



(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公開本

(11)公開編號：TW 201726717 A

(43)公開日：中華民國 106 (2017) 年 08 月 01 日

(21)申請案號：105132649

(22)申請日：中華民國 105 (2016) 年 10 月 07 日

(51)Int. Cl. : C07K14/575 (2006.01)

A61K38/22 (2006.01)

A61K47/48 (2006.01)

A61P3/00 (2006.01)

(30)優先權：2015/10/26 美國

62/246,199

(71)申請人：美國禮來大藥廠(美國) ELI LILLY AND COMPANY (US)

美國

(72)發明人：亞利西納－佛南德茲 喬治 ALSINA-FERNANDEZ, JORGE (US)；寇斯康 塔莫 COSKUN, TAMER (US)

(74)代理人：陳長文

申請實體審查：有 申請專利範圍項數：21 項 圖式數：0 共 77 頁

(54)名稱

升糖素受體促效劑

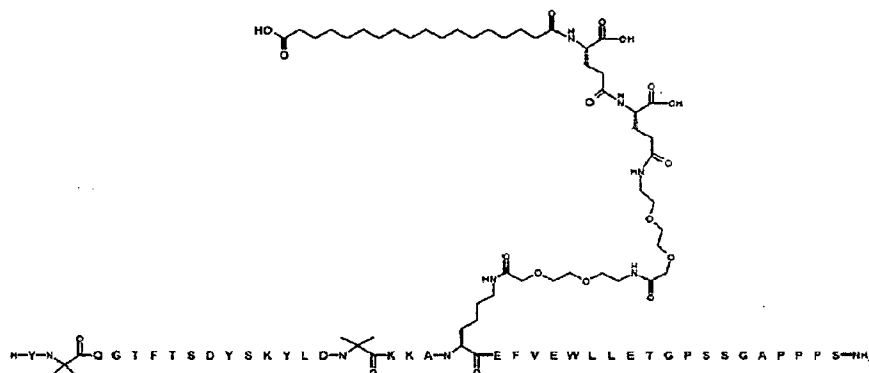
GLUCAGON RECEPTOR AGONISTS

(57)摘要

本發明係關於一種可比天然升糖素更能延長在升糖素受體處之作用持續時間之化合物。具體而言，提供一種升糖素受體促效劑，其已在天然升糖素結構中進行修飾，以在延長時期內選擇性促效升糖素受體。

The present invention relates to compounds with an extended duration of action at the glucagon receptor as compared to native glucagon. Specifically provided are glucagon receptor agonists with modifications to the structure of native glucagon introduced to selectively agonize the glucagon receptor over an extended period of time.

特徵化學式：



201726717

【發明摘要】

【中文發明名稱】

升糖素受體促效劑

【英文發明名稱】

GLUCAGON RECEPTOR AGONISTS

【中文】

本發明係關於一種可比天然升糖素更能延長在升糖素受體處之作用持續時間之化合物。具體而言，提供一種升糖素受體促效劑，其已在天然升糖素結構中進行修飾，以在延長時期內選擇性促效升糖素受體。

【英文】

The present invention relates to compounds with an extended duration of action at the glucagon receptor as compared to native glucagon. Specifically provided are glucagon receptor agonists with modifications to the structure of native glucagon introduced to selectively agonize the glucagon receptor over an extended period of time.

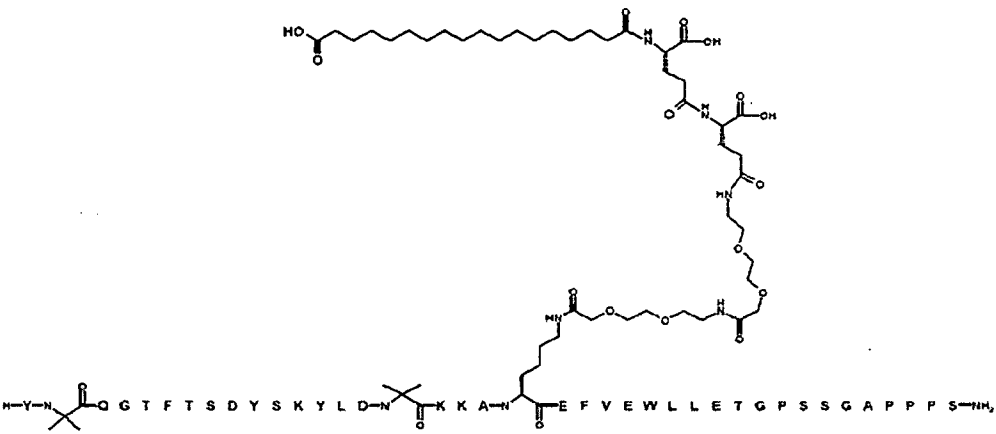
【指定代表圖】

無

【代表圖之符號簡單說明】

無

【特徵化學式】



【發明說明書】

【中文發明名稱】

升糖素受體促效劑

【英文發明名稱】

GLUCAGON RECEPTOR AGONISTS

【技術領域】

本發明係關於一種可比天然升糖素更能延長在升糖素受體處之作用持續時間之化合物。具體而言，提供一種升糖素受體促效劑，其已在天然升糖素結構中進行修飾，以在延長時期內選擇性地促效升糖素受體。升糖素受體促效劑可組合其他治療劑來治療疾病諸如2型糖尿病(T2DM)及/或肥胖，或可作為單藥療法來治療多種疾病，諸如肥胖、非酒精性脂肪肝病(non-alcoholic fatty liver disease；NAFLD)、非酒精性脂肪肝炎(non-alcoholic steatohepatitis；NASH)、血脂異常、代謝症候群、高胰島素血症及/或夜間低血糖症以及奶牛脂肪肝症候群。

【先前技術】

在過去的幾十年間，糖尿病之盛行率持續上升。T2DM為糖尿病之最常見的形式，佔全部糖尿病約90%。T2DM之特徵係由胰島素抗性引起之高血糖濃度。T2DM之當前照護標準包括飲食及運動、及口服藥物治療、及可注射降葡萄糖藥物，包括基於腸促胰島素之療法，諸如升糖素樣肽-1(GLP-1)受體促效劑及二肽基肽酶IV(DPP-IV)抑制劑。當口服藥物治療及基於腸促胰島素之療法不足時，考慮用胰島素治療。疾病已進展到需要胰島素療法之點的患者一般開始每天單次注射長效基礎胰島素，然而，在一些情況中可按需要包括在進餐時間注射速效胰島素。

不管該等療法之可利用性，許多罹患T2DM的患者之血糖含量之控制仍舊不充足。不受控之糖尿病會導致若干影響患者致病率及死亡率之病症。T2DM之主要風險因子之一係肥胖。大多數T2DM患者(~90%)超重或肥胖。文獻記載身體肥胖減少將導致與肥胖相關聯之共病症(co-morbidity)(包括高血糖及心血管事件)改善。因此，需要對葡萄糖控制及體重減輕有效之療法以更好地管理疾病。

此外，非酒精性脂肪肝病(NAFLD)(該病係指與肝臟中脂肪累積相關聯之肝病叢)及非酒精性脂肪肝炎(NASH)(該病係NAFLD之嚴重形式，其特徵係諸如發炎、肝細胞損傷及纖維化之組織學發現)之盛行率及知曉度亦已持續上升。NASH係西方國家最常見的肝病，及在美國影響3至5%的成人。治療通常包括開立飲食改變及運動之處方，及可涉及減肥手術、吡格列酮(pioglitazone)、斯他汀(statins)、 $\omega 3$ 及維生素E療法(就非糖尿病性NASH患者而言)以減少肝臟脂肪，但尚不存在已獲批可解決與NASH相關聯之發炎及/或纖維化之治療劑。因此，需要其他療法。

可取得且/或在開發中作為治療劑之幾種肽(包括升糖素)係衍生自前升糖素原，其係一在組織中經處理以形成幾種結構相關肽之多肽。升糖素為與前升糖素原之第53位至81位胺基酸對應之29個胺基酸肽，其具有以下胺基酸序列：HSQGTFTSDYSKYLDNRRAQDFVQWLMNT(SEQ ID NO:1)。升糖素係藉由結合並活化肝細胞上的升糖素受體，引起肝臟經由稱為肝糖分解之過程釋放呈糖原形式儲存的葡萄糖來幫助維持血液中葡萄糖之含量。當糖原儲存物耗盡時，升糖素刺激肝臟以藉由糖生成作用合成其他葡萄糖。該葡萄糖被釋放至血流中，從而防止發展出低血糖症。投與升糖素係一已確立可用於治療急性低血糖症之療法，及緊急投與升糖素可

在投與的幾分鐘內恢復正常葡萄糖含量。某些升糖素類似物已描述作展現提高之溶解度及穩定性。參見，例如，WO2015094875；WO2015094876；WO2015094878。

衍生自前升糖素原之其他肽包括GLP-1、升糖素樣肽-2(GLP-2)及調酸素(OXM)。GLP-1係36個胺基酸肽，其主要生物活性片段(GLP-1₇₋₃₆)係經產生為與前升糖素原之第98位至127位胺基酸對應之30個胺基酸經C端醯胺化之肽，其具有以下胺基酸序列：HAEGTFTSDVSSYLEGQAAKEFIAWLVKGR(SEQ ID NO:2)。雖然升糖素刺激釋放葡萄糖以防止低血糖症，但是GLP-1(SEQ ID NO:2)刺激胰島素之合成及分泌且已證實可預防在糖尿病中發展出高血糖症。多種GLP-1類似物係當前可用的，包括艾塞那肽(exenatide)、利拉魯肽(liraglutide)、阿必魯肽(albiglutide)及杜拉魯肽(dulaglutide)。

OXM係由升糖素之全29個胺基酸的序列與八肽羧基端延伸(前升糖素原之第82位至89位胺基酸且稱為「插入肽1」或IP-1)組成之37個胺基酸肽，其具有以下胺基酸序列：HSQGTFTSDYSKYLDNRRAQDFVQWLMNTKRNRNNIA(SEQ ID NO:3)。OXM活化升糖素及GLP-1受體二者，針對於升糖素受體之效力略高於GLP-1受體。已描述具有雙重升糖素受體及GLP-1受體活性之OXM類似物。參見，例如，WO2011087672；WO2011087671。

雖然不是衍生自前升糖素原，但葡萄糖依賴性促胰島素多肽(GIP)係在葡萄糖穩衡作用中藉由刺激在葡萄糖存在下自胰臟β細胞分泌胰島素來發揮生理作用之另一肽。GIP係42個胺基酸肽，其具有以下胺基酸序列：YAEGTFISDYSIAMDKIHQQDFVNWLLAQKGKKNDWKHNITQ(SEQ

ID NO:4)。某些GIP類似物已描述作同時展現GIP及GLP-1受體活性。參見，例如，WO2015067715；WO2011119657；WO2013164483。

此外，類似於上述OXM之雙重活性，某些升糖素類似物已描述作不但在升糖素受體處而且在GLP-1或GIP受體之一或多個受體處具有共促效活性。例如，WO2011075393及WO 2012177444旨在描述不但在升糖素受體處而且在GLP-1受體處具有活性之升糖素類似物。類似地，WO2013192130旨在描述在GIP受體處亦具有活性之升糖素類似物。另外，WO2015067716旨在描述在升糖素、GLP-1及GIP受體中之各者處具有三重促效劑活性之類似物。

不管提出作為T2DM及/或肥胖療法之多種肽及蛋白質，當前可利用及/或處在開發中之療法具有限制。特定言之，雖然可闡明上述雙重或三重促效劑以提供GLP-1受體及/或GIP受體促效劑之降葡萄糖性質及升糖素受體促效劑之代謝效益，但此等肽在其等所促效的各種受體各者處之活性程度係固定的，從而極難達成理想的受體活化平衡以在在最小副作用下於活體內獲得高療效。而不涉及升糖素受體促效作用之療法缺乏此種作用機制之潛在代謝效益。

雖然合併投與升糖素理論上可能夠具有減少此等限制之能力，但將當前可利用的升糖素產品用於此等應用中係不切實際的。特定言之，升糖素之血漿半衰期小於一小時，使得就長期性用途而言係不切實際的，尤其在涉及與可利用及/或在開發中之其他療法組合之實施例中，例如，許多此等療法係如每天一次不頻繁地給藥，及有些係提出用於如每週一次不頻繁地給藥。此外，野生型升糖素在GLP-1受體處亦具有部分活性，其可使在其中之其他化合物具有其減低的GLP-1受體活性之組合療法中達成升糖

素相對GLP-1受體活性之適宜平衡之努力複雜化。除此之外，當前可利用的升糖素產品之溶解度及化學及物理穩定性特徵亦不適合在此等應用中用於長期性用途，及將不允許與其他治療劑共調配。

因此，需要具有延長之作用持續時間之升糖素受體促效劑，其允許如每天一次、每週三次、每週兩次或每週一次不頻繁地給藥。亦需要在升糖素受體處具有強力活性及在升糖素受體處之活性相對在GLP-1受體處之活性具高選擇性之升糖素受體促效劑。亦需要具有適合與其他治療劑共調配之特徵之升糖素受體促效劑。亦需要具有允許長期儲存及使用之溶解度及穩定性特徵之升糖素受體促效劑。

【發明內容】

【實施方式】

本發明升糖素受體促效劑尋求滿足該等需求。因此，本發明提供一種具有延長作用持續時間之升糖素受體促效劑，其允許如每天一次、每週三次、每週兩次或每週一次不頻繁地給藥。本發明提供在升糖素受體處與在例如GLP-1及/或GIP受體處相比具有最佳及選擇性活性之升糖素受體促效劑。本發明提供具有適用於長期性用途及與其他治療劑共調配之物理及化學特徵之升糖素受體促效劑。本發明提供升糖素受體促效劑，當其組合其他糖尿病治療劑使用時導致增強之葡萄糖控制，當組合其他糖尿病治療劑使用時得到代謝效益(諸如體重減輕)及/或脂質效益(降低PCSK9)。特定言之，本發明升糖素受體促效劑與GLP-1R促效劑或GIP-GLP-1共促效劑之組合於諸如體重損失及身體組成之量度上具有有益協同效應。本發明亦尋求提供當作為單藥療法及/或組合其他療法使用時針對其他疾病(包括肥胖、NAFLD、NASH、血脂異常、代謝疾病、高胰島素血症及/或夜間低

血糖症)有效治療。

因此，本發明之一個實施例提供一種升糖素受體促效劑，其包含式 I：



其中

X_1 為 Aib；

X_2 為 T 或 L；

X_3 為 Aib；

X_4 為 K，其係經由用([2-(2-胺基-乙氧基)-乙氧基]-乙醯基)₂-(γGlu)_a-CO-(CH₂)_b-CO₂H 共軛接合至 K 側鏈之 ε-胺基進行化學修飾，其中 a 為 1 或 2 且 b 為 14 至 24；

X_5 為 E 或 A；

X_6 為 T 或 E；

X_7 係不存在的，或為選自由 GPSSGAPPPS 及 GPSSG 組成之群之肽；

且 C 端胺基酸係視情況經醯胺化(SEQ ID NO:5)；

或其醫藥上可接受之鹽。

本發明之另一實施例提供一種升糖素受體促效劑，其包含由式 I 組成之式：



其中

X_1 為 Aib；

X_2 為 T 或 L；

X_3 為 Aib；

X_4 為K，其係經由用([2-(2-胺基-乙氧基)-乙氧基]-乙醯基)₂-(γ Glu)_a-CO-(CH₂)_b-CO₂H共軛接合至K側鏈之 ϵ -胺基進行化學修飾，其中a為1或2且b為14至24；

X_5 為E或A；

X_6 為T或E；

X_7 係不存在的，或為選自由GPSSGAPPPS及GPSSG組成之群之肽；

且C端胺基酸係視情況經醯胺化(SEQ ID NO:5)；

或其醫藥上可接受之鹽。

本發明之另一實施例提供一種升糖素受體促效劑，其係由式I組成：

$YX_1QGTFX_2SDYSKYLDX_3KKAX_4EFVX_5WLLEX_6X_7$ [式I]

其中

X_1 為Aib；

X_2 為T或L；

X_3 為Aib；

X_4 為K，其係經由用([2-(2-胺基乙氧基)乙氧基]乙醯基)₂-(γ Glu)_a-CO-(CH₂)_b-CO₂H共軛接合至K側鏈之 ϵ -胺基進行化學修飾，其中a為1或2且b為14至24；

X_5 為E或A；

X_6 為T或E；

X_7 係不存在的，或為選自由GPSSGAPPPS及GPSSG組成之群之肽；

且C端胺基酸係視情況經醯胺化(SEQ ID NO:5)；

或其醫藥上可接受之鹽。

在某些實施例中，升糖素受體促效劑具有式I之結構，其中 X_2 為T。

在某些實施例中，升糖素受體促效劑具有式I之結構，其中 X_2 為L。

在某些實施例中，升糖素受體促效劑具有上述實施例中任一者之結構，其中 X_5 為E。在某些實施例中，升糖素受體促效劑具有上述實施例中任一者之結構，其中 X_5 為A。

在某些實施例中，升糖素受體促效劑具有上述實施例中任一者之結構，其中 X_6 為T。在某些實施例中，升糖素受體促效劑具有上述實施例中任一者之結構，其中 X_6 為E。

在某些實施例中，升糖素受體促效劑具有上述實施例中任一者之結構，其中 X_7 為GPSSGAPPPS。在某些實施例中，升糖素受體促效劑具有上述實施例中任一者之結構，其中 X_7 為GPSSG。在某些實施例中，升糖素受體促效劑具有上述實施例中任一者之結構，其中 X_7 係不存在的。

