)总血浆胰岛素水平的体内影响的图表集。

[0096] 图30表示显示在用溶媒对照、肽X-PEG或肽Y-PEG治疗一个月的饮食诱导肥胖的小鼠中第3周对A)摄食、B)总能量消耗、C)总呼吸商、D)活动能力、E)总活动能力、F)曲线下面积ipGTT、G)血浆C-肽水平、H)PEPCK/HPRT倍表达和I)G6P/HPRT倍表达水平的体内影响的图表集。

[0097] 图31表示证明在用溶媒对照、肽X-PEG或肽Y-PEG治疗一个月的饮食诱导肥胖的小鼠中对A)胆固醇、B)胆固醇FPLC、C)甘油三酯、D)瘦素(leptin)、E)抵抗素(resistin)和F)脂连蛋白的体内影响的图表集。

[0098] 图32表示证明在用溶媒对照、肽X-PEG或肽Y-PEG治疗的小鼠中对由激素敏感脂肪酶磷酸化(pHSL)反映的A)BAT UCP-1表达水平和B)白色脂肪组织的体内影响的图表集。

[0099] 图33表示证明溶媒对照、肽X-PEG或肽Y-PEG在DIO大鼠中对A)体重和B)脂肪量的体内影响的图表集。图33C表示在用肽Y-PEG、肽X-PEG或溶媒治疗2周的小鼠中分离的附睾脂肪组织中由实时RT-PCR定量评估的CD68与TFIIB的相对表达的图表。数据由标准化为TFIIB mRNA表达的相对CD68 mRNA表达表示,以平均值 $\pm$ SEM表示。

[0100] 图34A到34F表示显示在用溶媒对照、肽X-PEG或肽Y-PEG治疗的GLP-1-R敲除小鼠中对体重(BW;34A和34B)、脂肪量(34C)、摄食(34D)和血糖水平(34E和34F)的体内影响的图表集。

[0101] 图35A到35C表示证明在用溶媒对照、肽V或肽U治疗的DIO小鼠中对体重(35A)、血糖(35B)和脂肪量(35C)的体内影响的一系列图表。

[0102] 详述

[0103] 定义

[0104] 在阐述及主张本发明权利过程中,将根据下面阐述的定义来使用以下术语。

[0105] 本文所用术语“可药用载体”包括任何标准药物载体,例如磷酸盐缓冲的盐水溶液、水、乳剂(例如油/水或水/油乳剂)及各种类型的湿润剂。本术语亦包含美国联邦政府管理机构批准的或美国药典列出的用于动物(包括人)的任何作用剂。

[0106] 本文所用术语“可药用盐”指保留母体化合物的生物学活性并在生物学上或其它方面不会不符合要求的化合物的盐。本文公开的很多化合物由于存在氨基和/或羧基或与其类似基团而能够形成酸和/或碱盐。

[0107] 可药用碱加成盐可自无机碱及有机碱制备。仅为了举例,来源于无机碱的盐包括钠、钾、锂、铵、钙和镁的盐。来源于有机碱的盐包括但不限于伯胺盐、仲胺盐和叔胺盐。

[0108] 可药用酸加成盐可自无机酸及有机酸制备。来源于无机酸的盐包括盐酸、氢溴酸、硫酸、硝酸、磷酸等的盐。来源于有机酸的盐包括乙酸、丙酸、乙醇酸、丙酮酸、草酸、苹果酸、丙二酸、琥珀酸、马来酸、富马酸、酒石酸、柠檬酸、苯甲酸、月桂酸、扁桃酸、甲磺酸、乙磺酸、对甲苯磺酸、水杨酸等的盐。

[0109] 本文所用术语“治疗”包括预防特定病症或病况,或减轻与特定病症或病况有关的症状,和/或预防或根除所述症状。例如,本文所用术语“治疗糖尿病”一般指改变血液葡萄糖水平到正常水平,根据既定情况可包括提高或降低血糖水平。

[0110] 本文所用胰高血糖素肽的“有效”量或“治疗有效量”指无毒但足以提供所需效果的肽的量。例如一种所需效果可能为防止或治疗低血糖症,其例如由提高血糖水平来测量。本发明共激动剂类似物的备选所需效果应包括:治疗高血糖症,例如由血糖水平变化接近正常来测量;或诱导减重/防止增重,例如由减轻体重来测量;或预防或减少体重增加;或使身体脂肪分布正常化。“有效”量在不同受试者之间将不相同,这要视个体年龄、一般状况、给药方式等而定。因此,指定确切的“有效量”并不总是可能的。然而,本领域一般人员用常规实验方法可确定任何人体病例的合适的“有效”量。

[0111] 术语“胃肠外”意指不通过消化道而是通过某些其它途径,例如皮下、肌肉内、脊柱内或静脉内。

[0112] 本文所用术语“纯化的”等术语涉及基本上无污染物的分子或化合物的分离物形

式,而所述污染物在天然或自然环境中通常与所述分子或化合物结合在一起。

[0113] 本文所用术语“纯化的”不需要绝对纯度;相反,其意欲作为相对定义。本文所用术语“纯化的多肽”阐述与其它化合物分开的多肽,所述其它化合物包括但不限于核酸分子、脂类和碳水化合物。

[0114] 术语“分离的”需要从其初始环境(例如若其为天然存在的物质则指天然环境)中除去有关物质。例如,存在于活的动物中的天然存在的多核苷酸未被分离,但与自然系统中所共存的某些或所有物质分开的同样的多核苷酸为分离的多核苷酸。

[0115] 本文所用术语“肽”包含3个或更多个氨基酸且通常小于50个氨基酸的序列,其中氨基酸为天然存在的或非天然存在的氨基酸。非天然存在的氨基酸指不在体内天然存在的氨基酸,但其可被引入到本文所述的肽结构中。

[0116] 本文所用术语“多肽”和“蛋白质”为可互换使用的术语,指氨基酸聚合物,而不考虑聚合物的长度。通常多肽和蛋白质具有长于“肽”的聚合物长度。

[0117] 本文所用“胰高血糖素肽”包括包含SEQ ID NO:1氨基酸序列或SEQ ID NO:1氨基酸序列的任何类似物的任何肽,所述类似物包括肽的氨基酸取代、添加、缺失或翻译后修饰(例如甲基化、酰化、泛素化、分子内共价键合例如内酰胺桥形成、聚乙二醇化等),其中所述类似物刺激胰高血糖素或GLP-1受体活性,其例如用实施例14所述测定由cAMP产量来测量。

[0118] 术语“胰高血糖素激动剂”指包含刺激胰高血糖素受体活性的胰高血糖素肽的复合物,其例如用实施例14所述测定由cAMP产量来测量。

[0119] 本文所用“胰高血糖素激动剂类似物”为包含选自以下序列的胰高血糖素肽:SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:14和SEQ ID NO:15,或经修饰包括在以下位置中的一处或多处的一个或多个保守性氨基酸取代的所述序列的类似物:2、5、7、10、11、12、13、14、17、18、19、20、21、24、27、28或29。

[0120] 本文所用氨基酸“修饰”指氨基酸的取代、添加或缺失,包括用人蛋白质中常见的20种氨基酸以及非典型或非天然存在的氨基酸中的任何一种来取代或添加。在整篇说明书中,所有由数字提及特定氨基酸位置(例如28位)都指在天然胰高血糖素(SEQ ID NO:1)中该位置的氨基酸或其任何类似物中对应的氨基酸位置。例如,本文提及“28位”意味着某种胰高血糖素类似物的对应的27位,在该类似物中缺失了SEQ ID NO:1的第一个氨基酸。同样地,本文提及“28位”意味着某种胰高血糖素类似物的对应的29位,在该类似物中在SEQ ID NO:1的N-末端之前添加了一个氨基酸。非典型氨基酸的商业来源包括Sigma-Aldrich (Milwaukee,WI)、ChemPep Inc.(Miami,FL)和Genzyme Pharmaceuticals(Cambridge,MA)。非典型氨基酸可购自商业供应商、从头合成或从其它氨基酸经化学修饰或衍生自其它氨基酸。

[0121] 本文所用“胰高血糖素共激动剂”是这样的胰高血糖素肽,其表现出相对于天然胰高血糖素针对胰高血糖素受体活性的至少约10%-约500%或更大,并亦表现出相对于天然GLP-1针对GLP-1受体活性的约至少10%-约200%或更大。

[0122] 本文所用“胰高血糖素/GLP-1共激动剂分子”为这样的分子,其表现出相对于天然胰高血糖素针对胰高血糖素受体活性的至少约10%,并亦表现出相对于天然GLP-1针对GLP-1受体活性的至少约10%。

[0123] 本文所用术语“天然胰高血糖素”指由SEQ ID NO:1序列组成的肽,术语“天然GLP-

1”是指定为GLP-1(7-36)酰胺(由SEQ ID NO:52序列组成)、GLP-1(7-37)酸(由SEQ ID NO:50序列组成)或这两种化合物的混合物的通称。本文在缺乏任何进一步指定时对“胰高血糖素”或“GLP-1”一般提及分别意指天然胰高血糖素或天然GLP-1。

[0124] 本文所用氨基酸“取代”指由不同的氨基酸残基来替换一个氨基酸残基。

[0125] 本文所用术语“保守性氨基酸取代”在本文中定义为在以下5组内进行组内互换：

[0126] I.脂肪族的非极性或非极性的小残基：

[0127] Ala、Ser、Thr、Pro、Gly；

[0128] II.极性的带负电荷的残基及其酰胺和酯：

[0129] Asp、Asn、Glu、Gln、半胱氨酸和高半胱氨酸；

[0130] III.极性的带正电荷的残基：

[0131] His、Arg、Lys、鸟氨酸(Orn)；

[0132] IV.脂肪族的非极性大残基：

[0133] Met、Leu、Ile、Val、Cys、正亮氨酸(Nle)、高半胱氨酸

[0134] V.芳香族大残基：

[0135] Phe、Tyr、Trp、乙酰苯丙氨酸。

[0136] 本文所用通用术语“聚乙二醇链”或“PEG链”，指由通式 $H(OCH_2CH_2)_nOH$ 代表的作为支链或直链的环氧乙烷及水的缩聚物的混合物，其中 n 为至少9。在没有任何另外的界定下，本术语意欲包括平均总分子量选自500-40,000道尔顿范围的乙二醇的聚合物。“聚乙二醇链”或“PEG链”与数字后缀联用，表示其大约平均分子量。例如，PEG-5,000指具有平均约5,000的总分子量的聚乙二醇链。

[0137] 本文所用术语“聚乙二醇化的”及类似术语，指业已通过让聚乙二醇链与化合物连接来使化合物的天然状态发生改变的化合物。“聚乙二醇化的胰高血糖素肽”是具有与胰高血糖素肽共价结合的PEG链的胰高血糖素肽。

[0138] 本文通常提及肽意欲包含氨基和羧基末端经过修饰的肽。例如，在末端羧酸的位置包含酰胺基的氨基酸链意欲包括在指定标准氨基酸的氨基酸序列中。

[0139] 本文所用“接头”为让两个分开实体互相结合的键、分子或分子团。接头可为两个实体提供最佳间距，或可进一步提供允许这两个实体彼此分开的易分解连接(labile linkage)。易分解连接包括光可裂解基团、酸-易分解部分、碱-易分解部分和酶可裂解基团。

[0140] 本文所用“二聚体”为包含经由接头彼此共价结合的两个亚单位的复合体。当不用任何限定语言使用术语二聚体时，既包括同二聚体又包含异二聚体。同型二聚体包含两个一样的亚单位，而异二聚体包含两个不同的亚单位，但这两个亚单位基本上彼此相似。

[0141] 本文所用术语“带电荷的氨基酸”指在生理pH水溶液中包含带负电荷(即去质子化)或带正电荷(即质子化)的侧链的氨基酸。例如，带负电荷的氨基酸包括天冬氨酸、谷氨酸、半胱氨酸、高半胱氨酸和高谷氨酸，而带正电荷的氨基酸包括精氨酸、赖氨酸和组氨酸。带电荷的氨基酸包括在人蛋白质中常见的20种氨基酸以及非典型或非天然存在的氨基酸中的带电荷的氨基酸。

[0142] 本文所用术语“酸性氨基酸”指包含第二个酸性部分的氨基酸，所述第二个酸性部分包括例如羧酸或磺酸基。

[0143] 术语“烷基”指含有指定数目的碳原子的直链或支链烃。例示性烷基包括甲基、乙基和直链丙基。

[0144] 术语“杂烷基”指在结构主链中含有指定碳原子数目及至少一个杂原子的直链或支链烃。用于本文目的的适当的杂原子包括但不限于N、S和O。

[0145] 实施方案

[0146] 本发明提供具有提高的或降低的针对胰高血糖素受体或GLP-1受体或针对这两种受体活性的胰高血糖素肽。本发明亦提供改变胰高血糖素受体相对于GLP-1受体的选择性的胰高血糖素肽。

[0147] 如本文所述通过对天然胰高血糖素(SEQ ID NO:1)进行16位氨基酸修饰来提供提高的针对胰高血糖素受体的活性。

[0148] 通过用谷氨酰胺类似物(例如(Dab(Ac)))在天然胰高血糖素3位的氨基酸修饰亦提供保持或提高的针对胰高血糖素受体的活性。

[0149] 例如,如本文所述通过用酸性、碱性或疏水氨基酸取代3位氨基酸提供降低的针对胰高血糖素受体的活性。

[0150] 通过用电中性基团(例如酰胺或酯)取代C-末端氨基酸的羧酸提供针对GLP-1受体的提高的活性。

[0151] 通过稳定胰高血糖素C-末端部分的 α 螺旋(例如大约12-29位残基)的修饰提供针对GLP-1受体的提高的活性。在某些实施方案中,所述修饰允许在由三个间插氨基酸分开的两个氨基酸侧链之间形成分子内桥,所述两个氨基酸例如12和16位或16和20位或20和24位氨基酸,其如本文所述。在其它实施方案中,所述修饰包括在16、20、21或24位中的一处或多处引入一个或多个 α,α -二取代氨基酸(例如AIB)的插入或取代修饰。

[0152] 通过让酰基或烷基与肽的10位氨基酸侧链共价连接,为缺乏分子内桥(例如共价分子内桥)的肽提供提高的针对GLP-1和胰高血糖素受体的活性,其中所述酰基或烷基对10位氨基酸为非天然。可通过在酰基或烷基与10位氨基酸侧链之间引入间隔物,为缺乏分子内桥(例如共价分子内桥)的肽提供进一步提高的针对GLP-1和胰高血糖素受体的活性。合适的间隔物如本文所述,包括但不限于3-10个原子长度的间隔物。

[0153] 如本文所述通过20位的氨基酸修饰提供针对GLP-1受体的提高的活性。

[0154] 包含SEQ ID NO:26C-末端延伸的胰高血糖素类似物提供针对GLP-1受体的提高的活性。所述包含SEQ ID NO:26的类似物的GLP-1活性可通过修饰18、28或29位或18和29位氨基酸进一步提高,其如本文所述。

[0155] 由1和2位氨基酸修饰业已降低的胰高血糖素活性,通过本文所述由三个间插氨基酸分开的两个(例如12和16或16和20或20和24位)氨基酸侧链之间的共价键来恢复。

[0156] 通过将10位氨基酸修饰为Trp提供GLP-1效价的进一步适度提高。

[0157] 可单独施加或联合施加提高或降低胰高血糖素受体活性及提高GLP-1受体活性的上述任何修饰。上述任何修饰亦可与赋予其它所需性质的其它修饰联合,所述其它所需性质例如增加溶解性和/或稳定性和/或作用时间。或者,上述任何修饰可与基本上不影响溶解性或稳定性或活性的其它修饰联合。例示性修饰包括但不限于:

[0158] (A)例如,通过将一个、两个、三个或更多个带电荷的氨基酸引入到天然胰高血糖素的C-末端部分内,优选引入到27位的C-末端位置来改进溶解性。所述带电荷的氨基酸可

例如在28或29位用带电荷的氨基酸取代天然氨基酸来引入,或作为备选通过例如在27、28或29位后添加带电荷的氨基酸来引入。在例示性实施方案中,一个、二个、三个或全部带电荷的氨基酸为带负电荷。在其它实施方案中,一个、二个、三个或全部带电荷的氨基酸为带正电荷。所述修饰增加溶解性,例如在既定的约5.5和8之间的pH例如pH 7下当于25℃24小时后测量时提供相对于天然胰高血糖素至少2-倍、5-倍、10-倍、15-倍、25-倍、30-倍或更高的溶解性。

[0159] (B)如本文所述,例如在肽的16、17、20、21、24或29位或在C-末端氨基酸处添加亲水的部分例如聚乙二醇链,来增加溶解性和作用时间或循环半衰期。

[0160] (C)通过对15位天冬氨酸的修饰,例如通过缺失或用谷氨酸、高谷氨酸、半胱磺酸或高半胱磺酸取代来增加。所述修饰可减少pH 5.5-8范围下的降解或裂解,例如在25℃24小时后保留至少75%、80%、90%、95%、96%、97%、98%或99%的原始肽。

[0161] (D)通过修饰27位甲硫氨酸,例如通过用亮氨酸或正亮氨酸取代来提高稳定性。所述修饰可降低氧化性降解。通过修饰20或24位的Gln,例如通过用Ala、Ser、Thr或AIB取代,亦可提高稳定性。所述修饰可减少通过Gln的脱酰胺化而发生的降解。可通过修饰21位Asp,例如通过用Glu取代,提高稳定性。所述修饰可减少Asp脱水形成环状琥珀酰亚胺中间体接着异构化为异天冬氨酸盐而发生的降解。

[0162] (E)如本文所述通过修饰1或2位氨基酸来增加对二肽基肽酶IV (DPP IV)裂解的抗性。

[0163] (F)不影响活性的保守性或非保守性取代、添加或缺失,例如在2、5、7、10、11、12、13、14、16、17、18、19、20、21、24、27、28或29位中的一处或多处的保守性取代;在27、28或29位中的一处或多处缺失;或任选与C-末端酰胺或酯取代C-末端羧酸基团联合的29位氨基酸缺失;

[0164] (G)如本文所述添加C-末端延伸;

[0165] (H)例如如本文所述通过胰高血糖素肽酰化或烷化,增加循环半衰期和/或延长作用时间和/或延迟作用开始;

[0166] (I)同二聚体化或异二聚体化,其如本文所述。

[0167] 在例示性实施方案中,相对于天然胰高血糖素序列,所述胰高血糖素肽可包含总共1个、至多2个、至多3个、至多4个、至多5个、至多6个、至多7个、至多8个、至多9个或至多10个氨基酸修饰。

[0168] 其它修饰包括用芳香族大氨基酸(例如Tyr、Phe、Trp或氨基-Phe)取代1位His;

[0169] 用Ala取代2位Ser;

[0170] 用Val或Phe取代10位Tyr;

[0171] 用Arg取代12位Lys;

[0172] 用Glu取代15位Asp;

[0173] 用Thr或AIB取代16位Ser。

[0174] 本文公开的一个实施方案涉及胰高血糖素激动剂,所述胰高血糖素激动剂相对于野生型肽His-Ser-Gln-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Lys-Tyr-Leu-Asp-Ser-Arg-Arg-Ala-Gln-Asp-Phe-Val-Gln-Trp-Leu-Met-Asn-Thr(SEQ ID NO:1)经过修饰,以提高肽针对胰高血糖素受体的效价。意想不到的是,申请人发现天然胰高血糖素(SEQ ID NO:1)通

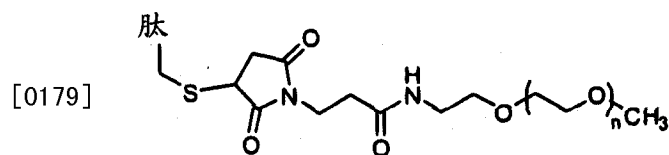
常存在的16位丝氨酸可被所选择的酸性氨基酸取代,以提高胰高血糖素的效价,也就是提高其在体外验证模型测定(参见实施例14)中刺激cAMP合成的能力。更具体地,该取代提高所述类似物针对胰高血糖素受体效价至少2倍、4倍、5倍和至多10倍以上。该取代亦提高所述类似物相对于天然胰高血糖素针对GLP-1受体活性的至少5倍、10倍或15倍,但保持对胰高血糖素受体优于GLP-1受体的选择性。

[0175] 根据一个实施方案,天然胰高血糖素的16位丝氨酸残基被选自以下的氨基酸取代:谷氨酸、谷氨酰胺、高谷氨酸、高半胱氨酸、苏氨酸或甘氨酸。根据一个实施方案,天然胰高血糖素的16位丝氨酸残基被选自以下的氨基酸取代:谷氨酸、谷氨酰胺、高谷氨酸和高半胱氨酸,在一个实施方案中,丝氨酸残基被谷氨酸取代。在一个实施方案中,具有增加胰高血糖素受体特异性的胰高血糖素肽包含肽SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10或其胰高血糖素激动剂类似物,其中所述羧基末端氨基酸保留其天然羧基团。根据一个实施方案,提供包含序列NH₂-His-Ser-Gln-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Lys-Tyr-Leu-Asp-Glu-Arg-Arg-Ala-Gln-Asp-Phe-Val-Gln-Trp-Leu-Met-Asn-Thr-COOH(SEQ ID NO:10)的胰高血糖素激动剂,其中所述肽相对于天然胰高血糖素表现出增加大约5倍的针对胰高血糖素受体的效价,其如实施例14的体外cAMP测定所测量。

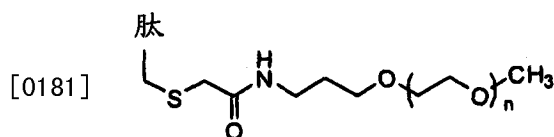
[0176] 亲水部分

[0177] 可进一步修饰本发明胰高血糖素肽,以改进所述肽在生理pH水溶液中的溶解性和稳定性,同时保留相对于天然胰高血糖素更高的生物学活性。亲水部分例如PEG基团可在让蛋白质与活化的聚合物分子反应的任何合适的条件下与胰高血糖素肽连接。可使用本领域已知的任何手段,包括经由酰化、还原性烷化、Michael加成、硫醇烷化或通过PEG部分上的活性基团(例如醛、氨基、酯、硫醇、 α -卤代乙酰基、马来酰亚胺基或肼基)与靶标化合物上的活性基团(例如醛、氨基、酯、硫醇、 α -卤代乙酰基、马来酰亚胺基或肼基)的其它化学选择性缀合/连接方法。可用于让水溶性聚合物与一种或多种蛋白质连接的活性基团包括但不限于砜、马来酰亚胺、巯基、硫醇、三氟甲磺酸基、三氟乙磺酸基、氮丙烯(aziridine)、环氧乙烷、5-吡啶基和 α -卤代酰基(例如 α -碘乙酸、 α -溴乙酸、 α -氯乙酸)。若通过还原性烷化与肽连接,则所选聚合物应该具有单一的活性醛,以便控制聚合程度。参见例如Kinstler等, Adv. Drug. Delivery Rev. 54:477-485(2002); Roberts等, Adv. Drug Delivery Rev. 54:459-476(2002); 和Zalipsky等, Adv. Drug Delivery Rev. 16:157-182(1995)。

[0178] 在本发明的特定方面,用亲水部分例如PEG修饰胰高血糖素肽上具有硫醇的氨基酸残基。在某些实施方案中,在Michael加成反应中用马来酰亚胺-活化的PEG修饰硫醇,以产生包含以下所示硫醚连接的聚乙二醇化的肽:



[0180] 在某些实施方案中,在亲核取代反应中用卤代乙酰基-活化的PEG修饰硫醇,产生包含以下所示硫醚连接的聚乙二醇化肽:



[0182] 合适的亲水部分包括：聚乙二醇(PEG)、聚丙二醇、聚氧乙烯化多元醇(例如POG)、聚氧乙烯化山梨醇、聚氧乙烯化葡萄糖、聚氧乙烯化丙三醇(POG)、聚氧乙烯、聚乙二醇丙醛、乙二醇/丙二醇共聚物、单甲氧基-聚乙二醇、单-(C1-C10)烷氧基-或芳氧基-聚乙二醇、羧甲基纤维素、聚缩醛、聚乙烯醇(PVA)、聚乙烯吡咯烷酮、聚-1,3-二氧杂环戊烷、聚-1,3,6-三噁烷、乙烯/马来酸酐共聚物、聚(.β.-氨基酸)(同聚物或无规共聚物)、聚(n-乙烯基吡咯烷酮)聚乙二醇、聚丙二醇同聚物(PPG)和其它聚环氧烷烃、聚环氧丙烷/环氧乙烷共聚物、大肠酸(colonic acid)或其它多糖聚合物、聚蔗糖(Ficoll)或右旋糖酐及其混合物。右旋糖酐为葡萄糖亚单位的多糖聚合物,主要以α1-6键合来连接。可获得多种分子量范围的右旋糖酐,例如约1kD-约100kD或从约5、10、15或20kD到约20、30、40、50、60、70、80或90kD。

[0183] 涵盖线性或支化聚合物。得到的缀合物制剂可为基本上单分散或多分散,每个肽可具有约0.5、0.7、1、1.2、1.5或2个聚合物部分。

[0184] 根据一个实施方案,在SEQ ID NO:9或SEQ ID NO:10肽的17、21和24位引入亲水基团,预期改进高效价胰高血糖素类似物在具有生理pH的溶液中的溶解性和稳定性。引入所述基团亦增加作用时间,其例如如延长循环半衰期所测量。合适的亲水部分包括本领域已知的任何水溶性聚合物,包括PEG、PEG同聚物或共聚物、PEG单甲基-取代聚合物(mPEG)或聚氧乙烯化甘油(POG)。根据一个实施方案,亲水基团包含聚乙烯(PEG)链。更具体地,在一个实施方案中,胰高血糖素肽包含序列SEQ ID NO:6或SEQ ID NO:7,其中让PEG链与胰高血糖素肽的21和24位所存在的氨基酸侧链共价连接,所述肽的羧基末端氨基酸具有羧酸基团。

[0185] 缀合物

[0186] 本发明亦包含其它缀合物,其中本发明胰高血糖素肽任选经由共价键合和任选经由接头与缀合物部分连接。可通过共价化学键、物理作用力(例如静电、氢键、离子键、范德华力或疏水或亲水作用)来完成连接。可使用多种非共价偶联系统,包括生物素-抗生物素蛋白、配体/受体、酶/底物、核酸/核酸结合蛋白、脂类/脂类结合蛋白、细胞粘连分子配偶体;或彼此具有亲和力的任何结合配偶体或其片段。

[0187] 可通过肽的目标氨基酸残基与有机衍生化试剂反应经由直接共价连接来使肽与缀合物部分连接,所述有机衍生化试剂能够与所选择的这些目标氨基酸的侧链或N-或C-末端残基反应。肽或缀合物部分上的活性基团包括例如醛、氨基、酯、硫醇、α-卤代乙酰基、马来酰亚胺基或胍基。衍生化试剂包括例如:马来酰亚胺苯甲酰磺基琥珀酰亚胺酯(maleimidobenzoyl sulfosuccinimide ester)(通过半胱氨酸残基缀合)、N-羟基琥珀酰亚胺(通过赖氨酸残基)、戊二醛、戊琥珀酐或本领域已知的其它作用剂。或者,可通过中间体载体(例如多糖或多肽载体)将缀合物部分间接连接到肽。多糖载体的实例包括氨基右旋糖酐。合适的多肽载体实例包括聚赖氨酸、聚谷氨酸、聚天冬氨酸、其共聚物 and 这些氨基酸和其它氨基酸(例如丝氨酸)的混合聚合物,从而赋予由此产生的带负载的载体所所需的溶解特性。

[0188] 最常见的半胱氨酸残基与α-卤代乙酸基(及对应胺)反应,得到羧甲基或羧基酰氨

甲基衍生物,所述卤代乙酸基例如氯乙酸、氯乙酰胺。还通过与以下物质反应衍生半胱氨酰残基:溴三氟丙酮、 α -溴- β -(5-咪唑基(imidazolyl))丙酸、氯乙酰基磷酸、N-烷基马来酰亚胺、3-硝基-2-吡啶二硫化物、甲基2-吡啶二硫化物、对-氯苯甲酸汞、2-氯基-4-硝基苯酚汞或氯-7-硝基苯并-2-氧杂-1,3-二唑。

[0189] 通过与焦炭酸二乙酯在pH 5.5-7.0时反应来衍生组氨酰残基,因为焦炭酸二乙酯对组氨酰侧链有相对特异性。对溴苯酰甲基溴亦有用;反应优选在0.1M二甲胂酸钠中于pH 6.0下进行。

[0190] 赖氨酰和氨基-末端残基与琥珀酸酐或其它羧酸酐反应。与这些试剂衍生具有反转赖氨酰残基的电荷的作用。用于衍生含 α -氨基的残基的其它合适的试剂包括亚氨酸酯(例如甲基吡啶亚胺甲酯)、磷酸吡哆醛、吡哆醛、氯硼氢化物、三硝基苯磺酸、O-甲基异脲、2,4-戊二酮和转氨酶催化的与乙醛酸酯的反应。

[0191] 通过与一种或若干种常规试剂反应来修饰精氨酰残基,所述常规试剂有苯甲酰甲酐、2,3-丁二酮、1,2-环己二酮和茚三酮。因为胍官能团的高pKa,精氨酸残基衍生需要在碱性条件下进行反应。此外,这些试剂可与赖氨酸基团以及精氨酸 ϵ -氨基反应。

[0192] 可用特定的添加物通过与芳香族重氮化合物或四硝基甲烷反应将光谱标记引入酪氨酰残基,来进行酪氨酰残基的特定修饰。最常用N-乙酰咪唑和四硝基甲烷来分别形成O-乙酰基酪氨酰物质和3-硝基衍生物。

[0193] 通过与碳二亚胺($R-N=C=N-R'$)反应来选择性地修饰羧基侧基(天冬氨酰或谷氨酰),其中R和R'为不同烷基,例如1-环己基-3-(2-吗啉基-4-乙基)碳二亚胺或1-乙基-3-(4-氮杂-4,4-二甲基戊基)碳二亚胺。另外,通过与铵离子反应将天冬氨酰和谷氨酰残基转化为天冬酰胺酰基及谷氨酰胺酰基残基。

[0194] 其它修饰包括脯氨酸和赖氨酸的羟基化、丝氨酰或苏氨酰残基的羟基的磷酸化、赖氨酸、精氨酸和组氨酸侧链的 α -氨基的甲基化(T.E.Creighton, Proteins: Structure and Molecular Properties, W.H. Freeman & Co., San Francisco, 第79-86页(1983))、天冬酰胺或谷氨酰胺的脱酰胺化、N-末端胺的乙酰化和/或C-末端羧酸基团的酰胺化或酯化。

[0195] 另一类共价修饰涉及糖苷与肽的化学或酶学偶联。可将糖连接到:(a)精氨酸和组氨酸;(b)游离羧基;(c)游离巯基,例如半胱氨酸的巯基;(d)游离羟基,例如丝氨酸、苏氨酸或羟基脯氨酸的羟基;(e)芳香族残基,例如酪氨酸或色氨酸的芳香族残基;或(f)谷氨酰胺的酰胺基团。这些方法在以下文献中阐述:1987年9月11日公开的W087/05330和Aplin和Wriston, CRC Crit. Rev. Biochem., 第259-306页(1981)。

[0196] 可与本文所述的任何胰高血糖素肽连接的例示性缀合物部分包括但不限于异种肽或异种多肽(包括例如血浆蛋白)、靶向剂、免疫球蛋白或其部分(例如可变区、CDR或Fc区)、诊断标记(例如放射性同位素、荧光团或酶标记)、包括水溶性聚合物在内的聚合物或其它治疗剂或诊断剂。在一个实施方案中提供缀合物,所述缀合物包含本发明胰高血糖素肽和血浆蛋白,其中所述血浆蛋白选自白蛋白、转铁蛋白、纤维蛋白原和球蛋白。在一个实施方案中,缀合物的血浆蛋白部分为白蛋白或转铁蛋白。

[0197] 在某些实施方案中,所述接头包含1-约60或1-30个原子或更长、2-5个原子、2-10个原子、5-10个原子或10-20个原子长的链。在某些实施方案中,链原子都为碳原子。在某些实施方案中,接头主链的链原子选自C、O、N和S。可按照其所需溶解性(亲水性)来选择链原

子和接头,以提供更可溶的缀合物。在某些实施方案中,接头提供由酶或其它催化剂或在靶组织或器官或细胞中发现的水解条件裂解的官能团。在某些实施方案中,接头长度长到足以降低位阻电势。若接头为共价键或肽基键并且缀合物为多肽,则整个缀合物可为融合蛋白。所述肽基接头可为任何长度。例示性接头长度约1-50个氨基酸、5-50、3-5、5-10、5-15或10-30个氨基酸。作为备选,可通过本领域一般人员已知的重组遗传工程方法产生所述融合蛋白。

[0198] 如上所述,在某些实施方案中,胰高血糖素肽被缀合,例如与免疫球蛋白或其部分(例如可变区、CDR或Fc区)融合。已知的免疫球蛋白(Ig)类型包括IgG、IgA、IgE、IgD或IgM。Fc区为Ig重链的C-末端区,其负责与实现活性的Fc受体结合,所述活性例如再循环(其导致半衰期延长)、抗体依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC)和补体依赖性细胞毒性(CDC)。

[0199] 例如,根据某些定义,人IgG重链Fc区从重链的Cys226延伸到C-末端。“铰链区”通常从人IgG1的Glu216延伸到Pro230(可通过比对半胱氨酸键合中涉及的半胱氨酸让其它IgG同种型的铰链区与IgG1序列进行比对)。IgG的Fc区包括两个恒定结构域CH2和CH3。人IgG Fc区的CH2结构域通常从231位氨基酸延伸到341位氨基酸。人IgG Fc区的CH3结构域通常从342位氨基酸延伸到447位氨基酸。对免疫球蛋白或免疫球蛋白片段或区的氨基酸编号所用的参考资料都基于Kabat等1991, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 马里兰州贝塞斯达的美国公共卫生部。在相关实施方案中,所述Fc区可包含来自免疫球蛋白重链的除CH1外的一个或多个天然或修饰的恒定区,所述恒定区例如IgG和IgA的CH2和CH3区或IgE的CH3和CH4区。

[0200] 合适的缀合物部分包括免疫球蛋白序列的部分,所述部分包括FcRn结合位点。FcRn这种清道夫受体(salvage receptor)负责免疫球蛋白再循环并使其回到血液循环中。业已基于X射线结晶学阐述了结合FcRn受体的IgG Fc部分的区域(Burmeister等1994, *Nature* 372:379)。Fc与FcRn的主要接触区域靠近CH2和CH3结构域的汇合点。Fc-FcRn接触处全部在单个Ig重链内。主要接触位点包括CH2结构域的氨基酸残基248、250-257、272、285、288、290-291、308-311和314及CH3结构域的氨基酸残基385-387、428和433-436。

[0201] 某些缀合物部分可包括或可不包括Fc γ R结合位点。Fc γ R负责ADCC和CDC。直接与Fc γ R接触的Fc区内位置实例为氨基酸234-239(较低的铰链区)、氨基酸265-269(B/C环)、氨基酸297-299(C'/E环)和氨基酸327-332(F/G)环(Sondermann等, *Nature* 406:267-273, 2000)。IgE的较低的铰链区亦涉及FcRI结合(Henry等, *Biochemistry* 36,15568-15578, 1997)。IgA受体结合中涉及的残基阐述于Lewis等, (*J Immunol.*175:6694-701, 2005)中。IgE受体结合中涉及的氨基酸残基阐述于Sayers等(*J Biol Chem.*279(34):35320-5, 2004)中。

[0202] 可对免疫球蛋白的Fc区进行氨基酸修饰。所述变体Fc区包含Fc区的CH3结构域(残基342-447)的至少一个氨基酸修饰和/或Fc区的CH2结构域(残基231-341)的至少一个氨基酸修饰。认为赋予FcRn提高的亲合力的突变包括T256A、T307A、E380A和N434A(Shields等2001, *J. Biol. Chem.* 276:6591)。其它突变可降低Fc区与Fc γ RI、Fc γ RIIA、Fc γ RIIB和/或Fc γ RIIIA的结合而不显著降低对FcRn的亲合力。例如,用Ala或另一氨基酸取代Fc区297位的Asn,除去了高度保守的N-糖基化位点,并可导致降低Fc区的免疫原性而同时延长半衰期,并且降低与Fc γ R的结合(Routledge等1995, *Transplantation* 60:847; Friend等1999,

Transplantation 68:1632;Shields等1995,J.Biol.Chem.276:6591)。实施了对IgG1的233-236位的氨基酸修饰,该修饰降低与Fc γ R的结合(Ward和Ghetie 1995,Therapeutic Immunology 2:77和Armour等1999,Eur.J.Immunol.29:2613)。某些例示性氨基酸取代阐述于美国专利7,355,008和7,381,408中,其各自以其整体在此引作参考。

[0203] 融合蛋白和末端延伸

[0204] 本发明亦包含胰高血糖素融合肽或融合蛋白,其中将第二个肽或多肽融合到胰高血糖素肽的末端(例如羧基末端)。更具体地,融合胰高血糖素肽可包含进一步包含与胰高血糖素肽的29位氨基酸连接的氨基酸序列SEQ ID NO:26(GPSSGAPPPS)、SEQ ID NO:27(KRNRNIA)或SEQ ID NO:28(KRNR)的胰高血糖素激动剂SEQ ID NO:55、SEQ ID NO:9或SEQ ID NO:10。在一个实施方案中,氨基酸序列SEQ ID NO:26(GPSSGAPPPS)、SEQ ID NO:27(KRNRNIA)或SEQ ID NO:28(KRNR)通过肽键与胰高血糖素肽的29位氨基酸键合。申请人发现,在包含毒蜥外泌肽-4的C-末端延伸肽(例如SEQ ID NO:26或SEQ ID NO:29)的胰高血糖素融合肽中,用甘氨酸取代29位天然苏氨酸残基极大地提高GLP-1受体活性。该氨基酸取代可与本文公开的其它修饰联合使用,以提高胰高血糖素类似物对GLP-1受体的亲和力。例如,T29G取代可与S16E和N20K氨基酸取代联合,任选与16和20位氨基酸之间的内酰胺桥和任选与添加PEG链联合,其如本文所述。在一个实施方案中,提供包含序列SEQ ID NO:64的胰高血糖素/GLP-1受体共激动剂。在一个实施方案中,胰高血糖素融合肽的胰高血糖素肽部分选自SEQ ID NO:55、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4和SEQ ID NO:5,其中当PEG链存在于17、21、24位或C-末端氨基酸或21和24两处时,其选自500-40,000道尔顿范围。更具体地,在一个实施方案中,胰高血糖素肽片段选自SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8和SEQ ID NO:63,其中PEG链选自500-5,000范围。在一个实施方案中,胰高血糖素肽为包含序列SEQ ID NO:55和SEQ ID NO:65的融合肽,其中让肽SEQ ID NO:65与SEQ ID NO:55的羧基末端连接。

[0205] 电荷中性的C-末端

[0206] 根据一个实施方案,胰高血糖素肽SEQ ID NO:10的另外的化学修饰赋予提高的GLP-1受体效价到其中针对胰高血糖素受体和GLP-1受体的相对活性几乎相等的程度。因此,在一个实施方案中,提供胰高血糖素/GLP-1受体共激动剂,其中本发明胰高血糖素肽的末端氨基酸在天然氨基酸上存在羧酸基团的位置具有酰胺基团。可通过进一步修饰胰高血糖素肽以产生类似物来调整胰高血糖素类似物针对胰高血糖素和GLP-1受体各自的相对活性,所述类似物显示天然胰高血糖素针对胰高血糖素受体活性的约40%-约500%或更高,和天然GLP-1针对GLP-1受体活性的约20%-约200%或更高,例如增加50倍、100倍或更多的相对于胰高血糖素针对GLP-1受体的正常活性。在某些实施方案中,本文所述胰高血糖素肽表现出至多约100%、1000%、10,000%、100,000%或1,000,000%的天然胰高血糖素针对胰高血糖素受体的活性。在某些实施方案中,本文所述胰高血糖素肽表现出至多约100%、1000%、10,000%、100,000%或1,000,000%的天然GLP-1针对GLP-1受体的活性。

[0207] α 螺旋/分子内桥的稳定化

[0208] 在另一实施方案中,提供表现出增加的GLP-1受体激动剂活性的胰高血糖素类似物,其中在两个氨基酸侧链之间形成分子内桥,以稳定所述肽羧基末端的三维结构。可通过非共价键,例如氢键、离子相互作用,例如形成盐桥,或通过共价键,让两个氨基酸侧链彼此

连接。当两个氨基酸侧链通过一个或多个共价键彼此连接时,可认为本文的肽包含共价分子内桥。当两个氨基酸侧链通过非共价键(例如氢键、离子相互作用)彼此连接时,可认为本文肽包含非共价分子内桥。

[0209] 在某些实施方案中,在相隔3个氨基酸的两个氨基酸之间形成分子内桥,例如i和i+4位置的氨基酸之间,其中i为12和25之间的任何整数(例如12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24和25)。更具体地,让氨基酸对12和16、16和20、20和24或24和28(氨基酸对中的i=12、16、20或24)的侧链彼此连接,从而稳定胰高血糖素的 α 螺旋。或者,i可为17。

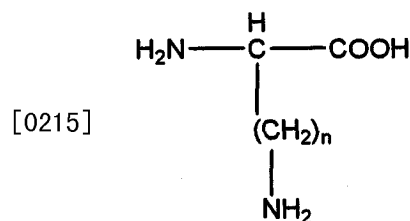
[0210] 在某些特定实施方案中,其中i和i+4位置的氨基酸通过分子内桥连接,接头的大小为约8个原子或约7-9个原子。

[0211] 在其它实施方案中,在相隔两个氨基酸的两个氨基酸之间形成分子内桥,例如在j和j+3位置的氨基酸之间,其中j为12和26之间的任何整数(例如12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25和26)。在某些特定实施方案中,j为17。

[0212] 在某些特定实施方案中,其中j和j+3位置的氨基酸通过分子内桥连接,接头大小为约6个原子或约5-7个原子。

[0213] 仍是在其它实施方案中,在相隔6个氨基酸的两个氨基酸之间形成分子内桥,例如k和k+7位置的氨基酸之间,其中k为12和22之间的任何整数(例如12、13、14、15、16、17、18、19、20、21和22)。在某些特定实施方案中,k为12、13或17。在例示性实施方案中,k为17。

[0214] 能够共价键合形成6个原子的连接桥的氨基酸对的实例包括Orn和Asp、Glu和式I氨基酸(其中n为2)、高谷氨酸和式I氨基酸(其中n为1),其中式I为:



[0216] 其中n=1-4

[0217] [式I]

[0218] 能够共价键合形成7个原子的连接桥的氨基酸对的实例包括:Orn-Glu(内酰胺环);Lys-Asp(内酰胺);或高ser-高glu(内酯)。可形成8个原子的接头的氨基酸对的实例包括:Lys-Glu(内酰胺);高Lys-Asp(内酰胺);Orn-高glu(内酰胺);4-氨基Phe-Asp(内酰胺);或Tyr-Asp(内酯)。可形成9个原子的接头的氨基酸对的实例包括:高Lys-Glu(内酰胺);Lys-高glu(内酰胺);4-氨基Phe-Glu(内酰胺);或Tyr-Glu(内酯)。可用其它化学基团另外取代这些氨基酸上的任何侧链,只要 α -螺旋的三维结构不被破坏即可。本领域一般人员可设想形成类似大小和所需效果的稳定结构的备选配对或备选氨基酸类似物,其包括化学修饰的衍生物。例如,高半胱氨酸-高半胱氨酸二硫桥长度为6个原子,可对其进行进一步修饰以提供所需效果。即使没有共价连接,上述氨基酸对或本领域一般人员可设想的类似的配对,亦可通过非共价键(例如通过形成盐桥或氢键作用)为 α -螺旋提供进一步的稳定性。

[0219] 另外的例示性实施方案包括任选含内酰胺桥的以下配对:12位Glu与16位Lys;12位天然Lys与16位Glu;16位Glu与20位Lys;16位Lys与20位Glu;20位Glu与24位Lys;20位Lys与24位Glu;24位Glu与28位Lys;24位Lys与28位Glu。

[0220] 根据一个实施方案,提供表现出胰高血糖素/GLP-1受体共激动剂活性的胰高血糖素类似物,其中所述类似物包含选自SEQ ID NO:11,47,48和49的氨基酸序列。在一个实施方案中,侧链彼此共价结合,在一个实施方案中,两个氨基酸彼此结合以形成内酰胺环。内酰胺环的大小可视氨基酸侧链的长度而变化,在一个实施方案中,通过让赖氨酸氨基酸的侧链与谷氨酸的侧链连接来形成内酰胺。

[0221] 内酰胺环内的酰胺键的次序可逆(例如可在Lys12和Glu16侧链之间形成内酰胺环,或作为备选在Glu 12和Lys16之间形成内酰胺环)。根据一个实施方案,提供SEQ ID NO:45胰高血糖素类似物,其中在选自氨基酸对12和16、16和20、20和24或24和28的氨基酸对的侧链之间形成至少一个内酰胺环。在一个实施方案中,提供胰高血糖素/GLP-1受体共激动剂,其中所述共激动剂包含SEQ ID NO:20胰高血糖素肽类似物,其中所述肽包含在12和16位氨基酸之间或16和20位氨基酸之间形成的分子内内酰胺桥。在一个实施方案中,提供包含序列SEQ ID NO:20的胰高血糖素/GLP-1受体共激动剂,其中在12和16位氨基酸之间、16和20位氨基酸之间或20和24位氨基酸之间形成分子内内酰胺桥,并且29位氨基酸为甘氨酸,其中让序列SEQ ID NO:29与SEQ ID NO:20的C-末端氨基酸连接。在另一实施方案中,28位氨基酸为天冬氨酸。

[0222] 可使用除了内酰胺桥之外的分子内桥来稳定胰高血糖素类似物肽的 α 螺旋。在一个实施方案中,所述分子内桥为疏水桥。在这种情况下,分子内桥任选在胰高血糖素类似物肽 α 螺旋的疏水面部分两个氨基酸侧链之间。例如,通过疏水桥连接的氨基酸之一可为10、14和18位的氨基酸。

[0223] 在一个特定方面,用全-烃交联系统(all-hydrocarbon cross-linking system)利用烯烃歧化来交联胰高血糖素肽的 α 螺旋的一个或两个转角。这种情况中的胰高血糖素肽可包含荷有 α -甲基化的氨基酸的不同长度的烯烃侧链,所述 α -甲基化氨基酸在*i*和*i*+4或*i*+7位构成R或S立体化学。例如,烯烃侧链可包含(CH₂)_n,其中*n*为1-6之间的任何整数。在一个实施方案中,对于8个原子的交联长度,*n*为3。本领域阐述了形成所述分子内桥的合适的方法。参见例如Schafmeister等,J. Am. Chem. Soc. 122:5891-5892(2000)和Walensky等, Science 305:1466-1470(2004)。或者,胰高血糖素肽可包含位于邻近的螺旋转角处的O-烯丙基Ser残基,其经由钌催化的环闭合复分解(ring closing metathesis)桥联在一起。在例如Blackwell等, Angew. Chem., Int. Ed. 37:3281-3284(1998)中阐述了所述交联的方法。

[0224] 在另一特定方面,利用羊毛硫氨酸这种非天然的巯基-二丙氨酸氨基酸(其作为胱氨酸的肽模拟物被广泛采用)来交联 α 螺旋的一个转角。基于羊毛硫氨酸的环化的合适的方法为本领域所知。参见例如,Matteucci等, Tetrahedron Letters 45:1399-1401(2004); Mayer等, J. Peptide Res. 51:432-436(1998); Polinsky等, J. Med. Chem. 35:4185-4194(1992); Osapay等, J. Med. Chem. 40:2241-2251(1997); Fukase等, Bull. Chem. Soc. Jpn. 65:2227-2240(1992); Harpp等, J. Org. Chem. 36:73-80(1971); Goodman和Shao, Pure Appl. Chem. 68:1303-1308(1996); 和Osapay和Goodman, J. Chem. Soc. Chem. Commun. 1599-1600(1993)。

[0225] 在某些实施方案中,用*i*和*i*+7位的两个Glu残基之间的 α, ω -二氨基烷烃系链(例如1,4-二氨基丙烷和1,5-二氨基戊烷),来稳定胰高血糖素肽的 α 螺旋。所述系链导致形成9-个原子或更长的桥,这视二氨基烷烃系链的长度而定。本领域阐述了产生用所述系链交

联的肽的合适的方法。参见例如Phelan等, J. Am. Chem. Soc. 119:455-460(1997)。

[0226] 在本发明再一实施方案中,用二硫桥来交联胰高血糖素肽 α 螺旋的一个或两个转角。或者,用经修饰的二硫桥来稳定胰高血糖素肽的 α 螺旋,所述二硫桥中的一个或两个硫原子被亚甲基取代,从而导致电子等排大环化(isosteric macrocyclization)。用二硫桥修饰肽或基于硫的环化的合适的方法阐述于例如Jackson等, J. Am. Chem. Soc. 113:9391-9392(1991)和Rudinger和Jost, *Experientia* 20:570-571(1964)中。

[0227] 在本发明又一实施方案中,经由i和i+4位的两个His残基或His和Cys对结合金属原子来稳定胰高血糖素肽的 α 螺旋。金属原子可为例如Ru(III)、Cu(II)、Zn(II)或Cd(II)。本领域已知所述基于金属结合 α 螺旋稳定的方法。参见例如,Andrews和Tabor, *Tetrahedron* 55:11711-11743(1999);Ghadiri等, J. Am. Chem. Soc. 112:1630-1632(1990);和Ghadiri等, J. Am. Chem. Soc. 119:9063-9064(1997)。

[0228] 作为备选,可通过其它肽环化手段来稳定胰高血糖素肽的 α 螺旋,所述手段在Davies, J. PEPTIDE. Sci. 9:471-501(2003)中综述。可经由形成酰胺桥、硫醚桥、硫酯桥、脲桥、氨基甲酸盐桥、磺酰胺桥等来稳定 α 螺旋。例如,可在C-末端和Cys残基的侧链之间形成硫酯桥。或者,可经由具有硫醇(Cys)和羧酸(例如Asp、Glu)的氨基酸侧链形成硫酯。在另一方法中,交联剂例如二羧酸、例如辛二酸(辛烷二元酸)等可在氨基酸侧链的两个官能团之间引入连接,所述官能团例如为游离氨基、羟基、硫醇基团及其组合。

[0229] 根据一个实施方案,通过在i和i+4位引入疏水氨基酸来稳定胰高血糖素肽的 α 螺旋。例如,i可为Tyr,i+4可为Val或Leu;i可为Phe,i+4可为Cys或Met;i可为Cys,i+4可为Met;或i可为Phe,i+4可为Ile。应该理解,为本文目的上述氨基酸对可相反,以使位置i表示的氨基酸可作为备选位于i+4,而i+4的氨基酸可位于i位置。

[0230] 按照本发明再一实施方案,增加GLP-1活性的胰高血糖素肽包含:(a)用 α,α -二取代氨基酸在12-29位氨基酸内的一处或多处取代;和任选(b)C-末端酰胺。在某些方面,应该理解,所述胰高血糖素肽明确缺乏稳定胰高血糖素C-末端部分 α -螺旋(大约位置12-29)的分子内桥,例如共价分子内桥。在某些实施方案中,胰高血糖素的16、17、18、19、20、21、24或29位中的一个、二个、三个、四个或更多个位置被以下氨基酸取代: α,α -二取代氨基酸,例如氨基异丁酸(AIB);被选自以下的相同或不同基团二取代的氨基酸:甲基、乙基、丙基和正丁基;或被环辛烷或环庚烷二取代的氨基酸(例如1-氨基环辛烷-1-羧酸)。例如,在缺乏分子内桥(例如非共价分子内桥(例如盐桥)或共价分子内桥(例如内酰胺))下,用AIB取代16位提高GLP-1活性。在某些实施方案中,16、20、21或24位中的一个、二个、三个或更多个位置被AIB取代。所述胰高血糖素肽可进一步包含一种或多种本文所述其它修饰,所述修饰包括但不限于:酰化、烷化、聚乙二醇化、缺失C-末端1-2个氨基酸、用带电荷的氨基酸在C-末端添加和/或取代、用酰胺取代C-末端羧酸酯、添加C-末端延伸和保守性和/或非保守性氨基酸取代,所述保守性和/或非保守性氨基酸取代例如为用Leu或Nle取代27位Met,用Glu(或类似氨基酸)取代15位Asp,用实现DPP-IV蛋白酶抗性的氨基酸取代1和/或2位,用Ala取代2位Ser,用Val或Phe取代10位Tyr,用Arg取代12位Lys,用Thr或AIB取代16位Ser,用Asp、Glu或AIB取代20和/或24位Gln,用Glu或Thr取代16位Ser,用Ala取代18位Arg,用Lys取代20位Gln,用Glu取代21位Asp,和用Asn或Cys取代24位Gln。在某些实施方案中,前述胰高血糖素肽包含29位Gln或Gly或添加的C-末端延伸,例如在28位氨基酸的C-末端的GGPSSGAPPPS

(SEQ ID NO:26)。在特定方面,胰高血糖素肽包含取代C-末端羧酸酯的酰胺基团、酰基(例如C16脂肪酸)和亲水部分(例如聚乙二醇(PEG))中的一种或多种。

[0231] 在另一特定方面,胰高血糖素肽亦包含任何以下氨基酸序列:SEQ ID NO:1-25、30-64和66-555,其包含相对于SEQ ID NO:1的不多于10个的修饰,并包含用AIB在16、20、21和/或24位的一处或多处的氨基酸取代,其中所述肽在所述肽的两个氨基酸侧链之间缺乏分子内桥,例如共价分子内桥。因此,在更特定方面,胰高血糖素肽包含SEQ ID NO:556-561中的任何氨基酸序列。

[0232] 根据某些实施方案,缺乏分子内桥的胰高血糖素肽包含在12-29位氨基酸内的一个或多个用 α,α -二取代氨基酸的取代和共价连接到胰高血糖素肽10位氨基酸侧链的酰基或烷基。在特定实施方案中,氨基酸上的酰基或烷基不是天然存在的。在某些方面,所述酰基或烷基对于10位氨基酸为非天然的。在例示性实施方案中,缺乏分子内桥的胰高血糖素肽包含SEQ ID NO:556-561中的任何氨基酸序列及共价连接到胰高血糖素肽10位氨基酸侧链的酰基或烷基。所述缺乏分子内桥的酰化或烷化的胰高血糖素肽与非酰化的对应肽相比,表现出提高的针对GLP-1和胰高血糖素受体的活性。可通过酰基或烷基与在肽的10位氨基酸的侧链之间引入间隔物,来实现进一步提高缺乏分子内桥的酰化的胰高血糖素肽针对GLP-1和胰高血糖素受体的活性。本文进一步阐述引入或不引入间隔物的酰化和烷化。

[0233] 1位修饰

[0234] 按照一个本发明实施方案,具有增加的GLP-1活性的胰高血糖素肽包含:(a)用芳香族大氨基酸进行1位His的氨基酸取代;和(b)稳定所述分子C-末端部分的 α -螺旋(例如大约12-29位)的分子内桥。在特定实施方案中,1位氨基酸为Tyr、Phe、Trp、氨基-Phe、硝基-Phe、氯-Phe、磺基-Phe、4-吡啶基-Ala、甲基-Tyr或3-氨基Tyr。在特定方面,分子内桥在由三个间隔氨基酸分开的两个氨基酸侧链之间,即在i和i+4位氨基酸侧链之间。在某些实施方案中,分子内桥为内酰胺桥。在更特定的本发明实施方案中,胰高血糖素肽包含1位芳香族大氨基酸和在肽的16和20位氨基酸之间的内酰胺桥。所述胰高血糖素肽可进一步包含一种或多种(例如二种、三种、四种、五种或更多种)本文所述其它修饰。例如,胰高血糖素肽可包含在C-末端羧酸酯位置的酰胺。因此,在一个实施方案中,胰高血糖素肽包含氨基酸序列SEQ ID NO:555。

[0235] 酰化

[0236] 根据个实施方案,胰高血糖素肽包含酰基,例如对于天然存在的氨基酸而言为非天然的酰基。所述酰基导致肽具有以下性质中的一种或多种:(i)延长循环半衰期;(ii)推迟作用开始;(iii)延长作用时间;(iv)改进对蛋白酶例如DPP-IV的抗性;和(v)提高针对GLP-1和胰高血糖素受体的效价。如本文所述,酰化的胰高血糖素肽与对应的未酰化的胰高血糖素肽相比,不表现出降低的针对胰高血糖素受体和GLP-1受体的活性。相反,在某些情况下,酰化的胰高血糖素肽实际上表现出提高的针对GLP-1和胰高血糖素受体的活性。因此,酰化的类似物效价即使不比胰高血糖素共激动剂类似物的未酰化形式的效价高,也是与其相当。

[0237] 根据一个实施方案,为延长循环半衰期和/或推迟作用开始和/或延长作用时间和/或改进对蛋白酶例如DPP-IV的抗性目的,修饰胰高血糖素肽以包含酰基,所述酰基经由酯、硫酯或酰胺连接与胰高血糖素肽连接。

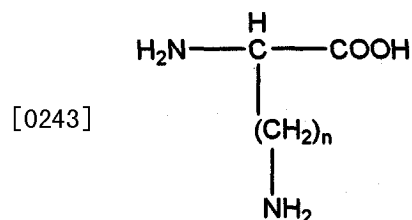
[0238] 酰化可在胰高血糖素肽内的任何位置进行,包括1-29位、C-末端延伸或C-末端氨基酸中的任何位置,前提是即使不提高也要保留胰高血糖素和/或GIP活性。非限制性实例包括5、7、10、11、12、13、14、16、17、18、19、20、21、24、27、28或29位。在特定实施方案中,酰化发生在所述胰高血糖素肽的10位,并且所述胰高血糖素肽缺乏分子内桥,例如共价分子内桥(例如内酰胺桥)。所述缺乏分子内桥的酰化肽与缺乏共价分子内桥的非酰化对应肽相比并与缺乏分子内桥的在非10位的位置酰化的对应肽相比,显示出提高的针对GLP-1和胰高血糖素受体的活性。如本文所述,10位酰化甚至可将几乎不具有针对胰高血糖素受体活性的胰高血糖素类似物,转化为具有针对胰高血糖素受体和GLP-1活性的胰高血糖素类似物。因此,酰化发生的位置可改变胰高血糖素类似物的总活性概况。

[0239] 胰高血糖素肽可在连接亲水部分的同一个氨基酸位置被酰化,或在不同的氨基酸位置被酰化。非限制性实例包括10位的酰化,并在胰高血糖素肽的C-末端部分的一个或多个位置(例如24、28或29位)、C-末端延伸内或在C-末端(例如通过添加C-末端Cys)聚乙二醇化。

[0240] 酰基可直接与胰高血糖素肽的氨基酸共价连接,或经由间隔物与胰高血糖素肽的氨基酸间接连接,其中间隔物位于胰高血糖素肽的氨基酸和酰基之间。

[0241] 在本发明的特定方面,通过直接酰化胰高血糖素肽氨基酸侧链的胺、羟基或硫醇,来修饰胰高血糖素肽以包含酰基。在某些实施方案中,通过氨基酸侧链的胺、羟基或硫醇直接使胰高血糖素肽酰化。在某些实施方案中,在10、20、24或29位酰化。在这点上,酰化的胰高血糖素肽可包含SEQ ID NO:1氨基酸序列或其经修饰的氨基酸序列,所述经修饰的氨基酸序列包含一种或多种本文所述氨基酸修饰,且10、20、24和29位中的至少一个氨基酸被修饰为包含侧链胺、羟基或硫醇的任何氨基酸。在本发明某些特定实施方案中,通过10位氨基酸的侧链胺、羟基或硫醇使胰高血糖素肽直接酰化。

[0242] 在某些实施方案中,包含侧链胺的氨基酸为式I氨基酸:

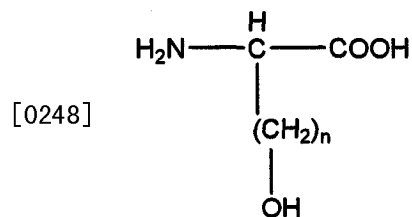


[0244] 其中 $n=1-4$

[0245] [式I]

[0246] 在某些例示性实施方案中,式I氨基酸是其中 n 为4(Lys)或 n 为3(Orn)的氨基酸。

[0247] 在其它实施方案中,包含侧链羟基的氨基酸为式II氨基酸:

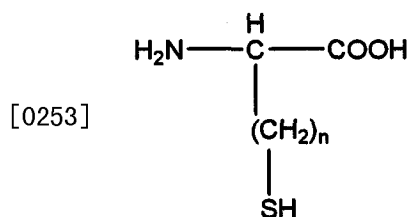


[0249] 其中 $n=1-4$

[0250] [式II]

[0251] 在某些例示性实施方案中,式II氨基酸是其中n为1(Ser)的氨基酸。

[0252] 仍是在其它实施方案中,包含侧链硫醇的氨基酸为式III氨基酸:



[0254] 其中n=1-4

[0255] [式III]

[0256] 在某些例示性实施方案中,式III氨基酸是其中n为1(Cys)的氨基酸。

[0257] 仍是在其它实施方案中,包含侧链胺、羟基或硫醇的氨基酸为包含同样的式I、式II或式III结构的二取代氨基酸,不同的是用第二个侧链来代替键合到式I、式II或式III氨基酸的 α 碳的氢。

[0258] 在本发明一个实施方案中,酰化的胰高血糖素肽包含肽和酰基之间的间隔物。在某些实施方案中,胰高血糖素肽与间隔物共价键合,所述间隔物与酰基共价键合。

[0259] 在某些实施方案中,间隔物为包含侧链胺、羟基或硫醇的氨基酸或包含包含侧链胺、羟基或硫醇的氨基酸的二肽或三肽。被间隔物连接的氨基酸可为包含允许与间隔物连接的部分的任何氨基酸(例如单或双 α -取代氨基酸)。例如,包含侧链 NH_2 、 $-\text{OH}$ 或 $-\text{COOH}$ 的氨基酸(例如Lys、Orn、Ser、Asp或Glu)为合适的。在这点上,酰化的胰高血糖素肽可包含SEQ ID NO:1氨基酸序列或其经修饰的氨基酸序列,所述经修饰的氨基酸序列包含一种或多种本文所述氨基酸修饰,且10、20、24和29位中的至少一个氨基酸被修饰为包含侧链胺、羟基或羧酸酯的任何氨基酸。

[0260] 在某些实施方案中,间隔物为包含侧链胺、羟基或硫醇的氨基酸或包含包含侧链胺、羟基或硫醇的氨基酸的二肽或三肽。

[0261] 当通过间隔物的胺基团进行酰化时,酰化可通过氨基酸的 α 胺或侧链胺进行。在其中 α 胺被酰化的情况下,间隔物氨基酸可为任何氨基酸。例如,间隔物氨基酸可为疏水氨基酸,例如Gly、Ala、Val、Leu、Ile、Trp、Met、Phe、Tyr、6-氨基己酸、5-氨基戊酸、7-氨基庚酸和8-氨基辛酸。或者,间隔物氨基酸可为酸性残基,例如Asp和Glu。

[0262] 在中间隔物氨基酸侧链胺被酰化的情况下,间隔物氨基酸为包含侧链胺的氨基酸,例如式I氨基酸(例如Lys或Orn)。在这种情况下,可能间隔物氨基酸的 α 胺和侧链胺二者都被酰化,由此胰高血糖素肽被二酰化。本发明实施方案包括所述二酰化的分子。

[0263] 当通过间隔物的羟基进行酰化时,氨基酸或二肽或三肽的氨基酸之一可为式II氨基酸。在特定例示性实施方案中,所述氨基酸为Ser。

[0264] 当通过间隔物的硫醇基团进行酰化时,氨基酸或二肽或三肽的氨基酸之一可为式III氨基酸。在特定例示性实施方案中,所述氨基酸为Cys。

[0265] 在某些实施方案中,间隔物为亲水双官能间隔物。在某些实施方案中,亲水双官能间隔物包含两个或更多个活性基团,例如胺、羟基、硫醇和羧基或其任何组合。在某些实施方案中,亲水双官能间隔物包含羟基和羧基(carboxylate)。在其它实施方案中,亲水双官能间隔物包含胺基团和羧基。在其它实施方案中,亲水双官能间隔物包含巯基和羧基。在特

定实施方案中,间隔物包含氨基聚(烷氧基)羧酸盐。在这点上,间隔物可包含例如 $\text{NH}_2(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n(\text{CH}_2)_m\text{COOH}$,其中 m 为自1到6的任何整数, n 为自2到12的任何整数,所述间隔物例如8-氨基-3,6-二氧杂辛酸,其可购自Peptides International, Inc. (Louisville, KY)。

[0266] 在某些实施方案中,间隔物为疏水双官能间隔物。疏水双官能间隔物为本领域所知。参见例如Bioconjugate Techniques, G.T. Hermanson (Academic Press, San Diego, CA, 1996), 以其整体在此引作参考。在某些实施方案中,疏水双官能间隔物包含两个或更多个活性基团,例如胺、羟基、硫醇和羧基或其任何组合。在某些实施方案中,疏水双官能间隔物包含羟基和羧基。在其它实施方案中,疏水双官能间隔物包含胺基团和羧基。在其它实施方案中,疏水双官能间隔物包含巯基和羧基。包含羧基和羟基或巯基的合适的疏水双官能间隔物为本领域已知,并包括例如8-羟基辛酸和8-巯基辛酸。

[0267] 在某些实施方案中,双官能间隔物不是二羧酸,所述二羧酸包含羧基之间的1-7个碳原子的非支链亚甲基。在某些实施方案中,双官能间隔物是二羧酸,所述二羧酸包含羧基之间的1-7个碳原子的非支链亚甲基。

[0268] 特定实施方案中的间隔物(例如氨基酸、二肽、三肽、亲水双官能间隔物或疏水双官能间隔物)长度为3-10个原子(例如6-10个原子(例如6、7、8、9或10个原子))。在更特定实施方案中,所述间隔物长度为约3-10个原子(例如6-10个原子),所述酰基为C12-C18脂肪酰基,例如C14脂肪酰基、C16脂肪酰基,以使间隔物和酰基的总长为14-28个原子,例如约14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27或28个原子。在某些实施方案中,间隔物和酰基的长度为17-28(例如19-26、19-21)个原子。

