

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.
A61K 38/00 (2006.01)



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200680033105.0

[43] 公开日 2008年9月10日

[11] 公开号 CN 101262874A

[22] 申请日 2006.9.7

[21] 申请号 200680033105.0

[30] 优先权

[32] 2005.9.8 [33] US [31] 60/715,322

[86] 国际申请 PCT/US2006/034685 2006.9.7

[87] 国际公布 WO2007/030519 英 2007.3.15

[85] 进入国家阶段日期 2008.3.10

[71] 申请人 塔夫茨大学信托人

地址 美国马萨诸塞州

[72] 发明人 W·W·巴乔夫钦 D·G·桑福德

[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

代理人 程 淼 黄可峻

权利要求书5页 说明书33页 附图7页

[54] 发明名称

稳定化的 GLP-1 类似物

[57] 摘要

本发明的多肽类似物, 包括 a) 与 GLP-1 片段之一至少 80% 相同的基础氨基酸序列; 和 b) 连接到所述基础氨基酸序列的羧基末端的氨基酸残基, 其中所述类似物具有比天然 GLP-1 更长持续时间的 GLP-1 样活性, 和/或 GLP-1 受体对所述类似物比对天然 GLP-1 具有更大亲和性。本发明的其它多肽类似物包括 a) 与 GLP-1 片段至少 50% 相同的基础氨基酸序列, 其中在所述基础氨基酸序列中对应于 GLP-1 的 P'₁ 残基的氨基酸残基是具有四取代 C_β 碳的氨基酸类似物; 和 b) 连接到所述基础氨基酸序列的羧基末端的氨基酸残基, 其中所述类似物具有上述的性质。本发明还包括施用这些类似物的治疗方法。

1. 一种多肽类似物，包括：

a) 与 GLP-1-(7-34)、GLP-1-(7-35)、GLP-1-(7-36)和 GLP-1-(7-37) (SEQ ID NOS: 1-4)之一至少 80%相同的基础氨基酸序列；和

b) 连接到所述基础氨基酸序列的羧基末端的一至十五个氨基酸残基，

其中，相较于天然 GLP-1，所述类似物在人类体内具有更长的持续时间的 GLP-1 样活性。

2. 一种多肽类似物，包括：

a) 与 GLP-1-(7-34)、GLP-1-(7-35)、GLP-1-(7-36)和 GLP-1-(7-37) (SEQ ID NOS: 1-4)之一至少 80%相同的基础氨基酸序列；和

b) 连接到所述基础氨基酸序列的羧基末端的一至十五个氨基酸残基，

其中 GLP-1 受体对所述类似物比对天然 GLP-1 具有更大亲和性。

3. 一种多肽类似物，包括：

a) 与 GLP-1-(7-34)、GLP-1-(7-35)、GLP-1-(7-36)和 GLP-1-(7-37) (SEQ ID NOS: 1-4)之一至少 50%相同的基础氨基酸序列，其中在所述基础氨基酸序列中对应于 GLP-1 的 P₁' 残基的氨基酸残基是具有四取代 C_β 碳的氨基酸类似物；和

b) 连接到所述基础氨基酸序列的羧基末端的一至十五个氨基酸残基，

其中，相较于天然 GLP-1，所述类似物在人类体内具有更长的持续时间的 GLP-1 样活性。

4. 一种多肽类似物，包括：

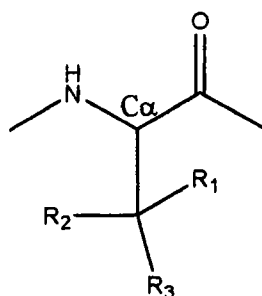
a) 与 GLP-1-(7-34)、GLP-1-(7-35)、GLP-1-(7-36)和 GLP-1-(7-37) (SEQ ID NOS: 1-4)之一至少 50%相同的基础氨基酸序列，其中在所述基础氨基酸序列中对应于 GLP-1 的 P₁' 残基的氨基酸残基是具有四取代 C_β 碳的氨基酸类似物；和

b) 连接到所述基础氨基酸序列的羧基末端的一至十五个氨基酸残基，

其中 GLP-1 受体对所述类似物比对天然 GLP-1 具有更大亲和性。

5. 如权利要求 3 或 4 所述的类似物, 其中相对于 GLP-1, 与所述 P'₁ 残基相对应的所述残基降低了所述类似物对于蛋白酶切割的易感性。

6. 如权利要求 5 所述的蛋白酶抗性类似物, 其中与所述 P'₁ 残基相对应的所述残基由下式表示:



其中

R₁ 和 R₂ 各自独立地表示低碳烷基、杂烷基、环烷基、杂环烷基、芳基、烷氧基、羰基、酰胺、卤素、羟基、胺或氰基, 或者 R₁ 和 R₂ 一起形成 4-7 个原子的环;

R₃ 表示低碳烷基、杂烷基、氨基、烷氧基、卤素、酰胺、羰基、氰基、巯基、硫烷基、酰氨基、硝基、叠氮基、硫酸酯、磺酸酯、亚磺酰氨基、-(CH₂)_m-R₄、-(CH₂)_m-OH、-(CH₂)_m-COOH、-(CH₂)_m-O-低碳烷基、-(CH₂)_m-O-低碳链烯基、-(CH₂)_n-O-(CH₂)_m-R₄、-(CH₂)_m-S-低碳烷基、-(CH₂)_m-S-低碳链烯基、-(CH₂)_n-S-(CH₂)_m-R₄、-(CH₂)_m-N-C(=NH)NH₂、-(CH₂)_m-C(=O)NH₂ 或 -(CH₂)_m-NH₂;

对于每一次出现, R₄ 独立地表示芳基、芳烷基、环烷基、环烯基或非芳香族的杂环基; 并且

m = 0、1 或 2。

7. 如权利要求 6 所述的类似物, 其中 R₁ 和 R₂ 各自独立地表示低碳烷基或卤素; 且 R₃ 表示低碳烷基、芳基、羟基、-(CH₂)_m-COOH、-(CH₂)_m-NH₂、-(CH₂)_m-N-C(=NH)NH₂、-(CH₂)_m-C(=O)NH₂、-SH 或 -(CH₂)_m-S-CH₃。

8. 如权利要求 7 所述的类似物, 其中 R₁ 和 R₂ 各自独立地表示甲基、乙基或丙基。

9. 如权利要求 8 所述的类似物, 其中 R₁ 和 R₂ 各自表示甲基。

10. 如权利要求 8 所述的类似物, 其中 R₃ 表示低碳烷基、苯基、羟基苯基、吲哚、咪唑、羟基、-COOH、-CH₂-COOH、

-CH₂-CH₂-N-C(=NH)NH₂、-CH₂-C(=O)NH₂、-CH₂-CH₂-C(=O)NH₂、-SH 或 -CH₂-S-CH₃。

11. 如权利要求 1-4 中任一项所述的类似物，其中所述类似物保持 GLP-1 的生物活性的至少 50%。

12. 如权利要求 1-4 任一项所述的类似物，其中一个或多个非天然存在的氨基酸残基被连接到所述基础氨基酸序列的羧基末端。

13. 如权利要求 12 所述的类似物，其中所述非天然存在的氨基酸残基具有含芳基的侧链。

14. 如权利要求 13 所述的类似物，其中所述非天然存在的氨基酸是联苯基丙氨酸。

15. 如权利要求 1-4 任一项所述的类似物，其中连接于所述基础氨基酸序列的羧基末端的所述氨基酸残基选自 exendin-4 的氨基酸残基 31-39。

16. 如权利要求 15 所述的类似物，其中连接到所述基础氨基酸序列的羧基末端的氨基酸残基是选自 exendin-4 的氨基酸残基 31-39 的三个或更多个连续的氨基酸残基。

17. 如权利要求 16 所述的类似物，其中连接到所述基础氨基酸序列的羧基末端的所述氨基酸残基是 Pro-Ser-Ser。

18. 如权利要求 16 所述的类似物，其中连接到所述基础氨基酸序列的羧基末端的氨基酸残基是 Pro-Ser-Ser-Gly-Ala-Pro-Pro-Ser (SEQ ID NO: 5)。

19. 如权利要求 3 或 4 所述的类似物，其中所述类似物具有与 GLP-1-(7-34)、GLP-1-(7-35)、GLP-1-(7-36)和 GLP-1-(7-37) (SEQ ID NOS: 1-4)之一至少 80%相同的基础氨基酸序列。

20. 如权利要求 19 所述的类似物，其中所述类似物具有与 GLP-1-(7-34)、GLP-1-(7-35)、GLP-1-(7-36)和 GLP-1-(7-37) (SEQ ID NOS: 1-4)之一至少 90%相同的基础氨基酸序列。

21. 如权利要求 20 所述的类似物，其中所述类似物具有与 GLP-1-(7-34)、GLP-1-(7-35)、GLP-1-(7-36)和 GLP-1-(7-37) (SEQ ID NOS: 1-4)之一至少 95%相同的基础氨基酸序列。

22. 如权利要求 21 所述的类似物，其中所述类似物具有下列基础氨基酸序列：

His-Ala-Xaa-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Val-Ser-Ser-Tyr-Leu-Glu-Gly-Gln-Ala-Ala-Lys-Glu-Phe-Ile-Ala-Trp-Leu-Val-Lys-Gly-Arg (SEQ ID NO: 12),

其中 Xaa 是 β -二甲基天冬氨酸或叔亮氨酸。

23. 如权利要求 1 或 2 所述的类似物, 其中所述类似物具有的基础氨基酸序列与 GLP-1-(7-36)序列(SEQ ID NO: 3)相差不超过一个残基。

24. 如权利要求 24 所述的类似物, 其中所述类似物具有与 GLP-1-(7-36) (SEQ ID NO: 3) 相同的基础氨基酸序列。

25. 药物组合物, 其包括如权利要求 1-24 中任一项所述的类似物, 以及药学上可接受的载体或赋形剂。

26. 包装的药物制剂, 其包括如权利要求 1-24 中任一项所述的类似物, 和药学上可接受的载体; 以及用于对患者施用的标签、说明书或标签和说明书。

27. 包装的兽用制剂, 其包括如权利要求 1-24 中任一项所述的类似物, 和药学上可接受的载体; 以及用于对动物施用的标签、说明书或标签和说明书。

28. 在需要治疗的患者中治疗胰岛素抗性、葡萄糖不耐受、高血糖症、高胰岛素血症、肥胖、血脂过多和糖尿病并发症的一种或多种的方法, 包括施用治疗有效量的如权利要求 1-24 中任一项所述的类似物。

29. 增加与 GLP-1 至少 80%相同的肽在人体内的半衰期的方法, 包括将一至十五个氨基酸残基连接到所述肽的羧基末端。

30. 如权利要求 29 所述的方法, 其中所述氨基酸残基是非天然存在的。

31. 如权利要求 30 所述的方法, 其中至少所述非天然存在的氨基酸残基具有含芳基的侧链。

32. 如权利要求 31 所述的方法, 其中至少所述非天然存在的氨基酸残基是联苯基丙氨酸。

33. 如权利要求 29 所述的方法, 其中所述氨基酸残基选自 exendin-4 的氨基酸残基 31-39。

34. 如权利要求 33 所述的方法，其中所述氨基酸残基是选自 exendin-4 的氨基酸残基 31-39 的三个或更多个连续的氨基酸残基。

35. 如权利要求 34 所述的方法，其中所述氨基酸残基是 Pro-Ser-Ser。

36. 如权利要求 34 所述的方法，其中所述氨基酸残基是 Pro-Ser-Ser-Gly-Ala-Pro-Pro-Pro-Ser (SEQ ID NO: 5)。

37. 如权利要求 29 所述的方法，其中所述肽与 GLP-1-(7-36)序列 (SEQ ID NO: 3)相差不超过一个氨基酸残基。

稳定化的 GLP-1 类似物

相关申请

[0001] 本申请要求于 2005 年 9 月 8 日提交的美国临时专利申请序列第 60/715,322 号的优先权权益；该申请的全部内容通过引用被并入。

发明背景

[0002] 多肽和肽治疗剂被广泛用于医疗实践中。它们的易于生产，通过重组 DNA 技术或肽合成仪，确保它们在接下来的若干年中将持续用于各种情况。因此，多肽治疗剂，例如激素、细胞因子和生长因子，代表着重要的一类治疗剂。然而，某些天然多肽，通过蛋白水解或异构化在体内可被迅速灭活。这类灭活在其中期望在一段时期内维持一致的或持续的治疗剂血水平的情况下可能是不便的，因为其后重复给药将是必要的。在某些情况下，该多肽的一种或多种蛋白水解产物可能拮抗完整多肽的活性。在这些情况下，单独施用额外的治疗剂可能不足以克服水解产物的拮抗效应。

[0003] 为进一步阐述，在血液中延长的存在时间可能是有益的一种肽激素包括胰高血糖素样肽 1 (glucagon-like peptide 1, GLP-1)。GLP-1 是在葡萄糖代谢和胃肠分泌和代谢中起调节功能的重要多肽激素。当前的成果表明，GLP-1 是胰腺中 β 细胞的生长因子，并可能参与胰腺外的其它器官中的细胞分化。

[0004] GLP-1 被认为是由丝氨酸蛋白酶的后脯氨酸切割类 (post-proline cleaving class) 的成员加以降解，例如二肽基肽酶 IV (dipeptidyl peptidase IV, DPP IV)。DPP IV 是膜结合的丝氨酸肽酶，其从肽链切割 N 末端二肽，所述肽链在倒数第二(P1)位含有——优选地——脯氨酸残基或者丙氨酸残基，如果 N 末端残基(P2)是组氨酸或大的芳族氨基酸例如酪氨酸、色氨酸或苯丙氨酸。GLP-1 的氨基末端序列是 His-Ala-Glu。因此，DPP IV 已被暗示涉及体内 GLP-1 的活性调节。

