



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104039822 A

(43) 申请公布日 2014. 09. 10

(21) 申请号 201280054416. 0

(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司 72001

(22) 申请日 2012. 09. 06

代理人 林毅斌 李炳爱

(30) 优先权数据

11180265. 8 2011. 09. 06 EP

61/532, 323 2011. 09. 08 US

(51) Int. Cl.

C07K 14/605 (2006. 01)

A61K 38/26 (2006. 01)

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2014. 05. 06

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/EP2012/067364 2012. 09. 06

(87) PCT国际申请的公布数据

W02013/037690 EN 2013. 03. 21

(71) 申请人 诺沃—诺迪斯克有限公司

地址 丹麦鲍斯韦

(72) 发明人 杰斯珀·刘 P·布洛奇

J·科福伊德 P·加里贝

权利要求书3页 说明书80页

序列表6页

(54) 发明名称

GLP-1 衍生物

(57) 摘要

本发明涉及 GLP-1 肽的衍生物,所述肽具有 2 个 Lys 残基即第一 Lys 残基和第二 Lys 残基和与 GLP-1 (7-37) (SEQIDNO:3) 相比最多 8 个氨基酸变化,所述衍生物包含通过接头分别与所述第一 Lys 残基和第二 Lys 残基的 ϵ 氨基连接的两个延长部分,其中延长部分选自化学式 15 : $\text{HOO}-(\text{CH}_2)_x-\text{CO}-*$ 和化学式 16 : $\text{HOO}-\text{C}_6\text{H}_4-\text{O}-(\text{CH}_2)_y-\text{CO}-*$, 其中 x 为范围为 10-16 的整数, y 为范围为 8-12 的整数;所述接头包含第一接头元件 $*-\text{NH}-\text{CH}(\text{CH}_2\text{OH})-\text{CO}-*$ 。优选的接头为 gGlu-Ser-Ser-Gly-Ser-Ser-Gly (SEQIDNO:2)。本发明的衍生物具有非常好的效能和与 GLP-1 受体非常好的结合。本发明还涉及衍生物的药物用途,例如治疗和/或预防所有形式的糖尿病和相关疾病。

1. 一种 GLP-1 肽的衍生物或所述衍生物的药学上可接受的盐、酰胺或酯，

所述肽只有 2 个 Lys 残基，即第一 Lys 残基和第二 Lys 残基和与 GLP-1 (7-37) (SEQ ID NO: 3) 相比最多 8 个氨基酸变化，

所述衍生物包含通过接头分别与所述第一 Lys 残基和第二 Lys 残基的 ϵ 氨基连接的两个延长部分，其中

延长部分选自化学式 15 和化学式 16：

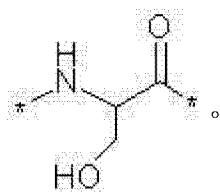
化学式 15 : $\text{HOOC}-(\text{CH}_2)_x-\text{CO}-*$

化学式 16 : $\text{HOOC}-\text{C}_6\text{H}_4-\text{O}-(\text{CH}_2)_y-\text{CO}-*$,

其中 x 为范围为 10-16 的整数, y 为范围为 8-12 的整数 ; 和

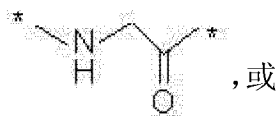
接头包含第一接头元件, 化学式 1：

化学式 1：

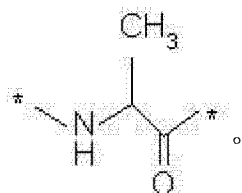


2. 权利要求 1 的衍生物, 其中所述接头包含 2 个化学式 1。

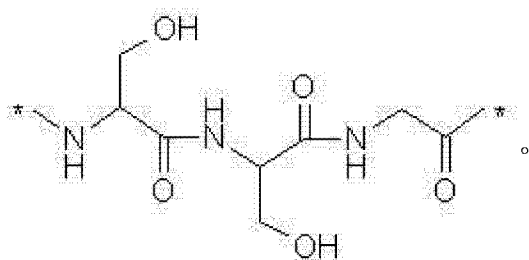
3. 权利要求 1-2 中任一项的衍生物, 其中所述接头还包含第二接头元件, 化学式 2：



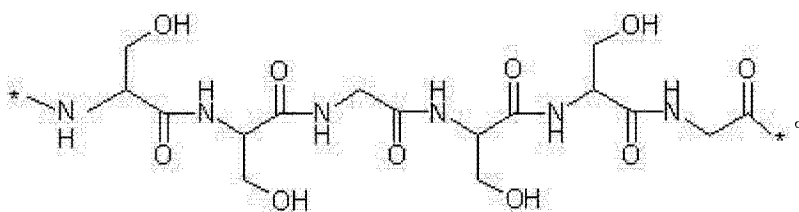
第 3 接头元件, 化学式 7：



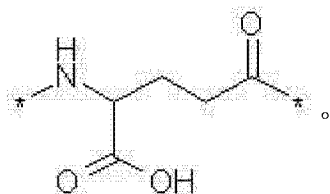
4. 权利要求 1-3 中任一项的衍生物, 其中所述接头包含如下的第 1 和第 2 接头元件的组合, 化学式 3：



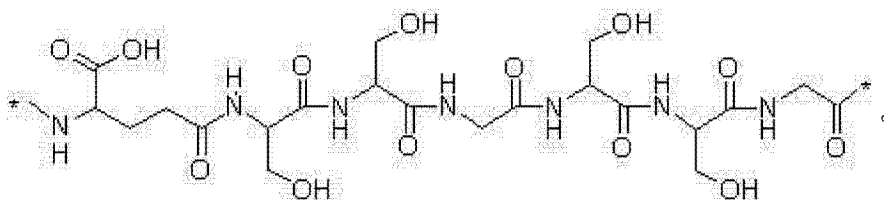
5. 权利要求 1-4 中任一项的衍生物, 其中所述接头包含如下的第 1 和第 2 接头元件的组合, 化学式 4：



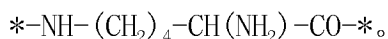
6. 权利要求 1-5 中任一项的衍生物, 其中所述接头还包含第 4 接头元件, 化学式 5:



7. 权利要求 1-6 中任一项的衍生物, 其中所述接头包含化学式 6:



8. 权利要求 1-7 中任一项的衍生物, 其中所述接头还包含第 5 接头元件, 化学式 12:



9. 权利要求 1-8 中任一项的衍生物, 其中所述 GLP-1 肽包含式 I 的 GLP-1 肽:

式 I:

Xaa₇-Xaa₈-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Xaa₁₆-Ser-Xaa₁₈-Xaa₁₉-Xaa₂₀-Glu-Xaa₂₂-Xaa₂₃-Ala-Xaa₂₅-Xaa₂₆-Xaa₂₇-Phe-Ile-Xaa₃₀-Xaa₃₁-Leu-Xaa₃₃-Xaa₃₄-Xaa₃₅-Xaa₃₆-Xaa₃₇-Xaa₃₈,
其中

Xaa₇ 为 L-组氨酸、咪唑并丙酮、α-羟基-组氨酸、D-组氨酸、脱氨基-组氨酸、2-氨基-组氨酸、β-羟基-组氨酸、高组氨酸、N^α-乙酰基-组氨酸、N^α-甲酰基-组氨酸、α-氟甲基-组氨酸、α-甲基-组氨酸、3-吡啶基丙氨酸、2-吡啶基丙氨酸或 4-吡啶基丙氨酸;

Xaa₈ 为 Ala、Gly、Val、Leu、Ile、Thr、Ser、Lys、Aib、(1-氨基环丙基)甲酸、(1-氨基环丁基)甲酸、(1-氨基环戊基)甲酸、(1-氨基环己基)甲酸、(1-氨基环庚基)甲酸或(1-氨基环辛基)甲酸;

Xaa₁₆ 为 Val 或 Leu;

Xaa₁₈ 为 Ser 或 Lys;

Xaa₁₉ 为 Tyr 或 Gln;

Xaa₂₀ 为 Leu 或 Met;

Xaa₂₂ 为 Gly、Glu、Lys 或 Aib;

Xaa₂₃ 为 Gln、Glu 或 Arg;

Xaa₂₅ 为 Ala 或 Val;

Xaa₂₆ 为 Val、His、Lys 或 Arg;

Xaa₂₇ 为 Glu、Leu 或 Lys;

Xaa₃₀ 为 Ala、Glu、Lys 或 Arg;

Xaa₃₁ 为 Trp、Lys 或 His；

Xaa₃₃ 为 Val 或 Lys；

Xaa₃₄ 为 Lys、Glu、Asn、Gly、Gln、His、Arg 或不存在；

Xaa₃₅ 为 Gly、Aib 或不存在；

Xaa₃₆ 为 Arg、Gly、Lys 或不存在；

Xaa₃₇ 为 Gly、Ala、Glu、Pro、Lys、Arg 或不存在；和

Xaa₃₈ 为 Ser、Gly、Ala、Glu、Pro、Lys、Arg 或不存在。

10. 一种化合物或其药学上可接受的盐、酰胺或酯，所述化合物选自：化学式 20、化学式 21、化学式 22、化学式 23、化学式 24、化学式 25、化学式 26、化学式 27、化学式 28、化学式 29、化学式 30、化学式 31、化学式 32、化学式 33、化学式 34、化学式 35、化学式 36、化学式 37、化学式 38、化学式 39、化学式 40、化学式 41、化学式 42、化学式 43、化学式 44、化学式 45、化学式 46、化学式 47、化学式 48、化学式 49 和化学式 50。

11. 一种药物组合物，其包含权利要求 1-10 中任一项的衍生物和药学上可接受的赋形剂。

12. 用作药物的权利要求 1-10 中任一项的衍生物。

13. 用于以下方面的权利要求 1-10 中任一项的衍生物：治疗和 / 或预防所有形式的糖尿病和相关疾病例如进食障碍、心血管疾病、肠胃道疾病、糖尿病并发症、危重疾病和 / 或多囊性卵巢综合征；和 / 或用于改善脂质参数，改善 β 细胞功能，和 / 或用于延缓或防止糖尿病疾病进展。

14. 权利要求 1-10 中任一项的衍生物在制备用于以下方面的药物中的用途：治疗和 / 或预防所有形式的糖尿病和相关疾病例如进食障碍、心血管疾病、肠胃道疾病、糖尿病并发症、危重疾病和 / 或多囊性卵巢综合征；和 / 或用于改善脂质参数，改善 β 细胞功能，和 / 或用于延缓或防止糖尿病疾病进展。

15. 一种通过给予药学活性量的权利要求 1-10 中任一项的衍生物用于以下方面的方法：治疗或预防所有形式的糖尿病和相关疾病例如进食障碍、心血管疾病、肠胃道疾病、糖尿病并发症、危重疾病和 / 或多囊性卵巢综合征；和 / 或用于改善脂质参数，改善 β 细胞功能，和 / 或用于延缓或防止糖尿病疾病进展。

GLP-1 衍生物

技术领域

[0001] 本发明涉及 GLP-1 衍生物,更具体地说涉及通过包含 $^*\text{-NH-CH}(\text{CH}_2\text{OH})\text{-CO-}^*$ 的接头被酰化的 GLP-1 肽。本发明还涉及这些衍生物的药物用途。

[0002] 通过引用结合的序列表

[0003] 题名为“SEQUENCE LISTING”的序列表为 3.77KB,创建于 2012 年 8 月 16 日,并通过引用结合到本文。

[0004] 发明背景

[0005] US5525491A 公开了用于连接两个或更多个蛋白质结构域以形成融合蛋白的富含丝氨酸的肽接头。

[0006] US7271149B2 公开了用于 GLP-1 融合蛋白的富含甘氨酸的肽接头。

[0007] US2007/0135338A1 公开了掺入含有丝氨酸和甘氨酸的接头序列的 GLP-1CH1 缺失模拟体(mimetibody)多肽。

[0008] US2010/0292133A1 和 US2011/0082079A1 公开了掺入除 Cys 以外的一个氨基酸或二肽(例如 Gly-Lys)作为接头的 GLP-1 衍生物。

[0009] 发明概述

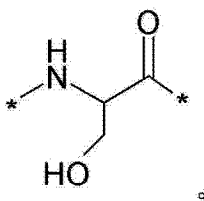
[0010] 本发明涉及 GLP-1(7-37)(SEQ ID NO:3)的衍生物或其类似物。

[0011] 在这些衍生物中,白蛋白结合侧链各通过包含 $^*\text{-NH-CH}(\text{CH}_2\text{OH})\text{-CO-}^*$ 的接头(一种氨基酸丝氨酸的二价基团)与 GLP-1 肽的两个或更多个 Lys 残基共价连接,即与 Lys 的 ϵ 氨基共价连接。

[0012] 更具体地说,本发明涉及 GLP-1 肽的衍生物,所述衍生物具有两个 Lys 残基即第一 Lys 残基和第二 Lys 残基和与 GLP-1(7-37)(SEQ ID NO:3)相比最多 8 个氨基酸变化,所述衍生物包含通过接头分别与所述第一 Lys 残基和第二 Lys 残基的 ϵ 氨基连接的两个延长部分,其中延长部分选自化学式 (Chem.) 15: $\text{HOO}(\text{C})\text{-}(\text{CH}_2)_x\text{-CO-}^*$ 和化学式 16: $\text{HOO}(\text{C})\text{-C}_6\text{H}_4\text{-O-}(\text{CH}_2)_y\text{-CO-}^*$,其中 x 为范围为 10-16 的整数, y 为范围为 8-12 的整数;且接头包含第一接头元件:

[0013] 化学式 1:

[0014]



[0015] 本发明还涉及与 GLP-1(7-37)(SEQ ID NO:3)相比包含以下氨基酸变化的 GLP-1 肽:(8Aib,34H,37K)或(7Imp,8Aib,34R,37K)。

[0016] 本发明还涉及与 GLP-1(7-37)(SEQ ID NO:3)相比具有以下氨基酸变化的 GLP-1 肽:(8Aib,34H,37K);(7Imp,8Aib,34R,37K)或(7Imp,8Aib,18K,34Q)。

[0017] 本发明还涉及这类肽或衍生物用作药物,特别用于治疗 and / 或预防所有形式的糖

尿病和相关疾病例如进食障碍、心血管疾病、肠胃道疾病、糖尿病并发症、危重疾病和 / 或多囊性卵巢综合征 ; 和 / 或用于改善脂质参数, 改进 β 细胞功能, 和 / 或用于延缓或防止糖尿病疾病进展。

[0018] 本发明的衍生物是有生物活性的。具体地说, 它们是完全 GLP-1 受体激动剂, 正如通过其以相对低的浓度与 GLP-1 受体结合的能力联合其激活受体的能力所反映。亦或者, 它们具有延长的药代动力学概况。亦或者, 它们具有高的口服生物利用度。亦或者, 它们具有高的水溶性和 / 或溶解速率。

[0019] 这些性质在用于皮下、静脉内和 / 或口服给予的下一代 GLP-1 化合物的研发中具有重要性。

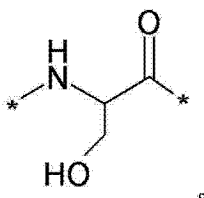
[0020] 发明描述

[0021] 在下文中, 希腊字母可通过其符号或相应的书面名称表示, 例如: α = alpha; β = beta; ϵ = epsilon; γ = gamma; ω = omega; 等。此外, μ 的希腊字母可用“u”表示, 例如 $\mu\text{ l} = \text{ul}$ 或 $\mu\text{ M} = \text{uM}$ 。

[0022] 化学式中的星号 (*) 表明 i) 连接点, ii) 基团, 和 / 或 iii) 未共享电子。

[0023] 本发明涉及 GLP-1 肽的衍生物或其药学上可接受的盐、酰胺或酯, 所述肽仅具有 2 个 Lys 残基即第一 Lys 残基和第二 Lys 残基和与 GLP-1 (7-37) (SEQ ID NO :3) 相比最多 8 个氨基酸变化, 所述衍生物包含通过接头分别与所述第一 Lys 残基和第二 Lys 残基的 ϵ 氨基连接的两个延长部分, 其中延长部分选自化学式 15 : $\text{HOO}-(\text{CH}_2)_x-\text{CO}-*$ 和化学式 16 : $\text{HOO}-\text{C}_6\text{H}_4-\text{O}-(\text{CH}_2)_y-\text{CO}-*$, 其中 x 为范围为 10-16 的整数, y 为范围为 8-12 的整数 ; 且接头包含第一接头元件, 化学式 1 :

[0024]

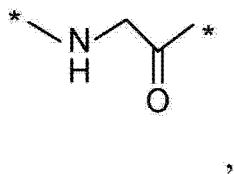


[0025] 在一个具体的实施方案中, 化学式 1 代表氨基酸丝氨酸 (Ser) 的二价基团。

[0026] 在又一个具体的实施方案中, 接头还分别包含第二或第三接头元件, 化学式 2 或化学式 3 :

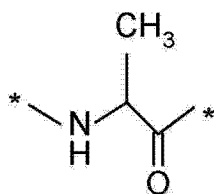
[0027] 化学式 2 :

[0028]



[0029] 化学式 3 :

[0030]

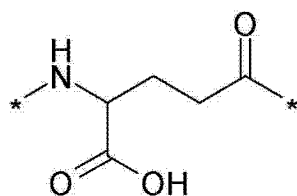


[0031] 化学式 2 表示氨基酸甘氨酸 (Gly) 的二价基团, 化学式 3 表示氨基酸丙氨酸 (Ala) 的二价基团。

[0032] 在另外又一个具体的实施方案中, 接头还包含第 4 接头元件, 化学式 5 :

[0033] 化学式 5 :

[0034]



[0035] 其中化学式 5 表示氨基酸 γ 谷氨酸 (简称为 γ -Glu 或 gGlu) 的二价基团。

[0036] 在另外又一个实施方案中, 接头还包含第 5 接头元件, 化学式 12 : $*-\text{NH}-(\text{CH}_2)_4-\text{CH}(\text{NH}_2)-\text{CO}-*$, 其表示氨基酸 ϵ -Lys (简称为 eps-Lys) 的二价基团。

[0037] 以下为用于本发明的衍生物的接头的非限制性实例, 其中 Glu 是指 γ -Glu, Lys 是指 ϵ -Lys :

[0038] Glu-Ser-Ser-Gly-Ser-Ser-Gly (SEQ ID NO :2) ;

[0039] Glu-Ser-Ser-Ala-Ser-Ser-Ala (SEQ ID NO :6) ;

[0040] Glu-Ser-Ser-Gly-Ser-Ser-Gly-Ser-Ser-Gly-Ser-Ser-Gly (SEQ ID NO :7) ;

[0041] Glu-Ser-Ser-Ser-Ser-Ser-Ser (SEQ ID NO :8) ;

[0042] Glu-Ser-Ser-Gly-Ser-Ser-Gly-Lys (SEQ ID NO :9) ;

[0043] Glu-Ser-Ser-Gly-Ser-Ser-Gly-Ser-Ser-Gly-Ser-Ser-Gly-Lys (SEQ ID NO :10) ;

[0044] Glu-Ser-Ser-Gly-Ser-Ser-Gly-Ser-Ser-Gly-Ser-Ser-Gly-Ser-Ser-Gly-Ser-Ser-Gly-Lys (SEQ ID NO :11) ;

[0045] Glu-Ser-Ser-Ser-Ser-Ser-Ser-Lys (SEQ ID NO :12)

[0046] 和 Glu-Ser-Gly-Ser-Lys (SEQ ID NO :13) 。

[0047] 因此, 例如 SEQ ID NO :9 是指下列序列 (且或者可如下书写) :

[0048] gGlu-Ser-Ser-Gly-Ser-Ser-Gly-eps-Lys。这反之亦然也适用于本文的其它序列, 即适用于 SEQ ID NO :2 和 6-13 的每一个。

[0049] GLP-1 肽和类似物

[0050] 本文所用术语“GLP-1 肽”是指人胰高血糖素样肽 -1 (GLP-1 (7-37)) (其序列作为 SEQ ID NO :3 包括在序列表中) 或其类似物、GLP-1 类似物。

[0051] 具有 SEQ ID NO :3 序列的肽亦可称为天然 GLP-1。本文所用术语“GLP-1 类似物”或“GLP-1 的类似物”是指是其为天然人 GLP-1 (SEQ ID NO :3) 的变体的肽或化合物。

[0052] 在序列表中,SEQ ID NO :3 的第 1 个氨基酸残基(组氨酸)被指定为第 1 号。然而,在下文中-按照本领域的成规-该组氨酸残基称为第 7 号,随后的氨基酸残基依次编号,以第 37 号的甘氨酸结束。因此,一般而言,本文任何提及 GLP-1 (7-37) 序列的氨基酸残基编号或位置数时,是指以第 7 位的 His 开始和以第 37 位的 Gly 结束的序列。

[0053] 本发明的衍生物的 GLP-1 类似物可通过提及以下来描述:i) 对应于改变的氨基酸残基的天然 GLP-1 (7-37) 中氨基酸残基的编号(即天然 GLP-1 中的相应位置),和 ii) 实际改变。

[0054] 本发明的衍生物的 GLP-1 类似物包含至少 2 个 Lys 残基。例如,它可在对应于 GLP-1 (7-37) 的 18 位的位置上包含第一赖氨酸残基。如果该类似物的氨基酸序列在其它方面与天然 GLP-1 的相同,则所述类似物可命名为 K¹⁸-GLP-1 (7-37)。该命名因此表示其中 18 位的丝氨酸被赖氨酸取代的天然 GLP-1 的氨基酸序列。作为附加注释,该类似物在 26 位包含第二 Lys 残基,在 34 位包含第三 Lys 残基(即 GLP-1 (7-37) 的天然赖氨酸)。

[0055] 作为另一个实例,在 18 位包含第一 Lys 残基的类似物还可可在一个或多个其它位置上包含赖氨酸,例如 31 位上的另一个 Lys 残基。所述类似物可命名为 K¹⁸,K³¹-GLP-1 (7-37),条件是除 K¹⁸- 和 K³¹- 取代以外,其氨基酸序列与天然 GLP-1 的相同。

[0056] 当与天然 GLP-1 (SEQ ID NO :3) 相比时,本发明的衍生物的 GLP-1 类似物形成部分包含(优选具有)最多 8 个氨基酸变化-换句话说,它是当与天然 GLP-1 (7-37) (SEQ ID NO :3) 相比时,其中多个氨基酸残基发生变化的 GLP-1 肽。这些变化可独立地表示一个或多个氨基酸取代、添加和/或缺失。

[0057] 下面是合适类似物命名的非限制性实例。

[0058] 例如,当与天然 GLP-1 相比时,类似物 [Aib8, Lys18, Glu22, Val25, Arg26, Lys31, Arg34]-GLP-1-(7-37) 表示通过下列取代变化的 GLP-1 (7-37) 肽:8 位的丙氨酸被 Aib(α -氨基异丁酸)取代、18 位的丝氨酸被赖氨酸取代、22 位的甘氨酸被谷氨酸取代、25 位的丙氨酸被缬氨酸取代、26 位的赖氨酸被精氨酸取代、31 位的色氨酸被赖氨酸取代和 34 位的赖氨酸被精氨酸取代。该类似物亦可简称为 (8Aib, 18K, 22E, 25V, 26R, 31K, 34R),其中含有提及 GLP-1 (7-37) 的意思。

[0059] 作为另一个实例,类似物 [Arg34, Lys37, Glu38]-GLP-1 (7-37) 表示当与天然 GLP-1 相比时,通过 34 位的赖氨酸被精氨酸取代、37 位的甘氨酸被赖氨酸取代和 C 端添加谷氨酸而变化的 GLP-1 (7-37) 肽。该类似物还可简称为 (34R, 37K, 38E),其中含有提及 GLP-1 (7-37) 的意思。

[0060] 作为又一个实例,包含 Aib⁸ 的类似物是指当与天然 GLP-1 相比时,包含 8 位的丙氨酸被 α -氨基异丁酸(Aib)取代的 GLP-1 (7-37) 肽。与 SEQ ID NO :3 相比,该类似物可包含更多变化。

[0061] 从上述实例看显而易见,氨基酸残基可通过其全名、其一字母代码和/或其三字母代码识别。这 3 种方式完全等同。

[0062] 表述“相当于..... 的位置”或“相应位置”可用来表征参考天然 GLP-1 (7-37) (SEQ ID NO :3) 的 GLP-1 序列的变化位点。可通过例如简单手写和目测容易地推断等同的或相应的位置;和/或可采用标准蛋白质或肽比对程序,例如作为 Needleman-Wunsch 比对的“比对”。该算法描述于 Needleman, S. B. 和 Wunsch, C. D., (1970), Journal of Molecular

Biology, 48 :443-453 以及 Myers 和 W. Miller 载 于“Optimal Alignments in Linear Space (线性空间的优化比对)”CABIOS ((computer applications in the biosciences (生物科学中的计算机应用) (1988) 4 :11-17 的比对程序。对于比对, 可采用默认计分矩阵 BLOSUM62 和默认单位矩阵, 空位中第一残基的罚分可设为 -10 (负 10), 空位中其它残基的罚分设为 -0.5 (负 0.5)。

[0063] 将这类比对的一个实例插入下文中,其中序列_1 为 SEQ ID NO :3,序列_2 为其类似物(34R,37K,38E):

[0064]

```
# 1: 序列_1
# 2: 序列_2
# 矩阵: EBLOSUM62
# 空位_罚分: 10.0
# 延伸_罚分: 0.5
# 长度: 32
# 同一性:      29/32 (90.6%)
# 相似性:      30/32 (93.8%)
# 空位:        1/32 ( 3.1%)
# 分数: 150.0
#=====
```

序列_1	1 HAEGTFTSDVSSYLEGQAAKEFIAWLVKGRG-	31
	: . .	
序列_2	1 HAEGTFTSDVSSYLEGQAAKEFIAWLVGRKE	32

[0065] 在序列中包括非天然氨基酸例如 Imp 和 / 或 Aib 的情况下, 出于比对目的, 它们可用 X 替换。如有需要, 稍后可对 X 进行手工校正。

[0066] 术语“肽”，例如用于接头以及本发明的衍生物的 GLP-1 类似物的情况，是指包含通过酰胺（或肽）键相互连接的一系列氨基酸的化合物。肽接头包含至少 3 个氨基酸。GLP-1 肽包含至少 10 个、优选至少 15 个、更优选至少 20 个、甚至更优选至少 25 个或最优选至少 27 个氨基酸。

[0067] 在具体的实施方案中, GLP-1 肽由至少 28 个、至少 29 个、至少 30 个、至少 31 个或至少 32 个氨基酸组成。

[0068] 在另外又一个具体的实施方案中,肽由通过肽键相互连接的氨基酸组成。

[0069] 氨基酸是含有胺基和羧酸基及任选一个或多个其它基团（常称为氨基酸侧链）的分子。

[0070] 术语“氨基酸”包括蛋白质性氨基酸（由遗传密码编码，包括天然氨基酸和标准氨基酸）以及非蛋白质性氨基酸（不存在于蛋白质中，和/或非标准遗传密码编码）和合成氨基酸。因此，氨基酸可选自蛋白质性氨基酸、非蛋白质性氨基酸和/或合成氨基酸。

[0071] 非通过遗传密码编码的氨基酸的非限制性实例为 γ -羧基谷氨酸、鸟氨酸和磷酸丝氨酸。合成氨基酸的非限制性实例为氨基酸的D-异构体例如D-丙氨酸和D-亮氨酸。

氨酸、Aib(α -氨基异丁酸)、 β -丙氨酸和脱氨基-组氨酸(desH, 别名咪唑并丙酸(imidazopropionic acid), 简称 Imp)。

[0072] 在下文中, 未规定其旋光异构体的 GLP-1 肽的各个氨基酸要理解为是指 L- 异构体(除非另有说明)。

[0073] 接头的氨基酸元件(Gly 除外)可以两种旋光异构形式的任一种存在。因此, 化学式 1(Ser)、化学式 5(gGlu)、化学式 7(Ala) 和 / 或化学式 12(eps-Lys) 的每一个可表示 D- 型、L- 型或其混合物(D/L)。在一个具体的实施方案中, 这些中的每一个是 L- 异构体。在另一个具体实施方案中, 这些中的每一个是 D- 异构体。在又一个具体的实施方案中, 这些中的每一个是 D- 和 L- 异构体的混合物。在另外其它的具体实施方案中, i) 接头的至少一个、优选各 Ser 残基为 L- 型; ii) 接头的至少一个、优选各 Ala 残基为 L- 型, iii) 接头的至少一个、优选各 gGlu 残基为 L- 型; 和 / 或 iii) 接头的至少一个、优选各 eps-Lys 残基为 L- 型。

[0074] 众所周知, L- 和 D- 惯例是指可从其中合成所述氨基酸的甘油醛的异构体的光学活性。或者, 可采用(S)和(R)命名法定义立体化学。对于本发明的目的, L- 标识相当于(S)标识, D- 标识相当于(R)标识。

[0075] 本发明的 GLP-1 衍生物和类似物具有 GLP-1 活性。该术语是指与 GLP-1 受体结合并启动导致促胰岛素作用或本领域已知的其它生理作用的信号转导途径的能力。例如, 可采用本文实施例 32-33 中描述的一种或多种测定法测试本发明的类似物和衍生物的 GLP-1 活性。本文实施例 34 中描述的 GLP-1 受体结合测定法也可用作 GLP-1 活性的度量。

[0076] GLP-1 衍生物

[0077] 本文中在 GLP-1 肽或类似物的情况下使用的术语“衍生物”意指化学修饰的 GLP-1 肽或类似物, 其中一个或多个取代基与肽共价连接。取代基也可称为侧链。

[0078] 在一个具体的实施方案中, 侧链能够与白蛋白形成非共价聚集体, 因此促进衍生物随血液循环, 且由于 GLP-1- 衍生物和白蛋白的聚集体仅慢慢崩解以释放活性药物成分这一事实, 其还具有延长衍生物的作用时间的作用。因此, 取代基(或侧链)作为整体, 可称为白蛋白结合部分。

[0079] 在另一个具体实施方案中, 白蛋白结合部分包含对白蛋白结合并且因此对延长特别有关的部分, 该部分因此可称为延长部分。相对于其与肽的连接点, 延长部分可位于白蛋白结合部分的相对端或相对端的附近。

[0080] 在另外又一个具体的实施方案中, 白蛋白结合部分包含在延长部分和与肽的连接点之间的部分, 该部分可称为接头、接头部分、间隔区等。

[0081] 在具体的实施方案中, 延长部分是亲脂性的, 和 / 或在生理 pH(7.4) 带负电荷。

[0082] 白蛋白结合部分、延长部分或接头可通过酰化与 GLP-1 肽的赖氨酸残基共价连接。

[0083] 在一个优选的实施方案中, 白蛋白结合部分的活性酯, 优选包含延长部分和接头, 在酰胺键形成(该过程称为酰化)下与赖氨酸残基的氨基优选其 ϵ - 氨基共价连接。

[0084] 除非另有说明, 否则当提及赖氨酸残基的酰化时, 要理解是与其 ϵ - 氨基的酰化。

[0085] 具有通过接头与第一和第二 K 残基(例如 K¹⁸ 和 K³¹)连接的两个延长部分的衍生物可称为在 GLP-1 肽的第一和第二赖氨酸残基(例如分别在 18 和 31 位)的 ϵ - 氨基上被

酰化两次、双重酰化或二重酰化的衍生物。

[0086] 对于本发明的目的,术语“白蛋白结合部分”、“延长部分”和“接头”包括分子本身及其基团。从使用该术语的上下文来看,是否是指一种形式还是其它形式是显然的。在一个优选的实施方案中,这些术语是指基团。基团优选适于形成一个或多个酰胺键,即具有与羰基和 / 或氨基连接的一个或两个未共享电子 (*)。这类基团的实例为化学式 1- 化学式 12,以及化学式 15-16,下面显示了其结构。

[0087] 在本发明的一个方面,两个延长部分的每一个包含独立选自化学式 15 和化学式 16 的延长部分,或由独立选自化学式 15 和化学式 16 的延长部分组成:

[0088] 化学式 15 : $\text{HOOC}-(\text{CH}_2)_x-\text{CO}-*$

[0089] 化学式 16 : $\text{HOOC}-\text{C}_6\text{H}_4-\text{O}-(\text{CH}_2)_y-\text{CO}-*$,

[0090] 其中 x 为范围为 10-16 的整数, y 为范围为 8-12 的整数。

[0091] 在一个实施方案中, $*(\text{CH}_2)_x*$ 是指直链亚烷基。

[0092] 在另一个实施方案中, $*(\text{CH}_2)_y*$ 是指直链亚烷基。

[0093] 命名如本领域的惯例,例如上式中 $*-\text{COOH}$ 是指羧基, $*-\text{C}_6\text{H}_4*$ 是指亚苯基, $*-\text{CO}-*$ 是指羰基 ($\text{O}=\text{C}<*$)。在一个具体的实施方案中,芳族苯氧基独立地为对位。

[0094] 在一个具体的实施方案中,两个白蛋白结合部分(即整个侧链)是相似的,优选基本相同,或者最优选相同。

[0095] 在另一个具体实施方案中,两个延长部分是相似的,优选基本相同,或者最优选相同。

[0096] 在另外又一个具体的实施方案中,两个接头是相似的,优选基本相同,或者最优选相同。

[0097] 术语“基本相同”包括因以下所致的同一性的差异:一种或多种盐、酯和 / 或酰胺的形成;优选一种或多种盐、甲基酯和简单酰胺的形成;更优选不超过两种盐、甲基酯和 / 或简单酰胺的形成;甚至更优选不超过一种盐、甲基酯和 / 或简单酰胺的形成;或最优选不超过一种盐的形成。

[0098] 在化合物例如白蛋白结合部分、延长部分和接头的情况下,相似性和 / 或同一性可采用本领域已知的任何合适的计算机程序和 / 或算法测定。

[0099] 例如,两个延长部分、两个接头和 / 或两个完整侧链的相似性可适宜采用分子指纹测定。指纹是代表化学结构的数学方法(参见例如 Chemoinformatics :A textbook, Johann Gasteiger 和 Thomas Engel(编辑), Wiley-VCH Verlag, 2003)。

[0100] 合适指纹的实例包括而不限于 UNITY 指纹、MDL 指纹和 / 或 ECFP 指纹,例如 ECFP_6 指纹 (ECFP 代表扩展连接性指纹 (extended-connectivity fingerprint))。

[0101] 本发明的两个接头的相似性还可采用本领域已知的肽比对程序测定,例如上述“比对”。

[0102] 在具体的实施方案中,两个延长部分、两个接头和 / 或两个完整侧链以 a) ECFP_6 指纹 ;b) UNITY 指纹 ;和 / 或 c) MDL 指纹表示。

[0103] Tanimoto 系数优选用于计算两个指纹的相似性,不论使用 a)、b) 或 c)。

[0104] 在具体的实施方案中,不论使用 a)、b) 或 c),两个延长部分、两个接头和 / 或两个完整侧链分别具有以下相似性:至少 0.5 (50%) ;优选至少 0.6 (60%) ;更优选至少

0.7(70%) 或至少 0.8(80%);甚至更优选至少 0.9(90%);或最优选至少 0.99(99%),例如 1.0(100%) 的相似性。

[0105] 可应用程序 SYBYL(可获自 Tripos,1699South Hanley Road, St.Louis, MO63144-2319USA),计算 UNITY 指纹。可应用程序 Pipeline Pilot(可获自 Accelrys Inc., 10188Telesis Court, Suite100, San Diego, CA92121, USA),计算 ECFP₆ 和 MDL 指纹。

[0106] 更多详情参见例如 J. Chem. Inf. Model. 2008, 48, 542-549; J. Chem. Inf. Comput. Sci. 2004, 44, 170-178; J. Med. Chem. 2004, 47, 2743-2749; J. Chem. Inf. Model. 2010, 50, 742-754; 以及 SciTegic Pipeline Pilot Chemistry Collection: Basic Chemistry User Guide, 2008 年 3 月, SciTegic Pipeline Pilot Data Modeling Collection, 2008- 两个均来自 Accelrys Software Inc., San Diego, US 及指导 http://www.tripos.com/tripos_resources/fileroot/pdfs/Unity_111408.pdf, 和 http://www.tripos.com/data/SYBYL/SYBYL_072505.pdf。

[0107] 参考 W02011/080103, 其在第 15 页并入相似性计算的实例, 其中将具体侧链与其甲基酯进行比较。

[0108] 在具体的实施方案中, 本发明的两个接头有至少 90% 同一性、优选至少 94% 同一性、更优选至少 96% 同一性、甚至更优选至少 98% 同一性或最优选至少 99% 同一性。

[0109] 在备选实施方案中, 两个接头有至少 50% 同一性、优选至少 60% 同一性、更优选至少 70% 同一性或最优选至少 80% 同一性, 其中程序“比对”用上述设置使用。

[0110] 在两个相同侧链(白蛋白结合部分)的情况下, 衍生物可称为对称的。

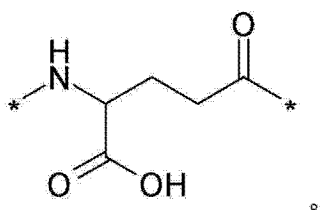
[0111] 在一个具体的实施方案中, 用于本发明衍生物的接头包含氨基酸 Ser 和 Gly。在一个实施方案中, 接头包含三肽基序 Ser-Ser-Gly。基序可重复, 例如两次。因此, 在另一个实施方案中, 接头包含六肽基序 Ser-Ser-Gly-Ser-Ser-Gly (SEQ ID NO:1)。

[0112] 接头还可包含 gGlu, 即例如 gGlu-Ser-Ser-Gly-Ser-Ser-Gly (SEQ ID NO:2) 的七肽基序。

[0113] 在一个具体的实施方案中, gGlu 具有化学式 5 的结构:

[0114] 化学式 5:

[0115]



[0116] 由于该接头元件是氨基酸谷氨酸的 γ 羧基, 在本文其用于与例如 Ser 接头元件的 N 端或与赖氨酸的 ϵ -氨基等连接(不论哪种情况)这一事实, 因此该接头元件也可称为 γ -Glu 或简称 gGlu。

