



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 101842386 A

(43) 申请公布日 2010.09.22

(21) 申请号 200880114458.2

(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司
72001

(22) 申请日 2008.09.05

代理人 权陆军 付磊

(30) 优先权数据

07115743.2 2007.09.05 EP

08101010.0 2008.01.28 EP

(51) Int. Cl.

C07K 14/605 (2006.01)

A61K 38/26 (2006.01)

C07K 14/575 (2006.01)

A61K 38/22 (2006.01)

(85) PCT申请进入国家阶段日

2010.04.30

(86) PCT申请的申请数据

PCT/EP2008/061833 2008.09.05

(87) PCT申请的公布数据

W02009/030774 EN 2009.03.12

(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 J·斯佩茨勒 L·沙弗 J·刘

J·T·科德拉 K·马德森

P·W·加里贝 J·科富德 S·伦奇

H·索格森 I·彼得森

权利要求书 5 页 说明书 88 页 序列表 5 页
附图 0 页

(54) 发明名称

截短的 GLP-1 衍生物和它们的治疗用途

(57) 摘要

本发明涉及截短的 GLP-1 类似物,特别是作为修饰的 GLP-1(7-35) (SEQ ID NO :1) 的 GLP-1 类似物,其具有 :i) 与 GLP-1(7-35) 相比总共 2、3、4、5、6、7、8 或 9 个氨基酸取代,包括 a) 在相当于 GLP-1(7-35) 的位置 22 的位置处的 Glu 残基,和 b) 在相当于 GLP-1(7-35) 的位置 26 的位置处的 Arg 残基 ;以及其衍生物和治疗用途和组合物。这些类似物和衍生物是高度有效的,具有对 GLP-1 受体、以及对 GLP-1 受体的细胞外结构域的良好结合亲和力,其对实现具有每周施用一次的潜力的长效、稳定的 GLP-1 化合物是潜在相关的。

1. 一种 GLP-1 类似物, 其是修饰的 GLP-1 (7-35) (SEQ ID NO :1), 具有:
 - i) 与 GLP-1 (7-35) 相比总共 2、3、4、5、6、7、8 或 9 个氨基酸取代, 包括
 - a) 在相当于 GLP-1 (7-35) 的位置 22 的位置处的 Glu 残基, 和
 - b) 在相当于 GLP-1 (7-35) 的位置 26 的位置处的 Arg 残基 ;或其衍生物。
2. 根据权利要求 1 的 GLP-1 类似物或其衍生物, 其中在相当于 GLP-1 (7-35) 的位置 30、31、32、33、34 或 35 的位置处的氨基酸是没有的, 条件是如果在位置 30、31、32、33 或 34 的氨基酸是没有的, 则每个下游的氨基酸残基也是没有的。
3. 根据权利要求 1-2 的任一项的 GLP-1 类似物或其衍生物, 其中所述 GLP-1 类似物包含 i) C- 末端羧酸基团 ;或 (iii) C- 末端酰胺基团。
4. 根据权利要求 1-3 的任一项的 GLP-1 类似物或其衍生物, 其是用白蛋白结合残基衍生化或是聚乙二醇化的。
5. 根据权利要求 1-4 的任一项的 GLP-1 类似物或其衍生物, 其中在位置 35 处的氨基酸是没有的, 以及其中所述 GLP-1 类似物的总长度是 28 个氨基酸。
6. 根据权利要求 1-5 的任一项的 GLP-1 类似物或其衍生物, 其中在位置 34 和 35 处的氨基酸是没有的, 以及其中所述 GLP-1 类似物的总长度是 27 个氨基酸。
7. 根据权利要求 1-6 的任一项的 GLP-1 类似物或其衍生物, 其中在位置 33、34 和 35 处的氨基酸是没有的, 以及其中所述 GLP-1 类似物的总长度是 26 个氨基酸。
8. 根据权利要求 1-7 的任一项的 GLP-1 类似物或其衍生物, 其中在位置 32、33、34 和 35 处的氨基酸是没有的, 以及其中所述 GLP-1 类似物的总长度是 25 个氨基酸。
9. 根据权利要求 1-8 的任一项的 GLP-1 类似物或其衍生物, 其中在位置 31、32、33、34 和 35 处的氨基酸是没有的, 以及其中所述 GLP-1 类似物的总长度是 24 个氨基酸。
10. 根据权利要求 1-9 的任一项的 GLP-1 类似物或其衍生物, 其中在位置 30、31、32、33、34 和 35 处的氨基酸是没有的, 以及其中所述 GLP-1 类似物的总长度是 23 个氨基酸。
11. 根据权利要求 1-10 的任一项的 GLP-1 类似物或其衍生物, 具有式 (I) 的序列
Xaa₇-Xaa₈-Xaa₉-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Xaa₁₆-Ser-Xaa₁₈-Tyr-Xaa₂₀-Glu-Glu-Xaa₂₃-Xaa₂₄-Xaa₂₅-Arg-Xaa₂₇-Phe-Ile-Xaa₃₀-Xaa₃₁-Leu-Xaa₃₃-Xaa₃₄-Xaa₃₅-R 式 (I) (SEQ ID No : 2)

其中

Xaa₇ 是 L- 组氨酸、D- 组氨酸、去氨基 - 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、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 是 Ala、Gly、Val、Leu、Ile、Lys、Aib、(1- 氨基环丙基) 羧酸、(1- 氨基环丁基) 羧酸、(1- 氨基环戊基) 羧酸、(1- 氨基环己基) 羧酸、(1- 氨基环庚基) 羧酸, 或 (1- 氨基环辛基) 羧酸 ;

Xaa₉ 是 Glu 或 Glu 衍生物, 例如, α , α 二甲基 -Glu ;

Xaa₁₆ 是 Val 或 Leu ;

Xaa₁₈ 是 Ser、Lys、Cys 或 Arg ;

Xaa₂₀ 是 Leu、Lys 或 Cys ;

Xaa₂₃ 是 Gln、Glu、Lys、Cys 或 Arg ;

Xaa₂₄ 是 Ala 或 Asn ;

Xaa₂₅ 是 Ala 或 Val ;

Xaa₂₇ 是 Glu、Ala 或 Leu ;

Xaa₃₀ 是 Ala、Glu、Lys、Arg 或没有 ;

Xaa₃₁ 是 Trp、Lys、Cys 或没有 ;

Xaa₃₃ 是 Val、Lys、Cys 或没有 ;

Xaa₃₄ 是 Lys、Glu、Asn、Arg、Cys 或没有 ;

Xaa₃₅ 是 Gly、Aib 或没有 ;

R 是酰胺或是没有的 ;

条件是,如果 Xaa₃₀、Xaa₃₁、Xaa₃₂、Xaa₃₃ 或 Xaa₃₄ 是没有的,则下游的每个氨基酸残基也是没有的。

12. 根据权利要求 1-10 的任一项的 GLP-1 类似物或其衍生物,具有式 (II) 的序列

Xaa₇-Xaa₈-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Val-Ser-Xaa₁₈-Tyr-Leu-Glu-Glu-Gln-Ala-Ala-Arg-Glu-Phe-Ile-Xaa₃₀-Trp-Leu-Xaa₃₃-Xaa₃₄-Xaa₃₅-R 式 (II) (SEQ ID No :3)

其中

Xaa₇ 是 L- 组氨酸、D- 组氨酸、去氨基 - 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、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 是 Ala、Gly、Val、Leu、Ile、Lys、Aib、(1- 氨基环丙基) 羧酸、(1- 氨基环丁基) 羧酸、(1- 氨基环戊基) 羧酸、(1- 氨基环己基) 羧酸、(1- 氨基环庚基) 羧酸,或 (1- 氨基环辛基) 羧酸 ;

Xaa₁₈ 是 Ser、Lys 或 Arg ;

Xaa₃₀ 是 Ala、Glu、Lys、Arg 或是没有的 ;

Xaa₃₃ 是 Val、Lys 或没有 ;

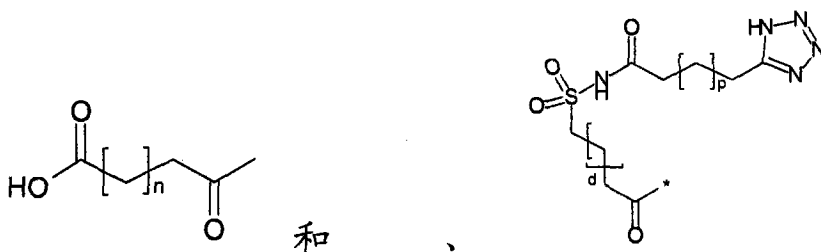
Xaa₃₄ 是 Lys、Glu、Arg 或是没有的 ;

Xaa₃₅ 是 Gly、Aib 或是没有的 ;

R 是酰胺或是没有的。

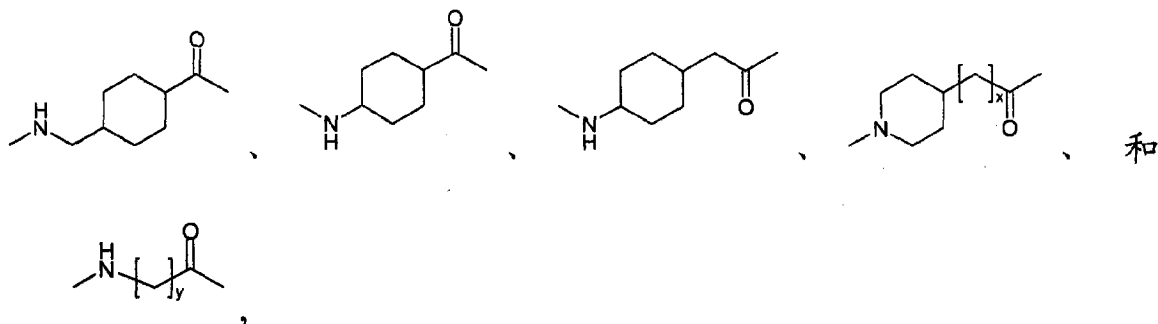
13. 根据权利要求 1-12 的任一项的 GLP-1 类似物或其衍生物,其中至少一个氨基酸残基用 A-B-C-D- 衍生化

其中 A- 选自以下构成的组



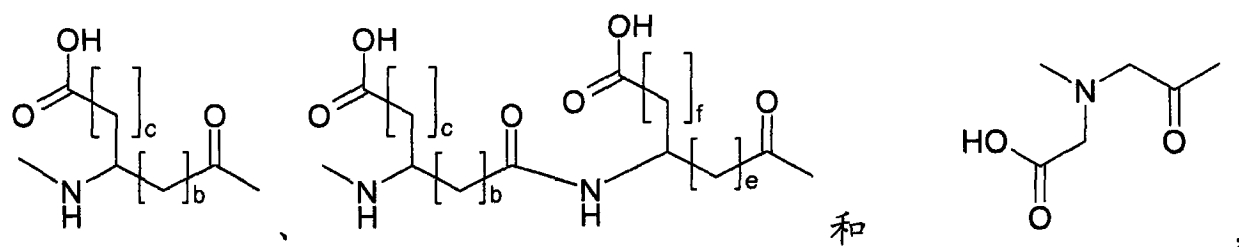
其中 n 选自由 14、15、16、17、18 和 19 构成的组, p 选自由 10、11、12、13 和 14 构成的组, 以及 d 选自由 0、1、2、3、4 和 5 构成的组,

-B- 选自以下构成的组



其中 x 选自由 0、1、2、3 和 4 构成的组, y 选自由 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11 和 12 构成的组,

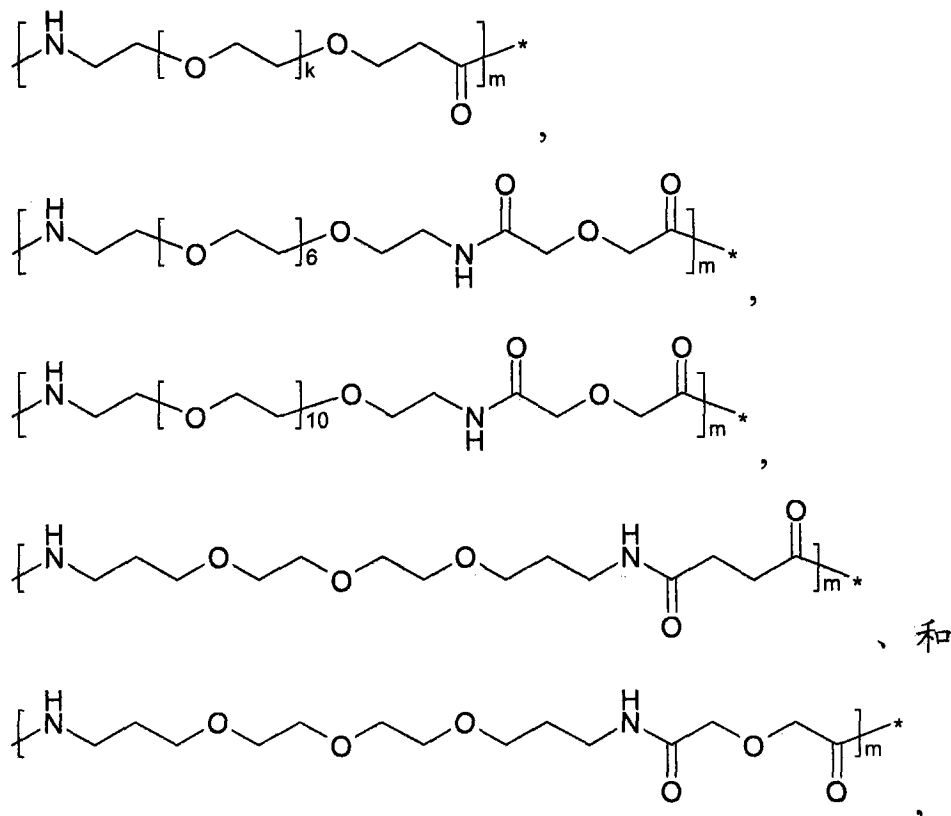
-C- 选自以下构成的组



其中 b 和 e 各自独立地选自由 0、1 和 2 构成的组, c 和 f 各自独立地选自由 0、1 和 2 构成的组, 条件是当 c 是 0 时 b 是 1 或 2, 或当 c 是 1 或 2 时 b 是 0, 和当 f 是 0 时 e 是 1 或 2, 或当 f 是 1 或 2 时 e 是 0, 和

-D- 附着到所述氨基酸残基以及是接头。

14. 根据权利要求 13 的 GLP-1 类似物或其衍生物, 其中 D 选自以下构成的组



和其中 k 选自由 0、1、2、3、4、5、11 和 27 构成的组, m 选自由 0、1、2、3、4、5 和 6 构成的组。

15. 根据权利要求 1-14 的任一项的 GLP-1 类似物或其衍生物,其选自以下的:

[Glu22, Arg26]GLP-1 (7-33) 酰胺

N-ε 20 {2-(2-{2-[2-(2-{2-[4- 羧基 -4-(17- 羧基 - 十七烷酰基氨基) 丁酰基氨基] 乙氧基} 乙氧基) 乙酰基氨基] 乙氧基} 乙氧基) 乙酰基}-(Aib8, Lys20, Glu22, Val25, Arg26, Leu27, Glu30, Lys33)GLP-1 (7-33) 酰胺;

N-ε 20 {2-(2-{2-[2-(2-{2-[4- 羧基 -4-(17- 羧基 - 十七烷酰基氨基) 丁酰基氨基] 乙氧基} 乙氧基) 乙酰基氨基] 乙氧基} 乙氧基) 乙酰基}-(Aib8, Lys20, Glu22, Arg26, Glu30)GLP-1 (7-33) 酰胺;

[Glu22, Val25, Arg26]GLP-1 (7-33) 酰胺;

[Aib8, Lys20, Glu22, Val25, Arg26, Glu30]GLP-1 (7-33) 酰胺;

N-ε 20 {2-(2-{2-[2-(2-{2-[4- 羧基 -4-(17- 羧基 - 十七烷酰基氨基) 丁酰基氨基] 乙氧基} 乙氧基) 乙酰基氨基] 乙氧基} 乙氧基) 乙酰基}-[Aib8, Lys20, Glu22, Val25, Arg26, Glu30]GLP-1 (7-33) 酰胺;

[Glu22, Arg26]GLP-1 (7-33) 肽;

[Glu22, Val25, Arg26]GLP-1 (7-32) 酰胺;

N-ε 20 {2-(2-{2-[2-(2-{2-[4- 羧基 -4-(17- 羧基 - 十七烷酰基氨基) 丁酰基氨基] 乙氧基} 乙氧基) 乙酰基氨基] 乙氧基} 乙氧基) 乙酰基}-(Aib8, Lys20, Glu22, Arg26)GLP-1 (7-33) 酰胺;

N-ε 31 {2-(2-{2-[2-(2-{2-[4- 羧基 -4-(17- 羧基 - 十七烷酰基氨基) 丁酰基氨基] 乙氧基} 乙氧基) 乙酰基氨基] 乙氧基} 乙氧基) 乙酰基}-(Aib8, Glu22, Val25, Arg26, Lys31)GLP-1 (7-33) 酰胺;

N-ε 20 {2-(2-{2-[2-(2-{2-[4- 羧基 -4-(17- 羧基 - 十七烷酰基氨基) 丁酰基氨基] 乙氧基} 乙氧基) 乙酰基氨基] 乙氧基} 乙氧基) 乙酰基}-(去氨基 His7, Lys20, Glu22, Arg26)GLP-1 (7-33) 酰胺;

N-ε 31 {2-(2-{2-[2-(2-{2-[4- 羧基 -4-(17- 羧基 - 十七烷酰基氨基) 丁酰基氨基] 乙氧基} 乙氧基) 乙酰基氨基] 乙氧基} 乙氧基) 乙酰基}-(去氨基 His7, Glu22, Arg26, Lys31)GLP-1 (7-33) 酰胺;

N-ε 20 {2-(2-{2-[2-(2-{2-[4- 羧基 -4-(17- 羧基 - 十七烷酰基氨基) 丁酰基氨基] 乙氧基} 乙氧基) 乙酰基氨基] 乙氧基} 乙氧基) 乙酰基}-(Aib8, Lys20, Glu22, Val25, Arg26, Leu27, Glu30, Lys31)GLP-1 (7-32) 酰胺;

N-ε 20 {2-(2-{2-[2-(2-{2-[4- 羧基 -4-(17- 羧基 - 十七烷酰基氨基) 丁酰基氨基] 乙氧基} 乙氧基) 乙酰基氨基] 乙氧基} 乙氧基) 乙酰基}-(Aib8, Lys20, Glu22, Val25, Arg26, Leu27, Nle30, Lys31)GLP-1 (7-32) 酰胺;

N-ε 31-[2-(2-{2-[2-(2-{2-[2-(S)-4- 羧基 -4-({反式 -4-[(19- 羧基十九烷酰基氨基) 甲基] 环己烷羰基) 氨基] 丁酰基氨基] 乙氧基} 乙氧基) 乙酰基氨基] 乙氧基} 乙氧基) 乙酰基]-(Aib8, Glu22, Val25, Arg26, Lys31)GLP-1-(7-33) 酰胺;

[去氨基 His7, Glu22, Arg26]-GLP-1 (7-34);

[Aib8, Lys20, Glu22, Val25, Arg26, Leu27, Lys31]GLP-1 (7-32) 酰胺;

N-ε 31-[2-(2-{2-[2-(2-{2-[2-(S)-4- 羧基 -4-(17- 羧基十七烷酰基氨基) 丁酰基氨基]

基]乙氧基}乙氧基)乙酰基氨基]乙氧基}乙氧基)乙酰基][去氨基 His7, Asp11, Glu18, Glu22, Val25, Arg26, Asp27, Glu30, Lys31]GLP-1(7-33) 酰胺;

[Aib8, Glu22, Val25, Lys31]GLP-1(7-33)-酰胺;和

N-ε 31-{2-(2-{2-[2-(2-{4-羧基-4-(17-羧基-十七烷酰基氨基)丁酰基氨基]乙氧基}乙氧基)乙酰基氨基]乙氧基}乙氧基)乙酰基}-N-β 34-(2-(二羧基甲基氨基)乙酰基)[Aib8, Glu22, Val25, Arg26, Lys31, Dap34]GLP-1(7-34) 酰胺。

16. 一种药物组合物,包含根据权利要求 1-15 的任一项的 GLP-1 类似物或其衍生物或其衍生物或其药学上可接受的盐、酰胺、烷基或酯,以及药学上可接受的赋形剂。

17. 根据权利要求 1-15 的任一项的 GLP-1 类似物或其衍生物或根据权利要求 16 的药物组合物,其用作药物。

18. 根据权利要求 1-15 的任一项的 GLP-1 类似物或其衍生物,或根据权利要求 16 的药物组合物,其用于高血糖、2 型糖尿病、损害的葡萄糖耐受、1 型糖尿病、肥胖、高血压、综合征 X、血脂异常、认知障碍、动脉粥样硬化、心肌梗塞、冠心病和其他心血管病症、中风、炎性肠综合征、消化不良和胃溃疡的治疗或预防。

19. 根据权利要求 1-15 的任一项的 GLP-1 类似物或其衍生物,或根据权利要求 16 的药物组合物在制造用于治疗或预防高血糖、2 型糖尿病、损害的葡萄糖耐受、1 型糖尿病、肥胖、高血压、综合征 X、血脂异常、认知障碍、动脉粥样硬化、心肌梗塞、冠心病和其他心血管病症、中风、炎性肠综合征、消化不良和胃溃疡的药物中的用途。

20. 一种通过施用药学上活性数量的根据权利要求 1-15 的任一项的 GLP-1 类似物或其衍生物或根据权利要求 16 的药物组合物来治疗或预防高血糖、2 型糖尿病、损害的葡萄糖耐受、1 型糖尿病、肥胖、高血压、综合征 X、血脂异常、认知障碍、动脉粥样硬化、心肌梗塞、冠心病和其他心血管病症、中风、炎性肠综合征、消化不良和胃溃疡的方法。

截短的 GLP-1 衍生物和它们的治疗用途

发明领域

[0001] 本发明涉及治疗肽的领域,即,涉及新的截短的胰高血糖素样肽-1 (GLP-1) 类似物和其衍生物。

[0002] 发明背景

[0003] 许多不同的方法已经用于修饰胰高血糖素样肽-1 (GLP-1) 化合物,以提供体内的更长的作用持续时间。

[0004] WO 2006/097538、WO 2006/097536、WO 2006/037810、WO2006005667、WO 2005/027978、WO 98/08871 和 US 2001/0011071 描述了各种 GLP-1 类似物和其衍生物。

[0005] 在本发明的优先权日之后公开的 Runge et al (Journal of Biological Chemistry, vol. 283, no. 17, pp. 11340-11347) 公开了配体结合 GLP-1 受体的细胞外结构域的晶体结构。

[0006] 许多糖尿病患者,特别是 2 型糖尿病部分的患者经历了所谓的“针头恐惧”,即,自己注射的相当的担忧。在 2 型糖尿病部分中,大多数患者用口服的降血糖试剂治疗,由于 GLP-1 化合物预计是这些患者将要施用的可注射的药物产品,注射的担忧可能成为临床上非常有前景的化合物的广泛应用的严重障碍。因而,需要开发新的化合物,其可以低于每天一次地,例如,每两天或三天一次、优选的每周一次地施用,而保持了可接受的临床概况,或任选地通过非侵入性的施用例如肺部的、鼻部的、舌下的、口腔的或口服施用来施用。

[0007] 本发明的一个目的是提供化学上、物理上和酶学上稳定的 GLP-1 类似物或其衍生物。

[0008] 本发明的进一步的目的是提供长效的、即具有如上所述的施用方式的 GLP-1 类似物或其衍生物。

[0009] 本发明的另一个目的是提供具有高效力(受体亲和力)的 GLP-1 类似物或其衍生物,以降低用于例如每周一次 s. c. 给药、或作为选择用于非侵入性递送的治疗剂量。

[0010] 本发明的另一个目的是提供具有对 GLP-1 受体 (GLP-1R) 的高结合亲和力的 GLP-1 化合物。

[0011] 本发明的更进一步的目的是提供具有对 GLP-1 受体 (nGLP-1R) 的细胞外结构域的高结合亲和力的 GLP-1 化合物。

[0012] 本发明的另一个目的是提供具有高白蛋白结合亲和力的 GLP-1 类似物或其衍生物,其保护所述肽免于蛋白水解降解并降低所述肽的肾脏清除。

[0013] 效价、对 GLP-1 受体的结合亲和力、以及可能还对 GLP-1 受体的细胞外结构域的结合亲和力,是实现长效、稳定和当然地治疗活性的、具有每周施用一次的潜力的 GLP-1 衍生物总体目标的潜在相关的性质。

[0014] 发明概述

[0015] 本发明涉及 GLP-1 (7-37) 的截短的类似物和其衍生物。

[0016] 本发明涉及 GLP-1 类似物,其是修饰的 GLP-1 (7-35) (SEQ IDNO :1),具有:i) 与 GLP-1 (7-35) 相比总共 2、3、4、5、6、7、8 或 9 个氨基酸取代,包括 a) 在相当于 GLP-1 (7-35)

的位置 22 的位置处的 Glu 残基,和 b) 在相当于 GLP-1 (7-35) 的位置 26 的位置处的 Arg 残基 ;或其衍生物。

[0017] 本发明还涉及这些衍生物和类似物的组合物和用途。

[0018] 任选地,在相当于 GLP-1 (7-35) 的位置 30、31、32、33、34 或 35 的位置处的氨基酸可以是没有的,条件是如果在位置 30、31、32、33 或 34 处的氨基酸是没有的,则下游的每个氨基酸残基也是没有的。

[0019] 还任选地,本发明的 GLP-1 类似物包含 C- 末端酰胺基团,或 C- 末端羧酸基团。

[0020] 在进一步的方面,提供了根据本发明的类似物和衍生物的药物组合物和方法 and 用途。

[0021] 发明的描述

[0022] 定义和特定的实施方式

[0023] 在本说明书中,以下的术语具有所指明的含义:在此使用的术语“多肽”和“肽”是指由通过肽键连接的至少五个构成性氨基酸组成的化合物。组成氨基酸可以来自自由遗传密码编码的氨基酸的组,它们可以是不由遗传密码编码的天然氨基酸,以及合成氨基酸。不由遗传密码编码的天然氨基酸有,例如, γ - 羧基谷氨酸、鸟氨酸、磷酸丝氨酸、D- 丙氨酸和 D- 谷氨酰胺。合成的氨基酸包含通过化学合成制造的氨基酸,即,由遗传密码编码的氨基酸的 D- 同分异构体,例如 D- 丙氨酸和 D- 亮氨酸、Aib (α - 氨基异丁酸)、Abu (α - 氨基丁酸)、Tle (叔- 丁基甘氨酸)、 β - 丙氨酸、3- 氨基苯甲酸、邻氨基苯甲酸。

[0024] 22 种成蛋白 (proteogenic) 氨基酸是:丙氨酸、精氨酸、天冬酰胺、天冬氨酸、半胱氨酸、胱氨酸、谷氨酰胺、谷氨酸、甘氨酸、组氨酸、羟脯氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、赖氨酸、甲硫氨酸、苯丙氨酸、脯氨酸、丝氨酸、苏氨酸、色氨酸、酪氨酸、缬氨酸。

[0025] 因而非成蛋白质 (也称为非天然的) 氨基酸是可以经由肽键被掺入到肽中、但是不是成蛋白质氨基酸的部分。实例有 γ - 羧基谷氨酸、鸟氨酸、磷酸丝氨酸、D- 氨基酸,例如 D- 丙氨酸和 D- 谷氨酰胺。合成的非成蛋白氨基酸包括通过化学合成制造的氨基酸,即,由遗传密码编码的氨基酸的 D- 同分异构体,例如 D- 丙氨酸和 D- 亮氨酸、Aib (α - 氨基异丁酸)、Abu (α - 氨基丁酸)、Tle (叔- 丁基甘氨酸)、3- 氨基苯甲酸、邻氨基苯甲酸、des- 氨基- 组氨酸、氨基酸的 β 类似物,例如 β - 丙氨酸等等, D- 组氨酸、去氨基- 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、 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、(1- 氨基环丙基) 羧酸、(1- 氨基环丁基) 羧酸、(1- 氨基环戊基) 羧酸、(1- 氨基环己基) 羧酸、(1- 氨基环庚基) 羧酸或 (1- 氨基环辛基) 羧酸。

[0026] 在此关于多肽使用的术语“类似物”是指修饰的肽,其中肽的一个或更多个氨基酸残基被其他氨基酸残基替代,和 / 或其中一个或更多个氨基酸残基在肽的 C- 末端中从肽上删除。

[0027] 在此使用的术语“修饰的肽”是指上文定义的修饰的肽。对此,这个术语与术语“修饰的肽序列”可互换地使用。与此一致地,术语“修饰”当在此与肽序列一起使用时,是指氨基酸取代、添加和 / 或删除。

[0028] 为本目的,任何氨基酸取代、删除和 / 或添加是指人类 GLP-1 (7-35) 的序列,其在此作为 SEQ ID NO:1 被包括。然而,在序列表中氨基酸残基的编号总是从 no. 1 开始,而对

我们所需要的,根据本领域中的惯例,从氨基酸残基 no. 7 开始,对它指定编号 7。因而,一般地,在此对 GLP-1 (7-35) 序列的位置编号的引述是从位置 7 的 His 开始、以位置 35 的 Gly 结束的序列。

[0029] 一种简单的系统常常用于描述类似物:例如, [Arg34]GLP-1 (7-37)Lys 是指 GLP-1 (7-37) 类似物,其中位置 34 处的天然存在的赖氨酸被精氨酸替代,以及其中赖氨酸添加到末端氨基酸残基,即添加到 Gly³⁷。

[0030] 但在此使用来表征修饰的 GLP-1 (7-35) 序列时表述“相当于..... 的位置”是指在天然的 GLP-1 (7-35) 序列(具有 SEQ ID NO:1 的序列)中的相应的位置。例如,通过简单的手写和目测,容易地推断相应的位置。在备选方案中,可以使用标准的蛋白质或肽比对程序,例如“align”,其是 Needleman-Wunsch 比对。该算法在 Needleman, S. B. and Wunsch, C. D., (1970), Journal of Molecular Biology, 48:443-453 以及 Myers and W. Miller in "Optimal Alignments in LinearSpace" CABIOS (computer applications in the biosciences) (1988) 4:11-17 的比对程序中描述了。对于所述比对,可以使用默认的计分矩阵 BLOSUM50 和默认的同源性矩阵,缺口中第一个残基的罚分可以设置在 -12, 缺口中其他残基的罚分设置在 -2。

[0031] 旋光异构体没有声明的所有氨基酸被理解是指 L- 同分异构体。

[0032] 在此使用的术语“下游的每个氨基酸残基”是指相对于特定的氨基酸位于 C- 末端的每个氨基酸。例如, Lys34 和 Gly35 是 GLP-1 (7-35) 中 Val33 的下游的每个氨基酸残基。

[0033] 在本发明的实施方式中,最多 8 个氨基酸被修饰。在本发明的实施方式中,最多 7 个氨基酸被修饰。在本发明的实施方式中,最多 6 个氨基酸被修饰。在本发明的实施方式中,最多 5 个氨基酸被修饰。在本发明的实施方式中,最多 4 个氨基酸被修饰。在本发明的实施方式中,最多 3 个氨基酸被修饰。在本发明的实施方式中,最多 2 个氨基酸被修饰。

[0034] 在本发明的实施方式中,一个或更多个氨基酸在 C- 末端中被删除。

[0035] 在本发明的一个方面,根据本发明的类似物或衍生物的 C- 末端可以以酸或者酰胺结束。在优选的方面,本发明的类似物或衍生物的 C- 末端是酰胺。

[0036] 在一个方面,本发明涉及 GLP-1 类似物或其衍生物,其中在位置 35、36 和 37 处的氨基酸是没有的,和其中 GLP-1 类似物的总长度是 28 个氨基酸。在进一步的方面,本发明涉及 GLP-1 类似物或其衍生物,其中在位置 34、35、36 和 37 处的氨基酸是没有的,和其中 GLP-1 类似物的总长度是 27 个氨基酸。在进一步的方面,本发明涉及 GLP-1 类似物或其衍生物,其中在位置 33、34、35、36 和 37 处的氨基酸是没有的,和其中 GLP-1 类似物的总长度是 26 个氨基酸。在进一步的方面,本发明涉及 GLP-1 类似物或其衍生物,其中在位置 32、33、34、35、36 和 37 处的氨基酸是没有的,和其中 GLP-1 类似物的总长度是 25 个氨基酸。在进一步的方面,本发明涉及 GLP-1 类似物或其衍生物,其中在位置 31、32、33、34、35、36 和 37 处的氨基酸是没有的,和其中 GLP-1 类似物的总长度是 24 个氨基酸。在进一步的方面,本发明涉及 GLP-1 类似物或其衍生物,其中在位置 30、31、32、33、34、35、36 和 37 处的氨基酸是没有的,和其中 GLP-1 类似物的总长度是 23 个氨基酸。

[0037] 在一个方面,本发明涉及具有 C- 末端酰胺基团的 GLP-1 类似物或其衍生物。

[0038] 在一个方面,本发明涉及 GLP-1 类似物或其衍生物,其具有与 SEQ ID NO:1 的序列 7-35 相比的 3 个氨基酸取代,包括在位置 22 和 26 处的取代。在进一步的方面,本发明涉

及 GLP-1 类似物或其衍生物,其具有与 SEQ ID NO:1 的序列 7-35 相比在选自位置 7、8、18、20、23、24、25、27、30、31、33 和 34 的组的取代。在进一步的方面,本发明涉及 GLP-1 类似物或其衍生物,其具有选自由去氨基 His7、Aib8、Lys18、Cys18、Lys20、Cys20、Lys23、Cys23、Asn24、Val25、Ala27、Leu27、Glu30、Lys31、Cys31、Lys33、Cys33、Lys34、Cys34 和 Asn34 构成的组的取代。在进一步的方面,本发明涉及 GLP-1 类似物或其衍生物,其具有选自由去氨基 His7、Aib8、Lys18、Lys20、Lys23、Glu30、Lys31、Lys33 和 Lys34 构成的组的取代。在进一步的方面,本发明涉及 GLP-1 类似物或其衍生物,其具有选自由去氨基 His7 和 Aib8 构成的组的取代。

[0039] 在一个方面,本发明涉及 GLP-1 类似物或其衍生物,其具有与 SEQ ID NO:1 的序列 7-35 相比的 4 个氨基酸取代,包括在位置 22 和 26 处的取代。在进一步的方面,本发明涉及 GLP-1 类似物或其衍生物,其具有与 SEQ ID NO:1 的序列 7-35 相比在选自位置 7、8、18、20、23、24、25、27、30、31、33 和 34 的组的两个取代。在进一步的方面,本发明涉及 GLP-1 类似物或其衍生物,其具有选自由去氨基 His7、Aib8、Lys18、Cys18、Lys20、Cys20、Lys23、Cys23、Asn24、Val25、Ala27、Leu27、Glu30、Lys31、Cys31、Lys33、Cys33、Lys34、Cys34 和 Asn34 构成的组的两个取代。在进一步的方面,本发明涉及 GLP-1 类似物或其衍生物,其具有选自由去氨基 His7 和 Aib8 构成的组的氨基酸取代,和选自由 Lys18、Lys20、Lys23、Glu30、Lys31、Lys33 和 Lys34 构成的组的氨基酸取代。在进一步的方面,本发明涉及 GLP-1 类似物或其衍生物,其具有选自由去氨基 His7 和 Aib8 构成的组的氨基酸取代,和选自由 Lys18、Lys20、Lys23、Glu30、Lys31、Lys33 和 Lys34 构成的组的氨基酸取代。

[0040] 在一个方面,本发明涉及 GLP-1 类似物或其衍生物,其具有与 SEQ ID NO:1 的序列 7-35 相比的 5 个氨基酸取代,包括在位置 22 和 26 处的取代。在进一步的方面,本发明涉及 GLP-1 类似物或其衍生物,其具有与 SEQ ID NO:1 的序列 7-35 相比在选自位置 7、8、18、20、23、24、25、27、30、31、33 和 34 的组的三个氨基酸取代。在进一步的方面,本发明涉及 GLP-1 类似物或其衍生物,其具有选自去氨基 His7、Aib8、Lys18、Cys18、Lys20、Cys20、Lys23、Cys23、Asn24、Val25、Ala27、Leu27、Glu30、Lys31、Cys31、Lys33、Cys33、Lys34、Cys34 和 Asn34 的组的三个氨基酸取代。在进一步的方面,本发明涉及 GLP-1 类似物或其衍生物,其具有选自由去氨基 His7 和 Aib8 构成的组的氨基酸取代,和选自由 Lys18、Lys20、Lys23、Glu30、Lys31、Lys33 和 Lys34 构成的组的两个氨基酸取代。在进一步的方面,本发明涉及 GLP-1 类似物或其衍生物,其具有选自由去氨基 His7 和 Aib8 构成的组的氨基酸取代,和选自由 Lys18、Lys20、Lys23、Glu30、Lys31、Lys33 和 Lys34 构成的组的两个氨基酸取代。

[0041] 在一个方面,本发明涉及 GLP-1 类似物或其衍生物,其具有与 SEQ ID NO:1 的序列 7-35 相比的 6、7 或 8 个氨基酸取代,包括在位置 22 和 26 处的取代。在进一步的方面,本发明涉及 GLP-1 类似物或其衍生物,其具有选自位置 7、8、18、20、23、24、25、27、30、31、33 和 34 的组的四、五或六个氨基酸取代。在进一步的方面,本发明涉及 GLP-1 类似物或其衍生物,其具有选自由去氨基 His7、Aib8、Lys18、Cys18、Lys20、Cys20、Lys23、Cys23、Asn24、Val25、Ala27、Leu27、Glu30、Lys31、Cys31、Lys33、Cys33、Lys34、Cys34 和 Asn34 构成的组的四、五或六个氨基酸取代。在进一步的方面,本发明涉及 GLP-1 类似物或其衍生物,其具有选自由去氨基 His7 和 Aib8 构成的组的氨基酸取代,和选自由 Lys18、Lys20、Lys23、Glu30、Lys31、Lys33 和 Lys34 构成的组的三、四或五个氨基酸取代。在进一步的方面,本发明涉及

GLP-1 类似物或其衍生物,其具有选自去氨基 His7 和 Aib8 构成的组的氨基酸取代,和选自 Lys18、Lys20、Lys23、Glu30、Lys31、Lys33 和 Lys34 构成的组的三、四或五个氨基酸取代。

[0042] 在一个方面,本发明涉及具有式 (I) 的序列的 GLP-1 类似物或其衍生物 Xaa₇-Xaa₈-Xaa₉-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Xaa₁₆-Ser-Xaa₁₈-Tyr-Xaa₂₀-Glu-Glu-Xaa₂₃-Xaa₂₄-Xaa₂₅-Arg-Xaa₂₇-Phe-Ile-Xaa₃₀-Xaa₃₁-Leu-Xaa₃₃-Xaa₃₄-Xaa₃₅-R

[0043] 式 (I) (SEQ ID No :2)

[0044] 其中

[0045] Xaa₇ 是 L- 组氨酸、D- 组氨酸、去氨基 - 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、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;

[0046] Xaa₈ 是 Ala、Gly、Val、Leu、Ile、Lys、Aib、(1- 氨基环丙基) 羧酸、(1- 氨基环丁基) 羧酸、(1- 氨基环戊基) 羧酸、(1- 氨基环己基) 羧酸、(1- 氨基环庚基) 羧酸,或 (1- 氨基环辛基) 羧酸;

[0047] Xaa₉ 是 Glu 或 Glu 衍生物,例如, α , α 二甲基 -Glu;

[0048] Xaa₁₆ 是 Val 或 Leu;

[0049] Xaa₁₈ 是 Ser、Lys、Cys 或 Arg;

[0050] Xaa₂₀ 是 Leu、Lys 或 Cys;

[0051] Xaa₂₃ 是 Gln、Glu、Lys、Cys 或 Arg;

[0052] Xaa₂₄ 是 Ala 或 Asn;

[0053] Xaa₂₅ 是 Ala 或 Val;

[0054] Xaa₂₇ 是 Glu、Ala 或 Leu;

[0055] Xaa₃₀ 是 Ala、Glu、Lys、Arg 或没有;

[0056] Xaa₃₁ 是 Trp、Lys、Cys 或没有;

[0057] Xaa₃₃ 是 Val、Lys、Cys 或没有;

[0058] Xaa₃₄ 是 Lys、Glu、Asn、Arg、Cys 或没有;

[0059] Xaa₃₅ 是 Gly、Aib 或没有;

[0060] R 是酰胺或是没有的;

[0061] 条件是,如果 Xaa₃₀、Xaa₃₁、Xaa₃₂、Xaa₃₃ 或 Xaa₃₄ 是没有的,则下游的每个氨基酸残基也是没有的。

[0062] 在一个方面,本发明涉及具有式 (II) 的序列的 GLP-1 类似物或其衍生物 Xaa₇-Xaa₈-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Val-Ser-Xaa₁₈-Tyr-Leu-Glu-Glu-Gln-Ala-Ala-Arg-Glu-Phe-Ile-Xaa₃₀-Trp-Leu-Xaa₃₃-Xaa₃₄-Xaa₃₅-R

[0063] 式 (II) (SEQ ID No :3)

[0064] 其中

[0065] Xaa₇ 是 L- 组氨酸、D- 组氨酸、去氨基 - 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、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;

[0066] Xaa₈ 是 Ala、Gly、Val、Leu、Ile、Lys、Aib、(1- 氨基环丙基) 羧酸、(1- 氨基环丁

结合残基衍生化。在一个方面,本发明涉及在位置 18、20、23、31、33、34 或在 C- 末端氨基酸聚乙二醇化的或用白蛋白结合残基衍生化的 GLP-1 类似物或其衍生物。在进一步的方面,本发明涉及在位置 18 聚乙二醇化的或用白蛋白结合残基衍生化的 GLP-1 类似物或其衍生物。在进一步的方面,本发明涉及在位置 20 聚乙二醇化的或用白蛋白结合残基衍生化的 GLP-1 类似物或其衍生物。在进一步的方面,本发明涉及在位置 23 聚乙二醇化的或用白蛋白结合残基衍生化的 GLP-1 类似物或其衍生物。在进一步的方面,本发明涉及在位置 31 聚乙二醇化的或用白蛋白结合残基衍生化的 GLP-1 类似物或其衍生物。在进一步的方面,本发明涉及在位置 33 聚乙二醇化的或用白蛋白结合残基衍生化的 GLP-1 类似物或其衍生物。在进一步的方面,本发明涉及在位置 34 聚乙二醇化的或用白蛋白结合残基衍生化的 GLP-1 类似物或其衍生物。

[0081] 在一个方面,本发明涉及 GLP-1 类似物或其衍生物,其用白蛋白结合残基衍生化。

[0082] 在此使用的术语“衍生化的”是指通过共价键化学地连接的。例如,赖氨酸残基或半胱氨酸残基经由化学键连接到白蛋白结合残基。例如,这样的化学键可以通过通过用白蛋白结合残基的活性酯,例如长脂肪酸的酰化的赖氨酸的 ϵ 氨基基团的衍生化来获得。