[0005] DPP IV 介导的、从生物活性肽激素例如 GLP-1 的 N-末端进行的 Xaa-Ala 或 Xaa-Pro 二肽的切除——其中 Xaa 是氨基酸残基，使得它们失活或者甚至是拮抗的。因此，肽激素通过丝氨酸蛋白酶如 DPP IV

的切割和失活是一个例子，其说明了应用治疗剂多肽的局限性；即，它们在体内短的作用持续时间。由于这个原因，在本领域中存在对于具有 GLP-1 样活性的作用时间更长的肽的需求。

发明概述

[0006] 本发明一般地提供 GLP-1 类似物，其在体内具有增加的 GLP-1 样活性持续时间。本发明还提供了 GLP-1 类似物，其对 GLP-1 受体具有增加的亲和性。

[0007] 一方面，本发明是多肽类似物，其包括：

- a) 与 GLP-1-(7-34)、GLP-1-(7-35)、GLP-1-(7-36)和 GLP-1-(7-37) (SEQ ID NOS: 1-4)之一至少 80%相同的基础氨基酸序列；和
- b) 一至十五个(天然或非天然存在的)氨基酸残基，其连接于所述基础氨基酸序列的羧基末端，

其中与天然 GLP-1 相比，所述类似物具有在人类中更长体内持续时间的 GLP-1 样活性。

[0008] 另一方面，本发明是多肽类似物，其包括：

- a) 与 GLP-1-(7-34)、GLP-1-(7-35)、GLP-1-(7-36)和 GLP-1-(7-37) (SEQ ID NOS: 1-4)之一至少 80%相同的基础氨基酸序列；和
- b) 连接于所述基础氨基酸序列的羧基末端的一至十五个氨基酸残基，

其中 GLP-1 受体对所述类似物具有比天然 GLP-1 更高的亲和性。这种类似物还有利地具有 GLP-1 样活性，所述活性在人类中具有比天然 GLP-1 更长的体内持续时间。

[0009] 在又另一方面，本发明是多肽类似物，其包括：

- a) 与 GLP-1-(7-34)、GLP-1-(7-35)、GLP-1-(7-36)和 GLP-1-(7-37) (SEQ ID NOS: 1-4)之一至少 50%相同的基础氨基酸序列，其中在所述基础氨基酸序列中对应于 GLP-1 的 P₁' 残基的氨基酸残基是具有四取代 C_β碳的氨基酸类似物；和
- b) 连接于所述基础氨基酸序列的羧基末端的一至十五个氨基酸残基，

其中所述类似物具有 GLP-1 样活性，所述活性在人类中具有比天然 GLP-1 更长的体内持续时间。

[0010] 在又一方面，本发明是多肽类似物，其包括：

- a) 与 GLP-1-(7-34)、GLP-1-(7-35)、GLP-1-(7-36)和 GLP-1-(7-37) (SEQ ID NOS: 1-4)之一至少 50%相同的基础氨基酸序列，其中在所述基础氨基酸序列中对应于 GLP-1 的 P₁ 残基的氨基酸残基是具有四取代 C_β碳的氨基酸类似物；和
- b) 连接于所述基础氨基酸序列的羧基末端的一至十五个氨基酸残基，

其中 GLP-1 受体对所述类似物具有比天然 GLP-1 更高的亲和性。这类类似物还有利地具有 GLP-1 样活性，所述活性在人类中具有比天然 GLP-1 更长的体内持续时间。

[0011] 本发明还提供了包括一种或更多种题述类似物的药物组合物。示例性的药物组合物包括一种或多种与药学上可接受载体或赋形剂一起配制的类似物。

[0012] 本发明的另一方面是治疗受试者 (subject) 中的疾病的方法，其包括施用治疗有效量的一种或多种所述类似物。题述类似物可以被单独施用，或可作为治疗方案的一部分加以施用，所述治疗方案包括适于具体疾病适应症的其它治疗。作为例子，用于治疗糖尿病类似物的施用可被单独应用，或者可与饮食调节和锻炼和/或胰岛素施用联合应用。进一步的示例性联合治疗方法包括施用类似物和施用切割天然 GLP-1 多肽的特定的一种或多种酶的抑制剂。这类抑制剂对于特定酶可以是特异的 (例如，DPP IV 特异性抑制剂)，或者对于酶类可以是更一般性的 (例如，丝氨酸蛋白酶抑制剂)。

[0013] 本发明的另一方面是为了诊断目的应用题述类似物。

[0014] 本发明的另一方面是题述类似物在生产用于治疗本文所公开的疾病或状况的药物中的应用。

[0015] 本发明的再一方面是通过增加与 GLP-1 至少 80%相同的肽在人类中的体内半衰期的方法，其包括将一至十五个氨基酸残基连接至所述肽的羧基端。

[0016] 本发明的又一方面是通过进行商业行为的方法，包括对本发明的类似物、其药物组合物和/或包含所述类似物的试剂盒进行鉴别、生产、市场开发、分配、和/或许可。

附图简述

[0017] 图 1 示出了(A)在 pH 8.0 的 50 mM HEPES、0.14 M NaCl 中于 37 °C 与大鼠 DPP IV 温育的 Ala-Pro-Leu-Ser-Trp-Ser-NH₂ (□)、Ala-Pro-Ile-Ser-Trp-Ser-NH₂ (△) 和 Ala-Pro-Tle-Ser-Trp-Ser-NH₂ (▽) 的消化; 和 (B)在 pH 8.0 的 50 mM HEPES、0.14 M NaCl 中于 30 °C 与人 DPP IV 温育的 GLP-1 (7-36 酰胺) (■)、TPA1B4 (◆)和 P1732 (▲)的消化。在所示出的时刻取出等分试样, 通过添加 HCl 至 pH 为 2 来停止反应, 并通过 LCMS 分析样品。肽浓度为 0.1 mM。通过对 MS 色谱图中的底物峰和产物峰进行积分确定切割百分数。数据被拟合至单相指数方程。

[0018] 图 2 示出了在表达人 GLP-1 受体的 COS-7 细胞中 GLP-1 (■)、Exendin-4 (▲)、TPA144 (○)、TPA1B4 (◆)和 P1732 (▼)与 ¹²⁵I 毒蜥外泌肽(exendin) (9-39)结合 (binding) 的竞争。IC₅₀ 值对于 GLP-1 为 1.5 nM, 对于 TPA144 为 36.3 nM, 对于 TPA1B4 为 7.6 nM, 对于 P1732 为 2.5 nM, 以及对于 Exendin-40 为 0.4 nM。数据表示独立实验的结果, 并被标准化为竞争剂不存在下的 ¹²⁵I Exendin(9-39)结合。

[0019] 图 3 示出了 GLP-1 受体的活化, 如 cAMP 产生所测量的。以 300 nM 的浓度测试肽的激动剂活性。数据表示平均值 + SEM, 其中 n=4。

[0020] 图 4 表示在与各种浓度的 GLP-1 (■)、P1732 (▼)和 Exendin-4 (▲)温育之后在表达人 GLP-1 受体的 COS-7 细胞中的 cAMP 产生情况。数据值 ± SEM 被绘制并拟合为 S 形剂量-应答曲线。从该拟合曲线得到的 EC₅₀ 值对于 GLP-1、P1732 和 Exendin-4 分别为 0.5 nM、0.6 nM 和 0.2 nM。

[0021] 图 5 示出了葡萄糖降低效应的时程, 其中血糖测量在注射盐水(●)或 8 μg GLP-1 (■)、TPA1B4 (◆)、P1732 (▼)、DGS65 (□)或 Exendin-4 (▲)之前和在注射盐水(●)或 8 μg GLP-1 (■)、TPA1B4 (◆)、P1732 (▼)、DGS65 (□)或 Exendin-4 (▲)后所示时间进行。具有 P3 β-二甲基 Asp 的 TPA1B4 被比较于 GLP-1 (A), 而具有 P3 和羧基末端修饰的肽类似物被比较于 exendin-4 (B)。在每个时间点, 测定 10 只小鼠的血糖变化百分比, 并对平均变化 ± SEM 进行绘图。

[0022] 图 6 示出了糖尿病小鼠中由实施例 1 的肽表现出的剂量应答。血糖测量在注射各种剂量的 TPA1B4 (◆)、P1732 (▼)和 Exendin-4

(▲)之前进行,并在注射后 60 分钟时再次进行。在每一个剂量下,测定 10 只小鼠的血糖变化百分比,并对平均变化 \pm SEM 进行绘图。数据被拟合成 S 形剂量应答曲线。来自这些拟合的 EC₅₀ 值(和 95%的置信区间)对于 TPA1B4 为 0.4 μ g (0.1-1.92 μ g),对于 P1732 为 0.5 μ g (0.4-3.5 μ g),以及对于 exendin-4 为 0.5 μ g (0.2-1.2 μ g)。

[0023] 图 7 示出了葡萄糖降低效应的时程,其中血糖测量注射盐水(■)或 8 μ g TPA1B4 (▼)、DGS69 (▽)或 Exendin-4 (▲)之前或在注射盐水(●)或 8 μ g TPA1B4 (▼)、DGS69 (▽)或 Exendin-4 (▲)后所示时间进行。在每个时间点,测定 10 只小鼠的血糖变化百分比,并对平均变化 \pm SEM 进行绘图。

发明详述

1. 综述

[0024] 本发明一般地涉及 GLP-1 类似物,其具有增加的体内半衰期——例如源自降低的蛋白水解酶切割易感性 (susceptibility) 和/或增加的 GLP-1 受体亲和性,但仍保留想要的 GLP-1 活性。具体而言,本发明涉及这样的发现:具有 GLP-1 样活性的所述肽的体内半衰期可以通过将一至十五个(天然或非天然存在的)氨基酸残基连接到所述肽的羧基末端而被延长。

[0025] 本发明的 GLP-1 类似物具有连接至基础氨基酸序列的羧基末端的一至十五个氨基酸残基。基础氨基酸序列是指在一至十五个额外的氨基酸残基修饰之前的氨基酸序列。典型地,基础氨基酸序列与 GLP-1-(7-34)、GLP-1-(7-35)、GLP-1-(7-36)和 GLP-1-(7-37) (SEQ ID NOS: 1-4)之一的序列至少 50%相同,特别是至少 80%相同,至少 90%相同,至少 95%相同,或甚至 100%相同。典型地,序列相同性(identity)在相关序列的全长范围内进行测量。在本发明的某些实施方式中,基础氨基酸序列是 GLP-1-(7-34)、GLP-1-(7-35)、GLP-1-(7-36)和 GLP-1-(7-37) (SEQ ID NOS: 1-4)之一,或与 GLP-1-(7-34)、GLP-1-(7-35)、GLP-1-(7-36)和 GLP-1-(7-37) (SEQ ID NOS: 1-4)之一的区别在于仅一个氨基酸残基。GLP-1-(7-34)、GLP-1-(7-35)、GLP-1-(7-36)和 GLP-1-(7-37) (SEQ ID NOS: 1-4)的序列如下:

GLP-1-(7-34): HAEGTFTSDVSSYLEGQAAKEFIAWLVK (SEQ ID NO: 1)

GLP-1-(7-35): HAEGTFTSDVSSYLEGQAAKEFIAWLVKG (SEQ ID NO: 2)

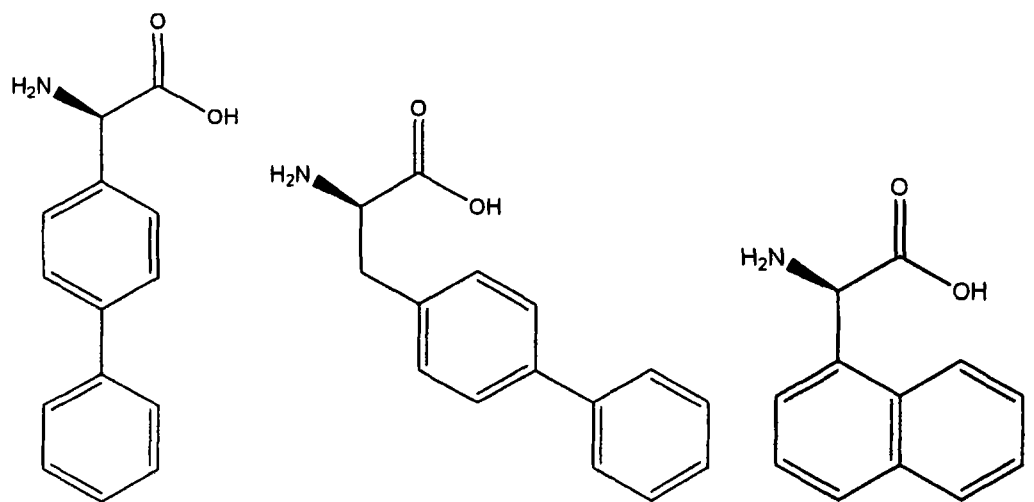
GLP-1-(7-36): HAEGTFTSDVSSYLEGQAAKEFIAWLVKGR (SEQ ID NO: 3)

GLP-1-(7-37): HAEGTFTSDVSSYLEGQAAKEFIAWLVKGRG (SEQ ID NO: 4)