[0117] 本发明的衍生物可以不同的立体异构形式存在, 其具有相同分子式和键合原子的顺序, 但仅在空间上在其原子的三维方向上不同。采用标准命名法, 在实验部分中在名称以及结构上标明了本发明示例性衍生物的立体异构现象。除非另有说明, 否则本发明涉及所要求保护的衍生物的所有立体异构形式。

[0118] 本发明的 GLP-1 衍生物的血浆浓度可采用任何合适的方法测定。例如可采用 LC-MS(液相色谱质谱),或免疫测定法例如 RIA(放射免疫测定法)、ELISA(酶联免疫吸附测定法)和 LOCI(发光氧通道免疫测定法(Luminescence Oxygen Channeling Immunoassay))。合适的 RIA 和 ELISA 测定法的一般方案参见例如 W009/030738 第 116-118 页。

[0119] 药学上可接受的盐、酰胺或酯

[0120] 本发明的肽和衍生物可呈药学上可接受的盐、酰胺或酯的形式。

[0121] 例如,盐通过碱和酸间的化学反应形成,例如: $2\text{NH}_3 + \text{H}_2\text{SO}_4 \rightarrow (\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 。

[0122] 盐可以是碱式盐、酸式盐,或可以两者都不是(即中性盐)。在水中,碱式盐产生氢氧根离子,酸式盐产生水合氢离子。

[0123] 可与添加的分别与阴离子基团或阳离子基团反应的阳离子或阴离子形成盐。这些基团可位于肽部分和/或本发明衍生物的侧链中。

[0124] 本发明衍生物的阴离子基团的非限制性实例包括侧链(如有的话)以及肽部分中的游离羧基。肽部分常包括 C 端的游离羧酸基,还可包括内部酸式氨基酸残基(例如 Asp 和 Glu)的游离羧基。

[0125] 肽部分的阳离子基团的非限制性实例包括 N 端(如存在的话)的游离氨基以及内部碱式氨基酸残基(例如 His、Arg 和 Lys)的任何游离氨基。

[0126] 酯可例如通过游离羧酸基与醇或酚的反应形成,这导致至少一个羟基被烷氧基或芳氧基置换。

[0127] 酯形成可涉及肽 C 端的游离羧基和/或侧链的任何游离羧基。

[0128] 可例如通过活化形式的游离羧酸基与胺或取代胺的反应或者通过游离氨基或取代氨基与活化形式的羧酸的反应,形成本发明衍生物的酰胺。

[0129] 酰胺形成可涉及肽 C 端的游离羧基、侧链中的任何游离羧基、肽 N 端的游离氨基、和/或肽和/或侧链中的肽的任何游离或取代氨基。

[0130] 在一个具体的实施方案中,肽或衍生物呈药学上可接受的盐的形式。在另一个具体实施方案中,衍生物呈药学上可接受的酰胺的形式,优选在肽的 C 端具有酰胺基。在另外一个具体的实施方案中,肽或衍生物呈药学上可接受的酯的形式。

[0131] 功能性质

[0132] 第一方面,本发明的衍生物具有极好的效能。亦或者备选地,第二方面,它们在低浓度的白蛋白下与 GLP-1 受体极好地结合。优选它们是完全 GLP-1 受体激动剂,正如通过其与 GLP-1 受体强结合的能力联合激活受体的能力所反映。亦或者备选地,第三方面,它们具有延长的药代动力学概况。亦或者备选地,第四方面,它们具有高的口服生物利用度。亦或者备选地,第五方面,它们具有高的水溶性和/或溶解速率。

[0133] 生物活性(效能)

[0134] 按照第一方面,本发明的衍生物是有生物活性的或有效能的。实际上,本发明的衍生物具有出乎意料的良好效能。特别当与到目前为止被视为最佳的相应的比较化合物比较时更是如此。在实验部分中,在题为“比较化合物”一节中论述了比较化合物。

[0135] 在一个具体的实施方案中,效能和/或活性是指体外效能,即在功能 GLP-1 受体测定法中的性能,更具体地说是指激活人 GLP-1 受体的能力。

[0136] 例如,可在含有表达人 GLP-1 受体的膜的培养基中,和 / 或在用表达人 GLP-1 受体的完整细胞的测定法中,测定体外效能。

[0137] 例如,来自表达人 GLP-1 受体的稳定转染的细胞系的纯化的血浆膜可用所述 GLP-1 类似物或衍生物刺激,并例如根据内源形成的 cAMP 和外源添加的生物素标记的 cAMP (其可使用特异性抗体俘获) 之间的竞争,测量 cAMP 产生的效能,例如实施例 32 中所述。

[0138] 亦或者备选地,可在报道基因测定法中,例如在表达人 GLP-1 受体并含有与萤火虫萤光素酶的启动子和基因偶联的 cAMP 应答元件 (CRE) (CRE 萤光素酶) 的 DNA 的稳定转染的 BHK 细胞系中,测量人 GLP-1 受体的反应。当 cAMP 因为 GLP-1 受体活化而产生时,这进而导致萤光素酶表达。可通过加入萤光素测定萤光素酶,萤光素被所述酶转化成氧化萤光素,并产生生物发光,测量生物发光,其是体外效能的度量。该测定法的一个非限制性实例描述于实施例 33。

[0139] 术语半数最大有效浓度 (EC_{50}) 一般是指诱导介于基线和最大的中间的反应的浓度,参见剂量反应曲线。 EC_{50} 用作化合物的效能的度量,并表示其中观察到其最大作用的 50% 的浓度。

[0140] 可如上文所述测定本发明衍生物的体外效能,并测定所述衍生物的 EC_{50} 。 EC_{50} 值越低,效能越好。

[0141] 在一个具体的实施方案中,本发明的衍生物在基于 AlphaScreen 膜的测定法具有相当于以下 EC_{50} 的体外效能: 500pM 或低于 500pM、更优选低于 400pM、甚至更优选低于 300pM 或最优选低于 200pM。

[0142] 在又一个具体的实施方案中,本发明的衍生物在 CRE- 萤光素酶完整细胞测定法中具有相当于以下 EC_{50} 的体外效能: 100pM 或低于 100pM、优选低于 75pM、更优选低于 50pM、甚至更优选低于 25pM 或最优选低于 10pM。

[0143] 在另一个具体实施方案中,本发明的衍生物是体内有效的,其可按照本领域已知在任何合适的动物模型中以及在临床试验中进行测定。

[0144] 糖尿病 db/db 小鼠是合适动物模型的一个实例,可在这种小鼠体内测定血糖降低作用以及体重减轻作用,例如 W02011/080103 的实施例 53 所述。

[0145] 受体结合 / 低白蛋白

[0146] 按照第二方面,本发明的衍生物在低浓度的白蛋白下与 GLP-1 受体极好地结合。这可按实施例 34 中所述测定。

[0147] 一般而言,在低白蛋白浓度下与 GLP-1 受体的结合应尽可能地好,相当于低的半数最大抑制浓度 (IC_{50}) 值。

[0148] 作为实例,在本发明衍生物的一个具体实施方案中,在 0.001% HSA (低白蛋白) 存在下 GLP-1 受体结合亲和力 (IC_{50}) 低于 50nM, 优选低于 20nM, 还更优选低于 10nM, 甚至更优选低于 5.0nM 或最优选低于 1.0nM。

[0149] GLP-1 受体激动剂

[0150] 受体激动剂可定义为与受体结合并引起天然配体特有反应的结构类似物。完全激动剂可定义为引起与天然配体相同幅度的反应的激动剂 (参见例如 “Principles of Biochemistry”, AL Lehninger, DL Nelson, MM Cox, 第 2 版, Worth Publishers, 1993, 第 763

页)。

[0151] 在一个具体的实施方案中,本发明的衍生物是完全 GLP-1 受体激动剂。完全 GLP-1 受体激动剂可定义为例如 GLP-1 (7-37) (SEQ ID NO :3) 的结构类似物,其 (i) 在受体结合亲和力和测定法中(例如本文实施例 34 的测定法),以等于或小于 50nM 的 IC_{50} 值与 GLP-1 受体结合;和(ii)在报道基因测定法(例如本文实施例 33 的测定法)中,以等于或小于 100pM 的 EC_{50} 值和/或在 cAMP 测定法(例如本文实施例 32 的测定法)中,以等于或小于 500pM 的 EC_{50} 值激活受体。

[0152] 长效性 - 小型猪中的体内半寿期

[0153] 按照第三方面,本发明的衍生物是长效的。在一个具体的实施方案中,可在 i. v. 给予后,以小型猪中的体内终末半寿期 ($T_{1/2}$) 测定长效性,如 W02011/080103 的实施例 54 中所述。

[0154] 在一个具体的实施方案中,本发明的衍生物在小型猪中 i. v. 给予后具有以下终末半寿期 ($T_{1/2}$):至少 8 小时,优选至少 16 小时,更优选至少 24 小时,甚至更优选至少 32 小时或最优选至少 40 小时。

[0155] 在其它另外的具体实施方案中,本发明的衍生物在小型猪中 i. v. 给予后具有以下的终末半寿期 ($T_{1/2}$):至少 50 小时,优选至少 55 小时,更优选至少 60 小时,甚至更优选至少 65 小时或最优选至少 70 小时。

[0156] 在其它另外的具体实施方案中,本发明的衍生物在小型猪中 i. v. 给予后具有以下的终末半寿期 ($T_{1/2}$):至少 75 小时,优选至少 80 小时或最优选至少 85 小时。

[0157] 本发明的长效衍生物优选还具有极好的功效,如下文包括的具体实施方案和其它具体实施方案中所定义。

[0158] 本发明的长效衍生物优选还具有与 GLP-1 受体的极好结合,如下文包括的具体实施方案和其它具体实施方案中所定义。

[0159] 口服生物利用度

[0160] 按照第四方面,本发明的衍生物具有高的口服生物利用度。

[0161] 商业化 GLP-1 衍生物的口服生物利用度非常低。在开发用于 i. v. 或 s. c 给予的情况下, GLP-1 衍生物的口服生物利用度也低。

[0162] 因此,本领域存在对口服生物利用度改进的 GLP-1 衍生物(或具有改进的口服生物利用度的 GLP-1 衍生物)的需要。这样的衍生物可能是口服给予的合适候选物,只要大多数情况下其效能是大体令人满意的,和/或只要其半寿期也是大体令人满意的。

[0163] 一般而言,术语生物利用度是指所给予剂量的活性药物成分(API)(例如本发明的衍生物)达到全身循环而未改变的部分。根据定义,当 API 静脉内给予时,其生物利用度为 100%。然而,当通过其它途径(例如口服)给予时,其生物利用度降低(因为降解和/或不完全吸收和首过代谢所致)。在计算用于非静脉内给药途径的剂量时,有关生物利用度的了解是重要的。

[0164] 口服和静脉内两种给予后,绘制血浆 API 浓度与时间曲线。绝对生物利用度 (F) 为 (AUC- 口服再除以剂量) 除以 (AUC- 静脉内再除以剂量)。

[0165] 在一个具体的实施方案中,本发明的衍生物具有高于利拉鲁肽 (liraglutide) 和/或 semaglutide 的绝对口服生物利用度,优选高至少 10%,更优选高至少 20%,甚至更优

选高至少 30% 或最优选高至少 40%。在其它具体实施方案中,它具有是利拉鲁肽和 / 或 semaglutide 的至少 1.5 倍的绝对口服生物利用度,优选为利拉鲁肽和 / 或 semaglutide 的至少 2.0 倍,更优选至少 3.0 倍,甚至更优选至少 4.0 倍或最优选至少 5.0 倍。

[0166] 在测试口服生物利用度之前,可按促胰岛素化化合物的口服制剂领域已知,适当地配制本发明的衍生物,例如使用 W02008/145728 中描述的任一种或多种制剂。

[0167] 例如,可按 PCT/EP2012/056642 的实施例 40 所述,在用 SNAC 的配方中,在大鼠肠注射和 / 或口服强饲研究中,估算口服生物利用度。

[0168] 水溶性

[0169] 对于几种肽药物,通过口服途径的高浓度递送难以实现。这可能至少部分由低溶解性所致。在第五方面,本发明的衍生物具有高的水溶性和 / 或溶解速率。这是获得药学上有用的口服产品的若干重要性质之一。在一个具体的实施方案中,与最接近的先有技术相比,本发明的衍生物具有较高的水溶性。亦或者备选地,它们在水性缓冲液中具有较快的溶出。可采用本领域已知的不同方法测量肽的绝对溶解度,参见例如 J. Pharm. Sci., 2008, 4155-66。为了测量毫克标度的肽的溶出度和 / 或溶解度,可采用例如来自 Pion Instruments (www.pion-inc.com) 的仪器例如 μ DISS Profiler™,其是用光纤紫外光谱法实时测量浓度的多用途仪器。

[0170] 本发明的衍生物的具体实施方案描述于实验部分之前题名为“具体实施方案”和“其它具体实施方案”的部分中。

[0171] 生产过程

[0172] 肽样 GLP-1 (7-37) 和 GLP-1 类似物的生产是本领域众所周知的。

[0173] 本发明的衍生物的 GLP-1 部分,即 K¹⁸-GLP-1 (7-37) 或其类似物,可例如通过例如经典肽合成产生,例如使用 t-Boc 或 Fmoc 化学的固相肽合成或其它充分确立的技术,参见例如 Greene 和 Wuts, “Protective Groups in Organic Synthesis (有机合成中的保护基)”, John Wiley & Sons, 1999; Florencio Zaragoza Dörwald, “Organic Synthesis on solid Phase (固相有机合成)”, Wiley-VCH Verlag GmbH, 2000; 以及 “Fmoc Solid Phase Peptide Synthesis (Fmoc 固相肽合成)”, W. C. Chan 和 P. D. White 编辑, Oxford University Press, 2000。

[0174] 亦或者备选地,它们可通过重组方法产生,即通过将含有编码类似物的 DNA 序列和能够在合适的营养培养基中表达肽的宿主细胞在允许肽表达的条件下培养。适于表达这些肽的宿主细胞的非限制性实例为:大肠杆菌 (Escherichia coli)、酿酒酵母 (Saccharomyces cerevisiae) 以及哺乳动物 BHK 或 CHO 细胞系。

[0175] 包括非天然氨基酸和 / 或共价连接的 N 端一肽或二肽模拟物的本发明的这些衍生物可例如按实验部分中的描述产生。或参见例如 Hodgson 等: “The synthesis of peptides and proteins containing non-natural amino acids (含有非天然氨基酸的肽和蛋白质的合成)”, Chemical Society Reviews, 第 33 卷, 第 7 期 (2004), 第 422-430 页; 以及题名为 “Semi-recombinant preparation of GLP-1 analogues (GLP-1 类似物的半重组制备)” 的 W02009/083549A1。

[0176] 制备多种本发明衍生物的方法的具体实例包括在实验部分中。

[0177] 药物组合物

[0178] 包含本发明的衍生物或其药学上可接受的盐、酰胺或酯和药学上可接受的赋形剂的药物组合物可按照本领域已知方法制备。

[0179] 术语“赋形剂”广义上是指除活性治疗成分以外的任何组分。赋形剂可以是惰性物质、无活性的物质和 / 或无医药活性的物质。

[0180] 赋形剂可用于各种目的,例如作为载体、溶媒、稀释剂、片剂助剂,和 / 或改进活性物质的给予和 / 或吸收。

[0181] 药学活性成分与各种赋形剂的制剂是本领域已知的,参见例如 Remington :The Science and Practice of Pharmacy (例如第 19 版 (1995),和任何较后的版本)。

[0182] 赋形剂的非限制性实例为 :溶剂、稀释剂、缓冲剂、防腐剂、张度调节剂、螯合剂和稳定剂。

[0183] 制剂的实例包括液体制剂,即含水制剂,即包含水的制剂。液体制剂可以是溶液剂或混悬剂。含水制剂通常包含至少 50% w/w 水或至少 60%、70%、80%或甚至至少 90% w/w 的水。

[0184] 或者药物组合物可以是固体制剂,例如冷冻干燥或喷雾干燥的组合物,其可照原样使用,或医生或患者在使用前向其中加入溶剂和 / 或稀释剂。

[0185] 含水制剂中的 pH 可介于 pH3 和 pH10 之间,例如约 7.0- 约 9.5 或约 3.0- 约 7.0。

[0186] 药物组合物可包含缓冲剂。缓冲剂可选自例如乙酸钠、碳酸钠、柠檬酸盐、甘氨酸、组氨酸、赖氨酸、精氨酸、磷酸二氢钠、磷酸氢二钠、磷酸钠和三 (羟甲基)- 氨基甲烷、N- 二 (羟乙基) 甘氨酸、N- 三 (羟甲基) 甲基甘氨酸、苹果酸、琥珀酸盐、马来酸、富马酸、酒石酸、天冬氨酸及其混合物。

[0187] 药物组合物可包含防腐剂。防腐剂可选自例如苯酚、邻甲酚、间甲酚、对甲酚、对羟基苯甲酸甲酯、对羟基苯甲酸丙酯、2- 苯氧乙醇、对羟基苯甲酸丁酯、2- 苯基乙醇、苯甲醇、氯丁醇和硫柳汞、溴硝丙二醇、苯甲酸、咪唑、氯己定 (chlorohexidine)、脱氢醋酸钠、氯甲酚、对羟基苯甲酸乙酯、苄索氯铵、chlorphenesine (3p- 氯苯氧基丙烷 -1,2- 二醇) 和其混合物。防腐剂可以 0.1mg/ml-20mg/ml 的浓度存在。

[0188] 药物组合物可包含等渗剂。等渗剂可选自例如盐 (例如氯化钠)、糖或糖醇、氨基酸 (例如甘氨酸、组氨酸、精氨酸、赖氨酸、异亮氨酸、天冬氨酸、色氨酸、苏氨酸)、多羟糖醇 (alditol) (例如甘油 (丙三醇)、1,2- 丙二醇 (propanediol/propyleneglycol)、1,3- 丙二醇、1,3- 丁二醇)、聚乙二醇 (例如 PEG400) 及其混合物。可以使用任何糖例如单糖、双糖或多糖或者水溶性葡聚糖类,包括例如果糖、葡萄糖、甘露糖、山梨糖、木糖、麦芽糖、乳糖、蔗糖、海藻糖、葡聚糖、普鲁兰多糖 (pullulan)、糊精、环糊精、 α 和 β HPCD、可溶性淀粉、羟乙基淀粉和羧甲基纤维素钠。糖醇的定义为具有至少一个 -OH 基团的 C4-C8 烃,包括例如甘露醇、山梨醇、肌醇、半乳糖醇、卫矛醇、木糖醇和阿拉伯糖醇。

[0189] 药物组合物可包含螯合剂。螯合剂可选自例如乙二胺四乙酸 (EDTA)、柠檬酸和天冬氨酸的盐及其混合物。

[0190] 药物组合物可包含稳定剂。稳定剂可为例如一种或多种氧化抑制剂、聚集抑制剂、表面活性剂和 / 或一种或多种蛋白酶抑制剂。

[0191] 术语“聚集体形成”是指多肽分子间导致寡聚体形成的物理相互作用,寡聚体可保持可溶性,或是从溶液中沉淀出的大量可见的聚集体。在液体药物组合物的保存期间由多

肽所致的聚集体形成可不利地影响该多肽的生物活性,导致药物组合物的治疗功效丧失。此外,聚集体形成可引起其它问题,例如当使用输注系统给予含有多肽的药物组合物时会阻塞管道、膜或泵。

[0192] 药物组合物可包含足以减少组合物保存期间肽的聚集体形成的量的氨基酸碱。术语“氨基酸碱”是指一种或多种氨基酸(例如甲硫氨酸、组氨酸、咪唑、精氨酸、赖氨酸、异亮氨酸、天冬氨酸、色氨酸、苏氨酸)或其类似物。任何氨基酸可以其游离碱形式或以其盐形式存在。可存在氨基酸碱的任何立体异构体(即 L、D 或其混合物)。

[0193] 当肽是包含易受氧化影响的至少一个甲硫氨酸残基的多肽时,可加入甲硫氨酸(或其它含硫氨基酸或氨基酸类似物)以抑制甲硫氨酸残基氧化成甲硫氨酸亚砷。可使用甲硫氨酸的任何立体异构体(L 或 D)或其组合。

[0194] 药物组合物可包含选自高分子量聚合物或低分子量化合物的稳定剂。稳定剂可选自例如聚乙二醇(例如 PEG3350)、聚乙烯醇(PVA)、聚乙烯吡咯烷酮、羧基/羟基纤维素或其衍生物(例如 HPC、HPC-SL、HPC-L 和 HPMC)、环糊精、含硫物质如单硫代甘油、巯基乙酸和 2-甲基硫代乙醇和不同的盐(例如氯化钠)。

[0195] 药物组合物可包含其它稳定剂,例如但不限于甲硫氨酸和 EDTA,其保护多肽免受甲硫氨酸氧化;以及非离子型表面活性剂,其保护多肽免于与冻融或机械剪切有关的聚集。

[0196] 药物组合物可包含一种或多种表面活性剂,例如一种表面活性剂、至少一种表面活性剂或两种不同的表面活性剂。术语“表面活性剂”是指由水溶性(亲水)部分和脂溶性(亲脂)部分组成的任何分子或离子。表面活性剂可选自例如阴离子表面活性剂、阳离子表面活性剂、非离子型表面活性剂和/或两性离子表面活性剂。

[0197] 药物组合物可包含一种或多种蛋白酶抑制剂,例如 EDTA(乙二胺四乙酸)和/或苯甲脒 HCl。

[0198] 药物组合物的其它任选成分包括例如润湿剂、乳化剂、抗氧化剂、填充剂、金属离子、油性溶媒、蛋白质(例如人血清白蛋白、明胶)和两性离子(例如氨基酸,例如甜菜碱、牛磺酸、精氨酸、甘氨酸、赖氨酸和组氨酸)。

[0199] 更进一步,药物组合物可按促胰岛素化合物口服制剂领域已知配制,例如使用描述于 W02008/145728 的任一种或多种制剂。

[0200] 给予的剂量可含有 0.01mg-100mg 的衍生物,或 0.01-50mg 或 0.01-20mg 或 0.01mg-10mg 的衍生物。

[0201] 衍生物可以药物组合物的形式给予。可在若干部位给予有需要的患者,所述部位例如在局部部位例如皮肤和粘膜部位;在避开吸收的部位例如在动脉中、静脉中、心脏中;以及在涉及吸收的部位,例如在皮肤中、在皮肤下、在肌肉中或在腹部中。

[0202] 给药途径可例如舌、舌下、口腔、口内、口服、胃中、肠中、经鼻、经肺(例如通过细支气管和肺泡或其组合)、胃肠外、表皮、真皮、透皮、结膜、输尿管、阴道、直肠和/或眼。在一个具体的实施方案中,给药途径是口服。

[0203] 组合物可以若干剂型给予,例如作为溶液剂、混悬剂、乳剂、微乳剂、复合型乳剂、泡沫剂、药膏剂、糊剂、药用硬膏剂(plasters)、软膏剂、片剂、包衣片剂、口香糖、冲洗剂、胶囊剂(例如硬明胶胶囊剂和软明胶胶囊剂)、栓剂、直肠胶囊剂、滴剂、凝胶剂、喷雾剂、粉剂、气雾剂、吸入剂、滴眼剂、眼用软膏剂、眼用冲洗剂、阴道栓剂、阴道环、阴道软膏剂、注射

用溶液剂、原位转化溶液剂 (in situ transforming solution) (例如原位胶凝剂、原位沉降剂、原位沉淀剂、原位结晶剂)、输液剂和植入剂。组合物还可进一步在药物载体或药物递送系统中配混 (compound), 例如以提高稳定性、生物利用度和 / 或溶解度。组合物可通过共价、疏水和 / 或静电相互作用与所述系统连接。这种配混的目的可为例如降低不良反应、实现计时疗法及提高患者依从性。

[0204] 组合物还可用于控释、缓释、延长释放、迟释和 / 或慢释药物递送系统的制剂。

[0205] 胃肠外给药可以用注射器 (任选笔型注射器), 通过皮下、肌内、腹膜内或静脉内注射进行, 或者用输注泵进行。

[0206] 组合物可以溶液剂、混悬剂或粉剂的形式经鼻给予; 或可以液体喷雾剂或粉末喷雾剂的形式经肺给予。

[0207] 透皮给予是另外又一个选择, 例如通过无针注射、自贴剂 (例如离子导入贴剂) 或通过跨粘膜途径 (例如经含服) 给予。

[0208] 组合物可以是稳定化制剂。术语“稳定化制剂”是指物理稳定性和 / 或化学稳定性提高、优选物理稳定性和化学稳定性均提高的制剂。一般而言, 制剂必须在使用和贮存期间保持稳定 (遵从所建议的使用和贮存条件) 直到达到失效期。

[0209] 术语“物理稳定性”是指由于暴露于热机械性应力和 / 或与不稳定的界面和表面 (例如疏水表面) 相互作用所致, 多肽形成生物学上无活性和 / 或不溶性聚集体的倾向。可在不同温度下暴露于机械性 / 物理性应力 (例如搅拌) 达不同时间后, 通过目测和 / 或浊度测量来评价含水多肽制剂的物理稳定性。或者, 可利用多肽构象状态的光谱剂 (spectroscopic agent) 或光谱探针例如硫黄素 T 或疏水斑 (hydrophobic patch) 探针, 评价含水抗体制剂的物理稳定性。

[0210] 术语“化学稳定性”是指多肽结构的化学 (特别是共价) 变化, 所述变化导致形成与完整多肽相比可能具有降低的生物效能和 / 或增加的免疫原性作用的化学降解产物。可通过例如 SEC-HPLC 和 / 或 RP-HPLC, 在暴露于不同环境条件后在各个时间点上测量化学降解产物的量, 来评价化学稳定性。

[0211] 用本发明的衍生物治疗还可与例如选自以下的一种或多种其它药理学活性物质组合: 抗糖尿病药、抗肥胖症药、食欲调节药、抗高血压药、用于治疗 and / 或预防由糖尿病引起或与糖尿病有关的并发症的药剂和用于治疗 and / 或预防由肥胖症引起或与肥胖症有关的并发症和病症的药剂。这些药理学活性物质的实例为: 胰岛素、磺酰脲类、双胍类、氯茴苯酸类、葡糖苷酶抑制剂、胰高血糖素拮抗剂、DPP-IV (二肽基肽酶-IV) 抑制剂、参与刺激糖异生和 / 或糖原分解的肝酶的抑制剂、葡萄糖摄取调节剂、改进脂质代谢的化合物例如抗高血脂药如 HMG CoA 抑制剂 (他汀类)、抑胃多肽 (GIP 类似物)、减少食物摄取的化合物、RXR 激动剂和作用于 β 细胞的 ATP 依赖性钾通道的药剂; 消胆胺、考来替泊、氯贝丁酯、吉非贝齐、洛伐他汀、普伐他汀、辛伐他汀、普罗布考、右旋甲状腺素、内他列奈 (neteglinide)、瑞格列奈; β -阻断剂例如阿普洛尔、阿替洛尔、噻吗洛尔、吡哌洛尔、普萘洛尔和美托洛尔、ACE (血管紧张素转化酶) 抑制剂例如贝那普利、卡托普利、依那普利、福辛普利、赖诺普利、alatriopril、喹那普利和雷米普利、钙通道阻断剂例如硝苯地平、非洛地平、尼卡地平、伊拉地平、尼莫地平、地尔硫䓬和维拉帕米及 α -阻断剂例如多沙唑嗪、乌拉地尔、哌唑嗪和特拉唑嗪; CART (可卡因苯丙胺调节转录物) 激动剂、NPY (神经肽 Y) 拮抗剂、PYY 激动剂、Y2

受体激动剂、Y4 受体激动剂、混合型 Y2/Y4 受体激动剂、MC4(黑皮质素 4) 激动剂、食欲拮抗剂、TNF(肿瘤坏死因子) 激动剂、CRF(促肾上腺皮质激素释放因子) 激动剂、CRF BP(促肾上腺皮质激素释放因子结合蛋白) 拮抗剂、尿皮质素(urocortin) 激动剂、 β 3 激动剂、泌酸调节肽(oxyntomodulin) 和类似物、MSH(黑素细胞刺激激素) 激动剂、MCH(黑素细胞集群激素(melanocyte-concentrating hormone)) 拮抗剂、CCK(缩胆囊素) 激动剂、5-羟色胺再摄取抑制剂、5-羟色胺和去甲肾上腺素再摄取抑制剂、混合型 5-羟色胺和去甲肾上腺素能化合物、5HT(5-羟色胺) 激动剂、铃蟾肽激动剂、甘丙肽拮抗剂、生长激素、生长激素释放化合物、TRH(促甲状腺激素释放激素) 激动剂、UCP2 或 3(解偶联蛋白 2 或 3) 调节剂、瘦蛋白激动剂、DA 激动剂(溴隐亭(bromocriptin)、doprexin)、脂肪酶/淀粉酶抑制剂、RXR(类视黄醇 X 受体) 调节剂、TR β 激动剂;组胺 H3 拮抗剂、抑胃多肽激动剂或拮抗剂(GIP 类似物)、促胃液素和促胃液素类似物。

[0212] 用本发明衍生物的治疗还可与影响葡萄糖水平和/或脂质稳态的手术(例如胃囊带术或胃旁路术) 组合。

[0213] 药物适应症

[0214] 本发明还涉及用作药物的本发明的衍生物。

[0215] 在具体的实施方案中,本发明的衍生物可用于下列医学治疗,不管怎样全部优选与糖尿病相关:

[0216] (i) 预防和/或治疗所有形式的糖尿病,例如高血糖症、2 型糖尿病、葡萄糖耐量减低、1 型糖尿病、非胰岛素依赖性糖尿病、MODY(青春晚期糖尿病)、妊娠糖尿病和/或用于降低 HbA1C;

[0217] (ii) 延迟或防止糖尿病疾病进展,例如 2 型糖尿病的进展,延迟葡萄糖耐量减低(IGT) 向胰岛素需求型 2 型糖尿病的发展和/或延迟非胰岛素需求型 2 型糖尿病向胰岛素需求型 2 型糖尿病发展;

[0218] (iii) 改进 β 细胞功能,例如减少 β 细胞凋亡、提高 β 细胞功能和/或 β 细胞积聚和/或恢复对 β 细胞的葡萄糖敏感性;

[0219] (iv) 预防和/或治疗认识障碍;

[0220] (v) 例如通过减少食物摄取、减轻体重、抑制食欲、诱导饱满感,预防和/或治疗进食障碍,例如肥胖症;治疗或预防因给予抗精神病药或类固醇诱导的暴食障碍、神经性贪食症和/或肥胖症;降低胃蠕动;和/或延迟胃排空;

[0221] (vi) 预防和/或治疗糖尿病并发症,例如神经病包括外周神经病、肾病或视网膜病;

[0222] (vii) 改进脂质参数,例如预防和/或治疗血脂异常(dyslipidemia),降低总血清脂质;降低 HDL;降低小密度 LDL;降低 VLDL;降低甘油三酯;降低胆固醇;增加 HDL;降低人的脂蛋白 a(Lp(a)) 的血浆水平;抑制体外和/或体内产生载脂蛋白 a(apo(a));

[0223] (iix) 预防和/或治疗心血管疾病,例如 X 综合征;动脉粥样硬化;心肌梗死;冠心病;中风,脑缺血;早期心脏病或早期心血管疾病,例如左心室肥大;冠状动脉疾病;原发性高血压;急性高血压突发;心肌病;心功能不全;运动耐量;慢性心力衰竭;心律失常;心节律紊乱;晕厥(syncopy);动脉粥样硬化(atherosclerosis);轻度慢性心力衰竭;心绞痛;心脏分流术再闭塞;间歇性跛行(闭塞性动脉硬化);舒张期功能障碍和/或收缩期功

能障碍；

[0224] (ix) 预防和 / 或治疗肠胃道疾病, 例如炎症肠综合征; 小肠综合征或克罗恩病 (Crohn's disease); 消化不良和 / 或胃溃疡;

[0225] (x) 预防和 / 或治疗危重疾病, 例如治疗垂危患者、危重多发性肾病 (critical illness poly-nephropathy, CIPNP) 患者和 / 或潜在的 CIPNP 患者; 防止危重疾病或 CIPNP 的发展; 预防、治疗和 / 或治愈患者的全身炎症反应综合征 (SIRS); 和 / 或防止或降低住院期间患者罹患菌血症、败血症和 / 或败血症性休克的可能性; 和 / 或

[0226] (xi) 预防和 / 或治疗多囊性卵巢综合征 (PCOS)。

[0227] 在一个具体的实施方案中, 适应症选自 (i)-(iii) 和 (v)-(iix), 例如适应症 (i)、(ii) 和 / 或 (iii); 或适应症 (v)、适应症 (vi)、适应症 (vii) 和 / 或适应症 (iix)。

[0228] 在另一个具体实施方案中, 适应症为 (i)。在又一个具体的实施方案中, 适应症为 (v)。在另外又一个具体的实施方案中, 适应症为 (iix)。

[0229] 特别优选下列适应症: 2 型糖尿病和 / 或肥胖症。

具体实施方案

[0230] 1. GLP-1 肽的衍生物或所述衍生物的药学上可接受的盐、酰胺或酯,

[0231] 所述肽具有 2 个 Lys 残基即第一 Lys 残基和第二 Lys 残基和与 GLP-1 (7-37) (SEQ ID NO :3) 相比最多 8 个氨基酸变化,

[0232] 所述衍生物具有通过接头分别与所述第一 Lys 残基和第二 Lys 残基的 ϵ 氨基连接的两个延长部分, 其中

[0233] 延长部分选自化学式 15 和化学式 16 :

[0234] 化学式 15 : $\text{HOO}-(\text{CH}_2)_x-\text{CO}-*$

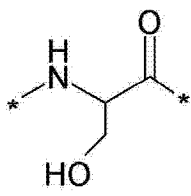
[0235] 化学式 16 : $\text{HOO}-\text{C}_6\text{H}_4-\text{O}-(\text{CH}_2)_y-\text{CO}-*$,

[0236] 其中 x 为范围为 10-16 的整数, y 为范围为 8-12 的整数; 和

[0237] 接头包含第一接头元件, 化学式 1 :

[0238] 化学式 1 :

[0239]



[0240] 2. 实施方案 1 的衍生物, 其中接头包含 2 个化学式 1。

[0241] 3. 实施方案 1 的衍生物, 其中接头包含 4 个化学式 1。

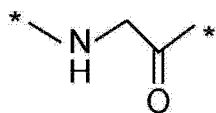
[0242] 4. 实施方案 1 的衍生物, 其中接头包含 6 个化学式 1。

[0243] 5. 实施方案 1 的衍生物, 其中接头包含 8 个化学式 1。

[0244] 6. 实施方案 1 的衍生物, 其中接头包含 12 个化学式 1。

[0245] 7. 实施方案 1-3 或 5-6 中任一个的衍生物, 其中接头还包含第二接头元件, 化学式 2 :

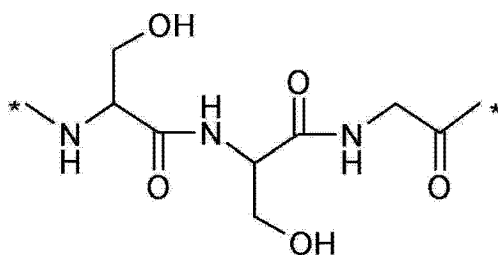
[0246]



[0247] 8. 实施方案 7 的衍生物, 其中接头包含如下的第 1 和第 2 接头元件的组合, 化学式 3 :

[0248] 化学式 3 :

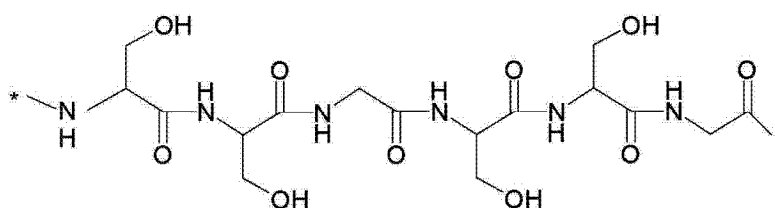
[0249]



[0250] 9. 实施方案 7-8 中任一个的衍生物, 其中接头包含如下的第 1 和第 2 接头元件的组合, 化学式 4 :

[0251] 化学式 4 :

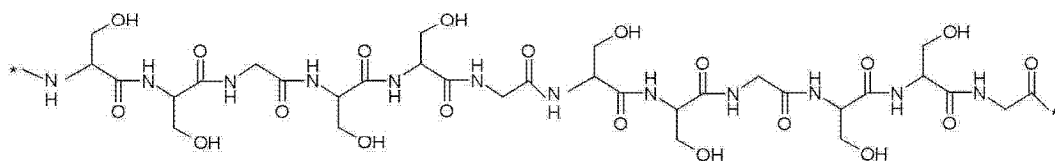
[0252]



[0253] 10. 实施方案 7-9 中任一个的衍生物, 其中接头包含如下的第 1 和第 2 接头元件的组合, 化学式 10 :

[0254] 化学式 10 :

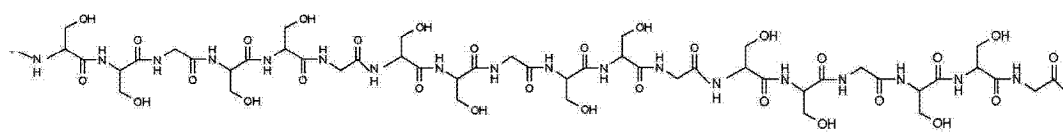
[0255]



[0256] 11. 实施方案 7-10 中任一个的衍生物, 其中接头包含如下的第 1 和第 2 接头元件的组合, 化学式 11 :

[0257] 化学式 11 :

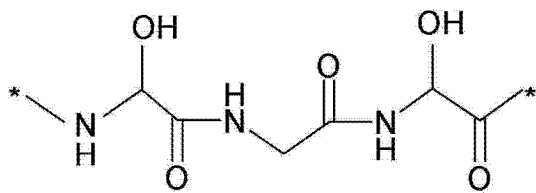
[0258]