[0083] 在本发明中使用的连接两个化学部分的其他实例包括但不限于烷基化、酯形成、酰胺形成或马来酰亚胺偶联。

[0084] 在此使用的术语“接头”是指分隔肽和白蛋白结合残基或聚乙二醇聚合物的间隔区(在本说明书中,两个术语间隔区和接头可互换地使用)。

[0085] 在本发明的一个方面,接头包含一个或更多个亚烷基二醇单元,例如,1 到 5 个亚烷基二醇单元。亚烷基二醇单元在进一步方面中是乙二醇、丙二醇或丁二醇,但也可以是更高级的亚烷基二醇。

[0086] 在本发明的另一个方面,所述接头是选自以下的亲水性接头

[0087] $-(CH_2)_1D[(CH_2)_nE]_m(CH_2)_p-Q_q-$, 其中

[0088] 1、m 和 n 独立地是 1-20, p 是 0-10,

[0089] Q 是 $-Z-(CH_2)_1D[(CH_2)_nG]_m(CH_2)_p-$,

[0090] q 是 0 到 5 的范围内的整数,

[0091] 每个 D、E 和 G 独立地选自 $-O-$ 、 $-NR^3-$ 、 $-N(COR^4)-$ 、 $-PR^5(O)-$ 和 $-P(OR^6)(O)-$, 其中 R^3 、 R^4 、 R^5 和 R^6 独立地代表氢或 C_{1-6} - 烷基,

[0092] Z 选自 $-C(O)NH-$ 、 $-C(O)NHCH_2-$ 、 $-OC(O)NH-$ 、 $-C(O)NHCH_2CH_2-$ 、 $-C(O)CH_2-$ 、 $-C(O)CH=CH-$ 、 $-(CH_2)_s-$ 、 $-C(O)-$ 、 $-C(O)O-$ 或 $-NHC(O)-$, 其中 s 是 0 或 1。

[0093] 在本发明的另一个方面,所述接头是上文定义的亲水性接头,其中 1 是 1 或 2, n 和 m 独立地是 1-10, p 是 0-10。

[0094] 在本发明的另一个方面,接头是上文定义的亲水性接头,其中 D 是 $-O-$ 。

[0095] 在本发明的另一个方面,所述接头是上文定义的亲水性接头,其中 E 是 $-O-$ 。

[0096] 在本发明的又一个方面,所述亲水性接头是

[0097] $-CH_2O[(CH_2)_2O]_m(CH_2)_pQ_q-$, 其中 m 是 1-10, p 是 1-3, Q 是 $-Z-CH_2O[(CH_2)_2O]_m(CH_2)_p-$ 其中 Z 是上文定义的。

[0098] 在本发明的另一个方面,接头是上文定义的亲水性接头,其中 q 是 1。

[0099] 在本发明的另一个方面,所述接头是上文定义的亲水性接头,其中 G 是 $-O-$ 。

[0100] 在本发明的另一个方面,所述接头是上文定义的亲水性接头,其中 Z 选自由 $-C(O)NH-$ 、 $-C(O)NHCH_2$ 和 $-OC(O)NH-$ 构成的组。

[0101] 在本发明的另一个方面,所述接头是上文定义的亲水性接头,其中 q 是 0。

[0102] 在本发明的另一个方面,所述接头是上文定义的亲水性接头,其中 1 是 2。

[0103] 在本发明的另一个方面,所述接头是上文定义的亲水性接头,其中 n 是 2。

[0104] 在本发明的一个方面,使用“亲水性接头”,其分隔肽和白蛋白结合残基与化学部分。

[0105] 在本发明的一个方面,所述亲水性接头是 $-C(O)-(CH_2)_1-O-[(CH_2CH_2-O)]_m-(CH_2)_p-[NHC(O)-(CH_2)_1-O-[(CH_2)_n-O]]_q-NH-$, 其中 1、m、n 和 p 独立地是 1-5, q 是 0-5。

[0106] 在本发明的又一个方面,所述亲水性接头是 $-C(O)-CH_2-O-CH_2CH_2-O-CH_2CH_2-[NHC(O)-CH_2-O-CH_2CH_2-O-CH_2CH_2]_q-NH-$, 其中 q 是 0-5。

[0107] 在本发明的又一个方面,所述亲水性接头是 $-C(O)-CH_2-O-CH_2CH_2-O-CH_2CH_2-NHC(O)-CH_2-O-CH_2CH_2-O-CH_2CH_2-NH-$ 。

[0108] 在本发明的又一个方面,所述亲水性接头是 $-[CH_2CH_2O]_{m+1}(CH_2)_pQ_q-$

[0109] 其中 m 和 p 独立地是 0-10, 和

[0110] Q 是如上文定义的 $-Z-(CH_2)_1D[(CH_2)_nG]_m(CH_2)_p-$ 。

[0111] 在本发明的又一个方面,所述亲水性接头是

[0112] $-(CH_2)_1-O-[(CH_2)_n-O]_m-(CH_2)_p-[C(O)NH-(CH_2)_1-O-[(CH_2)_n-O]_m-(CH_2)_p]_q-$, 其中 1、m、n 和 p 独立地是 1-5, q 是 0-5。

[0113] 在本发明的进一步的方面,所述接头包含除了 Cys 以外的氨基酸残基,或二肽,例如 Gly-Lys。在本文中,表示“二肽,例如 Gly-Lys”被用于指一种二肽,其中 C-末端氨基酸残基是 Lys、His 或 Trp,优选的 Lys,和其中 N-末端氨基酸残基选自包含 Ala、Arg、Asp、Asn、Gly、Glu、Gln、Ile、Leu、Val、Phe 和 Pro 的组。适合的 PEG 聚合物一般是商业上可获得的,或可以通过本领域技术人员公知的技术制得。

[0114] 在本发明的一个方面,PEG 聚合物具有大于 700D 的分子量,在进一步的方面,大于 5kD 的分子量,在又进一步的方面,大于 10kD,在再进一步的方面,大于 20kD。PEG 聚合物可以是线性的或分支的。在 PEG 聚合物大于 20kDa 的情况下,PEG 聚合物优选的具有分支结构,例如,43kD 分支的 PEG-肽 (Shearwater 2001catalog#2D3X0T01, mPEG2-MAL)。

[0115] PEG 对完整的肽的附着可以伴随着将 PEG 附着到与受体相互作用的肽表面的对侧。

[0116] 存在着几种策略用于偶联 PEG 到肽上 (参见,例如 Veronese, Biomaterials 22: 405-417, 2001), 所有这些通过完全引用合并在此。因而本领域技术人员将能够利用公知的技术,连接 PEG 聚合物到此处描述的人类胰淀素 (amylin) 或胰淀素类似物。

[0117] 简要地,半胱氨酸 PEG 化是位点特异性 PEG 化的一种方法,可以通过在人类胰淀素或胰淀素类似物上的特定位置之一处引入独特的半胱氨酸突变,然后将产生的肽与半胱氨酸-特异性 PEG 化试剂,例如 PEG-马来酰亚胺反应来完成。可能必需突变肽以允许位点特异性 PEG 化。例如,如果肽含有半胱氨酸残基,这些将需要用保守的氨基酸取代,以确保位点特异性 PEG 化。此外,刚性的接头,包括但不限于“GGG”、“GGSGGS”和“PPPS”可以添加到 C-末端,但是在 PEG 附着的位点 (即,独特的半胱氨酸残基) 之前。

[0118] 在本发明的一个方面,所述白蛋白结合残基是亲脂性的残基。在进一步的方面,亲脂性残基任选地经由接头、通过缀合化学作用,例如,通过烃基化、酰化、酯形成或酰胺形式附着到赖氨酸残基,或通过马来酰亚胺偶联附着到半胱氨酸残基。

[0119] 在本发明的进一步的方面,所述白蛋白结合残基是在生理学 pH 值下带负电的。在本发明的另一个方面,所述白蛋白结合残基包含可以带负电的基团。可以带负电的一种优选的基团是羧酸基团。

[0120] 在本发明的又一个方面,所述白蛋白结合残基选自由直链烷基基团、支链烷基基团、具有 ω -羧酸基团的羧酸基团基团和部分地或完全地氢化的环戊烷菲(cyclopentanophenanthrene) 主干构成的组。

[0121] 在本发明的进一步的方面,所述白蛋白结合残基是 cibacronyl 残基。

[0122] 在本发明的进一步的方面,所述白蛋白结合残基具有 6 到 40 个碳原子,8 到 26 个碳原子或 8 到 20 个碳原子。

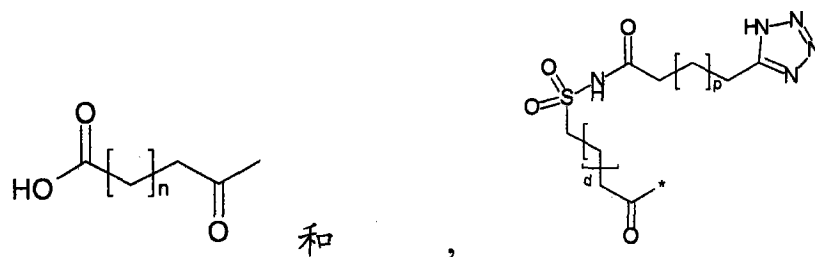
[0123] 在本发明的进一步的方面,所述白蛋白结合残基是选自包含 $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_r\text{CO}^-$ 的组的酰基基团,其中 r 是 4 到 38 的整数,优选的 4 到 24 的整数,更优选的选自包含 $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_6\text{CO}^-$, $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_8\text{CO}^-$, $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{10}\text{CO}^-$, $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{12}\text{CO}^-$, $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{14}\text{CO}^-$, $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{16}\text{CO}^-$, $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{18}\text{CO}^-$, $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{20}\text{CO}^-$ 和 $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{22}\text{CO}^-$ 的组。

[0124] 在本发明的另一个方面,所述白蛋白结合残基是直链或支链烷 α , ω -二羧酸的酰基基团。

[0125] 在一个方面,本发明涉及 GLP-1 类似物或其衍生物,其中至少一个氨基酸残基用 A-B-C-D- 衍生化

[0126] 其中 A- 选自以下构成的组

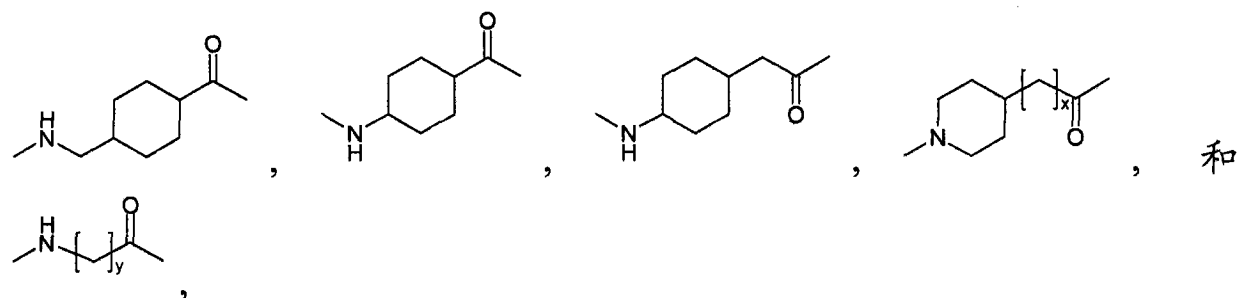
[0127]



[0128] 其中 n 选自由 14、15、16、17、18 和 19 构成的组, p 选自由 10、11、12、13 和 14 构成的组,以及 d 选自由 0、1、2、3、4 和 5 构成的组,

[0129] -B- 选自以下构成的组

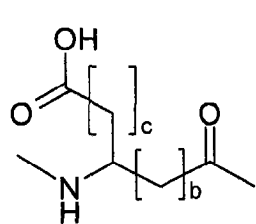
[0130]



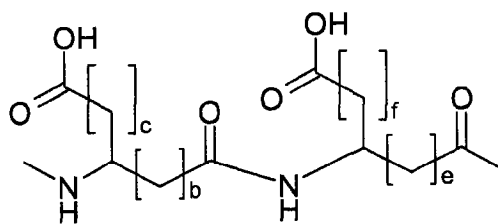
[0131] 其中 x 选自由 0、1、2、3 和 4 构成的组, y 选自由 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11 和 12 构成的组,

[0132] -C- 选自以下构成的组

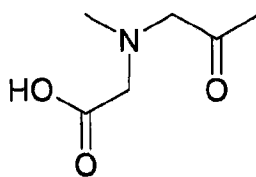
[0133]



,



和



,

[0134] 其中 b 和 e 各自独立地选自由 0、1 和 2 构成的组, c 和 f 各自独立地选自由 0、1 和 2 构成的组, 条件是当 c 是 0 时 b 是 1 或 2, 或当 c 是 1 或 2 时 b 是 0, 和当 f 是 0 时 e 是 1 或 2, 或当 f 是 1 或 2 时 e 是 0, 知

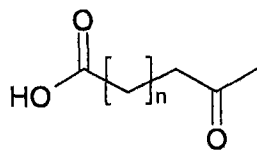
[0135] -D- 附着到所述氨基酸残基以及是接头。

[0136] 在本发明的一个方面, 根据本发明的类似物的一个氨基酸残基用 A-B-C-D- 衍生化。

[0137] 在一个方面, 所述衍生化的氨基酸残基包含氨基基团。在进一步的方面, 所述衍生化的氨基酸残基包含侧链中的伯氨基基团。在又进一步的方面, 所述衍生化的氨基酸残基是赖氨酸。

[0138] 在一个方面, A- 是

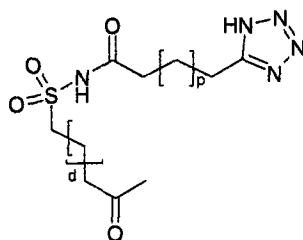
[0139]



[0140] 在一个方面, n 选自由 15 和 17 构成的组, 更优选的是 17。

[0141] 在一个方面, A- 是

[0142]

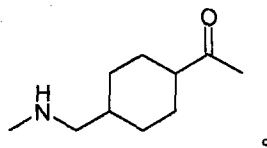


[0143] 在一个方面, p 选自由 12、13 和 14 构成的组, 更优选的是 13。在一个方面, d 选自由 0、1、2、3 和 4 构成的组, 更优选的 0、1 和 2 构成的组, 最优选的 1。在一个方面, d 选自由 0、1 和 2 构成的组, p 选自由 12、13 或 14 构成的组, 更优选的, d 选自由 1 和 2 构成的组, p

选自由 13 和 14 构成的组,最优选的 d 是 1 和 p 是 13。

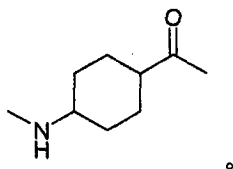
[0144] 在一个方面, -B- 是

[0145]



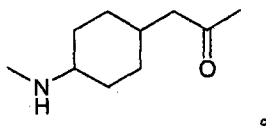
[0146] 在一个方面, -B- 是

[0147]



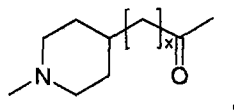
[0148] 在一个方面, -B- 是

[0149]



[0150] 在一个方面, -B- 是

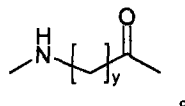
[0151]



[0152] 在一个方面, x 选自由 0、1 和 2 构成的组,更优选的, x 选自由 0 和 1 构成的组,最优选的 x 是 1。

[0153] 在一个方面, -B- 是

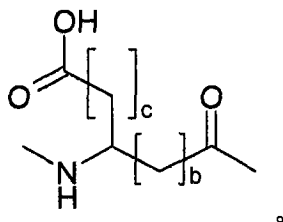
[0154]



[0155] 在一个方面, y 选自由 2、3、4、5、6、7、8、9 和 10 构成的组,更优选的 y 选自由 2、3、4、5、6、7 和 8 构成的组。

[0156] 在一个方面, -C- 是

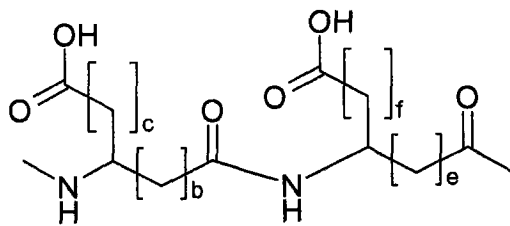
[0157]



[0158] 在一个方面, c 选自由 0 和 1 构成的组, b 选自由 1 和 2 构成的组,更优选的 b 是 1 和 c 是 0。

[0159] 在一个方面, -C- 是

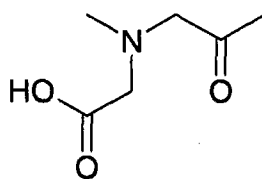
[0160]



[0161] 在一个方面, f 选自由 0 和 1 构成的组, e 选自由 1 和 2 构成的组, 更优选的 e 是 1 和 f 是 0。

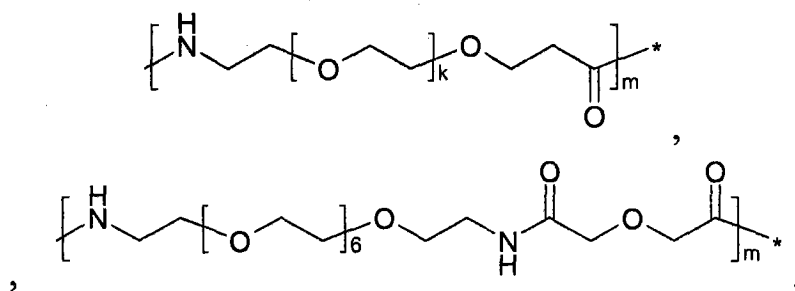
[0162] 在一个方面, $-C-$ 是

[0163]

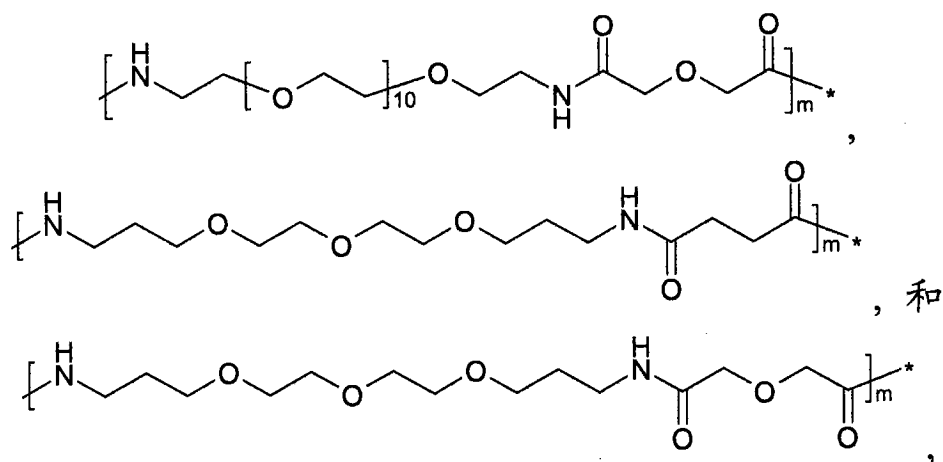


[0164] 在一个方面, D 选自以下构成的组

[0165]



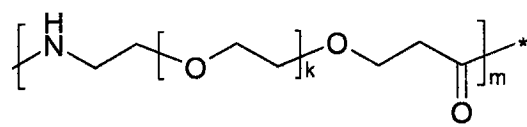
[0166]



[0167] 和其中 k 选自由 0、1、2、3、4、5、11 和 27 构成的组, m 选自由 0、1、2、3、4、5 和 6 构成的组。

[0168] 在一个方面, $-D-$ 是

[0169]

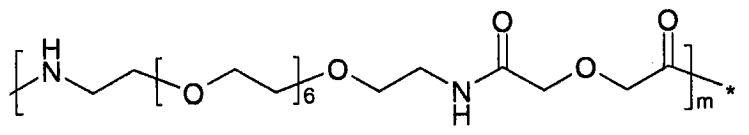


[0170] 在一个方面, k 选自由 1、2、3、11 和 27 构成的组, 更优选的 k 是 1。在一个方面, m 选自由 0、1、2、3 和 4 构成的组, 更优选的 m 选自由 0、1 和 2 构成的组。

[0171] 在一个方面, -D- 是

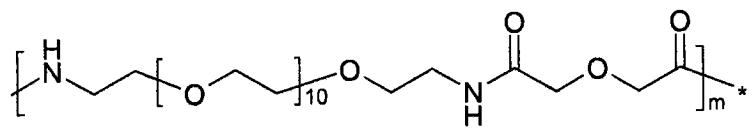
[0172] 在一个方面, -D- 是

[0173]



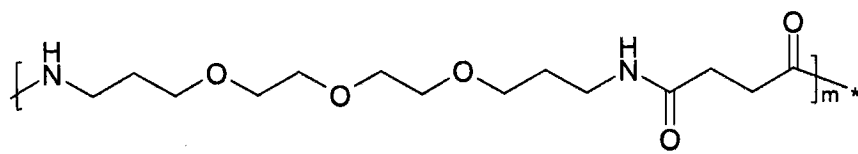
[0174] 在一个方面, -D- 是

[0175]



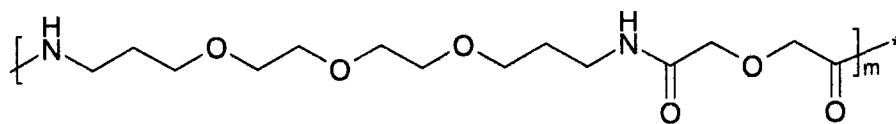
[0176] 在一个方面, -D- 是

[0177]



[0178] 在一个方面, -D- 是

[0179]

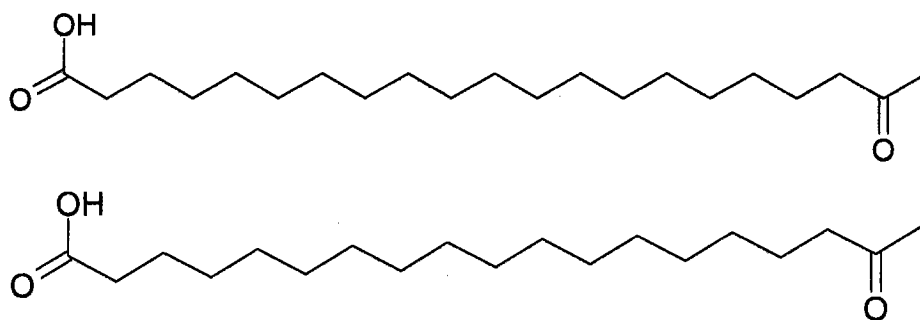


[0180] 在一个方面, m 选自由 0、1、2、3 和 4 构成的组, 更优选的 m 选自由 0、1 和 2 构成的组。

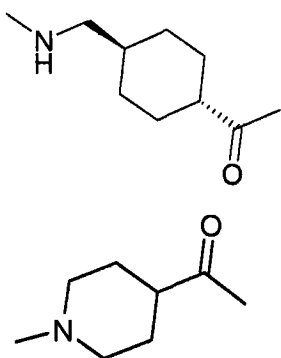
[0181] 在一个方面, A-B-C-D- 选择和组合自

[0182]

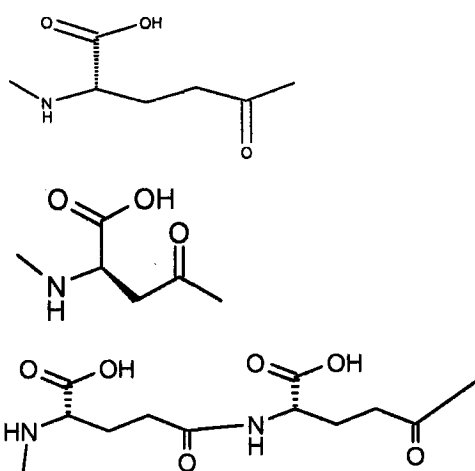
A-



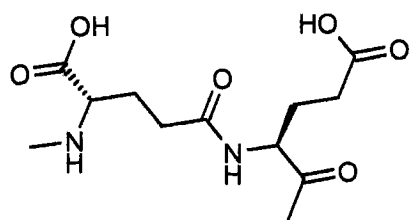
-B-



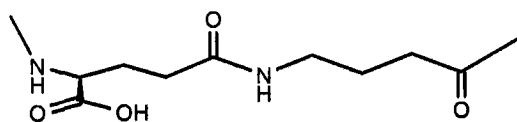
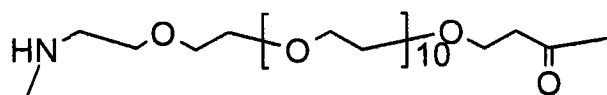
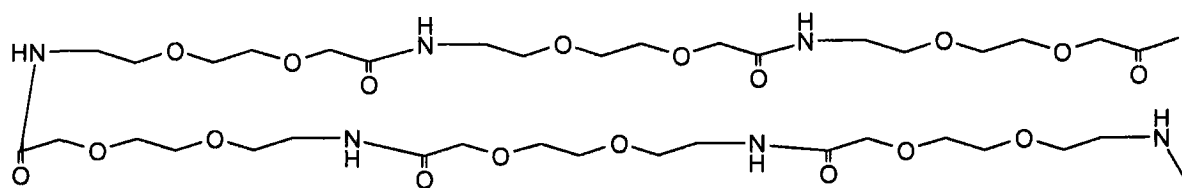
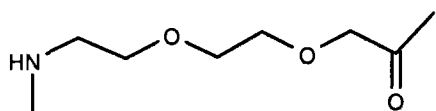
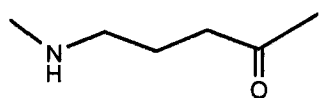
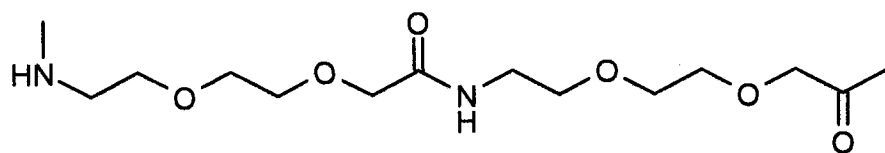
-C-



[0183]



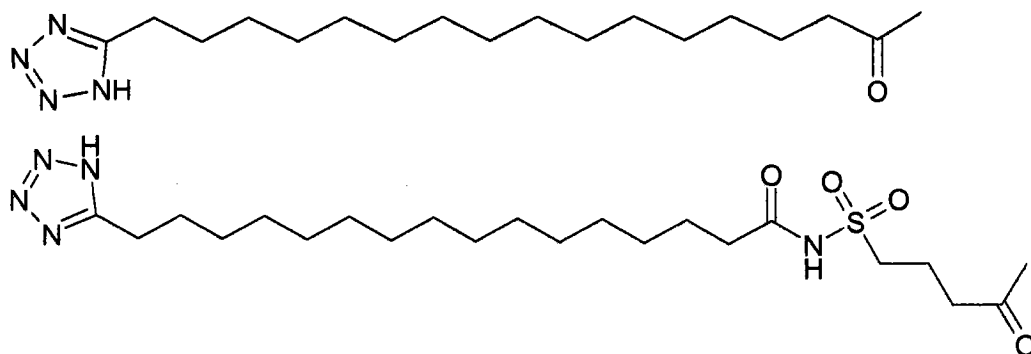
-D-



[0184] 在一个方面，A-B-C-D- 选择和组合自

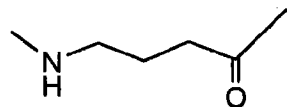
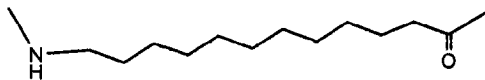
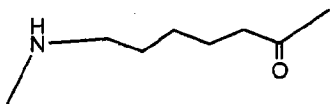
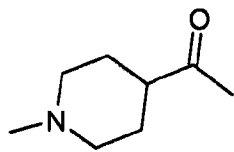
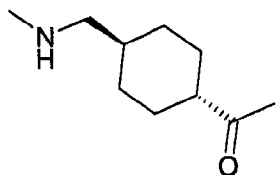
[0185]

A-

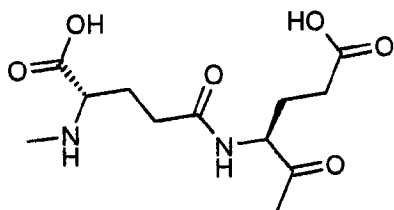
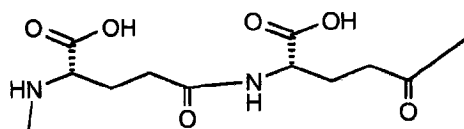
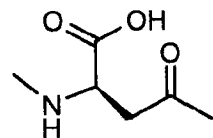
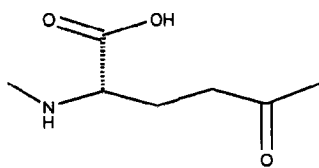


-B-

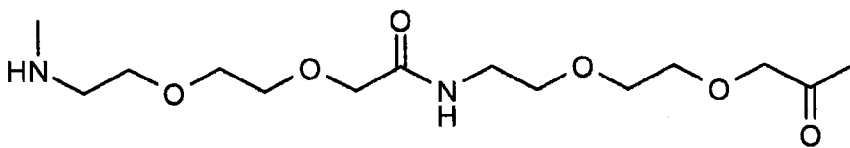
[0186]



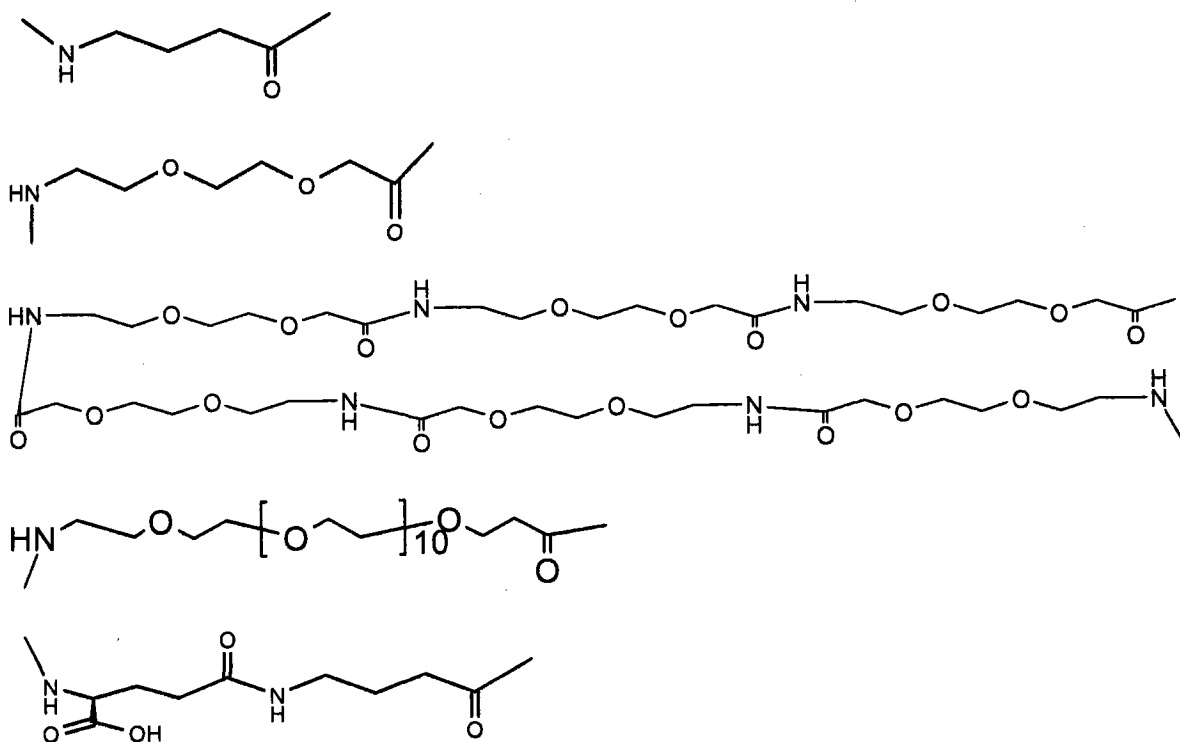
-C-



-D-

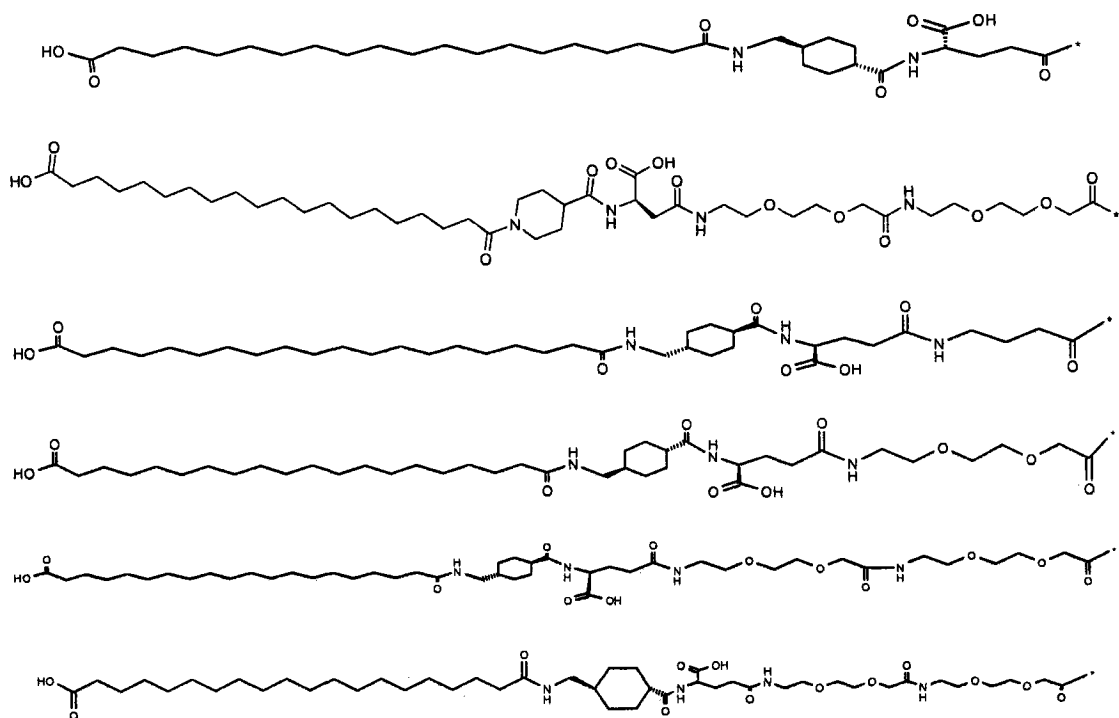


[0187]

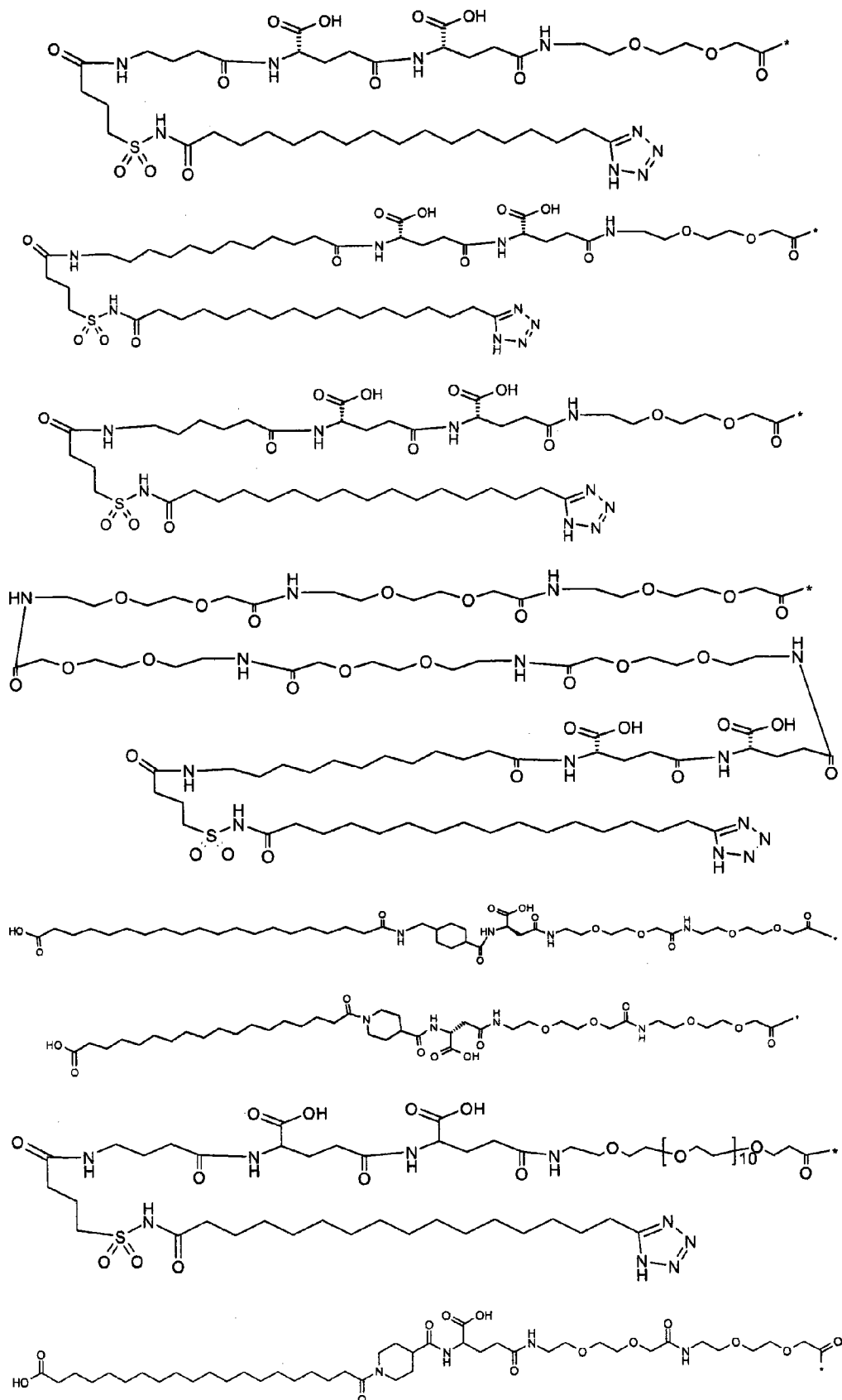


[0188] 在一个方面，A-B-C-D- 选自以下构成的组

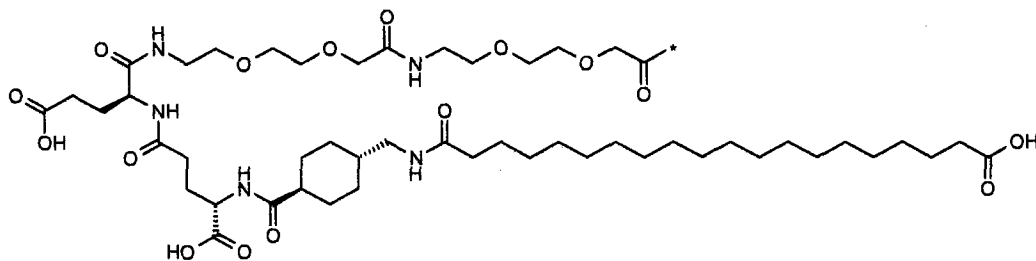
[0189]



[0190]



[0191]



[0192] 在一个方面,本发明涉及 GLP-1 类似物或其衍生物,其中至少一个氨基酸残基用 A-B-C-D- 衍生化,其中所述衍生物结合白蛋白。

[0193] 在一个方面, A-B-C-D 由白蛋白结合片段 A-B-C- 和亲水性接头 D 组成。

[0194] 在此使用的术语“GLP-1 肽”是指 GLP-1 (7-35) (SEQ ID NO:1) 或其 GLP-1 (7-35) 类似物。

[0195] 在一个实施方式中,根据本发明的 GLP-1 类似物或其衍生物是促胰岛素试剂。

[0196] 在本发明的方面中,其中类似物是衍生化的, GLP-1 类似物中的任何氨基酸位置可以被衍生化。在本发明的一个方面,被衍生化的氨基酸残基包含氨基基团。包含氨基基团的氨基酸残基的实例有赖氨酸、鸟氨酸、 ϵ -N-烷基化的赖氨酸,例如 ϵ -N 甲基赖氨酸、O-氨基乙基丝氨酸、O-氨基丙基丝氨酸或在侧链中含有伯或仲氨基基团的更长的 O-烷基化的丝氨酸。

[0197] 在本发明的进一步的方面,衍生化的氨基酸残基包含侧链中的伯氨基基团。包含伯氨基基团的氨基酸残基的实例是赖氨酸、鸟氨酸、O-氨基乙基丝氨酸、O-氨基丙基丝氨酸、或在侧链中含有伯氨基基团的更长的 O-烷基化的丝氨酸。

[0198] 在本发明的又进一步的方面,所述衍生化的氨基酸残基是赖氨酸。在本发明的又进一步的方面,根据本发明的衍生物是仅在一个位置衍生化的,例如,仅一个氨基酸残基被衍生化。

[0199] 在本发明的另一个方面,所述被衍生化的氨基酸残基是半胱氨酸。

[0200] 功能性质

[0201] 如实验部分所描述的,已经合成和测试了许多本发明的 GLP-1 化合物。

[0202] 本发明的 GLP-1 化合物具有几种有利的和有益的性质,如下文、参考实施例所解释的。

[0203] 在此使用的术语“促胰岛素试剂”是指一种 GLP-1 类似物或其衍生物,其是人类 GLP-1 受体的激动剂,即,刺激含有人类 GLP-1 受体的适合的介质中 cAMP 的形成的 GLP-1 类似物或其衍生物(一种这样的介质在下文公开)。

[0204] 在第一个方面,本发明的 GLP-1 类似物或衍生物具有可接受的、优选的高效价(对受体)。

[0205] 促胰岛素试剂例如本发明的 GLP-1 化合物的效价可以通过从剂量反应曲线计算 EC_{50} 值,例如实施例 21 中描述的来确定。

[0206] 在特定的实施方式中, (i) 使用表达克隆的人类 GLP-1 受体的婴儿仓鼠肾脏 (BHK) 细胞,优选的 BHK-467-12A,更优选的 BHK-467-12A(tk-ts13); (ii) 细胞在添加了 100IU/mL 青霉素、100 μ g/mL 链霉素、5% 胎牛血清和 0.5mg/ml 遗传霉素 G-418(LifeTechnologies) 的 DMEM 培养基中,优选的在 5% CO₂ 下生长; (iii) 细胞,优选的在大约 80% 汇合时,在磷酸

盐缓冲盐水中洗涤两次；(iv) 用乙二胺四乙酸的四钠盐的水溶液，例如 Versene 收获细胞；(v) 通过匀质化，优选的在缓冲液 1 中，从细胞制备质膜；匀浆物在 4℃ 例如在 48,000x g 离心 15 分钟；和 / 或 (vii) 团粒通过在缓冲液 2 中匀质化来悬浮。步骤 (vi) 和 (vii) 优选的再重复例如一次或两次。

