



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 107735100 B

(45) 授权公告日 2021.11.05

(21) 申请号 201680036771.3 F.A.巴伦苏埃拉
(22) 申请日 2016.06.16 (74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司 72001
(65) 同一申请的已公布的文献号 代理人 翟建伟 万雪松
申请公布号 CN 107735100 A
(43) 申请公布日 2018.02.23 (51) Int.Cl.
(30) 优先权数据 A61K 38/00 (2006.01)
62/182847 2015.06.22 US A61K 38/26 (2006.01)
(85) PCT国际申请进入国家阶段日 C07K 14/605 (2006.01)
2017.12.22 C07K 14/00 (2006.01)
(86) PCT国际申请的申请数据 A61P 3/00 (2006.01)
PCT/US2016/037818 2016.06.16 A61P 1/00 (2006.01)
(87) PCT国际申请的公布数据 (56) 对比文件
W02016/209707 EN 2016.12.29 US 2014/0100156 A1,2014.04.10
WO 2011/094337 A1,2011.08.04
(73) 专利权人 伊莱利利公司 审查员 孙谦
地址 美国印第安纳州
(72) 发明人 Y.陈 A.R.梅佐 H.屈 权利要求书3页 说明书34页
序列表9页

(54) 发明名称
胰高血糖素和GLP-1协同激动剂化合物

(57) 摘要
本发明提供在治疗II型糖尿病、肥胖、非酒精性脂肪肝病 (NAFLD) 和/或非酒精性脂肪性肝炎 (NASH) 中有用的胰高血糖素和GLP-1协同激动剂化合物。

1. 一种下述式的化合物或其药学上可接受的盐:

His-Xaa2-Gln-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Lys-Tyr-Leu-Asp-Glu-Lys-Lys-Ala-Lys-Glu-Phe-Val-Glu-Trp-Leu-Leu-Xaa28-Gly-Gly-Pro-Ser-Ser-Gly

其中

Xaa2是Aib;

Xaa28是Glu或Ser;

20位的Lys通过经由20位的Lys与C14-C24脂肪酸之间的接头而使Lys侧链的 ϵ -氨基与C14-C24脂肪酸缀合从而被化学修饰,其中所述接头是([2-(2-氨基乙氧基)-乙氧基]-乙酰基)₂-(γ -Glu)_t,其中t是1或2;且

C端氨基酸被酰胺化。

2. 根据权利要求1所述的化合物或其药学上可接受的盐,其中Xaa28是Glu。

3. 根据权利要求1所述的化合物或其药学上可接受的盐,其中Xaa28是Ser。

4. 根据权利要求1至3中任一项所述的化合物或其药学上可接受的盐,其中t是1。

5. 根据权利要求1至3中任一项所述的化合物或其药学上可接受的盐,其中t是2。

6. 根据权利要求1至3中任一项所述的化合物或其药学上可接受的盐,其中所述C14-C24脂肪酸是饱和一元酸或饱和二元酸。

7. 根据权利要求6所述的化合物或其药学上可接受的盐,其中脂肪酸是选自肉豆蔻酸(十四烷酸)(C14一元酸)、十四烷二酸(C14二元酸)、棕榈酸(十六烷酸)(C16一元酸)、十六烷二酸(C16二元酸)、十七酸(十七烷酸)(C17一元酸)、十七烷二酸(C17二元酸)、硬脂酸(十八烷酸)(C18一元酸)、十八烷二酸(C18二元酸)、十九酸(十九烷酸)(C19一元酸)、十九烷二酸(C19二元酸)、花生酸(二十烷酸)(C20一元酸)、二十烷二酸(C20二元酸)、二十一酸(二十一烷酸)(C21一元酸)、二十一烷二酸(C21二元酸)、山萘酸(二十二烷酸)(C22)、二十二烷二酸(C22二元酸)、二十四酸(二十四烷酸)(C24一元酸)和二十四烷二酸(C24二元酸)的饱和一元酸或饱和二元酸。

8. 根据权利要求6或7所述的化合物或其药学上可接受的盐,其中所述C14-C24脂肪酸是十八烷二酸。

9. 根据权利要求6或7所述的化合物或其药学上可接受的盐,其中所述C14-C24脂肪酸是二十烷二酸。

10. 根据权利要求1-3和7中任一项所述的化合物或其药学上可接受的盐,其中所述C端氨基酸被酰胺化。

11. 一种药物组合物,其包含根据权利要求1至10中任一项所述的化合物或其药学上可接受的盐,以及药学上可接受的载体、稀释剂或者赋形剂。

12. 权利要求1至10中任一项所述的化合物或其药学上可接受的盐在制备药物中的用途,所述药物用于在需要其的主体中治疗II型糖尿病的方法,其包括对主体施用有效量的根据权利要求1至10中任一项所述的化合物或其药学上可接受的盐。

13. 权利要求1至10中任一项所述的化合物或其药学上可接受的盐在制备药物中的用途,所述药物用于在需要其的主体中治疗肥胖的方法,其包括对主体施用有效量的根据权利要求1至10中任一项所述的化合物或其药学上可接受的盐。

14. 权利要求1至10中任一项所述的化合物或其药学上可接受的盐在制备药物中的用

途,所述药物用于在需要其的主体中治疗非酒精性脂肪肝病 (NAFLD) 的方法,其包括对主体施用有效量的根据权利要求1至10中任一项所述的化合物或其药学上可接受的盐。

15. 权利要求1至10中任一项所述的化合物或其药学上可接受的盐在制备药物中的用途,所述药物用于在需要其的主体中治疗非酒精性脂肪性肝炎 (NASH) 的方法,其包括对主体施用有效量的根据权利要求1至10中任一项所述的化合物或其药学上可接受的盐。

16. 根据权利要求1至10中任一项所述的化合物或其药学上可接受的盐,其用于治疗II型糖尿病。

17. 根据权利要求1至10中任一项所述的化合物或其药学上可接受的盐,其用于治疗肥胖。

18. 根据权利要求1至10中任一项所述的化合物或其药学上可接受的盐,其用于治疗非酒精性脂肪肝病 (NAFLD)。

19. 根据权利要求1至10中任一项所述的化合物或其药学上可接受的盐,其用于非酒精性脂肪性肝炎 (NASH)。

20. 一种中间体化合物或其药学上可接受的盐,其具有下述式:

His-Xaa2-Gln-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Lys-Tyr-Leu-Asp-Glu-Lys-Lys-Ala-Lys-Glu-Phe-Val-Glu-Trp-Leu-Leu-Xaa28-Gly-Gly-Pro-Ser-Ser-Gly

其中

Xaa2是Aib;

Xaa28是Glu或Ser;且

C端氨基酸被酰胺化 (SEQ ID NO: 9)。

21. 根据权利要求20所述的中间体化合物,其中Xaa28是Glu。

22. 根据权利要求20所述的中间体化合物,其中Xaa28是Ser。

23. 一种用于制备下述式的化合物的方法:

His-Xaa2-Gln-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Lys-Tyr-Leu-Asp-Glu-Lys-Lys-Ala-Lys-Glu-Phe-Val-Glu-Trp-Leu-Leu-Xaa28-Gly-Gly-Pro-Ser-Ser-Gly

其中

Xaa2是Aib;

Xaa28是Glu或Ser;

20位的Lys通过经由20位的Lys与C14-C24脂肪酸之间的接头而使Lys侧链的 ϵ -氨基与C14-C24脂肪酸缀合从而被化学修饰,其中所述接头是([2-(2-氨基乙氧基)-乙氧基]-乙酰基)₂-(γ -Glu)_t,其中t是1或2;且

C端氨基酸被酰胺化,

所述方法包括下述步骤:

(i) 通过经由接头而缀合中间体化合物的20位的Lys侧链的 ϵ -氨基与C14-C24脂肪酸,修饰下述式的中间体化合物:

His-Xaa2-Gln-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Lys-Tyr-Leu-Asp-Glu-Lys-Lys-Ala-Lys-Glu-Phe-Val-Glu-Trp-Leu-Leu-Xaa28-Gly-Gly-Pro-Ser-Ser-Gly

其中

Xaa2是Aib;

Xaa28是Glu或Ser；且

C端氨基酸被酰胺化 (SEQ ID NO: 9)；

其中所述接头是 $([2-(2\text{-氨基乙氧基})\text{-乙氧基}]\text{-乙酰基})_2\text{-}(\gamma\text{-Glu})_t$ ，其中t是1或2。

胰高血糖素和GLP-1协同激动剂化合物

[0001] 本发明属于医药领域。更具体地,本发明属于治疗糖尿病和肥胖的领域,并且涉及激动胰高血糖素(Gcg)受体和胰高血糖素样肽-1(GLP-1)受体两者的化合物。具体提供的是泌酸调节肽/胰高血糖素类似物,其具有用于调节Gcg受体和GLP-1受体两者活性而引入的氨基酸修饰。

[0002] 过去数十年,糖尿病的流行率持续上升。II型糖尿病(T2D)是最普遍的糖尿病形式,其贡献了所有糖尿病的约90%。T2D的特征在于由胰岛素耐受性引起的高血糖水平。治疗T2D的现行标准包括节食和锻炼以及可用的口服或可注射的降糖药。尽管如此,许多患T2D的患者仍然得不到充分控制。不受控的糖尿病导致多种病况,其影响患者的发作率和死亡率。糖尿病患者的首要死亡原因是心血管并发症。对于II型糖尿病而言的主要风险因素之一是肥胖。大多数T2D患者(~90%)超重或肥胖。已记录的是,身体肥胖方面的减少将导致包括高血糖和心血管事件在内的肥胖相关的副发作症方面的改善。因此,为更好的疾病管理,需要在血糖控制和体重降低方面有效的治疗。

[0003] 已提出许多源自前胰高血糖素原和其类似物的肽作为用于治疗T2D和肥胖的治疗方法,特别是Gcg、GLP-1和泌酸调节肽(OXM)。前胰高血糖素原是158氨基酸前体多肽,其在组织中被分化处理从而形成多种结构相关的胰高血糖素原衍生肽、包括Gcg、GLP-1、胰高血糖素样肽-2(GLP-2)和泌酸调节肽(OXM)。这些分子涉及宽泛种类的生理功能、包括血糖稳态、胰岛素分泌、胃排空和肠道发育以及食物摄取调节。

[0004] Gcg是29氨基酸肽,其对应于前胰高血糖素原的氨基酸53至81。OXM是37氨基酸肽,并且由具有八肽羧基末端延伸的Gcg的完整29氨基酸序列组成(前胰高血糖素原的氨基酸82至89,并且被称为“插入肽1”或IP-1)。GLP-1的主要生物学活性片段(GLP-1₇₋₃₆)作为30氨基酸的C端酰胺化肽产生,其对应于前胰高血糖素原的氨基酸98至127。

[0005] Gcg通过与肝细胞上的Gcg受体结合而有助于维持血糖水平,这引起肝脏通过肝糖分解而释放以糖原形式储存的葡萄糖。随着这些储存耗尽,Gcg刺激肝脏通过糖异生作用而合成额外的葡萄糖。该葡萄糖被释放至血流中,避免了低血糖的发展。

[0006] GLP-1具有与Gcg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Gcg分泌和抑制食物摄取。GLP-1已显示出在糖尿病中降低高血糖。已批准多种GLP-1激动剂用于治疗人中的T2D,包括艾塞那肽(exenatide)、利拉鲁肽(liraglutide)、利西拉肽(lixisenatide)、阿必鲁肽(albiglutide)和度拉糖肽(dulaglutide)。这样的GLP-1激动剂在血糖控制方面是有效的,其具有在体重方面的有利的效果而没有低血糖的风险。但是,由于剂量依赖的肠胃副作用,体重减少是适度的。

[0007] OXM与营养摄入成比例地与GLP-1一起从小肠的L细胞中释放。OXM活化Gcg和GLP-1受体两者,对于Gcg受体比GLP-1受体具有略微更高的功效。其对于各自受体与天然Gcg和GLP-1相比功效更低。人Gcg也能够活化两种受体,尽管存在对于Gcg受体比对于GLP-1受体更强的优选性。GLP-1不能活化Gcg受体。OXM涉及食物摄取和体重的调节。已在人中显示出压抑食欲且抑制食物摄取。在对超重和肥胖主体的4周的研究中,每日三次餐前皮下施用OXM与安慰剂组中的0.5 kg相比产生了2.3 kg的减重。在该试验中,与基于GLP-1的治疗(例

如艾塞那肽和利拉鲁肽) 相关的最常见的副作用, 即恶心的频率更低。在另一个更短的研究中, OXM在超重和肥胖主体中显示出降低的热量摄取并增加了与活动相关的能量消耗。

[0008] 这些数据表明, OXM具有成为耐受良好的抗糖尿病/肥胖药的潜力。但是, OXM对于开发为可商业化的治疗剂而言呈现许多挑战。内源性OXM通过二肽基肽酶IV和其他肽酶而在体内快速降解, 并且由于其小尺寸而经受快速肾清除。因此, 期望确定活化Gcg和GLP-1受体且具有改善的代谢稳定性和降低的清除率的肽。

[0009] 现有技术中, 公开了具有氨基酸取代以改善稳定性且具有额外的修饰, 例如聚乙二醇化或脂化以减缓清除的OXM肽。还陈述了其他肽以结合并活化Gcg受体和GLP-1受体两者, 并且压抑体重增重(参见例如WO 2011/075393 A2和WO 2012/177444 A2)。

[0010] 除了可获得激动Gcg和GLP-1受体两者的多种肽之外, 还存在对更高效、稳定、长效和/或耐受良好的化合物的需求, 所述化合物具有已优化的Gcg受体(Gcg-R)/GLP-1受体(GLP-1-R)活性比率, 以使得化合物的功效和促胰岛素活性提供对于糖尿病, 优选T2D和相关病症的有效治疗。具体地, 还存在对减少体重的具有平衡的Gcg-R/GLP-1-R协同激动剂活性比率的化合物的需求。并且, 还存在提供支持潜在的对人每日、每两周、每周或每月给药的具有平衡的Gcg-R/GLP-1-R协同激动剂活性比率的化合物的需求。相应地, 本发明寻求提供对于糖尿病、肥胖、非酒精性脂肪肝病(NAFLD)和/或非酒精性脂肪性肝炎(NASH)的有效治疗。

[0011] 在一个方面中, 本发明提供下述式的化合物或其药学上可接受的盐:

[0012] His-Xaa2-Gln-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Lys-Tyr-Leu-Asp-Glu-Lys-Lys-Ala-Lys-Glu-Phe-Val-Glu-Trp-Leu-Leu-Xaa28-Gly-Gly-Pro-Ser-Ser-Gly

[0013] 其中

[0014] Xaa2是Aib;

[0015] Xaa28是Glu或Ser;

[0016] 20位的Lys通过经由(i)直接键或(ii)20位的Lys与C14-C24脂肪酸之间的接头而使Lys侧链的 ϵ -氨基与C14-C24脂肪酸缀合从而被化学修饰; 且

[0017] C端氨基酸任选被酰胺化(SEQ ID NO: 2)。

[0018] 在另一个方面中, 本发明提供下述式的化合物或其药学上可接受的盐:

[0019] His-Xaa2-Gln-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Lys-Tyr-Leu-Asp-Glu-Lys-Lys-Ala-Lys-Glu-Phe-Val-Glu-Trp-Leu-Leu-Glu-Gly-Gly-Pro-Ser-Ser-Gly

[0020] 其中

[0021] Xaa2是Aib;

[0022] 20位的Lys通过经由(i)直接键或(ii)20位的Lys与C14-C24脂肪酸之间的接头而使Lys侧链的 ϵ -氨基与C14-C24脂肪酸缀合从而被化学修饰; 且

[0023] C端氨基酸任选被酰胺化(SEQ ID NO: 3)。

[0024] 在又一个方面中, 本发明提供下述式的化合物或其药学上可接受的盐:

[0025] His-Xaa2-Gln-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Lys-Tyr-Leu-Asp-Glu-Lys-Lys-Ala-Lys-Glu-Phe-Val-Glu-Trp-Leu-Leu-Ser-Gly-Gly-Pro-Ser-Ser-Gly

[0026] 其中

[0027] Xaa2是Aib;

[0028] 20位的Lys通过经由(i)直接键或(ii)20位的Lys与C14-C24脂肪酸之间的接头而使Lys侧链的 ϵ -氨基与C14-C24脂肪酸缀合从而被化学修饰;且

[0029] C端氨基酸任选被酰胺化(SEQ ID NO: 4)。

[0030] 在本发明的化合物或其药学上可接受的盐的一个优选的方面中,20位的Lys通过经由20位的Lys与C14-C24脂肪酸之间的接头而与C14-C24脂肪酸缀合从而被化学修饰。

[0031] 进一步优选地,接头选自:

[0032] (a) 式I的氨基聚乙二醇羧酸盐:

[0033] $H-\{NH-CH_2-CH_2-[O-CH_2-CH_2]_m-O-(CH_2)_p-CO\}_n-OH$ (I)

[0034] 其中m是1至12的任意整数,n是1至12的任意整数,且p是1或2;

[0035] (b) 选自精氨酸(Arg)、天冬酰胺(Asn)、天冬氨酸(Asp)、谷氨酰胺(Gln)、谷氨酸(Glu)、组氨酸(His)、赖氨酸(Lys)、丝氨酸(Ser)、苏氨酸(Thr)、瓜氨酸(Cit)、鸟氨酸(Orn)、肌氨酸(Sar)、甘氨酸(Gly)、 γ -氨基丁酸(γ -Abu)和 γ -谷氨酸(γ -Glu)的氨基酸;

[0036] (c) 选自Ala-Ala、 β -Ala- β -Ala、Glu-Glu、Gly-Gly、Leu-Leu、Ser-Ser、Thr-Thr、 γ -Glu- γ -Glu、Glu- γ -Glu、 γ -Glu-Glu、 γ -Abu- γ -Abu、6-氨基己酸-6-氨基己酸、5-氨基戊酸-5-氨基戊酸、7-氨基庚酸-7-氨基庚酸和8-氨基辛酸-8-氨基辛酸的二肽;

