(19)国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 119654159 A
(43)申请公布日 2025.03.18

(21)申请号 202380057217.3
(22)申请日 2023.08.02
(30)优先权数据
63/395,783 2022.08.05 US
(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2025.01.26
(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/US2023/071477 2023.08.02
(87)PCT国际申请的公布数据
WO2024/030934 EN 2024.02.08
(71)申请人 印第安纳大学研究与技术公司
地址 美国印第安纳州
(72)发明人 理查德·D·迪马尔奇
彼得·安杰伊·姆罗兹
基肖尔·塔卢里
(74)专利代理机构 成都超凡明远知识产权代理有限公司 51258
专利代理师 卢兴旺
(51)Int.Cl.
A61K 38/26(2006.01)

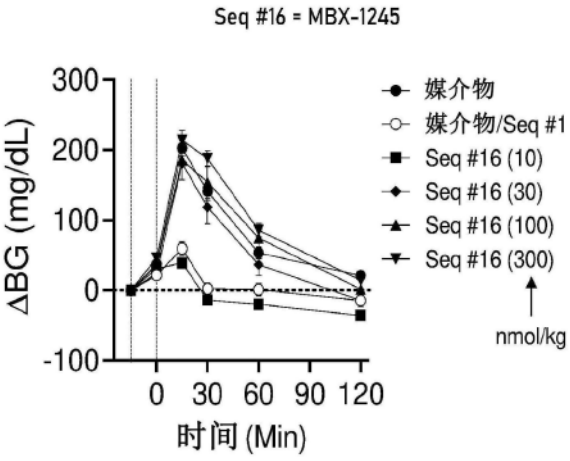
权利要求书3页 说明书43页
序列表（电子公布） 附图11页

(54)发明名称

胰高血糖素样肽-1受体拮抗剂

(57)摘要

胰高血糖素样肽-1(GLP-1)在调节人体血糖水平中发挥着重要作用。其作用包括刺激胰岛素合成和分泌、抑制胰高血糖素分泌和抑制食物摄入。本文提供了用于治疗低血糖的GLP-1受体拮抗剂肽和药物组合物。本文进一步提供了治疗已变为高胰岛素血症的患者，包括在减重手术后变为高胰岛素血症的患者的非典型低血糖的方法。



CN 119654159 A

1.一种GLP-1受体拮抗剂,所述拮抗剂包括以下氨基酸序列:

R_{10}-DV$X_{11}X_{12}$YL$X_{15}X_{16}$QA$X_{19}X_{20}$EF$X_{23}X_{24}$WLVRGGPSSGAPPPS-R_{20} SEQ ID NO:97),其中,

R_{10}是C14-C20脂肪酸或二酸,共价连接至GLP-1拮抗剂氨基酸序列的N末端α胺;

X_{11}是Trp、dTrp或Ser;

X_{12}是Arg或Ser;

X_{15}是Glu或dGlu;

X_{16}是Glu、dGlu、Asp、高谷氨酸或高半胱氨酸;

X_{19}是Val、环丙烷、环戊烷、环己烷或苯基甘氨酸;

X_{20}是Arg、高赖氨酸或瓜氨酸;

X_{23}是Ile或dIle;

X_{24}是Glu或Ala;以及

R_{20}是COOH或$CONH_2$,任选地其中,基于天然Exendin4(SEQ ID NO:1)的编号,位置16、18、19、24、26或28中的任何处的1、2或3个氨基酸被Aib置换。

2.根据权利要求1所述的GLP-1拮抗剂,其中,所述拮抗剂包括以下氨基酸序列:

R_{10}-DV$X_{11}X_{12}$YL$X_{15}X_{16}$QA$X_{19}X_{20}$EFX_{23}EWLVRGGPSSGAPPPS-R_{20}SEQ ID NO:99),其中,

R_{10}是C14-C20脂肪酸或二酸,共价连接至所述GLP-1拮抗剂氨基酸序列的N末端α胺;

X_{11}是Trp、dTrp或Ser;X_{12}是Arg或Ser;

X_{15}是Glu或dGlu;

X_{16}是Glu、dGlu、Asp、高谷氨酸或高半胱氨酸;

X_{19}是Val;

X_{20}是Arg、高赖氨酸或瓜氨酸;

X_{23}是Ile或dIle;以及

R_{20}是COOH或$CONH_2$,任选地其中,基于天然Exendin4(SEQ ID NO:1)的编号,位置16、18、19、24、26或28中的任何处的1、2或3个氨基酸被Aib置换。

