(19)国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 115052615 A
(43)申请公布日 2022.09.13

(21)申请号 202080095675.2
(22)申请日 2020.12.03
(30)优先权数据
62/943,667 2019.12.04 US
62/994,791 2020.03.25 US
(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2022.08.04
(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/US2020/063149 2020.12.03
(87)PCT国际申请的公布数据
WO2021/113535 EN 2021.06.10
(71)申请人 斯克利普斯研究所
地址 美国加利福尼亚州
(72)发明人 沈卫军 埃尔莎·普弗利姆林 萨姆·李尔 扎伊德·阿姆索 彼得·G·舒尔茨
(74)专利代理机构 北京安信方达知识产权代理有限公司 11262
专利代理师 贺淑东 武晶晶
(51)Int.Cl.
A61K 38/14(2006.01)
A61K 38/12(2006.01)

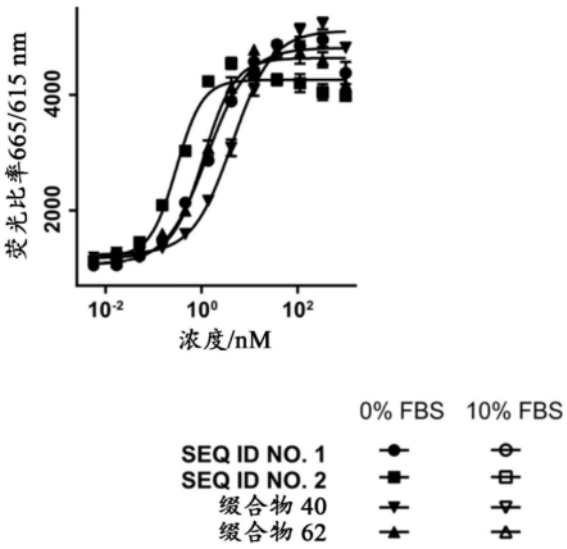
权利要求书23页 说明书177页 附图38页

(54)发明名称

肽缀合物和使用方法

(57)摘要

本文公开了肽缀合物，其包含选自以下的肽：调节PYY受体的肽、调节GLP-1受体和GCG受体的肽、调节GLP-1受体和GIP受体的肽以及调节GLP-1受体的肽；以及在第一氨基酸和第二氨基酸处与肽连接的钉合体。本文还提供了包含催乳素释放肽的肽缀合物。该肽缀合物可用于治疗诸如肥胖症的病症。本文还提供了钉合的催乳素释放肽。



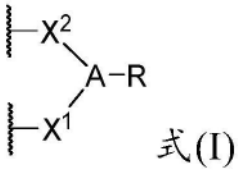
CN 115052615 A

1.一种肽缀合物,其包含:

a)选自以下的肽:调节PYY受体的肽、调节GLP-1受体和GCG受体的肽、调节GLP-1受体和GIP受体的肽以及调节GLP-1受体的肽;以及

b)在第一含巯基氨基酸和第二含巯基氨基酸处与所述肽连接的钉合体;

其中所述钉合体为式(I)的化合物:



式(I)

其中:

A为-N-;

X^1和X^2为键、-C(=O)-、-亚烷基-C(=O)-、-C(=O)-亚烷基-、-亚烷基-C(=O)NR^3-、-亚烷基-NR^3C(=O)-、-C(=O)NR^3-亚烷基-、-NR^3C(=O)-亚烷基-、-亚烷基-C(=O)NR^3-亚烷基-或-亚烷基-NR^3C(=O)-亚烷基-;

其中X^1与所述肽的含巯基氨基酸连接,X^2与所述肽的含巯基氨基酸连接,且X^1和X^2相同;

R为氢或-$(L)_s$-Y;

每个L独立地为-$(CR^1R^2)_v$-、-亚烷基-O-、-O-亚烷基-、-C(=O)-亚烷基-、-亚烷基-C(=O)-、-NR^3-亚烷基-、-亚烷基-NR^3-、-S-亚烷基-、-亚烷基-S-、-S(=O)-亚烷基-、-亚烷基-S(=O)-、-S$(=O)_2$-亚烷基、-亚烷基-S$(=O)_2$-、-C(=O)-、-C(=O)NR^3-、-NR^3C(=O)-、-NR^3C(=O)NR^3-、-NR^3C(=O)NR^3-亚烷基-、-NR^3C(=O)-亚烷基-NR^3-、-亚烷基-C(=O)NR^3-、-C(=O)NR^3-亚烷基-、-亚烷基-NR^3C(=O)-或-NR^3C(=O)-亚烷基-;

v为2-20;

R^1或R^2各自独立地为氢、卤素、-CN、-OR^a、-SR^a、-S(=O)R^b、-NO_2、-NR^cR^d、-S$(=O)_2R^d$、-NR^aS$(=O)_2R^d$、-S$(=O)_2NR^cR^d$、-C(=O)R^b、-OC(=O)R^b、-CO_2R^a、-OCO_2R^a、-C(=O)NR^cR^d、-OC(=O)NR^cR^d、-NR^aC(=O)NR^cR^d、-NR^aC(=O)R^b、-NR^aC(=O)OR^a、C_1-C_6烷基、C_2-C_6烯基、C_2-C_6炔基、C_1-C_6杂烷基、C_3-C_8环烷基、C_2-C_8杂环烷基、芳基或杂芳基;其中所述烷基、烯基、炔基和杂烷基任选地被卤素、-OR^a或-NR^cR^d中的一个、两个或三个取代;并且所述环烷基、杂环烷基、芳基和杂芳基任选地被卤素、C_1-C_6烷基、C_1-C_6卤代烷基、-OR^a或-NR^cR^d中的一个、两个或三个取代;

或R^1和R^2一起形成C_1-C_6环烷基或C_1-C_6杂环烷基;

每个R^3独立地为氢、-S(=O)R^b、-S$(=O)_2R^a$、-S$(=O)_2NR^cR^d$、-C(=O)R^b、-CO_2R^a、-C(=O)NR^cR^d、C_1-C_6烷基、C_2-C_6烯基、C_2-C_6炔基、C_1-C_6杂烷基、C_3-C_8环烷基、C_2-C_8杂环烷基、芳基或杂芳基;其中所述烷基、烯基、炔基和杂烷基任选地被卤素、-OR^a或-NR^cR^d中的一个、两个或三个取代;并且所述环烷基、杂环烷基、芳基和杂芳基任选地被卤素、C_1-C_6烷基、C_1-C_6卤代烷基、-OR^a或-NR^cR^d中的一个、两个或三个取代;

Y为氢、C_1-C_6烷基、-CO_2H、-CO_2(C_1-C_6烷基)、-CO_2NH_2、-CO_2N(烷基)$_2$或-CO_2NH(烷基);

s为0-20;

R^a为氢、C_1-C_6烷基、C_2-C_6烯基、C_2-C_6炔基、C_1-C_6杂烷基、C_3-C_8环烷基、C_2-C_8杂环烷基、芳基或杂芳基;其中所述烷基、烯基、炔基和杂烷基任选地被卤素、-OH、-OMe或-NH_2中的一个、

两个或三个取代;并且所述环烷基、杂环烷基、芳基和杂芳基任选地被卤素、C_1-C_6烷基、C_1-C_6卤代烷基、-OH、-OMe或-NH_2中的一个、两个或三个取代;

R^b为C_1-C_6烷基、C_2-C_6烯基、C_2-C_6炔基、C_1-C_6杂烷基、C_3-C_8环烷基、C_2-C_8杂环烷基、芳基或杂芳基;其中所述烷基、烯基、炔基和杂烷基任选地被卤素、-OH、-OMe或-NH_2中的一个、两个或三个取代;并且所述环烷基、杂环烷基、芳基和杂芳基任选地被卤素、C_1-C_6烷基、C_1-C_6卤代烷基、-OH、-OMe或-NH_2中的一个、两个或三个取代;以及

R^c和R^d各自独立地为氢、C_1-C_6烷基、C_2-C_6烯基、C_2-C_6炔基、C_1-C_6杂烷基、C_3-C_8环烷基、C_2-C_8杂环烷基、芳基或杂芳基;其中所述烷基、烯基、炔基和杂烷基任选地被卤素、-OH、-OMe或-NH_2中的一个、两个或三个取代;并且所述环烷基、杂环烷基、芳基和杂芳基任选地被卤素、C_1-C_6烷基、C_1-C_6卤代烷基、-OH、-OMe或-NH_2中的一个、两个或三个取代;

或者R^c和R^d与它们所连接的氮原子一起形成杂环烷基或杂芳基;其中所述杂环烷基和杂芳基任选地被卤素、C_1-C_6烷基、C_1-C_6卤代烷基、-OH、-OMe或-NH_2中的一个、两个或三个取代。

2.根据权利要求1所述的肽缀合物,其中所述第一含巯基氨基酸和第二含巯基氨基酸独立地选自半胱氨酸、高半胱氨酸、2-氨基-5-巯基戊酸和2-氨基-6-巯基己酸。

3.根据权利要求1或2所述的肽缀合物,其中所述第一含巯基氨基酸和第二含巯基氨基酸为半胱氨酸。

4.根据权利要求1至3中任一项所述的肽缀合物,其还包含与所述肽中的含巯基氨基酸或含胺氨基酸残基连接的半衰期延长分子。

5.根据权利要求4所述的肽缀合物,其中所述含胺氨基酸选自赖氨酸、鸟氨酸、二氨基丁酸、二氨基丙酸和高赖氨酸。

6.根据权利要求4或5所述的肽缀合物,其中所述含胺氨基酸为赖氨酸。

7.根据权利要求4所述的肽缀合物,其中所述含巯基氨基酸选自半胱氨酸、高半胱氨酸、2-氨基-5-巯基戊酸和2-氨基-6-巯基己酸。

8.根据权利要求4或7所述的肽缀合物,其中所述含巯基氨基酸为半胱氨酸。

9.根据权利要求1至8中任一项所述的肽缀合物,其中所述第一含巯基氨基酸在所述肽中的位置为i,且所述第二含巯基氨基酸在所述肽中的位置为i+n,其中n为4-16。

10.根据权利要求1至8中任一项所述的肽缀合物,其中所述第一含巯基氨基酸在所述肽中的位置为i,且所述第二含巯基氨基酸在所述肽中的位置为i+4。

11.根据权利要求1至8中任一项所述的肽缀合物,其中所述第一含巯基氨基酸在所述肽中的位置为i,且所述第二含巯基氨基酸在所述肽中的位置为i+7。

12.根据权利要求1至8中任一项所述的肽缀合物,其中所述第一含巯基氨基酸在所述肽中的位置为i,且所述第二含巯基氨基酸在所述肽中的位置为i+11。

13.根据权利要求1至8中任一项所述的肽缀合物,其中所述第一含巯基氨基酸在所述肽中的位置为i,且所述第二含巯基氨基酸在所述肽中的位置为i+15。

14.根据权利要求1至8中任一项所述的肽缀合物,其中所述第一含巯基氨基酸在所述肽中的位置为i,且所述第二含巯基氨基酸在所述肽中的位置为i+16。

15.根据权利要求1至14中任一项所述的肽缀合物,其包含调节所述PYY受体的肽。

16.根据权利要求15所述的肽缀合物,其中所述调节PYY受体的肽包含与SEQ ID NO:3-

45中的任一项具有至少约90%同一性的肽序列。

17.根据权利要求15所述的肽缀合物,其中所述调节PYY受体的肽包含与SEQ ID NO:3-45中的任一项具有至少约95%同一性的肽序列。

18.根据权利要求15所述的肽缀合物,其中所述调节PYY受体的肽包含与SEQ ID NO:3-45中的任一项具有至少约99%同一性的肽序列。

19.根据权利要求15所述的肽缀合物,其中所述调节PYY受体的肽包含选自SEQ ID NO:3-45的肽序列。

20.根据权利要求15所述的肽缀合物,其中所述调节PYY受体的肽包含与SEQ ID NO:6具有至少约90%同一性的序列。

21.根据权利要求15所述的肽缀合物,其中所述调节PYY受体的肽包含与SEQ ID NO:6具有至少约95%同一性的序列。

22.根据权利要求15所述的肽缀合物,其中所述调节PYY受体的肽包含与SEQ ID NO:6具有至少约99%同一性的序列。

23.根据权利要求15所述的肽缀合物,其中所述调节PYY受体的肽包含SEQ ID NO:6的序列。

24.根据权利要求1至14中任一项所述的肽缀合物,其包含调节所述GLP-1受体和所述GCG受体的肽。

25.根据权利要求24所述的肽缀合物,其中所述调节GLP-1受体和GCG受体的肽包含与SEQ ID NO:60-61或80-82中的任一项具有至少约90%同一性的肽序列。

26.根据权利要求24所述的肽缀合物,其中所述调节GLP-1受体和GCG受体的肽包含与SEQ ID NO:60-61或80-82中的任一项具有至少约95%同一性的肽序列。

27.根据权利要求24所述的肽缀合物,其中所述调节GLP-1受体和GCG受体的肽包含与SEQ ID NO:60-61或80-82中的任一项具有至少约99%同一性的肽序列。

28.根据权利要求24所述的肽缀合物,其中所述调节GLP-1受体和GCG受体的肽包含选自SEQ ID NO:60-61或80-82的肽序列。

29.根据权利要求24所述的肽缀合物,其中所述调节GLP-1受体和GCG受体的肽包含与SEQ ID NO:48-52或55-61或80-82中的任一项具有至少约90%同一性的肽序列。

30.根据权利要求24所述的肽缀合物,其中所述调节GLP-1受体和GCG受体的肽包含与SEQ ID NO:48-52或55-61或80-82中的任一项具有至少约95%同一性的肽序列。

31.根据权利要求24所述的肽缀合物,其中所述调节GLP-1受体和GCG受体的肽包含与SEQ ID NO:48-52或55-61或80-82中的任一项具有至少约99%同一性的肽序列。

32.根据权利要求24所述的肽缀合物,其中所述调节GLP-1受体和GCG受体的肽包含选自SEQ ID NO:48-52或55-61或80-82的肽序列。

33.根据权利要求24所述的肽缀合物,其中所述调节GLP-1受体和GCG受体的肽包含与SEQ ID NO:60具有至少约90%同一性的序列。

34.根据权利要求24所述的肽缀合物,其中所述调节GLP-1受体和GCG受体的肽包含与SEQ ID NO:60具有至少约95%同一性的序列。

35.根据权利要求24所述的肽缀合物,其中所述调节GLP-1受体和GCG受体的肽包含与SEQ ID NO:60具有至少约99%同一性的序列。

36.根据权利要求24所述的肽缀合物，其中所述调节GLP-1受体和GCG受体的肽包含SEQ ID NO:60的序列。

37.根据权利要求1至14中任一项所述的肽缀合物，其包含调节所述GLP-1受体和所述GIP受体的肽。

38.根据权利要求37所述的肽缀合物，其中所述调节GLP-1受体和GIP受体的肽包含与SEQ ID NO:69-71中的任一项具有至少约90％同一性的肽序列。

39.根据权利要求37所述的肽缀合物，其中所述调节GLP-1受体和GIP受体的肽包含与SEQ ID NO:69-71中的任一项具有至少约95％同一性的肽序列。

40.根据权利要求37所述的肽缀合物，其中所述调节GLP-1受体和GIP受体的肽包含与SEQ ID NO:69-71中的任一项具有至少约99％同一性的肽序列。

41.根据权利要求37所述的肽缀合物，其中所述调节GLP-1受体和GIP受体的肽包含选自SEQ ID NO:69-71的肽序列。

42.根据权利要求37所述的肽缀合物，其中所述调节GLP-1受体和GIP受体的肽包含与SEQ ID NO:62或65中的任一项具有至少约90％同一性的肽序列。

43.根据权利要求37所述的肽缀合物，其中所述调节GLP-1受体和GIP受体的肽包含与SEQ ID NO:62或65中的任一项具有至少约95％同一性的肽序列。

44.根据权利要求37所述的肽缀合物，其中所述调节GLP-1受体和GIP受体的肽包含与SEQ ID NO:62或65中的任一项具有至少约99％同一性的肽序列。

45.根据权利要求37所述的肽缀合物，其中所述调节GLP-1受体和GIP受体的肽包含选自SEQ ID NO:62或65的肽序列。

46.根据权利要求1至14中任一项所述的肽缀合物，其包含调节所述GLP-1受体的肽。

47.根据权利要求46所述的肽缀合物，其中所述调节GLP-1受体的肽包含与SEQ ID NO:76-79中的任一项具有至少约90％同一性的肽序列。

48.根据权利要求46所述的肽缀合物，其中所述调节GLP-1受体的肽包含与SEQ ID NO:76-79中的任一项具有至少约95％同一性的肽序列。

49.根据权利要求46所述的肽缀合物，其中所述调节GLP-1受体的肽包含与SEQ ID NO:76-79中的任一项具有至少约99％同一性的肽序列。

50.根据权利要求46所述的肽缀合物，其中所述调节GLP-1受体的肽包含选自SEQ ID NO:76-79的肽序列。

51.根据权利要求46所述的肽缀合物，其中所述调节GLP-1受体的肽包含与SEQ ID NO:76具有至少约90％同一性的序列。

52.根据权利要求46所述的肽缀合物，其中所述调节GLP-1受体的肽包含与SEQ ID NO:76具有至少约95％同一性的序列。

53.根据权利要求46所述的肽缀合物，其中所述调节GLP-1受体的肽包含与SEQ ID NO:76具有至少约99％同一性的序列。

54.根据权利要求46所述的肽缀合物，其中所述调节GLP-1受体的肽包含SEQ ID NO:76的序列。

55.根据权利要求46所述的肽缀合物，其中所述调节GLP-1受体的肽包含与SEQ ID NO:77具有至少约90％同一性的序列。

56.根据权利要求46所述的肽缀合物，其中所述调节GLP-1受体的肽包含与SEQ ID NO:77具有至少约95％同一性的序列。

57.根据权利要求46所述的肽缀合物，其中所述调节GLP-1受体的肽包含与SEQ ID NO:77具有至少约99％同一性的序列。

58.根据权利要求46所述的肽缀合物，其中所述调节GLP-1受体的肽包含SEQ ID NO:77的序列。

59.根据权利要求1至58中任一项所述的肽缀合物，其中所述肽缀合物的半衰期是未修饰形式的所述肽的半衰期的至少约2倍。

60.根据权利要求1至58中任一项所述的肽缀合物，其中所述肽缀合物的半衰期是未修饰形式的所述肽的半衰期的至少约5倍。

61.根据权利要求1至58中任一项所述的肽缀合物，其中所述肽缀合物的半衰期是未修饰形式的所述肽的半衰期的至少约10倍。

62.根据权利要求1至61中任一项所述的肽缀合物，其中所述肽缀合物的结合亲和力在未修饰形式的所述肽的结合亲和力的约5％以内。

63.根据权利要求1至62中任一项所述的肽缀合物，其中所述肽缀合物的结合亲和力在未修饰形式的所述肽的结合亲和力的约10％以内。

64.根据权利要求1至63中任一项所述的肽缀合物，其中所述肽缀合物的结合亲和力在未修饰形式的所述肽的结合亲和力的约15％以内。

65.根据权利要求1至64中任一项所述的肽缀合物，其中所述肽缀合物的结合亲和力在未修饰形式的所述肽的结合亲和力的约20％以内。

66.根据权利要求1至65中任一项所述的肽缀合物，其中X^1和X^2为-C(=O)-。

67.根据权利要求1至65中任一项所述的肽缀合物，其中X^1和X^2为-亚烷基-C(=O)-或-C(=O)亚烷基-。

68.根据权利要求1至65中任一项所述的肽缀合物，其中X^1和X^2为-CH_2-C(=O)-或-C(=O)-CH_2-。

69.根据权利要求1至65中任一项所述的肽缀合物，其中X^1和X^2为-亚烷基-C(=O)NR^3-或-C(=O)NR^3-亚烷基-。

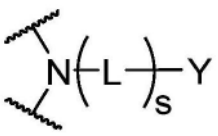
70.根据权利要求1至65中任一项所述的肽缀合物，其中X^1和X^2为-CH_2-C(=O)NR^3-或-C(=O)NR^3-CH_2-。

71.根据权利要求1至65中任一项所述的肽缀合物，其中X^1和X^2为-亚烷基-C(=O)NR^3-亚烷基-或-亚烷基-NR^3C(=O)-亚烷基-。

72.根据权利要求1至65中任一项所述的肽缀合物，其中X^1和X^2为-CH_2-C(=O)NR^3-CH_2CH_2-或-CH_2-NR^3C(=O)-CH_2CH_2-。

73.根据权利要求1至65中任一项所述的肽缀合物，其中X^1和X^2为-CH_2-C(=O)NH-CH_2CH_2-或-CH_2-NHC(=O)-CH_2CH_2-。

74.根据权利要求1至73中任一项所述的肽缀合物，其中>A-R具有以下结构：



。

75.根据权利要求1至74中任一项所述的肽缀合物，其中s为1-15。

76.根据权利要求1至75中任一项所述的肽缀合物，其中s为1-10。

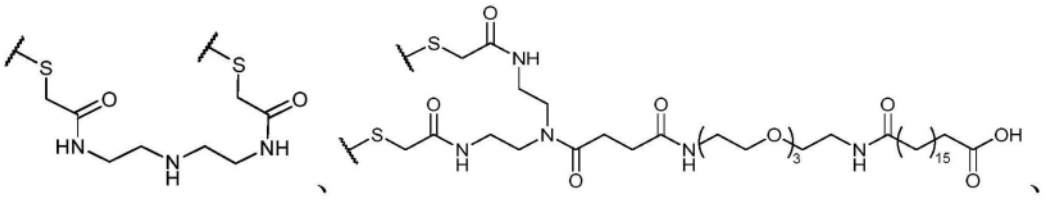
77.根据权利要求1至76中任一项所述的肽缀合物，其中s为5-15。

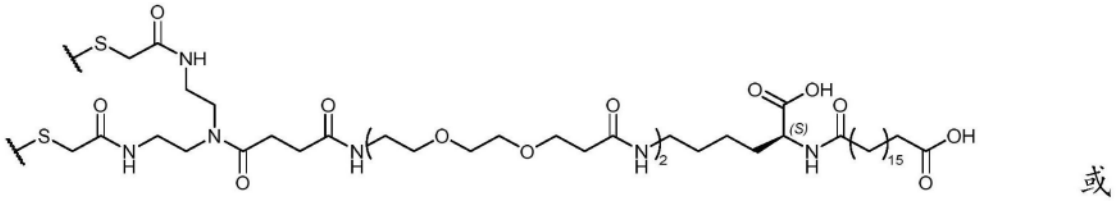
78.根据权利要求1至77中任一项所述的肽缀合物，其中s为5-10。

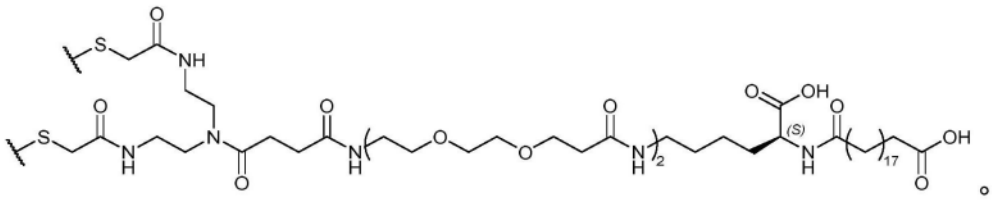
79.根据权利要求1至78中任一项所述的肽缀合物，其中Y为氢或$-CO_2H$。

80.根据权利要求1至79中任一项所述的肽缀合物，其中每个L独立地为$-(CR^1R^2)_v-$、-亚烷基-O-、-C(=O)-、-C(=O)NR^3-、-NR^3C(=O)-、-亚烷基-C(=O)NR^3-或-亚烷基-NR^3C(=O)-；且v为2-20。

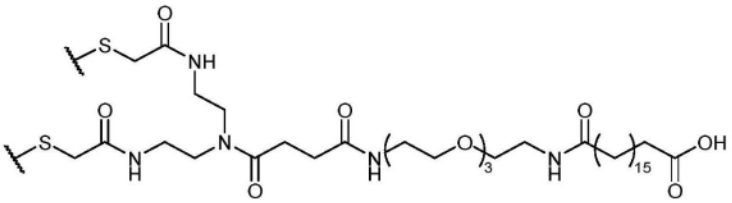
81.根据权利要求1所述的肽缀合物，其中所述肽缀合物包含：

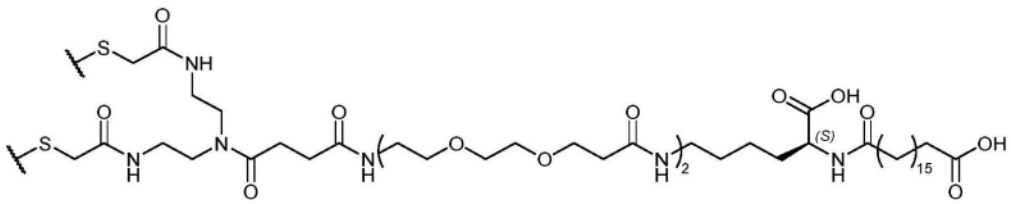

、

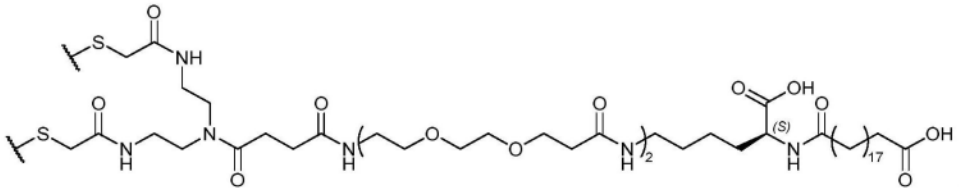

或


。

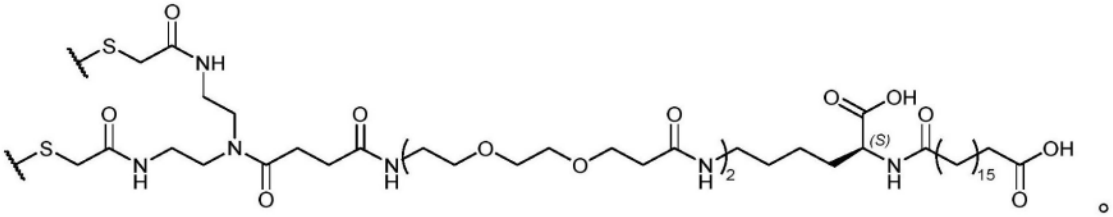
82.根据权利要求1所述的肽缀合物，其中所述肽缀合物包含：


、

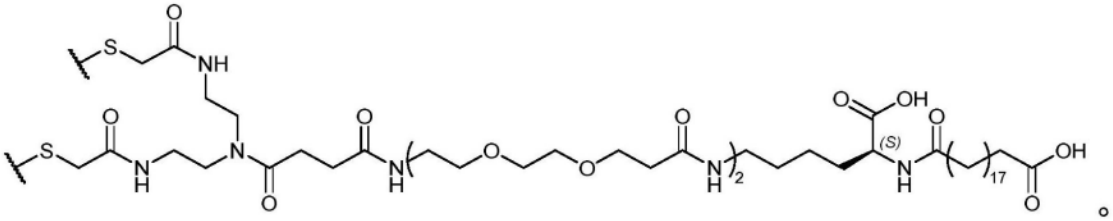

或


。

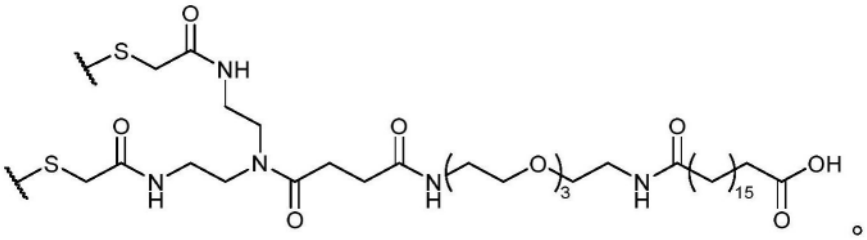
83.根据权利要求1所述的肽缀合物，其中所述肽缀合物包含：



84.根据权利要求1所述的肽缀合物,其中所述肽缀合物包含:



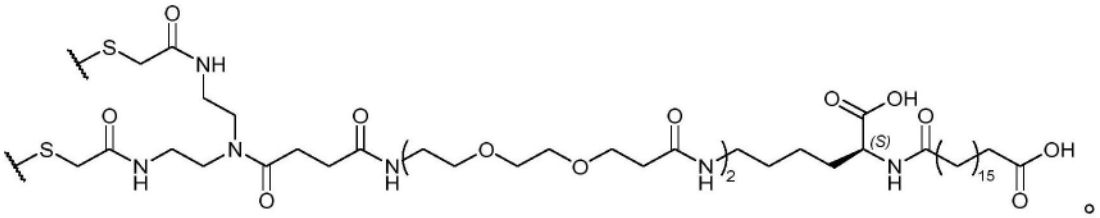
85.根据权利要求1所述的肽缀合物,其中所述肽缀合物包含:



86.根据权利要求1所述的肽缀合物,其中所述肽缀合物包含:

a)调节所述PYY受体的肽,其包含SEQ ID NO:6的肽序列;以及

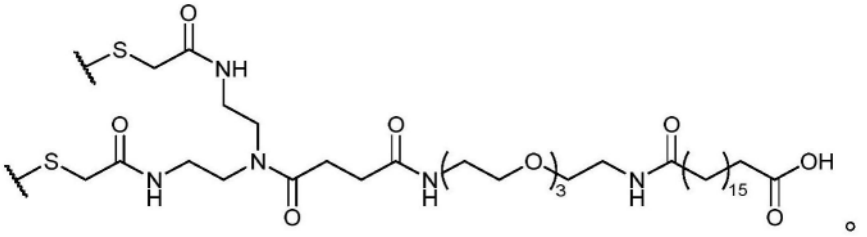
b)在第一半胱氨酸和第二半胱氨酸处与所述肽连接的具有以下结构的钉合体(“-S”为半胱氨酸残基的一部分):



87.根据权利要求1所述的肽缀合物,其中所述肽缀合物包含:

a)调节所述GLP-1受体和所述GCG受体的肽,其包含SEQ ID NO:60的肽序列;以及

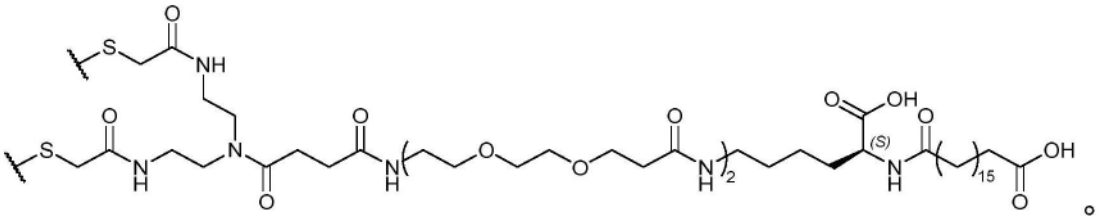
b)在第一半胱氨酸和第二半胱氨酸处与所述肽连接的具有以下结构的钉合体(“-S”为半胱氨酸残基的一部分):



88.根据权利要求1所述的肽缀合物,其中所述肽缀合物包含:

a)调节所述GLP-1受体的肽,其包含SEQ ID NO:76的肽序列;以及

b)在第一半胱氨酸和第二半胱氨酸处与所述肽连接的具有以下结构的钉合体(“{-S”为半胱氨酸残基的一部分)：



89.一种肽缀合物,其包含：

a)调节PYY受体的肽,其包含与SEQ ID NO:3、5、6、8、14-30、36或37中的任一项具有至少约95%同一性的肽序列;以及

b)在第一氨基酸和第二氨基酸处与所述肽连接的钉合体。

90.根据权利要求89所述的肽缀合物,其中所述调节PYY受体的肽包含与SEQ ID NO:3、5、6、8、14-30、36或37中的任一项具有至少约99%同一性的肽序列。

91.根据权利要求89所述的肽缀合物,其中所述调节PYY受体的肽包含SEQ ID NO:3、5、6、8、14-30、36或37的肽序列。

92.根据权利要求89所述的肽缀合物,其中所述调节PYY受体的肽包含与SEQ ID NO:6具有至少约99%同一性的序列。

93.根据权利要求89所述的肽缀合物,其中所述调节PYY受体的肽包含SEQ ID NO:6的序列。

94.一种肽缀合物,其包含：

a)调节GLP-1受体和GCGR受体的肽,其包含与SEQ ID NO:50-59中的任一项具有至少约95%同一性的肽序列;以及

b)在第一氨基酸和第二氨基酸处与所述肽连接的钉合体。

95.根据权利要求94所述的肽缀合物,其中所述调节GLP-1受体和GCG受体的肽包含与SEQ ID NO:50-59中的任一项具有至少约99%同一性的肽序列。

96.根据权利要求94所述的肽缀合物,其中所述调节GLP-1受体和GCG受体的肽包含选自SEQ ID NO:50-59的肽序列。

97.一种肽缀合物,其包含：

a)调节GLP-1受体和GIP受体的肽,其包含与SEQ ID NO:62-71中的任一项具有至少约95%同一性的肽序列;以及

b)在第一氨基酸和第二氨基酸处与所述肽连接的钉合体。

98.根据权利要求97所述的肽缀合物,其中所述调节GLP-1受体和GIP受体的肽包含与SEQ ID NO:62-71中的任一项具有至少约99%同一性的肽序列。

99.根据权利要求97所述的肽缀合物,其中所述调节GLP-1受体和GIP受体的肽包含选自SEQ ID NO:62-71的肽序列。

100.根据权利要求88所述的肽缀合物,其中所述调节GLP-1受体和GIP受体的肽包含与SEQ ID NO:63具有至少约99%同一性的序列。

101.根据权利要求97所述的肽缀合物,其中所述调节GLP-1受体和GIP受体的肽包含SEQ ID NO:63的序列。

102.一种肽缀合物,其包含:

a)调节GLP-1受体的肽,其包含与SEQ ID NO:74和79中的任一项具有至少约95%同一性的肽序列;以及

b)在第一氨基酸和第二氨基酸处与所述肽连接的钉合体。

103.根据权利要求102所述的肽缀合物,其中所述调节GLP-1受体的肽包含与SEQ ID NO:74和79中的任一项具有至少约99%同一性的肽序列。

104.根据权利要求102所述的肽缀合物,其中所述调节GLP-1受体的肽包含选自SEQ ID NO:74和79的肽序列。

105.根据权利要求89至104中任一项所述的肽缀合物,其中所述第一氨基酸和所述第二氨基酸独立地选自含胺氨基酸和含巯基氨基酸。

106.根据权利要求89至105中任一项所述的肽缀合物,其中所述第一氨基酸和第二氨基酸独立地选自半胱氨酸、高半胱氨酸、2-氨基-5-巯基戊酸和2-氨基-6-巯基己酸。

107.根据权利要求89至106中任一项所述的肽缀合物,其中所述第一氨基酸和第二氨基酸为半胱氨酸。

108.根据权利要求89至104中任一项所述的肽缀合物,其中所述第一氨基酸和第二氨基酸独立地选自赖氨酸、鸟氨酸、二氨基丁酸、二氨基丙酸和高赖氨酸。

109.根据权利要求89至104或108中任一项所述的肽缀合物,其中所述第一氨基酸和第二氨基酸为赖氨酸。

110.根据权利要求89至108中任一项所述的肽缀合物,其还包含与所述肽中的含巯基氨基酸或含胺氨基酸残基连接的半衰期延长分子。

111.根据权利要求110所述的肽缀合物,其中所述含胺氨基酸选自赖氨酸、鸟氨酸、二氨基丁酸、二氨基丙酸和高赖氨酸。

112.根据权利要求110或111所述的肽缀合物,其中所述含胺氨基酸为赖氨酸。

113.根据权利要求110所述的肽缀合物,其中所述含巯基氨基酸选自半胱氨酸、高半胱氨酸、2-氨基-5-巯基戊酸和2-氨基-6-巯基己酸。

114.根据权利要求110或113所述的肽缀合物,其中所述含巯基氨基酸为半胱氨酸。

115.根据权利要求89至114中任一项所述的肽缀合物,其中所述第一氨基酸在所述肽中的位置为i,且所述第二氨基酸在所述肽中的位置为i+n,其中n为4-16。

116.根据权利要求89至115中任一项所述的肽缀合物,其中所述第一氨基酸在所述肽中的位置为i,且所述第二氨基酸在所述肽中的位置为i+7。

117.根据权利要求89至116中任一项所述的肽缀合物,其中所述肽缀合物的半衰期是未修饰形式的所述肽的半衰期的至少约2倍。

118.根据权利要求89至116中任一项所述的肽缀合物,其中所述肽缀合物的半衰期是未修饰形式的所述肽的半衰期的至少约5倍。

119.根据权利要求89至116中任一项所述的肽缀合物,其中所述肽缀合物的半衰期是未修饰形式的所述肽的半衰期的至少约10倍。

120.根据权利要求89至116中任一项所述的肽缀合物,其中所述肽缀合物的结合亲和力在未修饰形式的所述肽的结合亲和力的约5%以内。

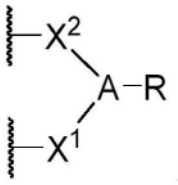
121.根据权利要求89至116中任一项所述的肽缀合物,其中所述肽缀合物的结合亲和

力在未修饰形式的所述肽的结合亲和力的约10%以内。

122.根据权利要求89至116中任一项所述的肽缀合物，其中所述肽缀合物的结合亲和力在未修饰形式的所述肽的结合亲和力的约15%以内。

123.根据权利要求89至116中任一项所述的肽缀合物，其中所述肽缀合物的结合亲和力在未修饰形式的所述肽的结合亲和力的约20%以内。

124.根据权利要求89至123中任一项所述的肽缀合物，其中所述钉合体为式(I)的化合物：



式(I)

其中：

A为任选取代的亚烷基、任选取代的亚芳基、任选取代的杂亚芳基、任选取代的-NR^3-亚烷基-NR^3-或-N-；

X^1和X^2独立地为键、-C(=O)-、-亚烷基-C(=O)-、-C(=O)-亚烷基-、-亚烷基-C(=O)NR^3-、-亚烷基-NR^3C(=O)-、-C(=O)NR^3-亚烷基-、-NR^3C(=O)-亚烷基-、-亚烷基-C(=O)NR^3-亚烷基-或-亚烷基-NR^3C(=O)-亚烷基-；

其中X^1与所述肽的第一氨基酸连接，且X^2与所述肽的第二氨基酸连接；

R为氢或-$(L)_s$-Y；

每个L独立地为-$(CR^1R^2)_v$-、-亚烷基-O-、-O-亚烷基-、-C(=O)-亚烷基-、-亚烷基-C(=O)-、-NR^3-亚烷基-、-亚烷基-NR^3-、-S-亚烷基-、-亚烷基-S-、-S(=O)-亚烷基-、-亚烷基-S(=O)-、-$S(=O)_2$-亚烷基、-亚烷基-$S(=O)_2$-、-C(=O)-、-C(=O)NR^3-、-NR^3C(=O)-、-NR^3C(=O)NR^3-、-NR^3C(=O)NR^3-亚烷基-、-NR^3C(=O)-亚烷基-NR^3-、-亚烷基-C(=O)NR^3-、-C(=O)NR^3-亚烷基-、-亚烷基-NR^3C(=O)-或-NR^3C(=O)-亚烷基-；

v为2-20；

R^1或R^2各自独立地为氢、卤素、-CN、-OR^a、-SR^a、-S(=O)R^b、-NO_2、-NR^cR^d、-$S(=O)_2R^d$、-$NR^aS(=O)_2R^d$、-$S(=O)_2NR^cR^d$、-C(=O)R^b、-OC(=O)R^b、-CO_2R^a、-OCO_2R^a、-C(=O)NR^cR^d、-OC(=O)NR^cR^d、-$NR^aC(=O)NR^cR^d$、-$NR^aC(=O)R^b$、-$NR^aC(=O)OR^a$、C_1-C_6烷基、C_2-C_6烯基、C_2-C_6炔基、C_1-C_6杂烷基、C_3-C_8环烷基、C_2-C_8杂环烷基、芳基或杂芳基；其中所述烷基、烯基、炔基和杂烷基任选地被卤素、-OR^a或-NR^cR^d中的一个、两个或三个取代；并且所述环烷基、杂环烷基、芳基和杂芳基任选地被卤素、C_1-C_6烷基、C_1-C_6卤代烷基、-OR^a、-NR^cR^d中的一个、两个或三个取代；

或R^1和R^2一起形成C_1-C_6环烷基或C_1-C_6杂环烷基；

每个R^3独立地为氢、-S(=O)R^b、-$S(=O)_2R^a$、-$S(=O)_2NR^cR^d$、-C(=O)R^b、-CO_2R^a、-C(=O)NR^cR^d、C_1-C_6烷基、C_2-C_6烯基、C_2-C_6炔基、C_1-C_6杂烷基、C_3-C_8环烷基、C_2-C_8杂环烷基、芳基或杂芳基；其中所述烷基、烯基、炔基和杂烷基任选地被卤素、-OR^a或-NR^cR^d中的一个、两个或三个取代；并且所述环烷基、杂环烷基、芳基和杂芳基任选地被卤素、C_1-C_6烷基、C_1-C_6卤代烷基、-OR^a或-NR^cR^d中的一个、两个或三个取代；

Y为氢、C_1-C_6烷基、-CO_2H、-CO_2(C_1-C_6烷基)、-CO_2NH_2、-CO_2N(烷基)$_2$或-CO_2NH(烷基)；以及

s为0-20；

R^a为氢、C_1-C_6烷基、C_2-C_6烯基、C_2-C_6炔基、C_1-C_6杂烷基、C_3-C_8环烷基、C_2-C_8杂环烷基、芳基或杂芳基；其中所述烷基、烯基、炔基和杂烷基任选地被卤素、-OH、-OMe或-NH_2中的一个、两个或三个取代；并且所述环烷基、杂环烷基、芳基和杂芳基任选地被卤素、C_1-C_6烷基、C_1-C_6卤代烷基、-OH、-OMe或-NH_2中的一个、两个或三个取代；

R^b为C_1-C_6烷基、C_2-C_6烯基、C_2-C_6炔基、C_1-C_6杂烷基、C_3-C_8环烷基、C_2-C_8杂环烷基、芳基或杂芳基；其中所述烷基、烯基、炔基和杂烷基任选地被卤素、-OH、-OMe或-NH_2中的一个、两个或三个取代；并且所述环烷基、杂环烷基、芳基和杂芳基任选地被卤素、C_1-C_6烷基、C_1-C_6卤代烷基、-OH、-OMe或-NH_2中的一个、两个或三个取代；

R^c和R^d各自独立地为氢、C_1-C_6烷基、C_2-C_6烯基、C_2-C_6炔基、C_1-C_6杂烷基、C_3-C_8环烷基、C_2-C_8杂环烷基、芳基或杂芳基；其中所述烷基、烯基、炔基和杂烷基任选地被卤素、-OH、-OMe或-NH_2中的一个、两个或三个取代；并且所述环烷基、杂环烷基、芳基和杂芳基任选地被卤素、C_1-C_6烷基、C_1-C_6卤代烷基、-OH、-OMe或-NH_2中的一个、两个或三个取代；

或者R^c和R^d与它们所连接的氮原子一起形成杂环烷基或杂芳基；其中所述杂环烷基和杂芳基任选地被卤素、C_1-C_6烷基、C_1-C_6卤代烷基、-OH、-OMe或-NH_2中的一个、两个或三个取代。

125.根据权利要求124所述的肽缀合物，其中A为任选取代的亚烷基。

126.根据权利要求124或125所述的肽缀合物，其中A为-$(CH_2)_t$-，其中t为1-12。

127.根据权利要求124所述的肽缀合物，其中A为任选取代的亚芳基。

128.根据权利要求124所述的肽缀合物，其中A为-NR^3-亚烷基-NR^3-。

129.根据权利要求124所述的肽缀合物，其中A为-N-。

130.根据权利要求124至129中任一项所述的肽缀合物，其中X^1和X^2相同。

131.根据权利要求124至129中任一项所述的肽缀合物，其中X^1和X^2不同。

132.根据权利要求124至129中任一项所述的肽缀合物，其中X^1和X^2为-C(=O)-。

133.根据权利要求124至129中任一项所述的肽缀合物，其中X^1和X^2独立地为-亚烷基-C(=O)-或-C(=O)亚烷基-。

134.根据权利要求124至129中任一项所述的肽缀合物，其中X^1和X^2独立地为-CH_2-C(=O)-或-C(=O)-CH_2-。

135.根据权利要求124至129中任一项所述的肽缀合物，其中X^1和X^2独立地为-亚烷基-C(=O)NR^3-或-C(=O)NR^3-亚烷基-。

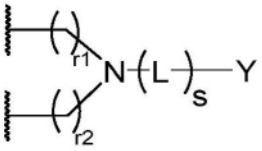
136.根据权利要求124至129中任一项所述的肽缀合物，其中X^1和X^2独立地为-CH_2-C(=O)NR^3-或-C(=O)NR^3-CH_2-。

137.根据权利要求124至129中任一项所述的肽缀合物，其中X^1和X^2独立地为-亚烷基-C(=O)NR^3-亚烷基-或-亚烷基-NR^3C(=O)-亚烷基-。

138.根据权利要求124至129中任一项所述的肽缀合物，其中X^1和X^2独立地为-CH_2-C(=O)NR^3-CH_2CH_2-或-CH_2-NR^3C(=O)-CH_2CH_2-。

139.根据权利要求124至129中任一项所述的肽缀合物，其中X^1和X^2独立地为-CH_2-C(=O)NH-CH_2CH_2-或-CH_2-NHC(=O)-CH_2CH_2-。

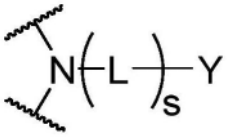
140.根据权利要求124至139中任一项所述的肽缀合物，其中>A-R具有以下结构：



，

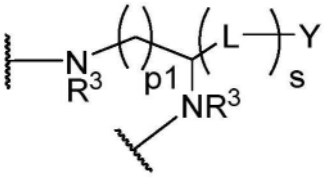
其中r1和r2各自独立地为0-4。

141.根据权利要求124至140中任一项所述的肽缀合物，其中>A-R具有以下结构：



。

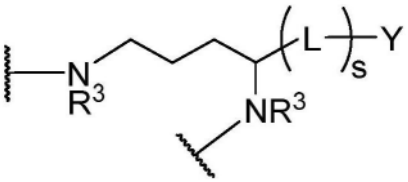
142.根据权利要求124至139中任一项所述的肽缀合物，其中>A-R具有以下结构：



，

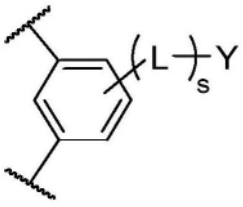
其中p1为1-5。

143.根据权利要求124至139或142中任一项所述的肽缀合物，其中>A-R具有以下结构：



。

144.根据权利要求124至139中任一项所述的肽缀合物，其中>A-R具有以下结构：



。

145.根据权利要求124至144中任一项所述的肽缀合物，其中s为1-15。

146.根据权利要求124至145中任一项所述的肽缀合物，其中s为1-10。

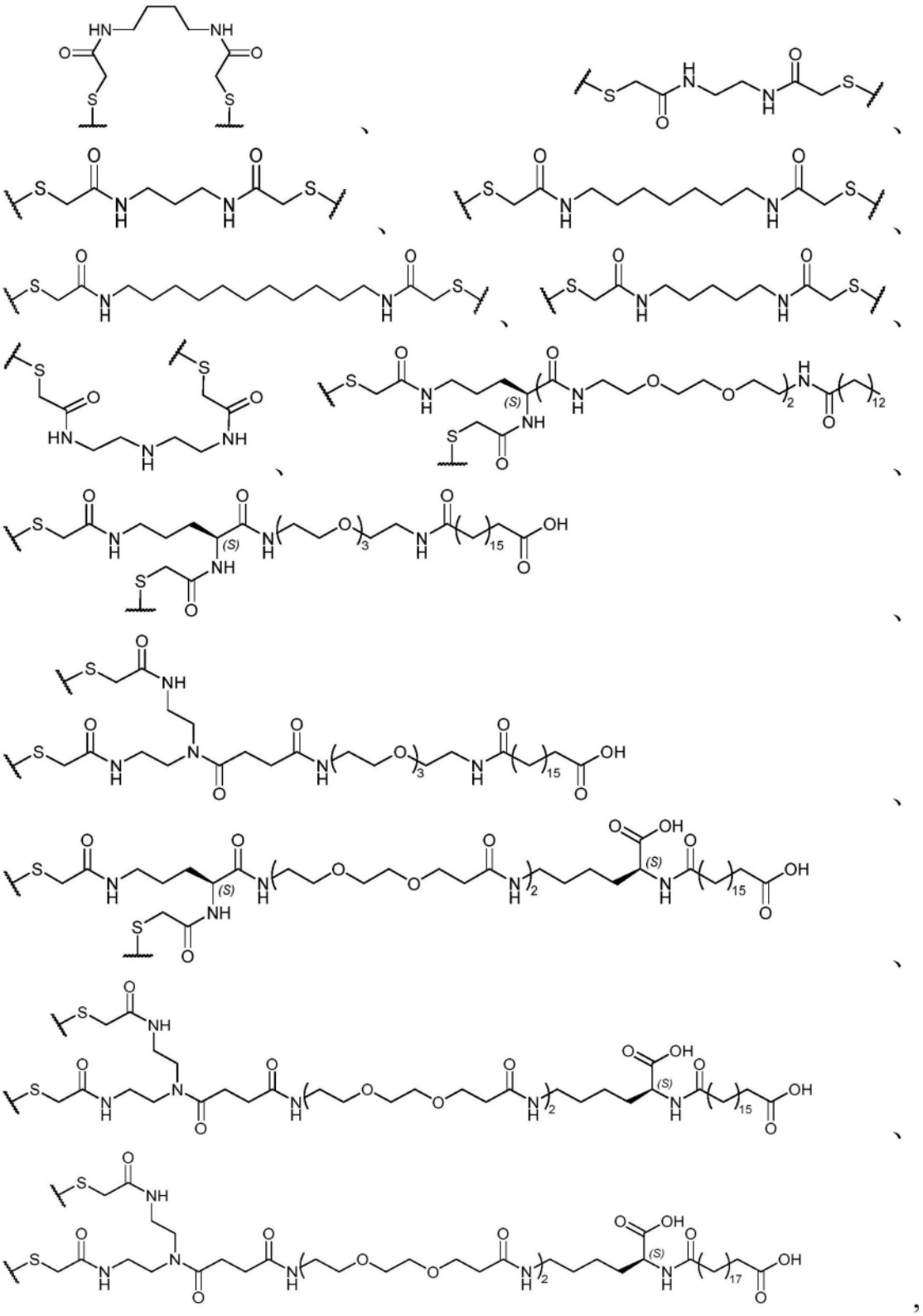
147.根据权利要求124至145中任一项所述的肽缀合物，其中s为5-15。

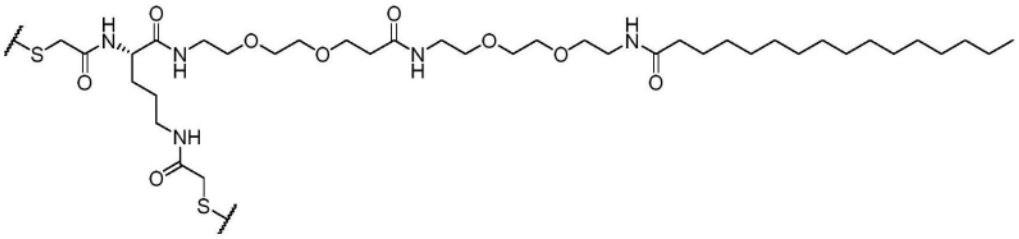
148.根据权利要求124至145中任一项所述的肽缀合物，其中s为5-10。

149.根据权利要求124至148中任一项所述的肽缀合物，其中Y为氢或$-CO_2H$。

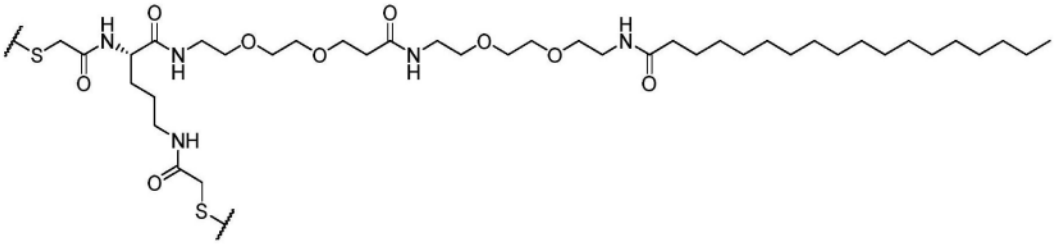
150.根据权利要求124至149中任一项所述的肽缀合物，其中每个L独立地为$-(CR^1R^2)_v-$、-亚烷基-O-、-C(=O)-、-C(=O)NR^3-、-NR^3C(=O)-、-亚烷基-C(=O)NR^3-或-亚烷基-NR^3C(=O)-；且v为2-20。

151.根据权利要求89至145中任一项所述的肽缀合物，其中所述肽缀合物包含：

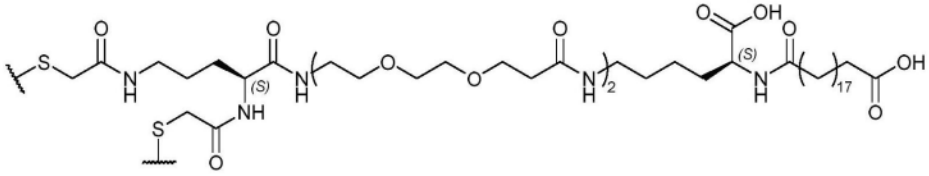




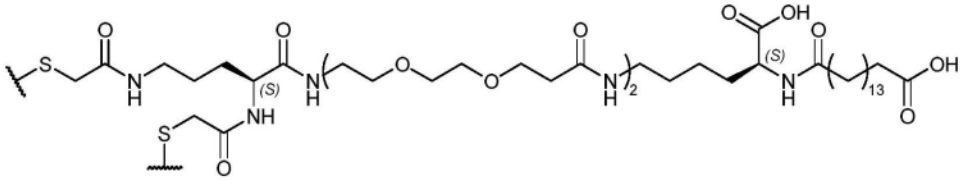
、



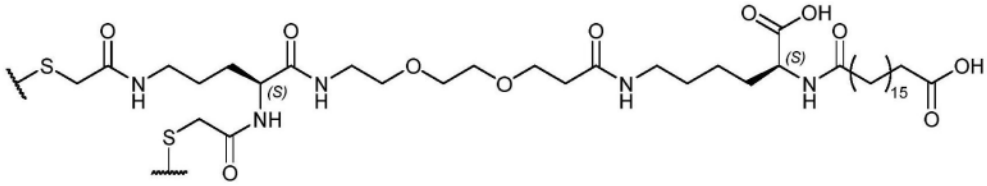
、



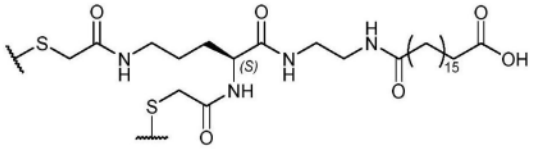
、



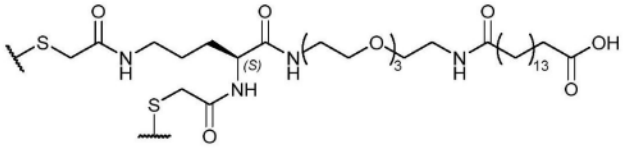
、



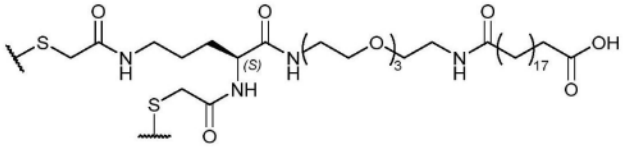
、



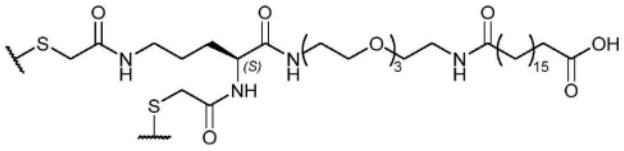
、



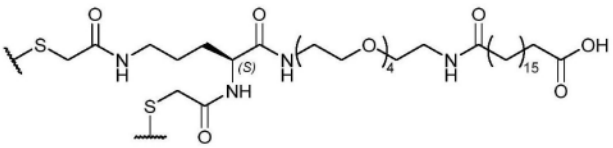
、



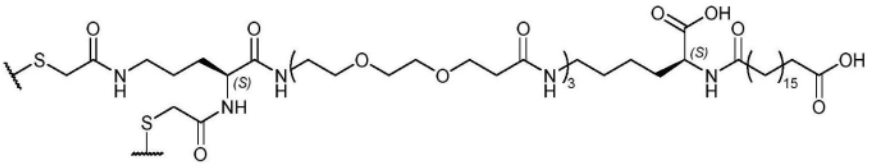
、



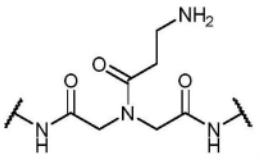
、



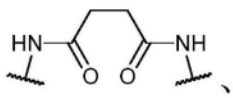
、



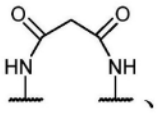
、



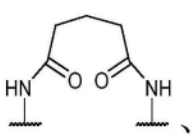
、



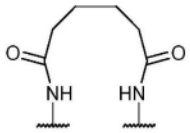
、



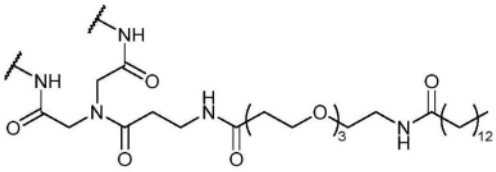
、



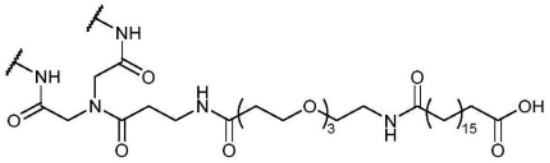
、



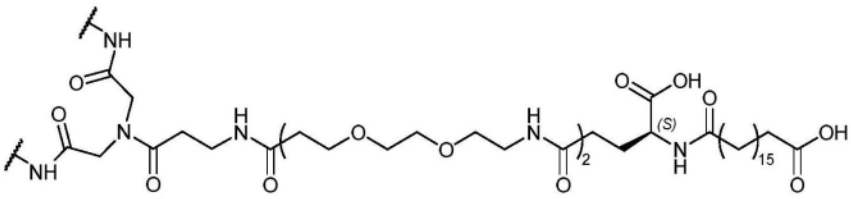
、



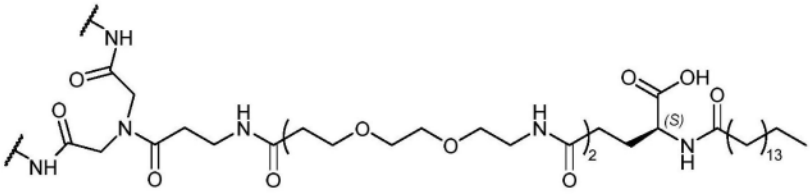
、



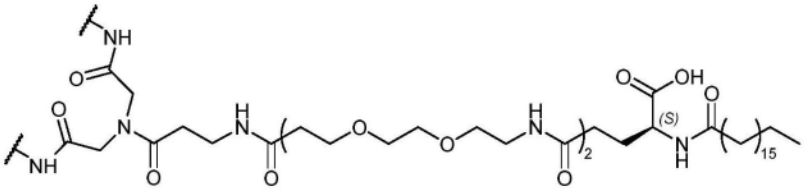
、



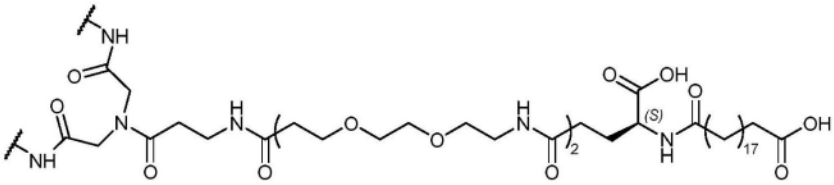
、



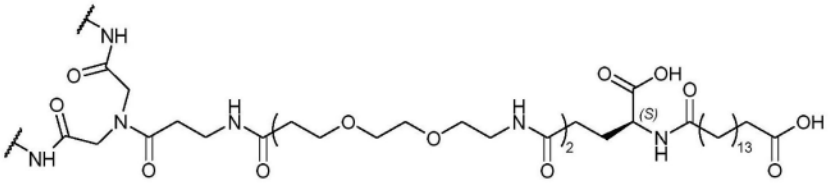
、



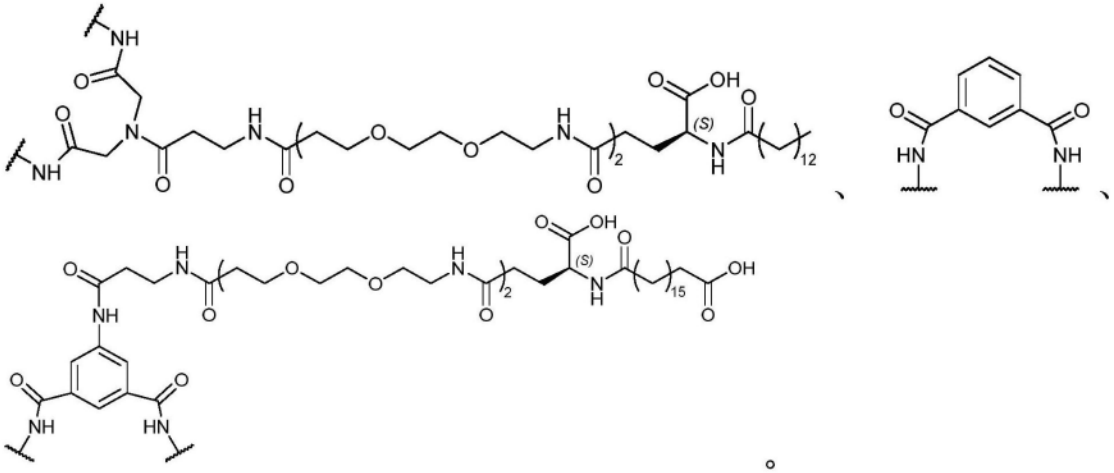
、



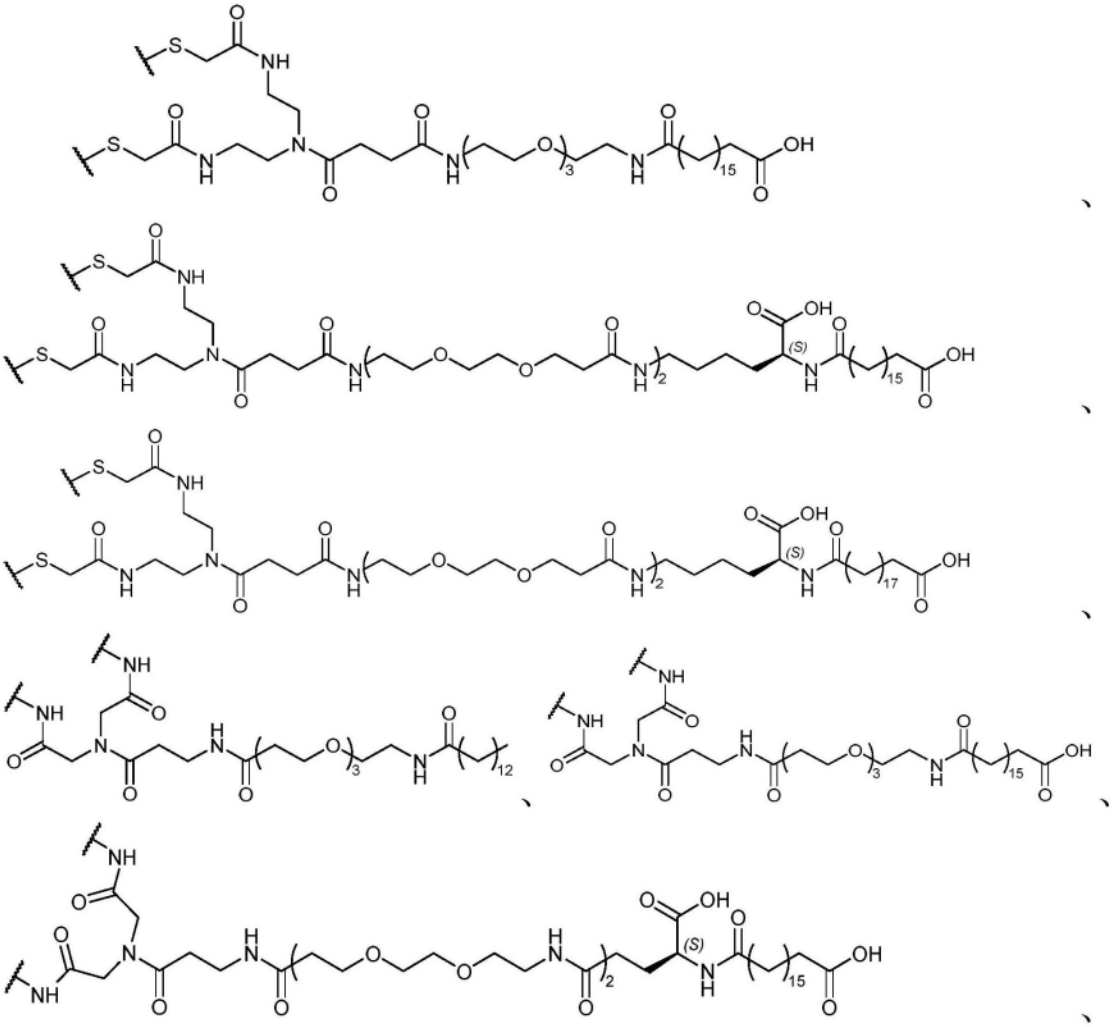
、

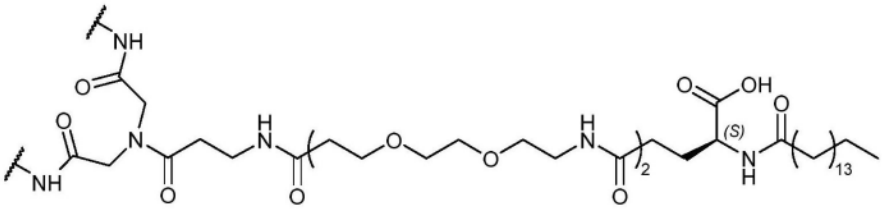
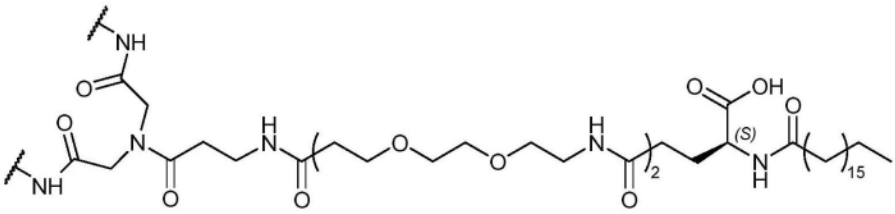
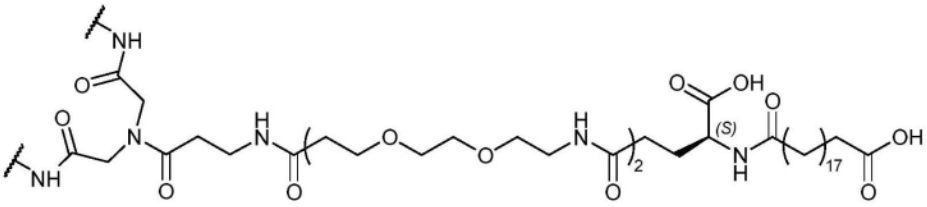
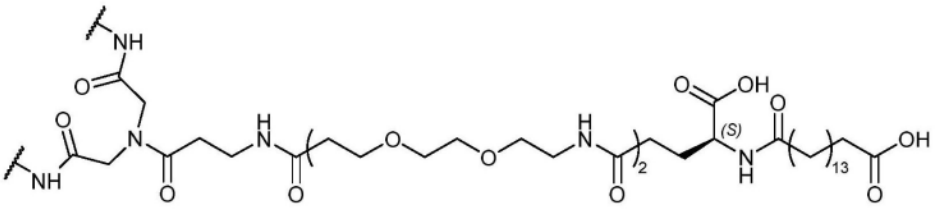
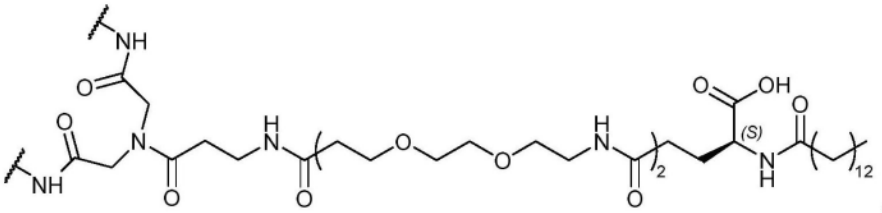


、

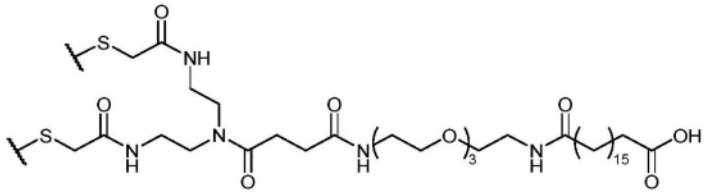
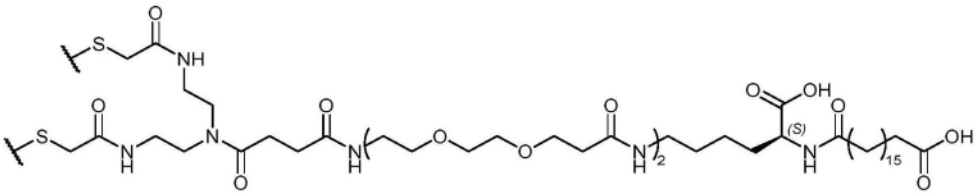
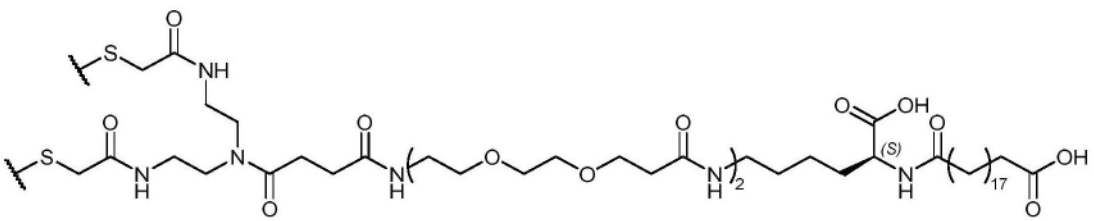


152.根据权利要求89至145中任一项所述的肽缀合物,其中所述肽缀合物包含:

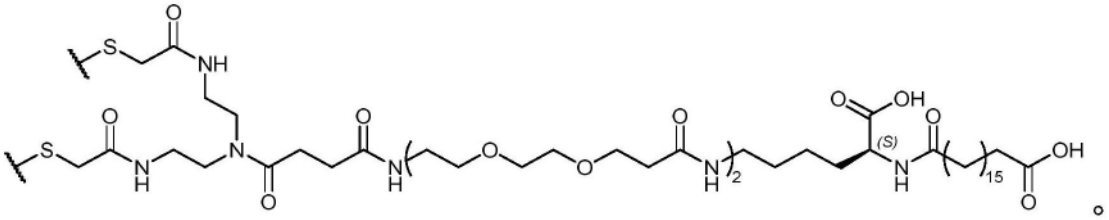



、

、

、

或

。

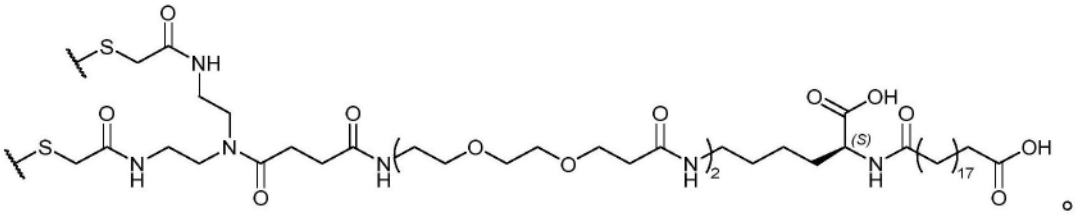
153.根据权利要求89至145中任一项所述的肽缀合物,其中所述肽缀合物包含:


、

或

。

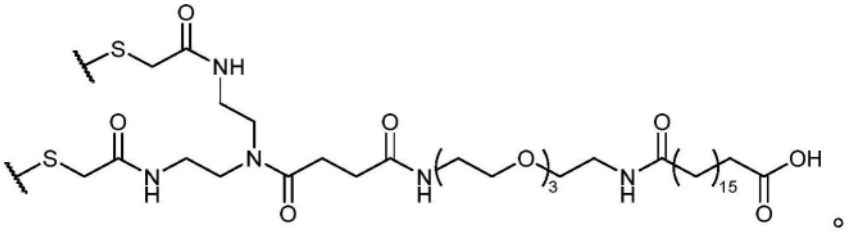
154.根据权利要求89至145中任一项所述的肽缀合物,其中所述肽缀合物包含:



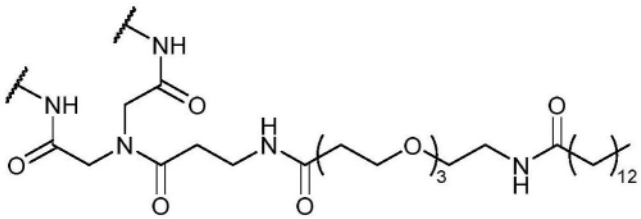
155.根据权利要求89至145中任一项所述的肽缀合物，其中所述肽缀合物包含：

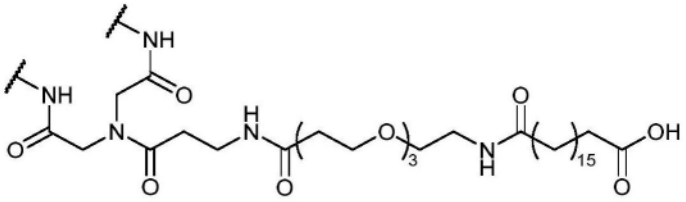


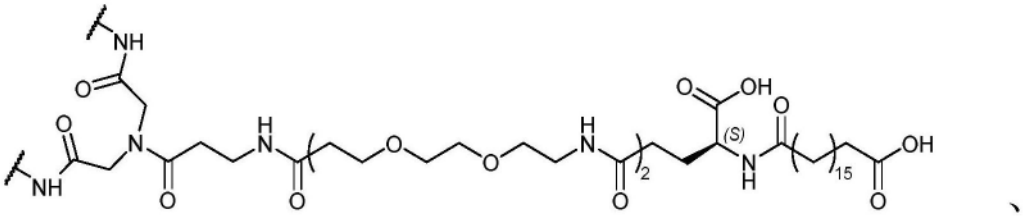
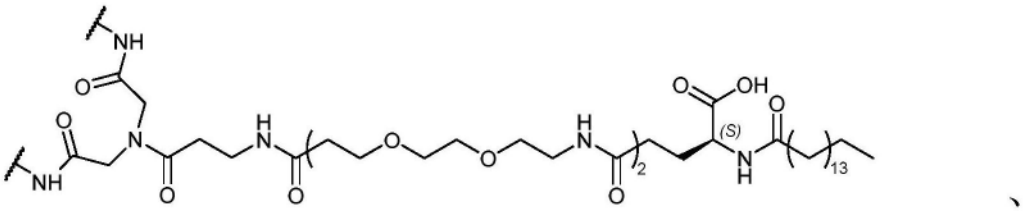
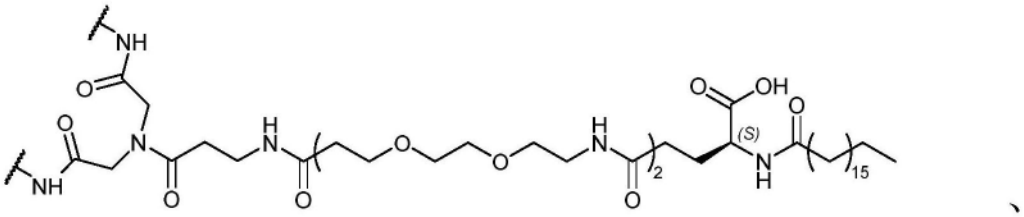
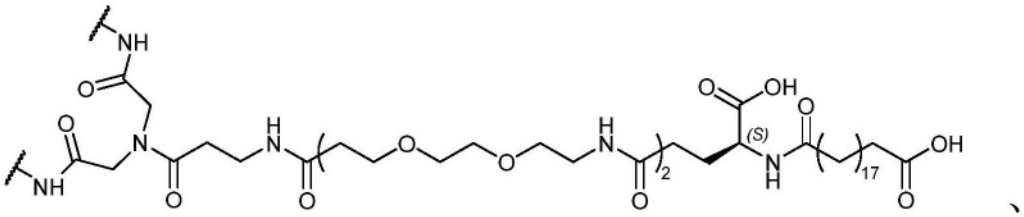
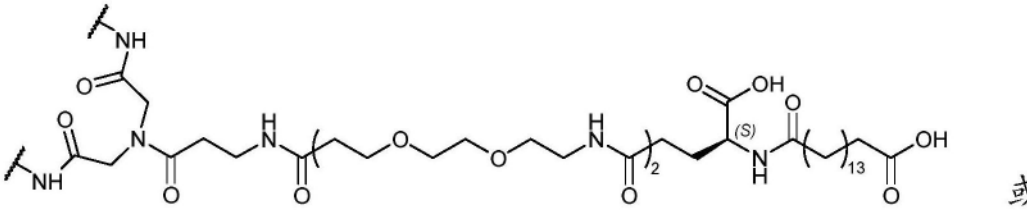
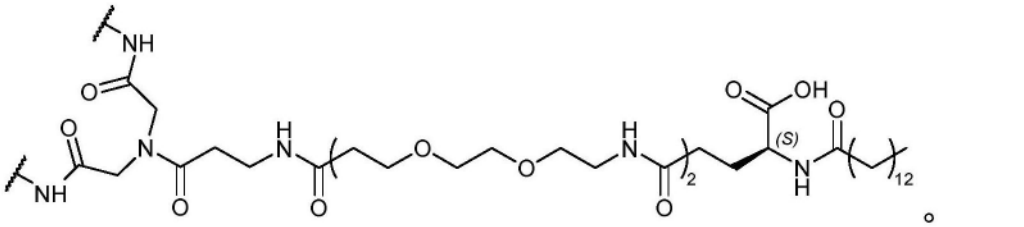
156.根据权利要求89至145中任一项所述的肽缀合物，其中所述肽缀合物包含：



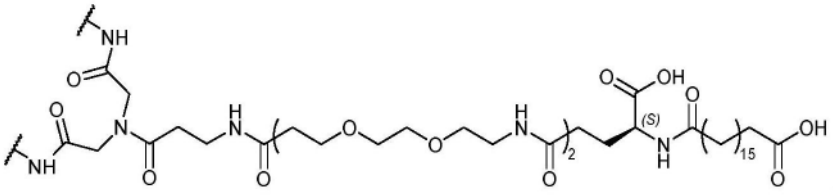
157.根据权利要求89至145中任一项所述的肽缀合物，其中所述肽缀合物包含：



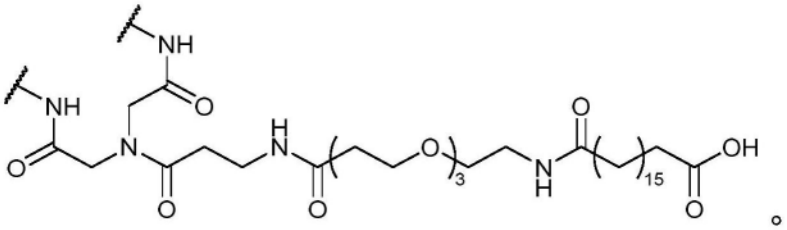



、

、

、

、

或

。

158.根据权利要求89至145中任一项所述的肽缀合物,其中所述肽缀合物包含:


。

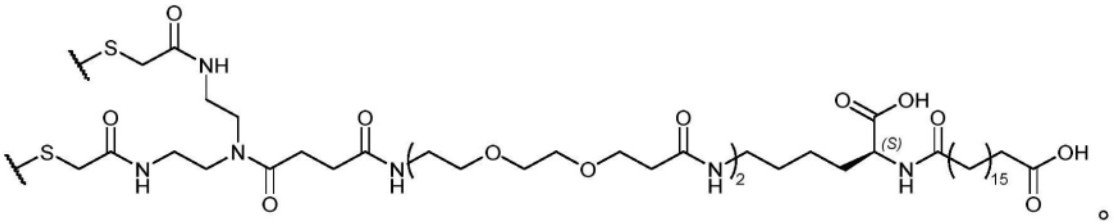
159.根据权利要求89至145中任一项所述的肽缀合物,其中所述肽缀合物包含:



160.根据权利要求89至145中任一项所述的肽缀合物,其中所述肽缀合物包含:

a)调节所述PYY受体的肽,其包含SEQ ID NO:6的肽序列;以及

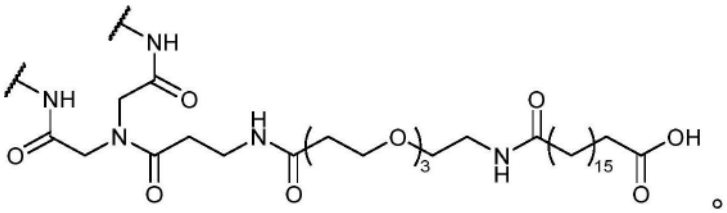
b)在第一半胱氨酸和第二半胱氨酸处与所述肽连接的具有以下结构的钉合体("-S"为半胱氨酸残基的一部分):



161.根据权利要求89至145中任一项所述的肽缀合物,其中所述肽缀合物包含:

a)调节所述GLP-1受体和所述GCG受体的肽,其包含SEQ ID NO:48的肽序列;以及

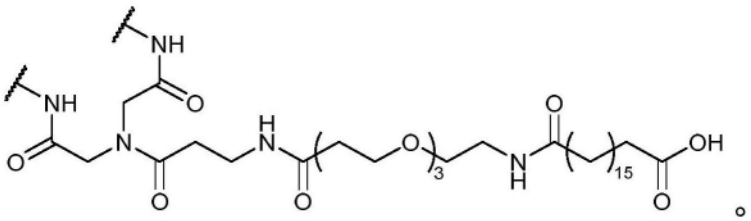
b)在第一赖氨酸和第二赖氨酸处与所述肽连接的具有以下结构的钉合体("-NH"为赖氨酸残基的一部分):



162.根据权利要求89至145中任一项所述的肽缀合物,其中所述肽缀合物包含:

a)调节所述GLP-1受体和所述GIP受体的肽,其包含SEQ ID NO:63的肽序列;以及

b)在第一赖氨酸和第二赖氨酸处与所述肽连接的具有以下结构的钉合体("-NH"为赖氨酸残基的一部分):



163.一种药物组合物,其包含根据权利要求1-62中任一项所述的肽缀合物和药学上可接受的赋形剂。

164.一种用于在有需要的对象中治疗疾病或病症的方法,所述方法包括向所述对象施用包含治疗有效量的根据权利要求1-162中任一项所述的肽缀合物的组合物。

165.根据权利要求164所述的方法,其中所述疾病或病症为糖尿病或肥胖症。

166.根据权利要求164所述的方法,其中所述疾病或病症是非酒精性脂肪肝病

(NAFLD)、非酒精性脂肪性肝炎(NASH)或心血管疾病。

167.根据权利要求164所述的方法,其中所述疾病或病症为短肠综合征(SBS)。

168.根据权利要求164所述的方法,其中所述疾病或病症是炎性肠病(IBD)、炎性肠综合征(IBS)或银屑病。

169.根据权利要求164所述的方法,其中所述疾病或病症是克罗恩病或溃疡性结肠炎。

170.根据权利要求164所述的方法,其中所述疾病或病症是阿尔茨海默病、帕金森病或亨廷顿病。

171.根据权利要求164至170中任一项所述的方法,其还包括向所述对象施用一种或多种另外的治疗剂。

172.根据权利要求171所述的方法,其中所述一种或多种另外的治疗剂包含肠促胰岛素激素或其衍生物。

173.根据权利要求172所述的方法,其中所述肠促胰岛素激素或其衍生物选自GLP-1、毒蜥外泌肽-4、胰高血糖素(GCG)、葡萄糖依赖性促胰岛素多肽(GIP)、胃泌酸调节素及其组合。

174.一种肽序列,其为SEQ ID NO:3。

175.一种肽序列,其为SEQ ID NO:5。

176.一种肽序列,其为SEQ ID NO:6。

177.一种肽序列,其为SEQ ID NO:8。

178.一种肽序列,其为SEQ ID NO:14。

179.一种肽序列,其为SEQ ID NO:15。

180.一种肽序列,其为SEQ ID NO:16。

181.一种肽序列,其为SEQ ID NO:17。

182.一种肽序列,其为SEQ ID NO:18。

183.一种肽序列,其为SEQ ID NO:19。

184.一种肽序列,其为SEQ ID NO:20。

185.一种肽序列,其为SEQ ID NO:21。

186.一种肽序列,其为SEQ ID NO:22。

187.一种肽序列,其为SEQ ID NO:23。

188.一种肽序列,其为SEQ ID NO:24。

189.一种肽序列,其为SEQ ID NO:25。

190.一种肽序列,其为SEQ ID NO:26。

191.一种肽序列,其为SEQ ID NO:27。

192.一种肽序列,其为SEQ ID NO:28。

193.一种肽序列,其为SEQ ID NO:29。

194.一种肽序列,其为SEQ ID NO:30。

195.一种肽序列,其为SEQ ID NO:36。

196.一种肽序列,其为SEQ ID NO:37。

197.一种肽序列,其为SEQ ID NO:50。

198.一种肽序列,其为SEQ ID NO:51。

199.一种肽序列,其为SEQ ID NO:52。
200.一种肽序列,其为SEQ ID NO:53。
201.一种肽序列,其为SEQ ID NO:54。
202.一种肽序列,其为SEQ ID NO:55。
203.一种肽序列,其为SEQ ID NO:56。
204.一种肽序列,其为SEQ ID NO:57。
205.一种肽序列,其为SEQ ID NO:58。
206.一种肽序列,其为SEQ ID NO:59。
207.一种肽序列,其为SEQ ID NO:62。
208.一种肽序列,其为SEQ ID NO:63。
209.一种肽序列,其为SEQ ID NO:64。
210.一种肽序列,其为SEQ ID NO:65。
211.一种肽序列,其为SEQ ID NO:66。
212.一种肽序列,其为SEQ ID NO:67。
213.一种肽序列,其为SEQ ID NO:68。
214.一种肽序列,其为SEQ ID NO:69。
215.一种肽序列,其为SEQ ID NO:70。
216.一种肽序列,其为SEQ ID NO:71。
217.一种肽序列,其为SEQ ID NO:74。
218.一种肽序列,其为SEQ ID NO:75。
219.一种肽序列,其为SEQ ID NO:80。
220.一种肽序列,其为SEQ ID NO:81。
221.一种肽序列,其为SEQ ID NO:82。
222.一种肽序列,其为SEQ ID NO:83。
223.一种肽序列,其为SEQ ID NO:84。
224.一种肽序列,其为SEQ ID NO:85。
225.一种肽序列,其为SEQ ID NO:86。
226.一种肽序列,其为SEQ ID NO:87。
227.一种肽序列,其为SEQ ID NO:88。
228.一种肽序列,其为SEQ ID NO:89。
229.一种肽序列,其为SEQ ID NO:90。
230.一种肽序列,其为SEQ ID NO:91。
231.一种肽序列,其为SEQ ID NO:92。
232.一种肽序列,其为SEQ ID NO:93。
233.一种肽序列,其为SEQ ID NO:94。
234.一种肽序列,其为SEQ ID NO:95。
235.一种肽序列,其为SEQ ID NO:96。
236.一种肽序列,其为SEQ ID NO:97。
237.一种肽序列,其为SEQ ID NO:98。

238.一种肽序列,其为SEQ ID NO:99。

239.一种肽序列,其为SEQ ID NO:100。

240.一种肽序列,其为SEQ ID NO:101。

241.一种肽序列,其为SEQ ID NO:102。

242.一种肽序列,其为SEQ ID NO:103。

243.一种肽序列,其为SEQ ID NO:104。

244.一种肽序列,其为SEQ ID NO:105。

肽缀合物和使用方法

交叉引用

[0001] 本申请要求2019年12月4日提交的美国临时申请序列号62/943,667和2020年3月25日提交的美国临时申请序列号62/994,791的权益,这些申请通过引用以其整体并入本文。

背景技术

[0002] 治疗剂的开发通常受到短半衰期的阻碍。药剂的生物半衰期是药剂失去一半药理学、生理学或放射学活性所需的时间。因此,患者经常更频繁地施用更高剂量的治疗剂,这可能导致顺应性降低、成本升高和副作用风险增加。因此,需要产生具有延长的半衰期的治疗剂。

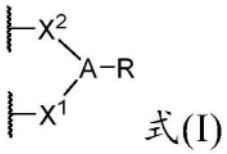
发明内容

[0003] 本文公开了一种肽缀合物,其包含:

a)选自以下的肽:调节PYY受体的肽、调节GLP-1受体和GCG受体的肽、调节GLP-1受体和GIP受体的肽以及调节GLP-1受体的肽;以及

b)在第一含巯基氨基酸和第二含巯基氨基酸处与肽连接的钉合体(staple);

其中钉合体为式(I)的化合物:



式(I)

其中:

A为-N-;

X^1和X^2为键、-C(=O)-、-亚烷基-C(=O)-、-C(=O)-亚烷基-、-亚烷基-C(=O)NR^3-、-亚烷基-NR^3C(=O)-、-C(=O)NR^3-亚烷基-、-NR^3C(=O)-亚烷基-、-亚烷基-C(=O)NR^3-亚烷基-或-亚烷基-NR^3C(=O)-亚烷基-;

其中X^1与肽的含巯基氨基酸连接,X^2与肽的含巯基氨基酸连接,且X^1和X^2相同;

R为氢或-$(L)_s$-Y;

每个L独立地为-$(CR^1R^2)_v$-、-亚烷基-O-、-O-亚烷基-、-C(=O)-亚烷基-、-亚烷基-C(=O)-、-NR^3-亚烷基-、-亚烷基-NR^3-、-S-亚烷基-、-亚烷基-S-、-S(=O)-亚烷基-、-亚烷基-S(=O)-、-S(=O)$_2$-亚烷基、-亚烷基-S(=O)$_2$-、-C(=O)-、-C(=O)NR^3-、-NR^3C(=O)-、-NR^3C(=O)NR^3-、-NR^3C(=O)NR^3-亚烷基-、-NR^3C(=O)-亚烷基-NR^3-、-亚烷基-C(=O)NR^3-、-C(=O)NR^3-亚烷基-、-亚烷基-NR^3C(=O)-或-NR^3C(=O)-亚烷基-;

v为2-20;

R^1或R^2各自独立地为氢、卤素、-CN、-OR^a、-SR^a、-S(=O)R^b、-NO_2、-NR^cR^d、-S(=O)$_2R^d$、-NR^aS(=O)$_2R^d$、-S(=O)$_2NR^cR^d$、-C(=O)R^b、-OC(=O)R^b、-CO_2R^a、-OCO_2R^a、-C(=O)NR^cR^d、-OC(=O)NR^cR^d、-NR^aC(=O)NR^cR^d、-NR^aC(=O)R^b、-NR^aC(=O)OR^a、C_1-C_6烷基、C_2-C_6烯基、C_2-C_6