[0037] (d) 选自Ala-Ala-Ala、 β -Ala- β -Ala- β -Ala、Glu-Glu-Glu、 γ -Glu- γ -Glu- γ -Glu、Glu- γ -Glu- γ -Glu、 γ -Glu- γ -Glu-Glu、 γ -Glu-Glu- γ -Glu、Gly-Gly-Gly、Gly-Gly-Gly-Ser、Ser-Gly-Gly、Gly-Ser-Gly、Gly-Gly-Glu、Glu-Gly-Gly、Gly-Glu-Gly、Gly-Gly- γ -Glu、 γ -Glu-Gly-Gly、Gly- γ -Glu-Gly、Leu-Leu-Leu和 γ -Abu- γ -Abu- γ -Abu的三肽;

[0038] (e) 选自(Gly-Gly-Ser)_q(Gly-Gly-Gly-Ser)_r和(Gly-Gly-Gly-Gly-Ser)_r、(6-氨基己酸)_s、(5-氨基戊酸)_s、(7-氨基庚酸)_s和(8-氨基辛酸)_s的多肽,其中q是2至5的任意整数,r是1至3的任意整数,且s是4至15的任意整数;和

[0039] (f) 缀合接头,其中如(a)中定义的式I的氨基聚乙二醇羧酸盐与下述缀合:

[0040] (i) 选自Arg、Asn、Asp、Gln、Glu、His、Lys、Ser、Thr、Cit、Orn、Sar、Gly、 γ -Abu和 γ -Glu的氨基酸;

[0041] (ii) 选自Ala-Ala、 β -Ala- β -Ala、Glu-Glu、Gly-Gly、Leu-Leu、Ser-Ser、Thr-Thr、 γ -Glu- γ -Glu、Glu- γ -Glu、 γ -Glu-Glu、 γ -Abu- γ -Abu、6-氨基己酸-6-氨基己酸、5-氨基戊酸-5-氨基戊酸、7-氨基庚酸-7-氨基庚酸和8-氨基辛酸-8-氨基辛酸的二肽;

[0042] (iii) 选自Ala-Ala-Ala、 β -Ala- β -Ala- β -Ala、Glu-Glu-Glu、 γ -Glu- γ -Glu- γ -Glu、Glu- γ -Glu- γ -Glu、 γ -Glu- γ -Glu-Glu、 γ -Glu-Glu- γ -Glu、Gly-Gly-Gly、Gly-Gly-Gly-Ser、Ser-Gly-Gly、Gly-Ser-Gly、Gly-Gly-Glu、Glu-Gly-Gly、Gly-Glu-Gly、Gly-Gly- γ -Glu、 γ -Glu-Gly-Gly、Gly- γ -Glu-Gly、Leu-Leu-Leu和 γ -Abu- γ -Abu- γ -Abu的三肽;或

[0043] (iv) 选自(Gly-Gly-Ser)_q(Gly-Gly-Gly-Ser)_r和(Gly-Gly-Gly-Gly-Ser)_r、(6-氨基己酸)_s、(5-氨基戊酸)_s、(7-氨基庚酸)_s和(8-氨基辛酸)_s的多肽,其中q是2至5的任意整数,r是1至3的任意整数,且s是4至15的任意整数。

[0044] 在本发明的化合物或其药学上可接受的盐的一个优选的方面中,接头是式I的氨基聚乙二醇羧酸盐:

[0045] $H-\{NH-CH_2-CH_2-[O-CH_2-CH_2]_m-O-(CH_2)_p-CO\}_n-OH$ (I)

[0046] 其中m是1至12的任意整数,n是1至12的任意整数,且p是1或2。

[0047] 优选地,对于式I的氨基聚乙二醇羧酸盐,n是1、2、3、4、5或6,且m是1,且p是1。

[0048] 进一步优选地,对于式I的氨基聚乙二醇羧酸盐,n是2,m是1,且p是1。

[0049] 在本发明的化合物或其药学上可接受的盐的一个进一步优选的方面中,接头是选自Arg、Asn、Asp、Gln、Glu、His、Lys、Ser、Thr、Cit、Orn、Sar、Gly、 γ -Abu和 γ -Glu的氨基酸。

[0050] 优选地,氨基酸是 γ -Glu。

[0051] 在本发明的化合物或其药学上可接受的盐的一个进一步优选的方面中,接头是选自Ala-Ala、 β -Ala- β -Ala、Glu-Glu、Gly-Gly、Leu-Leu、Ser-Ser、Thr-Thr、 γ -Glu- γ -Glu、Glu- γ -Glu、 γ -Glu-Glu、 γ -Abu- γ -Abu、6-氨基己酸-6-氨基己酸、5-氨基戊酸-5-氨基戊酸、7-氨基庚酸-7-氨基庚酸和8-氨基辛酸-8-氨基辛酸的二肽。

[0052] 优选地,二肽是 γ -Glu- γ -Glu。

[0053] 在本发明的化合物或其药学上可接受的盐的一个还进一步优选的方面中,接头是选自Ala-Ala-Ala、 β -Ala- β -Ala- β -Ala、Glu-Glu-Glu、 γ -Glu- γ -Glu- γ -Glu、Glu- γ -Glu- γ -Glu、 γ -Glu- γ -Glu-Glu、 γ -Glu-Glu- γ -Glu、Gly-Gly-Gly、Gly-Gly-Ser、Ser-Gly-Gly、Gly-Ser-Gly、Gly-Gly-Glu、Glu-Gly-Gly、Gly-Glu-Gly、Gly-Gly- γ -Glu、 γ -Glu-Gly-Gly、Gly- γ -Glu-Gly、Leu-Leu-Leu和 γ -Abu- γ -Abu- γ -Abu的三肽。

[0054] 在本发明的化合物或其药学上可接受的盐的一个还进一步优选的方面中,接头是选自(Gly-Gly-Ser)_q(Gly-Gly-Gly-Ser)_r和(Gly-Gly-Gly-Gly-Ser)_r、(6-氨基己酸)_s、(5-氨基戊酸)_s、(7-氨基庚酸)_s和(8-氨基辛酸)_s的多肽,其中q是2至5的任意整数,r是1至3的任意整数,且s是4至15的任意整数。

[0055] 在本发明的化合物或其药学上可接受的盐的一个还进一步优选的方面中,接头是缀合接头,其中式I的氨基聚乙二醇羧酸盐



[0057] 其中m是1至12的任意整数,n是1至12的任意整数,且p是1或2;

[0058] 与下述缀合:

[0059] (i) 选自Arg、Asn、Asp、Gln、Glu、His、Lys、Ser、Thr、Cit、Orn、Sar、Gly、 γ -Abu和 γ -Glu的氨基酸;

[0060] (ii) 选自Ala-Ala、 β -Ala- β -Ala、Glu-Glu、Gly-Gly、Leu-Leu、Ser-Ser、Thr-Thr、 γ -Glu- γ -Glu、Glu- γ -Glu、 γ -Glu-Glu、 γ -Abu- γ -Abu、6-氨基己酸-6-氨基己酸、5-氨基戊酸-5-氨基戊酸、7-氨基庚酸-7-氨基庚酸和8-氨基辛酸-8-氨基辛酸的二肽;

[0061] (iii) 选自Ala-Ala-Ala、 β -Ala- β -Ala- β -Ala、Glu-Glu-Glu、 γ -Glu- γ -Glu- γ -Glu、Glu- γ -Glu- γ -Glu、 γ -Glu- γ -Glu-Glu、 γ -Glu-Glu- γ -Glu、Gly-Gly-Gly、Gly-Gly-Ser、Ser-Gly-Gly、Gly-Ser-Gly、Gly-Gly-Glu、Glu-Gly-Gly、Gly-Glu-Gly、Gly-Gly- γ -Glu、 γ -Glu-Gly-Gly、Gly- γ -Glu-Gly、Leu-Leu-Leu和 γ -Abu- γ -Abu- γ -Abu的三肽;或

[0062] (iv) 选自(Gly-Gly-Ser)_q(Gly-Gly-Gly-Ser)_r和(Gly-Gly-Gly-Gly-Ser)_r、(6-氨基己酸)_s、(5-氨基戊酸)_s、(7-氨基庚酸)_s和(8-氨基辛酸)_s的多肽,其中q为2至5的任意整数,r是1至3的任意整数,且s是4至15的任意整数。

[0063] 优选地,对于式I的氨基聚乙二醇羧酸盐,n是1、2、3、4、5或6,且m是1,且p是1。

- [0064] 进一步优选地,对于式I的氨基聚乙二醇羧酸盐,n是2,m是1,且p是1。
- [0065] 还进一步优选地,氨基酸是 γ -Glu。
- [0066] 还进一步优选地,二肽是 γ -Glu- γ -Glu。
- [0067] 在本发明的化合物的一个优选的方式中,接头是([2-(2-氨基乙氧基)-乙氧基]-乙酰基)₂-(γ -Glu)_t,其中t是1或2。
- [0068] 优选地,t是1。
- [0069] 进一步优选地,t是2。
- [0070] 在本发明的化合物或其药学上可接受的盐的一个还进一步优选的方面中,C14-C24脂肪酸是饱和一元酸或饱和二元酸。
- [0071] 优选地,脂肪酸是选自肉豆蔻酸(十四烷酸)(C14一元酸)、十四烷二酸(C14二元酸)、棕榈酸(十六烷酸)(C16一元酸)、十六烷二酸(C16二元酸)、十七酸(十七烷酸)(C17一元酸)、十七烷二酸(C17二元酸)、硬脂酸(十八烷酸)(C18一元酸)、十八烷二酸(C18二元酸)、十九酸(十九烷酸)(C19一元酸)、十九烷二酸(C19二元酸)、花生酸(二十烷酸)(C20一元酸)、二十烷二酸(C20二元酸)、二十一酸(二十一烷酸)(C21一元酸)、二十一烷二酸(C21二元酸)、山嵛酸(二十二烷酸)(C22)、二十二烷二酸(C22二元酸)、二十四酸(二十四烷酸)(C24一元酸)和二十四烷二酸(C24二元酸)的饱和一元酸或饱和二元酸。
- [0072] 还进一步优选地,C14-C24脂肪酸是肉豆蔻酸。
- [0073] 还进一步优选地,C14-C24脂肪酸是十四烷二酸。
- [0074] 还进一步优选地,C14-C24脂肪酸是棕榈酸。
- [0075] 还进一步优选地,C14-C24脂肪酸是十六烷二酸。
- [0076] 还进一步优选地,C14-C24脂肪酸是硬脂酸。
- [0077] 还进一步优选地,C14-C24脂肪酸是十八烷二酸。
- [0078] 还进一步优选地,C14-C24脂肪酸是十九烷二酸。
- [0079] 还进一步优选地,C14-C24脂肪酸是花生酸。
- [0080] 还进一步优选地,C14-C24脂肪酸是二十烷二酸。
- [0081] 还进一步优选地,C14-C24脂肪酸是二十二烷二酸。
- [0082] 在本发明的化合物或其药学上可接受的盐的一个还进一步优选的方面中,C端氨基酸被酰胺化。
- [0083] 在一个进一步的方面中,本发明提供下述式的化合物或其药学上可接受的盐:
- [0084] His-Xaa2-Gln-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Lys-Tyr-Leu-Asp-Glu-Lys-Lys-Ala-Lys-Glu-Phe-Val-Glu-Trp-Leu-Leu-Glu-Gly-Gly-Pro-Ser-Ser-Gly
- [0085] 其中Xaa2是Aib;
- [0086] 20位的Lys通过使Lys侧链的 ϵ -氨基与([2-(2-氨基乙氧基)-乙氧基]-乙酰基)₂-(γ -Glu)-CO-(CH₂)₁₆CO₂H缀合而被化学修饰;且
- [0087] C端氨基酸被酰胺化(SEQ ID NO: 5)。
- [0088] 在一个进一步的方面中,本发明提供下述式的化合物或其药学上可接受的盐:
- [0089] His-Xaa2-Gln-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Lys-Tyr-Leu-Asp-Glu-Lys-Lys-Ala-Lys-Glu-Phe-Val-Glu-Trp-Leu-Leu-Glu-Gly-Gly-Pro-Ser-Ser-Gly
- [0090] 其中Xaa2是Aib;

- [0091] 20位的Lys通过使Lys侧链的 ϵ -氨基与([2-(2-氨基乙氧基)-乙氧基]-乙酰基)₂-(γ -Glu)-CO-(CH₂)₁₈CO₂H缀合而被化学修饰;且
- [0092] C端氨基酸被酰胺化(SEQ ID NO: 6)。
- [0093] 在一个进一步的方面中,本发明提供下述式的化合物或其药学上可接受的盐:
- [0094] His-Xaa2-Gln-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Lys-Tyr-Leu-Asp-Glu-Lys-Lys-Ala-Lys-Glu-Phe-Val-Glu-Trp-Leu-Leu-Ser-Gly-Gly-Pro-Ser-Ser-Gly
- [0095] 其中Xaa2是Aib;
- [0096] 20位的Lys通过使Lys侧链的 ϵ -氨基与([2-(2-氨基乙氧基)-乙氧基]-乙酰基)₂-(γ -Glu)-CO-(CH₂)₁₆CO₂H缀合而被化学修饰;且
- [0097] C端氨基酸被酰胺化(SEQ ID NO: 7)。
- [0098] 在一个进一步的方面中,本发明提供下述式的化合物或其药学上可接受的盐:
- [0099] His-Xaa2-Gln-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Lys-Tyr-Leu-Asp-Glu-Lys-Lys-Ala-Lys-Glu-Phe-Val-Glu-Trp-Leu-Leu-Ser-Gly-Gly-Pro-Ser-Ser-Gly
- [0100] 其中Xaa2是Aib;
- [0101] 20位的Lys通过使Lys侧链的 ϵ -氨基与([2-(2-氨基乙氧基)-乙氧基]-乙酰基)₂-(γ -Glu)-CO-(CH₂)₁₈CO₂H缀合而被化学修饰;且
- [0102] C端氨基酸被酰胺化(SEQ ID NO: 8)。
- [0103] 在一个进一步的方面中,本发明提供药物组合物,其包含本发明的化合物或其药学上可接受的盐和药学上可接受的载体、稀释剂或赋形剂。
- [0104] 在一个进一步的方面中,本发明提供药物组合物,其包含本发明的化合物或其药学上可接受的盐和药学上可接受的载体、稀释剂或赋形剂和其他治疗成分。
- [0105] 在一个还进一步的方面中,本发明提供在需要其的主体中治疗II型糖尿病的方法,其包括对主体施用有效量的本发明的化合物或其药学上可接受的盐。
- [0106] 在一个还进一步的方面中,本发明提供在需要其的主体中治疗肥胖的方法,其包括对主体施用有效量的本发明的化合物或其药学上可接受的盐。
- [0107] 在一个还进一步的方面中,本发明提供在需要其的主体中治疗非酒精性脂肪肝病(NAFLD)的方法,其包括对主体施用有效量的本发明的化合物或其药学上可接受的盐。
- [0108] 在一个还进一步的方面中,本发明提供在需要其的主体中治疗非酒精性脂肪性肝炎(NASH)的方法,其包括对主体施用有效量的本发明的化合物或其药学上可接受的盐。
- [0109] 在一个还进一步的方面中,本发明提供在主体中诱导非治疗性减重的方法,其包括对主体施用有效量的本发明的化合物或其药学上可接受的盐。
- [0110] 在一个还进一步的方面中,本发明提供本发明的化合物在治疗中的用途。
- [0111] 在一个还进一步的方面中,本发明提供本发明的化合物在治疗II型糖尿病中的用途。
- [0112] 在一个还进一步的方面中,本发明提供本发明的化合物在治疗肥胖中的用途。
- [0113] 在一个还进一步的方面中,本发明提供本发明的化合物在治疗非酒精性脂肪肝病(NAFLD)中的用途。
- [0114] 在一个还进一步的方面中,本发明提供本发明的化合物在治疗非酒精性脂肪性肝炎(NASH)中的用途。

[0115] 在一个还进一步的方面中,本发明提供本发明的化合物在制备用于治疗II型糖尿病的药物中的用途。

[0116] 在一个还进一步的方面中,本发明提供本发明的化合物在制备用于治疗肥胖的药物中的用途。

[0117] 在一个还进一步的方面中,本发明提供本发明的化合物在制备用于治疗非酒精性脂肪肝病 (NAFLD) 的药物中的用途。

[0118] 在一个还进一步的方面中,本发明提供本发明的化合物在制备用于治疗非酒精性脂肪性肝炎 (NASH) 的药物中的用途。

[0119] 在一个还进一步的方面中,本发明提供下述式的中间体化合物或其药学上可接受的盐:

[0120] His-Xaa2-Gln-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Lys-Tyr-Leu-Asp-Glu-Lys-Lys-Ala-Lys-Glu-Phe-Val-Glu-Trp-Leu-Leu-Xaa28-Gly-Gly-Pro-Ser-Ser-Gly

[0121] 其中Xaa2是Aib;

[0122] Xaa28是Glu或Ser (SEQ ID NO: 9);且

[0123] C端氨基酸任选被酰胺化。

[0124] 优选地,本发明提供下述式的中间体化合物或其药学上可接受的盐:

[0125] His-Xaa2-Gln-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Lys-Tyr-Leu-Asp-Glu-Lys-Lys-Ala-Lys-Glu-Phe-Val-Glu-Trp-Leu-Leu-Glu-Gly-Gly-Pro-Ser-Ser-Gly

[0126] Xaa2是Aib;且

[0127] C端氨基酸任选被酰胺化 (SEQ ID NO: 10)。

[0128] 更优选地,本发明提供下述式的中间体化合物或其药学上可接受的盐:

[0129] His-Xaa2-Gln-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Lys-Tyr-Leu-Asp-Glu-Lys-Lys-Ala-Lys-Glu-Phe-Val-Glu-Trp-Leu-Leu-Ser-Gly-Gly-Pro-Ser-Ser-Gly

[0130] Xaa2是Aib;且

[0131] C端氨基酸任选被酰胺化 (SEQ ID NO: 11)。

[0132] 在一个还进一步的方面中,本发明提供用于制备下述式的化合物或其药学上可接受的盐的方法:

[0133] His-Xaa2-Gln-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Lys-Tyr-Leu-Asp-Glu-Lys-Lys-Ala-Lys-Glu-Phe-Val-Glu-Trp-Leu-Leu-Xaa28-Gly-Gly-Pro-Ser-Ser-Gly

[0134] Xaa2是Aib;且

[0135] Xaa28是Glu或Ser;

[0136] 20位的Lys通过经由 (i) 直接键或 (ii) 20位的Lys与C14-C24脂肪酸之间的接头而使Lys侧链的 ϵ -氨基与C14-C24脂肪酸缀合从而被化学修饰;且

[0137] C端氨基酸任选被酰胺化 (SEQ ID NO: 2),

[0138] 所述方法包括下述步骤:

[0139] (i) 通过任选经由接头而将中间体化合物的20位的Lys侧链的 ϵ -氨基与C14-C24脂肪酸缀合,修饰下述式的中间体化合物:

[0140] His-Xaa2-Gln-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Lys-Tyr-Leu-Asp-Glu-Lys-Lys-Ala-Lys-Glu-Phe-Val-Glu-Trp-Leu-Leu-Xaa28-Gly-Gly-Pro-Ser-Ser-Gly

[0141] 其中Xaa2是Aib;

[0142] Xaa28是Glu或Ser;且

[0143] C端氨基酸任选被酰胺化 (SEQ ID NO: 9)。

[0144] 优选地,中间体化合物的20位的Lys通过经由20位的Lys与C14-C24脂肪酸之间的接头而与C14-C24脂肪酸缀合从而被化学修饰。

[0145] 在一个还进一步的方面中,本发明提供通过上述方法生产的化合物。

[0146] 本发明的化合物能够结合于并活化GLP-1受体和Gcg受体两者。本发明的化合物能够在超重和肥胖主体中引发食物摄取的减少。本发明的化合物具有提供优于野生型人OXM的减重效果的潜力。

[0147] 本发明的化合物可以在患有T2D和/或相关代谢失调的主体中改善葡萄糖耐受性和脂质代谢,并且可以与野生型人OXM相比更有效。

[0148] 本发明的化合物的一个特别的优点在于,通常与GLP-1治疗(例如艾塞那肽和利拉鲁肽)相伴的副作用,例如恶心的频率可以被减轻或消除。本发明的化合物因此可以具有与GLP-1治疗相比减轻的副作用。

[0149] 本发明的化合物包含缀合于脂肪酸的多肽。脂肪酸通过其白蛋白结合基序,可以通过延长血浆半衰期和降低清除率来改善肽的药代动力学。尽管本发明的化合物可以期待展现出相对于野生型人OXM的改善的药代动力学概况,但改善的量级是不可预测的。本发明人已发现,本发明的化合物中的脂肪酸和任选的接头的长度、组成和位置导致化合物具有期望药代动力学概况,其支持每日、每两周、每周或每月给药。

[0150] 除了改善的药代动力学概况之外,本发明人还发现,脂肪酸和任选的接头的长度、组成和位置对于优化Gcg-R/GLP-1-R协同激动剂活性比率是至关重要的。

[0151] 野生型人OXM在人GLP-1-R和人Gcg-R上具有完全的效能和功效。野生型人OXM的氨基酸序列提供如下:

[0152] 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-Lys-Arg-Asn-Arg-Asn-Asn-Ile-Ala (SEQ ID NO: 1)。

[0153] 某些本发明的化合物具有平衡的Gcg-R/GLP-1-R协同激动剂活性比率。如在本文中使用的平衡的Gcg和GLP-1活性是指在体外结合测定中接近1:1,例如1:1 GLP-1/Gcg、2:1 GLP-1/Gcg、3:2 GLP-1/Gcg、1:2 GLP-1/Gcg或2:3 GLP-1/Gcg的对Gcg和GLP-1受体具有亲和性的化合物。通过本发明人进行的研究表明,脂肪酸的长度、组成和位置对于实现作为本发明的化合物的特征的平衡的Gcg-R/GLP-1-R协同激动剂活性比率,以及影响本发明的化合物的血浆半衰期、物理稳定性、溶解性和体内稳定性而言是至关重要的。

[0154] 尽管缀合肽与脂肪酸在改善的药代动力学概况和/或平衡的Gcg-R/GLP-1-R协同激动剂活性比率方面具有优点,但还要预期的是,化合物可能因存在与Gcg受体或GLP-1受体的结合界面的潜在干扰而丧失活性。但已发现,20位的赖氨酸残基与脂肪酸的缀合相比于其他位置的氨基酸与脂肪酸缀合的情况,在两种受体中以更高的程度保持了体外和体内活性。

[0155] 另外,要求保护的化合物中的多种相对于野生型人OXM氨基酸取代能够提高Gcg-R和/或GLP-1-R的功效,由此弥补了由于与脂肪酸缀合而导致的功效损失,同时维持了适当

的Gcg-R/GLP-1-R协同激动剂活性比率。重要的是要注意到,在特定蛋白质中的一个氨基酸残基的取代可能会影响蛋白质整体的特征,并且总体效果可能是对药理学功效和/或药理学稳定性而言有益或有害的。某些氨基酸取代可以增加功效但在分子稳定性方面具有有害影响,以及反之亦然。本发明的化合物相对于野生型人OXM(SEQ ID NO: 1)的氨基酸取代包括S2Aib、S16E、R17K、R18K、Q20K、D21E、Q24E、M27L、N28E或N28S和T29G。此外,OXM的C端序列、KRNRNNIA已被GPSSG C端序列替代。

[0156] S2Aib取代保护了肽免受通过肽酶、尤其是二肽基肽酶的降解。S16E、R17K、R18K和Q20K取代能够改善本发明的化合物的体外测试和体内动物模型的功效。D21E和Q24E取代能够改善本发明的化合物的稳定性并调节体外活性。M27L取代能够保护肽免受蛋氨酸残基的氧化。N28E取代能够改善包含该取代的化合物的溶解性。N28S取代也能够改善包含该取代的化合物的溶解性,但并非达到与N28E取代相同的程度。但是,包含N28S取代的化合物的溶解性可以通过选择适当的接头而得到改善。28位的天冬酰胺残基取代避免了在该位置发生的脱酰胺作用的可能性。

[0157] 去除OXM的C段序列的残基、KRNRNNIA可以改善溶解性,其可归功于去除精氨酸残基。本发明人对(i)不具有C端序列的化合物、(ii)具有GPSSG C端序列的化合物和(iii)具有GPSSGAPPS C端序列的化合物进行评估。出人意料地发现,某些具有GPSSG C端序列的化合物在动物模型中展现出相对于野生型人OXM、不具有C端序列的化合物和具有GPSSGAPPS C端序列的化合物而言改善的体内功效。GPSSG C端序列还相对于野生型人OXM和不具有C端序列的化合物而言改善了根据本发明所述的化合物的稳定性和溶解性。

[0158] 本发明的化合物因此含有氨基酸取代,其单独或共同地不仅能够改善功效,还能够提供改善的物理稳定性和溶解性特征和提高的体内稳定性。

[0159] 在本发明的化合物的一些方面中,C14-C24脂肪酸经由接头而缀合于赖氨酸的 ϵ -氨基,其中接头选自:

[0160] (a) 式I的氨基聚乙二醇羧酸盐:

[0161] $H-\{NH-CH_2-CH_2-[O-CH_2-CH_2]_m-O-(CH_2)_p-CO\}_n-OH$ (I)

[0162] 其中m是1至12的任意整数,n是1至12的任意整数,且p是1或2;

[0163] (b) 选自Arg、Asn、Asp、Gln、Glu、His、Lys、Pro、Ser、Thr、Cit、Orn、Sar、Gly、 γ -Abu和 γ -Glu的氨基酸;

[0164] (c) 选自Ala-Ala、 β -Ala- β -Ala、Glu-Glu、Gly-Gly、Leu-Leu、Pro-Pro、Ser-Ser、Thr-Thr、 γ -Glu- γ -Glu、Glu- γ -Glu、 γ -Glu-Glu、 γ -Abu- γ -Abu、6-氨基己酸-6-氨基己酸、5-氨基戊酸-5-氨基戊酸、7-氨基庚酸-7-氨基庚酸和8-氨基辛酸-8-氨基辛酸的二肽;

[0165] (d) 选自Ala-Ala-Ala、 β -Ala- β -Ala- β -Ala、Glu-Glu-Glu、 γ -Glu- γ -Glu- γ -Glu、Glu- γ -Glu- γ -Glu、 γ -Glu- γ -Glu-Glu、 γ -Glu-Glu- γ -Glu、Gly-Gly-Gly、Gly-Gly-Ser、Ser-Gly-Gly、Gly-Ser-Gly、Gly-Gly-Glu、Glu-Gly-Gly、Gly-Glu-Gly、Gly-Gly- γ -Glu、 γ -Glu-Gly-Gly、Gly- γ -Glu-Gly、Leu-Leu-Leu、Pro-Pro-Pro和 γ -Abu- γ -Abu- γ -Abu的三肽;

[0166] (e) 选自(Gly-Gly-Ser)_q(Gly-Gly-Gly-Ser)_r和(Gly-Gly-Gly-Gly-Ser)_r、(6-氨基己酸)_s、(5-氨基戊酸)_s、(7-氨基庚酸)_s和(8-氨基辛酸)_s的多肽,其中q是2至5的任意整数,r是1至3的任意整数,且s是4至15的任意整数;和

[0167] (f) 缀合接头,其中如(a)中定义的式I的氨基聚乙二醇羧酸盐与下述缀合:

[0168] (i) 选自Arg、Asn、Asp、Gln、Glu、His、Lys、Pro、Ser、Thr、Cit、Orn、Sar、Gly、 γ -Abu和 γ -Glu的氨基酸;

[0169] (ii) 选自Ala-Ala、 β -Ala- β -Ala、Glu-Glu、Gly-Gly、Leu-Leu、Pro-Pro、Ser-Ser、Thr-Thr、 γ -Glu- γ -Glu、Glu- γ -Glu、 γ -Glu-Glu、 γ -Abu- γ -Abu、6-氨基己酸-6-氨基己酸、5-氨基戊酸-5-氨基戊酸、7-氨基庚酸-7-氨基庚酸和8-氨基辛酸-8-氨基辛酸的二肽;

[0170] (iii) 选自Ala-Ala-Ala、 β -Ala- β -Ala- β -Ala、Glu-Glu-Glu、 γ -Glu- γ -Glu- γ -Glu、Glu- γ -Glu- γ -Glu、 γ -Glu- γ -Glu-Glu、 γ -Glu-Glu- γ -Glu、Gly-Gly-Gly、Gly-Gly-Ser、Ser-Gly-Gly、Gly-Ser-Gly、Gly-Gly-Glu、Glu-Gly-Gly、Gly-Glu-Gly、Gly-Gly- γ -Glu、 γ -Glu-Gly-Gly、Gly- γ -Glu-Gly、Leu-Leu-Leu、Pro-Pro-Pro和 γ -Abu- γ -Abu- γ -Abu的三肽;或

[0171] (iv) 选自(Gly-Gly-Ser)_q(Gly-Gly-Gly-Ser)_r和(Gly-Gly-Gly-Gly-Ser)_r、(6-氨基己酸)_s、(5-氨基戊酸)_s、(7-氨基庚酸)_s和(8-氨基辛酸)_s的多肽,其中q是2至5的任意整数,r是1至3的任意整数,且s是4至15的任意整数。

[0172] 在本发明的化合物的优选的方面中,接头是式I的氨基聚乙二醇羧酸盐或者其中式I的氨基聚乙二醇羧酸盐与如上定义的氨基酸、二肽、三肽或多肽缀合的缀合接头,其中n是1、2、3、4、5或6,m是1,且p是1。

[0173] 在本发明的化合物的更优选的方面中,接头是式I的氨基聚乙二醇羧酸盐或者其中式I的氨基聚乙二醇羧酸盐与如上定义的氨基酸、二肽、三肽或多肽缀合的缀合接头,其中n是2,m是1,且p是1。

[0174] 式I的氨基聚乙二醇羧酸盐接头或者其中式I的氨基聚乙二醇羧酸盐与如上定义的氨基酸、二肽、三肽或多肽缀合的缀合接头包含含有结构[-O-CH₂-CH₂-]_m的小的聚乙二醇部分(PEG),其中m是1与12之间的整数(例如1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12)。这样的小PEG在本文中被称为“微型PEG”。在优选的方面中,微型PEG具有式I的结构:

[0175]
$$\text{H}-\{\text{NH}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-[\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2]_m-\text{O}-(\text{CH}_2)_p-\text{CO}\}_n-\text{OH} \quad (\text{I})$$

[0176] 其中m是1至12的任意整数,n是1至12的任意整数,且p是1或2。优选地,微型PEG具有式I的结构,其中n是1、2、3、4、5或6,m是1,且p是1。进一步优选地,微型PEG具有式I的结构,其中n是1,m是1,且p是1。适合的用于酰化具有微型PEG的氨基酸的试剂可商业获得于供应商,例如Peptides International (Louisville, KY)和ChemPep, Inc. (Wellington, FL)。此外,适合的用于酰化具有微型PEG的氨基酸的技术在本文中描述(参见实施例1-4)。

[0177] 式I的微型PEG是包含胺官能团和羧基官能团的官能化的微型PEG。羧基官能团与赖氨酸侧链的 ϵ -氨基反应从而形成酰胺键。胺官能团与脂肪酸的羧基反应。SEQ ID NO: 2的肽的20位的赖氨酸由此经由式I的微型PEG缀合于C14-C24脂肪酸。

[0178] 可选地,当式I的微型PEG是缀合接头的一部分(即式I的微型PEG缀合于如上定义的氨基酸、二肽、三肽或多肽)时,式I的微型PEG的胺官能团与所述氨基酸、二肽、三肽或多肽的官能团反应。氨基酸、二肽、三肽或多肽的另外的官能团与脂肪酸的羧基反应。SEQ ID NO: 2的肽的20位的赖氨酸由此经由如上定义的缀合接头缀合于C14-C24脂肪酸。

[0179] 式I的微型PEG的亲水性起增加本发明的化合物的溶解性的作用,所述化合物包含含有式I的氨基聚乙二醇羧酸盐的接头或者其中式I的氨基聚乙二醇羧酸盐缀合于所定义

的氨基酸、二肽、三肽或多肽的缀合接头。

[0180] 优选的包含式I的微型PEG的接头包括但不限于([2-(2-氨基乙氧基)-乙氧基]-乙酰基)₂和8-氨基-3,6-二氧杂辛酸。

[0181] 接头可以为位于赖氨酸侧链的ε-氨基与C14-C24脂肪酸之间的单氨基酸。在一些优选的方面中,氨基酸为亲水的氨基酸。适合的氨基酸包括Arg、Asn、Asp、Gln、Glu、His、Lys、Pro、Ser、Thr、Cit、Orn、Sar、Gly、γ-Abu和γ-Glu。

[0182] 在更优选的方面中,氨基酸为γ-Glu。

[0183] 可选地,接头是选自Ala-Ala、β-Ala-β-Ala、Glu-Glu、Gly-Gly、Leu-Leu、Pro-Pro、Ser-Ser、Thr-Thr、γ-Glu-γ-Glu、Glu-γ-Glu、γ-Glu-Glu、γ-Abu-γ-Abu、6-氨基己酸-6-氨基己酸、5-氨基戊酸-5-氨基戊酸、7-氨基庚酸-7-氨基庚酸和8-氨基辛酸-8-氨基辛酸的二肽。

[0184] 在一个进一步优选的可选方面中,二肽的各氨基酸可以相同或不同于二肽的另一个氨基酸,并且可以独立地选自Ala、β-Ala、Glu、Gly、Leu、Pro、Ser、Thr、γ-Glu、γ-Abu、6-氨基己酸、5-氨基戊酸、7-氨基庚酸和8-氨基辛酸。

[0185] 在更优选的方面中,接头为γ-Glu-γ-Glu。

[0186] 在一些方面中,接头是三肽,其中三肽的氨基酸独立地选自:Ala、β-Ala、Glu、Gly、Leu、Pro、Ser、Thr、γ-氨基丁酸(γ-Abu)、γ-谷氨酸(γ-Glu)、6-氨基己酸、5-氨基戊酸、7-氨基庚酸和8-氨基辛酸。

[0187] 在优选的方面中,接头是选自Ala-Ala-Ala、β-Ala-β-Ala-β-Ala、Glu-Glu-Glu、γ-Glu-γ-Glu-γ-Glu、Glu-γ-Glu-γ-Glu、γ-Glu-γ-Glu-Glu、γ-Glu-Glu-γ-Glu、Gly-Gly-Gly、Gly-Gly-Ser、Ser-Gly-Gly、Gly-Ser-Gly、Gly-Gly-Glu、Glu-Gly-Gly、Gly-Glu-Gly、Gly-Gly-γ-Glu、γ-Glu-Gly-Gly、Gly-γ-Glu-Gly、Leu-Leu-Leu、Pro-Pro-Pro和γ-Abu-γ-Abu-γ-Abu的三肽。

[0188] 在一些方面中,接头是选自(Gly-Gly-Ser)_q、(Gly-Gly-Gly-Ser)_r和(Gly-Gly-Gly-Gly-Ser)_r、(6-氨基己酸)_s、(5-氨基戊酸)_s、(7-氨基庚酸)_s和(8-氨基辛酸)_s的多肽,其中q为2至5的任意整数,r是1至3的任意整数,且s是4至15的任意整数。

