

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.

C07K 14/605 (2006.01)

A61K 38/26 (2006.01)



[12] 发明专利说明书

专利号 ZL 97198413.1

[45] 授权公告日 2006 年 8 月 23 日

[11] 授权公告号 CN 1271086C

[22] 申请日 1997.8.22 [21] 申请号 97198413.1

[30] 优先权

[32] 1996. 8. 30 [33] DK [31] 0931/96

[32] 1996. 11. 8 [33] DK [31] 1259/96

[32] 1996. 12. 20 [33] DK [31] 1470/96

[86] 国际申请 PCT/DK1997/000340 1997.8.22

[87] 国际公布 WO1998/008871 英 1998.3.5

[85] 进入国家阶段日期 1999.3.30

[71] 专利权人 诺沃挪第克公司

地址 丹麦鲍斯韦

[72] 发明人 L·B·克努德森

P·O·胡斯菲尔德

P·F·尼尔森

审查员 唐 慧

[74] 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专利
商标事务所

代理人 黄革生

权利要求书 8 页 说明书 62 页

[54] 发明名称

GLP-1 衍生物

[57] 摘要

GLP-1 及其类似物的具有亲脂性取代基的衍生物，它们具有令人感兴趣的药物学性质，尤其它们有比 GLP-1(7-37) 更长时间的作用曲线。

1. GLP-1 (7-37) 或与GLP-1 (7-37)相比有最多达6个氨基酸改变的GLP-1 (7-37)类似物的衍生物, 所述GLP-1 (7-37)类似物具有人GLP-1的功能, 其特征在于所述衍生物仅具有一个选自下述的、包含8-25个碳原子的亲脂性取代基: $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_n\text{CO}-$, 其中n是整数, $\text{HOOC}(\text{CH}_2)_m\text{CO}-$, 其中m是整数, 或石胆酰基, 该亲脂性取代基连接到既非N-末端也非C-末端的氨基酸残基上。

2. GLP-1 (7-37) 或与GLP-1 (7-37)相比有最多达6个氨基酸改变的GLP-1 (7-37)类似物的衍生物, 所述GLP-1 (7-37)类似物具有人GLP-1的功能, 其特征在于所述衍生物仅具有两个选自下述的、包含8-25个碳原子的亲脂性取代基: $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_n\text{CO}-$, 其中n是整数, $\text{HOOC}(\text{CH}_2)_m\text{CO}-$, 其中m是整数, 或石胆酰基, 其中所述亲脂性取代基之一连接到既非N-末端也非C-末端的氨基酸残基上。

3. 权利要求2的衍生物, 其中所述的亲脂性取代基之一连接到C-末端氨基酸残基上, 而另一亲脂性取代基连接到既非N-末端也非C-末端的氨基酸残基上。

4. GLP-1 (7-37) 或与GLP-1 (7-37)相比有最多达6个氨基酸改变的GLP-1 (7-37)类似物的衍生物, 所述GLP-1 (7-37)类似物具有人GLP-1的功能, 其特征在于所述衍生物仅具有两个选自下述的、包含8-25个碳原子的亲脂性取代基: $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_n\text{CO}-$, 其中n是整数, $\text{HOOC}(\text{CH}_2)_m\text{CO}-$, 其中m是整数, 或石胆酰基, 其中所述亲脂性取代基连接到既非N-末端也非C-末端的氨基酸残基上。

5. 与GLP-1 (7-37)相比有最多达6个氨基酸改变的GLP-1 (7-37)类似物的衍生物, 所述类似物是GLP-1 (7-C), 其中C是38-45, 并且具有人GLP-1的功能, 其特征在于所述衍生物仅具有一个选自下述的、包含8-25个碳原子的亲脂性取代基: $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_n\text{CO}-$, 其中n是整数, $\text{HOOC}(\text{CH}_2)_m\text{CO}-$, 其中m是整数, 或石胆酰基, 该亲脂性取代基连接到C-末端氨基酸残基上。

6. 与GLP-1(7-37)相比有最多达6个氨基酸改变的GLP-1(7-37)类似物的衍生物, 所述类似物是GLP-1(A-B), 其中 A是1-7的整数, B 是38-45的整数, 并且具有人GLP-1的功能, 其特征在于所述衍生物在C-末端氨基酸残基处连接了一个选自下述的、包含8-25个碳原子的亲脂性取代基: $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_n\text{CO}-$, 其中 n是整数, $\text{HOO}(\text{CH}_2)_m\text{CO}-$, 其中m 是整数, 或石胆酰基, 并且还任选地具有另一个连接到其它氨基酸残基之一处的、包含8-25个碳原子的亲脂性取代基, 所述亲脂性取代基选自下组: $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_n\text{CO}-$, 其中 n是整数, $\text{HOO}(\text{CH}_2)_m\text{CO}-$, 其中m 是整数, 或石胆酰基。

7. 权利要求1-6中任一项的衍生物, 其中所述GLP-1 (7-37) 类似物选自由下述组成的组:

Arg²⁶-GLP-1(7-37); Arg³⁴-GLP-1(7-37); Lys³⁶-GLP-1(7-37); Arg^{26,34}Lys³⁶-GLP-1(7-37); Arg^{26,34}Lys³⁸GLP-1(7-38); Arg^{26,34}Lys³⁹-GLP-1(7-39); Arg^{26,34}Lys⁴⁰-GLP-1(7-40); Arg²⁶Lys³⁶-GLP-1(7-37); Arg³⁴Lys³⁶-GLP-1(7-37); Arg²⁶Lys³⁹-GLP-1(7-39); Arg³⁴Lys⁴⁰-GLP-1(7-40); Arg^{26,34}Lys^{36,39}-GLP-1(7-39); Arg^{26,34}Lys^{36,40}-GLP-1(7-40); Gly⁸Arg²⁶-GLP-1(7-37); Gly⁸Arg³⁴-GLP-1(7-37); Gly⁸Lys³⁶-GLP-1(7-37); Gly⁸Arg^{26,34}Lys³⁶-GLP-1(7-37); Gly⁸Arg^{26,34}Lys³⁹-GLP-1(7-39); Gly⁸Arg^{26,34}Lys⁴⁰-GLP-1(7-40); Gly⁸Arg²⁶Lys³⁶-GLP-1(7-37); Gly⁸Arg³⁴Lys³⁶-GLP-1(7-37); Gly⁸Arg²⁶Lys³⁹-GLP-1(7-39); Gly⁸Arg³⁴Lys⁴⁰-GLP-1(7-40); Gly⁸Arg^{26,34}Lys^{36,39}-GLP-1(7-39) 和 Gly⁸Arg^{26,34}Lys^{36,40}-GLP-1(7-40)。

8. 权利要求1-6中任一项的衍生物, 其中所述GLP-1 (7-37) 类似物选自由下述组成的组:

Arg^{26,34}Lys³⁸GLP-1(7-38); Arg^{26,34}Lys³⁹GLP-1(7-39); Arg^{26,34}Lys⁴⁰GLP-1(7-40); Arg^{26,34}Lys⁴¹GLP-1(7-41); Arg^{26,34}Lys⁴²GLP-1(7-42); Arg^{26,34}Lys⁴³GLP-1(7-43); Arg^{26,34}Lys⁴⁴GLP-1(7-44); Arg^{26,34}Lys⁴⁵GLP-1(7-45); Arg^{26,34}Lys³⁸GLP-1(1-38); Arg^{26,34}Lys³⁹GLP-1(1-39); Arg^{26,34}Lys⁴⁰GLP-1(1-40); Arg^{26,34}Lys⁴¹GLP-1(1-41); Arg^{26,34}Lys⁴²GLP-1(1-42); Arg^{26,34}Lys⁴³GLP-1(1-43); Arg^{26,34}Lys⁴⁴GLP-1(1-44); Arg^{26,34}Lys⁴⁵GLP-1(1-45); Arg^{26,34}Lys³⁸GLP-1(2-38); Arg^{26,34}Lys³⁹GLP-1(2-39); Arg^{26,34}Lys⁴⁰GLP-1(2-40); Arg^{26,34}Lys⁴¹GLP-1(2-41); Arg^{26,34}Lys⁴²GLP-1(2-42); Arg^{26,34}Lys⁴³GLP-1(2-43); Arg^{26,34}Lys⁴⁴GLP-1(2-44); Arg^{26,34}Lys⁴⁵GLP-1(2-45); Arg^{26,34}Lys³⁸GLP-1(3-38); Arg^{26,34}Lys³⁹GLP-1(3-39); Arg^{26,34}Lys⁴⁰GLP-1(3-40); Arg^{26,34}Lys⁴¹GLP-1(3-41);

Arg^{26,34}Lys⁴²GLP-1(3-42); Arg^{26,34}Lys⁴³GLP-1(3-43); Arg^{26,34}Lys⁴⁴GLP-1(3-44); Arg^{26,34}Lys⁴⁵GLP-1(3-45); Arg^{26,34}Lys³⁸GLP-1(4-38); Arg^{26,34}Lys³⁹GLP-1(4-39); Arg^{26,34}Lys⁴⁰GLP-1(4-40); Arg^{26,34}Lys⁴¹GLP-1(4-41); Arg^{26,34}Lys⁴²GLP-1(4-42); Arg^{26,34}Lys⁴³GLP-1(4-43); Arg^{26,34}Lys⁴⁴GLP-1(4-44); Arg^{26,34}Lys⁴⁵GLP-1(4-45); Arg^{26,34}Lys³⁸GLP-1(5-38); Arg^{26,34}Lys³⁹GLP-1(5-39); Arg^{26,34}Lys⁴⁰GLP-1(5-40); Arg^{26,34}Lys⁴¹GLP-1(5-41); Arg^{26,34}Lys⁴²GLP-1(5-42); Arg^{26,34}Lys⁴³GLP-1(5-43); Arg^{26,34}Lys⁴⁴GLP-1(5-44); Arg^{26,34}Lys⁴⁵GLP-1(5-45); Arg^{26,34}Lys³⁸GLP-1(6-38); Arg^{26,34}Lys³⁹GLP-1(6-39); Arg^{26,34}Lys⁴⁰GLP-1(6-40); Arg^{26,34}Lys⁴¹GLP-1(6-41); Arg^{26,34}Lys⁴²GLP-1(6-42); Arg^{26,34}Lys⁴³GLP-1(6-43); Arg^{26,34}Lys⁴⁴GLP-1(6-44); Arg^{26,34}Lys⁴⁵GLP-1(6-45); Arg²⁶Lys³⁸GLP-1(1-38); Arg³⁴Lys³⁸GLP-1(1-38); Arg^{26,34}Lys^{36,38}GLP-1(1-38); Arg²⁶Lys³⁸GLP-1(7-38); Arg³⁴Lys³⁸GLP-1(7-38); Arg^{26,34}Lys^{36,38}GLP-1(7-38); Arg^{26,34}Lys³⁸GLP-1(7-38); Arg²⁶Lys³⁹GLP-1(1-39); Arg³⁴Lys³⁹GLP-1(1-39); Arg^{26,34}Lys^{36,39}GLP-1(1-39); Arg²⁶Lys³⁹GLP-1(7-39); Arg³⁴Lys³⁹GLP-1(7-39) 和 Arg^{26,34}Lys^{36,39}GLP-1(7-39)。

9. 与GLP-1(7-37)相比有最多达6个氨基酸改变的GLP-1(7-37)类似物的衍生物, 所述GLP-1(7-37)类似物具有人GLP-1的功能, 其中所述衍生物中至少一个氨基酸残基连接了选自下述的、包含8-25个碳原子的亲脂性取代基: $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_n\text{CO}-$, 其中 n 是整数, $\text{HOO}(\text{CH}_2)_m\text{CO}-$, 其中 m 是整数, 或石胆酰基, 该类似物选自由下述组成的组:

Arg^{26,34}Lys³⁸GLP-1(7-38); Arg^{26,34}Lys³⁹GLP-1(7-39); Arg^{26,34}Lys⁴⁰GLP-1(7-40); Arg^{26,34}Lys⁴¹GLP-1(7-41); Arg^{26,34}Lys⁴²GLP-1(7-42); Arg^{26,34}Lys⁴³GLP-1(7-43); Arg^{26,34}Lys⁴⁴GLP-1(7-44); Arg^{26,34}Lys⁴⁵GLP-1(7-45); Arg^{26,34}Lys³⁸GLP-1(1-38); Arg^{26,34}Lys³⁹GLP-1(1-39); Arg^{26,34}Lys⁴⁰GLP-1(1-40); Arg^{26,34}Lys⁴¹GLP-1(1-41); Arg^{26,34}Lys⁴²GLP-1(1-42); Arg^{26,34}Lys⁴³GLP-1(1-43); Arg^{26,34}Lys⁴⁴GLP-1(1-44); Arg^{26,34}Lys⁴⁵GLP-1(1-45); Arg^{26,34}Lys³⁸GLP-1(2-38); Arg^{26,34}Lys³⁹GLP-1(2-39); Arg^{26,34}Lys⁴⁰GLP-1(2-40); Arg^{26,34}Lys⁴¹GLP-1(2-41); Arg^{26,34}Lys⁴²GLP-1(2-42); Arg^{26,34}Lys⁴³GLP-1(2-43); Arg^{26,34}Lys⁴⁴GLP-1(2-44); Arg^{26,34}Lys⁴⁵GLP-1(2-45); Arg^{26,34}Lys³⁸GLP-1(3-38); Arg^{26,34}Lys³⁹GLP-1(3-39); Arg^{26,34}Lys⁴⁰GLP-1(3-40); Arg^{26,34}Lys⁴¹GLP-1(3-41); Arg^{26,34}Lys⁴²GLP-1(3-42); Arg^{26,34}Lys⁴³GLP-1(3-43); Arg^{26,34}Lys⁴⁴GLP-1(3-44); Arg^{26,34}Lys⁴⁵GLP-1(3-45); Arg^{26,34}Lys³⁸GLP-1(4-38); Arg^{26,34}Lys³⁹GLP-1(4-39); Arg^{26,34}Lys⁴⁰GLP-1(4-40);

Arg^{26,34}Lys⁴¹GLP-1(4-41); Arg^{26,34}Lys⁴²GLP-1(4-42); Arg^{26,34}Lys⁴³GLP-1(4-43); Arg^{26,34}Lys⁴⁴GLP-1(4-44); Arg^{26,34}Lys⁴⁵GLP-1(4-45); Arg^{26,34}Lys³⁸GLP-1(5-38); Arg^{26,34}Lys³⁹GLP-1(5-39); Arg^{26,34}Lys⁴⁰GLP-1(5-40); Arg^{26,34}Lys⁴¹GLP-1(5-41); Arg^{26,34}Lys⁴²GLP-1(5-42); Arg^{26,34}Lys⁴³GLP-1(5-43); Arg^{26,34}Lys⁴⁴GLP-1(5-44); Arg^{26,34}Lys⁴⁵GLP-1(5-45); Arg^{26,34}Lys³⁸GLP-1(6-38); Arg^{26,34}Lys³⁹GLP-1(6-39); Arg^{26,34}Lys⁴⁰GLP-1(6-40); Arg^{26,34}Lys⁴¹GLP-1(6-41); Arg^{26,34}Lys⁴²GLP-1(6-42); Arg^{26,34}Lys⁴³GLP-1(6-43); Arg^{26,34}Lys⁴⁴GLP-1(6-44); Arg^{26,34}Lys⁴⁵GLP-1(6-45); Arg²⁶Lys³⁸GLP-1(1-38); Arg³⁴Lys³⁸GLP-1(1-38); Arg^{26,34}Lys^{36,38}GLP-1(1-38); Arg²⁶Lys³⁸GLP-1(7-38); Arg³⁴Lys³⁸GLP-1(7-38); Arg^{26,34}Lys^{36,38}GLP-1(7-38); Arg^{26,34}Lys³⁸GLP-1(7-38); Arg²⁶Lys³⁹GLP-1(1-39); Arg³⁴Lys³⁹GLP-1(1-39); Arg^{26,34}Lys^{36,39}GLP-1(1-39); Arg²⁶Lys³⁹GLP-1(7-39); Arg³⁴Lys³⁹GLP-1(7-39) 和 Arg^{26,34}Lys^{36,39}GLP-1(7-39)。

10. 权利要求1-6和9中任一项的衍生物, 其中亲脂性取代基与氨基酸残基的连接方式使得该亲脂性取代基的羧基与氨基酸残基的氨基之间形成酰氨键。

11. 权利要求1-6和9中任一项的衍生物, 其中亲脂性取代基与氨基酸残基通过间隔子连接。

12. 权利要求11的衍生物, 其中所述间隔子是除Cys外的氨基酸残基, 或者是如Gly-Lys的二肽。

13. 权利要求12的衍生物, 其中亲本肽的羧基与Lys或者含Lys残基的二肽的氨基之间形成酰氨键, Lys间隔子或含Lys残基的二肽间隔子的另一氨基与亲脂性取代基的羧基形成酰氨键。

14. 权利要求12的衍生物, 其中所述肽的氨基与所述氨基酸残基或二肽间隔子的羧基之间形成酰氨键, 该氨基酸或二肽间隔子的氨基与亲脂性取代基的羧基形成酰氨键。

15. 权利要求1-6和9中任一项的衍生物, 其中所述亲脂性取代基选自包含下述的组: CH₃(CH₂)_nCO-。

16. 权利要求1-6和9中任一项的衍生物, 其中所述亲脂性取代基选自包含H₂COO(CH₂)_nCO-的组。

17. 权利要求1-6和9中任一项的衍生物, 其中GLP-1(7-37)中总计有最多达6个氨基酸残基被替换成可由遗传密码编码的任何α-氨

氨基酸残基。

18. 权利要求1的衍生物, 它是 $\text{Lys}^{26}(\text{N}^{\epsilon}\text{-十四酰基})\text{-GLP-1 (7-37)}$ 。

19. 权利要求1的衍生物, 它是 $\text{Lys}^{34}(\text{N}^{\epsilon}\text{-十四酰基})\text{-GLP-1 (7-37)}$ 。

20. 权利要求4的衍生物, 它是 $\text{Lys}^{26, 34}\text{-双}(\text{N}^{\epsilon}\text{-十四酰基})\text{-GLP-1 (7-37)}$ 。

21. 权利要求1的衍生物, 它是 $\text{Lys}^{26}(\text{N}^{\epsilon}\text{-十四酰基})\text{Arg}^{34}\text{-GLP-1 (7-37)}$ 。

22. 权利要求1的衍生物, 它是 $\text{Gly}^8\text{Arg}^{26, 34}\text{Lys}^{36}(\text{N}^{\epsilon}\text{-十四酰基})\text{-GLP-1 (7-37)}$ 。

23. 权利要求1的衍生物, 它是 $\text{Arg}^{26, 34}\text{Lys}^{36}(\text{N}^{\epsilon}\text{-十四酰基})\text{-GLP-1 (7-37)}$ 。

24. 权利要求4的衍生物, 它是 $\text{Lys}^{26, 34}\text{-双}(\text{N}^{\epsilon}\text{-(}\omega\text{-羧基十九酰基)})\text{-GLP-1 (7-37)}$ 。

25. 权利要求6的衍生物, 它是 $\text{Arg}^{26, 34}\text{Lys}^{38}(\text{N}^{\epsilon}\text{-(}\omega\text{-羧基十九酰基)})\text{-GLP-1 (7-38)}$ 。

26. 权利要求1的衍生物, 它是 $\text{Arg}^{34}\text{Lys}^{26}(\text{N}^{\epsilon}\text{-(}\omega\text{-羧基十九酰基)})\text{-GLP-1 (7-37)}$ 。

27. 权利要求1的衍生物, 它是 $\text{Arg}^{34}\text{Lys}^{26}(\text{N}^{\epsilon}\text{-(}\omega\text{-羧基十七酰基)})\text{-GLP-1 (7-37)}$ 。

28. 权利要求1的衍生物, 它是 $\text{Arg}^{26, 34}\text{Lys}^{36}(\text{N}^{\epsilon}\text{-(}\omega\text{-羧基十七酰基)})\text{-GLP-1 (7-37)}$ 。

29. 权利要求6的衍生物, 它是 $\text{Arg}^{26, 34}\text{Lys}^{38}(\text{N}^{\epsilon}\text{-(}\omega\text{-羧基十七酰基)})\text{-GLP-1 (7-38)}$ 。

30. 权利要求1的衍生物, 它是 $\text{Arg}^{26, 34}\text{Lys}^{36}(\text{N}^{\epsilon}\text{-(}\omega\text{-羧基十一酰基)})\text{-GLP-1 (7-37)}$ 。

31. 权利要求6的衍生物, 它是 $\text{Arg}^{26, 34}\text{Lys}^{38}(\text{N}^{\epsilon}\text{-(}\omega\text{-羧基十一酰基)})\text{-GLP-1 (7-38)}$ 。

32. 权利要求4的衍生物, 它是 $\text{Lys}^{26,34}$ 双(N^{ϵ} -(ω -羧基十一酰基))-GLP-1(7-37)。

33. 权利要求1的衍生物, 它是 $\text{Arg}^{34}\text{Lys}^{26}$ (N^{ϵ} -(ω -羧基十一酰基))-GLP-1(7-37)。

34. 权利要求1的衍生物, 它是 $\text{Arg}^{34}\text{Lys}^{26}$ (N^{ϵ} -(ω -羧基庚酰基))-GLP-1(7-37)。

35. 权利要求6的衍生物, 它是 $\text{Arg}^{26,34}\text{Lys}^{38}$ (N^{ϵ} -(ω -羧基庚酰基))-GLP-1(7-38)。

36. 权利要求1的衍生物, 它是 $\text{Arg}^{26,34}\text{Lys}^{36}$ (N^{ϵ} -(ω -羧基庚酰基))-GLP-1(7-37)。

37. 权利要求4的衍生物, 它是 $\text{Lys}^{26,34}$ 双(N^{ϵ} -(ω -羧基庚酰基))-GLP-1(7-37)。

38. 权利要求1的衍生物, 它是 $\text{Arg}^{34}\text{Lys}^{26}$ (N^{ϵ} -(ω -羧基十五酰基))-GLP-1(7-37)。

39. 权利要求1的衍生物, 它是 $\text{Arg}^{34}\text{Lys}^{26}$ (N^{ϵ} -石胆酰基))-GLP-1(7-37)。

40. 权利要求6或11的衍生物, 它是 $\text{Glu}^{22,23,30}\text{Arg}^{26,34}\text{Lys}^{38}$ (N^{ϵ} -(γ -谷氨酰基(N^{α} -十四酰基)))-GLP-1(7-38)。

41. 权利要求6或11的衍生物, 它是 $\text{Glu}^{23,26}\text{Arg}^{34}\text{Lys}^{38}$ (N^{ϵ} -(γ -谷氨酰基(N^{α} -十四酰基)))-GLP-1(7-38)。

42. 权利要求4的衍生物, 它是 $\text{Lys}^{26,34}$ -双(N^{ϵ} -(ω -羧基十三酰基))-GLP-1(7-37)。

43. 权利要求4或11的衍生物, 它是 $\text{Lys}^{26,34}$ -双(N^{ϵ} -(γ -谷氨酰基(N^{α} -十四酰基)))-GLP-1(7-37)。

44. 权利要求6的衍生物, 它是 $\text{Arg}^{26,34}\text{Lys}^{38}$ (N^{ϵ} -(ω -羧基十五酰基))-GLP-1(7-38)。

45. 权利要求4或11的衍生物, 它是 $\text{Lys}^{26,34}$ -双(N^{ϵ} -(γ -谷氨酰基(N^{α} -十六酰基)))-GLP-1(7-37)。

46. 权利要求1的衍生物, 它是 $\text{Arg}^{34}\text{Lys}^{26}$ (N^{ϵ} -(γ -谷氨酰基(N^{α} -

十六酰基)))-GLP-1 (7-37)。

47. 权利要求6或11的衍生物, 它是 $\text{Arg}^{26,34}\text{Lys}^{38}(\text{N}^\epsilon\text{-(}\gamma\text{-谷氨酰基(N}^\alpha\text{-十四酰基))})\text{-GLP-1 (7-38)}。$