炔基、C_1-C_6杂烷基、C_3-C_8环烷基、C_2-C_8杂环烷基、芳基或杂芳基；其中烷基、烯基、炔基和杂烷基任选地被卤素、-OR^a或-NR^cR^d中的一个、两个或三个取代；并且环烷基、杂环烷基、芳基和杂芳基任选地被卤素、C_1-C_6烷基、C_1-C_6卤代烷基、-OR^a或-NR^cR^d中的一个、两个或三个取代；

或R^1和R^2一起形成C_1-C_6环烷基或C_1-C_6杂环烷基；

每个R^3独立地为氢、-S(=O)R^b、-S(=O)$_2R^a$、-S(=O)$_2NR^cR^d$、-C(=O)R^b、-CO_2R^a、-C(=O)NR^cR^d、C_1-C_6烷基、C_2-C_6烯基、C_2-C_6炔基、C_1-C_6杂烷基、C_3-C_8环烷基、C_2-C_8杂环烷基、芳基或杂芳基；其中烷基、烯基、炔基和杂烷基任选地被卤素、-OR^a或-NR^cR^d中的一个、两个或三个取代；并且环烷基、杂环烷基、芳基和杂芳基任选地被卤素、C_1-C_6烷基、C_1-C_6卤代烷基、-OR^a或-NR^cR^d中的一个、两个或三个取代；

Y为氢、C_1-C_6烷基、-CO_2H、-CO_2(C_1-C_6烷基)、-CO_2NH_2、-CO_2N(烷基)$_2$或-CO_2NH(烷基)；

s为0-20；

R^a为氢、C_1-C_6烷基、C_2-C_6烯基、C_2-C_6炔基、C_1-C_6杂烷基、C_3-C_8环烷基、C_2-C_8杂环烷基、芳基或杂芳基；其中烷基、烯基、炔基和杂烷基任选地被卤素、-OH、-OMe或-NH_2中的一个、两个或三个取代；并且环烷基、杂环烷基、芳基和杂芳基任选地被卤素、C_1-C_6烷基、C_1-C_6卤代烷基、-OH、-OMe或-NH_2中的一个、两个或三个取代；

R^b为C_1-C_6烷基、C_2-C_6烯基、C_2-C_6炔基、C_1-C_6杂烷基、C_3-C_8环烷基、C_2-C_8杂环烷基、芳基或杂芳基；其中烷基、烯基、炔基和杂烷基任选地被卤素、-OH、-OMe或-NH_2中的一个、两个或三个取代；并且环烷基、杂环烷基、芳基和杂芳基任选地被卤素、C_1-C_6烷基、C_1-C_6卤代烷基、-OH、-OMe或-NH_2中的一个、两个或三个取代；以及

R^c和R^d各自独立地为氢、C_1-C_6烷基、C_2-C_6烯基、C_2-C_6炔基、C_1-C_6杂烷基、C_3-C_8环烷基、C_2-C_8杂环烷基、芳基或杂芳基；其中烷基、烯基、炔基和杂烷基任选地被卤素、-OH、-OMe或-NH_2中的一个、两个或三个取代；并且环烷基、杂环烷基、芳基和杂芳基任选地被卤素、C_1-C_6烷基、C_1-C_6卤代烷基、-OH、-OMe或-NH_2中的一个、两个或三个取代；

或者R^c和R^d与它们所连接的氮原子一起形成杂环烷基或杂芳基；其中杂环烷基和杂芳基任选地被卤素、C_1-C_6烷基、C_1-C_6卤代烷基、-OH、-OMe或-NH_2中的一个、两个或三个取代。

[0004] 本文还提供了一种肽缀合物，其包含：

a)调节PYY受体的肽，其包含与SEQ ID NO:3、5、6、8、14-30、36或37中的任一项具有至少约95％同一性的肽序列；以及

b)在第一氨基酸和第二氨基酸处与肽连接的钉合体。

[0005] 本文还提供了一种肽缀合物，其包含：

a)调节GLP-1受体和GCGR受体的肽，其包含与SEQ ID NO:50-59中的任一项具有至少约95％同一性的肽序列；以及

b)在第一氨基酸和第二氨基酸处与肽连接的钉合体。

[0006] 本文还提供了一种肽缀合物，其包含：

a)调节GLP-1受体和GIP受体的肽，其包含与SEQ ID NO:62-71中的任一项具有至少约95％同一性的肽序列；以及

b)在第一氨基酸和第二氨基酸处与肽连接的钉合体。

[0007] 本文还提供了一种肽缀合物,其包含:

a)调节GLP-1受体的肽,其包含与SEQ ID NO:74和79中的任一项具有至少约95%同一性的肽序列;以及

b)在第一氨基酸和第二氨基酸处与肽连接的钉合体。

[0008] 本文还提供了一种药物组合物,其包含本文所述的肽缀合物和药学上可接受的赋形剂。

[0009] 本文还提供了一种用于在有需要的对象中治疗疾病或病症的方法,该方法包括向对象施用包含治疗有效量的本文所述的肽缀合物的组合物。

附图说明

[0010] 图1A显示了在不存在胎牛血清的情况下对称钉合的PYY类似物的剂量-反应曲线。

[0011] 图1B显示了在存在胎牛血清(10%)的情况下对称钉合的PYY类似物的剂量-反应曲线。

[0012] 图2图示了PYY2、缀合物40和缀合物62在大鼠中的药代动力学。

[0013] 图3A图示了用单剂量的缀合物187、缀合物40、缀合物187和40的组合或单独的媒介物处理的小鼠在24h内的摄食量变化。

[0014] 图3B图示了用单剂量的缀合物187、缀合物40、缀合物187和40的组合或单独的媒介物处理的小鼠在24h内的体重变化。

[0015] 图4A图示了用缀合物187、缀合物40、缀合物187和40的组合或单独的媒介物处理的饮食诱导的肥胖小鼠在第1天的食物消耗量的变化。

[0016] 图4B图示了用缀合物187、缀合物40、缀合物187和40的组合或单独的媒介物处理的饮食诱导的肥胖小鼠在第5天的食物消耗量的变化。

[0017] 图4C图示了用缀合物187、缀合物40、缀合物187和40的组合或单独的媒介物处理的饮食诱导的肥胖小鼠在2周内的体重变化。

[0018] 图4D图示了在口服葡萄糖耐量试验中给予用缀合物187、缀合物40、缀合物187和40的组合或单独的媒介物处理的饮食诱导的肥胖小鼠的处理14天后的葡萄糖水平。

[0019] 图4E图示了在口服葡萄糖耐量试验中给予用缀合物187、缀合物40、缀合物187和40的组合或单独的媒介物处理的饮食诱导的肥胖小鼠的处理14天后的曲线下面积。

[0020] 图4F图示了用缀合物187、缀合物40、缀合物187和40的组合或单独的媒介物处理的饮食诱导的肥胖小鼠的处理14天后的空腹血糖。

[0021] 图5A显示了胰高血糖素、索马鲁肽、缀合物122和缀合物135对GLP-1R的剂量反应曲线。

[0022] 图5B显示了胰高血糖素、缀合物122和缀合物135对GCGR的剂量反应曲线。

[0023] 图5C描述了缀合物122和135在2%血浆中在50h内的稳定性。

[0024] 图6A描述了静脉内和皮下递送时缀合物135的药代动力学。

[0025] 图6B描述了静脉内和皮下递送时缀合物122的药代动力学。

[0026] 图6C描述了用肽142静脉内和皮下处理的小鼠的药代动力学。

[0027] 图6D描述了用肽183静脉内和皮下处理的小鼠的药代动力学。

[0028] 图7A描述了在口服葡萄糖耐量试验中化合物在给药后6h对血糖水平随时间的影

响。A:122,B:135,C:138,D:Cotadutide,E:索马鲁肽。

[0029] 图7B描述了在口服葡萄糖耐量试验中化合物在给药后48h对血糖水平随时间的影响。A:122,B:135,C:138,D:Cotadutide,E:索马鲁肽。

[0030] 图7C描述了在口服葡萄糖耐量试验中化合物在给药后96h对血糖水平随时间的影响。A:122和E:索马鲁肽。

[0031] 图7D描述了在口服葡萄糖耐量试验中用化合物处理对血糖水平的影响,如给药后6h的曲线下面积(AUC)所测量的。A:122,B:135,C:138,D:Cotadutide,E:索马鲁肽。

[0032] 图7E描述了在口服葡萄糖耐量试验中用化合物处理对血糖水平的影响,如给药后48h的曲线下面积(AUC)所测量的。A:122,B:135,C:138,D:Cotadutide,E:索马鲁肽。

[0033] 图7F描述了在口服葡萄糖耐量试验中用化合物处理对血糖水平的影响,如在给药后96h的曲线下面积(AUC)所测量的。A:122,B:135,C:138,D:Cotadutide,E:索马鲁肽。

[0034] 图7G描述了在口服葡萄糖耐量试验中化合物在给药后6h对空腹葡萄糖水平的影响。A:122,B:135,C:138,D:Cotadutide,E:索马鲁肽。

[0035] 图7H描述了在口服葡萄糖耐量试验中化合物在给药后48h对空腹葡萄糖水平的影响。A:122,B:135,C:138,D:Cotadutide,E:索马鲁肽。

[0036] 图7I描述了在口服葡萄糖耐量试验中化合物在给药后96h对空腹葡萄糖水平的影响。A:122,B:135,C:138,D:Cotadutide,E:索马鲁肽。

[0037] 图8A描述了替西帕肽(tirzepatide)、NNC0090-2746、缀合物142、141和171的GLP1受体激活报告分子测定的结果。

[0038] 图8B描述了替西帕肽、NNC0090-2746、缀合物142、141和171的GIP受体激活报告分子测定的结果。

[0039] 图9A描述了在口服葡萄糖耐量试验中,用化合物处理在给药后2h与媒介物对照相比的随时间的影响。A:141,B:171,C:142,D:索马鲁肽,E:替西帕肽。

[0040] 图9B描述了在口服葡萄糖耐量试验中,用化合物处理在给药后72h与媒介物对照相比的随时间的影响。A:141,B:171,C:142,D:索马鲁肽,E:替西帕肽。

[0041] 图9C描述了在口服葡萄糖耐量试验中,用化合物处理在给药后96h与媒介物对照相比的随时间的影响。A:141,B:171,C:142,D:索马鲁肽,E:替西帕肽。

[0042] 图9D描述了在口服葡萄糖耐量试验中,用化合物处理在给药后144h与媒介物对照相比的随时间的影响。A:141,B:171,C:142,D:索马鲁肽,E:替西帕肽。

[0043] 图9E描述了在口服葡萄糖耐量试验中用化合物处理对血糖水平的影响,如在给药后2h与媒介物对照相比的曲线下面积(AUC)所测量的。A:141,B:171,C:142,D:索马鲁肽,E:替西帕肽。

[0044] 图9F描述了在口服葡萄糖耐量试验中用化合物处理对血糖水平的影响,如在给药后72h与媒介物对照相比的曲线下面积(AUC)所测量的。对于所有附图,A:141,B:171,C:142,D:索马鲁肽,E:替西帕肽。

[0045] 图9G描述了在口服葡萄糖耐量试验中用化合物处理对血糖水平的影响,如在给药后96h与媒介物对照相比的曲线下面积(AUC)所测量的。A:141,B:171,C:142,D:索马鲁肽,E:替西帕肽。

[0046] 图9H描述了在口服葡萄糖耐量试验中用化合物处理对血糖水平的影响,如在给药

后144h与媒介物对照相比的曲线下面积(AUC)所测量的。A:141,B:171,C:142,D:索马鲁肽,E:替西帕肽。

[0047] 图9I描述了用化合物处理对空腹葡萄糖的影响,如在给药后2h与媒介物对照相比的曲线下面积(AUC)所测量的。A:141,B:171,C:142,D:索马鲁肽,E:替西帕肽。

[0048] 图9J描述了用化合物处理对空腹葡萄糖的影响,如在给药后72h与媒介物对照相比的曲线下面积(AUC)所测量的。A:141,B:171,C:142,D:索马鲁肽,E:替西帕肽。

[0049] 图9K描述了用化合物处理对空腹葡萄糖的影响,如在给药后96h与媒介物对照相比的曲线下面积(AUC)所测量的。A:141,B:171,C:142,D:索马鲁肽,E:替西帕肽。

[0050] 图9L描述了用化合物处理对空腹葡萄糖的影响,如在给药后144h与媒介物对照相比的曲线下面积(AUC)所测量的。A:141,B:171,C:142,D:索马鲁肽,E:替西帕肽。

[0051] 图10A显示了每日一次或每日两次进行肽或媒介物对照的皮下给药的小鼠的体重变化。灰色箭头显示了每日一次化合物给药的情况,且黑色箭头显示了每周两次化合物给药的天数。A:142(7x/wk),B:142(2x/wk),C:替西帕肽(2x/wk),D:索马鲁肽(2x/wk)。

[0052] 图10B分别显示了每日一次或每日两次进行肽或媒介物对照的皮下给药的小鼠的体重变化百分比。灰色箭头显示了每日一次化合物给药的情况,且黑色箭头显示了每周两次化合物给药的天数。A:142(7x/wk),B:142(2x/wk),C:替西帕肽(2x/wk),D:索马鲁肽(2x/wk)。

[0053] 图10C显示了肽或媒介物对照皮下给药后7天内小鼠的累积摄食量。灰色箭头显示了每日一次化合物给药的情况,且黑色箭头显示了每周两次化合物给药的天数。A:142(7x/wk),B:142(2x/wk),C:替西帕肽(2x/wk),D:索马鲁肽(2x/wk)。

[0054] 图10D显示了在口服葡萄糖耐量试验(OGTT)中化合物对血糖水平随时间变化的结果。A:142(7x/wk),B:142(2x/wk),C:替西帕肽(2x/wk),D:索马鲁肽(2x/wk)。

[0055] 图10E显示了通过曲线下面积(AUC)测量的在口服葡萄糖耐量试验(OGTT)中化合物对血糖水平的结果。A:142(7x/wk),B:142(2x/wk),C:替西帕肽(2x/wk),D:索马鲁肽(2x/wk)。

[0056] 图10F显示了在口服葡萄糖耐量试验(OGTT)中化合物在第8天对空腹葡萄糖的结果。A:142(7x/wk),B:142(2x/wk),C:替西帕肽(2x/wk),D:索马鲁肽(2x/wk)。

[0057] 图11A显示了每日用肽或媒介物处理的小鼠的累积摄食量。A:122,B:142,C:索马鲁肽,D:Cotadutide。

[0058] 图11B显示了用肽或媒介物对照处理的小鼠在21天内的体重变化。A:122,B:142,C:索马鲁肽,D:Cotadutide。

[0059] 图11C显示了用肽或媒介物对照处理的小鼠在21天内的体重变化百分比。A:122,B:142,C:索马鲁肽,D:Cotadutide。

[0060] 图11D描述了与媒介物对照相比,在第20天化合物对进食状态下的血浆葡萄糖波动的影响。A:122,B:142,C:索马鲁肽,D:Cotadutide。

[0061] 图11E描述了与媒介物对照相比,在第20天化合物对空腹状态下的血浆葡萄糖波动的影响。A:122,B:142,C:索马鲁肽,D:Cotadutide。

[0062] 图11F描述了与媒介物对照相比,在第21天的口服葡萄糖耐量试验(OGTT)中用化合物处理的效果。A:122,B:142,C:索马鲁肽,D:Cotadutide。

[0063] 图11G描述了通过测量曲线下面积(AUC)确定的葡萄糖水平。A:122,B:142,C:索马鲁肽,D:Cotadutide。

[0064] 图11H描述了用化合物处理对天冬氨酸氨基转移酶(AST)的血浆水平的影响。A:122,B:142,C:索马鲁肽,D:Cotadutide。

[0065] 图11I描述了用化合物处理对丙氨酸氨基转移酶(ALT)的血浆水平的影响。A:122,B:142,C:索马鲁肽,D:Cotadutide。

[0066] 图11J描述了用化合物处理对碱性磷酸酶(ALP)血浆水平的影响。A:122,B:142,C:索马鲁肽,D:Cotadutide。

[0067] 图11K描述了用化合物处理对胆固醇血浆水平的影响。A:122,B:142,C:索马鲁肽,D:Cotadutide。

[0068] 图11L分别描述了用化合物处理对甘油三酯血浆水平的影响。A:122,B:142,C:索马鲁肽,D:Cotadutide。

[0069] 图11M描述了用化合物和媒介物对照处理对肝脏与体重比率的影响。A:122,B:142,C:索马鲁肽,D:Cotadutide。

[0070] 图11N描述了用化合物和媒介物对照处理对脂肪重量的影响。A:122,B:142,C:索马鲁肽,D:Cotadutide。

[0071] 图11O描述了用化合物和媒介物对照处理对肝脏重量的影响。A:122,B:142,C:索马鲁肽,D:Cotadutide。

[0072] 图11P描述了用化合物和媒介物对照处理对肝甘油三酯水平的影响。A:122,B:142,C:索马鲁肽,D:Cotadutide。

[0073] 图11Q描述了用化合物和媒介物对照处理对脂肪变性等级的影响。A:122,B:142,C:索马鲁肽,D:Cotadutide。

[0074] 图12显示了PrRP31、缀合物255(97-L3)和缀合物263(97-L5)的体外血浆稳定性。

[0075] 图13显示了在小鼠中单次皮下注射1mg/kg缀合物263(97-L5)的血浆浓度。

[0076] 图14显示了在CD-1雌性小鼠(n＝4)中单次皮下注射5mg/kg缀合物263(97-L5)的血浆浓度。

[0077] 图15显示了每日皮下给药缀合物263(97-L5)的饮食诱导的肥胖(DIO)小鼠模型(每组n＝8)中12天的体重研究。

[0078] 图16显示了每日皮下施用(0.5和5mg/kg)缀合物263(97-L5)的DIO模型小鼠(每组n＝8)在12天期间的体重减轻。

[0079] 图17显示了在体内体重研究的第14天,在禁食饮食诱导的肥胖(DIO)模型小鼠中口服施用PrRP31和缀合物263(97-L5)后的葡萄糖水平。

[0080] 图18显示了在体内体重研究的第14天,在禁食饮食诱导的肥胖(DIO)模型小鼠中口服施用PrRP31和缀合物263(97-L5)后的AUC。

具体实施方式

[0081] 肽YY(PYY)和胰高血糖素样肽(GLP)-1是肠道L细胞响应膳食而分泌的肽。已经表明,每种肽的血浆水平升高会降低食欲并抑制食物摄入。对于用PYY化合物和GLP-1化合物给药的啮齿动物,观察到在任一化合物的单独剂量下对摄食抑制的累加效应(additive

effect)。在遗传肥胖模型(ob/ob和db/db小鼠)中也观察到这种对摄食的累加抑制(additive inhibition)。对健康人志愿者的其他研究也显示PYY化合物和GLP-1化合物在自降低助餐时的能量摄入(27%)的累加效应。与PYY化合物或GLP-1化合物单独给药相比,进行该组合给药的个体的能量摄入减少更大。因此,任选地与GLP-1或类似化合物组合的PYY是用于治疗与体重减轻相关的病症的有希望的治疗剂。

[0082] 神经肽Y家族通过神经肽Y受体调节脑和肠之间的信号传导,包括肽PYY、NPY(神经肽Y)和PP(胰多肽)。PYY是天然分泌的36个氨基酸的肽PYY(1-36),其被裂解成PYY(3-36)。然而,PYY(3-36)被迅速消除,据报道其在猪体内的半衰期小于30分钟。因此,天然存在的PYY化合物的药代动力学性质对于治疗应用是次优的。

[0083] G蛋白偶联受体(GPCR)是具有由三个细胞内环和三个细胞外环连接的七个跨膜结构域的膜结合蛋白。它们的配体结合位点是高度特化的,使得每个受体仅对以高亲和力结合的有限种类的化学品(chemicals)作出响应。GPCR配体的实例为肽、蛋白质、脂质衍生的分子、小分子有机化合物(small organic compounds)和离子。GPCR作为药物靶点一直受到关注,因为它们参与多种病理生理过程,包括神经元兴奋性、代谢、生殖、激素稳态和行为的调节。据估计,所有食品和药物管理局(FDA)批准的药物中约34%靶向GPCR家族的108个成员。GPCR通常分为多个超家族。GPCR家族B或所谓的促胰液素受体家族是一种小的但结构和功能上不同的受体组。这些蛋白质对许多生理功能是至关重要的,并且作为几种人类疾病如II型糖尿病(T2DM)、偏头痛、骨质疏松症、抑郁症和焦虑症的关键药物靶标。该家族的成员包括长度为27-141个残基的多肽激素的受体。这些受体中有9种被结构上彼此相关的配体靶向,其实例包括胰高血糖素样肽(GLP-1和GLP-2)、胰高血糖素、葡萄糖依赖性促胰岛素多肽(GIP)、血管活性肠肽(VIP)、垂体腺苷酸环化酶激活多肽(PACAP)和生长激素释放激素(GHRH)。

[0084] 胰高血糖素样肽1(GLP-1)是一种天然存在的肠促胰岛素(incretin)激素,其由肠道L细胞响应摄入的营养物质释放到循环中。通过与其同源受体(GLP-1R)结合,GLP-1能够促进胰岛素分泌,同时抑制胰高血糖素分泌(但仅限于葡萄糖水平升高时),从而提供降低血浆葡萄糖水平同时降低低血糖风险的潜力。此外,GLP-1降低胃排空速率,并降低食欲,从而导致体重减轻。

[0085] GLP-1受体激动剂(GLP-1RA)代表了一种治疗糖尿病的独特方法,其益处超过了葡萄糖控制,包括对体重、血压、胆固醇水平和β-细胞功能的有利作用。目前美国批准了两种短效(艾塞那肽(exenatide)和利拉鲁肽(liraglutide);每日施用一次或两次)和三种长效(阿必鲁泰(albiglutide)、度拉鲁肽(dulaglutide)和艾塞那肽LAR;每周施用)GLP-1RA。特别地,艾塞那肽,一种最初从大毒蜥(Gila monster)唾液中分离的GLP-1类似物,在人体中静脉内施用后具有30分钟的半衰期,而在皮下施用后具有2-3h的半衰期。这些药物通过激活胰腺中的GLP-1受体来模拟天然存在的肠促胰岛素激素GLP-1的作用,这导致以葡萄糖依赖性方式增强胰岛素释放并降低胰高血糖素释放,从而降低低血糖的风险。这些GLP-1RA对CNS和胃肠道中GLP-1受体的作用也导致食欲降低和葡萄糖吸收延迟,伴随体重减轻。考虑到它们有限的口服生物利用度,这些GLP-1RA目前作为皮下注射给予。在一些方面,本文提供了GLP-1RA,其与脂肪酸衍生的侧链钉合体连接以增加半衰期。

[0086] 基于肠促胰岛素的肽是治疗2型糖尿病(T2DM)的有效治疗剂。胃泌酸调节素(OXM)

是一种GLP-1R和GCGR的双重激动剂，与单一GLP-1R激动剂相比，已经显示出优异的体重减轻和葡萄糖降低效果。为了克服限制OXM治疗潜力的短半衰期和快速肾清除，已经报道了脂质和PEG修饰的OXM类似物。然而，这些方法经常导致效力降低或与PEG相关的毒性。在某些实施方案中，本文提供了GLP-1R和GCGR双重激动剂，其具有增加的血浆稳定性和在激活GLP-1R和GCGR中的更高效力。

[0087] GIP的特征还在于以葡萄糖依赖性方式刺激胰岛素分泌的肠促胰岛素。GIP和GLP-1受体双重激动剂已显示与安慰剂相比降低空腹血糖并减轻体重。每周一次皮下施用该双重激动剂LY3298176。在某些实施方案中，本文还提供了包含钉合的特征以增加血清稳定性和半衰期的GIPR和GLP-1R双重激动剂。

[0088] 催乳素释放肽(PrRP)最初是从下丘脑发现的一种新的肽，其通过激活孤儿G蛋白偶联受体人味觉受体3(Gr3)及其大鼠直系同源未知下丘脑受体-1(UHR-1)刺激垂体前叶细胞中的催乳素分泌。然而，后来的报道显示PrRP不刺激催乳素或其他垂体激素的分泌，但可作为神经调质并在通过激活催乳素释放肽受体(也称为G蛋白偶联受体10(GPR10，与hGr3相同))调节能量平衡中起关键作用。PrRP可减轻体重和摄食量，并在中枢施用时改变体温，这表明了其在能量稳态中的作用。PrRP的抑制食欲作用由促肾上腺皮质激素释放激素(CRH)受体介导，并且其还与瘦素相互作用以减少摄食量和体重。PrRP缺陷型小鼠表现出迟发性肥胖和肥胖，表明PrRP传递脑内的饱腹感信号。PrRP受体信号传导的紊乱可导致肥胖和代谢紊乱。因此，PrP可以通过利用其抑制食欲性质用于摄食量和体重减轻而提供作为糖尿病和肥胖症的治疗剂的潜力。

[0089] 然而，中枢施用PrRP导致心肌收缩性、心率和血压显著增加。PrRP属于RFamide肽家族，并且除了激活GPR10之外，其还表现出对NPFF2R(神经肽FF受体2或GPR74)的高亲和力。虽然NPFF2R信号传导发挥了可能增加GPR10介导的厌食作用，但是NPFF2R与动脉血压升高有关，并且可能负责PrRP诱导的心血管作用。PrRP引起动脉血压和心率的增加，这可以通过共同施用RF9(一种特异性NPFF2R拮抗剂)而不是神经肽Y(一种推定的GPR10拮抗剂)来消除。棕榈酸经由第11位的Lys侧链与PrRP的N-末端的直接缀合导致半衰期的显著延长和体内抑制食欲作用，伴随大鼠和小鼠肥胖模型中摄食量、体重和葡萄糖耐受不良的减少。尽管在外周施用后发挥中枢神经系统作用是有益的，棕榈酰化的PrRP类似物似乎证明对NPFF2R的活性增加。因此，需要开发GPR10选择性PrRP类似物，其保留了其抑制食欲和抗糖尿病作用，同时降低了其针对NPFF2R激动作用的活性及其相关心血管风险。

[0090] 本文提供了肽缀合物，其包含与分子如半衰期延长分子钉合的治疗性肽。

[0091] 在某些实施方案中，钉合的肽包含肠促胰岛素肽或肠促胰岛素肽模拟物。肠促胰岛素肽通常以α-螺旋构象与其同源受体结合，因此本文的某些实施方案提供了稳定α-螺旋的修饰，其在一些情况下可增加与其受体的结合亲和力。此外，蛋白水解稳定性也可以以螺旋而不是延伸构象增强。在一些方面，本文提供了这样的缀合肽，其具有增加的循环半衰期和对其同源受体的效力。

[0092] 在一些方面，本文描述了用于产生具有与天然肽相当的效力和显著增强的药代动力学性质的钉合的长效肽类似物的肽工程策略。

调节PYY受体的肽

[0093] 在一个方面，本文提供了包含对神经肽Y家族受体(生物活性肽的NPY家族、NPY、肽

YY(PYY)和胰多肽(PP))衍生物具有特异性的肽的肽缀合物。在一个方面,本文提供了包含调节PYY受体的肽的肽缀合物。在一些实施方案中,调节PYY受体的肽是PYY受体激动剂。

[0094] 本文所述的肽缀合物的结合亲和力可在未修饰形式的肽的结合亲和力的约5%以内。本文所述的肽缀合物的结合亲和力可在未修饰形式的肽的结合亲和力的约10%以内。本文所述的肽缀合物的结合亲和力可在未修饰形式的肽的结合亲和力的约15%以内。本文所述的肽缀合物的结合亲和力可在未修饰形式的肽的结合亲和力的约20%以内。

[0095] 在一些情况下,NPY衍生物是指PYY衍生物。在一些情况下,NPY衍生物是指具有与具有SEQ ID NO:1或2的PYY相差少于9、8、7、6、5、4、3、2或10个氨基酸的氨基酸序列的PYY衍生物。

[0096] NPY衍生物例如PYY衍生物可包含一个或多个含巯基氨基酸残基。一个或多个含巯基氨基酸残基可用于将钉合体连接至PYY。一个或多个含巯基氨基酸残基可用于将HEM连接至NPY衍生物。一个或多个含巯基氨基酸残基可以天然存在于NPY衍生物中。一个或多个含巯基氨基酸残基可以插入PYY衍生物中。一个或多个含巯基氨基酸残基可取代PYY衍生物中的一个或多个氨基酸残基。氨基酸取代和/或插入的方法是本领域已知的。

[0097] NPY衍生物例如PYY衍生物可包含一个或多个含胺残基。含胺残基的非限制性实例包括赖氨酸、鸟氨酸、二氨基丁酸、二氨基丙酸和高赖氨酸。一个或多个含胺残基可用于将钉合体连接至PYY衍生物。一个或多个含胺残基可用于将HEM连接至PYY衍生物。一个或多个含胺残基可以天然存在于PYY衍生物中。一个或多个含胺残基可以插入PYY衍生物中。一个或多个含胺残基可以取代PYY衍生物中的一个或多个氨基酸残基。

[0098] NPY衍生物,例如PYY衍生物,可以包含含有一个或多个氨基酸突变的野生型肽的至少一部分。一个或多个氨基酸突变可包括缺失、取代、添加或其组合。一个或多个氨基酸突变可包括向野生型肽添加一个或多个氨基酸残基。一个或多个氨基酸突变可包括野生型肽的一个或多个氨基酸残基的缺失。一个或多个氨基酸突变可包括野生型肽的一个或多个氨基酸残基的取代。一个或多个氨基酸突变可包括用一个或多个半胱氨酸、赖氨酸或其他含巯基或胺的残基取代野生型肽的一个或多个氨基酸残基。一个或多个氨基酸突变可包括用一个或多个D-氨基酸残基取代野生型肽的一个或多个氨基酸残基。野生型肽的一个或多个氨基酸残基可包含一个或多个丙氨酸、甲硫氨酸、精氨酸、丝氨酸、苏氨酸和酪氨酸。

[0099] NPY衍生物(例如PYY衍生物)可用例如乙酰化、磷酸化和甲基化修饰。肽修饰可包括化学修饰。肽修饰可发生在肽的N-末端。肽修饰可包括在肽的N-末端乙酰化氨基。或者或另外,肽修饰可发生在肽的C-末端。肽修饰可发生在肽的一个或多个内部氨基酸处。肽修饰可包括置换肽C-末端的羧基。肽修饰可包括修饰肽C-末端的羧基。可修饰肽C-末端的羧基以产生酰胺基。可修饰肽C-末端的羧基以产生氨基。

[0100] 在一些实施方案中,肽衍生物可以是用D-丝氨酸取代L-丝氨酸的修饰的PYY。在一些实施方案中,肽衍生物可以是用氨基异丁酸[Aib]取代L-丝氨酸的修饰的PYY。在一些实施方案中,肽衍生物可以是用神经亮氨酸[Nle]取代亮氨酸(Leu)的修饰的PYY。

[0101] 在一些实施方案中,调节PYY受体的肽包含截短形式的野生型36氨基酸PYY肽。在一些实施方案中,N-末端被1、2、3或4个残基截短。在一些实施方案中,N-末端被2个残基截短。在一些情况下,PYY衍生物包含与SEQ ID NO:1或2具有至少约80%、约81%、约82%、约83%、约84%、约85%、约86%、约87%、约88%、约89%、90%、约91%、约92%、约93%、约

94％、约95％、约96％、约97％、约98％或约99％同一性的肽序列。在一些情况下，肽衍生物具有与SEQ ID NO:1或2中的任一项具有至少约80％同一性的氨基酸序列。在一些情况下，调节PYY受体的肽包含与SEQ ID NO:1或2具有至少约90％同一性的肽序列。在一些情况下，调节PYY受体的肽包含与SEQ ID NO:1或2具有至少约91％同一性的肽序列。在一些情况下，调节PYY受体的肽包含与SEQ ID NO:1或2具有至少约92％同一性的肽序列。在一些情况下，调节PYY受体的肽包含与SEQ ID NO:1或2具有至少约93％同一性的肽序列。在一些情况下，调节PYY受体的肽包含与SEQ ID NO:1或2具有至少约94％同一性的肽序列。在一些情况下，调节PYY受体的肽包含与SEQ ID NO:1或2具有至少约95％同一性的肽序列。在一些情况下，调节PYY受体的肽包含与SEQ ID NO:1或2具有至少约96％同一性的肽序列。在一些情况下，调节PYY受体的肽包含与SEQ ID NO:1或2具有至少约97％同一性的肽序列。在一些情况下，调节PYY受体的肽包含与SEQ ID NO:1或2具有至少约98％同一性的肽序列。在一些情况下，调节PYY受体的肽包含与SEQ ID NO:1或2具有至少约99％同一性的肽序列。

[0102] 在一些实施方案中，调节PYY受体的肽包含SEQ ID NO:3-45中任一项的肽序列。在一些情况下，调节PYY受体的肽包含与SEQ ID NO:3-45中的任一项具有至少约80％、约81％、约82％、约83％、约84％、约85％、约86％、约87％、约88％、约89％、90％、约91％、约92％、约93％、约94％、约95％、约96％、约97％、约98％或约99％同一性的肽序列。在一些情况下，调节PYY受体的肽包含与SEQ ID NO:3-45中的任一项具有至少约90％同一性的肽序列。在一些情况下，调节PYY受体的肽包含与SEQ ID NO:3-45中的任一项具有至少约95％同一性的肽序列。在一些情况下，调节PYY受体的肽包含与SEQ ID NO:3-45中的任一项具有至少约99％同一性的肽序列。在一些情况下，调节PYY受体的肽包含与SEQ ID NO:3-45中的任一项相比具有至多约1、2、3、4或5个氨基酸插入、缺失、修饰或取代的氨基酸序列。

[0103] 在一些实施方案中，调节PYY受体的肽包含SEQ ID NO:6的肽序列。在一些情况下，调节PYY受体的肽包含与SEQ ID NO:6具有至少约80％、约81％、约82％、约83％、约84％、约85％、约86％、约87％、约88％、约89％、90％、约91％、约92％、约93％、约94％、约95％、约96％、约97％、约98％或约99％同一性的肽序列。在一些情况下，调节PYY受体的肽包含与SEQ ID NO:6具有至少约90％同一性的肽序列。在一些情况下，调节PYY受体的肽包含与SEQ ID NO:6具有至少约95％同一性的肽序列。在一些情况下，调节PYY受体的肽包含与SEQ ID NO:6具有至少约99％同一性的肽序列。在一些情况下，调节PYY受体的肽包含与SEQ ID NO:6相比具有至多约1、2、3、4或5个氨基酸插入、缺失、修饰或取代的氨基酸序列。

[0104] 在一些实施方案中，调节PYY受体的肽包含SEQ ID NO:10的肽序列。在一些情况下，调节PYY受体的肽包含与SEQ ID NO:10具有至少约80％、约81％、约82％、约83％、约84％、约85％、约86％、约87％、约88％、约89％、90％、约91％、约92％、约93％、约94％、约95％、约96％、约97％、约98％或约99％同一性的肽序列。在一些情况下，调节PYY受体的肽包含与SEQ ID NO:10具有至少约90％同一性的肽序列。在一些情况下，调节PYY受体的肽包含与SEQ ID NO:10具有至少约95％同一性的肽序列。在一些情况下，调节PYY受体的肽包含与SEQ ID NO:10具有至少约99％同一性的肽序列。在一些情况下，调节PYY受体的肽包含与SEQ ID NO:10相比具有至多约1、2、3、4或5个氨基酸插入、缺失、修饰或取代的氨基酸序列。

[0105] 在一些实施方案中，调节PYY受体的肽包含SEQ ID NO:20的肽序列。在一些情况下，调节PYY受体的肽包含与SEQ ID NO:20具有至少约80％、约81％、约82％、约83％、约

84％、约85％、约86％、约87％、约88％、约89％、90％、约91％、约92％、约93％、约94％、约95％、约96％、约97％、约98％或约99％同一性的肽序列。在一些情况下，调节PYY受体的肽包含与SEQ ID NO:20具有至少约90％同一性的肽序列。在一些情况下，调节PYY受体的肽包含与SEQ ID NO:20具有至少约95％同一性的肽序列。在一些情况下，调节PYY受体的肽包含与SEQ ID NO:20具有至少约99％同一性的肽序列。在一些情况下，调节PYY受体的肽包含与SEQ ID NO:20相比具有至多约1、2、3、4或5个氨基酸插入、缺失、修饰或取代的氨基酸序列。

[0106] 在一些情况下，PYY衍生物的编号是序列中最后一个氨基酸作为36位。

[0107] 肽衍生物的非限制性实例示于表1中。

表1:PYY SEQ ID表

SEQ ID NO.	序列
1	IKPEAPGEDASPEELNRYYASLRHYLNLVTRQRY
2	PKPEAPGKDASPEEWNRYYADLRHYLNWLTRQRY
3	IKPEAPGCDASPEECNRYYASLRHYLNLVTRQRY
4	IKPEAPGEDASPEELNRYYACLRHYLNCVTRQRY
5	PKPEAPGCDASPEECNRYYADLRHYLNWLTRQRY
6	PKPEAPGKDASPEEWNRYYACLRHYLNCLTRQRY
7	PKPEAPGKDASPEEKNRYYADLRHYLNWLTRQRY
8	PKPEAPGKDASPEEWNRYYAKLRHYLNKLTRQRY
9	PKPEAPGKDASPEEWNRYYA[Orn]LRHYLN[Orn]LTRQRY
10	PKPEAPGCDASPEEWNRYYADLRHYLNWLTRQRY
11	PKPEAPGKDASPEECNRYYADLRHYLNWLTRQRY
12	PKPEAPGKDASPEEWNRYYACLRHYLNWLTRQRY
13	PKPEAPGKDASPEEWNRYYADLRHYLNCLTRQRY
14	PKPEAPGCDASPEEWNRYYACLRHYLNCLTRQRY (*)
15	PKPEAPGCDASPEECNRYYACLRHYLNWLTRQRY (*)
16	HCIKPEAPCEDASPEELNRYYASLRHYLNLVTRQRY
17	HIKPEAPGCDASPEECNRYYASLRHYLNLVTRQRY
18	HIKPEAPGEDASPEECNRYYASCRHYLNLVTRQRY
19	IKPEAPGEDASPEELCRYYASLCHYLNLVTRQRY
20	IKPEAPGEDASPEELNCYYASLRCYLNLVTRQRY
21	HIKPEAPGEDASPEELNRCYASLRHCLNLVTRQRY
22	IKPEAPGEDASPEELNRYCASLRHYCNLVTRQRY
23	IKPEAPGEDASPEELNRYYCSLRHYLCLVTRQRY

SEQ ID NO.	序列
24	HIKPEAPGEDASPEELNRYYASCRHYLNLCTRQRY
25	IKPEAPGCDASPEELNRYCASLRHYLNLVTRQRY
26	IKPEAPGEDACPEELNRYYASCRHYLNLVTRQRY
27	IKPEAPCEDASPEELNRYYASCRHYLNLVTRQRY
28	IKPEAPGEDASPCELNRYYASLRHYLNCVTRQRY
29	IKPEAPGEDASCEELNRYYASLRHYLNCVTRQRY
30	IKPEAPGEDASPEELNCYYASLRHYLNCVTRQRY
31	IKPEAPGEDASPEELNRYYASLRHYLNLVTRQ [N-MeR]Y
32	IKPEAPGEDASPEELNRYYASLRHYLNWVTRQ[N-MeR]Y
33	IKPEAPGCDASPEECNRYYASLRHYLNWVTRQ[N-MeR]Y
34	IKPEAPGEDASPEELNRYYACLRHYLNCVTRQ[N-MeR]Y
35	PKPEAPGCDASPEECNRYYADLRHYLNWLTRQ[N-MeR]Y
36	IKPEAPGCDASLEECNRYYASLRHYLNLVTRQRY
37	IKPEAPGCDASVEECNRYYASLRHYLNLVTRQRY
38	IKPECPGEDASPEELQRYYASLRHYLNWVTRQ[β-hArg]Y
39	HIKPECPGEDASPEELQRYYASLRHYLNWVTRQ[β-hArg]Y
40	异戊酰基-RPECPGEDASPEELQRYYASLRHYLNWVTRQ[β-hArg]Y
41	Ac-IC[Pqa]RHYLNWVTRQ[N-MeR]Y

SEQ ID NO.	序列
42	Ac-IK[Ahx]CNRYYASCRHYLNWVTRQ[N-MeR]Y
43	Ac-IK[Pqa]CNRYYASCRHYLNWVTRQ[N-MeR]Y
44	YESK[Ahx]CARYYSACRHYINLITRQRY
45	YESK[Ahx]CEDLARYCSALRHYINLITRQRY
46	PKPEHPGKDASPEEWAKYYAALRHYINWVTRQRY
47	H[Aib]EGTFTSDVSSYLEGQAAKEFIAWLVRGRG (*)

(*)表示C-末端-OH基团。所有其他的具有C-末端-NH_2。

调节GLP-1受体和GCG受体的肽

[0108] 在一个方面，本文提供了包含调节GLP-1受体和/或GCG受体的肽的肽缀合物。在一些实施方案中，肽调节GLP-1受体和GCG受体。在一些实施方案中，调节GLP-1受体的肽是GLP-1受体激动剂。在一些实施方案中，调节GCG受体的肽是GCG受体激动剂。

[0109] 本文所述的肽缀合物的结合亲和力可在未修饰形式的肽的结合亲和力的约5％以内。本文所述的肽缀合物的结合亲和力可在未修饰形式的肽的结合亲和力的约10％以内。本文所述的肽缀合物的结合亲和力可在未修饰形式的肽的结合亲和力的约15％以内。本文所述的肽缀合物的结合亲和力可在未修饰形式的肽的结合亲和力的约20％以内。

[0110] 调节GLP-1受体和GCG受体的肽可包含一个或多个含巯基氨基酸残基。一个或多个含巯基氨基酸残基可用于连接钉合体。一个或多个含巯基氨基酸残基可用于连接HEM。一个或多个含巯基氨基酸残基可以天然存在于调节GLP-1受体和GCG受体的肽中。一个或多个含巯基氨基酸残基可插入调节GLP-1受体和GCG受体的肽中。一个或多个含巯基氨基酸残基可取代调节GLP-1受体和GCG受体的肽中的一个或多个氨基酸残基。氨基酸取代和/或插入的方法是本领域已知的。

[0111] 调节GLP-1受体和GCG受体的肽可包含一个或多个含胺残基。含胺残基的非限制性实例包括赖氨酸、鸟氨酸、二氨基丁酸、二氨基丙酸和高赖氨酸。一个或多个含胺残基可用于连接钉合体。一个或多个含胺残基可用于连接HEM。一个或多个含胺残基可以天然存在于调节GLP-1受体和GCG受体的肽中。一个或多个含胺残基可插入调节GLP-1受体和GCG受体的肽中。一个或多个含胺残基可取代调节GLP-1受体和GCG受体的肽中的一个或多个氨基酸残基。

[0112] 调节GLP-1受体和GCG受体的肽可包含含有一个或多个氨基酸突变的野生型肽的至少一部分。一个或多个氨基酸突变可包括缺失、取代、添加或其组合。一个或多个氨基酸突变可包括向野生型肽添加一个或多个氨基酸残基。一个或多个氨基酸突变可包括野生型肽的一个或多个氨基酸残基的缺失。一个或多个氨基酸突变可包括野生型肽的一个或多个氨基酸残基的取代。一个或多个氨基酸突变可包括用一个或多个半胱氨酸、赖氨酸或其他含巯基或胺的残基取代野生型肽的一个或多个氨基酸残基。一个或多个氨基酸突变可包括

用一个或多个D-氨基酸残基取代野生型肽的一个或多个氨基酸残基。野生型肽的一个或多个氨基酸残基可包含一个或多个丙氨酸、甲硫氨酸、精氨酸、丝氨酸、苏氨酸和酪氨酸。

[0113] 调节GLP-1受体和GCG受体的肽可用例如乙酰化、磷酸化和甲基化修饰。肽修饰可包括化学修饰。肽修饰可发生在肽的N-末端。肽修饰可包括在肽的N-末端乙酰化氨基。或者或另外，肽修饰可发生在肽的C-末端。肽修饰可发生在肽的一个或多个内部氨基酸处。肽修饰可包括置换肽C-末端的羧基。肽修饰可包括修饰肽C-末端的羧基。可修饰肽C-末端的羧基以产生酰胺基。可修饰肽C-末端的羧基以产生氨基。

[0114] 在一些实施方案中，调节GLP-1受体和GCG受体的肽可以是用D-丝氨酸取代L-丝氨酸的修饰的肽。在一些实施方案中，调节GLP-1受体和GCG受体的肽可以是用氨基异丁酸[Aib]取代L-丝氨酸的修饰的肽。在一些实施方案中，调节GLP-1受体和GCG受体的肽可以是用神经亮氨酸[Nle]取代亮氨酸(Leu)的修饰的肽。

[0115] 在一些实施方案中，调节GLP-1受体和GCG受体的肽包含SEQ ID NO:48-61或80-82中任一项的肽序列。在一些情况下，调节GLP-1受体和GCG受体的肽包含与SEQ ID NO:48-61或80-82中的任一项具有至少约80％、约81％、约82％、约83％、约84％、约85％、约86％、约87％、约88％、约89％、90％、约91％、约92％、约93％、约94％、约95％、约96％、约97％、约98％或约99％同一性的肽序列。在一些情况下，调节GLP-1受体和GCG受体的肽包含与SEQ ID NO:48-61或80-82中的任一项具有至少约90％同一性的肽序列。在一些情况下，调节GLP-1受体和GCG受体的肽包含与SEQ ID NO:48-61或80-82中的任一项具有至少约95％同一性的肽序列。在一些情况下，调节GLP-1受体和GCG受体的肽包含与SEQ ID NO:48-61或80-82中的任一项具有至少约99％同一性的肽序列。在一些情况下，调节GLP-1受体和GCG受体的肽包含与SEQ ID NO:48-61或80-82中的任一项相比具有至多约1、2、3、4或5个氨基酸插入、缺失、修饰或取代的氨基酸序列。

[0116] 在一些实施方案中，调节GLP-1受体和GCG受体的肽包含SEQ ID NO:108-114中任一项的肽序列。在一些情况下，调节GLP-1受体和GCG受体的肽包含与SEQ ID NO:108-114中的任一项具有至少约80％、约81％、约82％、约83％、约84％、约85％、约86％、约87％、约88％、约89％、90％、约91％、约92％、约93％、约94％、约95％、约96％、约97％、约98％或约99％同一性的肽序列。在一些情况下，调节GLP-1受体和GCG受体的肽包含与SEQ ID NO:108-114中的任一项具有至少约90％同一性的肽序列。在一些情况下，调节GLP-1受体和GCG受体的肽包含与SEQ ID NO:108-114中的任一项具有至少约95％同一性的肽序列。在一些情况下，调节GLP-1受体和GCG受体的肽包含与SEQ ID NO:108-114中的任一项具有至少约99％同一性的肽序列。在一些情况下，调节GLP-1受体和GCG受体的肽包含与SEQ ID NO:108-114中的任一项相比具有至多约1、2、3、4或5个氨基酸插入、缺失、修饰或取代的氨基酸序列。

[0117] 在一些实施方案中，调节GLP-1受体和GCG受体的肽包含SEQ ID NO:80-82中任一项的肽序列。在一些情况下，调节GLP-1受体和GCG受体的肽包含与SEQ ID NO:80-82中的任一项具有至少约80％、约81％、约82％、约83％、约84％、约85％、约86％、约87％、约88％、约89％、90％、约91％、约92％、约93％、约94％、约95％、约96％、约97％、约98％或约99％同一性的肽序列。在一些情况下，调节GLP-1受体和GCG受体的肽包含与SEQ ID NO:80-82中的任一项具有至少约90％同一性的肽序列。在一些情况下，调节GLP-1受体和GCG受体的肽包含

与SEQ ID NO:80-82中的任一项具有至少约95%同一性的肽序列。在一些情况下，调节GLP-1受体和GCG受体的肽包含与SEQ ID NO:80-82中的任一项具有至少约99%同一性的肽序列。在一些情况下，调节GLP-1受体和GCG受体的肽包含与SEQ ID NO:80-82中的任一项相比具有至多约1、2、3、4或5个氨基酸插入、缺失、修饰或取代的氨基酸序列。

[0118] 在一些实施方案中，调节GLP-1受体和GCG受体的肽包含SEQ ID NO:48-59中任一项的肽序列。在一些情况下，调节GLP-1受体和GCG受体的肽包含与SEQ ID NO:48-59中的任一项具有至少约80%、约81%、约82%、约83%、约84%、约85%、约86%、约87%、约88%、约89%、90%、约91%、约92%、约93%、约94%、约95%、约96%、约97%、约98%或约99%同一性的肽序列。在一些情况下，调节GLP-1受体和GCG受体的肽包含与SEQ ID NO:48-59中的任一项具有至少约90%同一性的肽序列。在一些情况下，调节GLP-1受体和GCG受体的肽包含与SEQ ID NO:48-59中的任一项具有至少约95%同一性的肽序列。在一些情况下，调节GLP-1受体和GCG受体的肽包含与SEQ ID NO:48-59中的任一项具有至少约99%同一性的肽序列。在一些情况下，调节GLP-1受体和GCG受体的肽包含与SEQ ID NO:48-59中的任一项相比具有至多约1、2、3、4或5个氨基酸插入、缺失、修饰或取代的氨基酸序列。

[0119] 在一些实施方案中，调节GLP-1受体和GCG受体的肽包含SEQ ID NO:108-110中任一项的肽序列。在一些情况下，调节GLP-1受体和GCG受体的肽包含与SEQ ID NO:108-110中的任一项具有至少约80%、约81%、约82%、约83%、约84%、约85%、约86%、约87%、约88%、约89%、90%、约91%、约92%、约93%、约94%、约95%、约96%、约97%、约98%或约99%同一性的肽序列。在一些情况下，调节GLP-1受体和GCG受体的肽包含与SEQ ID NO:108-110中的任一项具有至少约90%同一性的肽序列。在一些情况下，调节GLP-1受体和GCG受体的肽包含与SEQ ID NO:108-110中的任一项具有至少约95%同一性的肽序列。在一些情况下，调节GLP-1受体和GCG受体的肽包含与SEQ ID NO:108-110中的任一项具有至少约99%同一性的肽序列。在一些情况下，调节GLP-1受体和GCG受体的肽包含与SEQ ID NO:108-110中的任一项相比具有至多约1、2、3、4或5个氨基酸插入、缺失、修饰或取代的氨基酸序列。

[0120] 在一些实施方案中，调节GLP-1受体和GCG受体的肽包含SEQ ID NO:60-61或80-82中任一项的肽序列。在一些情况下，调节GLP-1受体和GCG受体的肽包含与SEQ ID NO:60-61或80-82中的任一项具有至少约80%、约81%、约82%、约83%、约84%、约85%、约86%、约87%、约88%、约89%、90%、约91%、约92%、约93%、约94%、约95%、约96%、约97%、约98%或约99%同一性的肽序列。在一些情况下，调节GLP-1受体和GCG受体的肽包含与SEQ ID NO:60-61或80-82中的任一项具有至少约90%同一性的肽序列。在一些情况下，调节GLP-1受体和GCG受体的肽包含与SEQ ID NO:60-61或80-82中的任一项具有至少约95%同一性的肽序列。在一些情况下，调节GLP-1受体和GCG受体的肽包含与SEQ ID NO:60-61或80-82中的任一项具有至少约99%同一性的肽序列。在一些情况下，调节GLP-1受体和GCG受体的肽包含与SEQ ID NO:60-61或80-82中的任一项相比具有至多约1、2、3、4或5个氨基酸插入、缺失、修饰或取代的氨基酸序列。

[0121] 在一些实施方案中，调节GLP-1受体和GCG受体的肽包含SEQ ID NO:111的肽序列。在一些情况下，调节GLP-1受体和GCG受体的肽包含与SEQ ID NO:111具有至少约80%、约81%、约82%、约83%、约84%、约85%、约86%、约87%、约88%、约89%、90%、约91%、约

92％、约93％、约94％、约95％、约96％、约97％、约98％或约99％同一性的肽序列。在一些情况下，调节GLP-1受体和GCG受体的肽包含与SEQ ID NO:111具有至少约90％同一性的肽序列。在一些情况下，调节GLP-1受体和GCG受体的肽包含与SEQ ID NO:111具有至少约95％同一性的肽序列。在一些情况下，调节GLP-1受体和GCG受体的肽包含与SEQ ID NO:111具有至少约99％同一性的肽序列。在一些情况下，调节GLP-1受体和GCG受体的肽包含与SEQ ID NO:111相比具有至多约1、2、3、4或5个氨基酸插入、缺失、修饰或取代的氨基酸序列。

[0122] 在一些实施方案中，调节GLP-1受体和GCG受体的肽包含SEQ ID NO:48-52或55-61或80-82中任一项的肽序列。在一些情况下，调节GLP-1受体和GCG受体的肽包含与SEQ ID NO:48-52或55-61或80-82中的任一项具有至少约80％、约81％、约82％、约83％、约84％、约85％、约86％、约87％、约88％、约89％、90％、约91％、约92％、约93％、约94％、约95％、约96％、约97％、约98％或约99％同一性的肽序列。在一些情况下，调节GLP-1受体和GCG受体的肽包含与SEQ ID NO:48-52或55-61或80-82中的任一项具有至少约90％同一性的肽序列。在一些情况下，调节GLP-1受体和GCG受体的肽包含与SEQ ID NO:48-52或55-61或80-82中的任一项具有至少约95％同一性的肽序列。在一些情况下，调节GLP-1受体和GCG受体的肽包含与SEQ ID NO:48-52或55-61或80-82中的任一项具有至少约99％同一性的肽序列。在一些情况下，调节GLP-1受体和GCG受体的肽包含与SEQ ID NO:48-52或55-61或80-82中的任一项相比具有至多约1、2、3、4或5个氨基酸插入、缺失、修饰或取代的氨基酸序列。

[0123] 在一些实施方案中，调节GLP-1受体和GCG受体的肽包含SEQ ID NO:48的肽序列。在一些情况下，调节GLP-1受体和GCG受体的肽包含与SEQ ID NO:48具有至少约80％、约81％、约82％、约83％、约84％、约85％、约86％、约87％、约88％、约89％、90％、约91％、约92％、约93％、约94％、约95％、约96％、约97％、约98％或约99％同一性的肽序列。在一些情况下，调节GLP-1受体和GCG受体的肽包含与SEQ ID NO:48具有至少约90％同一性的肽序列。在一些情况下，调节GLP-1受体和GCG受体的肽包含与SEQ ID NO:48具有至少约95％同一性的肽序列。在一些情况下，调节GLP-1受体和GCG受体的肽包含与SEQ ID NO:48具有至少约99％同一性的肽序列。在一些情况下，调节GLP-1受体和GCG受体的肽包含与SEQ ID NO:48相比具有至多约1、2、3、4或5个氨基酸插入、缺失、修饰或取代的氨基酸序列。

[0124] 在一些实施方案中，调节GLP-1受体和GCG受体的肽包含SEQ ID NO:60的肽序列。在一些情况下，调节GLP-1受体和GCG受体的肽包含与SEQ ID NO:60具有至少约80％、约81％、约82％、约83％、约84％、约85％、约86％、约87％、约88％、约89％、90％、约91％、约92％、约93％、约94％、约95％、约96％、约97％、约98％或约99％同一性的肽序列。在一些情况下，调节GLP-1受体和GCG受体的肽包含与SEQ ID NO:60具有至少约90％同一性的肽序列。在一些情况下，调节GLP-1受体和GCG受体的肽包含与SEQ ID NO:60具有至少约95％同一性的肽序列。在一些情况下，调节GLP-1受体和GCG受体的肽包含与SEQ ID NO:60具有至少约99％同一性的肽序列。在一些情况下，调节GLP-1受体和GCG受体的肽包含与SEQ ID NO:60相比具有至多约1、2、3、4或5个氨基酸插入、缺失、修饰或取代的氨基酸序列。

[0125] 肽衍生物的非限制性实例示于表2中。

表2:GLP-1R/GCGR调节剂SEQ ID表

SEQ ID NO.	序列
48	H[D-Ser]QGTFTSDYSKYLDEKAAKEFIKWLLNGGPSSGAPPPS
49	H[D-Ser]QGTFTSDYSKYLDEKAAKEFIKWLLRA
50	H[Aib]QGTFTSDYSKYLDEKAAKEFIKWLLNGRNRNNIA
51	H[Aib]QGTFTSDYSKYLDSKKAKEFVKWLLN[Aib]GPSSGAPPPS
52	H[Aib]QGTFTSDYSKYLDSKKAQEFVKWLLNGPSSGAPPPS

SEQ ID NO.	序列
53	H[Aib]QGTFTSDYSKYLDKKAAKEFKQWLLNGPSSGAPPPS
54	H[Aib]QGTFTSDYSKYLDKKKAKEFKQWLLN[Aib]GRNRNNIA
55	H[D-Ser]QGT[D-Phe]TSDYSEYLDEKAAKEFIKWLLNGGPSSGAPPPS
56	H[D-Ser]QGT[D-Phe]TSDYSEYLDEKAAREFIKWLLAGGPSSGAPPPS
57	H[D-Ser]QGT[Nle]TSDYSEYLDEKAAKEFIKWLLNGGPSSGAPPPS
58	H[D-Ser]QGTLTSDYSEYLDEKAAKEFIKWLLNGGPSSGAPPPS
59	H[D-Ser]QGTLTSDYSEYLDSKRAREFVKWLEAGGPSSGAPPPS
60	H[D-Ser]QGTFTSDYSKYLDECAAKEFICWLLNGGPSSGAPPPS
61	H[D-Ser]QGTFTSDYSKYLDECAAKEFICWLLRA
80	H[D-Ser]QGTFTSDYSKYLDECAAKEFICWLMNTKRNRNNIA
81	H[D-Ser]QGTFTSDYSKYLDECAAHDFVCWLLRA
82	H[D-Ser]QGTFTSDYSKYLDECAAKEFICWLLRAGPSSGAPPPS
108	H[Aib]QGTFTSDYSEYLDSKKAKEFVKWLLN[Aib]GPSSGAPPPS
109	H[Aib]QGTFTSDYSEYLDSKKAQEFVKWLLNGGPSSGAPPPS
110	H[D-Ser]QGTFTSDYSEYLDEKAAKEFIKWLLNGGPSSGAPPPS
111	H[D-Ser]QGTFTSDYSKQLDECAAKEFICWLLQGGPSSGAPPPS

调节GLP-1受体和GIP受体的肽

[0126] 在一个方面，本文提供了包含调节GLP-1受体和/或GIP受体的肽的肽缀合物。在一些实施方案中，肽调节GLP-1受体和GIP受体。在一些实施方案中，调节GLP-1受体的肽是GLP-1受体激动剂。在一些实施方案中，调节GIP受体的肽是GIP受体激动剂。

[0127] 本文所述的肽缀合物的结合亲和力可在未修饰形式的肽的结合亲和力的约5%以内。本文所述的肽缀合物的结合亲和力可在未修饰形式的肽的结合亲和力的约10%以内。本文所述的肽缀合物的结合亲和力可在未修饰形式的肽的结合亲和力的约15%以内。本文所述的肽缀合物的结合亲和力可在未修饰形式的肽的结合亲和力的约20%以内。

[0128] 调节GLP-1受体和GIP受体的肽可包含一个或多个含巯基氨基酸残基。一个或多个含巯基氨基酸残基可用于连接钉合体。一个或多个含巯基氨基酸残基可用于连接HEM。一个或多个含巯基氨基酸残基可以天然存在于调节GLP-1受体和GIP受体的肽中。一个或多个含巯基氨基酸残基可插入调节GLP-1受体和GIP受体的肽中。一个或多个含巯基氨基酸残基可取代调节GLP-1受体和GIP受体的肽中的一个或多个氨基酸残基。氨基酸取代和/或插入的方法是本领域已知的。

[0129] 调节GLP-1受体和GIP受体的肽可包含一个或多个含胺残基。含胺残基的非限制性实例包括赖氨酸、鸟氨酸、二氨基丁酸、二氨基丙酸和高赖氨酸。一个或多个含胺残基可用于连接钉合体。一个或多个含胺残基可用于连接HEM。一个或多个含胺残基可以天然存在于调节GLP-1受体和GIP受体的肽中。一个或多个含胺残基可插入调节GLP-1受体和GIP受体的肽中。一个或多个含胺残基可取代调节GLP-1受体和GIP受体的肽中的一个或多个氨基酸残基。

[0130] 调节GLP-1受体和GIP受体的肽可包含野生型肽的至少一部分，该野生型肽包含一个或多个氨基酸突变。一个或多个氨基酸突变可包括缺失、取代、添加或其组合。一个或多个氨基酸突变可包括向野生型肽添加一个或多个氨基酸残基。一个或多个氨基酸突变可包括野生型肽的一个或多个氨基酸残基的缺失。一个或多个氨基酸突变可包括野生型肽的一个或多个氨基酸残基的取代。一个或多个氨基酸突变可包括用一个或多个半胱氨酸、赖氨酸或其他含巯基或胺的残基取代野生型肽的一个或多个氨基酸残基。一个或多个氨基酸突变可包括用一个或多个D-氨基酸残基取代野生型肽的一个或多个氨基酸残基。野生型肽的一个或多个氨基酸残基可包含一个或多个丙氨酸、甲硫氨酸、精氨酸、丝氨酸、苏氨酸和酪氨酸。

[0131] 调节GLP-1受体和GIP受体的肽可用例如乙酰化、磷酸化和甲基化修饰。肽修饰可包括化学修饰。肽修饰可发生在肽的N-末端。肽修饰可包括在肽的N-末端乙酰化氨基。或者或另外，肽修饰可发生在肽的C-末端。肽修饰可发生在肽的一个或多个内部氨基酸处。肽修饰可包括置换肽C-末端的羧基。肽修饰可包括修饰肽C-末端的羧基。可修饰肽C-末端的羧基以产生酰胺基。可修饰肽C-末端的羧基以产生氨基。

[0132] 在一些实施方案中，调节GLP-1受体和GIP受体的肽可以是用D-丝氨酸取代L-丝氨酸的修饰的肽。在一些实施方案中，调节GLP-1受体和GIP受体的肽可以是用氨基异丁酸[Aib]取代L-丝氨酸的修饰的肽。在一些实施方案中，调节GLP-1受体和GIP受体的肽可以是用神经亮氨酸[Nle]取代亮氨酸(Leu)的修饰的肽。

[0133] 在一些实施方案中，调节GLP-1受体和GIP受体的肽包含SEQ ID NO:62-71中任一项的肽序列。在一些情况下，调节GLP-1受体和GIP受体的肽包含与SEQ ID NO:62-71中的任一项具有至少约80%、约81%、约82%、约83%、约84%、约85%、约86%、约87%、约88%、约89%、90%、约91%、约92%、约93%、约94%、约95%、约96%、约97%、约98%或约99%同一性的肽序列。在一些情况下，调节GLP-1受体和GIP受体的肽包含与SEQ ID NO:62-71中的任

一项具有至少约90%同一性的肽序列。在一些情况下，调节GLP-1受体和GIP受体的肽包含与SEQ ID NO:62-71中的任一项具有至少约95%同一性的肽序列。在一些情况下，调节GLP-1受体和GIP受体的肽包含与SEQ ID NO:62-71中的任一项具有至少约99%同一性的肽序列。在一些情况下，调节GLP-1受体和GIP受体的肽包含与SEQ ID NO:62-71中的任一项相比具有至多约1、2、3、4或5个氨基酸插入、缺失、修饰或取代的氨基酸序列。

[0134] 在一些实施方案中，调节GLP-1受体和GIP受体的肽包含SEQ ID NO:62或65中任一项的肽序列。在一些情况下，调节GLP-1受体和GIP受体的肽包含与SEQ ID NO:62或65中的任一项具有至少约80%、约81%、约82%、约83%、约84%、约85%、约86%、约87%、约88%、约89%、90%、约91%、约92%、约93%、约94%、约95%、约96%、约97%、约98%或约99%同一性的肽序列。在一些情况下，调节GLP-1受体和GIP受体的肽包含与SEQ ID NO:62或65中的任一项具有至少约90%同一性的肽序列。在一些情况下，调节GLP-1受体和GIP受体的肽包含与SEQ ID NO:62或65中的任一项具有至少约95%同一性的肽序列。在一些情况下，调节GLP-1受体和GIP受体的肽包含与SEQ ID NO:62或65中的任一项具有至少约99%同一性的肽序列。在一些情况下，调节GLP-1受体和GIP受体的肽包含与SEQ ID NO:62或65中的任一项相比具有至多约1、2、3、4或5个氨基酸插入、缺失、修饰或取代的氨基酸序列。

[0135] 在一些实施方案中，调节GLP-1受体和GIP受体的肽包含SEQ ID NO:114-120中任一项的肽序列。在一些情况下，调节GLP-1受体和GIP受体的肽包含与SEQ ID NO:114-120中的任一项具有至少约80%、约81%、约82%、约83%、约84%、约85%、约86%、约87%、约88%、约89%、90%、约91%、约92%、约93%、约94%、约95%、约96%、约97%、约98%或约99%同一性的肽序列。在一些情况下，调节GLP-1受体和GIP受体的肽包含与SEQ ID NO:114-120中的任一项具有至少约90%同一性的肽序列。在一些情况下，调节GLP-1受体和GIP受体的肽包含与SEQ ID NO:114-120中的任一项具有至少约95%同一性的肽序列。在一些情况下，调节GLP-1受体和GIP受体的肽包含与SEQ ID NO:114-120中的任一项具有至少约99%同一性的肽序列。在一些情况下，调节GLP-1受体和GIP受体的肽包含与SEQ ID NO:114-120中的任一项相比具有至多约1、2、3、4或5个氨基酸插入、缺失、修饰或取代的氨基酸序列。

[0136] 在一些实施方案中，调节GLP-1受体和GIP受体的肽包含SEQ ID NO:62-68中任一项的肽序列。在一些情况下，调节GLP-1受体和GIP受体的肽包含与SEQ ID NO:62-68中的任一项具有至少约80%、约81%、约82%、约83%、约84%、约85%、约86%、约87%、约88%、约89%、90%、约91%、约92%、约93%、约94%、约95%、约96%、约97%、约98%或约99%同一性的肽序列。在一些情况下，调节GLP-1受体和GIP受体的肽包含与SEQ ID NO:62-68中的任一项具有至少约90%同一性的肽序列。在一些情况下，调节GLP-1受体和GIP受体的肽包含与SEQ ID NO:62-68中的任一项具有至少约95%同一性的肽序列。在一些情况下，调节GLP-1受体和GIP受体的肽包含与SEQ ID NO:62-68中的任一项具有至少约99%同一性的肽序列。在一些情况下，调节GLP-1受体和GIP受体的肽包含与SEQ ID NO:62-68中的任一项相比具有至多约1、2、3、4或5个氨基酸插入、缺失、修饰或取代的氨基酸序列。在一些实施方案中，调节GLP-1受体和GIP受体的肽包含SEQ ID NO:69-71中任一项的肽序列。在一些情况下，调节GLP-1受体和GIP受体的肽包含与SEQ ID NO:69-71中的任一项具有至少约80%、约81%、约82%、约83%、约84%、约85%、约86%、约87%、约88%、约89%、90%、约91%、约

92％、约93％、约94％、约95％、约96％、约97％、约98％或约99％同一性的肽序列。在一些情况下，调节GLP-1受体和GIP受体的肽包含与SEQ ID NO:69-71中的任一项具有至少约90％同一性的肽序列。在一些情况下，调节GLP-1受体和GIP受体的肽包含与SEQ ID NO:69-71中的任一项具有至少约95％同一性的肽序列。在一些情况下，调节GLP-1受体和GIP受体的肽包含与SEQ ID NO:69-71中的任一项具有至少约99％同一性的肽序列。在一些情况下，调节GLP-1受体和GIP受体的肽包含与SEQ ID NO:69-71中的任一项相比具有至多约1、2、3、4或5个氨基酸插入、缺失、修饰或取代的氨基酸序列。在一些实施方案中，调节GLP-1受体和GIP受体的肽包含SEQ ID NO:63的肽序列。在一些情况下，调节GLP-1受体和GIP受体的肽包含与SEQ ID NO:63具有至少约80％、约81％、约82％、约83％、约84％、约85％、约86％、约87％、约88％、约89％、90％、约91％、约92％、约93％、约94％、约95％、约96％、约97％、约98％或约99％同一性的肽序列。在一些情况下，调节GLP-1受体和GIP受体的肽包含与SEQ ID NO:63具有至少约90％同一性的肽序列。在一些情况下，调节GLP-1受体和GIP受体的肽包含与SEQ ID NO:63具有至少约95％同一性的肽序列。在一些情况下，调节GLP-1受体和GIP受体的肽包含与SEQ ID NO:63具有至少约99％同一性的肽序列。在一些情况下，调节GLP-1受体和GIP受体的肽包含与SEQ ID NO:63相比具有至多约1、2、3、4或5个氨基酸插入、缺失、修饰或取代的氨基酸序列。

[0137] 肽衍生物的非限制性实例示于表3中。

表3:GLP-1R/GIPR调节剂SEQ ID表

SEQ ID NO.	序列
62	Y[Aib]EGTFTSDYSIYLDKKAA[Aib]EFVKWLLAGGPSSGAPPPS
63	Y[Aib]EGTFTSDYSIYKDKQAA[Aib]KFVNWLLAGGPSSGAPPPS
64	Y[Aib]EGTFTSDYSIYKDKQAA[Aib]KFKNWLKAGGPSSGAPPPS
65	Y[Aib]EGTFTSDYSIYLDKKAQ[Aib]AFVKWLIAQGPSSGAPPPS
66	Y[Aib]EGTFHSDYDIYKDKQAA[Aib]KFVQWLLAGGPSSGAPPPS
67	Y[Aib]EGTFHSDYDIYKDKQAA[Nle]KFVAWLLAGGPSSGAPPPS
68	Y[Aib]EGTFT[D-Ser]DY[D-Ser]IYKDKQAA[Nle]KFVAWLLAGGPSSGAPPPS
69	Y[Aib]EGTFTSDYSIYCDKQAA[Aib]CFVNWLLAGGPSSGAPPPS
70	YGEGTFTSDYSIYCDKQAAQCFVNWLLAGGPSSGAPPPS
71	Y[Aib]EGTFTSDYSIYCDKQAAQCFVNWLLAGGPSSGAPPPS
114	Y[Aib]EGTFTSDYSIYLDKCAA[Aib]EFVCWLLAGGPSSGAPPPS
115	Y[Aib]EGTFTSDYSIYLDKCAQ[Aib]AFVCWLIAQGPSSGAPPPS
116	Y[Aib]EGTFTSDYSIYCDKQAA[Aib]CFVNWLIAGGPSSGAPPPS
117	Y[Aib]EGTFISDVSIYCDKQAA[Aib]CFVNWLIAGGPSSGAPPPS
118	Y[Aib]EGTFISDVSIYLDKCAA[Aib]EFVCWLIAGGPSSGAPPPS
119	Y[Aib]EGTFISDLSIYCDKQAA[Aib]CFVQWLIAGGPSSGAPPPS
120	Y[Aib]EGTFISDLSIYLDKCAA[Aib]EFVCWLIAGGPASGAPPPS

调节GLP-1受体的肽

[0138] 在一个方面，本文提供了包含调节GLP-1受体的肽的肽缀合物。在一些实施方案中，调节GLP-1受体的肽是GLP-1受体激动剂。

[0139] 本文所述的肽缀合物的结合亲和力可在未修饰形式的肽的结合亲和力的约5％以内。本文所述的肽缀合物的结合亲和力可在未修饰形式的肽的结合亲和力的约10％以内。本文所述的肽缀合物的结合亲和力可在未修饰形式的肽的结合亲和力的约15％以内。本文所述的肽缀合物的结合亲和力可在未修饰形式的肽的结合亲和力的约20％以内。

[0140] 调节GLP-1受体的肽可包含一个或多个含巯基氨基酸残基。一个或多个含巯基氨基酸残基可用于连接钉合体。一个或多个含巯基氨基酸残基可用于连接HEM。一个或多个含巯基氨基酸残基可天然存在于调节GLP-1受体的肽中。一个或多个含巯基氨基酸残基可插入调节GLP-1受体的肽中。一个或多个含巯基氨基酸残基可取代调节GLP-1受体的肽中的一个或多个氨基酸残基。氨基酸取代和/或插入的方法是本领域已知的。

[0141] 调节GLP-1受体的肽可包含一个或多个含胺残基。含胺残基的非限制性实例包括赖氨酸、鸟氨酸、二氨基丁酸、二氨基丙酸和高赖氨酸。一个或多个含胺残基可用于连接钉合体。一个或多个含胺残基可用于连接HEM。一个或多个含胺残基可以天然存在于调节GLP-

1受体的肽中。一个或多个含胺残基可插入调节GLP-1受体的肽中。一个或多个含胺残基可取代调节GLP-1受体的肽中的一个或多个氨基酸残基。

[0142] 调节GLP-1受体的肽可包含含有一个或多个氨基酸突变的野生型肽的至少一部分。一个或多个氨基酸突变可包括缺失、取代、添加或其组合。一个或多个氨基酸突变可包括向野生型肽添加一个或多个氨基酸残基。一个或多个氨基酸突变可包括野生型肽的一个或多个氨基酸残基的缺失。一个或多个氨基酸突变可包括野生型肽的一个或多个氨基酸残基的取代。一个或多个氨基酸突变可包括用一个或多个半胱氨酸、赖氨酸或其他含巯基或胺的残基取代野生型肽的一个或多个氨基酸残基。一个或多个氨基酸突变可包括用一个或多个D-氨基酸残基取代野生型肽的一个或多个氨基酸残基。野生型肽的一个或多个氨基酸残基可包含一个或多个丙氨酸、甲硫氨酸、精氨酸、丝氨酸、苏氨酸和酪氨酸。

[0143] 调节GLP-1受体的肽可用例如乙酰化、磷酸化和甲基化修饰。肽修饰可包括化学修饰。肽修饰可发生在肽的N-末端。肽修饰可包括在肽的N-末端乙酰化氨基。或者或另外，肽修饰可发生在肽的C-末端。肽修饰可发生在肽的一个或多个内部氨基酸处。肽修饰可包括置换肽C-末端的羧基。肽修饰可包括修饰肽C-末端的羧基。可修饰肽C-末端的羧基以产生酰胺基。可修饰肽C-末端的羧基以产生氨基。

[0144] 在一些实施方案中，调节GLP-1受体的肽可以是用D-丝氨酸取代L-丝氨酸的修饰的肽。在一些实施方案中，调节GLP-1受体的肽可以是用氨基异丁酸[Aib]取代L-丝氨酸的修饰的肽。在一些实施方案中，调节GLP-1受体的肽可以是用神经亮氨酸[Nle]取代亮氨酸(Leu)的修饰的肽。

[0145] 在一些实施方案中，调节GLP-1受体的肽包含SEQ ID NO:48-82或108-120中任一项的肽序列。在一些情况下，调节GLP-1受体的肽包含与SEQ ID NO:48-82或108-120中的任一项具有至少约80％、约81％、约82％、约83％、约84％、约85％、约86％、约87％、约88％、约89％、90％、约91％、约92％、约93％、约94％、约95％、约96％、约97％、约98％或约99％同一性的肽序列。在一些情况下，调节GLP-1受体的肽包含与SEQ ID NO:48-82或108-120中的任一项具有至少约90％同一性的肽序列。在一些情况下，调节GLP-1受体的肽包含与SEQ ID NO:48-82或108-120中的任一项具有至少约95％同一性的肽序列。在一些情况下，调节GLP-1受体的肽包含与SEQ ID NO:48-82或108-120中的任一项具有至少约99％同一性的肽序列。在一些实施情况中，调节GLP-1受体的肽包含与SEQ ID NO:48-82或108-120中的任一项相比具有至多约1、2、3、4或5个氨基酸插入、缺失、修饰或取代的氨基酸序列。

[0146] 在一些实施方案中，调节GLP-1受体的肽包含SEQ ID NO:72-79中任一项的肽序列。在一些情况下，调节GLP-1受体的肽包含与SEQ ID NO:72-79中的任一项具有至少约80％、约81％、约82％、约83％、约84％、约85％、约86％、约87％、约88％、约89％、90％、约91％、约92％、约93％、约94％、约95％、约96％、约97％、约98％或约99％同一性的肽序列。在一些情况下，调节GLP-1受体的肽包含与SEQ ID NO:72-79中的任一项具有至少约90％同一性的肽序列。在一些情况下，调节GLP-1受体的肽包含与SEQ ID NO:72-79中的任一项具有至少约95％同一性的肽序列。在一些情况下，调节GLP-1受体的肽包含与SEQ ID NO:72-79中的任一项具有至少约99％同一性的肽序列。在一些情况下，调节GLP-1受体的肽包含与SEQ ID NO:72-79中的任一项相比具有至多约1、2、3、4或5个氨基酸插入、缺失、修饰或取代的氨基酸序列。

[0147] 在一些实施方案中，调节GLP-1受体的肽包含SEQ ID NO:72-75中任一项的肽序列。在一些情况下，调节GLP-1受体的肽包含与SEQ ID NO:72-75中的任一项具有至少约80％、约81％、约82％、约83％、约84％、约85％、约86％、约87％、约88％、约89％、90％、约91％、约92％、约93％、约94％、约95％、约96％、约97％、约98％或约99％同一性的肽序列。在一些情况下，调节GLP-1受体的肽包含与SEQ ID NO:72-75中的任一项具有至少约90％同一性的肽序列。在一些情况下，调节GLP-1受体的肽包含与SEQ ID NO:72-75中的任一项具有至少约95％同一性的肽序列。在一些情况下，调节GLP-1受体的肽包含与SEQ ID NO:72-75中的任一项具有至少约99％同一性的肽序列。在一些情况下，调节GLP-1受体的肽包含与SEQ ID NO:72-75中的任一项相比具有至多约1、2、3、4或5个氨基酸插入、缺失、修饰或取代的氨基酸序列。

[0148] 在一些实施方案中，调节GLP-1受体的肽包含SEQ ID NO:76-79中任一项的肽序列。在一些情况下，调节GLP-1受体的肽包含与SEQ ID NO:76-79中的任一项具有至少约80％、约81％、约82％、约83％、约84％、约85％、约86％、约87％、约88％、约89％、90％、约91％、约92％、约93％、约94％、约95％、约96％、约97％、约98％或约99％同一性的肽序列。在一些情况下，调节GLP-1受体的肽包含与SEQ ID NO:76-79中的任一项具有至少约90％同一性的肽序列。在一些情况下，调节GLP-1受体的肽包含与SEQ ID NO:76-79中的任一项具有至少约95％同一性的肽序列。在一些情况下，调节GLP-1受体的肽包含与SEQ ID NO:76-79中的任一项具有至少约99％同一性的肽序列。在一些情况下，调节GLP-1受体的肽包含与SEQ ID NO:76-79中的任一项相比具有至多约1、2、3、4或5个氨基酸插入、缺失、修饰或取代的氨基酸序列。

[0149] 在一些实施方案中，调节GLP-1受体的肽包含SEQ ID NO:76的肽序列。在一些情况下，调节GLP-1受体的肽包含与SEQ ID NO:76具有至少约80％、约81％、约82％、约83％、约84％、约85％、约86％、约87％、约88％、约89％、90％、约91％、约92％、约93％、约94％、约95％、约96％、约97％、约98％或约99％同一性的肽序列。在一些情况下，调节GLP-1受体的肽包含与SEQ ID NO:76具有至少约90％同一性的肽序列。在一些情况下，调节GLP-1受体的肽包含与SEQ ID NO:76具有至少约95％同一性的肽序列。在一些情况下，调节GLP-1受体的肽包含与SEQ ID NO:76具有至少约99％同一性的肽序列。在一些情况下，调节GLP-1受体的肽包含与SEQ ID NO:76相比具有至多约1、2、3、4或5个氨基酸插入、缺失、修饰或取代的氨基酸序列。

[0150] 在一些实施方案中，调节GLP-1受体的肽包含SEQ ID NO:77的肽序列。在一些情况下，调节GLP-1受体的肽包含与SEQ ID NO:77具有至少约80％、约81％、约82％、约83％、约84％、约85％、约86％、约87％、约88％、约89％、90％、约91％、约92％、约93％、约94％、约95％、约96％、约97％、约98％或约99％同一性的肽序列。在一些情况下，调节GLP-1受体的肽包含与SEQ ID NO:77具有至少约90％同一性的肽序列。在一些情况下，调节GLP-1受体的肽包含与SEQ ID NO:77具有至少约95％同一性的肽序列。在一些情况下，调节GLP-1受体的肽包含与SEQ ID NO:77具有至少约99％同一性的肽序列。在一些情况下，调节GLP-1受体的肽包含与SEQ ID NO:77相比具有至多约1、2、3、4或5个氨基酸插入、缺失、修饰或取代的氨基酸序列。

[0151] 肽衍生物的非限制性实例示于表4中。

表4:GLP-1R调节剂SEQ ID表

SEQ ID NO.	序列
72	HGEGTFTSDLSKQMEEKAVRLFIKWLKNGGPSSGAPPPS
73	HGEGTFTSDLSKQLEEKAVRLFIKWLKNGGPSSGAPPPS
74	HGEGTFTSDLSKQ[Nle]EEKAVRLFIKWLKNGGPSSGAPPPS
75	H[Aib]EGTFTSDVSSYLEGKAAKEFIKWLVKGRG (*)
76	HGEGTFTSDLSKQLEECAVRLFICWLKNGGPSSGAPPPS
77	HGEGTFTSDLSKQMEECAVRLFICWLKNGGPSSGAPPPS
78	HGEGTFTSDVSSYLEGCAAKEFICWLVKGRG (*)
79	H[Aib]EGTFTSDVSSYLEGCAAKEFICWLVKGRG (*)

(*)表示C-末端-OH基团。所有其他的具有C-末端-NH_2。

催乳素释放肽(PrRP)

[0152] 在一个方面,本文提供了包含催乳素释放肽(PrRP)的肽缀合物。

[0153] 本文所述的肽缀合物的结合亲和力可在未修饰形式的肽的结合亲和力的约5%以内。本文所述的肽缀合物的结合亲和力可在未修饰形式的肽的结合亲和力的约10%以内。本文所述的肽缀合物的结合亲和力可在未修饰形式的肽的结合亲和力的约15%以内。本文所述的肽缀合物的结合亲和力可在未修饰形式的肽的结合亲和力的约20%以内。

[0154] 催乳素释放肽(PrRP)可包含一个或多个含巯基氨基酸残基。一个或多个含巯基氨基酸残基可用于将钉合体连接至催乳素释放肽(PrRP)。一个或多个含巯基氨基酸残基可以天然存在于催乳素释放肽(PrRP)中。一个或多个含巯基氨基酸残基可以插入到催乳素释放肽(PrRP)中。一个或多个含巯基氨基酸残基可以取代催乳素释放肽(PrRP)中的一个或多个氨基酸残基。氨基酸取代和/或插入的方法是本领域已知的。

[0155] 催乳素释放肽(PrRP)可包含含有一个或多个氨基酸突变的野生型肽的至少一部分。一个或多个氨基酸突变可包括缺失、取代、添加或其组合。一个或多个氨基酸突变可包括向野生型肽添加一个或多个氨基酸残基。一个或多个氨基酸突变可包括野生型肽的一个或多个氨基酸残基的缺失。一个或多个氨基酸突变可包括野生型肽的一个或多个氨基酸残基的取代。一个或多个氨基酸突变可包括用一个或多个半胱氨酸、赖氨酸或其他含巯基或胺的残基取代野生型肽的一个或多个氨基酸残基。一个或多个氨基酸突变可包括用一个或多个D-氨基酸残基取代野生型肽的一个或多个氨基酸残基。野生型肽的一个或多个氨基酸残基可包含一个或多个丙氨酸、甲硫氨酸、精氨酸、丝氨酸、苏氨酸和酪氨酸。

[0156] 催乳素释放肽(PrRP)可用例如乙酰化、磷酸化和甲基化修饰。肽修饰可包括化学修饰。肽修饰可发生在肽的N-末端。肽修饰可包括在肽的N-末端乙酰化氨基。或者或另外,肽修饰可发生在肽的C-末端。肽修饰可发生在肽的一个或多个内部氨基酸处。肽修饰可包括置换肽C-末端的羧基。肽修饰可包括修饰肽C-末端的羧基。可修饰肽C-末端的羧基以产

生酰胺基。可修饰肽C-末端的羧基以产生氨基。

[0157] 在一些实施方案中，肽衍生物可以是用hArg取代Arg的修饰的催乳素释放肽(PrRP)。在一些实施方案中，肽衍生物可以是用β-hArg取代Arg的修饰的催乳素释放肽(PrRP)。在一些实施方案中，肽衍生物可以是用NMe-Arg取代Arg的修饰的催乳素释放肽(PrRP)。在一些实施方案中，肽衍生物可以是Nle取代Met的修饰的催乳素释放肽(PrRP)。

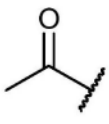
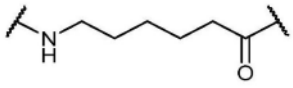
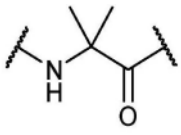
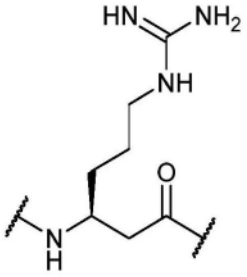
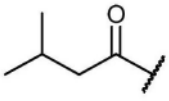
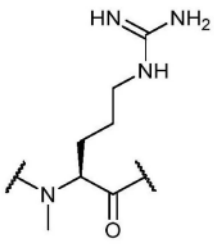
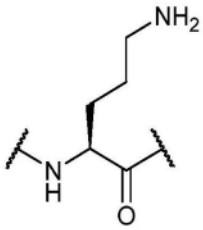
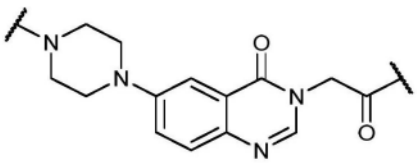
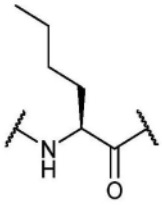
[0158] 催乳素释放肽(PrRP)的非限制性实例示于表5中。

[0159] 在一些情况下，催乳素释放肽(PrRP)具有与SEQ ID NO:83-105中的任一项具有至少约80％、约81％、约82％、约83％、约84％、约85％、约86％、约87％、约88％、约89％、90％、约91％、约92％、约93％、约94％、约95％、约96％、约97％、约98％或约99％同一性的氨基酸序列。在一些情况下，催乳素释放肽(PrRP)具有与SEQ ID NO:83-105中的任一项具有至少约80％同一性的氨基酸序列。在一些情况下，催乳素释放肽(PrRP)具有与SEQ ID NO:83-105中的任一项具有至少约80％同一性的氨基酸序列。在一些情况下，催乳素释放肽(PrRP)具有与SEQ ID NO:83-105中的任一项具有至少约85％同一性的氨基酸序列。在一些情况下，催乳素释放肽(PrRP)具有与SEQ ID NO:83-105中的任一项具有至少约90％同一性的氨基酸序列。在一些情况下，催乳素释放肽(PrRP)具有与SEQ ID NO:83-105中的任一项具有至少约95％同一性的氨基酸序列。在一些情况下，催乳素释放肽(PrRP)具有与SEQ ID NO:83-105中的任一项具有至少约99％同一性的氨基酸序列。在一些情况下，PrRP包含与SEQ ID NO:83-105中的任一项相比具有至多约1、2、3、4或5个氨基酸插入、缺失、修饰或取代的氨基酸序列。

表5:PrRP SEQ ID表

SEQ	肽序列
103	TCDINPAWCTGRGIRPVGRF-NH2
104	TPCINPAWYCGRGIRPVGRF-NH2
105	TPDCNPAWYTCRGIRPVGRF-NH2
83	TPDICPAWYTGCGIRPVGRF-NH2
84	TPDINCAWYTGRCIRPVGRF-NH2
85	TPDINPCWYTGRGCRPVGRF-NH2
86	TPDINPACYTGRGICPVGRF-NH2
87	TPDINPAWCTGRGIRCVGRF-NH2
88	TPDINPAWYCGRGIRPCGRF-NH2
89	CRAHQHSCETRTPDINPAWYTGRGIRPVGRF-NH2
90	SRAHQCSMETRTCDINPAWYTGRGIRPVGRF-NH2
91	SRAHQHSMCTRTPDICPAWYTGRGIRPVGRF-NH2
92	SRAHQHSMETRTCDINPAWCTGRGIRPVGRF-NH2
93	SRAHQHSMETRTPDCNPAWYTCRGIRPVGRF-NH2
94	SRAHQHSMETRTPDICPAWYTGCGIRPVGRF-NH2
95	SRAHQHSMETRTPDINPCWYTGRGCRPVGRF-NH2
96	SRAHQHSMETRTPDINPAWCTGRGIRCVGRF-NH2
97	SRAHQCS-**Nle**-ETRTCDINPAWYTG-**hArg**-GIRPVGRF-NH2

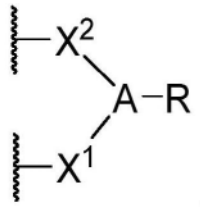
SEQ	肽序列
98	SRAHQCS-**Nle**-ETRTCDINPAWYTG-**β-hArg**-GIRPVGRF-NH2
99	SRAHQCS-**Nle**-ETRTCDINPAWYTG-**NMe-Arg**-GIRPVGRF-NH2
100	SRAHQCS-**Nle**-ETRTCDINPAWYTGRGIRPVG-**hArg**-F-NH2
101	SRAHQCS-**Nle**-ETRTCDINPAWYTGRGIRPVG-**β-hArg**-F-NH2
102	SRAHQCS-**Nle**-ETRTCDINPAWYTGRGIRPVG-**NMe-Arg**-F-NH2
106	TPDINPAWYTGRGIRPVGRF-NH2
107	SRAHQHSMETRTPDINPAWYTGRGIRPVGRF-NH2

Ac =  ; Ahx =  ; Aib =  ; β-hArg =  ;异戊酰基=  ;N-MeR =  ; Orn =  ; Pqa =  ; Nle =  。

钉合体

[0160] 本文公开了包含钉合体的肽缀合物。

[0161] 在一些实施方案中,与肽连接的钉合体为式(I)的化合物:



式(I)

其中：

A为任选取代的亚烷基、任选取代的亚芳基、任选取代的杂亚芳基、任选取代的-NR^3-亚烷基-NR^3-或-N-；

X^1和X^2独立地为键、-C(=O)-、-亚烷基-C(=O)-、-C(=O)-亚烷基-、-亚烷基-C(=O)NR^3-、-亚烷基-NR^3C(=O)-、-C(=O)NR^3-亚烷基-、-NR^3C(=O)-亚烷基-、-亚烷基-C(=O)NR^3-亚烷基-或-亚烷基-NR^3C(=O)-亚烷基-；

其中X^1与肽的第一氨基酸连接，且X^2与肽的第二氨基酸连接；

R为氢或-$(L)_s$-Y；

每个L独立地为-$(CR^1R^2)_v$-、-亚烷基-O-、-O-亚烷基-、-C(=O)-亚烷基-、-亚烷基-C(=O)-、-NR^3-亚烷基-、-亚烷基-NR^3-、-S-亚烷基-、-亚烷基-S-、-S(=O)-亚烷基-、-亚烷基-S(=O)-、-$S(=O)_2$-亚烷基、-亚烷基-$S(=O)_2$-、-C(=O)-、-C(=O)NR^3-、-NR^3C(=O)-、-NR^3C(=O)NR^3-、-NR^3C(=O)NR^3-亚烷基-、-NR^3C(=O)-亚烷基-NR^3-、-亚烷基-C(=O)NR^3-、-C(=O)NR^3-亚烷基-、-亚烷基-NR^3C(=O)-或-NR^3C(=O)-亚烷基-；

v为2-20；

R^1或R^2各自独立地为氢、卤素、-CN、-OR^a、-SR^a、-S(=O)R^b、-NO_2、-NR^cR^d、-$S(=O)_2R^d$、-$NR^aS(=O)_2R^d$、-$S(=O)_2NR^cR^d$、-C(=O)R^b、-OC(=O)R^b、-CO_2R^a、-OCO_2R^a、-C(=O)NR^cR^d、-OC(=O)NR^cR^d、-$NR^aC(=O)NR^cR^d$、-$NR^aC(=O)R^b$、-$NR^aC(=O)OR^a$、C_1-C_6烷基、C_2-C_6烯基、C_2-C_6炔基、C_1-C_6杂烷基、C_3-C_8环烷基、C_2-C_8杂环烷基、芳基或杂芳基；其中烷基、烯基、炔基和杂烷基任选地被卤素、-OR^a或-NR^cR^d中的一个、两个或三个取代；并且环烷基、杂环烷基、芳基和杂芳基任选地被卤素、C_1-C_6烷基、C_1-C_6卤代烷基、-OR^a、-NR^cR^d中的一个、两个或三个取代；