在某些實施例中，升糖素受體促效劑具有上述實施例中任一者之結構，其中b為16至20。在某些實施例中，升糖素受體促效劑具有上述實施例中任一者之結構，其中b為16至18。在某些實施例中，升糖素受體促效劑具有上述實施例中任一者之結構，其中b為16。在某些實施例中，升糖素受體促效劑具有上述實施例中任一者之結構，其中b為18。

在某些實施例中，升糖素受體促效劑具有式I之結構，其中： X_2 為T；a為2；b為16； X_5 為E； X_6 為T；且 X_7 為GPSSGAPPPS；且其中C-端胺基酸係經醯胺化為C端一級醯胺(SEQ ID NO:6)。

在某些實施例中，升糖素受體促效劑具有式I之結構，其中： X_2 為T；a為2；b為18； X_5 為E； X_6 為T； X_7 為GPSSGAPPPS；且其中C端胺基酸係經醯胺化為C端一級醯胺(SEQ ID NO:7)。

在某些實施例中，升糖素受體促效劑具有式I之結構，其中： X_2 為

L；a為2；b為16；X₅為E；X₆為T；且X₇為GPSSGAPPPS；且其中C端胺基酸係經醯胺化為C端一級醯胺(SEQ ID NO:8)。

在某些實施例中，升糖素受體促效劑具有式I之結構，其中：X₂為T；a為2；b為16；X₅為E；X₆為T；且X₇為GPSSG；且其中C端胺基酸係經醯胺化為C端一級醯胺(SEQ ID NO:9)。

在某些實施例中，升糖素受體促效劑具有式I之結構，其中：X₂為T；a為2；b為18；X₅為E；X₆為T；且X₇為GPSSG；且其中C端胺基酸係經醯胺化為C端一級醯胺(SEQ ID NO:10)。

在某些實施例中，升糖素受體促效劑具有式I之結構，其中：X₂為T；a為1；b為16；X₅為A；X₆為E；且X₇係不存在的(SEQ ID NO:11)。

在某些實施例中，升糖素受體促效劑具有式I之結構，其中：X₂為T；a為1；b為18；X₅為A；X₆為E；且X₇係不存在的(SEQ ID NO:12)。

在某些實施例中，升糖素受體促效劑具有式I之結構，其中：a為2；X₅為E；X₆為T；X₇為選自由GPSSGAPPPS及GPSSG組成之群之肽；且C端胺基酸係經醯胺化(SEQ ID NO:16)。

在某些實施例中，升糖素受體促效劑具有式I之結構，其中：X₂為T；a為1；X₅為A；X₆為E；且X₇係不存在的(SEQ ID NO:17)。

在某些實施例中，升糖素受體促效劑在升糖素受體之處的活性比升糖素受體促效劑在GLP-1受體之處的活性高至少100倍。

本發明之另一實施例提供一種治療選自由T2DM、肥胖、脂肪肝病、NASH、血脂異常、代謝症候群、高胰島素血症及夜間低血糖症組成之群之疾病之方法，其包括對有此需要的個體投與有效量之本發明升糖素受體促效劑。

本發明之另一實施例提供一種治療選自由T2DM、肥胖、脂肪肝病、NASH、血脂異常、代謝症候群、高胰島素血症及夜間低血糖症組成之群之疾病之方法，其包括對有此需要的個體投與組合有效量之一或多種其他治療劑的有效量之本發明升糖素受體促效劑。在某些實施例中，該疾病為T2DM。在某些實施例中，該疾病為肥胖。在某些實施例中，該疾病為脂肪肝病。在某些實施例中，該一或多種其他治療劑係選自由GLP-1R促效劑、GIP-GLP-1共促效劑、胰島素受體促效劑、調酸素、二甲雙胍、噻唑烷二酮、磺醯脲、二肽基肽酶-4(「DPP-4」)抑制劑及鈉葡萄糖共轉運體2(「SGLT2」)抑制劑組成之群。在某些實施例中，該其他治療劑為GLP-1R促效劑。在某些實施例中，該GLP-1R促效劑為杜拉魯肽。在某些實施例中，該其他治療劑為GIP-GLP-1共促效劑。在某些實施例中，該GIP-GLP-1共促效劑具有SEQ ID NO:15之結構。在某些實施例中，該其他治療劑為胰島素受體促效劑。

在某些實施例中，升糖素受體促效劑當組合其他治療劑諸如GLP-1R促效劑或GIP-GLP-1共促效劑使用時對於體重損失及身體組成具有協同效應。

本發明之另一實施例提供一種本發明升糖素受體促效劑於療法中之用途。本發明之另一實施例提供一種本發明升糖素受體促效劑於治療選自由T2DM、肥胖、脂肪肝病、NASH、血脂異常、代謝症候群、高胰島素血症及夜間低血糖症組成之群之疾病中之用途。在某些實施例中，該疾病為T2DM。在某些實施例中，該疾病為肥胖。在某些實施例中，該疾病為脂肪肝病。

本發明之另一實施例提供一種本發明升糖素受體促效劑，其係組合

一或多種其他治療劑使用以同時、分開或連續用於療法中。在某些實施例中，該一或多種其他治療劑係選自由GLP-1R促效劑、GIP-GLP-1共促效劑、胰島素受體促效劑、調酸素、二甲雙胍、噻唑烷二酮、磺醯脲、DPP-4抑制劑及鈉葡萄糖共轉運體2(「SGLT2」)抑制劑組成之群。在某些實施例中，該其他治療劑為GLP-1R促效劑。在某些實施例中，該GLP-1R促效劑為杜拉魯肽。在某些實施例中，該其他治療劑為GIP-GLP-1共促效劑。在某些實施例中，該GIP-GLP-1共促效劑具有SEQ ID NO:15之結構。

本發明之另一實施例提供一種本發明升糖素受體促效劑於製造用於治療T2DM、肥胖、脂肪肝病、NASH、血脂異常、代謝症候群、高胰島素血症及夜間低血糖症的藥物中之用途。

本發明之另一實施例提供一種醫藥組合物，其包含本發明升糖素受體促效劑及其醫藥上可接受之載劑、稀釋劑或賦形劑。在某些實施例中，該醫藥組合物進一步包含其他治療劑。在某些實施例中，該其他治療劑係選自由GLP-1R促效劑、GIP-GLP-1共促效劑、胰島素受體促效劑、調酸素、二甲雙胍、噻唑烷二酮、磺醯脲、DPP-4抑制劑及SGLT2抑制劑組成之群。在某些實施例中，該其他治療劑為GLP-1R促效劑。在某些實施例中，該GLP-1R促效劑為杜拉魯肽。在某些實施例中，該其他治療劑為GIP-GLP-1共促效劑。在某些實施例中，該GIP-GLP-1共促效劑具有SEQ ID NO:15之結構。在某些實施例中，該其他治療劑為胰島素受體促效劑。

本發明之另一實施例提供一種誘發非治療性體重損失之方法，其包括投與有效量之本發明升糖素受體促效劑。

本發明之另一實施例提供一種治療牛之脂肪肝症候群之方法，其包括對有此需要的牛投與有效量之本發明升糖素受體促效劑。

本發明之另一實施例提供一種本發明升糖素受體促效劑，其係用於治療牛之脂肪肝症候群。

術語「升糖素受體促效劑」在用於本文中時意指包含天然人類升糖素(SEQ ID NO:1)、升糖素類似物、升糖素衍生物或升糖素融合蛋白質之胺基酸序列之化合物，其結合並活化升糖素受體，且維持在升糖素受體處相對在GLP-1受體處之選擇性活性，使得在作為單藥療法投與時血清葡萄糖含量增加。可使用已知的活體外及活體內方法，諸如彼等述於下文研究中者測量此等結合特徵及藥效動力學效應。升糖素類似物為與天然人類升糖素(SEQ ID NO:1)之胺基酸序列相比時具有包括一或多個胺基酸取代、缺失、插入或新增之修飾的分子。升糖素衍生物為具有天然人類升糖素(SEQ ID NO:1)或升糖素類似物之胺基酸序列，但另外具有其胺基酸側基、 α -碳原子、末端胺基或末端羧酸基中一或多者之至少一個化學修飾之分子。升糖素融合蛋白質為包含升糖素、升糖素類似物或升糖素衍生物及第二多肽之異種蛋白質，諸如免疫球蛋白Fc區。

本發明升糖素受體促效劑對升糖素受體之活性相對於GLP-1受體亦具選擇性。術語「相對於...具選擇性」、「選擇性」及「對...具選擇性」在本文中使用時係指展現對升糖素受體之效力比GLP-1受體高50倍、100倍、200倍、250倍、500倍或1000倍之化合物。可使用已知的活體外方法諸如彼等述於下文研究中者測量此種選擇性。

本發明升糖素受體促效劑具有延長的時間作用曲線，其允許如每天一次、每週三次、每週兩次或每週一次不頻繁地給藥。可使用已知的藥物

動力學測試方法測量升糖素受體促效劑之時間作用曲線。

經由使用與在位置20之離胺酸胺基酸側鏈之 ϵ -胺基共軛之脂肪酸部分來達成本發明升糖素受體促效劑之延長的時間作用曲線。脂肪酸經連接子與離胺酸側鏈之 ϵ -胺基共軛，該連接子包含[2-(2-胺基-乙氧基)-乙氧基]-乙醯基)₂-(γ Glu)_a，其中a為1或2。脂肪酸及連接子中之 γ -麩胺酸充作白蛋白結合劑，且提供生成長效化合物之可能性。以連接子方式與在位置20之離胺酸胺基酸側鏈之 ϵ -胺基共軛之脂肪酸包含-CO-(CH₂)_b-CO₂H，其中b為14至24。因此，該完整的連接子-脂肪酸結構包含([2-(2-胺基乙氧基)乙氧基]乙醯基)₂-(γ Glu)_a-CO-(CH₂)_b-CO₂H，其中a為1或2且b為14或24。如下文實例1至7之化學結構中所示，[2-(2-胺基-乙氧基)-乙氧基]-乙醯基之第一單元係連接至離胺酸側鏈之 ϵ -胺基。[2-(2-胺基-乙氧基)-乙氧基]-乙醯基之第二單元則係連接至[2-(2-胺基-乙氧基)-乙氧基]-乙醯基之第一單元的胺基。然後， γ Glu之第一單元經側鏈之 γ -羧基連接至[2-(2-胺基-乙氧基)-乙氧基]-乙醯基之第二單元的胺基。當a = 2時， γ Glu之第二單元經側鏈之 γ -羧基連接至 γ Glu之第一單元的 α -胺基。最後，脂肪酸連接至 γ Glu之第一(當a=1時)或第二(當a=2時)單元之 α -胺基。

本發明升糖素受體促效劑較佳係調配成經非經腸途徑(例如，皮下、靜脈內、腹膜內、肌肉內或經皮)投與之醫藥組合物。此等醫藥組合物以及製備其之方法係相關技術所熟知。(參見，例如，Remington: The Science and Practice of Pharmacy (D.B. Troy編輯，第21版，Lippincott, Williams & Wilkins, 2006)。較佳之投藥途徑為皮下。

本發明升糖素受體促效劑可與多種無機酸及有機酸中之任一者反應以形成醫藥上可接受之酸加成鹽。醫藥上可接受之鹽及用於製備其等之常

見方法係為相關技術所熟知。(參見，例如，P. Stahl等人 Handbook of Pharmaceutical Salts: Properties, Selection and Use，第2修訂版(Wiley-VCH, 2011))。本發明之醫藥上可接受之鹽包括三氟乙酸鹽、鹽酸鹽及乙酸鹽。

由本發明升糖素受體促效劑對於升糖素受體優於GLP-1受體之選擇性所提供的一個特定的效益係當本發明升糖素受體促效劑組合其他治療劑投與時提供彈性治療選項之能力，使得在升糖素受體處之活性與在其他受體(例如，GLP-1、GIP及/或胰島素受體)處之活性之比。因此，在某些較佳實施例中，本發明提供一種治療患者之T2DM之方法，其包括對有此種治療需要的患者投與組合其他治療劑之有效量之本發明升糖素受體促效劑或其醫藥上可接受之鹽。在某些實施例中，該其他治療劑係選自由GLP-1R促效劑、GIP-GLP-1共促效劑或胰島素受體促效劑組成之群。

術語「其他治療劑」在用於本文中時意指已知具有有益治療效應之其他化合物，諸如，針對T2DM及/或肥胖之治療，其係當前可利用的及/或處在開發中，包括(例如)GLP-1R促效劑、GIP-GLP-1共促效劑、胰島素受體促效劑、調酸素、二甲雙胍、噻唑烷二酮、磺醯脲、DPP-4抑制劑及SGLT2抑制劑。

術語「組合」在用於本文中時意指本發明升糖素受體促效劑與一或多種其他治療劑同時、連續或呈單一組合調配物形式投與。

術語「GLP-1R促效劑」在用於本文中時係指包含天然人類GLP-1(SEQ ID NO:2)、GLP-1類似物、GLP-1衍生物或GLP-1融合蛋白質之胺基酸序列之化合物，其維持在GLP-1受體處之活性。可由相關技術中已知的方法，包括使用測量GLP-1受體結合活性或受體活化之活體內實驗及活

體外分析來測量GLP-1受體活性。GLP-1類似物為與天然人類GLP-1(SEQ ID NO:2)之胺基酸序列相比時具有包括一或多個胺基酸取代、缺失、插入或新增之修飾的分子。GLP-1衍生物為具有天然人類GLP-1(SEQ ID NO:2)或GLP-1類似物之胺基酸序列，但另外具有其胺基酸側基、 α -碳原子、末端胺基或末端羧酸基中一或多者之至少一個化學修飾之分子。GLP-1融合蛋白質為包含GLP-1、GLP-1類似物或GLP-1衍生物及第二多肽之異種蛋白質，諸如免疫球蛋白Fc區。當前可利用及/或處在開發中之GLP-1R促效劑包括艾塞那肽、利拉魯肽、利西拉肽、阿必魯肽、杜拉魯肽及索馬魯肽。在某些較佳的實施例中，其中本發明升糖素受體促效劑係組合GLP-1R促效劑投與，該GLP-1R促效劑為杜拉魯肽。參見，例如，US 7,452,966。

術語「GIP-GLP-1共促效劑」在用於本文中時係指在GIP及GLP-1受體處均具有活性之化合物。可由相關技術中已知的方法，包括使用測量GIP受體及/或GLP-1受體結合活性或受體活化之活體內實驗及活體外分析來測量GIP受體及GLP-1受體活性。雖然GIP-GLP-1共促效劑在當前不可用作T2DM治療，但多種GIP類似物已描述為同時展現GIP及GLP-1受體活性，參見，例如，WO2013164483；WO 2011119657。

在某些較佳的實施例中，其中本發明升糖素受體促效劑係組合GIP-GLP-1共促效劑投與，該GIP-GLP-1共促效劑具有以下結構：

$\text{YX}_1\text{EGTFTSDYSIX}_2\text{LDKIAQX}_3\text{AX}_4\text{VQWLIAGGPSSGAPPPS}$ ；

其中

X_1 為Aib；

X_2 為Aib；

X_3 為 K，其係經由用 $([2-(2\text{-胺基乙氧基})\text{乙氧基}]\text{乙醯基})_2-(\gamma\text{Glu})_a\text{-CO}(\text{CH}_2)_b\text{-CO}_2\text{H}$ 共軛接合至 K 側鏈之 ϵ -胺基進行化學修飾，其中 a 為 1 或 2 且 b 為 10 至 20；

X_4 為 Phe 或 1-萘基丙胺酸(1-Nal)；

且 C 端胺基酸係視情況經醯胺化(SEQ ID NO:13)，

或其醫藥上可接受之鹽。

在某些較佳實施例中，a 為 2，b 為 18； X_4 為 1-Nal；且 C 端胺基酸係經醯胺化為 C 端一級醯胺(SEQ ID NO:14)。在某些較佳實施例中，a 為 1，b 為 18； X_4 為 Phe；且 C 端胺基酸係經醯胺化為 C 端一級醯胺(SEQ ID NO:15)。可使用技術諸如彼等可用於製備本發明升糖素受體促效劑者，如下文在肽合成實例中所述來製備此等 GIP-GLP-1 共促效劑。

術語「胰島素受體促效劑」在用於本文中時係指人類胰島素、或其類似物或衍生物、或能夠結合並活化胰島素受體之任何其他蛋白質。可由相關技術中已知的方法，包括使用測量胰島素受體結合活性或受體活化之活體內實驗及活體外分析來測量胰島素受體活性。胰島素類似物為在與結構為人所熟知的天然人類胰島素相比時具有包括一或多個胺基酸取代、缺失、插入或新增之修飾的分子。胰島素衍生物為具有天然人類胰島素或其類似物之胺基酸序列，但另外具有其胺基酸側基、 α -碳原子、末端胺基或末端羧酸基中一或多者之至少一個化學修飾之分子。胰島素融合蛋白質為包含胰島素、胰島素類似物或胰島素衍生物部分及第二多肽之異種蛋白質。雖然可考慮將任何胰島素受體促效劑用於其中本發明升糖素受體促效劑係組合胰島素受體促效劑投與之實施例中，但是較佳的胰島素受體促效劑為彼等具有基礎或延長之作用持續時間者。當前可利用的具有基礎活性

之胰島素受體促效劑包括甘精胰島素(insulin glargine)、地特胰島素(insulin detemir)及德谷胰島素(insulin degludec)，其各者係指明每天一次投與。