[0259] 12. 实施方案 7 的衍生物, 其中接头包含如下的第 1 和第 2 接头元件的组合, 化学式 8 :

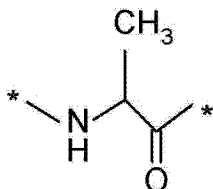
[0260] 化学式 8 :

[0261]



[0262] 13. 实施方案 1-3 中任一个的衍生物, 其中接头还包含第 3 接头元件, 化学式 7 :

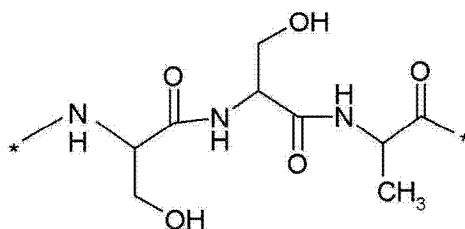
[0263]



[0264] 14. 实施方案 13 的衍生物, 其中接头包含如下的第 1 和第 3 接头元件的组合, 化学式 9 :

[0265] 化学式 9 :

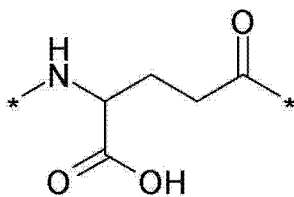
[0266]



[0267] 15. 实施方案 1-14 中任一个的衍生物, 其中接头还包含第 4 接头元件, 化学式 5 :

[0268] 化学式 5 :

[0269]

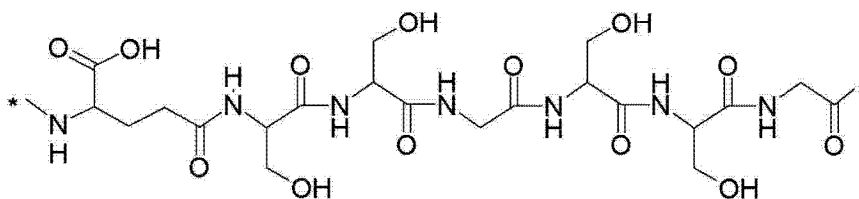


[0270] 16. 实施方案 15 的衍生物, 其中化学式 5 在其 *-NH 端与延长部分的羰基连接。

[0271] 17. 实施方案 1-3、7-9 或 15-16 中任一个的衍生物, 其中接头包含化学式 6 :

[0272] 化学式 6 :

[0273]



[0274] 18. 实施方案 1-12 或 15-17 中任一个的衍生物, 其中接头还包含第 5 接头元件, 化学式 12 :

[0275] 化学式 12：

[0276] $*-\text{NH}-(\text{CH}_2)_4-\text{CH}(\text{NH}_2)-\text{CO}-*$ 。

[0277] 19. 实施方案 18 的衍生物,其化学式 12 在其 CO-* 端与 GLP-1 肽的第一或第二 Lys 残基的 ϵ 氨基连接。

[0278] 20. 实施方案 1-3 或 13-16 中任一个的衍生物,其包含 1 个化学式 5 和 2 个化学式 9。

[0279] 21. 实施方案 1-5、7-10 或 15-16 中任一个的衍生物,其包含 1 个化学式 5 和 4 个化学式 3。

[0280] 22. 实施方案 1-4 或 15-16 中任一个的衍生物,其包含 1 个化学式 5 和 6 个化学式 1。

[0281] 23. 实施方案 1-3、7-9、15-16 或 18-19 中任一个的衍生物,其包含 1 个化学式 5、2 个化学式 3 和 1 个化学式 12。

[0282] 24. 实施方案 1-5、7-10、15-16 或 18-19 中任一个的衍生物,其包含 1 个化学式 5、4 个化学式 3 和 1 个化学式 12。

[0283] 25. 实施方案 1-11、15-16 或 18-19 中任一个的衍生物,其包含 1 个化学式 5、6 个化学式 3 和 1 个化学式 12。

[0284] 26. 实施方案 1-4、15-16 或 18-19 中任一个的衍生物,其包含 1 个化学式 5、6 个化学式 1 和 1 个化学式 12。

[0285] 27. 实施方案 1-2、7、12、15-16 或 18-19 中任一个的衍生物,其包含 1 个化学式 5、1 个化学式 8 和 1 个化学式 12。

[0286] 28. 实施方案 1-3、7-9 或 15-17 中任一个的衍生物,其中由化学式 6 组成的接头在其 *-NH 端通过酰胺键与延长部分的羰基连接,且在其 CO-* 端通过酰胺键与 GLP-1 肽的第一或第二 Lys 残基的 ϵ 氨基连接。

[0287] 29. 实施方案 1-3、13-16 或 20 中任一个的衍生物,其中接头由“化学式 5- 化学式 9- 化学式 9”组成,其中接头元件化学式 5、化学式 9 和化学式 9 按规定的顺序(即以 *-NH 端在左边,CO-* 端在右边)通过酰胺键互相连接,并且其中接头此外还在 *-NH 端通过酰胺键与延长部分的羰基连接,在 CO-* 端与 GLP-1 肽的第一或第二 Lys 残基的 ϵ 氨基连接。

[0288] 30. 实施方案 1-5、7-10、15-16 或 21 中任一个的衍生物,其中接头由“化学式 5- 化学式 3- 化学式 3- 化学式 3- 化学式 3”组成,其中接头元件化学式 5、化学式 3、化学式 3、化学式 3 和化学式 3 按规定的顺序(即以 *-NH 端在左边,CO-* 端在右边)通过酰胺键互相连接,并且其中接头此外还在 *-NH 端通过酰胺键与延长部分的羰基连接,在 CO-* 端与 GLP-1 肽的第一或第二 Lys 残基的 ϵ 氨基连接。

[0289] 31. 实施方案 1-4 或 15-16 或 22 中任一个的衍生物,其中接头由“化学式 5- 化学式 1- 化学式 1- 化学式 1- 化学式 1- 化学式 1- 化学式 1”组成,其中接头元件化学式 5、化学式 1、化学式 1、化学式 1、化学式 1、化学式 1 和化学式 1 按规定的顺序(即以 *-NH 端在左边,CO-* 端在右边)通过酰胺键互相连接,并且其中接头此外还在 *-NH 端通过酰胺键与延长部分的羰基连接,在 CO-* 端与 GLP-1 肽的第一或第二 Lys 残基的 ϵ 氨基连接。

[0290] 32. 实施方案 1-3、7-9、15-16、18-19 或 23 中任一个的衍生物,其中接头由“化学

式 5- 化学式 3- 化学式 3- 化学式 12”组成,其中接头元件化学式 5、化学式 3、化学式 3 和化学式 12 按规定的顺序(即以 *-NH 端在左边,CO-* 端在右边)通过酰胺键互相连接,并且其中接头此外还在 *-NH 端通过酰胺键与延长部分的羰基连接,在 CO-* 端与 GLP-1 肽的第一或第二 Lys 残基的 ϵ 氨基连接。

[0291] 33. 实施方案 1-5、7-10、15-16、18-19 或 24 中任一个的衍生物,其中接头由“化学式 5- 化学式 3- 化学式 3- 化学式 3- 化学式 3- 化学式 12”组成,其中接头元件化学式 5、化学式 3、化学式 3、化学式 3、化学式 3 和化学式 12 按规定的顺序(即以 *-NH 端在左边,CO-* 端在右边)通过酰胺键互相连接,并且其中接头此外还在 *-NH 端通过酰胺键与延长部分的羰基连接,在 CO-* 端与 GLP-1 肽的第一或第二 Lys 残基的 ϵ 氨基连接。

[0292] 34. 实施方案 1-11、15-16、18-19 或 25 中任一个的衍生物,其中接头由“化学式 5- 化学式 3- 化学式 3- 化学式 3- 化学式 3- 化学式 3- 化学式 12”组成,其中接头元件化学式 5、化学式 3、化学式 3、化学式 3、化学式 3、化学式 3、化学式 3 和化学式 12 按规定的顺序(即以 *-NH 端在左边,CO-* 端在右边)通过酰胺键互相连接,并且其中接头此外还在 *-NH 端通过酰胺键与延长部分的羰基连接,在 CO-* 端与 GLP-1 肽的第一或第二 Lys 残基的 ϵ 氨基连接。

[0293] 35. 实施方案 1-4、15-16、18-19 或 26 中任一个的衍生物,其中接头由“化学式 5- 化学式 1- 化学式 1- 化学式 1- 化学式 1- 化学式 1- 化学式 12”组成,其中接头元件化学式 5、化学式 1、化学式 1、化学式 1、化学式 1、化学式 1、化学式 1 和化学式 12 按规定的顺序(即以 *-NH 端在左边,CO-* 端在右边)通过酰胺键互相连接,并且其中接头此外还在 *-NH 端通过酰胺键与延长部分的羰基连接,在 CO-* 端与 GLP-1 肽的第一或第二 Lys 残基的 ϵ 氨基连接。

[0294] 36. 实施方案 1-2、7、12、15-16、18-19 或 27 中任一个的衍生物,其中接头由“化学式 5- 化学式 8- 化学式 12”组成,其中接头元件化学式 5、化学式 8 和化学式 12 按规定的顺序(即以 *-NH 端在左边,CO-* 端在右边)通过酰胺键互相连接,并且其中接头此外还在 *-NH 端通过酰胺键与延长部分的羰基连接,在 CO-* 端与 GLP-1 肽的第一或第二 Lys 残基的 ϵ 氨基连接。

[0295] 37. 实施方案 1-36 中任一个的衍生物,其中化学式 1 为 Ser。

[0296] 38. 实施方案 1-37 中任一个的衍生物,其中化学式 2 为 Gly。

[0297] 39. 实施方案 1-38 中任一个的衍生物,其中化学式 3 为 Ser-Ser-Gly。

[0298] 40. 实施方案 1-39 中任一个的衍生物,其中化学式 4 为 Ser-Ser-Gly-Ser-Ser-Gly (SEQ ID NO :1)。

[0299] 41. 实施方案 1-40 中任一个的衍生物,其中化学式 5 为 gGlu。

[0300] 42. 实施方案 1-41 中任一个的衍生物,其中化学式 6 为 gGlu-Ser-Ser-Gly-Ser-Ser-Gly (SEQ ID NO :2)。

[0301] 43. 实施方案 1-42 中任一个的衍生物,其中化学式 7 为 Ala。

[0302] 44. 实施方案 1-43 中任一个的衍生物,其中化学式 8 为 Ser-Gly-Ser。

[0303] 45. 实施方案 1-44 中任一个的衍生物,其中化学式 9 为 Ser-Ser-Ala。

[0304] 46. 实施方案 1-45 中任一个的衍生物,其中化学式 10 为 Ser-Ser-Gly-Ser-Ser-Gly-Ser-Ser-Gly (SEQ ID NO :4)。

- [0305] 47. 实施方案 1-46 中任一个的衍生物,其中化学式 11 为 Ser-Ser-Gly-Ser-Ser-Gly-Ser-Ser-Gly-Ser-Ser-Gly-Ser-Ser-Gly (SEQ ID NO :5)。
- [0306] 48. 实施方案 1-47 中任一个的衍生物,其中化学式 12 为 eps-Lys。
- [0307] 49. 实施方案 1-3、7-9、15-17 或 28 中任一个的衍生物,其中接头为 gGlu-Ser-Ser-Gly-Ser-Ser-Gly (SEQ ID NO :2)。
- [0308] 50. 实施方案 1-3、13-16、20 或 29 中任一个的衍生物,其中接头为 gGlu-Ser-Ser-Ala-Ser-Ser-Ala (SEQ ID NO :6)。
- [0309] 51. 实施方案 1-5、7-10、15-16、21 或 30 中任一个的衍生物,其中接头为 gGlu-Ser-Ser-Gly-Ser-Ser-Gly-Ser-Ser-Gly-Ser-Ser-Gly (SEQ ID NO :7)。
- [0310] 52. 实施方案 1-4 或 15-16、22 或 31 中任一个的衍生物,其中接头为 gGlu-Ser-Ser-Ser-Ser (SEQ ID NO :8)。
- [0311] 53. 实施方案 1-3、7-9、15-16、18-19、23 或 32 中任一个的衍生物,其中接头为 gGlu-Ser-Ser-Gly-Ser-Ser-Gly-eps-Lys (SEQ ID NO :9)。
- [0312] 54. 实施方案 1-5、7-10、15-16、18-19、24 或 33 中任一个的衍生物,其中接头为 gGlu-Ser-Ser-Gly-Ser-Ser-Gly-Ser-Ser-Gly-Ser-Ser-Gly-eps-Lys (SEQ ID NO :10)。
- [0313] 55. 实施方案 1-11、15-16、18-19、25 或 34 中任一个的衍生物,其中接头为 gGlu-Ser-Ser-Gly-Ser-Ser-Gly-Ser-Ser-Gly-Ser-Ser-Gly-Ser-Ser-Gly-Ser-Ser-Gly-eps-Lys (SEQ ID NO :11)。
- [0314] 56. 实施方案 1-4、15-16、18-19、26 或 35 中任一个的衍生物,其中接头为 gGlu-Ser-Ser-Ser-Ser-Ser-eps-Lys (SEQ ID NO :12)。
- [0315] 57. 实施方案 1-2、7、12、15-16、18-19、27 或 36 中任一个的衍生物,其中接头为 gGlu-Ser-Gly-Ser-eps-Lys (SEQ ID NO :13)。
- [0316] 58. 实施方案 1-57 中任一个的衍生物,其中 GLP-1 肽为 GLP-1 (7-37) (SEQ ID NO :3) 或其类似物。
- [0317] 59. 实施方案 58 的衍生物,其中与 GLP-1 (7-37) (SEQ ID NO :3) 相比,类似物具有最多 8 个氨基酸变化。
- [0318] 60. 实施方案 58-59 中任一个的衍生物,其中与 GLP-1 (7-37) (SEQ ID NO :3) 相比,类似物具有最多 7 个氨基酸变化。
- [0319] 61. 实施方案 58-60 中任一个的衍生物,其中与 GLP-1 (7-37) (SEQ ID NO :3) 相比,类似物具有最多 6 个氨基酸变化。
- [0320] 62. 实施方案 58-61 中任一个的衍生物,其中与 GLP-1 (7-37) (SEQ ID NO :3) 相比,类似物具有最多 5 个氨基酸变化。
- [0321] 63. 实施方案 58-62 中任一个的衍生物,其中与 GLP-1 (7-37) (SEQ ID NO :3) 相比,类似物具有最多 4 个氨基酸变化。
- [0322] 64. 实施方案 58-63 中任一个的衍生物,其中与 GLP-1 (7-37) (SEQ ID NO :3) 相比,类似物具有最多 3 个氨基酸变化。
- [0323] 65. 实施方案 58-64 中任一个的衍生物,其中与 GLP-1 (7-37) (SEQ ID NO :3) 相比,类似物具有 7 个氨基酸变化。
- [0324] 66. 实施方案 58-65 中任一个的衍生物,其中与 GLP-1 (7-37) (SEQ ID NO :3) 相比,

类似物具有 4 个氨基酸变化。

[0325] 67. 实施方案 58-66 中任一个的衍生物,其中与 GLP-1 (7-37) (SEQ ID NO :3) 相比,类似物具有 3 个氨基酸变化。

[0326] 68. 实施方案 58-67 中任一个的衍生物,其中与 GLP-1 (7-37) (SEQ ID NO :3) 相比,类似物具有最少 3 个氨基酸变化。

[0327] 69. 实施方案 58-68 中任一个的衍生物,其中与 GLP-1 (7-37) (SEQ ID NO :3) 相比,类似物具有最少 4 个氨基酸变化。

[0328] 70. 实施方案 58-69 中任一个的衍生物,其中与 GLP-1 (7-37) (SEQ ID NO :3) 相比,类似物具有最少 5 个氨基酸变化。

[0329] 71. 实施方案 58-70 中任一个的衍生物,其中与 GLP-1 (7-37) (SEQ ID NO :3) 相比,类似物具有最少 6 个氨基酸变化。

[0330] 72. 实施方案 58-71 中任一个的衍生物,其中与 GLP-1 (7-37) (SEQ ID NO :3) 相比,类似物具有最少 7 个氨基酸变化。

[0331] 73. 实施方案 1-72 中任一个的衍生物,其中氨基酸变化独立选自取代、缺失和添加。

[0332] 74. 实施方案 1-73 中任一个的衍生物,其中氨基酸变化独立选自取代和添加。

[0333] 75. 实施方案 1-74 中任一个的衍生物,其中氨基酸变化为取代。

[0334] 76. 实施方案 1-75 中任一个的衍生物,其中 GLP-1 肽包含式 I 的 GLP-1 肽:

[0335] 式 I:

[0336] Xaa₇-Xaa₈-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Xaa₁₆-Ser-Xaa₁₈-Xaa₁₉-Xaa₂₀-Glu-Xaa₂₂-Xaa₂₃-Ala-Xaa₂₅-Xaa₂₆-Xaa₂₇-Phe-Ile-Xaa₃₀-Xaa₃₁-Leu-Xaa₃₃-Xaa₃₄-Xaa₃₅-Xaa₃₆-Xaa₃₇-Xaa₃₈, 其中

[0337] Xaa₇ 为 L-组氨酸、咪唑并丙酰、 α -羟基-组氨酸、D-组氨酸、脱氨基-组氨酸、2-氨基-组氨酸、 β -羟基-组氨酸、高组氨酸、N^q-乙酰基-组氨酸、N^q-甲酰基-组氨酸、 α -氟甲基-组氨酸、 α -甲基-组氨酸、3-吡啶基丙氨酸、2-吡啶基丙氨酸或 4-吡啶基丙氨酸;

[0338] Xaa₈ 为 Ala、Gly、Val、Leu、Ile、Thr、Ser、Lys、Aib、(1-氨基环丙基)甲酸、(1-氨基环丁基)甲酸、(1-氨基环戊基)甲酸、(1-氨基环己基)甲酸、(1-氨基环庚基)甲酸或(1-氨基环辛基)甲酸;

[0339] Xaa₁₆ 为 Val 或 Leu;

[0340] Xaa₁₈ 为 Ser 或 Lys;

[0341] Xaa₁₉ 为 Tyr 或 Gln;

[0342] Xaa₂₀ 为 Leu 或 Met;

[0343] Xaa₂₂ 为 Gly、Glu、Lys 或 Aib;

[0344] Xaa₂₃ 为 Gln、Glu 或 Arg;

[0345] Xaa₂₅ 为 Ala 或 Val;

[0346] Xaa₂₆ 为 Val、His、Lys 或 Arg;

[0347] Xaa₂₇ 为 Glu、Leu 或 Lys;

[0348] Xaa₃₀ 为 Ala、Glu、Lys 或 Arg;

- [0349] Xaa₃₁ 为 Trp、Lys 或 His ;
- [0350] Xaa₃₃ 为 Val 或 Lys ;
- [0351] Xaa₃₄ 为 Lys、Glu、Asn、Gly、Gln、His、Arg 或不存在 ;
- [0352] Xaa₃₅ 为 Gly、Aib 或不存在 ;
- [0353] Xaa₃₆ 为 Arg、Gly、Lys 或不存在 ;
- [0354] Xaa₃₇ 为 Gly、Ala、Glu、Pro、Lys、Arg 或不存在 ;和
- [0355] Xaa₃₈ 为 Ser、Gly、Ala、Glu、Pro、Lys、Arg 或不存在。
- [0356] 77. 实施方案 1-76 中任一个的衍生物,其中 GLP-1 肽为式 I 的 GLP-1 肽。
- [0357] 78. 实施方案 76-77 中任一个的衍生物,其中式 I 的肽为 GLP-1 (7-37) (SEQ ID NO : 3) 的类似物。
- [0358] 79. 实施方案 76-78 中任一个的衍生物,其中如果 Xaa₃₇ 不存在,则 Xaa₃₈ 也不存在。
- [0359] 80. 实施方案 76-79 中任一个的衍生物,其中如果 Xaa₃₆ 不存在,则 Xaa₃₇ 和 Xaa₃₈ 也不存在。
- [0360] 81. 实施方案 76-80 中任一个的衍生物,其中如果 Xaa₃₅ 不存在,则 Xaa₃₆、Xaa₃₇ 和 Xaa₃₈ 也不存在。
- [0361] 82. 实施方案 76-81 中任一个的衍生物,其中如果 Xaa₃₄ 不存在,则 Xaa₃₅、Xaa₃₆、Xaa₃₇ 和 Xaa₃₈ 也不存在。
- [0362] 83. 实施方案 76-82 中任一个的衍生物,其中 Xaa₇ 为 L-组氨酸或咪唑并丙酮 ;Xaa₈ 为 Ala 或 Aib ;Xaa₁₆ 为 Val ;Xaa₁₈ 为 Ser 或 Lys ;Xaa₁₉ 为 Tyr ;Xaa₂₀ 为 Leu ;Xaa₂₂ 为 Gly 或 Glu ;Xaa₂₃ 为 Gln ;Xaa₂₅ 为 Ala 或 Val ;Xaa₂₆ 为 Lys 或 Arg ;Xaa₂₇ 为 Glu ;Xaa₃₀ 为 Ala ;Xaa₃₁ 为 Trp、Lys 或 His ;Xaa₃₃ 为 Val ;Xaa₃₄ 为 Lys、Gln、His 或 Arg ;Xaa₃₅ 为 Gly ;Xaa₃₆ 为 Arg ;Xaa₃₇ 为 Gly 或 Lys ;和 Xaa₃₈ 为 Glu、Lys 或不存在。
- [0363] 84. 实施方案 1-83 中任一个的衍生物,其中 GLP-1 肽包含 His⁷。
- [0364] 85. 实施方案 1-83 中任一个的衍生物,其中 GLP-1 肽包含 Imp⁷。
- [0365] 86. 实施方案 1-85 中任一个的衍生物,其中 GLP-1 肽包含 Ala⁸。
- [0366] 87. 实施方案 1-85 中任一个的衍生物,其中 GLP-1 肽包含 Aib⁸。
- [0367] 88. 实施方案 1-87 中任一个的衍生物,其中 GLP-1 肽包含 Val¹⁶。
- [0368] 89. 实施方案 1-88 中任一个的衍生物,其中 GLP-1 肽包含 Ser¹⁸。
- [0369] 90. 实施方案 1-88 中任一个的衍生物,其中 GLP-1 肽包含 Lys¹⁸。
- [0370] 91. 实施方案 1-90 中任一个的衍生物,其中 GLP-1 肽包含 Tyr¹⁹。
- [0371] 92. 实施方案 1-91 中任一个的衍生物,其中 GLP-1 肽包含 Leu²⁰。
- [0372] 93. 实施方案 1-92 中任一个的衍生物,其中 GLP-1 肽包含 Gly²²。
- [0373] 94. 实施方案 1-92 中任一个的衍生物,其中 GLP-1 肽包含 Glu²²。
- [0374] 95. 实施方案 1-94 中任一个的衍生物,其中 GLP-1 肽包含 Gln²³。
- [0375] 96. 实施方案 1-95 中任一个的衍生物,其中 GLP-1 肽包含 Ala²⁵。
- [0376] 97. 实施方案 1-95 中任一个的衍生物,其中 GLP-1 肽包含 Val²⁵。
- [0377] 98. 实施方案 1-97 中任一个的衍生物,其中 GLP-1 肽包含 Lys²⁶。
- [0378] 99. 实施方案 1-97 中任一个的衍生物,其中 GLP-1 肽包含 Arg²⁶。
- [0379] 100. 实施方案 1-99 中任一个的衍生物,其中 GLP-1 肽包含 Glu²⁷。

- [0380] 101. 实施方案 1-100 中任一个的衍生物, 其中 GLP-1 肽包含 Ala³⁰。
- [0381] 102. 实施方案 1-101 中任一个的衍生物, 其中 GLP-1 肽包含 His³¹。
- [0382] 103. 实施方案 1-101 中任一个的衍生物, 其中 GLP-1 肽包含 Trp³¹。
- [0383] 104. 实施方案 1-101 中任一个的衍生物, 其中 GLP-1 肽包含 Lys³¹。
- [0384] 105. 实施方案 1-104 中任一个的衍生物, 其中 GLP-1 肽包含 Val³³。
- [0385] 106. 实施方案 1-105 中任一个的衍生物, 其中 GLP-1 肽包含 Gln³⁴。
- [0386] 107. 实施方案 1-105 中任一个的衍生物, 其中 GLP-1 肽包含 Arg³⁴。
- [0387] 108. 实施方案 1-105 中任一个的衍生物, 其中 GLP-1 肽包含 His³⁴。
- [0388] 109. 实施方案 1-105 中任一个的衍生物, 其中 GLP-1 肽包含 Lys³⁴。
- [0389] 110. 实施方案 1-109 中任一个的衍生物, 其中 GLP-1 肽包含 Gly³⁵。
- [0390] 111. 实施方案 1-110 中任一个的衍生物, 其中 GLP-1 肽包含 Arg³⁶。
- [0391] 112. 实施方案 1-111 中任一个的衍生物, 其中 GLP-1 肽包含 Gly³⁷。
- [0392] 113. 实施方案 1-111 中任一个的衍生物, 其中 GLP-1 肽包含 Lys³⁷。
- [0393] 114. 实施方案 1-113 中任一个的衍生物, 其中 GLP-1 肽包含 Lys³⁸。
- [0394] 115. 实施方案 1-113 中任一个的衍生物, 其中, 在 GLP-1 肽中, Xaa³⁸ 不存在。
- [0395] 116. 实施方案 1-113 中任一个的衍生物, 其中 GLP-1 肽包含 Glu³⁸。
- [0396] 117. 实施方案 1-116 中任一个的衍生物, 其中 GLP-1 肽只有 2 个 Lys 残基。
- [0397] 118. 实施方案 1-117 中任一个的衍生物, 其中 2 个 Lys 残基为 Lys²⁶ 和 Lys³⁷。
- [0398] 119. 实施方案 1-117 中任一个的衍生物, 其中 2 个 Lys 残基为 Lys¹⁸ 和 Lys²⁶。
- [0399] 120. 实施方案 1-117 中任一个的衍生物, 其中 2 个 Lys 残基为 Lys¹⁸ 和 Lys³¹。
- [0400] 121. 实施方案 1-117 中任一个的衍生物, 其中 2 个 Lys 残基为 Lys²⁶ 和 Lys³⁸。
- [0401] 122. 实施方案 117-121 中任一个的衍生物, 其中 GLP-1 肽包含 Gln³⁴、His³⁴ 或 Arg³⁴。
- [0402] 123. 实施方案 120 或 122 中任一个的衍生物, 其中 GLP-1 肽包含 Arg²⁶。
- [0403] 124. 实施方案 123 的衍生物, 其中 GLP-1 肽包含 Arg²⁶ 和 Arg³⁴。
- [0404] 125. 实施方案 1-124 中任一个的衍生物, 其中与 GLP-1 (7-37) (SEQ ID NO:3) 相比, GLP-1 肽包含下列氨基酸变化: (i) 8Aib、34R、37K; (ii) 8Aib、31H、34Q、37K; (iii) 31H、34Q、37K; (iv) 34R、37K、38E; (v) 18K、22E、34Q; (vi) 8Aib、18K、22E、25V、26R、31K、34R; (vii) 8Aib、18K、22E、34Q; (viii) 8Aib、18K、34Q; (ix) 8Aib、34Q、37K; (x) 8Aib、34H、37K; (xi) 8Aib、31H、34Q、38K; (xii) 7Imp、8Aib、34R、37K; 或 (xiii) 7Imp、8Aib、18K、34Q。
- [0405] 126. 实施方案 1-125 中任一个的衍生物, 其中与 GLP-1 (7-37) (SEQ ID NO:3) 相比, GLP-1 肽包含下列氨基酸变化: (i) 8Aib、34R、37K; (ii) 8Aib、31H、34Q、37K; (iii) 31H、34Q、37K; (iv) 34R、37K、38E; (v) 18K、22E、34Q; (vi) 8Aib、18K、22E、25V、26R、31K、34R; (vii) 8Aib、18K、22E、34Q; (viii) 8Aib、34Q、37K; (x) 8Aib、34H、37K; (xi) 8Aib、31H、34Q、38K; (xii) 7Imp、8Aib、34R、37K; 或 (xiii) 7Imp、8Aib、18K、34Q。
- [0406] 127. 实施方案 1-126 中任一个的衍生物, 其中与 GLP-1 (7-37) (SEQ ID NO:3) 相比, GLP-1 肽具有下列氨基酸变化: (i) 8Aib、34R、37K; (ii) 8Aib、31H、34Q、37K; (iii) 31H、34Q、37K; (iv) 34R、37K、38E; (v) 18K、22E、34Q; (vi) 8Aib、18K、22E、25V、26R、31K、34R; (vii) 8Aib、18K、22E、34Q; (viii) 8Aib、18K、34Q; (ix) 8Aib、34Q、37K; (x) 8Aib、34H、37K;

(xi) 8Aib、31H、34Q、38K ; (xii) 7Imp、8Aib、34R、37K ; 或 (xiiv) 7Imp、8Aib、18K、34Q。

[0407] 128. 实施方案 1-127 中任一个的衍生物, 其中与 GLP-1 (7-37) (SEQ ID NO :3) 相比, GLP-1 肽具有下列氨基酸变化 : (i) 8Aib、34R、37K ; (ii) 8Aib、31H、34Q、37K ; (iii) 31H、34Q、37K ; (iv) 34R、37K、38E ; (v) 18K、22E、34Q ; (vi) 8Aib、18K、22E、25V、26R、31K、34R ; (vii) 8Aib、18K、22E、34Q ; (ix) 8Aib、34Q、37K ; (x) 8Aib、34H、37K ; (xi) 8Aib、31H、34Q、38K ; (xii) 7Imp、8Aib、34R、37K ; 或 (xiiv) 7Imp、8Aib、18K、34Q。

[0408] 129. 实施方案 1-128 中任一个的衍生物, 其中与 GLP-1 (7-37) (SEQ ID NO :3) 相比, GLP-1 肽不具有下列氨基酸变化 : (iix) 8Aib、18K、34Q。

[0409] 130. 实施方案 1-129 中任一个的衍生物, 其中与 GLP-1 (7-37) (SEQ ID NO :3) 相比氨基酸变化的数目通过手写和目测来鉴定。

[0410] 131. 实施方案 1-130 中任一个的衍生物, 其中氨基酸变化的技术和位置是与 GLP-1 (7-37) (SEQ ID NO :3) 比较, 并且通过手写和目测鉴定。

[0411] 132. 实施方案 1-131 中任一个的衍生物, 其中氨基酸变化的技术和位置是与 GLP-1 (7-37) (SEQ ID NO :3) 比较, 并且通过利用标准蛋白质或肽比对程序鉴定。

[0412] 133. 实施方案 132 的衍生物, 其中比对程序为 Needleman-Wunsch 比对。

[0413] 134. 实施方案 132-133 中任一个的衍生物, 其中采用默认计分矩阵和默认单位矩阵。

[0414] 135. 实施方案 132-134 中任一个的衍生物, 其中评分矩阵为 BLOSUM62。

[0415] 136. 实施方案 132-135 中任一个的衍生物, 其中空位中第一残基的罚分为 -10 (负 10)。

[0416] 137. 实施方案 132-136 中任一个的衍生物, 其中空位中其它残基的罚分为 -0.5 (负 0.5)。

[0417] 138. 实施方案 1-137 中任一个的衍生物, 其中 x 为偶数。

[0418] 139. 实施方案 1-138 中任一个的衍生物, 其中 x 为 12 或 14。

[0419] 140. 实施方案 1-139 中任一个的衍生物, 其中 x 为 12。

[0420] 141. 实施方案 1-139 中任一个的衍生物, 其中 x 为 14。

[0421] 142. 实施方案 1-141 中任一个的衍生物, 其中 y 为 9、10 或 11。

[0422] 143. 实施方案 1-142 中任一个的衍生物, 其中 y 为 9。

[0423] 144. 实施方案 1-142 中任一个的衍生物, 其中 y 为 10。

[0424] 145. 实施方案 1-142 中任一个的衍生物, 其中 y 为 11。

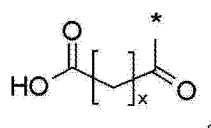
[0425] 146. 实施方案 1-145 中任一个的衍生物, 其中延长部分为化学式 15。

[0426] 147. 实施方案 1-145 中任一个的衍生物, 其中延长部分为化学式 16。

[0427] 148. 实施方案 1-146 中任一个的衍生物, 其中化学式 15 用化学式 15a 表示 :

[0428] 化学式 15a :

[0429]

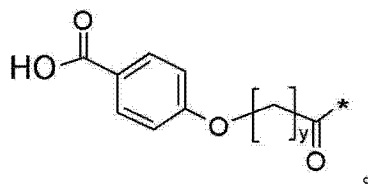


[0430] 149. 实施方案 1-145 或 147 中任一个的衍生物, 其中化学式 16 用化学式 16a 表

示：

[0431] 化学式 16a：

[0432]



[0433] 150. 实施方案 1-149 中任一个的衍生物,其中两个延长部分基本相同。

[0434] 151. 实施方案 1-150 中任一个的衍生物,其中两个延长部分具有以下相似性:至少 0.5;优选至少 0.6;更优选至少 0.7,或至少 0.8;甚至更优选至少 0.9;或最优选至少 0.99,例如 1.0 的相似性。

[0435] 152. 实施方案 1-151 中任一个的衍生物,其中两个接头基本相同。

[0436] 153. 实施方案 1-152 中任一个的衍生物,其中两个接头具有以下相似性:至少 0.5;优选至少 0.6;更优选至少 0.7,或至少 0.8;甚至更优选至少 0.9;或最优选至少 0.99,例如 1.0 的相似性。

[0437] 154. 实施方案 1-153 中任一个的衍生物,其中由延长部分和接头组成的 2 个侧链基本相同。

[0438] 155. 实施方案 1-154 中任一个的衍生物,其中由延长部分和接头组成的 2 个侧链具有以下相似性:至少 0.5;优选至少 0.6;更优选至少 0.7,或至少 0.8;甚至更优选至少 0.9;或最优选至少 0.99,例如 1.0 的相似性。

[0439] 156. 实施方案 151、153 或 155 中任一个的衍生物,其中待比较的 2 个化学结构以指纹表示,例如 a) ECFP₆ 指纹;b) UNITY 指纹;和/或 c) MDL 指纹;且其中对于 a)、b) 和 c) 的每一个,优选应用 Tanimoto 系数以计算两个指纹的相似性。

[0440] 157. 实施方案 1-156 中任一个的衍生物,其中接头为肽。

[0441] 158. 实施方案 1-157 中任一个的衍生物,其中接头为包含 5-20 个氨基酸残基的肽。

[0442] 159. 实施方案 1-158 中任一个的衍生物,其中接头为包含 3-7 个氨基酸残基的肽。

[0443] 160. 实施方案 1-159 中任一个的衍生物,其中接头为由 3-7 个氨基酸残基组成的肽。

[0444] 161. 实施方案 1-159 中任一个的衍生物,其中接头为由 5-20 个氨基酸残基组成的肽。

[0445] 162. 实施方案 158 或 159 中任一个的衍生物,其中接头包含 5、7、8、13、15 或 20 个氨基酸残基。

[0446] 163. 实施方案 162 的衍生物,其中接头由 5、7、8、13、15 或 20 个氨基酸残基组成。

[0447] 164. 实施方案 1-163 中任一个的衍生物,其中接头与各 Lys 残基的 ϵ -氨基连接。

[0448] 165. 实施方案 1-164 中任一个的衍生物,其中接头的 C 端与各 Lys 残基的 ϵ -氨基连接。

[0449] 166. 实施方案 1-165 中任一个的衍生物,其中延长部分和接头通过酰胺键相互连接。

[0450] 167. 实施方案 1-166 中任一个的衍生物,其中接头的 N 端与延长部分的 *-CO 端连接。

[0451] 168. 一种化合物,优选实施方案 1-167 中任一个的化合物,选自:化学式 20、化学式 21、化学式 22、化学式 23、化学式 24、化学式 25、化学式 26、化学式 27、化学式 28、化学式 29、化学式 30、化学式 31、化学式 32、化学式 33、化学式 34、化学式 35、化学式 36、化学式 37、化学式 38、化学式 39、化学式 40、化学式 41、化学式 42、化学式 43、化学式 44、化学式 45、化学式 46、化学式 47、化学式 48、化学式 49 和化学式 50;或化学式 20- 化学式 50 任一个的药学上可接受的盐、酰胺或酯。

[0452] 169. 一种化合物,其通过其名称来表征,并选自本文实施例 1-31 的化合物的各个名称的列表;或这些化合物中任一个的药学上可接受的盐、酰胺或酯。

[0453] 170. 实施方案 168 的化合物,其是实施方案 169 的化合物。

[0454] 171. 与 GLP-1(7-37)(SEQ ID NO:3) 相比,包含以下氨基酸变化的 GLP-1 肽:(x)8Aib、34H、37K;或(xii)7Imp、8Aib、34R、37K;或者(x)或(xii)的任一个的药学上可接受的盐、酰胺或酯。

[0455] 172. 与 GLP-1(7-37)(SEQ ID NO:3) 相比,具有下列氨基酸变化的 GLP-1 肽:(x)8Aib、34H、37K;(xii)7Imp、8Aib、34R、37K;或(xiiiv)7Imp、8Aib、18K、34Q;或者(x)、(xii)或(xiiiv)任一个的药学上可接受的盐、酰胺或酯。

[0456] 173. 实施方案 172 的肽,所述肽与 GLP-1(7-37)(SEQ ID NO:3) 相比没有其它氨基酸修饰。

[0457] 174. 实施方案 171-173 中任一个的肽,其中氨基酸变化的技术和位置是与 GLP-1(7-37)(SEQ ID NO:3) 比较,并且按实施方案 130-137 任一个中的描述鉴定。

