



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102123723 A

(43) 申请公布日 2011. 07. 13

(21) 申请号 200980132562. 9

J · 帕特森 B · C · 瓦德

(22) 申请日 2009. 06. 16

(74) 专利代理机构 中国专利代理 (香港) 有限公司 72001

(30) 优先权数据

61/073269 2008. 06. 17 US

61/078168 2008. 07. 03 US

61/090412 2008. 08. 20 US

61/177476 2009. 05. 12 US

代理人 李进 李连涛

(51) Int. Cl.

A61K 38/00 (2006. 01)

(85) PCT申请进入国家阶段日

2011. 02. 17

(86) PCT申请的申请数据

PCT/US2009/047438 2009. 06. 16

(87) PCT申请的公布数据

W02009/155258 EN 2009. 12. 23

(71) 申请人 印第安纳大学研究及科技有限公司

地址 美国印第安纳州

(72) 发明人 R · D · 迪马奇 D · L · 斯米莱

M · 迪马奇 J · 查本内 J · 戴

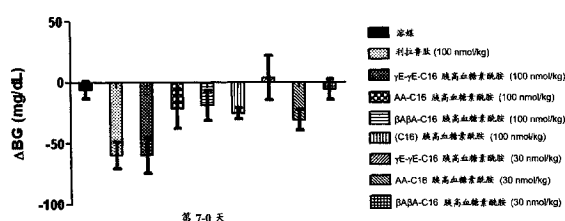
权利要求书 7 页 说明书 116 页 附图 49 页

(54) 发明名称

胰高血糖素 /GLP-1 受体共激动剂

(57) 摘要

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



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

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

3. 权利要求 1 或 2 的胰高血糖素肽,其包含 16 位 Glu 和 20 位 Lys,其中任选内酰胺桥连接所述 Glu 和 Lys。

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

5. 权利要求 1-4 中任一项的胰高血糖素肽,其包含 C-末端酰胺。

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

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

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

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

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

11. 权利要求 10 的胰高血糖素肽,其中所述被修饰的胰高血糖素肽包含 SEQ ID NO:55。

12. 权利要求 10 的胰高血糖素肽,其中所述被修饰的胰高血糖素肽包含 SEQ ID NO:56。

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

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

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

16. 权利要求 15 的胰高血糖素肽,其中所述内酰胺桥在 16 和 20 位氨基酸之间。

17. 权利要求 10 的胰高血糖素肽,其中在 10 位被修饰的胰高血糖素肽包含 SEQ ID NO:33。

18. 权利要求 10 的胰高血糖素肽,其中所述 28 位氨基酸为 Asp、Asn 或 Lys,所述 29 位氨基酸为 Gly 或 Thr。

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

20. 权利要求 10 的胰高血糖素肽,其中在 10 位被修饰的胰高血糖素肽包含以 1 个氨基酸不同于 SEQ ID NO :55 的 SEQ ID NO :55 类似物。

21. 权利要求 20 的胰高血糖素肽,其中在 10 位被修饰的胰高血糖素肽包含序列 SEQ ID NO :53。

22. 权利要求 21 的胰高血糖素肽,其中 3 位氨基酸为谷氨酰胺。

23. 权利要求 10 的胰高血糖素肽,其中 3 位氨基酸为谷氨酸。

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

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

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

27. 权利要求 10-21 和 23 中任一项的胰高血糖素肽,其表现出天然胰高血糖素针对胰高血糖素受体活性的 0.1-10%,和天然 GLP-1 针对 GLP-1 受体活性的至少 20%。

28. 权利要求 10-21 和 23 中任一项的胰高血糖素肽,其表现出天然胰高血糖素针对胰高血糖素受体活性的 1-10%,和天然 GLP-1 针对 GLP-1 受体活性的至少 20%。

29. 权利要求 10-28 中任一项的胰高血糖素肽,其中 16 位氨基酸为谷氨酸,20 位氨基酸为赖氨酸,C-末端羧酸基团被酰胺取代,任选在所述 16 位谷氨酸和 20 位赖氨酸之间具有内酰胺桥。

30. 权利要求 29 的胰高血糖素肽,其中聚乙二醇链与 17、21 或 24 位氨基酸或 C-末端氨基酸的侧链共价连接。

31. 权利要求 29 的胰高血糖素肽,其中 28 或 29 位氨基酸包括酸性氨基酸。

32. 权利要求 10、14、17、29、30 和 41 中任一项的胰高血糖素肽,其中修饰 1 或 2 位氨基酸以使对二肽基肽酶 IV 裂解表现出降低的敏感性。

33. 权利要求 10 的胰高血糖素肽,其中在 10 位被修饰的胰高血糖素肽包含序列 $X_1X_2QGTFTSDY SKYLD ERX_5AK DFX_3W LMNX_4$ (SEQ ID NO :61) 或 $X_1X_2QGTFTSDY SKYLD EQ X_5AK EFI X_3W LMNX_4$ (SEQ ID NO :62),前提为当 X_3 为 Cys-PEG 时, X_4 不是 Cys-PEG 或 GGPSSGAPPPSC-PEG,并且当 X_2 为丝氨酸时, X_1 不是组氨酸。

34. 权利要求 33 的胰高血糖素肽,其中 X_3 为 Cys-PEG。

35. 权利要求 34 的胰高血糖素肽,其中 X_4 为 GGPSSGAPPPS。

36. 权利要求 33 的胰高血糖素肽,其中 X_4 为 GGPSSGAPPPSC-PEG。

37. 权利要求 33-36 中任一项的胰高血糖素肽,其进一步包含 16 和 20 位氨基酸之间的内酰胺桥。

38. 权利要求 10 的胰高血糖素肽,其中在 10 位被修饰的胰高血糖素肽包含序列

$NH_2-His-Ser-Gln-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Lys-Tyr-Leu-Asp-Glu-Arg-A$

rg-Ala-Gln-Asp-Phe-Val-Gln-Trp-Leu-Xaa-Asn-Thr-COOH(SEQ ID NO :9), 其中 Xaa 选自 Met、Leu 和 Nle。

39. 权利要求 10 的胰高血糖素肽, 其中在 10 位被修饰的胰高血糖素肽包含选自 SEQ ID NO :40、SEQ ID NO :41、SEQ ID NO :42、SEQ ID NO :43 和 SEQ ID NO :44 的序列。

40. 权利要求 10 的胰高血糖素肽, 其中在 10 位被修饰的胰高血糖素肽包含选自 SEQ ID NO :12、SEQ ID NO :13、SEQ ID NO :14 和 SEQ ID NO :15 的序列。

41. 权利要求 32 的胰高血糖素肽, 其中 2 位氨基酸选自 D- 丝氨酸、丙氨酸、D- 丙氨酸、缬氨酸、甘氨酸、N- 甲基丝氨酸、N- 甲基丙氨酸和氨基异丁酸。

42. 权利要求 32 的胰高血糖素肽, 其中 1 位氨基酸选自 D- 组氨酸、去氨基组氨酸、羟基 - 组氨酸、乙酰基 - 组氨酸、高组氨酸、N- 甲基组氨酸、 α - 甲基组氨酸、咪唑乙酸和 α , α - 二甲基咪唑乙酸 (DMIA)。

43. 权利要求 10-32 中任一项的胰高血糖素肽, 其进一步包含在所述胰高血糖素肽的 17、21 或 24 位或 C- 末端氨基酸共价键合的亲水部分。

44. 权利要求 43 的胰高血糖素肽, 其中所述亲水部分为聚乙二醇链。

45. 权利要求 10 或 40 的胰高血糖素肽, 其中所述胰高血糖素肽进一步包含选自 SEQ ID NO :26、SEQ ID NO :27、SEQ ID NO :28 和 SEQ ID NO :65 的序列。

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

47. 权利要求 46 的胰高血糖素肽, 其中在 10 位被修饰的胰高血糖素肽包含序列 SEQ ID NO :64。

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

49. 权利要求 10 的胰高血糖素肽, 其中在 10 位被修饰的胰高血糖素肽包含选自以下的序列:

SEQ ID NO :10、SEQ ID NO :11、

NH₂-His-Ser-Gln-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Lys-Tyr-Leu-Asp-Glu-Arg-Arg-Ala-Gln-Asp-Phe-Val-Gln-Trp-Leu-Met-Xaa-Xaa-R(SEQ ID NO :66)、

NH₂-His-Ser-Gln-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Lys-Tyr-Leu-Asp-Glu-Arg-Arg-Ala-Lys-Asp-Phe-Val-Gln-Trp-Leu-Met-Xaa-Xaa-R(SEQ ID NO :67)、

NH₂-His-Ser-Gln-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Lys-Tyr-Leu-Asp-Ser-Arg-Arg-Ala-Lys-Asp-Phe-Val-Glu-Trp-Leu-Met-Xaa-Xaa-R(SEQ ID NO :68)、

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

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

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

NH₂-His-Ser-Gln-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Lys-Tyr-Leu-Asp-Glu-Arg-A

rg-Ala-Lys-Asp-Phe-Val-Glu-Trp-Leu-Met-Lys-Thr-R(SEQ ID NO:18) 和 SEQ ID NO:55, 其中所述肽的 28 位 Xaa 为天冬酰胺或天冬氨酸;所述肽的 29 位 Xaa 为苏氨酸或甘氨酸;和 R 为 SEQ ID NO:26、SEQ ID NO:29、COOH 或 CONH₂。

50. 权利要求 49 的胰高血糖素肽,其中 R 为 CONH₂。

51. 权利要求 49 的胰高血糖素肽,其中在 10 位被修饰的胰高血糖素肽包含序列 SEQ ID NO:10。

52. 权利要求 49 的胰高血糖素肽,其中在 10 位被修饰的胰高血糖素肽包含序列 SEQ ID NO:11。

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

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

55. 权利要求 53 的胰高血糖素肽,其中所述聚乙二醇链具有约 40,000 道尔顿的分子量。

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

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

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

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

NH₂-His-Ser-Gln-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Lys-Tyr-Leu-Asp-Xaa-Xaa-Arg-Ala-Gln-Asp-Phe-Val-Gln-Trp-Leu-Xaa-Asn-Thr-R(SEQ ID NO:2);

NH₂-His-Ser-Gln-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Lys-Tyr-Leu-Asp-Xaa-Arg-Arg-Ala-Gln-Xaa-Phe-Val-Gln-Trp-Leu-Xaa-Asn-Thr-R(SEQ ID NO:3);或

NH₂-His-Ser-Gln-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Lys-Tyr-Leu-Asp-Xaa-Arg-Arg-Ala-Gln-Asp-Phe-Val-Xaa-Trp-Leu-Xaa-Asn-Thr-R(SEQ ID NO:4);

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

60. 权利要求 59 的胰高血糖素肽,其中 R 为 CONH₂,并且所述亲水部分为聚乙二醇链。

61. 权利要求 60 的胰高血糖素肽,其中在 10 位被修饰的胰高血糖素肽包含选自 SEQ ID NO:23、SEQ ID NO:24 和 SEQ ID NO:25 的序列。

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

63. 权利要求 61 的胰高血糖素肽,其中所述聚乙二醇链具有至少约 20,000 道尔顿的分子量。

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

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

66. 权利要求 1-65 中任一项的胰高血糖素肽,其中所述胰高血糖素肽的 10 位氨基酸为式 I、式 II 或式 III 氨基酸。

67. 权利要求 66 的胰高血糖素肽,其中所述式 I 氨基酸为 Lys。

68. 权利要求 1-67 中任一项的胰高血糖素肽,其中所述酰基为 C8-C24 脂肪酸。

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

70. 权利要求 69 的胰高血糖素肽,其中所述间隔物长度为 3-10 个原子。

71. 权利要求 70 的胰高血糖素肽,其中所述间隔物为氨基酸或二肽。

72. 权利要求 71 的胰高血糖素肽,其中所述间隔物选自以下氨基酸:Trp、Asp 和 Cys。

73. 权利要求 71 的胰高血糖素肽,其中所述间隔物为氨基酸 Glu。

74. 权利要求 71 的胰高血糖素肽,其中所述间隔物为 6-氨基己酸。

75. 权利要求 71 的胰高血糖素肽,其中所述间隔物为选自以下的二肽:Ala-Ala、 β -Ala- β -Ala、Leu-Leu、Pro-Pro 和 γ -Glu- γ -Glu。

76. 权利要求 69-75 中任一项的胰高血糖素肽,其中所述间隔物和所述酰基或烷基的总长为约 14-约 28 个原子。

77. 权利要求 76 的胰高血糖素肽,其中所述酰基为 C12-C18 脂肪酰基。

78. 权利要求 77 的胰高血糖素肽,其中所述酰基为 C14 或 C16。

79. 权利要求 1-78 中任一项的胰高血糖素肽,其中所述胰高血糖素肽包含亲水部分。

80. 权利要求 79 的胰高血糖素肽,其中所述亲水部分为 PEG。

81. 权利要求 1-80 中任一项的胰高血糖素肽,其中所述胰高血糖素肽包含两个酰基。

82. 以不超过 10 个氨基酸修饰不同于 SEQ ID NO:1 的非天然胰高血糖素肽,所述非天然胰高血糖素肽包含 AIB 在 16、20、21 和 / 或 24 位中的一个或多个氨基酸取代,其中所述胰高血糖素肽表现出天然 GLP-1 针对 GLP-1 受体活性的至少 20%。

83. 权利要求 82 的胰高血糖素肽,其包含使对二肽基肽酶 IV 裂解的敏感性降低的 1 位和 / 或 2 位氨基酸修饰。

84. 权利要求 82 或 83 的胰高血糖素肽,其包含取代 C-末端羧酸酯的酰胺。

85. 权利要求 82-84 中任一项的胰高血糖素肽,其包含 16 位 AIB。

86. 权利要求 82-85 中任一项的胰高血糖素肽,其包含 2 位 AIB。

87. 权利要求 82-86 中任一项的胰高血糖素肽,其包含 20 位 AIB。

88. 权利要求 82-87 中任一项的胰高血糖素肽,其包含与胰高血糖素肽的 10 位氨基酸共价连接的酰基或烷基。

89. 权利要求 88 的胰高血糖素肽,其中所述酰基或烷基对天然存在的氨基酸为非天然的。

90. 权利要求 88 或 89 的胰高血糖素肽,其中胰高血糖素肽的 10 位氨基酸为式 I、式 II 或式 III 氨基酸。

91. 权利要求 90 的胰高血糖素肽,其中所述式 I 氨基酸为 Lys。

92. 权利要求 88 的胰高血糖素肽,其中所述酰基为 C8-C20 脂肪酸。

93. 权利要求 88-92 中任一项的胰高血糖素肽,其进一步包含 10 位氨基酸和所述酰基或烷基之间的间隔物。

94. 权利要求 93 的胰高血糖素肽,其中所述间隔物长度为 3-10 个原子。

95. 权利要求 94 的胰高血糖素肽,其中所述间隔物为氨基酸或二肽。

96. 权利要求 95 的胰高血糖素肽,其中所述间隔物为 6-氨基己酸。

97. 权利要求 95 的胰高血糖素肽,其中所述间隔物为选自以下的二肽:Ala-Ala、 β -Ala- β -Ala、Leu-Leu、Pro-Pro 和 γ -Glu- γ -Glu。

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

99. 权利要求 98 的胰高血糖素肽,其中所述酰基为 C12-C18 脂肪酸。

100. 权利要求 99 的胰高血糖素肽,其中所述酰基为 C14 或 C16。

101. 权利要求 82-100 中任一项的胰高血糖素肽,其包含亲水部分。

102. 权利要求 101 的胰高血糖素肽,其中所述亲水部分为聚乙二醇 (PEG)。

103. 权利要求 101 或 102 的胰高血糖素肽,其中所述亲水部分与 24 位 Cys 连接。

104. 前述权利要求中任一项的胰高血糖素肽,其中当所述胰高血糖素肽包含 PEG 时,所述 PEG 经由硫醚连接与所述胰高血糖素肽的 Cys 连接,所述硫醚连接通过让所述胰高血糖素肽与卤代乙酰基-活化的 PEG 反应来形成。

105. 前述权利要求中任一项的胰高血糖素肽,其中当所述胰高血糖素肽缺乏亲水部分时,所述胰高血糖素肽表现出天然 GLP-1 针对 GLP-1 受体活性的至少 20%。

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

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

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

109. 包含两个胰高血糖素肽的二聚体,其中至少一个胰高血糖素肽为权利要求 1-108 中任一项的胰高血糖素肽,它们通过接头彼此结合。

110. 包含权利要求 1-108 中任一项的胰高血糖素肽、权利要求 109 的二聚体或其可药用盐与可药用载体的药物组合物。

111. 用预制水性组合物治疗低血糖症的方法,所述方法包括给予有效量的权利要求 110 的药物组合物的步骤。

112. 治疗糖尿病的方法,所述方法包括给予有效量的权利要求 110 的药物组合物。

113. 引起肠道临时麻痹的方法,所述方法包括给予有效量的权利要求 110 的药物组合

物。

114. 减少增重或诱导减重的方法,所述方法包括给予有效量的权利要求 110 的药物组合物。

胰高血糖素 /GLP-1 受体共激动剂

[0001] 相关申请的交叉引用

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

[0003] 背景

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

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

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

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

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

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

压、血脂过多症、心血管病和肌骨病的风险。

[0010] 因此,仍需要备选及优选的用于治疗糖尿病和肥胖症的改进的方法。

[0011] 概述

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

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

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

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

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

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

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

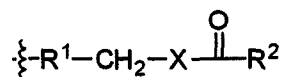
[0018] 可通过 3 位氨基酸修饰来降低、保持或提高胰高血糖素受体活性, 例如取代 3 位天然存在的谷氨酰胺。在一个实施方案中, 用酸性、碱性或疏水氨基酸 (谷氨酸、鸟氨酸、正亮氨酸) 取代 3 位氨基酸显示大大降低或破坏胰高血糖素受体活性。用例如谷氨酸、鸟氨酸或正亮氨酸取代的类似物具有天然胰高血糖素针对胰高血糖素受体活性的约 10% 或更小, 例如约 1-10% 或约 0.1-10% 或大于约 0.1% 但小于约 10%, 同时表现出 GLP-1 针对 GLP-1 受体活性的至少 20%。例如, 本文所述例示性类似物具有约 0.5%、约 1% 或约 7% 的天然胰高血糖素活性, 同时表现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

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

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

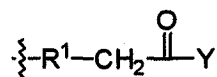
[0020] 在某些实施方案中，谷氨酰胺类似物为天然存在的或非天然存在的氨基酸，所述氨基酸包含结构 I、II 或 III 侧链：

[0021]



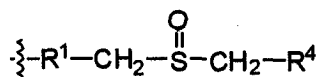
[0022] 结构 I

[0023]



[0024] 结构 II

[0025]



[0026] 结构 III

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

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

共激动剂,其中所述肽包含序列 SEQ ID NO:20,其中 28 位氨基酸为 Asn 或 Lys,29 位氨基酸为 Thr- 酰胺。

[0029] 通过稳定胰高血糖素 C-末端部分的 α -螺旋结构(大约 12-29 位氨基酸)亦提供提高的针对 GLP-1 受体的活性,所述稳定通过在由三个间插氨基酸分开的两个氨基酸(即“i”位氨基酸和“i+4”位氨基酸,其中 i 为 12 和 25 之间的任何整数)侧链之间、在由两个间插氨基酸分开的两个氨基酸(即“j”位氨基酸和“j+3”位氨基酸,其中 j 为 12 和 27 之间的任何整数)侧链之间、或在由六个间插氨基酸分开的两个氨基酸(即“k”位氨基酸和“k+7”位氨基酸,其中 k 为 12 和 22 之间的任何整数)侧链之间,形成分子内桥来实现。在例示性实施方案中,所述桥或接头长度为约 8(或约 7-9)个原子,并在 12 和 16 位或 16 和 20 位或 20 和 24 位或 24 和 28 位氨基酸侧链之间形成。这些氨基酸侧链可通过非共价键例如氢键或离子相互作用例如形成盐桥或通过共价键互相连接。

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

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

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

代。

[0033] 通过将酰基或烷基添加到肽的 10 位氨基酸的侧链,来提供缺乏分子内桥(例如共价分子内桥)的胰高血糖素类似物肽的针对 GLP-1 和胰高血糖素受体的活性。在某些方面,所述酰基或烷基并非天然存在于氨基酸上。在特定方面,所述酰基或烷基对任何天然存在的氨基酸为非天然的。在某些实施方案中,酰基为脂肪酰基,例如 C4-C30 脂肪酰基。例如,本文提供的缺乏共价分子内桥的胰高血糖素类似物肽包含 16 位 AIB 和共价连接到 10 位 Lys 残基的 C14、C16 或 C18 脂肪酰基。亦提供包含 2 和 16 位 AIB 和共价连接到 10 位 Lys 残基的 C14、C16 或 C18 脂肪酰基的缺乏分子内桥(例如共价分子内桥)的胰高血糖素类似物肽。所述缺乏分子内桥(例如共价分子内桥)的酰化的胰高血糖素类似物肽可被聚乙二醇化,其如本文进一步所述。

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

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

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

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

为 12 位氨基酸不是 Arg ;或任选前提为 9 位氨基酸不是 Glu。

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

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

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

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

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

[0043] 在另一实施方案中, 可通过氨基酸取代和 / 或添加来改进任何前述胰高血糖素类似物的溶解性, 所述氨基酸取代和 / 或添加将带电荷的氨基酸引入到肽的 C- 末端部分, 优选在 SEQ ID NO:1 的 27 位的 C- 末端位置。任选在 C- 末端部分 (优选 27 位的 C- 末端处)

内引入一个、两个或三个带电荷的氨基酸。根据一个实施方案,28 和 / 或 29 位的天然氨基酸被带电荷的氨基酸取代,和 / 或在另一实施方案中,亦可将 1-3 个带电荷的氨基酸添加到肽的 C- 末端。在例示性实施方案中,一个、两个或所有带电荷的氨基酸为带负电荷。可对胰高血糖素肽进行使其仍保留胰高血糖素活性的另外的修饰,例如保守性取代。在一个实施方案中,提供 SEQ ID NO :20 肽的类似物,其中该类似物与 SEQ ID NO :20 的区别在于 17-26 位的 1-2 个氨基酸取代,在一个实施方案中,所述类似物与 SEQ ID NO :20 肽的区别在于 20 位的氨基酸取代。

[0044] 根据某些实施方案,通过截短 C- 末端的一个或两个氨基酸残基来修饰本文公开的胰高血糖素肽。如本文所述,所述修饰的胰高血糖素肽保留针对胰高血糖素受体和 GLP-1 受体的相似的活性和效价。在这点上,胰高血糖素肽可包含天然胰高血糖素肽 (SEQ ID NO :1) 的 1-27 或 1-28 位氨基酸,任选含本文所述的任何另外的修饰。

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

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

[0047] 因此,提供亦表现出改进溶解性和/或稳定性的本文所揭示的高效价的胰高血糖素类似物或胰高血糖素共激动剂类似物。例示性高效价胰高血糖素类似物表现出天然胰高血糖素针对胰高血糖素受体活性的至少约 200%,并任选在 pH 6 和 8 之间或 6 和 9 之间或 7 和 9 之间(例如 pH 7)以至少 1mg/mL 的浓度可溶,任选在 25°C 24 小时后保留至少 95% 的原始肽(例如 5% 或更少的原始肽被降解或裂解)。举例而言,例示性胰高血糖素共激动剂类似物表现出大于约 40% 或大于约 60% 的针对胰高血糖素受体和 GLP-1 受体(以约 1:3 和 3:1 之间的比率或约 1:2 和 2:1 之间的比率)的活性,任选在 pH 6 和 8 之间或 6 和 9 之间或 7 和 9 之间(例如 pH 7)以至少 1mg/mL 的浓度可溶,并任选在 25°C 24 小时后保留至少 95% 的原始肽。另一例示性胰高血糖素共激动剂类似物表现出约 175% 或更高的天然胰高血糖素针对胰高血糖素受体的活性和约 20% 或更小的天然 GLP-1 针对 GLP-1 受体的活性,任选在 pH 6 和 8 之间或 6 和 9 之间或 7 和 9 之间(例如 pH 7)以至少 1mg/mL 的浓度可溶,并任选在 25°C 24 小时后保留至少 95% 的原始肽。再一例示性胰高血糖素共激动剂类似物表现出约 10% 或更小的天然胰高血糖素针对胰高血糖素受体的活性和至少约 20% 的天然 GLP-1 针对 GLP-1 受体的活性,任选在 pH 6 和 8 之间或 6 和 9 之间或 7 和 9 之间(例如 pH 7)以至少 1mg/mL 的浓度可溶,并任选在 25°C 24 小时后保留至少 95% 的原始肽。再一例示性胰高血糖素共激动剂类似物表现出约 10% 或更小但高于 0.1%、0.5% 或 1% 的天然胰高血糖素针对胰高血糖素受体的活性和至少约 50%、60%、70%、80%、90% 或 100% 或更高的天然 GLP-1 针对 GLP-1 受体的活性,任选在 pH 6 和 8 之间或 6 和 9 之间或 7 和 9 之间(例如 pH 7)以至少 1mg/mL 的浓度可溶,并任选在 25°C 24 小时后保留至少 95% 的原始肽。在某些实施方案中,胰高血糖素肽表现出不大于约 100%、1000%、10,000%、100,000% 或 1,000,000% 的天然 GLP-1 针对 GLP-1 受体的活性。在某些实施方案中,所述胰高血糖素类似物在天然胰高血糖素的对应位置保留至少 22、23、24、25、26、27 或 28 个天然存在的氨基酸(例如相对于天然存在的胰高血糖素具有 1-7、1-5 或 1-3 个修饰)。

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

[0049] 根据一个实施方案,提供包含本文公开的任何新型胰高血糖素肽和可药用稀释剂、载体或赋形剂的药物组合物,所述新型胰高血糖素肽优选无菌并优选以至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98% 或 99% 的纯度水平。所述组合物可含有至少 A 浓度的胰高血糖素肽,其中 A 为 0.001mg/mL、0.01mg/mL、0.1mg/mL、0.5mg/mL、1mg/mL、2mg/mL、3mg/mL、4mg/mL、5mg/mL、6mg/mL、7mg/mL、8mg/mL、9mg/mL、10mg/mL、11mg/mL、12mg/mL、13mg/mL、14mg/mL、15mg/mL、16mg/mL、17mg/mL、18mg/mL、19mg/mL、20mg/mL、21mg/mL、

22mg/ml、23mg/ml、24mg/ml、25mg/ml 或更高。在其它实施方案中,所述组合物可含有至多 B 浓度的胰高血糖素肽,其中 B 为 30mg/ml、25mg/ml、24mg/ml、23, mg/ml、22mg/ml、21mg/ml、20mg/ml、19mg/ml、18mg/ml、17mg/ml、16mg/ml、15mg/ml、14mg/ml、13mg/ml、12mg/ml、11mg/ml、10mg/ml、9mg/ml、8mg/ml、7mg/ml、6mg/ml、5mg/ml、4mg/ml、3mg/ml、2mg/ml、1mg/ml 或 0.1mg/ml。在某些实施方案中,组合物可含有从 A 到 B mg/ml 浓度范围的胰高血糖素肽,例如 0.001-30.0mg/ml。在一个实施方案中,药物组合物包含已灭菌的水溶液并任选储存在各种容器中。可根据一个实施方案使用本发明化合物,以制备即用于注射的预制溶液。在其它实施方案中,药物组合物包含冻干粉。药物组合物可进一步作为药盒的一部分包装,所述药盒包括用于将组合物给予患者的一次性器械。容器或药盒可标明储存在环境室温或冷冻温度。

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

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

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

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

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

[0055] 根据 2001 年的美国国家胆固醇教育计划成人治疗组指南(National Cholesterol Education Program Adult Treatment Panel)(ATP III),同一个体的任何以下三个特征满足代谢综合征标准:(a) 腹部肥胖(男性腰围超过 102cm,女性超过 88cm);(b) 血清甘油三

酯 (150mg/dl 或以上); (c) HDL 胆固醇 (男性中 40mg/dl 或更低, 女性中 50mg/dl 或更低); (d) 血压 (130/85 或更高); 和 (e) 禁食血糖 (110mg/dl 或以上)。根据世界卫生组织 (WHO), 具有高胰岛素水平 (禁食血糖升高或仅餐后葡萄糖升高) 并且至少以下两条标准的个体满足代谢综合征的标准: (a) 腹部肥胖 (腰臀比率大于 0.9, 身体质量指数至少 30kg/m² 或腰围测量超过 37 英寸); (b) 胆固醇组显示至少 150mg/dl 的甘油三酯水平或低于 35mg/dl 的 HDL 胆固醇; (c) 140/90 或更高的血压或在接受高血压治疗)。(Mathur, Ruchi, "Metabolic Syndrome (代谢综合征)" Shiel, Jr., William C. 编辑, MedicineNet.com, 2009 年 5 月 11 日)。

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

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

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

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

[0060] 不依附任何特定理论, 本文所述胰高血糖素肽用于治疗酒精性肝病、NAFLD 或其任何阶段, 包括例如脂肪变性、脂肪性肝炎、肝炎、肝脏炎症、NASH、肝硬化或并其发症。因此, 本发明提供在受试者中预防或治疗酒精性肝病、NAFLD 或其任何阶段的方法, 所述方法包括给予受试者有效预防或治疗酒精性肝病、NAFLD 或其阶段的量的本文所述胰高血糖素肽。所述治疗方法包括降低以下中的一种、二种、三种或更多种: 肝脏脂肪含量、肝硬化的发生率

或进展、肝细胞癌的发生率、炎症指征例如异常肝酶水平（例如天冬氨酸氨基转移酶 AST 和 / 或丙氨酸氨基转移酶 ALT 或 LDH）、升高的血清铁蛋白、升高的血清胆红素和 / 或纤维化指征例如升高的 TGF- β 水平。在优选实施方案中，将胰高血糖素肽用于治疗其进展超过单纯脂肪肝（脂肪变性）并表现出炎症或肝炎指征的患者。所述方法可导致例如 AST 和 / 或 ALT 水平降低。

[0061] 在再一实施方案中，提供治疗高血糖症的方法或减少增重或诱导减重的方法，所述方法涉及给予包含本发明胰高血糖素肽的有效量的水溶液。在一个实施方案中，任一种方法包括给予有效量的包含选自以下的胰高血糖素激动剂的组合物：SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:17、SEQ ID NO:18 和 SEQ ID NO:19。在另一实施方案中，所述方法包括给予有效量的包含胰高血糖素激动剂的组合物，其中所述胰高血糖素激动剂包含选自以下的胰高血糖素肽：SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:17、SEQ ID NO:18、SEQ ID NO:19、SEQ ID NO:66、SEQ ID NO:67、SEQ ID NO:68 和 SEQ ID NO:69，其中胰高血糖素肽的 29 位氨基酸通过肽键与第二肽结合，所述第二肽包含序列 SEQ ID NO:26、SEQ ID NO:27 或 SEQ ID NO:28。在另外的实施方案中，提供涉及同时给予常规剂量或低剂量胰岛素和本发明胰高血糖素肽的治疗糖尿病的方法。亦提供用本发明胰高血糖素肽治疗糖尿病而不同时给予胰岛素的方法。

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

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

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

[0065] 根据一个实施方案，不包括在所述胰高血糖素/GLP-1 共激动剂分子中的是现有技术中已知用于所述方法的任何胰高血糖素类似物或 GLP-1 类似物。美国专利号 6,864,069 中阐述作为 GLP-1 激动剂和胰高血糖素拮抗剂的用于治疗糖尿病的另一实施方

案肽,亦排除在胰高血糖素/GLP-1 共激动剂分子之外。在另一实施方案中,不包括胰高血糖素拮抗剂治疗糖尿病的用途,例如在 Unson 等, J. Biol. Chem., 264 :789-794 (1989), Ahn 等, J. Med. Chem., 44 :3109-3116 (2001) 和 Sapse 等, Mol. Med., 8 (5) :251-262 (2002) 中所述的拮抗剂。在另一实施方案中,泌酸调节肽或含有泌酸调节肽的 8 个 C-末端氨基酸 (SEQ ID NO :27) 的胰高血糖素类似物亦排除在胰高血糖素/GLP-1 共激动剂分子之外。

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

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

[0068] 附图简述

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

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

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

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

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

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

[0075] 图 7A 和 7B 表示显示胰高血糖素类似物对受体介导的 cAMP 的诱导的数据。更具

体地,图 7A 比较了胰高血糖素类似物 (Gluc-NH₂ ●、E16 Gluc-NH₂ ▲、K12, E16 Gluc-NH₂ 内酰胺 ▼、E16, K20 Gluc-NH₂ ◀和 E16, K20 Gluc-NH₂ 内酰胺 ▶) 相对于胰高血糖素 (■) 对胰高血糖素受体的诱导,而图 7B 比较了胰高血糖素类似物 (Gluc-NH₂ ●、E16 Gluc-NH₂ ▲、K12, E16 Gluc-NH₂ 内酰胺 ▼、E16, K20 Gluc-NH₂ ◀和 E16, K20 Gluc-NH₂ 内酰胺 ▶) 相对于 GLP-1 (■) 对 GLP-1 受体的诱导。

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

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

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

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

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

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

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

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

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

[0085] 图 19 表示在用 15 或 70nmol/kg 以下物质治疗的 DIO 小鼠中作为时间 (天) 的函数的体重变化 (%) 的图表: 仅用溶媒 (实线菱形); 嵌合体 -2AIB², Cys²⁴-40kD PEG (15nmol/kg, 虚线空心菱形; 70nmol/kg, 实线空心三角形); 嵌合体 -2 AIB², K¹⁰-C8 Cys²⁴-40kD PEG (15nmol/kg, 虚线实心三角形; 70nmol/kg, 实线实心三角形); 嵌合体 -2 AIB², K¹⁰-C16 Cys²⁴-40kD PEG (15nmol/kg, 虚线倒三角; 70nmol/kg; 实线倒三角)。

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

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

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

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

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

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

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

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

较)的图表。

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

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

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

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

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

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

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

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

[0102] 详述

[0103] 定义

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

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

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

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

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

对甲苯磺酸、水杨酸等的盐。

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

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

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

[0112] 本文所用术语“纯化的”等术语涉及基本上无污染物的分子或化合物的分离物形式,而所述污染物在天然或自然环境中通常与所述分子或化合物结合在一起。

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

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

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

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

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

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

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

[0120] 本文所用氨基酸“修饰”指氨基酸的取代、添加或缺失,包括用人蛋白质中常见的20种氨基酸以及非典型或非天然存在的氨基酸中的任何一种来取代或添加。在整篇

说明书中,所有由数字提及特定氨基酸位置(例如 28 位)都指在天然胰高血糖素(SEQ ID NO:1)中该位置的氨基酸或其任何类似物中对应的氨基酸位置。例如,本文提及“28 位”意味着某种胰高血糖素类似物的对应的 27 位,在该类似物中缺失了 SEQ ID NO:1 的第一个氨基酸。同样地,本文提及“28 位”意味着某种胰高血糖素类似物的对应的 29 位,在该类似物中在 SEQ ID NO:1 的 N-末端之前添加了一个氨基酸。非典型氨基酸的商业来源包括 Sigma-Aldrich(Milwaukee, WI)、ChemPep Inc. (Miami, FL) 和 Genzyme Pharmaceuticals(Cambridge, MA)。非典型氨基酸可购自商业供应商、从头合成或从其它氨基酸经化学修饰或衍生自其它氨基酸。

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

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

[0123] 本文所用术语“天然胰高血糖素”指由 SEQ ID NO:1 序列组成的肽,术语“天然 GLP-1”是指定为 GLP-1(7-36) 酰胺(由 SEQ ID NO:52 序列组成)、GLP-1(7-37) 酸(由 SEQ ID NO:50 序列组成)或这两种化合物的混合物的通称。本文在缺乏任何进一步指定时对“胰高血糖素”或“GLP-1”一般提及分别意指天然胰高血糖素或天然 GLP-1。

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

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

[0126] I. 脂肪族的非极性或稍带极性的小残基:

[0127] Ala、Ser、Thr、Pro、Gly;

[0128] II. 极性的带负电荷的残基及其酰胺和酯:

[0129] Asp、Asn、Glu、Gln、半胱氨酸和高半胱氨酸;

[0130] III. 极性的带正电荷的残基:

[0131] His、Arg、Lys、鸟氨酸(Orn);

[0132] IV. 脂肪族的非极性大残基:

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

[0134] V. 芳香族大残基:

[0135] Phe、Tyr、Trp、乙酰苯丙氨酸。

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

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

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

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

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

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

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

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

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

[0145] 实施方案

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

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

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

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

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

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

[0152] 通过让酰基或烷基与肽的 10 位氨基酸侧链共价连接，为缺乏分子内桥（例如共价分子内桥）的肽提供提高的针对 GLP-1 和胰高血糖素受体的活性，其中所述酰基或烷基对

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

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

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

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

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

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

[0158] (A) 例如,通过将一个、两个、三个或更多个带电荷的氨基酸引入到天然胰高血糖素的 C- 末端部分内,优选引入到 27 位的 C- 末端位置来改进溶解性。所述带电荷的氨基酸可例如在 28 或 29 位用带电荷的氨基酸取代天然氨基酸来引入,或作为备选通过例如在 27、28 或 29 位后添加带电荷的氨基酸来引入。在例示性实施方案中,一个、二个、三个或全部带电荷的氨基酸为带负电荷。在其它实施方案中,一个、二个、三个或全部带电荷的氨基酸为带正电荷。所述修饰增加溶解性,例如在既定的约 5.5 和 8 之间的 pH 例如 pH 7 下当于 25°C 24 小时后测量时提供相对于天然胰高血糖素至少 2- 倍、5- 倍、10- 倍、15- 倍、25- 倍、30- 倍或更高的溶解性。

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

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

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

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

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

[0164] (G) 如本文所述添加 C- 末端延伸；

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

[0166] (I) 同二聚体化或异二聚体化，其如本文所述。

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

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

[0169] 用 Ala 取代 2 位 Ser；

[0170] 用 Val 或 Phe 取代 10 位 Tyr；

[0171] 用 Arg 取代 12 位 Lys；

[0172] 用 Glu 取代 15 位 Asp；

[0173] 用 Thr 或 AIB 取代 16 位 Ser。

[0174] 本文公开的一个实施方案涉及胰高血糖素激动剂，所述胰高血糖素激动剂相对于野生型肽 His-Ser-Gln-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Lys-Tyr-Leu-Asp-Ser-Arg-Arg-Ala-Gln-Asp-Phe-Val-Gln-Trp-Leu-Met-Asn-Thr (SEQ ID NO :1) 经过修饰，以提高肽针对胰高血糖素受体的效价。意想不到的是，申请人发现天然胰高血糖素 (SEQ ID NO :1) 通常存在的 16 位丝氨酸可被所选择的酸性氨基酸取代，以提高胰高血糖素的效价，也就是提高其在体外验证模型测定（参见实施例 14）中刺激 cAMP 合成的能力。更具体地，该取代提高所述类似物针对胰高血糖素受体效价至少 2 倍、4 倍、5 倍和至多 10 倍以上。该取代亦提高所述类似物相对于天然胰高血糖素针对 GLP-1 受体活性的至少 5 倍、10 倍或 15 倍，但保持对胰高血糖素受体优于 GLP-1 受体的选择性。

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

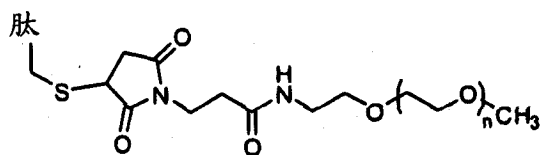
[0176] 亲水部分

[0177] 可进一步修饰本发明胰高血糖素肽，以改进所述肽在生理 pH 水溶液中的溶解性和稳定性，同时保留相对于天然胰高血糖素更高的生物学活性。亲水部分例如 PEG 基团可在让蛋白质与活化的聚合物分子反应的任何合适的条件下与胰高血糖素肽连接。可使用本领域已知的任何手段，包括经由酰化、还原性烷化、Michael 加成、硫醇烷化或通过 PEG 部分上的活性基团（例如醛、氨基、酯、硫醇、 α - 卤代乙酰基、马来酰亚胺基或胍基）与靶化合物上的活性基团（例如醛、氨基、酯、硫醇、 α - 卤代乙酰基、马来酰亚胺基或胍基）

的其它化学选择性缀合 / 连接方法。可用于让水溶性聚合物与一种或多种蛋白质连接的活性基团包括但不限于砒、马来酰亚胺、巯基、硫醇、三氟甲磺酸基、三氟乙磺酸基、氮丙烯 (azidirine)、环氧乙烷、5-吡啶基和 α -卤代酰基 (例如 α -碘乙酸、 α -溴乙酸、 α -氯乙酸)。若通过还原性烷化与肽连接,则所选聚合物应该具有单一的活性醛,以便控制聚合程度。参见例如 Kinstler 等, *Adv. Drug. Delivery Rev.* 54:477-485(2002); Roberts 等, *Adv. Drug Delivery Rev.* 54:459-476(2002); 和 Zalipsky 等, *Adv. Drug Delivery Rev.* 16:157-182(1995)。

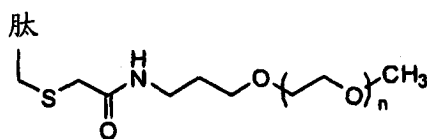
[0178] 在本发明的特定方面,用亲水部分例如 PEG 修饰胰高血糖素肽上具有硫醇的氨基酸残基。在某些实施方案中,在 Michael 加成反应中用马来酰亚胺-活化的 PEG 修饰硫醇,以产生包含以下所示硫醚连接的聚乙二醇化的肽:

[0179]



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

[0181]



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

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

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

胰高血糖素肽的 21 和 24 位所存在的氨基酸侧链共价连接,所述肽的羧基末端氨基酸具有羧酸基团。

[0185] 缀合物

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

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

[0188] 最常见的半胱氨酸残基与 α - 卤代乙酰基(及对应胺)反应,得到羧甲基或羧基酰氨基衍生物,所述卤代乙酰基例如氯乙酸、氯乙酰胺。还通过与以下物质反应衍生半胱氨酸残基:溴三氟丙酮、 α - 溴- β -(5- 咪唑基(imidazolyl)) 丙酸、氯乙酰基磷酸、N- 烷基马来酰亚胺、3- 硝基-2- 吡啶二硫化物、甲基 2- 吡啶二硫化物、对- 氯苯甲酸汞、2- 氯基-4- 硝基苯酚汞或氯-7- 硝基苯并-2- 氧杂-1,3- 二唑。

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

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

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

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

[0193] 通过与碳二亚胺($R-N=C=N-R'$)反应来选择性地修饰羧基侧基(天冬氨酸或谷氨酸),其中 R 和 R' 为不同烷基,例如 1- 环己基-3-(2- 吗啉基-4- 乙基)碳二亚胺或 1- 乙基-3-(4- 氮杂-4,4- 二甲基戊基)碳二亚胺。另外,通过与铵离子反应将天冬氨酸

酰和谷氨酰胺残基转化为天冬酰胺酰基及谷氨酰胺酰基残基。

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

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

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

[0197] 在某些实施方案中, 所述接头包含 1- 约 60 或 1-30 个原子或更长、2-5 个原子、2-10 个原子、5-10 个原子或 10-20 个原子长的链。在某些实施方案中, 链原子都为碳原子。在某些实施方案中, 接头主链的链原子选自 C、O、N 和 S。可按照其所需溶解性 (亲水性) 来选择链原子和接头, 以提供更可溶的缀合物。在某些实施方案中, 接头提供由酶或其它催化剂或在靶组织或器官或细胞中发现的水解条件裂解的官能团。在某些实施方案中, 接头长度长到足以降低位阻电势。若接头为共价键或肽基键并且缀合物为多肽, 则整个缀合物可为融合蛋白。所述肽基接头可为任何长度。例示性接头长度约 1-50 个氨基酸、5-50、3-5、5-10、5-15 或 10-30 个氨基酸。作为备选, 可通过本领域一般人员已知的重组遗传工程方法产生所述融合蛋白。

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

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

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

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

[0202] 可对免疫球蛋白的 Fc 区进行氨基酸修饰。所述变体 Fc 区包含 Fc 区的 CH3 结构域 (残基 342-447) 的至少一个氨基酸修饰和 / 或 Fc 区的 CH2 结构域 (残基 231-341) 的至少一个氨基酸修饰。认为赋予 FcRn 提高的亲合力的突变包括 T256A、T307A、E380A 和 N434A (Shields 等 2001, J. Biol. Chem. 276 :6591)。其它突变可降低 Fc 区与 Fc γ RI、Fc γ RIIA、Fc γ RIIB 和 / 或 Fc γ RIIIA 的结合而不显著降低对 FcRn 的亲合力。例如,用 Ala 或另一氨基酸取代 Fc 区 297 位的 Asn,除去了高度保守的 N-糖基化位点,并可导致降低 Fc 区的免疫原性而同时延长半衰期,并且降低与 Fc γ R 的结合 (Routledge 等 1995, Transplantation 60 :847 ;Friend 等 1999, Transplantation 68 :1632 ;Shields 等 1995, J. Biol. Chem. 276 :6591)。实施了对 IgG1 的 233-236 位的氨基酸修饰,该修饰降低与 Fc γ R 的结合 (Ward 和 Ghetie 1995, Therapeutic Immunology 2 :77 和 Armour 等 1999, Eur. J. Immunol. 29 :2613)。某些例示性氨基酸取代阐述于美国专利 7,355,008 和 7,381,408 中,其各自以其整体在此引作参考。

[0203] 融合蛋白和末端延伸

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

合肽的胰高血糖素肽部分选自 SEQ ID NO :55、SEQ ID NO :2、SEQ ID NO :3、SEQ ID NO :4 和 SEQ ID NO :5, 其中当 PEG 链存在于 17、21、24 位或 C- 末端氨基酸或 21 和 24 两处时, 其选自 500-40,000 道尔顿范围。更具体地, 在一个实施方案中, 胰高血糖素肽片段选自 SEQ ID NO :7、SEQ ID NO :8 和 SEQ ID NO :63, 其中 PEG 链选自 500-5,000 范围。在一个实施方案中, 胰高血糖素肽为包含序列 SEQ ID NO :55 和 SEQ ID NO :65 的融合肽, 其中让肽 SEQ ID NO :65 与 SEQ ID NO :55 的羧基末端连接。

[0205] 电荷中性的 C- 末端

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

[0207] α 螺旋 / 分子内桥的稳定化

[0208] 在另一实施方案中, 提供表现出增加的 GLP-1 受体激动剂活性的胰高血糖素类似物, 其中在两个氨基酸侧链之间形成分子内桥, 以稳定所述肽羧基末端的三维结构。可通过非共价键, 例如氢键、离子相互作用, 例如形成盐桥, 或通过共价键, 让两个氨基酸侧链彼此连接。当两个氨基酸侧链通过一个或多个共价键彼此连接时, 可认为本文的肽包含共价分子内桥。当两个氨基酸侧链通过非共价键 (例如氢键、离子相互作用) 彼此连接时, 可认为本文肽包含非共价分子内桥。

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

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

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

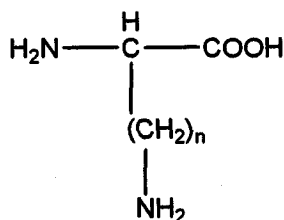
[0212] 在某些特定实施方案中, 其中 j 和 j+3 位置的氨基酸通过分子内桥连接, 接头大小为约 6 个原子或约 5-7 个原子。

[0213] 仍是在其它实施方案中, 在相隔 6 个氨基酸的两个氨基酸之间形成分子内桥, 例

如 k 和 k+7 位置的氨基酸之间,其中 k 为 12 和 22 之间的任何整数(例如 12、13、14、15、16、17、18、19、20、21 和 22)。在某些特定实施方案中,k 为 12、13 或 17。在例示性实施方案中,k 为 17。

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

[0215]



[0216] 其中 n = 1-4

[0217] [式 I]

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

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

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

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

位氨基酸之间、16 和 20 位氨基酸之间或 20 和 24 位氨基酸之间形成分子内内酰胺桥,并且 29 位氨基酸为甘氨酸,其中让序列 SEQ ID NO:29 与 SEQ ID NO:20 的 C-末端氨基酸连接。在另一实施方案中,28 位氨基酸为天冬氨酸。

[0222] 可使用除了内酰胺桥之外的分子内桥来稳定胰高血糖素类似物肽的 α 螺旋。在一个实施方案中,所述分子内桥为疏水桥。在这种情况下,分子内桥任选在胰高血糖素类似物肽 α 螺旋的疏水面部分的两个氨基酸侧链之间。例如,通过疏水桥连接的氨基酸之一可为 10、14 和 18 位的氨基酸。

[0223] 在一个特定方面,用全-烃交联系统 (all-hydrocarbon cross-linking system) 利用烯烃歧化来交联胰高血糖素肽的 α 螺旋的一个或两个转角。这种情况中的胰高血糖素肽可包含含有 α -甲基化的氨基酸的不同长度的烯烃侧链,所述 α -甲基化氨基酸在 i 和 $i+4$ 或 $i+7$ 位构成 R 或 S 立体化学。例如,烯烃侧链可包含 $(CH_2)_n$, 其中 n 为 1-6 之间的任何整数。在一个实施方案中,对于 8 个原子的交联长度, n 为 3。本领域阐述了形成所述分子内桥的合适的方法。参见例如 Schafmeister 等, J. Am. Chem. Soc. 122 :5891-5892 (2000) 和 Walensky 等, Science 305 :1466-1470 (2004)。或者,胰高血糖素肽可包含位于邻近的螺旋转角处的 O-烯丙基 Ser 残基,其经由钨催化的环闭合复分解 (ring closing metathesis) 桥联在一起。在例如 Blackwell 等, Angew. Chem., Int. Ed. 37 :3281-3284 (1998) 中阐述了所述交联的方法。

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

[0225] 在某些实施方案中,用 i 和 $i+7$ 位的两个 Glu 残基之间的 α, ω -二氨基烷烃系链 (例如 1,4-二氨基丙烷和 1,5-二氨基戊烷), 来稳定胰高血糖素肽的 α 螺旋。所述系链导致形成 9-个原子或更长的桥,这视二氨基烷烃系链的长度而定。本领域阐述了产生用所述系链交联的肽的合适的方法。参见例如 Phelan 等, J. Am. Chem. Soc. 119 :455-460 (1997)。

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

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

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

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

[0230] 按照本发明再一实施方案,增加 GLP-1 活性的胰高血糖素肽包含:(a) 用 α , α -二取代氨基酸在 12-29 位氨基酸内的一处或多处取代;和任选 (b) C- 末端酰胺。在某些方面,应该理解,所述胰高血糖素肽明确缺乏稳定胰高血糖素 C- 末端部分 α -螺旋 (大约位置 12-29) 的分子内桥,例如共价分子内桥。在某些实施方案中,胰高血糖素的 16、17、18、19、20、21、24 或 29 位中的一个、二个、三个、四个或更多个位置被以下氨基酸取代: α , α -二取代氨基酸,例如氨基异丁酸 (AIB);被选自以下的相同或不同基团二取代的氨基酸:甲基、乙基、丙基和正丁基;或被环辛烷或环庚烷二取代的氨基酸 (例如 1-氨基环辛烷-1-羧酸)。例如,在缺乏分子内桥 (例如非共价分子内桥 (例如盐桥) 或共价分子内桥 (例如内酰胺)) 下,用 AIB 取代 16 位提高 GLP-1 活性。在某些实施方案中,16、20、21 或 24 位中的一个、二个、三个或更多个位置被 AIB 取代。所述胰高血糖素肽可进一步包含一种或多种本文所述其它修饰,所述修饰包括但不限于:酰化、烷化、聚乙二醇化、缺失 C- 末端 1-2 个氨基酸、用带电荷的氨基酸在 C- 末端添加和 / 或取代、用酰胺取代 C- 末端羧酸酯、添加 C- 末端延伸和保守性和 / 或非保守性氨基酸取代,所述保守性和 / 或非保守性氨基酸取代例如为用 Leu 或 Nle 取代 27 位 Met,用 Glu (或类似氨基酸) 取代 15 位 Asp,用实现 DPP-IV 蛋白酶抗性的氨基酸取代 1 和 / 或 2 位,用 Ala 取代 2 位 Ser,用 Val 或 Phe 取代 10 位 Tyr,用 Arg 取代 12 位 Lys,用 Thr 或 AIB 取代 16 位 Ser,用 Asp、Glu 或 AIB 取代 20 和 / 或 24 位 Gln,用 Glu 或 Thr 取代 16 位 Ser,用 Ala 取代 18 位 Arg,用 Lys 取代 20 位 Gln,用 Glu 取代 21 位 Asp,和用 Asn 或 Cys 取代 24 位 Gln。在某些实施方案中,前述胰高血糖素肽包含 29 位 Gln 或 Gly 或添加的 C- 末端延伸,例如在 28 位氨基酸的 C- 末端的 GGPSSGAPPPS (SEQ ID NO :26)。在特定方面,胰高血糖素肽包含取代 C- 末端羧酸酯的酰胺基团、酰基 (例如 C16 脂肪酸) 和亲水部分 (例如聚乙二醇 (PEG)) 中的一种或多种。

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

[0232] 根据某些实施方案,缺乏分子内桥的胰高血糖素肽包含在 12-29 位氨基酸内的一个或多个用 α , α -二取代氨基酸的取代和共价连接到胰高血糖素肽 10 位氨基酸侧链的酰基或烷基。在特定实施方案中,氨基酸上的酰基或烷基不是天然存在的。在某些方面,所

述酰基或烷基对于 10 位氨基酸为非天然的。在例示性实施方案中,缺乏分子内桥的胰高血糖素肽包含 SEQ ID NO:556-561 中的任何氨基酸序列及共价连接到胰高血糖素肽 10 位氨基酸侧链的酰基或烷基。所述缺乏分子内桥的酰化或烷化的胰高血糖素肽与非酰化的对应肽相比,表现出提高的针对 GLP-1 和胰高血糖素受体的活性。可通过酰基或烷基与在肽的 10 位氨基酸的侧链之间引入间隔物,来实现进一步提高缺乏分子内桥的酰化的胰高血糖素肽针对 GLP-1 和胰高血糖素受体的活性。本文进一步阐述引入或不引入间隔物的酰化和烷化。

[0233] 1 位修饰

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

[0235] 酰化

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

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

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

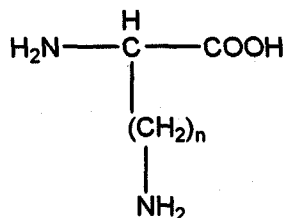
[0239] 胰高血糖素肽可在连接亲水部分的同一个氨基酸位置被酰化,或在不同的氨基酸位置被酰化。非限制性实例包括 10 位的酰化,并在胰高血糖素肽的 C-末端部分的一个或多个位置(例如 24、28 或 29 位)、C-末端延伸内或在 C-末端(例如通过添加 C-末端 Cys)聚乙二醇化。

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

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

[0242] 在某些实施方案中,包含侧链胺的氨基酸为式 I 氨基酸:

[0243]



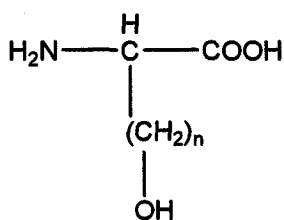
[0244] 其中 $n = 1-4$

[0245] [式 I]

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

[0247] 在其它实施方案中,包含侧链羟基的氨基酸为式 II 氨基酸:

[0248]



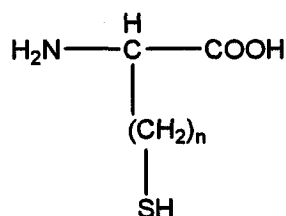
[0249] 其中 $n = 1-4$

[0250] [式 II]

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

[0252] 仍是在其它实施方案中,包含侧链硫醇的氨基酸为式 III 氨基酸:

[0253]



[0254] 其中 $n = 1-4$

[0255] [式 III]

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

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

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

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

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

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

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

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

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

[0265] 在某些实施方案中,间隔物为亲水双官能间隔物。在某些实施方案中,亲水双官能间隔物包含两个或更多个活性基团,例如胺、羟基、硫醇和羧基或其任何组合。在某些实施方案中,亲水双官能间隔物包含羟基和羧基(carboxylate)。在其它实施方案中,亲水双官能间隔物包含胺基团和羧基。在其它实施方案中,亲水双官能间隔物包含巯基和羧基。在特定实施方案中,间隔物包含氨基聚(烷氧基)羧酸盐。在这点上,间隔物可包含例如 $\text{NH}_2(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n(\text{CH}_2)_m\text{COOH}$, 其中 m 为自 1 到 6 的任何整数, n 为自 2 到 12 的任何整

数,所述间隔物例如 8-氨基-3,6-二氧杂辛酸,其可购自 Peptides International, Inc. (Louisville, KY)。

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

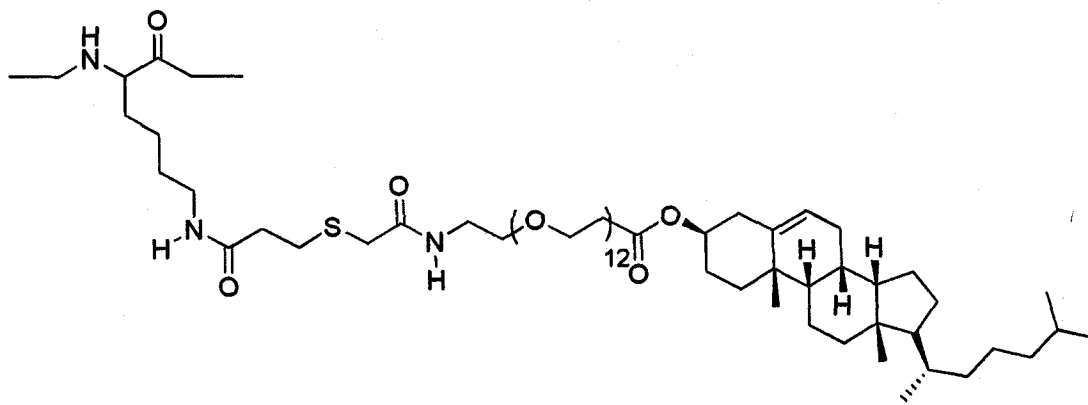
[0277] 在某些实施方案中,通过与胰高血糖素肽连接的间隔物使长链烷烃酰化来修饰胰高血糖素肽以包含酰基。在特定方面,所述长链烷烃包含胺、羟基或巯基,它们与间隔物的羧基或其活化形式反应。本文阐述了包含羧基或其活化形式的合适的间隔物,其包括例如双官能间隔物,例如氨基酸、二肽、三肽、亲水双官能间隔物和疏水双官能间隔物。

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

[0279] 关于通过胰高血糖素肽或间隔物来酰化长链烷烃的本发明这些方面,所述长链烷烃可为任何大小,可包含任何长度的碳链。长链烷烃可为直链或支链的。在某些方面,长链烷烃为 C4-C30 烷烃。例如,长链烷烃可为 C4 烷烃、C6 烷烃、C8 烷烃、C10 烷烃、C12 烷烃、C14 烷烃、C16 烷烃、C18 烷烃、C20 烷烃、C22 烷烃、C24 烷烃、C26 烷烃、C28 烷烃或 C30 烷烃中的任何一种。在某些实施方案中,长链烷烃包括 C8-C20 烷烃,例如 C14 烷烃、C16 烷烃或 C18 烷烃。

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

[0281]



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

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

Ac-Phe 中的一个或多个氨基酸的间隔物。

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

[0285] 烷化

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

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

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

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

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

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

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

[0293] 在本发明一个实施方案中,烷化的胰高血糖素肽包含肽和烷基之间的间隔物。在某些实施方案中,胰高血糖素肽与间隔物共价键合,所述间隔物与烷基共价结合。在某些例示性实施方案中,通过烷化间隔物的胺、羟基或硫醇来修饰胰高血糖素肽以包含烷基,将所述间隔物连接到胰高血糖素肽的 10、20、24 或 29 位氨基酸的侧链。被间隔物连接的氨基酸可为包含允许与间隔物连接的部分的任何氨基酸。例如,包含侧链 NH_2 、-OH 或 $-\text{COOH}$ (例如 Lys、Orn、Ser、Asp 或 Glu) 的氨基酸为合适的。在这点上,烷化的胰高血糖素肽可包含 SEQ ID NO :1 氨基酸序列或其经修饰的氨基酸序列,所述经修饰的氨基酸序列包含一种或多种

本文所述氨基酸修饰,且 10、20、24 和 29 位氨基酸中的至少一个被修饰为包含侧链胺、羟基或羧酸酯的任何氨基酸。

[0294] 在某些实施方案中,间隔物为包含侧链胺、羟基或硫醇的氨基酸或二肽或三肽,所述二肽或三肽包含包含侧链胺、羟基或硫醇的氨基酸。

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

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

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

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

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

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

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

负电荷的氨基酸。在某些实施方案中,二肽间隔物选自:Ala-Ala、 β -Ala- β -Ala、Leu-Leu、Pro-Pro、 γ -氨基丁酸- γ -氨基丁酸和 γ -Glu- γ -Glu。

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

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

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

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

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

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

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

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

[0310] 或者,烷化的胰高血糖素肽可包含间隔物,其中间隔物既被烷化又被修饰为包含

亲水部分。合适的间隔物的非限制性实例包括包含选自 Cys、Ac-Cys、Lys、Orn、高 Cys 和 Ac-Phe 的一个或多个氨基酸的间隔物。

[0311] C-末端截短

[0312] 在某些实施方案中,通过截短或缺失胰高血糖素肽 C-末端的一个或两个氨基酸(即 29 和 / 或 28 位处)来进一步修饰本文所述胰高血糖素肽,而不影响其针对胰高血糖素受体和 GLP-1 受体的活性和 / 或效价。在这点上,胰高血糖素肽可包含天然胰高血糖素肽 (SEQ ID NO :1) 的 1-27 或 1-28 位氨基酸,其任选含一种或多种本文所述修饰。

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

[0314] 带电荷的 C-末端残基

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

[0316] 例示性实施方案

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

[0318] 根据一个实施方案,提供包含以下序列的胰高血糖素 /GLP-1 受体共激动剂: NH_2 -His-Ser-Gln-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Lys-Tyr-Leu-Xaa-Xaa-Arg-Arg-Ala-Xaa-Asp-Phe-Val-Xaa-Trp-Leu-Met-Xaa-Xaa-R (SEQ ID NO :33), 其中 15 位 Xaa 选自以下氨基酸: Asp、Glu、半胱氨酸、高谷氨酸和高半胱氨酸, 16 位 Xaa 选自以下氨基酸: Ser、Glu、Gln、高谷氨酸和高半胱氨酸, 20 位 Xaa 为 Gln 或 Lys, 24 位 Xaa 为 Gln 或 Glu, 28 位 Xaa 为 Asn、Lys 或酸性氨基酸, 29 位 Xaa 为 Thr、Gly 或酸性氨基酸, R 为 COOH 或 CONH_2 , 前提为当 16 位为丝氨酸时, 20 位为 Lys, 或作为备选当 16 位为丝氨酸时, 24 位为 Glu, 并且 20 或 28 位任一位置为 Lys。在一个实施方案中,胰高血糖素 /GLP-1 受体共激动剂包含序列 SEQ ID NO :33, 其中 28 位氨基酸为天冬氨酸, 并且 29 位氨基酸为谷氨酸。在另一实施方案中, 28 位氨基酸为天然天冬酰胺, 29 位氨基酸为甘氨酸, 并且氨基酸序列 SEQ ID NO :29 或 SEQ ID NO :65 与 SEQ ID NO :33 的羧基末端共价连接。

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

[0320] 根据一个实施方案,提供胰高血糖素肽类似物 SEQ ID NO :33, 其中所述类似物以

1-3 个选自 1、2、3、5、7、10、11、13、14、17、18、19、21 和 27 位的氨基酸不同于 SEQ ID NO :33, 前提为当 16 位氨基酸为丝氨酸时, 20 位为赖氨酸, 或在 24 位氨基酸和 20 或 28 位任一位置氨基酸之间形成内酰胺桥。根据一个实施方案, 所述类似物以 1-3 个选自 1、2、3、21 和 27 位的氨基酸不同于 SEQ ID NO :33。在一个实施方案中, 胰高血糖素肽类似物 SEQ ID NO :33 以 1-2 个氨基酸不同于该序列, 或在一个实施方案中, 以选自 1、2、3、5、7、10、11、13、14、17、18、19、21 和 27 位的单个氨基酸不同于该序列, 前提为当 16 位氨基酸为丝氨酸时, 20 位为赖氨酸, 或在 24 位氨基酸和 20 或 28 位任一氨基酸之间形成内酰胺桥。

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

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

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

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

[0325] 在一个实施方案中,提供胰高血糖素类似物 SEQ ID NO:20,其中选自类似物的 1、2、5、7、10、11、13、14、17、18、19、21、27、28 或 29 位的 1-6 个氨基酸不同于 SEQ ID NO:1 对应的氨基酸,前提为当 16 位氨基酸为丝氨酸时,20 位为 Lys,或作为备选当 16 位为丝氨酸时,24 位为 Glu 并且 20 或 28 位的任一位置为 Lys。按照另一实施方案,提供胰高血糖素类似物 SEQ ID NO:20,其中选自类似物 1、2、5、7、10、11、13、14、17、18、19、20、21、27、28 或 29 位的 1-3 个氨基酸不同于 SEQ ID NO:1 的对应的氨基酸。在另一实施方案中,提供胰高血糖素类似物 SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9 或 SEQ ID NO:11,其中选自类似物 1、2、5、7、10、11、13、14、17、18、19、20 或 21 位的 1-2 个氨基酸不同于 SEQ ID NO:1 的对应的氨基酸,在另一实施方案中,所述 1-2 个不同的氨基酸代表相对于天然胰高血糖素序列 (SEQ ID NO:1) 中存在的氨基酸的保守性氨基酸取代。在一个实施方案中,提供胰高血糖素肽 SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:14 或 SEQ ID NO:15,其中胰高血糖素肽进一步包含选自 2、5、7、10、11、13、14、17、18、19、20、21、27 或 29 位的位置中的一个、两个或三个氨基酸取代。在一个实施方案中,2、5、7、10、11、13、14、16、17、18、19、20、21、27 或 29 位取代为保守性氨基酸取代。

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

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

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

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

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

[0331] 在备选实施方案中,提供胰高血糖素/GLP-1 受体共激动剂,其中所述肽包含至少一个在谷氨酸残基和赖氨酸残基侧链之间形成的内酰胺环,其中谷氨酸残基和赖氨酸残基

由三个氨基酸分开。在一个实施方案中, 荷有内酰胺的胰高血糖素肽的羧基末端氨基酸在天然氨基酸的羧酸位置具有酰胺基团。更具体地, 在一个实施方案中, 提供包含选自以下的经修饰的胰高血糖素肽的胰高血糖素和 GLP-1 共激动剂:

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

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

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

[0335] $\text{NH}_2\text{-His-Ser-Gln-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Lys-Tyr-Leu-Asp-Ser-Arg-Arg-Ala-Gln-Asp-Phe-Val-Glu-Trp-Leu-Met-Lys-Xaa-R}$ (SEQ ID NO :69)

[0336] $\text{NH}_2\text{-His-Ser-Gln-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Lys-Tyr-Leu-Asp-Glu-Arg-Arg-Ala-Lys-Asp-Phe-Val-Glu-Trp-Leu-Met-Asn-Thr-R}$ (SEQ ID NO :16)

[0337] $\text{NH}_2\text{-His-Ser-Gln-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Lys-Tyr-Leu-Asp-Glu-Arg-Arg-Ala-Gln-Asp-Phe-Val-Glu-Trp-Leu-Met-Lys-Thr-R}$ (SEQ ID NO :17)

[0338] $\text{NH}_2\text{-His-Ser-Gln-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Lys-Tyr-Leu-Asp-Glu-Arg-Arg-Ala-Lys-Asp-Phe-Val-Glu-Trp-Leu-Met-Lys-Thr-R}$ (SEQ ID NO :18)

[0339] 其中 28 位 Xaa = Asp 或 Asn, 29 位 Xaa 为 Thr 或 Gly, R 选自 COOH 、 CONH_2 、谷氨酸、天冬氨酸、甘氨酸、SEQ ID NO :26、SEQ ID NO :27 和 SEQ ID NO :28, 并且在以下位置之间形成内酰胺桥: SEQ ID NO :66 的 12 位 Lys 和 16 位 Glu; SEQ ID NO :67 的 16 位 Glu 和 20 位 Lys; SEQ ID NO :68 的 20 位 Lys 和 24 位 Glu; SEQ ID NO :69 的 24 位 Glu 和 28 位 Lys; SEQ ID NO :16 的 12 位 Lys 和 16 位 Glu 及 20 位 Lys 和 24 位 Glu; SEQ ID NO :17 的 12 位 Lys 和 16 位 Glu 及 24 位 Glu 和 28 位 Lys; 和 SEQ ID NO :18 的 16 位 Glu 和 20 位 Lys 及 24 位 Glu 和 28 位 Lys。在一个实施方案中, R 选自 COOH 、 CONH_2 、谷氨酸、天冬氨酸、甘氨酸, 28 位氨基酸为 Asn, 和 29 位氨基酸为苏氨酸。在一个实施方案中, R 为 CONH_2 , 28 位氨基酸为 Asn, 29 位氨基酸为苏氨酸。在另一实施方案中, R 选自 SEQ ID NO :26、SEQ ID NO :29 和 SEQ ID NO :65, 和 29 位氨基酸为甘氨酸。

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

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

端氨基酸延伸在一个实施方案中以酰胺基团或酯基团而不是羧酸为末端。

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

[0343] $\text{NH}_2\text{-His-Ser-Gln-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Lys-Tyr-Leu-Asp-Glu-Arg-Arg-Ala-Gln-Asp-Phe-Val-Gln-Trp-Leu-Met-Asn-Thr-Xaa-CONH}_2$ (SEQ ID NO:19), 其中 30 位 Xaa 表示任何氨基酸。在一个实施方案中,Xaa 选自 20 种常见氨基酸之一,在一个实施方案中,所述氨基酸为谷氨酸、天冬氨酸或甘氨酸。可通过让 PEG 链与 SEQ ID NO:19 的 17、21、24 或 30 位氨基酸的侧链共价连接,来进一步改进该肽的溶解性。在另一实施方案中,所述肽包含另外的选自 SEQ ID NO:26、SEQ ID NO:27 和 SEQ ID NO:28 的肽的羧基末端延伸。根据一个实施方案,所述胰高血糖素/GLP-1 受体共激动剂包含序列 SEQ ID NO:30、SEQ ID NO:31 和 SEQ ID NO:32。

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

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

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

SEQ ID NO:19, 其中 PEG 链与所述胰高血糖素肽的 17、21 或 24 位氨基酸或 C- 末端氨基酸的侧链共价连接。

[0347] 根据一个实施方案和前面段落所述限制性条款的主题, 修饰胰高血糖素共激动剂肽以含有 16、17、21、24 或 29 位氨基酸或 C- 末端氨基酸处的一个或多个氨基酸取代, 其中所述天然氨基酸被具有适于与亲水部分 (包括例如 PEG) 交联的侧链的氨基酸取代。天然肽可被天然存在的氨基酸或合成 (非天然存在的) 氨基酸取代。合成或非天然存在的氨基酸指没有在体内天然存在但可将其纳入本文所述肽结构的氨基酸。或者, 可将具有适于与亲水部分 (包括例如 PEG) 交联的侧链的氨基酸添加到任何本文公开的胰高血糖素类似物的羧基末端。根据一个实施方案, 用选自赖氨酸、半胱氨酸、鸟氨酸、高半胱氨酸和乙酰基苯丙氨酸的氨基酸, 在选自胰高血糖素 /GLP-1 受体共激动剂肽的 16、17、21、24 或 29 位取代天然氨基酸, 来进行氨基酸取代, 其中所述取代氨基酸进一步包含与所述氨基酸侧链共价键合的 PEG 链。在一个实施方案中, 进一步修饰选自 SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:17、SEQ ID NO:18 和 SEQ ID NO:19 的胰高血糖素肽, 以包含与所述胰高血糖素肽的 17 或 21 位氨基酸侧链共价连接的 PEG 链。在一个实施方案中, 聚乙二醇化胰高血糖素 /GLP-1 受体共激动剂进一步包含序列 SEQ ID NO:26、SEQ ID NO:27 或 SEQ ID NO:29。

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

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

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

[0351] 在某些例示性实施方案中, 胰高血糖素肽包含至多 10 个氨基酸修饰的氨基酸

序列 SEQ ID NO :1, 并包含在 10 位被酰化或烷化的氨基酸。在某些实施方案中, 用 C4-C30 脂肪酸酰化或烷化 10 位氨基酸。在某些方面, 10 位氨基酸包含对天然存在的氨基酸为非天然的酰基或烷基。

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

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

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

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

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

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

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

[0359] 用途

[0360] 如实施例中所详述, 本发明胰高血糖素激动剂相对于天然肽具有提高的生物物理稳定性和水溶性, 同时表现出增加的生物活性。因此, 认为本发明胰高血糖素激动剂适于先前对于天然胰高血糖素肽所述的任何用途。因此, 可将本文所述经修饰的胰高血糖素肽用

于治疗低血糖症,或用于提高血糖水平,用于诱导放射性用途的消化道临时麻痹或治疗其它因胰高血糖素的低血液水平而产生的代谢病。亦预期本文所述胰高血糖素肽用于降低或维持体重或治疗高血糖症或降低血糖水平或使血糖水平正常化。

[0361] 可单独或与其它抗糖尿病药物或抗肥胖症药物联合给予本发明胰高血糖素肽。本领域已知或正在研究的抗糖尿病药物包括:胰岛素;磺脲类,例如甲苯磺丁脲(甲糖宁(Orinase))、乙酸己脲(戴美乐(Dymelor))、甲磺氮草脲(妥拉磺脲(Tolinase))、氯磺丙脲(特泌胰(Diabinese))、格列甲嗪(glipizide)((利糖妥片(Glucotrol))、格列本脲(Glyburide)(达安宁(Diabeta)、优降糖(Micronase)、达安辽(Glynase))、格列美脲(glimepiride)(亚莫利(Amaryl))或格列齐特(gliclazide)(达美康(Diamicron));氯茴苯酸类,例如瑞格列奈(repaglinide)(Prandin)或那格列奈(nateglinide)(Starlix);双胍类,例如二甲双胍(格华止(Glucophage))或苯乙双胍;噻唑烷二酮类,例如罗格列酮(rosiglitazone)(文迪雅(Avandia))、匹格列酮(pioglitazone)(Actos)或曲格列酮(troglitazone)(瑞如林(Rezulin))或其它PPAR γ 抑制剂;抑制碳水化合物消化的 α 葡萄糖苷酶抑制剂,例如米格列醇(miglitol)(德赛天(Glyset))、阿卡波糖(acarbose)(阿卡糖(Precose)/拜糖平(Glucobay));艾塞那肽(exenatide)(百泌达(Byetta))或普兰林肽(pramlintide);二肽基肽酶-4(DPP-4)抑制剂,例如维格列汀(vildagliptin)或西格列汀(sitagliptin);SGLT(钠-依赖的葡萄糖转运蛋白1)抑制剂;葡萄糖酶激活剂(GKA);胰高血糖素受体拮抗剂(GRA);或FBP酶(果糖1,6-二磷酸酶)抑制剂。

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

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

[0364] 包括但不限于治疗低血糖症的本发明治疗方法,可包括用任何标准给药途径将本文公开的胰高血糖素激动剂给予患者的步骤,所述标准给药途径包括胃肠外(例如静脉内、腹膜内、皮下或肌肉内)、鞘内、经皮、直肠、经口、经鼻或通过吸入。在一个实施方案中,

皮下或肌肉内给予组合物。在一个实施方案中,胃肠外给予组合物,并将胰高血糖素组合物预包装在注射器中。在另一实施方案中,将所述组合物预包装在吸入器或其它气雾药物递送装置中。

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

[0366] 可将经修饰与具有大于 10,000 道尔顿的分子量的 PEG 链共价键合的胰高血糖素肽与胰岛素联合给予,以缓冲胰岛素的作用并帮助维持糖尿病患者的稳定血糖水平。可将本发明经修饰的胰高血糖素肽与胰岛素作为单一组合物共同给予或作为分开的溶液同时给予,或作为备选可在彼此相隔不同的时间给予胰岛素和经修饰的胰高血糖素肽。在一个实施方案中,在彼此相隔 12 小时内给予包含胰岛素的组合物和包含经修饰的胰高血糖素肽的组合物。经修饰的胰高血糖素肽相对于给予的胰岛素的确切比率,部分地视对患者的胰高血糖素水平测定而定,其可通过常规实验方法测定。

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

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

[0369] 在另一实施方案中,用于诱导肠道临时麻痹的组合物包含第一经修饰的胰高血糖素肽和第二经修饰的胰高血糖素肽。第一经修饰的肽包含选自 SEQ ID NO:23、SEQ ID NO:24 和 SEQ ID NO:25 的序列,其任选与约 500-约 5,000 道尔顿的 PEG 链连接,第二肽包含

选自 SEQ ID NO :23、SEQ ID NO :24 和 SEQ ID NO :25 的序列,其与约 10,000–约 40,000 道尔顿的 PEG 链共价连接。在该实施方案中,每一肽的 PEG 链与各肽的 17、21 或 24 位任一位置的氨基酸残基共价键合并彼此独立。

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

[0371] 因此,本发明亦包含具有羧基末端延伸 SEQ ID NO :27(KRNRNNIA)或 SEQ ID NO :28 的本发明经修饰的胰高血糖素肽。可将这些化合物给予个体以诱导减重或防止增重。根据一个实施方案,将进一步包含与胰高血糖素肽的 29 位氨基酸连接的氨基酸序列 SEQ ID NO :27(KRNRNNIA)或 SEQ ID NO :28 的胰高血糖素激动剂类似物 SEQ ID NO :33 或 SEQ ID NO :20 给予个体,以诱导减重或防止增重。更具体地,所述胰高血糖素肽包含选自以下的序列: SEQ ID NO :10、SEQ ID NO :12、SEQ ID NO :13、SEQ ID NO :14 和 SEQ ID NO :15,所述序列进一步包含与所述胰高血糖素肽的 29 位氨基酸连接的氨基酸序列 SEQ ID NO :27(KRNRNNIA)或 SEQ ID NO :28。

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

[0373] 多聚体

[0374] 本发明亦包含本文公开的经修饰胰高血糖素肽的多聚体。用标准连接剂和本领域技术人员所知的方法,可将两种或更多种经修饰的胰高血糖素肽连接在一起。例如,通过用双官能硫醇交联剂和双官能胺交联剂,可在两种经修饰的胰高血糖素肽之间形成二聚体,尤其是对于被半胱氨酸、赖氨酸、鸟氨酸、高半胱氨酸或乙酰基苯丙氨酸残基取代的胰高血糖素肽(例如 SEQ ID NO :3 和 SEQ ID NO :4)。二聚体可为同二聚体,或作为备选可为异二

聚体。在某些实施方案中,连接两个(或更多个)胰高血糖素肽的接头为 PEG,例如 5kDa PEG、20kDaPEG。在某些实施方案中,接头为二硫键。例如,二聚体的每一单体可包含 Cys 残基(例如末端或内部位置的 Cys),每一 Cys 残基的硫原子参与二硫键的形成。在本发明某些方面,经由末端氨基酸(例如 N-末端或 C-末端)、经由内部氨基酸或经由至少一个单体的末端氨基酸和至少一个另外单体的内部氨基酸连接单体。在特定方面,经由 N-末端氨基酸连接单体。在某些方面,多聚体的单体以“尾-对-尾”方向连接在一起,其中每一单体的 C-末端氨基酸连接在一起。

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

[0376] 根据一个实施方案,提供包含经由接头与第二胰高血糖素肽键合的第一胰高血糖素肽的二聚体,其中所述第一胰高血糖素肽包含选自 SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10 和 SEQ ID NO:11 的肽,所述第二胰高血糖素肽包含 SEQ ID NO:20。按照另一实施方案,提供包含经由接头与第二胰高血糖素肽键合的第一胰高血糖素肽的二聚体,其中所述第一胰高血糖素肽包含选自以下的序列:SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11,所述第二胰高血糖素肽包含 SEQ ID NO:11 和所述胰高血糖素多肽的可药用盐。按照另一实施方案,提供包含经由接头与第二胰高血糖素肽键合的第一胰高血糖素肽的二聚体,其中所述第一胰高血糖素肽选自 SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:17 和 SEQ ID NO:18,所述第二胰高血糖素肽独立选自 SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:17 和 SEQ ID NO:18 和所述胰高血糖素多肽的可药用盐。在一个实施方案中,所述第一胰高血糖素肽选自 SEQ ID NO:20,所述第二胰高血糖素肽独立选自 SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9 和 SEQ ID NO:11。在一个实施方案中,二聚体在两个肽之间形成,其中每一肽包含氨基酸序列 SEQ ID NO:11。

[0377] 药盒

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

ID NO :14、SEQ ID NO :15、SEQ ID NO :16、SEQ ID NO :17 和 SEQ ID NO :18。

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

[0380] 药物制剂

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

[0382] 在某些实施方案中,药物组合物包含任何以下组分中的一种或组合:阿拉伯树胶、乙酰氨基磺酸钾、乙酰柠檬酸三丁酯、乙酰柠檬酸三乙酯、琼脂、白蛋白、醇、无水醇、工业酒精、稀释酒精、油桐酸、藻酸、脂肪族聚酯、氧化铝、氢氧化铝、硬脂酸铝、支链淀粉、 α -直链淀粉、抗坏血酸、抗坏血酸棕榈酸酯、天冬氨酸苄甲氨酸甲酯、注射用抑菌水、膨润土、膨润土岩浆、苯扎氯铵、苄索氯铵、苯甲酸、苯甲醇、苯甲酸苄酯、溴硝醇、丁基羟基茴香醚、丁羟甲苯、对羟基苯甲酸丁酯、丁基对羟基苯甲酸钠、藻酸钙、抗坏血酸钙、碳酸钙、环己基氨基磺酸钙、无水磷酸氢钙、脱水磷酸氢钙、磷酸三钙、丙酸钙、硅酸钙、山梨酸钙、硬脂酸钙、硫酸钙、硫酸钙半水合物、芥花籽油、卡波姆(carbomer)、二氧化碳、羧甲基纤维素钙、羧甲基纤维素钠、 β -胡萝卜素、角叉胶、蓖麻油、氢化蓖麻油、阳离子乳化钠、乙酸纤维素、乙酸邻苯二甲酸纤维素、乙基纤维素、微晶纤维素、粉状纤维素、硅化微晶纤维素、羧甲基纤维素钠、鲸脂醇、溴化十六烷基三甲铵、鲸蜡醇、氯己定、氯丁醇、氯甲酚、胆固醇、乙酸氯己定、葡萄糖酸氯己定、盐酸氯己定、氟利昂(HCFC)、一氯二氟甲烷、含氯氟烃(CFC)、氯苯氧基乙醇、氯二甲苯酚、淀粉糖浆干粉、无水柠檬酸、柠檬酸一水合物、可可油、着色剂、玉米油、棉籽油、甲酚、间甲酚、邻甲酚、对甲酚、交联甲羧纤维素钠、交联聚乙烯吡咯烷酮、环拉酸、环糊精、葡萄糖结合剂、糊精、右旋糖、无水右旋糖、双咪唑烷基脲、邻苯二甲酸二丁酯、癸二酸二丁酯、二乙醇胺、邻苯二甲酸二乙酯、二氟乙烷(HFC)、二甲基- β -环糊精、环糊精型化合物例如 Captisol[®]、二甲基醚、邻苯二甲酸二甲酯、依地酸二钾、依地酸二钠、磷酸氢二钠、多库酯钙、多库酯钾、多库酯钠、没食子酸十二酯、十二烷基三甲基溴化铵、依地酸钙二钠、乙二胺四乙酸、乙葡胺、乙醇、乙基纤维素、没食子酸乙酯、月桂酸乙酯、乙基麦芽酚、油酸乙酯、对羟甲基苯甲酸乙酯、对羟甲基苯甲酸钾、乙基对羟甲基苯甲酸钠、乙基香兰素、果糖、液体果糖、磨碎的果糖、无热原果糖、粉状果糖、富马酸、白明胶、葡萄糖、液体葡萄糖、

饱和植物脂肪酸的甘油酯混合物、甘油、山嵛酸甘油酯、单油酸甘油酯、单硬脂酸甘油酯、自乳化单硬脂酸甘油酯、硬脂酸棕榈酸甘油酯、甘氨酸、乙二醇、四乙二醇醚、瓜尔胶、七氟丙烷 (HFC)、十六基三甲基溴化铵、高果糖糖浆、人血清白蛋白、烃 (HC)、烯盐酸、II 型氢化植物油、羟基乙基纤维素、2- 羟基乙基 - β - 环糊精、羟基丙基纤维素、低取代羟基丙基纤维素、2- 羟基丙基 - β - 环糊精、羟丙基甲基纤维素、羟丙基甲基纤维素邻苯二甲酸酯、咪脲、靛蓝、离子交换剂、氧化铁、异丙醇、豆蔻酸异丙酯、棕榈酸异丙酯、等渗盐水、高岭土、乳酸、乳糖醇、乳糖、羊毛脂、羊毛脂醇、无水羊毛脂、卵磷脂、硅酸镁铝、碳酸镁、正常碳酸镁、无水碳酸镁、碱式碳酸镁、氢氧化镁、月桂基硫酸镁、氧化镁、硅酸镁、硬脂酸镁、三硅酸镁、无水三硅酸镁、苹果酸、麦芽、麦芽糖醇、麦芽糖醇溶液、麦芽糊精、麦芽酚、麦芽糖、甘露醇、中链甘油三酯、甲葡胺、薄荷醇、甲基纤维素、甲基丙烯酸甲酯、油酸甲酯、对羟甲基苯甲酸甲酯、甲基对羟甲基苯甲酸钾、甲基对羟甲基苯甲酸钠、微晶纤维素和羧甲基纤维素钠、矿物油、轻矿物油、矿物油和羊毛脂醇、油、橄榄油、单乙醇胺、蒙脱石、没食子酸辛酯、油酸、棕榈酸、石蜡、花生油、矿脂、矿脂和羊毛脂醇、药用釉料、苯酚、液化苯酚、苯氧乙醇、苯氧丙醇、苯基乙醇、乙酸苯汞、硼酸苯汞、硝酸苯汞、波拉克林 (polacrilin)、波拉克林钾、泊洛沙姆 (poloxamer)、聚右旋糖、聚乙二醇、聚环氧乙烷、聚丙烯酸酯、聚乙烯 - 聚氧丙烯 - 嵌段聚合物、聚甲基丙烯酸、聚氧乙烯烷基醚、聚氧乙烯蓖麻油衍生物、聚氧乙烯山梨醇脂肪酸酯、硬脂酸聚氧乙烯酯、聚乙烯醇、聚乙烯吡咯烷酮、藻酸钾、苯甲酸钾、碳酸氢钾、硫酸氢钾、氯化钾、柠檬酸钾、无水柠檬酸钾、磷酸氢钾、偏亚硫酸氢钾、磷酸二氢钾、丙酸钾、山梨酸钾、聚乙烯吡咯烷酮、丙醇、丙酸、碳酸丙烯、丙二醇、丙二醇藻酸、没食子酸丙酯、对羟甲基苯甲酸丙酯、丙基对羟甲基苯甲酸钾、丙基对羟甲基苯甲酸钠、硫酸精蛋白、油菜籽油、Ringer 氏溶液、糖精、糖精铵、糖精钙、糖精钠、红花油、皂石、血清蛋白质、芝麻油、硅胶、二氧化硅胶、藻酸钠、抗坏血酸钠、苯甲酸钠、碳酸氢钠、硫酸氢钠、氯化钠、无水柠檬酸钠、脱水柠檬酸钠、氯化钠、甜精钠、依地酸钠、十二烷基硫酸钠、月桂基硫酸钠、偏亚硫酸氢钠、磷酸氢二钠、磷酸二氢钠、磷酸三钠、无水丙酸钠、丙酸钠、山梨酸钠、淀粉乙醇酸钠、硬脂酰醇富马酸钠、亚硫酸钠、山梨酸、山梨坦酯 (山梨坦脂肪酯)、山梨醇、山梨醇溶液 70%、大豆油、鲸蜡、淀粉、玉米淀粉、土豆淀粉、预胶化淀粉、灭菌玉米淀粉、硬脂酸、纯化的硬脂酸、硬脂醇、蔗糖、糖、可压缩糖、糖粉、糖球、转化糖、蔗糖 - 转化糖聚合物、晚霞黄 FCF、合成石蜡、滑石、酒石酸、酒石黄、四氟乙烷 (HFC)、梧桐油、硫汞撒、二氧化钛、 α 生育酚、乙酸生育酚、琥珀酸 α 生育酚、 β - 生育酚、 δ - 生育酚、 γ - 生育酚、西黄耆胶、醋精、柠檬酸三丁酯、三乙醇胺、柠檬酸三乙酯、三甲基 - β - 环糊精、三甲基十四烷基溴化铵、tris 缓冲液、依地酸三钠、香兰素、I 型氢化植物油、水、软水、硬水、无二氧化碳水、无热原水、注射用水、吸入用无菌水、无菌注射用水、冲洗用无菌水、蜡、阴离子乳化钠、巴西棕榈蜡、阳离子乳化钠、鲸酯蜡、微晶蜡、非离子乳化钠、栓剂蜡、白蜡、黄蜡、白矿脂、羊毛脂、黄原胶、木糖醇、玉米蛋白、丙酸锌、锌盐、硬脂酸锌或 Handbook of Pharmaceutical Excipients 第三版, A. H. Kibbe (Pharmaceutical Press, London, UK, 2000) 中的任何赋形剂, 该书以其整体在此引作参考。Remington's Pharmaceutical Sciences 第 16 版, E. W. Martin (Mack Publishing Co., Easton, Pa., 1980) (以其整体在此引作参考) 揭示了在调配可药用组合物中所用的各种组分及制备可药用组合物的已知技术。除了与药物组合物不相容的常规作用剂外, 至于其余的任何常规作用剂在药物组合物中涵盖其用途。亦可将补充性的活性成分纳入所述组

合物中。

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

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

[0385] 可调配药物组合物以获得生理上相容的 pH。在某些实施方案中,药物组合物的 pH 可为至少 5、至少 5.5、至少 6、至少 6.5、至少 7、至少 7.5、至少 8、至少 8.5、至少 9、至少 9.5、至少 10 或至少 10.5,至多包括 pH 11,这视制剂和给药途径而定。在某些实施方案中,药物组合物可包含缓冲剂以获得生理相容的 pH。缓冲剂可包括能够在所需 pH 处缓冲的任何化合物,例如磷酸盐缓冲液(例如 PBS)、三乙醇胺、Tris、N,N-二羟乙基甘氨酸、TAPS、曲辛、HEPES、TES、MOPS、PIPES、甲次砷酸盐、MES 和其它缓冲剂。在某些实施方案中,缓冲液浓度为至少 0.5mM、至少 1mM、至少 5mM、至少 10mM、至少 20mM、至少 30mM、至少 40mM、至少 50mM、至少 60mM、至少 70mM、至少 80mM、至少 90mM、至少 100mM、至少 120mM、至少 150mM 或至少 200mM。在某些实施方案中,缓冲液浓度不大于 300mM(例如至多 200mM、至多 100mM、至多 90mM、至多 80mM、至多 70mM、至多 60mM、至多 50mM、至多 40mM、至多 30mM、至多 20mM、至多 10mM、至多 5mM、至多 1mM)。

[0386] 3 位修饰

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

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

[0389] 制备方法

[0390] 可通过标准合成方法、重组 DNA 技术或制备肽和融合蛋白的任何其它方法来制备本发明化合物。尽管某些非天然氨基酸不能由标准重组 DNA 技术表达,但其制备技术为本

领域已知。除了用合适的标准肽化学反应之外,还可通过标准有机化学反应合成包含非肽部分的本发明化合物。

实施例

[0391] 通用合成方案

[0392] 在改良的 Applied Biosystem 430 A 肽合成仪上,用 HBTU-活化的“Fast Boc”单连接从 0.2 毫摩尔的 Boc Thr(OBzl)Pam 树脂开始合成胰高血糖素类似物。Boc 氨基酸和 HBTU 来自 Midwest Biotech(Fishers, IN)。所用侧链保护基团为:Arg(Tos)、Asn(Xan)、Asp(OcHex)、Cys(pMeBzl)、His(Bom)、Lys(2Cl-Z)、Ser(OBzl)、Thr(OBzl)、Tyr(2Br-Z) 和 Trp(CHO)。N-末端 His 上的侧链保护基团是 Boc。

[0393] 用含 20% 哌啶的二甲基甲酰胺溶液与每一个完成的肽基树脂反应,以从色氨酸除去甲酰基基团。在对甲酚和二甲基硫醚存在下进行液态氟化氢裂解。用 HF 仪器(Penninsula Labs)在冰浴中进行 1 小时裂解。蒸发 HF 后,将残留物悬浮在乙醚中,过滤固体物质。将每种肽提取到 30-70ml 乙酸水溶液中,由 HPLC 分析稀释的等份样 [Beckman System Gold, 0.46x5cm Zorbax C8, 1ml/分钟, 45C, 214nm, A 缓冲液 = 0.1% TFA, B = 0.1% TFA/90% 乙腈, 梯度为经 10 分钟 10% -80% B]。

[0394] 在 FPLC 上经 2.2x25cm Kromasil C18 柱进行纯化,同时在 214nm 处监测 UV,收集馏分 5 分钟。合并同类馏分并冻干,得到产物纯度为 > 95%。用 MALDI-质谱分析确认准确的分子量和纯度。

[0395] 通用聚乙二醇化方案:(Cys-马来酰亚胺基)

[0396] 典型地,让胰高血糖素 Cys 类似物溶解于磷酸盐缓冲的盐水 (5-10mg/ml) 中,加入 0.01M 乙二醇四乙酸 (10-15% 的总体积)。加入过量 (2-倍) 的马来酰亚胺基甲氧基 PEG 试剂 (Nektar),在室温下搅拌反应物,同时用 HPLC 监测反应进程。8-24 小时后,使反应混合物酸化,并将其装载到制备性反相柱上,用 0.1% TFA/乙腈梯度进行纯化。合并合适的馏分并冻干,得到所期需的聚乙二醇化类似物。

[0397] 实施例 1

[0398] 合成胰高血糖素 Cys¹⁷ (1-29) 和类似的单 Cys 类似物

[0399] 60ml 反应瓶中有 0.2 毫摩尔 Boc Thr(OBzl)Pam 树脂 (SynChem Inc),加入以下序列并让其在 FastBoc HBTU-活化的单连接的改良 Applied Biosystems 430A 肽合成仪上流过。

[0400] HSQGTFTSDYSKYLDSCRAQDFVQWLMNT (SEQ ID NO :35)

[0401] 使用以下侧链保护基:Arg(Tos)、Asp(OcHex)、Asn(Xan)、Cys(pMeBzl)、Glu(OcHex)、His(Boc)、Lys(2Cl-Z)、Ser(Bzl)、Thr(Bzl)、Trp(CHO) 和 Tyr(Br-Z)。用 20% 哌啶/二甲基甲酰胺与完成的肽基树脂反应,以除去 Trp 的甲酰基保护,然后转移到 HF 反应瓶中,在真空干燥。加入 1.0ml 对甲酚和 0.5ml 二甲基硫醚连同磁力搅拌棒。将反应瓶连接到 HF 仪器 (Penninsula Labs),在干冰/甲醇浴中冷却,蒸发,浓缩为大约 10ml 的液态氟化氢。在冰浴中将反应物搅拌 1 小时,然后真空除去 HF。让残留物悬浮在乙醚中;过滤固体,用醚洗涤,将肽提取到 50ml 乙酸水溶液中。让裂解提取物小样进行分析性 HPLC [0.46x5cm Zorbax C8, 1ml/分钟, 45C, 214nm, 0.1% TFA 的 A 缓冲液, 0.1% TFA/90%

ACN 的 B 缓冲液, 梯度 = 经 10 分钟 10% B-80% B]。将其余的提取物装载到 2.2x25cm Kromasil C18 制备性反相柱上, 用 Pharmacia FPLC 系统进行乙腈梯度。收集 5 分钟馏分, 同时在 214nm 处监测 UV (2.0A)。A = 0.1% TFA, B = 0.1% TFA/50% 乙腈。梯度 = 经 450 分钟 30% B-100% B。

[0402] 合并含有最纯产物 (48-52) 的馏分, 冷冻并冻干, 得到 30.1mg。产物的 HPLC 分析证明纯度 > 90%, MALDI 质谱分析证明所期需的 3429.7 的质量。类似地制备胰高血糖素 Cys²¹、胰高血糖素 Cys²⁴ 和胰高血糖素 Cys²⁹。

[0403] 实施例 2

[0404] 合成胰高血糖素-Cex 和其它 C-末端延伸的类似物

[0405] 将 285mg (0.2 毫摩尔) 甲氧基二苯甲胺树脂 (Midwest Biotech) 置于 60ml 反应瓶中, 让以下序列进入并让其在使用 FastBoc HBTU-活化的单连接的改良 Applied Biosystems 430A 肽合成仪上流过。

[0406] HSQGTFTSDYSKYLSRRRAQDFVQWLMNTGPSSGAPPPS (SEQ ID NO :36)

[0407] 使用以下侧链保护基: Arg (Tos)、Asp (OchHex)、Asn (Xan)、Cys (pMeBzl)、Glu (OchHex)、His (Boc)、Lys (2Cl-Z)、Ser (Bzl)、Thr (Bzl)、Trp (CHO) 和 Tyr (Br-Z)。用 20% 哌啶 / 二甲基甲酰胺与完成的肽基树脂反应, 以除去 Trp 的甲酰基保护, 然后转移到 HF 反应瓶中, 真空干燥。加入 1.0ml 对甲酚和 0.5ml 二甲基硫醚连同磁力搅拌棒。将反应瓶连接到 HF 仪器 (Pennisula Labs), 在干冰 / 甲醇浴中冷却, 蒸发, 浓缩为大约 10ml 的液态氟化氢。在冰浴中将反应物搅拌 1 小时, 然后真空除去 HF。让残留物悬浮在乙基醚中; 过滤固体, 用醚洗涤, 将肽提取到 50ml 乙酸水溶液中。让裂解提取物等份样进行分析性 HPLC [0.46x5cm Zorbax C8, 1ml/分钟, 45C, 214nm, 0.1% TFA 的 A 缓冲液, 0.1% TFA/90% ACN 的 B 缓冲液, 梯度 = 经 10 分钟 10% B-80% B]。将提取物装载到 2.2x25cm Kromasil C18 制备性反相柱上, 用 Pharmacia FPLC 系统进行乙腈梯度洗脱。收集 5 分钟馏分, 同时在 214nm 处监测 UV (2.0A)。A = 0.1% TFA, B = 0.1% TFA/50% 乙腈。梯度 = 经 450 分钟 30% B-100% B。合并 58-65 馏分, 冷冻并冻干, 得到 198.1mg。

[0408] 产物的 HPLC 分析证明纯度大于 95%, MALDI 质谱分析证明所期需的 4316.7 的理论质量, 产物含 C-末端酰胺。从合适装载的 PAM-树脂开始, 类似地制备含 C-末端羧酸的泌酸调节肽和泌酸调节肽-KRNR。

[0409] 实施例 3

[0410] 胰高血糖素 Cys¹⁷ Mal-PEG-5K

[0411] 让 15.1mg 胰高血糖素 Cys¹⁷ (1-29) 和 27.3mg 平均分子量 5000 的甲氧基聚 (乙烯乙二醇) 马来酰亚胺 (mPEG-Mal-5000, Nektar Therapeutics) 溶解于 3.5ml 磷酸盐缓冲盐水 (PBS) 中, 加入 0.5ml 0.01M 乙二胺四乙酸 (EDTA)。在室温搅拌反应物, 由 HPLC 分析监测反应进展 [0.46x5cm Zorbax C8, 1ml/分钟, 45C, 214nm (0.5A), A = 0.1% TFA, B = 0.1% TFA/90% ACN, 梯度 = 经 10 分钟 10% B-80% B]。

[0412] 5 小时后将反应混合物装载到 2.2x25cm Kromasil C18 制备性反相柱上。在 Pharmacia FPLC 上实施乙腈梯度, 同时在波长 214nm 处监测 UV, 收集 5 分钟馏分。A = 0.1% TFA, B = 0.1% TFA/50% 乙腈, 梯度 = 经 450 分钟 30% B-100% B。合并对应产物的馏分, 冷冻并冻干, 得到 25.9mg。

[0413] 在 HPLC 上分析该产物 [0.46x5cm Zorbax C8, 1ml/ 分钟, 45C, 214nm(0.5A), A = 0.1% TFA, B = 0.1% TFA/90% ACN, 梯度=经 10 分钟 10% B-80% B], 显示纯度大约 90%。MALDI (基料辅助激光解吸电离) 质谱分析显示 8700-9500 的广泛质量范围 (PEG 衍生物特有的)。这表明在起始胰高血糖素肽 (3429) 上加上了大约 5,000 原子质量单位的质量。

[0414] 实施例 4

[0415] 胰高血糖素 Cys²¹ Mal-PEG-5K

[0416] 让 21.6mg 胰高血糖素 Cys²¹(1-29) 和 24mg mPEG-Mal-5000 (Nektar Therapeutics) 溶解于 3.5ml 磷酸盐缓冲的盐水 (PBS), 并加入 0.5ml 0.01M 乙二胺四乙酸 (EDTA)。在室温搅拌反应物。2 小时后, 再加入 12.7mg 的 mPEG-MAL-5000。8 小时后将反应混合物装载到 2.2x25cm Vydac C18 制备性反相柱上, 在 Pharmacia FPLC 上以 4ml/ 分钟实施乙腈梯度, 同时收集馏分 5 分钟。A = 0.1% TFA, B = 0.1% TFA/50% ACN, 梯度=经 450 分钟 20% B-80% B。

[0417] 冷冻合并对应于产物外观的馏分, 并冻干, 得到 34mg。通过分析性 HPLC 进行该产物的分析 [0.46x5cm Zorbax C8, 1ml/ 分钟, 45C, 214nm(0.5A), A = 0.1% TFA, B = 0.1% TFA/90% ACN, 梯度=经 10 分钟 10% B-80% B], 显示不同于起始胰高血糖素肽的均一产物。MALDI (基料辅助激光解吸电离) 质谱分析显示 8700-9500 的广泛质量范围 (PEG 类似物特有的)。这表明在起始胰高血糖素肽 (3470) 上加上了大约 5,000 原子质量单位的质量。

[0418] 实施例 5

[0419] 胰高血糖素 Cys²⁴ Mal-PEG-5K

[0420] 让 20.1mg 胰高血糖素 Cys²⁴(1-29) 和 39.5mg mPEG-Mal-5000 (Nektar Therapeutics) 搅拌溶解于 3.5ml PBS 中, 加入 0.5ml 0.01M EDTA。在室温搅拌反应物 7 小时, 然后再加 40mg 的 mPEG-Mal-5000。在大约 15 小时后, 将反应混合物装载到 2.2x25cm Vydac C18 制备性反相柱上并用 Pharmacia FPLC 实施乙腈梯度。收集馏分 5 分钟, 同时在波长 214nm 处监测 UV (2.0A)。A 缓冲液 = 0.1% TFA, B 缓冲液 = 0.1% TFA/50% ACN, 梯度=经 450 分钟 30% B-100% B。合并对应于产物的馏分, 冷冻并冻干, 得到 45.8mg。MALDI 质谱分析显示典型的最大 9175.2 的 PEG 宽信号, 其比胰高血糖素 C²⁴ (3457.8) 大约多 5,000 原子质量单位。

[0421] 实施例 6

[0422] 胰高血糖素 Cys²⁴ Mal-PEG-20K

[0423] 让 25.7mg 胰高血糖素 Cys²⁴(1-29) 和 40.7mg mPEG-Mal-20K (Nektar Therapeutics) 在室温下搅拌溶解于 3.5ml PBS 中, 加入 0.5ml 0.01M EDTA。6 小时后由 HPLC 测定的起始物质与产物的比率大约 60 : 40。再加入 25.1mg 的 mPEG-Mal-20K, 让反应物再搅拌 16 小时。产物比率没有显著改进, 因此将反应混合物装载到 2.2x25cm Kromasil C18 制备性反相柱上, 并在 Pharmacia FPLC 上经 450 分钟用 30% B-100% B 的梯度进行纯化。A 缓冲液 = 0.1% TFA, B = 缓冲液 0.1% TFA/50% ACN, 流速 = 4ml/ 分钟, 收集馏分 5 分钟, 同时在波长 214nm 处监测 UV (2.0A)。合并含同类产物的馏分, 冷冻并冻干, 得到 25.7mg。由分析性 HPLC 测得纯度为大约 90%。MALDI 质谱分析显示 23,000-27,000 的宽峰, 这比起始胰高血糖素 C²⁴ (3457.8) 大约多 20,000 原子质量单位。

[0424] 实施例 7

[0425] 胰高血糖素 Cys²⁹ Mal-PEG-5K

[0426] 让 20.0mg 胰高血糖素 Cys²⁹(1-29) 和 24.7mg mPEG-Mal-5000 (Nektar Therapeutics) 在室温搅拌溶解于 3.5ml PBS 中, 加入 0.5ml 0.01M EDTA。4 小时后再加 15.6mg 的 mPEG-Mal-5000 以驱动反应完成。8 小时后将反应混合物装载到 2.2x25cm Vydac C18 制备性反相柱上, 在 Pharmacia FPLC 系统上实施乙腈梯度。收集馏分 5 分钟, 同时在波长 214nm 处监测 UV。A = 0.1% TFA, B = 0.1% TFA/50% ACN。合并 75-97 的馏分, 冷冻并冻干, 得到 40.0mg 不同于在 HPLC 上回收的起始物质 (馏分 58-63) 的产物。由分析性 HPLC 分析该产物 [0.46x5cm Zorbax C8, 1ml/分钟, 45C, 214nm(0.5A), A = 0.1% TFA, B = 0.1% TFA/90% ACN, 梯度=经 10 分钟 10% B-80% B], 显示纯度大于 95%。MALDI 质谱分析显示存在质量范围为 8,000-10,000 (最大 9025.3) 的 PEG 组分, 其比起始物质 (3484.8) 大 5,540 原子质量单位。

[0427] 实施例 8

[0428] 胰高血糖素 Cys²⁴(2-丁内酯)

[0429] 向 24.7mg 胰高血糖素 Cys²⁴(1-29) 中加入 4ml 0.05M 碳酸氢铵/50%乙腈和 5.5ul 的 2-溴-4-羟基丁酸-γ-内酯 (100ul 存于 900ul 乙腈中) 溶液。在室温搅拌 3 小时后, 再向反应混合物中加入 105ul 内酯溶液, 再搅拌 15 小时。用 10% 乙酸水溶液将反应混合物稀释到 10ml, 装载到 2.2x25cm Kromasil C18 制备性反相柱上。在 Pharmacia FPLC 上实施乙腈梯度 (经 450 分钟 20% B-80% B), 同时收集馏分 5 分钟, 在 214nm 处监测 UV (2.0A)。流速 = 4ml/分钟, A = 0.1% TFA, B = 0.1% TFA/50% ACN。合并馏分 74-77, 冷冻并冻干, 得到 7.5mg。HPLC 分析显示纯度为 95%, MALDI 质谱显示 3540.7 的质量或大于起始物质 84 的质量单位。该结果符合加入单一的丁内酯部分。

[0430] 实施例 9

[0431] 胰高血糖素 Cys²⁴(S-羧甲基)

[0432] 将 18.1mg 胰高血糖素 Cys²⁴(1-29) 溶解于 9.4ml 0.1M 磷酸钠缓冲液 (pH = 9.2) 中, 加入 0.6ml 溴乙酸溶液 (乙腈中 1.3mg/ml)。室温下搅拌反应物, 由分析性 HPLC 跟踪反应进程。1 小时后再加入 0.1ml 溴乙酸溶液。将反应物再搅拌 60 分钟, 然后用乙酸水溶液酸化, 装载到 2.2x25cm Kromasil C18 制备性反相柱上用于纯化。在 Pharmacia FPLC 上实施乙腈梯度 (流速 = 4ml/分钟), 同时收集馏分 5 分钟, 在 214nm 处监测 UV (2.0A)。A = 0.1% TFA, B = 0.1% TFA/50% ACN。合并馏分 26-29, 冷冻并冻干, 得到若干 mg 产物。分析性 HPLC 显示纯度为 90%, MALDI 质谱分析确认所期需产物的质量为 3515。

[0433]



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

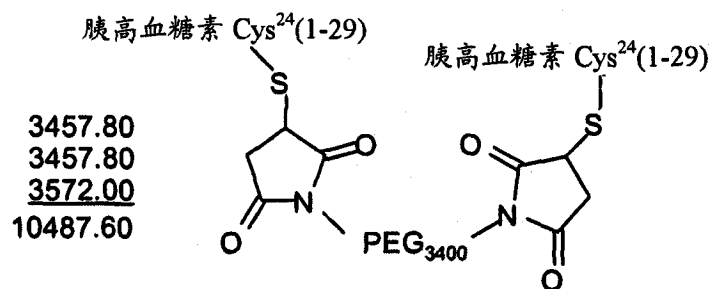
SEQ ID NO: 38

[0434] 实施例 10

[0435] 胰高血糖素 Cys²⁴ 马来酰亚胺基, PEG-3.4K-二聚体

[0436] 让 16mg 胰高血糖素 Cys²⁴ 和 1.02mg 平均分子量 3400 的 Mal-PEG-Mal-3400 聚(乙二醇)-双-马来酰亚胺(Nektar Therapeutics) 溶解于 3.5 磷酸盐缓冲盐水和 0.5ml 0.01M EDTA 中, 室温下搅拌反应物。16 小时后, 再加入 16mg 的胰高血糖素 Cys²⁴, 持续搅拌。大约 40 小时后, 将反应混合物装载到 Pharmacia PepRPC 16/10 柱上, 在 Pharmacia FPLC 上实施乙腈梯度, 同时收集 2 分钟馏分, 在 214nm 处监测 UV(2.0A)。流速 = 2ml/分钟, A = 0.1% TFA, B = 0.1% TFA/50% ACN。合并馏分 69-74, 冷冻并冻干, 得到 10.4mg。分析性 HPLC 显示纯度为 90%, MALDI 质谱分析显示 9500-11,000 范围内的组分, 这符合所期需的二聚体。

[0437]



[0438] 实施例 11

[0439] 合成胰高血糖素内酰胺

[0440] 将 285mg (0.2 毫摩尔) 甲氧基二苯甲胺树脂 (Midwest Biotech) 加入到 60mL 反应瓶中, 用 Boc-DEPBT-活化的单连接让以下序列聚合到改良的 Applied Biosystems 430A 肽合成仪上。

[0441] HSQGTFTSDYSKYLDERRAQDFVQWLMNT-NH₂ (12-16 内酰胺; SEQ ID NO:12)