[0207] 功能性受体分析可以通过测量作为对促胰岛素试剂刺激的反应的环化 AMP (cAMP) 如实施例 21 中描述的来进行。形成的 cAMP 优选的通过 AlphaScreen™ cAMP Kit (Perkin Elmer Life Sciences) 来定量。孵育可以在总体积 50 μl 的缓冲液 3 (50mM Tris-HCl、5mMHEPES、10mM MgCl₂、pH 7.4) 和具有以下添加物的半区域 96 孔微量滴定板中进行：1mM ATP、1 μM GTP、0.5mM 3-异丁基-1-甲基黄嘌呤 (IBMX)、0.01% Tween-20、0.1% BSA、6 μg 膜制品、15 μg/mL 接受体珠子、与 6nM 生物素基-cAMP 预孵育的 20 μg/mL 供体珠子。测试激动剂活性的类似物或衍生物优选的在缓冲液 3 中溶解和稀释。GTP 对每个实验新鲜地制备。平板在室温下在暗处缓慢搅动孵育三小时，随后在 Fusion™ 仪器 (Perkin Elmer Life Sciences) 中计数。对单独的类似物或衍生物标绘浓度-反应曲线，利用 Prism，版本 4.0 或 5.0 (GraphPad, Carlsbad, CA) 的四参数逻辑模型估计 EC₅₀ 值。

[0208] 在第一个特定的实施方式中，如利用 cAMP 分析测定的，本发明的 GLP-1 衍生物具有的效价（按 nM 的 EC₅₀）低于 10.00、优选的低于 9.00、更优选的低于 8.00、再更优选的低于 7.00 和最优选的低于 6.00 (nM)。

[0209] 在第二个特定的实施方式中，如利用 cAMP 分析测定的，本发明的 GLP-1 衍生物具有的效价（按 nM 的 EC₅₀）低于 5.00、优选的低于 4.00、更优选的低于 3.00、再更优选的低于 2.00 和最优选的低于 1.00 (nM)。

[0210] 在第三个特定的实施方式中，如利用 cAMP 分析测定的，本发明的 GLP-1 衍生物具有的效价（按 nM 的 EC₅₀）低于 0.80、优选的低于 0.60、更优选的低于 0.40、再更优选的低于 0.20 和最优选的低于 0.10 (nM)。

[0211] 在第四个特定的实施方式中，如利用 cAMP 分析测定的，本发明的 GLP-1 衍生物具有的效价（按 nM 的 EC₅₀）低于 0.090、优选的低于 0.080、更优选的低于 0.070、再更优选的低于 0.060 和最优选的低于 0.050 (nM)。

[0212] 在第五个特定的实施方式中，如利用 cAMP 分析测定的，本发明的 GLP-1 衍生物具有的效价（按 nM 的 EC₅₀）低于 0.040、优选的低于 0.030、更优选的低于 0.020、最优选的低于 0.010 (nM)。

[0213] 因而，本发明的 GLP-1 衍生物的效价（按照 nM 的 EC₅₀，使用 cAMP 分析测定的）的示范性的范围是 0.010-10.0, 0.010-8.0, 0.010-6.0, 0.010-4.0, 0.010-2.0, 0.010-1.00, 0.010-0.80, 0.010-0.60, 0.010-0.40, 0.010-0.30, 0.010-0.20, 0.010-0.10, 和 0.010-0.90 (nM)，优选的 0.010-0.40, 0.010-0.30, 0.010-0.20, 0.010-0.10, 和 0.010-0.90 (nM)。

[0214] 在第二个方面，GLP-1 类似物或其衍生物（“GLP-1 化合物”）具有对 GLP-1 受体的高亲和力。对 GLP-1 受体的亲和力可以如实施例 23 中描述的测定，即，通过从受体置换 ¹²⁵I-GLP-1 的方式。BHK 细胞可以用于膜制备，优选的菌株 tk-ts13。膜可以优选的如实施例 23 中描述的纯化。优选的结合分析方法是实施例 23 的 SPA 分析。IC₅₀ 值可以从结果（结合）曲线中作为从受体替换 50% 的 ¹²⁵I-GLP-1 的浓度来读取。

[0215] 在第一个特定的实施方式中,所述 IC_{50} 值低于 500nM、优选的低于 400nM、更优选的低于 300nM、再更优选的低于 200nM、最优选的低于 100nM。

[0216] 在第二个特定的实施方式中,所述 IC_{50} 值低于 80nM、优选的低于 60nM、更优选的低于 50nM、再更优选的低于 40nM、最优选的低于 30nM。

[0217] 在第三个特定的实施方式中,所述 IC_{50} 值低于 20nM、优选的低于 15nM、更优选的低于 10nM、再更优选的低于 5.0nM、最优选的低于 4.0nM。

[0218] 在第四个特定的实施方式中,所述 IC_{50} 值低于 3.0nM、优选的低于 2.0nM、更优选的低于 1.0nM、再更优选的低于 0.80nM、最优选的低于 0.60nM。

[0219] 在第五个特定的实施方式中,所述 IC_{50} 值低于 0.50nM、优选的低于 0.40nM、更优选的低于 0.30nM、再更优选的低于 0.20nM、最优选的低于 0.10nM。

[0220] 因而, IC_{50} 的示范性的范围是:0.1-400、0.2-300、0.3-200、0.4-100、0.5-50 和 1-10nM。

[0221] 在第三个方面,本发明涉及 GLP-1 类似物或其衍生物,其以高亲和力结合分离的 GLP-1 受体的 N-末端细胞外结构域 (nGLP-1R)。亲和力可以作为从替换 ^{125}I -Exendin-4(9-39) 结合 nGLP-1R 的能力来测量,例如实施例 22 中描述的。

[0222] 在该分析中,Exendin-4 以 5nM 的 IC_{50} 值结合 nGLP-1R, GLP-1(7-37) 以 1120nM 的 IC_{50} 值结合 nGLP-1R, 利拉鲁肽以 1500nM 的 IC_{50} 值结合 nGLP-1R。在本发明的一个方面,本发明的 GLP-1 类似物或其衍生物以比利拉鲁肽更低的 IC_{50} 值结合 nGLP-1R。更优选的,本发明的 GLP-1 类似物或其衍生物以低于 100nM 的 IC_{50} 值结合 nGLP-1R, 再更优选的低于 10nM、或甚至低于 5nM。

[0223] 蛋白质 nGLP-1R 可以如 Runge et al 2007 (In Biochemistry, vol. 46, pp. 5830-5840) 所描述的制备。然后蛋白质被生物素化的和固定,优选的固定在链霉抗生物素蛋白包被的 SPA 珠子上。适合的缓冲液例如 0.1M $NaHCO_3$ 中的 nGLP-1R 可以利用 75 μ g BNHS (Sigma H 1759) 生物素化为 1mg 蛋白质。生物素化的 nGLP-1R 随后优选的相对于 PBS 来透析。所有试剂和类似物或衍生物优选的在具有 0.05% v/v Tween20 的 PBS 中稀释。例如,结合分析可以在 200 μ l 的最终体积中在 96 孔 OptiPlates (PerkinElmer 6005290) 中进行。每个反应孔可以含有 2mg 的链霉抗生物素蛋白包被的 SPA 珠子 (PerkinElmer RPNQ007)、0.1pmol 生物素化的 nGLP-1R、50pCi ^{125}I -Exendin(9-39) 和终浓度例如从 1000nM 到 0.064nM 的测试肽。平板优选的在 RT 在摇动器上孵育 3 小时。SPA 颗粒可以通过在例如 1500rpm 离心 10 分钟来旋转沉降,平板在例如 TopCount-NXT (PerkinElmer) 中计数。

[0224] 亲和力可以通过 IC_{50} 值来表示,其是作为替换 50% 的 ^{125}I -Exendin-4(9-39) 结合 nGLP-1R 的 GLP-1 衍生物从曲线上读取。

[0225] 在第一个特定的实施方式中,如在实施例 22 的分析中作为 IC_{50} /nM 测量的,本发明的 GLP-1 衍生物对 GLP-1 受体的细胞外结构域 (nGLP-1R) 的亲和力低于 1500、优选的低于 1000、再更优选的低于 900、最优选的低于 800 (nM)。

[0226] 在第二个特定的实施方式中,如在实施例 22 的分析中作为 IC_{50} /nM 测量的,本发明的 GLP-1 衍生物对 GLP-1 受体的细胞外结构域 (nGLP-1R) 的亲和力低于 700、优选的低于 600、再更优选的低于 500、最优选的低于 400 (nM)。

[0227] 在第三个特定的实施方式中,如在实施例 22 的分析中作为 IC_{50} /nM 测量的,本发明

的 GLP-1 衍生物对 GLP-1 受体的细胞外结构域 (nGLP-1R) 的亲合力低于 300、优选的低于 200、再更优选的低于 100、最优选的低于 80 (nM)。

[0228] 在第四个特定的实施方式中,如在实施例 22 的分析中作为 IC_{50} /nM 测量的,本发明的 GLP-1 衍生物对 GLP-1 受体的细胞外结构域 (nGLP-1R) 的亲合力低于 60、优选的低于 50、再更优选的低于 40、最优选的低于 30 (nM)。

[0229] 在第五个特定的实施方式中,如在实施例 22 的分析中作为 IC_{50} /nM 测量的,本发明的 GLP-1 衍生物对 GLP-1 受体的细胞外结构域 (nGLP-1R) 的亲合力低于 20、优选的低于 15、再更优选的低于 10.0、最优选的低于 5.0 (nM)。

[0230] 因此,本发明的 GLP-1 衍生物对 nGLP-1R 的亲合力的示范性的范围 (按 nM 的 IC_{50}) 是: 5-1500, 5-1000, 10-500, 20-300, 50-500, 10-500, 和 5-50 (nM)。

[0231] 在此对于多肽使用的术语“DDP-IV 保护的”是指一种多肽,其已经被化学地修饰以使得所述衍生物对血浆肽酶二肽基氨肽酶-4 (DPP-IV) 有抗性。血浆中的 DPP-IV 酶已知涉及几种肽激素,例如 GLP-1、GLP-2、Exendin-4 等等的降解。因而,进行了相当大的努力来开发对 DPP-IV 介导的水解敏感的多肽的类似物和衍生物,以降低通过 DPP-IV 的降解速度。

[0232] 在一个实施方式中,根据本发明的 GLP-1 类似物或其衍生物是 DPP-IV 保护的 GLP-1 类似物或其衍生物。

[0233] 在一个实施方式中,根据本发明的 GLP-1 类似物或其衍生物是 DPP-IV 保护的 GLP-1 类似物或其衍生物,与利拉鲁肽相比其对于 DPP-IV 是更有抗性的。

[0234] 肽对二肽基氨肽酶 IV 的降解的抗性通过以下降解分析来测定:

[0235] 肽的等分量 (5nmol) 在 37°C 在 100 μ L 0.1M 三乙胺-HCl 缓冲液 pH 7.4 中与相当于 5mU 酶活性的 1 μ L 纯化的二肽基氨肽酶 IV 孵育 10-180 分钟。通过添加 5 μ L 的 10% 三氟乙酸终止酶反应,分离肽降解产物并利用 HPLC 分析来定量。进行这种分析的一种方法是:混合物施加到 Vydac C 18widerpore (30nm 孔, 5 μ m 颗粒) 250 $\times$ 4.6mm 柱上,以 1ml/ 分钟的流速用 0.1% 三氟乙酸中线性阶式梯度的乙腈洗脱 (0% 乙腈 3 分钟, 0-24% 乙腈 17 分钟, 24-48% 乙腈 1 分钟), 根据 Siegel et al., Regul. Pept. 1999 ;79 :93-102 和 Mentlein et al. Eur. J. Biochem. 1993 ;214 :829-35。肽和它们的降解产物可以通过它们在 220nm 处 (肽键) 或 280nm 处 (芳香族氨基酸) 的吸光度来监测,和通过相对于标准物来积分它们的峰面积来定量。肽被二肽基氨肽酶 IV 的水解的速率以引起低于 10% 的肽被水解的孵育时间来估计。

[0236] 做为选择,肽对二肽基氨肽酶 IV 的降解的抗性可以通过以下降解分析来测定:

[0237] 肽的等分量 (4nmol) 在存在或缺乏 1.6% 人血清白蛋白的情况下,在 37°C 在 40 μ L 的 0.085M Tris-HCl 缓冲液 pH 8.0 中与 10.9mU 的纯化的二肽基氨肽酶 IV 孵育 22 小时。在 0、4 和 22 小时之后,采集 10 μ L 的样品,通过与 100 μ L 的 1% 三氟乙酸混合来终止酶反应。分离肽降解产物,使用 HPLC 分析来定量。进行这种分析的一种方法是:混合物施加到 Agilent Zorbax 300SB-C18 (5 μ m 颗粒) 150 $\times$ 2.1mm 柱上,以 0.5ml/ 分钟的流速用具有 0.07% TFA 的从 0.1% 三氟乙酸到 100% 乙腈的线性梯度在 30 分钟内洗脱。肽和它们的降解产物通过它们在 214nm 处的吸光度来监测,通过积分它们的峰面积来定量。肽对二肽基氨肽酶 IV 的稳定性作为相对于完整肽与裂解后缺少两个氨基末端氨基酸的降解产物的峰面积的总和的完整肽的峰面积来测定。

[0238] 在此使用的术语“药学上可接受的”是指适合于正常的药物应用,即,在患者中不产生严重的有害事件,等等。

[0239] 在此使用的术语“赋形剂”是指通常被添加到药物组合物中的化合物,例如,缓冲剂、张度试剂、防腐剂,等等。

[0240] 在此使用的术语“有效数量”是指与没有治疗相比对于患者的治疗足以有效的剂量。

[0241] 在此使用的术语“药物组合物”是指一种产物,其包含根据本发明的活性 GLP-1 类似物或其衍生物以及药物赋形剂,例如缓冲剂、防腐剂和任选地张度修饰剂和 / 或稳定剂。因而,药物组合物在本领域中也称为药物制剂。

[0242] 在此使用的术语“疾病的治疗”是指发生了疾病、状况或病症的患者的管理和照料。治疗的目的是对抗疾病、状况或病症。治疗包括施用根据本发明的活性类似物或衍生物来消除或控制疾病、状况或病症,以及减轻与疾病、状况或病症相关的症状或并发症。

[0243] 在另一个方面,本发明涉及可以同时结合白蛋白和 GLP-1 受体的 GLP-1 类似物或其衍生物。

[0244] 在另一个方面,本发明涉及在存在 2% 白蛋白的情况下以低于 100nM、优选的低于 30nM 的亲合力结合 GLP-1 受体的 GLP-1 类似物或其衍生物。

[0245] 在另一个方面,所述 GLP-1 类似物或其衍生物 (“GLP-1 化合物”) 具有对 GLP-1 受体的亲合力,当比较存在极低浓度 (例如 0.005% 到 0.2%) 的人白蛋白的情况下的亲和力和存在 2% 人白蛋白的情况下的亲合力时,其仅部分地降低。在这些条件下结合亲和力的改变低于 50 倍、优选的低于 30 倍,更优选的低于 10 倍。

[0246] 在另一个方面,本发明涉及 GLP-1 类似物或其衍生物,其对于 exendin-4 通常所见的化学降解、特别是氧化和脱酰胺作用是稳定的。

[0247] 在另一个方面,本发明涉及 GLP-1 类似物或其衍生物,其具有对受体的高效价。对于具有低于 100nM 的白蛋白结合亲和力的非常强的白蛋白结合类似物,在 cAMP 分析中, GLP-1 效价是好于 3 微摩尔、优选的效价是好于 1 微摩尔。

[0248] 对于具有低于 500nM 的白蛋白结合亲和力的强白蛋白结合类似物或衍生物,在 cAMP 分析中, GLP-1 效价是好于 1 微摩尔,优选的效价是好于 0.2 微摩尔。

[0249] 在另一个方面,本发明涉及具有高白蛋白结合亲和力的 GLP-1 类似物或其衍生物。本发明的类似物或衍生物具有低于 1 微摩尔的白蛋白结合亲合力。更优选的,本发明的类似物或衍生物具有低于 500nM、再更优选的低于 200nM 或甚至低于 100nM 的白蛋白结合亲合力。

[0250] 白蛋白结合亲合力可以利用以下的分析来测量:

[0251] 白蛋白结合分析:

[0252] GLP-1 类似物或其衍生物对人血清白蛋白 (HSA) 的亲合力通过竞争性闪烁亲近分析 (SPA) 来测量。链霉抗生物素蛋白-SPA 珠子 (GEHealthcare RPNQ0009) 与生物素化的 HSA 孵育 5 小时。珠子用缓冲液洗涤来除去未结合的 HSA。珠子与 ¹²⁵I 标记的酰化的 GLP-1 类似物例如 N-ε 26-[2-(2-{2-[2-(2-{2-[(S)-4-羧基-4-(17-羧基-十七烷酰基氨基)丁酰基氨基]乙氧基}乙氧基)乙酰基氨基]乙氧基}乙氧基)乙酰基][Aib8,¹²⁵I-Tyr19, Arg34]GLP-1(7-37) 或 N-ε 37-[2-(2-[2-((S)-4-((S)-4-(12-[4-(16-(1H-四唑-5-基)

十六烷酰基氨磺酰基)丁酰基氨基]十二烷酰氨基)-4-羧基丁酰氨基)-4-羧基丁酰氨基)乙氧基]乙氧基)乙酰基][Aib8,¹²⁵I-Tyr19,Glu22,Arg26,34,Lys37]GLP-1(7-37)-NH₂在含有 100mM Hepes、100mM NaCl、10mM MgSO₄、0.025% Tween-20、pH7.4 的缓冲液中混合。混合物吸移到 Perkin Elmer Optiplate-96 6005290(100 μl 每孔)的反应孔中,100 μl 的要测量的 GLP-1 类似物或衍生物的稀释系列添加到相同的缓冲液中。在室温下温和摇动 20 小时后,平板被离心,在 TopCounter 上计数。作为 GLP-1 类似物或衍生物浓度的函数标绘结合的 cpm,竞争曲线的 EC₅₀ 值用作类似物或衍生物对 HSA 的亲力的度量。

[0253] 在另一个方面,本发明涉及 GLP-1 类似物或其衍生物,相对于利拉鲁肽,其在啮齿动物中和在非啮齿动物模型中具有实质上改善的终末半衰期。

[0254] 在本发明的一个方面,相对于利拉鲁肽,在啮齿动物或在非啮齿动物模型中的终末半衰期被改善至至少 3 倍。

[0255] 在本发明的另一个方面,相对于利拉鲁肽,在非啮齿动物模型中的终末半衰期被改善至至少 6 倍。

[0256] 在另一个方面,本发明涉及 GLP-1 类似物或其衍生物,其在 i. v. 施用给大鼠后具有至少 10 小时的体内半衰期。

[0257] 在另一个方面,本发明涉及 GLP-1 类似物或其衍生物,其在 s. c. 施用给迷你猪后具有至少 50 小时的体内半衰期,优选的,在 s. c. 施用给迷你猪后具有至少 80 小时的体内半衰期。

[0258] 在另一个方面,本发明涉及 GLP-1 类似物或其衍生物,其可以配制为适合于肺部施用的颗粒。

[0259] 在另一个方面,本发明涉及 GLP-1 类似物或其衍生物,其中性 pH 值下,最优选的在 6-8 的范围内是化学上和物理上稳定的。

[0260] 在另一个方面,本发明涉及 GLP-1 类似物或其衍生物,其有很少的或没有聚集的倾向。在一个方面,当在硫黄素分析中测试时,相对于利拉鲁肽,聚集倾向被显著地改善了。

[0261] 在另一个方面,本发明涉及 GLP-1 类似物或其衍生物,其适合于肺部递送。这可以是关于对肺部制剂有用的物理或化学方面。做为选择,类似物或衍生物对于气道和肺中酶的降解是稳定的。

[0262] 在本发明的实施方式中,实现了上述特征的组合。

[0263] 在此使用的术语“白蛋白结合部分”是指与人血清白蛋白非共价地结合的残基。附着于治疗性多肽的白蛋白结合残基一般具有低于 1 微摩尔的白蛋白结合亲和力,优选的低于 500nM、再更优选的低于 200nM 或甚至低于 100nM。

[0264] 在含有 4-40 个碳原子、具有末端酸性基团的线性和分支亲脂 (lipophilic) 部分中,许多白蛋白结合残基是已知的。

[0265] 在此使用的术语“亲水的接头”是指将肽和白蛋白结合残基与化学物质部分分隔的间隔区,所述化学物质部分包含至少 5 个非氢原子,其中它们的 30-50% 是 N 或 O。

[0266] 在一个方面,本发明涉及 GLP-1 类似物或其衍生物,其包含在修饰的 GLP-1 序列和一个或更多个白蛋白结合残基之间的亲水性接头。

[0267] 在一个方面,所述亲水性接头是不分支的寡聚乙二醇部分,在两个末端都具有合适的官能团,其形成修饰的 GLP-1 序列的氨基基团与白蛋白结合残基的官能团之间的桥。

[0268] 在此处的式子中,来自附着的基团的末端键被认为是附着键,并且除非声明了,不以亚甲基基团结束。

[0269] 在本发明的一个方面,所述 GLP-1 类似物或衍生物选自以下构成的组

[0270] [Glu22, Arg26]GLP-1 (7-33) 酰胺,

[0271] $N \epsilon 20 \{2-(2-\{2-[2-(2-\{2-[4- \text{羧基}-4-(17- \text{羧基}-十七烷酰基氨基)丁酰基氨基\}乙氧基\}乙氧基)乙酰基氨基\}乙氧基\}乙氧基)乙酰基\}-(\text{Aib8, Lys20, Glu22, Val25, Arg26, Leu27, Glu30, Lys33})\text{GLP-1 (7-33) 酰胺},$

[0272] $N \epsilon 20 \{2-(2-\{2-[2-(2-\{2-[4- \text{羧基}-4-(17- \text{羧基}-十七烷酰基氨基)丁酰基氨基\}乙氧基\}乙氧基)乙酰基氨基\}乙氧基\}乙氧基)乙酰基\}-(\text{Aib8, Lys20, Glu22, Arg26, Glu30})\text{GLP-1 (7-33) 酰胺},$

[0273] [Glu22, Val25, Arg26]GLP-1 (7-33) 酰胺,

[0274] $N \epsilon 20 \{2-(2-\{2-[2-(2-\{2-[4- \text{羧基}-4-(17- \text{羧基}-十七烷酰基氨基)丁酰基氨基\}乙氧基\}乙氧基)乙酰基氨基\}乙氧基\}乙氧基)乙酰基\}-(\text{Aib8, Lys20, Glu22, Arg26, Glu30})\text{GLP-1 (7-33) 酰胺},$

[0275] [Glu22, Arg26]GLP-1 (7-33) 肽,

[0276] $N \epsilon 20 \{2-(2-\{2-[2-(2-\{2-[4- \text{羧基}-4-(17- \text{羧基}-十七烷酰基氨基)丁酰基氨基\}乙氧基\}乙氧基)乙酰基氨基\}乙氧基\}乙氧基)乙酰基\}-(\text{Aib8, Lys20, Glu22, Val25, Arg26, Glu30})\text{GLP-1 (7-33) 酰胺},$ 和

[0277] [Glu22, Val25, Arg26]GLP-1 (7-32) 酰胺。

[0278] 制剂

[0279] 本发明的另一个目的是提供包含以 0.1mg/ml 到 25mg/ml 的浓度存在的根据本发明的类似物或衍生物的药物制剂,和其中所述制剂具有 3.0 到 9.0 的 pH 值。制剂可以进一步包含缓冲系统、防腐剂、张度试剂、螯合剂、稳定剂和表面活性剂。

[0280] 在本发明的一个实施方式中,所述药物制剂是水性制剂,即包含水的制剂。这样的制剂一般是溶液或悬浮液。

[0281] 在本发明的进一步的实施方式中,所述药物制剂是水溶液。

[0282] 术语“水性制剂”被定义为包含至少 50% w/w 水的制剂。同样地,术语“水性溶液”被定义为包含至少 50% w/w 水的溶液,术语“水性悬浮液”被定义为包含至少 50% w/w 水的悬浮液。

[0283] 在另一个实施方式中,所述药物制剂是冻干的制剂,在使用前医师或患者向其中添加溶剂和 / 或稀释剂。

[0284] 在另一个实施方式中,所述药物制剂是不需要任何在前的溶解随时可使用的干燥的制剂(例如,冻干的或喷雾干燥的)。

[0285] 在进一步的方面,本发明涉及药物制剂,其包含根据本发明的类似物或衍生物的水溶液和缓冲剂,其中所述类似物或衍生物以 0.1mg/ml 或更高的浓度存在,并且其中所述制剂具有约 3.0 到约 9.0 的 pH 值。

[0286] 在本发明的另一个实施方式中,制剂的 pH 值是从约 7.0 到约 9.5。在本发明的另一个实施方式中,制剂的 pH 值是从约 3.0 到约 7.0。在本发明的另一个实施方式中,制剂的 pH 值是从约 5.0 到约 7.5。在本发明的另一个实施方式中,制剂的 pH 值是从约 7.5 到约

9.0。在本发明的另一个实施方式中,制剂的 pH 值是从约 7.5 到约 8.5。在本发明的另一个实施方式中,制剂的 pH 值是从约 6.0 到约 7.5。在本发明的另一个实施方式中,制剂的 pH 值是从约 6.0 到约 7.0。在另一个实施方式中,药物制剂是 8.0 到 8.5。

[0287] 在本发明的实施方式中,每个施用的剂量含有 0.01mg-10mg 的根据本发明的活性类似物或衍生物。在一个实施方式中,施用的剂量含有超过 0.05mg 的活性类似物或衍生物。在一个实施方式中,施用的剂量含有超过 0.1mg 的根据本发明的活性类似物或衍生物。在一个实施方式中,施用的剂量含有达到 10mg 的根据本发明的活性类似物或衍生物。在一个实施方式中,施用的剂量含有达到 9mg 的根据本发明的活性类似物或衍生物。在一个实施方式中,施用的剂量含有达到 8mg 的根据本发明的活性类似物或衍生物。在一个实施方式中,施用的剂量含有达到 7mg 的根据本发明的活性类似物或衍生物。在一个实施方式中,施用的剂量含有达到 6mg 的根据本发明的活性类似物或衍生物。在一个实施方式中,施用的剂量含有达到 5mg 的根据本发明的活性类似物或衍生物。在一个实施方式中,施用的剂量含有从 0.2mg 到 5mg 的根据本发明的活性类似物或衍生物。

[0288] 在本发明的进一步的实施方式中,所述缓冲剂选自自由乙酸钠、碳酸钠、柠檬酸盐、双甘氨酸、组氨酸、甘氨酸、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(羟乙基)甲基甘氨酸、苹果酸、琥珀酸盐、顺丁烯二酸、延胡索酸、酒石酸、天冬氨酸或其混合物构成的组。这些特定缓冲剂的每一个构成了本发明的可选择的实施方式。

[0289] 在本发明的进一步的实施方式中,所述制剂进一步包含药学上可接受的防腐剂。在本发明的进一步的实施方式中,防腐剂选自自由苯酚、o-甲酚、m-甲酚、p-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-苯乙醇、苯甲醇、氯丁醇和 thiomerosal、溴硝丙二醇、苯甲酸、咪脲(imidurea)、chlorohexidine、脱氢醋酸钠、氯甲酚、对羟基苯甲酸乙酯、苧索氯铵、chlorphenesine(3p-氯苯氧基丙烷-1,2-二醇)或其混合物构成的组。在一个实施方式中,所述防腐剂是苯酚或 m-甲酚。在本发明的进一步的实施方式中,所述防腐剂以 0.1mg/ml 到 20mg/ml 的浓度存在。在本发明的进一步的实施方式中,所述防腐剂以 0.1mg/ml 到 5mg/ml 的浓度存在。在本发明的进一步的实施方式中,所述防腐剂以 5mg/ml 到 10mg/ml 的浓度存在。在本发明的进一步的实施方式中,所述防腐剂以 10mg/ml 到 20mg/ml 的浓度存在。这些特定防腐剂的每一个构成了本发明的可选择的实施方式。防腐剂在药物组合物中的使用是技术人员公知的。为了方便起见,参考 Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 19th edition, 1995。

[0290] 在本发明的进一步的实施方式中,所述制剂进一步包含等渗试剂。在本发明的进一步的实施方式中,等渗试剂选自自由盐(例如,氯化钠)、糖或糖醇、氨基酸(例如, L-甘氨酸、L-组氨酸、精氨酸、赖氨酸、异亮氨酸、天冬氨酸、色氨酸、苏氨酸)、糖醇(例如甘油醇(甘油)、1,2-丙二醇(丙二醇)、1,3-丙二醇、1,3-丁二醇)聚乙二醇(例如 PEG400)或其混合物构成的组。在一个实施方式中,所述等渗试剂是丙二醇。可以使用任何糖类,例如单糖、二糖或多糖,或水溶性的葡聚糖,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、茁霉多糖、糊精、环糊精、alfa 和 beta HPCD、可溶性淀粉、羟乙基淀粉和羧甲基纤维素-Na。在一个实施方式中,糖添加剂是蔗糖。糖醇被定义为具有至少一个 -OH 基团的 C4-C8 烃类,包括,例如,甘露醇、山梨醇、肌醇、半乳糖醇、卫矛醇、木糖醇和

阿拉伯醇。在一个实施方式中,糖醇添加剂是甘露醇。上述的糖类或糖醇可以单独地或组合地使用。对于使用的数量没有固定的限制,只要糖类或糖醇可溶于液体制品中,并且不会不利地影响利用本发明的方法实现的稳定效果。在一个实施方式中,糖类或糖醇浓度在约 1mg/ml 和约 150mg/ml 之间。在本发明的进一步的实施方式中,所述等渗试剂以 1mg/ml 到 50mg/ml 的浓度存在。在本发明的进一步的实施方式中,所述等渗试剂以 1mg/ml 到 7mg/ml 的浓度存在。在本发明的实施方式中,所述等渗试剂以 5mg/ml 到 7mg/ml 的浓度存在。在本发明的进一步的实施方式中,所述等渗试剂以 8mg/ml 到 24mg/ml 的浓度存在。在本发明的进一步的实施方式中,所述等渗试剂以 25mg/ml 到 50mg/ml 的浓度存在。这些特定等渗试剂的每一个构成了本发明的可选择的实施方式。在药物组合物中等渗试剂的使用是技术人员公知的。为了方便起见,参考 Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 19th edition, 1995。

[0291] 在本发明的进一步的实施方式中,所述制剂进一步包含螯合剂。在本发明的进一步的实施方式中,所述螯合剂选自乙二胺四乙酸 (EDTA)、柠檬酸和天冬氨酸的盐和其混合物。在本发明的进一步的实施方式中,螯合剂以 0.1mg/ml 到 5mg/ml 的浓度存在。在本发明的进一步的实施方式中,螯合剂以 0.1mg/ml 到 2mg/ml 的浓度存在。在本发明的进一步的实施方式中,螯合剂以 2mg/ml 到 5mg/ml 的浓度存在。这些特定螯合剂的每一个构成了本发明的可选择的实施方式。螯合剂在药物组合物中的使用是技术人员公知的。为了方便起见,参考 Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 19th edition, 1995。

[0292] 在本发明的进一步的实施方式中,所述制剂进一步包含稳定剂。稳定剂在药物组合物中的使用是技术人员公知的。为了方便起见,参考 Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 19th edition, 1995。

[0293] 更特别地,本发明的组合物是稳定的液体药物组合物,它的治疗活性成分包括多肽,所述多肽在液体药物制剂的保存期间可能展现聚集物形成。

[0294] “聚集物形成”是指引起寡聚体形成的多肽分子之间的物理相互作用,其可以是仍然可溶的,或是从溶液沉淀的大的可见的聚集物。“在保存期间”意指液体药物组合物或制剂一旦被制备,不立即施用给受试者。然而,在制备之后,它被包装用于保存,处于液态、冷冻状态、或干燥的形式,用于以后重构成液态或适合于施用给受试者的其他形式。“干燥的形式”意指液体药物组合物或制剂被干燥,通过冷冻干燥(即,冻干;参见,例如, Williams and Polli (1984) J. Parenteral Sci. Technol. 38:48-59)、喷雾干燥(参见 Masters (1991) in Spray-Drying Handbook (5th ed; Longman Scientific and Technical, Essex, U. K.), pp. 491-676; Broadhead et al. (1992) Drug Devel. Ind. Pharm. 18:1169-1206; 和 Mumenthaler et al. (1994) Pharm. Res. 11:12-20) 或风干 (Carpenter and Crowe (1988) Cryobiology 25:459-470; and Roser (1991) Biopharm. 4:47-53)。在液体药物组合物的保存期间多肽的聚集物形成可能不利地影响多肽的生物学活性,引起药物组合物的治疗效力的损失。此外,聚集物形成可以引起其他问题,例如,当含有多肽的药物组合物利用输注系统来施用时,管道、膜或泵的阻塞。

[0295] 本发明的药物组合物可以进一步包含足以降低组合物的保存期间多肽的聚集物形成的、一定数量的氨基酸碱。“氨基酸碱”是指氨基酸或氨基酸的组合,其中任何给定的氨基酸以它的游离碱形式或以它的盐形式存在。当使用氨基酸的组合时,所有的氨基酸可

以以它们的游离碱形式存在,所有的可以以它们的盐形式存在,或某一些以它们的游离碱形式存在而其他的以它们的盐形式存在。在一个实施方式中,在制备本发明的组合物中使用的氨基酸是带有带电侧链的那些,例如精氨酸、赖氨酸、天冬氨酸和谷氨酸。特定氨基酸(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、苏氨酸和其混合物)的任何立体异构体(即,L-D 或其混合物)或这些立体异构体的组合,可以在本发明的药物组合物中存在,只要特定的氨基酸以它们的游离碱形式或它的盐形式存在。在一个实施方式中,使用 L- 立体异构体。本发明的组合物还可以用这些氨基酸的类似物来配制。“氨基酸类似物”是指天然存在的氨基酸的衍生物,其带来在本发明的液体药物组合物的保存期间降低多肽的聚集物形成的期望的效果。适合的精氨酸类似物包括,例如,氨基胍、鸟氨酸和 N- 单乙基 L- 精氨酸,适合的甲硫氨酸类似物包括乙硫氨酸和 *buthionine*,适合的半胱氨酸类似物包括 S- 甲基 -L 半胱氨酸。对于其他氨基酸,氨基酸类似物以它们的游离碱形式或它们的盐形式掺入到组合物中。在本发明的进一步的实施方式中,氨基酸或氨基酸类似物以一定浓度使用,所述浓度足以防止或延缓蛋白质的聚集。

[0296] 在本发明的进一步的实施方式中,甲硫氨酸(或其他含硫的氨基酸或氨基酸类似物)可以添加来抑制甲硫氨酸残基向甲硫氨酸亚砷的氧化,当作为治疗试剂的多肽是包含对这样的氧化敏感的至少一个甲硫氨酸残基的多肽时。“抑制”是指随着时间的过去甲硫氨酸氧化的物质的最小的积累。抑制甲硫氨酸氧化引起多肽在它的适当的分子形式的更多的存留。可以使用甲硫氨酸的任何立体异构体(L 或 D) 或其组合。添加的数量应当是足够抑制甲硫氨酸残基的氧化的数量,从而甲硫氨酸亚砷的数量对于管理机构是可接受的。一般地,这意味着组合物包含不超过约 10% 到约 30% 的甲硫氨酸亚砷。一般地,这可以通过添加甲硫氨酸、从而添加的甲硫氨酸与甲硫氨酸残基的比例从约 1 : 1 到约 1000 : 1,例如 10 : 1 到约 100 : 1,来实现。

[0297] 在本发明的进一步的实施方式中,所述制剂进一步包含选自高分子量聚合物或低分子化合物的组的稳定剂。

[0298] 在本发明的进一步的实施方式中,稳定剂选自聚乙二醇(例如,PEG 3350)、聚乙烯醇(PVA)、聚乙烯吡咯烷酮、羧基 / 氧化纤维素或其衍生物(例如,HPC、HPC-SL、HPC-L 和 HPMC)、环糊精、包含硫的物质如单硫代甘油、巯基乙酸和 2- 甲基硫乙醇和不同的盐(例如,氯化钠)。这些特定稳定剂的每一个构成了本发明的可选择的实施方式。

[0299] 所述药物组合物还可以包含另外的稳定剂,其进一步增强其中的治疗活性多肽的稳定性。

[0300] 本发明特别感兴趣的稳定剂包括,但不限于,甲硫氨酸和 EDTA,其保护多肽对抗甲硫氨酸氧化,以及非离子表面活性剂,其保护多肽对抗与冻融或机械剪切相关的聚集。

[0301] 在本发明的进一步的实施方式中,所述制剂进一步包含表面活性剂。在本发明的另一个实施方式中,所述药物组合物包含两种不同的表面活性剂。在此使用的术语“表面活性剂”是指包含水溶性的(亲水性的)部分、头部和脂溶性的(亲油性的)区段的任何分子或离子。表面活性剂优选地在界面积累,其中亲水性部分朝向水(亲水性的相)亲油性部分朝向油或疏水的相(即,玻璃、空气、油,等等)。表面活性剂开始形成胶束的浓度被称为临界胶束浓度或 CMC。此外,表面活性剂降低了液体的表面张力。表面活性剂也称为两亲化合物。术语“洗涤剂”是一般用于表面活性剂的异名。

[0302] 阴离子表面活性剂可以选自下组：鹅去氧胆酸、鹅去氧胆酸钠盐、胆酸、去氢胆酸、去氧胆酸、去氧胆酸甲酯、毛地黄皂苷、毛地黄毒苷配基、N,N-二甲基十二烷基胺 N-氧化物、多库酯钠、甘氨酸去氧胆酸钠、甘氨酸胆酸水合物、甘氨酸脱氧胆酸一水合物、甘氨酸脱氧胆酸钠盐、甘氨酸脱氧胆酸钠盐、甘氨酸胆酸 3-硫酸二钠盐、甘氨酸胆酸乙酯、

[0303] N-十二烷基酰基肌氨酸钠盐、N-十二烷基酰基肌氨酸钠盐、N-十二烷基酰基肌氨酸、N-十二烷基酰基肌氨酸、十二烷基硫酸锂、Lugol、1-辛烷磺酸钠盐、1-辛烷磺酸钠盐、1-丁烷磺酸钠、1-癸烷磺酸钠、1-十二烷基磺酸钠、1-庚烷磺酸钠、1-庚烷磺酸钠、1-壬烷磺酸钠、1-丙烷磺酸钠一水合物、2-溴乙烷磺酸钠、胆酸钠水合物、牛或绵羊胆汁、胆酸钠水合物、络胆酸钠、脱氧胆酸钠、十二烷基硫酸钠、十二烷基硫酸钠、己烷磺酸钠、辛基硫酸钠、戊烷磺酸钠、牛磺胆酸钠、牛磺鹅脱氧胆酸钠盐、牛磺去氧胆酸钠盐一水合物、牛磺石胆酸 3-硫酸二钠盐、牛熊去氧胆酸钠盐、**Trizma**[®]十二烷基硫酸盐、DSS(多库酯钠、CAS 登记号 [577-11-7])、多库酯钙、CAS 登记号 [128-49-4])、多库酯钾、CAS 登记号 [7491-09-0])、SDS(十二烷基硫酸钠或月桂烷基硫酸钠)、十二烷基磷酸胆碱(FOS-胆碱-12)、癸基磷酸胆碱(FOS-胆碱-10)、壬基磷酸胆碱(FOS-胆碱-9)、二棕榈酰磷脂酸、辛酸钠和/或熊去氧胆酸。

[0304] 阳离子表面活性剂可以选自下组：烷基三甲基溴化铵、苯扎氯铵、苯扎氯铵、苄基二甲基十六烷基氯化铵、苄基二甲基十四烷基氯化铵、苄基三甲基四氯碘酸铵、二甲基双十八烷基溴化铵、十二烷基乙基二甲基溴化铵、十二烷基三甲基溴化铵、十二烷基三甲基溴化铵、乙基十六烷基二甲基溴化铵、十六烷基三甲基溴化铵、十六烷基三甲基溴化铵、聚氧乙烯(10)-N-动物脂-1,3-二氨基丙烷、通佐溴胺(Thonzoniumbromide)和/或三甲基(十四烷基)溴化铵。

[0305] 非离子表面活性剂可选自下组：BigCHAP、二(聚乙二醇二[咪唑基羰基])、嵌段共聚物，如聚氧化乙烯/聚氧化丙烯嵌段共聚物，例如泊洛沙姆、泊洛沙姆 188 和泊洛沙姆 407、**Brij**[®] 35、**Brij**[®] 56、**Brij**[®] 72、**Brij**[®] 76、**Brij**[®] 92V、**Brij**[®] 97、**Brij**[®] 58P、**Cremophor**[®] EL、十乙二醇单十二烷基醚、N-癸酰基-N-甲基葡萄糖胺、n-十二烷基-N-甲基葡萄糖酰胺、烷基多聚葡萄糖苷、乙氧基化蓖麻油、七乙二醇单癸基醚、七乙二醇单十二烷基醚、七乙二醇单十四烷基醚、六乙二醇单十二烷基醚、六乙二醇单十六烷基醚、六乙二醇单十八烷基醚、六乙二醇单十四烷基醚、Igepal CA-630、Igepal CA-630、甲基-6-0-(N-庚基氨基甲酰基)-beta-D-吡喃葡萄糖苷、九乙二醇单十二烷基醚、N-壬酰基-N-甲基葡萄糖胺、N-壬酰基-N-甲基葡萄糖胺、八乙二醇单癸基醚、八乙二醇单十二烷基醚、八乙二醇单十六烷基醚、八乙二醇单十八烷基醚、八乙二醇单十四烷基醚、辛基-beta-D-吡喃葡萄糖苷、五乙二醇单癸基醚、五乙二醇单十二烷基醚、五乙二醇单十六烷基醚、五乙二醇单己基醚、五乙二醇单十八烷基醚、五乙二醇单辛基醚、聚乙二醇二环氧甘油醚、聚乙二醇醚 W-1、聚氧乙烯 10 十三烷基醚、聚氧乙烯 100 硬脂酸盐、聚氧乙烯 20 异十六烷基醚、聚氧乙烯 20 油基醚、聚氧乙烯 40 硬脂酸盐、聚氧乙烯 50 硬脂酸盐、聚氧乙烯 8 硬脂酸盐、聚氧乙烯二(咪唑基羰基)、聚氧乙烯 25 丙二醇硬脂酸盐、来自皂树属树皮的皂角苷、**Span**[®] 20、**Span**[®] 40、**Span**[®] 60、**Span**[®] 65、**Span**[®] 80、**Span**[®] 85、Tergitol, Type 15-S-12、Tergitol, 15-S-30 型、Tergitol, 15-S-5 型、Tergitol, 15-S-7 型、Tergitol, 15-S-9 型、Tergitol, NP-10

型, Tergitol, NP-4 型, Tergitol, NP-40 型, Tergitol, NP-7 型, Tergitol, NP-9 型、十四烷基- β -D- 麦芽糖苷、四乙二醇单癸基醚、四乙二醇单十二烷基醚、四乙二醇单十四烷基醚、三乙二醇单癸基醚、三乙二醇单十二烷基醚、三乙二醇单十六烷基醚、三乙二醇单辛基醚、三乙二醇单十四烷基醚、Triton CF-21, Triton CF-32, Triton DF-12, Triton DF-16, Triton GR-5M, Triton QS-15, Triton QS-44, Triton X-100, Triton X-102, Triton X-15, Triton X-151, Triton X-200, Triton X-207, Triton[®] X-100, Triton[®] X-114, Triton[®] X-165 溶液, Triton[®] X-305 溶液, Triton[®] X-405, Triton[®] X-45, Triton[®] X-705-70, TWEEN[®] 20, TWEEN[®] 40, TWEEN[®] 60, TWEEN[®] 6, TWEEN[®] 65, TWEEN[®] 80, TWEEN[®] 81, TWEEN[®] 85、Tyloxapol、鞘磷脂(鞘磷脂)和鞘糖脂(神经酰胺、神经节苷脂)、磷脂和/或 n- 十一烷基 β -D- 吡喃葡萄糖苷。