[0458] 175. 实施方案 1-174 中任一个的衍生物,其具有 GLP-1 活性。

[0459] 176. 实施方案 175 的衍生物,其中 GLP-1 活性是指激活人 GLP-1 受体的能力。

[0460] 177. 实施方案 176 的衍生物,其中人 GLP-1 受体的激活作为 cAMP 产生的效能能在体外测定法中测量。

[0461] 178. 实施方案 1-177 中任一个的衍生物,其具有相当于以下 EC_{50} 的效能:

[0462] a) 低于 3000pM,优选低于 2600pM,更优选低于 2400pM,甚至更优选低于 2000pM 或最优选低于 1500pM;

[0463] b) 低于 1000pM,优选低于 1600pM,更优选低于 1400pM,甚至更优选低于 1200pM 或最优选低于 900pM;

[0464] c) 低于 500pM,优选低于 400pM,更优选低于 300pM,甚至更优选低于 250pM 或最优选低于 200pM;或

[0465] d) 低于 150pM,优选低于 125pM,更优选低于 100pM,甚至更优选低于 60pM 或最优选低于 50pM。

[0466] 179. 实施方案 178 的衍生物,其中测定效能为在含有人 GLP-1 受体的培养基中刺激 cAMP 形成的 EC_{50} 。

[0467] 180. 实施方案 179 的衍生物,其中使用稳定转染的细胞系例如 BHK467-12A(tk-ts13)。

[0468] 181. 实施方案 179-180 中任一个的衍生物,其中采用功能性受体测定法以测定

cAMP。

[0469] 182. 实施方案 179-181 中任一个的衍生物,其中所述测定法基于内源形成的 cAMP 与外源添加的生物素-cAMP 间的竞争。

[0470] 183. 实施方案 179-182 中任一个的衍生物,其中 cAMP 使用特异性抗体俘获。

[0471] 184. 实施方案 179-183 中任一个的衍生物,其中测定法是 AlphaScreen cAMP 测定法,优选本文实施例 32 中描述的测定法。

[0472] 185. 实施方案 176 中任一个的衍生物,其中人 GLP-1 受体的激活在报道基因测定法中测定。

[0473] 186. 实施方案 186 的衍生物,其中报道基因测定法利用表达人 GLP-1 受体和含有与萤火虫萤光素酶的启动子和基因偶联的 cAMP 应答元件 (CRE) (CRE 萤光素酶) 的 DNA 的稳定转染的 BHK 细胞系。

[0474] 187. 实施方案 186 的衍生物,其中通过加入萤光素来测定萤光素酶,所述萤光素转化成氧化萤光素并产生生物发光,测量所述生物发光,其是体外效能的度量。

[0475] 188. 实施方案 185-187 中任一个的衍生物,其中所述测定法描述于实施例 33。

[0476] 189. 实施方案 185-188 中任一个的衍生物,其具有相当于以下 EC_{50} 的体外效能: 100pM 或低于 100pM, 优选低于 75pM, 更优选低于 50pM, 甚至更优选低于 25pM 或最优选低于 10pM。

[0477] 190. 实施方案 171-174 中任一个的肽,其具有如实施方案 175-189 中任一个定义的 GLP-1 活性。

[0478] 191. 实施方案 1-189 中任一个的衍生物,在 0.005%、优选 0.001% HSA (低白蛋白) 存在下,对于其的 GLP-1 受体结合亲和力 (IC_{50}) 为

[0479] a) 低于 50nM, 优选低于 25nM, 还更优选低于 20nM, 甚至更优选低于 10nM 或最优选低于 5.0nM ;或

[0480] b) 低于 1.0nM, 或更优选低于 0.50nM。

[0481] 192. 实施方案 191 的衍生物,其中优选采用 SPA 结合测定法,通过从受体中置换 ^{125}I -GLP-1 的方式,测量与 GLP-1 受体的结合亲和力。

[0482] 193. 实施方案 192 的衍生物,其中使用稳定转染的细胞系,优选仓鼠细胞系,更优选幼仓鼠肾细胞系,例如 BHK tk-ts13,来制备 GLP-1 受体。

[0483] 194. 实施方案 191-193 中任一个的衍生物,其中 IC_{50} 值定义为从受体中置换 50% 的 ^{125}I -GLP-1 的浓度。

[0484] 195. 实施方案 171-174 或 190 中任一个的肽,其能够与实施方案 191-194 任一个中定义的 GLP-1 受体结合。

[0485] 196. 一种药物组合物,其包含实施方案 171-174、190 和 / 或 195 中任一个的肽,或实施方案 1-170、175-189 和 / 或 191-194 中任一个的衍生物 ;和药学上可接受的赋形剂。

[0486] 197. 用作药物的实施方案 171-174、190 和 / 或 195 中任一个的肽或实施方案 1-170、175-189 和 / 或 191-194 中任一个的衍生物。

[0487] 198. 实施方案 171-174、190 和 / 或 195 中任一个的肽,或实施方案 1-170、175-189 和 / 或 191-194 中任一个的衍生物,其用于治疗 and / 或预防所有形式的糖尿病和相关疾病,例如进食障碍、心血管疾病、肠胃道疾病、糖尿病并发症、危重疾病和 / 或多囊性卵巢综合

征 ;和 / 或用于改善脂质参数,改善 β 细胞功能,和 / 或用于延缓或防止糖尿病疾病进展。

[0488] 199. 实施方案 171-174、190 和 / 或 195 中任一个的肽,或实施方案 1-170、175-189 和 / 或 191-194 中任一个的衍生物在制备用于以下方面的药物中的用途 :治疗和 / 或预防所有形式的糖尿病和相关疾病,例如进食障碍、心血管疾病、肠胃道疾病、糖尿病并发症、危重疾病和 / 或多囊性卵巢综合征 ;和 / 或用于改善脂质参数,改善 β 细胞功能,和 / 或用于延缓或防止糖尿病疾病进展。

[0489] 200. 一种方法,其通过给予药理学活性量的实施方案 171-174、190 和 / 或 195 中任一个的肽 ;或实施方案 1-170、175-189 和 / 或 191-194 中任一个的衍生物,用于治疗或预防所有形式的糖尿病和相关疾病,例如进食障碍、心血管疾病、肠胃道疾病、糖尿病并发症、危重疾病和 / 或多囊性卵巢综合征 ;和 / 或用于改善脂质参数,改善 β 细胞功能,和 / 或用于延缓或防止糖尿病疾病进展。

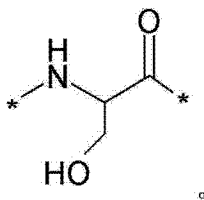
[0490] 其它具体实施方案

[0491] 以下为本发明的其它具体实施方案 :

[0492] 1. 一种 GLP-1 肽的衍生物,所述肽包含至少 2 个 Lys 残基,其中延长部分通过包含化学式 1 的接头与各 Lys 残基的 ϵ 氨基连接 :

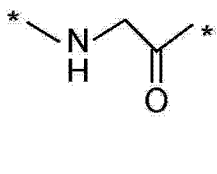
[0493] 化学式 1 :

[0494]



[0495] 2. 实施方案 1-2 中任一个的衍生物,其中接头还包含化学式 2 :化学式 2 :

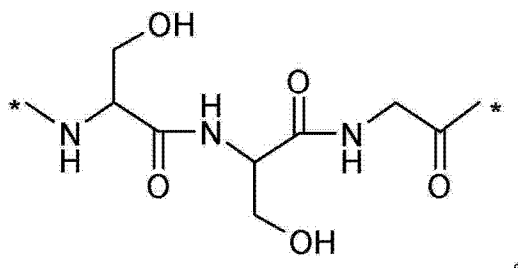
[0496]



[0497] 3. 实施方案 1-2 中任一个的衍生物,其中接头包含化学式 3 :

[0498] 化学式 3 :

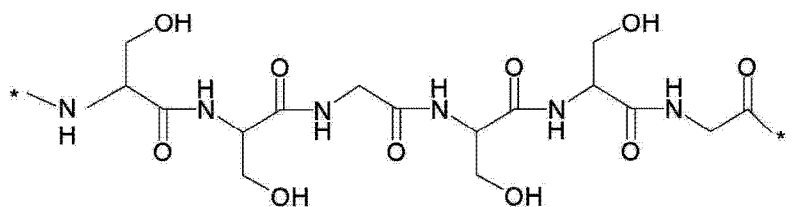
[0499]



[0500] 4. 实施方案 1-3 中任一个的衍生物,其中接头包含化学式 4 :

[0501] 化学式 4 :

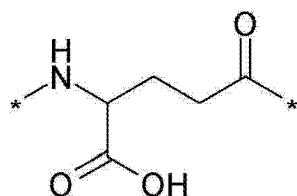
[0502]



[0503] 5. 实施方案 1-4 中任一个的衍生物, 其中接头还包含化学式 5:

[0504] 化学式 5:

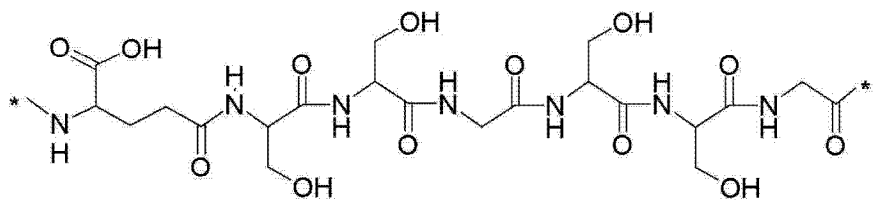
[0505]



[0506] 6. 实施方案 1-5 中任一个的衍生物, 其中接头包含化学式 6:

[0507] 化学式 6:

[0508]



[0509] 7. 实施方案 1-6 中任一个的衍生物, 其中接头由化学式 6 组成。

[0510] 8. 实施方案 1-7 中任一个的衍生物, 其包含 Ser。

[0511] 9. 实施方案 1-8 中任一个的衍生物, 其中接头还包含 Gly。

[0512] 10. 实施方案 1-9 中任一个的衍生物, 其中接头包含 Ser-Ser-Gly。

[0513] 11. 实施方案 1-10 中任一个的衍生物, 其中接头包含 Ser-Ser-Gly-Ser-Ser-Gly (SEQ ID NO :1)。

[0514] 12. 实施方案 1-11 中任一个的衍生物, 其中接头还包含 Glu。

[0515] 13. 实施方案 1-12 中任一个的衍生物, 其中接头包含 Glu-Ser-Ser-Gly-Ser-Ser-Gly (SEQ ID NO :2)。

[0516] 14. 实施方案 1-3 中任一个的衍生物, 其中接头由 Glu-Ser-Ser-Gly-Ser-Ser-Gly (SEQ ID NO :2) 组成。

[0517] 15. 实施方案 12-14 中任一个的衍生物, 其中 Glu 为化学式 5 的 gGlu。

[0518] 16. 实施方案 1-15 中任一个的衍生物, 其中 GLP-1 肽为 GLP-1 (7-37) (SEQ ID NO :3) 或其类似物。

[0519] 17. 实施方案 16 的衍生物, 其中与 GLP-1 (7-37) (SEQ ID NO :3) 相比, 类似物具有最多 10 个氨基酸变化。

[0520] 18. 实施方案 16-17 中任一个的衍生物, 其中与 GLP-1 (7-37) (SEQ ID NO :3) 相比, 类似物具有最多 9 个氨基酸变化。

[0521] 19. 实施方案 16-18 中任一个的衍生物, 其中与 GLP-1 (7-37) (SEQ ID NO :3) 相比, 类似物具有最多 8 个氨基酸变化。

[0522] 20. 实施方案 16-19 中任一个的衍生物,其中与 GLP-1 (7-37) (SEQ ID NO :3) 相比,类似物具有最多 7 个氨基酸变化。

[0523] 21. 实施方案 16-20 中任一个的衍生物,其中与 GLP-1 (7-37) (SEQ ID NO :3) 相比,类似物具有最多 6 个氨基酸变化。

[0524] 22. 实施方案 16-21 中任一个的衍生物,其中与 GLP-1 (7-37) (SEQ ID NO :3) 相比,类似物具有最多 5 个氨基酸变化。

[0525] 23. 实施方案 16-22 中任一个的衍生物,其中与 GLP-1 (7-37) (SEQ ID NO :3) 相比,类似物具有最多 4 个氨基酸变化。

[0526] 24. 实施方案 16-23 中任一个的衍生物,其中与 GLP-1 (7-37) (SEQ ID NO :3) 相比,类似物具有最多 3 个氨基酸变化。

[0527] 25. 实施方案 16-20 中任一个的衍生物,其中与 GLP-1 (7-37) (SEQ ID NO :3) 相比,类似物具有 7 个氨基酸变化。

[0528] 26. 实施方案 16-23 中任一个的衍生物,其中与 GLP-1 (7-37) (SEQ ID NO :3) 相比,类似物具有 4 个氨基酸变化。

[0529] 27. 实施方案 16-24 中任一个的衍生物,其中与 GLP-1 (7-37) (SEQ ID NO :3) 相比,类似物具有 3 个氨基酸变化。

[0530] 28. 实施方案 17-27 中任一个的衍生物,其中变化独立选自取代、缺失和添加。

[0531] 29. 实施方案 17-28 中任一个的衍生物,其中变化独立选自取代和添加。

[0532] 30. 实施方案 17-29 中任一个的衍生物,其中变化为取代。

[0533] 31. 实施方案 1-30 中任一个的衍生物,其中 GLP-1 肽包含式 I 的 GLP-1 肽:

[0534] 式 I:

[0535] Xaa₇-Xaa₈-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Xaa₁₆-Ser-Lys-Xaa₁₈-Xaa₁₉-Xaa₂₀-Glu-Xaa₂₂-Xaa₂₃-Ala-Xaa₂₅-Xaa₂₆-Xaa₂₇-Phe-Ile-Xaa₃₀-Xaa₃₁-Leu-Xaa₃₃-Xaa₃₄-Xaa₃₅-Xaa₃₆-Xaa₃₇-Xaa₃₈, 其中

[0536] Xaa₇ 为 L- 组氨酸、咪唑并丙酰、 α - 羟基 - 组氨酸、D- 组氨酸、脱氨基 - 组氨酸、2- 氨基 - 组氨酸、 β - 羟基 - 组氨酸、高组氨酸、N^α- 乙酰基 - 组氨酸、N^α- 甲酰基 - 组氨酸、 α - 氟甲基 - 组氨酸、 α - 甲基 - 组氨酸、3- 吡啶基丙氨酸、2- 吡啶基丙氨酸或 4- 吡啶基丙氨酸;

[0537] Xaa₈ 为 Ala、Gly、Val、Leu、Ile、Thr、Ser、Lys、Aib、(1- 氨基环丙基) 甲酸、(1- 氨基环丁基) 甲酸、(1- 氨基环戊基) 甲酸、(1- 氨基环己基) 甲酸、(1- 氨基环庚基) 甲酸或 (1- 氨基环辛基) 甲酸;

[0538] Xaa₁₆ 为 Val 或 Leu;

[0539] Xaa₁₈ 为 Ser 或 Lys;

[0540] Xaa₁₉ 为 Tyr 或 Gln;

[0541] Xaa₂₀ 为 Leu 或 Met;

[0542] Xaa₂₂ 为 Gly、Glu、Lys 或 Aib;

[0543] Xaa₂₃ 为 Gln、Glu 或 Arg;

[0544] Xaa₂₅ 为 Ala 或 Val;

[0545] Xaa₂₆ 为 Val、His、Lys 或 Arg;

- [0546] Xaa₂₇ 为 Glu、Leu 或 Lys；
- [0547] Xaa₃₀ 为 Ala、Glu、Lys 或 Arg；
- [0548] Xaa₃₁ 为 Trp、Lys 或 His；
- [0549] Xaa₃₃ 为 Val 或 Lys；
- [0550] Xaa₃₄ 为 Lys、Glu、Asn、Gly、Gln、Arg 或不存在；
- [0551] Xaa₃₅ 为 Gly、Aib 或不存在；
- [0552] Xaa₃₆ 为 Arg、Gly、Lys 或不存在；
- [0553] Xaa₃₇ 为 Gly、Ala、Glu、Pro、Lys、Arg 或不存在；和
- [0554] Xaa₃₈ 为 Ser、Gly、Ala、Glu、Pro、Lys、Arg 或不存在。
- [0555] 32. 实施方案 1-31 中任一个的衍生物，其中 GLP-1 肽为式 I 的 GLP-1 肽。
- [0556] 33. 实施方案 31-32 中任一个的衍生物，其中式 I 的肽为 GLP-1 (7-37) (SEQ ID NO : 3) 的类似物。
- [0557] 34. 实施方案 31-33 中任一个的衍生物，其中如果 Xaa₃₇ 不存在，则 Xaa₃₈ 也不存在。
- [0558] 35. 实施方案 31-34 中任一个的衍生物，其中如果 Xaa₃₆ 不存在，则 Xaa₃₇ 和 Xaa₃₈ 也不存在。
- [0559] 36. 实施方案 31-35 中任一个的衍生物，其中如果 Xaa₃₅ 不存在，则 Xaa₃₆、Xaa₃₇ 和 Xaa₃₈ 也不存在。
- [0560] 37. 实施方案 31-36 中任一个的衍生物，其中如果 Xaa₃₄ 不存在，则 Xaa₃₅、Xaa₃₆、Xaa₃₇ 和 Xaa₃₈ 也不存在。
- [0561] 38. 实施方案 31-37 中任一个的衍生物，其中 Xaa₇ 为 L-组氨酸；Xaa₈ 为 Ala 或 Aib；Xaa₁₆ 为 Val；Xaa₁₈ 为 Ser 或 Lys；Xaa₁₉ 为 Tyr；Xaa₂₀ 为 Leu；Xaa₂₂ 为 Gly 或 Glu；Xaa₂₃ 为 Gln；Xaa₂₅ 为 Ala 或 Val；Xaa₂₆ 为 Lys 或 Arg；Xaa₂₇ 为 Glu；Xaa₃₀ 为 Ala；Xaa₃₁ 为 Trp、Lys 或 His；Xaa₃₃ 为 Val；Xaa₃₄ 为 Lys、Gln 或 Arg；Xaa₃₅ 为 Gly；Xaa₃₆ 为 Arg；Xaa₃₇ 为 Gly 或 Lys；和 Xaa₃₈ 为 Glu 或不存在。
- [0562] 39. 实施方案 1-38 中任一个的衍生物，其中 GLP-1 肽包含 Aib⁸。
- [0563] 40. 实施方案 1-39 中任一个的衍生物，其中 GLP-1 肽包含 Gln³⁴。
- [0564] 41. 实施方案 1-40 中任一个的衍生物，其中 GLP-1 肽包含 Arg³⁴。
- [0565] 42. 实施方案 1-41 中任一个的衍生物，其中 GLP-1 肽包含 Glu²²。
- [0566] 43. 实施方案 1-42 中任一个的衍生物，其中 GLP-1 肽包含 2 个 Lys 残基。
- [0567] 44. 实施方案 1-43 中任一个的衍生物，其中 GLP-1 肽只有 2 个 Lys 残基。
- [0568] 45. 实施方案 1-44 中任一个的衍生物，其中 GLP-1 肽包含 Lys²⁶ 和 Lys³⁷。
- [0569] 46. 实施方案 1-44 中任一个的衍生物，其中 GLP-1 肽包含 Lys¹⁸ 和 Lys²⁶。
- [0570] 47. 实施方案 45 和 46 中任一个的衍生物，其中 GLP-1 肽包含 Gln³⁴ 或 Arg³⁴。
- [0571] 48. 实施方案 1-44 中任一个的衍生物，其中 GLP-1 肽包含 Lys¹⁸ 和 Lys³¹。
- [0572] 49. 实施方案 48 的衍生物，其中 GLP-1 肽包含 Arg²⁶ 和 Arg³⁴。
- [0573] 50. 实施方案 1-49 中任一个的衍生物，其中与 GLP-1 (7-37) (SEQ ID NO : 3) 相比，GLP-1 肽包含下列氨基酸变化：(i) 8Aib、34R、37K；(ii) 8Aib、31H、34Q、37K；(iii) 31H、34Q、37K；(iv) 34R、37K、38E；(v) 18K、22E、34Q；(vi) 8Aib、18K、22E、25V、26R、31K、34R；(vii) 8Aib、18K、22E、34Q；(viii) 8Aib、18K、22E、34Q；(ix) 8Aib、18K、34Q；或 (x) 8Aib、34Q、

37K。

[0574] 51. 实施方案 1-50 中任一个的衍生物, 其中与 GLP-1 (7-37) (SEQ ID NO :3) 相比, GLP-1 肽具有下列氨基酸变化:(i) 8Aib、34R、37K;(ii) 8Aib、31H、34Q、37K;(iii) 31H、34Q、37K;(iv) 34R、37K、38E;(v) 18K、22E、34Q;(vi) 8Aib、18K、22E、25V、26R、31K、34R;(vii) 8Aib、18K、22E、34Q;(iix) 8Aib、18K、22E、34Q;(ix) 8Aib、18K、34Q; 或 (x) 8Aib、34Q、37K。

[0575] 52. 实施方案 1-51 中任一个的衍生物, 其中与 GLP-1 (7-37) (SEQ ID NO :3) 相比, 氨基酸变化的数目通过手写和目测来鉴定。

[0576] 53. 实施方案 1-52 中任一个的衍生物, 其中氨基酸变化的技术和位置是与 GLP-1 (7-37) (SEQ ID NO :3) 比较, 并且通过手写和目测鉴定。

[0577] 54. 实施方案 1-53 中任一个的衍生物, 其中氨基酸变化的技术和位置是与 GLP-1 (7-37) (SEQ ID NO :3) 比较, 并且通过利用标准蛋白质或肽比对程序鉴定。

[0578] 55. 实施方案 54 的衍生物, 其中比对程序为 Needleman-Wunsch 比对。

[0579] 56. 实施方案 54-55 中任一个的衍生物, 其中采用默认计分矩阵和默认单位矩阵。

[0580] 57. 实施方案 54-56 中任一个的衍生物, 其中评分矩阵为 BLOSUM62。

[0581] 58. 实施方案 54-57 中任一个的衍生物, 其中空位中第一残基的罚分为 -10 (负 10)。

[0582] 59. 实施方案 54-58 中任一个的衍生物, 其中空位中其它残基的罚分为 -0.5 (负 0.5)。

[0583] 60. 实施方案 1-59 中任一个的衍生物, 其中延长部分选自化学式 15 和化学式 16:

[0584] 化学式 15 : $\text{HOO}-(\text{CH}_2)_x-\text{CO}-*$

[0585] 化学式 16 : $\text{HOO}-\text{C}_6\text{H}_4-\text{O}-(\text{CH}_2)_y-\text{CO}-*$,

[0586] 其中 x 为范围为 6-18 的整数, y 为范围为 3-11 的整数。

[0587] 61. 实施方案 60 的衍生物, 其中 x 为偶数。

[0588] 62. 实施方案 60-61 中任一个的衍生物, 其中 x 为 12。

[0589] 63. 实施方案 60-62 中任一个的衍生物, 其中 y 为奇数

[0590] 64. 实施方案 60-63 中任一个的衍生物, 其中 y 为 7、9 或 11。

[0591] 65. 实施方案 60-64 中任一个的衍生物, 其中 y 为 9。

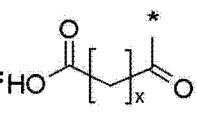
[0592] 66. 实施方案 60-62 中任一个的衍生物, 其中 y 为偶数。

[0593] 67. 实施方案 66 的衍生物, 其中 y 为 10。

[0594] 68. 实施方案 60-67 中任一个的衍生物, 其中延长部分为化学式 15。

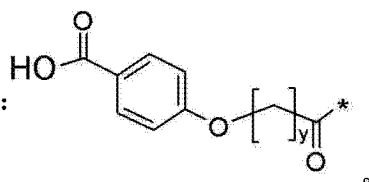
[0595] 69. 实施方案 60-67 中任一个的衍生物, 其中延长部分为化学式 16。

[0596] 70. 实施方案 60-68 中任一个的衍生物, 其中化学式 15 用化学式 15a 表示:

[0597] 化学式 15a : 

[0598] 71. 实施方案 60-67 和 69 的衍生物, 其中化学式 16 用化学式 16a 表示:

[0599] 化学式 16a :



- [0600] 72. 实施方案 1-71 中任一个的衍生物, 其中至少两个延长部分基本相同。
- [0601] 73. 实施方案 1-72 中任一个的衍生物, 其中至少两个延长部分具有以下相似性: 至少 0.5; 优选至少 0.6; 更优选至少 0.7, 或至少 0.8; 甚至更优选至少 0.9; 或最优选至少 0.99, 例如 1.0 的相似性。
- [0602] 74. 实施方案 1-73 中任一个的衍生物, 其中至少 2 个接头基本相同。
- [0603] 75. 实施方案 1-74 中任一个的衍生物, 其中至少 2 个接头具有以下相似性: 至少 0.5; 优选至少 0.6; 更优选至少 0.7, 或至少 0.8; 甚至更优选至少 0.9; 或最优选至少 0.99, 例如 1.0 的相似性。
- [0604] 76. 实施方案 1-75 中任一个的衍生物, 其中由延长部分和接头组成的至少 2 个侧链基本相同。
- [0605] 77. 实施方案 1-76 中任一个的衍生物, 其中由延长部分和接头组成的至少 2 个侧链具有以下相似性: 至少 0.5; 优选至少 0.6; 更优选至少 0.7, 或至少 0.8; 甚至更优选至少 0.9; 或最优选至少 0.99, 例如 1.0 的相似性。
- [0606] 78. 实施方案 73、75 和 77 中任一个的衍生物, 其中至少 2 个待比较的化学结构以指纹表示, 例如 a) ECFP₆ 指纹; b) UNITY 指纹; 和 / 或 c) MDL 指纹; 且其中对于 a)、b) 和 c) 的每一个, 优选应用 Tanimoto 系数以计算两个指纹的相似性。
- [0607] 79. 实施方案 1-78 中任一个的衍生物, 其中接头为肽。
- [0608] 80. 实施方案 1-79 中任一个的衍生物, 其中接头为包含 3-7 个氨基酸残基的肽。
- [0609] 81. 实施方案 1-80 中任一个的衍生物, 其中接头为由 3-7 个氨基酸残基组成的肽。
- [0610] 82. 实施方案 1-81 中任一个的衍生物, 其中接头与各 Lys 残基的 ϵ -氨基连接。
- [0611] 83. 实施方案 1-82 中任一个的衍生物, 其中接头的 C 端与各 Lys 残基的 ϵ -氨基连接。
- [0612] 84. 实施方案 1-83 中任一个的衍生物, 其中延长部分和接头通过酰胺键相互连接。
- [0613] 85. 实施方案 1-84 中任一个的衍生物, 其中接头的 N 端与延长部分的 *-CO 端连接。
- [0614] 86. 一种化合物或其药学上可接受的盐、酰胺或酯, 优选实施方案 1-85 中任一个的化合物, 选自: 化学式 20、化学式 21、化学式 22、化学式 23、化学式 24、化学式 25、化学式 26、化学式 27、化学式 28 和化学式 29。
- [0615] 87. 一种化合物或其药学上可接受的盐、酰胺或酯, 所述化合物通过其名称表征, 并选自本文实施例 1-10 的化合物各个名称的列表。
- [0616] 88. 实施方案 86 的化合物, 其是实施方案 87 的化合物。
- [0617] 89. 实施方案 1-82 中任一个的衍生物, 其具有 GLP-1 活性。
- [0618] 90. 实施方案 89 的衍生物, 其中 GLP-1 活性是指激活人 GLP-1 受体的能力。
- [0619] 91. 实施方案 90 的衍生物, 其中人 GLP-1 受体的激活作为 cAMP 产生的效能能在体外

测定法中测量。

[0620] 92. 实施方案 1-91 中任一个的衍生物,其具有相当于以下 EC_{50} 的效能:

[0621] a) 低于 500pM,优选低于 400pM,更优选低于 300pM,甚至更优选低于 250pM 或最优选低于 200pM;或

[0622] b) 低于 150pM,优选低于 125pM,更优选低于 100pM,甚至更优选低于 60pM 或最优选低于 50pM。

[0623] 93. 实施方案 92 的衍生物,其中测定效能为在含有人 GLP-1 受体的培养基中刺激 cAMP 形成的 EC_{50} 。

[0624] 94. 实施方案 93 的衍生物,其中使用稳定转染的细胞系例如 BHK467-12A(tk-ts13)。

[0625] 95. 实施方案 93-94 中任一个的衍生物,其中采用功能性受体测定法以测定 cAMP。

[0626] 96. 实施方案 93-95 中任一个的衍生物,其中所述测定法基于内源形成的 cAMP 和外源添加的生物素标记的 cAMP 之间的竞争。

[0627] 97. 实施方案 93-96 中任一个的衍生物,其中 cAMP 使用特异性抗体俘获。

[0628] 98. 实施方案 93-97 中任一个的衍生物,其中测定法是 AlphaScreen cAMP 测定法,优选本文实施例 11 描述的测定法。

[0629] 99. 实施方案 1-98 中任一个的衍生物,在 0.005% HSA(低白蛋白)存在下,对于其的 GLP-1 受体结合亲和力 (IC_{50}) 为

[0630] a) 低于 50nM,优选低于 25nM,还更优选低于 20nM,甚至更优选低于 10nM 或最优选低于 5.0nM;或

[0631] b) 低于 1.0nM,或更优选低于 0.50nM。

[0632] 100. 实施方案 99 的衍生物,其中优选采用 SPA 结合测定法,通过从受体置换 ^{125}I -GLP-1 的方式,测量与 GLP-1 受体的结合亲和力。

[0633] 101. 实施方案 100 的衍生物,其中使用稳定转染的细胞系,优选仓鼠细胞系,更优选幼仓鼠肾细胞系,例如 BHK tk-ts13,来制备 GLP-1 受体。

[0634] 102. 实施方案 99-101 中任一个的衍生物,其中 IC_{50} 值测定为从受体置换 50%的 ^{125}I -GLP-1 的浓度。

[0635] 103. 一种药物组合物,其包含实施方案 1-102 中任一个的衍生物和药学上可接受的赋形剂。

[0636] 104. 用作药物的实施方案 1-102 中任一个的衍生物。

[0637] 105. 实施方案 1-102 中任一个的衍生物,其用于治疗 and / 或预防所有形式的糖尿病和相关疾病,例如进食障碍、心血管疾病、肠胃道疾病、糖尿病并发症、危重疾病和 / 或多囊性卵巢综合征;和 / 或用于改善脂质参数,改善 β 细胞功能,和 / 或用于延缓或防止糖尿病疾病进展。

[0638] 106. 实施方案 1-92 中任一个的衍生物在制备用于以下方面的药物中的用途:治疗和 / 或预防所有形式的糖尿病和相关疾病,例如进食障碍、心血管疾病、肠胃道疾病、糖尿病并发症、危重疾病和 / 或多囊性卵巢综合征;和 / 或用于改善脂质参数,改善 β 细胞功能,和 / 或用于延缓或防止糖尿病疾病进展。

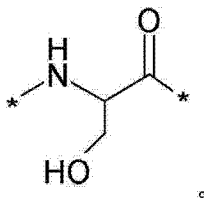
[0639] 107. 一种方法,其通过给予药学活性量的实施方案 1-102 中任一个的衍生物,治

疗或预防所有形式的糖尿病和相关疾病,例如进食障碍、心血管疾病、肠胃道疾病、糖尿病并发症、危重疾病和 / 或多囊性卵巢综合征;和 / 或用于改善脂质参数,改善 β 细胞功能,和 / 或用于延缓或防止糖尿病疾病进展。

[0640] 以下为本发明更进一步的具体实施方案:

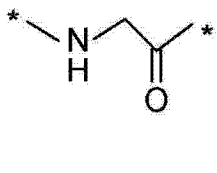
[0641] i). GLP-1 肽的衍生物,所述肽包含至少 2 个 Lys 残基,其中延长部分通过包含化学式 1 的接头与各 Lys 残基的 ϵ 氨基连接:

[0642]



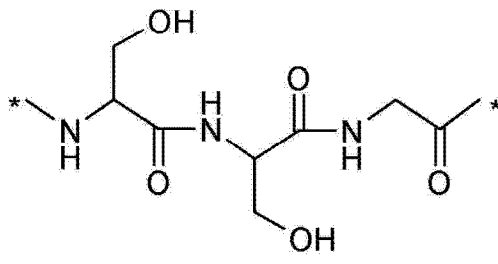
[0643] ii). 实施方案 1-2 中任一个的衍生物,其中接头还包含化学式 2:

[0644]



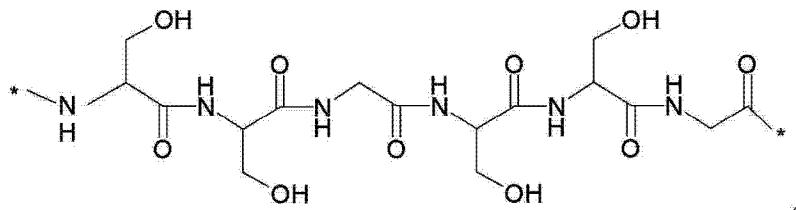
[0645] iii). 实施方案 i)-ii) 中任一个的衍生物,其中接头包含化学式 3:

[0646]



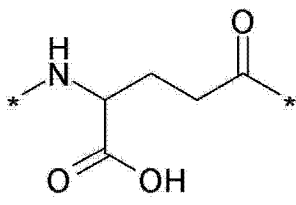
[0647] iv). 实施方案 i)-iii) 中任一个的衍生物,其中接头包含化学式 4:

[0648]



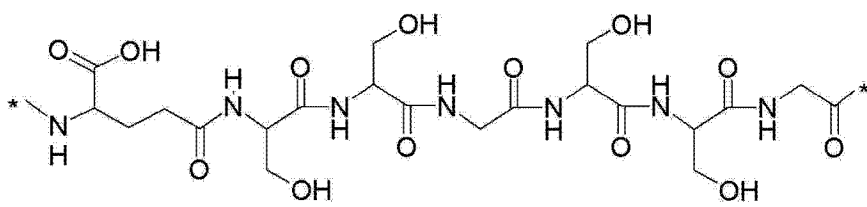
[0649] v). 实施方案 i)-iv) 中任一个的衍生物,其中接头还包含化学式 5:

[0650]



[0651] vi). 实施方案 i)-v) 中任一个的衍生物,其中接头包含化学式 6:

[0652]



[0653] vii). 实施方案 i)-vi) 中任一个的衍生物, 其中 GLP-1 肽为 GLP-1 (7-37) (SEQ ID NO :3) 或其与 GLP-1 (7-37) (SEQ ID NO :3) 相比具有最多 10 个氨基酸变化的类似物。

[0654] iix). 实施方案 i)-vii) 中任一个的衍生物, 其中延长部分选自化学式 15 和化学式 16 :

[0655] 化学式 15 : $\text{HOOC}-(\text{CH}_2)_x-\text{CO}-*$

[0656] 化学式 16 : $\text{HOOC}-\text{C}_6\text{H}_4-\text{O}-(\text{CH}_2)_y-\text{CO}-*$,

[0657] 其中 x 为范围为 6-18 的整数, y 为范围为 3-11 的整数。

[0658] ix). 一种选自以下的化合物或其药学上可接受的盐、酰胺或酯 : 化学式 20、化学式 21、化学式 22、化学式 23、化学式 24、化学式 25、化学式 26、化学式 27、化学式 28 和化学式 29。

[0659] x). 一种药物组合物, 其包含实施方案 i)-ix) 中任一个的衍生物和药学上可接受的赋形剂。

[0660] xi). 用作药物的实施方案 i)-ix) 中任一个的衍生物。

[0661] xii). 实施方案 i)-ix) 中任一个的衍生物, 用于治疗和 / 或预防所有形式的糖尿病和相关疾病, 例如进食障碍、心血管疾病、肠胃道疾病、糖尿病并发症、危重疾病和 / 或多囊性卵巢综合征 ; 和 / 或用于改善脂质参数, 改善 β 细胞功能, 和 / 或用于延缓或防止糖尿病疾病进展。

[0662] xiii). 实施方案 i)-ix) 中任一个的衍生物在制备用于以下方面的药物中的用途 : 治疗和 / 或预防所有形式的糖尿病和相关疾病, 例如进食障碍、心血管疾病、肠胃道疾病、糖尿病并发症、危重疾病和 / 或多囊性卵巢综合征 ; 和 / 或用于改善脂质参数, 改善 β 细胞功能, 和 / 或用于延缓或防止糖尿病疾病进展。

[0663] xiv). 一种方法, 其通过给予药学活性量的实施方案 i)-ix) 中任一个的衍生物, 用于治疗或预防所有形式的糖尿病和相关疾病, 例如进食障碍、心血管疾病、肠胃道疾病、糖尿病并发症、危重疾病和 / 或多囊性卵巢综合征 ; 和 / 或用于改善脂质参数, 改善 β 细胞功能, 和 / 或用于延缓或防止糖尿病疾病进展。

[0664] 实施例

[0665] 该实验部分始于缩略语列表, 接下来为包括用于合成和表征本发明的类似物和衍生物的通用方法的部分。然后接着涉及制备具体 GLP-1 衍生物的多个实施例, 最后包括涉及这些类似物和衍生物的活性和性质的多个实施例 (题名为药理学方法的部分)。