或R^1和R^2一起形成C_1-C_6环烷基或C_1-C_6杂环烷基；

每个R^3独立地为氢、-S(=O)R^b、-$S(=O)_2R^a$、-$S(=O)_2NR^cR^d$、-C(=O)R^b、-CO_2R^a、-C(=O)NR^cR^d、C_1-C_6烷基、C_2-C_6烯基、C_2-C_6炔基、C_1-C_6杂烷基、C_3-C_8环烷基、C_2-C_8杂环烷基、芳基或杂芳基；其中烷基、烯基、炔基和杂烷基任选地被卤素、-OR^a或-NR^cR^d中的一个、两个或三个取代；并且环烷基、杂环烷基、芳基和杂芳基任选地被卤素、C_1-C_6烷基、C_1-C_6卤代烷基、-OR^a或-NR^cR^d中的一个、两个或三个取代；

Y为氢、C_1-C_6烷基、-CO_2H、-CO_2(C_1-C_6烷基)、-CO_2NH_2、-CO_2N(烷基)$_2$或-CO_2NH(烷基)；以及

s为0-20；

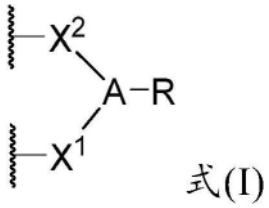
R^a为氢、C_1-C_6烷基、C_2-C_6烯基、C_2-C_6炔基、C_1-C_6杂烷基、C_3-C_8环烷基、C_2-C_8杂环烷基、芳基或杂芳基；其中烷基、烯基、炔基和杂烷基任选地被卤素、-OH、-OMe或-NH_2中的一个、两个或三个取代；并且环烷基、杂环烷基、芳基和杂芳基任选地被卤素、C_1-C_6烷基、C_1-C_6卤代烷基、-OH、-OMe或-NH_2中的一个、两个或三个取代；

R^b为C_1-C_6烷基、C_2-C_6烯基、C_2-C_6炔基、C_1-C_6杂烷基、C_3-C_8环烷基、C_2-C_8杂环烷基、芳基或杂芳基;其中烷基、烯基、炔基和杂烷基任选地被卤素、-OH、-OMe或-NH_2中的一个、两个或三个取代;并且环烷基、杂环烷基、芳基和杂芳基任选地被卤素、C_1-C_6烷基、C_1-C_6卤代烷基、-OH、-OMe或-NH_2中的一个、两个或三个取代;

R^c和R^d各自独立地为氢、C_1-C_6烷基、C_2-C_6烯基、C_2-C_6炔基、C_1-C_6杂烷基、C_3-C_8环烷基、C_2-C_8杂环烷基、芳基或杂芳基;其中烷基、烯基、炔基和杂烷基任选地被卤素、-OH、-OMe或-NH_2中的一个、两个或三个取代;并且环烷基、杂环烷基、芳基和杂芳基任选地被卤素、C_1-C_6烷基、C_1-C_6卤代烷基、-OH、-OMe或-NH_2中的一个、两个或三个取代;

或者R^c和R^d与它们所连接的氮原子一起形成杂环烷基或杂芳基;其中杂环烷基和杂芳基任选地被卤素、C_1-C_6烷基、C_1-C_6卤代烷基、-OH、-OMe或-NH_2中的一个、两个或三个取代。

[0162] 在一些实施方案中,与肽连接的钉合体为式(I)的化合物:



式(I)

其中:

A为-N-;

X^1和X^2为键、-C(=O)-、-亚烷基-C(=O)-、-C(=O)-亚烷基-、-亚烷基-C(=O)NR^3-、-亚烷基-NR^3C(=O)-、-C(=O)NR^3-亚烷基-、-NR^3C(=O)-亚烷基-、-亚烷基-C(=O)NR^3-亚烷基-或-亚烷基-NR^3C(=O)-亚烷基-;

其中X^1与肽的第一氨基酸连接,X^2与肽的第二氨基酸连接,且X^1和X^2相同;

R为氢或-$(L)_s$-Y;

每个L独立地为-$(CR^1R^2)_v$-、-亚烷基-O-、-O-亚烷基-、-C(=O)-亚烷基-、-亚烷基-C(=O)-、-NR^3-亚烷基-、-亚烷基-NR^3-、-S-亚烷基-、-亚烷基-S-、-S(=O)-亚烷基-、-亚烷基-S(=O)-、-S(=O)$_2$-亚烷基、-亚烷基-S(=O)$_2$-、-C(=O)-、-C(=O)NR^3-、-NR^3C(=O)-、-NR^3C(=O)NR^3-、-NR^3C(=O)NR^3-亚烷基-、-NR^3C(=O)-亚烷基-NR^3-、-亚烷基-C(=O)NR^3-、-C(=O)NR^3-亚烷基-、-亚烷基-NR^3C(=O)-或-NR^3C(=O)-亚烷基-;

v为2-20;

R^1或R^2各自独立地为氢、卤素、-CN、-OR^a、-SR^a、-S(=O)R^b、-NO_2、-NR^cR^d、-S(=O)$_2R^d$、-NR^aS(=O)$_2R^d$、-S(=O)$_2NR^cR^d$、-C(=O)R^b、-OC(=O)R^b、-CO_2R^a、-OCO_2R^a、-C(=O)NR^cR^d、-OC(=O)NR^cR^d、-NR^aC(=O)NR^cR^d、-NR^aC(=O)R^b、-NR^aC(=O)OR^a、C_1-C_6烷基、C_2-C_6烯基、C_2-C_6炔基、C_1-C_6杂烷基、C_3-C_8环烷基、C_2-C_8杂环烷基、芳基或杂芳基;其中烷基、烯基、炔基和杂烷基任选地被卤素、-OR^a或-NR^cR^d中的一个、两个或三个取代;并且环烷基、杂环烷基、芳基和杂芳基任选地被卤素、C_1-C_6烷基、C_1-C_6卤代烷基、-OR^a或-NR^cR^d中的一个、两个或三个取代;

或R^1和R^2一起形成C_1-C_6环烷基或C_1-C_6杂环烷基;

每个R^3独立地为氢、-S(=O)R^b、-S(=O)$_2R^a$、-S(=O)$_2NR^cR^d$、-C(=O)R^b、-CO_2R^a、-C

(=O)NR^cR^d、C_1-C_6烷基、C_2-C_6烯基、C_2-C_6炔基、C_1-C_6杂烷基、C_3-C_8环烷基、C_2-C_8杂环烷基、芳基或杂芳基;其中烷基、烯基、炔基和杂烷基任选地被卤素、-OR^a或-NR^cR^d中的一个、两个或三个取代;并且环烷基、杂环烷基、芳基和杂芳基任选地被卤素、C_1-C_6烷基、C_1-C_6卤代烷基、-OR^a或-NR^cR^d中的一个、两个或三个取代;

Y为氢、C_1-C_6烷基、-CO_2H、-CO_2(C_1-C_6烷基)、-CO_2NH_2、-CO_2N(烷基)$_2$或-CO_2NH(烷基);

s为0-20;

R^a为氢、C_1-C_6烷基、C_2-C_6烯基、C_2-C_6炔基、C_1-C_6杂烷基、C_3-C_8环烷基、C_2-C_8杂环烷基、芳基或杂芳基;其中烷基、烯基、炔基和杂烷基任选地被卤素、-OH、-OMe或-NH_2中的一个、两个或三个取代;并且环烷基、杂环烷基、芳基和杂芳基任选地被卤素、C_1-C_6烷基、C_1-C_6卤代烷基、-OH、-OMe或-NH_2中的一个、两个或三个取代;

R^b为C_1-C_6烷基、C_2-C_6烯基、C_2-C_6炔基、C_1-C_6杂烷基、C_3-C_8环烷基、C_2-C_8杂环烷基、芳基或杂芳基;其中烷基、烯基、炔基和杂烷基任选地被卤素、-OH、-OMe或-NH_2中的一个、两个或三个取代;并且环烷基、杂环烷基、芳基和杂芳基任选地被卤素、C_1-C_6烷基、C_1-C_6卤代烷基、-OH、-OMe或-NH_2中的一个、两个或三个取代;以及

R^c和R^d各自独立地为氢、C_1-C_6烷基、C_2-C_6烯基、C_2-C_6炔基、C_1-C_6杂烷基、C_3-C_8环烷基、C_2-C_8杂环烷基、芳基或杂芳基;其中烷基、烯基、炔基和杂烷基任选地被卤素、-OH、-OMe或-NH_2中的一个、两个或三个取代;并且环烷基、杂环烷基、芳基和杂芳基任选地被卤素、C_1-C_6烷基、C_1-C_6卤代烷基、-OH、-OMe或-NH_2中的一个、两个或三个取代;

或者R^c和R^d与它们所连接的氮原子一起形成杂环烷基或杂芳基;其中杂环烷基和杂芳基任选地被卤素、C_1-C_6烷基、C_1-C_6卤代烷基、-OH、-OMe或-NH_2中的一个、两个或三个取代。

[0163] 在一些实施方案中,A为任选取代的亚烷基。在一些实施方案中,A为-$(CH_2)_t$-,其中t为1-12。在一些实施方案中,A为-$(CH_2)_t$-,其中t为1-10。在一些实施方案中,A为-$(CH_2)_t$-,其中t为1-8。在一些实施方案中,A为-$(CH_2)_t$-,其中t为1-6。在一些实施方案中,A为-$(CH_2)_t$-,其中t为1-4。

[0164] 在一些实施方案中,A为任选取代的亚芳基。在一些实施方案中,A为任选地被卤素、烷基或卤代烷基取代的亚芳基。在一些实施方案中,A为未取代的亚芳基。

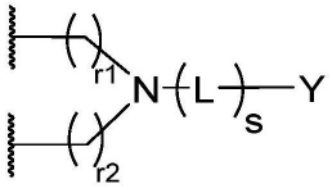
[0165] 在一些实施方案中,A为-NR^3-亚烷基-NR^3-。在一些实施方案中,A为-N-。

[0166] 在一些实施方案中,X^1和X^2相同。在一些实施方案中,X^1和X^2不同。

[0167] 在一些实施方案中,X^1和X^2为-C(=O)-。在一些实施方案中,X^1和X^2独立地为-亚烷基-C(=O)-或-C(=O)亚烷基-。在一些实施方案中,X^1和X^2独立地为-CH_2-C(=O)-或-C(=O)-CH_2-。在一些实施方案中,X^1和X^2独立地为-亚烷基-C(=O)NR^3或-C(=O)NR^3-亚烷基-。在一些实施方案中,X^1和X^2独立地为-CH_2-C(=O)NR^3-或-C(=O)NR^3-CH_2-。在一些实施方案中,X^1和X^2独立地为-亚烷基-C(=O)NR^3-亚烷基-或-亚烷基-NR^3C(=O)-亚烷基-。在一些实施方案中,X^1和X^2独立地为CH_2-C(=O)NR^3-CH_2CH_2-或-CH_2-NR^3C(=O)-CH_2CH_2-。在一些实施方案中,X^1和X^2独立地为-CH_2-C(=O)NH-CH_2CH_2-或-CH_2-NHC(=O)-CH_2CH_2-。

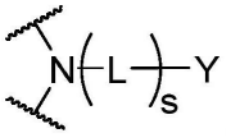
[0168] 在一些实施方案中,每个R^3独立地为氢或C_1-C_6烷基。在一些实施方案中,R^3各自为氢。

[0169] 在一些实施方案中,>A-R具有以下结构:

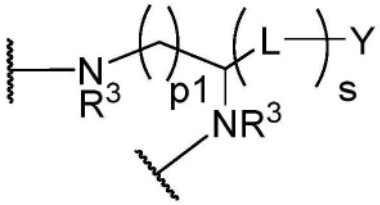

其中r1和r2各自独立地为0-4。

[0170] 在一些实施方案中，r1和r2各自独立地为0-2。在一些实施方案中，r1和r2各自为0。在一些实施方案中，r1和r2各自为1。在一些实施方案中，r1和r2各自为3。在一些实施方案中，r1和r2各自为2。

[0171] 在一些实施方案中，>A-R具有以下结构：

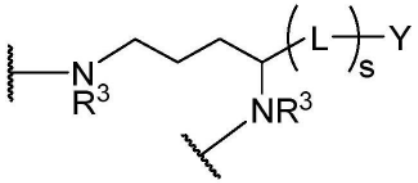


[0172] 在一些实施方案中，>A-R具有以下结构：

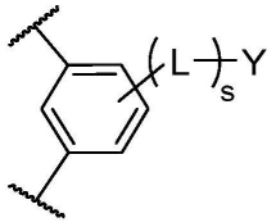

其中p1为1-5。

[0173] 在一些实施方案中，p1为1-3。在一些实施方案中，p1为1-2。在一些实施方案中，p1为1。在一些实施方案中，p1为2。在一些实施方案中，p1为3。在一些实施方案中，p1为4。在一些实施方案中，p1为5。

[0174] 在一些实施方案中，>A-R具有以下结构：



[0175] 在一些实施方案中，>A-R具有以下结构：



[0176] 在一些实施方案中，s为1-15。在一些实施方案中，s为1-10。在一些实施方案中，s为5-15。在一些实施方案中，s为5-10。在一些实施方案中，s为5-20。

[0177] 在一些实施方案中，Y为氢或-CO_2H。在一些实施方案中，Y为氢。在一些实施方案中，Y为-CO_2H。

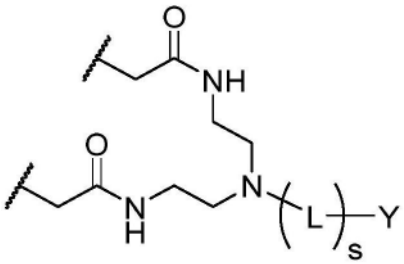
[0178] 在一些实施方案中，每个L独立地为-$(CR^1R^2)_v$-、-亚烷基-O-、-C(=O)-、-C(=O)NR^3-、-NR^3C(=O)-、-亚烷基-C(=O)NR^3-或-亚烷基-NR^3C(=O)-；且v为2-20。

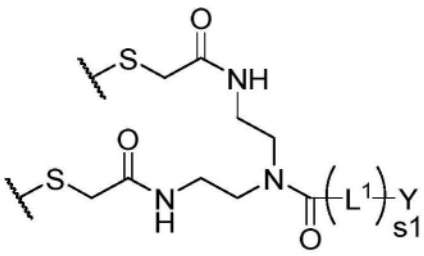
[0179] 在一些实施方案中，每个L独立地为-$(CR^1R^2)_v$-、-亚烷基-O-、-C(=O)-、-C(=O)NR^3-、-NR^3C(=O)-、-亚烷基-C(=O)NR^3-或-亚烷基-NR^3C(=O)-；且v为2-16。

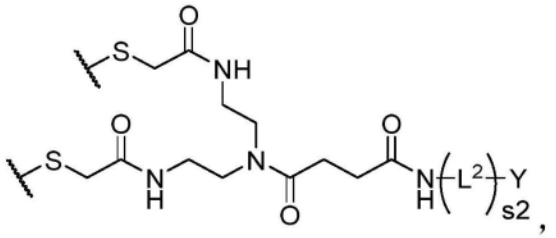
[0180] 在一些实施方案中，v为2-16。在一些实施方案中，v为2-5。在一些实施方案中，v为5-16。在一些实施方案中，v为5或16。在一些实施方案中，v为2或16。

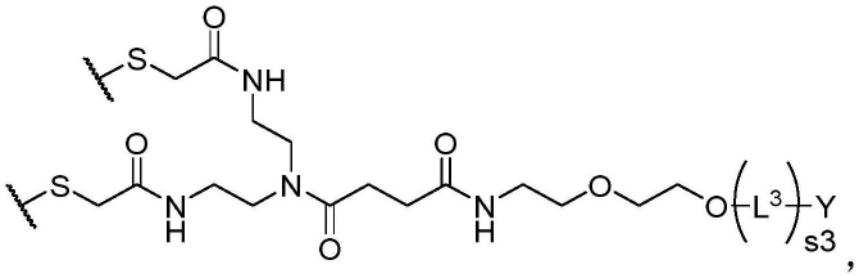
[0181] 在一些实施方案中，R^1或R^2各自独立地为氢、卤素、-CN、-OR^a、-NR^cR^d、-C(=O)R^b、-CO_2R^a、-C(=O)NR^cR^d或C_1-C_6烷基。

[0182] 在一些实施方案中，R^1或R^2各自独立地为氢、卤素、-CO_2R^a、-C(=O)NR^cR^d或C_1-C_6烷基。在一些实施方案中，R^1或R^2各自独立地为氢、-CO_2R^a、或-C(=O)NR^cR^d.在一些实施方案中，R^1或R^2各自独立地为氢或-CO_2R^a。

[0183] 在一些实施方案中，钉合体为 。

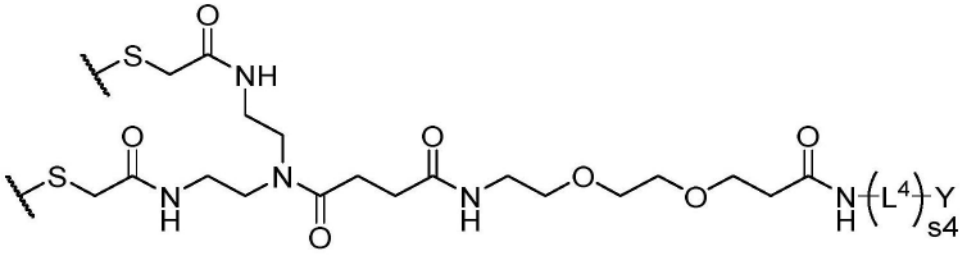
[0184] 在一些实施方案中，与肽连接的钉合体为 ，其中每个L^1独立地为-$(CR^1R^2)_v$-、-亚烷基-O-、-O-亚烷基-、-C(=O)NR^3-、-NR^3C(=O)-、-亚烷基-C(=O)NR^3-或-亚烷基-NR^3C(=O)-；v为2-20；且s1为1-15。

[0185] 在一些实施方案中，与肽连接的钉合体为 ，其中每个L^2独立地为-$(CR^1R^2)_v$-、-亚烷基-O-、-O-亚烷基-、-C(=O)NR^3-、-NR^3C(=O)-、-亚烷基-C(=O)NR^3-或-亚烷基-NR^3C(=O)-；v为2-20；且s2为1-15。

[0186] 在一些实施方案中，与肽连接的钉合体为 ，其中每个L^3独立地为-

$(CR^1R^2)_v$-、-亚烷基-O-、-O-亚烷基-、-C(=O)NR^3-、-NR^3C(=O)-、-亚烷基-C(=O)NR^3-或-亚烷基-NR^3C(=O)-；v为2-20；且s3为1-15。

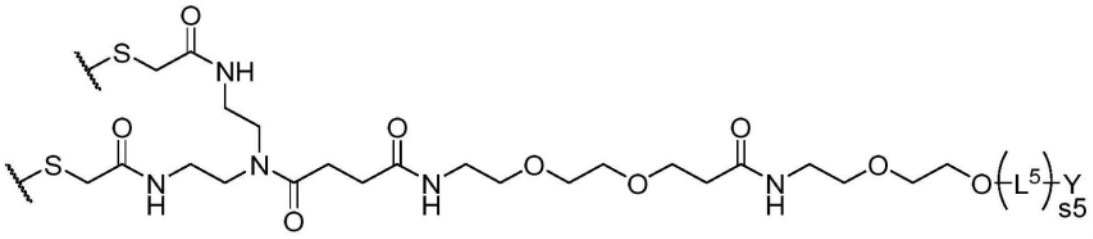
[0187] 在一些实施方案中，与肽连接的钉合体为



其中每个

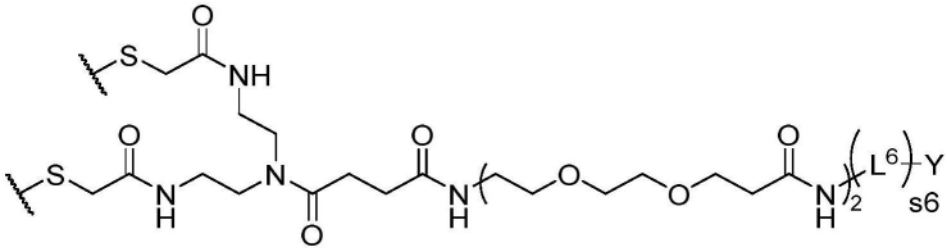
L^4独立地为-$(CR^1R^2)_v$-、-亚烷基-O-、-O-亚烷基-、-C(=O)NR^3-、-NR^3C(=O)-、-亚烷基-C(=O)NR^3-或-亚烷基-NR^3C(=O)-；v为2-20；且s4为1-15。

[0188] 在一些实施方案中，与肽连接的钉合体为



其中每个L^5独立地为-$(CR^1R^2)_v$-、-C(=O)NR^3-、-NR^3C(=O)-、-亚烷基-C(=O)NR^3-或-亚烷基-NR^3C(=O)-；v为2-20；且s5为1-10。

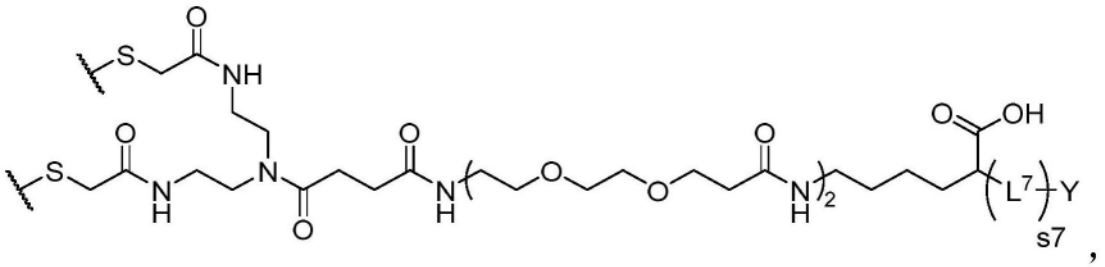
[0189] 在一些实施方案中，与肽连接的钉合体为



其中每个

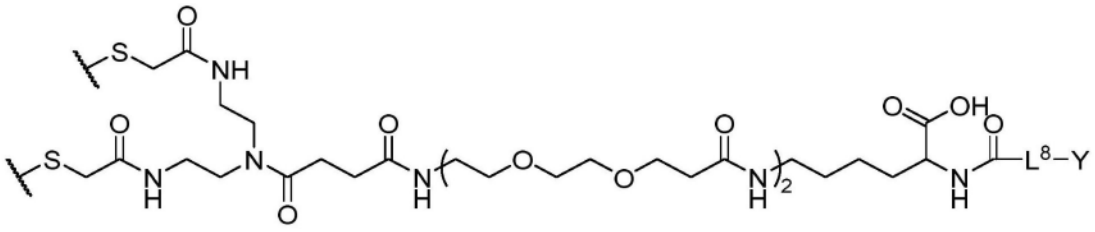
L^6独立地为-$(CR^1R^2)_v$-、-C(=O)NR^3-、-NR^3C(=O)-、-亚烷基-C(=O)NR^3-或-亚烷基-NR^3C(=O)-；v为2-20；且s6为1-5。

[0190] 在一些实施方案中，与肽连接的钉合体为



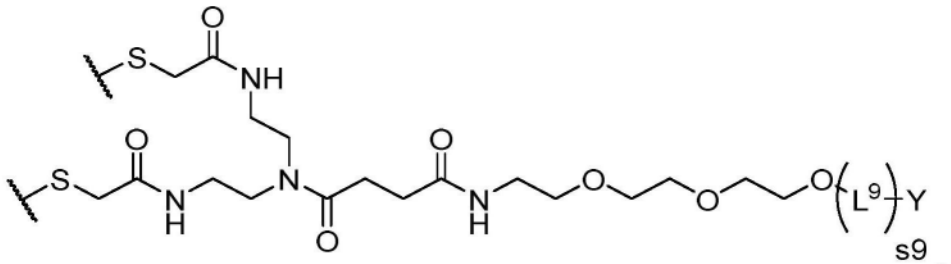
其中每个L^7独立地为-$(CR^1R^2)_v$-、-C(=O)NR^3-或-NR^3C(=O)-；v为2-20；且s7为1-5。

[0191] 在一些实施方案中，与肽连接的钉合体为



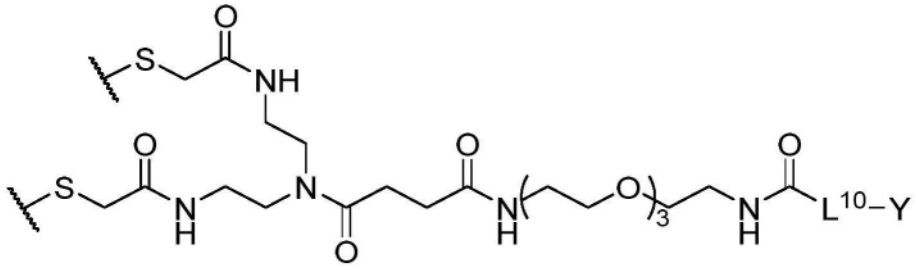
其中L^8为-$(CR^1R^2)_v$-且v为10-20。

[0192] 在一些实施方案中,与肽连接的钉合体为



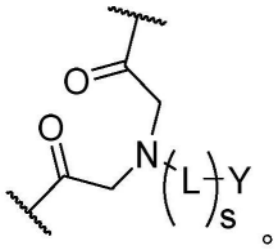
其中每个L^9独立地为-$(CR^1R^2)_v$-、-C(=O)NR^3-、-NR^3C(=O)-、-亚烷基-C(=O)NR^3-或-亚烷基-NR^3C(=O)-;v为2-20;且s9为1-5。

[0193] 在一些实施方案中,与肽连接的钉合体为



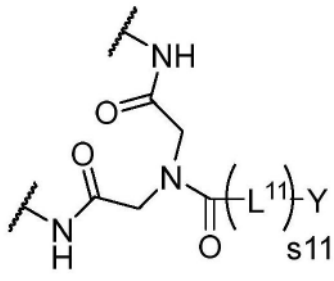
其中L^{10}为-$(CR^1R^2)_v$-且v为10-20。

[0194] 在一些实施方案中,与肽连接的钉合体为

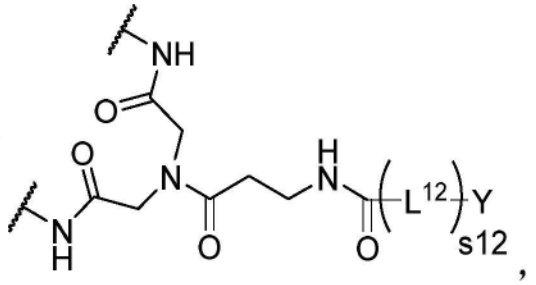


。

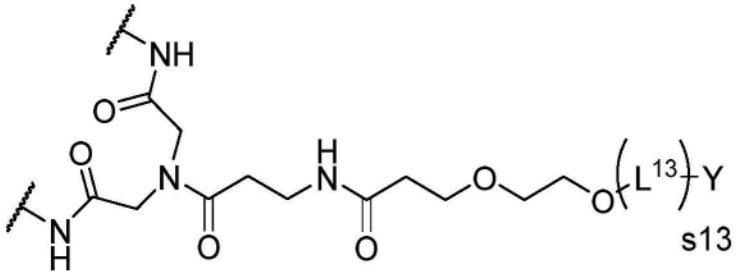
[0195] 在一些实施方案中,与肽连接的钉合体为



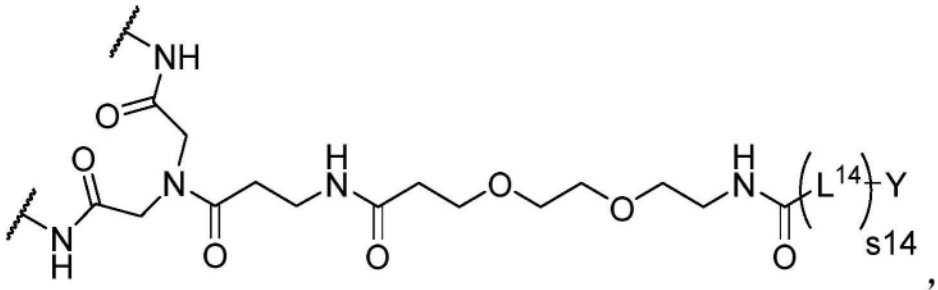
其中每个L^{11}独立地为-$(CR^1R^2)_v$-、-亚烷基-O-、-O-亚烷基-、-C(=O)NR^3-、-NR^3C(=O)-、-亚烷基-C(=O)NR^3-或-亚烷基-NR^3C(=O)-;v为2-20;且s11为1-15。

[0196] 在一些实施方案中，与肽连接的钉合体为 

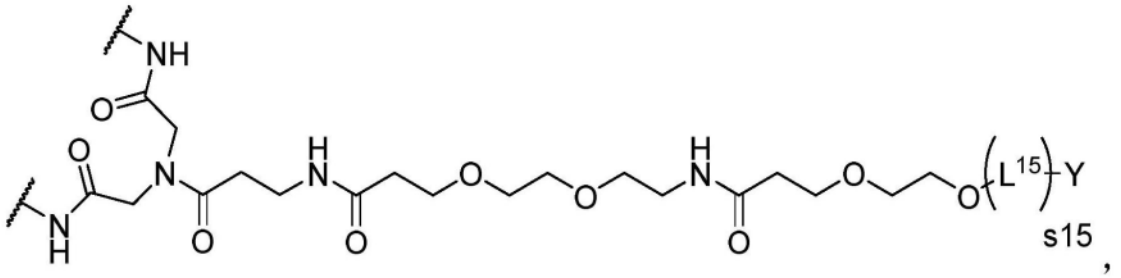
其中每个L^{12}独立地为-$(CR^1R^2)_v$-、-亚烷基-O-、-O-亚烷基-、-C(=O)NR^3-、-NR^3C(=O)-、-亚烷基-C(=O)NR^3-或-亚烷基-NR^3C(=O)-；v为2-20；且s12为1-15。

[0197] 在一些实施方案中，与肽连接的钉合体为 

其中每个L^{13}独立地为-$(CR^1R^2)_v$-、-亚烷基-O-、-O-亚烷基-、-C(=O)NR^3-、-NR^3C(=O)-、-亚烷基-C(=O)NR^3-或-亚烷基-NR^3C(=O)-；v为2-20；且s13为1-15。

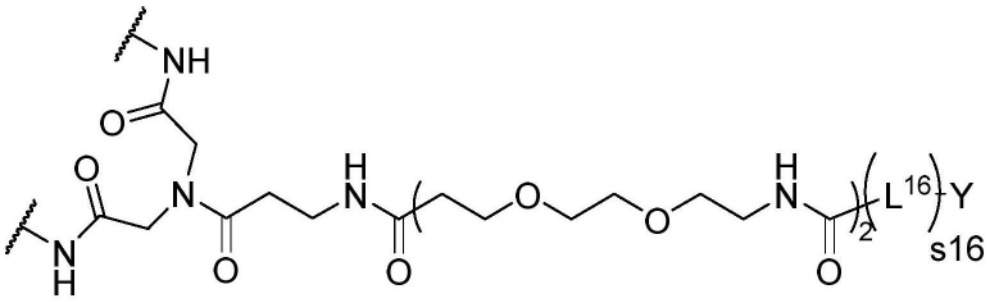
[0198] 在一些实施方案中，与肽连接的钉合体为 

其中每个L^{14}独立地为-$(CR^1R^2)_v$-、-亚烷基-O-、-O-亚烷基-、-C(=O)NR^3-、-NR^3C(=O)-、-亚烷基-C(=O)NR^3-或-亚烷基-NR^3C(=O)-；v为2-20；且s14为1-15。

[0199] 在一些实施方案中，与肽连接的钉合体为 

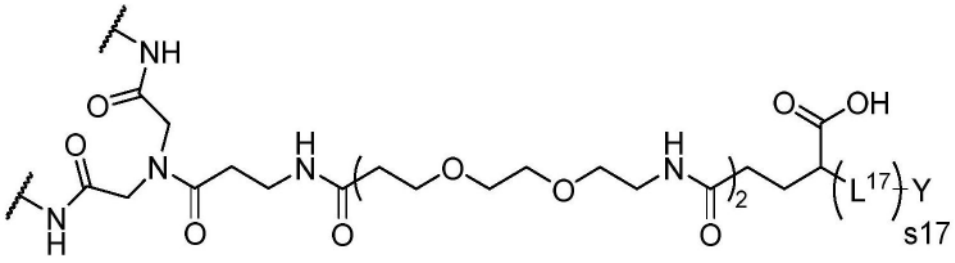
其中每个L^{15}独立地为-$(CR^1R^2)_v$-、-C(=O)NR^3-、-NR^3C(=O)-、-亚烷基-C(=O)NR^3-或-亚烷基-NR^3C(=O)-；v为2-20；且s15为1-10。

[0200] 在一些实施方案中，与肽连接的钉合体为



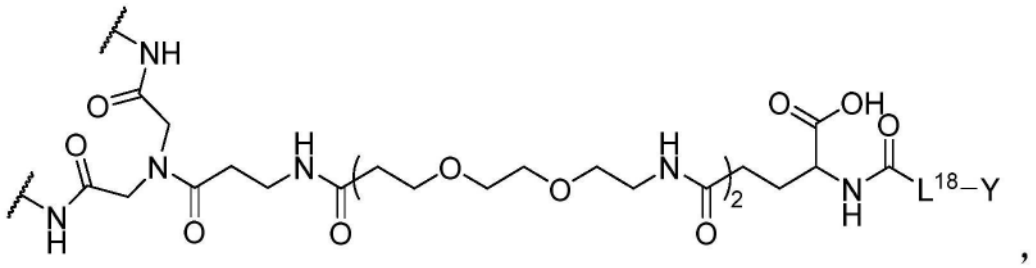
其中每个L^{16}独立地为-$(CR^1R^2)_v$-、-C(=O)NR^3-或-NR^3C(=O)-;v为2-20;且s16为1-5。

[0201] 在一些实施方案中,与肽连接的钉合体为



其中每个L^{17}独立地为-$(CR^1R^2)_v$-、-C(=O)NR^3-或-NR^3C(=O)-;v为2-20;且s17为1-5。

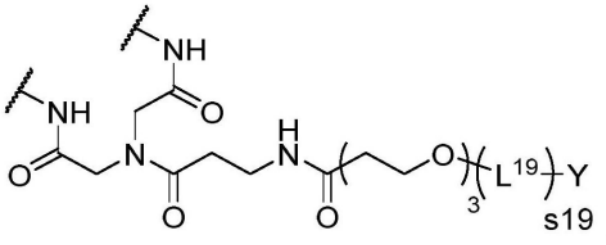
[0202] 在一些实施方案中,与肽连接的钉合体为



其中

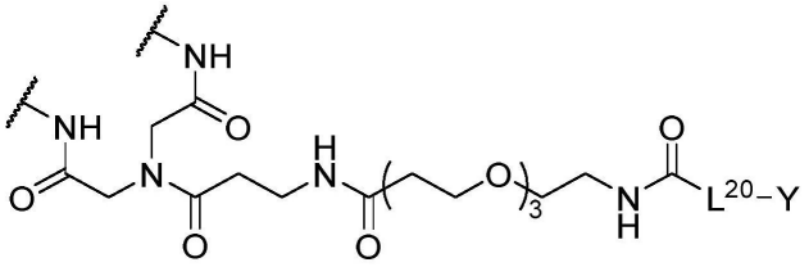
L^{18}为-$(CR^1R^2)_v$-且v为10-20。

[0203] 在一些实施方案中,与肽连接的钉合体为



其中每个$L1^9$独立地为-$(CR^1R^2)_v$-、-C(=O)NR^3-、-NR^3C(=O)-、-亚烷基-C(=O)NR^3-或-亚烷基-NR^3C(=O)-;v为2-20;且s19为1-5。

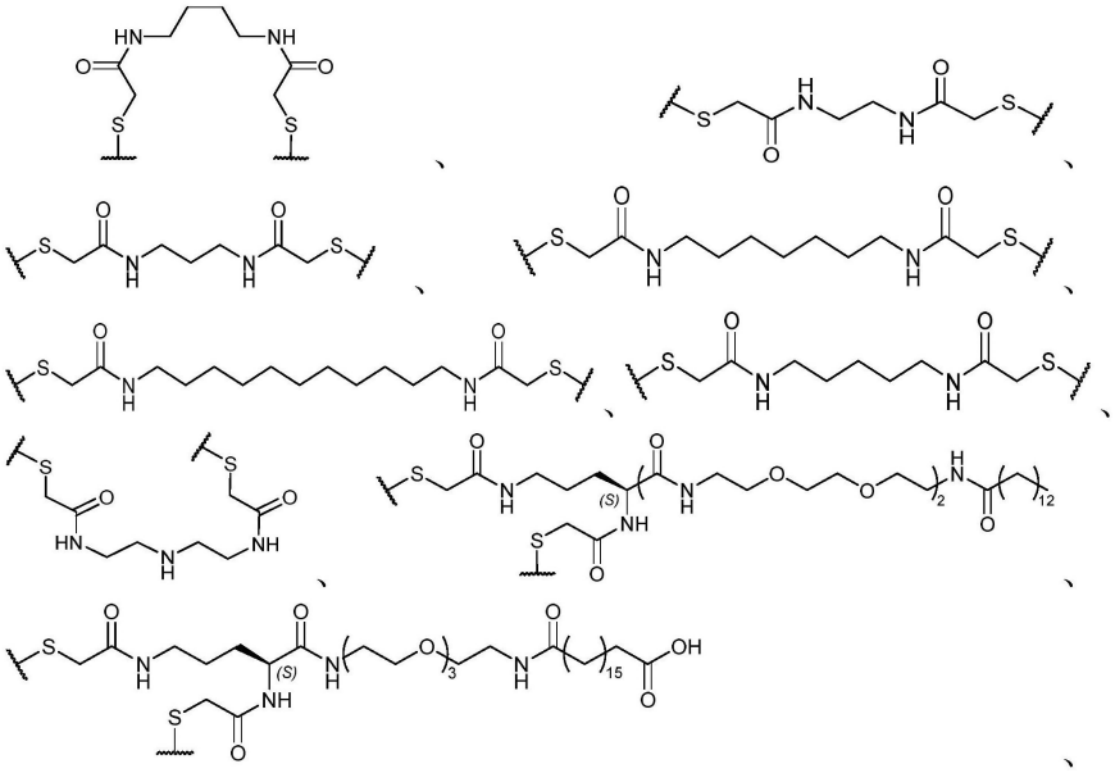
[0204] 在一些实施方案中,与肽连接的钉合体为

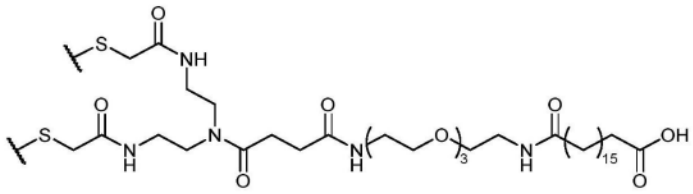


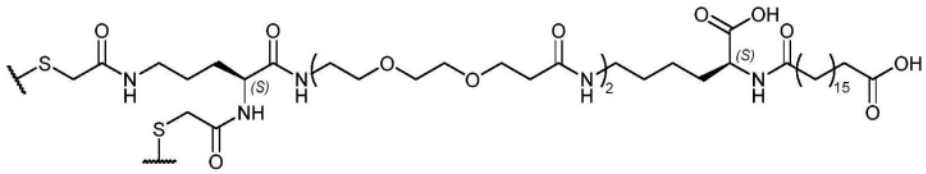
其中L^{20}为-$(CR^1R^2)_v$-

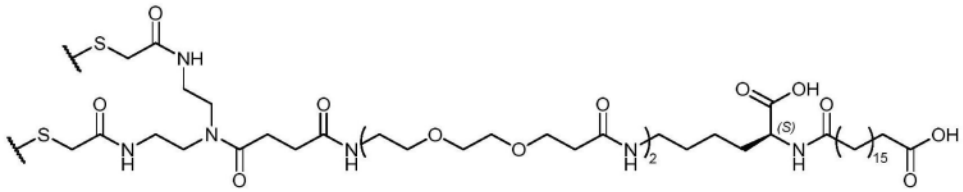
且v为10-20。

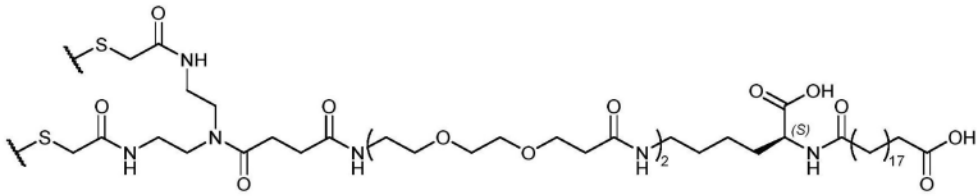
[0205] 在一些实施方案中，与肽连接的钉合体为：

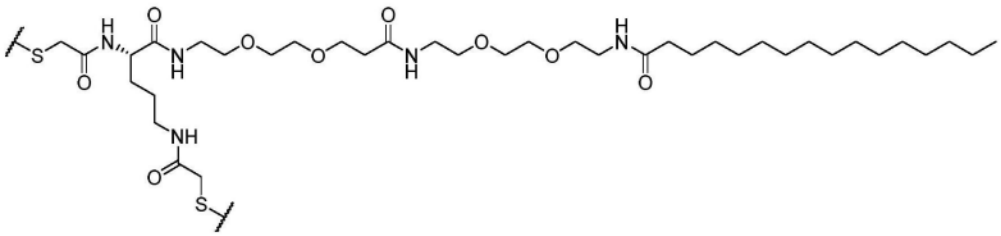


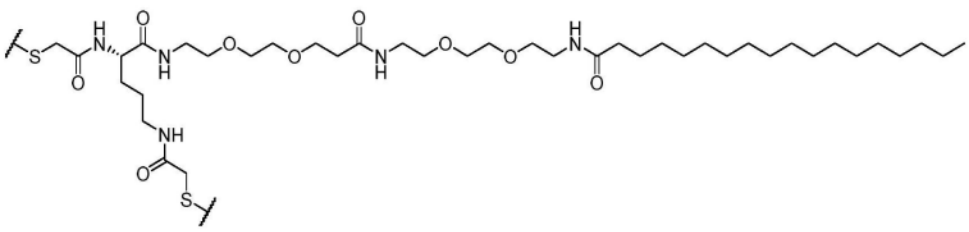


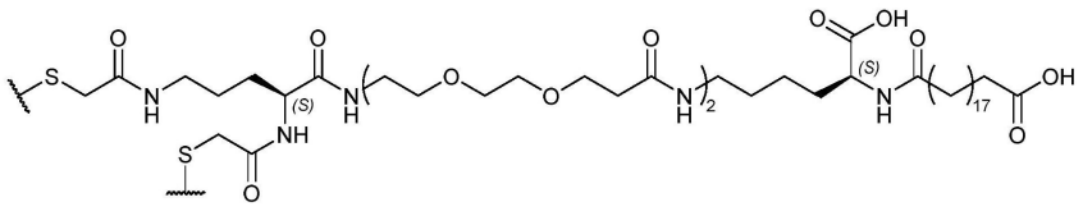


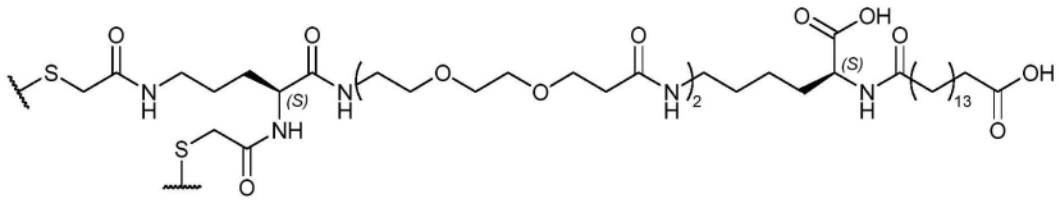


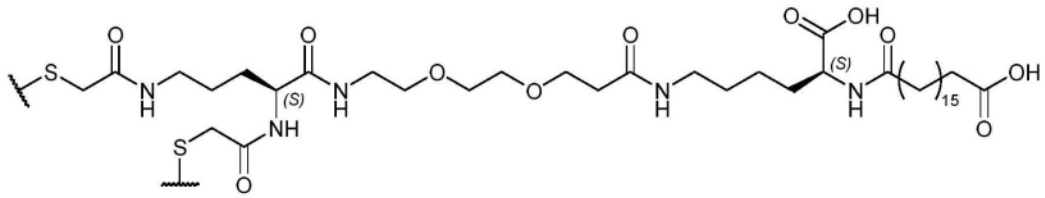


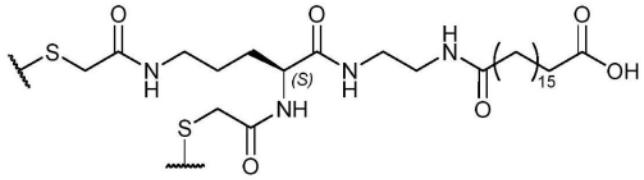


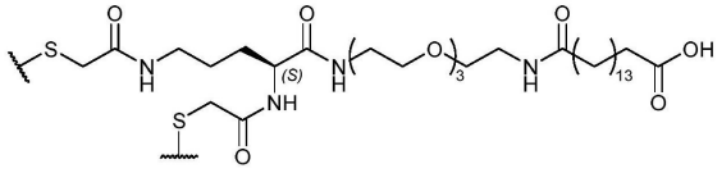


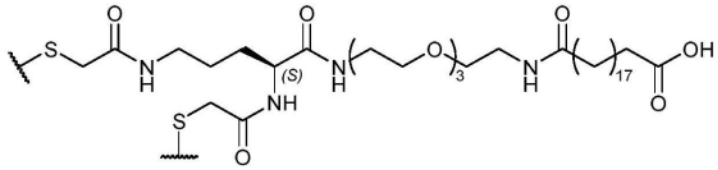


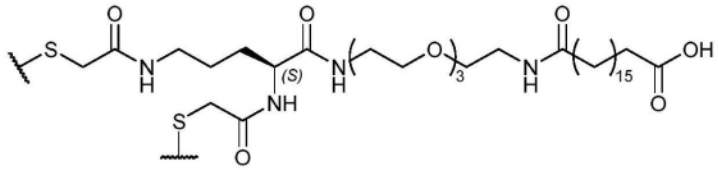


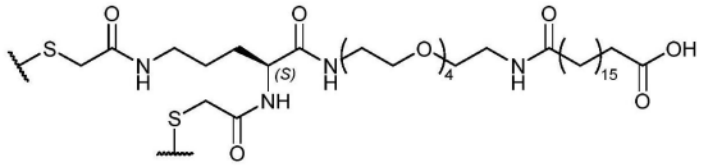


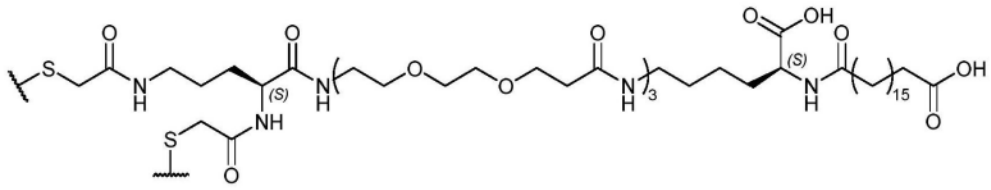


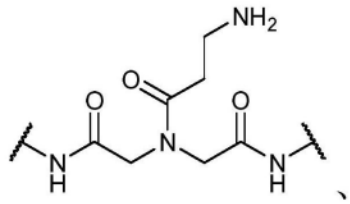


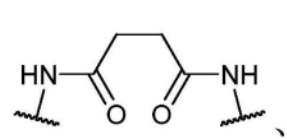


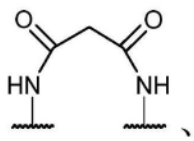


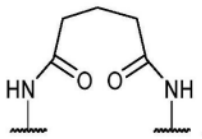


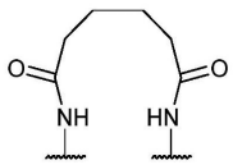


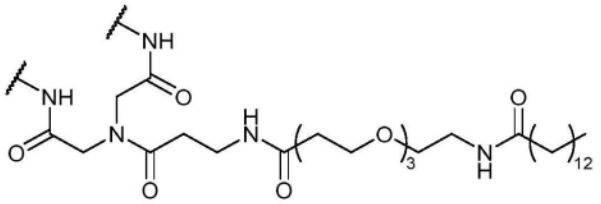


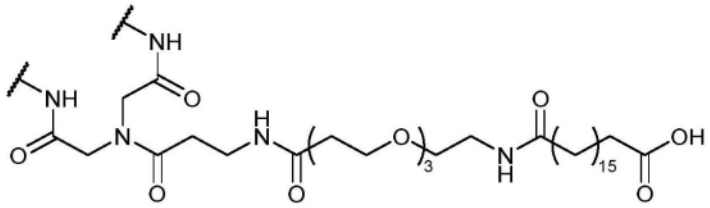




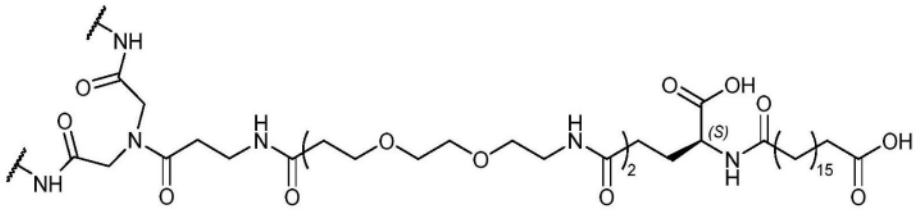




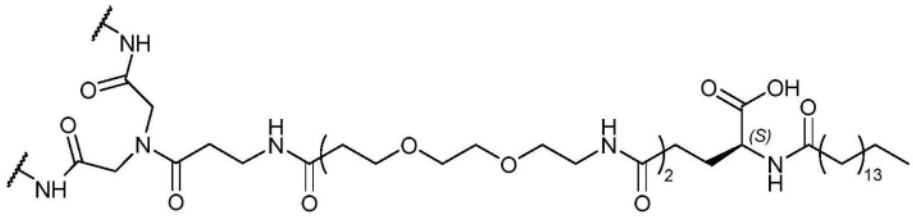




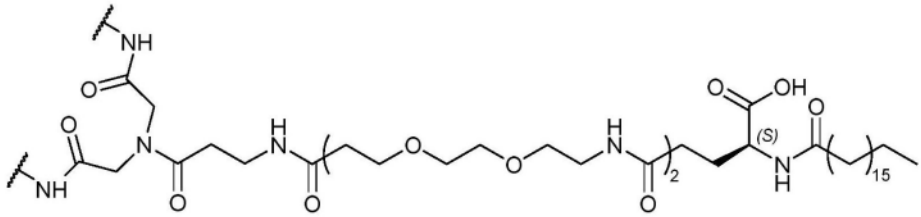
、



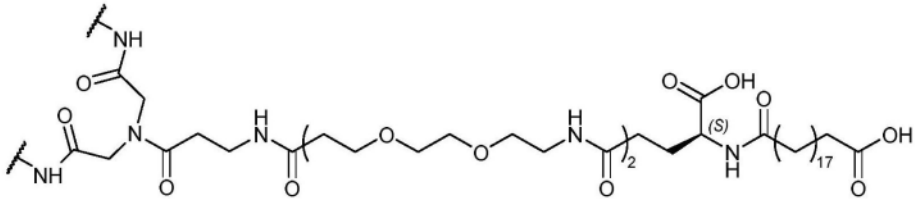
、



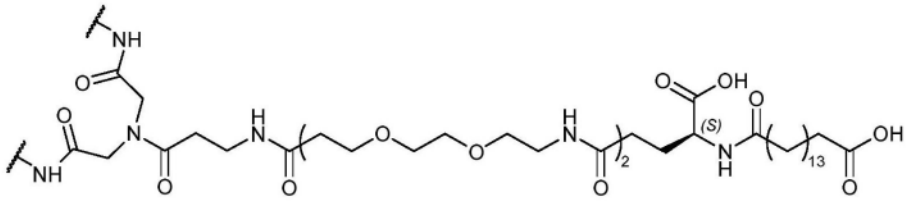
、



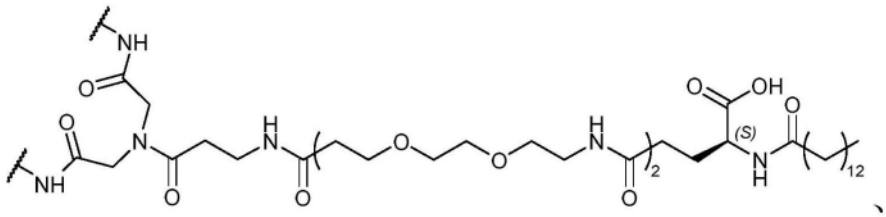
、



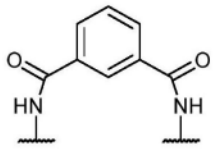
、

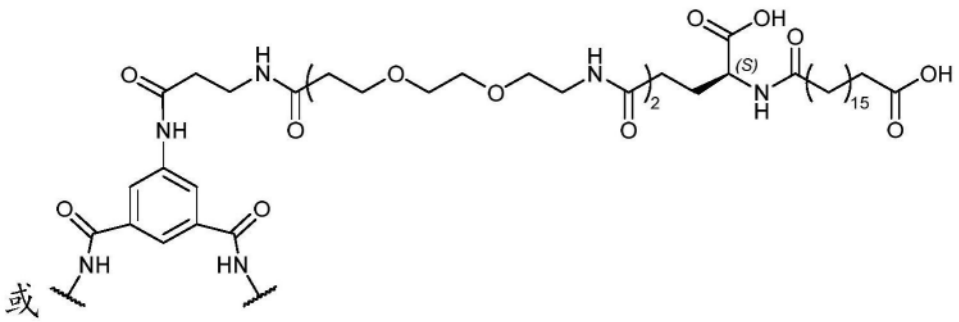


、



、



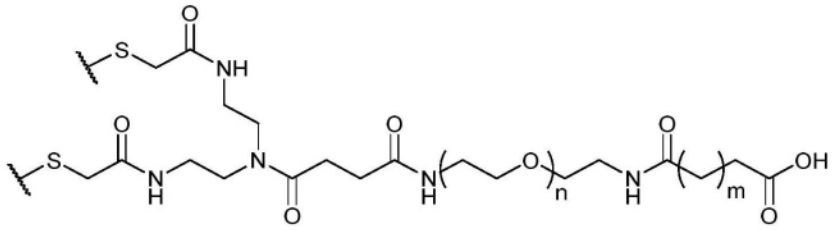


或

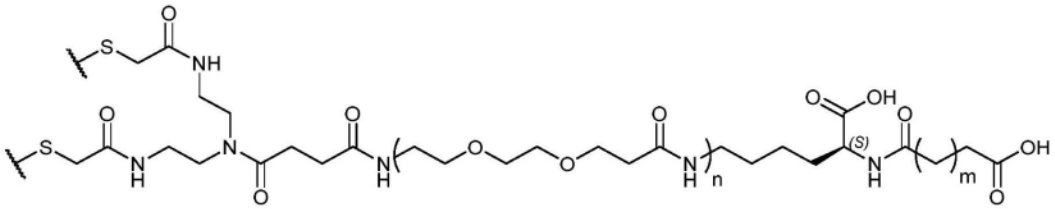
；

“ -S”为半胱氨酸、高半胱氨酸、2-氨基-5-巯基戊酸或2-氨基-6-巯基己酸残基的一部分，且“ -NH”为赖氨酸、鸟氨酸、二氨基丁酸、二氨基丙酸或高赖氨酸残基的一部分。

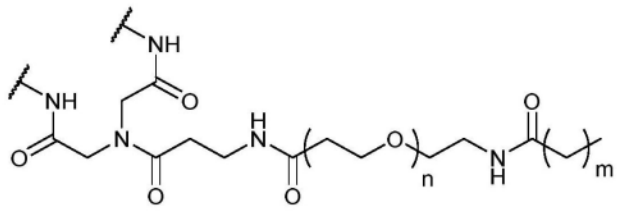
[0206] 在一些实施方案中，与肽连接的钉合体为：



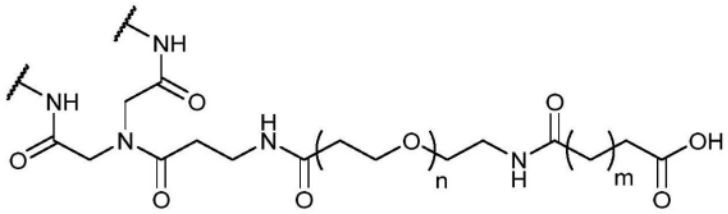
、



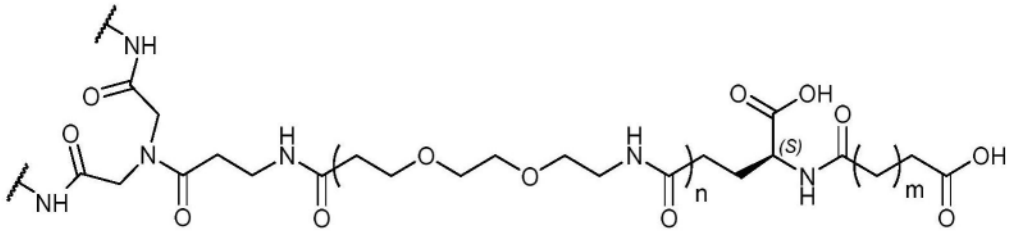
、



、



或



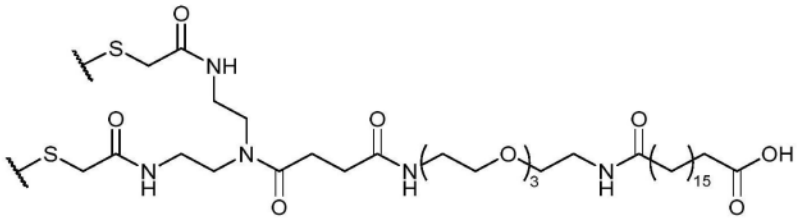
其中n为1-4且m为6-20；

；

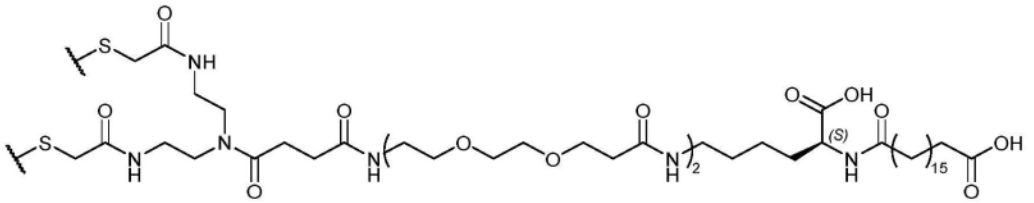
“ -S”为半胱氨酸、高半胱氨酸、2-氨基-5-巯基戊酸或2-氨基-6-巯基己酸残基

的一部分，且“ -NH”为赖氨酸、鸟氨酸、二氨基丁酸、二氨基丙酸或高赖氨酸残基的一部分。

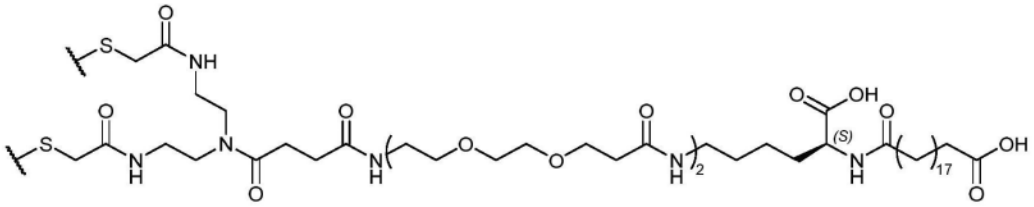
[0207] 在一些实施方案中，与肽连接的钉合体为：



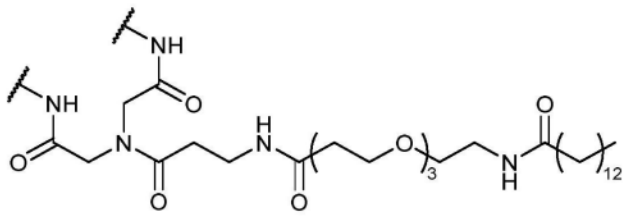
、



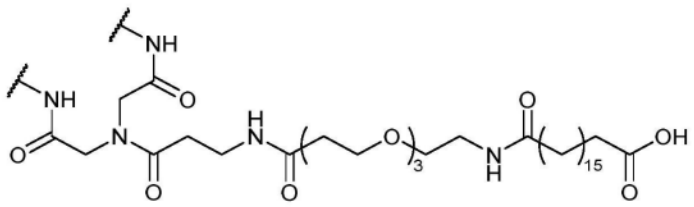
、



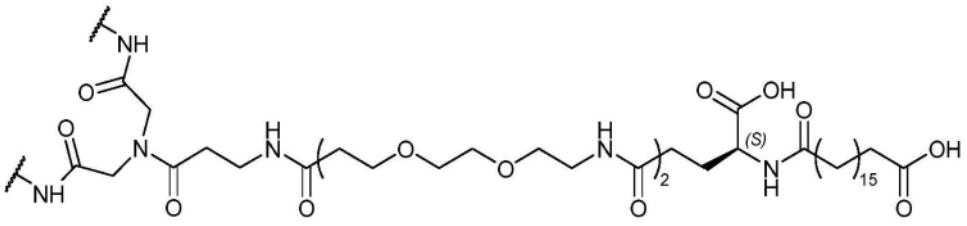
、



、

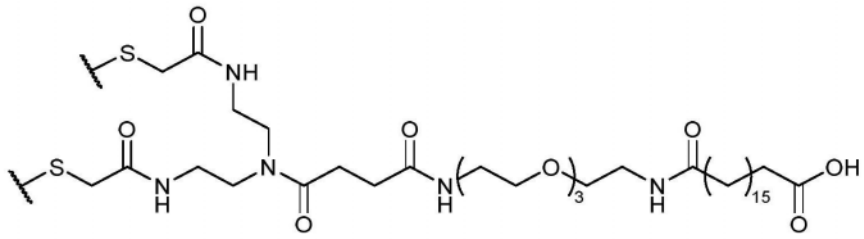


或

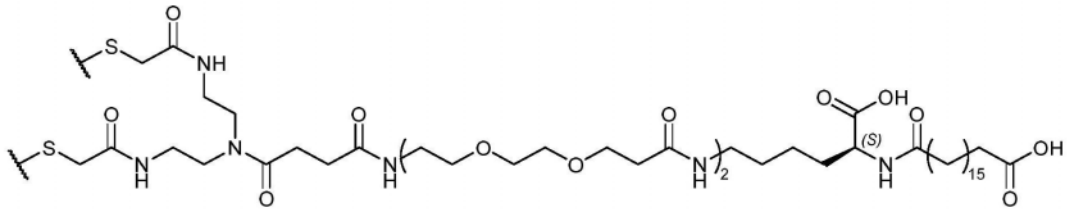


为半胱氨酸、高半胱氨酸、2-氨基-5-巯基戊酸或2-氨基-6-巯基己酸残基的一部分；“ -S”；“ -NH”为赖氨酸、鸟氨酸、二氨基丁酸、二氨基丙酸或高赖氨酸残基的一部分。

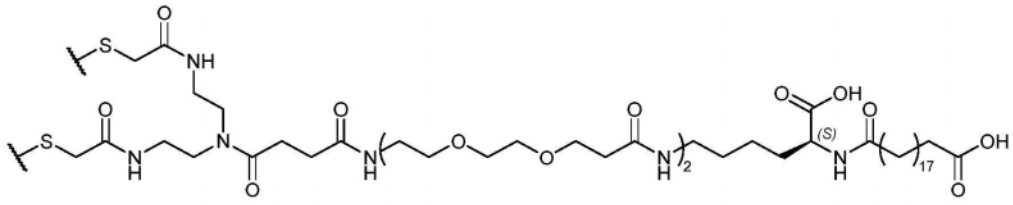
[0208] 在一些实施方案中，与肽连接的钉合体为：



、



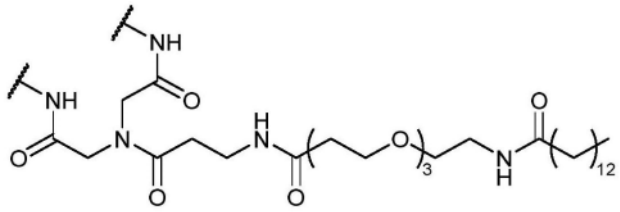
或



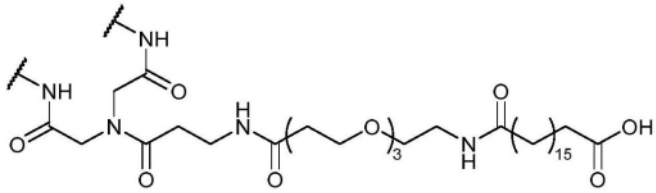
；“

S”为半胱氨酸、高半胱氨酸、2-氨基-5-巯基戊酸或2-氨基-6-巯基己酸残基的一部分。

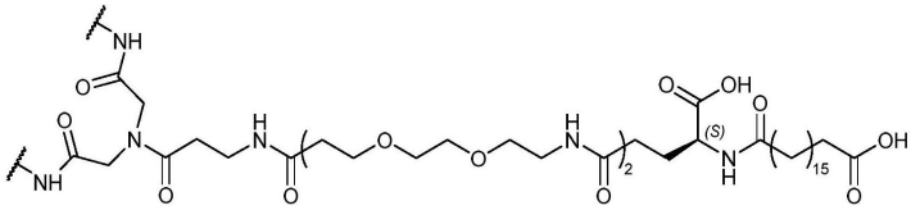
[0209] 在一些实施方案中，与肽连接的钉合体为：



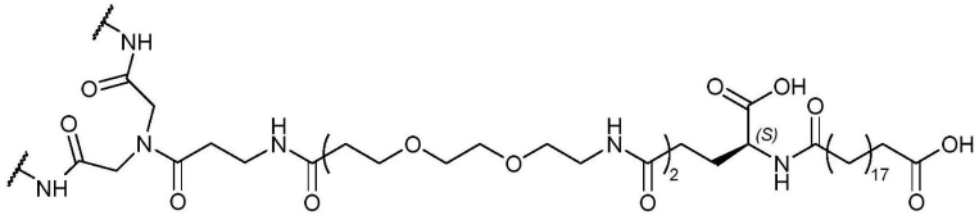
、



、



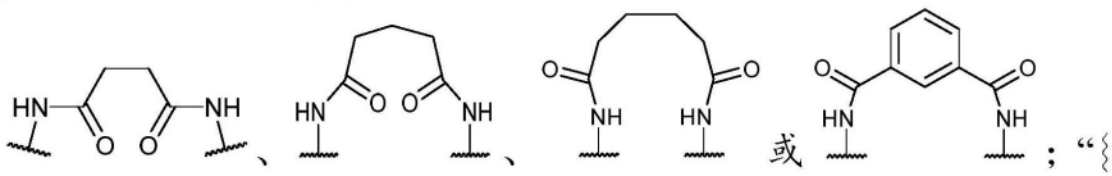
或



；“

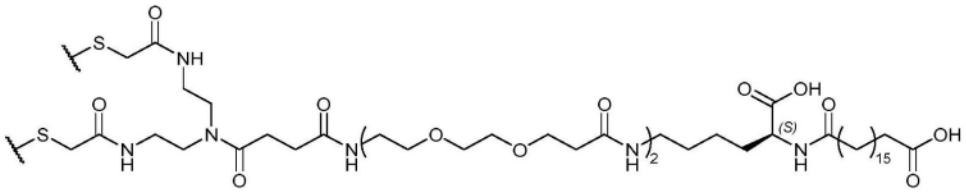
NH”为赖氨酸、鸟氨酸、二氨基丁酸、二氨基丙酸或高赖氨酸残基的一部分。

[0210] 在一些实施方案中，与肽连接的钉合体为：



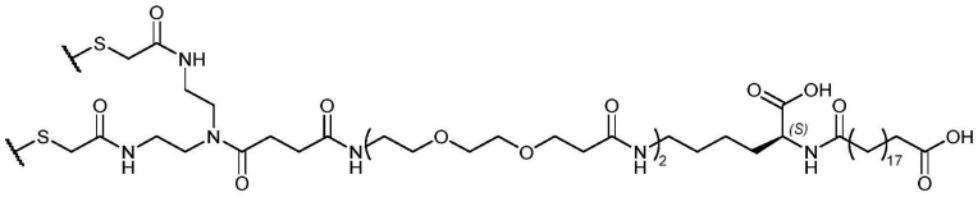
或 ；“ -NH”为赖氨酸、鸟氨酸、二氨基丁酸、二氨基丙酸或高赖氨酸残基的一部分。

[0211] 在一些实施方案中，与肽连接的钉合体为：



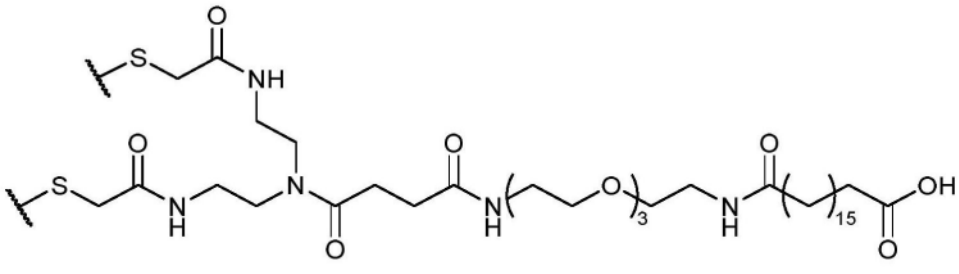
；“ -S”为半胱氨酸、高半胱氨酸、2-氨基-5-巯基戊酸或2-氨基-6-巯基己酸残基的一部分。

[0212] 在一些实施方案中，与肽连接的钉合体为：



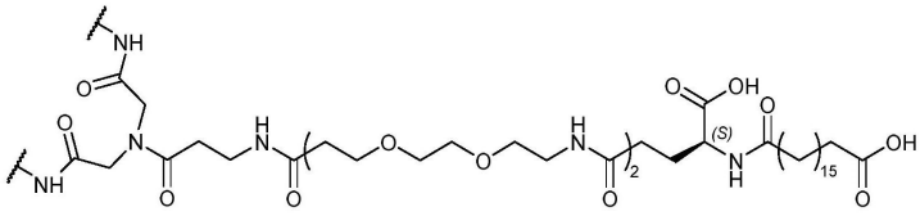
；“ -S”为半胱氨酸、高半胱氨酸、2-氨基-5-巯基戊酸或2-氨基-6-巯基己酸残基的一部分。

[0213] 在一些实施方案中，与肽连接的钉合体为：



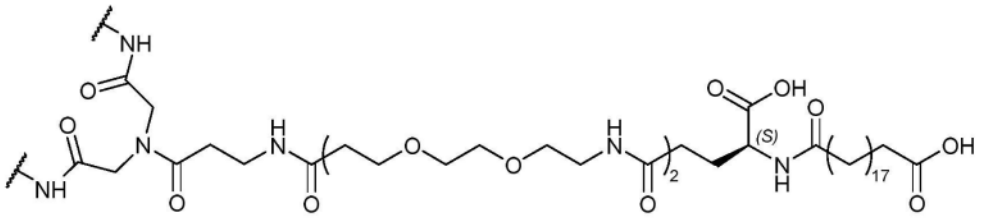
；“ -S”为半胱氨酸、高半胱氨酸、2-氨基-5-巯基戊酸或2-氨基-6-巯基己酸残基的一部分。

[0214] 在一些实施方案中，与肽连接的钉合体为：



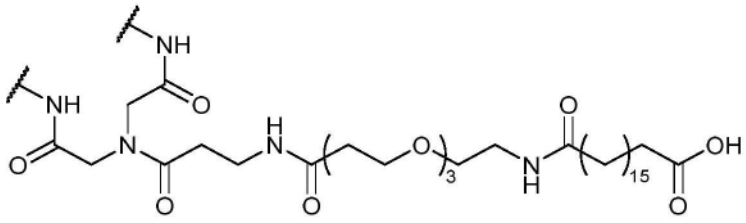
；“ -NH”为赖氨酸、鸟氨酸、二氨基丁酸、二氨基丙酸或高赖氨酸残基的一部分。

[0215] 在一些实施方案中，与肽连接的钉合体为：



；“ -NH”为赖氨酸、鸟氨酸、二氨基丁酸、二氨基丙酸或高赖氨酸残基的一部分。

[0216] 在一些实施方案中，与肽连接的钉合体为：



为赖氨酸、鸟氨酸、二氨基丁酸、二氨基丙酸或高赖氨酸残基的一部分。

半衰期延长部分(HEM)

[0217] 本文公开了包含HEM的肽缀合物。

[0218] 在一些实施方案中，与肽连接的HEM为式(II)的化合物：

$-X^3-(L)_s-Y$ 式(II)

其中：

X^3为键、-C(=O)-、-亚烷基-C(=O)-、-C(=O)-亚烷基-、-亚烷基-C(=O)NR^3-、-亚烷基-NR^3C(=O)-、-C(=O)NR^3-亚烷基-、-NR^3C(=O)-亚烷基-、-亚烷基-C(=O)NR^3-亚烷基-或-亚烷基-NR^3C(=O)-亚烷基-；

其中X^3与肽的第一氨基酸连接；

每个L独立地为$-(CR^1R^2)_v-$、-亚烷基-O-、-O-亚烷基-、-C(=O)-亚烷基-、-亚烷基-C(=O)-、-NR^3-亚烷基-、-亚烷基-NR^3-、-S-亚烷基-、-亚烷基-S-、-S(=O)-亚烷基-、-亚烷基-S(=O)-、-S(=O)$_2$-亚烷基、-亚烷基-S(=O)$_2$-、-C(=O)-、-C(=O)NR^3-、-NR^3C(=O)-、-NR^3C(=O)NR^3-、-NR^3C(=O)NR^3-亚烷基-、-NR^3C(=O)-亚烷基-NR^3-、-亚烷基-C(=O)NR^3-、-C(=O)NR^3-亚烷基-、-亚烷基-NR^3C(=O)-或-NR^3C(=O)-亚烷基-；

v为2-20；

R^1或R^2各自独立地为氢、卤素、-CN、-OR^a、-SR^a、-S(=O)R^b、-NO_2、-NR^cR^d、-S(=O)$_2R^d$、-NR^aS(=O)$_2R^d$、-S(=O)$_2NR^cR^d$、-C(=O)R^b、-OC(=O)R^b、-CO_2R^a、-OCO_2R^a、-C(=O)NR^cR^d、-OC(=O)NR^cR^d、-NR^aC(=O)NR^cR^d、-NR^aC(=O)R^b、-NR^aC(=O)OR^a、C_1-C_6烷基、C_2-C_6烯基、C_2-C_6炔基、C_1-C_6杂烷基、C_3-C_8环烷基、C_2-C_8杂环烷基、芳基或杂芳基；其中烷基、烯基、炔基和杂烷基任选地被卤素、-OR^a或-NR^cR^d中的一个、两个或三个取代；并且环烷基、杂环烷基、芳基和杂芳基任选地被卤素、C_1-C_6烷基、C_1-C_6卤代烷基、-OR^a、-NR^cR^d中的一个、两个或三个取代；

或R^1和R^2一起形成C_1-C_6环烷基或C_1-C_6杂环烷基；

每个R^3独立地为氢、-S(=O)R^b、-S(=O)$_2R^a$、-S(=O)$_2NR^cR^d$、-C(=O)R^b、-CO_2R^a、-C(=O)NR^cR^d、C_1-C_6烷基、C_2-C_6烯基、C_2-C_6炔基、C_1-C_6杂烷基、C_3-C_8环烷基、C_2-C_8杂环烷基、芳

基或杂芳基;其中烷基、烯基、炔基和杂烷基任选地被卤素、-OR^a或-NR^cR^d中的一个、两个或三个取代;并且环烷基、杂环烷基、芳基和杂芳基任选地被卤素、C_1-C_6烷基、C_1-C_6卤代烷基、-OR^a或-NR^cR^d中的一个、两个或三个取代;

Y为氢、C_1-C_6烷基、-CO_2H、-CO_2(C_1-C_6烷基)、-CO_2NH_2、-CO_2N(烷基)$_2$或-CO_2NH(烷基);以及

s为0-20;

R^a为氢、C_1-C_6烷基、C_2-C_6烯基、C_2-C_6炔基、C_1-C_6杂烷基、C_3-C_8环烷基、C_2-C_8杂环烷基、芳基或杂芳基;其中烷基、烯基、炔基和杂烷基任选地被卤素、-OH、-OMe或-NH_2中的一个、两个或三个取代;并且环烷基、杂环烷基、芳基和杂芳基任选地被卤素、C_1-C_6烷基、C_1-C_6卤代烷基、-OH、-OMe或-NH_2中的一个、两个或三个取代;

R^b为C_1-C_6烷基、C_2-C_6烯基、C_2-C_6炔基、C_1-C_6杂烷基、C_3-C_8环烷基、C_2-C_8杂环烷基、芳基或杂芳基;其中烷基、烯基、炔基和杂烷基任选地被卤素、-OH、-OMe或-NH_2中的一个、两个或三个取代;并且环烷基、杂环烷基、芳基和杂芳基任选地被卤素、C_1-C_6烷基、C_1-C_6卤代烷基、-OH、-OMe或-NH_2中的一个、两个或三个取代;

R^c和R^d各自独立地为氢、C_1-C_6烷基、C_2-C_6烯基、C_2-C_6炔基、C_1-C_6杂烷基、C_3-C_8环烷基、C_2-C_8杂环烷基、芳基或杂芳基;其中烷基、烯基、炔基和杂烷基任选地被卤素、-OH、-OMe或-NH_2中的一个、两个或三个取代;并且环烷基、杂环烷基、芳基和杂芳基任选地被卤素、C_1-C_6烷基、C_1-C_6卤代烷基、-OH、-OMe或-NH_2中的一个、两个或三个取代;

或者R^c和R^d与它们所连接的氮原子一起形成杂环烷基或杂芳基;其中杂环烷基和杂芳基任选地被卤素、C_1-C_6烷基、C_1-C_6卤代烷基、-OH、-OMe或-NH_2中的一个、两个或三个取代。

[0219] 在一些实施方案中,X^3为键。

[0220] 在一些实施方案中,X^3为-亚烷基-C(=O)-或-C(=O)亚烷基-。在一些实施方案中,X^3为-CH_2-C(=O)-或-C(=O)-CH_2-。在一些实施方案中,X^3为-亚烷基-C(=O)NR^3或-C(=O)NR^3-亚烷基-。在一些实施方案中,X^3为-CH_2-C(=O)NR^3-或-C(=O)NR^3-CH_2-。在一些实施方案中,X^3为-亚烷基-C(=O)NR^3-亚烷基-或-亚烷基-NR^3C(=O)-亚烷基-。在一些实施方案中,X^3为-CH_2-C(=O)NR^3-CH_2CH_2-或-CH_2-NR^3C(=O)-CH_2CH_2-。在一些实施方案中,X^3为-CH_2-C(=O)NH-CH_2CH_2-或-CH_2-NHC(=O)-CH_2CH_2-。

[0221] 在一些实施方案中,每个R^3独立地为氢或C_1-C_6烷基。在一些实施方案中,R^3各自为氢。

[0222] 在一些实施方案中,s为1-15。在一些实施方案中,s为1-10。

在一些实施方案中,s为5-15。在一些实施方案中,s为5-10。在一些实施方案中,s为5-20。

[0223] 在一些实施方案中,Y为氢或-CO_2H。在一些实施方案中,Y为氢。在一些实施方案中,Y为-CO_2H。

[0224] 在一些实施方案中,每个L独立地为-$(CR^1R^2)_v$-、-亚烷基-O-、-C(=O)-、-C(=O)NR^3-、-NR^3C(=O)-、-亚烷基-C(=O)NR^3-或-亚烷基-NR^3C(=O)-;且v为2-20。

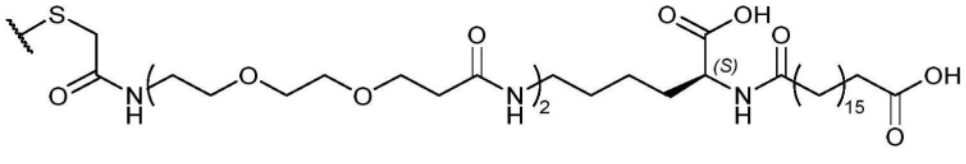
[0225] 在一些实施方案中,每个L独立地为-$(CR^1R^2)_v$-、-亚烷基-O-、-C(=O)-、-C(=O)NR^3-、-NR^3C(=O)-、-亚烷基-C(=O)NR^3-或-亚烷基-NR^3C(=O)-;且v为2-16。

[0226] 在一些实施方案中，v为2-16。在一些实施方案中，v为2-5。在一些实施方案中，v为5-16。在一些实施方案中，v为5或16。在一些实施方案中，v为2或16。

[0227] 在一些实施方案中，R^1或R^2各自独立地为氢、卤素、-CN、$-OR^a$、$-NR^cR^d$、$-C(=O)R^b$、$-CO_2R^a$、$-C(=O)NR^cR^d$或C_1-C_6烷基。

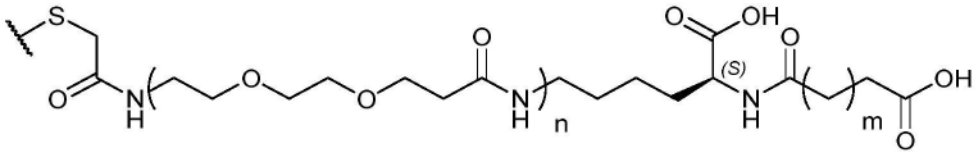
[0228] 在一些实施方案中，R^1或R^2各自独立地为氢、卤素、$-CO_2R^a$、$-C(=O)NR^cR^d$或C_1-C_6烷基。在一些实施方案中，R^1或R^2各自独立地为氢、$-CO_2R^a$或$-C(=O)NR^cR^d$。在一些实施方案中，R^1或R^2各自独立地为氢或$-CO_2R^a$。

[0229] 在一些实施方案中，与肽连接的HEM为：



；“$\sim$ -S”为半胱氨酸、高半胱氨酸、2-氨基-5-巯基戊酸或2-氨基-6-巯基己酸残基的一部分。

[0230] 在一些实施方案中，与肽连接的HEM为：



其中n为1-4且m为6-20；“$\sim$ -S”为半胱氨酸、高半胱氨酸、2-氨基-5-巯基戊酸或2-氨基-6-巯基己酸残基的一部分。

具有钉合体的肽缀合物

[0231] 在一个方面，本文公开了肽缀合物，其包含(a)选自以下的肽：调节PYY受体的肽、调节GLP-1受体和GCG受体的肽、调节GLP-1受体和GIP受体的肽以及调节GLP-1受体的肽；和(b)在第一氨基酸和第二氨基酸处与肽连接的钉合体。

[0232] 在一些实施方案中，肽缀合物包含(a)调节PYY受体的肽；和(b)在第一氨基酸和第二氨基酸处与肽连接的钉合体。

[0233] 在一些实施方案中，肽缀合物包含(a)调节GLP-1受体和GCG受体的肽；和(b)在第一氨基酸和第二氨基酸处与肽连接的钉合体。

[0234] 在一些实施方案中，肽缀合物包含(a)调节GLP-1受体和GIP受体的肽；和(b)在第一氨基酸和第二氨基酸处与肽连接的钉合体。

[0235] 在一些实施方案中，肽缀合物包含(a)调节GLP-1受体的肽；和(b)在第一氨基酸和第二氨基酸处与肽连接的钉合体。

[0236] 用于缀合的氨基酸的非限制性实例包括半胱氨酸、高半胱氨酸、2-氨基-5-巯基戊酸、2-氨基-6-巯基己酸、赖氨酸、鸟氨酸、二氨基丁酸、二氨基丙酸、高赖氨酸、其他含巯基氨基酸或其他含胺的氨基酸。在一些实施方案中，通过钉合体连接的两个氨基酸相隔约或至少约3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16或更多个氨基酸。例如，第一氨基酸的位置为i，且第二氨基酸的位置为i+7、i+11、i+13、i+15或i+16。例如，第一氨基酸在肽中的位置为i，且第二氨基酸在肽中的位置为i+n，其中n为4-16。在一些实施方案中，第一氨基酸在肽的14位，第二氨基酸在肽的21位。在一些实施方案中，第一氨基酸在肽的17位，第二氨基酸

在肽的24位。

[0237] 例如,第一氨基酸在肽中的位置为i,且第二氨基酸在肽中的位置为i+4。例如,第一氨基酸在肽中的位置为i,且第二氨基酸在肽中的位置为i+5。例如,第一氨基酸在肽中的位置为i,且第二氨基酸在肽中的位置为i+6。例如,第一氨基酸在肽中的位置为i,且第二氨基酸在肽中的位置为i+7。例如,第一氨基酸在肽中的位置为i,且第二氨基酸在肽中的位置为i+8。例如,第一氨基酸在肽中的位置为i,且第二氨基酸在肽中的位置为i+9。例如,第一氨基酸在肽中的位置为i,且第二氨基酸在肽中的位置为i+10。例如,第一氨基酸在肽中的位置为i,且第二氨基酸在肽中的位置为i+11。例如,第一氨基酸在肽中的位置为i,且第二氨基酸在肽中的位置为i+12。例如,第一氨基酸在肽中的位置为i,且第二氨基酸在肽中的位置为i+13。例如,第一氨基酸在肽中的位置为i,且第二氨基酸在肽中的位置为i+14。例如,第一氨基酸在肽中的位置为i,且第二氨基酸在肽中的位置为i+15。例如,第一氨基酸在肽中的位置为i,且第二氨基酸在肽中的位置为i+16。

[0238] 在一些实施方案中,第一氨基酸和第二氨基酸独立地选自含胺氨基酸和含巯基氨基酸。

[0239] 在一些实施方案中,第一氨基酸和第二氨基酸独立地选自半胱氨酸、高半胱氨酸、2-氨基-5-巯基戊酸和2-氨基-6-巯基己酸。在一些实施方案中,第一氨基酸和第二氨基酸为半胱氨酸。

[0240] 在一些实施方案中,第一氨基酸和第二氨基酸独立地选自赖氨酸、鸟氨酸、二氨基丁酸、二氨基丙酸和高赖氨酸。

[0241] 在一些实施方案中,第一氨基酸和第二氨基酸为赖氨酸。

[0242] 在一些实施方案中,第一氨基酸和第二氨基酸为鸟氨酸。

[0243] 在一些实施方案中,肽缀合物还包含与肽中的含巯基氨基酸或含胺氨基酸残基连接的半衰期延长分子。

[0244] 在一些实施方案中,含胺氨基酸选自赖氨酸、鸟氨酸、二氨基丁酸、二氨基丙酸和高赖氨酸。

[0245] 在一些实施方案中,含胺氨基酸为赖氨酸。

[0246] 在一些实施方案中,含巯基氨基酸选自半胱氨酸、高半胱氨酸、2-氨基-5-巯基戊酸和2-氨基-6-巯基己酸。

[0247] 在一些实施方案中,含巯基氨基酸为半胱氨酸。

具有半衰期延长部分的肽缀合物

[0248] 在一个方面,本文公开了肽缀合物,其包含(a)选自以下的肽:调节PYY受体的肽、调节GLP-1受体和GCG受体的肽、调节GLP-1受体和GIP受体的肽以及调节GLP-1受体的肽;和(b)在第一氨基酸处与肽连接的半衰期延长部分(HEM)。

[0249] 在一些实施方案中,肽缀合物包含(a)调节PYY受体的肽;和(b)在第一氨基酸处与肽连接的半衰期延长部分(HEM)。

[0250] 在一些实施方案中,肽缀合物包含(a)调节GLP-1受体和GCG受体的肽;和(b)在第一氨基酸处与肽连接的半衰期延长部分(HEM)。

[0251] 在一些实施方案中,肽缀合物包含(a)调节GLP-1受体和GIP受体的肽;和(b)在第一氨基酸处与肽连接的半衰期延长部分(HEM)。

[0252] 在一些实施方案中，肽缀合物包含(a)调节GLP-1受体的肽；和(b)在第一氨基酸处与肽连接的半衰期延长部分(HEM)。

[0253] 用于缀合的氨基酸的非限制性实例包括半胱氨酸、高半胱氨酸、2-氨基-5-巯基戊酸、2-氨基-6-巯基己酸、赖氨酸、鸟氨酸、二氨基丁酸、二氨基丙酸、高赖氨酸、其他含巯基氨基酸或其他含胺的氨基酸。在一些实施方案中，第一氨基酸选自含胺氨基酸和含巯基氨基酸。在一些实施方案中，第一氨基酸选自半胱氨酸、高半胱氨酸、2-氨基-5-巯基戊酸和2-氨基-6-巯基己酸。在一些实施方案中，第一氨基酸为半胱氨酸。在一些实施方案中，第一氨基酸选自赖氨酸、鸟氨酸、二氨基丁酸、二氨基丙酸和高赖氨酸。在一些实施方案中，第一氨基酸为赖氨酸。在一些实施方案中，第一氨基酸为鸟氨酸。在一些实施方案中，肽缀合物还包含与肽中的含巯基氨基酸或含胺氨基酸残基连接的第二半衰期延长部分。在一些实施方案中，含胺氨基酸选自赖氨酸、鸟氨酸、二氨基丁酸、二氨基丙酸和高赖氨酸。在一些实施方案中，含胺氨基酸为赖氨酸。在一些实施方案中，含巯基氨基酸选自半胱氨酸、高半胱氨酸、2-氨基-5-巯基戊酸和2-氨基-6-巯基己酸。在一些实施方案中，含巯基氨基酸为半胱氨酸。