[0306] 两性离子表面活性剂可选自下组: CHAPS、CHAPSO、3-(癸基二甲基铵) 丙烷磺酸内盐、3-(十二烷基二甲基铵) 丙烷磺酸内盐、3-(十二烷基二甲基铵) 丙烷磺酸内盐、3-(N, N- 二甲基肉豆蔻基铵) 丙烷磺酸盐、3-(N, N- 二甲基十八烷基铵) 丙烷磺酸盐、3-(N, N- 二甲基辛基铵) 丙烷磺酸内盐、3-(N, N- 二甲基棕榈基铵) 丙烷磺酸盐、N- 烷基-N, N- 二甲基铵-1- 丙烷磺酸盐、3-cholamido-1- 丙基二甲基铵-1- 丙烷磺酸盐、十二烷基磷酸胆碱、十四烷基溶血磷脂酰胆碱、两性试剂 3-12(N- 十二烷基-N, N- 二甲基-3- 铵基-1- 丙烷磺酸盐)、两性试剂 3-10(3-(癸基二甲基铵) 丙烷磺酸内盐)、两性试剂 3-08(3-(辛基二甲基铵) 丙烷磺酸盐)、甘油磷脂(卵磷脂、脑磷脂、磷脂酰丝氨酸)、甘油糖脂(吡喃型半乳糖苷)、溶血磷脂酰基和磷脂酰胆碱的烷基、烷氧基(烷基酯)、烷氧基(烷基醚)衍生物, 例如, 溶血磷脂酰胆碱的十二烷基和十四烷基衍生物、二棕榈酰磷脂酰胆碱和极性首基的修饰物, 也就是胆碱、乙醇胺、磷脂酸、丝氨酸、苏氨酸、甘油、肌醇、溶血磷脂酰丝氨酸和溶血磷脂酰苏氨酸、酰肉碱和衍生物、赖氨酸、精氨酸或组氨酸的 N^{beta} 酰化的衍生物, 或赖氨酸或精氨酸的侧链酰化的衍生物, 包含赖氨酸、精氨酸或组氨酸与中性或酸性氨基酸的任何组合的二肽的 N^{beta} 酰化的衍生物, 包含中性氨基酸和两个带电氨基酸的任何组合的三肽的 N^{beta} 酰化的衍生物, 或所述表面活性剂可以选自咪唑啉衍生物、长链脂肪酸和其盐 C₆-C₁₂(例如油酸和辛酸)、N- 十六烷基-N, N- 二甲基-3- 铵基-1- 丙烷磺酸盐、阴离子的(烷基-芳基-磺酸盐)单价的表面活性剂、棕榈酰溶血磷脂酰基-L- 丝氨酸、溶血磷脂(例如, 乙醇胺、胆碱、丝氨酸或苏氨酸的 1- 酰基-sn- 甘油基-3- 磷酸酯)或其混合物的组。

[0307] 在此使用的术语“烷基-多聚葡萄糖苷”涉及直链或分支的 C₅₋₂₀- 烷基、- 链烯基或- 炔基链, 其被一个或多个糖苷部分, 例如麦芽糖苷、糖等等取代。这些烷基-多聚葡萄糖苷的实施方式包括 C₆₋₁₈ 烷基-多聚葡萄糖苷。这些烷基-多聚葡萄糖苷的特定的实施方式包括偶数的碳链, 例如 C₆、C₈、C₁₀、C₁₂、C₁₄、C₁₆、C₁₈ 和 C₂₀ 烷基链。糖苷部分的特定实施方式包括吡喃糖苷、吡喃葡萄糖苷、麦芽糖苷、麦芽三糖苷和蔗糖。在本发明的实施方式中, 低于 6 个糖苷部分附着到所述烷基基团。在本发明的实施方式中, 低于 5 个糖苷部分附着到所述烷基基团。在本发明的实施方式中, 低于 4 个糖苷部分附着到所述烷基基团。在本发明的实施方式中, 低于 3 个糖苷部分附着到所述烷基基团。在本发明的实施方式中, 低于 2 个糖苷部分附着到所述烷基基团。烷基-多聚葡萄糖苷的具体实施方式有烷基糖苷, 例如 n- 癸基 β -D- 吡喃葡萄糖苷、癸基 β -D- 吡喃麦芽糖苷、十二烷基 β -D- 吡喃葡萄糖苷、n- 十二烷

基 β -D- 麦芽糖苷、n- 十二烷基 β -D- 麦芽糖苷、n- 十二烷基 β -D- 麦芽糖苷、十四烷基 β -D- 吡喃葡萄糖苷、癸基 β -D- 麦芽糖苷、十六烷基 β -D- 麦芽糖苷、癸基 β -D- 麦芽三糖苷、十二烷基 β -D- 麦芽三糖苷、十四烷基 β -D- 麦芽三糖苷、十六烷基 β -D- 麦芽三糖苷、n- 十二烷基 - 蔗糖、n- 癸基 - 蔗糖、蔗糖单癸酸酯、蔗糖单月桂酸酯、蔗糖单豆蔻酸酯和蔗糖单棕榈酸酯。

[0308] 表面活性剂在药物组合物中的使用是技术人员公知的。为了方便起见,参考 Remington :The Science and Practice of Pharmacy, 19th edition, 1995。

[0309] 在本发明的进一步的实施方式中,所述制剂进一步包含蛋白酶抑制物,例如 EDTA(乙二胺四乙酸) 和盐酸苯甲脒,但是其他商业上可获得的蛋白酶抑制物也可以使用。蛋白酶抑制物的使用在包含蛋白酶的酶原的药物组合物中是特别有用的,以抑制自催化。

[0310] 可能的是,其他成分可以存在于本发明的肽药物制剂中。这些其他成分可以包括润湿剂、乳化剂、抗氧化剂、填充剂、张度修饰剂、螯合剂、金属离子、油质载体、蛋白质(例如,人血清白蛋白、明胶或蛋白质)和两性离子(例如,氨基酸,如甜菜碱、牛磺酸、精氨酸、甘氨酸、赖氨酸和组氨酸)。当然,这些其他成分不应不利地影响本发明的药物制剂的总体稳定性。

[0311] 含有根据本发明的类似物或衍生物的药物组合物可以在几个位点施用给需要这样的治疗的患者,例如,在局部位点,例如,皮肤和粘膜位点,在绕过吸收的位点,例如,在动脉、静脉、心脏中施用,以及在涉及吸收的位点,例如,在皮肤、皮肤下、肌肉中或腹部内施用。

[0312] 根据本发明的药物组合物的施用可以通过几种施用途径,例如,舌的、舌下的、口腔的、口中的、口服、胃肠内的、鼻部的、肺部的,例如,通过细支气管和肺泡或其组合、皮肤的、真皮的、经皮的、阴道的、直肠的、眼的,例如通过结膜、输尿管的和胃肠外的途径施用给需要这样的治疗的患者。

[0313] 本发明的组合物可以在几种剂型中施用,例如,作为溶液、悬浮液、乳剂、微乳剂、多重乳剂、泡沫、油膏剂、糊剂、硬膏剂、软膏剂、片剂、糖衣片剂、口香糖、冲洗剂、胶囊剂、例如,硬明胶胶囊和软明胶胶囊、栓剂、直肠胶囊剂、滴剂、凝胶、喷雾剂、粉剂、气雾剂、吸入剂、滴眼剂、眼用软膏、眼用冲洗剂、阴道的阴道栓剂、阴道的环、阴道的软膏剂、注射溶液、原位转化溶液,例如,原位凝胶、原位凝固、原位沉淀、原位结晶,输注溶液和植入剂。

[0314] 本发明的组合物可以例如,通过共价的、疏水的和静电相互作用,进一步化合于或附着于药物载体、药物递送系统和先进的药物递送系统,以进一步增强本发明的类似物或衍生物的稳定性、提高生物利用率、提高溶解度、降低不利作用、实现本领域技术人员公知的时间治疗,和提高患者的顺应性,或任何其组合。载体、药物递送系统和先进的药物递送系统的实例包括但不限于,聚合物,例如纤维素和衍生物,多糖,例如葡聚糖和衍生物,淀粉和衍生物、聚(乙烯醇)、丙烯酸酯和异丁烯酸酯聚合物、聚乳酸和聚乙醇酸和其嵌段共聚物、聚乙二醇、载体蛋白,例如白蛋白,凝胶,例如,热凝胶化系统,例如,本领域技术人员公知的嵌段共聚物,胶束、脂质体、微球体、纳米颗粒、液晶和其分散体、L2 相和其分散体、脂质-水系统中相特性领域技术人员公知的,聚合的胶束、多重乳液、自乳化的、自微乳化的、环糊精和其衍生物以及树枝状高分子(dendrimers)。

[0315] 本发明的组合物在固体、半固体、粉剂和溶液的制剂中是有用的,用于根据本发明

的类似物或衍生物的肺部施用的,利用,例如,计量的剂量吸入器、干粉吸入器和喷雾器,这都是本领域技术人员公知的设备。

[0316] 本发明的组合物在控制的、持续的、延长的、延迟的和缓慢释放的药物递送系统的制剂中是特别有用的。更具体地,而不是受限的,组合物在本领域技术人员公知的胃肠外的控制释放和持续释放系统(两种系统都引起施用数量的多倍降低)的制剂中是有用的。再更优选的是皮下施用的控制释放和持续释放系统。不限制本发明的范围,有用的控制释放系统和组合物的实例有水凝胶、油质凝胶、液晶、聚合的胶束、微球体、纳米颗粒。

[0317] 产生对本发明的组合物有用的控制释放系统的方法包括但不限于,结晶、凝缩、共同结晶、沉淀、共同沉淀、乳化、分散、高压匀质化、包囊、喷雾干燥、微胶囊包裹、凝聚、相分离、溶剂蒸发来产生微球体、挤压和超临界流体过程。一般参考药物控制释放手册(Handbook of Pharmaceutical Controlled Release)(Wise,D.L.,ed.Marcel Dekker,New York,2000)和Drug and the Pharmaceutical Sciences vol.99:Protein Formulation and Delivery(MacNally,E.J.,ed.Marcel Dekker,New York,2000)。

[0318] 胃肠外施用可以通过凭借注射器任选地笔样注射器的皮下的、肌肉内的、腹膜内的或静脉内注射来进行。做为选择,胃肠外施用可以通过输注泵进行。进一步的选择是一种组合物,其可以是溶液或悬浮液或粉剂,用于以鼻部或肺部液体或粉末喷雾剂的形式施用本发明的类似物或衍生物。作为更进一步的选择,含有根据本发明的类似物或衍生物的药物组合物也可以适应于经皮的施用,例如,通过无针头的注射或来自贴片,任选地离子透入贴片,或穿粘膜的,例如口腔的施用。

[0319] 根据本发明的类似物或衍生物可以使用适合于肺部药物递送的任何已知类型的设备、经由肺部的途径在运载体如溶液、悬浮液或干粉中施用。这些的实例包括但不限于,用于肺部药物递送的三种一般类型的气雾剂发生器,可以包括喷射或超声喷雾器、计量给药吸入器,或干粉吸入器(参照 Yu J, Chien YW. Pulmonary drug delivery: Physiologic and mechanistic aspects. Crit Rev Ther Drug Carr Sys 14(4) (1997) 395-453)。

[0320] 根据标准的测试方法,颗粒的空气动力学直径(d_a)被定义为单位密度($1\text{g}/\text{cm}^3$)的参考标准球状颗粒的几何当量直径。在最简单的情况下,对于球状颗粒, d_a 作为密度比的平方根的函数与分度圆直径(reference diameter)(d)相关,如以下描述的:

[0321] 对非球形颗粒进行这种关系的修改(参照 Edwards DA, Ben-Jebria A, Langer R. Recent advances in pulmonary drug delivery using large, porous inhaled particles. J Appl Physiol 84(2) (1998) 379-385)。术语“MMAD”和“MMEAD”是本领域中很好地描述的和公知的(参照 Edwards DA, Ben-Jebria A, Langer R and represents a measure of the median value of an aerodynamic particle size distribution. Recent advances in pulmonary drug delivery using large, porous inhaled particles. J Appl Physiol 84(2) (1998) 379-385)。质量中值空气动力学直径(MMAD)和质量中值有效空气动力学直径(MMEAD)相互可换地使用,是统计学参数,独立于实际的形状、大小或密度,经验性地描述了与气溶胶粒子在肺部沉积的潜力相关的气溶胶粒子的大小(参照 Edwards DA, Ben-Jebria A, Langer R. Recent advances in pulmonary drug delivery using large, porous inhaled particles. J Appl Physiol 84(2) (1998) 379-385)。MMAD通常从用冲击器进行的测量来计算,冲击器是测量颗粒在空气中的惯性行为的仪器。

[0322] 在进一步的实施方式中,所述制剂可以通过任何已知的气溶胶化技术例如,雾化来气溶胶化,来实现低于 $10\mu\text{m}$ 、更优选的 $1\text{--}5\mu\text{m}$ 之间、最优选的 $1\text{--}3\mu\text{m}$ 之间的气溶胶粒子的 MMAD。优选的颗粒大小是基于用于药物向深部肺递送的最有效大小,在深部肺中蛋白质被最佳地吸收(参照 Edwards DA, Ben-Jebria A, Langer A, Recent advances in pulmonary drug delivery using large, porous inhaled particles. J Appl Physiol 84(2) (1998) 379–385)。

[0323] 包含根据本发明的类似物或衍生物的肺制剂的深部肺沉积任选地可以通过利用吸入技术的修改方法来进行进一步优化,例如,但不限于:缓慢吸入流动(例如,30L/分钟)、屏气和动作的定时(timing of actuation)。

[0324] 术语“稳定化的制剂”是指具有提高的物理稳定性、提高的化学稳定性或提高的物理和化学稳定性的制剂。

[0325] 在此使用的术语蛋白质制剂“物理稳定性”是指,作为蛋白质暴露于热-机械应力和/或与导致不稳定的界面和表面,例如疏水表面和界面相互作用的结果,蛋白质形成生物学无活性的和/或不溶的蛋白质聚集物的倾向。水性蛋白质制剂的物理稳定性通过在将填充在适合的容器(例如,药筒或管形瓶)中的制剂在不同温度下暴露于机械/物理应力(例如,搅动)各种时间之后目视检查和/或浊度测定的方式来评估。制剂的目视检查在黑暗背景的精确聚焦光线中进行。制剂的混浊度通过按照例如 0 到 3 的浑浊程度的目测评分排列来表征(没有显示混浊的制剂相应于目测评分 0,在日光下显示了可见的浑浊的制剂相应于目测评分 3)。当制剂在日光下显示了可见混浊时,制剂被分类为对蛋白质聚集是物理不稳定的。做为选择,制剂的混浊度可以通过技术人员公知的简单的浊度测定来评估。水性蛋白质制剂的物理稳定性也可以通过使用光谱学试剂或蛋白质构象状态的探针来评估。探针优选地是小分子,其优先地结合蛋白质的非天然构象异构体。蛋白质结构的小分子光谱学探针的一个实例是硫黄素 T。硫黄素 T 是广泛用于淀粉样纤维的检测的荧光染料。在存在纤维的情况下,可能其他蛋白质结构也一样,当与纤维蛋白质形式结合时,硫黄素 T 产生在约 450nm 处新的激发最大值和在约 482nm 处增强的发射。未结合的硫黄素 T 在该波长下是基本上没有荧光的。

[0326] 其他小分子可以用作蛋白质结构从天然到非天然状态改变的探针。例如,优先地结合蛋白质的暴露的疏水块的“疏水块”探针。疏水块一般包埋在天然状态的蛋白质的三级结构内,但是当蛋白质开始解折叠或变性时被暴露。这些小分子光谱学探针的实例有芳香族的疏水性染料,例如,蒽(anthracycline)、吖啶、菲咯啉,等等。其他的光谱学探针有金属氨基酸络合物,例如,疏水性氨基酸例如苯丙氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、甲硫氨酸和缬氨酸等等的钴金属络合物。

[0327] 在此使用的术语蛋白质制剂的“化学稳定性”是指在蛋白质结构方面的化学的共价改变,其导致与天然蛋白质结构相比具有潜在更低的生物学效价和/或潜在提高的免疫原性性质的化学降解产物的形成。各种化学降解产物可以取决于天然蛋白质的类型和性质、蛋白质暴露的环境而形成。化学降解的消除极其可能不能完全避免,化学降解产物的提高的数量常常在蛋白质制剂的保存和使用期间见到,这是本领域技术人员公知的。大多数蛋白质易于脱酰胺作用,其中谷氨酰胺酰胺基或天冬酰胺酰胺残基中的侧链酰胺基被水解形成游离的羧酸。其他降解途径涉及高分子量转化产物的形成,其中两种或更多种蛋白质

分子通过转酰胺基作用和 / 或二硫化物相互作用共价地相互结合, 导致共价结合的二聚体、寡聚体和聚合物降解产物的形成。(Stability of Protein Pharmaceuticals, Ahern. T. J. & Manning M. C., Plenum Press, New York 1992)。氧化(例如甲硫氨酸残基的氧化)可以作为化学降解的另一个变体被提及。蛋白质制剂的化学稳定性可以通过在暴露于不同的环境条件之后的各个时点测量化学降解产物的数量来评估(降解产物的形成常常可以通过例如提高温度来加速)。每种单独的降解产物的数量常常通过取决于分子大小和 / 或电荷使用各种层析技术(例如, SEC-HPLC 和 / 或 RP-HPLC) 分离降解产物来测定。

[0328] 因此, 如上文阐述的, “稳定的制剂”是指具有提高的物理稳定性、提高的化学稳定性或提高的物理和化学稳定性的制剂。一般地, 制剂必须在使用和保存(遵照建议的使用和保存条件)期间是稳定的直到达到期满日期。

[0329] 在本发明的一个实施方式中, 包含根据本发明的类似物或衍生物的药物制剂对于超过 6 周的使用和超过 3 年的保存是稳定的。

[0330] 在本发明的另一个实施方式中, 包含根据本发明的类似物或衍生物的药物制剂对于超过 4 周的使用和超过 3 年的保存是稳定的。

[0331] 在本发明的进一步的实施方式中, 包含根据本发明的类似物或衍生物的药物制剂对于超过 4 周的使用和超过两年的保存是稳定的。

[0332] 在本发明的再进一步的实施方式中, 包含根据本发明的类似物或衍生物的药物制剂对于超过 2 周的使用和超过两年的保存是稳定的。

[0333] 在另一个方面, 本发明涉及根据本发明的类似物或衍生物用于药物的制备的用途。

[0334] 在一个实施方式中, 根据本发明的类似物或衍生物被用于制备用于高血糖、2 型糖尿病、损害的葡萄糖耐受、1 型糖尿病、肥胖、高血压、综合征 X、血脂异常、认知障碍、动脉粥样硬化、心肌梗塞、中风、冠心病和其他心血管病症、炎性肠综合征、消化不良和胃溃疡的治疗或预防的药物。

[0335] 在另一个实施方式中, 根据本发明的类似物或衍生物被用于制备用于延缓或防止 2 型糖尿病中的疾病发展的药物。

[0336] 在另一个实施方式中, 根据本发明的类似物或衍生物被用于制备用于降低食物摄取、降低 β -细胞细胞凋亡、提高 β -细胞功能和 β -细胞群集和 / 或用于恢复对 β -细胞的葡萄糖敏感性的药物。

[0337] 使用根据本发明的类似物或衍生物的治疗还可以与第二种或更多种药理学活性物质组合, 所述药理学活性物质例如, 选自抗糖尿病试剂、抗肥胖试剂、食欲调节试剂、抗高血压试剂、用于来自或与糖尿病相关的并发症的治疗和 / 或预防的试剂, 和用于来自或与肥胖相关的并发症和病症的治疗和 / 或预防的试剂。这些药理学活性物质的实例有: 胰岛素、磺脲类、双胍、氯茴苯酸 (meglitinides)、葡萄糖苷酶抑制物、胰高血糖素拮抗剂、DPP-IV(二肽基肽酶-IV) 抑制物、涉及葡萄糖异生作用和 / 或糖原分解的刺激肝脏酶的抑制物、葡萄糖摄取调节物、修饰脂质代谢的化合物, 如抗高血脂试剂如 HMG CoA 抑制物 (statins)、抑胃多肽 (GIP 类似物)、降低食物摄取的化合物、RXR 激动剂和作用于 β -细胞的 ATP 依赖性钾通道的试剂; 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、那格列奈 (Neteglinide)、瑞格列奈 (repaglinide);

β -阻断剂,例如阿普洛尔、阿替洛尔、噻吗洛尔、吲哚洛尔、蔡心安和美托洛尔、ACE(血管紧张肽转化酶)抑制物,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,钙离子通道阻断剂,例如硝苯地平、非洛地平、尼卡地平、伊拉地平、尼莫地平、地尔硫卓和维拉帕米和 α -阻断剂,例如,多沙唑嗪、乌拉地尔、哌唑嗪和特拉唑嗪;CART(可卡因安非他明调节的转录产物)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、混合的Y2/Y4受体激动剂、MC4(黑皮质素4)激动剂、orexin拮抗剂、TNF(肿瘤坏死因子)激动剂、CRF(促肾上腺皮质素释放因子)激动剂、CRF BP(促肾上腺皮质素释放因子结合蛋白)拮抗剂、urocortin激动剂、 β 3激动剂、胃酸调节素和类似物、MSH(促黑素细胞激素)激动剂、MCH(黑色素细胞-浓缩激素)拮抗剂、CKK(胆囊收缩素)激动剂、血清素重新摄取抑制物、血清素和去甲肾上腺素重新摄取抑制物、混合的血清素和产去甲肾上腺素的化合物、5HT(血清素)激动剂、铃蟾肽素激动剂、神经节肽(galanin)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、UCP 2或3(解偶联蛋白质2或3)调节物、瘦素激动剂、DA激动剂(溴隐亭(bromocriptin)、doprexin)、脂酶/淀粉酶抑制剂、RXR(类视黄醇X受体)调节物、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。

[0338] 根据本发明的类似物或衍生物的治疗还可以与手术组合,所述手术影响葡萄糖水平和/或脂质内环境稳态,例如胃囊带术或胃旁流。

[0339] 要理解的是,根据本发明的类似物或衍生物与一种或更多种上述化合物以及任选地一种或更多种进一步药理学活性物质的任何适合的组合被认为处于本发明的范围之内。

[0340] 制造类似物的方法

[0341] 取决于序列,本发明的类似物可以通过一种方法产生,所述方法包括培养含有编码多肽的DNA序列、并且能在允许所述多肽表达的条件下在适合的营养培养基中表达所述多肽的宿主细胞,之后从培养物回收产生的肽。

[0342] 用于培养细胞的培养基可以是适合于生长宿主细胞的任何常规的培养基,例如,含有合适的添加物的最小或复合培养基。适合的培养基可以从商业的供应商获得,或可以根据公开的配方来制备(例如,在美国典型培养物保藏所的目录中)。细胞产生的肽然后通过常规过程从培养基中回收,包括通过离心或过滤从培养基分离宿主细胞,通过盐,例如硫酸铵来沉淀上清液或滤液的蛋白质成分,取决于所讨论的肽,通过各种层析过程,例如,离子交换层析、凝胶过滤层析、亲和层析等等纯化。

[0343] 编码治疗多肽的DNA序列可以适当地是基因组或cDNA来源的,例如,根据标准技术通过制备基因组或cDNA库,以及通过使用合成的寡核苷酸探针杂交来筛选编码多肽的全部或部分的DNA序列(参见,例如,Sambrook,J,Fritsch,EF and Maniatis,T,Molecular Cloning:A Laboratory Manual,Cold Spring Harbor Laboratory Press,New York,1989)。编码多肽的DNA序列还可以通过已建立的标准方法来合成地制备,例如,Beaucage and Caruthers,Tetrahedron Letters 22(1981),1859-1869所描述的亚磷酰胺方法,或Matthes et al.,EMBO Journal 3(1984),801-805所描述的方法。DNA序列还可以通过利用特异性引物的聚合酶链式反应来制备,例如在US 4,683,202或Saiki et al.,Science 239(1988),487-491中描述的。

[0344] DNA 序列还可以插入任何载体中,所述载体可以方便地经历重组 DNA 操作,载体的选择常常将取决于要导入它的宿主细胞。因而,载体可以是自主复制载体,即,其作为染色体外的实体存在的载体,其复制与染色体复制无关,例如,质粒。做为选择,载体可以是一种载体,当被导入宿主细胞中时,其整合到宿主细胞基因组中并且与它所整合入的染色体一起被复制。

[0345] 载体优选地是表达载体,其中编码肽的 DNA 序列可操作连接到 DNA 的转录所需的其它片段,例如启动子。启动子可以是任何 DNA 序列,其显示了在所选的宿主细胞中的转录活性,可以来自编码与宿主细胞同源或异源的蛋白质的基因。用于指导编码本发明的肽的 DNA 在多种的宿主细胞中转录的适合的启动子的实例是本领域公知的,例如,参考 Sambrook et al., 上文。

[0346] 如有必要,编码肽的 DNA 序列还可以可操作地连接到适合的终止子、多腺苷酸化信号、转录增强子序列和翻译增强子序列。本发明的重组载体可以进一步包含允许载体在所讨论的宿主细胞中复制的 DNA 序列。

[0347] 载体还可以包含可选择标记物,例如,其产物补足了宿主细胞中的缺陷,或赋予对药物例如氨苄西林、卡那霉素、四环素、氯霉素、新霉素、匀霉素或甲氨蝶呤的抗性的基因。

[0348] 为了指导本发明的亲本肽进入宿主细胞的分泌途径,分泌信号序列(也称为前导序列、前原序列或前序列)可以在重组载体中提供。分泌信号序列与编码肽的 DNA 序列按照正确的阅读框连接。分泌信号序列通常位于编码肽的 DNA 序列的 5'。分泌信号序列可以是通常与肽相连的那些,或可以是来自编码其他分泌蛋白质的基因。

[0349] 用于分别连接编码当前的肽的 DNA 序列、启动子和任选地终止子和/或分泌信号序列、以及将它们插入到含有复制必需的信息的适合的载体中的步骤,是本领域的技术人员公知的(参见,例如, Sambrook et al., 上文)。

[0350] 向其中导入 DNA 序列或重组载体的宿主细胞可以是能够产生当前的肽的任何细胞,包括细菌、酵母、真菌和高等真核细胞。本领域中公知的和使用的适合的宿主细胞的实例有,无限制地,大肠杆菌、酿酒酵母或哺乳动物 BHK 或 CHO 细胞系。

[0351] 根据本发明的实施方式

[0352] 1. 一种 GLP-1 类似物或其衍生物,其包含修饰的 GLP-1 序列 7-35 (SEQ ID NO :1), 所述修饰的 GLP-1 序列 7-35 具有:

[0353] i) 与 SEQ ID NO :1 的序列 7-35 相比总共 2、3、4、5、6、7 或 8 个氨基酸取代,包括

[0354] a) 在相当于 SEQ ID NO :1 的位置 22 的位置处的 Glu 残基,和

[0355] b) 在相当于 SEQ ID NO :1 的位置 26 的位置处的 Arg 残基,

[0356] ii) 任选地,在相当于 SEQ ID NO :1 的位置 30、31、32、33、34 或 35 的位置处的氨基酸可以是没有的,条件是如果在位置 30、31、32、33 或 34 处的氨基酸是没有的,则下游的每个氨基酸残基也是没有的,和

[0357] iii) 任选地 C-末端酰胺基团。

[0358] 2. 根据实施方式 1 的 GLP-1 类似物或其衍生物,其是用白蛋白结合残基衍生化的或是聚乙二醇化的。

[0359] 3. 根据实施方式 1-2 的任一项的 GLP-1 类似物或其衍生物,其中在位置 35 处的氨基酸是没有的,以及其中所述 GLP-1 类似物的总长度是 28 个氨基酸。

[0360] 4. 根据实施方式 1-2 的任一项的 GLP-1 类似物或其衍生物, 其中在位置 34 和 35 处的氨基酸是没有的, 以及其中所述 GLP-1 类似物的总长度是 27 个氨基酸。

[0361] 5. 根据实施方式 1-2 的任一项的 GLP-1 类似物或其衍生物, 其中在位置 33、34 和 35 处的氨基酸是没有的, 以及其中所述 GLP-1 类似物的总长度是 26 个氨基酸。

[0362] 6. 根据实施方式 1-2 的任一项的 GLP-1 类似物或其衍生物, 其中在位置 32、33、34 和 35 处的氨基酸是没有的, 以及其中所述 GLP-1 类似物的总长度是 25 个氨基酸。

[0363] 7. 根据实施方式 1-2 的任一项的 GLP-1 类似物或其衍生物, 其中在位置 31、32、33、34 和 35 处的氨基酸是没有的, 以及其中所述 GLP-1 类似物的总长度是 24 个氨基酸。

[0364] 8. 根据实施方式 1-2 的任一项的 GLP-1 类似物或其衍生物, 其中在位置 30、31、32、33、34 和 35 处的氨基酸是没有的, 以及其中所述 GLP-1 类似物的总长度是 23 个氨基酸。

[0365] 9. 根据实施方式 1-8 的任一项的 GLP-1 类似物或其衍生物, 具有 C- 末端酰胺基团。

[0366] 10. 根据实施方式 1-9 的任一项的 GLP-1 类似物或其衍生物, 具有式 (I) 的序列 X_{aa7}-X_{aa8}-X_{aa9}-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-X_{aa16}-Ser-X_{aa18}-Tyr-X_{aa20}-Glu-Glu-X_{aa23}-X_{aa24}-X_{aa25}-Arg-X_{aa27}-Phe-Ile-X_{aa30}-X_{aa31}-Leu-X_{aa33}-X_{aa34}-X_{aa35}-R

[0367] 式 (I) (SEQ ID No :2)

[0368] 其中

[0369] X_{aa7} 是 L- 组氨酸、D- 组氨酸、去氨基 - 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、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；

[0370] X_{aa8} 是 Ala、Gly、Val、Leu、Ile、Lys、Aib、(1- 氨基环丙基) 羧酸、(1- 氨基环丁基) 羧酸、(1- 氨基环戊基) 羧酸、(1- 氨基环己基) 羧酸、(1- 氨基环庚基) 羧酸, 或 (1- 氨基环辛基) 羧酸；

[0371] X_{aa9} 是 Glu 或 Glu 衍生物, 例如, α, α 二甲基 -Glu；

[0372] X_{aa16} 是 Val 或 Leu；

[0373] X_{aa18} 是 Ser、Lys、Cys 或 Arg；

[0374] X_{aa20} 是 Leu、Lys 或 Cys；

[0375] X_{aa23} 是 Gln、Glu、Lys、Cys 或 Arg；

[0376] X_{aa24} 是 Ala 或 Asn；

[0377] X_{aa25} 是 Ala 或 Val；

[0378] X_{aa27} 是 Glu、Ala 或 Leu；

[0379] X_{aa30} 是 Ala、Glu、Arg 或没有；

[0380] X_{aa31} 是 Trp、Lys、Cys 或没有；

[0381] X_{aa33} 是 Val、Lys、Cys 或没有；

[0382] X_{aa34} 是 Lys、Glu、Asn、Arg、Cys 或没有；

[0383] X_{aa35} 是 Gly、Aib 或没有；

[0384] R 是酰胺或是没有的；

[0385] 条件是, 如果 X_{aa30}、X_{aa31}、X_{aa32}、X_{aa33} 或 X_{aa34} 是没有的, 则下游的每个氨基酸残基也是没有的。

[0386] 11. 根据实施方式 1-9 的任一项的 GLP-1 类似物或其衍生物, 具有式 (II) 的序列

[0387] $\text{Xaa}_7\text{-Xaa}_8\text{-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Val-Ser-Xaa}_{18}\text{-Tyr-Leu-Glu-Glu-Gln-Ala-Ala-Arg-Glu-Phe-Ile-Xaa}_{30}\text{-Trp-Leu-Xaa}_{33}\text{-Xaa}_{34}\text{-Xaa}_{35}\text{-R}$

[0388] 式 (II) (SEQ ID No :3)

[0389] 其中

[0390] Xaa_7 是 L- 组氨酸、D- 组氨酸、去氨基 - 组氨酸、2- 氨基 - 组氨酸、 β - 羟基 - 组氨酸、高组氨酸、 N^a - 乙酰基 - 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;

[0391] Xaa_8 是 Ala、Gly、Val、Leu、Ile、Lys、Aib、(1- 氨基环丙基) 羧酸、(1- 氨基环丁基) 羧酸、(1- 氨基环戊基) 羧酸、(1- 氨基环己基) 羧酸、(1- 氨基环庚基) 羧酸, 或 (1- 氨基环辛基) 羧酸;

[0392] Xaa_{18} 是 Ser、Lys 或 Arg;

[0393] Xaa_{30} 是 Ala、Glu、Arg 或是没有的;

[0394] Xaa_{33} 是 Val、Lys 或没有;

[0395] Xaa_{34} 是 Lys、Glu、Arg 或是没有的;

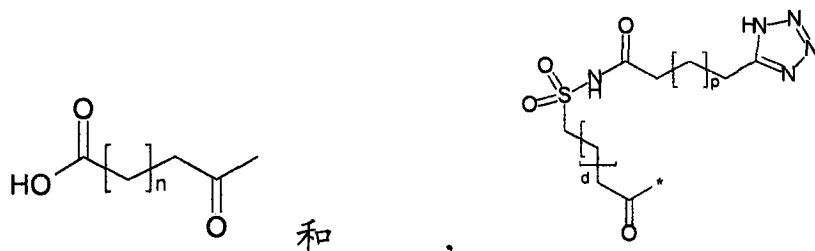
[0396] Xaa_{35} 是 Gly、Aib 或是没有的;

[0397] R 是酰胺或是没有的。

[0398] 12. 根据实施方式 1-11 的任一项的 GLP-1 类似物或其衍生物, 其中至少一个氨基酸残基用 A-B-C-D- 衍生化

[0399] 其中 A- 选自以下构成的组

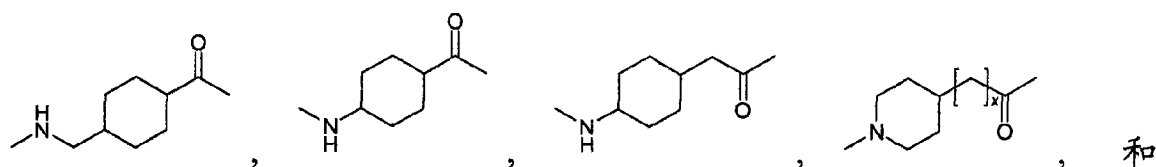
[0400]



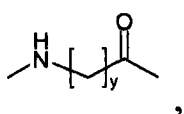
[0401] 其中 n 选自由 14、15、16、17、18 和 19 构成的组, p 选自由 10、11、12、13 和 14 构成的组, 以及 d 选自由 0、1、2、3、4 和 5 构成的组,

[0402] -B- 选自以下构成的组

[0403]



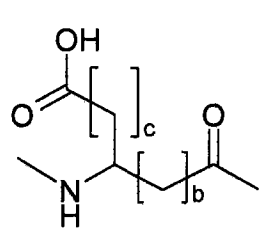
[0404]



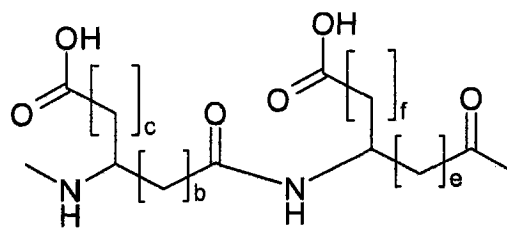
[0405] 其中 x 选自由 0、1、2、3 和 4 构成的组, y 选自由 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11 和 12 构成的组,

[0406] -C- 选自以下构成的组

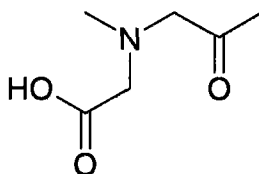
[0407]



,



和



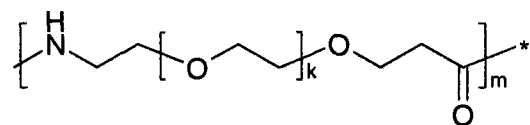
,

[0408] 其中 b 和 e 各自独立地选自由 0、1 和 2 构成的组, c 和 f 各自独立地选自由 0、1 和 2 构成的组, 条件是当 c 是 0 时 b 是 1 或 2, 或当 c 是 1 或 2 时 b 是 0, 和当 f 是 0 时 e 是 1 或 2, 或当 f 是 1 或 2 时 e 是 0, 和

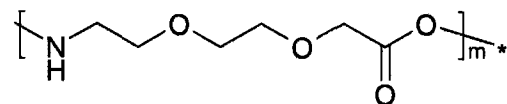
[0409] -D- 附着到所述氨基酸残基以及是接头。

[0410] 13. 根据实施方式 12 的 GLP-1 类似物或其衍生物, 其中 D 选自以下构成的组

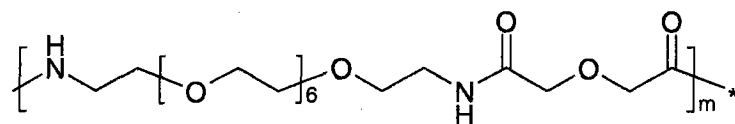
[0411]



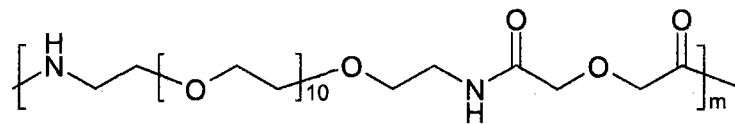
,



,

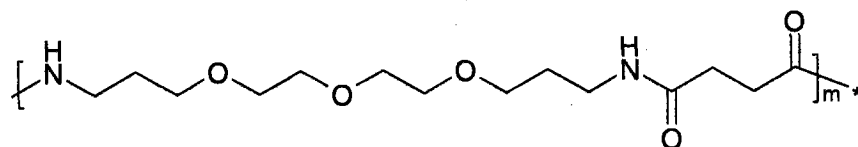


,

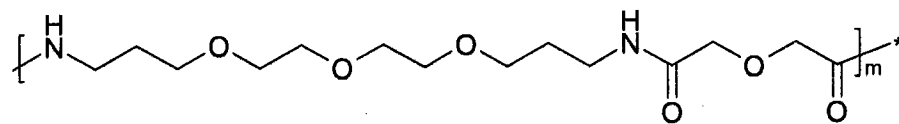


,

[0412]



和



,

[0413] 和其中 k 选自由 0、1、2、3、4、5、11 和 27 构成的组, m 选自由 0、1、2、3、4、5 和 6 构成的组。

[0414] 14. 一种包含根据实施方式 1-13 的任一项的 GLP-1 类似物或其衍生物和药学上可接受的赋形剂的药物组合物。

[0415] 15. 根据实施方式 1-14 的任一项的 GLP-1 类似物或其衍生物, 其用于高血糖、2 型糖尿病、损害的葡萄糖耐受、1 型糖尿病、肥胖、高血压、综合征 X、血脂异常、认知障碍、动脉粥样硬化、心肌梗塞、冠心病和其他心血管病症、中风、炎性肠综合征、消化不良和胃溃疡的治疗或预防。

[0416] 人类 GLP-1 (7-35) 的氨基酸序列作为 SEQ ID NO :1 被包括在序列表中, SEQ ID NO :2 和 3 是根据本发明的其衍生物。

[0417] 在序列表中, 编号从氨基酸残基 no. 1 开始。因而, 例如, SEQ ID NO :1 的位置 1 相当于 GLP-1 (7-35) 的位置 7 (His), SEQ ID NO :1 的位置 16 相当于 GLP-1 (7-35) 的位置 22 (Gly), SEQ ID NO :1 的位置 20 相当于 GLP-1 (7-35) 的位置 26 (Lys), 对于其他位置和其他序列也是这样。

[0418] 因而, 在上述实施方式 1 中, 本发明还提供了 GLP-1 类似物或衍生物, 其包含修饰的 GLP-1 (7-35) 序列, 所述序列具有:

[0419] i) 与 SEQ ID NO :1 的序列相比总共 2、3、4、5、6、7 或 8 个氨基酸取代, 包括

[0420] a) 在相当于 GLP-1 (7-35) 的位置 22 的位置处的 Glu 残基 (SEQ ID NO :1 的位置 16), 和

[0421] b) 在相当于 GLP-1 (7-35) 的位置 26 的位置处的 Arg 残基 (SEQ ID NO :1 的位置 20),

[0422] ii) 任选地, 相当于 GLP-1 (7-35) 的位置 30、31、32、33、34 或 35 的位置处的氨基酸 (分别地, SEQ ID NO :1 的位置 24、25、26、27、28 或 29) 可以是没有的, 条件是如果 GLP1 (7-35) 的位置 30、31、32、33 或 34 处的氨基酸 (SEQ ID NO :1 的位置 24、25、26、27 或 28) 是没有的, 则每个下游的氨基酸也是没有的, 和

[0423] iv) 任选地 C-末端酰胺基团。

[0424] 本发明另外提供了相应于根据本发明的任何上述实施方式和特定实施方式的 GLP-1 类似物或衍生物、方法和其用途以及具有其内容物的药物组合物, 其中相应的位置编号修改是如上所解释的进行的, 在上文对上述实施方式 1 的 GLP-1 类似物或衍生物显示了。

[0425] 1. 一种 GLP-1 类似物或其衍生物, 其包含修饰的 GLP-1 序列 7-35 (SEQ ID NO :1), 所述修饰的 GLP-1 序列 7-35 具有:

[0426] i) 与 SEQ ID NO :1 的序列 7-35 相比总共 2、3、4、5、6、7 或 8 个氨基酸取代, 包括

[0427] a) 在相当于 SEQ ID NO :1 的位置 22 的位置处的 Glu 残基, 和

[0428] b) 在相当于 SEQ ID NO :1 的位置 26 的位置处的 Arg 残基,

[0429] ii) 任选地, 在相当于 SEQ ID NO :1 的位置 30、31、32、33、34 或 35 的位置处的氨基酸可以是没有的, 条件是如果在位置 30、31、32、33 或 34 处的氨基酸是没有的, 则下游的每个氨基酸残基也是没有的, 和

[0430] iii) 任选地 C-末端酰胺基团。

[0431] 2. 根据实施方式 1 的 GLP-1 类似物或其衍生物, 其是用白蛋白结合残基衍生化的

或是聚乙二醇化的。

[0432] 3. 根据实施方式 1-2 的任一项的 GLP-1 类似物或其衍生物, 其中在位置 35 处的氨基酸是没有的, 以及其中所述 GLP-1 类似物的总长度是 28 个氨基酸。

[0433] 4. 根据实施方式 1-2 的任一项的 GLP-1 类似物或其衍生物, 其中在位置 34 和 35 处的氨基酸是没有的, 以及其中所述 GLP-1 类似物的总长度是 27 个氨基酸。

[0434] 5. 根据实施方式 1-2 的任一项的 GLP-1 类似物或其衍生物, 其中在位置 33、34 和 35 处的氨基酸是没有的, 以及其中所述 GLP-1 类似物的总长度是 26 个氨基酸。