[0026] 添加的氨基酸残基通常为 α -氨基酸残基。

[0027] 在某些实施方式中，所添加的氨基酸残基的一个或多个（甚至全部）是非天然存在的。如此处所使用，非天然存在的氨基酸是在人 DNA 中编码的 20 个氨基酸之外的氨基酸。“非天然存在的”不意图排除在有机体（例如，人类和其它哺乳动物）中发现的所有氨基酸，除非特别指出。

[0028] 适于在本发明中使用的示例性非天然存在的氨基酸是具有含芳基侧链的那些氨基酸。在某些实施方式中，含芳基侧链具有双环或多环芳基基团。在某些实施方式中，含芳基侧链具有两个或更多个芳基，例如联苯基(4-苯基-苯基)。具有非天然存在的侧链的氨基酸包括联苯基甘氨酸、联苯基丙氨酸和萘基甘氨酸，其结构如下：



[0029] 在某些实施方式中，所添加的氨基酸残基全部是天然存在的。当所有的添加的氨基酸都是天然存在的，残基有利地选自 exendin-4 的羧基末端（残基 31-39）残基的一个或多个。Exendin-4 是从赫拉毒蜥(*Heloderma suspectum*) (希拉毒蜥, Gila monster) 的唾液分离的肽激素，其在哺乳动物中具有葡萄糖降低活性。exendin-4 的残基 31-39 为：

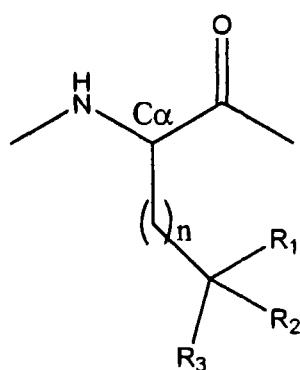
Pro-Ser-Ser-Gly-Ala-Pro-Pro-Pro-Ser (SEQ ID NO: 5)。

优选地，残基 31-39 的至少三个连续残基——例如 Pro-Ser-Ser 或全部九个残基序列，被添加到基础氨基酸序列的羧基末端。在另一优选的实施方式中，仅 Pro 被连接到羧基末端。

[0030] 在本发明的某些实施方式中，针对后脯氨酸切割蛋白酶，基础氨基酸序列在 P'₁ 位置（酰胺切割位点的羧基末端侧的残基）被修饰。该修饰产生相对于天然 GLP-1 具有大大降低的对酶介导切割的易感性的 GLP-1 类似物，该类似物仍保持天然 GLP-1 的生物活性。

[0031] 典型地，GLP-1 类似物在（切割位点的）P'₁ 残基的修饰包括具有四取代的 C β 碳的氨基酸类似物的取代。这类氨基酸类似物显著增加了所得到的类似物的体内半衰期，例如，其相对于野生型多肽可具有更长的生物作用持续时间和/或降低的清除率（例如，更长的血清半衰期）。

[0032] 尽管用另一天然存在的氨基酸置换 P'₁ 残基被考虑在内，但在优选的实施方式中，P'₁ 残基被用非天然存在的氨基酸类似物置换，甚至更优选地，用结构类似物置换，所述结构类似物例如保持位阻和/或电子性质方面的相似特性。为了举例说明，在某些实施方式中，本发明提供了修饰的多肽，其被赋予更低的对后脯氨酸切割蛋白酶如二肽基肽酶 IV (DPP-IV) 的蛋白水解作用的易感性，其中所述多肽在 P'₁ 位置用具有式 I 的氨基酸或氨基酸类似物修饰：



其中：

R₁ 和 R₂ 各自独立地表示低碳烷基 (lower alkyl)、杂烷基、环烷基、杂环烷基、芳基、烷氧基、酰胺、羰基、卤素、羟基、胺或氰基，或者 R₁ 和 R₂ 一起形成 4-7 个原子的环；

R_3 表示低碳烷基、杂烷基、环烷基、杂环烷基、芳基、氨基、烷氧基、卤素、酰胺、羰基、氰基、巯基、硫烷基 (thioalkyl)、酰氨基 (acylamino)、酰胺基 (amido)、氰基、硝基、叠氮基、硫酸酯 (sulfate)、磺酸酯、亚磺酰氨基、 $-(CH_2)_m-R_4$ 、 $-(CH_2)_m-OH$ 、 $-(CH_2)_m-COOH$ 、 $-(CH_2)_m-O$ -低碳烷基、 $-(CH_2)_m-O$ -低碳链烯基、 $-(CH_2)_n-O-(CH_2)_m-R_4$ 、 $-(CH_2)_m-S$ -低碳烷基、 $-(CH_2)_m-S$ -低碳链烯基、 $-(CH_2)_n-S-(CH_2)_m-R_4$ 、 $-(CH_2)_m-N-C(=NH)NH_2$ 、 $-(CH_2)_m-C(=O)NH_2$ 或 $-(CH_2)_m-NH_2$;

对于每一次出现, R_4 独立地表示芳基、芳烷基、环烷基、环烯基或杂环;

$m = 0, 1$ 或 2 ; 和

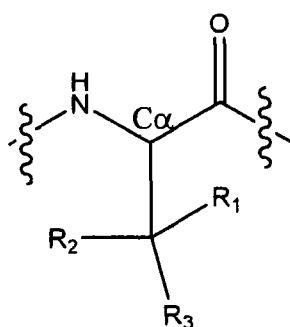
$n = 0, 1$ 或 2 。

[0033] 在某些优选的实施方式中, R_1 和 R_2 各自独立地表示小疏水基团, 例如低碳烷基 (优选甲基、乙基或丙基, 以及甚至更优选甲基)、卤素或卤化低碳烷基。

[0034] 在某些优选的实施方式中, R_3 表示低碳烷基, 更优选甲基、乙基或丙基, 以及甚至更优选甲基。在另一些优选的实施方式中, R_3 表示芳基, 例如苯基或羟苯基 (优选对羟基)。在其它优选的实施方式中, R_3 表示羟基。在另外的优选实施方式中, R_3 表示 $-(CH_2)_m-COOH$, 其中 m 优选是 0 或 1 。

[0035] 在某些优选的实施方式中, $n = 0$ 。

[0036] 在这类底物类似物的某些优选实施方式中, P'_1 是具有四取代的 C_β 碳的氨基酸类似物, 例如式 II 所表示:



其中:

R_1 和 R_2 各自独立地表示低碳烷基、杂烷基、环烷基、杂环烷基、芳基、烷氧基、羰基、酰胺、卤素、羟基、胺或氰基, 或者 R_1 和 R_2

一起形成 4-7 个原子的环;

R_3 表示低碳烷基、杂烷基、氨基、烷氧基、卤素、酰胺、羰基、氰基、巯基、硫烷基、酰氨基、硝基、叠氮基、硫酸酯、磺酸酯、亚磺酰氨基、 $-(CH_2)_m-R_4$ 、 $-(CH_2)_m-OH$ 、 $-(CH_2)_m-COOH$ 、 $-(CH_2)_m-O$ -低碳烷基、 $-(CH_2)_m-O$ -低碳链烯基、 $-(CH_2)_n-O-(CH_2)_m-R_4$ 、 $-(CH_2)_m-S$ -低碳烷基、 $-(CH_2)_m-S$ -低碳链烯基、 $-(CH_2)_n-S-(CH_2)_m-R_4$ 、 $-(CH_2)_m-N-C(=NH)NH_2$ 、 $-(CH_2)_m-C(=O)NH_2$ 或 $-(CH_2)_m-NH_2$;

对于每一次出现, R_4 独立地表示芳基、芳烷基、环烷基、环烯基或非芳香杂环基; 和

$m = 0, 1$ 或 2 。

[0037] 在某些实施方式中, R_1 和 R_2 各自独立地表示低碳烷基或卤素; R_3 表示低碳烷基、芳基、羟基、 $-(CH_2)_m-COOH$ 、 $-(CH_2)_m-NH_2$ 、 $-(CH_2)_m-N-C(=NH)NH_2$ 、 $-(CH_2)_m-C(=O)NH_2$ 、 $-SH$ 或 $-(CH_2)_m-S-CH_3$; 以及 $m = 0, 1$ 或 2 。

[0038] 在某些优选的实施方式中, R_1 和 R_2 各自独立地表示甲基、乙基或丙基, 以及甚至更优选甲基。

[0039] 在某些优选的实施方式中, R_3 表示低碳烷基, 更优选甲基、乙基或丙基, 以及甚至更优选甲基。在其它优选的实施方式中, R_3 表示芳基, 例如苯基或羟苯基 (优选对羟基)、吲哚或咪唑。在其它优选的实施方式中, R_3 表示羟基。在一些优选实施方案中, R_3 表示 $-COOH$ 或 CH_2-COOH 。在另一些优选实施方式中, R_3 表示 $-CH_2-CH_2-N-C(=NH)NH_2$ 、 $-CH_2-C(=O)NH_2$ 、 $-CH_2-CH_2-C(=O)NH_2$ 、 $-SH$ 、或 $-CH_2-S-CH_3$ 。

[0040] 具有修饰的 P'_1 残基的示例性基础氨基酸序列示于表 1 中, 其中 X 表示修饰的 P'_1 残基的位置:

表 1

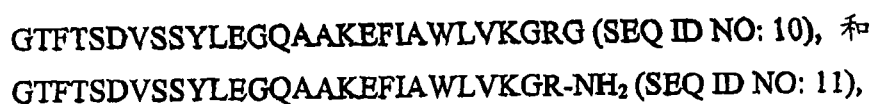
	天然序列	示例性类似物
人胰高血糖素样肽 GLP-1(7-37)	HAE*GTFTSDVSSYLEGQAAKEF LAWLVKGRG (SEQ ID NO: 4)	HAXGTFTSDVSSYLEGQAAKEFIA WLVKGRG (SEQ ID NO: 6)
人胰高血糖素样肽 1: GLP-1 (7-36)NH ₂	HAE*GTFTSDVSSYLEGQAAKEF LAWLVKGR-NH ₂ (SEQ ID NO: 3)	HAXGTFTSDVSSYLEGQAAKEFIA WLVKGR-NH ₂ (SEQ ID NO: 7)
Exendin-4 (GLP-1 类似物)	HGE*GTFTSDLKEMBEAAVRLF IEWLKNGGPSSGAPPPS-NH ₂ (SEQ ID NO: 8)	HGXGTFTSDLKEMBEAAVRLFIE WLKNGGPSSGAPPPS-NH ₂ (SEQ ID NO: 9)

更具体而言，本发明特别考虑了具有下列氨基酸序列的 GLP-1 类似物的产生：



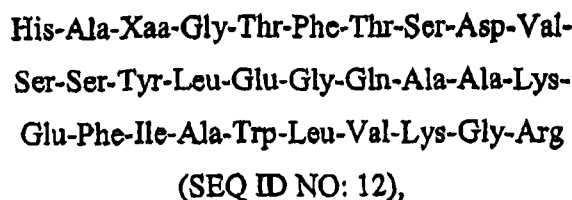
其中 Xaa 和 Yaa 表示氨基酸残基，而 R 和 R' 每一次出现独立地表示具有 GLP-1 样活性并包含 1 至约 100 个氨基酸残基的多肽链，其中类似物序列 Yaa 被由式 I 或式 II 表示的氨基酸残基置换。本发明考虑了序列不同于 GLP-1 的变体多肽的修饰，以便产生变体 P'₁ 类似物。这类变体与 GLP-1-(7-36) 至少 80%、85%、90%、95%、97%、99% 或 99% 以上相同。

[0041] 在某些实施方式中，R 是这样的多肽，其具有选自下列的氨基酸序列：



或者 5 个或更少的氨基酸残基与上述序列不同的序列，甚至更优选不超过 4、3 或甚至 2 个氨基酸残基不同。

优选的基础氨基酸序列是：



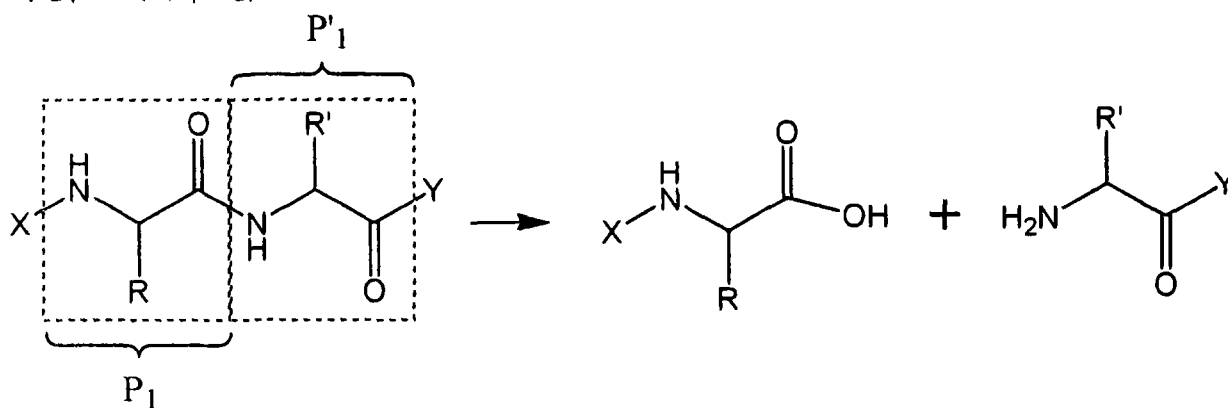
其中 Xaa 是 β -二甲基天冬氨酸或叔亮氨酸,特别是 β -二甲基天冬氨酸。有利地连接于该基础氨基酸序列的氨基酸包括联苯基亮氨酸、Pro-Ser-Ser 和 Pro-Ser-Ser-Gly-Ala-Pro-Pro-Pro-Ser (SEQ ID NO: 5)。