[0254] 在一些实施方案中，肽缀合物包含：

a)调节PYY受体的肽，其包含与SEQ ID NO:3、5、6、8、14-30、36或37中的任一项具有至少约95％同一性的肽序列；以及

b)在第一氨基酸和第二氨基酸处与肽连接的钉合体。

[0255] 在一些实施方案中，调节PYY受体的肽包含与SEQ ID NO:3、5、6、8、14-30、36或37中的任一项具有至少约99％同一性的肽序列；

[0256] 在一些实施方案中，调节PYY受体的肽包含SEQ ID NO:3、5、6、8、14-30、36或37的肽序列。

[0257] 在一些实施方案中，调节PYY受体的肽包含与SEQ ID NO:6具有至少约99％同一性的序列。

[0258] 在一些实施方案中，调节PYY受体的肽包含SEQ ID NO:6的序列。

[0259] 在一些实施方案中，肽缀合物包含：

a)调节GLP-1受体和GCGR受体的肽，其包含与SEQ ID NO:50-59中的任一项具有至少约95％同一性的肽序列；以及

b)在第一氨基酸和第二氨基酸处与肽连接的钉合体。

[0260] 在一些实施方案中，调节GLP-1受体和GCG受体的肽包含与SEQ ID NO:50-59中的任一项具有至少约99％同一性的肽序列。

[0261] 在一些实施方案中，调节GLP-1受体和GCG受体的肽包含选自SEQ ID NO:50-59的肽序列。

[0262] 在一些实施方案中，肽缀合物包含：

a)调节GLP-1受体和GIP受体的肽，其包含与SEQ ID NO:62-71中的任一项具有至少约95％同一性的肽序列；以及

b)在第一氨基酸和第二氨基酸处与肽连接的钉合体。

[0263] 在一些实施方案中，调节GLP-1受体和GIP受体的肽包含与SEQ ID NO:62-71中的任一项具有至少约99％同一性的肽序列。

[0264] 在一些实施方案中，调节GLP-1受体和GIP受体的肽包含选自SEQ ID NO:62-71的

肽序列。

[0265] 在一些实施方案中，调节GLP-1受体和GIP受体的肽包含与SEQ ID NO:63具有至少约99％同一性的序列。

[0266] 在一些实施方案中，调节GLP-1受体和GIP受体的肽包含SEQ ID NO:63的序列。

[0267] 在一些实施方案中，肽缀合物包含：

a)调节GLP-1受体的肽，其包含与SEQ ID NO:74或79中的任一项具有至少约95％同一性的肽序列；以及

b)在第一氨基酸和第二氨基酸处与肽连接的钉合体。

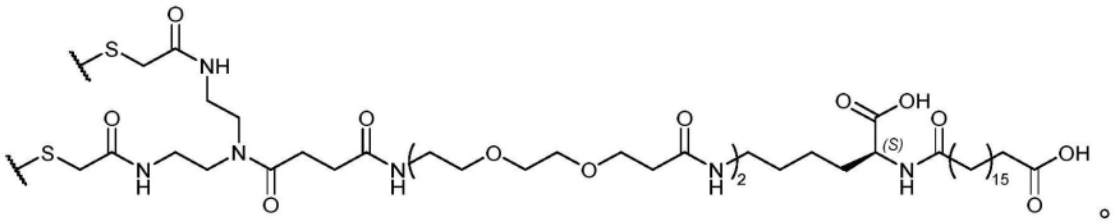
[0268] 在一些实施方案中，调节GLP-1受体的肽包含与SEQ ID NO:74或79中的任一项具有至少约99％同一性的肽序列。

[0269] 在一些实施方案中，调节GLP-1受体的肽包含选自SEQ ID NO:74或79的肽序列。

[0270] 在一些实施方案中，肽缀合物包含：

a)调节PYY受体的肽，其包含SEQ ID NO:6的肽序列；以及

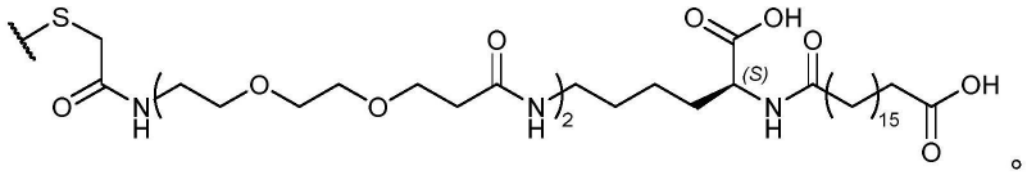
b)在第一半胱氨酸和第二半胱氨酸处与肽连接的具有以下结构的钉合体(“-S”为半胱氨酸残基的一部分)：



[0271] 在一些实施方案中，肽缀合物包含：

a)调节PYY受体的肽，其包含SEQ ID NO:10的肽序列；以及

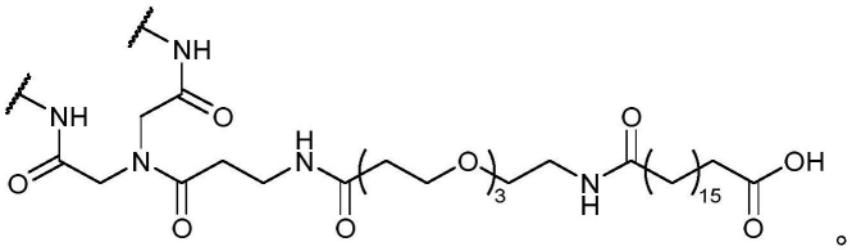
b)在第一半胱氨酸处与肽连接的具有以下结构的HEM(“-S”为半胱氨酸残基的一部分)：



[0272] 在一些实施方案中，肽缀合物包含：

a)调节GLP-1受体和GCG受体的肽，其包含SEQ ID NO:48的肽序列；以及

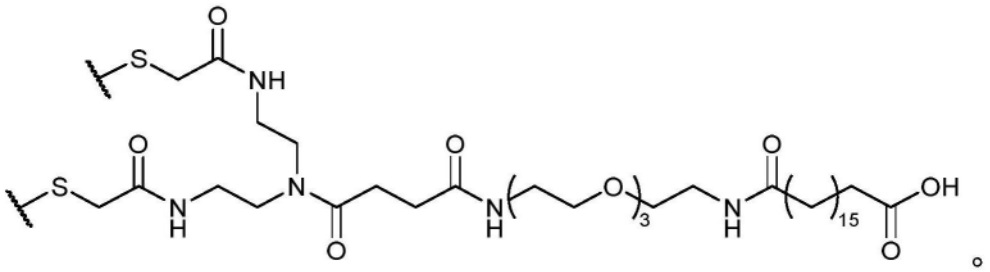
b)在第一赖氨酸和第二赖氨酸处与肽连接的具有以下结构的钉合体(“-NH”为赖氨酸残基的一部分)：



[0273] 在一些实施方案中,肽缀合物包含:

a)调节GLP-1受体和GCG受体的肽,其包含SEQ ID NO:60的肽序列;以及

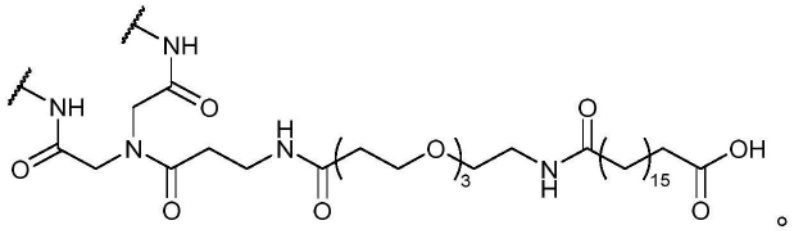
b)在第一半胱氨酸和第二半胱氨酸处与肽连接的具有以下结构的钉合体(“ -S”为半胱氨酸残基的一部分):



[0274] 在一些实施方案中,肽缀合物包含:

a)调节GLP-1受体和GIP受体的肽,其包含SEQ ID NO:63的肽序列;以及

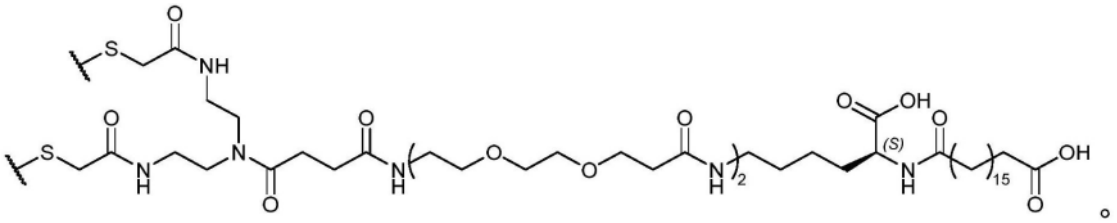
b)在第一赖氨酸和第二赖氨酸处与肽连接的具有以下结构的钉合体(“ -NH”为赖氨酸残基的一部分):



[0275] 在一些实施方案中,肽缀合物包含:

a)调节GLP-1受体的肽,其包含SEQ ID NO:76的肽序列;以及

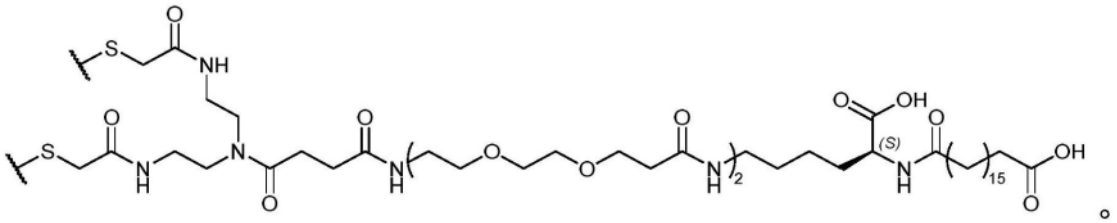
b)在第一半胱氨酸和第二半胱氨酸处与肽连接的具有以下结构的钉合体(“ -S”为半胱氨酸残基的一部分):



[0276] 在一些实施方案中,肽缀合物包含:

a)调节GLP-1受体的肽,其包含SEQ ID NO:77的肽序列;以及

b)在第一半胱氨酸和第二半胱氨酸处与肽连接的具有以下结构的钉合体(“ -S”为半胱氨酸残基的一部分):



催乳素释放肽(PrRP)肽缀合物

[0277] 在一个方面,本文公开了包含催乳素释放肽(PrRP)的肽缀合物。在示例性的情况下,催乳素释放肽(PrRP)包含通过钉合体连接的两个氨基酸。用于缀合的氨基酸的非限制性实例包括半胱氨酸、高半胱氨酸、2-氨基-5-巯基戊酸、2-氨基-6-巯基己酸或其他含巯基氨基酸。对于包含通过钉合体连接的两个氨基酸的催乳素释放肽(PrRP),两个氨基酸相隔约或至少约3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14或更多个氨基酸。例如,第一氨基酸的位置为i,且第二氨基酸的位置为i+7、i+11、i+13、i+15或i+16。例如,第一氨基酸在肽中的位置为i,且第二氨基酸在肽中的位置为i+n,其中n为4-16。例如,第一氨基酸在肽中的位置为i,且第二氨基酸在肽中的位置为i+7。例如,第一氨基酸在肽中的位置为i,且第二氨基酸在肽中的位置为i+11。例如,第一氨基酸在肽中的位置为i,且第二氨基酸在肽中的位置为i+15。例如,第一氨基酸在肽中的位置为i,且第二氨基酸在肽中的位置为i+16。

[0278] 本文公开了肽缀合物,其包含:

a)催乳素释放肽(PrRP);以及

b)连接至钉合体的半衰期延长分子,其中钉合体在第一氨基酸和第二氨基酸处连接至该肽。

[0279] 在一些实施方案中,第一氨基酸和第二氨基酸独立地选自含巯基氨基酸。

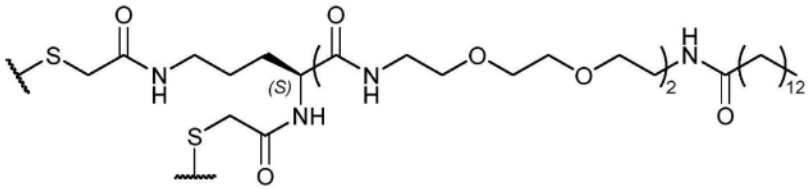
[0280] 在一些实施方案中,第一氨基酸和第二氨基酸独立地选自半胱氨酸、高半胱氨酸、2-氨基-5-巯基戊酸和2-氨基-6-巯基己酸。在一些实施方案中,第一氨基酸和第二氨基酸为半胱氨酸。

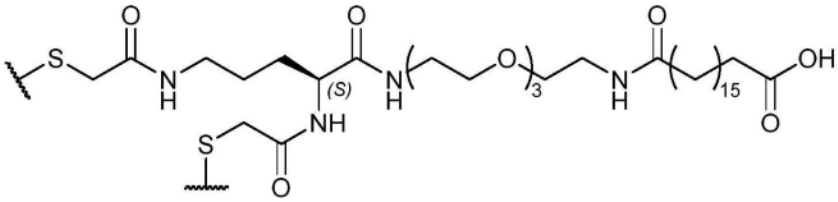
[0281] 在催乳素释放肽(PrRP)和与钉合体连接的半衰期延长分子的一些实施方案中,肽缀合物包含:

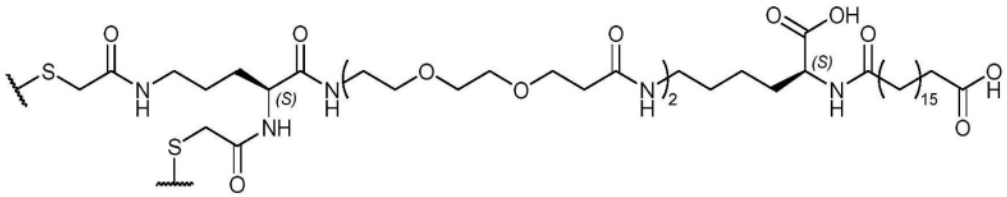
a)催乳素释放肽(PrRP),其包含选自SEQ ID NO:83-105的肽序列;以及

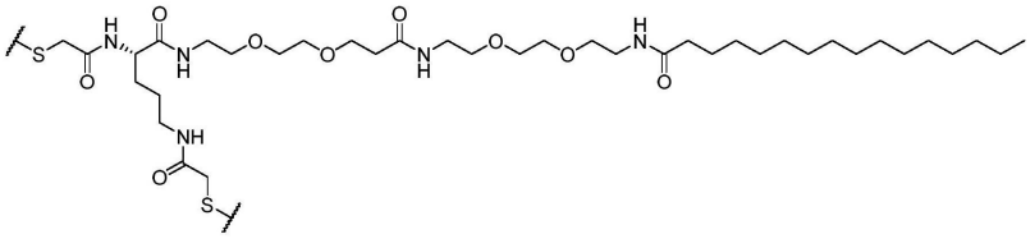
b)连接至钉合体的半衰期延长分子,其中钉合体在第一半胱氨酸和第二半胱氨酸处连接至该肽;

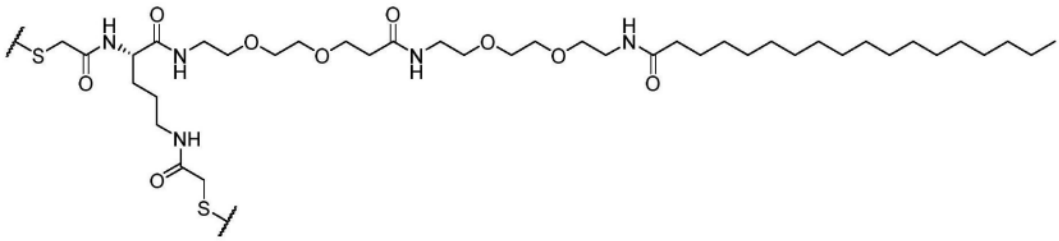
该半衰期延长分子连接至具有以下结构的钉合体(“”为半胱氨酸残基的一部分):

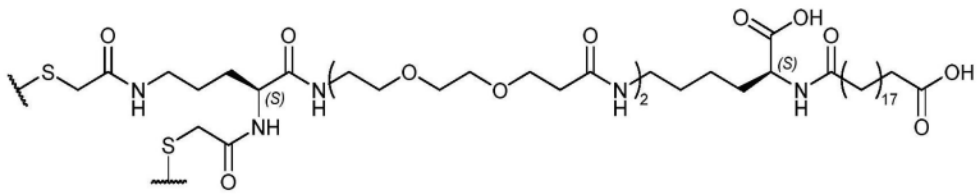


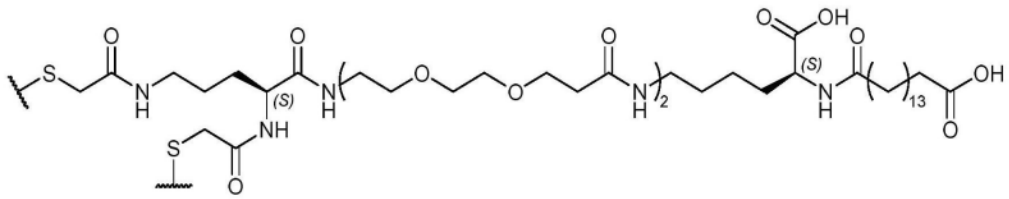


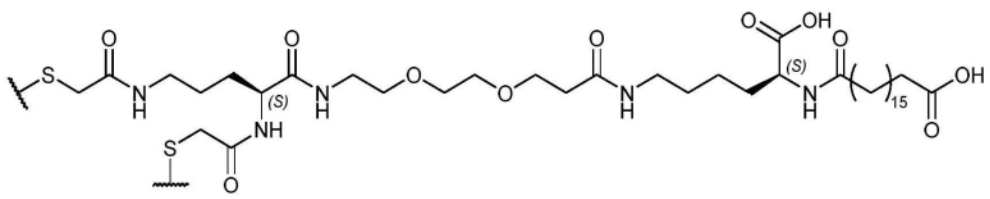


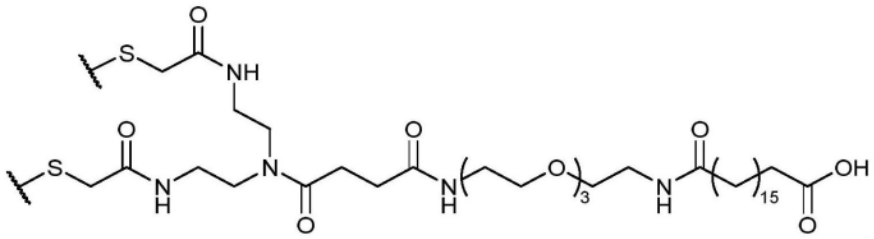




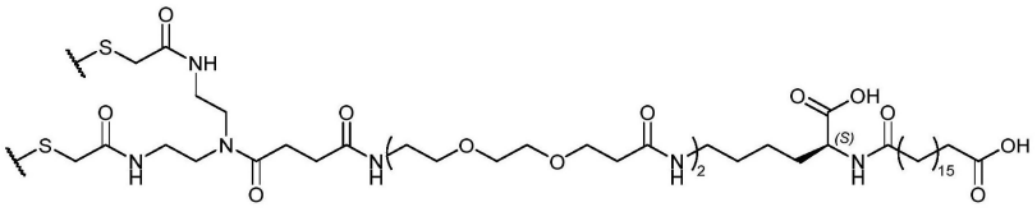




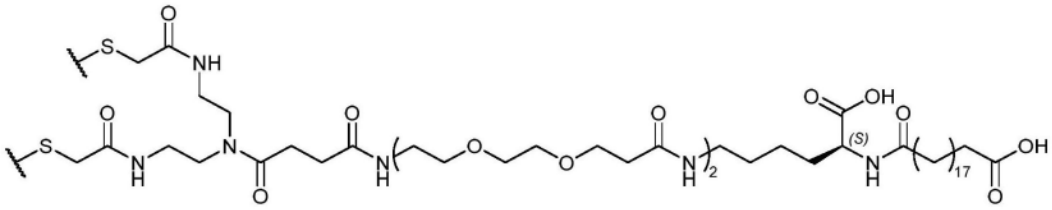




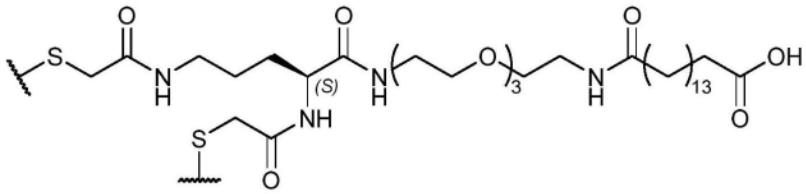
、



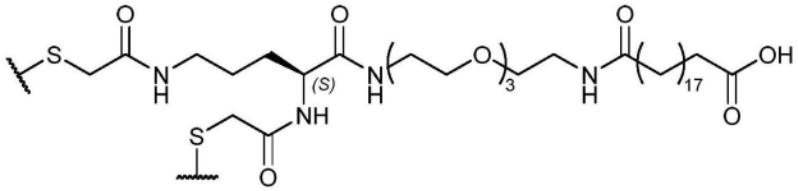
、



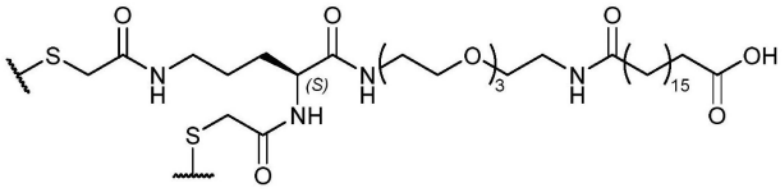
、



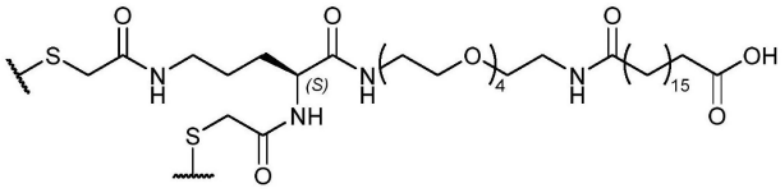
、



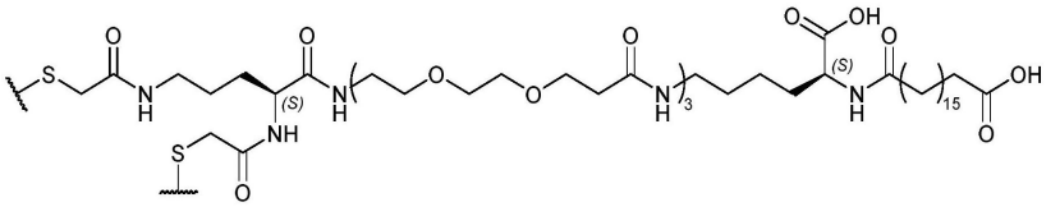
、



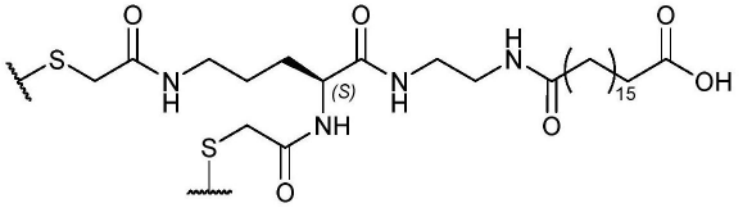
、



、



或

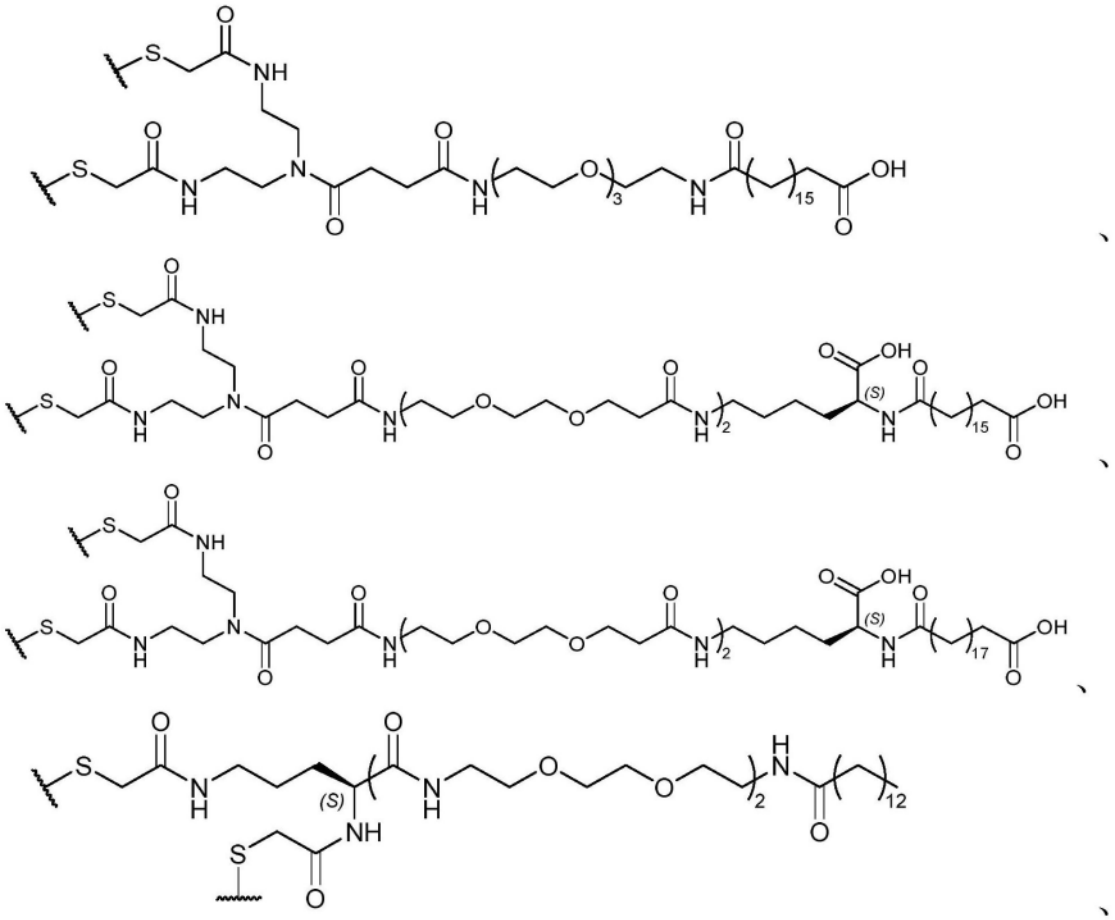


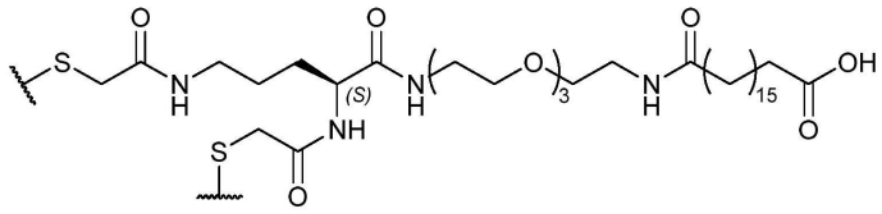
[0282] 在催乳素释放肽(PrRP)和与钉合体连接的半衰期延长分子的一些实施方案中,肽缀合物包含:

a)催乳素释放肽(PrRP),其包含选自SEQ ID NO:83-105的肽序列;以及

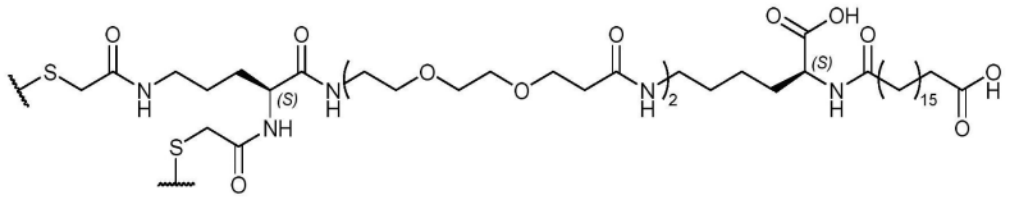
b)连接至钉合体的半衰期延长分子,其中钉合体在第一半胱氨酸和第二半胱氨酸处连接至该肽;

该半衰期延长分子连接至具有以下结构的钉合体("S"为半胱氨酸残基的一部分):

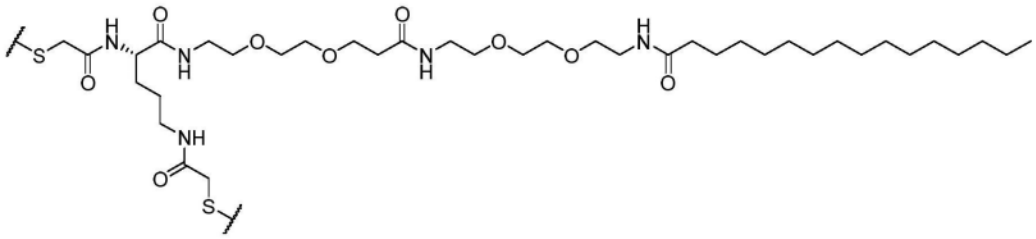




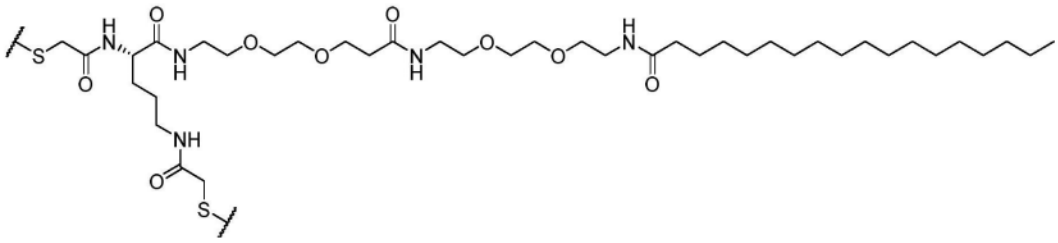
、



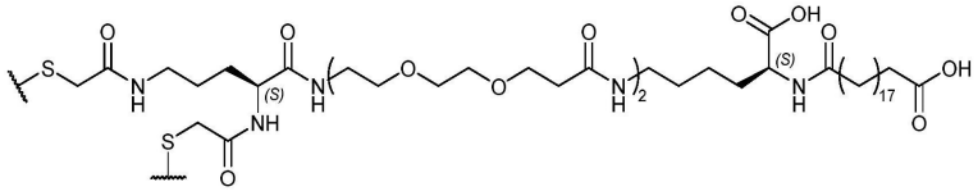
、



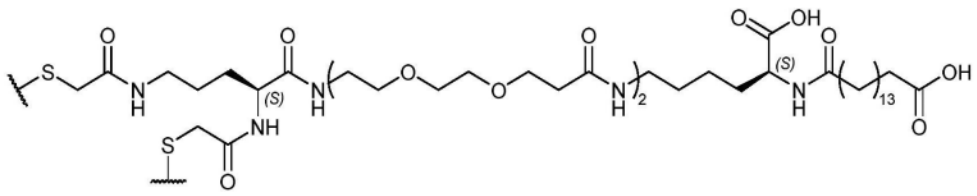
、



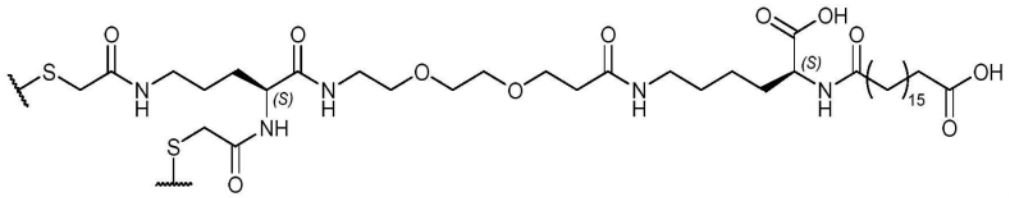
、



、



或



。

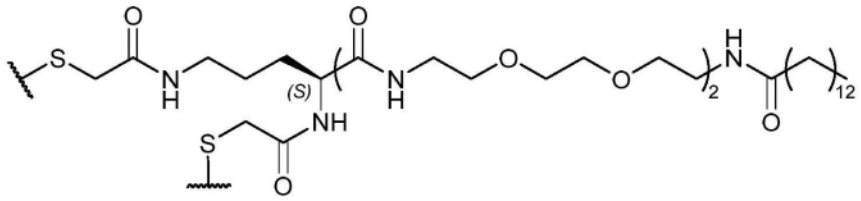
[0283] 在催乳素释放肽(PrRP)和与钉合体连接的半衰期延长分子的一些实施方案中,肽缀合物包含:

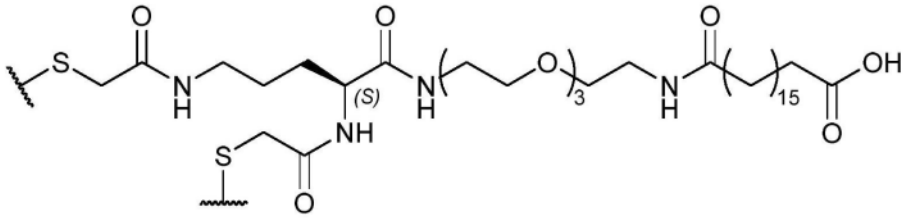
a)催乳素释放肽(PrRP),其包含选自SEQ ID NO:83-105的肽序列;以及

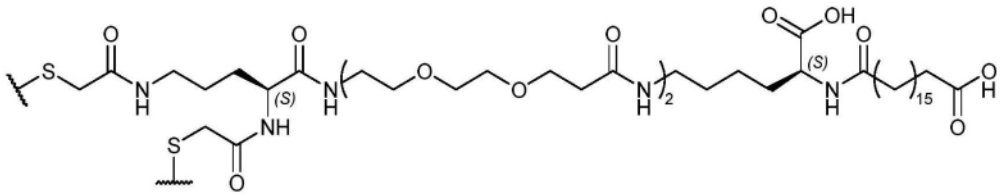
b)连接至钉合体的半衰期延长分子,其中钉合体在第一半胱氨酸和第二半胱氨酸处连接至该肽;

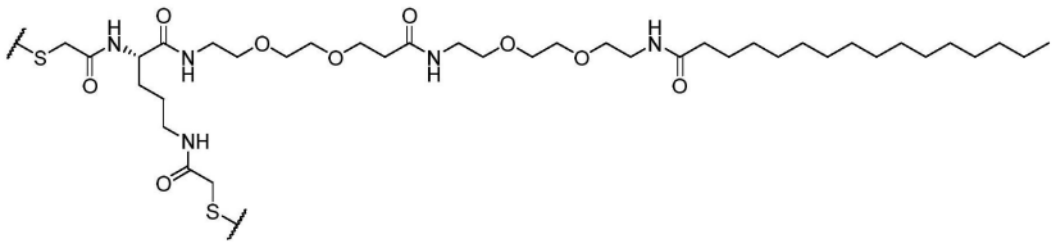
该半衰期延长分子连接至具有以下结构的钉合体("S"为半胱氨酸残基的一部

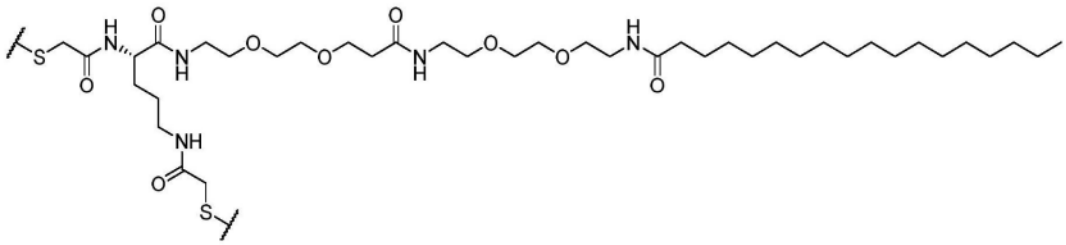
分)：

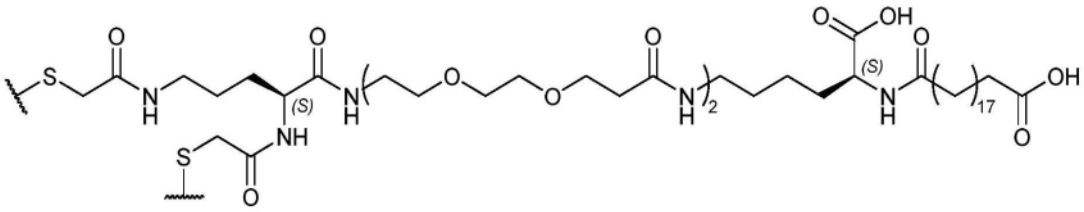


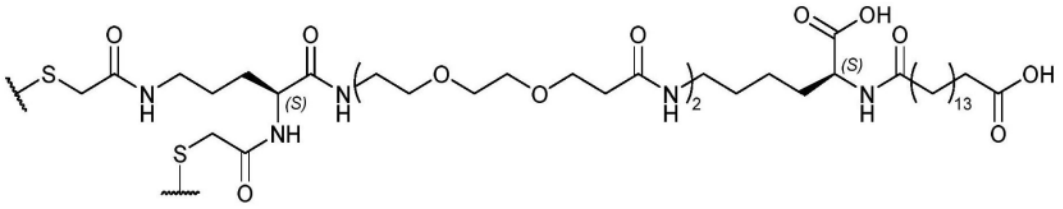




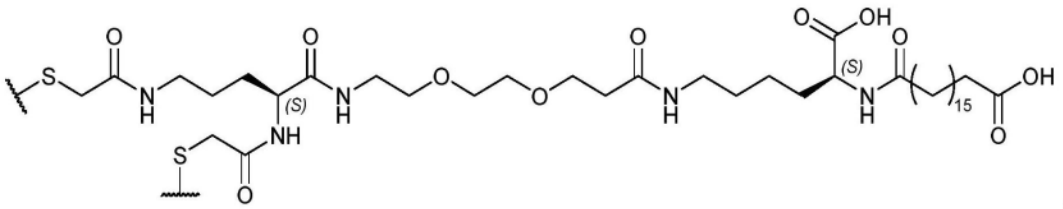








或



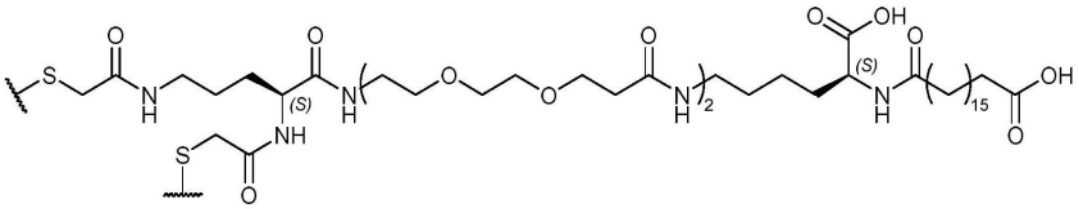
。

[0284] 在催乳素释放肽(PrRP)和与钉合体连接的半衰期延长分子的一些实施方案中,肽缀合物包含:

a)催乳素释放肽(PrRP),其包含选自SEQ ID NO:83-105的肽序列;以及

b)连接至钉合体的半衰期延长分子,其中钉合体在第一半胱氨酸和第二半胱氨酸处连接至该肽;

该半衰期延长分子连接至具有以下结构的钉合体("S"为半胱氨酸残基的一部分):



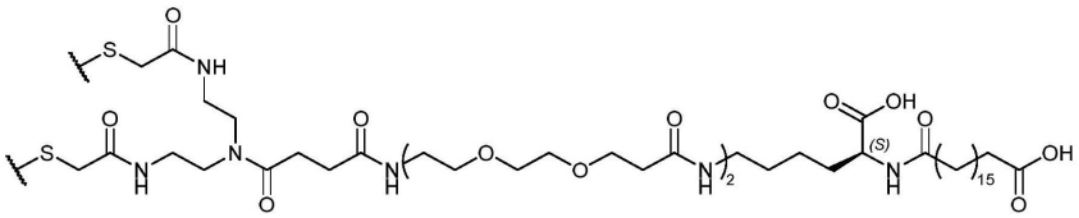
。

[0285] 在催乳素释放肽(PrRP)和与钉合体连接的半衰期延长分子的一些实施方案中,肽缀合物包含:

a)催乳素释放肽(PrRP),其包含选自SEQ ID NO:83-105的肽序列;以及

b)连接至钉合体的半衰期延长分子,其中钉合体在第一半胱氨酸和第二半胱氨酸处连接至该肽;

该半衰期延长分子连接至具有以下结构的钉合体("S"为半胱氨酸残基的一部分):



。

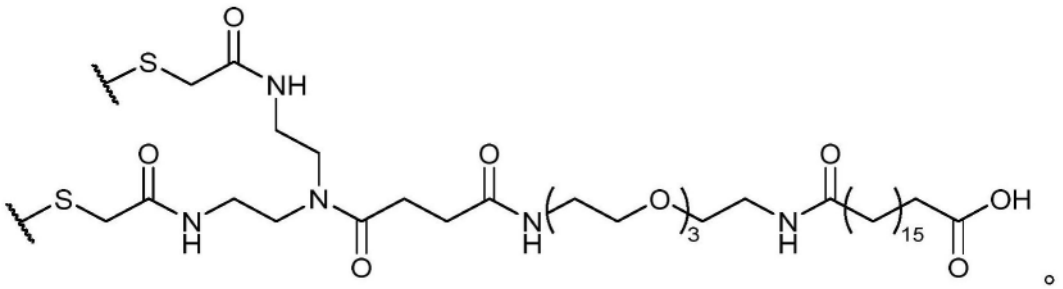
[0286] 在催乳素释放肽(PrRP)和与钉合体连接的半衰期延长分子的一些实施方案中,肽缀合物包含:

a)催乳素释放肽(PrRP),其包含选自SEQ ID NO:83-105的肽序列;以及

b)连接至钉合体的半衰期延长分子,其中钉合体在第一半胱氨酸和第二半胱氨酸处连接至该肽;

该半衰期延长分子连接至具有以下结构的钉合体("S"为半胱氨酸残基的一部

分)：

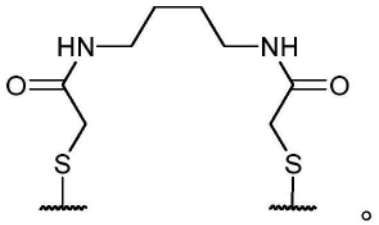


[0287] 在催乳素释放肽(PrRP)的一些实施方案中,肽缀合物包含：

a)催乳素释放肽(PrRP),其包含选自SEQ ID NO:83-105的肽序列;以及

b)在第一半胱氨酸和第二半胱氨酸处与肽连接的钉合体；

该半衰期延长分子连接至具有以下结构的钉合体(“S”为半胱氨酸残基的一部分)：



药代动力学

[0288] 肽缀合物积极影响药代动力学或药效学行为的机制包括但不限于(i)预防或减轻治疗剂的体内蛋白水解降解或其他活性降低化学修饰;(ii)通过减少肾过滤、减少受体介导的清除或增加生物利用度来改善半衰期或其他药代动力学性质;(iii)降低毒性;(iv)增加溶解度;和/或(v)增加未缀合的治疗剂的生物活性和/或靶标选择性。治疗剂可包含PYY受体调节剂、GLP-1受体调节剂、GCG受体调节剂、GIP受体调节剂或调节其组合的试剂(例如肽)。

[0289] 肽缀合物可在与治疗剂连接时增强该治疗剂的一种或多种药代动力学性质。在与单独的治疗剂或未修饰的治疗性肽相比时,如通过药效学测量的,本文公开的肽缀合物可将治疗剂的一种或多种药代动力学性质增强至少约200％。在与单独的治疗剂或未修饰的治疗性肽相比时,如通过药效学测量的,本文公开的肽缀合物可使治疗剂的一种或多种药代动力学性质增强至少约300％、400％、500％、600％、700％、800％、900％、1000％。

[0290] 药代动力学性质可包括半衰期。肽缀合物的半衰期可以是单独的未修饰的肽的半衰期的至少约2倍。本文公开的肽缀合物的半衰期可以是单独的治疗剂或未修饰的治疗性肽的半衰期的至少约3、4、5或10倍。本文公开的肽缀合物的半衰期可以是单独的未修饰的肽的半衰期的至少约6、7、8、9、10、15、20、25、30、35、40、45或50倍。

[0291] 在一些实施方案中,肽缀合物的半衰期是未修饰形式的肽的半衰期的至少约2倍。在一些实施方案中,肽缀合物的半衰期是未修饰形式的肽的半衰期的至少约5倍。在一些实施方案中,肽缀合物的半衰期是未修饰形式的肽的半衰期的至少约10倍。

[0292] 此外,与未缀合形式的未修饰的治疗性肽相比,本文所述的肽缀合物可在增加肽的可制造性和/或降低肽的免疫原性方面具有积极影响。

治疗用途

[0293] 在一方面，本文公开的肽缀合物可用于治疗、缓解、抑制和/或预防一种或多种疾病和/或病症。该疾病和/或病症可以是慢性疾病或病症。或者，该疾病和/或病症是急性疾病或病症。该疾病或病症可以是复发性的、难治性的、加速的或缓解的。该疾病或病症可影响一种或多种细胞类型。该一种或多种疾病和/或病症可以是自身免疫疾病、炎性疾病或代谢疾病。

[0294] 本文公开了用于在有需要的对象中治疗疾病或病症的方法，该方法包括向对象施用本文所述的肽缀合物。上述疾病或病症可以是糖尿病或肥胖症、或与糖尿病或肥胖症相关的医学病症。上述疾病或病症可以是非酒精性脂肪肝病(NAFLD)、非酒精性脂肪性肝炎(NASH)或心血管疾病。上述疾病或病症可以是自身免疫性病症。上述疾病或病症可以是克罗恩病(Crohn's disease)或溃疡性结肠炎。上述疾病或病症可以是短肠综合征(SBS)。上述疾病或病症可以是炎性肠病(IBD)、炎性肠综合征(IBS)或银屑病。上述疾病或病症可以是阿尔茨海默病(Alzheimer's disease)、帕金森病(Parkinson's disease)或亨廷顿病(Huntington's disease)。PLC可以与一种或多种另外的治疗剂一起施用。本文公开了在有需要的对象中治疗疾病或病症的方法，该方法包括向对象施用本文公开的包含一种或多种肽缀合物的组合物。

[0295] 本文提供了在有需要的对象中预防或治疗代谢疾病或病症的方法，该方法包括向对象施用本文所述的肽缀合物。代谢疾病或病症可以是糖尿病。代谢疾病或病症可以是肥胖症。代谢疾病或病症可以是糖原贮积病(glycogen storage disease)、苯丙酮酸尿症(phenylketonuria)、枫糖尿症(maple syrup urine disease)、戊二酸血症1型(glutaric acidemia type 1)、氨基甲酰基磷酸合成酶I缺乏症(Carbamoyl phosphate synthetase I deficiency)、尿黑酸尿症(alcaptonuria)、中链酰基辅酶A脱氢酶缺乏症(Medium-chain acyl-coenzyme A dehydrogenase deficiency,MCADD)、急性间歇性卟啉症(acute intermittent porphyria)、莱施-奈恩综合征(Lesch-Nyhan syndrome)、类脂先天性肾上腺增生症(lipoid congenital adrenal hyperplasia)、先天性肾上腺增生症(congenital adrenal hyperplasia)、POMPC缺乏症(POMPC deficiency)、LEPR缺乏症(LEPR deficiency)、巴尔得-别德尔综合征(Bardet Biedl syndrome)、Alstrome综合征(Alstrome syndrome)、普拉德-威利综合征(Prader-Willi Syndrome)、卡恩斯-塞尔综合征(Kearns-Sayre syndrome)、Zellweger综合征(Zellweger syndrome)、高雪氏病(Gaucher's disease)或尼曼皮克症(Niemann Pick disease)。

[0296] 本文提供了在有需要的对象中预防或治疗NAFLD、NASH或心血管疾病的方法，该方法包括向对象施用本文所述的肽缀合物。

[0297] 本文提供了在有需要的对象中预防或治疗短肠综合征(SBS)的方法，该方法包括向对象施用本文所述的肽缀合物。

[0298] 本文提供了在有需要的对象中预防或治疗炎性肠病(IBD)、炎性肠综合征(IBS)或银屑病的方法，该方法包括向对象施用本文所述的肽缀合物。

[0299] 本文提供了在有需要的对象中预防或治疗克罗恩病或溃疡性结肠炎的方法，该方法包括向对象施用本文所述的肽缀合物。

[0300] 本文提供了一种预防或治疗睡眠障碍的方法。

[0301] 本文提供了一种预防或治疗失神发作的方法。

本文提供了一种预防或治疗慢性肾病(例如糖尿病并发症)的方法。本文提供了一种预防或治疗糖尿病性心脏病的方法。

本文提供了一种预防或治疗心血管事件的方法。

[0302] 本文提供了一种在有需要的对象中预防或治疗阿尔茨海默病、帕金森病或亨廷顿病的方法,该方法包括向对象施用本文所述的肽缀合物。

[0303] 本文提供了一种预防或治疗胃和肠相关病症的方法,诸如治疗具有受损肠功能的新生儿、骨质疏松症和DPP-IV(二肽基肽酶-IV)介导的病状。作为实例,胃和肠相关病症包括溃疡(ulcer)、胃炎(gastritis)、消化功能紊乱(digestion disorder)、吸收不良综合征(malabsorption syndrome)、短肠综合征(short-gut syndrome)、盲肠综合征(cul-de-sac syndrome)、炎性肠病(inflammatory bowel disease)、乳糜泻(celiac sprue)(例如由谷蛋白诱导的肠病或麸质过敏症引起)、热带口炎性腹泻(tropical sprue)、低丙球蛋白血症(hypogammaglobulinemia sprue)、肠炎(enteritis)、局限性肠炎(regional enteritis)(克罗恩病Crohn's disease)、溃疡性结肠炎(ulcerative colitis)、与腹泻相关的肠易激综合征(irritable bowel syndrome associated with diarrhea)、小肠损伤(Small intestine damage)和短肠综合征(short bowel syndrome)。

[0304] 本文提供了一种预防或治疗放射性肠炎、感染性或感染后肠炎、以及由于毒性或其他化学治疗剂引起的小肠损伤的方法。这可能需要在化疗或放疗过程之前、同时或之后施用肽缀合物,以减少化疗的副作用如腹泻、腹部绞痛和呕吐,并减少由化疗或放疗导致的肠上皮的结构和功能损伤。

[0305] 本文提供了一种预防或治疗营养不良,例如诸如消耗综合征恶病质(wasting syndrome cachexia)和厌食症的病症的方法。

[0306] 本文提供了一种在有需要的对象中预防或治疗受益于PYY受体调节剂的疾病或病症的方法,其包括向对象施用本文所述的肽缀合物。

[0307] 本文提供了一种在有需要的对象中预防或治疗受益于GLP-1受体调节剂的疾病或病症的方法,其包括向对象施用本文所述的肽缀合物。

[0308] 本文提供了一种在有需要的对象中预防或治疗受益于GLP-1/GIP受体调节剂的疾病或病症的方法,其包括向对象施用本文所述的肽缀合物。

[0309] 本文提供了一种在有需要的对象中预防或治疗受益于GLP-1/GCG受体调节剂的疾病或病症的方法,其包括向对象施用本文所述的肽缀合物。

[0310] 本文提供了一种在有需要的对象中预防或治疗受益于催乳素释放肽(PrRP)受体调节剂的疾病或病症的方法,其包括向对象施用本文所述的肽缀合物。

组合

[0311] 本文公开了一种包含本文所述的肽缀合物和一种或多种另外的治疗剂的药物组合物。

[0312] 另外的治疗剂可包含一种或多种其他糖尿病药物(diabetes drugs)、DPP4抑制剂(DPP4 inhibitor)、SGLT2抑制剂(SGLT2 inhibitor)、降血糖药物(hypoglycemic drug)和双胍药物(biguanidine drug)、胰岛素促分泌剂(insulin secretogogue)和磺酰脲药物(sulfonyl urea drug)、TZD药物(TZD drug)、胰岛素(insulin)和胰岛素类似物(insulin analog)、FGF21和类似物(analog)、瘦素(leptin)或瘦素类似物(leptin analog)、胰淀素

(amylin)和胰淀素类似物(amylin analog)、抗炎药(anti-inflammatory drug)、环孢菌素A(cyclosporine A)或FK506、5-ASA或他汀(statin)或其任何组合。另外的治疗剂可以是阿司匹林。

[0313] 另外的治疗剂可包含治疗性肠促胰岛素或其衍生物。肠促胰岛素或其衍生物的非限制性实例包括GLP-1、胰高血糖素、胃泌酸调节素、毒蜥外泌肽-4、GLP-2、GIP及其组合。

[0314] 在一些实施方案中,组合治疗显示出比施用单一药剂更优越的葡萄糖控制、摄食量减少和体重减轻。在一些实施方案中,组合治疗模拟了肥胖患者中减肥手术的有益效果。

[0315] 在一些实施方案中,PYY受体调节剂与GLP-1受体调节剂一起施用。

[0316] 在一些实施方案中,PYY受体调节剂与GLP-1/GIP受体调节剂一起施用。

[0317] 在一些实施方案中,PYY受体调节剂与GLP-1/GCG受体调节剂一起施用。

[0318] 在一些实施方案中,GLP-1/GIP受体调节剂与GLP-1受体调节剂一起施用。

[0319] 在一些实施方案中,GLP-1/GIP受体调节剂与GLP-1/GCG受体调节剂一起施用。

[0320] 在一些实施方案中,GLP-1/GCG受体调节剂与GLP-1受体调节剂一起施用。

[0321] 在一些实施方案中,组合包含本文描述的多种肽缀合物。在一些实施方案中,另外的治疗剂为缀合物187。

组合物

[0322] 本文公开了包含本文所述的肽缀合物和药学上可接受的赋形剂或媒介物的药物组合物。药学上可接受的赋形剂或媒介物可包括载体(carrier)、赋形剂(excipient)、稀释剂(diluent)、抗氧化剂(antioxidant)、防腐剂(preservative)、着色剂(coloring agent)、调味剂(flavoring agent)和稀释剂(diluting agent)、乳化剂(emulsifying agent)、悬浮剂(suspending agent)、溶剂(solvent)、填充剂(filler)、膨胀剂(bulking agent)、缓冲液(buffer)、递送媒介物(delivery vehicle)、张度剂(tonicity agent)、共溶剂(cosolvent)、润湿剂(wetting agent)、络合剂(complexing agent)、缓冲剂(buffering agent)、抗微生物剂(antimicrobial)和表面活性剂(surfactant)。

[0323] 中性缓冲盐水或与血清白蛋白混合的盐水是示例性的合适载体。药物组合物可包括抗氧化剂如抗坏血酸;低分子量多肽;蛋白质如血清白蛋白、明胶或免疫球蛋白;亲水性聚合物如聚乙烯吡咯烷酮;氨基酸如甘氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺、精氨酸或赖氨酸;单糖、二糖和其他碳水化合物,包括葡萄糖、甘露糖或糊精;螯合剂如EDTA;糖醇如甘露醇或山梨醇;成盐抗衡离子(salt-forming counterions)如钠;和/或非离子表面活性剂如Tween、普朗尼克类(pluronics)或聚乙二醇(PEG)。还例如,合适的张度增强剂包括碱金属卤化物(优选氯化钠或氯化钾)、甘露醇、山梨醇等。合适的防腐剂包括苯扎氯铵、硫柳汞、苯乙醇、对羟基苯甲酸甲酯、对羟基苯甲酸丙酯、氯己定、山梨酸等。过氧化氢也可用作防腐剂。合适的助溶剂包括甘油、丙二醇和PEG。合适的络合剂包括咖啡因、聚乙烯吡咯烷酮、β-环糊精或羟丙基-β-环糊精。合适的表面活性剂或润湿剂包括脱水山梨糖醇酯、聚山梨醇酯如聚山梨醇酯80、氨丁三醇、卵磷脂、胆固醇、泰洛沙泊(tyloxapal)等。缓冲剂可以是常规缓冲剂,例如乙酸盐、硼酸盐、柠檬酸盐、磷酸盐、碳酸氢盐或Tris-HCl。乙酸盐缓冲液可为约pH 4-5.5,Tris缓冲液可为约pH 7-8.5。其他药剂在麦克出版公司(Mack Publishing Company,1990)出版的A.R.Gennaro编辑的《雷氏药学大全》第18版(Remington's Pharmaceutical Sciences,18th Edition,A.R.Gennaro,ed.)中阐述。

[0324] 组合物可以是液体形式或冻干或冷冻干燥形式，并且可以包括一种或多种冻干保护剂、赋形剂、表面活性剂、高分子量结构添加剂和/或膨胀剂。在一个实施方案中，包括冻干保护剂，它是非还原糖如蔗糖、乳糖或海藻糖。通常包括的冻干保护剂的量使得在重构时，所得制剂将是等渗的，尽管高渗或略微低渗制剂也可能是合适的。此外，冻干保护剂的量应足以防止冻干时蛋白质的不可接受量的降解和/或聚集。预冻干制剂中糖(例如蔗糖、乳糖、海藻糖)的示例性冻干保护剂浓度为约10mM至约400mM。在另一个实施方案中，包括表面活性剂，例如非离子表面活性剂和离子表面活性剂如聚山梨醇酯(polysorbate)(例如聚山梨醇酯20、聚山梨醇酯80)；泊洛沙姆(poloxamer)(例如，泊洛沙姆188)；聚(乙二醇)苯基醚(poly(ethylene glycol)phenyl ether)(例如Triton)；十二烷基硫酸钠(sodium dodecyl sulfate,SDS)；月桂硫酸钠(sodium laurel sulfate)；辛基糖苷钠(sodium octyl glycoside)；月桂基磺基甜菜碱(lauryl-sulfobetaine)、肉豆蔻基磺基甜菜碱(myristyl-sulfobetaine)、亚油烯基磺基甜菜碱(linoleyl-sulfobetaine)或硬脂基磺基甜菜碱(stearyl-sulfobetaine)；月桂基肌氨酸(lauryl-sarcosine)、肉豆蔻基肌氨酸(myristyl-sarcosine)、亚油烯基肌氨酸(linoleyl-sarcosine或硬脂基肌氨酸(stearyl-sarcosine)；亚油烯基甜菜碱(linoleyl-betaine)、肉豆蔻基甜菜碱(myristyl-betaine)或鲸蜡基甜菜碱(cetyl-betaine)；月桂酰氨基丙基甜菜碱(lauroamidopropyl-betaine)、椰油酰氨基丙基甜菜碱(cocamidopropyl-betaine)、亚油酰氨基丙基甜菜碱(linoleamidopropyl-betaine)、肉豆蔻酰氨基丙基甜菜碱(myristamidopropyl-betaine)、棕榈酰氨基丙基甜菜碱(palmidopropyl-betaine)或异硬脂酰氨基丙基甜菜碱(isostearamidopropyl-betaine)(例如，月桂酰氨基丙基)；肉豆蔻酰氨基丙基二甲胺(myristamidopropyl-dimethylamine)、棕榈酰氨基丙基二甲胺(palmidopropyl-dimethylamine)或异硬脂酰氨基丙基二甲胺(isostearamidopropyl-dimethylamine)；甲基椰油酰基牛磺酸钠(sodium methyl cocoyl-taurate)或甲基椰油酰基牛磺酸二钠(sodium methyl cocoyl-taurate)；以及MONAQUAT™系列(Mona Industries,Inc.,Paterson,N.J.)、聚乙二醇(polyethyl glycol)、聚丙二醇(polypropyl glycol)以及乙二醇和丙二醇的共聚物(copolymers of ethylene and propylene glycol)(例如普朗尼克类(Pluronics),PF68等)。可存在于预冻干制剂中的表面活性剂的示例性量为约0.001-0.5%。高分子量结构添加剂(例如，填充剂、粘合剂)可以包括例如阿拉伯树胶(acacia)、白蛋白(albumin)、海藻酸(alginic acid)、磷酸钙(二元)(calcium phosphate(dibasic))、纤维素(cellulose)、羧甲基纤维素(carboxymethylcellulose)、羧甲基纤维素钠(carboxymethylcellulose sodium)、羟乙基纤维素(hydroxyethylcellulose)、羟丙基纤维素(hydroxypropylcellulose)、羟丙基甲基纤维素(hydroxypropylmethylcellulose)、微晶纤维素(microcrystalline cellulose)、葡聚糖(dextran)、糊精(dextrin)、葡聚糖结合剂(dextrate)、蔗糖(sucrose)、纤基乙酸钠(tylose)、预胶化淀粉(pregelatinized starch)、硫酸钙(calcium sulfate)、直链淀粉(amylose)、甘氨酸(glycine)、膨润土(bentonite)、麦芽糖(maltose)、山梨醇(sorbitol)、乙基纤维素(ethylcellulose)、磷酸氢二钠(disodium hydrogen phosphate)、磷酸二钠(disodium phosphate)、焦亚硫酸二钠(disodium pyrosulfite)、聚乙烯醇(polyvinyl alcohol)、明胶(gelatin)、葡萄糖(glucose)、瓜尔胶(guar gum)、液体葡萄糖(liquid glucose)、可压缩糖(compressible

sugar)、硅酸镁铝(magnesium aluminum silicate)、麦芽糖糊精(maltodextrin)、聚环氧乙烷(polyethylene oxide)、聚甲基丙烯酸酯(polymethacrylate)、聚维酮(povidone)、海藻酸钠(sodium alginate)、黄蓍胶(tragacanth)、微晶纤维素(microcrystalline cellulose)、淀粉(starch)和玉米醇溶蛋白(zein)。高分子量结构添加剂的示例性浓度为按重量计0.1-10%。在其他实施方案中,可以包括膨胀剂(例如甘露醇、甘氨酸)。

[0325] 组合物可适于肠胃外施用。示例性的组合物适于通过技术人员可用的任何途径注射或输注到动物中,例如关节内、皮下、静脉内、肌内、腹膜内、脑内(脑实质内)、脑室内、肌内、眼内、动脉内或病灶内途径。肠胃外制剂通常可以是无菌、无热原、等渗水溶液,任选地含有药学上可接受的防腐剂。

[0326] 非水性溶剂的实例是丙二醇、聚乙二醇、植物油如橄榄油以及可注射的有机酯如油酸乙酯。水性载体包括水、醇/水溶液,乳液或悬浮液,包括盐水和缓冲介质。肠胃外载体包括氯化钠溶液、林格氏葡萄糖、葡萄糖和氯化钠、乳酸化林格氏液或不挥发性油。静脉内载体包括流体和营养补充剂、电解质补充剂(例如基于林格氏葡萄糖的那些)等。还可以存在防腐剂和其他添加剂,例如抗微生物剂、抗氧化剂、螯合剂和惰性气体等。一般参见麦克出版社(Mack Eds.,1980)出版的《雷氏药学大全》第16版(Remington's Pharmaceutical Science,16th Ed.)

[0327] 本文所述的药物组合物可以以在特定局部环境中提供产品的局部浓度(例如推注、贮库效应)和/或增加的稳定性或半衰期的方式配制用于受控或持续递送。组合物可包括本文公开的肽缀合物、多肽、核酸或载体的制剂,其具有聚合化合物如聚乳酸、聚乙醇酸等的颗粒制剂以及试剂如生物可降解的基质、可注射的微球、微囊颗粒、微胶囊、生物可蚀性颗粒珠、脂质体,以及提供活性剂的受控或持续释放的可植入的递送装置,该活性剂随后可以作为贮库注射剂递送。配制这种持续或受控递送方式的技术是已知的,并且已经开发了多种聚合物并用于药物的受控释放和递送。这样的聚合物通常是生物可降解的和生物相容的。聚合物水凝胶,包括通过对映体聚合物或多肽片段的络合形成的那些,以及具有温度或pH敏感性质的水凝胶,由于涉及捕获生物活性蛋白质试剂(例如,肽缀合物)的温和和水性条件,对于提供药物贮库效应可能是期望的。

[0328] 根据预期的施用途径、递送形式和所需剂量,可以鉴于本发明内容和制剂技术的一般知识来确定合适的和/或优选的药物制剂。不管施用方式如何,可根据患者体重、体表面积或器官大小计算有效剂量。进一步细化用于确定涉及本文所述的每种制剂的治疗的适当剂量的计算在本领域中是常规进行的,并且在本领域中常规进行的任务的范围内。可以通过使用适当的剂量-反应数据来确定适当的剂量。

定义

[0329] 如本文和所附权利要求中使用的,除非上下文另外明确指出,否则单数形式"一种(a/an)"和"所述(the)"包括复数指示物。因此,例如,提及"一种试剂"包括多种这样的试剂,提及"该细胞"包括提及一种或多种细胞(或提及多个细胞)及其本领域技术人员已知的等价物,等等。当范围在本文中用于物理性质(例如分子量)或化学性质(例如化学式)时,意图包括范围和其中的具体实施方案的所有组合和子组合。当提及数字或数值范围时,术语"约"意指所提及的数字或数值范围是在实验可变性内(或在统计实验误差内)的近似值,并且因此在某些情况下,数字或数值范围将在该数字或数值范围的1%与15%之间变化。术语

“包含(comprising)”(和相关术语如“包含(comprise/comprises)”或“具有(having)”或“包括(including)”)不旨在排除在其他某些实施方案中,例如,本文所述的任何物质组合物、组合物、方法或过程等的实施方案“由所述特征组成”或“基本上由所述特征组成”。

[0330] 如在说明书和所附权利要求中所使用的,除非有相反的说明,否则以下术语具有以下指示的含义。

[0331] “烷基”是指直链或支链烃单价基团,其可以是完全饱和的或不饱和的,具有1至约10个碳原子或1至6个碳原子,其中烷基残基的sp3杂化的碳通过单键连接至分子的其余部分。饱和烃单价基团的实例包括但不限于甲基、乙基、正丙基、异丙基、2-甲基-1-丙基、2-甲基-2-丙基、2-甲基-1-丁基、3-甲基-1-丁基、2-甲基-3-丁基、2,2-二甲基-1-丙基、2-甲基-1-戊基、3-甲基-1-戊基、4-甲基-1-戊基、2-甲基-2-戊基、3-甲基-2-戊基、4-甲基-2-戊基、2,2-二甲基-1-丁基、3,3-二甲基-1-丁基、2-乙基-1-丁基、正丁基、异丁基、仲丁基、叔丁基、正戊基、异戊基、新戊基、叔戊基和己基、以及更长的烷基、例如庚基、辛基等。每当其在本文中出现时,数值范围如“C_1-C_6烷基”意指烷基由1个碳原子、2个碳原子、3个碳原子、4个碳原子、5个碳原子或6个碳原子组成,尽管本定义还涵盖其中未指定数值范围的术语“烷基”的出现。在一些实施方案中,烷基为C_1-C_{10}烷基、C_1-C_9烷基、C_1-C_8烷基、C_1-C_7烷基、C_1-C_6烷基、C_1-C_5烷基、C_1-C_4烷基、C_1-C_3烷基、C_1-C_2烷基或C_1烷基。当烷基是指不饱和直链或支链烃单价基时,它被称为“烯基”或“炔基”。烯基可以是关于双键的顺式或反式构象,并且应理解为包括两种异构体。烯基的实例包括但不限于乙烯基(-CH=CH_2)、1-丙烯基(-CH_2CH=CH_2)、异丙烯基[-C(CH_3)=CH_2]、丁烯基、1,3-丁二烯基等。每当其在本文中出现时,数值范围如“C_2-C_6烯基”意指烯基可由2个碳原子、3个碳原子、4个碳原子、5个碳原子或6个碳原子组成,尽管本定义还涵盖其中未指定数值范围的术语“烯基”的出现。在一些实施方案中,烯基为C_2-C_{10}烯基、C_2-C_9烯基、C_2-C_8烯基、C_2-C_7烯基、C_2-C_6烯基、C_2-C_5烯基、C_2-C_4烯基、C_2-C_3烯基或C_2烯基。炔基的实例包括但不限于乙炔基、2-丙炔基、2-等。每当其在本文中出现时,数值范围如“C_2-C_6炔基”意指炔基可由2个碳原子、3个碳原子、4个碳原子、5个碳原子或6个碳原子组成,尽管本定义还涵盖其中未指定数值范围的术语“炔基”的出现。在一些实施方案中,烯基为C_2-C_{10}炔基、C_2-C_9炔基、C_2-C_8炔基、C_2-C_7炔基、C_2-C_6炔基、C_2-C_5炔基、C_2-C_4炔基、C_2-C_3炔基或C_2炔基。除非在说明书中另有具体说明,否则烷基任选地如下所述被例如氧代、卤素、氨基、腈、硝基、羟基、卤代烷基、烷氧基、芳基、环烷基、杂环烷基、杂芳基等取代。在一些实施方案中,烷基任选地被氧代、卤素、-CN、-CF_3、-OH、-OMe、-NH_2或-NO_2取代。在一些实施方案中,烷基任选地被氧代、卤素、-CN、-CF_3、-OH或-OMe取代。在一些实施方案中,烷基任选地被卤素取代。

[0332] “亚烷基”是指直链或支链二价烃链。每当其在本文中出现时,数值范围如“C_1-C_6亚烷基”意指亚烷基由1个碳原子、2个碳原子、3个碳原子、4个碳原子、5个碳原子或6个碳原子组成,尽管本定义还涵盖其中未指定数值范围的术语“亚烷基”的出现。在一些实施方案中,亚烷基为C_1-C_{10}亚烷基、C_1-C_9亚烷基、C_1-C_8亚烷基、C_1-C_7亚烷基、C_1-C_6亚烷基、C_1-C_5亚烷基、C_1-C_4亚烷基、C_1-C_3亚烷基、C_1-C_2亚烷基或C_1亚烷基。除非说明书中另有具体说明,否则亚烷基可任选地被例如氧代、卤素、氨基、腈、硝基、羟基、卤代烷基、烷氧基、芳基、环烷基、杂环烷基、杂芳基等取代。在一些实施方案中,亚烷基任选地被氧代、卤素、-CN、-CF_3、-OH、-OMe、-NH_2或-NO_2取代。在一些实施方案中,亚烷基任选地被氧代、卤素、-CN、-CF_3、-OH或-OMe

取代。在一些实施方案中，亚烷基任选地被卤素取代。

[0333] “烷氧基”是指式-OR_a的基团，其中R_a为如所定义的烷基。除非说明书中另有具体说明，否则烷氧基可任选地被例如氧代、卤素、氨基、腈、硝基、羟基、卤代烷基、烷氧基、芳基、环烷基、杂环烷基、杂芳基等取代。在一些实施方案中，烷氧基任选地被氧代、卤素、-CN、-CF_3、-OH、-OMe、-NH_2或-NO_2取代。在一些实施方案中，烷氧基任选地被氧代、卤素、-CN、-CF_3、-OH或-OMe取代。在一些实施方案中，烷氧基任选地被卤素取代。

[0334] “芳基”是指衍生自包含氢、6至30个碳原子和至少一个芳环的烃环体系的基团。芳基可以是单环、双环、三环或四环体系，其可以包括稠环(当与环烷基或杂环烷基环稠合时，芳基通过芳环原子键合)或桥环体系。在一些实施方案中，芳基是6-10元芳基。在一些实施方案中，芳基是6元芳基。芳基包括但不限于衍生自亚蒽基、亚萘基、亚菲基、蒽、蒽、苯、屈、荧蒽、芴、不对称引达省(as-indacene)、对称引达省(s-indacene)、茚满、茚、萘、非那烯、菲、七曜烯(pleiadene)、苊和苯并菲的烃环体系的芳基。在一些实施方案中，芳基是苯基。除非说明书中另有具体说明，否则芳基可任选地被例如卤素、氨基、腈、硝基、羟基、烷基、烯基、炔基、卤代烷基、烷氧基、芳基、环烷基、杂环烷基、杂芳基等取代。在一些实施方案中，芳基任选地被卤素、甲基、乙基、-CN、-CF_3、-OH、-OMe、-NH_2或-NO_2取代。在一些实施方案中，芳基任选地被卤素、甲基、乙基、-CN、-CF_3、-OH或-OMe取代。在一些实施方案中，芳基任选地被卤素取代。

[0335] “环烷基”是指稳定的、部分或完全饱和的单环或多环碳环，其可包括稠环(当与芳基或杂芳基环稠合时，环烷基通过非芳族环原子键合)或桥环体系。代表性的环烷基包括但不限于具有3-15个碳原子(C_3-C_{15}环烷基)、3-10个碳原子(C_3-C_{10}环烷基)、3-8个碳原子(C_3-C_8环烷基)、3-6个碳原子(C_3-C_6环烷基)、3-5个碳原子(C_3-C_5环烷基)或3-4个碳原子(C_3-C_4环烷基)的环烷基。在一些实施方案中，环烷基是3-6元环烷基。在一些实施方案中，环烷基是5-6元环烷基。单环环烷基包括例如环丙基、环丁基、环戊基、环己基、环庚基和环辛基。多环环烷基或碳环包括例如金刚烷基、降冰片基、十氢萘基、双环[3.3.0]辛烷、双环[4.3.0]壬烷、顺式-十氢化萘、反式-十氢化萘、双环[2.1.1]己烷、双环[2.2.1]庚烷、双环[2.2.2]辛烷、双环[3.2.2]壬烷和双环[3.3.2]癸烷以及7,7-二甲基-双环[2.2.1]庚烷基。部分饱和的环烷基包括例如环戊烯基、环己烯基、环庚烯基和环辛烯基。除非说明书中另有特别说明，否则环烷基任选地被例如氧代、卤素、氨基、腈、硝基、羟基、烷基、烯基、炔基、卤代烷基、烷氧基、芳基、环烷基、杂环烷基、杂芳基等取代。在一些实施方案中，环烷基任选地被氧代、卤素、甲基、乙基、-CN、-CF_3、-OH、-OMe、-NH_2或-NO_2取代。在一些实施方案中，环烷基任选地被氧代、卤素、甲基、乙基、-CN、-CF_3、-OH或-OMe取代。在一些实施方案中，环烷基任选地被卤素取代。

[0336] “卤代”或“卤素”是指溴、氯、氟或碘。在一些实施方案中，卤素为氟或氯。在一些实施方案中，卤素为氟。

[0337] “卤代烷基”是指被一个或多个如上定义的卤代基团取代的如上定义的烷基，例如三氟甲基、二氟甲基、氟甲基、三氯甲基、2,2,2-三氟乙基、1,2-二氟乙基、3-溴-2-氟丙基、1,2-二溴乙基等。

[0338] “杂环烷基”是指包含2-23个碳原子和1-8个选自氮、氧、磷和硫的杂原子的稳定的3-24元部分或完全饱和的环基团。代表性的杂环烷基包括但不限于具有2-15个碳原子的杂

环烷基(C_2-C_{15}杂环烷基)、2-10个碳原子的杂环烷基(C_2-C_{10}杂环烷基)、2-8个碳原子的杂环烷基(C_2-C_8杂环烷基)、2-6个碳原子的杂环烷基(C_2-C_6杂环烷基)、2-5个碳原子的杂环烷基(C_2-C_5杂环烷基)或2-4个碳原子的杂环烷基(C_2-C_4杂环烷基)。在一些实施方案中,杂环烷基是3-6元杂环烷基。在一些实施方案中,杂环烷基是5-6元杂环烷基。除非在说明书中另有具体说明,杂环烷基可以是单环、双环、三环或四环体系,其可以包括稠环(当与芳基或杂芳基环稠合时,杂环烷基通过非芳族环原子键合)或桥环体系;并且杂环烷基中的氮、碳或硫原子可以任选地被氧化;氮原子可以任选地被季铵化。此类杂环烷基的实例包括但不限于吖丙啶基(aziridinyl)、氮杂环丁烷基(azetidinyl)、二氧戊环基(dioxolanyl)、噻吩基[1,3]二噻烷基、十氢异喹啉基、咪唑啉基、咪唑烷基、异噻唑烷基、异噁唑烷基、吗啉基、八氢吲哚基、八氢异吲哚基、2-氧代哌嗪基、2-氧代哌啶基、2-氧代吡咯烷基、噁唑烷基、哌啶基、哌嗪基、4-哌啶酮基(4-piperidonyl)、吡咯烷基、吡唑烷基、奎宁环基、噻唑烷基、四氢呋喃基、三噻烷基、四氢吡喃基、硫代吗啉基、硫代吗啉基、1-氧代-硫代吗啉基、1,1-二氧代-硫代吗啉基、1,3-二氢异苯并呋喃-1-基(1,3-dihydroisobenzofuran-1-yl)、3-氧代-1,3-二氢异苯并呋喃-1-基、甲基-2-氧代-1,3-二氧杂环戊烯-4-基和2-氧代-1,3-二氧杂环戊烯-4-基。术语杂环烷基还包括碳水化合物的所有环形式,包括但不限于单糖、二糖和寡糖。除非另有说明,杂环烷基在环中具有2-10个碳。应当理解,当提及杂环烷基中的碳原子数时,杂环烷基中的碳原子数与构成杂环烷基(即杂环烷基环的骨架原子)的原子(包括杂原子)的总数不同。部分饱和的杂环烷基包括例如二氢吡咯基或四氢吡啶。除非说明书中另有特别说明,否则杂环烷基任选地被例如氧代、卤素、氨基、腈、硝基、羟基、烷基、烯基、炔基、卤代烷基、烷氧基、芳基、环烷基、杂环烷基、杂芳基等取代。在一些实施方案中,杂环烷基任选地被氧代、卤素、甲基、乙基、-CN、-CF_3、-OH、-OMe、-NH_2或-NO_2取代。在一些实施方案中,杂环烷基任选地被氧代、卤素、甲基、乙基、-CN、-CF_3、-OH或-OMe取代。在一些实施方案中,杂环烷基任选地被卤素取代。

[0339] “杂烷基”是指烷基基团,其中烷基的一个或多个骨架原子选自除碳以外的原子,例如氧、氮(例如-NH-、-N(烷基)-)、硫或其组合。杂烷基在杂烷基的碳原子处连接至分子的其余部分。在一个方面,杂烷基是C_1-C_6杂烷基,其中杂烷基包含1-6个碳原子和一个或多个除碳以外的原子,例如氧、氮(例如-NH-、-N(烷基)-)、硫或其组合,其中杂烷基在杂烷基的碳原子处连接至分子的其余部分。除非说明书中另有特别说明,否则杂烷基任选地被例如氧代、卤素、氨基、腈、硝基、羟基、烷基、烯基、炔基、卤代烷基、烷氧基、芳基、环烷基、杂环烷基、杂芳基等取代。在一些实施方案中,杂烷基任选地被氧代、卤素、甲基、乙基、-CN、-CF_3、-OH、-OMe、-NH_2或-NO_2取代。在一些实施方案中,杂烷基任选地被氧代、卤素、甲基、乙基、-CN、-CF_3、-OH或-OMe取代。在一些实施方案中,杂烷基任选地被卤素取代。

[0340] “杂芳基”是指包含氢原子、1-13个碳原子、1-6个选自氮、氧、磷和硫的杂原子以及至少一个芳环的5-14元环体系基团。杂芳基可以是单环、双环、三环或四环体系,其可以包括稠环(当与环烷基或杂环烷基环稠合时,杂芳基通过芳环原子键合)或桥环体系;并且杂芳基中的氮、碳或硫原子可以任选地被氧化;氮原子可以任选地被季铵化。在一些实施方案中,杂芳基是5-10元杂芳基。在一些实施方案中,杂芳基是5-6元杂芳基。在一些实施方案中,杂芳基是5元杂芳基。在一些实施方案中,杂芳基是6元杂芳基。实例包括但不限于氮杂基(azepinyl)、吖啶基、苯并咪唑基、苯并噻唑基、苯并吲哚基、苯并间二氧杂环戊烯基

(benzodioxolyl)、苯并呋喃基、苯并噁唑基、苯并噻唑基、苯并噻二唑基、苯并[b][1,4]二氧杂环庚基、1,4-苯并二噁烷基(benzodioxanyl)、苯并萘并呋喃(benzonaphthofuranyl)、苯并噁唑基、苯并二噁唑基、苯并二噁英基(benzodioxinyl)、苯并吡喃基、苯并吡喃酮基、苯并呋喃基、苯并呋喃酮基、苯并噻吩基(苯并苯硫基)、苯并三唑基、苯并[4,6]咪唑并[1,2-a]吡啶基、咔唑基、肉桂基(cinnolinyl)、二苯并呋喃基、二苯并苯硫基、呋喃基、呋喃酮基、异噻唑基、咪唑基、吲唑基、吲哚基、吲唑基、异吲哚基、吲哚啉基、异吲哚啉基、异喹啉基、中氮茚基(indolizinyl)、异噁唑基、萘啶基(naphthyridinyl)、噁二唑基、2-氧氮杂基(2-oxoazepinyl)、噁唑基、环氧乙烷基(oxiranyl)、1-氧化吡啶基、1-氧化嘧啶基、1-氧化吡嗪基、1-氧化哒嗪基、1-苯基-1H-吡咯基、吩嗪基、吩噻嗪基、吩噁嗪基、酞嗪基、蝶啶基(pteridinyl)、嘌呤基、吡咯基、吡唑基、吡啶基、吡嗪基、嘧啶基、哒嗪基、喹唑啉基、喹喔啉基、喹啉基(quinolinyl)、奎宁环基(quinuclidinyl)、异喹啉基、四唑喹啉基、噻唑基、噻二唑基(thiadiazolyl)、三唑基、四唑基、三嗪基和苯硫基(即噻吩基)。除非说明书中另有特别说明,否则杂芳基任选地被例如卤素、氨基、腈、硝基、羟基、烷基、烯基、炔基、卤代烷基、烷氧基、芳基、环烷基、杂环烷基、杂芳基等取代。在一些实施方案中,杂芳基任选地被卤素、甲基、乙基、-CN、-CF_3、-OH、-OMe、-NH_2或-NO_2取代。在一些实施方案中,杂芳基任选地被卤素、甲基、乙基、-CN、-CF_3、-OH或-OMe取代。在一些实施方案中,杂芳基任选地被卤素取代。

[0341] 术语“同一性百分比”是指两个核酸或氨基酸序列之间的比较。使用本领域已知的任何数量的比对方法测量这种比较,包括但不限于全局(例如,Needleman-Wunsch算法)或局部比对(例如,Smith-Waterman、Sellers或其他算法)。同一性百分比通常是指对于位置的连续部分,两个序列的匹配位置的百分比,其中两个序列以使匹配位置最大化和使非匹配位置的空位(gap)最小化的方式排列。在一些情况下,进行比对,其中在两个序列之间没有空位。在一些情况下,比对导致小于5%的空位、小于3%的空位或小于1%的空位。序列比较或比对的其他方法也与本公开一致。

[0342] 在比对序列并引入空位(如果需要)以获得最大百分比序列同一性后,并且不考虑任何保守取代作为序列同一性的一部分,相对于参考多肽序列的百分比(%)序列同一性是候选序列中与参考多肽序列中的氨基酸残基相同的氨基酸残基的百分比。用于确定氨基酸序列同一性百分比的比对可以以各种已知的方式实现,例如使用公开可用的计算机软件如BLAST、BLAST-2、ALIGN或Megalign(DNASTAR)软件。能够确定用于比对序列的适当参数,包括在被比较的序列的全长上实现最大比对所需的算法。然而,为了本文的目的,使用序列比较计算机程序ALIGN-2产生氨基酸序列同一性值%。ALIGN-2序列比较计算机程序由Genentech,Inc.授权,并且源代码已连同用户手册提交华盛顿(20559)的美国版权局,美国版权注册号为TXU510087。ALIGN-2程序可从加利福尼亚州南旧金山市的Genentech,Inc.公开获得或者可从源代码编译。应编译ALIGN-2程序,以便在UNIX操作系统(包括数字UNIX V4.0D)上使用。所有序列比较参数由ALIGN-2程序设定且不改变。在使用ALIGN2进行氨基酸序列比较的情况下,给定氨基酸序列A对于给定氨基酸序列B、与给定氨基酸序列B或针对给定氨基酸序列B的氨基酸序列同一性%(其可另外表示为给定氨基酸序列A对于给定氨基酸序列B、与给定氨基酸序列B或针对给定氨基酸序列B具有或包含某些氨基酸序列同一性%)计算如下:100乘以分数X/Y,其中X是在A和B的序列比对中通过序列比对程序ALIGN-2被评分为相同匹配的氨基酸残基的数目,并且其中Y是B中氨基酸残基的总数。应当理解,当氨基

酸序列A的长度不等于氨基酸序列B的长度时，A与B的氨基酸序列同一性％将不等于B与A的氨基酸序列同一性％。除非另有具体说明，本文所用的所有氨基酸序列同一性值％是如前一段中所述使用ALIGN-2计算机程序所获得的。

[0343] “药学上可接受的”是指由联邦或州政府的管理机构批准或认可的，或在美国药典或其他公认的药典中列出的用于动物包括人的。

[0344] “药学上可接受的盐”是指药学上可接受的并且具有母体化合物的所需药理学活性的化合物的盐。

[0345] “药学上可接受的赋形剂、载体或佐剂”是指可以与本发明的至少一种抗体一起施用于对象的赋形剂、载体或佐剂，并且当以足以递送治疗量的化合物的剂量施用时，其不破坏其药理学活性并且是无毒的。

[0346] “药学上可接受的媒介物”是指与本发明的至少一种抗体一起施用的稀释剂、佐剂、赋形剂或载体。

[0347] 术语如“治疗(treating/treatment/to treat)”或“缓解(alleviating/to alleviate)”等可指：1)治愈、减缓、减轻所诊断的病理病状或病症的症状和/或阻断所诊断的病理病状或病症的进展的治疗措施；和/或2)预防和/或减缓目标病理状况或病症发展的预防性措施(prophylactic or preventative measure)。“治疗(treatment)”是指试图改变所治疗的个体或细胞的自然过程的临床干预，并且可以为了预防或在临床病理学过程期间进行。治疗的理想效果包括预防疾病的发生或复发、缓解症状和减少疾病的任何直接或间接病理后果、预防转移、降低疾病进展的速率、改善或缓和疾病状态、以及缓解或改善预后。因此，需要治疗的人可包括已经患有这种病症的人；易患这种病症的人；以及要预防这种病症的人。

[0348] “氨基酸”是指天然存在的和合成的氨基酸，以及与天然存在的氨基酸功能相似的氨基酸类似物和氨基酸模拟物。天然存在的氨基酸是由遗传密码编码的那些，以及稍后被修饰的那些氨基酸，例如羟脯氨酸、γ-羧基谷氨酸和O-磷酸丝氨酸。氨基酸类似物是指具有与天然存在的氨基酸相同的基本化学结构的化合物，例如与氢结合的α碳、羧基、氨基和R基团，例如高丝氨酸、正亮氨酸、甲硫氨酸亚砜、甲硫氨酸甲基锍。此类类似物可具有经修饰的R基团(例如正亮氨酸)或经修饰的肽主链，但保留与天然存在的氨基酸相同的基本化学结构。氨基酸模拟物是指具有与氨基酸的一般化学结构不同的结构，但功能类似于天然存在的氨基酸的化学化合物。

[0349] “病症”或“疾病”是指将受益于用本文公开的物质/分子(例如，本文公开的肽缀合物)或方法治疗的病况。这包括慢性和急性病症或疾病，包括使哺乳动物易患所述病症的那些病理状况。

[0350] 用于治疗目的的“哺乳动物”是指分类为哺乳动物的任何动物，包括人、啮齿动物(例如小鼠和大鼠)和猴；家畜和农场动物；和动物园动物、运动动物、实验室动物或宠物，例如狗、猫、牛、马、绵羊、猪、山羊、兔等。在一些实施方案中，哺乳动物选自人、啮齿动物或猴。

[0351] “调节”是指肽与蛋白质受体结合的能力。在一些实施方案中，调节剂是受体的配体。在一些实施方案中，调节剂是激动剂。在一些实施方案中，调节剂是拮抗剂。例如，调节GLP-1受体的肽与GLP-1受体(GLP-1R)结合。例如，调节GCG受体的肽与GCG受体(GCGR)结合。例如，调节GIP受体的肽与GIP受体(GIPR)结合。例如，调节PYY受体的肽与PYY受体(PYYR)结

合。作为非限制性实例，调节GLP-1受体的肽是一种GLP-1R激动剂。作为非限制性实例，调节GLP-1受体和GCG受体的肽是双重GLP-1R/GCGR激动剂。作为非限制性实例，调节GLP-1受体和GIP受体的肽是双重GLP-1R/GIPR激动剂。作为非限制性实例，调节PYY受体的肽是PYYR激动剂。

[0352] “未修饰的肽”是指未修饰的序列(野生型肽)或没有钉合体的修饰序列。

实施例

[0353] 通过标准固相肽合成(SPPS)技术合成肽并通过HPLC(如所述)纯化。

[0354] 除非另有说明，否则所有试剂均购自商业供应商(西格玛奥德里奇公司(Sigma Aldrich)、费希尔公司(Fisher)、奥克伍德公司(Oakwood))并且未经进一步纯化即使用。所有涉及空气或水分敏感性试剂或中间体的反应在氮气或氩气的惰性气氛下进行。所用的所有溶剂均为HPLC级。通过LC-MS或通过薄层色谱(TLC)在使用KMnO4的水溶液染色的Merck 50×100mm硅胶60铝片上监测反应。

[0355] 快速色谱纯化在预填充硅胶柱(40μm，来自Teledyne Isco的RediSep® Rf)上在CombiFlash® Rf(Teledyne Isco)上进行。纯化的最终化合物作为单一和对称峰洗脱(从而证实纯度为≥95%)。

在Shimadzu HPLC上用Phenomenex Luna柱(C18，孔径100 Å，粒径10μm，250×10.0mm，流速：4mL/min)或在Agilent 1200HPLC上用Phenomenex Luna柱(C18，孔径100 Å，粒径5μm，150×21.2mm，流速：20mL/min)进行半制备性色谱。

[0356] 在Bruker400系统上在d_6-DMSO、$CDCl_3$或CD_3OD中记录^1H和^{13}C NMR光谱。化学位移以百万分率(ppm)给出，其中四甲基硅烷作为内标。缩写使用如下：s＝单峰，d＝双峰，t＝三重峰，q＝四重峰，p＝五重峰，m＝多重峰，dd＝双二重峰，br＝宽峰。偶合常数(J值)以赫兹(Hz)给出。

在具有Phemomenex Luna Omega C18柱(C18，孔径100 Å，粒径1.6μm，50×2.1mm，流速：0.4mL/min)的Waters Acquity UPLC上记录低分辨率质谱。溶剂：A-H_2O+0.1%甲酸，B-MeCN+0.1%甲酸，梯度：0-1min 10-90%B，1-1.6min 90%B，1.6-1.7min 90-10%B，1.7-2min 10%B。

[0357] 在配备Aeris Widepore色谱柱(XB-C8，粒径3.6μm，150×2.1mm，流速：0.5mL/min)的Agilent 1200系列精密飞行时间质谱仪(TOF)上记录高分辨率质谱(HRMS)。溶剂：A-H_2O+0.1%甲酸，B-MeCN+0.1%甲酸，梯度：0-2min 5%B，2-12min 5-60%B，12-13min 60-80%B，13-14min 80-20%B，14-15min 20-80%B，15-16min 80-20%B，16-17min 20-95%B，17-20min 95%B，20-21min 95-5%B。

用于装载氯三苯甲基氯树脂的通用方案A

[0358] 通过在5mL DMF中混合氨基酸、树脂和DIEA(70μL，400μmol)并搅拌30分钟，使Fmoc-Lys(ivDde)-OH(60mg，100μmol)与2-氯三苯甲基氯树脂(Novabiochem)(100mg，80μmol)偶联。然后将树脂用DMF(3×)、DCM(3×)洗涤并用CH_3OH/DCM/DIEA(8:1:1)处理10分钟以封闭未反应的三苯甲基氯位点，在真空下干燥并储存在干燥器中。

Fmoc保护基脱保护的通用方案B

[0359] 向树脂中加入哌啶的DMF溶液(20％)。将混合物振摇5分钟并排出。加入新鲜的20％哌啶,此时将混合物振摇15分钟。观察到茚三酮和/或TNBS试验呈阳性。然后用DMF(3×)、DCM(3×)洗涤树脂。

ivDde保护基脱保护的通用方案C

[0360] 用DMF和DCM洗涤后,用2％肼的DMF溶液(5mL,2×15min)处理树脂。观察到茚三酮和/或TNBS试验呈阳性。然后用DMF(3×)、DCM(3×)洗涤树脂。

肽偶联的通用方案D

[0361] 利用偶联剂HATU(3.3当量)和DIEA(3.3当量)的DMF(5mL)溶液,将树脂用指定的羧酸衍生物(3当量)处理2h或重复直到观察到茚三酮和/或TNBS测试为阴性。然后用DMF(3×)、DCM(3×)洗涤树脂。