[0435] 6. 根据实施方式 1-2 的任一项的 GLP-1 类似物或其衍生物, 其中在位置 32、33、34 和 35 处的氨基酸是没有的, 以及其中所述 GLP-1 类似物的总长度是 25 个氨基酸。

[0436] 7. 根据实施方式 1-2 的任一项的 GLP-1 类似物或其衍生物, 其中在位置 31、32、33、34 和 35 处的氨基酸是没有的, 以及其中所述 GLP-1 类似物的总长度是 24 个氨基酸。

[0437] 8. 根据实施方式 1-2 的任一项的 GLP-1 类似物或其衍生物, 其中在位置 30、31、32、33、34 和 35 处的氨基酸是没有的, 以及其中所述 GLP-1 类似物的总长度是 23 个氨基酸。

[0438] 9. 根据实施方式 1-8 的任一项的 GLP-1 类似物或其衍生物, 具有 C- 末端酰胺基团。

[0439] 10. 根据实施方式 1-9 的任一项的 GLP-1 类似物或其衍生物, 具有式 (I) 的序列 X_{aa7}-Xaa₈-Xaa₉-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Xaa₁₆-Ser-Xaa₁₈-Tyr-Xaa₂₀-Glu-Glu-Xaa₂₃-Xaa₂₄-Xaa₂₅-Arg-Xaa₂₇-Phe-Ile-Xaa₃₀-Xaa₃₁-Leu-Xaa₃₃-Xaa₃₄-Xaa₃₅-R

[0440] 式 (I) (SEQ ID No :2)

[0441] 其中

[0442] Xaa₇ 是 L- 组氨酸、D- 组氨酸、去氨基 - 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、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；

[0443] Xaa₈ 是 Ala、Gly、Val、Leu、Ile、Lys、Aib、(1- 氨基环丙基) 羧酸、(1- 氨基环丁基) 羧酸、(1- 氨基环戊基) 羧酸、(1- 氨基环己基) 羧酸、(1- 氨基环庚基) 羧酸, 或 (1- 氨基环辛基) 羧酸；

[0444] Xaa₉ 是 Glu 或 Glu 衍生物, 例如, α, α 二甲基 -Glu；

[0445] Xaa₁₆ 是 Val 或 Leu；

[0446] Xaa₁₈ 是 Ser、Lys、Cys 或 Arg；

[0447] Xaa₂₀ 是 Leu、Lys 或 Cys；

[0448] Xaa₂₃ 是 Gln、Glu、Lys、Cys 或 Arg；

[0449] Xaa₂₄ 是 Ala 或 Asn；

[0450] Xaa₂₅ 是 Ala 或 Val；

[0451] Xaa₂₇ 是 Glu、Ala 或 Leu；

[0452] Xaa₃₀ 是 Ala、Glu、Lys、Arg 或没有；

[0453] Xaa₃₁ 是 Trp、Lys、Cys 或没有；

[0454] Xaa₃₃ 是 Val、Lys、Cys 或没有；

[0455] Xaa₃₄ 是 Lys、Glu、Asn、Arg、Cys 或没有；

[0456] Xaa₃₅ 是 Gly、Aib 或没有；

[0457] R 是酰胺或是没有的；

[0458] 条件是,如果 Xaa₃₀、Xaa₃₁、Xaa₃₂、Xaa₃₃ 或 Xaa₃₄ 是没有的,则下游的每个氨基酸残基也是没有的。

[0459] 11. 根据实施方式 1-9 的任一项的 GLP-1 类似物或其衍生物,具有式 (II) 的序列 Xaa₇-Xaa₈-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Val-Ser-Xaa₁₈-Tyr-Leu-Glu-Glu-Gln-Ala-Ala-Arg-Glu-Phe-Ile-Xaa₃₀-Trp-Leu-Xaa₃₃-Xaa₃₄-Xaa₃₅-R

[0460] 式 (II) (SEQ ID No :3)

[0461] 其中

[0462] Xaa₇ 是 L-组氨酸、D-组氨酸、去氨基-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、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；

[0463] Xaa₈ 是 Ala、Gly、Val、Leu、Ile、Lys、Aib、(1-氨基环丙基)羧酸、(1-氨基环丁基)羧酸、(1-氨基环戊基)羧酸、(1-氨基环己基)羧酸、(1-氨基环庚基)羧酸,或(1-氨基环辛基)羧酸；

[0464] Xaa₁₈ 是 Ser、Lys 或 Arg；

[0465] Xaa₃₀ 是 Ala、Glu、Lys、Arg 或是没有的；

[0466] Xaa₃₃ 是 Val、Lys 或没有；

[0467] Xaa₃₄ 是 Lys、Glu、Arg 或是没有的；

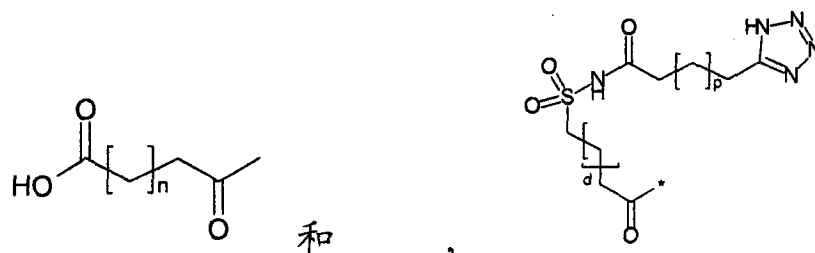
[0468] Xaa₃₅ 是 Gly、Aib 或是没有的；

[0469] R 是酰胺或是没有的。

[0470] 12. 根据实施方式 1-11 的任一项的 GLP-1 类似物或其衍生物,其中至少一个氨基酸残基用 A-B-C-D- 衍生化

[0471] 其中 A- 选自以下构成的组

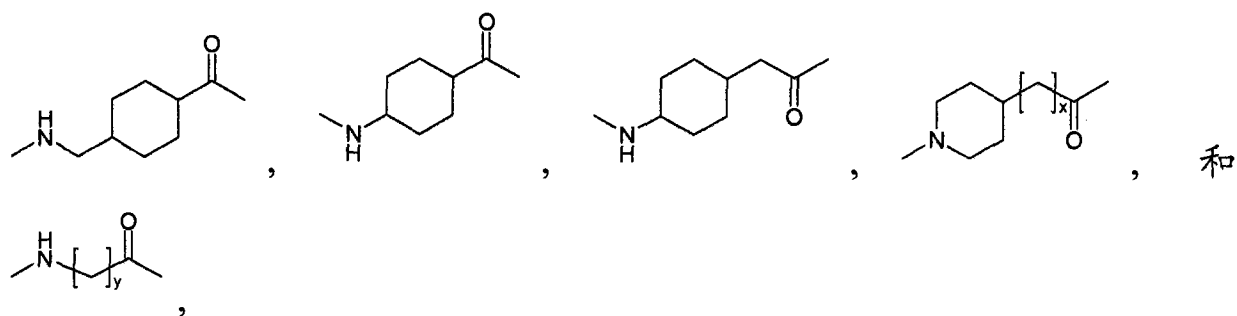
[0472]



[0473] 其中 n 选自由 14、15、16、17、18 和 19 构成的组, p 选自由 10、11、12、13 和 14 构成的组, 以及 d 选自由 0、1、2、3、4 和 5 构成的组,

[0474] -B- 选自以下构成的组

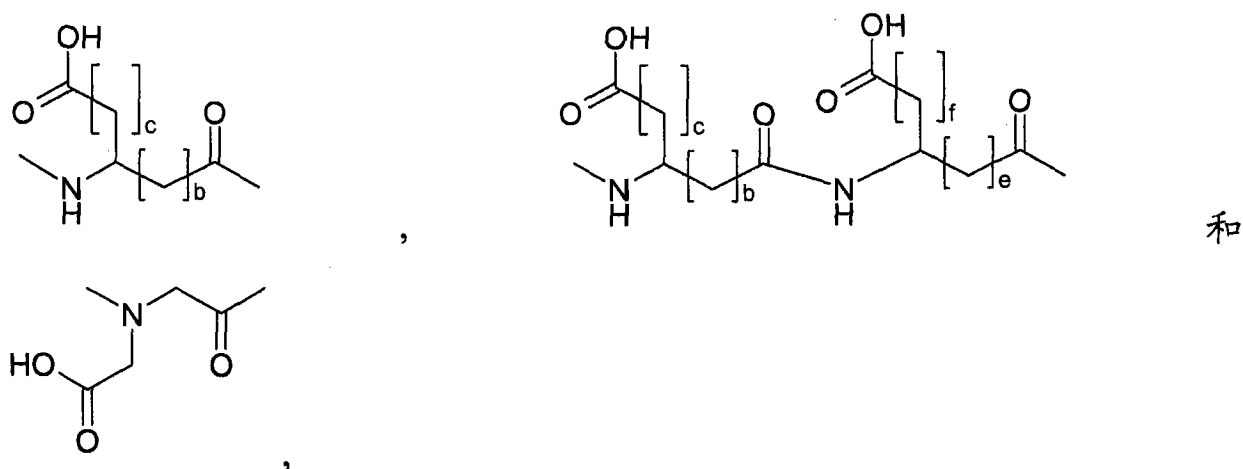
[0475]



[0476] 其中 x 选自由 0、1、2、3 和 4 构成的组, y 选自由 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11 和 12 构成的组,

[0477] -C- 选自以下构成的组

[0478]

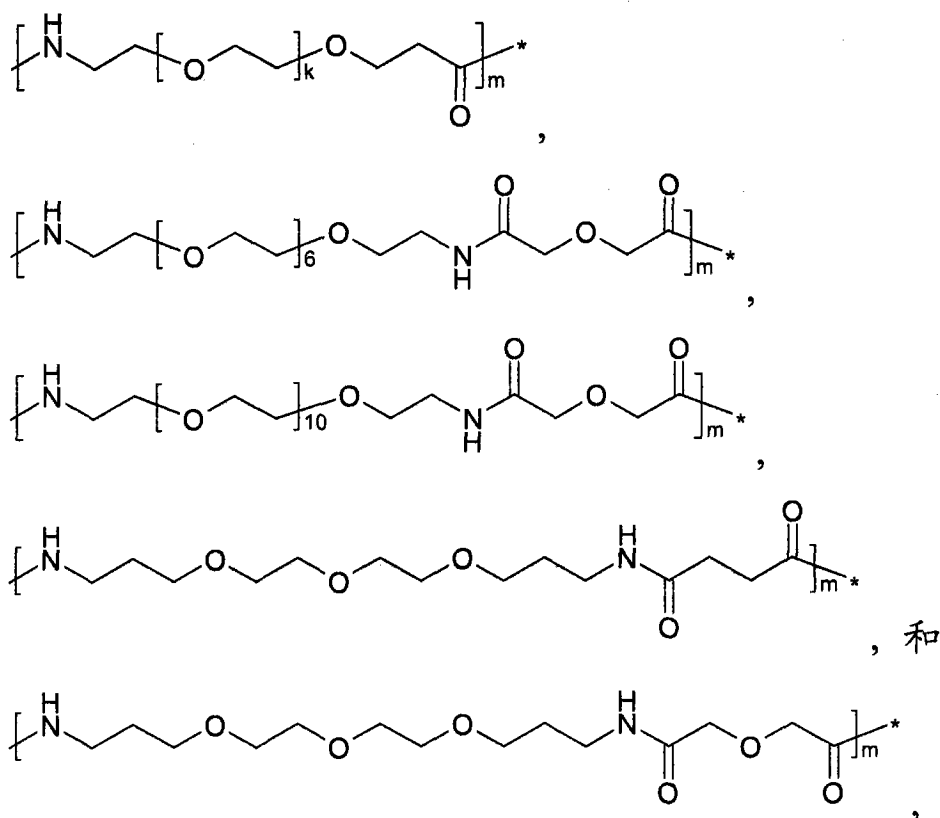


[0479] 其中 b 和 e 各自独立地选自由 0、1 和 2 构成的组, c 和 f 各自独立地选自由 0、1 和 2 构成的组, 条件是当 c 是 0 时 b 是 1 或 2, 或当 c 是 1 或 2 时 b 是 0, 和当 f 是 0 时 e 是 1 或 2, 或当 f 是 1 或 2 时 e 是 0, 和

[0480] -D- 附着到所述氨基酸残基以及是接头。

[0481] 13. 根据实施方式 12 的 GLP-1 类似物或其衍生物, 其中 D 选自以下构成的组

[0482]



[0483] 和其中 k 选自由 0、1、2、3、4、5、11 和 27 构成的组, m 选自由 0、1、2、3、4、5 和 6 构成的组。

[0484] 14. 一种包含根据实施方式 1-13 的任一项的 GLP-1 类似物或其衍生物和药学上可接受的赋形剂的药物组合物。

[0485] 15. 根据实施方式 1-14 的任一项的 GLP-1 类似物或其衍生物, 其用于高血糖、2 型糖尿病、损害的葡萄糖耐受、1 型糖尿病、肥胖、高血压、综合征 X、血脂异常、认知障碍、动脉粥样硬化、心肌梗塞、冠心病和其他心血管病症、中风、炎性肠综合征、消化不良和胃溃疡的治疗或预防。

[0486] oOo

[0487] 1. 一种 GLP-1 类似物, 其是修饰的 GLP-1 (7-35) (SEQ ID NO:1), 所述修饰的 GLP-1 (7-35) 具有:

[0488] i) 与 GLP-1 (7-35) 相比总共 2、3、4、5、6、7、8 或 9 个氨基酸取代, 包括

[0489] a) 在相当于 GLP-1 (7-35) 的位置 22 的位置处的 Glu 残基, 和

[0490] b) 在相当于 GLP-1 (7-35) 的位置 26 的位置处的 Arg 残基;

[0491] 或其衍生物。

[0492] 2. 根据实施方式 1 的 GLP-1 类似物或其衍生物, 其中在相当于 GLP-1 (7-35) 的位置 30、31、32、33、34 或 35 的位置处的氨基酸是没有的, 条件是如果在位置 30、31、32、33 或 34 的氨基酸是没有的, 则每个下游的氨基酸也是没有的。

[0493] 3. 根据实施方式 1-2 的任一项的 GLP-1 类似物或其衍生物, 其中所述 GLP-1 类似物包含 i) C-末端羧酸基团; 或 (iii) C-末端酰胺基团。

[0494] 4. 根据实施方式 1-3 的任一项的 GLP-1 类似物或其衍生物, 其是用白蛋白结合残基衍生化的或是聚乙二醇化的。

[0495] 5. 根据实施方式 1-4 的任一项的 GLP-1 类似物或其衍生物, 其中在位置 35 处的氨基酸是没有的, 以及其中所述 GLP-1 类似物的总长度是 28 个氨基酸。

[0496] 6. 根据实施方式 1-5 的任一项的 GLP-1 类似物或其衍生物, 其中在位置 34 和 35 处的氨基酸是没有的, 以及其中所述 GLP-1 类似物的总长度是 27 个氨基酸。

[0497] 7. 根据实施方式 1-6 的任一项的 GLP-1 类似物或其衍生物, 其中在位置 33、34 和 35 处的氨基酸是没有的, 以及其中所述 GLP-1 类似物的总长度是 26 个氨基酸。

[0498] 8. 根据实施方式 1-7 的任一项的 GLP-1 类似物或其衍生物, 其中在位置 32、33、34 和 35 处的氨基酸是没有的, 以及其中所述 GLP-1 类似物的总长度是 25 个氨基酸。

[0499] 9. 根据实施方式 1-8 的任一项的 GLP-1 类似物或其衍生物, 其中在位置 31、32、33、34 和 35 处的氨基酸是没有的, 以及其中所述 GLP-1 类似物的总长度是 24 个氨基酸。

[0500] 10. 根据实施方式 1-9 的任一项的 GLP-1 类似物或其衍生物, 其中在位置 30、31、32、33、34 和 35 处的氨基酸是没有的, 以及其中所述 GLP-1 类似物的总长度是 23 个氨基酸。

[0501] 11. 一种 GLP-1 类似物或其衍生物, 具有式 (I) 的序列 Xaa₇-Xaa₈-Xaa₉-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Xaa₁₆-Ser-Xaa₁₈-Tyr-Xaa₂₀-Glu-Glu-Xaa₂₃-Xaa₂₄-Xaa₂₅-Arg-Xaa₂₇-Phe-Ile-Xaa₃₀-Xaa₃₁-Leu-Xaa₃₃-Xaa₃₄-Xaa₃₅-R

[0502] 式 (I) (SEQ ID No :2)

[0503] 其中

[0504] Xaa₇ 是 L- 组氨酸、D- 组氨酸、去氨基 - 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、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；

[0505] Xaa₈ 是 Ala、Gly、Val、Leu、Ile、Lys、Aib、(1- 氨基环丙基) 羧酸、(1- 氨基环丁基) 羧酸、(1- 氨基环戊基) 羧酸、(1- 氨基环己基) 羧酸、(1- 氨基环庚基) 羧酸, 或 (1- 氨基环辛基) 羧酸；

[0506] Xaa₉ 是 Glu 或 Glu 衍生物, 例如, α, α 二甲基 -Glu；

[0507] Xaa₁₆ 是 Val 或 Leu；

[0508] Xaa₁₈ 是 Ser、Lys、Cys 或 Arg；

[0509] Xaa₂₀ 是 Leu、Lys 或 Cys；

[0510] Xaa₂₃ 是 Gln、Glu、Lys、Cys 或 Arg；

[0511] Xaa₂₄ 是 Ala 或 Asn；

[0512] Xaa₂₅ 是 Ala 或 Val；

[0513] Xaa₂₇ 是 Glu、Ala 或 Leu；

[0514] Xaa₃₀ 是 Ala、Glu、Lys、Arg 或没有；

[0515] Xaa₃₁ 是 Trp、Lys、Cys 或没有；

[0516] Xaa₃₃ 是 Val、Lys、Cys 或没有；

[0517] Xaa₃₄ 是 Lys、Glu、Asn、Arg、Cys 或没有；

[0518] Xaa₃₅ 是 Gly、Aib 或没有；

[0519] R 是酰胺或是没有的；

[0520] 条件是, 如果 Xaa₃₀、Xaa₃₁、Xaa₃₂、Xaa₃₃ 或 Xaa₃₄ 是没有的, 则下游的每个氨基酸残基也是没有的。

[0521] 12. 一种 GLP-1 类似物或其衍生物, 具有式 (II) 的序列 Xaa₇-Xaa₈-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Val-Ser-Xaa₁₈-Tyr-Leu-Glu-Glu-Gln-Ala-Ala-Arg-Glu-Phe-Ile-Xaa₃₀-Trp-Leu-Xaa₃₃-Xaa₃₄-Xaa₃₅-R

[0522] 式 (II) (SEQ ID No :3)

[0523] 其中

[0524] Xaa₇ 是 L- 组氨酸、D- 组氨酸、去氨基 - 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、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；

[0525] Xaa₈ 是 Ala、Gly、Val、Leu、Ile、Lys、Aib、(1- 氨基环丙基) 羧酸、(1- 氨基环丁基) 羧酸、(1- 氨基环戊基) 羧酸、(1- 氨基环己基) 羧酸、(1- 氨基环庚基) 羧酸, 或 (1- 氨基环辛基) 羧酸；

[0526] Xaa₁₈ 是 Ser、Lys 或 Arg；

[0527] Xaa₃₀ 是 Ala、Glu、Lys、Arg 或是没有的；

[0528] Xaa₃₃ 是 Val、Lys 或没有；

[0529] Xaa₃₄ 是 Lys、Glu、Arg 或是没有的；

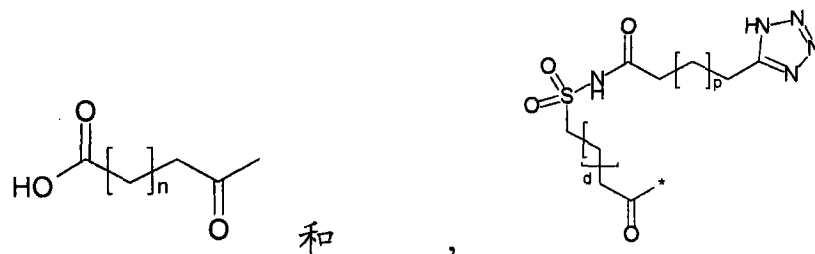
[0530] Xaa₃₅ 是 Gly、Aib 或是没有的；

[0531] R 是酰胺或是没有的。

[0532] 13. 根据实施方式 1-12 的任一项的 GLP-1 类似物或其衍生物, 其中至少一个氨基酸残基用 A-B-C-D- 衍生化

[0533] 其中 A- 选自以下构成的组

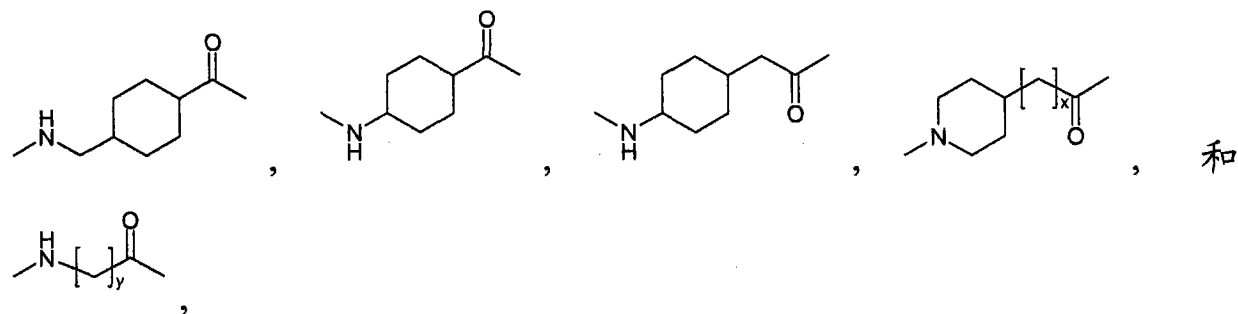
[0534]



[0535] 其中 n 选自由 14、15、16、17、18 和 19 构成的组, p 选自由 10、11、12、13 和 14 构成的组, 以及 d 选自由 0、1、2、3、4 和 5 构成的组,

[0536] -B- 选自以下构成的组

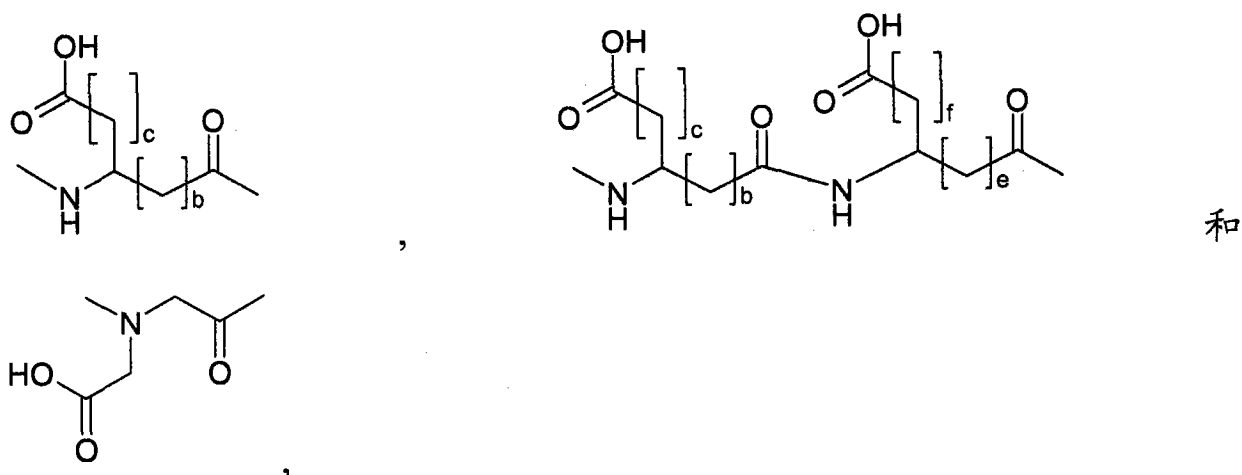
[0537]



[0538] 其中 x 选自由 0、1、2、3 和 4 构成的组, y 选自由 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11 和 12 构成的组,

[0539] -C- 选自以下构成的组

[0540]

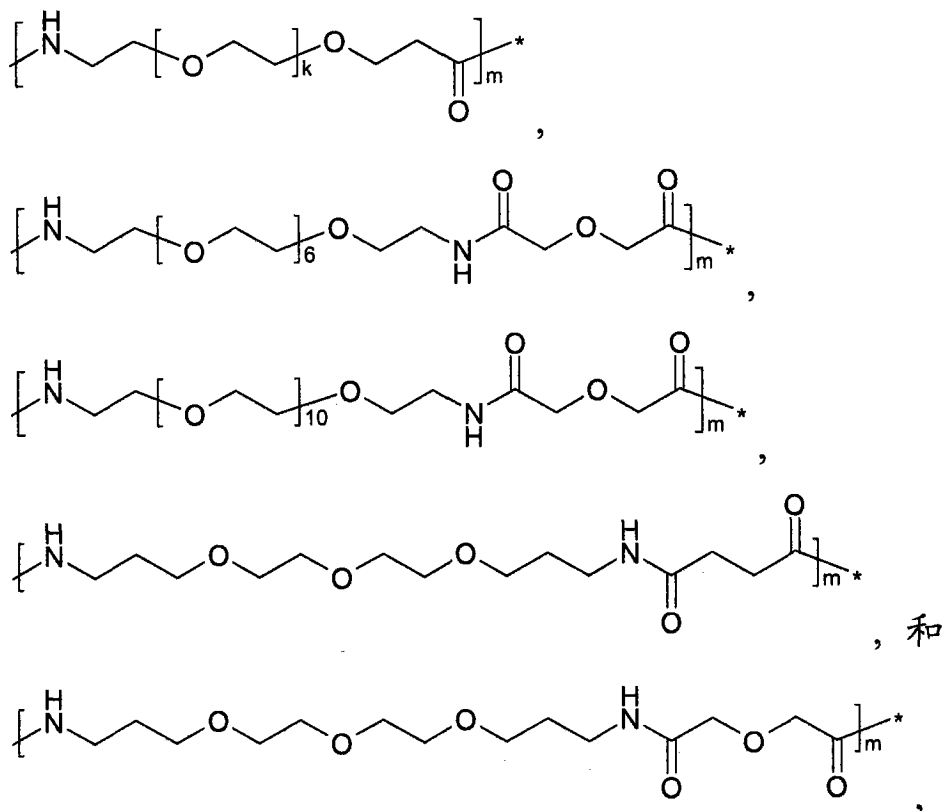


[0541] 其中 b 和 e 各自独立地选自由 0、1 和 2 构成的组, c 和 f 各自独立地选自由 0、1 和 2 构成的组, 条件是当 c 是 0 时 b 是 1 或 2, 或当 c 是 1 或 2 时 b 是 0, 和当 f 是 0 时 e 是 1 或 2, 或当 f 是 1 或 2 时 e 是 0, 知

[0542] -D- 附着到所述氨基酸残基以及是接头。

[0543] 14. 根据实施方式 13 的 GLP-1 类似物或其衍生物, 其中 D 选自以下构成的组

[0544]



[0545] 和其中 k 选自由 0、1、2、3、4、5、11 和 27 构成的组, m 选自由 0、1、2、3、4、5 和 6 构成的组。

[0546] 15. 一种 GLP-1 类似物或衍生物, 其选自以下的:

- [0547] [Glu22, Arg26]GLP-1 (7-33) 酰胺
- [0548] $N-\epsilon 20\{2-(2-\{2-[2-(2-\{2-[4-羧基-4-(17-羧基-十七烷酰基氨基)丁酰基氨基]乙氧基\}乙氧基)乙酰基氨基]乙氧基\}乙氧基)乙酰基\}-(Aib8, Lys20, Glu22, Val25, Arg26, Leu27, Glu30, Lys33)GLP-1(7-33)$ 酰胺;
- [0549] $N-\epsilon 20\{2-(2-\{2-[2-(2-\{2-[4-羧基-4-(17-羧基-十七烷酰基氨基)丁酰基氨基]乙氧基\}乙氧基)乙酰基氨基]乙氧基\}乙氧基)乙酰基\}-(Aib8, Lys20, Glu22, Arg26, Glu30)GLP-1(7-33)$ 酰胺;
- [0550] [Glu22, Val25, Arg26]GLP-1 (7-33) 酰胺;
- [0551] [Aib8, Lys20, Glu22, Val25, Arg26, Glu30]GLP-1 (7-33) 酰胺;
- [0552] $N-\epsilon 20\{2-(2-\{2-[2-(2-\{2-[4-羧基-4-(17-羧基-十七烷酰基氨基)丁酰基氨基]乙氧基\}乙氧基)乙酰基氨基]乙氧基\}乙氧基)乙酰基\}-[Aib8, Lys20, Glu22, Val25, Arg26, Glu30]GLP-1(7-33)$ 酰胺;
- [0553] [Glu22, Arg26]GLP-1 (7-33) 肽;
- [0554] [Glu22, Val25, Arg26]GLP-1 (7-32) 酰胺;
- [0555] $N-\epsilon 20\{2-(2-\{2-[2-(2-\{2-[4-羧基-4-(17-羧基-十七烷酰基氨基)丁酰基氨基]乙氧基\}乙氧基)乙酰基氨基]乙氧基\}乙氧基)乙酰基\}-(Aib8, Lys20, Glu22, Arg26)GLP-1(7-33)$ 酰胺;
- [0556] $N-\epsilon 31\{2-(2-\{2-[2-(2-\{2-[4-羧基-4-(17-羧基-十七烷酰基氨基)丁酰基氨基]乙氧基\}乙氧基)乙酰基氨基]乙氧基\}乙氧基)乙酰基\}-(Aib8, Glu22, Val25, Arg26, Lys31)GLP-1(7-33)$ 酰胺;
- [0557] $N-\epsilon 20\{2-(2-\{2-[2-(2-\{2-[4-羧基-4-(17-羧基-十七烷酰基氨基)丁酰基氨基]乙氧基\}乙氧基)乙酰基氨基]乙氧基\}乙氧基)乙酰基\}-(去氨基 His7, Lys20, Glu22, Arg26)GLP-1(7-33)$ 酰胺;
- [0558] $N-\epsilon 31\{2-(2-\{2-[2-(2-\{2-[4-羧基-4-(17-羧基-十七烷酰基氨基)丁酰基氨基]乙氧基\}乙氧基)乙酰基氨基]乙氧基\}乙氧基)乙酰基\}-(去氨基 His7, Glu22, Arg26, Lys31)GLP-1(7-33)$ 酰胺;
- [0559] $N-\epsilon 20\{2-(2-\{2-[2-(2-\{2-[4-羧基-4-(17-羧基-十七烷酰基氨基)丁酰基氨基]乙氧基\}乙氧基)乙酰基氨基]乙氧基\}乙氧基)乙酰基\}-(Aib8, Lys20, Glu22, Val25, Arg26, Leu27, Glu30, Lys31)GLP-1(7-32)$ 酰胺;
- [0560] $N-\epsilon 20\{2-(2-\{2-[2-(2-\{2-[4-羧基-4-(17-羧基-十七烷酰基氨基)丁酰基氨基]乙氧基\}乙氧基)乙酰基氨基]乙氧基\}乙氧基)乙酰基\}-(Aib8, Lys20, Glu22, Val25, Arg26, Leu27, Nle30, Lys31)GLP-1(7-32)$ 酰胺;
- [0561] $N-\epsilon 31-[2-(2-\{2-[2-(2-\{2-[4-羧基-4-(反式-4-[(19-羧基十九烷酰基氨基)甲基]环己基羰基)氨基]丁酰基氨基]乙氧基\}乙氧基)乙酰基氨基]乙氧基\}乙氧基)乙酰基\}-(Aib8, Glu22, Val25, Arg26, Lys31)GLP-1(7-33)$ 酰胺;
- [0562] [去氨基 His7, Glu22, Arg26]-GLP-1 (7-34);
- [0563] [Aib8, Lys20, Glu22, Val25, Arg26, Leu27, Lys31]GLP-1 (7-32) 酰胺;
- [0564] $N-\epsilon 31-[2-(2-\{2-[2-(2-\{2-[4-羧基-4-(17-羧基十七烷酰基氨基)丁酰基氨基]乙氧基\}乙氧基)乙酰基氨基]乙氧基\}乙氧基)乙酰基\}][去氨基 His7, Asp11,$

Glu18, Glu22, Val25, Arg26, Asp27, Glu30, Lys31]GLP-1 (7-33) 酰胺 ;

[0565] [Aib8, Glu22, Val25, Lys31]GLP-1 (7-33)- 酰胺 ;和

[0566] N-ε 31-{2-(2-{2-[2-(2-{2-[4- 羧基 -4-(17- 羧基 - 十七烷酰基氨基) 丁酰基氨基] 乙氧基} 乙氧基) 乙酰基氨基] 乙氧基} 乙氧基) 乙酰基}-N-beta34-(2-(二羧基甲基氨基) 乙酰基) [Aib8, Glu22, Val25, Arg26, Lys31, Dap34]GLP-1 (7-34) 酰胺。

[0567] 16. 一种药物组合物, 包含根据实施方式 1-15 的任一项的 GLP-1 类似物或其衍生物或其药学上可接受的盐、酰胺、烷基或酯, 以及药学上可接受的赋形剂。

[0568] 17. 根据实施方式 1-15 的任一项的 GLP-1 类似物或其衍生物或根据实施方式 16 的药物组合物, 其用作药物。

[0569] 18. 根据实施方式 1-15 的任一项的 GLP-1 类似物或其衍生物, 或根据实施方式 16 的药物组合物, 其用于高血糖、2 型糖尿病、损害的葡萄糖耐受、1 型糖尿病、肥胖、高血压、综合征 X、血脂异常、认知障碍、动脉粥样硬化、心肌梗塞、冠心病和其他心血管病症、中风、炎性肠综合征、消化不良和胃溃疡的治疗或预防。

[0570] 19. 根据实施方式 1-15 的任一项的 GLP-1 类似物或其衍生物, 或根据实施方式 16 的药物组合物在制造用于治疗或预防高血糖、2 型糖尿病、损害的葡萄糖耐受、1 型糖尿病、肥胖、高血压、综合征 X、血脂异常、认知障碍、动脉粥样硬化、心肌梗塞、冠心病和其他心血管病症、中风、炎性肠综合征、消化不良和胃溃疡的药物中的用途。

[0571] 20. 一种通过施用药学上活性数量的根据实施方式 1-15 的任一项的 GLP-1 类似物或其衍生物或根据实施方式 16 的药物组合物来治疗或预防高血糖、2 型糖尿病、损害的葡萄糖耐受、1 型糖尿病、肥胖、高血压、综合征 X、血脂异常、认知障碍、动脉粥样硬化、心肌梗塞、冠心病和其他心血管病症、中风、炎性肠综合征、消化不良和胃溃疡的方法。

[0572] 实施方式

[0573] 1. 一种 GLP-1 类似物或其衍生物, 其包含修饰的 GLP-1 序列 7-35 (SEQ ID NO :1), 所述修饰的 GLP-1 序列 7-35 具有 :

[0574] 与 SEQ ID NO :1 的序列 7-35 相比总共 2、3、4、5、6、7 或 8 个氨基酸取代, 包括

[0575] 在相当于 SEQ ID NO :1 的位置 22 的位置处的 Glu 残基, 和

[0576] 在相当于 SEQ ID NO :1 的位置 26 的位置处的 Arg 残基,

[0577] 任选地, 在相当于 SEQ ID NO :1 的位置 30、31、32、33、34 或 35 的位置处的氨基酸可以是没有的, 条件是如果在位置 30、31、32、33 或 34 处的氨基酸是没有的, 则下游的每个氨基酸残基也是没有的, 知

[0578] 任选地 C- 末端酰胺基团。

[0579] 2. 根据实施方式 1 的 GLP-1 类似物或其衍生物, 其是用白蛋白结合残基衍生化的或是聚乙二醇化的。

[0580] 3. 根据实施方式 1-2 的任一项的 GLP-1 类似物或其衍生物, 其中在位置 35 处的氨基酸是没有的, 以及其中所述 GLP-1 类似物的总长度是 28 个氨基酸。

[0581] 4. 根据实施方式 1-2 的任一项的 GLP-1 类似物或其衍生物, 其中在位置 34 和 35 处的氨基酸是没有的, 以及其中所述 GLP-1 类似物的总长度是 27 个氨基酸。

[0582] 5. 根据实施方式 1-2 的任一项的 GLP-1 类似物或其衍生物, 其中在位置 33、34 和 35 处的氨基酸是没有的, 以及其中所述 GLP-1 类似物的总长度是 26 个氨基酸。

[0583] 6. 根据实施方式 1-2 的任一项的 GLP-1 类似物或其衍生物, 其中在位置 32、33、34 和 35 处的氨基酸是没有的, 以及其中所述 GLP-1 类似物的总长度是 25 个氨基酸。

[0584] 7. 根据实施方式 1-2 的任一项的 GLP-1 类似物或其衍生物, 其中在位置 31、32、33、34 和 35 处的氨基酸是没有的, 以及其中所述 GLP-1 类似物的总长度是 24 个氨基酸。

[0585] 8. 根据实施方式 1-2 的任一项的 GLP-1 类似物或其衍生物, 其中在位置 30、31、32、33、34 和 35 处的氨基酸是没有的, 以及其中所述 GLP-1 类似物的总长度是 23 个氨基酸。

[0586] 9. 根据实施方式 1-8 的任一项的 GLP-1 类似物或其衍生物, 具有 C- 末端酰胺基团。

[0587] 10. 根据实施方式 1-9 的任一项的 GLP-1 类似物或其衍生物, 具有与 SEQ ID NO : 1 的序列 7-35 相比 3 个氨基酸取代, 包括在位置 22 和 26 的取代。

[0588] 11. 根据实施方式 1-10 的任一项的 GLP-1 类似物或其衍生物, 其具有与 SEQ ID NO : 1 的序列 7-35 相比在选自位置 7、8、18、20、23、24、25、27、30、31、33 和 34 的组的位置处的取代。

[0589] 12. 根据实施方式 11 的 GLP-1 类似物或其衍生物, 其具有选自由去氨基 His7、Aib8、Lys18、Cys18、Lys20、Cys20、Lys23、Cys23、Asn24、Val25、Ala27、Leu27、Glu30、Lys31、Cys31、Lys33、Cys33、Lys34、Cys34 和 Asn34 构成的组的取代。

[0590] 13. 根据实施方式 11-12 的任一项的 GLP-1 类似物或其衍生物, 其具有选自由去氨基 His7、Aib8、Lys18、Lys20、Lys23、Glu30、Lys31、Lys33 和 Lys34 构成的组的取代。

[0591] 14. 根据实施方式 11-13 的任一项的 GLP-1 类似物或其衍生物, 其具有选自由去氨基 His7 和 Aib8 构成的组的取代。

[0592] 15. 根据实施方式 1-9 的任一项的 GLP-1 类似物或其衍生物, 具有与 SEQ ID NO : 1 的序列 7-35 相比 4 个氨基酸取代, 包括在位置 22 和 26 的取代。

[0593] 16. 根据实施方式 1-9 和 15 的任一项的 GLP-1 类似物或其衍生物, 其具有与 SEQ ID NO : 1 的序列 7-35 相比在选自位置 7、8、18、20、23、24、25、27、30、31、33 和 34 的组的位置处的两个取代。

[0594] 17. 根据实施方式 15-16 的任一项的 GLP-1 类似物或其衍生物, 其具有选自由去氨基 His7、Aib8、Lys18、Cys18、Lys20、Cys20、Lys23、Cys23、Asn24、Val25、Ala27、Leu27、Glu30、Lys31、Cys31、Lys33、Cys33、Lys34、Cys34 和 Asn34 构成的组的两个取代。

[0595] 18. 根据实施方式 15-17 的任一项的 GLP-1 类似物或其衍生物, 具有选自由去氨基 His7 和 Aib8 构成的组的氨基酸取代, 和选自由 Lys18、Lys20、Lys23、Glu30、Lys31、Lys33 和 Lys34 构成的组的氨基酸取代。

[0596] 19. 根据实施方式 15-18 的任一项的 GLP-1 类似物或其衍生物, 具有选自由去氨基 His7 和 Aib8 构成的组的氨基酸取代, 和选自由 Lys18、Lys20、Lys23、Glu30、Lys31、Lys33 和 Lys34 构成的组的氨基酸取代。

[0597] 20. 根据实施方式 1-9 的任一项的 GLP-1 类似物或其衍生物, 具有与 SEQ ID NO : 1 的序列 7-35 相比 5 个氨基酸取代, 包括在位置 22 和 26 的取代。

[0598] 21. 根据实施方式 1-9 和 20 的任一项的 GLP-1 类似物或其衍生物, 其具有与 SEQ ID NO : 1 的序列 7-35 相比在选自位置 7、8、18、20、23、24、25、27、30、31、33 和 34 的组的位置处的三个氨基酸取代。

[0599] 22. 根据实施方式 20-21 的任一项的 GLP-1 类似物或其衍生物, 其具有选自去氨基 His7、Aib8、Lys18、Cys18、Lys20、Cys20、Lys23、Cys23、Asn24、Val25、Ala27、Leu27、Glu30、Lys31、Cys31、Lys33、Cys33、Lys34、Cys34 和 Asn34 的组的三个氨基酸取代。

[0600] 23. 根据实施方式 20-22 的任一项的 GLP-1 类似物或其衍生物, 具有选自自由去氨基 His7 和 Aib8 构成的组的氨基酸取代, 和选自自由 Lys18、Lys20、Lys23、Glu30、Lys31、Lys33 和 Lys34 构成的组的两个氨基酸取代。

[0601] 24. 根据实施方式 20-23 的任一项的 GLP-1 类似物或其衍生物, 具有选自自由去氨基 His7 和 Aib8 构成的组的氨基酸取代, 和选自自由 Lys18、Lys20、Lys23、Glu30、Lys31、Lys33 和 Lys34 构成的组两个氨基酸取代。

[0602] 25. 根据实施方式 1-9 的任一项的 GLP-1 类似物或其衍生物, 具有与 SEQ ID NO : 1 的序列 7-35 相比 6 个氨基酸取代, 包括在位置 22 和 26 的取代。

[0603] 26. 根据实施方式 1-9 和 25 的任一项的 GLP-1 类似物或其衍生物, 其具有在选自位置 7、8、18、20、23、24、25、27、30、31、33 和 34 的组的位置处的四个氨基酸取代。

[0604] 27. 根据实施方式 25-26 的任一项的 GLP-1 类似物或其衍生物, 其具有选自自由去氨基 His7、Aib8、Lys18、Cys18、Lys20、Cys20、Lys23、Cys23、Asn24、Val25、Ala27、Leu27、Glu30、Lys31、Cys31、Lys33、Cys33、Lys34、Cys34 和 Asn34 构成的组的四个氨基酸取代。

[0605] 28. 根据实施方式 25-27 的任一项的 GLP-1 类似物或其衍生物, 具有选自自由去氨基 His7 和 Aib8 构成的组的氨基酸取代, 和选自自由 Lys18、Lys20、Lys23、Glu30、Lys31、Lys33 和 Lys34 构成的组的三个氨基酸取代。

[0606] 29. 根据实施方式 25-28 的任一项的 GLP-1 类似物或其衍生物, 具有选自自由去氨基 His7 和 Aib8 构成的组的氨基酸取代, 和选自自由 Lys18、Lys20、Lys23、Glu30、Lys31、Lys33 和 Lys34 构成的组三个氨基酸取代。