[0666] 实施例用于说明本发明。

[0667] 缩略语列表

[0668] Aib : α -氨基异丁酸

[0669] API : 活性药物成分

[0670] AUC : 曲线下面积

[0671] BHK 幼仓鼠肾

- [0672] Boc : 叔丁氧基羰基
- [0673] BSA : 牛血清白蛋白
- [0674] CAS : 化学文摘服务
- [0675] Clt : 2- 氯三苯甲基
- [0676] collidine : 2,4,6- 三甲基吡啶
- [0677] DCM : 二氯甲烷
- [0678] DesH : 脱氨基组氨酸 (亦可称为咪唑并丙酸, Imp)
- [0679] DIC : 二异丙基碳二亚胺
- [0680] DIPEA : 二异丙基乙胺
- [0681] DMEM : Dulbecco 改良 Eagle 培养基 (DMEM)
- [0682] EDTA : 乙二胺四乙酸
- [0683] EGTA : 乙二醇四乙酸
- [0684] Fmoc : 9- 芴基甲氧基羰基
- [0685] HATU : (六 氟 磷 酸 0-(7- 氮 杂 苯 并 三 唑 -1- 基)-1,1,3,3- 四 甲 基 脲 鎓)
- [0686] HBTU : (六 氟 磷 酸 2-(1H- 苯 并 三 唑 -1- 基 -)-1,1,3,3- 四 甲 基 脲 鎓)
- [0687] HEPES : 4-(2- 羟基乙基)-1- 哌嗪乙磺酸
- [0688] HFIP 1,1,1,3,3,3- 六 氟 -2- 丙醇或六氟异丙醇
- [0689] HOAt : 1- 羟基 -7- 氮杂苯并三唑
- [0690] HPLC : 高效液相色谱法
- [0691] HSA : 人血清白蛋白
- [0692] IBMX : 3- 异丁基 -1- 甲基黄嘌呤
- [0693] Imp : 咪唑并丙酸 (亦称脱氨基组氨酸, DesH)
- [0694] i. v. 静脉内
- [0695] ivDde : 1-(4,4- 二甲基 -2,6- 二氧代亚环己基)-3- 甲基丁基
- [0696] LCMS : 液相色谱质谱联用法
- [0697] MALDI-MS : 参见 MALDI-TOF MS
- [0698] MALDI-TOF MS : 基质辅助激光解吸 / 电离飞行时间质谱法
- [0699] MeOH : 甲醇
- [0700] Mmt : 4- 四甲氧基三苯甲基
- [0701] Mtt : 4- 甲基三苯甲基
- [0702] NMP : N- 甲基吡咯烷酮
- [0703] OEG : 8- 氨基 -3,6- 二氧杂辛酸
- [0704] OtBu : 叔丁酯
- [0705] Pbf : 2,2,4,6,7- 五甲基二氢苯并呋喃 -5- 磺酰基
- [0706] PBS : 磷酸缓冲盐水
- [0707] Pen/Strep : 青霉素 / 链霉素
- [0708] RP : 反相

- [0709] RP-HPLC：反相高效液相色谱法
- [0710] RT：室温
- [0711] Rt：保留时间
- [0712] s. c.：皮下
- [0713] SEC-HPLC：大小排阻高效液相色谱法
- [0714] SPA：闪烁逼近分析法
- [0715] SPPS：固相肽合成
- [0716] tBu：叔丁基
- [0717] TFA：三氟乙酸
- [0718] TIS：三异丙基甲硅烷
- [0719] Tris：三(羟基甲基)氨基甲烷或 2-氨基-2-羟基甲基-丙烷-1,3-二醇 -1,
- [0720] UPLC：超高效液相色谱法
- [0721] 材料与方法
- [0722] 材料
- [0723] N- α , N- β -二-Fmoc-L-2,3-二氨基丙酸 (CAS201473-90-7)
- [0724] 3,5-二-叔丁基-4-羟基苯甲酸 (CAS1421-49-4)
- [0725] 3,5-二-叔丁基苯甲酸 (CAS16225-26-6)
- [0726] Fmoc-8-氨基-3,6-二氧杂辛酸 (CAS166108-71-0)
- [0727] 17-(9-苄基甲氧基羰基-氨基)-9-氮杂-3,6,12,15-四氧杂-10-酮-十七烷酸 (IRIS Biotech GmbH)
- [0728] Fmoc-L-谷氨酸 1-叔丁酯 (CAS84793-07-7)
- [0729] 2-(2-甲氧基乙氧基)乙酸 (CAS16024-56-9)
- [0730] N- α , N- ϵ -双(9-苄基甲氧基羰基)-L-赖氨酸 (CAS78081-87-5)
- [0731] 1-[(9H-苄-9-基甲氧基)羰基]哌啶-4-甲酸 (CAS148928-15-8)
- [0732] FMOC-8-氨基辛酸 (CAS126631-93-4)
- [0733] FMOC-6-氨基己酸 (CAS88574-06-5)
- [0734] FMOC-12-氨基十二烷酸 (CAS128917-74-8)
- [0735] 4-(9-羧基-壬氧基)-苯甲酸叔丁酯(按 W02006/082204 的实施例 25 步骤 1 和 2 所述制备)
- [0736] 4-(8-羧基-辛氧基)-苯甲酸叔丁酯 (M. p. :71-72°C .
- [0737] ^1H NMR(300MHz, CDCl_3 , δ_{H}):7.93(d, J = 8.9Hz, 2H) ;6.88(d, J = 8.9Hz, 2H) ; 4.00(t, J = 6.4Hz, 2H) ;2.36(t, J = 7.4Hz, 2H) ;1.80(m, 2H) ;1.65(m, 2H) ;1.59(s, 9H) ; 1.53-1.30(m, 8H) (按 W02006/082204 的实施例 25 步骤 1 和 2 所述制备,用 9-溴壬酸乙酯 (CAS28598-81-4) 置换 10-溴癸酸甲酯)
- [0738] 4-(7-羧基-庚氧基)-苯甲酸叔丁酯 (^1H NMR 波谱 (300MHz, CDCl_3 , δ_{H}):7.93(d, J = 9.0Hz, 2H) ;6.88(d, J = 9.0Hz, 2H) ;4.00(t, J = 6.5Hz, 2H) ;2.37(t, J = 7.4Hz, 2H) ; 1.80(m, 2H) ;1.64(m, 2H) ;1.59(s, 9H) ;1.53-1.33(m, 6H)) (按 W02006/082204 的实施例 25 步骤 1 和 2 所述制备,用 7-溴庚酸乙酯 (CAS29823-18-5) 置换 10-溴癸酸甲酯)

[0739] 化学方法

[0740] 该部分分成两个：部分 A 涉及通用方法（制备 (A1) 及检测和表征 (A2)），和部分 B，其中描述了多个具体实施例化合物的制备和表征。

[0741] A. 通用方法

[0742] A1. 制备方法

[0743] 该部分涉及用于固相肽合成的方法（SPPS 方法，包括氨基酸的脱保护的方法、从树脂上切割肽的方法和其纯化的方法），以及用于检测和表征所得肽的方法（LCMS、MALDI 和 UPLC 方法）。在某些情况下，可使用在二肽酰胺键上用在酸性条件下可被切割的基团（例如但不限于 2-Fmoc-氧基-4-甲氧基苄基或 2,4,6-三甲氧基苄基）保护的二肽，改进肽的固相合成。在其中丝氨酸或苏氨酸存在于肽中的情况下，可使用假脯氨酸（pseudoproline）二肽（可获自例如 Novabiochem，另参见 w. R. Sampson (1999)，J. Pep. Sci. 5, 403）。所使用的 Fmoc 保护的氨基酸衍生物是标准推荐的：Fmoc-Ala-OH、Fmoc-Arg(Pbf)-OH、Fmoc-Asn(Trt)-OH、Fmoc-Asp(OtBu)-OH、Fmoc-Cys(Trt)-OH、Fmoc-Gln(Trt)-OH、Fmoc-Glu(OtBu)-OH、Fmoc-Gly-OH、Fmoc-His(Trt)-OH、Fmoc-Ile-OH、Fmoc-Leu-OH、Fmoc-Lys(Boc)-OH、Fmoc-Met-OH、Fmoc-Phe-OH、Fmoc-Pro-OH、Fmoc-Ser(tBu)-OH、Fmoc-Thr(tBu)-OH、Fmoc-Trp(Boc)-OH、Fmoc-Tyr(tBu)-OH 或 Fmoc-Val-OH 等，由例如 Anaspec、Bachem、Iris Biotech 或 Novabiochem 供应。要是没有其它说明，则使用天然 L-型的氨基酸。N 端氨基酸是在 α 氨基上被 Boc 保护的（例如对于在 N 端具有 His 的肽，Boc-His(Boc)-OH 或 Boc-His(Trt)-OH）。在使用 SPPS 的模块化白蛋白结合部分连接的情况下，使用下列适当保护的结构单元，例如但不限于 Fmoc-8-氨基-3,6-二氧杂辛酸、Fmoc-凝血酸、Fmoc-Glu-OtBu、十八烷二酸一叔丁酯、十九烷二酸一叔丁酯、十四烷二酸一叔丁酯或 4-(9-羧基壬氧基)苯甲酸叔丁酯。下面所述的所有操作均在 250 μmol 合成规模下进行。

[0744] 1. 树脂结合保护的肽主链的合成

[0745] 方法：SPPS_A

[0746] 采用生产商供应的 FastMoc UV 方案，以 250 μmol 或 1000 μmol 规模，用 3 或 4 倍过量的 Fmoc-氨基酸，在 Applied Biosystems 433 肽合成仪中，按照 Fmoc 策略合成被保护的肽基树脂，所述方案利用 HBTU（六氟磷酸 2-(1H-苯并三唑-1-基)-1,1,3,3-四甲基脲鎓）或 HATU（六氟磷酸 O-(7-氮杂苯并三唑-1-基)-1,1,3,3-四甲基脲鎓）在 NMP 中介导的偶联和紫外监测 Fmoc 保护基的脱保护。在某些情况下使用双重偶联，这意味着在第一次偶联后，沥干树脂，并加入更多的 Fmoc-氨基酸和试剂。对于具有羧基 C 端的肽，用于合成肽酰胺的起始树脂为 Rink-酰胺树脂和预载的 Wang（例如低载 Fmoc-Gly-Wang 或 Fmoc-Lys(Mtt)-wang）或氯三苯甲基树脂。除了非天然氨基酸例如 Fmoc-Aib-OH（Fmoc-氨基异丁酸）以外，所用的受保护的氨基酸衍生物为以适于 ABI433A 合成仪的预称重柱体供应的标准 Fmoc-氨基酸（由例如 Anaspec 或 Novabiochem 供应）。N 端氨基酸是在 α 氨基上被 Boc 保护的（对于在 N 端具有 His 的肽，使用例如 Boc-His(Boc)-OH 或 Boc-His(Trt)-OH）。序列中赖氨酸的 ϵ 氨基被 Mtt、Mmt、Dde、ivDde 或 Boc 保护，这取决于白蛋白结合部分和间隔区连接的路线。在某些情况下，肽的合成可通过使用在二肽酰胺键上用在酸性条件下可被切割的基团（例如但不限于 2-Fmoc-氧基-4-甲氧基苄基或 2,4,6-三甲氧基苄基）保护的二肽来改进。在其中丝氨酸或苏氨酸存在于肽中的

情况下,可使用假脯氨酸二肽(参见例如 Novobiochem2009/2010 或更新版本的目录,或 W. R. Sampson(1999), J. Pep. Sci. 5, 403)。

[0747] 方法:SPPS_P

[0748] 在得自 Protein Technologies(Tucson, AZ85714U.S.A.)的 Prelude 固相肽合成仪(Prelude Solid Phase Peptide Synthesizer)上,以 250 μmol 规模,使用相对于树脂负载(例如低载 Fmoc-Gly-Wang(0.35mmol/g))的 6 倍过量的 Fmoc-氨基酸(300mM 于 NMP 中,含 300mM HOAt 或 Oxyma **Pure®**),进行 SPPS_P。使用含 20%哌啶的 NMP 进行 Fmoc 脱保护。使用含 3 : 3 : 3 : 4 氨基酸/(HOAt 或 Oxyma **Pure®**)/DIC/三甲基吡啶的 NMP 进行偶联。在脱保护和偶联步骤间进行 NMP 和 DCM 顶部洗涤(7ml, 0.5 分钟,各 2x2)。偶联时间一般为 60 分钟。一些氨基酸,包括但不限于 Fmoc-Arg(Pbf)-OH、Fmoc-Aib-OH 或 Boc-His(Trt)-OH,是“双重偶联的”,这意味着在第一次偶联后(例如 60 分钟),将树脂沥干,并加入更多试剂(氨基酸、(HOAt 或 Oxyma **Pure®**)、DIC 和三甲基吡啶),使混合物再次反应(例如 60 分钟)。

[0749] 方法:SPPS_CS

[0750] 采用利用 2-氰基-2-(羟基亚氨基)乙酸乙酯和二异丙基碳二亚胺在 NMP 中介导的偶联的方案,按照标准 Fmoc 策略,在定制的 CS Bio 肽合成仪上,以 250 μmol -6000 μmol 规模,用 4 倍过量的预活化的 Fmoc-氨基酸合成肽主链。采用紫外监测以确保通过用含 20%哌啶的 NMP 处理完成 Fmoc 脱保护。在某些情况下使用双重偶联,这意味着在第一次偶联后,将树脂沥干,并加入更多预活化的 Fmoc-氨基酸。对于具有羧基 C 端的肽,用于合成肽酰胺的起始树脂为 Rink-酰胺树脂和预载的 Wang(例如低载 Fmoc-Gly-Wang 或 Fmoc-Lys(Mtt)-wang)或氯三苯甲基树脂。所用的受保护的氨基酸衍生物为标准 Fmoc-氨基酸(由例如 Anaspec 或 Novabiochem 供应)。N 端氨基酸是在 α 氨基上被 Boc 保护的(例如对于在 N 端具有 His 的肽,使用 Boc-His(Boc)-OH 或 Boc-His(Trt)-OH)。序列中赖氨酸的 ϵ 氨基用 Mtt、Mmt、Dde、ivDde 或 Boc 保护,这取决于白蛋白结合部分和间隔区连接的路线。在某些情况下,肽的合成可通过使用在二肽酰胺键上用在酸性条件下可被切割的基团(例如但不限于 2-Fmoc-氧基-4-甲氧基苄基或 2,4,6-三甲氧基苄基)保护的二肽来改进。在其中丝氨酸或苏氨酸存在于肽中的情况下,可使用假脯氨酸二肽(参见例如 Novobiochem2011/2012 或更新版本的目录,或 W. R. Sampson(1999), J. Pep. Sci. 5, 403)。

[0751] 方法:SPPS_L

[0752] 在得自 CEM Corp. (Matthews, NC28106, U.S.A.)的基于微波的 Liberty 肽合成仪上,以 250 μmol 或 100 μmol 规模,使用相对于树脂负载(例如低载 Fmoc-Gly-Wang(0.35mmol/g))6 倍过量的 Fmoc-氨基酸(300mM 于 NMP 中,含 300mM HOAt 或 Oxyma **Pure®**),进行 SPPS_L。使用含 5%哌啶的 NMP 在高达 75°C 下进行 Fmoc 脱保护 30 秒钟,此时在树脂沥干并用 NMP 洗涤后,在 75°C 下重复 Fmoc 脱保护这次达 2 分钟。使用含 1 : 1 : 1 氨基酸/(HOAt 或 Oxyma **Pure®**)/DIC 的 NMP 进行偶联。偶联时间和温度一般为高达 75°C 5 分钟。对于较大规模反应使用较长的偶联时间,例如 10 分钟。使组氨酸氨基酸在 50°C 下双重偶联,或者如果前一个氨基酸是位阻的(例如 Aib)则为四重偶联。精氨酸氨基酸在室温下偶联 25 分钟,然后加热至 75°C 5 分钟。一些氨基酸,例如但不限于 Aib,是“双重偶联的”,这意味着在第一次偶联后(例如在 75°C 下 5 分钟),将树脂沥干,并加入

更多试剂（氨基酸、HOAt 或 Oxyma Pure®）和 DIC），再加热混合物（例如在 75℃ 下 5 分钟）。在脱保护和偶联步骤间进行 NMP 洗涤（5x10ml）。

[0753] 2. 侧链的合成

[0754] 脂肪二酸的单酯

[0755] C8、C10、C12、C14、C16 和 C18 二酸与 Boc- 酐 DMAP 叔丁醇在甲苯中过夜回流主要得到叔丁基单酯。在后处理后得到单酸、二酸和二酯的混合物。通过洗涤、短塞二氧化硅过滤和结晶进行纯化。

[0756] 3. 侧链与树脂结合保护的肽主链的连接

[0757] 当酰化存在于赖氨酸侧链上时，待酰化的赖氨酸的 ϵ 氨基用 Mtt、Mmt、Dde、ivDde 或 Boc 保护，这取决于延长部分和接头连接的路线。用含 2% 胍的 NMP (2x20ml, 各 10 分钟) 进行 Dde- 或 ivDde- 脱保护，接着 NMP 洗涤 (4x20ml)。用 2% TFA 和含 2-3% TIS 的 DCM (5x20ml, 各 10 分钟) 进行 Mtt- 或 Mmt- 脱保护，接着 DCM (2x20ml)、10% MeOH 和含 5% DIPEA 的 DCM (2x20ml) 和 NMP (4x20ml) 洗涤，或者用六氟异丙醇 /DCM (75 : 25, 5x20ml, 各 10 分钟) 处理，接着如上洗涤。在某些情况下，在 Liberty 肽合成仪上通过自动化步骤除去 Mtt 基团。用六氟异丙醇或六氟异丙醇 /DCM (75 : 25) 在室温下进行 Mtt 脱保护 30 分钟，接着用 DCM (7mlx5) 洗涤，接着 NMP 洗涤 (7mlx5)。延长部分和 / 或接头可通过树脂结合的肽的酰化或通过未保护的肽的溶液中的酰化与肽连接。在延长部分和 / 或接头与保护的肽基树脂连接的情况下，连接可使用 SPPS 和适当保护的结构单元模块化。

[0758] 方法 :SC_P

[0759] 如果 N- ϵ -赖氨酸保护基团为 Mtt，则 Mtt 基团用净 HFIP (3x15 分钟) 除去，接着 DCM 洗涤，并在 Prelude 肽合成仪中进行酰化 ((10eq. Fmoc-AA, 10eq. DIC 和 10eq. HOAt, 10eq. 三甲基吡啶 30 分钟和含 25% 哌啶的 NMP 以除去 Fmoc 基团)。使 Fmoc-Glu-OtBu 双重偶联 4 小时。采用类似条件连接末端残基。

[0760] 方法 :SC_A

[0761] 如果 N- ϵ -赖氨酸保护基团为 Mtt，则通过用六氟异丙醇 (5-10mlx2, 各 10 分钟, 0.12-0.25mmol 规模) 处理进行 Mtt- 脱保护，接着用 DCM (8ml x6) 洗涤。采用生产商供应的 FastMoc UV 方案，采用 Fmoc 策略，在 Applied Biosystems433 肽合成仪上以 125- μ mol 或 250 μ mol 规模，用 4 倍过量的 Fmoc-氨基酸和白蛋白结合部分，通过树脂结合的肽的酰化使 Fmoc 氨基酸和白蛋白结合部分与肽连接，所述方案利用 HBTU (六氟磷酸 2-(1H-苯并三唑-1-基)-1,1,3,3-四甲基脲鎓) 或 HATU (六氟磷酸 O-(7-氮杂苯并三唑-1-基)-1,1,3,3-四甲基脲鎓) 在 NMP (N-甲基吡咯烷酮) 中介导的偶联和紫外监测 Fmoc 保护基的脱保护，在某些情况下使用双重偶联。

[0762] 方法 :SC_CS

[0763] 如上所述除去 N- α -赖氨酸保护基团。采用利用 2-氰基-2-(羟基亚氨基)乙酸乙酯和二异丙基碳二亚胺在 NMP 中介导的偶联的方案，按照标准 Fmoc 策略，在定制的 CS Bio 肽合成仪上，以 250 μ mol-6000 μ mol 规模，用 4 倍过量的预活化的 Fmoc-氨基酸，合成化学修饰的赖氨酸残基。采用紫外监测以确保通过用含 20% 哌啶的 NMP 处理完成 Fmoc 脱保护。在某些情况下使用双重偶联，这意味着在第一次偶联后，将树脂沥干，并加入更多预活化的 Fmoc-氨基酸。所用的受保护的氨基酸衍生物为标准 Fmoc-氨基酸（由例如 Anaspec

或 Novabiochem 供应) 或通过常规有机合成制备的合成酸。

[0764] 4. 含或不含连接的侧链的树脂结合的肽的切割和纯化

[0765] 方法:CP_M1

[0766] 在合成后,树脂用 DCM 洗涤,通过用 TFA/TIS/水 (95/2.5/2.5 或 92.5/5/2.5) 处理 2-3 小时将肽从树脂上切割,接着用乙醚沉淀。将肽溶于合适的溶剂(例如 30%乙酸)中,使用乙腈/水/TFA,通过标准 RP-HPLC 在 C18,5 μ m 柱上纯化。通过 UPLC、MALDI 和 LCMS 方法组合分析流分,合并合适的流分,并冻干。

[0767] A2. 检测和表征的通用方法

[0768] 1. LC-MS 方法

[0769] 方法:LCMS_4

[0770] 在由得自 Micromass 的 waters Acquity UPLC 系统和 LCT Premier XE 质谱仪组成的设置中进行 LCMS_4。洗脱液:A:含 0.1%甲酸的水,B:含 0.1%甲酸的乙腈。通过将适当体积的样品(优选 2-10 μ l)注入柱(该柱用 A 和 B 的梯度洗脱)中,在室温下进行分析。UPLC 条件、检测器设置和质谱仪设置为:柱:Waters Acquity UPLC BEH,C-18,1.7 μ m,2.1mm x50mm。梯度:在 4.0 分钟(或 8.0 分钟)期间以 0.4ml/分钟线性 5%-95%乙腈。检测:214nm(类似物自 TUV(Tunable 紫外检测器)输出)。MS 电离模式:API-ES

[0771] 扫描:100-2000amu(或者 500-2000amu),步骤 0.1amu。

[0772] 方法:LCMS_AP

[0773] 在自由 Waters2525 二元梯度模块、Waters2767 样品管理器、Waters2996 光电二极管阵列检测器和 Waters2420ELS 检测器组成的 HPLC 系统洗脱之后,采用 Micromass Quattro 微型 API 质谱仪进行 LCMS_AP 以鉴定样品的质量。洗脱液:A:含 0.1%三氟乙酸的水;B:含 0.1%三氟乙酸的乙腈。柱:Phenomenex Synergi MAXRP,4 μ m,75x4,6mm。梯度:以 1.0ml/分钟在 7 分钟内的 5%-95% B。

[0774] 2. UPLC 方法

[0775] 方法:B5_1

[0776] 采用配备双频检测器的 Waters UPLC 系统进行 RP- 分析。采用 ACQUITY UPLC BEH130, C18, 130 $\text{\AA}$, 1.7 μ m, 2.1mmx150mm 柱,40 $^{\circ}\text{C}$, 收集 214nm 和 254nm 处的紫外检测。将 UPLC 系统与含有以下的 2 个洗脱液贮器连接:A:0.2M Na_2SO_4 ,0.04M H_3PO_4 ,10% CH_3CN (pH3.5);B:70% CH_3CN ,30% H_2O 。使用下列线性梯度:以 0.40ml/分钟的流速在 8 分钟内的 60% A,40% B-30% A,70% B。

[0777] 方法:B7_1

[0778] 采用配备双频检测器的 Waters UPLC 系统进行 RP- 分析。采用 ACQUITY UPLC BEH130, C18, 130 $\text{\AA}$, 1.7 μ m, 2.1mmx150mm 柱,40 $^{\circ}\text{C}$, 收集 214nm 和 254nm 处的紫外检测。将 UPLC 系统与含有以下的 2 个洗脱液贮器连接:A:0.2M Na_2SO_4 ,0.04M H_3PO_4 ,10% CH_3CN (pH3.5);B:70% CH_3CN ,30% H_2O 。使用下列线性梯度:以 0.40ml/分钟的流速在 8 分钟内的 80% A,20% B-40% A,60% B。

[0779] 方法:A3_1

[0780] 采用配备双频检测器的 Waters UPLC 系统进行 RP- 分析。采用 ACQUITY UPLC BEH130, C18,130 $\text{\AA}$, 1.7 μ m, 2.1mmx150mm 柱,40 $^{\circ}\text{C}$,收集 214nm 和 254nm 处的紫外检测。将

UPLC 系统与含有以下的 2 个洗脱液贮器连接 :A :90 % H₂O, 10 % CH₃CN, 0. 25M 碳酸氢铵 ;B : 70 % CH₃CN, 30 % H₂O。使用下列线性梯度 :以 0. 40ml/ 分钟的流速在 16 分钟内的 75 % A, 25 % B-45 % A, 55 % B。

[0781] 方法 :A6_1

[0782] 采用配备双频检测器的 Waters UPLC 系统进行 RP- 分析。采用 ACQUITY UPLC BEH130, C18, 130Å, 1. 7um, 2. 1mmx150mm 柱, 40℃, 收集 214nm 和 254nm 处的紫外检测。将 UPLC 系统与含有以下的 2 个洗脱液贮器连接 :A :10mM TRIS, 15mM 硫酸铵, 80 % H₂O, 20 % CH₃CN, pH7. 3 ;B :80 % CH₃CN, 20 % H₂O。使用下列线性梯度 :以 0. 35ml/ 分钟的流速在 16 分钟内的 95 % A, 5 % B-10 % A, 90 % B。

[0783] 方法 :B2_1

[0784] 采用配备双频检测器的 Waters UPLC 系统进行 RP- 分析。采用 ACQUITY UPLC BEH130, C18, 130Å, 1. 7um, 2. 1mmx150mm 柱, 40℃, 收集 214nm 和 254nm 处的紫外检测。将 UPLC 系统与含有以下的 2 个洗脱液贮器连接 :A :99. 95 % H₂O, 0. 05 % TFA ;B :99. 95 % CH₃CN, 0. 05 % TFA。使用下列线性梯度 :以 0. 40ml/ 分钟的流速在 16 分钟内的 95 % A, 5 % B-40 % A, 60 % B。

[0785] 方法 :B14_1

[0786] 采用配备双频检测器的 Waters UPLC 系统进行 RP- 分析。采用 ACQUITY UPLC BEH ShieldRP18, 1. 7um, 2. 1mmx150mm 柱, 50℃, 收集 214nm 和 254nm 处的紫外检测。将 UPLC 系统与含有以下的 2 个洗脱液贮器连接 :A :99. 95 % H₂O, 0. 05 % TFA ;B :99. 95 % CH₃CN, 0. 05 % TFA。使用下列线性梯度 :以 0. 40ml/ 分钟的流速, 在 12 分钟内的 70 % A, 30 % B-40 % A, 60 % B。

[0787] 方法 :B31_1

[0788] 采用配备双频检测器的 Waters UPLC 系统进行 RP- 分析。采用 kinetex1. 7u C18, 100A2. 1x150mm 柱, 60℃, 收集 215nm 和 254nm 处的紫外检测。将 UPLC 系统与含有以下的 2 个洗脱液贮器连接 :A :90 % 水和 10 % MeCN, 含 0. 045M (NH₄)₂HP0₄, pH3. 6, B :20 % 异丙醇, 20 % 水和 60 % CH₃CN。使用下列阶梯梯度 :以 0. 5ml/ 分钟的流速, 2 分钟内的 25 % B 和 75 % A, 然后 15 分钟内的 25 % B, 75 % A-55 % B, 45 % A, 然后 3 分钟内的 55 % B, 45 % A-80 % B, 20 % A。

[0789] 方法 :AP_B4_1

[0790] 采用配备双频检测器的 Waters UPLC 系统进行 RP- 分析。使用 ACQUITY UPLC BEH130, C18, 130Å, 1. 7um, 2. 1mmx150mm 柱, 30℃, 收集 214nm 和 254nm 处的紫外检测。将 UPLC 系统与含有以下的 2 个洗脱液贮器连接 :A :99. 95 % H₂O, 0. 05 % TFA ;B :99. 95 % CH₃CN, 0. 05 % TFA。使用下列线性梯度 :以 0. 30ml/ 分钟的流速, 16 分钟内的 95 % A, 5 % B-5 % A, 95 % B。

[0791] 方法 :B4_1

[0792] 采用配备双频检测器的 Waters UPLC 系统进行 RP- 分析。使用 ACQUITY UPLC BEH130, C18, 130 Å, 1. 7um, 2. 1mmx150mm 柱, 40℃, 收集 214nm 和 254nb 处的紫外检测。将 UPLC 系统与含有以下的 2 个洗脱液贮器连接 :A :99. 95 % H₂O, 0. 05 % TFA ;B :99. 95 % CH₃CN, 0. 05 % TFA。使用下列线性梯度 :以 0. 40ml/ 分钟的流速, 16 分钟内的 95 % A, 5 %

B-5% A, 95% B。

[0793] 方法 :B29_1

[0794] 采用配备双频检测器的 Waters UPLC 系统进行 RP- 分析。使用 Kinetex1.7 μ m C18, 100 Å, 2.1x150mm 柱, 在 60℃ 下, 收集 215nm 和 254nm 处的紫外检测。将 UPLC 系统与含有以下的 2 个洗脱液贮器连接 :A :90% 水和 10% CH₃CN, 含 0.09M (NH₄)₂HPO₄, pH3.6 ;B :20% 异丙醇, 20% 水和 60% CH₃CN。使用下列阶梯梯度 :以 0.5ml/ 分钟的流速, 2 分钟内的 35% B 和 65% A, 然后 15 分钟内的 35% B, 65% A-65% B, 35% A, 然后 3 分钟内的 65% B, 35% A-80% B, 20% A。

[0795] 3. MAIDI-MS 方法

[0796] 方法 :MALDI_MS

[0797] 采用基质辅助激光解吸和电离飞行时间质谱法测定分子量, 在 Microflex 或 Autoflex (Bruker) 中记录。使用 α - 氰基 -4- 羟基肉桂酸的基质。

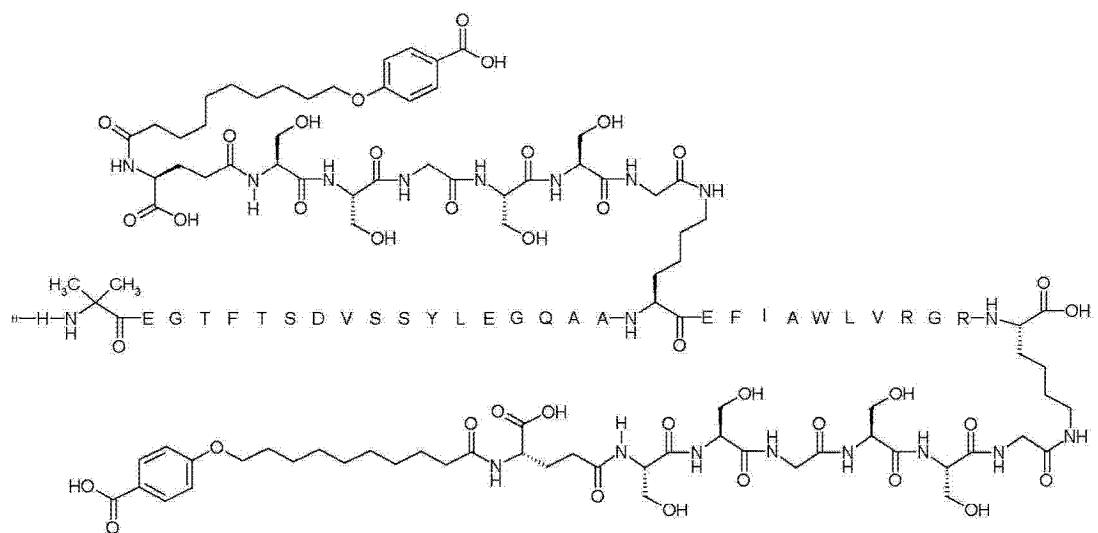
[0798] B. 具体实施例化合物

[0799] 实施例 1

[0800] N^ε26-[2-[[[(2S)-2-[[[(2S)-2-[[2-[[[(2S)-2-[[[(2S)-2-[[[(4S)-4- 羧基 -4-[10-(4- 羧基苯氧基) 癸酰基氨基] 丁酰基] 氨基]-3- 羟基丙酰基] 氨基]-3- 羟基丙酰基] 氨基] 乙酰基] 氨基]-3- 羟基丙酰基] 氨基]-3- 羟基丙酰基] 氨基] 乙酰基], N^ε37-[2-[[[(2S)-2-[[[(2S)-2-[[2-[[[(2S)-2-[[[(2S)-2-[[[(4S)-4- 羧基 -4-[10-(4- 羧基苯氧基) 癸酰基氨基] 丁酰基] 氨基]-3- 羟基丙酰基] 氨基]-3- 羟基丙酰基] 氨基] 乙酰基] 氨基]-3- 羟基丙酰基] 氨基]-3- 羟基丙酰基] 氨基] 乙酰基]-[Aib⁸, Arg³⁴, Lys³⁷]-GLP-1-(7-37)- 肽

[0801] 化学式 20 :

[0802]



[0803] 制备方法 :SPPS_A, SC_A, CP_M1

[0804] UPLC 方法 :B2_1 :Rt = 12.52 分钟

[0805] UPLC 方法 :B5_1 :Rt = 5.50 分钟

[0806] UPLC 方法 :A3_1 :Rt = 9.20 分钟

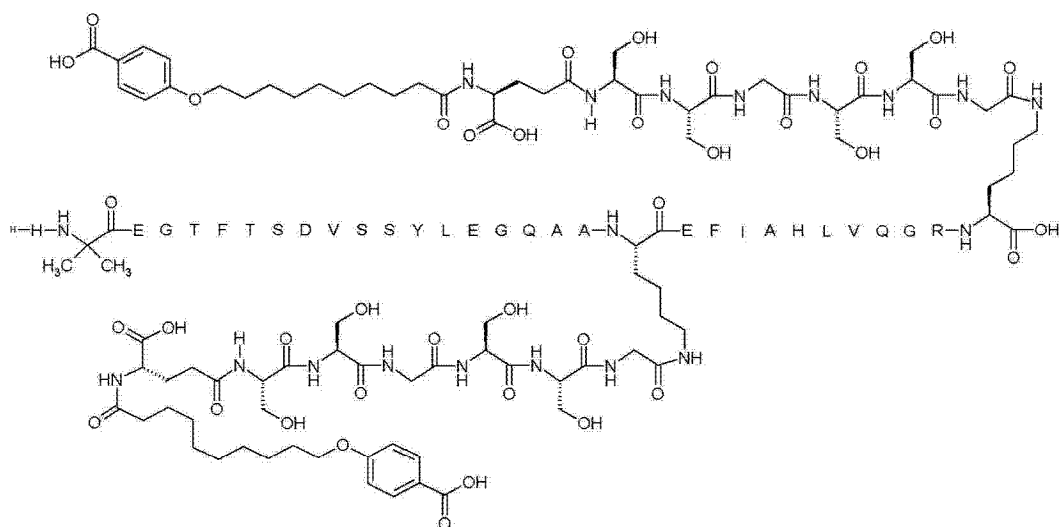
[0807] LCMS 方法 :LCMS_4 :Rt = 2.22 分钟 ;m/3 :1744 ;m/4 :1308 ;m/5 :1347。

[0808] 实施例 2

[0809] $N^{\epsilon 26}$ -[2-[[(2S)-2-[[(2S)-2-[[2-[[(2S)-2-[[(2S)-2-[[(4S)-4-羧基-4-[10-(4-羧基苯氧基)癸酰基氨基]丁酰基]氨基]-3-羟基丙酰基]氨基]-3-羟基丙酰基]氨基]乙酰基]氨基]-3-羟基丙酰基]氨基]-3-羟基丙酰基]氨基]乙酰基], $N^{\epsilon 37}$ -[2-[[(2S)-2-[[(2S)-2-[[2-[[(2S)-2-[[(2S)-2-[[(4S)-4-羧基-4-[10-(4-羧基苯氧基)癸酰基氨基]丁酰基]氨基]-3-羟基丙酰基]氨基]-3-羟基丙酰基]氨基]乙酰基]氨基]-3-羟基丙酰基]氨基]-3-羟基丙酰基]氨基]乙酰基]-[Aib⁸, His³¹, Gln³⁴, Lys³⁷]-GLP-1-(7-37)-肽

[0810] 化学式 21 :

[0811]



[0812] 制备方法 :SPPS_A, SC_A, CP_M1

[0813] UPLC 方法 :B2_1 :Rt = 11.57 分钟

[0814] UPLC 方法 :B7_1 :Rt = 7.74 分钟

[0815] UPLC 方法 :A3_1 :Rt = 6.56 分钟

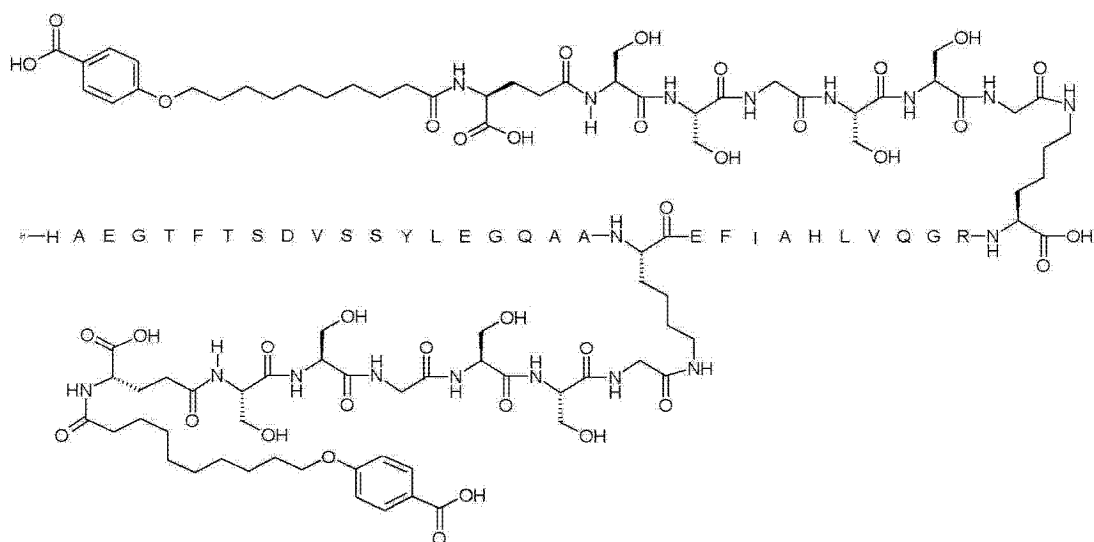
[0816] LCMS 方法 :LCMS_4 :Rt = 1.98 分钟 ;m/3 :1718 ;m/4 :1289 ;m/5 :1032。