48. 权利要求6的衍生物, 它是 $\text{Arg}^{26,34}\text{Lys}^{38}(\text{N}^\epsilon\text{-(}\omega\text{-羧基十五酰基))\text{-GLP-1 (7-38)}。$

49. 权利要求6或11的衍生物, 它是 $\text{Arg}^{26,34}\text{Lys}^{38}(\text{N}^\epsilon\text{-(}\gamma\text{-谷氨酰基(N}^\alpha\text{-十六酰基))})\text{-GLP-1 (7-38)}。$

50. 权利要求6的衍生物, 它是 $\text{Arg}^{18,23,26,30,34}\text{Lys}^{38}(\text{N}^\epsilon\text{-十六酰基})\text{-GLP-1 (7-38)}。$

51. 权利要求6的衍生物, 它是 $\text{Arg}^{26,34}\text{Lys}^{38}(\text{N}^\epsilon\text{-(}\omega\text{-羧基十三酰基))\text{-GLP-1 (7-38)}。$

52. 权利要求1的衍生物, 它是 $\text{Arg}^{34}\text{Lys}^{26}(\text{N}^\epsilon\text{-(}\gamma\text{-谷氨酰基(N}^\alpha\text{-十四酰基))})\text{-GLP-1 (7-37)}。$

53. 权利要求6或11的衍生物, 它是 $\text{Arg}^{26,34}\text{Lys}^{38}(\text{N}^\epsilon\text{-(}\gamma\text{-谷氨酰基(N}^\alpha\text{-十八酰基))})\text{-GLP-1 (7-38)}。$

54. 权利要求15的衍生物, 其中所述酰基选自下组:
 $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_6\text{CO-}$, $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_8\text{CO-}$, $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{10}\text{CO-}$, $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{12}\text{CO-}$,
 $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{14}\text{CO-}$, $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{16}\text{CO-}$, $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{18}\text{CO-}$, $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{20}\text{CO-}$ 和
 $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{22}\text{CO-}$ 。

55. 权利要求16的衍生物, 其中所述m是4-24。

56. 权利要求16的衍生物, 其中所述酰基选自下组:
 $\text{HOOC}(\text{CH}_2)_{14}\text{CO-}$, $\text{HOOC}(\text{CH}_2)_{16}\text{CO-}$, $\text{HOOC}(\text{CH}_2)_{18}\text{CO-}$, $\text{HOOC}(\text{CH}_2)_{20}\text{CO-}$
 和 $\text{HOOC}(\text{CH}_2)_{22}\text{CO-}$ 。

57. 含有权利要求1-56中任一项的衍生物和药学上可接受的赋形剂或载体的药物组合物。

58. 权利要求1-56中任一项的衍生物在制备具有比GLP-1 (7-37) 更长时间的作用曲线的药物中的用途。

59. 权利要求1-56中任一项的衍生物在制备可用于治疗非胰岛素依赖性糖尿病的药物中的用途。

60. 权利要求1-56中任一项的衍生物在制备可用于治疗胰岛素依赖性糖尿病的药物中的用途。

61. 权利要求1-56中任一项的衍生物在制备可用于治疗肥胖症的药物中的用途。

62. 权利要求1-56中任一项的衍生物在制备可用于治疗选自下述的一种或多种疾病的药物中的用途：非胰岛素依赖性糖尿病、胰岛素依赖性糖尿病和肥胖症。

GLP-1 衍生物

发明所属技术领域

本发明涉及人胰高血糖素样肽-1(GLP-1)及其片段和这些片段的类似物的新衍生物,它们具有更长时间的作用曲线(*protracted profile of action*),还涉及这些物质的制备和使用方法。

发明的技术背景

肽广泛用于医学实践,由于可以用 DNA 重组技术制备肽,因此可以预计在未来一些年内其重要性也将会增加。当在治疗中使用天然肽或其类似物时,通常发现它们有高的清除率。在需要使治疗剂在更长时间的期间内保持其高的血液水平的情况下,治疗剂的高清除率是不适宜的,因为这将需要重复给药。有高清除率的肽例如有: ACTH, 促肾上腺皮质激素释放因子, 血管紧张肽, 降钙素, 胰岛素, 胰高血糖素, 胰高血糖素样肽-1, 胰高血糖素样肽-2, 胰岛素样生长因子-1, 胰岛素样生长因子-2, 肠抑胃肽, 生长激素释放因子, 垂体腺苷酸环化酶活化肽, 胰泌素, 肠抑胃素(*enterogastrin*), 促生长素抑制素, 生长调节素, 促生长素, 甲状旁腺素, 血小板生成素, 红细胞生成素, 下丘脑释放因子, 促乳素, 促甲状腺素, 内啡肽, 脑啡肽, 血管升压素, 催产素, 阿片样物质及其类似物, 超氧化物歧化酶, 干扰素, 天冬酰胺酶, 精氨酸酶, 精氨酸脱氨酶, 腺苷脱氨酶和核糖核酸酶。在某些情况下, 能使用适宜的药物组合物以影响肽的释放曲线, 但这种方法存在各种不足之处, 一般是不适用的。

调节胰岛素分泌的激素属于所谓的肠胰岛轴, 指的是随着肠内营养素的存在和吸收而从胃肠粘膜释放的一组激素, 它促使胰岛素的早期释放并使之增强。促进胰岛素分泌的作用, 即所谓的肠降血糖素作用, 对于正常的葡萄糖耐受性或许是必需的。包括胃泌素和胰泌素的许多胃肠激素具有促胰岛素作用(人的缩胆囊素不具有促胰岛素作用), 但生理上

重要的、能导致肠降血糖素作用的仅有葡萄糖依赖性促胰岛素多肽 GIP 和胰高血糖素样肽-1(GLP-1)。由于 GIP 的促胰岛素作用,它在 1973 年得到分离(1)后立即在糖尿病学家中引起相当大的兴趣。然而,在随后一些年中进行的大量研究清楚地显示, GIP 分泌缺陷与胰岛素依赖性糖尿病(IDDM)或非胰岛素依赖性糖尿病(NIDDM)的发病原因并无关系(2)。进而还发现, GIP 虽是一种促胰岛素激素,但它对于 NIDDM 几乎无效(2)。另一种肠降血糖素激素 GLP-1,是已知最有效的促胰岛素物质(3)。不同于 GIP, GLP-1 在促进 NIDDM 病人的胰岛素分泌方面非常有效。另外,与其它促胰岛素激素相比(也许除肠泌素外), GLP-1 也有效地抑制胰高血糖素分泌。由于这些作用,它尤其对于 NIDDM 病人具有显著的降血糖效果。

GLP-1 是胰高血糖素原(proglucagon)的一种产物(4),它是胰泌素-VIP 族肽中最新成员之一,但它已被确认是一种对于葡萄糖代谢和胃肠分泌及代谢具有调节功能的重要的胃肠激素(5)。胰高血糖素基因在胰腺和肠内加工方式不同。在胰腺内(9),加工导致形成和平行分泌以下物质: 1)胰高血糖素自身,占据胰高血糖素原(PG)的 33-61 位; 2)一种有 30 个氨基酸(PG(1-30))的 N-末端肽,通常称之为胰高血糖素样肽相关的胰肽, GRPP(10, 11); 3)一种对应于 PG(64-69)的六肽; 4)最后还有所谓的主要的胰高血糖素原片段(PG(72-158)),其中藏有两个胰高血糖素样序列(9)。胰高血糖素似乎是唯一的生物活性产物。与之相比,在肠粘膜内,却是胰高血糖素被埋藏在一个大分子中,而两个胰高血糖素样肽则是分别形成的(8)。以下产物是平行形成并分泌的: 1)对应于 PG(1-69)的胰高血糖素样肽,其中胰高血糖素序列占据 No.33-61 残基(12); 2)GLP-1(7-36)酰胺,即 PG(78-107)酰胺(13),而不是最初认为的 PG(72-107)酰胺或 PG(72-108)酰胺,它是非活性的。也生成少量 C-末端甘氨酸延伸的具有同等生物活性的 GLP-1(7-37)(PG(78-108))(14); 3)中间肽-2(PG(111-122)酰胺)(15); 和 4)GLP-2(PG(126-158))(15,16)。胰高血糖素样肽的一部分进一步切割成 GRPP(PG(1-30))和胃泌酸调节素(PG(33-69))(17,18)。在这些肽中, GLP-1 有最显著的

生物活性。

由于 GLP-1 与胰高血糖素样肽/肠高血糖素平行分泌，因此对肠高血糖素分泌的许多研究(6,7)在某些程度上也可用于 GLP-1 分泌，但 GLP-1 代谢更快，其在人血浆中的半衰期为 2 分钟(19)。富含糖类或脂肪的膳食能促进分泌(20)，推测这是未吸收的营养与肠粘膜开放型 L-细胞的微绒毛直接相互作用的结果。可能存在促进 GLP-1 分泌的内分泌或神经机理，但在人体内还未得到证实。

用 GLP-1 受体拮抗剂 exendin 9-39 进行的实验已清楚地说明了 GLP-1 的肠降血糖素作用(29-31)，在此实验中，exendin 9-39 惊人地降低大鼠口服葡萄糖后的肠降血糖素作用(21, 22)。激素经由属于 G-蛋白耦联的 7-跨膜穿越受体的胰高血糖素/VIP/降钙素家族的 GLP-1 受体与 β -细胞直接相互作用(23)。最近的实验证明了 GLP-1 受体在调节胰岛素分泌方面的重要性，在此实验中，对小鼠进行了 GLP-1 受体基因的定向破坏。具有这种破坏的纯合动物有显著退化的葡萄糖耐受性和快速出现的高血糖，甚至杂合动物也不能耐受葡萄糖(24)。信号转导机理主要包括腺苷酸环化酶活化，但也必须有细胞内 Ca^{2+} 的升高(25, 26)。该激素的作用最好地描述为能增强葡萄糖刺激的胰岛素释放作用(25)，但尚不知道葡萄糖与 GLP-1 刺激之间的耦联机理。它可能包括一个钙诱发的钙释放(26, 27)。如已经提到的，糖尿病人的 β -细胞有 GLP-1 的促胰岛素作用。也不知道 GLP-1 与其赋予分离的胰岛素分泌细胞(26, 28)“葡萄糖感应性”的能力之间的关系，这种分离的胰岛素分泌细胞几乎不对单独的葡萄糖或 GLP-1 起反应，而是对二者的结合起反应。然而，同等重要的是，该激素也有效地抑制胰高血糖素分泌(29)。其机理还不清楚，但似乎是通过相邻胰岛素或促生长素抑制素细胞的旁分泌(25)。抑胰高血糖素作用(glucagonostatic action)也是葡萄糖依赖性的，所以当血糖降低时，抑制效应即降低。由于这种双重效应，如果通过增加分泌或通过外源性灌输增加血浆中的 GLP-1 浓度，通过门脉循环达到肝的血液中胰岛素与胰高血糖素之间的摩尔比将显著增加，而肝糖生成量降低(30)。结果，血糖浓度降低。由于促胰岛素作用

和抑胰高血糖素作用的葡萄糖依赖性，葡萄糖降低的效果是自限性的，因此，无论剂量如何，该激素均不导致低血糖(31)。有糖尿病的病人仍存在这些效应(32)，尽管有弱的代谢控制和磺酰脲类附属性障碍(33)，给这些病人灌输稍微超出生理剂量的 GLP-1 可能使血糖值完全正常化。已发现 GLP-1 在无残余 β -细胞分泌能力的 I 型糖尿病病人中也能降低血糖(34)，这说明了抑胰高血糖素效应的重要性。

除它对于胰岛的作用外，GLP-1 对胃肠道也具有有力的作用。灌输生理剂量的 GLP-1，能显著抑制五肽胃泌素诱发的及膳食诱发的胃酸分泌(35，36)。GLP-1 也抑制胃排空速率和胰酶分泌(36)。人回肠灌输含有糖或脂的溶液可能对胃、胰分泌和运动性具有相似的抑制效应(37，38)。伴随地，GLP-1 分泌得到显著刺激，并已推测 GLP-1 可能至少是这种所谓的“回肠闸”(ileal-brake)效应的部分原因(38)。实际上，最近的研究表明，生理上，GLP-1 的回肠闸效应可能比其对胰岛的效应更重要。因此，在剂量响应研究中，至少在影响胰岛分泌所需的最小灌输速度下，GLP-1 会影响胃排空速率(39)。

GLP-1 似乎对食物摄取有作用。GLP-1 的心室内给药极度抑制大鼠的食物摄入(40，42)。这种效应看似很特异的。因此，N-末端延伸的 GLP-1(PG72-107)酰胺是无活性的，并且适当剂量的 GLP-1 拮抗剂，exendin9-39，能消除 GLP-1 的效应(41)。GLP-1 快速外周给药不会快速地抑制大鼠食物摄入(41，42)。然而，从肠 L-细胞分泌的 GLP-1 仍有可能作为一个过饱信号。

糖尿病人不仅有促胰岛素作用，而且有 GLP-1 的对胃肠道的作用(43)，这可能有助于减弱膳食引起的葡萄糖偏移，但，更重要的是，也可能影响食物摄入。GLP-1 按 4ng/kg/min 持续静脉内给药一周，已证实显著改善了 NIDDM 病人的糖血控制而无明显的副作用(44)。肽在皮下给药后是完全有效的(45)，但主要由于二肽基肽酶 IV 样酶的降解作用，肽会快速降解(46，47)。

尤其是 Schmidt 等给出了 GLP-1 的氨基酸序列(糖尿病学(Diabetologia)，28,704-707(1985))。虽然 GLP-1(7-37)及其类似物的

令人感兴趣的药理学性质在近年来已引起很大关注,但关于这些分子的结构所知甚少。Thorton 等描述了 GLP-1 在胶束(micelle)中的二级结构(生物化学,33,3532-3539(1994)),但在正常溶液中, GLP-1 被认为是一种非常易变形的分子。意外地,我们发现这一较小且很易变形的分子经衍生化产生的化合物,其血浆分布曲线大大延长并仍保留了活性。

GLP-1、GLP-1 类似物以及它们的片段尤其在治疗 1 型和 2 型糖尿病中非常有效。然而高清除率限制了这些化合物的有效性,因此在这方面还需要改进。相应地,本发明的一个目的是提供 GLP-1 和其类似物的衍生物,这些衍生物具有比 GLP-1(7-37)更长时间的作用曲线。本发明的进一步的目的是提供 GLP-1 及其类似物的衍生物,这些衍生物具有比 GLP-1(7-37)更低的清除率。本发明的进一步的目的是提供一种含有本发明化合物的药物组合物,和使用本发明的化合物制备这种组合物。本发明的目的也包括提供一种治疗胰岛素依赖性和非胰岛素依赖性糖尿病的方法。

参考文献

1. Pederson RA. 抑胃多肽. Walsh JH, Dockray GJ(编). 肠肽: 生物化学与生理学. Raven Press, 纽约 1994, 217-259 页.
2. Krarup T. 免疫反应活性的抑胃多肽. 内分泌学综述, 1988; 9: 122-134.
3. Ørskov C. 胰高血糖素样肽-1, 一种新的肠胰岛轴激素. 糖尿病学, 1992; 35: 701-711.
4. Bell GI, Sanchez-Pescador R, Laybourn PJ, Najarian RC. 人前胰高血糖素原基因中的外显子复制和分散. 自然, 1983; 304: 368-371.
5. Holst JJ. 胰高血糖素样肽-1(GLP-1)-一种新发现的 GI 激素. 肠胃病学, 1994; 107: 1848-1855.
6. Holst JJ. 肠胰高血糖素, 肠高血糖素, 肠 GLI, 胰高血糖素样肽-当前状况. 肠胃病学, 1983; 84: 1602-1613.
7. Holst JJ, Ørskov C. 胰高血糖素和其它胰高血糖素原衍生肽. Walsh JH, Dockray GJ 编. 肠肽: 生物化学和生理学. Raven Press, 纽约; 305-340 页, 1993.

8. Ørskov C , Holst JJ , Knuhtsen S,Baldissera FGA, Poulsen ss,Nielsen OV., 胰高血糖素基因的预期产物-胰高血糖素样肽 GLP-1 和 GLP-2 在猪小肠而非胰腺中是分别分泌的.内分泌学,1986; 119: 1467-1475.
9. Holst JJ , Bersani M, Johnsen AH, Kofod H, Hartmann B, Ørskov C.在猪和人胰腺中的胰高血糖素加工.生物与化学杂志, 1994; 269: 18827-1883.
10. Moody AJ, Holst JJ , Thim L,Jensen SL.猪胰腺内胰高血糖素样肽与胰高血糖素原和胰高血糖素之间的关系.自然,1981; 289: 514-516.
11. Thim L,Moody AJ,纯化和化学鉴定从猪胰腺得到的与胰高血糖素样肽相关的胰肽(胰高血糖素原片段)。生物化学与生物物理学学报, 1982; 703: 134-141.
12. Thim L,Moody AJ, 胰高血糖素样肽(胰高血糖素原)的一级结构.调节肽, 1981;2:139-151.
13. Ørskov C , Bersani M,Johnsen AH,Højrup P,Holst JJ.人和猪小肠胰高血糖素样肽-1 的完整序列.生物与化学杂志,1989;264:12826 - 12829.
14. Ørskov C , Rabenhøj L,Kofod H,Wettergren A,Holst JJ.人体内酰胺化和甘氨酸延伸的胰高血糖素样肽-1(GLP-1)的产生和分泌.糖尿病, 1991; 43: 535-539
15. Buhl T,Thim L,Kofod H, Ø rskov C , Harling H,& Holst JJ:在猪和人小肠内天然存在的胰高血糖素原 111-160 产物.生物与化学杂志, 1988;263: 8621-8624.
16. Ø rskov C , Buhl T, Rabenhøj L, Kofod H, Holst JJ:猪和人小肠内胰高血糖素样肽-2C-末端的羧肽酶 B 样加工.FEBS letters,1989 ; 247: 193-106.
17. Holst JJ.肠高血糖素(II)与胰高血糖素样肽的 C-末端序列(残基 33-69)等价的证据.生物化学杂志,1980; 187: 337-343.
18. Bataille D,Tatemoto K,Gespach C,Jornvall H, Rosselin G,Mutt V.

从猪空肠-回肠(jejuno-ileum)分离胰高血糖素-37(生物活性的肠高血糖素/胃泌酸调节素,该肽的鉴定。FEBS letters, 1982; 146: 79-86.

19. Ørskov C, Wttergren A, Holst JJ. 健康志愿者体内 GLP-1 7-36 酰胺和 GLP-1 7-37 的代谢速度和生物效应是相同的. 糖尿病, 1993; 42: 658-661.

20. Elliott RM, Morgan LM, Tredger JA, Deacon S, Wright J, Marks V. 人体内与营养摄取相关的胰高血糖素样肽-1(7-36)酰胺和葡萄糖依赖性促胰岛素多肽的分泌: 餐后即刻和 24 小时的分泌方式. 内分泌学杂志, 1993; 138: 159-166.

21. Kolligs F, Fehmann HC, Goke R, Goke B. 在大鼠体内进行的胰高血糖素样肽-1 受体拮抗剂 exendin(9-39) 酰胺的降低肠降血糖素效应. 糖尿病, 1995; 44: 16-19.

22. Wang Z, Wang RM, Owji AA, Smith DM, Ghattei M, Bloom SR. 胰高血糖素样肽-1 是大鼠体内的一种生理性肠降血糖素. 临床研究杂志, 1995; 95: 417-421.

23. Thorens B. 糖-肠降血糖素激素胰高血糖素样肽 1 的胰腺 b 细胞受体的表达克隆. 美国国家科学院院报, 1992; 89: 8641-4645.

24. Scrocci L, Auerbach AB, Joyner AL, Drucher DJ. 具有 GLP-1 受体基因定向破坏的小鼠糖尿病. 糖尿病, 1996; 45: 21A.

25. Fehmann HC, Goke R., Goke B. 肠降血糖素激素胰高血糖素样肽-1(GLP-1)和葡萄糖依赖性胰岛素释放多肽(GIP)的细胞和分子生物学. 内分泌综述, 1995; 16: 390-410.

26. Gromada J, Dissing S, Bokvist K, Renstrom E, Frøkjær-Jensen J, Wulff BS, Rorsman P. 胰高血糖素样肽 1 通过促进细胞内钙转移增加分泌胰岛素的 bTC3 细胞中的胞质钙. 糖尿病, 1995; 44: 767-774.

27. Holz GG, Leech CA, Habener JF. 促胰岛素激素胰高血糖素样肽-1 激活胰腺β-细胞内 cAMP 调节的 Ca^{2+} 信号通道. 生物与化学杂志, 1996; 270: 17749-17759.

28. Holz GG, Kuhlreiber WM, Habener JF. 促胰岛素激素胰高血糖素

样肽-1(7-37)导致胰腺 β -细胞对葡萄糖能够感应.自然,1993;361:362-365.

29. Ø rskov C , Holst JJ, Nielsen OV:截短的胰高血糖素样肽-1(胰高血糖素原 78-107 酰胺)对猪胰腺、窦和胃的内分泌的效应.内分泌学,1988; 123: 2009-2013.

30.Hvidberg A,Toft Nielsen M,Hilsted J, Ø rskov C , Holst JJ. 胰高血糖素样肽-1(胰高血糖素原 78-107 酰胺)对于健康人肝葡萄糖生产的效应.代谢,1994; 43: 104-108 .

31.Qualmann C,Nauck M,Holst JJ, Ø rskov C , Creutzfeldt W. 健康受试者即刻静脉内注射胰高血糖素样肽-1[7-36 酰胺]的促胰岛素样作用.糖尿病学报,1995;32:13-16 .

32.Nauck MA,Heimesaat MM.,Ø rskov C , Holst JJ,Ebert R, Creutzfeldt W.2-型糖尿病人仍具有 GLP-1(7-36 酰胺)肠降血糖素活性而非合成的人体 GIP 的活性.临床研究杂志,1993; 91: 301-307 .

33. Nauck MA,Kleine N, Ø rskov C , Holst JJ,Willms B,Creutzfeldt W. 2 型糖尿病人中外源性 GLP-1(7-36 酰胺)所致急性高血糖的正常化.糖尿病学,1993;36:741-744.

34.Creutzfeldt W,Kleine N,Wilms B, Ø rskov C , Holst JJ, Nauck MA. I 型糖尿病人中外源性胰高血糖素样肽-1(7-36 酰胺)所致胰高血糖素样作用和急性高血糖的降低.糖尿病护理,1996; 19: 580-586.

35.Schjoldager BTG,Mortensen PE,Christiansen J, Ø rskov C , Holst JJ.GLP-1(胰高血糖素样肽-1)和截短的 GLP-1 , 人胰高血糖素原片段,能抑制人胃酸分泌.消化疾病与科学.1989; 35: 703-708.

36.Wettergren A,Schjoldager B,Mortensen PE,Myhre J, Christiansen J,Holst JJ.截短的 GLP-1(胰高血糖素原 72-107 酰胺)抑制人的胃、胰功能. 消化疾病与科学.1993;38:665-673.