3.根据权利要求1或2所述的GLP-1拮抗剂,其中

R_{10}是-$CO(CH_2)_{14-20}CH_3$或-$CO(CH_2)_{14-20}$COOH;

X_{11}是Trp、dTrp或Ser;

X_{12}是Ser;

X_{15}是Glu或dGlu;

X_{16}是Glu或dGlu;

X_{19}是Val;

X_{20}是Arg;

X_{23}是Ile或dIle;以及

R_{20}是COOH。

4.根据权利要求1-3中任一项所述的GLP-1拮抗剂,其中,R_{10}是

-$CO(CH_2)_{16-18}$COOH,共价连接至所述GLP-1拮抗剂氨基酸序列的N末端α胺。

5.根据权利要求1-4中任一项所述的GLP-1拮抗剂类似物,其中,基于天然Exendin4(SEQ ID NO:1)的编号,位置16、18、19、24、26或28处的氨基酸被Aib置换。

6.根据权利要求1-6中任一项所述的GLP-1拮抗剂类似物,进一步包括1-3个氨基酸的C末端延伸,任选地其中,所述C末端延伸的氨基酸中之一包括酰化氨基酸,任选地酰化Lys。

7.一种GLP-1受体拮抗剂,所述拮抗剂包括以下氨基酸序列:

R_{10}-D$X_{10}X_{11}X_{12}$YL$X_{15}X_{16}$QAVREF$X_{23}X_{24}$WLVRGGPSSGAPPPS-R_{20}(SEQ ID NO:98);其中,

R_{10}是C14-C20脂肪酸或二酸,共价连接至所述GLP-1拮抗剂氨基酸序列的N末端α胺;

X_{10}是Trp、dTrp或Val;

X_{11}是Trp、dTrp或Ser;

X_{12}是Arg、Lys或Ser;

X_{15}是Glu或dGlu;

X_{16}是Trp、dTrp、dGlu或Glu;

X_{23}是Ile或dIle;

X_{24}是Ala或Glu;以及

R_{20}是COOH或$CONH_2$。

8.根据权利要求7所述的GLP-1受体拮抗剂,其中,

R_{10}是-CO$(CH_2)_{14-20}CH_3$或-CO$(CH_2)_{14-20}$COOH,连接至所述GLP-1受体拮抗剂的N末端α胺;

X_{10}是Trp、dTrp或Val;

X_{11}是Trp、dTrp或Ser;

X_{12}是Arg、Lys或Ser;

X_{15}是Glu或dGlu;

X_{16}是Trp、dTrp、dGlu或Glu;

X_{23}是Ile或dIle;以及

X_{24}是Ala或Glu。

9.一种GLP-1受体拮抗剂,所述拮抗剂包括

R_{10}-DVSSYLEEQAVREFIAWLVKGGPSSGAPPPS-R_{20}(SEQ ID NO:3)的氨基酸序列或者与SEQ ID NO:3有1、2或3个氨基酸置换而不同但保留GLP-1激动剂活性的氨基酸序列,其中,

R_{10}是-CO$(CH_2)_{14-20}CH_3$或-CO$(CH_2)_{14-20}$COOH,连接至所述GLP-1受体拮抗剂的N末端α胺;以及

R_{20}是COOH或$CONH_2$。

10.根据权利要求9所述的GLP-1受体拮抗剂,其中,所述GLP-1受体拮抗剂在位置16、18、19、24、26或28的任何组合处包括一至三个Aib置换,其中,所述位置编号是相对于天然Exendin4氨基酸序列。

11.根据权利要求9或10所述的GLP-1受体拮抗剂,其中

R_{10}是-CO$(CH_2)_{14-20}$COOH;以及

R_{20}是COOH。

12.根据权利要求7-11中任一项所述的GLP-1拮抗剂,其中,X_{11}是Trp或dTrp。

13.根据权利要求7-12中任一项所述的GLP-1拮抗剂,其中,位置16、18、19、24、26或28处的氨基酸被Aib置换。

14.根据权利要求9-13中任一项所述的GLP-1拮抗剂,其中,

X_{15}是dGlu;

X_{16}是Glu;以及

X_{23}是Ile。

15.根据权利要求9-13中任一项所述的GLP-1拮抗剂,其中,

X_{15}是Glu;