[0817] 实施例 3

[0818] $N^{\epsilon 26}$ -[2-[[(2S)-2-[[(2S)-2-[[2-[[(2S)-2-[[(2S)-2-[[(4S)-4-羧基-4-[10-(4-羧基苯氧基)癸酰基氨基]丁酰基]氨基]-3-羟基丙酰基]氨基]-3-羟基丙酰基]氨基]乙酰基]氨基]-3-羟基丙酰基]氨基]-3-羟基丙酰基]氨基]乙酰基], $N^{\epsilon 37}$ -[2-[[(2S)-2-[[(2S)-2-[[2-[[(2S)-2-[[(2S)-2-[[(4S)-4-羧基-4-[10-(4-羧基苯氧基)癸酰基氨基]丁酰基]氨基]-3-羟基丙酰基]氨基]-3-羟基丙酰基]氨基]乙酰基]氨基]-3-羟基丙酰基]氨基]-3-羟基丙酰基]氨基]乙酰基]-[His³¹, Gln³⁴, Lys³⁷]-GLP-1-(7-37)-肽

[0819] 化学式 22 :

[0820]



[0821] 制备方法 :SPPS_A, SC_A, CP_M1

[0822] UPLC 方法 :B14_1 :Rt = 5.39 分钟

[0823] UPLC 方法 :A6_1 :Rt = 4.15 分钟

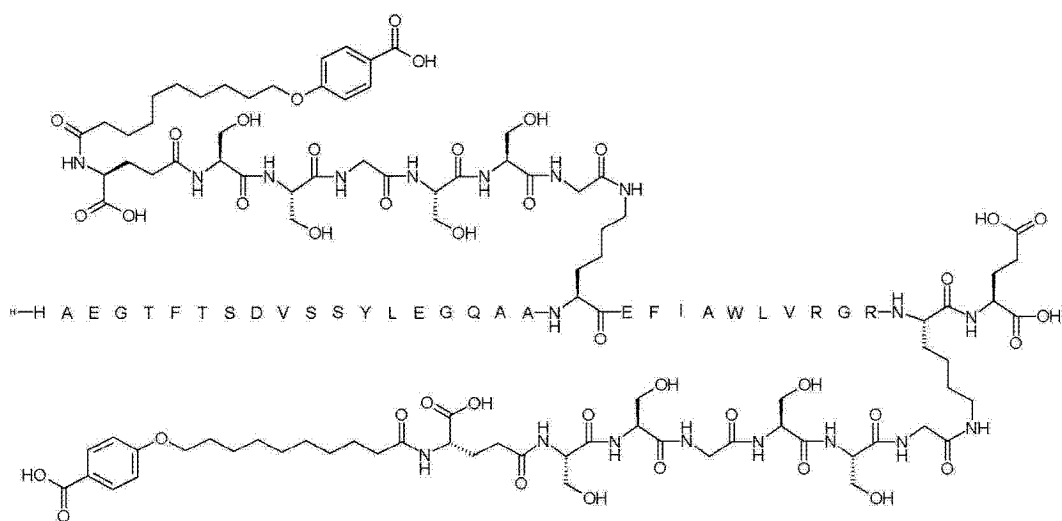
[0824] LCMS 方法 :LCMS_4 :Rt = 1.98 分钟 ;m/3 :1713 ;m/4 :1285 ;m/5 :1028。

[0825] 实施例 4

[0826] $N^{\epsilon 26}$ -[2-[[[(2S)-2-[[[(2S)-2-[[2-[[[(2S)-2-[[[(2S)-2-[[[(4S)-4-羧基-4-[10-(4-羧基苯氧基)癸酰基氨基]丁酰基]氨基]-3-羟基丙酰基]氨基]-3-羟基丙酰基]氨基]乙酰基]氨基]-3-羟基丙酰基]氨基]-3-羟基丙酰基]氨基]乙酰基], $N^{\epsilon 37}$ -[2-[[[(2S)-2-[[[(2S)-2-[[2-[[[(2S)-2-[[[(2S)-2-[[[(4S)-4-羧基-4-[10-(4-羧基苯氧基)癸酰基氨基]丁酰基]氨基]-3-羟基丙酰基]氨基]-3-羟基丙酰基]氨基]乙酰基]氨基]-3-羟基丙酰基]氨基]-3-羟基丙酰基]氨基]乙酰基]-[Arg³⁴, Lys³⁷]-GLP-1-(7-37)-肽基-Glu

[0827] 化学式 23 :

[0828]



[0829] 制备方法 :SPPS_A, SC_A, CP_M1

[0830] UPLC 方法 :B14_1 :Rt = 10.77 分钟

[0831] UPLC 方法 :A6_1 :Rt = 4.13 分钟

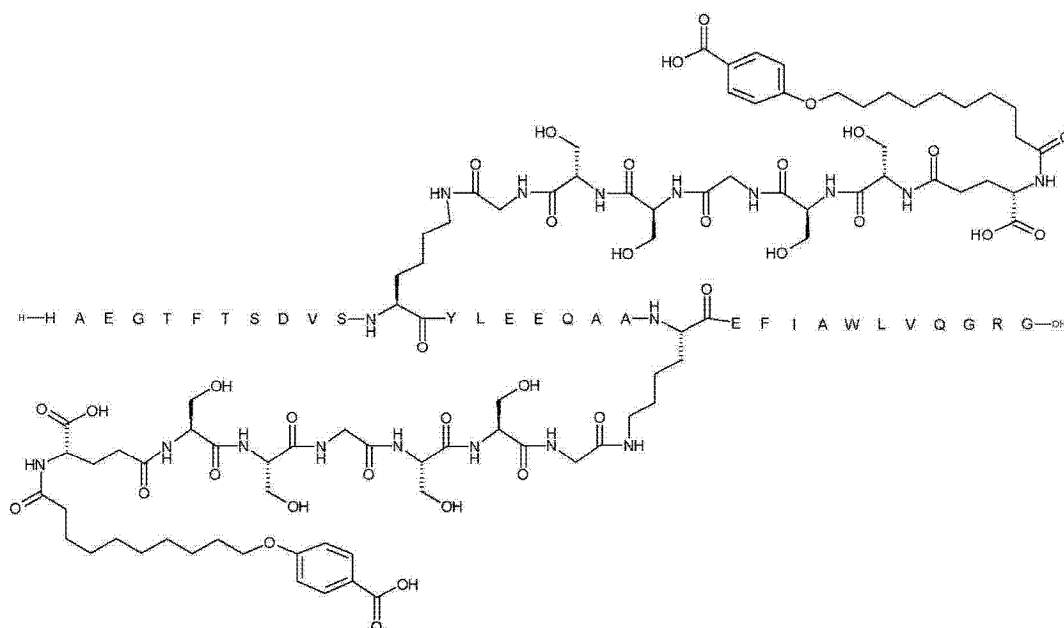
[0832] LCMS 方法 :LCMS_4 :Rt = 2.06 分钟 ;m/3 :1783 ;m/4 :1337 ;m/5 :1070。

[0833] 实施例 5

[0834] $N^{\epsilon 18}$ -[2-[[[(2S)-2-[[[(2S)-2-[[2-[[[(2S)-2-[[[(2S)-2-[[[(4S)-4-羧基-4-[10-(4-羧基苯氧基)癸酰基氨基]丁酰基]氨基]-3-羟基丙酰基]氨基]-3-羟基丙酰基]氨基]乙酰基]氨基]-3-羟基丙酰基]氨基]-3-羟基丙酰基]氨基]乙酰基], $N^{\epsilon 26}$ -[2-[[[(2S)-2-[[[(2S)-2-[[2-[[[(2S)-2-[[[(2S)-2-[[[(4S)-4-羧基-4-[10-(4-羧基苯氧基)癸酰基氨基]丁酰基]氨基]-3-羟基丙酰基]氨基]-3-羟基丙酰基]氨基]乙酰基]氨基]-3-羟基丙酰基]氨基]-3-羟基丙酰基]氨基]乙酰基]-[Lys¹⁸, Glu²², Gln³⁴]-GLP-1-(7-37)-肽

[0835] 化学式 24 :

[0836]



[0837] 制备方法 :SPPS_A, SC_A, CP_M1

[0838] UPLC 方法 :B14_1 :Rt = 6.77 分钟

[0839] UPLC 方法 :A6_1 :Rt = 9.03 分钟

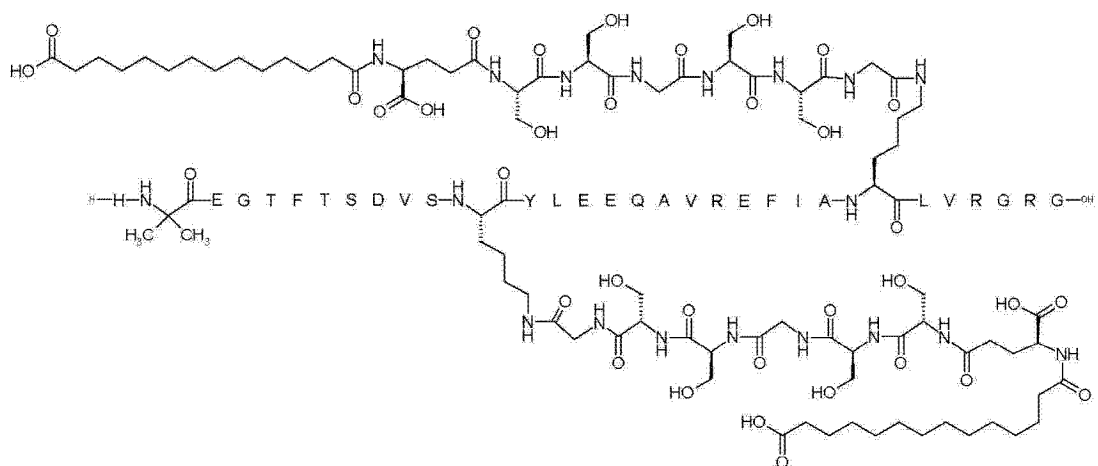
[0840] LCMS 方法 :LCMS_4 :Rt = 2.06 分钟 ;m/3 :1744 ;m/4 :1308 ;m/5 :1047。

[0841] 实施例 6

[0842] $N^{\epsilon 18}$ -[2-[[[(2S)-2-[[[(2S)-2-[[2-[[[(2S)-2-[[[(2S)-2-[[[(4S)-4-羧基-4-(13-羧基十三烷酰基氨基)丁酰基]氨基]-3-羟基丙酰基]氨基]-3-羟基丙酰基]氨基]乙酰基]氨基]-3-羟基丙酰基]氨基]-3-羟基丙酰基]氨基]乙酰基], $N^{\epsilon 31}$ -[2-[[[(2S)-2-[[[(2S)-2-[[2-[[[(2S)-2-[[[(2S)-2-[[[(4S)-4-羧基-4-(13-羧基十三烷酰基氨基)丁酰基]氨基]-3-羟基丙酰基]氨基]-3-羟基丙酰基]氨基]乙酰基]氨基]-3-羟基丙酰基]氨基]乙酰基]-[Aib⁸, Lys¹⁸, Glu²², Val²⁵, Arg²⁶, Lys³¹, Arg³⁴]-GLP-1-(7-37)-肽

[0843] 化学式 25 :

[0844]



[0845] 制备方法 :SPPS_A, SC_A, CP_M1

[0846] UPLC 方法 :B14_1 :Rt = 4.83 分钟

[0847] UPLC 方法 :A6_1 :Rt = 5.45 分钟

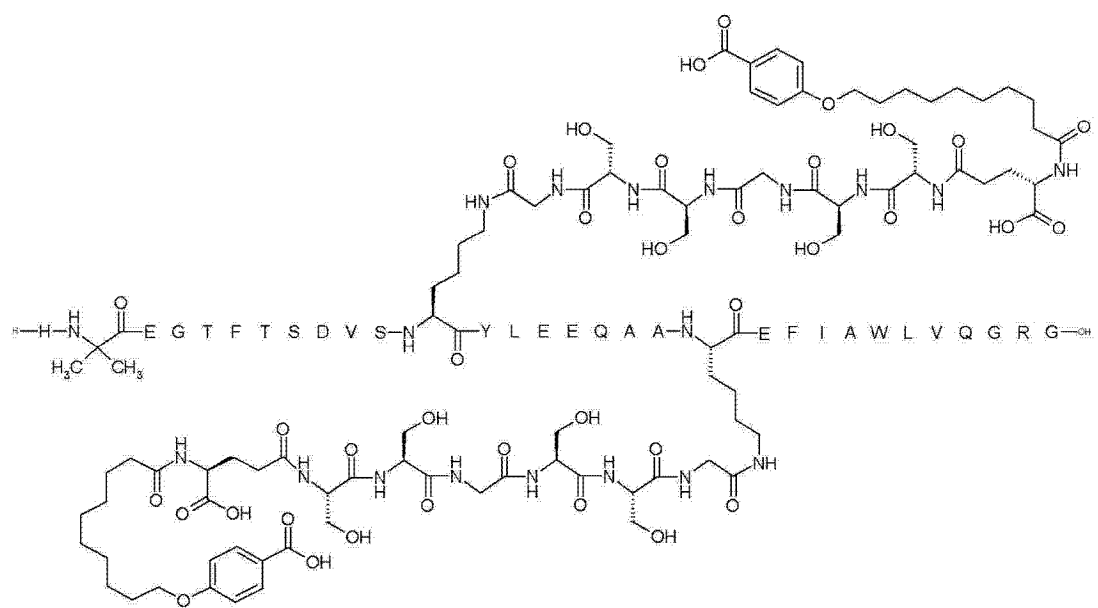
[0848] LCMS 方法 :LCMS_4 :Rt = 1.94 分钟 ;m/3 :1725 ;m/4 :1294 ;m/5 :1035。

[0849] 实施例 7

[0850] $N^{\epsilon 18}$ -[2-[[[(2S)-2-[[[(2S)-2-[[2-[[[(2S)-2-[[[(2S)-2-[[[(4S)-4-羧基-4-[10-(4-羧基苯氧基)癸酰基氨基]丁酰基]氨基]-3-羟基丙酰基]氨基]-3-羟基丙酰基]氨基]乙酰基]氨基]-3-羟基丙酰基]氨基]-3-羟基丙酰基]氨基]乙酰基], $N^{\epsilon 26}$ -[2-[[[(2S)-2-[[[(2S)-2-[[2-[[[(2S)-2-[[[(2S)-2-[[[(4S)-4-羧基-4-[10-(4-羧基苯氧基)癸酰基氨基]丁酰基]氨基]-3-羟基丙酰基]氨基]-3-羟基丙酰基]氨基]乙酰基]氨基]-3-羟基丙酰基]氨基]-3-羟基丙酰基]氨基]乙酰基]-[Aib⁸, Lys¹⁸, Glu²², G]_{n³⁴}]-GLP-1-(7-37)-肽

[0851] 化学式 26 :

[0852]



[0853] 制备方法 :SPPS_A, SC_A, CP_M1

[0854] UPLC 方法 :B14_1 :Rt = 6.69 分钟,

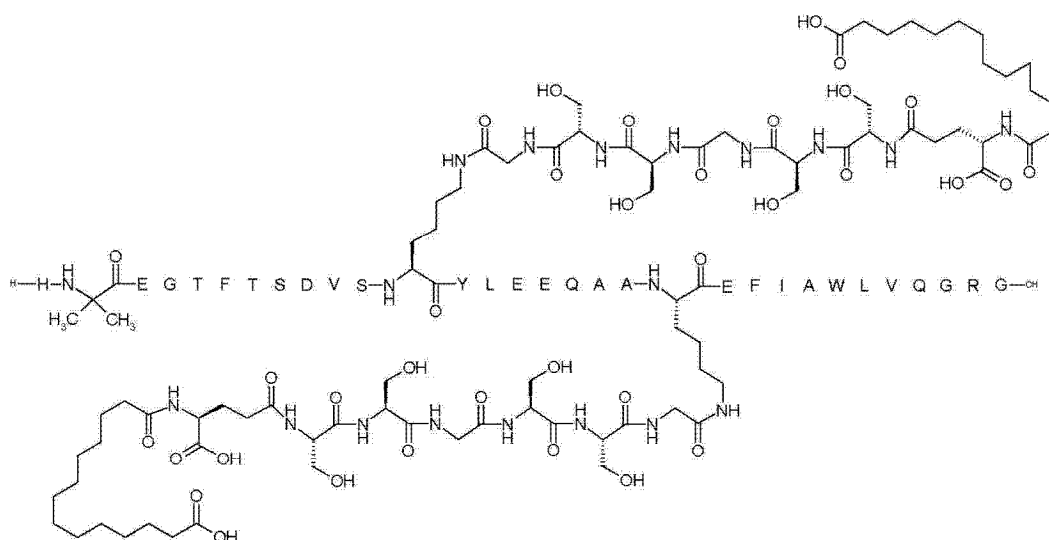
[0855] LCMS 方法 :LCMS_4 :Rt = 2.27 分钟 ;m/3 :1749 ;m/4 :1312 ;m/5 :1050。

[0856] 实施例 8

[0857] $N^{\epsilon 18}$ -[2-[[(2S)-2-[[(2S)-2-[[2-[[(2S)-2-[[(2S)-2-[[(4S)-4-羧基-4-(13-羧基十三烷酰基氨基)丁酰基]氨基]-3-羟基丙酰基]氨基]-3-羟基丙酰基]氨基]乙酰基]氨基]-3-羟基丙酰基]氨基]-3-羟基丙酰基]氨基]乙酰基], $N^{\epsilon 26}$ -[2-[[(2S)-2-[[(2S)-2-[[2-[[(2S)-2-[[(2S)-2-[[(4S)-4-羧基-4-(13-羧基十三烷酰基氨基)丁酰基]氨基]-3-羟基丙酰基]氨基]-3-羟基丙酰基]氨基]乙酰基]氨基]-3-羟基丙酰基]氨基]乙酰基]-[Aib⁸, Lys¹⁸, Glu²², Gln³⁴]-GLP-1-(7-37)-肽

[0858] 化学式 27 :

[0859]



[0860] 制备方法 :SPPS_A, SC_A, CP_M1

[0861] UPLC 方法 :B14_1 :Rt = 6.46 分钟

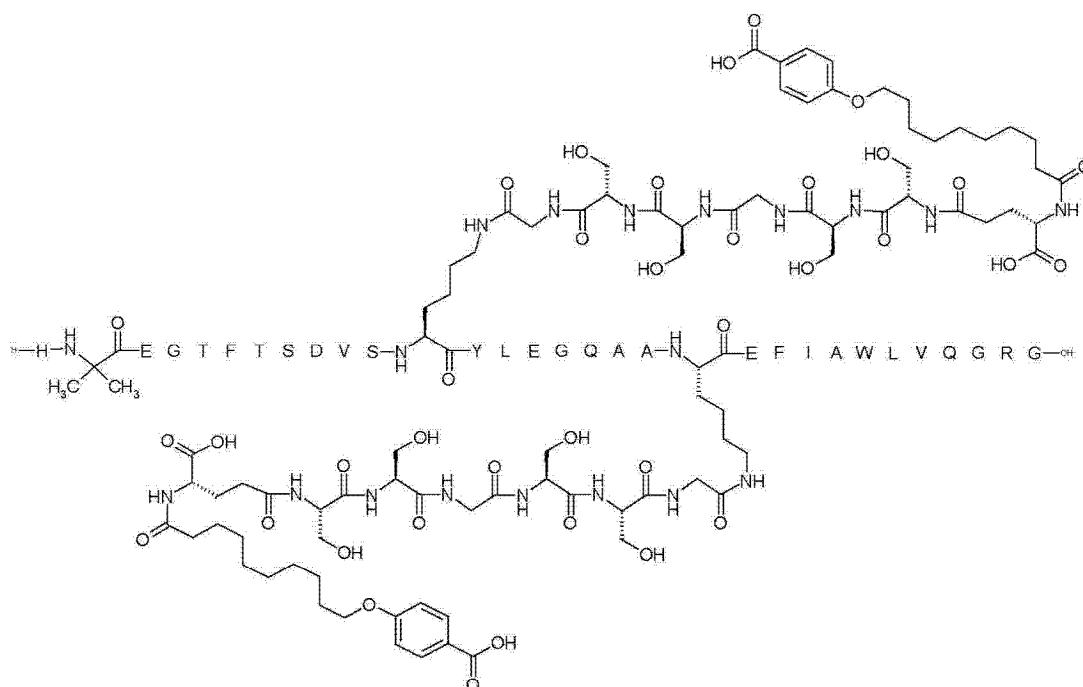
[0862] LCMS 方法 :LCMS_4 :Rt = 2.29 分钟 ;m/3 :1716 ;m/4 :1287 ;m/5 :1030。

[0863] 实施例 9

[0864] $N^{\epsilon 18}$ -[2-[[(2S)-2-[[(2S)-2-[[2-[[(2S)-2-[[(2S)-2-[[(4S)-4-羧基-4-[10-(4-羧基苯氧基)癸酰基氨基]丁酰基]氨基]-3-羟基丙酰基]氨基]-3-羟基丙酰基]氨基]乙酰基]氨基]-3-羟基丙酰基]氨基]-3-羟基丙酰基]氨基]乙酰基], $N^{\epsilon 26}$ -[2-[[(2S)-2-[[(2S)-2-[[2-[[(2S)-2-[[(2S)-2-[[(4S)-4-羧基-4-[10-(4-羧基苯氧基)癸酰基氨基]丁酰基]氨基]-3-羟基丙酰基]氨基]-3-羟基丙酰基]氨基]乙酰基]氨基]-3-羟基丙酰基]氨基]-3-羟基丙酰基]氨基]乙酰基]-[Aib⁸, Lys¹⁸, Gln³⁴]-GLP-1-(7-37)-肽

[0865] 化学式 28 :

[0866]



[0867] 制备方法 :SPPS_P, SC_P, CP_M1

[0868] UPLC 方法 :B31_1 :Rt = 14.9 分钟

[0869] UPLC 方法 :A6_1 :Rt = 4.9 分钟

[0870] Mw5174 的理论分子量通过以下证实 :

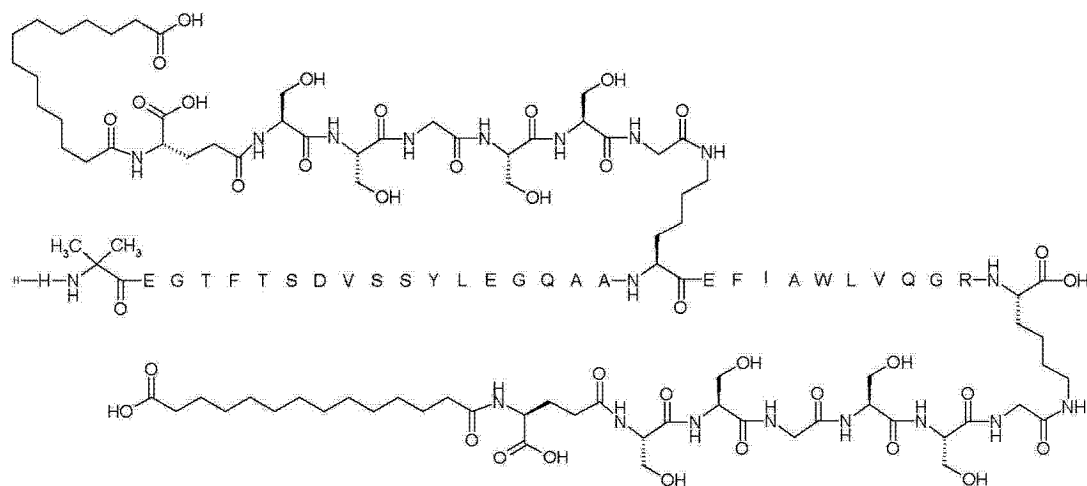
[0871] 方法 :Maldi_MS :5173。

[0872] 实施例 10

[0873] $N^{\varepsilon 26}$ -[2-[[(2S)-2-[[(2S)-2-[[2-[[(2S)-2-[[(2S)-2-[[(4S)-4-羧基-4-(13-羧基十三烷酰基氨基)丁酰基]氨基]-3-羟基丙酰基]氨基]-3-羟基丙酰基]氨基]乙酰基]氨基]-3-羟基丙酰基]氨基]-3-羟基丙酰基]氨基]乙酰基], $N^{\varepsilon 37}$ -[2-[[(2S)-2-[[(2S)-2-[[2-[[(2S)-2-[[(2S)-2-[[(4S)-4-羧基-4-(13-羧基十三烷酰基氨基)丁酰基]氨基]-3-羟基丙酰基]氨基]-3-羟基丙酰基]氨基]乙酰基]氨基]-3-羟基丙酰基]氨基]-3-羟基丙酰基]氨基]乙酰基]-[Aib⁸,Gln³⁴,Lys³⁷]-GLP-1-(7-37)-肽

[0874] 化学式 29 :

[0875]



[0876] 制备方法 :SPPS_A, SC_A, CP_M1

[0877] UPLC 方法 :B4_1 :Rt = 8.51 分钟,

[0878] UPLC 方法 :A6_1 :Rt = 6.36 分钟,

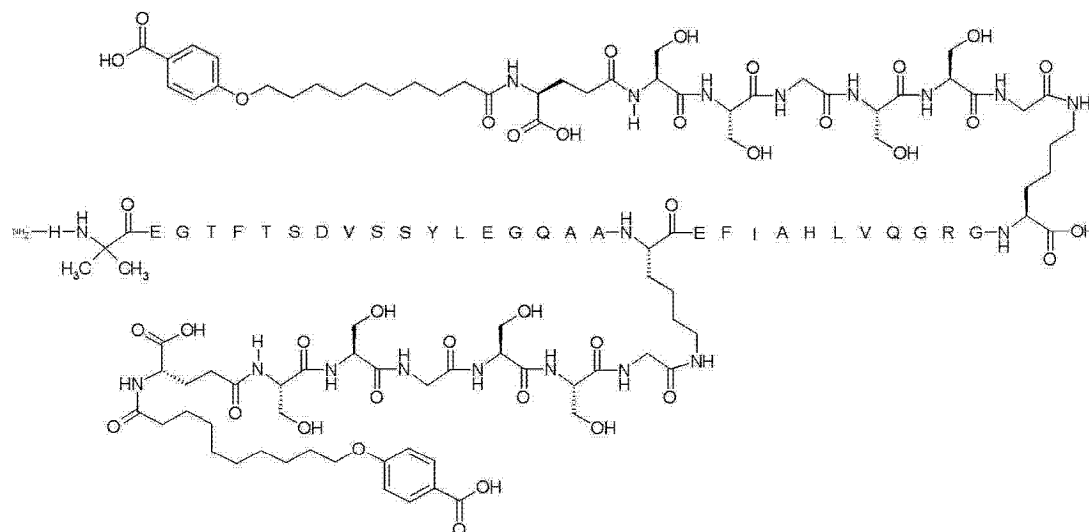
[0879] LCMS 方法 :LCMS_4 :Rt = 2.27 分钟 ;m/3 :1703 ;m/4 :1277 ;m/5 :1030。

[0880] 实施例 11

[0881] N^{ϵ} ($N^{\epsilon 26}$ -[2-[[(2S)-2-[[(2S)-2-[[2-[[(2S)-2-[[(2S)-2-[[(4S)-4-羧基-4-[10-(4-羧基苯氧基)癸酰基氨基]丁酰基]氨基]-3-羟基丙酰基]氨基]-3-羟基丙酰基]氨基]乙酰基]氨基]-3-羟基丙酰基]氨基]-3-羟基丙酰基]氨基]乙酰基]-[Aib⁸, His³¹, Gln³⁴]-GLP-1-(7-37)-肽基)- N^{ϵ} [2-[[(2S)-2-[[(2S)-2-[[2-[[(2S)-2-[[(2S)-2-[[(4S)-4-羧基-4-[10-(4-羧基苯氧基)癸酰基氨基]丁酰基]氨基]-3-羟基丙酰基]氨基]-3-羟基丙酰基]氨基]乙酰基]氨基]-3-羟基丙酰基]氨基]-3-羟基丙酰基]氨基]乙酰基]Lys

[0882] 化学式 30 :

[0883]



[0884] 制备方法 :SPPS_A, SC_A, CP_M1

[0885] UPLC 方法 :B2_1 :Rt = 11.72 分钟

[0886] UPLC 方法 :A3_1 :Rt = 6.46 分钟

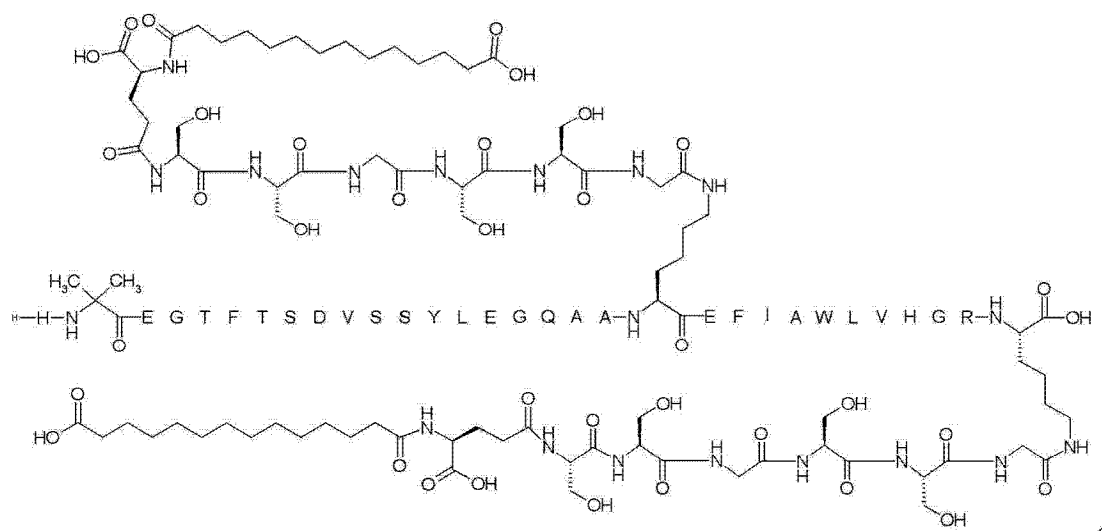
[0887] LCMS 方法 :LCMS_4 :Rt = 2.20 分钟 ;m/3 :1738 ;m/4 :1304 ;m/5 :1043。

[0888] 实施例 12

[0889] $N^{\epsilon 26}$ -[2-[[(2S)-2-[[(2S)-2-[[2-[[(2S)-2-[[(2S)-2-[[(4S)-4-羧基-4-(13-羧基十三烷酰基氨基)丁酰基]氨基]-3-羟基丙酰基]氨基]-3-羟基丙酰基]氨基]乙酰基]氨基]-3-羟基丙酰基]氨基]-3-羟基丙酰基]氨基]乙酰基], $N^{\epsilon 37}$ -[2-[[(2S)-2-[[(2S)-2-[[2-[[(2S)-2-[[(2S)-2-[[(4S)-4-羧基-4-(13-羧基十三烷酰基氨基)丁酰基]氨基]-3-羟基丙酰基]氨基]-3-羟基丙酰基]氨基]乙酰基]氨基]-3-羟基丙酰基]氨基]-3-羟基丙酰基]氨基]乙酰基]-[Aib⁸, His³⁴, Lys³⁷]-GLP-1-(7-37)-肽基]

[0890] 化学式 31 :

[0891]



[0892] 制备方法 :SPPS_A, SC_A, CP_M1

[0893] UPLC 方法 :B4_1 :Rt = 8.33 分钟

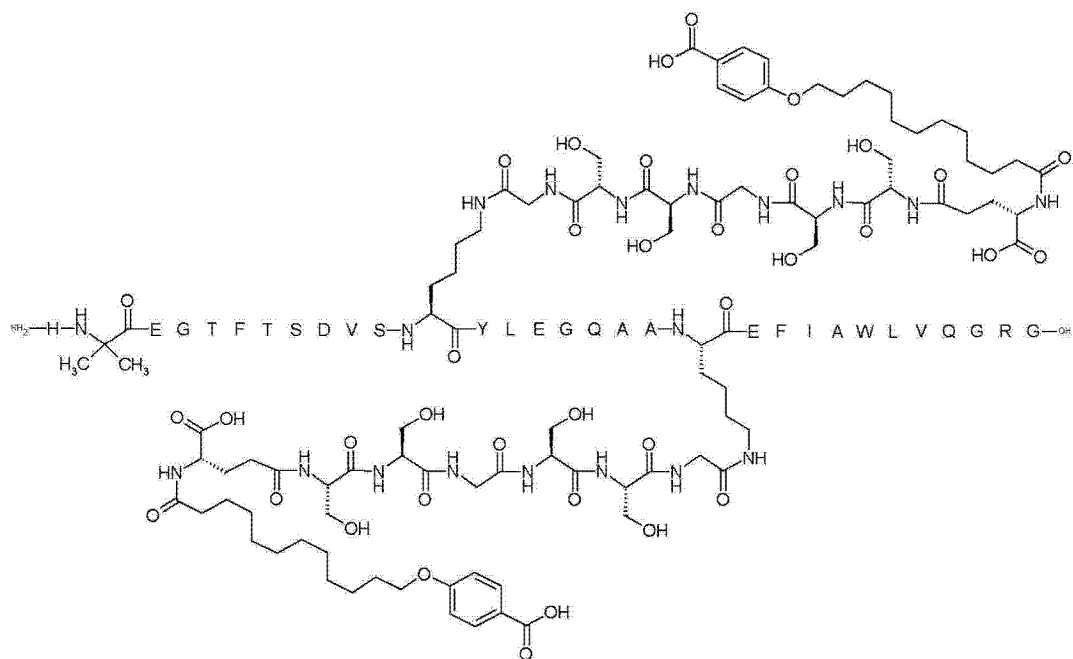
[0894] LCMS 方法 :LCMS_4 :Rt = 2.13 分钟 ;m/3 :1705 ;m/4 :1279 ;m/5 :1023。

[0895] 实施例 13

[0896] N^{+18} -[2-[[(2S)-2-[[(2S)-2-[[2-[[(2S)-2-[[(2S)-2-[[(4S)-4-羧基-4-[12-(4-羧基苯氧基)十二烷酰基氨基]丁酰基]氨基]-3-羟基丙酰基]氨基]-3-羟基丙酰基]氨基]乙酰基]氨基]-3-羟基丙酰基]氨基]-3-羟基丙酰基]氨基]乙酰基], N^{+26} -[2-[[(2S)-2-[[(2S)-2-[[2-[[(2S)-2-[[(2S)-2-[[(4S)-4-羧基-4-[12-(4-羧基苯氧基)十二烷酰基氨基]丁酰基]氨基]-3-羟基丙酰基]氨基]-3-羟基丙酰基]氨基]乙酰基]氨基]-3-羟基丙酰基]氨基]-3-羟基丙酰基]氨基]乙酰基]-[Aib⁸, Lys¹⁸, Gln³⁴]-GLP-1-(7-37)-肽

[0897] 化学式 32 :

[0898]



[0899] 制备方法 :SPPS_P ;SC_P ;CP_M1

[0900] UPLC 方法 :AP_B4_1 :Rt = 9.17 分钟

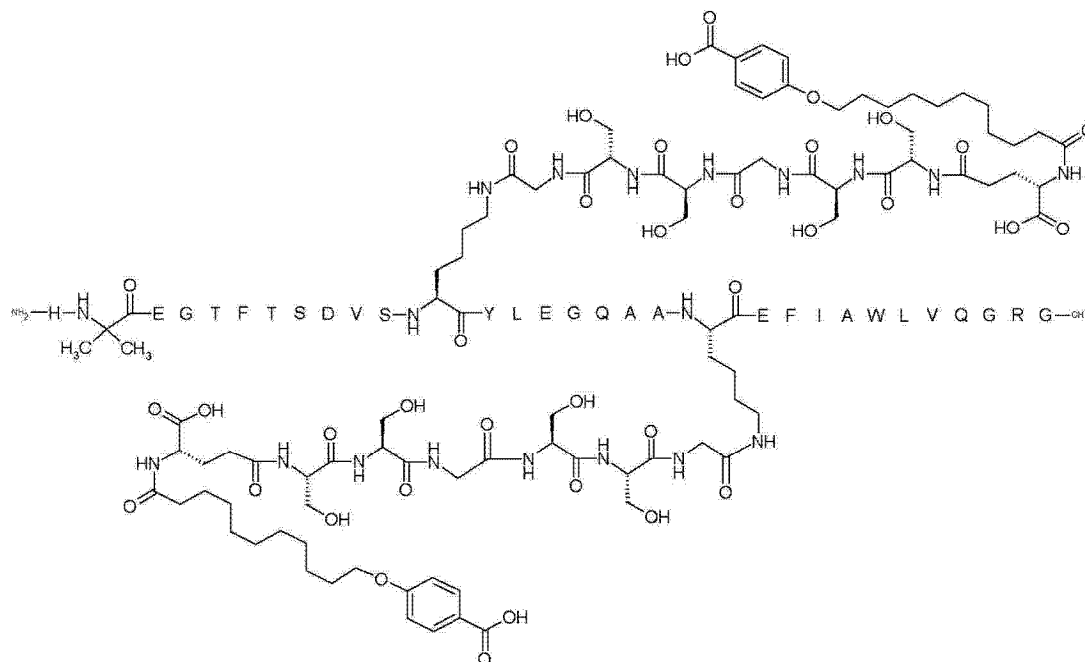
[0901] LCMS 方法 :LCMS_AP :m/3 = 1745。

[0902] 实施例 14

[0903] $N^{\alpha 18}$ -[2-[[[(2S)-2-[[[(2S)-2-[[2-[[[(2S)-2-[[[(2S)-2-[[[(4S)-4-羧基-4-[11-(4-羧基苯氧基)十一烷酰基氨基]丁酰基]氨基]-3-羟基丙酰基]氨基]-3-羟基丙酰基]氨基]乙酰基]氨基]-3-羟基丙酰基]氨基]-3-羟基丙酰基]氨基]乙酰基], $N^{\epsilon 26}$ -[2-[[[(2S)-2-[[[(2S)-2-[[2-[[[(2S)-2-[[[(2S)-2-[[[(4S)-4-羧基-4-[11-(4-羧基苯氧基)十一烷酰基氨基]丁酰基]氨基]-3-羟基丙酰基]氨基]-3-羟基丙酰基]氨基]乙酰基]氨基]-3-羟基丙酰基]氨基]-3-羟基丙酰基]氨基]乙酰基]-[Aib⁸, Lys¹⁸, Gln³⁴]-GLP-1-(7-37)-肽