37. Layer P,Holst JJ,Grandt D,Goebell H:胰高血糖素样肽-1(GLP-1)的回肠释放: 与人的胃酸分泌抑制的关系. 消化疾病与科学.1995;40:1074-1082.

38. Layer P, Holst JJ. GLP-1: 人回肠闸的体液介质. 消化, 1993; 54: 385-386.
39. Nauck M, Ettler R, Niedereichholz U, Ørskov C, Holst JJ, Schmiegel W. GLP-1(7-36 酰胺)或(7-37)抑制胃排空的作用: 对食后糖血和胰岛素分泌的作用. 肠摘要, 1995; 37(增刊 2): A124.
40. Schick RR, vom Walde T, Zimmermann JP, Schusdziarra V, Classen M. 胰高血糖素样肽 1-一种参与摄食调节的新的脑肽. Ditschuneit H, Gries FA, Hauner H, Schusdziarra V, Wechsler JG(编), 欧洲肥胖症. John Libbey & Company Ltd, 1994; pp. 363-367.
41. Tang-Christensen M, Larsen PJ, Goke R, Fink-Jensen A, Jessop DS, Møller M, Sheikh S. 脑 GLP-1(7-36)酰胺受体在食物和水摄入的调节中起主要作用. 美国生理学杂志, 1996, 待发表.
42. Turton MD, O'Shea D, Gunn I, Beak SA, Edwards CMB, Meeran K, 等. 胰高血糖素样肽-1 在摄食调节中的作用. 自然, 1996; 379: 69-72.
43. Willms B, Werner J, Creutzfeldt W, Ørskov C, Holst JJ, Nauck M. 胰高血糖素样肽-1(7-36 酰胺)对 2 型糖尿病人胃排空的抑制作用. 糖尿病学, 1994; 37, 增刊 1: A118.
44. Larsen J, Jallad N, Damsbo P. 连续一周灌输 GLP-1(7-37)促进 NIDDM 的糖血控制. 糖尿病, 1996; 45, 增刊 2: 233A.
45. Ritzel R, Ørskov C, Holst JJ, Nauck MA. 健康受试者皮下注射后, GLP-1(7-36 酰胺)的药物动力学、促胰岛素和抑胰高血糖素样的性质. 剂量-反应关系. 糖尿病学, 1995; 38: 720-725.
46. Deacon CF, Johnsen AH, Holst JJ. 胰高血糖素样肽-1 通过人血浆体外降解产生一种为主要的内源性体内代谢物的 N-末端截短的肽. 临床内分泌学与代谢杂志, 1995; 80: 952-957.
47. Deacon CF, Nauck MA, Toft-Nielsen M, Pridal L, Willms B, Holst JJ. 1995. 胰高血糖素样肽-1 经皮下和静脉内给药, 在 II 型糖尿病人和健康受试者体内均快速从氨基末端降解. 糖尿病, 44: 1126-1131.

发明概要

人 GLP-1 是一个 37 氨基酸残基的肽，它起源于前胰高血糖素原，前胰高血糖素原主要在远端回肠 L-细胞、胰腺和脑中合成。由前胰高血糖素原加工产生 GLP-1 (7-36) 酰胺、GLP-1 (7-37) 和 GLP-2 的过程主要发生在 L-细胞中。可用一简单体系来描述此肽的片段及类似物。因此，例如 Gly⁸-GLP-1 (7-37) 表示从 GLP-1 缺失掉氨基酸残基 Nos. 1-6，并在位置 8 (Ala) 用 Gly 取代天然存在的氨基酸残基后形成的 GLP-1 片段。类似地，Lys³⁴ (N^ε-十四酰基)-GLP-1 (7-37) 代表在 34 位的 Lys 残基的 ε-氨基已被十四酰基化的 GLP-1 (7-37)。本文中提到的 C-末端延伸的 GLP-1 类似物时，则除非另外说明，在 38 位的氨基酸残基均是 Arg，在 39 位的可选氨基酸残基也是 Arg (除非另有说明)，在 40 位的可选氨基酸残基是 Asp (除非另有说明)。同样，如果 C-末端延伸的类似物延伸到位置 41、42、43、44 或 45，则除非另外说明，此延伸物的氨基酸序列均与人前胰高血糖素原中的对应序列一样。

在最广泛的方面，本发明涉及 GLP-1 及其类似物的衍生物。本发明的衍生物具有令人感兴趣的药理学性质，尤其它们具有比母体肽更长时间的作用曲线。

在本文中，“类似物”用于代表一种肽，其中母体肽的一或多个氨基酸残基已被另一氨基酸残基取代，和/或其中母体肽上的一或多个氨基酸残基已被缺失，和/或其中向母体肽添加了一或多个氨基酸残基。这种添加可以发生在母体肽的 N-末端或 C-末端，或在两端均发生。

在本文中用术语“衍生物”表示一种肽，该肽在母体肽的一或多个氨基酸残基发生了化学修饰，例如发生了烷基化，酰基化，形成了酯或酰胺。

在本文中用术语“GLP-1 衍生物”表示 GLP-1 或其类似物的衍生物。在本文中，衍生衍生物的母体肽在一些地方被称为衍生物的“GLP-1 部分”。

在一个优选实施方案中，本发明涉及一种 GLP-1 衍生物，其中母体肽的至少一个氨基酸残基连接了一个亲脂性取代基，条件是如果只有

一个亲脂性取代基，并且此取代基连接到母体肽的 N-末端或 C-末端氨基酸残基上，那么此取代基是一个烷基或者有一个 ω -羧酸基团。

在一优选实施方案中，本发明涉及只有一个亲脂性取代基的 GLP-1 衍生物。

在一优选实施方案中，本发明涉及仅有一个亲脂性取代基的 GLP-1 衍生物，该取代基是烷基或者有一个 ω -羧酸基团，并连接到母体肽的 N-末端氨基酸残基上。

在一优选实施方案中，本发明涉及仅有一个亲脂性取代基的 GLP-1 衍生物，该取代基是烷基或者有一个 ω -羧酸基团，并连接到母体肽的 C-末端氨基酸残基上。

在一优选实施方案中，本发明涉及仅有一个亲脂性取代基的 GLP-1 衍生物，该取代基可以连接到母体肽上非 N-末端也非 C-末端的任一氨基酸残基上。

在一优选实施方案中，本发明涉及有 2 个亲脂性取代基的 GLP-1 衍生物。

在一优选实施方案中，本发明涉及有 2 个亲脂性取代基的 GLP-1 衍生物，其中一个亲脂性取代基连接到母体肽的 N-末端氨基酸残基上，另一亲脂性取代基连接到母体肽的 C-末端氨基酸残基上。

在一优选实施方案中，本发明涉及有 2 个亲脂性取代基的 GLP-1 衍生物，其中一个亲脂性取代基连接到母体肽的 N-末端氨基酸残基上，另一亲脂性取代基连接到母体肽的既非 N-末端也非 C-末端的氨基酸残基上。

在一优选实施方案中，本发明涉及有 2 个亲脂性取代基的 GLP-1 衍生物，其中一个亲脂性取代基连接到母体肽的 C-末端氨基酸残基上，另一亲脂性取代基连接到母体肽的既非 N-末端也非 C-末端的氨基酸残基上。

在进一步优选的实施方案中，本发明涉及一

种 GLP-1(7-C)衍生物,其中 C 选自含 38、39、40、41、42、43、44 和 45 的一组,该衍生物仅有一个连接到母体肽的 C-末端氨基酸残基上的亲脂性取代基。

在一个进一步优选的实施方案中,本发明涉及一种 GLP-1 衍生物,其中亲脂性取代基含有 4 至 40 个碳原子,更优选含有 8-25 个碳原子。

在一个进一步优选的实施方案中,本发明涉及一种 GLP-1 衍生物,其中一个亲脂性取代基以某种方式连接到一个氨基酸残基上,从而使该亲脂性取代基的一个羧基与该氨基酸残基的一个氨基形成酰胺键。

在一个进一步优选的实施方案中,本发明涉及一种 GLP-1 衍生物,其中一个亲脂性取代基以某种方式连接到一个氨基酸残基上,从而使该亲脂性取代基的一个氨基与该氨基酸残基的一个羧基形成酰胺键。

在一个进一步优选的实施方案中,本发明涉及一种 GLP-1 衍生物,其中一个亲脂性取代基通过一个间隔基团连接到母体肽上。

在一个进一步优选的实施方案中,本发明涉及一种 GLP-1 衍生物,其中一个亲脂性取代基(任选地通过一个间隔基团)连接到母体肽所含的一个 Lys 残基的 ϵ -氨基基团上。

在一个进一步优选的实施方案中,本发明涉及一种 GLP-1 衍生物,其中一个亲脂性取代基通过一个有 1-7 个亚甲基、优选有 2 个亚甲基的不分支链烷烃 α,ω -二羧基间隔基团而连接到母体肽上,此间隔基团在母体肽的一个氨基和该亲脂性取代基的一个氨基之间形成一个桥。

在一个进一步优选的实施方案中,本发明涉及一种 GLP-1 衍生物,其中一个亲脂性取代基通过一个间隔基团而连接到母体肽上,此间隔基团是除 Cys 外的一个氨基酸残基,或是一种如 Gly-Lys 的二肽。在本文中,“一种如 Gly-Lys 的二肽”这一表达方式指这样一种二肽,其中的 C-末端氨基酸残基是 Lys、His 或 Trp,优选 Lys,其中的 N-末端氨基酸残基选自含 Ala、Arg、Asp、Asn、Gly、Glu、Gln、Ile、

Leu、Val、Phe 和 Pro 之组。

在一个进一步优选的实施方案中，本发明涉及一种 GLP-1 衍生物，其中一个亲脂性取代基通过一个间隔基团而连接到母体肽上，此间隔基团是一个除 Cys 外的氨基酸残基，或是一种如 Gly-Lys 的二肽，并且其中母体肽的一个羧基与 Lys 残基或含有一个 Lys 残基的二肽中的一个氨基形成一个酰胺键，该 Lys 残基或含有一个 Lys 残基的二肽中的另一个氨基与该亲脂性取代基中的一个羧基形成一个酰胺键。

在一个进一步优选的实施方案中，本发明涉及一种 GLP-1 衍生物，其中一个亲脂性取代基通过一个间隔基团连接到母体肽上，此间隔基团是一个除 Cys 外的氨基酸残基，或是一种如 Gly-Lys 的二肽，其中母体肽的一个氨基与该氨基酸残基间隔基团或二肽间隔基团中的一个羧基形成一个酰胺键，并且该氨基酸残基间隔基团或二肽间隔基团中的一个氨基与亲脂性取代基的一个羧基形成一个酰胺键。

在一个进一步优选的实施方案中，本发明涉及一种 GLP-1 衍生物，其中一个亲脂性取代基通过一个间隔基团连接到母体肽上，此间隔基团是一个除 Cys 外的氨基酸残基，或是一种如 Gly-Lys 的二肽，并且其中母体肽的一个羧基与该氨基酸残基间隔基团或二肽间隔基团中的一个氨基形成一个酰胺键，该氨基酸残基间隔基团或二肽间隔基团中的羧基与亲脂性取代基的一个氨基形成一个酰胺键。

在一个进一步优选的实施方案中，本发明涉及一种 GLP-1 衍生物，其中一个亲脂性取代基通过一个间隔基团连接到母体肽上，此间隔基团是一个除 Cys 外的氨基酸残基，或是一种如 Gly-Lys 的二肽，并且其中母体肽的一个羧基与作为间隔基团的 Asp 或 Glu、或含有一个 Asp 或 Glu 残基的二肽间隔基团中的一个氨基形成一个酰胺键，该间隔基团中的一个羧基与该亲脂性取代基中的一个氨基形成一个酰胺键。

在一个进一步优选的实施方案中，本发明涉及一种具有一个亲脂性取代基的 GLP-1 衍生物，该亲脂性取代基含有一个部分或完全氢化的环戊菲(cyclopentanophenathrene)骨架。

在一个进一步优选的实施方案中，本发明涉及一种 GLP-1 衍生

物，它有一个为直链或分支烷基的亲脂性取代基。

在一个进一步优选的实施方案中，本发明涉及一种 GLP-1 衍生物，它有一个为直链或分支脂肪酸的酰基的亲脂性取代基。

在一个进一步优选的实施方案中，本发明涉及一种有一个亲脂性取代基的 GLP-1 衍生物，该亲脂性取代基是选自含 $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_n\text{CO}-$ 之组的一个酰基，其中 n 是 4-38 的整数，优选 4-24 的整数，进一步优选该亲脂性取代基是选自含 $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_6\text{CO}-$ ， $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_8\text{CO}-$ ， $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{10}\text{CO}-$ ， $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{12}\text{CO}-$ ， $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{14}\text{CO}-$ ， $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{16}\text{CO}-$ ， $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{18}\text{CO}-$ ， $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{20}\text{CO}-$ 和 $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{22}\text{CO}-$ 之组。

在一个进一步优选的实施方案中，本发明涉及一种具有有一个亲脂性取代基的 GLP-1 衍生物，该亲脂性取代基是直链或分支烷烃 α,ω -二羧酸的一个酰基。

在一个进一步优选的实施方案中，本发明涉及一种有一个亲脂性取代基的 GLP-1 衍生物，该亲脂性取代基是选自含 $\text{HOOC}(\text{CH}_2)_m\text{CO}-$ 之组的一个酰基，其中 m 是 4-38 的整数，优选 4-24 的整数，进一步优选该亲脂性取代基选自含 $\text{HOOC}(\text{CH}_2)_{14}\text{CO}-$ ， $\text{HOOC}(\text{CH}_2)_{16}\text{CO}-$ ， $\text{HOOC}(\text{CH}_2)_{18}\text{CO}-$ ， $\text{HOOC}(\text{CH}_2)_{20}\text{CO}-$ 和 $\text{HOOC}(\text{CH}_2)_{22}\text{CO}-$ 之组。

在一个进一步优选的实施方案中，本发明涉及一种 GLP-1 衍生物，它有一个具有式 $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_p((\text{CH}_2)_q\text{COOH})\text{CHNH-CO}(\text{CH}_2)_2\text{CO}-$ 的亲脂性取代基，其中 p 和 q 是整数，并且 $p+q$ 是 8-33 的整数，优选是 12-28 的整数。

在一个进一步优选的实施方案中，本发明涉及一种 GLP-1 衍生物，它有一个具有式 $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_r\text{CO-NHCH}(\text{COOH})(\text{CH}_2)_2\text{CO}-$ 的亲脂性取代基，其中 r 是 10-24 的整数。

在一个进一步优选的实施方案中，本发明涉及一种 GLP-1 衍生物，它有一个具有式 $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_s\text{CO-NHCH}((\text{CH}_2)_2\text{COOH})\text{CO}-$ 的亲脂性取代基，其中 s 是 8-24 的整数。

在一个进一步优选的实施方案中，本发明涉及一种 GLP-1 衍生物，它有一个具有式 $\text{COOH}(\text{CH}_2)_t\text{CO}-$ 的亲脂性取代基，其中 t 是 8-24

的整数。

在一个进一步优选的实施方案中，本发明涉及一种 GLP-1 衍生物，它有一个具有式 $\text{-NHCH(COOH)(CH}_2\text{)}_4\text{NH-CO(CH}_2\text{)}_u\text{CH}_3$ 的亲脂性取代基，其中 u 是 8-18 的整数。

在一个进一步优选的实施方案中，本发明涉及一种 GLP-1 衍生物，它有一个具有式 $\text{-NHCH(COOH)(CH}_2\text{)}_4\text{NH-COCH((CH}_2\text{)}_2\text{COOH)NH-CO(CH}_2\text{)}_w\text{CH}_3$ 的亲脂性取代基，其中 w 是 10-16 的整数。

在一个进一步优选的实施方案中，本发明涉及一种 GLP-1 衍生物，它有一个具有式 $\text{-NHCH(COOH)(CH}_2\text{)}_4\text{NH-CO(CH}_2\text{)}_2\text{CH(COOH)NH-CO(CH}_2\text{)}_x\text{CH}_3$ 的亲脂性取代基，其中 x 是 10-16 的整数。

在一个进一步优选的实施方案中，本发明涉及一种 GLP-1 衍生物，它有一个具有式 $\text{-NHCH(COOH)(CH}_2\text{)}_4\text{NH-CO(CH}_2\text{)}_2\text{CH(COOH)NH-CO(CH}_2\text{)}_y\text{CH}_3$ 的亲脂性取代基，其中 y 是 0 或 1-22 的整数。

在一个进一步优选的实施方案中，本发明涉及一种 GLP-1 衍生物，它有一个可以带负电荷的亲脂性取代基。这样的亲脂性取代基例如可以是有一个羧基的取代基。

在一个进一步优选的实施方案中，本发明涉及一种 GLP-1 衍生物，其母体肽选自 GLP-1(1-45)或其类似物。

在一个进一步优选的实施方案中，本发明涉及一种 GLP-1 衍生物，它由选自含 GLP-1(7-35), GLP-1(7-36), GLP-1(7-36)酰胺, GLP-1(7-37), GLP-1(7-38), GLP-1(7-39), GLP-1(7-40)和 GLP-1(7-41)之组的一个 GLP-1 片段或其类似物衍生得到。

在一个进一步优选的实施方案中，本发明涉及一种 GLP-1 类似物，它由选自含 GLP-1(1-35), GLP-1(1-36), GLP-1(1-36)酰胺, GLP-1(1-37), GLP-1(1-38), GLP-1(1-39), GLP-1(1-40)和 GLP-1(1-41)之组的 GLP-1 类似物或其类似物衍生得到。

在一个进一步优选的实施方案中，本发明涉及一种 GLP-1 衍生

物,其中所指定类似物包含的衍生物中总数至多 15 个、优选至多 10 个氨基酸残基已被任何 α -氨基酸残基更换。

在一个进一步优选的实施方案中,本发明涉及一种 GLP-1 衍生物,其中所指定类似物包含的衍生物中至多 15 个、优选至多 10 个氨基酸残基已被任何可以由遗传密码编码的 α -氨基酸残基更换。

在一个进一步优选的实施方案中,本发明涉及一种 GLP-1 衍生物,其中所指定类似物包含的衍生物中至多 6 个氨基酸残基已被另一可以由遗传密码编码的 α -氨基酸残基更换。

在一个进一步优选的实施方案中,本发明涉及一种 GLP-1(A-B)衍生物,其中 A 是 1-7 的整数, B 是 38-45 的整数;或此衍生物的类似物,其中含有一个连接到 C-末端氨基酸残基上的亲脂性取代基,并且任选地含有连接到另一氨基酸残基上的第二个亲脂性取代基。

在一个进一步优选的实施方案中,本发明衍生物的母体肽选自以下成员:Arg²⁶-GLP-1(7-37), Arg³⁴-GLP-1(7-37), Lys³⁶-GLP-1(7-37), Arg^{26,34}Lys³⁶-GLP-1(7-37), Arg^{26,34}Lys³⁸-GLP-1(7-38), Arg^{26,34}Lys³⁹-GLP-1(7-39), Arg^{26,34}Lys⁴⁰-GLP-1(7-40), Arg²⁶Lys³⁶-GLP-1(7-37), Arg³⁴Lys³⁶-GLP-1(7-37), Arg²⁶Lys³⁹-GLP-1(7-39), Arg³⁴Lys⁴⁰-GLP-1(7-40), Arg^{26,34}Lys^{36,39}-GLP-1(7-39), Arg^{26,34}Lys^{36,40}-GLP-1(7-40), Gly⁸Arg²⁶-GLP-1(7-37), Gly⁸Arg³⁴-GLP-1(7-37), Gly⁸Lys³⁶-GLP-1(7-37), Gly⁸Arg^{26,34} Lys³⁶-GLP-1(7-37), Gly⁸Arg^{26,34} Lys³⁹-GLP-1(7-39), Gly⁸Arg^{26,34} Lys⁴⁰-GLP-1(7-40), Gly⁸Arg²⁶ Lys³⁶-GLP-1(7-37), Gly⁸Arg³⁴ Lys³⁶-GLP-1(7-37), Gly⁸Arg²⁶ Lys³⁹-GLP-1(7-39), Gly⁸Arg³⁴ Lys⁴⁰-GLP-1(7-40), Gly⁸Arg^{26,34} Lys^{36,39}-GLP-1(7-39) 和 Gly⁸Arg^{26,34} Lys^{36,40}-GLP-1(7-40)。

在一个进一步优选的实施方案中,本发明衍生物的母体肽选自以下成员: Arg^{26,34} Lys³⁸-GLP-1(7-38), Arg^{26,34} Lys³⁹-GLP-1(7-39), Arg^{26,34} Lys⁴⁰-GLP-1(7-40), Arg^{26,34} Lys⁴¹-GLP-1(7-41), Arg^{26,34} Lys⁴²-GLP-1(7-42), Arg^{26,34} Lys⁴³-GLP-1(7-43), Arg^{26,34} Lys⁴⁴-

GLP-1(7-44), Arg^{26,34} Lys⁴⁵-GLP-1(7-45), Arg^{26,34} Lys³⁸-GLP-1(1-38), Arg^{26,34} Lys³⁹-GLP-1(1-39), Arg^{26,34} Lys⁴⁰-GLP-1(1-40), Arg^{26,34} Lys⁴¹-GLP-1(1-41), Arg^{26,34} Lys⁴²-GLP-1(1-42), Arg^{26,34} Lys⁴³-GLP-1(1-43), Arg^{26,34} Lys⁴⁴-GLP-1(1-44), Arg^{26,34} Lys⁴⁵-GLP-1(1-45), Arg^{26,34} Lys³⁸-GLP-1(2-38), Arg^{26,34} Lys³⁹-GLP-1(2-39), Arg^{26,34} Lys⁴⁰-GLP-1(2-40), Arg^{26,34} Lys⁴¹-GLP-1(2-41), Arg^{26,34} Lys⁴²-GLP-1(2-42), Arg^{26,34} Lys⁴³-GLP-1(2-43), Arg^{26,34} Lys⁴⁴-GLP-1(2-44), Arg^{26,34} Lys⁴⁵-GLP-1(2-45), Arg^{26,34} Lys³⁸-GLP-1(3-38), Arg^{26,34} Lys³⁹-GLP-1(3-39), Arg^{26,34} Lys⁴⁰-GLP-1(3-40), Arg^{26,34} Lys⁴¹-GLP-1(3-41), Arg^{26,34} Lys⁴²-GLP-1(3-42), Arg^{26,34} Lys⁴³-GLP-1(3-43), Arg^{26,34} Lys⁴⁴-GLP-1(3-44), Arg^{26,34} Lys⁴⁵-GLP-1(3-45), Arg^{26,34} Lys³⁸-GLP-1(4-38), Arg^{26,34} Lys³⁹-GLP-1(4-39), Arg^{26,34} Lys⁴⁰-GLP-1(4-40), Arg^{26,34} Lys⁴¹-GLP-1(4-41), Arg^{26,34} Lys⁴²-GLP-1(4-42), Arg^{26,34} Lys⁴³-GLP-1(4-43), Arg^{26,34} Lys⁴⁴-GLP-1(4-44), Arg^{26,34} Lys⁴⁵-GLP-1(4-45), Arg^{26,34} Lys³⁸-GLP-1(5-38), Arg^{26,34} Lys³⁹-GLP-1(5-39), Arg^{26,34} Lys⁴⁰-GLP-1(5-40), Arg^{26,34} Lys⁴¹-GLP-1(5-41), Arg^{26,34} Lys⁴²-GLP-1(5-42), Arg^{26,34} Lys⁴³-GLP-1(5-43), Arg^{26,34} Lys⁴⁴-GLP-1(5-44), Arg^{26,34} Lys⁴⁵-GLP-1(5-45), Arg^{26,34} Lys³⁸-GLP-1(6-38), Arg^{26,34} Lys³⁹-GLP-1(6-39), Arg^{26,34} Lys⁴⁰-GLP-1(6-40), Arg^{26,34} Lys⁴¹-GLP-1(6-41), Arg^{26,34} Lys⁴²-GLP-1(6-42), Arg^{26,34} Lys⁴³-GLP-1(6-43), Arg^{26,34} Lys⁴⁴-GLP-1(6-44), Arg^{26,34} Lys⁴⁵-GLP-1(6-45), Arg²⁶ Lys³⁸-GLP-1(1-38), Arg³⁴ Lys³⁸-GLP-1(1-38), Arg^{26,34} Lys^{36,38}-GLP-1(1-38), Arg²⁶ Lys³⁸-GLP-1(7-38), Arg³⁴ Lys³⁸-GLP-1(7-38), Arg^{26,34} Lys^{36,38}-GLP-1(7-38), Arg^{26,34} Lys³⁸-GLP-1(7-38), Arg²⁶ Lys³⁹-GLP-1(1-39), Arg³⁴ Lys³⁹-GLP-1(1-39), Arg^{26,34} Lys^{36,39}-GLP-1(1-39), Arg²⁶ Lys³⁹-GLP-1(7-39), Arg³⁴ Lys³⁹-GLP-1(7-39)和 Arg^{26,34} Lys^{36,39}-GLP-1(7-39).