X_{16}是Glu;以及

X_{23}是Ile。

16.根据权利要求9-15中任一项所述的GLP-1拮抗剂,其还包括具有酰基基团的氨基酸的C末端延伸,所述酰基基团任选地经由间隔基连接至所述氨基酸的侧链。

17.根据权利要求16所述的GLP-1拮抗剂,其中,所述酰化氨基酸是酰化赖氨酸。

18.根据权利要求16或17所述的GLP-1拮抗剂,其中,所述酰化氨基酸的酰基基团经由间隔基共价连接至所述酰化氨基酸的氨基酸侧链,任选地其中,所述间隔基包括

i)γ谷氨酸,

ii)minipeg聚合物:-[$COCH_2(OCH_2CH_2)_kNH$]-,其中,k是2、4、6或8,

iii)或者i)和/或ii)的任意多个或组合。

19.根据权利要求9-18中任一项所述的GLP-1拮抗剂,其中,R_{20}是$CONH_2$。

20.一种药物组合物,其包括权利要求1-19中任一项所述的GLP-1拮抗剂和药学上可接受的载体、稀释剂或赋形剂。

21.一种治疗患有非典型低血糖的患者的方法,所述方法包括向有此需要的患者给药有效升高血糖水平的量的根据权利要求20所述的药物组合物的步骤。

胰高血糖素样肽-1受体拮抗剂

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求于2022年8月5日提交的美国临时专利申请号63/395,783的优先权,其公开内容明确并入本文。

[0003] 通过援引并入以电子方式提交的材料

[0004] 本申请包含序列表,其已以XML文件形式电子提交并特此通过引用以其全文并入。所述XML副本创建于2023年8月1日,命名为32993-392614.2_SL.xml,并且大小为281千字节。

背景技术

[0005] 胰高血糖素样肽-1(GLP-1)在调节人体血糖水平中发挥着重要作用。其作用包括刺激胰岛素合成和分泌、抑制胰高血糖素分泌和抑制食物摄入。正常情况下,身体将血液中的葡萄糖浓度维持在每分升约70至110毫克(mg/dL)或每升3.9至6.1毫摩尔(mmol/L)的范围内。然而,血糖水平过低的情况可能会出现,导致低血糖。低血糖最常由摄取来控制糖尿病的药物引起。低血糖的较不常见原因在本文中被称为“非典型低血糖”,并且可以独立于外源胰岛素的给药而发生。

[0006] 非典型低血糖可能发生在大量饮酒而不进食的人身上,因为酒精可以阻止肝脏中葡萄糖的形成。此外,患有晚期肝病诸如病毒性肝炎、肝硬化或肝癌的人可能无法储存和产生足够的葡萄糖。非典型低血糖还可能发生在患有先天性突变的婴儿和儿童中,导致其高胰岛素血症。

[0007] 最近,在过去十年中,人们越来越认识到非典型低血糖是一种并发症,可能在出于逆转极度肥胖形式而进行的外科手术后出现。一些接受Roux-en-Y胃旁路手术(RYGB)手术的患者(不到10%)随后出现高胰岛素性低血糖血症,其中,血糖浓度可能变得足够低(20-40mg/dL)以至于导致惊厥、精神状态改变、意识丧失、认知功能障碍、残疾和死亡。

[0008] 治疗高胰岛素血症引起的低血糖的一种方法是给药GLP-1受体拮抗剂。此类肽拮抗剂阻断血浆GLP-1浓度不当升高而刺激胰岛素分泌的能力,并起到使血浆葡萄糖正常化并降低经历非典型低血糖的患者的认知损害、血管疾病和潜在猝死的风险的作用。

[0009] Exendin-4(SEQ ID NO:1)是胰高血糖素样肽1(GLP-1)受体的39个氨基酸激动剂。Exendin-4存在于希拉毒蜥(Heloderma suspectum)的唾液中。Ex-4(9-39)a(SEQ ID NO:2)是Exendin-4的N末端截短衍生物,已知其具有GLP-1受体拮抗剂的功能。然而,Ex-4(9-39)a在其治疗慢性非典型低血糖的潜在用途方面存在两个显著的局限性:其非人类氨基酸序列和其相对短的体内作用持续时间。

[0010] 根据本公开的一种实施方式,提供了一组新的优化的GLP-1拮抗剂,用作治疗非典型低血糖的候选药物的用途,该非典型低血糖包括减重手术后引起的或由先天性突变引起的高胰岛素血症诱发的低血糖。