在某些實施例中，本發明提供一種用於治療患者之T2DM之方法，其包括對有此治療需要的患者投與有效量之本發明升糖素受體促效劑或其醫藥上可接受之鹽。

在某些實施例中，本發明提供一種用於治療患者之肥胖之方法，其包括對有此治療需要的患者投與有效量之本發明升糖素受體促效劑或其醫藥上可接受之鹽。

在某些實施例中，本發明提供一種用於治療患者之脂肪肝病之方法，其包括對有此治療需要的患者投與有效量之本發明升糖素受體促效劑或其醫藥上可接受之鹽。

在某些實施例中，本發明提供一種用於治療患者之NASH之方法，其包括對有此治療需要的患者投與有效量之本發明升糖素受體促效劑或其醫藥上可接受之鹽。

在其他實施例中，本發明亦提供一種治療患者之T2DM之方法，其包括對有此治療需要的患者投與組合一或多種其他治療劑(諸如GLP-1R促效劑、GIP-GLP-1共促效劑、胰島素受體促效劑、調酸素、二甲雙胍、噻唑烷二酮、磺醯脲、DPP-4抑制劑及SGLT2抑制劑)之有效量之本發明升糖素受體促效劑或其醫藥上可接受之鹽。

術語「有此需要的患者」在用於本文中時係指罹患需要治療的疾病或病症(包括(例如)T2DM、肥胖、脂肪肝病、NASH及/或代謝症候群)之哺乳動物，較佳係人類或牛。

術語「有效量」在用於本文中時係指本發明升糖素受體促效劑或其醫藥上可接受之鹽呈單劑量或多劑量投與給患者時，在所診斷或治療的患者中提供所需效果時之用量或劑量。有效量很容易由熟習技術者通過使用已知技術及藉由觀察在類似情況下得到的結果來確定。在決定用於患者之有效量時，會考量許多因素，包括(但不限於)：哺乳動物之物種；其體型大小、年齡及基本健康狀況；所牽涉之具體疾病或病症；該疾病或病症之牽涉程度或嚴重程度；個別患者之反應；所投與之特定升糖素受體促效劑；投藥模式；所投與製劑之生物可利用性特性；所選擇之劑量療程；合併用藥之用法；及其他相關情況。

某些本發明升糖素受體促效劑一般在寬廣劑量範圍內有效。例如，適合每週一次投藥之劑量可落在每人每週約0.01至約30 mg範圍內。本發明升糖素受體促效劑可每天一次、每週三次、每週兩次或每週一次進行給藥。以每週一次投藥較佳。

如本文中所使用，術語「治療」或「以治療」包括抑制、減緩、停止、或逆轉現有症狀或病症之進展或嚴重度。

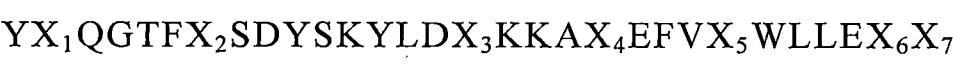
本發明胺基酸序列包含二十種天然生成之胺基酸之標準單字母或三字母代碼。另外，「Aib」為 α 胺基異丁酸。本發明亦包含可用於合成本發明升糖素受體促效劑或其醫藥上可接受之鹽之新穎中間產物及方法。該等中間產物及本發明升糖素受體促效劑可藉由相關技術中已知的多種程序製得。特定言之，以下實例中說明使用化學合成之方法。所述各途徑之具體合成步驟可依不同方式進行組合來製備本發明升糖素受體促效劑。一般技術者很容易獲得試劑及起始材料。

由以下實例進一步說明本發明，該等實例不應被解釋為具限制性。

肽合成

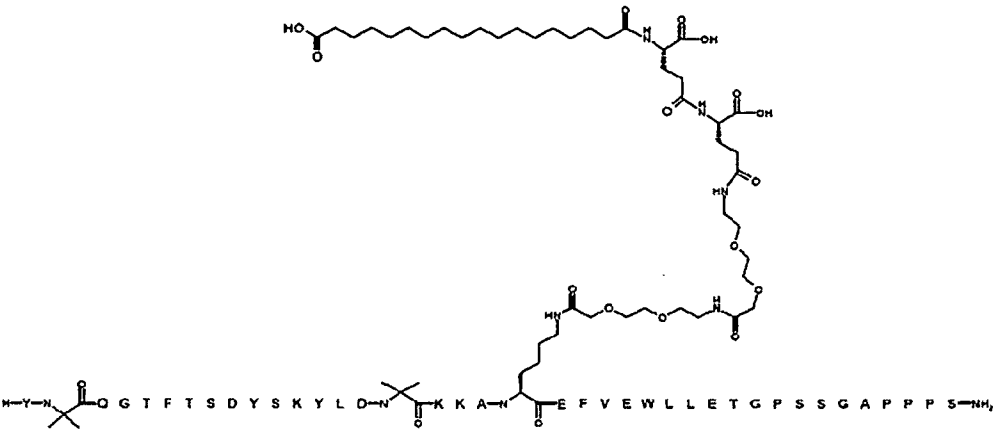
實例1

實例1係由以下描述表示之升糖素受體促效劑：



其中X₁為Aib；X₂為T；X₃為Aib；X₄為K，其係經由用([2-(2-胺基乙氧基)乙氧基]乙醯基)₂-(γGlu)_a-CO-(CH₂)_b-CO₂H共軛接合至K側鏈之ε-胺基進行化學修飾，其中a為2且b為16；X₅為E；X₆為T；X₇為GPSSGAPPPS；且C端胺基酸係經醯胺化為C端一級醯胺 (SEQ ID NO:6)。

以下係除了殘基Aib2、Aib16及K20以外的使用標準單字母胺基酸代碼描繪之實例1之結構，其中該等胺基酸殘基之結構已被放大：



藉由使用在Symphony自動肽合成儀(PTI Protein Technologies Inc.)上進行之Fmoc/t-Bu策略，從RAPP AM-Rink Amide樹脂開始之固相肽合成且在25 °C下使用6當量用二異丙基碳化二亞胺(DIC)及羥基苯并三唑(HOBt)活化之胺基酸(1:1:1莫耳比)在二甲基甲醯胺(DMF)中耦合90 min來生成實例1之肽。

對於Pro31(4 h)、Trp25(4 h)、Glu24(4 h)、Val23(10 h)、Glu21(4 h)、Aib16(4 h)、Asp15(4 h)、Thr7(4 h)、Thr5(4 h)、Gly4(4 h)、

Gln3(4 h)及Aib2(24 h)需要延長偶合來提高粗肽品質。對於Lys20偶合使用Fmoc-Lys(Alloc)-OH建構嵌段(正交保護基)以使得脂肪酸部分在合成方法中後期定點連接上。採用如上所述的DIC-HOBt方案(24 h偶合)併入N端殘基為Boc-Tyr(tBu)-OH。

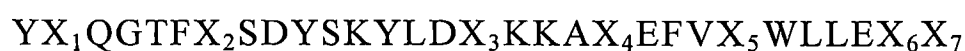
完成上述肽-樹脂之延長後，使用催化量之Pd(PPh₃)₄於存在PhSiH₃作為清除劑下移除存在於Lys20中之Alloc保護基。使用Fmoc/t-Bu策略以延伸Lys20側鏈之其他偶合/脫去保護基循環涉及Fmoc-NH-PEG₂-CH₂COOH(ChemPep目錄號280102)、Fmoc-Glu(OH)-OtBu (ChemPep 目錄號100703)及HOOC-(CH₂)₁₆-COOtBu。在所有的偶合中，在25℃下使用3當量的建構嵌段與PyBOP(3 equiv)及DIEA(6 equiv)於DMF中4 h。

於25℃下，在包含三氟乙酸(TFA):三異丙基矽烷:1,2-乙二硫醇:水:苯甲硫醚 90:4:2:2:2(v/v)之溶液中同時進行自樹脂裂解及脫去側鏈保護基2 h，接著用冷醚沉澱。藉由逆相HPLC層析以水/乙腈(含有0.05% v/v TFA)梯度在C18管柱上將粗肽純化至>99%純度(15至20%純化產率)，於該C18管柱收集適宜的溶離份並凍乾，得到TFA鹽。

在基本上如上所述進行的合成中，藉由分析型逆相HPLC檢驗實例1之純度，且使用LC/MS證實同一性(觀測值： $M+3H^+/3 = 1713.6$ ；計算值 $M+3H^+/3 = 1714.3$ ；觀測值： $M+4H^+/4 = 1285.7$ ；計算值 $M+4H^+/4 = 1285.9$)。

實例2

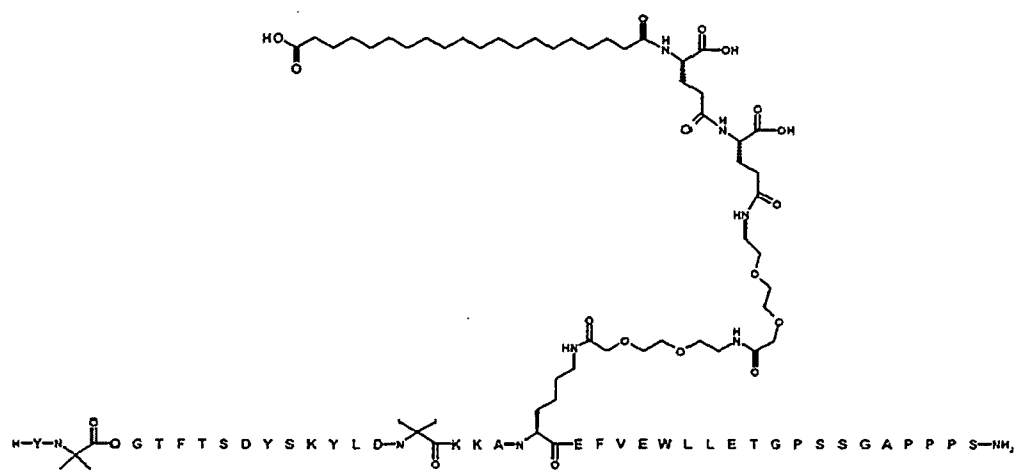
實例2係由以下描述表示之升糖素受體促效劑：



其中： X_1 為Aib， X_2 為T； X_3 為Aib； X_4 為K，其係經由用([2-(2-胺

基乙氧基)乙氧基]乙醯基)₂-(γGlu)_a-CO-(CH₂)_b-CO₂H共軛接合至K側鏈之ε-胺基進行化學修飾；a為2；b為18；X₅為E；X₆為T；X₇為GPSSGAPPPS；且其中C端胺基酸係經醯胺化為C端一級醯胺(SEQ ID NO:7)。

以下係除了殘基Aib2、Aib16及K20以外的使用標準單字母胺基酸代碼描繪之實例2之結構，其中該等胺基酸殘基之結構已被放大：

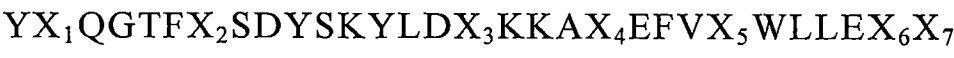


類似如上文在實例1中所述合成根據實例2之肽。在25℃下使用3當量的建構嵌段與PyBOP(3 equiv)及DIEA(6 equiv)於DMF中4 h，來併入HOOC-(CH₂)₁₈-COOtBu。

在基本上如上文針對實例1所述進行的合成中，藉由分析型逆相HPLC檢驗實例2之純度，且使用LC/MS證實同一性(觀測值：M+3H⁺/3=1723.2；計算值M+3H⁺/3=1723.6；觀測值：M+4H⁺/4=1292.9；計算值M+4H⁺/4=1293.0)。

實例3

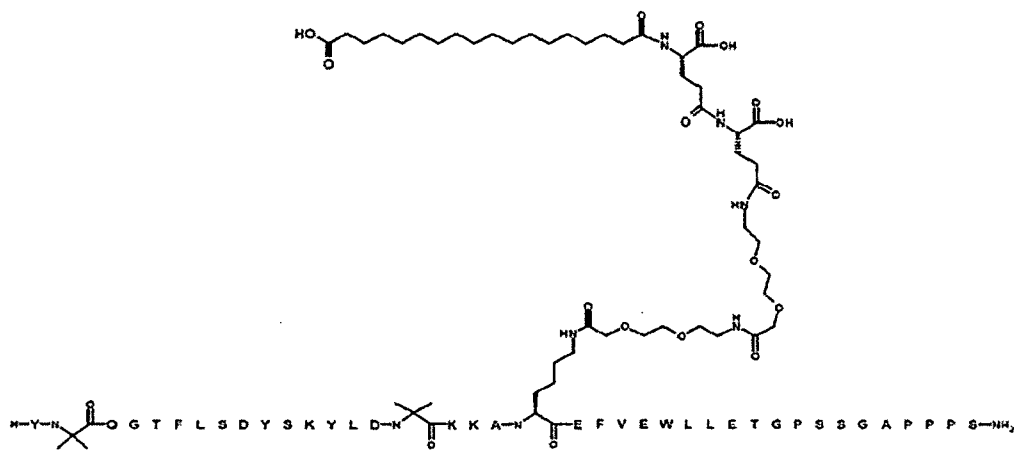
實例3係由以下描述表示之升糖素受體促效劑：



其中：X₁為Aib；X₂為L；X₃為Aib；X₄為K，其係經由用([2-(2-胺

基乙氧基)乙氧基]乙醯基)₂-(γGlu)_a-CO-(CH₂)_b-CO₂H共軛接合至K側鏈之ε-胺基進行化學修飾；a為2；b為16；X₅為E；X₆為T；且X₇為GPSSGAPPPS；且其中C端胺基酸係經醯胺化為C端一級醯胺(SEQ ID NO:8)。

以下係除了殘基Aib2、Aib16及K20以外的使用標準單字母胺基酸代碼描繪之實例3之結構，其中該等胺基酸殘基之結構已被放大：

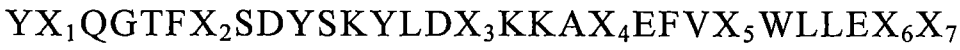


類似如上文針對實例1所述合成根據實例3之肽。

在基本上如上文針對實例1所述進行的合成中，藉由分析型逆相HPLC檢驗實例3之純度，且使用LC/MS證實同一性(觀測值：M+3H⁺/3 =1717.4；計算值M+3H⁺/3 =1718.3；觀測值：M+4H⁺/4 =1288.3；計算值M+4H⁺/4 =1289.0)。

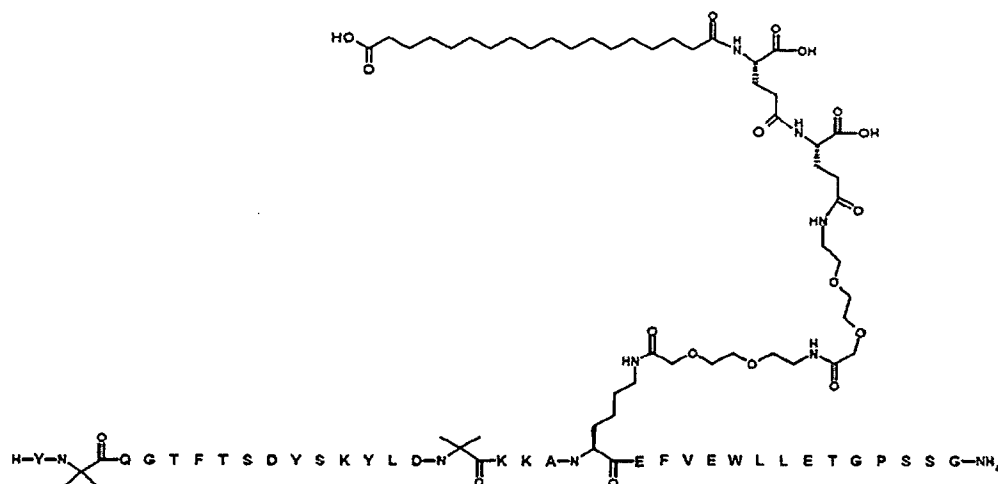
實例4

實例4係由以下描述表示之升糖素受體促效劑：



其中X₁為Aib；X₂為T；X₃為Aib；X₄為K，其係經由用([2-(2-胺基乙氧基)乙氧基]乙醯基)₂-(γGlu)_a-CO-(CH₂)_b-CO₂H共軛接合至K側鏈之ε-胺基進行化學修飾；a為2；b為16；X₅為E；X₆為T；且X₇為GPSSG；且C端胺基酸係經醯胺化為C端一級醯胺(SEQ ID NO:9)。

以下係除了殘基Aib2、Aib16及K20以外的使用標準單字母胺基酸代碼描繪之實例4之結構，其中該等胺基酸殘基之結構已被放大：

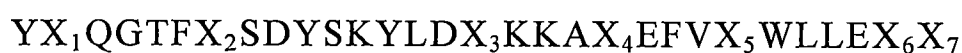


類似如上文針對實例1所述合成根據實例4之肽。

在基本上如上文針對實例1所述進行的合成中，藉由分析型逆相HPLC檢驗實例4之純度，且使用LC/MS證實同一性(觀測值： $M+3H^+/3=1563.7$ ；計算值 $M+3H^+/3=1564.4$ ；觀測值： $M+4H^+/4=1172.9$ ；計算值 $M+4H^+/4=1173.6$)。