[0189] 在优选的方面中,接头是缀合接头,其中式I的氨基聚乙二醇羧酸盐:

[0190]
$$\text{H}-\{\text{NH}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-[\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2]_m-\text{O}-(\text{CH}_2)_p-\text{CO}\}_n-\text{OH} \quad (\text{I})$$

[0191] 其中m是1至12的任意整数,n是1至12的任意整数,且p是1或2;

[0192] 所述接头与如上定义的氨基酸、二肽、三肽或多肽缀合。

[0193] 在一个优选的方面中,缀合接头的氨基聚乙二醇羧酸盐是([2-(2-氨基乙氧基)-乙氧基]-乙酰基)₂或8-氨基-3,6-二氧杂辛酸。

[0194] 在一个更优选的方面中,接头包含([2-(2-氨基乙氧基)-乙氧基]-乙酰基)₂-(γ-Glu)_t(也称为(AEEA)₂-(γ-Glu)_t),其中t是1或2。脂肪酸和接头中的γ-谷氨酸发挥作为白蛋白结合剂的作用,并且提供用以在体内生成长效化合物的潜能。在最优选的方面中,本发明的化合物包含通过使赖氨酸侧链的ε-氨基与([2-(2-氨基乙氧基)-乙氧基]-乙酰基)₂-(γ-Glu)_t-CO-(CH₂)_d-CO₂H缀合而被化学改性的20位的赖氨酸,其中t是1或2,且d是16或18。

[0195] 如在实施例1~4的化学结构中所示,第一单元的[2-(2-氨基-乙氧基)-乙氧基]-乙

酰基连接于赖氨酸侧链的 ϵ -氨基。然后,第二单元的[2-(2-氨基-乙氧基)-乙氧基]-乙酰基连接于第一单元的[2-(2-氨基-乙氧基)-乙氧基]-乙酰基的氨基。然后,第一单元的 γ -Glu通过侧链的 γ -羧基而连接于第二单元的[2-(2-氨基-乙氧基)-乙氧基]-乙酰基的氨基。当 $t = 2$ 时,第二单元的 γ -Glu通过侧链的 γ -羧基而连接于第一单元的 γ -Glu的 α -氨基。最终,脂肪酸连接于第一($t = 1$)或第二($t = 2$)单元的 γ -Glu的 α -氨基。

[0196] 当接头是如上定义的氨基酸、二肽、三肽或多肽时,优选的是,氨基酸或者二肽、三肽或多肽的至少一个氨基酸是亲水的氨基酸。

[0197] 类似地,当接头是其中式I的氨基聚乙二醇羧酸盐与如上定义的氨基酸、二肽、三肽或多肽缀合的缀合接头时,

[0198]
$$\text{H}-\{\text{NH}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-[\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2]_m-\text{O}-(\text{CH}_2)_p-\text{CO}\}_n-\text{OH} \quad (\text{II})$$

[0199] 其中 m 是1至12的任意整数, n 是1至12的任意整数,且 p 是1或2;

[0200] 优选的是氨基酸/二肽/三肽/多肽的氨基酸/至少一个氨基酸是亲水的氨基酸。

[0201] 适合的氨基酸包括但不限于Arg、Asn、Asp、Gln、Glu、His、Lys、Pro、Ser、Thr、Cit、Orn、Sar、Gly、 γ -Abu和 γ -Glu。

[0202] 本发明人发现,在接头中存在一个或多个亲水的氨基酸补偿了通常可以预期由SEQ ID NO: 1的肽中的氨基酸取代引发的溶解性的损失。例如,在其中接头包含([2-(2-氨基乙氧基)-乙氧基]-乙酰基)₂-(γ -Glu) _{t} ,其中 t 是1或2的实施方案中,SEQ ID NO: 1的肽的Xaa28可以为丝氨酸或谷氨酸。SEQ ID NO: 2的肽的28位的谷氨酸的选择改善了这样的化合物的溶解性。SEQ ID NO: 2的肽的28位的丝氨酸的选择可以预期相对于仅在28位具有谷氨酸残基而不同的那些化合物而言降低这样的化合物的溶解性。但是,上述接头中的第二 γ -Glu氨基酸(即 t 是2)补偿了这样的溶解性方面的预期减少。

[0203] 本发明的化合物利用通过直接键或通过接头而化学缀合于赖氨酸侧链的 ϵ -氨基的C14-C24脂肪酸。如在本文中使用的术语“C14-C24脂肪酸”是指具有14和24个碳原子之间的羧酸。适合于在本文中使用的C14-C24脂肪酸可以为饱和一元酸或饱和二元酸。所谓“饱和”是指脂肪酸不含碳-碳双键或三键。

[0204] 适合于在本文中公开的化合物和其用途的具体的饱和C14-C24脂肪酸的实例包括但不限于:肉豆蔻酸(十四烷酸)(C14一元酸)、十四烷二酸(C14二元酸)、棕榈酸(十六烷酸)(C16一元酸)、十六烷二酸(C16二元酸)、十七酸(十七烷酸)(C17一元酸)、十七烷二酸(C17二元酸)、硬脂酸(十八烷酸)(C18一元酸)、十八烷二酸(C18二元酸)、十九酸(十九烷酸)(C19一元酸)、十九烷二酸(C19二元酸)、花生酸(二十烷酸)(C20一元酸)、二十烷二酸(C20二元酸)、二十一酸(二十一烷酸)(C21一元酸)、二十一烷二酸(C21二元酸)、山嵛酸(二十二烷酸)(C22)、二十二烷二酸(C22二元酸)、二十四酸(二十四烷酸)(C24一元酸)、二十四烷二酸(C24二元酸),包括其支链和取代的衍生物。

[0205] 在本发明的化合物的优选的方面中,C14-C24脂肪酸选自饱和C14一元酸、饱和C14二元酸、饱和C16一元酸、饱和C16二元酸、饱和C18一元酸、饱和C18二元酸、饱和C19二元酸、饱和C20一元酸、饱和C20二元酸、饱和C22二元酸,以及其支链和取代的衍生物。

[0206] 在本发明的化合物的更优选的方面中,C14-C24脂肪酸选自肉豆蔻酸、十四烷二酸、棕榈酸、十六烷二酸、硬脂酸、十八烷二酸、十九烷二酸、花生酸、二十烷二酸和二十二烷二酸。

[0207] 优选地, C14-C24脂肪酸是十八烷二酸或二十烷二酸。

[0208] 本发明人已发现, 脂肪酸的位置在实现具有期望的Gcg-R/GLP-1-R协同激动剂活性比率的化合物方面是至关重要的。脂肪酸的长度和组成影响化合物的血浆半衰期、化合物在体内动物模型中的功效, 并且还影响化合物的溶解性和稳定性。在SEQ ID NO: 2中定义的肽与C14-C24饱和脂肪一元酸或二元酸导致了展现出期望的血浆半衰期、期望的体内动物模型中的功效, 并且还具备期望的溶解性和稳定性特征的化合物。肉豆蔻酸、十四烷二酸、棕榈酸、十六烷二酸、硬脂酸、十八烷二酸、十九烷二酸、花生酸、二十烷二酸和二十二烷二酸是特别优选的脂肪酸。

[0209] 特别地, 在SEQ ID NO: 2中定义的肽在20位的赖氨酸残基与十八烷二酸或二十烷二酸的缀合而产生化合物, 所述化合物: (i) 能够实现期望的Gcg-R/GLP-1-R协同激动剂活性比率; (ii) 能够改善体内动物模型中的功效; 和/或 (iii) 能够改善物理稳定性和溶解性特征。

[0210] 本发明的化合物优选被配制为通过肠胃外途径(例如皮下、静脉内、腹膜内、肌肉内或经皮)施用的药物组合物。

[0211] 本发明的化合物通常将肠胃外施用。肠胃外施用包括例如全身施用, 例如通过肌肉内、静脉内、皮下、皮肤内或腹膜内注射。优选的施用途径是皮下注射。本发明的化合物与可接受的药物载体、稀释剂或赋形剂结合作为用于治疗II型糖尿病、肥胖、NAFLD和/或NASH的药物组合物的一部分而对主体施用。药物组合物可以为溶液或混悬液, 例如其中本发明的化合物与二价金属阳离子、例如锌络合的一种。本发明的化合物还可以例如通过冻干法或喷雾干燥而被配制为固体制剂, 其接着在施用之前在适合的稀释溶剂中重构。适合的药物载体可以含有不与肽或肽衍生物发生相互作用的惰性成分。适合于肠胃外施用的药物载体包括例如无菌水、生理盐水、抑菌盐水(含有约0.9% mg/ml的苯甲醇的盐水)、磷酸盐缓冲盐水、Hank's液、林格乳酸盐等。适合的赋形剂的一些实例包括乳糖、右旋糖、蔗糖、海藻糖、山梨醇和甘露醇, 以及防腐剂、例如苯酚和间甲酚。

[0212] 可以采用标准的药物配制技术, 例如在Remington: Science and Practice of Pharmacy (D.B. Troy编, 第21版, Lippincott, Williams & Wilkins, 2006)中描述的那些。本发明的化合物可以替代地被配制用于经颊、经口、经皮、鼻腔或肺部途径施用。

[0213] 本发明的化合物可以与任意数量的无机和有机酸反应从而形成药学可接受的酸加成盐。药学上可接受的盐和用于制备它们的常规方法学是本领域公知的。参见例如P. Stahl等人, Handbook of Pharmaceutical Salts: Properties, Selection and Use, 第2修订版(Wiley-VCH, 2011)。本发明的药学可接受的盐包括三氟乙酸盐、盐酸盐和乙酸盐。

[0214] 本发明的化合物可以被用于治疗糖尿病, 特别是II型糖尿病。其他可能受益于使用本发明的化合物的治疗的主体包括: 患有糖耐量受损或空腹血糖受损的那些、体重对于主体的身高和体型而言高于正常体重约25%或更多的主体、具有一位或两位患有II型糖尿病的父母主体、已患有妊娠糖尿病的主体和患有代谢障碍, 例如因降低的内源性胰岛素分泌而导致的那些的主体。本发明的化合物可以用于预防患有糖耐量受损的主体发展为II型糖尿病、预防胰腺 β -细胞退化、诱导 β -细胞增殖、改善 β -细胞功能、激活休眠 β -细胞、促进细胞分化为 β -细胞、刺激 β -细胞复制、并抑制 β -细胞凋亡。在本发明的方法中, 其他的可以使用本发明的化合物治疗或预防的病症和状况包括: 成人发作型糖尿病(MODY) (Herman等

人, Diabetes 43:40, 1994);成人隐匿性自身免疫性糖尿病(LADA) (Zimmet等人, Diabetes Med. 11:299, 1994);葡萄糖糖耐量受损(IGT) (Expert Committee on Classification of Diabetes Mellitus, Diabetes Care 22 (Supp. 1):S5, 1999);空腹血糖受损(IFG) (Charles等人, Diabetes 40:796, 1991);妊娠糖尿病(Metzger, Diabetes, 40:197, 1991);代谢综合征X、血脂异常、高血糖症、高胰岛素血症、高甘油三酯血症和胰岛素抗性。

[0215] 本发明的化合物还可以在本发明的方法中被用于治疗继发性糖尿病(Expert Committee on Classification of Diabetes Mellitus, Diabetes Care 22 (Supp. 1):S5, 1999)。这样的继发原因包括糖皮质激素过量、生长激素过量、嗜铬细胞瘤和药物诱发的糖尿病。可能诱发糖尿病的药物包括但不限于吡甲硝苯脲、烟酸、糖皮质激素类、苯妥英、甲状腺激素、 β -肾上腺素药物、 α -干扰素和用于治疗HIV感染的药物。

[0216] 本发明的化合物可以在压抑食物摄取和治疗肥胖方面是有效的。

[0217] 本发明的化合物的“有效量”是在施用于主体时产生期望的治疗和/或预防效果而不引起不可接受的副作用的量。“期望的治疗效果”包括下述中一项或多项:1) 与疾病或状况相关的一种或多种症状的改善;2) 延迟与疾病或病况相关的症状的发作;3) 与不进行治疗相比提高寿命;和4) 与不进行治疗相比更高的生活质量。例如,对于治疗T2D而言的本发明的化合物的“有效量”是与不进行治疗相比产生更好的血糖浓度控制、由此导致延迟糖尿病并发症、例如视网膜病变、神经病变或肾病的发作的量。对于例如在患有糖耐量受损或空腹血糖受损的主体中预防II型糖尿病而言的本发明的化合物的“有效量”是与不进行治疗相比延迟抬升的血糖水平发作的量,所述抬升的血糖水平要求用抗高血糖症药物、例如磺脲类、噻唑烷二酮类、胰岛素和/或双胍类治疗。

[0218] 对主体施用的本发明的化合物的“有效量”也将取决于疾病的类型和严重程度以及主体的特征、例如总体健康情况、年龄、性别、体重和对药物的耐受性。对于使主体的血糖正常化而言有效的本发明的化合物的剂量将取决于多个因素,其中包括但不限于主体的性别、体重和年龄、不能调节血糖的严重程度、施用途径和生物利用度、肽的药代动力学概况、功效以及制剂。

[0219] 某些本发明的化合物跨宽范围的剂量总体是有效的。例如,对于每周给药而言的剂量可以落入每人每周约0.05至约30 mg的范围内。某些本发明的化合物可以为每日给药。另外,某些本发明的化合物可以每两周、每周或每月给药。

[0220] “主体”是哺乳动物、优选为人,但也可以为动物、包括伴侣动物(例如狗、猫等)、家畜(例如牛、绵羊、猪、马等)和实验室动物(例如大鼠、小鼠、豚鼠等)。

[0221] 如本文中使用的,术语“治疗”或“用于治疗”包括抑制、减缓、停止或反转已存在的症状或失调的病程或严重程度。

[0222] 术语“血浆半衰期”是指将相关化合物的一半从血浆中清除所需要的时间。一个可选的使用的术语是“排除半衰期”。在血浆半衰期或排除半衰期的上下文中使用的术语“延长的”或“更长的”是指如在可比条件下确定地,相对于参照分子(例如肽的无脂肪酸缀合形式、野生型人OXM或索马鲁肽)而言,在本发明的化合物的半衰期方面存在显著提高。

[0223] 清除率是身体从循环中消除药物的能力的度量。随着由于例如对药物的修饰而导致的清除率降低,可期望半衰期增加。但是,仅当在概况容积方面没有变化时,该互反关系

才是准确的。有用的末端对数半衰期 ($T_{1/2}$)、清除率 (C) 与概况容积 (V) 之间的近似关系通过下述式给出： $T_{1/2} \approx 0.693 (V/C)$ 。清除率不表示有多少药物被除去，而是表示将因排除而完全不含药物的生物体液、例如血液或血浆的体积。清除率被表述为每单位时间的体积。

[0224] 如在本文中使用的，“亲水”是指容易吸收湿气并具有容易与水发生相互作用的强极性基团的特性。

[0225] 如在本文中使用的，“索马鲁肽”是指化学合成的GLP-1类似物，其具有在CAS登记号910463-68-2中找到的肽骨架和整体化合物结构。

[0226] 本发明的氨基酸序列含有对于20种天然生成的氨基酸而言标准的单字母或三字母编码。另外，“Aib”是 α -氨基异丁酸，“Abu”是氨基丁酸，“Orn”是鸟氨酸，“Cit”是瓜氨酸，且“Sar”是肌氨酸。

[0227] 如在本文中使用的，术语“C端氨基酸”是指含有游离羧基的肽序列中的最后一个氨基酸。本发明的化合物的C端氨基酸是34位的Gly。

[0228] 本发明还涵盖对于合成本发明的化合物或其药学上可接受的盐而言有用的新型中间体和方案。中间体和本发明的化合物可以通过本领域已知的多种程序制备。特别地，使用化学合成的方法在下述实施例中说明。对于各途径而言的具体合成步骤可以以不同方式进行组合从而制备本发明的化合物或其盐。试剂和起始材料对于本领域普通技术人员是容易获得的。要理解的是，这些实施例不意图以任何方式限定本发明的范围。

[0229] 实施例1

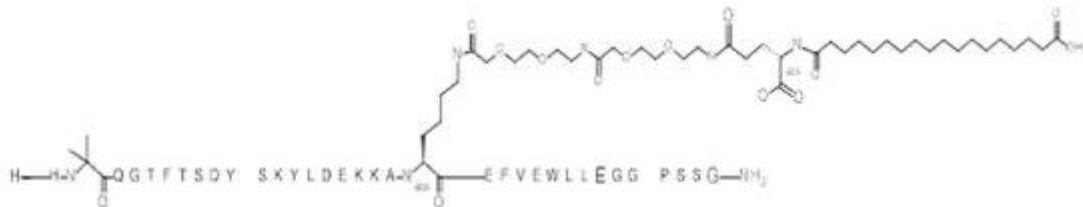
[0230] HXaa2QGTFSTSDYSKYLDEKKAKEFVEWLLEGGPSSG

[0231] 其中Xaa2是Aib；

[0232] 20位的K通过用([2-(2-氨基-乙氧基)-乙氧基]-乙酰基)₂-(γ Glu)₁-CO-(CH₂)₁₆-CO₂H缀合于K侧链的 ϵ -氨基从而被化学修饰；且

[0233] C端氨基酸被酰胺化为C端伯酰胺 (SEQ ID NO: 5)。

[0234]



[0235] 上图除了残基Aib2和K20之外使用标准的单字母氨基酸编码说明了SEQ ID NO: 5的化合物(后文称为“化合物1”)的结构，所述残基Aib2和K20中，这些氨基酸的结构已被扩展。

[0236] 化合物1的肽组分通过使用苄氧羰基 (Fmoc) /叔丁基 (t-Bu) 化学的自动固相合成在Symphony12通道多路肽合成仪 (Protein Technologies, Inc. Tucson, AZ) 上合成。