发明内容

[0011] 如本文所公开,提供了用于治疗经历非典型低血糖的患者的组合物和方法,并且更特别地在一种实施方式中,治疗经历高胰岛素血症诱发的低血糖的患者。根据一种实施方式,提供了用于治疗减重手术后导致的高胰岛素血症诱发的低血糖的组合物和方法。在一种实施方式中,所述方法包括给药有效升高血糖水平并减轻与低血糖相关的相关急性症状和慢性结果的量的胰高血糖素样肽-1受体拮抗剂(GLP1RA)。

[0012] 根据一种实施方式,提供了一种GLP-1受体拮抗剂肽,其包括以下氨基酸序列

[0013] R_{10}-D$X_{10}X_{11}$RYL$X_{15}X_{16}$QAVREFX_{23}EWLVRGGPSSGAPPPS$X_{40}R_{20}$(SEQ ID NO:5),其中

[0014] X_{10}是Trp、dTrp或Val;X_{11}是Trp、dTrp或Ser;X_{15}是Glu或dGlu

[0015] X_{16}是Trp、dTrp、dGlu或Glu;X_{23}是Ile或dIle;

[0016] X_{40}不存在或为酰化氨基酸,

[0017] R_{10}是NH_2、-CO$(CH_2)_{14-20}CH_3$或-CO$(CH_2)_{14-20}$COOH以及

[0018] R_{20}是COOH或$CONH_2$,任选地其中,相对于天然Exendin4序列(SEQ ID NO:1),所述肽包括在位置16、18、19、24、26或28中的任何处的一个或多个Aib的置换,或者任选地,相对于天然Exendin4序列(SEQ ID NO:1),在位置12处Lys的置换,任选地前提条件是当X_{10}或X_{11}之一是Trp或dTrp时,另一个不是Trp或dTrp,任选地前提条件是当X_{40}不存在时,R_{10}不是NH_2。在一种实施方式中,提供了SEQ ID NO:5的GLP-1受体拮抗剂,其中,X_{40}是酰化Lys,其中,酰化Lys的酰基基团是C16-C18酸或二酸,其任选地经由间隔基连接至Lys侧链。

[0019] 在一种实施方式中,提供了一种GLP-1受体拮抗剂,其中,所述拮抗剂包括以下氨基酸序列:

[0020] R_{10}-D$X_{10}X_{11}X_{12}$YL$X_{15}X_{16}$QAVREF$X_{23}X_{24}$WLVRGGPSSGAPPPS(SEQ ID NO:98);

[0021] 其中,

[0022] X_{10}是Trp、dTrp或Val;

[0023] X_{11}是Trp、dTrp或Ser;X_{12}是Arg、Lys或Ser;X_{15}是Glu或dGlu

[0024] X_{16}是Trp、dTrp、dGlu或Glu;X_{23}是Ile或dIle;

[0025] X_{24}是Ala或Glu;以及

[0026] R_{10}是-CO$(CH_2)_{14-20}CH_3$或-CO$(CH_2)_{14-20}$COOH。

[0027] 根据一种实施方式,提供了一种GLP-1受体拮抗剂肽,其具有以下氨基酸序列:

[0028] DVWRYLX_{15}EQAVREFIEWLVRGGPSSGAPPPSX_{40} R_{20}(SEQ ID NO:96),

[0029] 其中,

[0030] X_{15}是dGlu;

[0031] X_{40}是酰化Lys并且R_{20}是COOH或$CONH_2$,其中,酰化Lys的酰基基团是C16-C18酸或二酸,其任选地经由间隔基连接至Lys侧链。在一种实施方式中,间隔基包括minipeg或γ谷氨酸亚基或者这样的minipeg或γGlu分子的任意多个或组合。在一种实施方式中,SEQ ID NO:96的肽被1、2或3个氨基酸置换修饰,包括例如相对于SEQ ID NO:1的天然Exendin4序列在位置16、18、19、24、26或28中的一处或多处的氨基异丁酸(Aib)置换;或者在位置12处的Lys的置换。

[0032] 根据一种实施方式,提供了一种GLP-1受体拮抗剂肽,其包括以下氨基酸序列

[0033] D$X_{10}X_{11}$RYL$X_{15}X_{16}$QAVREFX_{23}EWLVRGGPSSGAPPPS$X_{40}R_{20}$(SEQ ID NO:5),其中,

[0034] X_{10}是Trp、dTrp或Val;

[0035] X_{11}是Trp、dTrp或Ser;

[0036] X_{15}是Glu或dGlu;

[0037] X_{16}是Trp、dTrp、dGlu或Glu;