[0904] 化学式 33 :

[0905]



[0906] 制备方法 :SPPS_P, SC_P, CP_M1

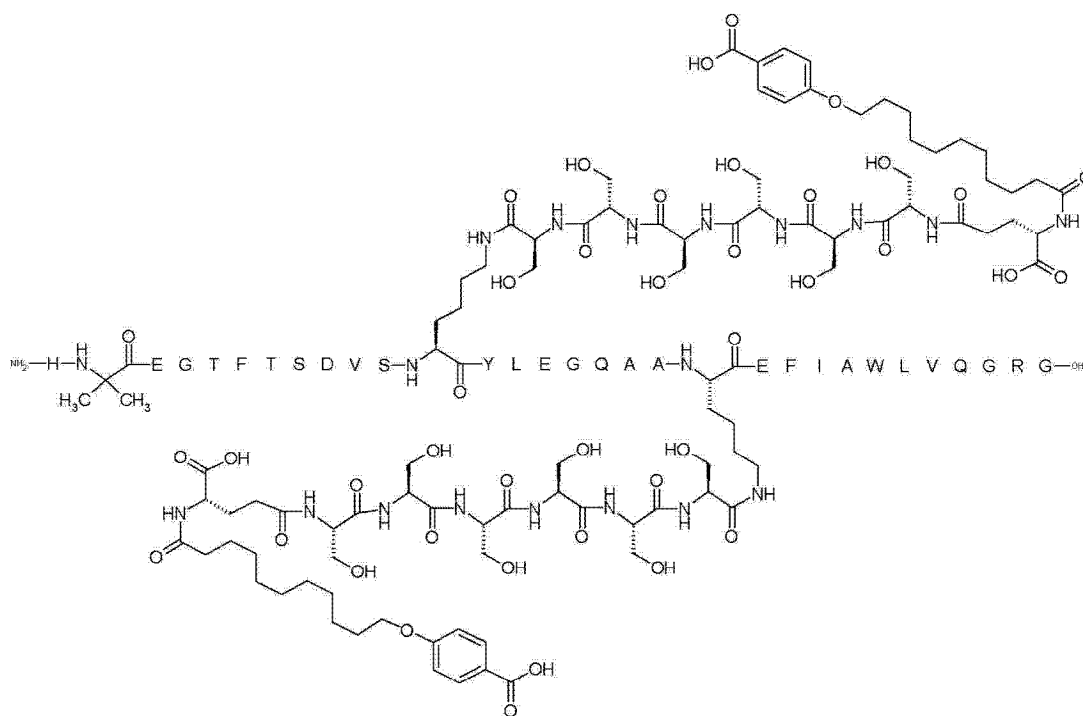
[0907] UPLC 方法 :B4_1 :Rt = 8.65 分钟

[0908] LCMS 方法 :LCMS_4 :Rt = 2.33 分钟 ;m/3 :1735 ;m/4 :1302。

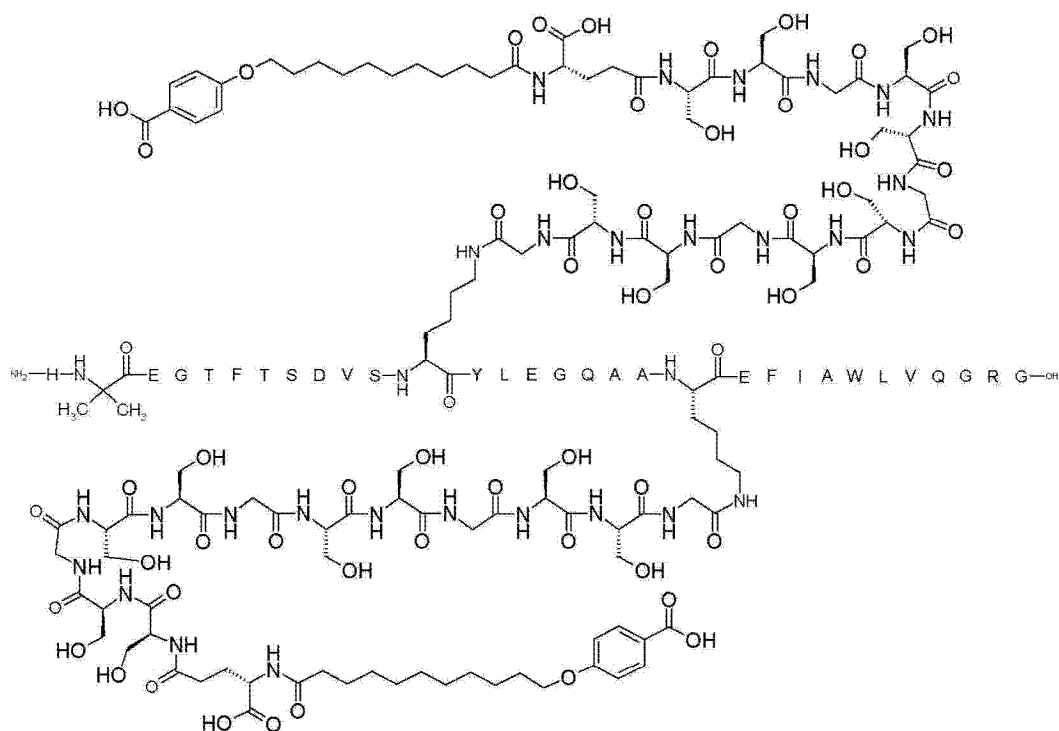
[0909] 实施例 15

[0910] $N^{\alpha 18}$ -[(2S)-2-[[[(2S)-2-[[[(2S)-2-[[[(2S)-2-[[[(2S)-2-[[[(4S)-4-羧基-4-[11-(4-羧基苯氧基)十一烷酰基氨基]丁酰基]氨基]-3-羟基丙酰基]氨基]-3-羟基丙酰基]氨基]丙酰基]氨基]-3-羟基丙酰基]氨基]-3-羟基丙酰基]氨基]丙酰基], $N^{\epsilon 26}$ -[(2S)-2-[[[(2S)-2-[[[(2S)-2-[[[(2S)-2-[[[(2S)-2-[[[(2S)-2-[[[(4S)-4-羧基-4-[11-(4-羧基苯氧基)十一烷酰基氨基]丁酰基]氨基]-3-羟基丙酰基]氨基]-3-羟基丙酰基]氨基]丙酰基]氨基]-3-羟基丙酰基]氨基]-3-羟基丙酰基]氨基]丙酰基]-[Aib⁸, Lys¹⁸, Gln³⁴]-GLP-1-(7-37)-肽

[0911] 化学式 34 :



[0926]



[0927] 制备方法 :SPPS_P, SC_P, CP_M1

[0928] UPLC 方法 :B4_1 :Rt = 8.28 分钟

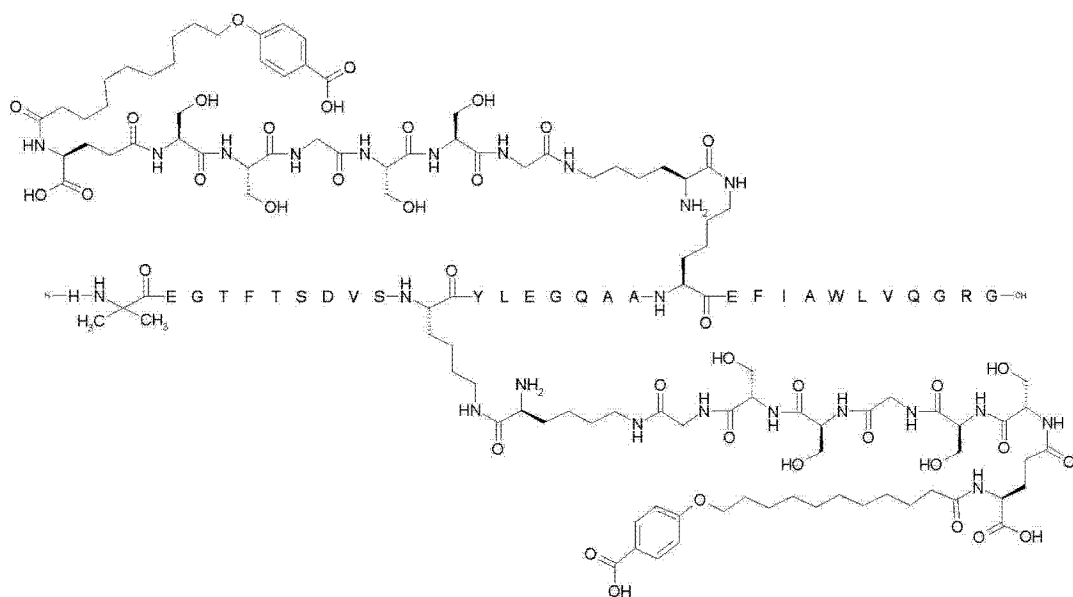
[0929] LCMS 方法 :LCMS_4 :Rt = 2.50 分钟 ;m/4 :1533 ;m/5 :1226。

[0930] 实施例 18

[0931] N^{+18} -[(2S)-2-氨基-6-[[2-[[[(2S)-2-[[[(2S)-2-[[2-[[[(2S)-2-[[[(2S)-2-[[[(4S)-4-羧基-4-[11-(4-羧基苯氧基)十一烷酰基氨基]丁酰基]氨基]-3-羟基丙酰基]氨基]-3-羟基丙酰基]氨基]乙酰基]氨基]-3-羟基丙酰基]氨基]-3-羟基丙酰基]氨基]乙酰基]氨基]己酰基], N^{+26} -[(2S)-2-氨基-6-[[2-[[[(2S)-2-[[[(2S)-2-[[2-[[[(2S)-2-[[[(2S)-2-[[[(4S)-4-羧基-4-[11-(4-羧基苯氧基)十一烷酰基氨基]丁酰基]氨基]-3-羟基丙酰基]氨基]-3-羟基丙酰基]氨基]乙酰基]氨基]-3-羟基丙酰基]氨基]-3-羟基丙酰基]氨基]乙酰基]氨基]己酰基]-[Aib⁸, Lys¹⁸, Gln³⁴]-GLP-1-(7-37)-肽

[0932] 化学式 37 :

[0933]



[0934] 制备方法: SPPS P, SC P, CP M1

[0935] UPLC 方法 :B4 1 :Rt = 8.11 分钟

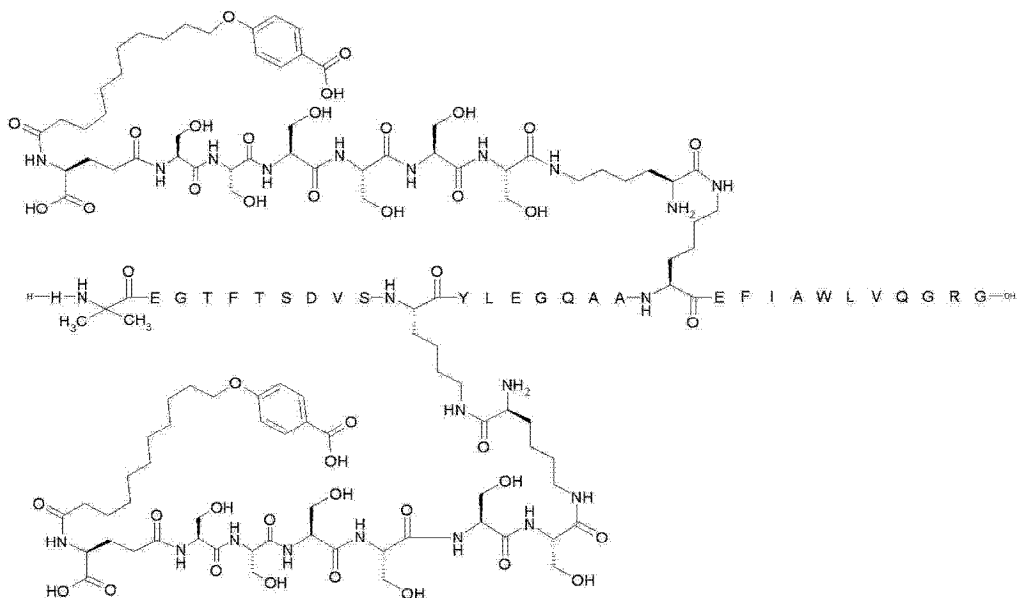
[0936] LCMS 方法:LCMS AP ;Rt = 4.79 分钟;m/3 :1820 ;m/4 :1365。

[0937] 实施例 19

[0938] N^{a18}-[(2S)-2-氨基-6-[[[(2S)-2-[[[(2S)-2-[[[(2S)-2-[[[(2S)-2-[[[(2S)-2-[[[(4S)-4-羧基-4-[11-(4-羧基苯氧基)十一烷酰基氨基]丁酰基]氨基]-3-羟基丙酰基]氨基]-3-羟基丙酰基]氨基]-3-羟基丙酰基]氨基]-3-羟基丙酰基]氨基]-3-羟基丙酰基]氨基]-己酰基],N^{e26}-[(2S)-2-氨基-6-[[[(2S)-2-[[[(2S)-2-[[[(2S)-2-[[[(2S)-2-[[[(2S)-2-[[[(4S)-4-羧基-4-[11-(4-羧基苯氧基)十一烷酰基氨基]丁酰基]氨基]-3-羟基丙酰基]氨基]-3-羟基丙酰基]氨基]-3-羟基丙酰基]氨基]-3-羟基丙酰基]氨基]-3-羟基丙酰基]氨基]-己酰基]-[Aib⁸,Lys¹⁸,Gln³⁴]-GLP-1-(7-37)-肽

[0939] 化学式 38 :

[0940]



[0941] 制备方法: SPPS P, SC P, CP M1

[0942] UPLC 方法 :B4 1 :Rt = 8.61 分钟

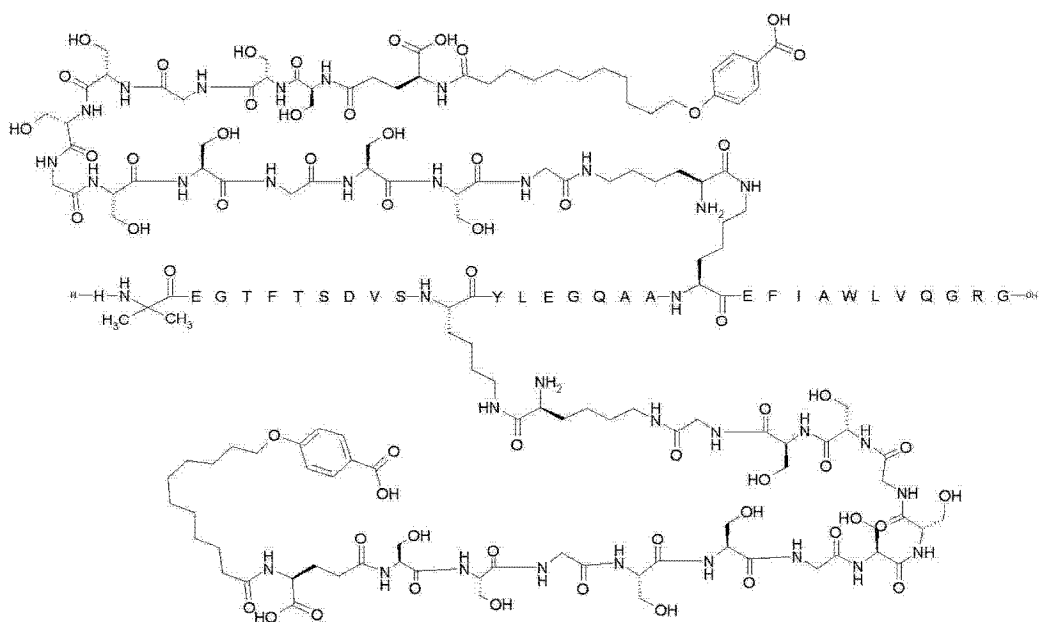
[0943] LCMS 方法:LCMS 4;Rt = 2.20 分钟;m/3:1860;m/4:1395;m/5:1117。

[0944] 实施例 20

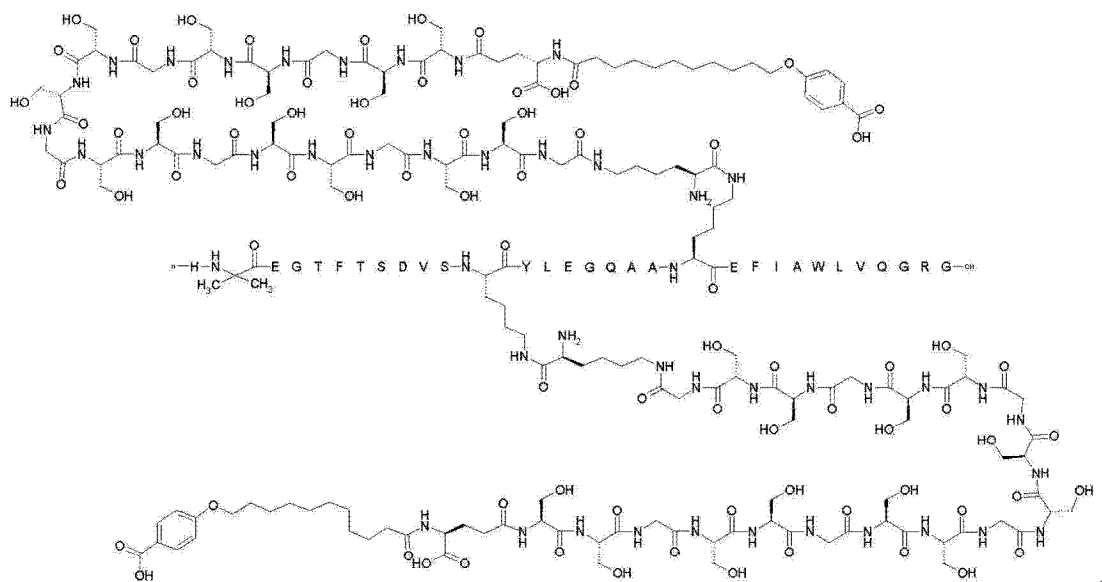
[illegible]

[0946] 化学式 39 :

[0947]



[0954]



[0955] 制备方法 :SPPS_P, SC_P, CP_M1

[0956] UPLC 方法 :B29_1 :Rt = 8.42 分钟

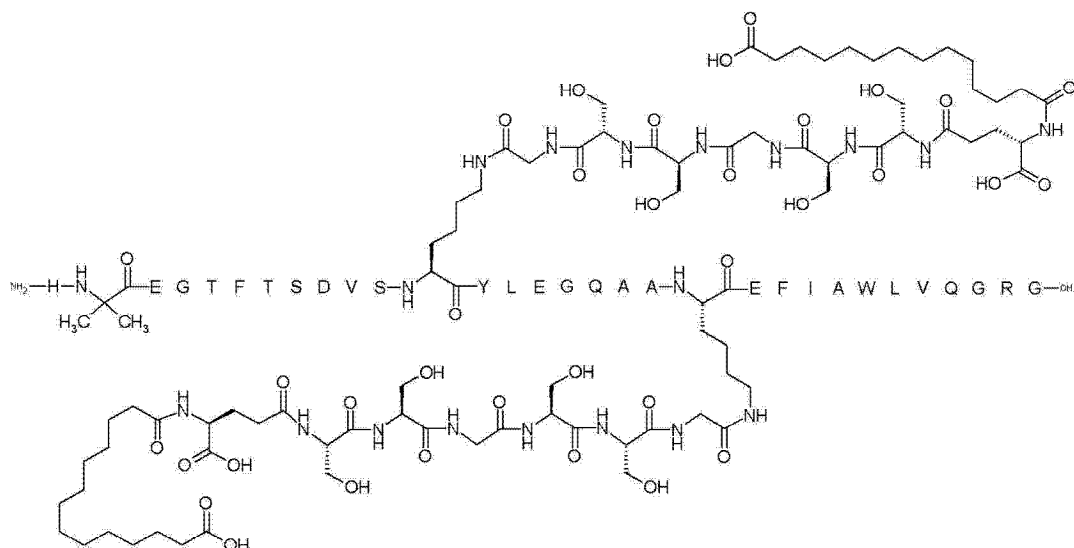
[0957] LCMS 方法 :LCMS_4 :Rt = 2.52 分钟 ;m/4 :1828 ;m/5 :1463。

[0958] 实施例 22

[0959] $N^{\alpha 18}$ -[2-[[[(2S)-2-[[[(2S)-2-[[2-[[[(2S)-2-[[[(2S)-2-[[[(4S)-4-羧基-4-(13-羧基十三烷酰基氨基)丁酰基]氨基]-3-羟基丙酰基]氨基]-3-羟基丙酰基]氨基]乙酰基]氨基]-3-羟基丙酰基]氨基]-3-羟基丙酰基]氨基]乙酰基], $N^{\epsilon 26}$ -[2-[[[(2S)-2-[[[(2S)-2-[[2-[[[(2S)-2-[[[(2S)-2-[[[(4S)-4-羧基-4-(13-羧基十三烷酰基氨基)丁酰基]氨基]-3-羟基丙酰基]氨基]-3-羟基丙酰基]氨基]乙酰基]氨基]-3-羟基丙酰基]氨基]乙酰基]-[Aib⁸, Lys¹⁸, Gln³⁴]-GLP-1-(7-37)-肽

[0960] 化学式 41 :

[0961]



[0962] 制备方法 :SPPS_P, SC_P, CP_M1

[0963] UPLC 方法 :B2_1 :Rt = 8.27 分钟

[0964] UPLC 方法 :A6_1 :Rt = 4.85 分钟

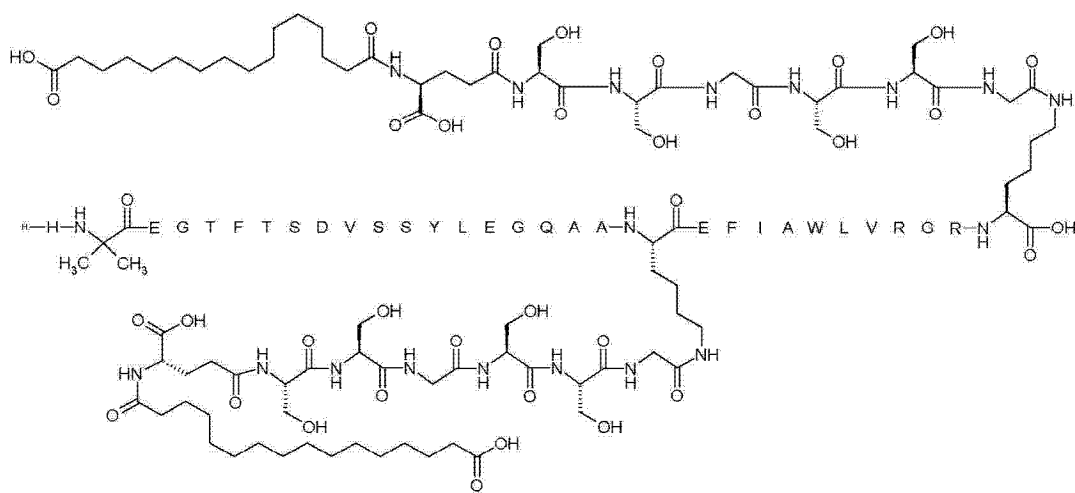
[0965] LCMS 方法 :LCMS_4 :Rt = 2.4 分钟 ;m/4 :1269。

[0966] 实施例 23

[0967] $N^{\epsilon 26}$ -[2-[[(2S)-2-[[(2S)-2-[[2-[[(2S)-2-[[(2S)-2-[[(4S)-4-羧基-4-(15-羧基十五烷酰基氨基)丁酰基]氨基]-3-羟基丙酰基]氨基]-3-羟基丙酰基]氨基]乙酰基]氨基]-3-羟基丙酰基]氨基]-3-羟基丙酰基]氨基]乙酰基], $N^{\epsilon 37}$ -[2-[[(2S)-2-[[(2S)-2-[[2-[[(2S)-2-[[(2S)-2-[[(4S)-4-羧基-4-(15-羧基十五烷酰基氨基)丁酰基]氨基]-3-羟基丙酰基]氨基]-3-羟基丙酰基]氨基]乙酰基]氨基]-3-羟基丙酰基]氨基]乙酰基]-[Aib⁸, Arg³⁴, Lys³⁷]-GLP-1-(7-37)-肽

[0968] 化学式 42 :

[0969]



[0970] 制备方法 :SPPS_P, SC_A, CP_M1

[0971] UPLC 方法 :B4_1 :Rt = 8.76 分钟

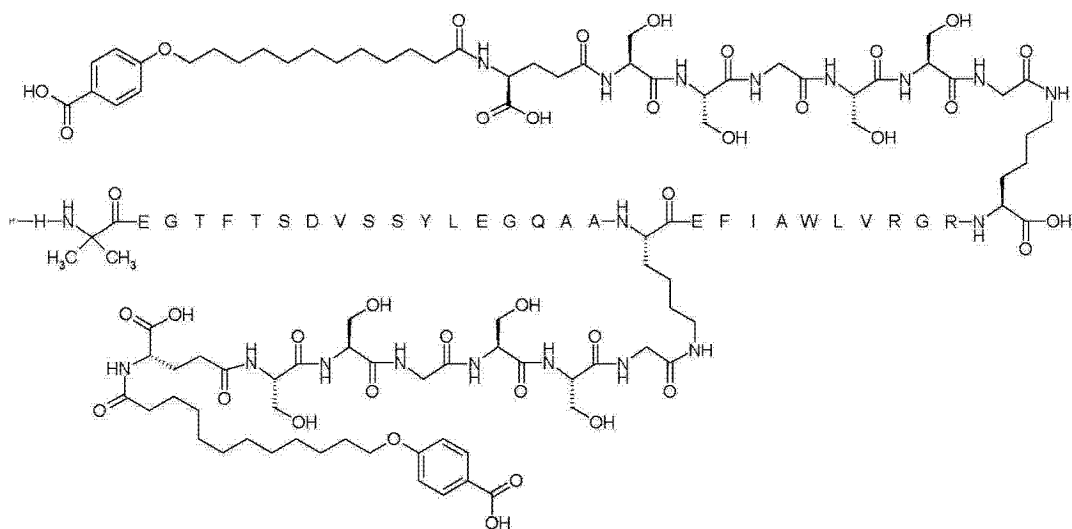
[0972] LCMS 方法 :LCMS_4 :Rt = 2.27 分钟 ;m/3 :1731 ;m/4 :1298 ;m/5 :1039。

[0973] 实施例 24

[0974] $N^{\epsilon 26}$ -[2-[[(2S)-2-[[(2S)-2-[[2-[[(2S)-2-[[(2S)-2-[[(4S)-4-羧基-4-[12-(4-羧基苯氧基)十二烷酰基氨基]丁酰基]氨基]-3-羟基丙酰基]氨基]-3-羟基丙酰基]氨基]乙酰基]氨基]-3-羟基丙酰基]氨基]-3-羟基丙酰基]氨基]乙酰基], $N^{\epsilon 37}$ -[2-[[(2S)-2-[[(2S)-2-[[2-[[(2S)-2-[[(2S)-2-[[(4S)-4-羧基-4-[12-(4-羧基苯氧基)十二烷酰基氨基]丁酰基]氨基]-3-羟基丙酰基]氨基]-3-羟基丙酰基]氨基]乙酰基]氨基]-3-羟基丙酰基]氨基]-3-羟基丙酰基]氨基]乙酰基]-[Aib⁸, Arg³⁴, Lys³⁷]-GLP-1-(7-37)-肽

[0975] 化学式 43 :

[0976]



[0977] 制备方法 :SPPS_P, SC_A, CP_M1

[0978] UPLC 方法 :B4_1 :Rt = 8.67 分钟

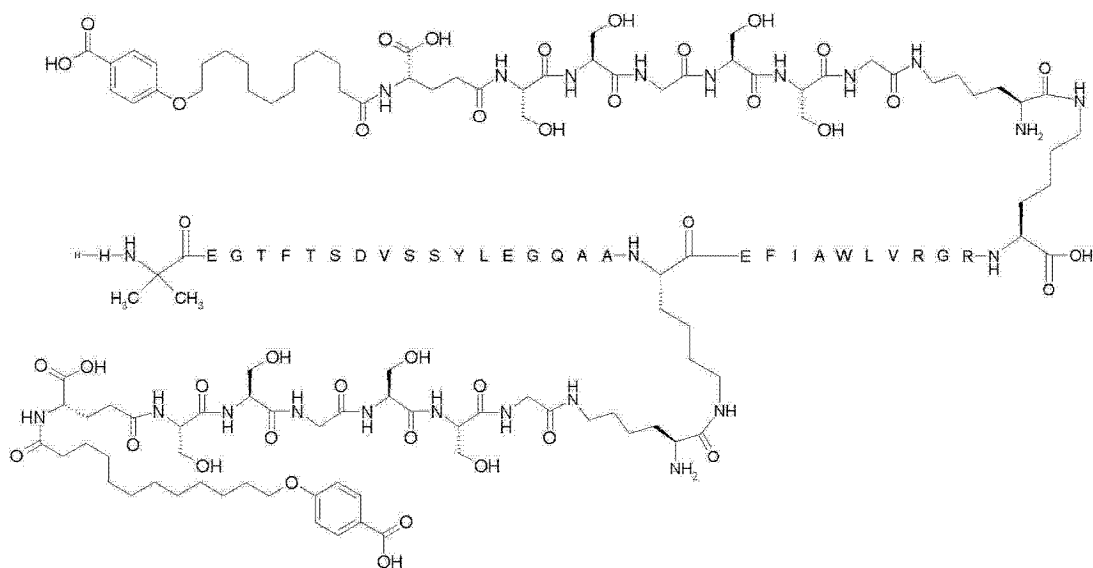
[0979] LCMS 方法 :LCMS_4 :Rt = 2.40 分钟 ;m/3 :1763 ;m/4 :1322。

[0980] 实施例 25

[0981] $N^{\epsilon 26}$ -[(2S)-2-氨基-6-[[2-[[[(2S)-2-[[2-[[[(2S)-2-[[[(2S)-2-[[[(4S)-4-羧基-4-[12-(4-羧基苯氧基)十二烷酰基氨基]丁酰基]氨基]-3-羟基丙酰基]氨基]-3-羟基丙酰基]氨基]乙酰基]氨基]-3-羟基丙酰基]氨基]-3-羟基丙酰基]氨基]乙酰基]氨基]己酰基], $N^{\epsilon 37}$ -[(2S)-2-氨基-6-[[2-[[[(2S)-2-[[[(2S)-2-[[2-[[[(2S)-2-[[[(2S)-2-[[[(4S)-4-羧基-4-[12-(4-羧基苯氧基)十二烷酰基氨基]丁酰基]氨基]-3-羟基丙酰基]氨基]-3-羟基丙酰基]氨基]乙酰基]氨基]-3-羟基丙酰基]氨基]-3-羟基丙酰基]氨基]乙酰基]氨基]己酰基]-[Aib⁸, Arg³⁴, Lys³⁷]-GLP-1-(7-37)-肽

[0982] 化学式 44 :

[0983]



[0984] 制备方法 :SPPS_L, SC_A, CP_M1

[0985] UPLC 方法 :B4_1 :Rt = 8.70 分钟

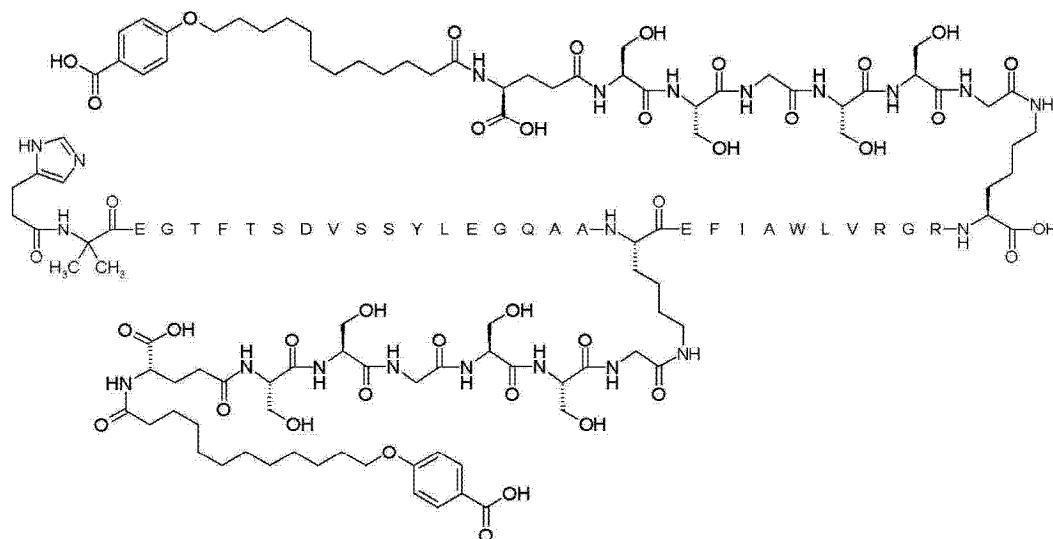
[0986] LCMS 方法 :LCMS_4 :Rt = 2.10 分钟 ;m/3 :1849 ;m/4 :1387 ;m/5 :1110。

[0987] 实施例 26

[0988] $N^{\epsilon 26}$ -[2-[[[(2S)-2-[[[(2S)-2-[[2-[[[(2S)-2-[[[(2S)-2-[[[(4S)-4-羧基-4-[12-(4-羧基苯氧基)十二烷酰基氨基]丁酰基]氨基]-3-羟基丙酰基]氨基]-3-羟基丙酰基]氨基]乙酰基]氨基]-3-羟基丙酰基]氨基]-3-羟基丙酰基]氨基]乙酰基], $N^{\epsilon 37}$ -[2-[[[(2S)-2-[[[(2S)-2-[[2-[[[(2S)-2-[[[(2S)-2-[[[(4S)-4-羧基-4-[12-(4-羧基苯氧基)十二烷酰基氨基]丁酰基]氨基]-3-羟基丙酰基]氨基]-3-羟基丙酰基]氨基]乙酰基]氨基]-3-羟基丙酰基]氨基]-3-羟基丙酰基]氨基]乙酰基]-[Imp⁷, Aib⁸, Arg³⁴, Lys³⁷]-GLP-1-(7-37)-肽

[0989] 化学式 45:

[0990]



[0991] 制备方法: SPPS_P; SC_P; CP_M1

[0992] UPLC 方法: B4_1: Rt = 8.9 分钟

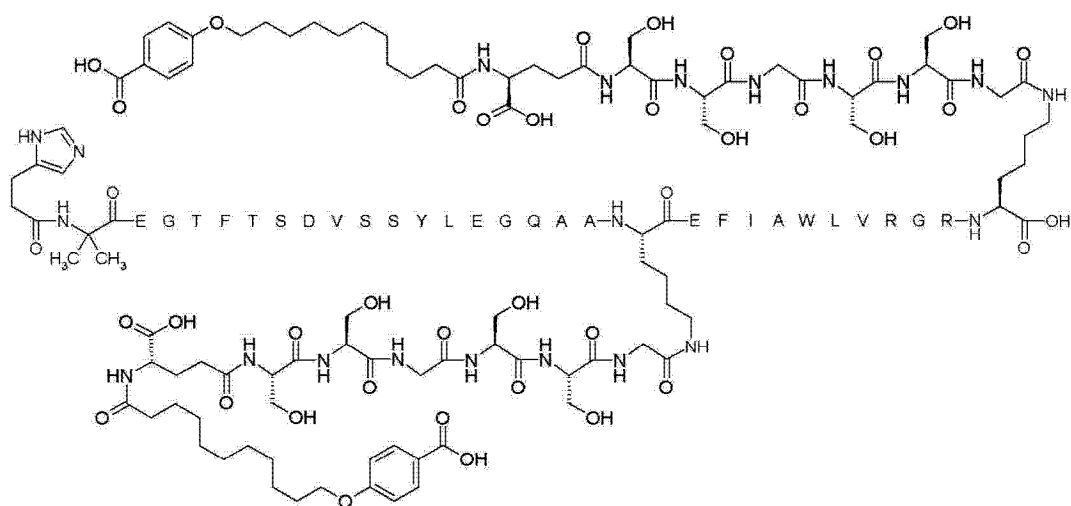
[0993] LCMS 方法: LCMS_4: Rt = 2.35 分钟; m/3 = 1758; m/4 = 1319; m/5 = 1055。

[0994] 实施例 27

[0995] $N^{\epsilon 26}$ -[2-[[[(2S)-2-[[[(2S)-2-[[2-[[[(2S)-2-[[[(2S)-2-[[[(4S)-4-羧基-4-[11-(4-羧基苯氧基)十一烷酰基氨基]丁酰基]氨基]-3-羟基丙酰基]氨基]-3-羟基丙酰基]氨基]乙酰基]氨基]-3-羟基丙酰基]氨基]-3-羟基丙酰基]氨基]乙酰基], $N^{\epsilon 37}$ -[2-[[[(2S)-2-[[[(2S)-2-[[2-[[[(2S)-2-[[[(2S)-2-[[[(4S)-4-羧基-4-[11-(4-羧基苯氧基)十一烷酰基氨基]丁酰基]氨基]-3-羟基丙酰基]氨基]-3-羟基丙酰基]氨基]乙酰基]氨基]-3-羟基丙酰基]氨基]-3-羟基丙酰基]氨基]乙酰基]-[Imp⁷, Aib⁸, Arg³⁴, Lys³⁷]-GLP-1-(7-37)-肽

[0996] 化学式 46:

[0997]