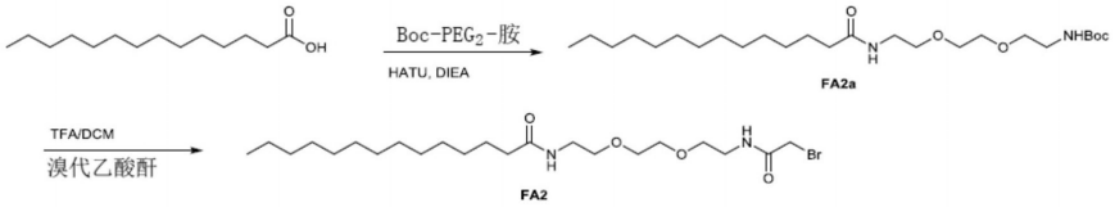
用于树脂上溴乙酰化的通用方案E

[0362] 然后将树脂用溴代乙酸酐(2.4当量)和DIEA(2.6当量)的200mL的DCM溶液处理30分钟。

用于从氯三苯甲基氯树脂裂解肽的通用方案F

[0363] 用DCM(3×)洗涤树脂,使用5mL含有10％H_2O和10％三异丙基硅烷的10％TFA的DCM溶液将产物从树脂上裂解1h。

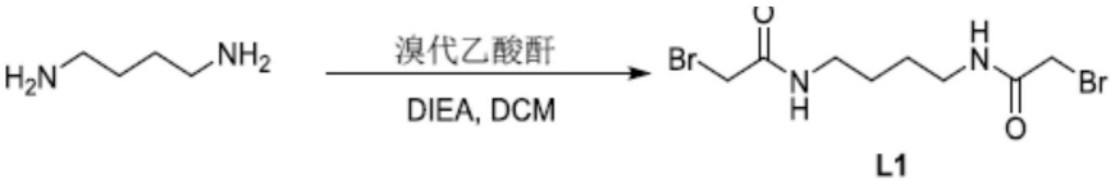
[0364] 实施例1:脂肪酸缀合试剂(FA2)的合成。



[0365] 中间体FA2a将肉豆蔻酸(0.46g,2mmol)溶于5mL DMF中。加入HATU(0.8g,2.1mmol)和DIEA(0.4μL,2.2mmol),然后加入Boc-NH-PEG_2-COOH(0.5g,2mmol)。然后将反应混合物搅拌6h,并除去溶剂。用EtOAc(3×15mL)萃取产物。将有机层依次用饱和$NaHCO_3$、冷却HCl(1M)和盐水洗涤,用Na_2SO_4干燥,过滤,并浓缩。通过硅胶快速柱色谱法纯化,得到白色固体(2-(2-(2-十四酰胺基乙氧基)乙基)氨基甲酸叔丁酯(FA2a)(0.81g,产物收率90％)。MS(ES^+)m/z 459.6($[M+H]^+$),MW计算值458.4。

[0366] FA2。将FA2a(0.23g,0.5mmol)的DCM(10mL)溶液用TFA(2mL)处理2h。将混合物浓缩,然后在0℃加入溴代乙酸酐(0.14g,0.55mmol)和DIEA(0.17mL,1mmol)的10mL DCM溶液。然后将反应混合物搅拌2h,并除去溶剂。用EtOAc(3×15mL)萃取产物。将有机层依次用饱和$NaHCO_3$、冷却HCl(1M)和盐水洗涤,用Na_2SO_4干燥,过滤,并浓缩。通过硅胶快速柱色谱法纯化,得到白色固体FA2(0.2g,产物收率83％)。MS(ES^+)m/z 480.4($[M+H]^+$),MW计算值479.5。

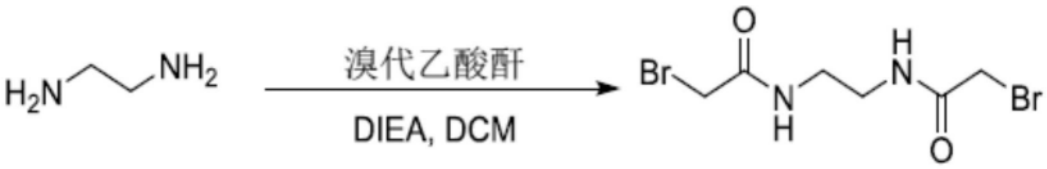
实施例2:L1的合成



[0367] 在0℃下向1,4-二氨基丁烷(80μL,0.795mmol,1当量)的DCM(10mL)溶液中加入

DIEA(276μL,1.59mmol,2当量),随后加入溶解于1mL DCM中的溴代乙酸酐(413g,1.59mmol,2当量)。然后将反应混合物在0℃搅拌30分钟,在室温搅拌1.5h,并除去溶剂。通过硅胶快速柱色谱法纯化,得到白色固体L1(162mg,0.49mmol,61%)。MS(ES$^+$)m/z 331.0([M+H]$^+$)。^{1}H NMR(400MHz,甲醇-d_4)δ3.94(s,4H),3.40-3.30(m,4H),1.68(p,J=3.5Hz,4H)。

实施例3:L1B的合成



L1B

[0368] 在0℃下向1,2-乙二胺(30μL,0.448mmol,1当量)的DCM(5mL)溶液中加入DIEA(172μL,0.985mmol,2.2当量),随后加入溶解于1mL DCM中的溴代乙酸酐(233mg,0.897mmol,2当量)。然后将反应混合物在0℃搅拌30分钟,在室温搅拌1.5h,并除去溶剂。通过硅胶快速柱色谱法纯化,得到白色固体L1B(43.9mg,0.145mmol,32%)。MS(ES$^+$)m/z 302.55([M+H]$^+$),304.54([M+H]$^+$)。^{1}H NMR(400MHz,甲醇-d_4)δ2.49(s,4H),2.06(s,4H)。

实施例4:L1C的合成



L1C

[0369] 在0℃下向1,3-二氨基丙烷(30μL,0.359mmol,1当量)的DCM(5mL)溶液中加入DIEA(138μL,0.789mmol,2.2当量),随后加入溶解于1mL DCM中的溴代乙酸酐(186mg,0.718mmol,2当量)。然后将反应混合物在0℃搅拌30分钟,在室温搅拌1.5h,并除去溶剂。通过硅胶快速柱色谱法纯化,得到白色固体L1C(60.8mg,0.19mmol,53%)。MS(ES$^+$)m/z 316.32([M+H]$^+$),318.6([M+H]$^+$)。^{1}H NMR(400MHz,甲醇-d_4)δ3.86(s,4H),3.27(t,J=6.8Hz,4H),1.74(p,J=6.8Hz,2H)。

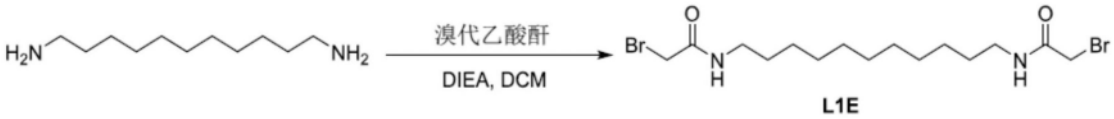
实施例5:L1D的合成



L1D

[0370] 在0℃下向1,7-二氨基己烷(65mg,0.499mmol,1当量)的DCM(15mL)溶液中加入DIEA(208μL,1.197mmol,2.4当量),随后加入溶解于1mL DCM中的溴代乙酸酐(259mg,0.998mmol,2当量)。然后将反应混合物在0℃搅拌30分钟,在室温搅拌1.5h,并除去溶剂。通过硅胶快速柱色谱法纯化,得到白色固体L1D(120mg,0.322mmol,64%)。MS(ES$^+$)m/z 372.71([M+H]$^+$),374.70([M+3H]$^+$)。^{1}H NMR(400MHz,氯仿-d)δ6.55(s,2H),3.91(s,4H),3.30(q,J=7.1Hz,4H),1.56(p,J=7.1Hz,4H),1.45-1.29(m,6H)。

实施例6:L1E的合成



L1E

[0371] 在0℃下向1,11-二氨基十一烷(48mg,0.257mmol,1当量)的DCM(10mL)溶液中加入DIEA(108μL,0.616mmol,2.4当量),随后加入溶解于1mL DCM中的溴代乙酸酐(134mg,0.515mmol,2当量)。然后将反应混合物在0℃搅拌30分钟,在室温搅拌1.5h,并除去溶剂。通过硅胶快速柱色谱法纯化,得到白色固体L1E(62.3mg,0.145mmol,56%)。MS(ES$^+$)m/z 428.33([M+H]$^+$)。^{1}H NMR(400MHz,氯仿-d)δ6.53(s,2H),3.91(s,4H),3.30(q,J=6.8Hz,4H),1.57(q,J=7.2Hz,4H),1.42-1.20(m,14H)。

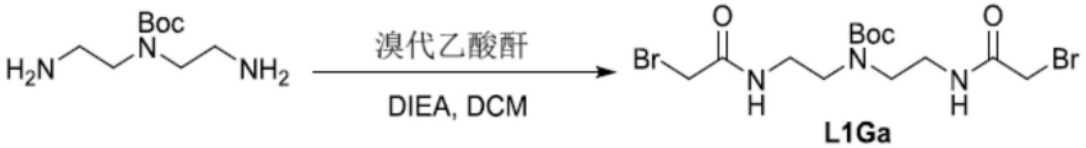
实施例7:L1F的合成



L1F

[0372] 在0℃下向尸胺(48mg,0.257mmol,1当量)的DCM(20mL)溶液中加入DIEA(284μL,1.63mmol,2.4当量),随后加入溶解于1mL DCM中的溴代乙酸酐(353mg,1.36mmol,2当量)。然后将反应混合物在0℃搅拌30分钟,在室温搅拌1.5h,并除去溶剂。通过硅胶快速柱色谱法纯化,得到白色固体L1F(156mg,0.453mmol,66%)。MS(ES$^+$)m/z 344.65([M+H]$^+$),346.64([M+H]$^+$)。^{1}H NMR(400MHz,甲醇-d_4)δ3.83(s,4H),3.23(q,J=6.8Hz,4H),1.57(p,J=7.2Hz,4H),1.44-1.33(m,2H)。

实施例8:L1G的合成



L1Ga



L1G

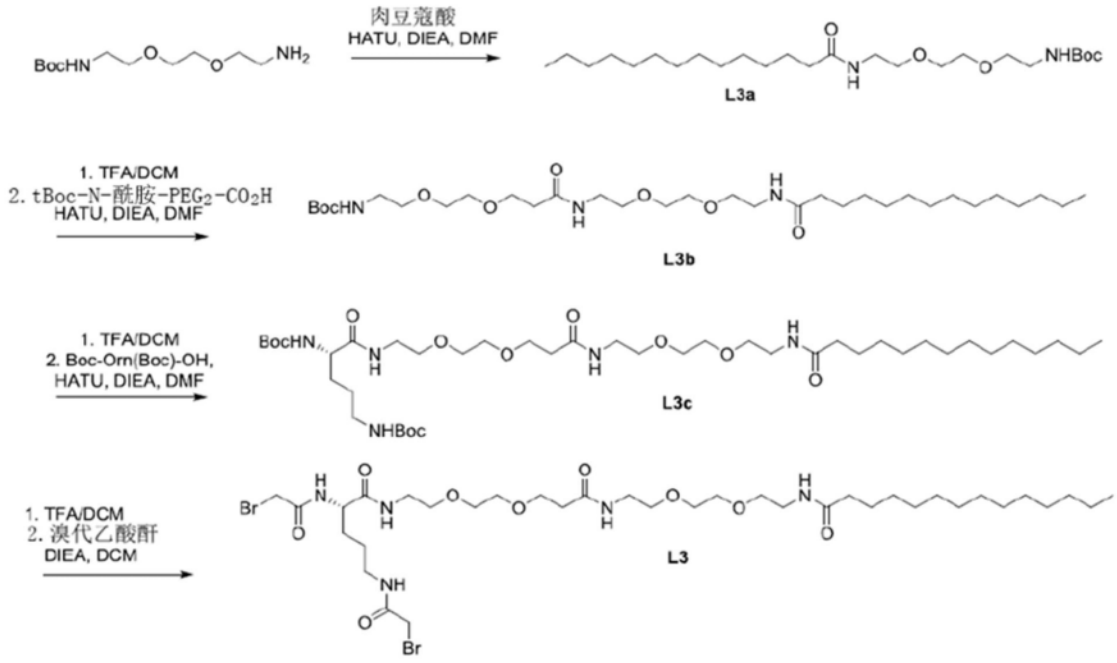
中间体L1Ga

[0373] 在0℃下向双(2-氨基乙基)氨基甲酸叔丁酯(167mg,0.82mmol,1当量)的DCM(20mL)溶液中加入DIEA(342μL,11.96mmol,2.4当量),随后加入溶解于1mL DCM中的溴代乙酸酐(426mg,1.64mmol,2当量)。然后将反应混合物在0℃搅拌30分钟,在室温搅拌1.5h,并除去溶剂。通过硅胶快速柱色谱法纯化,得到白色固体L1Ga(289mg,0.65mmol,79%)。MS(ES$^+$)m/z 445.71([M+H]$^+$),447.7([M+H]$^+$)。^{1}H NMR(400MHz,甲醇-d_4)δ3.85(s,4H),3.39(s,9H),1.50(s,10H)。

L1G

[0374] 将化合物L1Ga(20mg)溶于TFA/DCM(1:1,v/v,2mL)中,在室温下搅拌30分钟并蒸发(与己烷共蒸发),得到油状化合物L1G。将产物直接用于其他步骤。MS(ES$^+$)m/z 345.2([M+H]$^+$)。

实施例9:L3的合成



中间体L3a

[0375] 将肉豆蔻酸(184mg,0.805mmol,1当量)溶于4mL DMF中。加入HATU(321mg,0.845mmol,1.1当量)和DIEA(154μL,0.885mmol,1.1当量),然后加入Boc-NH-PEG_2-COOH(200mg,0.805mmol,1当量)。然后将反应混合物搅拌1.5h,并除去溶剂。将产物溶于EtOAc中。将有机层依次用1M HCl、饱和$NaHCO_3$和盐水洗涤,用Na_2SO_4干燥,过滤,并浓缩。通过硅胶快速柱色谱法纯化,得到所需的白色固体化合物L3a(254mg,0.55mmol,69%)。^{1}H NMR(400MHz,氯仿-d)δ3.66-3.54(m,8H),3.49(q,J=5.2Hz,2H),3.35(d,J=6.1Hz,2H),2.20(t,J=7.7Hz,2H),1.63-1.58(m,2H),1.47(s,8H),1.33-1.24(m,21H),0.90(t,J=6.9Hz,3H)。t_R=2.21min(Agilent).MS(ES^+)m/z 459.6($[M+H]^+$)。

中间体L3b

[0376] 将化合物L3a(242mg,0.527mmol,1当量)的DCM(2mL)溶液用TFA(2mL)处理30分钟。将混合物浓缩,与己烷共蒸发。向溶解于DMF(5mL)的BocNH-PEG_2-CO_2H(146mg,0.527mol,1当量)的溶液中加入HATU(224mg,0.59mmol,1.1当量)。将脱保护的化合物L3a和DIEA(183μL,1.05mmol,2当量)的DMF溶液加入到反应混合物中。将反应混合物在室温下搅拌2h。用EtOAc稀释产物。将有机层依次用1M HCl、饱和$NaHCO_3$和盐水洗涤,用Na_2SO_4干燥,过滤,并浓缩。通过硅胶快速柱色谱法纯化,得到所需的油状化合物L3b(129mg,0.209mmol,40%)。^{1}H NMR(400MHz,氯仿-d)δ6.76(s,1H),6.19(s,1H),5.29(s,1H),3.76(t,J=5.8Hz,2H),3.69-3.62(m,8H),3.57(dt,J=12.3,5.0Hz,6H),3.48(dt,J=10.4,5.5Hz,4H),3.33(s,2H),2.51(t,J=5.8Hz,2H),2.20(t,J=7.0Hz,2H),1.90-1.75(m,4H),1.64(p,J=7.3Hz,2H),1.46(s,9H),1.33-1.22(m,17H)。

中间体L3c

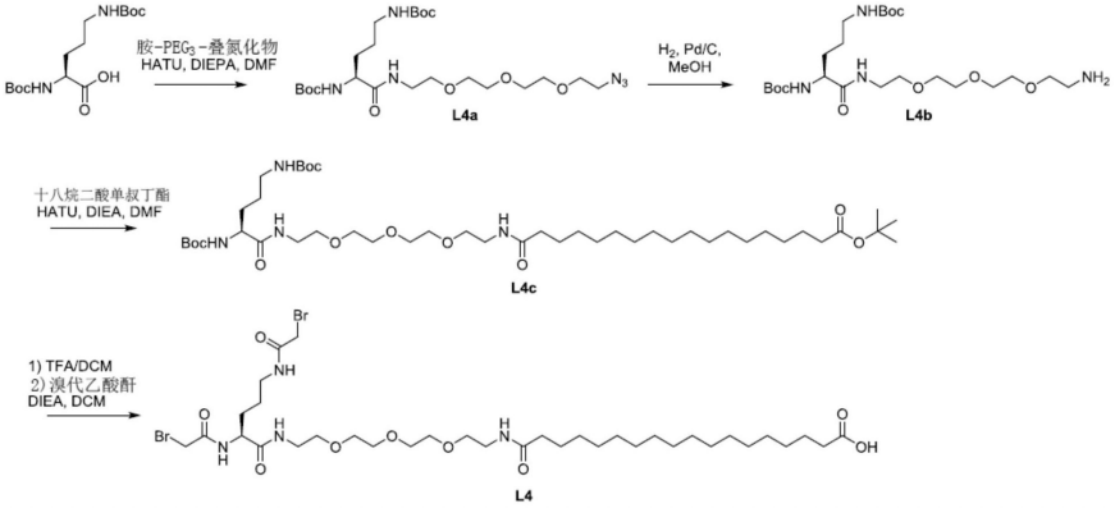
[0377] 将化合物L3b(129mg,0.209mmol,1当量)的DCM(2mL)溶液用TFA(2mL)处理30分钟。将混合物浓缩,与己烷共蒸发。向溶解于DMF(5mL)的Boc-Orn(Boc)-OH(69mg,0.209mmol,1当量)的溶液中加入HATU(88mg,0.23mmol,1.1当量)。将脱保护的化合物L3b和DIEA(73μL,0.419mmol,2当量)的DMF溶液加入到反应混合物中。将反应混合物在室温下搅拌2h。用

EtOAc稀释产物。将有机层依次用1M HCl、饱和$NaHCO_3$和盐水洗涤，用Na_2SO_4干燥，过滤，并浓缩。通过硅胶快速柱色谱法纯化，得到所需的油状化合物L3c(137mg，0.164mmol，78％)。t_R＝4.07min(Agilent)。MS(ES^+)m/z 832.9($[M+H]^+$)。^1H NMR(400MHz，氯仿-d)δ7.12(s,1H)，6.80(s,1H)，6.30(s,1H)，4.87(s,1H)，3.85-3.73(m,2H)，3.68-3.61(m,7H)，3.58(p,J＝6.1,5.5Hz,7H)，3.53-3.36(m,6H)，3.29-3.00(m,2H)，2.51(t,J＝5.8Hz,2H)，2.20(t,J＝7.7Hz,2H)，2.00-1.74(m,6H)，1.71-1.51(m,5H)，1.45(s,18H)，1.35-1.22(m,21H)。

L3

[0378] 将化合物L3c(137mg，0.165mmol，1当量)的DCM(2mL)溶液用TFA(2mL)处理30分钟。将混合物浓缩，与己烷共蒸发并溶解于10mL DCM中并在0℃下冷却。加入DIEA(115μL，0.66mmol，4当量)，然后加入溶解于1mL DCM中的溴代乙酸酐(85.8g，0.33mmol，2当量)。然后将反应混合物在0℃搅拌30分钟，在室温搅拌1.5h，并除去溶剂。通过硅胶快速柱色谱法纯化，得到白色固体L3(56mg，0.064mmol，39％)。t_R＝3.4min(Agilent)。MS(ES^+)m/z 872.4($[M+H]^+$)，874.3($[M+H]^+$)。

实施例10:L4的合成



中间体L4a

[0379] 向溶解于DMF(5mL)的Boc-Orn(Boc)-OH(595mg，1.79mmol，1当量)的溶液中加入溶解于1mL DMF中的HATU(750mg，1.79mmol，1.1当量)、DIEA(343μL，1.97mmol，1.1当量)和胺-PEG_3-N_3(391mg，1.79mmol，1当量)。将反应混合物在室温下搅拌16h。用EtOAc稀释产物。将有机层依次用1M HCl、饱和$NaHCO_3$和盐水洗涤，用Na_2SO_4干燥，过滤，并浓缩。通过硅胶快速柱色谱法纯化，得到所需的油状化合物L4a(558mg，1.05mmol，58％)。MS(ES^+)m/z 533.13($[M+H]^+$)。^1H NMR(400MHz，氯仿-d)δ6.82(s,1H)，5.25(d,J＝8.3Hz,1H)，4.75(s,1H)，4.19(s,1H)，3.76-3.60(m,10H)，3.57(t,J＝5.1Hz,2H)，3.43(t,J＝4.6Hz,2H)，3.30-3.19(m,1H)，3.18-3.03(m,1H)，1.85(s,4H)，1.68-1.49(m,2H)，1.45(s,18H)。

中间体L4b

[0380] 在氩气下向化合物L4a(548mg，1.02mmol，1当量)的无水MeOH(10mL)溶液中加入Pd/C(10.9mg，0.102mmol，0.1当量)且用H_2置换氩气。将反应混合物在室温下搅拌6h，在硅藻土上过滤并蒸发，得到油状化合物L4b(516mg，1.02mmol，定量)。产物无需进一步纯化即可使用。

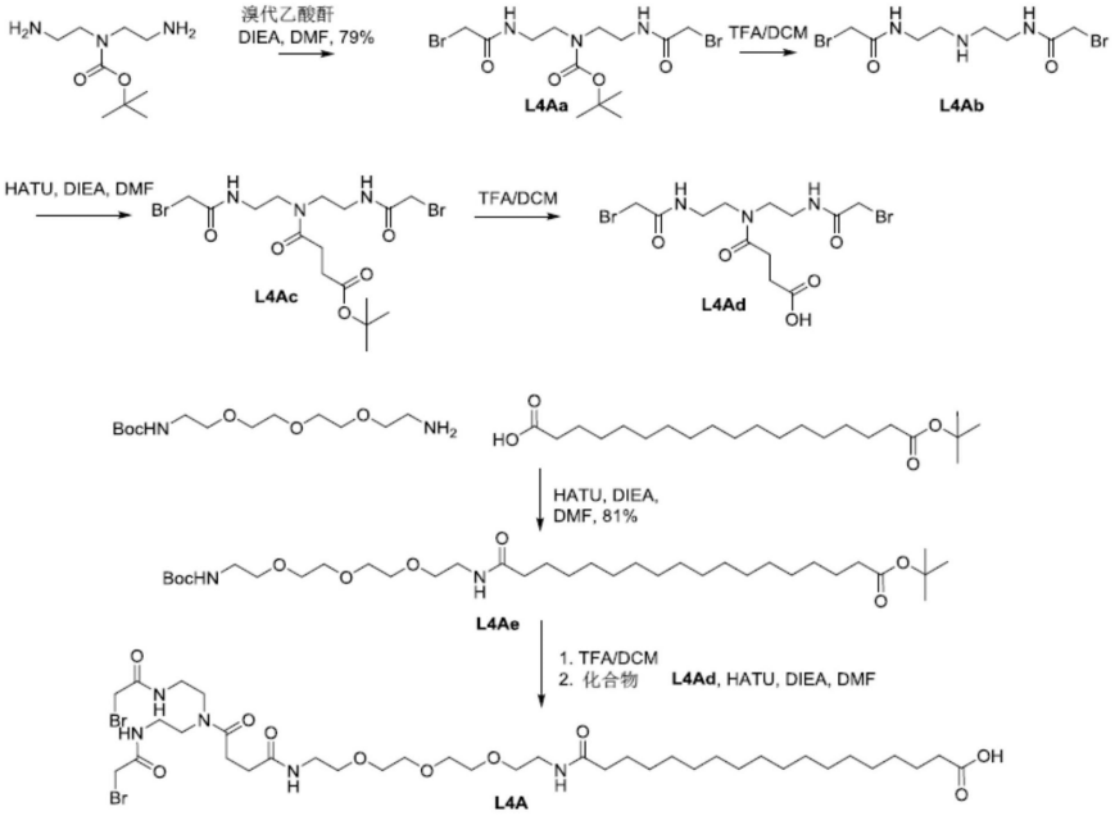
中间体L4c

[0381] 向溶解于DMF(5mL)的十八烷二酸单叔丁酯(370mg,1.02mmol,1当量)的溶液中加入溶解于1mL DMF中的HATU(387mg,1.02mmol,1.1当量)、DIEA(186μL,1.07mmol,2当量)和化合物L4b(516mg,1.02mmol,1当量)。将反应混合物在室温下搅拌3h。用EtOAc稀释产物。将有机层依次用1M HCl、饱和$NaHCO_3$和盐水洗涤,用Na_2SO_4干燥,过滤,并浓缩。通过硅胶快速柱色谱法纯化,得到所需的油状化合物L4c(697mg,0.81mmol,79%)。^1H NMR(400MHz,氯仿-d)δ6.94(s,1H),6.42(s,1H),4.81(s,1H),4.20(s,1H),3.65(d,J=6.7Hz,8H),3.59(dt,J=9.7,5.1Hz,4H),3.51-3.35(m,4H),3.31-3.18(m,1H),3.17-3.06(m,1H),2.20(q,J=8.0Hz,4H),1.87(s,4H),1.71-1.53(m,6H),1.45(s,26H),1.26(s,24H)。

L4

[0382] 将L4c(422mg,0.49mmol,1当量)的DCM(2mL)溶液用TFA(2mL)处理30分钟。将混合物浓缩,与己烷共蒸发并溶解于20mL DCM中并在0℃下冷却。加入DIEA(327μL,1.96mmol,4当量),然后加入溶解于1mL DCM中的溴代乙酸酐(254mg,0.98mmol,2当量)。然后将反应混合物在0℃搅拌30分钟,在室温搅拌1.5h,并除去溶剂。通过硅胶快速柱色谱法纯化,得到白色固体L4(53mg,0.063mmol,12%)。MS(ES^+)m/z 845.08($[M+H]^+$),847.07($[M+H]^+$)^1H NMR(400MHz,甲醇-d_4)δ3.68-3.60(m,8H),3.54(td,J=5.4,3.4Hz,4H),3.43-3.35(m,4H),3.30-3.16(m,2H),2.27(t,J=7.5Hz,2H),2.17(t,J=7.6Hz,2H),1.86-1.73(m,1H),1.72-1.45(m,8H),1.37-1.19(m,28H)。

实施例11:L4A的合成



中间体L4Aa

[0383] 在0℃向双(2-氨基乙基)氨基甲酸叔丁酯(500mg,2.45mmol,1当量)和DIEA

(1.02mL,5.88mmol,2当量)的DCM(20mL)溶液中逐滴加入溴代乙酸酐(1.31g,5.04mmol,2.05当量,1mL DCM溶液)。将反应混合物在0℃搅拌30分钟,在RT搅拌2h并在真空中蒸发。通过快速色谱法纯化得到油状产物(883mg,81%)。^{1}H NMR(400MHz,甲醇-d_4)δ1.50(s,9H),3.39(s,8H),3.85(s,4H)。t_R=1.04min.MS(ES$^+$)m/z 445.71/447.70([M+H]$^+$)。

中间体L4Ab

[0384] 将化合物L4Aa(1当量)的DCM/TFA(1:1,v/v)溶液在室温下搅拌30分钟并且在真空中浓缩(与庚烷共蒸发)。化合物L4Ab无需纯化直接用于其他步骤。t_R=0.58min.MS(ES$^+$)m/z 345.65/347.67([M+H]$^+$)。

中间体L4Ac

[0385] 向琥珀酸单叔丁酯(1.05当量)的DMF溶液中加入HATU(1.05当量)。将反应混合物在室温下搅拌5分钟。将化合物L4Ab和DIEA(4当量)溶解于DMF(1mL)中并添加至反应混合物中。将反应物在室温下搅拌过夜并用AcOEt稀释。将有机相用HCl 1N、饱和$NaHCO_3$溶液洗涤,用$MgSO_4$干燥并蒸发。通过快速色谱法纯化得到油状产物。t_R=1.07min.MS(ES$^+$)m/z 501.52/503.80([M+H]$^+$)。

中间体L4Ad

[0386] 将化合物L4Ac(1当量)的DCM/TFA(1:1,v/v)溶液在室温下搅拌30分钟并且在真空中浓缩(与庚烷共蒸发)。化合物L4Ad无需纯化直接用于其他步骤。t_R=0.57min.MS(ES$^+$)m/z 445.71/447.73([M+H]$^+$)。

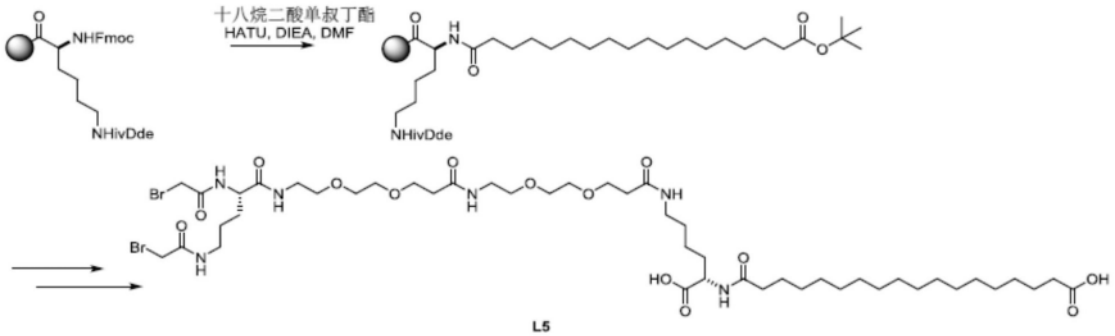
中间体L4Ae

[0387] 将十八烷二酸单叔丁酯酸(200mg,0.54mmol,1当量)溶于5mL DMF中。加入HATU(225mg,0.59mmol,1.1当量)和DIEA(103μL,0.59mmol,1.1当量),然后加入Boc-NH-PEG_3-NH_2(157.8g,0.54mmol,1当量)。然后将反应混合物搅拌3h,并除去溶剂。将产物溶于EtOAc中。将有机层依次用饱和$NaHCO_3$、1M HCl和盐水洗涤,用Na_2SO_4干燥,过滤,并浓缩。通过硅胶快速柱色谱法纯化,得到所需的白色固体产物L4Ae(281mg,0.43mmol,81%)。MS(ES$^+$)m/z 645.5([M+H]$^+$)。^{1}H NMR(400MHz,氯仿-d)δ3.76-3.61(m,8H),3.63-3.54(m,4H),3.48(q,J=5.1Hz,2H),3.34(s,2H),2.20(dt,J=9.8,7.6Hz,4H),1.67-1.55(m,4H),1.49-1.44(m,17H),1.30(s,6H),1.30-1.24(m,19H)。

L4A

[0388] 将化合物L4Ae的DCM溶液用TFA处理30分钟。将混合物浓缩,与庚烷共蒸发,溶解于DMF中并添加至化合物L4Ad、HATU和DIEA的DMF溶液中。将反应混合物搅拌3h并通过半制备型HPLC纯化,得到所需产物L4A。

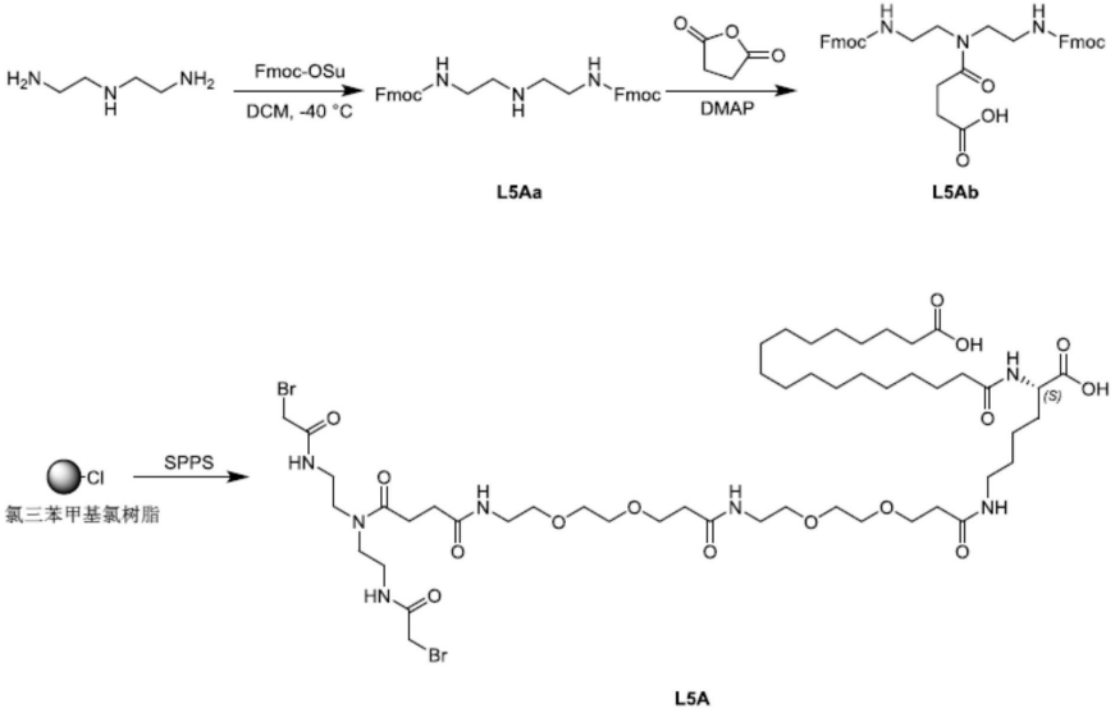
实施例12:L5的合成



[0389] 通用方案A、B、D(十八烷二酸单叔丁酯);C、D(Fmoc-PEG_2-丙酸);B、D(Fmoc-PEG_2-丙酸);B、D(Fmoc-Orn(Fmoc)-OH);B、E、F。

[0390] 通过具有质量检测的半制备型HPLC纯化粗产物,得到白色固体产物L5(73mg,0.065mmol,11%)。^{1}H NMR(400MHz,甲醇-d_4)δ4.36(td,J=8.9,5.1Hz,2H),3.89(q,J=11.4Hz,2H),3.82(s,2H),3.74(t,J=6.2Hz,2H),3.60(s,4H),3.54(t,J=5.5Hz,2H),3.37(q,J=5.2Hz,2H),3.29-3.11(m,5H),2.44(t,J=6.2Hz,2H),2.26(dt,J=12.3,7.5Hz,4H),1.89-1.77(m,2H),1.76-1.49(m,10H),1.48-1.38(m,2H),1.37-1.25(m,25H)。

实施例13:L5A的合成



中间体L5Aa

[0391] 在-40℃下在N_2下将Fmoc-OSu(131g,388mmol)的DCM(200mL)溶液滴加到二亚乙基三胺(20g,194mmol)的DCM(200mL)溶液中,搅拌2h。LCMS显示反应完成。溶液中的粗产物不经纯化直接用于下一步骤。^{1}H NMR(400MHz,DMSO-d_6)δ7.88(d,J=7.6Hz,4H),7.68(d,J=7.6Hz,4H),7.43-7.24(m,10H),4.30(d,J=6.4Hz,4H),4.21(d,J=6.4Hz,2H),3.06(d,J=5.6Hz,4H),2.57(d,J=7.6Hz,4H)。MS(ES$^+$)m/z 548.2([M+H]$^+$)。

中间体L5Ab

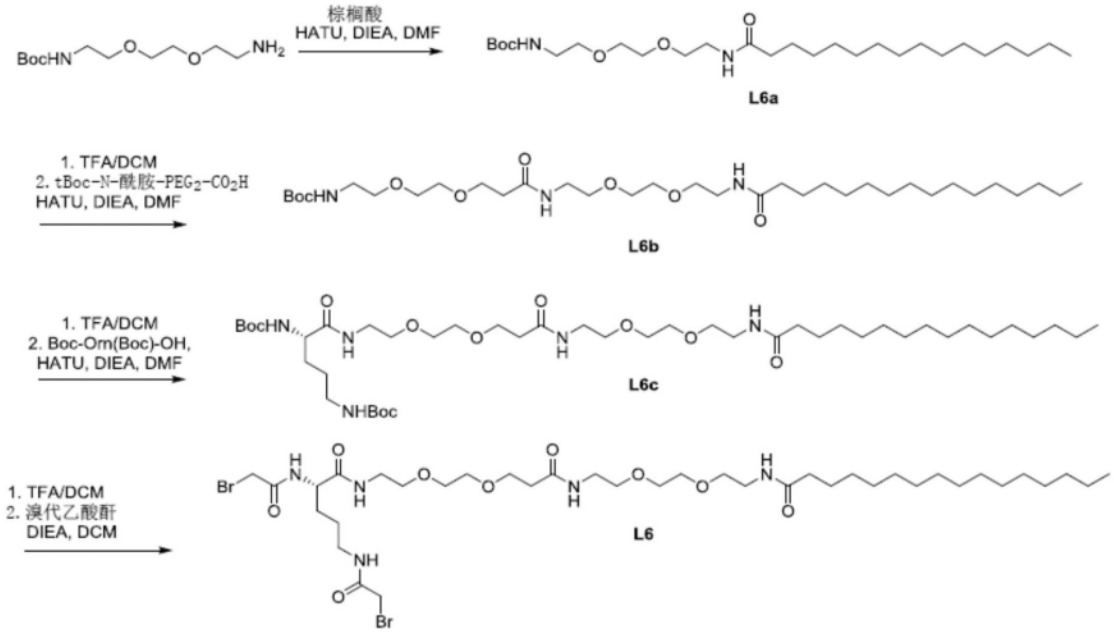
[0392] 向化合物L5Aa(106g,194mmol)的DCM(400mL)溶液中加入DMAP(4.74g,38.8mmol)和四氢呋喃-2,5-二酮(67.9g,678mmol),在25℃搅拌14h。LCMS显示反应完成。向反应混合物中加入1N HCl直至pH=5-6,搅拌15分钟,分离有机相,然后将有机相用水和饱和NaCl(500mL)洗涤,并将水相用DCM(500mL)萃取两次。合并的DCM经无水Na_2SO_4干燥,真空浓缩。粗产物通过硅胶柱色谱法纯化,使用DCM/MeOH(80:0-5:1)作为洗脱剂,得到白色固体粉末状化合物L5Ab(57.6g,45%产率)。^{1}H NMR(400MHz,DMSO-d_6)δ12.09(s,1H),7.87(d,J=7.5Hz,4H),7.66(d,J=7.0Hz,4H),7.23-7.48(m,10H),4.24-4.33(m,4H),4.14-4.22(m,2H),3.27(s,4H),2.95-3.19(m,4H),2.37-2.44(m,4H)。MS(ES$^+$)m/z 648.2([M+H]$^+$)。

L5A

[0393] 通用方案A、B、D(十八烷二酸单叔丁酯);C、D(Fmoc-PEG_2-丙酸);B、D(Fmoc-PEG_2-丙酸);B、D(化合物L5Ab);B、E、F。

[0394] 粗产物通过HPLC纯化,得到白色固体产物L5A(5.2g,11%收率)。MS(ES^+)m/z 1188.5($[M+H]^+$)。

实施例14:L6的合成



中间体L6a

[0395] 将棕榈酸(235mg,0.919mmol,1.05当量)溶于4mL DMF中。加入HATU(349mg,0.919mmol,1.05当量)和DIEA(167μL,0.963mmol,1.1当量),然后加入Boc-NH-PEG_2-NH_2(200mg,0.875mmol,1当量)。然后将反应混合物搅拌2h,并除去溶剂。将产物溶于EtOAc中。将有机层依次用1M HCl、饱和$NaHCO_3$、HCl和盐水洗涤,用Na_2SO_4干燥,过滤,并浓缩得到所需的白色固体化合物L6a(412mg,0.84mmol,97%)。^1H NMR(400MHz,氯仿-d)δ6.17(s,1H),5.07(s,1H),3.58(s,4H),3.53(t,J=5.0Hz,3H),3.43(q,J=5.3Hz,2H),3.36-3.21(m,2H),2.15(t,J=7.5Hz,2H),1.66-1.54(m,2H),1.32-1.15(m,26H),0.84(t,J=6.6Hz,3H)。

中间体L6b

[0396] 将化合物L6a(412mg,0.84mmol,1当量)的DCM(2mL)溶液用TFA(2mL)处理30分钟。将混合物浓缩,与己烷共蒸发。向溶解于DMF(5mL)的BocNH-PEG_2-CO_2H(258mg,0.931mmol,1.1当量)的溶液中加入HATU(353mg,0.931mmol,1.1当量)。将脱保护的化合物L6a和DIEA(294μL,1.69mmol,2当量)的DMF溶液加入到反应混合物中。将反应混合物在室温下搅拌2h。用EtOAc稀释产物。将有机层依次用1M HCl、饱和$NaHCO_3$、HCl和盐水洗涤,用Na_2SO_4干燥,过滤,并浓缩。通过硅胶快速柱色谱法纯化,得到所需的油状化合物L6b(329mg,0.51mmol,60%)。^1H NMR(400MHz,氯仿-d)δ6.79(s,1H),6.28(s,1H),5.28(s,1H),3.68(t,J=5.8Hz,2H),3.61-3.44(m,14H),3.38(p,J=5.6Hz,4H),3.24(q,J=5.5Hz,2H),2.42(t,J=5.8Hz,2H),2.11(t,J=7.9Hz,2H),1.55(p,J=7.2Hz,2H),1.38(s,9H),1.32-1.10(m,24H),0.81(t,J=6.7Hz,3H)。

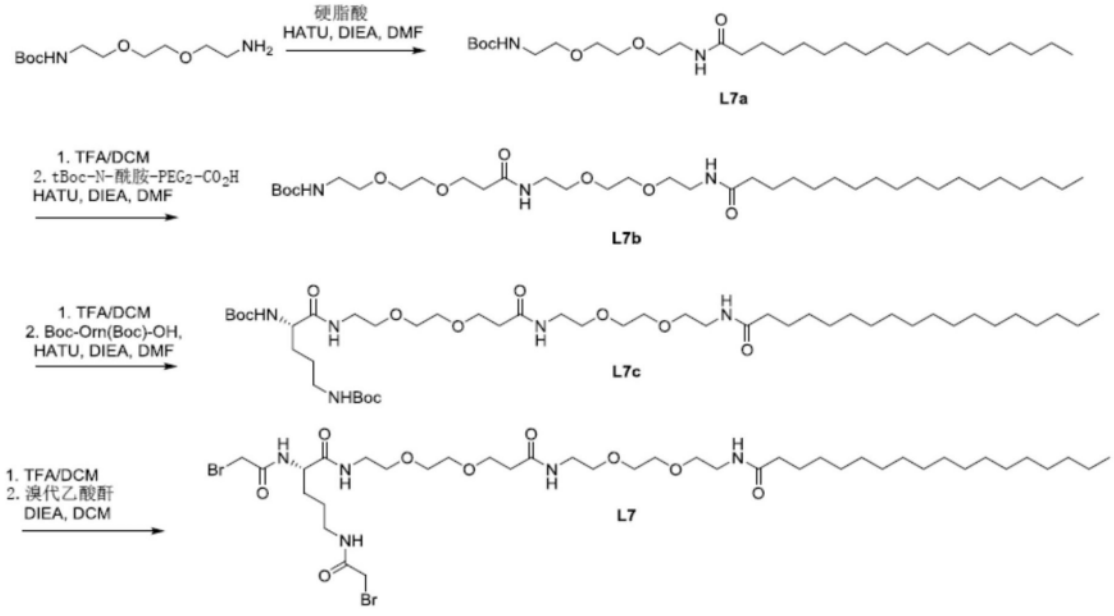
中间体L6c

[0397] 将化合物L6b(329mg,0.51mmol,1当量)的DCM(2mL)溶液用TFA(2mL)处理30分钟。将混合物浓缩,与己烷共蒸发。向溶解于DMF(5mL)的Boc-Orn(Boc)-OH(186mg,0.56mmol,1.1当量)的溶液中加入HATU(213mg,0.56mmol,1.1当量)。将脱保护的化合物L6b和DIEA(177μL,1.02mmol,2当量)的DMF溶液加入到反应混合物中。将反应混合物在室温下搅拌2h。用EtOAc稀释产物。将有机层依次用饱和$NaHCO_3$、1M HCl和盐水洗涤,用Na_2SO_4干燥,过滤,并浓缩。通过硅胶快速柱色谱法纯化,得到所需的油状化合物L6c(326mg,0.37mmol,94%)。^1H NMR(400MHz,氯仿-d)δ7.18(s,1H),6.92(s,1H),6.48(s,1H),5.61(d,J=8.4Hz,1H),5.08(t,J=5.9Hz,1H),4.13(s,1H),3.73-3.65(m,2H),3.59-3.44(m,14H),3.42-3.29(m,8H),3.19-2.86(m,2H),2.42(t,J=5.9Hz,2H),2.10(d,J=7.3Hz,2H),1.78-1.63(m,1H),1.60-1.40(m,5H),1.35(s,18H),1.26-1.09(m,22H),0.80(t,J=6.7Hz,3H)。

L6

[0398] 将化合物L6c(100mg,0.116mmol,1当量)的DCM(2mL)溶液用TFA(2mL)处理30分钟。将混合物浓缩,与己烷共蒸发并溶解于10mL DCM中并在0℃下冷却。加入DIEA(80.8μL,0.46mmol,4当量),然后加入溶解于1mL DCM中的溴代乙酸酐(61.9mg,0.238mmol,2.05当量)。然后将反应混合物在0℃搅拌30分钟,在室温搅拌1.5h,并除去溶剂。通过硅胶快速柱色谱法纯化,得到白色固体L6(50.1mg,0.055mmol,40%)。^1H NMR(400MHz,甲醇-d_4)δ4.39(dd,J=8.4,5.5Hz,1H),3.91(q,J=11.4Hz,2H),3.84(s,2H),3.76(t,J=6.2Hz,2H),3.63(d,J=7.1Hz,8H),3.57(q,J=5.5Hz,6H),3.43-3.36(m,6H),3.25(t,J=13.9,6.8Hz,2H),2.49(t,J=6.2Hz,2H),2.21(t,J=7.5Hz,2H),1.91-1.79(m,1H),1.75-1.53(m,5H),1.42-1.25(m,24H),0.92(t,J=6.7Hz,3H)。

实施例15:L7的合成



中间体L7a

[0399] 硬脂酸(261mg,0.919mmol,1.05当量)溶于4mL DMF中。加入HATU(349mg,0.919mmol,1.05当量)和DIEA(167μL,0.963mmol,1.1当量),然后加入Boc-NH-PEG_2-NH_2(200mg,0.875mmol,1当量)。然后将反应混合物搅拌2h,并除去溶剂。将产物溶于EtOAc中。将有机层依次用1M HCl、饱和$NaHCO_3$、和盐水洗涤,用Na_2SO_4干燥,过滤,并浓缩得到所需的

白色固体化合物L7a(430mg,0.83mmol,95%)。^{1}H NMR(400MHz,氯仿-d)δ3.69-3.59(m,4H),3.56(t,J=5.1Hz,4H),3.46(q,J=5.2Hz,2H),3.40-3.23(m,2H),2.18(t,J=7.6Hz,2H),1.62(t,J=7.3Hz,2H),1.45(s,9H),1.35-1.19(m,30H),0.88(t,J=6.7Hz,4H)。

中间体L7b

[0400] 将化合物L7a(426mg,0.87mmol,1当量)的DCM(2mL)溶液用TFA(2mL)处理30分钟。将混合物浓缩,与己烷共蒸发。向溶解于DMF(5mL)的BocNH-PEG_2-CO_2H(266mg,0.96mmol,1.1当量)的溶液中加入HATU(366mg,0.96mmol,1.1当量)。将脱保护的化合物L7a和DIEA(304μL,1.75mmol,2当量)的DMF溶液加入到反应混合物中。将反应混合物在室温下搅拌2h。用EtOAc稀释产物。将有机层依次用1M HCl、饱和$NaHCO_3$和盐水洗涤,用Na_2SO_4干燥,过滤,并浓缩。通过硅胶快速柱色谱法纯化,得到所需的油状化合物L7b(360mg,0.53mmol,61%)。^{1}H NMR(400MHz,氯仿-d)δ6.75(s,1H),6.18(s,1H),5.26(s,1H),3.75(t,J=5.8Hz,2H),3.69-3.52(m,14H),3.47(p,J=5.4Hz,4H),3.33(q,J=5.5Hz,2H),2.50(t,J=5.8Hz,2H),2.19(t,J=7.5Hz,2H),2.07(s,1H),1.63(p,J=7.3Hz,2H),1.46(s,9H),1.37-1.19(m,29H),0.89(t,J=6.7Hz,3H)。

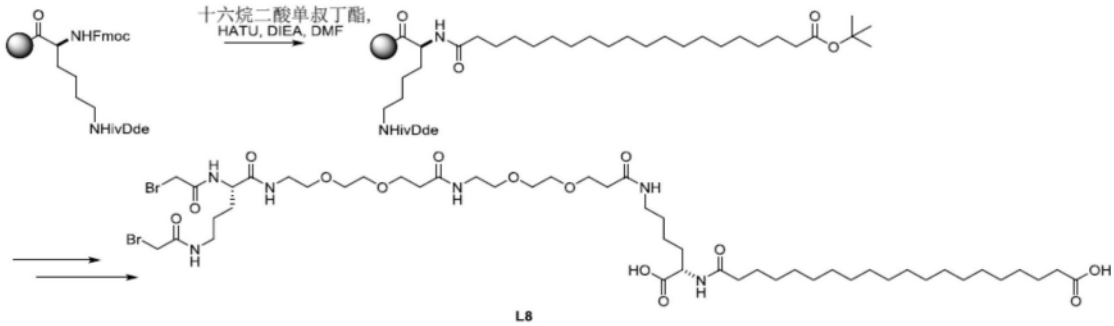
中间体L7c

[0401] 将化合物L7b(360mg,0.53mmol,1当量)的DCM(2mL)溶液用TFA(2mL)处理30分钟。将混合物浓缩,与己烷共蒸发。向溶解于DMF(5mL)的Boc-Orn(Boc)-OH(195mg,0.58mmol,1.1当量)的溶液中加入HATU(223mg,0.58mmol,1.1当量)。将脱保护的化合物L7b和DIEA(186μL,1.07mmol,2当量)的DMF溶液加入到反应混合物中。将反应混合物在室温下搅拌2h。用EtOAc稀释产物。将有机层依次用1M HCl、饱和$NaHCO_3$和盐水洗涤,用Na_2SO_4干燥,过滤,并浓缩。通过硅胶快速柱色谱法纯化,得到所需的油状化合物L7c(373mg,0.42mmol,78%)。^{1}H NMR(400MHz,氯仿-d)δ7.14(s,1H),6.84(s,1H),6.35(s,1H),5.53(d,J=8.2Hz,1H),5.05-4.88(m,1H),4.20(s,1H),3.82-3.69(m,2H),3.65-3.31(m,22H),3.23-3.00(m,2H),2.48(t,J=5.8Hz,2H),2.17(t,J=7.8Hz,2H),1.87-1.72(m,1H),1.67-1.48(m,5H),1.42(s,18H),1.34-1.14(m,29H),0.87(t,J=6.9Hz,3H)。

L7

[0402] 将化合物L7c(100mg,0.112mmol,1当量)的DCM(2mL)溶液用TFA(2mL)处理30分钟。将混合物浓缩,与己烷共蒸发并溶解于10mL DCM中并在0℃下冷却。加入DIEA(78μL,0.44mmol,4当量),然后加入溶解于1mL DCM中的溴代乙酸酐(62mg,0.24mmol,2.05当量)。然后将反应混合物在0℃搅拌30分钟,在室温搅拌1.5h,并除去溶剂。将产物溶于EtOAc中。将有机层依次用1M HCl、饱和$NaHCO_3$和盐水洗涤,用Na_2SO_4干燥,过滤,并浓缩。通过硅胶快速柱色谱法纯化,得到白色固体L7(95mg,0.10mmol,91%)。MS(ES^+)m/z 931.31($[M+H]^+$),933.25($[M+H]^+$)。^{1}H NMR(400MHz,甲醇-d_4)δ4.39(dd,J=8.5,5.4Hz,1H),3.91(q,J=11.3Hz,2H),3.84(s,2H),3.76(t,J=6.2Hz,2H),3.63(d,J=7.0Hz,8H),3.57(t,J=5.5Hz,6H),3.42-3.35(m,6H),3.31-3.13(m,4H),2.49(t,J=6.2Hz,2H),2.20(t,J=7.4Hz,2H),1.91-1.79(m,1H),1.75-1.56(m,6H),1.39-1.26(m,26H),0.92(t,J=6.3Hz,3H)。

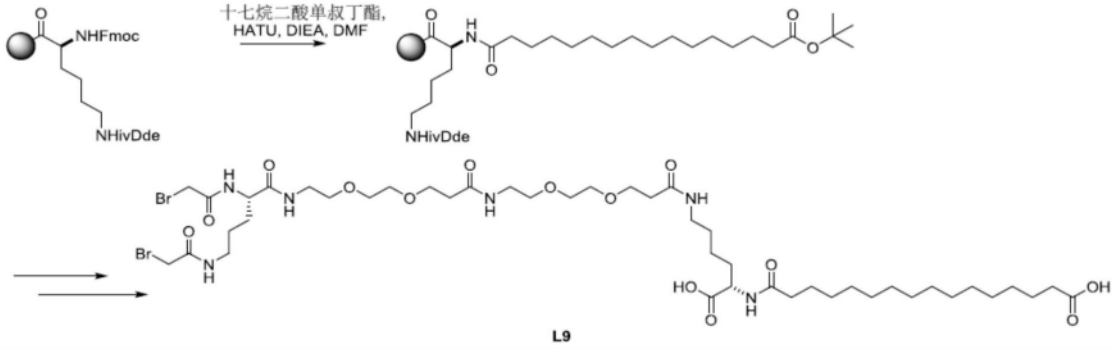
实施例16:L8的合成



[0403] 通用方案A、B、D(十六烷二酸单叔丁酯);C、D(Fmoc-PEG_2-丙酸);B、D(Fmoc-PEG_2-丙酸);B、D(Fmoc-Orn(Fmoc)-OH);B、E、F。

[0404] 通过具有质量检测的半制备型HPLC纯化粗产物,得到白色固体产物L8(42.6mg,0.038mmol,22%)。^{1}H NMR(400MHz,甲醇-d_4)δ4.38(td,J=8.6,5.1Hz,2H),3.91(q,J=11.3Hz,2H),3.84(s,2H),3.76(q,J=6.1Hz,4H),3.65-3.59(m,8H),3.56(td,J=5.5,1.7Hz,4H),3.43-3.37(m,4H),3.31-3.16(m,4H),2.48(dt,J=15.7,6.2Hz,4H),2.28(dt,J=12.6,7.5Hz,4H),1.95-1.79(m,1H),1.77-1.51(m,10H),1.49-1.41(m,2H),1.40-1.26(m,31H)。

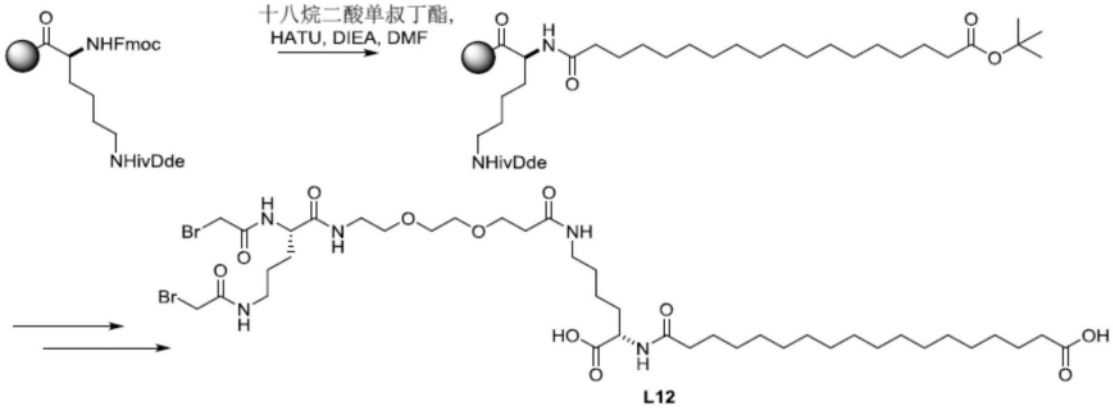
实施例17:L9的合成



[0405] 通用方案A、B、D(十七烷二酸单叔丁酯);C、D(Fmoc-PEG_2-丙酸);B、D(Fmoc-PEG_2-丙酸);B、D(Fmoc-Orn(Fmoc)-OH);B、E、F。

[0406] 通过具有质量检测的半制备型HPLC纯化粗产物,得到白色固体状产物L9(49mg,0.089mmol,9%)。^{1}H NMR(400MHz,甲醇-d_4)δ4.45-4.33(m,2H),3.92(t,J=10.9Hz,2H),3.85(d,J=1.1Hz,2H),3.77(q,J=6.0Hz,4H),3.63(s,8H),3.57(t,J=5.6Hz,4H),3.40(t,J=5.5Hz,4H),3.25(dq,J=22.7,6.7Hz,4H),2.48(dt,J=15.6,6.2Hz,4H),2.29(dt,J=13.2,7.4Hz,4H),1.95-1.79(m,2H),1.80-1.50(m,10H),1.51-1.41(m,2H),1.40-1.27(m,20H)。

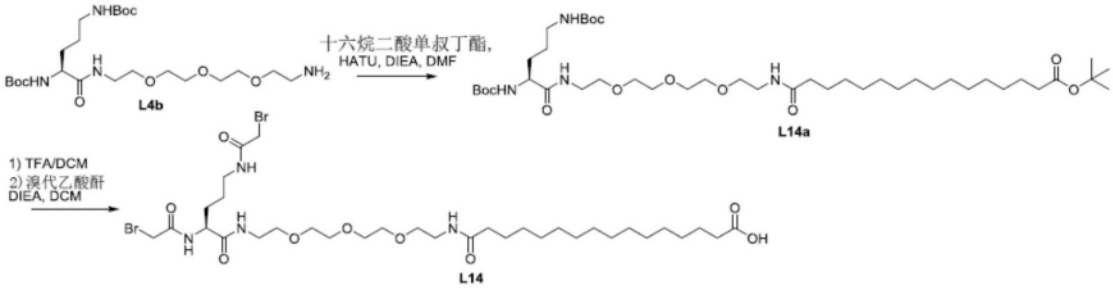
实施例18:L12的合成



[0407] 通用方案A、B、D(十八烷二酸);C、D(Fmoc-PEG_2-丙酸);B、D(Fmoc-Orn(Fmoc)-OH);B、E、F。

[0408] 通过具有质量检测的半制备型HPLC纯化粗产物,得到白色固体产物L12(51.7mg,0.054mmol,3%)。^{1}H NMR(400MHz,甲醇-d_4)δ4.39(td,J=9.2,5.1Hz,2H),3.92(qd,J=11.4,1.2Hz,2H),3.85(s,2H),3.76(t,J=6.2Hz,2H),3.63(s,4H),3.57(t,J=5.5Hz,2H),3.40(q,J=5.1Hz,2H),3.30-3.12(m,6H),2.47(t,J=6.1Hz,2H),2.29(dt,J=12.1,7.4Hz,4H),1.95-1.77(m,2H),1.78-1.50(m,10H),1.48-1.40(m,2H),1.39-1.26(m,22H)。

实施例19:L14的合成



中间体L14a

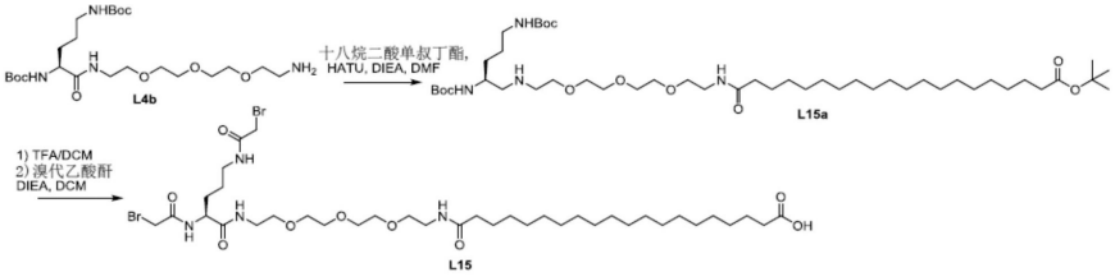
[0409] 向溶解于DMF(5mL)的十六烷二酸单叔丁酯(102mg,0.30mmol,1当量)的溶液中加入溶解于1mL DMF中的HATU(125mg,0.33mmol,1.1当量)、DIEA(51μL,0.33mmol,1.1当量)和化合物L4b(151.9mg,0.3mmol,1当量)。将反应混合物在室温下搅拌3h。用EtOAc稀释产物。将有机层依次用1M HCl、饱和$NaHCO_3$和盐水洗涤,用Na_2SO_4干燥,过滤,并浓缩。通过硅胶快速柱色谱法纯化,得到所需的油状化合物L14a(147mg,0.176mmol,59%)。^{1}H NMR(400MHz,氯仿-d)δ6.87(s,1H),6.40(s,1H),5.32(s,2H),4.79(s,1H),4.20(s,1H),3.66(d,J=7.0Hz,8H),3.60(dt,J=10.0,5.1Hz,4H),3.49-3.45(m,3H),3.31-3.18(m,1H),3.13-3.06(m,1H),2.21(td,J=7.8,6.0Hz,4H),1.88-1.78(m,1H),1.66-1.53(m,7H),1.51-1.42(m,27H),1.36-1.19(m,20H)。

L14

[0410] 将化合物L14a(40mg,0.048mmol,1当量)的DCM(2mL)溶液用TFA(2mL)处理30分钟。将混合物浓缩,与己烷共蒸发并溶解于20mL DCM中并在0℃下冷却。加入DIEA(34μL,0.1924mmol,4当量),然后加入溶解于1mL DCM中的溴代乙酸酐(23.63mg,0.098mmol,2.05当量)。然后将反应混合物在0℃搅拌30分钟,在室温搅拌1.5h,并除去溶剂。通过硅胶快速柱色谱法纯化,得到白色固体状L14(18.3mg,0.022mmol,46%)。MS(ES^+)m/z 817.1($[M+H]^+$),

819.09([M+H]$^+$)。^{1}H NMR(400MHz,甲醇-d_4)δ4.38(dd,J=8.4,5.5Hz,1H),3.92(q,J=11.2,10.6Hz,2H),3.84(s,2H),3.69-3.61(m,8H),3.56(td,J=5.5,2.6Hz,4H),3.44-3.36(m,4H),3.30-3.14(m,2H),2.29(t,J=7.4Hz,2H),2.21(t,J=7.5Hz,2H),1.91-1.78(m,1H),1.76-1.67(m,1H),1.67-1.54(m,6H),1.40-1.29(m,20H)。

实施例20:L15的合成



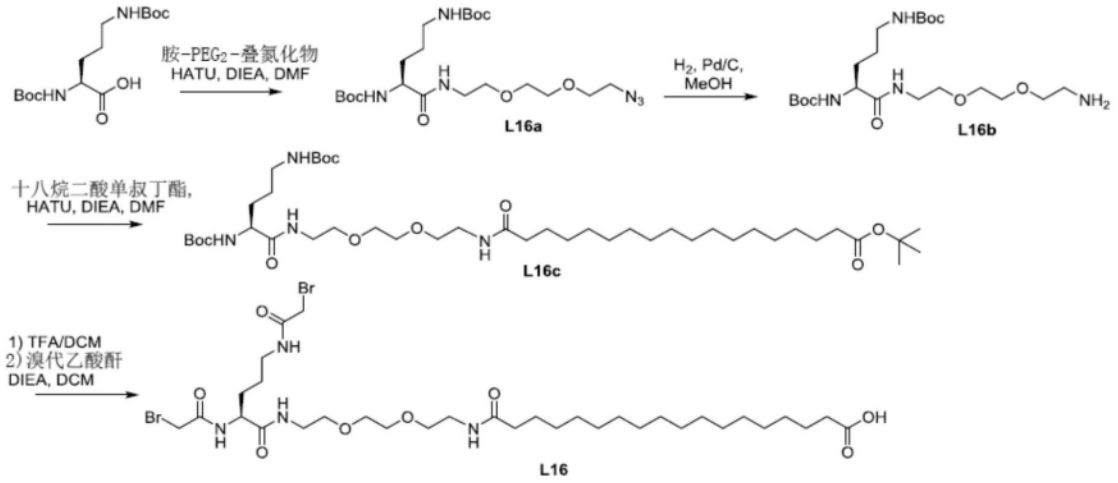
中间体L15a

[0411] 向溶解于DMF(5mL)的20-(叔丁氧基)-20-氧代二十烷酸(360mg,0.90mmol,1.05当量)的溶液中加入溶解于1mL DMF中的HATU(343mg,0.90mmol,1.05当量)、DIEA(300μL,1.71mmol,2当量)和化合物L4b(435mg,0.858mmol,1当量)。将反应混合物在室温下搅拌3h。用EtOAc稀释产物。将有机层依次用1M HCl、饱和$NaHCO_3$和盐水洗涤,用Na_2SO_4干燥,过滤,并浓缩。通过硅胶快速柱色谱法纯化,得到所需的油状化合物L15a(555mg,0.625mmol,72%)。^{1}H NMR(400MHz,氯仿-d)δ6.87(s,1H),6.40(s,1H),4.79(s,1H),4.21(s,1H),3.76-3.53(m,15H),3.47(s,5H),3.32-3.05(m,3H),2.29-2.17(m,4H),1.90-1.76(m,4H),1.69-1.53(m,2H),1.52-1.41(m,33H),1.36-1.20(m,29H)。

L15

[0412] 将化合物L15a(100mg,0.112mmol,1当量)的DCM(2mL)溶液用TFA(2mL)处理30分钟。将混合物浓缩,与己烷共蒸发并溶解于20mL DCM中并在0℃下冷却。加入DIEA(79μL,0.45mmol,4当量),然后加入溶解于1mL DCM中的溴代乙酸酐(60mg,0.231mmol,2.05当量)。然后将反应混合物在0℃搅拌30分钟,在室温搅拌1.5h,并除去溶剂。通过硅胶快速柱色谱法纯化,得到白色固体状L15(17.5mg,0.02mmol,18%)。MS(ES$^+$)m/z 873.21([M+H]$^+$),875.20([M+H]$^+$)^{1}H NMR(400MHz,甲醇-d_4)δ4.38(dd,J=8.4,5.5Hz,1H),3.91(q,J=11.4Hz,2H),3.84(s,2H),3.72-3.61(m,8H),3.56(td,J=5.5,2.7Hz,4H),3.44-3.35(m,5H),3.30-3.17(m,2H),2.29(t,J=7.4Hz,2H),2.21(t,J=7.5Hz,2H),1.92-1.77(m,1H),1.75-1.53(m,7H),1.40-1.27(m,27H)。

实施例21:L16的合成



中间体L16a

[0413] 向溶解于DMF(10mL)的Boc-Orn(Boc)-OH(400mg,1.2mmol,1当量)的溶液中加入溶解于1mL DMF中的HATU(504mg,1.32mmol,1.1当量)、DIEA(230μL,1.32mmol,1.1当量)和胺-PEG_2-N_3(210mg,1.20mmol,1当量)。将反应混合物在室温下搅拌4h。用EtOAc稀释产物。将有机层依次用1M HCl、饱和$NaHCO_3$和盐水洗涤,用Na_2SO_4干燥,过滤,并浓缩。通过硅胶快速柱色谱法纯化,得到所需的油状化合物L16a(471mg,0.96mmol,80%)。^{1}H NMR(400MHz,甲醇-d_4)δ4.01(t,J=6.6Hz,1H),3.71-3.60(m,6H),3.55(t,J=5.5Hz,2H),3.41-3.37(m,3H),3.04(t,J=6.2Hz,2H),1.78-1.66(m,1H),1.62-1.48(m,3H),1.48-1.39(m,18H)。

中间体L16b

[0414] 在氩气下向化合物L16a(471mg,0.9mmol,1当量)的无水MeOH(10mL)溶液中加入Pd/C(10.2mg,0.09mmol,0.1当量)且用H_2置换氩气。将反应混合物在室温下搅拌6h,在硅藻土上过滤并蒸发,得到油状化合物L16b(295.5mg,0.64mmol,71%)。产物无需进一步纯化即可使用。MS(ES^+)m/z 462.51([M+H]$^+$)。

中间体L16c

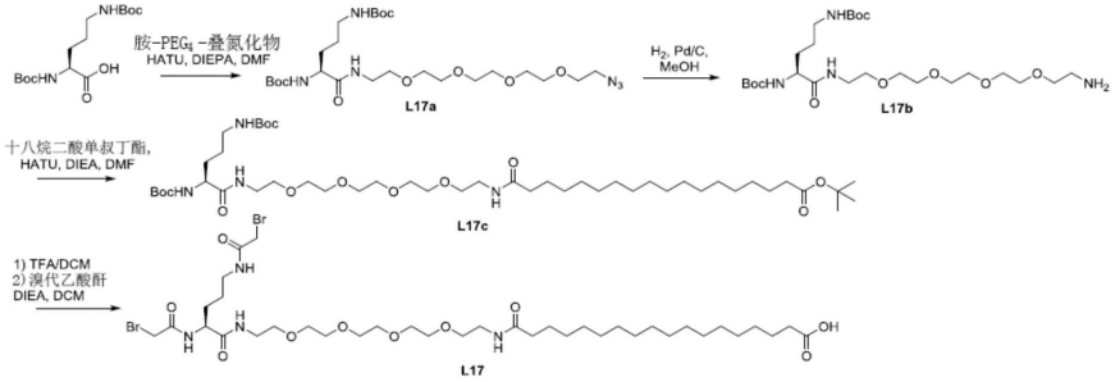
[0415] 向溶解于DMF(5mL)的十八烷二酸单叔丁酯(281mg,0.76mmol,1当量)的溶液中加入溶解于1mL DMF中的HATU(288mg,0.76mmol,1当量)、DIEA(132μL,0.76mmol,1当量)和化合物L16b(351mg,0.76mmol,1当量)。将反应混合物在室温下搅拌3h。用EtOAc稀释产物。将有机层依次用1M HCl、饱和$NaHCO_3$和盐水洗涤,用Na_2SO_4干燥,过滤,并浓缩。通过硅胶快速柱色谱法纯化,得到所需的油状化合物L16c(351mg,0.43mmol,57%)。^{1}H NMR(400MHz,甲醇-d_4)δ3.61(s,4H),3.54(td,J=5.6,2.3Hz,4H),3.40-3.34(m,4H),3.04(t,J=6.6Hz,2H),2.20(td,J=7.6,5.9Hz,4H),1.77-1.68(m,2H),1.64-1.48(m,2H),1.48-1.42(m,28H),1.35-1.26(m,26H)。

L16

[0416] 将化合物L16c(31mg,0.038mmol,1当量)的DCM(2mL)溶液用TFA(2mL)处理30分钟。将混合物浓缩,与己烷共蒸发并溶解于20mL DCM中并在0℃下冷却。加入DIEA(27μL,0.152mmol,4当量),然后加入溶解于1mL DCM中的溴代乙酸酐(21mg,0.078mmol,2.05当量)。然后将反应混合物在0℃搅拌30分钟,在室温搅拌1.5h,并除去溶剂。通过硅胶快速柱色谱法纯化,得到白色固体状L16(12.6mg,0.015mmol,41%)。MS(ES^+)m/z 801.13([M+H]$^+$),803.12([M+H]$^+$)。^{1}H NMR(400MHz,甲醇-d_4)δ4.37(dd,J=8.5,5.4Hz,1H),3.91(q,J=

11.3Hz,2H),3.84(s,2H),3.63(s,4H),3.57(td,J＝5.6,2.6Hz,4H),3.43-3.36(m,4H),3.31-3.17(m,1H),2.29(t,J＝7.4Hz,2H),2.21(t,J＝7.5Hz,2H),1.90-1.79(m,1H),1.76-1.54(m,7H),1.41-1.30(m,26H)。

实施例22:L17的合成



中间体L17a

[0417] 向溶解于DMF(10mL)的Boc-Orn(Boc)-OH(400mg,1.2mmol,1当量)的溶液中加入溶解于1mL DMF中的HATU(504mg,1.32mmol,1.1当量)、DIEA(230μL,1.32mmol,1.1当量)和胺-PEG_2-N_3(316mg,1.20mmol,1当量)。将反应混合物在室温下搅拌4h。用EtOAc稀释产物。将有机层依次用1M HCl、饱和$NaHCO_3$和盐水洗涤,用Na_2SO_4干燥,过滤,并浓缩。通过硅胶快速柱色谱法纯化,得到所需的油状化合物L17a(454mg,0.78mmol,66%)。^{1}H NMR(400MHz,甲醇-d_4)δ4.04-3.97(m,1H),3.71-3.58(m,14H),3.54(t,J＝5.4Hz,2H),3.37(t,J＝5.0Hz,4H),3.04(t,J＝6.6Hz,2H),1.75-1.67(m,1H),1.62-1.48(m,3H),1.48-1.41(m,18H)。

中间体L17b

[0418] 在氩气下向化合物L17a(454mg,0.9mmol,1当量)的无水MeOH(10mL)溶液中加入Pd/C(8.3mg,0.078mmol,0.1当量)且用H_2置换氩气。将反应混合物在室温下搅拌6h,在硅藻土上过滤并蒸发,得到油状化合物L17b(192mg,0.35mmol,45%)。产物无需进一步纯化即可使用。

中间体L17c

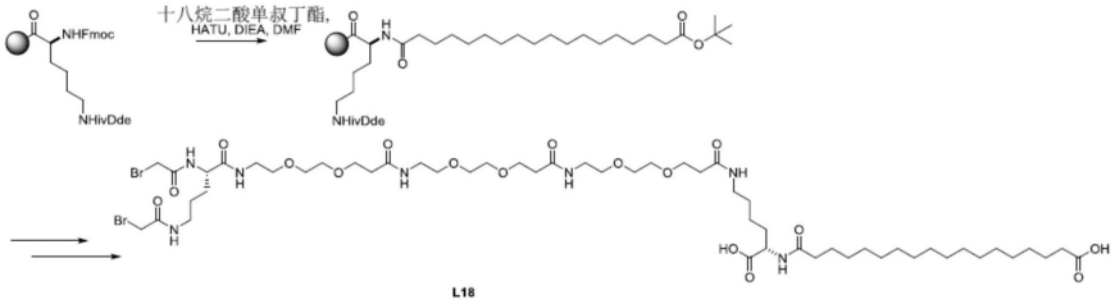
[0419] 向溶解于DMF(5mL)的十八烷二酸单叔丁酯(225mg,0.61mmol,1当量)的溶液中加入溶解于1mL DMF中的HATU(231mg,0.61mmol,1当量)、DIEA(106μL,0.61mmol,1当量)和化合物L17b(335mg,0.61mmol,1当量)。将反应混合物在室温下搅拌2h。用EtOAc稀释产物。将有机层依次用1M HCl、饱和$NaHCO_3$和盐水洗涤,用Na_2SO_4干燥,过滤,并浓缩。通过硅胶快速柱色谱法纯化,得到所需的油状化合物L17c(178mg,0.20mmol,32%)。^{1}H NMR(400MHz,氯仿-d)δ5.32(s,2H),3.74-3.63(m,11H),3.59(dt,J＝10.9,5.0Hz,4H),3.52-3.43(m,4H),3.27-3.08(m,2H),2.22(d,J＝7.6Hz,4H),1.69-1.52(m,6H),1.51-1.42(m,27H),1.27(s,26H)。

L17

[0420] 将化合物L17c(45.6mg,0.05mmol,1当量)的DCM(2mL)溶液用TFA(2mL)处理30分钟。将混合物浓缩,与己烷共蒸发并溶解于20mL DCM中并在0℃下冷却。加入DIEA(36μL,0.202mmol,4当量),然后加入溶解于1mL DCM中的溴代乙酸酐(27mg,0.103mmol,2.05当量)。然后将反应混合物在0℃搅拌30分钟,在室温搅拌1.5h,并除去溶剂。通过硅胶快速柱

色谱法纯化，得到白色固体状L17(14.9mg，0.017mmol，33%)。MS(ES^+)m/z 889.18($[M+H]^+$)，891.17($[M+H]^+$)^{1}H NMR(400MHz，甲醇-d_4)δ4.38(dd，J＝8.3，5.5Hz，1H)，3.92(q，J＝11.3Hz，2H)，3.84(s，2H)，3.67-3.60(m，7H)，3.56(td，J＝5.5，3.5Hz，4H)，3.45-3.35(m，5H)，3.32-3.15(m，3H)，2.29(t，J＝7.4Hz，2H)，2.21(t，J＝7.5Hz，2H)，1.90-1.76(m，1H)，1.74-1.57(m，7H)，1.41-1.26(m，25H)。

实施例23：L18的合成



[0421] 通用方案A、B、D(十八烷二酸)；C、D(Fmoc-PEG_2-丙酸)；B(Fmoc-PEG_2-丙酸)、B(Fmoc-PEG_2-丙酸)；B、D(Fmoc-Orn(Fmoc)-OH)；B、E、F。

[0422] 通过具有质量检测的半制备型HPLC纯化粗产物，得到白色固体产物L18(47mg，0.036mmol，10%)。MS(ES^+)m/z 1276.39($[M+H]^+$)，1278.37($[M+H]^+$)。

用于溴乙酰基肽钉合/缀合的通用方案

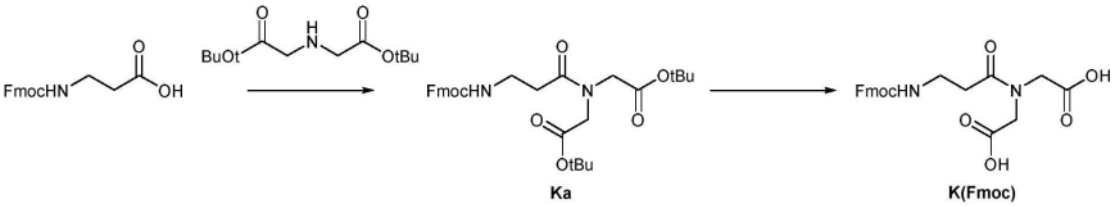
[0423] 将肽以2mM浓度用1.5当量溴乙酰基钉合体溶解在1:3(v/v)MeCN/30mM NH_4HCO_3缓冲液(pH 8.5)中。用氢氧化铵重新调节反应混合物的pH以校正由肽TFA抗衡离子引起的pH降低。对于特别不溶的肽，加入更多的MeCN。将反应物在室温下搅拌2-4h，然后通过滴加乙酸酸化至pH 5。将所得溶液冻干并通过反相HPLC纯化。

用于内酰胺钉合的通用固相方案

[0424] 将在每个钉合位置带有胺侧链正交保护(Dde/Mmt)的肽-树脂在DMF中溶胀1h。通过用DMF中的2%肼溶液处理(2×15min)从第一侧链除去Dde保护基。观察到TNBS检测呈阳性。如下所述偶联下文指定的接头构建单元，并观察到TNBS检测呈阴性。将溶剂交换为DCM，并通过用含有5%TIPS的1%TFA的DCM溶液处理5×2min从第二侧链除去Mmt基团。用DCM、10%DIEA的DMF溶液、DMF洗涤树脂，观察到TNBS检测呈阳性。如下所述，将接头环化，并将钉合体的PEG-脂肪酸部分(如果适用)延长。使用95%TFA、2.5%TIPS、2.5%H_2O，将完整的钉合的肽从树脂上裂解3h。将肽裂解混合物蒸发成油状物，研磨并用乙醚洗涤并通过反相HPLC纯化。

Dde/Alloc保护方案也可用于该方法，其需要向Dde脱保护混合物中加入烯丙醇作为清除剂以防止Alloc烯丙基部分同时还原。

K(Fmoc)接头的合成



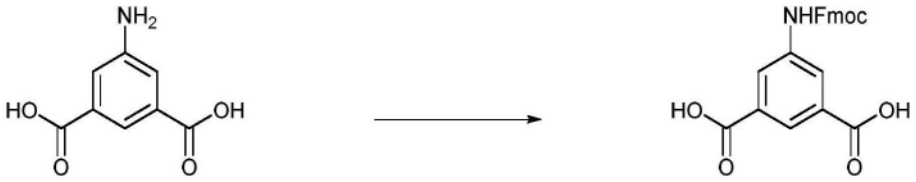
中间体Ka

[0425] 将Fmoc-β-Ala-OH(1.00g,3.21mmol)和亚氨基二乙酸二叔丁酯(0.461g,2.68mmol)悬浮于100mL DCM中。加入HATU(1.02g,2.68mmol)和DIEA(3.32mL,12.8mmol),并将反应物在室温下搅拌3.5h。蒸发溶剂,将残余物溶于甲醇中,通过快速硅胶柱色谱(己烷/EtOAc)纯化,得到白色固体产物(0.802g,56%)。^{1}H NMR(400MHz,氯仿-d)δ7.78(d,J=7.4Hz,2H),7.62(d,J=7.4Hz,2H),7.42(t,J=7.4Hz,2H),7.33(t,J=7.4Hz,2H),5.66(t,J=5.7Hz,1H),4.35(d,J=7.3Hz,2H),4.23(t,J=7.3Hz,1H),4.10(s,2H),4.02(s,2H),3.56(q,J=5.7Hz,2H),2.55(t,J=5.7Hz,2H),1.49(s,18H)。

K(Fmoc)接头

[0426] 将化合物Ka用20mL 1:1TFA/DCM处理2h。蒸发溶剂,研磨残余物,并用乙醚洗涤,得到白色固体K(Fmoc)接头(0.371g,58%)。MS(ES$^+$)m/z 427.15([M+H]$^+$)。

A(Fmoc)接头的合成



A (Fmoc)

[0427] 将5-氨基间苯二甲酸(1.00g,5.5mmol)的10mL二噁烷溶液加入Na_2CO_3(1.46g,5.5mmol)在15mL水中的脱气溶液中。将溶液在冰上冷却,然后在搅拌下在15分钟内滴加Fmoc氯化物(1.42g,5.5mmol)的10mL二噁烷溶液。然后将反应物搅拌1h,然后在室温搅拌24h。真空除去二噁烷,且剩余的水溶液用1M HCl酸化。然后将所得固体沉淀物用乙醚(4×10mL)洗涤,再溶解于EtOAc中,过滤,用盐水洗涤,经Na_2SO_4干燥,过滤,并浓缩得到白色固体状的A(Fmoc)接头(119mg,5%)。^{1}H NMR(500MHz,DMSO-d_6)δ13.24(s,2H),10.12(s,1H),8.33(d,J=1.5Hz,2H),8.12(t,J=1.5Hz,1H),7.91(d,J=7.6Hz,2H),7.76(dd,J=7.6,1.2Hz,2H),7.43(t,J=7.6Hz,2H),7.36(td,J=7.6,1.2Hz,2H),4.50(d,J=6.8Hz,2H),4.33(t,J=6.8Hz,1H)。

“A1”和“K1”系列简单内酰胺钉合体的通用方案G

[0428] 对于接头偶联,使用HATU(4当量)和DIEA(4当量)的DMF溶液连接合适的二酸构建单元(2当量)1×2h。使用HATU(1当量)和DIEA(2当量)的DMF溶液实现环化步骤1×2h。

用于‘K’PEG-脂肪酸三官能内酰胺钉合体的通用方案H

[0429] 对于接头偶联,使用DIC(2当量)和催化性DMAP在干燥DCM中于室温下预形成构建单元K(Fmoc)接头(2当量)的分子内对称酸酐10分钟。将肽-树脂溶剂换成DCM,然后加入酸酐并搅拌过夜。排出树脂,用DCM和DMF洗涤。通过DIC(1当量)和HOBt或HOAt(1当量)的DMF溶液处理将接头环化过夜,并观察到TNBS呈阴性。通过用10%乙酸酐的DMF溶液处理(30min)将剩余的未环化接头封端。通过用20%哌啶的DMF溶液处理(2×10min),将接头Fmoc基团脱保护。观察到TNBS呈阳性。随后的钉合体PEG和脂肪酸构建单元通过标准偶联化学依次连接至接头游离胺:构建单元(3当量)、HATU(3当量)和DIEA(6当量)的DMF溶液,室温,1h,使用20%哌啶的DMF溶液进行脱保护循环(5+10min,RT)。

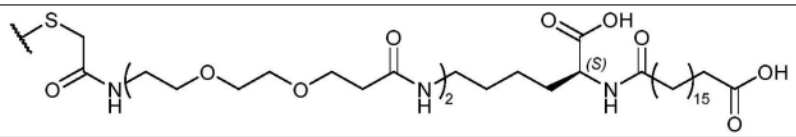
用于‘A’PEG-脂肪酸三官能内酰胺钉合体的通用方案I

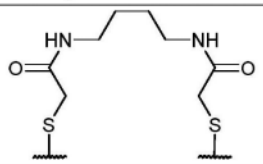
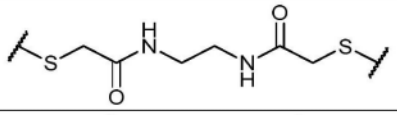
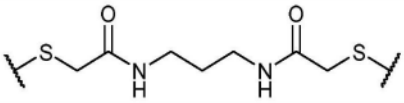
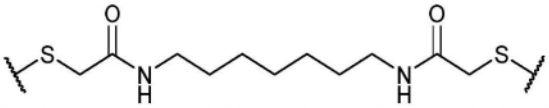
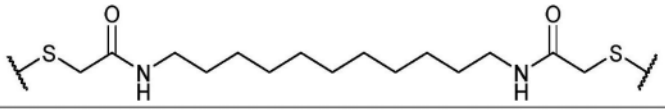
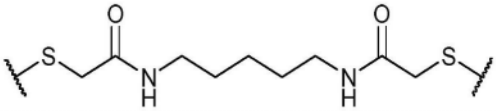
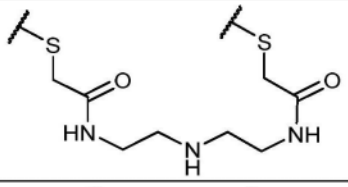
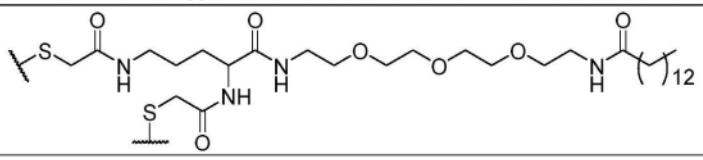
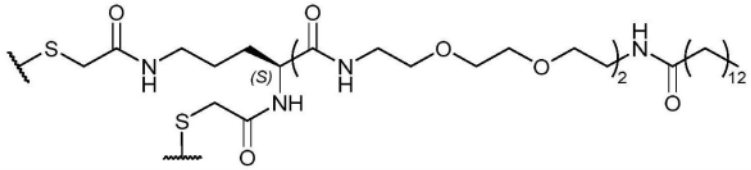
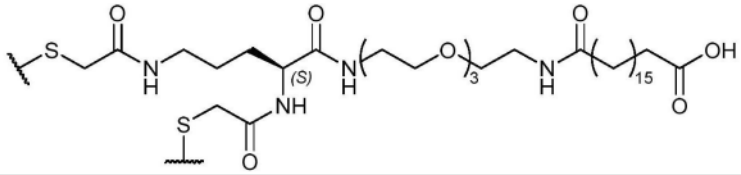
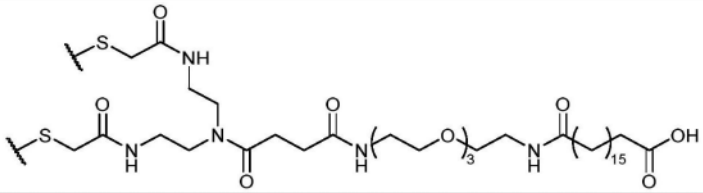
[0430] 对于接头偶联,使用HATU(4当量)和DIEA(4当量)的DMF溶液连接构建单元A(Fmoc)

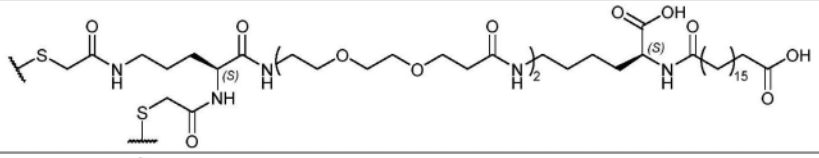
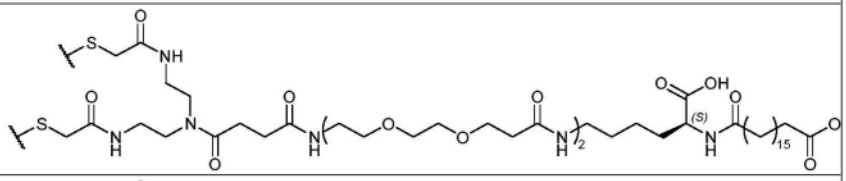
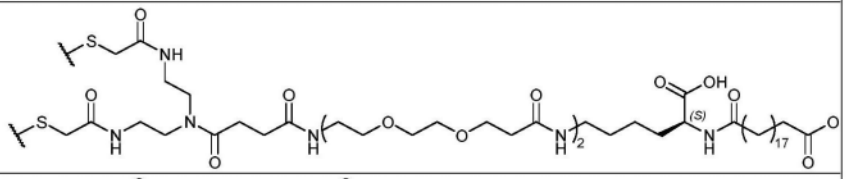
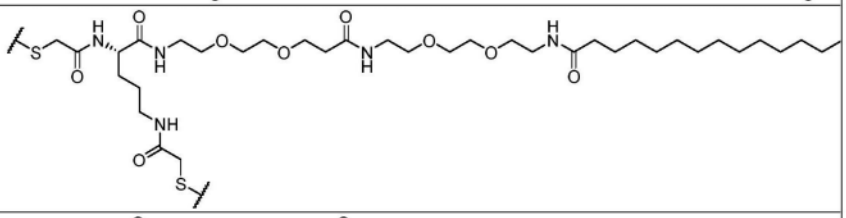
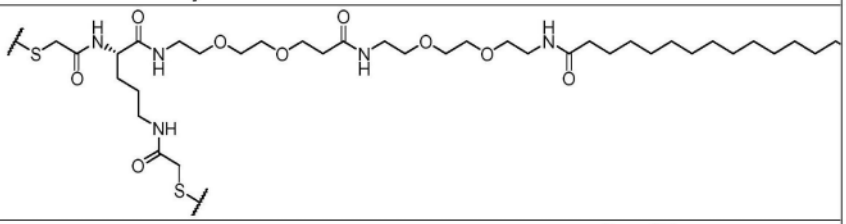
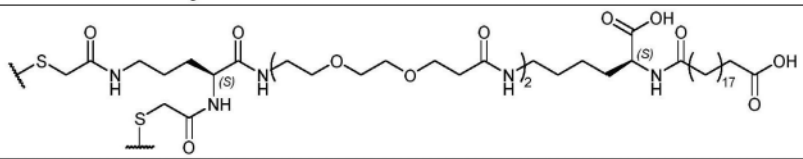
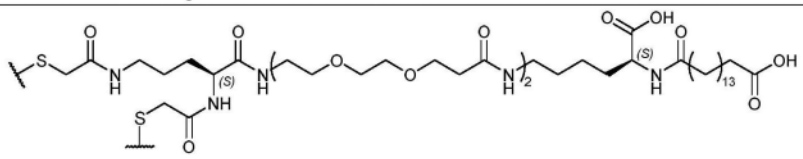
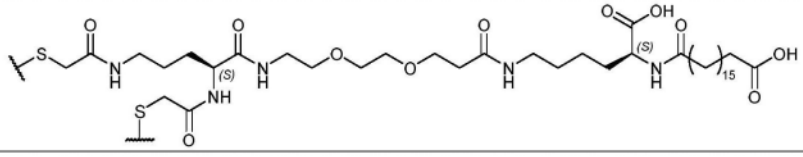
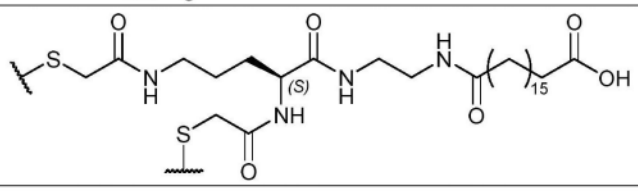
接头(2当量)1×2h。使用HATU(1当量)和DIEA(2当量)的DMF溶液实现环化步骤1×2h。通过用10%乙酸酐的DMF溶液处理将剩余的未环化接头封端(30min)。通过用20%哌啶的DMF溶液处理(2×10min),将接头Fmoc基团脱保护。不可能观察到苯胺氮的TNBS检测呈阳性。使用HATU(3当量)和DIEA(6当量)的DMF溶液在室温下偶联Fmoc-β-Ala-OH(3当量)4×1h或使用DIC/DMAP的DCM溶液(2h,RT)偶联作为对称酸酐。随后的钉合体PEG和脂肪酸构建单元通过标准偶联化学依次连接至接头游离胺:构建单元(3当量)、HATU(3当量)和DIEA(6当量)的DMF溶液,室温,1h,使用20%哌啶的DMF溶液进行脱保护循环(5+10min,RT)。