[0442] 使用以下侧链保护基: Arg(Tos)、Asp(OcHx)、Asn(Xan)、Glu(OFm)、His(BOM)、Lys(Fmoc)、Ser(Bzl)、Thr(Bzl)、Trp(CHO)、Tyr(Br-Z)。若从 16-20、20-24 或 24-28 构建内酰胺, 则 12 位用 Lys(Cl-Z)。用 20% 哌啶/二甲基甲酰胺与完成的肽基树脂作用 1 小时, 旋转以从 Lys12 和 Glu16 除去 Trp 的甲酰基基团以及 Fmoc 和 OFm 保护。在由阳性茚三酮检测确认除去后, 用二甲基甲酰胺接着用二氯甲烷然后再次用二甲基甲酰胺洗涤树脂。用二甲基甲酰胺和二异丙基乙基胺 (DIEA) 中的 520mg (1 毫摩尔) 苯并三唑-1-基-氧基-三-吡咯烷子基-磷六氟磷酸盐 (PyBOP) 与树脂作用。反应进行 8-10 小时, 通过阴性茚三酮反应来确认环化。用二甲基甲酰胺接着用二氯甲烷洗涤树脂, 随后用三氟乙酸处理 10 分钟。通过阳性茚三酮反应确认除去 Boc 基团。用二甲基甲酰胺和二氯甲烷洗涤树脂, 转移到氢氟酸 (HF) 反应瓶中后干燥。加入 500 μ L 对甲酚连同磁力搅拌棒。将反应瓶连接到 HF 仪器 (Peninsula Labs), 在干冰/甲醇浴中冷却, 蒸发, 反应瓶中浓缩到大约 10mL 液态氢氟酸。在冰浴中将反应物搅拌 1 小时, 随后真空除去 HF。让残留物悬浮在乙基醚中; 过滤固体, 用醚洗涤, 用 150mL 20% 乙腈/1% 乙酸溶解肽。

[0443] 在以下条件下进行粗溶解肽的分析性 HPLC 分析 [4.6X30mm Xterra C8, 1.50ml/分钟, 220nm, A 缓冲液 0.1% TFA/10% ACN, B 缓冲液 0.1% TFA/100% CAN, 梯度为经 15 分钟 5-95% B]。用水将提取物稀释 2 倍, 装载到 2.2X25cm Vydac C4 制备性反相柱上, 在 Waters HPLC 系统上用乙腈梯度洗脱 (A 缓冲液为 0.1% TFA/10% ACN, B 缓冲液为 0.1% TFA/10%

ACN,梯度为经 120 分钟 0-100% B,流速为 15.00ml/ 分钟)。纯化肽的 HPLC 分析显示大于 95%的纯度,电子喷雾离子质谱分析确认 12-16 内酰胺的 3506Da 的质量。类似地制备了 16-20、20-24 和 24-28 内酰胺。

[0444] 实施例 12

[0445] 胰高血糖素溶解性测定

[0446] 在 0.01N HCl 中制备胰高血糖素(或类似物)的 A 溶液(1mg/ml 或 3mg/ml)。用 0.01N HCl 将 100ul 储液稀释到 1ml,测定 UV 吸光度(276nm)。用 200-250ul 0.1M Na₂HP04(pH 9.2)将剩余储液的 pH 调整到 pH7。让溶液在 4℃静置过夜,然后离心。然后用 0.01N HCl 将 100ul 上清液稀释到 1ml,测定 UV 吸光度(一式两份)。

[0447] 初始吸光度读数补偿了体积的增大,用以下计算来确定溶解性百分比:

[0448]

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

[0449] 结果示于表 1 中,其中胰高血糖素-Cex 表示野生型胰高血糖素(SEQ ID NO:1)加 SEQ ID NO:26 的羧基末端添加,胰高血糖素-CexR¹²表示 SEQ ID NO:39。

[0450] 表 1 胰高血糖素类似物溶解数据

[0451] 类似物 溶解性百分比

[0452] 胰高血糖素 16

[0453] 胰高血糖素-Cex, R12 104

[0454] 胰高血糖素-Cex 87

[0455] 泌酸调节肽 104

[0456] 胰高血糖素, Cys17PEG5K 94

[0457] 胰高血糖素, Cys21PEG5K 105

[0458] 胰高血糖素, Cys24PEG5K 133

[0459] 实施例 13

[0460] 胰高血糖素受体结合测定

[0461] 在竞争结合测定中用闪烁亲近测定技术测量肽对胰高血糖素受体的亲和力。在 96 孔白色/透明底的板(Corning Inc., Acton, MA)中让以下物质混合:在闪烁亲近测定缓冲液(0.05M Tris-HCl, pH 7.5, 0.15M NaCl, 0.1% w/v 牛血清白蛋白)中进行 3-倍系列稀释的所测肽、每孔 1-6 微克的 0.05nM(3-[¹²⁵I]-碘酪氨酸)Tyr10 胰高血糖素(Amersham Biosciences, Piscataway, NJ)、从过表达人胰高血糖素受体的细胞制备的胞浆膜片段和 1mg/孔聚乙烯亚胺-处理的麦芽凝集素 A 型闪烁亲近测定珠粒(Amersham Biosciences, Piscataway, NJ)。在旋转振荡器上以 800rpm 振荡 5 分钟后,让板在室温孵育 12 小时,然后在 MicroB1450 液体闪烁计数仪(Perkin-Elmer, Wellesley, MA)上读数。测量孔中比试验样品最高浓度大 4 倍的“冷”天然配体的非特异性结合(NSB)的放射性,并检测无竞争物的孔中的总结合放射性。如下计算特异性结合的百分比:%特异性结合=((结合的 NSB)/(总结合-NSB))X 100。用 Origin 软件(OriginLab, Northampton, MA)测定 IC₅₀ 值。

[0462] 实施例 14

[0463] 功能测定 -cAMP 合成

[0464] 在基于萤火虫荧光素酶报告测定中测量胰高血糖素类似物诱导 cAMP 的能力。在 96 孔聚-D-赖氨酸-包被的“Biocoat”板 (BD Biosciences, San Jose, CA) 中,于 37℃、5% CO₂ 条件下,通过在补充 0.25% 牛生长血清 (HyClone, Logan, UT) 的 DMEM (Invitrogen, Carlsbad, CA) 中培养 16 小时,来对用胰高血糖素-受体或 GLP-1 受体和连接到 cAMP 响应元件的荧光素酶基因共转染的 HEK293 细胞实施血清剥夺,然后用系列稀释的胰高血糖素、GLP-1 或新型胰高血糖素类似物孵育 5 小时。在结束孵育时,每孔加入 100 微升 LucLite 发光底物试剂 (Perkin-Elmer, Wellesley, MA)。短时间振荡板,黑暗中孵育 10 分钟,在 MicroB-1450 液态闪烁计数仪 (Perkin-Elmer, Wellesley, MA) 上测量光输出。用 Origin 软件 (OriginLab, Northampton, MA) 计算 50% 有效浓度。结果示于图 3-9 和表 2 到 10 中。

[0465] 表 2

[0466] 含 C-末端延伸的胰高血糖素类似物对 cAMP 的诱导

[0467]

肽	cAMP 诱导			
	胰高血糖素受体		GLP-1 受体	
	EC ₅₀ , nM	N*	EC ₅₀ , nM	N
胰高血糖素	0.22 ± 0.09	14	3.85 ± 1.64	10
GLP-1	2214.00 ± 182.43	2	0.04 ± 0.01	14
胰高血糖素 Cex	0.25 ± 0.15	6	2.75 ± 2.03	7
泌酸调节肽	3.25 ± 1.65	5	2.53 ± 1.74	5
泌酸调节肽 KRNR	2.77 ± 1.74	4	3.21 ± 0.49	2
胰高血糖素 R12	0.41 ± 0.17	6	0.48 ± 0.11	5
胰高血糖素 R12 Cex	0.35 ± 0.23	10	1.25 ± 0.63	10
胰高血糖素 R12 K20	0.84 ± 0.40	5	0.82 ± 0.49	5
胰高血糖素 R12 K24	1.00 ± 0.39	4	1.25 ± 0.97	5
胰高血糖素 R12 K29	0.81 ± 0.49	5	0.41 ± 0.24	6
胰高血糖素酰胺	0.26 ± 0.15	3	1.90 ± 0.35	2
泌酸调节肽 C24	2.54 ± 0.63	2	5.27 ± 0.26	2
泌酸调节肽 C24 PEG 20K	0.97 ± 0.04	1	1.29 ± 0.11	1

[0468]

[0469] *- 实验次数

[0470] 表 3

[0471] 聚乙二醇化胰高血糖素类似物对 cAMP 的诱导

[0472]

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

[0473] *- 实验次数

[0474] 表 4

[0475] E16 胰高血糖素类似物对 cAMP 的诱导

[0476]

相对于天然配体的百分比效价

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

[0477] 表 5

[0478] E16 胰高血糖素类似物对 cAMP 的诱导

[0479]

相对于天然配体的百分比效价

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

[0480] 表 6

[0481] E16 胰高血糖素类似物诱导 cAMP 的 EC50 值

[0482]

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

[0483] 表 7

[0484] E16 胰高血糖素类似物诱导 cAMP 的 EC50 值

[0485]

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

[0486] 表 8

[0487] E16 胰高血糖素类似物诱导 cAMP 的 EC50 值

[0488]

	胰高血糖素受体			GLP-1受体		
肽	EC50 (nM)	标准差	n	EC50 (nM)	标准差	n
E16	0.07	0.07	10	0.16	0.14	10
T16 胰高血糖素-NH ₂	0.10	0.02	3	1.99	0.48	3
G16 胰高血糖素-NH ₂	0.10	0.01	3	2.46	0.60	3
胰高血糖素-NH ₂	0.53	0.33	4	1.82	0.96	5
GLP-1	2214	N/A	1	0.03	0.02	9

[0489] 当一起测定所述化合物时, E16 Gluc NH₂ 相对于 G16-COOH 和 T16 Gluc NH₂ 针对胰高血糖素受体的效价大 4 倍。

[0490] 表 9

[0491] E16/ 内酰胺胰高血糖素类似物对 cAMP 的诱导

[0492]

相对于天然配体的百分比效价

肽	胰高血糖素受体	GLP-1 受体
E24K28 Gluc-NH ₂ Lac	196.4	12.5
E16K20 Gluc-NH ₂ Lac	180.8	63.0
K12E16 Gluc-NH ₂ Lac	154.2	63.3
K20E24 Gluc-NH ₂ Lac	120.2	8.1
E16 Gluc-NH ₂	187.2	17.8
E16, K20 Gluc-NH ₂	130.1	41.5
胰高血糖素	100.0	0.8
Gluc-NH ₂	43.2	4.0

[0493]

[0494] 表 10

[0495] GLP-1 17-26 胰高血糖素类似物对 cAMP 的诱导

[0496]

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

[0497] 实施例 15

[0498] 胰高血糖素 Cys- 马来酰亚胺基 PEG 类似物的稳定性测定

[0499] 将各种胰高血糖素类似物溶解于水或 PBS 中, 进行初始 HPLC 分析。调整 pH(4、5、6、7) 后, 让样品在 37℃ 经特定时间孵育, 重新用 HPLC 分析以测定肽的完整性。测定特定目的肽的浓度, 计算相对于初始分析保留完整的百分比。胰高血糖素 Cys²¹- 马来酰亚胺基 PEG_{5K} 的结果示于图 1 和 2 中。

[0500] 实施例 16

[0501] 以下胰高血糖素肽基本上如以上实施例 1-11 所述构建:

[0502] 在以下所有序列中, “a” 意指 C- 末端酰胺。

[0503] HSQGT FTSDY SKYLD ERRAQ DFVQW LMNTa (SEQ ID NO :70)

[0504] HSQGT FTSDY SKYLD ERRAK DFVQW LMNTa (SEQ ID NO :71)

[0505] HSQGT FTSDY SKYLD ERRAK DFVQW LMNTa (内酰胺 @16-20 ;SEQ ID NO :72)

[0506] HSQGT FTSDY SKYLD ERRAQ DFVQW LMNTa (内酰胺 @12-16 ;SEQ ID NO :73)

[0507] HSQGT FTSDY SKYLD ERRAK DFVQW LMNTa (内酰胺 @12-16 ;SEQ ID NO :74)

[0508] HSQGT FTSDY SKYLD KRRAE DFVQW LMNTa (内酰胺 @16-20 ;SEQ ID NO :75)

[0509] HSQGT FTSDY SKYLD ERAAK DFVQW LMNTa (SEQ ID NO :76)

[0510] HSQGT FTSDY SKYLD ERAAK DFVQW LMNTa (内酰胺 @16-20 ;SEQ ID NO :77)

[0511] HSQGT FTSDY SKYLD ERAAQ DFVQW LMNTa (内酰胺 @12-16 ;SEQ ID NO :78)

[0512] HSQGT FTSDY SKYLD ERAAK DFVQW LMNTa (内酰胺 @12-16 ;SEQ ID NO :79)

[0513] HSQGT FTSDY SKYLD KRAAE DFVQW LMNTa (内酰胺 @16-20 ;SEQ ID NO :80)

[0514] HSQGT FTSDY SKYLD EQAAK EFIAW LMNTa (SEQ ID NO :81)

[0515] HSQGT FTSDY SKYLD EQAAK EFIAW LMNTa (内酰胺 @12-16 ;SEQ ID NO :82)

[0516] HSQGT FTSDY SKYLD EQAAK EFIAW LMNTa (内酰胺 @16-20 ;SEQ ID NO :83)

[0517] HSQGT FTSDY SKYLD EQAAK EFIAW LVKGa (SEQ ID NO :84)

[0518] HSQGT FTSDY SKYLD EQAAK EFIAW LVKGa (内酰胺 @12-16 ;SEQ ID NO :85)

[0519] HSQGT FTSDY SKYLD EQAAK EFIAW LVKGa (内酰胺 @16-20 ;SEQ ID NO :86)

[0520] X1SQGT FTSDY SKYLD ERRAQ DFVQW LMNTa (SEQ ID NO :87)

- [0521] X1SQGT FTSDY SKYLD ERRAK DFVQW LMNTa(SEQ ID NO :88)
- [0522] X1SQGT FTSDY SKYLD ERRAK DFVQW LMNTa(内酰胺 @16-20 ;SEQ ID NO :89)
- [0523] X1SQGT FTSDY SKYLD ERRAQ DFVQW LMNTa(内酰胺 @12-16 ;SEQ ID NO :90)
- [0524] X1SQGT FTSDY SKYLD ERRAK DFVQW LMNTa(内酰胺 @12-16 ;SEQ ID NO :91)
- [0525] X1SQGT FTSDY SKYLD KRRAE DFVQW LMNTa(内酰胺 @16-20 ;SEQ ID NO :92)
- [0526] X1SQGT FTSDY SKYLD ERAAK DFVQW LMNTa(SEQ ID NO :93)
- [0527] X1SQGT FTSDY SKYLD ERAAK DFVQW LMNTa(内酰胺 @16-20 ;SEQ ID NO :94)
- [0528] X1SQGT FTSDY SKYLD ERAAQ DFVQW LMNTa(内酰胺 @12-16 ;SEQ ID NO :95)
- [0529] X1SQGT FTSDY SKYLD ERAAK DFVQW LMNTa(内酰胺 @12-16 ;SEQ ID NO :96)
- [0530] X1SQGT FTSDY SKYLD KRAAE DFVQW LMNTa(内酰胺 @16-20 ;SEQ ID NO :97)
- [0531] X1SQGT FTSDY SKYLD EQAAK EFIAW LMNTa(SEQ ID NO :98)
- [0532] X1SQGT FTSDY SKYLD EQAAK EFIAW LMNTa(内酰胺 @12-16 ;SEQ ID NO :99)
- [0533] X1SQGT FTSDY SKYLD EQAAK EFIAW LMNTa(内酰胺 @16-20 ;SEQ ID NO :100)
- [0534] X1SQGT FTSDY SKYLD EQAAK EFIAW LVKGa(SEQ ID NO :101)
- [0535] X1SQGT FTSDY SKYLD EQAAK EFIAW LVKGa(内酰胺 @12-16 ;SEQ ID NO :102)
- [0536] X1SQGT FTSDY SKYLD EQAAK EFIAW LVKGa(内酰胺 @16-20 ;SEQ ID NO :103)
- [0537] 其中在前述序列中, X1 = (脱 - 氨基)His
- [0538] HX2QGT FTSDY SKYLD ERRAQ DFVQW LMNTa(SEQ ID NO :104)
- [0539] HX2QGT FTSDY SKYLD ERRAK DFVQW LMNTa(SEQ ID NO :105)
- [0540] HX2QGT FTSDY SKYLD ERRAK DFVQW LMNTa(内酰胺 @16-20 ;SEQ ID NO :106)
- [0541] HX2QGT FTSDY SKYLD ERRAQ DFVQW LMNTa(内酰胺 @12-16 ;SEQ ID NO :107)
- [0542] HX2QGT FTSDY SKYLD ERRAK DFVQW LMNTa(内酰胺 @12-16 ;SEQ ID NO :108)
- [0543] HX2QGT FTSDY SKYLD KRRAE DFVQW LMNTa(内酰胺 @16-20 ;SEQ ID NO :109)
- [0544] HX2QGT FTSDY SKYLD ERAAK DFVQW LMNTa(SEQ ID NO :110)
- [0545] HX2QGT FTSDY SKYLD ERAAK DFVQW LMNTa(内酰胺 @16-20 ;SEQ ID NO :111)
- [0546] HX2QGT FTSDY SKYLD ERAAQ DFVQW LMNTa(内酰胺 @12-16 ;SEQ ID NO :112)
- [0547] HX2QGT FTSDY SKYLD ERAAK DFVQW LMNTa(内酰胺 @12-16 ;SEQ ID NO :113)
- [0548] HX2QGT FTSDY SKYLD KRAAE DFVQW LMNTa(内酰胺 @16-20 ;SEQ ID NO :114)
- [0549] HX2QGT FTSDY SKYLD EQAAK EFIAW LMNTa(SEQ ID NO :115)
- [0550] HX2QGT FTSDY SKYLD EQAAK EFIAW LMNTa(内酰胺 @12-16 ;SEQ ID NO :116)
- [0551] HX2QGT FTSDY SKYLD EQAAK EFIAW LMNTa(内酰胺 @16-20 ;SEQ ID NO :117)
- [0552] HX2QGT FTSDY SKYLD EQAAK EFIAW LVKGa(SEQ ID NO :118)
- [0553] HX2QGT FTSDY SKYLD EQAAK EFIAW LVKGa(内酰胺 @12-16 ;SEQ ID NO :119)
- [0554] HX2QGT FTSDY SKYLD EQAAK EFIAW LVKGa(内酰胺 @16-20 ;SEQ ID NO :120)
- [0555] 其中在前述序列中, X2 = 氨基异丁酸
- [0556] HX2QGT FTSDY SKYLD ERRAQ DFVQW LMNTa(SEQ ID NO :121)
- [0557] HX2QGT FTSDY SKYLD ERRAK DFVQW LMNTa(SEQ ID NO :122)
- [0558] HX2QGT FTSDY SKYLD ERRAK DFVQW LMNTa(内酰胺 @16-20 ;SEQ ID NO :123)
- [0559] HX2QGT FTSDY SKYLD ERRAQ DFVQW LMNTa(内酰胺 @12-16 ;SEQ ID NO :124)

- [0560] HX2QGT FTSDY SKYLD ERRAK DFVQW LMNTa(内酰胺 @12-16 ;SEQ ID NO :125)
- [0561] HX2QGT FTSDY SKYLD KRRAE DFVQW LMNTa(内酰胺 @16-20 ;SEQ ID NO :126)
- [0562] HX2QGT FTSDY SKYLD ERAAK DFVQW LMNTa(SEQ ID NO :127)
- [0563] HX2QGT FTSDY SKYLD ERAAK DFVQW LMNTa(内酰胺 @16-20 ;SEQ ID NO :128)
- [0564] HX2QGT FTSDY SKYLD ERAAQ DFVQW LMNTa(内酰胺 @12-16 ;SEQ ID NO :129)
- [0565] HX2QGT FTSDY SKYLD ERAAK DFVQW LMNTa(内酰胺 @12-16 ;SEQ ID NO :130)
- [0566] HX2QGT FTSDY SKYLD KRAAE DFVQW LMNTa(内酰胺 @16-20 ;SEQ ID NO :131)
- [0567] HX2QGT FTSDY SKYLD EQAAK EFIAW LMNTa(SEQ ID NO :132)
- [0568] HX2QGT FTSDY SKYLD EQAAK EFIAW LMNTa(内酰胺 @12-16 ;SEQ ID NO :133)
- [0569] HX2QGT FTSDY SKYLD EQAAK EFIAW LMNTa(内酰胺 @16-20 ;SEQ ID NO :134)
- [0570] HX2QGT FTSDY SKYLD EQAAK EFIAW LVKGa(SEQ ID NO :135)
- [0571] HX2QGT FTSDY SKYLD EQAAK EFIAW LVKGa(内酰胺 @12-16 ;SEQ ID NO :136)
- [0572] HX2QGT FTSDY SKYLD EQAAK EFIAW LVKGa(内酰胺 @16-20 ;SEQ ID NO :137)
- [0573] 其中在前述序列中, X2 = (D-Ala)
- [0574] HSEGT FTSDY SKYLD ERRAQ DFVQW LMNTa(SEQ ID NO :138)
- [0575] HSEGT FTSDY SKYLD ERRAK DFVQW LMNTa(SEQ ID NO :139)
- [0576] HSEGT FTSDY SKYLD ERRAK DFVQW LMNTa(内酰胺 @16-20 ;SEQ ID NO :140)
- [0577] HSEGT FTSDY SKYLD ERRAQ DFVQW LMNTa(内酰胺 @12-16 ;SEQ ID NO :141)
- [0578] HSEGT FTSDY SKYLD ERRAK DFVQW LMNTa(内酰胺 @12-16 ;SEQ ID NO :142)
- [0579] HSEGT FTSDY SKYLD KRRAE DFVQW LMNTa(内酰胺 @16-20 ;SEQ ID NO :143)
- [0580] HSEGT FTSDY SKYLD ERAAK DFVQW LMNTa(SEQ ID NO :144)
- [0581] HSEGT FTSDY SKYLD ERAAK DFVQW LMNTa(内酰胺 @16-20 ;SEQ ID NO :145)
- [0582] HSEGT FTSDY SKYLD ERAAQ DFVQW LMNTa(内酰胺 @12-16 ;SEQ ID NO :146)
- [0583] HSEGT FTSDY SKYLD ERAAK DFVQW LMNTa(内酰胺 @12-16 ;SEQ ID NO :147)
- [0584] HSEGT FTSDY SKYLD KRAAE DFVQW LMNTa(内酰胺 @16-20 ;SEQ ID NO :148)
- [0585] HSEGT FTSDY SKYLD EQAAK EFIAW LMNTa(SEQ ID NO :149)
- [0586] HSEGT FTSDY SKYLD EQAAK EFIAW LMNTa(内酰胺 @12-16 ;SEQ ID NO :150)
- [0587] HSEGT FTSDY SKYLD EQAAK EFIAW LMNTa(内酰胺 @16-20 ;SEQ ID NO :151)
- [0588] HSEGT FTSDY SKYLD EQAAK EFIAW LVKGa(SEQ ID NO :152)
- [0589] HSEGT FTSDY SKYLD EQAAK EFIAW LVKGa(内酰胺 @12-16 ;SEQ ID NO :153)
- [0590] HSEGT FTSDY SKYLD EQAAK EFIAW LVKGa(内酰胺 @16-20 ;SEQ ID NO :154)
- [0591] X1SEGT FTSDY SKYLD ERRAQ DFVQW LMNTa(SEQ ID NO :155)
- [0592] X1SEGT FTSDY SKYLD ERRAK DFVQW LMNTa(SEQ ID NO :156)
- [0593] X1SEGT FTSDY SKYLD ERRAK DFVQW LMNTa(内酰胺 @16-20 ;SEQ ID NO :157)
- [0594] X1SEGT FTSDY SKYLD ERRAQ DFVQW LMNTa(内酰胺 @12-16 ;SEQ ID NO :158)
- [0595] X1SEGT FTSDY SKYLD ERRAK DFVQW LMNTa(内酰胺 @12-16 ;SEQ ID NO :159)
- [0596] X1SEGT FTSDY SKYLD KRRAE DFVQW LMNTa(内酰胺 @16-20 ;SEQ ID NO :160)
- [0597] X1SEGT FTSDY SKYLD ERAAK DFVQW LMNTa(SEQ ID NO :161)
- [0598] X1SEGT FTSDY SKYLD ERAAK DFVQW LMNTa(内酰胺 @16-20 ;SEQ ID NO :162)

- [0599] X1SEGT FTSDY SKYLD ERAAQ DFVQW LMNTa(内酰胺 @12-16 ;SEQ ID NO :163)
- [0600] X1SEGT FTSDY SKYLD ERAAK DFVQW LMNTa(内酰胺 @12-16 ;SEQ ID NO :164)
- [0601] X1SEGT FTSDY SKYLD KRAAE DFVQW LMNTa(内酰胺 @16-20 ;SEQ ID NO :165)
- [0602] X1SEGT FTSDY SKYLD EQAAK EFIAW LMNTa(SEQ ID NO :166)
- [0603] X1SEGT FTSDY SKYLD EQAAK EFIAW LMNTa(内酰胺 @12-16 ;SEQ ID NO :167)
- [0604] X1SEGT FTSDY SKYLD EQAAK EFIAW LMNTa(内酰胺 @16-20 ;SEQ ID NO :168)
- [0605] X1SEGT FTSDY SKYLD EQAAK EFIAW LVKGa(SEQ ID NO :169)
- [0606] X1SEGT FTSDY SKYLD EQAAK EFIAW LVKGa(内酰胺 @12-16 ;SEQ ID NO :170)
- [0607] X1SEGT FTSDY SKYLD EQAAK EFIAW LVKGa(内酰胺 @16-20 ;SEQ ID NO :171)
- [0608] 其中在前述序列中, X1 = (脱 - 氨基)His
- [0609] HX2EGT FTSDY SKYLD ERRAQ DFVQW LMNTa(SEQ ID NO :172)
- [0610] HX2EGT FTSDY SKYLD ERRAK DFVQW LMNTa(SEQ ID NO :173)
- [0611] HX2EGT FTSDY SKYLD ERRAK DFVQW LMNTa(内酰胺 @16-20 ;SEQ ID NO :174)
- [0612] HX2EGT FTSDY SKYLD ERRAQ DFVQW LMNTa(内酰胺 @12-16 ;SEQ ID NO :175)
- [0613] HX2EGT FTSDY SKYLD ERRAK DFVQW LMNTa(内酰胺 @12-16 ;SEQ ID NO :176)
- [0614] HX2EGT FTSDY SKYLD KRRAE DFVQW LMNTa(内酰胺 @16-20 ;SEQ ID NO :177)
- [0615] HX2EGT FTSDY SKYLD ERAAK DFVQW LMNTa(SEQ ID NO :178)
- [0616] HX2EGT FTSDY SKYLD ERAAK DFVQW LMNTa(内酰胺 @16-20 ;SEQ ID NO :179)
- [0617] HX2EGT FTSDY SKYLD ERAAQ DFVQW LMNTa(内酰胺 @12-16 ;SEQ ID NO :180)
- [0618] HX2EGT FTSDY SKYLD ERAAK DFVQW LMNTa(内酰胺 @12-16 ;SEQ ID NO :181)
- [0619] HX2EGT FTSDY SKYLD KRAAE DFVQW LMNTa(内酰胺 @16-20 ;SEQ ID NO :182)
- [0620] HX2EGT FTSDY SKYLD EQAAK EFIAW LMNTa(SEQ ID NO :183)
- [0621] HX2EGT FTSDY SKYLD EQAAK EFIAW LMNTa(内酰胺 @12-16 ;SEQ ID NO :184)
- [0622] HX2EGT FTSDY SKYLD EQAAK EFIAW LMNTa(内酰胺 @16-20 ;SEQ ID NO :185)
- [0623] HX2EGT FTSDY SKYLD EQAAK EFIAW LVKGa(SEQ ID NO :186)
- [0624] HX2EGT FTSDY SKYLD EQAAK EFIAW LVKGa(内酰胺 @12-16 ;SEQ ID NO :187)
- [0625] HX2EGT FTSDY SKYLD EQAAK EFIAW LVKGa(内酰胺 @16-20 ;SEQ ID NO :188)
- [0626] 其中在前述序列中, X2 = 氨基异丁酸
- [0627] HX2EGT FTSDY SKYLD ERRAQ DFVQW LMNTa(SEQ ID NO :189)
- [0628] HX2EGT FTSDY SKYLD ERRAK DFVQW LMNTa(SEQ ID NO :190)
- [0629] HX2EGT FTSDY SKYLD ERRAK DFVQW LMNTa(内酰胺 @16-20 ;SEQ ID NO :191)
- [0630] HX2EGT FTSDY SKYLD ERRAQ DFVQW LMNTa(内酰胺 @12-16 ;SEQ ID NO :192)
- [0631] HX2EGT FTSDY SKYLD ERRAK DFVQW LMNTa(内酰胺 @12-16 ;SEQ ID NO :193)
- [0632] HX2EGT FTSDY SKYLD KRRAE DFVQW LMNTa(内酰胺 @16-20 ;SEQ ID NO :194)
- [0633] HX2EGT FTSDY SKYLD ERAAK DFVQW LMNTa(SEQ ID NO :195)
- [0634] HX2EGT FTSDY SKYLD ERAAK DFVQW LMNTa(内酰胺 @16-20 ;SEQ ID NO :196)
- [0635] HX2EGT FTSDY SKYLD ERAAQ DFVQW LMNTa(内酰胺 @12-16 ;SEQ ID NO :197)
- [0636] HX2EGT FTSDY SKYLD ERAAK DFVQW LMNTa(内酰胺 @12-16 ;SEQ ID NO :198)
- [0637] HX2EGT FTSDY SKYLD KRAAE DFVQW LMNTa(内酰胺 @16-20 ;SEQ ID NO :199)

- [0638] HX2EGT FTSDY SKYLD EQAAK EFIAW LMNTa(SEQ ID NO :200)
- [0639] HX2EGT FTSDY SKYLD EQAAK EFIAW LMNTa(内酰胺 @12-16 ;SEQ ID NO :201)
- [0640] HX2EGT FTSDY SKYLD EQAAK EFIAW LMNTa(内酰胺 @16-20 ;SEQ ID NO :202)
- [0641] HX2EGT FTSDY SKYLD EQAAK EFIAW LVKGa(SEQ ID NO :203)
- [0642] HX2EGT FTSDY SKYLD EQAAK EFIAW LVKGa(内酰胺 @12-16 ;SEQ ID NO :204)
- [0643] HX2EGT FTSDY SKYLD EQAAK EFIAW LVKGa(内酰胺 @16-20 ;SEQ ID NO :205)
- [0644] 其中在前述序列中, X2 = (D-Ala)
- [0645] HSQGT FTSDY SKYLD ERRAQ DFVC*W LMNTa(SEQ ID NO :206)
- [0646] HSQGT FTSDY SKYLD ERRAK DFVC*W LMNTa(SEQ ID NO :207)
- [0647] HSQGT FTSDY SKYLD ERRAK DFVC*W LMNTa(内酰胺 @16-20 ;SEQ ID NO :208)
- [0648] HSQGT FTSDY SKYLD ERRAQ DFVC*W LMNTa(内酰胺 @12-16 ;SEQ ID NO :209)
- [0649] HSQGT FTSDY SKYLD ERRAK DFVC*W LMNTa(内酰胺 @12-16 ;SEQ ID NO :210)
- [0650] HSQGT FTSDY SKYLD KRRAE DFVC*W LMNTa(内酰胺 @16-20 ;SEQ ID NO :211)
- [0651] HSQGT FTSDY SKYLD ERAAK DFVC*W LMNTa(SEQ ID NO :212)
- [0652] HSQGT FTSDY SKYLD ERAAK DFVC*W LMNTa(内酰胺 @16-20 ;SEQ ID NO :213)
- [0653] HSQGT FTSDY SKYLD ERAAQ DFVC*W LMNTa(内酰胺 @12-16 ;SEQ ID NO :214)
- [0654] HSQGT FTSDY SKYLD ERAAK DFVC*W LMNTa(内酰胺 @12-16 ;SEQ ID NO :215)
- [0655] HSQGT FTSDY SKYLD KRAAE DFVC*W LMNTa(内酰胺 @16-20 ;SEQ ID NO :216)
- [0656] HSQGT FTSDY SKYLD EQAAK EFIC*W LMNTa(SEQ ID NO :217)
- [0657] HSQGT FTSDY SKYLD EQAAK EFIC*W LMNTa(内酰胺 @12-16 ;SEQ ID NO :218)
- [0658] HSQGT FTSDY SKYLD EQAAK EFIC*W LMNTa(内酰胺 @16-20 ;SEQ ID NO :219)
- [0659] HSQGT FTSDY SKYLD EQAAK EFIC*W LVKGa(SEQ ID NO :220)
- [0660] HSQGT FTSDY SKYLD EQAAK EFIC*W LVKGa(内酰胺 @12-16 ;SEQ ID NO :221)
- [0661] HSQGT FTSDY SKYLD EQAAK EFIC*W LVKGa(内酰胺 @16-20 ;SEQ ID NO :222)
- [0662] X1SQGT FTSDY SKYLD ERRAQ DFVC*W LMNTa(SEQ ID NO :223)
- [0663] X1SQGT FTSDY SKYLD ERRAK DFVC*W LMNTa(SEQ ID NO :224)
- [0664] X1SQGT FTSDY SKYLD ERRAK DFVC*W LMNTa(内酰胺 @16-20 ;SEQ ID NO :225)
- [0665] X1SQGT FTSDY SKYLD ERRAQ DFVC*W LMNTa(内酰胺 @12-16 ;SEQ ID NO :226)
- [0666] X1SQGT FTSDY SKYLD ERRAK DFVC*W LMNTa(内酰胺 @12-16 ;SEQ ID NO :227)
- [0667] X1SQGT FTSDY SKYLD KRRAE DFVC*W LMNTa(内酰胺 @16-20 ;SEQ ID NO :228)
- [0668] X1SQGT FTSDY SKYLD ERAAK DFVC*W LMNTa(SEQ ID NO :229)
- [0669] X1SQGT FTSDY SKYLD ERAAK DFVC*W LMNTa(内酰胺 @16-20 ;SEQ ID NO :230)
- [0670] X1SQGT FTSDY SKYLD ERAAQ DFVC*W LMNTa(内酰胺 @12-16 ;SEQ ID NO :231)
- [0671] X1SQGT FTSDY SKYLD ERAAK DFVC*W LMNTa(内酰胺 @12-16 ;SEQ ID NO :232)
- [0672] X1SQGT FTSDY SKYLD KRAAE DFVC*W LMNTa(内酰胺 @16-20 ;SEQ ID NO :233)
- [0673] X1SQGT FTSDY SKYLD EQAAK EFIC*W LMNTa(SEQ ID NO :234)
- [0674] X1SQGT FTSDY SKYLD EQAAK EFIC*W LMNTa(内酰胺 @12-16 ;SEQ ID NO :235)
- [0675] X1SQGT FTSDY SKYLD EQAAK EFIC*W LMNTa(内酰胺 @16-20 ;SEQ ID NO :236)
- [0676] X1SQGT FTSDY SKYLD EQAAK EFIC*W LVKGa(SEQ ID NO :237)

[0677] X1SQGT FTSDY SKYLD EQAAK EFIC*W LVKGa(内酰胺 @12-16 ;SEQ ID NO :238)
[0678] X1SQGT FTSDY SKYLD EQAAK EFIC*W LVKGa(内酰胺 @16-20 ;SEQ ID NO :239)
[0679] 其中在前述序列中, X1 = (脱-氨基)His ;其中 C* 为 Cys 或与亲水聚合物连接的 Cys, 或作为备选 C* 为与约 20kD 平均重量的聚乙二醇连接的 Cys, 或作为备选 C* 为与约 40kD 平均重量的聚乙二醇连接的 Cys。

[0680] HX2QGT FTSDY SKYLD ERRAQ DFVC*W LMNTa(SEQ ID NO :240)
[0681] HX2QGT FTSDY SKYLD ERRAK DFVC*W LMNTa(SEQ ID NO :241)
[0682] HX2QGT FTSDY SKYLD ERRAK DFVC*W LMNTa(内酰胺 @16-20 ;SEQ ID NO :242)
[0683] HX2QGT FTSDY SKYLD ERRAQ DFVC*W LMNTa(内酰胺 @12-16 ;SEQ ID NO :243)
[0684] HX2QGT FTSDY SKYLD ERRAK DFVC*W LMNTa(内酰胺 @12-16 ;SEQ ID NO :244)
[0685] HX2QGT FTSDY SKYLD KRRAE DFVC*W LMNTa(内酰胺 @16-20 ;SEQ ID NO :245)
[0686] HX2QGT FTSDY SKYLD ERAAK DFVC*W LMNTa(SEQ ID NO :246)
[0687] HX2QGT FTSDY SKYLD ERAAK DFVC*W LMNTa(内酰胺 @16-20 ;SEQ ID NO :247)
[0688] HX2QGT FTSDY SKYLD ERAAQ DFVC*W LMNTa(内酰胺 @12-16 ;SEQ ID NO :248)
[0689] HX2QGT FTSDY SKYLD ERAAK DFVC*W LMNTa(内酰胺 @12-16 ;SEQ ID NO :249)
[0690] HX2QGT FTSDY SKYLD KRAAE DFVC*W LMNTa(内酰胺 @16-20 ;SEQ ID NO :250)
[0691] HX2QGT FTSDY SKYLD EQAAK EFIC*W LMNTa(SEQ ID NO :251)
[0692] HX2QGT FTSDY SKYLD EQAAK EFIC*W LMNTa(内酰胺 @12-16 ;SEQ ID NO :252)
[0693] HX2QGT FTSDY SKYLD EQAAK EFIC*W LMNTa(内酰胺 @16-20 ;SEQ ID NO :253)
[0694] HX2QGT FTSDY SKYLD EQAAK EFIC*W LVKGa(SEQ ID NO :254)
[0695] HX2QGT FTSDY SKYLD EQAAK EFIC*W LVKGa(内酰胺 @12-16 ;SEQ ID NO :255)
[0696] HX2QGT FTSDY SKYLD EQAAK EFIC*W LVKGa(内酰胺 @16-20 ;SEQ ID NO :256)
[0697] 其中在前述序列中, X2 = 氨基异丁酸 ;其中 C* 为 Cys 或与亲水聚合物连接的 Cys, 或作为备选 C* 为与约 20kD 平均重量的聚乙二醇连接的 Cys, 或作为备选 C* 为与约 40kD 平均重量的聚乙二醇连接的 Cys。

[0698] HX2QGT FTSDY SKYLD ERRAQ DFVC*W LMNTa(SEQ ID NO :257)
[0699] HX2QGT FTSDY SKYLD ERRAK DFVC*W LMNTa(SEQ ID NO :258)
[0700] HX2QGT FTSDY SKYLD ERRAK DFVC*W LMNTa(内酰胺 @16-20 ;SEQ ID NO :259)
[0701] HX2QGT FTSDY SKYLD ERRAQ DFVC*W LMNTa(内酰胺 @12-16 ;SEQ ID NO :260)
[0702] HX2QGT FTSDY SKYLD ERRAK DFVC*W LMNTa(内酰胺 @12-16 ;SEQ ID NO :261)
[0703] HX2QGT FTSDY SKYLD KRRAE DFVC*W LMNTa(内酰胺 @16-20 ;SEQ ID NO :262)
[0704] HX2QGT FTSDY SKYLD ERAAK DFVC*W LMNTa(SEQ ID NO :263)
[0705] HX2QGT FTSDY SKYLD ERAAK DFVC*W LMNTa(内酰胺 @16-20 ;SEQ ID NO :264)
[0706] HX2QGT FTSDY SKYLD ERAAQ DFVC*W LMNTa(内酰胺 @12-16 ;SEQ ID NO :265)
[0707] HX2QGT FTSDY SKYLD ERAAK DFVC*W LMNTa(内酰胺 @12-16 ;SEQ ID NO :266)
[0708] HX2QGT FTSDY SKYLD KRAAE DFVC*W LMNTa(内酰胺 @16-20 ;SEQ ID NO :267)
[0709] HX2QGT FTSDY SKYLD EQAAK EFIC*W LMNTa(SEQ ID NO :268)
[0710] HX2QGT FTSDY SKYLD EQAAK EFIC*W LMNTa(内酰胺 @12-16 ;SEQ ID NO :269)
[0711] HX2QGT FTSDY SKYLD EQAAK EFIC*W LMNTa(内酰胺 @16-20 ;SEQ ID NO :270)

- [0712] HX2QGT FTSDY SKYLD EQAAK EFIC*W LVKGa(SEQ ID NO :271)
- [0713] HX2QGT FTSDY SKYLD EQAAK EFIC*W LVKGa(内酰胺 @12-16 ;SEQ ID NO :272)
- [0714] HX2QGT FTSDY SKYLD EQAAK EFIC*W LVKGa(内酰胺 @16-20 ;SEQ ID NO :273)
- [0715] 其中在前述序列中,X2 = (D-Ala) ;其中 C* 为 Cys 或与亲水聚合物连接的 Cys,或作为备选 C* 为与约 20kD 平均重量的聚乙二醇连接的 Cys,或作为备选 C* 为与约 40kD 平均重量的聚乙二醇连接的 Cys。
- [0716] HSEGT FTSDY SKYLD ERRAQ DFVC*W LMNTa(SEQ ID NO :274)
- [0717] HSEGT FTSDY SKYLD ERRAK DFVC*W LMNTa(SEQ ID NO :275)
- [0718] HSEGT FTSDY SKYLD ERRAK DFVC*W LMNTa(内酰胺 @16-20 ;SEQ ID NO :276)
- [0719] HSEGT FTSDY SKYLD ERRAQ DFVC*W LMNTa(内酰胺 @12-16 ;SEQ ID NO :277)
- [0720] HSEGT FTSDY SKYLD ERRAK DFVC*W LMNTa(内酰胺 @12-16 ;SEQ ID NO :278)
- [0721] HSEGT FTSDY SKYLD KRRAE DFVC*W LMNTa(内酰胺 @16-20 ;SEQ ID NO :279)
- [0722] HSEGT FTSDY SKYLD ERAAK DFVC*W LMNTa(SEQ ID NO :280)
- [0723] HSEGT FTSDY SKYLD ERAAK DFVC*W LMNTa(内酰胺 @16-20 ;SEQ ID NO :281)
- [0724] HSEGT FTSDY SKYLD ERAAQ DFVC*W LMNTa(内酰胺 @12-16 ;SEQ ID NO :282)
- [0725] HSEGT FTSDY SKYLD ERAAK DFVC*W LMNTa(内酰胺 @12-16 ;SEQ ID NO :283)
- [0726] HSEGT FTSDY SKYLD KRAAE DFVC*W LMNTa(内酰胺 @16-20 ;SEQ ID NO :284)
- [0727] HSEGT FTSDY SKYLD EQAAK EFIC*W LMNTa(SEQ ID NO :285)
- [0728] HSEGT FTSDY SKYLD EQAAK EFIC*W LMNTa(内酰胺 @12-16 ;SEQ ID NO :286)
- [0729] HSEGT FTSDY SKYLD EQAAK EFIC*W LMNTa(内酰胺 @16-20 ;SEQ ID NO :287)
- [0730] HSEGT FTSDY SKYLD EQAAK EFIC*W LVKGa(SEQ ID NO :288)
- [0731] HSEGT FTSDY SKYLD EQAAK EFIC*W LVKGa(内酰胺 @12-16 ;SEQ ID NO :289)
- [0732] HSEGT FTSDY SKYLD EQAAK EFIC*W LVKGa(内酰胺 @16-20 ;SEQ ID NO :290)
- [0733] X1SEGT FTSDY SKYLD ERRAQ DFVC*W LMNTa(SEQ ID NO :291)
- [0734] X1SEGT FTSDY SKYLD ERRAK DFVC*W LMNTa(SEQ ID NO :292)
- [0735] X1SEGT FTSDY SKYLD ERRAK DFVC*W LMNTa(内酰胺 @16-20 ;SEQ ID NO :293)
- [0736] X1SEGT FTSDY SKYLD ERRAQ DFVC*W LMNTa(内酰胺 @12-16 ;SEQ ID NO :294)
- [0737] X1SEGT FTSDY SKYLD ERRAK DFVC*W LMNTa(内酰胺 @12-16 ;SEQ ID NO :295)
- [0738] X1SEGT FTSDY SKYLD KRRAE DFVC*W LMNTa(内酰胺 @16-20 ;SEQ ID NO :296)
- [0739] X1SEGT FTSDY SKYLD ERAAK DFVC*W LMNTa(SEQ ID NO :297)
- [0740] X1SEGT FTSDY SKYLD ERAAK DFVC*W LMNTa(内酰胺 @16-20 ;SEQ ID NO :298)
- [0741] X1SEGT FTSDY SKYLD ERAAQ DFVC*W LMNTa(内酰胺 @12-16 ;SEQ ID NO :299)
- [0742] X1SEGT FTSDY SKYLD ERAAK DFVC*W LMNTa(内酰胺 @12-16 ;SEQ ID NO :300)
- [0743] X1SEGT FTSDY SKYLD KRAAE DFVC*W LMNTa(内酰胺 @16-20 ;SEQ ID NO :301)
- [0744] X1SEGT FTSDY SKYLD EQAAK EFIC*W LMNTa(SEQ ID NO :302)
- [0745] X1SEGT FTSDY SKYLD EQAAK EFIC*W LMNTa(内酰胺 @12-16 ;SEQ ID NO :303)
- [0746] X1SEGT FTSDY SKYLD EQAAK EFIC*W LMNTa(内酰胺 @16-20 ;SEQ ID NO :304)
- [0747] X1SEGT FTSDY SKYLD EQAAK EFIC*W LVKGa(SEQ ID NO :305)
- [0748] X1SEGT FTSDY SKYLD EQAAK EFIC*W LVKGa(内酰胺 @12-16 ;SEQ ID NO :306)

[0749] X1SEGT FTSDY SKYLD EQAAK EFIC*W LVKGa(内酰胺 @16-20 ;SEQ ID NO :307)

[0750] 其中在前述序列中, X1 = (脱-氨基)His ;其中 C* 为 Cys 或与亲水聚合物连接的 Cys, 或作为备选 C* 为与约 20kD 平均重量的聚乙二醇连接的 Cys, 或作为备选 C* 为与约 40kD 平均重量的聚乙二醇连接的 Cys。

[0751] HX2EGT FTSDY SKYLD ERRAQ DFVC*W LMNTa(SEQ ID NO :308)

[0752] HX2EGT FTSDY SKYLD ERRAK DFVC*W LMNTa(SEQ ID NO :309)

[0753] HX2EGT FTSDY SKYLD ERRAK DFVC*W LMNTa(内酰胺 @16-20 ;SEQ ID NO :310)

[0754] HX2EGT FTSDY SKYLD ERRAQ DFVC*W LMNTa(内酰胺 @12-16 ;SEQ ID NO :311)

[0755] HX2EGT FTSDY SKYLD ERRAK DFVC*W LMNTa(内酰胺 @12-16 ;SEQ ID NO :312)

[0756] HX2EGT FTSDY SKYLD KRRAE DFVC*W LMNTa(内酰胺 @16-20 ;SEQ ID NO :313)

[0757] HX2EGT FTSDY SKYLD ERAAK DFVC*W LMNTa(SEQ ID NO :314)

[0758] HX2EGT FTSDY SKYLD ERAAK DFVC*W LMNTa(内酰胺 @16-20 ;SEQ ID NO :315)

[0759] HX2EGT FTSDY SKYLD ERAAQ DFVC*W LMNTa(内酰胺 @12-16 ;SEQ ID NO :316)

[0760] HX2EGT FTSDY SKYLD ERAAK DFVC*W LMNTa(内酰胺 @12-16 ;SEQ ID NO :317)

[0761] HX2EGT FTSDY SKYLD KRAAE DFVC*W LMNTa(内酰胺 @16-20 ;SEQ ID NO :318)

[0762] HX2EGT FTSDY SKYLD EQAAK EFIC*W LMNTa(SEQ ID NO :319)

[0763] HX2EGT FTSDY SKYLD EQAAK EFIC*W LMNTa(内酰胺 @12-16 ;SEQ ID NO :320)

[0764] HX2EGT FTSDY SKYLD EQAAK EFIC*W LMNTa(内酰胺 @16-20 ;SEQ ID NO :321)

[0765] HX2EGT FT SDY SKYLD EQAAK EFIC*W LVKGa(SEQ ID NO :322)

[0766] HX2EGT FTSDY SKYLD EQAAK EFIC*W LVKGa(内酰胺 @12-16 ;SEQ ID NO :323)

[0767] HX2EGT FTSDY SKYLD EQAAK EFIC*W LVKGa(内酰胺 @16-20 ;SEQ ID NO :324)

[0768] 其中在前述序列中, X2 = 氨基异丁酸 ;其中 C* 为 Cys 或与亲水聚合物连接的 Cys, 或作为备选 C* 为与约 20kD 平均重量的聚乙二醇连接的 Cys, 或作为备选 C* 为与约 40kD 平均重量的聚乙二醇连接的 Cys。

[0769] HX2EGT FTSDY SKYLD ERRAQ DFVC*W LMNTa(SEQ ID NO :325)

[0770] HX2EGT FTSDY SKYLD ERRAK DFVC*W LMNTa(SEQ ID NO :326)

[0771] HX2EGT FTSDY SKYLD ERRAK DFVC*W LMNTa(内酰胺 @16-20 ;SEQ ID NO :327)

[0772] HX2EGT FTSDY SKYLD ERRAQ DFVC*W LMNTa(内酰胺 @12-16 ;SEQ ID NO :328)

[0773] HX2EGT FTSDY SKYLD ERRAK DFVC*W LMNTa(内酰胺 @12-16 ;SEQ ID NO :329)

[0774] HX2EGT FTSDY SKYLD KRRAE DFVC*W LMNTa(内酰胺 @16-20 ;SEQ ID NO :330)

[0775] HX2EGT FTSDY SKYLD ERAAK DFVC*W LMNTa(SEQ ID NO :331)

[0776] HX2EGT FTSDY SKYLD ERAAK DFVC*W LMNTa(内酰胺 @16-20 ;SEQ ID NO :332)

[0777] HX2EGT FTSDY SKYLD ERAAQ DFVC*W LMNTa(内酰胺 @12-16 ;SEQ ID NO :333)

[0778] HX2EGT FTSDY SKYLD ERAAK DFVC*W LMNTa(内酰胺 @12-16 ;SEQ ID NO :334)

[0779] HX2EGT FTSDY SKYLD KRAAE DFVC*W LMNTa(内酰胺 @16-20 ;SEQ ID NO :335)

[0780] HX2EGT FTSDY SKYLD EQAAK EFIC*W LMNTa(SEQ ID NO :336)

[0781] HX2EGT FTSDY SKYLD EQAAK EFIC*W LMNTa(内酰胺 @12-16 ;SEQ ID NO :337)

[0782] HX2EGT FTSDY SKYLD EQAAK EFIC*W LMNTa(内酰胺 @16-20 ;SEQ ID NO :338)

[0783] HX2EGT FTSDY SKYLD EQAAK EFIC*W LVKGa(SEQ ID NO :339)

[0784] HX2EGT FTSDY SKYLD EQAAK EFIC*W LVKGa(内酰胺 @12-16 ;SEQ ID NO :340)

[0785] HX2EGT FTSDY SKYLD EQAAK EFIC*W LVKGa(内酰胺 @16-20 ;SEQ ID NO :341)

[0786] 其中在前述序列中, X2 = (D-Ala) ;其中 C* 为 Cys 或与亲水聚合物连接的 Cys, 或作为备选 C* 为与约 20kD 平均重量的聚乙二醇连接的 Cys, 或作为备选 C* 为与约 40kD 平均重量的聚乙二醇连接的 Cys。

[0787] HSQGT FTSDY SKYLD C*RRAK DFVQW LMNTa(SEQ ID NO :342)

[0788] HSQGT FTSDY SKYLD C*RAAK DFVQW LMNTa(SEQ ID NO :343)

[0789] HSQGT FTSDY SKYLD C*QAAK EFIAW LMNTa(SEQ ID NO :344)

[0790] HSQGT FTSDY SKYLD C*QAAK EFIAW LVKGa(SEQ ID NO :345)

[0791] X1SQGT FTSDY SKYLD C*RRAK DFVQW LMNTa(SEQ ID NO :346)

[0792] X1SQGT FTSDY SKYLD C*RAAK DFVQW LMNTa(SEQ ID NO :347)

[0793] X1SQGT FTSDY SKYLD C*QAAK EFIAW LMNTa(SEQ ID NO :348)

[0794] X1SQGT FTSDY SKYLD C*QAAK EFIAW LVKGa(SEQ ID NO :349)

[0795] 其中 X1 = (脱-氨基)His ;其中 C* 为 Cys 或与亲水聚合物连接的 Cys, 或作为备选 C* 为与约 20kD 平均重量的聚乙二醇连接的 Cys, 或作为备选 C* 为与约 40kD 平均重量的聚乙二醇连接的 Cys。

[0796] HX2QGT FTSDY SKYLD C*RRAK DFVQW LMNTa(SEQ ID NO :350)

[0797] HX2QGT FTSDY SKYLD C*RAAK DFVQW LMNTa(SEQ ID NO :351)

[0798] HX2QGT FTSDY SKYLD C*QAAK EFIAW LMNTa(SEQ ID NO :352)

[0799] HX2QGT FTSDY SKYLD C*QAAK EFIAW LVKGa(SEQ ID NO :353)

[0800] 其中 X2 = 氨基异丁酸 ;其中 C* 为 Cys 或与亲水聚合物连接的 Cys, 或作为备选 C* 为与约 20kD 平均重量的聚乙二醇连接的 Cys, 或作为备选 C* 为与约 40kD 平均重量的聚乙二醇连接的 Cys。

[0801] HX2QGT FTSDY SKYLD C*RRAK DFVQW LMNTa(SEQ ID NO :354)

[0802] HX2QGT FTSDY SKYLD C*RAAK DFVQW LMNTa(SEQ ID NO :355)

[0803] HX2QGT FTSDY SKYLD C*QAAK EFIAW LMNTa(SEQ ID NO :356)

[0804] HX2QGT FTSDY SKYLD C*QAAK EFIAW LVKGa(SEQ ID NO :357)

[0805] 其中 X2 = (D-Ala) ;其中 C* 为 Cys 或与亲水聚合物连接的 Cys, 或作为备选 C* 为与约 20kD 平均重量的聚乙二醇连接的 Cys, 或作为备选 C* 为与约 40kD 平均重量的聚乙二醇连接的 Cys。

[0806] HSEGT FTSDY SKYLD C*RRAK DFVQW LMNTa(SEQ ID NO :358)

[0807] HSEGT FTSDY SKYLD C*RAAK DFVQW LMNTa(SEQ ID NO :359)

[0808] HSEGT FTSDY SKYLD C*QAAK EFIAW LMNTa(SEQ ID NO :360)

[0809] HSEGT FTSDY SKYLD C*QAAK EFIAW LVKGa(SEQ ID NO :361)

[0810] X1SEGT FTSDY SKYLD C*RRAK DFVQW LMNTa(SEQ ID NO :362)

[0811] X1SEGT FTSDY SKYLD C*RAAK DFVQW LMNTa(SEQ ID NO :363)

[0812] X1SEGT FTSDY SKYLD C*QAAK EFIAW LMNTa(SEQ ID NO :364)

[0813] X1SEGT FTSDY SKYLD C*QAAK EFIAW LVKGa(SEQ ID NO :365)

[0814] 其中 X1 = (脱-氨基)His ;其中 C* 为 Cys 或与亲水聚合物连接的 Cys, 或作为备

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

[0815] HX2EGT FTSDY SKYLD C*RRAK DFVQW LMNTa (SEQ ID NO :366)

[0816] HX2EGT FTSDY SKYLD C*RAAK DFVQW LMNTa (SEQ ID NO :367)