[0038] X_{23}是Ile或dIle;

[0039] X_{40}是酰化氨基酸,并且R_{20}是COOH或$CONH_2$,任选地其中,相对于天然Exendin4序列(SEQ ID NO:1),所述肽包括在位置16、18、19、24、26或28中的任何处的一个或多个Aib的置换,或者任选地,由X_7X_8对SEQ ID NO:5的肽进行N末端延伸,其中,X_7是酰化氨基酸(例如,Lys)并且X_8是Gly或C_1-C_3 N-烷基Gly,其具有相对于天然Exendin4序列(SEQ ID NO:1)的位置编号,任选地前提条件是当X_{10}或X_{11}之一是Trp或dTrp时,另一个不是Trp或dTrp。

[0040] 根据一种实施方式,提供了一种GLP-1受体拮抗剂肽,其具有以下氨基酸序列:

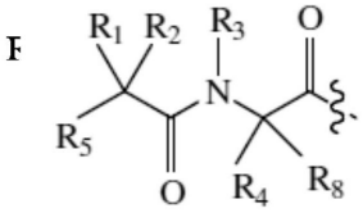
[0041] DVWRYLX_{15}EQAVREFIEWLVRGGPSSGAPPPSX_{40} R_{20}(SEQ ID NO:96),

[0042] 其中,

[0043] X_{15}是dGlu;

[0044] X_{40}是酰化Lys并且R_{20}是COOH或$CONH_2$,其中,酰化Lys的酰基基团是C16-C18酸或二酸,其任选地经由间隔基连接至Lys侧链。在一种实施方式中,间隔基包括minipeg或γ谷氨酸亚基或者这样的minipeg或γGlu分子的任意多个或组合。在一种实施方式中,SEQ ID NO:96的肽被1、2或3个氨基酸置换修饰,包括相对于SEQ ID NO:1的天然Exendin4序列,在例如位置16、18、19、24、26或28中的一处或多处的氨基异丁酸(Aib)置换;或者通过将二肽X_7X_8添加至SEQ ID NO:96的N末端而修饰,其中,X_7是酰化氨基酸(例如,Lys)并且X_8是Gly或C_1-C_3 N-烷基Gly,其具有相对于天然Exendin4序列(SEQ ID NO:1)的位置编号。

[0045] 在一种实施方式中,1至3个氨基酸被添加至SEQ ID NO:5的肽或其类似物的N末端。在一种实施方式中,包括N末端延伸的氨基酸之一是酰化氨基酸。在一种实施方式中,N末端延伸是二肽X_7X_8,其中,X_7是酰化赖氨酸,任选地其中,赖氨酸呈D-构象并且X_8是任何氨基酸。在一种实施方式中,N末端延伸是与9-29exendin4类似物(例如,SEQ ID NO:5的肽)的N末端α胺连接的自切割二肽,以形成本公开的任何GLP-1拮抗剂的前药。使用GLP-1拮抗剂的前药衍生物的一个优点是,这种方法基于抑制GLP-1受体对前药的识别的策略来延长肽的生物半衰期。在一种实施方式中,前药衍生物包括与GLP-1拮抗剂共价连接的自切割二肽(A-B),其中,二肽在生理条件下且在不存在酶活性的情况下被切割以恢复GLP-1拮抗剂的全部活性。在一种实施方式中,GLP-1拮抗剂通过一种或多种二肽(A-B)与GLP-1拮抗剂的胺共价连接来修饰,其中,A是氨基酸或羟基酸,并且B是N-烷基化氨基酸,其通过B的羧基部分和GLP-1拮抗剂的胺之间的酰胺键与GLP-1拮抗剂连接。在一种实施方式中,A-B包括以下结构:

[0046] 

[0047] 通过A-B的羧基和GLP-1拮抗剂的胺之间的酰胺键与GLP-1拮抗剂连接,其中

[0048] R_1、R_2、R_4和R_8独立地选自由以下组成的组:H、C_1-C_{18}烷基、C_2-C_{18}烯基、(C_1-C_{18}烷基)OH、(C_1-C_{18}烷基)SH、(C_2-C_3烷基)SCH_3、(C_1-C_4烷基)$CONH_2$、(C_1-C_4烷基)COOH、(C_1-C_4烷基)NH_2、(C_1-C_4烷基)NHC(NH_{2+})NH_2、(C_0-C_4烷基)(C_3-C_6环烷基)、(C_0-C_4烷基)(C_2-C_5杂环)、(C_0-C_4烷基)(C_6-C_{10}芳基)R_7、(C_1-C_4烷基)(C_3-C_9杂芳基)和C_1-C_{12}烷基(W1)C_1-C_{12}烷基,其中,W1是选自由N、S和O组成的组的杂原子;