在一个进一步优选的实施方案中,本发明涉及一种 GLP-1 衍生物,其中的母体肽选自以下成员:[Arg²⁶-GLP-1(7-37),Arg³⁴-GLP-1(7-

37), Lys³⁶-GLP-1(7-37), Arg^{26,34}Lys³⁶-GLP-1(7-37), Arg²⁶Lys³⁶-GLP-1(7-37), Arg³⁴Lys³⁶-GLP-1(7-37), Gly⁸Arg²⁶-GLP-1(7-37), Gly⁸Arg³⁴-GLP-1(7-37), Gly⁸Lys³⁶-GLP-1(7-37), Gly⁸Arg^{26,34}Lys³⁶-GLP-1(7-37), Gly⁸Arg²⁶Lys³⁶-GLP-1(7-37) 和 Gly⁸Arg³⁴Lys³⁶-GLP-1(7-37).

在一个进一步优选的实施方案中, 本发明涉及一种 GLP-1 衍生物, 其中的母体肽选自以下成员: Arg²⁶Lys³⁸-GLP-1(7-38), Arg^{26,34}Lys³⁸-GLP-1(7-38), Arg^{26,34}Lys^{36,38}-GLP-1(7-38), Gly⁸Arg²⁶Lys³⁸-GLP-1(7-38) 和 Gly⁸Arg^{26,34}Lys^{36,38}-GLP-1(7-38).

在一个进一步优选的实施方案中, 本发明涉及一种 GLP-1 衍生物, 其中的母体肽选自以下成员: Arg²⁶Lys³⁹-GLP-1(7-39), Arg^{26,34}Lys^{36,39}-GLP-1(7-39), Gly⁸Arg²⁶Lys³⁹-GLP-1(7-39) 和 Gly⁸Arg^{26,34}Lys^{36,39}-GLP-1(7-39).

在一个进一步优选的实施方案中, 本发明涉及一种 GLP-1 衍生物, 其中的母体肽选自以下成员: Arg³⁴Lys⁴⁰-GLP-1(7-40), Arg^{26,34}Lys^{36,40}-GLP-1(7-40), Gly⁸Arg³⁴Lys⁴⁰-GLP-1(7-40) 和 Gly⁸Arg^{26,34}Lys^{36,40}-GLP-1(7-40).

在一个进一步优选的实施方案中, 本发明涉及一种 GLP-1 衍生物, 其中的母体肽选自以下成员:

Lys²⁶(N^ε-十四酰基)-GLP-1(7-37);
 Lys³⁴(N^ε-十四酰基)-GLP-1(7-37);
 Lys^{26,34}-双(N^ε-十四酰基)-GLP-1(7-37);
 Gly⁸Lys²⁶(N^ε-十四酰基)-GLP-1(7-37);
 Gly⁸Lys³⁴(N^ε-十四酰基)-GLP-1(7-37);
 Gly⁸Lys^{26,34}-双(N^ε-十四酰基)-GLP-1(7-37);
 Arg²⁶Lys³⁴(N^ε-十四酰基)-GLP-1(7-37);
 Lys²⁶(N^ε-十四酰基)-GLP-1(7-38);
 Lys³⁴(N^ε-十四酰基)-GLP-1(7-38);
 Lys^{26,34}-双(N^ε-十四酰基)-GLP-1(7-38);

Gly⁸Lys²⁶(N^ε-十四酰基)-GLP-1(7-38);
Gly⁸Lys³⁴(N^ε-十四酰基)-GLP-1(7-38);
Gly⁸Lys^{26,34}-双(N^ε-十四酰基)-GLP-1(7-38);
Arg²⁶Lys³⁴(N^ε-十四酰基)-GLP-1(7-38);
Lys²⁶(N^ε-十四酰基)-GLP-1(7-39);
Lys³⁴(N^ε-十四酰基)-GLP-1(7-39);
Lys^{26,34}-双(N^ε-十四酰基)-GLP-1(7-39);
Gly⁸Lys²⁶(N^ε-十四酰基)-GLP-1(7-39);
Gly⁸Lys³⁴(N^ε-十四酰基)-GLP-1(7-39);
Gly⁸Lys^{26,34}-双(N^ε-十四酰基)-GLP-1(7-39);
Arg²⁶Lys³⁴(N^ε-十四酰基)-GLP-1(7-39);
Lys²⁶(N^ε-十四酰基)-GLP-1(7-40);
Lys³⁴(N^ε-十四酰基)-GLP-1(7-40);
Lys^{26,34}-双(N^ε-十四酰基)-GLP-1(7-40);
Gly⁸Lys²⁶(N^ε-十四酰基)-GLP-1(7-40);
Gly⁸Lys³⁴(N^ε-十四酰基)-GLP-1(7-40);
Gly⁸Lys^{26,34}-双(N^ε-十四酰基)-GLP-1(7-40);
Arg²⁶Lys³⁴(N^ε-十四酰基)-GLP-1(7-40);
Lys²⁶(N^ε-十四酰基)-GLP-1(7-36);
Lys³⁴(N^ε-十四酰基)-GLP-1(7-36);
Lys^{26,34}-双(N^ε-十四酰基)-GLP-1(7-36);
Gly⁸Lys²⁶(N^ε-十四酰基)-GLP-1(7-36);
Gly⁸Lys³⁴(N^ε-十四酰基)-GLP-1(7-36);
Gly⁸Lys^{26,34}-双(N^ε-十四酰基)-GLP-1(7-36);
Arg²⁶Lys³⁴(N^ε-十四酰基)-GLP-1(7-36);
Lys²⁶(N^ε-十四酰基)-GLP-1(7-35);
Lys³⁴(N^ε-十四酰基)-GLP-1(7-35);
Lys^{26,34}-双(N^ε-十四酰基)-GLP-1(7-35);
Gly⁸Lys²⁶(N^ε-十四酰基)-GLP-1(7-35);
Gly⁸Lys³⁴(N^ε-十四酰基)-GLP-1(7-35);
Gly⁸Lys^{26,34}-双(N^ε-十四酰基)-GLP-1(7-35);

Arg²⁶Lys³⁴(N^ε-十四酰基)-GLP-1(7-35);
Lys²⁶(N^ε-十四酰基)-GLP-1(7-36)酰胺;
Lys³⁴(N^ε-十四酰基)-GLP-1(7-36)酰胺;
Lys^{26,34}-双(N^ε-十四酰基)-GLP-1(7-36)酰胺;
Gly⁸Lys²⁶(N^ε-十四酰基)-GLP-1(7-36)酰胺;
Gly⁸Lys³⁴(N^ε-十四酰基)-GLP-1(7-36)酰胺;
Gly⁸Lys^{26,34}-双(N^ε-十四酰基)-GLP-1(7-36)酰胺;
Arg²⁶Lys³⁴(N^ε-十四酰基)-GLP-1(7-36)酰胺;
Gly⁸Arg²⁶Lys³⁴(N^ε-十四酰基)-GLP-1(7-37);
Lys²⁶(N^ε-十四酰基)Arg³⁴-GLP-1(7-37);
Gly⁸Lys²⁶(N^ε-十四酰基)Arg³⁴-GLP-1(7-37);
Arg^{26,34}Lys³⁶(N^ε-十四酰基)-GLP-1(7-37);
Gly⁸Arg^{26,34}Lys³⁶(N^ε-十四酰基)-GLP-1(7-37);
Gly⁸Arg²⁶Lys³⁴(N^ε-十四酰基)-GLP-1(7-38);
Lys²⁶(N^ε-十四酰基)Arg³⁴-GLP-1(7-38);
Gly⁸Lys²⁶(N^ε-十四酰基)Arg³⁴-GLP-1(7-38);
Arg^{26,34}Lys³⁶(N^ε-十四酰基)-GLP-1(7-38);
Arg^{26,34}Lys³⁸(N^ε-十四酰基)-GLP-1(7-38);
Gly⁸Arg^{26,34}Lys³⁶(N^ε-十四酰基)-GLP-1(7-38);
Gly⁸Arg²⁶Lys³⁴(N^ε-十四酰基)-GLP-1(7-39);
Lys²⁶(N^ε-十四酰基)Arg³⁴-GLP-1(7-39);
Gly⁸Lys²⁶(N^ε-十四酰基)Arg³⁴-GLP-1(7-39);
Arg^{26,34}Lys³⁶(N^ε-十四酰基)-GLP-1(7-39);
Gly⁸Arg^{26,34}Lys³⁶(N^ε-十四酰基)-GLP-1(7-39);
Gly⁸Arg²⁶Lys³⁴(N^ε-十四酰基)-GLP-1(7-40);
Lys²⁶(N^ε-十四酰基)Arg³⁴-GLP-1(7-40);
Gly⁸Lys²⁶(N^ε-十四酰基)Arg³⁴-GLP-1(7-40);
Arg^{26,34}Lys³⁶(N^ε-十四酰基)-GLP-1(7-40);
Gly⁸Arg^{26,34}Lys³⁶(N^ε-十四酰基)-GLP-1(7-40);
Lys²⁶(N^ε-(ω-羧基十九酰基))-GLP-1(7-37);
Lys³⁴(N^ε-(ω-羧基十九酰基))-GLP-1(7-37);

Lys^{26,34}-双(N^ε-(ω-羧基十九酰基))-GLP-1(7-37);
Gly⁸Lys²⁶(N^ε-(ω-羧基十九酰基))-GLP-1(7-37);
Gly⁸Lys³⁴(N^ε-(ω-羧基十九酰基))-GLP-1(7-37);
Gly⁸Lys^{26,34}-双(N^ε-(ω-羧基十九酰基))-GLP-1(7-37);
Lys²⁶(N^ε-(ω-羧基十九酰基))-GLP-1(7-38);
Lys³⁴(N^ε-(ω-羧基十九酰基))-GLP-1(7-38);
Lys^{26,34}-双(N^ε-(ω-羧基十九酰基))-GLP-1(7-38);
Gly⁸Lys²⁶(N^ε-(ω-羧基十九酰基))-GLP-1(7-38);
Gly⁸Lys³⁴(N^ε-(ω-羧基十九酰基))-GLP-1(7-38);
Gly⁸Lys^{26,34}-双(N^ε-(ω-羧基十九酰基))-GLP-1(7-38);
Lys²⁶(N^ε-(ω-羧基十九酰基))-GLP-1(7-39);
Lys³⁴(N^ε-(ω-羧基十九酰基))-GLP-1(7-39);
Lys^{26,34}-双(N^ε-(ω-羧基十九酰基))-GLP-1(7-39);
Gly⁸Lys²⁶(N^ε-(ω-羧基十九酰基))-GLP-1(7-39);
Gly⁸Lys³⁴(N^ε-(ω-羧基十九酰基))-GLP-1(7-39);
Gly⁸Lys^{26,34}-双(N^ε-(ω-羧基十九酰基))-GLP-1(7-39);
Lys²⁶(N^ε-(ω-羧基十九酰基))-GLP-1(7-40);
Lys³⁴(N^ε-(ω-羧基十九酰基))-GLP-1(7-40);
Lys^{26,34}-双(N^ε-(ω-羧基十九酰基))-GLP-1(7-40);
Gly⁸Lys²⁶(N^ε-(ω-羧基十九酰基))-GLP-1(7-40);
Gly⁸Lys³⁴(N^ε-(ω-羧基十九酰基))-GLP-1(7-40);
Gly⁸Lys^{26,34}-双(N^ε-(ω-羧基十九酰基))-GLP-1(7-40);
Lys²⁶(N^ε-(ω-羧基十九酰基))-GLP-1(7-36);
Lys³⁴(N^ε-(ω-羧基十九酰基))-GLP-1(7-36);
Lys^{26,34}-双(N^ε-(ω-羧基十九酰基))-GLP-1(7-36);
Gly⁸Lys²⁶(N^ε-(ω-羧基十九酰基))-GLP-1(7-36);
Gly⁸Lys³⁴(N^ε-(ω-羧基十九酰基))-GLP-1(7-36);
Gly⁸Lys^{26,34}-双(N^ε-(ω-羧基十九酰基))-GLP-1(7-36);
Lys²⁶(N^ε-(ω-羧基十九酰基))-GLP-1(7-36)酰胺;
Lys³⁴(N^ε-(ω-羧基十九酰基))-GLP-1(7-36)酰胺;
Lys^{26,34}-双(N^ε-(ω-羧基十九酰基))-GLP-1(7-36)酰胺;

Gly⁸Lys²⁶(N^ε-(ω-羧基十九酰基))-GLP-1(7-36)酰胺;
Gly⁸Lys³⁴(N^ε-(ω-羧基十九酰基))-GLP-1(7-36)酰胺;
Gly⁸Lys^{26,34}-双(N^ε-(ω-羧基十九酰基))-GLP-1(7-36)酰胺;
Lys²⁶(N^ε-(ω-羧基十九酰基))-GLP-1(7-35);
Lys³⁴(N^ε-(ω-羧基十九酰基))-GLP-1(7-35);
Lys^{26,34}-双 N^ε-(ω-羧基十九酰基))-GLP-1(7-35);
Gly⁸Lys²⁶(N^ε-(ω-羧基十九酰基))-GLP-1(7-35);
Gly⁸Lys³⁴(N^ε-(ω-羧基十九酰基))-GLP-1(7-35);
Gly⁸Lys^{26,34}-双(N^ε-(ω-羧基十九酰基))-GLP-1(7-35);
Arg²⁶Lys³⁴(N^ε-(ω-羧基十九酰基))-GLP-1(7-37);
Gly⁸Arg²⁶Lys³⁴(N^ε-(ω-羧基十九酰基))-GLP-1(7-37);
Lys²⁶(N^ε-(ω-羧基十九酰基))Arg³⁴-GLP-1(7-37);
Gly⁸Lys²⁶(N^ε-(ω-羧基十九酰基))Arg³⁴-GLP-1(7-37);
Arg^{26,34}Lys³⁶(N^ε-(ω-羧基十九酰基))-GLP-1(7-37);
Gly⁸Arg^{26,34}Lys³⁶(N^ε-(ω-羧基十九酰基))-GLP-1(7-37);
Arg²⁶Lys³⁴(N^ε-(ω-羧基十九酰基))-GLP-1(7-38);
Gly⁸Arg²⁶Lys³⁴(N^ε-(ω-羧基十九酰基))-GLP-1(7-38);
Lys²⁶(N^ε-(ω-羧基十九酰基))Arg³⁴-GLP-1(7-38);
Gly⁸Lys²⁶(N^ε-(ω-羧基十九酰基))Arg³⁴-GLP-1(7-38);
Arg^{26,34}Lys³⁶(N^ε-(ω-羧基十九酰基))-GLP-1(7-38);
Arg^{26,34}Lys³⁸(N^ε-(ω-羧基十九酰基))-GLP-1(7-38);
Gly⁸Arg^{26,34}Lys³⁶(N^ε-(ω-羧基十九酰基))-GLP-1(7-38);
Arg²⁶Lys³⁴(N^ε-(ω-羧基十九酰基))-GLP-1(7-39);
Gly⁸Arg²⁶Lys³⁴(N^ε-(ω-羧基十九酰基))-GLP-1(7-39);
Lys²⁶(N^ε-(ω-羧基十九酰基))Arg³⁴-GLP-1(7-39);
Gly⁸Lys²⁶(N^ε-(ω-羧基十九酰基))Arg³⁴-GLP-1(7-39);
Arg^{26,34}Lys³⁶(N^ε-(ω-羧基十九酰基))-GLP-1(7-39);
Gly⁸Arg^{26,34}Lys³⁶(N^ε-(ω-羧基十九酰基))-GLP-1(7-39);
Arg²⁶Lys³⁴(N^ε-(ω-羧基十九酰基))-GLP-1(7-40);
Gly⁸Arg²⁶Lys³⁴(N^ε-(ω-羧基十九酰基))-GLP-1(7-40);
Lys²⁶(N^ε-(ω-羧基十九酰基))Arg³⁴-GLP-1(7-40);

Gly⁸Lys²⁶(N^ε-(ω-羧基十九酰基))Arg³⁴-GLP-1(7-40);
Arg^{26,34}Lys³⁶(N^ε-(ω-羧基十九酰基))-GLP-1(7-40);
Gly⁸Arg^{26,34}Lys³⁶(N^ε-(ω-羧基十九酰基))-GLP-1(7-40);
Lys²⁶(N^ε-(7-脱氧胆酰基))-GLP-1(7-37);
Lys³⁴(N^ε-(7-脱氧胆酰基))-GLP-1(7-37);
Lys^{26,34}-双(N^ε-(7-脱氧胆酰基))-GLP-1(7-37);
Gly⁸Lys²⁶(N^ε-(7-脱氧胆酰基))-GLP-1(7-37);
Gly⁸Lys³⁴(N^ε-(7-脱氧胆酰基))-GLP-1(7-37);
Gly⁸Lys^{26,34}-双(N^ε-(7-脱氧胆酰基))-GLP-1(7-37);
Arg²⁶Lys³⁴(N^ε-(7-脱氧胆酰基))-GLP-1(7-37);
Lys²⁶(N^ε-(7-脱氧胆酰基))-GLP-1(7-38);
Lys³⁴(N^ε-(7-脱氧胆酰基))-GLP-1(7-38);
Lys^{26,34}-双(N^ε-(7-脱氧胆酰基))-GLP-1(7-38);
Gly⁸Lys²⁶(N^ε-(7-脱氧胆酰基))-GLP-1(7-38);
Gly⁸Lys³⁴(N^ε-(7-脱氧胆酰基))-GLP-1(7-38);
Gly⁸Lys^{26,34}-双(N^ε-(7-脱氧胆酰基))-GLP-1(7-38);
Arg²⁶Lys³⁴(N^ε-(7-脱氧胆酰基))-GLP-1(7-38);
Lys²⁶(N^ε-(7-脱氧胆酰基))-GLP-1(7-39);
Lys³⁴(N^ε-(7-脱氧胆酰基))-GLP-1(7-39);
Lys^{26,34}-双(N^ε-(7-脱氧胆酰基))-GLP-1(7-39);
Gly⁸Lys²⁶(N^ε-(7-脱氧胆酰基))-GLP-1(7-39);
Gly⁸Lys³⁴(N^ε-(7-脱氧胆酰基))-GLP-1(7-39);
Gly⁸Lys^{26,34}-双(N^ε-(7-脱氧胆酰基))-GLP-1(7-39);
Arg²⁶Lys³⁴(N^ε-(7-脱氧胆酰基))-GLP-1(7-39);
Lys²⁶(N^ε-(7-脱氧胆酰基))-GLP-1(7-40);
Lys³⁴(N^ε-(7-脱氧胆酰基))-GLP-1(7-40);
Lys^{26,34}-双(N^ε-(7-脱氧胆酰基))-GLP-1(7-40);
Gly⁸Lys²⁶(N^ε-(7-脱氧胆酰基))-GLP-1(7-40);
Gly⁸Lys³⁴(N^ε-(7-脱氧胆酰基))-GLP-1(7-40);
Gly⁸Lys^{26,34}-双(N^ε-(7-脱氧胆酰基))-GLP-1(7-40);
Arg²⁶Lys³⁴(N^ε-(7-脱氧胆酰基))-GLP-1(7-40);

Lys²⁶(N^ε-(7-脱氧胆酰基))-GLP-1(7-36);
Lys³⁴(N^ε-(7-脱氧胆酰基))-GLP-1(7-36);
Lys^{26,34}-双(N^ε-(7-脱氧胆酰基))-GLP-1(7-36);
Gly⁸Lys²⁶(N^ε-(7-脱氧胆酰基))-GLP-1(7-36);
Gly⁸Lys³⁴(N^ε-(7-脱氧胆酰基))-GLP-1(7-36);
Gly⁸Lys^{26,34}-双(N^ε-(7-脱氧胆酰基))-GLP-1(7-36);
Arg²⁶Lys³⁴(N^ε-(7-脱氧胆酰基))-GLP-1(7-36);
Lys²⁶(N^ε-(7-脱氧胆酰基))-GLP-1(7-35);
Lys³⁴(N^ε-(7-脱氧胆酰基))-GLP-1(7-35);
Lys^{26,34}-双(N^ε-(7-脱氧胆酰基))-GLP-1(7-35);
Gly⁸Lys²⁶(N^ε-(7-脱氧胆酰基))-GLP-1(7-35);
Gly⁸Lys³⁴(N^ε-(7-脱氧胆酰基))-GLP-1(7-35);
Gly⁸Lys^{26,34}-双(N^ε-(7-脱氧胆酰基))-GLP-1(7-35);
Arg²⁶Lys³⁴(N^ε-(7-脱氧胆酰基))-GLP-1(7-35);
Lys²⁶(N^ε-(7-脱氧胆酰基))-GLP-1(7-36)酰胺;
Lys³⁴(N^ε-(7-脱氧胆酰基))-GLP-1(7-36)酰胺;
Lys^{26,34}-双(N^ε-(7-脱氧胆酰基))-GLP-1(7-36)酰胺;
Gly⁸Lys²⁶(N^ε-(7-脱氧胆酰基))-GLP-1(7-36)酰胺;
Gly⁸Lys³⁴(N^ε-(7-脱氧胆酰基))-GLP-1(7-36)酰胺;
Gly⁸Lys^{26,34}-双(N^ε-(7-脱氧胆酰基))-GLP-1(7-35)酰胺;
Arg²⁶Lys³⁴(N^ε-(7-脱氧胆酰基))-GLP-1(7-35)酰胺;
Gly⁸Arg²⁶Lys³⁴(N^ε-(7-脱氧胆酰基))-GLP-1(7-37);
Lys²⁶(N^ε-(7-脱氧胆酰基))Arg³⁴-GLP-1(7-37);
Gly⁸Lys²⁶(N^ε-(7-脱氧胆酰基))Arg³⁴-GLP-1(7-37);
Arg^{26,34}Lys³⁶(N^ε-(7-脱氧胆酰基))-GLP-1(7-37);
Gly⁸Arg^{26,34}Lys³⁶(N^ε-(7-脱氧胆酰基))-GLP-1(7-37);
Lys²⁶(N^ε-(胆酰基))-GLP-1(7-37);
Lys³⁴(N^ε-(胆酰基))-GLP-1(7-37);
Lys^{26,34}-双(N^ε-(胆酰基))-GLP-1(7-37);
Gly⁸Lys²⁶(N^ε-(胆酰基))-GLP-1(7-37);
Gly⁸Lys³⁴(N^ε-(胆酰基))-GLP-1(7-37);