[0237] 合成树脂由0.3-0.4 meq/g的置换度下的1% DVB交联聚苯乙烯 (Fmoc-Rink-MBHA Low Loading resin, 100-200目, EMD Millipore, Temecula, CA) 构成。标准的侧链保护剂如下：对于Trp和Lys为叔丁氧羰基 (Boc)；对于Asp和Glu为叔丁酯 (OtBu)；对于Ser、Thr和Tyr为tBu；且对于Gln为三苯基甲基 (Trt)；将N- α -Fmoc-N- ϵ -4-甲基三苯基甲基-L-赖氨酸 (Fmoc-Lys (Mtt) -OH) 用于SEQ ID NO: 3的20位的赖氨酸，且将N _{α} , N_(im)-二Boc-L-组氨酸 (Boc-His (Boc) -OH) 用于1位的组氨酸。在各使用二甲基甲酰胺 (DMF) 中的20%哌啶的偶联步

骤(2 x 7分钟)之前,除去Fmoc基团。所有标准氨基酸偶联使用相等摩尔比的Fmoc氨基酸(EMD Millipore, Temecula, CA)、二异丙基碳二亚胺(DIC)(Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)和2-肟乙酸乙酯(Oxyma Pure, Iris Biotech, Marktredwitz, Germany),在相对于理论肽负载量9倍摩尔过量的情况下、且以0.18 M的DMF中的终浓度实施1小时。

[0238] 两个例外是:SEQ ID NO: 5的3位的谷氨酰胺残基,其为双偶联(2 x 1小时);和SEQ ID NO: 5的1位的组氨酸残基,其使用1-羟基-7-氮杂苯并三唑(HOAt)来替代2-肟乙酸乙酯以6倍摩尔过量偶联18小时。在完成合成线性肽之后,将树脂转移至配备有聚四氟乙烯(PTFE)活塞(Biotage, Charlotte, NC)的一次性玻璃25 mL聚丙烯注射器(Torviq, Niles, MI),并将SEQ ID NO: 5的20位的赖氨酸上的4-甲基三苯基甲基(Mtt)保护基选择性地使用三次用DCM中的20%六氟异丙醇(Oakwood Chemicals, West Columbia, SC)处理(2 x 10分钟和1 x 45分钟)而从肽树脂中除去,从而将游离的20位的赖氨酸的 ϵ -胺暴露并使其可进行进一步反应。

[0239] 接续的脂肪酸-接头部分的连接通过实施连续的两个[2-(2-(Fmoc-氨基)乙氧基)乙氧基]乙酸(Fmoc-AEEA-OH)(ChemPep, Inc. Wellington, FL;三倍过量的氨基酸(AA):1-[双(二甲基氨基)亚甲基]-1H-1,2,3-三唑并[4,5-b]嘧啶鎓-3-氧化物六氟磷酸盐(HATU):N,N-二异丙基乙基胺(DIPEA) [1:1:5 mol/mol],3小时偶联时间)的偶联、接着Fmoc-谷氨酸 α -叔丁酯(Fmoc-Glu-OtBu)(Ark Pharm, Inc. Libertyville IL,3倍过量的AA:HATU:DIPEA [1:1:5 mol/mol],3小时偶联时间)来完成。在各情况中,Fmoc部分如上所述地被除去。最终,将单-OtBu-十八烷二酸(WuXi AppTec, Shanghai, China)经18小时使用3倍过量的酸:HATU:DIPEA(1:1:5 mol/mol)而偶联于树脂。

[0240] 完成合成之后,用二氯甲烷(DCM)、二乙基醚洗涤肽树脂,并通过向注射器施加真空抽吸5分钟来彻底进行空气干燥。将干燥的树脂用剪切混合物(三氟乙酸(TFA):苯甲醚:水:三异丙基硅烷,88:5:5:2 v/v)在室温下处理2小时,从而从固体载体上释放肽并除去所有的侧链保护基。将树脂滤出,用纯净TFA洗涤两次,并且将合并的滤液用冷二乙基醚处理,从而沉淀粗肽。然后将肽/醚悬液在4000 rpm下离心,以形成固体沉淀物,倾析上清液,并将固体沉淀物用醚细磨额外两次,并在真空中干燥。将粗肽在20%乙腈/水中溶解,并通过RP-HPLC在C8制备型柱(Luna 21 x 250 mm, Phenomenex, Torrance, CA)上以乙腈和水的线性梯度、使用三种不同的缓冲液体系进行提纯:

[0241] 1) 0.1 M的水中的乙酸铵,pH 5.0;

[0242] 2) 0.1 %的水中的TFA;和

[0243] 3) 5%的水中的乙酸。

[0244] 接着冻干最终主产物集合物,生成冻干的肽乙酸盐。

[0245] 在主要如上所述地实施的合成中,化合物1的纯度使用分析RP-HPLC来评价,并且被发现为>97%。

[0246] 分子量通过分析电喷雾MS来确定。化合物1的分子量被计算为4535.0道尔顿,而所观察到的去卷积平均分子量被确定为4535.0道尔顿,且观察到下述离子:1512.3(M+3H)、1134.3(M+4H)、908(M+5H)。

[0247] 实施例2

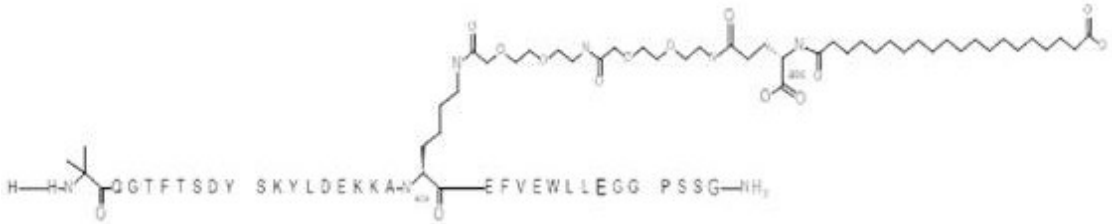
[0248] HXaa2QGTFTSDYSKYLDEKKAKEFVEWLLEGGPSSG

[0249] 其中Xaa2是Aib;

[0250] 20位的K通过用([2-(2-氨基-乙氧基)-乙氧基]-乙酰基)₂-(γ Glu)₁-CO-(CH₂)₁₈-CO₂H缀合于K侧链的ε-氨基从而被化学修饰;且

[0251] C端氨基酸被酰胺化为C端伯酰胺(SEQ ID NO: 6)。

[0252]



[0253] 上图除了残基Aib2和K20之外使用标准的单字母氨基酸编码说明了SEQ ID NO: 6的化合物(后文称为“化合物2”)的结构,所述残基Aib2和K20中,这些氨基酸的结构已被扩展。

[0254] 化合物2如实施例1那样合成,除了将单-OtBu-二十烷二酸(WuXi AppTec, Shanghai, China)经18小时使用3倍过量的AA:HATU:DIPEA(1:1:5 mol/mol)偶联于树脂,而非如实施例1中那样为单-OtBu-十八烷二酸。

[0255] 化合物2的分子量被计算为4563.1道尔顿,而所观察到的去卷积平均分子量被确定为4562.9道尔顿,且观察到下述离子:1521.7 (M+3H)、1141.3 (M+4H)、913.5 (M+5H)。

[0256] 实施例3

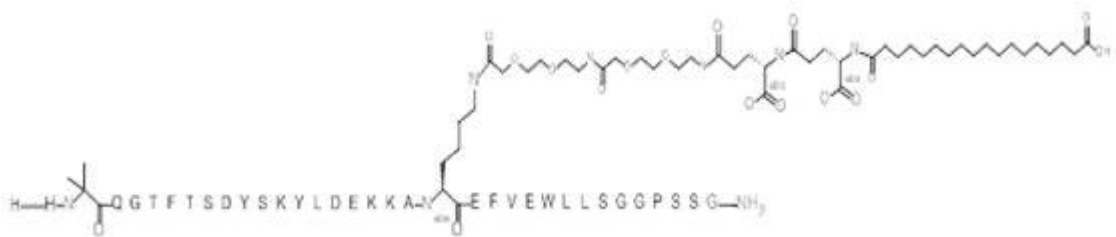
[0257] HXaa2QGTFTSDYSKYLDEKKAKEFVEWLLSGGPSSG

[0258] 其中Xaa2是Aib;

[0259] 20位的K通过用([2-(2-氨基-乙氧基)-乙氧基]-乙酰基)₂-(γ Glu)₂-CO-(CH₂)₁₆-CO₂H缀合于K侧链的ε-氨基从而被化学修饰;且

[0260] C端氨基酸被酰胺化为C端伯酰胺(SEQ ID NO: 7)。

[0261]



[0262] 上图除了残基Aib2和K20之外使用标准的单字母氨基酸编码说明了SEQ ID NO: 7的化合物(后文称为“化合物3”)的结构,所述残基Aib2和K20中,这些氨基酸的结构已被扩展。

[0263] 化合物3如实施例1那样合成,除了在接头合成循环中添加额外的Fmoc-Glu-OtBu部分。

[0264] 化合物3的分子量被计算为4622.1道尔顿,而所观察到的去卷积平均分子量被确定为4621.9道尔顿,且观察到下述离子:1541.3 (M+3H)、1156.2 (M+4H)、925.2 (M+5H)。

[0265] 实施例4

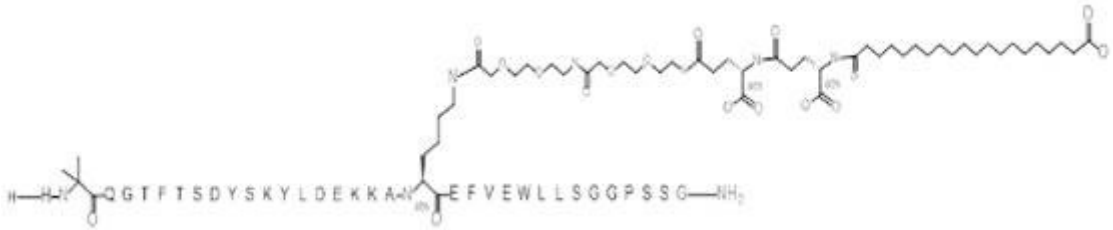
[0266] HXaa2QGTFTSDYSKYLDEKKAKEFVEWLLSGGPSSG

[0267] 其中Xaa2是Aib;

[0268] 20位的K通过用([2-(2-氨基-乙氧基)-乙氧基]-乙酰基)₂-(γ Glu)₂-CO-(CH₂)₁₈-CO₂H缀合于K侧链的ε-氨基从而被化学修饰;且

[0269] C端氨基酸被酰胺化为C端伯酰胺(SEQ ID NO: 8)。

[0270]



[0271] 上图除了残基Aib2和K20之外使用标准的单字母氨基酸编码说明了SEQ ID NO: 8的化合物(后文称为“化合物4”)的结构,所述残基Aib2和K20中,这些氨基酸的结构已被扩展。

[0272] 化合物4如实施例1那样合成,除了将单-OtBu-二十烷二酸(WuXi AppTec, Shanghai, China)经18小时使用3倍过量的AA:HATU:DIPEA(1:1:5 mol/mol)而偶联于树脂,而非如实施例1中所使用的单-OtBu-十八烷二酸。此外,在接头合成循环中添加额外的氨基酸Fmoc-Glu-OtBu部分。

[0273] 所述肽的分子量被计算为4650.1道尔顿,而所观察到的去卷积平均分子量被确定为4650.1道尔顿,且观察到下述离子:1550.7 (M+3H)、1163.3 (M+4H)、930.8 (M+5H)。

[0274] 物理特征

[0275] 粘度

[0276] 本发明的化合物的粘度以下述设置在Rheosense mVroc粘度计中测量:

[0277] (a) 注射器尺寸:500 μL 注射器

[0278] (b) 流速:100 μL/分钟流速

[0279] (c) 平均温度: 25°C

[0280] (d) 剪切速率:1934 s⁻¹

[0281] 称量干燥粉末(化合物),在水中溶解为浑浊沉淀,并且用1N NaOH滴定至约pH 8.0。对溶液进行超声处理,并且用手摇动直至肽处于溶液状态。将样品进行无菌过滤(0.22 μm PVDF过滤器)。然后,将样品通过UV-Vis来评价储备溶液浓度。将溶液使用在10 mM Tris pH 8.0缓冲液中的3x间甲酚稀释至终浓度,至以重量计在10 mM Tris + 3 mg/mL 间甲酚中、在pH 8.0下约10 mg/mL肽的终浓度。紧接粘度分析之前,将样品通过0.22 μm过滤器过滤。在分析之前和之后,移出25 μL的样品来通过RP-HPLC验证浓度。

[0282] 在分析各样品之前和之后,测量水和缓冲液对照样品。在各样品的分析之间,将仪器用缓冲液(3x)洗涤。将样品载入单独的注射器中并分析。第一次测量不包括在最终计算中,从而允许系统平衡。然后以一式三份分析样品(n=3)。

[0283] 化合物1-4的粘度本质上如在本测定中描述地测量。化合物1-4的粘度数据总结于表1。

[0284] 表1:化合物1-4的粘度数据

[0285]

| 样品 | 500 μL 注射器粘度 (cP或mPa-s) |
|-------|-------------------------|
| 缓冲液对照 | 0.99 |

| | |
|------|------|
| 化合物1 | 1.06 |
| 化合物2 | 1.04 |
| 化合物3 | 1.03 |
| 化合物4 | 1.05 |

[0286] 溶解性

[0287] 本发明的化合物的溶解性在Agilent 1100 HPLC、Agilent 1200 HPLC和Nanodrop 2000中测量。使用下述HPLC柱：

[0288] (a) RP-HPLC:Waters Symmetry Shield C18,3.6 μ m,4.6 x 100 mm

[0289] (b) HPLC-SEC:Tosoh Biosciences,TSK2000SWXL 7.8 cm x 30 mm

[0290] 使得所有肽浓度在下述中为10 mg/mL：

[0291] (a) 10 mM Tris pH 8.0 + 3 mg/mL 间甲酚

[0292] (b) 10 mM Tris pH 8.0 + 3 mg/mL 间甲酚 + 150 mM NaCl

[0293] (c) 10 mM Tris pH 8.0 + 3 mg/mL 间甲酚 +0.02% Tween-20

[0294] (d) PBS pH 7.4

[0295] 将溶解于pH 8.0下的10 mM Tris中的5mL的10 mg/mL 肽使用Amicon-ultra 3kDa MWC0设备浓缩至约20 mg/mL。将溶液使用Millivex 0.22 μ m过滤器(PVDF膜)过滤并且通过NanoDrop光谱仪测量终浓度。使用该储备溶液,使用3x 间甲酚、10x NaCl和100x Tween-20储备溶液来配制上述最终条件。还通过直接以5 mg/mL溶解并且使用Amicon-ultra 3kDa MWC0设备浓缩来制备10 mg/mL PBS溶液。

[0296] 将个溶液放置在4°C下的冰箱中1周,通过RP-HPLC来评价浓度,并且通过HPLC-SEC来评价HMW物种形成。在T-0周和T-1周完成分析。

[0297] 化合物1-4的溶解性本质上如在本测定中描述地测量。化合物1-4的溶解性数据总结于表2(a) - (d)。

[0298] 表2(a):化合物1的溶解性数据

| 参数 | 总结 |
|-----------------|---|
| [0299] 溶解性 / 溶解 | <p>Tris pH 8 + 3mg/mL 间甲酚(T8m)中的 10 mg/mL 溶解性;</p> <p>Tris pH 8 + 3mg/mL 间甲酚 + 150 mm NaCl(T8Nm)中的 10 mg/mL 溶解性;</p> <p>Tris pH 8 + 3mg/mL 间甲酚 + 0.02% Tween-20(T8Tm)中的 10 mg/mL 溶解性;</p> <p>PBS, pH 7.4 中的 10 mg/mL 溶解性;</p> <p>在储存于 4°C下 1周后, 没有观察到可见的沉淀或相分离;</p> <p>通过 SEC-HPLC 没有观察到 HMW 种类形成;</p> <p>RP-HPLC 证明经 1周的研究期间, 维持了 10 mg/mL 浓度。</p> |

[0300] 表2(b):化合物2的溶解性数据

| 参数 | 总结 |
|-----------------|--|
| [0301] 溶解性 / 溶解 | <p>Tris pH 8 + 3mg/mL 间甲酚(T8m)中的 10 mg/mL 溶解性;</p> <p>Tris pH 8 + 3mg/mL 间甲酚 + 150 mm NaCl(T8Nm)中的 10 mg/mL 溶解性;</p> <p>Tris pH 8 + 3mg/mL 间甲酚 + 0.02% Tween-20(T8Tm)中的 10 mg/mL 溶解性;</p> <p>PBS, pH 7.4 中的 10 mg/mL 溶解性;</p> <p>在储存于 4℃下 1 周后, 没有观察到可见的沉淀或相分离;</p> <p>通过 SEC-HPLC 没有观察到 HMW 种类形成;</p> <p>RP-HPLC 证明经 1 周的研究期间, 维持了 10 mg/mL 浓度。</p> |

[0302] 表2(c):化合物3的溶解性数据

| 参数 | 总结 |
|-----------------|--|
| [0303] 溶解性 / 溶解 | <p>Tris pH 8 + 3mg/mL 间甲酚(T8m)中的 10 mg/mL 溶解性;</p> <p>Tris pH 8 + 3mg/mL 间甲酚 + 150 mm NaCl(T8Nm)中的 10 mg/mL 溶解性;</p> <p>Tris pH 8 + 3mg/mL 间甲酚 + 0.02% Tween-20(T8Tm)中的 10 mg/mL 溶解性;</p> <p>PBS, pH 7.4 中的 10 mg/mL 溶解性;</p> <p>在储存于 4℃下 1 周后, 没有观察到可见的沉淀或相分离;</p> <p>通过 SEC-HPLC 没有观察到 HMW 种类形成;</p> <p>RP-HPLC 证明经 1 周的研究期间, 维持了 10 mg/mL 浓度。</p> |