[0607] 30. 根据实施方式 1-29 的任一项的 GLP-1 类似物或其衍生物, 具有式 (I) 的序列 Xaa₇-Xaa₈-Xaa₉-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Xaa₁₆-Ser-Xaa₁₈-Tyr-Xaa₂₀-Glu-Glu-Xaa₂₃-Xaa₂₄-Xaa₂₅-Arg-Xaa₂₇-Phe-Ile-Xaa₃₀-Xaa₃₁-Leu-Xaa₃₃-Xaa₃₄-Xaa₃₅-R

[0608] 式 (I) (SEQ ID No :2)

[0609] 其中

[0610] Xaa₇ 是 L- 组氨酸、D- 组氨酸、去氨基 - 组氨酸、2- 氨基 - 组氨酸、β - 羟基 - 组氨酸、高组氨酸、N^ε - 乙酰基 - 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 ;

[0611] Xaa₈ 是 Ala、Gly、Val、Leu、Ile、Lys、Aib、(1- 氨基环丙基) 羧酸、(1- 氨基环丁基) 羧酸、(1- 氨基环戊基) 羧酸、(1- 氨基环己基) 羧酸、(1- 氨基环庚基) 羧酸, 或 (1- 氨基环辛基) 羧酸 ;

[0612] Xaa₉ 是 Glu 或 Glu 衍生物, 例如, α , α 二甲基 -Glu ;

[0613] Xaa₁₆ 是 Val 或 Leu ;

[0614] Xaa₁₈ 是 Ser、Lys、Cys 或 Arg ;

[0615] Xaa₂₀ 是 Leu、Lys 或 Cys ;

[0616] Xaa₂₃ 是 Gln、Glu、Lys、Cys 或 Arg ;

[0617] Xaa₂₄ 是 Ala 或 Asn ;

- [0618] Xaa₂₅ 是 Ala 或 Val ;
- [0619] Xaa₂₇ 是 Glu、Ala 或 Leu ;
- [0620] Xaa₃₀ 是 Ala、Glu、Lys、Arg 或没有 ;
- [0621] Xaa₃₁ 是 Trp、Lys、Cys 或没有 ;
- [0622] Xaa₃₃ 是 Val、Lys、Cys 或没有 ;
- [0623] Xaa₃₄ 是 Lys、Glu、Asn、Arg、Cys 或没有 ;
- [0624] Xaa₃₅ 是 Gly、Aib 或没有 ;
- [0625] R 是酰胺或是没有的 ;
- [0626] 条件是,如果 Xaa₃₀、Xaa₃₁、Xaa₃₂、Xaa₃₃ 或 Xaa₃₄ 是没有的,则下游的每个氨基酸残基也是没有的。
- [0627] 31. 根据实施方式 1-29 的任一项的 GLP-1 类似物或其衍生物,具有式 (II) 的序列 Xaa₇-Xaa₈-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Val-Ser-Xaa₁₈-Tyr-Leu-Glu-Glu-Gln-Ala-Ala-Arg-Glu-Phe-Ile-Xaa₃₀-Trp-Leu-Xaa₃₃-Xaa₃₄-Xaa₃₅-R
- [0628] 式 (II) (SEQ ID No :3)
- [0629] 其中
- [0630] Xaa₇ 是 L- 组氨酸、D- 组氨酸、去氨基 - 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、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 ;
- [0631] Xaa₈ 是 Ala、Gly、Val、Leu、Ile、Lys、Aib、(1- 氨基环丙基) 羧酸、(1- 氨基环丁基) 羧酸、(1- 氨基环戊基) 羧酸、(1- 氨基环己基) 羧酸、(1- 氨基环庚基) 羧酸,或 (1- 氨基环辛基) 羧酸 ;
- [0632] Xaa₁₈ 是 Ser、Lys 或 Arg ;
- [0633] Xaa₃₀ 是 Ala、Glu、Lys、Arg 或是没有的 ;
- [0634] Xaa₃₃ 是 Val、Lys 或没有 ;
- [0635] Xaa₃₄ 是 Lys、Glu、Arg 或是没有的 ;
- [0636] Xaa₃₅ 是 Gly、Aib 或是没有的 ;
- [0637] R 是酰胺或是没有的。
- [0638] 32. 根据实施方式 30-31 的任一项的 GLP-1 类似物或其衍生物,其中 R 是没有的。
- [0639] 33. 根据实施方式 30-32 的任一项的 GLP-1 类似物或其衍生物,其中 Xaa₃₅ 和 R 是没有的。
- [0640] 34. 根据实施方式 30-33 的任一项的 GLP-1 类似物或其衍生物,其中 Xaa₃₄、Xaa₃₅ 和 R 是没有的。
- [0641] 35. 根据实施方式 30-34 的任一项的 GLP-1 类似物或其衍生物,其中 Xaa₃₃、Xaa₃₄、Xaa₃₅ 和 R 是没有的。
- [0642] 36. 根据实施方式 30 和 32-35 的任一项的 GLP-1 类似物或其衍生物,具有与 SEQ ID NO :1 的序列 7-35 相比总共 2 个氨基酸取代,其是在相当于 SEQ ID NO :2 的位置 22 的位置处的 Glu 残基和相当于 SEQ ID NO :2 的位置 26 的位置处的 Arg 残基。
- [0643] 37. 根据实施方式 30 和 32-35 的任一项的 GLP-1 类似物或其衍生物,具有与 SEQ ID NO :1 的序列 7-35 相比总共 3 个氨基酸取代,其是在相当于 SEQ ID NO :2 的位置 22 的

位置处的 Glu 残基、相当于 SEQ ID NO :2 的位置 26 的位置处的 Arg 残基, 和与 SEQ ID NO :1 的序列 7-35 相比选自 SEQ ID NO :2 中 Xaa₇、Xaa₈、Xaa₉、Xaa₁₆、Xaa₁₈、Xaa₂₀、Xaa₂₃、Xaa₂₄、Xaa₂₅、Xaa₂₇、Xaa₃₀、Xaa₃₁、Xaa₃₃、Xaa₃₄ 和 Xaa₃₅ 构成的组的一个氨基酸取代。

[0644] 38. 根据实施方式 30 和 32-35 的任一项的 GLP-1 类似物或其衍生物, 具有与 SEQ ID NO :1 的序列 7-35 相比总共 4 个氨基酸取代, 其是在相当于 SEQ ID NO :2 的位置 22 的位置处的 Glu 残基、相当于 SEQ ID NO :2 的位置 26 的位置处的 Arg 残基, 和与 SEQ ID NO :1 的序列 7-35 相比选自 SEQ ID NO :2 中 Xaa₇、Xaa₈、Xaa₉、Xaa₁₆、Xaa₁₈、Xaa₂₀、Xaa₂₃、Xaa₂₄、Xaa₂₅、Xaa₂₇、Xaa₃₀、Xaa₃₁、Xaa₃₃、Xaa₃₄ 和 Xaa₃₅ 构成的组的 2 个氨基酸取代。

[0645] 39. 根据实施方式 30 和 32-35 的任一项的 GLP-1 类似物或其衍生物, 具有与 SEQ ID NO :1 的序列 7-35 相比总共 5 个氨基酸取代, 其是在相当于 SEQ ID NO :2 的位置 22 的位置处的 Glu 残基、相当于 SEQ ID NO :2 的位置 26 的位置处的 Arg 残基, 和与 SEQ ID NO :1 的序列 7-35 相比选自 SEQ ID NO :2 中 Xaa₇、Xaa₈、Xaa₉、Xaa₁₆、Xaa₁₈、Xaa₂₀、Xaa₂₃、Xaa₂₄、Xaa₂₅、Xaa₂₇、Xaa₃₀、Xaa₃₁、Xaa₃₃、Xaa₃₄ 和 Xaa₃₅ 构成的组的 3 个氨基酸取代。

[0646] 40. 根据实施方式 30 和 32-35 的任一项的 GLP-1 类似物或其衍生物, 具有与 SEQ ID NO :1 的序列 7-35 相比总共 6 个氨基酸取代, 其是在相当于 SEQ ID NO :2 的位置 22 的位置处的 Glu 残基、相当于 SEQ ID NO :2 的位置 26 的位置处的 Arg 残基, 和与 SEQ ID NO :1 的序列 7-35 相比选自 SEQ ID NO :2 中 Xaa₇、Xaa₈、Xaa₉、Xaa₁₆、Xaa₁₈、Xaa₂₀、Xaa₂₃、Xaa₂₄、Xaa₂₅、Xaa₂₇、Xaa₃₀、Xaa₃₁、Xaa₃₃、Xaa₃₄ 和 Xaa₃₅ 构成的组的 4 个氨基酸取代。

[0647] 41. 根据实施方式 30 和 32-35 的任一项的 GLP-1 类似物或其衍生物, 具有与 SEQ ID NO :1 的序列 7-35 相比总共 7 个氨基酸取代, 其是在相当于 SEQ ID NO :2 的位置 22 的位置处的 Glu 残基、相当于 SEQ ID NO :2 的位置 26 的位置处的 Arg 残基, 和与 SEQ ID NO :1 的序列 7-35 相比选自 SEQ ID NO :2 中 Xaa₇、Xaa₈、Xaa₉、Xaa₁₆、Xaa₁₈、Xaa₂₀、Xaa₂₃、Xaa₂₄、Xaa₂₅、Xaa₂₇、Xaa₃₀、Xaa₃₁、Xaa₃₃、Xaa₃₄ 和 Xaa₃₅ 构成的组的 5 个氨基酸取代。

[0648] 42. 根据实施方式 30 和 32-35 的任一项的 GLP-1 类似物或其衍生物, 具有与 SEQ ID NO :1 的序列 7-35 相比总共 8 个氨基酸取代, 其是在相当于 SEQ ID NO :2 的位置 22 的位置处的 Glu 残基、相当于 SEQ ID NO :2 的位置 26 的位置处的 Arg 残基, 和与 SEQ ID NO :1 的序列 7-35 相比选自 SEQ ID NO :2 中 Xaa₇、Xaa₈、Xaa₉、Xaa₁₆、Xaa₁₈、Xaa₂₀、Xaa₂₃、Xaa₂₄、Xaa₂₅、Xaa₂₇、Xaa₃₀、Xaa₃₁、Xaa₃₃、Xaa₃₄ 和 Xaa₃₅ 构成的组的 3 个氨基酸取代。

[0649] 43. 根据实施方式 31-35 的任一项的 GLP-1 类似物或其衍生物, 具有与 SEQ ID NO :1 的序列 7-35 相比总共 2 个氨基酸取代, 其是在相当于 SEQ ID NO :3 的位置 22 的位置处的 Glu 残基和相当于 SEQ ID NO :3 的位置 26 的位置处的 Arg 残基。

[0650] 44. 根据实施方式 31-35 的任一项的 GLP-1 类似物或其衍生物, 具有与 SEQ ID NO :1 的序列 7-35 相比总共 3 个氨基酸取代, 其是在相当于 SEQ ID NO :3 的位置 22 的位置处的 Glu 残基、相当于 SEQ ID NO :3 的位置 26 的位置处的 Arg 残基, 和与 SEQ ID NO :1 的序列 7-35 相比选自 SEQ ID NO :3 中 Xaa₇、Xaa₈、Xaa₁₈、Xaa₃₀、Xaa₃₃、Xaa₃₄ 和 Xaa₃₅ 构成的组的一个氨基酸取代。

[0651] 45. 根据实施方式 31-35 的任一项的 GLP-1 类似物或其衍生物, 具有与 SEQ ID NO :1 的序列 7-35 相比总共 4 个氨基酸取代, 其是在相当于 SEQ ID NO :3 的位置 22 的位置处的 Glu 残基、相当于 SEQ ID NO :3 的位置 26 的位置处的 Arg 残基, 和与 SEQ ID NO :1 的序

列 7-35 相比选自 SEQ ID NO :3 中 Xaa₇、Xaa₈、Xaa₁₈、Xaa₃₀、Xaa₃₃、Xaa₃₄ 和 Xaa₃₅ 构成的组的 2 个氨基酸取代。

[0652] 46. 根据实施方式 31-35 的任一项的 GLP-1 类似物或其衍生物,具有与 SEQ ID NO :1 的序列 7-35 相比总共 5 个氨基酸取代,其是在相当于 SEQ ID NO :3 的位置 22 的位置处的 Glu 残基、相当于 SEQ IDNO :3 的位置 26 的位置处的 Arg 残基,和与 SEQ ID NO :1 的序列 7-35 相比选自 SEQ ID NO :3 中 Xaa₇、Xaa₈、Xaa₁₈、Xaa₃₀、Xaa₃₃、Xaa₃₄ 和 Xaa₃₅ 构成的组的 3 个氨基酸取代。

[0653] 47. 根据实施方式 31-35 的任一项的 GLP-1 类似物或其衍生物,具有与 SEQ ID NO :1 的序列 7-35 相比总共 6 个氨基酸取代,其是在相当于 SEQ ID NO :3 的位置 22 的位置处的 Glu 残基、相当于 SEQ IDNO :3 的位置 26 的位置处的 Arg 残基,和与 SEQ ID NO :1 的序列 7-35 相比选自 SEQ ID NO :3 中 Xaa₇、Xaa₈、Xaa₁₈、Xaa₃₀、Xaa₃₃、Xaa₃₄ 和 Xaa₃₅ 构成的组的 4 个氨基酸取代。

[0654] 48. 根据实施方式 31-35 的任一项的 GLP-1 类似物或其衍生物,具有与 SEQ ID NO :1 的序列 7-35 相比总共 7 个氨基酸取代,其是在相当于 SEQ ID NO :3 的位置 22 的位置处的 Glu 残基、相当于 SEQ IDNO :3 的位置 26 的位置处的 Arg 残基,和与 SEQ ID NO :1 的序列 7-35 相比选自 SEQ ID NO :3 中 Xaa₇、Xaa₈、Xaa₁₈、Xaa₃₀、Xaa₃₃、Xaa₃₄ 和 Xaa₃₅ 构成的组的 5 个氨基酸取代。

[0655] 49. 根据实施方式 31-35 的任一项的 GLP-1 类似物或其衍生物,具有与 SEQ ID NO :1 的序列 7-35 相比总共 8 个氨基酸取代,其是在相当于 SEQ ID NO :3 的位置 22 的位置处的 Glu 残基、相当于 SEQ IDNO :3 的位置 26 的位置处的 Arg 残基,和与 SEQ ID NO :1 的序列 7-35 相比选自 SEQ ID NO :3 中 Xaa₇、Xaa₈、Xaa₁₈、Xaa₃₀、Xaa₃₃、Xaa₃₄ 和 Xaa₃₅ 构成的组的 3 个氨基酸取代。

[0656] 50. 根据实施方式 30-49 的任一项的 GLP-1 类似物或其衍生物,其中 Xaa₇ 是去氨基-组氨酸。

[0657] 51. 根据实施方式 30-49 的任一项的 GLP-1 类似物或其衍生物,其中 Xaa₈ 是 Aib。

[0658] 52. 根据实施方式 1-51 的任一项的 GLP-1 类似物或其衍生物,其中被聚乙二醇化的或用白蛋白结合残基衍生化的氨基酸是 Lys- 残基或 Cys- 残基。

[0659] 53. 根据实施方式 1-51 的任一项的 GLP-1 类似物或其衍生物,其中被聚乙二醇化的或用白蛋白结合残基衍生化的氨基酸是 Lys- 残基。

[0660] 54. 根据实施方式 1-51 的任一项的 GLP-1 类似物或其衍生物,其中 C- 末端氨基酸是聚乙二醇化的或用白蛋白结合残基衍生化的。

[0661] 55. 根据实施方式 1-54 的任一项的 GLP-1 类似物或其衍生物,其在位置 18、20、23、31、33、34 或在 C- 末端氨基酸被聚乙二醇化或用白蛋白结合残基衍生化。

[0662] 56. 根据实施方式 1-55 的任一项的 GLP-1 类似物或其衍生物,其在位置 18 被聚乙二醇化或用白蛋白结合残基衍生化。

[0663] 57. 根据实施方式 1-55 的任一项的 GLP-1 类似物或其衍生物,其在位置 20 被聚乙二醇化或用白蛋白结合残基衍生化。

[0664] 58. 根据实施方式 1-55 的任一项的 GLP-1 类似物或其衍生物,其在位置 23 被聚乙二醇化或用白蛋白结合残基衍生化。

[0665] 59. 根据实施方式 1-55 的任一项的 GLP-1 类似物或其衍生物,其在位置 31 被聚乙二醇化或用白蛋白结合残基衍生化。

[0666] 60. 根据实施方式 1-55 的任一项的 GLP-1 类似物或其衍生物,其在位置 33 被聚乙二醇化或用白蛋白结合残基衍生化。

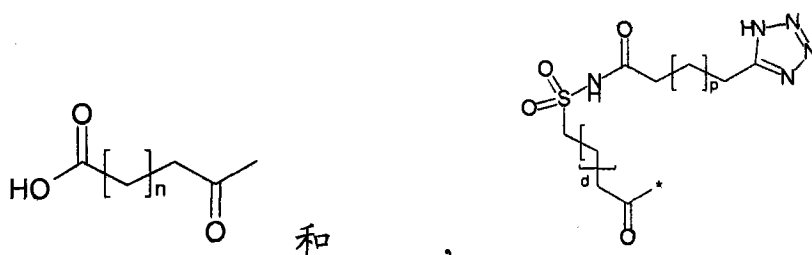
[0667] 61. 根据实施方式 1-55 的任一项的 GLP-1 类似物或其衍生物,其在位置 34 被聚乙二醇化或用白蛋白结合残基衍生化。

[0668] 62. 根据实施方式 1-55 的任一项的 GLP-1 类似物或其衍生物,其用白蛋白结合残基衍生化。

[0669] 63. 根据实施方式 1-62 的任一项的 GLP-1 类似物或其衍生物,其中至少一个氨基酸残基用 A-B-C-D- 衍生化

[0670] 其中 A- 选自以下构成的组

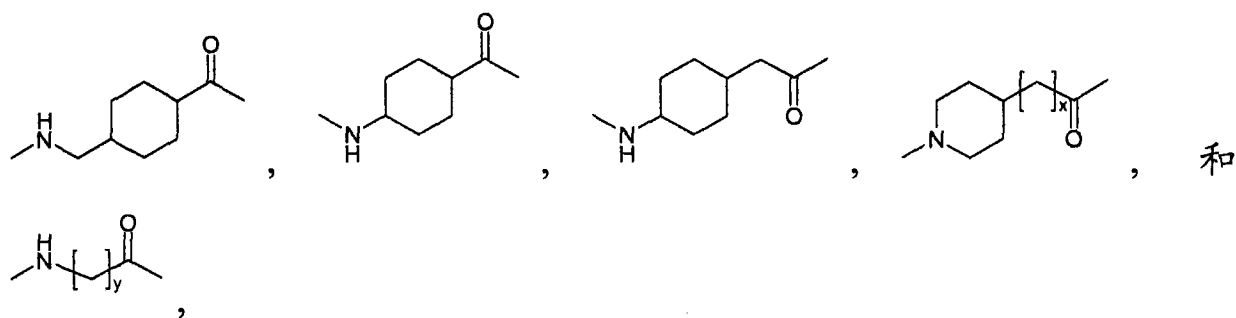
[0671]



[0672] 其中 n 选自由 14、15、16、17、18 和 19 构成的组, p 选自由 10、11、12、13 和 14 构成的组,以及 d 选自由 0、1、2、3、4 和 5 构成的组,

[0673] -B- 选自以下构成的组

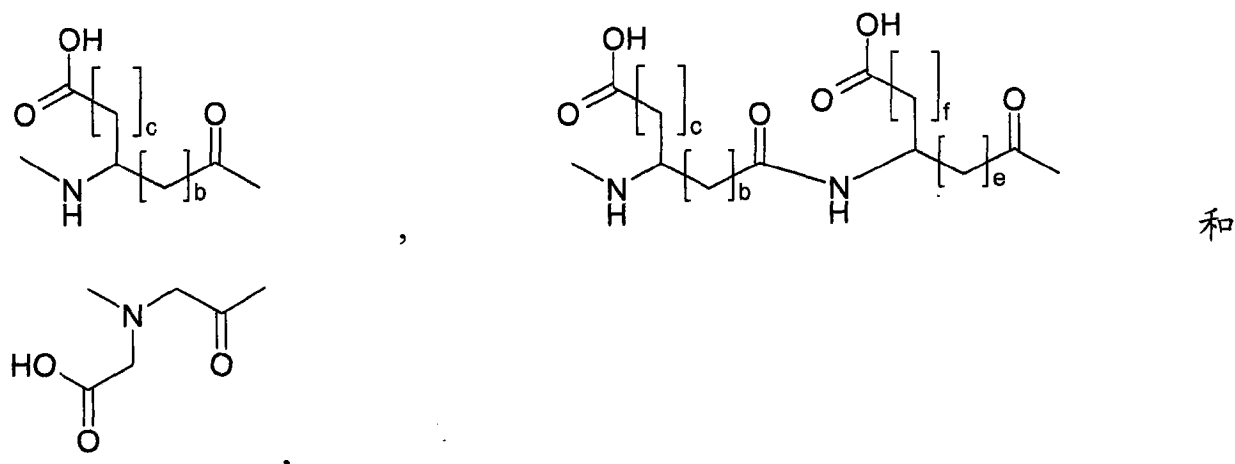
[0674]



[0675] 其中 x 选自由 0、1、2、3 和 4 构成的组, y 选自由 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11 和 12 构成的组,

[0676] -C- 选自以下构成的组

[0677]



[0678] 其中 b 和 e 各自独立地选自由 0、1 和 2 构成的组, c 和 f 各自独立地选自由 0、1 和 2 构成的组, 条件是当 c 是 0 时 b 是 1 或 2, 或当 c 是 1 或 2 时 b 是 0, 和当 f 是 0 时 e 是 1 或 2, 或当 f 是 1 或 2 时 e 是 0, 知

[0679] -D- 附着到所述氨基酸残基以及是接头。

[0680] 64. 根据实施方式 61 的 GLP-1 类似物或其衍生物, 其中至少一个氨基酸残基用 A-B-C-D- 衍生化。

[0681] 65. 根据实施方式 63-64 的任一项的 GLP-1 类似物或其衍生物, 其中所述衍生化的氨基酸残基包含氨基基团。

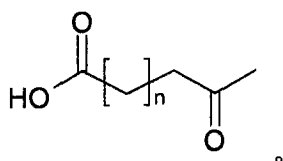
[0682] 66. 根据实施方式 63-65 的任一项的 GLP-1 类似物或其衍生物, 其中所述衍生化的氨基酸残基包含侧链中的伯氨基基团。

[0683] 67. 根据实施方式 63-66 的任一项的 GLP-1 类似物或其衍生物, 其中所述衍生化的氨基酸残基是赖氨酸。

[0684] 68. 根据实施方式 63-67 的任一项的 GLP-1 类似物或其衍生物, 其中仅一个氨基酸残基是衍生化的。

[0685] 69. 根据实施方式 63-68 的任一项的 GLP-1 类似物或其衍生物, 其中 A- 是

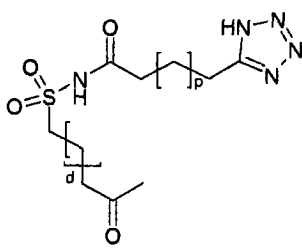
[0686]



[0687] 70. 根据实施方式 63-69 的任一项的 GLP-1 类似物或其衍生物, 其中 n 选自由 15 和 17 构成的组, 更优选的是 17。

[0688] 71. 根据实施方式 63-68 的任一项的 GLP-1 类似物或其衍生物, 其中 A- 是

[0689]



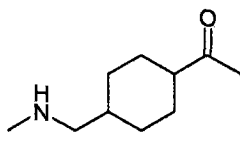
[0690] 72. 根据实施方式 63-68 和 69 的任一项的 GLP-1 类似物或其衍生物, 其中 p 选自

由 12、13 和 14 构成的组,更优选的是 13。

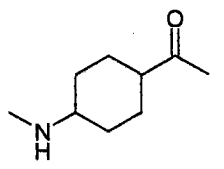
[0691] 73. 根据实施方式 61-68 和 69-70 的任一项的 GLP-1 类似物或其衍生物,其中 d 选自由 0、1、2、3 和 4 构成的组,更优选的选自由 0、1 和 2 构成的组,最优选的是 1。

[0692] 74. 根据实施方式 63-68 和 69-71 的任一项的 GLP-1 类似物或其衍生物,其中 d 选自由 0、1 和 2 构成的组, p 选自由 12、13 或 14 构成的组,更优选的 d 选自由 1 和 2 构成的组和 p 选自由 13 和 14 构成的组,最优选的 d 是 1 和 p 是 13。

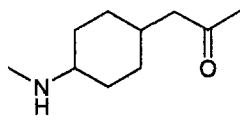
[0693] 75. 根据实施方式 63-74 的任一项的 GLP-1 类似物或其衍生物,其中 -B- 是
[0694]



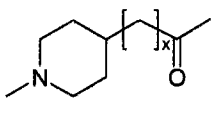
[0695] 76. 根据实施方式 63-74 的任一项的 GLP-1 类似物或其衍生物,其中 -B- 是
[0696]



[0697] 77. 根据实施方式 63-74 的任一项的 GLP-1 类似物或其衍生物,其中 -B- 是
[0698]

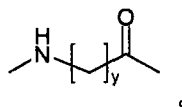


[0699] 78. 根据实施方式 63-74 的任一项的 GLP-1 类似物或其衍生物,其中 -B- 是
[0700]



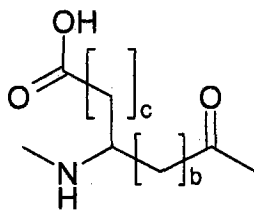
[0701] 79. 根据实施方式 78 的 GLP-1 类似物或其衍生物,其中 x 选自由 0、1 和 2 构成的组,更优选的 x 选自由 0 和 1 构成的组,最优选的 x 是 1。

[0702] 80. 根据实施方式 63-74 的任一项的 GLP-1 类似物或其衍生物,其中 -B- 是
[0703]



[0704] 81. 根据实施方式 80 的 GLP-1 类似物或其衍生物,其中 y 选自由 2、3、4、5、6、7、8、9 和 10 构成的组,更优选的 y 选自由 2、3、4、5、6、7 和 8 构成的组。

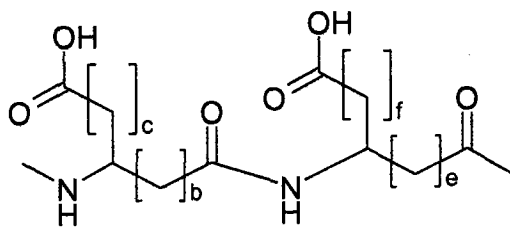
[0705] 82. 根据实施方式 63-81 的任一项的 GLP-1 类似物或其衍生物,其中 -C- 是
[0706]



[0707] 83. 根据实施方式 82 的 GLP-1 类似物或其衍生物, 其中 c 选自由 0 和 1 构成的组, b 选自由 1 和 2 构成的组, 更优选的 b 是 1 和 c 是 0。

[0708] 84. 根据实施方式 63-81 的任一项的 GLP-1 类似物或其衍生物, 其中 -C- 是

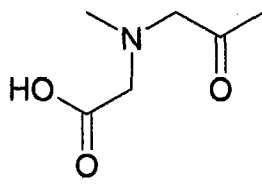
[0709]



[0710] 85. 根据实施方式 84 的 GLP-1 类似物或其衍生物, 其中 f 选自由 0 和 1 构成的组, e 选自由 1 和 2 构成的组, 更优选的 e 是 1 和 f 是 0。

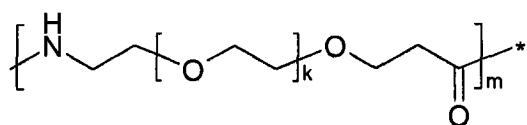
[0711] 86. 根据实施方式 63-81 的任一项的 GLP-1 类似物或其衍生物, 其中 -C- 是

[0712]

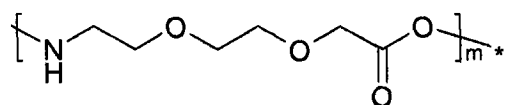


[0713] 87. 根据实施方式 63-86 的任一项的 GLP-1 类似物或其衍生物, 其中 D 选自以下构成的组

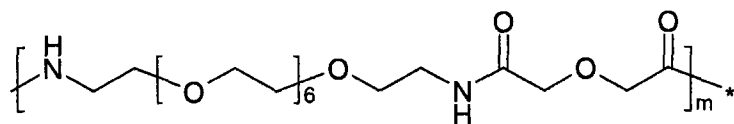
[0714]



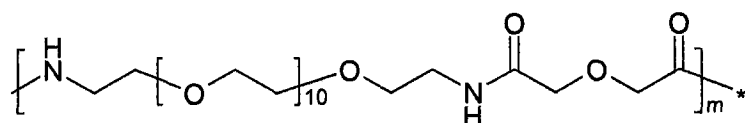
,



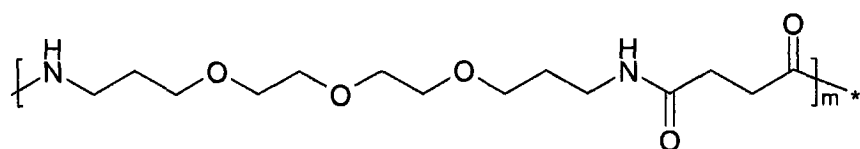
,



,

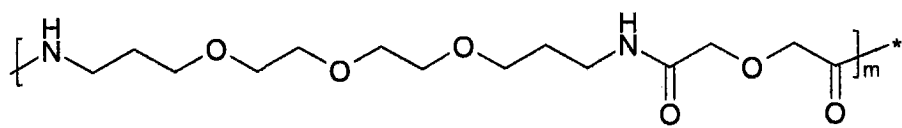


,



, 和

[0715]

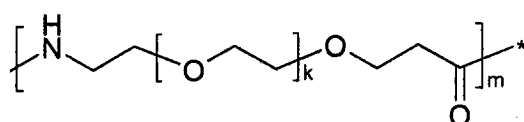


,

[0716] 和其中 k 选自由 0、1、2、3、4、5、11 和 27 构成的组, m 选自由 0、1、2、3、4、5 和 6 构成的组。

[0717] 88. 根据实施方式 63-87 的任一项的 GLP-1 类似物或其衍生物, 其中 -D- 是

[0718]



。

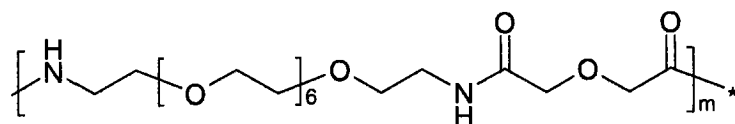
[0719] 89. 根据实施方式 88 的 GLP-1 类似物或其衍生物, 其中 k 选自由 1、2、3、11 和 27 构成的组, 更优选的 k 是 1。

[0720] 90. 根据实施方式 88-89 的任一项的 GLP-1 类似物或其衍生物, 其中 m 选自由 0、1、2、3 和 4 构成的组, 更优选的 m 选自由 0、1 和 2 构成的组。

[0721] 91. 根据实施方式 91 的 GLP-1 类似物或其衍生物, 其中 m 选自由 0、1、2、3 和 4 构成的组, 更优选的 m 选自由 0、1 和 2 构成的组。

[0722] 92. 根据实施方式 63-87 的任一项的 GLP-1 类似物或其衍生物, 其中 -D- 是

[0723]

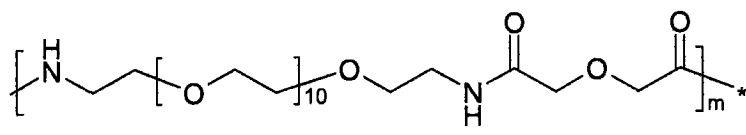


。

[0724] 93. 根据实施方式 93 的 GLP-1 类似物或其衍生物, 其中 m 选自由 0、1、2、3 和 4 构成的组, 更优选的 m 选自由 0、1 和 2 构成的组。

[0725] 94. 根据实施方式 1-87 的任一项的 GLP-1 类似物或其衍生物, 其中 -D- 是

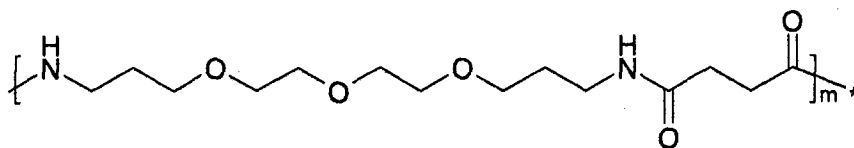
[0726]



[0727] 95. 根据实施方式 95 的 GLP-1 类似物或其衍生物, 其中 m 选自由 0、1、2、3 和 4 构成的组, 更优选的 m 选自由 0、1 和 2 构成的组。

[0728] 96. 根据实施方式 1-87 的任一项的 GLP-1 类似物或其衍生物, 其中 -D- 是

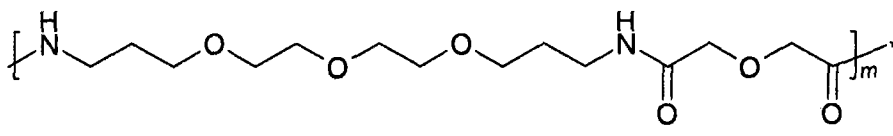
[0729]



[0730] 97. 根据实施方式 97 的 GLP-1 类似物或其衍生物, 其中 m 选自由 0、1、2、3 和 4 构成的组, 更优选的 m 选自由 0、1 和 2 构成的组。

[0731] 98. 根据实施方式 1-87 的任一项的 GLP-1 类似物或其衍生物, 其中 -D- 是

[0732]

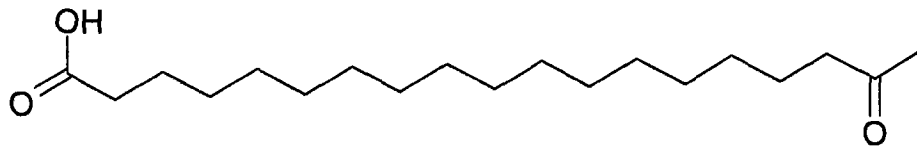
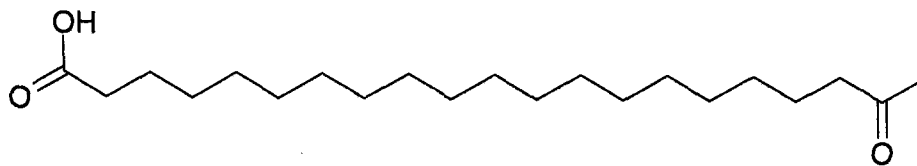


[0733] 99. 根据实施方式 99 的 GLP-1 类似物或其衍生物, 其中 m 选自由 0、1、2、3 和 4 构成的组, 更优选的 m 选自由 0、1 和 2 构成的组。

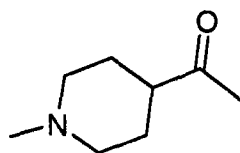
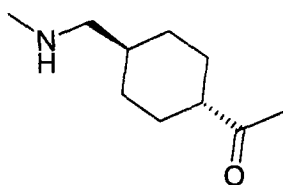
[0734] 100. 根据实施方式 1-100 的任一项的 GLP-1 类似物或其衍生物, 其中 A-B-C-D- 选择和组合自

[0735]

A-

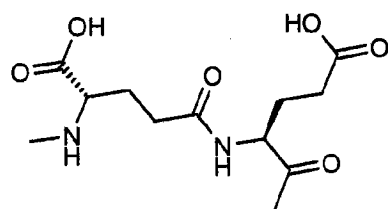
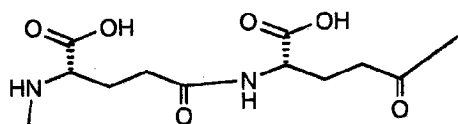
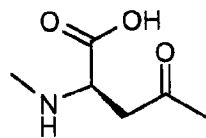
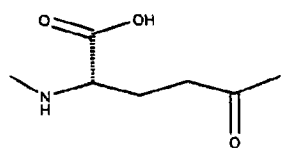


-B-

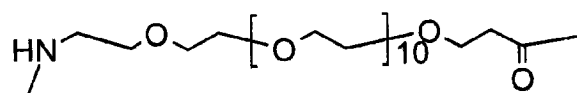
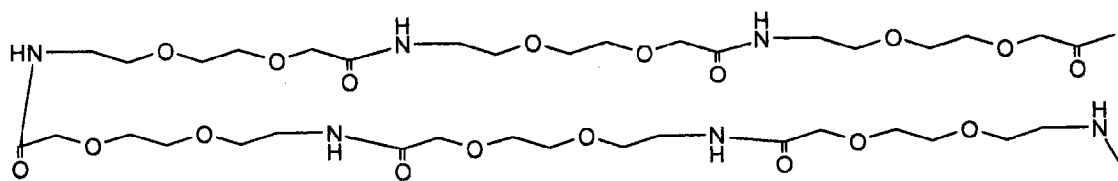
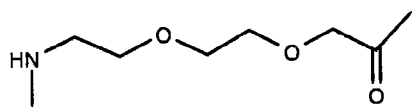
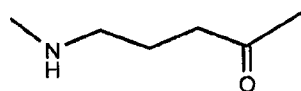
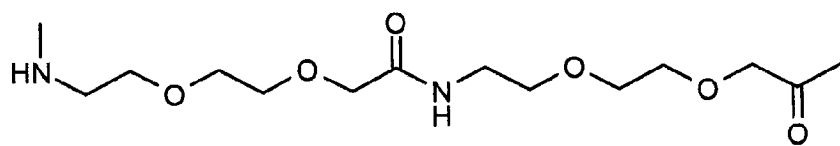


[0736]

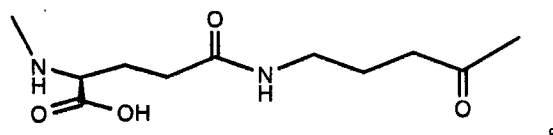
-C-



-D-



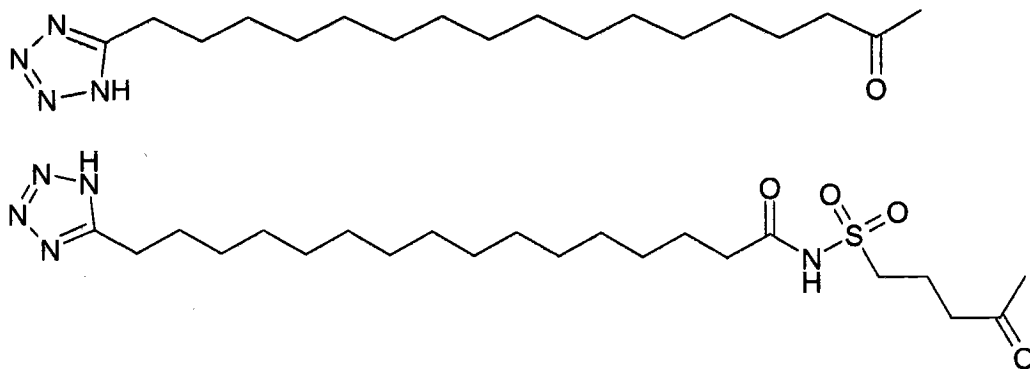
[0737]



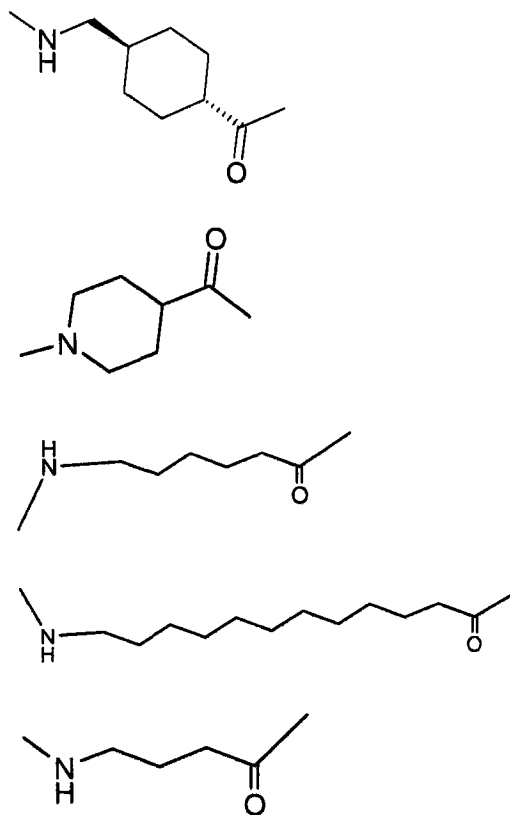
[0738] 101. 根据实施方式 1-100 的任一项的 GLP-1 类似物或其衍生物, 其中 A-B-C-D- 选择和组合自

[0739]

A-

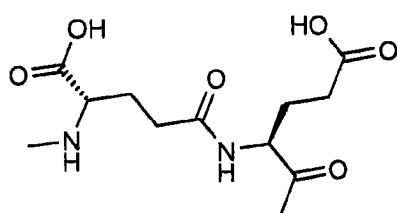
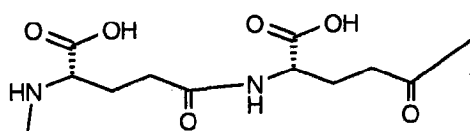
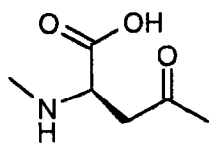
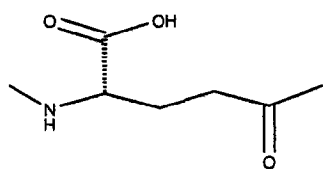


-B-

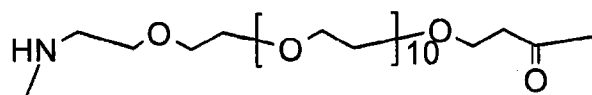
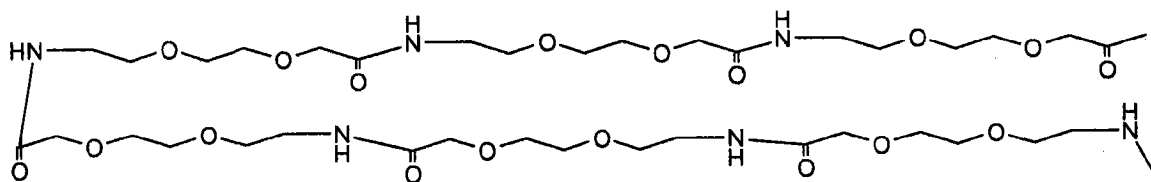
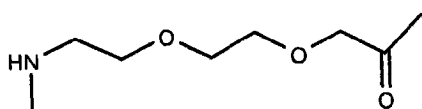
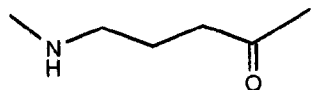
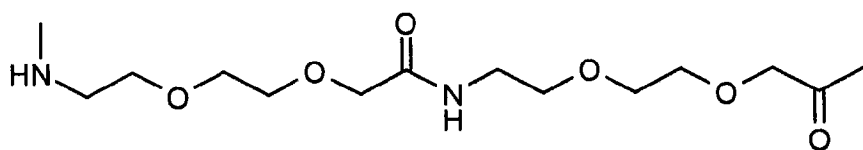