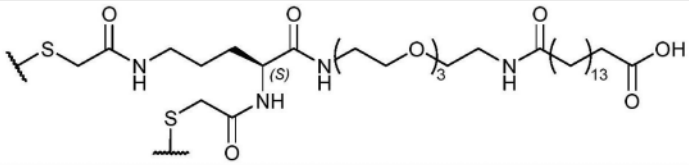
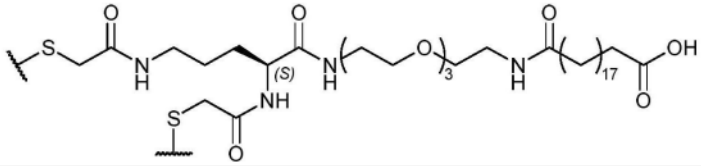
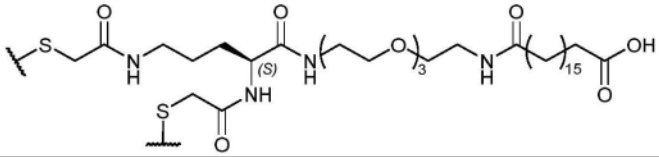
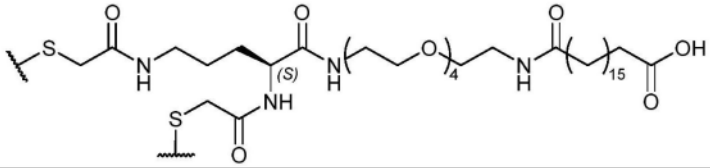
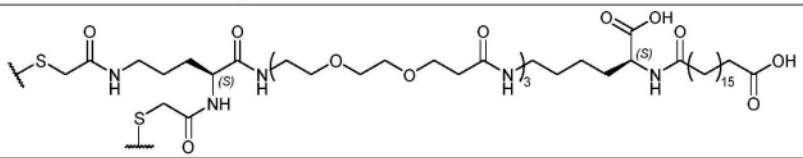
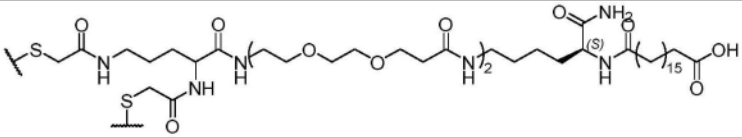
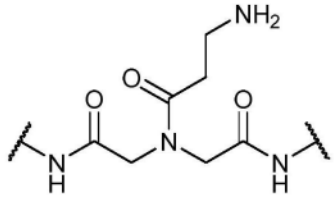
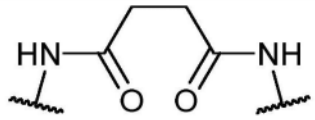
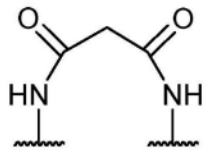
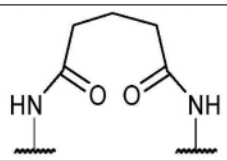
[0431] 在一些实施方案中,本文所述的肽缀合物包含表6的半衰期延长部分或钉合体。

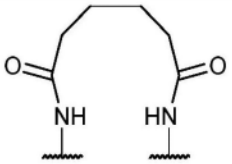
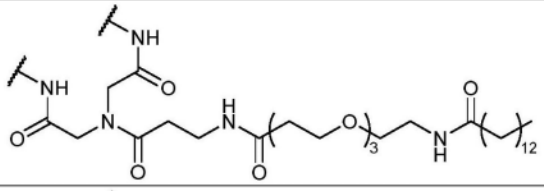
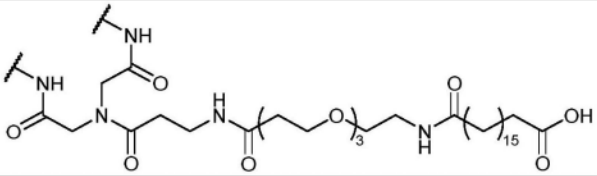
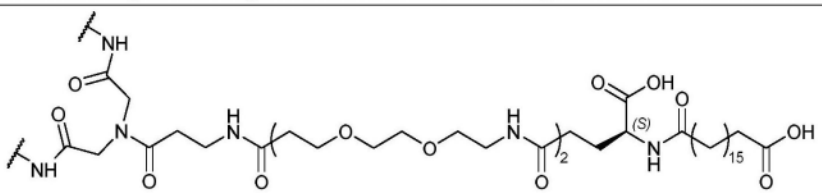
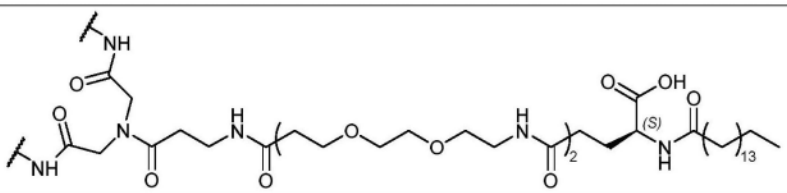
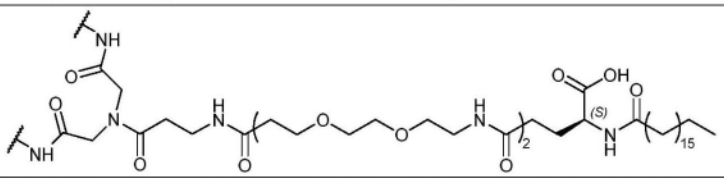
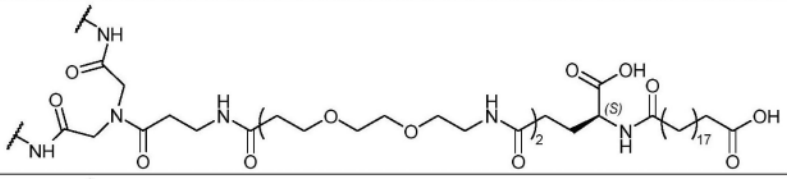
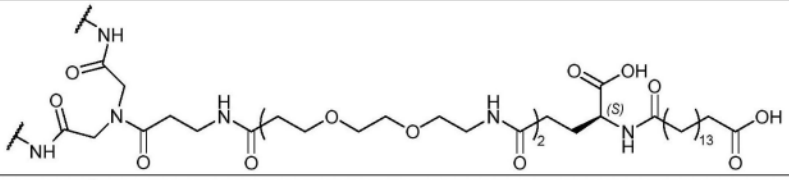
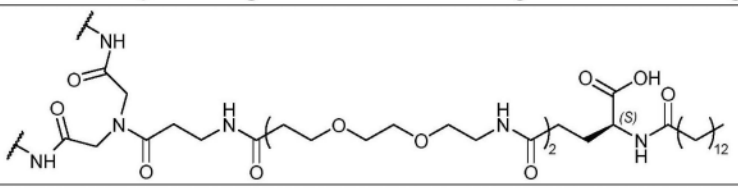
表6

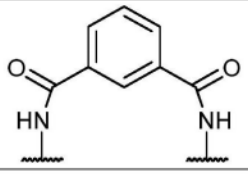
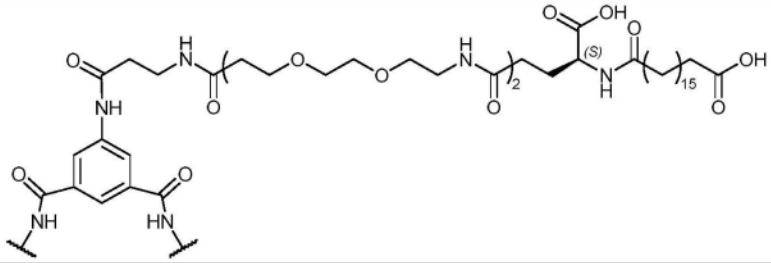
实施例	ID	结构
1	FA2	

实施例	ID	结构
2	L1	
3	L1B	
4	L1C	
5	L1D	
6	L1E	
7	L1F	
8	L1G	
	L2	
9	L3	
10	L4	
11	L4A	

实施例	ID	结构
12	L5	
13	L5A	
	C20 L5A	
14	L6	
15	L7	
16	L8	
17	L9	
18	L12	
	L13	

实施例	ID	结构
19	L14	
20	L15	
21	L16	
22	L17	
23	L18	
	L19	
	K0	
	K1	
	K1C	
	K1F	

实施例	ID	结构
	K1H	
	K3	
	K4	
	K5	
	K6	
	K7	
	K8	
	K9	
	K20	

实施例	ID	结构
	A1	
	A5	

[0432] “ -S”为半胱氨酸、高半胱氨酸、2-氨基-5-巯基戊酸或2-氨基-6-巯基己酸残基的一部分，且“ -N”为赖氨酸、鸟氨酸、二氨基丁酸、二氨基丙酸或高赖氨酸残基的一部分。

[0433] 在一些实施方案中，本文所述的PYY肽缀合物如表7所示。

表7:PYY肽缀合物

缀合物	序列	缀合位置	钉合体	计算质量	实测质量
1	IKPEAPGCDASPEEC NRYYASLRHYLNL VTRQRY (SEQ ID No. 3)	8, 15	L1		
2	IKPEAPGCDASPEEC NRYYASLRHYLNL VTRQRY (SEQ ID No. 3)	8, 15	L1B	4153.67	4154.12
3	IKPEAPGCDASPEEC NRYYASLRHYLNL VTRQRY (SEQ ID No. 3)	8, 15	L1C	4167.70	4168.23
4	IKPEAPGCDASPEEC NRYYASLRHYLNL VTRQRY (SEQ ID No. 3)	8, 15	L3	4725.47	4725.90
5	IKPEAPGCDASPEEC NRYYASLRHYLNL VTRQRY (SEQ ID No. 3)	8, 15	L4	4696.43	4696.90
6	IKPEAPGCDASPEEC NRYYASLRHYLNL VTRQRY (SEQ ID No. 3)	8, 15	L5	4968.73	4969.20
7	IKPEAPGCDASPEEC	8, 15	L5A		

缀合物	序列	缀合位置	钉合体	计算质量	实测质量
	NRYYASLRHYLNL VTRQRY (SEQ ID No. 3)				
8	IKPEAPGEDASPEEL NRYYACLRHYLNC VTRQRY (SEQ ID No. 4)	21, 28	L1	4223.76	4224.02
9	IKPEAPGEDASPEEL NRYYACLRHYLNC VTRQRY (SEQ ID No. 4)	21, 28	L1C	4209.74	4210.00
10	IKPEAPGEDASPEEL NRYYACLRHYLNC VTRQRY (SEQ ID No. 4)	21, 28	L3	4767.51	4767.89
11	IKPEAPGEDASPEEL NRYYACLRHYLNC VTRQRY (SEQ ID No. 4)	21, 28	L4	4738.47	4738.97
12	IKPEAPGEDASPEEL NRYYACLRHYLNC VTRQRY (SEQ ID No. 4)	21, 28	L5	5010.77	5011.18
13	IKPEAPGEDASPEEL NRYYACLRHYLNC VTRQRY (SEQ ID No. 4)	21, 28	L5A	5081.85	5082.30

缀合物	序列	缀合位置	钌合体	计算质量	实测质量
14	IKPEAPGEDASPEELNRYYACLRHYLNCVTRQRY (SEQ ID No. 4)	21, 28	L8	5038.82	5039.30
15	PKPEAPGCDASPEECNRYYADLRHYLNWLTRQRY (SEQ ID No. 5)	8, 15	L1	4280.78	4281.20
16	PKPEAPGCDASPEECNRYYADLRHYLNWLTRQRY (SEQ ID No. 5)	8, 15	L1F	4294.80	4295.00
17	PKPEAPGCDASPEECNRYYADLRHYLNWLTRQRY (SEQ ID No. 5)	8, 15	L1G	4295.79	4296.10
18	PKPEAPGCDASPEECNRYYADLRHYLNWLTRQRY (SEQ ID No. 5)	8, 15	L3	4824.52	4825.00
19	PKPEAPGCDASPEECNRYYADLRHYLNWLTRQRY (SEQ ID No. 5)	8, 15	L4	4795.48	4796.10
20	PKPEAPGCDASPEECNRYYADLRHYLNWLTRQRY (SEQ ID	8, 15	L4A	4863.43	4863.39

缀合物	序列	缀合位置	钉合体	计算质量	实测质量
	No. 5)				
21	PKPEAPGCDASPEECNRYYADLRHYLNWLTRQRY (SEQ ID No. 5)	8, 15	L5	5067.78	5068.30
22	PKPEAPGCDASPEECNRYYADLRHYLNWLTRQRY (SEQ ID No. 5)	8, 15	L5A	5138.86	5138.51
23	PKPEAPGCDASPEECNRYYADLRHYLNWLTRQRY (SEQ ID No. 5)	8, 15	L8	5095.84	5096.30
24	PKPEAPGCDASPEECNRYYADLRHYLNWLTRQRY SEQ ID No. 5)	8, 15	L9	5039.73	5040.20
25	PKPEAPGCDASPEECNRYYADLRHYLNWLTRQRY (SEQ ID No. 5)	8, 15	L12	4908.60	4909.00
26	PKPEAPGCDASPEECNRYYADLRHYLNWLTRQRY (SEQ ID No. 5)	8, 15	L13		
27	PKPEAPGCDASPEECNRYYADLRHYLN	8, 15	L14	4767.43	4767.90

缀合物	序列	缀合位置	钉合体	计算质量	实测质量
	WLTRQRY (SEQ ID No. 5)				
28	PKPEAPGCDASPEE CNRYYADLRHYLN WLTRQRY (SEQ ID No. 5)	8, 15	L15	4823.53	4824.00
29	PKPEAPGCDASPEE CNRYYADLRHYLN WLTRQRY (SEQ ID No. 5)	8, 15	L16	4751.43	4751.90
30	PKPEAPGCDASPEE CNRYYADLRHYLN WLTRQRY (SEQ ID No. 5)	8, 15	L17	4839.53	4840.00
31	PKPEAPGCDASPEE CNRYYADLRHYLN WLTRQRY (SEQ ID No. 5)	8, 15	L18	5226.97	5227.40
32	PKPEAPGKDASPEE WNRYYACLRHYLN CLTRQRY (SEQ ID No. 6)	21, 28	L1	4293.86	4294.34
33	PKPEAPGKDASPEE WNRYYACLRHYLN CLTRQRY (SEQ ID No. 6)	21, 28	L1C	4279.84	4280.00
34	PKPEAPGKDASPEE	21, 28	L1F	4307.89	4308.30

缀合物	序列	缀合位置	钌合体	计算质量	实测质量
	WNRYYACLRHYLN CLTRQRY (SEQ ID No. 6)				
35	PKPEAPGKDASPEE WNRYYACLRHYLN CLTRQRY (SEQ ID No. 6)	21, 28	L1G	4308.88	4309.00
36	PKPEAPGKDASPEE WNRYYACLRHYLN CLTRQRY (SEQ ID No. 6)	21, 28	L3	4837.61	4838.10
37	PKPEAPGKDASPEE WNRYYACLRHYLN CLTRQRY (SEQ ID No. 6)	21, 28	L4	4808.57	4809.00
38	PKPEAPGKDASPEE WNRYYACLRHYLN CLTRQRY (SEQ ID No. 6)	21, 28	L4A	4876.49	4876.46
39	PKPEAPGKDASPEE WNRYYACLRHYLN CLTRQRY (SEQ ID No. 6)	21, 28	L5	5080.87	5081.30
40	PKPEAPGKDASPEE WNRYYACLRHYLN CLTRQRY (SEQ ID No. 6)	21, 28	L5A	5151.95	5152.30

缀合物	序列	缀合位置	钉合体	计算质量	实测质量
41	PKPEAPGKDASPEEWNRYYACLRHYLNCLTRQRY (SEQ ID No. 6)	21, 28	L8	5108.92	5109.30
42	PKPEAPGKDASPEEWNRYYACLRHYLNCLTRQRY (SEQ ID No. 6)	21, 28	L9	5052.81	5053.30
43	PKPEAPGKDASPEEWNRYYACLRHYLNCLTRQRY (SEQ ID No. 6)	21, 28	L12	4921.68	4922.10
44	PKPEAPGKDASPEEWNRYYACLRHYLNCLTRQRY (SEQ ID No. 6)	21, 28	L18		
45	PKPEAPGKDASPEEWNRYYACLRHYLNCLTRQRY (SEQ ID No. 6)	21, 28	FA2 (x2)	5724.04	5723.99
46	PKPEAPGKDASPEEKNRYYADLRHYLNWLTRQRY (SEQ ID No. 7)	8, 15	K1		
47	PKPEAPGKDASPEEKNRYYADLRHYLNWLTRQRY (SEQ ID	8, 15	K3		

缀合物	序列	缀合位置	钉合体	计算质量	实测质量
	No. 7)				
48	PKPEAPGKDASPEEKNRYYADLRHYLNWLTRQRY (SEQ ID No. 7)	8, 15	K4		
49	PKPEAPGKDASPEEKNRYYADLRHYLNWLTRQRY (SEQ ID No. 7)	8, 15	K5		
50	PKPEAPGKDASPEEKNRYYADLRHYLNWLTRQRY (SEQ ID No. 7)	8, 15	A5		
51	PKPEAPGKDASPEEWNRYYAKLRHYLNKLTRQRY (SEQ ID No. 8)	21, 28	K1	4255.18	4255.12
52	PKPEAPGKDASPEEWNRYYAKLRHYLNKLTRQRY (SEQ ID No. 8)	21, 28	K1C		
53	PKPEAPGKDASPEEWNRYYAKLRHYLNKLTRQRY (SEQ ID No. 8)	21, 28	K1F	4269.20	4269.13
54	PKPEAPGKDASPEEWNRYYAKLRHYLN	21, 28	K1H	4283.21	4283.16

缀合物	序列	缀合位置	钉合体	计算质量	实测质量
	KLTRQRY (SEQ ID No. 8)				
55	PKPEAPGKDASPEE WNRYYAKLRHYLN KLTRQRY (SEQ ID No. 8)	21, 28	K3		
56	PKPEAPGKDASPEE WNRYYAKLRHYLN KLTRQRY (SEQ ID No. 8)	21, 28	K4		
57	PKPEAPGKDASPEE WNRYYAKLRHYLN KLTRQRY (SEQ ID No. 8)	21, 28	K5	5084.69	5084.69
58	PKPEAPGKDASPEE WNRYYAKLRHYLN KLTRQRY (SEQ ID No. 8)	21, 28	A1	4303.18	4303.15
59	PKPEAPGKDASPEE WNRYYAKLRHYLN KLTRQRY (SEQ ID No. 8)	21, 28	A5	5132.69	5132.68
60	PKPEAPGKDASPEE WNRYYA[Orn]LRH YLN[Orn]LTRQRY (SEQ ID No. 9)	21, 28	K5		
61	PKPEAPGKDASPEE	21, 28	A5		

缀合物	序列	缀合位置	钉合体	计算质量	实测质量
	WNRYYA[Orn]LRHYLN[Orn]LTRQRY (SEQ ID No. 9)				
62	PKPEAPGCDASPEEWNRYYADLRHYLNWLTRQRY (SEQ ID No. 10)	8	FA2	4996.69	4997.10
63	PKPEAPGKDASPEECNRYYADLRHYLNWLTRQRY (SEQ ID No. 11)	15	FA2	4938.65	4939.20
64	PKPEAPGKDASPEEWNRYYACLRHYLNWLTRQRY (SEQ ID No. 12)	21	FA2	5009.77	5010.20
65	PKPEAPGKDASPEEWNRYYADLRHYLNCLTRQRY (SEQ ID No. 13)	28	FA2	4938.65	4939.10
66	PKPEAPGCDASPEEWNRYYACLRHYLNCLTRQRY (SEQ ID No. 14)	8 (FA2), 21 + 28 (L1)	L1 + FA2	5067.51	5066.45
67	PKPEAPGCDASPEECNRYYACLRHYLNWLTRQRY (SEQ ID No. 15)	8 + 15 (L1), 21 (FA2)	L1 + FA2		

缀合物	序列	缀合位置	钌合体	计算质量	实测质量
68	HCIKPEAPCEDASPEELNRYYASLRHYLNLVTRQRY (SEQ ID No. 16)	2, 9	L1	4504.09	4504.30
69	HCIKPEAPCEDASPEELNRYYASLRHYLNLVTRQRY (SEQ ID No. 16)	2, 9	L3	5047.84	5048.20
70	HCIKPEAPCEDASPEELNRYYASLRHYLNLVTRQRY (SEQ ID No. 16)	2, 9	L4	5018.80	5019.28
71	HCIKPEAPCEDASPEELNRYYASLRHYLNLVTRQRY (SEQ ID No. 16)	2, 9	L5	5291.10	5291.63
72	HIKPEAPGCDASPEECNRYYASLRHYLNLVTRQRY (SEQ ID No. 17)	9, 16	L1	4318.87	4319.05
73	HIKPEAPGCDASPEECNRYYASLRHYLNLVTRQRY (SEQ ID No. 17)	9, 16	L3	4725.47	4725.90
74	HIKPEAPGCDASPEECNRYYASLRHYLNLVTRQRY (SEQ ID	9, 16	L4	4696.43	4696.90

缀合物	序列	缀合位置	钉合体	计算质量	实测质量
	No. 17)				
75	HIKPEAPGCDASPEECNRYYASLRHYLNLVTRQRY (SEQ ID No. 17)	9, 16	L5	4968.73	4969.20
76	HIKPEAPGEDASPEECNRYYASCRHYLNLVTRQRY (SEQ ID No. 18)	16, 23	L1	4334.82	4335.10
77	HIKPEAPGEDASPEECNRYYASCRHYLNLVTRQRY (SEQ ID No. 18)	16, 23	L3	4878.57	4879.00
78	HIKPEAPGEDASPEECNRYYASCRHYLNLVTRQRY (SEQ ID No. 18)	16, 23	L4	4849.53	4849.72
79	HIKPEAPGEDASPEECNRYYASCRHYLNLVTRQRY (SEQ ID No. 18)	16, 23	L5	5121.83	5121.90
80	IKPEAPGEDASPEELCRYYASLCHYLNLVTRQRY (SEQ ID No. 19)	16, 23	L1	4153.71	4153.98
81	IKPEAPGEDASPEELCRYYASLCHYLNL	16, 23	L3	4697.46	4697.88

缀合物	序列	缀合位置	钉合体	计算质量	实测质量
	VTRQRY (SEQ ID No. 19)				
82	IKPEAPGEDASPEELCRYYASLCHYLNLVTRQRY (SEQ ID No. 19)	16, 23	L4	4668.41	4668.90
83	IKPEAPGEDASPEELCRYYASLCHYLNLVTRQRY (SEQ ID No. 19)	16, 23	L5	4940.72	4941.10
84	IKPEAPGEDASPEELNCYYASLRCYLNLVTRQRY (SEQ ID No. 20)	17, 24	L1		
85	HIKPEAPGEDASPEELNRCYASLRHCLNLVTRQRY (SEQ ID No. 21)	19, 26	L1	4234.79	4235.05
86	HIKPEAPGEDASPEELNRCYASLRHCLNLVTRQRY (SEQ ID No. 21)	19, 26	L3	4778.54	4778.97
87	HIKPEAPGEDASPEELNRCYASLRHCLNLVTRQRY (SEQ ID No. 21)	19, 26	L4	4749.50	4749.80
88	HIKPEAPGEDASPEE	19, 26	L5	5021.80	5022.24

缀合物	序列	缀合位置	钉合体	计算质量	实测质量
	LNRCYASLRHCLNLVTRQRY (SEQ ID No. 21)				
89	IKPEAPGEDASPEELNRYCASLRHYCNLVTRQRY (SEQ ID No. 22)	19, 26	L1	4147.67	4147.96
90	IKPEAPGEDASPEELNRYCASLRHYCNLVTRQRY (SEQ ID No. 22)	19, 26	L3	4691.41	4691.90
91	IKPEAPGEDASPEELNRYCASLRHYCNLVTRQRY (SEQ ID No. 22)	19, 26	L4	4662.37	4662.70
92	IKPEAPGEDASPEELNRYCASLRHYCNLVTRQRY (SEQ ID No. 22)	19, 26	L5	4934.67	4935.10
93	IKPEAPGEDASPEELNRYYCSLRHYLCLVTRQRY (SEQ ID No. 23)	20, 27	L1	4238.82	4238.82
94	HIKPEAPGEDASPEELNRYYASCRHYLNLCTRQRY (SEQ ID No. 24)	23, 30	L1	4348.85	4349.20

缀合物	序列	缀合位置	钉合体	计算质量	实测质量
95	IKPEAPGCDASPEELNRYCASLRHYLNLVTRQRY (SEQ ID No. 25)	8, 19	L1D	4173.79	4174.09
96	IKPEAPGEDACPEELNRYYASCRHYLNLVTRQRY (SEQ ID No. 26)	11, 22	L1D	4265.85	4266.00
97	IKPEAPCEDASPEELNRYYASCRHYLNLVTRQRY (SEQ ID No. 27)	7, 22	L1E	4351.98	4351.26
98	IKPEAPGEDASPCELNRYYASLRHYLNCVTRQRY (SEQ ID No. 28)	13, 28	L1E	4279.92	4280.06
99	IKPEAPGEDASCEELNRYYASLRHYLNCVTRQRY (SEQ ID No. 29)	12, 28	L1E		
100	IKPEAPGEDASPEELNCYYASLRHYLNCVTRQRY (SEQ ID No. 30)	17, 28	L1D	4196.74	4196.98
101	IKPEAPGCDASPEECNRYYASLRHYLNWVTRQ[N-MeR]Y	8, 15	L1	4267.80	4269.10

缀合物	序列	缀合位置	钌合体	计算质量	实测质量
	(SEQ ID No. 33)				
102	IKPEAPGCDASPEEC NRYYASLRHYLNW VTRQ[N-MeR]Y (SEQ ID No. 33)	8, 15	L3	4811.55	4812.94
103	IKPEAPGCDASPEEC NRYYASLRHYLNW VTRQ[N-MeR]Y (SEQ ID No. 33)	8, 15	L4	4782.51	4783.94
104	IKPEAPGCDASPEEC NRYYASLRHYLNW VTRQ[N-MeR]Y (SEQ ID No. 33)	8, 15	L5	5054.81	5056.30
105	IKPEAPGEDASPEEL NRYYACLRHYLNC VTRQ[N-MeR]Y (SEQ ID No. 34)	21, 28	L1	4235.08	4235.10
106	PKPEAPGCDASPEE CNRYYADLRHYLN WLTRQ[N-MeR]Y (SEQ ID No. 35)	8, 15	L5		
107	IKPEAPGCDASLEEC NRYYASLRHYLNL VTRQRY (SEQ ID No. 36)	8, 15	L1	4197.77	4198.11
108	IKPEAPGCDASLEEC NRYYASLRHYLNL	8, 15	L1B	4169.72	4169.97

缀合物	序列	缀合位置	钉合体	计算质量	实测质量
	VTRQRY (SEQ ID No. 36)				
109	IKPEAPGCDASLEECNRYYASLRHYLNLVTRQRY (SEQ ID No. 36)	8, 15	L1C	4183.74	4183.98
110	IKPEAPGCDASVEECNRYYASLRHYLNLVTRQRY (SEQ ID No. 37)	8, 15	L1	4183.74	4184.01
111	IKPEAPGCDASVEECNRYYASLRHYLNLVTRQRY (SEQ ID No. 37)	8, 15	L1B	4155.69	4155.97
112	IKPEAPGCDASVEECNRYYASLRHYLNLVTRQRY (SEQ ID No. 37)	8, 15	L1C	4169.72	4169.98
113	IKPECPGEDASPEELQRYYASLRHYLNWVTRQ[β-hArg]Y (SEQ ID No. 38)	5	FA2		
114	HIKPECPGEDASPEELQRYYASLRHYLNWVTRQ[β-hArg]Y (SEQ ID No. 39)	6	FA2	5117.64	5117.62
115	异戊酰基-	4	FA2		

缀合物	序列	缀合位置	钉合体	计算质量	实测质量
	RPECPGEDASPEELQRYYASLRHYLNWVTRQ[β-hArg]Y (SEQ ID No. 40)				
116	Ac-IC[Pqa]RHYLNWVTRQ[N-MeR]Y (SEQ ID No. 41)	2	FA2		
117	Ac-IK[Ahx]CNRYYASCRHYLNWVTRQ[N-MeR]Y (SEQ ID No. 42)	4, 11	L1		
118	Ac-IK[Pqa]CNRYYASCRHYLNWVTRQ[N-MeR]Y (SEQ ID No. 43)	4, 11	L1		
119	YESK[Ahx]CARYYSACRHYINLITRQRY (SEQ ID No. 44)	6, 13	L1		
120	YESK[Ahx]CEDLARYCSALRHYINLITRQRY (SEQ ID No. 45)	6, 13	L1		

[0434] 在一些实施方案中，本文所述的GLP-1R/GCGR双重激动剂肽缀合物如表8所示。

表8:GLP-1R/GCGR双重激动剂肽缀合物

缀合物	序列	缀合位置	钉合体	计算质量	实测质量
121	H[D-Ser]QGTFTSDYSKYLDEKAAKEFIKWLLNGGPSSGAPPPS (SEQ ID No. 48)	17, 24	K5	1281.66	1281.91
122	H[D-Ser]QGTFTSDYSKYLDEKAAKEFIKWLLNGGPSSGAPPPS (SEQ ID No. 48)	17, 24	K4	1220.63	1220.87
123	H[D-Ser]QGTFTSDYSKYLDEKAAKEFIKWLLRA (SEQ ID No. 49)	17, 24	K4	1026.05	1026.05
124	H[D-Ser]QGTFTSDYSKYLDEKAAKEFIKWLLNGGPSSGAPPPS (SEQ ID No. 48)	17, 24	K0	1095.79	1095.79
125	H[Aib]QGTFTSDYSKYLDEKAAKEFIKWLLNGRNRNNIA (SEQ ID No. 50)	17, 24	K4	1221.15	1221.40
126	H[Aib]QGTFTSDYSKYLDSKKAKEFVKWLLN[Aib]GPSSGAPPPS (SEQ ID No. 51)	17, 24	K4	1227.40	1227.65
127	H[Aib]QGTFTSDYSKYLDSKKAQEFVKWLLNGPSSGAPPPS (SEQ ID No. 52)	17, 24	K4	1206.13	1206.38
128	H[Aib]QGTFTSDYSKYLDKKAAKEFKQWLLNGPSSGAPPPS (SEQ ID No. 53)	16, 23	K4	1209.39	1209.39

缀合物	序列	缀合位置	钉合体	计算质量	实测质量
129	H[Aib]QGTFTSDYSKYLDKKKAKEFKQWLLN[Aib]GRNRNNIA (SEQ ID No. 54)	16, 23	K4	1260.19	1260.19
130	H[D-Ser]QGT[D-Phe]TSDYSEYLDEKAAKEFIKWLLNGGPSSGAPPPS (SEQ ID No. 55)	17, 24	K4	1220.87	1220.86
131	H[D-Ser]QGT[D-Phe]TSDYSEYLDEKAAREFIKWLLAGGPSSGAPPPS (SEQ ID No. 56)	17, 24	K4	1217.12	1217.11
132	H[D-Ser]QGT[Nle]TSDYSEYLDEKAAKEFIKWLLNGGPSSGAPPPS (SEQ ID No. 57)	17, 24	K4	1212.37	1212.36
133	H[D-Ser]QGTLTSDYSEYLDEKAAKEFIKWLLNGGPSSGAPPPS (SEQ ID No. 58)	17, 24	K4	1212.37	1212.37
134	H[D-Ser]QGTLTSDYSEYLDSKRAREFVKWLEAGGPSSGAPPPS (SEQ ID No. 59)	17, 24	K4	1219.87	1219.86
135	H[D-Ser]QGTFTSDYSKYLDECAAKEFICWLLNGGPSSGAPPPS (SEQ ID No. 60)	17, 24	L4A	1229.61	1229.86
136	H[D-Ser]QGTFTSDYSKYL	17, 24	L4A	1035.03	1035.04

缀合物	序列	缀合位置	钉合体	计算质量	实测质量
	DECAAKEFICWLLRA (SEQ ID No. 61)				
137	H[D-Ser]QGTFTSDYSKYLDECAAKEFICWLLRA (SEQ ID No. 61)	17, 24	L5A	1103.07	1103.05
138	H[D-Ser]QGTFTSDYSKYLDECAAKEFICWLLNGGPSSGAPPPS (SEQ ID No. 60)	17, 24	L5A	1297.64	1297.89
188	H[D-Ser]QGTFTSDYSKYLDECAAKEFICWLMNTKRNRNNIA (SEQ ID No. 80)	17, 24	L1	4524.1	1510.0 ([M+3H]$^{3+}$), 1132.0 ([M+4H]$^{4+}$)
189	H[D-Ser]QGTFTSDYSKYLDECAAKEFICWLMNTKRNRNNIA (SEQ ID No. 80)	17, 24	L2	4952.7	1651.8 ([M+3H]$^{3+}$), 1239.2 ([M+4H]$^{4+}$)
190	H[D-Ser]QGTFTSDYSKYLDECAAKEFICWLMNTKRNRNNIA (SEQ ID No. 80)	17, 24	L16	5038.8	1680.3 ([M+3H]$^{3+}$), 1260.6 ([M+4H]$^{4+}$)
191	H[D-Ser]QGTFTSDYSKYLDECAAHDFVCWLLRA (SEQ ID No. 81)	17, 24	L1	3489.9	1164.4 ([M+3H]$^{3+}$), 873.6 ([M+4H]$^{4+}$)
192	H[D-	17, 24	L2	3918.5	1307.2

缀合物	序列	缀合位置	钉合体	计算质量	实测质量
	Ser]QGTFTSDYSKYLDECAAHDFVCWLLRA (SEQ ID No. 81)				([M+3H]$^{3+}$), 980.6 ([M+4H]$^{4+}$)
193	H[D-Ser]QGTFTSDYSKYLDECAAKEFICWLLRA (SEQ ID No. 61)	17, 24	L1	3509.0	1170.6 ([M+3H]$^{3+}$), 878.2 ([M+4H]$^{4+}$)
194	H[D-Ser]QGTFTSDYSKYLDECAAKEFICWLLRA (SEQ ID No. 61)	17, 24	L2	3937.6	1313.6 ([M+3H]$^{3+}$), 985.4 ([M+4H]$^{4+}$)
195	H[D-Ser]QGTFTSDYSKYLDECAAKEFICWLLRA (SEQ ID No. 61)	17, 24	L16	4065.7	1355.6 ([M+3H]$^{3+}$), 1017.3 ([M+4H]$^{4+}$)
196	H[D-Ser]QGTFTSDYSKYLDECAAKEFICWLLRA (SEQ ID No. 61)	17, 24	L19	4295.0	1432.6 ([M+3H]$^{3+}$), 1074.7 ([M+4H]$^{4+}$)
197	H[D-Ser]QGTFTSDYSKYLDECAAKEFICWLLRA (SEQ ID No. 61)	17, 24	L5	4296.0	1433.0 ([M+3H]$^{3+}$), 1075.1 ([M+4H]$^{4+}$)
198	H[D-	17, 24	L16	4902.6	1635.2

缀合物	序列	缀合位置	钉合体	计算质量	实测质量
	Ser]QGTFTSDYSKYL DECAAKEFICWLLR AGPSSGAPPPS (SEQ ID No. 82)				([M+3H]$^{3+}$), 1226.6 ([M+4H]$^{4+}$)
199	H[D-Ser]QGTFTSDYSKYL DECAAKEFICWLLR AGPSSGAPPPS (SEQ ID No. 82)	17, 24	L19	5129.9	1711.0 ([M+3H]$^{3+}$), 1284.2 ([M+4H]$^{4+}$)
200	H[D-Ser]QGTFTSDYSKYL DECAAKEFICWLLR AGPSSGAPPPS (SEQ ID No. 82)	17, 24	L5	5130.8	1711.3 ([M+3H]$^{3+}$), 1283.8 ([M+4H]$^{4+}$)
201	H[D-Ser]QGTFTSDYSKYL DECAAKEFICWLLN GGPSSGAPPPS (SEQ ID No. 60)	17, 24	L16	4844.5	1615.6 ([M+3H]$^{3+}$), 1212.2 ([M+4H]$^{4+}$)
202	H[D-Ser]QGTFTSDYSKYL DECAAKEFICWLLN GGPSSGAPPPS (SEQ ID No. 60)	17, 24	L19	5073.7	1092.2 ([M+3H]$^{3+}$), 1269.4 ([M+4H]$^{4+}$)
203	H[D-Ser]QGTFTSDYSKYL DECAAKEFICWLLN GGPSSGAPPPS (SEQ ID No. 60)	17, 24	L5	5074.7	1692.6 ([M+3H]$^{3+}$), 1269.8 ([M+4H]$^{4+}$)
	H[D-	17, 24	K8		

缀合物	序列	缀合位置	钉合体	计算质量	实测质量
	Ser]QGTFTSDYSKYLDEKAAKEFIKWLLNGGPSSGAPPPS (SEQ ID No. 48)				
	H[D-Ser]QGTFTSDYSKYLDECAAKEFICWLLNGGPSSGAPPPS (SEQ ID No. 60)	17, 24	C20L5A		
	H[Aib]QGTFTSDYSEYLDSKKAKEFVKWLLN[Aib]GPSSGAPPPS (SEQ ID No. 108)	17, 24	K4		
	H[Aib]QGTFTSDYSEYLDSKKAKEFVKWLLN[Aib]GPSSGAPPPS (SEQ ID No. 108)	17, 24	K5		
	H[Aib]QGTFTSDYSEYLDSKKAKEFVKWLLN[Aib]GPSSGAPPPS (SEQ ID No. 108)	17, 24	K8		
	H[Aib]QGTFTSDYSEYLDSKKAQEFVKWLLNGGPSSGAPPPS (SEQ ID No. 109)	17, 24	K4		
	H[Aib]QGTFTSDYSEYLDSKKAQEFVKWLLNGGPSSGAPPPS (SEQ ID No. 109)	17, 24	K5		
	H[Aib]QGTFTSDYSEYLDSKKAQEFVKWLLNGGPSSGAPPPS (SEQ ID No. 109)	17, 24	K8		
	H[D-Ser]QGTFTSDYSEYL	17, 24	K4		

缀合物	序列	缀合位置	钉合体	计算质量	实测质量
	DEKAAKEFIKWLLNGGPSSGAPPPS (SEQ ID No. 110)				
	H[D-Ser]QGTFTSDYSEYLDEKAAKEFIKWLLNGGPSSGAPPPS (SEQ ID No. 110)	17, 24	K5		
	H[D-Ser]QGTFTSDYSEYLDEKAAKEFIKWLLNGGPSSGAPPPS (SEQ ID No. 110)	17, 24	K8		
	H[D-Ser]QGT[D-Phe]TSDYSEYLDEKAAKEFIKWLLNGGPSSGAPPPS (SEQ ID No. 55)	17, 24	K5		
	H[D-Ser]QGT[D-Phe]TSDYSEYLDEKAAKEFIKWLLNGGPSSGAPPPS (SEQ ID No. 55)	17, 24	K8		
	H[D-Ser]QGT[D-Phe]TSDYSEYLDEKAAREFIKWLLAGGPSSGAPPPS (SEQ ID No. 56)	17, 24	K5		
	H[D-Ser]QGT[D-Phe]TSDYSEYLDEKAAREFIKWLLAGGPSSGAPPPS (SEQ ID No. 56)	17, 24	K8		
	H[D-Ser]QGTFTSDYSKQLDECAAKEFICWLLQ	17, 24	L5A		

缀合物	序列	缀合位置	钉合体	计算质量	实测质量
	GGPSSGAPPPS (SEQ ID No. 111)				
	H[D-Ser]QGTFTSDYSKQLDECAAKEFICWLLQGGPSSGAPPPS (SEQ ID No. 111)	17, 24	C20L5A		

[0435] 在一些实施方案中，本文所述的GLP-1R/GIPR双重激动剂肽缀合物如表9所示。

表9:GLP-1R/GIPR双重肽缀合物

缀合物	序列	缀合位置	钉合体	计算质量	实测质量
139	Y[Aib]EGTFTSDYSIYLDKKAA[Aib]EFVKWLLAGGPSSGAPPPS (SEQ ID No. 62)	17, 24	K5	1258.9	1259.16
140	Y[Aib]EGTFTSDYSIYLDKKAA[Aib]EFVKWLLAGGPSSGAPPPS (SEQ ID No. 62)	17, 24	K4	1197.88	1197.88
141	Y[Aib]EGTFTSDYSIYKDKQAA[Aib]KFVNWLLAGGPSSGAPPPS (SEQ ID No. 63)	14, 21	K5	1258.9	1259.15
142	Y[Aib]EGTFTSDYSIYKDKQAA[Aib]KFVNWLLAGGPSSGAPPPS (SEQ ID No. 63)	14, 21	K4	1197.87	1197.87

缀合物	序列	缀合位置	钉合体	计算质量	实测质量
143	Y[Aib]EGTFTSDYSIYLDKKAA[Aib]EFVKWLLAGGPSSGAPPPS (SEQ ID No. 62)	17, 24	K9	1251.9	1252.14
144	Y[Aib]EGTFTSDYSIYKDKQAA[Aib]KFVNWLLAGGPSSGAPPPS (SEQ ID No. 63)	14, 21	K9	1251.89	1252.14
145	Y[Aib]EGTFTSDYSIYKDKQAA[Aib]KFKNWLKAGGPSSGAPPPS (SEQ ID No. 64)	23, 27	K4	1208.88	1209.38
146	Y[Aib]EGTFTSDYSIYLDKKAQ[Aib]AFVKWLIAQGPSSGAPPPS (SEQ ID No. 65)	17, 24	K4	1215.39	1215.89
147	Y[Aib]EGTFTSDYSIYLDKKAA[Aib]EFVKWLLAGGPSSGAPPPS (SEQ ID No. 62)	17, 24	K6	1244.4	1244.91
148	Y[Aib]EGTFTSDYSIYLDKKAA[Aib]EFVKWLLAGGPSSGAPPPS (SEQ ID No. 62)	17, 24	K8	1265.91	1266.42
149	Y[Aib]EGTFTSDYSIYLDKKAA[Aib]EFVKWLLAGGPSSGAPPPS	17, 24	K20	1237.4	1237.89

缀合物	序列	缀合位置	钉合体	计算质量	实测质量
	(SEQ ID No. 62)				
150	Y[Aib]EGTFTSDYSIYLDKKAA[Aib]EFVKWLLAGGPSSGAPPPS (SEQ ID No. 62)	17, 24	K7	1251.41	1251.91
151	Y[Aib]EGTFTSDYSIYKDKQAA[Aib]KFVNWLLAGGPSSGAPPPS (SEQ ID No. 63)	14, 21	K6	1244.4	1244.89
152	Y[Aib]EGTFTSDYSIYKDKQAA[Aib]KFVNWLLAGGPSSGAPPPS (SEQ ID No. 63)	14, 21	K8	1265.91	1266.41
153	Y[Aib]EGTFTSDYSIYKDKQAA[Aib]KFVNWLLAGGPSSGAPPPS (SEQ ID No. 63)	14, 21	K20	1237.4	1237.89
154	Y[Aib]EGTFTSDYSIYKDKQAA[Aib]KFVNWLLAGGPSSGAPPPS (SEQ ID No. 63)	14, 21	K7	1251.41	1251.91
155	Y[Aib]EGTFTSDYSIYKDKQAA[Aib]KFKNWLKAGGPSSGAPPPS (SEQ ID No. 64)	23, 27	K6	1255.41	1255-91
156	Y[Aib]EGTFTSDYSIYKDKQAA[Aib]KFKN	23, 27	K8	1276.92	1277.42

缀合物	序列	缀合位置	钉合体	计算质量	实测质量
	WLKAGGPSSGAPPPS (SEQ ID No. 64)				
157	Y[Aib]EGTFTSDYSIY KDKQAA[Aib]KFKN WLKAGGPSSGAPPPS (SEQ ID No. 64)	23, 27	K20	1248.40	1248.89
158	Y[Aib]EGTFTSDYSIY KDKQAA[Aib]KFKN WLKAGGPSSGAPPPS (SEQ ID No. 64)	23, 27	K5	1269.91	1270.41
159	Y[Aib]EGTFTSDYSIY KDKQAA[Aib]KFKN WLKAGGPSSGAPPPS (SEQ ID No. 64)	23, 27	K9	1262.90	1263.40
160	Y[Aib]EGTFTSDYSIY LDKKAQ[Aib]AFVK WLIAQGPSSGAPPPS (SEQ ID No. 65)	17, 24	K6	1261.92	1262.42
161	Y[Aib]EGTFTSDYSIY LDKKAQ[Aib]AFVK WLIAQGPSSGAPPPS (SEQ ID No. 65)	17, 24	K8	1283.43	1283.93
162	Y[Aib]EGTFTSDYSIY LDKKAQ[Aib]AFVK WLIAQGPSSGAPPPS (SEQ ID No. 65)	17, 24	K20	1254.91	1255.41
163	Y[Aib]EGTFTSDYSIY	17, 24	K5	1276.42	1276.

缀合物	序列	缀合位置	钉合体	计算质量	实测质量
	LDKKAQ[Aib]AFVK WLIAQGPSSGAPPPS (SEQ ID No. 65)				66
164	Y[Aib]EGTFTSDYSIY LDKKAQ[Aib]AFVK WLIAQGPSSGAPPPS (SEQ ID No. 65)	17, 24	K9	1269.41	1269.91
165	Y[Aib]EGTFHSDYDI YKDKQAA[Aib]KFV QWLLAGGPSSGAPP PS (SEQ ID No. 66)	14, 21	K4	1622.83	1623.22
166	Y[Aib]EGTFHSDYDI YKDKQAA[Aib]KFV QWLLAGGPSSGAPP PS (SEQ ID No. 66)	14, 21	K5	1704.19	1704.6
167	Y[Aib]EGTFHSDYDI YKDKQAA[Nle]KFV AWLLAGGPSSGAPP PS (SEQ ID No. 67)	14, 21	K4	1613.16	1613.56
168	Y[Aib]EGTFHSDYDI YKDKQAA[Nle]KFV AWLLAGGPSSGAPP PS (SEQ ID No. 67)	14, 21	K5	1694.53	1694.94
169	Y[Aib]EGTFT[D-Ser]DY[D-Ser]IYKDKQAA[Nle] KFVAWLLAGGPSSG	14, 21	K4	1591.83	1592.23

缀合物	序列	缀合位置	钉合体	计算质量	实测质量
	APPPS (SEQ ID No. 68)				
170	Y[Aib]EGTFT[D-Ser]DY[D-Ser]IYKDKQAA[Nle]KFVAWLLAGGPSSGAPPPS (SEQ ID No. 68)	14, 21	K5	1673.20	1673.60
171	Y[Aib]EGTFTSDYSIYCDKQAA[Aib]CFVNWLLAGGPSSGAPPPS (SEQ ID No. 69)	14, 21	L5A	1274.88	1275.13
172	Y[Aib]EGTFTSDYSIYCDKQAA[Aib]CFVNWLLAGGPSSGAPPPS (SEQ ID No. 69)	14, 21	L4A	1206.84	
173	YGEGTFTSDYSIYCDKQAAQCFVNWLLAGGPSSGAPPPS (SEQ ID No. 70)	14, 21	L4A	1210.59	
174	YGEGTFTSDYSIYCDKQAAQCFVNWLLAGGPSSGAPPPS (SEQ ID No. 70)	14, 21	L5A	1278.62	
175	Y[Aib]EGTFTSDYSIYCDKQAAQCFVNWLLAGGPSSGAPPPS	14, 21	L4A	1217.59	

缀合物	序列	缀合位置	钉合体	计算质量	实测质量
	(SEQ ID No. 71)				
176	Y[Aib]EGTFTSDYSIY CDKQAAQCFVNWL LAGGPSSGAPPPS (SEQ ID No. 71)	14, 21	L5A	1285.63	
	Y[Aib]EGTFTSDYSIY CDKQAA[Aib]CFVN WLLAGGPSSGAPPPS (SEQ ID No. 69)	14, 21	C20L5 A		
	Y[Aib]EGTFTSDYSIY LDKCAA[Aib]EFVC WLLAGGPSSGAPPPS (SEQ ID No. 114)	17, 24	L5A		
	Y[Aib]EGTFTSDYSIY LDKCAA[Aib]EFVC WLLAGGPSSGAPPPS (SEQ ID No. 114)	17, 24	C20L5 A		
	Y[Aib]EGTFTSDYSIY LDKCAQ[Aib]AFVC WLIAQGPSSGAPPPS (SEQ ID No. 115)	17, 24	L5A		
	Y[Aib]EGTFTSDYSIY LDKCAQ[Aib]AFVC WLIAQGPSSGAPPPS (SEQ ID No. 115)	17, 24	C20L5 A		
	Y[Aib]EGTFTSDYSIY CDKQAA[Aib]CFVN	14, 21	L5A		

缀合物	序列	缀合位置	钉合体	计算质量	实测质量
	WLIAGGPSSGAPPPS (SEQ ID No. 116)				
	Y[Aib]EGTFTSDYSIY CDKQAA[Aib]CFVN WLIAGGPSSGAPPPS (SEQ ID No. 116)	14, 21	C20L5A		
	Y[Aib]EGTFISDVSIY CDKQAA[Aib]CFVN WLIAGGPSSGAPPPS (SEQ ID No. 117)	14, 21	L5A		
	Y[Aib]EGTFISDVSIY CDKQAA[Aib]CFVN WLIAGGPSSGAPPPS (SEQ ID No. 117)	14, 21	C20L5A		
	Y[Aib]EGTFISDVSIY LDKCAA[Aib]EFVC WLIAGGPSSGAPPPS (SEQ ID No. 118)	17, 24	L5A		
	Y[Aib]EGTFISDVSIY LDKCAA[Aib]EFVC WLIAGGPSSGAPPPS (SEQ ID No. 118)	17, 24	C20L5A		
	Y[Aib]EGTFISDLSIY CDKQAA[Aib]CFVQ WLIAGGPSSGAPPPS (SEQ ID No. 119)	14, 21	L5A		
	Y[Aib]EGTFISDLSIY	14, 21	C20L5		

缀合物	序列	缀合位置	钉合体	计算质量	实测质量
	CDKQAA[Aib]CFVQ WLIAGGPSSGAPPPS (SEQ ID No. 119)		A		
	Y[Aib]EGTFISDLSIY LDKCAA[Aib]EFVC WLIAGGPASGAPPPS (SEQ ID No. 120)	17, 24	L5A		
	Y[Aib]EGTFISDLSIY LDKCAA[Aib]EFVC WLIAGGPASGAPPPS (SEQ ID No. 120)	17, 24	C20L5 A		

[0436] 在一些实施方案中，本文所述的GLP-1R肽缀合物如表10所示。

表10:GLP-1R肽缀合物

缀合物	序列	缀合位置	钉合体	计算质量	实测质量
177	HGEGTFTSDLSKQMEEKA VRLFIKWLKNGGPSSGAP PPS (SEQ ID No. 72)	17, 24	K5	1274.42	1274.41
178	HGEGTFTSDLSKQMEEKA VRLFIKWLKNGGPSSGAP PPS (SEQ ID No. 72)	17, 24	A1	1079.04	1079.05
179	HGEGTFTSDLSKQLEEKA VRLFIKWLKNGGPSSGAP PPS (SEQ ID No. 73)	17, 24	K5	1269.93	1269.93
180	HGEGTFTSDLSKQ[Nle]EE KAVRLFIKWLKNGGPSSG	17, 24	K5	1269.93	1269.93

缀合物	序列	缀合位置	钉合体	计算质量	实测质量
	APPPS (SEQ ID No. 74)				
181	H[Aib]EGTFTSDVSSYLEG KAAKEFIKWLVKGRG (SEQ ID No. 75)	17, 24	K5	1085.08	1085. 07
182	H[Aib]EGTFTSDVSSYLEG KAAKEFIKWLVKGRG (SEQ ID No. 75)	17, 24	A1	889.70	889.7 0
183	HGEGTFTSDLSKQLEECA VRLFICWLKNGGPSSGAP PPS (SEQ ID No. 76)	17, 24	L5A	1285.92	1285. 92
184	HGEGTFTSDLSKQMEECA VRLFICWLKNGGPSSGAP PPS (SEQ ID No. 77)	17, 24	L5A	1290.65	1290. 40
185	HGEGTFTSDVSSYLEGCA AKEFICWLVKGRG (SEQ ID No. 78)	17, 24	L5A	1094.06	1094. 05
186	H[Aib]EGTFTSDVSSYLEG CAAKEFICWLVKGRG (SEQ ID No. 79)	17, 24	L5A	1101.07	1101. 06
187	HGEGTFTSDLSKQMEECA VRLFICWLKNGGPSSGAP PPS (SEQ ID No. 77)	17, 24	L5	1018.99	1018. 70

[0437] 在一些实施方案中，本文所述的肽缀合物如表11和12所示。

表11-钉合的PrRP20肽序列[a]

缀合物	肽序列	钌合体/HEM	计算质量	实测质量
204	TCDINPAWCTGRGIRPVGRF-NH2 (SEQ ID NO.: 103)	L1	2386.79	1194.1, $[M+2H]^{2+}$
205	TPCINPAWYCGRGIRPVGRF-NH2 (SEQ ID NO.: 104)	L1	2429.88	1216.1, $[M+2H]^{2+}$
206	TPDCNPAWYTCRGIRPVGRF-NH2 (SEQ ID NO.: 105)	L1	2475.86	1239.1, $[M+2H]^{2+}$
207	TPDICPAWYTGCGIRPVGRF-NH2 (SEQ ID NO.: 83)	L1	2376.79	1189.1, $[M+2H]^{2+}$
208	TPDINCAWYTGRCIRPVGRF-NH2 (SEQ ID NO.: 84)	L1	2491.90	831.7, $[M+3H]^{3+}$
209	TPDINPCWYTGRGCRPVGRF-NH2 (SEQ ID NO.: 85)	L1	2461.83	1232.1, $[M+2H]^{2+}$
210	TPDINPACYTGRGICPVGRF-NH2 (SEQ ID NO.: 86)	L1	2304.68	1153.1, $[M+2H]^{2+}$
211	TPDINPAWCTGRGIRCVGRF-NH2 (SEQ ID NO.: 87)	L1	2385.78	1194.1, $[M+2H]^{2+}$
212	TPDINPAWYCGRGIRPCGRF-NH2	L1	2446.84	1224.1, [M+2H]

缀合物	肽序列	钌合体/HEM	计算质量	实测质量
	(SEQ ID NO.: 88)			$^{2+}$
213	TCDINPAWCTGRGIRPVGRF-NH2 (SEQ ID NO.: 103)	L3	2930.53	1465.8, [M+2H] $^{2+}$
214	TCDINPAWCTGRGIRPVGRF-NH2 (SEQ ID NO.: 103)	L4	2901.49	967.9, [M+3H] $^{3+}$
215	TCDINPAWCTGRGIRPVGRF-NH2 (SEQ ID NO.: 103)	L5	3173.79	1058.6, [M+3H] $^{3+}$
216	TPDCNPAWYTCRGIRPVGRF-NH2 (SEQ ID NO.: 105)	L3	3019.61	1007.5, [M+3H] $^{3+}$
217	TPDCNPAWYTCRGIRPVGRF-NH2 (SEQ ID NO.: 105)	L4	2990.56	997.9, [M+3H] $^{3+}$
218	TPDCNPAWYTCRGIRPVGRF-NH2 (SEQ ID NO.: 105)	L5	3262.86	1088.9, [M+3H] $^{3+}$
219	TPDICPAWYTGCGIRPVGRF-NH2 (SEQ ID NO.: 83)	L3	2920.53	1460.8, [M+2H] $^{2+}$
220	TPDICPAWYTGCGIRPVGRF-NH2 (SEQ ID NO.: 83)	L4	2891.49	964.5, [M+3H] $^{3+}$
221	TPDICPAWYTGCGIRPVGR	L5	3163.7	1055.6,

缀合物	肽序列	钌合体/HEM	计算质量	实测质量
	F-NH2 (SEQ ID NO.: 83)		9	[M+3H]$^{3+}$
222	TPDINPCWYTGRGCRPVGRF-NH2 (SEQ ID NO.: 85)	L3	3005.58	1002.8, [M+3H]$^{3+}$
223	TPDINPCWYTGRGCRPVGRF-NH2 (SEQ ID NO.: 85)	L4	2976.54	993.2, [M+3H]$^{3+}$
224	TPDINPCWYTGRGCRPVGRF-NH2 (SEQ ID NO.: 85)	L5	3248.84	1084.2, [M+3H]$^{3+}$

[a]所有肽均通过HPLC(LC-MS)证实纯度>95%。

表12-钌合的PrRP31肽序列[a]

缀合物	肽序列	钌合体/HEM	计算质量	实测质量
225	CRAHQHSCETRTPDINPAWYTGRGIRPVGRF-NH2 (SEQ ID NO.: 89)	L1	3750.25	626.1, [M+6H]$^{6+}$
226	SRAHQCSMETRTCDINPAWYTGRGIRPVGRF-NH2 (SEQ ID NO.: 90)	L1	3734.26	747.8, [M+5H]$^{5+}$
227	SRAHQHSMCTRTPDICPAWYTGRGIRPVGRF-NH2	L1	3725.30	621.8, [M+6H]$^{6+}$

缀合物	肽序列	钌合体/HEM	计算质量	实测质量
	(SEQ ID NO.: 91)			
228	SRAHQHSMETRTCDINPAWCTGRGIRPVGRF-NH2 (SEQ ID NO.: 92)	L1	3708.23	619.0, $[M+6H]^{6+}$
229	SRAHQHSMETRTPDCNPAWYTCRGIRPVGRF-NH2 (SEQ ID NO.: 93)	L1	3797.30	760.6, $[M+5H]^{5+}$
230	SRAHQHSMETRTPDICPAWYTGCGIRPVGRF-NH2 (SEQ ID NO.: 94)	L1	3698.23	740.6, $[M+5H]^{5+}$
231	SRAHQHSMETRTPDINPCWYTGRGCRPVGRF-NH2 (SEQ ID NO.: 95)	L1	3783.27	757.8, $[M+5H]^{5+}$
232	SRAHQHSMETRTPDINPAWCTGRGIRCVGRF-NH2 (SEQ ID NO.: 96)	L1	3707.22	742.6, $[M+5H]^{5+}$
233	CRAHQHSCETRTPDINPAWYTGRGIRPVGRF-NH2 (SEQ ID NO.: 89)	L3	4294.00	4294.2, $[M+H]^{+}$
234	CRAHQHSCETRTPDINPAWYTGRGIRPVGRF-	L4	4264.95	4265.3, $[M+H]^{+}$

缀合物	肽序列	钌合体/HEM	计算质量	实测质量
	NH2 (SEQ ID NO.: 89)			
235	CRAHQHSCETRTPDINP AWYTGRGIRPVGRF- NH2 (SEQ ID NO.: 89)	L5	4537.26	4537.5, $[M+H]^+$
236	SRAHQCSMETRTCDINP AWYTGRGIRPVGRF- NH2 (SEQ ID NO.: 90)	L3	4278.01	4278.3, $[M+H]^+$
237	SRAHQCSMETRTCDINP AWYTGRGIRPVGRF- NH2 (SEQ ID NO.: 90)	L4	4248.97	4249.3, $[M+H]^+$
238	SRAHQCSMETRTCDINP AWYTGRGIRPVGRF- NH2 (SEQ ID NO.: 90)	L5	4521.27	4521.5, $[M+H]^+$
239	SRAHQHSMETRTCDINP AWCTGRGIRPVGRF- NH2 (SEQ ID NO.: 92)	L3	4251.97	4252.2, $[M+H]^+$
240	SRAHQHSMETRTCDINP AWCTGRGIRPVGRF- NH2 (SEQ ID NO.: 92)	L4	4222.93	4223.1, $[M+H]^+$

缀合物	肽序列	钌合体/HEM	计算质量	实测质量
241	SRAHQHSMETRTCDINPAWCTGRGIRPVGRF-NH2 (SEQ ID NO.: 92)	L5	4495.23	4495.5, $[M+H]^+$
242	SRAHQHSMETRTPDCNPAWYTCRGIRPVGRF-NH2 (SEQ ID NO.: 93)	L3	4341.05	4342.4, $[M+H]^+$
243	SRAHQHSMETRTPDCNPAWYTCRGIRPVGRF-NH2 (SEQ ID NO.: 93)	L4	4312.01	4313.3, $[M+H]^+$
244	SRAHQHSMETRTPDCNPAWYTCRGIRPVGRF-NH2 (SEQ ID NO.: 93)	L5	4584.31	4585.5, $[M+H]^+$
245	SRAHQHSMETRTPDICPAWYTGCGIRPVGRF-NH2 (SEQ ID NO.: 94)	L3	4241.97	4242.0, $[M+H]^+$
246	SRAHQHSMETRTPDICPAWYTGCGIRPVGRF-NH2 (SEQ ID NO.: 94)	L4	4212.93	4213.1, $[M+H]^+$
247	SRAHQHSMETRTPDICPAWYTGCGIRPVGRF-NH2	L5	4485.23	4485.5, $[M+H]^+$

缀合物	肽序列	钌合体/HEM	计算质量	实测质量
	(SEQ ID NO.: 94)			
248	SRAHQHSMETRTPDINPCWYTGRGCRPVGRF-NH2 (SEQ ID NO.: 95)	L3	4327.02	4328.5, $[M+H]^+$
249	SRAHQHSMETRTPDINPCWYTGRGCRPVGRF-NH2 (SEQ ID NO.: 95)	L4	4297.98	4299.4, $[M+H]^+$
250	SRAHQHSMETRTPDINPCWYTGRGCRPVGRF-NH2 (SEQ ID NO.: 95)	L5	4570.28	4571.9, $[M+H]^+$
251	SRAHQCS-Nle-ETRTCDINPAWYTG-hArg-GIRPVGRF-NH2 (SEQ ID NO.: 97)	L1	3730.26	747.0, $[M+5H]^{5+}$
252	SRAHQCS-Nle-ETRTCDINPAWYTG-β-hArg-GIRPVGRF-NH2 (SEQ ID NO.: 98)	L1	3730.26	747.0, $[M+5H]^{5+}$
253	SRAHQCS-Nle-ETRTCDINPAWYTG-NMe-Arg-GIRPVGRF-NH2 (SEQ ID NO.: 99)	L1	3730.26	747.0, $[M+5H]^{5+}$
254	SRAHQCS-Nle-	L1	3730.2	747.0,

缀合物	肽序列	钌合体/HEM	计算质量	实测质量
	ETRTCDINPAWYTGRGIRPVG-NMe-Arg-F-NH2 (SEQ ID NO.: 102)		6	[M+5H]$^{5+}$
255	SRAHQCS-Nle-ETRTCDINPAWYTG-hArg-GIRPVGRF-NH2 (SEQ ID NO.: 97)	L3	4274.00	4274.1, [M+H]$^{+}$
256	SRAHQCS-Nle-ETRTCDINPAWYTG-β-hArg-GIRPVGRF-NH2 (SEQ ID NO.: 98)	L3	4274.00	4274.4, [M+H]$^{+}$
257	SRAHQCS-Nle-ETRTCDINPAWYTG-NMe-Arg-GIRPVGRF-NH2 (SEQ ID NO.: 99)	L3	4274.00	4274.1, [M+H]$^{+}$
258	SRAHQCS-Nle-ETRTCDINPAWYTGRGIRPVG-NMe-Arg-F-NH2 (SEQ ID NO.: 102)	L3	4274.00	4274.3, [M+H]$^{+}$
259	SRAHQCS-Nle-ETRTCDINPAWYTG-hArg-GIRPVGRF-NH2 (SEQ ID NO.: 97)	L4	4244.96	4245.4, [M+H]$^{+}$
260	SRAHQCS-Nle-ETRTCDINPAWYTG-β-hArg-GIRPVGRF-NH2	L4	4244.96	4245.3, [M+H]$^{+}$

缀合物	肽序列	钌合体/HEM	计算质量	实测质量
	(SEQ ID NO.: 98)			
261	SRAHQCS-Nle-ETRTCDINPAWYTG-NMe-Arg-GIRPVGRF-NH2 (SEQ ID NO.: 99)	L4	4244.96	4245.4, $[M+H]^+$
262	SRAHQCS-Nle-ETRTCDINPAWYTGRGIRPVG-NMe-Arg-F-NH2 (SEQ ID NO.: 102)	L4	4244.96	4245.2, $[M+H]^+$
263	SRAHQCS-Nle-ETRTCDINPAWYTG-hArg-GIRPVGRF-NH2 (SEQ ID NO.: 97)	L5	4517.26	753.9, $[M+6H]^{6+}$
264	SRAHQCS-Nle-ETRTCDINPAWYTG-β-hArg-GIRPVGRF-NH2 (SEQ ID NO.: 98)	L5	4517.26	4517.8, $[M+H]^+$
265	SRAHQCS-Nle-ETRTCDINPAWYTG-NMe-Arg-GIRPVGRF-NH2 (SEQ ID NO.: 99)	L5	4517.26	4517.4, $[M+H]^+$
266	SRAHQCS-Nle-ETRTCDINPAWYTGRGIRPVG-NMe-Arg-F-NH2 (SEQ ID NO.: 102)	L5	4517.26	4517.8, $[M+H]^+$

缀合物	肽序列	钌合体/HEM	计算质量	实测质量
267	SRAHQCS-Nle-ETRTCDINPAWYTG-hArg-GIRPVGRF-NH2 (SEQ ID NO.: 97)	L8	4545.31	4545.8, $[M+H]^+$
268	SRAHQCS-Nle-ETRTCDINPAWYTG-hArg-GIRPVGRF-NH2 (SEQ ID NO.: 97)	L9	4489.21	4489.3, $[M+H]^+$
269	SRAHQCS-Nle-ETRTCDINPAWYTG-hArg-GIRPVGRF-NH2 (SEQ ID NO.: 97)	L12	4358.08	4358.4, $[M+H]^+$
270	SRAHQCS-Nle-ETRTCDINPAWYTG-hArg-GIRPVGRF-NH2 (SEQ ID NO.: 97)	L6	4302.06	4302.4, $[M+H]^+$
271	SRAHQCS-Nle-ETRTCDINPAWYTG-hArg-GIRPVGRF-NH2 (SEQ ID NO.: 97)	L7	4330.11	4330.8, $[M+H]^+$

[a]所有肽均通过HPLC(LC-MS)证实纯度>95%。

生物测定方案

GPR10激活的β-抑制蛋白募集测定

[0438] PathHunter CHO-K1 GPR101β-抑制蛋白孤儿GPCR细胞系购自DiscoverX。简言之，将细胞(每孔20μL,5000个细胞)接种在用金属盖覆盖的白色固体384孔板中，并孵育过夜。在第2天，将培养基更换为新鲜培养基(0%FBS组不含FBS)。将细胞用5μL 12倍稀释的PrRP31作为阳性对照处理，并在37℃、5%CO_2下一式三份地用蛋白稀释缓冲液(0.1%BSA)(来自PathHunter®检测试剂盒)中的样品肽(起始浓度为400nM和1:3连续稀释)处理90分钟。使用购自DiscoverX的PathHunter®检测试剂盒进行检测。每孔加入12.5μL工作检测溶液，在室温下避光孵育1h。在光通量(PerkinElmer)上测量发光信号。使用Prism软件获得

EC_{50}值。

用于NPFF2R激活的cAMP测定

[0439] 将稳定过表达人NPFF2R的CHO细胞(20μL,每孔5000个细胞;获自佛罗里达大学药学院Christopher McCurdy实验室)接种在用金属盖覆盖的白色固体384孔板中,并孵育过夜。在第2天,将培养基更换为新鲜培养基(0%FBS组不含FBS)。用5μL PrRP31或类似物以12点剂量-反应(起始浓度为20μM,此后1:3连续稀释)处理细胞,在培养基中用20μM毛喉素作为阳性对照,用0.5mM IBMX(3-异丁基-1-甲基黄嘌呤)处理细胞以抑制cAMP降解。该测定在37℃、5%CO_2下一式三份进行30分钟。使用来自Cisbio的cAMP dynamic 2试剂盒检测cAMP水平。简言之,每孔加入25μL cAMP检测试剂(cAMP-d2:穴状化合物缀合物:裂解缓冲液=1:1:38)并在室温下孵育1h。对于细胞阴性对照孔,加入不含d2的cAMP检测试剂。然后在Ex320nm、Em-1 665nm和Em-2 615nm读板。使用Prism软件用比值或Delta F作图,然后获得EC_{50}。比值=$A_{665nm}/B_{620nm}\times10\hat{}4$。%Delta F=(标准品或样品比值-比值$_{neg}$)/比值$_{neg}\times100$。

血浆肽稳定性

[0440] 将12μL 1mM的肽DMSO储备液加入300μL小鼠血浆(终浓度20μM)中。将样品在37℃下孵育48h。在特定的时间间隔(0、0.25、0.5、1、2、4、8、24和48h),取25μL血浆并加入到150μL冷乙腈/H_2O(9:1,v/v)+0.1%TFA中以沉淀血浆蛋白。将样品在0℃下孵育30分钟并且在17rpm下离心10分钟(4℃)。使用LC-MS(QTOF)分析样品。

体内药代动力学研究

[0441] 体内药代动力学(PK)由无锡药明康德新药开发股份有限公司(WuXi AppTec Co.,Ltd.)按照无锡实验动物使用和管理委员会(IACUC)标准动物程序以及符合《动物福利法》、《实验动物护理和使用指南》的IACUC指南,以及适用的无锡标准操作程序和公认的良好实验室规范进行。使来自SLAC实验室动物有限公司或SIPPR/BK实验室动物有限公司(中国上海)的未经禁食的雄性C57小鼠(7-9周)驯化至少3天,然后以5mL/kg体重的0.2mg/mL的化合物60(18-S4)(1mg/kg剂量)的生理盐水溶液(0.9%NaCl)给药。在以下时间点从眶后或隐静脉收集血液样品(70μL):0.25、0.5、1、3、7、24、48和72h(每组n=3,3组)。在驯化期间将动物分组圈养并在研究期间单独圈养。控制动物室环境(18℃至26℃,相对湿度30%至70%,12h人工光照和12h黑暗)。所有动物允许随意取用合格的啮齿动物饮食(SLAC实验室动物有限公司)和水。将所有血液样品转移至含有2μL的0.5M K_2EDTA抗凝剂的微量离心管中,并置于湿冰上直至离心,在收集的30分钟内以3000g离心15分钟(4℃)。将血浆储存在聚丙烯管中,在干冰上快速冷冻并保持在-70℃直至LC-MS/MS分析。

来自药物动力学研究的血浆样品的LC-MS分析

[0442] 通过无锡药明康德新药开发股份有限公司进行PK生物分析。将8μL血浆样品的等分试样加入到8μL的4%H_3PO_4中,并使用160μL含有100ng/mL格列本脲的甲醇作为内标沉淀血浆蛋白。将混合物充分涡旋并在3220g下离心15分钟(4℃)。将10μL上清液注入与SCIEX Triple Quad™6500+LC-MS/MS体系(ES+)串联的ACQUITY UPLC®HSS T3柱(1.8μm,2.1×50mm)中。在1分钟内使用10-60%B的溶剂梯度进行分析,其中A=0.1%甲酸的水溶液且B=0.1%甲酸的乙腈溶液(流速0.6mL/min,柱温60℃)。化合物60(18-S4)的保留时间为0.96分钟。使用Analyst 1.6.3软件分析LC-MS数据。使用由高、中和低浓度组成的8个非零校准标准品,包括定量下限(LLOQ)为1-3ng/mL的那些标准品,生成校准曲线。研究样品分析与一组

校准标准和使用校准曲线的两组样品同时进行。使用Phoenix WinNonlin 6.3软件通过非隔室方法分析血浆浓度对时间的数据。由于小鼠的体积/采样限制,使用稀疏采样。因此,通过组合来自不同动物的浓度获得单一PK曲线,并将PK参数估计值进行平均。

实施例A:cAMP HTRP测定(PYY)

[0443] 为了测量肽诱导的NPY2R介导的cAMP产生抑制的作用,根据制造商的说明书(cAMP-Gs Dynamic试剂盒,Cisbio)进行cAMP HTRF测定。简言之,在37℃和5%CO_2下,将表达NPY2R(DiscoveRx)的cAMP Hunter CHO细胞以每孔5,000个细胞接种于白色384孔板中的20μL的F12培养基中过夜。第二天,除去培养基并在存在或不存在10%FBS的情况下用20μL的Opti-MEM(Gibco)替换。加入不同浓度的肽(在Opti-MEM中制备为5×溶液)和毛喉素(终浓度为10μM,腺苷酸环化酶的直接激活剂)并在37℃下孵育30分钟。加入检测试剂并在室温下进一步温育60分钟,并在相容的HTRF酶标仪(PHERAstar)上读数。使用Prism软件(GraphPad Software Inc)通过非线性回归分析测定浓度-响应曲线。

表13.cAMP HTRP数据(SEQID NO)

SEQ ID	hNPY2R - cAMP 0% FBS /nM	hNPY2R - cAMP 10% FBS /nM
1	1.2 ± 0.3	1.0 ± 0.1
2	0.29 ± 0.07	0.5 ± 0.1
3	ND	1.5
4	ND	5.6
5	ND	0.32
6	ND	0.32
10	ND	0.47
11	ND	0.25
12	ND	0.55
13	ND	0.5
16	ND	2.9

SEQ ID	hNPY2R - cAMP 0% FBS /nM	hNPY2R - cAMP 10% FBS /nM
17	ND	4.7
18	ND	15
19	ND	750
20	ND	69
21	ND	4.7
22	ND	190
23	ND	>10000
24	ND	630
25	ND	18
26	ND	98
27	ND	23
28	ND	7.6
30	ND	7.6
31	ND	0.18
32	ND	0.33
33	ND	92
34	ND	61
35	140	82
36	ND	8.9
37	ND	6.3

ND＝未测定。

表14.cAMP HTRP数据(肽缀合物)

缀合物	hNPY2R - cAMP 0% FBS /nM	hNPY2R - cAMP 10% FBS /nM
1	2.7	4.8
2	ND	6.1
3	2.9	8.1

缀合物	hNPY2R - cAMP 0% FBS /nM	hNPY2R - cAMP 10% FBS /nM
4	2.3	170
5	22.	250
6	44	310
8	0.95	0.9
10	1.2	5.6
11	3.1	150
12	40	340
13	6.9	160
14	ND	28
15	0.18	0.18
16	0.21	0.18
17	0.58	0.5
18	0.62	5.2
19	0.45	21
20	0.27	ND
21	1.2	15
22	0.65	14
23	5.8	160
24	0.85	20
25	1.2	77
27	ND	1.3
28	ND	32
29	ND	14
30	ND	8.7
31	2.4	47
32	0.51	0.64
34	0.37	0.29

缀合物	hNPY2R - cAMP 0% FBS /nM	hNPY2R - cAMP 10% FBS /nM
35	0.53	0.41
36	0.44	4.9
37	0.91	9.2
39	3.7 ± 0.7	170 ± 20
40	5 ± 2	36 ± 5
41	ND	28
42	ND	15
43	ND	24
44	ND	ND
45	220	1600
51	0.4	0.38
53	0.2	0.21
54	0.56	0.51
57	3.4	130
58	0.12	0.15
59	4.2	84
62	1.0 ± 0.5	9.2 ± 0.4
63	2.3 ± 0.8	40 ± 10
64	1.0 ± 0.4	10 ± 1
65	56 ± 6	210
66	10 ± 1	29 ± 3
68	ND	4.4
69	ND	5.6
70	ND	340
71	ND	1700
72	ND	1.5
73	ND	2.3

缀合物	hNPY2R - cAMP 0% FBS /nM	hNPY2R - cAMP 10% FBS /nM
74	ND	19
75	ND	>10000
76	ND	4.3
77	ND	9.5
78	ND	2700
79	ND	>10000
80	ND	2.6
81	ND	6.5
82	ND	40
83	ND	630
85	ND	5.4
86	ND	2.4
87	ND	490
88	ND	520
89	ND	4
90	ND	4.1
91	ND	200
92	ND	660
93	ND	14
94	ND	160
95	ND	3.1
96	ND	22
97	ND	32
98	ND	15
100	ND	8.4
101	ND	9.7
102	ND	45

缀合物	hNPY2R - cAMP 0% FBS /nM	hNPY2R - cAMP 10% FBS /nM
103	ND	56
104	ND	48
105	ND	0.27
107	ND	3.2
108	ND	1.4
109	ND	0.24
110	ND	2.5
111	ND	1.7
112	ND	0.29
113	ND	90
114	120	450

ND＝未测定。

实施例B:体内研究

静脉内输注

[0444] 将化合物溶解在无菌盐水中,并通过股静脉插管以0.033mg/kg的终浓度静脉内输注1h施用于非禁食雄性Sprague-Dawley大鼠(每组n＝3)。制剂以1.67mL/kg/h的速率施用。在开始输注0.25、0.5、0.75、1、1.17、1.33、1.5、2、4、6、8、24、30和48h后,通过颈静脉插管将血样(约250μL)收集到含有作为抗凝剂的K_2EDTA和25μL蛋白酶抑制剂混合物的微容器管中,用于药物动力学分析。通过离心制备血浆并储存在-80℃下直至分析。

血浆样品制备

[0445] 将各血浆样品的等分试样置于96孔板中。向各孔中加入吐温-20至终浓度为0.05%。然后将板涡旋混合,然后将3体积的0.1%TFA的乙醇:乙腈(2:1)溶液(含有适当的内标)中加入到每个孔中。将板再次涡旋混合,然后以2844x g离心10分钟。将上清液置于干净的96孔板中并在45℃下在氮气流下蒸发。将残余物在含有0.1%甲酸的20%乙腈(水溶液)中重构。

血浆中肽的LC/MS定量

[0446] 在含有K_2EDTA和蛋白酶抑制剂混合物的对照大鼠血浆中制备所有校准标准品。

使用由CTC HTS PAL自动进样器(Leap,Carrboro,NC)、具有柱温箱的Agilent Infinity1290系统(Paloalto,CA)、Valco转换阀(Houston,TX)和AB Sciex API 5600TripleTOF™或Sciex API 4000QTrap质谱仪(Framingham,MA)组成的系统,通过TurboIonSpray™ UPLC-MS/MS分析样品和标准品。将样品注入到2.1×50mm反相C18分析柱上,通常为Waters ACQUITY UPLC HSS T3,1.8μm(Waters Corporation,Milford,MA)或类似物。使用含0.1%甲酸的水(A)和含0.1%甲酸的乙腈(B)作为流动相,用梯度法实现色谱

分离。初始条件由95％A和5％B组成。有机组分在3-4分钟内增加到95％B，这取决于肽。典型的流速为600μL/min。柱温保持恒定在40℃或45℃。通过监测由多电荷母离子产生的一种或多种产物离子对肽进行定量。

表15大鼠中的半衰期和清除率(SEQ ID NO)

SEQ ID	大鼠 $T_{1/2}$ /h	大 鼠 CL /(mL/kg/min)
2	1.2	6.8
46	0.92	8.6

表16大鼠中的半衰期和清除率(肽缀合物)

缀合物	大鼠 $T_{1/2}$ /h	大 鼠 CL /(mL/kg/min)
5	0.5 ± 0.1	12 ± 3
6	5 ± 5	2 ± 1
11	2.4 ± 0.2	2.4 ± 0.2
12	3.9 ± 0.6	0.4 ± 0.1

缀合物	大鼠 $T_{1/2}$ /h	大 鼠 CL /(mL/kg/min)
19	2 ± 1	2.9 ± 0.3
21	2.0 ± 0.4	0.95 ± 0.07
37	4.5	2.2
39	15	0.23
40	14	0.23
59	8 ± 2	20 ± 3
62	12 ± 1	0.45 ± 0.04
63	5.7	0.78 ± 0.04
64	5 ± 3	1.2 ± 0.3

实施例C:PYY类似物中的钉合体长度和位置的优化

[0447] 通过检测与人G蛋白偶联的神经肽Y受体Y2(NPY2R)结合的同源神经肽Y(NPY)的结构来选择PYY上的钉合位点。在选择共价修饰位点时，避免了在与受体相互作用的表面上出

现的残基(Y20、L24、Y27和I28),以便使关键肽-受体相互作用的破坏最小化。分泌后通过二肽基肽酶-4(DPP-4)在PYY的N-末端快速裂解产生了截短的肽PYY_{3-36}(PYY1:SEQ ID No:1),这是循环中的主要形式。由于PYY1对Y_2受体亚型的特异性高于PYY,我们决定使用这种截短形式进行开发。合成了一组PYY1类似物,其在代表整个序列扫描的所选钉合位置掺入了双半胱氨酸(di-cysteine)突变。选择Cys取代使得能够使用先前描述的液相化学连接溴乙酰基官能化的钉合体。[40]

[0448] 首先进行i、i+7diCys突变体的筛选,以在序列中找到使用10原子U钉合体L1钉合的最佳位置。

[0449] 为了测量肽诱导的NPY2R介导的cAMP产生的抑制,根据制造商的说明书(cAMP-Gs Dynamic剂盒,Cisbio)进行cAMP HTRF(环腺苷酸均相时间分辨荧光)测定。简言之,在37℃和5%CO_2下,将表达NPY2R(DiscoveRx)的cAMP Hunter CHO细胞以每孔5,000个细胞接种于白色384孔板中的20μL的F12培养基中过夜。第二天,除去培养基并在存在或不存在10%FBS的情况下用20μL的Opti-MEM(Gibco)替换。加入不同浓度的肽(制备为在Opti-MEM中的5X溶液)和毛喉素(腺苷酸环化酶的直接激活剂,终浓度10μM)并在37℃孵育30分钟。加入检测试剂并在室温下进一步温育60分钟,并在相容的HTRF酶标仪(PHERAstar)上读数。使用Prism软件(GraphPad Software Inc.)通过非线性回归分析测定浓度-响应曲线。

[0450] 未钉合的PYY1(2-9、10-17、20-27和23-30)可以容许多个diCys取代位置,并且用L1在位置23-30钉合导致亚纳摩尔效力,类似于天然序列的效力(表17)。还预期在位置i、i+11和i、i+15的较长的钉合体可潜在地增强肽的蛋白水解稳定性,然而用长度匹配的L1D和L1E的钉合分别不利地影响它们的活性。此外,将突变引入PYY1序列以增强天然肽(序列'PYY2'或SEQ ID NO.2)的效力。在位置10-17和23-30钉合的PYY2类似物也被发现是有效的NPY2R激动剂。钉合体L1F和L1G(略长于L1)在位置10-17处也是容许的。因此,在位置10-17和23-30钉合的PYY1和PYY2序列被用于脂肪酸缀合以改善血清结合。

表17:钉合的PYY类似物的EC_{50}

序列	半胱氨酸取代		hNPY2R EC_{50} /nM					
			无钉合体	L1 10 原子	其他钉合体			
PYY1	无		0.97					
	i, *i* + 7	2, 9	2.9	4.4				
		10, 17	1.5	4.8	L1B (8 原子)	6.1	L1C (9 原子)	8.1
		17, 24	15	4.3				
		18, 25	750	2.6				

序列	半胱氨酸取代		hNPY2R EC_{50} /nM					
			无钉合体	L110原子	其他钉合体			
		19, 26	69					
		20, 27	4.7	5.4				
		21, 28	190	4				
		22, 29	>10000	14				
		23, 30	5.6	0.9				
		24, 31	630	160				
	i, *i* + 11	10, 21	18					
		13, 24	98		L1D (13原子)	2.2		
		19, 30	7.6		“	8.4		
	i, *i* + 15	9, 24	23		L1E (17原子)	32		
		15, 30	7.6		“	15		
PYY2	无		0.45					
	i, *i* + 7	10, 17	0.32	0.18	L1F(11原子)	0.18	L1G(11原子)	0.5

序列	半胱氨酸取代	hNPY2R EC_{50} /nM					
		无钉合体	L1 10 原子	其他钉合体			
	23, 30	0.32	0.64				

实施例D:脂肪酸缀合增强血清蛋白结合并延长半衰期

[0451] 合成了包含多种PEG接头和脂肪酸类型的钉合体文库,从而促进缀合物的快速筛选。为了测量肽诱导的NPY2R介导的cAMP产生的抑制,根据制造商的说明书(cAMP-Gs Dynamic剂盒,Cisbio)进行cAMP HTRF(环腺苷酸均相时间分辨荧光)测定。简言之,在37℃和5%CO_2下,将表达NPY2R(DiscoveRx)的cAMP Hunter CHO细胞以每孔5,000个细胞接种于白色384孔板中的20μL的F12培养基中过夜。第二天,除去培养基并在存在或不存在10%FBS的情况下用20μL的Opti-MEM(Gibco)替换。加入不同浓度的肽(制备为在Opti-MEM中的5X溶液)和毛喉素(腺苷酸环化酶的直接激活剂,终浓度10μM)并在37℃孵育30分钟。加入检测试剂并在室温下进一步温育60分钟,并在相容的HTRF酶标仪(PHERAstar)上读数。使用Prism软件(GraphPad Software Inc.)通过非线性回归分析测定浓度-响应曲线。

[0452] 该测定结果如表18所示。通常,在存在和不存在血清的情况下测定的钉合体L4和L5的活性之间观察到大的偏移。例如,当比较在含有10%FBS的条件下测试的PYY1缀合物时,与在相同条件下测试的未钉合的PYY1的0.97nM的EC50相比,具有钉合体L4和L5的缀合物在位置10-17的EC_{50}分别为250nM和310nM,在位置23-30的EC_{50}分别为150nM和340nM。类似地,在10%FBS下比较PYY2缀合物时,与在相同条件下测试的未钉合的PYY2的0.45nM的EC_{50}相比,具有钉合体L4和L5的缀合物在位置10-17的EC_{50}分别为21和15,并且在位置23-30的EC_{50}分别为有9.2和170。

表18:脂肪酸钉合的PYY缀合物的NYPYR2激活

缀合物	序列	半胱氨酸取代	钉合体	hNPY2R EC_{50} /nM cAMP		
				0% FBS	10% FBS	比率 10:0%
SEQ ID No: 1	PYY1	无	-	1.2	0.97	0.81
1		10, 17	L1	2.7	4.8	1.8
4			L3	2.3	170	74
5			L4	22	250	11
6			L5	44	310	7.0
8		23, 30	L1	0.95	0.9	0.95
10			L3	1.2	5.6	4.7
11			L4	3.1	150	48
12			L5	40	340	8.5
SEQ ID No: 2	PYY2	无	-	0.29	0.45	1.6
15		10, 17	L1	0.18	0.18	1
18			L3	0.62	5.2	8.4
19			L4	0.45	21	47
21			L5	1.2	15	13
32		23, 30	L1	0.51	0.64	1.3
36			L3	0.44	4.9	11
37			L4	0.91	9.2	10
39			L5	3.7	170	46

实施例E:对称钉合的缀合物对NPY2R有效

[0453] 引入“对称”钉合体L5A以避免区域异构体的形成,其可在用“不对称”L5订合时发生。为了测量肽诱导的NPY2R介导的cAMP产生的抑制,根据制造商的说明书(cAMP-Gs Dynamic剂盒,Cisbio)进行cAMP HTRF(环腺苷酸均相时间分辨荧光)测定。简言之,在37℃和5%CO_2下,将表达NPY2R(DiscoveRx)的cAMP Hunter CHO细胞以每孔5,000个细胞接种于白色384孔板中的20μL的F12培养基中过夜。第二天,除去培养基并在存在或不存在10%FBS的情况下用20μL的Opti-MEM(Gibco)替换。加入不同浓度的肽(制备为在Opti-MEM中的5X溶液)和毛喉素(腺苷酸环化酶的直接激活剂,终浓度10μM)并在37℃孵育30分钟。加入检测试剂并在室温下进一步温育60分钟,并在相容的HTRF酶标仪(PHERAstar)上读数。使用Prism

软件(GraphPad Software Inc.)通过非线性回归分析测定浓度-响应曲线。

[0454] L5A钉合的缀合物的活性示于表19中。对于PYY1中位置23、30处的钉合体,对称钉合的缀合物在10%FBS下的EC_{50}为160nM。对于PYY2,对称钉合的缀合物在10%FBS下对位置10-17和23-30处的钉合体的EC_{50}分别为14nM和36nM。

表19:对称钉合的缀合物的活性

缀合物	序列	半胱氨酸取代	钉合体/脂质	hNPY2R EC_{50} /nM cAMP		
				0% FBS	10% FBS	比率 10:0%
SEQ ID No: 1	PYY1	无	-	1.2	0.97	0.81
13		23, 30	L5A	6.9	160	23
SEQ ID No: 2	PYY2	无	-	0.29	0.45	1.6
22		10, 17	L5A	0.65	14	22
40		23, 30	“	5.3	36	6.8
62		10	FA2	1.0	9.2	9.2
63		17	“	2.3	41	18
64		23	“	1.0	9.7	9.7
65		30	“	56	210	3.8

[0455] 此外,还发现使用FA2的缀合物(没有钉合)的简单脂化生成了具有令人印象深刻的效力的NPY2R激动剂。在单个Cys缀合位点(62)处观察到了经钉合(diCys突变体40)或脂化的脂肪酸缀合的PYY类似物的明显血清偏移,如存在和不存在血清时的剂量-响应曲线所示,这意味着增强的血清结合和更长的体内半衰期。

实施例F:PYY缀合物具有延长的半衰期

[0456] 在体内评估缀合物的药代动力学性质以确定半衰期延长作用。将缀合物溶解在无菌盐水中,并通过股静脉插管以0.033mg/kg的终浓度静脉内输注1h施用于非禁食雄性Sprague-Dawley大鼠(每组n=3)。制剂以1.67mL/kg/h的速率施用。在开始输注0.25、0.5、0.75、1、1.17、1.33、1.5、2、4、6、8、24、30和48h后,通过颈静脉插管将血样(约250μL)收集到含有作为抗凝剂的K_2EDTA和25μL蛋白酶抑制剂混合物的微容器管中,用于药物动力学分析。通过离心制备血浆并储存在-80℃下直至分析。

[0457] 将各血浆样品的等分试样置于96孔板中。向各孔中加入吐温-20至终浓度为0.05%。然后将板涡旋混合,然后将3体积的0.1%TFA的乙醇:乙腈(2:1)溶液(含有适当的内标)中加入到每个孔中。将板再次涡旋混合,然后以2844×g离心10分钟。将上清液置于干净的96孔板中并在45℃下在氮气流下蒸发。将残余物在含有0.1%甲酸的20%乙腈(水溶

液)中重构。

[0458] 在含有K_2EDTA和蛋白酶抑制剂混合物的对照大鼠血浆中制备所有校准标准品。使用由CTC HTS PAL自动进样器(Leap,Carrboro,NC)、具有柱温箱的Agilent Infinity1290系统(Paloalto,CA)、Valco转换阀(Houston,TX)和AB Sciex API 5600TripleTOF™或Sciex API4000QTrap质谱仪(Framingham,MA)组成的系统,通过TurboIonSpray™ UPLC-MS/MS分析样品和标准品。将样品注入到2.1×50mm反相C18分析柱上,通常为Waters ACQUITY UPLC HSS T3,1.8μm(Waters Corporation,Milford,MA)或类似物。使用含0.1%甲酸的水(A)和含0.1%甲酸的乙腈(B)作为流动相,用梯度法实现色谱分离。初始条件由95%A和5%B组成。有机组分在3-4分钟内增加到95%B,这取决于缀合物。典型的流速为600μL/min。柱温保持恒定在40℃或45℃。通过监测由多电荷母离子产生的一种或多种产物离子对缀合物进行定量。