[0269] 根据某些前述实施方案,双官能间隔物可为合成的或天然存在的氨基酸(包括但不限于本文所述的任何氨基酸),所述氨基酸包含长度为3-10个原子的氨基酸主链(例如6-氨基己酸、5-氨基戊酸、7-氨基庚酸和8-氨基辛酸)。或者,间隔物可为二肽或三肽间隔物,其具有长度为3-10个原子(例如6-10个原子)的肽主链。二肽或三肽间隔物的每一个氨基酸可与该二肽或三肽的其它氨基酸相同或不同,并可独立选自:天然存在的和/或非天然存在的氨基酸,包括例如天然存在的氨基酸(Ala、Cys、Asp、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Pro、Arg、Ser、Thr、Val、Trp、Tyr)的任何D或L异构体,或选自以下的非天然存在的氨基酸的任何D或L异构体: β -丙氨酸(β -Ala)、N- α -甲基-丙氨酸(Me-Ala)、氨基丁酸(Abu)、 γ -氨基丁酸(γ -Abu)、氨基己酸(ϵ -Ahx)、氨基异丁酸(Aib)、氨基甲基吡咯甲酸、氨基哌啶甲酸、氨基丝氨酸(Ams)、氨基四氢吡喃-4-甲酸、精氨酸N-甲氧基-N-甲基酰胺、 β -天冬氨酸(β -Asp)、氮杂环丁烷甲酸、3-(2-苯并噻唑基)丙氨酸、 α -叔-丁基甘氨酸、2-氨基-5-脲基-正戊酸(瓜氨酸,Cit)、 β -环己基丙氨酸(Cha)、乙酰氨基甲基-半胱氨酸、二氨基丁酸(Dab)、二氨基丙酸(Dpr)、二羟苯丙氨酸(DOPA)、二甲基噻唑烷(DMTA)、 γ -谷氨酸(γ -Glu)、高丝氨酸(Hse)、羟基脯氨酸(Hyp)、异亮氨酸N-甲氧基-N-甲基酰胺、甲基-异亮氨酸(MeIle)、六氢异烟酸(Isn)、甲基-亮氨酸(MeLeu)、甲基-赖氨酸、二甲基-赖氨酸、三甲基-赖氨酸、甲醇基脯氨酸(methanoproline)、甲硫氨酸-亚砷(Met(O))、甲硫氨酸-砷(Met(O₂))、正亮氨酸(Nle)、甲基-正亮氨酸(Me-Nle)、正缬氨酸(Nva)、鸟氨酸(Orn)、对氨基苯甲酸(PABA)、青霉胺(Pen)、甲基苯丙氨酸(MePhe)、4-氯苯丙氨酸(Phe(4-Cl))、4-氟苯丙氨酸(Phe(4-F))、4-硝基苯丙氨酸(Phe(4-NO₂))、4-氰基苯丙氨酸((Phe(4-CN)))、苯基甘氨酸(Phg)、哌啶基丙氨酸、哌啶基甘氨酸、3,4-脱氢脯氨酸、吡咯烷基丙氨酸、肌氨酸(Sar)、硒代半胱氨酸

(Sec)、O-苄基-磷酸丝氨酸、4-氨基-3-羟基-6-甲基庚酸(Sta)、4-氨基-5-环己基-3-羟基戊酸(ACHPA)、4-氨基-3-羟基-5-苯基戊酸(AHPPA)、1,2,3,4,-四氢-异喹啉-3-甲酸(Tic)、四氢吡喃甘氨酸、噻吩基丙氨酸(Thi)、O-苄基-磷酸酪氨酸、O-磷酸酪氨酸、甲氧基酪氨酸、乙氧基酪氨酸、O-(双-二甲基氨基-磷酸)-酪氨酸、酪氨酸硫酸四丁基胺(tyrosine sulfate tetrabutylamine)、甲基-缬氨酸(MeVal)和烷化的3-巯基丙酸。

[0270] 在某些实施方案中,间隔物包含综合负电荷(overall negative charge),例如包含一种或两种带负电荷的氨基酸。在某些实施方案中,二肽不是任何通常结构A-B的二肽,其中A选自Gly、Gln、Ala、Arg、Asp、Asn、Ile、Leu、Val、Phe和Pro,其中B选自Lys、His、Trp。在某些实施方案中,二肽间隔物选自:Ala-Ala、 β -Ala- β -Ala、Leu-Leu、Pro-Pro、 γ -氨基丁酸- γ -氨基丁酸和 γ -Glu- γ -Glu。

[0271] 在某些例示性实施方案中,通过酰化间隔物的胺、羟基或硫醇来修饰胰高血糖素肽以包含酰基,将所述间隔物连接到胰高血糖素肽的10、20、24或29位或C-末端氨基酸的氨基酸侧链。

[0272] 在更为特定的实施方案中,将酰基连接到胰高血糖素肽的10位氨基酸,并且间隔物和酰基的长度为14-28个原子。在某些方面,10位氨基酸为式I氨基酸,例如Lys,或为与式I相关的二取代氨基酸。在更特定实施方案中,胰高血糖素肽缺乏分子内桥,例如共价分子内桥。例如,胰高血糖素肽可为包含一个或多个用于稳定肽的 α 螺旋的 α , α -二取代氨基酸(例如AIB)的肽。因此,酰化的胰高血糖素肽可包含SEQ ID NO:555-561和610-612中的任何氨基酸序列、表20和28中含AIB的肽。如本文所述,所述包含共价连接到10位氨基酸侧链的酰化的间隔物的肽针对GLP-1受体和胰高血糖素受体都表现出提高的效价。

[0273] 经由胺、羟基和硫醇使肽酰化的合适的方法为本领域已知。参见例如:实施例19(通过胺酰化的方法),Miller,Biochem Biophys Res Commun 218:377-382(1996); Shimohigashi和Stammer,Int J Pept Protein Res 19:54-62(1982);和Previero等,Biochim Biophys Acta 263:7-13(1972)(通过羟基酰化的方法);和San和Silvius,J Pept Res 66:169-180(2005)(通过硫醇酰化的方法);Bioconjugate Chem."Chemical Modifications of Proteins:History and Applications(蛋白质的化学修饰:历史和应用)"第1、2-12页(1990);Hashimoto等,Pharmaceutical Res."Synthesis of Palmitoyl Derivatives of Insulin and their Biological Activity(胰岛素的棕榈酰衍生物的合成及其生物学活性)"第6卷,No:2第171-176页(1989)。

[0274] 酰化的胰高血糖素肽的酰基可为任何大小,例如任何长度的碳链,可为直链或支链的。在本发明某些特定实施方案中,所述酰基为C4-C30脂肪酸。例如,酰基可为C4脂肪酸、C6脂肪酸、C8脂肪酸、C10脂肪酸、C12脂肪酸、C14脂肪酸、C16脂肪酸、C18脂肪酸、C20脂肪酸、C22脂肪酸、C24脂肪酸、C26脂肪酸、C28脂肪酸或C30脂肪酸中的任何一种。在某些实施方案中,酰基为C8-C20脂肪酸,例如C14脂肪酸或C16脂肪酸。

[0275] 在备选实施方案中,酰基为胆汁酸。胆汁酸可为任何合适的胆汁酸,包括但不限于胆酸、鹅脱氧胆酸、脱氧胆酸、石胆酸、牛磺胆酸、甘氨酸胆酸和胆固醇酸。

[0276] 在本发明某些实施方案中,通过胰高血糖素肽使长链烷烃酰化来修饰胰高血糖素肽以包含酰基。在特定方面,所述长链烷烃包含胺、羟基或巯基(例如十八胺、十四醇和十六烷硫醇),它们与胰高血糖素肽的羧基或其活化形式反应。胰高血糖素肽的羧基或其活化形

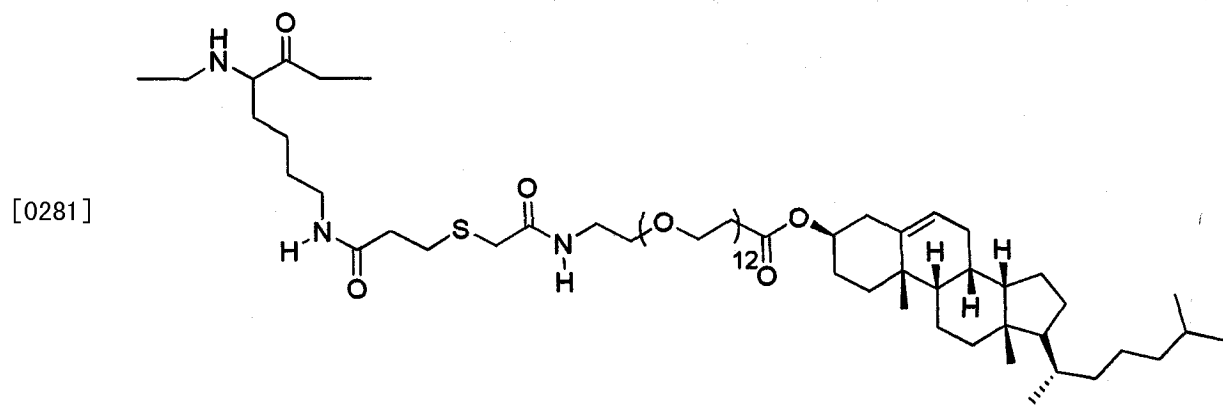
式可为胰高血糖素肽的氨基酸(例如谷氨酸、天冬氨酸)的侧链部分,或可为肽主链部分。

[0277] 在某些实施方案中,通过与胰高血糖素肽连接的间隔物使长链烷烃酰化来修饰胰高血糖素肽以包含酰基。在特定方面,所述长链烷烃包含胺、羟基或巯基,它们与间隔物的羧基或其活化形式反应。本文阐述了包含羧基或其活化形式的合适的间隔物,其包括例如双官能间隔物,例如氨基酸、二肽、三肽、亲水双官能间隔物和疏水双官能间隔物。

[0278] 本文所用术语“羧基的活化形式”指具有通式 $R(C=O)X$ 的羧基,其中 X 为离去基团, R 为胰高血糖素肽或间隔物。例如,羧基的活化形式可包括但不限于酰基氯、酐和酯。在某些实施方案中,活化的羧基为含 N -羟基琥珀酰亚胺酯(NHS)离去基团的酯。

[0279] 关于通过胰高血糖素肽或间隔物来酰化长链烷烃的本发明这些方面,所述长链烷烃可为任何大小,可包含任何长度的碳链。长链烷烃可为直链或支链的。在某些方面,长链烷烃为 C_4 - C_{30} 烷烃。例如,长链烷烃可为 C_4 烷烃、 C_6 烷烃、 C_8 烷烃、 C_{10} 烷烃、 C_{12} 烷烃、 C_{14} 烷烃、 C_{16} 烷烃、 C_{18} 烷烃、 C_{20} 烷烃、 C_{22} 烷烃、 C_{24} 烷烃、 C_{26} 烷烃、 C_{28} 烷烃或 C_{30} 烷烃中的任何一种。在某些实施方案中,长链烷烃包括 C_8 - C_{20} 烷烃,例如 C_{14} 烷烃、 C_{16} 烷烃或 C_{18} 烷烃。

[0280] 在某些实施方案中,亦用胆固醇酸来酰化胰高血糖素肽的胺、羟基或巯基。在特定实施方案中,通过经烷化的脱氨基Cys间隔物(即烷化3-巯基丙酸间隔物)让胰高血糖素肽与胆固醇酸连接。所述烷化的脱氨基Cys间隔物可为例如包含十二乙二醇部分的脱氨基-Cys间隔物。在一个实施方案中,胰高血糖素肽包含以下结构:



[0282] 可进一步修饰本文所述酰化的胰高血糖素肽以包含亲水部分。在某些特定实施方案中,亲水部分可包含聚乙二醇(PEG)链。可通过任何合适的方式引入亲水部分,例如本文所述的任何方法。在这点上,酰化的胰高血糖素肽可包含包括任何本文所述修饰在内的SEQ ID NO:1,其中在10、20、24和29位中的至少一个氨基酸位置包含酰基,在16、17、21、24或29位、C-末端延伸内的位置的氨基酸或C-末端氨基酸中至少一个被修饰为Cys、Lys、Orn、高Cys或Ac-Phe,将氨基酸侧链共价键合到亲水部分(例如PEG)。在某些实施方案中,将酰基连接到10位,任选经由包含Cys、Lys、Orn、高Cys或Ac-Phe的间隔物,在24位Cys残基处引入亲水部分。

[0283] 或者,酰化的胰高血糖素肽可包含间隔物,其中间隔物既被酰化又被修饰为包含亲水部分。合适的间隔物的非限制性实例包括包含选自Cys、Ac-Cys、Lys、Orn、高Cys和Ac-Phe中的一个或多个氨基酸的间隔物。

[0284] 在本发明的特定方面,酰化的胰高血糖素肽包含SEQ ID NO:534-544和546-549中的任何氨基酸序列。

[0285] 烷化

[0286] 根据某些实施方案,修饰胰高血糖素肽以包含烷基,例如氨基酸上并非天然存在的烷基(例如对于天然存在的氨基酸为非天然的烷基)。不坚持任何特定的理论,认为胰高血糖素的烷化将会达到与胰高血糖素肽酰化相似(即使不是相同)的效果,例如延长循环半衰期,推迟作用起始,延长作用时间,改进对蛋白酶例如DPP-IV的抗性,和提高针对GLP-1受体和胰高血糖素受体的效价。

[0287] 烷化可在胰高血糖素肽内的任何位置进行,包括1-29位、C-末端延伸内位置或C-末端氨基酸中的任何位置,前提是保留针对胰高血糖素的活性。非限制性实例包括5、7、10、11、12、13、14、16、17、18、19、20、21、24、27、28或29位。可将烷基直接与胰高血糖素肽的氨基酸共价连接,或经由间隔物与胰高血糖素肽的氨基酸间接连接,其中间隔物位于胰高血糖素肽的氨基酸和烷基之间。胰高血糖素肽可在连接亲水部分的同一个氨基酸位置被烷化,或在不同的氨基酸位置被烷化。非限制性实例包括10位的烷化,并在胰高血糖素肽的C-末端部分的一个或多个位置(例如24、28或29位)、C-末端延伸内或在C-末端(例如通过添加C-末端Cys)聚乙二醇化。

[0288] 在本发明特定方面,通过直接使胰高血糖素肽氨基酸侧链的胺、羟基或硫醇烷化,来修饰胰高血糖素肽以包含烷基。在某些实施方案中,在10、20、24或29位烷化。在这点上,烷化的胰高血糖素肽可包含SEQ ID NO:1氨基酸序列或其经修饰的氨基酸序列,所述经修饰的氨基酸序列包含一种或多种本文所述氨基酸修饰,且10、20、24和29位中的至少一个氨基酸被修饰为包含侧链胺、羟基或硫醇的任何氨基酸。在本发明某些特定实施方案中,通过10位氨基酸的侧链胺、羟基或硫醇使胰高血糖素肽直接烷化。

[0289] 在某些实施方案中,包含侧链胺的氨基酸为式I氨基酸。在某些例示性实施方案中,式I氨基酸是其中n为4(Lys)或n为3(Orn)的氨基酸。

[0290] 在其它实施方案中,包含侧链羟基的氨基酸为式II氨基酸。在某些例示性实施方案中,式II氨基酸是其中n为1(Ser)的氨基酸。

[0291] 仍是在其它实施方案中,包含侧链硫醇的氨基酸为式III氨基酸。在某些例示性实施方案中,式III氨基酸是其中n为1(Cys)的氨基酸。

[0292] 仍是在其它实施方案中,包含侧链胺、羟基或硫醇的氨基酸为包含同样的式I、式II或式III结构的二取代氨基酸,不同的是用第二个侧链来代替键合到式I、式II或式III氨基酸的 α 碳的氢。

[0293] 在本发明一个实施方案中,烷化的胰高血糖素肽包含肽和烷基之间的间隔物。在某些实施方案中,胰高血糖素肽与间隔物共价键合,所述间隔物与烷基共价结合。在某些例示性实施方案中,通过烷化间隔物的胺、羟基或硫醇来修饰胰高血糖素肽以包含烷基,将所述间隔物连接到胰高血糖素肽的10、20、24或29位氨基酸的侧链。被间隔物连接的氨基酸可为包含允许与间隔物连接的部分的任何氨基酸。例如,包含侧链NH₂、-OH或-COOH(例如Lys、Orn、Ser、Asp或Glu)的氨基酸为合适的。在这点上,烷化的胰高血糖素肽可包含SEQ ID NO:1氨基酸序列或其经修饰的氨基酸序列,所述经修饰的氨基酸序列包含一种或多种本文所述氨基酸修饰,且10、20、24和29位氨基酸中的至少一个被修饰为包含侧链胺、羟基或羧酸酯的任何氨基酸。

[0294] 在某些实施方案中,间隔物为包含侧链胺、羟基或硫醇的氨基酸或二肽或三肽,所

述二肽或三肽包含包含侧链胺、羟基或硫醇的氨基酸。

[0295] 当通过间隔物的胺基团进行烷化时,烷化可通过氨基酸的 α 胺或侧链胺进行。在其中 α 胺被烷化的情况下,间隔物氨基酸可为任何氨基酸。例如,间隔物氨基酸可为疏水氨基酸,例如Gly、Ala、Val、Leu、Ile、Trp、Met、Phe、Tyr、6-氨基己酸、5-氨基戊酸、7-氨基庚酸和8-氨基辛酸。或者,间隔物氨基酸可为酸性残基,例如Asp和Glu,前提是烷化发生在酸性残基的 α 胺上。在中间隔物氨基酸侧链胺被烷化的情况下,间隔物氨基酸为包含侧链胺的氨基酸,例如式I氨基酸(例如Lys或Orn)。在这种情况下,可能间隔物氨基酸的 α 胺和侧链胺二者都被烷化,由此胰高血糖素肽被二烷化。本发明实施方案包括这样的二烷化的分子。

[0296] 当通过间隔物的羟基进行烷化时,所述氨基酸或二肽或三肽的氨基酸之一可为式II氨基酸。在特定例示性实施方案中,所述氨基酸为Ser。

[0297] 当通过间隔物的巯基进行烷化时,所述氨基酸或二肽或三肽的氨基酸之一可为式III氨基酸。在特定例示性实施方案中,所述氨基酸为Cys。

[0298] 在某些实施方案中,间隔物为亲水双官能间隔物。在某些实施方案中,亲水双官能间隔物包含两个或更多个活性基团,例如胺、羟基、硫醇和羧基或其任何组合。在某些实施方案中,亲水双官能间隔物包含羟基和羧基。在其它实施方案中,亲水双官能间隔物包含胺基和羧基。在其它实施方案中,亲水双官能间隔物包含巯基和羧基。在特定实施方案中,所述间隔物包含氨基聚(烷氧基)羧酸盐。在这点上,间隔物可包含例如 $\text{NH}_2(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n(\text{CH}_2)_m\text{COOH}$,其中m为自1到6的任何整数,n为自2到12的任何整数,所述间隔物例如8-氨基-3,6-二氧杂辛酸,其可购自Peptides International, Inc. (Louisville, KY)。

[0299] 在某些实施方案中,间隔物为疏水双官能间隔物。在某些实施方案中,疏水双官能间隔物包含两个或更多个活性基团,例如胺、羟基、硫醇和羧基或其任何组合。在某些实施方案中,疏水双官能间隔物包含羟基和羧基。在其它实施方案中,疏水双官能间隔物包含胺基团和羧基。在其它实施方案中,疏水双官能间隔物包含巯基和羧基。包含羧基和羟基或巯基的合适的疏水双官能间隔物为本领域已知,包括例如8-羟基辛酸和8-巯基辛酸。

[0300] 特定实施方案中的间隔物(例如氨基酸、二肽、三肽、亲水双官能间隔物或疏水双官能间隔物)长度为3-10个原子(例如6-10个原子(例如6、7、8、9或10个原子))。在更特定实施方案中,所述间隔物长度为约3-10个原子(例如6-10个原子),所述烷基为C12-C18烷基,例如C14烷基、C16烷基,以使间隔物和烷基的总长为14-28个原子,例如约14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27或28个原子。在某些实施方案中,间隔物和烷基的长度为17-28(例如19-26、19-21)个原子。

[0301] 根据某些前述实施方案,双官能间隔物可为合成的或天然存在的氨基酸,所述氨基酸包含长度为3-10个原子的氨基酸主链(例如6-氨基己酸、5-氨基戊酸、7-氨基庚酸和8-氨基辛酸)。或者,间隔物可为二肽或三肽间隔物,其具有长度为3-10个原子(例如6-10个原子)的肽主链。二肽或三肽间隔物可由天然和/或非天然氨基酸组成,包括例如本文教导的任何氨基酸。在某些实施方案中,间隔物包含综合负电荷,例如包含一种或两种带负电荷的氨基酸。在某些实施方案中,二肽间隔物选自:Ala-Ala、 β -Ala- β -Ala、Leu-Leu、Pro-Pro、 γ -氨基丁酸- γ -氨基丁酸和 γ -Glu- γ -Glu。

[0302] 经由胺、羟基和硫醇使肽烷化的合适的方法为本领域已知。例如,可用Williamson醚合成来形成胰高血糖素肽羟基和所述烷基之间的醚连接。同样,肽与卤代烷的亲核取代

反应可产生任何醚、硫醚或氨基连接。

[0303] 烷化的胰高血糖素肽的烷基可为任何大小,例如任何长度的碳链,可为直链或支链的。在本发明某些实施方案中,所述烷基为C4-C30烷基。例如,烷基可为C4烷基、C6烷基、C8烷基、C10烷基、C12烷基、C14烷基、C16烷基、C18烷基、C20烷基、C22烷基、C24烷基、C26烷基、C28烷基或C30烷基中的任何一种。在某些实施方案中,烷基为C8-C20烷基,例如C14烷基或C16烷基。

[0304] 在某些特定实施方案中,烷基包含胆汁酸的类固醇部分,所述胆汁酸例如胆酸、鹅脱氧胆酸、脱氧胆酸、石胆酸、牛磺胆酸、甘氨酸胆酸和胆固醇酸。

[0305] 在本发明某些实施方案中,通过让亲核长链烷烃与胰高血糖素肽反应来修饰胰高血糖素肽以包含烷基,其中胰高血糖素肽包含适于亲核取代的离去基团。在特定方面,长链烷烃的亲核基团包含胺、羟基或巯基(例如十八胺、十四醇和十六烷硫醇)。胰高血糖素肽的离去基团可为氨基酸的侧链部分,或可为肽主链的部分。合适的离去基团包括例如N-羟基琥珀酰亚胺、卤素和磺酸酯。

[0306] 在某些实施方案中,通过让亲核长链烷烃与连接到胰高血糖素肽的间隔物反应来修饰胰高血糖素肽以包含烷基,其中所述间隔物包含离去基团。在特定方面,长链烷烃包含胺、羟基或巯基。在某些实施方案中,包含离去基团的间隔物可为本文所述的任何间隔物,例如进一步包含合适的离去基团的氨基酸、二肽、三肽、亲水双官能间隔物和疏水双官能间隔物。

[0307] 关于通过胰高血糖素肽或间隔物来烷化长链烷烃的本发明这些方面,所述长链烷烃可为任何大小,并可包含任何长度的碳链。长链烷烃可为直链或支链的。在某些方面,长链烷烃为C4-C30烷烃。例如,长链烷烃可为C4烷烃、C6烷烃、C8烷烃、C10烷烃、C12烷烃、C14烷烃、C16烷烃、C18烷烃、C20烷烃、C22烷烃、C24烷烃、C26烷烃、C28烷烃或C30烷烃中的任何一种。在某些实施方案中,长链烷烃包括C8-C20烷烃,例如C14烷烃、C16烷烃或C18烷烃。

[0308] 在某些实施方案中,亦可在胰高血糖素肽和胆固醇部分之间进行烷化。例如,胆固醇羟基可替换长链烷烃上的离去基团以形成胆固醇-胰高血糖素肽产物。

[0309] 可进一步修饰本文所述烷化的胰高血糖素肽以包含亲水部分。在某些特定实施方案中,亲水部分可包含聚乙二醇(PEG)链。可通过任何合适的方式引入亲水部分,例如本文所述的任何方法。在这点上,烷化的胰高血糖素肽可包含SEQ ID NO:1或其经修饰的氨基酸序列,所述经修饰的氨基酸序列包含本文所述的一个或多个氨基酸修饰,其中在10、20、24和29位氨基酸中的至少一个包含烷基,在16、17、21、24和29位、C-末端延伸内的位置或C-末端氨基酸中至少一个氨基酸被修饰为Cys、Lys、Orn、高Cys或Ac-Phe,将氨基酸侧链共价键合到亲水部分(例如PEG)。在某些实施方案中,将烷基连接到10位,任选经由包含Cys、Lys、Orn、高Cys或Ac-Phe的间隔物,并且在24位Cys残基处引入亲水部分。

[0310] 或者,烷化的胰高血糖素肽可包含间隔物,其中间隔物既被烷化又被修饰为包含亲水部分。合适的间隔物的非限制性实例包括包含选自Cys、Ac-Cys、Lys、Orn、高Cys和Ac-Phe的一个或多个氨基酸的间隔物。

[0311] C-末端截短

[0312] 在某些实施方案中,通过截短或缺失胰高血糖素肽C-末端的一个或两个氨基酸(即29和/或28位处)来进一步修饰本文所述胰高血糖素肽,而不影响其针对胰高血糖素受

体和GLP-1受体的活性和/或效价。在这点上,胰高血糖素肽可包含天然胰高血糖素肽(SEQ ID NO:1)的1-27或1-28位氨基酸,其任选含一种或多种本文所述修饰。

[0313] 在一个实施方案中,截短的胰高血糖素激动剂肽包含SEQ ID NO:550或SEQ ID NO:551。在另一实施方案中,截短的胰高血糖素激动剂肽包含SEQ ID NO:552或SEQ ID NO:553。

[0314] 带电荷的C-末端残基

[0315] 可例如通过将一个、二个、三个或更多个带电荷的氨基酸引入胰高血糖素肽SEQ ID NO:20的C-末端部分(优选在27位的C-末端),来进一步改进胰高血糖素肽SEQ ID NO:20的溶解性。可通过用带电荷的氨基酸在例如28或29位取代天然氨基酸,或作为备选通过将带电荷的氨基酸添加到例如27、28或29位后,来引入所述带电荷的氨基酸。在例示性实施方案中,一个、二个、三个或全部带电荷的氨基酸为带负电荷的。或者,亦可通过让亲水部分(例如聚乙二醇)与所述肽共价连接来增加溶解性。

[0316] 例示性实施方案

[0317] 根据本发明一个实施方案,提供包含序列SEQ ID NO:55的胰高血糖素类似物,其中所述类似物以1-3个选自1、2、3、5、7、10、11、13、14、17、18、19、21、24、27、28和29位置的氨基酸不同于SEQ ID NO:55,其中所述胰高血糖素肽表现出天然GLP-1针对GLP-1受体活性的至少20%。

[0318] 根据一个实施方案,提供包含以下序列的胰高血糖素/GLP-1受体共激动剂: NH_2 -His-Ser-Gln-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Lys-Tyr-Leu-Xaa-Xaa-Arg-Arg-Ala-Xaa-Asp-Phe-Val-Xaa-Trp-Leu-Met-Xaa-Xaa-R(SEQ ID NO:33),其中15位Xaa选自以下氨基酸:Asp、Glu、半胱磺酸、高谷氨酸和高半胱磺酸,16位Xaa选自以下氨基酸:Ser、Glu、Gln、高谷氨酸和高半胱磺酸,20位Xaa为Gln或Lys,24位Xaa为Gln或Glu,28位Xaa为Asn、Lys或酸性氨基酸,29位Xaa为Thr、Gly或酸性氨基酸,R为COOH或CONH₂,前提为当16位为丝氨酸时,20位为Lys,或作为备选当16位为丝氨酸时,24位为Glu,并且20或28位任一位置为Lys。在一个实施方案中,胰高血糖素/GLP-1受体共激动剂包含序列SEQ ID NO:33,其中28位氨基酸为天冬氨酸,并且29位氨基酸为谷氨酸。在另一实施方案中,28位氨基酸为天然天冬酰胺,29位氨基酸为甘氨酸,并且氨基酸序列SEQ ID NO:29或SEQ ID NO:65与SEQ ID NO:33的羧基末端共价连接。

[0319] 在一个实施方案中,提供包含序列SEQ ID NO:33的共激动剂,其中将另外的酸性氨基酸加到所述肽的羧基末端。在另一实施方案中,所述胰高血糖素类似物的羧基末端氨基酸在天然氨基酸的羧基团位置具有酰胺。在一个实施方案中,胰高血糖素类似物包含选自SEQ ID NO:40、SEQ ID NO:41、SEQ ID NO:42、SEQ ID NO:43和SEQ ID NO:44的序列。

[0320] 根据一个实施方案,提供胰高血糖素肽类似物SEQ ID NO:33,其中所述类似物以1-3个选自1、2、3、5、7、10、11、13、14、17、18、19、21和27位的氨基酸不同于SEQ ID NO:33,前提为当16位氨基酸为丝氨酸时,20位为赖氨酸,或在24位氨基酸和20或28位任一位置氨基酸之间形成内酰胺桥。根据一个实施方案,所述类似物以1-3个选自1、2、3、21和27位的氨基酸不同于SEQ ID NO:33。在一个实施方案中,胰高血糖素肽类似物SEQ ID NO:33以1-2个氨基酸不同于该序列,或在一个实施方案中,以选自1、2、3、5、7、10、11、13、14、17、18、19、21和27位的单个氨基酸不同于该序列,前提为当16位氨基酸为丝氨酸时,20位为赖氨酸,或在24

位氨基酸和20或28位任一氨基酸之间形成内酰胺桥。

[0321] 按照另一实施方案,提供包含以下序列的相对选择GLP-1受体的激动剂: NH₂-His-Ser-Xaa-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Lys-Tyr-Leu-Xaa-Xaa-Arg-Arg-Ala-Xaa-Asp-Phe-Val-Xaa-Trp-Leu-Met-Xaa-Xaa-R (SEQ ID NO: 53), 其中3位Xaa选自以下氨基酸: Glu、Orn或Nle, 15位Xaa选自以下氨基酸: Asp、Glu、半胱氨酸、高谷氨酸和高半胱氨酸, 16位Xaa选自以下氨基酸: Ser、Glu、Gln、高谷氨酸和高半胱氨酸, 20位Xaa为Gln或Lys, 24位Xaa为Gln或Glu, 28位Xaa为Asn、Lys或酸性氨基酸, 29位Xaa为Thr、Gly或酸性氨基酸, R为COOH、CONH₂、SEQ ID NO: 26或SEQ ID NO: 29, 前提为当16位为丝氨酸时, 20位为Lys, 或作为备选当16位为丝氨酸时, 24位为Glu并且20或28任一位置为Lys。在一个实施方案中, 3位氨基酸为谷氨酸。在一个实施方案中, 28和/或29位取代的酸性氨基酸为天冬氨酸或谷氨酸。在一个实施方案中, 胰高血糖素肽包括(共激动剂肽)包含序列SEQ ID NO: 33, 所述序列SEQ ID NO: 33包含添加到所述肽的羧基末端的另外的酸性氨基酸。在另一实施方案中, 胰高血糖素类似物的羧基末端氨基酸在天然氨基酸的羧基基团位置具有酰胺。

[0322] 根据一个实施方案, 提供包含选自以下的经修饰的胰高血糖素肽的胰高血糖素/GLP-1受体共激动剂:

[0323] NH₂-His-Ser-Gln-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Lys-Tyr-Leu-Xaa-Xaa-Arg-Arg-Ala-Xaa-Asp-Phe-Val-Xaa-Trp-Leu-Met-Xaa-Xaa-R (SEQ ID NO: 34), 其中15位Xaa选自以下氨基酸: Asp、Glu、半胱氨酸、高谷氨酸和高半胱氨酸, 16位Xaa选自以下氨基酸: Ser、Glu、Gln、高谷氨酸和高半胱氨酸, 20位Xaa为Gln或Lys, 24位Xaa为Gln或Glu和28位Xaa为Asn、Asp或Lys, R为COOH或CONH₂, 29位Xaa为Thr或Gly和R为COOH、CONH₂、SEQ ID NO: 26或SEQ ID NO: 29, 前提为当16位为丝氨酸时, 20位为Lys, 或作为备选当16位为丝氨酸时, 24位为Glu并且20或28位任一位置为Lys。在一个实施方案中, R为CONH₂, 15位Xaa为Asp, 16位Xaa选自以下氨基酸: Glu、Gln、高谷氨酸和高半胱氨酸, 20和24位Xaa各自为Gln, 28位Xaa为Asn或Asp, 和29位Xaa为Thr。在一个实施方案中, 15和16位Xaa各自为Glu, 20和24位Xaa各自为Gln, 28位Xaa为Asn或Asp, 29位Xaa为Thr, 和R为CONH₂。

[0324] 据报道可修饰天然胰高血糖素肽的某些位置同时保留母体肽的至少某些活性。因此, 申请人预期位于肽SEQ ID NO: 11的2、5、7、10、11、12、13、14、17、18、19、20、21、24、27、28或29位氨基酸中的一个或多个, 可被不同于天然胰高血糖素肽中所存在的氨基酸取代, 而仍保留针对胰高血糖素受体的活性。在一个实施方案中, 将存在于天然肽27位的甲硫氨酸残基改变为亮氨酸或正亮氨酸以防止肽的氧化性降解。在另一实施方案中, 20位氨基酸被Lys、Arg、Orn或瓜氨酸取代, 和/或21位被Glu、高谷氨酸或高半胱氨酸取代。

[0325] 在一个实施方案中, 提供胰高血糖素类似物SEQ ID NO: 20, 其中选自类似物的1、2、5、7、10、11、13、14、17、18、19、21、27、28或29位的1-6个氨基酸不同于SEQ ID NO: 1对应的氨基酸, 前提为当16位氨基酸为丝氨酸时, 20位为Lys, 或作为备选当16位为丝氨酸时, 24位为Glu并且20或28位的任一位置为Lys。按照另一实施方案, 提供胰高血糖素类似物SEQ ID NO: 20, 其中选自类似物1、2、5、7、10、11、13、14、17、18、19、20、21、27、28或29位的1-3个氨基酸不同于SEQ ID NO: 1的对应的氨基酸。在另一实施方案中, 提供胰高血糖素类似物SEQ ID NO: 8、SEQ ID NO: 9或SEQ ID NO: 11, 其中选自类似物1、2、5、7、10、11、13、14、17、18、19、20或21位的1-2个氨基酸不同于SEQ ID NO: 1的对应的氨基酸, 在另一实施方案中, 所述1-2个

不同的氨基酸代表相对于天然胰高血糖素序列(SEQ ID NO:1)中存在的氨基酸的保守性氨基酸取代。在一个实施方案中,提供胰高血糖素肽SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:14或SEQ ID NO:15,其中胰高血糖素肽进一步包含选自2、5、7、10、11、13、14、17、18、19、20、21、27或29位的位置中的一个、两个或三个氨基酸取代。在一个实施方案中,2、5、7、10、11、13、14、16、17、18、19、20、21、27或29位取代为保守性氨基酸取代。

[0326] 根据一个实施方案,提供包含序列SEQ ID NO 33的变体的胰高血糖素/GLP-1受体共激动剂,其中选自变体各自16、17、18、20、21、23、24、27、28和29位的1-10个氨基酸不同于SEQ ID NO:1的对应的氨基酸。根据一个实施方案,提供序列SEQ ID NO 33变体,其中所述变体以选自Gln17、Ala18、Glu21、Ile23、Ala24、Val27和Gly29的一个或多个氨基酸取代不同于SEQ ID NO:33。根据一个实施方案,提供包含序列SEQ ID NO 33的变体的胰高血糖素/GLP-1受体共激动剂,其中选自所述变体的17-26位的1-2个氨基酸不同于SEQ ID NO:1的对应的氨基酸。根据一个实施方案,提供序列SEQ ID NO 33的变体,其中所述变体以选自Gln17、Ala18、Glu21、Ile23和Ala24的氨基酸取代不同于SEQ ID NO:33。根据一个实施方案,提供序列SEQ ID NO 33的变体,其中所述变体以18位氨基酸取代不同于SEQ ID NO:33,其中所述取代的氨基酸选自Ala、Ser、Thr和Gly。根据一个实施方案,提供序列SEQ ID NO 33的变体,其中所述变体以18位Ala氨基酸取代不同于SEQ ID NO:33。所述变化包含在SEQ ID NO:55中。在另一实施方案中,提供包含序列SEQ ID NO 33的变体的胰高血糖素/GLP-1受体共激动剂,其中选自所述变体的17-22位的1-2个氨基酸不同于SEQ ID NO:1的对应的氨基酸,在另一实施方案中,提供SEQ ID NO 33的变体,其中所述变体以20和21位的1或2个氨基酸取代不同于SEQ ID NO:33。根据一个实施方案,提供包含以下序列的胰高血糖素/GLP-1受体共激动剂:NH₂-His-Ser-Gln-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Lys-Tyr-Leu-Xaa-Xaa-Arg-Arg-Ala-Xaa-Xaa-Phe-Val-Xaa-Trp-Leu-Met-Xaa-Xaa-R(SEQ ID NO:51),其中15位Xaa为Asp、Glu、半胱氨酸、高谷氨酸或高半胱氨酸,16位Xaa为Ser、Glu、Gln、高谷氨酸或高半胱氨酸,20位Xaa为Gln、Lys、Arg、Orn或瓜氨酸,21位Xaa为Asp、Glu、高谷氨酸或高半胱氨酸,24位Xaa为Gln或Glu,28位Xaa为Asn、Lys或酸性氨基酸,29位Xaa为Thr或酸氨基酸,和R为COOH或CONH₂。在一个实施方案中,R为CONH₂。根据一个实施方案,提供包含以下序列的变体的胰高血糖素/GLP-1受体共激动剂:SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:47、SEQ ID NO:48或SEQ ID NO:49,其中所述变体以20位氨基酸取代不同于所述序列。在一个实施方案中,所述氨基酸取代选自20位Lys、Arg、Orn或瓜氨酸。

[0327] 在一个实施方案中,提供包含类似物肽SEQ ID NO:34的胰高血糖素激动剂,其中所述类似物以在2位具有丝氨酸以外的氨基酸不同于SEQ ID NO:34。在一个实施方案中,丝氨酸残基被氨基异丁酸、D-丙氨酸取代,在一个实施方案中,丝氨酸残基被氨基异丁酸取代。所述修饰阻止二肽基肽酶IV的裂解,同时保留母体化合物固有的效价(例如至少75%、80%、85%、90%、95%或更多母体化合物效价)。在一个实施方案中,例如,通过将一个、二个、三个或更多个带电荷的氨基酸引入到天然胰高血糖素的C-末端部分(优选27位的C-末端)提高类似物的溶解性。在例示性实施方案中,一个、二个、三个或全部带电荷的氨基酸为带负电荷的。在另一实施方案中,类似物进一步包含取代28或29位的天然氨基酸的酸性氨基酸或添加到肽SEQ ID NO:34的羧基末端的酸性氨基酸。

[0328] 在一个实施方案中,在1或2位进一步修饰本文公开的胰高血糖素类似物,以降低对二肽基肽酶IV裂解的敏感性。在一个实施方案中,提供胰高血糖素类似物SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:14或SEQ ID NO:15,其中所述类似物以2位取代不同于母体分子,并对二肽基肽酶IV裂解表现出降低的敏感性(即抗性)。更具体地,在一个实施方案中,所述类似物肽的2位被选自以下的氨基酸取代:D-丝氨酸、D-丙氨酸、缬氨酸、氨基正-丁酸、甘氨酸、N-甲基丝氨酸和氨基异丁酸。在一个实施方案中,所述类似物肽的2位被选自以下的氨基酸取代:D-丝氨酸、D-丙氨酸、甘氨酸、N-甲基丝氨酸和氨基异丁酸。在另一实施方案中,所述类似物肽的2位被选自以下的氨基酸取代:D-丝氨酸、甘氨酸、N-甲基丝氨酸和氨基异丁酸。在一个实施方案中,胰高血糖素肽包含序列SEQ ID NO:21或SEQ ID NO:22。

[0329] 在一个实施方案中,提供胰高血糖素类似物SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:14或SEQ ID NO:15,其中所述类似物以1位取代不同于母体分子,并对二肽基肽酶IV裂解表现出降低的敏感性(即抗性)。更具体地,类似物肽的1位被选自以下的氨基酸取代:D-组氨酸、 α,α -二甲基咪唑乙酸(DMIA)、N-甲基组氨酸、 α -甲基组氨酸、咪唑乙酸、去氨基组氨酸、羟基-组氨酸、乙酰基-组氨酸和高组氨酸。在另一实施方案中,提供包含类似物肽SEQ ID NO:34的胰高血糖素激动剂,其中所述类似物以在1位具有组氨酸以外的氨基酸不同于SEQ ID NO:34。在一个实施方案中,例如通过将一个、二个、三个或更多个带电荷的氨基酸引入天然胰高血糖素的C-末端部分(优选27位C-末端),来提高类似物的溶解性。在例示性实施方案中,一个、二个、三个或全部带电荷的氨基酸为带负电荷的。在另一实施方案中,所述类似物进一步包含取代28或29位天然氨基酸的酸性氨基酸或添加到肽SEQ ID NO:34的羧基末端的酸性氨基酸。在一个实施方案中,所述酸性氨基酸为天冬氨酸或谷氨酸。

[0330] 在一个实施方案中,包含序列SEQ ID NO:20的胰高血糖素/GLP-1受体共激动剂进一步包含另外的一个氨基酸或选自SEQ ID NO:26、SEQ ID NO:27和SEQ ID NO:28的肽的羧基末端延伸。在其中将单个氨基酸添加到SEQ ID NO:20羧基末端的实施方案中,所述氨基酸通常选自20种常见氨基酸之一,在一个实施方案中,所述另外的羧基末端氨基酸在天然氨基酸的羧酸位置具有酰胺基团。在一个实施方案中,所述另外的氨基酸选自谷氨酸、天冬氨酸和甘氨酸。

[0331] 在备选实施方案中,提供胰高血糖素/GLP-1受体共激动剂,其中所述肽包含至少一个在谷氨酸残基和赖氨酸残基侧链之间形成的内酰胺环,其中谷氨酸残基和赖氨酸残基由三个氨基酸分开。在一个实施方案中,含有内酰胺的胰高血糖素肽的羧基末端氨基酸在天然氨基酸的羧酸位置具有酰胺基团。更具体地,在一个实施方案中,提供包含选自以下的经修饰的胰高血糖素肽的胰高血糖素和GLP-1共激动剂:

[0332] $\text{NH}_2\text{-His-Ser-Gln-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Lys-Tyr-Leu-Asp-Glu-Arg-Arg-Ala-Gln-Asp-Phe-Val-Gln-Trp-Leu-Met-Xaa-Xaa-R}$ (SEQ ID NO:66)

[0333] $\text{NH}_2\text{-His-Ser-Gln-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Lys-Tyr-Leu-Asp-Glu-Arg-Arg-Ala-Lys-Asp-Phe-Val-Gln-Trp-Leu-Met-Xaa-Xaa-R}$ (SEQ ID NO:67)

[0334] $\text{NH}_2\text{-His-Ser-Gln-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Lys-Tyr-Leu-Asp-Ser-Arg-Arg-Ala-Lys-Asp-Phe-Val-Glu-Trp-Leu-Met-Xaa-Xaa-R}$ (SEQ ID NO:68)

[0335] NH₂-His-Ser-Gln-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Lys-Tyr-Leu-Asp-Ser-Arg-Arg-Ala-Gln-Asp-Phe-Val-Glu-Trp-Leu-Met-Lys-Xaa-R(SEQ ID NO:69)

[0336] NH₂-His-Ser-Gln-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Lys-Tyr-Leu-Asp-Glu-Arg-Arg-Ala-Lys-Asp-Phe-Val-Glu-Trp-Leu-Met-Asn-Thr-R(SEQ ID NO:16)

[0337] NH₂-His-Ser-Gln-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Lys-Tyr-Leu-Asp-Glu-Arg-Arg-Ala-Gln-Asp-Phe-Val-Glu-Trp-Leu-Met-Lys-Thr-R(SEQ ID NO:17)

[0338] NH₂-His-Ser-Gln-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Lys-Tyr-Leu-Asp-Glu-Arg-Arg-Ala-Lys-Asp-Phe-Val-Glu-Trp-Leu-Met-Lys-Thr-R(SEQ ID NO:18)

[0339] 其中28位Xaa=Asp或Asn,29位Xaa为Thr或Gly,R选自COOH、CONH₂、谷氨酸、天冬氨酸、甘氨酸、SEQ ID NO:26、SEQ ID NO:27和SEQ ID NO:28,并且在以下位置之间形成内酰胺桥:SEQ ID NO:66的12位Lys和16位Glu;SEQ ID NO:67的16位Glu和20位Lys;SEQ ID NO:68的20位Lys和24位Glu;SEQ ID NO:69的24位Glu和28位Lys;SEQ ID NO:16的12位Lys和16位Glu及20位Lys和24位Glu;SEQ ID NO:17的12位Lys和16位Glu及24位Glu和28位Lys;和SEQ ID NO:18的16位Glu和20位Lys及24位Glu和28位Lys。在一个实施方案中,R选自COOH、CONH₂、谷氨酸、天冬氨酸、甘氨酸,28位氨基酸为Asn,和29位氨基酸为苏氨酸。在一个实施方案中,R为CONH₂,28位氨基酸为Asn,29位氨基酸为苏氨酸。在另一实施方案中,R选自SEQ ID NO:26、SEQ ID NO:29和SEQ ID NO:65,和29位氨基酸为甘氨酸。

[0340] 在另一实施方案中,胰高血糖素/GLP-1受体共激动剂选自:SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:17和SEQ ID NO:18,其中所述肽进一步包含另外的一个氨基酸或选自SEQ ID NO:26、SEQ ID NO:27和SEQ ID NO:28的肽的羧基末端延伸。在一个实施方案中,所述末端延伸包含序列SEQ ID NO:26、SEQ ID NO:29或SEQ ID NO:65,并且所述胰高血糖素肽包含序列SEQ ID NO:55。在一个实施方案中,胰高血糖素/GLP-1受体共激动剂包含序列SEQ ID NO:33,其中16位氨基酸为谷氨酸,20位氨基酸为赖氨酸,28位氨基酸为天冬酰胺,并且氨基酸序列SEQ ID NO:26或SEQ ID NO:29与SEQ ID NO:33的羧基末端连接。

[0341] 在其中将单一氨基酸添加到SEQ ID NO:20的羧基末端的实施方案中,所述氨基酸通常选自20种常见氨基酸之一,在一个实施方案中,所述氨基酸在天然氨基酸的羧酸位置具有酰胺基团。在一个实施方案中,所述另外的氨基酸选自谷氨酸和天冬氨酸和甘氨酸。在其中所述胰高血糖素激动剂类似物进一步包含羧基末端延伸的实施方案中,所述羧基末端氨基酸延伸在一个实施方案中以酰胺基团或酯基团而不是羧酸为末端。

[0342] 在另一实施方案中,胰高血糖素/GLP-1受体共激动剂包含以下序列:

[0343] NH₂-His-Ser-Gln-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Lys-Tyr-Leu-Asp-Glu-Arg-Arg-Ala-Gln-Asp-Phe-Val-Gln-Trp-Leu-Met-Asn-Thr-Xaa-CONH₂(SEQ ID NO:19),其中30位Xaa表示任何氨基酸。在一个实施方案中,Xaa选自20种常见氨基酸之一,在一个实施方案中,所述氨基酸为谷氨酸、天冬氨酸或甘氨酸。可通过让PEG链与SEQ ID NO:19的17、21、24或30位氨基酸的侧链共价连接,来进一步改进该肽的溶解性。在另一实施方案中,所述肽包含另外的选自SEQ ID NO:26、SEQ ID NO:27和SEQ ID NO:28的肽的羧基末端延伸。根据一个实施方案,所述胰高血糖素/GLP-1受体共激动剂包含序列SEQ ID NO:30、SEQ ID NO:31和SEQ ID NO:32。

[0344] 可在胰高血糖素序列SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:17、SEQ ID NO:18、SEQ ID NO:19和SEQ ID NO:64内部进行另外的位点特异性修饰,以产生一组具有不同GLP-1激动程度的胰高血糖素激动剂。因此,制备并表征了拥有针对各种受体几乎相同的体外效价的肽。同样地,业已鉴定并表征了具有选择性地提高针对两种受体的每一任10倍效价的肽。如上所述用谷氨酸取代16位丝氨酸残基提高天然胰高血糖素针对胰高血糖素受体和GLP-1受体的效价,但保持对胰高血糖素受体大约10倍的选择性。另外,通过用谷氨酸取代3位天然谷氨酰胺(SEQ ID NO:22),产生表现出针对GLP-1受体大约10倍选择性的胰高血糖素类似物。

[0345] 可通过在肽的16、17、21和24位引入亲水基团,或通过胰高血糖素/GLP-1共激动剂肽的羧基末端添加单一经修饰的氨基酸(即修饰以包含亲水基团的氨基酸),来进一步提高胰高血糖素/GLP-1共激动剂肽在生理pH水溶液中的溶解性,同时保留相对于天然胰高血糖素的高生物学活性。根据一个实施方案,亲水基团包含聚乙烯(PEG)链。更具体地,在一个实施方案中,胰高血糖素肽包含以下序列:SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:17或SEQ ID NO:18,其中PEG链与所述胰高血糖素肽的16、17、21、24、29位氨基酸或C-末端氨基酸的侧链共价连接,前提为:当所述肽包含SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:12或SEQ ID NO:13时,聚乙二醇链与17、21或24位的氨基酸残基共价键合;当所述肽包含SEQ ID NO:14或SEQ ID NO:15时,聚乙二醇链与16、17或21位的氨基酸残基共价键合;和当所述肽包含SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:17或SEQ ID NO:18时,聚乙二醇链与17或21位氨基酸残基共价键合。

[0346] 在一个实施方案中,胰高血糖素肽包含序列SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:12或SEQ ID NO:13,其中PEG链与所述胰高血糖素肽的17、21、24位氨基酸和或C-末端氨基酸的侧链共价连接,并且所述肽的羧基末端氨基酸在天然氨基酸的羧基团位置具有酰胺基团。在一个实施方案中,胰高血糖素/GLP-1受体共激动剂肽包含选自以下的序列:SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:17、SEQ ID NO:18和SEQ ID NO:19,其中PEG链与所述胰高血糖素肽的以下位置的氨基酸侧链共价连接:SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:13和SEQ ID NO:19的17、21或24位或SEQ ID NO:14和SEQ ID NO:15的16、17或21位或SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:17和SEQ ID NO:18的17或21位。在另一实施方案中,胰高血糖素/GLP-1受体共激动剂肽包含序列SEQ ID NO:11或SEQ ID NO:19,其中PEG链与所述胰高血糖素肽的17、21或24位氨基酸或C-末端氨基酸的侧链共价连接。

[0347] 根据一个实施方案和前面段落所述限制性条款的主题,修饰胰高血糖素共激动剂肽以含有16、17、21、24或29位氨基酸或C-末端氨基酸处的一个或多个氨基酸取代,其中所述天然氨基酸被具有适于与亲水部分(包括例如PEG)交联的侧链的氨基酸取代。天然肽可被天然存在的氨基酸或合成(非天然存在的)氨基酸取代。合成或非天然存在的氨基酸指没有体内天然存在但可将其纳入本文所述肽结构的氨基酸。或者,可将具有适于与亲水部分(包括例如PEG)交联的侧链的氨基酸添加到任何本文公开的胰高血糖素类似物的羧基末端。根据一个实施方案,用选自赖氨酸、半胱氨酸、鸟氨酸、高半胱氨酸和乙酰基苯丙氨酸的氨基酸,在选自胰高血糖素/GLP-1受体共激动剂肽的16、17、21、24或29位取代天然氨基酸,来进行氨基酸取代,其中所述取代氨基酸进一步包含与所述氨基酸侧链共价键合的PEG链。在一个实施方案中,进一步修饰选自SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:14、SEQ ID

NO:15、SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:17、SEQ ID NO:18和SEQ ID NO:19的胰高血糖素肽,以包含与所述胰高血糖素肽的17或21位氨基酸侧链共价连接的PEG链。在一个实施方案中,聚乙二醇化胰高血糖素/GLP-1受体共激动剂进一步包含序列SEQ ID NO:26、SEQ ID NO:27或SEQ ID NO:29。

[0348] 在另一实施方案中,胰高血糖素肽包含序列SEQ ID NO:55或SEQ ID NO:56,其进一步包含与SEQ ID NO:55或SEQ ID NO:56的C-末端氨基酸连接的C-末端延伸SEQ ID NO:26、SEQ ID NO:29或SEQ ID NO:65,并任选进一步包含与所述肽的17、18、21、24或29位氨基酸或C-末端氨基酸的侧链共价连接的PEG链。在另一实施方案中,胰高血糖素肽包含序列SEQ ID NO:55或SEQ ID NO:56,其中PEG链与胰高血糖素肽的21或24位氨基酸侧链共价连接,并且所述肽进一步包含C-末端延伸SEQ ID NO:26或SEQ ID NO:29。

[0349] 在另一实施方案中,胰高血糖素肽包含序列SEQ ID NO:55或SEQ ID NO:33或SEQ ID NO:34,其中将另外的氨基酸添加到SEQ ID NO:33或SEQ ID NO:34的羧基末端,并且PEG链与所加入的氨基酸的侧链共价连接。在另一实施方案中,聚乙二醇化胰高血糖素类似物进一步包含与SEQ ID NO:33或SEQ ID NO:34的C-末端氨基酸连接的C-末端延伸SEQ ID NO:26或SEQ ID NO:29。在另一实施方案中,胰高血糖素肽包含序列SEQ ID NO:19,其中PEG链与胰高血糖素肽30位氨基酸的侧链共价连接,并且所述肽进一步包含与SEQ ID NO:19的C-末端氨基酸连接的C-末端延伸SEQ ID NO:26或SEQ ID NO:29。

[0350] 聚乙二醇链可呈直链形式,或其可为分枝。根据一个实施方案,聚乙二醇链具有选自约500-约10,000道尔顿范围的平均分子量。在一个实施方案中,聚乙二醇链具有选自约1,000-约5,000道尔顿范围的平均分子量。在备选实施方案中,聚乙二醇链具有选自约10,000-约20,000道尔顿范围的平均分子量。根据一个实施方案,聚乙二醇化胰高血糖素肽包含两个或更多个与胰高血糖素肽共价键合的聚乙烯链,其中胰高血糖素链的总分子量为约1,000-约5,000道尔顿。在一个实施方案中,聚乙二醇化胰高血糖素激动剂包含由SEQ ID NO:5或胰高血糖素激动剂类似物SEQ ID NO:5组成的肽,其中PEG链与21和24位的氨基酸残基共价连接,并且其中所结合的两个PEG链的分子量为约1,000-约5,000道尔顿。

[0351] 在某些例示性实施方案中,胰高血糖素肽包含含至多10个氨基酸修饰的氨基酸序列SEQ ID NO:1,并包含在10位被酰化或烷化的氨基酸。在某些实施方案中,用C4-C30脂肪酸酰化或烷化10位氨基酸。在某些方面,10位氨基酸包含对天然存在的氨基酸为非天然的酰基或烷基。

[0352] 在某些实施方案中,包含10位酰化或烷化的氨基酸的胰高血糖素肽包含稳定的 α 螺旋。因此,在某些方面,胰高血糖素肽包含本文所述酰基或烷基和分子内桥,例如i位氨基酸和i+4位氨基酸侧链之间的共价分子内桥(例如内酰胺桥),其中i为12、16、20或24。作为备选或另外地,胰高血糖素肽包含本文所述酰基或烷基,并且胰高血糖素肽的16、20、21和/或24位的一个、二个、三个或更多个位置被 α , α -二取代氨基酸(例如AIB)取代。在某些情况下,非天然胰高血糖素肽包含16位Glu和20位Lys,其中任选内酰胺桥连接Glu和Lys,并任选胰高血糖素肽进一步包含一个或个选自以下的修饰:17位Gln、18位Ala、21位Glu、23位Ile和24位Ala。

[0353] 同样是在其中胰高血糖素肽包含10位酰化或烷化氨基酸的任何实施方案中,胰高血糖素肽可进一步包含代替C-末端 α 羧酸酯的C-末端酰胺。

[0354] 在某些实施方案中,包含本文所述酰基或烷基的胰高血糖素肽进一步包含1位、2位或1和2位氨基酸取代,其中所述氨基酸取代获得DPP-IV蛋白酶抗性。例如,1位His可被选自以下的氨基酸取代:D-组氨酸、 α,α -二甲基咪唑乙酸(DMIA)、N-甲基组氨酸、 α -甲基组氨酸、咪唑乙酸、去氨基组氨酸、羟基-组氨酸、乙酰基-组氨酸和高组氨酸。作为备选或另外地,2位Ser可被选自以下的氨基酸取代:D-丝氨酸、丙氨酸、D-丙氨酸、缬氨酸、甘氨酸、N-甲基丝氨酸、N-甲基丙氨酸和氨基异丁酸。

[0355] 包含本文所述10位酰化或烷化氨基酸的胰高血糖素肽可包含基本上与SEQ ID NO:1有关的任何氨基酸序列。例如,胰高血糖素肽包含含至多10个氨基酸修饰(例如0、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10个修饰)的SEQ ID NO:1。在某些实施方案中,酰化或烷化胰高血糖素肽的氨基酸序列与SEQ ID NO:1同一性大于25%(例如与SEQ ID NO:1同一性大于30%、35%、40%、50%、60%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或将近100%)。在某些特定实施方案中,胰高血糖素肽为包含含本文所述10位酰化或烷化氨基酸的SEQ ID NO:55胰高血糖素肽。胰高血糖素肽可为含1或2个氨基酸修饰的SEQ ID NO:55、55及SEQ ID NO:2-4、9-18、20、23-25、33、40-44、53、56、61、62、64、66-514和534中的任何一种。

[0356] 这些实施方案中的酰基或烷基可为本文所述任何酰基或烷基。例如,酰基可为C4-C30(例如C8-C24)脂肪酰基,烷基可为C4-C30(例如C8-C24)烷基。

[0357] 酰基或烷基所连接的氨基酸可为本文所述任何氨基酸,例如式I(例如Lys)、式II和式III的任何氨基酸。

[0358] 在某些实施方案中,酰基或烷基直接与10位氨基酸连接。在某些实施方案中,酰基或烷基经由间隔物与10位氨基酸连接,例如经由长度为3-10个原子的间隔物,例如氨基酸或二肽。为连接酰基或烷基目的的合适的间隔物如本文所述。

[0359] 用途

[0360] 如实施例中所详述,本发明胰高血糖素激动剂相对于天然肽具有提高的生物物理稳定性和水溶性,同时表现出增加的生物活性。因此,认为本发明胰高血糖素激动剂适于先前对于天然胰高血糖素肽所述的任何用途。因此,可将本文所述经修饰的胰高血糖素肽用于治疗低血糖症,或用于提高血糖水平,用于诱导放射性用途的消化道临时麻痹或治疗其它因胰高血糖素的低血液水平而产生的代谢病。亦预期本文所述胰高血糖素肽用于降低或维持体重或治疗高血糖症或降低血糖水平或使血糖水平正常化。

[0361] 可单独或与其它抗糖尿病药物或抗肥胖症药物联合给予本发明胰高血糖素肽。本领域已知或正在研究的抗糖尿病药物包括:胰岛素;磺脲类,例如甲苯磺丁脲(甲糖宁(Orinase))、乙酸己脲(戴美乐(Dymelor))、甲磺氮草脲(妥拉磺脲(Tolinase))、氯磺丙脲(特泌胰(Diabinese))、格列甲嗪(glipizide)((利糖妥片(Glucotrol))、格列本脲(Glyburide)(达安宁(Diabeta)、优降糖(Micronase)、达安辽(Glynase))、格列美脲(glimepiride)(亚莫利(Amaryl))或格列齐特(gliclazide)(达美康(Diamicon));氯茴苯酸类,例如瑞格列奈(repaglinide)(Prandin)或那格列奈(nateglinide)(Starlix);双胍类,例如二甲双胍(格华止(Glucophage))或苯乙双胍;噻唑烷二酮类,例如罗格列酮(rosiglitazone)(文迪雅(Avandia))、匹格列酮(pioglitazone)(Actos)或曲格列酮(troglitazone)(瑞如林(Rezulin))或其它PPAR γ 抑制剂;抑制碳水化合物消化的 α 葡萄糖苷酶抑制剂,例如米格列醇(miglitol)(德赛天(Glyset))、阿卡波糖(acarbose)(阿卡糖

(Precose)/拜糖平(Glucobay));艾塞那肽(exenatide)(百泌达(Byetta))或普兰林肽(pramlintide);二肽基肽酶-4(DPP-4)抑制剂,例如维格列汀(vildagliptin)或西格列汀(sitagliptin);SGLT(钠-依赖的葡萄糖转运蛋白1)抑制剂;葡糖酶激活剂(GKA);胰高血糖素受体拮抗剂(GRA);或FBP酶(果糖1,6-二磷酸酶)抑制剂。

[0362] 本领域已知或正在研究的抗肥胖症药物包括:食欲抑制剂,包括苯乙胺型刺激剂、苯丁胺(任选用氟苯丙胺或右旋氟苯丙胺)、二乙胺苯丙酮(Tenuate®)、苯二甲吗啉(Prelu-2®、Bontril®)、苄非他明(benzphetamine)(Didrex®)、西布曲明(sibutramine)(Meridia®、Reductil®);利莫那班(rimonabant)(Acomplia®)、其它大麻受体拮抗剂;泌酸调节肽;盐酸氟西汀(floxetine hydrochloride)(Prozac);Qnexa(托吡酯(topiramate)和苯丁胺)、Excalia(安非拉酮(bupropion)和唑尼沙胺(zonisamide))或Contrave(安非拉酮和纳曲酮(naltrexone));或脂肪酶抑制剂,类似于赛尼可(XENICAL)(奥里斯特(Orlistat))或赛利司他(Cetilistat)(亦称为ATL-962)或GT 389-255。

[0363] 本发明一方面涉及本文公开的胰高血糖素激动剂的预制水溶液用于治疗低血糖症。本文所述激动剂组合物改进的稳定性和溶解性使得可制备胰高血糖素预制水溶液用于快速给予并治疗低血糖症。在一个实施方案中,提供包含聚乙二醇化胰高血糖素激动剂的溶液,用于给予罹患低血糖症的患者,其中连接到聚乙二醇化胰高血糖素激动剂的PEG链的总分子量为约500-约5,000道尔顿。在一个实施方案中,聚乙二醇化胰高血糖素激动剂包含选自以下的肽:SEQ ID NO:23、SEQ ID NO:24和SEQ ID NO:25和胰高血糖素激动剂类似物SEQ ID NO:23、SEQ ID NO:24和SEQ ID NO:25或包含序列SEQ ID NO:20的胰高血糖素的聚乙二醇化内酰胺衍生物,其中所述胰高血糖素肽氨基酸残基的侧链与聚乙二醇链共价键合。

[0364] 包括但不限于治疗低血糖症的本发明治疗方法,可包括用任何标准给药途径将本文公开的胰高血糖素激动剂给予患者的步骤,所述标准给药途径包括胃肠外(例如静脉内、腹膜内、皮下或肌肉内)、鞘内、经皮、直肠、经口、经鼻或通过吸入。在一个实施方案中,皮下或肌肉内给予组合物。在一个实施方案中,胃肠外给予组合物,并将胰高血糖素组合物预包装在注射器中。在另一实施方案中,将所述组合物预包装在吸入器或其它气雾药物递送装置中。

[0365] 申请人意想不到地发现可制备保留母体肽的生物活性和特异性的聚乙二醇化胰高血糖素肽。然而,增加PEG链长度或将多个PEG链与所述肽连接(因此连接的PEG总分子量大于5,000道尔顿),起初延迟修饰的胰高血糖素的作用时间。根据一个实施方案,提供包含序列SEQ ID NO:20的胰高血糖素肽SEQ ID NO:23、SEQ ID NO:24和SEQ ID NO:25或其胰高血糖素激动剂类似物或胰高血糖素的聚乙二醇化内酰胺衍生物,其中所述肽包含一种或多种聚乙二醇链,其中所连接的PEG总分子量大于5,000道尔顿,在一个实施方案中,大于10,000道尔顿但小于40,000道尔顿。所述修饰的胰高血糖素肽具有延迟或延长时间的活性但不损失生物活性。因此,可给予所述化合物以延长给予的胰高血糖素肽的作用。

[0366] 可将经修饰与具有大于10,000道尔顿的分子量的PEG链共价键合的胰高血糖素肽与胰岛素联合给予,以缓冲胰岛素的作用并帮助维持糖尿病患者的稳定血糖水平。可将本发明经修饰的胰高血糖素肽与胰岛素作为单一组合物共同给予或作为分开的溶液同时给

予,或作为备选可在彼此相隔不同的时间给予胰岛素和经修饰的胰高血糖素肽。在一个实施方案中,在彼此相隔12小时内给予包含胰岛素的组合物和包含经修饰的胰高血糖素肽的组合物。经修饰的胰高血糖素肽相对于给予的胰岛素的确切比率,部分地视对患者的胰高血糖素水平测定而定,其可通过常规实验方法测定。

[0367] 根据一个实施方案,提供包含胰岛素和选自以下的经修饰的胰高血糖素肽的组合物:SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5和其胰高血糖素激动剂类似物,其中所述经修饰的胰高血糖素肽进一步包含与17、21、24或21和24位氨基酸侧链共价键合的聚乙二醇链。在一个实施方案中,组合物为包含胰岛素和胰高血糖素类似物的水溶液。在其中胰高血糖素肽包含序列SEQ ID NO:24或SEQ ID NO:25的实施方案中,PEG链在胰高血糖素肽的21或24位共价键合。在一个实施方案中,聚乙二醇链具有约10,000-约40,000的分子量。

[0368] 根据一个实施方案,将本文公开的经修饰的胰高血糖素肽用于诱导肠道临时麻痹。该方法用于放射学目的,其包括给予有效量的药物组合物的步骤,所述药物组合物包含聚乙二醇化的胰高血糖素肽、包含c-末端延伸的胰高血糖素肽或所述肽的二聚体。在一个实施方案中,胰高血糖素肽包含选自以下的序列:SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:13 SEQ ID NO:14和SEQ ID NO:15。在一个实施方案中,胰高血糖素肽进一步包含与21或24位氨基酸残基共价键合的约1,000-40,000道尔顿的PEG链。在一个实施方案中,胰高血糖素肽选自SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:14和SEQ ID NO:15。在一个实施方案中,PEG链具有约500-约5,000道尔顿的分子量。

[0369] 在另一实施方案中,用于诱导肠道临时麻痹的组合物包含第一经修饰的胰高血糖素肽和第二经修饰的胰高血糖素肽。第一经修饰的肽包含选自SEQ ID NO:23、SEQ ID NO:24和SEQ ID NO:25的序列,其任选与约500-约5,000道尔顿的PEG链连接,第二肽包含选自SEQ ID NO:23、SEQ ID NO:24和SEQ ID NO:25的序列,其与约10,000-约40,000道尔顿的PEG链共价连接。在该实施方案中,每一肽的PEG链与各肽的17、21或24位任一位置的氨基酸残基共价键合并彼此独立。

[0370] 业已报道当将在小肠中发现的天然存在的消化性激素泌酸调节肽给予大鼠或人时,引起减重(参见Diabetes 2005;54:2390-2395)。泌酸调节肽为37个氨基酸的肽,其含有胰高血糖素(即SEQ ID NO:1)的29个氨基酸序列,接着是8个氨基酸羧基末端延伸SEQ ID NO:27(KRNRNNIA)。因此,申请人相信可通过用本文公开的经修饰的胰高血糖素肽取代泌酸调节肽的胰高血糖素肽部分,来保留泌酸调节肽的生物活性(即抑制食欲和诱导减重/保持重量),同时改进该化合物的溶解性和稳定性并改进药代动力学。另外,申请人亦相信,包含本发明胰高血糖素肽的除去泌酸调节肽的末端四个氨基酸的截短的泌酸调节肽分子,在抑制食欲和诱导减重/保持重量中亦有效。