[0817] HX2EGT FTSDY SKYLD C*QAAK EFIAW LMNTa (SEQ ID NO :368)

[0818] HX2EGT FTSDY SKYLD C*QAAK EFIAW LVKGa (SEQ ID NO :369)

[0819] 其中 X2 = (D-Ala) ; 其中 C* 为 Cys 或与亲水聚合物连接的 Cys, 或作为备选 C* 为与约 20kD 平均重量的聚乙二醇连接的 Cys, 或作为备选 C* 为与约 40kD 平均重量的聚乙二醇连接的 Cys。

[0820] HX2EGT FTSDY SKYLD C*RRAK DFVQW LMNTa (SEQ ID NO :370)

[0821] HX2EGT FTSDY SKYLD C*RAAK DFVQW LMNTa (SEQ ID NO :371)

[0822] HX2EGT FTSDY SKYLD C*QAAK EFIAW LMNTa (SEQ ID NO :372)

[0823] HX2EGT FTSDY SKYLD C*QAAK EFIAW LVKGa (SEQ ID NO :373)

[0824] 其中 X2 = (D-Ala) ; 其中 C* 为 Cys 或与亲水聚合物连接的 Cys, 或作为备选 C* 为与约 20kD 平均重量的聚乙二醇连接的 Cys, 或作为备选 C* 为与约 40kD 平均重量的聚乙二醇连接的 Cys。

[0825] HSQGT FTSDY SKYLD ERRAQ DFVQW LMDTa (SEQ ID NO :374)

[0826] HSQGT FTSDY SKYLD ERRAQ DFVQW LMDTa (SEQ ID NO :375)

[0827] HSQGT FTSDY SKYLD ERRAQ DFVQW LMDTa (内酰胺 @16-20 ; SEQ ID NO :376)

[0828] HSQGT FTSDY SKYLD ERRAQ DFVQW LMDTa (内酰胺 @12-16 ; SEQ ID NO :377)

[0829] HSQGT FTSDY SKYLD ERRAQ DFVQW LMDTa (内酰胺 @12-16 ; SEQ ID NO :378)

[0830] HSQGT FTSDY SKYLD KRRAE DFVQW LMDTa (内酰胺 @16-20 ; SEQ ID NO :379)

[0831] HSQGT FTSDY SKYLD ERAAK DFVQW LMDTa (SEQ ID NO :380)

[0832] HSQGT FTSDY SKYLD ERAAK DFVQW LMDTa (内酰胺 @16-20 ; SEQ ID NO :381)

[0833] HSQGT FTSDY SKYLD ERAAK DFVQW LMDTa (内酰胺 @12-16 ; SEQ ID NO :382)

[0834] HSQGT FTSDY SKYLD ERAAK DFVQW LMDTa (内酰胺 @12-16 ; SEQ ID NO :383)

[0835] HSQGT FTSDY SKYLD KRAAE DFVQW LMDTa (内酰胺 @16-20 ; SEQ ID NO :384)

[0836] HSQGT FTSDY SKYLD EQAAK EFIAW LMDTa (SEQ ID NO :385)

[0837] HSQGT FTSDY SKYLD EQAAK EFIAW LMDTa (内酰胺 @12-16 ; SEQ ID NO :386)

[0838] HSQGT FTSDY SKYLD EQAAK EFIAW LMDTa (内酰胺 @16-20 ; SEQ ID NO :387)

[0839] X1SQGT FTSDY SKYLD ERRAQ DFVQW LMDTa (SEQ ID NO :388)

[0840] X1SQGT FTSDY SKYLD ERRAQ DFVQW LMDTa (SEQ ID NO :389)

[0841] X1SQGT FTSDY SKYLD ERRAQ DFVQW LMDTa (内酰胺 @16-20 ; SEQ ID NO :390)

[0842] X1SQGT FTSDY SKYLD ERRAQ DFVQW LMDTa (内酰胺 @12-16 ; SEQ ID NO :391)

[0843] X1SQGT FTSDY SKYLD ERRAQ DFVQW LMDTa (内酰胺 @12-16 ; SEQ ID NO :392)

[0844] X1SQGT FTSDY SKYLD KRRAE DFVQW LMDTa (内酰胺 @16-20 ; SEQ ID NO :393)

[0845] X1SQGT FTSDY SKYLD ERAAK DFVQW LMDTa (SEQ ID NO :394)

[0846] X1SQGT FTSDY SKYLD ERAAK DFVQW LMDTa (内酰胺 @16-20 ; SEQ ID NO :395)

[0847] X1SQGT FTSDY SKYLD ERAAK DFVQW LMDTa (内酰胺 @12-16 ; SEQ ID NO :396)

- [0848] X1SQGT FTSDY SKYLD ERAAK DFVQW LMDTa(内酰胺 @12-16 ;SEQ ID NO :397)
- [0849] X1SQGT FTSDY SKYLD KRAAE DFVQW LMDTa(内酰胺 @16-20 ;SEQ ID NO :398)
- [0850] X1SQGT FTSDY SKYLD EQAAK EFIAW LMDTa(SEQ ID NO :399)
- [0851] X1SQGT FTSDY SKYLD EQAAK EFIAW LMDTa(内酰胺 @12-16 ;SEQ ID NO :400)
- [0852] X1SQGT FTSDY SKYLD EQAAK EFIAW LMDTa(内酰胺 @16-20 ;SEQ ID NO :401)
- [0853] 其中在前述序列中, X1 = (脱 - 氨基)His
- [0854] HX2QGT FTSDY SKYLD ERRAQ DFVQW LMDTa(SEQ ID NO :402)
- [0855] HX2QGT FTSDY SKYLD ERRAK DFVQW LMDTa(SEQ ID NO :403)
- [0856] HX2QGT FTSDY SKYLD ERRAK DFVQW LMDTa(内酰胺 @16-20 ;SEQ ID NO :404)
- [0857] HX2QGT FTSDY SKYLD ERRAQ DFVQW LMDTa(内酰胺 @12-16 ;SEQ ID NO :405)
- [0858] HX2QGT FTSDY SKYLD ERRAK DFVQW LMDTa(内酰胺 @12-16 ;SEQ ID NO :406)
- [0859] HX2QGT FTSDY SKYLD KRRAE DFVQW LMDTa(内酰胺 @16-20 ;SEQ ID NO :407)
- [0860] HX2QGT FTSDY SKYLD ERAAK DFVQW LMDTa(SEQ ID NO :408)
- [0861] HX2QGT FTSDY SKYLD ERAAK DFVQW LMDTa(内酰胺 @16-20 ;SEQ ID NO :409)
- [0862] HX2QGT FTSDY SKYLD ERAAQ DFVQW LMDTa(内酰胺 @12-16 ;SEQ ID NO :410)
- [0863] HX2QGT FTSDY SKYLD ERAAK DFVQW LMDTa(内酰胺 @12-16 ;SEQ ID NO :411)
- [0864] HX2QGT FTSDY SKYLD KRAAE DFVQW LMDTa(内酰胺 @16-20 ;SEQ ID NO :412)
- [0865] HX2QGT FTSDY SKYLD EQAAK EFIAW LMDTa(SEQ ID NO :413)
- [0866] HX2QGT FTSDY SKYLD EQAAK EFIAW LMDTa(内酰胺 @12-16 ;SEQ ID NO :414)
- [0867] HX2QGT FTSDY SKYLD EQAAK EFIAW LMDTa(内酰胺 @16-20 ;SEQ ID NO :415)
- [0868] 其中在前述序列中, X2 = 氨基异丁酸
- [0869] HX2QGT FTSDY SKYLD ERRAQ DFVQW LMDTa(SEQ ID NO :416)
- [0870] HX2QGT FTSDY SKYLD ERRAK DFVQW LMDTa(SEQ ID NO :417)
- [0871] HX2QGT FTSDY SKYLD ERRAK DFVQW LMDTa(内酰胺 @16-20 ;SEQ ID NO :418)
- [0872] HX2QGT FTSDY SKYLD ERRAQ DFVQW LMDTa(内酰胺 @12-16 ;SEQ ID NO :419)
- [0873] HX2QGT FTSDY SKYLD ERRAK DFVQW LMDTa(内酰胺 @12-16 ;SEQ ID NO :420)
- [0874] HX2QGT FTSDY SKULD KRAAE DFVQW LMDTa(内酰胺 @16-20 ;SEQ ID NO :421)
- [0875] HX2QGT FTSDY SKYLD ERAAK DFVQW LMDTa(SEQ ID NO :422)
- [0876] HX2QGT FTSDY SKYLD ERAAK DFVQW LMDTa(内酰胺 @16-20 ;SEQ ID NO :423)
- [0877] HX2QGT FTSDY SKYLD ERAAQ DFVQW LMDTa(内酰胺 @12-16 ;SEQ ID NO :424)
- [0878] HX2QGT FTSDY SKYLD ERAAK DFVQW LMDTa(内酰胺 @12-16 ;SEQ ID NO :425)
- [0879] HX2QGT FTSDY SKYLD KRAAE DFVQW LMDTa(内酰胺 @16-20 ;SEQ ID NO :426)
- [0880] HX2QGT FTSDY SKYLD EQAAK EFIAW LMDTa(SEQ ID NO :427)
- [0881] HX2QGT FTSDY SKYLD EQAAK EFIAW LMDTa(内酰胺 @12-16 ;SEQ ID NO :428)
- [0882] HX2QGT FTSDY SKYLD EQAAK EFIAW LMDTa(内酰胺 @16-20 ;SEQ ID NO :429)
- [0883] 其中在前述序列中, X2 = (D-Ala)
- [0884] HSEGT FTSDY SKYLD ERRAQ DFVQW LMDTa(SEQ ID NO :430)
- [0885] HSEGT FTSDY SKYLD ERRAK DFVQW LMDTa(SEQ ID NO :431)
- [0886] HSEGT FTSDY SKYLD ERRAK DFVQW LMDTa(内酰胺 @16-20 ;SEQ ID NO :432)

- [0887] HSEGT FTSDY SKYLD ERRAQ DFVQW LMDTa(内酰胺 @12-16 ;SEQ ID NO :433)
- [0888] HSEGT FTSDY SKYLD ERRAK DFVQW LMDTa(内酰胺 @12-16 ;SEQ ID NO :434)
- [0889] HSEGT FTSDY SKYLD KRRAE DFVQW LMDTa(内酰胺 @16-20 ;SEQ ID NO :435)
- [0890] HSEGT FTSDY SKYLD ERAAK DFVQW LMDTa(SEQ ID NO :436)
- [0891] HSEGT FTSDY SKYLD ERAAK DFVQW LMDTa(内酰胺 @16-20 ;SEQ ID NO :437)
- [0892] HSEGT FTSDY SKYLD ERAAQ DFVQW LMDTa(内酰胺 @12-16 ;SEQ ID NO :438)
- [0893] HSEGT FTSDY SKYLD ERAAK DFVQW LMDTa(内酰胺 @12-16 ;SEQ ID NO :439)
- [0894] HSEGT FTSDY SKYLD KRAAE DFVQW LMDTa(内酰胺 @16-20 ;SEQ ID NO :440)
- [0895] HSEGT FTSDY SKYLD EQAAK EFIAW LMDTa(SEQ ID NO :441)
- [0896] HSEGT FTSDY SKYLD EQAAK EFIAW LMDTa(内酰胺 @12-16 ;SEQ ID NO :442)
- [0897] HSEGT FTSDY SKYLD EQAAK EFIAW LMDTa(内酰胺 @16-20 ;SEQ ID NO :443)
- [0898] X1SEGT FTSDY SKYLD ERRAQ DFVQW LMDTa(SEQ ID NO :444)
- [0899] X1SEGT FTSDY SKYLD ERRAK DFVQW LMDTa(SEQ ID NO :445)
- [0900] X1SEGT FTSDY SKYLD ERRAK DFVQW LMDTa(内酰胺 @16-20 ;SEQ ID NO :446)
- [0901] X1SEGT FTSDY SKYLD ERRAQ DFVQW LMDTa(内酰胺 @12-16 ;SEQ ID NO :447)
- [0902] X1SEGT FTSDY SKYLD ERRAK DFVQW LMDTa(内酰胺 @12-16 ;SEQ ID NO :448)
- [0903] X1SEGT FTSDY SKYLD KRRAE DFVQW LMDTa(内酰胺 @16-20 ;SEQ ID NO :449)
- [0904] X1SEGT FTSDY SKYLD ERAAK DFVQW LMDTa(SEQ ID NO :450)
- [0905] X1SEGT FTSDY SKYLD ERAAK DFVQW LMDTa(内酰胺 @16-20 ;SEQ ID NO :451)
- [0906] X1SEGT FTSDY SKYLD ERAAQ DFVQW LMDTa(内酰胺 @12-16 ;SEQ ID NO :452)
- [0907] X1SEGT FTSDY SKYLD ERAAK DFVQW LMDTa(内酰胺 @12-16 ;SEQ ID NO :453)
- [0908] X1SEGT FTSDY SKYLD KRAAE DFVQW LMDTa(内酰胺 @16-20 ;SEQ ID NO :454)
- [0909] X1SEGT FTSDY SKYLD EQAAK EFIAW LMDTa(SEQ ID NO :455)
- [0910] X1SEGT FTSDY SKYLD EQAAK EFIAW LMDTa(内酰胺 @12-16 ;SEQ ID NO :456)
- [0911] X1SEGT FTSDY SKYLD EQAAK EFIAW LMDTa(内酰胺 @16-20 ;SEQ ID NO :457)
- [0912] 其中在前述序列中, X1 = (脱 - 氨基)His
- [0913] HX2EGT FTSDY SKYLD ERRAQ DFVQW LMDTa(SEQ ID NO :458)
- [0914] HX2EGT FTSDY SKYLD ERRAK DFVQW LMDTa(SEQ ID NO :459)
- [0915] HX2EGT FTSDY SKYLD ERRAK DFVQW LMDTa(内酰胺 @16-20 ;SEQ ID NO :460)
- [0916] HX2EGT FTSDY SKYLD ERRAQ DFVQW LMDTa(内酰胺 @12-16 ;SEQ ID NO :461)
- [0917] HX2EGT FTSDY SKYLD ERRAK DFVQW LMDTa(内酰胺 @12-16 ;SEQ ID NO :462)
- [0918] HX2EGT FTSDY SKYLD KRRAE DFVQW LMDTa(内酰胺 @16-20 ;SEQ ID NO :463)
- [0919] HX2EGT FTSDY SKYLD ERAAK DFVQW LMDTa(SEQ ID NO :464)
- [0920] HX2EGT FTSDY SKYLD ERAAK DFVQW LMDTa(内酰胺 @16-20 ;SEQ ID NO :465)
- [0921] HX2EGT FTSDY SKYLD ERAAQ DFVQW LMDTa(内酰胺 @12-16 ;SEQ ID NO :466)
- [0922] HX2EGT FTSDY SKYLD ERAAK DFVQW LMDTa(内酰胺 @12-16 ;SEQ ID NO :467)
- [0923] HX2EGT FTSDY SKYLD KRAAE DFVQW LMDTa(内酰胺 @16-20 ;SEQ ID NO :468)
- [0924] HX2EGT FTSDY SKYLD EQAAK EFIAW LMDTa(SEQ ID NO :469)
- [0925] HX2EGT FTSDY SKYLD EQAAK EFIAW LMDTa(内酰胺 @12-16 ;SEQ ID NO :470)

- [0926] HX2EGT FTSDY SKYLD EQAAK EFIAW LMDTa(内酰胺 @16-20 ;SEQ ID NO :471)
- [0927] 其中在前述序列中, X2 = 氨基异丁酸
- [0928] HX2EGT FTSDY SKYLD ERRAQ DFVQW LMDTa(SEQ ID NO :472)
- [0929] HX2EGT FTSDY SKYLD ERRAK DFVQW LMDTa(SEQ ID NO :473)
- [0930] HX2EGT FTSDY SKYLD ERRAK DFVQW LMDTa(内酰胺 @16-20 ;SEQ ID NO :474)
- [0931] HX2EGT FTSDY SKYLD ERRAQ DFVQW LMDTa(内酰胺 @12-16 ;SEQ ID NO :475)
- [0932] HX2EGT FTSDY SKYLD ERRAK DFVQW LMDTa(内酰胺 @12-16 ;SEQ ID NO :476)
- [0933] HX2EGT FTSDY SKYLD KRRAE DFVQW LMDTa(内酰胺 @16-20 ;SEQ ID NO :477)
- [0934] HX2EGT FTSDY SKYLD ERAAK DFVQW LMDTa(SEQ ID NO :478)
- [0935] HX2EGT FTSDY SKYLD ERAAK DFVQW LMDTa(内酰胺 @16-20 ;SEQ ID NO :479)
- [0936] HX2EGT FTSDY SKYLD ERAAQ DFVQW LMDTa(内酰胺 @12-16 ;SEQ ID NO :480)
- [0937] HX2EGT FTSDY SKYLD ERAAK DFVQW LMDTa(内酰胺 @12-16 ;SEQ ID NO :481)
- [0938] HX2EGT FTSDY SKYLD KRAAE DFVQW LMDTa(内酰胺 @16-20 ;SEQ ID NO :482)
- [0939] HX2EGT FTSDY SKYLD EQAAK EFIAW LMDTa(SEQ ID NO :483)
- [0940] HX2EGT FTSDY SKYLD EQAAK EFIAW LMDTa(内酰胺 @12-16 ;SEQ ID NO :484)
- [0941] HX2EGT FTSDY SKYLD EQAAK EFIAW LMDTa(内酰胺 @16-20 ;SEQ ID NO :485)
- [0942] 其中在前述序列中, X2 = (D-Ala)。
- [0943] 亦基本上如以上实施例 1-11 所述构建以下含约 5 或更高的 GLP-1/ 胰高血糖素活性比率的胰高血糖素肽。在这些肽中, 通常 2 位 AIB 提供 DPP IV 抗性但亦显著降低胰高血糖素活性。
- [0944] HX2QGT FTSDY SKYLD EQAAK EFIC*W LMNTa(SEQ ID NO :486)
- [0945] HX2QGT FTSDY SKYLD EQAAK EFIAW LMNC*a(SEQ ID NO :487)
- [0946] HX2QGT FTSDY SKYLD EQAAK EFIAW LMNGG PSSGA PPPSC*a(SEQ ID NO :488)
- [0947] HX2QGT FTSDY SKYLD EQAAK EFIAW LMNGG PSSGA PPPSC*a(内酰胺 @16-20 ;SEQ ID NO :489)
- [0948] HX2QGT FTSDY SKYLD EQAAK EFIC*W LMNGG PSSGA PPPSa(SEQ ID NO :490)
- [0949] HX2QGT FTSDY SKYLD EQAAK EFIC*W LMNGG PSSGA PPPSa(内酰胺 @16-20 ;SEQ ID NO :491)
- [0950] 其中在前述序列中 X2 = AIB, 其中 C* 为 Cys 或与亲水聚合物连接的 Cys, 或作为备选 C* 为与约 20kD 平均重量的聚乙二醇连接的 Cys, 或作为备选 C* 为与约 40kD 平均重量的聚乙二醇连接的 Cys。
- [0951] HX2QGT FTSDY SKYLD ERAAK DFVC*W LMNTa(SEQ ID NO :492)
- [0952] HX2QGT FTSDY SKYLD ERAAK DFVQW LMNC*a(SEQ ID NO :493)
- [0953] HX2QGT FTSDY SKYLD ERAAK DFVQW LMNGG PSSGA PPPSC*a(SEQ ID NO :494)
- [0954] HX2QGT FTSDY SKYLD ERAAK DFVQW LMNGG PSSGA PPPSC*a(内酰胺 @16-20 ;SEQ ID NO :495)
- [0955] HX2QGT FTSDY SKYLD ERAAK DFVC*W LMNGG PSSGA PPPSa(SEQ ID NO :496)
- [0956] HX2QGT FTSDY SKYLD ERAAK DFVC*W LMNGG PSSGA PPPSa(内酰胺 @16-20 ;SEQ ID NO :497)

[0957] HX2QGT FTSDY SKYLD ERRAK DFVC*W LMNTa(SEQ ID NO :498)

[0958] HX2QGT FTSDY SKYLD ERRAK DFVQW LMNC*a(SEQ ID NO :499)

[0959] HX2QGT FTSDY SKYLD ERRAK DFVQW LMNGG PSSGA PPPSC*a(SEQ ID NO :500)

[0960] HX2QGT FTSDY SKYLD ERRAK DFVQW LMNGG PSSGA PPPSC*a(内酰胺 @16-20 ;SEQ ID NO :501)

[0961] HX2QGT FTSDY SKYLD ERRAK DFVC*W LMNGG PSSGA PPPSa(SEQ ID NO :502)

[0962] HX2QGT FTSDY SKYLD ERRAK DFVC*W LMNGG PSSGA PPPSa(内酰胺@16-20 ;SEQ ID NO :503)

[0963] 其中在前述序列中 X2 = AIB, 其中 C* 为 Cys 或与亲水聚合物连接的 Cys, 或作为备选 C* 为与约 20kd 平均重量的聚乙二醇连接的 Cys, 或作为备选 C* 为与约 40kd 平均重量的聚乙二醇连接的 Cys。

[0964] 亦基本上如以上实施例 1-11 所述构建以下为 GLP-1/ 胰高血糖素共激动剂的胰高血糖素肽。16 和 20 位氨基酸之间形成的内酰胺桥恢复由 2 位取代引起的胰高血糖素活性的降低。

[0965] HX2QGT FTSDY SKYLD EQAAK EFIC*W LMNTa(内酰胺 @16-20 ;SEQ ID NO :504)

[0966] 其中在前述序列中 X2 = AIB, 其中 C* 为 Cys 或与亲水聚合物连接的 Cys, 或作为备选 C* 为与约 20kd 平均重量的聚乙二醇连接的 Cys, 或作为备选 C* 为与约 40kd 平均重量的聚乙二醇连接的 Cys。

[0967] X1SQGT FTSDY SKYLD EQAAK EFIC*W LMNTa(内酰胺 @16-20 ;SEQ ID NO :505)

[0968] X1SQGT FTSDY SKYLD EQAAK EFIAW LMNC*a(内酰胺 @16-20 ;SEQ ID NO :506)

[0969] X1SQGT FTSDY SKYLD EQAAK EFIAW LMNGG PSSGA PPPSC*a(内酰胺 @16-20 ;SEQ ID NO :507)

[0970] X1SQGT FTSDY SKYLD ERRAK DFVQW LMNGG PSSGA PPPSC*a(内酰胺 @16-20 ;SEQ ID NO :508)

[0971] X1SQGT FTSDY SKYLD EQAAK EFIC*W LMNGG PSSGA PPPSa(内酰胺@16-20 ;SEQ ID NO :509)

[0972] X1SQGT FTSDY SKYLD ERRAK DFVC*W LMNTa(内酰胺 @16-20 ;SEQ ID NO :510)

[0973] HX2QGT FTSDY SKYLD ERRAK DFVC*W LMNTa(内酰胺 @16-20 ;SEQ ID NO :511)

[0974] X1SQGT FTSDY SKYLD ERRAK DFVQW LMNC*a(内酰胺 @16-20 ;SEQ ID NO :512)

[0975] X1SQGT FTSDY SKYLD ERRAK DFVC*W LMNGG PSSGA PPPSa(内酰胺@16-20 ;SEQ ID NO :513)

[0976] 其中在前述序列中 X1 = DMIA(α , α -二甲基咪唑乙酸), 其中 C* 为 Cys 或与亲水聚合物连接的 Cys, 或作为备选 C* 为与约 20kd 平均重量的聚乙二醇连接的 Cys, 或作为备选 C* 为与约 40kd 平均重量的聚乙二醇连接的 Cys。

[0977] HSQGT FTSDY SKYLD EQAAK EFIC*W LMNTa(任选含内酰胺 @16-20 ;SEQ ID NO :514)

[0978] 其中 C* 为 Cys 或与亲水聚合物连接的 Cys, 或作为备选 C* 为与约 20kd 平均重量的聚乙二醇连接的 Cys, 或作为备选 C* 为与约 40kd 平均重量的聚乙二醇连接的 Cys。

[0979] HX2QGT FTSDY SKYLD ERRAK DFVC*W LMNTa(内酰胺 @16-20 ;SEQ ID NO :517)

- [0980] HX2QGT FTSDY SKYLD ERRAK DFVC*W LMNTa(内酰胺 @16-20 ;SEQ ID NO :528)
- [0981] HX2QGT FTSDY SKYLD ERRAK EFIC*W LMNGG PSSGA PPPSC*a(SEQ ID NO :531)
- [0982] HX2QGT FTSDY SKYLD EQAAK EFIAW LMNGG PSSGA PPPSC*C*a(SEQ ID NO :532)
- [0983] HX2QGT FTSDY SKYLD EQAAK EFIC*W LMNGG PSSGA PPPSa(SEQ ID NO :533)
- [0984] 其中在前述序列中 X2 = AIB,其中 C* 为 Cys 或与亲水聚合物连接的 Cys,或作为备选 C* 为与约 20kD 平均重量的聚乙二醇连接的 Cys,或作为备选 C* 为与约 40kD 平均重量的聚乙二醇连接的 Cys。
- [0985] HSQGT FTSDYSKYLD EQAAK EFIC*W LMNTa(SEQ ID NO :518)
- [0986] X1SQGT FTSDYSKYLD EQAAK EFIC*W LMNTa(SEQ ID NO :519)
- [0987] X1SQGT FTSDYSKYLD EQAAK EFIAW LMNC*a(SEQ ID NO :520)
- [0988] X1SQGT FTSDY SKYLD ERRAK DFVC*W LMNGG PSSGA PPPSa(SEQ ID NO :529)
- [0989] X1SQGT FTSDY SKYLD ERRAK DFVC*W LMNTa(SEQ ID NO :530)
- [0990] 其中在前述序列中 X1 = DMIA(α , α -二甲基咪唑乙酸),其中 C* 为 Cys 或与亲水聚合物连接的 Cys,或作为备选 C* 为与约 20kD 平均重量的聚乙二醇连接的 Cys,或作为备选 C* 为与约 40kD 平均重量的聚乙二醇连接的 Cys。
- [0991] HSQGT FTSDYSKYLD SRRAQ DFVQW LMNTGPSSGAPPPSa(SEQ ID NO :521)
- [0992] HSQGT FTSDYSKYLD SRRAQ DFVQW LMNGGPSSGAPPPSa(SEQ ID NO :522)
- [0993] HSQGT FTSDYSKYLD SRRAQ DFVQW LMKGPSSGAPPPSa(SEQ ID NO :523)
- [0994] HSQGT FTSDYSKYLD SRRAQ DFVQW LVKGPSSGAPPPSa(SEQ ID NO :524)
- [0995] HSQGT FTSDYSKYLD SRRAQ DFVQW LMDGPSSGAPPPSa(SEQ ID NO :525)
- [0996] HSQGT FTSDYSKYLD ERRAK DFVQW LMDGPSSGAPPPSa(SEQ ID NO :526)
- [0997] HAEGT FTSDV SSYLE GQAAK EFIAW LVKGGa(SEQ ID NO :527)
- [0998] X1X2QGT FTSDY SKYLD ERX5AK DFVX3W LMNX4(SEQ ID NO :61)
- [0999] 其中
- [1000] X1 = His、D-组氨酸、去氨基组氨酸、羟基-组氨酸、乙酰基-组氨酸、高组氨酸或 α , α -二甲基咪唑乙酸 (DMIA) N-甲基组氨酸、 α -甲基组氨酸或咪唑乙酸,
- [1001] X2 = Ser、D-丝氨酸、Ala、Val、甘氨酸、N-甲基丝氨酸或氨基异丁酸 (AIB)、N-甲基丙氨酸和 D-丙氨酸。
- [1002] X3 = Ala、Gln 或 Cys-PEG
- [1003] X4 = Thr-CONH₂ 或 Cys-PEG 或 GGPSSGAPPPS(SEQ ID NO :515) 或 GGPSSGAPPPSC-PEG(SEQ ID NO :516)
- [1004] 前提为当 X3 为 Cys-PEG 时, X4 不是 Cys-PEG 或 GGPSSGAPPPSC-PEG(SEQ ID NO :516), 并当 X2 = Ser 时, X1 不是 His。
- [1005] X5 = Ala 或 Arg。
- [1006] X1X2QGT FTSDY SKYLD EQ X5AK EFI X3W LMNX4(SEQ ID NO :62)
- [1007] 其中
- [1008] X1 = His、D-组氨酸、去氨基组氨酸、羟基-组氨酸、乙酰基-组氨酸、高组氨酸或 α , α -二甲基咪唑乙酸 (DMIA)、N-甲基组氨酸、 α -甲基组氨酸或咪唑乙酸
- [1009] X2 = Ser、D-丝氨酸、Ala、Val、甘氨酸、N-甲基丝氨酸或氨基异丁酸 (AIB)、N-甲

基丙氨酸和 D- 丙氨酸。

[1010] X3 = Ala、Gln 或 Cys-PEG

[1011] X4 = Thr-CONH₂ 或 Cys-PEG 或 GGPSSGAPPPS (SEQ ID NO :515) 或 GGPSSGAPPPSC-PEG (SEQ ID NO :516)

[1012] 前提为当 X3 为 Cys-PEG 时, X4 不是 Cys-PEG 或 GGPSSGAPPPSC-PEG (SEQ ID NO :516), 并当 X2 = Ser 时, X1 不是 His。

[1013] X5 = Ala 或 Arg

[1014] HSEGT FTSDY SKYLD EQAAK EFIAW LXNTa (SEQ ID NO :554), 其中 27 位 X 为正亮氨酸, 其中 29 位氨基酸被酰胺化。

[1015] 任何前述序列可包括另外的修饰, 例如不破坏活性的 1、2、3、4 或 5 个修饰, 包括但不限于可用于提高效价的 W10 或 R20 取代。亦可在无赋予 DPP IV 抗性的修饰下产生任何前述序列, 即其中 1 位为天然 His 并且 2 位为天然 Ser。另外, 任何前述化合物可任选与缀合物连接, 所述缀合物例如异种多肽、免疫球蛋白或其部分 (例如 Fc 区)、靶向剂、诊断标记或诊断剂或治疗剂。

[1016] 实施例 17

[1017] 基本上如以上实施例 1-11 所述构建以下胰高血糖素肽, 其经修饰以包含与所述胰高血糖素肽的羧基末端连接的 c- 末端延伸 SEQ ID NO :26, 并用实施例 14 所述的体外测定来测定针对 GLP-1 和胰高血糖素受体的活性。

[1018] 表 11 表示各种胰高血糖素类似物针对胰高血糖素受体和 GLP-1 受体的活性。数据显示对于包含 c- 末端延伸 SEQ ID NO :26 的胰高血糖素类似物而言, 16、20、28 和 29 位氨基酸取代可影响所述类似物针对 GLP-1 受体的活性。

[1019] 表 11

[1020] 胰高血糖素 -Cex 结构活性关系

[1021]

胰高血糖素肽

胰高血糖素受体

GLP-1 受体

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

[1022] 实施例 18

[1023] 表 12 表示比较各种胰高血糖素肽针对胰高血糖素受体和 GLP-1 受体的相对活性所累积的体外数据。

[1024] 表 12 :激动剂和共激动剂 w/ 和 w/o PEG 的比较

[1025]

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

[1026]

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

[1027]

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

[1028] 实施例 19

[1029] 如下制备酰化和 / 或聚乙二醇化肽。用 CS Bio 4886 肽合成仪或 Applied Biosystems 430A 肽合成仪在固相载体树脂上合成肽。用 Schnolzer 等, Int. J. PEPTIDE Protein Res. 40 :180-193(1992) 所述的原位中和化学。对于酰化的肽而言,用 N ϵ -FMOC 赖氨酸残基取代待酰化的靶氨基酸残基(例如 10 位)。用 20% 哌啶 /DMF 将完成的 N- 末端 BOC 保护的肽处理 30 分钟除去 FMOC/ 甲酰基基团。通过让 10 倍摩尔过量的 FMOC- 保护的间隔物氨基酸(例如 FMOC-(N-BOC)- 色氨酸 -OH) 或酰基链(例如 C17-COOH) 与 DMF/DIEA 中的 PyBOP 或 DEPBT 偶联试剂偶联,实现与游离 ϵ - 氨基 Lys 残基的偶联。随后除去间隔物氨基酸的 FMOC 基团,接着重复与酰基链的偶联。用 100% TFA 的最后处理导致除去任何侧链保护基团和 N- 末端 BOC 基团。用 5% DIEA/DMF 中和肽树脂,干燥,然后用 95 : 5 的 HF/ 对甲酚在 0°C 1 小时使其从载体上裂解。在醚提取后,用 5% HOAc 溶液使粗肽成为溶剂化物。然后通过 ESI-MS 确证溶液样品含有符合分子量的肽。通过 RP-HPLC 用 10% CH₃CN/0.1% TFA 到 100% CH₃CN 中的 0.1% TFA 线性梯度纯化符合的肽。用 Vydac C18 22mmx250mm 蛋白质柱来纯化。通常用 20 : 80 比率的缓冲液完成酰化肽类似物的洗脱。将各部分集中在一起,在分析性 RP-HPLC 上检查其纯度。冻干纯馏分产生白色固态肽。产率通常视合成而定介于 10mg-100mg 范围内。

[1030] 若肽包含内酰胺桥和待酰化的靶标残基,则在将该氨基酸添加到肽主链后进行上述酰化。

[1031] 对于肽的聚乙二醇化,在 7M 脲、50mM Tris-HCl 缓冲液中用将肽及 PEG 二者都溶解为澄清溶液所需的最小量溶剂(通常对于用 2-3mg 肽反应小于 2mL),让等摩尔的肽与 40kDa 甲氧基聚(乙二醇)马来酰亚胺基-丙酰胺(Chirotech Technology Ltd.)反应。室温剧烈搅拌 4-6 小时,由分析性 RP-HPLC 分析反应物。聚乙二醇化产物表现得与原料明显不同,其保留时间缩短。在 Vydac C4 柱上用与初始肽纯化所用相似的条件进行纯化。在大约 50 : 50 缓冲液比率进行洗脱。收集和冻干纯聚乙二醇化肽馏分。产率高于 50%,其依每次反应不等。

[1032] 通过用胰高血糖素受体 (GLUR) 或 GLP-1 受体 (GLP-1R) 和连接到 cAMP 响应元件的荧光素酶基因共转染 HEK293 细胞,来测定肽的生物学活性。通过在补充 0.25% 牛生长血清的 DMEM 中培养 16 小时,来对转染的细胞实施血清剥夺,然后用系列稀释的所选类似物及分别作为标准的胰高血糖素或 GLP-1 孵育 5 小时。在 Genesys 6 分光光度计 (Thermo Electron Corporation) 上从 UV 吸光度测量中获得 280nm 处的肽吸光度读数。用 Beer 定律基于每一类似物的色氨酸和酪氨酸残基计算溶液浓度。在孵育结束时,将 100 μ L LucLite 发光底物试剂加入到各孔中,密封板,振荡并置于 Wallac Trilux 发光计数器 (luminescence counter) 中进行 cAMP 检测。用 Origin 软件 (OriginLab, Northampton, MA) 计算有效 50% 浓度 (EC₅₀)。

[1033] 制备酰化的基于胰高血糖素的共激动剂肽。这些肽选择的体外结果示于表 13 中。尽管未酰化的肽例如天然胰高血糖素在磷酸盐-缓冲的溶液中以 1mg/mL 浓度不可溶,但观察到酰化提高所述肽在中性 pH 时的溶解性。

[1034] 表 13

[1035]

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

[1036] 四种酰化肽都表现出提高的针对 GLP-1 受体的效价。包含色氨酸间隔物提供更好的针对胰高血糖素受体的效价。稍优选 C18 酰基链长。

[1037] 尽管酰化可将肽的半衰期延长数小时或更长,但以数十 kDa 范围重复的聚乙二醇化效果可更好。制备包含这两种修饰类型的肽。预期这些肽表现出延伸的循环半衰期以及对 DPP-IV 和其它蛋白酶的抗性。这些肽选择的体外结果示于表 14 中。

[1038] 表 14

[1039]

酰化、聚乙二醇化肽的受体激活曲线和nM EC ₅₀ 值				
肽	GLP-1受体	N	胰高血糖素受体	N
GLP-1	0.04	15	>100	3
E16 K20-胰高血糖素-NH ₂ (SEQ ID NO: 545)	0.21	9	0.18	10
含K ¹⁰ -W-C ₁₆ 和C ²⁴ -40K PEG的E16 K20-胰高血糖素-NH ₂ (SEQ ID NO: 546)	0.23	13	0.52	13
含K ¹⁰ -C ₁₈ 和C ²⁴ -40K PEG的E16 K20-胰高血糖素-NH ₂ (SEQ ID NO: 547)	0.15	12	0.84	13
含K ¹⁰ -W-C ₁₈ 和C ²⁴ -40K PEG的E16 K20-胰高血糖素-NH ₂ (SEQ ID NO: 548)	1.64	3	1.30	5
胰高血糖素 (SEQ ID NO: 1)	7.42	6	0.07	17

[1040]

[1041] 三种肽中的两种保留其针对 GLP-1 受体和胰高血糖素受体的高效价, 且 EC₅₀ 小于 1nM。K¹⁰-W-C₁₈ 酰化和聚乙二醇化的肽针对这两种受体表现出约 10- 倍的效价损失。这一系列的肽显示, 10 位酰化与胰高血糖素肽 C- 末端部分 (例如 24、28 或 29 位)、C- 末端延伸或 C- 末端 (例如通过添加 C- 末端 Cys) 的聚乙二醇化相容。

[1042] 实施例 20

[1043] 基本上如实施例 19 所述制备各种酰化的胰高血糖素共激动剂肽并检测体内活性。具体而言, 进一步修饰肽 A (修饰 SEQ ID NO: 1 以含有 2 位 AIB、16 位 Glu、17 位 Gln、18 位 Ala、20 位 Lys、21 位 Glu、23 位 Ile、24 位 Cys, 其中 Cys 与 40K PEG 键合和 C- 末端酰胺) 以包含 10 位 Lys。用 C8 脂肪酸链、C14 脂肪酸链、C16 脂肪酸链或 C18 脂肪酸链酰化 Lys10。

[1044] 如实施例 14 所述测定每一酰化肽针对 GLP-1 受体的活性, 并与作为对照的 GLP-1 (7-37) 酸 (SEQ ID NO: 50) 活性比较。表 15 中所示的每一酰化肽针对 GLP-1 受体的 EC₅₀ 与 GLP-1 肽的 EC₅₀ 相似。

[1045] 表 15

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

[1046]

[1047] 然后用各种酰化和非酰化肽或单独溶媒每周一次 (70nmol/kg/ 周) 皮下注射饮食诱导的肥胖症 (DIO) 小鼠 2 周, 进行体内肽测定。测定初始平均体重为 44g 的每组 6 只小

鼠。周期性测定体重、身体组成、摄食和血糖水平。

[1048] 如图 11 所示,酰化肽能够以与非酰化肽相似的程度引起减重。如图 11 所示,用酰化肽治疗头 3 天内达到约 7-12%的减重。如图 12 所示,酰化肽引起摄食减少。另外,如图 13 所示,治疗 1 天后降低酰化肽的随意血糖水平。

[1049] 实施例 21

[1050] 基本上如实施例 19 所述制备以下酰化的胰高血糖素共激动剂肽。

[1051] (A) “嵌合体 -2 Aib2 Lys10-C18 Cys24(40K)” :其为包含以下修饰的天然胰高血糖素氨基酸序列 (SEQ ID NO :1) :16 位 Glu、17 位 Gln、18 位 Ala、20 位 Lys、21 位 Glu、23 位 Ile 和 24 位 Ala 和 C- 末端酰胺 (“嵌合体 2”),其进一步用如下氨基酸来进行修饰 :2 位 AIB、用 C18 脂肪酸酰化的 Lys10 和用 40K PEG 基团聚乙二醇化的 24 位 Cys ;

[1052] (B) “嵌合体 -2Aib2 Lys10-C16 Cys24(40K)” :其为用以下氨基酸进一步修饰的嵌合体 2 :2 位 AIB、用 C16 脂肪酸酰化的 Lys10 和用 40KPEG 基团聚乙二醇化的 Cys24 ;

[1053] (C) “胰高血糖素 Lys10-C18 E16 K20 Cys24(40K)” :其为包含以下修饰的天然胰高血糖素氨基酸序列 (SEQ ID NO :1) :16 位 Glu、20 位 Lys 和 C- 末端酰胺 (“E16K20- 胰高血糖素 -NH₂”),其进一步用以下氨基酸进行修饰 :用 C18 脂肪酸酰化的 Lys10 和用 40K PEG 基团聚乙二醇化的 Cys24 ;

[1054] (D) “胰高血糖素 Lys10-TrpC16 E16 K20 Cys24(40K)” :其为进一步用与 Trp 间隔物连接的 Lys10 修饰的 E16K20- 胰高血糖素 -NH₂,其中所述 Trp 间隔物用 C16 脂肪酸酰化 ;

[1055] (E) “胰高血糖素 Lys10-TrpC18 E16 K20 Cys24(40K)” :其为进一步用与 Trp 间隔物连接的 Lys10 修饰的 E16K20- 胰高血糖素 -NH₂,其中所述 Trp 间隔物用 C18 脂肪酸酰化。

[1056] 基本上如实施例 14 所述测定酰化的胰高血糖素共激动剂肽针对胰高血糖素受体和 GLP-1 受体的活性。将针对胰高血糖素受体和 GLP-1 受体每一种的 EC₅₀ 与对照 (GLP-1 (7-37)OH(GLP-1 的 7-37 位氨基酸)、胰高血糖素 (1-29)OH(SEQ ID NO :1) 和嵌合体 2Cys24(40K) (在 Cys 24 上含 40K PEG 的嵌合体 2)) 比较,结果如表 16 所示。

[1057] 表 16

[1058]

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

[1059] 实施例 22

[1060] 基本上如实施例 19 所述制备以下酰化的胰高血糖素共激动剂肽：

[1061] (A) 肽 A：其为包含以下修饰的天然胰高血糖素氨基酸序列 (SEQ ID NO:1)：16 位 Glu、20 位 Lys 和 C-末端酰胺 (“E16K20-胰高血糖素-NH₂”)；

[1062] (B) 肽 B：其为进一步包含用 C16 脂肪酸酰化的 Lys10 的 E16K20-胰高血糖素-NH₂；

[1063] (C) 肽 C：其为进一步包含用 C18 脂肪酸酰化的 Lys10 的 E16K20-胰高血糖素-NH₂；

[1064] (D) 肽 D：其为进一步包含与用 C16 脂肪酸酰化的 Glu (间隔物残基) 连接的 Lys10 的 E16K20-胰高血糖素-NH₂；

[1065] (E) 肽 E：其为进一步包含与用 C18 脂肪酸酰化的 Trp (间隔物残基) 连接的 Lys10 的 E16K20-胰高血糖素-NH₂。

[1066] 基本上按照实施例 14 测定所述肽的活性，针对胰高血糖素受体和 GLP-1 受体每一种的 EC50 示于表 17 中。

[1067] 表 17

[1068]

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

[1069] 实施例 23

[1070] 制备包含具有以下修饰的氨基酸序列 SEQ ID NO:1 的胰高血糖素共激动剂肽:16 位 Glu、17 位 Gln、18 位 Ala、20 位 Lys、21 位 Glu、23 位 Ile、24 位 Ala、27 位 Val、28 位 Lys 和 C-末端酰胺 (“嵌合体 1”)。通过缺失嵌合体 1 的 29 位氨基酸 (“Chi 1(1-28)”) 或通过缺失嵌合体 1 的 28 和 29 两个位置的氨基酸 (“Chi 1(1-27)”) 制备嵌合体 1 的 C-末端截短的形式。

[1071] 包含具有以下修饰的氨基酸序列 SEQ ID NO:1 的胰高血糖素共激动剂肽:16 位 Glu、C-末端酰胺 (“E16 Gluc-NH₂”) 亦通过缺失 29 位氨基酸 (“E16 GlucNH₂(1-28)”) 或通过缺失 28 和 29 位两个位置的氨基酸 (“E16 GlucNH₂(1-27)”) 在 C-末端截短。

[1072] 基本上按照实施例 14 所述测定截短肽以及非截短肽针对胰高血糖素受体和 GLP-1 受体的功能活性。对 E16 GlucNH₂ 肽或嵌合体 1 肽缺失 28 和 29 位氨基酸未显著影响所述肽针对胰高血糖素受体的活性。对 E16 GlucNH₂ 缺失 28 和 29 位氨基酸根本不改变所述肽针对 GLP-1 受体的效价。对嵌合体 1 缺失 28 和 29 位氨基酸不影响其针对 GLP-1 受体的活性。

[1073] 对嵌合体 1 肽或 E16 GlucNH₂ 肽缺失 29 位氨基酸未显著影响针对胰高血糖素受体或 GLP-1 受体的活性。

[1074] 实施例 24

[1075] 用 0.2、2、20 或 70nmol/kg 的以下物质之一在 -15 分钟的时间点腹膜内注射饮食诱导肥胖症 (DIO) 的小鼠:

[1076] (A) 仅溶媒;

[1077] (B) 包含以下修饰的天然胰高血糖素氨基酸序列 (SEQ ID NO:1):16 位 Glu、17 位 Gln、18 位 Ala、20 位 Lys、21 位 Glu、23 位 Ile 和 24 位 Ala 和 C-末端酰胺 (“嵌合体 2”), 其进一步修饰以包含 2 位 AIB 和 24 位 Cys, 其中用 40K PEG 使 Cys 聚乙二醇化 (“嵌合

体 -2-AIB²Cys²⁴-40kD”)。

[1078] (C) 进一步修饰嵌合体 2 以包含 2 位 AIB、用 C8 脂肪酸酰化的 10 位 Lys 和用 40K PEG 聚乙二醇化的 24 位 Cys (“嵌合体 -2 AIB² K¹⁰-C8 Cys²⁴-40kD”) 或

[1079] (D) 进一步修饰嵌合体 2 以包含 2 位 AIB、用 C16 脂肪酸酰化的 10 位 Lys 和用 40K PEG 聚乙二醇化的 24 位 Cys (“嵌合体 -2 AIB²K¹⁰-C16 Cys²⁴-40kD”)。

[1080] 以 1.5g/kg 体重的剂量在 0 分钟时间点注射包含 25% (v/v) 葡萄糖的盐水溶液。在 -15、0、15、30、60 和 120 分钟的时间点测量血糖水平。

[1081] 图 15-17 显示分别用 2、20 和 70nmol/kg 注射的小鼠在所示时间点的血糖水平 (mg/dL)。对于所有检测剂量,嵌合体 -2AIB² K¹⁰-C8 Cys²⁴-40kD 都显示出最大的降低小鼠血糖的能力。如图 17 所示,该肽具有与嵌合体 -2-AIB² Cys²⁴-40kD 相似的活性。

[1082] 实施例 25

[1083] 用 70nmol/kg 的以下物质之一在 -24 小时的时间点腹膜内注射 DIO 小鼠 :

[1084] (A) 仅溶媒 ;

[1085] (B) 如以上实施例 24 所述的嵌合体 -2-AIB² Cys²⁴-40kD。

[1086] (C) 如以上实施例 24 所述的嵌合体 -2AIB² K¹⁰-C8 Cys²⁴-40kD 或

[1087] (D) 如以上实施例 24 所述的嵌合体 -2AIB² K¹⁰-C16 Cys²⁴-40kD。

[1088] 以 1.5g/kg 体重的剂量在 0 分钟时间点注射包含 25% (v/v) 葡萄糖的盐水溶液。在 0、15、30、60 和 120 分钟的时间点测量血糖水平。

[1089] 图 18 显示在所示时间点小鼠的血糖水平 (mg/dL)。三种肽都显示出显著的降低小鼠血糖的活性。

[1090] 实施例 26

[1091] 仅用溶媒或 15 或 70nmol/kg 的以下物质之一腹膜内注射 DIO 小鼠 :

[1092] (A) 如以上实施例 24 所述的嵌合体 -2-AIB² Cys²⁴-40kD ;

[1093] (B) 如以上实施例 24 所述的嵌合体 -2AIB² K¹⁰-C8 Cys²⁴-40kD 或

[1094] (C) 如以上实施例 24 所述的嵌合体 -2AIB² K¹⁰-C16 Cys²⁴-40kD。

[1095] 在注射前和注射后 1、3、5 和 7 天测量体重。

[1096] 图 19 显示每组小鼠体重变化 %。在两种测试剂量中,嵌合体 -2AIB² K¹⁰-C8 Cys²⁴-40kD 和嵌合体 -2-AIB² Cys²⁴-40kD 显示出可类比的降低体重的能力。嵌合体 -2AIB² K¹⁰-C16 Cys²⁴-40kD 以较高测试剂量显示出显著的降低体重的能力。

[1097] 实施例 27

[1098] 基本上如上所述合成包含 1 位酪氨酸和 E16 和 K20 之间的内酰胺桥 (和取代 C- 末端羧酸酯的酰胺) 的肽 SEQ ID NO :555,并通过实施例 14 测定其针对 GLP-1 受体和胰高血糖素受体的体外活性。所述肽针对每种受体的 EC₅₀ 示于表 18 中。

[1099] 表 18

[1100]

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

GLP-1	0.062	0.062	100.00%
-------	-------	-------	---------

[1101] 相对活性为相对于所示受体的天然激素的活性。

[1102] 基于这些数据,确定肽 SEQ ID NO:555 为例示性胰高血糖素/GLP-1 共激动剂肽。

[1103] 实施例 28

[1104] 基本上如上所述合成以下肽:肽 SEQ ID NO:1(胰高血糖素(1-29))、含取代 C-末端羧酸酯的酰胺的肽 SEQ ID NO:1(胰高血糖素(1-29a))和含 2 及 16 位每一位置的 AIB 和取代 C-末端羧酸酯的酰胺的肽 SEQ ID NO:1(胰高血糖素(1-29a)Aib² Aib¹⁶)。然后通过实施例 14 所述方法测定这些肽针对 GLP-1 受体和胰高血糖素受体的体外活性。每一肽的 EC₅₀ 示于表 19 中。

[1105] 表 19

[1106]

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

[1107] SD = 标准偏差

[1108] 实施例 29

[1109] 基本上如上所述合成以下肽:

[1110] (1) 胰高血糖素(1-29),其如实施例 28 所述;

[1111] (2) 含 24 位 Cys 和与包含 C16 脂肪酸的 Trp 共价键合的 10 位 Lys 的胰高血糖素(1-29a)Aib² Aib¹⁶(如实施例 28 所述)(“胰高血糖素(1-29a)Aib² Lys¹⁰-Trp-C16 Aib¹⁶ Cys²⁴”);

[1112] (3) 其中 Cys 包含 40kD PEG 基团的胰高血糖素(1-29a)Aib² Lys¹⁰-Trp-C16 Aib¹⁶ Cys²⁴(“胰高血糖素(1-29a)Aib² Lys¹⁰-Trp-C16 Aib¹⁶ Cys²⁴-40kD”);

[1113] (4) 包含 20 位 AIB 的胰高血糖素(1-29a)Aib² Lys¹⁰-Trp-C16 Aib¹⁶ Cys²⁴(“胰高血糖素(1-29a)Aib² Lys¹⁰-Trp-C16 Aib¹⁶ Aib²⁰Cys²⁴”);和

[1114] (5) 其中 Cys 包含 40kD PEG 基团的胰高血糖素(1-29a)Aib² Lys¹⁰-Trp-C16 Aib¹⁶ Aib²⁰ Cys²⁴(“胰高血糖素(1-29a)Aib² Lys¹⁰-Trp-C16 Aib¹⁶ Aib²⁰ Cys²⁴-40kD”)。

[1115] 然后通过实施例 14 所述方法测定这些肽针对 GLP-1 受体和胰高血糖素受体的体外活性。每一肽的 EC₅₀ 示于表 20 中。

[1116] 表 20

[1117]

肽	胰高血糖素受体		GLP-1 受体	
	EC ₅₀ (nM)	SD	EC ₅₀ (nM)	SD
胰高血糖素(1-29)	0.04	0.01		
胰高血糖素(1-29a) Aib ² Lys ¹⁰ -Trp-C16 Aib ¹⁶ Cys ²⁴	0.25	0.02	0.24	0.03
胰高血糖素(1-29a) Aib ² Lys ¹⁰ -Trp-C16 Aib ¹⁶ Cys ²⁴ -40K	0.29	0.03	0.19	0.02
胰高血糖素(1-29a) Aib ² Lys ¹⁰ -Trp-C16 Aib ¹⁶ Aib ²⁰ Cys ²⁴	2.06	0.02	1.15	0.19
胰高血糖素(1-29a) Aib ² Lys ¹⁰ -Trp-C16 Aib ¹⁶ Aib ²⁰ Cys ²⁴ -40K	2.37	0.24	0.60	0.06
GLP-1(1-31)OH			0.02	0.01

[1118]

[1119] 实施例 30

[1120] 在 D10 小鼠中检测酰化和聚乙二醇化胰高血糖素肽的体内作用。具体而言,用 10、20、40 或 80nmol/kg 的酰化和聚乙二醇化的胰高血糖素肽或溶媒对照对 6 组 D10 小鼠(每组 8 只小鼠)每周一次腹膜内注射 2 周,每组小鼠具有 58g 的平均初始体重。在本研究中所用的酰化和聚乙二醇化胰高血糖素肽为嵌合体 -2 AIB² K¹⁰-C8 Cys²⁴-40kD(如实施例 26 所述)和肽 A K¹⁰-C14(如实施例 20 所述)。

[1121] 在注射后 0、1、3、5、7、8、10、12 和 14 天测量小鼠的体重和摄食变化。在 14 天期间监测小鼠的血糖水平。如下进行葡萄糖耐受测定:在给予酰化或聚乙二醇化肽后 1 小时或 24 小时注射含 25%葡萄糖的盐水溶液,并在葡萄糖注射后 -60、0、15、30、60 或 120 分钟测量血糖水平。

[1122] 如图 20 所示,与用溶媒对照注射的小鼠比较,用 40 或 80nmol/kg 酰化和聚乙二醇化肽 A K¹⁰-C14 注射的小鼠总体重降低。

[1123] 如图 21 所示,与用溶媒对照比较,用 20、40 或 80nmol/kg 肽 A K¹⁰-C14 或用 20nmol/kg 嵌合体 -2 AIB² K¹⁰-C8 Cys²⁴-40kD 注射的小鼠的血糖水平对葡萄糖注射的响应降低。

[1124] 实施例 31

[1125] 通过固相合成制备包含或缺乏共价分子内桥的酰化的胰高血糖素类似物肽,并检测其针对胰高血糖素受体和 GLP-1 受体的体外活性。每一受体的 EC₅₀ (nM) 和所述肽相对于天然肽针对对应的受体的活性%示于表 21 中。

[1126] 表 21

[1127]

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

[1128]

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

[1129] 基本上如本文所述制备几种缺乏共价分子内桥并包含 2 位 AIB、16 位 AIB 和经由间隔物与 10 位 Lys 残基连接的脂肪酰基的胰高血糖素类似物。所述酰化的胰高血糖素类似物的间隔物类型不同, 存在或不存在聚乙二醇化和 / 或酰基大小不同。基本上如实施例 14 所述检测所述酰化的胰高血糖素类似物针对胰高血糖素受体和 GLP-1 受体的体外活性。各肽的结构概述及针对胰高血糖素受体和 GLP-1 受体的体外活性示于表 22 和 23 中。

[1130] 表 22

[1131]

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

[1132]

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

[1133] *表示包含 24 位 Cys 残基（取代 Gln）的肽，其中 Cys 与 40kDaPEG 基团共价连接。

[1134] 表 23

[1135]

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

[1136]