Gly⁸Lys^{26,34}-双(N^ε-(胆酰基))-GLP-1(7-37);
Arg²⁶Lys³⁴(N^ε-(胆酰基))-GLP-1(7-37);
Gly⁸Arg²⁶Lys³⁴(N^ε-(7-脱氧胆酰基))-GLP-1(7-38);
Lys²⁶(N^ε-(7-脱氧胆酰基))Arg³⁴-GLP-1(7-38);
Gly⁸Lys²⁶(N^ε-(7-脱氧胆酰基))Arg³⁴-GLP-1(7-38);
Arg^{26,34}Lys³⁶(N^ε-(7-脱氧胆酰基))-GLP-1(7-38);
Arg^{26,34}Lys³⁸(N^ε-(7-脱氧胆酰基))-GLP-1(7-38);
Gly⁸Arg^{26,34}Lys³⁶(N^ε-(7-脱氧胆酰基))-GLP-1(7-38);
Lys²⁶(N^ε-(胆酰基))-GLP-1(7-38);
Lys³⁴(N^ε-(胆酰基))-GLP-1(7-38);
Lys^{26,34}-双(N^ε-(胆酰基))-GLP-1(7-38);
Gly⁸Lys²⁶(N^ε-(胆酰基))-GLP-1(7-38);
Gly⁸Lys³⁴(N^ε-(胆酰基))-GLP-1(7-38);
Gly⁸Lys^{26,34}-双(N^ε-(胆酰基))-GLP-1(7-38);
Arg²⁶Lys³⁴(N^ε-(胆酰基))-GLP-1(7-38);
Gly⁸Arg²⁶Lys³⁴(N^ε-(7-脱氧胆酰基))-GLP-1(7-39);
Lys²⁶(N^ε-(7-脱氧胆酰基))Arg³⁴-GLP-1(7-39);
Gly⁸Lys²⁶(N^ε-(7-脱氧胆酰基))Arg³⁴-GLP-1(7-39);
Arg^{26,34}Lys³⁶(N^ε-(7-脱氧胆酰基))-GLP-1(7-39);
Gly⁸Arg^{26,34}Lys³⁶(N^ε-(7-脱氧胆酰基))-GLP-1(7-39);
Lys²⁶(N^ε-(胆酰基))-GLP-1(7-39);
Lys³⁴(N^ε-(胆酰基))-GLP-1(7-39);
Lys^{26,34}-双(N^ε-(胆酰基))-GLP-1(7-39);
Gly⁸Lys²⁶(N^ε-(胆酰基))-GLP-1(7-39);
Gly⁸Lys³⁴(N^ε-(胆酰基))-GLP-1(7-39);
Gly⁸Lys^{26,34}-双(N^ε-(胆酰基))-GLP-1(7-39);
Arg²⁶Lys³⁴(N^ε-(胆酰基))-GLP-1(7-39);
Gly⁸Arg²⁶Lys³⁴(N^ε-(7-脱氧胆酰基))-GLP-1(7-40);
Lys²⁶(N^ε-(7-脱氧胆酰基))Arg³⁴-GLP-1(7-40);
Gly⁸Lys²⁶(N^ε-(7-脱氧胆酰基))Arg³⁴-GLP-1(7-40);
Arg^{26,34}Lys³⁶(N^ε-(7-脱氧胆酰基))-GLP-1(7-40);

Gly⁸Arg^{26,34}Lys³⁶(N^ε-(7-脱氧胆酰基))-GLP-1(7-40);
Lys²⁶(N^ε-(胆酰基))-GLP-1(7-40);
Lys³⁴(N^ε-(胆酰基))-GLP-1(7-40);
Lys^{26,34}-双(N^ε-(胆酰基))-GLP-1(7-40);
Gly⁸Lys²⁶(N^ε-(胆酰基))-GLP-1(7-40);
Gly⁸Lys³⁴(N^ε-(胆酰基))-GLP-1(7-40);
Gly⁸Lys^{26,34}-双(N^ε-(胆酰基))-GLP-1(7-40);
Arg²⁶Lys³⁴(N^ε-(胆酰基))-GLP-1(7-40);
Lys²⁶(N^ε-(胆酰基))-GLP-1(7-36);
Lys³⁴(N^ε-(胆酰基))-GLP-1(7-36);
Lys^{26,34}-双(N^ε-(胆酰基))-GLP-1(7-36);
Gly⁸Lys²⁶(N^ε-(胆酰基))-GLP-1(7-36);
Gly⁸Lys³⁴(N^ε-(胆酰基))-GLP-1(7-36);
Gly⁸Lys^{26,34}-双(N^ε-(胆酰基))-GLP-1(7-36);
Arg²⁶Lys³⁴(N^ε-(胆酰基))-GLP-1(7-36);
Lys²⁶(N^ε-(胆酰基))-GLP-1(7-35);
Lys³⁴(N^ε-(胆酰基))-GLP-1(7-35);
Lys^{26,34}-双(N^ε-(胆酰基))-GLP-1(7-35);
Gly⁸Lys²⁶(N^ε-(胆酰基))-GLP-1(7-35);
Gly⁸Lys³⁴(N^ε-(胆酰基))-GLP-1(7-35);
Gly⁸Lys^{26,34}-双(N^ε-(胆酰基))-GLP-1(7-35);
Arg²⁶Lys³⁴(N^ε-(胆酰基))-GLP-1(7-35);
Lys²⁶(N^ε-(胆酰基))-GLP-1(7-36)酰胺;
Lys³⁴(N^ε-(胆酰基))-GLP-1(7-36)酰胺;
Lys^{26,34}-双(N^ε-(胆酰基))-GLP-1(7-36)酰胺;
Gly⁸Lys²⁶(N^ε-(胆酰基))-GLP-1(7-36)酰胺;
Gly⁸Lys³⁴(N^ε-(胆酰基))-GLP-1(7-36)酰胺;
Gly⁸Lys^{26,34}-双(N^ε-(胆酰基))-GLP-1(7-36)酰胺;
Arg²⁶Lys³⁴(N^ε-(胆酰基))-GLP-1(7-36)酰胺;
Gly⁸Arg²⁶Lys³⁴(N^ε-(胆酰基))-GLP-1(7-37);
Lys²⁶(N^ε-(胆酰基))Arg³⁴-GLP-1(7-37);

Gly⁸Lys²⁶(N^ε-(胆酰基))Arg³⁴-GLP-1(7-37);
Arg^{26,34}Lys³⁶(N^ε-(胆酰基))-GLP-1(7-37);
Gly⁸Arg^{26,34}Lys³⁶(N^ε-(胆酰基))-GLP-1(7-37);
Lys²⁶(N^ε-(石胆酰基))-GLP-1(7-37);
Lys³⁴(N^ε-(石胆酰基))-GLP-1(7-37);
Lys^{26,34}-双(N^ε-(石胆酰基))-GLP-1(7-37);
Gly⁸Lys²⁶(N^ε-(石胆酰基))-GLP-1(7-37);
Gly⁸Lys³⁴(N^ε-(石胆酰基))-GLP-1(7-37);
Gly⁸Lys^{26,34}-双(N^ε-(石胆酰基))-GLP-1(7-37);
Arg²⁶Lys³⁴(N^ε-(石胆酰基))-GLP-1(7-37);
Gly⁸Arg²⁶Lys³⁴(N^ε-(胆酰基))-GLP-1(7-38);
Lys²⁶(N^ε-(胆酰基))Arg³⁴-GLP-1(7-38);
Gly⁸Lys²⁶(N^ε-(胆酰基))Arg³⁴-GLP-1(7-38);
Arg^{26,34}Lys³⁶(N^ε-(胆酰基))-GLP-1(7-38);
Arg^{26,34}Lys³⁸(N^ε-(胆酰基))-GLP-1(7-38);
Gly⁸Arg^{26,34}Lys³⁶(N^ε-(胆酰基))-GLP-1(7-38);
Lys²⁶(N^ε-(石胆酰基))-GLP-1(7-38);
Lys³⁴(N^ε-(石胆酰基))-GLP-1(7-38);
Lys^{26,34}-双(N^ε-(石胆酰基))-GLP-1(7-38);
Gly⁸Lys²⁶(N^ε-(石胆酰基))-GLP-1(7-38);
Gly⁸Lys³⁴(N^ε-(石胆酰基))-GLP-1(7-38);
Gly⁸Lys^{26,34}-双(N^ε-(石胆酰基))-GLP-1(7-38);
Arg²⁶Lys³⁴(N^ε-(石胆酰基))-GLP-1(7-38);
Gly⁸Arg²⁶Lys³⁴(N^ε-(胆酰基))-GLP-1(7-39);
Lys²⁶(N^ε-(胆酰基))Arg³⁴-GLP-1(7-39);
Gly⁸Lys²⁶(N^ε-(胆酰基))Arg³⁴-GLP-1(7-39);
Arg^{26,34}Lys³⁶(N^ε-(胆酰基))-GLP-1(7-39);
Gly⁸Arg^{26,34}Lys³⁶(N^ε-(胆酰基))-GLP-1(7-39);
Lys²⁶(N^ε-(石胆酰基))-GLP-1(7-39);
Lys³⁴(N^ε-(石胆酰基))-GLP-1(7-39);
Lys^{26,34}-双(N^ε-(石胆酰基))-GLP-1(7-39);

Gly⁸Lys²⁶(N^ε-(石胆酰基))-GLP-1(7-39);
Gly⁸Lys³⁴(N^ε-(石胆酰基))-GLP-1(7-39);
Gly⁸Lys^{26,34}-双(N^ε-(石胆酰基))-GLP-1(7-39);
Arg²⁶Lys³⁴(N^ε-(石胆酰基))-GLP-1(7-39);
Gly⁸Arg²⁶Lys³⁴(N^ε-(胆酰基))-GLP-1(7-40);
Lys²⁶(N^ε-(胆酰基))Arg³⁴-GLP-1(7-40);
Gly⁸Lys²⁶(N^ε-(胆酰基))Arg³⁴-GLP-1(7-40);
Arg^{26,34}Lys³⁶(N^ε-(胆酰基))-GLP-1(7-40);
Gly⁸Arg^{26,34}Lys³⁶(N^ε-(胆酰基))-GLP-1(7-40);
Lys²⁶(N^ε-(石胆酰基))-GLP-1(7-40);
Lys³⁴(N^ε-(石胆酰基))-GLP-1(7-40);
Lys^{26,34}-双(N^ε-(石胆酰基))-GLP-1(7-40);
Gly⁸Lys²⁶(N^ε-(石胆酰基))-GLP-1(7-40);
Gly⁸Lys³⁴(N^ε-(石胆酰基))-GLP-1(7-40);
Gly⁸Lys^{26,34}-双(N^ε-(石胆酰基))-GLP-1(7-40);
Arg²⁶Lys³⁴(N^ε-(石胆酰基))-GLP-1(7-37);
Lys²⁶(N^ε-(石胆酰基))-GLP-1(7-36);
Lys³⁴(N^ε-(石胆酰基))-GLP-1(7-36);
Lys^{26,34}-双(N^ε-(石胆酰基))-GLP-1(7-36);
Gly⁸Lys²⁶(N^ε-(石胆酰基))-GLP-1(7-36);
Gly⁸Lys³⁴(N^ε-(石胆酰基))-GLP-1(7-36);
Gly⁸Lys^{26,34}-双(N^ε-(石胆酰基))-GLP-1(7-36);
Arg²⁶Lys³⁴(N^ε-(石胆酰基))-GLP-1(7-36);
Lys²⁶(N^ε-(石胆酰基))-GLP-1(7-35);
Lys³⁴(N^ε-(石胆酰基))-GLP-1(7-35);
Lys^{26,34}-双(N^ε-(石胆酰基))-GLP-1(7-35);
Gly⁸Lys²⁶(N^ε-(石胆酰基))-GLP-1(7-35);
Gly⁸Lys³⁴(N^ε-(石胆酰基))-GLP-1(7-35);
Gly⁸Lys^{26,34}-双(N^ε-(石胆酰基))-GLP-1(7-35);
Arg²⁶Lys³⁴(N^ε-(石胆酰基))-GLP-1(7-35);
Lys²⁶(N^ε-(石胆酰基))-GLP-1(7-36)酰胺;

Lys³⁴(N^ε-(石胆酰基))-GLP-1(7-36)酰胺;
Lys^{26,34}-双(N^ε-(石胆酰基))-GLP-1(7-36)酰胺;
Gly⁸Lys²⁶(N^ε-(石胆酰基))-GLP-1(7-36)酰胺;
Gly⁸Lys³⁴(N^ε-(石胆酰基))-GLP-1(7-36)酰胺;
Gly⁸Lys^{26,34}-双(N^ε-(石胆酰基))-GLP-1(7-36)酰胺;
Arg²⁶Lys³⁴(N^ε-(石胆酰基))-GLP-1(7-36)酰胺;
Gly⁸Arg²⁶Lys³⁴(N^ε-(石胆酰基))-GLP-1(7-37);
Lys²⁶(N^ε-(石胆酰基))Arg³⁴-GLP-1(7-37);
Gly⁸Lys²⁶(N^ε-(石胆酰基))Arg³⁴-GLP-1(7-37);
Arg^{26,34}Lys³⁶(N^ε-(石胆酰基))-GLP-1(7-37);
Arg^{26,34}Lys³⁸(N^ε-(石胆酰基))-GLP-1(7-37);
Gly⁸Arg^{26,34}Lys³⁶(N^ε-(石胆酰基))-GLP-1(7-37);
Gly⁸Arg²⁶Lys³⁴(N^ε-(石胆酰基))-GLP-1(7-38);
Lys²⁶(N^ε-(石胆酰基))Arg³⁴-GLP-1(7-38);
Gly⁸Lys²⁶(N^ε-(石胆酰基))Arg³⁴-GLP-1(7-38);
Arg^{26,34}Lys³⁶(N^ε-(石胆酰基))-GLP-1(7-38);
Arg^{26,34}Lys³⁸(N^ε-(石胆酰基))-GLP-1(7-38);
Gly⁸Arg^{26,34}Lys³⁶(N^ε-(石胆酰基))-GLP-1(7-38);
Gly⁸Arg²⁶Lys³⁴(N^ε-(石胆酰基))-GLP-1(7-39);
Lys²⁶(N^ε-(石胆酰基))Arg³⁴-GLP-1(7-39);
Gly⁸Lys²⁶(N^ε-(石胆酰基))Arg³⁴-GLP-1(7-39);
Arg^{26,34}Lys³⁶(N^ε-(石胆酰基))-GLP-1(7-39);
Gly⁸Arg^{26,34}Lys³⁶(N^ε-(石胆酰基))-GLP-1(7-39);
Gly⁸Arg²⁶Lys³⁴(N^ε-(石胆酰基))-GLP-1(7-40);
Lys²⁶(N^ε-(石胆酰基))Arg³⁴-GLP-1(7-40);
Gly⁸Lys²⁶(N^ε-(石胆酰基))Arg³⁴-GLP-1(7-40);
Arg^{26,34}Lys³⁶(N^ε-(石胆酰基))-GLP-1(7-40); 和
Gly⁸Arg^{26,34}Lys³⁶(N^ε-(石胆酰基))-GLP-1(7-40).

在一个进一步优选的实施方案中, 本发明涉及含有一种 GLP-1 衍生物和一种药剂学可接受的载体的药物组合物。

在一个进一步优选的实施方案中,本发明涉及根据本发明的 GLP-1 衍生物在制备具有比 GLP-1(7-37)更长时间的作用曲线的药剂中的用途。

在一个进一步优选的实施方案中,本发明涉及根据本发明的 GLP-1 衍生物在制备具有更长时间的作用效果的用于治疗非胰岛素依赖性糖尿病的药剂中的用途。

在一个进一步优选的实施方案中,本发明涉及根据本发明的 GLP-1 衍生物在制备具有更长时间的作用效果的用于治疗胰岛素依赖性糖尿病的药剂中的用途。

在一个进一步优选的实施方案中,本发明涉及根据本发明的 GLP-1 衍生物在制备具有更长时间的作用效果的用于治疗肥胖症的药剂中的用途。

在一个进一步优选的实施方案中,本发明涉及在需要这种治疗的病人中治疗胰岛素依赖性或非胰岛素依赖性糖尿病的方法,该方法包括给病人服用治疗有效量的权利要求 1 所述的 GLP-1 衍生物与药剂学可接受的载体。

对本发明的详细描述

为得到 GLP-1 衍生物充分长时间的作用曲线,连接到 GLP-1 部分的亲脂性取代基优选含有 4-40 个碳原子,尤其是 8-25 个碳原子。该亲脂性取代基可以通过其羧基和与之相连的氨基酸残基的氨基形成酰胺键而连接到 GLP-1 部分的氨基上。或选择地,该亲脂性取代基可以通过其氨基和所述氨基酸残基的羧基形成酰胺键而连接到该氨基酸残基上。作为另外一种选择,该亲脂性取代基可以通过酯键而连接到 GLP-1 部分。正常地,可以通过 GLP-1 部分的羧基与该取代基的羟基之间的反应,或通过 GLP-1 部分的羟基与取代基的羧基之间的反应而形成酯键。作为另外一种选择,该亲脂性取代基可以是烷基,它被引入 GLP-1 部分的伯氨基中。

在本发明的一个优选实施方案中,该亲脂性取代基通过一个间隔基团的一个羧基与 GLP-1 部分的一个氨基形成酰胺键,从而连接到

GLP-1 部分。适宜的间隔基团的例子有琥珀酸、Lys、Glu 或 Asp，或一种如 Gly-Lys 的二肽。当间隔基团是琥珀酸时，它的一个羧基可以与氨基酸残基的一个氨基形成酰胺键，并且它的另一个羧基可以与该亲脂性取代基的氨基形成酰胺键。当间隔基团是 Lys、Glu 或 Asp 时，其羧基可以与氨基酸残基的氨基形成酰胺键，并且其氨基可以与亲脂性取代基的羧基形成酰胺键。当以 Lys 作为间隔基团时，在一些情况下可以在 Lys 的 ϵ -氨基与该亲脂性取代基之间插入另外的间隔基团。在一个优选的实施方案中，这一另外的间隔基团是琥珀酸，它与 Lys 的 ϵ -氨基和亲脂性取代基中存在的氨基形成酰胺键。在另一个优选的实施方案中，这一另外的间隔基团是 Glu 或 Asp，它与 Lys 的 ϵ -氨基形成一个酰胺键，与亲脂性取代基中出现的羧基形成另一个酰胺键，即该亲脂性取代基是一个 N^ϵ -酰基化的赖氨酸残基。

在本发明的另一优选实施方案中，该亲脂性取代基有一个可以带负电的基团。一种优选的可以带负电荷的基团是羧基。

可以通过这样一种方法制备母体肽，该方法包括在允许肽表达的条件下，在适宜的营养培养基中，培养含有编码该多肽的 DNA 序列并能表达该肽的宿主细胞，然后从培养物中回收产生的肽。

用来培养细胞的培养基可以是用于培养该宿主细胞的任何常规培养基，如基本培养基或含有适宜添加物的复合培养基。可以通过市售得到适宜的培养基，或根据已公开的制法制备适宜的培养基(如美国典型培养物保藏中心目录中介绍的方法)。然后通过常规方法从培养基中回收由该细胞产生的多肽，这些方法包括通过离心或过滤而从培养基中分离宿主细胞，用盐如硫酸铵沉淀上清液或滤液中的蛋白质成分，根据目的肽的种类而选用各种层析方法如离子交换层析、凝胶过滤层析、亲和层析等进行纯化。

编码母体肽的 DNA 序列可以来源于基因组或 cDNA，如通过制备基因组或 cDNA 文库，并根据标准技术(如，见 Sambrook, J, Fritsch, EF 和 Maniatis, T, 分子克隆：实验操作指南，Cold Spring Harbor Laboratory Press, 纽约，1989)使用合成的寡核苷酸探针，进行杂交而

筛选出编码该肽的全部或部分的 DNA 序列。也可以通过已建立的标准方法,如 Beaucage 和 Caruthers 所述的磷酰胺(phosphoramidite)方法(四面体快报, 22(1981), 1859-1869), 或 Matthes 等所述的方法(欧洲分子生物学组织杂志, 3(1984), 801-805)合成该编码肽的 DNA 序列。也可以使用特定的引物, 如 US4,683,202 或 Saiki 等在《科学》, 239(1988), 487-491 所述, 通过聚合酶链反应制备 DNA 序列。

可以将 DNA 序列插入任何便于进行 DNA 重组过程的载体中, 并且载体的选择常常取决于该载体将要被引入的宿主细胞。因此, 载体可以是一种自主复制型载体, 即作为一个染色体外实体存在的载体, 其复制不依赖于染色体复制, 如质粒。或者, 载体可以是这样一种类型, 当将其引入宿主细胞时, 它将整合到宿主细胞基因组中, 并与它所整合入的染色体一起复制。

载体优选是一种表达载体, 其内编码所述肽的 DNA 序列与该 DNA 转录所需的其它区段(如启动子)有效相连。启动子可以是在选用的宿主细胞中有转录活性的任何 DNA 序列, 它可以来源于编码宿主细胞同源性或异源性蛋白质的基因。本领域熟知适于在多种宿主细胞中指导编码本发明肽的 DNA 进行转录的启动子例子, 参见如 Sambrook 等, 出处同前。

需要时, 编码该肽的 DNA 序列也可以与合适的终止子、多聚腺苷酸化信号、转录增强子序列和翻译增强子序列有效连接。本发明的重组载体还可以含有能使其在目的宿主细胞中复制的 DNA 序列。

载体还可以含有一个选择标记, 如一个基因, 其基因产物将弥补宿主细胞内的一个缺陷, 或者能赋予对药物如氨苄青霉素、卡那霉素、四环素、氯霉素、新霉素、潮霉素或氨基喋呤等的抗性。

为将本发明的母体肽引入宿主细胞的分泌途径, 可以在重组载体中提供一个分泌信号序列(也称之为前导序列、前原序列或前序列)。分泌信号序列以正确读框与编码该肽的 DNA 序列连接。分泌信号序列通常位于编码该肽的 DNA 序列的 5' 侧。分泌信号序列可以是正常地与该肽连接的分泌信号序列, 或可以源于编码另一种分泌蛋白质的基因。

用于分别连接编码本发明肽的 DNA 序列、启动子和可选择的终止子和/或分泌信号序列,并将其插入到适宜的含有复制所必需的信息的载体中的方法,对于本领域的技术人员是已知的(参见如 Sambrook 等,出处同前)。

将导入 DNA 序列或重组载体的宿主细胞可以是能够产生本发明肽的任何细胞,包括细菌、酵母、真菌和高等真核生物细胞。本领域技术人员熟知并使用的适宜的宿主细胞的例子如下,但不限于这些:大肠杆菌,酿酒酵母,或哺乳动物 BHK 或 CHO 细胞系。

国际专利申请 No.WO87/06941(The General Hospital Corporation)记载了根据本发明可以用作 GLP-1 部分的化合物的例子,该申请涉及一种含有 GLP-1(7-37)及其功能性衍生物的肽片段和它作为促胰岛素剂的用途。

国际专利申请 No.90/11296(The General Hospital orporation)记载了其它 GLP-1 类似物,该申请涉及含有 GLP-1(7-36)及其功能性衍生物的肽片段,这些肽片段具有超过 GLP-1(1-36)或 GLP-1(1-37)的促胰岛素活性,还涉及它们作为促胰岛素剂的用途。

国际专利申请 No.91/11457(Buckley 等)公开了活性 GLP-1 肽 7-34,7-35,7-36 和 7-37 的类似物,根据本发明它们也能用作 GLP-1 部分。

药物组合物

根据本发明含有 GLP-1 衍生物的药物组合物可以胃肠外施用于需要这种治疗的病人。可以用注射器,可选择地用笔式注射器通过皮下、肌肉内或静脉内注射进行胃肠外给药。另外,可以通过输液泵进行胃肠外给药。另外的选择是一种用于鼻或肺喷雾形式施用的 GLP-1 衍生物粉状或液体组合物。本发明的 GLP-1 衍生物还可以选择透皮途径给药,如经贴剂透皮给药,可选择离子透入贴剂;或经透粘膜途径给药,如透过颊粘膜。

可以用常规技术,如 Remington 的《药物科学》,1985 或 Remington: 药物科学与实践, 19 版, 1995 所述的方法,制备含有本发明 GLP-1

衍生物的药物组合物。

因此，可以用制药工业的常规技术制备本发明 GLP-1 衍生物的注射用组合物，这些技术包括适当地溶解和混合各组分以得到所需的最终产物。

根据一种方法，将 GLP-1 衍生物溶解于一定量的水中，其中水的量稍小于所制备的组合物最终体积。按需要加入等渗剂、防腐剂和缓冲剂，并在需要时用酸如盐酸、或碱如氢氧化钠水溶液调节溶液的 pH 值。最后，用水调节溶液体积得到所需的组分浓度。