[0371] 因此,本发明亦包含具有羧基末端延伸SEQ ID NO:27(KRNRNNIA)或SEQ ID NO:28的本发明经修饰的胰高血糖素肽。可将这些化合物给予个体以诱导减重或防止增重。根据一个实施方案,将进一步包含与胰高血糖素肽的29位氨基酸连接的氨基酸序列SEQ ID NO:27(KRNRNNIA)或SEQ ID NO:28的胰高血糖素激动剂类似物SEQ ID NO:33或SEQ ID NO:20

给予个体,以诱导减重或防止增重。更具体地,所述胰高血糖素肽包含选自以下的序列:SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:13 SEQ ID NO:14和SEQ ID NO:15,所述序列进一步包含与所述胰高血糖素肽的29位氨基酸连接的氨基酸序列SEQ ID NO:27(KRNRNIA)或SEQ ID NO:28。

[0372] 毒蜥外泌肽-4是由39个氨基酸组成的肽。其是称为GLP-1的受体的有效刺激剂。亦报道该肽抑制食欲并诱导减重。申请人发现当在胰高血糖素的羧基末端添加毒蜥外泌肽-4的末端序列时,改进胰高血糖素的溶解性和稳定性而不损害胰高血糖素的生物活性。在一个实施方案中,让毒蜥外泌肽-4的末端10个氨基酸(即序列SEQ ID NO:26(GPSSGAPPPS))与本发明的胰高血糖素肽羧基末端连接。预期这些融合蛋白具有用于抑制食欲和诱导减重/维持体重的药理活性。根据一个实施方案,将进一步包含与胰高血糖素肽的29位氨基酸连接的氨基酸序列SEQ ID NO:26(GPSSGAPPPS)或SEQ ID NO:29的胰高血糖素激动剂类似物SEQ ID NO:33或SEQ ID NO:20给予个体,以诱导减重或防止增重。更具体地,所述胰高血糖素肽包含选自以下的序列:SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:13SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:17、SEQ ID NO:18、SEQ ID NO:66、SEQ ID NO:67、SEQ ID NO:68、SEQ ID NO:69、SEQ ID NO:55和SEQ ID NO:56,所述序列进一步包含与所述胰高血糖素肽的29位氨基酸连接的氨基酸序列SEQ ID NO:26(GPSSGAPPPS)或SEQ ID NO:29。在一个实施方案中,给予的胰高血糖素肽类似物包含序列SEQ ID NO:64。

[0373] 多聚体

[0374] 本发明亦包含本文公开的经修饰胰高血糖素肽的多聚体。用标准连接剂和本领域技术人员所知的方法,可将两种或更多种经修饰的胰高血糖素肽连接在一起。例如,通过用双官能硫醇交联剂和双官能胺交联剂,可在两种经修饰的胰高血糖素肽之间形成二聚体,尤其是对于被半胱氨酸、赖氨酸、鸟氨酸、高半胱氨酸或乙酰基苯丙氨酸残基取代的胰高血糖素肽(例如SEQ ID NO:3和SEQ ID NO:4)。二聚体可为同二聚体,或作为备选可为异二聚体。在某些实施方案中,连接两个(或更多个)胰高血糖素肽的接头为PEG,例如5kDa PEG、20kDaPEG。在某些实施方案中,接头为二硫键。例如,二聚体的每一单体可包含Cys残基(例如末端或内部位置的Cys),每一Cys残基的硫原子参与二硫键的形成。在本发明某些方面,经由末端氨基酸(例如N-末端或C-末端)、经由内部氨基酸或经由至少一个单体的末端氨基酸和至少一个另外单体的内部氨基酸连接单体。在特定方面,经由N-末端氨基酸连接单体。在某些方面,多聚体的单体以“尾-对-尾”方向连接在一起,其中每一单体的C-末端氨基酸连接在一起。

[0375] 在一个实施方案中,二聚体包含胰高血糖素融合肽的同型二聚体,其中所述胰高血糖素肽部分包含SEQ ID NO:11或SEQ ID NO:20和与胰高血糖素肽的29位氨基酸连接的氨基酸序列SEQ ID NO:26(GPS SGAPPPS)、SEQ ID NO:27(KRNRNIA)或SEQ ID NO:28(KRNR)。在另一实施方案中,二聚体包含胰高血糖素激动剂类似物SEQ ID NO:11的同二聚体,其中胰高血糖素肽进一步包含与胰高血糖素肽的21或24位共价键合的聚乙二醇链。

[0376] 根据一个实施方案,提供包含经由接头与第二胰高血糖素肽键合的第一胰高血糖素肽的二聚体,其中所述第一胰高血糖素肽包含选自SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10和SEQ ID NO:11的肽,所述第二胰高血糖素肽包含SEQ ID NO:20。按照另一实施方案,提供包含经由接头与第二胰高血糖素肽键合的第一胰高血糖素肽的二聚体,其中所述

第一胰高血糖素肽包含选自以下的序列:SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11,所述第二胰高血糖素肽包含SEQ ID NO:11和所述胰高血糖素多肽的可药用盐。按照另一实施方案,提供包含经由接头与第二胰高血糖素肽键合的第一胰高血糖素肽的二聚体,其中所述第一胰高血糖素肽选自SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:13SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:17和SEQ ID NO:18,所述第二胰高血糖素肽独立选自SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:13SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:17和SEQ ID NO:18和所述胰高血糖素多肽的可药用盐。在一个实施方案中,所述第一胰高血糖素肽选自SEQ ID NO:20,所述第二胰高血糖素肽独立选自SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9和SEQ ID NO:11。在一个实施方案中,二聚体在两个肽之间形成,其中每一肽包含氨基酸序列SEQ ID NO:11。

[0377] 药盒

[0378] 根据一个实施方案,可作为药盒的部分提供本发明经修饰的胰高血糖素肽。在一个实施方案中,提供用于将胰高血糖素激动剂给予需要的患者的药盒,其中所述药盒包括选自以下的经修饰的胰高血糖素肽:1)包含序列SEQ ID NO:20、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10或SEQ ID NO:11的胰高血糖素肽;2)胰高血糖素融合肽,其包含胰高血糖素激动剂类似物SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:20或SEQ ID NO:55和与所述胰高血糖素肽的29位氨基酸连接的氨基酸序列SEQ ID NO:26(GPSSGAPPPS)、SEQ ID NO:27(KRNRNIA)或SEQ ID NO:28(KRNR);和3)聚乙二醇化的胰高血糖素肽SEQ ID NO:11或SEQ ID NO:51,其进一步包含与所述胰高血糖素肽的29位氨基酸连接的氨基酸序列SEQ ID NO:26(GPSSGAPPPS)、SEQ ID NO:27(KRNRNIA)或SEQ ID NO:28(KRNR),其中与17、21或24位共价键合的PEG链具有约500-约40,000道尔顿的分子量。在一个实施方案中,所述药盒包括胰高血糖素/GLP-1共激动剂,其中所述肽包含选自以下的序列:SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:13SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:17和SEQ ID NO:18。

[0379] 在一个实施方案中,提供含将胰高血糖素组合物给予患者的器具的药盒,所述器具例如注射器针头、注射笔、喷射注射器或其它无针头注射器。作为备选或另外地,药盒可包括一种或多种容器,例如小瓶、试管、瓶子、单室或多室预充式注射器、药筒、输液泵(外置式或植入式)、喷射注射器、预充式注射笔等,任选含有呈冻干形式或处于水溶液中的胰高血糖素肽。优选药盒亦包括使用说明。根据一个实施方案,药盒器具为气雾剂分配器,其中将组合物预包装在气雾剂装置中。在另一实施方案中,药盒包含注射器和针头,在一个实施方案中,将无菌胰高血糖素组合物预包装在注射器中。

[0380] 药物制剂

[0381] 根据一个实施方案,提供药物组合物,其中所述组合物包含本发明胰高血糖素肽或其可药用盐和可药用载体。药物组合物可包含任何可药用成分,包括例如:酸化剂、添加剂、吸附剂、气雾推进剂、空气清新剂、碱化剂、抗结块剂、抗凝剂、抗微生物防腐剂、抗氧化剂、消毒剂、基料、粘合剂、缓冲剂、螯合剂、涂层剂(coating agent)、着色剂、干燥剂、去污剂、稀释剂、消毒剂、分解剂、分散剂、增溶剂、染料、润肤剂、乳化剂、乳液稳定剂、填充剂、薄膜形成剂、鲜味剂、矫味剂、助流剂、胶凝剂、粒化剂、保湿剂、润滑剂、粘膜粘着剂、软膏基料、软膏、油性溶媒、有机碱、锭剂基料、色素、增塑剂、抛光剂、防腐剂、掩蔽剂、皮肤渗透剂、

增溶剂、溶剂、稳定剂、栓剂基料、表面活性剂、去污剂、悬浮剂、甜味剂、治疗剂、增稠剂、张度剂、毒性剂、增粘剂、吸水剂、与水混溶助溶剂、水软化剂或湿润剂。

[0382] 在某些实施方案中,药物组合物包含任何以下组分中的一种或组合:阿拉伯树胶、乙酰氨基磺酸钾、乙酰柠檬酸三丁酯、乙酰柠檬酸三乙酯、琼脂、白蛋白、醇、无水醇、工业酒精、稀释酒精、油桐酸、藻酸、脂肪族聚酯、氧化铝、氢氧化铝、硬脂酸铝、支链淀粉、 α -直链淀粉、抗坏血酸、抗坏血酸棕榈酸酯、天冬氨酰苯甲氨酸甲酯、注射用抑菌水、膨润土、膨润土岩浆、苯扎氯铵、苄索氯铵、苯甲酸、苯甲醇、苯甲酸苄酯、溴硝醇、丁基羟基茴香醚、丁羟甲苯、对羟基苯甲酸丁酯、丁基对羟基苯甲酸钠、藻酸钙、抗坏血酸钙、碳酸钙、环己基氨基磺酸钙、无水磷酸氢钙、脱水磷酸氢钙、磷酸三钙、丙酸钙、硅酸钙、山梨酸钙、硬脂酸钙、硫酸钙、硫酸钙半水合物、芥花籽油、卡波姆(carbomer)、二氧化碳、羧甲基纤维素钙、羧甲基纤维素钠、 β -胡萝卜素、角叉胶、蓖麻油、氢化蓖麻油、阳离子乳化钠、乙酸纤维素、乙酸邻苯二甲酸纤维素、乙基纤维素、微晶纤维素、粉状纤维素、硅化微晶纤维素、羧甲基纤维素钠、鲸脂醇、溴化十六烷基三甲铵、鲸蜡醇、氯己定、氯丁醇、氯甲酚、胆固醇、乙酸氯己定、葡萄糖酸氯己定、盐酸氯己定、氟利昂(HCFC)、一氯二氟甲烷、含氯氟烃(CFC)、氯苯氧基乙醇、氯二甲苯酚、淀粉糖浆干粉、无水柠檬酸、柠檬酸一水合物、可可油、着色剂、玉米油、棉籽油、甲酚、间甲酚、邻甲酚、对甲酚、交联甲羧纤维素钠、交联聚乙烯吡咯烷酮、环拉酸、环糊精、葡萄糖结合剂、糊精、右旋糖、无水右旋糖、双咪唑烷基脲、邻苯二甲酸二丁酯、癸二酸二丁酯、二乙醇胺、邻苯二甲酸二乙酯、二氟乙烷(HFC)、二甲基- β -环糊精、环糊精型化合物例如 Captisol[®]、二甲基醚、邻苯二甲酸二甲酯、依地酸二钾、依地酸二钠、磷酸氢二钠、多库酯钙、多库酯钾、多库酯钠、没食子酸十二酯、十二烷基三甲基溴化铵、依地酸钙二钠、乙二胺四乙酸、乙葡胺、乙醇、乙基纤维素、没食子酸乙酯、月桂酸乙酯、乙基麦芽酚、油酸乙酯、对羟基苯甲酸乙酯、对羟基苯甲酸钾、乙基对羟基苯甲酸钠、乙基香兰素、果糖、液体果糖、磨碎的果糖、无热原果糖、粉状果糖、富马酸、白明胶、葡萄糖、液体葡萄糖、饱和植物脂肪酸的甘油酯混合物、甘油、山嵛酸甘油酯、单油酸甘油酯、单硬脂酸甘油酯、自乳化单硬脂酸甘油酯、硬脂酸棕榈酸甘油酯、甘氨酸、乙二醇、四乙二醇醚、瓜尔胶、七氟丙烷(HFC)、十六基三甲基溴化铵、高果糖糖浆、人血清白蛋白、烃(HC)、烯盐酸、II型氢化植物油、羟基乙基纤维素、2-羟基乙基- β -环糊精、羟基丙基纤维素、低取代羟基丙基纤维素、2-羟基丙基- β -环糊精、羟丙基甲基纤维素、羟丙基甲基纤维素邻苯二甲酸酯、咪脲、靛蓝、离子交换剂、氧化铁、异丙醇、豆蔻酸异丙酯、棕榈酸异丙酯、等渗盐水、高岭土、乳酸、乳糖醇、乳糖、羊毛脂、羊毛脂醇、无水羊毛脂、卵磷脂、硅酸镁铝、碳酸镁、正常碳酸镁、无水碳酸镁、碱式碳酸镁、氢氧化镁、月桂基硫酸镁、氧化镁、硅酸镁、硬脂酸镁、三硅酸镁、无水三硅酸镁、苹果酸、麦芽、麦芽糖醇、麦芽糖醇溶液、麦芽糊精、麦芽酚、麦芽糖、甘露醇、中链甘油三酯、甲葡胺、薄荷醇、甲基纤维素、甲基丙烯酸甲酯、油酸甲酯、对羟基苯甲酸甲酯、甲基对羟基苯甲酸钾、甲基对羟基苯甲酸钠、微晶纤维素和羧甲基纤维素钠、矿物油、轻矿物油、矿物油和羊毛脂醇、油、橄榄油、单乙醇胺、蒙脱石、没食子酸辛酯、油酸、棕榈酸、石蜡、花生油、矿脂、矿脂和羊毛脂醇、药用釉料、苯酚、液化苯酚、苯氧乙醇、苯氧丙醇、苯基乙醇、乙酸苯汞、硼酸苯汞、硝酸苯汞、波拉克林(polacrillin)、波拉克林钾、泊洛沙姆(poloxamer)、聚右旋糖、聚乙二醇、聚环氧乙烷、聚丙烯酸酯、聚乙烯-聚氧丙烯-嵌段聚合物、聚甲基丙烯酸、聚氧乙烯烷基醚、聚氧乙烯蓖麻油衍生物、聚氧乙烯山梨醇脂肪酸酯、硬脂酸聚氧乙烯酯、聚乙烯

醇、聚乙烯吡咯烷酮、藻酸钾、苯甲酸钾、碳酸氢钾、硫酸氢钾、氯化钾、柠檬酸钾、无水柠檬酸钾、磷酸氢钾、偏亚硫酸氢钾、磷酸二氢钾、丙酸钾、山梨酸钾、聚乙烯吡咯烷酮、丙醇、丙酸、碳酸丙烯、丙二醇、丙二醇藻酸、没食子酸丙酯、对羟甲基苯甲酸丙酯、丙基对羟甲基苯甲酸钾、丙基对羟甲基苯甲酸钠、硫酸精蛋白、油菜籽油、Ringer氏溶液、糖精、糖精铵、糖精钙、糖精钠、红花油、皂石、血清蛋白质、芝麻油、硅胶、二氧化硅胶、藻酸钠、抗坏血酸钠、苯甲酸钠、碳酸氢钠、硫酸氢钠、氯化钠、无水柠檬酸钠、脱水柠檬酸钠、氯化钠、甜精钠、依地酸钠、十二烷基硫酸钠、月桂基硫酸钠、偏亚硫酸氢钠、磷酸氢二钠、磷酸二氢钠、磷酸三钠、无水丙酸钠、丙酸钠、山梨酸钠、淀粉乙醇酸钠、硬脂酰醇富马酸钠、亚硫酸钠、山梨酸、山梨坦酯(山梨坦脂肪酯)、山梨醇、山梨醇溶液70%、大豆油、鲸蜡、淀粉、玉米淀粉、土豆淀粉、预胶化淀粉、灭菌玉米淀粉、硬脂酸、纯化的硬脂酸、硬脂醇、蔗糖、糖、可压缩糖、糖粉、糖球、转化糖、蔗糖-转化糖聚合物、晚霞黄FCF、合成石蜡、滑石、酒石酸、酒石黄、四氟乙烷(HFC)、梧桐油、硫汞撒、二氧化钛、 α -生育酚、乙酸生育酚、琥珀酸 α -生育酚、 β -生育酚、 δ -生育酚、 γ -生育酚、西黄耆胶、醋精、柠檬酸三丁酯、三乙醇胺、柠檬酸三乙酯、三甲基- β -环糊精、三甲基十四烷基溴化铵、tris缓冲液、依地酸三钠、香兰素、I型氢化植物油、水、软水、硬水、无二氧化碳水、无热原水、注射用水、吸入用无菌水、无菌注射用水、冲洗用无菌水、蜡、阴离子乳化钠、巴西棕榈蜡、阳离子乳化钠、鲸酯蜡、微晶蜡、非离子乳化钠、栓剂蜡、白蜡、黄蜡、白矿脂、羊毛脂、黄原胶、木糖醇、玉米蛋白、丙酸锌、锌盐、硬脂酸锌或Handbook of Pharmaceutical Excipients第三版,A.H.Kibbe(Pharmaceutical Press,London,UK,2000)中的任何赋形剂,该书以其整体在此引作参考。Remington's Pharmaceutical Sciences第16版,E.W.Martin(Mack Publishing Co.,Easton,Pa.,1980)(以其整体在此引作参考)揭示了在调配可药用组合物中所用的各种组分及制备可药用组合物的已知技术。除了与药物组合物不相容的常规作用剂外,至于其余的任何常规作用剂在药物组合物中涵盖其用途。亦可将补充性的活性成分纳入所述组合物中。

[0383] 可将本文公开的药物制剂设计为短效、快速释放、长效或持续释放,其如下所述。药物制剂亦可调配为用于即释、控释或用于慢释。本发明组合物可进一步包含例如胶囊或脂质体或某些其它微囊形式,或可以以延释形式给予来提供延长储存时间和/或给予效果。所公开的药物制剂可按照任何给药方案来给予,所述给药方案包括例如每日给药(每天1次、每天2次、每天3次、每天4次、每天5次、每天6次)、每两天一次、每三天一次、每四天一次、每五天一次、每六天一次、每周一次、每两周一次、每三周一次、每月一次或每两月一次给药。

[0384] 在某些实施方案中,前述组分可以以任何浓度存在于药物组合物中,例如至少A,其中A为0.0001%w/v、0.001%w/v、0.01%w/v、0.1%w/v、1%w/v、2%w/v、5%w/v、10%w/v、20%w/v、30%w/v、40%w/v、50%w/v、60%w/v、70%w/v、80%w/v或90%w/v。在某些实施方案中,前述组分可以任何浓度存在于药物组合物中,例如至多B,其中B为90%w/v、80%w/v、70%w/v、60%w/v、50%w/v、40%w/v、30%w/v、20%w/v、10%w/v、5%w/v、2%w/v、1%w/v、0.1%w/v、0.001%w/v或0.0001%。在其它实施方案中,前述组分可以以任何浓度范围存在于药物组合物中,例如从约A到约B。在某些实施方案中,A为0.0001%,而B为90%。

[0385] 可调配药物组合物以获得生理上相容的pH。在某些实施方案中,药物组合物的pH可为至少5、至少5.5、至少6、至少6.5、至少7、至少7.5、至少8、至少8.5、至少9、至少9.5、至

少10或至少10.5,至多包括pH 11,这视制剂和给药途径而定。在某些实施方案中,药物组合可包含缓冲剂以获得生理相容的pH。缓冲剂可包括能够在所需pH处缓冲的任何化合物,例如磷酸盐缓冲液(例如PBS)、三乙醇胺、Tris、N,N-二羟乙基甘氨酸、TAPS、曲辛、HEPES、TES、MOPS、PIPES、甲次砷酸盐、MES和其它缓冲剂。在某些实施方案中,缓冲液浓度为至少0.5mM、至少1mM、至少5mM、至少10mM、至少20mM、至少30mM、至少40mM、至少50mM、至少60mM、至少70mM、至少80mM、至少90mM、至少100mM、至少120mM、至少150mM或至少200mM。在某些实施方案中,缓冲液浓度不大于300mM(例如至多200mM、至多100mM、至多90mM、至多80mM、至多70mM、至多60mM、至多50mM、至多40mM、至多30mM、至多20mM、至多10mM、至多5mM、至多1mM)。

[0386] 3位修饰

[0387] 可修饰本文所述任何胰高血糖素肽(包括胰高血糖素类似物、胰高血糖素激动剂类似物、胰高血糖素共激动剂和胰高血糖素/GLP-1共激动剂分子),以含有3位修饰(例如Gln被Glu取代)、以产生具有高选择性的肽(例如与对胰高血糖素受体选择性比较具有对GLP-1受体10倍的选择性)。

[0388] 可修饰本文所述任何胰高血糖素肽(包括胰高血糖素类似物、胰高血糖素激动剂类似物、胰高血糖素共激动剂和胰高血糖素/GLP-1共激动剂分子),以含有3位修饰,例如Gln被谷氨酰胺类似物(例如Dab(Ac))取代而基本上不损失针对胰高血糖素受体的活性,在某些情况下且具有提高的胰高血糖素受体活性。

[0389] 制备方法

[0390] 可通过标准合成方法、重组DNA技术或制备肽和融合蛋白的任何其它方法来制备本发明化合物。尽管某些非天然氨基酸不能由标准重组DNA技术表达,但其制备技术为本领域已知。除了用合适的标准肽化学反应之外,还可通过标准有机化学反应合成包含非肽部分的本发明化合物。

[0391] 本发明包括以下实施方案:

[0392] 1.包含氨基酸序列SEQ ID NO:1的胰高血糖素肽,所述胰高血糖素肽具有至多10个氨基酸修饰并包含用C4-C30脂肪酸酰化或烷化的10位氨基酸。

[0393] 2.实施方案1的胰高血糖素肽,其中:(i)所述胰高血糖素肽包含i位氨基酸和i+4位氨基酸侧链之间的分子内桥,其中i为12、16、20或24;(ii)所述胰高血糖素肽的16、20、21或24位中的一个、二个、三个或更多个位置被 α,α -二取代氨基酸取代;或(iii)(i)和(ii)两者。

[0394] 3.实施方案1或2的胰高血糖素肽,其包含16位Glu和20位Lys,其中任选内酰胺桥连接所述Glu和Lys。

[0395] 4.实施方案3的胰高血糖素肽,其进一步包含选自以下的一个或多个修饰:17位Gln、18位Ala、21位Glu、23位Ile和24位Ala。

[0396] 5.实施方案1-4中任一项的胰高血糖素肽,其包含C-末端酰胺。

[0397] 6.实施方案1-5中任一项的胰高血糖素肽,其包含在1位、2位或1和2位的氨基酸取代,其中所述氨基酸取代实现DPP-IV蛋白酶抗性。

[0398] 7.实施方案6的胰高血糖素肽,其中1位His被选自以下的氨基酸取代:D-组氨酸、 α,α -二甲基咪唑乙酸(DMIA)、N-甲基组氨酸、 α -甲基组氨酸、咪唑乙酸、去氨基组氨酸、羧基-组氨酸、乙酰基-组氨酸和高组氨酸。

[0399] 8. 实施方案6或7的胰高血糖素肽, 其中2位Ser被选自以下的氨基酸取代: D-丝氨酸、丙氨酸、D-丙氨酸、缬氨酸、甘氨酸、N-甲基丝取代氨酸、N-甲基丙氨酸和氨基异丁酸。

[0400] 9. 被修饰以包含与胰高血糖素肽10位氨基酸共价连接的酰基或烷基的非天然胰高血糖素肽。

[0401] 10. 实施方案9的胰高血糖素肽, 其中所述在10位被修饰的胰高血糖素肽包含序列SEQ ID NO:55或SEQ ID NO:55的类似物, 其中所述类似物不是天然存在的肽, 所述类似物以选自以下1、2、3、5、7、10、11、13、14、17、18、19、21、24、27、28和29位的1-3处位置的氨基酸修饰不同于SEQ ID NO:55, 并且其中所述胰高血糖素肽表现出天然GLP-1针对GLP-1受体活性的至少20%。

[0402] 11. 实施方案10的胰高血糖素肽, 其中所述被修饰的胰高血糖素肽包含SEQ ID NO:55。

[0403] 12. 实施方案10的胰高血糖素肽, 其中所述被修饰的胰高血糖素肽包含SEQ ID NO:56。

[0404] 13. 实施方案10-12中任一项的胰高血糖素肽, 其中所述胰高血糖素肽进一步包含选自以下的与所述胰高血糖素肽羧基末端连接的肽: SEQ ID NO:26、SEQ ID NO:29和SEQ ID NO:65。

[0405] 14. 实施方案11或12的胰高血糖素肽, 其中所述胰高血糖素肽进一步包含与所述胰高血糖素肽羧基末端连接的SEQ ID NO:26。

[0406] 15. 实施方案11-14中任一项的胰高血糖素肽, 其包含选自以下的两个氨基酸之间的内酰胺桥: 16和20位氨基酸、12和16位氨基酸、20和24位氨基酸及24和28位氨基酸。

[0407] 16. 实施方案15的胰高血糖素肽, 其中所述内酰胺桥在16和20位氨基酸之间。

[0408] 17. 实施方案10的胰高血糖素肽, 其中在10位被修饰的胰高血糖素肽包含SEQ ID NO:33。

[0409] 18. 实施方案10的胰高血糖素肽, 其中所述28位氨基酸为Asp、Asn或Lys, 所述29位氨基酸为Gly或Thr。

[0410] 19. 实施方案10的胰高血糖素肽, 其中在10位被修饰的胰高血糖素肽包含以1-2个氨基酸不同于SEQ ID NO:55的SEQ ID NO:55类似物。

[0411] 20. 实施方案10的胰高血糖素肽, 其中在10位被修饰的胰高血糖素肽包含以1个氨基酸不同于SEQ ID NO:55的SEQ ID NO:55类似物。

[0412] 21. 实施方案20的胰高血糖素肽, 其中在10位被修饰的胰高血糖素肽包含序列SEQ ID NO:53。

[0413] 22. 实施方案21的胰高血糖素肽, 其中3位氨基酸为谷氨酰胺。

[0414] 23. 实施方案10的胰高血糖素肽, 其中3位氨基酸为谷氨酸。

[0415] 24. 实施方案10-11中任一项的胰高血糖素肽, 其表现出天然胰高血糖素针对胰高血糖素受体活性的至少10%, 和天然GLP-1针对GLP-1受体活性的至少50%。

[0416] 25. 实施方案10-11中任一项的胰高血糖素肽, 其表现出天然胰高血糖素针对胰高血糖素受体活性的至少40%, 和天然GLP-1针对GLP-1受体活性的至少40%。

[0417] 26. 实施方案10-11中任一项的胰高血糖素肽, 其表现出天然胰高血糖素针对胰高血糖素受体活性的至少60%, 和天然GLP-1针对GLP-1受体活性的至少60%。

- [0418] 27. 实施方案10-21和23中任一项的胰高血糖素肽,其表现出天然胰高血糖素针对胰高血糖素受体活性的0.1-10%,和天然GLP-1针对GLP-1受体活性的至少20%。
- [0419] 28. 实施方案10-21和23中任一项的胰高血糖素肽,其表现出天然胰高血糖素针对胰高血糖素受体活性的1-10%,和天然GLP-1针对GLP-1受体活性的至少20%。
- [0420] 29. 实施方案10-28中任一项的胰高血糖素肽,其中16位氨基酸为谷氨酸,20位氨基酸为赖氨酸,C-末端羧酸基团被酰胺取代,任选在所述16位谷氨酸和20位赖氨酸之间具有内酰胺桥。
- [0421] 30. 实施方案29的胰高血糖素肽,其中聚乙二醇链与17、21或24位氨基酸或C-末端氨基酸的侧链共价连接。
- [0422] 31. 实施方案29的胰高血糖素肽,其中28或29位氨基酸包括酸性氨基酸。
- [0423] 32. 实施方案10、14、17、29、30和41中任一项的胰高血糖素肽,其中修饰1或2位氨基酸以使对二肽基肽酶IV裂解表现出降低的敏感性。
- [0424] 33. 实施方案10的胰高血糖素肽,其中在10位被修饰的胰高血糖素肽包含序列X₁X₂QGT FTSDY SKYLD ERX₅AK DFVX₃W LMNX₄(SEQ ID NO:61)或X₁X₂QGT FTSDY SKYLD EQX₅AK EFI X₃W LMNX₄(SEQ ID NO:62),前提为当X₃为Cys-PEG时,X₄不是Cys-PEG或GGPSSGAPPPSC-PEG,并且当X₂为丝氨酸时,X₁不是组氨酸。
- [0425] 34. 实施方案33的胰高血糖素肽,其中X₃为Cys-PEG。
- [0426] 35. 实施方案34的胰高血糖素肽,其中X₄为GGPSSGAPPPS。
- [0427] 36. 实施方案33的胰高血糖素肽,其中X₄为GGPSSGAPPPSC-PEG。
- [0428] 37. 实施方案33-36中任一项的胰高血糖素肽,其进一步包含16和20位氨基酸之间的内酰胺桥。
- [0429] 38. 实施方案10的胰高血糖素肽,其中在10位被修饰的胰高血糖素肽包含序列
- [0430] NH₂-His-Ser-Gln-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Lys-Tyr-Leu-Asp-Glu-Arg-Arg-Ala-Gln-Asp-Phe-Val-Gln-Trp-Leu-Xaa-Asn-Thr-COOH(SEQ ID NO:9),其中Xaa选自Met、Leu和Nle。
- [0431] 39. 实施方案10的胰高血糖素肽,其中在10位被修饰的胰高血糖素肽包含选自SEQ ID NO:40、SEQ ID NO:41、SEQ ID NO:42、SEQ ID NO:43和SEQ ID NO:44的序列。
- [0432] 40. 实施方案10的胰高血糖素肽,其中在10位被修饰的胰高血糖素肽包含选自SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:14和SEQ ID NO:15的序列。
- [0433] 41. 实施方案32的胰高血糖素肽,其中2位氨基酸选自D-丝氨酸、丙氨酸、D-丙氨酸、缬氨酸、甘氨酸、N-甲基丝氨酸、N-甲基丙氨酸和氨基异丁酸。
- [0434] 42. 实施方案32的胰高血糖素肽,其中1位氨基酸选自D-组氨酸、去氨基组氨酸、羟基-组氨酸、乙酰基-组氨酸、高组氨酸、N-甲基组氨酸、 α -甲基组氨酸、咪唑乙酸和 α,α -二甲基咪唑乙酸(DMIA)。
- [0435] 43. 实施方案10-32中任一项的胰高血糖素肽,其进一步包含在所述胰高血糖素肽的17、21或24位或C-末端氨基酸共价键合的亲水部分。
- [0436] 44. 实施方案43的胰高血糖素肽,其中所述亲水部分为聚乙二醇链。
- [0437] 45. 实施方案10或40的胰高血糖素肽,其中所述胰高血糖素肽 进一步包含选自SEQ ID NO:26、SEQ ID NO:27、SEQ ID NO:28和SEQ ID NO:65的序列。

[0438] 46.实施方案45的胰高血糖素肽,其中在10位被修饰的胰高血糖素肽包含序列SEQ ID NO:33,其中28位氨基酸为天冬氨酸,29位氨基酸为甘氨酸,并且氨基酸序列SEQ ID NO:29与SEQ ID NO:33的羧基末端共价连接。

[0439] 47.实施方案46的胰高血糖素肽,其中在10位被修饰的胰高血糖素肽包含序列SEQ ID NO:64。

[0440] 48.实施方案10的胰高血糖素肽,其中在10位被修饰的胰高血糖素肽包含SEQ ID NO:20,其中20位氨基酸选自精氨酸、鸟氨酸和瓜氨酸。

[0441] 49.实施方案10的胰高血糖素肽,其中在10位被修饰的胰高血糖素肽包含选自以下的序列:

[0442] SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11、

[0443] $\text{NH}_2\text{-His-Ser-Gln-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Lys-Tyr-Leu-Asp-Glu-Arg-Arg-Ala-Gln-Asp-Phe-Val-Gln-Trp-Leu-Met-Xaa-Xaa-R}$ (SEQ ID NO:66)、

[0444] $\text{NH}_2\text{-His-Ser-Gln-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Lys-Tyr-Leu-Asp-Glu-Arg-Arg-Ala-Lys-Asp-Phe-Val-Gln-Trp-Leu-Met-Xaa-Xaa-R}$ (SEQ ID NO:67)、

[0445] $\text{NH}_2\text{-His-Ser-Gln-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Lys-Tyr-Leu-Asp-Ser-Arg-Arg-Ala-Lys-Asp-Phe-Val-Glu-Trp-Leu-Met-Xaa-Xaa-R}$ (SEQ ID NO:68)、

[0446] $\text{NH}_2\text{-His-Ser-Gln-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Lys-Tyr-Leu-Asp-Ser-Arg-Arg-Ala-Gln-Asp-Phe-Val-Glu-Trp-Leu-Met-Lys-Thr-R}$ (SEQ ID NO:69)、

[0447] $\text{NH}_2\text{-His-Ser-Gln-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Lys-Tyr-Leu-Asp-Glu-Arg-Arg-Ala-Lys-Asp-Phe-Val-Glu-Trp-Leu-Met-Asn-Thr-R}$ (SEQ ID NO:16)、

[0448] $\text{NH}_2\text{-His-Ser-Gln-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Lys-Tyr-Leu-Asp-Glu-Arg-Arg-Ala-Gln-Asp-Phe-Val-Glu-Trp-Leu-Met-Lys-Thr-R}$ (SEQ ID NO:17)和

[0449] $\text{NH}_2\text{-His-Ser-Gln-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Lys-Tyr-Leu-Asp-Glu-Arg-Arg-Ala-Lys-Asp-Phe-Val-Glu-Trp-Leu-Met-Lys-Thr-R}$ (SEQ ID NO:18)和SEQ ID NO:55,

[0450] 其中所述肽的28位Xaa为天冬酰胺或天冬氨酸;所述肽的29位Xaa为苏氨酸或甘氨酸;和R为SEQ ID NO:26、SEQ ID NO:29、COOH或CONH₂。

[0451] 50.实施方案49的胰高血糖素肽,其中R为CONH₂。

[0452] 51.实施方案49的胰高血糖素肽,其中在10位被修饰的胰高血糖素肽包含序列SEQ ID NO:10。

[0453] 52.实施方案49的胰高血糖素肽,其中在10位被修饰的胰高血糖素肽包含序列SEQ ID NO:11。

[0454] 53.实施方案50的胰高血糖素肽,其中所述肽进一步包含与16、17、21或24位氨基酸残基或C-末端氨基酸共价键合的聚乙二醇链,前提为当所述肽包含SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:12或SEQ ID NO:13时,所述聚乙二醇链与17、21或24位氨基酸残基共价键合,当所述肽包含SEQ ID NO:14或SEQ ID NO:15时,所述聚乙二醇链与16、17或21位氨基酸残基共价键合,当所述肽包含SEQ ID NO:55时,所述聚乙二醇链与21或24位氨基酸共价键合,并且当所述肽包含SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:17或SEQ ID NO:18时,所述聚乙二醇链与17或21位氨基酸残基共价键合。

[0455] 54.实施方案53的胰高血糖素肽,其中所述聚乙二醇链具有选自约1,000-约5,000道尔顿范围的分子量。

[0456] 55.实施方案53的胰高血糖素肽,其中所述聚乙二醇链具有约40,000道尔顿的分子量。

[0457] 56.实施方案48的胰高血糖素肽,其中所述肽进一步包含添加到所述肽的羧基末端的另外的氨基酸,所述另外的氨基酸包含取代天然氨基酸的末端羧酸基团的酰胺基团。

[0458] 57.实施方案49的胰高血糖素肽,其进一步包含与所述胰高血糖素肽的29位氨基酸键合的延伸肽,所述延伸肽包含选自SEQ ID NO:26、SEQ ID NO:27和SEQ ID NO:28的氨基酸序列。

[0459] 58.实施方案57的胰高血糖素肽,其中28位氨基酸为天冬氨酸,29位氨基酸为甘氨酸,并且SEQ ID NO:29氨基酸序列与所述胰高血糖素肽的29位氨基酸共价连接。

[0460] 59.实施方案1的胰高血糖素肽,其中在10位被修饰的胰高血糖素肽包含以下序列或SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3和SEQ ID NO:4的胰高血糖素激动剂类似物:

[0461] $\text{NH}_2\text{-His-Ser-Gln-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Lys-Tyr-Leu-Asp-Xaa-Xaa-Arg-Ala-Gln-Asp-Phe-Val-Gln-Trp-Leu-Xaa-Asn-Thr-R}$ (SEQ ID NO:2);

[0462] $\text{NH}_2\text{-His-Ser-Gln-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Lys-Tyr-Leu-Asp-Xaa-Arg-Arg-Ala-Gln-Xaa-Phe-Val-Gln-Trp-Leu-Xaa-Asn-Thr-R}$ (SEQ ID NO:3);或

[0463] $\text{NH}_2\text{-His-Ser-Gln-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Lys-T-Leu-Asp-Xaa-Arg-Arg-Ala-Gln-Asp-Phe-Val-Xaa-Trp-Leu-Xaa-Asn-Thr-R}$ (SEQ ID NO:4);

[0464] 其中R为COOH或CONH₂,并且所述胰高血糖素肽的17、21或24位氨基酸残基或C-末端氨基酸的侧链进一步包含与所述氨基酸残基共价键合的亲水部分。

[0465] 60.实施方案59的胰高血糖素肽,其中R为CONH₂,并且所述亲水部分为聚乙二醇链。

[0466] 61.实施方案60的胰高血糖素肽,其中在10位被修饰的胰高血糖素肽包含选自SEQ ID NO:23、SEQ ID NO:24和SEQ ID NO:25的序列。

[0467] 62.实施方案61的胰高血糖素肽,其中所述聚乙二醇链具有选自约1,000-约5,000道尔顿范围的分子量。

[0468] 63.实施方案61的胰高血糖素肽,其中所述聚乙二醇链具有至少约20,000道尔顿的分子量。

[0469] 64.实施方案1的胰高血糖素肽,其中在10位被修饰的胰高血糖素肽包含选自由SEQ ID NO:70到SEQ ID NO:514和SEQ ID NO:534表示的任何序列的序列。

[0470] 65.实施方案10-64中任一项的胰高血糖素肽,其中所述胰高血糖素肽以不超过10个氨基酸修饰不同于SEQ ID NO:1。

[0471] 66.实施方案1-65中任一项的胰高血糖素肽,其中所述胰高血糖素肽的10位氨基酸为式I、式II或式III氨基酸。

[0472] 67.实施方案66的胰高血糖素肽,其中所述式I氨基酸为Lys。

[0473] 68.实施方案1-67中任一项的胰高血糖素肽,其中所述酰基为C8-C24脂肪酸。

[0474] 69.实施方案1-68中任一项的胰高血糖素肽,其进一步包含在所述胰高血糖素肽10位氨基酸和所述酰基或烷基之间的间隔物。

- [0475] 70.实施方案69的胰高血糖素肽,其中所述间隔物长度为3-10个原子。
- [0476] 71.实施方案70的胰高血糖素肽,其中所述间隔物为氨基酸或二肽。
- [0477] 72.实施方案71的胰高血糖素肽,其中所述间隔物选自以下氨基酸:Trp、Asp和Cys。
- [0478] 73.实施方案71的胰高血糖素肽,其中所述间隔物为氨基酸Glu。
- [0479] 74.实施方案71的胰高血糖素肽,其中所述间隔物为6-氨基己酸。
- [0480] 75.实施方案71的胰高血糖素肽,其中所述间隔物为选自以下的二肽:Ala-Ala、 β -Ala- β -Ala、Leu-Leu、Pro-Pro和 γ -Glu- γ -Glu。
- [0481] 76.实施方案69-75中任一项的胰高血糖素肽,其中所述间隔物和所述酰基或烷基的总长为约14-约28个原子。
- [0482] 77.实施方案76的胰高血糖素肽,其中所述酰基为C12-C18脂肪酰基。
- [0483] 78.实施方案77的胰高血糖素肽,其中所述酰基为C14或C16。
- [0484] 79.实施方案1-78中任一项的胰高血糖素肽,其中所述胰高血糖素肽包含亲水部分。
- [0485] 80.实施方案79的胰高血糖素肽,其中所述亲水部分为PEG。
- [0486] 81.实施方案1-80中任一项的胰高血糖素肽,其中所述胰高血糖素肽包含两个酰基。
- [0487] 82.以不超过10个氨基酸修饰不同于SEQ ID NO:1的非天然胰高血糖素肽,所述非天然胰高血糖素肽包含AIB在16、20、21和/或24位中的一个或多个氨基酸取代,其中所述胰高血糖素肽表现出天然GLP-1针对GLP-1受体活性的至少20%。
- [0488] 83.实施方案82的胰高血糖素肽,其包含使对二肽基肽酶IV裂解的敏感性降低的1位和/或2位氨基酸修饰。
- [0489] 84.实施方案82或83的胰高血糖素肽,其包含取代C-末端羧酸酯的酰胺。
- [0490] 85.实施方案82-84中任一项的胰高血糖素肽,其包含16位AIB。
- [0491] 86.实施方案82-85中任一项的胰高血糖素肽,其包含2位AIB。
- [0492] 87.实施方案82-86中任一项的胰高血糖素肽,其包含20位AIB。
- [0493] 88.实施方案82-87中任一项的胰高血糖素肽,其包含与胰高血糖素肽的10位氨基酸共价连接的酰基或烷基。
- [0494] 89.实施方案88的胰高血糖素肽,其中所述酰基或烷基对天然存在的氨基酸为非天然的。
- [0495] 90.实施方案88或89的胰高血糖素肽,其中胰高血糖素肽的10位氨基酸为式I、式II或式III氨基酸。
- [0496] 91.实施方案90的胰高血糖素肽,其中所述式I氨基酸为Lys。
- [0497] 92.实施方案88的胰高血糖素肽,其中所述酰基为C8-C20脂肪酸。
- [0498] 93.实施方案88-92中任一项的胰高血糖素肽,其进一步包含10位氨基酸和所述酰基或烷基之间的间隔物。
- [0499] 94.实施方案93的胰高血糖素肽,其中所述间隔物长度为3-10个原子。
- [0500] 95.实施方案94的胰高血糖素肽,其中所述间隔物为氨基酸或二肽。
- [0501] 96.实施方案95的胰高血糖素肽,其中所述间隔物为6-氨基己酸。

[0502] 97. 实施方案95的胰高血糖素肽, 其中所述间隔物为选自以下的二肽: Ala-Ala、 β -Ala- β -Ala、Leu-Leu、Pro-Pro和 γ -Glu- γ -Glu。

[0503] 98. 实施方案93-97中任一项的胰高血糖素肽, 其中所述间隔物和所述酰基的总长为约14-约28个原子。

[0504] 99. 实施方案98的胰高血糖素肽, 其中所述酰基为C12-C18脂肪酸。

[0505] 100. 实施方案99的胰高血糖素肽, 其中所述酰基为C14或C16。

[0506] 101. 实施方案82-100中任一项的胰高血糖素肽, 其包含亲水部分。

[0507] 102. 实施方案101的胰高血糖素肽, 其中所述亲水部分为聚乙二醇(PEG)。

[0508] 103. 实施方案101或102的胰高血糖素肽, 其中所述亲水部分与24位Cys连接。

[0509] 104. 前述实施方案中任一项的胰高血糖素肽, 其中当所述胰高血糖素肽包含PEG时, 所述PEG经由硫醚连接与所述胰高血糖素肽的Cys连接, 所述硫醚连接通过让所述胰高血糖素肽与卤代乙酰基-活化的PEG反应来形成。

[0510] 105. 前述实施方案中任一项的胰高血糖素肽, 其中当所述胰高血糖素肽缺乏亲水部分时, 所述胰高血糖素肽表现出天然GLP-1针对GLP-1受体活性的至少20%。

[0511] 106. 实施方案105的胰高血糖素肽, 其中当所述胰高血糖素肽缺乏亲水部分时, 所述胰高血糖素肽表现出天然胰高血糖素针对胰高血糖素受体活性的至少0.5%。

[0512] 107. 实施方案106的胰高血糖素肽, 其中当所述胰高血糖素肽缺乏亲水部分时, 所述胰高血糖素肽表现出天然胰高血糖素针对胰高血糖素受体活性的至少1%。

[0513] 108. 实施方案107的胰高血糖素肽, 其中当所述胰高血糖素肽缺乏亲水部分时, 所述胰高血糖素肽表现出天然胰高血糖素针对胰高血糖素受体活性的至少5%。

[0514] 109. 包含两个胰高血糖素肽的二聚体, 其中至少一个胰高血糖素肽为实施方案1-108中任一项的胰高血糖素肽, 它们通过接头彼此结合。

[0515] 110. 包含实施方案1-108中任一项的胰高血糖素肽、实施方案109的二聚体或其可药用盐与可药用载体的药物组合物。

[0516] 111. 用预制水性组合物治疗低血糖症的方法, 所述方法包括给予有效量的实施方案110的药物组合物的步骤。

[0517] 112. 治疗糖尿病的方法, 所述方法包括给予有效量的实施方案110的药物组合物。

[0518] 113. 引起肠道临时麻痹的方法, 所述方法包括给予有效量的实施方案110的药物组合物。

[0519] 114. 减少增重或诱导减重的方法, 所述方法包括给予有效量的实施方案110的药物组合物。

[0520] 实施例

[0521] 通用合成方案

[0522] 在改良的Applied Biosystem 430A肽合成仪上, 用HBTU-活化的“Fast Boc”单连接从0.2毫摩尔的Boc-Thr(OBzl)Pam树脂开始合成胰高血糖素类似物。Boc氨基酸和HBTU来自Midwest Biotech(Fishers, IN)。所用侧链保护基团为: Arg(Tos)、Asn(Xan)、Asp(OcHex)、Cys(pMeBzl)、His(Bom)、Lys(2Cl-Z)、Ser(OBzl)、Thr(OBzl)、Tyr(2Br-Z)和Trp(CHO)。N-末端His上的侧链保护基团是Boc。

[0523] 用含20%哌啶的二甲基甲酰胺溶液与每一个完成的肽基树脂反应, 以从色氨酸除

去甲酰基基团。在对甲酚和二甲基硫醚存在下进行液态氟化氢裂解。用HF仪器(Penninsula Labs)在冰浴中进行1小时裂解。蒸发HF后,将残留物悬浮在乙醚中,过滤固体物质。将每种肽提取到30-70ml乙酸水溶液中,由HPLC分析稀释的等份样[Beckman System Gold, 0.46x5cm Zorbax C8, 1ml/分钟, 45°C, 214nm, A缓冲液=0.1%TFA, B=0.1%TFA/90%乙腈, 梯度为经10分钟10%-80%B]。

[0524] 在FPLC上经2.2x 25cm Kromasil C18柱进行纯化,同时在214nm处监测UV,收集馏分5分钟。合并同类馏分并冻干,得到产物纯度为>95%。用MALDI-质谱分析确认准确的分子量和纯度。通用聚乙二醇化方案:(Cys-马来酰亚胺基)

[0525] 典型地,让胰高血糖素Cys类似物溶解于磷酸盐缓冲的盐水(5-10mg/ml)中,加入0.01M乙二胺四乙酸(10-15%的总体积)。加入过量(2-倍)的马来酰亚胺基甲氧基PEG试剂(Nektar),在室温下搅拌反应物,同时用HPLC监测反应进程。8-24小时后,使反应混合物酸化,并将其装载到制备性反相柱上,用0.1%TFA/乙腈梯度进行纯化。合并合适的馏分并冻干,得到所期需的聚乙二醇化类似物。

[0526] 实施例1

[0527] 合成胰高血糖素Cys¹⁷(1-29)和类似的单Cys类似物

[0528] 60ml反应瓶中有0.2毫摩尔Boc Thr(Obzl)Pam树脂(SynChem Inc),加入以下序列并让其在使用FastBoc HBTU-活化的单连接的改良Applied Biosystems 430A肽合成仪上流过。

[0529] HSQGTFTSDYSKYLDSCRAQDFVQWLMNT(SEQ ID NO:35)

[0530] 使用以下侧链保护基:Arg(Tos)、Asp(OcHex)、Asn(Xan)、Cys(pMeBzl)、Glu(OcHex)、His(Boc)、Lys(2Cl-Z)、Ser(Bzl)、Thr(Bzl)、Trp(CHO)和Tyr(Br-Z)。用20%哌啶/二甲基甲酰胺与完成的肽基树脂反应,以除去Trp的甲酰基保护,然后转移到HF反应瓶中,在真空干燥。加入1.0ml对甲酚和0.5ml二甲基硫醚连同磁力搅拌棒。将反应瓶连接到HF仪器(Penninsula Labs),在干冰/甲醇浴中冷却,蒸发,浓缩为大约10ml的液态氟化氢。在冰浴中将反应物搅拌1小时,然后真空除去HF。让残留物悬浮在乙基醚中;过滤固体,用醚洗涤,将肽提取到50ml乙酸水溶液中。让裂解提取物小样进行分析性HPLC[0.46x 5cm Zorbax C8, 1ml/分钟, 45°C, 214nm, 0.1%TFA的A缓冲液, 0.1%TFA/90%ACN的B缓冲液, 梯度=经10分钟10%B-80%B]。将其余的提取物装载到2.2x 25cm Kromasil C18制备性反相柱上,用Pharmacia FPLC系统进行乙腈梯度。收集5分钟馏分,同时在214nm处监测UV(2.0A)。A=0.1%TFA, B=0.1%TFA/50%乙腈。梯度=经450分钟30%B-100%B。

[0531] 合并含有最纯产物(48-52)的馏分,冷冻并冻干,得到30.1mg。产物的HPLC分析证明纯度>90%,MALDI质谱分析证明所期需的3429.7的质量。类似地制备胰高血糖素Cys²¹、胰高血糖素Cys²⁴和胰高血糖素Cys²⁹。

[0532] 实施例2

[0533] 合成胰高血糖素-Cex和其它C-末端延伸的类似物

[0534] 将285mg(0.2毫摩尔)甲氧基二苯甲胺树脂(Midwest Biotech)置于60ml反应瓶中,让以下序列进入并让其在使用FastBoc HBTU-活化的单连接的改良Applied Biosystems 430A肽合成仪上流过。

[0535] HSQGTFTSDYSKYLDSRRAQDFVQWLMNTGPSSGAPPPS(SEQ ID NO:36)

[0536] 使用以下侧链保护基:Arg(Tos)、Asp(OcHex)、Asn(Xan)、Cys(pMeBzl)、Glu(OcHex)、His(Boc)、Lys(2Cl-Z)、Ser(Bzl)、Thr(Bzl)、Trp(CHO)和Tyr(Br-Z)。用20%哌啶/二甲基甲酰胺与完成的肽基树脂反应,以除去Trp的甲酰基保护,然后转移到HF反应瓶中,真空干燥。加入1.0ml对甲酚和0.5ml二甲基硫醚连同磁力搅拌棒。将反应瓶连接到HF仪器(Penninsula Labs),在干冰/甲醇浴中冷却,蒸发,浓缩为大约10ml的液态氟化氢。在冰浴中将反应物搅拌1小时,然后真空除去HF。让残留物悬浮在乙基醚中;过滤固体,用醚洗涤,将肽提取到50ml乙酸水溶液中。让裂解提取物等份样进行分析性HPLC[0.46x 5cm Zorbax C8,1ml/分钟,45C,214nm,0.1%TFA的A缓冲液,0.1%TFA/90%ACN的B缓冲液,梯度=经10分钟10%B-80%B]。将提取物装载到2.2x 25cm Kromasil C18制备性反相柱上,用Pharmacia FPLC系统进行乙腈梯度洗脱。收集5分钟馏分,同时在214nm处监测UV(2.0A)。A=0.1%TFA,B=0.1%TFA/50%乙腈。梯度=经450分钟30%B-100%B。合并58-65馏分,冷冻并冻干,得到198.1mg。

[0537] 产物的HPLC分析证明纯度大于95%,MALDI质谱分析证明所期需的4316.7的理论质量,产物含C-末端酰胺。从合适装载的PAM-树脂开始,类似地制备含C-末端羧酸的泌酸调节肽和泌酸调节肽-KRNR。

[0538] 实施例3

[0539] 胰高血糖素Cys¹⁷Mal-PEG-5K

[0540] 让15.1mg胰高血糖素Cys¹⁷(1-29)和27.3mg平均分子量5000的甲氧基聚(乙烯乙二醇)马来酰亚胺(mPEG-Mal-5000,Nektar Therapeutics)溶解于3.5ml磷酸盐缓冲盐水(PBS)中,加入0.5ml 0.01M乙二胺四乙酸(EDTA)。在室温搅拌反应物,由HPLC分析监测反应进展[0.46x 5cm Zorbax C8,1ml/分钟,45C,214nm(0.5A),A=0.1%TFA,B=0.1%TFA/90%ACN,梯度=经10分钟10%B-80%B]。

[0541] 5小时后将反应混合物装载到2.2x 25cm Kromasil C18制备性反相柱上。在Pharmacia FPLC上实施乙腈梯度,同时在波长214nm处监测UV,收集5分钟馏分。A=0.1%TFA,B=0.1%TFA/50%乙腈,梯度=经450分钟30%B-100%B。合并对应产物的馏分,冷冻并冻干,得到25.9mg。

[0542] 在HPLC上分析该产物[0.46x 5cm Zorbax C8,1ml/分钟,45C,214nm(0.5A),A=0.1%TFA,B=0.1%TFA/90%ACN,梯度=经10分钟10%B-80%B],显示纯度大约90%。MALDI(基料辅助激光解吸电离)质谱分析显示8700-9500的广泛质量范围(PEG衍生物特有的)。这表明在起始胰高血糖素肽(3429)上加上了大约5,000原子质量单位的质量。

[0543] 实施例4

[0544] 胰高血糖素Cys²¹Mal-PEG-5K

[0545] 让21.6mg胰高血糖素Cys²¹(1-29)和24mg mPEG-Mal-5000(Nektar Therapeutics)溶解于3.5ml磷酸盐缓冲的盐水(PBS),并加入0.5ml 0.01M乙二胺四乙酸(EDTA)。在室温搅拌反应物。2小时后,再加入12.7mg的mPEG-MAL-5000。8小时后将反应混合物装载到2.2x 25cm Vydac C18制备性反相柱上,在Pharmacia FPLC上以4ml/分钟实施乙腈梯度,同时收集馏分5分钟。A=0.1%TFA,B=0.1%TFA/50%ACN,梯度=经450分钟20%B-80%B。

[0546] 冷冻合并对应于产物外观的馏分,并冻干,得到34mg。通过分析性HPLC进行该产物

的分析[0.46x 5cm Zorbax C8, 1ml/分钟, 45°C, 214nm (0.5A), A=0.1%TFA, B=0.1%TFA/90%ACN, 梯度=经10分钟10%B-80%B], 显示不同于起始胰高血糖素肽的均一产物。MALDI (基料辅助激光解吸电离) 质谱分析显示8700-9500的广泛质量范围(PEG类似物特有的)。这表明在起始胰高血糖素肽(3470)上加上了大约5,000原子质量单位的质量。

[0547] 实施例5

[0548] 胰高血糖素Cys²⁴Mal-PEG-5K

[0549] 让20.1mg胰高血糖素Cys²⁴(1-29)和39.5mg mPEG-Mal-5000(Nektar Therapeutics)搅拌溶解于3.5ml PBS中, 加入0.5ml 0.01MEDTA。在室温搅拌反应物7小时, 然后再加40mg的mPEG-Mal-5000。在大约15小时后, 将反应混合物装载到2.2x 25cm Vydac C18制备性反相柱上并用Pharmacia FPLC实施乙腈梯度。收集馏分5分钟, 同时在波长214nm处监测UV(2.0A)。A缓冲液=0.1%TFA, B缓冲液=0.1%TFA/50%ACN, 梯度=经450分钟30%B-100%B。合并对应于产物的馏分, 冷冻并冻干, 得到45.8mg。MALDI质谱分析显示典型的最大9175.2的PEG宽信号, 其比胰高血糖素C²⁴(3457.8)大约多5,000原子质量单位。

[0550] 实施例6

[0551] 胰高血糖素Cys²⁴Mal-PEG-20K

[0552] 让25.7mg胰高血糖素Cys²⁴(1-29)和40.7mg mPEG-Mal-20K(Nektar Therapeutics)在室温下搅拌溶解于3.5ml PBS中, 加入0.5ml 0.01M EDTA。6小时后由HPLC测定的起始物质与产物的比率大约60:40。再加入25.1mg的mPEG-Mal-20K, 让反应物再搅拌16小时。产物比率没有显著改进, 因此将反应混合物装载到2.2x 25cm Kromasil C18制备性反相柱上, 并在Pharmacia FPLC上经450分钟用30%B-100%B的梯度进行纯化。A缓冲液=0.1%TFA, B=缓冲液0.1%TFA/50%ACN, 流速=4ml/分钟, 收集馏分5分钟, 同时在波长214nm处监测UV(2.0A)。合并含同类产物的馏分, 冷冻并冻干, 得到25.7mg。由分析性HPLC测得纯度为大约90%。MALDI质谱分析显示23,000-27,000的宽峰, 这比起始胰高血糖素C²⁴(3457.8)大约多20,000原子质量单位。

[0553] 实施例7

[0554] 胰高血糖素Cys²⁹Mal-PEG-5K

[0555] 让20.0mg胰高血糖素Cys²⁹(1-29)和24.7mg mPEG-Mal-5000(Nektar Therapeutics)在室温搅拌溶解于3.5ml PBS中, 加入0.5ml 0.01M EDTA。4小时后再加15.6mg的mPEG-Mal-5000以驱动反应完成。8小时后将反应混合物装载到2.2x 25cm Vydac C18制备性反相柱上, 在Pharmacia FPLC系统上实施乙腈梯度。收集馏分5分钟, 同时在波长214nm处监测UV。A=0.1%TFA, B=0.1%TFA/50%ACN。合并75-97的馏分, 冷冻并冻干, 得到40.0mg不同于在HPLC上回收的起始物质(馏分58-63)的产物。由分析性HPLC分析该产物[0.46x5cm Zorbax C8, 1ml/分钟, 45°C, 214nm(0.5A), A=0.1%TFA, B=0.1%TFA/90%ACN, 梯度=经10分钟10%B-80%B], 显示纯度大于95%。MALDI质谱分析显示存在质量范围为8,000-10,000(最大9025.3)的PEG组分, 其比起始物质(3484.8)大5,540原子质量单位。

[0556] 实施例8

[0557] 胰高血糖素Cys²⁴(2-丁内酯)

[0558] 向24.7mg胰高血糖素Cys²⁴(1-29)中加入4ml 0.05M碳酸氢铵/50%乙腈和5.5ul的2-溴-4-羟基丁酸-γ-内酯(100ul存于900ul乙腈中)溶液。在室温搅拌3小时后, 再向反应

混合物中加入105ul内酯溶液,再搅拌15小时。用10%乙酸水溶液将反应混合物稀释到10ml,装载到2.2x 25cm Kromasil C18制备性反相柱上。在Pharmacia FPLC上实施乙腈梯度(经450分钟20%B-80%B),同时收集馏分5分钟,在214nm处监测UV(2.0A)。流速=4ml/分钟,A=0.1%TFA,B=0.1%TFA/50%ACN。合并馏分74-77,冷冻并冻干,得到7.5mg。HPLC分析显示纯度为95%,MALDI质谱显示3540.7的质量或大于起始物质84的质量单位。该结果符合加入单一的丁内酯部分。

[0559] 实施例9

[0560] 胰高血糖素Cys²⁴(S-羧甲基)

[0561] 将18.1mg胰高血糖素Cys²⁴(1-29)溶解于9.4ml 0.1M磷酸钠缓冲液(pH=9.2)中,加入0.6ml溴乙酸溶液(乙腈中1.3mg/ml)。室温下搅拌反应物,由分析性HPLC跟踪反应进程。1小时后再加入0.1ml溴乙酸溶液。将反应物再搅拌60分钟,然后用乙酸水溶液酸化,装载到2.2x 25cm Kromasil C18制备性反相柱上用于纯化。在Pharmacia FPLC上实施乙腈梯度(流速=4ml/分钟),同时收集馏分5分钟,在214nm处监测UV(2.0A)。A=0.1%TFA,B=0.1%TFA/50%ACN。合并馏分26-29,冷冻并冻干,得到若干mg产物。分析性HPLC显示纯度为90%,MALDI质谱分析确认所期需产物的质量为3515。

[0562]



分子量=3515.87
准确质量=3512
分子式=C153H224N42O50S2

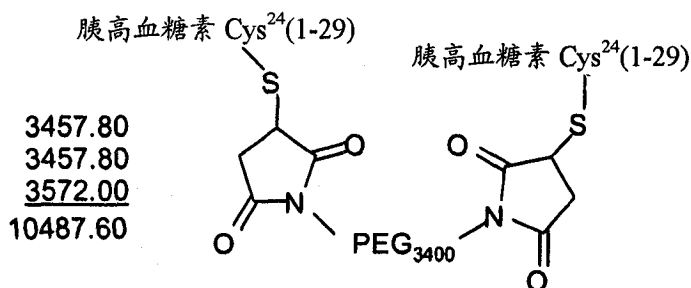
SEQ ID NO: 38

[0563] 实施例10

[0564] 胰高血糖素Cys²⁴马来酰亚胺基,PEG-3.4K-二聚体

[0565] 让16mg胰高血糖素Cys²⁴和1.02mg平均分子量3400的Mal-PEG-Mal-3400聚(乙二醇)-双-马来酰亚胺(Nektar Therapeutics)溶解于3.5磷酸盐缓冲盐水和0.5ml 0.01M EDTA中,室温下搅拌反应物。16小时后,再加入16mg的胰高血糖素Cys²⁴,持续搅拌。大约40小时后,将反应混合物装载到Pharmacia PepRPC 16/10柱上,在PharmaciaFPLC上实施乙腈梯度,同时收集2分钟馏分,在214nm处监测UV(2.0A)。流速=2ml/分钟,A=0.1%TFA,B=0.1%TFA/50%ACN。合并馏分69-74,冷冻并冻干,得到10.4mg。分析性HPLC显示纯度为90%,MALDI质谱分析显示9500-11,000范围内的组分,这符合所期需的二聚体。

[0566]



[0567] 实施例11

[0568] 合成胰高血糖素内酰胺

[0569] 将285mg(0.2毫摩尔)甲氧基二苯胺树脂(Midwest Biotech)加入到60mL反应瓶

中,用Boc DEPBT-活化的单连接让以下序列聚合到改良的Applied Biosystems 430A肽合成仪上。

[0570] HSQGTFTSDYSKYLDERRAQDFVQWLMNT-NH₂(12-16内 酰胺;SEQ ID NO:12)

[0571] 使用以下侧链保护基:Arg(Tos)、Asp(OcHx)、Asn(Xan)、Glu(OFm)、His(BOM)、Lys(Fmoc)、Ser(Bzl)、Thr(Bzl)、Trp(CHO)、Tyr(Br-Z)。若从16-20、20-24或24-28构建内酰胺,则12位用Lys(Cl-Z)。用20%哌啶/二甲基甲酰胺与完成的肽基树脂作用1小时,旋转以从Lys12和Glu16除去Trp的甲酰基基团以及Fmoc和OFm保护。在由阳性茚三酮检测确认除去后,用二甲基甲酰胺接着用二氯甲烷然后再次用二甲基甲酰胺洗涤树脂。用二甲基甲酰胺和二异丙基乙基胺(DIEA)中的520mg(1毫摩尔)苯并三唑-1-基-氧基-三-吡咯烷子基- 磷六氟磷酸盐(PyBOP)与树脂作用。反应进行8-10小时,通过阴性茚三酮反应来确认环化。用二甲基甲酰胺接着用二氯甲烷洗涤树脂,随后用三氟乙酸处理10分钟。通过阳性茚三酮反应确认除去Boc基团。用二甲基甲酰胺和二氯甲烷洗涤树脂,转移到氢氟酸(HF)反应瓶中后干燥。加入500μL对甲酚连同磁力搅拌棒。将反应瓶连接到HF仪器(Peninsula Labs),在干冰/甲醇浴中冷却,蒸发,反应瓶中浓缩到大约10mL液态氢氟酸。在冰浴中将反应物搅拌1小时,随后真空除去HF。让残留物悬浮在乙基醚中;过滤固体,用醚洗涤,用150mL 20%乙腈/1%乙酸溶解肽。

[0572] 在以下条件下进行粗溶解肽的分析性HPLC分析[4.6X 30mmXterra C8,1.50ml/分钟,220nm,A缓冲液0.1%TFA/10%ACN,B缓冲液0.1%TFA/100%CAN,梯度为经15分钟5-95%B]。用水将提取物稀释2倍,装载到2.2X 25cm Vydac C4制备性反相柱上,在Waters HPLC系统上用乙腈梯度洗脱(A缓冲液为0.1%TFA/10%ACN,B缓冲液为0.1%TFA/10%ACN,梯度为经120分钟0-100%B,流速为15.00ml/分钟)。纯化肽的HPLC分析显示大于95%的纯度,电子喷雾离子质谱分析确认12-16内酰胺的3506 Da的质量。类似地制备了16-20、20-24和24-28内酰胺。

[0573] 实施例12

[0574] 胰高血糖素溶解性测定

[0575] 在0.01N HCl中制备胰高血糖素(或类似物)的A溶液(1mg/ml或3mg/ml)。用0.01N HCl将100μl储液稀释到1ml,测定UV吸光度(276nm)。用200-250μl 0.1M Na₂HPO₄(pH 9.2)将剩余储液的pH调整到pH7。让溶液在4℃静置过夜,然后离心。然后用0.01N HCl将100μl上清液稀释到1ml,测定UV吸光度(一式两份)。

[0576] 初始吸光度读数补偿了体积的增大,用以下计算来确定溶解性百分比:

$$[0577] \quad \frac{\text{最终吸光度}}{\text{初始吸光度}} \times 100 = \text{溶解性百分比}$$

[0578] 结果示于表1中,其中胰高血糖素-C_{ex}表示野生型胰高血糖素(SEQ ID NO:1)加SEQ ID NO:26的羧基末端添加,胰高血糖素-C_{ex}R¹²表示SEQ ID NO:39。

[0579] 表1胰高血糖素类似物溶解数据

	类似物	溶解性百分比
	胰高血糖素	16
	胰高血糖素-Cex, R12	104
[0580]	胰高血糖素-Cex	87
	泌酸调节肽	104
	胰高血糖素, Cys17PEG5K	94
	胰高血糖素, Cys21PEG5K	105
	胰高血糖素, Cys24PEG5K	133

[0581] 实施例13

[0582] 胰高血糖素受体结合测定

[0583] 在竞争结合测定中用闪烁亲近测定技术测量肽对胰高血糖素受体的亲和力。在96孔白色/透明底的板(Corning Inc., Acton, MA)中让以下物质混合:在闪烁亲近测定缓冲液(0.05M Tris-HCl, pH 7.5, 0.15M NaCl, 0.1%w/v牛血清白蛋白)中进行3-倍系列稀释的所测肽、每孔1-6微克的0.05nM(3-[¹²⁵I]-碘酪氨酸)Tyr10胰高血糖素(Amersham Biosciences, Piscataway, NJ)、从过表达人胰高血糖素受体的细胞制备的胞浆膜片段和1mg/孔聚乙烯亚胺-处理的麦芽凝集素A型闪烁亲近测定珠粒(Amersham Biosciences, Piscataway, NJ)。在旋转振荡器上以800rpm振荡5分钟后,让板在室温孵育12小时,然后在MicroB1450液体闪烁计数仪(Perkin-Elmer, Wellesley, MA)上读数。测量孔中比试验样品最高浓度大4倍的“冷”天然配体的非特异性结合(NSB)的放射性,并检测无竞争物的孔中的总结合放射性。如下计算特异性结合的百分比:%特异性结合=((结合的NSB)/(总结合-NSB))X 100。用Origin软件(OriginLab, Northampton, MA)测定IC₅₀值。