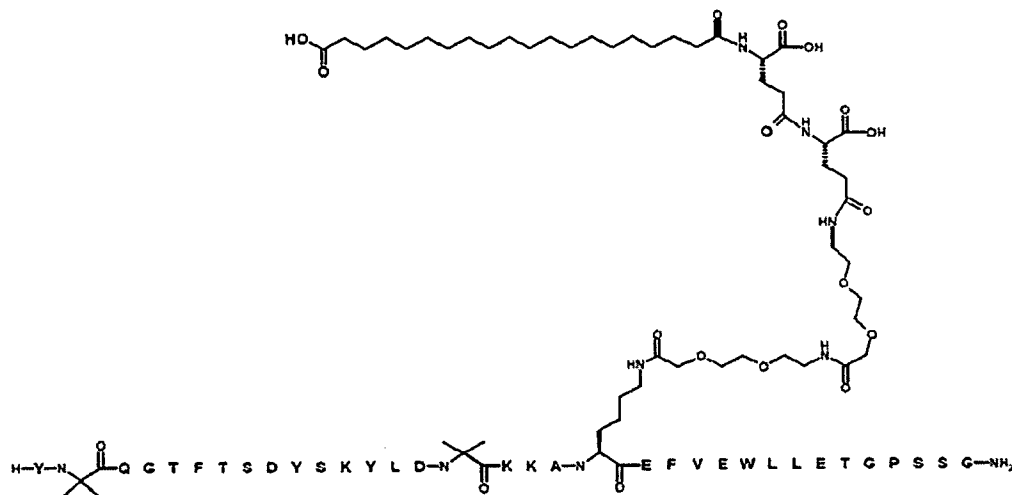
實例5

實例5係由以下描述表示之升糖素受體促效劑：



其中X₁為Aib；X₂為T；X₃為Aib；X₄為K，其係經由用([2-(2-胺基乙氧基)乙氧基]乙醯基)₂-(γGlu)_a-CO-(CH₂)_b-CO₂H共軛接合至K側鏈之ε-胺基進行化學修飾；a為2；b為18；X₅為E；X₆為T；且X₇為GPSSG；且C端胺基酸係經醯胺化為C端一級醯胺(SEQ ID NO:10)。

以下係除了殘基Aib2、Aib16及K20以外的使用標準單字母胺基酸代碼描繪之實例5之結構，其中該等胺基酸殘基之結構已被放大：

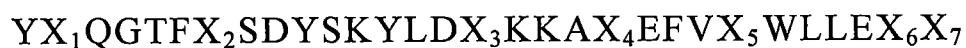


類似如上文針對實例1所述合成根據實例5之肽。

在基本上如上文針對實例1及2所述進行的合成中，藉由分析型逆相HPLC檢驗實例5之純度，且使用LC/MS證實同一性(觀測值： $M+3H^+/3=1572.9$ ；計算值 $M+3H^+/3=1573.8$ ；觀測值： $M+4H^+/4=1179.8$ ；計算值 $M+4H^+/4=1180.6$)。

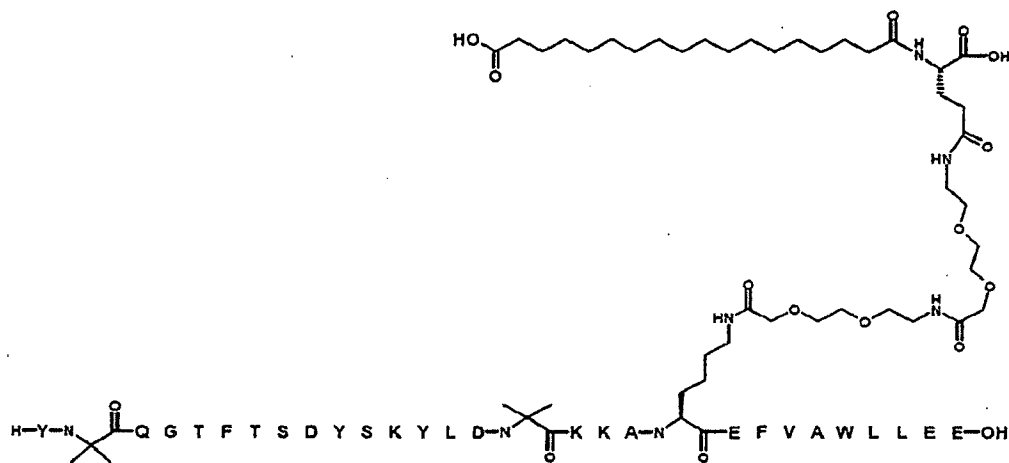
實例6

實例6係由以下描述表示之升糖素受體促效劑：



其中 X_1 為Aib； X_2 為T； X_3 為Aib； X_4 為K，其係經由用([2-(2-胺基乙氧基)乙氧基]乙醯基)₂-(γ Glu)_a-CO-(CH₂)_b-CO₂H共軛接合至K側鏈之 ϵ -胺基進行化學修飾；a為1；b為16； X_5 為A； X_6 為E；且 X_7 係不存在的；且C端胺基酸為C端酸(SEQ ID NO:11)。

以下係除了殘基Aib2、Aib16及K20以外的使用標準單字母胺基酸代碼描繪之實例6之結構，其中該等胺基酸殘基之結構已被放大：



藉由使用在Symphony自動肽合成儀(PTI Protein Technologies Inc.)上進行之Fmoc/t-Bu策略，從Fmoc-L-Glu(OtBu)-Wang樹脂(NovaBiochem目錄項# 856008；初始負載量 0.51 mmol/g)開始之固相肽合成且在25℃下使用6當量用二異丙基碳化二亞胺(DIC)及羥基苯并三唑(HOBt)活化之胺基酸(1:1:1莫耳比)在二甲基甲醯胺(DMF)中偶合90 min來生成根據實例6之肽。

對於Trp25(4 h)、Ala24(4 h)、Val23(10 h)、Glu21(4 h)、Aib16(4 h)、Asp15(4 h)、Thr7(4 h)、Thr5(4 h)、Gln3(4 h)及Aib2(24 h)需要延長偶合來提高粗肽品質。對於Lys20偶合使用Fmoc-Lys(Alloc)-OH建構嵌段(正交保護基)以使得脂肪酸部分在合成方法中後期定點連接上(4 h偶合時間)。採用如上所述的DIC-HOBt方案(24 h偶合)併入N端殘基為Boc-Tyr(tBu)-OH。

完成上述肽-樹脂之延長後，使用催化量之 $\text{Pd(PPh}_3)_4$ 於存在 PhSiH_3 作為清除劑下脫去存在於Lys20中之Alloc保護基。使用Fmoc/t-Bu策略以延伸Lys20側鏈之其他偶合/脫去保護基循環涉及Fmoc-NH-PEG₂-CH₂COOH(ChemPep 目錄號280102)、Fmoc-Glu(OH)-OtBu(ChemPep 目錄號100703)及HOOC-(CH₂)₁₆-COOtBu。在所有偶合中，在25℃下使用3

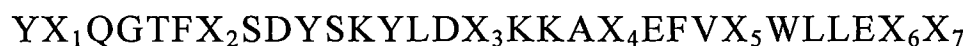
當量的建構嵌段與PyBOP(3 equiv)及DIEA(6 equiv)於DMF中4 h。

於25℃下，在包含三氟乙酸(TFA):三異丙基矽烷:1,2-乙二硫醇:水:苯甲硫醚 90:4:2:2:2(v/v)之溶液中同時進行自樹脂裂解及脫去側鏈保護基2 h，接著用冷醚沉澱。藉由逆相HPLC層析以水/乙腈(含有0.05% v/v TFA)梯度在C18管柱上將粗肽純化至>99%純度(15至20%純化產率)，於該C18管柱收集適宜的溶離份並凍乾。

在基本上如上所述進行的合成中，藉由分析型逆相HPLC檢驗實例6之純度，且使用LC/MS證實同一性(觀測值： $M+3H^+/3 = 1382.7$ ；計算值 $M+3H^+/3 = 1383.3$ ；觀測值： $M+4H^+/4 = 1036.6$ ；計算值 $M+4H^+/4 = 1037.7$)。

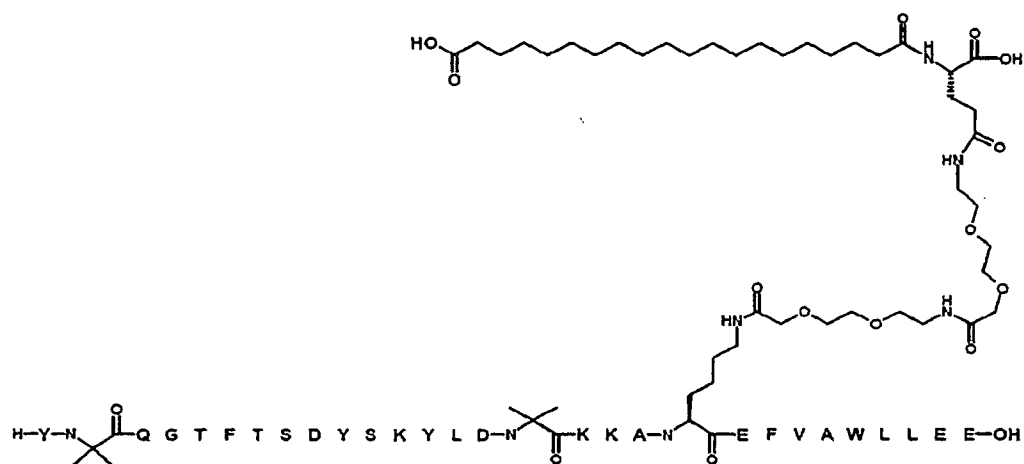
實例7

實例7係由以下描述表示之升糖素受體促效劑：



其中 X_1 為Aib； X_2 為T； X_3 為Aib； X_4 為K，其係經由用([2-(2-胺基乙氧基)乙氧基]乙醯基)₂-(γ Glu)_a-CO-(CH₂)_b-CO₂H共軛接合至K側鏈之 ϵ -胺基進行化學修飾；a為1；b為18； X_5 為A； X_6 為E；且 X_7 係不存在的；且C端胺基酸為C端酸(SEQ ID NO:12)。

以下係除了殘基Aib2、Aib16及K20以外的使用標準單字母胺基酸代碼描繪之實例7之結構，其中該等胺基酸殘基之結構已被放大：



類似如上文在實例6中所述合成根據實例7之肽。在25℃下，使用3當量的建構嵌段與PyBOP(3 equiv)及DIEA(6 equiv)於DMF中4 h，來併入HOOC-(CH₂)₁₈-COOtBu。

在基本上如上文在實例6中所述進行的合成中，藉由分析型逆相HPLC檢驗實例7之純度，且使用LC/MS證實同一性(觀測值： $M+3H^+/3=1391.8$ ；計算值 $M+3H^+/3=1392.6$ ；觀測值： $M+4H^+/4=1044.3$ ；計算值 $M+4H^+/4=1044.7$)。

活體外功能

結合親和力

測定實例1至7之肽對重組人類升糖素受體(hGcg-R)、小鼠升糖素受體(mGcg-R)及大鼠升糖素受體(rGcg-R)之結合親和力。運行使用鄰近閃爍分析(SPA)法及自過度表現hGcg-R、mGcg-R或rGcg-R之經293HEK穩定轉染之細胞製備的膜之放射性配體競爭結合分析以測定實例1至7之肽之平衡解離常數(K_i)。下文描述實驗方案及結果。

人類Gcg受體結合分析使用經選殖之hGcg-R(Lok, S等人, Gene 140 (2), 203-209 (1994))，其係從過度表現重組hGcg-R之293HEK細胞單離得到。該hGcg-R cDNA係經次選殖進入表現質體pHD中(Trans-activated

expression of fully gamma-carboxylated recombinant human protein C, an antithrombotic factor. Grinnell, BW等人, Bio/Technology 5: 1189-1192 (1987))。該質體DNA經轉染進入293HEK細胞中且用200 $\mu\text{g/mL}$ 潮黴素進行篩選。

小鼠Gcg受體結合分析使用從293HEK膜單離得到的經選殖之小鼠升糖素受體(mGcgR)(Burcelin R、Li J、Charron MJ. Gene 164 (2), 305-10 (1995) GenBank: L38613)。該mGcgR cDNA經次選殖進入表現質體pcDNA3.1(Promega)-ZeoR中。該質體DNA經轉染進入293HEK細胞中及使用100 $\mu\text{g/mL}$ 爭光黴素(Zeocin)篩選之純系。

大鼠Gcg受體結合分析使用在從瞬態表現rGcg-R之293HEK細胞單離得到的膜中經選殖之大鼠升糖素受體(rGcg-R)(Svoboda, M、Ciccarelli, E、Tastenoy, M、Robberecht, P、Christophe, J. A cDNA construct allowing the expression of rat hepatic glucagon receptors. Biochem. Biophys. Res. Commun. 192 (1), 135-142 (1993), GenBank: L04796)。該rGcg-R cDNA經次選殖進入表現質體pcDNA3.1(Promega)-ZeoR中。該質體DNA經轉染進入293HEK細胞中並瞬態表現48小時。

使用從黏附培養物獲得的細胞製備粗質膜。於冰上在含有50 mM Tris HCl, pH 7.5及具有EDTA之Roche Complete™蛋白酶抑制劑之低滲緩衝液中裂解該等細胞。使用安裝有Teflon®研杵之玻璃Potter-Elvehjem均質機破壞細胞懸浮液持續25個衝程。在4℃下以1100 x g離心勻漿10分鐘。收集上清液並儲存在冰上同時將顆粒物再懸浮於低滲緩衝液中並再均質化。以1100 x g離心該混合物10分鐘。將第二上清液與第一上清液合併並在4℃下以35000 x g離心1小時。將膜顆粒物再懸浮於含有蛋白酶抑制

劑之均質化緩衝液中，在液氮中快速冷凍並呈等分試樣儲存在-80℃冷凍機中直至使用。

藉由I-125-乳過氧化酶程序將Gcg放射性碘化並藉由在Perkin-Elmer(NEX207)之逆相HPLC純化。比活性為2200 Ci/mmol。藉由勻相競爭或飽和結合分析進行 K_D 之測定。估計人類Gcg-R之 K_D 為3.92 nM且將其用於計算在hGcg-R分析中所測試的所有化合物之 K_i 值。估計小鼠Gcg-R之 K_D 為3.52 nM且將其用於計算在mGcg-R分析中所測試的所有化合物之 K_i 值。估計大鼠Gcg-R之 K_D 為21.4 nM且將其用於計算在rGcg-R分析中所測試的所有化合物之 K_i 值。

使用具有小麥胚芽凝集素(WGA)珠粒之鄰近閃爍分析(SPA)格式(Perkin Elmer)進行受體結合分析。結合緩衝液含有25 mM 4-(2-羥乙基)-1-哌嗪乙磺酸(HEPES)(pH 7.4)、2.5 mM CaCl_2 、1 mM MgCl_2 、0.1%(w/v)桿菌肽(bacitracin)(Affymetrix)、0.003%(w/v)聚氧乙烯山梨糖醇酐單月桂酸酯(TWEEN®-20)及無EDTA之Roche Complete™蛋白酶抑制劑。將Gcg(Eli Lilly and Company)溶解於3.48 mg/mL (1 mM) DMSO中並以100 μL 等分試樣冷凍儲存在-20℃。稀釋Gcg等分試樣且在一小時內用於結合分析中。將肽類似物溶解於DMSO中並在100% DMSO中連續3倍稀釋。接下來，將5 μL 經連續稀釋之化合物或DMSO轉移至裝納45 μL 分析結合緩衝液或未標記之Gcg對照物(NSB之最終濃度為1 μM)之Corning® 3632透明底分析板中。接著，添加50 μL hGcg-R(1.5 $\mu\text{g}/\text{孔}$)、mGcg-R(6.47 $\mu\text{g}/\text{孔}$)或rGcg-R膜(1.5 $\mu\text{g}/\text{孔}$)、50 μL I-125 Gcg(反應中之最終濃度為0.15 nM)及50 μL WGA珠粒(150 $\mu\text{g}/\text{孔}$)，密封該等板並在板振盪器(設置6)上混合1分鐘。在室溫經過12小時的沉降後，用

PerkinElmer Trilux MicroBeta®閃爍計數器讀取該等板。結果係計算為存在化合物下特異性I-125-Gcg結合之百分比。藉由I-125-Gcg之特異性結合百分比對所添加的化合物之濃度之非線性回歸導出化合物之絕對IC₅₀濃度。使用 Cheng-Prusoff 等式 (Cheng, Y.、Prusoff, W. H., Biochem. Pharmacol. 22, 3099-3108, (1973))將IC₅₀濃度換算成K_i。

實例1至7之肽及人類Gcg在hGcg-R、mGcg-R及rGcg-R處之K_i示於下表1中。

表1.

	hGcg-R K _i , nM ± SEM, (n)	mGcg-R K _i , nM ± SEM, (n)	rGcg-R K _i , nM ± SEM, (n)
實例1	2.04 ± 1.02 (n=2)	1.92 ± 0.71 (n=2)	9.78 ± 0.22 (n=2)
實例2	1.07 ± 0.16 (n=2)	0.991 ± 0.066 (n=2)	5.59 ± 0.24 (n=2)
實例3	0.287 ± 0.171 (n=2)	0.174 (n=1)	1.56 ± 0.13 (n=2)
實例4	0.738 (n=1)	0.774 (n=1)	5.86 (n=1)
實例5	1.59 (n=1)	1.58 (n=1)	4.36 (n=1)
實例6	0.316 (n=1)	0.123 (n=1)	0.98 (n=1)
實例7	0.673 (n=1)	0.753 (n=1)	1.38 (n=1)
人類升糖素	3.64 ± 0.91 (n=3)	2.41 ± 0.22 (n=3)	23.3 ± 1.7 (n=3)

該等資料指示本發明升糖素受體促效劑在三種不同物種(人類、小鼠及大鼠受體)中以類似於或大於人類升糖素之親和力結合至升糖素受體。

功能活性及選擇性

藉由在表現人類升糖素受體(hGcg-R)、人類升糖素樣肽-1受體(hGLP-1R)或人類胃抑制肽(亦稱為葡萄糖依賴性促胰島素多肽受體, hGIP-R)之HEK293細胞中定量細胞內cAMP來測定功能活性及選擇性。實驗方案及結果述於下文中。

hGcg-R功能cAMP分析使用表現經選殖之hGcg-R之293HEK細胞(Lok, S等人, Gene 140 (2), 203-209 (1994))。hGcg-R cDNA經次選殖進