等渗剂例如有氯化钠、甘露糖醇、甘油。

防腐剂例如有苯酚、间甲酚、甲基对羟基苯甲酸酯、苜醇。

适宜的缓冲剂如乙酸钠和磷酸钠。

除上述成分外，含有本发明 GLP-1 衍生物的溶液也可以含有表面活性剂以改善 GLP-1 衍生物的溶解性和稳定性。

可以按欧洲专利 No.272097(Nordisk A/S)或 WO93/18785 所述制备用于鼻腔给药的某些肽的组合物。

根据本发明的一个优选实施方案，以适于注射给药的组合物形式提供 GLP-1 衍生物的组合物。这种组合物既可以是随时可用的注射液，也可以是一定量的固态组合物，如一种冻干制品，需要在注射前将其溶解在溶剂中。此注射用溶液中所含 GLP-1 衍生物不少于 2mg/ml，优选不少于 5mg/ml，更优选不少于 10mg/ml，并优选不多于 100mg/ml。

本发明的 GLP-1 衍生物可用于治疗各种疾病。病人所用的具体 GLP-1 衍生物和最佳剂量水平将取决于待治疗的疾病和各种因素，包括所用的具体肽衍生物的效能及病人的年龄、体重、身体活动性和饮食，还取决于可能与其它药物的联合用药以及病情的严重程度。建议本领域的技术人员针对每个病人确定本发明 GLP-1 衍生物的剂量。

具体地说，预计 GLP-1 衍生物对于制备具有更长时间的作用曲线的用于治疗非胰岛素依赖性糖尿病和/或治疗肥胖症的药物将是有益的。

可以用以下实施例进一步说明本发明，但不应认为这些实施例是对

保护范围的限定。前面的描述和以下实施例所公开的特点分别地或任意组合地，对于以各种方式实现本发明是重要的。

实施例

使用市售化学制品的以下缩写：

DMF： N,N-二甲基甲酰胺

NMP： N-甲基-2-吡咯烷酮

EDPA： N-乙基-N,N-二异丙胺

EGTA： 乙二醇二(β-氨基乙醚)-N,N,N',N'-四乙酸

GTP： 鸟苷 5'-三磷酸

TFA： 三氟乙酸

THF： 四氢呋喃

Myr-ONSu： 十四烷酸 2,5-二氧代吡咯烷-1-基酯

Pal-ONSu： 十六烷酸 2,5-二氧代吡咯烷-1-基酯

Ste-ONSu： 十八烷酸 2,5-二氧代吡咯烷-1-基酯

HOOC-(CH₂)₆-COONSu： ω-羧基庚酸 2,5-二氧代吡咯烷-1-基酯

HOOC-(CH₂)₁₀-COONSu： ω-羧基十一烷酸 2,5-二氧代吡咯烷-1-基酯

HOOC-(CH₂)₁₂-COONSu： ω-羧基十三烷酸 2,5-二氧代吡咯烷-1-基酯

HOOC-(CH₂)₁₄-COONSu： ω-羧基十五烷酸 2,5-二氧代吡咯烷-1-基酯

HOOC-(CH₂)₁₆-COONSu： ω-羧基十七烷酸 2,5-二氧代吡咯烷-1-基酯

HOOC-(CH₂)₁₈-COONSu： ω-羧基十九烷酸 2,5-二氧代吡咯烷-1-基酯

缩写：

PDMS： 等离子体解吸附质谱测定法(Plasma Desorption Mass Spectrometry)

MALDI-MS： 基质辅助的激光解吸附/电离质谱测定法

HPLC： 高效液相层析法

amu： 原子质量单位

分析

等离子体解吸附质谱测定法

样品制备:

将样品溶于 0.1%TFA/EtOH(1:1), 使其浓度达到 $1\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 。将样品溶液(5-10 μl)置于硝酸纤维素靶(Bio-ion AB,Uppsala,瑞典)上并使其在靶的表面吸收 2 分钟。随后用 $2 \times 25\mu\text{l}$ 0.1 % TFA 将靶清洗并旋转干燥。最后将硝酸纤维素靶置于靶旋转器内并放入质谱仪中。

质谱分析

用 Bio-ion 20 飞行时间装置(Bio-ion Nordic AB, Uppsala,瑞典)进行 PDMS 分析。使用 15kV 的加速电压, 使由 252-Cf 裂变片段轰击硝酸纤维素表面形成的分子离子加速射向一终端检测器。在 m/z 1 和 30 分别使用 H^+ 和 NO^+ 离子将产生的飞行时间谱校正为一种真正的质谱。一般累积在 15-20 分钟内的 1.0×10^6 次裂变得得到质谱。所测得的质量均对应于同位素平均分子质量。质量测定的精确度一般好于 0.1 %。

MALDI-MS

使用一种安装有延迟分离装置并以线性方式工作的 Voyager RP 仪器(PerSeptive Biosystems Inc., Framingham,MA)进行 MALDI-MS 分析。使用 α -氰基-4-羟基-肉桂酸作为基质, 并基于外部校正法进行质量测定。

例 1

Lys²⁶(N^E-十四酰基) -GLP-1(7-37)的合成

由 GLP-1(7-37)合成得到目标化合物。将 GLP-1(7-37)(25mg, 7.45 μmol), EDPA(26.7mg,208 μmol), NMP(520 μl)和水(260 μl)的混合物在室温温和摇动 5 分钟。向所得混合物中加入 Myr-ONSu(2.5mg, 7.67 μmol)溶于 NMP(62.5 μl)得到的溶液, 将反应混合物在室温温和摇动 5 分钟, 然后放置 20 分钟。另加入 Myr-ONSu(2.5mg,7.67 μmol)溶于 NMP (62.5 μl)得到的溶液, 将所得混合物温和摇动 5 分钟。经过 40 分钟的总反应时间后, 向其中加入甘氨酸(12.5mg,166 μmol)溶于 50 % 乙醇水溶

液(12.5ml)中制得的溶液终止反应。使用氰丙基(cyanopropyl)柱(Zorbax 300SB-CN)和标准乙腈/TFA系统,通过HPLC法从反应混合物中分离目标化合物,产量为1.3mg(相当于理论产率的4.9%)。将柱加热到65℃,乙腈的浓度梯度为60分钟内0-100%。用PDMS法分析分离出的产物,发现质子化分子离子峰的 m/z 值为 3567.9 ± 3 。因此得出的分子量为 3566.9 ± 3 amu(理论值为3565.9amu)。由金黄色葡萄球菌V8蛋白酶对目标化合物进行酶解切割,随后通过PDMS进行肽片段的质量测定,从而确定酰基化位置(Lys26)。

除目标化合物外,用同样的层析柱和更窄的梯度(60分钟内乙腈35-38%)从反应混合物中分离得到其它两种GLP-1衍生物,见例2和3。

例 2

Lys³⁴(N^ε-十四酰基)-GLP-1(7-37)的合成

通过HPLC法从例1所述反应混合物中分离得到目标化合物。经PDMS分析得到 m/z 为 3567.7 ± 3 的质子化分子离子峰。因此发现分子量为 3566.7 ± 3 amu(理论值为3565.9amu)。根据断裂方式确定酰基化位置。

例 3

Lys^{26,34}-双(N^ε-十四酰基)-GLP-1(7-37)的合成

通过HPLC法从例1所述反应混合物中分离得到目标化合物。PDMS分析得到 m/z 为 3778.4 ± 3 的质子化分子离子峰。因此发现分子量为 3777.4 ± 3 amu(理论值为3776.1amu)。

例 4

Lys²⁶(N^ε-十四酰基)Arg³⁴-GLP-1(7-37)的合成

由Arg³⁴-GLP-1(7-37)合成得到目标化合物。将Arg³⁴-GLP-1(7-37)(5mg,1.47μm),EDPA(5.3mg,41.1μm),NMP(105μl)和水(50μl)的混合物在室温温和摇动5分钟。向所得混合物中加入Myr-ONSu(0.71mg,

2.2 μ m)溶于 NMP(17.8 μ l)得到的溶液,将反应混合物在室温温和摇动 5 分钟,然后放置 20 分钟。经过 30 分钟的总反应时间后,向其中加入甘氨酸(25mg,33.3 μ m)溶于 50 % 乙醇水溶液(2.5ml)中制得的溶液终止反应。按例 1 所述经 HPLC 法纯化反应混合物。PDMS 分析得到 m/z 值为 3594.9 $\pm$ 3 的质子化分子离子峰。得出的分子量为 3593.9 $\pm$ 3amu(理论值为 3593.9amu)。

例 5

Gly⁸Arg^{26,34}Lys³⁶(N^ε-十四酰基)-GLP-1(7-37)的合成

由购自 QCB 的 Gly⁸Arg^{26,34}Lys³⁶-GLP-1(7-37)合成得到目标化合物。将 Gly⁸Arg^{26,34}Lys³⁶-GLP-1(7-37)(1.3mg,0.39 μ m), EDPA(1.3mg, 10 μ m), NMP(125 μ l)和水(30 μ l)的混合物在室温温和摇动 5 分钟。向所得混合物中加入 Myr-ONSu(0.14mg,0.44 μ m)溶于 NMP(3.6ml)得到的溶液,将反应混合物在室温温和摇动 15 分钟。向其中加入甘氨酸(0.1mg,1.33 μ m)溶于 50 % 乙醇水溶液(10 μ l)中制得的溶液终止反应。用 HPLC 法纯化反应混合物,分离出目标化合物(60 μ g,4%)。

例 6

Arg^{26,34}Lys³⁶(N^ε-十四酰基)-GLP-1(7-37)-OH 的合成

将 Arg^{26,34}Lys³⁶-GLP-1(7-37)-OH(5.0mg,1.477 μ mol), EDPA (5.4mg, 41.78 μ mol), NMP(105 μ l)和水(50 μ l)的混合物在室温温和摇动 5 分钟。向所得混合物中加入 Myr-ONSu(0.721mg,2.215 μ mol)溶于 NMP(18 μ l)得到的溶液。将反应混合物在室温温和摇动 5 分钟,并使其在室温另外保持 45 分钟。向其中加入甘氨酸(2.5mg,33.3 μ mol)溶于 50 % 乙醇水溶液(250 μ l)中制得的溶液终止反应。使用氰丙基柱(Zorbax 300SB-CN)和标准乙腈/TFA 系统,通过柱层析法纯化反应混合物。将柱加热到 65 $^{\circ}$ C,乙腈的浓度梯度为 60 分钟内 0-100 %。分离目标化合物(1.49mg,28%),然后用 PDMS 法分析产物。发现质子化的分子离子峰的 m/z 值为 3595 $\pm$ 3。因此得出的分子量为 3594 $\pm$ 3amu(理论值为

3594amu).

例 7

Lys^{26,34} 双(N^ε-(ω-羧基十九酰基))-GLP-1(7-37)-OH 的合成

将 GLP-1(7-37)-OH (70mg, 20.85μmol), EDPA (75.71mg, 585.8μmol), NMP (1.47ml)和水(700μl)的混合物在室温温和摇动 10 分钟。向所得混合物中加入 HOOC-(CH₂)₁₈-COONSu(27.44mg,62.42μmol)溶于 NMP(686μl)得到的溶液, 将反应混合物在室温温和摇动 5 分钟, 并使其在室温另外保持 50 分钟。向其中加入甘氨酸(34.43mg,458.7μmol)溶于 50 % 乙醇水溶液(3.44ml)中制得的溶液终止反应。使用氰丙基柱(Zorbax 300SB-CN)和标准乙腈/TFA 系统, 通过柱层析法纯化反应混合物。将柱加热到 65 °C, 乙腈的浓度梯度为 60 分钟内 0-100 %。分离目标化合物(8.6mg,10%), 然后用 PDMS 法分析产物。发现质子化的分子离子峰的 m/z 值为 4006±3。因而得出的分子量为 4005±3amu(理论值为 4005amu)。

例 8

Arg^{26,34}Lys³⁶(N^ε-(ω-羧基十九酰基))-GLP-1(7-36)-OH 的合成

将 Arg^{26,34}Lys³⁶-GLP-1(7-36)-OH (5.06mg,1.52μmol), EDPA (5.5mg,42.58μmol), NMP(106μl)和水(100μl)的混合物在室温温和摇动 5 分钟。向所得混合物中加入 HOOC-(CH₂)₁₈-COONSu(1.33mg, 3.04μmol)溶于 NMP(33.2μl)得到的溶液, 将反应混合物在室温温和摇动 5 分钟, 然后在室温再放置 2.5 小时。向其中加入甘氨酸(2.50mg, 33.34μmol)溶于 50 % 乙醇水溶液(250μl)中制得的溶液终止反应。使用氰丙基柱(Zorbax 300SB-CN)和标准乙腈/TFA 系统, 通过柱层析法纯化反应混合物。将柱加热到 65 °C, 乙腈的浓度梯度为 60 分钟内 0-100 %。分离出目标化合物(0.46mg,8%),用 PDMS 法分析产物。发现质子化的分子离子峰的 m/z 值为 3652±3。因而得出分子量为 3651±3amu(理论值为 3651amu)。

例 9

Arg^{26,34}Lys³⁸(N^ε-(ω-羧基十九酰基))-GLP-1(7-38)-OH 的合成

将 Arg^{26,34}Lys³⁸-GLP-1(7-38)-OH (5.556mg,1.57μmol)、EDPA (5.68mg,43.96μmol)、NMP(116.6μl)和水(50μl)的混合物在室温温和摇动 10 分钟。向所得混合物中加入 HOOC-(CH₂)₁₈-COONSu(1.38mg, 3.14μmol)溶于 NMP(34.5μl)得到的溶液,将反应混合物在室温温和摇动 5 分钟,然后在室温再放置 2.5 小时。向其中加入甘氨酸(2.5mg, 33.3μmol)溶于 50 % 乙醇水溶液(250μl)中制得的溶液以终止反应。使用氰丙基柱(Zorbax 300SB-CN)和标准乙腈/TFA 系统,通过柱层析法纯化反应混合物。将柱加热到 65 °C,乙腈的浓度梯度为 60 分钟内 0-100 %。分离出目标化合物(0.7mg,12%),用 PDMS 法分析产物。发现质子化的分子离子峰的 m/z 值为 3866±3。因而得出分子量为 3865±3amu(理论值为 3865amu)。

例 10

Arg³⁴Lys²⁶(N^ε-(ω-羧基十九酰基))-GLP-1(7-37)-OH 的合成

将 Arg³⁴-GLP-1(7-37)-OH (5.04mg,1.489μmol)、EDPA (5.39mg, 41.70μmol)、NMP(105μl)和水(50μl)的混合物在室温温和摇动 10 分钟。向所得混合物中加入 HOOC-(CH₂)₁₈-COONSu(1.31mg,2.97μmol)溶于 NMP(32.8μl)而得到的溶液,将反应混合物在室温温和摇动 5 分钟,然后在室温再放置 30 分钟。向其中加入甘氨酸(2.46mg,32.75μmol)溶于 50 % 乙醇水溶液(246μl)中制得的溶液以终止反应。使用氰丙基柱(Zorbax 300SB-CN)和标准乙腈/TFA 系统,通过柱层析法纯化反应混合物。将柱加热到 65 °C,乙腈的浓度梯度为 60 分钟内 0-100 %。分离出目标化合物(1.2mg,22%),用 PDMS 法分析产物。发现质子化的分子离子峰的 m/z 值为 3709±3。因而得出分子量为 3708±3amu(理论值为 3708amu)。

例 11

Arg³⁴Lys²⁶(N^ε-(ω-羧基十七酰基))-GLP-1(7-37)-OH 的合成

将 Arg³⁴-GLP-1(7-37)-OH (5.8mg,1.714μmol)、EDPA(6.20mg, 47.99μmol)、NMP(121.8μl)和水(58μl)的混合物在室温温和摇动 10 分钟。向所得混合物中加入 HOOC-(CH₂)₁₆-COONSu(2.11mg,5.142μmol)溶于 NMP(52.8μl)得到的溶液,将反应混合物在室温温和摇动 5 分钟,然后在室温再放置 2 小时。向其中加入甘氨酸(2.83mg,37.70μmol)溶于 50 % 乙醇水溶液(283μl)中制得的溶液以终止反应。使用氰丙基柱(Zorbax 300SB-CN)和标准乙腈/TFA 系统,通过柱层析法纯化反应混合物。将柱加热到 65 ℃,乙腈的浓度梯度为 60 分钟内 0-100 %。分离出目标化合物(0.81mg,13%),用 PDMS 法分析产物。发现质子化的分子离子峰的 m/z 值为 3681±3。因而得出分子量为 3680±3amu(理论值为 3680amu)。

例 12

Arg^{26,34}Lys³⁶(N^ε-(ω-羧基十七酰基))-GLP-1(7-37)-OH 的合成

将 Arg^{26,34} Lys³⁶-GLP-1(7-37)-OH (3.51mg,1.036μmol)、EDPA (3.75mg,29.03μmol)、NMP(73.8μl)和水(35μl)的混合物在室温温和摇动 10 分钟。向所得混合物中加入 HOOC-(CH₂)₁₆-COONSu(1.27mg, 3.10μmol)溶于 NMP(31.8μl)得到的溶液,将反应混合物在室温温和摇动 5 分钟,然后在室温再放置 2 小时 10 分钟。向其中加入甘氨酸(1.71mg, 22.79μmol)溶于 50 % 乙醇水溶液(171μl)中制得的溶液以终止反应。使用氰丙基柱(Zorbax 300SB-CN)和标准乙腈/TFA 系统通过柱层析法纯化反应混合物。将柱加热到 65 ℃,乙腈的浓度梯度为 60 分钟内 0-100 %。分离出目标化合物(0.8mg,21%),用 PDMS 法分析产物。发现质子化的分子离子峰的 m/z 值为 3682±3。因而得出分子量为 3681±3amu(理论值为 3681amu)。

例 13

Arg^{26,34}Lys³⁸(N^ε-(ω-羧基十七酰基))-GLP-1(7-38)-OH 的合成

将 $\text{Arg}^{26,34} \text{Lys}^{38}\text{-GLP-1(7-38)-OH}$ (5.168mg, 1.459 μmol)、EDPA (5.28mg, 40.85 μmol)、NMP(108.6 μl)和水(51.8 μl)的混合物在室温温和摇动 10 分钟。向所得混合物中加入 $\text{HOOC-(CH}_2\text{)}_{16}\text{-COONSu}$ (1.80mg, 4.37 μmol)溶于 NMP(45 μl)得到的溶液, 将反应混合物在室温温和摇动 10 分钟, 然后在室温再放置 2 小时 15 分钟。向其中加入甘氨酸(2.41mg, 32.09 μmol)溶于 50 % 乙醇水溶液(241 μl)中制得的溶液以终止反应。使用氰丙基柱(Zorbax 300SB-CN)和标准乙腈/TFA 系统, 通过柱层析法纯化反应混合物。将柱加热到 65 $^{\circ}\text{C}$, 乙腈的浓度梯度为 60 分钟内 0-100 %。分离出目标化合物(0.8mg, 14%), 用 PDMS 法分析产物。发现质子化的分子离子峰的 m/z 值为 3838 ± 3 。因而得出分子量为 $3837 \pm 3 \text{amu}$ (理论值为 3837amu)。

例 14

$\text{Arg}^{26,34} \text{Lys}^{36}(\text{N}^{\epsilon}\text{-(}\omega\text{-羧基十七酰基)})\text{-GLP-1(7-36)-OH}$ 的合成

将 $\text{Arg}^{26,34} \text{Lys}^{36}\text{-GLP-1(7-36)-OH}$ (24.44mg, 7.34 μmol)、EDPA (26.56mg, 205.52 μmol)、NMP(513 μl)和水(244.4 μl)的混合物在室温温和摇动 5 分钟。向所得混合物中加入 $\text{HOOC-(CH}_2\text{)}_{16}\text{-COONSu}$ (9.06mg, 22.02 μmol)溶于 NMP(1.21ml)得到的溶液, 将反应混合物在室温温和摇动 5 分钟, 然后在室温再放置 30 分钟。向其中加入甘氨酸(12.12mg, 161.48 μmol)溶于 50 % 乙醇水溶液(1.21ml)中制得的溶液以终止反应。使用氰丙基柱(Zorbax 300SB-CN)和标准乙腈/TFA 系统, 通过柱层析法纯化反应混合物。将柱加热到 65 $^{\circ}\text{C}$, 乙腈的浓度梯度为 60 分钟内 0-100 %。分离出目标化合物(7.5mg, 28%), 用 PDMS 法分析产物。发现质子化的分子离子峰的 m/z 值为 3625 ± 3 。因而得出分子量为 $3624 \pm 3 \text{amu}$ (理论值为 3624amu)。

例 15

$\text{Arg}^{26,34} \text{Lys}^{36}(\text{N}^{\epsilon}\text{-(}\omega\text{-羧基十一酰基)})\text{-GLP-1(7-37)-OH}$ 的合成

将 $\text{Arg}^{26,34} \text{Lys}^{36}\text{-GLP-1(7-37)-OH}$ (4.2mg, 1.24 μmol)、EDPA

(4.49mg, 34.72 μ mol)、NMP(88.2 μ l)和水(42 μ l)的混合物在室温温和摇动 10 分钟。向所得混合物中加入 HOOC-(CH₂)₁₀-COONSu(1.21mg, 3.72 μ mol)溶于 NMP(30.25 μ l)得到的溶液, 将反应混合物在室温温和摇动 5 分钟, 然后在室温再放置 40 分钟。向其中加入甘氨酸(2.04mg, 27.28 μ mol)溶于 50 % 乙醇水溶液(204 μ l)中制得的溶液以终止反应。使用氰丙基柱(Zorbax 300SB-CN)和标准乙腈/TFA 系统, 通过柱层析法纯化反应混合物。将柱加热到 65 °C, 乙腈的浓度梯度为 60 分钟内 0-100 %。分离出目标化合物(0.8mg, 18%), 用 PDMS 法分析产物。发现质子化的分子离子峰的 m/z 值为 3598 $\pm$ 3。因而得出分子量为 3597 $\pm$ 3amu(理论值为 3597amu)。

例 16

Arg^{26,34}Lys³⁸(N^ε-(ω -羧基十一酰基))-GLP-1(7-38)-OH 的合成

将 Arg^{26,34}Lys³⁸-GLP-1(7-38)-OH (5.168mg, 1.46 μ mol)、EDPA (5.28mg, 40.88 μ mol)、NMP(108.6 μ l)和水(51.7 μ l)的混合物在室温温和摇动 10 分钟。向所得混合物中加入 HOOC-(CH₂)₁₀-COONSu(1.43mg, 4.38 μ mol)溶于 NMP(35.8 μ l)得到的溶液, 将反应混合物在室温温和摇动 5 分钟, 然后在室温再放置 50 分钟。向其中加入甘氨酸(2.41mg, 32.12 μ mol)溶于 50 % 乙醇水溶液(241 μ l)中制得的溶液以终止反应。使用氰丙基柱(Zorbax 300SB-CN)和标准乙腈/TFA 系统, 通过柱层析法纯化反应混合物。将柱加热到 65 °C, 乙腈的浓度梯度为 60 分钟内 0-100 %。分离出目标化合物(0.85mg, 16%), 用 PDMS 法分析产物。发现质子化的分子离子峰的 m/z 值为 3753 $\pm$ 3。因而得出分子量为 3752 $\pm$ 3amu(理论值为 3752amu)。

例 17

Arg^{26,34}双(N^ε-(ω -羧基十一酰基))-GLP-1(7-37)-OH 的合成

将 GLP-1(7-37)-OH (10.0mg, 2.98 μ mol)、EDPA (10.8mg, 83.43 μ mol)、NMP(210 μ l)和水(100 μ l)的混合物在室温温和摇动 10 分

钟。向所得混合物中加入 $\text{HOOC}-(\text{CH}_2)_{10}-\text{COONSu}$ (2.92mg, 8.94 μmol) 溶于 NMP (73 μl) 得到的溶液, 将反应混合物在室温温和摇动 5 分钟, 然后在室温再放置 50 分钟。向其中加入甘氨酸 (4.92mg, 65.56 μmol) 溶于 50 % 乙醇水溶液 (492 μl) 中制得的溶液以终止反应。使用氰丙基柱 (Zorbax 300SB-CN) 和标准乙腈/TFA 系统, 通过柱层析法纯化反应混合物。将柱加热到 65 $^{\circ}\text{C}$, 乙腈的浓度梯度为 60 分钟内 0-100 %。分离出目标化合物 (1.0mg, 9%), 用 PDMS 法分析产物。发现质子化的分子离子峰的 m/z 值为 3781 ± 3 。因而得出分子量为 $3780\pm 3\text{amu}$ (理论值为 3780amu)。