II. 定义

[0042] 肽底物的结合位点由沿着酶表面的一系列“特异性亚位点 (specificity subsites)”组成。术语“特异性亚位点”是指酶上能够与酶底物的一部分相互作用的口袋或其它位点。

[0043] 在讨论肽和蛋白质底物与蛋白酶如丝氨酸和半胱氨酸蛋白酶等之间的相互作用时,本发明采用了 Schechter 和 Berger [(1967) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 27:157-162)] 的命名法。底物或抑制剂的各个氨基酸残基从氨基末端到羧基末端被称为 $-P_2-P_1-P'_1-P'_2-$ 等等,而酶的相应亚位点被称为 S_2, S_1, S'_1, S'_2 等等。底物的分离键(scissile bond)是连接 P_1 和 P'_1 残基的酰胺键。

[0044] “ P'_1 残基”是指底物多肽的氨基酸残基,其成为由底物多肽的酰胺骨架的蛋白酶介导切割得到的产物多肽的新氨基末端。为进一步举例说明,底物多肽包括酰胺骨架键,其经受下列一般方案所表示的蛋白水解反应:



[0045] 术语“氨基酸残基”意指氨基酸,通常是 α -氨基酸。一般而言,本文用于命名天然存在的氨基酸的缩写基于 IUPAC-IUB 生物化学命名委员会的建议(参见 *Biochemistry* (1972) 11:1726-1732)。例如, Met、Ile、Leu、Ala 和 Gly 分别表示甲硫氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、丙氨酸和甘氨酸的残基。残基意指通过消去羧基的 OH 部分和 α -氨基的 H 部分衍生自相应的 α -氨基酸的基团 (radical)。

[0046] 术语“氨基酸侧链”是氨基酸残基除了骨架之外的那部分，如 K. D. Kopple, “Peptides and Amino Acids”, W. A. Benjamin Inc., New York and Amsterdam, 1966, 第 2 和 33 页所定义；常见氨基酸的这类侧链的例子是 $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{SCH}_3$ (甲硫氨酸的侧链)、 $-\text{CH}_2(\text{CH}_3)-\text{CH}_2\text{CH}_3$ (异亮氨酸的侧链)、 $-\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ (亮氨酸的侧链) 或 $-\text{H}$ (甘氨酸的侧链)。这些侧链连接于骨架 C_α 碳 (pendant from the backbone C_α carbon)。

[0047] 术语“四取代 C_β 碳”是指这样的碳原子，其(i)直接连接于氨基酸骨架的 C_α 碳，和(ii)带有四个取代基 (包括 C_α 碳)，其中没有一个是氢。

[0048] 如此处所使用，“蛋白质”是基本上由 20 个氨基酸的任意个的组合组成的多聚体。尽管“多肽”通常在提及相对大的蛋白质时被使用，而“肽”通常在提及小蛋白时被使用，但在本领域中这些术语的使用有所重叠并变化。除非通过上下文是清楚的，术语“肽”、“蛋白质”和“多肽”在本文中可互换使用。

[0049] 对于肽键水解酶的亚型(亚类 E.C 3.4.)，生物化学和分子生物学国际联合会 (The International Union of Biochemistry and Molecular Biology) (1984) 已经建议使用术语“肽酶”。广泛使用的术语“蛋白酶”与“肽酶”同义，并且它们在本文中被互换使用。肽酶包括两组酶：内肽酶和外肽酶。内肽酶切割蛋白质内位点处的肽键，而外肽酶从氨基末端或羧基末端顺序除去氨基酸。

[0050] 术语“蛋白酶”也用作内肽酶的同义词。蛋白酶根据它们的催化机理进行分类。四种机理类别已经被生物化学和分子生物学国际联合会承认：丝氨酸蛋白酶、半胱氨酸蛋白酶、天冬氨酸蛋白酶和金属蛋白酶。

[0051] 术语“激动剂”，如此处所使用，意指保持保持感兴趣的天然底物(例如，GLP-1)的生物活性以便当施用于动物时产生类似的生物学效应的类似物。

[0052] 术语“拮抗剂”是指一种类似物，其不保持感兴趣的天然底物(例如，GLP-1)的生物活性或至少相对于天然底物处于降低的活性水平，并抑制天然底物的生物作用。

[0053] 术语“类似物”是指在功能上基本上类似于天然肽或蛋白或其片段的分子。

[0054] 如本文所使用,“说明书”意指描述与试剂盒或包装药物的使用有关的相关材料或方法的产品标签和/或文件。这些材料科包括如下的任何组合:背景信息、成分列表、建议剂量、关于可能的副作用的警告、施用药物的说明、技术支持以及任何其它相关文件。

[0055] 对于在治疗中使用,化合物例如本发明的类似物的“有效量”是指类似物在制剂中的量,当其作为期望的剂量方案的一部分被施用(给哺乳动物,优选人类)时,根据待治疗的疾病或病症或美容目的的临床可接受标准,例如以适于任何医学治疗的合理效益/风险比,减轻症状、改善病症或减缓疾病状况的起始。

[0056] 术语“烷基”是指完全饱和的支化或未支化碳链基团,其具有指定的碳原子数,或者如果未进行说明则最多可达30个碳原子。例如,“低碳烷基”是指具有1至10个碳原子的烷基,例如甲基、乙基、丙基、丁基、戊基、己基、庚基、和辛基,以及这些烷基的位置异构体。具有10至30个碳原子的烷基包括癸基、十一烷基、十二烷基、十三烷基、十四烷基、十五烷基、十六烷基、十七烷基、十八烷基、十九烷基、二十烷基、二十一烷基、二十二烷基、二十三烷基和二十四烷基。在优选的实施方式中,直链或支链烷基在其骨架中具有30个或更少的碳原子(例如,对于直链为C₁-C₃₀,对于支链为C₃-C₃₀),并且更优选20个或更少。同样,优选的环烷基在它们的环结构中具有3-10个碳原子,并且更优选在环结构中具有5、6或7个碳。

[0057] 而且,如在整个说明书、实施例和权利要求书中所使用的,术语“烷基”(或“低碳烷基”)意图包括未取代的和取代的烷基链,后者是指具有取代基的烷基部分,该取代基取代烃骨架的一个或多个碳上的氢。这类取代基可包括例如卤素、羟基、羰基(例如羧基、烷氧基羰基、甲酰基或酰基)、硫代羰基(例如硫代酸酯、硫代乙酸酯或硫代甲酸酯)、烷氧基、磷酰基、磷酸酯、膦酸酯、次磷酸酯、氨基、酰氨基、脒、氰基、硝基、巯基、烷硫基、硫酸酯、磺酸酯、氨磺酰基、亚磺酰氨基、磺酰基、杂环基、芳烷基、或者芳族部分或杂芳族部分。本领域普通技术人员将理解,如果适当,在烃链上被取代的部分它们本身可以被取代。例如,取代的烷基的取代基可包括取代形式和未取代形式的氨基、叠氨基、亚氨基、酰氨基、磷酰基(包括膦酸酯和次磷酸酯)、磺酰基(包括硫酸酯、亚磺酰氨基、氨磺酰和磺酸酯)和甲

硅烷基, 以及醚、烷硫基、羰基(包括酮、醛、羧酸酯和酯)、 $-CF_3$ 、 $-CN$ 等等。示例性的取代烷基在下面进行了描述。环烷基可用烷基、链烯基、烷氧基、烷硫基、氨基烷基、羰基-取代的烷基、 $-CF_3$ 、 $-CN$ 等等进一步取代。

[0058] 除非碳原子数另外说明, “低碳烷基”, 如此处所使用, 意指如上所定义的烷基, 但在其骨架结构中具有一至十个碳, 更优选一至六个碳原子, 例如甲基、乙基、正丙基、异丙基、正丁基、异丁基、仲丁基和叔丁基。同样, “低碳链烯基”和“低碳炔基”具有类似的链长。在整个申请中, 优选的烷基是低碳烷基。在优选的实施方式中, 本文称为烷基的取代基是低碳烷基。

[0059] “杂烷基基团”是一种烷基基团, 其中一个或更多个内部(即, 非末端)碳原子被杂原子如氮、氧、硫、磷、硒或硅取代。典型地, 杂原子是氮、氧或硫。“杂环烷基基团”是类似的环烷基基团, 其中碳原子被杂原子取代。

[0060] 术语“碳环”, 如此处所使用, 是指其中环的每个原子都是碳的芳环或非芳环。

[0061] 如此处所使用, 术语“芳基”包括 5-、6-和 7-元单环芳香基团, 其可包括零至四个杂原子, 例如苯、吡咯、咪唑、噻吩、咪唑、噻唑、三唑、吡唑、吡啶、吡嗪、哒嗪和嘧啶等。这些在环结构中具有杂原子的芳基也可被称为“芳基杂环”或“杂芳族化合物”。芳环可在一个或更多个环位置用上述的这类取代基取代, 所述取代基例如卤素、叠氮基、烷基、芳烷基、链烯基、炔基、环烷基、羟基、烷氧基、氨基、硝基、巯基、亚氨基、酰氨基、磷酸酯、次磷酸酯、羰基、羧基、甲硅烷基、醚、烷硫基、磺酰基、亚磺酰氨基、酮、醛、酯、杂环基、芳族部分或杂芳族部分、 $-CF_3$ 、 $-CN$ 等等。术语“芳基”还包括具有两个或更多个环的多环体系, 其中两个或更多个碳由两个相邻环共用(环是“稠合环”), 其中至少一个环是芳香性的, 例如, 另一些环可以是环烷基、环烯基、环炔基、芳基和/或杂环基。

[0062] “链烯基”是指任何支化的或未支化的不饱和碳链基团, 其具有指定的碳原子数, 或者如果未说明对碳原子数的限制可达 26 个碳原子; 并在基团中具有 1 个或多个双键。具有 6 至 26 个碳原子的链烯基由下列示例: 各种形式的己烯基、庚烯基、辛烯基、壬烯基、癸烯基、

十一碳烯基、十二碳烯基、十三碳烯基、十四碳烯基、十五碳烯基、十六碳烯基、十七碳烯基、十八碳烯基、十九碳烯基、二十碳烯基、二十一碳烯基、二十二碳烯基、二十三碳烯基和二十四碳烯基，其中不饱和键（一个或多个）可位于基团内任意位置且对于双键（一个或多个）可具有(Z)或(E)构型。

[0063] 术语“炔基”是指链烯基的范围的烃基团（radical），但在基团内具有1个或多个三键。

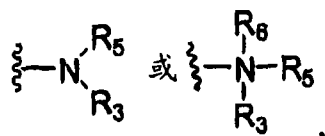
[0064] 如此处所使用，术语“烷氧基（alkoxyl 或 alkoxy）”是指烷基基团，如下所定义，其具有连接于其上的氧基。代表性的烷氧基基团包括甲氧基、乙氧基、丙氧基、叔丁氧基等。“醚”是由氧共价连接的两个烃。因此，烷基的取代基——其使得该烷基成为醚——是烷氧基或类似烷氧基，例如可由-O-烷基、-O-链烯基、-O-炔基、-O-(CH₂)_m-R₁所表示，其中 m 和 R₁ 在下面加以描述。

[0065] 术语“杂环基（heterocyclyl 或 heterocyclic group）”是指3-至10-元环结构，更优选3-至7-元环，其环结构包括一至四个杂原子。杂环还可以是多环。杂环基包括例如噻吩、噻蒎、呋喃、吡喃、异苯并呋喃、色烯、咕吨、吩噻（phenoxathiin）、吡咯、咪唑、吡唑、异噻唑、异噁唑、吡啶、吡嗪、嘧啶、哒嗪、中氮茛（indolizine）、异吲哚、吲哚、吲唑、嘌呤、喹啉、异喹啉、喹啉、2,3-二氮杂萘、1,5-二氮杂萘、喹啶、喹唑啉、噌啉、蝶啶、吡啶、吡啶、菲啶、吡啶、嘧啶、菲咯啉、吩嗪、吩吡嗪、吩噻嗪、呋喃、吩噻嗪、吡咯烷、四氢呋喃（oxolane）、四氢噻吩、噁唑、哌啶、哌嗪、吗啉、内酯、内酰胺如β-丙内酰胺和吡咯烷酮、磺内酰胺、磺内酯等等。杂环可在一个或多个环位置用上述的这类取代基取代，所述取代基例如卤素、烷基、芳烷基、链烯基、炔基、环烷基、羟基、氨基、硝基、巯基、亚氨基、酰氨基、磷酸酯、膦酸酯、次磷酸酯、羧基、羧基、甲硅烷基、氨磺酰、亚磺酰、醚、烷硫基、磺酰基、酮、醛、酯、杂环基、芳族部分或杂芳族部分、-CF₃、-CN 等等。

[0066] 术语“烷硫基”是指烷基基团，如上所定义，具有连接于其上的硫基。在优选的实施方式中，“烷硫基”部分由-(S)-烷基、-(S)-链烯基、-(S)-炔基和-(S)-(CH₂)_m-R₁之一所代表，其中 m 和 R₁ 在下面加以定义。代表性的烷硫基基团包括甲硫基、乙硫基等。

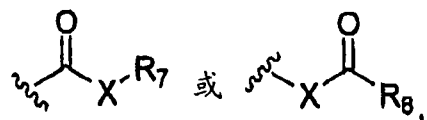
[0067] 如本文所使用，术语“硝基”意指-NO₂；术语“卤素”表示-F、-Cl、-Br 或-I；术语“巯基”（“sulfhydryl”或“thiol”）意指-SH；术语“羟基”意指-OH；以及术语“磺酰基”意指-SO₂-。