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

[1137] ** 肽包含 24 位 Cys (取代 Gln), 其中 Cys 不与 PEG 分子共价连接。

[1138] 如表 22 和 23 所述, 与包含直接与肽主链连接的脂肪酰基的肽比较, 包含经由间隔物连接的脂肪酰基的肽显著提高其效价。

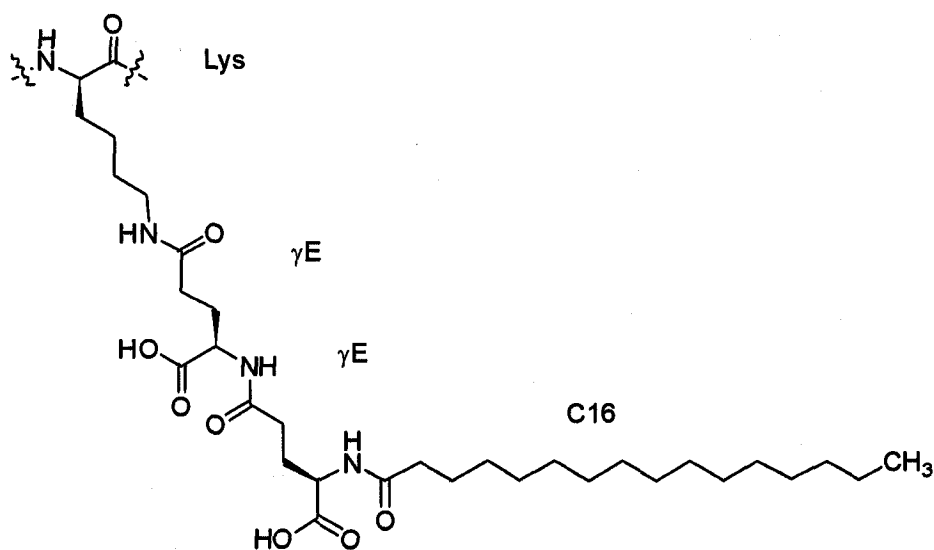
[1139] 实施例 32

[1140] 用单独溶媒、用 30nmol/kg 或 100nmol/kg 的酰化的胰高血糖素类似物肽或用长效 GLP-1 类似物利拉鲁肽 (Liraglutide) (Novo Nordisk, Denmark), 每日一次皮下注射 D10 小鼠 (每组 8 只小鼠) 7 天, 每只小鼠具有 48.7g 的平均体重。酰化的胰高血糖素类似物如下:

[1141] “(C16) 胰高血糖素酰胺”包含野生型胰高血糖素的氨基酸序列 (SEQ ID NO:1), 且含 10 位 Tyr 修饰成酰化的 Lys 残基和取代 C- 末端羧酸酯的酰胺基团, 其中酰化的 Lys 包含 C16 脂肪酰基;

[1142] “ γ E- γ E-C16 胰高血糖素酰胺”包含与 C16 胰高血糖素酰胺相同的结构, 只是 C16 脂肪酰基通过 γ -Glu- γ -Glu 二肽间隔物 (参见以下酰化的 Lys 的结构) 与 10 位 Lys 连接;

[1143]



[1144] “AA-C16 胰高血糖素酰胺”包含与 C16 胰高血糖素酰胺相同的结构, 只是 C16 脂肪

酰基通过 Ala-Ala 二肽间隔物与 10 位 Lys 连接 ;和

[1145] “ β A β A-C16 胰高血糖素酰胺”,其包含与 C16 胰高血糖素酰胺相同的结构,只是 C16 脂肪酰基通过 β -Ala- β -Ala 二肽间隔物与 10 位 Lys 连接。

[1146] 每日监测小鼠体重,体重的总变化(%)示于图 22 中。如图 22 所示,大部分酰化的胰高血糖素肽在各剂量下引起体重减轻。尽管利拉鲁肽显示出大约 12%的体重减轻,但胰高血糖素类似物肽 γ E- γ E-C16 胰高血糖素酰胺在相匹配的剂量下表现出最大的引起小鼠减重的能力。即使较低的 γ E- γ E-C16 胰高血糖素酰胺剂量也引起体重的大大降低。

[1147] 在研究的第 7 天测量小鼠的脂肪量。如图 23 所示,给予 100nmol/kg γ E- γ E-C16 胰高血糖素酰胺的小鼠表现出最低的脂肪量。

[1148] 在测定过程中亦监测小鼠的血糖水平。如图 24 所示,胰高血糖素类似物肽 γ E- γ E-C16 胰高血糖素酰胺以较高剂量和利拉鲁肽一样降低小鼠的血糖水平。

[1149] 实施例 33

[1150] 如下评估具有 GLP-1 活性的酰化的胰高血糖素类似物肽。修饰包含具有 2 位 AIB 和 24 位 Cys(包含 40kDa PEG 分子)的嵌合体 2 结构的非酰化的胰高血糖素类似物肽,以包含酰化的 10 位 Lys 残基。非酰化的胰高血糖素类似物肽包含氨基酸序列 SEQ ID NO:580。用 C8、C14、C16 或 C18 脂肪酰基酰化 10 位 Lys,酰化的肽分别包含 SEQ ID NO:534-537 的结构。基本上如本文所述检测非酰化肽及其酰化形式的针对 GLP-1 受体的体外活性。各肽针对 GLP-1 受体的 EC₅₀ 示于表 24 中。

[1151] 表 24

[1152]

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

[1153] 实施例 34

[1154] 如本文所述通过固相肽合成制备胰高血糖素类似物肽,并在所述肽的 10 或 30 位酰化。所述肽及其结构如下:

[1155] “肽 dS2E16K20K30-C14 Gluc 酰胺” 包含氨基酸序列 HXQGTFTSDYSKYLDERRAKDFVQWLMNTK- 酰胺 (SEQ ID NO:581),其中 2 位 X 为 d-Ser,其中用 C14 脂肪酰基酰化 30 位 Lys,用酰胺取代 C- 末端羧酸酯;

[1156] “肽 dS2K10(C14)E16K20-Gluc 酰胺” 包含氨基酸序列 HXQGTFTSDKSKYLDERRAKDFVQWLMNT- 酰胺 (SEQ ID NO:582);其中 2 位 X 为 d-Ser,其中用 C14 脂肪酰基酰化 10 位 Lys,用酰胺取代 C- 末端羧酸酯;

[1157] “肽 dS2E16K20K30-C16 Gluc 酰胺” 包含氨基酸序列 HXQGTFTSDYSKYLDERRAKDFVQWLMNTK- 酰胺 (SEQ ID NO:583),其中 2 位 X 为 d-Ser,其中用 C16 脂肪酰基酰化 30 位 Lys,用酰胺取代 C- 末端羧酸酯;

[1158] “肽 dS2K10(C16)E16K20-Gluc 酰胺” 包含氨基酸序列 HXQGTFTSDKSKYLDERRAKDFVQWLMNT- 酰胺 (SEQ ID NO:584);其中 2 位 X 为 d-Ser,其中用 C16 脂肪酰基酰化 10 位 Lys,用酰胺取代 C- 末端羧酸酯;

[1159] “肽 嵌合体 2-AIB2-K10- 酰化” 包含氨基酸序列 HXQGTFTSDKSKYLDEQAQKEFICWLMNT- 酰胺 (SEQ ID NO:585);其中 2 位 X 为 AIB,用 C18 脂肪酰基酰化 10 位 K,24 位 Cys 包含 40kDa PEG 分子,用酰胺取代 C- 末端羧酸酯;和

[1160] “肽 嵌合体 2-AIB2-K30- 酰化” 包含氨基酸序列 HXQGTFTSDYSKYLDQAQKEFICWLMNTK- 酰胺 (SEQ ID NO:586),其中 2 位 X 为 AIB,用 C18 脂肪酰基酰化 10 位 K,24 位 Cys 包含 40kDa PEG 分子,用酰胺取代 C- 末端羧酸酯。

[1161] 基本上如实施例 14 所述检测各肽针对 GLP-1 受体和胰高血糖素受体的体外活性。结果示于表 25 中。

[1162] 表 25

[1163]

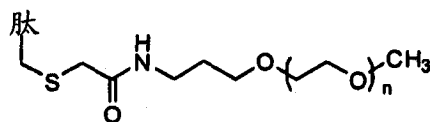
肽名称	酰基所在位置	针对胰高血糖素受体的 EC50 (nM)	针对 GLP-1 受体的 EC50 (nM)
肽 dS2E16K20K30-C14 Gluc 酰胺	30	3.53	0.84
肽 dS2K10(C14)E16K20-Gluc 酰胺	10	0.155	0.041
肽 dS2E16K20K30-C16 Gluc 酰胺	30	4.89	3.05
dS2K10(C16)E16K20-Gluc 酰胺	10	0.076	0.041
肽嵌合体 2-AIB2-K10- 酰化	30	N/A	0.465
肽嵌合体 2-AIB2-K30- 酰化	10	N/A	0.007

[1164]

[1165] 实施例 35

[1166] 采用固相肽合成用于集合序列 XSQGTFTSDYSKYLDERRAKDFVCWLMNT-NH₂, 其中 X = DMIA (SEQ ID NO :587)。在选择性除去 16 位 Glu 和 20 位 Lys 的保护后, 在树脂上经由内酰胺桥环化该肽。然后通过制备性 RP-HPLC 纯化裂解后的粗肽, 由 MS 表征 (计算的 [M+H] 为 3479.9 ;检测的为 3480.9)。通过让肽前体和碘乙酰基-功能化的 40k Da PEG (NOF) (1 : 1) 在 7M 脲 /50mM Tris 缓冲液 (pH 8.5) 中于室温混合 45 分钟来聚乙二醇化, 以在 PEG 和肽的 Cys 之间形成共价硫醚键, 其如下所示 :

[1167]



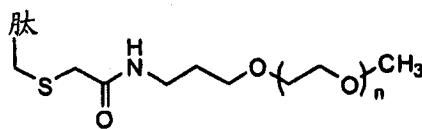
[1168] 通过制备性 HPLC 纯化聚乙二醇化肽, 收集并冻干所需馏分, 得到淡白色粉末。由 MALDI-TOF-MS 确证产物 (44000-46000 宽峰)。

[1169] 基本上如实施例 14 所述检测针对 GLP-1 受体和胰高血糖素受体的体外活性。针对 GLP-1 受体和胰高血糖素受体的 EC50 分别为 0.327nM 和 0.042nM。

[1170] 实施例 36

[1171] 采用固相肽合成用于制备肽前体 HXEGTFTSDYSKYLDERRAKDFVCWLMNT-NH₂, 其中 X = AIB (SEQ ID NO :589)。通过制备性 RP-HPLC 纯化粗肽, 由 MS 表征 (计算的 [M+H] 为 3412.8 ;检测的为 3413.9)。通过让肽前体和碘乙酰基-功能化的 40k Da PEG (NOF) (1 : 1) 在 7M 脲 /50mM Tris 缓冲液 (pH 8.5) 中于室温混合 45 分钟来聚乙二醇化, 以在 PEG 和肽的 Cys 之间形成共价硫醚键, 其如下所示 :

[1172]



[1173] 通过制备性 HPLC 纯化聚乙二醇化肽, 收集并冻干所需馏分, 得到淡白色粉末。由 MALDI-TOF-MS 确证产物 (44000-46000 宽峰)。

[1174] 基本上如实施例 14 所述检测针对 GLP-1 受体和胰高血糖素受体的体外活性。针对 GLP-1 受体和胰高血糖素受体的 EC50 分别为 0.027nM 和 33nM。

[1175] 实施例 37

[1176] 基本上如本文所述通过固相肽合成制备以下胰高血糖素类似物肽 :包含以下肽 J 主链的肽

[1177] HS-X-GTFTSDYSKYLDTRRAAEFVAWL (N1e) DE (SEQ ID NO :591)

[1178] 或包含以下肽 K 主链的肽

[1179] HS-X-GTFTSDYSKYLD (Aib) RRAAEFVAWLMDE (SEQ ID NO :592), 且在 3 位有另外的修饰。基本上如实施例 14 所述检测所述肽针对胰高血糖素受体的体外活性。各肽的 EC50 (nM) 示于表 26 中。

[1180] 表 26

[1181]

肽主链	3 位氨基酸	SEQ ID NO:	针对胰高血糖素受体的 EC50 (nM)	活性%*
J	Q	593	0.24	25%
J	C(Acm)	594	0.18	33%
J	Dab(Ac)	595	0.31	19%
J	Dap(脲)	596	0.48	13%
J	Q(Me)	597	0.48	13%
J	M(O)	598	0.91	7%
J	Orn(Ac)	599	0.92	7%
K	Q	600	0.39	15%
K	Dab(Ac)	601	0.07	86%
K	Q(Me)	602	0.11	55%

[1182]

[1183] Q = 谷氨酰胺 ;C(Acm) = 乙酰氨甲基 - 半胱氨酸 ;Dab(Ac) = 乙酰基二氨基丁酸 ;Dap(脲) = 氨基甲酰二氨基丙酸 ;Q(Me) = 甲基谷氨酰胺 ;M(O) = 甲硫氨酸 - 亚砷 ;Orn(Ac) = 乙酰鸟氨酸。

[1184] 如表 26 所示,3 位可被多种氨基酸取代而基本上不损失针对胰高血糖素受体的活性,在某些情况下,所述修饰(例如肽 K 主链上的 Dab(Ac) 和 Q(Me)) 实际上提高所述活性。

[1185] 实施例 38

[1186] 基本上如本文所述制备在各种胰高血糖素类似物主链上包含 3 位 Dab(Ac) 的胰高血糖素类似物肽,并检测其针对胰高血糖素受体的体外活性。各肽的结构和活性示于表 27 中。

[1187] 表 27

[1188]

氨基酸序列	SEQ ID NO:	针对胰 高血糖 素受体 的 EC50 (nm)	% 活性 *
野生型胰高血糖素	1	0.026	100
HSQGTFTSDYSKYLDSRRAQDFVQWLMDT	642	0.015	173
HSDab(Ac)GTFTSDYSKYLDAibRRAADFVAWLLDE	603	0.069	37
HSDab(Ac)GTFTSDYSKYLDAibRRAADFVAWLLDT GPSSGAPPPS 酰胺	604	0.023	113
HSDab(Ac)GTFTSDYSKYLDAibRRASDFVSWLLDE	605	0.048	54
HSDab(Ac)GTFTSDYSKYLDAibRRATDFVTWLLDE	606	0.057	46

[1189]

[1190] 实施例 39

[1191] 基本上如本文所述制备包含 SEQ ID NO:1 的第一胰高血糖素类似物肽 (AIB2, AIB16, K10(C16)Gluc 酰胺), 其含 2 和 16 位 AIB、10 位 Lys 和取代 C- 末端羧酸酯的酰胺, 其中 10 位 Lys 与 C16 脂肪酰基共价连接。第二胰高血糖素类似物肽 (AIB2, AIB16, K10(C16), K30 Gluc 酰胺) 具有与第一胰高血糖素类似物肽相似的结构, 只是在其 C- 末端加上 Cys。基本上如实施例 14 所述检测所述肽的体外活性, 并另外在包含 20% 人血浆的溶液中检测。所述肽针对各受体的 EC50 (nM) 示于表 28 中。

[1192] 表 28

[1193]

氨基酸序列	SEQ ID NO:	针对胰 高血糖 素受体 的 EC50 (nm)	针对胰 高血糖 素受体 的 EC50 (nm) (20%人 血浆)	针对 GLP-1 受体的 EC50 (nm)	针对 GLP-1 受体的 EC50 (nm) (20%人 血浆)
胰高血糖素	1	0.026	0.046		
GLP-1				0.022	0.028
AIB2, AIB16, K10(C16)胰高血糖素酰胺	563	0.052	0.023	0.026	0.014
AIB2, AIB16, K10(C16), K30 胰高血糖素酰胺	622	0.761	0.313	0.031	0.017

[1194]

[1195] 实施例 40

[1196] 瘦素 (leptin) 的发现证明存在调节能量平衡和身体肥胖的内分泌系统。其亦吸引对肥胖症研究的兴趣和投资, 该研究可作为鉴别控制业已成为全球性流行病的环境和药理学途径的手段。尚未出现用于肥胖症的足够有效安全的药物治疗, 外科手术成为唯一经证明持续减重的选择。本文报道针对两种内分泌激素受体的联合受体激动的效用, 其达到以持续作用的单一肽有效饱腹感诱导和脂肪分解作用。两种特异性的胰高血糖素类似物针对 GLP1-R 的活性与天然 GLP-1 相当, 但其对胰高血糖素受体激动的水平彼此不同, 在啮齿类肥胖症模型中研究了其药理。每周一次给予这些选自一系列高效价类似物的具有不同的胰高血糖素和 GLP-1 活性的聚乙二醇化肽, 它们在一个月使饮食诱导的肥胖症小鼠 (平均体重大约 50g) 的肥胖和葡萄糖耐受水平正常化。体重减轻是因减少摄食和提高能量消耗 (因胰高血糖素受体激动而提高) 而导致的身体脂肪损失的结果。这些共激动剂化合物亦使葡萄糖和脂类代谢 (包括肝脏脂肪变性) 正常化。作用为剂量依赖性的, 可在饮食诱导的肥胖大鼠中成功地重复。这些临床前研究表明当因适当程度的胰高血糖素受体激活而增加充分的 GLP-1 激动时, 可安全地大大加快身体脂肪的降解。本文所述发现确立了临床测试的基础, 为代谢综合征提出了诱人的新型治疗选择。

[1197] 实施例 41

[1198] 以下材料和方法适合实施例 42-51 所述的实验。

[1199] Boc 肽合成和裂解

[1200] 在改良 Applied Biosystems 430A 肽合成仪上用 0.2 毫摩尔的 4- 甲基二苯甲基胺 (MBHA) 树脂 (Midwest Biotech, Fishers, Indiana) 合成肽。用原位中和 Boc- 化学合成固相肽 (Schnolzer, M. 等, International Journal of Peptide Research and Therapeutics, 13 : 31-44 (2007))。用 HF/ 对 - 甲酚 (10 : 0.5 v/v) 于 0℃ 处理完成的

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

[1201] 内酰胺合成

[1202] 在树脂上合成形成 i 到 i+4 内酰胺的环化肽。Glu(OFm)-OH γ 酯 (Peptides International, Louisville, Kentucky) 和 Lys(Fmoc)-OH (肽 s International) 取代了涉及形成内酰胺位置的 Glu(OcHex) 和 Lys(2-Cl-Z)。用 20% 哌啶 / DMF 处理完全受到保护的肽基树脂 45 分钟, 以除去 Fmoc 和 OFm 保护基团。在用含 5 当量苯并三唑-1-基氧基-三-吡咯烷基-磷六氟磷酸盐 (PyBOP) (Fluka) 的 DMF/DIEA 处理 5 小时后, 实现树脂上的内酰胺形成。通过茚三酮分析及相对于肽的开放形式质量减少 18 来确证内酰胺形成。

[1203] 肽纯化

[1204] 从树脂裂解后, 通过分析性反相 HPLC 分析粗肽提取物。在 Zorbax C8 柱 (0.46X5cm) 上用乙腈梯度在 0.1% TFA 中进行分析性分离。分析性检测后, 在 Vydac C4 或 C18 柱 (2.2X25cm) 上用乙腈梯度在 0.1% TFA 中通过半制备色谱纯化粗提取物。用同样条件纯化聚乙二醇化的肽。通过分析性反相 HPLC 用分析性分离所列条件分析制备性馏分的纯度 (> 95%)。通过电喷雾电离质谱 (ESI-MS) 或基料辅助激光解吸 / 电离飞行时间 (MALDI-TOF) 质谱确证肽质量和纯度。聚乙二醇化肽通过 MALDI-TOF 显示跨度 43400 的宽质量范围。冻干纯化的肽并储存在 4°C。

[1205] 肽的聚乙二醇化

[1206] 纯化的肽与甲氧基聚(乙二醇)马来酰亚胺基-丙酰胺-40K (Chirotech Technology Ltd, Cambridge) 以 1:1 摩尔比在 7M 脲 / 50mM Tris(pH 8.0) 中混合。通过分析性反相 HPLC 监测反应进程, 在 30 分钟内耗尽游离肽。在 0.1% TFA 中淬灭反应, 如别处所述纯化并表征。

[1207] 胰高血糖素和 GLP-I 受体-介导的 cAMP 合成

[1208] 通过胰高血糖素 (Gcg) 和 GLP-1 受体检测每一肽类似物刺激 cAMP 产生的能力。用 GcgR 或 GLP-1R cDNA 和连接到 cAMP 响应元件 (CRE) 的荧光素酶报告基因共转染 HEK293 细胞。通过在 DMEM (Invitrogen, Carlsbad, CA) 中培养 16 小时并补充 0.25% 牛生长血清 (HyClone, Logan, UT) 使细胞血清饥饿。将系列稀释的胰高血糖素和 GLP-1 类似物加入到含有共转染的 HEK293 细胞的 96-孔聚-D-赖氨酸-包被的板 (BD Biosciences, San Jose, CA) 中, 让板在 37°C、5% CO₂ 中孵育 5 小时。孵育后将等体积 (100 μ L) 的 LucLite 发光底物试剂 (Perkin-Elmer, Wellesley, MA) 加到各孔中, 并以 800rpm 震荡板 3 分钟。让板在黑暗中孵育 10 分钟, 在 MicroBeta1450 液态闪烁计数器 (Perkin-Elmer, Wellesley, MA) 上定量测量光输出量。通过 Origin 软件 (OriginLab, Northampton, MA) 计算有效 50% 浓度 (EC₅₀)。

[1209] 圆二色谱测量

[1210] 用渐增浓度的 TFE 让肽溶解于 10mM 磷酸盐缓冲液 pH 5.9 中, 定量肽浓度。将各样品稀释到 10 μ M 用于 CD 测量。在具有恒定氮气流及设定为 25°C 的 1mm 路径长的温控

小室的 JASCO J-715 圆二色谱分光偏振计上收集 CD 数据。以 100nm/ 分钟的扫描速度和 1nm 波长步伐从 270-190nm 扫描 5 次累积光谱数据。用 JASCO Spectra Manager 软件减去溶剂信号并使数据平缓 (Savitzky 和 Golay, Anal. Chem. 36 :1627 (1964))。将获得的毫度值转化为单位为 $\text{deg. cm}^2. \text{dmol}^{-1}$ 的平均残基椭圆率。将计算的平均残基椭圆率输入到 DICHROWEB (Whitmore 和 Wallace, Biopolymers 89 :392-400 (2008) ;Whitmore 和 Wallace, Nucleic Acids Research 32 :W668-W673 (2004), 获得螺旋值百分比。

[1211] 动物

[1212] 从 Jackson 实验室获得 C57BI/6 小鼠, 饲喂来自 Research Diets 的致糖尿病食物, 其为 58% 千卡来自脂肪的高蔗糖食物。小鼠单独或分组于 22°C 的 12 : 12 小时光照 - 黑暗周期居住, 自由获得食物和水。所有研究获得辛辛那提大学动物关怀和使用委员会的批准并按照其指导方针进行。

[1213] 人体成分测量

[1214] 用 NMR 技术 (EchoMRI, Houston, TX) 测量整体人体成分 (脂肪和瘦肉量)。

[1215] 能量平衡生理学测量

[1216] 通过用组合间接热量测定系统 (TSE Systems, Bad Homburg, Germany) 来评估能量摄取和消耗以及鼠笼活动。每 45 分钟测量一次氧消耗及 CO₂ 产生, 总共测 120 小时 (包括 12 小时的适应期), 以测定呼吸商和能量消耗。在与通过将测量等级整合到密封的笼环境进行间接热量测定评估的同时, 连续测定 120 小时的食物和水摄取及进餐时间类型。将进餐时间定义为最少 60 秒的摄食事件, 在摄食事件之间休息 300 秒。用带有扫描笼的底部和顶部的光束的多维红外光束系统测定鼠笼的活动活性, 将活性表示为光束中断。将静止的活动能力 (烦躁) 定义为在笼底部连续中断一个单束光, 将运动的活动定义为在底部中断任何两个不同光束, 将饲养定义为同时中断笼底和笼顶二者的光束。

[1217] 血液参数

[1218] 禁食 6 小时后用 EDTA- 包被的 Microvette 试管 (Sarstedt, Nuremberg, Germany) 从尾静脉采集血液, 立即在冰上冷却。以 3,000g 在 4°C 离心 15 分钟后, 将血浆储存在 -80°C。通过放射性免疫测定从 Linco (敏感性大鼠胰岛素 RIA ;Linco Research, St. Charles, MO) 定量测定血浆胰岛素。通过酶检测试剂盒 (Thermo Electron, Waltham, MA) 测量血浆 TG 和胆固醇水平。单个地分析样品, 例外情况为让来自 5 只动物 / 组的合并的样品 (0.25ml) 在两个串联有脂蛋白分离的 Superose6 柱上进行快速液态色谱 (FPLC) 凝胶过滤。所有测定按照厂商说明书进行。

[1219] 葡萄糖耐受测定

[1220] 为了测定葡萄糖耐受, 让小鼠禁食 6 小时, 并用 2g 葡萄糖 /kg 体重 wt (0.9% 盐水中的 50% D- 葡萄糖 (Sigma)) 腹膜内 (i. p.) 注射进行葡萄糖耐受测定 (GTT)。用手持血糖测计仪 (TheraSense Freestyle) 在注射前 (0 分钟) 和注射后 15、30、60、90 及 120 分钟测量尾静脉血糖水平 (mg/dl)。

[1221] WAT HS1 蛋白质印迹

[1222] 将脂肪组织置于 1.5-ml 台式离心管中, 在冰冷的 RIPA 缓冲液 (1X PBS、1% Nonidet P40、0.5% 脱氧胆酸钠、含 50mM NaF 的 0.1% SDS、0.5M 苯甲基磺酰氟、0.1mM 钼酸钠、20 $\mu\text{g/ml}$ 抑酶肽、10g/ml 亮肽素) 中用组织匀浆仪 (Retsch, Inc Newtown, PA Cat. #

85210) 以 30hz 匀浆 3 分钟。让样品以 12,000rpm 离心 15 分钟 (4℃), 将上清液移到新管中, 在冰上超声破碎 15 秒。让样品以 14,000rpm 离心 10 分钟 (4℃), 将上清液收集到新管中。让样品再次以 19,000rpm 离心 10 分钟 (4℃) 将上清液收集到新管中。然后取等份样品进行蛋白质测定。然后让样品在 4x SDS/DTT 缓冲液中煮沸 2 分钟。让来自细胞裂解液的 50g 蛋白质在 9% (w/v) 丙烯酰胺分析凝胶上进行 SDS/PAGE, 并转移到 Hybond ECL 硝酸纤维素膜上。封闭膜, 用目的第一抗体 (来自 Cell Signaling 的 HSL(4107)); 来自 Cell Signaling 的 Phospho-HSL(ser660) (4126)) 探测。洗涤后, 用 HRP-缀合的抗-(兔 IgG) 或抗-(鼠 IgG) (HRP-缀合的抗-兔和抗-鼠第二抗体购自 Bio-Rad(170-6515 & 170-6516)) 实施第一抗体检测, 用增强化学发光 (Amersham Biosciences) 检测并对 CL-Xposure 膜 (Pierce) 曝光。

[1223] 免疫组织化学

[1224] 用苏木精/曙红如所述 (Ogden, C. L. 等 JAMA 295:1549-1555(2006)) 对石蜡包埋的白色附睾脂肪组织切片 (5 μm) 染色。对于每一单独的小鼠组织区段而言, 用 Image Pro Plus 5.1 软件 (Media Cybernetics, Bethesda, MD, USA) 定量测定来自三个不同高倍视野每一个的 100 个细胞的脂肪细胞大小作为来自一个地区的测量。

[1225] 油红染色

[1226] 为了显现肝脏组织中的脂类聚积, 用油红 O 染料对处死时收获的肝脏的 4-8mm 横截面进行染色。用 [复合透镜] 显微镜获得放大 20X 和 40X 的图像。

[1227] 定量 RT-PCR 程序

[1228] 用断头术将喂食状态 (早上喂食后 1-4 小时) 的动物处死, 制作各种组织样本, 冷夹并储存在 -80℃, 用于随后通过实时定量 PCR (icycler, BioRad) PEPCK、G6P 和 HPRT (管家基因) 的 mRNA 测量。

[1229] 用 RNeasy 脂类组织试剂盒 (Qiagen, Ca# 74804) 用标准方案从冷冻的组织样品提取总 RNA。用 Nanodrop 通过分光光度计测定 RNA 浓度和纯度。用 2g 总 RNA 获得用于 RT-PCR 的 cDNA 模板。用以下物质进行反转录反应: 10X DNase I 反应缓冲液, DNase I, Amp Grade, 1U/μl, depc-H₂O, 25mM EDTA, 10mM dNTP Mix, 寡 (dT) 20 (50 μM), 5X 第一链缓冲液, 0.1M DTT, RNaseOUT 和 SuperScript III (Invitrogen)。

[1230] 通过 PCR 用含有终浓度为 0.5M 前导和反向引物的荧光染料 SYBR 绿 (BioRad, Ca# 1708882) 进一步扩增合成的 cDNA。通过解离曲线确证产物纯度。所有测定中都不包括模板对照, 产生不一致的扩增。用标准曲线获得 PEPCK 或 G6P 的相对浓度, 按照用作管家基因的 HPRT 浓度修正结果。将结果表示为溶媒百分比, 设定平均溶媒组为 100%, 然后计算所研究的三组动物每一个的单独值。

[1231] 引物序列

[1232] 从 NIH 网站获得 PEPCK、G6P 和 HPRT 的引物序列, 由 IDT DNA 产生引物。

[1233] 反转录和定量实时 RT-PCR

[1234] 如所述 (Nomiyama, T. 等 Journal of Clinical Investigation 117: 2877-2888(2007)) 通过实时 RT-PCR 来定量测定 CD68 mRNA 表达。简言之, 处死后让 100mg 附睾脂肪组织在 TRIZOL 中匀浆, 将总 mRNA 反转录为 cDNA。用 iCycler (Bio-Rad) 和 SYBR Green I 系统 (Bio-Rad) 实施 PCR 反应。一式三份分析各样品, 并正常化为 TFIIB mRNA 表

达值。所用的小鼠引物序列如下：

[1235] CD68, 5' -CAAGGTCCAGGGAGGTTGTG-3' (正向)(SEQ ID NO :638)、

[1236] 5' -CCAAAGGTAAGCTGTCCATAAGGA-3' (反向)(SEQ ID NO :639)；

[1237] 和 TFIIB, 5' -CTCTCCCAAGAGTCACATGTCC(SEQ ID NO :640)、

[1238] 5' -CAATAACTCGGTCCCCTACAAC-3' (反向)(SEQ ID NO :641)。

[1239] 统计学分析

[1240] 除非另外指出, 否则用 GraphPad Prism 一步 ANOVA 和柱统计实施所有统计学分析。所述 P 值为一步分析的方差。所有结果表示为平均值 $\pm$ SE。(受体激活数据为 $\pm$ S. D.)。

[1241] 实施例 42

[1242] 如本文所述制备包含具有氨基酸修饰的氨基酸序列 SEQ ID NO :1 的两种胰高血糖素肽-肽 X 和 Y。两种肽都包含 2 位 AIB、16 位 Glu、17 位 Gln、18 位 Ala、20 位 Lys、21 位 Glu、23 位 Ile 和 24 位 Cys。通过与马来酰亚胺-功能化的线性 peg 反应产生肽 X-PEG 和 Y-PEG, 来达到在 24 位 Cys 的位点特异性 40-kd 聚乙二醇化。肽 Y 和 Y-PEG 分别不同于肽 X 和 X-PEG, 因为在肽 Y 或肽 Y-PEG 中间引入了单一侧链内酰胺桥以稳定二级结构并提高胰高血糖素激动。在肽组装过程中, 16 位 Glu 和 20 位 Lys 的两个侧链作为侧链酰胺共价连接。肽的这种大环化代表 21 个原子的内酰胺。检测肽 X-PEG 和 Y-PEG 的溶解性, 发现它们在生理缓冲液中以超过 25mg/ml 的浓度可溶, 肽 X-PEG 和 Y-PEG 证明对与血浆离体孵育一周有充分的抗性。

[1243] 实施例 43

[1244] 当肽溶解于各种浓度的三氟乙醇 (TFE) 水溶液中时, 由圆二色谱分析其二级构象 (图 25)。胰高血糖素是所测的最小螺旋状肽, 计算其在 0、10 和 20% 的 TFE 溶液中的螺旋性分别为 10、15 和 33% (表 29)。在同样的实验条件下, GLP-1 具有增加的 14、29 和 55% 的螺旋性, 说明这两种肽在一级及二级结构上不同。当肽 X 和 Y 聚乙二醇化时螺旋性没有显著变化, 即使事实上聚乙二醇化部分代表大于 90% 的分子质量 (表 29)。与此形成对照, 肽 Y 在缺乏 TFE 的磷酸盐缓冲液中的表观螺旋性大约为肽 X 的双倍, 从 17% 到 36%。因此, 这两种嵌合肽 (肽 X-PEG 和肽 Y-PEG) 的聚乙二醇化形式的二级结构明显不同 (图 25), 生物学性质的差异很可能是二次级结构差异的函数。

[1245] 表 29

[1246]

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

[1247] 实施例 44

[1248] 在基于细胞的 CRE- 荧光素酶报告测定中评估了两种肽（肽 X 和 Y）及其 40-kd 的聚乙二醇化衍生物（肽 X-PEG 和 Y-PEG）刺激 cAMP 合成的能力（图 26）。如表 30 所示，天然胰高血糖素以 $0.055 \pm 0.014 \text{ nM}$ 的半数最大有效浓度（EC₅₀）激活胰高血糖素受体，以更高的浓度即 $3.29 \pm 0.39 \text{ nM}$ EC₅₀ 激活 GLP-1 受体（GLP-1R）。与此形成对照，GLP-1 以 $0.028 \pm 0.009 \text{ nM}$ 的 EC₅₀ 激活其受体，并以针对胰高血糖素受体（GcgR）发生作用的 EC₅₀ 超过 $1 \mu \text{M}$ 来证明其高度特异性。天然配体针对其受体显示的特异性的动力学范围超出百万。肽 X-PEG 针对 GLP-1R 的效价为天然 GLP-1 效价的 2 倍，甚至在相对情况下针对 GcgR 的效价更高。然而，GcgR 活性只有天然胰高血糖素的大约 10%。引入内酰胺恢复了全部胰高血糖素激动但对 GLP-1R 无变化。因此，肽 Y-PEG 相对于天然配体针对各自两种受体为接近平衡的极为高效的共激动剂。每种肽的聚乙二醇化降低针对 GcgR 效价的 10 倍，针对 GLP-1R 效价的 5 倍。针对 GcgR 活性的损失稍高一些可能是因为 C- 末端序列对于胰高血糖素受体的相互作用相对重要性更大。聚乙二醇化肽（肽 X-PEG 和 Y-PEG）针对 GLP-1R 比天然 GLP-1 效价稍弱一些，但仍具有纳摩尔以下的 EC₅₀。肽 X-PEG 是该肽的内酰胺形式（即肽 Y-PEG）针对 GLP-1R 的选择性的 7 倍。因此，这两种 DPP-4- 抗性肽适于体内持续的时间作用实验，很适合 GLP-1R 激动，但在胰高血糖素激动中表现不同。

[1249] 表 30

[1250]

肽	胰高血糖素受体			GLP-1 受体			选择性 *
	EC50 (nM)	标准 偏差	天然胰高血 糖素活性%	EC50 (nM)	标准 偏差	天然 GLP-1 活 性%	
胰高血 糖素	0.055	0.014	100.00	3.293	0.389	0.86	0.009
GLP-1	>1000	-	<0.008	0.028	0.009	100.00	>12500
肽 X	0.585	0.125	9.38	0.014	0.002	202.12	21.5
肽 X-PEG	2.895	0.963	1.90	0.036	0.014	78.41	41.4
肽 Y	0.055	0.011	99.51	0.013	0.005	219.78	2.21
肽 Y-PEG	0.667	0.264	8.22	0.059	0.029	47.61	5.79

[1251]

[1252] 实施例 45

[1253] 在饮食诱导肥胖 (D10) 的 C57B6 小鼠中每周一次皮下 (s. c) 注射 40-kd 聚乙二醇化的肽: 肽 X-PEG 和 Y-PEG。单次注射 325nmol/kg 的肽 Y-PEG 经一周降低体重 25.8%, 其从 $50.9 \pm 1.4\text{g}$ 到 $37.8 \pm 0.8\text{g}$ ($p < 0.0001, n = 8/\text{组}$)。类似地给予肽 X-PEG 是有效的, 但相当低效, 因为体重减少为 9% ($49.1 \pm 1.51\text{g}$ 至 $44.68 \pm 1.38\text{g}$)。盐水注射的对照小鼠体重没有变化 (注射前: $50.61 \pm 1.32\text{g}$, 注射后: $50.87 \pm 1.46\text{g}$; 图 27A)。体重变化是脂肪量减少 (对于内酰胺肽为 41.9%, 对于开环形式为 22.2%, 对于对照为 2.3%, $p < 0.001$; 图 27B) 的结果, 与平均每日摄食显著降低 (肽 Y-PEG: $0.40 \pm 0.29\text{g/天}$, 肽 X-PEG: $1.83 \pm 0.81\text{g/天}$)。

天, 盐水: $2.70 \pm 0.78 \text{g/天}$, $p < 0.0001$, 图 27C) 平行。当与对照比较时, 两种肽的血糖显著降低, 在肽 Y-PEG 中降低程度稍高一些 (肽 Y-PEG: -90.1mg/dL , 肽 X-PEG: -79.6mg/dL , 对照: -23.9g/dL , $p = 0.0433$; 图 27D)。两种肽 (肽 X-PEG 和肽 Y-PEG) 之间的相对差异统计学不显著。

[1254] 实施例 46

[1255] 在单独实验中, 单次 s. c. 注射六种不同剂量 (0、7、14、35、70、140 和 350nmol/kg) 的肽 Y-PEG 和肽 X-PEG 显示线性响应, 体重和血糖剂量依赖性降低 (图 28A、28B、28C 和 28D)。这提示所观察到的作用除了快速过度损失体重的间接作用外在药理上没有明显的毒性相关性。肽 Y-PEG 的作用重要性更加突出, 表示另一元素胰高血糖素激动改进了该肽的效价。

[1256] 实施例 47

[1257] 在单独实验中, 每周一次 s. c. 注射 70nmol/kg 的肽 Y-PEG 或肽 X-PEG 分别降低 DIO 小鼠体重 28.1% 和 20.1% ($p < 0.0001$, $n = 7-8/\text{组}$; 图 29A)。体重变化与脂肪量降低相关联 (对于肽 Y-PEG 为 -62.9% , 对于肽 X-PEG 为 -52.2% , 对于对照为 5.1% , $p < 0.0001$; 图 29B)。这些低剂量对摄食的长期作用 ($p = 0.95$; 图 29C) 不如高剂量的短期作用 (图 27C) 给人印象深刻。与溶媒 ($12.71 \pm 0.45 \text{千卡/[kg}\cdot\text{h]}$), $p = 0.0187$) 比较, 肽 Y-PEG ($14.60 \pm 0.69 \text{千卡/[kg}\cdot\text{h]}$) 和肽 X-PEG ($17.19 \pm 1.49 \text{千卡/[kg}\cdot\text{h]}$) 的能量消耗提高, 然而呼吸商往往降低 (图 29D 和 29E; 对于肽 Y-PEG 为 0.719 ± 0.01 , 对于肽 X-PEG 为 0.725 ± 0.01 , 对于溶媒为 0.755 ± 0.01 , $p = 0.1028$), 这表明提高的生热作用和改变的应用分配可解释综合负能量平衡。提高的能量消耗与自发的物理活动诱导的生热作用 (NEAT) 的变化不相关, 因为在治疗组和对照组之间活动能力没有差异 ($p = 0.4281$; 图 29F)。自动在线监测急性喂食或长期监测摄食二者都未显示任何热量摄入差异 (自动监测 $p = 0.667$, 长期监测 $p = 0.9484$; 图 30A)。

[1258] 在首次注射后第 3 天开始的治疗期间血糖水平显著降低 (平均降低: 肽 Y-PEG 为 -32% , 肽 X-PEG 为 -24.5% , 对照为 -2.7% , $p < 0.0001$; 图 29G)。因响应第 3 天的腹膜内 (i. p.) 葡萄糖攻击, 与溶媒处理的对照 (34125 ± 3142 , $p < 0.0001$) 比较, 两个治疗组 (肽 Y-PEG 为 14183 ± 1072 , 肽 X-PEG 为 13794 ± 824.1) 血糖峰值 (图 29H) 和曲线 (AUC) 显著降低 (图 30F)。用肽 Y-PEG 或肽 X-PEG 治疗一个月后, 与对照 (2675pg/ml) 比较, 治疗组中的血浆胰岛素降低 (1194pg/ml , 1034pg/ml , $p = 0.0244$), 这提示改进胰岛素敏感性 (图 29I)。在用肽 Y-PEG 或肽 X-PEG 治疗一个月后, 与溶媒 (1077pg/ml) ($p = 0.108$) 比较, 血浆 C-肽水平往往降低 (738.8pg/ml , 624.7pg/ml) (图 30G)。

[1259] 为了测定主要现象在不同物种中是否普遍, 将这两种化合物给予饮食诱导肥胖的大鼠 (平均重量 $777.4 \pm 2.1 \text{g}$, 剂量 70nmol/kg/周 , 一周注射一次, 3 周治疗)。肽 Y-PEG 和肽 X-PEG 各自降低 DIO 大鼠的体重 (肽 X-PEG: $-11.15 \pm 0.88\%$; 肽 Y-PEG: $-20.58 \pm 2.26\%$, 溶媒: $1.09 \pm 0.56\%$) ($p < 0.0001$) 和脂肪量 (肽 X-PEG: $-19.17 \pm 2.03\%$; 肽 Y-PEG: $-33.76 \pm 4.76\%$, 溶媒: $0.65 \pm 1.20\%$; $p < 0.0001$), 这确证这种抗-肥胖症治疗方法的适用性不依赖物种。

[1260] 实施例 48

[1261] 相对于溶媒 ($254.025.33 \text{mg/dL}$, $p = 0.0441$; 图 31A), 用肽 X-PEG 和肽 Y-PEG 经 27

天长期 s. c. 治疗降低 DIO 小鼠的总胆固醇（分别为 $106.9 \pm 6.3 \text{ mg/dL}$ 和 $200.8 \pm 29.58 \text{ mg/dL}$ ）。在分开的实验中，DIO 小鼠在第 0 天和第 7 天接受 70 nmol/kg s. c. 的肽 X-PEG、肽 Y-PEG 或溶媒，并在第 9 天评估。肽 Y-PEG 降低血浆甘油三酯、LDL 胆固醇和总胆固醇（与溶媒 $177.7 \pm 11.8 \text{ mg/dL}$ 比较，总胆固醇为 $63.0 \pm 2.49 \text{ mg/dL}$ ）（ $p < 0.0001$ ），同时可能引起从 LDL 到 HDL 胆固醇转化（图 31B）。肽 X-PEG 降低 LDL 和 HDL 胆固醇二者，但对甘油三酯没有显著作用（图 31C）。瘦素显著降低（对于肽 Y-PEG 为 $3343 \pm 723.3 \text{ pg/ml}$ ；对于肽 X-PEG 为 7308 ± 2927 ；对于溶媒为 $18,642 \pm 6124$ ； $p = 0.0426$ ；图 31D、31E、31F）。长期治疗 27 天亦使肝脏脂类含量正常化，同时对照 DIO 小鼠保持显著的肝脏脂肪变性（数据未显示）。

[1262] 实施例 49

[1263] 用肽 X-PEG 或肽 Y-PEG 治疗一个月导致在 DIO 小鼠的白色脂肪组织 (WAT) 中增加激素敏感性脂肪酶 (HSL) 的磷酸化（肽 X-PEG： 1.135 ± 0.315 ；肽 Y-PEG： 1.625 ± 0.149 ；溶媒： 0.597 ± 0.204 ； $p = 0.0369$ ；图 32B），这暗示胰高血糖素对 WAT 脂肪分解有特异性指向作用。用肽 Y-PEG 和肽 X-PEG 以 35 nmol/kg/周 剂量治疗 2 周，同时降低小鼠的脂肪量，当与对照小鼠（数据未显示）比较时，附睾脂肪组织的脂肪细胞大小显著缩小。然而，尽管降低脂肪量及缩小脂肪细胞，但这种用肽 Y-PEG 和肽 X-PEG 进行 2 周的短期治疗与由 CD68 的实时 RT-PCR（图 33C）定量测量的脂肪组织巨噬细胞含量的显著减少没有相关性。肽 X-PEG 治疗提高棕色脂肪组织 (BAT) 中解偶联蛋白 I (UCP1) 的水平，但肽 Y-PEG 治疗不能（肽 X-PEG 为 2.167 ± 0.429 ，肽 Y-PEG 为 1.287 ± 0.1558 ，溶媒为 1.0 ± 0.118 ； $p = 0.0264$ ；图 32A），其与 GLP-1 对 BAT 制止热量生成的特异性作用一致。反映肝糖质生成的肝基因表达不受肽 X-PEG 或肽 Y-PEG 的影响（图 30H 和 30I）。组织学表明胰腺小岛在用肽 X-PEG 治疗后往往小些（数据未显示）。

[1264] 实施例 50

[1265] 为了仔细分析肽 X-PEG 和 Y-PEG 的 GLP-1R 和 GcgR 激动剂组分的贡献，将每一种给予敲除 GLP-1 受体 (GLP-1R^{-/-}) 的小鼠一个月，保持高脂肪饮食。与盐水比较，肽 X-PEG 引起体重（ $p > 0.05$ ；图 34A 和 34B）和脂肪量（ $p > 0.05$ ；图 34C）降低。肽 Y-PEG 在 GLP-1R^{-/-} 小鼠中引起体重（ $p = 0.0025$ ）和脂肪量（ $p = 0.0025$ ）显著降低（图 34A-34C）。肽 X-PEG 对 GLP-1R^{-/-} 小鼠的摄食没有作用，但肽 Y-PEG 显著抑制摄食（ $p = 0.017$ ）（图 34D）。肽 Y-PEG（不是肽 X-PEG）在缺乏功能性 GLP-1R 时在葡萄糖耐受试验中倾向于提高血糖（ $p = 0.03$ ）（图 34E 和 34F），这暗示需要共激动剂的 GLP-1 组分保护免受胰高血糖素诱导的高血糖症。

[1266] 实施例 51

[1267] 作为对可归于胰高血糖素激动的肽 X-PEG 和 Y-PEG 的作用的独立评估，研究了具有相当于 GLP-1R 效价但显著不同的 GcgR 活性的两种另外的肽激动剂。这两种肽（肽 U 和 V）与肽 X-PEG 和 Y-PEG 相关。肽 U 和 V 包含具有以下修饰的氨基酸序列 SEQ ID NO:1:16 位 Glu、17 位 Gln、18 位 Ala、20 位 Lys、21 位 Glu、23 位 Ile 和 24 位 Cys，但包含 24 位 Cys 处的 20-kd 聚乙二醇化，不包含 2 位 AIB。肽 V 另外包含用 Glu 取代 Gln3，其选择性地降低 10 倍以上的胰高血糖素激动。肽 U 和肽 V 都不包含内酰胺桥。用肽 V 每天以 50 nmol/kg s. c. 治疗 DIO 小鼠一周，显示相对于肽 U 减轻了降体重作用（分别为 -9.09 ± 0.80 对 $-13.71 \pm 0.92 \text{ g}$ ，（ $p < 0.0001$ ）；图 35A）。

[1268] 实施例 52

[1269] 基本上如本文所述制备包含经由 γ -Glu 间隔物或 γ -Glu- γ -Glu 二肽间隔物与 Lys 残基连接的 C16 脂肪酰基的胰高血糖素肽, 其中 Lys 残基位于 10 位或在 C- 末端 (29 位)。如本文所述检测所述肽针对胰高血糖素受体和 GLP-1 受体的体外活性。结果示于表 31 中。

[1270] 表 31

[1271]

肽			SEQ ID NO:	针对胰高血糖 素受体的 EC50 (nM)	针对 GLP-1 受 体的 EC50
	酰化的 AA	间隔物			
Chi-2, d-Ser2	Lys10	γ E	643	0.011	0.0014
Chi-2, d-Ser2	Lys10	γ E- γ E	644	0.008	0.003
Chi-2, AIB2	Lys10	γ E	645	0.025	0.0014
Chi-2, AIB2	Lys10	γ E- γ E	646	0.014	0.0018
Chi-2, AIB2, E3	Lys10	无	647	46.084	0.005
Chi-2, AIB2, E3	Lys10	γ E- γ E	648	2.922	0.004
Chi-2, AIB2, I7	Lys10	γ E	649	0.014	0.024 (0.044*)
Chi-2, AIB2, I7	Lys10	γ E- γ E	650	0.007	0.010
DMIA1, E16/K20 内酰胺	Lys10	γ E	651	0.019	0.006
DMIA1, E16/K20 内酰胺	Lys10	γ E- γ E	652	0.014	0.004
DMIA1, E16/K20 内酰胺	Lys29	γ E	653	0.107	0.075
DMIA1, E16/K20 内酰胺	Lys29	γ E- γ E	654	0.025	0.070
AIB2, AIB16, A18, D28	Lys10	γ E- γ E	655	0.003	0.004
AIB2, AIB16, A18, D28	Lys10	γ E	656	0.006	0.004

[1272]

[1273] 实施例 53

[1274] 基本上如本文所述制备表 32 中所示的肽：

[1275] 表 32

[1276]

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

[1277]

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

[1278] 除了肽 SEQ ID NO :624、631 和 632 外,表 32 中的所有肽都显示针对胰高血糖素受体和 GLP-1 受体的有效体外活性。

[1279] 基本上如本文所述制备 A 系列的肽,其除表 33 中所述变化之外包含天然胰高血糖素 (SEQ ID NO :1) 的氨基酸序列。

[1280] 表 33

[1281]

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

[1282]

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

[1283]

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

[1284]

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

[1285]

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

[1286] * 表示野生型或嵌合体 2 (17 位 Gln、18 位 Ala、21 位 Glu 和 23 位 Ile) 的 17、28、21 和 23 位氨基酸。

[1287] 基本上如本文所述制备具有与 A 系列肽相同结构只是用正亮氨酸取代 27 位 Met 的肽。这些经修饰的肽为 B 系列的肽。

[1288] 基本上如本文所述制备具有与 A 和 B 系列肽相同结构的肽, 只是所述肽用与 40kDa PEG 共价连接的 Cys 取代 24 位 Gln。这些聚乙二醇化肽构成 C 系列肽。

[1289] 基本上如本文所述制备具有与 A、B 或 C 系列肽相同结构的肽, 只是所述肽用与 C8、C12、C14、C16 或 C18 脂肪酰基共价连接的 Lys 取代 10 位 Tyr。用 C8 脂肪酰基酰化的肽构成 D 系列肽。用 C12 脂肪酰基酰化的肽构成 E 系列肽。用 C14 脂肪酰基酰化的肽构成 F 系列肽。用 C16 脂肪酰基酰化的肽构成 G 系列肽。用 C18 脂肪酰基酰化的肽构成 H 系列肽。

[1290] 基本上如本文所述制备具有与 D 到 H 系列肽相同结构的肽, 只是所述肽的脂肪酰基经由间隔物与 10 位 Lys 连接。包含 γ -Glu- γ -Glu 间隔物的肽构成 I 系列肽。包含 γ -Glu 间隔物的肽构成 J 系列肽。包含 Ala-Ala 间隔物的肽构成 K 系列肽。包含 β -Ala- β -Ala 间隔物的肽构成 L 系列肽。

[1291] 本文引用的包括出版物、专利申请和专利在内的所有参考文献在此引作参考, 引用程度如同每一参考文献被单独并具体而言表示引作参考并在本文中以其整体提出一样。

[1292] 除非本文另外指出或明确与上下文有矛盾, 否则在阐述本发明上下文 (尤其是在以上权利要求上下文) 中术语 "一个" 和 "一种" 和 "该" 及类似说法的应用, 应理解为既包括单数又包括复数。除非另外指出, 否则术语 "包含"、"具有"、"包括" 和 "含有" 应理解为开放性术语 (即意味着 "包括但不限于")。

[1293] 本文值范围的列举仅意欲作为对单独提及每一个落入所述范围的单独值及每一个端点的速记方法,除非本文另外指出,否则本说明书包括每一个单独值及每一个端点,如同其在本文被单独列举一样。

[1294] 除非本文另外指出或另外明确与上下文有矛盾,否则可以以任何合适的次序来实施本文所述方法。除非另外声明,否则本文提供的任何及所有实施例或例示性语言(例如“例如”)的应用仅意欲更好地阐明本发明,并非提出对本发明范围的限制。本发明书中的任何语言都不应该理解为表明任何未提出权利要求的部分对实行本发明是必不可少。

[1295] 本发明优选实施方案如本文所述,包括发明人已知的实施本发明最好的方式。在阅读了前述说明后,本领域一般技术人员可明了优选实施方案的变体。本发明人希望技术人员酌情使用所述变体,本发明人希望本发明除了如本文所明确阐述那样实施外还能另外实施。因此,本发明如适用法律所允许那样包括附加权利要求所列举的主题的所有修改及等同内容。此外,除非本文另外指出或另外明确与上下文有矛盾,否则本发明包括上述元件以其所有可能变化的任何组合。

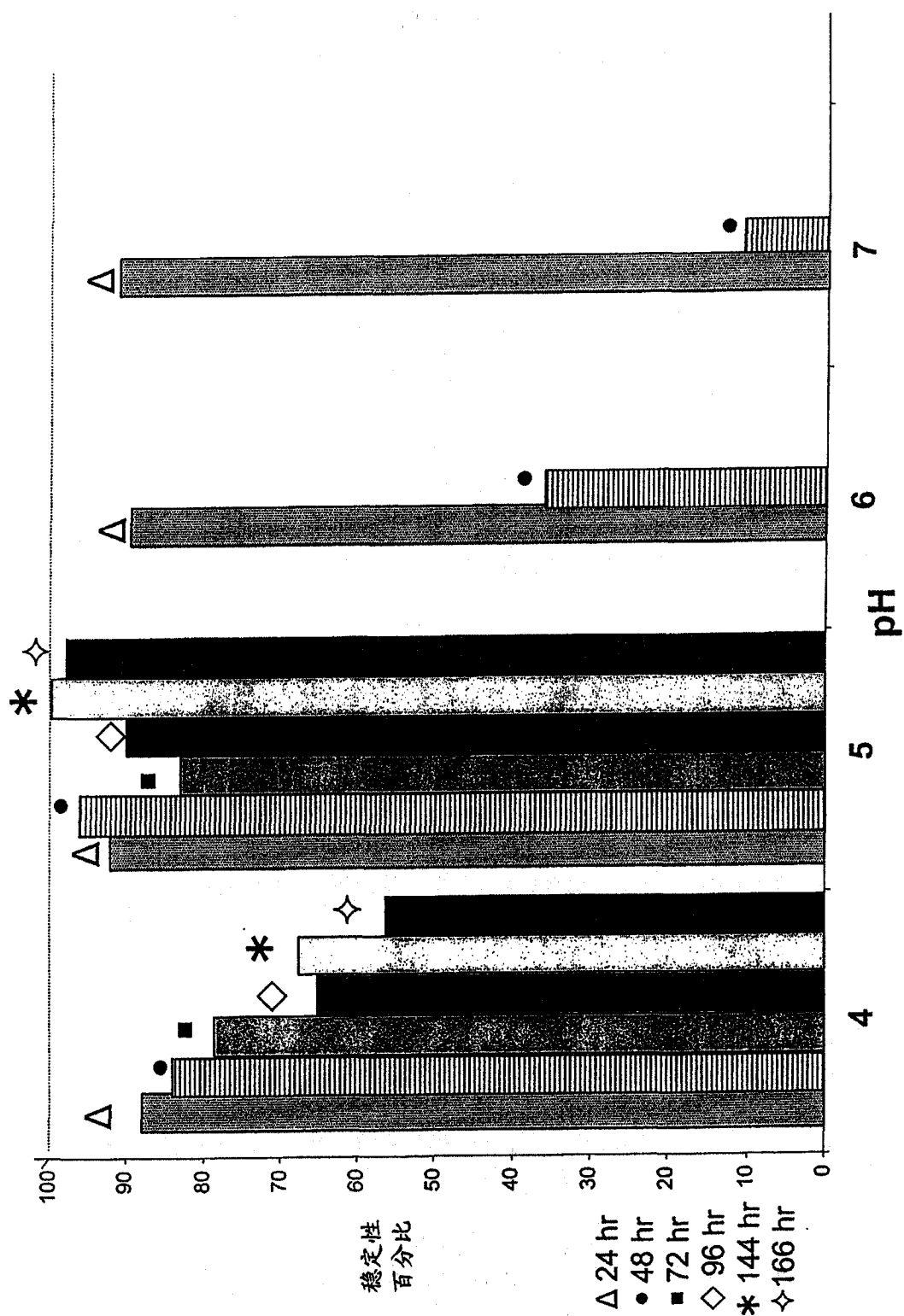


图 1 :胰高血糖素 Cys21- 马来酰亚胺 PEG5k 的稳定性 (37°C)