[0584] 实施例14

[0585] 功能测定-cAMP合成

[0586] 在基于萤火虫荧光素酶报告测定中测量胰高血糖素类似物诱导cAMP的能力。在96孔聚-D-赖氨酸-包被的“Biocoat”板(BD Biosciences, San Jose, CA)中,于37°C、5%CO₂条件下,通过在补充0.25%牛生长血清(HyClone, Logan, UT)的DMEM(Invitrogen, Carlsbad, CA)中培养16小时,来对用胰高血糖素-受体或GLP-1受体和连接到cAMP响应元件的荧光素酶基因共转染的HEK293细胞实施血清剥夺,然后用系列稀释的胰高血糖素、GLP-1或新型胰高血糖素类似物孵育5小时。在结束孵育时,每孔加入100微升LucLite发光底物试剂(Perkin-Elmer, Wellesley, MA)。短时间振荡板,黑暗中孵育10分钟,在MicroB-1450液态闪烁计数仪(Perkin-Elmer, Wellesley, MA)上测量光输出。用Origin软件(OriginLab, Northampton, MA)计算50%有效浓度。结果示于图3-9和表2到10中。

[0587] 表2

[0588] 含C-末端延伸的胰高血糖素类似物对cAMP的诱导

[0589]

肽	cAMP 诱导			
	胰高血糖素受体		GLP-1 受体	
	EC ₅₀ , nM	N*	EC ₅₀ , nM	N
胰高血糖素	0.22 ± 0.09	14	3.85 ± 1.64	10

[0590]

GLP-1	2214.00 ± 182.43	2	0.04 ± 0.01	14
胰高血糖素 Cex	0.25 ± 0.15	6	2.75 ± 2.03	7
泌酸调节肽	3.25 ± 1.65	5	2.53 ± 1.74	5
泌酸调节肽 KRNR	2.77 ± 1.74	4	3.21 ± 0.49	2
胰高血糖素 R12	0.41 ± 0.17	6	0.48 ± 0.11	5
胰高血糖素 R12 Cex	0.35 ± 0.23	10	1.25 ± 0.63	10
胰高血糖素 R12 K20	0.84 ± 0.40	5	0.82 ± 0.49	5
胰高血糖素 R12 K24	1.00 ± 0.39	4	1.25 ± 0.97	5
胰高血糖素 R12 K29	0.81 ± 0.49	5	0.41 ± 0.24	6
胰高血糖素酰胺	0.26 ± 0.15	3	1.90 ± 0.35	2
泌酸调节肽 C24	2.54 ± 0.63	2	5.27 ± 0.26	2
泌酸调节肽 C24 PEG 20K	0.97 ± 0.04	1	1.29 ± 0.11	1

[0591] *-实验次数

[0592] 表3

[0593] 聚乙二醇化胰高血糖素类似物对cAMP的诱导

[0594]

肽	cAMP 诱导			
	胰高血糖素受体		GLP-1 受体	
	EC ₅₀ , nM	N *	EC ₅₀ , nM	N
胰高血糖素	0.33 ± 0.23	18	12.71 ± 3.74	2
胰高血糖素 C17 PEG 5K	0.82 ± 0.15	4	55.86 ± 1.13	2
胰高血糖素 C21 PEG 5K	0.37 ± 0.16	6	11.52 ± 3.68	2
胰高血糖素 C24 PEG 5K	0.22 ± 0.10	12	13.65 ± 2.95	4
胰高血糖素 C29 PEG 5K	0.96 ± 0.07	2	12.71 ± 3.74	2
胰高血糖素 C24 PEG 20K	0.08 ± 0.05	3	未测定	
胰高血糖素 C24 二聚体	0.10 ± 0.05	3	未测定	
GLP-1	> 1000		0.05 ± 0.02	4

[0595] *-实验次数

[0596] 表4

[0597] E16胰高血糖素类似物对cAMP的诱导

[0598]

相对于天然配体的百分比效价

肽	胰高血糖素受体 (GRec)	GLP-1 受体 (GLP-1Rec)
E16 Gluc-NH2	187.2	17.8
胰高血糖素	100.0	0.8
Gluc-NH2	43.2	4.0
NLeu3, E16 Gluc-NH2	7.6	20.6
E3, E16 Gluc-NH2	1.6	28.8
Orn3, E16 Gluc-NH2	0.5	0.1
GLP-1	<0.1	100

[0599] 表5

[0600] E16胰高血糖素类似物对cAMP的诱导

[0601]

相对于天然配体的百分比效价

肽	胰高血糖素受体	GLP-1 受体
E16 Gluc-NH2	187.2	17.8
E15, E16 Gluc-NH2	147.0	9.2
E16, K20 Gluc-NH2	130.1	41.5
Gluc-NH2	43.2	4.0

[0602] 表6

[0603] E16胰高血糖素类似物诱导cAMP的EC50值

[0604]

	胰高血糖素受体			GLP-1 受体		
肽	EC50 (nM)	标准差	n	EC50 (nM)	标准差	n
胰高血糖素	0.28	0.14	10	4.51	N/A	1
胰高血糖素-NH2	0.53	0.33	8	1.82	0.96	5
E16 Gluc-NH2	0.07	0.07	10	0.16	0.14	10
E16, G30 Gluc-NH2	0.41	0.36	5	0.24	0.10	5
E16, G30 Gluc-Cex	0.51	0.46	5	1.19	0.86	5
GLP-1	2214	N/A	1	0.03	0.02	9

[0605] 表7

[0606] E16胰高血糖素类似物诱导cAMP的EC50值

[0607]

	胰高血糖素受体			GLP-1 受体		
肽	EC50 (nM)	标准差	n	EC50 (nM)	标准差	n
E16 胰高血糖素-NH2	0.07	0.07	10	0.16	0.14	10
hCSO ₃ 16 胰高血糖素-NH2	0.25	0.12	2	0.19	0.02	2
hE16 胰高血糖素-NH2	0.17	0.08	2	0.25	0.03	2
H16 胰高血糖素-NH2	0.45	0.3	2	0.38	0.11	2
Q16 胰高血糖素-NH2	0.22	0.1	2	0.39	0.08	2
D16 胰高血糖素-NH2	0.56	0.15	2	0.93	0.28	2
(S16) 胰高血糖素-NH2	0.53	0.33	8	1.82	0.96	5

[0608] 表8

[0609] E16胰高血糖素类似物诱导cAMP的EC50值

[0610]

	胰高血糖素受体			GLP-1受体		
肽	EC50 (nM)	标准差	n	EC50 (nM)	标准差	n
E16	0.07	0.07	10	0.16	0.14	10
T16 胰高血糖素-NH2	0.10	0.02	3	1.99	0.48	3
G16 胰高血糖素-NH2	0.10	0.01	3	2.46	0.60	3
胰高血糖素-NH2	0.53	0.33	4	1.82	0.96	5
GLP-1	2214	N/A	1	0.03	0.02	9

[0611] 当一起测定所述化合物时,E16 Gluc NH₂相对于G16-COOH和T16 Gluc NH₂针对胰高血糖素受体的效价大4倍。

[0612] 表9

[0613] E16/内酰胺胰高血糖素类似物对cAMP的诱导

[0614]

相对于天然配体的百分比效价

肽	胰高血糖素受体	GLP-1受体
---	---------	---------

[0615]

E24K28 Gluc-NH2 Lac	196.4	12.5
E16K20 Gluc-NH2 Lac	180.8	63.0
K12E16 Gluc-NH2 Lac	154.2	63.3
K20E24 Gluc-NH2 Lac	120.2	8.1
E16 Gluc-NH2	187.2	17.8
E16, K20 Gluc-NH2	130.1	41.5
胰高血糖素	100.0	0.8
Gluc-NH2	43.2	4.0

[0616] 表10

[0617] GLP-117-26胰高血糖素类似物对cAMP的诱导

[0618]

	胰高血糖素受体		GLP-1 受体	
肽	EC50(nM)	标准差	EC50(nM)	标准差
GLP-1			0.023	0.002
Gluc-NH2	0.159	0.023		
E16 GLP-1			0.009	0.000
E16 胰高血糖素-NH2	0.072	0.007		
E16 GLP(17-26)Glu(27-29)-NH2	0.076	0.004	0.014	0.001
E16 GLP(17-29)-NH2	0.46	0.023	0.010	0.000
E16 GLP(17-29)-NH2 E24, K28	0.23	0.020	0.007	
E16 GLP(17-29)-NH2 E24, K28 内酰胺	0.16	0.017	0.007	0.000

[0619] 实施例15

[0620] 胰高血糖素Cys-马来酰亚胺基PEG类似物的稳定性测定

[0621] 将各种胰高血糖素类似物溶解于水或PBS中,进行初始HPLC分析。调整pH(4、5、6、7)后,让样品在37°C经特定时间孵育,重新用HPLC分析以测定肽的完整性。测定特定目的肽的浓度,计算相对于初始分析保留完整的百分比。胰高血糖素Cys²¹-马来酰亚胺基PEG_{5k}的结果示于图1和2中。

[0622] 实施例16

[0623] 以下胰高血糖素肽基本上如以上实施例1-11所述构建:

[0624] 在以下所有序列中,“a”意指C-末端酰胺。

[0625] HSQGT FTSDY SKYLD ERRAQ DFVQW LMNTa(SEQ ID NO:70)

[0626] HSQGT FTSDY SKYLD ERRAK DFVQW LMNTa(SEQ ID NO:71)

[0627] HSQGT FTSDY SKYLD ERRAK DFVQW LMNTa(内酰胺@16-20;SEQ ID NO:72)

[0628] HSQGT FTSDY SKYLD ERRAQ DFVQW LMNTa(内酰胺@12-16;SEQ ID NO:73)

[0629] HSQGT FTSDY SKYLD ERRAK DFVQW LMNTa(内酰胺@12-16;SEQ ID NO:74)

[0630] HSQGT FTSDY SKYLD KRRAE DFVQW LMNTa(内酰胺@16-20;SEQ ID NO:75)

[0631] HSQGT FTSDY SKYLD ERAAK DFVQW LMNTa(SEQ ID NO:76)

[0632] HSQGT FTSDY SKYLD ERAAK DFVQW LMNTa(内酰胺@16-20;SEQ ID NO:77)

[0633] HSQGT FTSDY SKYLD ERAAQ DFVQW LMNTa(内酰胺@12-16;SEQ ID NO:78)

[0634] HSQGT FTSDY SKYLD ERAAK DFVQW LMNTa(内酰胺@12-16;SEQ ID NO:79)

[0635] HSQGT FTSDY SKYLD KRAAE DFVQW LMNTa(内酰胺@16-20;SEQ ID NO:80)

[0636] HSQGT FTSDY SKYLD EQAAK EFIAW LMNTa(SEQ ID NO:81)

[0637] HSQGT FTSDY SKYLD EQAAK EFIAW LMNTa(内酰胺@12-16;SEQ ID NO:82)

[0638] HSQGT FTSDY SKYLD EQAAK EFIAW LMNTa(内酰胺@16-20;SEQ ID NO:83)

[0639] HSQGT FTSDY SKYLD EQAAK EFIAW LVKGa(SEQ ID NO:84)

[0640] HSQGT FTSDY SKYLD EQAAK EFIAW LVKGa(内酰胺@12-16;SEQ ID NO:85)

[0641] HSQGT FTSDY SKYLD EQAAK EFIAW LVKGa(内酰胺@16-20;SEQ ID NO:86)

[0642] X1SQGT FTSDY SKYLD ERRAQ DFVQW LMNTa(SEQ ID NO:87)

- [0643] X1SQGT FTSDY SKYLD ERRAK DFVQW LMNTa(SEQ ID NO:88)
- [0644] X1SQGT FTSDY SKYLD ERRAK DFVQW LMNTa(内酰胺@16-20;SEQ ID NO:89)
- [0645] X1SQGT FTSDY SKYLD ERRAQ DFVQW LMNTa(内酰胺@12-16;SEQ ID NO:90)
- [0646] X1SQGT FTSDY SKYLD ERRAK DFVQW LMNTa(内酰胺@12-16;SEQ ID NO:91)
- [0647] X1SQGT FTSDY SKYLD KRRAE DFVQW LMNTa(内酰胺@16-20;SEQ ID NO:92)
- [0648] X1SQGT FTSDY SKYLD ERAAK DFVQW LMNTa(SEQ ID NO:93)
- [0649] X1SQGT FTSDY SKYLD ERAAK DFVQW LMNTa(内酰胺@16-20;SEQ ID NO:94)
- [0650] X1SQGT FTSDY SKYLD ERAAQ DFVQW LMNTa(内酰胺@12-16;SEQ ID NO:95)
- [0651] X1SQGT FTSDY SKYLD ERAAK DFVQW LMNTa(内酰胺@12-16;SEQ ID NO:96)
- [0652] X1SQGT FTSDY SKYLD KRAAE DFVQW LMNTa(内酰胺@16-20;SEQ ID NO:97)
- [0653] X1SQGT FTSDY SKYLD EQAAK EFIAW LMNTa(SEQ ID NO: 98)
- [0654] X1SQGT FTSDY SKYLD EQAAK EFIAW LMNTa(内酰胺@12-16;SEQ ID NO:99)
- [0655] X1SQGT FTSDY SKYLD EQAAK EFIAW LMNTa(内酰胺@16-20;SEQ ID NO:100)
- [0656] X1SQGT FTSDY SKYLD EQAAK EFIAW LVKGa(SEQ ID NO:101)
- [0657] X1SQGT FTSDY SKYLD EQAAK EFIAW LVKGa(内酰胺@12-16;SEQ ID NO:102)
- [0658] X1SQGT FTSDY SKYLD EQAAK EFIAW LVKGa(内酰胺@16-20;SEQ ID NO:103)
- [0659] 其中在前述序列中,X1=(脱-氨基)His
- [0660] HX2QGT FTSDY SKYLD ERRAQ DFVQW LMNTa(SEQ ID NO:104)
- [0661] HX2QGT FTSDY SKYLD ERRAK DFVQW LMNTa(SEQ ID NO:105)
- [0662] HX2QGT FTSDY SKYLD ERRAK DFVQW LMNTa(内酰胺@16-20;SEQ ID NO:106)
- [0663] HX2QGT FTSDY SKYLD ERRAQ DFVQW LMNTa(内酰胺@12-16;SEQ ID NO:107)
- [0664] HX2QGT FTSDY SKYLD ERRAK DFVQW LMNTa(内酰胺@12-16;SEQ ID NO:108)
- [0665] HX2QGT FTSDY SKYLD KRRAE DFVQW LMNTa(内酰胺@16-20;SEQ ID NO:109)
- [0666] HX2QGT FTSDY SKYLD ERAAK DFVQW LMNTa(SEQ ID NO:110)
- [0667] HX2QGT FTSDY SKYLD ERAAK DFVQW LMNTa(内酰胺@16-20;SEQ ID NO:111)
- [0668] HX2QGT FTSDY SKYLD ERAAQ DFVQW LMNTa(内酰胺@12-16;SEQ ID NO:112)
- [0669] HX2QGT FTSDY SKYLD ERAAK DFVQW LMNTa(内酰胺@12-16;SEQ ID NO:113)
- [0670] HX2QGT FTSDY SKYLD KRAAE DFVQW LMNTa(内酰胺@16-20;SEQ ID NO:114)
- [0671] HX2QGT FTSDY SKYLD EQAAK EFIAW LMNTa(SEQ ID NO:115)
- [0672] HX2QGT FT SDY S KYLD EQAAK EFIAW LMNTa(内酰胺@12-16;SEQ ID NO:116)
- [0673] HX2QGT FTSDY SKYLD EQAAK EFIAW LMNTa(内酰胺@16-20;SEQ ID NO:117)
- [0674] HX2QGT FTSDY SKYLD EQAAK EFIAW LVKGa(SEQ ID NO:118)
- [0675] HX2QGT FTSDY SKYLD EQAAK EFIAW LVKGa(内酰胺@12-16;SEQ ID NO:119)
- [0676] HX2QGT FTSDY SKYLD EQAAK EFIAW LVKGa(内酰胺@16-20;SEQ ID NO:120)
- [0677] 其中在前述序列中,X2=氨基异丁酸
- [0678] HX2QGT FTSDY SKYLD ERRAQ DFVQW LMNTa(SEQ ID NO:121)
- [0679] HX2QGT FTSDY SKYLD ERRAK DFVQW LMNTa(SEQ ID NO:122)
- [0680] HX2QGT FTSDY SKYLD ERRAK DFVQW LMNTa(内酰胺@16-20;SEQ ID NO:123)
- [0681] HX2QGT FTSDY SKYLD ERRAQ DFVQW LMNTa(内酰胺@12-16;SEQ ID NO:124)

- [0682] HX2QGT FTSDY SKYLD ERRAK DFVQW LMNTa(内酰胺@ 12-16;SEQ ID NO:125)
- [0683] HX2QGT FTSDY SKYLD KRRAE DFVQW LMNTa(内酰胺@16-20;SEQ ID NO:126)
- [0684] HX2QGT FTSDY SKYLD ERAAK DFVQW LMNTa(SEQ ID NO:127)
- [0685] HX2QGT FTSDY SKYLD ERAAK DFVQW LMNTa(内酰胺@16-20;SEQ ID NO:128)
- [0686] HX2QGT FTSDY SKYLD ERAAQ DFVQW LMNTa(内酰胺@12-16;SEQ ID NO:129)
- [0687] HX2QGT FTSDY SKYLD ERAAK DFVQW LMNTa(内酰胺@12-16;SEQ ID NO:130)
- [0688] HX2QGT FTSDY SKYLD KRAAE DFVQW LMNTa(内酰胺@16-20;SEQ ID NO:131)
- [0689] HX2QGT FTSDY SKYLD EQAAK EFIAW LMNTa(SEQ ID NO:132)
- [0690] HX2QGT FTSDY SKYLD EQAAK EFIAW LMNTa(内酰胺@12-16;SEQ ID NO:133)
- [0691] HX2QGT FT SDY SKYLD EQAAK EFIAW LMNTa(内酰胺@16-20;SEQ ID NO:134)
- [0692] HX2QGT FTSDY SKYLD EQAAK EFIAW LVKGa(SEQ ID NO:135)
- [0693] HX2QGT FTSDY SKYLD EQAAK EFIAW LVKGa(内酰胺@12-16;SEQ ID NO:136)
- [0694] HX2QGT FTSDY SKYLD EQAAK EFIAW LVKGa(内酰胺@16-20;SEQ ID NO:137)
- [0695] 其中在前述序列中,X2=(D-Ala)
- [0696] HSEGT FTSDY SKYLD ERRAQ DFVQW LMNTa(SEQ ID NO:138)
- [0697] HSEGT FTSDY SKYLD ERRAK DFVQW LMNTa(SEQ ID NO:139)
- [0698] HSEGT FTSDY SKYLD ERRAK DFVQW LMNTa(内酰胺@16-20;SEQ ID NO:140)
- [0699] HSEGT FTSDY SKYLD ERRAQ DFVQW LMNTa(内酰胺@12-16;SEQ ID NO:141)
- [0700] HSEGT FTSDY SKYLD ERRAK DFVQW LMNTa(内酰胺@12-16;SEQ ID NO:142)
- [0701] HSEGT FTSDY SKYLD KRRAE DFVQW LMNTa(内酰胺@16-20;SEQ ID NO:143)
- [0702] HSEGT FTSDY SKYLD ERAAK DFVQW LMNTa(SEQ ID NO:144)
- [0703] HSEGT FTSDY SKYLD ERAAK DFVQW LMNTa(内酰胺@16-20;SEQ ID NO:145)
- [0704] HSEGT FTSDY SKYLD ERAAQ DFVQW LMNTa(内酰胺@12-16;SEQ ID NO:146)
- [0705] HSEGT FTSDY SKYLD ERAAK DFVQW LMNTa(内酰胺@12-16;SEQ ID NO:147)
- [0706] HSEGT FTSDY SKYLD KRAAE DFVQW LMNTa(内酰胺@16-20;SEQ ID NO:148)
- [0707] HSEGT FTSDY SKYLD EQAAK EFIAW LMNTa(SEQ ID NO:149)
- [0708] HSEGT FTSDY SKYLD EQAAK EFIAW LMNTa(内酰胺@12-16;SEQ ID NO:150)
- [0709] HSEGT FTSDY SKYLD EQAAK EFIAW LMNTa(内酰胺@16-20;SEQ ID NO:151)
- [0710] HSEGT FTSDY SKYLD EQAAK EFIAW LVKGa(SEQ ID NO:152)
- [0711] HSEGT FTSDY SKYLD EQAAK EFIAW LVKGa(内酰胺@ 12-16;SEQ ID NO:153)
- [0712] HSEGT FTSDY SKYLD EQAAK EFIAW LVKGa(内酰胺@16-20;SEQ ID NO:154)
- [0713] X1SEGT FTSDY SKYLD ERRAQ DFVQW LMNTa(SEQ ID NO:155)
- [0714] X1SEGT FTSDY SKYLD ERRAK DFVQW LMNTa(SEQ ID NO:156)
- [0715] X1SEGT FTSDY SKYLD ERRAK DFVQW LMNTa(内酰胺@16-20;SEQ ID NO:157)
- [0716] X1SEGT FTSDY SKYLD ERRAQ DFVQW LMNTa(内酰胺@12-16;SEQ ID NO:158)
- [0717] X1SEGT FTSDY SKYLD ERRAK DFVQW LMNTa(内酰胺@12-16;SEQ ID NO:159)
- [0718] X1SEGT FTSDY SKYLD KRRAE DFVQW LMNTa(内酰胺@16-20;SEQ ID NO:160)
- [0719] X1SEGT FTSDY SKYLD ERAAK DFVQW LMNTa(SEQ ID NO:161)
- [0720] X1SEGT FTSDY SKYLD ERAAK DFVQW LMNTa(内酰胺@16-20;SEQ ID NO:162)

- [0721] X1SEGT FTSDY SKYLD ERAAQ DFVQW LMNTa(内酰胺@12-16;SEQ ID NO:163)
- [0722] X1SEGT FTSDY SKYLD ERAAK DFVQW LMNTa(内酰胺@12-16;SEQ ID NO:164)
- [0723] X1SEGT FTSDY SKYLD KRAAE DFVQW LMNTa(内酰胺@16-20;SEQ ID NO:165)
- [0724] X1SEGT FTSDY SKYLD EQAAK EFIAW LMNTa(SEQ ID NO:166)
- [0725] X1SEGT FTSDY SKYLD EQAAK EFIAW LMNTa(内酰胺@12-16;SEQ ID NO:167)
- [0726] X1SEGT FTSDY SKYLD EQAAK EFIAW LMNTa(内酰胺@16-20;SEQ ID NO:168)
- [0727] X1SEGT FTSDY SKYLD EQAAK EFIAW LVKGa(SEQ ID NO:169)
- [0728] X1SEGT FTSDY SKYLD EQAAK EFIAW LVKGa(内酰胺@12-16;SEQ ID NO:170)
- [0729] X1SEGT FTSDY SKYLD EQAAK EFIAW LVKGa(内酰胺@16-20;SEQ ID NO:171)
- [0730] 其中在前述序列中,X1=(脱-氨基)His
- [0731] HX2EGT FTSDY SKYLD ERRAQ DFVQW LMNTa(SEQ ID NO:172)
- [0732] HX2EGT FTSDY SKYLD ERRAK DFVQW LMNTa(SEQ ID NO:173)
- [0733] HX2EGT FTSDY SKYLD ERRAK DFVQW LMNTa(内酰胺@16-20;SEQ ID NO:174)
- [0734] HX2EGT FTSDY SKYLD ERRAQ DFVQW LMNTa(内酰胺@12-16;SEQ ID NO:175)
- [0735] HX2EGT FTSDY SKYLD ERRAK DFVQW LMNTa(内酰胺@12-16;SEQ ID NO:176)
- [0736] HX2EGT FTSDY SKYLD KRRAE DFVQW LMNTa(内酰胺@16-20;SEQ ID NO:177)
- [0737] HX2EGT FTSDY SKYLD ERAAK DFVQW LMNTa(SEQ ID NO:178)
- [0738] HX2EGT FTSDY SKYLD ERAAK DFVQW LMNTa(内酰胺@16-20;SEQ ID NO:179)
- [0739] HX2EGT FTSDY SKYLD ERAAQ DFVQW LMNTa(内酰胺@12-16;SEQ ID NO:180)
- [0740] HX2EGT FTSDY SKYLD ERAAK DFVQW LMNTa(内酰胺@ 12-16;SEQ ID NO:181)
- [0741] HX2EGT FTSDY SKYLD KRAAE DFVQW LMNTa(内酰胺@16-20;SEQ ID NO:182)
- [0742] HX2EGT FTSDY SKYLD EQAAK EFIAW LMNTa(SEQ ID NO:183)
- [0743] HX2EGT FTSDY SKYLD EQAAK EFIAW LMNTa(内酰胺@12-16;SEQ ID NO:184)
- [0744] HX2EGT FTSDY SKYLD EQAAK EFIAW LMNTa(内酰胺@16-20;SEQ ID NO:185)
- [0745] HX2EGT FTSDY SKYLD EQAAK EFIAW LVKGa(SEQ ID NO:186)
- [0746] HX2EGT FTSDY SKYLD EQAAK EFIAW LVKGa(内酰胺@12-16;SEQ ID NO:187)
- [0747] HX2EGT FTSDY SKYLD EQAAK EFIAW LVKGa(内酰胺@16-20;SEQ ID NO:188)
- [0748] 其中在前述序列中,X2=氨基异丁酸
- [0749] HX2EGT FTSDY SKYLD ERRAQ DFVQW LMNTa(SEQ ID NO:189)
- [0750] HX2EGT FTSDY SKYLD ERRAK DFVQW LMNTa(SEQ ID NO:190)
- [0751] HX2EGT FTSDY SKYLD ERRAK DFVQW LMNTa(内酰胺@16-20;SEQ ID NO:191)
- [0752] HX2EGT FTSDY SKYLD ERRAQ DFVQW LMNTa(内酰胺@12-16;SEQ ID NO:192)
- [0753] HX2EGT FTSDY SKYLD ERRAK DFVQW LMNTa(内酰胺@12-16;SEQ ID NO:193)
- [0754] HX2EGT FTSDY SKYLD KRRAE DFVQW LMNTa(内酰胺@16-20;SEQ ID NO:194)
- [0755] HX2EGT FTSDY SKYLD ERAAK DFVQW LMNTa(SEQ ID NO:195)
- [0756] HX2EGT FTSDY SKYLD ERAAK DFVQW LMNTa(内酰胺@16-20;SEQ ID NO:196)
- [0757] HX2EGT FTSDY SKYLD ERAAQ DFVQW LMNTa(内酰胺@12-16;SEQ ID NO:197)
- [0758] HX2EGT FTSDY SKYLD ERAAK DFVQW LMNTa(内酰胺@12-16;SEQ ID NO:198)
- [0759] HX2EGT FTSDY SKYLD KRAAE DFVQW LMNTa(内酰胺@16-20;SEQ ID NO:199)

- [0760] HX2EGT FTSDY SKYLD EQAAK EFIAW LMNTa(SEQ ID NO:200)
- [0761] HX2EGT FTSDY SKYLD EQAAK EFIAW LMNTa(内酰胺@12-16;SEQ ID NO:201)
- [0762] HX2EGT FTSDY SKYLD EQAAK EFIAW LMNTa(内酰胺@16-20;SEQ ID NO:202)
- [0763] HX2EGT FTSDY SKYLD EQAAK EFIAW LVKGa(SEQ ID NO:203)
- [0764] HX2EGT FTSDY SKYLD EQAAK EFIAW LVKGa(内酰胺@12-16;SEQ ID NO:204)
- [0765] HX2EGT FTSDY SKYLD EQAAK EFIAW LVKGa(内酰胺@16-20;SEQ ID NO:205)
- [0766] 其中在前述序列中,X2=(D-Ala)
- [0767] HSQGT FTSDY SKYLD ERRAQ DFVC*W LMNTa(SEQ ID NO:206)
- [0768] HSQGT FTSDY SKYLD ERRAK DFVC*W LMNTa(SEQ ID NO:207)
- [0769] HSQGT FTSDY SKYLD ERRAK DFVC*W LMNTa(内酰胺@ 16-20;SEQ ID NO:208)
- [0770] HSQGT FTSDY SKYLD ERRAQ DFVC*W LMNTa(内酰胺@12-16;SEQ ID NO:209)
- [0771] HSQGT FTSDY SKYLD ERRAK DFVC*W LMNTa(内酰胺@12-16;SEQ ID NO:210)
- [0772] HSQGT FTSDY SKYLD KRRAE DFVC*W LMNTa(内酰胺@16-20;SEQ ID NO:211)
- [0773] HSQGT FTSDY SKYLD ERAAK DFVC*W LMNTa(SEQ ID NO:212)
- [0774] HSQGT FTSDY SKYLD ERAAK DFVC*W LMNTa(内酰胺@16-20;SEQ ID NO:213)
- [0775] HSQGT FTSDY SKYLD ERAAQ DFVC*W LMNTa(内酰胺@12-16;SEQ ID NO:214)
- [0776] HSQGT FTSDY SKYLD ERAAK DFVC*W LMNTa(内酰胺@12-16;SEQ ID NO:215)
- [0777] HSQGT FTSDY SKYLD KRAAE DFVC*W LMNTa(内酰胺@16-20;SEQ ID NO:216)
- [0778] HSQGT FTSDY SKYLD EQAAK EFIC*W LMNTa(SEQ ID NO:217)
- [0779] HSQGT FTSDY SKYLD EQAAK EFIC*W LMNTa(内酰胺@12-16;SEQ ID NO:218)
- [0780] HSQGT FTSDY SKYLD EQAAK EFIC*W LMNTa(内酰胺@16-20;SEQ ID NO:219)
- [0781] HSQGT FTSDY SKYLD EQAAK EFIC*W LVKGa(SEQ ID NO:220)
- [0782] HSQGT FTSDY SKYLD EQAAK EFIC*W LVKGa(内酰胺@12-16;SEQ ID NO:221)
- [0783] HSQGT FTSDY SKYLD EQAAK EFIC*W LVKGa(内酰胺@16-20;SEQ ID NO:222)
- [0784] X1SQGT FTSDY SKYLD ERRAQ DFVC*W LMNTa(SEQ ID NO:223)
- [0785] X1SQGT FTSDY SKYLD ERRAK DFVC*W LMNTa(SEQ ID NO:224)
- [0786] X1SQGT FTSDY SKYLD ERRAK DFVC*W LMNTa(内酰胺@16-20;SEQ ID NO:225)
- [0787] X1SQGT FTSDY SKYLD ERRAQ DFVC*W LMNTa(内酰胺@12-16;SEQ ID NO:226)
- [0788] X1SQGT FTSDY SKYLD ERRAK DFVC*W LMNTa(内酰胺@12-16;SEQ ID NO:227)
- [0789] X1SQGT FTSDY SKYLD KRRAE DFVC*W LMNTa(内酰胺@16-20;SEQ ID NO:228)
- [0790] X1SQGT FTSDY SKYLD ERAAK DFVC*W LMNTa(SEQ ID NO:229)
- [0791] X1SQGT FTSDY SKYLD ERAAK DFVC*W LMNTa(内酰胺@16-20;SEQ ID NO:230)
- [0792] X1SQGT FTSDY SKYLD ERAAQ DFVC*W LMNTa(内酰胺@12-16;SEQ ID NO:231)
- [0793] X1SQGT FTSDY SKYLD ERAAK DFVC*W LMNTa(内酰胺@12-16;SEQ ID NO:232)
- [0794] X1SQGT FTSDY SKYLD KRAAE DFVC*W LMNTa(内酰胺@16-20;SEQ ID NO:233)
- [0795] X1SQGT FTSDY SKYLD EQAAK EFIC*W LMNTa(SEQ ID NO:234)
- [0796] X1SQGT FTSDY SKYLD EQAAK EFIC*W LMNTa(内酰胺@12-16;SEQ ID NO:235)
- [0797] X1SQGT FTSDY SKYLD EQAAK EFIC*W LMNTa(内酰胺@16-20;SEQ ID NO:236)
- [0798] X1SQGT FTSDY SKYLD EQAAK EFIC*W LVKGa(SEQ ID NO:237)

- [0799] X1SQGT FTSDY SKYLD EQAAK EFIC*W LVKGa(内酰胺@12-16;SEQ ID NO:238)
- [0800] X1SQGT FTSDY SKYLD EQAAK EFIC*W LVKGa(内酰胺@16-20;SEQ ID NO:239)
- [0801] 其中在前述序列中,X1=(脱-氨基)His;其中C*为Cys或与亲水聚合物连接的Cys,或作为备选C*为与约20kD平均重量的聚乙二醇连接的Cys,或作为备选C*为与约40kD平均重量的聚乙二醇连接的Cys。
- [0802] HX2QGT FTSDY SKYLD ERRAQ DFVC*W LMNTa(SEQ ID NO:240)
- [0803] HX2QGT FTSDY SKYLD ERRAK DFVC*W LMNTa(SEQ ID NO:241)
- [0804] HX2QGT FTSDY SKYLD ERRAK DFVC*W LMNTa(内酰胺@16-20;SEQ ID NO:242)
- [0805] HX2QGT FTSDY SKYLD ERRAQ DFVC*W LMNTa(内酰胺@12-16;SEQ ID NO:243)
- [0806] HX2QGT FTSDY SKYLD ERRAK DFVC*W LMNTa(内酰胺@12-16;SEQ ID NO:244)
- [0807] HX2QGT FTSDY SKYLD KRRAE DFVC*W LMNTa(内酰胺@16-20;SEQ ID NO:245)
- [0808] HX2QGT FTSDY SKYLD ERAAK DFVC*W LMNTa(SEQ ID NO:246)
- [0809] HX2QGT FTSDY SKYLD ERAAK DFVC*W LMNTa(内酰胺@16-20;SEQ ID NO:247)
- [0810] HX2QGT FTSDY SKYLD ERAAQ DFVC*W LMNTa(内酰胺@12-16;SEQ ID NO:248)
- [0811] HX2QGT FTSDY SKYLD ERAAK DFVC*W LMNTa(内酰胺@12-16;SEQ ID NO:249)
- [0812] HX2QGT FTSDY SKYLD KRAAE DFVC*W LMNTa(内酰胺@16-20;SEQ ID NO:250)
- [0813] HX2QGT FTSDY SKYLD EQAAK EFIC*W LMNTa(SEQ ID NO:251)
- [0814] HX2QGT FTSDY SKYLD EQAAK EFIC*W LMNTa(内酰胺@12-16;SEQ ID NO:252)
- [0815] HX2QGT FTSDY SKYLD EQAAK EFIC*W LMNTa(内酰胺@16-20;SEQ ID NO:253)
- [0816] HX2QGT FTSDY SKYLD EQAAK EFIC*W LVKGa(SEQ ID NO:254)
- [0817] HX2QGT FTSDY SKYLD EQAAK EFIC*W LVKGa(内酰胺@12-16;SEQ ID NO:255)
- [0818] HX2QGT FTSDY SKYLD EQAAK EFIC*W LVKGa(内酰胺@16-20;SEQ ID NO:256)
- [0819] 其中在前述序列中,X2=氨基异丁酸;其中C*为Cys或与亲水聚合物连接的Cys,或作为备选C*为与约20kD平均重量的聚乙二醇连接的Cys,或作为备选C*为与约40kD平均重量的聚乙二醇连接的Cys。
- [0820] HX2QGT FTSDY SKYLD ERRAQ DFVC*W LMNTa(SEQ ID NO:257)
- [0821] HX2QGT FTSDY SKYLD ERRAK DFVC*W LMNTa(SEQ ID NO:258)
- [0822] HX2QGT FTSDY SKYLD ERRAK DFVC*W LMNTa(内酰胺@16-20;SEQ ID NO:259)
- [0823] HX2QGT FTSDY SKYLD ERRAQ DFVC*W LMNTa(内酰胺@12-16;SEQ ID NO:260)
- [0824] HX2QGT FTSDY SKYLD ERRAK DFVC*W LMNTa(内酰胺@12-16;SEQ ID NO:261)
- [0825] HX2QGT FTSDY SKYLD KRRAE DFVC*W LMNTa(内酰胺@16-20;SEQ ID NO:262)
- [0826] HX2QGT FTSDY SKYLD ERAAK DFVC*W LMNTa(SEQ ID NO:263)
- [0827] HX2QGT FTSDY SKYLD ERAAK DFVC*W LMNTa(内酰胺@16-20;SEQ ID NO:264)
- [0828] HX2QGT FTSDY SKYLD ERAAQ DFVC*W LMNTa(内酰胺@12-16;SEQ ID NO:265)
- [0829] HX2QGT FTSDY SKYLD ERAAK DFVC*W LMNTa(内酰胺@12-16;SEQ ID NO:266)
- [0830] HX2QGT FTSDY SKYLD KRAAE DFVC*W LMNTa(内酰胺@16-20;SEQ ID NO:267)
- [0831] HX2QGT FTSDY SKYLD EQAAK EFIC*W LMNTa(SEQ ID NO:268)
- [0832] HX2QGT FTSDY SKYLD EQAAK EFIC*W LMNTa(内酰胺@12-16;SEQ ID NO:269)
- [0833] HX2QGT FTSDY SKYLD EQAAK EFIC*W LMNTa(内酰胺@16-20;SEQ ID NO:270)

- [0834] HX2QGT FTSDY SKYLD EQAAK EFIC*W LVKGa(SEQ ID NO:271)
- [0835] HX2QGT FTSDY SKYLD EQAAK EFIC*W LVKGa(内酰胺@12-16;SEQ ID NO:272)
- [0836] HX2QGT FTSDY SKYLD EQAAK EFIC*W LVKGa(内酰胺@16-20;SEQ ID NO:273)
- [0837] 其中在前述序列中,X2=(D-Ala);其中C*为Cys或与亲水聚合物连接的Cys,或作为备选C*为与约20kD平均重量的聚乙二醇连接的Cys,或作为备选C*为与约40kD平均重量的聚乙二醇连接的Cys。
- [0838] HSEGT FTSDY SKYLD ERRAQ DFVC*W LMNTa(SEQ ID NO:274)
- [0839] HSEGT FTSDY SKYLD ERRAK DFVC*W LMNTa(S EQ ID NO:275)
- [0840] HSEGT FTSDY SKYLD ERRAK DFVC*W LMNTa(内酰胺@16-20;SEQ ID NO:276)
- [0841] HSEGT FTSDY SKYLD ERRAQ DFVC*W LMNTa(内酰胺@12-16;SEQ ID NO:277)
- [0842] HSEGT FTSDY SKYLD ERRAK DFVC*W LMNTa(内酰胺@12-16;SEQ ID NO:278)
- [0843] HSEGT FTSDY SKYLD KRRAE DFVC*W LMNTa(内酰胺@16-20;SEQ ID NO:279)
- [0844] HSEGT FTSDY SKYLD ERAAK DFVC*W LMNTa(SEQ ID NO:280)
- [0845] HSEGT FTSDY SKYLD ERAAK DFVC*W LMNTa(内酰胺@16-20;SEQ ID NO:281)
- [0846] HSEGT FTSDY SKYLD ERAAQ DFVC*W LMNTa(内酰胺@12-16;SEQ ID NO:282)
- [0847] HSEGT FTSDY SKYLD ERAK DFVC*W LMNTa(内酰胺@12-16;SEQ ID NO:283)
- [0848] HSEGT FTSDY SKYLD KRAAE DFVC*W LMNTa(内酰胺@16-20;SEQ ID NO:284)
- [0849] HSEGT FTSDY SKYLD EQAAK EFIC*W LMNTa(SEQ ID NO:285)
- [0850] HSEGT FTSDY SKYLD EQAAK EFIC*W LMNTa(内酰胺@12-16;SEQ ID NO:286)
- [0851] HSEGT FTSDY SKYLD EQAAK EFIC*W LMNTa(内酰胺@16-20;SEQ ID NO:287)
- [0852] HSEGT FTSDY SKYLD EQAAK EFIC*W LVKGa(SEQ ID NO:288)
- [0853] HSEGT FTSDY SKYLD EQAAK EFIC*W LVKGa(内酰胺@12-16;SEQ ID NO:289)
- [0854] HSEGT FTSDY SKYLD EQAAK EFIC*W LVKGa(内酰胺@16-20;SEQ ID NO:290)
- [0855] X1SEGT FTSDY SKYLD ERRAQ DFVC*W LMNTa(SEQ ID NO:291)
- [0856] X1SEGT FTSDY SKYLD ERRAK DFVC*W LMNTa(SEQ ID NO:292)
- [0857] X1SEGT FTSDY SKYLD ERRAK DFVC*W LMNTa(内酰胺@16-20;SEQ ID NO:293)
- [0858] X1SEGT FTSDY SKYLD ERRAQ DFVC*W LMNTa(内酰胺@12-16;SEQ ID NO:294)
- [0859] X1SEGT FTSDY SKYLD ERRAK DFVC*W LMNTa(内酰胺@12-16;SEQ ID NO:295)
- [0860] X1SEGT FTSDY SKYLD KRRAE DFVC*W LMNTa(内酰胺@16-20;SEQ ID NO:296)
- [0861] X1SEGT FTSDY SKYLD ERAAK DFVC*W LMNTa(SEQ ID NO:297)
- [0862] X1SEGT FTSDY SKYLD ERAAK DFVC*W LMNTa(内酰胺@16-20;SEQ ID NO:298)
- [0863] X1SEGT FTSDY SKYLD ERAAQ DFVC*W LMNTa(内酰胺@12-16;SEQ ID NO:299)
- [0864] X1SEGT FTSDY SKYLD ERAAK DFVC*W LMNTa(内酰胺@12-16;SEQ ID NO:300)
- [0865] X1SEGT FTSDY SKYLD KRAAE DFVC*W LMNTa(内酰胺@16-20;SEQ ID NO:301)
- [0866] X1SEGT FTSDY SKYLD EQAAK EFIC*W LMNTa(SEQ ID NO: 302)
- [0867] X1SEGT FTSDY SKYLD EQAAK EFIC*W LMNTa(内酰胺@12-16;SEQ ID NO:303)
- [0868] X1SEGT FTSDY SKYLD EQAAK EFIC*W LMNTa(内酰胺@16-20;SEQ ID NO:304)
- [0869] X1SEGT FTSDY SKYLD EQAAK EFIC*W LVKGa(SEQ ID NO:305)
- [0870] X1SEGT FTSDY SKYLD EQAAK EFIC*W LVKGa(内酰胺@12-16;SEQ ID NO:306)

[0871] X1SEGT FTSDY SKYLD EQAAK EFIC*W LVKGa(内酰胺@16-20;SEQ ID NO:307)

[0872] 其中在前述序列中,X1=(脱-氨基)His;其中C*为Cys或与亲水聚合物连接的Cys,或作为备选C*为与约20kD平均重量的聚乙二醇连接的Cys,或作为备选C*为与约40kD平均重量的聚乙二醇连接的Cys。

[0873] HX2EGT FTSDY SKYLD ERRAQ DFVC*W LMNTa(SEQ ID NO:308)

[0874] HX2EGT FTSDY SKYLD ERRAK DFVC*W LMNTa(SEQ ID NO:309)

[0875] HX2EGT FTSDY SKYLD ERRAK DFVC*W LMNTa(内酰胺@16-20;SEQ ID NO:310)

[0876] HX2EGT FTSDY SKYLD ERRAQ DFVC*W LMNTa(内酰胺@12-16;SEQ ID NO:311)

[0877] HX2EGT FTSDY SKYLD ERRAK DFVC*W LMNTa(内酰胺@12-16;SEQ ID NO:312)

[0878] HX2EGT FTSDY SKYLD KRRAE DFVC*W LMNTa(内酰胺@16-20;SEQ ID NO:313)

[0879] HX2EGT FTSDY SKYLD ERAAK DFVC*W LMNTa(SEQ ID NO:314)

[0880] HX2EGT FTSDY SKYLD ERAAK DFVC*W LMNTa(内酰胺@16-20;SEQ ID NO:315)

[0881] HX2EGT FTSDY SKYLD ERAAQ DFVC*W LMNTa(内酰胺@12-16;SEQ ID NO:316)

[0882] HX2EGT FTSDY SKYLD ERAAK DFVC*W LMNTa(内酰胺@12-16;SEQ ID NO:317)

[0883] HX2EGT FTSDY SKYLD KRAAE DFVC*W LMNTa(内酰胺@16-20;SEQ ID NO:318)

[0884] HX2EGT FTSDY SKYLD EQAAK EFIC*W LMNTa(SEQ ID NO:319)

[0885] HX2EGT FTSDY SKYLD EQAAK EFIC*W LMNTa(内酰胺@12-16;SEQ ID NO:320)

[0886] HX2EGT FTSDY SKYLD EQAAK EFIC*W LMNTa(内酰胺@16-20;SEQ ID NO:321)

[0887] HX2EGT FTSDY SKYLD EQAAK EFIC*W LVKGa(SEQ ID NO:322)

[0888] HX2EGT FTSDY SKYLD EQAAK EFIC*W LVKGa(内酰胺@12-16;SEQ ID NO:323)

[0889] HX2EGT FTSDY SKYLD EQAAK EFIC*W LVKGa(内酰胺@16-20;SEQ ID NO:324)

[0890] 其中在前述序列中,X2=氨基异丁酸;其中C*为Cys或与亲水聚合物连接的Cys,或作为备选C*为与约20kD平均重量的聚乙二醇连接的Cys,或作为备选C*为与约40kD平均重量的聚乙二醇连接的Cys。

[0891] HX2EGT FTSDY SKYLD ERRAQ DFVC*W LMNTa(SEQ ID NO:325)

[0892] HX2EGT FTSDY SKYLD ERRAK DFVC*W LMNTa(SEQ ID NO:326)

[0893] HX2EGT FTSDY SKYLD ERRAK DFVC*W LMNTa(内酰胺@16-20;SEQ ID NO:327)

[0894] HX2EGT FTSDY SKYLD ERRAQ DFVC*W LMNTa(内酰胺@12-16;SEQ ID NO:328)

[0895] HX2EGT FTSDY SKYLD ERRAK DFVC*W LMNTa(内酰胺@12-16;SEQ ID NO:329)

[0896] HX2EGT FTSDY SKYLD KRRAE DFVC*W LMNTa(内酰胺@16-20;SEQ ID NO:330)

[0897] HX2EGT FTSDY SKYLD ERAAK DFVC*W LMNTa(SEQ ID NO:331)

[0898] HX2EGT FTSDY SKYLD ERAAK DFVC*W LMNTa(内酰胺@16-20;SEQ ID NO:332)

[0899] HX2EGT FTSDY SKYLD ERAAQ DFVC*W LMNTa(内酰胺@12-16;SEQ ID NO:333)

[0900] HX2EGT FTSDY SKYLD ERAAK DFVC*W LMNTa(内酰胺@12-16;SEQ ID NO:334)

[0901] HX2EGT FTSDY SKYLD KRAAE DFVC*W LMNTa(内酰胺@16-20;SEQ ID NO:335)

[0902] HX2EGT FTSDY SKYLD EQAAK EFIC*W LMNTa(SEQ ID NO:336)

[0903] HX2EGT FTSDY SKYLD EQAAK EFIC*W LMNTa(内酰胺@12-16;SEQ ID NO:337)

[0904] HX2EGT FTSDY SKYLD EQAAK EFIC*W LMNTa(内酰胺@16-20;SEQ ID NO:338)

[0905] HX2EGT FTSDY SKYLD EQAAK EFIC*W LVKGa(SEQ ID NO:339)

- [0906] HX2EGT FTSDY SKYLD EQAAK EFIC*W LVKGa(内酰胺@12-16;SEQ ID NO:340)
- [0907] HX2EGT FTSDY SKYLD EQAAK EFIC*W LVKGa(内酰胺@16-20;SEQ ID NO:341)
- [0908] 其中在前述序列中,X2=(D-Ala);其中C*为Cys或与亲水聚合物连接的Cys,或作为备选C*为与约20kD平均重量的聚乙二醇连接的Cys,或作为备选C*为与约40kD平均重量的聚乙二醇连接的Cys。
- [0909] HSQGT FTSDY SKYLD C*RRAK DFVQW LMNTa(SEQ ID NO:342)
- [0910] HSQGT FTSDY SKYLD C*RAAK DFVQW LMNTa(SEQ ID NO:343)
- [0911] HSQGT FTSDY SKYLD C*QAAK EFIAW LMNTa(SEQ ID NO:344)
- [0912] HSQGT FTSDY SKYLD C*QAAK EFIAW LVKGa(SEQ ID NO:345)
- [0913] X1SQGT FTSDY SKYLD C*RRAK DFVQW LMNTa(SEQ ID NO:346)
- [0914] X1SQGT FTSDY SKYLD C*RAAK DFVQW LMNTa(SEQ ID NO:347)
- [0915] X1SQGT FTSDY SKYLD C*QAAK EFIAW LMNTa(SEQ ID NO:348)
- [0916] X1SQGT FTSDY SKYLD C*QAAK EFIAW LVKGa(SEQ ID NO:349)
- [0917] 其中X1=(脱-氨基)His;其中C*为Cys或与亲水聚合物连接的Cys,或作为备选C*为与约20kD平均重量的聚乙二醇连接的Cys,或作为备选C*为与约40kD平均重量的聚乙二醇连接的Cys。
- [0918] HX2QGT FTSDY SKYLD C*RRAK DFVQW LMNTa(SEQ ID NO:350)
- [0919] HX2QGT FTSDY SKYLD C*RAAK DFVQW LMNTa(SEQ ID NO:351)
- [0920] HX2QGT FTSDY SKYLD C*QAAK EFIAW LMNTa(SEQ ID NO: 352)
- [0921] HX2QGT FTSDY SKYLD C*QAAK EFIAW LVKGa(SEQ ID NO:353)
- [0922] 其中X2=氨基异丁酸;其中C*为Cys或与亲水聚合物连接的Cys,或作为备选C*为与约20kD平均重量的聚乙二醇连接的Cys,或作为备选C*为与约40kD平均重量的聚乙二醇连接的Cys。
- [0923] HX2QGT FTSDY SKYLD C*RRAK DFVQW LMNTa(SEQ ID NO:354)
- [0924] HX2QGT FTSDY SKYLD C*RAAK DFVQW LMNTa(SEQ ID NO:355)
- [0925] HX2QGT FTSDY SKYLD C*QAAK EFIAW LMNTa(SEQ ID NO:356)
- [0926] HX2QGT FTSDY SKYLD C*QAAK EFIAW LVKGa(SEQ ID NO:357)
- [0927] 其中X2=(D-Ala);其中C*为Cys或与亲水聚合物连接的Cys,或作为备选C*为与约20kD平均重量的聚乙二醇连接的Cys,或作为备选C*为与约40kD平均重量的聚乙二醇连接的Cys。
- [0928] HSEGT FTSDY SKYLD C*RRAK DFVQW LMNTa(SEQ ID NO:358)
- [0929] HSEGT FTSDY SKYLD C*RAAK DFVQW LMNTa(SEQ ID NO:359)
- [0930] HSEGT FTSDY SKYLD C*QAAK EFIAW LMNTa(SEQ ID NO:360)
- [0931] HSEGT FTSDY SKYLD C*QAAK EFIAW LVKGa(SEQ ID NO:361)
- [0932] X1SEGT FTSDY SKYLD C*RRAK DFVQW LMNTa(SEQ ID NO:362)
- [0933] X1SEGT FTSDY SKYLD C*RAAK DFVQW LMNTa(SEQ ID NO:363)
- [0934] X1SEGT FTSDY SKYLD C*QAAK EFIAW LMNTa(SEQ ID NO:364)
- [0935] X1SEGT FTSDY SKYLD C*QAAK EFIAW LVKGa(SEQ ID NO:365)
- [0936] 其中X1=(脱-氨基)His;其中C*为Cys或与亲水聚合物连接的Cys,或作为备选C*

为与约20kD平均重量的聚乙二醇连接的Cys,或作为备选C*为与约40kD平均重量的聚乙二醇连接的Cys。

[0937] HX2EGT FTSDY SKYLD C*RRAK DFVQW LMNTa(SEQ ID NO:366)

[0938] HX2EGT FTSDY SKYLD C*RAAK DFVQW LMNTa(SEQ ID NO:367)

[0939] HX2EGT FTSDY SKYLD C*QAAK EFIAW LMNTa(SEQ ID NO:368)

[0940] HX2EGT FTSDY SKYLD C*QAAK EFIAW LVKGa(SEQ ID NO:369)

[0941] 其中X2=(D-Ala);其中C*为Cys或与亲水聚合物连接的Cys,或作为备选C*为与约20kD平均重量的聚乙二醇连接的Cys,或作为备选C*为与约40kD平均重量的聚乙二醇连接的Cys。

[0942] HX2EGT FTSDY SKYLD C*RRAK DFVQW LMNTa(SEQ ID NO:370)

[0943] HX2EGT FTSDY SKYLD C*RAAK DFVQW LMNTa(SEQ ID NO:371)

[0944] HX2EGT FTSDY SKYLD C*QAAK EFIAW LMNTa(SEQ ID NO:372)

[0945] HX2EGT FTSDY SKYLD C*QAAK EFIAW LVKGa(SEQ ID NO:373)

[0946] 其中X2=(D-Ala);其中C*为Cys或与亲水聚合物连接的Cys,或作为备选C*为与约20kD平均重量的聚乙二醇连接的Cys,或作为备选C*为与约40kD平均重量的聚乙二醇连接的Cys。

[0947] HSQGT FTSDY SKYLD ERRAQ DFVQW LMDTa(SEQ ID NO:374)

[0948] HSQGT FTSDY SKYLD ERRAQ DFVQW LMDTa(SEQ ID NO:375)

[0949] HSQGT FTSDY SKYLD ERRAQ DFVQW LMDTa(内酰胺@16-20;SEQ ID NO:376)

[0950] HSQGT FTSDY SKYLD ERRAQ DFVQW LMDTa(内酰胺@12-16;SEQ ID NO:377)

[0951] HSQGT FTSDY SKYLD ERRAQ DFVQW LMDTa(内酰胺@12-16;SEQ ID NO:378)

[0952] HSQGT FTSDY SKYLD KRRAE DFVQW LMDTa(内酰胺@16-20;SEQ ID NO:379)

[0953] HSQGT FTSDY SKYLD ERAAK DFVQW LMDTa(SEQ ID NO:380)

[0954] HSQGT FTSDY SKYLD ERAAK DFVQW LMDTa(内酰胺@16-20;SEQ ID NO:381)

[0955] HSQGT FTSDY SKYLD ERAAQ DFVQW LMDTa(内酰胺@12-16;SEQ ID NO:382)

[0956] HSQGT FTSDY SKYLD ERAAK DFVQW LMDTa(内酰胺@12-16;SEQ ID NO:383)

[0957] HSQGT FTSDY SKYLD KRAAE DFVQW LMDTa(内酰胺@16-20;SEQ ID NO:384)

[0958] HSQGT FTSDY SKYLD EQAAK EFIAW LMDTa(SEQ ID NO:385)

[0959] HSQGT FTSDY SKYLD EQAAK EFIAW LMDTa(内酰胺@12-16;SEQ ID NO:386)

[0960] HSQGT FTSDY SKYLD EQAAK EFIAW LMDTa(内酰胺@16-20;SEQ ID NO:387)

[0961] X1SQGT FTSDY SKYLD ERRAQ DFVQW LMDTa(SEQ ID NO:388)

[0962] X1SQGT FTSDY SKYLD ERRAQ DFVQW LMDTa(SEQ ID NO:389)

[0963] X1SQGT FTSDY SKYLD ERRAQ DFVQW LMDTa(内酰胺@16-20;SEQ ID NO:390)

[0964] X1SQGT FTSDY SKYLD ERRAQ DFVQW LMDTa(内酰胺@12-16;SEQ ID NO:391)

[0965] X1SQGT FTSDY SKYLD ERRAQ DFVQW LMDTa(内酰胺@12-16;SEQ ID NO:392)

[0966] X1SQGT FTSDY SKYLD KRRAE DFVQW LMDTa(内酰胺@16-20;SEQ ID NO:393)

[0967] X1SQGT FTSDY SKYLD ERAAK DFVQW LMDTa(SEQ ID NO:394)

[0968] X1SQGT FTSDY SKYLD ERAAK DFVQW LMDTa(内酰胺@16-20;SEQ ID NO:395)

[0969] X1SQGT FTSDY SKYLD ERAAQ DFVQW LMDTa(内酰胺@12-16;SEQ ID NO:396)

- [0970] X1SQGT FTSDY SKYLD ERAAK DFVQW LMDTa(内酰胺@12-16;SEQ ID NO:397)
- [0971] X1SQGT FTSDY SKYLD KRAAE DFVQW LMDTa(内酰胺@16-20;SEQ ID NO:398)
- [0972] X1SQGT FTSDY SKYLD EQAAK EFIAW LMDTa(SEQ ID NO:399)
- [0973] X1SQGT FTSDY SKYLD EQAAK EFIAW LMDTa(内酰胺@12-16;SEQ ID NO:400)
- [0974] X1SQGT FTSDY SKYLD EQAAK EFIAW LMDTa(内酰胺@16-20;SEQ ID NO:401)
- [0975] 其中在前述序列中,X1=(脱-氨基)His
- [0976] HX2QGT FTSDY SKYLD ERRAQ DFVQW LMDTa(SEQ ID NO:402)
- [0977] HX2QGT FTSDY SKYLD ERRAK DFVQW LMDTa(SEQ ID NO:403)
- [0978] HX2QGT FTSDY SKYLD ERRAK DFVQW LMDTa(内酰胺@16-20;SEQ ID NO:404)
- [0979] HX2QGT FTSDY SKYLD ERRAQ DFVQW LMDTa(内酰胺@12-16;SEQ ID NO:405)
- [0980] HX2QGT FTSDY SKYLD ERRAK DFVQW LMDTa(内酰胺@12-16;SEQ ID NO:406)
- [0981] HX2QGT FTSDY SKYLD KRRAE DFVQW LMDTa(内酰胺@16-20;SEQ ID NO:407)
- [0982] HX2QGT FTSDY SKYLD ERAAK DFVQW LMDTa(SEQ ID NO:408)
- [0983] HX2QGT FTSDY SKYLD ERAAK DFVQW LMDTa(内酰胺@16-20;SEQ ID NO:409)
- [0984] HX2QGT FTSDY SKYLD ERAAQ DFVQW LMDTa(内酰胺@12-16;SEQ ID NO:410)
- [0985] HX2QGT FTSDY SKYLD ERAAK DFVQW LMDTa(内酰胺@12-16;SEQ ID NO:411)
- [0986] HX2QGT FTSDY SKYLD KRAAE DFVQW LMDTa(内酰胺@16-20;SEQ ID NO:412)
- [0987] HX2QGT FTSDY SKYLD EQAAK EFIAW LMDTa(SEQ ID NO:413)
- [0988] HX2QGT FT SDY SKYLD EQAAK EFIAW LMDTa(内酰胺@12-16;SEQ ID NO:414)
- [0989] HX2QGT FTSDY SKYLD EQAAK EFIAW LMDTa(内酰胺@16-20;SEQ ID NO:415)
- [0990] 其中在前述序列中,X2=氨基异丁酸
- [0991] HX2QGT FTSDY SKYLD ERRAQ DFVQW LMDTa(SEQ ID NO:416)
- [0992] HX2QGT FTSDY SKYLD ERRAK DFVQW LMDTa(SEQ ID NO:417)
- [0993] HX2QGT FTSDY SKYLD ERRAK DFVQW LMDTa(内酰胺@16-20;SEQ ID NO:418)
- [0994] HX2QGT FTSDY SKYLD ERRAQ DFVQW LMDTa(内酰胺@12-16;SEQ ID NO:419)
- [0995] HX2QGT FTSDY SKYLD ERRAK DFVQW LMDTa(内酰胺@12-16;SEQ ID NO:420)
- [0996] HX2QGT FTSDY SKYLD KRRAE DFVQW LMDTa(内酰胺@16-20;SEQ ID NO:421)
- [0997] HX2QGT FTSDY SKYLD ERAAK DFVQW LMDTa(SEQ ID NO:422)
- [0998] HX2QGT FTSDY SKYLD ERAAK DFVQW LMDTa(内酰胺@16-20;SEQ ID NO:423)
- [0999] HX2QGT FTSDY SKYLD ERAAQ DFVQW LMDTa(内酰胺@12-16;SEQ ID NO:424)
- [1000] HX2QGT FTSDY SKYLD ERAAK DFVQW LMDTa(内酰胺@12-16;SEQ ID NO:425)
- [1001] HX2QGT FTSDY SKYLD KRAAE DFVQW LMDTa(内酰胺@16-20;SEQ ID NO:426)
- [1002] HX2QGT FTSDY SKYLD EQAAK EFIAW LMDTa(SEQ ID NO:427)
- [1003] HX2QGT FTSDY SKYLD EQAAK EFIAW LMDTa(内酰胺@12-16;SEQ ID NO:428)
- [1004] HX2QGT FTSDY SKYLD EQAAK EFIAW LMDTa(内酰胺@ 16-20;SEQ ID NO:429)
- [1005] 其中在前述序列中,X2=(D-Ala)
- [1006] HSEGT FTSDY SKYLD ERRAQ DFVQW LMDTa(SEQ ID NO:430)
- [1007] HSEGT FTSDY SKYLD ERRAK DFVQW LMDTa(SEQ ID NO:431)
- [1008] HSEGT FTSDY SKYLD ERRAK DFVQW LMDTa(内酰胺@16-20;SEQ ID NO:432)

- [1009] HSEGT FTSDY SKYLD ERRAQ DFVQW LMDTa(内酰胺@12-16;SEQ ID NO:433)
- [1010] HSEGT FTSDY SKYLD ERRAK DFVQW LMDTa(内酰胺@12-16;SEQ ID NO:434)
- [1011] HSEGT FTSDY SKYLD KRRAE DFVQW LMDTa(内酰胺@16-20;SEQ ID NO:435)
- [1012] HSEGT FTSDY SKYLD ERAAK DFVQW LMDTa(SEQ ID NO:436)
- [1013] HSEGT FTSDY SKYLD ERAAK DFVQW LMDTa(内酰胺@16-20;SEQ ID NO:437)
- [1014] HSEGT FTSDY SKYLD ERAAQ DFVQW LMDTa(内酰胺@12-16;SEQ ID NO:438)
- [1015] HSEGT FTSDY SKYLD ERAAK DFVQW LMDTa(内酰胺@12-16;SEQ ID NO:439)
- [1016] HSEGT FTSDY SKYLD KRAAE DFVQW LMDTa(内酰胺@16-20;SEQ ID NO:440)
- [1017] HSEGT FTSDY SKYLD EQAAK EFIAW LMDTa(SEQ ID NO:441)
- [1018] HSEGT FTSDY SKYLD EQAAK EFIAW LMDTa(内酰胺@12-16;SEQ ID NO:442)
- [1019] HSEGT FTSDY SKYLD EQAAK EFIAW LMDTa(内酰胺@16-20;SEQ ID NO:443)
- [1020] X1SEGT FTSDY SKYLD ERRAQ DFVQW LMDTa(SEQ ID NO:444)
- [1021] X1SEGT FTSDY SKYLD ERRAK DFVQW LMDTa(SEQ ID NO:445)
- [1022] X1SEGT FTSDY SKYLD ERRAK DFVQW LMDTa(内酰胺@16-20;SEQ ID NO:446)
- [1023] X1SEGT FTSDY SKYLD ERRAQ DFVQW LMDTa(内酰胺@12-16;SEQ ID NO:447)
- [1024] X1SEGT FTSDY SKYLD ERRAK DFVQW LMDTa(内酰胺@12-16;SEQ ID NO:448)
- [1025] X1SEGT FTSDY SKYLD KRRAE DFVQW LMDTa(内酰胺@16-20;SEQ ID NO:449)
- [1026] X1SEGT FTSDY SKYLD ERAAK DFVQW LMDTa(SEQ ID NO:450)
- [1027] X1SEGT FTSDY SKYLD ERAAK DFVQW LMDTa(内酰胺@16-20;SEQ ID NO:451)
- [1028] X1SEGT FTSDY SKYLD ERAAQ DFVQW LMDTa(内酰胺@12-16;SEQ ID NO:452)
- [1029] X1SEGT FTSDY SKYLD ERAAK DFVQW LMDTa(内酰胺@12-16;SEQ ID NO:453)
- [1030] X1SEGT FTSDY SKYLD KRAAE DFVQW LMDTa(内酰胺@16-20;SEQ ID NO:454)
- [1031] X1SEGT FTSDY SKYLD EQAAK EFIAW LMDTa(SEQ ID NO:455)
- [1032] X1SEGT FTSDY SKYLD EQAAK EFIAW LMDTa(内酰胺@12-16;SEQ ID NO:456)
- [1033] X1SEGT FTSDY SKYLD EQAAK EFIAW LMDTa(内酰胺@ 16-20;SEQ ID NO:457)
- [1034] 其中在前述序列中,X1=(脱-氨基)His
- [1035] HX2EGT FTSDY SKYLD ERRAQ DFVQW LMDTa(SEQ ID NO:458)
- [1036] HX2EGT FTSDY SKYLD ERRAK DFVQW LMDTa(SEQ ID NO:459)
- [1037] HX2EGT FTSDY SKYLD ERRAK DFVQW LMDTa(内酰胺@16-20;SEQ ID NO:460)
- [1038] HX2EGT FTSDY SKYLD ERRAQ DFVQW LMDTa(内酰胺@12-16;SEQ ID NO:461)
- [1039] HX2EGT FTSDY SKYLD ERRAK DFVQW LMDTa(内酰胺@12-16;SEQ ID NO:462)
- [1040] HX2EGT FTSDY SKYLD KRRAE DFVQW LMDTa(内酰胺@16-20;SEQ ID NO:463)
- [1041] HX2EGT FTSDY SKYLD ERAAK DFVQW LMDTa(SEQ ID NO:464)
- [1042] HX2EGT FTSDY SKYLD ERAAK DFVQW LMDTa(内酰胺@16-20;SEQ ID NO:465)
- [1043] HX2EGT FTSDY SKYLD ERAAQ DFVQW LMDTa(内酰胺@12-16;SEQ ID NO:466)
- [1044] HX2EGT FTSDY SKYLD ERAAK DFVQW LMDTa(内酰胺@12-16;SEQ ID NO:467)
- [1045] HX2EGT FTSDY SKYLD KRAAE DFVQW LMDTa(内酰胺@16-20;SEQ ID NO:468)
- [1046] HX2EGT FTSDY SKYLD EQAAK EFIAW LMDTa(SEQ ID NO:469)
- [1047] HX2EGT FTSDY SKYLD EQAAK EFIAW LMDTa(内酰胺@12-16;SEQ ID NO:470)