[0049] R_3选自由以下组成的组:C_1-C_{18}烷基、(C_1-C_{18}烷基)OH、(C_1-C_{18}烷基)NH_2、(C_1-C_{18}烷基)SH、(C_0-C4烷基)(C_3-C_6)环烷基、(C_0-C_4烷基)(C_2-C_5杂环)、(C_0-C_4烷基)(C_6-C_{10}芳基)R_7和(C_1-C_4烷基)(C_3-C_9杂芳基),或R_4和R_3连同它们所连接的原子一起形成吡咯烷环;

[0050] R_5是NHR_6或OH;

[0051] R_6是H、C_1-C_8烷基;以及

[0052] R_7选自由H和OH组成的组,其中,在生理条件下的PBS中,A-B从所述GLP-1拮抗剂的化学裂解半衰期($t_{1/2}$)为至少约1小时至约1周。在一种实施方式中,二肽A-B共价连接至所述GLP-1拮抗剂氨基酸序列的N末端α胺。在一种实施方式中,其中,R_1是H、C_1-C_4烷基、(C_1-C_4烷基)OH或(C_1-C_4烷基)NH_2;R_2是H,R_3是C_1-C_6烷基;R_4是H、C_1-C_4烷基或(CH_2)(C_6芳基)R_7;R_5是NH_2;R_7是H或OH以及R_8是氢。

[0053] 本公开还提供了药物组合物,其包括本文所述的GLP-1拮抗剂肽和变体肽以及药学上可接受的载体、稀释剂或赋形剂中的任何一种。在一种实施方式中,提供了一种治疗患有非典型低血糖的患者的方法,其中,所述方法包括向有此需要的患者给药有效升高血糖水平的量的药物组合物的步骤,所述药物组合物包括本文所述的GLP-1拮抗剂肽或变体肽。

[0054] 根据一种实施方式,提供了一种治疗非典型低血糖的方法,其中,所述方法包括给药升高血糖水平的治疗有效量的本文公开的任何GLP-1受体拮抗剂肽的步骤。在一种实施方式中,GLP-1受体拮抗剂被足够大小的脂肪酸或二酸基团酰化以便以高亲和力结合血清白蛋白。在一种实施方式中,所述方法包括给药酰化的GLP-1受体拮抗剂,其中,GLP-1拮抗剂被足够大小的脂肪酸或二酸基团酰化以便以高亲和力结合血清白蛋白。在一种实施方式中,GLP-1受体拮抗剂的N-末端α胺被酰化,任选地在C-末端处进行第二酰化。在一种实施方式中,GLP-1受体拮抗剂在C末端被酰化,任选地,其中酰化氨基酸是C末端氨基酸,并且任选地,GLP-1拮抗剂通过经由酰胺键连接自裂解二肽来进一步修饰,任选地其中,二肽的氨基酸被足够大小的脂肪酰基基团酰化以便以高亲和力结合血清白蛋白。在一种实施方式中,将酰化氨基酸添加到SEQ ID NO:11的C末端位置40处,并且任选地,添加的酰化氨基酸是用C14-C20脂肪酸或脂肪二酸酰化的Lys,任选地经由本文公开的任何间隔基连接至氨基酸侧链。

[0055] 在一种实施方式中,用于治疗非典型低血糖的药物组合物包括本文公开的任何GLP-1受体拮抗剂与可用于治疗低血糖的任何现有治疗剂的组合。例如,药物组合物可以包括本发明的GLP-1受体拮抗剂和以下的一种或多种:葡萄糖补充剂(例如,右旋糖);血糖升高剂,诸如胰高血糖素和胰高血糖素类似物以及胰岛素分泌抑制剂(例如二氮嗪、奥曲肽(octreotide))。

附图说明

[0056] 图1是呈现向小鼠皮下给药媒介物对照、Ex-4(具有SEQ ID NO:1的氨基酸序列的

GLP-1激动剂)或GLP-1拮抗剂肽(DVSRYLEEQAVREFIEWLVRGGPSSGAPPPSK$_{40}$[mPEG-γE-C16]酸;SEQ ID NO:16,随后腹腔内给药葡萄糖(1.5g葡萄糖/kg体重)后血糖水平随时间的剂量依赖性变化的图,其中,在GLP-1拮抗剂后4hr皮下给药葡萄糖。