[0304] 表2(d):化合物4的溶解性数据

| 参数 | 总结 |
|-----------------|--|
| [0305] 溶解性 / 溶解 | <p>Tris pH 8 + 3mg/mL 间甲酚(T8m)中的 10 mg/mL 溶解性;</p> <p>Tris pH 8 + 3mg/mL 间甲酚 + 150 mm NaCl(T8Nm)中的 10 mg/mL 溶解性;</p> <p>Tris pH 8 + 3mg/mL 间甲酚 + 0.02% Tween-20(T8Tm)中的 10 mg/mL 溶解性;</p> <p>PBS, pH 7.4 中的 10 mg/mL 溶解性;</p> <p>在储存于 4℃下 1 周后, 没有观察到可见的沉淀或相分离;</p> <p>通过 SEC-HPLC 没有观察到 HMW 种类形成;</p> <p>RP-HPLC 证明经 1 周的研究期间, 维持了 10 mg/mL 浓度。</p> |

[0306] 体外功能

[0307] 化合物1-4对重组的人Gcg受体(hGcg-R)和人GLP-1受体(hGLP-1-R)的结合亲和性

[0308] 实施使用闪烁逼近分析(SPA)法和由过表达hGcg-R或hGLP-1-R的293HEK稳定转染细胞制备的膜的放射性配体竞争结合测定,从而确定化合物1-4平衡解离常数(K_i)。实验程序和结果描述于下文。

[0309] hGLP-1R结合测定

[0310] GLP-1受体结合测定使用由过表达重组的hGLP-1R的293HEK细胞分离出的克隆hGLP-1-R(Graziano MP,Hey PJ,Borkowski D,Chicchi GG,Strader CD,Biochem Biophys

Res Commun. 196 (1): 141-6, 1993)。hGLP-1R cDNA被亚克隆为表达质粒pHD (Trans-activated expression of fully gamma-carboxylated recombinant human protein C, an antithrombotic factor. Grinnell, B.W., Berg, D.T., Walls, J.和Yan, S.B. Bio/Technology 5:1189-1192, 1987)。将该质粒DNA转染进入293HEK细胞,并用200 µg/mL潮霉素选择。

[0311] 使用来自贴壁培养的细胞制备粗质膜。在含有50 mM Tris HCl, pH 7.5和含EDTA的Roche Complete™蛋白酶抑制剂的低渗缓冲液中,细胞在冰上溶解。使用装有Teflon®研磨棒的玻璃Potter-Elvehjem均化器敲击25次破坏细胞悬液。将匀浆在4°C下以1100 x g离心10分钟。收集上清液并在冰上储存,同时将沉淀物在低渗缓冲液中重悬并重均化。将混合物以1100 x g离心10分钟。将第二上清液与第一上清液合并,并且在4°C下以35000 x g离心1小时。将膜沉淀物在含有蛋白酶抑制剂的均化缓冲液中重悬,在液氮中快速冷冻,并且以等分试样在-80 °C冷冻箱中储存至使用。

[0312] GLP-1通过I-125-乳过氧化物酶程序而被放射碘化,并且通过反向HPLC在Perkin-Elmer (NEX308)上提纯。比活度为2200 Ci/mmol。由于I-125 GLP-1材料中的高丙醇含量,通过同源竞争而非饱和结合来实施 K_D 确定。 K_D 被预计为1.24 nM,并且被用于计算所有测试化合物的 K_i 值。

[0313] 受体结合测定使用闪烁逼近分析 (SPA) 方式,用麦胚凝集素 (WGA) 微珠 (Perkin Elmer) 实施。结合缓冲液含有25 mM 4-(2-羟基乙基)-1-哌嗪乙磺酸 (HEPES)、pH 7.4、2.5 mM $CaCl_2$ 、1 mM $MgCl_2$ 、0.1% (w/v) 杆菌肽 (Affymetrix)、0.003% (w/v) 聚氧乙烯脱水山梨糖醇单月桂酸酯 (TWEEN®-20) 和不含EDTA的Roche Complete™蛋白酶抑制剂。将GLP-1以0.339 mg/mL (0.1 mM) 溶解于DMSO中,并以100 µL等分试样在-20°C下冷冻储存。在一小时内,稀释GLP-1等分试样并在结合测定中使用。将肽类似物溶解于二甲基亚砜 (DMSO) 中,并在100% DMSO中连续稀释3倍。接着,将5 µL连续稀释的化合物或DMSO转移至含45 µL 测定结合缓冲液或无标记的GLP-1对照 (0.25 µM终浓度下非特异性结合 (NSB)) 的Corning® 3632澄清底测定板中。接着,添加50 µL hGLP-1R膜 (0.5 µg/孔)、50 µL I-125 GLP-1 (0.15 nM终浓度) 和50 µL的WGA微珠 (150 µg/孔),将板密封并在板振动器 (设置6) 上混合1分钟。在室温下12小时的静置时间后,用PerkinElmer Trilux MicroBeta® 闪烁体计数器对板进行读数。

[0314] 结果被计算为化合物的存在下的特异性I-125-GLP-1结合百分比。通过I-125-GLP-1的百分比特异性结合对所添加化合物的非线性回归而推导出化合物的绝对 IC_{50} 浓度。 IC_{50} 浓度使用Cheng-Prusoff公式而转化为 K_i (Cheng, Y., Prusoff, W. H., Biochem. Pharmacol. 22, 3099-3108, (1973))。

[0315] 化合物1-4、人Gcg和人GLP-1 (7-36) NH_2 在hGLP-1-R下的 K_i 示于下述表3。重复次数 (n) 在括号中说明。(>) 限定表明%抑制率未达到50%,并且所计算的 K_i 是使用最高测试浓度获得。 $n=1/n$ 表明当所有值具有>标志并未计算平均值,并且示出的值为最高的计算值。

[0316] 表3: 化合物1-4、人Gcg和人GLP-1 (7-36) NH_2 在hGLP-1-R下的 K_i

[0317]

| 化合物 | K_i , nM ± SEM, (n) |
|------|-----------------------|
| 化合物1 | 23.0 ± 5.5 (n=6) |
| 化合物2 | 28.6 ± 4.8 (n=4) |

| | |
|-------------------------------|---------------------|
| 化合物3 | 8.68 ± 1.60 (n=4) |
| 化合物4 | 20.2 ± 8.2 (n=4) |
| 人Gcg | >4940 (n=1/2) |
| 人GLP-1 (7-36) NH ₂ | 0.75 ± 0.056 (n=67) |

[0318] hGcg-R结合测定

[0319] Gcg受体结合测定利用由过表达重组hGcg-R的293HEK细胞分离的克隆hGcg-R (Lok, S等人, Gene 140 (2), 203-209 (1994))。hGcg-R cDNA被亚克隆为表达质粒pHD (Trans-activated expression of fully gamma-carboxylated recombinant human protein C, an antithrombotic factor. Grinnell, B.W.等人, Bio/Technology 5: 1189-1192 (1987))。将该质粒DNA转染进入293HEK细胞,并用200 µg/mL潮霉素选择。

[0320] 使用来自贴壁培养的细胞制备粗质膜。在含有50 mM Tris HCl, pH 7.5和含EDTA的Roche Complete™蛋白酶抑制剂的低渗缓冲液中,细胞在冰上溶解。使用装有Teflon®研磨棒的玻璃Potter-Elvehjem均化器敲击25次破坏细胞悬液。将匀浆在4°C下以1100 x g离心10分钟。收集上清液并在冰上储存,同时将沉淀物在低渗缓冲液中重悬并重均化。将混合物以1100 x g离心10分钟。将第二上清液与第一上清液合并,并且在4°C下以35000 x g离心1小时。将膜沉淀物在含有蛋白酶抑制剂的均化缓冲液中重悬,在液氮中快速冷冻,并且以等分试样在-80 °C冷冻箱中储存至使用。

[0321] Gcg通过I-125-乳过氧化物酶程序而被放射碘化,并且通过反向HPLC在Perkin-Elmer (NEX207) 上提纯。比活度为2200 Ci/mmol。由于I-125 Gcg材料中的高丙醇含量,通过同源竞争而非饱和结合来实施K_D确定。K_D被预计为3.92 nM,并且被用于计算所有测试化合物的K_i值。

[0322] 受体结合测定使用闪烁逼近分析 (SPA) 方式,用麦胚凝集素 (WGA) 微珠 (Perkin Elmer) 实施。结合缓冲液含有25 mM HEPES、pH 7.4、2.5 mM CaCl₂、1 mM MgCl₂、0.1% (w/v) 杆菌肽 (Affymetrix)、0.003% (w/v) 聚氧乙烯脱水山梨糖醇单月桂酸酯 (TWEEN® -20) 和不含EDTA的Roche Complete™蛋白酶抑制剂。将Gcg以3.48 mg/mL (1 mM) 溶解于DMSO中,并以100 µL等分试样在-20°C下冷冻储存。在一小时内,稀释Gcg等分试样并在结合测定中使用。将肽类似物溶解于DMSO中,并在100% DMSO中连续稀释3倍。接着,将5 µL连续稀释的化合物或DMSO转移至含45 µL 测定结合缓冲液或未标签的Gcg对照 (1 µM终浓度下NSB) 的Corning® 3632澄清底测定板中。接着,添加50 µL hGcg-R膜 (0.5 µg/孔)、50 µL I-125 Gcg (0.15 nM反应终浓度) 和50 µL的WGA微珠 (150 µg/孔),将板密封并在板振荡器 (设置6) 上混合1分钟。在室温下12小时的静置时间后,用PerkinElmer Trilux MicroBeta® 闪烁体计数器对板进行读数。

[0323] 结果被计算为化合物的存在下的特异性I-125-Gcg结合百分比。通过I-125-Gcg的百分比特异性结合对所添加化合物的非线性回归而推导出化合物的绝对IC₅₀浓度。IC₅₀浓度使用Cheng-Prusoff公式而转化为K_i (Cheng, Y., Prusoff, W. H., Biochem. Pharmacol. 22, 3099-3108, (1973))。化合物1-4、人Gcg和人GLP-1 (7-36) NH₂在hGcg-R下的K_i示于下述表4。重复次数 (n) 在括号中说明。(>) 限定表明%抑制率未达到50%,并且所计算的K_i使用最高测试浓度而获得。n=1/2表明当所有值具有>标志并时未计算平均值,并且示出的结果值为最高的计算值。

[0324] 表4: 化合物1-4、人Gcg和人GLP-1 (7-36) NH₂在hGcg-R下的K_i

| 化合物 | K _i , nM ± SEM, (n) |
|-------------------------------|--------------------------------|
| 化合物1 | 14.6 ± 4.4 (n=6) |
| 化合物2 | 17.7 ± 5.0 (n=4) |
| 化合物3 | 37.3 ± 4.2 (n=4) |
| 化合物4 | 27.4 ± 3.3 (n=4) |
| 人Gcg | 2.49 ± 0.24 (n=73) |
| 人GLP-1 (7-36) NH ₂ | >2420 (n=1/2) |

[0326] 功能hGLP-1-R和hGcg-R测定

[0327] 在表达hGLP-1-R和hGcg-R的HEK-293无性繁殖细胞系中确定功能活性。实验程序和结果描述于下文。

[0328] 将各过表达受体的细胞系以40μL的测定体积在DMEM (达尔伯克改良伊格尔培养基, Gibco Cat# 31053) 中的肽处理, 所述DMEM补充有1X GlutaMAX™ (L-丙氨酸-L-谷氨酰胺二肽在0.85% NaCl中, Gibco Cat# 35050)、0.25% FBS (透析胎牛血清, Gibco Cat# 26400)、0.05% 级分V BSA (牛白蛋白级分V, Gibco Cat# 15260)、250 μM IBMX (3-异丁基-1-甲基黄嘌呤) 和20 mM HEPES [N-(2-羟基乙基) 哌嗪-N'-(2-乙磺酸), HyClone Cat# SH30237.01]。在室温下60分钟温育后, 使用CisBio cAMP Dynamic 2 HTRF试剂盒 (62AM4PEJ) 来定量确定所得到的细胞内cAMP (3', 5'-环单磷酸腺苷) 的增长。通过向细胞裂解缓冲液中添加cAMP-d2缀合物 (20 μl), 随后同样向细胞裂解缓冲液中添加抗体抗cAMP-Eu³⁺-穴合物 (20 μl) 来检测细胞内cAMP水平。将所得竞争测定在室温下温育至少60分钟, 然后使用PerkinElmer Envision® 仪器以320 nm下的激发以及665 nm和620 nm下的发射来检测。Envision单元 (665nm/620nm下发射*10,000) 与存在的cAMP的量成反比, 并且使用cAMP标准曲线而被转化为每孔nM cAMP。各孔中产生的cAMP的量 (nM) 被转化为用10 nM 人GLP-1 (7-36) NH₂或10 nM 人Gcg观察到的最大响应的百分比。

[0329] 相对EC₅₀值和百分比最大值 (E_{max}) 通过非线性回归分析、使用百分比最大响应对所添加的肽的浓度, 拟合为四参数逻辑斯谛方程而推导出 (Genedata Screener®)。

[0330] 化合物1-4、人GLP-1 (7-36) NH₂、人Gcg和野生型人OXM的功能数据示于下述表5。EC₅₀的平均值被表示为几何平均值 ± 平均标准误差 (SEM), 且带有在括号中表示的重复数 (n)。E_{max}的平均值被表示为算数平均值 ± 标准误差。ND表明没有检测到激动剂活性。所有示出的值为三位 (3) 有效数字。

[0331] 表5: 化合物1-4、人GLP-1 (7-36) NH₂、人Gcg和野生型人OXM的功能功效 (EC₅₀) 和效能 (E_{max})

[0332]

| 化合物 | 人 GLP-1-R | | 人 Gcg-R | |
|------------------------------|----------------------------------|----------------------|----------------------------------|----------------------|
| | EC ₅₀ , nM ± SEM, (n) | E _{max} , % | EC ₅₀ , nM ± SEM, (n) | E _{max} , % |
| 化合物 1 | 23.9 ± 4.5(13) | 104 ± 7 | 7.21 ± 1.06(13) | 112 ± 3 |
| 化合物 2 | 83.1 ± 16.8(15) | 107 ± 7 | 26.5 ± 2.2(15) | 114 ± 5 |
| 化合物 3 | 34.3 ± 9.4(13) | 105 ± 5 | 15.3 ± 2.2(13) | 104 ± 5 |
| 化合物 4 | 106 ± 18(13) | 85.2 ± 6.0 | 68.8 ± 7.2(15) | 116 ± 4 |
| 人 Gcg | ND | ND | 0.023 ± 0.014(47) | 113 ± 1 |
| 人 GLP-1(7-36)NH ₂ | 0.168 ± 0.008(51) | 101 ± 1 | ND | ND |
| 野生型人 OXM | 9.54 ± 1.34(8) | 96.9 ± 5.7 | 0.757 ± 0.090(8) | 121 ± 7 |

[0333] 在胰岛瘤细胞系INS1 832-3中的大鼠GLP-1-R的功能活化

[0334] 使用大鼠胰腺β-细胞系、INS1 832-3 细胞来确定化合物1-4在内生GLP-1受体刺激cAMP生产上的功能活性。细胞在37℃、5%CO₂温育箱中被保持在RPMI 1640培养基(HyClone, Cat# SH30027)中并每周传代两次,所述培养基补充有10%胎牛血清、10 mM HEPES、1 mM丙酮酸钠、2 mM L-谷氨酰胺、50 μM 2-巯基乙醇和100U/ml 青霉素/100μg/ml 链霉素。

[0335] 测定的实施需要使用无酶细胞分离剂将细胞从培养瓶上脱离,并且在室温下通过以1000 rpm离心5分钟沉淀。细胞沉淀物重悬于Earle's平衡盐溶液(EBSS)中,所述溶液补充有11.2 mM葡萄糖和0.1% BSA。将密度为1x10⁶/ml的40 μl的细胞悬液放置于96孔半量黑色微孔板(Costar 3875)中,并在37℃、5% CO₂温育箱中温育2小时以复苏并饥饿。以100X最终测试浓度在100% DMSO中制备测试化合物的连续稀释液,并且进一步在补充有11.2 mM葡萄糖、0.1% BSA和1.25 mM IBMX(Sigma I-7816)的EBSS中稀释20倍。2小时饥饿后,通过添加10 μl的5X 化合物稀释液至细胞微孔板(n = 2)并在37℃、5% CO₂温育箱中温育30分钟,从而将细胞用化合物处理。

[0336] 使用HTRF cAMP测定试剂盒(Cisbio)来测量cAMP浓度:向微孔板的细胞添加细胞裂解缓冲液中的cAMP-d2缀合物(20 μl)、接着添加同样在细胞裂解缓冲液中的抗体抗cAMP-Eu³⁺-穴合物(20 μl)。将所得竞争测定在室温下温育至少60分钟,然后使用PerkinElmer Envision® 仪器以320 nm下的激发以及665 nm和620 nm下的发射来检测。Envision单元(665nm/620nm下发射*10,000)与存在的cAMP的量成反比,并且使用cAMP标准曲线转化为每孔nM cAMP。

[0337] 使用cAMP标准曲线计算各孔中的cAMP的浓度(nM),并且将其转化为对于曲线拟合的在用300 nM下的天然GLP-1肽观察到的最大响应的百分比。

[0338] 相对EC₅₀值和百分比最大值(%E_{max})通过非线性回归分析,使用百分比最大响应相

对于所添加的肽的浓度,拟合为四参数逻辑斯谛方程而推导出(GraphPad Prism (版本 6.05) 软件)。测定用一式两份的微孔板实施。重复次数(n)在括号中说明。

[0339] 野生型人OXM、索马鲁肽以及化合物1和2的 EC_{50} 和 E_{max} 本质上如上所述地计算。这些化合物 EC_{50} 和 E_{max} 数据被提供于表6中。进一步,以剂量依赖方式,化合物1和2增加了cAMP产量(数据未示出)。