-C-

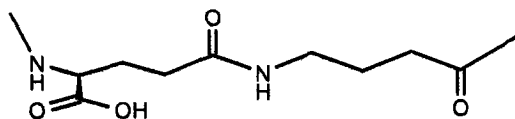
[0740]



-D-

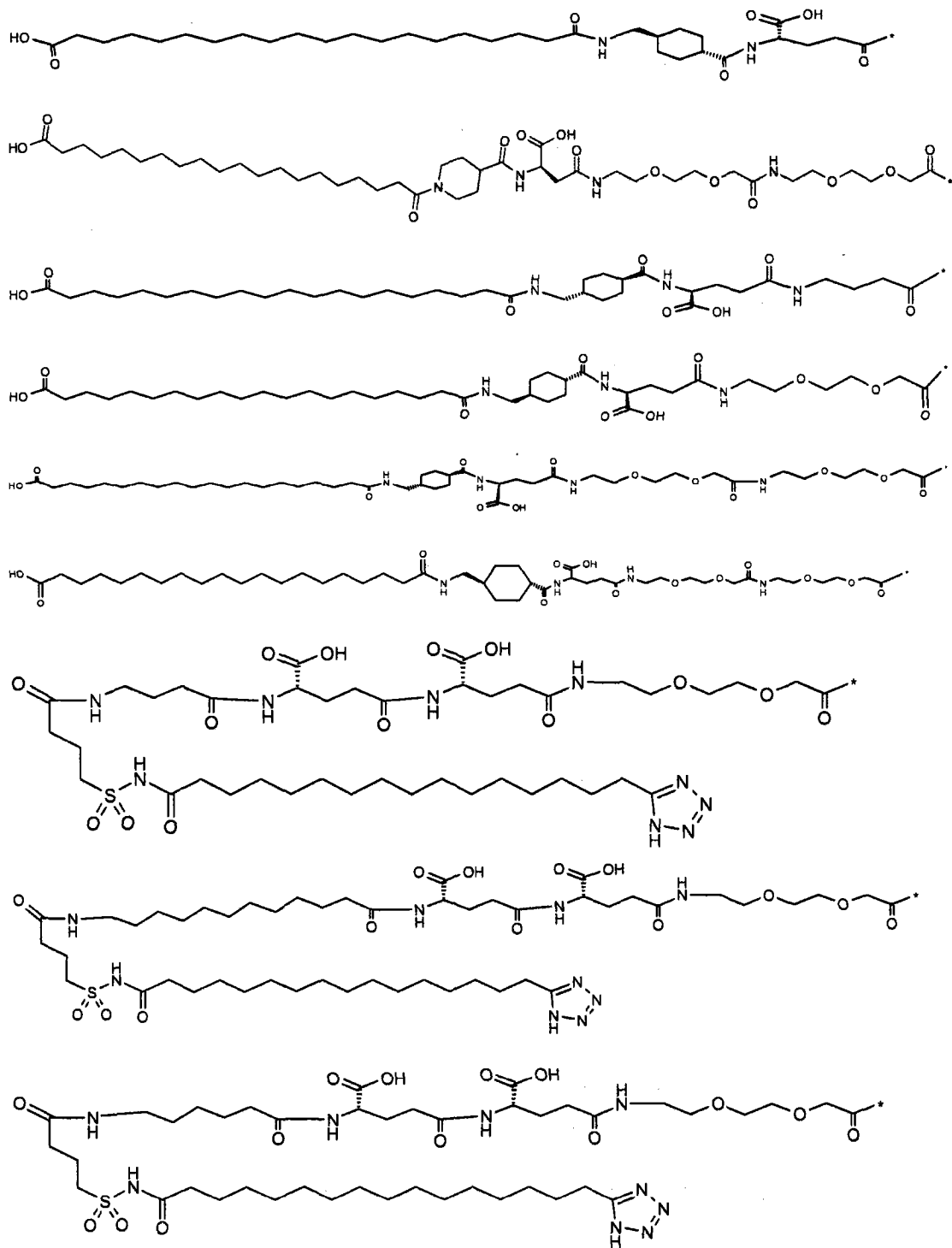


[0741]

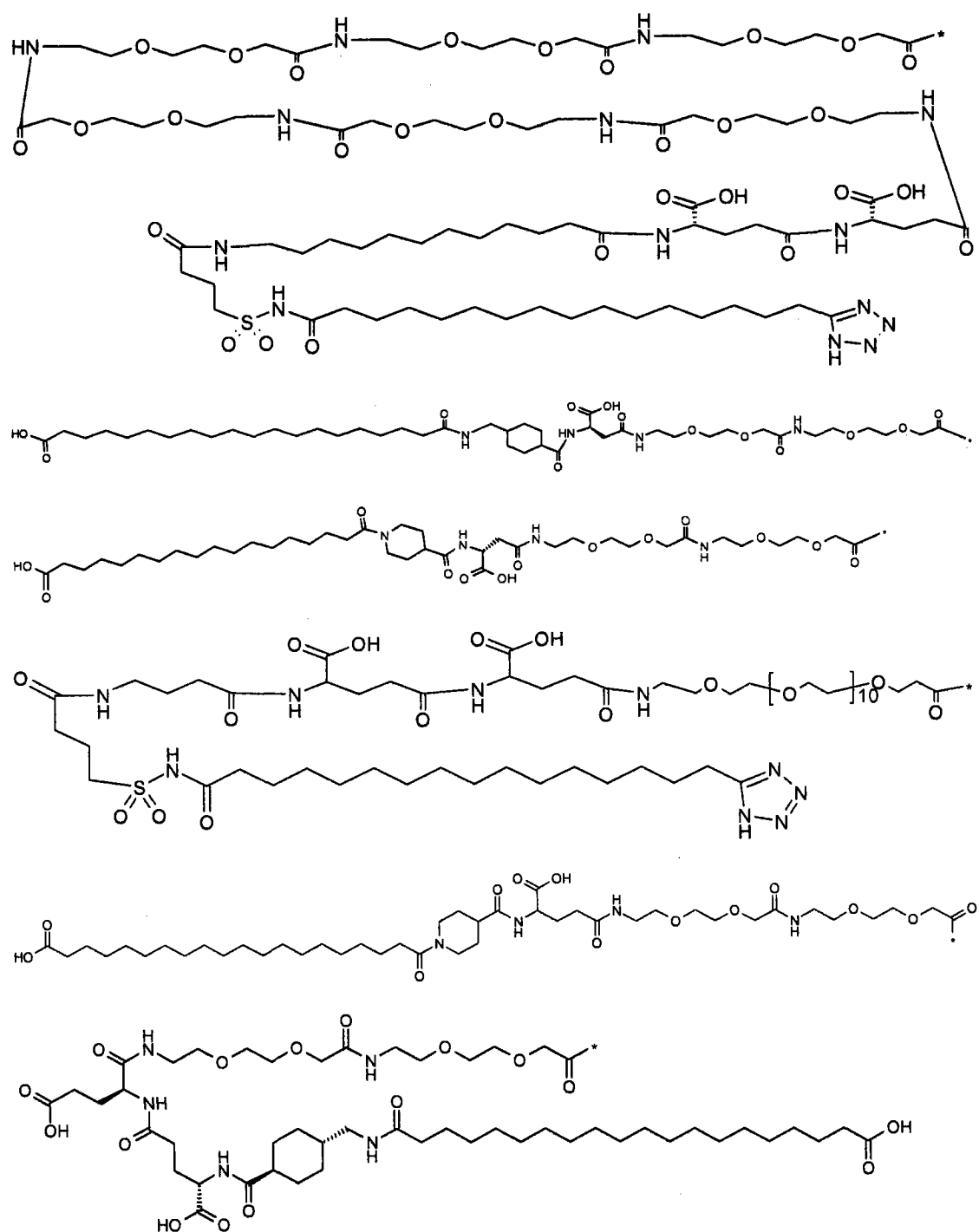


[0742] 102. 根据实施方式 1-100 的任一项的 GLP-1 类似物或其衍生物, 其中 A-B-C-D- 选自以下构成的组

[0743]



[0744]



[0745] 103. 根据实施方式 1-103 的任一项的 GLP-1 类似物或其衍生物,其包含修饰的 GLP-1 序列和一个或多个白蛋白结合残基之间的亲水性接头。

[0746] 104. 根据实施方式 104 的 GLP-1 类似物或其衍生物,其中所述亲水性接头是不分支的寡聚乙二醇部分,在两个末端具有合适的官能团,其形成修饰的 GLP-1 序列的氨基基团与白蛋白结合残基的官能团之间的桥。

[0747] 105. 根据上述实施方式的任一项的 GLP-1 类似物或其衍生物,其选自以下构成的组

- [0748] [Glu22, Arg26]GLP-1 (7-33) 酰胺,
- [0749] $N \epsilon 20 \{2-(2-\{2-[2-(2-[4- \text{羧基}-4-(17- \text{羧基}-十七烷酰基氨基)} \text{丁酰基氨基}] \text{乙氧基}\} \text{乙氧基}) \text{乙酰基氨基}] \text{乙氧基}\} \text{乙氧基}) \text{乙酰基}\}-(\text{Aib8, Lys20, Glu22, Val25, Arg26, Leu27, Glu30, Lys33})\text{GLP-1 (7-33) 酰胺},$
- [0750] $N \epsilon 20 \{2-(2-\{2-[2-(2-[4- \text{羧基}-4-(17- \text{羧基}-十七烷酰基氨基)} \text{丁酰基氨基}] \text{乙氧基}\} \text{乙氧基}) \text{乙酰基氨基}] \text{乙氧基}\} \text{乙氧基}) \text{乙酰基}\}-(\text{Aib8, Lys20, Glu22, Arg26, Glu30})\text{GLP-1 (7-33) 酰胺},$
- [0751] [Glu22, Val25, Arg26]GLP-1 (7-33) 酰胺,
- [0752] $N \epsilon 20 \{2-(2-\{2-[2-(2-[4- \text{羧基}-4-(17- \text{羧基}-十七烷酰基氨基)} \text{丁酰基氨基}] \text{乙氧基}\} \text{乙氧基}) \text{乙酰基氨基}] \text{乙氧基}\} \text{乙氧基}) \text{乙酰基}\}-(\text{Aib8, Lys20, Glu22, Arg26, Glu30})\text{GLP-1 (7-33) 酰胺},$
- [0753] [Glu22, Arg26]GLP-1 (7-33) 肽,
- [0754] $N \epsilon 20 \{2-(2-\{2-[2-(2-[4- \text{羧基}-4-(17- \text{羧基}-十七烷酰基氨基)} \text{丁酰基氨基}] \text{乙氧基}\} \text{乙氧基}) \text{乙酰基氨基}] \text{乙氧基}\} \text{乙氧基}) \text{乙酰基}\}-(\text{Aib8, Lys20, Glu22, Val25, Arg26, Glu30})\text{GLP-1 (7-33) 酰胺}, \text{和}$
- [0755] [Glu22, Val25, Arg26]GLP-1 (7-32) 酰胺。
- [0756] 106. 一种提高 GLP-1 类似物或其衍生物在患者中的作用时间的方法, 特征在于修饰的 GLP-1 序列 7-35 (SEQ ID NO :1) 如在前述实施方式的任一项中公开的衍生化或聚乙二醇化。
- [0757] 107. 一种提高 GLP-1 类似物或其衍生物在患者中的作用时间到超过约 40 小时的方法, 特征在于修饰的 GLP-1 序列 7-37 (SEQ ID NO :1) 如在前述实施方式的任一项中公开的衍生化或聚乙二醇化。
- [0758] 108. 一种包含根据实施方式 1-107 的任一项的 GLP-1 类似物或其衍生物和药学上可接受的赋形剂的药物组合物。
- [0759] 109. 根据实施方式 109 的药物组合物, 其适合于胃肠外施用。
- [0760] 110. 根据实施方式 1-107 的任一项的 GLP-1 类似物或其衍生物用于药物的制备的用途。
- [0761] 111. 根据实施方式 1-107 的任一项的 GLP-1 类似物或其衍生物用于制备用于高血糖、2 型糖尿病、损害的葡萄糖耐受、1 型糖尿病、肥胖、高血压、综合征 X、血脂异常、认知障碍、动脉粥样硬化、心肌梗塞、冠心病和其他心血管病症、中风、炎性肠综合征、消化不良和胃溃疡的治疗或预防的药物的用途。
- [0762] 112. 根据实施方式 1-107 的任一项的 GLP-1 类似物或其衍生物用于制备用于延缓或防止 2 型糖尿病中的疾病发展的药物的用途。
- [0763] 113. 根据实施方式 1-107 的任一项的 GLP-1 类似物或其衍生物的用途, 用于制备降低食物摄取、降低 β -细胞细胞凋亡、提高 β -细胞功能和 β -细胞群集, 和 / 或恢复对 β -细胞的葡萄糖敏感性的药物。
- [0764] 114. 根据权利要求 1-107 的任一项的 GLP-1 类似物或其衍生物, 其用于高血糖、2 型糖尿病、损害的葡萄糖耐受、1 型糖尿病、肥胖、高血压、综合征 X、血脂异常、认知障碍、动脉粥样硬化、心肌梗塞、冠心病和其他心血管病症、中风、炎性肠综合征、消化不良和胃溃疡

的治疗或预防。

[0765] 在此引用的所有的参考文献,包括公开物、专利申请和专利通过引用合并在此,到达如同每个参考文献被单独地和特别地指明通过引用合并、以及在此完全地阐述的程度。

[0766] 所有标题和副标题在此仅为了方便而使用,无论如何不应看作是限制本发明。

[0767] 上文描述的元素的所有其可能的变体的任何组合被本发明涵盖,除非在此另有陈述或明显与上下文矛盾。

[0768] 如用于描述本发明的上下文中术语“一”以及“该”和类似对象的使用被认为是覆盖了单数和复数,除非在此另有陈述或与上下文明显抵触。

[0769] 此处的数值范围的叙述仅仅意图充当单独指落于该范围的每个独立的值的简便方法,除非在此另有陈述,每个独立的值被合并到说明书中,如同它在此单独地叙述。除非另有说明,在此提供的所有确切数值是相应的近似值的表示(例如,对于特定因素或度量来说提供的的所有确切示范性数值被认为还提供了相应的大略的度量,在合适时由“约”来修饰)。

[0770] 此处描述的所有方法按照任何适合的顺序进行,除非在此另有陈述或与上下文明显抵触。

[0771] 在此提供的任何和所有实例、或示范性的措辞(如,“例如”)的使用,仅仅意图更好地说明本发明,不构成对本发明的范围的限制,除非另有陈述。在说明书中的用语不应被看作表示任何元素对于本发明的实践是必需的,除非也明确地声明了。

[0772] 此处专利文件的引用和合并仅是为了方便而进行的,不反映这些专利文件的有效性、可专利性和/或可实施性的任何评论。

[0773] 对于单个元素或复数个元素使用术语如“包含”、“具有”、“包括”或“含有”的本发明的任何方面或实施方式的在此的描述,是意图提供对“由……组成”、“基本上由……组成”或“基本上包含”所述特定单个元素或复数个元素的本发明的类似方面或实施方式的支持,除非另有说明或与上下文明显地抵触(例如,在此描述的制剂包含特定元素应当被理解为还描述了制剂由该元素组成,除非另有说明或与上下文明显地抵触)。

[0774] 本发明以适用的法律所允许的最大的程度包括在此呈现的方面或权利要求中引述的主题的所有修改体和等价物。

[0775] 在以下代表性的方法和实施例中进一步说明本发明,然而,无论如何其不意味着限制本发明的范围。

[0776] 在上述描述和以下实施例中公开的特征可以单独地或以其任何组合地是用于以其各种形式实现本发明的材料。

实施例

[0777] 使用的缩写:

[0778] r. t : 室温

[0779] DIPEA : 二异丙基乙胺

[0780] H₂O : 水

[0781] CH₃CN : 乙腈

[0782]	DMF :	NN 二甲基甲酰胺
[0783]	HBTU :	2-(1H- 苯并三唑 -1- 基)-1,1,3,3 四甲基脒鎓六氟磷酸盐
[0784]	Fmoc :	9H- 芴 -9- 基甲氧羰基
[0785]	Boc :	叔丁氧基羰基
[0786]	OtBu :	叔丁酯
[0787]	tBu :	叔丁基
[0788]	Trt :	三苯甲基
[0789]	Pmc :	2,2,5,7,8- 五甲基 - 色满 -6- 磺酰基
[0790]	Dde :	1-(4,4- 二甲基 -2,6- 二氧化环亚己基) 乙基
[0791]	ivDde :	1-(4,4- 二甲基 -2,6- 二氧化环亚己基)-3- 甲基丁基
[0792]	Mtt :	4- 甲基三苯甲基
[0793]	Mmt :	4- 甲氧基三苯甲基
[0794]	DCM :	二氯甲烷
[0795]	TIS :	三异丙基硅烷)
[0796]	TFA :	三氟乙酸
[0797]	Et ₂ O :	二乙醚
[0798]	NMP :	1- 甲基 - 吡咯烷 -2- 酮
[0799]	DIPEA :	二异丙基乙胺
[0800]	HOAt :	1- 羟基 -7- 氮杂苯并三唑
[0801]	HOBt :	1- 羟基苯并三唑
[0802]	DIC :	二异丙基碳二亚胺
[0803]	DBU :	1,8- 二氮杂环 -[5,4,0] 十一烯 -7
[0804]	MW :	分子量
[0805]	A :树脂结合的肽的合成	
[0806]	SPPS 方法 A	

[0807] 保护的肽基树脂根据 Fmoc 策略利用厂家提供的 FastMoc UV 方案以 0.25mmol 或 1.0mmol 规模在 Applied Biosystems 433 肽合成仪上合成, 所述方案采用了 HBTU(2-(1H- 苯并三唑 -1- 基)-1,1,3,3 四甲基脒鎓六氟磷酸盐) 或 HATU(0-(7- 氮杂苯并三唑 -1- 基)-1,1,3,3- 四甲基脒鎓六氟磷酸盐) 介导的 NMP(N- 甲基吡咯烷酮) 中的偶联, 以及 Fmoc 保护基团的脱保护的 UV 监测。用于肽酰胺合成的起始树脂是 Rink- 酰胺树脂, Wang 或氯三苯甲基树脂用于具有羧基 C- 末端的肽。使用的保护的氨基酸衍生物是在适合于 ABI433A 合成仪的预先称重的柱体上提供的标准的 Fmoc- 氨基酸(由, 例如 Anaspec 或 Novabiochem 提供), 除了非天然氨基酸例如 Fmoc-Aib-OH(Fmoc- 氨基异丁酸) 之外。N 末端氨基酸是在 α 氨基基团 Boc 保护的(例如, Boc-His(Boc)OH 用于在 N- 末端具有 His 的肽)。在位置 26 的赖氨酸的 ϵ 氨基基团用 Mtt、Mmt、Dde、ivDde 或 Boc 保护, 取决于白蛋白结合部分和间隔区的附着的途径。在某些情况下肽的合成可以通过使用在二肽酰胺键上用可以在酸性条件下被裂解的基团, 例如但不限于 2-Fmoc- 氧 -4- 甲氧苯甲基或 2,4,6- 三甲氧基苯甲基保护的二肽来改进。在肽中存在丝氨酸或苏氨酸的情况下, 可以使用伪脯氨酸二肽。(参见, 例如 Novobiochem 2002/2003 或新版本的目录, 或 W. R. Sampson(1999),

J. Pep. Sci. 5, 403。

[0808] SPSS 方法 B:

[0809] 肽合成的一种可选择的方法 (方法 B) 是在基于微波的 Liberty 肽合成仪 (CEM Corp., North Carolina) 上通过 Fmoc 化学作用。树脂是具有 0.24mmol/g 的载荷的 Tentagel S RAM。偶联化学作用是 NMP 中的 DIC/HOAt, 利用 NMP 中 0.3M 的氨基酸溶液和 8-10 倍的摩尔过量。偶联条件是在高达 70°C 5 分钟。脱保护在高达 70°C 下利用在 NMP 中的 5% 哌啶。当赖氨酸侧链的化学修饰是期望的时, 赖氨酸作为 Lys(Mtt) 来掺入。Mtt 基团通过将树脂悬浮在纯净的六氟异丙醇 20 分钟, 随后用 DCM 和 NMP 洗涤来除去。赖氨酸的化学修饰通过人工合成或通过在 Liberty 上一种或更多种自动化步骤然后人工偶联来进行。肽合成的另一种方法是通过利用 HBTU 偶联的在 ABI433 上的 Fmoc 化学作用。在合成之后, 树脂用 DCM 洗涤并干燥, 通过 TFA/TIS/水 (92.5/5/2.5) 处理 2 小时, 然后用二乙醚沉淀来从树脂上裂解肽。肽在 30% 乙酸或类似的溶剂中重新溶解, 在 C18 柱上利用乙腈/TFA 通过标准的 RP-HPLC 来纯化。肽的身份通过 MALDI-MS 确认。

[0810] SPSS 方法 C

[0811] 保护的肽基树脂利用制造商提供的方案根据 Fmoc 策略在 Advanced ChemTech 合成仪 (APEX 348) 上合成, 0.25mmol 规模, 其采用 NMP (N-甲基吡咯烷酮) 中 DIC (二环己基碳二亚胺) 和 HOBt (1-羟基苯并三唑) 介导的偶联。用于肽酰胺合成的起始树脂是 Rink-酰胺树脂, Wang 或氯三苯甲基树脂用于具有羧基 C-末端的肽。使用的保护的氨基酸衍生物是标准的 Fmoc-氨基酸 (由例如 Anaspec 或 Novabiochem 提供)。N 末端氨基酸是在 α 氨基基团 Boc 保护的 (例如, Boc-His(Boc)OH 用于在 N-末端具有 His 的肽)。在位置 26 的赖氨酸的 ϵ 氨基基团用 Mtt、Mmt、Dde、ivDde 或 Boc 保护, 取决于白蛋白结合部分和间隔区的附着的途径。肽的合成在某些情况下可以通过使用二肽来改进, 例如, 来自 Novabiochem 的伪脯氨酸, Fmoc-Ser(tbu)- Ψ Ser(Me, Me)-OH, 参见, 例如, Novobiochem 2002/2003 或更新版本的目录, 或 W. R. Sampson (1999), J. Pep. Sci. 5, 403

[0812] 除去 ivDde 或 Dde 保护的过程

[0813] 树脂 (0.25mmol) 置于人工摇动器/过滤装置中, 用 N-甲基吡咯烷酮中的 2% 胍处理 (20ml, 2x 12 分钟) 来除去 Dde 或 ivDde 基团, 用 N-甲基吡咯烷酮洗涤 (4x20ml)。

[0814] 除去 Mtt 或 Mmt- 保护的过程

[0815] 树脂 (0.25mmol) 置于人工摇动器/过滤装置中, 用 DCM 中的 2% TFA 和 2-3% TIS 处理 (20ml, 5-10 分钟重复 6-12 次) 来除去 Mtt 或 Mmt 基团, 用 DCM (2x20ml)、DCM 中的 10% MeOH 和 5% DIPEA (2x20ml) 和 N-甲基吡咯烷酮 (4x20ml) 洗涤。

[0816] 除去 Mtt 保护的可选择的过程:

[0817] 树脂置于注射器中, 用六氟异丙醇处理 2x10 分钟来除去 Mtt 基团。树脂然后如上所述用 DCM 和 NMP 洗涤。

[0818] 用于侧链向赖氨酸残基的附着的过程

[0819] 白蛋白结合残基 (式 I 的 B-U- 侧链) 可以通过利用标准的酰化试剂例如但不限于 DIC、HOBt/DIC、HOAt/DIC 或 HBTU 酰化到树脂结合的肽、或在溶液中酰化到未保护的肽来附着到肽上。

[0820] 附着到树脂结合的肽:

[0821] 途径 I

[0822] 式 (I) 的活化的 (活性酯或对称的酸酐) 白蛋白结合残基 (A-B)-侧链, 例如十八烷基二酸单-(2,5-二氧化代-吡咯烷-1-基) 酯 (Ebashi et al. EP511600, 相对于树脂结合的肽 4 摩尔当量) 溶于 NMP (25mL) 中, 添加到树脂在室温下摇动过夜。过滤反应混合物, 树脂用 NMP、二氯甲烷、2-丙醇、甲醇和二乙醚广泛地洗涤。

[0823] 途径 II

[0824] 白蛋白结合残基 (式 I 的 A-(B)-侧链) 溶于 N-甲基吡咯烷酮 / 二氯甲烷 (1 : 1, 10ml) 中。添加活化试剂例如羟基苯并三唑 (HOBt) (相对于树脂 4 摩尔当量) 和二异丙基碳二亚胺 (相对于树脂 4 倍摩尔当量), 搅动溶液 15 分钟。溶液添加到树脂中, 添加二异丙基乙胺 (相对于树脂 4 摩尔当量)。树脂在室温下摇动 2 到 24 小时。树脂用 N-甲基吡咯烷酮 (2x20ml)、N-甲基吡咯烷酮 / 二氯甲烷 (1 : 1) (2x20ml) 和二氯甲烷 (2x20ml) 洗涤。

[0825] 途径 III

[0826] 活化的 (活性酯或对称的酸酐) 白蛋白结合残基 (式 I 的 A-B 侧链) 例如十八烷基二酸单-(2,5-二氧化代-吡咯烷-1-基) 酯 (Ebashi et al. EP511600, 相对于肽 1-1.5 摩尔当量) 溶于有机溶剂例如乙腈、THF、DMF、DMSO 或水 / 有机溶剂的混合物中 (1-2mL), 与 10 摩尔当量的 DIPEA 一起添加到肽在水中 (10-20mL) 的溶液中。对于白蛋白结合残基上的保护基团, 例如叔丁基来说, 反应混合物被冻干 0/N, 并且分离的粗肽此后脱保护-在叔-丁基基团的情况下肽溶于三氟乙酸、水和三异丙基硅烷 (90 : 5 : 5) 的混合物中。在 30 分钟后, 混合物在真空中蒸发, 最后的肽通过制备型 HPLC 纯化。

[0827] 除去 Fmoc 保护的过程: 树脂 (0.25mmol) 置于人工摇动器的滤瓶中, 用 N-甲基吡咯烷酮 / 二氯甲烷 (1 : 1) 处理 (2x20ml) 和用 N-甲基吡咯烷酮 (1x20ml), N-甲基吡咯烷酮中 20% 哌啶的溶液 (3x20ml, 各 10 分钟) 处理。树脂用 N-甲基吡咯烷酮 (2x20ml)、N-甲基吡咯烷酮 / 二氯甲烷 (1 : 1) (2x20ml) 和二氯甲烷 (2x20ml) 洗涤。

[0828] 肽裂解下树脂的操作:

[0829] 通过与三氟乙酸、水和三异丙基硅烷 (95 : 2.5 : 2.5 到 92 : 4 : 4) 的混合物在室温下搅动 180 分钟, 从树脂上裂解肽。过滤裂解混合物, 滤液通过氮气流浓缩成油。粗肽用 45mL 二乙醚从这种油中沉淀, 用 45mL 二乙醚洗涤 1 到 3 次。

[0830] 纯化: 粗肽通过半制备型 HPLC 在装填了 5 μ 或 7 μ C-18 硅石的 20mm x 250mm 柱上纯化。取决于肽, 使用一个或两个纯化系统。

[0831] TFA: 在干燥之后, 粗肽溶于 5ml 50% 乙酸 H₂O 中, 用 H₂O 稀释到 20ml, 注射到柱上, 其然后用 0.1% TFA 中 40-60% CH₃CN 的梯度 10ml/分钟在 40°C 在 50 分钟期间洗脱。收集含有肽的级分。纯化的肽在用水稀释洗脱物之后冻干。

[0832] 硫酸铵: 柱用 0.05M(NH₄)₂SO₄ 中的 40% CH₃CN 平衡, 其用浓缩的 H₂SO₄ 调节到 pH 2.5。在干燥之后, 粗肽溶于 5ml 50% 乙酸 H₂O 中, 用 H₂O 稀释到 20ml, 注射到柱上, 其然后用 0.05M(NH₄)₂SO₄、pH 2.5 中 40%-60% CH₃CN 的梯度 10ml/分钟在 40°C 在 50 分钟期间洗脱。采集含有肽的级分, 用 3 倍体积的 H₂O 稀释, 通过用 0.1% TFA 平衡的 Sep-**Pak®** C18 柱 (Waters part#51910)。然后用含有 70% CH₃CN 的 0.1% TFA 洗脱, 纯化的肽通过在用水稀释洗脱物之后的冻干法来分离。

[0833] 获得的最终产物通过分析性 RP-HPLC (滞留时间) 和通过 LCMS 来表征。

[0834] RP-HPLC 分析可以使用 214nm 处的 UV 检测、以及例如, Vydac218TP544.6mm x 250mm 5 μ C-18 硅石柱 (The Separations Group, Hesperia, USA) 和在 42°C 在例如 1ml/ 分钟洗脱来进行。最常使用以下特定条件的一种:

[0835] 方法 03_A1_1

[0836] HPLC(方法 03_A1_1): 利用装备有 Waters 996 二极管阵列检测器的 Waters 2690 系统进行 RP 分析。UV 检测在在 42°C 以 1ml/ 分钟洗脱的 218TP544.6mm x 250mm 5 μ C-18 硅石柱 (The Separations Group, Hesperia) 上, 在 214、254、276 和 301nm 处采集。柱用 10% 的 0.5M 硫酸铵平衡, 其用 4M 硫酸调节到 pH 2.5。在注射之后, 样品通过在相同的水性缓冲液中 0% 到 60% 乙腈的梯度在 50 分钟期间洗脱。

[0837] 方法 03_B1_2

[0838] HPLC(方法 03_B1_2): 利用装备有 Waters 996 二极管阵列检测器的 Waters 2690 系统进行 RP 分析。UV 检测在在 42°C 以 0.5ml/ 分钟洗脱的 Zorbax 300SB C-18 (4,5x150mm, 5 μ) 上, 在 214、254、276 和 301nm 处采集。柱用 TFA 在水中的水溶液 (0.1%) 平衡。在注射之后, 样品通过在 TFA 在水中的水溶液 (0.1%) 中 0% 到 60% 乙腈 (+0.1% TFA) 的梯度在 50 分钟内洗脱。

[0839] 方法 02_B1_1

[0840] HPLC(方法 02_B1_1): 利用装备有 Waters 2487 双波带检测器的 Alliance Waters 2695 系统进行 RP 分析。214nm 和 254nm 处的 UV 检测利用 Vydac 218TP53, C18, **300Å**, 5 μ m, 3.2mm x 250mm 柱, 42°C 来采集。以 0.50ml/ 分钟的流速, 用水中 0-60% 乙腈、95-35% 水和 5% 三氟乙酸 (1.0%) 的线性梯度在 50 分钟内洗脱。

[0841] 方法 01_B4_2

[0842] HPLC(方法 01_B4_2): 利用装备有 Waters 996 二极管阵列检测器的 Waters 600S 系统进行 RP 分析。214nm、254nm 处的 UV 检测使用 Symmetry300C18, 5 μ m, 3.9mm x 150mm, 42°C 采集。用水中 5-95% 乙腈、90-0% 水和 5% 三氟乙酸 (1.0%) 的线性梯度以 1.0 分钟 / 分钟的流速在 15 分钟内洗脱。

[0843] 方法 02_B4_4

[0844] HPLC(方法 02_B4_4): 利用装备有 Waters 2487 双波带检测器的 Alliance Waters 2695 系统进行 RP 分析。214nm、254nm 处的 UV 检测使用 Symmetry300C18, 5 μ m, 3.9mm x 150mm, 42°C 采集。用水中 5-95% 乙腈、90-0% 水和 5% 三氟乙酸 (1.0%) 的线性梯度以 1.0 分钟 / 分钟的流速在 15 分钟内洗脱。

[0845] 方法 02_B6_1

[0846] HPLC(方法 02_B6_1): 利用装备有 Waters 2487 双波带检测器的 Alliance Waters 2695 系统进行 RP 分析。214nm 和 254nm 处的 UV 检测利用 Vydac 218TP53, C18, **300Å**, 5 μ m, 3.2mm x 250mm 柱, 42°C 来采集。以 0.50ml/ 分钟的流速, 用水中 0-90% 乙腈、95-5% 水和 5% 三氟乙酸 (1.0%) 的线性梯度在 50 分钟内洗脱。

[0847] 方法 03_B6_1

[0848] HPLC(方法 03_B1_1): 利用装备有 Waters 996 二极管阵列检测器的 Waters 2690 系统进行 RP 分析。UV 检测在 218TP544.6mm x 250mm 5 μ C-18 硅石柱 (The Separations Group, Hesperia) 上, 在 214、254、276 和 301nm 处采集, 其在 42°C 以 1ml/ 分钟洗脱。柱用

水中 TFA 的水溶液 (0.1%) 中 5% 乙腈 (+0.1% TFA) 来平衡。在注射之后,样品通过在 TFA 在水中的水溶液 (0.1%) 中 0% 到 90% 乙腈 (+0.1% TFA) 的梯度在 50 分钟内洗脱。

[0849] HPLC(方法 I_BDSB2):

[0850] 缓冲液 A:10mM tris,15mM(NH₄)₂SO₄, pH 值用 4N H₂SO₄ 调节到 7.3,20% v/v 乙腈

[0851] 缓冲液 B:80% v/v 乙腈

[0852] 流速:1.0ml/min

[0853] 梯度:0-20 分钟 10-50% B

[0854] 柱:Phenomenex, Jupiter 4.6mm x 150mm, C4,5 μ, **300 Å**

[0855] 柱温度:40℃.

[0856] 做为选择,可以如上述的进行制备梯度洗脱,其中洗脱化合物的乙腈的百分比是标注的。通过 MALDI 鉴定身份。

[0857] 使用以下设备:

[0858] LCMS 在由 Sciex API 100Single quadropole 质谱仪、Perkin ElmerSeries 200Quard泵、Perkin Elmer Series 200 自动进样器、AppliedBiosystems 785A UV检测器、Sedex 75 蒸发光散射检测器组成的装备上进行。

[0859] 仪器控制和数据获取通过在 Windows 2000 计算机上的 SciexSample 控制软件进行。

[0860] HPLC 泵连接到含有以下的两个洗脱液贮备池:

[0861] A:水中 0.05%三氟乙酸

[0862] B:乙腈中 0.05%三氟乙酸

[0863] 分析在室温下通过在柱上注射合适体积的样品(优选的 20 μ l)来进行,所述柱用乙腈梯度来洗脱。

[0864] 使用的 HPLC 条件、检测器设置和质谱仪设置在下表中给出。

[0865] 柱:Waters Xterra MS C-18X 3mm id 5 μ m

[0866] 梯度:以 1.5ml/ 分钟在 7.5 分钟期间 5% -90%乙腈线性

[0867] 检测:210nm(来自 DAD 的模拟输出)

[0868] ELS(来自 ELS 的模拟输出),40℃

[0869] MS 电离作用方式 API-ES

[0870] 做为选择,LCMS 在由 Hewlett Packard 系列 1100G 1312A BinPump、Hewlett Packard 系列 1100Column compartment、Hewlett Packard 系列 1100G1315A DAD 二极管阵列检测器、Hewlett Packard 系列 1100MSD 和 Sedex 75 蒸发光散射检测器组成的、由 HP Chemstation 软件控制的装备上进行。HPLC 泵连接到含有以下的两个洗脱液贮备池:

[0871] A:水中的 10mM NH₄OH

[0872] B:90%乙腈中的 10mM NH₄OH

[0873] 分析在 23℃下通过在柱上注射合适体积的样品(优选的 20 μ l)来进行,所述柱用 A 和 B 的梯度来洗脱。

[0874] 使用的 HPLC 条件、检测器设置和质谱仪设置在下表中给出。

[0875] 柱 Waters Xterra MS C-18X 3mm id 5 μ m

[0876] 梯度以 1.5ml/ 分钟在 6.5 分钟期间 5% -100%乙腈

[0877] 检测 210nm(来自 DAD 的模拟输出)

[0878] ELS(来自 ELS 的模拟输出)

[0879] MS 电离作用方式 API-ES。扫描 100-1000amu 步进 0.1amu

[0880] MALDI-MS;

[0881] 肽的分子量利用基质辅助的激光解吸飞行时间质谱法(MALDI-MS)来测定,记录在 Microflex(Bruker)上。使用 α -氰-4-羟基肉桂酸的基质。

[0882] 分析 HPLC 条件(方法 I);

[0883] 用 0.1 % TFA/H₂O 平衡柱(Xterra TM MS C18,5um,4,6x 150mm 柱,P7N 186000490),在 25 分钟期间通过 0% CH₃CN/0.1% TFA/H₂O 到 60% CH₃CN/0.1% TFA/H₂O 的梯度、随后在 5 分钟期间从 60%到 100%的梯度洗脱。

[0884] 在本发明的实例中,命名和结构图是指:

[0885] 对天然的氨基酸使用单字母符号,例如,H 是 L-组氨酸、A 是 L-丙氨酸,等等。氨基酸的三字母缩写也可以使用,例如 His 是 L-组氨酸、Ala 是 L-丙氨酸,等等。对于非天然的氨基酸,使用三字母缩写,例如, Aib 是氨基异丁酸。氨基酸的位置可以用氨基酸符号之后的上标数字来表示,例如 Lys³³ 或 Lys33。N-末端氨基基团可以表示为 NH₂ 或 H。C-末端羧基可以表示为 -OH 或 -COOH。C-末端酰胺基标记为 -NH₂。

[0886] 亚结构

[0887]



[0888] 都是指 His-Aib-Glu-Gly-Thr-Phe。

[0889] 赖氨酸的 ϵ 氨基基团可以用希腊符号 ϵ 或拼写的 "epsilon" 来描述。

[0890] 以下实施例中的结构在一些情况下是组合了氨基异丁酸的三字母缩写 Aib 的天然氨基酸的单字母符号的组合。在某些情况下,一些氨基酸以展开的完整结构显示。因而被衍生化的赖氨酸可以显示为实施例 2 中的展开的完整结构,其中在位置 20 的赖氨酸是展开的。位置 19 的酪氨酸和位置 20 的展开的赖氨酸之间的氮(具有标明的 H)因而是连接实施例 2 中两个氨基酸的肽键的氮。

[0891] 根据上文的过程,以下衍生物作为本发明的非限制性实例被制备:

[0892] 实施例 1

[0893] [Glu22, Arg26]GLP-1(7-33) 酰胺

[0894] H-H A E G T F T S D V S S Y L E E Q A A R E F I A W L V-NH₂

[0895] 制备方法:B

[0896] 肽在 64%乙腈下洗脱。

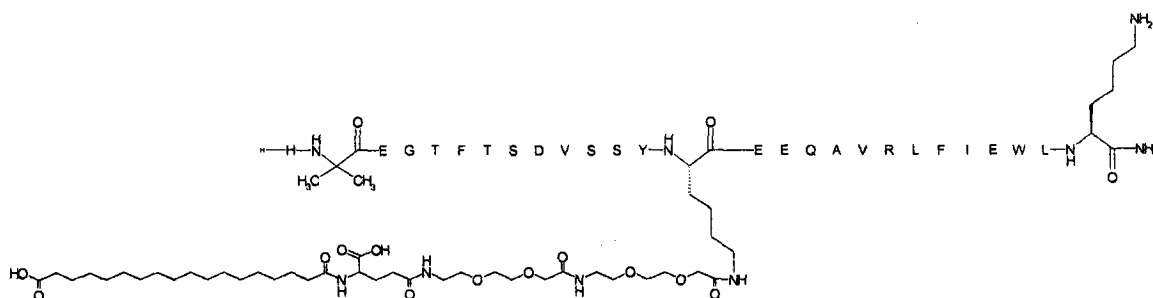
[0897] 通过 MALDI-MS 确认结构

[0898] 计算的 MW = 3056.4

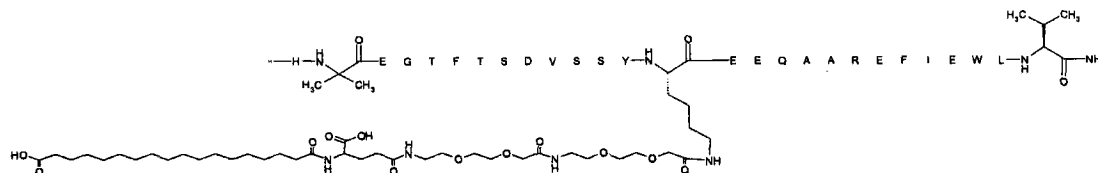
[0899] 实施例 2

[0900] N ϵ 20 {2-(2-{2-[2-(2-{2-[4-羧基-4-(17-羧基-十七烷酰基氨基)丁酰基氨基]乙氧基}乙氧基)乙酰基氨基]乙氧基}乙氧基)乙酰基}-(Aib8, Lys20, Glu22,

[0901]



[0909]



[0922] 计算的 $MW = 3084.4$

[0923] 实施例 5

[0924] [Aib8, Lys20, Glu22, Val25, Arg26, Glu30]GLP-1 (7-33) 酰胺

[0925]



[0926] 制备方法 :B

[0927] 肽在 60% 乙腈下洗脱。

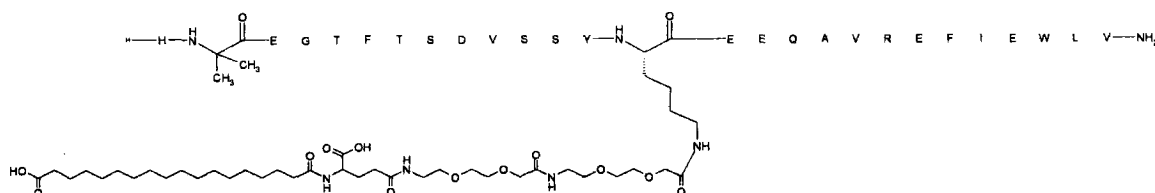
[0928] 通过 MALDI-MS 确认结构

[0929] 计算的 MW = 3171.5

[0930] 实施例 6

[0931] N ε 20 {2-(2-{2-[2-(2-{2-[4- 羧基 -4-(17- 羧基 - 十七烷酰基氨基) 丁酰基氨基] 乙氧基} 乙氧基) 乙酰基氨基] 乙氧基} 乙氧基) 乙酰基}-[Aib8, Lys20, Glu22, Val25, Arg26, Glu30]GLP-1 (7-33) 酰胺

[0932]



[0933] 制备方法 :B

[0934] 肽在 70% 乙腈下洗脱。

[0935] 通过 MALDI-MS 确认结构

[0936] 计算的 MW = 3887.4

[0937] 实施例 7

[0938] [Glu22, Arg26]GLP-1 (7-33) 肽

[0939] H-H A E G T F T S D V S S Y L E E Q A A R E F I A W L V-OH

[0940] 制备方法 :A

[0941] HPLC(方法 B6) :

[0942] RT = 28.09min

[0943] LCMS :m/z = 1020 (M+3H)³⁺

[0944] 计算的 MW = 3057.3

[0945] 实施例 8

[0946] [Glu22, Val25, Arg26]GLP-1 (7-32) 酰胺

[0947] NH₂-H A E G T F T S D V S S Y L E E Q A V R E F I A W L-NH₂

[0948] 制备方法 :A

[0949] HPLC(方法 03_A1_1)