入表現質體 pH₈ 中 (Trans-activated expression of fully gamma-carboxylated recombinant human protein C, an antithrombotic factor. Grinnell, BW等人, Bio/Technology 5: 1189-1192 (1987))。該質體DNA經轉染進入293HEK細胞中並用200 µg/mL潮黴素篩選細胞。

hGLP-1-R功能cAMP分析使用表現經選殖之hGLP-1-R之293HEK細胞(Graziano MP、Hey PJ、Borkowski D、Chicchi GG、Strader CD, Biochem Biophys Res Commun. 196(1):141-6, 1993)。hGLP-1R cDNA經次選殖進入表現質體 pH₈ 中 (Trans-activated expression of fully gamma-carboxylated recombinant human protein C, an antithrombotic factor. Grinnell, B.W.、Berg, D.T.、Walls, J. 及 Yan, S.B. Bio/Technology 5: 1189-1192, 1987)。該質體DNA經轉染進入293HEK細胞中且用200 µg/mL潮黴素篩選該等細胞。

hGIP-R功能分析使用經選殖進入pcDNA3.1(Promega)-NeoR質體中之hGIP-R(Usdin, T.B.、Gruber, C.、Modi, W.及Bonner, T.I., GenBank: AAA84418.1)。該hGIP-R-pcDNA3.1/Neo質體經轉染進入中國倉鼠卵巢細胞 CHO-S 中，進行懸浮培養，並於 500 µg/mL 遺傳黴素 (Geneticin)(Invitrogen)存在下篩選。

使用含於補充有1X GlutaMAX™(L-丙胺鹽基-L-麩醯胺酸二肽之0.85% NaCl溶液，Gibco目錄號35050)、0.1%酪蛋白(Sigma目錄號C4765)、250 µM IBMX(3-異丁基-1-甲基黃嘌呤)及20 mM HEPES [N-(2-羥乙基)哌嗪-N'-(2-乙磺酸)，HyClone目錄號SH30237.01]之DMEM(杜貝卡氏改良依格培養基(Dulbecco's Modified Eagle Medium)，Gibco目錄號31053)中之肽，以40 µL分析體積處理各種受體過度表現細

胞系。在室溫下培養60分鐘後，使用CisBio cAMP Dynamic 2 HTRF分析套組(CisBio 62AM4PEC)定量測定所得之細胞內cAMP(3',5'-環狀單磷酸腺苷)的增量。藉由在細胞溶菌緩衝液(20 μL)中添加cAMP-d2共軛物，接著添加抗體抗-cAMP-Eu³⁺-穴狀化合物(亦含於細胞溶菌緩衝液(20 μL)中)來偵測細胞中之cAMP含量。在室溫下培養所得的競爭性分析至少60 min，接著使用PerkinElmer Envision[®]儀器在320 nm激發及在665 nm及620 nm發射下進行檢測。Envision單位(在665 nm/620 nm之發射 * 10,000)與存在之cAMP含量成反比，並使用cAMP標準曲線換算成每孔cAMP的nM。將每一孔中所產生的cAMP含量(nM)換算成用10 nM人類GLP-1(7-36)NH₂(hGLP-1R分析)、10 nM人類Gcg(hGcg-R分析)或10 nM人類GIP(1-42)NH₂(hGIP-R分析)中任一者所觀察到的最大反應百分比。藉由擬合至四參數邏輯方程式之非線性回歸分析，利用最大反應百分比相對於所添加的肽濃度，推算出相對EC₅₀值及最大百分比(E_{max})。

實例1至7、人類GIP(1-42)NH₂、人類GLP-1(7-36)NH₂及人類Gcg之功能數據示於下表2中。EC₅₀之平均值以幾何平均值 ± 平均值標準誤差(SEM)表示，圓括號內指示重複次數(n)。(>) 限定符號指示效率%未達到50%，及EC₅₀計算值係利用所測試的最高濃度得到。

表2.

	hGcg-R EC ₅₀ , nM ± SEM , (n)	hGlp-1R EC ₅₀ , nM ± SEM , (n)	hGIP-R EC ₅₀ , nM ± SEM , (n)
實例1	0.00436 ± 0.00079 (n=4)	73.9 ± 19.6 (n=2)	>500 (n=3)
實例2	0.0112 ± 0.0025 (n=3)	>100 (n=2)	>500 (n=3)
實例3	0.00340 ± 0.00010 (n=2)	>100 (n=2)	>500 (n=3)
實例4	0.00278 ± 0.00010 (n=2)	19.0 ± 8.2 (n=2)	>500 (n=3)

實例5	0.0160 ± 0.0038 (n=2)	27.0 ± 4.5 (n=2)	>500 (n=3)
實例6	0.00413 ± 0.00026 (n=2)	>100 (n=3)	>500 (n=3)
實例7	0.0166 ± 0.0004 (n=2)	>100 (n=3)	>500 (n=3)
人類升糖素	0.00760 ± 0.00101 (n=7)	7.70 ± 1.03 (n=2)	>500 (n=3)
人類 GLP-1	>10 (n=1)	0.076 ± 0.017 (n=2)	>500 (n=3)
人類GIP	>10 (n=1)	>10 (n=1)	0.145 ± 0.041 (n=3)

該等資料指示本發明升糖素受體促效劑在升糖素受體處具有如人類升糖素之相似效力，而相對GLP-1受體及GIP受體之選擇性增加。

藥物動力學

大鼠中之藥物動力學

對雄性斯潑累格多雷(Sprague Dawley)大鼠投與一實例化合物以1 mL/kg體積含在Tris緩衝液(pH 8.0)中之皮下單劑量(100 nmole/kg)。在給藥後1小時、6小時、12小時、24小時、48小時、72小時、96小時、120小時、144小時、168小時、192小時及240小時時從每隻動物採集血液。

藉由LC/MS方法測定化合物之血漿濃度。用各方法測量完整肽(肽加上連接時間延長)。對於每次分析，從100%大鼠或猴血漿(50 μ l)使用甲醇及0.1%甲酸萃取化合物及用作內標準(IS)之類似物。在離心後形成兩個不同層，其中化合物及IS位於上清液中。取上清液的275 μ l等分試樣轉移至熱蛋白質沉澱板，於該處施加真空以收集通過進入96孔板中之液流。

用經加熱之氮氣乾燥樣品以移除上清液。將150 μ l體積之30%乙腈及5%甲酸添加至孔以將該等樣品復水。將所注入樣品(20 μ l)加載至Supelco分析型Discovery BIO寬孔徑C5-3, 5 cm X 0.1 mm, 3 μ m管柱上。導引管柱流出物進入Thermo Q-Exactive質譜儀中以進行檢測及定量。

100 nmol/kg皮下單劑量投與給雄性斯潑累格多雷大鼠後的平均藥物動力學參數示於下表3中(就實例1、2及5而言 $n=3$ 且就實例3及4而言 T_{max} 及 C_{max} ；就實例3及4而言， $n=2$ 針對於 $T_{1/2}$ ， AUC_{0-inf} 及 CL/F)。

表3.

化合物	$T_{1/2}$ (hr)	T_{max} (hr)	C_{max} (nmole/L)	AUC_{0-inf} (hr*nmole/L)	CL/F (mL/hr/kg)
實例1	13	8	425	11692	8.8
實例2	22	24	346	21329	4.7
實例3	11	8	394	11133	9.2
實例4	16	6	257	5948	17.0
實例5	22	24	237	12948	7.8

縮寫： AUC_{0-inf} = 從0至無窮大之曲線下面積， CL/F = 清除率/生物可利用率， T_{max} = 至最大濃度之時間， C_{max} = 最大血漿濃度， $T_{1/2}$ = 半衰期，ND = 無資料。

該等資料顯示實例1至5相對於天然人類升糖素(其具有約30分鐘之 $T_{1/2}$)具有延長之作用持續時間。

石蟹獼猴中之藥物動力學

對雄性石蟹獼猴投與測試化合物以0.25 mL/kg之體積含在Tris緩衝液(pH 8.0)中之靜脈內單劑量(50 nmole/kg)或皮下單劑量 (50 nmole/kg)。在給藥後0.5小時(僅IV)、6小時、12小時、24小時、48小時、72小時、96小時、120小時、168小時、192小時、240小時、336小時、480小時、576小時、及672小時時從每隻動物採集血液。由一般如上文在斯潑累格多雷大鼠研究所述之LC/MS方法來測定化合物之血漿濃度。

平均($n=2$)藥物動力學參數提供於下表4中。

表4.

化合物 (途徑/劑 量)	動物_ID	T _{1/2} (hr)	T _{max} (hr)	C ₀ 或C _{max} (nmole/L)	AUC _{0-inf} (hr*nmole/L)	CL或CL/F (mL/hr/kg)
實例1 (IV 50 nmol/kg)	平均值	2	NA	1182	37278	1.36
實例1 (SC 50 nmol/kg)	平均值	44	9	425	31821	1.57
實例2 (SC 50 nmol/k)	平均值	79	18	377	46292	1.08

縮寫：AUC_{0-inf} = 從0至無窮大之曲線下面積，CL = 清除率，CL/F = 清除率/生物可利用率，T_{max} = 至最大濃度之時間，C₀ = 外推至時間0小時之濃度，C_{max} = 最大血漿濃度，T_{1/2} = 半衰期，NA = 不適用。

該等資料顯示實例1及2相對於天然人類升糖素(其具有小於一小時之T_{1/2})具有延長之作用持續時間。

活體內研究

連續監測大鼠中之葡萄糖

將 12 至 14 週齡正常雄性斯潑雷格多雷大鼠 (HARLANTM，Indianapolis, IN) 個別圈養在具有12小時光照/黑暗週期之溫度受控(24℃)設施中且自由取得食物(TD2014 TEKLAD GLOBAL RODENT DIET®、HARLANTM實驗室，Indianapolis, IN)與水。適應該設施2週後，對大鼠植入HD-XG發射機(Data Sciences International, St Paul, MN)。

在2%至3%異氟烷(2-氯-2-(二氟甲氧基)-1,1,1-三氟乙烷)麻醉下進行發射機植入手術。將發射機之葡萄糖感測器置於降主動脈中。將發射機之溫度感測器與發射機本體一起置於腹腔中。於發射機植入手術七天後，將所有大鼠置於遙測接收器上以1分鐘時間間隔連續記錄血糖及核心體溫測量值，同時該等大鼠在其籠子中自由地運動。控制資料之獲取並藉由

DATAQUEST A.R.T.TM系統軟體(Data Sciences International, St Paul, MN)分析。在手術7天後，藉由腹膜內葡萄糖耐受性測試(ipGTT)達成葡萄糖感測器之初始校準且每隔一天經由通過尾部血液之葡萄糖測量值進行後續校準。從手術後第9天至第11天開始，藉由皮下注射投與含於20 mM Tris-HCl緩衝液(pH 8.0，1 mL/Kg體重)中之10 nmol/kg劑量之測試化合物一次。長達7天監測血糖含量。

血糖資料指示實例1至7分別導致血糖含量依劑量依賴性方式持續增加。

物理及化學特性

溶解度與穩定性

以5 mg/mL在H₂O中製得實例1至6之樣品並如所述透析至緩衝液C6N(10 mM檸檬酸鹽、100 mM NaCl，pH 6)、C7N(10 mM檸檬酸鹽、100 mM NaCl，pH 7)、H6.5N(10 mM組胺酸、100 mM NaCl，pH 6.5)及H7.5N(10 mM組胺酸、100 mM NaCl，pH 7.5)中。如所述將樣品濃縮至10 mg/mL肽並保持在4℃達一週。如所述目測並藉由SEC-HPLC評估樣品。

在4℃下一週後，以所有調配物形式之實例1至6為透明且無色。SEC-HPLC資料提供於表5中。未發生高分子量(HMW)聚合物顯著生長或主峰消失。實例1至6之SEC-HPLC回收率在5%以內。

表5.

緩衝液	HMW峰Δ%				
	實例1	實例2	實例3	實例4	實例6
C6N	0.13	-0.03	-0.01	0.64	-0.03
C7N	0	-0.06	0.16	0.26	-0.26
H6.5N	-0.02	0.06	-0.03	0.35	0.11
H7.5N	0.35	-0.15	-0.09	0.44	0.14
緩衝液	主峰Δ%				

	實例1	實例2	實例3	實例4	實例6
C6N	-0.02	0.08	0.08	-3.42	-0.98
C7N	0.26	-0.26	-0.18	-1.19	0.36
H6.5N	-0.39	-1.28	-0.58	-2.88	-1.17
H7.5N	-1.43	-0.87	-1.21	-0.79	-1.68

亦以三種其他調配物評估實例1至2之溶解度：T7(10 mM Tris-HCl, pH 7)、T7Tm(10 mM Tris-HCl、0.02%聚山梨糖醇酯-20、29 mM間甲酚，pH 7)及T7Nm(10 mM Tris-HCl、100 mM NaCl、29 mM間甲酚，pH 7)。在T7中如所述經由透析製得化合物。如所述，以2 mg/mL在T7、T7Tm或T7Nm中調配樣品，接著濃縮至10 mg/mL肽。在4℃下保持調配物一週且如所述目測並藉由SEC-HPLC及RP-HPLC評估。

所有調配物仍係透明且無色的。SEC-HPLC及RP-HPLC資料係在表6中。任何調配物之HMW聚合物生長不超過0.2%。所有調配物之RP-HPLC峰回收率在5%以內。

表6.

肽	調配物	HMW Δ%
實例1	T7m	0.1
	T7Nm	0.05
	T7Tm	0.18
實例2	T7m	0.1
	T7Nm	0.08
	T7Tm	0.07

該等資料指示實例1至6在不同緩衝液條件下具有可接受之溶解度性質。

化學穩定性

在各種pH值之不同緩衝液中測定實例1之化學穩定性。在H₂O中製備5 mg/mL濃度之樣品，在4℃下使用Slide-A-Lyzer透析盒，2000

MWCO(部件號66203)透析過夜至受關注緩衝液中，透過0.22 μm 過濾器(Millex, SLGV013SL)過濾，接著在各自緩衝液中稀釋至1 mg/mL。緩衝液組成為10 mM Tris-HCl之 H_2O 溶液 pH 8 (T8)、10 mM Tris-HCl之 H_2O 溶液 pH 7(T7)、10 mM組胺酸之 H_2O 溶液 pH 7(H7)或10 mM檸檬酸鹽之 H_2O 溶液 pH 6(C6)。將各1 mg/mL樣品轉移至三個小瓶。將樣品維持在4 $^{\circ}\text{C}$ 、25 $^{\circ}\text{C}$ 及40 $^{\circ}\text{C}$ 。總共四週每兩週評估樣品。目測評估樣品之濁度及相分離。藉由分析型逆相HPLC(RP-HPLC)在經60 $^{\circ}\text{C}$ 加熱之Waters Symmetry Shield RP18, 3.5 μm , 4.6 X 100 mm管柱(部件號18600179)上用歷時3 min為10% B等濃度，歷時3 min為30% B，歷時30 min從30% B變為60% B及歷時2 min變為95% B之AB(A=0.1% TFA/ H_2O ，B=0.085% TFA/乙腈)梯度以流速0.9 mL/min(波長為214 nm)評估化合物之穩定性。亦藉由尺寸排除HPLC(SEC-HPLC)在胰島素HMWP，7.8 X 300 mm管柱(部件號WAT2015549)上用20 mM磷酸鈉、20%乙腈，pH 7.2之運行緩衝液以0.5 mL/min之流速運行40 min來評估穩定性。

物理外觀係透明至無色，且實例1在pH 7及pH 8下無乳白色或顆粒。RP-HPLC及SEC-HPLC結果概述於下表7中。由RP-HPLC及SEC-HPLC之回收率在5%以內，這係可接受的。

表7.

溫度	4週時藉由RP得到的主峰Δ%			
	T8	T7	H7	C6
4℃	3.13%	2.52%	1.73%	2.01%
25℃	4.84%	2.92%	0.12%	3.05%
40℃	1.41%	1.74%	8.69%	3.61%
溫度	4週時藉由SEC得到的主峰Δ%			
	T8	T7	H7	C6
4℃	0.21%	0.6%	1.77%	0.31%
25℃	0.17%	0.1%	3.1%	8.72%
40℃	0.65%	0.97%	1.22%	1.17%

亦藉由液相層析-質譜法(LC-MS)分析保持在4℃及40℃下四週的在T8緩衝液中之樣品。實例1在pH 8下未識別到降解之主要位點。總之，實例1之化學穩定性指示在所測試緩衝液條件下極佳的穩定性。

物理穩定性

透過在T7緩衝液中透析，接著如所述以2 mg/mL肽在T7m、T7Nm及T7Tm中調配製得實例1之測試樣品。將各調配物轉移至乾淨玻璃小瓶並在室溫下以400 rpm經由塗佈鐵氟龍(Teflon)之磁性攪拌子攪拌6小時。取100 μL之等分試樣以用於在時間0、1小時、3小時及6小時時之評估。如前文目測並藉由SEC-HPLC評估樣品。

所有調配物仍係透明且無色的，未出現乳白色或沉澱。如表8中所顯示，所有調配物之SEC-HPLC之主峰中肽之百分比仍在5%以內。資料指明實例1在所測試條件下具有良好的物理穩定性特性。

表8.