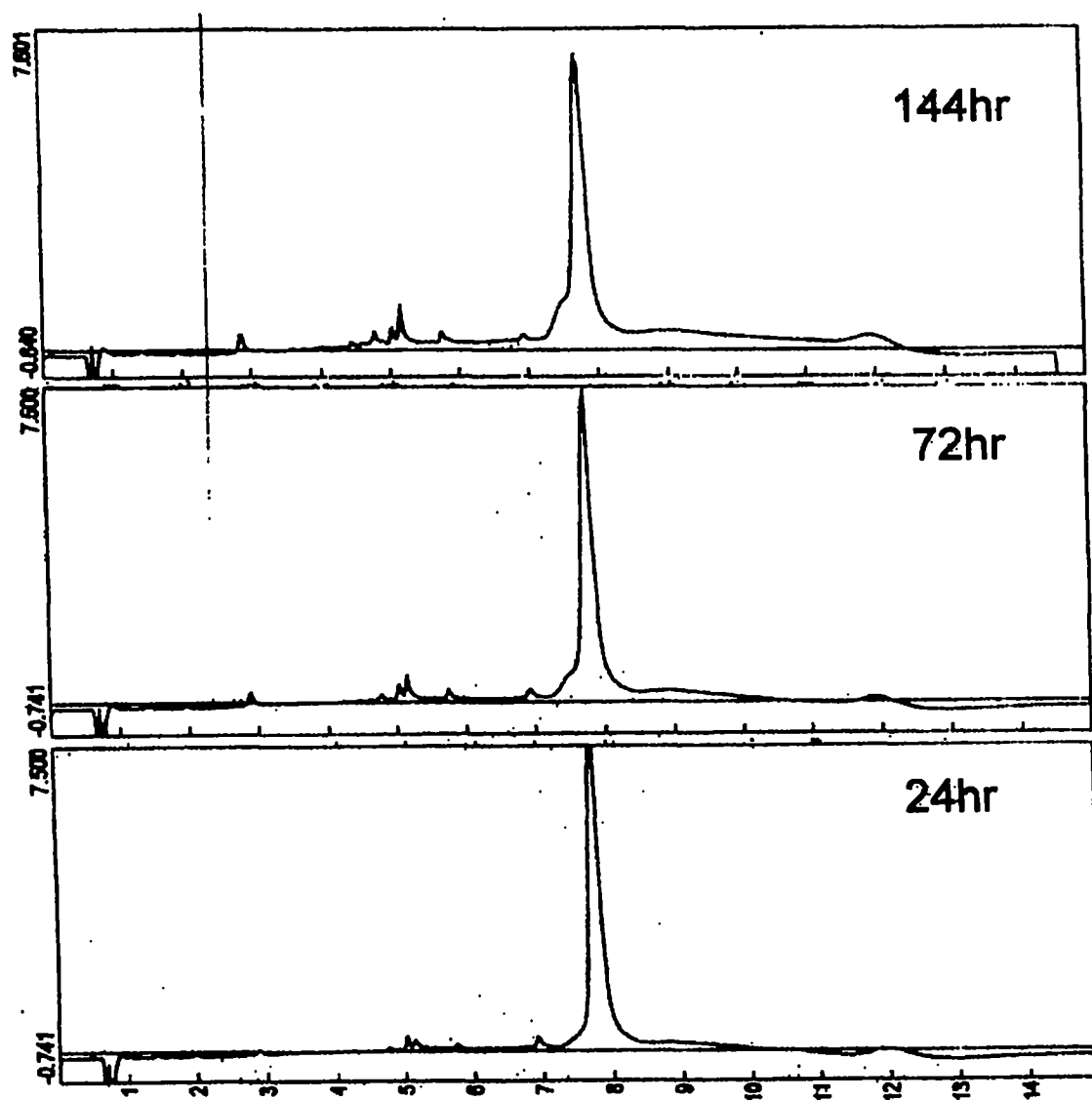


图 2 :胰高血糖素 Cys²¹- 马来酰亚胺 PEG_{5k} 在 pH5 (37℃) 下的 HPLC 分析

胰高血糖素受体介导的 cAMP 诱导

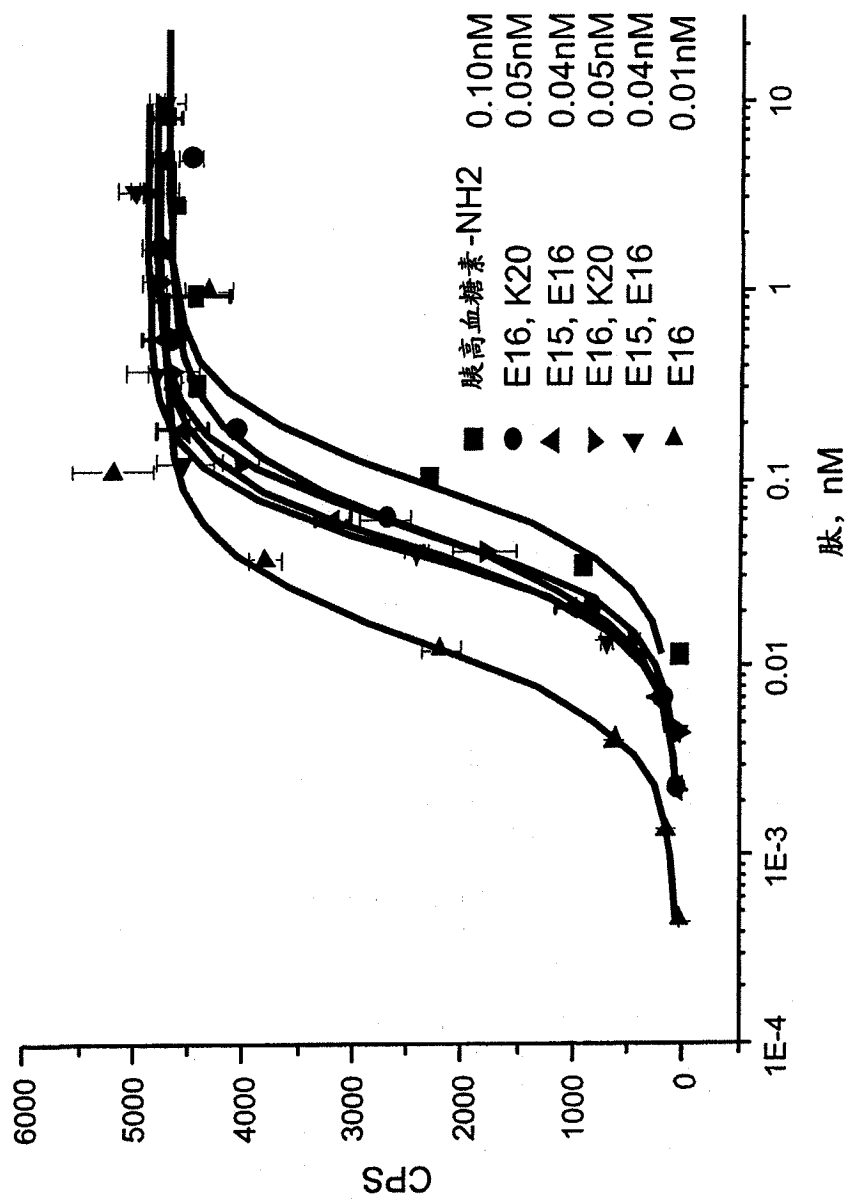


图3 胰高血糖素受体介导的 cAMP 诱导

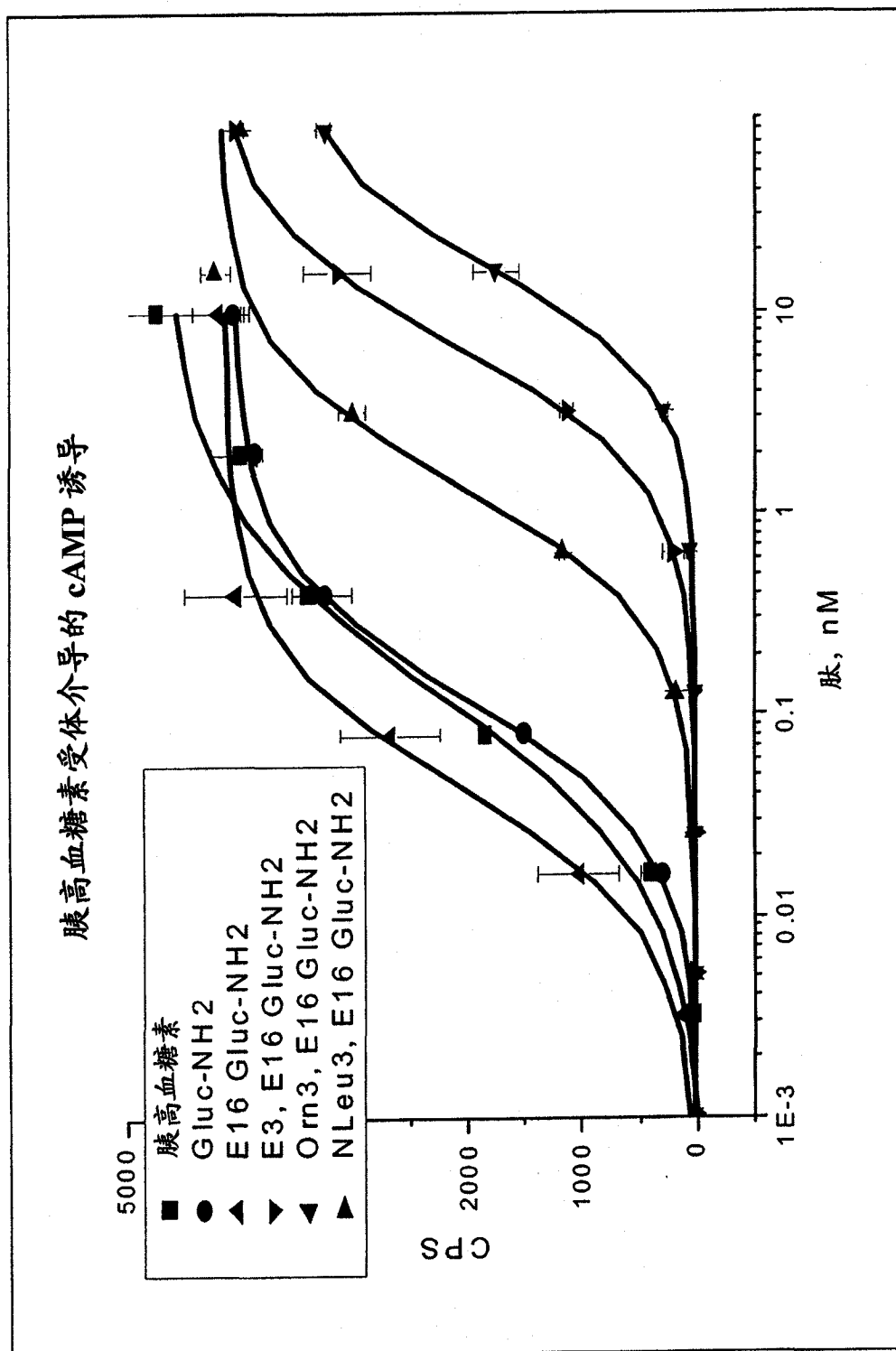


图 4A

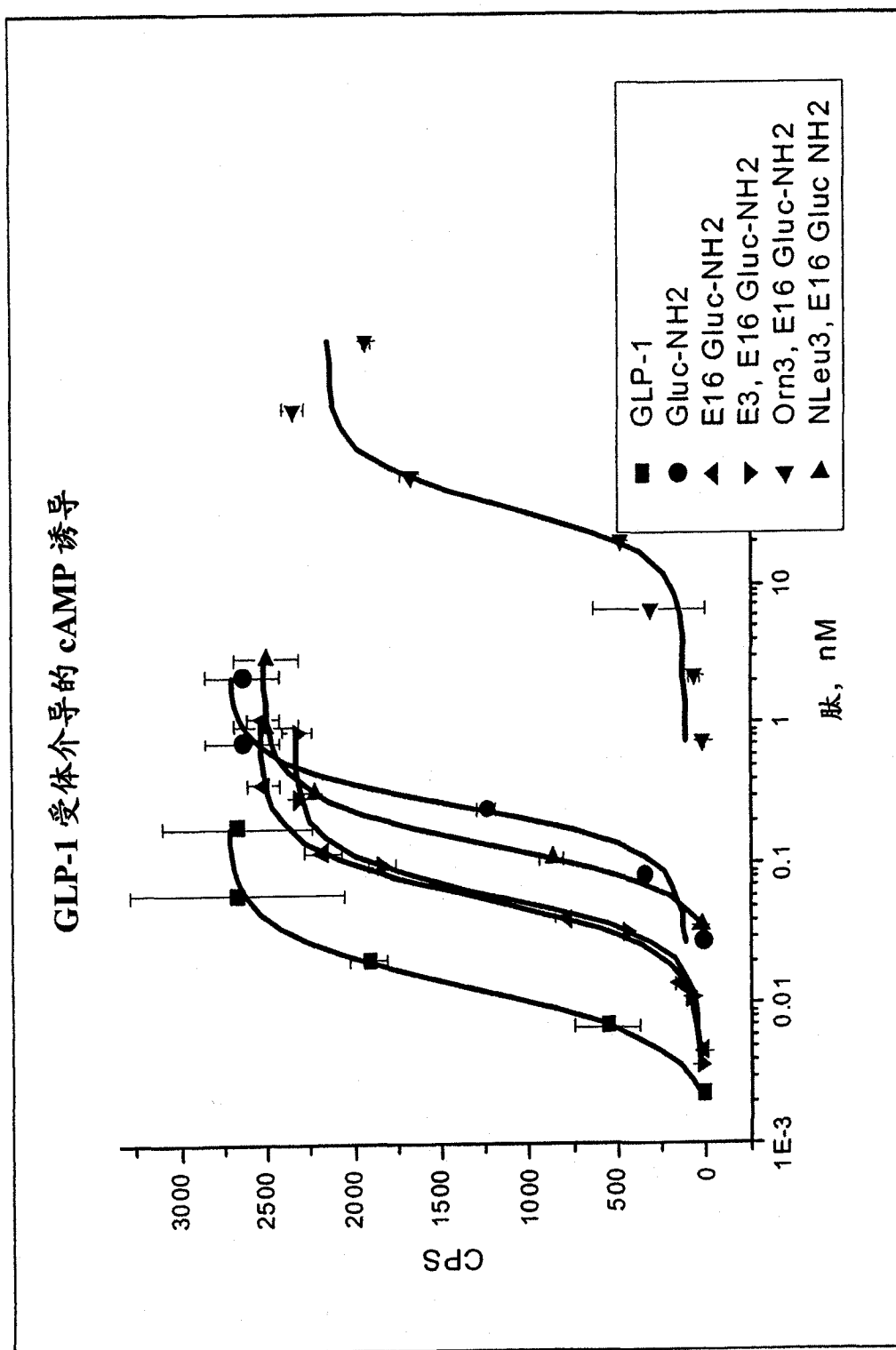


图 4B

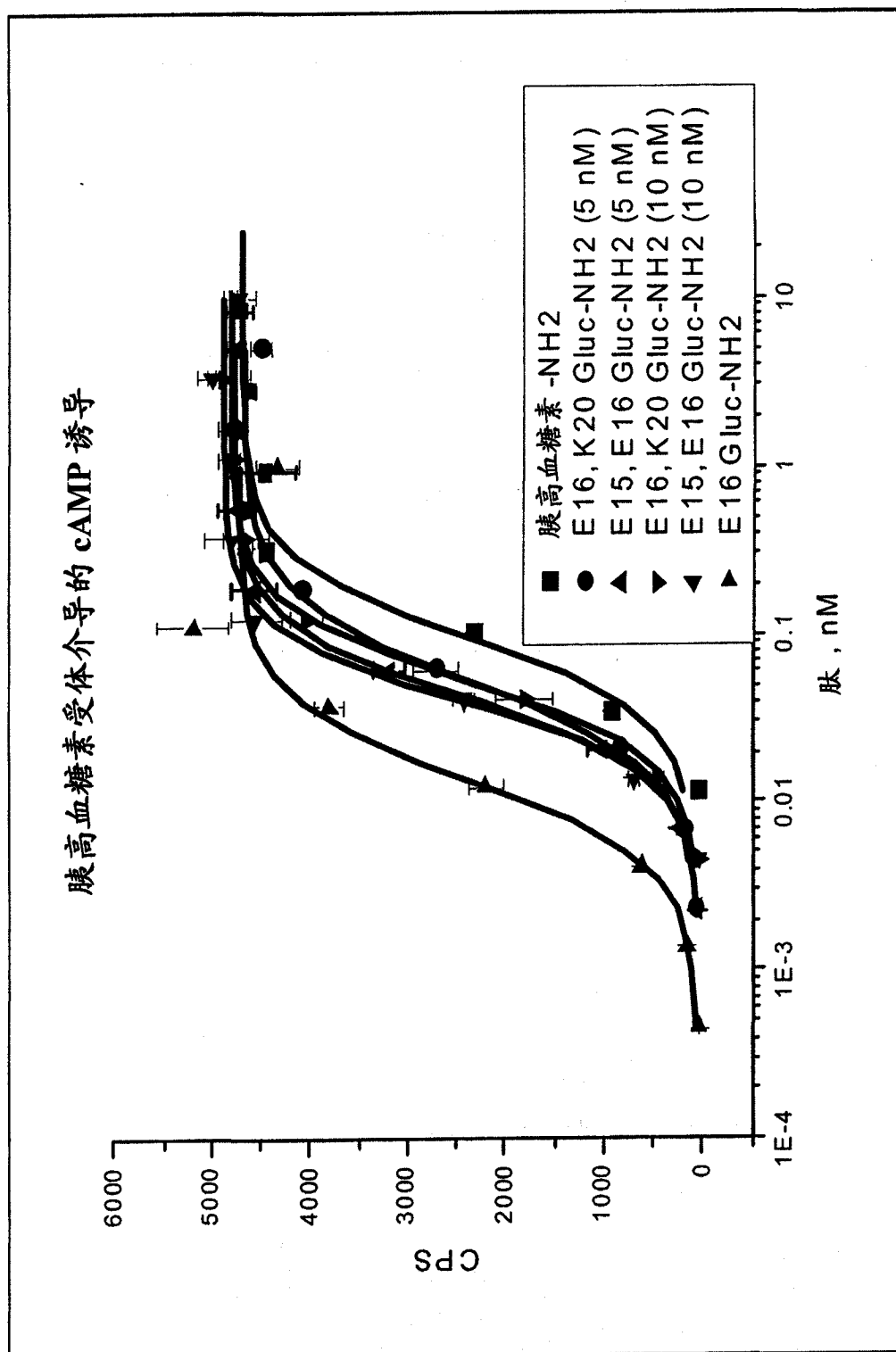


图 5A

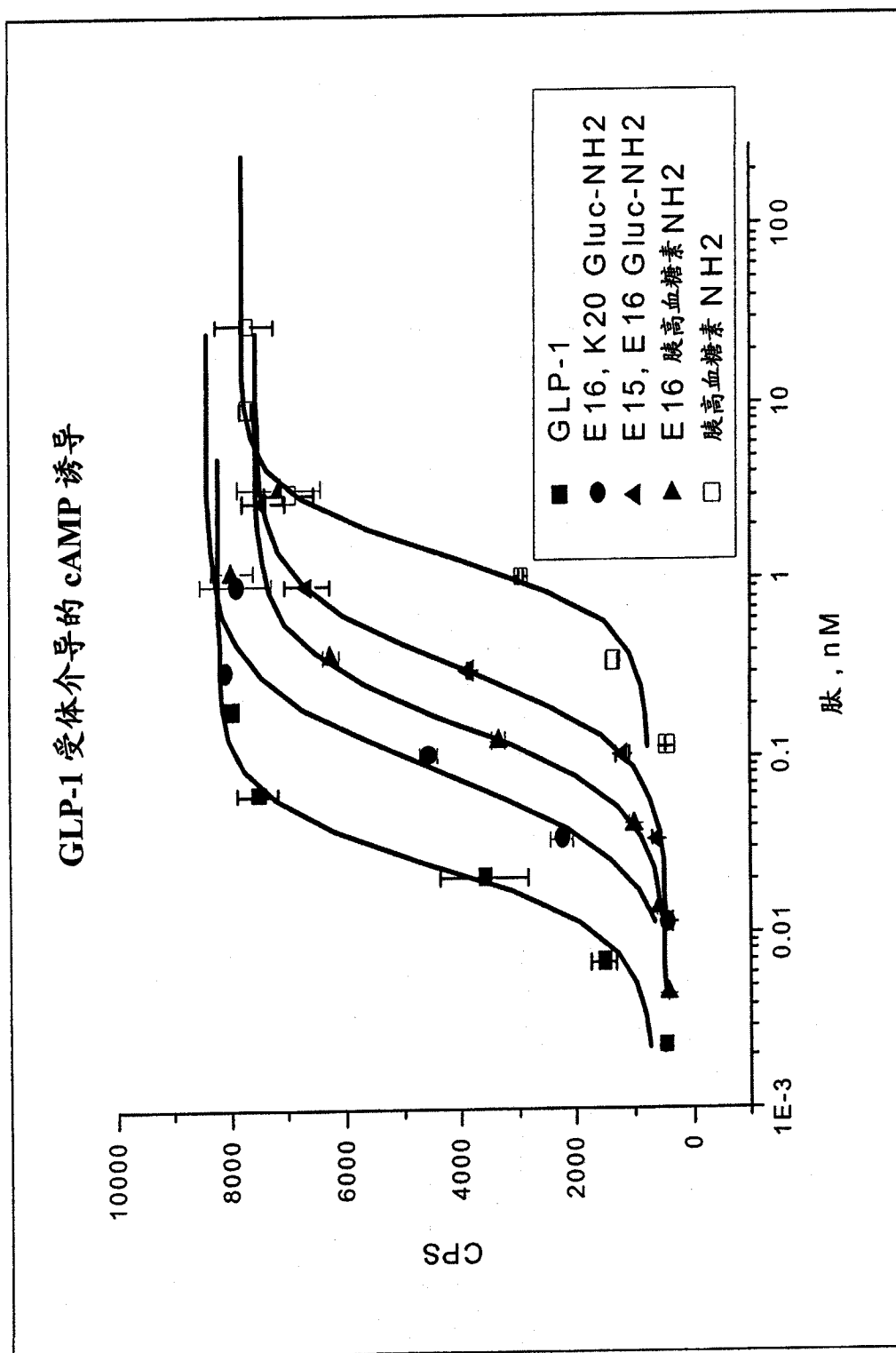


图 5B

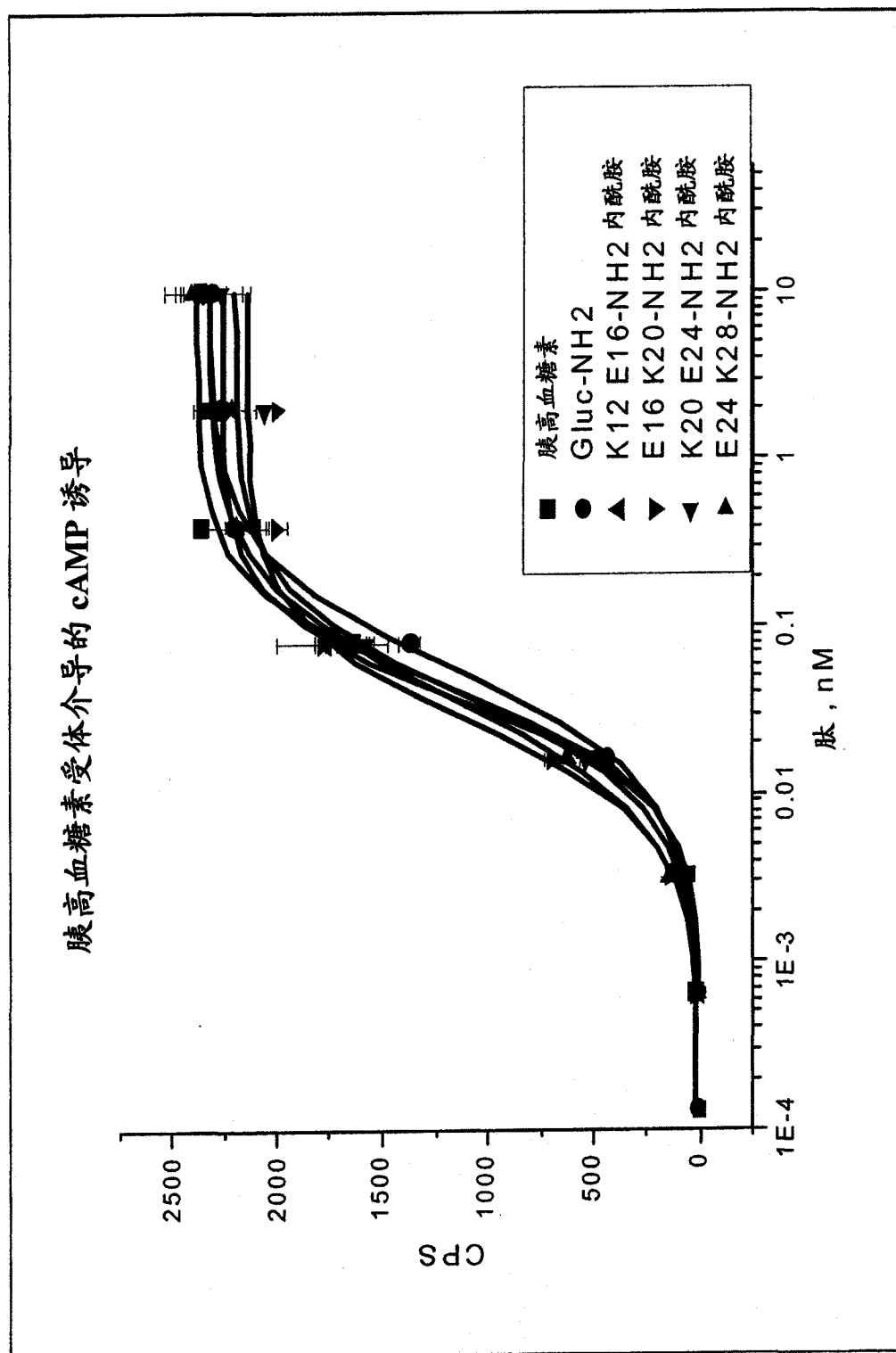


图 6A

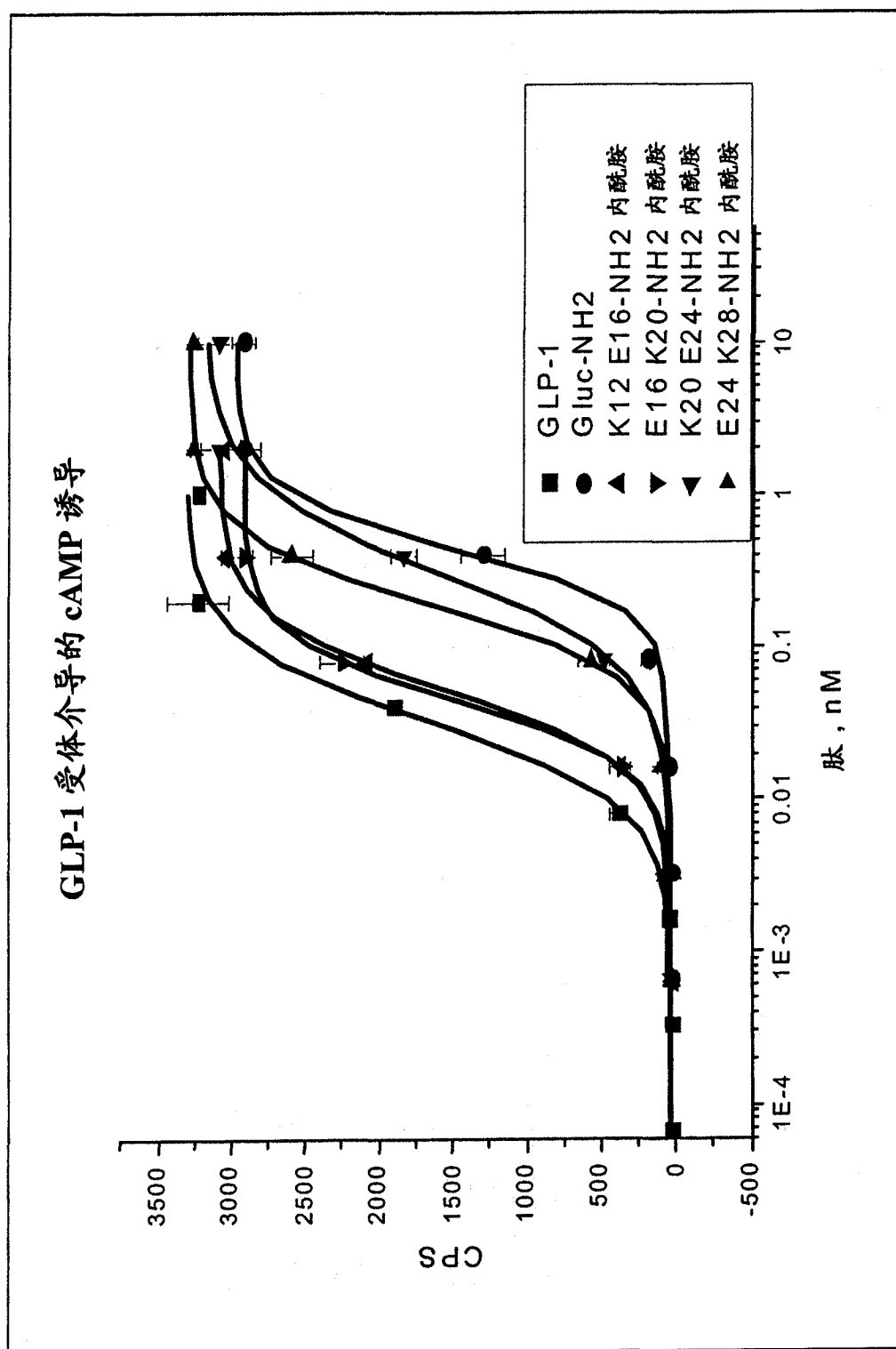


图 6B

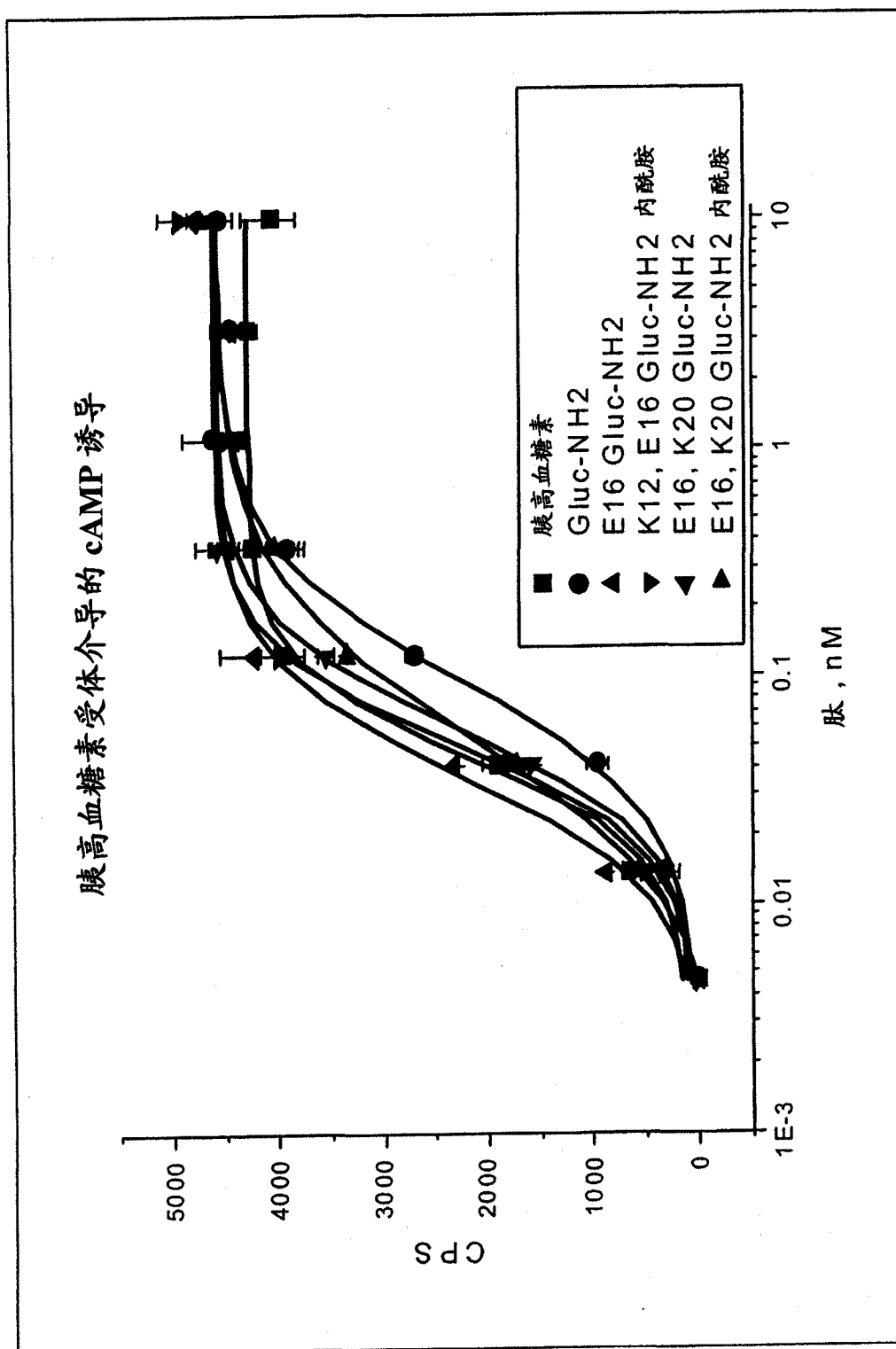


图 7A

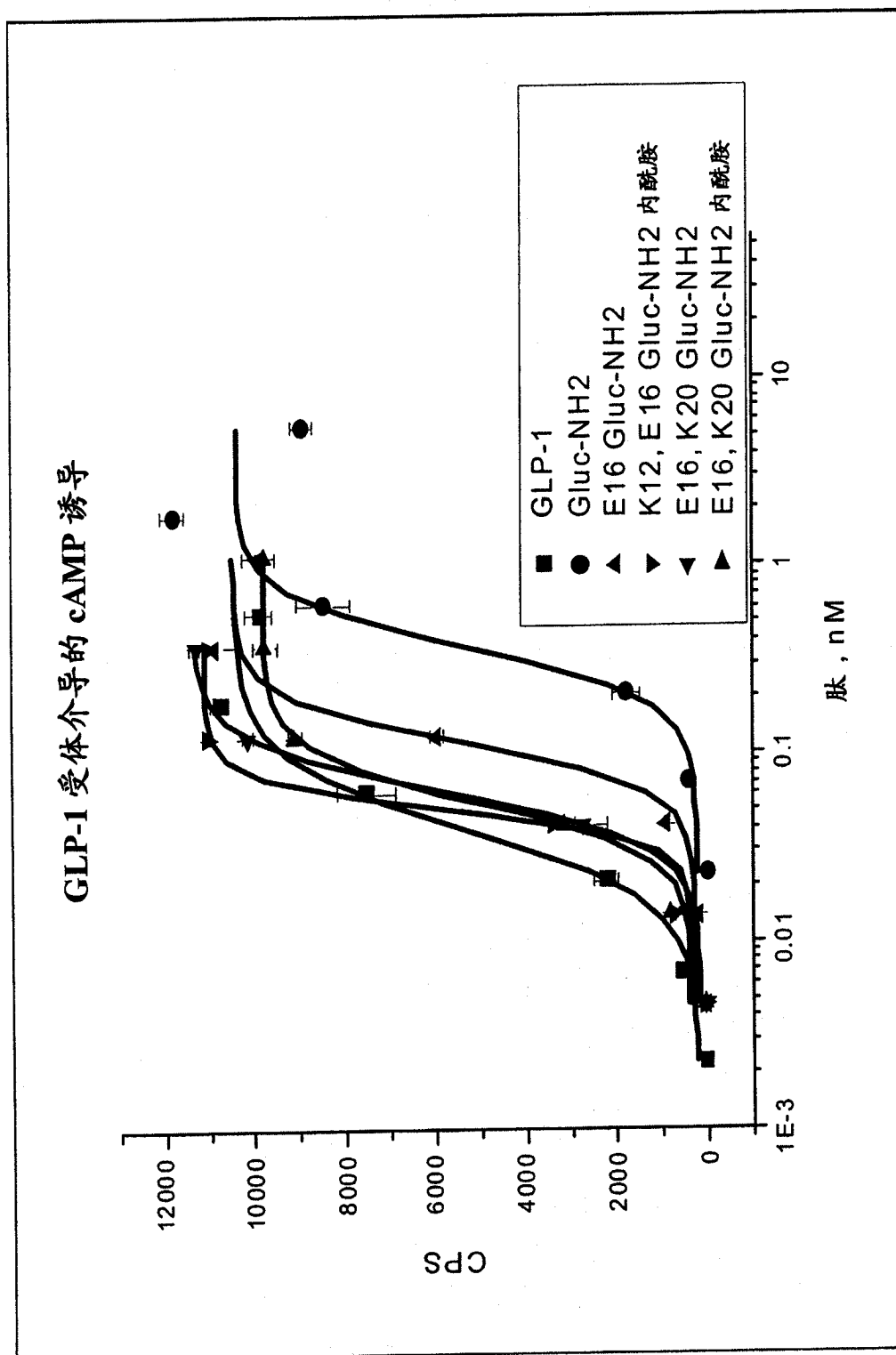


图 7B

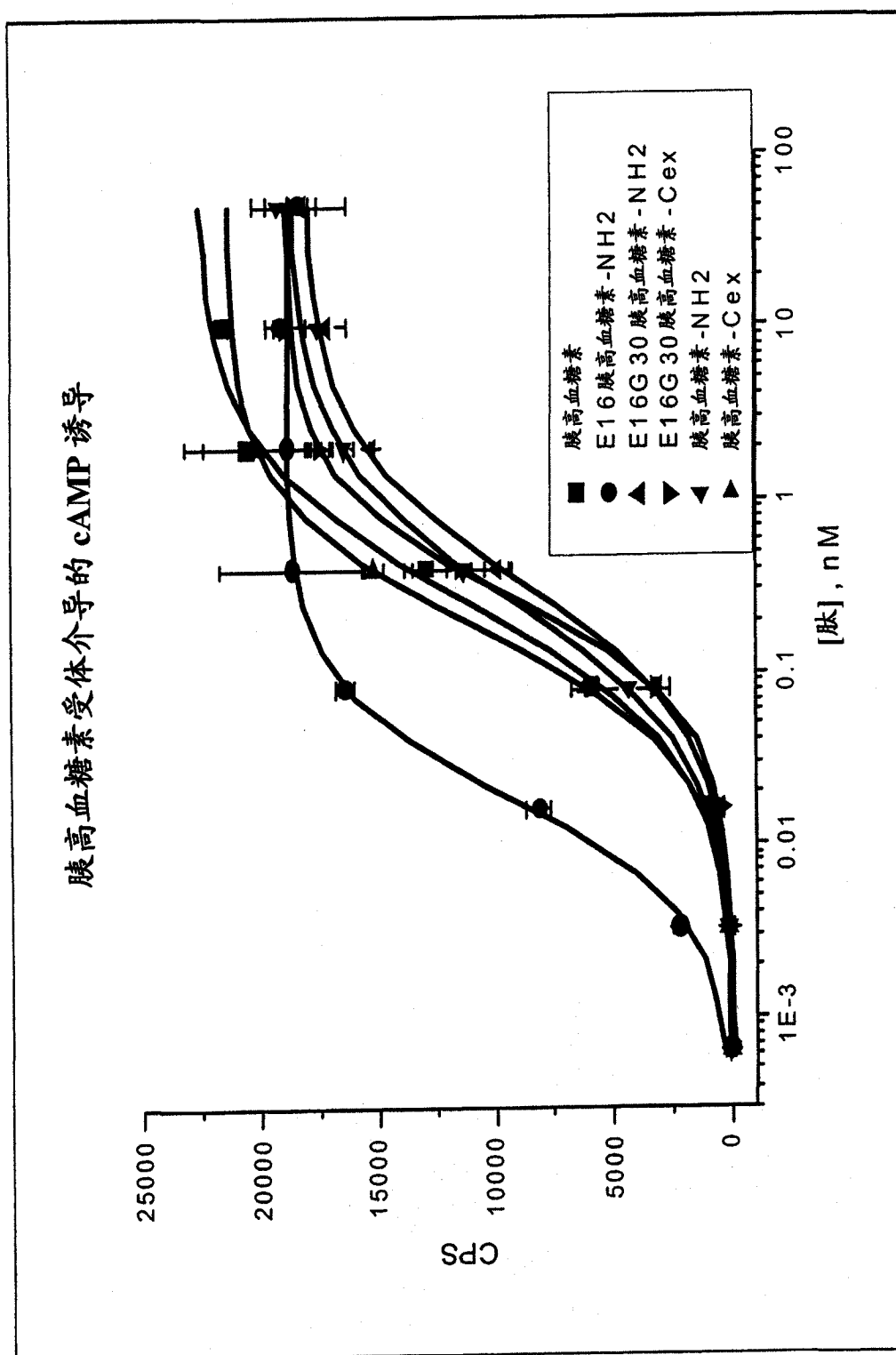


图 8A:胰高血糖素的 16 位和 C 末端修饰

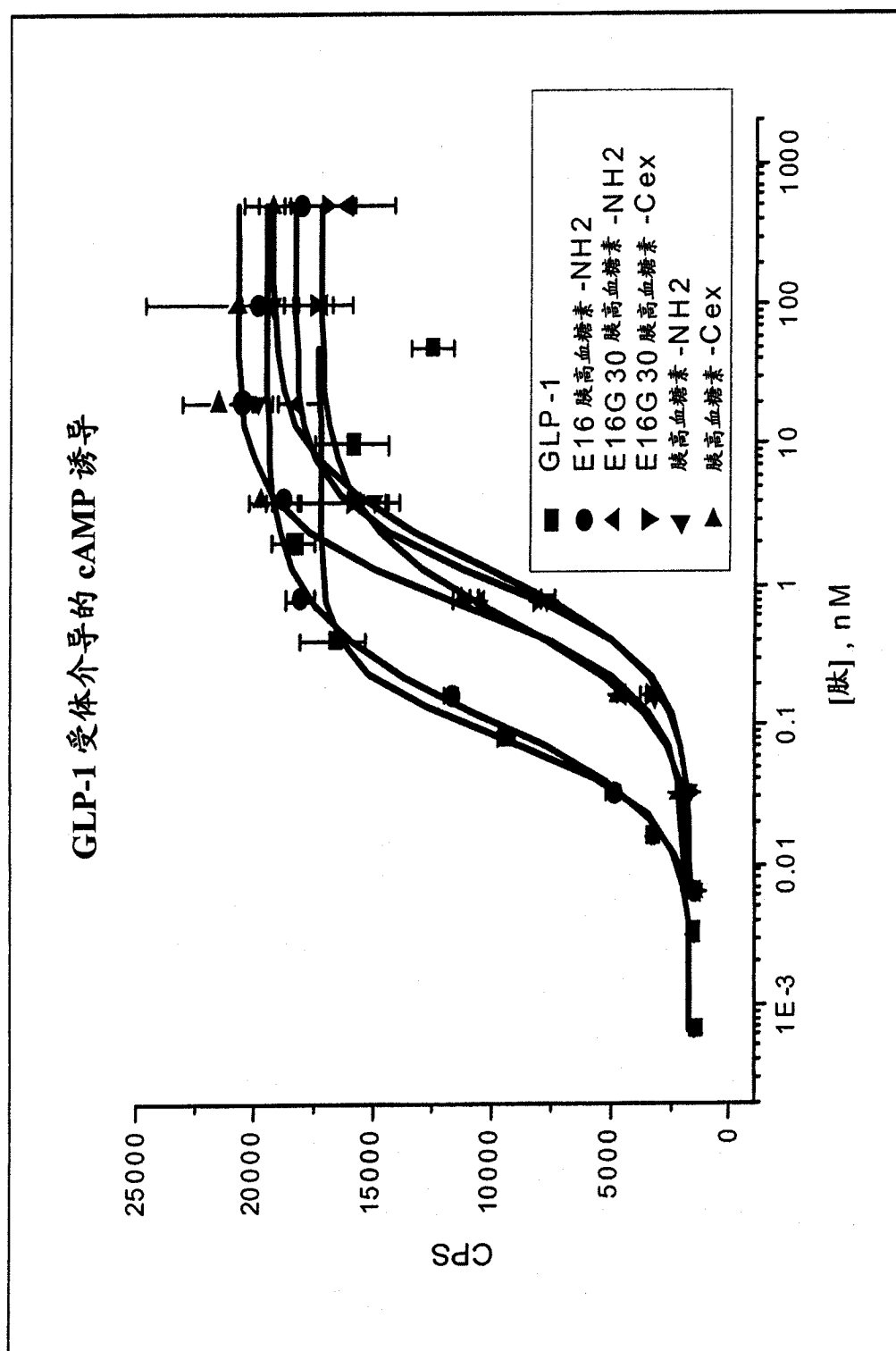


图 8B:胰高血糖素的 16 位和 C 末端修饰