[0950] RT = 41.9min

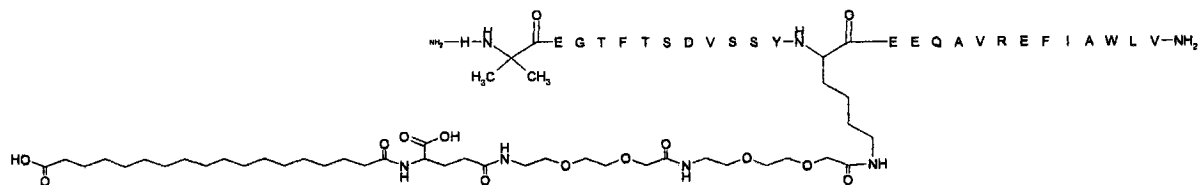
[0951] LCMS :m/z = 996.0 (M+3H)³⁺

[0952] 计算的 MW = 2985.3

[0953] 实施例 9

[0954] N-ε-20 {2-(2-{2-[2-(2-{2-[4-羧基-4-(17-羧基-十七烷酰基氨基)丁酰基氨基]乙氧基}乙氧基)乙酰基氨基]乙氧基}乙氧基)乙酰基)-(Aib8, Lys20, Glu22, Arg26)GLP-1(7-33)酰胺

[0955]



[0956] 制备方法:方法 C,除了使用 8-10 倍摩尔过量的氨基酸、DIC 和 HOAt/HOBt(1 : 1) 在来自 Advanced Chemtech 的 Apex396 上制备肽, Mtt 基团用六氟异丙醇脱保护。最终产物通过分析性 HPLC 和 LC-MS 来表征。

[0957] HPLC(方法 02_B6_1) :

[0958] RT = 34.31min

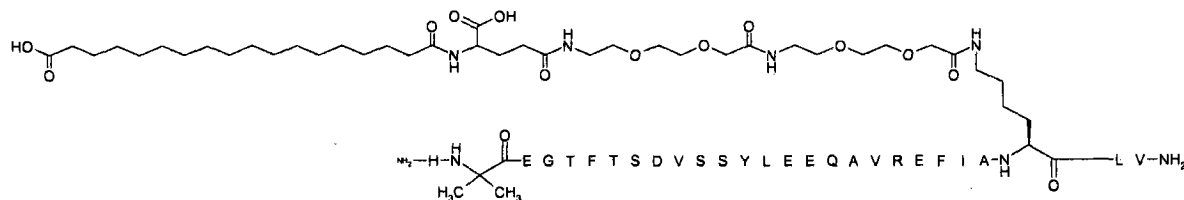
[0959] LCMS :m/z = 1277 (M+3H)³⁺

[0960] 计算的 MW = 3831

[0961] 实施例 10

[0962] N-ε-31 {2-(2-{2-[2-(2-{2-[4-羧基-4-(17-羧基-十七烷酰基氨基)丁酰基氨基]乙氧基}乙氧基)乙酰基氨基]乙氧基}乙氧基)乙酰基)-(Aib8, Glu22, Val25, Arg26, Lys31)GLP-1(7-33)酰胺

[0963]



[0964] 制备方法:方法 C,除了使用 8-10 倍摩尔过量的氨基酸、DIC 和 HOAt/HOBt(1 : 1) 在来自 Advanced Chemtech 的 Apex396 上制备肽, Mtt 基团用六氟异丙醇脱保护。最终产物通过分析性 HPLC 和 LC-MS 来表征。

[0965] HPLC(方法 02_B6_1) :

[0966] RT = 34.02min

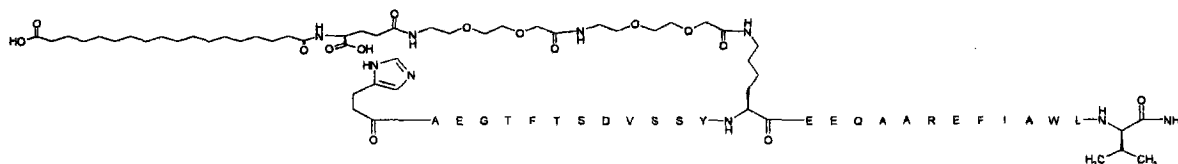
[0967] LCMS :m/z = 1253 (M+3H)³⁺

[0968] 计算的 MW = 3759

[0969] 实施例 11

[0970] N-ε-20 {2-(2-{2-[2-(2-{2-[4-羧基-4-(17-羧基-十七烷酰基氨基)丁酰基氨基]乙氧基}乙氧基)乙酰基氨基]乙氧基}乙氧基)乙酰基)-(去氨基 His7, Lys20, Glu22, Arg26)GLP-1(7-33)酰胺

[0971]



[0972] 制备方法:方法 C,除了使用 8-10 倍摩尔过量的氨基酸、DIC 和 HOAt/HOBt (1 : 1) 在来自 Advanced Chemtech 的 Apex396 上制备肽, Mtt 基团用六氟异丙醇脱保护。最终产物通过分析性 HPLC 和 LC-MS 来表征。

[0973] HPLC(方法 02_B6_1):

[0974] RT = 33.3min

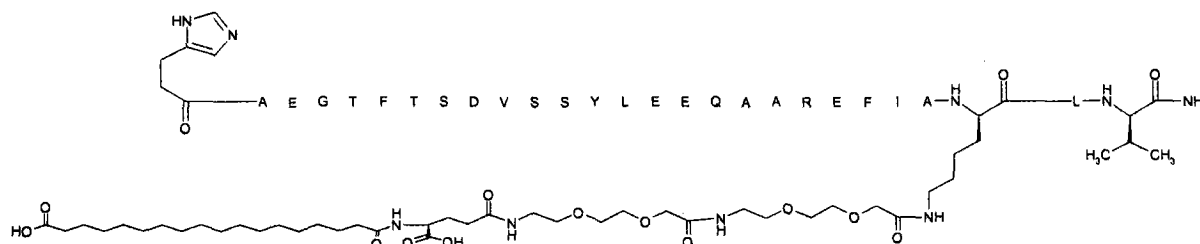
[0975] LCMS :m/z = 1257.7 (M+3H)³⁺

[0976] 计算的 MW = 3773

[0977] 实施例 12

[0978] N-ε 31 {2-(2-{2-[2-(2-{2-[4-羧基-4-(17-羧基-十七烷酰基氨基)丁酰基氨基]乙氧基}乙氧基)乙酰基氨基]乙氧基}乙氧基)乙酰基}-(去氨基 His7, Glu22, Arg26, Lys31)GLP-1 (7-33) 酰胺

[0979]



[0980] 制备方法:方法 C,除了使用 8-10 倍摩尔过量的氨基酸、DIC 和 HOAt/HOBt (1 : 1) 在来自 Advanced Chemtech 的 Apex396 上制备肽, Mtt 基团用六氟异丙醇脱保护。最终产物通过分析性 HPLC 和 LC-MS 来表征。

[0981] HPLC(方法 02_B6_1):

[0982] RT = 33.2min

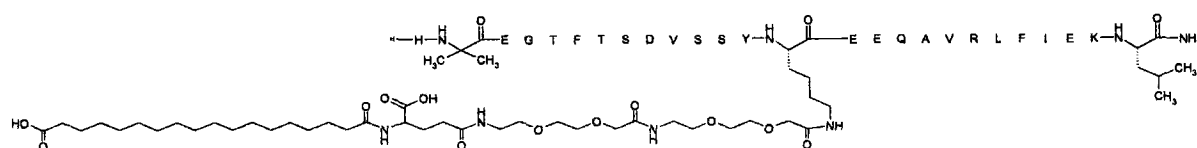
[0983] LCMS :m/z = 1233.9 (M+3H)³⁺

[0984] 计算的 MW = 3699

[0985] 实施例 13

[0986] N-ε -20 {2-(2-{2-[2-(2-{2-[4-羧基-4-(17-羧基-十七烷酰基氨基)丁酰基氨基]乙氧基}乙氧基)乙酰基氨基]乙氧基}乙氧基)乙酰基}-(Aib8, Lys20, Glu22, Val25, Arg26, Leu27, Glu30, Lys31)GLP-1 (7-32) 酰胺

[0987]



[0988] 制备方法:方法 C,除了使用 8-10 倍摩尔过量的氨基酸、DIC 和 HOAt/HOBt(1 : 1) 在来自 Advanced Chemtech 的 Apex396 上制备肽, Mtt 基团用六氟异丙醇脱保护。最终产物通过分析性 HPLC 和 MALDI-MS 来表征。

[0989] HPLC(方法 02_B6_1):

[0990] RT = 32.6min

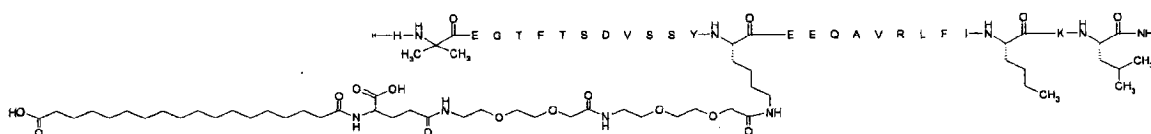
[0991] MALDI-MS :3715.5

[0992] 计算的 MW = 3714.3

[0993] 实施例 14

[0994] N-ε-20{2-(2-{2-[2-(2-{2-[4-羧基-4-(17-羧基-十七烷酰基氨基)丁酰基氨基]乙氧基}乙氧基)乙酰基氨基]乙氧基}乙氧基)乙酰基}-(Aib8, Lys20, Glu22, Val25, Arg26, Leu27, Nle30, Lys31)GLP-1(7-32)酰胺

[0995]



[0996] 制备方法:方法 C,除了使用 8-10 倍摩尔过量的氨基酸、DIC 和 HOAt/HOBt(1 : 1) 在来自 Advanced Chemtech 的 Apex396 上制备肽, Mtt 基团用六氟异丙醇脱保护。最终产物通过分析性 HPLC 和 MALDI-MS 来表征。

[0997] HPLC(Method 02_B6_1):

[0998] RT = 33min

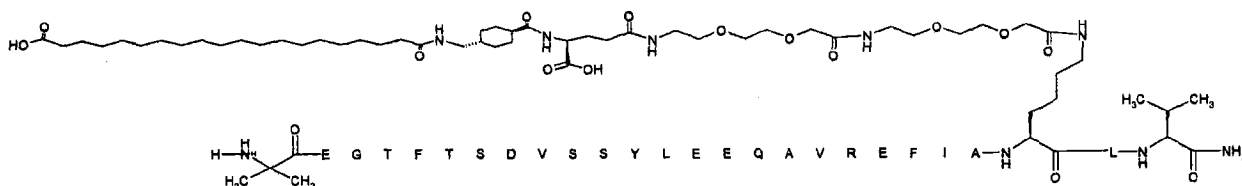
[0999] MALDI-MS :3696.9

[1000] 计算的 MW = 3698

[1001] 实施例 15

[1002] N-ε-31-[2-(2-{2-[2-(2-{2-[2-(S)-4-羧基-4-({反式-4-[(19-羧基十九烷酰基氨基)甲基]环己烷羰基}氨基)丁酰基氨基]乙氧基}乙氧基)乙酰基氨基]乙氧基}乙氧基)乙酰基]-[Aib8, Glu22, Val25, Arg26, Lys31]GLP-1-(7-33)酰胺

[1003]



[1004] 制备方法:方法 C,除了使用 8-10 倍摩尔过量的氨基酸、DIC 和 HOAt/HOBt(1 : 1) 在来自 Advanced Chemtech 的 Apex396 上制备肽, Mtt 基团用六氟异丙醇脱保护。最终产物通过分析性 HPLC 和 MALDI-MS 来表征。

[1005] HPLC(方法 02_B6_1):

[1006] RT = 39.3min

[1007] MALDI-MS :3696.9

[1008] 计算的 MW = 3698

[1009] 实施例 16

[1010] [去氨基 His7, Glu22, Arg26]-GLP-1 (7-34)

[1011]



[1012] HPLC(方法 I_BDSB2)

[1013] RT = 5.65min

[1014] LCMS :m/z = 1057.5 (M+3H)³⁺

[1015] 计算的 MW = 3170.5

[1016] 实施例 17

[1017] [Aib8, Lys20, Glu22, Val25, Arg26, Leu27, Lys31]GLP-1 (7-32) 酰胺

[1018]



[1019] 制备类似于 SPPS 方法 B。

[1020] HPLC 方法 02_B6_1 :

[1021] RT = 27.09min

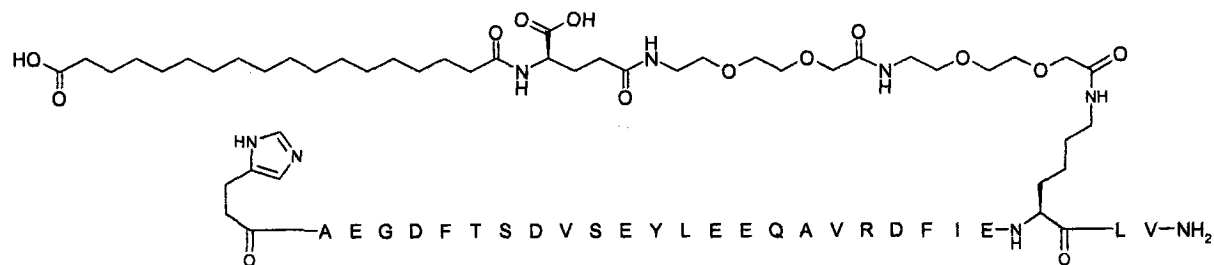
[1022] LCMS :m/z = 735 (M+4H)⁴⁺

[1023] 计算的 (M) = 2940.3

[1024] 实施例 18

[1025] N-ε 31-[2-(2-{2-[2-(2-{2-[(S)-4-羧基-4-(17-羧基十七烷酰基氨基)丁酰基氨基]乙氧基}乙氧基)乙酰基氨基]乙氧基}乙氧基)乙酰基][去氨基 His7, Asp11, Glu18, Glu22, Val25, Arg26, Asp27, Glu30, Lys31]GLP-1 (7-33)-肽酰胺

[1026]



[1027] 制备方法 B 在 ChemMatrix Rink Amide 树脂 (0.24mmol/g, 0.4g) 上。

[1028] HPLC(02B44) :Rt = 10,649min ;99.6%纯度

[1029] HPLC(03A31) :Rt = 8.491min ;94.3%纯度

[1030] MALDI-MS :α-氰-4-羟基肉桂酸 ;m/z :3824.543 (负模式)

[1031] 实施例 19

[1032] [Aib8, Glu22, Val25, Lys31]GLP-1 (7-33)-酰胺

[1033]



[1034] 制备方法:肽通过 SPPS 方法 C 来制备,最终产物通过分析性 HPLC 和 MALDI-MS 来表征。

[1035] HPLC(02-B6-1):RT = 31, 5min

[1036] HPLC(04-A3-1):RT = 8, 6min

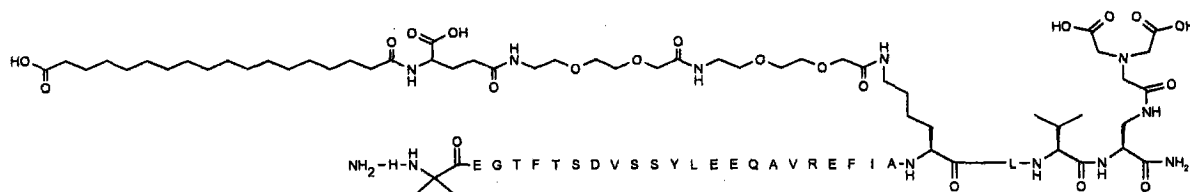
[1037] MALDI-MS:3043, 6

[1038] 计算的 MW = 3040, 4

[1039] 实施例 20

[1040] N-ε 31-{2-(2-{2-[2-(2-{2-[4-羧基-4-(17-羧基-十七烷酰基氨基)丁酰基氨基]乙氧基}乙氧基)乙酰基氨基]乙氧基}乙氧基)乙酰基}-N-beta34-(2-(二羧基甲基氨基)乙酰基)[Aib8, Glu22, Val25, Arg26, Lys31, Dap34]GLP-1 (7-34) 酰胺。

[1041]



[1042] 制备方法:肽通过 SPPS 方法 C 来制备,最终产物通过分析性 HPLC 和 MALDI-MS 来表征。

[1043] HPLC(02-B6-1):RT = 36, 7min

[1044] HPLC(A4-A3-1):RT = 8, 9min

[1045] MALDI-MS:4015, 9

[1046] 计算的 MW = 4015, 5

[1047] 生物学发现

[1048] 在 i. v. 或 s. c. 施用后 GLP-1 衍生物的延长

[1049] 本发明的许多 GLP-1 化合物的延长通过使用如下所述的方法在向健康猪 sc 施用之后监视其浓度来确定。为了比较,也可以跟踪 sc. 施用之后 GLP-1 (7-37) 在血浆中的浓度。本发明的其他 GLP-1 化合物的延长可以以同样的方法测定。

[1050] 迷你猪中 GLP-1 类似物的药物动力学测试

[1051] 测试物质溶于适合于皮下或静脉内施用的载体中。调整浓度,从而给药体积是大约 1ml。

[1052] 在来自 Ellegaard **Göttingen** Minipigs ApS 的 12 只雄性**Göttingen**迷你猪中进行研究。在动物进入研究前容许的驯化期是大约 10 天。在驯化期的开始,迷你猪约 5 月

龄, 体重范围 8-10kg。

[1053] 研究在室温设置在 21-23℃、相对湿度 $\geq 50\%$ 的适合的动物房中进行。房间被照亮, 给出 12 小时光线和 12 小时黑暗的周期。光线是从 06.00 到 18.00h。

[1054] 动物置于有稻草作为床的围栏中, 每个围栏中六只一起。

[1055] 在研究期间动物自由摄取民用质量的饮用水, 但是在给药前一天的大约下午 4 点开始禁食, 直到给药后约 12 小时。

[1056] 动物在到达时和在给药当天称重。

[1057] 动物接受单次静脉内的或皮下的注射。在颈部的右侧、离耳朵约 5-7cm、离颈部中间约 7-9cm 处给予皮下注射。用针头上的止动器给予注射, 容许 0.5cm 针头引入。

[1058] 每种测试物质给予三只动物。每个动物接受 2nmol/kg 体重的剂量。

[1059] 六只动物每周给药, 而其余六只静止。

[1060] 从每个动物获得全血浆浓度 - 时间分布。根据以下时间表采集血液样品:

[1061] 在静脉内的施用以后:

[1062] 给药前 (0)、注射后 0.17 (10 分钟)、0.5、1、2、4、6、8、12、24、48、72、96 和 120 小时。

[1063] 皮下施用之后:

[1064] 给药前 (0)、注射后 0.5、1、2、4、6、8、12、24、48、72、96 和 120 小时。

[1065] 在每个采样时间, 从每个动物抽取 2ml 血液。血液样品采自颈静脉。

[1066] 血液样品采集到含有缓冲液的试管中, 用于稳定化以免 GLP-1 化合物的酶促降解。

[1067] 血浆立即转移到 Micronic 试管。大约 200 μ l 的血浆转移到每个 Micronic 试管。血浆保存在 -20℃ 直到被分析。利用免疫分析分析血浆样品的 GLP-1 化合物含量。

[1068] 通过非区室药物动力学分析来分析血浆浓度 - 时间分布。在每个场合计算以下药物动力学参数: AUC、AUC/Dose、AUC%_{Extrap}、C_{max}、t_{max}、 λ_z 、t_{1/2}、CL、CL/f、V_z、V_z/f 和 MRT。

[1069] 选择的本发明的化合物在丹麦长白猪中测试。

[1070] GL P-1 化合物在猪中的药物动力学测试

[1071] 猪 (50% 杜洛克猪、25% 约克夏猪、25% 丹麦长白猪, 约 40kg) 在实验开始时禁食。对每只猪, 施用处于 50 μ M 等渗溶液 (5mM 磷酸盐、pH7.4, 0.02% **Tween®**-20 (Merck)、45mg/ml 甘露醇 (无热原的, Novo Nordisk) 中的 0.5nmol 测试化合物每公斤体重。从颈静脉中的导管抽取血液样品。5ml 的血液样品注入含有 175 μ l 以下溶液的钢化玻璃容器中: 0.18M EDTA、15000KIE/ml 抑酶肽 (NovoNordisk) 和 0.30mM 缬氨酸-Pyrrolidide (Novo Nordisk), pH 7.4。在 30 分钟内, 样品在 5-6000*g 离心 10 分钟。温度保持在 4℃。上清液吸移到不同的玻璃容器中, 保持在负 20℃ 待用。

[1072] 肽的血浆浓度在夹心 ELISA 中、或通过利用不同单克隆或多克隆抗体的 RIA 来测定。抗体的选择取决于 GLP-1 化合物。取决于所选择的特定 GLP-1 化合物, 达到血浆中的峰值浓度的时间在大范围内变动。

[1073] 96 孔微滴定板中夹心 ELISA 的一般分析方案

[1074] 包被缓冲液 (PBS) : 磷酸盐缓冲盐水, pH7.2

[1075] 洗涤 - 缓冲液 (PBS-wash) : 磷酸盐缓冲盐水, 0.05% v/v Tween

[1076] 20, pH 7.2

- [1077] 分析 - 缓冲液 (BSA-buffer) : 磷酸盐缓冲盐水, 10g/l 牛血清白蛋白
[1078] (Fluka 05477), 0.05% v/v Tween 20,
[1079] pH 7.2
[1080] 链霉抗生物素蛋白 - 缓冲液 磷酸盐缓冲盐水, 0.5M NaCl, 0.05%
[1081] v/v Tween 20, pH 7.2
[1082] 标准物 : 血浆 - 基质中单独的化合物
[1083] A-TNP : 无义抗体
[1084] AMDEX : 链霉抗生物素 - 辣根过氧化酶
[1085] (Amersham RPN4401V)
[1086] TMB- 底物 : 3,3',5,5' 四甲基联苯胺 (< 0.02%),
[1087] 过氧化氢
[1088] 如下进行分析 (体积 / 反应孔):
[1089] 1.) 用 100 μ l PBS- 缓冲液中 5 μ g/ml 的捕获抗体包被
[1090] • 孵育 o/n, 4°C
[1091] • 5x PBS-wash
[1092] • 在最少 30 分钟内用最后的洗涤 (last wash) 封闭
[1093] • 然后清空平板
[1094] 2.) 20 μ l 样品 + 在具有 10 μ g/ml A-TNP 的 100 μ l BSA- 缓冲液中 1 μ g/ml 的生
物素化的检测抗体
[1095] • 室温, 在摇动器上孵育 2h 5x PBS-wash, 然后清空平板
[1096] 3.) 100 μ l 的链霉抗生物素蛋白 - 缓冲液中的 AMDEX 1 : 8000
[1097] • 室温, 在摇动器上孵育 45-60 分钟
[1098] • 5x PBS-wash, 然后清空平板
[1099] 4.) 100 μ l TMB- 底物
[1100] • 在摇动器上在室温下孵育 x 分钟
[1101] • 用 100 μ l 4M H_3PO_4 终止反应
[1102] 读取 450nm 处的吸光度, 620nm 的作为参考
[1103] 样品中的的浓度从标准曲线计算。
[1104] RIA 的一般分析方案
[1105] DB- 缓冲液 : 80mM 磷酸盐缓冲液、0.1% 人血清白蛋白、10
[1106] mM EDTA, 0.6mM 硫柳汞, pH 7.5
[1107] FAM- 缓冲液 : 40mM 磷酸盐缓冲液、0.1% 人血清白蛋白、
[1108] 0.6mM 硫柳汞、pH 7.5
[1109] 活性炭 : 40mM 磷酸盐缓冲液、0.6mM 硫柳汞、16.7%
[1110] 牛血浆、15g/l 活性炭、pH 7.5 (使用前在 4°C 混
[1111] 合悬浮液最少 1 小时)
[1112] 标准物 : 血浆 - 基质中单独的化合物
[1113] 分析在 minisorp 试管 12x75mm (体积 / 试管) 中如下进行:
[1114]

	Db- 缓冲液	样品	抗原	FAM- 缓冲液	追踪物	活性炭	H ₂ O
第1天							
总计					100 μ L		
NSB	330 μ L			100 μ L			
样品	300 μ L	30 μ L	100 μ L		100 μ L		
混合, 在4℃孵育 o/n 第 2 天							

[1115]

总计							1, 5mL
NSB						1, 5mL	
样品						1, 5mL	

[1116] 混合 - 在 4℃ 孵育 30 分钟 - 在 3000rpm 离心 30 分钟 - 在将上清液转移到新试管中之后立即地用塞子封闭, 在 γ 计数器上计数 1 分钟。

[1117] 样品中的的浓度从单独的标准曲线计算。

[1118] GLP-1 放射受体分析 (RRA) :

[1119] 所述方法是利用 LEADseeker 成像颗粒的放射测量的 - 配体结合分析。分析由下列组成: 含有 GLP-1 受体的膜片段、未标记的 GLP-1 类似物、用 125 I 标记的人类 GLP-1、以及用麦胚凝集素 (WGA) 包被的 PS LEADseeker 颗粒。冷的和 125 I 标记的 GLP-1 将竞争与受体的结合。当添加 LEADseeker 颗粒时, 它们将经由 WGA 残基结合膜片段上的碳水化合物残基。 125 I 分子与 LEADseeker 颗粒之间的接近引起来自颗粒的光发射。LEADseeker 将成像发射光, 它将与样品中存在的 GLP-1 类似物的数量逆相关。

[1120] 试剂 & 材料:

[1121] 动物血浆的预处理: 动物血浆在 56℃ 热处理 4 小时, 在 10,000rpm 离心 10 分钟。此后, 添加 Val-Pyr (10 μ M) 和抑酶肽 (500KIE/mL), 在 < -18℃ 保存待用。

[1122] GLP-1 类似物校准物: GLP-1 类似物掺入热处理过的血浆中, 产生从约 1 μ M 到 1pM 的稀释度系列。

[1123] GLP-1RRA 分析缓冲液: 25mM Na-HEPES (pH = 7.5), 2.5mM CaCl₂, 1mM MgCl₂, 50mM NaCl, 0.1% 卵清蛋白, 0.003% tween 20, 0.005% bacitracin, 0.05% NaN₃.

[1124] GLP-1 受体悬浮液: GLP-1 受体膜片段从稳定地表达人类胰腺 GLP-1 受体的婴儿仓鼠肾脏 (BHK) 细胞纯化。保存在 < -80℃ 待用。

[1125] WGA 偶联的聚苯乙烯 LEADseeker 成像珠子 (RPNQ0260, Amersham): 珠子用 GLP-1RRA 分析缓冲液重构到 13.3mg/ml 的浓度。然后添加 GLP-1 受体膜悬浮液, 使用之前翻滚冷孵育 (2-8℃) 至少 1 小时。

[1126] [125 I]-GLP-1 (7-36) 酰胺 (Novo Nordisk A/S). 保存在 < -18℃ 待用。

[1127] 乙醇 99.9% vol (De Dansk Spritfabrikker A/S): 保存在 < -18℃ 待用。

- [1128] **MultiScreen®** Solvinert 0.45 μm 疏水性 PTFE 平板 (MSRPN0450, Millipore Corp.)
- [1129] 聚丙烯平板 (cat.no. 650201, Greiner Bio-One)
- [1130] 白色聚苯乙烯 384 孔平板 (cat.no. 781075, Greiner Bio-One)
- [1131] 设备:
- [1132] 水平板混合器
- [1133] 具有标准的摇摆-桶微量滴定板转子部件的离心机
- [1134] UltraVap-Drydown 样品浓缩机 (Porvair)
- [1135] LEADseeker™ 多模式成像系统 (Amersham)
- [1136] 分析过程:
- [1137] 样品制备:
- [1138] 在化学可比较的接受平板 (即, 聚丙烯平板) 上固定 **MultiScreen®** Solvinert 滤板来采集滤液。
- [1139] 添加 150 μL 冰冷的乙醇 99.9% 到 **MultiScreen®** Solvinert 滤板的空反应孔中, 随后添加 50 μL 的校准物或血浆样品。将保存盖置于滤板上。
- [1140] 在水平板混合器上在 18-22°C 孵育 15 分钟。
- [1141] 将带有盖子的组装的滤器和接受平板置于标准摇摆桶微量滴定板转子部件中。然后在 1500rpm 在接受平板的空反应孔中采集滤液 2 分钟。
- [1142] 通过使用 UltraVap 和加热的 (40°C) N_2 干燥滤液持续时间 15 分钟。通过向每个反应孔添加 100 μL GLP-1RRA 分析缓冲液重构干燥的材料。在水平混合器上孵育 5 分钟。
- [1143] GLP-1 放射受体分析:
- [1144] 使用以下吸移方案和白色聚苯乙烯 384 孔平板:
- [1145] • 35 μL LGLP-1RRA 分析缓冲液
- [1146] • 5 μL 重构的滤液。
- [1147] • 10 μL [^{125}I]-GLP-1 (7-36) 酰胺. 贮备溶液溶液在使用前在 GLP-1RRA 分析缓冲液中稀释到 20,000cpm/孔。
- [1148] • 预包被到 WGA-聚苯乙烯 LEADseeker 成像珠子 (0.2mg/孔) 的 15 μL LGLP-1 受体膜片段 ($\approx 0.5 \mu\text{g}$ /孔)
- [1149] 封闭平板, 在 18-22°C 孵育过夜
- [1150] 通过使用 LEADseeker™ 多模式成像系统检测每个反应孔的光发射持续 10 分钟。
- [1151] 实施例 21: 表达克隆的人类 GLP-1 受体的细胞系中 cAMP 形成的刺激
- [1152] 本发明的许多 GLP-1 类似物和衍生物 (实施例 1-7、9-17 和 19-20 的化合物) 的效价如下所述地测定, 即, 作为含有人类 GLP-1 受体的介质中环化 AMP (cAMP) 的形成的刺激。为了对比, 还测定了截短的天然的人类 GLP-1 (7-33) 的效价。
- [1153] 来自表达人类 GLP-1 受体的稳定转染的细胞系 BHK467-12A (tk-ts13) 的纯化的质膜用所讨论的 GLP-1 化合物刺激, cAMP 生产的效价使用来自 Perkin Elmer Life Sciences 的 AlphaScreen™ cAMP 分析试剂盒测定。
- [1154] 稳定转染的细胞系在 NN A/S, Denmark 制备, 选择高表达克隆用于筛选。细胞在 DMEM、5% FCS、1% Pen/Strep (青霉素/链霉素) 和 0.5mg/ml 的选择标记物 G418 中在 5%

CO₂ 下生长。

[1155] 在近似 80% 汇合的细胞用 PBS (磷酸盐缓冲盐水) 洗涤两次, 用 Versene (乙二胺四乙酸的四钠盐的水溶液) 收获, 在 1000rpm 离心 5 分钟, 除去上清液。其他步骤全部在冰上进行。细胞团通过 Ultrathurax 在 10mL 缓冲液 1 (20mM Na-HEPES、10mM EDTA、pH = 7.4) 匀化 20-30 秒, 在 20.000rpm 离心 15 分钟, 团粒重悬浮在 10ml 缓冲液 2 (20mM Na-HEPES、0.1mM EDTA、pH = 7.4) 中。悬浮液匀化 20-30 秒, 在 20.000rpm 离心 15 分钟。缓冲液 2 中的悬浮, 匀质化和离心重复一次, 膜重悬浮在缓冲液 2 中, 准备用于进一步分析或保存在 -80°C。

[1156] 功能性受体分析通过由 AlphaScreen Technology 测量肽诱导的 cAMP 生产来进行。AlphaScreen Technology 的基本原理是内源的 cAMP 和外源添加的生物素-cAMP 之间的竞争。cAMP 的捕获通过利用与接受体珠子缀合的特异性抗体来实现。形成的 cAMP 在 AlphaFusion 微量培养板分析仪上计数和测量。利用 Graph-Pad Prism 软件 (版本 5) 计算 EC₅₀ 值。

[1157] 截短的天然的 GLP-1 (7-3) 肽具有极低的效价 (11.3nM 的高 EC₅₀ 值)。所有测试的本发明的 GLP-1 化合物具有非常高的效价 (六种化合物 EC₅₀ 低于 0.10nM, 六种化合物和 EC₅₀ 处于 0.10-0.50nM 的范围内)。

[1158] 有趣地, 实施例 1、4、5 和 7 的化合物, 其都没有衍生化, 也具有低于 0.30nM 的 EC₅₀, 这是强烈地令人惊讶的。

[1159] 实施例 22: 对 GLP-1 受体的细胞外结构域的结合

[1160] 对于许多本发明的 GLP-1 化合物 (实施例 1-17 的化合物), 与 GLP-1R 受体的分离的 N-末端细胞外结构域 (nGLP-1R) 的结合的亲和力如下所述地测量。为了对比, 还测定了截短的天然的人类 GLP-1 (7-33) 的效价。

[1161] 亲和力是所讨论的 GLP-1 衍生物替换 ¹²⁵I-Exendin-4 (9-39) 与 nGLP-1R 的结合的能力, 与 nGLP-1R 的结合在以下分析中测量: 如 Runge et al 2007 (Biochemistry, vol. 46, pp. 5830-5840) 所描述的制备蛋白质 nGLP-1R, 生物素化并固定在链霉抗生物素蛋白包被的 SPA 珠子上。在 0.1M NaHCO₃ 中的 nGLP1R 利用 75 μg BNHS (Sigma H1759) 生物素化为 1mg 蛋白质。生物素化的 nGLP1R 随后相对于 PBS 来透析。所有试剂和衍生物在具有 0.05% v/v Tween 20 的 PBS 中稀释。结合分析在 200 μl 的最终体积中在 96 孔 OptiPlates (PerkinElmer 6005290) 中进行。每个反应孔含有 2mg 的链霉抗生物素蛋白包被的 SPA 珠子 (PerkinElmer RPNQ007)、0.1pmol 生物素化的 nGLP1R、50pCi ¹²⁵I-Exendin (9-39) 和终浓度从 1000nM 到 0.064nM 的测试肽。平板在 RT 在摇动器上孵育 3 小时。SPA 颗粒通过在 1500rpm 离心 10 分钟来旋转沉降, 平板在 TopCount-NXT (PerkinElmer) 中计数。

[1162] 作为替换 50% 的 ¹²⁵I-Exendin-4 (9-39) 对 nGLP-1R 的结合的所讨论的 GLP-1 化合物的浓度, 从相应的曲线读取 IC₅₀ 值。

[1163] 截短的 (天然的、人类) GLP-1 (7-33) 对 nGLP-1R 的亲和力 (IC₅₀) 被测定为 886nM。十一种测试的本发明的 GLP-1 化合物具有低于 600nM 的亲和力 (IC₅₀) (从 20-556nM), 六种化合物低于 100nM。因而本发明的几种 GLP-1 化合物展现了对 N-末端 GLP-1 受体非常好的结合亲和力 (IC₅₀ 值越低, 结合越好)。在实施例 21 中也讨论的化合物 1、4、5 和 7 具有在 200-1500nM 范围内的可接受的结合亲和力, 它们的三种在 200-600nM 范围内。

[1164] 实施例 23 :对 GLP-1 受体的亲和力

[1165] 许多本发明的化合物 GLP-1 (实施例 1-7 和 9-18 的化合物) 对人类 GLP-1 受体的结合亲和力通过它们从受体替换 ^{125}I -GLP-1 的能力的方式来测量。

[1166] 条件

[1167] 物种 (体外) :仓鼠

[1168] 生物学终点 :受体结合

[1169] 分析方法 :SPA

[1170] 受体 :GLP-1 受体

[1171] 细胞系 :BHK tk-ts13

[1172] 膜纯化 :

[1173] 细胞 (近似地 80% 汇合) 在 PBS 中洗涤两次,收获 (PBS+EDTA 或 Versene),之后它们通过在 1000rpm 离心 5 分钟来分离。细胞 / 细胞团必需在随后的步骤中尽可能保持在冰上。细胞团在适合的数量的缓冲液 1 (取决于细胞的数量,但例如,10ml) 中用 Ultrathurax 匀化 20-30 秒。匀浆物在 20000rpm 离心 15 分钟。团粒在 10mL 缓冲液 2 中重悬浮 (匀化) 并重新离心。这个步骤再次重复。产生的团粒重悬浮在缓冲液 2 中,测定蛋白质浓度。膜保存在 -80°C 。

[1174] 缓冲液 1 :20mM Na-HEPES+10mM EDTA, pH 7.4

[1175] 缓冲液 2 :20mM Na-HEPES+0.1mM EDTA, pH 7.4

[1176] 结合分析 :

[1177] SPA :

[1178] 测试化合物 / 肽、膜、SPA- 颗粒和 ^{125}I 在分析缓冲液中稀释。25 μl (微升) 的测试化合物 / 肽添加到 Optiplate 中。添加缓冲液 (50 μl)。添加 5-10 μg 蛋白质 / 样品 (50 μl),其相应于 0.1-0.2mg 蛋白质 /ml (优选地对每种膜制品优化的)。添加 SPA- 颗粒 (麦胚凝集素 SPA 珠子) RPNQ 0001) 0.5mg/ 反应孔 (50 μl)。开始用 ^{125}I -GLP-1 (终浓度 0.05nM,其相应于 49.880DPM,25 μl) 孵育。平板用 PlateSealer 密封。在 30°C 孵育 120 分钟,同时摇动。离心平板 (1500rpm,10 分钟),在 Topcounter 中计数。

[1179] 分析缓冲液 :50mM HEPES

[1180] 5mM EGTA

[1181] 5mM MgCl_2

[1182] 0.005% Tween 20

[1183] pH 7.4

[1184] IC_{50} 值可以从曲线中作为从受体替换 50% 的 ^{125}I -GLP-1 的浓度来读取。

[1185] GLP-1 (7-33) (截短的天然 GLP-1) 的 IC_{50} 值是 241nM。除了一种化合物以外,所有测试的本发明的化合物具有与 GLP-1 受体更好的结合 (即,更低的 IC_{50} 值)。六种化合物具有低于 1.00nM 的值,五种化合物处在 1-10nM 的范围内,五种化合物处在 20-200nM 的范围内。在早先的实施例中讨论的化合物 1、4、5 和 7 具有处在 0.24nM 到 44nM 的范围内的 IC_{50} 值,它们中的三种低于 2.0nM。

序列表

<110>Novo Nordisk A/S

<120> 截短的 GLP-1 衍生物和它们的治疗用途

<130>7695. 204-W0

<160>3

<170>PatentIn version 3.5

<210>1

<211>29

<212>PRT

<213> 智人

<220>

<221> 肽

<222>(1).. (29)

<400>1

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			
			20					25							

<210>2

<211>29

<212>PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 式 I (GLP-1 类似物)

<220>

<221> 肽

<222>(1).. (29)

<220>

<221>MISC_FEATURE

<222>(1).. (1)

<223>Xaa7 是 L-his, D-his, 去氨基 -his, 2- 氨基 -his, beta- 羟基 -his, 高 his, Nalpha- 乙酰基 -his, alpha- 氟甲基 -his, alpha- 甲基 -hist, 3- 吡啶基丙氨酸, 2- 吡啶基丙氨酸或 4- 吡啶基丙氨酸

<220>

<221>MISC_FEATURE

<222>(2).. (2)

<223>Xaa8 是 Ala, Gly, Val, Leu, Ile, Lys, Aib, (1- 氨基环丙基, - 丁基 -, - 戊基 -, - 己基 -, - 庚基 -, 或 - 辛基) 羧酸

<220>

<221>MISC_FEATURE

<222>(3).. (3)

<223>Xaa9 是 Glu 或 Glu 衍生物, 例如 alpha, alpha 二甲基 -Glu

<220>

<221>MISC_FEATURE

<222>(10).. (10)

<223>Xaa16 是 Val 或 Leu

<220>

<221>MISC_FEATURE

<222>(12).. (12)

<223>Xaa18 是 Ser, Lys, Cys 或 Arg

<220>

<221>MISC_FEATURE

<222>(14).. (14)

<223>Xaa20 是 Leu, Lys 或 Cys

<220>

<221>MISC_FEATURE

<222>(17).. (17)

<223>Xaa23 是 Gln, Glu, Lys, Cys 或 Arg

<220>

<221>MISC_FEATURE

<222>(18).. (18)

<223>Xaa24 是 Ala 或 Asn

<220>

<221>MISC_FEATURE

<222>(19).. (19)

<223>Xaa25 是 Ala 或 Val

<220>

<221>MISC_FEATURE

<222>(21).. (21)

<223>Xaa27 是 Glu, Ala 或 Leu

<220>

<221>MISC_FEATURE

<222>(24).. (24)

<223>Xaa30 是 Ala, Glu, Lys, Arg 或没有

<220>

<221>MISC_FEATURE

<222>(25).. (25)

<223>Xaa31 是 Trp, Lys, Cys 或没有

<220>

<221>MISC_FEATURE

<222>(27).. (27)

<223>Xaa33 是 Val, Lys, Cys 或没有

<220>

<221>MISC_FEATURE

<222>(28).. (28)

<223>Xaa34 是 Lys, Glu, Asn, Arg, Cys 或没有

<220>

<221>MISC_FEATURE

<222>(29).. (29)

<223>Xaa35 是 Gly, Aib 或没有 ;

$\langle 400 \rangle_2$

Xaa Xaa Xaa Gly Thr Phe Thr Ser Asp Xaa Ser Xaa Tyr Xaa Glu Glu
1 5 10 15
Xaa Xaa Xaa Arg Xaa Phe Ile Xaa Xaa Leu Xaa Xaa Xaa
20 25

 $\langle 210 \rangle_3$

<211>29

 $\langle 212 \rangle$ PRT

〈213〉 人工序列

 $\langle 220 \rangle$

<223> 式 II (GLP-1 类似物)

 $\langle 220 \rangle$

〈221〉 肽

 $\langle 222 \rangle (1) \dots (29)$ $\langle 220 \rangle$

<221>MISC FEATURE

 $\langle 222 \rangle (1) \dots (1)$

<223>Xaa7 是 L-his, D-his, 去氨基 -his, 2- 氨基 -his, beta- 羟基 -his, 高 his, Nalpha- 乙酰基 -his, alpha- 氟甲基 -his, alpha- 甲基 -his, 3- 吡啶基丙氨酸, 2- 吡啶基丙氨酸或 4- 吡啶基丙氨酸

 $\langle 220 \rangle$

<221>MISC FEATURE

 $\langle 222 \rangle (2) \dots (2)$

<223>Xaa8 是 Ala, Gly, Val, Leu, Ile, Lys, Aib, (1-氨基环丙基, -丁基-, -戊基-, -己基-, -庚基-, 或 -辛基) 羧酸

 $\langle 220 \rangle$

<221>MISC FEATURE

 $\langle 222 \rangle (12) \dots (12)$

<223>Xaa18 是 Ser, Lys 或 Arg

 $\langle 220 \rangle$

&lt221>MISC_FEATURE

<222> (24).. (24)

<223>Xaa30 是 Ala, Glu, Lys, Arg 或没有

<220>

<221>MISC_FEATURE

<222> (24).. (24)

<223>Xaa30 是 Ala, Glu, Lys, Arg 或没有

<220>

<221>MISC_FEATURE

<222> (27).. (27)

<223>Xaa33 是 Val, Lys 或没有

<220>

<221>MISC_FEATURE

<222> (28).. (28)

<223>Xaa34 是 Lys, Glu, Arg 或没有

<220>

<221>MISC_FEATURE

<222> (29).. (29)

<223>Xaa35 是 Gly, Aib 或没有

<400>3

Xaa Xaa Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Xaa Tyr Leu Glu Glu

1 5 10 15

Gln Ala Ala Arg Glu Phe Ile Xaa Trp Leu Xaa Xaa Xaa

20 25