調配物	主峰%			
	時間0	1小時	3小時	6小時
T7m	95.94	96.02	96.18	95.69
T7Nm	95.39	95.45	95.43	95.43
T7Tm	96.21	96.12	96.27	96.18

組合研究

與GIP-GLP-1共促效劑或GLP-1R促效劑之共調配物中之活性

如下文在穩定性研究所述製備實例1及3與SEQ ID NO:15之GIP-GLP-1共促效劑或杜拉魯肽之共調配物，且使用上文所述的方法測定個別化合物及共調配物之活性。資料顯示於表9及10中。(>)限定符指示效率%未達到50%及EC₅₀計算值係利用所測試的最高濃度得到。

表9.

治療	樣品條件	EC ₅₀ (N = 2之平均值± 標準偏差，*N = 1)		
		Gcg受體檢定	GLP-1受體檢定	GIP受體檢定
實例3	T7-4C-4wk	14.3 ± 3.4 pM	> 100 nM	> 100 nM
	T7-40C-4wk	24.9 ± 2.9 pM	> 100 nM	> 100 nM
	T7m-4C-4wk	21.1 ± 4.0 pM	> 100 nM	> 100 nM
	T7m-40C-4wk	21.1 ± 5.1 pM	> 100 nM	> 100 nM
實例3 + GIP-GLP-1 共促效劑	T7-4C-4wk	21.3 ± 2.5 pM	1.47 nM*	0.65 nM*
	T7-40C-4wk	21.9 ± 0.4 pM	2.66 nM*	0.74 nM*
	T7m-4C-4wk	16.0 ± 3.4 pM	3.08 nM*	0.71 nM*
	T7m-40C-4wk	24.2 ± 0.5 pM	2.61 nM*	0.40 nM*
實例1	T7-4C-4wk	20.3 ± 2.5 pM	> 100 nM	> 100 nM
	T7-40C-4wk	21.7 ± 3.4 pM	57.53 nM*	> 100 nM
	T7m-4C-4wk	23.0 ± 0.3 pM	43.83 nM*	> 100 nM
	T7m-40C-4wk	19.4 ± 5.0 pM	49.66 nM*	> 100 nM
實例1 + GIP-GLP-1 共促效劑	T7-4C-4wk	23.7 ± 0.7 pM	1.78 nM*	0.49 ± 0.16 nM
	T7-40C-4wk	19.2 ± 2.4 pM	1.65 nM*	0.60 ± 0.21 nM
	T7m-4C-4wk	16.5 ± 1.8 pM	1.41 nM*	0.39 ± 0.06 nM
	T7m-40C-4wk	18.7 ± 0.6 pM	1.21 nM*	0.36 ± 0.34 nM
GIP-GLP-1 共促效劑	T7-4C-4wk	> 100 nM	2.56 nM*	0.70 nM*
	T7-40C-4wk	> 100 nM	2.76 nM*	0.41 nM*
	T7m-4C-4wk	> 100 nM	1.61 nM*	0.30 ± 0.19 nM
	T7m-40C-4wk	> 100 nM	0.73 nM*	0.15 ± 0.02 nM

表10.

肽	樣品條件	EC ₅₀ (N = 2之平均值± 標準偏差)		
		Gcg受體分析	GLP-1受體分析	GIP受體分析
實例 1	C6.5-4C-4wk	17.8 ± 6.8 pM	41.6 ± 5.0 nM	> 100 nM
	C6.5-40C-4wk	24.3 ± 11.1 pM	54.6 ± 46.2 nM	> 100 nM
	C6.5MT-4C-4wk	18.8 ± 1.8 pM	55.6 ± 9.2 nM	> 100 nM
	C6.5MT-40C-4wk	14.6 ± 5.0 pM	47.9 ± 5.8 nM	> 100 nM
實例 3	C6.5-4C-4wk	36.9 ± 29.6 pM	> 100 nM	> 100 nM
	C6.5-40C-4wk	25.7 ± 6.9 pM	> 100 nM	> 100 nM
	C6.5MT-4C-4wk	19.3 ± 1.1 pM	> 100 nM	> 100 nM
	C6.5MT-40C-4wk	21.4 ± 3.1 pM	> 100 nM	> 100 nM
實例 1 + 杜拉魯肽	C6.5MT-4C-4wk	14.6 ± 0.8 pM	0.36 ± 0.01 nM	> 100 nM
	C6.5MT-40C-4wk	15.2 ± 6.4 pM	0.37 ± 0.00 nM	> 100 nM
實例 3 + 杜拉魯肽	C6.5MT-4C-4wk	22.7 ± 5.2 pM	0.57 ± 0.25 nM	> 100 nM
	C6.5MT-40C-4wk	22.6 ± 2.1 pM	0.30 ± 0.01 nM	> 100 nM
杜拉魯肽	C6.5-4C-4wk	51.9 ± 68.1 nM	0.37 ± 0.11 nM	> 100 nM
	C6.5-40C-4wk	> 100 nM	0.31 ± 0.17 nM	> 100 nM
	C6.5MT-4C-4wk	54.0 ± 65.0 nM	0.40 ± 0.14 nM	> 100 nM
	C6.5MT-40C-4wk	> 100 nM	0.29 ± 0.09 nM	> 100 nM

該等資料指示在應力及非應力條件下及/或組合GLP-1R促效劑或GIP-GLP-1共促效劑下維持實例1及3之生物活性。

與GLP-1R促效劑或GIP-GLP-1共促效劑之組合之活體內研究

在C57/BL6飲食誘發性肥胖(DIO)小鼠中測試本發明升糖素受體促效劑與長效GLP-1R促效劑或GIP-GLP-1共促效劑之組合之效應。GIP-GLP-1共促效劑具有如上所述之SEQ ID NO:14之結構。GLP-1R促效劑為WO2005000892中所述之GLP-1-Fc融合體。一般如下文在共調配物穩定性研究所述來製備共調配物。

雖然C57/BL6 DIO動物係非糖尿病性，但在以高脂肪(60%千卡來自脂肪)飲食飼養12週後仍可能呈現胰島素抗性、血脂異常、及肝脂肪變性、代謝症候群之所有特徵。因此，在該等動物中之研究可用於調查所提

出的治療劑對於參數諸如體重損失、身體組成及肝脂肪變性之效應。

使用稱得體重為42至47 g且具有範圍自11.9 g至17.2 g之初始脂肪質量之20至21週齡雄性DIO C57/B16雄性小鼠。將動物個別地圈養在具有12小時光照/黑暗週期(22:00開燈)之溫度受控(24°C)的設施中，可自由取得食物與水。適應該設施2週後，根據體重將該等小鼠隨機分成治療組(n=5/組)，因此各個組具有相似的起始平均體重。

每三天在開始黑暗週期前30至90分鐘期間藉由SC注射投與媒劑、已溶於媒劑(20 mM Tris-HCl緩衝液，pH 8.0)中之測試化合物(劑量範圍為3至10 nmol/kg)、GLP-1R促效劑(10 nmol/kg)、GIP-GLP-1共促效劑(10 nmol/kg)或其組合(劑量範圍為3至10 nmol/kg)至隨意餵養之小鼠連續15天。在第1天、第4天、第7天、第10天及第13天進行SC注射。在整個研究中每天測量體重、食物攝入及葡萄糖。藉由減去同一動物在第一次注射分子前之體重計算得絕對體重變化。在第0天及第14天，藉由利用Echo醫學系統(Houston, TX)儀器之核磁共振(NMR)測得總脂肪質量。

每天用Accu-Chek血糖儀(Roche)測量尾靜脈血之血糖。研究結束時，將動物殺死且取出肝臟並冷凍。從殺死時所收集的肝臟勻漿測定肝臟三酸甘油酯，及在Hitachi Modular P臨床分析儀上測量血漿膽固醇。利用單因子ANOVA接著鄧恩多重比較試驗(Dunnett's multiple comparison test)完成各組間之統計學比較。在GraphPad Prism中使用非線性擬合工具測定體重損失降低之ED₅₀值。

如上文所述實施的研究之體重損失及脂肪質量改變百分比資料提供於下表11(實例1)及12(實例1及2)中。表11中之結果表示為每組5隻小鼠之平均值 ± SEM，表12中之結果表示為每組6隻小鼠之平均值 ± SEM。

與單單實例1或2、GLP-1R促效劑或GIP-GLP-1共促效劑之效應相比，實例1及2與GLP-1R促效劑或GIP-GLP-1共促效劑中任一者之組合對體重及脂肪質量具有協同效應(表11及12)。

表11.

治療	劑量(nmol/kg)	自起始體重之改變%	自起始脂肪質量之改變%
媒劑	0	-3.72 ± 1.169	-4.39 ± 1.84
實例1	3	-6.07 ± 1.81	-9.60 ± 3.35
實例1	10	-10.56 ± 1.78	-18.12 ± 3.40*
GLP1-R促效劑	10	-15.54 ± 1.67**	-28.32 ± 2.94***
GLP1-R促效劑 + 實例1	10+3	-26.57 ± 2.05****	-49.88 ± 3.87****
GLP1-R促效劑 + 實例1	10+10	-30.78 ± 1.97****	-62.22 ± 4.10****
GIP-GLP-1共促效劑	10	-23.67 ± 1.83****	-48.21 ± 4.67****
GIP-GLP-1共促效劑 + 實例1	10+3	-34.83 ± 3.60****	-68.99 ± 4.05****
GIP-GLP-1共促效劑 + 實例1	10+10	-43.06 ± 2.49****	-82.06 ± 1.41****

*p<0.05、**p<0.01、***p<0.001及****p<0.0001表示與媒劑對照組相比為顯著(單因子ANOVA、鄧恩試驗)。

表12.

治療	劑量(nmol/kg)	自起始體重之改變%	自起始脂肪質量之改變%
媒劑	0	1.14 ± 1.02	3.17 ± 1.61
GLP1-R促效劑	10	-10.74 ± 1.42*	-21.52 ± 3.51*
GIP-GLP-1共促效劑	10	-17.76 ± 4.52***	-33.30 ± 7.35****
實例1	3	-1.77 ± 2.08	-2.08 ± 3.59
實例1	10	-3.87 ± 1.41	-6.20 ± 2.90
實例2	3	-0.85 ± 2.71	0.11 ± 5.11
實例2	10	-5.29 ± 0.84	-6.03 ± 1.99
GLP1-R促效劑 + 實例1	10+3	-17.49 ± 2.90***	-34.41 ± 7.38****
GLP1-R促效劑 + 實例1	10+10	-23.49 ± 1.40****	-48.16 ± 4.14****
GLP1-R促效劑 + 實例2	10+3	-14.83 ± 2.43**	-27.21 ± 6.34**
GLP1-R促效劑 + 實例2	10+10	-30.60 ± 4.33****	-55.55 ± 7.93****

GIP-GLP促效劑 + 實例1	10+3	-18.41 ± 1.23****	-39.06 ± 4.13****
GIP-GLP促效劑 + 實例1	10+10	-32.01 ± 3.81****	-65.66 ± 5.92****
GIP-GLP促效劑 + 實例2	10+3	-15.94 ± 1.20***	-33.54 ± 3.43****
GIP-GLP促效劑 + 實例2	10+10	-40.37 ± 4.03****	-76.34 ± 3.11****

*p<0.05、**p<0.01、***p<0.001及****p<0.0001表示與媒劑對照組相比顯著(單因子ANOVA、鄧恩試驗)。

關於對於血糖、血漿膽固醇及肝臟三酸甘油酯之效應之資料提供於下表13(平均值 ± SEM, n=5)及14(平均值 ± SEM, n=6)中。然而, 個別投與的實例1及2以劑量依賴性方式增加血糖, 此等實例升糖素受體促效劑與GLP-1R促效劑或GIP-GLP-1共促效劑中任一者之組合降低血糖、血漿膽固醇及肝臟三酸甘油酯。

表13.

治療	劑量 (nmol/kg)	血糖AUC (mg/dl/15天)	血漿膽固醇 (mg/dl)	肝臟甘油三酸酯 (mg/g組織)
媒劑	0	2224 ± 78.55	228.00 ± 6.50	200.29 ± 33.67
實例1	3	2553 ± 112.5*	207.00 ± 6.43	68.83 ± 5.82****
實例1	10	2607 ± 109.4**	157.80 ± 15.44****	32.94 ± 11.23****
GLP1-R促效劑	10	1565 ± 26.39****	153.40 ± 11.64****	55.01 ± 12.62****
GLP1-R促效劑 + 實例1	10+3	1452 ± 25.48****	96.20 ± 7.86****	20.89 ± 4.39****
GLP1-R促效劑 + 實例1	10+10	1388 ± 80.92****	86.60 ± 3.47****	12.78 ± 1.57****
GIP-GLP-1 共促效劑	10	1453 ± 27.96****	137.80 ± 9.05****	32.60 ± 6.70****
GIP-GLP-1 共促效劑 + 實例1	10+3	1256 ± 111.5****	103.00 ± 3.56****	35.47 ± 15.78****
GIP-GLP-1 共促效劑 + 實例1	10 + 10	1044 ± 63.37****	77.40 ± 10.10****	24.99 ± 13.43****

*p<0.05、**p<0.01、***p<0.001相對於對照組 (單因子ANOVA、鄧恩試驗)。

表 14.

治療	劑量 (nmol/kg)	血糖AUC (mg/dl/15天)	血漿膽固醇 (mg/dl)	肝臟三酸甘油酯 (mg/g組織)
媒劑	0	1806 ± 52.85	224.40 ± 5.12	174.72 ± 26.56
GLP1-R促效劑	10	1189 ± 28.83***	149.50 ± 12.02****	46.06 ± 12.31****
GIP-GLP-1 共 促 效劑	10	1137 ± 63.27****	135.50 ± 7.11****	48.50 ± 7.18****
實例1	3	2080 ± 103.2	230.50 ± 6.61	111.87 ± 22.43**
實例1	10	2491 ± 110.9****	152.83 ± 8.82****	29.42 ± 3.54****
實例2	3	2433 ± 124.7***	201.83 ± 10.11	75.45 ± 12.82****
實例2	10	2641 ± 186.6****	117.67 ± 4.46****	16.33 ± 1.53****
GLP1-R促效劑 + 實例1	10 + 3	1081 ± 56.68****	132.50 ± 19.56****	34.34 ± 6.48****
GLP1-R促效劑 + 實例1	10 + 10	1031 ± 61.29****	83.33 ± 8.50****	25.57 ± 7.27****
GLP1-R促效劑 + 實例2	10 + 3	1098 ± 52.69****	152.00 ± 9.32****	38.99 ± 5.96****
GLP1-R促效劑 + 實例2	10 + 10	1008 ± 107.2****	78.50 ± 6.03****	34.42 ± 14.36****
GIP-GLP-1 共 促 效劑 + 實例1	10 + 3	1142 ± 31.32****	131.83 ± 6.42****	22.48 ± 3.92****
GIP-GLP-1 共 促 效劑 + 實例1	10 + 10	916.9 ± 97.73****	91.67 ± 4.75****	6.99 ± 1.29****
GIP-GLP-1 共 促 效劑 + 實例2	10 + 3	1063 ± 20.89****	119.33 ± 5.79****	22.87 ± 5.94****
GIP-GLP-1 共 促 效劑 + 實例2	10 + 10	801.8 ± 48.21****	90.33 ± 7.89****	17.99 ± 9.65****

*p<0.05、**p<0.01、***p<0.001相對於對照組(單因子ANOVA、鄧恩試驗)。

與GIP-GLP-1共促效劑之共調配物中之穩定性

如所述製備實例1及3之樣品並用T7對其透析。分別以1 mg/mL肽在T7、T7m、T7N及T7Nm中調配這兩個實例。亦如針對實例升糖素受體促效劑所述製備SEQ ID NO:15之GIP-GLP-1共促效劑並用T7對其透析。以1 mg/mL肽在T7、T7m及T7Nm中調配GIP-GLP-1共促效劑。亦製備含有

1 mg/mL 實例1及1 mg/mL GIP-GLP-1共促效劑或1 mg/mL 實例3及1 mg/mL GIP-GLP-1共促效劑之經共調配之樣品並在T7、T7m、T7N及T7Nm中進行調配。將每個經調配之樣品轉移至三個小瓶。將樣品維持在4°C、25°C及40°C。每兩週共四週評估該等樣品。目測評估樣品之濁度及相分離。藉由如上文針對單一藥劑調配物所述之RP-HPLC評估穩定性。所述RP-HPLC法提供實例化合物與GIP-GLP-1共促效劑主峰以及在pH 9及40°C下對樣品施加應力3天所產生的所有降解峰之良好分離。

RP-HPLC之全部樣品之峰總回收率在5%以內。所有調配物仍係透明且無色的，未產生乳白色或沉澱。其4週後如藉由RP-HPLC觀察到的各自主峰中肽之百分比改變概述於表15中。在全部的所測試調配物中，實例1在調配呈單一藥劑時相比與GIP-GLP-1共促效劑之共調配物而言，主峰之百分比損失無明顯改變。GIP-GLP-1共促效劑在調配呈單一藥劑時相比與實例1或實例3中任一者之共調配物而言展現主峰百分比一致的損失。資料指示實例1及3在調配呈單一藥劑或與GIP-GLP-1共促效劑之共調配物時具有可接受之穩定性，且實例1及3不會不利地影響共調配物中之GIP-GLP-1共促效劑穩定性。

表15.