- [1048] HX2EGT FTSDY SKYLD EQAAK EFIAW LMDTa(内酰胺@16-20;SEQ ID NO:471)
- [1049] 其中在前述序列中,X2=氨基异丁酸
- [1050] HX2EGT FTSDY SKYLD ERRAQ DFVQW LMDTa(SEQ ID NO:472)
- [1051] HX2EGT FTSDY SKYLD ERRAK DFVQW LMDTa(SEQ ID NO:473)
- [1052] HX2EGT FTSDY SKYLD ERRAK DFVQW LMDTa(内酰胺@16-20;SEQ ID NO:474)
- [1053] HX2EGT FTSDY SKYLD ERRAQ DFVQW LMDTa(内酰胺@12-16;SEQ ID NO:475)
- [1054] HX2EGT FTSDY SKYLD ERRAK DFVQW LMDTa(内酰胺@12-16;SEQ ID NO:476)
- [1055] HX2EGT FTSDY SKYLD KRRAE DFVQW LMDTa(内酰胺@16-20;SEQ ID NO:477)
- [1056] HX2EGT FTSDY SKYLD ERAAK DFVQW LMDTa(SEQ ID NO:478)
- [1057] HX2EGT FTSDY SKYLD ERAAK DFVQW LMDTa(内酰胺@16-20;SEQ ID NO:479)
- [1058] HX2EGT FTSDY SKYLD ERAAQ DFVQW LMDTa(内酰胺@12-16;SEQ ID NO:480)
- [1059] HX2EGT FTSDY SKYLD ERAAK DFVQW LMDTa(内酰胺@12-16;SEQ ID NO:481)
- [1060] HX2EGT FTSDY SKYLD KRAAE DFVQW LMDTa(内酰胺@16-20;SEQ ID NO:482)
- [1061] HX2EGT FTSDY SKYLD EQAAK EFIAW LMDTa(SEQ ID NO:483)
- [1062] HX2EGT FTSDY SKYLD EQAAK EFIAW LMDTa(内酰胺@ 12-16;SEQ ID NO:484)
- [1063] HX2EGT FTSDY SKYLD EQAAK EFIAW LMDTa(内酰胺@16-20;SEQ ID NO:485)
- [1064] 其中在前述序列中,X2=(D-Ala)。
- [1065] 亦基本上如以上实施例1-11所述构建以下含约5或更高的GLP-1/胰高血糖素活性比率的胰高血糖素肽。在这些肽中,通常2位AIB提供DPP IV抗性但亦显著降低胰高血糖素活性。
- [1066] HX2QGT FTSDY SKYLD EQAAK EFIC*W LMNTa(SEQ ID NO:486)
- [1067] HX2QGT FTSDY SKYLD EQAAK EFIAW LMNC*a(SEQ ID NO:487)
- [1068] HX2QGT FTSDY SKYLD EQAAK EFIAW LMNGG PS SGAPPPSC*a(SEQ ID NO:488)
- [1069] HX2QGT FTSDY SKYLD EQAAK EFIAW LMNGG PS SGAPPPSC*a(内酰胺@16-20;SEQ ID NO:489)
- [1070] HX2QGT FTSDY SKYLD EQAAK EFIC*W LMNGG PSSGAPPPSa(SEQ ID NO:490)
- [1071] HX2QGT FTSDY SKYLD EQAAK EFIC*W LMNGG PSSGAPPPSa(内酰胺@16-20;SEQ ID NO:491)
- [1072] 其中在前述序列中X2=AIB,其中C*为Cys或与亲水聚合物连接的Cys,或作为备选C*为与约20kD平均重量的聚乙二醇连接的Cys,或作为备选C*为与约40kD平均重量的聚乙二醇连接的Cys。
- [1073] HX2QGT FTSDY SKYLD ERAAK DFVC*W LMNTa(SEQ ID NO:492)
- [1074] HX2QGT FTSDY SKYLD ERAAK DFVQW LMNC*a(SEQ ID NO:493)
- [1075] HX2QGT FTSDY SKYLD ERAAK DFVQW LMNGG PSSGAPPPSC*a(SEQ ID NO:494)
- [1076] HX2QGT FTSDY SKYLD ERAAK DFVQW LMNGG PSSGA PPPSC*a(内酰胺@16-20;SEQ ID NO:495)
- [1077] HX2QGT FTSDY SKYLD ERAAK DFVC*W LMNGG PSSGA PPPSa(SEQ ID NO:496)
- [1078] HX2QGT FTSDY SKYLD ERAAK DFVC*W LMNGG PSSGA PPPSa(内酰胺@16-20;SEQ ID NO:497)

- [1079] HX2QGT FTSDY SKYLD ERRAK DFVC*W LMNTa(SEQ ID NO:498)
- [1080] HX2QGT FTSDY SKYLD ERRAK DFVQW LMNC*a(SEQ ID NO:499)
- [1081] HX2QGT FTSDY SKYLD ERRAK DFVQW LMNGG PSSGA PPPSC*a(SEQ ID NO:500)
- [1082] HX2QGT FTSDY SKYLD ERRAK DFVQW LMNGG PSSGA PPPSC*a(内酰胺@16-20;SEQ ID NO:501)
- [1083] HX2QGT FTSDY SKYLD ERRAK DFVC*W LMNGG PSSGA PPPSa(SEQ ID NO:502)
- [1084] HX2QGT FTSDY SKYLD ERRAK DFVC*W LMNGG PSSGA PPPSa(内酰胺@16-20;SEQ ID NO:503)
- [1085] 其中在前述序列中X2=AIB,其中C*为Cys或与亲水聚合物连接的Cys,或作为备选C*为与约20kD平均重量的聚乙二醇连接的Cys,或作为备选C*为与约40kD平均重量的聚乙二醇连接的Cys。
- [1086] 亦基本上如以上实施例1-11所述构建以下为GLP-1/胰高血糖素共激动剂的胰高血糖素肽。16和20位氨基酸之间形成的内酰胺桥恢复由2位取代引起的胰高血糖素活性的降低。
- [1087] HX2QGT FTSDY SKYLD EQAAK EFIC*W LMNTa(内酰胺@16-20;SEQ ID NO:504)
- [1088] 其中在前述序列中X2=AIB,其中C*为Cys或与亲水聚合物连接的Cys,或作为备选C*为与约20kD平均重量的聚乙二醇连接的Cys,或作为备选C*为与约40kD平均重量的聚乙二醇连接的Cys。
- [1089] X1SQGT FTSDY SKYLD EQAAK EFIC*W LMNTa(内酰胺@16-20;SEQ ID NO:505)
- [1090] X1SQGT FTSDY SKYLD EQAAK EFIAW LMNC*a(内酰胺@16-20;SEQ ID NO:506)
- [1091] X1SQGT FTSDY SKYLD EQAAK EFIAW LMNGG PSSGA PPPSC*a(内酰胺@16-20;SEQ ID NO:507)
- [1092] X1SQGT FTSDY SKYLD ERRAK DFVQW LMNGG PSSGA PPPSC*a(内酰胺@16-20;SEQ ID NO:508)
- [1093] X1SQGT FTSDY SKYLD EQAAK EFIC*W LMNGG PSSGA PPPSa(内酰胺@16-20;SEQ ID NO:509)
- [1094] X1SQGT FTSDY SKYLD ERRAK DFVC*W LMNTa(内酰胺@16-20;SEQ ID NO:510)
- [1095] HX2QGT FTSDY SKYLD ERRAK DFVC*W LMNTa(内酰胺@16-20;SEQ ID NO:511)
- [1096] X1SQGT FTSDY SKYLD ERRAK DFVQW LMNC*a(内酰胺@16-20;SEQ ID NO:512)
- [1097] X1SQGT FTSDY SKYLD ERRAK DFVC*W LMNGG PSSGAPPPSa(内酰胺@16-20;SEQ ID NO:513)
- [1098] 其中在前述序列中X1=DMIA(α , α -二甲基咪唑乙酸),其中C*为Cys或与亲水聚合物连接的Cys,或作为备选C*为与约20kD平均重量的聚乙二醇连接的Cys,或作为备选C*为与约40kD平均重量的聚乙二醇连接的Cys。
- [1099] HSQGT FTSDY SKYLD EQAAK EFIC*W LMNTa(任选含内酰胺@16-20;SEQ ID NO:514)
- [1100] 其中C*为Cys或与亲水聚合物连接的Cys,或作为备选C*为与约20kD平均重量的聚乙二醇连接的Cys,或作为备选C*为与约40kD平均重量的聚乙二醇连接的Cys。
- [1101] HX2QGT FTSDY SKYLD ERRAK DFVC*W LMNTa(内酰胺@16-20;SEQ ID NO:517)

- [1102] HX2QGT FTSDY SKYLD ERRAK DFVC*W LMNTa(内酰胺@16-20;SEQ ID NO:528)
- [1103] HX2QGT FTSDY SKYLD ERRAK EFIC*W LMNGG PSSGA PPPSC*a(SEQ ID NO:531)
- [1104] HX2QGT FTSDY SKYLD EQAAK EFIAW LMNGG PSSGA PPPSC*C*a(SEQ ID NO:532)
- [1105] HX2QGT FTSDY SKYLD EQAAK EFIC*W LMNGG PSSGA PPPSa(SEQ ID NO:533)
- [1106] 其中在前述序列中X2=AIB,其中C*为Cys或与亲水聚合物连接的Cys,或作为备选C*为与约20kD平均重量的聚乙二醇连接的Cys,或作为备选C*为与约40kD平均重量的聚乙二醇连接的Cys。
- [1107] HSQGT FTSDYSKYLD EQAAK EFIC*W LMNTa(SEQ ID NO:518)
- [1108] X1SQGT FTSDYSKYLD EQAAK EFIC*W LMNTa(SEQ ID NO:519)
- [1109] X1SQGT FTSDYSKYLD EQAAK EFIAW LMNC*a(SEQ ID NO:520)
- [1110] X1SQGT FTSDY SKYLD ERRAK DFVC*W LMNGG PSSGAPPPSa(SEQ ID NO:529)
- [1111] X1SQGT FTSDY SKYLD ERRAK DFVC*W LMNTa(SEQ ID NO:530)
- [1112] 其中在前述序列中X1=DMIA(α , α -二甲基咪唑乙酸),其中C*为Cys或与亲水聚合物连接的Cys,或作为备选C*为与约20kD平均重量的聚乙二醇连接的Cys,或作为备选C*为与约40kD平均重量的聚乙二醇连接的Cys。
- [1113] HSQGT FTSDYSKYLD SRRAQ DFVQW LMNTGPSSGAPPPSa(SEQ ID NO:521)
- [1114] HSQGT FTSDYSKYLD SRRAQ DFVQW LMNGGPSSGAPPPSa(SEQ ID NO:522)
- [1115] HSQGT FTSDYSKYLD SRRAQ DFVQW LMKGGPS SGAPPPSa(SEQ ID NO:523)
- [1116] HSQGT FTSDYSKYLD SRRAQ DFVQW LVKGGPSSGAPPPSa(SEQ ID NO:524)
- [1117] HSQGT FTSDYSKYLD SRRAQ DFVQW LMDGGPS SGAPPPSa(SEQ ID NO:525)
- [1118] HSQGT FTSDYSKYLD ERRAK DFVQW LMDGGPS SGAPPPSa(SEQ ID NO:526)
- [1119] HAEGT FTSDV S SYLE GQAAK EFIAW LVKGGa(SEQ ID NO:527)
- [1120] X1X2QGT FTSDY SKYLD ERX5AK DFVX3W LMNX4(SEQ ID NO:61)
- [1121] 其中
- [1122] X1=His、D-组氨酸、去氨基组氨酸、羟基-组氨酸、乙酰基-组氨酸、高组氨酸或 α , α -二甲基咪唑乙酸(DMIA)N-甲基组氨酸、 α -甲基组氨酸或咪唑乙酸,
- [1123] X2=Ser、D-丝氨酸、Ala、Val、甘氨酸、N-甲基丝氨酸或氨基异丁酸(AIB)、N-甲基丙氨酸和D-丙氨酸
- [1124] X3=Ala、Gln或Cys-PEG
- [1125] X4=Thr-CONH2或Cys-PEG或GGPSSGAPPPS(SEQ ID NO:515)或GGPSSGAPPPSC-PEG(SEQ ID NO:516)
- [1126] 前提为当X3为Cys-PEG时,X4不是Cys-PEG或GGPSSGAPPPSC-PEG(SEQ ID NO:516),并当X2=Ser时,X1不是His。
- [1127] X5=Ala或Arg。
- [1128] X1X2QGT FTSDY SKYLD EQ X5AK EFI X3W LMNX4(SEQ ID NO:62)
- [1129] 其中
- [1130] X1=His、D-组氨酸、去氨基组氨酸、羟基-组氨酸、乙酰基-组氨酸、高组氨酸或 α , α -二甲基咪唑乙酸(DMIA)、N-甲基组氨酸、 α -甲基组氨酸或咪唑乙酸
- [1131] X2=Ser、D-丝氨酸、Ala、Val、甘氨酸、N-甲基丝氨酸或氨基异丁酸(AIB)、N-甲基

丙氨酸和D-丙氨酸

[1132] X3=Ala、Gln或Cys-PEG

[1133] X4=Thr-CONH₂或Cys-PEG或GGPSSGAPPPS(SEQ ID NO:515)或GGPSSGAPPPSC-PEG(SEQ ID NO:516)

[1134] 前提为当X3为Cys-PEG 时,X4不是Cys-PEG或GGPSSGAPPPSC-PEG(SEQ ID NO:516),并当X2=Ser时,X1不是His。

[1135] X5=Ala或Arg

[1136] HSEGT FTSDY SKYLD EQAAK EFIAW LXNTa(SEQ ID NO:554),其中27位X为正亮氨酸,其中29位氨基酸被酰胺化。

[1137] 任何前述序列可包括另外的修饰,例如不破坏活性的1、2、3、4或5个修饰,包括但不限于可用于提高效价的W10或R20取代。亦可在无赋予DPP IV抗性的修饰下产生任何前述序列,即其中1位为天然His并且2位为天然Ser。另外,任何前述化合物可任选与缀合物连接,所述缀合物例如异种多肽、免疫球蛋白或其部分(例如Fc区)、靶向剂、诊断标记或诊断剂或治疗剂。

[1138] 实施例17

[1139] 基本上如以上实施例1-11所述构建以下胰高血糖素肽,其经修饰以包含与所述胰高血糖素肽的羧基末端连接的c-末端延伸SEQ ID NO:26,并用实施例14所述的体外测定来测定针对GLP-1和胰高血糖素受体的活性。

[1140] 表11表示各种胰高血糖素类似物针对胰高血糖素受体和GLP-1受体的活性。数据显示对于包含c-末端延伸SEQ ID NO:26的胰高血糖素类似物而言,16、20、28和29位氨基酸取代可影响所述类似物针对GLP-1受体的活性。

[1141] 表11

[1142] 胰高血糖素-Cex结构活性关系

[1143]

胰高血糖素肽

胰高血糖素受体

GLP-1 受体

	EC50 (nM)	相对效价 (%)	EC50 (nM)	相对效价 (%)
-MNT ²⁹ (SEQ ID NO: 1)	0.086	100		
-MNTG ³⁰ PSSGAPPPS (SEQ ID NO: 521)	0.14	61	1.19	2
-MNGG ³⁰ PSSGAPPPS (SEQ ID NO: 522)	0.28	30	0.31	8
-MKGG ³⁰ PSSGAPPPS (SEQ ID NO: 523)	0.61	14	0.80	3
-VKGG ³⁰ PSSGAPPPS (SEQ ID NO: 524)	1.16	7	0.21	12
-MDGG ³⁰ PSSGAPPPS (SEQ ID NO: 525)	0.12	72	0.13	19
E ¹⁶ K ²⁰ -MDGG ³⁰ PSSGAPPPS (SEQ ID NO: 526)	0.22	39	0.020	125
GLP-1-VKGG ³⁰ (SEQ ID NO: 527)			0.025	100

[1144] 实施例18

[1145] 表12表示比较各种胰高血糖素肽针对胰高血糖素受体和GLP-1受体的相对活性所累积的体外数据。

[1146] 表12:激动剂和共激动剂w/和w/o PEG的比较

[1147]

	相对于天然效价%	
对照	胰高血糖素受体(GR)	GL-1 受体 (GLP-1R)
胰高血糖素	100	0.78
GLP-1	<0.01	100

[1148]

	母体 w/o PEG		母体 w/PEG	
	相对于天然效价%		相对于天然效价%	
激动剂	GR	GLP-1R	GR	GLP-1R
嵌合体 AIB2, Cys24 (SEQ ID NO: 486)	15.4	160.6	2.6	82.5
嵌合体 AIB2, Cys29 (SEQ ID NO: 487)	20.1	124.6	5.6	54.3
嵌合体 AIB2, Gly29,30 Cys40 Cex (SEQ ID NO: 488)	2.2	359.1	0.3	68.8
嵌合体 AIB2, Gly29,30 Cys40 Cex 内酰胺 (SEQ ID NO: 489)	14.2	169.6	3.2	63.6
嵌合体 AIB2, Gly29,30 Cys24 Cex (SEQ ID NO: 490)	2.5	457.8	0.2	95.4
嵌合体 AIB2, Gly29,30 Cys24 Cex 内酰胺 (SEQ ID NO: 491)	25.2	381.5	1.4	96.4
E16, K20AIB2, A18 Cys24 (SEQ ID NO: 492)	--	--	1.1	73.5
E16, K20AIB2, A18 Gly29,30 Cys24 Cex (SEQ ID NO: 496)	--	--	0.1	88.5
共激动剂	GR	GLP-1R	GR	GLP-1R
嵌合体 DMIA1, Cys24 内酰胺 (SEQ ID NO: 505)	160.7	82.5	19.1	12.5

[1149]

嵌合体 AIB2, Cys24 内酰胺(SEQ ID NO: 504)	114.2	230.4	9.2	38.0
嵌合体 DMIA1, Cys29 内酰胺(SEQ ID NO: 506)	--	--	--	--
嵌合体 DMIA1, Gly29,30 Cys40 Cex 内酰胺(SEQ ID NO: 507)	--	--	--	--
E16, K20 DMIA1, Gly29,30 Cys40 Cex 内酰胺(SEQ ID NO: 508)	--	--	--	--
嵌合体 DMIA1, Gly29,30 Cys24 Cex 内酰胺(SEQ ID NO: 509)	--	--	--	--
E16, K20 DMIA1, Cys24 内酰胺(SEQ ID NO: 510)	--	--	64.1	9.3
E16, K20 AIB2, Cys24 内酰胺(SEQ ID NO: 517)	108.3	96.9	15.8	31.0
嵌合体 Cys24 (SEQ ID NO: 518)	--	--	19.8	29.3
E16, K20 DMIA1, Gly29,30 Cys24 Cex 内酰胺(SEQ ID NO: 513)	116.0	78.3	12.6	11.3
嵌合体 DMIA1, Cys29 (SEQ ID NO: 520)	--	--	5.3	27.3
嵌合体 DMIA1, Cys24 (SEQ ID NO: 519)	28.9	64.5	6.9	19.3

[1150] 实施例19

[1151] 如下制备酰化和/或聚乙二醇化肽。用CS Bio 4886肽合成仪或Applied Biosystems 430A肽合成仪在固相载体树脂上合成肽。用Schnolzer等, Int. J. PEPTIDE Protein Res. 40:180-193(1992)所述的原位中和化学。对于酰化的肽而言, 用Nε-FMOC赖氨酸残基取代待酰化的靶氨基酸残基(例如10位)。用20%哌啶/DMF将完成的N-末端BOC保护的肽处理30分钟除去FMOC/甲酰基基团。通过让10倍摩尔过量的FMOC-保护的间隔物氨基酸(例如FMOC-(N-BOC)-色氨酸-OH)或酰基链(例如C17-COOH)与DMF/DIEA中的PyBOP或DEPBT偶联试剂偶联, 实现与游离ε-氨基Lys残基的偶联。随后除去间隔物氨基酸的FMOC基团, 接着重复与酰基链的偶联。用100% TFA的最后处理导致除去任何侧链保护基团和N-末端BOC基团。用5% DIEA/DMF中和肽树脂, 干燥, 然后用95:5的HF/对甲酚在0°C 1小时使其从载体上裂解。在醚提取后, 用5% HOAc溶液使粗肽成为溶剂化物。然后通过ESI-MS确证溶液样品含有符合分子量的肽。通过RP-HPLC用10% CH₃CN/0.1% TFA到100% CH₃CN中的0.1% TFA线性梯度纯化符合的肽。用Vydac C18 22mm x 250mm蛋白质柱来纯化。通常用20:80比率的缓冲液完成酰化肽类似物的洗脱。将各部分集中在一起, 在分析性RP-HPLC上检查其纯度。冻干纯馏分产生白色固态肽。产率通常视合成而定介于10mg-100mg范围内。

[1152] 若肽包含内酰胺桥和待酰化的靶标残基, 则在将该氨基酸添加到肽主链后进行上述酰化。

[1153] 对于肽的聚乙二醇化, 在7M脲、50mM Tris-HCl缓冲液中用将肽及PEG二者都溶解

为澄清溶液所需的最小量溶剂(通常对于用2-3mg肽反应小于2mL),让等摩尔的肽与40kDa 甲氧基聚(乙二醇)马来酰亚胺基-丙酰胺(Chirotech Technology Ltd.)反应。室温剧烈搅拌4-6小时,由分析性RP-HPLC分析反应物。聚乙二醇化产物表现得与原料明显不同,其保留时间缩短。在Vydac C4柱上用与初始肽纯化所用相似的条件进行纯化。在大约50:50缓冲液比率进行洗脱。收集和冻干纯聚乙二醇化肽馏分。产率高于50%,其依每次反应不等。

[1154] 通过用胰高血糖素受体(GLUR)或GLP-1受体(GLP-1R)和连接到cAMP响应元件的荧光素酶基因共转染HEK293细胞,来测定肽的生物学活性。通过在补充0.25%牛生长血清的DMEM中培养16小时,来对转染的细胞实施血清剥夺,然后用系列稀释的所选类似物及分别作为标准的胰高血糖素或GLP-1孵育5小时。在Genesys 6分光光度计(Thermo Electron Corporation)上从UV吸光度测量中获得280nm处的肽吸光度读数。用Beer定律基于每一类似物的色氨酸和酪氨酸残基计算溶液浓度。在孵育结束时,将100μL LucLite发光底物试剂加入到各孔中,密封板,振荡并置于Wallac Trilux发光计数器(luminescence counter)中进行cAMP检测。用Origin软件(OriginLab, Northampton, MA)计算有效50%浓度(EC50)。

[1155] 制备酰化的基于胰高血糖素的共激动剂肽。这些肽选择的体外结果示于表13中。尽管未酰化的肽例如天然胰高血糖素在磷酸盐-缓冲的溶液中以1mg/mL浓度不可溶,但观察到酰化提高所述肽在中性pH时的溶解性。

[1156] 表13

[1157]

酰化肽的受体激活曲线和nM EC ₅₀ 值				
肽	GLP-1受体	N	胰高血糖素受体	N
GLP-1	0.04	15	>100	3
E16 K20-胰高血糖素-NH ₂	0.21	9	0.18	10
含K ¹⁰ -C ₁₆ 的E16 K20-胰高血糖素-NH ₂	0.09	8	0.40	8
含K ¹⁰ -W-C ₁₆ 的E16 K20-胰高血糖素-NH ₂	0.05	8	0.14	8
含K ¹⁰ -C ₁₈ 的E16 K20-胰高血糖素-NH ₂	0.03	8	0.12	8
含K ¹⁰ -W-C ₁₈ 的E16 K20-胰高血糖素-NH ₂	0.04	11	0.05	12
胰高血糖素	7.42	6	0.07	17

[1158] 四种酰化肽都表现出提高的针对GLP-1受体的效价。包含色氨酸间隔物提供更好的针对胰高血糖素受体的效价。稍优选C18酰基链长。

[1159] 尽管酰化可将肽的半衰期延长数小时或更长,但以数十kDa范围重复的聚乙二醇化效果可更好。制备包含这两种修饰类型的肽。预期这些肽表现出延伸的循环半衰期以及对DPP-IV和其它蛋白酶的抗性。这些肽选择的体外结果示于表14中。

[1160] 表14

[1161]

酰化、聚乙二醇化肽的受体激活曲线和nM EC ₅₀ 值				
肽	GLP-1受体	N	胰高血糖素受体	N
GLP-1	0.04	15	>100	3
E16 K20-胰高血糖素-NH ₂ (SEQ ID NO: 545)	0.21	9	0.18	10
含K ¹⁰ -W-C ₁₆ 和C ²⁴ -40K PEG的E16 K20-胰高血糖素-NH ₂ (SEQ ID NO: 546)	0.23	13	0.52	13

[1162]

含K ¹⁰ -C ₁₈ 和C ²⁴ -40K PEG的E16 K20-胰高血糖素-NH ₂ (SEQ ID NO: 547)	0.15	12	0.84	13
含K ¹⁰ -W-C ₁₈ 和C ²⁴ -40K PEG的E16 K20-胰高血糖素-NH ₂ (SEQ ID NO: 548)	1.64	3	1.30	5
胰高血糖素 (SEQ ID NO: 1)	7.42	6	0.07	17

[1163] 三种肽中的两种保留其针对GLP-1受体和胰高血糖素受体的高效价,且EC₅₀小于1nM。K¹⁰-W-C₁₈酰化和聚乙二醇化的肽针对这两种受体表现出约10-倍的效价损失。这一系列的肽显示,10位酰化与胰高血糖素肽C-末端部分(例如24、28或29位)、C-末端延伸或C-末端(例如通过添加C-末端Cys)的聚乙二醇化相容。

[1164] 实施例20

[1165] 基本上如实施例19所述制备各种酰化的胰高血糖素共激动剂肽并检测体内活性。具体而言,进一步修饰肽A(修饰SEQ ID NO:1以含有2位AIB、16位Glu、17位Gln、18位Ala、20位Lys、21位Glu、23位Ile、24位Cys,其中Cys与40K PEG键合和C-末端酰胺)以包含10位Lys。用C8脂肪酸链、C14脂肪酸链、C16脂肪酸链或C18脂肪酸链酰化Lys10。

[1166] 如实施例14所述测定每一酰化肽针对GLP-1受体的活性,并与作为对照的GLP-1(7-37)酸(SEQ ID NO:50)活性比较。表15中所示的每一酰化肽针对GLP-1受体的EC₅₀与GLP-1肽的EC₅₀相似。

[1167] 表15

	GLP-1 受体激活 效价 EC ₅₀ (nM)
GLP-1	0.0222 ± 0.0002
肽 A K ¹⁰ -C ₈	0.0174 ± 0.0004
肽 A K ¹⁰ -C ₁₄	0.0168 ± 0.0004
肽 A K ¹⁰ -C ₁₆	0.0127 ± 0.0003
肽 A K ¹⁰ -C ₁₈	0.0118 ± 0.0002

[1168]

[1169] 然后用各种酰化和非酰化肽或单独溶媒每周一次(70nmol/kg/周)皮下注射饮食诱导的肥胖症(DIO)小鼠2周,进行体内肽测定。测定初始平均体重为44g的每组6只小鼠。周

期性测定体重、身体组成、摄食和血糖水平。

[1170] 如图11所示,酰化肽能够以与非酰化肽相似的程度引起减重。如图11所示,用酰化肽治疗头3天内达到约7-12%的减重。如图12所示,酰化肽引起摄食减少。另外,如图13所示,治疗1天后降低酰化肽的随意血糖水平。

[1171] 实施例21

[1172] 基本上如实施例19所述制备以下酰化的胰高血糖素共激动剂肽。

[1173] (A)“嵌合体-2Aib2Lys10-C18Cys24(40K)”：其为包含以下修饰的天然胰高血糖素氨基酸序列(SEQ ID NO:1):16位Glu、17位Gln、18位Ala、20位Lys、21位Glu、23位Ile和24位Ala和C-末端酰胺(“嵌合体2”),其进一步用如下氨基酸来进行修饰:2位AIB、用C18脂肪酸酰化的Lys10和用40K PEG基团聚乙二醇化的24位Cys;

[1174] (B)“嵌合体-2Aib2Lys 10-C 16Cys24(40K)”：其为用以下氨基酸进一步修饰的嵌合体2:2位AIB、用C16脂肪酸酰化的Lys10和用40KPEG基团聚乙二醇化的Cys24;

[1175] (C)“胰高血糖素Lys10-C18E16K20Cys24(40K)”：其为包含以下修饰的天然胰高血糖素氨基酸序列(SEQ ID NO:1):16位Glu、20位Lys和C-末端酰胺(“E16K20-胰高血糖素-NH2”),其进一步用以下氨基酸进行修饰:用C18脂肪酸酰化的Lys10和用40K PEG基团聚乙二醇化的Cys24;

[1176] (D)“胰高血糖素Lys10-TrpC16E16K20Cys24(40K)”：其为进一步用与Trp间隔物连接的Lys10修饰的E16K20-胰高血糖素-NH2,其中所述Trp间隔物用C16脂肪酸酰化;

[1177] (E)“胰高血糖素Lys10-TrpC18E16K20Cys24(40K)”：其为进一步用与Trp间隔物连接的Lys10修饰的E16K20-胰高血糖素-NH2,其中所述Trp间隔物用C18脂肪酸酰化。

[1178] 基本上如实施例14所述测定酰化的胰高血糖素共激动剂肽针对胰高血糖素受体和GLP-1受体的活性。将针对胰高血糖素受体和GLP-1受体每一种的EC50与对照(GLP-1(7-37)OH(GLP-1的7-37位氨基酸)、胰高血糖素(1-29)OH(SEQ ID NO:1)和嵌合体2Cys24(40K)(在Cys 24上含40K PEG的嵌合体2))比较,结果如表16所示。

[1179] 表16

[1180]

	针对胰高血糖素受体的 EC50 (nM)	针对 GLP-1 受体的 EC50 (nM)
GLP-1 (7-37) OH	>1000.00	0.04
胰高血糖素(1-29) OH	0.07	7.5
嵌合体 2 Cys24 (40K)	2.83	0.04
嵌合体-2 Aib2 Lys10-C18 Cys24(40K)	8.55	0.14
嵌合体-2 Aib2 Lys10-C16 Cys24(40K)	17.41	0.05
胰高血糖素 Lys10-C18 E16 K20 Cys24(40K)	0.84	0.15
胰高血糖素 Lys10-TrpC16 E16 K20 Cys24(40K)	0.54	0.23
胰高血糖素 Lys10-TrpC18 E16 K20 Cys24(40K)	1.29	1.64

[1181] 实施例22

[1182] 基本上如实施例19所述制备以下酰化的胰高血糖素共激动剂肽：

[1183] (A)肽A：其为包含以下修饰的天然胰高血糖素氨基酸序列(SEQ ID NO:1)：16位Glu、20位Lys和C-末端酰胺(“E16K20-胰高血糖素-NH₂”)；

[1184] (B)肽B：其为进一步包含用C16脂肪酸酰化的Lys10的E16K20-胰高血糖素-NH₂；

[1185] (C)肽C：其为进一步包含用C18脂肪酸酰化的Lys10的E16K20-胰高血糖素-NH₂；

[1186] (D)肽D：其为进一步包含与用C16脂肪酸酰化的Glu(间隔物残基)连接的Lys10的E16K20-胰高血糖素-NH₂；

[1187] (E)肽E：其为进一步包含与用C18脂肪酸酰化的Trp(间隔物残基)连接的Lys10的E16K20-胰高血糖素-NH₂。

[1188] 基本上按照实施例14测定所述肽的活性，针对胰高血糖素受体和GLP-1受体每一种的EC50示于表17中。

[1189] 表17

[1190]

	针对胰高 血糖素受 体的 EC ₅₀ (nM)	针对胰高血 糖素受体的 EC ₅₀ (nM)
GLP-1 OH	>1000	0.037
胰高血糖素受体(1-29) OH (SEQ ID NO: 1)	0.098	10
肽 A	0.203	0.188
肽 B	0.236	0.125
肽 C	0.086	0.032
Peptide D	0.062	0.056
肽 E	0.044	0.031

[1191] 实施例23

[1192] 制备包含具有以下修饰的氨基酸序列SEQ ID NO:1的胰高血糖素共激动剂肽:16位Glu、17位Gln、18位Ala、20位Lys、21位Glu、23位Ile、24位Ala、27位Val、28位Lys和C-末端酰胺(“嵌合体1”)。通过缺失嵌合体1的29位氨基酸(“Chi 1(1-28)”)或通过缺失嵌合体1的28和29两个位置的氨基酸(“Chi 1(1-27)”)制备嵌合体1的C-末端截短的形式。

[1193] 包含具有以下修饰的氨基酸序列SEQ ID NO:1的胰高血糖素共激动剂肽:16位Glu、C-末端酰胺(“E16 Gluc-NH₂”)亦通过缺失29位氨基酸(“E16 GlucNH₂(1-28)”)或通过缺失28和29位两个位置的氨基酸(“E16 GlucNH₂(1-27)”)在C-末端截短。

[1194] 基本上按照实施例14所述测定截短肽以及非截短肽针对胰高血糖素受体和GLP-1受体的功能活性。对E16 GlucNH₂肽或嵌合体1肽缺失28和29位氨基酸未显著影响所述肽针对胰高血糖素受体的活性。对E16 GlucNH₂缺失28和29位氨基酸根本不改变所述肽针对GLP-1受体的效价。对嵌合体1缺失28和29位氨基酸不影响其针对GLP-1受体的活性。

[1195] 对嵌合体1肽或E16 GlucNH₂肽缺失29位氨基酸未显著影响针对胰高血糖素受体或GLP-1受体的活性。

[1196] 实施例24

[1197] 用0.2、2、20或70nmol/kg的以下物质之一在-15分钟的时间点腹膜内注射饮食诱导肥胖症(DIO)的小鼠:

[1198] (A)仅溶媒;

[1199] (B)包含以下修饰的天然胰高血糖素氨基酸序列(SEQ ID NO:1):16位Glu、17位Gln、18位Ala、20位Lys、21位Glu、23位Ile和24位Ala和C-末端酰胺(“嵌合体2”),其进一步修饰以包含2位AIB和24位Cys,其中用40K PEG使Cys聚乙二醇化(“嵌合体-2-AIB2Cys²⁴-40kD”)。

[1200] (C)进一步修饰嵌合体2以包含2位AIB、用C8脂肪酸酰化的10位Lys和用40K PEG聚

乙二醇化的24位Cys(“嵌合体-2AIB²K¹⁰-C8Cys²⁴-40kD”)或

[1201] (D)进一步修饰嵌合体2以包含2位AIB、用C16脂肪酸酰化的10位Lys和用40K PEG聚乙二醇化的24位Cys(“嵌合体-2AIB²K¹⁰-C16Cys²⁴-40kD”)。

[1202] 以1.5g/kg体重的剂量在0分钟时间点注射包含25%(v/v)葡萄糖的盐水溶液。在-15、0、15、30、60和120分钟的时间点测量血糖水平。

[1203] 图15-17显示分别用2、20和70nmol/kg注射的小鼠在所示时间点的血糖水平(mg/dL)。对于所有检测剂量,嵌合体-2AIB²K¹⁰-C8Cys²⁴-40kD都显示出最大的降低小鼠血糖的能力。如图17所示,该肽具有与嵌合体-2-AIB²Cys²⁴-40kD相似的活性。

[1204] 实施例25

[1205] 用70nmol/kg的以下物质之一在-24小时的时间点腹膜内注射DIO小鼠:

[1206] (A)仅溶媒;

[1207] (B)如以上实施例24所述的嵌合体-2-AIB²Cys²⁴-40kD。

[1208] (C)如以上实施例24所述的嵌合体-2AIB²K¹⁰-C8Cys²⁴-40kD或

[1209] (D)如以上实施例24所述的嵌合体-2AIB²K¹⁰-C16Cys²⁴-40kD。

[1210] 以1.5g/kg体重的剂量在0分钟时间点注射包含25%(v/v)葡萄糖的盐水溶液。在0、15、30、60和120分钟的时间点测量血糖水平。

[1211] 图18显示在所示时间点小鼠的血糖水平(mg/dL)。三种肽都显示出显著的降低小鼠血糖的活性。

[1212] 实施例26

[1213] 仅用溶媒或15或70nmol/kg的以下物质之一腹膜内注射DIO小鼠:

[1214] (A)如以上实施例24所述的嵌合体-2-AIB²Cys²⁴-40kD;

[1215] (B)如以上实施例24所述的嵌合体-2AIB²K¹⁰-C8Cys²⁴-40kD或

[1216] (C)如以上实施例24所述的嵌合体-2AIB²K¹⁰-C16Cys²⁴-40kD。

[1217] 在注射前和注射后1、3、5和7天测量体重。

[1218] 图19显示每组小鼠体重变化%。在两种测试剂量中,嵌合体-2AIB²K¹⁰-C8Cys²⁴-40kD和嵌合体-2-AIB²Cys²⁴-40kD显示出可类比的降低体重的能力。嵌合体-2AIB²K¹⁰-C16Cys²⁴-40kD以较高测试剂量显示出显著的降低体重的能力。

[1219] 实施例27

[1220] 基本上如上所述合成包含1位酪氨酸和E16和K20之间的内酰胺桥(和取代C-末端羧酸酯的酰胺)的肽SEQ ID NO:555,并通过实施例14测定其针对GLP-1受体和胰高血糖素受体的体外活性。所述肽针对每种受体的EC₅₀示于表18中。

[1221] 表18

[1222]

受体	EC ₅₀ (nM)	标准偏差	相对活性
胰高血糖素	0.044	0.151	343.18%
GLP-1	0.062	0.062	100.00%

[1223] 相对活性为相对于所示受体的天然激素的活性。

[1224] 基于这些数据,确定肽SEQ ID NO:555为例示性胰高血糖素/GLP-1共激动剂肽。

[1225] 实施例28

[1226] 基本上如上所述合成以下肽：肽SEQ ID NO:1(胰高血糖素(1-29))、含取代C-末端羧酸酯的酰胺的肽SEQ ID NO:1(胰高血糖素(1-29a))和含2及16位每一位置的AIB和取代C-末端羧酸酯的酰胺的肽SEQ ID NO:1(胰高血糖素(1-29a)Aib²Aib¹⁶)。然后通过实施例14所述方法测定这些肽针对GLP-1受体和胰高血糖素受体的体外活性。每一肽的EC₅₀示于表19中。

[1227] 表19

[1228]

肽	胰高血糖素受体		GLP-1 受体	
	EC ₅₀ (nM)	SD	EC ₅₀ (nM)	SD
胰高血糖素(1-29)	0.04	0.01	3.65	0.21
胰高血糖素(1-29a) Aib ² Aib ¹⁶	0.09	0.02	0.10	0.01
胰高血糖素(1-29a)	ND	ND	0.50	0.05
GLP-1(1-31)OH	ND	ND	0.03	0.00

[1229] SD=标准偏差

[1230] 实施例29

[1231] 基本上如上所述合成以下肽：

[1232] (1)胰高血糖素(1-29)，其如实施例28所述；

[1233] (2)含24位Cys和与包含C16脂肪酸的Trp共价键合的10位Lys的胰高血糖素(1-29a)Aib² Aib¹⁶(如实施例28所述)(“胰高血糖素(1-29a)Aib² Lys¹⁰-Trp-C16 Aib¹⁶ Cys²⁴”);

[1234] (3)其中Cys包含40kD PEG基团的胰高血糖素(1-29a)Aib²Lys¹⁰-Trp-C16 Aib¹⁶ Cys²⁴(“胰高血糖素(1-29a)Aib² Lys¹⁰-Trp-C16 Aib¹⁶Cys²⁴-40kD”);

[1235] (4)包含20位AIB的胰高血糖素(1-29a)Aib² Lys¹⁰-Trp-C16 Aib¹⁶Cys²⁴(“胰高血糖素(1-29a)Aib² Lys¹⁰-Trp-C16 Aib¹⁶ Aib²⁰ Cys²⁴”);和

[1236] (5)其中Cys包含40kD PEG基团的胰高血糖素(1-29a)Aib²Lys¹⁰-Trp-C16 Aib¹⁶ Aib²⁰ Cys²⁴(“胰高血糖素(1-29a)Aib²Lys¹⁰-Trp-C16 Aib¹⁶ Aib²⁰ Cys²⁴-40kD”)。

[1237] 然后通过实施例14所述方法测定这些肽针对GLP-1受体和胰高血糖素受体的体外活性。每一肽的EC₅₀示于表20中。

[1238] 表20

[1239]

肽	胰高血糖素受体		GLP-1 受体	
	EC ₅₀ (nM)	SD	EC ₅₀ (nM)	SD
胰高血糖素(1-29)	0.04	0.01		
胰高血糖素(1-29a) Aib ² Lys ¹⁰ -Trp-C16 Aib ¹⁶ Cys ²⁴	0.25	0.02	0.24	0.03
胰高血糖素(1-29a) Aib ² Lys ¹⁰ -Trp-C16 Aib ¹⁶ Cys ²⁴ -40K	0.29	0.03	0.19	0.02
胰高血糖素(1-29a) Aib ² Lys ¹⁰ -Trp-C16	2.06	0.02	1.15	0.19

[1240]

Aib ¹⁶ Aib ²⁰ Cys ²⁴				
胰高血糖素(1-29a) Aib ² Lys ¹⁰ -Trp-C16 Aib ¹⁶ Aib ²⁰ Cys ²⁴ -40K	2.37	0.24	0.60	0.06
GLP-1(1-31)OH			0.02	0.01

[1241] 实施例30

[1242] 在DIO小鼠中检测酰化和聚乙二醇化胰高血糖素肽的体内作用。具体而言,用10、20、40或80nmol/kg的酰化和聚乙二醇化的胰高血糖素肽或溶媒对照对6组DIO小鼠(每组8只小鼠)每周一次腹腔内注射2周,每组小鼠具有58g的平均初始体重。在本研究中所用的酰化和聚乙二醇化胰高血糖素肽为嵌合体-2AIB²K¹⁰-C8Cys²⁴-40kD(如实施例26所述)和肽A K¹⁰-C14(如实施例20所述)。

[1243] 在注射后0、1、3、5、7、8、10、12和14天测量小鼠的体重和摄食变化。在14天期间监测小鼠的血糖水平。如下进行葡萄糖耐受测定:在给予酰化或聚乙二醇化肽后1小时或24小时注射含25%葡萄糖的盐水溶液,并在葡萄糖注射后-60、0、15、30、60或120分钟测量血糖水平。

[1244] 如图20所示,与用溶媒对照注射的小鼠比较,用40或80nmol/kg酰化和聚乙二醇化肽A K¹⁰-C14注射的小鼠总体重降低。

[1245] 如图21所示,与用溶媒对照比较,用20、40或80nmol/kg肽AK¹⁰-C14或用20nmol/kg嵌合体-2AIB²K¹⁰-C8Cys²⁴-40kD注射的小鼠的血糖水平对葡萄糖注射的响应降低。

[1246] 实施例31

[1247] 通过固相合成制备包含或缺乏共价分子内桥的酰化的胰高血糖素类似物肽,并检

测其针对胰高血糖素受体和GLP-1受体的体外活性。每一受体的EC50(nM)和所述肽相对于天然肽针对对应的受体的活性%示于表21中。

[1248] 表21

[1249]

肽名称	SEQ ID NO:	针对 GLP-1 受体的 EC50 (nM)	GLP-1 的活 性%	针对胰高 血糖素受 体的 EC50 (nM)	胰高血 糖素的 活性%
DMIA1, K10(C14), [E16/K20]-Gluc 酰胺	607	0.050	30%	0.027	203.7%
DMIA1, K10(C16), [E16/K20]-Gluc 酰胺	608	0.015	100%	0.014	392%
DMIA1, K10(C18), [E16/K20]-Gluc 酰胺	609	0.011	136%	0.13	42.3%
AIB2, AIB16, K10(C14) Gluc 酰胺	610	0.024	33.3%	0.044	77.3%
AIB2, AIB16, K10(C16) Gluc 酰胺	611	0.011	72.3%	0.020	170%
AIB2, AIB16, K10(C18) Gluc 酰胺	612	0.009	88.9%	0.016	212.5%
dS2, E16/K20, K10(C14) Gluc 酰胺	613	0.128	6.3%	0.155	21.9%
dS2, E16/K20, K10(C16) Gluc	614	0.041	19.5%	0.076	44.7%

[1250]

酰胺					
dS2, E16/K20, K10(C18) Gluc 酰胺	615	0.025	60%	0.028	196%

[1251] 基本上如本文所述制备几种缺乏共价分子内桥并包含2位AIB、16位AIB和经由间隔物与10位Lys残基连接的脂肪酰基的胰高血糖素类似物。所述酰化的胰高血糖素类似物的间隔物类型不同,存在或不存在聚乙二醇化和/或酰基大小不同。基本上如实施例14所述检测所述酰化的胰高血糖素类似物针对胰高血糖素受体和GLP-1受体的体外活性。各肽的结构概述及针对胰高血糖素受体和GLP-1受体的体外活性示于表22和23中。

[1252] 表22

[1253]

胰高血糖素类似物主链氨基酸序列: HXQGTFTSDKSKYLDXRRAQDFVQWLMNT-NH ₂ 其中 X = AIB (SEQ ID NO: 562)					
肽名称	SEQ ID NO:	间隔物	脂肪酰基大小	针对胰高血糖素受体的 EC50 (nM)	针对 GLP-1 受体的 EC50 (nM)
wt 胰高血糖素	1	n/a	n/a	0.031 ± 0.014	
wt GLP-1		n/a	n/a		0.036 ± 0.010
26	637	无	无	0.653 ± 0.285	0.475 ± 0.046
50	563	无	C16	0.572 ± 0.084	0.291 ± 0.060
82	564	Ala-Ala	C16	0.024 ± 0.001	0.108 ± 0.018
83	565	γ-Glu- γ-Glu	C16	0.014 ± 0.002	0.043 ± 0.005

[1254]

84	566	β -Ala- β -Ala	C16	0.011	0.004
85	567	6-氨基-己酸	C16	0.010	0.005
86	568	Leu-Leu	C16	0.011	0.006
87	569	Pro-Pro	C16	0.017	0.009
77*	570	无	C14	21.94 ± 14.47	1.458 ± 0.132
78*	571	γ -Glu- γ -Glu	C14	0.319 ± 0.091	0.103 ± 0.023
81*	573	Ala-Ala	C14	0.597 ± 0.175	0.271 ± 0.019
79*	575	Ala-Ala	C16	0.102 ± 0.011	0.055 ± 0.001
80*	576	γ -Glu- γ -Glu	C16	0.108 ± 0.028	0.042 ± 0.008

[1255] *表示包含24位Cys残基(取代Gln)的肽,其中Cys与40kDaPEG基团共价连接。

[1256] 表23

[1257]

胰高血糖素类似物主链氨基酸序列: HXQGTFTSDKSKYLDXRRAQDFVWLMNT-NH ₂ 其中 X = AIB (SEQ ID NO: 562)					
肽名称	SEQ ID NO:	间隔物	脂肪酰基大小	针对胰高血糖素受体的 EC50 (nM)	针对 GLP-1 受体的 EC50 (nM)
wt 胰高血糖素	1	n/a	n/a	0.008 ± 0.003	
wt GLP-1		n/a	n/a		0.004 ± 0.001
77**	616	无	C14	$0.144 \pm$	$0.063 \pm$

[1258]

				0.029	0.012
78**	617	γ -Glu- γ -Glu	C14	$0.009 \pm$ 0.001	$0.008 \pm$ 0.001
81**	618	Ala-Ala	C14	$0.027 \pm$ 0.006	$0.018 \pm$ 0.001
80**	619	γ -Glu- γ -Glu	C16	$0.006 \pm$ 0.001	$0.008 \pm$ 0.001
79**	620	Ala-Ala	C16	$0.010 \pm$ 0.001	$0.008 \pm$ 0.001

[1259] **肽包含24位Cys(取代Gln),其中Cys不与PEG分子共价连接。

[1260] 如表22和23所述,与包含直接与肽主链连接的脂肪酰基的肽比较,包含经由间隔物连接的脂肪酰基的肽显著提高其效价。

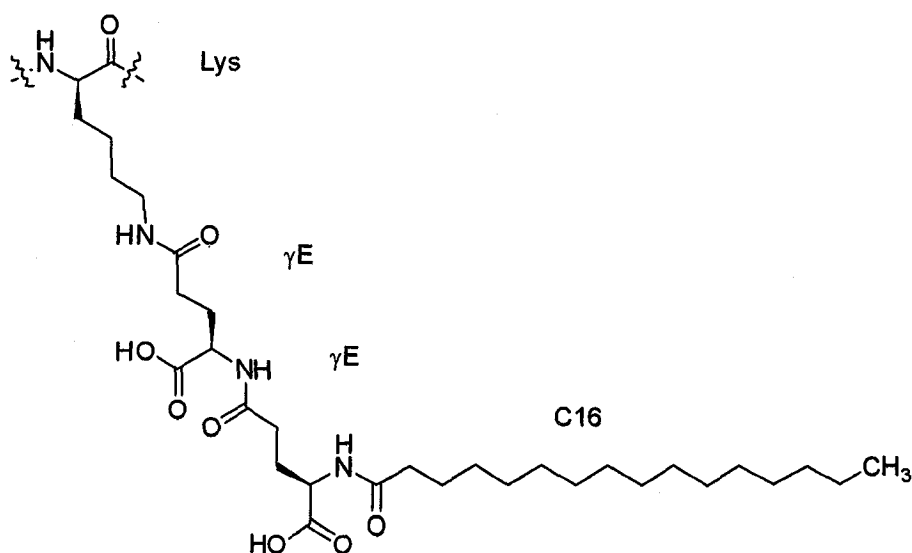
[1261] 实施例32

[1262] 用单独溶媒、用30nmol/kg或100nmol/kg的酰化的胰高血糖素类似物肽或用长效GLP-1类似物利拉鲁肽(Liraglutide)(Novo Nordisk,Denmark),每日一次皮下注射D10小鼠(每组8只小鼠)7天,每只小鼠具有48.7g的平均体重。酰化的胰高血糖素类似物如下:

[1263] “(C16)胰高血糖素酰胺”包含野生型胰高血糖素的氨基酸序列(SEQ ID NO:1),且含10位Tyr修饰成酰化的Lys残基和取代C-末端羧酸酯的酰胺基团,其中酰化的Lys包含C16脂肪酰基;

[1264] “ γ E- γ E-C16胰高血糖素酰胺”包含与C16胰高血糖素酰胺相同的结构,只是C16脂肪酰基通过 γ -Glu- γ -Glu二肽间隔物(参见以下酰化的Lys的结构)与10位Lys连接;

[1265]



[1266] “AA-C16胰高血糖素酰胺”包含与C16胰高血糖素酰胺相同的结构,只是C16脂肪酰基通过Ala-Ala二肽间隔物与10位Lys连接;和

[1267] “BABA-C16胰高血糖素酰胺”,其包含与C16胰高血糖素酰胺相同的结构,只是C16脂肪酰基通过 β -Ala- β -Ala二肽间隔物与10位Lys连接。

[1268] 每日监测小鼠体重,体重的总变化(%)示于图22中。如图22所示,大部分酰化的胰高血糖素肽在各剂量下引起体重减轻。尽管利拉鲁肽显示出大约12%的体重减轻,但胰高血糖素类似物肽 γ E- γ E-C16胰高血糖素酰胺在相匹配的剂量下表现出最大的引起小鼠减重的能力。即使较低的 γ E- γ E-C16胰高血糖素酰胺剂量也引起体重的大大降低。

[1269] 在研究的第7天测量小鼠的脂肪量。如图23所示,给予100nmol/kg γ E- γ E-C16胰高血糖素酰胺的小鼠表现出最低的脂肪量。

[1270] 在测定过程中亦监测小鼠的血糖水平。如图24所示,胰高血糖素类似物肽 γ E- γ E-C16胰高血糖素酰胺以较高剂量和利拉鲁肽一样降低小鼠的血糖水平。

[1271] 实施例33

[1272] 如下评估具有GLP-1活性的酰化的胰高血糖素类似物肽。修饰包含具有2位AIB和24位Cys(包含40kDa PEG分子)的嵌合体2结构的非酰化的胰高血糖素类似物肽,以包含酰化的10位Lys残基。非酰化的胰高血糖素类似物肽包含氨基酸序列SEQ ID NO:580。用C8、C14、C16或C18脂肪酰基酰化10位Lys,酰化的肽分别包含SEQ ID NO:534-537的结构。基本上如本文所述检测非酰化肽及其酰化形式的针对GLP-1受体的体外活性。各肽针对GLP-1受体的EC₅₀示于表24中。

[1273] 表24

胰高血糖素类似物肽序列		
HXQGTFTSDYSKYLD EQAAKEFICWLMNT-NH ₂ ,		
其中 X = AIB		
(SEQ ID NO: 580)		
	EC ₅₀ (nM)	SD
GLP-1	0.026	0.003
[1274] 非酰化的胰高血糖素类似物肽(SEQ ID NO: 580)	0.095	0.015
C ₈ 酰化的胰高血糖素类似物肽(SEQ ID NO: 534)	0.058	0.002
C ₁₄ 酰化的胰高血糖素类似物肽(SEQ ID NO: 535)	0.044	0.005
C ₁₆ 酰化的胰高血糖素类似物肽(SEQ ID NO: 536)	0.033	0.005
C ₁₈ 酰化的胰高血糖素类似物肽(SEQ ID NO: 537)	0.011	0.001

[1275] 实施例34

[1276] 如本文所述通过固相肽合成制备胰高血糖素类似物肽,并在所述肽的10或30位酰化。所述肽及其结构如下:

[1277] “肽 d S 2 E 1 6 K 2 0 K 3 0 - C 1 4 G l u c 酰胺”包含氨基酸序列HXQGTFTSDYSKYLDERRAKDFVQWLMNTK-酰胺(SEQ ID NO:581),其中2位X为d-Ser,其中用C14

脂肪酰基酰化30位Lys,用酰胺取代C-末端羧酸酯;

[1278] “肽 dS2K10(C14)E16K20-Gluc 酰胺”包含氨基酸序列 HXQGTFTSDKSKYLDERRAKDFVQWLMNT-酰胺(SEQ ID NO:582);其中2位X为d-Ser,其中用C14脂肪酰基酰化10位Lys,用酰胺取代C-末端羧酸酯;

[1279] “肽 dS2E16K20K30-C16 Gluc 酰胺”包含氨基酸序列 HXQGTFTSDYSKYLDERRAKDFVQWLMNTK-酰胺(SEQ ID NO:583),其中2位X为d-Ser,其中用C16脂肪酰基酰化30位Lys,用酰胺取代C-末端羧酸酯;

[1280] “肽 dS2K10(C16)E16K20-Gluc 酰胺”包含氨基酸序列 HXQGTFTSDKSKYLDERRAKDFVQWLMNT-酰胺(SEQ ID NO:584);其中2位X为d-Ser,其中用C16脂肪酰基酰化10位Lys,用酰胺取代C-末端羧酸酯;

[1281] “肽嵌合体2-AIB2-K10-酰化”包含氨基酸序列HXQGTFTSDKSKYLDEQAQAEFICWLMNT-酰胺(SEQ ID NO:585);其中2位X为AIB,用C18脂肪酰基酰化10位K,24位Cys包含40kDa PEG分子,用酰胺取代C-末端羧酸酯;和

[1282] “肽嵌合体2-AIB2-K30-酰化”包含氨基酸序列 HXQGTFTSDYSKYLDEQAQAEFICWLMNTK-酰胺(SEQ ID NO:586),其中2位X为AIB,用C18脂肪酰基酰化10位K,24位Cys包含40kDa PEG分子,用酰胺取代C-末端羧酸酯。

[1283] 基本上如实施例14所述检测各肽针对GLP-1受体和胰高血糖素受体的体外活性。结果示于表25中。

[1284] 表25

[1285]

肽名称	酰基所在位置	针对胰高血糖素受体的 EC50 (nM)	针对 GLP-1 受体的 EC50 (nM)
肽 dS2E16K20K30-C14 Gluc 酰胺	30	3.53	0.84
肽 dS2K10(C14)E16K20-Gluc 酰胺	10	0.155	0.041
肽 dS2E16K20K30-C16 Gluc 酰胺	30	4.89	3.05

[1286]

dS2K10(C16)E16K20-Gluc 酰胺	10	0.076	0.041
肽嵌合体 2-AIB2-K10-酰化	30	N/A	0.465
肽嵌合体 2-AIB2-K30-酰化	10	N/A	0.007

[1287] 实施例35

[1288] 采用固相肽合成用于集合序列XSQGTFTSDYSKYLDERRAKDFVCWLMNT-NH₂,其中X=DMIA(SEQ ID NO:587)。在选择性除去16位Glu和20位Lys的保护后,在树脂上经由内酰胺桥环化该肽。然后通过制备性RP-HPLC纯化裂解后的粗肽,由MS表征(计算的[M+H]为3479.9;

肽主链	3 位氨基酸	SEQ ID NO:	针对胰高血糖素受体的 EC50 (nM)	活性%*
J	Q	593	0.24	25%
J	C(Acm)	594	0.18	33%
J	Dab(Ac)	595	0.31	19%
J	Dap(脲)	596	0.48	13%

[1304]

J	Q(Me)	597	0.48	13%
J	M(O)	598	0.91	7%
J	Orn(Ac)	599	0.92	7%
K	Q	600	0.39	15%
K	Dab(Ac)	601	0.07	86%
K	Q(Me)	602	0.11	55%

[1305] Q=谷氨酰胺;C(Acm)=乙酰氨基-半胱氨酸;Dab(Ac)=乙酰基二氨基丁酸;Dap(脲)=氨基甲酰二氨基丙酸;Q(Me)=甲基谷氨酰胺;M(O)=甲硫氨酸-亚砷;Orn(Ac)=乙酰鸟氨酸。

[1306] 如表26所示,3位可被多种氨基酸取代而基本上不损失针对胰高血糖素受体的活性,在某些情况下,所述修饰(例如肽K主链上的Dab(Ac)和Q(Me))实际上提高所述活性。

[1307] 实施例38

[1308] 基本上如本文所述制备在各种胰高血糖素类似物主链上包含3位Dab(Ac)的胰高血糖素类似物肽,并检测其针对胰高血糖素受体的体外活性。各肽的结构和活性示于表27中。

[1309] 表27

[1310]

氨基酸序列	SEQ ID NO:	针对胰 高血糖 素受体 的 EC50 (nm)	% 活性 *
野生型胰高血糖素	1	0.026	100

[1311]

HSQGTFTSDYSKYLDsRRAQDFVQWLMDT	642	0.015	173
HSDab(Ac)GTFTSDYSKYLDAibRRAADFVAWLLDE	603	0.069	37
HSDab(Ac)GTFTSDYSKYLDAibRRAADFVAWLLDT GPSSGAPPPS 酰胺	604	0.023	113
HSDab(Ac)GTFTSDYSKYLDAibRRASDFVSWLLDE	605	0.048	54
HSDab(Ac)GTFTSDYSKYLDAibRRATDFVTWLLDE	606	0.057	46

[1312] 实施例39

[1313] 基本上如本文所述制备包含SEQ ID NO:1的第一胰高血糖素类似物肽(AIB2, AIB16, K10(C16)Gluc酰胺), 其含2和16位AIB、10位Lys和取代C-末端羧酸酯的酰胺, 其中10位Lys与C16脂肪酰基共价连接。第二胰高血糖素类似物肽(AIB2, AIB16, K10(C16), K30Gluc酰胺)具有与第一胰高血糖素类似物肽相似的结构, 只是在其C-末端加上Cys。基本上如实施例14所述检测所述肽的体外活性, 并另外在包含20%人血浆的溶液中检测。所述肽针对各受体的EC50(nM)示于表28中。

[1314] 表28

[1315]

氨基酸序列	SEQ ID NO:	针对胰 高血糖 素受体 的 EC50 (nm)	针对胰 高血糖 素受体 的 EC50 (nm) (20%人 血浆)	针对 GLP-1 受体的 EC50 (nm)	针对 GLP-1 受体的 EC50 (nm) (20%人 血浆)
胰高血糖素	1	0.026	0.046		
GLP-1				0.022	0.028

[1316]

AIB2, AIB16, K10(C16)胰高血糖素酰胺	563	0.052	0.023	0.026	0.014
AIB2, AIB16, K10(C16), K30 胰高血糖素酰胺	622	0.761	0.313	0.031	0.017

[1317] 实施例40

[1318] 瘦素(leptin)的发现证明存在调节能量平衡和身体肥胖的内分泌系统。其亦吸引对肥胖症研究的兴趣和投资,该研究可作为鉴别控制业已成为全球性流行病的环境和药理学途径的手段。尚未出现用于肥胖症的足够有效安全的药物治疗,外科手术成为唯一经证明持续减重的选择。本文报道针对两种内分泌激素受体的联合受体激动的效用,其达到以持续作用的单一肽有效饱腹感诱导和脂肪分解作用。两种特异性的胰高血糖素类似物针对GLP1-R的活性与天然GLP-1相当,但其对胰高血糖素受体激动的水平彼此不同,在啮齿类肥胖症模型中研究了其药理。每周一次给予这些选自一系列高效价类似物的具有不同的胰高血糖素和GLP-1活性的聚乙二醇化肽,它们在一个半月内使饮食诱导的肥胖症小鼠(平均体重大约50g)的肥胖和葡萄糖耐受水平正常化。体重减轻是因减少摄食和提高能量消耗(因胰高血糖素受体激动而提高)而导致的身體脂肪损失的结果。这些共激动剂化合物亦使葡萄糖和脂类代谢(包括肝脏脂肪变性)正常化。作用为剂量依赖性的,可在饮食诱导的肥胖大鼠中成功地重复。这些临床前研究表明当因适当程度的胰高血糖素受体激活而增加充分的GLP-1激动时,可安全地大大加快身体脂肪的降解。本文所述发现确立了临床测试的基础,为代谢综合征提出了诱人的新型治疗选择。

[1319] 实施例41

[1320] 以下材料和方法适合实施例42-51所述的实验。

[1321] Boc肽合成和裂解

[1322] 在改良Applied Biosystems 430A肽合成仪上用0.2毫摩尔的4-甲基二苯甲基胺(MBHA)树脂(Midwest Biotech, Fishers, Indiana)合成肽。用原位中和Boc-化学合成固相肽(Schnolzer, M.等, International Journal of Peptide Research and Therapeutics,

13:31-44(2007))。用HF/对-甲酚(10:0.5v/v)于0℃处理完成的肽基树脂1小时。真空除去HF,沉淀去保护的肽并在乙醚中洗涤。让肽溶解于20%乙腈/1%乙酸中,冻干。通过Boc化学制备大部分肽。以下侧链保护基团用于Boc-氨基酸(Midwest Biotech):Arg(Tos)、Asp(OcHex)、Asn(Xan)、Glu(OcHex)、His(BOM)、Lys(2-Cl-Z)、Ser(Bzl)、Thr(Bzl)、Trp(CHO)、Tyr(Br-Z)。通过电离喷雾离子质谱或MALDI-TOF质谱确证肽分子量,并如别处所述纯化。

[1323] 内酰胺合成

[1324] 在树脂上合成形成i到i+4内酰胺的环化肽。Glu(OFm)-OH γ 酯(Peptides International, Louisville, Kentucky)和Lys(Fmoc)-OH(肽s International)取代了涉及形成内酰胺位置的Glu(OcHex)和Lys(2-Cl-Z)。用20%哌啶/DMF处理完全受到保护的肽基树脂45分钟,以除去Fmoc和OFm保护基团。在用含5当量苯并三唑-1-基氧基-三-吡咯烷基-磷六氟磷酸盐(PyBOP)(Fluka)的DMF/DIEA处理5小时后,实现树脂上的内酰胺形成。通过茚三酮分析及相对于肽的开放形式质量减少18来确证内酰胺形成。

[1325] 肽纯化

[1326] 从树脂裂解后,通过分析性反相HPLC分析粗肽提取物。在Zorbax C8柱(0.46X 5cm)上用乙腈梯度在0.1% TFA中进行分析性分离。分析性检测后,在Vydac C4或C18柱(2.2X 25cm)上用乙腈梯度在0.1% TFA中通过半制备色谱纯化粗提取物。用同样条件纯化聚乙二醇化的肽。通过分析性反相HPLC用分析性分离所列条件分析制备性馏分的纯度(>95%)。通过电喷雾电离质谱(ESI-MS)或基料辅助激光解吸/电离飞行时间(MALDI-TOF)质谱确证肽质量和纯度。聚乙二醇化肽通过MALDI-TOF显示跨度43400的宽质量范围。冻干纯化的肽并储存在4℃。

[1327] 肽的聚乙二醇化

[1328] 纯化的肽与甲氧基聚(乙二醇)马来酰亚胺基-丙酰胺-40K(Chirotech Technology Ltd, Cambridge)以1:1摩尔比在7M脲/50mM Tris(pH 8.0)中混合。通过分析性反相HPLC监测反应进程,在30分钟内耗尽游离肽。在0.1% TFA中淬灭反应,如别处所述纯化并表征。

[1329] 胰高血糖素和GLP-I受体-介导的cAMP合成

[1330] 通过胰高血糖素(Gcg)和GLP-1受体检测每一肽类似物刺激cAMP产生的能力。用GcgR或GLP-1R cDNA和连接到cAMP响应元件(CRE)的荧光素酶报告基因共转染HEK293细胞。通过在DMEM(Invitrogen, Carlsbad, CA)中培养16小时并补充0.25%牛生长血清(HyClone, Logan, UT)使细胞血清饥饿。将系列稀释的胰高血糖素和GLP-1类似物加入到含有共转染的HEK293细胞的96-孔聚-D-赖氨酸-包被的板(BD Biosciences, San Jose, CA)中,让板在37℃、5% CO₂中孵育5小时。孵育后将等体积(100 μ L)的LucLite发光底物试剂(Perkin-Elmer, Wellesley, MA)加到各孔中,并以800rpm震荡板3分钟。让板在黑暗中孵育10分钟,在MicroBeta1450液态闪烁计数器(Perkin-Elmer, Wellesley, MA)上定量测量光输出量。通过Origin软件(OriginLab, Northampton, MA)计算有效50%浓度(EC₅₀)。

[1331] 圆二色谱测量

[1332] 用渐增浓度的TFE让肽溶解于10mM磷酸盐缓冲液pH 5.9中,定量肽浓度。将各样品稀释到10 μ M用于CD测量。在具有恒定氮气流及设定为25℃的1mm路径长的温控小室的JASCO J-715圆二色谱分光偏振计上收集CD数据。以100nm/分钟的扫描速度和1nm波长步伐从270-

190nm扫描5次累积光谱数据。用JASCO Spectra Manager软件减去溶剂信号并使数据平缓(Savitzky和Golay, Anal. Chem. 36:1627(1964))。将获得的毫度值转化为单位为deg.cm².dmol⁻¹的平均残基椭圆率。将计算的平均残基椭圆率输入到DICHROWEB(Whitmore和Wallace, Biopolymers 89:392-400(2008); Whitmore和Wallace, Nucleic Acids Research 32:W668-W673(2004), 获得螺旋值百分比。

[1333] 动物

[1334] 从Jackson实验室获得C57BI/6小鼠, 饲喂来自Research Diets的致糖尿病食物, 其为58%千卡来自脂肪的高蔗糖食物。小鼠单独或分组于22℃的12:12小时光照-黑暗周期居住, 自由获得食物和水。所有研究获得辛辛那提大学动物关怀和使用委员会的批准并按照其指导方针进行。