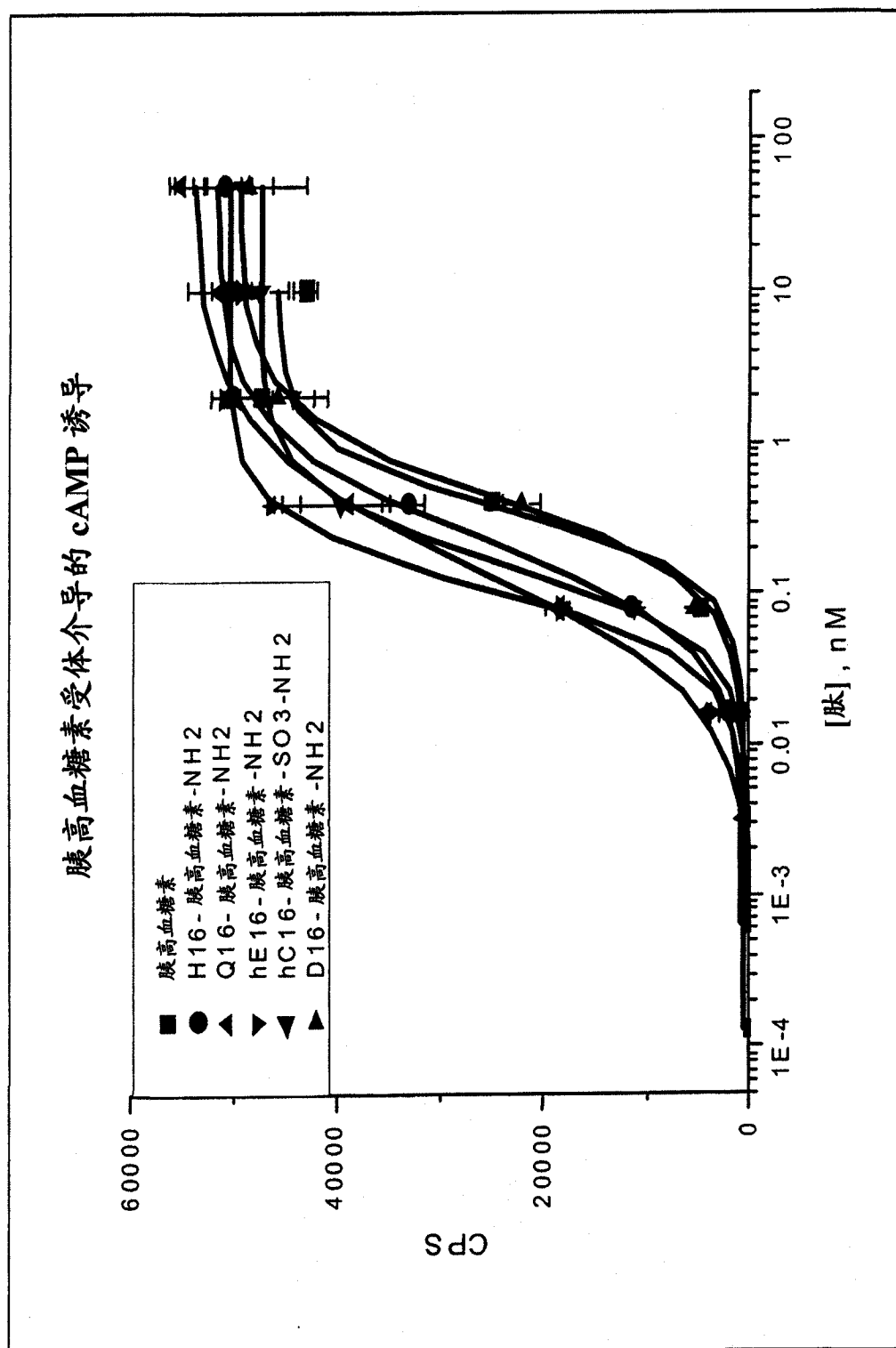


图 8C:胰高血糖素的 16 位取代

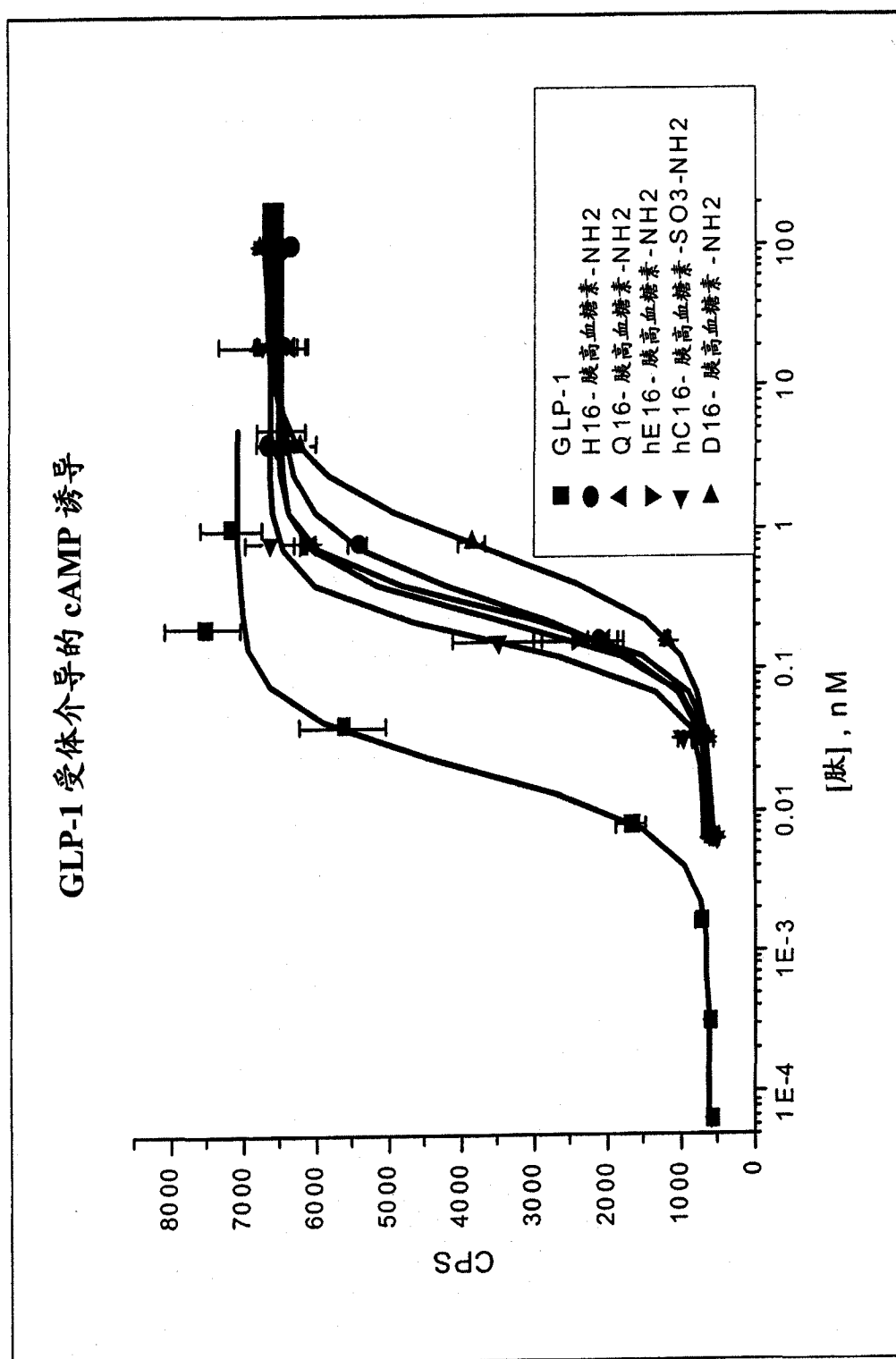


图 8D: 胰高血糖素的 16 位取代

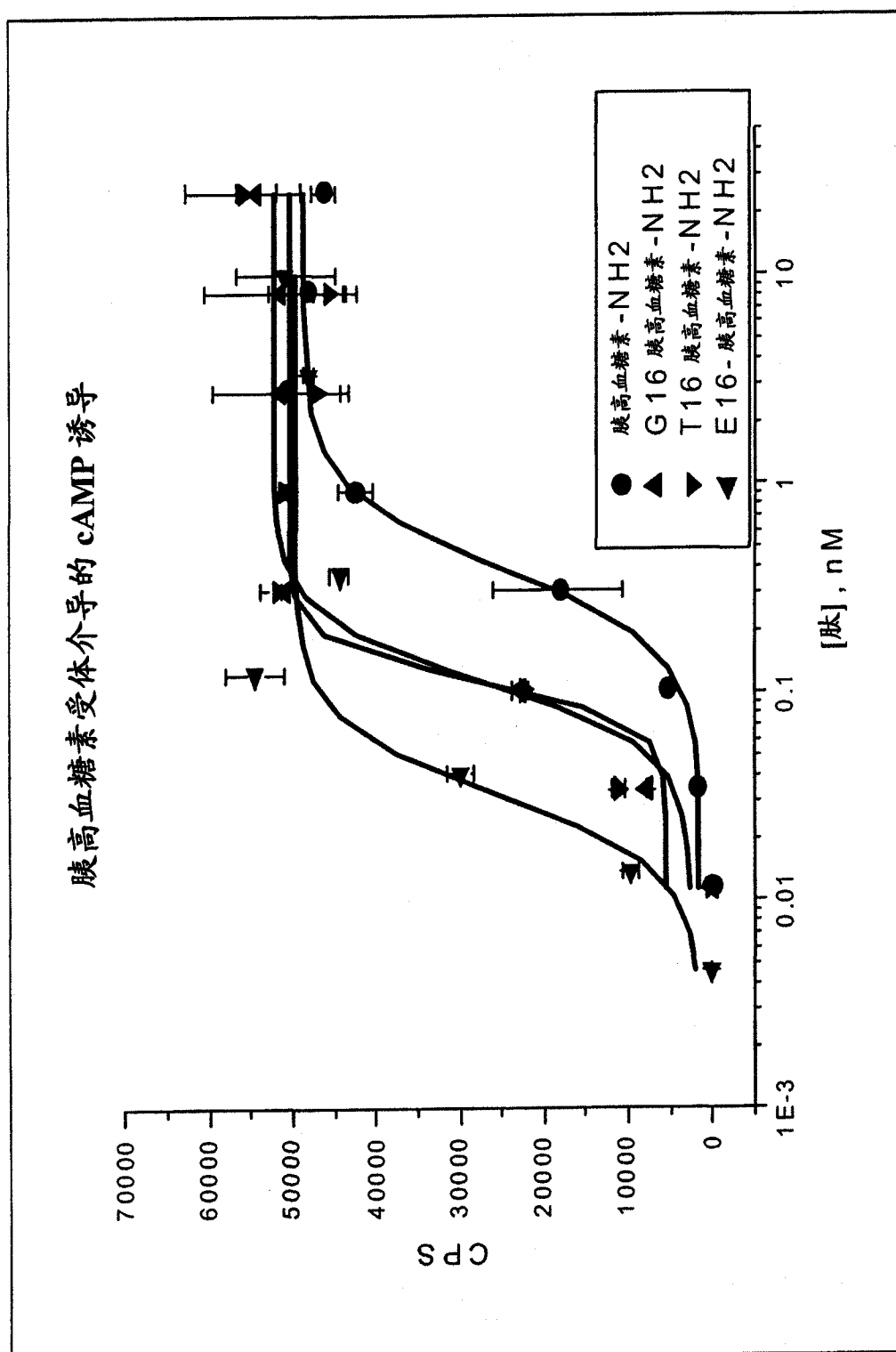


图 8E:胰高血糖素的 16 位取代

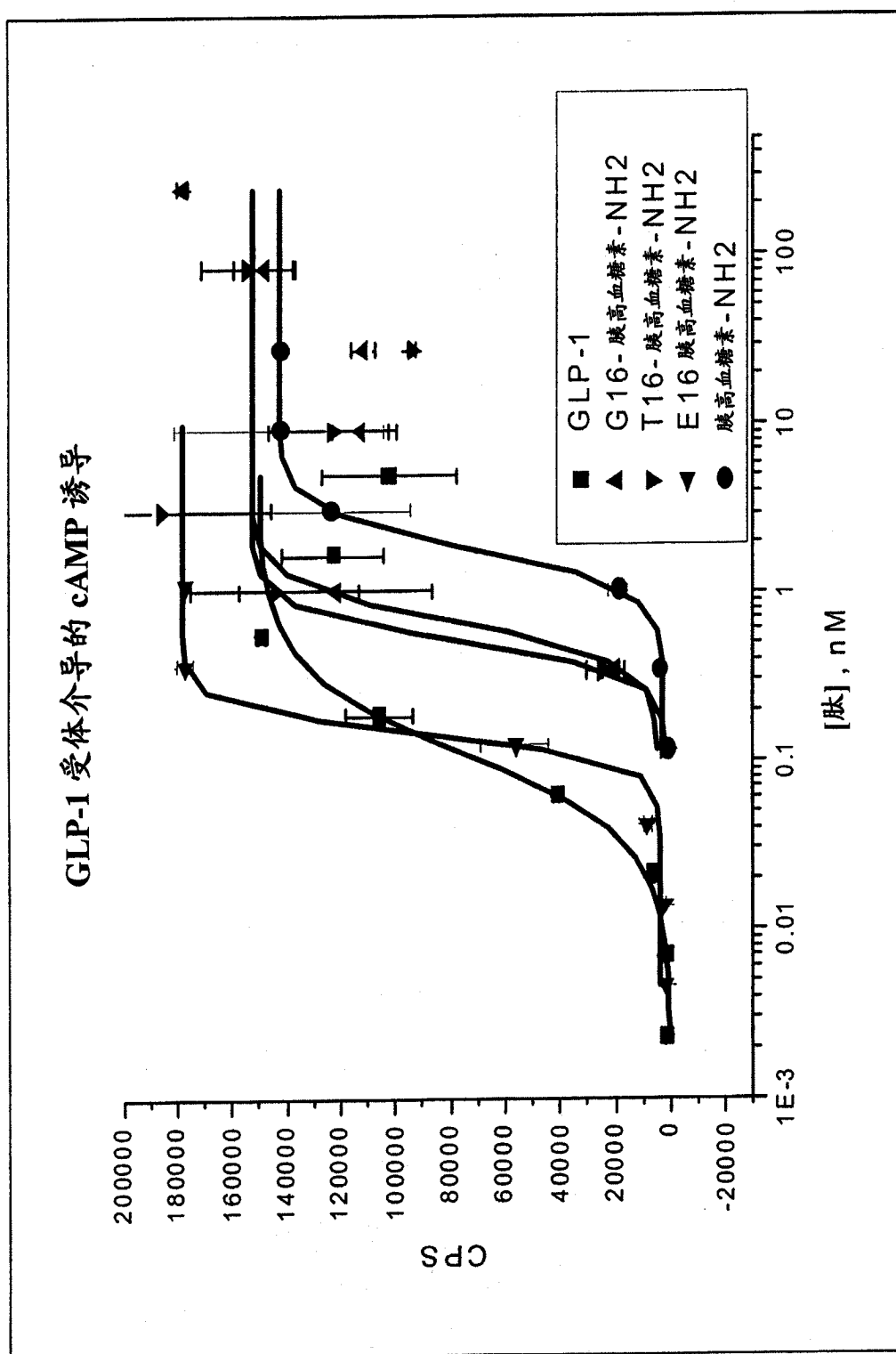


图 8F:胰高血糖素的 16 位取代

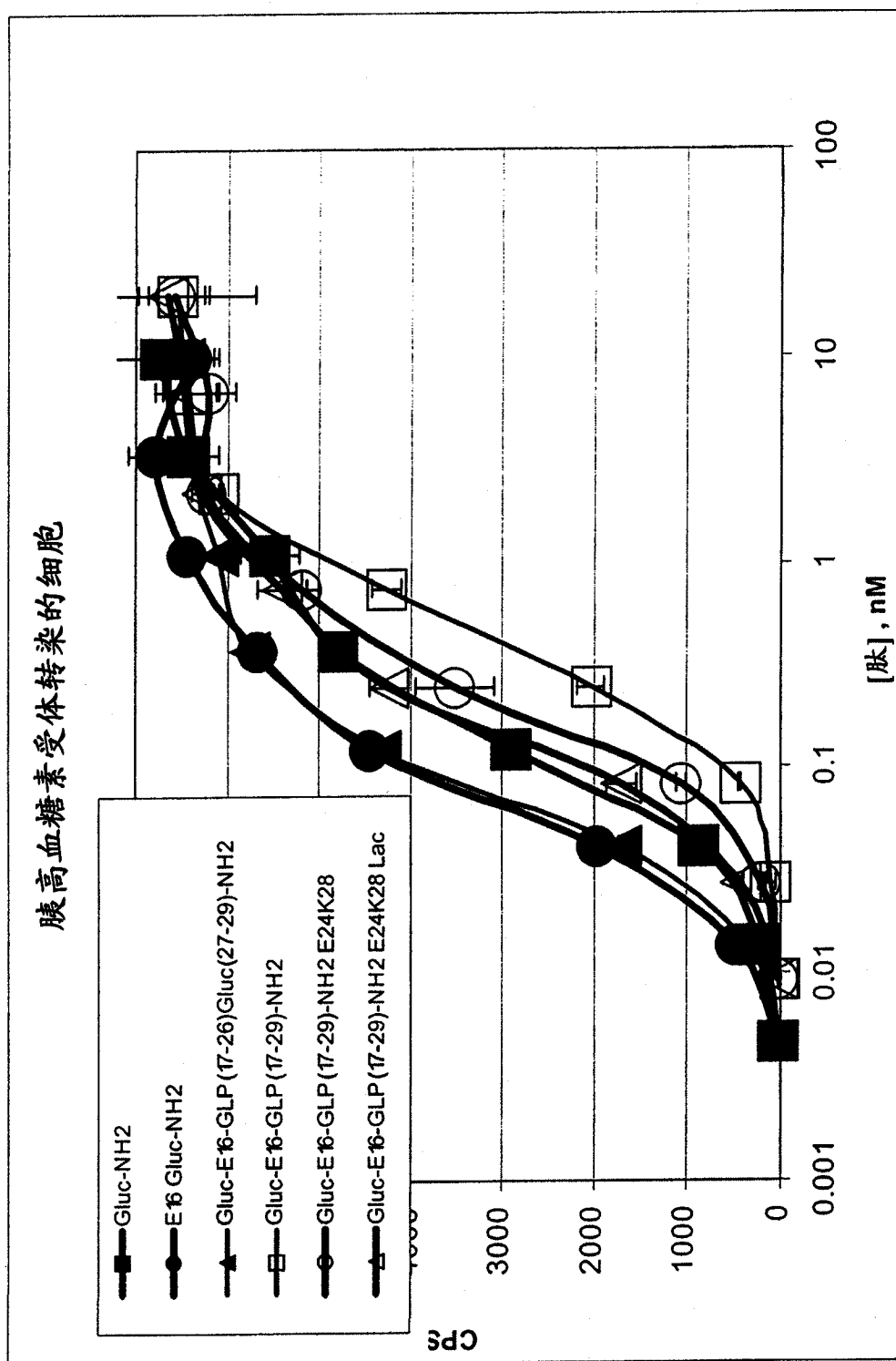


图 9A :GLP-1 17-26 胰高血糖素类似物对 cAMP 的诱导

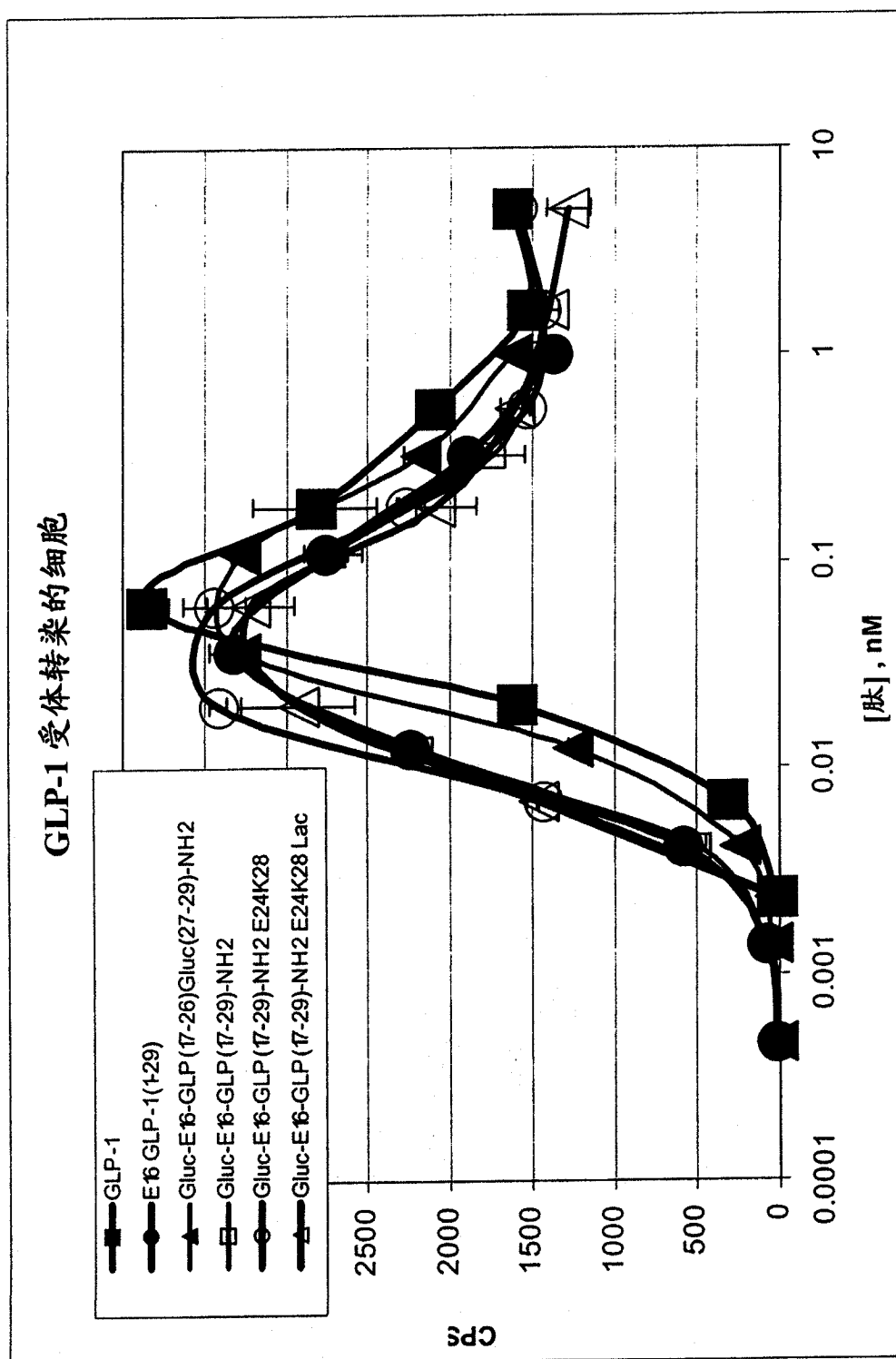


图 9B:GLP-1 17-26 胰高血糖素类似物对 cAMP 的诱导

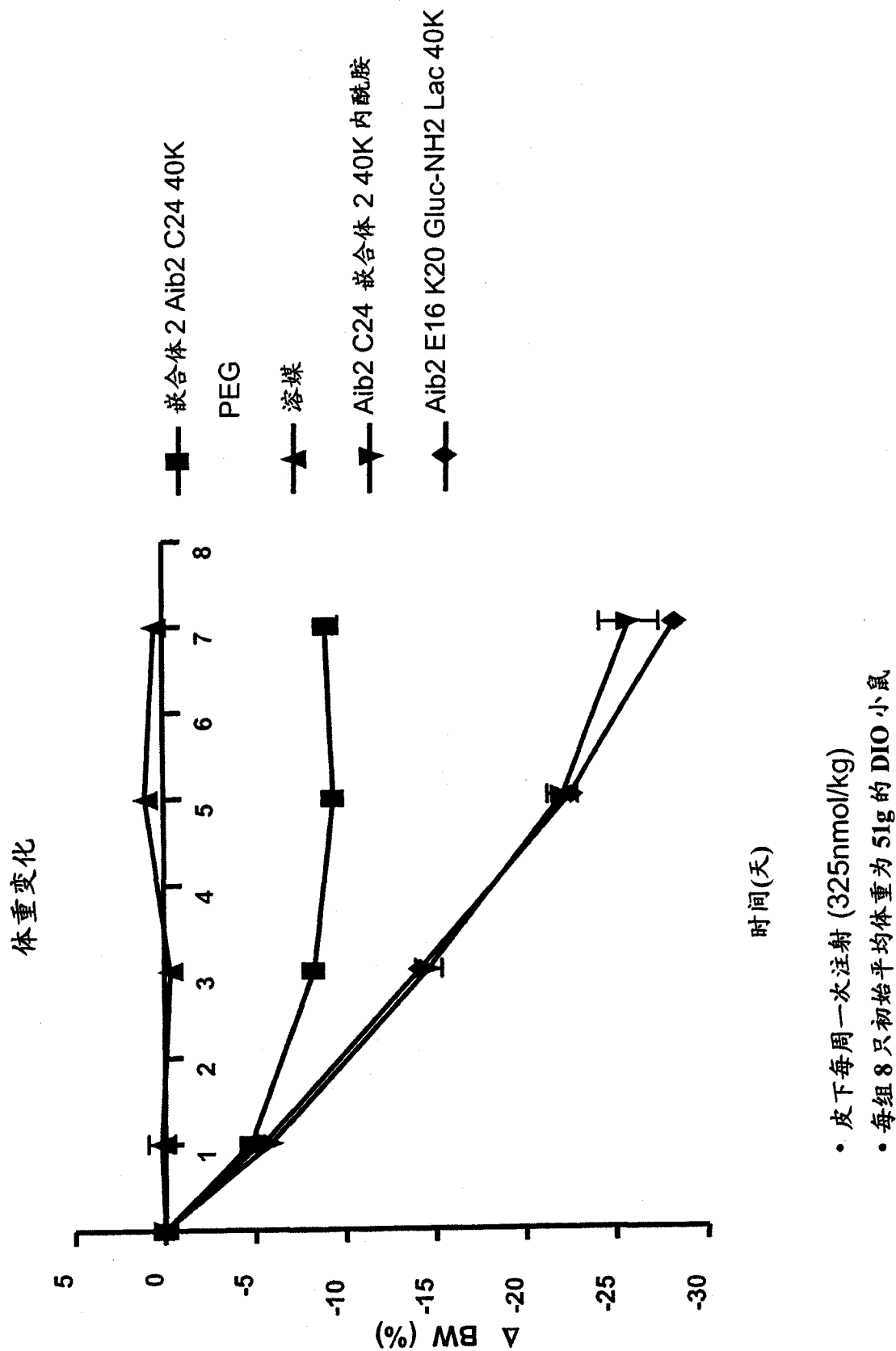
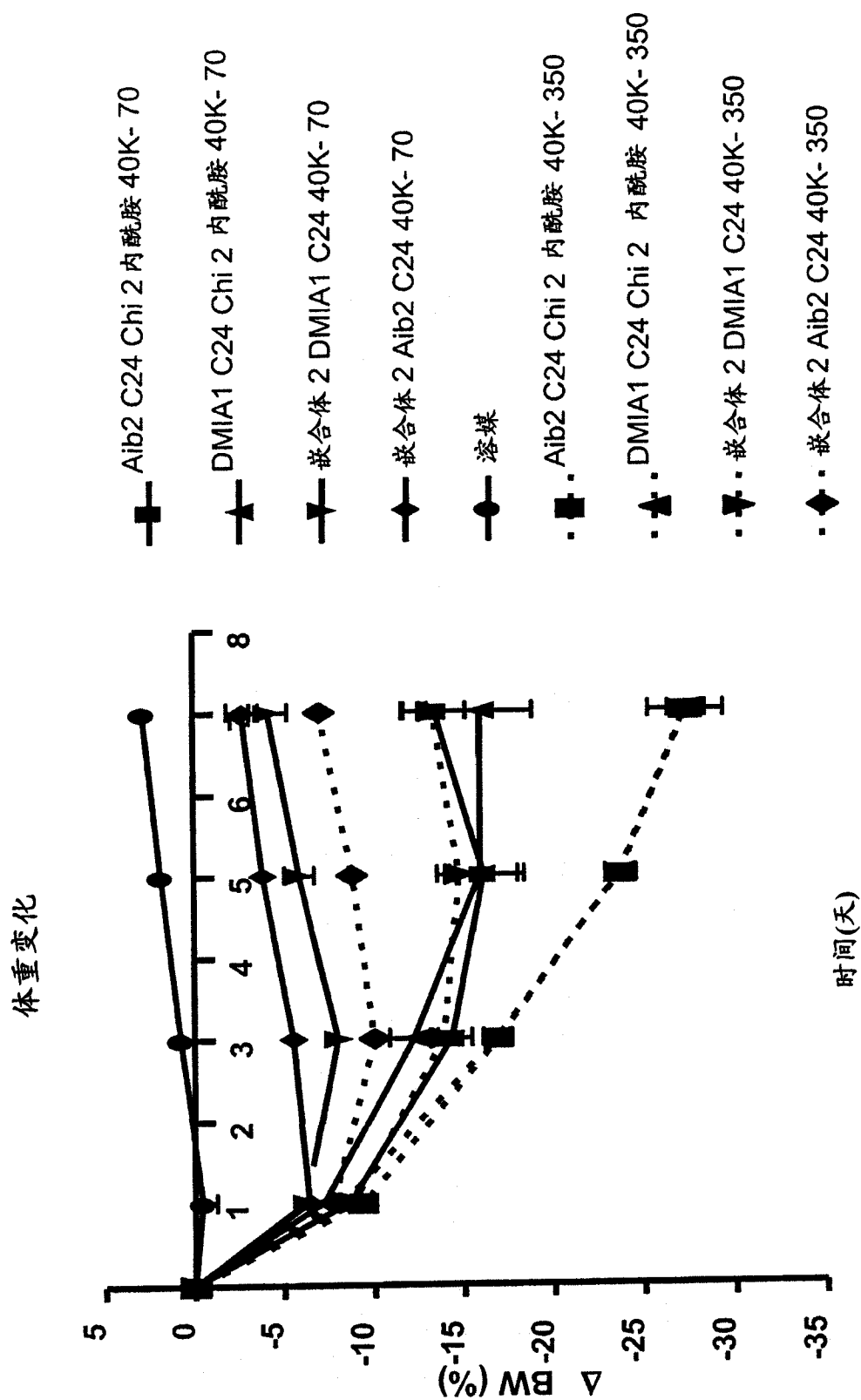


图 10A



- 皮下每周一次注射 (70 或 350nmol/kg)
- 每组 8 只平均体重为 44g 的 DIO 小鼠

图 10B

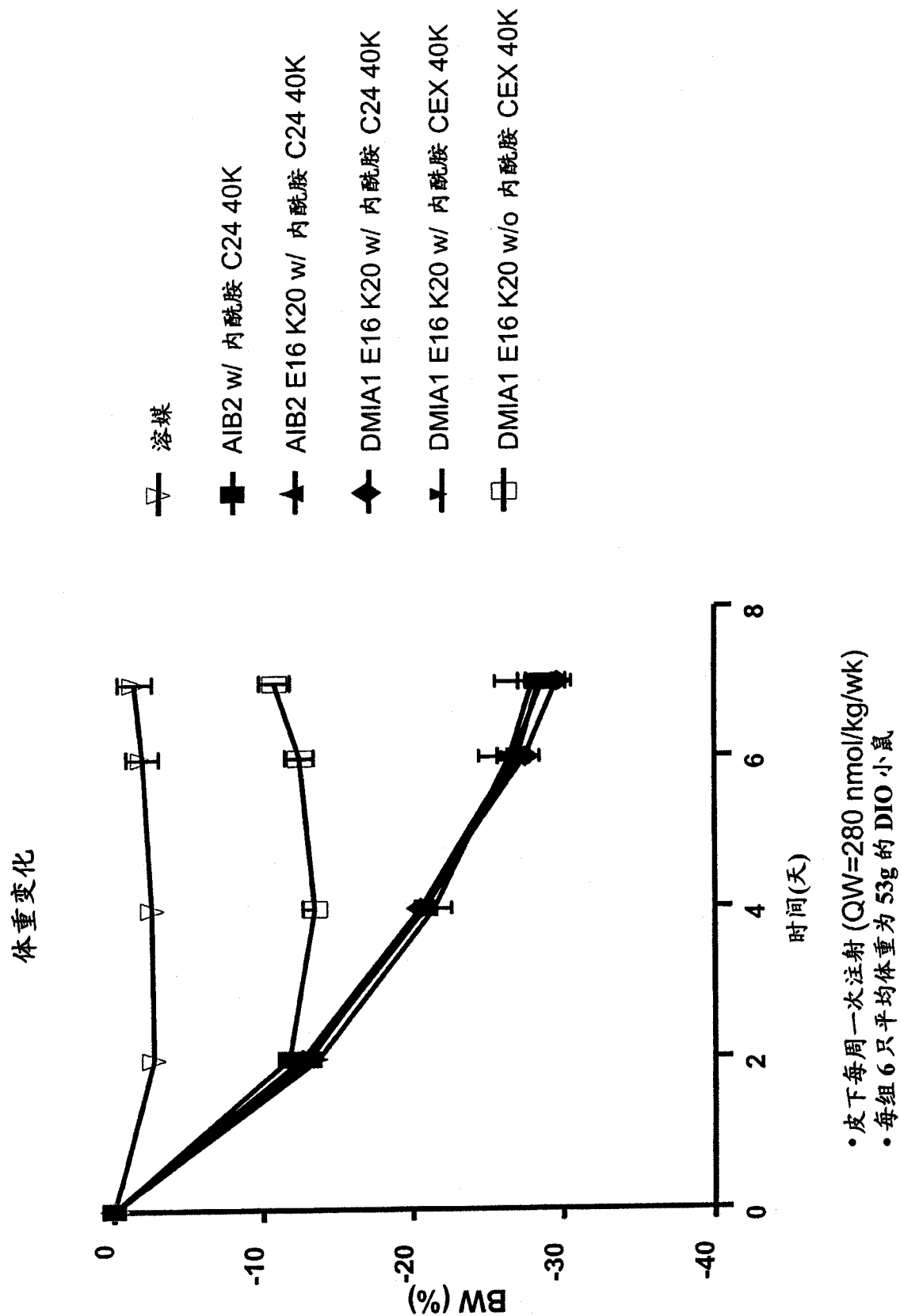
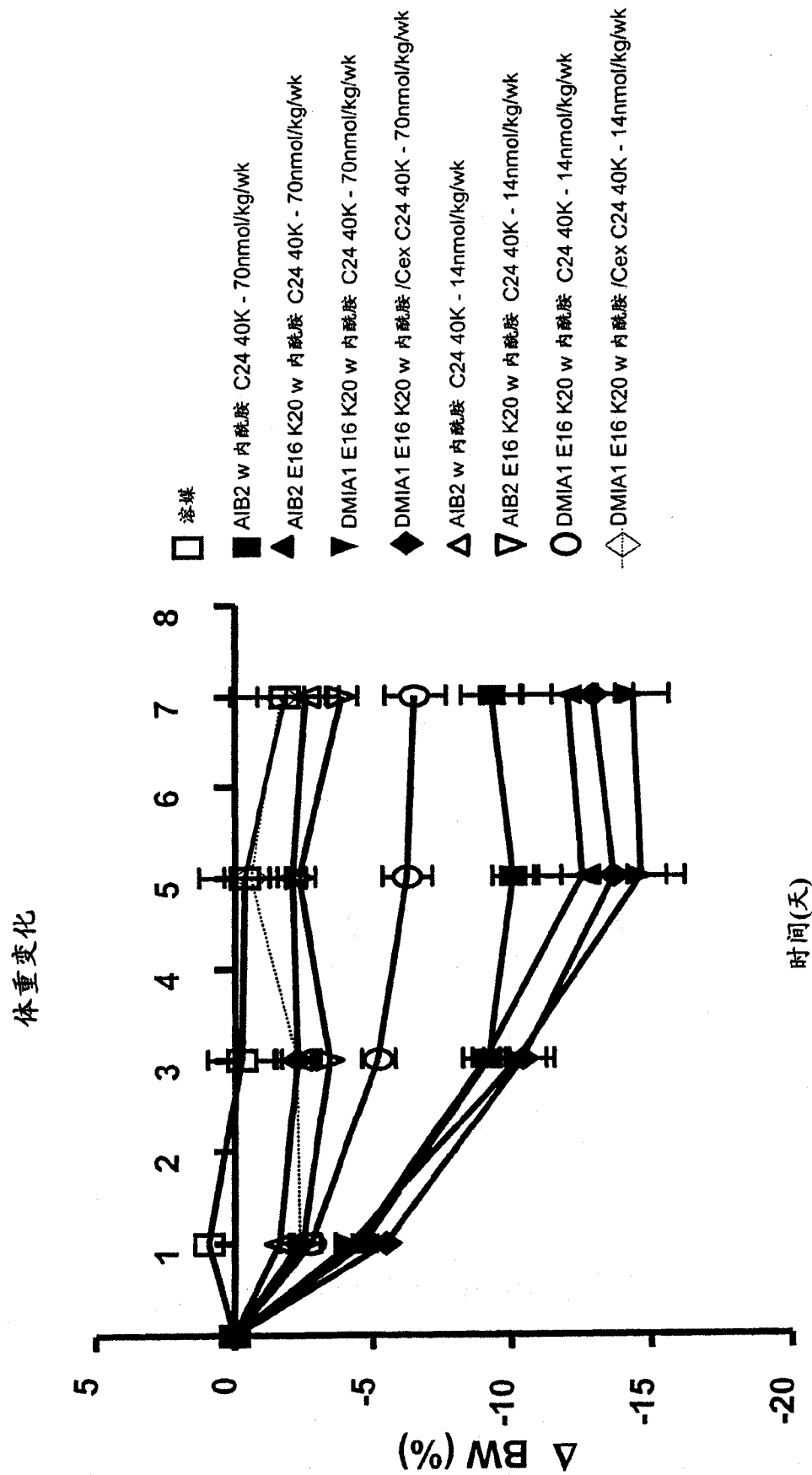
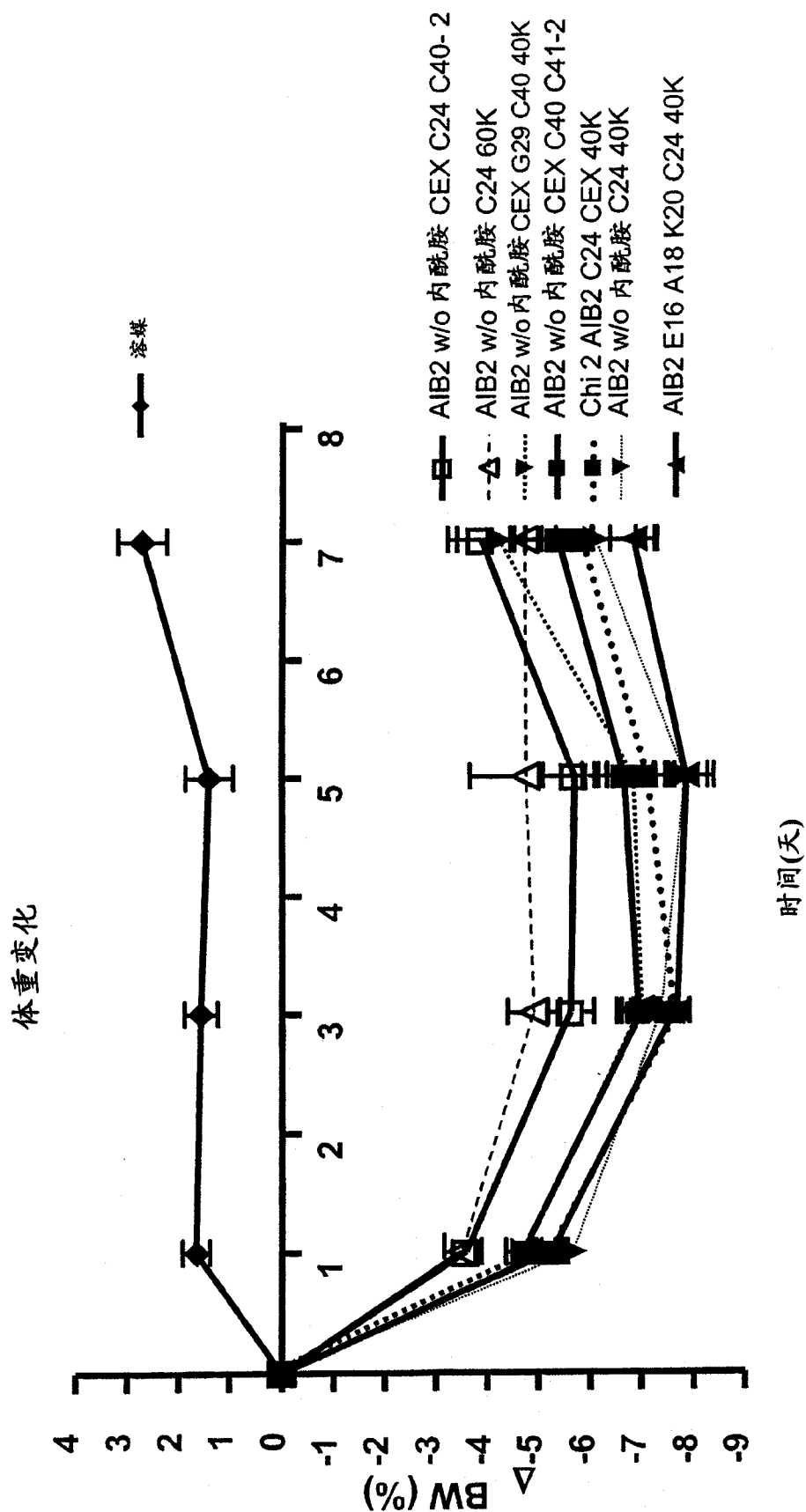