[0057] 图2A和2B呈现了葡萄糖耐量试验的数据,其中,向小鼠皮下给药GLP-1拮抗剂,随后四小时后腹腔内给药葡萄糖(1.5g葡萄糖/kg体重)。结果表明,SEQ ID NO:16(图2A)的GLP-1拮抗剂是一种完全拮抗剂,其效力远高于GLP-1拮抗剂Ex-9-40(DVSKQMEEEAVRLFIEWLKNGGPSSGAPPPS;SEQ ID NO:2);图2B)。

[0058] 图3呈现了来自葡萄糖耐量试验的数据,其研究了Aib置换对GLP-1拮抗剂功效的影响。向小鼠皮下给药GLP-1拮抗剂,随后四小时后腹腔内给药葡萄糖(1.5g葡萄糖/kg体重)。图3展示了以下的活性:包括(SEQ ID NO:47)的序列的9-40Jant4-K$_{40}$(DVSSYLEEQAVREFIAWLVKGGPSSGAPPPSK;SEQ ID NO:3)的GLP-1拮抗剂肽类似物,及其包括一系列Aib置换的衍生物:SEQ ID NO:43(Aib在位置20处)、SEQ ID NO:44(Aib在位置18处)、以及SEQ ID NO:45(Aib在位置11处)、SEQ ID NO:46(Aib在位置10处)。

[0059] 图4呈现了来自葡萄糖耐量试验的数据,其研究了D-氨基酸置换对GLP-1拮抗剂功效的影响。向小鼠皮下给药GLP-1拮抗剂,随后四小时后腹腔内给药葡萄糖(1.5g葡萄糖/kg体重)。(miniPEG)$_2$-γE-C16酰化的9-40Jant4-K$_{40}$(DVSSYLEEQAVREFIAWLVKGGPSSGAPPPSX$_{40}$(SEQ ID NO:12))肽SEQ ID NO:48的GLP-1拮抗剂活性,其中,X$_{40}$是被(miniPEG)2-γGlu-C16酰化的Lys并且具有C末端酰胺),其相对于媒介物对照和包括置换的变体,其中,X$_{40}$是被C16和C末端酰胺酰化的Lys,具有如下D-构象的相应氨基酸:SEQ ID NO:49(d-Glu^{15})、SEQ ID NO:50(d-Val^{19})、SEQ ID NO:51(d-Ile^{23})。

[0060] 图5A-5D提供了本发明GLP-1受体拮抗剂的前药衍生物的数据。图5A呈现了在PBS中于37℃孵育的前药dK$_7$(mPeg-γE-二酸C18)N-Me-Gly^{8}肽SEQ ID NO:19随时间的质谱分光光度数据。图5B-5D是呈现在葡萄糖耐量试验中,DVSRYLEEQAVREFIEWLVRGGPSSGAPPPSX$_{40}$;SEQ ID NO:18的二肽前药的GLP-1拮抗剂活性的图,其中该肽已被共价连接的dK$_7$(mPeg-γE-二酸C18)N-iPr-Gly^{8}二肽修饰,其中,在给药拮抗剂后24h(图5B)、48h(图5C)或120h(图5D)施用葡萄糖负荷。

[0061] 图6A和6B提供了包括两个酰化氨基酸的本发明GLP-1受体拮抗剂衍生物的数据。图6A和6B是呈现葡萄糖耐量试验结果的图,其中,在给药拮抗剂后24h(图6A)或48h(图6B)施用葡萄糖负荷,其中

[0062] SEQ ID NO:16是R$_{12}$,E$_{24}$,R$_{28,}$K$_{40}$[mPEG-γE-C16]-(Jant4,9-40)酸(SEQ ID NO:16);

[0063] SEQ ID NO:17是dK$_7$(mPeg-γE(C18-二酸)G^8,R$_{12}$,E$_{24}$,R$_{28}$,K$_{40}$[mPEG-γE-C16]-(Jant4,9-40)酸(SEQ ID NO:17);

[0064] SEQ ID NO:18dK^7(mPeg-γE(C18-二酸)i-Pr,G^8,R^{12},E^{24},R^{28},K^{40}[mPEG-

[0065] γE-C16]-(Jant4,9-40)酸(SEQ ID NO:18);