[1335] 人体成分测量

[1336] 用NMR技术(EchoMRI, Houston, TX)测量整体人体成分(脂肪和瘦肉量)。

[1337] 能量平衡生理学测量

[1338] 通过用组合间接热量测定系统(TSE Systems, Bad Homburg, Germany)来评估能量摄取和消耗以及鼠笼活动。每45分钟测量一次氧消耗及CO₂产生, 总共测120小时(包括12小时的适应期), 以测定呼吸商和能量消耗。在与通过将测量等级整合到密封的笼环境进行间接热量测定评估的同时, 连续测定120小时的食物和水摄取及进餐时间类型。将进餐时间定义为最少60秒的摄食事件, 在摄食事件之间休息300秒。用带有扫描笼的底部和顶部的光束的多维红外光束系统测定鼠笼的活动活性, 将活性表示为光束中断。将静止的活动能力(烦躁)定义为在笼底部连续中断一个单束光, 将运动的活动定义为在底部中断任何两个不同光束, 将饲养定义为同时中断笼底和笼顶二者的光束。

[1339] 血液参数

[1340] 禁食6小时后用EDTA-包被的Microvette试管(Sarstedt, Nuremberg, Germany)从尾静脉采集血液, 立即在冰上冷却。以3,000g在4℃离心15分钟后, 将血浆储存在-80℃。通过放射性免疫测定从Linco(敏感性大鼠胰岛素RIA; Linco Research, St. Charles, MO)定量测定血浆胰岛素。通过酶检测试剂盒(Thermo Electron, Waltham, MA)测量血浆TG和胆固醇水平。单个地分析样品, 例外情况为让来自5只动物/组的合并的样品(0.25ml)在两个串联有脂蛋白分离的Superose6柱上进行快速液态色谱(FPLC)凝胶过滤。所有测定按照厂商说明书进行。

[1341] 葡萄糖耐受测定

[1342] 为了测定葡萄糖耐受, 让小鼠禁食6小时, 并用2g葡萄糖/kg体重wt(0.9%盐水中的50%D-葡萄糖(Sigma))腹膜内(i.p.)注射进行葡萄糖耐受测定(GTT)。用手持血糖测定仪(TheraSense Freestyle)在注射前(0分钟)和注射后15、30、60、90及120分钟测量尾静脉血糖水平(mg/dl)。

[1343] WAT HS1蛋白质印迹

[1344] 将脂肪组织置于1.5-ml台式离心管中, 在冰冷的RIPA缓冲液(1X PBS、1%Nonidet P40、0.5%脱氧胆酸钠、含50mM NaF的0.1%SDS、0.5M苯甲基磺酰氟、0.1mM钒酸钠、20μg/ml抑酶肽、10g/ml亮肽素)中用组织匀浆仪(Retsch, Inc Newtown, PA Cat.#85210)以30hz匀浆3分钟。让样品以12,000rpm离心15分钟(4℃), 将上清液移到新管中, 在冰上超声破碎15

秒。让样品以14,000rpm离心10分钟(4℃),将上清液收集到新管中。让样品再次以19,000rpm离心10分钟(4℃)将上清液收集到新管中。然后取等份样样品进行蛋白质测定。然后让样品在4x SDS/DTT缓冲液中煮沸2分钟。让来自细胞裂解液的50g蛋白质在9%(w/v)丙烯酰胺分析凝胶上进行SDS/PAGE,并转移到Hybond ECL硝酸纤维素膜上。封闭膜,用目的第一抗体(来自Cell Signaling的HSL(4107));来自Cell Signaling的Phospho-HSL(ser660)(4126))探测。洗涤后,用HRP-缀合的抗-(兔IgG)或抗-(鼠IgG)(HRP-缀合的抗-兔和抗-鼠第二抗体购自Bio-Rad(170-6515 & 170-6516))实施第一抗体检测,用增强化学发光(Amersham Biosciences)检测并对CL-Xposure膜(Pierce)曝光。

[1345] 免疫组织化学

[1346] 用苏木精/曙红如所述(Ogden, C.L.等JAMA 295:1549-1555(2006))对石蜡包埋的白色附睾脂肪组织切片(5μm)染色。对于每一单独的小鼠组织区段而言,用Image Pro Plus 5.1软件(Media Cybernetics, Bethesda, MD, USA)定量测定来自三个不同高倍视野每一个的100个细胞的脂肪细胞大小作为来自一个地区的测量。

[1347] 油红染色

[1348] 为了显现肝脏组织中的脂类聚积,用油红O染料对处死时收获的肝脏的4-8mm横截面进行染色。用[复合透镜]显微镜获得放大20X和40X的图像。

[1349] 定量RT-PCR程序

[1350] 用断头术将喂食状态(早上喂食后1-4小时)的动物处死,制作各种组织样本,冷夹并储存在-80℃,用于随后通过实时定量PCR(icycler, BioRad)PEPCK、G6P和HPRT(管家基因)的mRNA测量。

[1351] 用RNeasy脂类组织试剂盒(Qiagen, Ca# 74804)用标准方案从冷冻的组织样品提取总RNA。用Nanodrop通过分光光度计测定RNA浓度和纯度。用2g总RNA获得用于RT-PCR的cDNA模板。用以下物质进行反转录反应:10X DNase I反应缓冲液, DNase I, Amp Grade, 1U/μl, depc-H₂O, 25mM EDTA, 10mM dNTP Mix, 寡(dT)20(50μM), 5X第一链缓冲液, 0.1M DTT, RNaseOUT和SuperScript III(Invitrogen)。

[1352] 通过PCR用含有终浓度为0.5M前导和反向引物的荧光染料SYBR绿(BioRad, Ca# 1708882)进一步扩增合成的cDNA。通过解离曲线确证产物纯度。所有测定中都不包括模板对照,产生不一致的扩增。用标准曲线获得PEPCK或G6P的相对浓度,按照用作管家基因的HPRT浓度修正结果。将结果表示为溶媒百分比,设定平均溶媒组为100%,然后计算所研究的三组动物每一个的单独值。

[1353] 引物序列

[1354] 从NIH网站获得PEPCK、G6P和HPRT的引物序列,由IDT DNA产生引物。

[1355] 反转录和定量实时RT-PCR

[1356] 如所述(Nomiyama, T.等Journal of Clinical Investigation 117:2877-2888(2007))通过实时RT-PCR来定量测定CD68 mRNA表达。简言之,处死后让100mg附睾脂肪组织在TRIZOL中匀浆,将总mRNA反转录为cDNA。用iCycler(Bio-Rad)和SYBR Green I系统(Bio-Rad)实施PCR反应。一式三份分析各样品,并正常化为TFIIB mRNA表达值。所用的小鼠引物序列如下:

[1357] CD68, 5'-CAAGGTCCAGGGAGGTTGTG-3'(正向)(SEQ ID NO:638)、

[1358] 5'-CCAAAGGTAAGCTGTCCATAAGGA-3' (反向)(SEQ ID NO:639);

[1359] 和TFIIB, 5'-CTCTCCCAAGAGTCACATGTCC(SEQ ID NO:640)、

[1360] 5'-CAATAACTCGGTCCCCTACAAC-3' (反向)(SEQ ID NO:641)。

[1361] 统计学分析

[1362] 除非另外指出, 否则用GraphPad Prism一步ANOVA和柱统计实施所有统计学分析。所述P值为一步分析的方差。所有结果表示为平均值 $\pm$ SE。(受体激活数据为 $\pm$ S.D.)。

[1363] 实施例42

[1364] 如本文所述制备包含具有氨基酸修饰的氨基酸序列SEQ ID NO:1的两种胰高血糖素肽-肽X和Y。两种肽都包含2位AIB、16位Glu、17位Gln、18位Ala、20位Lys、21位Glu、23位Ile和24位Cys。通过与马来酰亚胺-功能化的线性peg反应产生肽X-PEG和Y-PEG, 来达到在24位Cys的位点特异性40-kd聚乙二醇化。肽Y和Y-PEG分别不同于肽X和X-PEG, 因为在肽Y或肽Y-PEG中间 引入了单一侧链内酰胺桥以稳定二级结构并提高胰高血糖素激动。在肽组装过程中, 16位Glu和20位Lys的两个侧链作为侧链酰胺共价连接。肽的这种大环化代表21个原子的内酰胺。检测肽X-PEG和Y-PEG的溶解性, 发现它们在生理缓冲液中以超过25mg/ml的浓度可溶, 肽X-PEG和Y-PEG证明对与血浆离体孵育一周有充分的抗性。

[1365] 实施例43

[1366] 当肽溶解于各种浓度的三氟乙醇(TFE)水溶液中时, 由圆二色谱分析其二级构象(图25)。胰高血糖素是所测的最小螺旋状肽, 计算其在0、10和20%的TFE溶液中的螺旋性分别为10、15和33%(表29)。在同样的实验条件下, GLP-1具有增加的14、29和55%的螺旋性, 说明这两种肽在一级及二级结构上不同。当肽X和Y聚乙二醇化时螺旋性没有显著变化, 即使事实上聚乙二醇化部分代表大于90%的分子质量(表29)。与此形成对照, 肽Y在缺乏TFE的磷酸盐缓冲液中的表观螺旋性大约为肽X的双倍, 从17%到36%。因此, 这两种嵌合肽(肽X-PEG和肽Y-PEG)的聚乙二醇化形式的二级结构明显不同(图25), 生物学性质的差异很可能是二次级结构差异的函数。

[1367] 表29

[1368]

肽	螺旋性百分比		
	0% TFE	10% TFE	20% TFE
胰高血糖素	10	15	33
GLP-1	14	29	55
肽 X	17	34	60
肽 X-PEG	12	31	-
肽 Y	36	35	64
肽 Y-PEG	37	51	-

[1369] 实施例44

[1370] 在基于细胞的CRE-荧光素酶报告测定中评估了两种肽(肽X和Y)及其40-kd的聚乙二醇化衍生物(肽X-PEG和Y-PEG)刺激cAMP合成的能力(图26)。如表30所示,天然胰高血糖素以 0.055 ± 0.014 nM的半数最大有效浓度(EC₅₀)激活胰高血糖素受体,以更高的浓度即 3.29 ± 0.39 nM EC₅₀激活GLP-1受体(GLP-1R)。与此形成对照,GLP-1以 0.028 ± 0.009 nM的EC₅₀激活其受体,并以针对胰高血糖素受体(GcgR)发生作用的EC₅₀超过1 μ M来证明其高度特异性。天然配体针对其受体显示的特异性的动力学范围超出百万。肽X-PEG针对GLP-1R的效价为天然GLP-1效价的2倍,甚至在相对情况下针对GcgR的效价更高。然而,GcgR活性只有天然胰高血糖素的大约10%。引入内酰胺恢复了全部胰高血糖素激动但对GLP-1R无变化。因此,肽Y-PEG相对于天然配体针对各自两种受体为接近平衡的极为高效的共激动剂。每种肽的聚乙二醇化降低针对GcgR效价的10倍,针对GLP-1R效价的5倍。针对GcgR活性的损失稍高一些可能是因为C-末端序列对于胰高血糖素受体的相互作用相对重要性更大。聚乙二醇化肽(肽X-PEG和Y-PEG)针对GLP-1R比天然GLP-1效价稍弱一些,但仍具有纳摩尔以下的EC₅₀。肽X-PEG是该肽的内酰胺形式(即肽Y-PEG)针对GLP-1R的选择性的7倍。因此,这两种DPP-4-抗性肽适于体内持续的时间作用实验,很适合GLP-1R激动,但在胰高血糖素激动中表现不同。

[1371] 表30

[1372]

肽	胰高血糖素受体			GLP-1 受体			选择性 *
	EC50 (nM)	标准 偏差	天然胰高血 糖素活性%	EC50 (nM)	标准 偏差	天然 GLP-1 活 性%	

[1373]

胰高血 糖素	0.055	0.014	100.00	3.293	0.389	0.86	0.009
GLP-1	>1000	-	<0.008	0.028	0.009	100.00	>12500
肽 X	0.585	0.125	9.38	0.014	0.002	202.12	21.5
肽 X-PEG	2.895	0.963	1.90	0.036	0.014	78.41	41.4
肽 Y	0.055	0.011	99.51	0.013	0.005	219.78	2.21
肽 Y-PEG	0.667	0.264	8.22	0.059	0.029	47.61	5.79

[1374] 实施例45

[1375] 在饮食诱导肥胖(D10)的C57B6小鼠中每周一次皮下(s.c)注射40-kd聚乙二醇化的肽:肽X-PEG和Y-PEG。单次注射325nmol/kg的肽Y-PEG经一周降低体重25.8%,其从 $50.9 \pm 1.4\text{g}$ 到 $37.8 \pm 0.8\text{g}$ ($p < 0.0001$, $n = 8/\text{组}$)。类似地给予肽X-PEG是有效的,但相当低效,因为体重减少为9%($49.1 \pm 1.51\text{g}$ 至 $44.68 \pm 1.38\text{g}$)。盐水注射的对照小鼠体重没有变化(注

射前: $50.61 \pm 1.32\text{g}$, 注射后: $50.87 \pm 1.46\text{g}$; 图27A)。体重变化是脂肪量减少(对于内酰胺肽为41.9%, 对于开环形式为22.2%, 对于对照为2.3%, $p < 0.001$; 图27B)的结果, 与平均每日摄食显著降低(肽Y-PEG: $0.40 \pm 0.29\text{g/天}$, 肽X-PEG: $1.83 \pm 0.81\text{g/天}$, 盐水: $2.70 \pm 0.78\text{g/天}$, $p < 0.0001$, 图27C)平行。当与对照比较时, 两种肽的血糖显著降低, 在肽Y-PEG中降低程度稍高一些(肽Y-PEG: -90.1mg/dL , 肽X-PEG: -79.6mg/dL , 对照: -23.9g/dL , $p = 0.0433$; 图27D)。两种肽(肽X-PEG和肽Y-PEG)之间的相对差异统计学不显著。

[1376] 实施例46

[1377] 在单独实验中, 单次s.c.注射六种不同剂量(0、7、14、35、70、140和350nmol/kg)的肽Y-PEG和肽X-PEG显示线性响应, 体重和血糖剂量依赖性降低(图28A、28B、28C和28D)。这提示所观察到的作用除了快速过度损失体重的间接作用外在药理上没有明显的毒性相关性。肽Y-PEG的作用重要性更加突出, 表示另一元素胰高血糖素激动改进了该肽的效价。

[1378] 实施例47

[1379] 在单独实验中, 每周一次s.c.注射70nmol/kg的肽Y-PEG或肽X-PEG分别降低DIO小鼠体重28.1%和20.1% ($p < 0.0001$, $n = 7-8/\text{组}$; 图29A)。体重变化与脂肪量降低相关联(对于肽Y-PEG为-62.9%, 对于肽X-PEG为-52.2%, 对于对照为5.1%, $p < 0.0001$; 图29B)。这些低剂量对摄食的长期作用($p = 0.95$; 图29C)不如高剂量的短期作用(图27C)给人印象深刻。与溶媒($12.71 \pm 0.45\text{千卡}/[\text{kg}\cdot\text{h}]$), $p = 0.0187$)比较, 肽Y-PEG($14.60 \pm 0.69\text{千卡}/[\text{kg}\cdot\text{h}]$)和肽X-PEG($17.19 \pm 1.49\text{千卡}/[\text{kg}\cdot\text{h}]$)的能量消耗提高, 然而呼吸商往往降低(图29D和29E; 对于肽Y-PEG为 0.719 ± 0.01 , 对于肽X-PEG为 0.725 ± 0.01 , 对于溶媒为 0.755 ± 0.01 , $p = 0.1028$), 这表明提高的生热作用和改变的应用分配可解释综合负能量平衡。提高的能量消耗与自发的物理活动诱导的生热作用(NEAT)的变化不相关, 因为治疗组和对照组之间活动能力没有差异($p = 0.4281$; 图29F)。自动在线监测急性喂食或长期监测摄食二者都未显示任何热量摄入差异(自动监测 $p = 0.667$, 长期监测 $p = 0.9484$; 图30A)。

[1380] 在首次注射后第3天开始的治疗期间血糖水平显著降低(平均降低: 肽Y-PEG为-32%, 肽X-PEG为-24.5%, 对照为-2.7%, $p < 0.0001$; 图29G)。因响应第3天的腹膜内(i.p.)葡萄糖攻击, 与溶媒处理的对照(34125 ± 3142 , $p < 0.0001$)比较, 两个治疗组(肽Y-PEG为 14183 ± 1072 , 肽X-PEG为 13794 ± 824.1)血糖峰值(图29H)和曲线(AUC)显著降低(图30F)。用肽Y-PEG或肽X-PEG治疗一个月后, 与对照(2675pg/ml)比较, 治疗组中的血浆胰岛素降低(1194pg/ml , 1034pg/ml , $p = 0.0244$), 这提示改进胰岛素敏感性(图29I)。在用肽Y-PEG或肽X-PEG治疗一个月后, 与溶媒(1077pg/ml) ($p = 0.108$)比较, 血浆C-肽水平往往降低(738.8pg/ml , 624.7pg/ml) (图30G)。

[1381] 为了测定主要现象在不同物种中是否普遍, 将这两种化合物给予饮食诱导肥胖的大鼠(平均重量 $777.4 \pm 2.1\text{g}$, 剂量70nmol/kg/周, 一周注射一次, 3周治疗)。肽Y-PEG和肽X-PEG各自降低DIO大鼠的体重(肽X-PEG: $-11.15 \pm 0.88\%$; 肽Y-PEG: $-20.58 \pm 2.26\%$, 溶媒: $1.09 \pm 0.56\%$) ($p < 0.0001$)和脂肪量(肽X-PEG: $-19.17 \pm 2.03\%$; 肽Y-PEG: $-33.76 \pm 4.76\%$, 溶媒: $0.65 \pm 1.20\%$; $p < 0.0001$), 这确证这种抗-肥胖症治疗方法的适用性不依赖物种。

[1382] 实施例48

[1383] 相对于溶媒($254.025.33\text{mg/dL}$, $p = 0.0441$; 图31A), 用肽X-PEG和肽Y-PEG经27天

长期s.c.治疗降低DIO小鼠的总胆固醇(分别为 $106.9 \pm 6.3 \text{ mg/dL}$ 和 $200.8 \pm 29.58 \text{ mg/dL}$)。在分开的实验中,DIO小鼠在第0天和第7天接受 70 nmol/kg s.c.的肽X-PEG、肽Y-PEG或溶媒,并在第9天评估。肽Y-PEG降低血浆甘油三酯、LDL胆固醇和总胆固醇(与溶媒 $177.7 \pm 11.8 \text{ mg/dL}$ 比较,总胆固醇为 $63.02.49 \text{ mg/dL}$)($p < 0.0001$),同时可能引起从LDL到HDL胆固醇转化(图31B)。肽X-PEG降低LDL和HDL胆固醇二者,但对甘油三酯没有显著作用(图31C)。瘦素显著降低(对于肽Y-PEG为 $3343 \pm 723.3 \text{ pg/ml}$;对于肽X-PEG为 7308 ± 2927 ;对于溶媒为 $18,642 \pm 6124$; $p = 0.0426$;图31D、31E、31F)。长期治疗27天亦使肝脏脂类含量正常化,同时对对照DIO小鼠保持显著的肝脏脂肪变性(数据未显示)。

[1384] 实施例49

[1385] 用肽X-PEG或肽Y-PEG治疗一个月导致在DIO小鼠的白色脂肪组织(WAT)中增加激素敏感性脂肪酶(HSL)的磷酸化(肽X-PEG: 1.135 ± 0.315 ;肽Y-PEG: 1.625 ± 0.149 ;溶媒: 0.597 ± 0.204 ; $p = 0.0369$;图32B),这暗示胰高血糖素对WAT脂肪分解有特异性指向作用。用肽Y-PEG和肽X-PEG以 35 nmol/kg/周 剂量治疗2周,同时降低小鼠的脂肪量,当与对照小鼠(数据未显示)比较时,附睾脂肪组织的脂肪细胞大小显著缩小。然而,尽管降低脂肪量及缩小脂肪细胞,但这种用肽Y-PEG和肽X-PEG进行2周的短期治疗与由CD68的实时RT-PCR(图33C)定量测量的脂肪组织巨噬细胞含量的显著减少没有相关性。肽X-PEG治疗提高棕色脂肪组织(BAT)中解偶联蛋白I(UCP1)的水平,但肽Y-PEG治疗不能(肽X-PEG为 2.167 ± 0.429 ,肽Y-PEG为 1.287 ± 0.1558 ,溶媒为 1.0 ± 0.118 ; $p = 0.0264$;图32A),其与GLP-1对BAT制止热量生成的特异性作用一致。反映肝糖质生成的肝基因表达不受肽X-PEG或肽Y-PEG的影响(图30H和30I)。组织学表明胰腺小岛在用肽X-PEG治疗后往往小些(数据未显示)。

[1386] 实施例50

[1387] 为了仔细分析肽X-PEG和Y-PEG的GLP-1R和GcgR激动剂组分的贡献,将每一种给予敲除GLP-1受体(GLP-1R $^{-/-}$)的小鼠一个月,保持高脂肪饮食。与盐水比较,肽X-PEG引起体重($p > 0.05$;图34A和34B)和脂肪量($p > 0.05$;图34C)降低。肽Y-PEG在GLP-1R $^{-/-}$ 小鼠中引起体重($p = 0.0025$)和脂肪量($p = 0.0025$)显著降低(图34A-34C)。肽X-PEG对GLP-1R $^{-/-}$ 小鼠的摄食没有作用,但肽Y-PEG显著抑制摄食($p = 0.017$)(图34D)。肽Y-PEG(不是肽X-PEG)在缺乏功能性GLP-1R时在葡萄糖耐受试验中倾向于提高血糖($p = 0.03$)(图34E和34F),这暗示需要共激动剂的GLP-1组分保护免受胰高血糖素诱导的高血糖症。

[1388] 实施例51

[1389] 作为对可归于胰高血糖素激动的肽X-PEG和Y-PEG的作用的独立评估,研究了具有相当于GLP-1R效价但显著不同的GcgR活性的两种另外的肽激动剂。这两种肽(肽U和V)与肽X-PEG和Y-PEG相关。肽U和V包含具有以下修饰的氨基酸序列SEQ ID NO:1:16位Glu、17位Gln、18位Ala、20位Lys、21位Glu、23位Ile和24位Cys,但包含24位Cys处的20-kd聚乙二醇化,不包含2位AIB。肽V另外包含用Glu取代Gln3,其选择性地降低10倍以上的胰高血糖素激动。肽U和肽V都不包含内酰胺桥。用肽V每天以 50 nmol/kg s.c.治疗DIO小鼠一周,显示相对于肽U减轻了降体重作用(分别为 -9.09 ± 0.80 对 $-13.71 \pm 0.92 \text{ g}$, ($p < 0.0001$);图35A)。

[1390] 实施例52

[1391] 基本上如本文所述制备包含经由 γ -Glu间隔物或 γ -Glu- γ -Glu二肽间隔物与Lys残基连接的C16脂肪酰基的胰高血糖素肽,其中Lys残基位于10位或在C-末端(29位)。如

本文所述检测所述肽针对胰高血糖素受体和GLP-1受体的体外活性。结果示于表31中。

[1392] 表31

[1393]

肽			SEQ ID NO:	针对胰高血糖 素受体的 EC50 (nM)	针对 GLP-1 受 体的 EC50
	酰化的 AA	间隔物			
Chi-2, d-Ser2	Lys10	γ E	643	0.011	0.0014
Chi-2, d-Ser2	Lys10	γ E- γ E	644	0.008	0.003
Chi-2, AIB2	Lys10	γ E	645	0.025	0.0014
Chi-2, AIB2	Lys10	γ E- γ E	646	0.014	0.0018
Chi-2, AIB2, E3	Lys10	无	647	46.084	0.005
Chi-2, AIB2, E3	Lys10	γ E- γ E	648	2.922	0.004
Chi-2, AIB2, I7	Lys10	γ E	649	0.014	0.024 (0.044*)

[1394]

Chi-2, AIB2, I7	Lys10	γ E- γ E	650	0.007	0.010
DMIA1, E16/K20 内酰胺	Lys10	γ E	651	0.019	0.006
DMIA1, E16/K20 内酰胺	Lys10	γ E- γ E	652	0.014	0.004
DMIA1, E16/K20 内酰胺	Lys29	γ E	653	0.107	0.075
DMIA1, E16/K20 内酰胺	Lys29	γ E- γ E	654	0.025	0.070
AIB2, AIB16, A18, D28	Lys10	γ E- γ E	655	0.003	0.004
AIB2, AIB16, A18, D28	Lys10	γ E	656	0.006	0.004

[1395] 实施例53

[1396] 基本上如本文所述制备表32中所示的肽：

[1397] 表32

[1398]

肽名称	SEQ ID NO:	序列
嵌合体-2 Aib2C24Mal40KPEG	624	H(Aib)QGTFTSDYSKYLDEQAAKEFICWLMNT-酰胺
嵌合体-2 Aib2E16K20 内酰胺 C24Mal40KPEG	625	H(Aib)QGTFTSDYSKYLDEQAAKEFICWLMNT-酰胺
胰高血糖素 Aib2E16K20 内酰胺 C24 酰胺 Mal40KPEG	626	H(Aib)QGTFTSDYSKYLDERRAKDFVCWLMNT-酰胺 内酰胺
胰高血糖素 Dmia1E16K20 内酰胺 C24Mal40KPEG	628	(Dmia)SQGTFTSDYSKYLDERRAKDFVCWLMNT-酰 胺内酰胺

[1399]

胰高血糖素 Dmia1E16K20 内酰胺 C24Mal40KPEG	629	(Dmia)SQGTFTSDYSKYLDERRAKDFVCWLMNT-OH 内酰胺
胰高血糖素 Dmia1E16K20 内酰胺 C24 硫 醚 40KPEG	630	(Dmia)SQGTFTSDYSKYLDERRAKDFVCWLMNT-酰 胺内酰胺
嵌合体 2 Aib2E3C24-硫醚 40K PEG	631	H(Aib)EGTFTSDYSKYLDERRAKDFVCWLMNT-酰胺
胰高血糖素 DMIA1, E3, E15, E16, K20, C24-Peg	632	(Dmia)SEGTFSTSDYSKYLEERRAKDFVC(PEG40K)WL MNT-酰胺
胰高血糖素 Aib2Aib16C24K10(rErE-C14)C24PEG40K TE)酰胺	633	H(Aib)QGTFTSDK(rErE-C14)SKYLDaibRRAQDFVC(PEG40K TE)WLMNT-酰胺
胰高血糖素 Aib2Aib16K10(AA-C14)C24PEG40K TE 酰胺	634	H(Aib)QGTFTSDK(AA-C14)SKYLDaibRRAQDFVC(P EG40K TE)WLMNT-酰胺
胰高血糖素 Aib2Aib16K10(AA-C16)酰胺	635	H(Aib)QGTFTSD K(AA-C16)SKYLDaibRRAQDFVQWLMNT 酰胺
胰高血糖素 Aib2Aib16K10(rErE-C16)酰胺	636	H(Aib)QGTFTSD K(rErE-C16)SKYLDaibRRAQDFVQWLMNT 酰胺

[1400] 除了肽SEQ ID NO:624、631和632外,表32中的所有肽都显示针对胰高血糖素受体和GLP-1受体的有效体外活性。

[1401] 基本上如本文所述制备A系列的肽,其除表33中所述变化之外包含天然胰高血糖素(SEQ ID NO:1)的氨基酸序列。

[1402] 表33

[1403]

DPP-IV 保护	α 螺旋稳定	位置 3	主链*	C-末端 酰胺?
--------------	---------------	------	-----	-------------

[1404]

DPP-IV 保护	α 螺旋稳定	位置 3	主链*	C-末端 酰胺?
1 位 DMIA	16 位 AIB	Gln (野生 型)	野生型	是
2 位 AIB	16 位 AIB	Gln (野生 型)	野生型	是
2 位 d-Ser	16 位 AIB	Gln (野生 型)	野生型	是
1 位 DMIA	16 位 AIB	Glu	野生型	是
2 位 AIB	16 位 AIB	Glu	野生型	是
2 位 d-Ser	16 位 AIB	Glu	野生型	是
1 位 DMIA	16 和 20 位 AIB	Gln (野生 型)	野生型	是
2 位 AIB	16 和 20 位 AIB	Gln (野生 型)	野生型	是
2 位 d-Ser	16 和 20 位 AIB	Gln (野生 型)	野生型	是
1 位 DMIA	16 和 20 位 AIB	Glu	野生型	是
2 位 AIB	16 和 20 位 AIB	Glu	野生型	是
2 位 d-Ser	16 和 20 位 AIB	Glu	野生型	是

[1405]

DPP-IV 保护	α 螺旋稳定	位置 3	主链*	C-末端 酰胺?
1 位 DMIA	16 位 Glu 和 20 位 Lys	Gln (野生 型)	野生型	是
2 位 AIB	16 位 Glu 和 20 位 Lys	Gln (野生 型)	野生型	是
2 位 d-Ser	16 位 Glu 和 20 位 Lys	Gln (野生 型)	野生型	是
1 位 DMIA	16 位 Glu 和 20 位 Lys 侧链之间的内 酰胺桥	Gln (野生 型)	野生型	是
2 位 AIB	16 位 Glu 和 20 位 Lys 侧链之间的内 酰胺桥	Gln (野生 型)	野生型	是
2 位 d-Ser	16 位 Glu 和 20 位 Lys 侧链之间的内 酰胺桥	Gln (野生 型)	野生型	是
1 位 DMIA	16 位 Glu 和 20 位 Lys	Glu	野生型	是
2 位 AIB	16 位 Glu 和 20 位 Lys	Glu	野生型	是
2 位 d-Ser	16 位 Glu 和 20 位 Lys	Glu	野生型	是
1 位 DMIA	16 位 Glu 和 20 位 Lys 侧链之间的内 酰胺桥	Glu	野生型	是

[1406]

DPP-IV 保护	α 螺旋稳定	位置 3	主链*	C-末端 酰胺?
2 位 AIB	16 位 Glu 和 20 位 Lys 侧链之间的内 酰胺桥	Glu	野生型	是
2 位 d-Ser	16 位 Glu 和 20 位 Lys 侧链之间的内 酰胺桥	Glu	野生型	是
1 位 DMIA	16 位 Glu 和 20 位 Lys	Gln (野生 型)	嵌合体 2	是
2 位 AIB	16 位 Glu 和 20 位 Lys	Gln (野生 型)	嵌合体 2	是
2 位 d-Ser	16 位 Glu 和 20 位 Lys	Gln (野生 型)	嵌合体 2	是
1 位 DMIA	16 位 Glu 和 20 位 Lys 侧链之间的内 酰胺桥	Gln (野生 型)	嵌合体 2	是
2 位 AIB	16 位 Glu 和 20 位 Lys 侧链之间的内 酰胺桥	Gln (野生 型)	嵌合体 2	是
2 位 d-Ser	16 位 Glu 和 20 位 Lys 侧链之间的内 酰胺桥	Gln (野生 型)	嵌合体 2	是
1 位 DMIA	16 位 Glu 和 20 位 Lys	Glu	嵌合体 2	是
2 位 AIB	16 位 Glu 和 20 位 Lys	Glu	嵌合体 2	是

[1407]

DPP-IV 保护	α 螺旋稳定	位置 3	主链*	C-末端 酰胺?
2 位 d-Ser	16 位 Glu 和 20 位 Lys	Glu	嵌合体 2	是
1 位 DMIA	16 位 Glu 和 20 位 Lys 侧链之间的内 酰胺桥	Glu	嵌合体 2	是
2 位 AIB	16 位 Glu 和 20 位 Lys 侧链之间的内 酰胺桥	Glu	嵌合体 2	是
2 位 d-Ser	16 位 Glu 和 20 位 Lys 侧链之间的内 酰胺桥	Glu	嵌合体 2	是

[1408] *表示野生型或嵌合体2(17位Gln、18位Ala、21位Glu和23位Ile)的17、28、21和23位氨基酸。

[1409] 基本上如本文所述制备具有与A系列肽相同结构只是用正亮氨酸取代27位Met的肽。这些经修饰的肽为B系列的肽。

[1410] 基本上如本文所述制备具有与A和B系列肽相同结构的肽,只是所述肽用与40kDa PEG共价连接的Cys取代24位Gln。这些聚乙二醇化肽构成C系列肽。

[1411] 基本上如本文所述制备具有与A、B或C系列肽相同结构的肽,只是所述肽用与C8、C12、C14、C16或C18脂肪酰基共价连接的Lys取代10位Tyr。用C8脂肪酰基酰化的肽构成D系列肽。用C12脂肪酰基酰化的肽构成E系列肽。用C14脂肪酰基酰化的肽构成F系列肽。用C16脂肪酰基酰化的肽构成G系列肽。用C18脂肪酰基酰化的肽构成H系列肽。

[1412] 基本上如本文所述制备具有与D到H系列肽相同结构的肽,只是所述肽的脂肪酰基经由间隔物与10位Lys连接。包含 γ -Glu- γ -Glu间隔物的肽构成I系列肽。包含 γ -Glu间隔物的肽构成J系列肽。包含Ala-Ala间隔物的肽构成K系列肽。包含 β -Ala- β -Ala间隔物的肽构成L系列肽。

[1413] 本文引用的包括出版物、专利申请和专利在内的所有参考文献在此引作参考,引用程度如同每一参考文献被单独并具体而言表示引作参考并在本文中以其整体提出一样。

[1414] 除非本文另外指出或明确与上下文有矛盾,否则在阐述本发明上下文(尤其是在以上权利要求上下文)中术语“一个”和“一种”和“该”及类似说法的应用,应理解为既包括单数又包括复数。除非另外指出,否则术语“包含”、“具有”、“包括”和“含有”应理解为开放

性术语(即意味着“包括但不限于”)。

[1415] 本文值范围的列举仅意欲作为对单独提及每一个落入所述范围的单独值及每一个端点的速记方法,除非本文另外指出,否则本说明书包括每一个单独值及每一个端点,如同其在本文被单独列举一样。

[1416] 除非本文另外指出或另外明确与上下文有矛盾,否则可以以任何合适的次序来实施本文所述方法。除非另外声明,否则本文提供的任何及所有实施例或例示性语言(例如“例如”)的应用仅意欲更好地阐明本发明,并非提出对本发明范围的限制。本发明书中的任何语言都不应该理解为表明任何未提出权利要求的部分对实行本发明是必不可少。

[1417] 本发明优选实施方案如本文所述,包括发明人已知的实施本发明最好的方式。在阅读了前述说明后,本领域一般技术人员可明了优选实施方案的变体。本发明人希望技术人员酌情使用所述变体,本发明人希望本发明除了如本文所明确阐述那样实施外还能另外实施。因此,本发明如适用法律所允许那样包括附加权利要求所列举的主题的所有修改及等同内容。此外,除非本文另外指出或另外明确与上下文有矛盾,否则本发明包括上述元件以其所有可能变化的任何组合。

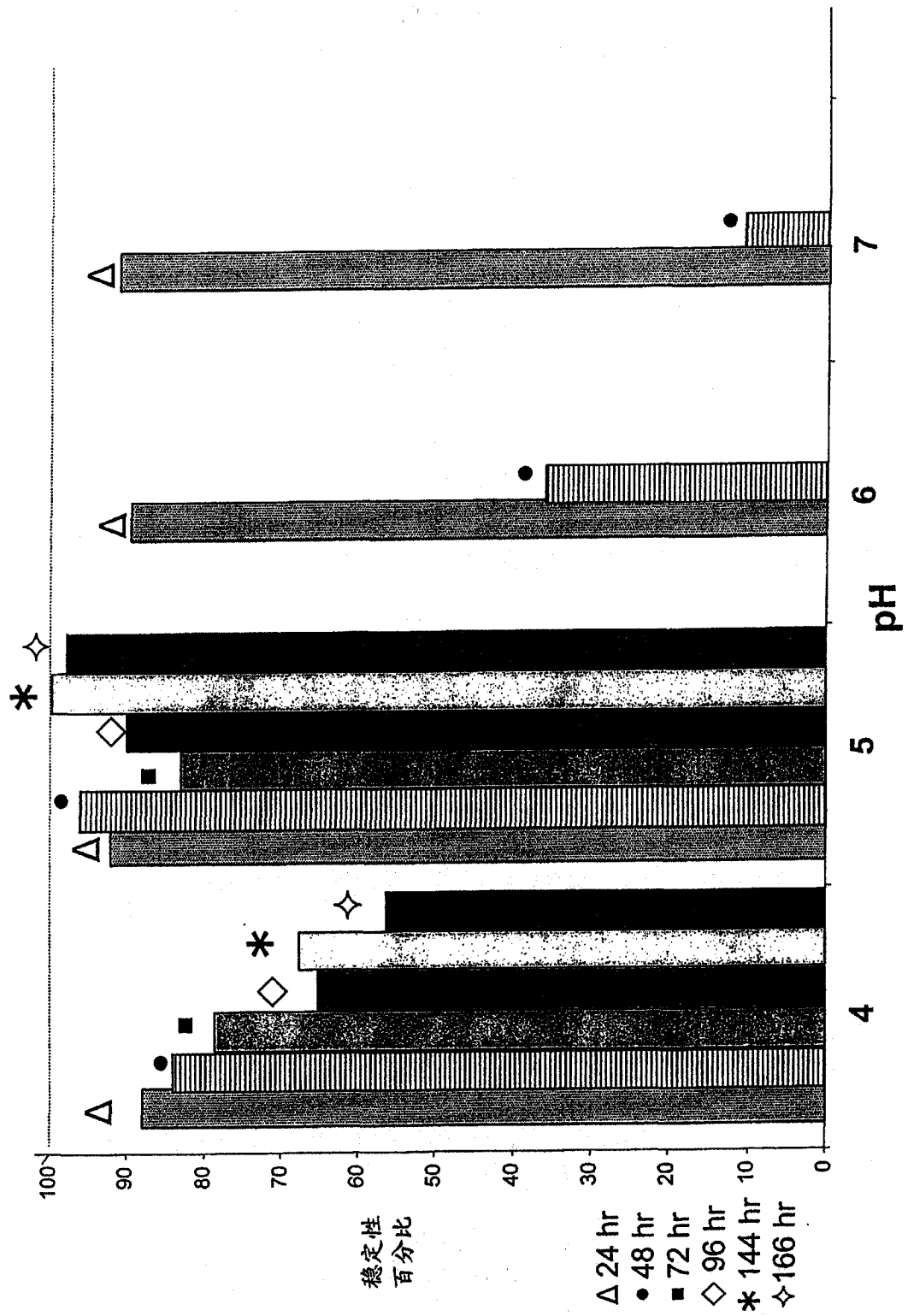


图1:胰高血糖素Cys21-马来酰亚胺PEG5k的稳定性(37°C)