[0068] 术语“胺”和“氨基”是领域公知的，是指未取代和取代的胺，例如可由下列通式表示的部分：



其中 R₃、R₅ 和 R₆ 各自独立表示氢、烷基、链烯基、-(CH₂)_m-R₁，或者 R₃ 和 R₅ 与它们连接在其上的 N 原子一起完成在环结构中具有 4 至 8 个原子的杂环；R₁ 表示链烯基、芳基、环烷基、环烯基、杂环基或多环基；以及 m 是零或 1 至 8 的范围中的整数。在优选的实施方式中，仅 R₃ 或 R₅ 之一可以是羰基，例如 R₃、R₅ 和氮一起不形成二酰亚胺。在甚至更优选的实施方式中，R₃ 和 R₅（以及任选地，R₆）各自独立表示氢、烷基、链烯基或-(CH₂)_m-R₁。因此，如此处所使用，术语“烷基胺”意指胺基团，如上所定义，具有连接于其上的取代或未取代烷基，即，R₃ 和 R₅ 的至少一个是烷基基团。在某些实施方式中，氨基或烷基胺是碱性的，意味着它具有 pK_a ≥ 7.00。这些官能团的质子化形式具有相对于水在 7.00 以上的 pK_a。

[0069] 术语“羰基”是领域公知的，并包括如下列通式所表示的这类部分：

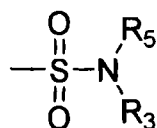


其中 X 是键或者表示氧或硫，而 R₇ 表示氢、烷基、链烯基、-(CH₂)_m-R₁ 或药学上可接受的盐，R₈ 表示氢、烷基、链烯基、-(CH₂)_m-R₁，其中 m 和 R₁ 如上所定义。在 X 是氧且 R₇ 或 R₈ 不是氢的情况下，该式子表示“酯”。在 X 是氧且 R₇ 如上所定义的情况下，该部分在本文被称为羰基，以及尤其当 R₇ 是氢时，该式子表示“羧酸”。在 X 是氧且 R₈ 是氢的情况下，该式子表示“甲酸酯”。一般而言，在上式的氧原子被硫取

代的情况下，该式子表示“硫代羰基”基团。在 X 是硫且 R₇ 或 R₈ 不是氢的情况下，该式子表示“硫代酸酯”基团。在 X 是硫且 R₇ 是氢的情况下，该式子表示“硫代羧酸”基团。在 X 是硫且 R₈ 是氢的情况下，该式子表示“硫代甲酸酯”基团。另一方面，在 X 是键且 R₇ 不是氢的情况下，上式表示“酰基”基团。在 X 是键且 R₇ 是氢的情况下，上式表示“醛”基团。

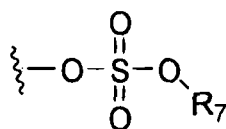
[0070] 如此处所使用，术语“取代的”考虑包括有机化合物的所有容许的取代基。在宽的方面，容许的取代基包括有机化合物的无环的和环状的、支化的和未支化的、碳环的和杂环的、芳族的和非芳族取代基。说明性取代基包括例如本文中上面描述的那些取代基。对于合适的有机化合物，容许的取代基可以是一个或多个并且可相同或不同。为了本发明的目的，杂原子例如氮可具有氢取代基和/或任何本文描述的有机化合物容许取代基，其满足杂原子的化合价。本发明不意图以任何方式受限于有机化合物的容许取代基。应当理解，“取代”或“用……取代”包括暗含的条件：这类取代与被取代的原子和取代基所允许的化合价一致，并且取代产生稳定的化合物，例如，其不会自发地经历转变，例如通过重排、环化、消去等进行的转变。

[0071] 术语“氮磺酰”是领域公知的 (art-recognized) 并包括可由下列通式表示的部分：



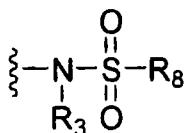
其中 R₃ 和 R₅ 如上所定义。

[0072] 术语“硫酸酯”是领域公知的并包括可由下列通式表示的部分：



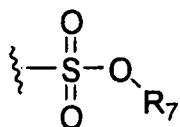
其中 R₇ 如上所定义。

[0073] 术语“亚磺酰氨基”是领域公知的并包括可由下列通式表示的部分：



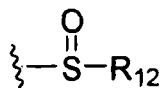
其中 R₂ 和 R₄ 如上所定义。

[0074] 术语“磺酸酯”是领域公知的并包括可由下列通式表示的部分：



其中 R₇ 是电子对、氢、烷基、环烷基或芳基。

[0075] 术语“亚砷基”或“亚磺酰”，如此处所使用，是指可由下列通式表示的部分：



其中 R₁₂ 选自氢、烷基、链烯基、炔基、环烷基、杂环基、芳烷基或芳基。

[0076] 类似的取代可对链烯基和炔基基团进行，以产生例如氨基链烯基、氨基炔基、酰胺链烯基、酰胺炔基、亚氨基链烯基、亚氨基炔基、硫代链烯基、硫代炔基、羰基取代的链烯基或炔基。

[0077] 如此处所使用，每一表达方式，例如烷基、m、n 等，的定义，当该表达方式在任何结构中出现一次以上时，意图独立于其在该同一结构中其它位置的定义。

[0078] 为了本发明的目的，化学元素根据 CAS 版本, Handbook of Chemistry and Physics, 67th Ed., 1986-87 的内封面的元素周期表加以鉴定。同样为了本发明的目的，术语“烃”考虑包括具有至少一个氢和一个碳原子的所有容许的化合物。在宽的方面，容许的烃包括无环和环状的、支化和未支化的、碳环和杂环的、芳族和非芳族的有机化合物，其可以是取代或未取代的。

III. 示例性实施方式

(a) 类似物的特性

[0079] 在许多实施方式中，类似物将被选择，以保持天然底物的体外或体内活性的一种或更多种。体外和体内活性可采用适于特定类似物的、本领域普通技术人员可利用的任何方案加以测量。可被测量以确定类似物是否保持相同或相似功能活性的示例性功能活性包括类似物在基于细胞的测定或无细胞测定中结合其受体（一种或多种）的能力、类似物诱导应答于 GLP-1 的细胞变化（例如，增殖、分化、存活、生长、迁移等等）、类似物调节在细胞中应答于 GLP-1 的一个或更多个其它基因或蛋白质的表达的能力。

[0080] 在某些实施方式中，类似物具有与天然 GLP-1 或其片段基本上相似的活性（例如，活性为天然 GLP-1 的大约 80%、90%、100%、110% 或 120%）。在一些实施方式中，类似物活性较天然 GLP-1 低（例如，活性为该天然多肽的大约 50%、60%、70% 或 75%）。我们注意到，如果活性降低仍提供在足够的时间期间内提供足够的类似物局部浓度的能力，活性稍微低一些的类似物可能是有用的，例如在体内或在细胞培养物中。因此，例如通过蛋白酶抗性得到的半衰期增加可补偿类似物的构建所导致的活性降低。在另外的实施方式中，类似物比天然 GLP-1 活性更强（例如，活性为天然 GLP-1 的大约 130%、150%、175%、200%、300%、500%、800% 或甚至 1000%）。在前述的任一种中，“活性”意指天然 GLP-1 的一种或多种功能。例如，类似物的活性（例如，生物功能）可以是受体结合、作为转录激活子或抑制子起作用的能力、参与特定的信号转导通路的能力、或影响细胞行为（例如，增殖、分化、存活或迁移）的能力。

[0081] 这类活性可被例如表示为相对结合常数（例如用于受体结合）、有效浓度 (EC_{50}) 和/或有效剂量 (ED_{50})。

[0082] 示例性的类似物相比于天然 GLP-1 具有增加的半衰期（或作用持续时间）（体外和/或体内）。然而，一般应当理解，各种类似物将具有不同的半衰期（以及不同的、相对于天然 GLP-1 的半衰期变化）。体外和/或体内半衰期（或作用持续时间）可以利用标准方法例如葡萄糖降低效应的时程由本领域普通技术人员方便地加以测量。在某些实施方式中，类似物具有这样的体外或体内半衰期（作用持续时间），其在相似的半衰期测量分析条件下是天然多肽的体外和/或体内

半衰期的大约 0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1.0、1.3、1.5、2、3、5、10、25、30、50、75、100 或甚至高于 100 的倍数。

(b) 肽激素类似物的合成

[0083] 本发明的类似物可通过标准固相合成法加以制备；参见，例如 Stewart, J. M., et al., *Solid Phase Synthesis* (Pierce Chemical Co., 2d ed. 1984)。如通常所知，具有必要长度的肽可采用商业可得的设备和试剂加以制备，遵照生产商的说明，以阻断干扰基团、保护待反应的氨基酸、偶联、去保护和帽化未反应的残基。合适的设备可从例如 Foster City, Calif. 的 Applied BioSystems 或 San Raphael, Calif. 的 Biosearch Corporation 获得。

[0084] 在优选的方法中，应用标准的自动固相合成法合成类似物，该自动固相合成法利用具有合适的侧链保护的叔丁氧基羰基- α -氨基酸。完成的类似物从固相载体除去，同时应用标准的氟化氢法进行侧链去保护。使用在 0.1% 三氟乙酸(TFA)中的乙腈梯度，通过半制备反相-HPLC (Vydac C₁₈)进一步纯化粗制类似物。类似物被真空干燥以除去乙腈，并从 0.1% TFA 水溶液冷冻干燥出来。通过分析性 RP-HPLC 确认纯度。肽被冻干，然后按重量计以 1-2 mg/mL 的浓度溶解在水或 0.01 M 乙酸中。

[0085] 如果非编码氨基酸或 D 型氨基酸存在于类似物中，则前述合成方法的使用是需要的。然而，对于可以被基因编码的类似物，也可求助于重组技术，其在商业可得的表达系统中应用容易合成的 DNA 序列。

(c) 功能测定

[0086] 评价候选类似物是否抗蛋白水解的各种方法是本领域中可得的。例如，特定蛋白酶切割类似物的能力可在体外无细胞体系中加以测定。在无细胞测定体系的一个这样的实施方式中，候选底物（例如，类似物和/或天然多肽）用可检测的标记如放射性进行末端标记。标记的底物在蛋白酶存在下进行温育。随着时间的过去，反应混合物的样品可被停止，并进行跑胶。放射性条带的大小变化表明多肽被蛋白酶切割，且该变化发生的速率指示多肽被蛋白酶切割的速率。该速率可与

用天然多肽观察到的速率相比。

[0087] 为进一步举例说明，测试特定类似物的示例性实验包括下列内容。天然多肽(GLP-1)和推定类似物各自被放射性标记（注意：为了标记的目的，全部的必要条件是：多肽的切割产生其大小不同于全长的标记多肽的放射性片段）。标记的天然多肽和类似物与特定的蛋白酶一起温育。在温育之后，天然多肽和类似物都通过凝胶电泳加以分离，并检测标记物质的迁移。由于已知该特定蛋白酶切割所述天然多肽，所以期望将观察到标记的天然多肽片段的大小变化（在与酶温育前后），其中较小的片段相应于切割产物。然而，如果类似物抗蛋白水解，那么与蛋白酶温育后迁移率的变化将或者不发生，或者将发生得比天然蛋白质的蛋白水解慢得多。

[0088] 相比于切割天然多肽，蛋白酶切割类似物的相对能力也可在基于细胞的体外系统中进行评价。在一个这类基于细胞的测定中，表达给定蛋白酶的细胞与天然多肽或类似物接触，使得天然多肽和类似物存在于细胞中。与在上述的无细胞测定中类似，天然多肽和类似物被可检测地标记。天然多肽和类似物的切割可通过从细胞提取蛋白质并测量标记蛋白质的迁移加以测量和比较。

[0089] 在基于细胞的测定的进一步的例子中，不表达给定蛋白酶的细胞与可检测地标记的天然多肽或类似物接触，使得天然多肽或类似物在所述细胞中表达。所述细胞与特定蛋白酶进一步接触，使得所述蛋白酶在所述细胞中表达。天然多肽和类似物的切割可通过从细胞提取蛋白质并测量标记蛋白质的迁移加以测量和比较。

[0090] 在前述基于细胞的测定中的任何一种中，本发明考虑使用许多原代细胞或细胞系的任何一种。在一些情况下，选择特定的细胞或细胞系来在其中进行体外分析可能是有利的。例如，在一些情况下，选择这样的细胞系可能是有利的，该细胞系与最终希望在其中应用类似物的细胞类型更紧密相关。然而，在其它情况下，可能最有用的是：在主要根据方便性而选择的、可能不相关的细胞类型或细胞系中进行候选类似物的初步筛选和测试，然后根据需要在更特定的细胞系中或在动物模型中进行安全性和有效性测试。

[0091] 除了无细胞测定和基于细胞的测定，特定类似物的蛋白酶抗性可利用许多动物模型的任何一种进行体内测量。给定类似物的初

步蛋白水解测试可在野生型动物中进行评价。在这类初步测试期间，类似物的潜在正效应或负效应并不是问题，而问题是特定的类似物是否抗蛋白水解。使用上述的无细胞测定、基于细胞的测定或体内测定的任何一种，一旦特定类似物显示出抗蛋白水解，则可进行类似物的进一步体外和体内测试，以确定类似物的治疗有效性。