化合物	調配物	升糖素類似物主峰改變%			GIP-GLP-1共促效劑主峰改變%		
		4℃	25℃	40℃	4℃	25℃	40℃
實例1	T7	-1.23	-2.91	-4.69	N/A		
	T7m	-0.6	-0.15	-2.36			
	T7N	-0.29	-1.39	-4.19			
	T7Nm	-0.38	-1.71	-3.93			
實例1 + GIP-GLP-1 共促效劑	T7	-1.57	-0.26	-3.59	-0.37	-0.37	-3.35
	T7m	-1.19	-0.92	-2.67	0.54	0.35	-3.76
	T7N	-0.25	-0.89	-2.15	-0.21	-0.57	-4.42
	T7Nm	-1.22	-1.94	-3.78	-0.71	-1.07	-5.50
實例3	T7	-2.23	-7.00	-1.78	N/A		
	T7m	0.92	1.23	-0.78			
	T7N	-1.78	-6.13	-2.15			
	T7Nm	0.11	-0.76	-2.02			
實例3 + GIP-GLP-1 共促效劑	T7	-0.07	-7.51	-0.80	-0.40	-0.40	-4.14
	T7m	-3.17	-4.12	-5.08	-1.23	-1.23	-5.40
	T7N	-3.26	-7.50	-6.37	-0.22	-1.90	-6.12
	T7Nm	-2.75	-3.24	-3.35	-0.92	-0.87	-4.73
GIP-GLP-1 共促效劑	T7	N/A			-0.59	-2.12	-5.25
	T7m				0.10	-0.50	-4.3
	T7Nm				-0.85	-1.14	-4.66

亦藉由LC-MS評估在4℃及40℃下培養四週之在T7Nm中調配之實例1、GIP-GLP-1共促效劑及其組合、及在T7中調配之實例1及GIP-GLP-1共促效劑之組合之樣品。未識別出降解之主要位點。就實例1及GIP-GLP-1共促效劑二者而言，單一藥劑調配物相對共調配物而言化學修飾無明顯差異。

與GLP-1R促效劑之共調配物中之穩定性

製備實例1及3並採用如上文針對製備成T7緩衝液所述之相同方法用C6.5(10 mM檸檬酸鹽，pH 6.5)透析。分別以1 mg/mL肽在緩衝液C6.5、C6.5M(10 mM檸檬酸鹽、46.4 mg/mL D-甘露醇，pH 6.5)、C6.5T(10 mM檸檬酸鹽、0.02%聚山梨糖醇酯-80，pH 6.5)及C6.5MT(10 mM檸檬酸鹽、46.4 mg/mL D-甘露醇、0.02%聚山梨糖醇酯-80，pH 6.5)中調配

該等化合物。使用原液濃度為46.5 mg/mL之杜拉魯肽之C6.5溶液以調配以3 mg/mL之杜拉魯肽在C6.5及C6.5MT中。製備具有3 mg/mL杜拉魯肽及1 mg/mL實例1、或3 mg/mL杜拉魯肽及1 mg/mL實例3在C6.5MT中之共調配物。將每個經調配之樣品轉移至三個小瓶並維持在4℃、25℃及40℃。每兩週共四週評估該等樣品。目測評估樣品之濁度及相分離。藉由如上所述之RP-HPLC及SEC-HPLC評估穩定性。兩種所述HPLC方法提供實例化合物與杜拉魯肽主峰以及藉由在pH 9及40℃下對樣品施加應力3天所產生的所有降解峰之良好分離。

RP-HPLC及SEC-HPLC兩種方法之所有穩定性樣品之峰總回收率在5%以內。所有調配物仍係透明且無色的，未產生乳白色或沉澱。其如四週後藉由SEC-HPLC觀察到的各自主峰中化合物之百分比改變概述於表16中。實例1及3大體上穩定且未顯示主峰明顯損失。實例1在與杜拉魯肽共調配時相比單一藥劑調配物而言未展現降低的穩定性。實例3在與杜拉魯肽之共調配物中相比單一藥劑調配物而言展現略降低之穩定性。GLP-1R促效劑在與實例1或3中任一者共調配時相比單一藥劑調配物而言未展現降低之穩定性。

表16.

化合物	調配物	升糖素類似物主峰Δ%			GLP-1-Fc主峰Δ%		
		4℃	25℃	40℃	4℃	25℃	40℃
實例1	C6.5	-1.32	-1.99	-2.35	N/A		
	C6.5M	0.70	-1.26	-1.67			
	C6.5T	-2.76	-3.97	-1.72			
	C6.5MT	-1.04	-2.65	-1.40			

實例3	C6.5	1.03	-0.34	-0.37	N/A		
	C6.5M	0.49	-0.24	1.08			
	C6.5T	0.46	0.10	-0.02			
	C6.5MT	1.02	-0.07	0.64			
杜拉魯肽	C6.5	N/A			0.19	-0.54	>-10
	C6.5MT				0.29	-0.87	-0.83
實例1 + 杜拉魯肽	C6.5MT	-0.67	-0.75	-0.75	0.25	-0.16	-0.16
實例3 + 杜拉魯肽	C6.5MT	-1.04	-1.90	-1.90	0.21	-0.11	-0.11

如藉由RP-HPLC所觀察到，穩定性趨勢類似於彼等藉由SEC-HPLC所觀察到者。其四週後如藉由RP-HPLC觀察到的各自主峰中化合物之百分比改變概述於表17中。實例1及3大體上穩定且未顯示主峰明顯損失。實例1在與GLP-1R促效劑共調配時相比單一藥劑調配物而言未展現降低之穩定性。實例3在與GLP-1R促效劑之共調配物中相比單一藥劑調配物而言顯示略降低之穩定性。GLP-1R促效劑在與任一實例共調配時相比單一藥劑調配物而言未顯示降低之穩定性。

表17.

化合物	調配物	升糖素類似物主峰Δ%			GLP-1-Fc主峰Δ%		
		4℃	25℃	40℃	4℃	25℃	40℃
實例1	C6.5	-0.06	-0.47	-3.73	N/A		
	C6.5M	0.34	-2.61	-4.47			
	C6.5T	0.51	-0.35	-3.57			
	C6.5MT	-0.98	-0.69	-4.39			
實例3	C6.5	1.06	0.17	0.24	N/A		
	C6.5M	2.43	0.64	1.86			
	C6.5T	-2.11	*	-3.18			
	C6.5MT	-1.22	*	-0.4			
GLP-1R促效劑	C6.5	N/A			-1.45	>-10	-9.96
	C6.5MT				-0.46	-0.8	-7.47

實例1 + GLP-1R促效劑	C6.5MT	0.62	*	-2.55	1.90	*	-8.18
實例3 + GLP-1R促效劑	C6.5MT	-0.82	-2.49	-1.39	0.27	-3.05	-9.64

*由於儀器誤差的緣故，資料不可用

序列

SEQ ID NO:1 - 人類升糖素

HSQGTFTSDYSKYLD~~SRRAQDFVQWLMNT~~

SEQ ID NO:2 - 人類GLP-1

HAEGTFTSDVSSYLEGQAAKEFIAWL~~VKGR~~

SEQ ID NO:3 - 人類OXM

HSQGTFTSDYSKYLD~~SRRAQDFVQWLMNTKRNRNNIA~~

SEQ ID NO:4 - 人類GIP

YAEGTFISDYSIAMDKIHQQDFVNWLLAQKGKKNDW~~KHNITQ~~

SEQ ID NO:5 - 升糖素受體促效劑

YX₁QGTFX₂SDYSKYLDX₃KKAX₄EFVX₅WLLEX₆X₇

其中

X₁為Aib；

X₂為T或L；

X₃為Aib；

X₄為K，其係經由用([2-(2-胺基乙氧基)乙氧基]乙醯基)₂-(γGlu)_a-CO-(CH₂)_b-CO₂H共軛接合至K側鏈之ε-胺基進行化學修飾，其中a為1或2且b為14至24；

X₅為E或A；

X₆為T或E；

X₇係不存在的，或為選自由GPSSGAPPPS及GPSSG組成之群之肽；
且C端胺基酸係視情況經醯胺化。

SEQ ID NO:6 - 升糖素受體促效劑

YX₁QGTFX₂SDYSKYLDX₃KKAX₄EFVX₅WLLEX₆X₇

其中

X₁為Aib；

X₂為T；

X₃為Aib；

X₄為K，其係經由用([2-(2-胺基乙氧基)乙氧基]乙醯基)₂-(γGlu)_a-CO-(CH₂)_b-CO₂H(其中a為2且b為16)共軛接合至K側鏈之ε-胺基進行化學修飾；

X₅為E；

X₆為T；

X₇為GPSSGAPPPS；

且C端胺基酸係經醯胺化為C端一級醯胺。

SEQ ID NO:7 - 升糖素受體促效劑

YX₁QGTFX₂SDYSKYLDX₃KKAX₄EFVX₅WLLEX₆X₇

其中：

X₁為Aib，

X₂為T；

X₃為Aib；

X₄為K，其係經由用([2-(2-胺基乙氧基)乙氧基]乙醯基)₂-(γGlu)_a-CO-(CH₂)_b-CO₂H(其中a為2且b為18)共軛接合至K側鏈之ε-胺基進行化學

修飾；

X_5 為 E；

X_6 為 T；

X_7 為 GPSSGAPPPS；

且其中 C 端胺基酸係經醯胺化為 C 端一級醯胺。

SEQ ID NO:8 - 升糖素受體促效劑

$YX_1QGTFX_2SDYSKYLDX_3KKAX_4EFVX_5WLLEX_6X_7$

其中：

X_1 為 Aib；

X_2 為 L；

X_3 為 Aib；

X_4 為 K，其係經由用 $([2-(2\text{-胺基乙氧基})\text{乙氧基}]\text{乙醯基})_2-(\gamma\text{Glu})_a\text{-CO}-(\text{CH}_2)_b\text{-CO}_2\text{H}$ (其中 a 為 2 且 b 為 16) 共軛接合至 K 側鏈之 ϵ -胺基進行化學修飾；

X_5 為 E；

X_6 為 T；且

X_7 為 GPSSGAPPPS；

且其中 C 端胺基酸係經醯胺化為 C 端一級醯胺。

SEQ ID NO:9 - 升糖素受體促效劑

$YX_1QGTFX_2SDYSKYLDX_3KKAX_4EFVX_5WLLEX_6X_7$

其中 X_1 為 Aib；

X_2 為 T；

X_3 為 Aib；

X_4 為 K，其係經由用 $([2-(2\text{-}\epsilon\text{-}\text{氨基乙氧基})\text{乙氧基}]\text{乙醯基})_2-(\gamma\text{Glu})_a\text{-CO-(CH}_2)_b\text{-CO}_2\text{H}$ (其中 a 為 2 且 b 為 16) 共軛接合至 K 側鏈之 ϵ -氨基進行化學修飾；

X_5 為 E；

X_6 為 T；且

X_7 為 GPSSG；

且 C 端胺基酸係經醯胺化為 C 端一級醯胺。

SEQ ID NO:10 - 升糖素受體促效劑

$\text{YX}_1\text{QGTFX}_2\text{SDYSKYLDX}_3\text{KKAX}_4\text{EFVX}_5\text{WLLEX}_6\text{X}_7$

其中 X_1 為 Aib；

X_2 為 T；

X_3 為 Aib；

X_4 為 K，其係經由用 $([2-(2\text{-}\epsilon\text{-}\text{氨基乙氧基})\text{乙氧基}]\text{乙醯基})_2-(\gamma\text{Glu})_a\text{-CO-(CH}_2)_b\text{-CO}_2\text{H}$ (其中 a 為 2 且 b 為 18) 共軛接合至 K 側鏈之 ϵ -氨基進行化學修飾；

X_5 為 E；

X_6 為 T；且

X_7 為 GPSSG；

且 C 端胺基酸係經醯胺化為 C 端一級醯胺。

SEQ ID NO:11 - 升糖素受體促效劑

$\text{YX}_1\text{QGTFX}_2\text{SDYSKYLDX}_3\text{KKAX}_4\text{EFVX}_5\text{WLLEX}_6\text{X}_7$

其中

X_1 為 Aib；

X_2 為 T ；

X_3 為 Aib ；

X_4 為 K ，其係經由用 $([2-(2\text{-}\epsilon\text{-}\text{氨基乙氧基})\text{乙氧基}]\text{乙醯基})_2-(\gamma\text{Glu})_a\text{-CO-(CH}_2)_b\text{-CO}_2\text{H}$ (其中 a 為 1 且 b 為 16) 共軛接合至 K 側鏈之 ϵ -氨基進行化學修飾 ；

X_5 為 A ；

X_6 為 E ；

X_7 係不存在的 ； 且

C 端胺基酸為 C 端酸 。

SEQ ID NO:12 - 升糖素受體促效劑

$\text{YX}_1\text{QGTFX}_2\text{SDYSKYLDX}_3\text{KKAX}_4\text{EFVX}_5\text{WLLEX}_6\text{X}_7$

其中

X_1 為 Aib ；

X_2 為 T ；

X_3 為 Aib ；

X_4 為 K ，其係經由用 $([2-(2\text{-}\epsilon\text{-}\text{氨基乙氧基})\text{乙氧基}]\text{乙醯基})_2-(\gamma\text{Glu})_a\text{-CO-(CH}_2)_b\text{-CO}_2\text{H}$ (其中 a 為 1 且 b 為 18) 共軛接合至 K 側鏈之 ϵ -氨基進行化學修飾 ；

X_5 為 A ；

X_6 為 E ；

X_7 係不存在的 ； 且

C 端胺基酸為 C 端酸 。

SEQ ID NO:13 - GIP-GLP 共促效劑

$\text{YX}_1\text{EGTFTSDYSIX}_2\text{LDKIAQX}_3\text{AX}_4\text{VQWLIAGGPSSGAPPPS}$;

其中

X_1 為 Aib ;

X_2 為 Aib ;

X_3 為 K , 其係經由用 $[\text{2}-(\text{2}-\text{胺基乙氧基})\text{乙氧基}]\text{乙醯基})_2-(\gamma\text{Glu})_a-\text{CO}(\text{CH}_2)_b-\text{CO}_2\text{H}$ (其中 a 為 1 或 2 且 b 為 10 至 20) 共軛接合至 K 側鏈之 ϵ -胺基進行化學修飾 ;

X_4 為 Phe 或 1-萘基丙胺酸 (1-Nal) ;

且 C 端胺基酸係視情況經醯胺化。

SEQ ID NO:14 - GIP-GLP 共促效劑

$\text{YX}_1\text{EGTFTSDYSIX}_2\text{LDKIAQX}_3\text{AX}_4\text{VQWLIAGGPSSGAPPPS}$;

其中

X_1 為 Aib ;

X_2 為 Aib ;

X_3 為 K , 其係經由用 $[\text{2}-(\text{2}-\text{胺基乙氧基})\text{乙氧基}]\text{乙醯基})_2-(\gamma\text{Glu})_a-\text{CO}(\text{CH}_2)_b-\text{CO}_2\text{H}$ (其中 a 為 2 且 b 為 18) 共軛接合至 K 側鏈之 ϵ -胺基進行化學修飾 ;

X_4 為 1-Nal ;

且 C 端胺基酸係經醯胺化為 C 端一級醯胺。

SEQ ID NO:15 - GIP-GLP 共促效劑

$\text{YX}_1\text{EGTFTSDYSIX}_2\text{LDKIAQX}_3\text{AX}_4\text{VQWLIAGGPSSGAPPPS}$;

其中

X_1 為 Aib ;

X_2 為 Aib ；

X_3 為 K ，其係經由用 ([2-(2-胺基乙氧基)乙氧基]乙醯基) $_2$ -(γ Glu) $_a$ -CO(CH $_2$) $_b$ -CO $_2$ H(其中 a 為 1 且 b 為 18)共軛接合至 K 側鏈之 ϵ -胺基進行化學修飾 ；

X_4 為 Phe ；

且 C 端胺基酸係經醯胺化為 C 端一級醯胺 。

SEQ ID NO:16 - 升糖素受體促效劑

YX $_1$ QGTFX $_2$ SDYSKYLDX $_3$ KKAX $_4$ EFVX $_5$ WLLEX $_6$ X $_7$

其中

X_1 為 Aib ；

X_2 為 T 或 L ；

X_3 為 Aib ；

X_4 為 K ，其係經由用 ([2-(2-胺基乙氧基)乙氧基]乙醯基) $_2$ -(γ Glu) $_a$ -CO-(CH $_2$) $_b$ -CO $_2$ H(其中 a 為 2 且 b 為 14 至 24)共軛接合至 K 側鏈之 ϵ -胺基進行化學修飾 ；

X_5 為 E ；

X_6 為 T ；

X_7 為選自由 GPSSGAPPPS 及 GPSSG 組成之群之肽 ；

且 C 端胺基酸係經醯胺化 。

SEQ ID NO:17 - 升糖素受體促效劑

YX $_1$ QGTFX $_2$ SDYSKYLDX $_3$ KKAX $_4$ EFVX $_5$ WLLEX $_6$ X $_7$

其中

X_1 為 Aib ；

X_2 為 T ；

X_3 為 Aib ；

X_4 為 K ，其係經由用 $([2-(2\text{-胺基乙氧基})\text{乙氧基}]\text{乙醯基})_2-(\gamma\text{Glu})_a\text{-CO-(CH}_2)_b\text{-CO}_2\text{H}$ (其中 a 為 1 且 b 為 14 至 24) 共軛接合至 K 側鏈之 ϵ -胺基進行化學修飾 ；

X_5 為 A ；

X_6 為 E ； 且

X_7 係不存在的 。

【序列表】

<110> 美國禮來大藥廠

<120> 升糖素受體促效劑

<130> X20416

<150> 62/246,199

<151> 2015-10-26

<160> 17

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 29

<212> PRT

<213> 現代人

<400> 1

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

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

<210> 2

<211> 30

<212> PRT

<213> 現代人

<400> 2

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

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

<210> 3

<211> 37

<212> PRT

<213> 現代人

<400> 3

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

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

Arg Asn Asn Ile Ala
35

<210> 4
<211> 42
<212> PRT
<213> 現代人

<400> 4

Tyr Ala Glu Gly Thr Phe Ile Ser Asp Tyr Ser Ile Ala Met Asp Lys
1 5 10 15

Ile His Gln Gln Asp Phe Val Asn Trp Leu Leu Ala Gln Lys Gly Lys
20 25 30

Lys Asn Asp Trp Lys His Asn Ile Thr Gln
35 40

<210> 5
<211> 30
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構築體

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (2)..(2)
<223> 在位置2的Xaa為α胺基異丁酸