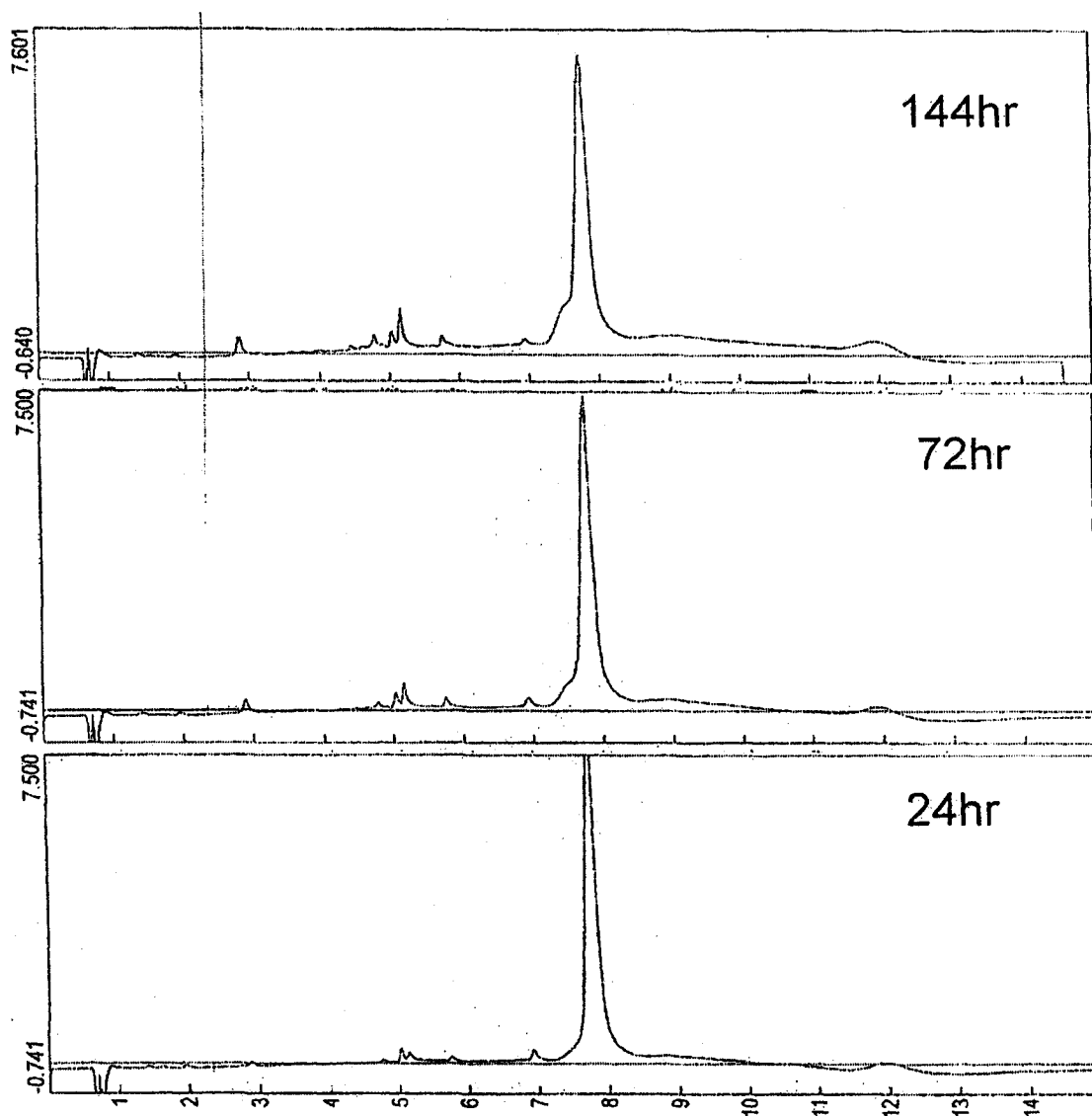


图2:胰高血糖素Cys²¹-马来酰亚胺PEG_{5k}在pH5(37°C)下的HPLC分析

胰高血糖素受体介导的 cAMP 诱导

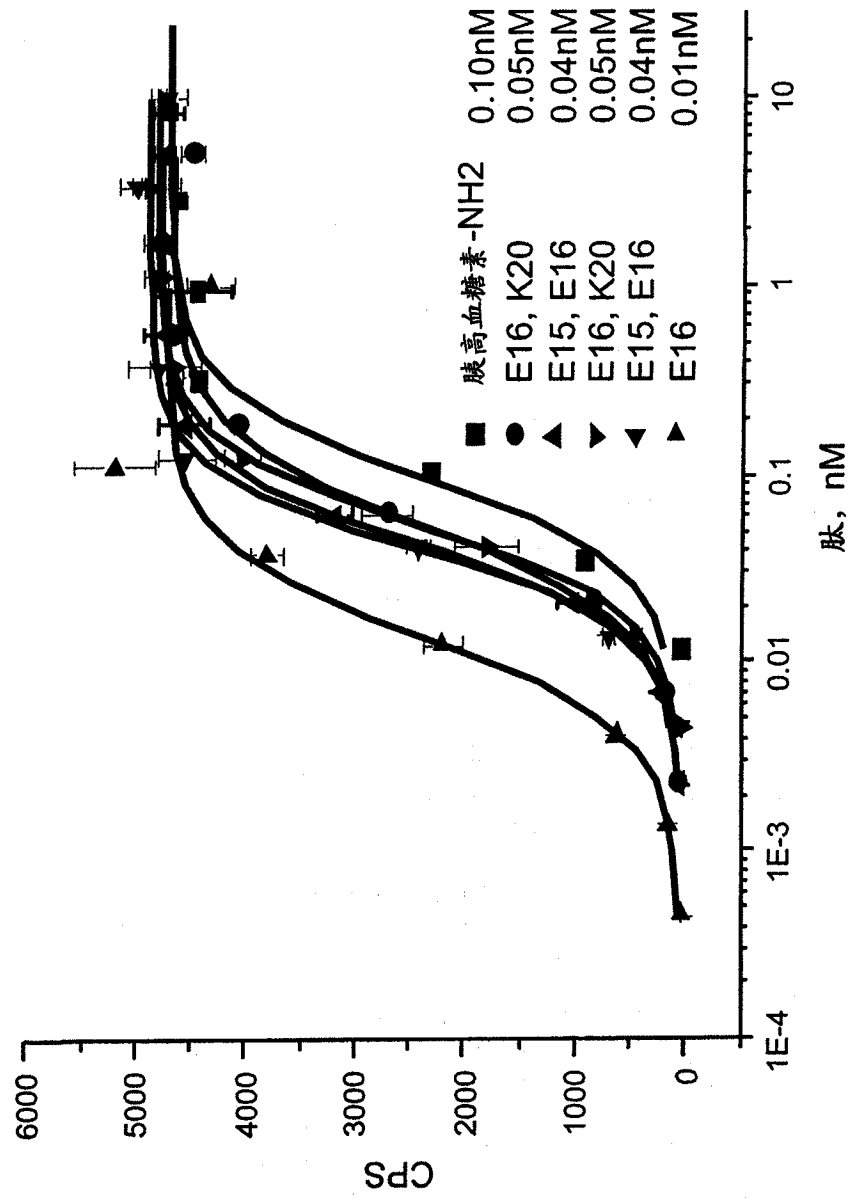


图3 胰高血糖素受体介导的cAMP诱导

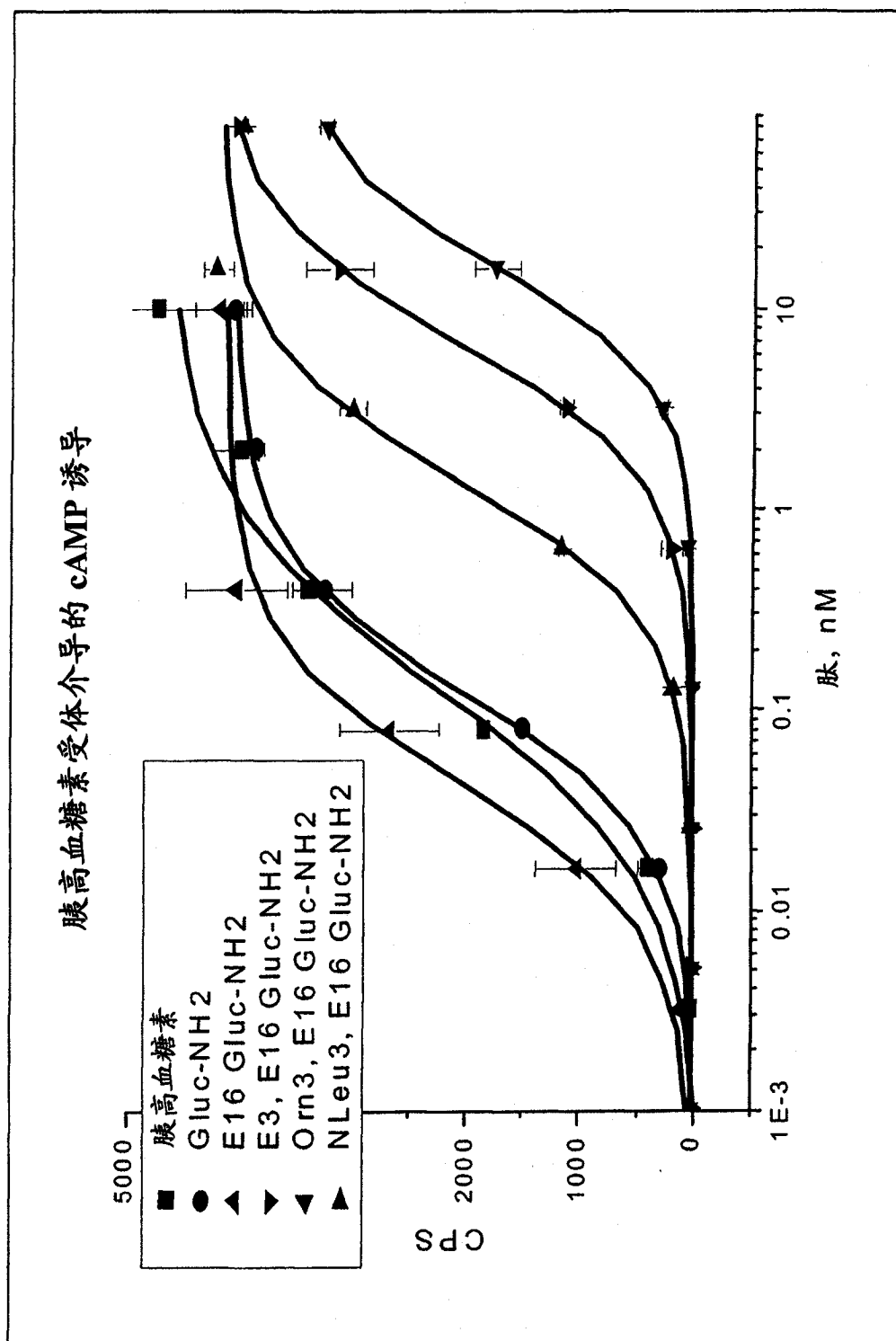


图4A

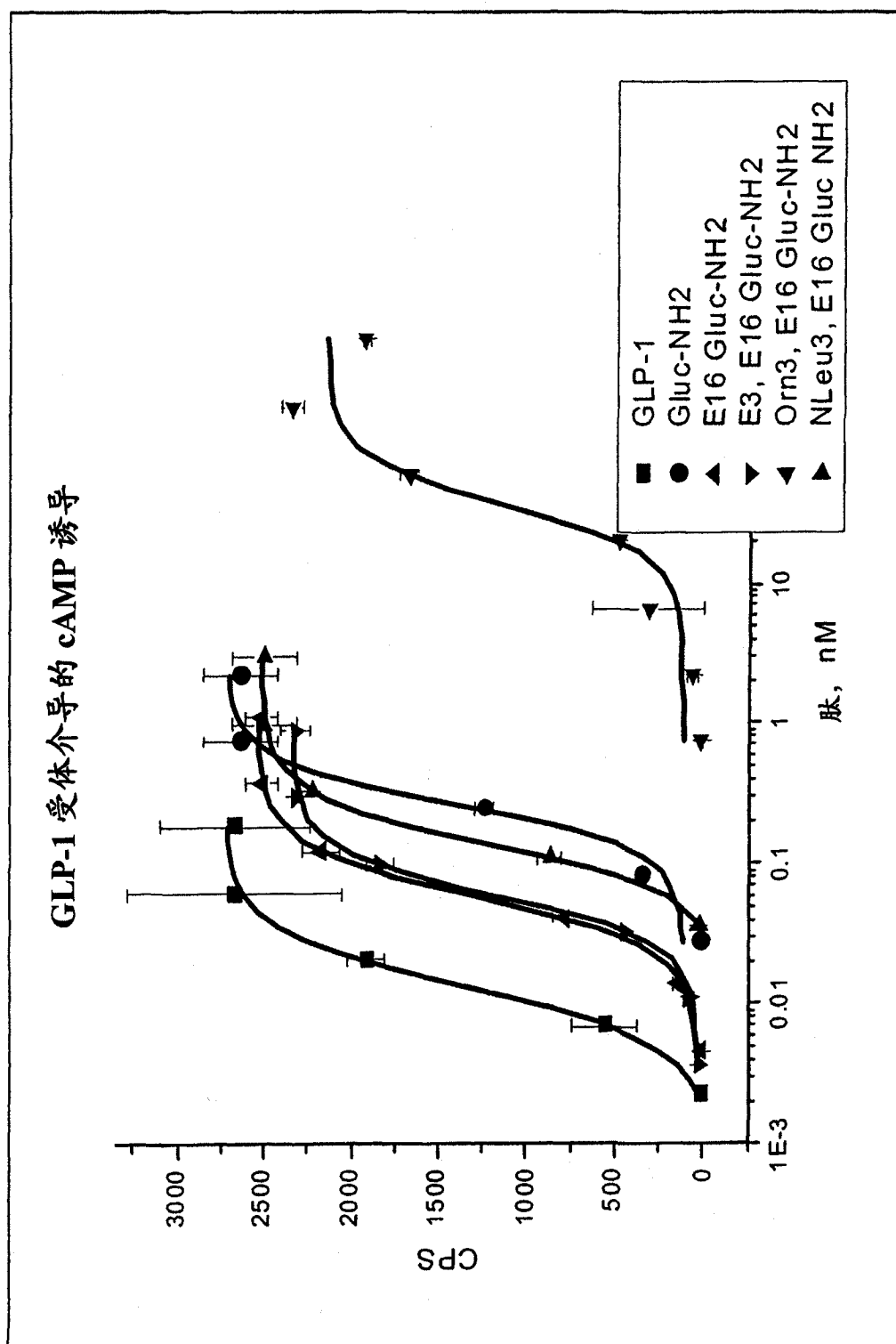


图4B

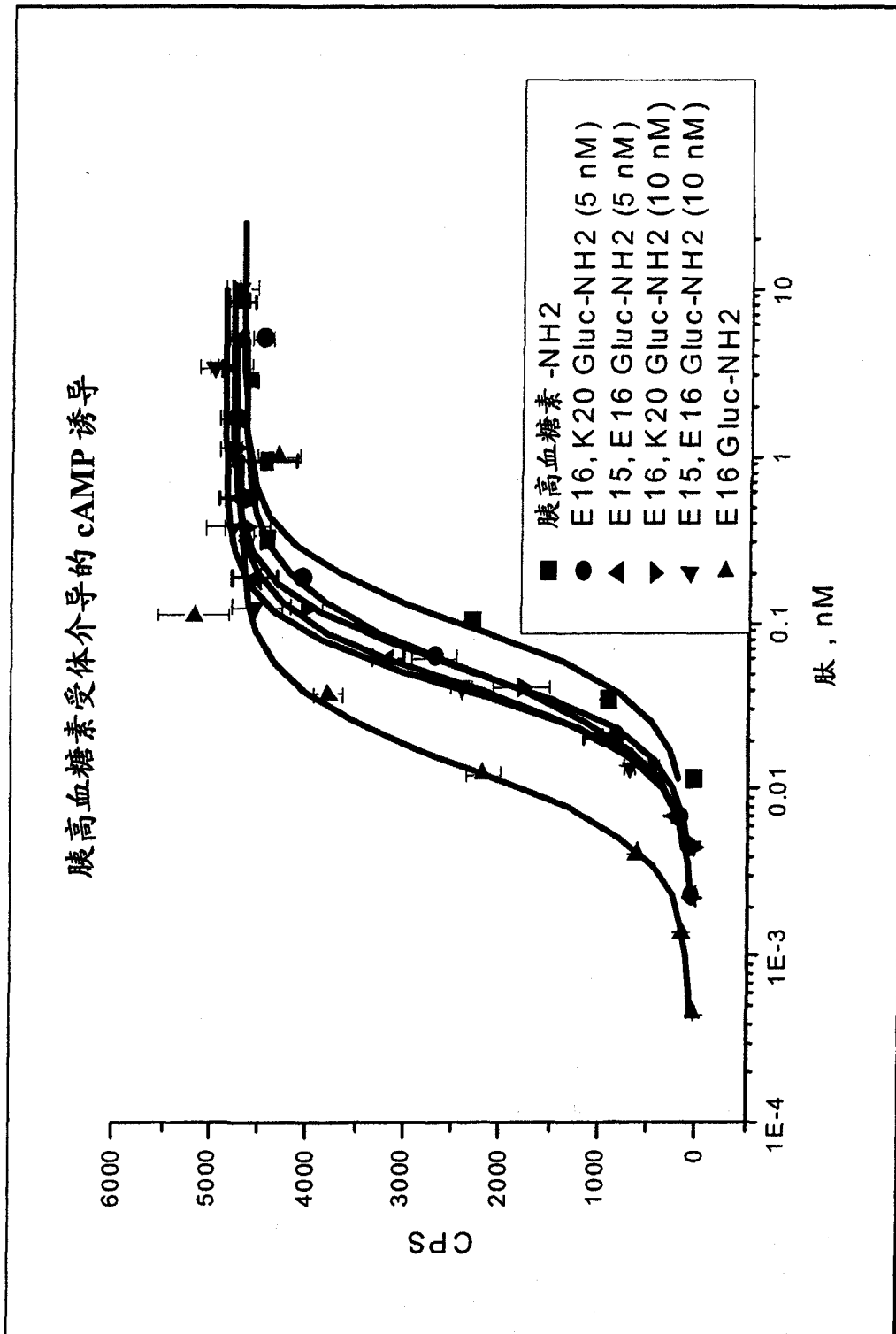


图5A

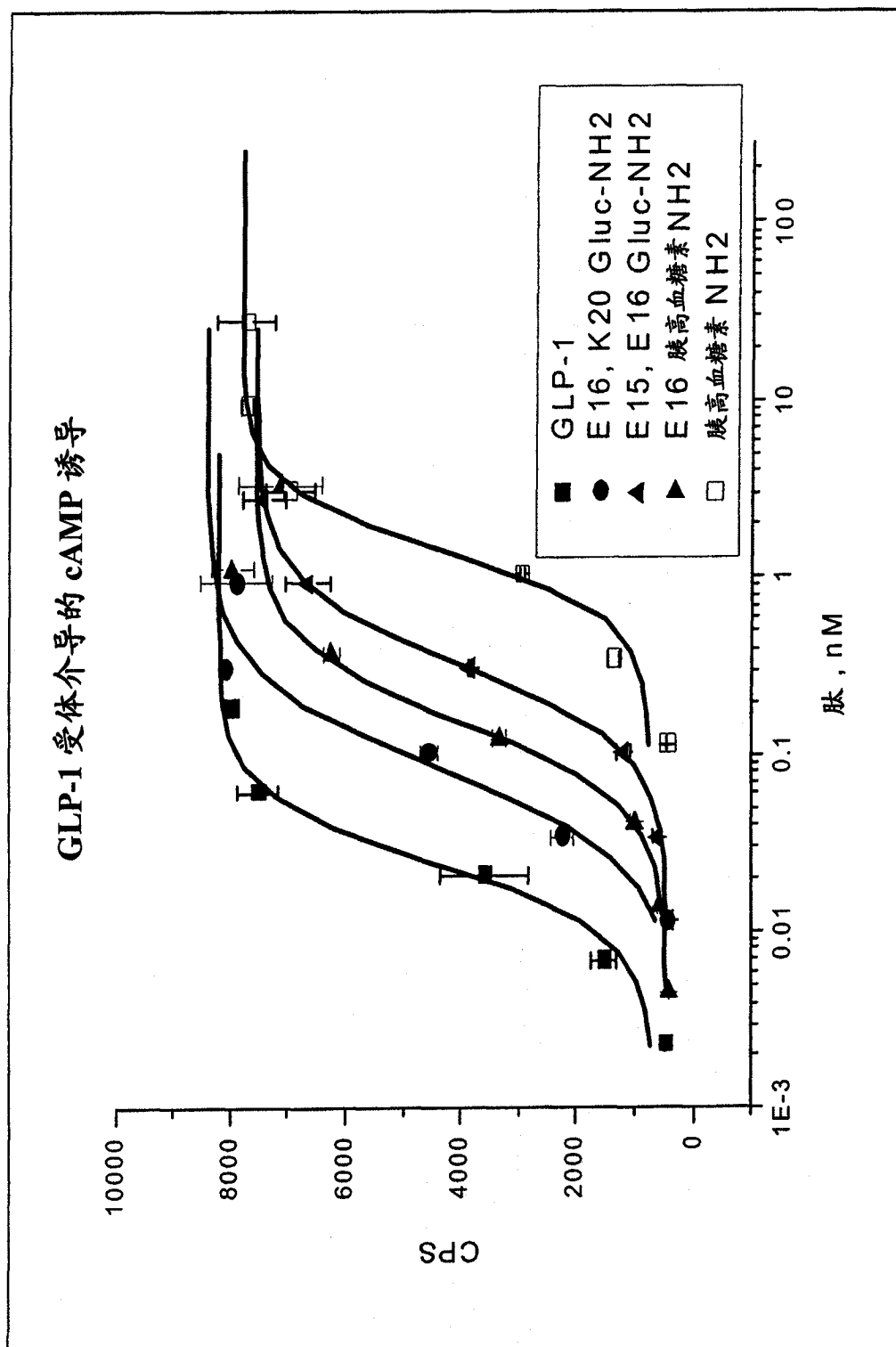


图5B

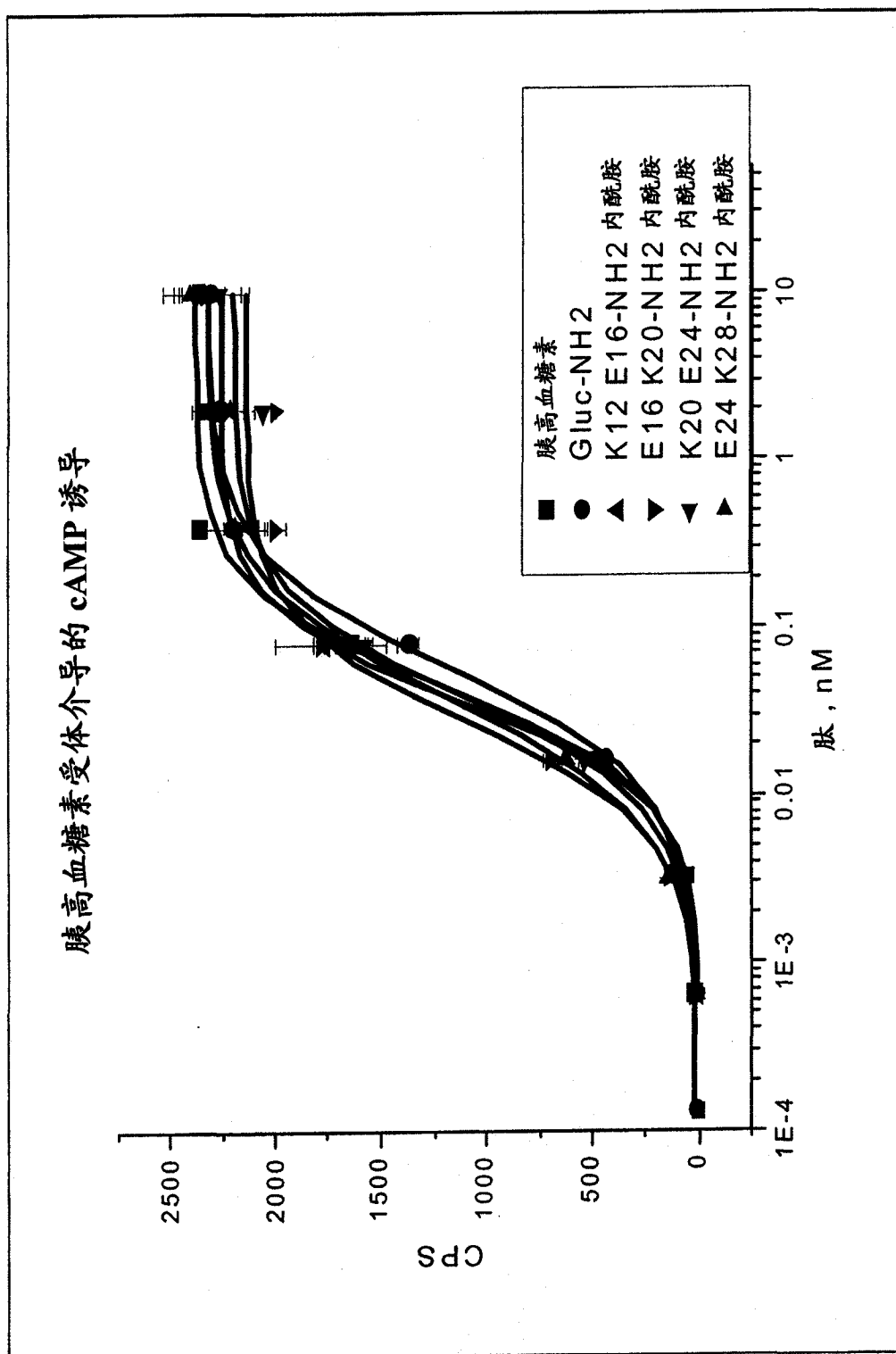


图6A

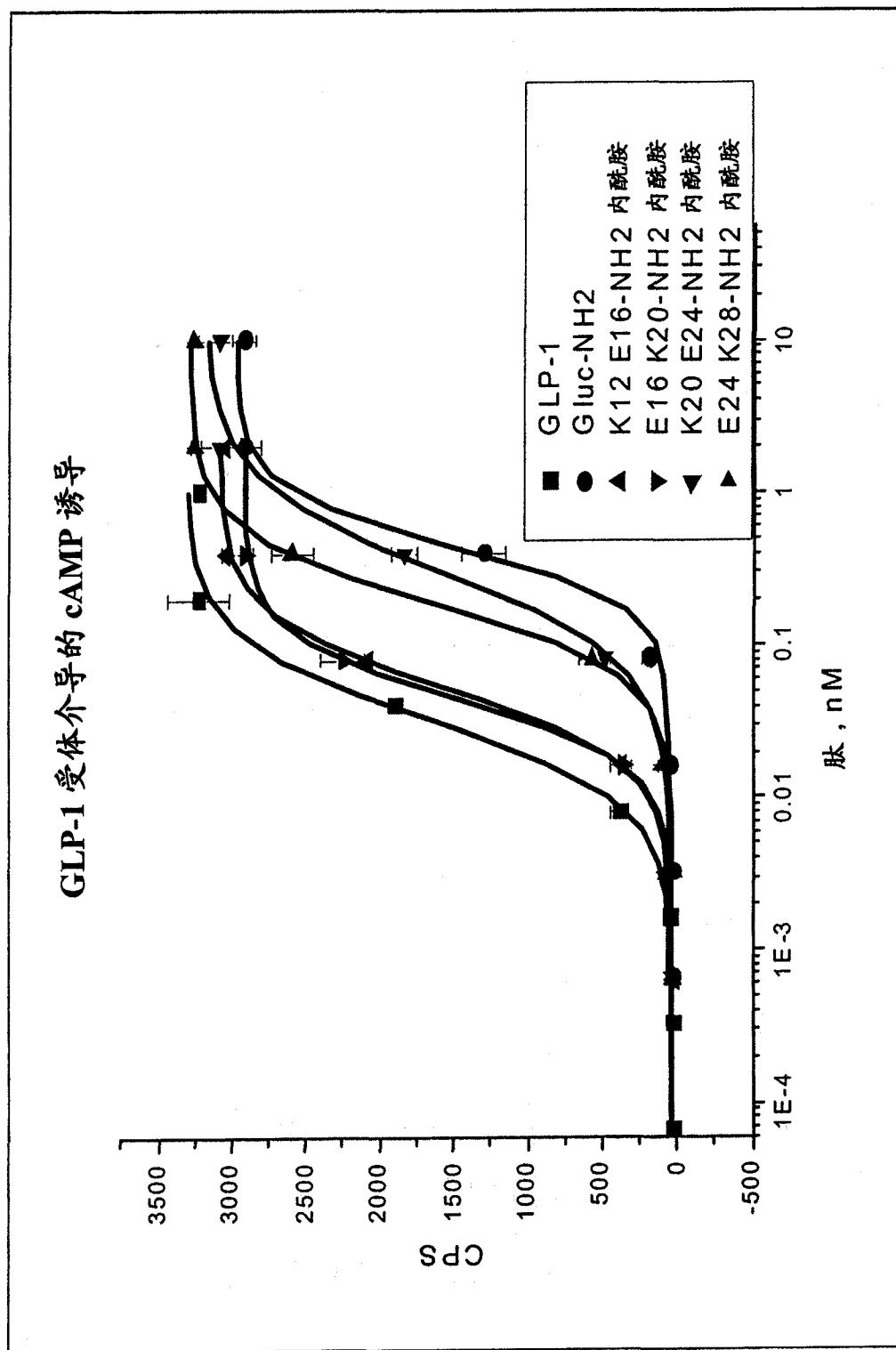


图6B

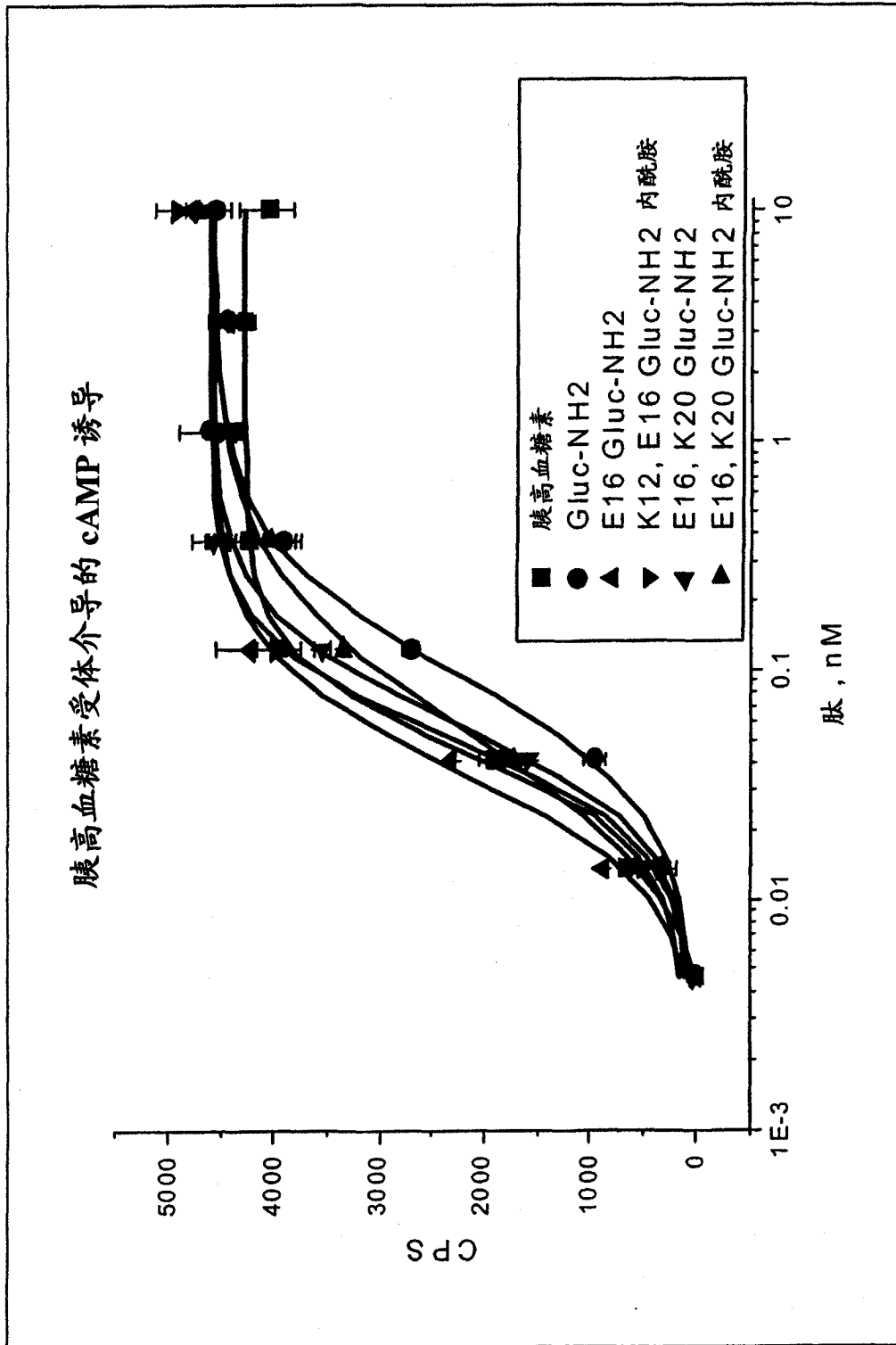


图7A

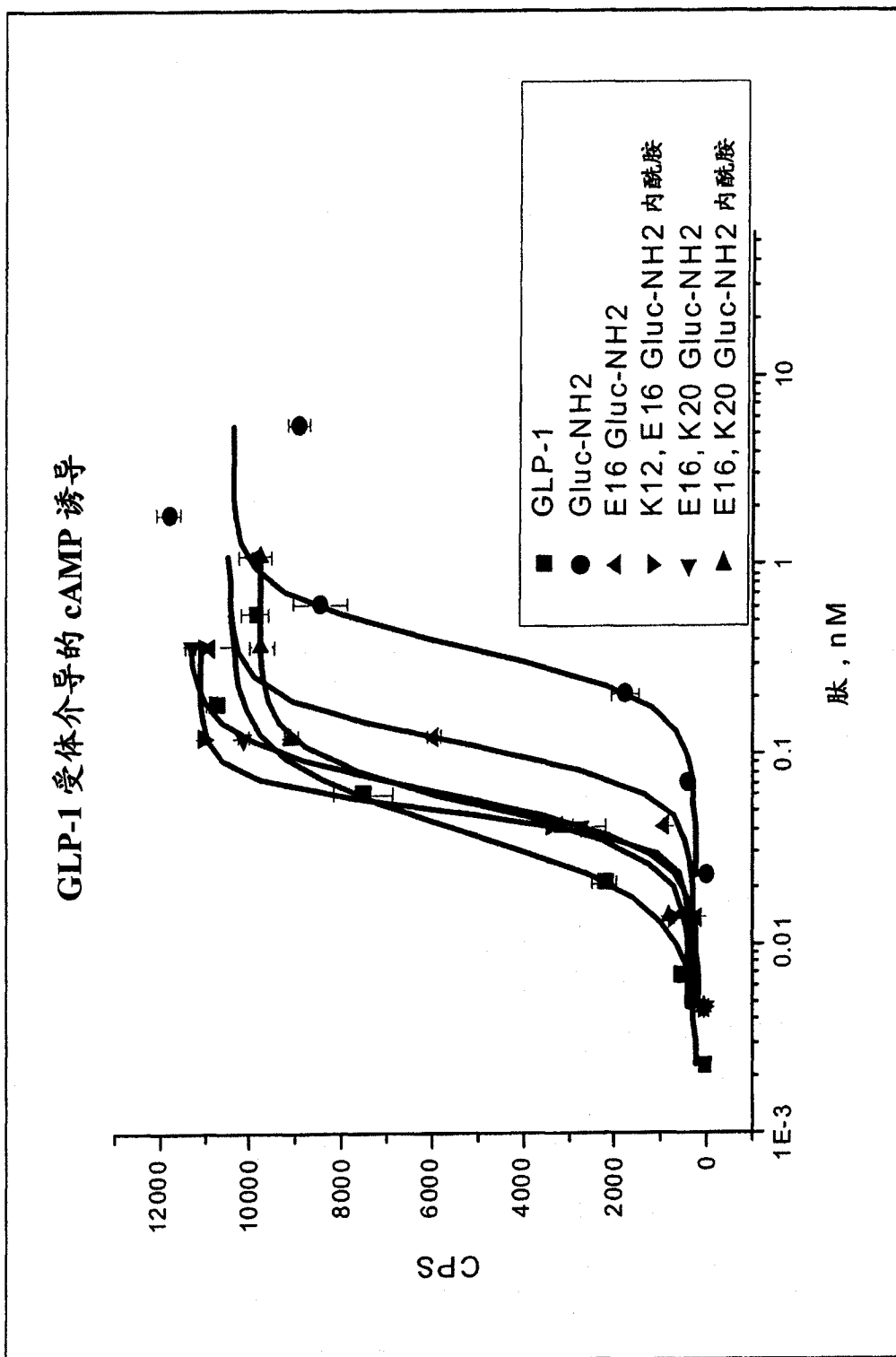


图7B

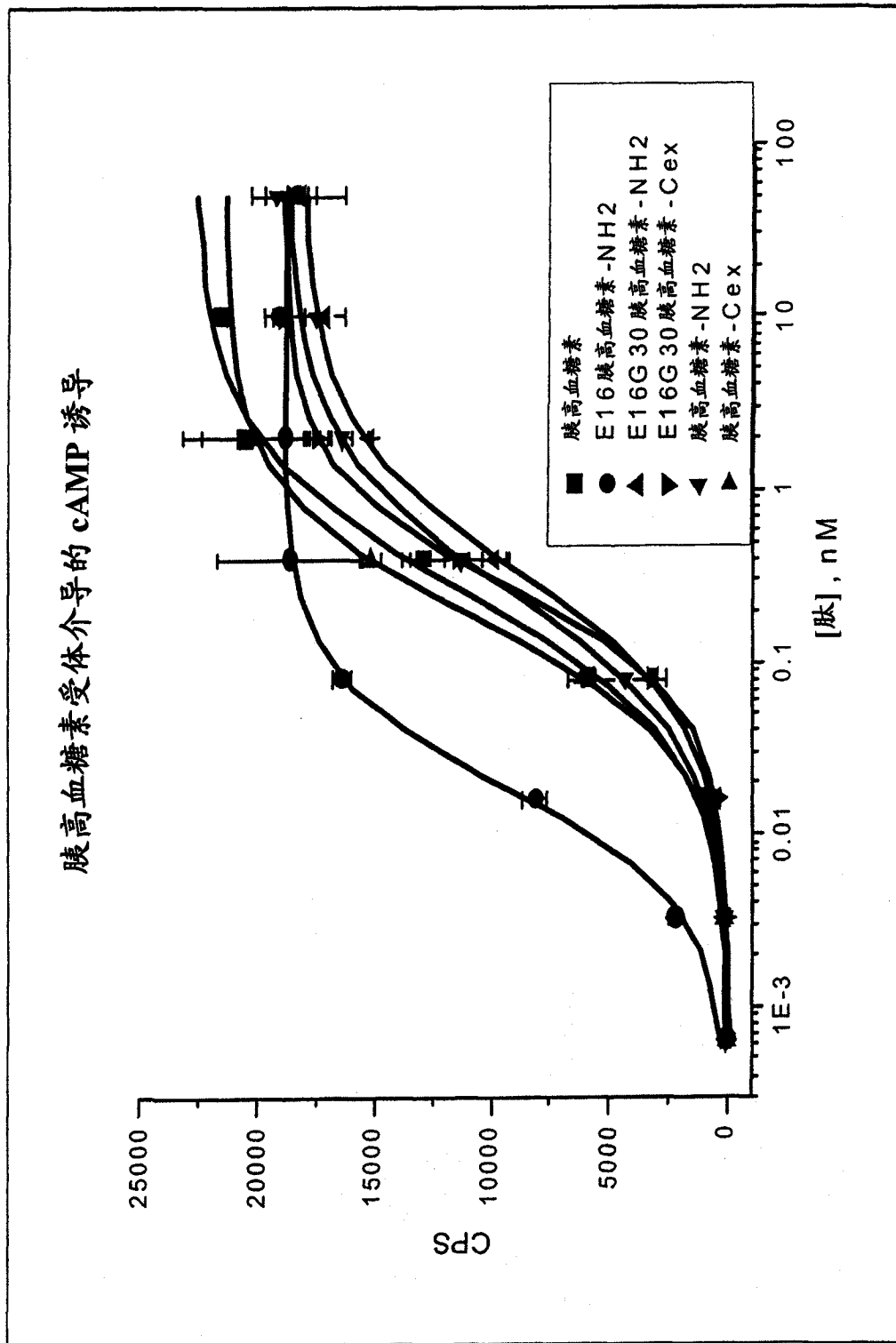


图8A:胰高血糖素的16位和C末端修饰

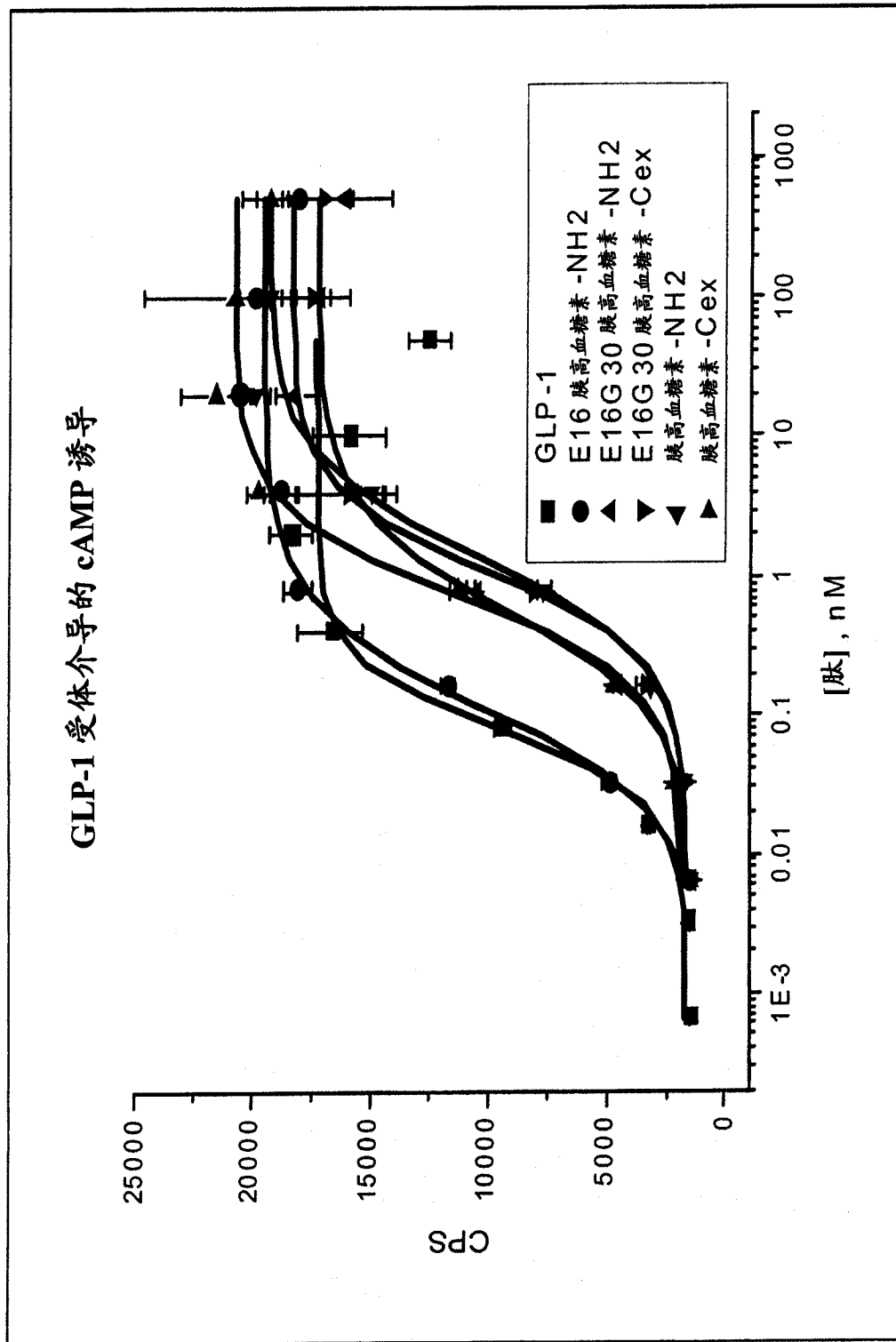


图8B:胰高血糖素的16位和C末端修饰

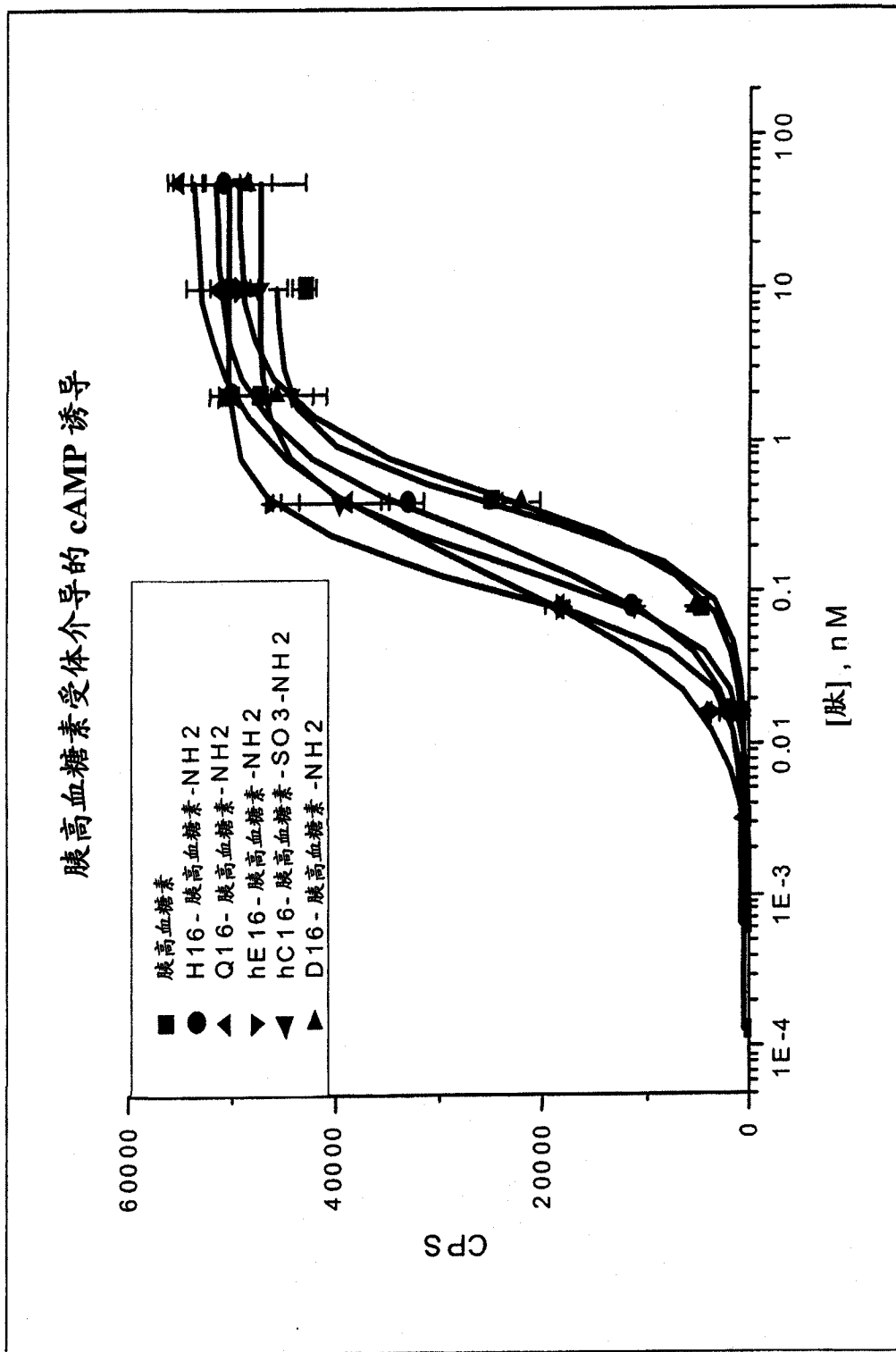


图8C:胰高血糖素的16位取代

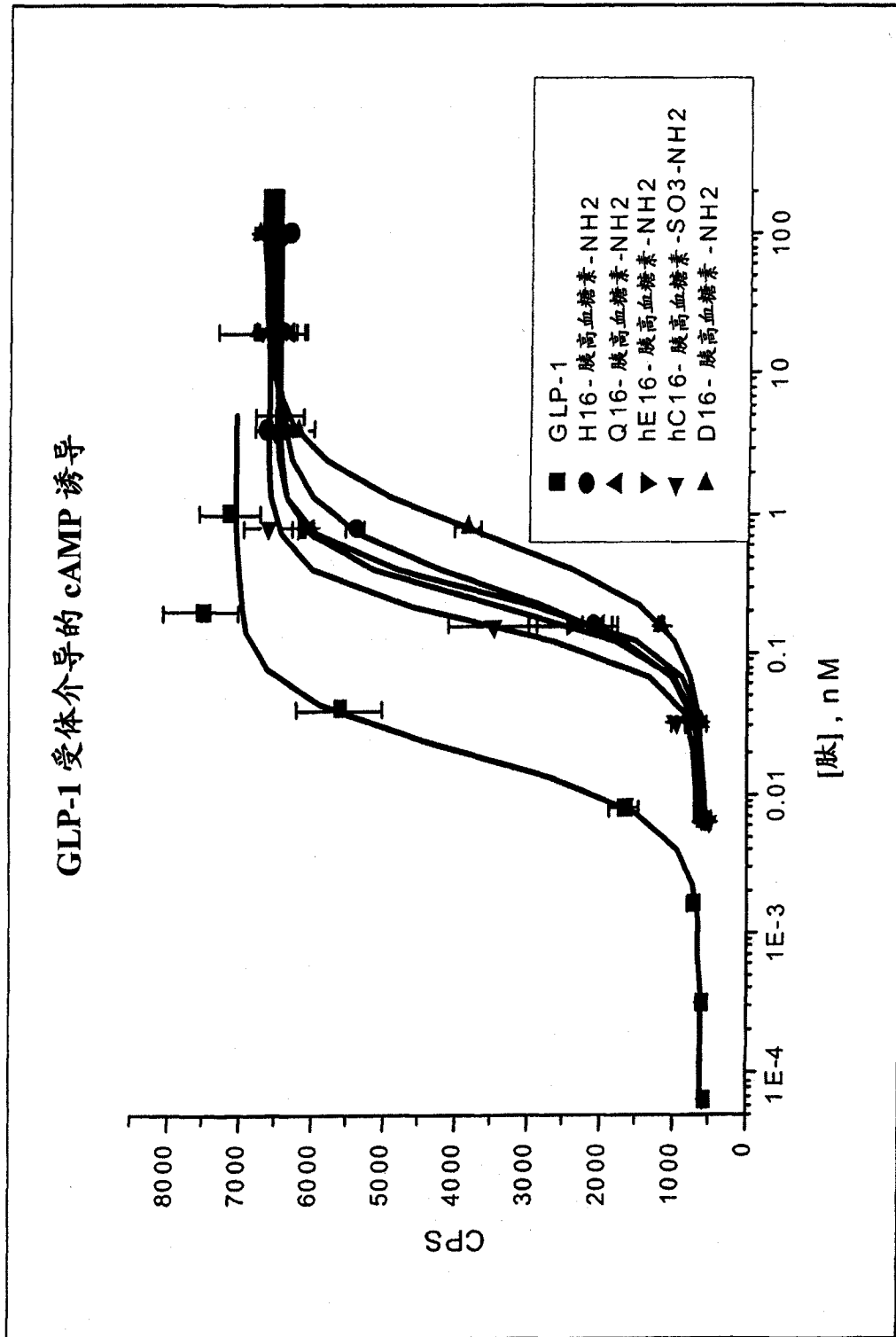


图8D:胰高血糖素的16位取代

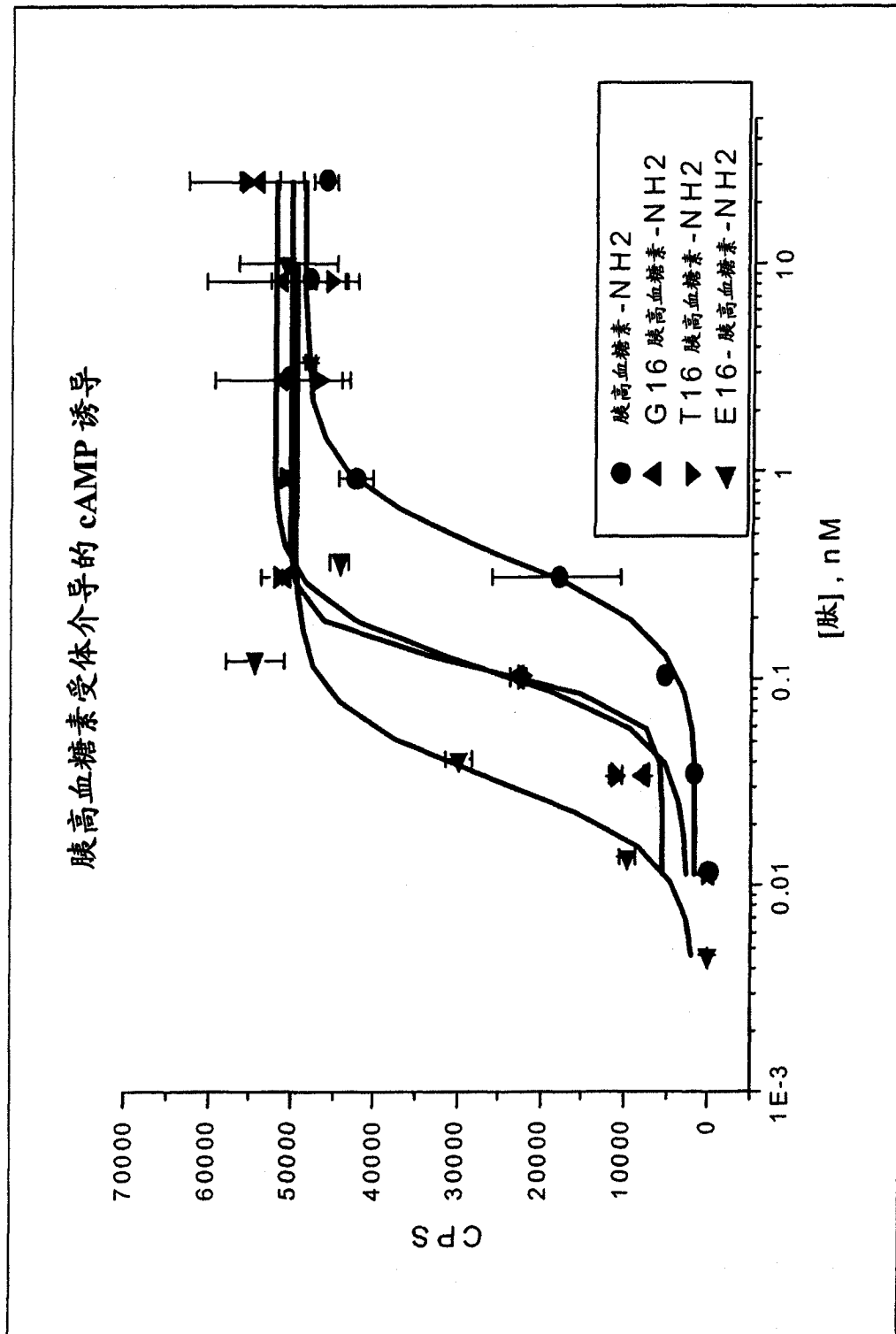


图8E:胰高血糖素的16位取代

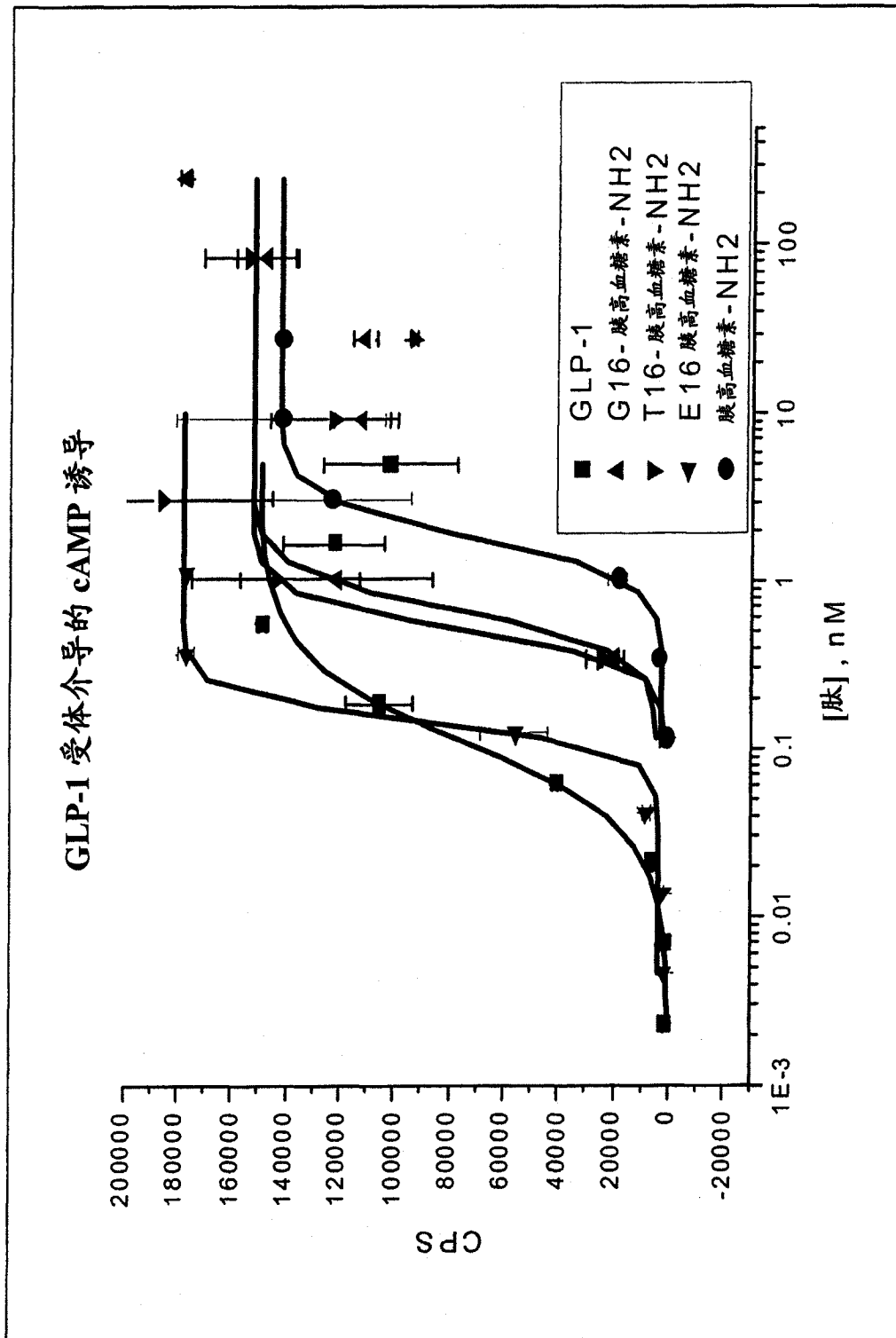


图8F:胰高血糖素的16位取代

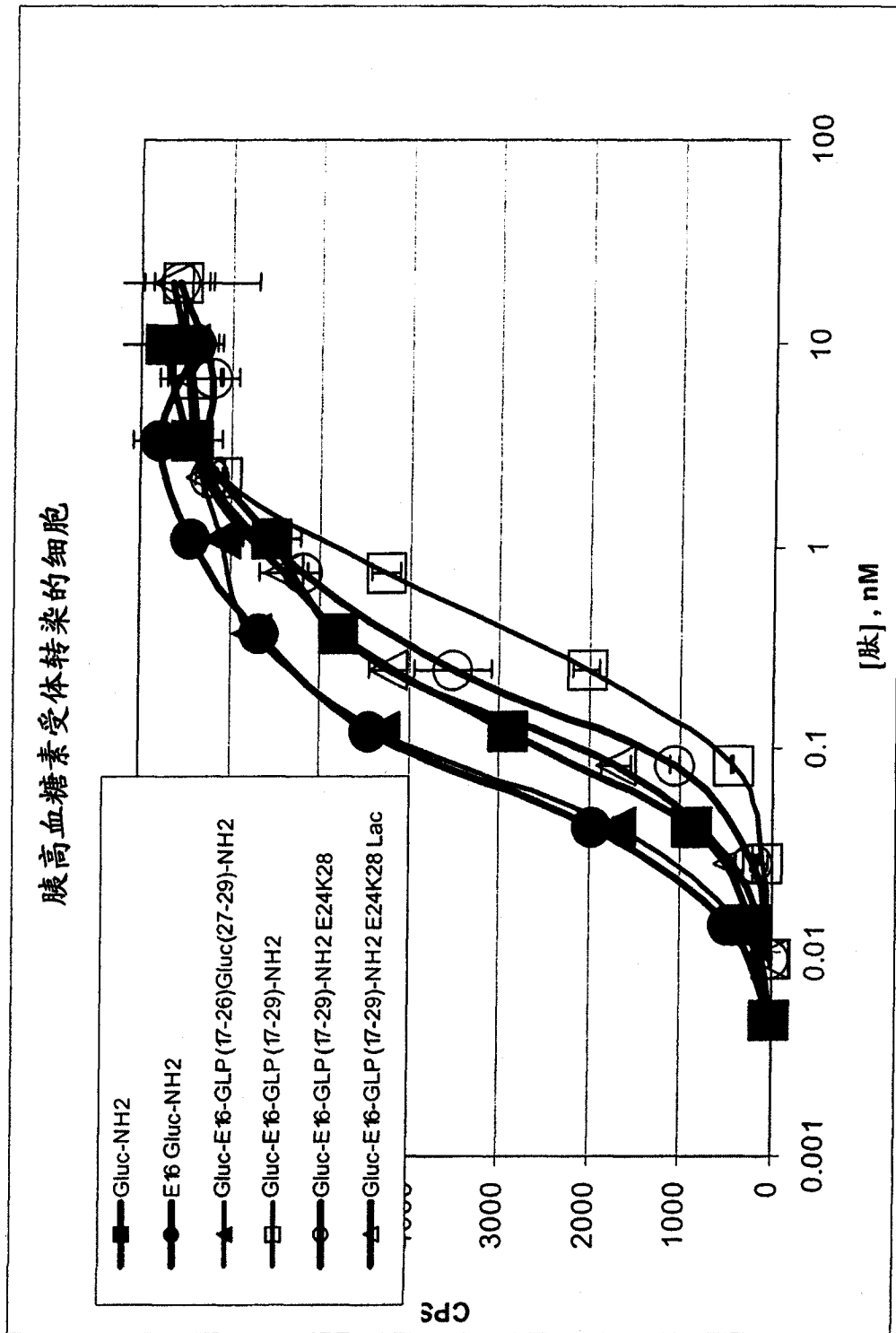


图9A:GLP-1 17-26胰高血糖素类似物对cAMP的诱导

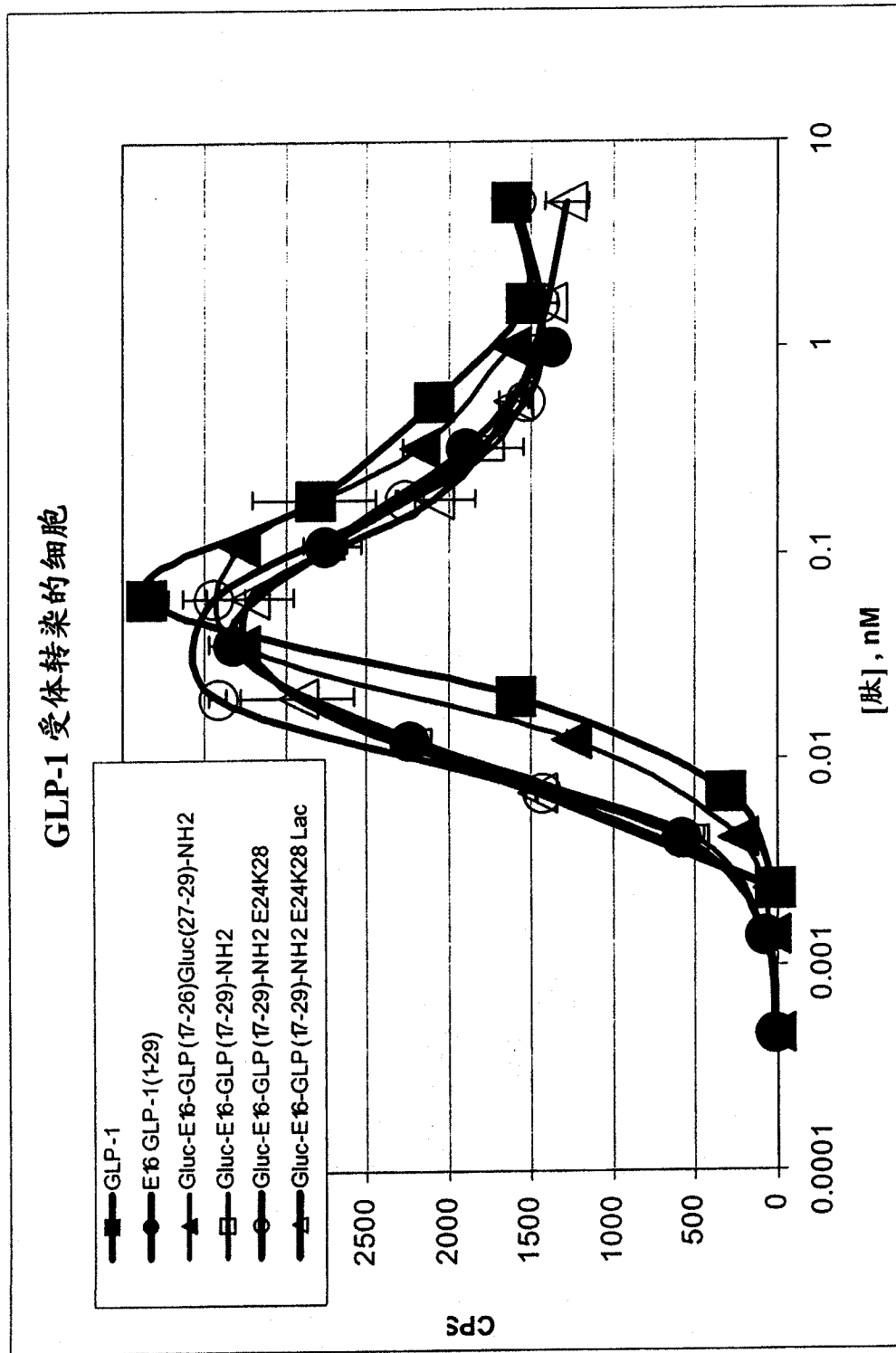


图9B: GLP-1 17-26胰高血糖素类似物对cAMP的诱导

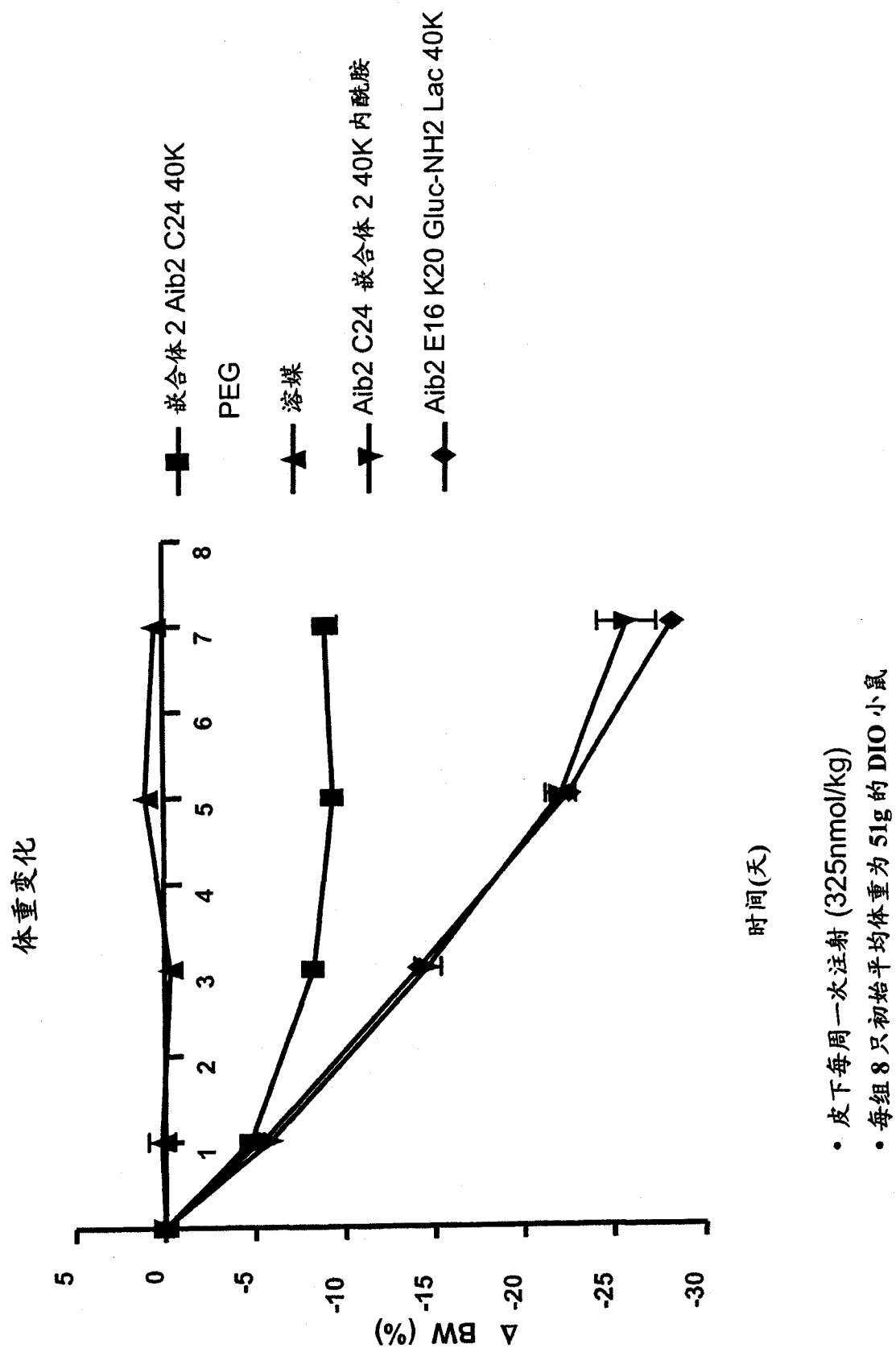


图10A

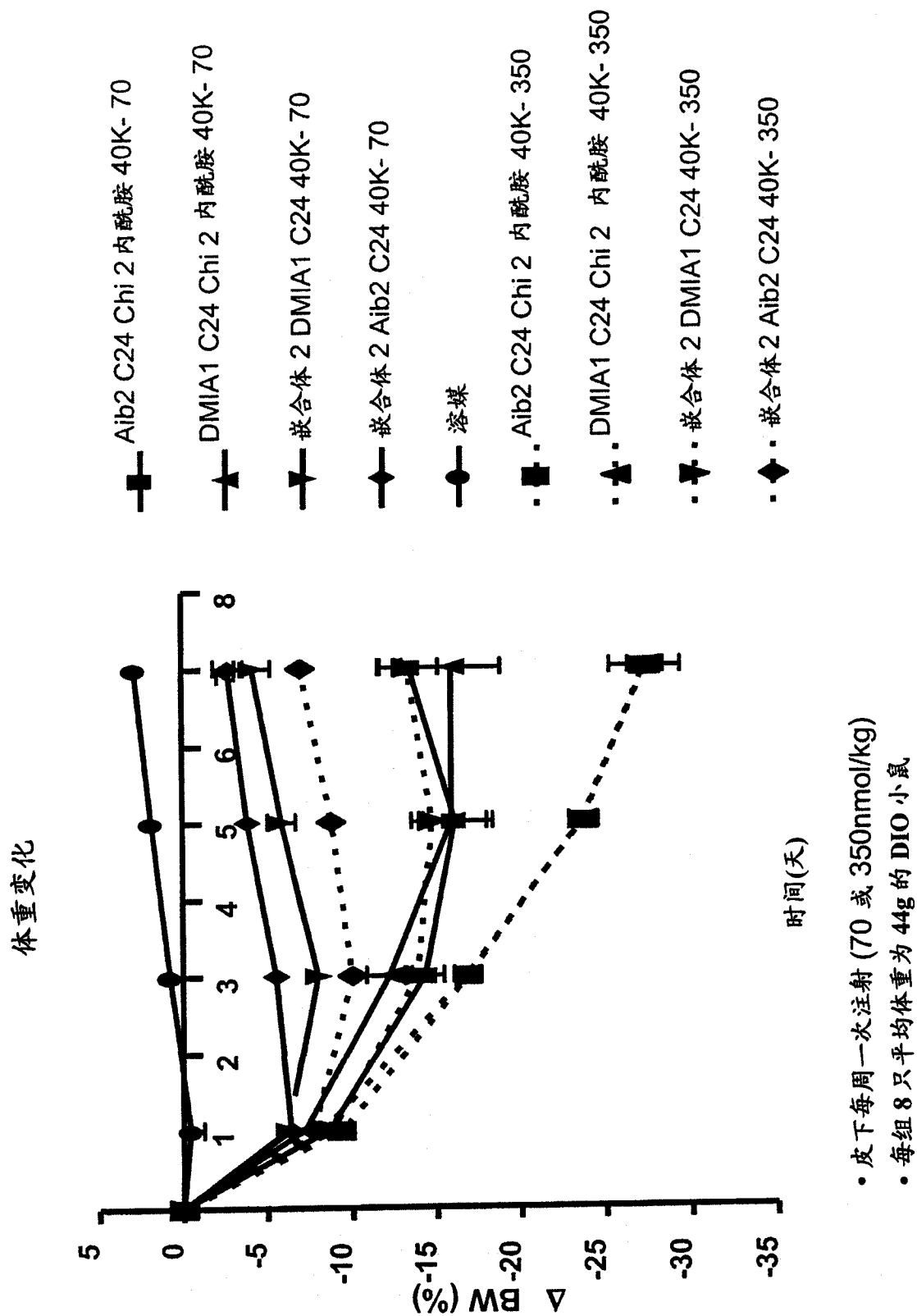


图10B

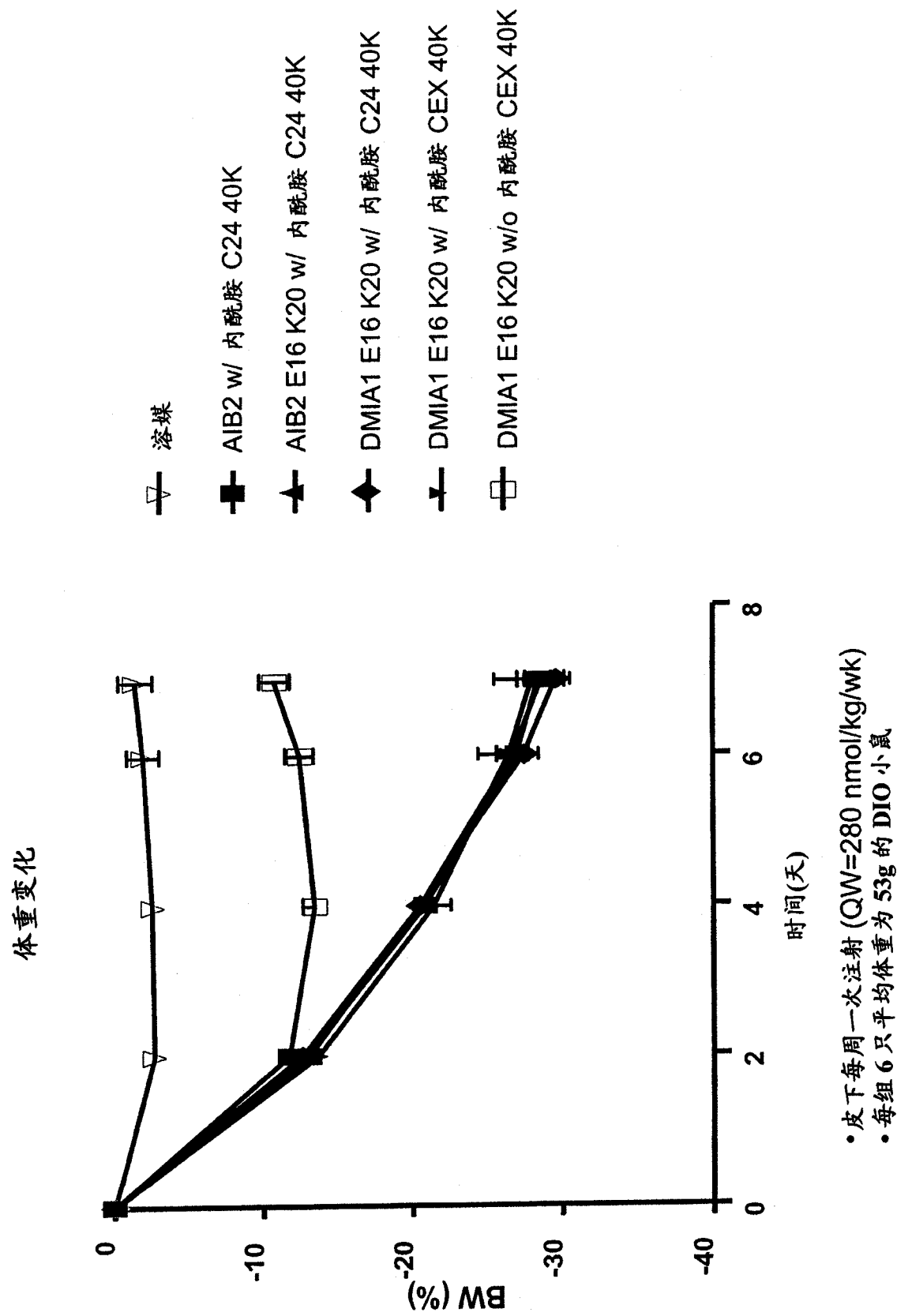
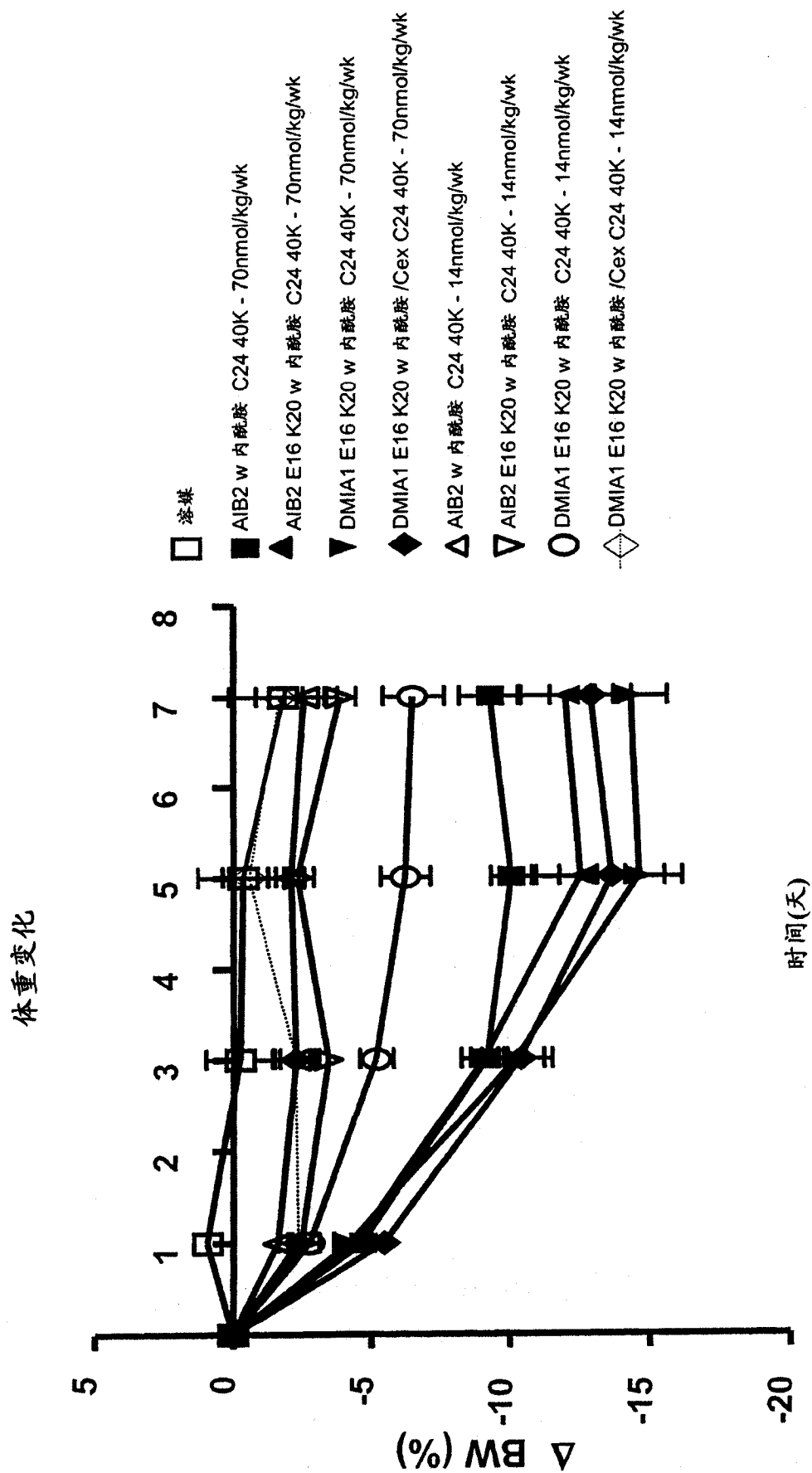
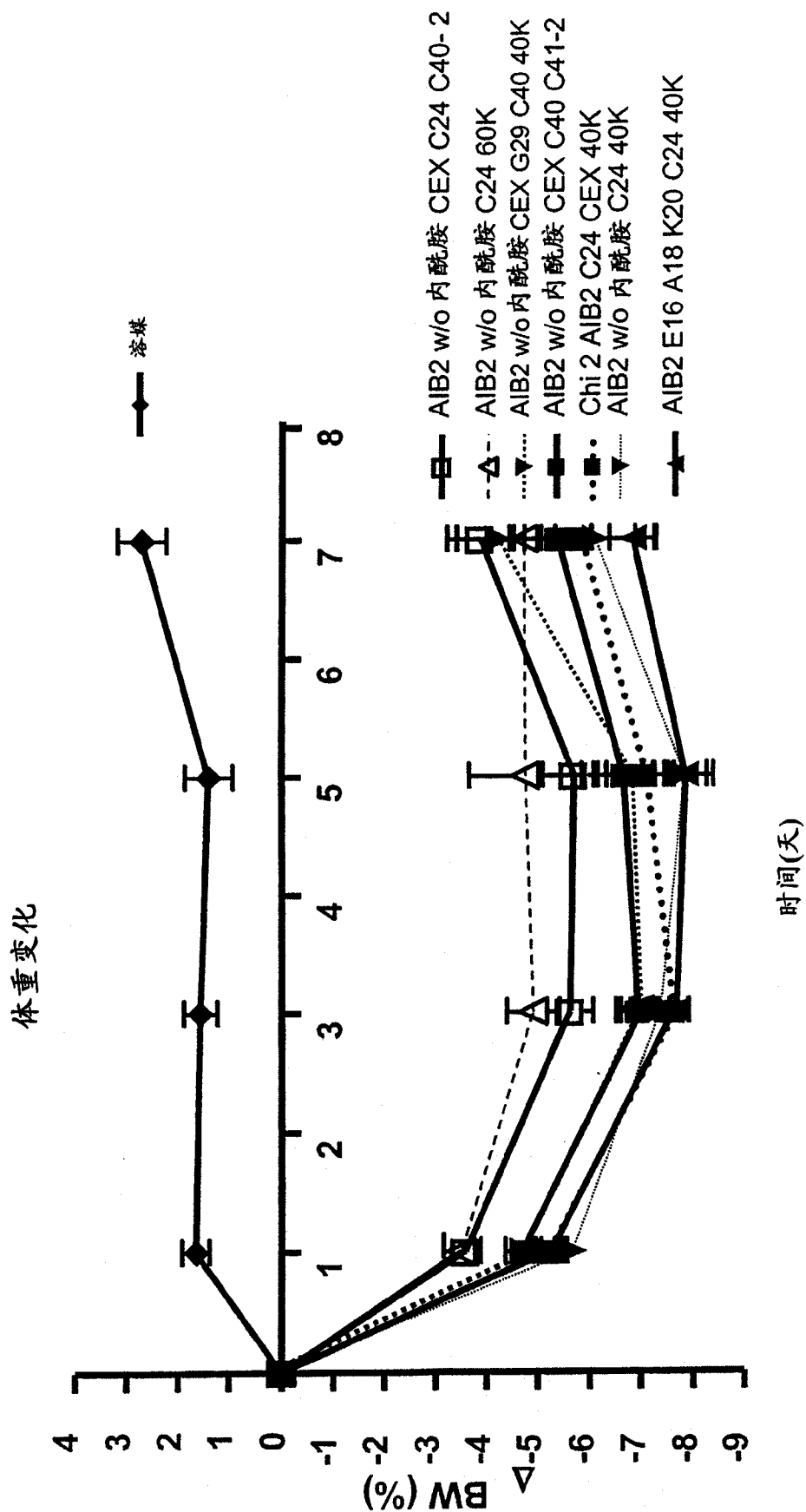