[0340] 表6:野生型人OXM、索马鲁肽以及化合物1和2在胰岛瘤细胞系INS1 832-3中在大鼠GLP-1-R的 EC_{50}

| 化合物 | EC_{50} (nM) | E_{max} (%) |
|---------|----------------|---------------|
| 野生型人OXM | 7.3 (n=1) | 121.1 |
| 索马鲁肽 | 5.8 (n=1) | 107.2 |
| 化合物1 | 26.1 (n=1) | 112.3 |
| 化合物2 | 62 (n=1) | 104.5 |

[0342] 在人原代肝细胞中的hGcg-R的功能活化

[0343] 使用人原代肝细胞来确定化合物在内生Gcg受体下刺激cAMP生产方面的功能活性。

[0344] 将人原代肝细胞的小瓶在液氮罐中冷冻。在移出时,将小瓶立刻在具有37°C的温度的水浴中解冻。然后,将细胞悬液转移至50 ml CHRM(Gibco/Life Technologies cat# CM7000 冻存肝细胞复苏培养基)。

[0345] 将细胞悬液以1,000 x g离心10min。在通过抽吸除去CHRM之后,将细胞沉淀物在5ml的铺板培养基中重悬。铺板培养基通过向500ml Williams培养基(Gibco/Life Technologies)添加全成分的CM3000 Supplement Packs制备,并通过0.22 μ m膜进行无菌过滤。

[0346] 通过添加100 μ l的细胞悬液至100 μ l台盼蓝(HyClone Trypan Blue 0.04%,目录号SV30084.01),在血细胞计数器上对细胞密度进行计数。将细胞悬液进一步在铺板培养基中稀释至 0.8×10^6 细胞/ml的最终细胞密度。将65 ml的铺板培养基添加至胶原包被的96孔微孔板(Corning BioCoat,目录编号354649, Lot# 22314033)的各孔。然后将65 ml细胞悬液添加至胶原包被的96孔微孔板的各孔至最终细胞密度为50,000细胞/孔。将细胞微孔板在37°C、5% CO₂的温育箱中温育3~4小时。

[0347] 在3~4小时温育之后,抽吸培养基,并用100 ml维持培养基替换。维持培养基通过向500ml Williams培养基(Gibco/Life Technologies)添加全成分的CM4000 Supplement Packs,并通过0.22 μ m膜进行无菌过滤。在cAMP测定的准备中,将细胞微孔板返回至37°C、5% CO₂温育箱过夜。

[0348] 在测定的准备中,使化合物1和2以及野生型人OXM经受10个浓度的在化合物测定缓冲液(含20 mM HEPES和1% 热灭活的FBS的HBSS)中的3倍连续稀释。

[0349] 将细胞微孔板从温育箱中移出,并通过温和抽吸而不搅动细胞单层除去培养基。通过添加40 μ l的细胞测定缓冲液和40 μ l的测试溶液(即在化合物测定缓冲液中稀释的化合物1、化合物2或野生型人OXM)至细胞微孔板中来处理细胞,并在室温下以温和抽吸温育1小时。

[0350] 使用HTRF cAMP测定试剂盒(Cisbio)来测量cAMP浓度:向微孔板的细胞添加细胞

裂解缓冲液中的cAMP-d2缀合物(40 μ l),接着添加同样在细胞裂解缓冲液中的抗体抗cAMP-Eu³⁺-穴合物(40 μ l)。将所得竞争测定在室温下温育至少60分钟,然后使用PerkinElmer Envision® 仪器以320 nm下的激发以及665 nm和620 nm下的发射来检测。Envision单元(665nm/620nm下发射*10,000)与存在的cAMP的量成反比,并且使用cAMP标准曲线转化为每孔nM cAMP。

[0351] 使用cAMP标准曲线各孔中的cAMP的浓度(nM),并且将其转化为对曲线拟合而言用缀合于饱和C18脂肪酸(二元酸)的Gcg类似物观察到的最大响应的百分比。

[0352] 相对EC₅₀值和百分比最大值(%E_{max})通过非线性回归分析,使用百分比最大响应对所添加的肽的浓度,拟合为四参数逻辑斯谛方程而推导出(GraphPad Prism (版本6.05)软件)。

[0353] 化合物1和2以及野生型人OXM的EC₅₀和% E_{max}本质上如上所述地计算。这些化合物EC₅₀和% E_{max}数据被提供于表7中。进一步,以剂量依赖方式,化合物1和2增加了cAMP产生(数据未示出)。重复次数(n)在括号中说明。

[0354] 表7:人原代肝细胞中在hGcg-R上的化合物1和2以及野生型人OXM的EC₅₀

| 化合物 | EC ₅₀ (nM) | E _{max} (%) |
|---------|-----------------------|----------------------|
| 野生型人OXM | 29.8 (n=1) | 90.0 |
| 化合物1 | 99.9 (n=1) | 100.0 |
| 化合物2 | 159.4 (n=1) | 101.2 |

[0356] 药代动力学

[0357] 食蟹猴中的药代动力学

[0358] 使用食蟹猴证明本发明的化合物的体内药代动力学特性。

[0359] 化合物通过50 nmole/kg或250 nmole/kg的单次静脉内或皮下剂量施用。在给药后4、8、12、24、48、72、96、120、144、168、192、240、288、208、480、576和672小时,从各动物收集血液。

[0360] 通过LC/MS法确定化合物的血浆浓度。简而言之,使用乙腈从100%猴血浆(25 μ l)中萃取出本发明的化合物。在离心使形成两个分离的层,其中化合物位于液体层。将80 μ l等分试样的上清液转移至96孔微孔板,用150 μ l的水和25 μ l的甲酸稀释。将经稀释的样品(10 μ l)注射于Supelco Analytical Discovery BIO Wide Pore C5-3,5 cm X 1 mm,3 μ m柱上。将柱流出液导入Thermo Q-Exactive质谱仪以检测并定量。

[0361] 在本质上如针对该测定而描述地实施的实验中,对食蟹猴以0.20 mL/kg的体积施用单次皮下(50 nmole/kg)剂量的40 mM Tris HCl (pH 8.0)中的化合物1。在给药后2(仅IV)、7、12、24、48、72、96、120、168、192、240、336、480、576和672小时,从各动物收集血液。

[0362] 对其它食蟹猴以0.20 mL/kg的体积施用单次静脉内(50 nmole/kg)或皮下(50或250 nmole/kg)剂量的40 mM Tris HCl (pH 8.0)中的化合物2。在给药后2(仅IV)、7、12、24、48、72、96、120、168、192、240、336、480、576和672小时,从各动物收集血液。

[0363] 化合物1的数据提供于表9,并且化合物2的数据提供于表10。

[0364] 化合物1在50 nmol/kg皮下剂量之后约12小时达到平均最大血浆浓度。平均半衰期为57小时,且平均清除率为2.16 mL/小时/kg(表8)。

[0365] 化合物2在50 nmol/kg皮下剂量之后约24小时达到平均最大血浆浓度。平均半衰

期为122小时,且平均清除率为0.55 mL/小时/kg(表9)。

[0366] 表8:对雄性食蟹猴单次50 nmol/kg皮下给药的化合物1之后的单独的和平均药代动力学参数

| 化合物 | 动物 ID | T _{1/2} (小时) | T _{max} (小时) | C _{max} (nmol/L) | AUC _{0-∞} (hr*nmol/L) | CL/F(mL/hr/kg) |
|---------------------------------|--------|-----------------------|-----------------------|---------------------------|--------------------------------|----------------|
| [0367] 化合物 1:SC 50nmol/kg | I07762 | 47 | 12 | 253 | 21672 | 2.31 |
| | I07763 | 67 | 12 | 236 | 24865 | 2.01 |
| | 平均 | 57 | 12 | 244 | 23268 | 2.16 |

[0368] 缩写:AUC_{0-∞} = 0至无穷大的曲线下面积,CL/F =清除率/生物利用度,T_{max} = 到达最大浓度的时间,C_{max} = 最大血浆浓度,T_{1/2} = 半衰期。

[0369] 表9:对雄性食蟹猴单次静脉内或皮下给药之后的化合物2的单独或平均药代动力学参数

| 化合物/途径/ 剂量 | 动物 ID | T _{1/2} (小时) | T _{max} (小时) | C ₀ 或C _{max} (nmol/L) | AUC _{0-∞} (hr*nmol/L) | CL/F(mL/hr/kg) |
|------------------------------|--------|-----------------------|-----------------------|---|--------------------------------|----------------|
| [0370] 化合物 2:IV 50nmol/kg | I07772 | 88 | NA | 1017 | 94828 | 0.53 |
| | I07773 | 131 | NA | 1105 | 93174 | 0.54 |
| | 平均 | 110 | NA | 1061 | 94001 | 0.53 |
| 化合物 2:SC 50nmol/kg | I07764 | 137 | 24 | 474 | 100967 | 0.50 |
| | I07765 | 106 | 24 | 452 | 82792 | 0.60 |
| | 平均 | 122 | 24 | 463 | 91879 | 0.55 |
| 化合物 2:SC 250nmol/kg | I07766 | 115 | 12 | 3640 | 429859 | 0.58 |
| | I07767 | 104 | 12 | 3615 | 540175 | 0.46 |
| | 平均 | 110 | 12 | 3628 | 485017 | 0.52 |

[0371] 缩写:AUC_{0-∞} = 0至无穷大的曲线下面积,CL = 清除率,CL/F = 清除率/生物利用度,T_{max} = 到达最大浓度的时间,C₀ = 外延至时间为0小时的浓度,C_{max} = 最大血浆浓度,T_{1/2} = 半衰期,NA = 不适用。

[0372] 体内研究

[0373] DIO小鼠中的口服葡萄糖耐量测试(OGTT)

[0374] 饮食诱导肥胖的(DIO)小鼠模型是胰岛素耐受性的模型。在本研究中,使用来自Taconic Biosciences的五至六月龄的雄性DIO小鼠(C57BL/6)。将动物在温度受控的(24℃)设施中以12小时昼/夜循环(06:00开灯)中饲养,并且自由获取食物和水。对设施的适应期为两周。在研究前一天,将动物基于其体重随机分组。在同一天下午,将动物在干净的笼子中禁食,并且通过皮下注射给药载体(40 mM Tris-HCl,pH 8.0)或测试物质。第二天早晨,在注射肽之后16小时,获得禁食体重以计算葡萄糖剂量。采集血液样品从而测量零时葡萄糖。然后,对动物口服填喂葡萄糖(2 g/kg)。在口服葡萄糖后15、30、60和120分钟,通过血糖仪获得两个葡萄糖读数。在各时间点报告两个葡萄糖读数的平均值,并且计算曲线下面积。使用采用通过JMP 6的Dunnett's比较的方差分析来分析统计;以相对于载体p ≤ 0.05来表示显著性。

[0375] 在本质上如在本测定中所述地实施的实验中,化合物2显示出在耐量测试的过程中在葡萄糖方面的剂量依赖的降低,并且葡萄糖AUC在所有三种测试剂量1、3和10 nmol/kg下均减少(表10)。

[0376] 表10:用化合物2和索马鲁肽治疗的雄性DIO小鼠的响应于OGTT (2g/kg) 的葡萄糖AUC

| 化合物 | 剂量(nmol/kg) | 葡萄糖 AUC (%载体) |
|-------|-------------|---------------|
| 化合物 2 | 1 | 76* |
| 化合物 2 | 3 | 50* |
| 化合物 2 | 10 | 39* |
| 索马鲁肽 | 1 | 59* |
| 索马鲁肽 | 3 | 51* |
| 索马鲁肽 | 10 | 38* |

[0378] %载体被计算为100 x (化合物组计算的值/载体组计算的值)

[0379] * $p \leq 0.05$ 。

[0380] 链脲霉素 (STZ) 治疗的DIO小鼠中的OGTT

[0381] STZ治疗的小鼠模型是早期糖尿病的模式。在本研究中,使用来自Taconic Biosciences的五至六月龄的雄性DIO小鼠 (C57BL/6)。将动物在温度受控的 (24°C) 设施中以12小时昼/夜循环 (06:00开灯) 中饲养,并且自由获取食物和水。在对设施适应两周之后,在周二和周五对小鼠腹腔内注射50mg/kg的STZ。注射后两周,选择在09:00具有180-300mg/dL之间的血糖水平的动物用于OGTT研究。在研究前一天,将动物基于其体重和血糖水平随机分组。在移除食物过夜 (16:00) 之前,通过皮下注射用载体或测试物质治疗动物。第二天早晨08:00,注射化合物16小时后,采集血液样品从而测量零时葡萄糖。对动物口服给药葡萄糖 (2 g/kg)。在口服葡萄糖挑战之后15、30、60和120分钟,测量葡萄糖。使用采用通过JMP 6的Dunnett's比较的方差分析来分析统计。以相对于载体 $p \leq 0.05$ 来表示显著性。

[0382] 在本质上如在本测定中所述地实施的实验中,化合物2显示出在耐量试验的过程中在葡萄糖波动方面的剂量依赖的降低。葡萄糖AUC在所有三种测试剂量1、3和10 nmol/kg下均减少(表11)。

[0383] 表11:用化合物2和索马鲁肽治疗的雄性STZ小鼠的响应于OGTT (2g/kg) 的葡萄糖AUC

| 化合物 | 剂量(nmol/kg) | 葡萄糖 AUC (%载体) |
|-------|-------------|---------------|
| 化合物 2 | 1 | 70* |
| 化合物 2 | 3 | 48* |
| 化合物 2 | 10 | 35* |
| 索马鲁肽 | 1 | 72* |
| 索马鲁肽 | 3 | 53* |
| 索马鲁肽 | 10 | 35* |

[0385] %载体被计算为100 x (化合物组计算的值/载体组计算的值)

[0386] * $p \leq 0.05$ 。

[0387] D10小鼠中的血糖控制

[0388] 在本研究中,使用来自Taconic Biosciences的五至六月龄的雄性D10小鼠(C57BL/6)。将动物在温度受控的(24°C)设施中以12小时昼/夜循环(06:00开灯)中饲养,并且自由获取食物和水。对设施适应两周之后,将小鼠基于其体重和血糖随机分组为治疗组(n=7/组)。对小鼠用载体或化合物(25 nmol/kg)皮下注射一次。注射后2和8小时监测血糖,然后在08:00每日一次监测4天。在注射肽之后44和78小时实施OGTT。使用采用通过JMP 6的Dunnett's比较的方差分析来分析统计。以相对于载体 $p \leq 0.05$ 来表示显著性。

[0389] 在本质上如在本测定中所述地实施的实验中,化合物2和化合物4治疗的小鼠具有在最多注射后96小时低于载体对照的葡萄糖。在实施OGTT时,化合物2和化合物4治疗的小鼠在口服葡萄糖挑战之后的两个时间点均具有更低的葡萄糖波动。

[0390] 化合物1和化合物3最多72小时降低血糖(表12)。化合物1和化合物3治疗的小鼠在注射肽之后在口服葡萄糖挑战之后44小时具有更低的糖波动。

[0391] 表12:在雄性D10小鼠中在注射后2、8、24、48、72和96小时测量的血糖

| 时间 | 注射载体之后的血糖 (mg/dL) | | 注射化合物 1 之后的血糖 (mg/dL) | | 注射化合物 2 之后的血糖 (mg/dL) | | 注射化合物 3 之后的血糖 (mg/dL) | | 注射化合物 4 之后的血糖 (mg/dL) | |
|----|-------------------|-----|-----------------------|------|-----------------------|-----|-----------------------|------|-----------------------|-----|
| | 平均 | SEM | 平均 | SEM | 平均 | SEM | 平均 | SEM | 平均 | SEM |
| 2 | 155.7 | 5.0 | 168.5 | 21.4 | 112.7 | 8.5 | 173.4 | 19.0 | 110.2 | 2.3 |
| 8 | 164.5 | 6.7 | 79.4 | 3.4 | 87.4 | 1.2 | 81.4 | 3.8 | 91.5 | 4.4 |
| 24 | 189.1 | 5.1 | 90.6 | 4.0 | 101.1 | 3.1 | 96.6 | 2.8 | 87.4 | 1.6 |
| 48 | 142.6 | 2.5 | 101.9 | 4.1 | 101.3 | 3.1 | 95.8 | 5.3 | 102.9 | 4.7 |
| 72 | 154.2 | 4.2 | 113.4 | 5.6 | 97.6 | 3.8 | 104.7 | 5.6 | 115.7 | 2.8 |
| 96 | 159.4 | 4.3 | 150.0 | 10.4 | 115.0 | 5.5 | 141.1 | 7.2 | 104.6 | 2.6 |

[0393] 表13:注射化合物之后44小时和78小时在OGTT的过程中的葡萄糖波动

| 化合物 | 44 小时 | 78 小时 |
|-------|---------------|---------------|
| | 葡萄糖 AUC (%载体) | 葡萄糖 AUC (%载体) |
| 化合物 1 | 42* | 90 |
| 化合物 2 | 39* | 66* |
| 化合物 3 | 35* | 76* |
| 化合物 4 | 41* | 60* |

[0395] %载体被计算为 $100 \times (\text{化合物组计算的值} / \text{载体组计算的值})$

[0396] * $p \leq 0.05$ 。

[0397] D10小鼠中的长期治疗

[0398] 在DIO小鼠中评价食物摄取和体重/脂肪方面的影响。在本研究中,使用来自Taconic Biosciences的五至六月龄的DIO小鼠(C57BL/6)。将动物在温度受控的(24℃)设施中以12小时昼/夜循环(06:00开灯)中饲养,并且自由获取食物和水。使小鼠对设施适应两周。在研究开始前一天,使用Echo Medical System(Houston,TX)仪器通过核磁共振(NMR)测量脂肪质量。将小鼠基于体重和脂肪质量随机分为治疗组(N=7/组),从而各组具有类似的起始平均体重和脂肪质量。将载体(40mM Tris-HCl,pH 8.0)、测试化合物或阳性对照索马鲁肽通过皮下(SC)注射每三天在8~10am施用至任意小鼠15天。SC注射在第1、4、7、10和13天进行。贯穿研究,在紧接各次注射之前测量体重和食物摄取量。体重方面的百分比变化如下计算:

[0399] $100 \times (\text{动物的最终体重} - \text{动物的初始体重})$

[0400] 动物的初始体重

[0401] 在研究结束时,再次通过NMR测量脂肪质量。使用采用通过JMP 6的Dunnett's比较的方差分析来分析统计。以相对于载体 $p \leq 0.05$ 来表示显著性。

[0402] 在本质上如在本测定中所述地实施的实验中,化合物1~4减少了食物摄入和体重/体脂,如下述表14所示:

[0403] 表14:DIO小鼠中的%体重变化和%体脂变化

| 化合物 | 剂量 (nmol/kg) | 体重 (从第1天起相对于载体的%改变) | 体脂 (从第1天起相对于载体的%改变) |
|-------|-----------------|------------------------|------------------------|
| 化合物 1 | 15 | -19* | -49* |
| | 30 | -29* | -66* |
| 化合物 2 | 15 | -19* | -43* |
| | 30 | -33* | -70* |
| 化合物 3 | 15 | -17* | -32* |
| | 30 | -37* | -67* |
| 化合物 4 | 15 | -15* | -26* |
| | 30 | -39* | -69* |
| 索马鲁肽 | 30 | -8 | -20* |
| | 60 | -12* | -29* |

[0405] * $p \leq 0.05$ 。

[0406] DIO小鼠中的急性治疗

[0407] 为了研究不依赖于体重减少的本发明的化合物的治疗所参与的代谢途径,在DIO小鼠(C57BL/6)中急性地测试化合物。所使用的小鼠为三至四月龄,在高脂肪饮食下至少4周。将动物在温度受控的(24℃)设施中以12小时昼/夜循环(06:00开灯)中饲养,并且自由获取食物和水。将载体或测试化合物通过皮下注射在研究日之前一天16:00对小鼠施用。在16小时后牺牲动物从而通过心脏穿刺收集血液。使用采用用于JMP 6的Dunnett's比较的方差分析来分析统计。以相对于载体 $p \leq 0.05$ 来表示显著性。

[0408] 在本质上如在本测定中所述地实施的实验中,化合物1~3降低了血清胆固醇和PCSK9水平,并提高了FGF-21水平,如表15中所示。与此相对,使用索马鲁肽的治疗没有降低

血清胆固醇和PCSK9水平和增加FGF-21水平。在所有治疗组中食物摄取降低至相似的水平，这可能表明胆固醇、PCSK9和FGF-21方面的改变是不依赖于食物摄取的。

[0409] 表15:PCSK9、FGF-21和胆固醇水平上的急性效果。

| 化合物 | 剂量 (nmol/kg) | PCSK9 (%载体) | FGF-21 (%载体) | 胆固醇 (%载体) |
|--------------|-----------------|----------------|-----------------|--------------|
| [0410] 化合物 1 | 30 | 14.6* | 1770* | 60.9* |
| 化合物 2 | 30 | 12.8* | 465* | 80.6* |
| 化合物 3 | 30 | 15.6* | 1124* | 55.6* |
| 索马鲁肽 | 30 | 115.3 | 75 | 117.6 |

[0411] %载体被计算为100 x (化合物组计算的值/载体组计算的值)

[0412] * $p \leq 0.05$ 。

[0413] 在DIO小鼠中在能量消耗方面的效果

[0414] 在本研究中,使用重45~50g的七至八月龄的雄性DIO小鼠 (C57BL/6) 来评价本发明的化合物在能量代谢方面的效果。将动物在温度受控的 (24°C) 设施中以12小时昼/夜循环 (22:00开灯) 中饲养,并且自由获取食物 (TD95217) (Teklad) 和水。在对设施驯化2周之后,将小鼠基于体重随机分至治疗组 (N=6/组),以使得各组具有相似的起始平均体重。将动物放置于PhenoMaster/LabMaster热量计 (TSE Systems, Chesterfield, MO) 中8天以适应。将载体 (pH 8.0下的40 mM Tris HCl缓冲液, 10 ml/kg)、测试物质 (15 nmol/kg) 或索马鲁肽 (60 nmol/kg) 在夜循环开始之前30~90分钟每三天皮下施用于任意饲养的DIO小鼠15天。

[0415] 通过间接热量计,使用开路热量计系统来测量热量和呼吸商 (RER)。RER是所生产的CO₂体积 (V_{CO₂}) 与所消耗的O₂体积 (V_{O₂}) 之比。热量用所考虑的瘦体重来计算。能量消耗为kcal/kg/3天,并且被表示为每组6只小鼠的平均值 ± SEM。通过双因素方差分析,接着通过Tukey's多重比较检验评价统计显著性。

[0416] 在本质上如在本测定中所述地实施的实验中,用化合物1和2治疗的小鼠从第2周起增加了其代谢率,并且贯穿治疗期间维持效果,如表16所示。但是,索马鲁肽对代谢率不具有效果。该代谢率的增加可以归于与施用索马鲁肽相比施用化合物1和化合物2所观察到的额外的体重减少。

[0417] 表16:在DIO小鼠中在代谢率方面用化合物1、化合物2或索马鲁肽的长期治疗的效果

| 治疗期间 | 累计热量(Kcal/kg 瘦质量/3天) | | | |
|--------------------|----------------------|-----------|--------------|--------------|
| | 载体 | 索马鲁肽 | 化合物 1 | 化合物 2 |
| [0418] 第 1 天至第 4 天 | 2184 ± 27 | 1973 ± 51 | 1749 ± 136** | 1746 ± 96** |
| 第 4 天至第 7 天 | 2154 ± 36 | 2018 ± 54 | 1822 ± 173 | 1778 ± 132* |
| 第 7 天至第 10 天 | 2239 ± 28 | 2151 ± 48 | 2349 ± 129 | 2549 ± 129** |
| 第 10 天至第 13 天 | 2207 ± 16 | 2138 ± 46 | 2351 ± 144 | 2568 ± 147* |

[0419] * 相对于载体 $p \leq 0.05$

[0420] ** 相对于索马鲁肽 $p \leq 0.05$ 。

[0421] 氨基酸序列

- [0422] SEQ ID NO:1 (人 OXM)
- [0423] 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-Lys-Arg-Asn-Arg-Asn-Asn-Ile-Ala
- [0424] (HSQGTFTSDYSKYLDSSRAQDFVQWLMNTRNRNIA)
- [0425] SEQ ID NO:2 (人工序列)
- [0426] His-Xaa2-Gln-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Lys-Tyr-Leu-Asp-Glu-Lys-Lys-Ala-Lys-Glu-Phe-Val-Glu-Trp-Leu-Leu-Xaa28-Gly-Gly-Pro-Ser-Ser-Gly
- [0427] (HXaa2QGTFTSDYSKYLDKKAKEFVEWLLXaa28GGPSSG)
- [0428] 其中Xaa2是Aib;
- [0429] Xaa28是Glu (E) 或Ser (S);
- [0430] 20位的Lys通过经由 (i) 直接键或 (ii) 20位的Lys与C14-C24脂肪酸之间的接头而使Lys侧链的 ϵ -氨基与C14-C24脂肪酸缀合从而被化学修饰;且
- [0431] C端氨基酸任选被酰胺化。
- [0432] SEQ ID NO:3 (人工序列)
- [0433] His-Xaa2-Gln-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Lys-Tyr-Leu-Asp-Glu-Lys-Lys-Ala-Lys-Glu-Phe-Val-Glu-Trp-Leu-Leu-Glu-Gly-Gly-Pro-Ser-Ser-Gly
- [0434] (HXaa2QGTFTSDYSKYLDKKAKEFVEWLLLEGGPSSG)
- [0435] 其中Xaa2是Aib;
- [0436] 20位的Lys通过经由 (i) 直接键或 (ii) 20位的Lys与C14-C24脂肪酸之间的接头而使Lys侧链的 ϵ -氨基与C14-C24脂肪酸缀合从而被化学修饰;且
- [0437] C端氨基酸任选被酰胺化。
- [0438] SEQ ID NO:4 (人工序列)
- [0439] His-Xaa2-Gln-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Lys-Tyr-Leu-Asp-Glu-Lys-Lys-Ala-Lys-Glu-Phe-Val-Glu-Trp-Leu-Leu-Ser-Gly-Gly-Pro-Ser-Ser-Gly (HXaa2QGTFTSDYSKYLDKKAKEFVEWLLSGGPSSG)
- [0440] 其中Xaa2是Aib;
- [0441] 20位的Lys通过经由 (i) 直接键或 (ii) 20位的Lys与C14-C24脂肪酸之间的接头而使Lys侧链的 ϵ -氨基与C14-C24脂肪酸缀合从而被化学修饰;且
- [0442] C端氨基酸任选被酰胺化。
- [0443] SEQ ID NO:5 (人工序列)
- [0444] His-Xaa2-Gln-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Lys-Tyr-Leu-Asp-Glu-Lys-Lys-Ala-Lys-Glu-Phe-Val-Glu-Trp-Leu-Leu-Glu-Gly-Gly-Pro-Ser-Ser-Gly
- [0445] (HXaa2QGTFTSDYSKYLDKKAKEFVEWLLLEGGPSSG)
- [0446] 其中Xaa2是Aib;
- [0447] 20位的Lys通过使Lys侧链的 ϵ -氨基与([2-(2-氨基乙氧基)-乙氧基]-乙酰基)₂-(γ -Glu)-CO-(CH₂)₁₆CO₂H缀合而被化学修饰;且
- [0448] C端氨基酸被酰胺化。
- [0449] SEQ ID NO:6 (人工序列)

- [0450] His-Xaa2-Gln-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Lys-Tyr-Leu-Asp-Glu-Lys-Lys-Ala-Lys-Glu-Phe-Val-Glu-Trp-Leu-Leu-Glu-Gly-Gly-Pro-Ser-Ser-Gly
- [0451] (HXaa2QGTFTSDYSKYLDEKKAKEFVEWLLLEGGPSSG)
- [0452] 其中Xaa2是Aib;
- [0453] 20位的Lys通过使Lys侧链的 ϵ -氨基与([2-(2-氨基乙氧基)-乙氧基]-乙酰基)₂-(γ -Glu)-CO-(CH₂)₁₈CO₂H缀合而被化学修饰;且
- [0454] C端氨基酸被酰胺化。
- [0455] SEQ ID NO:7 (人工序列)
- [0456] His-Xaa2-Gln-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Lys-Tyr-Leu-Asp-Glu-Lys-Lys-Ala-Lys-Glu-Phe-Val-Glu-Trp-Leu-Leu-Ser-Gly-Gly-Pro-Ser-Ser-Gly
- [0457] (HXaa2QGTFTSDYSKYLDEKKAKEFVEWLLSGGPSSG)
- [0458] 其中Xaa2是Aib;
- [0459] 20位的Lys通过使Lys侧链的 ϵ -氨基与([2-(2-氨基乙氧基)-乙氧基]-乙酰基)₂-(γ -Glu)-CO-(CH₂)₁₆CO₂H缀合而被化学修饰;且
- [0460] C端氨基酸被酰胺化。
- [0461] SEQ ID NO:8 (人工序列)
- [0462] His-Xaa2-Gln-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Lys-Tyr-Leu-Asp-Glu-Lys-Lys-Ala-Lys-Glu-Phe-Val-Glu-Trp-Leu-Leu-Ser-Gly-Gly-Pro-Ser-Ser-Gly
- [0463] (HXaa2QGTFTSDYSKYLDEKKAKEFVEWLLSGGPSSG)
- [0464] 其中Xaa2是Aib;
- [0465] 20位的Lys通过使Lys侧链的 ϵ -氨基与([2-(2-氨基乙氧基)-乙氧基]-乙酰基)₂-(γ -Glu)-CO-(CH₂)₁₈CO₂H缀合而被化学修饰;且
- [0466] C端氨基酸被酰胺化。
- [0467] SEQ ID NO:9 (人工序列)
- [0468] His-Xaa2-Gln-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Lys-Tyr-Leu-Asp-Glu-Lys-Lys-Ala-Lys-Glu-Phe-Val-Glu-Trp-Leu-Leu-Xaa28-Gly-Gly-Pro-Ser-Ser-Gly
- [0469] (HXaa2QGTFTSDYSKYLDEKKAKEFVEWLLXaa28GGPSSG)
- [0470] 其中Xaa2是Aib;
- [0471] Xaa28是Glu(E)或Ser(S);且
- [0472] C端氨基酸任选被酰胺化。
- [0473] SEQ ID NO:10 (人工序列)
- [0474] His-Xaa2-Gln-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Lys-Tyr-Leu-Asp-Glu-Lys-Lys-Ala-Lys-Glu-Phe-Val-Glu-Trp-Leu-Leu-Glu-Gly-Gly-Pro-Ser-Ser-Gly
- [0475] (HXaa2QGTFTSDYSKYLDEKKAKEFVEWLLLEGGPSSG)
- [0476] 其中Xaa2是Aib;且
- [0477] C端氨基酸任选被酰胺化。
- [0478] SEQ ID NO:11 (人工序列)
- [0479] His-Xaa2-Gln-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Lys-Tyr-Leu-Asp-Glu-Lys-Lys-Ala-Lys-Glu-Phe-Val-Glu-Trp-Leu-Leu-Ser-Gly-Gly-Pro-Ser-Ser-Gly

- [0480] (HXaa2QGTFTSDYSKYLDEKKAKEFVEWLLSGGPSSG)
- [0481] 其中Xaa2是Aib;且
- [0482] C端氨基酸任选被酰胺化。

<222> (20)..(20)
 <223> L20位的Lys通过经由(i)直接键或(ii)20位的Lys与C14-C24脂肪酸之间的接头而使Lys侧链的 ϵ -氨基与C14-C24脂肪酸缀合从而被化学修饰

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (28)..(28)
 <223> 在位置28的Xaa是Glu或Ser

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (34)..(34)
 <223> 在位置34的Gly任选被酰胺化

<400> 2

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

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

Ser Gly

[0002]

<210> 3
 <211> 34
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成构建体

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (2)..(2)
 <223> 在位置2的Xaa是非天然存在的氨基酸
 2-氨基异丁酸

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (2)..(2)
 <223> Aib

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (20)..(20)
 <223> 20位的Lys通过经由(i)直接键或(ii)20位的Lys与C14-C24脂肪酸之间的接头而使Lys侧链的 ϵ -氨基与C14-C24脂肪酸缀合从而被化学修饰

<220>
 <221> MOD_RES

<222> (34)..(34)
 <223> 在位置34的Gly任选被酰胺化

<400> 3

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

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

Ser Gly

<210> 4
 <211> 34
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成构建体

[0003] <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (2)..(2)
 <223> 在位置2的Xaa是非天然存在的氨基酸
 2-氨基异丁酸

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (2)..(2)
 <223> Aib

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (20)..(20)
 <223> 20位的Lys通过经由(i)直接键或(ii)20位的Lys与C14-C24脂肪酸之间的接头而使Lys侧链的ε-氨基与C14-C24脂肪酸缀合从而被化学修饰

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (34)..(34)
 <223> 在位置34的Gly任选被酰胺化

<400> 4

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

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

Ser Gly

<210> 5
 <211> 34
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成构建体

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (2)..(2)
 <223> 在位置2的Xaa是非天然存在的氨基酸
 2-氨基异丁酸

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (2)..(2)
 <223> Aib

[0004]

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (20)..(20)
 <223> 20位的Lys通过使Lys侧链的ε-氨基与
 ([2-(2-氨基乙氧基)-乙氧基]-acetyl)2-(γ-Glu)-CO-(CH₂)₁₆CO₂H缀合从而被化学
 修饰

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (34)..(34)
 <223> 在位置34的Gly被酰胺化

<400> 5

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

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

Ser Gly

<210> 6
 <211> 34
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (2)..(2)
 <223> Aib

 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (20)..(20)
 <223> 20位的Lys通过使Lys侧链的ε-氨基与
 ([2-(2-氨基乙氧基)-乙氧基]-acetyl)2-(γ-Glu)-CO-(CH₂)₁₆CO₂H缀合从而被化学
 修饰

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (34)..(34)
 <223> 在位置34的Gly被酰胺化

<400> 7

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

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

[0006] Ser Gly

<210> 8
 <211> 34
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成构建体

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (2)..(2)
 <223> 在位置2的Xaa是非天然存在的氨基酸
 2-氨基异丁酸

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (2)..(2)
 <223> Aib

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (20)..(20)
 <223> 20位的Lys通过使Lys侧链的ε-氨基与

修饰 ([2-(2-氨基乙氧基)-乙氧基]-acetyl)2-(γ-Glu)-CO-(CH₂)₁₈CO₂H 缀合从而被化学

<220>

<221> MOD_RES

<222> (34)..(34)

<223> 在位置34的Gly被酰胺化

<400> 8

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

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

Ser Gly

<210> 9

<211> 34

<212> PRT

<213> 人工序列

[0007]

<220>

<223> 合成构建体

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (2)..(2)

<223> 在位置2的Xaa是非天然存在的氨基酸
2-氨基异丁酸

<220>

<221> MOD_RES

<222> (2)..(2)

<223> Aib

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (28)..(28)

<223> 在位置28的Xaa是Glu或Ser

<220>

<221> MOD_RES

<222> (34)..(34)

<223> 在位置34的Gly任选被酰胺化

<400> 9

His Xaa Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Glu

<223> 合成构建体

 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (2)..(2)
 <223> 在位置2的Xaa是非天然存在的氨基酸
 2-氨基异丁酸

 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (2)..(2)
 <223> Aib

 [0009] <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (34)..(34)
 <223> 在位置34的Gly任选被酰胺化

 <400> 11

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

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

 Ser Gly