例 18

$\text{Arg}^{26,34}\text{Lys}^{36}(\text{N}^{\epsilon}-(\omega\text{-羧基十一酰基}))- \text{GLP-1(7-36)-OH}$ 的合成

将 $\text{Arg}^{26,34}\text{Lys}^{36}\text{-GLP-1(7-36)-OH}$ (15.04mg, 4.52 μmol)、EDPA (16.35mg, 126.56 μmol)、NMP (315.8 μl) 和水 (150.4 μl) 的混合物在室温温和摇动 10 分钟。向所得混合物中加入 $\text{HOOC}-(\text{CH}_2)_{10}-\text{COONSu}$ (4.44mg, 13.56 μmol) 溶于 NMP (111 μl) 得到的溶液, 将反应混合物在室温温和摇动 5 分钟, 然后在室温再放置 40 分钟。向其中加入甘氨酸 (7.5mg, 99.44 μmol) 溶于 50 % 乙醇水溶液 (250 μl) 中制得的溶液以终止反应。使用氰丙基柱 (Zorbax 300SB-CN) 和标准乙腈/TFA 系统, 通过柱层析法纯化反应混合物。将柱加热到 65 $^{\circ}\text{C}$, 乙腈的浓度梯度为 60 分钟内 0-100 %。分离出目标化合物 (3.45mg, 22%), 用 PDMS 法分析产物。发现质子化的分子离子峰的 m/z 值为 3540 ± 3 。因而得出分子量为 $3539\pm 3\text{amu}$ (理论值为 3539amu)。

例 19

$\text{Arg}^{34}\text{Lys}^{26}(\text{N}^{\epsilon}-(\omega\text{-羧基十一酰基}))- \text{GLP-1(7-37)-OH}$ 的合成

将 $\text{Arg}^{34}\text{-GLP-1(7-37)-OH}$ (5.87mg, 1.73 μmol)、EDPA (6.27mg, 48.57 μmol)、NMP (123.3 μl) 和水 (58.7 μl) 的混合物在室温温和摇动 10 分钟。向所得混合物中加入 $\text{HOOC}-(\text{CH}_2)_{10}-\text{COONSu}$ (1.70mg,

5.20 μ mol)溶于 NMP(42.5 μ l)得到的溶液, 将反应混合物在室温温和摇动 5 分钟, 然后在室温再放置 40 分钟。向其中加入甘氨酸(2.86mg, 286 μ mol)溶于 50 % 乙醇水溶液(286 μ l)中制得的溶液以终止反应。使用氰丙基柱(Zorbax 300SB-CN)和标准乙腈/TFA 系统, 通过柱层析法纯化反应混合物。将柱加热到 65 $^{\circ}$ C, 乙腈的浓度梯度为 60 分钟内 0-100 %。分离出目标化合物(1.27mg, 20%), 用 PDMS 法分析产物。发现质子化的分子离子峰的 m/z 值为 3597 $\pm$ 3。因而得出分子量为 3596 $\pm$ 3amu(理论值为 3596amu)。

例 20

Arg³⁴Lys²⁶(N ^{ϵ} -(ω -羧基庚酰基))-GLP-1(7-37)-OH 的合成

将 Arg³⁴-GLP-1(7-37)-OH (4.472mg, 1.32 μ mol)、EDPA (4.78mg, 36.96 μ mol)、NMP(94 μ l)和水(44.8 μ l)的混合物在室温温和摇动 5 分钟。向所得混合物中加入 HOOC-(CH₂)₆-COONSu(1.07mg, 3.96 μ mol)溶于 NMP(26.8 μ l)得到的溶液, 将反应混合物在室温温和摇动 5 分钟, 然后在室温再放置 1 小时 50 分钟。向其中加入甘氨酸(2.18mg, 29.04 μ mol)溶于 50 % 乙醇水溶液(218 μ l)中制得的溶液以终止反应。使用氰丙基柱(Zorbax 300SB-CN)和标准乙腈/TFA 系统, 通过柱层析法纯化反应混合物。将柱加热到 65 $^{\circ}$ C, 乙腈的浓度梯度为 60 分钟内 0-100 %。分离出目标化合物(0.5mg, 11%), 用 PDMS 法分析产物。发现质子化的分子离子峰的 m/z 值为 3540 $\pm$ 3。因而得出分子量为 3539 $\pm$ 3amu(理论值为 3539amu)。

例 21

Arg^{26,34}Lys³⁸(N ^{ϵ} -(ω -羧基庚酰基))-GLP-1(7-38)-OH 的合成

将 Arg^{26,34}Lys³⁸-GLP-1(7-38)-OH (5.168mg, 1.459 μ mol)、EDPA (5.28mg, 40.85 μ mol)、NMP(108.6 μ l)和水(51.6 μ l)的混合物在室温温和摇动 10 分钟。向所得混合物中加入 HOOC-(CH₂)₆-COONSu(1.18mg, 4.37 μ mol)溶于 NMP(29.5 μ l)得到的溶液, 将反应混合物在室温温和摇

动 5 分钟,然后在室温再放置 1 小时 50 分钟。向其中加入甘氨酸(2.40mg, 32.09 μ mol)溶于 50 % 乙醇水溶液(240 μ l)中制得的溶液以终止反应。使用氰丙基柱(Zorbax 300SB-CN)和标准乙腈/TFA 系统,通过柱层析法纯化反应混合物。将柱加热到 65 $^{\circ}$ C,乙腈的浓度梯度为 60 分钟内 0-100 %。分离出目标化合物(0.5mg,9%),用 PDMS 法分析产物。发现质子化的分子离子峰的 m/z 值为 3697 ± 3 。因而得出分子量为 3695 ± 3 amu(理论值为 3695amu)。

例 22

Arg^{26,34}Lys³⁶(N^ε-(ω -羧基庚酰基))-GLP-1(7-37)-OH 的合成

将 Arg^{26,34} Lys³⁶-GLP-1(7-37)-OH (5.00mg,1.47 μ mol)、EDPA (5.32mg,41.16 μ mol)、NMP(105 μ l)和水(50 μ l)的混合物在室温温和摇动 5 分钟。向所得混合物中加入 HOOC-(CH₂)₆-COONSu(1.19mg, 4.41 μ mol)溶于 NMP(29.8 μ l)得到的溶液,将反应混合物在室温温和摇动 5 分钟,然后在室温再放置 2 小时。向其中加入甘氨酸(2.42mg, 32.34 μ mol)溶于 50 % 乙醇水溶液(242 μ l)中制得的溶液以终止反应。使用氰丙基柱(Zorbax 300SB-CN)和标准乙腈/TFA 系统,通过柱层析法纯化反应混合物。将柱加热到 65 $^{\circ}$ C,乙腈的浓度梯度为 60 分钟内 0-100 %。分离出目标化合物(0.78mg,15%),用 PDMS 法分析产物。发现质子化的分子离子峰的 m/z 值为 3542 ± 3 。因而得出分子量为 3541 ± 3 amu(理论值为 3541amu)。

例 23

Arg^{26,34}Lys³⁶(N^ε-(ω -羧基庚酰基))-GLP-1(7-36)-OH 的合成

将 Arg^{26,34} Lys³⁶-GLP-1(7-36)-OH (5.00mg,1.50 μ mol)、EDPA (5.44mg,42.08 μ mol)、NMP(210 μ l)和水(50 μ l)的混合物在室温温和摇动 5 分钟。向所得混合物中加入 HOOC-(CH₂)₆-COONSu(1.22mg, 4.5 μ mol)溶于 NMP(30.5 μ l)得到的溶液,将反应混合物在室温温和摇动 5 分钟,然后在室温再放置 2 小时。向其中加入甘氨酸(2.47mg,33.0 μ mol)

溶于 50 % 乙醇水溶液(247 μ l)中制得的溶液以终止反应。使用氰丙基柱(Zorbax 300SB-CN)和标准乙腈/TFA 系统,通过柱层析法纯化反应混合物。将柱加热到 65 $^{\circ}$ C,乙腈的浓度梯度为 60 分钟内 0-100 %。分离出目标化合物(0.71mg,14%),用 PDMS 法分析产物。发现质子化的分子离子峰的 m/z 值为 3484 ± 3 。因而得出分子量为 $3483\pm3\text{amu}$ (理论值为 3483amu)。

例 24

Arg^{26,34} 双(N ^{ϵ} -(ω -羧基庚酰基))-GLP-1(7-37)-OH 的合成

将 GLP-1(7-37)-OH (10mg,2.5 μ mol)、EDPA(10.8mg,83.56 μ mol)、NMP(210 μ l)和水(100 μ l)的混合物在室温温和摇动 10 分钟。向所得混合物中加入 HOOC-(CH₂)₆-COONSu(2.42mg,8.92 μ mol)溶于 NMP(60.5 μ l)得到的溶液,将反应混合物在室温温和摇动 5 分钟,然后在室温再放置 2 小时 35 分钟。向其中加入甘氨酸(4.92mg,65.54 μ mol)溶于 50 % 乙醇水溶液(492 μ l)中制得的溶液以终止反应。使用氰丙基柱(Zorbax 300SB-CN)和标准乙腈/TFA 系统,通过柱层析法纯化反应混合物。将柱加热到 65 $^{\circ}$ C,乙腈的浓度梯度为 60 分钟内 0-100 %。分离目标化合物(2.16mg,24%),用 PDMS 法分析产物。发现质子化的分子离子峰的 m/z 值为 3669 ± 3 。得出的分子量为 $3668\pm3\text{amu}$ (理论值为 3668amu)。

例 25

Arg³⁴Lys²⁶(N ^{ϵ} -(ω -羧基十五酰基))-GLP-1(7-37)-OH 的合成

将 Arg³⁴-GLP-1(7-37)-OH (4.472mg,1.321 μ mol)、EDPA(4.78mg,36.99 μ mol)、NMP(93.9 μ l)和水(44.7 μ l)的混合物在室温温和摇动 10 分钟。向所得混合物中加入 HOOC-(CH₂)₁₄-COONSu(1.519mg,3.963 μ mol)溶于 NMP(38 μ l)得到的溶液,将反应混合物在室温温和摇动 5 分钟,然后在室温再放置 1 小时。向其中加入甘氨酸(2.18mg,29.06 μ mol)溶于 50 % 乙醇水溶液(218 μ l)中制得的溶液以终止反应。使用氰丙基柱(Zorbax

300SB-CN)和标准乙腈/TFA 系统,通过柱层析法纯化反应混合物。将柱加热到 65 ℃,乙腈的浓度梯度为 60 分钟内 0-100 %。分离出目标化合物(0.58mg,12%),用 PDMS 法分析产物。发现质子化的分子离子峰的 m/z 值为 3654 ± 3 。因而得出分子量为 $3653\pm3\text{amu}$ (理论值为 3653amu)。

例 26

Arg^{26,34}Lys³⁶(N^ε-(ω-羧基庚酰基))-GLP-1(7-36)-OH 的合成

将 Arg^{26,34} Lys³⁶-GLP-1(7-36)-OH (5.00mg,1.50μmol)、EDPA (5.44mg, 42.08μmol)、NMP(210μl)和水(50μl)的混合物在室温温和摇动 5 分钟。向所得混合物中加入 HOOC-(CH₂)₁₄-COONSu(1.72mg, 4.5μmol)溶于 NMP(43μl)得到的溶液,将反应混合物在室温温和摇动 5 分钟,然后在室温再放置 1 小时。向其中加入甘氨酸(2.48mg,33μmol)溶于 50 % 乙醇水溶液(248μl)中制得的溶液以终止反应。使用氰丙基柱(Zorbax 300SB-CN)和标准乙腈/TFA 系统,通过柱层析法纯化反应混合物。将柱加热到 65 ℃,乙腈的浓度梯度为 60 分钟内 0-100 %。分离出目标化合物(0.58mg,11%),用 PDMS 法分析产物。发现质子化的分子离子峰的 m/z 值为 3596 ± 3 。因而得出分子量为 $3595\pm3\text{amu}$ (理论值为 3595amu)。

例 27

石胆酸 2,5-二氧代吡咯烷-1-基酯的合成

向含有石胆酸(5.44g,14.34mmol)、N-羟基琥珀酰亚胺(1.78g, 15.0mmol)、无水 THF(120ml)和无水乙腈(30ml)并保持在 10 ℃的混合物中加入 N,N'-二环己基碳二亚胺(3.44g,16.67mmol)溶于无水 THF 制得的溶液。反应混合物在环境温度下搅拌 16 小时,过滤并真空浓缩。将残余物溶解于二氯甲烷(450ml)中,用 10 % 碳酸钠水溶液(2 × 150ml)和水(2 × 150ml)洗涤,并干燥(硫酸镁)。过滤,将滤液真空浓缩得到晶态残余物。从二氯甲烷(30ml)和正庚烷(30ml)的混合物中重结晶残余物,以结晶固体形式得到目标化合物(3.46g,51%)。

例 28

Arg³⁴Lys²⁶(N^ε-石胆酸基)-GLP-1(7-37)-OH 的合成

将 Arg³⁴-GLP-1(7-37)-OH (4.472mg, 1.32μmol)、EDPA(4.78mg, 36.96μmol)、NMP(94μl)和水(44.8μl)的混合物在室温温和摇动 10 分钟。向所得混合物中加入由石胆酸 2,5-二氧代吡咯烷-1-基酯(1.87mg, 3.96μmol)溶于 NMP(46.8μl)得到的溶液, 将反应混合物在室温温和摇动 5 分钟, 然后在室温再放置 1 小时。加入甘氨酸(2.18mg, 29.04μmol)溶于 50 % 乙醇水溶液(218μl)中制得的溶液以终止反应。使用氰丙基柱(Zorbax 300SB-CN)和标准乙腈/TFA 系统, 通过柱层析法纯化反应混合物。将柱加热到 65 °C, 乙腈的浓度梯度为 60 分钟内 0-100 %。分离出目标化合物(1.25mg, 25%), 用 PDMS 法分析产物。发现质子化的分子离子峰的 m/z 值为 3744±3。因而得出分子量为 3743±3amu(理论值为 3743amu)。

例 29

N^α-十四酰基-Glu (ONSu)-OBu^t 的合成

向 H-Glu (OH)-OBu^t(2.5g, 12.3mmol), DMF(283ml)和 EDPA (1.58g, 12.3mmol)的悬液中滴加 Myr-ONSu(4.0g, 12.3mmol)溶于 DMF(59ml)制得的溶液。将反应混合物在室温搅拌 16 小时, 然后真空浓缩至总体积为 20ml。将残余物在 5 % 柠檬酸水溶液(250ml)和乙酸乙酯(150ml)之间分配, 分离两相。有机相真空浓缩后, 将残余物溶于 DMF (40ml)中。将所得溶液滴加入保持在 0 °C 的 10 % 柠檬酸水溶液(300ml)中。收集沉淀化合物, 并用冰水洗涤, 在真空干燥箱中干燥。将干燥后的化合物溶于 DMF(23ml), 并加入 HONSu(1.5g, 13mmol)。向所得混合物中加入 N,N'-二环己基碳二亚胺(2.44g, 11.9mmol)溶于二氯甲烷(47ml)制得的溶液。将反应混合物在室温搅拌 16 小时, 然后将沉淀化合物过滤。将沉淀从正庚烷/2-丙醇中重结晶得到目标化合物(3.03g, 50%)。

例 30

$\text{Glu}^{22,23,30}\text{Arg}^{26,34}\text{Lys}^{38}(\text{N}^{\epsilon}-(\gamma\text{-谷氨酰基}(\text{N}^{\alpha}\text{-十四酰基})))\text{-GLP-1(7-38)-OH}$ 的合成

将 $\text{Glu}^{22,23,30}\text{Arg}^{26,34}\text{Lys}^{38}\text{-GLP-1(7-38)-OH}$ (1.0mg, 0.272 μmol)、EDPA (0.98mg, 7.62 μmol)、NMP(70 μl)和水(70 μl)的混合物在室温温和摇动 5 分钟。将按例 29 方法制得的 $\text{N}^{\alpha}\text{-十四酰基-Glu(ONSu)-OBu}^t$ (0.41mg, 0.816 μmol)溶解于 NMP(10.4 μl) 所得溶液, 加入所得混合物中, 将反应混合物在室温温和摇动 5 分钟, 然后在室温再放置 45 分钟。向其中加入甘氨酸(0.448mg, 5.98 μmol)溶于 50 % 乙醇水溶液(45 μl)中制得的溶液以终止反应。加入乙酸铵的 0.5%水溶液(0.9ml), 将所得混合物冲洗到 Varian 500mg C8Mega Bond Elut[®]柱体上, 用 5 % 乙腈水溶液(10ml)清洗已固定的化合物, 最终通过用 TFA(10ml)洗脱将其从柱中释放下来。将洗脱物真空浓缩, 使用氰丙基柱(Zorbax 300SB-CN)和标准乙腈/TFA 系统, 通过柱层析法纯化反应混合物。将柱加热到 65 $^{\circ}\text{C}$, 乙腈的浓度梯度为 60 分钟内 0-100 %。分离目标化合物(0.35mg, 32%), 用 PDMS 法分析产物。发现质子化的分子离子峰的 m/z 值为 4012 ± 3 。因而得出分子量为 $4011 \pm 3\text{amu}$ (理论值为 4011amu)。

例 31

$\text{Glu}^{23,26}\text{Arg}^{34}\text{Lys}^{38}(\text{N}^{\epsilon}-(\gamma\text{-谷氨酰基}(\text{N}^{\alpha}\text{-十四酰基})))\text{-GLP-1(7-38)-OH}$ 的合成

将 $\text{Glu}^{23,26}\text{Arg}^{34}\text{Lys}^{38}\text{-GLP-1(7-38)-OH}$ (6.07mg, 1.727 μmol)、EDPA (6.25mg, 48.36 μmol)、NMP(425 μl)和水(425 μl)的混合物在室温温和摇动 5 分钟。将按例 29 方法制得的 $\text{N}^{\alpha}\text{-十四酰基-Glu(ONSu)-OBu}^t$ (2.65mg, 5.18 μmol)溶解于 NMP(66.3 μl) 所得溶液, 加入所得混合物中, 将反应混合物在室温温和摇动 5 分钟, 然后在室温再放置 45 分钟。向其中加入甘氨酸(2.85mg, 38.0 μmol)溶于 50 % 乙醇水溶液(285 μl)中制得的溶液以终止反应。加入乙酸铵的 0.5%水溶液(5.4ml), 将所得混合物冲洗到 Varian 500mg C8 Mega Bond Elut[®]柱体上, 用 5 % 乙腈水

溶液(10ml)清洗已固定的化合物,最终通过用 TFA(10ml)洗脱将其从柱中释放下来。将洗脱物真空浓缩,使用氰丙基柱(Zorbax 300SB-CN)和标准乙腈/TFA 系统,通过柱层析法纯化反应混合物。将柱加热到 65 °C,乙腈的浓度梯度为 60 分钟内 0-100 %。分离出目标化合物(0.78mg,12%),用 PDMS 法分析产物。发现质子化的分子离子峰的 m/z 值为 3854 ± 3 。因而得出分子量为 $3853 \pm 3 \text{amu}$ (理论值为 3853amu)。

例 32

Lys^{26,34}-双(N^ε-(ω-羧基十三酰基))-GLP-1(7-37)-OH 的合成

将 GLP-1(7-37)-OH (30mg,8.9μmol)、EDPA(32.3mg, 250μmol)、NMP(2.1ml)和水(2.1ml)的混合物在室温温和摇动 5 分钟。将 HOOC-(CH₂)₁₂-COONSu(12.7mg,35.8μmol)溶解于 NMP(318μl) 所得溶液,加入到所得混合物中,将反应混合物在室温温和摇动 1 小时 40 分钟。向其中加入甘氨酸(3.4mg,44.7μmol)溶于 50 % 乙醇水溶液(335μl)中制得的溶液以终止反应。使用氰丙基柱(Zorbax 300SB-CN)和标准乙腈/TFA 系统通过柱层析法纯化反应混合物。将柱加热到 65 °C,乙腈的浓度梯度为 60 分钟内 0-100 %。分离出目标化合物(10mg,29%),用 PDMS 法分析产物。发现质子化的分子离子峰的 m/z 值为 3840 ± 3 。因而得出分子量为 $3839 \pm 3 \text{amu}$ (理论值为 3839amu)。

例 33

Lys^{26,34}-双(N^ε-(γ-谷氨酰基(N^α-十四酰基)))-GLP-1(7-37)-OH 的合成(NNC 90-1167)

将 GLP-1(7-37)-OH (300mg,79.8μmol)、EDPA(288.9mg, 2.24mmol)、NMP(21ml)和水(21ml)的混合物在室温温和摇动 5 分钟。将按例 29 方法制得的 N^α-十四酰基-Glu(ONSu)-OBu^t(163mg,319.3μmol)溶解于 NMP(4.08ml) 所得溶液,加入到所得混合物中,将反应混合物在室温温和摇动 5 分钟,然后在室温再放置 1 小时。向其中加入甘氨酸(131.8mg,1.76mmol)溶于 50 % 乙醇水溶液

(13.2ml)中制得的溶液以终止反应。加入乙酸铵的 0.5%水溶液(250ml),将所得混合物分成 4 等份。将每份样品冲洗到 Varian 500mg C8 Mega Bond Elut[®]柱体上,用 0.1 % TFA 水溶液(3.5ml)清洗已固定的化合物,最终用 70%乙腈水溶液(4ml)洗脱而将其从柱中释放下来。用 0.1%TFA 水溶液(300ml)将合并的洗脱物稀释。离心收集沉淀化合物,用 0.1%TFA 水溶液(50ml)洗涤,最终离心分离沉淀化合物。向沉淀中加入 TFA(60ml),将所得反应混合物在室温搅拌 1 小时 30 分钟。真空除去多余的 TFA,将残余物倾入水(50ml)中。使用氰丙基柱(Zorbax 300SB-CN)和标准乙腈/TFA 系统,通过柱层析法纯化沉淀化合物。将柱加热到 65 °C,乙腈的浓度梯度为 60 分钟内 0-100 %。分离出目标化合物(27.3mg,8%),用 PDMS 法分析产物。发现质子化的分子离子峰的 m/z 值为 4036±3。因而得出分子量为 4035±3amu(理论值为 4035amu)。

例 34

Arg^{26,34}Lys³⁸(N^ε-(ω-羧基十五酰基))-GLP-1(7-38)-OH 的合成

将 Arg^{26,34}Lys³⁸-GLP-1(7-38)-OH (30mg,8.9μmol)、EDPA (32.3mg,250μmol)、NMP(2.1ml)和水(2.1ml)的混合物在室温温和摇动 5 分钟。将 HOOC-(CH₂)₁₄-COONSu(13.7mg,35.8μmol)溶解于 NMP (343μl) 所得溶液,加入到所得混合物中,将反应混合物在室温温和摇动 1 小时。向其中加入甘氨酸(3.4mg,44.7μmol)溶于 50 % 乙醇水溶液(335μl)中制得的溶液以终止反应。使用氰丙基柱(Zorbax 300SB-CN)和标准乙腈/TFA 系统,通过柱层析法纯化反应混合物。将柱加热到 65 °C,乙腈的浓度梯度为 60 分钟内 0-100 %。分离出目标化合物(4.8mg,14%),用 PDMS 法分析产物。发现质子化的分子离子峰的 m/z 值为 3894±3。因而得出分子量为 3893±3amu(理论值为 3893amu)。