[0459] 如表20所示,在位置10-17用L4和L5钉合的PYY1类似物在大鼠中分别显示出0.45h和5.4h的半衰期。与L4和L5在位置23、30处钉合的PYY1类似物在大鼠中分别显示出2.4h和3.9h的半衰期。在位置10-17具有钉合体的PYY2类似物保留活性,半衰期分别为1.9h和2.0h。如图2和表21所示,在位置23-30钉合的PYY2表现出优异的长效作用,大鼠半衰期长达15h。位置10处的脂质化还导致长达12h的延长的半衰期。这种作用对应于大的体外血清转移(serum shift),并且推测是由缀合物与血清白蛋白的有利相互作用引起的,如对于其他可商购获得的脂质化缀合物治疗剂如索马鲁肽所观察到的。发现全部掺入带有羧酸基团的脂肪酸部分的钉合体L4、L5和L5A以及脂质FA2(无钉合体)提供最有利的药代动力学性质,其中在赖氨酸接头上用“内部”羧酸酯修饰的L5、FA2和L5A较好。尽管血清位移被认为是白蛋白结合增强的指示,但对于在位置10-17钉合的类似物,未观察到预测的体内半衰期延长,这可能是由于在该位置的钉合对于蛋白质降解不是保护性的。

表20:PYY类似物的体内药代动力学数据

缀合物	序列	半胱氨酸取代	钉合体	hNPY2R (cAMP)		大鼠 $T_{½}$ /h
				EC_{50} /nM (0% FBS)	比率 10:0%	
4	PYY1	10, 17	L3	2.3	74	INS
5			L4	22	11	0.45
6			L5	44	7.0	5.4
10		23, 30	L3	1.2	4.7	INS
11			L4	3.1	48	2.4
12			L5	40	8.5	3.9

SEQ ID No: 2	PYY2	无	-	0.29	1.6	1.2
18		10, 17	**L3**	0.62	8.4	INS
19			**L4**	0.45	47	1.9
21			**L5**	1.2	13	2.0
37		23, 30	**L4**	0.91	10	4.5
39			**L5**	3.7	46	15
40			**L5A**	5.3	6.8	14
62		10	**FA2**	1.0	9.2	12
63		17	“	2.3	18	5.7
64		23	“	1.0	9.7	5.3

[0460] 长效类似物40和62的详细药代动力学曲线示于表21中。与SEQ ID No:2相比，两种缀合物的半衰期均增加到10倍或更多，清除率大大降低。这类似于脂肪酸缀合的GLP-1R激动剂索马鲁肽，其在人中每周给药一次。

表21:大鼠药代动力学数据

缀合物	**终剂量**	**输注**	**CL**	**T_{max}**	**C_{max}**	**$T_{½}$**	**AUC_{all}**	**预测的人CL**	**预测的人$T_{½}$**
	/mg kg^{-1}	**/h**	**/mL min^{-1} kg^{-1}**	**/h**	**/ng mL^{-1}**	**/h**	**/h ng mL^{-1}**	**/mL min^{-1} kg^{-1}**	**/天数**
SEQ ID No: 2-	0.1	3	6.76	3.00	86.2	1.21	237	-	-
40	0.033	1	0.234	1.11	246	14.4	1870	0.027	4.5
62	0.033	1	0.446	1.00	111	11.6	1130	0.10	1.9

实施例G:钉合的PYY缀合物具有长的预测的人血浆半衰期。

[0461] 使用Biacore表面等离子体共振(SPR)测定直接测量缀合物血清白蛋白结合亲和

力，其用于计算各缀合物的未结合分数(f_u)。使用稳态分布体积(V_{ss})和清除率(CL)，利用以下等式计算半衰期：

$$T_{\frac{1}{2}} = \frac{\ln 2 \cdot V_{ss}}{CL}$$

对于代谢稳定的缀合物，在肾清除率(CLR)和肾小球滤过率(GFR)方面：

$$CL \cong CL_R = f_u \cdot GFR$$

因此：

$$T_{\frac{1}{2}} = \frac{\ln 2 \cdot V_{ss}}{f_u \cdot GFR}$$

[0462] 表19中显示了基于对白蛋白结合进行校正的量标度的预测的人半衰期以及实验确定的大鼠(RSA)和人血清白蛋白(HSA)参数。发现所有化合物对RSA和HSA都具有相对高的亲和力，与索马鲁肽的亲和力相当。此外，没有观察到大的物种差异。

表22：预测的人半衰期

缀合物	大鼠 $T_{½}$ /h	大鼠 CL /mL min^{-1} kg^{-1}	大鼠 V_{ss} /mL kg^{-1}	K_d /μM		f_u /%		预测的人 $T_{½}$/天数	预测的人 CL /mL min^{-1} kg^{-1}
				HSA	RSA	HSA	RSA		
索马鲁肽	-	-	-	4.4	17	0.69	3.3	-	-
39	15	0.23	270	4.4	2.3	0.69	0.47	1.4	0.095
40	14	0.23	250	0.96	1.8	0.15	0.37	4.5	0.027
62	12 ± 1	0.45 ± 0.04	390	3.3	3.0	0.51	0.60	1.9	0.10
63	5.7	0.78 ± 0.04	230	2.5	3.8	0.40	0.37	1.0	0.11
64	5 ± 3	1.2 ± 0.3	310	3.0	1.8	0.48	0.37	0.4	0.41

[0463] 特别地，缀合物40在大鼠中表现出显著延长的14h半衰期，预侧的人半衰期为约4.5天。进一步的体内研究揭示了在长期效力研究中与我们先前发现的长效GLP-1R激动剂缀合物187组合的高度有利的摄食量控制和显著的体重减轻作用。与批准的肽治疗性索马鲁肽的比较表明，观察到的啮齿动物半衰期可能转化为适用于每周一次给药的人的预测的药代动力学曲线。

实施例H：PYY类似物显示了对NPY2R的高特异性。

[0464] 使用萤光素酶检测法(luciferase assay)来评估PYY类似物对NPY2R的特异性。在cAMP应答元件(CRE)启动子(Qiagen,荷兰)的控制下用编码萤火虫荧光素酶基因的慢病毒感染HEK293细胞,然后使用1μg/mL嘌呤霉素(Life Technologies,Carlsbad)选择1周。扩增存活细胞(称为CRE-HEK293),然后用编码人NPY1R、NPY2R、NPY4R和NPY5R的G418选择性哺乳动物表达质粒转染。使用Lipofectamine2000将质粒转染到CRE-HEK293细胞中并用400μg/mL遗传霉素(Life Technologies,Carlsbad,CA)选择。然后建立过表达CRE-荧光素酶和NPY受体的单集落稳定细胞系,用于每种NPY受体的体外活性测定。将这些细胞以每孔5000个细胞的密度接种在384孔板中并在37℃和5%CO_2下在含有10%FBS的DMEM中培养18h。用缀合物处理细胞24h,并根据制造商的说明书使用One-Glo(Promega,WI)荧光素酶试剂通过发光强度报告受体激活。使用GraphPad Prism 6软件(GraphPad,San Diego,CA)确定每种缀合物的EC_{50}。

[0465] 如表23所示,与其他NPY受体相比,SEQ ID No:1、SEQ ID No:2和缀合物21显示出对NPY2R的高特异性。对于未钉合的PYY1类似物,与针对NPY2R的0.49的EC_{50}相比,针对NPY1R、NPY4R和NPY5R的EC_{50}分别为1900nM、6700nM和410nM。对于未钉合的PYY2类似物,与针对NPY2R的2.2nM相比,针对NPY1R和NPY4R的EC_{50}>10000nM,针对NPY5R的EC_{50}>1200nM。对于缀合物21,在位置10-17具有钉合体L5的PYY2类似物,对于NPY2R的EC_{50}为0.39,对于所有其他测试的NPY受体的EC_{50}>10000nM。

表23:PYY类似物对NPY受体的特异性

缀合物	EC_{50} /nM			
	NPY 1R	NPY 2R	NPY 4R	NPY 5R
SEQ ID No: 1	1900	0.49	6700	410
SEQ ID No: 2	>10000	2.2	>10000	1200
21	>10000	0.39	>10000	>10000

实施例I:PYY类似物减少小鼠的摄食量

[0466] 考虑到PYY施用的公认的抑制食欲作用,在C57BL/6野生型小鼠中使用0.04和0.2mg/kg皮下注射(SC)的缀合物40进行食物摄入研究。还测试了缀合物40与先前公开的长效GLP-1R激动剂缀合物187的组合。

[0467] 维持常规饲料的C57BL/6野生型雄性小鼠(15周龄,来自缅因州巴尔港杰克逊实验室)在反向光周期中驯化并通过皮下注射施用单剂量的缀合物(5mL/kg)(n=6,每组圈养2只/笼)。在0(暗周期开始)、3、6、12和24h监测摄食量,并在给药后0和48h监测体重。

[0468] 如图3A所示,所有组都表现出摄食量的显著减少,在野生型模型中缀合物40单独给药表现出食物消耗量的剂量依赖性减少。虽然以0.01mg/kg给药的缀合物187显示与以0.04mg/kg给药的缀合物40相当的摄食量减少,但是当缀合物187与0.04和0.2mg/kg的缀合

物40组合使用时，观察到最强烈的摄食量减少效果，导致24h累积摄食量分别减少64％和90％。缀合物187和40的单一组合剂量产生在给药后48h观察到的显著的体重损失(-5％)，如图3B所示，表明了持久的作用。

实施例J:PYY类似物的施用导致小鼠体重减轻。

[0469] 在饮食诱导的肥胖(DIO)小鼠模型中进行两周慢性研究，以研究单独或与缀合物187组合每日施用缀合物40对体重和葡萄糖稳态的影响。

[0470] 维持高脂肪饮食(D12492，60％脂肪饮食)12周的饮食诱导肥胖(DIO)模型雄性小鼠(18周龄，来自Taconic Biosciences)通过每日皮下注射施用缀合物，持续长达13天(n＝6，分组饲养，2只/笼，规则的光周期)。实验开始时的平均体重为50g。在第0、2、4、6、8、10、12和13天测量小鼠体重。在第14天进行口服葡萄糖耐受试验(OGTT)之前，将小鼠禁食过夜，然后用缀合物给药。6h后，每千克体重口服施用1g葡萄糖溶液，在葡萄糖攻击2h之前(0min)和之后测量小鼠尾部血糖水平。使用非配对学生t检验比较数据。适当时，使用重复测量或单向方差分析比较数据，然后进行SNK(Student-Newman-Keuls)事后检验。

[0471] 两剂单独的PYY类似物(40)在第1天表现出剂量依赖性的摄食量减少(图4A)，尽管该作用似乎随时间减弱(第5天，图4B)。如图4C所示，与媒介物对照相比，高剂量的单独的缀合物40也显示出体重的显著减轻。如在急性食物摄入研究中所观察到的，单独的缀合物187表现出一些效力，但是在两个组合组中均表现出优异的体重减轻。与高剂量(0.2mg/kg)缀合物40组合的0.01mg/kg缀合物187的给药在13天后导致体重减轻接近25％。此外，组合组中的体重减轻显著超过基于单独加和效应的预测曲线(预期加和性，如图所绘)，表明组合给药时效力协同增强。类似地，如图4B所示，在给药第5天后，与单独的GLP-1R激动剂缀合物187相比，组合治疗对食物消耗量表现出更大的抑制作用。

[0472] 通过口服葡萄糖耐量试验评价第14天的血糖稳态(OGTT，图4D-4F)。用单独的PYY类似物40处理对OGTT结果或空腹血糖没有显著影响。虽然在GLP-1R激动剂(缀合物187)给药组中观察到了显著的改善，正如所预期的，但组合组产生了略优的葡萄糖控制。所证实的相对适度的葡萄糖控制作用并非意料之外的，并且可能是由于在糖尿病前期DIO模型中观察到的稍微轻度的高血糖。用缀合物187给药的那些组和不用缀合物187给药的那些组之间的明显区别表明在该研究中驱动葡萄糖控制作用的是GLP-1R激动剂的作用。然而，如图4F所示，组合组对空腹葡萄糖水平显示出优异的效果，表明组合治疗可对葡萄糖处理发挥一些持续的累加效果。

[0473] 实施例K:过表达GLP-1R或GCGR的CRE-Luc稳定细胞系的产生。在cAMP应答元件(CRE)启动子(Qiagen，荷兰)的控制下用编码萤火虫荧光素酶基因的慢病毒感染HEK293细胞，然后使用1μg/mL嘌呤霉素(Life Technologies，Carlsbad)选择1周。扩增存活细胞(称为CRE-HEK293)，然后用编码人GLP-1R或GCGR的G418选择性哺乳动物表达质粒转染。简言之，使用Lipofectamine 2000将GLP-1R或GCGR质粒转染到CRE-HEK293细胞中，并用400μg/mL遗传霉素(Life Technologies，Carlsbad，CA)选择。然后建立过表达CRE-荧光素酶和GLP1R或GCGR的单集落稳定细胞系(HEK293-GLP-1R-CRE或HEK293-GCGR-CRE)用于体外活性测定。

实施例L:体外受体激活报告分子测定(受体介导的cAMP合成)

[0474] 将HEK293-GLP-1R-CRE或HEK293-GCGR-CRE细胞以每孔5000个细胞的密度接种在

384孔板中，并在37℃和5％CO_2下在含有10％FBS的DMEM中培养18h。以剂量依赖性方式用肽处理细胞24h，并使用One-Glo(Promega，WI)荧光素酶试剂按照制造商的说明通过发光强度报告受体激活。使用GraphPad Prism 6软件(GraphPad，San Diego，CA)确定每种肽的EC_{50}。

表24.cAMP数据(肽缀合物)

	GLP-1R/GCGR - cAMP 0% FBS /nM
121	1.357/2.543
122	0.0037 / 0.070
123	2.371 / 0.4512

	GLP-1R/GCGR - cAMP 0% FBS /nM
124	0.049 / 0.319
125	0.210 / 0.626
126	0.119 / 0.092
127	0.148 / 0.009
128	6.640 / 16.22
129	31.080 / 55.95
135	0.0075/0.0068
136	2.8735/0.5589
137	2.018/0.4443
138	0.9076/1.4214

实施例M:cAMP测定

[0475] 将稳定过表达人GLP-1R或GCGR的CHOK1细胞(每孔20μL，5000个细胞)接种在用金属盖覆盖的白色固体384孔板中，并孵育过夜。在第2天，将培养基更换为不含FBS的新鲜培养基(针对0％FBS组)。在含有0.5mM IBMX的培养基中，在37℃、5％CO_2下，将细胞用5μL肽以12点剂量反应处理30分钟，一式三份。使用来自Cisbio的cAMP dynamic 2试剂盒检测cAMP水平。简言之，每孔加入25μL cAMP检测试剂(cAMP-d2:穴状化合物缀合物:裂解缓冲液＝1:1:38)并在室温下孵育1h。对于细胞阴性对照孔，加入不含d2的cAMP检测试剂。然后在Ex320nm、Em-1665nm和EM-2615nm读板。使用Prism软件用比值或Delta F作图，然后获得EC_{50}。比值＝A_{665nm}/B_{620nm}×10^4。％Delta F＝(标准品或样品比值-比值$_{neg}$)/比值$_{neg}$×100。结果见图5A-5C。

实施例N:PK研究

[0476] 简言之,将来自查尔斯河实验室的雌性CD-1小鼠(每组n=3或4)禁食过夜并通过静脉内(i.v.)或皮下(s.c.)途径施用100μL每种肽的磷酸盐缓冲盐水(pH=8.2)。在3h时间点采血后向小鼠提供食物。将血液收集到肝素管中并以3,000x g离心15分钟。然后将所得血浆储存在-80℃下用于肽浓度测定。通过体外基于细胞的活性测定来确定每个时间点血浆中肽的浓度。简言之,在不同时间点用血浆样品处理HEK293-GLP-1R-CRE细胞(5点剂量反应,从各血浆样品的1:10至1:100稀释度开始),并在37℃和5%CO_2下在含有10%FBS的DMEM中孵育16h,然后测量萤火虫荧光素酶活性。同时,使用相同的肽获得Bottom(输入数据)、Top(输出数据)、EC_{50}和Hill斜率的标准曲线和参数。利用得自标准曲线的参数,使用每个血浆样品的相对荧光素酶单位(RLU)计算血浆中的肽浓度(nmol/L)(RLU=Bottom+(Top-Bottom)/(1+10^((LogEC_{50}-Conc.)*Hill斜率))。获得血浆中的肽浓度,并利用WinNonLin Phoenix软件(Pharsight Corp,St.Louis,MO)相对于时间点作图以获得每种肽的体内半衰期。

[0477] 肽122和135的结果参见图6A-6B和表25a和25b。

表25a:静脉内施用的分析物的药代动力学参数

肽	剂量 (mg/kg)	动物	$t_{1/2}$ (h)	T_{max} (h)	C_{max} (ng/mL)	AUC_{last} (h*ng/mL)	AUC_{∞} (h*ng/mL)	Cl (mL/h/kg)
122	0.3	AN#7	8.95	0.08	11800	101000	101000	2.96
	0.3	AN#8	8.37	1	13300	97600	97800	3.07
	0.3	AN#9	9.5	0.08	24700	139000	140000	2.14
		平均值	8.94	0.389	16600	113000	113000	2.72
		SD	0.565	0.529	7060	23100	23300	0.504
135	0.3	AN#1	10.76	1	10300	78900	79300	3.78
	0.3	AN#2	9.49	1	9920	87100	87400	3.43
		平均值	10.1	1	10100	83000	83400	3.61
		SD	0.896	0	298	5850	5780	0.25

表25b:皮下施用的分析物的药代动力学参数

肽	剂量 (mg/kg)	动物	$t_{1/2}$ (h)	T_{max} (h)	C_{max} (ng/mL)	AUC_{last} (h*ng/mL)	AUC_{∞} (h*ng/mL)	Cl (mL/h/kg)	%F
122	1	AN#10	9.65	7	9870	282000	284000	3.51	
	1	AN#11	8.47	24	8050	276000	278000	3.59	
	1	AN#12	7.09	24	7990	250000	250000	3.99	
		平均值	8.4	18.3	8630	269000	271000	3.7	72%
		SD	1.28	9.81	1070	17300	18200	0.257	
135	1	AN#4	10.61	3	7650	242000	246000	4.06	
	1	AN#5	10.97	3	12700	245000	248000	4.04	
	1	AN#6	11.52	7	13300	260000	264000	3.79	
		平均值	11	4.33	11200	249000	253000	3.96	91%
		SD	0.457	2.31	3100	9770	9760	0.15	

[0478] 图6C描述了血浆中肽142随时间的浓度。药代动力学参数列于表26a和26b中。肽142静脉内施用时的平均半衰期为10.71h,皮下施用时的平均半衰期为11.56h。

表26a:静脉内施用的肽142的药代动力学

动物	$T_{1/2}$	T_{max}	C_{max}	AUClast	AUCINF	Vss_obs	Cl_obs

	(hr)	(hr)	(ng/mL)	(hr*ng/mL)	_obs (hr*ng/mL)	(L/kg)	(mL/min/kg)
1	10.52	0.08	3900	15700	15800	0.21	0.32
2	11.25	0.08	3550	21300	21400	0.12	0.23
3	10.35	0.08	3930	18000	18100	0.19	0.28
平均值	10.71	0.08	3790	18300	18400	0.175	0.276
SD	0.478	0	209	2840	2850	0.05	0.042
CV%	4.5	0	5.5	15.5	15.4	28.3	15.2

表26b:皮下施用的肽142的药代动力学

动物	$T_{1/2}$ (hr)	T_{max} (hr)	C_{max} (ng/mL)	AUClast (hr*ng/mL)	AUCINF_obs (hr*ng/mL)	Vss_obs (L/kg)	Cl_obs (mL/min/kg)
4	11.15	3	3980	54900	55400	0.29	0.3
5	12.54	1	4880	67100	67700	0.27	0.25
6	10.99	3	5270	55600	55900	0.28	0.3
平均值	11.56	2.33	4710	59200	59700	0.28	0.282
SD	0.849	1.16	659	6810	6970	0.012	0.031
CV%	7.3	49.5	14	11.5	11.7	4.3	10.9

[0479] 图6D描述了血浆中肽183随时间的浓度。药代动力学参数列于表26c和26d中。肽142静脉内施用时的平均半衰期为6.335h,皮下施用时的平均半衰期为7.87h。

表26c:静脉内施用的肽183的药代动力学

动物	$T_{1/2}$ (hr)	T_{max} (hr)	C_{max} (ng/mL)	AUClast (hr*ng/mL)	AUCINF_obs (hr*ng/mL)	Vss_obs (L/kg)	Cl_obs (mL/min/kg)
7	5.88	0.08	12000	31400	31400	0.08	0.16
8	6.69	0.08	9720	35600	35600	0.07	0.14
9	6.44	0.08	7970	37400	37500	0.07	0.13
平均值	6.335	0.08	9890	34800	34800	0.077	0.144
SD	0.413	0	2010	3120	3120	0.005	0.013
CV%	6.5	0	20.3	9	9	6.6	9.3

表26d:皮下施用的肽183的药代动力学

动物	$T_{1/2}$ (hr)	T_{max} (hr)	C_{max} (ng/mL)	AUClast (hr*ng/mL)	AUCINF_obs (hr*ng/mL)	Vss_obs (L/kg)	Cl_obs (mL/min/kg)
10	8.23	3	6220	90300	90500	0.13	0.18
11	7.65	7	8100	136000	137000	0.08	0.12
12	8.08	3	7770	139000	139000	0.08	0.12
平均值	7.987	4.33	7360	122000	122000	0.098	0.142
SD	0.301	2.31	1000	27400	27500	0.028	0.037
CV%	3.8	53.3	13.6	22.5	22.5	28.7	25.8

实施例0:体内效力

[0480] 将10-12周龄的C57BL/6J小鼠(n=6只/组)禁食过夜,然后通过皮下途径施用5mL/kg的每种肽的PBS溶液(pH=8.2)。6h后,小鼠口服或腹膜内施用2g葡萄糖溶液/kg体重,并在葡萄糖攻击2h之前(0min)和之后测量其尾部血糖水平。在禁食过夜后的相同小鼠中,在原始剂量后48h和96h也进行了随访OGTT。

[0481] 随后在萎蔫类型小鼠(wilt type mice)中的口服葡萄糖耐受性测试(OGTT)中评估GLP-1R/GCGR双重激动剂135的效力。作为阳性对照,我们使用每周施用一次的单一GLP-1R激动剂索马鲁肽和双重GLP-1R/GCGR激动剂cotautide,这是一种目前由AstraZeneca在II期试验中每日施用一次的肽。

[0482] 与媒介物对照(PBS pH 8.2)相比,化合物在给药后6h、48h和96h的口服葡萄糖耐

量试验(OGTT)中的作用显示在图7A-7C中。图7A-7C显示了化合物随时间对血糖的影响。图7D-7F显示了通过曲线下面积测量的化合物对葡萄糖水平的影响。图7G-7I显示了化合物对空腹血糖的作用。对于所有附图,A:1224,B:135,C:138,D:Cotadutide,E:索马鲁肽。与媒介物相比,所有肽在给药后6h显著降低血糖至相似水平。对于所有肽的空腹血糖观察到类似的结果。然而,在施用肽48h后观察到葡萄糖水平的显著差异。在48h后,Cotadutide没有表现出超过媒介物的任何改善,这与它作为用于人类对象的每日一次注射的适合性一致。另一方面,与索马鲁肽相比,用缀合物135处理的小鼠在处理葡萄糖48h后显示出更显著的改善。此外,缀合物135能够显著降低空腹血糖水平,而其余的肽没有导致效力的改善。在此观察到的缀合物135的增加的体内效力可能是由于更高的双重激动活性和延长的体内半衰期。假定药代动力学和药代动力学之间有直接关系,该实验的结果表明肽缀合物135比索马鲁肽表现出更长的半衰期,并因此具有用适当的制剂每周一次或半月一次开发的潜力。

实施例P:过表达GLP-1R或GCGR的CRE-Luc稳定细胞系的产生。

[0483] 在cAMP应答元件(CRE)启动子(Qiagen,荷兰)的控制下用编码萤火虫荧光素酶基因的慢病毒感染HEK293细胞,然后使用1μg/mL嘌呤霉素(Life Technologies,Carlsbad)选择1周。扩增存活细胞(称为CRE-HEK293),然后用编码人GLP-1R或GCGR的G418选择性哺乳动物表达质粒转染。简言之,使用Lipofectamine 2000将GLP-1R或GCGR质粒转染到CRE-HEK293细胞中,并用400μg/mL遗传霉素(Life Technologies,Carlsbad,CA)选择。然后建立过表达CRE-荧光素酶和GLP1R或GIPR的单集落稳定细胞系(HEK293-GLP-1R-CRE或HEK293-GIPR-CRE)用于体外活性测定。

实施例Q:体外受体激活报告分子测定(受体介导的cAMP合成)HEK293

[0484] 将GLP-1R-CRE或HEK293-GIPR-CRE细胞以每孔5000个细胞的密度接种在384孔板中,并在37℃和5%CO_2下在含有10%FBS的DMEM中培养18h。以剂量依赖性方式用肽处理细胞24h,并使用One-Glo(Promega,WI)荧光素酶试剂按照制造商的说明通过发光强度报告受体激活。使用GraphPad Prism 6软件(GraphPad,San Diego,CA)确定每种肽的EC_{50}。结果如图8A-8B所示。

表27 Creluc数据(肽缀合物)

	GLP-1R/GIPR - Creluc /nM
141	0.01 / 0.02
142	0.02/0.02
165	13.77/5.31
166	83.92/12.55
167	18.77/20.43
168	>1000/303
169	1.32/11.29
170	3.74/15.66

实施例R:cAMP测定

[0485] 将稳定过表达人GLP-1R或GIPR的CHOK1细胞(每孔20μL,5000个细胞)接种在用金属盖覆盖的白色固体384孔板中,并孵育过夜。在第2天,将培养基更换为不含FBS的新鲜培养基(针对0%FBS组)。在含有0.5mM IBMX的培养基中,在37℃、5%CO_2下,将细胞用5μL肽以12点剂量反应处理30分钟,一式三份。使用来自Cisbio的cAMP dynamic 2试剂盒检测cAMP水平。简言之,每孔加入25μL cAMP检测试剂(cAMP-d2:穴状化合物缀合物:裂解缓冲液=1:1:38)并在室温下孵育1h。对于细胞阴性对照孔,加入不含d2的cAMP检测试剂。然后在Ex320nm、Em-1665nm和EM-2615nm读板。使用Prism软件用比值或Delta F作图,然后获得EC_{50}。比值=A_{665nm}/B_{620nm}×10^4。%Delta F=(标准品或样品比值-比值$_{neg}$)/比值$_{neg}$×100。结果见图5A-5C。

表28.cAMP数据(肽缀合物)

	GLP-1R/GIPR - cAMP 0% FBS /nM
139	0.061 / 0.0026
140	0.034 / 0.0028
141	0.022 / 0.0048
142	0.026 / 0.0080
143	0.068 / 0.0020
144	0.012 / 0.0022
145	61.37 / 14.99
146	0.11 / 0.03
147	0.07 / 0.02
148	0.46 / 0.03
149	0.05 / 0.01
150	0.06 / 0.02
151	0.03 / 0.02
152	0.49 / 0.05
153	0.05 / 0.01
154	0.03 / 0.02
155	4.08 / 1.66
156	14.64 / 2.82
157	16.45 / ND

	GLP-1R/GIPR - cAMP 0% FBS /nM
158	98.29 / 30.52
159	1179 / 0.0312
160	0.03 / 7.297
161	0.4 / 0.01
162	0.05 / 0.02
163	0.24 / 0.05
164	0.14 / 68.29
171	0.32/017
272	0.46/0.03
273	0.49/0.05
274	0.40/0.01

实施例S:口服葡萄糖耐量试验(OGTT)

[0486] 将10-12周龄的C57BL/6J小鼠(n＝6只/组)禁食过夜,然后通过皮下途径施用5mL/kg的每种肽的PBS溶液(pH＝8.2)。6h后,小鼠口服或腹膜内施用2g葡萄糖溶液/kg体重,并在葡萄糖攻击2h之前(0min)和之后测量其尾部血糖水平。在禁食过夜后的相同小鼠中,在原始剂量后72h、96h和144h也进行了随访OGTT。

对于所有附图,A:141,4,B:171,C:替西帕肽,D:142,E:索马鲁肽。

如图9A-9D所示,在给药后2h、72h、96h和144h进行口服葡萄糖耐量试验(OGTT)。如图9E所示,在2h,与单独用媒介物处理的小鼠相比,在用化合物141、化合物171、化合物142、索马鲁肽和替西帕肽处理的小鼠中,如通过AUC所测量的,存在血糖水平的显著降低。如图9F所示,在给药后72h进行的OGTT中,与单独用媒介物处理的小鼠相比,在用化合物141、化合物171、化合物142和索马鲁肽处理的小鼠中,如通过AUC所测量的,存在血糖水平的显著降低。如图9G所示,在给药后96h进行的OGTT中,与单独用媒介物处理的小鼠相比,在用化合物141、化合物142和索马鲁肽处理的小鼠中,如通过AUC所测量的,存在血糖水平的显著降低。如图9F所示,在给药后144h进行的OGTT中,与单独用媒介物处理的小鼠相比,在用化合物141、化合物142和索马鲁肽处理的小鼠中,如通过AUC所测量的,存在血糖水平的显著降低。

如图9I所示,与单独用媒介物处理相比,用化合物141、化合物171、化合物142、索马鲁肽和替西帕肽处理导致在处理后2h空腹血糖水平显著降低。如图9J所示,与单独用媒介物处理相比,用化合物141、化合物171和索马鲁肽处理导致在处理后72h空腹血糖水平显著降低。如图9K-9L所示,与单独用媒介物处理相比,用化合物141、化合物142和索马鲁肽处理导致在处理后96h和144h空腹血糖水平显著降低。

实施例T:DIO小鼠研究

[0487] 结果表示为平均值±S.E.,并且使用非配对学生t检验比较数据。适当时,使用重复测量或单向方差分析比较数据,然后进行SNK(Student-Newman-Keuls)事后检验。使用GraphPad Prism 6计算血浆葡萄糖的曲线下面积(AUC)增量分析。如果$p<0.01$,则认为数据组显著不同。

体重、摄食量和内脏脂肪质量测量

将DIO小鼠(C57BL/6,雄性,37周龄)基于其体重随机分组,并且每日或每周两次皮下注射肽或媒介物进行处理(n=6/组)。在整个研究中每日监测体重和摄食量。

[0488] 如图10A-10B所示,与单独用媒介物处理的小鼠相比,用化合物142或替西帕肽处理的小鼠显示总体重和体重百分比随时间降低。此外,如图10C中所示,与单独用媒介物处理的小鼠相比时,用化合物142或替西帕肽处理的小鼠显示累积摄食量减少。如图10D所示,在口服葡萄糖耐量试验(OGTT)中,与单独用媒介物处理的小鼠相比,用化合物142或替西帕肽处理的小鼠的血糖水平随时间降低。此外,与单独用媒介物处理的小鼠相比,在接受用化合物142或替西帕肽处理的小鼠中,如通过曲线下面积(AUC)所测量的,存在总葡萄糖水平的显著降低。与单独用媒介物处理的小鼠相比,用这些化合物处理的小鼠在第8天禁食过夜后也显示出葡萄糖水平的降低。用化合物142每周7次处理的小鼠显示葡萄糖水平降低53%,用化合物142每周2次处理的小鼠显示血糖水平降低42%,用替西帕肽处理的小鼠显示血糖水平降低30%。

动物和统计学分析

[0489] 所有动物护理和实验程序均由加利福尼亚生物医学研究所(Calibr)的机构动物护理和使用委员会(IACUC)批准,并严格遵循美国国立卫生研究院(NIH)人道处理动物指南。结果表示为平均值±S.E.,并且使用非配对学生t检验比较数据。适当时,使用重复测量或单向方差分析比较数据,然后进行SNK(Student-Newman-Keuls)事后检验。使用GraphPad Prism 6计算血浆葡萄糖的曲线下面积(AUC)增量分析。如果$p<0.01$,则认为数据组显著不同。

体重、摄食量和内脏脂肪质量测量

[0490] 将DIO小鼠(C57BL/6,雄性,28周龄)基于其体重随机分组,并且每日皮下注射肽或媒介物进行处理(n=7/组)。在整个研究中每日监测体重和摄食量。实验结束时,处死小鼠,称重内脏脂肪质量。根据制造商的指南(胆固醇测定试剂盒,Abcam,Cambridge,England)将收集的血浆用于胆固醇水平测定,并使用甘油三酯比色测定试剂盒(Cayman chemical,Ann Arbor,Michigan)测定甘油三酯水平。

胆固醇水平测定

[0491] 收集的血浆用于根据制造商指南(胆固醇测定试剂盒,Abcam,Cambridge,England)测定胆固醇水平。简言之,用胆固醇测定缓冲液稀释血浆,然后与相同体积的含有胆固醇测定缓冲液、胆固醇探针、酶混合物和胆固醇酯酶的反应混合物反应。在37℃下孵育1h后,使用Envision多功能酶标仪(PerkinElmer,Waltham,MA)测量560nm处的吸光度。随后,根据标准曲线计算血浆中胆固醇的浓度。

甘油三酯测量

[0492] 使用甘油三酯比色测定试剂盒(Cayman chemical,Ann Arbor,Michigan)将收集

的血浆用于甘油三酯水平测定。将5μL血浆样品或标准品铺板到384孔板中，然后向每个孔中加入75μL稀释的酶缓冲液。将混合物在室温下孵育15分钟，并使用Envision酶标仪(PerkinElmer,Waltham,Ma)在560nm处读取吸光度。使用标准曲线计算血浆中甘油三酯的浓度。

生化和组织学分析

[0493] 采用Alfa Wassermann Vet Axcel ®临床分析仪测定包括总胆固醇、甘油三酯、丙氨酸转氨酶(ALT)、天冬氨酸转氨酶(AST)、碱性磷酸酶(ALP)在内的血清终末分析物(Terminal serum analytes)。在用比色甘油三酯试剂盒(Cayman Chemical)产生的肝匀浆中测量肝甘油三酯。将多聚甲醛固定的肝脏石蜡包埋、切片，并由Histotox实验室(Boulder,CO)用苏木精-曙红和天狼猩红(Picro-Sirius Red)染色。所有组织学评估(脂肪变性、纤维化评分)均由经过认证的对治疗不知情的组织病理学家(HistoTox Labs)根据Kleiner等人概述的分类进行。[3]

结果

[0494] 结果如图11A-11Q所示。对于所有附图，A:122,B:142,C:索马鲁肽,D:cotadutide。媒介物对照是pH 8.2的PBS。如图11A中所示，与单独用媒介物处理的小鼠相比，用化合物122、化合物142或索马鲁肽处理的小鼠在20天内表现出食物消耗量的减少。此外，如图11B-11C所示，与单独用媒介物处理的小鼠相比时，用化合物122、化合物142或索马鲁肽处理的小鼠在21天内表现出总体重和初始体重的变化百分比的降低。用这些化合物处理也影响葡萄糖水平。如图11D-11E所示，用化合物122、化合物142或索马鲁肽处理的小鼠在第20天的进食状态和第21天的禁食状态下显示血浆葡萄糖偏移的显著降低。在禁食状态下，用cotadutide处理的小鼠仅显示出血浆葡萄糖偏移(glucose excursion)的显著降低。如图11F-11G中所示，在第21天进行的口服葡萄糖耐量试验(OGTT)中，在与单独用媒介物处理的小鼠相比时，如通过曲线下面积所测量的，用化合物122、化合物142或索马鲁肽处理的小鼠显示葡萄糖水平随时间显著降低。

[0495] 用这些化合物处理影响肝功能标志物的血浆水平。如图11J-11L所示，与单独用媒介物处理相比，用化合物122或索马鲁肽处理显著降低了ALT、ALP、胆固醇和甘油三酯的水平，而与单独用媒介物处理相比，用化合物142处理显著降低了AST、ALT、ALP、胆固醇和甘油三酯的水平。如图11M、11O和11P所示，与单独用媒介物处理的小鼠相比，用化合物122、化合物142、索马鲁肽或cotadutide处理的小鼠的肝脏与体重的比例、肝脏重量和肝甘油三酯水平显著降低。如图11N所示，与单独用媒介物处理的小鼠相比，用化合物122、化合物142或索马鲁肽处理显著降低了脂肪重量。与单独用媒介物处理的小鼠相比，在用化合物122、化合物142或索马鲁肽处理的小鼠中脂肪变性等级降低。

实施例U:cAMP测定(GLP-1R单激动剂)

[0496] 在cAMP应答元件(CRE)启动子(Qiagen,荷兰)的控制下用编码萤火虫荧光素酶基因的慢病毒感染HEK293细胞，然后使用1μg/mL嘌呤霉素(Life technologies,Carlsbad)选择1周。扩增存活细胞(称为CRE-HEK293)，然后用编码人GLP-1R的G418选择性哺乳动物表达质粒转染。简言之，使用Lipofectamine 2000将GLP-1R粒转染到CRE-HEK293细胞中，并用400μg/mL遗传霉素(Life technologies,Carlsbad,CA)选择。然后建立过表达CRE-荧光素酶和GLP-1R的单集落稳定细胞系(HEK293-GLP-1R-CRE)用于体外活性测定。

[0497] 将HEK293-GLP-1R-CRE细胞以每孔5000个细胞的密度接种在384孔板中并在37℃和5％CO_2下在含有10％FBS的DMEM中培养18h。以剂量依赖性方式用肽处理细胞24h，并使用One-Glo(Promega,WI)荧光素酶试剂按照制造商的说明通过发光强度报告受体激活。使用GraphPad Prism 6软件(GraphPad,San Diego,CA)确定每种肽的EC_{50}。

表29.cAMP数据(肽缀合物)

	GLP-1R - cAMP 0% FBS /nM	GLP-1R - cAMP 10% FBS /nM	GLP-1R - Cre-Luc /nM
177	0.025	6.4	ND
181	0.026	ND	ND
183	0.043	ND	0.03 (0.04 recomb.)
184	0.047	7.8	ND
186	ND	ND	7.3

实施例A:β-抑制蛋白募集测定

[0498] 结果如表30-32所示。

表30 PrRP20和PrRP31衍生物对GPR10受体的效力。

	GPR10 EC_{50} /nM[a]					
SEQ ID NO	**Di-Cys**	**无 钉合体**	**含 S1**	**含 S2**	**含 S3**	**含 S4**
106 (PrRP20)	-	13 ± 1	-	-	-	-
103	2-9	33 ± 3	12 ± 1	33 ± 4	230 ± 30	620 ± 60
104	3-10	16 ± 2	21 ± 2	N.D.	N.D.	N.D.
105	4-11	10 ± 1	7.3 ± 0.6	3.9 ± 0.2	77 ± 9	81 ± 7
83	5-12	44 ± 6	13 ± 1	25 ± 3	610 ± 80	840
84	6-13	18 ± 2	15 ± 2	N.D.	N.D.	N.D.
85	7-14	33 ± 4	10 ± 1	5.2 ± 0.6	>1000	>1000
86	8-15	6800	720 ±	N.D.	N.D.	N.D.

			80			
87	9-16	120 ± 10	160 ± 20	N.D.	N.D.	N.D.
88	10-17	1600	>10000	N.D.	N.D.	N.D.
107 (PrRP31)	-	12 ± 3	-	-	-	-
89	1-8	16 ± 2	24 ± 3	17 ± 2	230 ± 20	330 ± 30
90	6-13	29 ± 5	20 ± 3	13 ± 2	80 ± 10	260 ± 20
91	9-16	41 ± 4	85 ± 10	N.D.	N.D.	N.D.
92	13-20	18 ± 2	40 ± 6	17 ± 2	630 ± 80	1500
93	15-22	17 ± 2	10 ± 1	6.1 ± 0.4	80 ± 10	230 ± 20
94	16-23	70 ± 7	29 ± 3	23 ± 3	360 ± 40	2800
95	18-25	33 ± 4	18 ± 2	7.5 ± 0.9	>1000	>1000
96	20-27	920	130 ± 20	N.D.	N.D.	N.D.

[a]在β-抑制蛋白募集测定中使用过表达GPR10的CHO-K1细胞测定的EC_{50}。在37℃、5%CO_2下，用不同浓度的肽一式三份处理细胞90分钟。测量发光并相对于log激动剂浓度作图。在Prism中拟合斜率以生成EC_{50}，报告为平均值±SEM(n＝3)。

表31 C(6-13)PrRP31的序列和钉合体MEG-FA的优化

	GPR10 EC_{50} /nM[a]				
SEQ ID	**无钉合**	**含S1**	**含S2**	**含S3**	**含S4**

NO	体				
107 (PrRP31)	12 ± 3	-	-	-	-
90	29 ± 5	20 ± 3	13 ± 2	80 ± 10	260 ± 20
97	17 ± 2	10 ± 1	9.1 ± 0.9	26 ± 3	80 ± 10
98	13 ± 2	16 ± 2	5.1 ± 0.7	60 ± 7	81 ± 8
99	44 ± 5	34 ± 4	8.8 ± 0.8	120 ± 20	160 ± 20
100	>200	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
101	>200	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
102	100 ± 10	100 ± 10	10 ± 1	280 ± 30	1100

[a]在β-抑制蛋白募集测定中使用过表达GPR10的CHO-K1细胞测定的EC_{50}。平均值±SEM(n=3)。

表32 Nle8、hArg23、C(6-13)PrRP31的钉合体MEG-FA的优化

				NPFF2R		
	EC_{50} /nM[a]			EC_{50} /nM[b]		
缀合物	10% FBS	0% FBS	10% / 0% FBS 比率	10% FBS	0% FBS	NPFF2R / GPR10[c] 比率
251 (97-L1)	10 ± 1	5.9 ± 0.8	1.7	1200	920	160
255 (97-L3)	9.1 ± 0.9	8.0 ± 0.7	1.1	220 ± 20	150	19
259 (97-L4)	26 ± 3	12 ± 1	2.2	>10 000	470	39
263 (97-L5)	80 ± 10	7.8 ± 0.6	10	>10 000	520	67
270 (97-	42 ± 4	12 ± 1	3.5	310 ±	270	23

L6)				30		
271 (97-L7)	39 ± 5	9 ± 1	4.3	140 ± 20	130	14
267 (97-L8)	830	24 ± 3	35	~ 10 000	560	23
268 (97-L9)	120 ± 10	8.2 ± 0.9	15	>10 000	9000	1100
269 (97-L12)	120 ± 20	10 ± 1	12	~ 8000	1600	160

[a]在存在(10%)或不存在(0%)FBS的情况下使用过表达GPR10的CHO-K1细胞在β-抑制蛋白募集测定中测定的EC_{50}。[b]在存在(10%)或不存在(0%)FBS的情况下使用NPFF2R过表达CHO细胞在cAMP报告分子测定中测定的EC_{50}。平均值±SEM(n=3)。用在培养基中12点剂量反应的肽和0.5mM IBMX(3-异丁基-1-甲基黄嘌呤)处理过表达NPFF2R的CHO细胞以抑制cAMP降解,用20μM毛喉素作为阳性对照。该测定在37℃、5%CO_2下,一式三份进行30分钟,并且使用来自Cisbio的cAMP检测试剂盒来定量cAMP累积。[c]使用在0%FBS下获得的EC_{50}计算比率。

实施例B:血浆稳定性

[0499] 为了研究缀合物在血浆中的稳定性,将PrRP31、缀合物255(97-L3)和缀合物263(97-L5)在小鼠血浆中孵育长达24h(图12)。在血清蛋白沉淀后,通过LC-MS(QTOF)定量剩余的完整肽水平。小鼠血浆中PrRP31的降解快,半衰期约11分钟,1h后完全消失。在位置6-13处与L3钉合增强了稳定性,将半衰期延长至30-60分钟。当缀合至钉合体L5时,半衰期进一步增加至约3h。

[0500] 在单次重复中进行血浆稳定性,在不同的时间点在小鼠血浆中孵育肽,随后在甲醇中沉淀血浆蛋白并经LC-MS定量。

实施例C:药代动力学研究

[0501] 在1mg/kg皮下注射后,在雄性C57小鼠中评价缀合物263(97-L5)的药代动力学曲线(图13)。使用LC-MS测定不同时间点(0.25、0.5、1、3、7、24、48和72h)的肽血浆浓度。C_{max}在施用后约3h达到约1.67μg/mL,消除半衰期为8h,这类似于啮齿动物中索马鲁肽的消除半衰期。

[0502] 使用在小鼠中单次皮下注射1mg/kg缀合物263(97-L5)进行小鼠PK研究,并且在不同时间点收集血浆样品并使用LC-MS定量。通过使用WinNonlin拟合数据计算PK参数。由于小鼠的体积/采样限制,使用稀疏采样。因此,通过组合来自不同动物的浓度获得单一PK曲线,并将PK参数估计值进行平均。因此,未报告SEM。

[0503] 在5mg/kg剂量下进行另外的PK研究,并且观察到类似的药代动力学曲线,其中使用基于细胞的功能测定法测定血浆浓度(图14)。

	$t_{½}$ /h	C_{max} /μg mL^{-1}	AUC_{last} /h μg mL^{-1}	AUC_{∞} /h μg mL^{-1}	AUC_{0-24h} /h μg mL^{-1}
平均值	8.44	32.4	648	652	444
SD	0.31	7.93	92.2	92.6	113
CV%	3.78	24.4	14.2	14.2	25.5

实施例D:体内效力测定

[0504] 为了证明缀合物263(97-L5)的延长的半衰期转化为体内效力,在饮食诱导的肥胖(DIO)小鼠模型(每组n＝8)中进行12天体重研究,每日皮下给药(图15)。对于0.5mg/kg的缀合物263(97-L5)观察到显著的体重减轻作用。较高剂量的5mg/kg化合物263(97-L5)每日注射产生与0.5mg/kg剂量相似的效力(图16),表明缀合物263(97-L5)的ED_{50}低于0.5mg/kg。虽然这种选择性似乎导致抑制食欲作用降低,但预期缀合物263(97-L5)在与NPFF2R激动相关的不期望的心血管副作用方面表现出更有利的安全性特征。5mg/kg和1mg/kg PK研究的24h血浆暴露显著高于缀合物263(97-L5)的EC_{50},这可能表明需要较低剂量来显示剂量反应效应。目前正在进行在更多慢性肥胖和代谢疾病模型中的详细剂量-反应和效力研究。

[0505] 在饮食诱导的肥胖(DIO)小鼠中测定效力,在12天内每日以0.5mg/kg皮下给药缀合物263(97-L5)或媒介物(n＝8)。与媒介物处理相比,体重显著减轻;****＝p≤0.0001,***＝p≤0.001,**＝p≤0.01。

实施例E:体内体重研究和口服葡萄糖耐量试验(OGTT)

[0506] 所有动物护理和实验程序均由加利福尼亚生物医学研究所(Calibr)的机构动物护理和使用委员会(IACUC)批准,并严格遵循美国国立卫生研究院(NIH)人道处理动物指南。维持高脂肪饮食(D12492,60％脂肪饮食)18周的Charles River饮食诱导肥胖(DIO)模型雄性小鼠(24周龄,来自Jackson Labs,Bar Harbor,ME)通过每日皮下注射以0.5或5mg/kg剂量施用肽,持续长达12天(分组饲养,2只/笼)。实验开始时的平均体重为50g。在整个研究中每日监测小鼠体重,并在第1、2、6和9天监测摄食量。在第14天进行口服葡萄糖耐量试验(OGTT)之前,将小鼠禁食过夜,然后用肽给药。6h后,每千克体重口服施用1g葡萄糖溶液,并在葡萄糖攻击2h之前(0min)和之后测量小鼠尾部血糖水平。使用非配对学生t检验比较数据。适当时,使用重复测量或单向方差分析比较数据,然后进行SNK(Student-Newman-Keuls)事后检验。口服施用PrRP31和缀合物263(97-L5)后的葡萄糖水平和AUC示于图17和图18中。

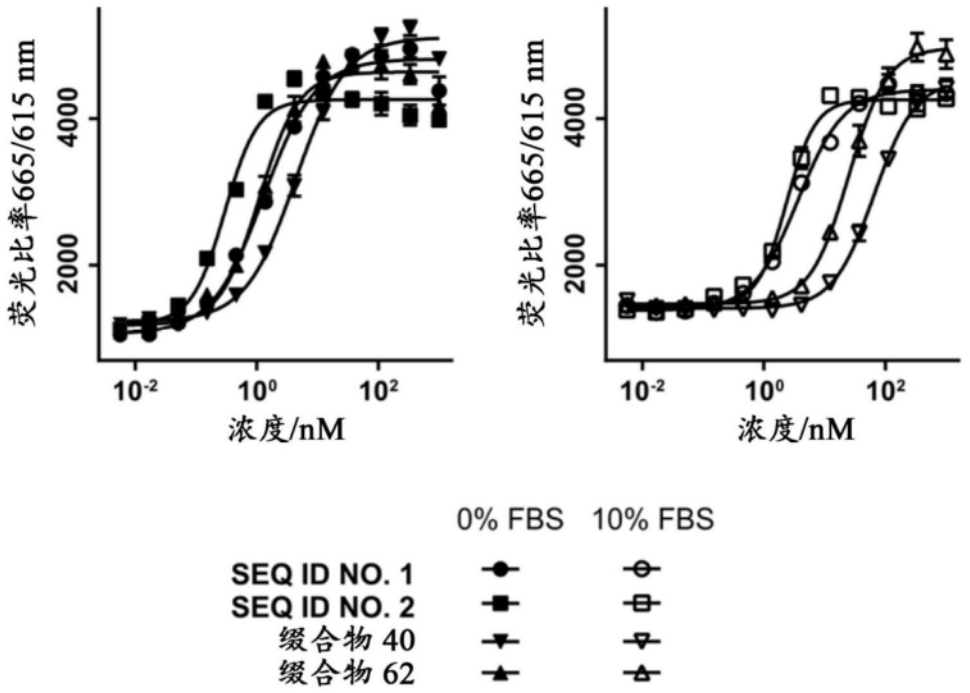

荧光比率665/615 nm
4000
2000
10-2
100
102
浓度/nM
荧光比率665/615 nm
4000
2000
10-2
100
102
浓度/nM
0% FBS
10% FBS
SEQ ID NO. 1
SEQ ID NO. 2
缀合物 40
缀合物 62

图 1A 图 1B

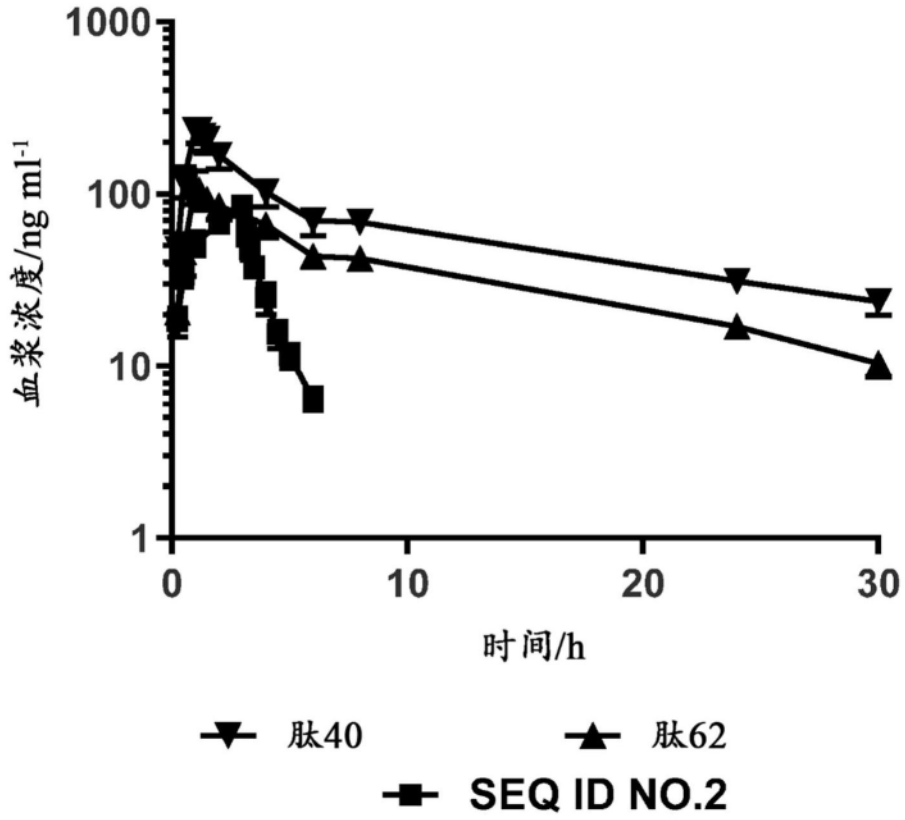


图2

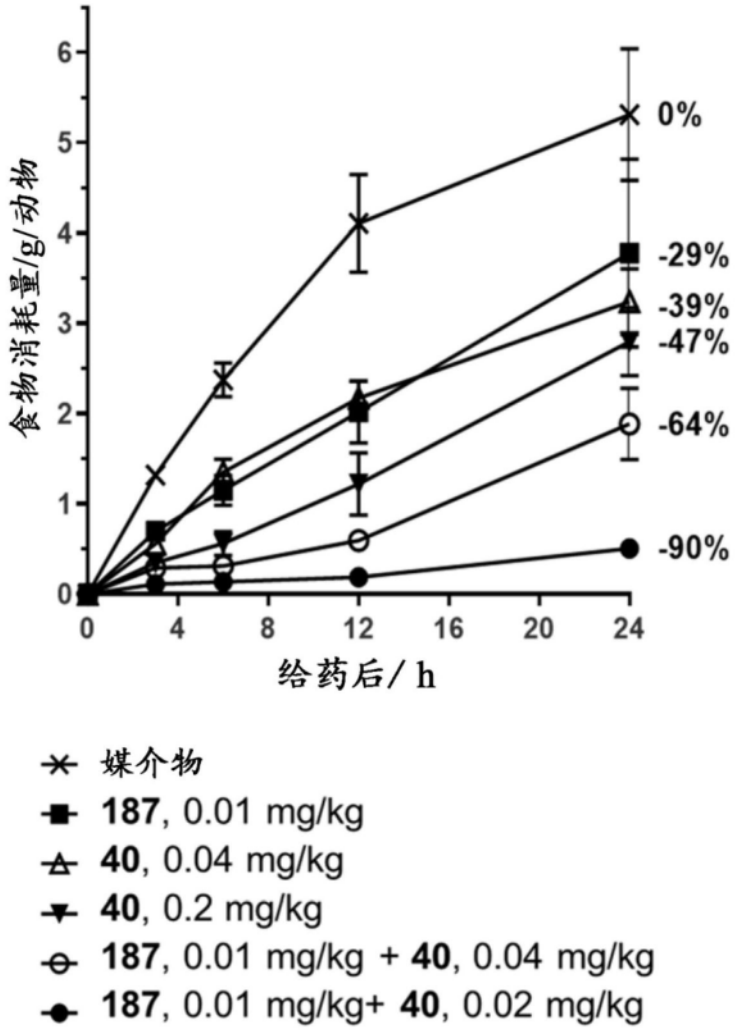

食物消耗量/g/动物
给药后/ h
0%
-29%
-39%
-47%
-64%
-90%
媒介物
187, 0.01 mg/kg
40, 0.04 mg/kg
40, 0.2 mg/kg
187, 0.01 mg/kg + 40, 0.04 mg/kg
187, 0.01 mg/kg+ 40, 0.02 mg/kg

图3A

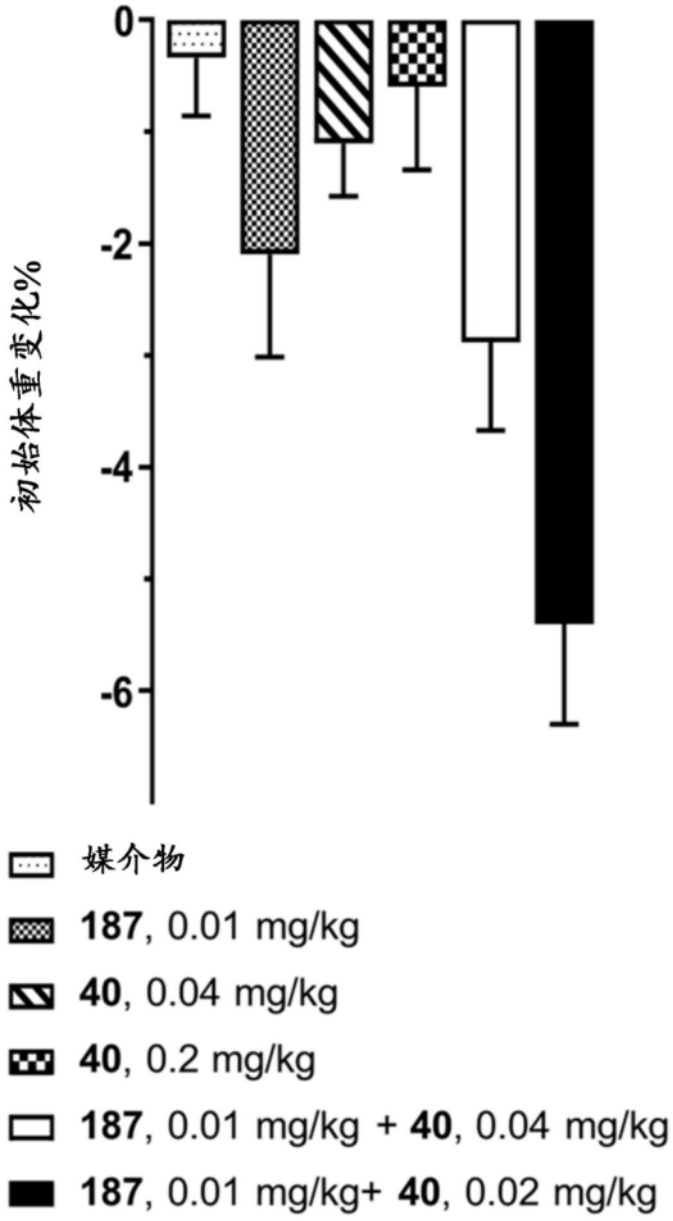

0
-2
-4
-6
初始体重变化%
媒介物
187, 0.01 mg/kg
40, 0.04 mg/kg
40, 0.2 mg/kg
187, 0.01 mg/kg + 40, 0.04 mg/kg
187, 0.01 mg/kg+ 40, 0.02 mg/kg

图3B

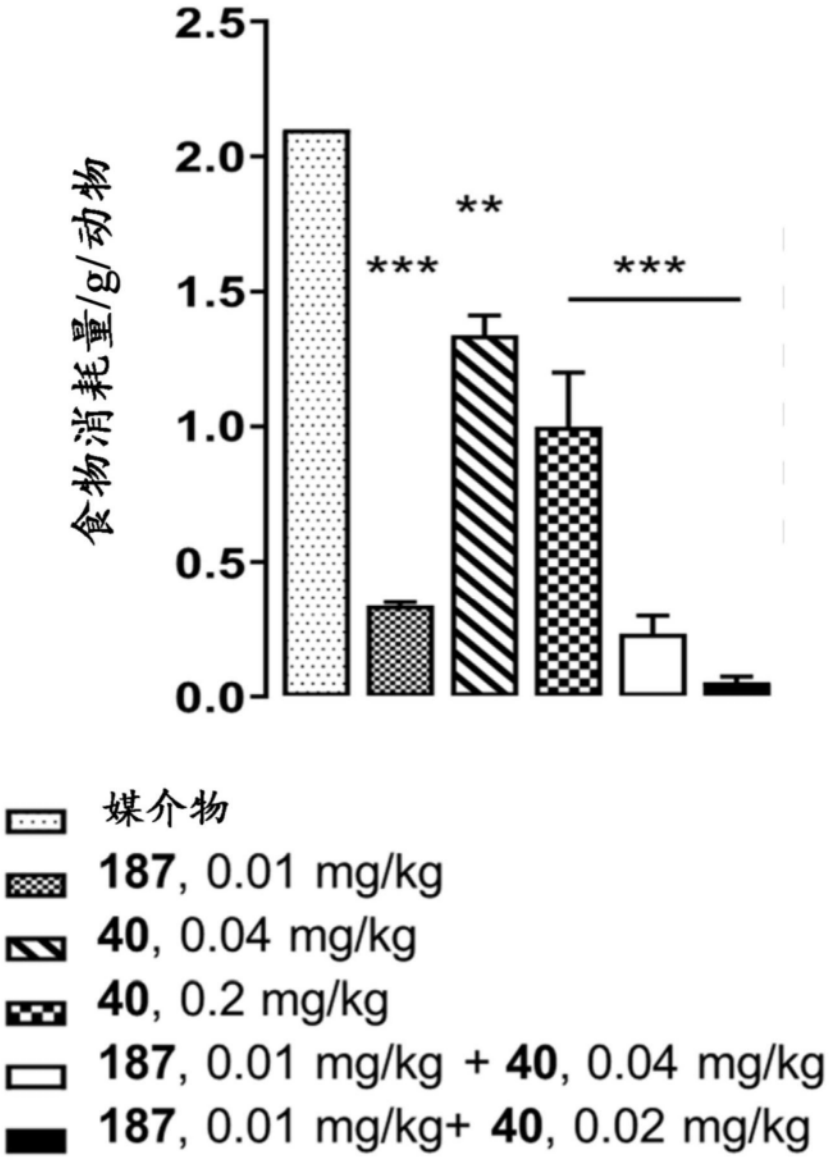

食物消耗量/g/动物
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
***
**
***
媒介物
187, 0.01 mg/kg
40, 0.04 mg/kg
40, 0.2 mg/kg
187, 0.01 mg/kg + 40, 0.04 mg/kg
187, 0.01 mg/kg+ 40, 0.02 mg/kg

图4A

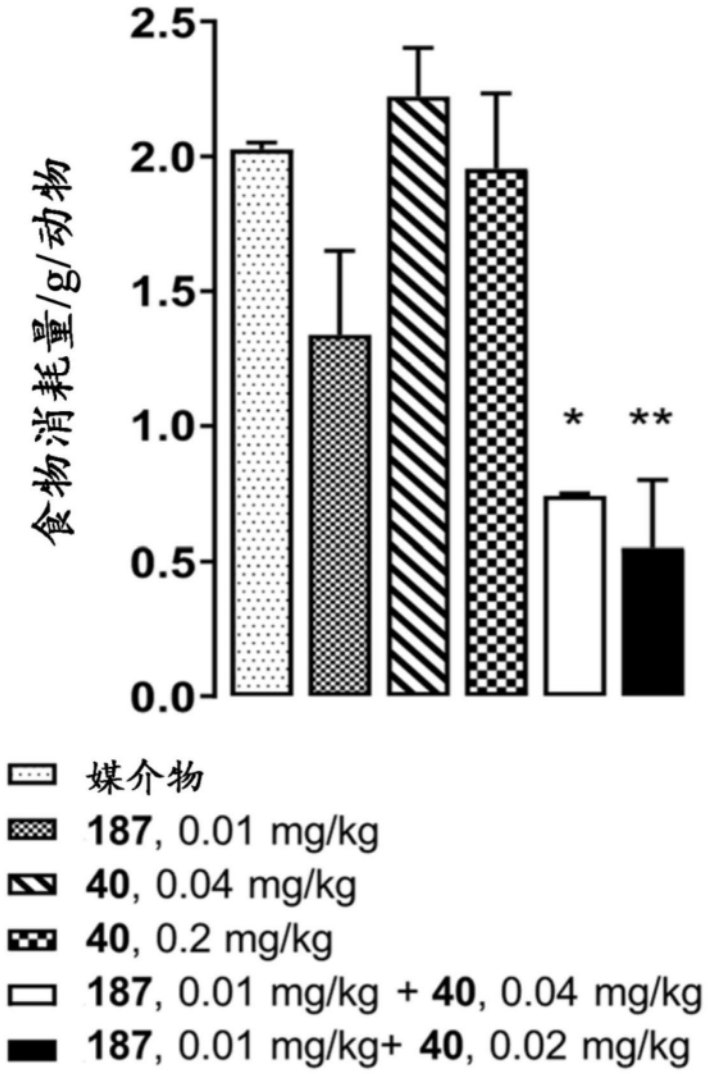

食物消耗量/g/动物
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
*
**
媒介物
187, 0.01 mg/kg
40, 0.04 mg/kg
40, 0.2 mg/kg
187, 0.01 mg/kg + 40, 0.04 mg/kg
187, 0.01 mg/kg+ 40, 0.02 mg/kg

图4B

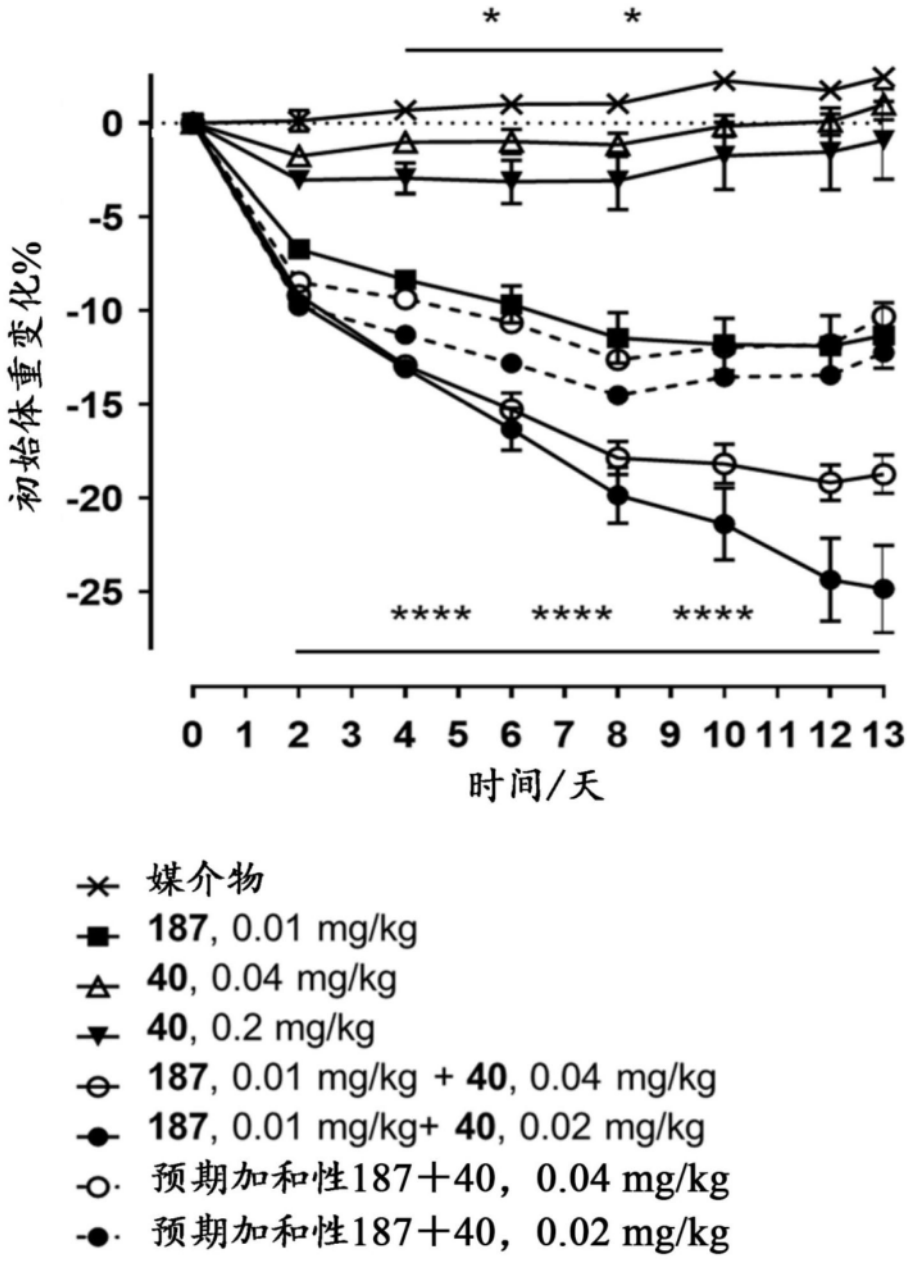

*
*
0
-5
-10
-15
-20
-25
初始体重变化%
****
****
****
0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13
时间/天
媒介物
187, 0.01 mg/kg
40, 0.04 mg/kg
40, 0.2 mg/kg
187, 0.01 mg/kg + 40, 0.04 mg/kg
187, 0.01 mg/kg+ 40, 0.02 mg/kg
预期加和性187＋40，0.04 mg/kg
预期加和性187＋40，0.02 mg/kg

图4C

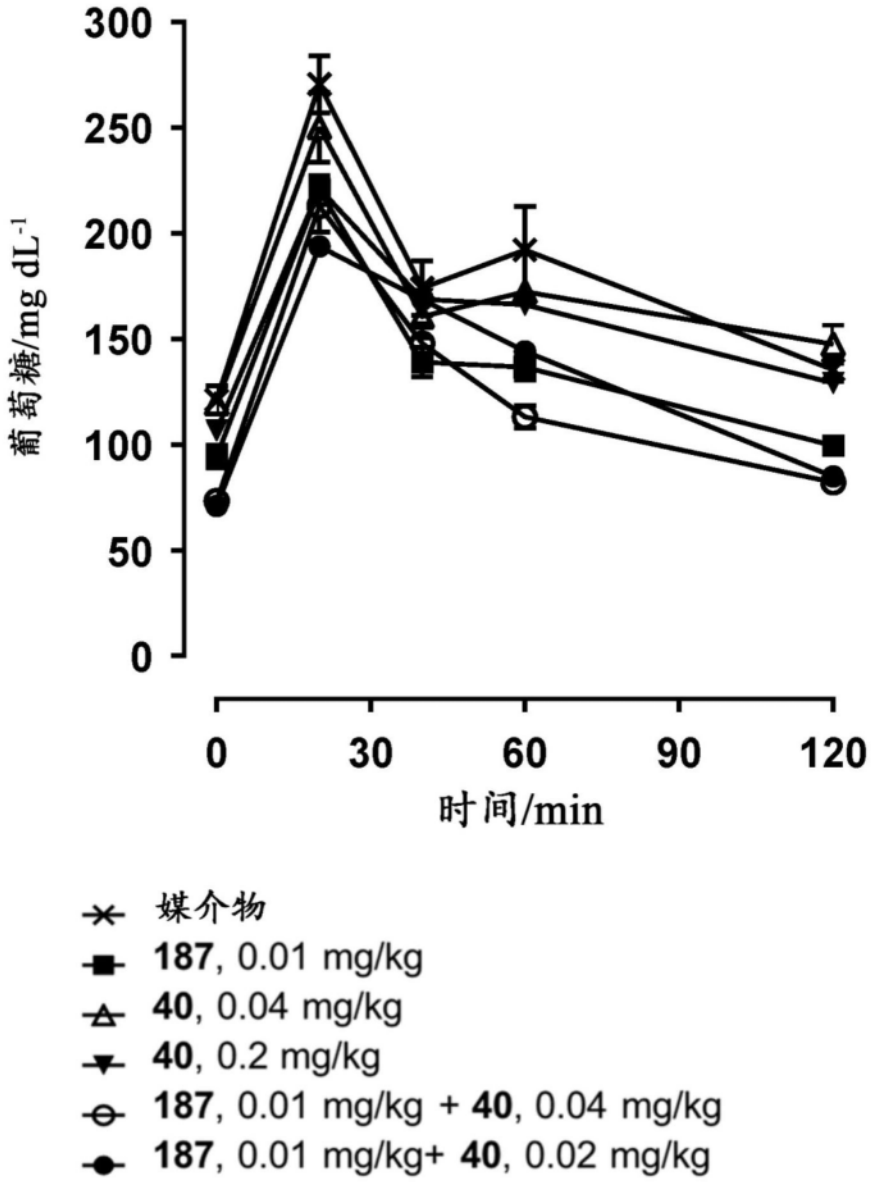

300
250
200
150
100
50
0
葡萄糖/mg dL-1
0
30
60
90
120
时间/min
媒介物
187, 0.01 mg/kg
40, 0.04 mg/kg
40, 0.2 mg/kg
187, 0.01 mg/kg + 40, 0.04 mg/kg
187, 0.01 mg/kg+ 40, 0.02 mg/kg

图4D

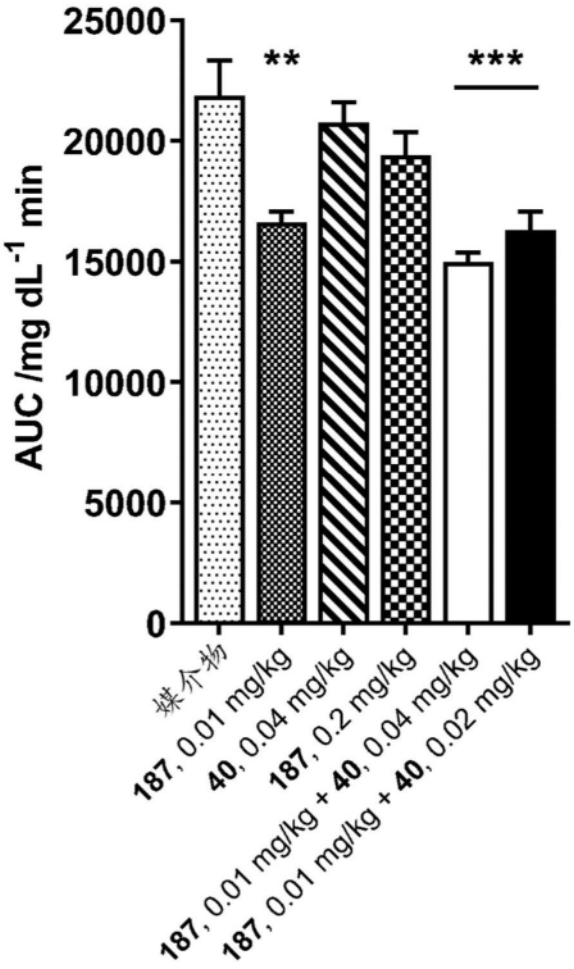

25000
20000
15000
10000
5000
0
AUC /mg dL-1 min
**
***
媒介物
187, 0.01 mg/kg
40, 0.04 mg/kg
187, 0.2 mg/kg
187, 0.01 mg/kg + 40, 0.04 mg/kg
187, 0.01 mg/kg + 40, 0.02 mg/kg

图4E

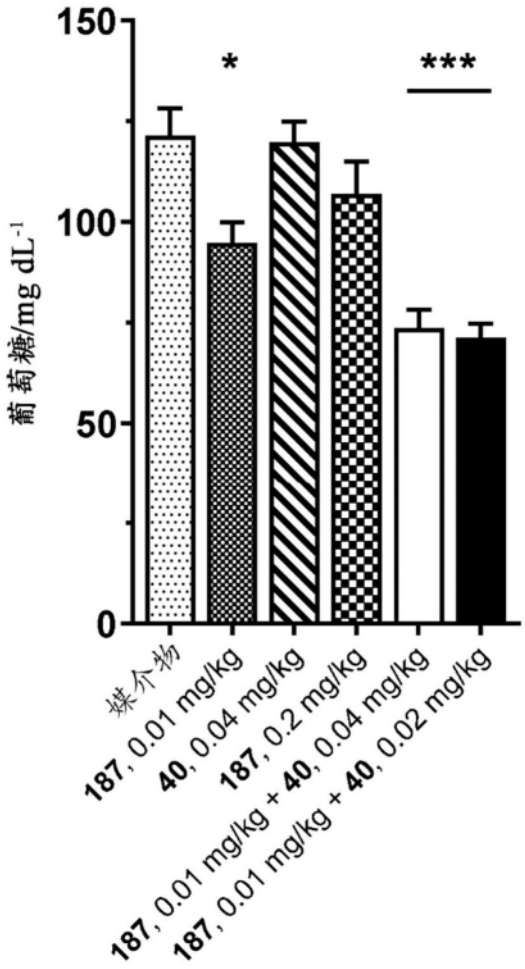

150
100
50
0
葡萄糖/mg dL-1
*
***
媒介物
187, 0.01 mg/kg
40, 0.04 mg/kg
187, 0.2 mg/kg
187, 0.01 mg/kg + 40, 0.04 mg/kg
187, 0.01 mg/kg + 40, 0.02 mg/kg

图4F

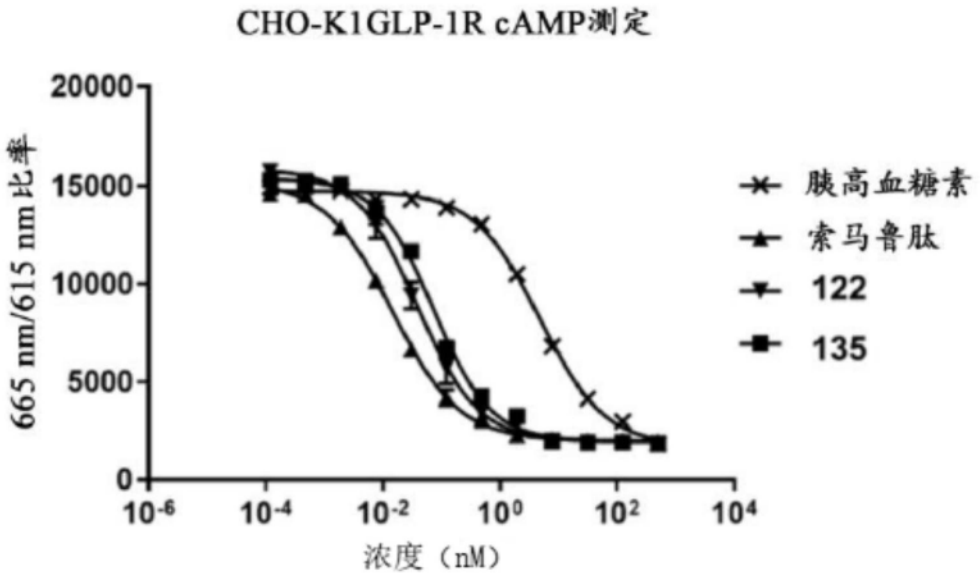

CHO-K1GLP-1R cAMP测定
665 nm/615 nm 比率
20000
15000
10000
5000
0
10-6
10-4
10-2
100
102
104
浓度（nM）
胰高血糖素
索马鲁肽
122
135

图5A

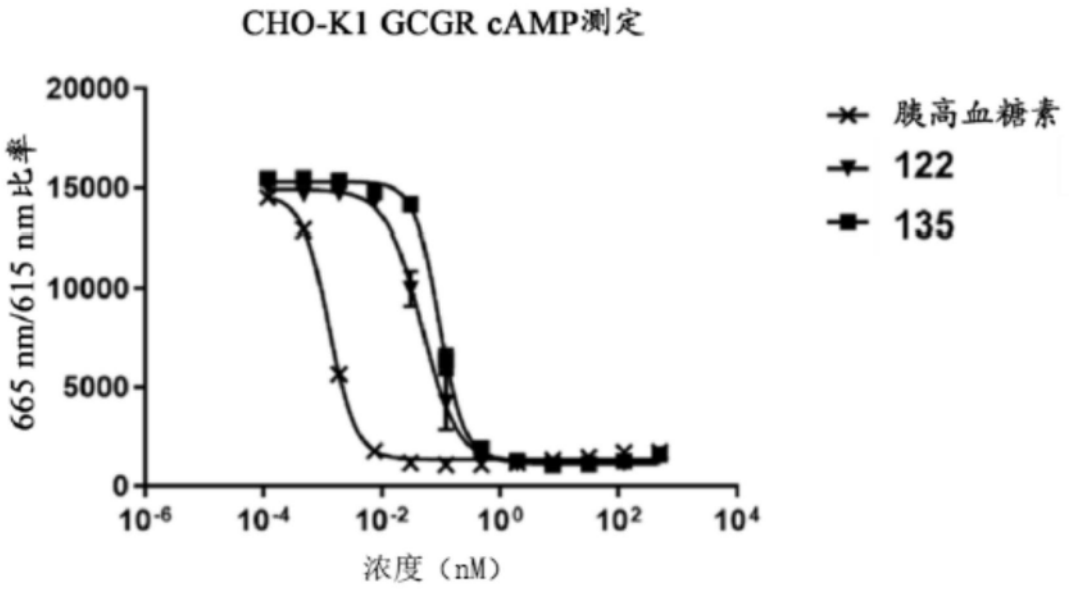

CHO-K1 GCGR cAMP测定
665 nm/615 nm比率
20000
15000
10000
5000
0
10-6
10-4
10-2
100
102
104
浓度（nM）
胰高血糖素
122
135

图5B

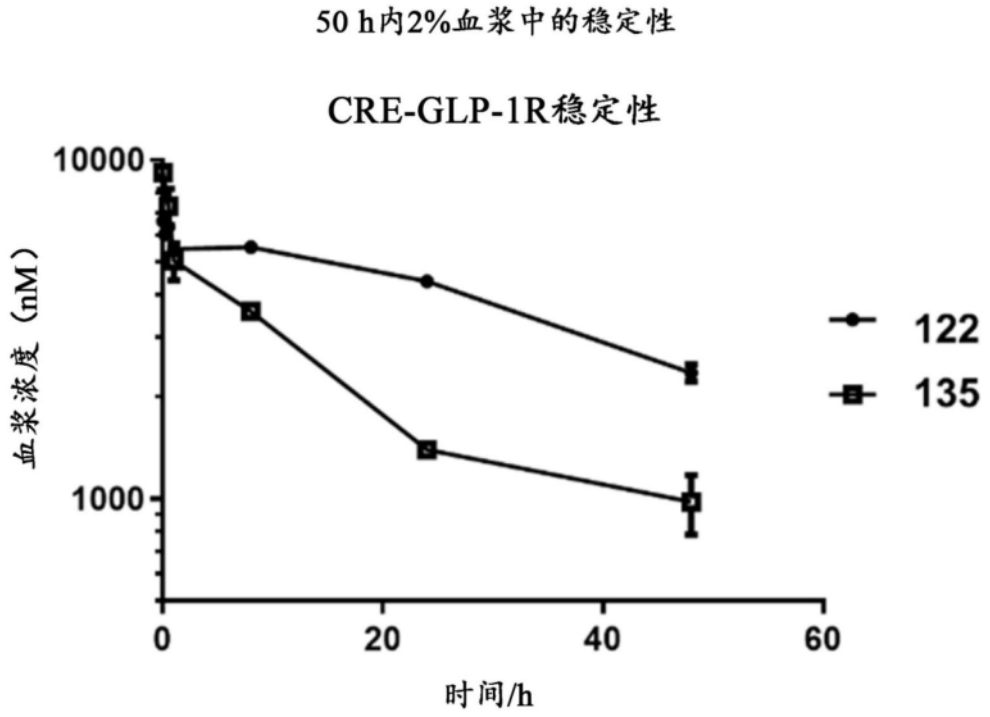

50 h内2%血浆中的稳定性
CRE-GLP-1R稳定性
血浆浓度（nM）
10000
1000
0
20
40
60
时间/h
122
135

图5C

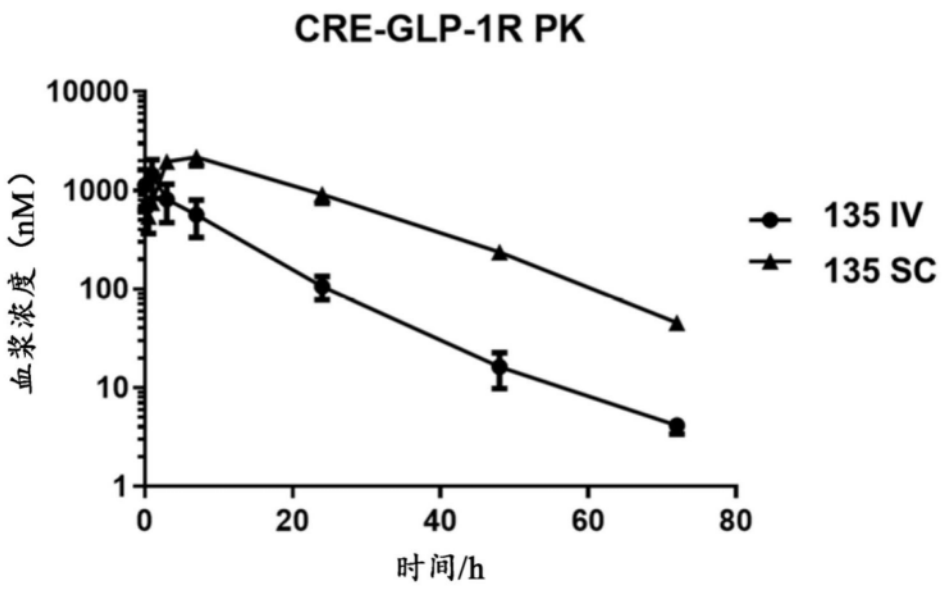

CRE-GLP-1R PK
血浆浓度（nM）
10000
1000
100
10
1
0
20
40
60
80
时间/h
135 IV
135 SC

图6A

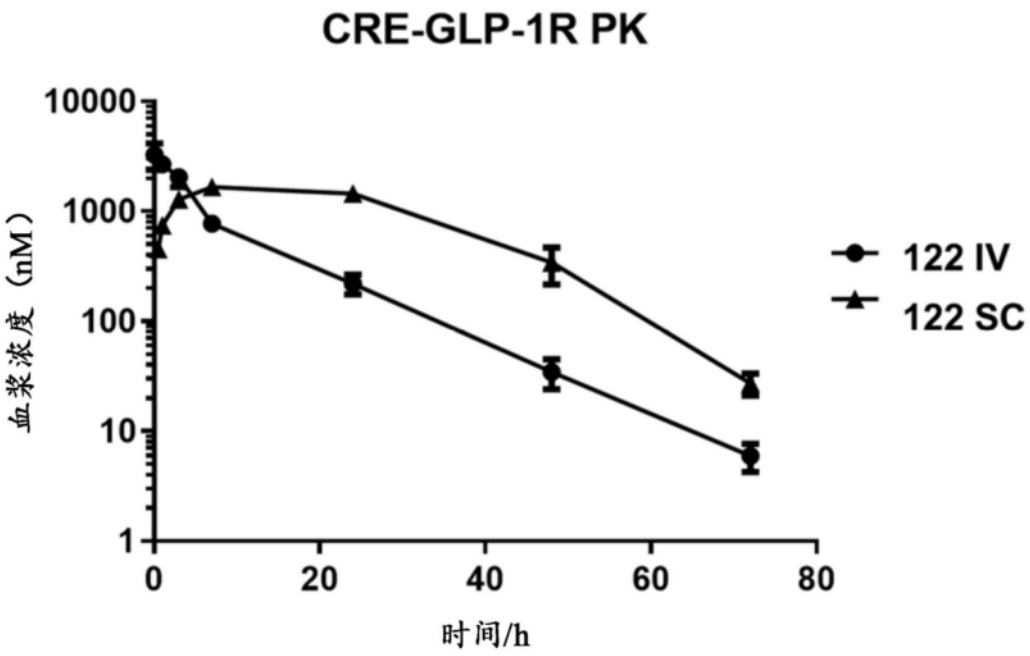

CRE-GLP-1R PK
血浆浓度（nM）
10000
1000
100
10
1
0
20
40
60
80
时间/h
122 IV
122 SC

图6B

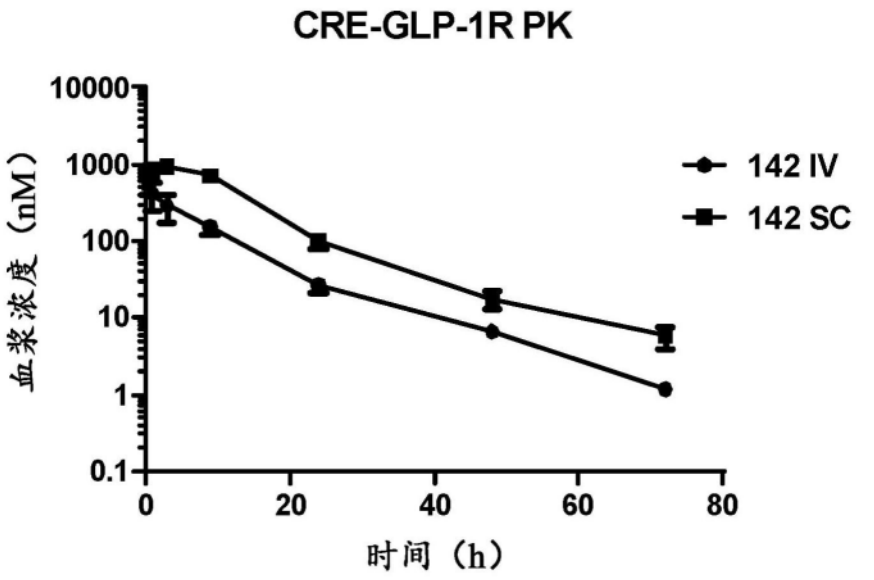

CRE-GLP-1R PK
10000
1000
100
10
1
0.1
血浆浓度（nM）
0
20
40
60
80
时间（h）
142 IV
142 SC

图6C

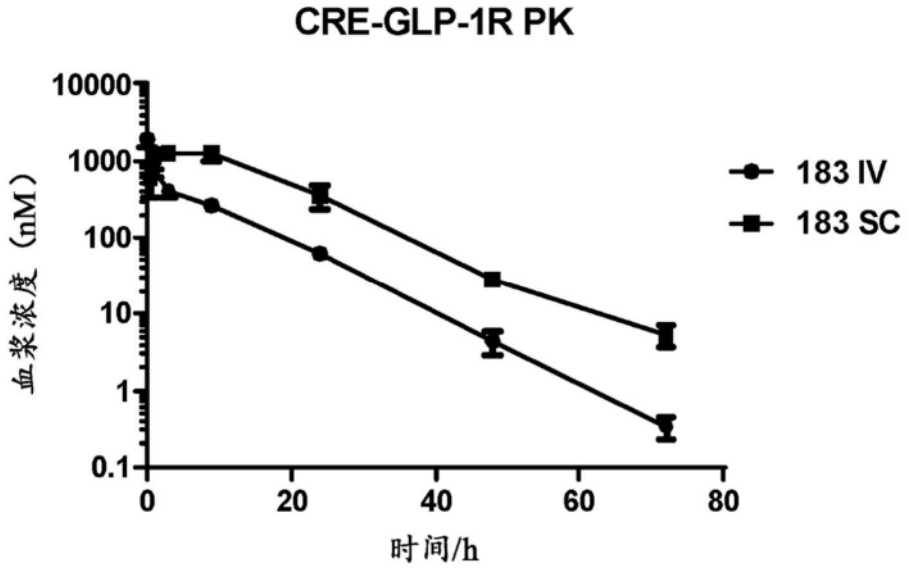

CRE-GLP-1R PK
10000
1000
100
10
1
0.1
血浆浓度（nM）
0
20
40
60
80
时间/h
183 IV
183 SC

图6D

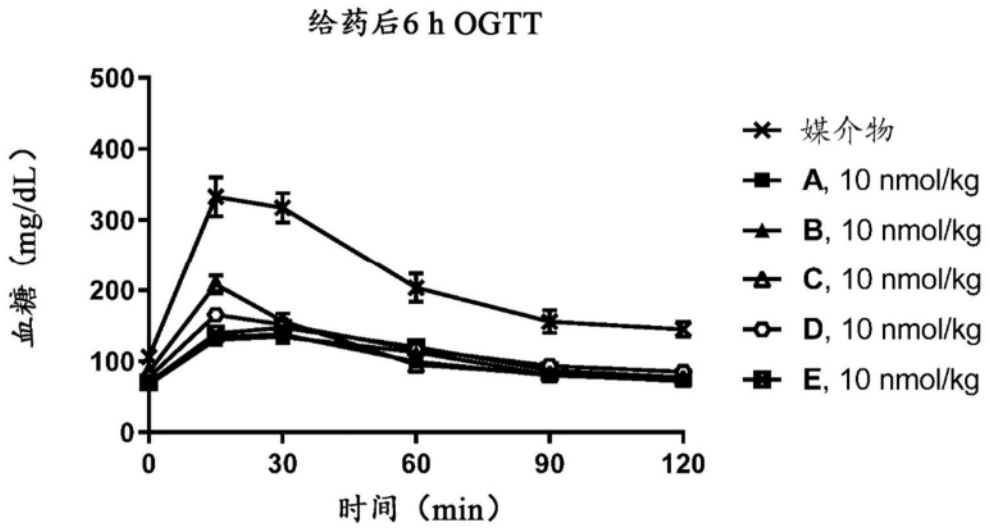

给药后6 h OGTT
血糖（mg/dL）
500
400
300
200
100
0
0
30
60
90
120
时间（min）
媒介物
A, 10 nmol/kg
B, 10 nmol/kg
C, 10 nmol/kg
D, 10 nmol/kg
E, 10 nmol/kg