[0998] 制备方法 :SPPS_P ;SC_P ;CP_M1

[0999] UPLC 方法 :AP_B4_1 :Rt = 8.5 分钟

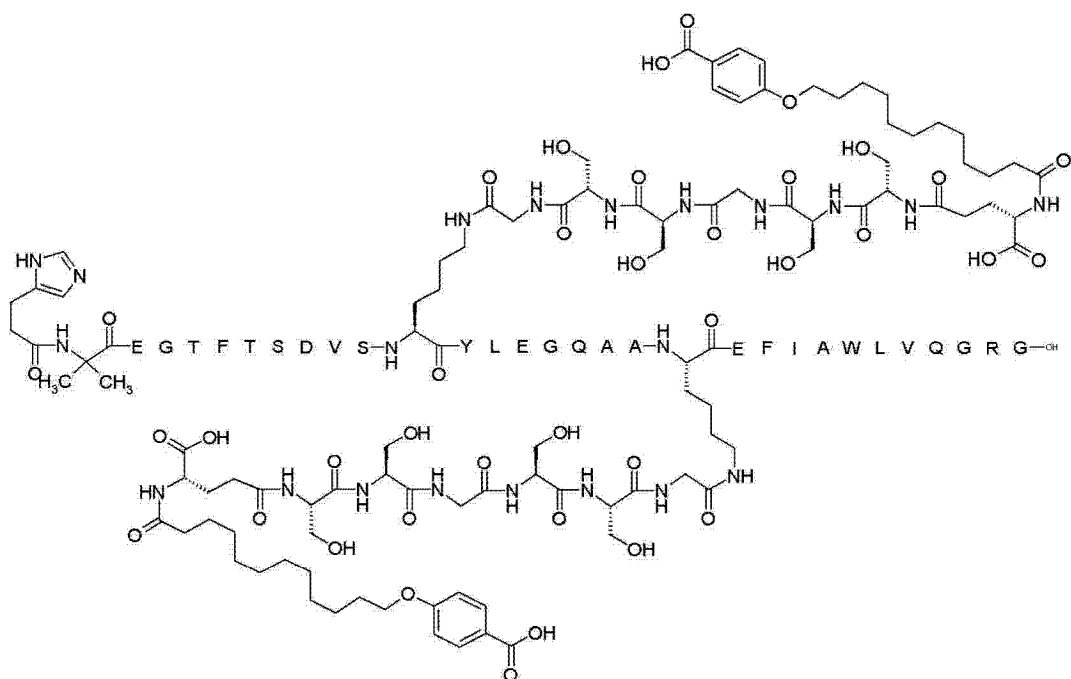
[1000] LCMS 方法 :LCMS_4 :Rt = 2.28 分钟, m/3 = 1749 ;m/4 = 1312。

[1001] 实施例 28

[1002] N^{18} -[2-[[(2S)-2-[[(2S)-2-[[2-[[(2S)-2-[[(2S)-2-[[(4S)-4-羧基-4-[12-(4-羧基苯氧基)十二烷酰基氨基]丁酰基]氨基]-3-羟基丙酰基]氨基]-3-羟基丙酰基]氨基]乙酰基]氨基]-3-羟基丙酰基]氨基]-3-羟基丙酰基]氨基]乙酰基], N^{26} -[2-[[(2S)-2-[[(2S)-2-[[2-[[(2S)-2-[[(2S)-2-[[(4S)-4-羧基-4-[12-(4-羧基苯氧基)十二烷酰基氨基]丁酰基]氨基]-3-羟基丙酰基]氨基]-3-羟基丙酰基]氨基]乙酰基]氨基]-3-羟基丙酰基]氨基]-3-羟基丙酰基]氨基]乙酰基]-[Imp⁷, Aib⁸, Lys¹⁸, Gln³⁴]-GLP-1-(7-37)-肽

[1003] 化学式 47 :

[1004]



[1005] 制备方法 :SPPS_P ;SC_P ;CP_M1

[1006] UPLC 方法 :AP_B4_1 :Rt = 9.3 分钟

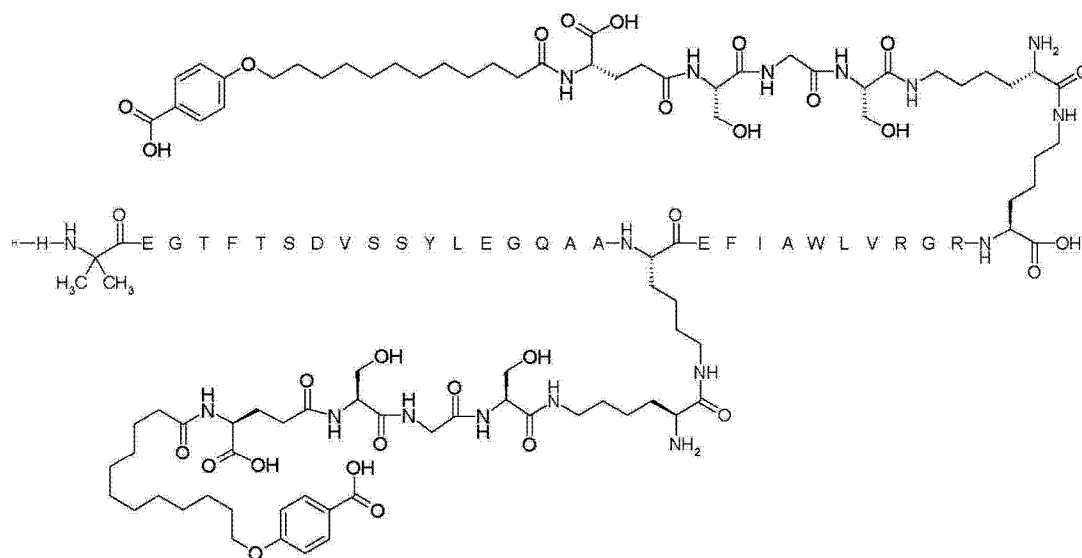
[1007] LCMS 方法 :LCMS_4 :Rt = 2.45 分钟, m/3 = 1739 ;m/4 = 1305。

[1008] 实施例 29

[1009] $N^{\epsilon 26}$ -[(2S)-2-氨基-6-[[[(2S)-2-[[2-[[[(2S)-2-[(4S)-4-羧基-4-[12-(4-羧基苯氧基)十二烷酰基氨基]丁酰基]氨基]-3-羟基丙酰基]氨基]乙酰基]氨基]-3-羟基丙酰基]氨基]己酰基], $N^{\epsilon 37}$ -[(2S)-2-氨基-6-[[[(2S)-2-[[2-[[[(2S)-2-[(4S)-4-羧基-4-[12-(4-羧基苯氧基)十二烷酰基氨基]丁酰基]氨基]-3-羟基丙酰基]氨基]乙酰基]氨基]-3-羟基丙酰基]氨基]己酰基]-[Aib⁸, Arg³⁴, Lys³⁷]-GLP-1-(7-37)-肽

[1010] 化学式 48 :

[1011]



[1012] 制备方法 :SPPS_P ;SC_P ;CP_M1

[1013] UPLC 方法 :AP_B4_1 :Rt = 8.4 分钟

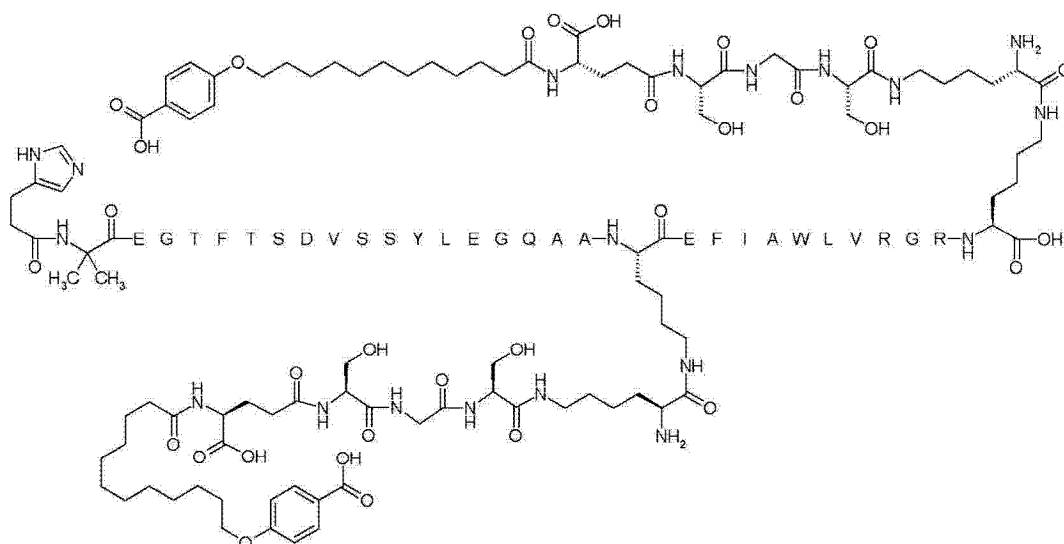
[1014] LCMS 方法 :LCMS_4 :Rt = 2.15 分钟, m/3 = 1695 ;m/4 = 1271。

[1015] 实施例 30

[1016] $N^{\epsilon 26}$ -[(2S)-2-氨基-6-[[[(2S)-2-[[2-[[[(2S)-2-[(4S)-4-羧基-4-[12-(4-羧基苯氧基)十二烷酰基氨基]丁酰基]氨基]-3-羟基丙酰基]氨基]乙酰基]氨基]-3-羟基丙酰基]氨基]己酰基], $N^{\epsilon 37}$ -[(2S)-2-氨基-6-[[[(2S)-2-[[2-[[[(2S)-2-[(4S)-4-羧基-4-[12-(4-羧基苯氧基)十二烷酰基氨基]丁酰基]氨基]-3-羟基丙酰基]氨基]乙酰基]氨基]-3-羟基丙酰基]氨基]己酰基]-[Imp⁷, Aib⁸, Arg³⁴, Lys³⁷]-GLP-1-(7-37)-肽

[1017] 化学式 49 :

[1018]



[1019] 制备方法 :SPPS_P ;SC_P ;CP_M1

[1020] UPLC 方法 :AP_B4_1 :Rt = 8.5 分钟

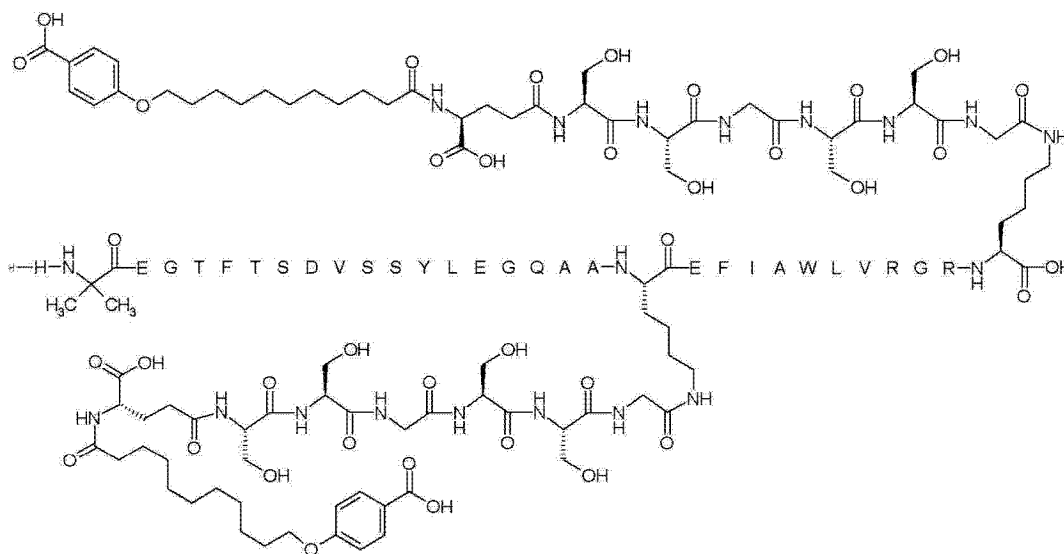
[1021] LCMS 方法 :LCMS_4 :Rt = 2.2 分钟, m/3 = 1690 ;m/4 = 1268。

[1022] 实施例 31

[1023] $N^{\varepsilon 26}$ -[2-[[(2S)-2-[[(2S)-2-[[2-[[(2S)-2-[[(2S)-2-[[(4S)-4-羧基-4-[11-(4-羧基苯氧基)十一烷酰基氨基]丁酰基]氨基]-3-羟基丙酰基]氨基]-3-羟基丙酰基]氨基]乙酰基]氨基]-3-羟基丙酰基]氨基]-3-羟基丙酰基]氨基]乙酰基], $N^{\varepsilon 37}$ -[2-[[(2S)-2-[[(2S)-2-[[2-[[(2S)-2-[[(2S)-2-[[(4S)-4-羧基-4-[11-(4-羧基苯氧基)十一烷酰基氨基]丁酰基]氨基]-3-羟基丙酰基]氨基]-3-羟基丙酰基]氨基]乙酰基]氨基]-3-羟基丙酰基]氨基]-3-羟基丙酰基]氨基]乙酰基]-[Aib⁸, Arg³⁴, Lys³⁷]-GLP-1-(7-37)-肽

[1024] 化学式 50 :

[1025]



[1026] 制备方法 :SPPS_CS ;SPPS_L ;SC_CS ;CP_M1

[1027] UPLC 方法 :B4_1 :Rt = 8.47 分钟

[1028] LCMS 方法 :LCMS_4 :Rt = 2.20 分钟 ;m/3 :1754 ;m/4 :1316 ;m/5 :1053。

[1029] 比较化合物

[1030] 本申请中提及多种比较化合物。

[1031] 利拉鲁肽,一种单酰化 GLP-1 衍生物,每日给予一次,由 NovoNordiskA/S 销售(商品名称 **VICTOZA®**),公开于 W098/08871A1(实施例 37)。

[1032] Semaglutide,一种单酰化 GLP-1 衍生物,一周给予一次,由 NovoNordiskA/S 开发中,公开于 w006/097537A2(实施例 4)。

[1033] 下面提及的比较化合物公开于 W02011/080103、W02011/080102 或 W02012/062803。在仅在接头中不同于本发明的化合物的意义下,它们是直接比较化合物。比较化合物的接头可称为“gGlu-2xOEG”接头。过往已极频繁地使用过该接头,并已证实是非常好的接头。gGlu-2xOEG 接头描述于几项以往的出版物中,例如 W02011/080103,参见化学式 5, 5a(OEG) 和 6(gGlu)。

[1034] 至于本文使用的命名法,我们在比较实施例编号上加上“a”。例如,实施例 1 的化合物的直接比较物是实施例 1a 的化合物;实施例 2 的化合物的直接比较物是实施例 2a 的化合物等(加上强调显示)。本文实施例化合物中的 10 个具有本领域已知的上述直接比较物。其余的实施例化合物的情况并非如此。因此,对于其余化合物,没有已知相应的直接比较物化合物。

[1035] 实施例 1a

[1036] W02011/080103 中的实施例 2 的化合物,化学式 21。

[1037] 实施例 2a

[1038] W02011/080103 中的实施例 17 的化合物,化学式 36。

[1039] 实施例 3a

[1040] W02011/080103 中的实施例 33 的化合物,化学式 52。

[1041] 实施例 4a

[1042] W02011/080103 中的实施例 46 的化合物,化学式 65。

[1043] 实施例 5a

[1044] W02012/062803 中的实施例 38 的化合物,化学式 57。

[1045] 实施例 6a

[1046] W02012/062803 中的实施例 74 的化合物,化学式 93。

[1047] 实施例 7a

[1048] W02012/062803 中的实施例 2 的化合物,化学式 21。

[1049] 实施例 9a

[1050] W02012/062803 中的实施例 92 的化合物,化学式 111。

[1051] 实施例 22a

[1052] W02012/062803 中的实施例 141 的化合物,化学式 189。

[1053] 实施例 23a

[1054] W02011/080103 中的实施例 3 的化合物,化学式 22。

[1055] 药理学方法

[1056] 实施例 32:体外效能(AlphaScreen;膜)

[1057] 本实施例的目的是测试 GLP-1 衍生物的体外活性或效能。

[1058] 如下所述测定实施例 1-31 和比较实施例 1a-7a、9a、22a 和 23a 的 GLP-1 衍生物的效能,即为在含有表达人 GLP-1 受体的膜的培养基中刺激环状 AMP(cAMP) 的形成。

[1059] 原理

[1060] 将从表达人 GLP-1 受体的稳定转染的细胞系 BHK467-12A(tk-ts13) 纯化的血浆膜用所述 GLP-1 类似物或衍生物刺激,并使用得自 Perkin Elmer Life Sciences 的 AlphaScreen™ cAMP 测定试剂盒,测量 cAMP 产生的效能。AlphaScreen 测定法的基本原理是内源 cAMP 和外源添加的生物素 -cAMP 间的竞争。通过使用与接纳珠缀合的特异性抗体实现 cAMP 的俘获。

[1061] 细胞培养和膜的制备

[1062] 选择稳定转染的细胞系和高表达克隆用于筛选。使细胞在 5% CO₂ 下于 DMEM、5% FCS、1% Pen/Strep(青霉素/链霉素)和 0.5mg/ml 选择标记 G418 中生长。

[1063] 将约 80%汇合的细胞用 PBS 洗涤两次,并用 Versene(乙二胺四乙酸四钠盐的水溶液)收获,以 1000rpm 离心 5 分钟,除去上清液。其它步骤在冰上进行。将细胞沉淀在 10ml 缓冲液 1(20mMNa-HEPES,10mM EDTA, pH = 7.4) 中通过 Ultrathurax 匀浆 20-30s,以 20,000rpm 离心 15 分钟,将沉淀重新悬浮于 10ml 缓冲液 2(20mMNa-HEPES,0.1mM EDTA, pH = 7.4) 中。对悬液进行匀浆 20-30s,以 20,000rpm 离心 15 分钟。重复悬浮于缓冲液 2 中、匀浆和离心一次,将膜重新悬浮于缓冲液 2 中。测定蛋白质浓度,将膜保存在 -80℃ 下备用。

[1064] 该测定法在平底 96 孔板(Costar 目录号:3693)中进行。每孔的最终体积为 50 μl。

[1065] 溶液和试剂

[1066] AlphaScreen cAMP 测定试剂盒得自 Perkin Elmer Life Sciences(目录号:6760625M);含有抗 -cAMP 接纳珠(10U/μl)、链霉抗生物素供体珠(10U/μl)和生物素化 -cAMP(133U/μl)。

[1067] AlphaScreen 缓冲液, pH = 7.4:50mM Tris-HCl(Sigma, 目录号:T3253);5mM HEPES(Sigma, 目录号:H3375);10mM MgCl₂·6H₂O(Merck, 目录号:5833);150mM NaCl(Sigma, 目录号:S9625);0.01% Tween(Merck, 目录号:822184)。用前将下列加入 AlphaScreen 缓冲液中(规定的终浓度):BSA(Sigma, 目录号 A7906):0.1%;IBMX(Sigma, 目录号 I5879):0.5mM;ATP(Sigma, 目录号 A7699):1mM;GTP(Sigma, 目录号 G8877):1 μM。

[1068] cAMP 标准品(测定的稀释因子 = 5):cAMP 溶液:5 μL 的 5mMcAMP 储液 +495 μL AlphaScreen 缓冲液。

[1069] 在 AlphaScreen 缓冲液中制备 cAMP 标准品以及待测试的 GLP-1 类似物或衍生物的适当稀释系列,例如下列 8 个浓度的 GLP-1 化合物:10⁻⁷、10⁻⁸、10⁻⁹、10⁻¹⁰、10⁻¹¹、10⁻¹²、10⁻¹³ 和 10⁻¹⁴M 及例如 10⁻⁶-3x10⁻¹¹ 的 cAMP 的系列。

[1070] 膜/接纳珠

[1071] 自 hGLP-1/BHK467-12A 细胞制备浓度为 6 μg/孔(相当于 0.6mg/ml)的膜(每孔所用的膜的量可以变化)

[1072] “无膜”:AlphaScreen 缓冲液中的接纳珠(15 μg/ml 最终)

[1073] “6 μg/孔膜”:AlphaScreen 缓冲液中的膜 + 接纳珠(15 μg/ml 最终)

[1074] 将等分(10 μl)的“无膜”加入 cAMP 标准品(每孔一式两份)和阳性和阴性对照

中

[1075] 将等分 (10 μ l) 的“6 μ g/ 孔膜”加入 GLP-1 和类似物中 (每孔一式两份或一式三份)

[1076] 阳性对照 :10 μ l “无膜”+10 μ l AlphaScreen 缓冲液

[1077] 阴性对照 :10 μ l “无膜”+10 μ l cAMP 储液 (50 μ M)

[1078] 由于珠粒对直射光敏感,所以全部处理在暗中 (尽可能的暗) 或在绿光中进行。全部稀释在冰上进行。

[1079] 程序

[1080] 1. 制备 AlphaScreen 缓冲液。

[1081] 2. 将 GLP-1/ 类似物 /cAMP 标准品在 AlphaScreen 缓冲液中溶解和稀释。

[1082] 3. 通过将链霉抗生物素供体珠 (2 单位 / 孔) 和生物素化 cAMP (1.2 单位 / 孔) 混合制备供体珠溶液,并在室温下避光温育 20-30 分钟。

[1083] 4. 将 cAMP/GLP-1/ 类似物加入板中 :10 μ l/ 孔。

[1084] 5. 制备膜 / 接纳珠溶液,并加入板中 :10 μ l/ 孔。

[1085] 6. 加入供体珠 :30 μ l/ 孔。

[1086] 7. 将板包在铝箔纸中,在振荡器上在室温下温育 3 小时 (非常缓慢)。

[1087] 8. 在 AlphaScreen 上计数 - 将各板在 AlphaScreen 中预温育 3 分钟后计数。

[1088] 结果

[1089] 应用 Graph-Pad Prism 软件 (版本 5) 计算 EC_{50} [pM] 值,并在下表中显示。可通过计算 $N : N = 100 \times (EC_{50}(\text{比较化合物}) / EC_{50}(\text{本发明的化合物}))$,使本发明的各种化合物的 EC_{50} [pM] 值与相应的比较化合物相关联。因此数字 N 表示本发明的化合物相对于相应的比较化合物的体外效能改进的百分比。

[1090] 表 1

	实施例编号	体外效能
		(AlphaScreen cAMP; 膜) EC_{50} [pM]
[1091]	1	32
	1a	112
	2	116
	2a	582
	3	137
	3a	506
	4	48
	4a	101
	5	95

[1092]

5a	224
6	34
6a	62
7	110
7a	395
8	230
9	276
9a	1589
10	31
11	381
12	145
13	314
14	261
15	183
16	146
17	171
18	89
19	181
20	350
21	486
22	307
22a	1139
23	2500
23a	1683
24	166
25	252
26	446
27	138
28	460
29	238
30	276
31	27

[1093] 所有受测试的衍生物的效能在体外得到证实。

[1094] 除单独的例外（实施例 23 的化合物）以外，衍生物具有出乎意料的好的体外效能，相当于 500pM 或低于 500pM 的 EC_{50} 。17 种衍生物甚至更有效，其 EC_{50} 为 200pM 或低于 200pM；7 种衍生物具有非常良好的效能，相当于 EC_{50} 为 100pM 或低于 100pM。

[1095] 除相同单独的例外以外,与比较化合物相比,本发明化合物的体外效能一般改进 2-5 倍。

[1096] 实施例 33:体外效能(CRE 萤光素酶;全细胞)

[1097] 本实施例的目的是测试 GLP-1 衍生物的体外活性或效能。体外效能是在全细胞测定法中人 GLP-1 受体活化的度量。

[1098] 如下测定实施例 1-31 和比较实施例 1a-7a、9a、22a 和 23a 的 GLP-1 衍生物的效能。

[1099] 原理

[1100] 通过在报道基因测定法中测量人 GLP-1 受体的反应,来测定体外效能。在表达人 GLP-1 受体和含有与萤火虫萤光素酶的启动子和基因偶联的 cAMP 应答元件(CRE)(CRE 萤光素酶)的 DNA 的稳定转染的 BHK 细胞系中进行测定。当人 GLP-1 受体被激活时,导致 cAMP 的产生,这进而导致萤光素酶蛋白进行表达。当测定温育完成时,加入萤光素酶底物(萤光素),该酶将萤光素转化成氧化萤光素并产生生物发光。测量发光,其是该测定法的读出。

[1101] 细胞培养和制备

[1102] 用于该测定法的细胞(克隆 FCW467-12A/KZ10-1)为 BHK 细胞,其以 BHKTS13 为亲本细胞系。所述细胞来源于表达人 GLP-1 受体的克隆(FCW467-12A),并通过用 CRE 萤光素酶进一步转染以获得现有克隆来建立。

[1103] 将细胞培养在 5% CO₂ 下的细胞培养基中。将其等分,并保存在液氮中。在每次测定之前,取等分试样,在 PBS 中洗涤两次后,以所需浓度悬浮于测定专用的缓冲液中。对于 96 孔板,制备悬液,得到 5x10³ 细胞/孔的终浓度。

[1104] 材料

[1105] 在该测定中使用下列化学制剂:Pluronic F-68(10%)(Gibco2404)、人血清白蛋白(HSA)(Sigma A9511)、卵清蛋白(Sigma A5503)、无酚红 DMEM(Gibco11880-028)、1M Hepes(Gibco15630)、Glutamax100x(Gibco35050)和 steady lite plus(PerkinElmer6016757)。

[1106] 细胞培养基由 10% FBS(胎牛血清)、1mg/ml G418、240nM MTX(甲氨蝶呤)和 1% pen/strep(青霉素/链霉素)组成。测定培养基由无酚红 DMEM、10mM Hepes 和 1x Glutamax 组成。1%测定缓冲液由含 2%卵清蛋白、0.2% Pluronic F-68 和 2% HAS 的测定培养基组成。0%测定缓冲液由含 2%卵清蛋白和 0.2% Pluronic F-68 的测定培养基组成。

[1107] 程序

[1108] 1) 使细胞储液在 37°C 水浴中融化。

[1109] 2) 将细胞在 PBS 中洗涤 3 次。

[1110] 3) 对细胞计数,并在测定培养基中调节至 5x10³ 细胞/50 μl (1x10⁵ 细胞/nl)。将 50 μl 等分的细胞转移到测定板的各孔中。

[1111] 4) 将试验化合物和参比化合物的储液在 0%测定缓冲液(0% HSACRE 萤光素酶测定法)和 1%测定缓冲液(HSA CRE 萤光素酶测定法)中稀释至 0.2 μM 的浓度。将化合物稀释 10 倍,得到下列浓度:2x10⁻⁷M、2x10⁻⁸M、2x10⁻⁹M、2x10⁻¹⁰M、2x10⁻¹¹M、2x10⁻¹²M 和 2x10⁻¹³M。对于各种化合物,还包括空白测定缓冲液对照。

[1112] 5) 将 50 μl 等分的化合物或空白从稀释板一式三份转移到测定板。测定下列终浓度的化合物:1x10⁻⁷M、1x10⁻⁸M、1x10⁻⁹M、1x10⁻¹⁰M、1x10⁻¹¹M、1x10⁻¹²M 和 1x10⁻¹³M。

- [1113] 6) 将测定板在 5% CO₂ 培养箱中于 37℃ 温育 3 小时。
- [1114] 7) 从培养箱中取出测定板, 使之在室温下静置 15 分钟。
- [1115] 8) 将 100 μl 等分的 steadylite plus 试剂加入测定板的各孔中 (试剂是光敏感的)。
- [1116] 9) 各测定板用铝箔纸包覆以避光并在室温下振荡 30 分钟。
- [1117] 10) 在 Packard TopCount NXT 仪器中对各测定板读数。
- [1118] 计算与结果
- [1119] 将得自 TopCount 仪器的数据传送至 GraphPad Prism5 软件。软件对各一式三份的值取平均值, 并执行非线性回归 (log (激动剂) 相对于反应 - 变量斜率 (4 参数))。EC₅₀ 值通过软件计算, 并显示于下表 2 中 (单位 pM)。
- [1120] 表 2 :

实施例编号	体外效能
	(CRE-萤光素酶) 低白蛋白 EC ₅₀ [pM]
1	4.3
1a	6.7
2	23
2a	132
3	31
3a	124
4	8.0
4a	40
5	5.3
5a	25
6	7.5
6a	62
7	6.8
7a	17
8	34
9	12
9a	60
10	22
11	n. d. *
12	9.8
13	9.6
14	5.6
15	15

[1121]

[1122]	16	8.3
	17	29
	18	6.8
	19	11
	20	22
	21	47
	22	60
	22a	174
	23	6.1
	23a	41
	24	5.2
	25	4.6
	26	5.8
	27	4.3
	28	5.0
	29	5.0
	30	9.4
	31	2.8

[1123] * 从测试中未获得

[1124] 所有受测试衍生物的效能能在体外得到证实。

[1125] 所有受测试的衍生物具有出乎意料的良好体外效能,相当于 100pM 或低于 100pM 的 EC_{50} 。22 种衍生物甚至更有效,其 EC_{50} 为 20pM 或低于 20pM;19 种衍生物具有非常好的效能,相当于 10pM 或低于 10pM 的 EC_{50} 。

[1126] 与比较化合物相比,本发明化合物的体外效能一般改进 2-8 倍。

[1127] 实施例 34 :GLP-1 受体结合

[1128] 该实验的目的是研究 GLP-1 衍生物与 GLP-1 受体的结合。这通过下述体外实验进行。

[1129] 通过其从受体置换 ^{125}I -GLP-1 的能力来测量实施例 1-31 和比较实施例 1a-7a、9a、22a 和 23a 的 GLP-1 衍生物与人 GLP-1 受体的结合亲和力。用低浓度的白蛋白 (0.001% - 相当于示踪剂中的其残余量) 进行该测定法。

[1130] 条件

[1131] 物种 (体外):仓鼠

[1132] 生物终点:受体结合

[1133] 测定方法:SPA

[1134] 受体:GLP-1 受体

[1135] 细胞系:BHK tk-ts13

[1136] 细胞培养和膜纯化

[1137] 选择稳定转染的细胞系和高表达克隆用于筛选。使细胞在 5% CO₂ 下于 DMEM、10% FCS、1% Pen/Strep (青霉素 / 链霉素) 和 1.0mg/ml 选择标记 G418 中生长。

[1138] 将细胞 (约 80% 汇合) 在 PBS 中洗涤两次, 用 Versene (乙二胺四乙酸四钠盐的水溶液) 收获, 接着通过以 1000rpm 离心 5 分钟使之分离。细胞 / 细胞沉淀在后续步骤中必须尽可能地保持在冰上。将细胞沉淀在适量的缓冲液 1 (取决于细胞的量, 例如 10ml) 中用 Ultrathurax 匀浆 20-30 秒钟。将匀浆物以 20000rpm 离心 15 分钟。将沉淀重新悬浮 (匀浆) 于 10ml 缓冲液 2 中, 并再次离心。将该步骤再次重复。将所得沉淀重新悬浮于缓冲液 2 中, 测定蛋白质浓度。将膜保存在 -80°C 下。

[1139] 缓冲液 1 : 20mM Na-HEPES+10mM EDTA, pH7.4

[1140] 缓冲液 2 : 20mM Na-HEPES+0.1mM EDTA, pH7.4

[1141] 结合测定法:

[1142] SPA :

[1143] 将试验化合物、膜、SPA-颗粒和 [¹²⁵I]-GLP-1 (7-36)NH₂ 在测定缓冲液中稀释。将 50ul (微升) 缓冲液 (含有 0.001% HSA 的“低白蛋白”实验) 加入 Optiplate 中, 加入 25ul 的试验化合物。加入 5-10 μg 膜蛋白 / 样品 (50 μl), 相当于 0.1-0.2mg 蛋白质 / ml (对于各膜制备, 优选使之最优化)。以 0.5mg / 孔 (50 μl) 的量加入 SPA-颗粒 (Wheatgerm 凝集素 SPA 珠粒, Perkin Elmer, #RPNQ0001)。与 [¹²⁵I]-GLP-1-(7-36)NH₂ (终浓度 0.06nM, 相当于 49.880DPM, 25 μl) 一起开始温育。将板用 PlateSealer 密封, 在振荡的同时在 30°C 下温育 120 分钟。将板离心 (1500rpm, 10 分钟), 在 Topcounter 中读数。

[1144] 测定缓冲液:

[1145] 50mM HEPES

[1146] 5mM EGTA

[1147] 5mM MgCl₂

[1148] 0.005% Tween20

[1149] pH7.4

[1150] HAS 为 SIGMA A1653

[1151] 计算

[1152] IC₅₀ 值自曲线读出, 为自受体中置换 50% 的 ¹²⁵I-GLP-1 的浓度。

[1153] 一般而言, 在低白蛋白浓度下与 GLP-1 受体结合应尽可能地好, 相当于低的 IC₅₀ 值。

[1154] 结果

[1155] 本发明的各个化合物以及相应的比较化合物的 IC₅₀ [nM] 值见下表 3。可通过计算 N 使之与相应的比较化合物相关联: $N = 100 \times (IC_{50}(\text{比较化合物}) / IC_{50}(\text{本发明的化合物}))$ 。数字 N 因此表示相对于相应的比较化合物, 本发明化合物的受体结合改进的百分比。

[1156] 表 3

[1157]

实施例编号	IC ₅₀ [nM] (低白蛋白)
1	0.34
1a	2.27
2	8.99
2a	44.50
3	11.60
3a	51.50
4	0.58
4a	2.77
5	1.63
5a	5.80

[1158]

6	0.43
6a	0.80
7	0.91
7a	7.03
8	8.50
9	1.55
9a	8.09
10	1.72
11	12.80
12	4.61
13	0.84
14	0.37
15	0.50
16	0.54
17	1.34
18	0.48
19	0.42
20	2.27
21	4.87
22	10.50
22a	48.40
23	0.43
23a	3.55
24	0.19
25	0.27
26	0.53
27	0.69
28	0.96
29	0.27
30	0.18
31	0.17

[1159] 所有受测试的衍生物均能够在低浓度的白蛋白下与 GLP-1 受体结合。

[1160] 本发明的所有衍生物以低于 13nM 的 IC_{50} (低白蛋白) 值与受体紧密结合 ;26 种低于 5.0nM ;19 种低于 1.0nM。

[1161] 正如可从表 3 推知,与比较化合物相比,本发明化合物的受体结合一般改进 3-8 倍。

[1162] 虽然本文说明和描述了本发明的某些特征,但是本领域普通技术人员此刻将会想到许多修改、替换、变化和等同物。因此要理解,随附权利要求书意指包括落入本发明真实精神范围内的所有这样的修改和变化。

[0001]

CPCH1460294P

序 列 表

<110> Novo Nordisk A/S

<120> GLP-1 衍生物

<130> 8382.204-W0

<160> 13

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 6

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 肽接头

<400> 1

Ser Ser Gly Ser Ser Gly
1 5

<210> 2

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 肽接头

<220>

<221> 其它特征

<222> (1)..(1)

<223> Glu 为 γ -Glu

<400> 2

Glu Ser Ser Gly Ser Ser Gly
1 5

<210> 3

[0002]

<211> 31
<212> PRT
<213> 智人

<400> 3

His Ala Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Gly
1 5 10 15

Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly Arg Gly
20 25 30

<210> 4
<211> 12
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 肽接头

<400> 4

Ser Ser Gly Ser Ser Gly Ser Ser Gly Ser Ser Gly
1 5 10

<210> 5
<211> 18
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 肽接头

<400> 5

Ser Ser Gly Ser Ser Gly Ser Ser Gly Ser Ser Gly Ser Ser Gly Ser
1 5 10 15

Ser Gly

<210> 6
<211> 7
<212> PRT

[0003]

<213> 人工序列

<220>

<223> 肽接头

<220>

<221> 其它特征

<222> (1)..(1)

<223> Glu 为 γ -Glu

<400> 6

Glu Ser Ser Ala Ser Ser Ala
1 5

<210> 7

<211> 13

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 肽接头

<220>

<221> 其它特征

<222> (1)..(1)

<223> Glu 为 γ -Glu

<400> 7

Glu Ser Ser Gly Ser Ser Gly Ser Ser Gly Ser Ser Gly
1 5 10

<210> 8

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 肽接头

<220>

<221> 其它特征

<222> (1)..(1)

[0004]

<223> Glu 为 γ -Glu

<400> 8

Glu Ser Ser Ser Ser Ser Ser
1 5

<210> 9

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 肽接头

<220>

<221> 其它特征

<222> (1).. (1)

<223> Glu 为 γ -Glu

<220>

<221> 其它特征

<222> (8).. (8)

<223> Lys 为 ϵ -Lys

<400> 9

Glu Ser Ser Gly Ser Ser Gly Lys
1 5

<210> 10

<211> 14

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 肽接头

<220>

<221> 其它特征

<222> (1).. (1)

<223> Glu 为 γ -Glu

<220>

<221> 其它特征

[0005]

<222> (14).. (14)

<223> Lys 为 ϵ -Lys

<400> 10

Glu Ser Ser Gly Ser Ser Gly Ser Ser Gly Ser Ser Gly Lys
1 5 10

<210> 11

<211> 20

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 肽接头

<220>

<221> 其它特征

<222> (1).. (1)

<223> Glu 为 γ -Glu

<220>

<221> 其它特征

<222> (20).. (20)

<223> Lys 为 ϵ -Lys

<400> 11

Glu Ser Ser Gly Ser Ser Gly Ser Ser Gly Ser Ser Gly Ser Ser Gly
1 5 10 15

Ser Ser Gly Lys
20

<210> 12

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 肽接头

<220>

<221> 其它特征

[0006]

<222> (8)..(8)

<223> Lys 为 ϵ -Lys

<400> 12

Glu Ser Ser Ser Ser Ser Ser Lys

1

5

<210> 13

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 肽接头

<220>

<221> 其它特征

<222> (1)..(1)

<223> Glu 为 γ -Glu

<220>

<221> 其它特征

<222> (5)..(5)

<223> Lys 为 ϵ -Lys

<400> 13

Glu Ser Gly Ser Lys

1

5