[0092] 其它测定可用于评价类似物的具体功能活性。这类测定可基于特定类似物进行选择。对于本 GLP-1 类似物，类似物的功能活性可通过测量类似物在无细胞测定或基于细胞的测定中结合其受体的能力并将其与天然肽激素的能力比较来加以评价。在这些例子的任何一个中，功能活性还可以在动物模型中进行测量，例如测定血糖或胰岛素水平的那些。

[0093] 下列例证性例子提供了类似物功能活性的可能的评估方法。

1. 促胰岛活性测定

[0094] 活性 GLP-1 肽 7-34、7-35、7-36 和 7-37 具有促胰岛活性，本发明提供制备这些活性 GLP-1 肽的肽类似物的方法。GLP-1 肽类似物对蛋白质水解的抗性可被容易地测定。另外，GLP-1 肽类似物的功能活性可通过检测该肽激素类似物的促胰岛素性能加以证明。促胰岛素活性可被测定，例如通过将给定肽类似物提供至动物细胞或者将该类似物注射到动物中，并分别监测免疫反应性胰岛素(IRI)向培养基或动物循环系统的释放。IRI 的存在可通过利用可特异性检测胰岛素的放射免疫测定加以检测。

[0095] db/db 小鼠是遗传性肥胖和糖尿病株小鼠。该 db/db 小鼠伴随其肥胖的发展而发展高血糖症和高胰岛素血症，从而用作肥胖 2 型糖尿病(NIDDM)的模型。例如，db/db 小鼠可从 The Jackson Laboratories (Bar Harbor, Me.) 购买。在示例性的实施方式中，为用包括肽激素类似物或对照的方案治疗小鼠，对每只动物在给药之前和在给药之后一定时间（如，60 分钟）采集眼窝窦（sub-orbital sinus）血样。血糖测量可通过几种常规技术的任一种来进行，例如使用葡萄糖仪。比较对照和肽激素类似物给药的动物的血糖水平。

[0096] 外源 GLP-1 类似物的代谢命运也可在非糖尿病或 II 型糖尿病受试者中进行追踪，且测定候选类似物的效果。例如，可使用高压

液相色谱(HPLC)、特异性放射免疫测定(RIAs)和酶联免疫吸附测定(ELISA)的组合,由此完整的生物活性 GLP-1 和其代谢物可被检测。参见,例如 Deacon 等. (1995) *Diabetes* 44:1126-1131。为举例说明,在 GLP-1 类似物施用后,完整肽可使用 NH₂-末端定向的(NH₂-terminally directed) RIA 或 ELISA 进行测量,尽管在这些实验之间的浓度差异和 COOH 末端特异性 RIA 允许测定 NH₂-末端截短的代谢物。在没有类似物的情况下,皮下 GLP-1 以时间依赖方式迅速降解,形成在 HPLC 上与 GLP-1-(9-36)酰胺共洗脱并具有相同免疫反应性特征的代谢物。例如,在向糖尿病患者(n = 8)皮下施用 GLP-1 后三十分钟,代谢物占由 COOH-末端 RIA 测定的血浆免疫反应性增加的 88.5 + 1.9%,这高于在健康受试者中测量的水平(78.4 + 3.2%; n = 8; P < 0.05)。参见 Deacon 等,如前述。静脉内输注的 GLP-I 也被广泛降解。

[0097] 测量 GLP-1 类似物的促胰岛素活性的其它方法被公开在美国专利 5,545,618 中。

(d) 药物制剂

[0098] 为了治疗用途,所选择的类似物与载体一起配制,所述载体是药学上可接受的并适于使用所选施用途径所适用的剂量来向受试者施用治疗有效量的所述类似物以便将肽输送到所需组织,所述施用途径即经口、静脉内或肠胃外。在某些实施方式中,类似物是非热原性的,即不引发高于临床可接受量的患者体温升高。合适的药学上可接受载体是传统上与肽类药物一起使用的那些,例如稀释剂、赋形剂等。对于药物制剂方面的一般性指导,可参考 "Remington's Pharmaceutical Sciences", 17th Ed., Mack Publishing Company, Easton, Pa., 1985。在本发明的一个实施方式中,化合物被配制,用于通过输注施用,例如,当用作完全肠胃外营养疗法中患者的液体营养补充剂时,或者通过注射施用,例如皮下、肌肉内或静脉内注射时,并因此被用作无菌和无热原形式的水溶液,且可选地缓冲至生理上可耐受的 pH,例如稍微酸性 pH 或生理 pH。因此,所述化合物可以在载体例如蒸馏水中被施用,或者更期望地,在盐水、磷酸盐缓冲盐水或 5% 的葡萄糖溶液中被施用。如需要,类似物的水溶性可通过掺入例如乙酸或氢氧化钠等助溶剂而增强。

[0099] 本发明的类似物可用药理学上可接受的盐的形式来提供。这类盐的例子包括但不限于用有机酸（例如，乙酸、乳酸、马来酸、柠檬酸、苹果酸、抗坏血酸、琥珀酸、苯甲酸、甲磺酸或甲苯磺酸）、无机酸（例如，盐酸、硫酸或磷酸）和高分子酸（例如，丹宁酸、羧甲基纤维素、聚乳酸、聚羟基乙酸或聚乳酸-羟基乙酸的共聚物）形成的那些盐。

[0100] 治疗有效量的本发明类似物和药理学上可接受载体物质（例如碳酸镁、乳糖、或与该治疗类似物可形成胶束的磷脂）一起形成治疗组合物（例如，丸剂、片剂、胶囊或液体），用于施用（例如，经口、静脉内、经皮、肺部、阴道、皮下、经鼻、用离子透入（iontophoretically）、气管内、颅内、心肌内、心包内、肌肉内）给受试者。经口施用的丸剂、片剂或胶囊可用物质进行包衣，用于在一段足以使活性组合物未经消化地进入小肠的时间内保护所述活性组合物在胃中免受胃酸或肠酶破坏。治疗组合物还可以是生物可降解的或非生物可降解的缓释制剂的形式，用于皮下或肌肉内施用。参见，例如美国专利 3,773,919 和 4,767,628 以及 PCT 公开号 WO 94/15587。使用可植入的泵或外部泵（例如，INFUSAID™ 泵），也可实现持续施用。施用也可被间歇地进行——例如每日一次注射，或以低剂量连续进行，例如缓释制剂。

[0101] 本发明的治疗或诊断组合物以足以治疗或诊断疾病的量被施用至个体。用于治疗上述疾病或紊乱的本发明的肽的有效量根据给药方式、受试者的年龄和体重、待治疗受试者的状况而变化，并最终由主治医生或兽医决定。

[0102] 还被考虑在本发明的范围内的是上述通式所覆盖的肽，其用于治疗与异常葡萄糖代谢、脂代谢或进食障碍相关的疾病或紊乱。

[0103] 本发明的其它特征和优势通过详细的描述和权利要求书将变得明显。

(e) 使用方法

1. 诊断应用

[0104] 本发明的类似物可以被放射标记的或未标记的形式用于诊断或治疗多种疾病状态，包括但不限于与葡萄糖代谢、脂类代谢和食物摄取相关的那些。

[0105] 优选地，本发明的化合物的放射标记复合物被用于这类诊断和治疗中。本发明化合物的放射标记的实施方式可用在放射性同位素指导的手术（radioisotope guided surgery）中，如在 WO 93/18797 和 Woltering, et al. (1994) Surgery 116, 1139-1147 中所述。在优选的实施方式中，例如 ^{99}Tc 等的 γ -发射放射性核素和本发明的化合物的复合物被用于诊断 SSTR-表达肿瘤，随后，例如 ^{188}Re 或 ^{186}Re 等的 β -发射放射性核素与所述化合物的复合物被用于治疗肿瘤。

[0106] 为了诊断目的，诊断有效量的本发明的诊断剂或放射诊断剂被施用，优选静脉内施用。诊断有效量被定义为利用常规方法例如磁共振、计算机化断层 X 线摄影法、 γ 闪烁法、SPECT、PET 等实现体内标记的定位和检测所必需的诊断剂或放射诊断剂的量。

[0107] 为了使用闪烁成像进行诊断，优选地，本发明的 ^{99}Tc 标记化合物以单个单位可注射剂量给药。本发明提供的 ^{99}Tc 标记化合物可在用于静脉内注射的任何常规介质如盐水介质中或在血浆介质中被静脉内施用。一般而言，待施用的单位剂量具有约 0.01 mCi 至约 100 mCi 的放射活性，优选 1 mCi 至 50 mCi。以单位剂量注射的溶液为约 0.01 mL 至约 10 mL。在静脉内施用之后，体内成像可在大概数分钟内发生。然而，如果需要，成像可在放射性标记化合物被注射入患者后数小时或甚至更长的时间内发生。在大多数情况下，所施用剂量的足够量将在大约 0.1 小时内在待成像区内积累，允许进行闪烁照相。用于诊断目的的任何常规闪烁成像方法都可根据本发明被采用。

2. 治疗方法

[0108] 本发明的类似物提供了治疗任何可用给出的治疗组合物治疗的疾病或状况的改进方法，其中“母体”多肽通常被蛋白酶体内切割。假设蛋白水解降低或消除了治疗剂的可获得性（availability），并且在一些情况下导致功能上拮抗产物的产生，则许多可用于治疗特定疾病和状况的多肽治疗剂的安全性和功效大大受损。因此，本发明的方法和类似物的组合物提供了治疗许多不同疾病和状况的改进方法。

[0109] 本发明的类似物在一些实施方式中具有降低血糖水平的能力，以缓解肥胖、减轻受损的葡萄糖耐受、抑制肝葡萄糖再生和降低血脂水平（例如，游离脂肪酸）以及抑制醛糖还原酶。本发明的类似物，在一些实施方式中，还能够增加胰岛增殖和再生、增加葡萄糖依

赖性胰岛素分泌、增加胰岛素生物合成、降低胰高血糖素分泌、延迟胃排空、降低食物摄取和/或食欲、增加心脏功能(例如,左心室射血分数)、增加心率、增加收缩血压、降低血管阻力(舒张血压)、增加外周血流、增加高钠血症患者的钠排泄(例如,降低Na依赖性高血压)、降低局部缺血/再灌注损伤(例如,在心肌梗塞之后降低梗塞尺寸)、降低神经毒性(例如,与谷氨酸盐或红藻氨酸盐兴奋性中毒相关的神经毒性)、降低凋亡(例如,在神经元中)、降低 β -淀粉状蛋白的流行性和增加空间和/或联想学习。因此,尤其是,它们可用于预防和/或治疗高血糖、肥胖、血脂过多、糖尿病并发症(包括视网膜病、肾病、神经病、白内障、冠状动脉疾病和动脉硬化)、心脏病、心肌梗塞、循环障碍、神经退行性疾病(例如,阿尔茨海默病、杭廷顿氏病、肌萎缩性侧索硬化)以及用于预防和/或治疗肥胖相关的高血压和骨质疏松症。因此,本发明的一方面是治疗患者或受试者的疾病的方法,包括施用治疗有效量的本文公开的一种或多种GLP-1类似物。

[0110] 当施用给患有糖尿病包括I型和II型糖尿病但尤其是II型的患者时,GLP-1肽的类似物特别有用。糖尿病是一种疾病,其特征在于由相对或绝对降低的胰岛素分泌、降低的胰岛素敏感性或胰岛素抗性而发生的高血糖。该疾病的发病率和死亡率是由血管、肾脏和神经的并发症所致。口服葡萄糖耐受试验是用于诊断糖尿病的临床试验。在口服葡萄糖耐量试验中,患者对葡萄糖荷载或激发(challenge)的生理应答被评价。在摄入葡萄糖后,患者对葡萄糖激发的生理应答被评价。通常,这通过在几个预定时间点测定患者血糖水平(患者血浆、血清或全血中的葡萄糖浓度)来完成。

[0111] 因此,在一方面,本发明涉及治疗剂和蛋白水解抗性的GLP-1类似物在治疗高血糖、肥胖、血脂过多、糖尿病并发症(包括视网膜病、肾病、神经病、白内障、冠状动脉疾病和动脉硬化)以及用于肥胖相关的高血压和骨质疏松症中的相关用途。

[0112] 本发明考虑了类似物在所述类似物单独组成治疗方案的治疗方法中的用途,以及在采用施用作为更复杂的多因子治疗方案的一部分的一种或多种类似物的治疗方法中的用途。例如,在糖尿病和/或糖尿病并发症的治疗方法的情况下,本发明考虑了通过施用GLP-1类似物治疗糖尿病的方法。本发明进一步考虑:在一些情况下,施用一

种以上的类似物可能是优选的。例如，治疗方法可包括施用两种或更多种类似物。而且，本发明考虑：一种或多种类似物的施用可被用作复杂治疗方案的一部分。在糖尿病或糖类病并发症的治疗方法的情况下，示例性的治疗方案可以包括施用一种或多种类似物、施用胰岛素、饮食调节和锻炼调节。

[0113] 在多面性治疗方案的进一步的例子中，本发明考虑了施用一种或多种类似物和一种或多种抑制内源性切割天然蛋白质的特定酶的酶活的药剂。在 GLP-1 的情况下，示例性方法将包括施用一种或多种类似物和一种或多种 DPP IV 抑制剂。特定酶的抑制剂可以是特异性的（例如，仅调节 DPP IV 的活性的抑制剂）或者抑制剂可以是更混杂的（例如，调节多种丝氨酸蛋白酶活性的抑制剂）。此外，本发明考虑了施用一种或多种类似物和降解内源性切割天然蛋白质的特定酶的一种或多种酶。在 GLP-1 的情况下，示例性的方法将包括施用一种或多种类似物和一种或多种降解 DPP IV 的酶。这类酶可以是特异性的（例如仅降解 DPP IV 的酶）或所述酶可降解多种其它蛋白质（例如，降解几种丝氨酸蛋白酶的酶）。