图7A

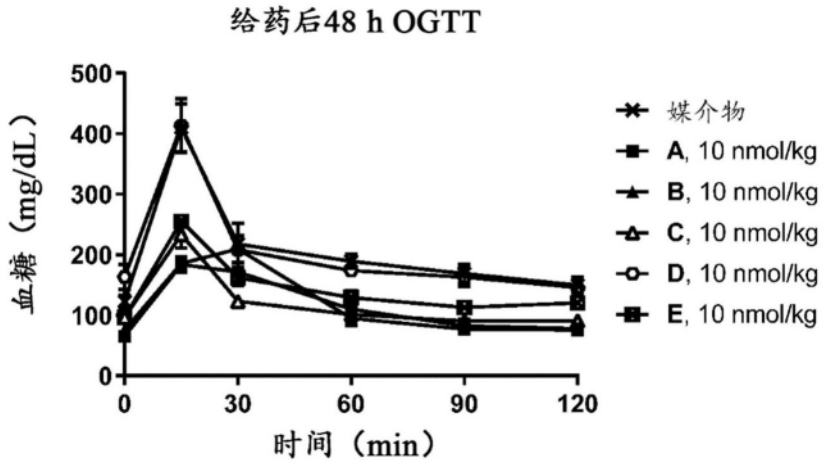

给药后48 h OGTT
血糖（mg/dL）
500
400
300
200
100
0
0
30
60
90
120
时间（min）
媒介物
A, 10 nmol/kg
B, 10 nmol/kg
C, 10 nmol/kg
D, 10 nmol/kg
E, 10 nmol/kg

图7B

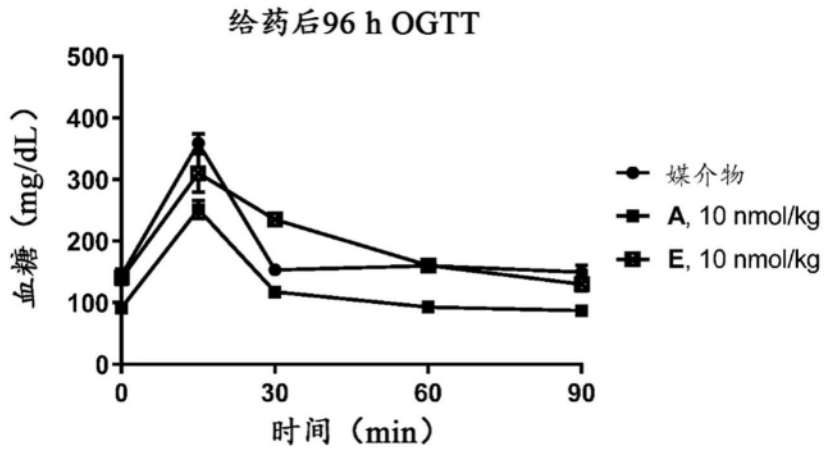

给药后96 h OGTT
血糖（mg/dL）
500
400
300
200
100
0
0
30
60
90
时间（min）
媒介物
A, 10 nmol/kg
E, 10 nmol/kg

图7C

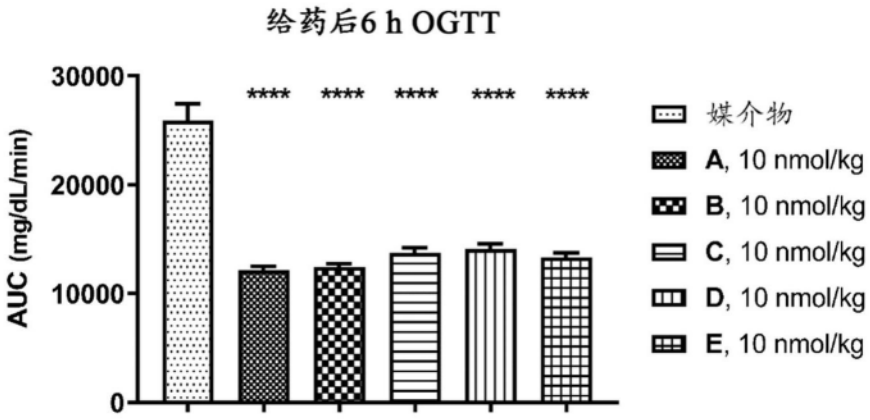

给药后6 h OGTT
AUC (mg/dL/min)
30000
20000
10000
0
****
****
****
****
****
媒介物
A, 10 nmol/kg
B, 10 nmol/kg
C, 10 nmol/kg
D, 10 nmol/kg
E, 10 nmol/kg

图7D

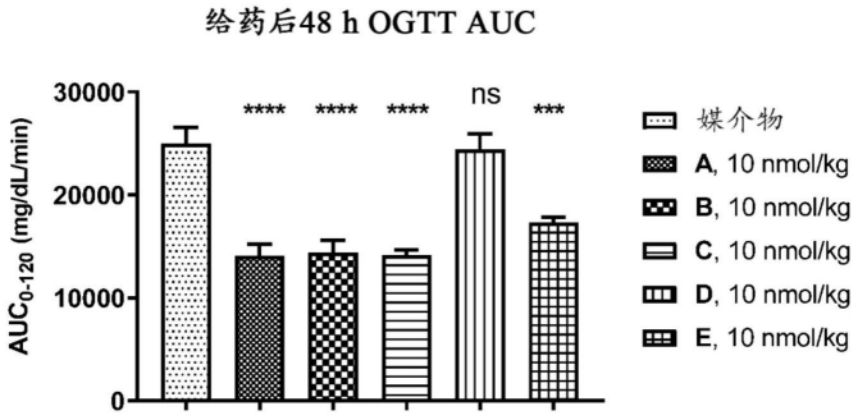

给药后48 h OGTT AUC
AUC0-120 (mg/dL/min)
30000
20000
10000
0
****
****
****
ns
***
媒介物
A, 10 nmol/kg
B, 10 nmol/kg
C, 10 nmol/kg
D, 10 nmol/kg
E, 10 nmol/kg

图7E

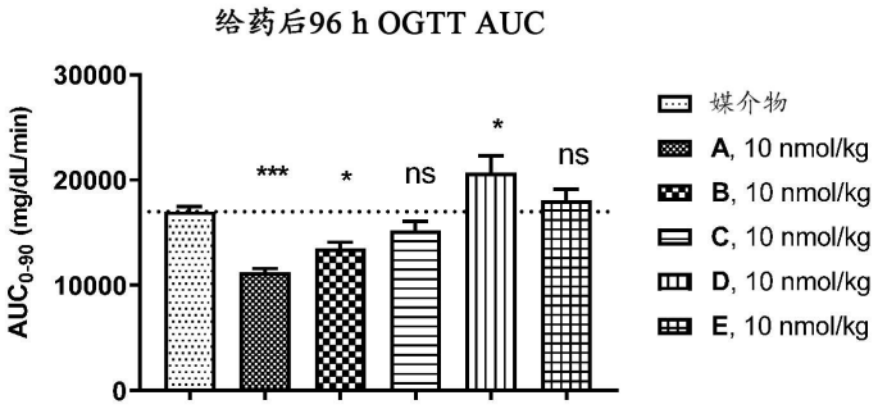

给药后96 h OGTT AUC
30000
20000
10000
0
AUC0-90 (mg/dL/min)
***
*
ns
*
ns
媒介物
A, 10 nmol/kg
B, 10 nmol/kg
C, 10 nmol/kg
D, 10 nmol/kg
E, 10 nmol/kg

图7F

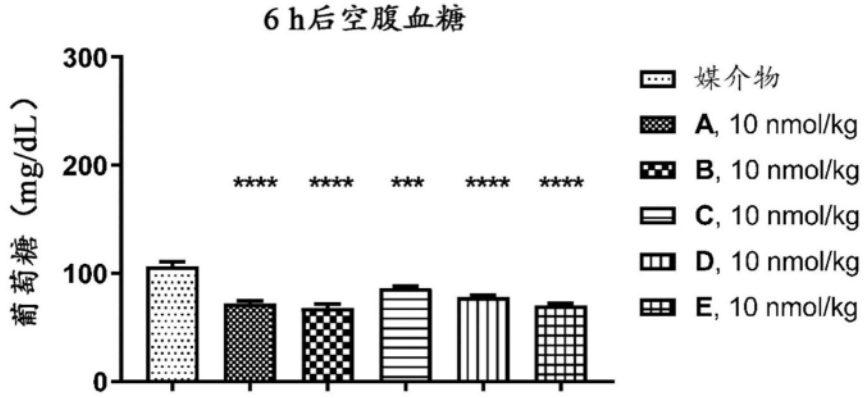

6 h后空腹血糖
300
200
100
0
葡萄糖（mg/dL）
****
****
***
****
****
媒介物
A, 10 nmol/kg
B, 10 nmol/kg
C, 10 nmol/kg
D, 10 nmol/kg
E, 10 nmol/kg

图7G

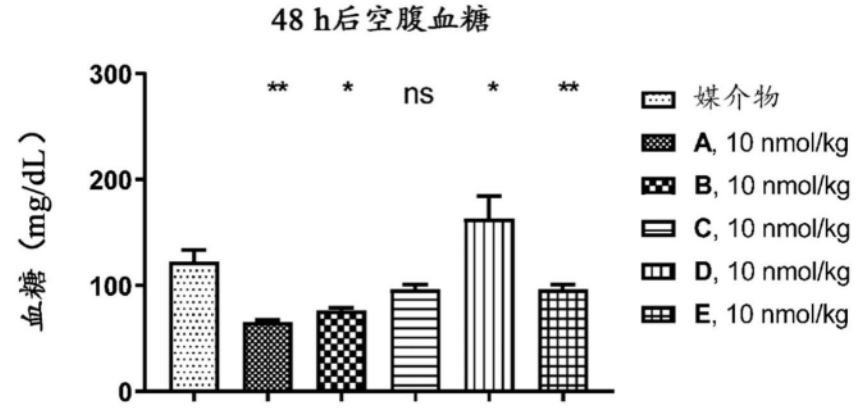

48 h后空腹血糖
300
200
100
0
血糖（mg/dL）
**
*
ns
*
**
媒介物
A, 10 nmol/kg
B, 10 nmol/kg
C, 10 nmol/kg
D, 10 nmol/kg
E, 10 nmol/kg

图7H

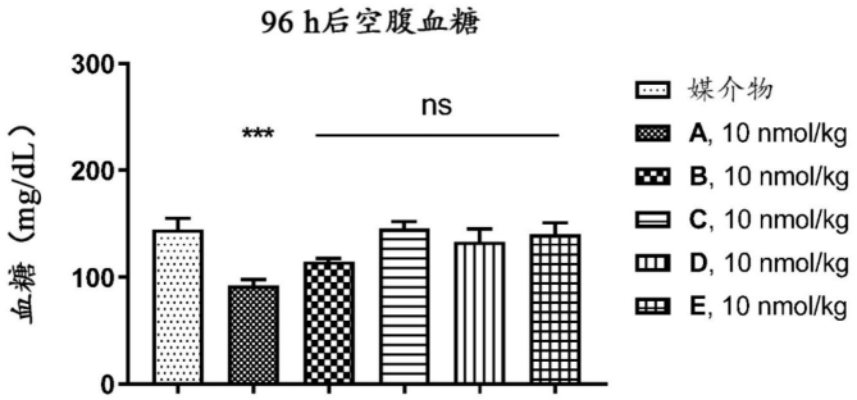

96 h后空腹血糖
血糖（mg/dL）
300
200
100
0
***
ns
媒介物
A, 10 nmol/kg
B, 10 nmol/kg
C, 10 nmol/kg
D, 10 nmol/kg
E, 10 nmol/kg

图7I

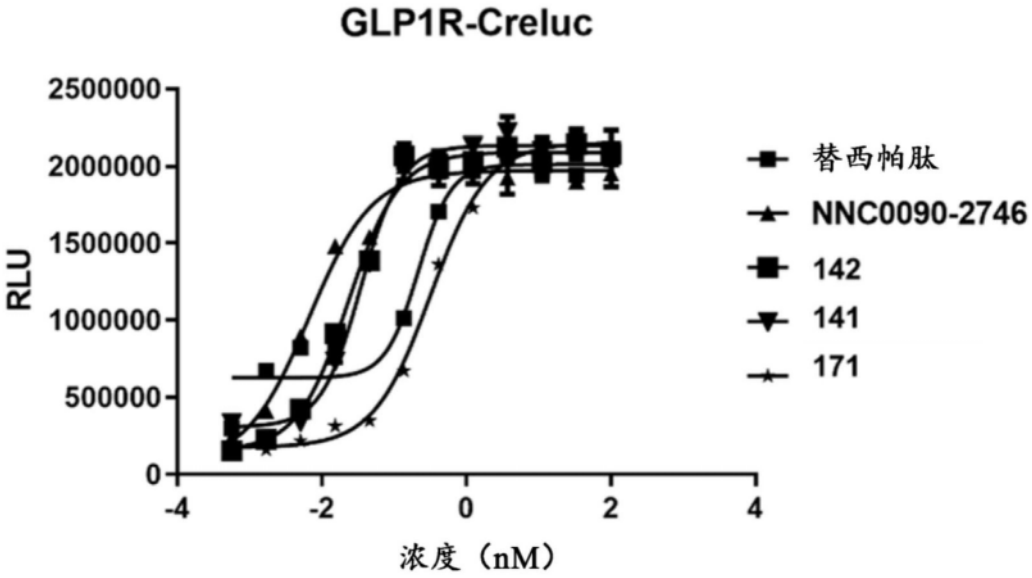

GLP1R-Creluc
RLU
2500000
2000000
1500000
1000000
500000
0
-4
-2
0
2
4
浓度（nM）
替西帕肽
NNC0090-2746
142
141
171

图8A

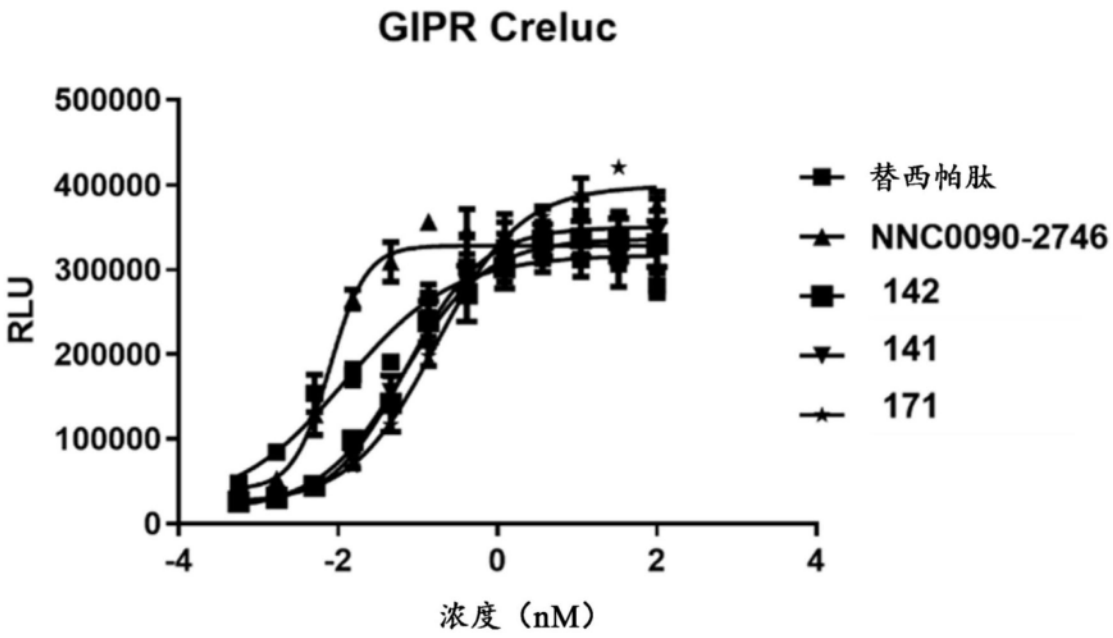

GIPR Creluc
500000
400000
300000
200000
100000
0
RLU
-4
-2
0
2
4
浓度（nM）
替西帕肽
NNC0090-2746
142
141
171

图8B

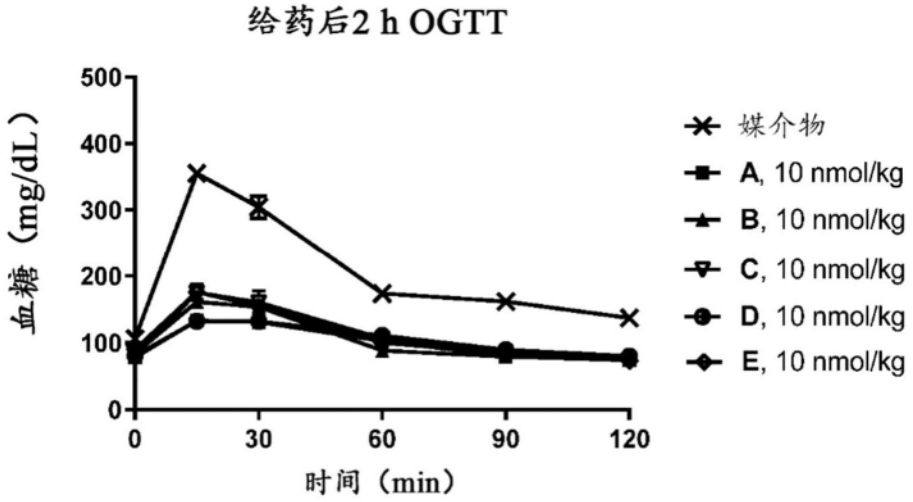

给药后2 h OGTT
500
400
300
200
100
0
血糖（mg/dL）
0
30
60
90
120
时间（min）
媒介物
A, 10 nmol/kg
B, 10 nmol/kg
C, 10 nmol/kg
D, 10 nmol/kg
E, 10 nmol/kg

图9A

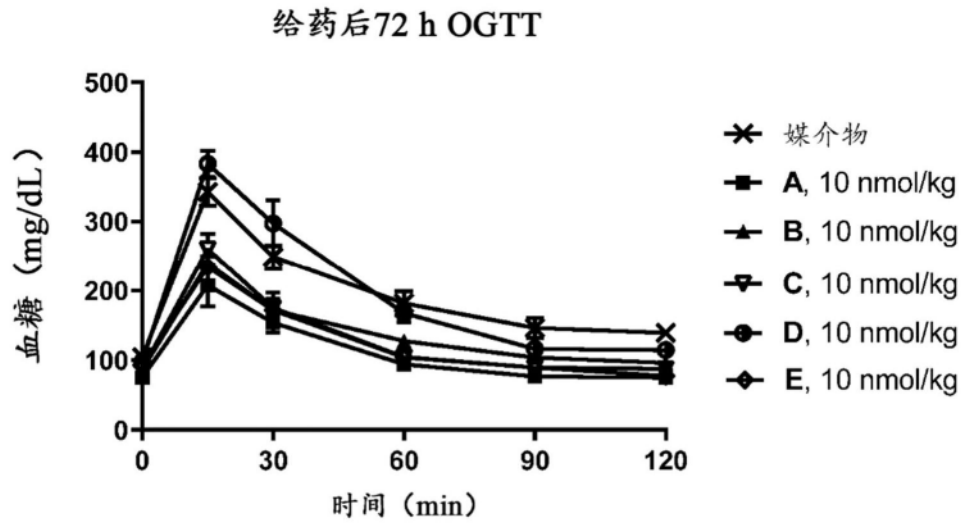

给药后72 h OGTT
血糖（mg/dL）
500
400
300
200
100
0
0
30
60
90
120
时间（min）
媒介物
A, 10 nmol/kg
B, 10 nmol/kg
C, 10 nmol/kg
D, 10 nmol/kg
E, 10 nmol/kg

图9B

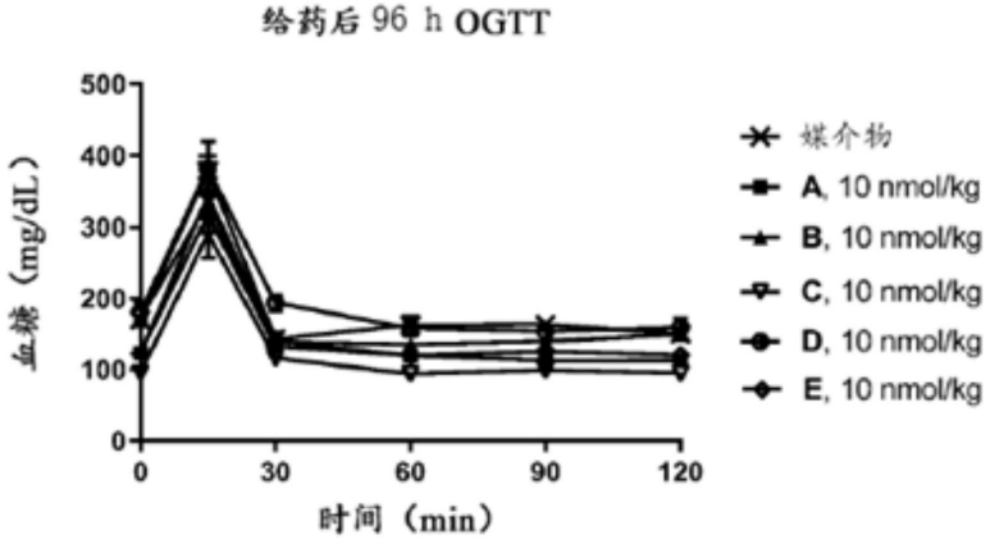

给药后 96 h OGTT
血糖（mg/dL）
500
400
300
200
100
0
0
30
60
90
120
时间（min）
媒介物
A, 10 nmol/kg
B, 10 nmol/kg
C, 10 nmol/kg
D, 10 nmol/kg
E, 10 nmol/kg

图9C

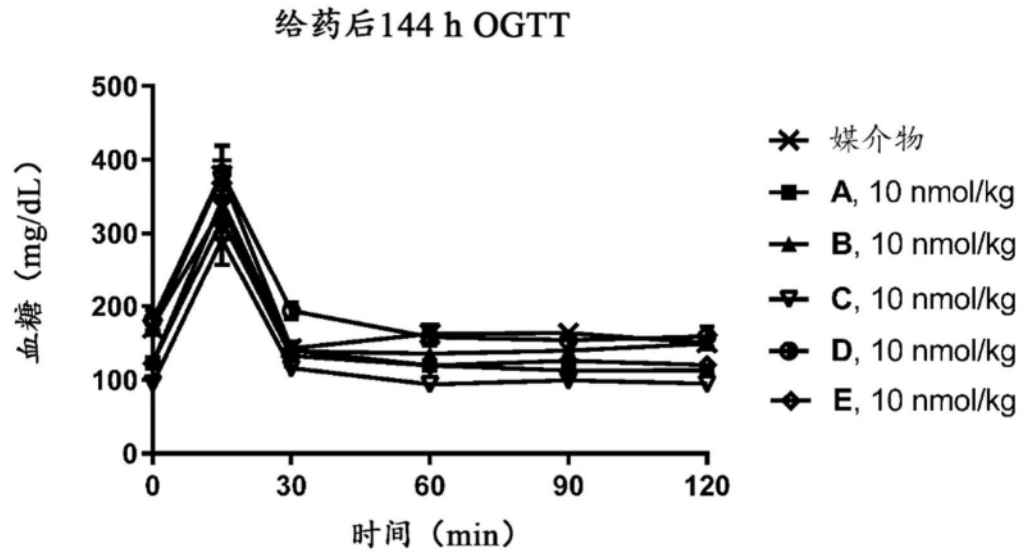

给药后144 h OGTT
血糖（mg/dL）
500
400
300
200
100
0
0
30
60
90
120
时间（min）
媒介物
A, 10 nmol/kg
B, 10 nmol/kg
C, 10 nmol/kg
D, 10 nmol/kg
E, 10 nmol/kg

图9D

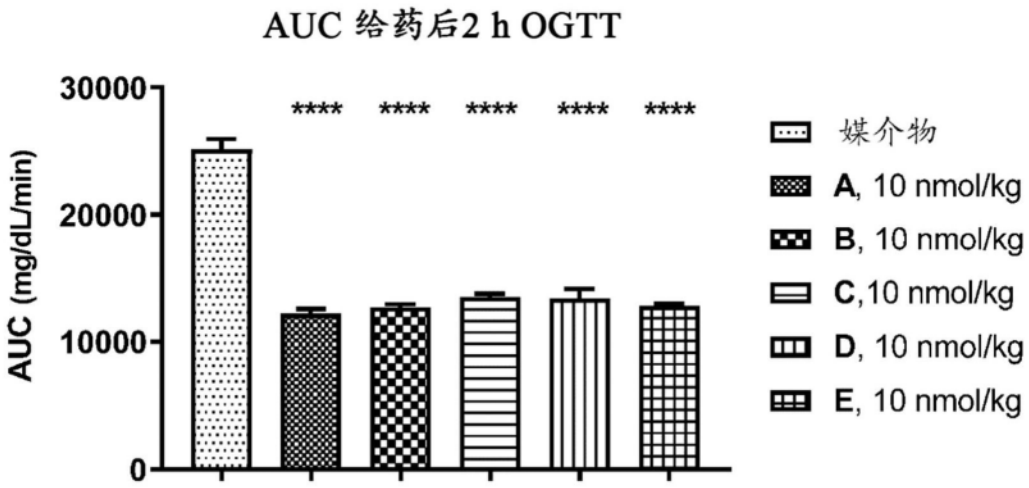

AUC 给药后2 h OGTT
AUC (mg/dL/min)
30000
20000
10000
0
****
****
****
****
****
媒介物
A, 10 nmol/kg
B, 10 nmol/kg
C,10 nmol/kg
D, 10 nmol/kg
E, 10 nmol/kg

图9E

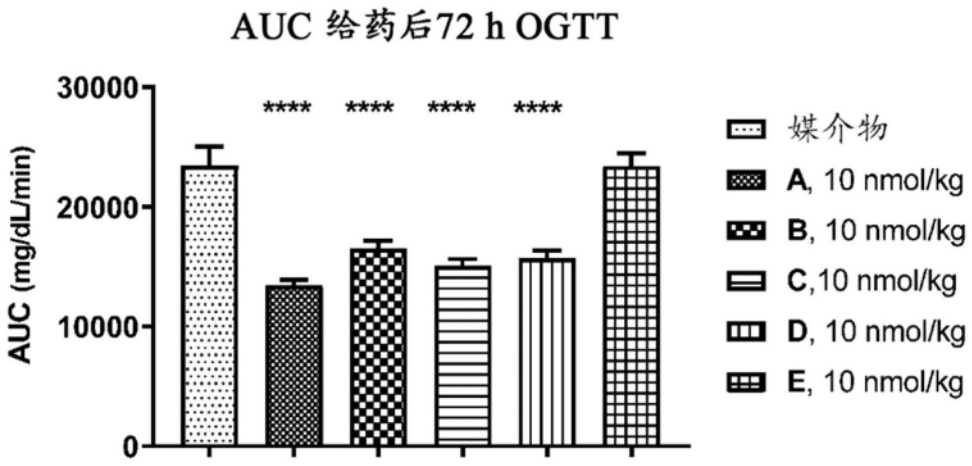

AUC 给药后72 h OGTT
AUC (mg/dL/min)
30000
20000
10000
0
****
****
****
****
媒介物
A, 10 nmol/kg
B, 10 nmol/kg
C,10 nmol/kg
D, 10 nmol/kg
E, 10 nmol/kg

图9F

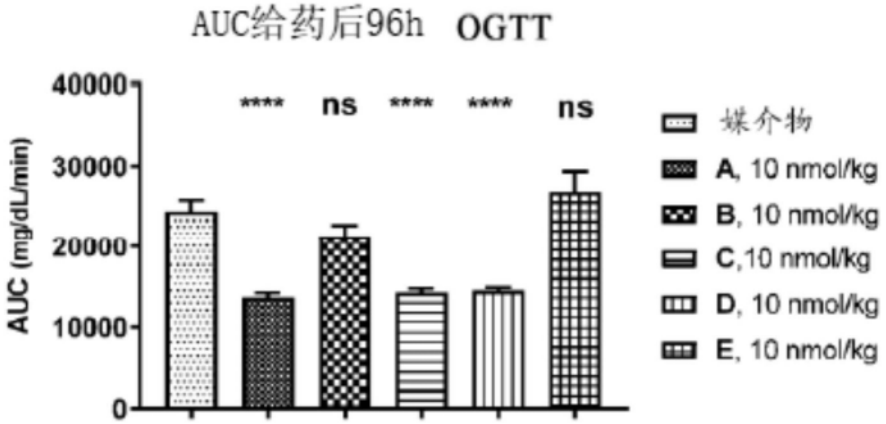

AUC给药后96h OGTT
AUC (mg/dL/min)
40000
30000
20000
10000
0
****
ns
****
****
ns
媒介物
A, 10 nmol/kg
B, 10 nmol/kg
C,10 nmol/kg
D, 10 nmol/kg
E, 10 nmol/kg

图9G

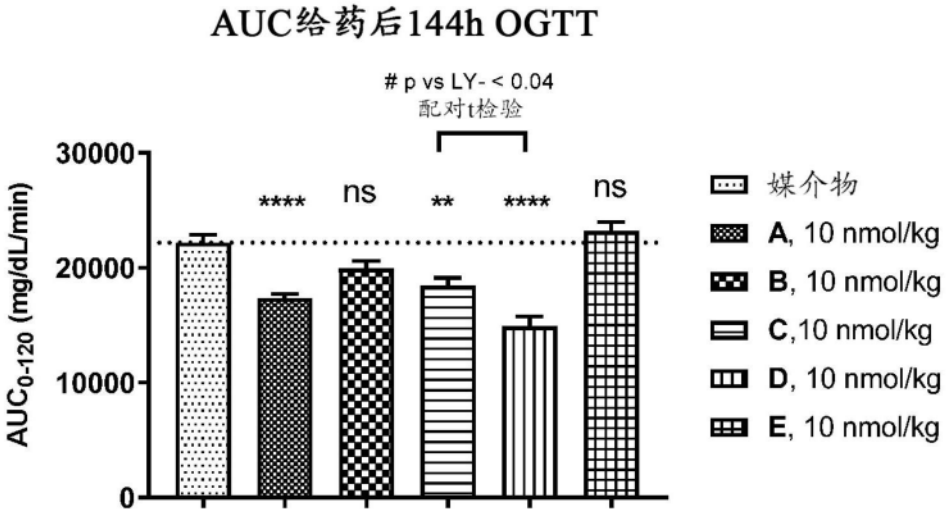

AUC给药后144h OGTT
p vs LY- < 0.04
配对t检验
AUC0-120 (mg/dL/min)
30000
20000
10000
0
****
ns
**
****
ns
媒介物
A, 10 nmol/kg
B, 10 nmol/kg
C,10 nmol/kg
D, 10 nmol/kg
E, 10 nmol/kg

图9H

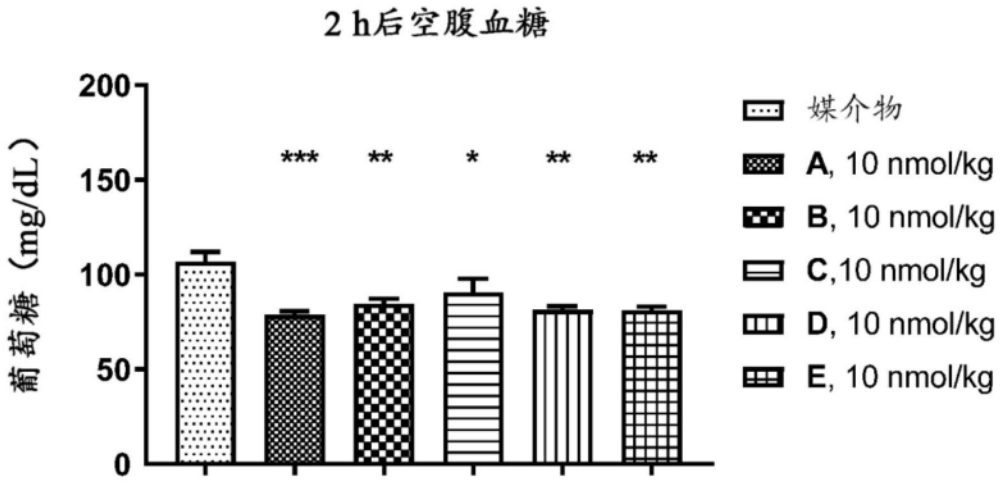

2 h后空腹血糖
葡萄糖（mg/dL）
200
150
100
50
0
***
**
*
**
**
媒介物
A, 10 nmol/kg
B, 10 nmol/kg
C,10 nmol/kg
D, 10 nmol/kg
E, 10 nmol/kg

图9I

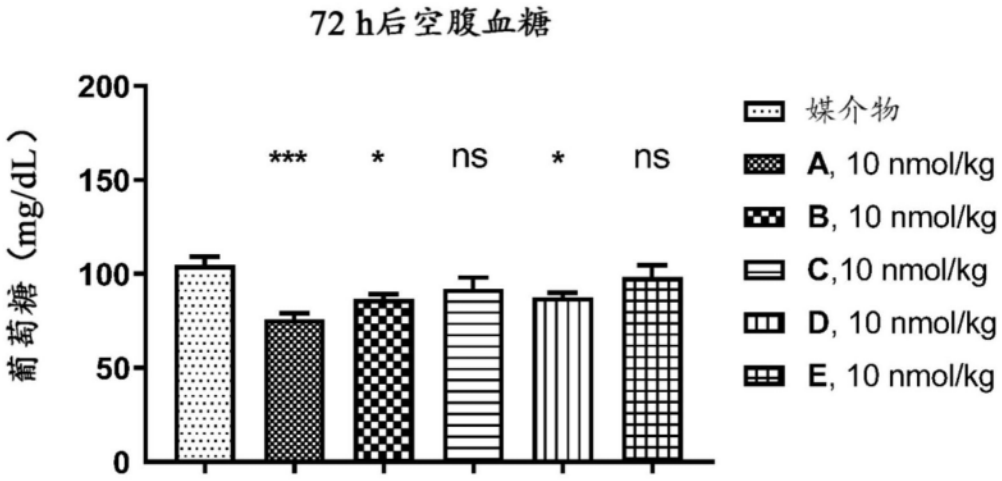

72 h后空腹血糖
葡萄糖（mg/dL）
200
150
100
50
0
***
*
ns
*
ns
媒介物
A, 10 nmol/kg
B, 10 nmol/kg
C,10 nmol/kg
D, 10 nmol/kg
E, 10 nmol/kg

图9J

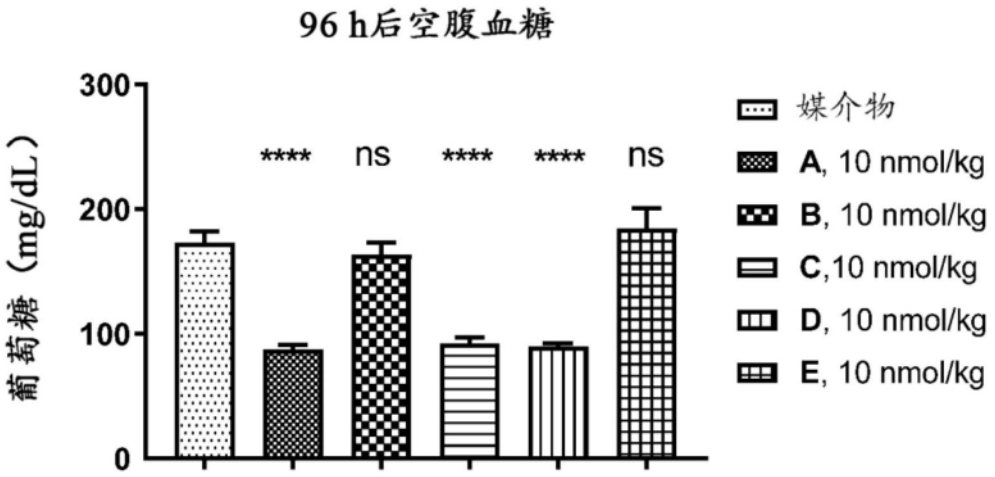

96 h后空腹血糖
葡萄糖（mg/dL）
300
200
100
0
**** ns **** **** ns
媒介物
A, 10 nmol/kg
B, 10 nmol/kg
C,10 nmol/kg
D, 10 nmol/kg
E, 10 nmol/kg

图9K

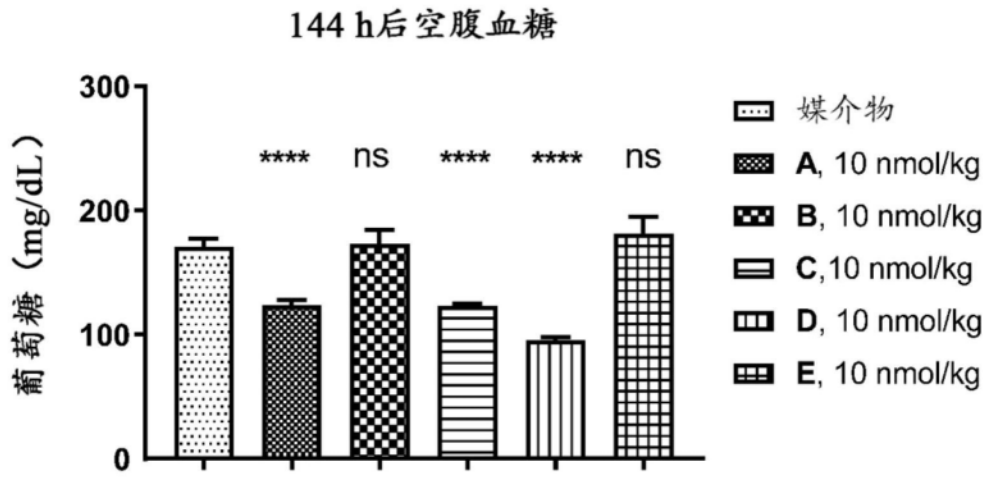

144 h后空腹血糖
葡萄糖（mg/dL）
300
200
100
0
**** ns **** **** ns
媒介物
A, 10 nmol/kg
B, 10 nmol/kg
C,10 nmol/kg
D, 10 nmol/kg
E, 10 nmol/kg

图9L

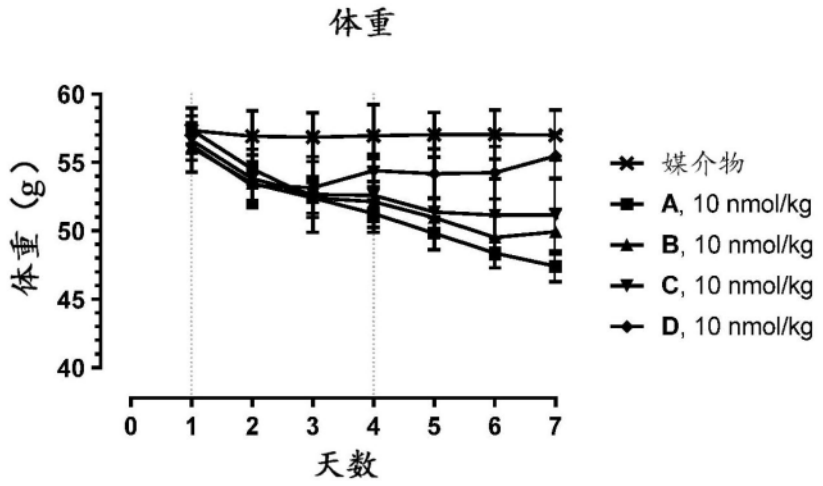

体重
体重（g）
60
55
50
45
40
0
1
2
3
4
5
6
7
天数
媒介物
A, 10 nmol/kg
B, 10 nmol/kg
C, 10 nmol/kg
D, 10 nmol/kg

图10A

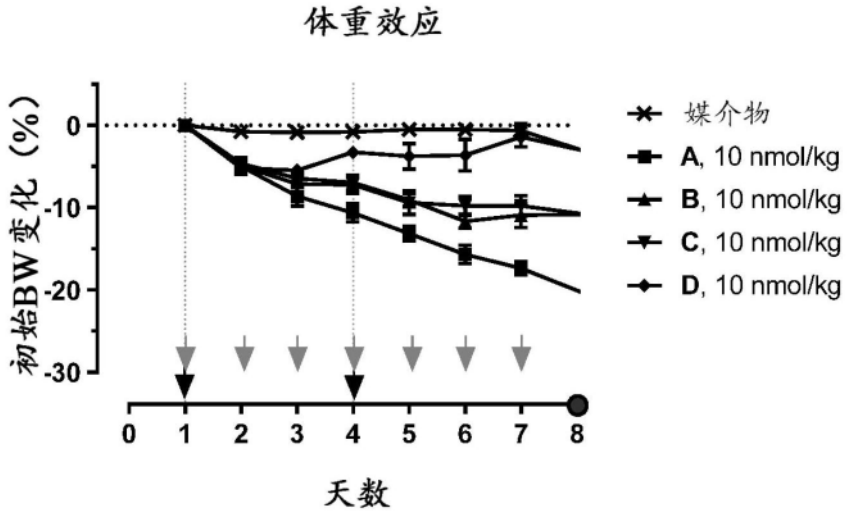

体重效应
初始BW变化（%）
0
-10
-20
-30
0
1
2
3
4
5
6
7
8
天数
媒介物
A, 10 nmol/kg
B, 10 nmol/kg
C, 10 nmol/kg
D, 10 nmol/kg

图10B

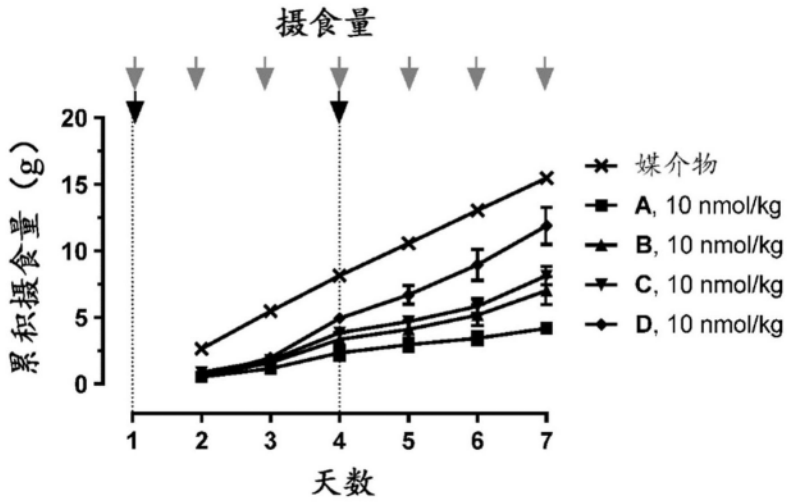

摄食量
累积摄食量（g）
20
15
10
5
0
1
2
3
4
5
6
7
天数
媒介物
A, 10 nmol/kg
B, 10 nmol/kg
C, 10 nmol/kg
D, 10 nmol/kg

图10C

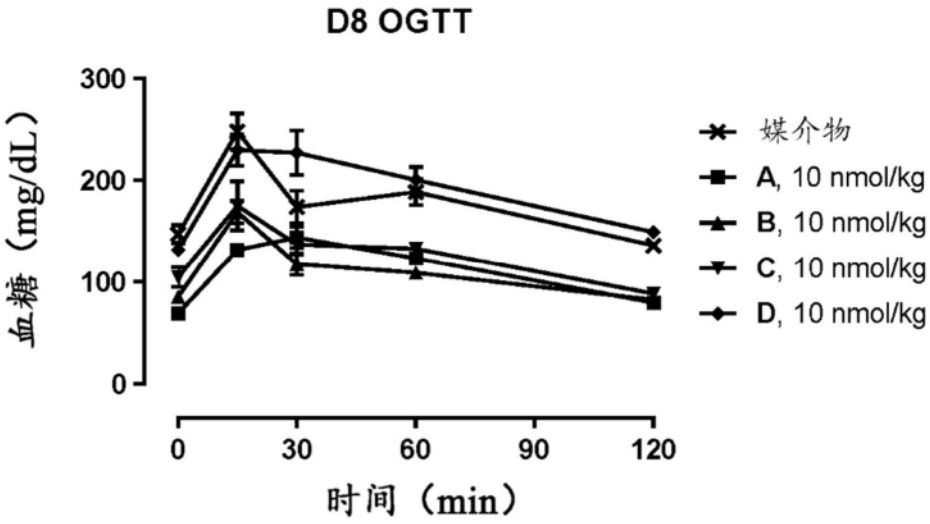

D8 OGTT
血糖（mg/dL）
300
200
100
0
0
30
60
90
120
时间（min）
媒介物
A, 10 nmol/kg
B, 10 nmol/kg
C, 10 nmol/kg
D, 10 nmol/kg

图10D

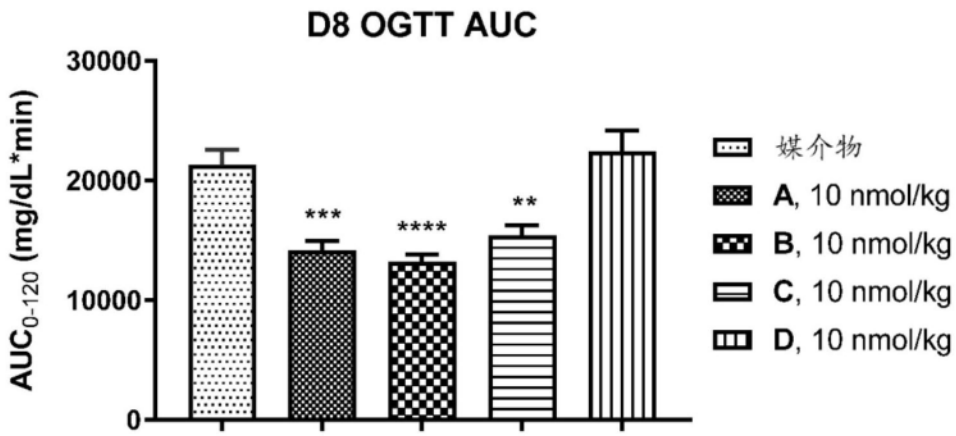


图10E

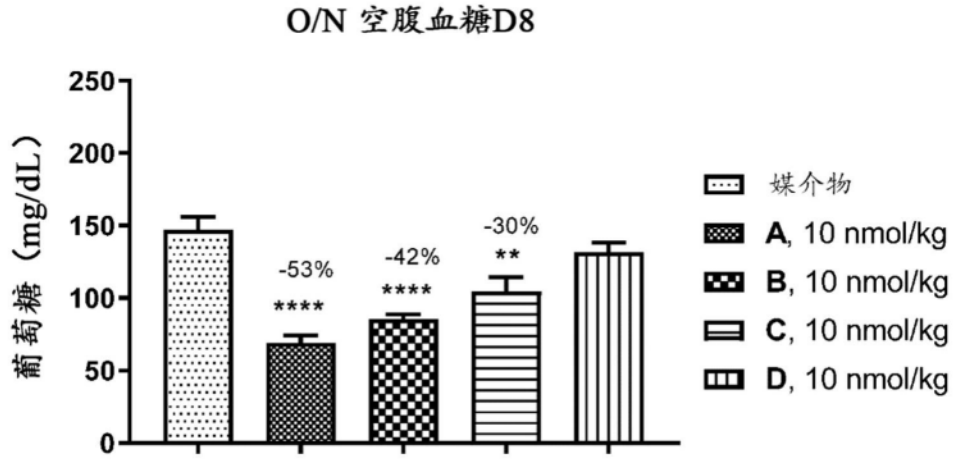


图10F

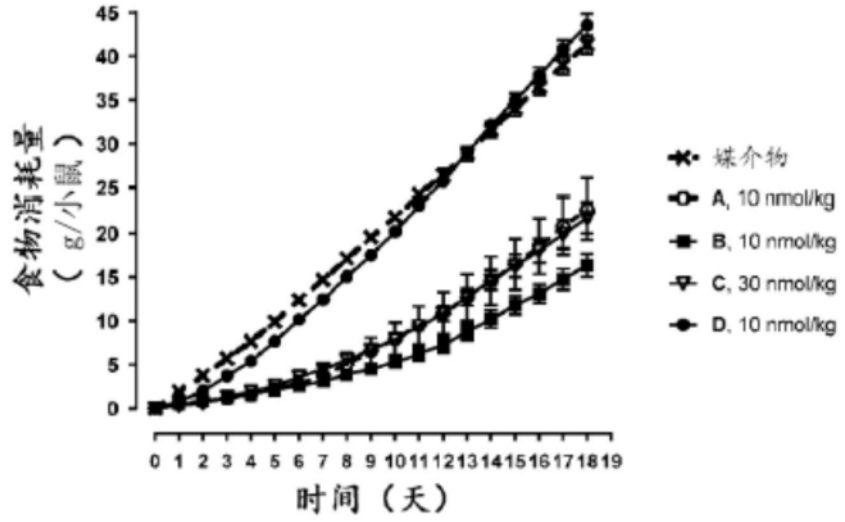


图11A

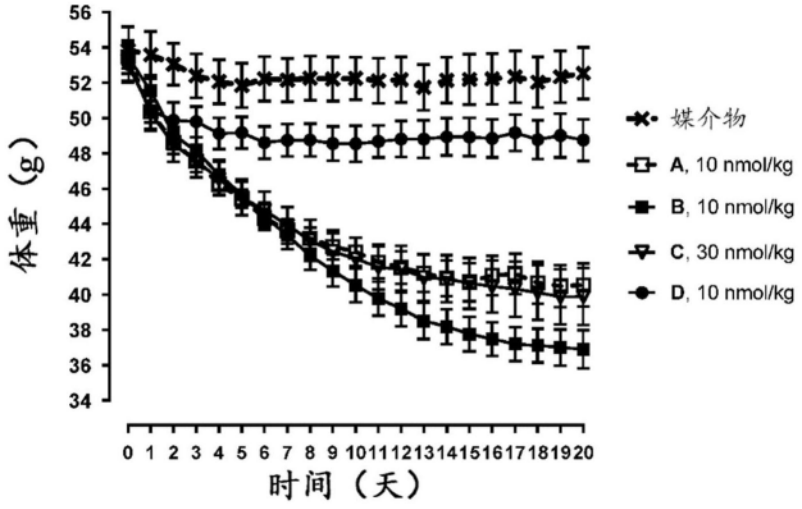

体重（g）
时间（天）
媒介物
A, 10 nmol/kg
B, 10 nmol/kg
C, 30 nmol/kg
D, 10 nmol/kg

图11B

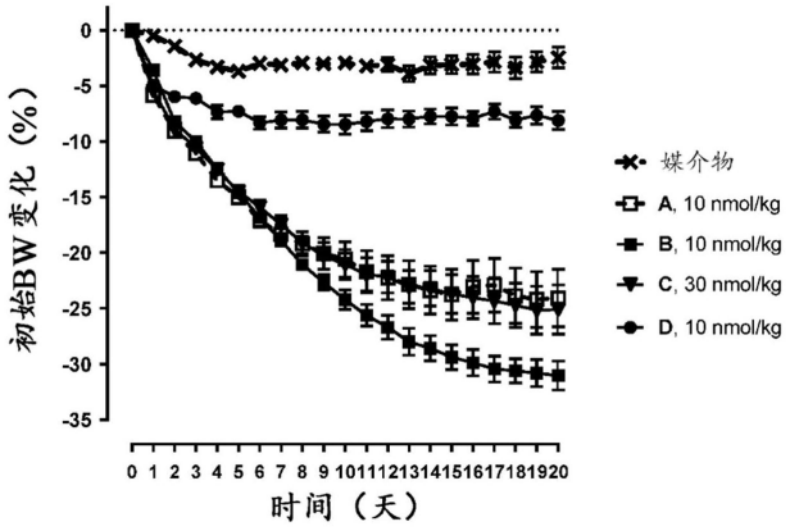

初始BW变化（%）
时间（天）
媒介物
A, 10 nmol/kg
B, 10 nmol/kg
C, 30 nmol/kg
D, 10 nmol/kg

图11C

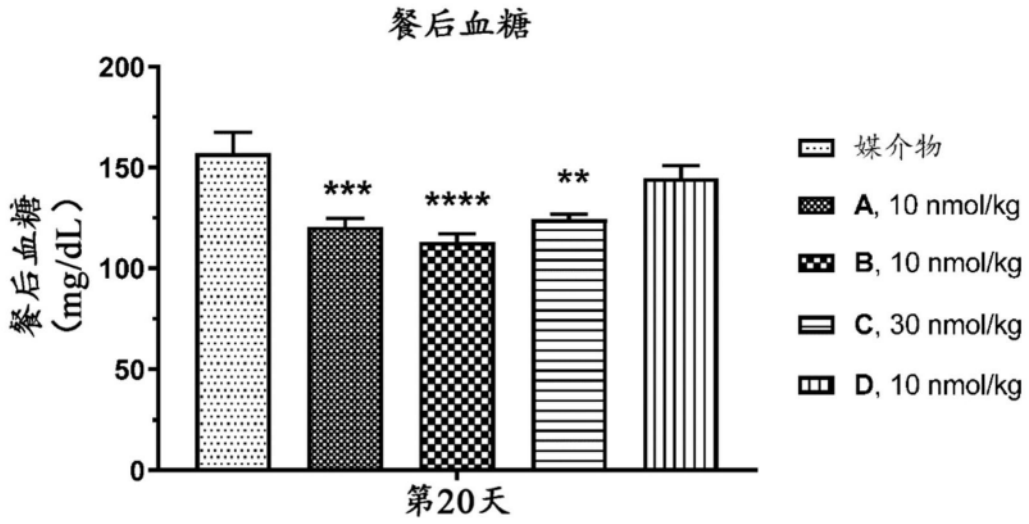

餐后血糖
200
150
100
50
0
餐后血糖
(mg/dL)
***
****
**
第20天
媒介物
A, 10 nmol/kg
B, 10 nmol/kg
C, 30 nmol/kg
D, 10 nmol/kg

图11D

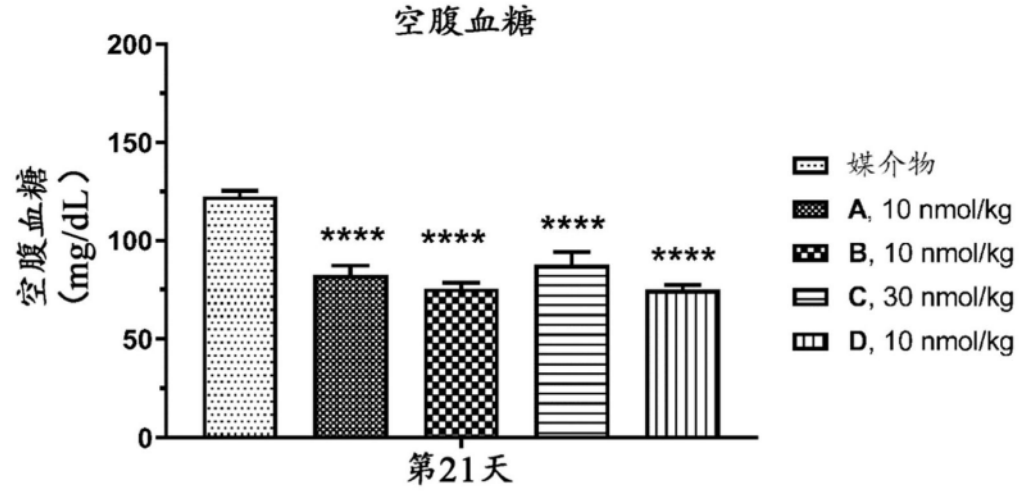

空腹血糖
200
150
100
50
0
空腹血糖
(mg/dL)
****
****
****
****
第21天
媒介物
A, 10 nmol/kg
B, 10 nmol/kg
C, 30 nmol/kg
D, 10 nmol/kg

图11E

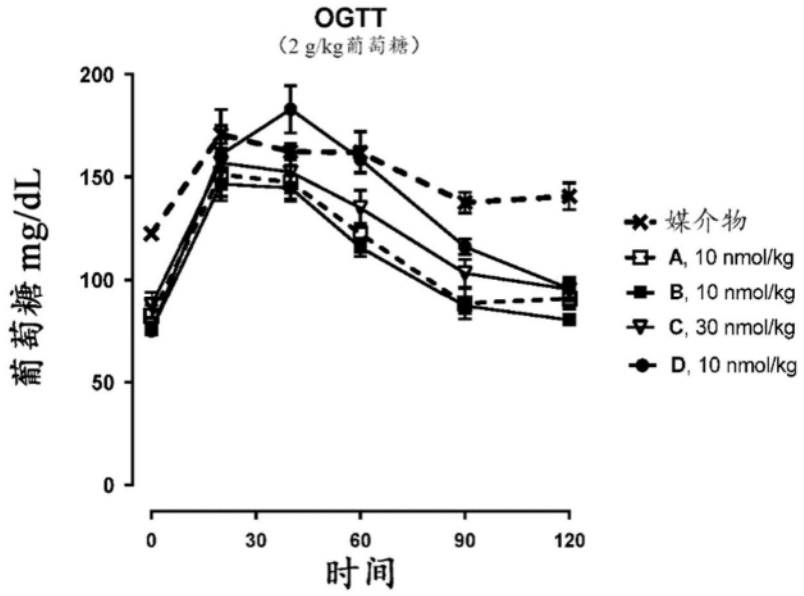

OGTT
（2 g/kg葡萄糖）
葡萄糖 mg/dL
200
150
100
50
0
0
30
60
90
120
时间
媒介物
A, 10 nmol/kg
B, 10 nmol/kg
C, 30 nmol/kg
D, 10 nmol/kg

图11F

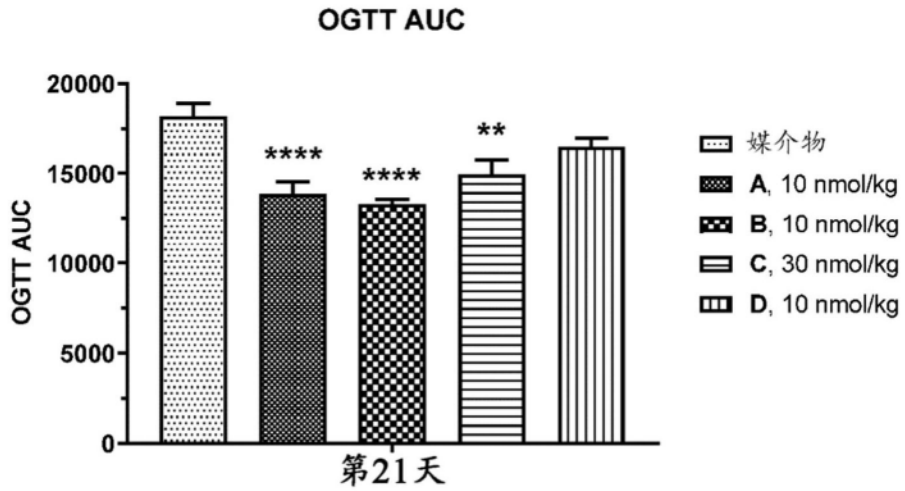

OGTT AUC
OGTT AUC
20000
15000
10000
5000
0
****
****
**
第21天
媒介物
A, 10 nmol/kg
B, 10 nmol/kg
C, 30 nmol/kg
D, 10 nmol/kg

图11G

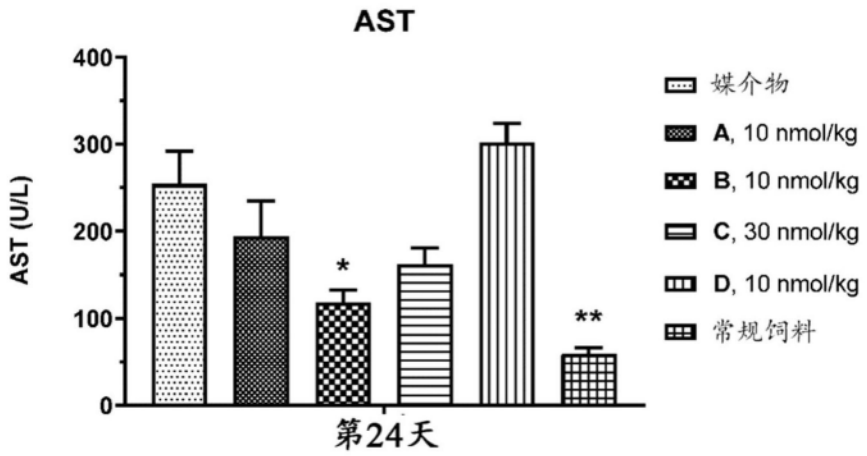

AST
AST (U/L)
400
300
200
100
0
*
**
第24天
媒介物
A, 10 nmol/kg
B, 10 nmol/kg
C, 30 nmol/kg
D, 10 nmol/kg
常规饲料

图11H

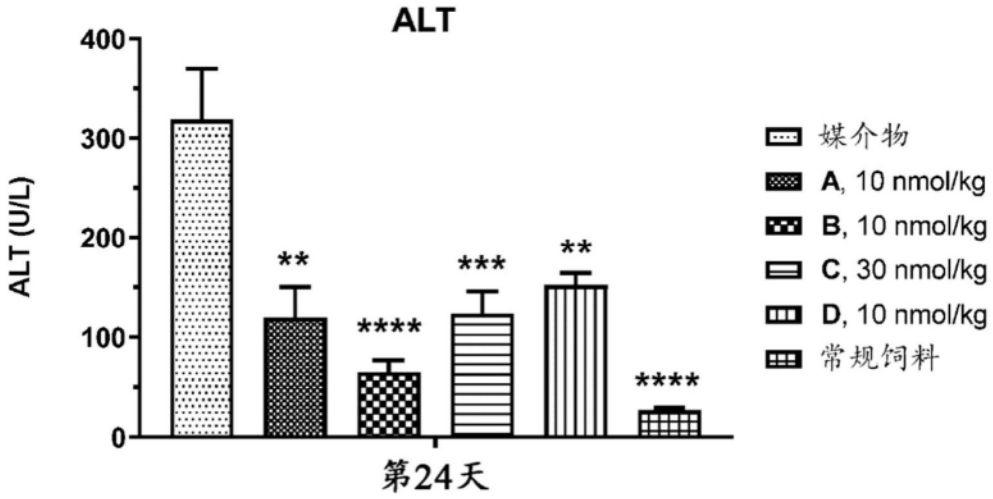

ALT
ALT (U/L)
400
300
200
100
0
**
****
***
**
****
第24天
媒介物
A, 10 nmol/kg
B, 10 nmol/kg
C, 30 nmol/kg
D, 10 nmol/kg
常规饲料

图11I

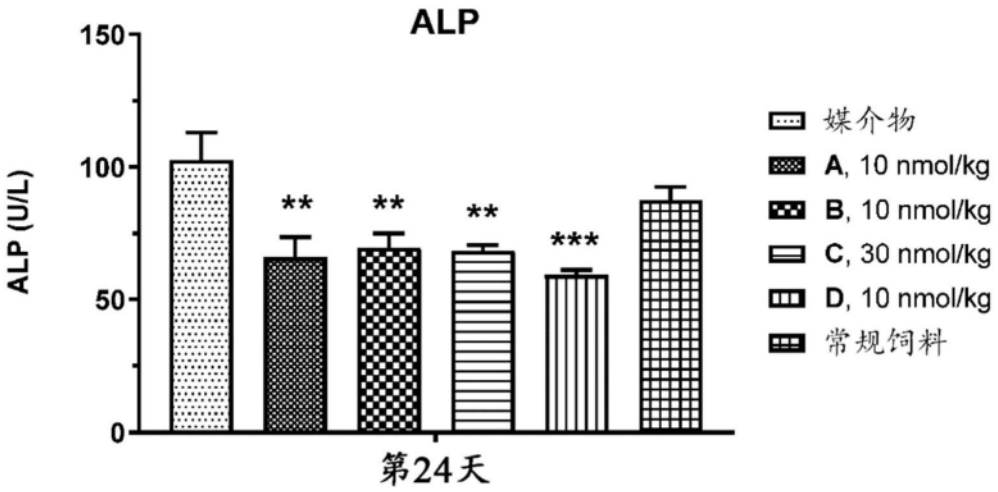

ALP
ALP (U/L)
150
100
50
0
**
**
**
***
第24天
媒介物
A, 10 nmol/kg
B, 10 nmol/kg
C, 30 nmol/kg
D, 10 nmol/kg
常规饲料

图11J

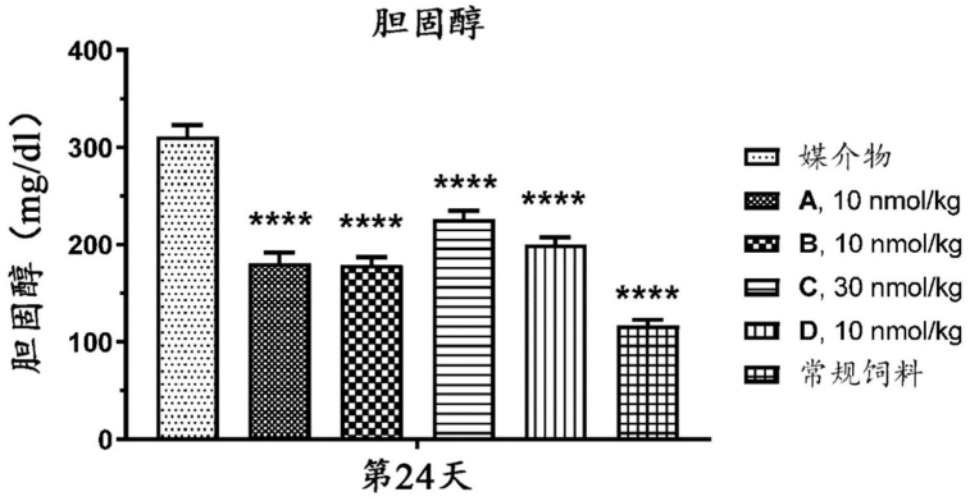

胆固醇
胆固醇（mg/dl）
400
300
200
100
0
****
****
****
****
****
第24天
媒介物
A, 10 nmol/kg
B, 10 nmol/kg
C, 30 nmol/kg
D, 10 nmol/kg
常规饲料

图11K

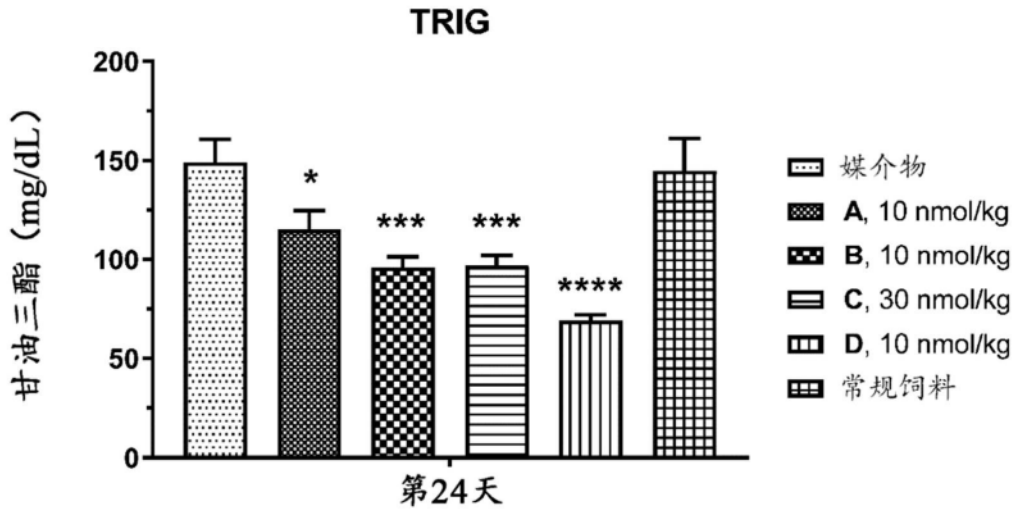

TRIG
甘油三酯（mg/dL）
200
150
100
50
0
*
***
***
****
第24天
媒介物
A, 10 nmol/kg
B, 10 nmol/kg
C, 30 nmol/kg
D, 10 nmol/kg
常规饲料

图11L

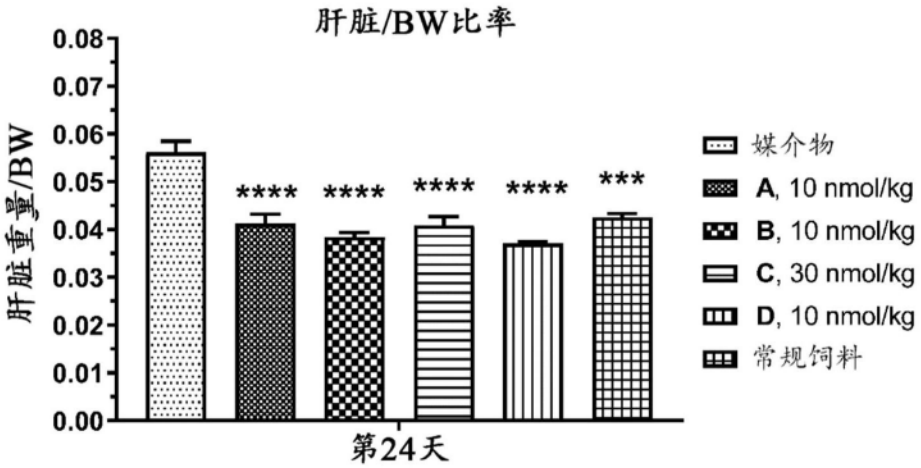

肝脏/BW比率
肝脏重量/BW
0.08
0.07
0.06
0.05
0.04
0.03
0.02
0.01
0.00
****
****
****
****
***
第24天
媒介物
A, 10 nmol/kg
B, 10 nmol/kg
C, 30 nmol/kg
D, 10 nmol/kg
常规饲料

图11M

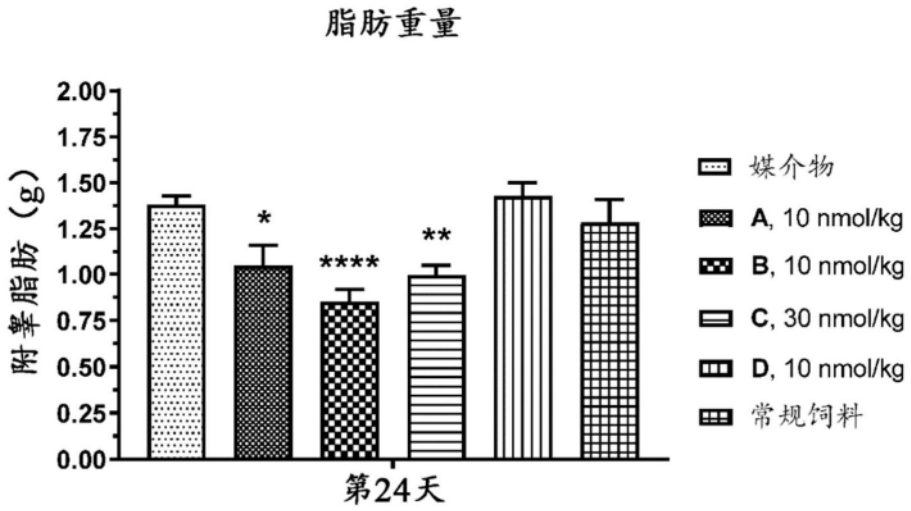

脂肪重量
附睾脂肪（g）
2.00
1.75
1.50
1.25
1.00
0.75
0.50
0.25
0.00
*
****
**
第24天
媒介物
A, 10 nmol/kg
B, 10 nmol/kg
C, 30 nmol/kg
D, 10 nmol/kg
常规饲料

图11N

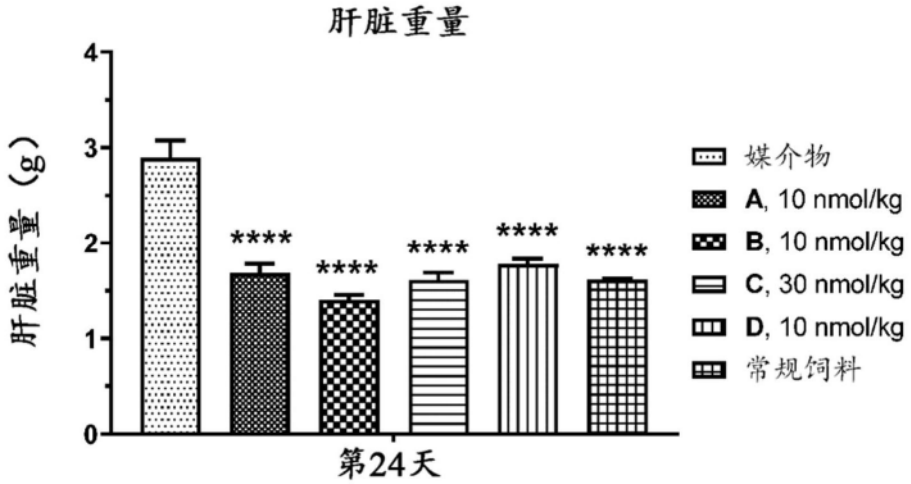

肝脏重量
肝脏重量（g）
4
3
2
1
0
****
****
****
****
****
第24天
媒介物
A, 10 nmol/kg
B, 10 nmol/kg
C, 30 nmol/kg
D, 10 nmol/kg
常规饲料

图110

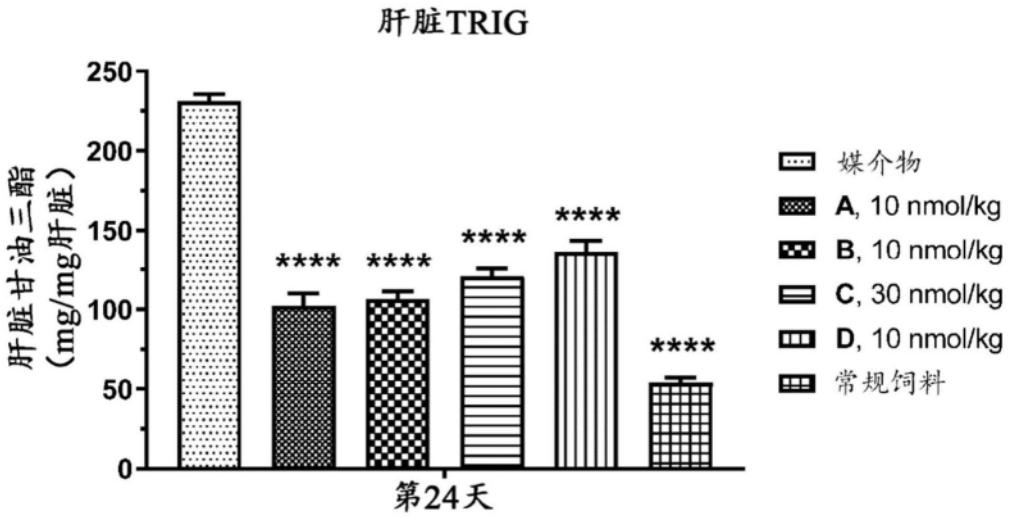

肝脏TRIG
肝脏甘油三酯
(mg/mg肝脏)
250
200
150
100
50
0
****
****
****
****
第24天
媒介物
A, 10 nmol/kg
B, 10 nmol/kg
C, 30 nmol/kg
D, 10 nmol/kg
常规饲料

图11P

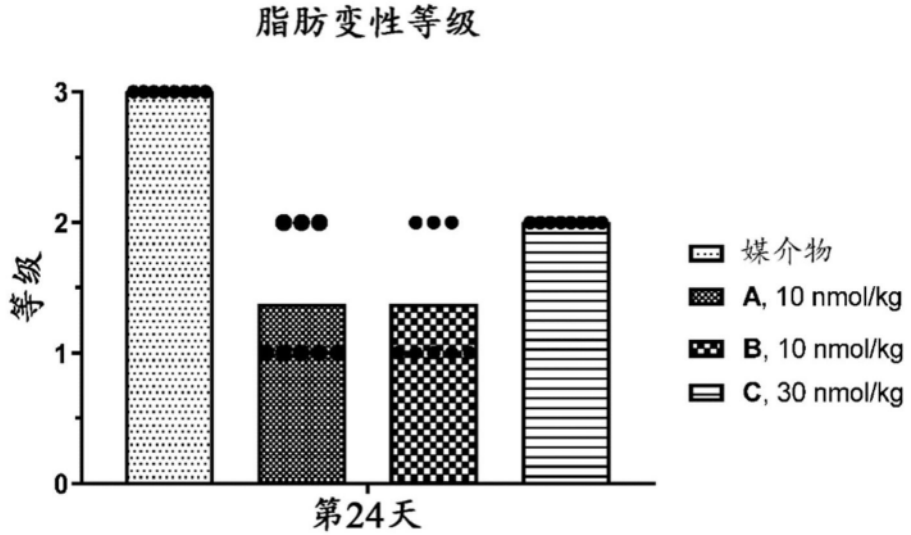

脂肪变性等级
等级
3
2
1
0
第24天
媒介物
A, 10 nmol/kg
B, 10 nmol/kg
C, 30 nmol/kg

图11Q

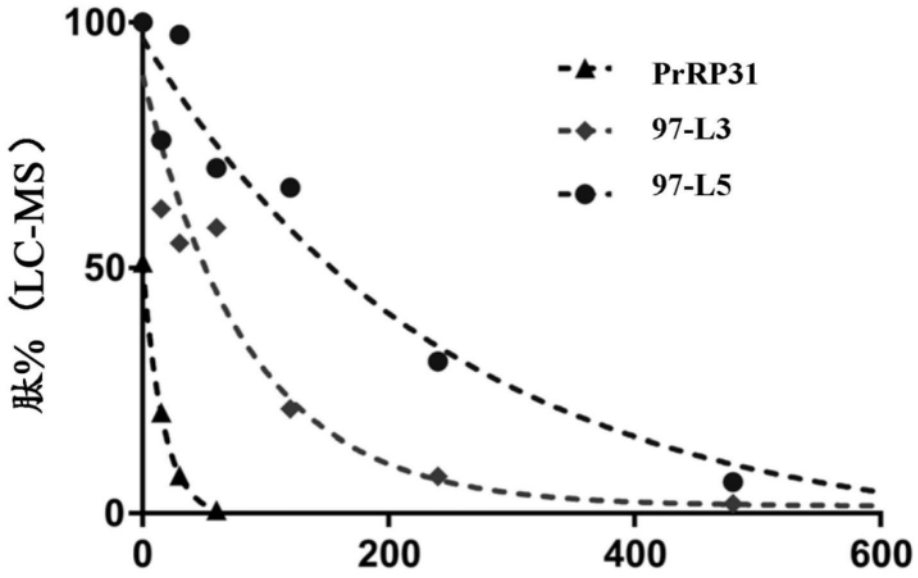

100
50
0
肽%（LC-MS）
0
200
400
600
PrRP31
97-L3
97-L5

图12

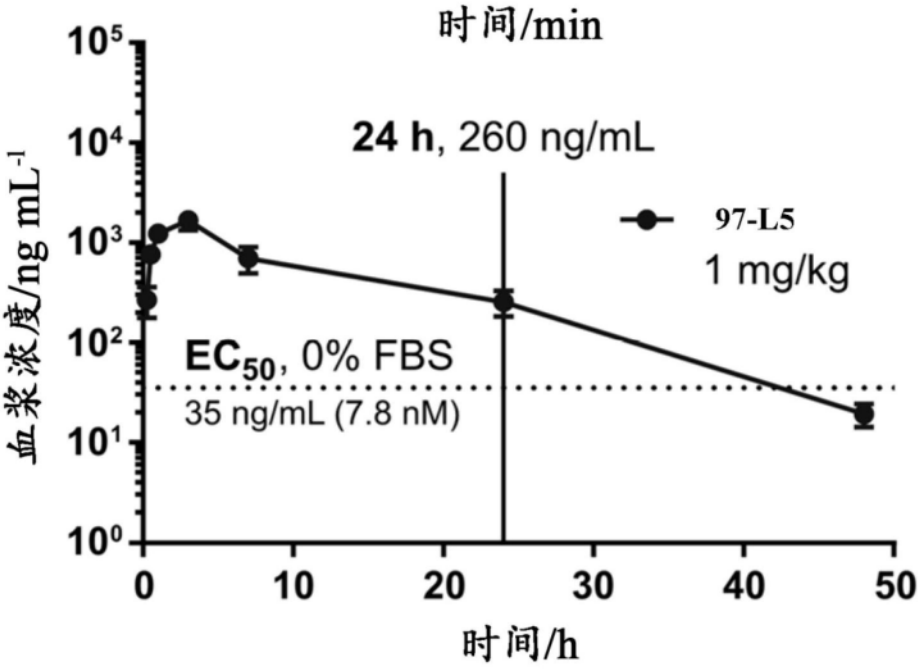

时间/min
10^5
10^4
10^3
10^2
10^1
10^0
血浆浓度/ng mL^{-1}
24 h, 260 ng/mL
97-L5
1 mg/kg
EC_{50}, 0% FBS
35 ng/mL (7.8 nM)
0
10
20
30
40
50
时间/h

图13

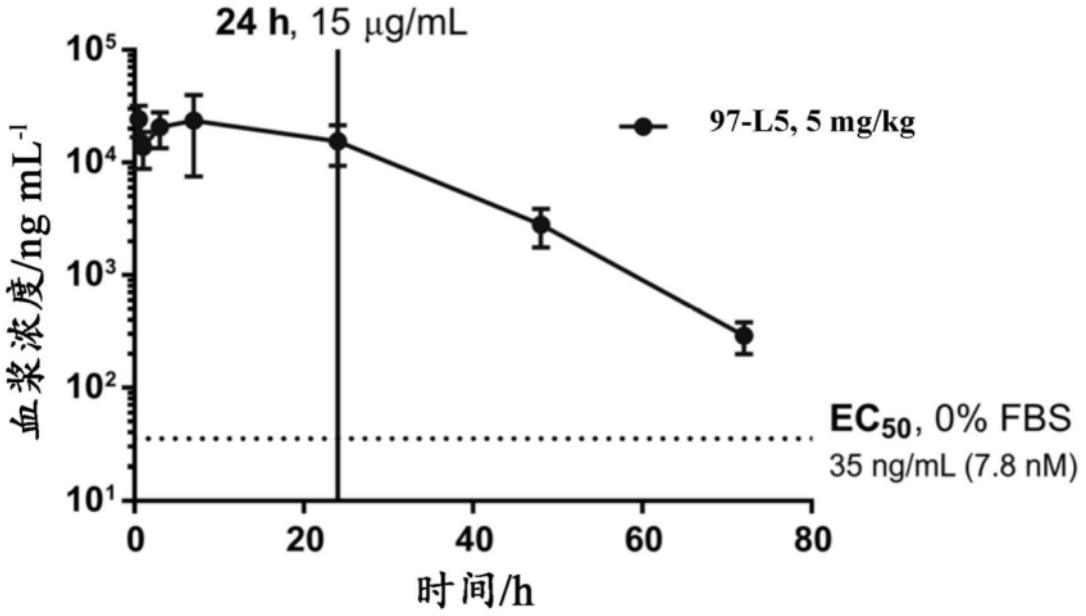

24 h, 15 μg/mL
97-L5, 5 mg/kg
血浆浓度/ng mL-1
EC50, 0% FBS
35 ng/mL (7.8 nM)
时间/h

图14

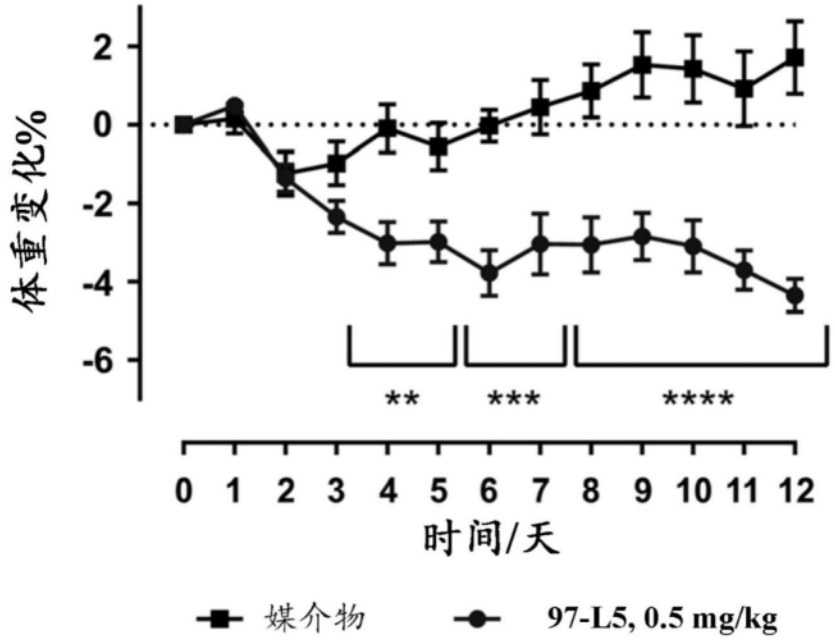

体重变化%
**
***
****
时间/天
媒介物
97-L5, 0.5 mg/kg

图15

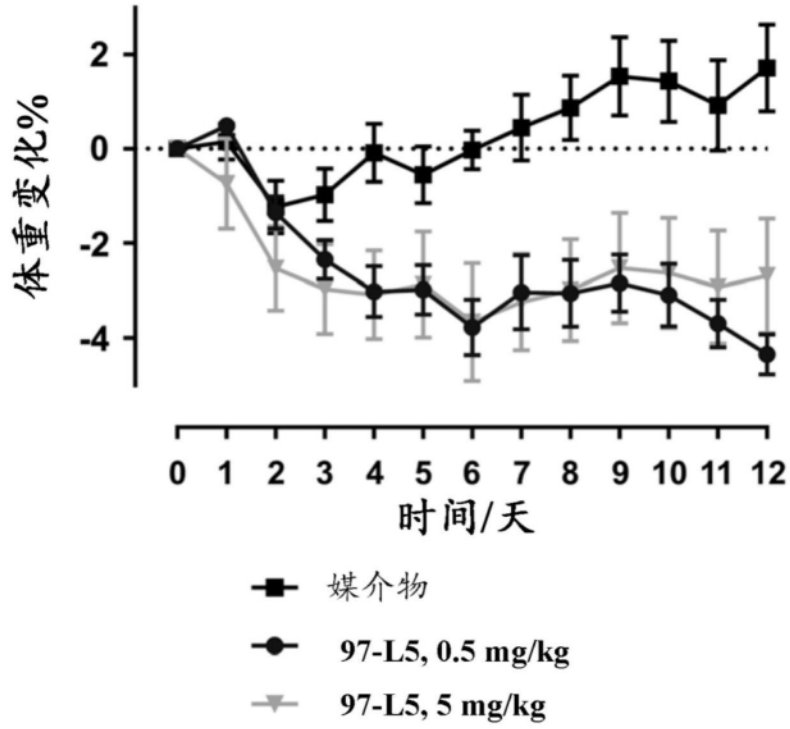

体重变化%
2
0
-2
-4
0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12
时间/天
媒介物
97-L5, 0.5 mg/kg
97-L5, 5 mg/kg

图16

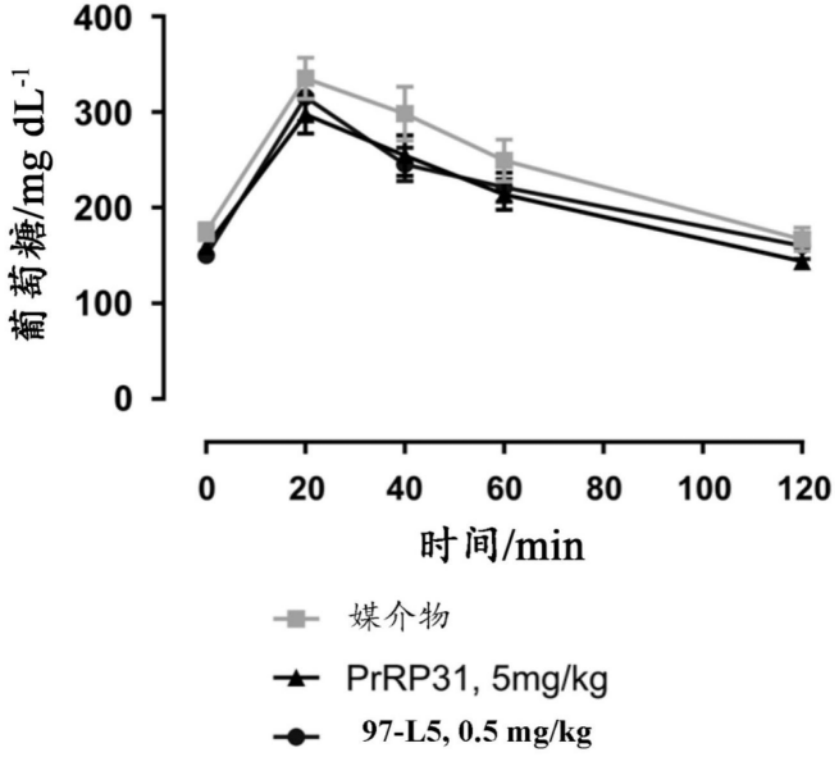

葡萄糖/mg dL-1
400
300
200
100
0
0 20 40 60 80 100 120
时间/min
媒介物
PrRP31, 5mg/kg
97-L5, 0.5 mg/kg

图17

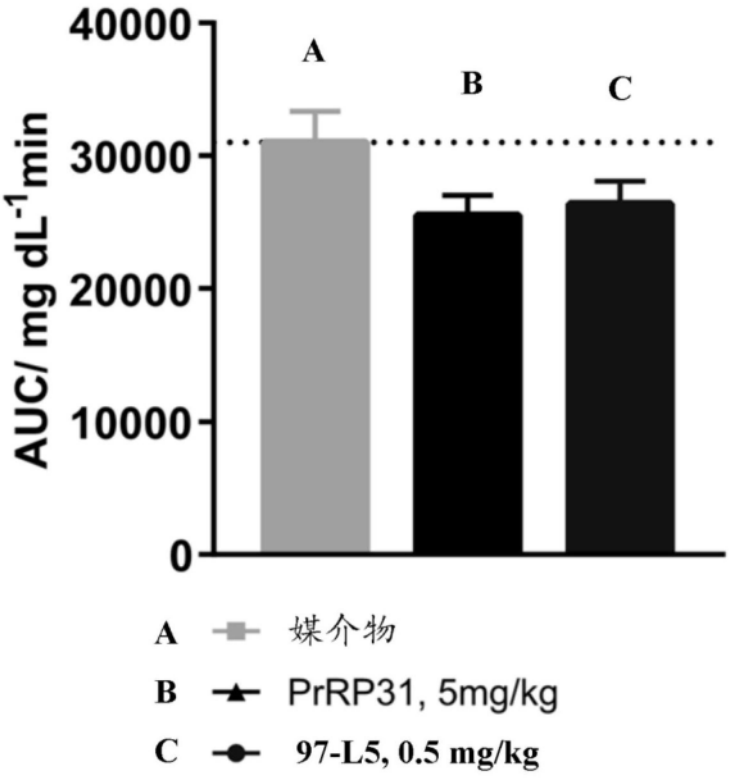

40000
30000
20000
10000
0
AUC/ mg dL-1min
A
B
C
A 媒介物
B PrRP31, 5mg/kg
C 97-L5, 0.5 mg/kg

图18