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (7)..(7)
<223> 在位置7的Xaa為Thr或Leu

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (16)..(16)
<223> 在位置16的Xaa為α胺基異丁酸

<220>
<221> MOD_RES
<222> (20)..(20)

<223> 在位置 20 的 Xaa 為經由用([2-(2-胺基乙氧基)乙氧基]乙醯基)2-(γ-Glu)a-CO-(CH₂)b-CO₂H(其中 a 為 1 或 2 且 b 為 14 至 24)共軛接合至 Lys 側鏈之 ε-胺基進行化學修飾之 Lys

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (24)..(24)

<223> 在位置24的Xaa為Glu或Ala。

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (29)..(29)

<223> 在位置29的Xaa為Thr或Glu。

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (30)..(30)

<223> 在位置30的Xaa為以下中之任何一者：不存在、或選自由GPSSGAPPPS及GPSSG組成之群之多肽，且C端胺基酸係視情況經醯胺化

<400> 5

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

Lys	Lys	Ala	Xaa	Glu	Phe	Val	Xaa	Trp	Leu	Leu	Glu	Xaa	Xaa
		20					25					30	

<210> 6

<211> 39

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成構築體

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (2)..(2)

<223> 在位置2的Xaa為α胺基異丁酸

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (16)..(16)

<223> 在位置16的Xaa為α胺基異丁酸

<220>

<221> MOD_RES

<222> (20)..(20)

<223> 在位置 20 的 Xaa 為經由用([2-(2-胺基乙氧基)乙氧基]乙醯基)2-(γ-Glu)a-CO-(CH₂)b-CO₂H(其中 a 為 2 且 b 為 16)共軛接合至 Lys 側鏈之 ε-胺基進行化學修飾之 Lys

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (39)..(39)
 <223> 在位置39的Ser係經醯胺化為C端一級醯胺

<400> 6

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

Lys Lys Ala Xaa Glu Phe Val Glu Trp Leu Leu Glu Thr Gly Pro Ser
 20 25 30

Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser
 35

<210> 7
 <211> 39
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成構築體

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (2)..(2)
 <223> 在位置2的Xaa為 α 胺基異丁酸

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (16)..(16)
 <223> 在位置16的Xaa為 α 胺基異丁酸

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (20)..(20)
 <223> 在位置 20 的 Xaa 為經由用([2-(2-胺基乙氧基)乙氧基]乙醯基)2-(γ -Glu)a-CO-(CH₂)b-CO₂H(其中 a 為 2 且 b 為 18)共軛接合至 Lys 側鏈之 ϵ -胺基進行化學修飾之 Lys

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (39)..(39)
 <223> 在位置39的Ser係經醯胺化為C端一級醯胺

<400> 7

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

Lys Lys Ala Xaa Glu Phe Val Glu Trp Leu Leu Glu Thr Gly Pro Ser
20 25 30

Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser
35

<210> 8
<211> 39
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構築體

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (2)..(2)
<223> 在位置2的Xaa為α胺基異丁酸

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (16)..(16)
<223> 在位置16的Xaa為α胺基異丁酸

<220>
<221> MOD_RES
<222> (20)..(20)
<223> 在位置 20 的 Xaa 為經由用([2-(2-胺基乙氧基)乙氧基]乙醯基)2-(γ-Glu)a-CO-(CH₂)_b-CO₂H(其中 a 為 2 且 b 為 16)共軛接合至 Lys 側鏈之 ε-胺基進行化學修飾之 Lys

<220>
<221> MOD_RES
<222> (39)..(39)
<223> 在位置39的Ser係經醯胺化為C端一級醯胺

<400> 8

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

Lys Lys Ala Xaa Glu Phe Val Glu Trp Leu Leu Glu Thr Gly Pro Ser
20 25 30

Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser
35

<210> 9
<211> 34
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構築體

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (2)..(2)
<223> 在位置2的Xaa為α-氨基異丁酸

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (16)..(16)
<223> 在位置16的Xaa為α-氨基異丁酸

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (20)..(20)
<223> 在位置 20 的 Xaa 為經由用([2-(2-氨基乙氧基)乙氧基]乙醯基)2-(γ-Glu)α-CO-(CH₂)_b-CO₂H(其中 a 為 2 且 b 為 16)共軛接合至 Lys 側鏈之 ε-氨基進行化學修飾之 Lys

<220>
<221> MOD_RES
<222> (34)..(34)
<223> 在位置34的Gly係經醯胺化為C端一級醯胺

<400> 9

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

Lys Lys Ala Xaa Glu Phe Val Glu Trp Leu Leu Glu Thr Gly Pro Ser
20 25 30

Ser Gly

<210> 10
<211> 34
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構築體

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (2)..(2)
<223> 在位置2的Xaa為α-胺基異丁酸

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (16)..(16)
<223> 在位置16的Xaa為α-胺基異丁酸

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (20)..(20)
<223> 在位置 20 的 Xaa 為經由用([2-(2-胺基乙氧基)乙氧基]乙醯基)2-(γ-Glu)a-CO-(CH₂)b-CO₂H(其中 a 為 2 且 b 為 18)共軛接合至 Lys 側鏈之 ε-胺基進行化學修飾之 Lys

<220>
<221> MOD_RES
<222> (34)..(34)
<223> 在位置34的Gly係經醯胺化為C端一級醯胺

<400> 10

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

Lys Lys Ala Xaa Glu Phe Val Glu Trp Leu Leu Glu Thr Gly Pro Ser
20 25 30

Ser Gly

<210> 11
<211> 29
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構築體

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (2)..(2)
<223> 在位置2的Xaa為α-胺基異丁酸

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (16)..(16)
 <223> 在位置16的Xaa為α-氨基異丁酸

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (20)..(20)
 <223> 在位置 20 的 Xaa 為經由用([2-(2-氨基乙氧基)乙氧基]乙醯基)2-(γ-Glu)a-CO-(CH₂)b-CO₂H(其中 a 為 1 且 b 為 16)共軛接合至 Lys 側鏈之 ε-胺基進行化學修飾之 Lys

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (29)..(29)
 <223> 在位置29的Glu為C端酸

<400> 11

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

Lys	Lys	Ala	Xaa	Glu	Phe	Val	Ala	Trp	Leu	Leu	Glu	Glu
			20					25				

<210> 12
 <211> 29
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成構築體

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (2)..(2)
 <223> 在位置2的Xaa為α-氨基異丁酸

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (16)..(16)
 <223> 在位置16的Xaa為α-氨基異丁酸

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (20)..(20)
 <223> 在位置 20 的 Xaa 為經由用([2-(2-氨基乙氧基)乙氧基]乙醯基)2-(γ-Glu)a-CO-(CH₂)b-CO₂H(其中 a 為 1 且 b 為 18)共軛接合至 Lys 側鏈之 ε-胺基進行化學修飾之 Lys

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (29)..(29)
 <223> 在位置29的Glu為C端酸。

<400> 12

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

Lys Lys Ala Xaa Glu Phe Val Ala Trp Leu Leu Glu Glu
 20 25

<210> 13
 <211> 39
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成構築體

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (2)..(2)
 <223> 在位置2的Xaa為α-胺基異丁酸

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (13)..(13)
 <223> 在位置13的Xaa為α-胺基異丁酸

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (20)..(20)
 <223> 在位置 20 的 Xaa 為經由用([2-(2-胺基乙氧基)乙氧基]乙醯基)2-(γ-Glu)α-CO-(CH₂)_b-CO₂H(其中 a 為 1 或 2 且 b 為 10 至 20)共軛接合至 Lys 側鏈之 ε-胺基進行化學修飾之 Lys

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (22)..(22)
 <223> 在位置 22 的 Xaa 為 Phe 或 1-萘基丙胺酸 (1-Nal)

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (39)..(39)
 <223> 在位置39的Ser係視情況經醯胺化

<400> 13

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

Ile Ala Gln Xaa Ala Xaa Val Gln Trp Leu Ile Ala Gly Gly Pro Ser
20 25 30

Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser
35

<210> 14
<211> 39
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構築體

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (2)..(2)
<223> 在位置2的Xaa為α-胺基異丁酸

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (13)..(13)
<223> 在位置13的Xaa為α-胺基異丁酸

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (20)..(20)
<223> 在位置 20 的 Xaa 為經由用([2-(2-胺基乙氧基)乙氧基]乙醯基)2-(γ-Glu)a-CO-(CH₂)_b-CO₂H(其中 a 為 2 且 b 為 18)共軛接合至 Lys 側鏈之 ε-胺基進行化學修飾之 Lys

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (22)..(22)
<223> 在位置22的Xaa為1-Nal

<220>
<221> MOD_RES
<222> (39)..(39)
<223> 在位置39的Ser係經醯胺化為C端一級醯胺

<400> 14

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

Ile Ala Gln Xaa Ala Xaa Val Gln Trp Leu Ile Ala Gly Gly Pro Ser
 20 25 30

Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser
 35

<210> 15
 <211> 39
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成構築體

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (2)..(2)
 <223> 在位置2的Xaa為α胺基異丁酸

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (13)..(13)
 <223> 在位置13的Xaa為α胺基異丁酸

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (20)..(20)
 <223> 在位置 20 的 Xaa 為經由用([2-(2-胺基乙氧基)乙氧基]乙醯基)2-(γ-Glu)a-CO-(CH₂)_b-CO₂H(其中 a 為 1 且 b 為 18)共軛接合至 Lys 側鏈之 ε-胺基進行化學修飾之 Lys

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (39)..(39)
 <223> 在位置29的Ser係經醯胺化為C端一級醯胺

<400> 15

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

Ile Ala Gln Xaa Ala Phe Val Gln Trp Leu Ile Ala Gly Gly Pro Ser
 20 25 30

Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser
 35

<210> 16

<211> 30
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構築體

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (2)..(2)
<223> 在位置2的Xaa為 α 胺基異丁酸

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (7)..(7)
<223> 在位置7的Xaa為Thr或Leu

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (16)..(16)
<223> 在位置16的Xaa為 α 胺基異丁酸

<220>
<221> MOD_RES
<222> (20)..(20)
<223> 在位置 20 的 Xaa 為經由用([2-(2-胺基乙氧基)乙氧基]乙醯基)2-(γ -Glu)a-CO-(CH₂)b-CO₂H(其中 a 為 2 且 b 為 14 至 24)共軛接合至 Lys 側鏈之 ϵ -胺基進行化學修飾之 Lys

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (24)..(24)
<223> 在位置24的Xaa為Glu

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (29)..(29)
<223> 在位置29的Xaa為Thr

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (30)..(30)
<223> 在位置30的Xaa為選自由GPSSGAPPPS及GPSSG組成之群之肽；且C端胺基酸係經醯胺化

<400> 16
Tyr Xaa Gln Gly Thr Phe Xaa Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Xaa
1 5 10 15

Lys Lys Ala Xaa Glu Phe Val Xaa Trp Leu Leu Glu Xaa Xaa
20 25 30

<210> 17
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成構築體

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (2)..(2)
 <223> 在位置2的Xaa為 α 胺基異丁酸

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (7)..(7)
 <223> 在位置7的Xaa為Thr

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (16)..(16)
 <223> 在位置16的Xaa為 α 胺基異丁酸

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (20)..(20)
 <223> 在位置 20 的 Xaa 為經由用([2-(2-胺基乙氧基)乙氧基]乙醯基)2-(γ -Glu)a-CO-(CH₂)b-CO₂H(其中 a 為 1 且 b 為 14 至 24)共軛接合至 Lys 側鏈之 ϵ -胺基進行化學修飾之 Lys

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (24)..(24)
 <223> 在位置24的Xaa為Ala

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (29)..(29)
 <223> 在位置29的Xaa為Glu

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (30)..(30)
 <223> 在位置30的Xaa係不存在的

<400> 17

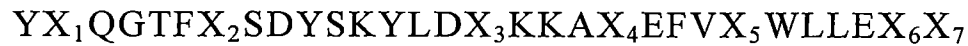
Tyr	Xaa	Gln	Gly	Thr	Phe	Xaa	Ser	Asp	Tyr	Ser	Lys	Tyr	Leu	Asp	Xaa
1				5					10					15	

Lys	Lys	Ala	Xaa	Glu	Phe	Val	Xaa	Trp	Leu	Leu	Glu	Xaa	Xaa
			20					25					30

【發明申請專利範圍】

【第1項】

一種升糖素受體促效劑化合物，其包含下式：



其中

X_1 為 Aib ；

X_2 為 T ；

X_3 為 Aib ；

X_4 為 K ，其係經由用 $[\text{2}-(\text{2}-\text{胺基乙氧基})\text{乙氧基}]\text{乙醯基})_2-(\gamma\text{Glu})_a\text{-CO}-(\text{CH}_2)_b\text{-CO}_2\text{H}$ 共軛接合至 K 側鏈之 ϵ -胺基進行化學修飾，其中 a 為 2 且 b 為 16 ；

X_5 為 E ；

X_6 為 T ；

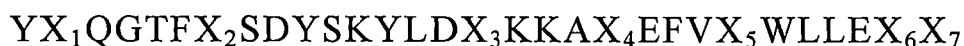
X_7 為 GPSSGAPPPS ；

且 C 端胺基酸係經醯胺化為 C 端一級醯胺 (SEQ ID NO:6) ；

或其醫藥上可接受之鹽。

【第2項】

一種升糖素受體促效劑化合物，其係由下式組成：



其中

X_1 為 Aib ；

X_2 為 T ；

X_3 為 Aib ；

X_4 為 K，其係經由用 $([2-(2\text{-胺基乙氧基})\text{乙氧基}]\text{乙醯基})_2-(\gamma\text{Glu})_a\text{-CO}-(\text{CH}_2)_b\text{-CO}_2\text{H}$ 共軛接合至 K 側鏈之 ϵ -胺基進行化學修飾，其中 a 為 2 且 b 為 16；

X_5 為 E；

X_6 為 T；

X_7 為 GPSSGAPPPS；

且 C 端胺基酸係經醯胺化為 C 端一級醯胺 (SEQ ID NO:6)；

或其醫藥上可接受之鹽。

【第3項】

一種如請求項 1 或 2 之升糖素受體促效劑之用途，其用於製造用於治療選自由 T2DM、肥胖、脂肪肝病、NASH、血脂異常、代謝症候群、高胰島素血症及夜間低血糖症組成之群之疾病的藥物。

【第4項】

如請求項 3 之用途，其中該藥物進一步包含一或多種其他治療劑或係與一或多種其他治療劑一起投與。

【第5項】

如請求項 4 之用途，其中該其他治療劑為 GLP-1R 促效劑。

【第6項】

如請求項 5 之用途，其中該 GLP-1R 促效劑為杜拉魯肽 (dulaglutide)。

【第7項】

如請求項 4 之用途，其中該其他治療劑為 GIP-GLP-1 共促效劑。

【第8項】

如請求項 7 之用途，其中該 GIP-GLP-1 共促效劑具有 SEQ ID NO:15

之結構。

【第9項】

如請求項1至2中任一項之升糖素受體促效劑，其係用於醫療。

【第10項】

如請求項1至2中任一項之升糖素受體促效劑，其係用於治療T2DM、肥胖、脂肪肝病、NAFLD、NASH、血脂異常、代謝症候群、高胰島素血症或夜間低血糖症。

【第11項】

如請求項1至2中任一項之升糖素受體促效劑，其係組合一或多種選自由GLP-1R促效劑、GIP-GLP-1共促效劑及胰島素受體促效劑組成之群之其他治療劑，供同時、分開或連續用於治療T2DM、肥胖、NAFLD、NASH、血脂異常、代謝症候群、高胰島素血症或夜間低血糖症。

【第12項】

如請求項1至2中任一項之升糖素受體促效劑，其係組合杜拉魯肽，供同時、分開或連續用於治療T2DM、肥胖、NAFLD、NASH、血脂異常、代謝症候群、高胰島素血症或夜間低血糖症。

【第13項】

如請求項1至2中任一項之升糖素受體促效劑，其係組合具有SEQ ID NO:15之結構之GIP-GLP-1共促效劑，供同時、分開或連續用於治療T2DM、肥胖、NAFLD、NASH、血脂異常、代謝症候群、高胰島素血症或夜間低血糖症。

【第14項】

一種醫藥組合物，其包含如請求項1至2中任一項之升糖素受體促效

劑及醫藥上可接受之載劑、稀釋劑或賦形劑。

【第15項】

如請求項14之醫藥組合物，其進一步包含其他治療劑。

【第16項】

如請求項15之醫藥組合物，其中該其他治療劑為GLP-1R促效劑。

【第17項】

如請求項16之醫藥組合物，其中該GLP-1R促效劑為杜拉魯肽。

【第18項】

如請求項15之醫藥組合物，其中該其他治療劑為GIP-GLP-1共促效劑。

【第19項】

如請求項18之醫藥組合物，其中該GIP-GLP-1共促效劑具有SEQ ID NO:15之結構。

【第20項】

如請求項1至2中任一項之升糖素受體促效劑，其中該升糖素受體促效劑在升糖素受體處的活性比該升糖素受體促效劑在GLP-1受體處的效力高至少100倍。

【第21項】

一種誘發非治療性體重損失之方法，其包括投與有效量之如請求項1至2中任一項之升糖素受體促效劑。