例 35

N^α-十六酰基-Glu (ONSu)-OBu^t的合成

向 H-Glu (OH)-OBu^t(4.2g,20.6mmol), DMF(500ml)和 EDPA

(2.65g, 20.6mmol)的悬液中滴加 Pal-ONSu(7.3g,20.6mmol)溶于 DMF (100ml)制得的溶液。将反应混合物在室温搅拌 64 小时,然后真空浓缩至总体积为 20ml。将残余物在 10 % 柠檬酸水溶液(300ml)和乙酸乙酯(250ml)之间分配,分离两相。有机相真空浓缩后,将残余物溶于 DMF (50ml)。将所得溶液滴加入保持在 0 °C 的 10 % 柠檬酸水溶液(500ml)中。收集沉淀化合物,并用冰水洗涤,在真空干燥箱中干燥。将干燥后的化合物溶于 DMF(45ml), 并加入 HONSu(2.15g,18.7mmol)。向所得混合物中加入 N,N'-二环己基碳二亚胺(3.5g,17mmol)溶于二氯甲烷(67ml)制得的溶液。将反应混合物在室温搅拌 16 小时,然后将沉淀化合物过滤。将沉淀从正庚烷/2-丙醇中重结晶得到目标化合物(6.6g,72%)。

例 36

Lys^{26,34}-双(N^ε-(γ-谷氨酰基(N^α-十六酰基)))-GLP-1(7-37)-OH 的合成

将 GLP-1(7-37)-OH (10mg,2.9μmol)、EDPA (10.8mg, 83.4μmol)、NMP (0.7ml)和水(0.7ml)的混合物在室温温和摇动 5 分钟。将按例 33 方法制得的 N^α-十六酰基-Glu(ONSu)-OBu^t(163mg, 319.3μmol)溶解于 NMP(4.08ml)所得溶液,向其中加入到所得混合物中,将反应混合物在室温温和摇动 1 小时 20 分钟。加入甘氨酸(4.9mg, 65.6μmol)溶于 50 % 乙醇水溶液(492μl)中制得的溶液以终止反应。加入乙酸铵的 0.5%水溶液(9ml),将所得混合物冲洗到一个 Varian 1g C8 Mega Bond Elut[®]柱体上,用 5 % 乙腈水溶液(10ml)清洗已固定的化合物,最终用 TFA(10ml)洗脱而将其从柱上释放下来。真空浓缩洗脱物,使用氰丙基柱(Zorbax 300SB-CN)和标准乙腈/TFA 系统,通过柱层析法纯化残余物。将柱加热到 65 °C,乙腈的浓度梯度为 60 分钟内 0-100 %。分离出目标化合物(2.4mg,20%),用 PDMS 法分析产物。发现质子化的分子离子峰的 m/z 值为 4092±3。因而得出分子量为 4091±3amu(理论值为 4091amu)。

例 37

Arg³⁴Lys²⁶ (N^ε-(γ-谷氨酰基(N^α-十六酰基)))-GLP-1(7-37)-OH 的合成

将 Arg³⁴-GLP-1(7-37)-OH (3.7mg,1.1μmol)、EDPA(4.0mg, 30.8μmol)、乙腈(260μl)和水(260μl)的混合物在室温温和摇动 5 分钟。将按例 35 方法制得的 N^α-十六酰基-Glu(ONSu)-OBu^t(1.8mg,3.3μmol)溶解于乙腈(44.2μl) 所得溶液,加入到所得混合物中,将反应混合物在室温温和摇动 1 小时 20 分钟。向其中加入甘氨酸(1.8mg,24.2μmol)溶于 50 % 乙醇水溶液(181μl)中制得的溶液以终止反应。加入乙酸铵的 0.5%水溶液(12ml)和 NMP(300μL),将所得混合物冲洗到 Varian 1g C8 Mega Bond Elut[®]膜柱体上,用 5%乙腈水溶液(10ml)清洗已固定的化合物,最终用 TFA(6ml)洗脱而将其从柱中释放下来。将洗脱物在室温放置 2 小时,然后真空浓缩。使用氰丙基柱(Zorbax 300SB-CN)和标准乙腈/TFA 系统,通过用柱层析法纯化残余物。将柱加热到 65 °C,乙腈的浓度梯度为 60 分钟内 0-100 %。分离出目标化合物(0.23mg,6%),用 PDMS 法分析产物。发现质子化的分子离子峰的 m/z 值为 3752±3。因而得出分子量为 3751±3amu(理论值为 3751amu)。

例 38

Arg^{26,34}Lys³⁸ (N^ε-(γ-谷氨酰基(N^α-十四酰基)))-GLP-1(7-38)-OH 的合成

将 Arg^{26,34}Lys³⁸-GLP-1(7-38)-OH (14mg,4.0μmol)、EDPA (14.3mg, 110.6μmol)、NMP(980μl)和水(980μl)的混合物在室温温和摇动 5 分钟。将按例 29 方法制得的 N^α-十四酰基-Glu(ONSu)-OBu^t (12.1mg,23.7μmol)溶解于 NMP(303μl) 所得溶液,加入到所得混合物中,将反应混合物在室温温和摇动 2 小时。向其中加入甘氨酸 (6.5mg,86.9mmol)溶于 50 % 乙醇水溶液(652μl)中制得的溶液以终止反应。加入乙酸铵的 0.5%水溶液(50ml),将所得混合物冲洗到 Varian 1g

C8 Mega Bond Elut[®]柱体上,用 5 % 乙腈水溶液(15ml)清洗已固定的化合物,最终用 TFA 水溶液(6ml)洗脱而将其从柱中释放下来。将洗脱物在室温放置 1 小时 45 分钟,然后真空浓缩。使用氰丙基柱(Zorbax 300SB-CN)和标准乙腈/TFA 系统,通过柱层析法纯化残余物。将柱加热到 65 ℃, 乙腈的浓度梯度为 60 分钟内 0-100 %。分离出目标化合物(3.9mg, 26%),用 PDMS 法分析产物。发现质子化的分子离子峰的 m/z 值为 3881 ± 3 。因而得出分子量为 $3880 \pm 3 \text{amu}$ (理论值为 3880amu)。

例 39

$\text{Arg}^{26,34}\text{Lys}^{38}(\text{N}^{\epsilon}-(\omega\text{-羧基十五酰基}))- \text{GLP-1(7-38)-OH}$ 的合成

将 $\text{Arg}^{26,34}\text{Lys}^{38} - \text{GLP-1(7-38)-OH}$ (14mg, $4.0 \mu\text{mol}$)、EDPA (14.3mg, $111 \mu\text{mol}$)、NMP($980 \mu\text{l}$)和水($980 \mu\text{l}$)的混合物在室温温和摇动 5 分钟。将 $\text{HOOC}-(\text{CH}_2)_{14}-\text{COONSu}$ (4.5mg, $11.9 \mu\text{mol}$)溶解于 NMP ($114 \mu\text{l}$) 所得溶液,加入到所得混合物中,将反应混合物在室温温和摇动 1 小时 45 分钟。另加入 $\text{HOOC}-(\text{CH}_2)_{14}-\text{COONSu}$ (4.0mg, $10.4 \mu\text{mol}$)溶解于 NMP($100 \mu\text{l}$) 所得溶液,将所得混合物在室温再温和摇动 1 小时 30 分钟。向其中加入甘氨酸(1.5mg, $19.8 \mu\text{mol}$)溶于 50 % 乙醇水溶液 ($148 \mu\text{l}$)中制得的溶液以终止反应。使用氰丙基柱(Zorbax 300SB-CN)和标准乙腈/TFA 系统,通过用柱层析法纯化反应混合物。将柱加热到 65 ℃, 乙腈的浓度梯度为 60 分钟内 0-100 %。分离出目标化合物(3.9mg, 26%),用 PDMS 法分析产物。发现质子化的分子离子峰的 m/z 值为 3809 ± 3 。因而得出分子量为 $3808 \pm 3 \text{amu}$ (理论值为 3808amu)。

例 40

$\text{Arg}^{26,34}\text{Lys}^{38}(\text{N}^{\epsilon}-(\gamma\text{-谷氨酰基}(\text{N}^{\alpha}\text{-十六酰基}))) - \text{GLP-1(7-38)-OH}$ 的合成

将 $\text{Arg}^{26,34}\text{Lys}^{38} - \text{GLP-1(7-38)-OH}$ (14mg, $4.0 \mu\text{mol}$)、EDPA (14.3mg, $110.6 \mu\text{mol}$)、NMP($980 \mu\text{l}$)和水($980 \mu\text{l}$)的混合物在室温温和摇动 5 分钟。将按例 35 法制得的 $\text{N}^{\alpha}\text{-十六酰基-Glu(ONSu)-O}^t\text{Bu}$ (6.4mg,

11.9 μ mol)溶解于 NMP(160 μ l) 所得溶液, 加入到所得混合物中, 将反应混合物在室温温和摇动 1 小时 20 分钟。向其中加入甘氨酸(6.5mg, 87mmol)溶于 50 % 乙醇水溶液(653 μ l)中制得的溶液以终止反应。加入乙酸铵的 0.5%水溶液(50ml),将所得混合物冲洗到 Varian 1g C8 Mega Bond Elut[®]柱体上,用 5 % 乙腈水溶液(10ml)清洗已固定的化合物,最终用 TFA(6ml)洗脱而将其从柱中释放下来。将洗脱物在室温静置 1 小时 30 分钟,然后真空浓缩。使用氰丙基柱(Zorbax 300SB-CN)和标准乙腈/TFA 系统,通过柱层析法纯化残余物。将柱加热到 65 $^{\circ}$ C, 乙腈的浓度梯度为 60 分钟内 0-100 %。分离出目标化合物(7.2mg,47%),用 PDMS 法分析产物。发现质子化的分子离子峰的 m/z 值为 3881 ± 3 。因而得出分子量为 3880 ± 3 amu(理论值为 3880amu)。

例 41

Arg^{18,23,26,30,34}Lys³⁸(N^ε-十六酰基)-GLP-1(7-38)-OH 的合成

将 Arg^{18,23,26,30,34}Lys³⁸-GLP-1(7-38)-OH (1.0mg,0.27 μ mol)、EDPA (0.34mg,2.7 μ mol)和 DMSO(600 μ l)的混合物在室温温和摇动 5 分钟。向所得混合物中加入 Pal-ONSu(0.28mg,0.8 μ mol)溶于 NMP(7 μ l)制得的溶液。将反应混合物在室温温和摇动 5 分钟,然后在室温放置 6 小时。向其中加入甘氨酸(1.6mg,21.7 μ mol)溶于 50 % 乙醇水溶液(163 μ l)中制得的溶液以终止反应。使用氰丙基柱(Zorbax 300SB-CN)和标准乙腈/TFA 系统,通过柱层析法纯化反应混合物。将柱加热到 65 $^{\circ}$ C, 乙腈的浓度梯度为 60 分钟内 0-100 %。分离出目标化合物(0.17mg,16%),用 MALDI-MS 法分析产物。发现质子化的分子离子峰的 m/z 值为 3961 ± 3 。因而得出的分子量为 3960 ± 3 amu(理论值为 3960amu)。

例 42

Arg^{26,34}Lys³⁸(N^ε-(ω -羧基十三酰基))-GLP-1(7-38)-OH 的合成

将 Arg^{26,34}Lys³⁸-GLP-1(7-38)-OH (14mg,4.0 μ mol)、EDPA (14.3mg,111 μ mol)、NMP(980 μ l)和水(980 μ l)的混合物在室温温和摇动

5 分钟。将 $\text{HOOC}-(\text{CH}_2)_{12}-\text{COONSu}$ (4.2mg, 11.9 μmol) 溶解于 NMP (105 μl) 所得溶液, 加入到所得混合物中, 将反应混合物在室温温和摇动 1 小时 50 分钟。向其中加入甘氨酸 (6.5mg, 87 μmol) 溶于 50 % 乙醇水溶液 (652 μl) 中制得的溶液以终止反应。使用氰丙基柱 (Zorbax 300SB-CN) 和标准乙腈/TFA 系统, 通过柱层析法纯化反应混合物。将柱加热到 65 $^{\circ}\text{C}$, 乙腈的浓度梯度为 60 分钟内 0-100 %。分离出目标化合物 (5.8mg, 39%), 用 MALDI-MS 法分析产物。发现质子化的分子离子峰的 m/z 值为 3780 ± 3 。因而得出分子量为 $3779\pm 3\text{amu}$ (理论值为 3781amu)。

例 43

$\text{Arg}^{34}\text{Lys}^{26}$ (N^{ϵ} -(γ -谷氨酰基(N^{α} -十四酰基))) -GLP-1(7-37)-OH 的合成

将 Arg^{34} -GLP-1(7-37)-OH (15mg, 4.4 μmol)、EDPA (16mg, 124 μmol)、NMP (2ml) 和水 (4.8ml) 的混合物在室温温和摇动 5 分钟。将按例 29 方法制得的 N^{α} -十四酰基-Glu(ONSu)- OBu^t (12.1mg, 23.7 μmol) 溶解于 NMP (303 μl) 所得溶液, 加入到所得混合物中, 将反应混合物在室温温和摇动 2 小时。向其中加入甘氨酸 (6.5mg, 86.9 μmol) 溶于 50 % 乙醇水溶液 (652 μl) 中制得的溶液以终止反应。加入乙酸铵的 0.5% 水溶液 (50ml), 将所得混合物冲洗到 Varian 1g C8 Mega Bond Elut[®] 柱体上, 用 5 % 乙腈水溶液 (15ml) 清洗已固定的化合物, 最终用 TFA (6ml) 洗脱而将其从柱中释放下来。将洗脱物在室温放置 1 小时 45 分钟, 然后真空浓缩。使用氰丙基(cyanopropyl)柱 (Zorbax 300SB-CN) 和标准乙腈/TFA 系统, 通过柱层析法纯化残余物。将柱加热到 65 $^{\circ}\text{C}$, 乙腈的浓度梯度为 60 分钟内 0-100 %。分离出目标化合物 (3.9mg, 26%), 用 MALDI-MS 法分析产物。发现质子化的分子离子峰的 m/z 值为 3723 ± 3 。因而得出分子量为 $3722\pm 3\text{amu}$ (理论值为 3723amu)。

例 44

N^{α} -十八酰基-Glu(ONSu)- OBu^t 的合成

向 H-Glu(OH)-OBu^t (2.82g,13.9mmol)、DMF(370ml)和 EDPA (1.79g,13.9mmol)的悬浮液中滴加 Ste-ONSu(5.3g,13.9mmol)溶于 DMF (60ml)得到的溶液。加入二氯甲烷(35ml),将反应混合物在室温搅拌 24 小时,然后真空浓缩。使残余物在 10 % 柠檬酸水溶液(330ml)和乙酸乙酯(200ml)之间分配,分离两相。将有机相真空浓缩,使残余物溶解于 DMF(60ml)。将所得溶液滴加到保持在 0 °C 的 10 % 柠檬酸水溶液 (400ml)中。收集沉淀物,并用冰水洗涤,在真空干燥箱内干燥。将干燥后的化合物溶于 DMF(40ml),并加入 HONSu (1.63g,14.2mmol)。向反应混合物中加入 DCC(2.66g,12.9mmol)溶于二氯甲烷(51ml)形成的溶液。将所得混合物在室温搅拌 64 小时,过滤得到沉淀化合物。将沉淀在正庚烷/2-丙醇中重结晶得到目标化合物(4.96g,68%)。

例 45

Arg^{26,34}Lys³⁸ (N^ε-(γ-谷氨酰基(N^α-十八酰基)))-GLP-1(7-38)-OH 的合成

将 Arg^{26,34}-GLP-1(7-38)-OH (28mg,7.9μmol)、EDPA(28.6mg , 221.5μmol)、NMP(1.96ml)和水(1.96ml)的混合物在室温温和摇动 5 分钟。将按例 44 方法制得的 N^α-十八酰基-Glu(ONSu)-OBu^t(17.93g , 31.6μmol)溶解于 NMP(448μl) 所得溶液,加入到所得混合物中,将反应混合物在室温温和摇动 2 小时。向其中加入甘氨酸(13.1mg,174μmol)溶于 50 % 乙醇水溶液(1.3ml)中制得的溶液以终止反应。加入乙酸铵的 0.5%水溶液(120ml),将所得混合物分成 2 等份。将每份冲洗到 Varian 5g C8 Mega Bond Elut[®]柱体上,用 5 % 乙腈水溶液(25ml)清洗已固定的化合物,最终用 TFA(25ml)洗脱而将其从柱中释放下来。将合并的洗脱物在室温放置 1 小时 25 分钟,然后真空浓缩。使用氰丙基柱(Zorbax 300SB-CN)和标准乙腈/TFA 系统,通过柱层析法纯化残余物。将柱加热到 65 °C, 乙腈的浓度梯度为 60 分钟内 0-100 %。分离出目标化合物 (3.6mg,11%),用 MALDI-MS 法分析产物。发现质子化的分子离子峰的 m/z 值为 3940±3。因而得出分子量为 3939±3amu(理论值为 3937amu)。

生物学观察

GLP-1 衍生物皮下给药后的长时间作用

采用下述方法，监测健康猪皮下施用 GLP-1 衍生物后其血浆中的浓度，从而测定本发明的一些 GLP-1 衍生物的长时间作用。为了进行比较，也对皮下施用 GLP-1(7-37)后其在血浆中的浓度进行了测定。结果示于表 1。可以按此方法测定本发明其它 GLP-1 衍生物的长时间作用。

从实验开始即使猪(50 % Duroc,25%Yorkshire,25%Danish Landrace，重约 40kg)禁食。每只猪按每公斤体重给以溶于 50 μ M 等渗溶液(5mM 磷酸盐，pH7.4，0.02%吐温[®]-20(Merck),45mg/ml 甘露糖醇(除去热原，Novo Nordisk))的 0.5nmol 测试化合物。在表 1 所示时间从颈静脉导管抽取血样。将 5ml 血样倒入含有 175 μ l 下述溶液的冰冷玻璃杯中：0.18M EDTA,1500KIE/ml 抑酶肽(Novo Nordisk)和 3 % 杆菌肽(Sigma)，pH7.4。30 分钟内，将样品在 5-6000^{*}g 离心 10 分钟。将温度保持在 4℃。用吸管将上清液吸至不同的玻璃杯中，贮于-20℃直至使用。

利用对 GLP-1(7-37)的 N-末端区域具有特异性的单克隆抗体，通过 RIA 法测定诸肽的血浆浓度。与 GLP-1(1-37)和 GLP-1(8-36)酰胺的交叉反应小于 1%，与 GLP-1(9-37)、GLP-1(10-36)酰胺和 GLP-1(11-36)酰胺的交叉反应小于 0.1%。在 4℃进行全部反应。

如下进行测定：将 100 μ l 血浆与 271 μ l 96 % 乙醇混合，用涡旋混合器混匀并在 2600^{*}g 离心 30 分钟。将上清液轻轻倒入 Minisorp 试管中，并完全蒸发(Savant Speedvac AS290)。将蒸发残余物重新溶解在含有 80mM 磷酸二氢钠/磷酸氢二钠、0.1%HSA(Orpha 20/21，Behring)、10mM EDTA, 0.6mM 乙基汞硫代水杨酸钠(Sigma)，pH7.5 的测定缓冲液中。将试样溶于适于达到其预计浓度的体积内，并使其溶解 30 分钟。向 300 μ l 试样中加入 100 μ l 由含有 40mM 磷酸二氢钠/磷酸氢二钠、0.1%HSA,0.6mM 乙基汞硫代水杨酸钠、pH7.5 的稀释缓冲液制成的抗体溶液。将 300 μ l 缓冲液与 100 μ l 稀释缓冲液混合制

成非特异性样品。从冷冻干燥贮备物制得各个标准, 将其溶解于 300 μ l 测定缓冲液中。所有样品均在 Minisorp 管中与如上所述的抗体预保温 72 小时。向其中加入溶于稀释缓冲液中的含有 6-7000CPM 的示踪剂 200 μ l, 将样品混合并保温 48 小时。在每管中加入在 40mM 磷酸二氢钠/磷酸氢二钠、0.6 mM 乙基汞硫代水杨酸钠, pH7.5 中的肝素稳定的牛血浆 200ml/l 和 18g/l 活性碳(Merck)的悬液 1.5ml。使用前, 将悬液混合并使其在 4 $^{\circ}$ C 放置 2 小时。将所有样品在 4 $^{\circ}$ C 保温 1 小时, 然后在 3400 * g 离心 25 分钟。离心后立即轻轻取出上清液并在 γ -计数器内计数。从各个标准物曲线计算样品中的浓度。测得以下血浆浓度, 它们是各个化合物的最大浓度的百分数(n=2):

表 1

测试化合物 ¹⁾	皮下给药后的时间(小时)								
	0.75	1	2	4	6	8	10	12	24
GLP-(7-37)		100	9	1					
例 25	73	92	100	98	82	24	16	16	16
例 17	76	71	91	100	84	68	30		9
例 43		39	71	93	100	91	59	50	17
例 37		26	38	97	100	71	81	80	45
例 11	24	47	59	71	100	94	100		94
例 12	36	54	65	94	80	100	85		93
例 32	55	53	90	83	88	70	98	100	100
例 14	18	25	32	47	98	83	97		100
例 13	15	22	38	59	97	85	100		76
例 38	60	53	100	66	48	39	25	29	0
例 39	38	100	70	47	33	33	18	27	14
例 40	47	19	50	100	51	56	34	14	0
例 34	19	32	44	84	59	66	83	84	100

¹⁾测试用化合物是给出例号的各例目标化合物

如表 1 所示, 本发明的 GLP-1 衍生物具有比 GLP-1(7-37)更长时间的作用曲线, 并且在血浆中比 GLP-1(7-37)远为持久。表 1 还显示, 所选

的特定 GLP-1 衍生物不同，它们达到血浆内峰浓度的时间变化范围很大。

对表达克隆的人 GLP-1 受体的细胞系内 cAMP 形成的刺激作用

为证实 GLP-1 衍生物的效能，测定了它们在表达克隆的人 GLP-1 受体的细胞系内刺激 cAMP 形成的能力。从剂量-响应曲线计算出 EC_{50} 。

使用表达人胰腺 GLP-1 受体的幼仓鼠肾(BHK)细胞(Knudsen 和 Pridal,1996,欧洲药理学杂志, 318, 429-435)。通过在缓冲液(10mmol/l Tris-HCl和30mmol/l NaCl pH7.4,另外还含有1mmol/l 二硫苏糖醇,5mg/l 亮抑酶肽(Sigma,St.Louis,MO, USA), 5mg/l 抑胃酶肽(Sigma,St.Louis,MO,USA), 100mg/l 杆菌肽(Sigma,St.Louis,MO,USA)和16mg/l 抑酶肽(Novo Nordisk A/S, Bagsvaerd,Denmark))中匀浆制备质膜(Adelhorst 等,1994,生物化学杂志, 269, 6275)。匀浆物在41w/v%蔗糖层上部离心。将两层之间的白色条带在缓冲液中稀释并离心。质膜保存在-80℃备用。

在96孔微量滴定板中以总体积140 μ l进行测定。所用的缓冲液为50mmol/l Tris-HCl,pH7.4,还加入1mmol/l EGTA、1.5mmol/l $MgSO_4$ 、1.7mmol/l ATP、20mM GTP,2mmol/l 3-异丁基-1-甲基黄嘌呤、0.01%吐温-20和0.1%人血清白蛋白(Reinst,Behringwerke AG,Marburg,德国)。将欲测其激动剂活性的化合物溶解并稀释在缓冲液中,加入到质膜制剂中,将混合物在37℃保温2小时。加入25 μ l 0.05mol/l 盐酸终止反应。将样品稀释10倍后用闪烁亲近测定法(scintillation proximity assay)(RPA 538, Amersham,UK)分析cAMP。得到以下结果:

测试化合物 ^{·)}	EC ₅₀ ,pM	测试化合物 ^{·)}	EC ₅₀ ,pM
GLP-1(7-37)	61	例 31	96
例 45	120	例 30	41
例 43	24	例 26	8.8
例 40	55	例 25	99
例 39	5.1	例 19	79
例 38	54	例 16	3.5
例 37	60		

^{·)}测试用化合物是给出例号的实例的目标化合物