图 10C



- 皮下每周一次注射 (QW=70 nmol/kg/wk 或 14 nmol/kg/wk)
- 每组 8 只初始平均体重为 44.3g 的 DIO 小鼠

图 10D



- 皮下每周一次注射 (QW=70 nmol/kg/wk)
- 每组 8 只初始平均体重为 46.3g 的 DIO 小鼠

图 10E

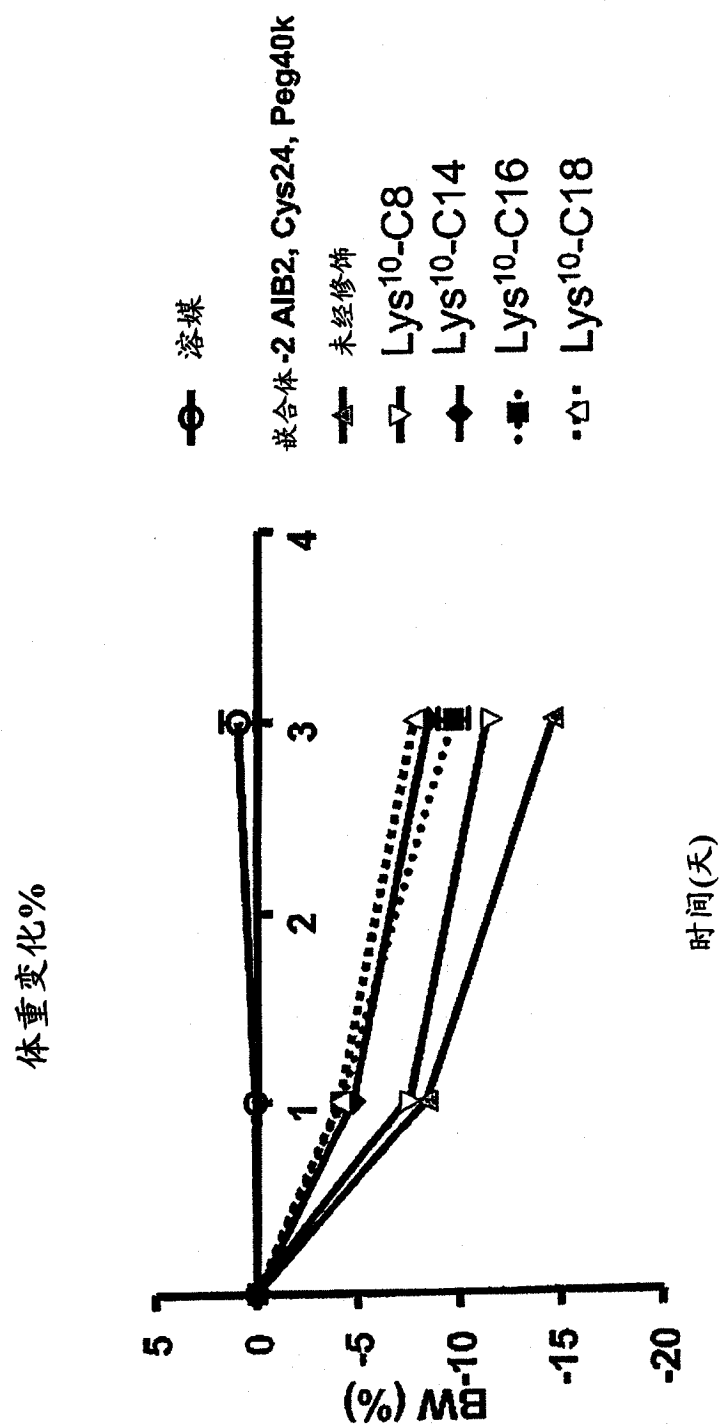


图 11

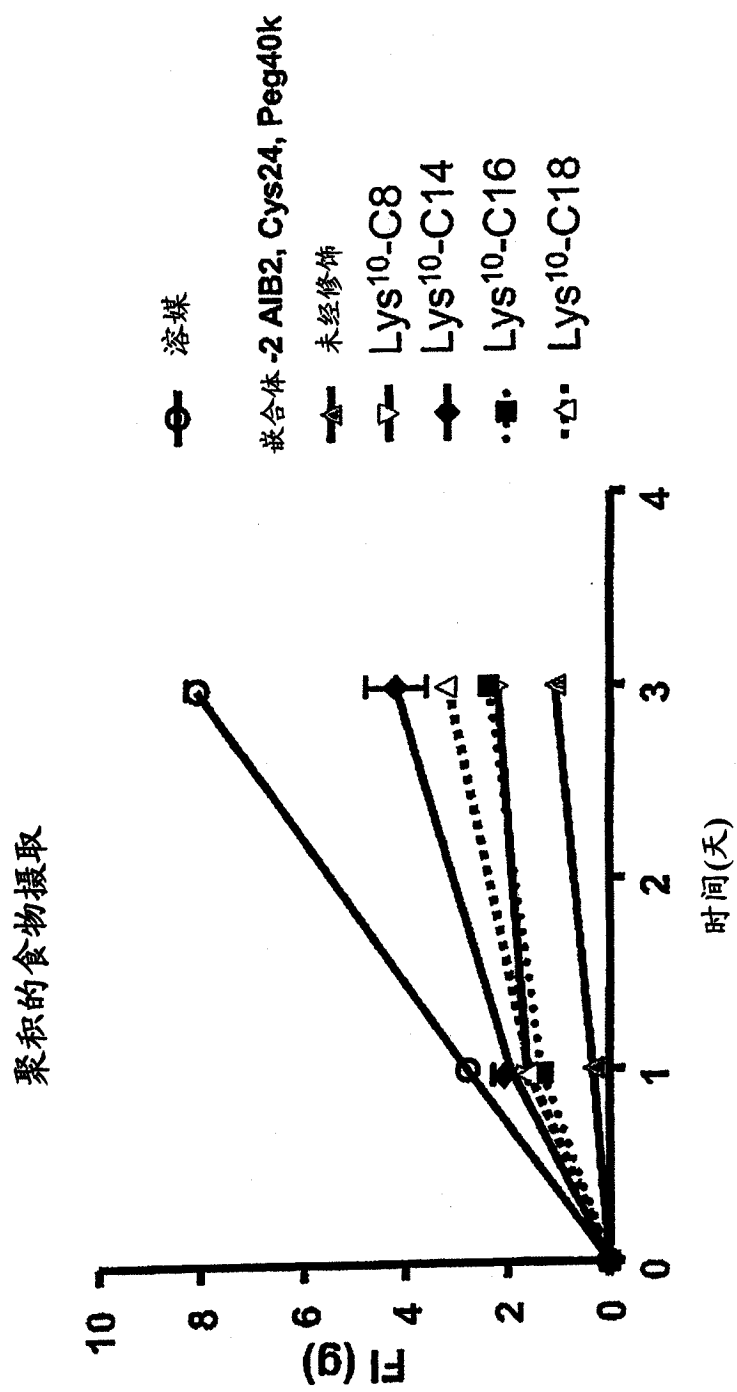


图 12

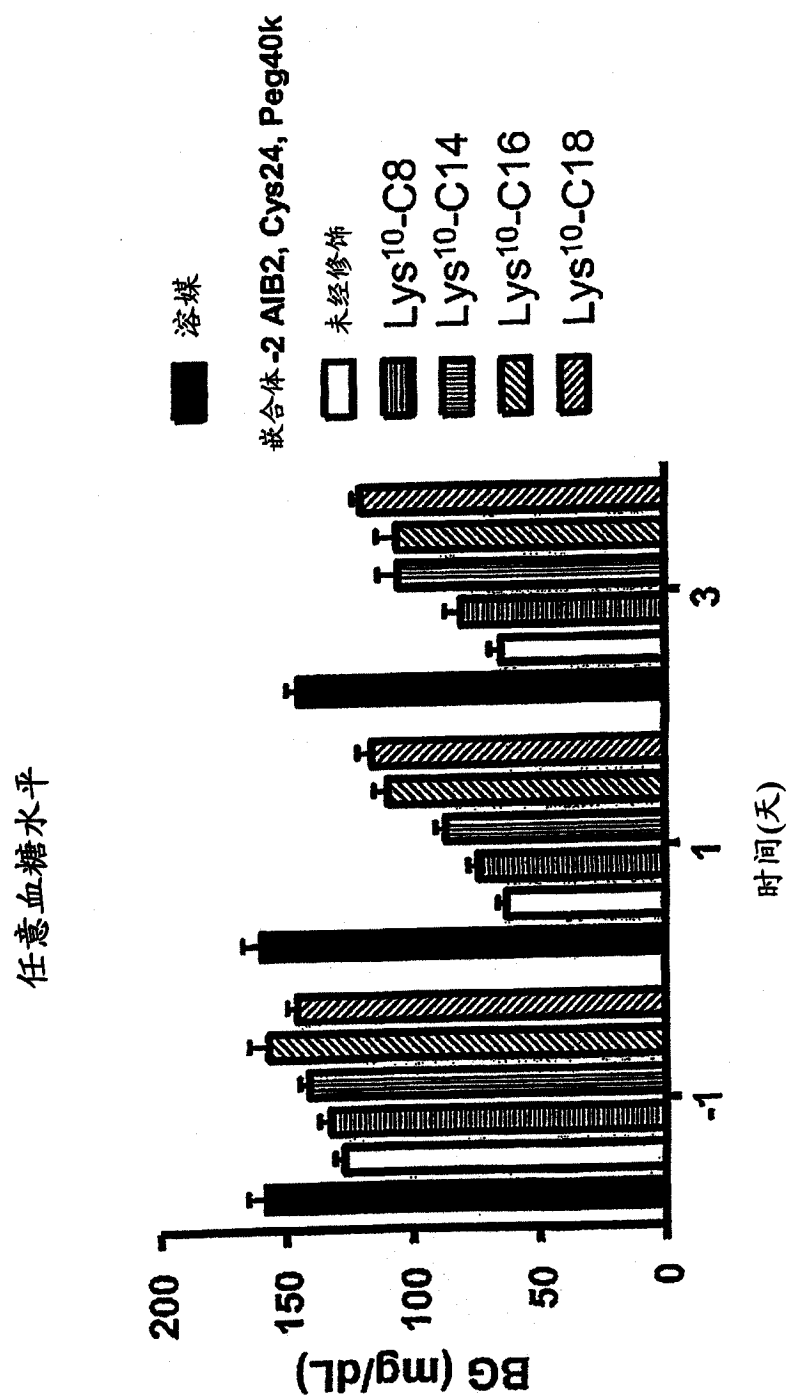


图 13

缩短的胰高血糖素酰胺的体外分析

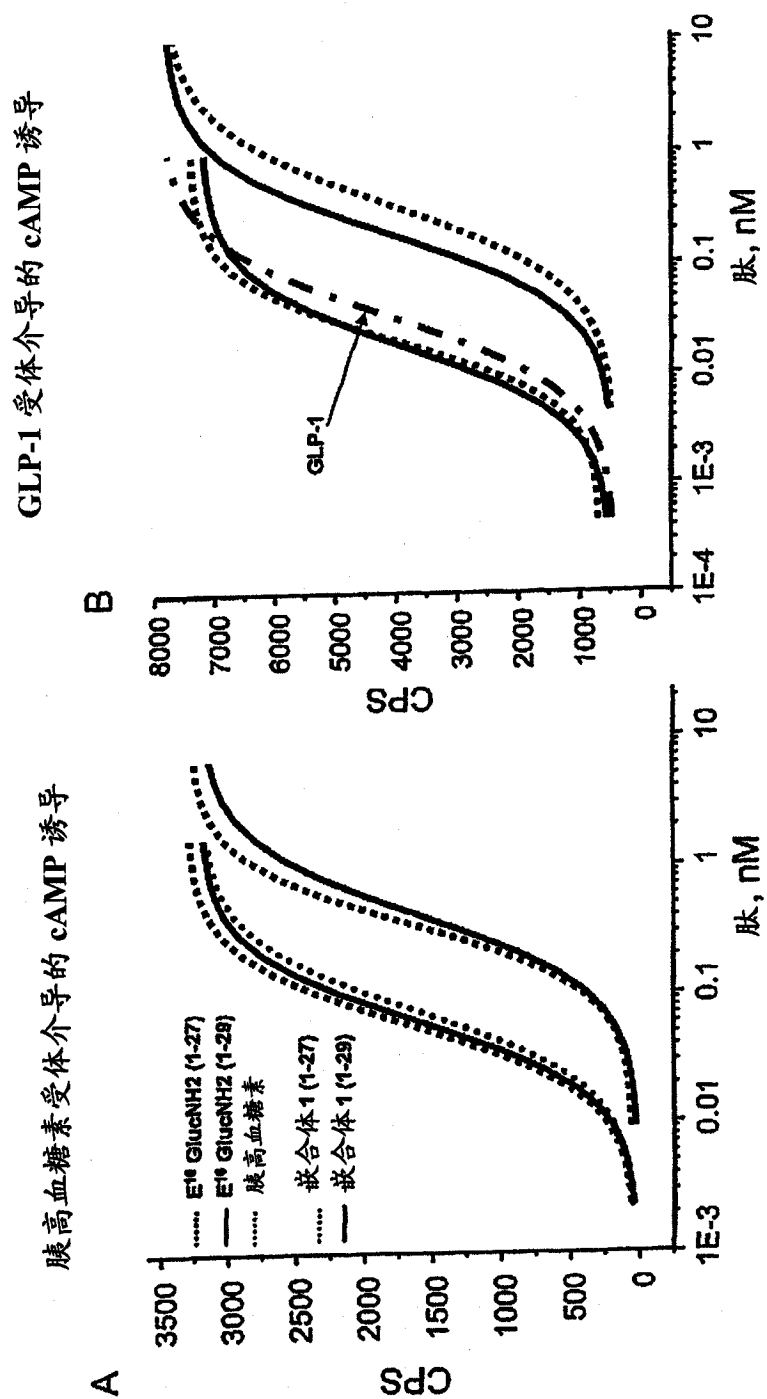


图 14

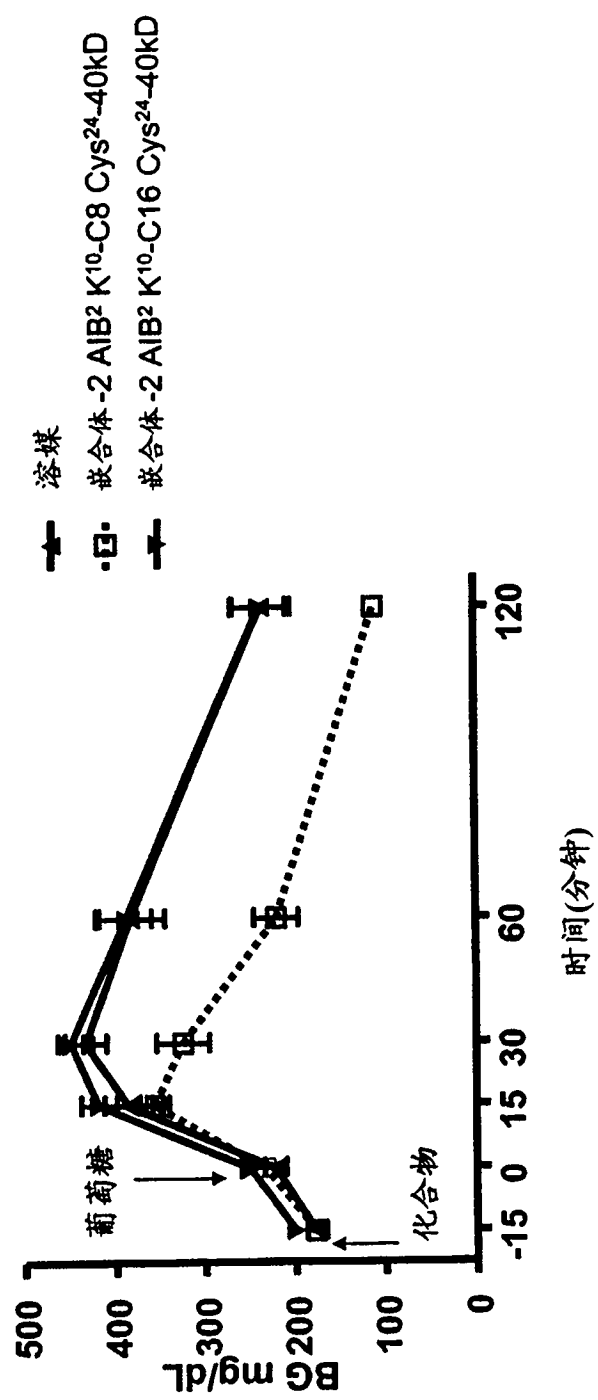


图 15

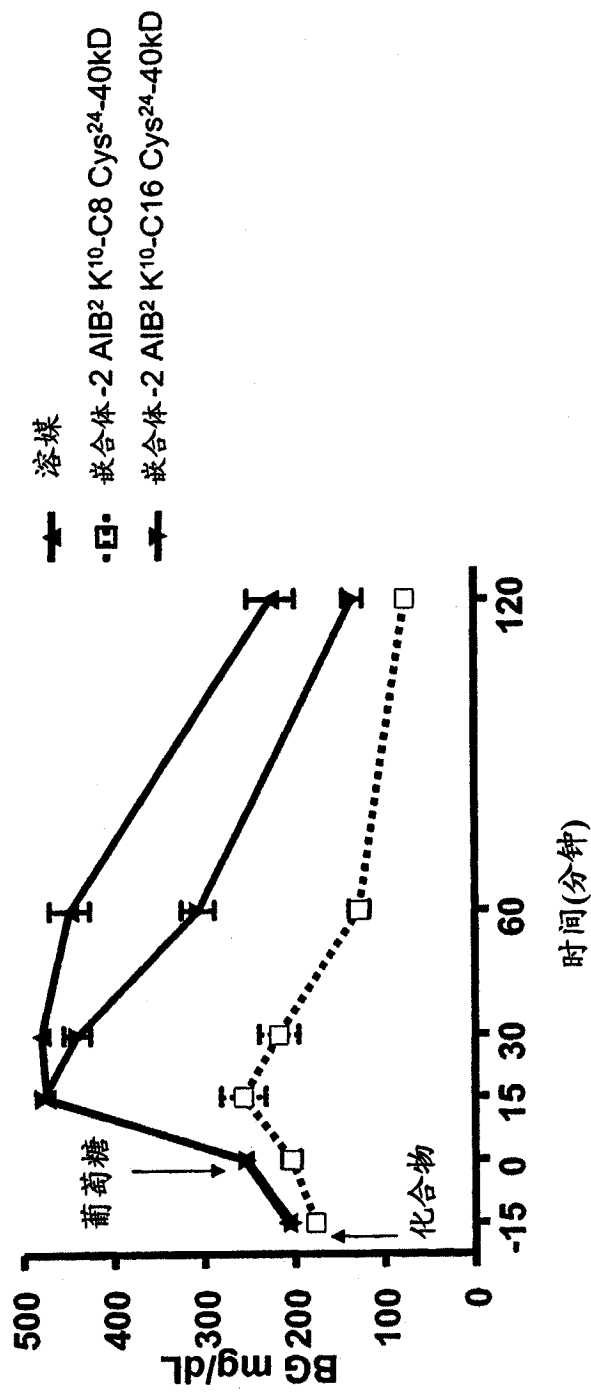


图 16

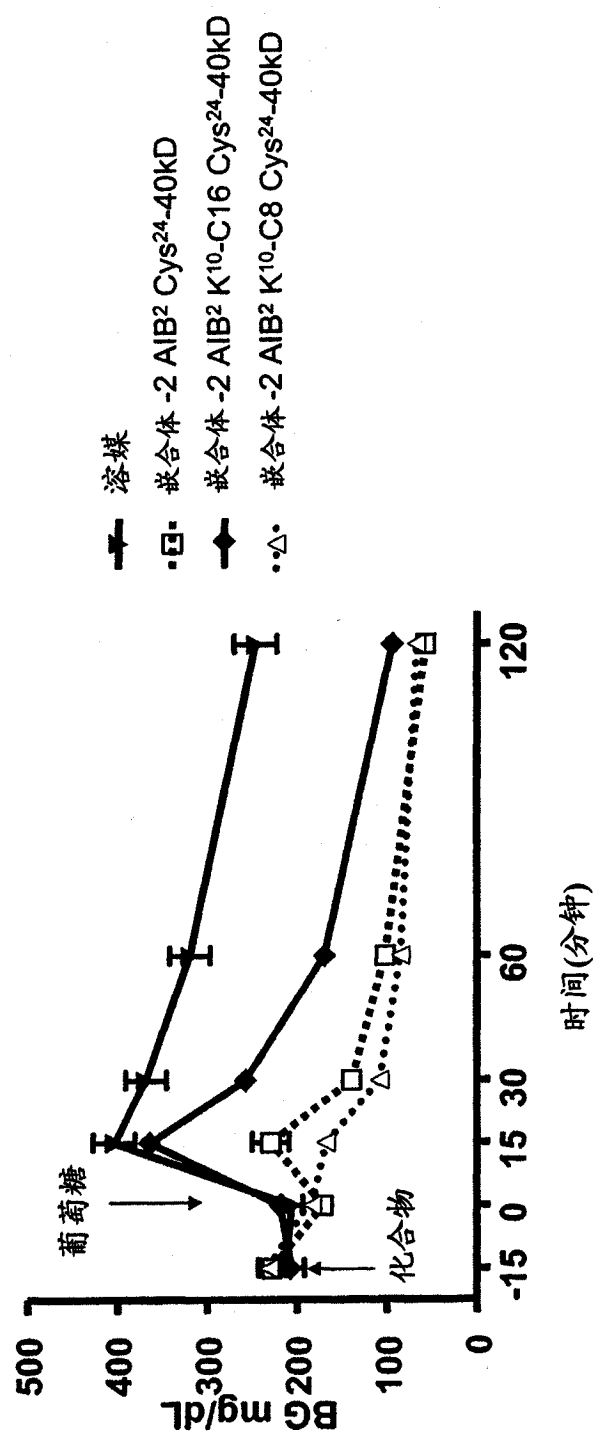


图 17

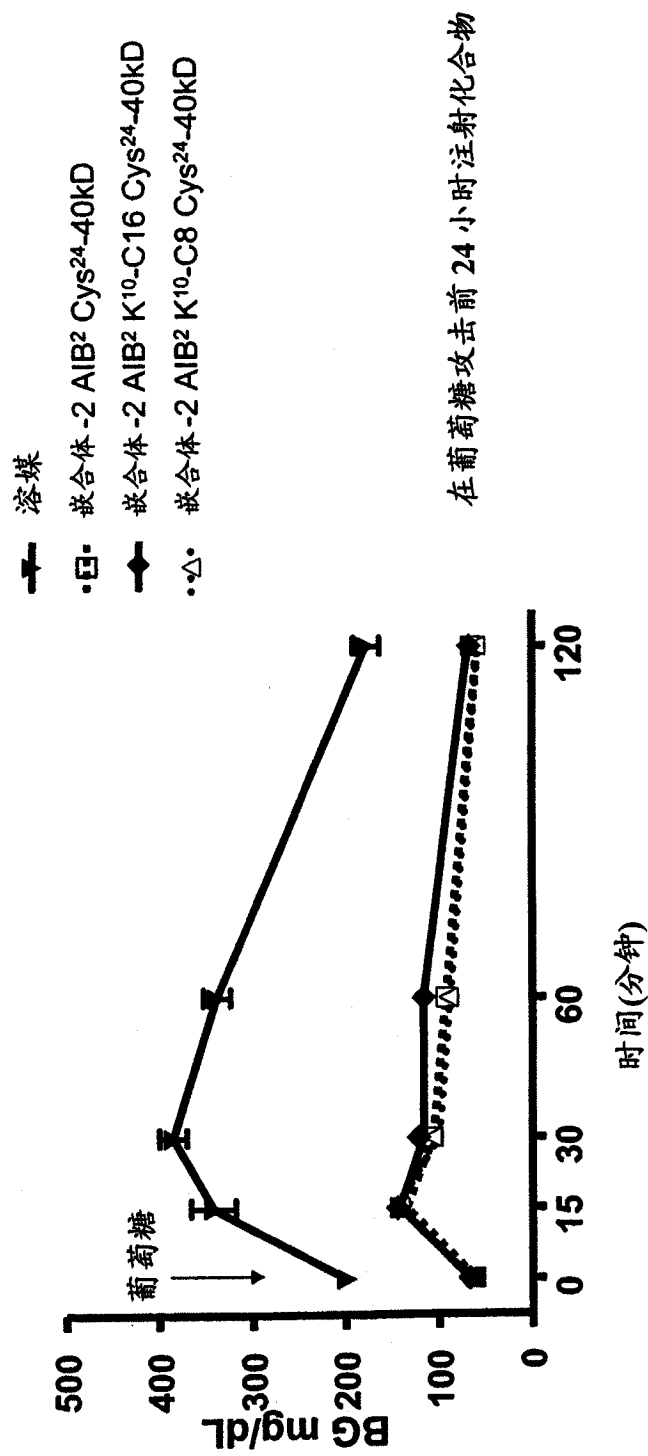


图 18

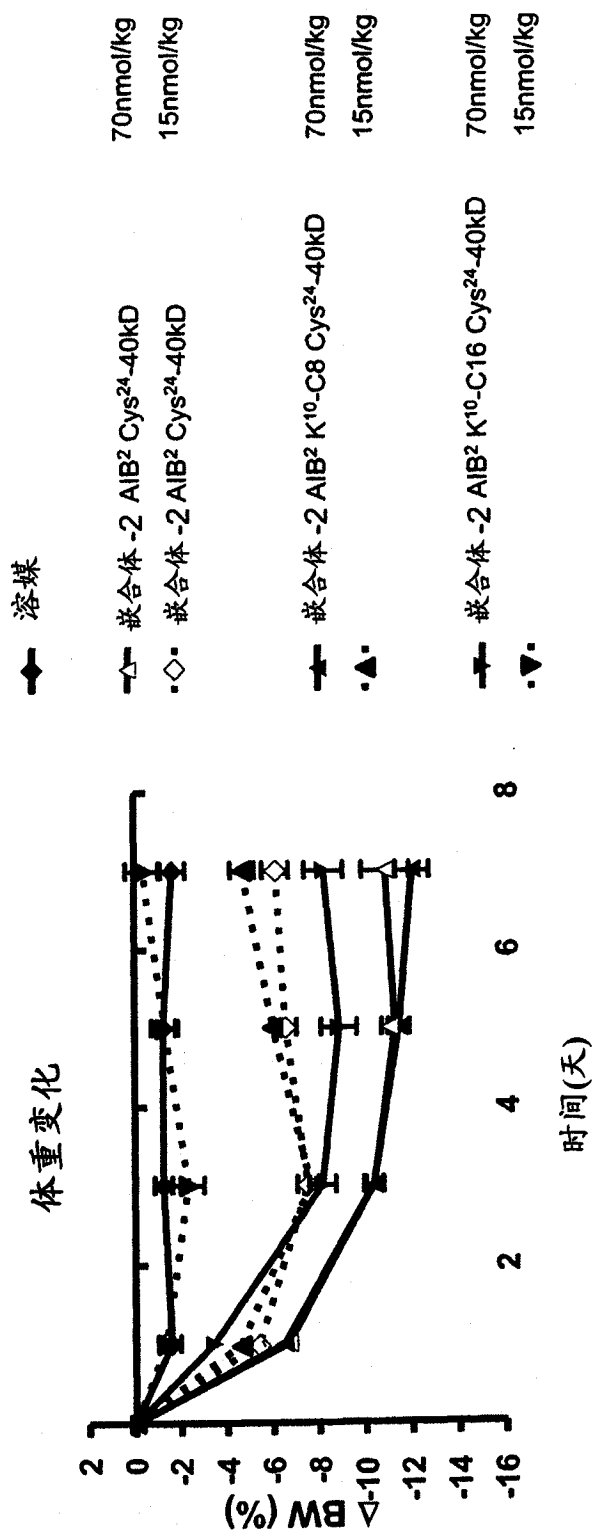


图 19

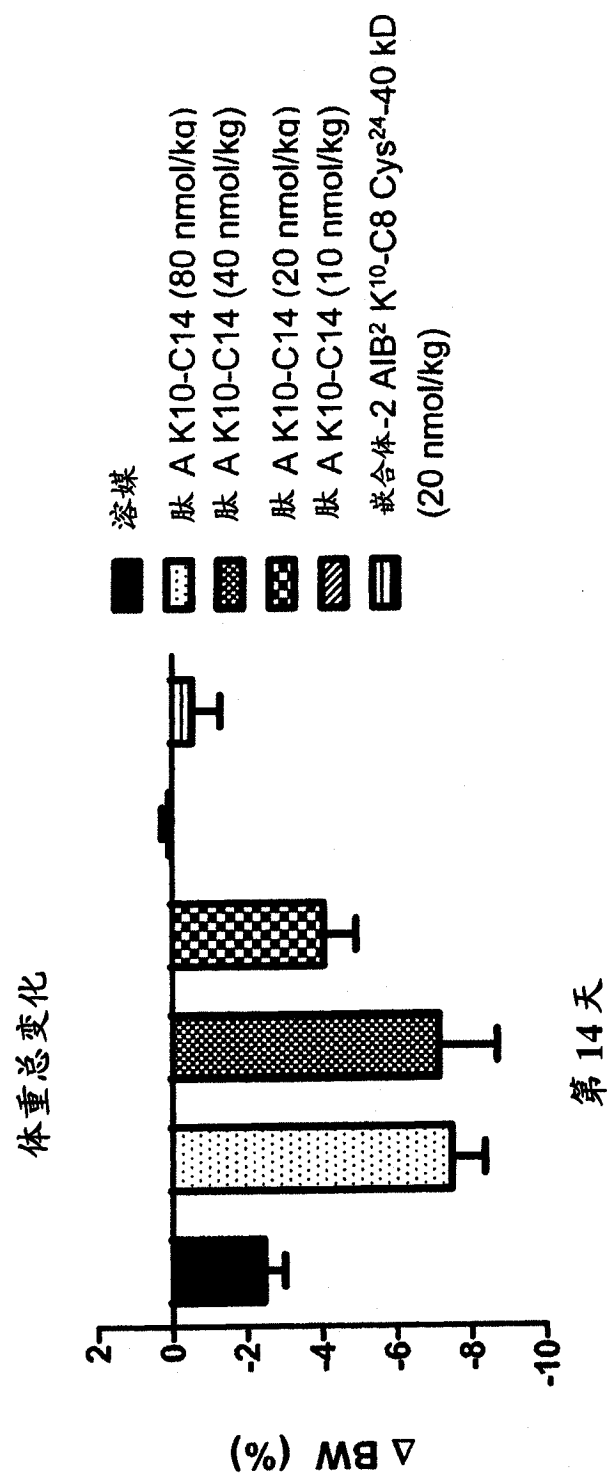


图 20

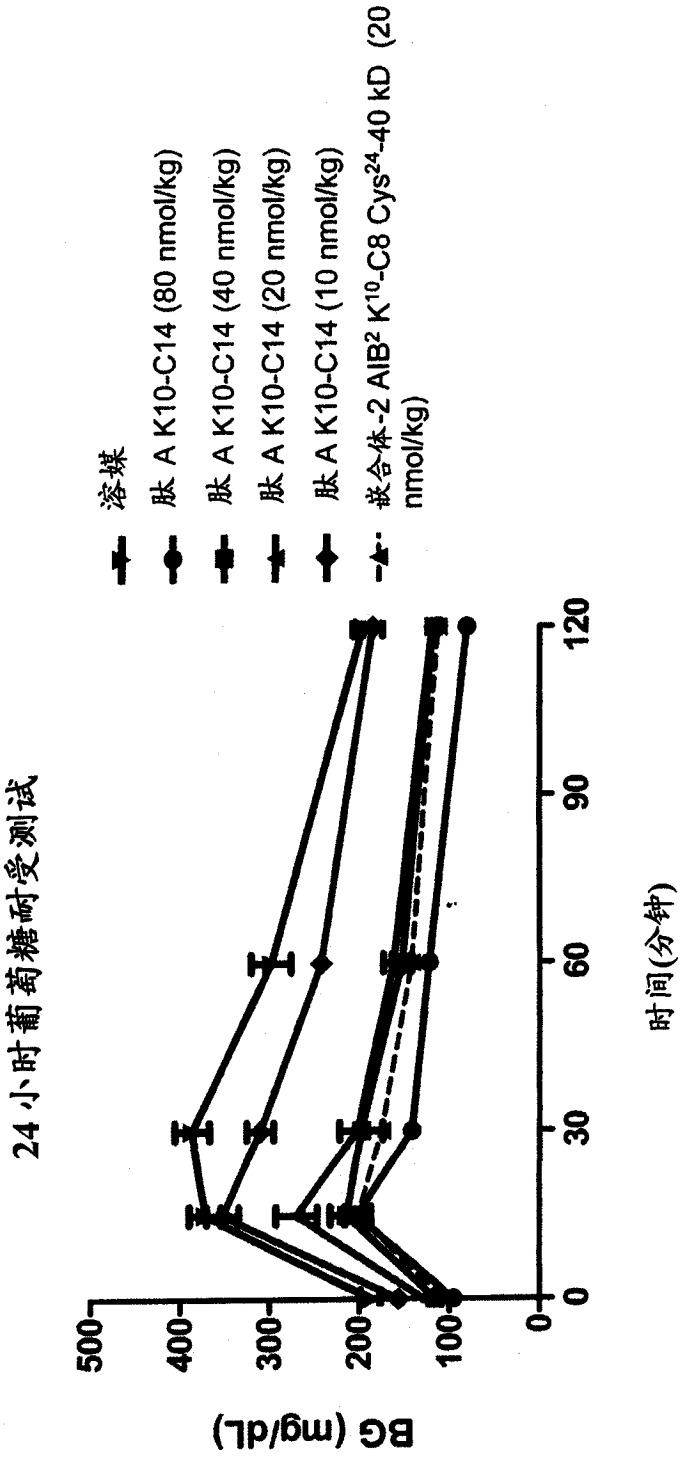


图 21

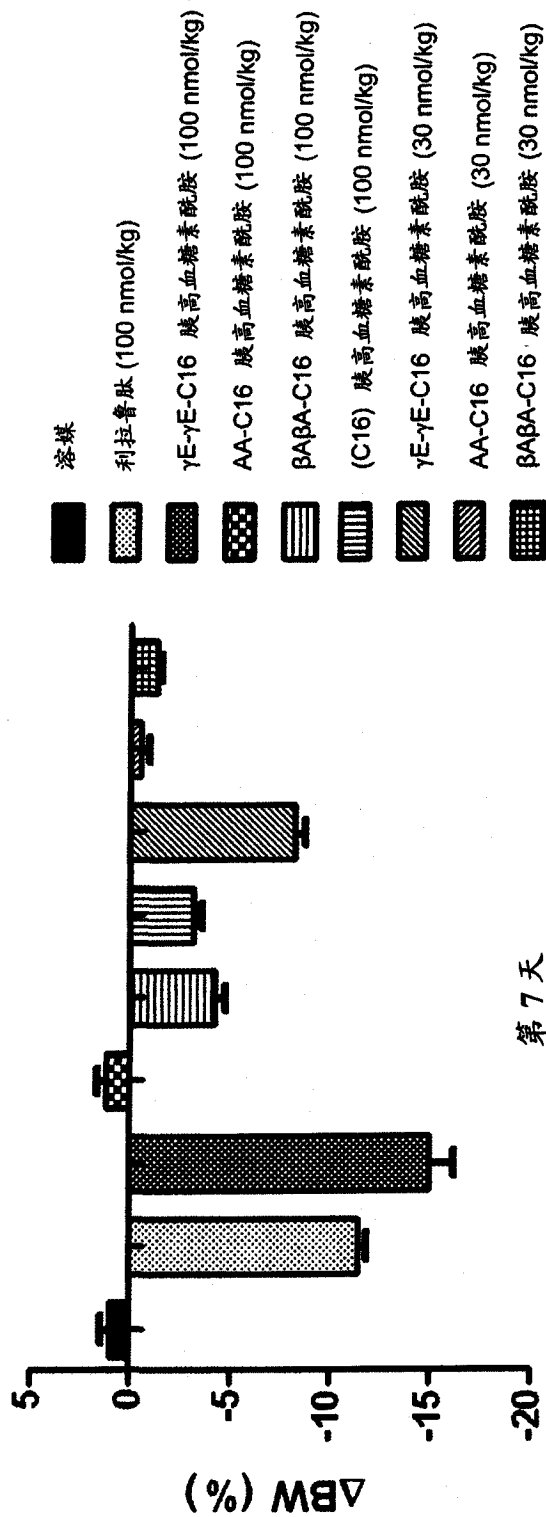


图 22

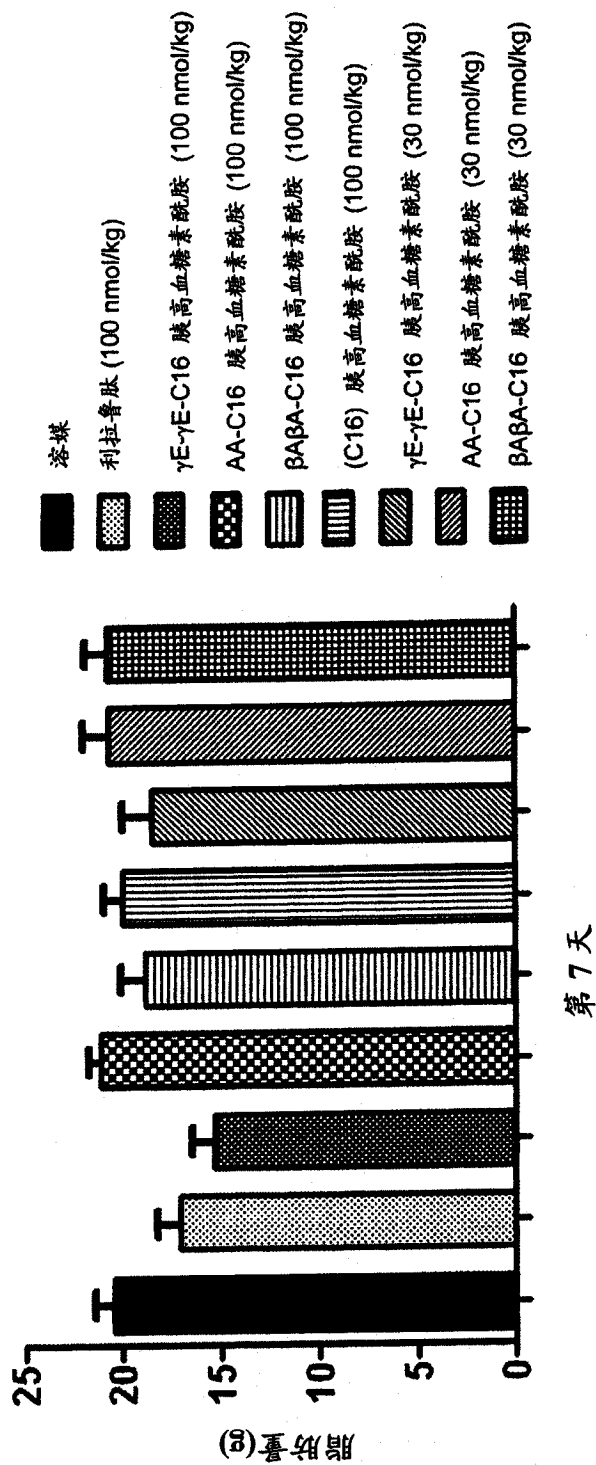


图 23

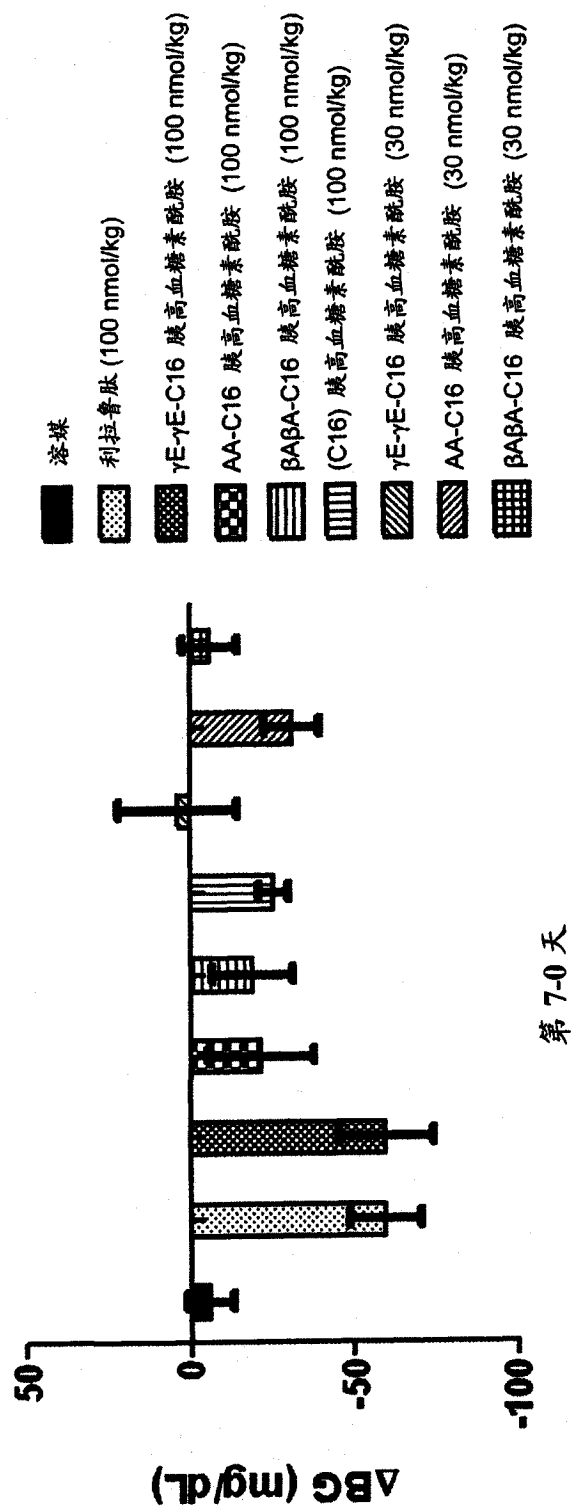


图 24

在 pH5.9 下的 10mM 磷酸盐中 PEG 化肽的 CD 光谱

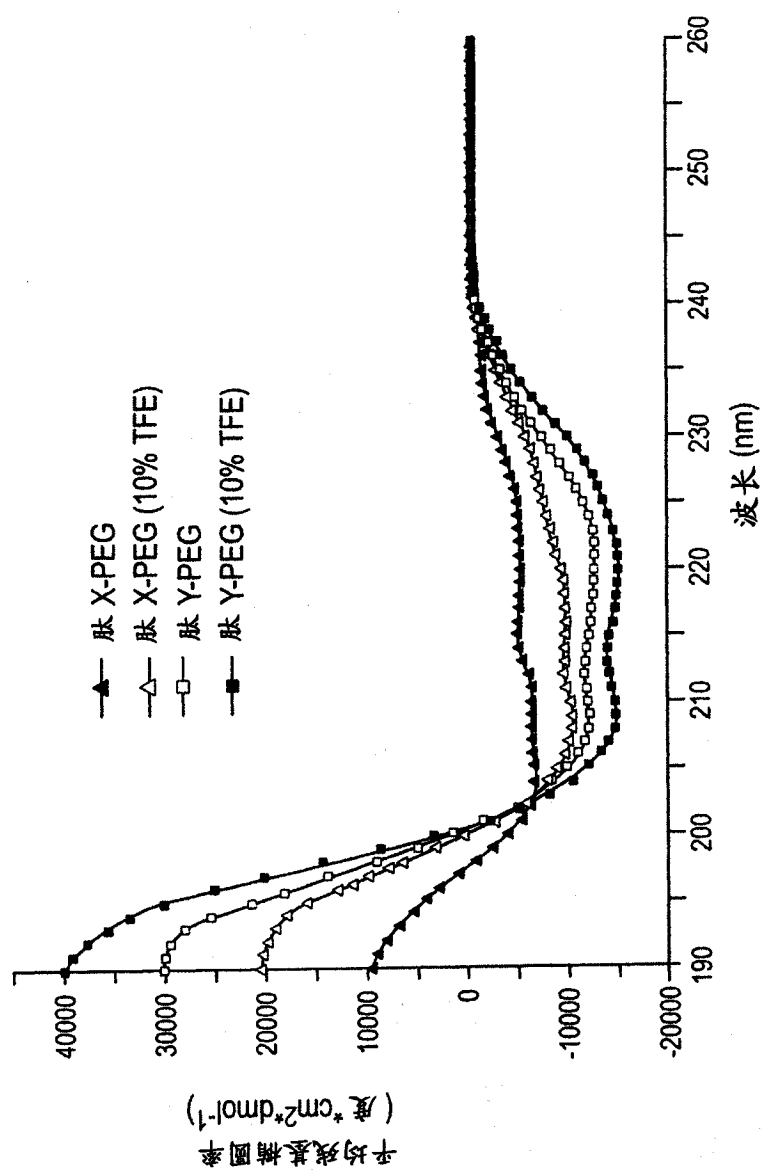


图 25

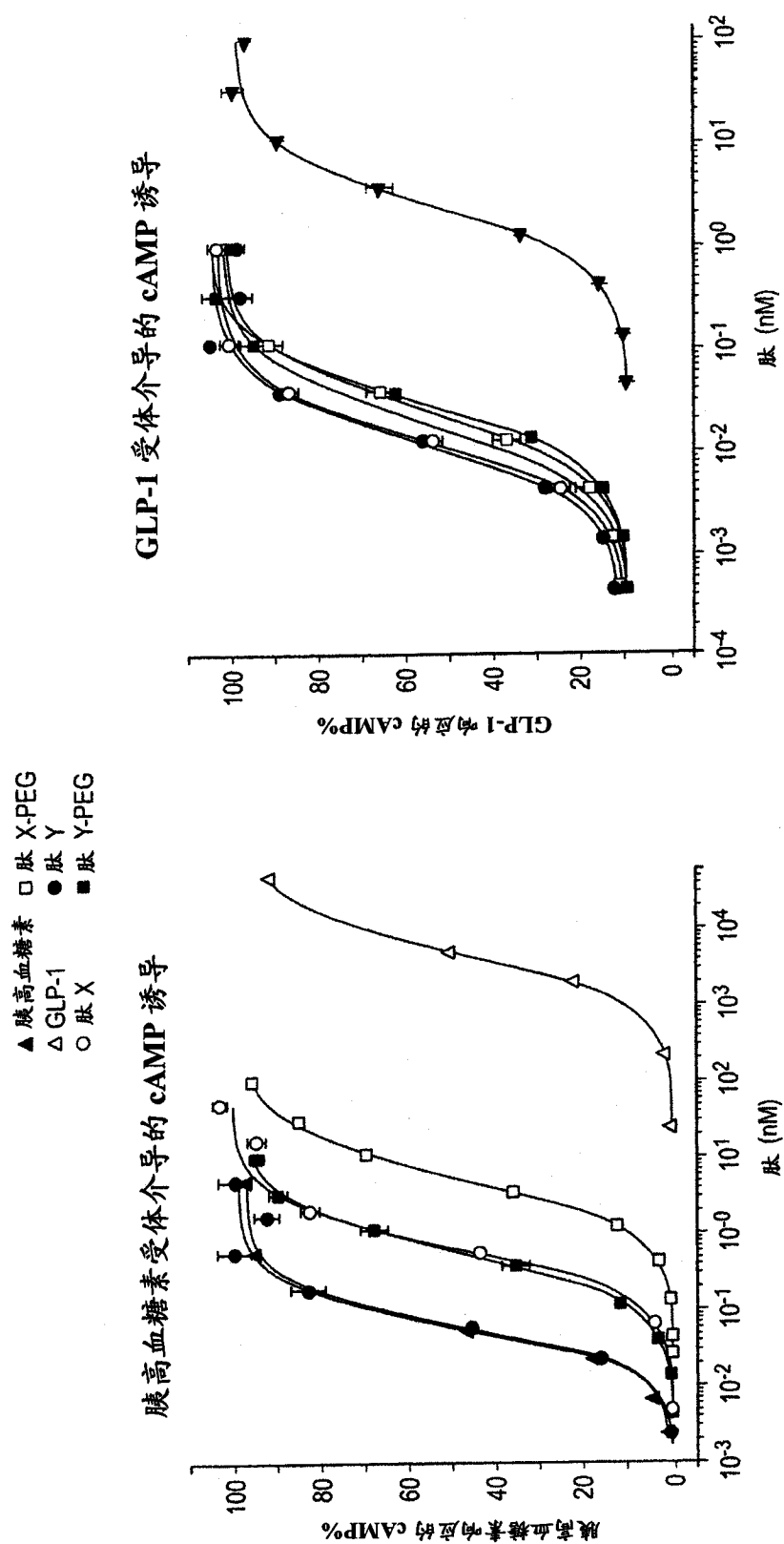


图 26

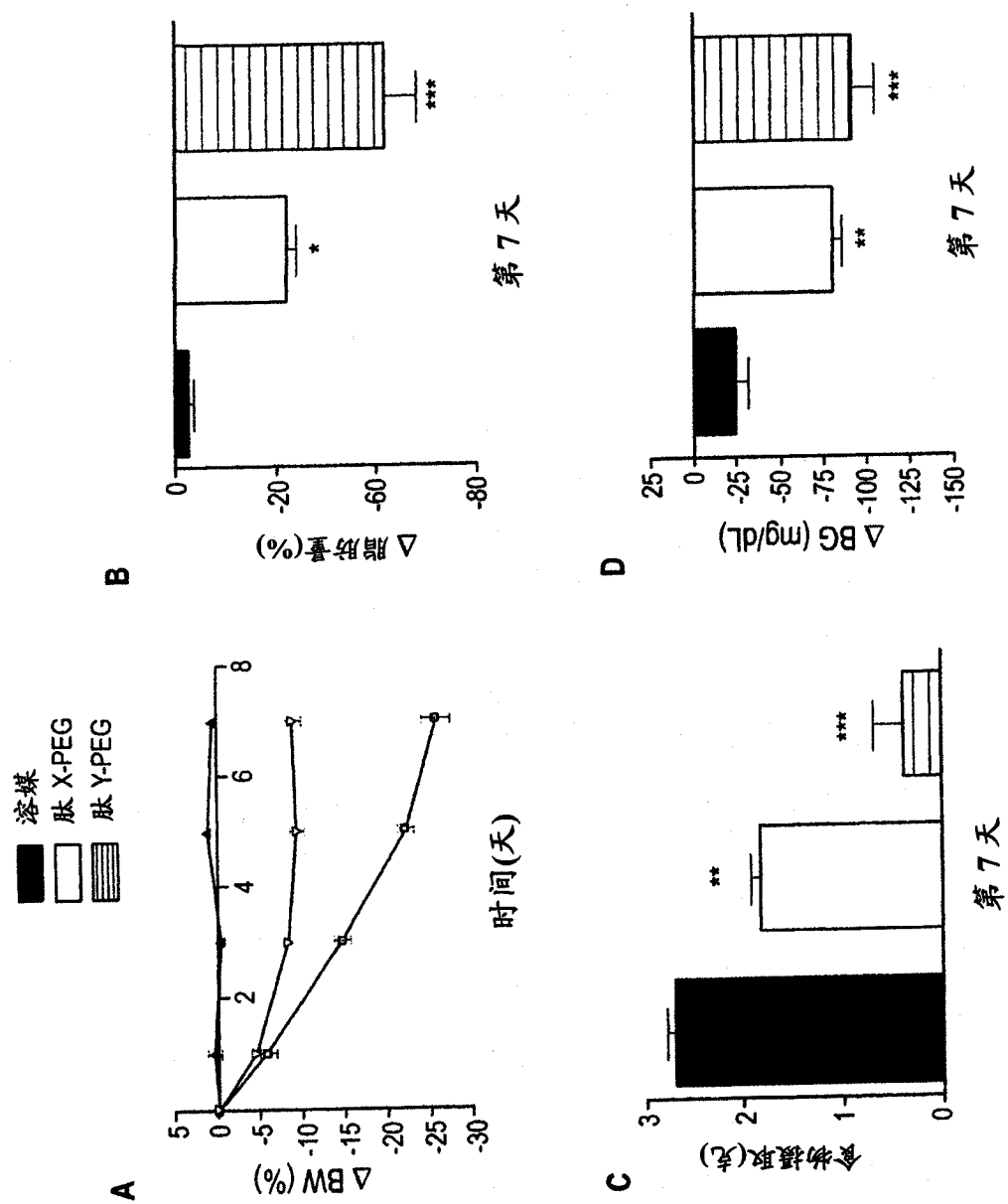


图 27

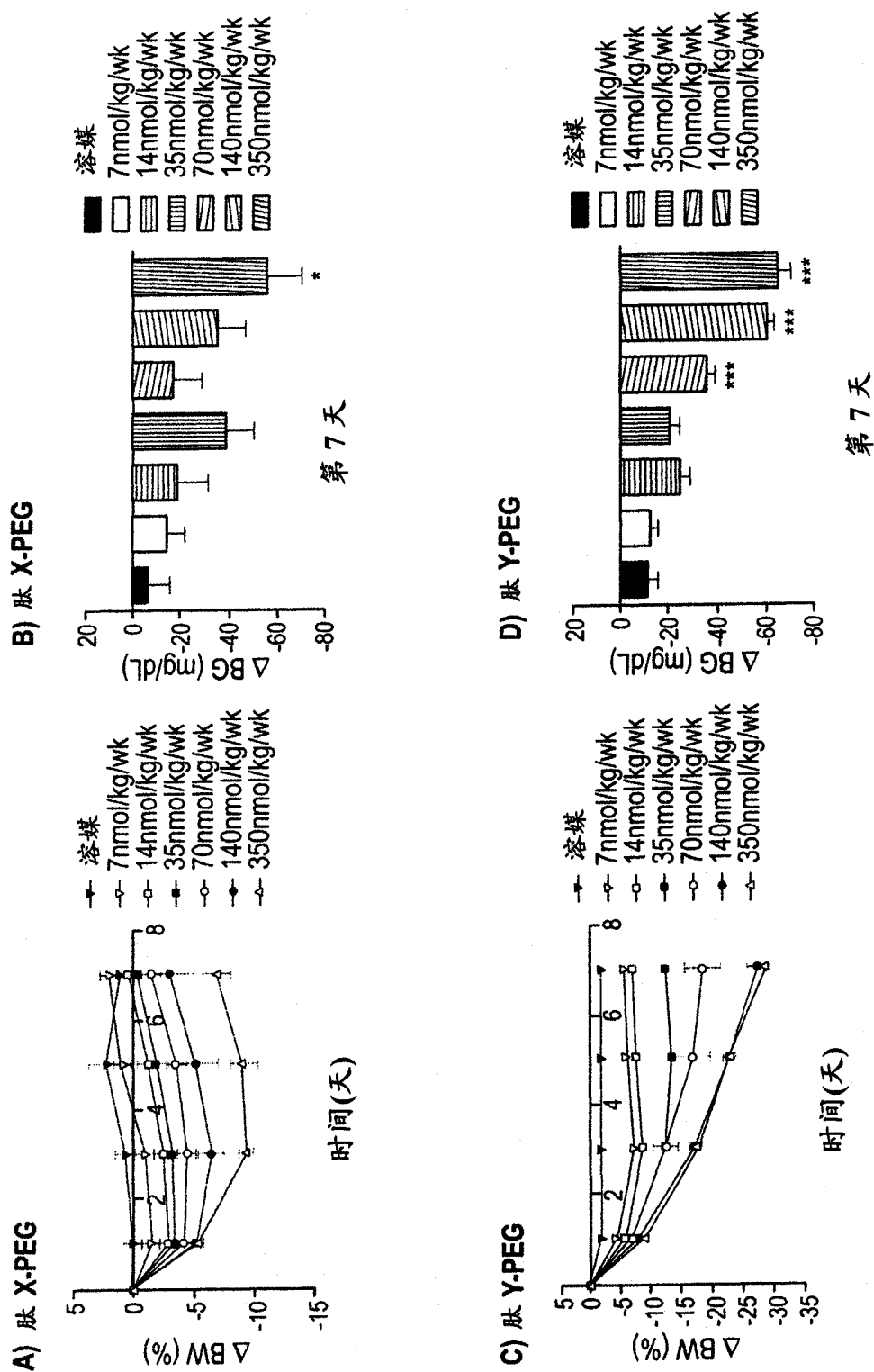


图 28

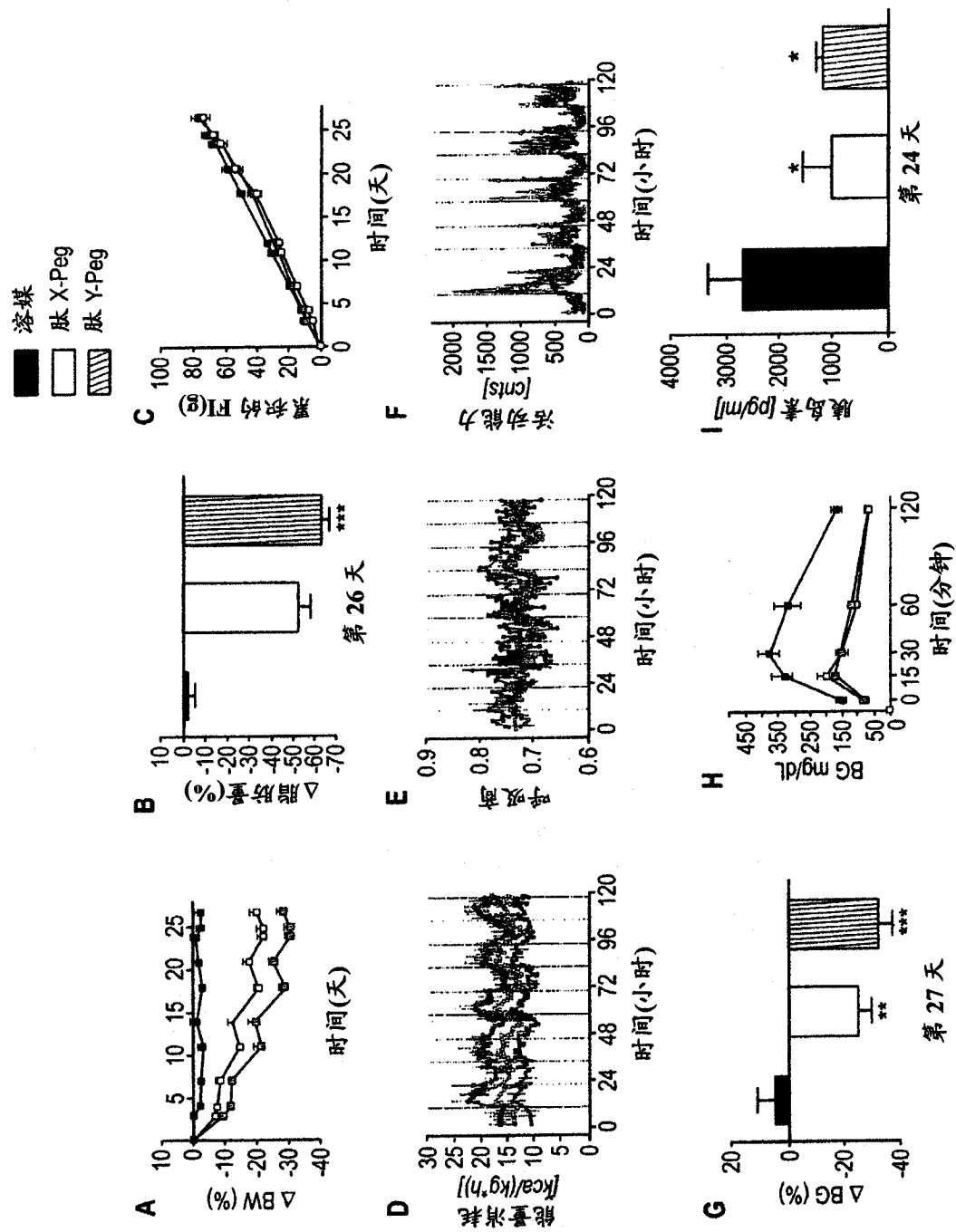


图 29

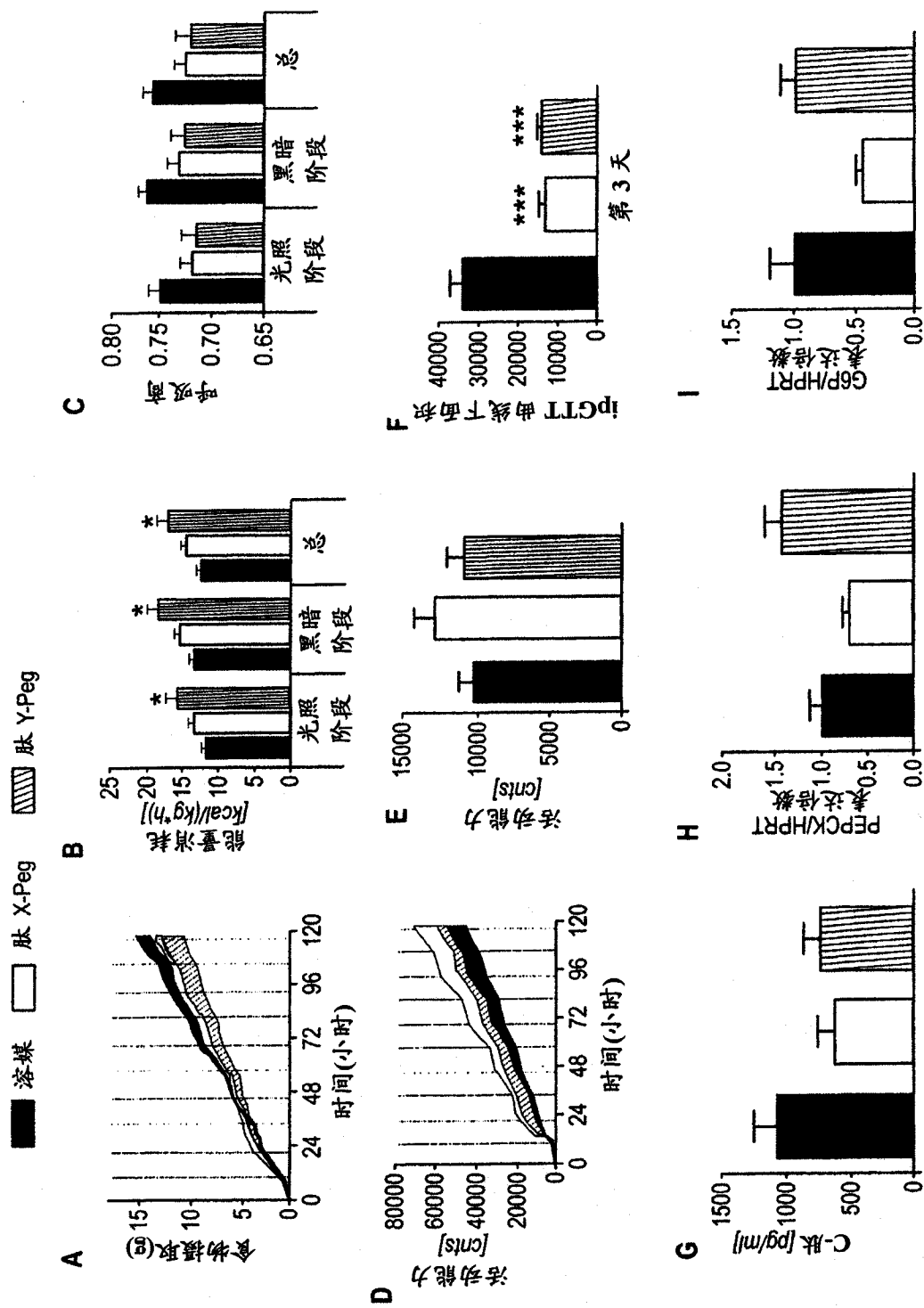


图 30

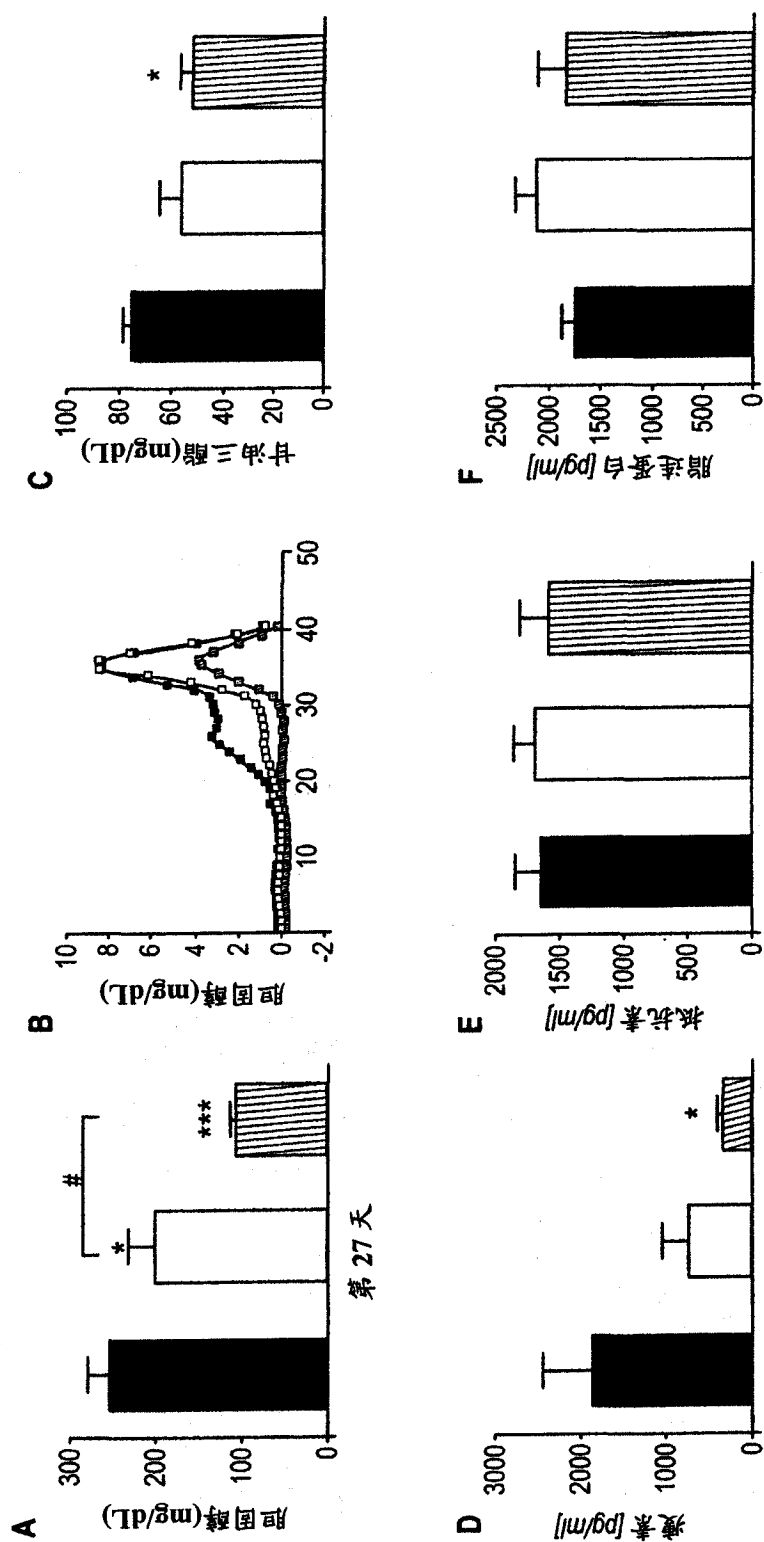


图 31

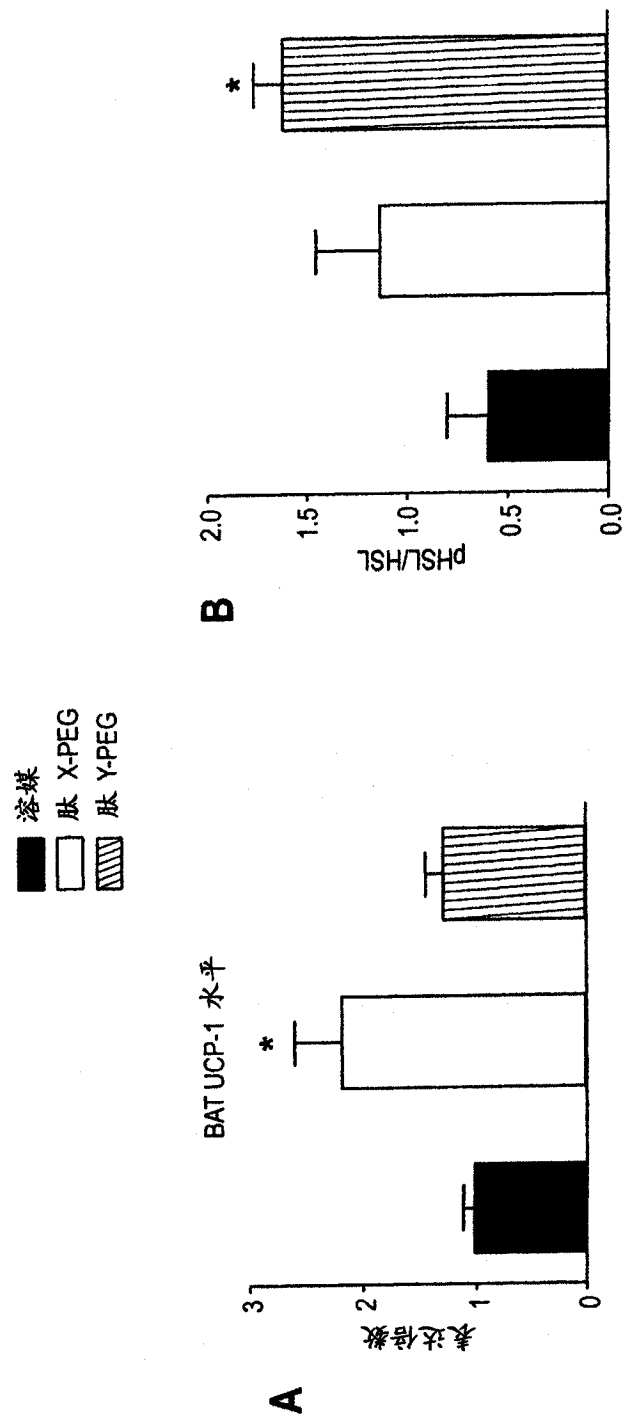


图 32

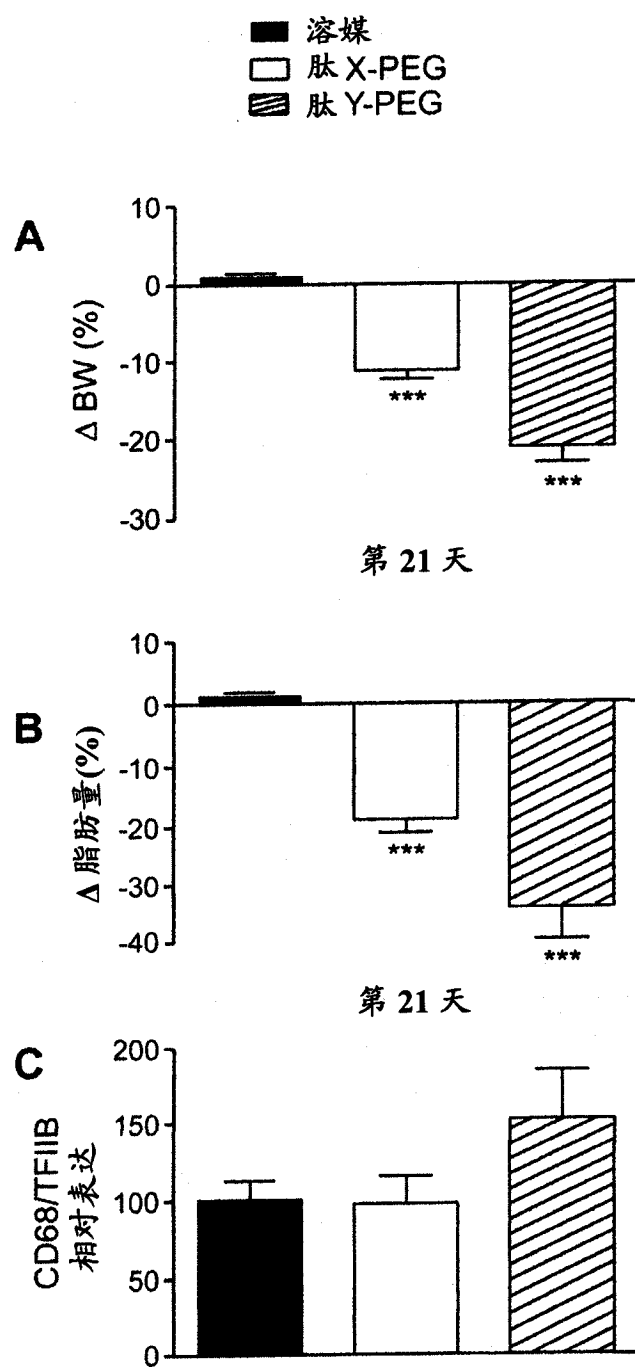


图 33

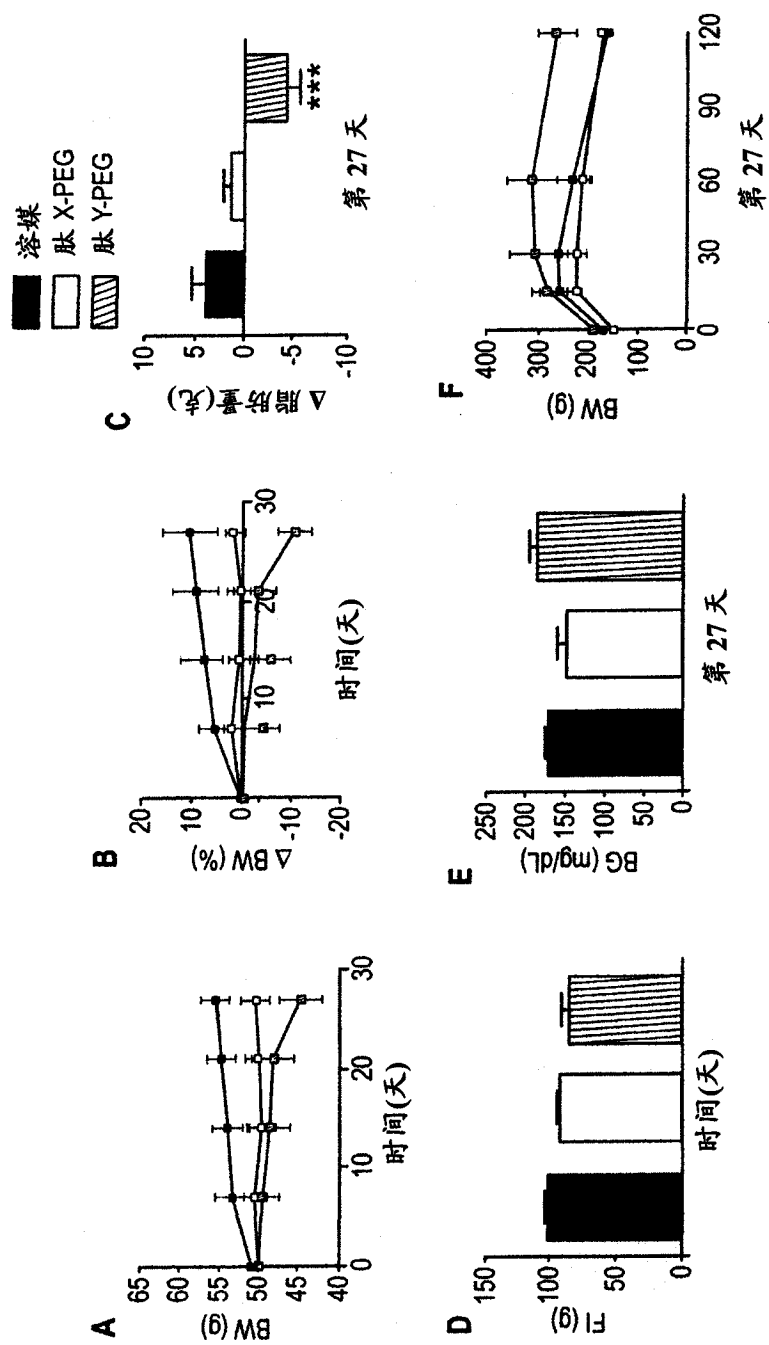


图 34

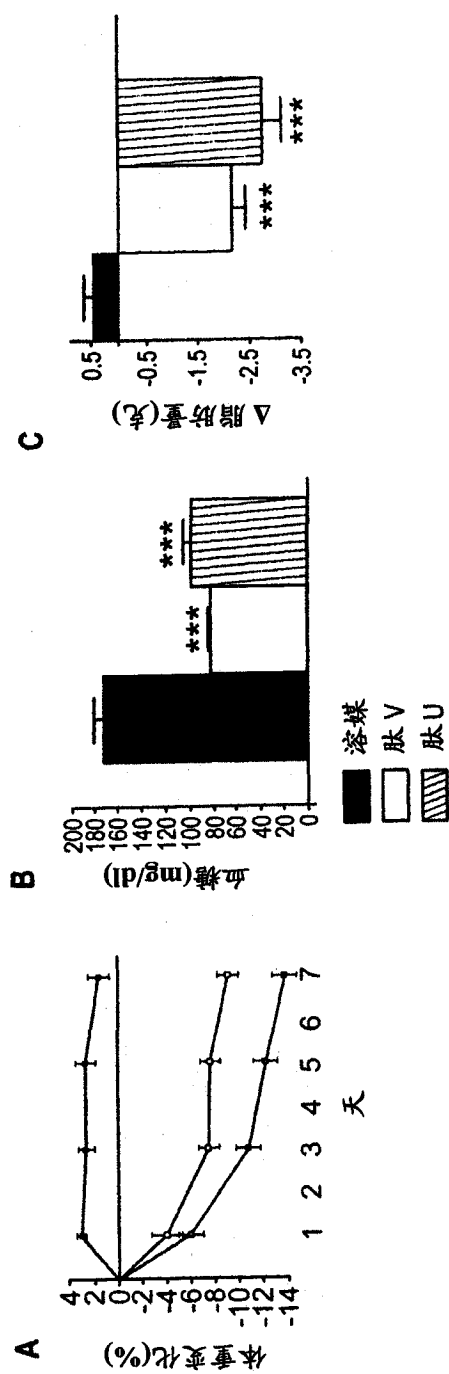


图 35