图10C



- 皮下每周一次注射 (QW=70 nmol/kg/wk 或 14 nmol/kg/wk)
- 每组 8 只初始平均体重为 44.3g 的 DIO 小鼠

图10D



- 皮下每周一次注射 (QW=70 nmol/kg/wk)
- 每组 8 只初始平均体重为 46.3g 的 DIO 小鼠

图10E

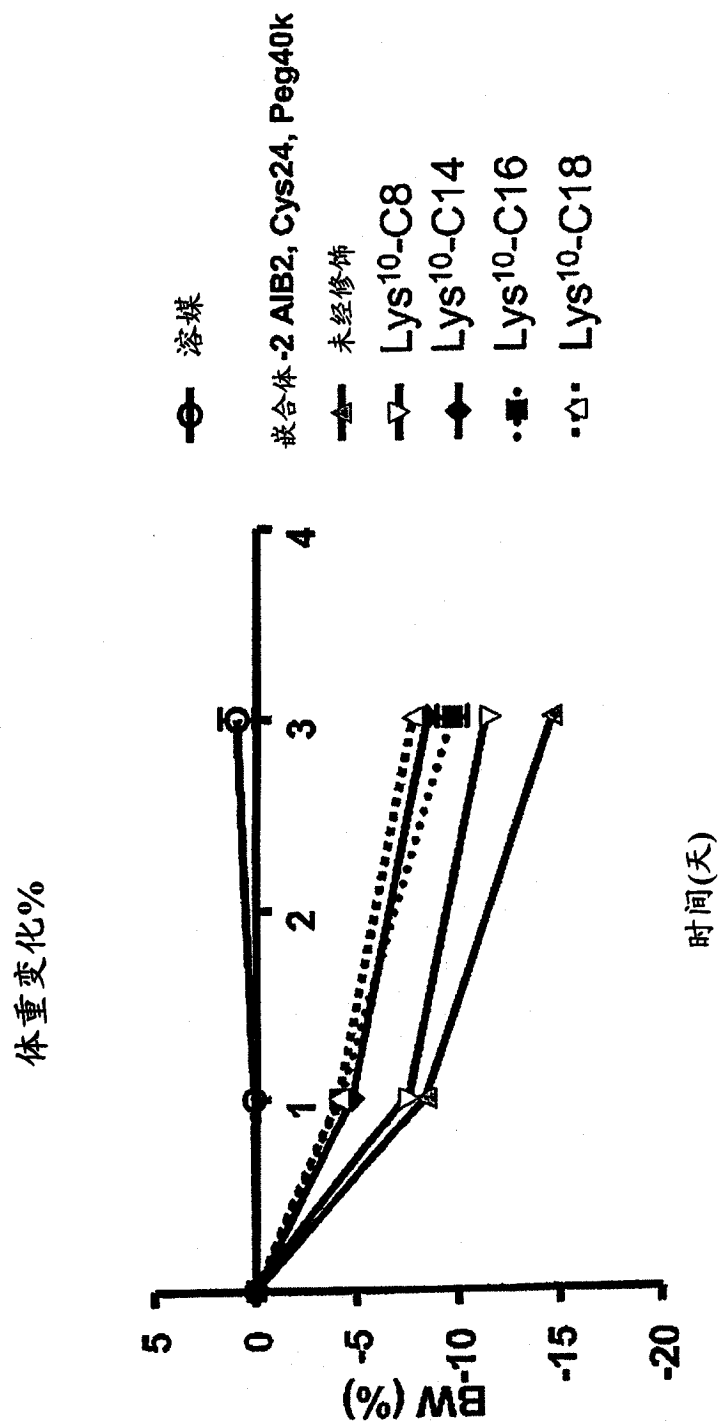


图11

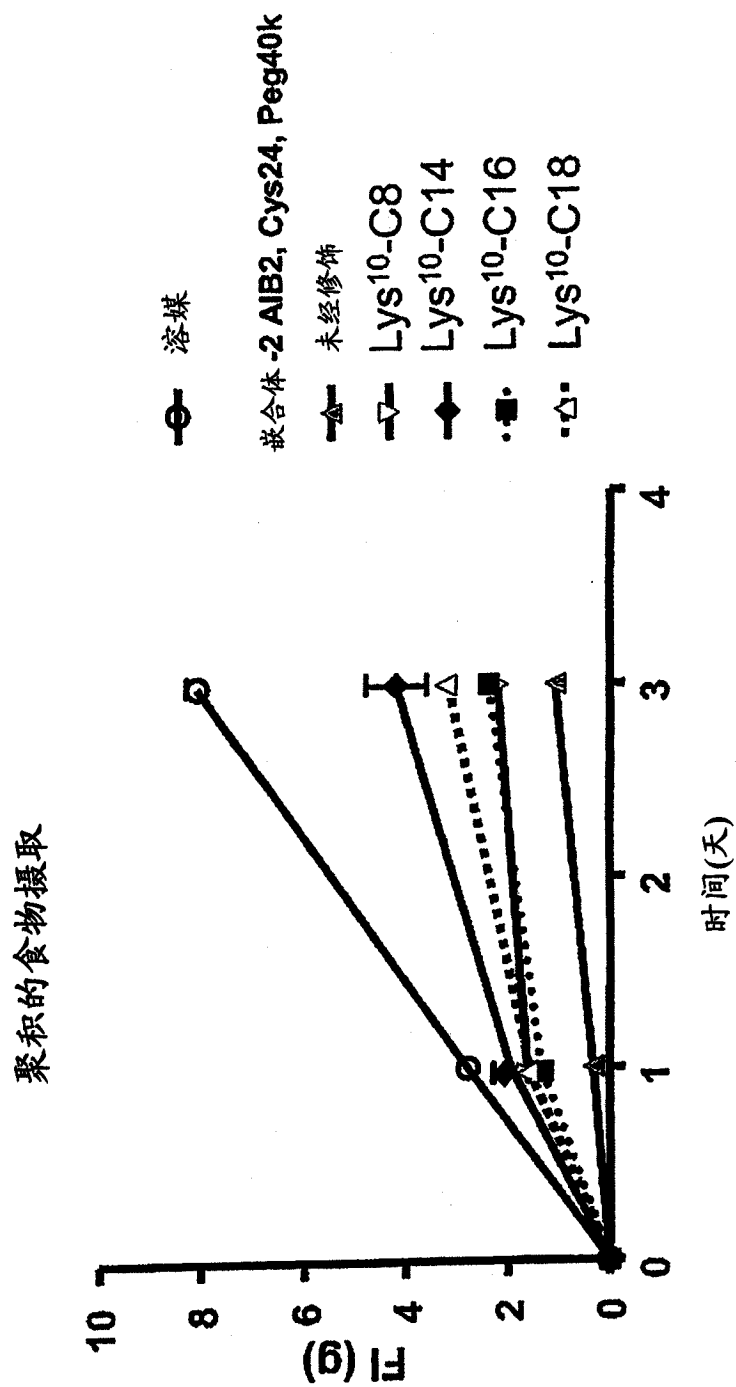


图12

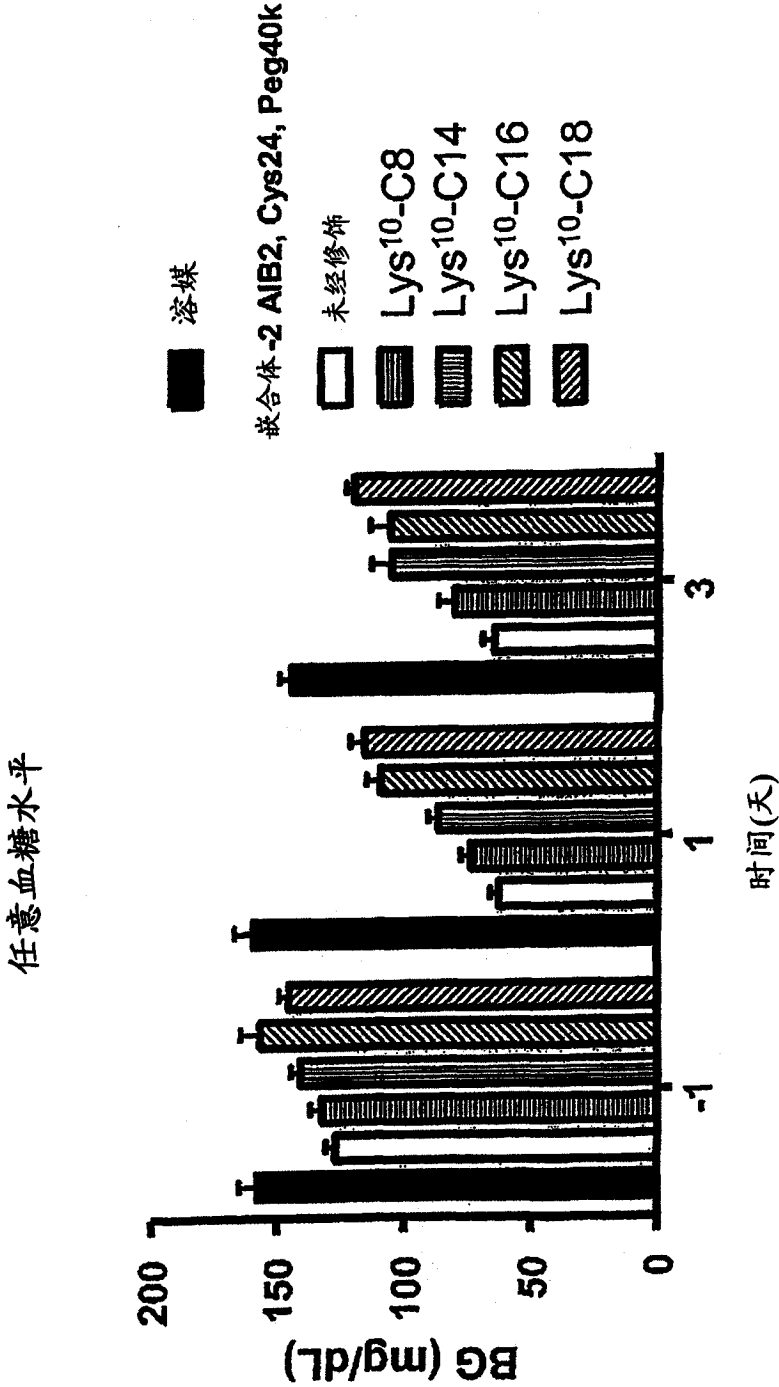


图13

缩短的胰高血糖素酰胺的体外分析

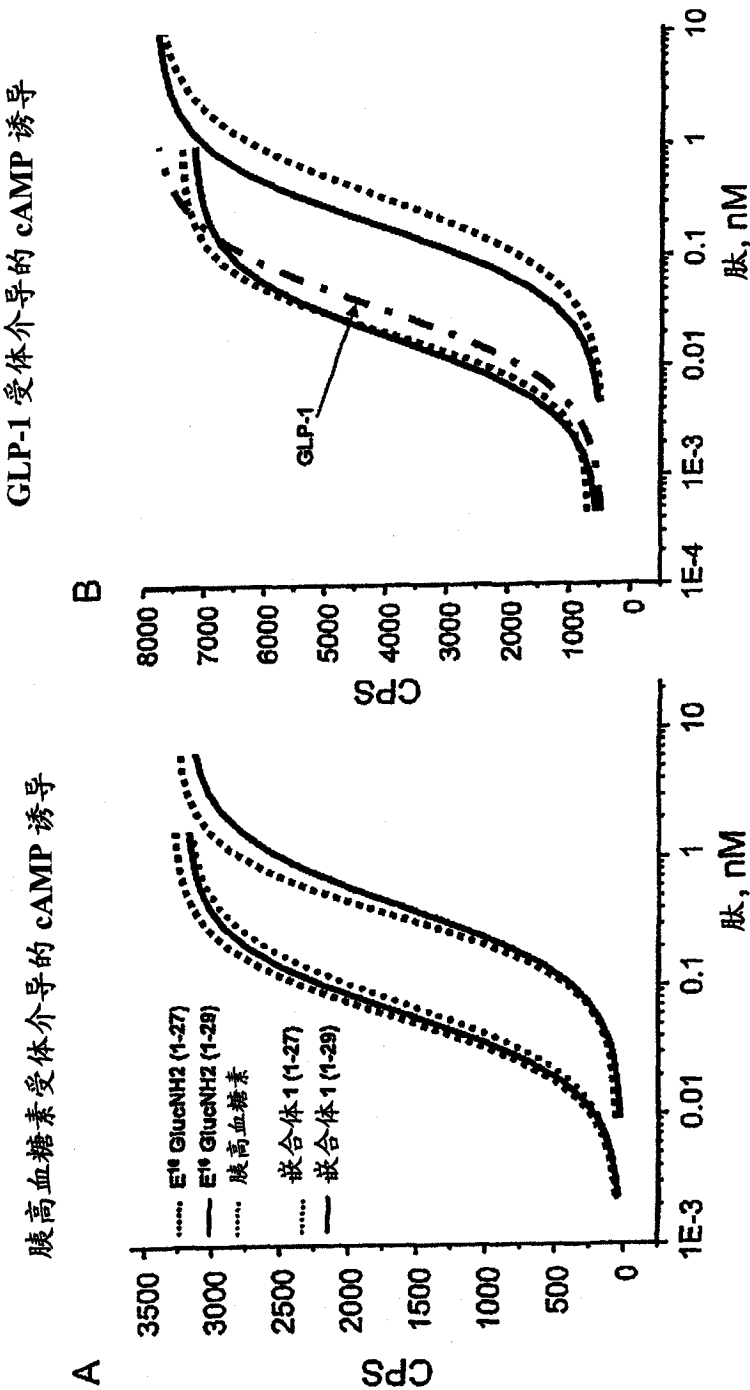


图14

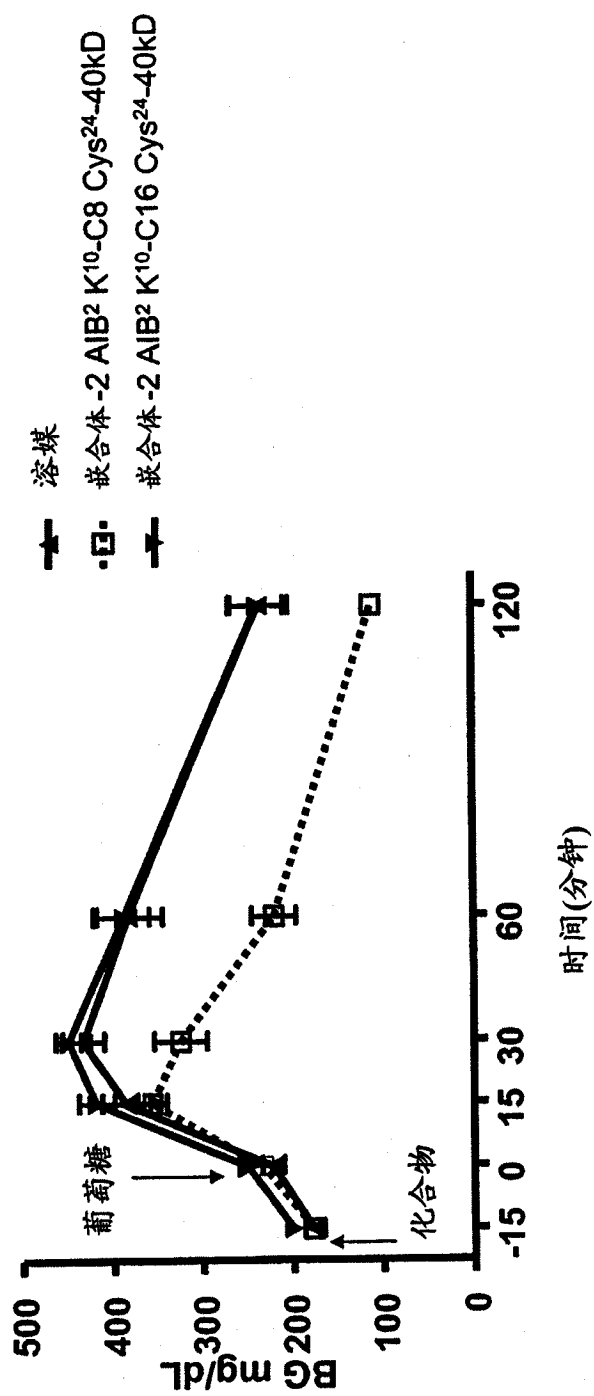


图15

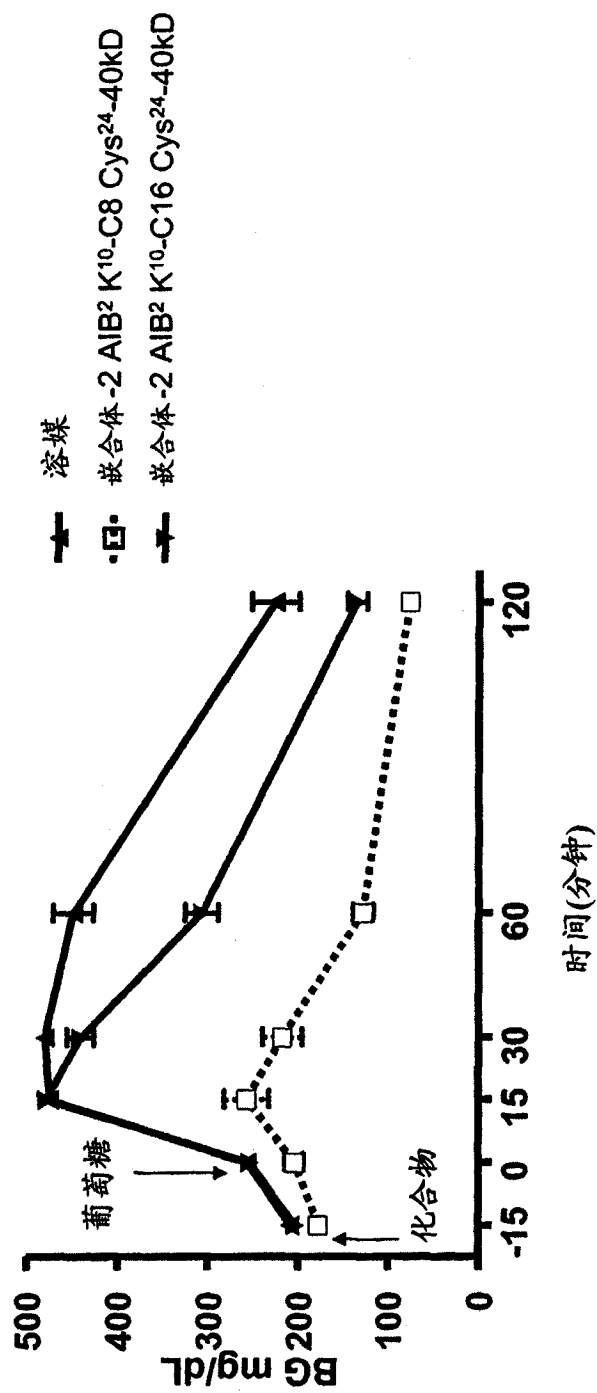


图16

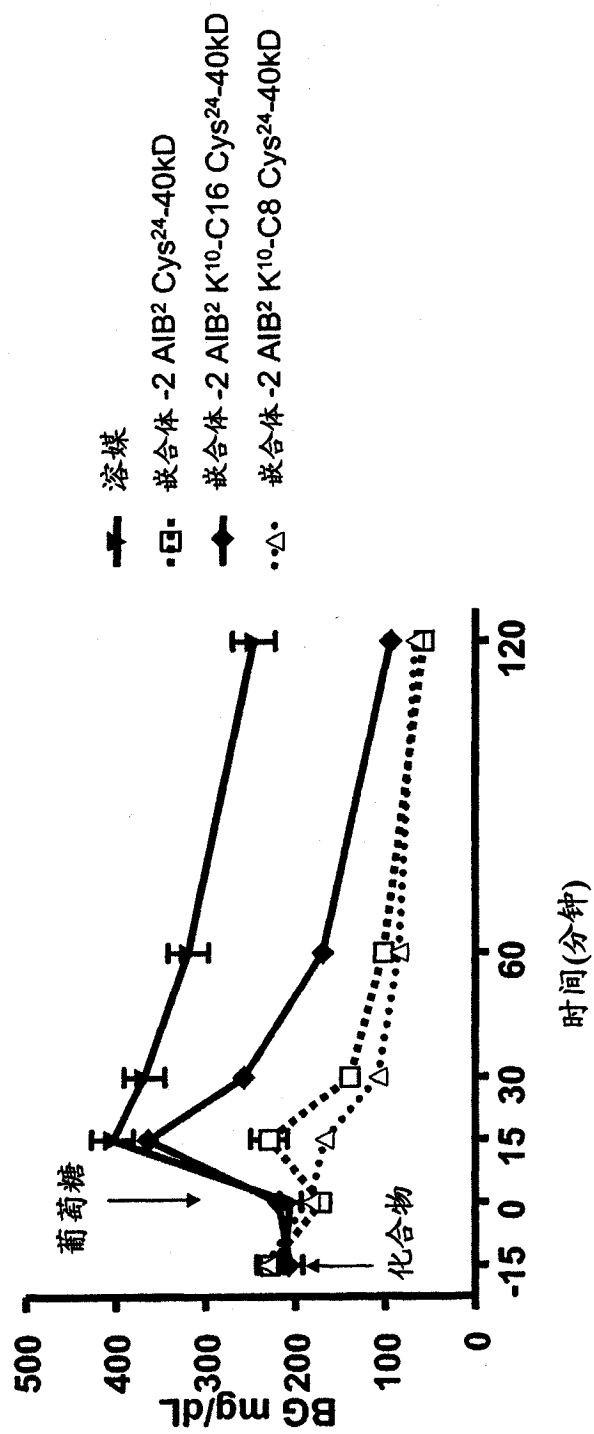


图17

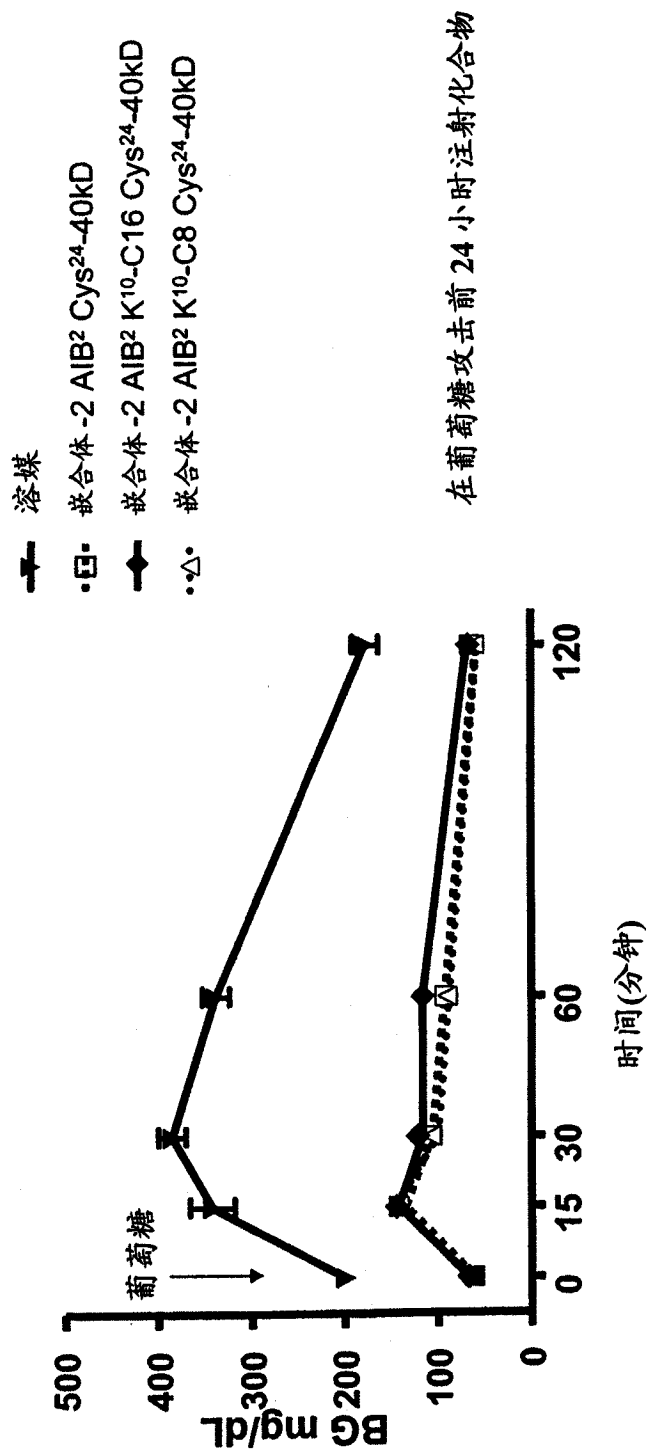


图18

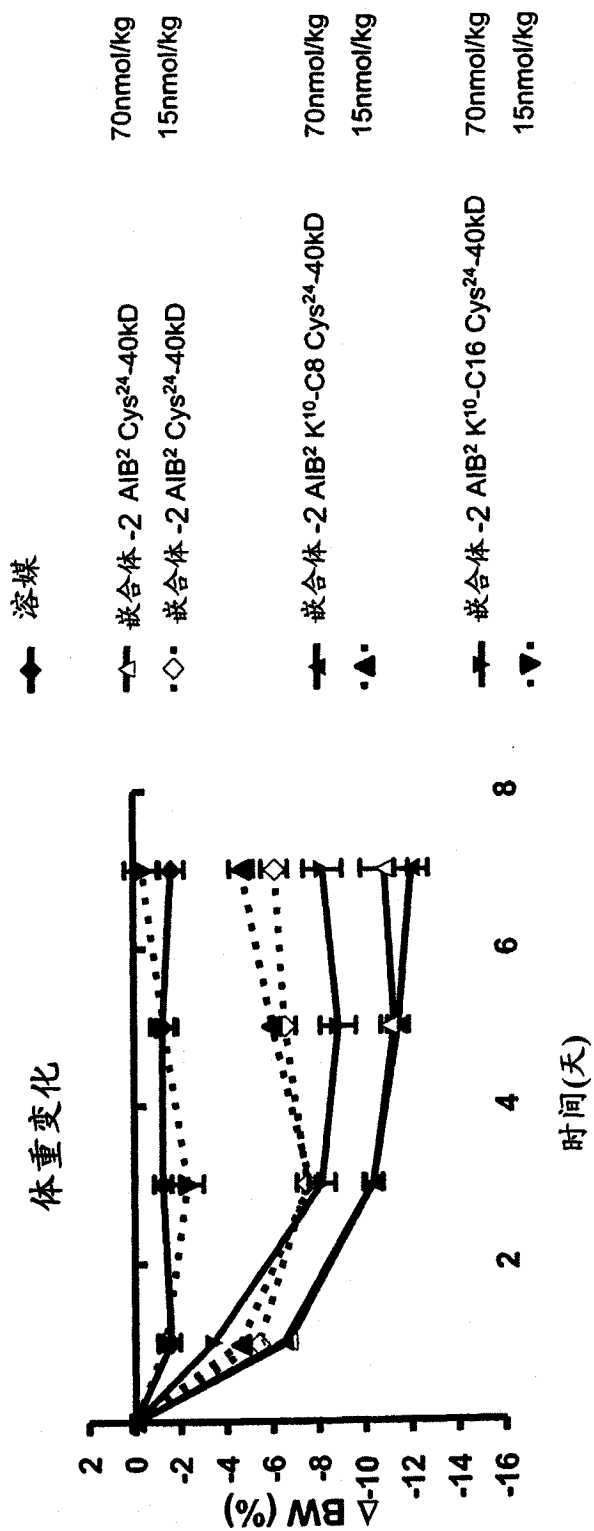


图19

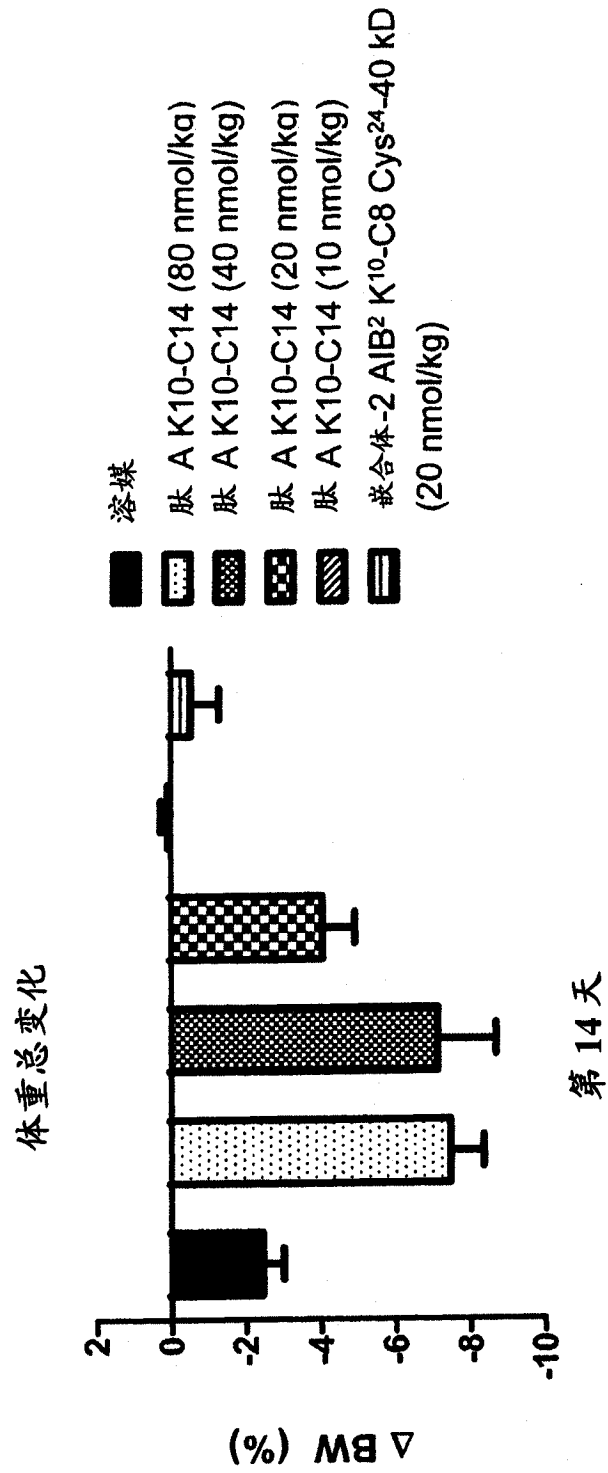


图20

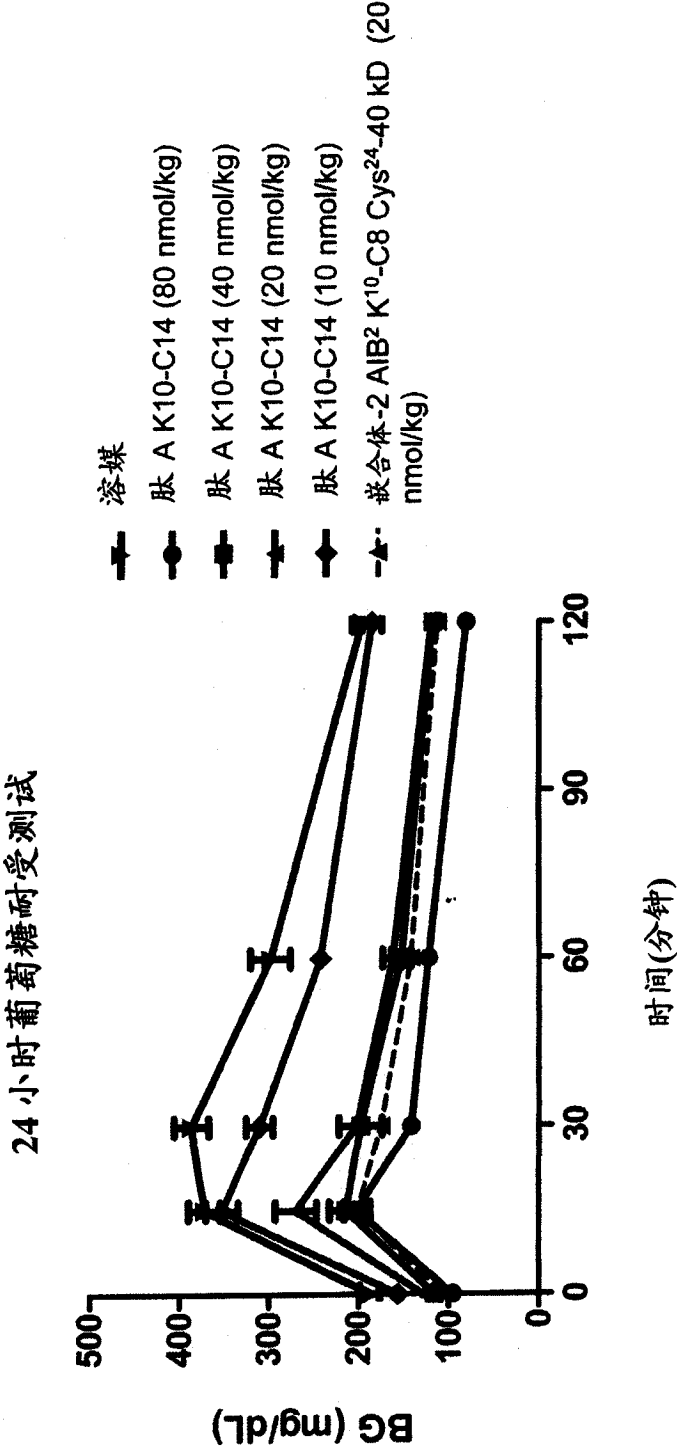


图21

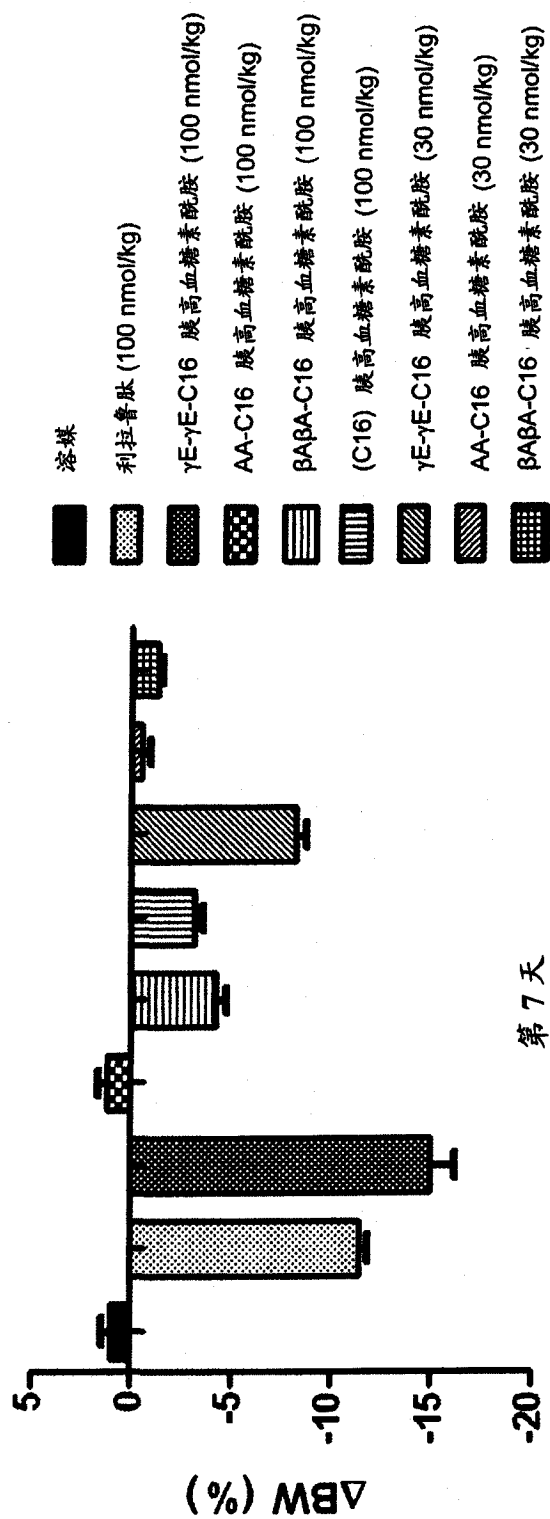


图22

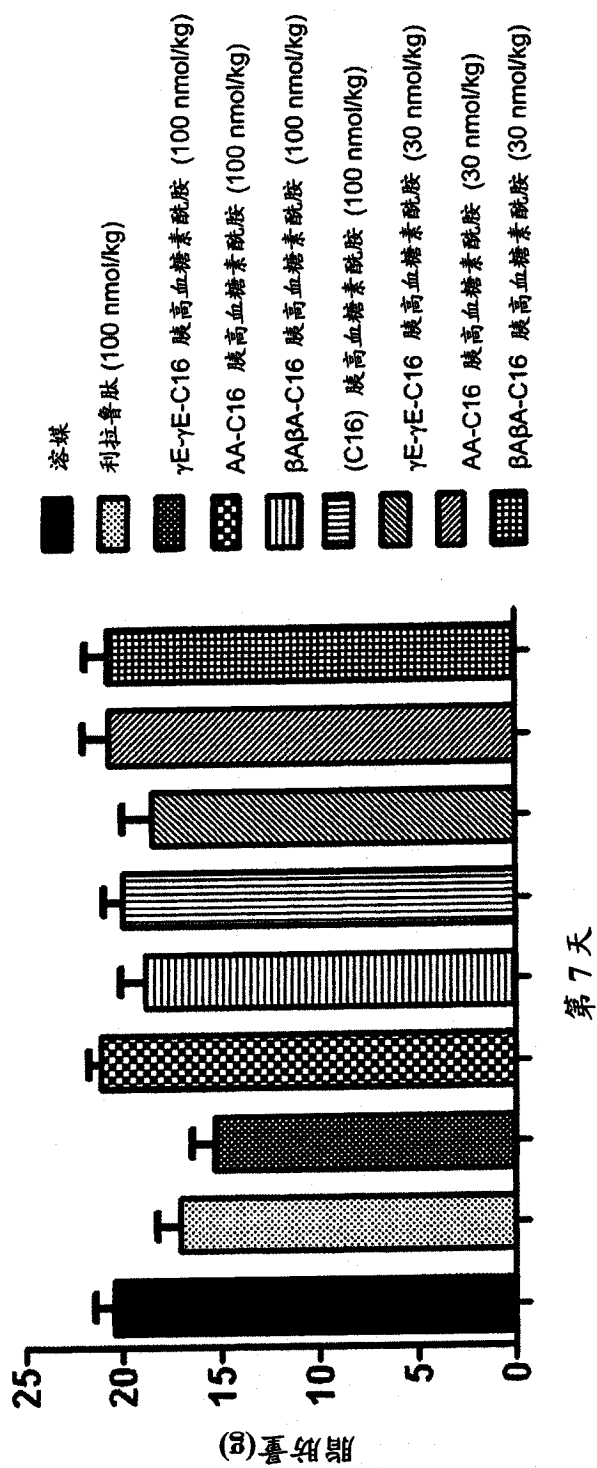


图23

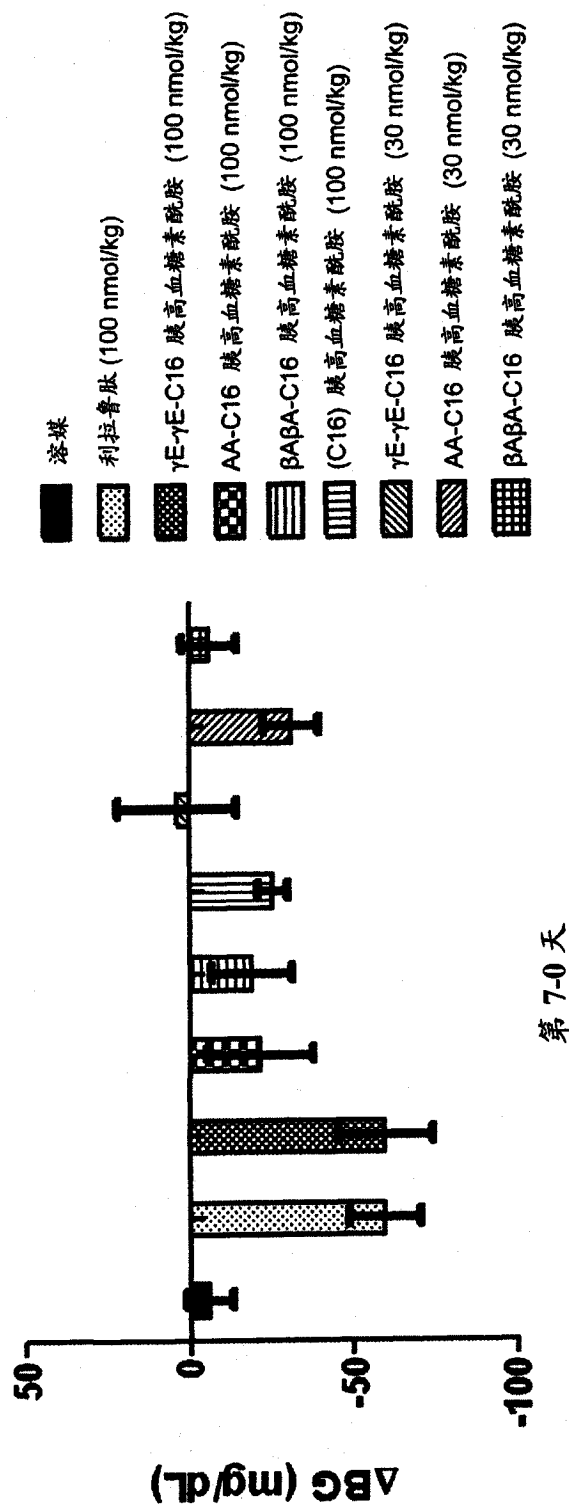


图24

在 pH5.9 下的 10mM 磷酸盐中 PEG 化肽的 CD 光谱

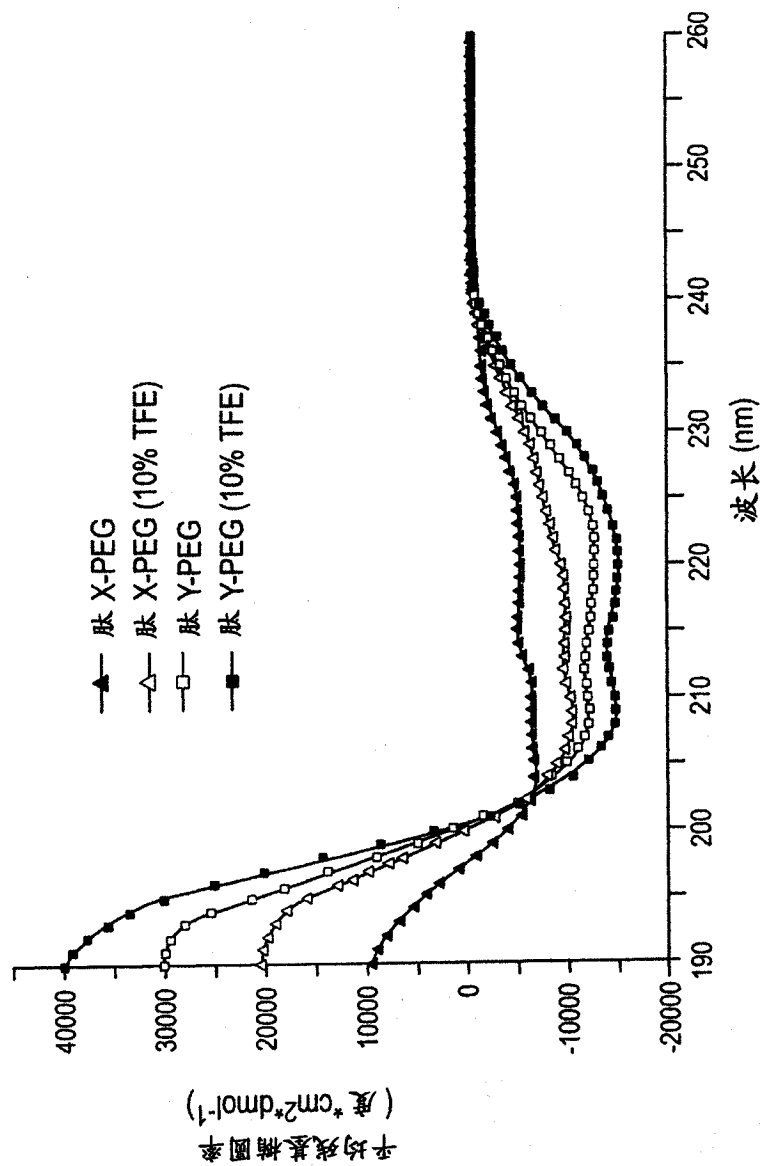


图25

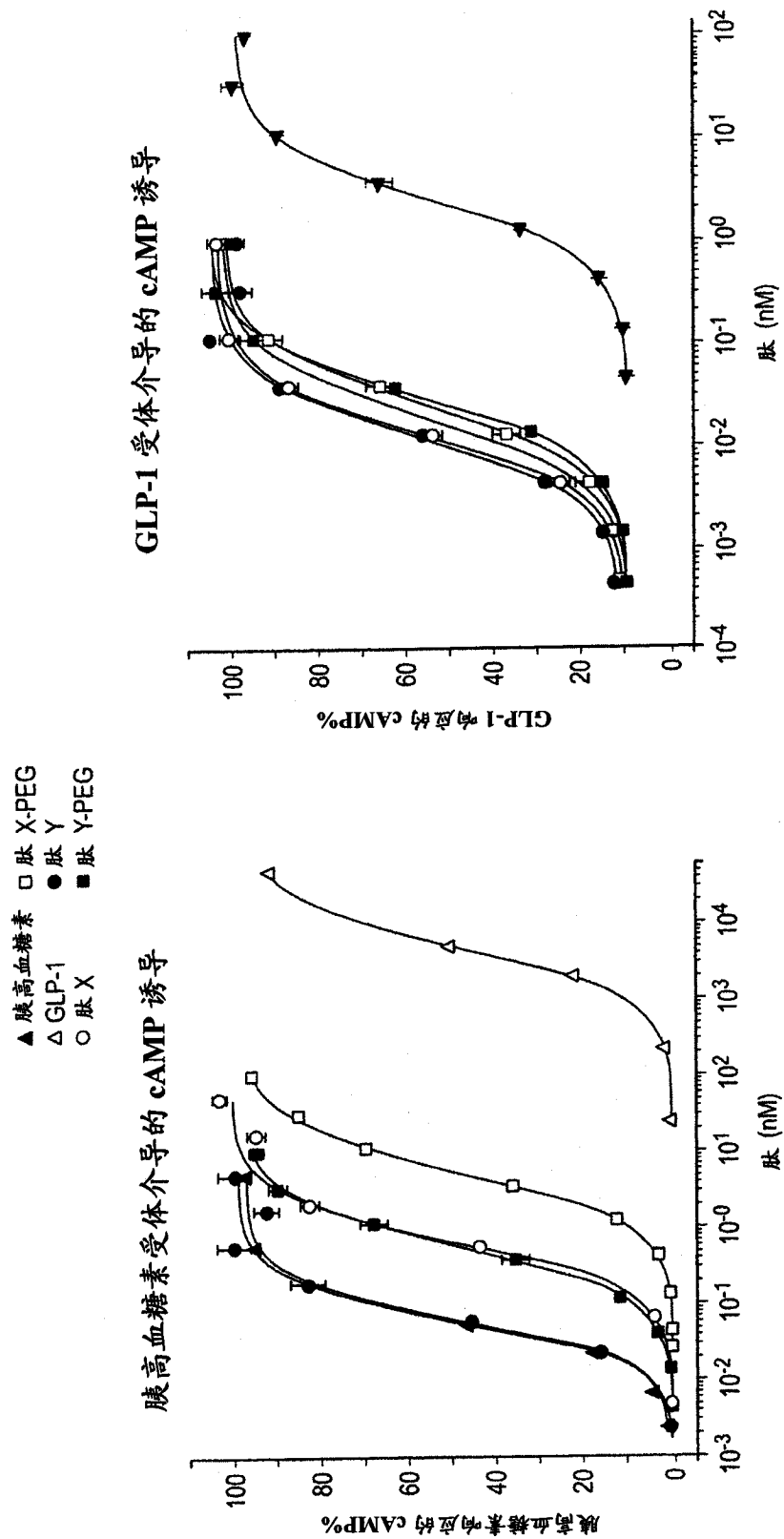


图26

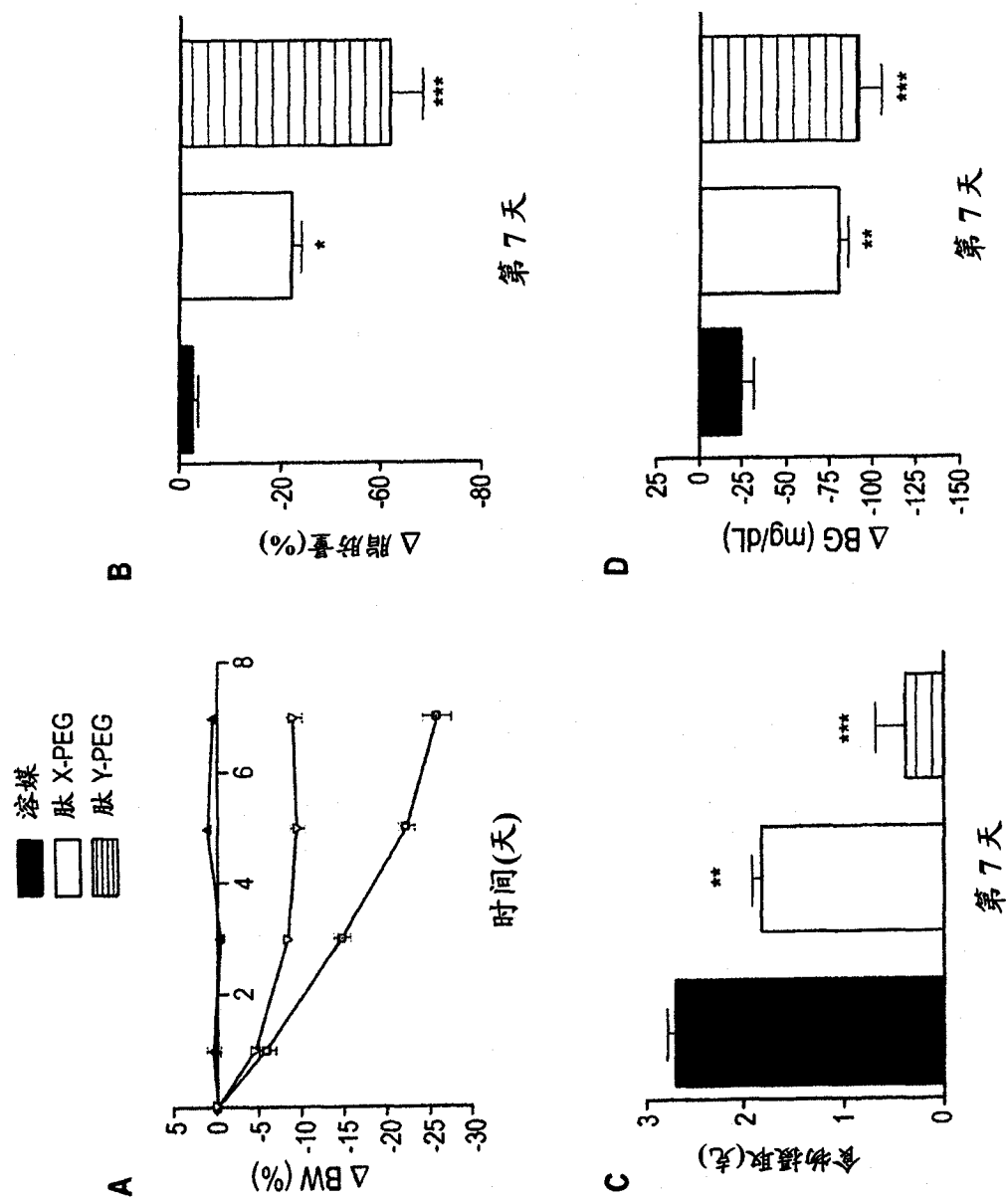


图27

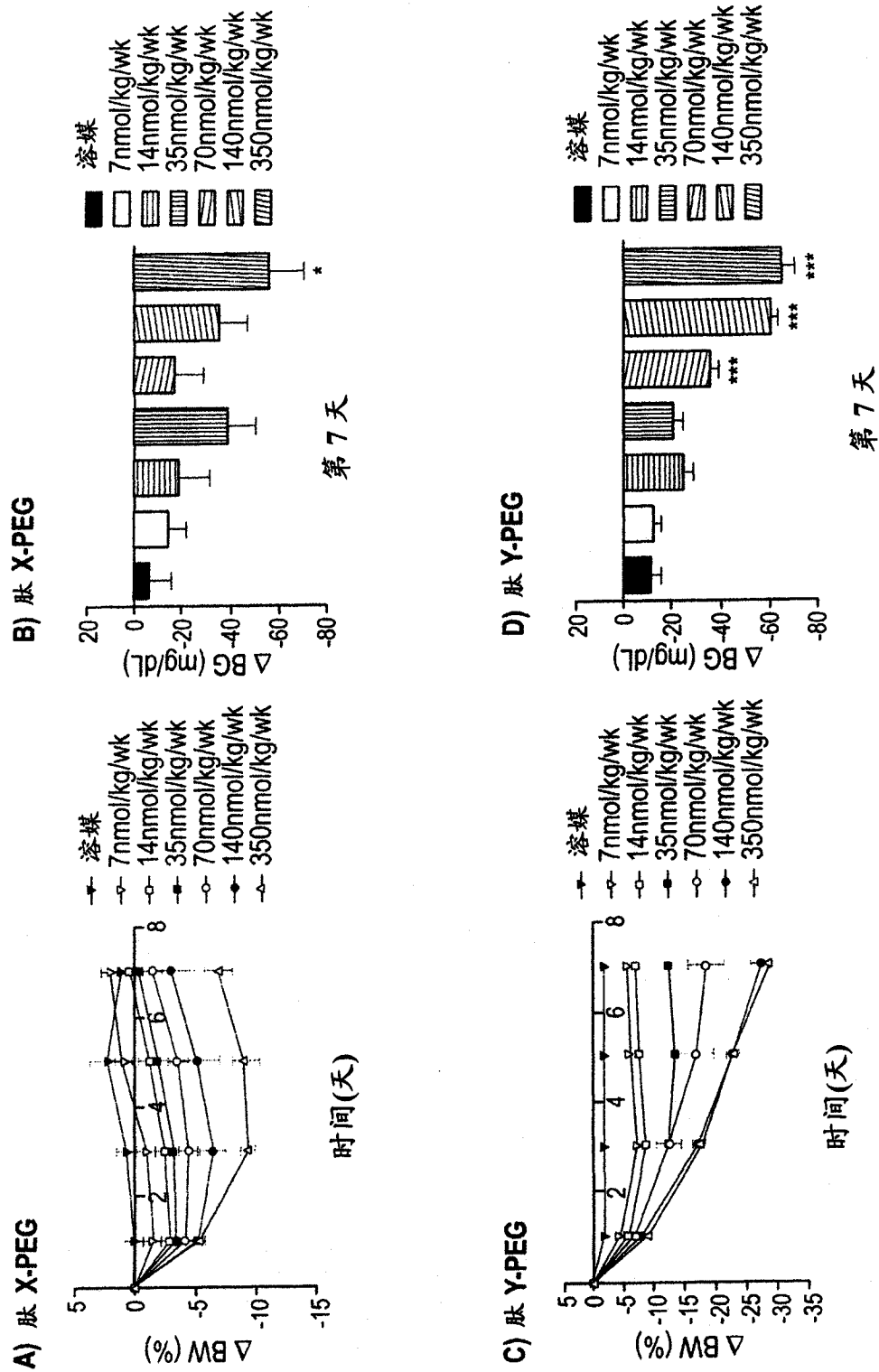


图28

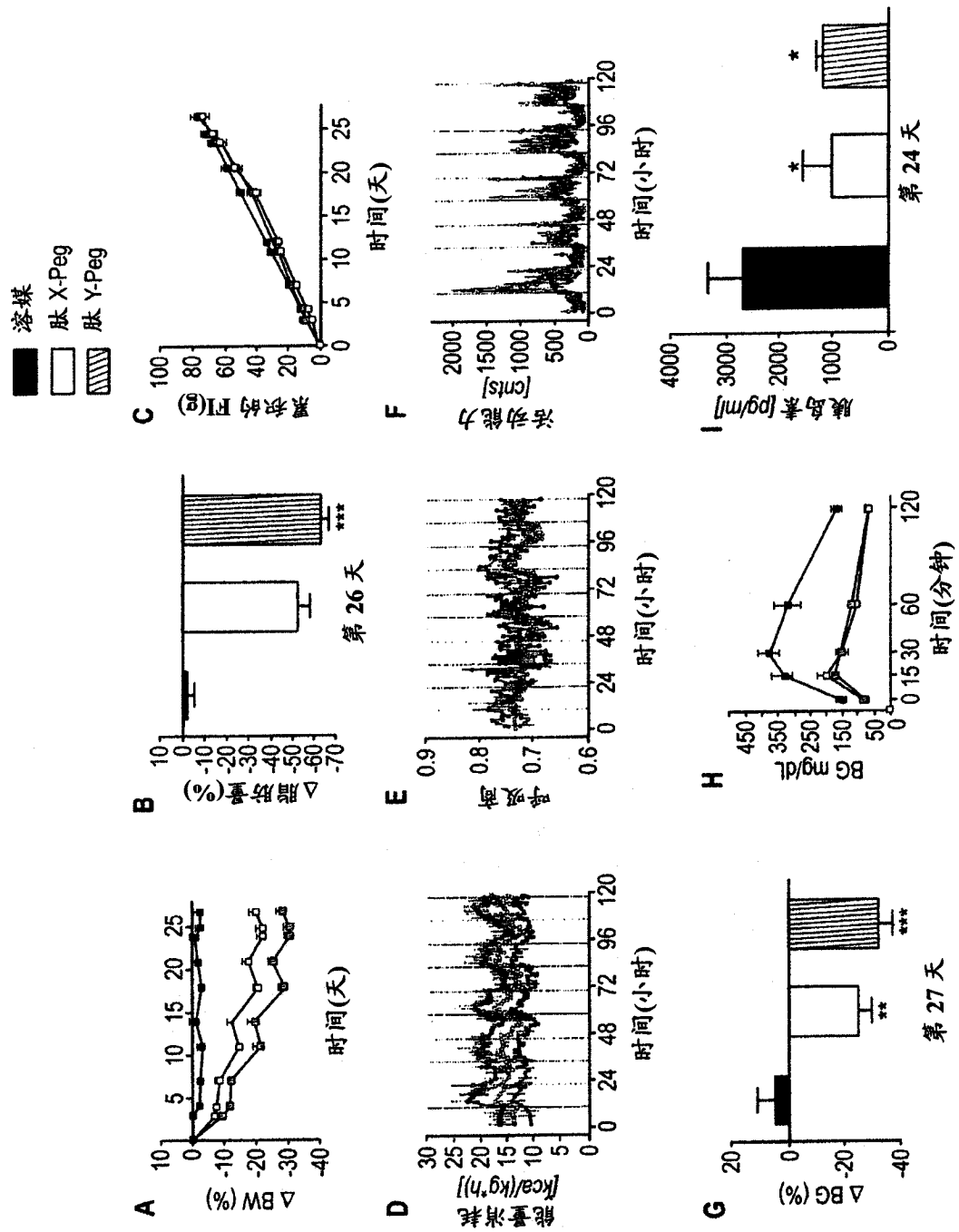


图29

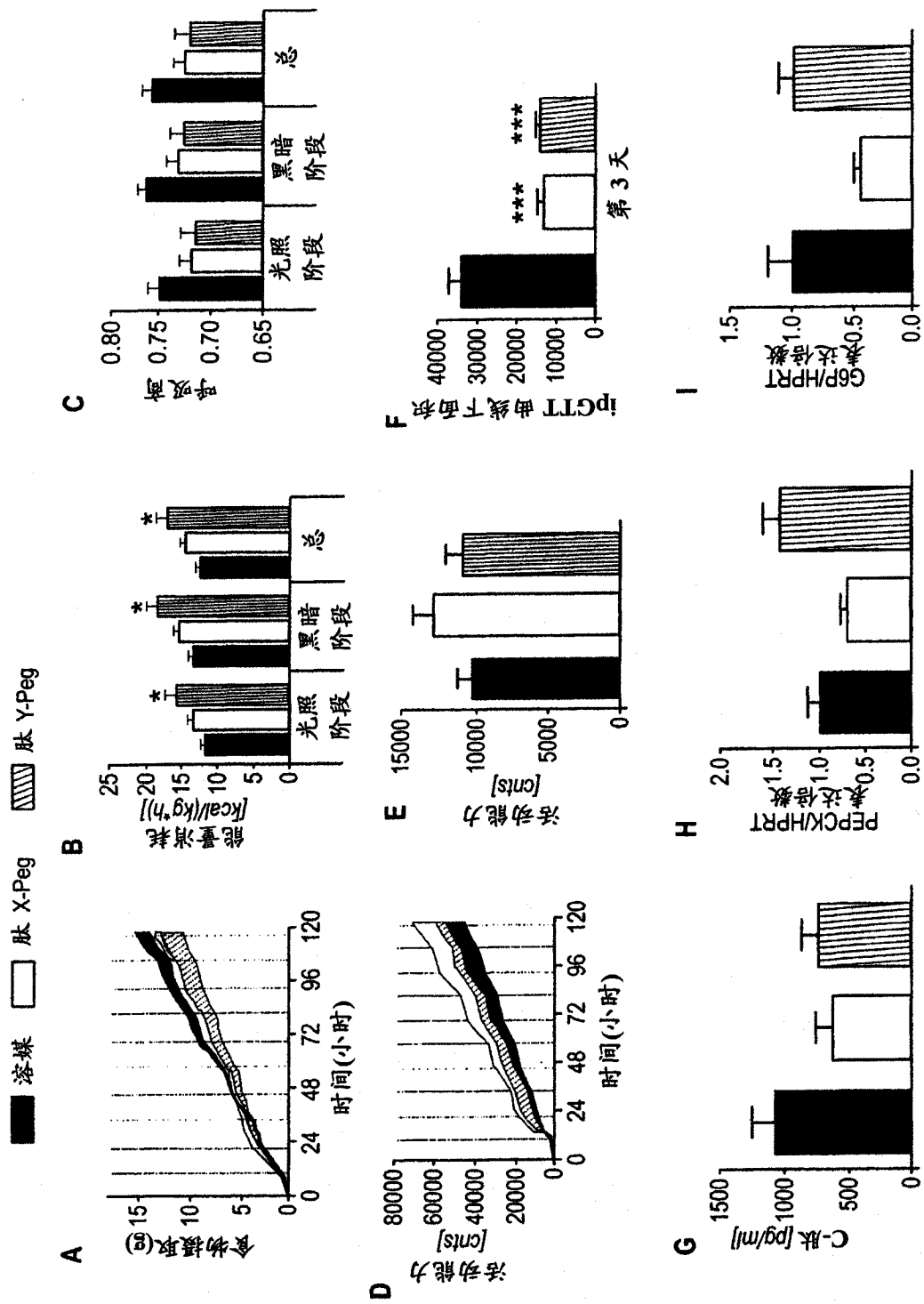


图30

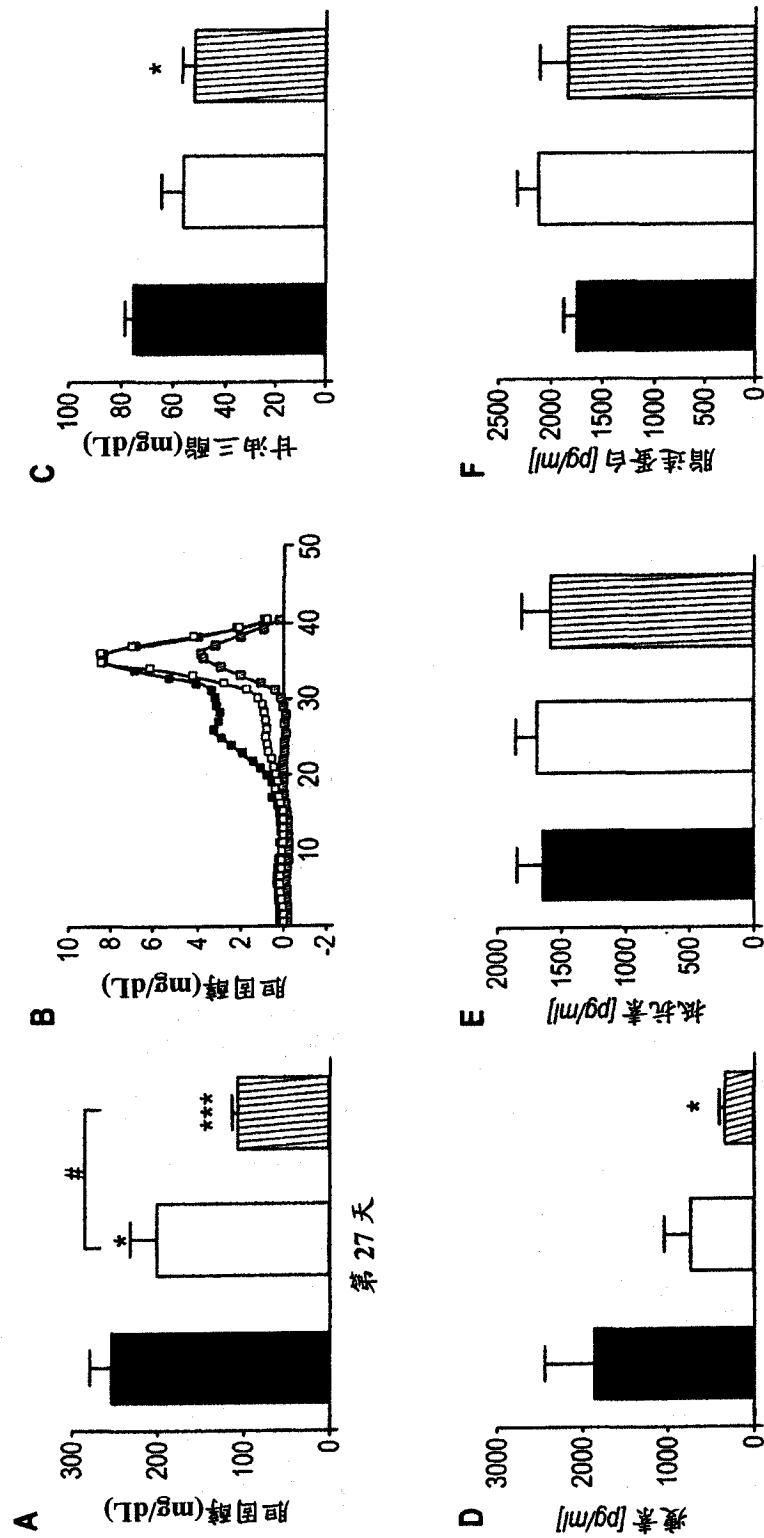


图31

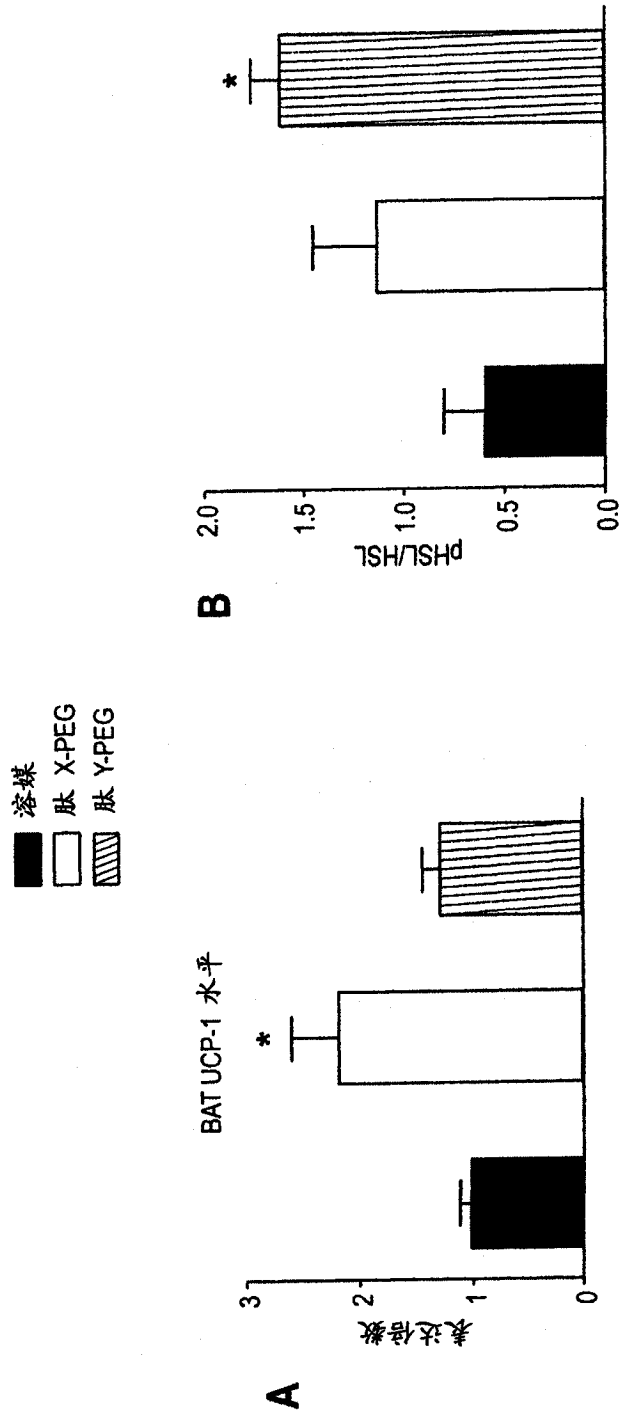


图32

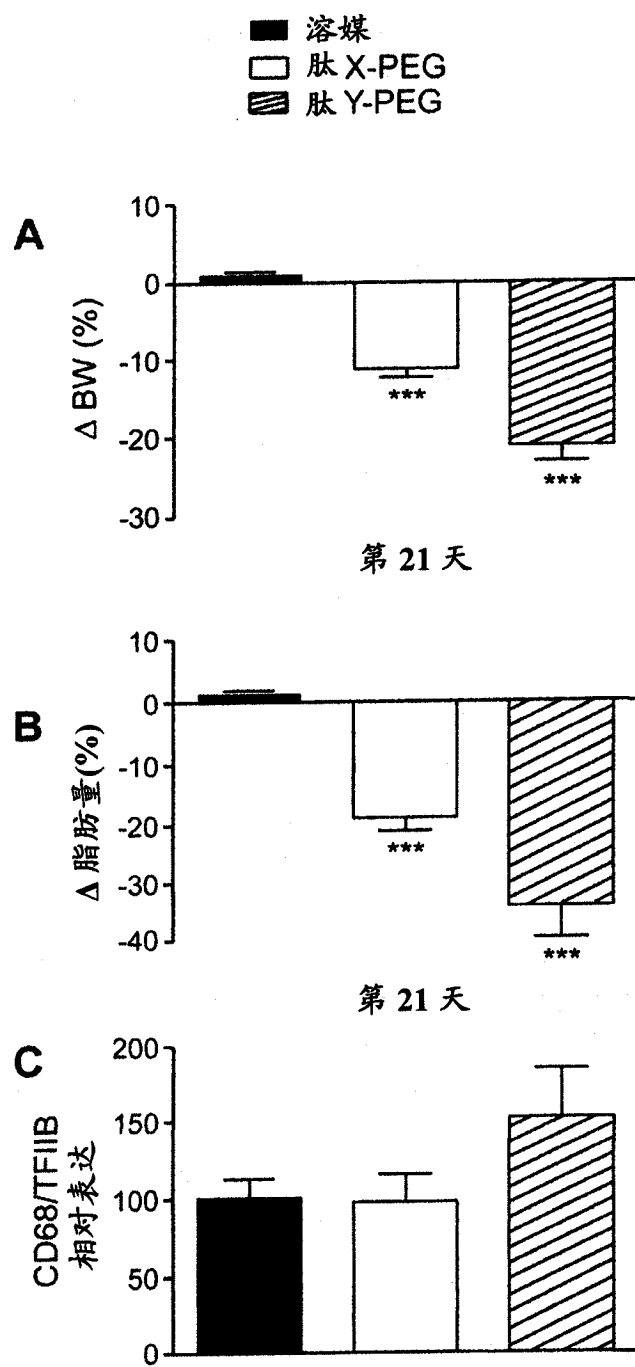


图33

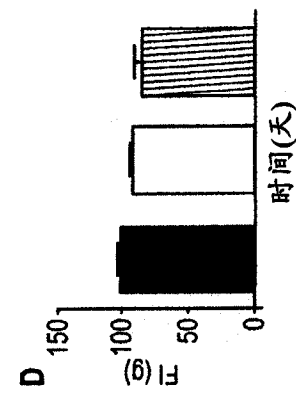
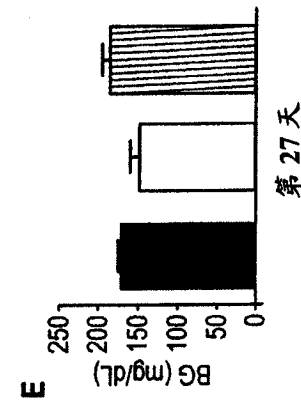
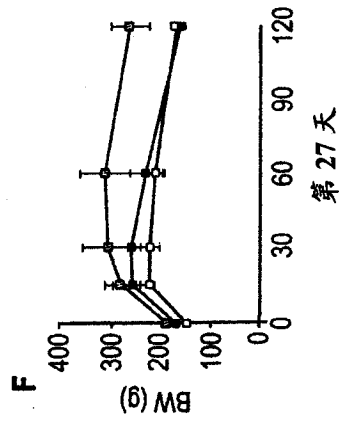
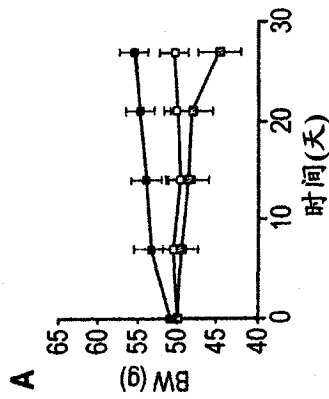
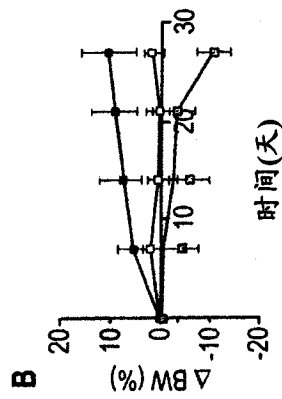
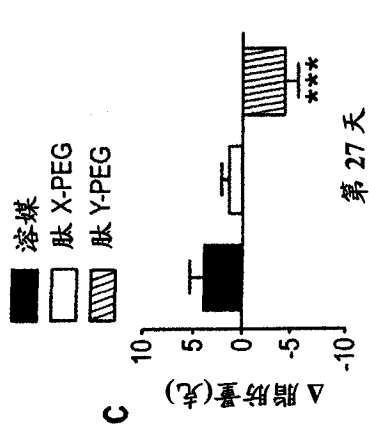


图34

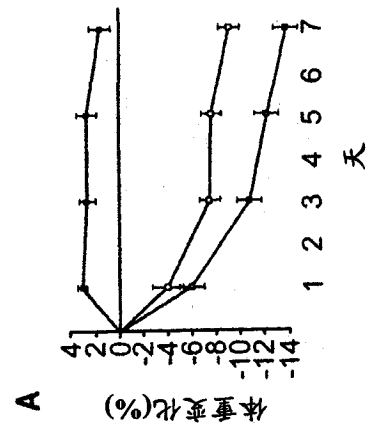
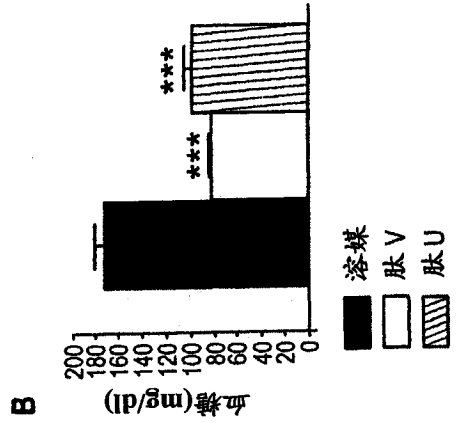
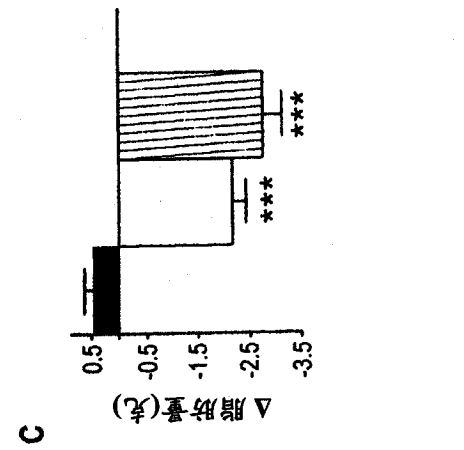


图35