(f) 商业方法

[0114] 本发明的其它方面提供了进行商业行为的某些方法。具体而言，实践本发明的方法可鉴别某些 GLP-1 类似物。该技术步骤，当与一个或多个其它步骤相结合时，提供了进行制药上、农用化学品上、生物技术或优选地生命科学上的商业行为的新方法。例如，根据本发明的类似物可被检测作为各种疾病模型中的治疗剂的功效，然后该潜在治疗组合物可在所得到的疾病治疗制剂的配制、包装和随后的市场化之前被检测其毒性和其它安全特性。或者，开发和销售这类制剂或进行这类步骤的权利可被许可给第三方进行考量。在本发明的某些其它方面，由此鉴定的类似物能够以可提供给第三方考量的信息的形式而具有实用性，从而获得对所述类似物在生物或治疗背景中的功能或副作用的增强理解。

[0115] 在某些实施方式中，初步鉴定的类似物可经历进一步的优化，例如，以进一步精修前导类似物的结构。这类优化可导致这样的类似物的开发，所述类似物结合了最长的作用持续时间和其它期望的

药理学特征，包括溶解性、渗透性、生物利用度、毒性、致突变性和药代动力学。

[0116] 通常对前导类似物进行结构修饰，以解决关于上述参数的问题。然而，这些修饰必须考虑对类似物的效能和活性的可能影响。例如，如果在动物模型中测试时前导药物的毒性高，则对所述类似物进行修饰，以努力降低毒性同时保持期望的特性。

[0117] 候选类似物（所述类似物是否被修饰以改变或改善体内特性）或其组合必须在动物模型中测试其功效和毒性。这类治疗剂测验（therapeutic profiling）通常在制药领域中被采用。在人中测试实验治疗剂之前，大量的治疗剂测验（临床前试验）必须被完成，以建立安全性和功效的初步参数。临床前试验通过体外（即，在试管、烧杯、培养皿等中）和在动物中进行的研究，建立了治疗剂的作用机制、其生物利用度、吸收、分布、代谢和清除。动物研究被用于评价治疗剂是否将提供期望的结果。不同剂量的实验治疗剂被施用，以测试治疗剂的功效、鉴定可能发生的有害副作用以及评价毒性。

[0118] 简言之，本领域普通技术人员将认识到，候选类似物的鉴定是开发可用于施用的药物制剂的第一步。施用对治疗病症或疾病有效的一定量的包含所述类似物的药物制剂必须是安全且有效的。本领域常规使用的早期药物试验有助于解决对潜在药物的安全性和功效的疑虑。在类似物的具体情况下，药物制剂的功效可首先在细胞培养物中接着在小鼠或大鼠模型中容易地进行评价。适于给定类似物将被应用的具体疾病适应症的细胞培养系统和动物模型可由本领域普通技术人员容易地进行选择。简言之，小鼠或大鼠可在不同的时间方案内被施用变化剂量的所述药物制剂。基于药剂的具体特性和所述类似物期望输送的细胞类型，施用途径可被合适地选择。对照小鼠可被施用安慰剂（例如，单独的载体或赋形剂）。

[0119] 在一个实施方式中，治疗剂测验的步骤包括类似物在细胞培养物中和在动物中的毒性试验；候选类似物的药代动力学和代谢的分析；和在疾病动物模型中的药效测定。在某些情况下，所述方法可包括分析结构-活性关系并基于功效、安全性和药代动力学特征优化前体类似物。这类步骤的目标是选择类似物候选物，用于临床前试验，以便在人临床试验之前向 FDA 提交 Investigational New Drug 申请

("IND")。

[0120] 在前导优化和治疗剂测验之间，一个目标是开发具有相对于天然 GLP-1 和其片段作用持续时间长并可在具有最小副作用的情况下施用的类似物。在体外应用的类似物的情况下，示例性的类似物对培养中的细胞不应当是异常毒性的，且对培养中的细胞不应当是致突变的。在体内应用的类似物的情况下，示例性的类似物不应当是异常毒性的（例如，当施用给患者时应当仅具有可耐受的副作用），不应当是致突变性的，且不应当是致癌的。

[0121] 毒性测验意指对当施用有效量的药物制剂时可能发生的潜在有害副作用的评价。副作用可以是有害的或可以不是有害的，而确定与药物制剂相关的副作用是否是可接受的副作用由 Food and Drug Administration 在管理批准过程期间进行。该确定并不按照硬性和快速的规定，什么是可接受的副作用基于下列因素而变化：(a) 正治疗的病症的严重程度，和(b) 其它治疗的可利用性和与这类可利用的治疗当前相关的副作用。例如，术语癌症包括与失控的细胞生长、增殖和分化相关的疾病状态的复杂家族。许多形式的癌症是导致严重疼痛、受影响组织的功能缺失以及死亡的极具破坏性的疾病。化疗剂是许多形式的癌症的标准疗法的重要组成部分。尽管化疗剂本身可具有许多副作用，包括脱发、严重的恶心、体重下降和不育，考虑到它们要治疗的疾病的严重性，这类副作用被认为是可接受的。在本发明的背景中，副作用是否被认为是显著的将取决于待治疗的病症和其它治疗该病症的其他方法的可利用性 (availability)。

[0122] 毒性试验可与功效试验一前一后进行，施用有效剂量的药物制剂的小鼠可被监测其对所述制剂的不利反应。

[0123] 一种或多种类似物，其在动物研究中被证明是安全和有效的，可被配制成药物制剂。然后，这类药物制剂可被上市、分配和销售。示例性的类似物和这类类似物的药物制剂可被单独上市和销售，或可作为药物包装和/或试剂盒进行销售。而且，在任何前述的方面，基于一种或多种类似物的设计进行商业行为的方法可任选地包括向患者和/或患者的保险提供商收费的系统，以及从患者和/或患者的保险提供商收集适当付款的系统。

实施例

[0124] 下列的实施例以举例说明的方式而不是限制的方式被示出。

实施例 1

GLP-1 类似物的作用持续时间

[0125] DPP-IV 从在倒数第二位置(P2)处具有 Pro 或 Ala 的肽上切割 N 端二肽。非天然氨基酸叔亮氨酸(Tle)——其具有叔侧链 β -碳——的插入大大降低了切割速率。这在使用三种同源肽 Ala-Pro-Leu-Ser-Trp-Ser-NH₂、Ala-Pro-Ile-Ser-Trp-Ser-NH₂ 和 Ala-Pro-Tle-Ser-Trp-Ser-NH₂——它们仅在 P3 残基的侧链原子的排列上有所不同——的图 1A 中得到证明。在含 Leu 和 Ile 的肽的切割速率之间几乎没有区别(半衰期分别为 49 分钟和 41 分钟)。对于含 Tle 肽在 30 分钟的消化期间未观察到反应。

[0126] 已知 DPP IV 切割在 P2 位置具有 Ala 且在 P3 位置具有 Glu 的 GLP-1。其中 Tle 取代 P3 Glu 残基的 GLP-1 类似物对于 DPP IV 的降解是稳定的(图 1B)。已知 Glu 残基对于 GLP-1 受体结合和激活是重要的。因此,我们合成了在 P3 具有 β -二甲基 Asp (DMA)的另一类似物。该修饰维持在天然序列中发现的酸性基团,但引入叔 β -碳。如在图 1B 中所示, Tle-取代的和 β -DMA-取代的 GLP-1 类似物对于 DPP IV 的降解是抗性的,所述 GLP-1 类似物的半衰期在 1000 分钟以上,与其相比,天然 Glp-1 的半衰期为 96 分钟。

[0127] 尽管 GLP-1 的 P3 残基的修饰稳定了该肽,但是该修饰也降低了受体亲和性。然而,将 exendin-4 的氨基酸残基连接到该肽的羧基末端提高了该修饰肽对于 GLP-1 受体的亲和性并在很大程度上补偿了 P3 修饰所导致的损失(图 2)。将 GLP-1 的 P3 处的 Glu 残基变成 Tle 以产生被称为 TPA144 的肽,导致对 GLP-1 受体的亲和性相比于 GLP-1 降低 20 倍。 IC_{50} 从 GLP-1 的 1.5 nM 增加到 TPA144 的 36.3 nM。当 P3 残基是 β -二甲基 Asp 以形成 TPA1B4 时,亲和性仅降低大约 5 倍。TPA1B4 具有 7.6 nM 的 IC_{50} 。向 TPA1B4 序列的末端添加 exendin-4 的羧基末端 9 个残基,以形成 P1732,补偿了 P3 DMA 残基的亲和性损失。P1732 的亲和性显著不同于 GLP-1 的亲和性(P1732 的 IC_{50} 为 2.5 nM, GLP-1 的 IC_{50} 为 1.5 nM)。exendin-4 与 GLP-1 受体的结合被测量,

用于比较。相比于 GLP-1, 该肽的结合具有小但显著的亲和性增加, 因为 exendin-4 结合 GLP-1 受体的 IC_{50} 值为 0.4 nM。

[0128] GLP-1 的修饰不影响肽功效 (图 3)。在高肽浓度下, GLP-1 受体激活的量, 如 cAMP 产生所测量, 对于 GLP-1、TPA144、TPA1B4 和 P1732 是相同的。因此, 具有 P3 修饰的 P3 GLP-1 类似物作为 GLP-1 受体的完全激动剂起作用。羧基末端延伸的进一步延伸不减少该激动剂活性。通过测量受体激活的 EC_{50} 值, P1732 的体外效能被测量, 并与 GLP-1 和 exendin-4 比较 (图 4)。具有组合的氨基和羧基末端修饰的 GLP-1 类似物维持正常效能, 具有 0.4-1.1 nM 的 EC_{50} , 与其相比, GLP-1 具有 0.3-0.8 nM 的 EC_{50} 。Exendin-4 具有稍微低于 GLP-1 的 EC_{50} (0.1-0.5 nM)。

[0129] 相比于 GLP-1, DPP IV 抗性的 GLP-1 类似物已延长了作用持续时间 (图 5A)。在注射后 30 分钟, GLP-1 降低了 db 小鼠的血糖, 但在 60 分钟时, 该效应大部分消失。相比之下, DPP IV 抗性类似物 TPA1B4 在 30 分钟时显示了相似的效应, 但注射后血糖持续降低达 60 分钟。在 60 分钟时的血糖值在正常小鼠所观察到的范围之内。该效应持续达至少 90 分钟。4 小时后, 血糖值回复到对照动物中观察到的高血糖值。

[0130] Exendin-4 比 GLP-1 或 DPP IV 抗性类似物 TPA1B4 具有显著更长的作用持续时间。注射后, db 小鼠血糖值被降低达至少 4 小时 (图 5B)。通过添加 9 残基 C-末端延伸以形成 P1732, 对血糖的效应等价于 exendin-4 的效应。为测试整个 9 残基延伸对于作用持续时间的这种效应而言是否是必需的, 用 P3 β -DMA 和相应于 exendin-4 的残基 31-33(Pro-Ser-Ser)的 3 残基羧基末端延伸制备 GLP-1 类似物 DGS65。就像 exendin-4 和 P1732 一样, 该肽将 db 小鼠血糖降至正常值达至少 4 小时, 并在 8 小时后回复至高血糖水平。

[0131] Exendin-4 与 DPP IV 抗性的 GLP-1 类似物 P1732 和 TPA1B4 被施用给 db 小鼠, 剂量在 0.008 μ g 至 80 μ g 的范围内, 以确定葡萄糖降低效应的剂量依赖性。在注射后 60 分钟测量血糖, 其对应于 8 μ g 剂量下的最大效应的时间。所有三种肽都表现出剂量依赖性 (图 6), 并具有相似的 EC_{50} 值: exendin-4 为 0.5 μ g, P1732 为 1.1 μ g, 以及 TPA1B4 为 0.4 μ g。

部并入本文：好比每个单独出版物、专利或专利申请被具体和单独地指出其通过引用被全部并入。

等价物

[0136] 只是使用常规实验，本领域普通技术人员将认识到或能够确定本文所描述的化合物和其使用方法的许多等价物。这类等价物被认为落在本发明的范围内并被下面的权利要求书所覆盖。

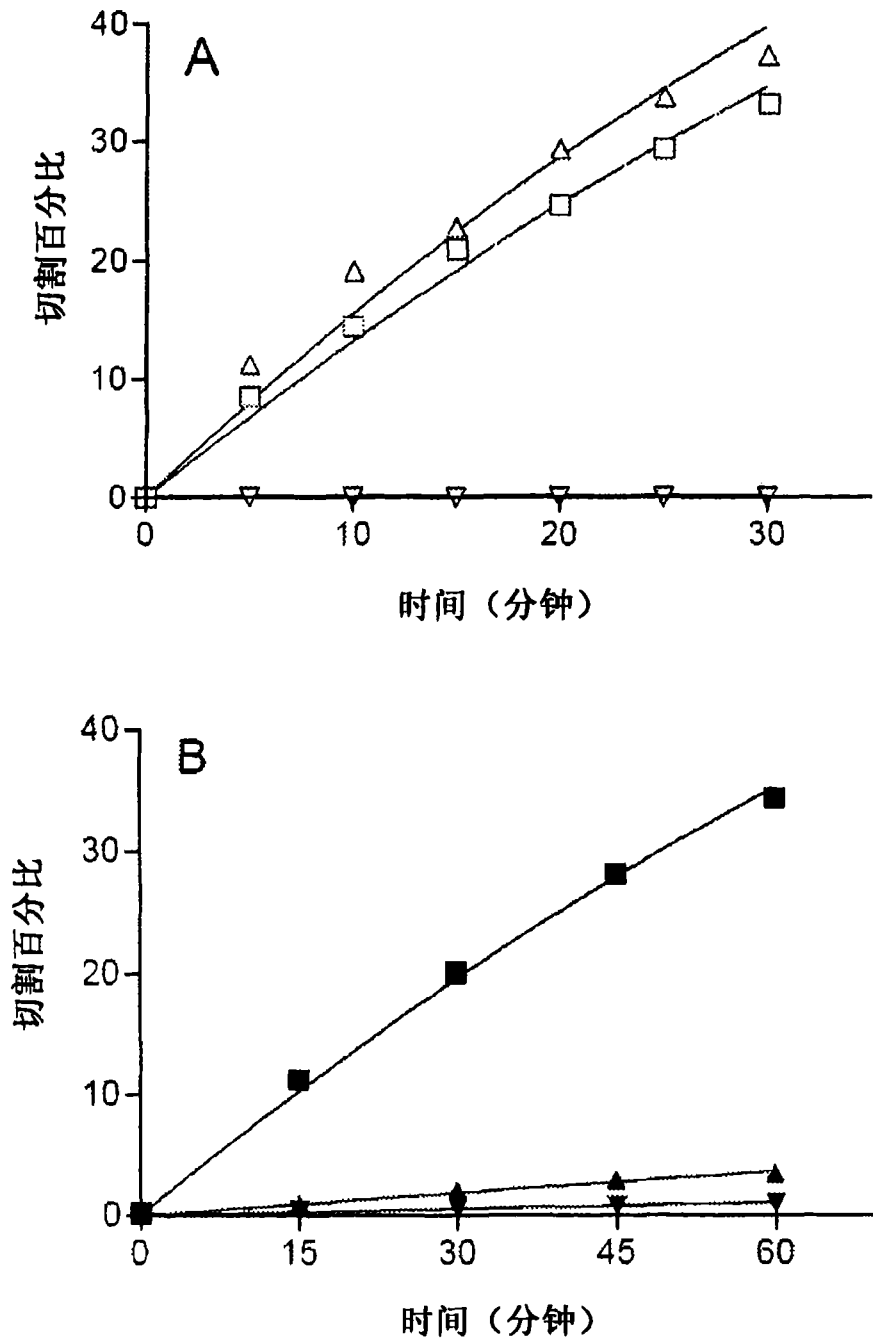


图 1

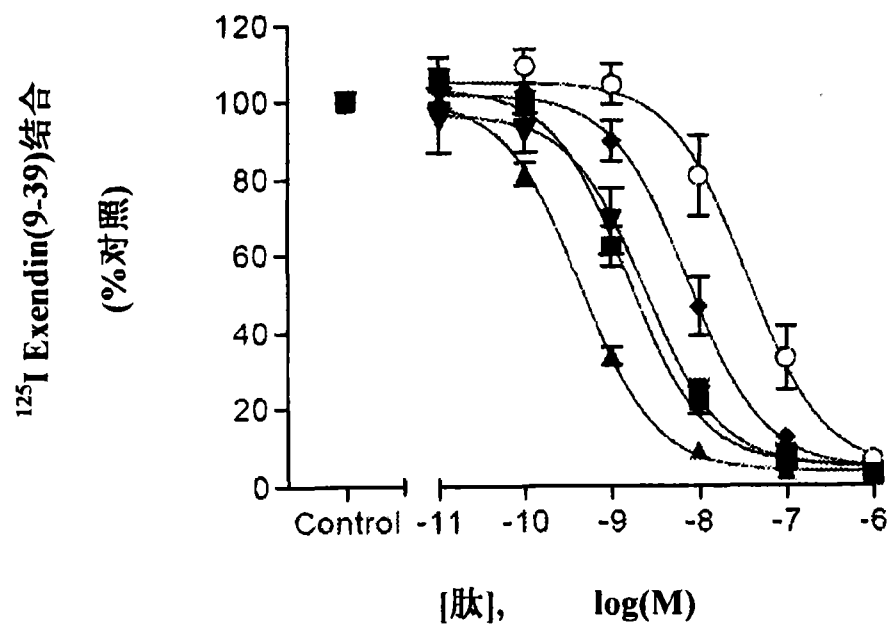


图 2

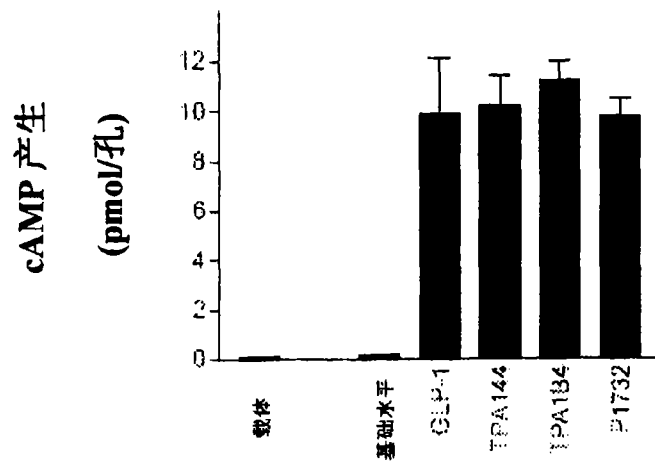


图 3

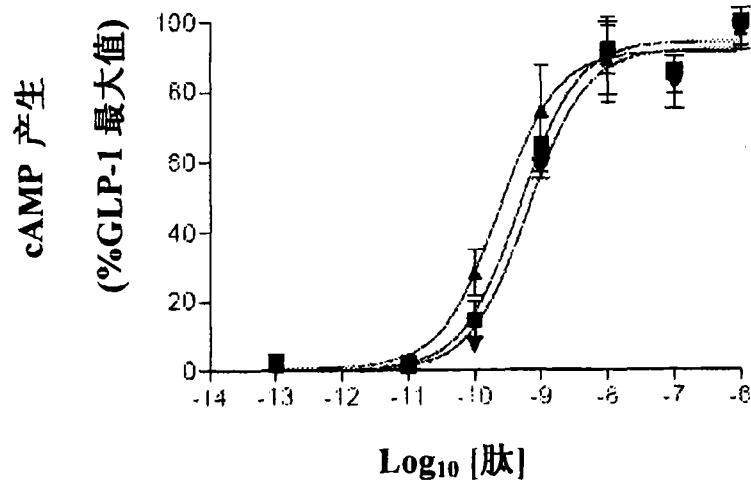


图 4

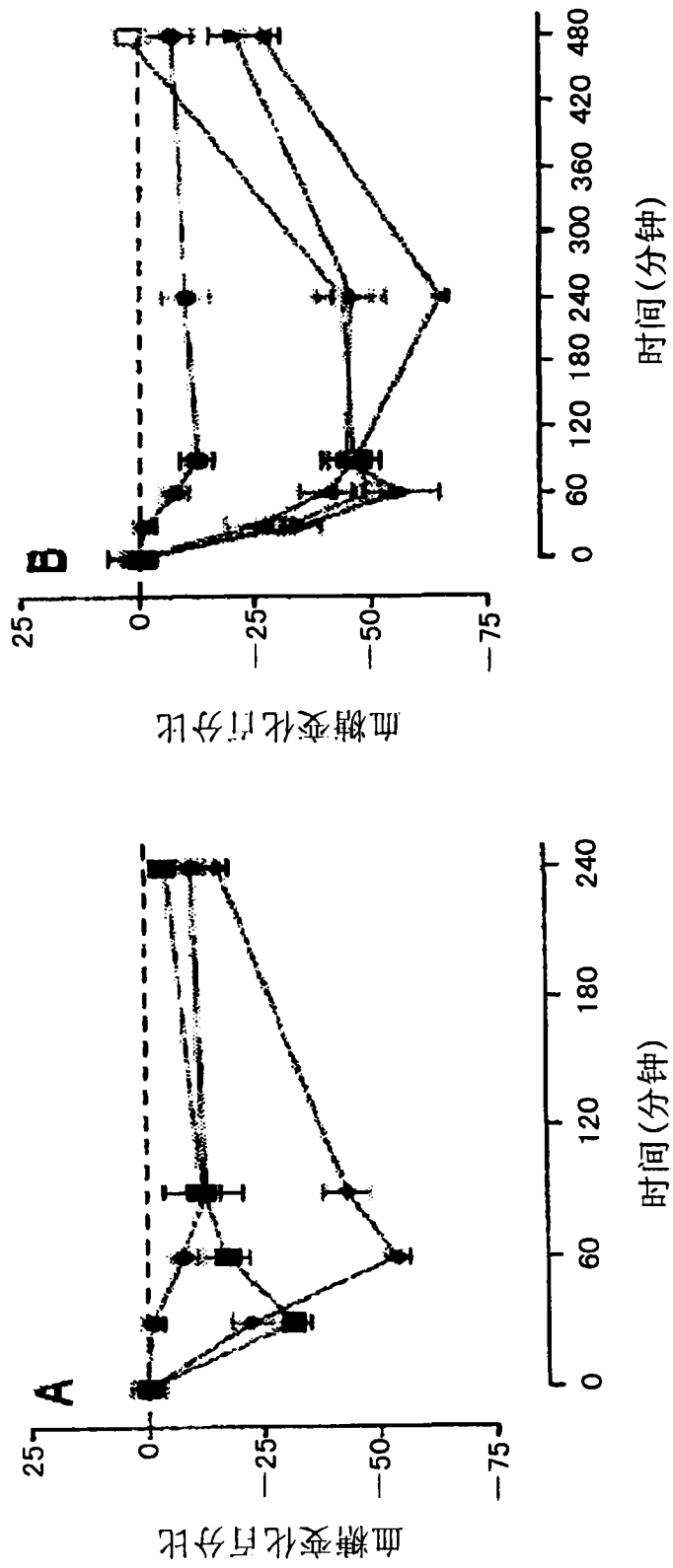


图 5

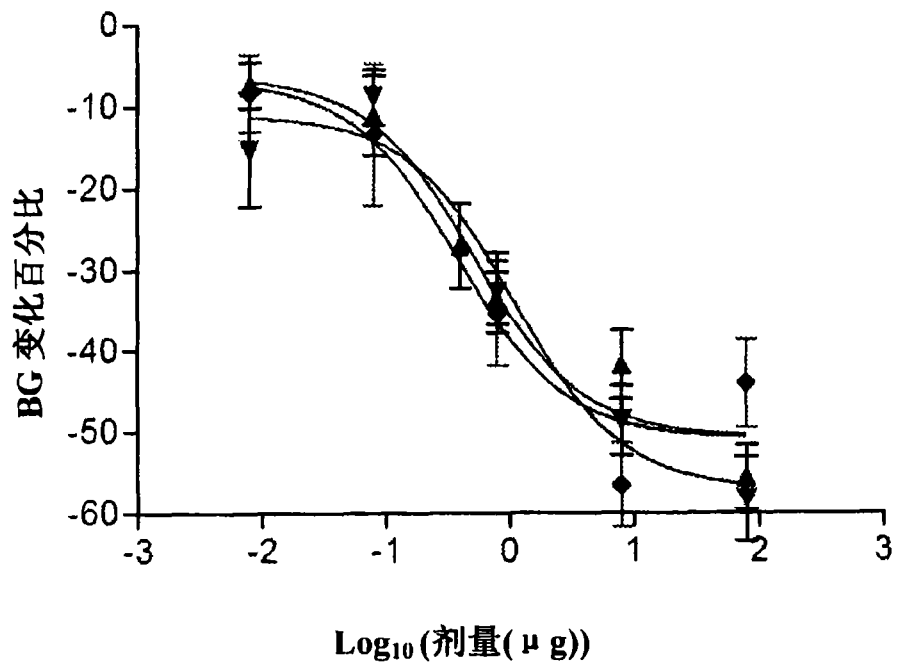


图 6

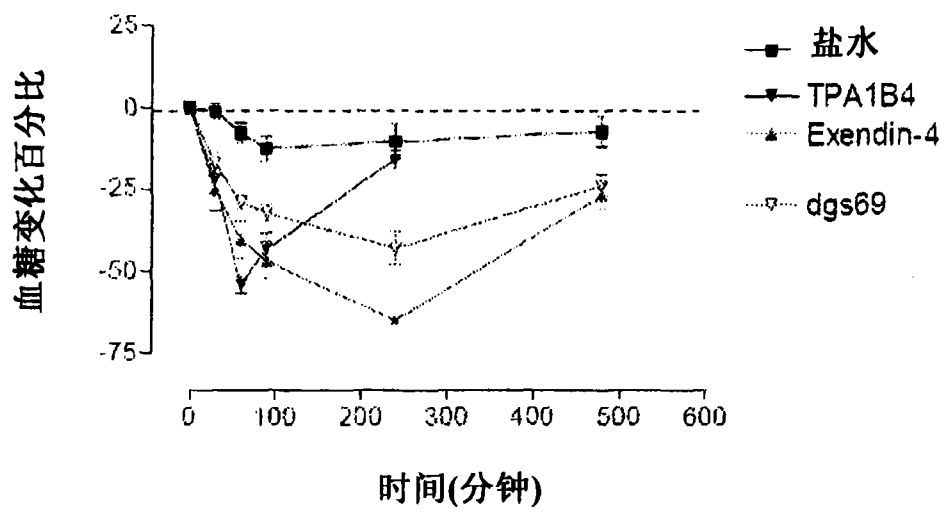


图 7