[0066] SEQ ID NO:19dK$_7$(mPeg-γE(C18-二酸)N-Me,G$_8$,R$_{12,}$E$_{24}$,R$_{28}$,K$_{40}$[mPEG-γE-C16]-(Jant4,9-40)酸(SEQ ID NO:19);

[0067] SEQ ID NO:20dK^7(K(mPeg-γE-C18二酸)$_2$G^8,R^{12},E^{24},R^{28} K^{40}[mPEG-γE-

[0068] C18二酸](Jant4,9-40)酰胺(SEQ ID NO:20);

[0069] SEQ ID NO:21dK^{7}(K(mPeg-γE-C18二酸)$_{2}$G^{8},R^{12},E^{24},R^{28} K^{40}[mPEG-γE-C16](Jant4,9-40)酰胺(SEQ ID NO:21);

[0070] SEQ ID NO:22dK^{7}(K(mPeg-γE-C18二酸)$_{2}$N-Me,G^{8},R^{12},E^{24},R^{28}

[0071] K$_{40}$[mPEG-γE-C16](Jant4,9-40)酰胺(SEQ ID NO:22)。

[0072] 图7提供了根据本公开制备的各种N-末端酰化GLP-1拮抗剂(MBX 1391;SEQ ID NO:118;MBX 1401;SEQ ID NO:119;MBX 1402;SEQ ID NO:120;MBX 1403;SEQ ID NO:121;MBX 1404;SEQ ID NO:122;MBX 1406;SEQ ID NO:123;MBX 1407;SEQ ID NO:124;MBX 1408;SEQ ID NO:125;MBX 1416;SEQ ID NO:126)的表。所有这些GLP-1类似物也在羧基末端处被酰化,但最终化合物MBX 1416除外,其仅在N末端处被酰化。

[0073] 图8是呈现小鼠皮下注射10nmol/kg、30nmol/kg、100nmol/kg和300nmol/kg三种不同剂量的双酰化GLP-1拮抗剂(MBX 1407;SEQ ID NO:116),在24hr、48hr和72hr测量血糖水平的图,显示了剂量依赖性反应。

[0074] 图9是呈现以下的图:皮下注射300nmol/kg的双酰化GLP-1拮抗剂(MBX 1407;X-DVSSYLEEQAVREFIAWLVRGGPSSGAPPPSO-酸;SEQ ID NO:116)与单酰化GLP-1拮抗剂(MBX 1342;DLSKQMEEEAVRLFIEWLKNGGPSSGAPPPSO-酰胺;SEQ ID NO:117)的小鼠的血糖水平随着时间的变化,其中X=C18-二酸,并且O=Lys(C18-二酸)。单位点脂质化GLP-1拮抗剂比双位点脂质化GLP-1拮抗剂更有效。

[0075] 图10呈现了各种GLP-1拮抗剂类似物(MBX 1342;SEQ ID NO:127;MBX 1373;SEQ ID NO:128;MBX 1416;SEQ ID NO:126;MBX 1417;SEQ ID NO:129;MBX 1418;SEQ ID NO:130)的IC$_{50}$(nMoles),其是使用GLP-1R过表达293细胞进行体外测定来测量的。

[0076] 图11A和11B是呈现皮下注射300nmol/kg的双酰化GLP-1拮抗剂(MBX 1407;图11A)与单酰化GLP-1拮抗剂(MBX 1342;图11B)的小鼠的体重随时间变化的图。单位点脂质化GLP-1拮抗剂比双位点脂质化GLP-1拮抗剂更有效。

[0077] 图12呈现了皮下注射100或300nmol/kg的非酰化GLP-1拮抗剂(MBX 1118(Ex-9))、双酰化GLP-1拮抗剂(MBX 1407)和单酰化GLP-1拮抗剂(MBX 1416)的小鼠血糖随时间变化的数据,分别在第2、4、7、9、11和14天测量。

[0078] 图13示出了皮下注射100或300nmol/kg的非酰化GLP-1拮抗剂(MBX 1118(Ex-9))、双酰化GLP-1拮抗剂(MBX 1407)和单酰化GLP-1拮抗剂(MBX 1416)后第14天进行的葡萄糖耐量试验的结果。

具体实施方式

[0079] 定义

[0080] 在描述和要求保护本发明时,将根据以下给出的定义使用以下术语。

[0081] 如本文使用的术语“约”是指大于或小于10%所述值或值的范围,但并不旨在仅将任何值或值的范围指定为仅此更宽的定义。以术语“约”开头的每个值或值范围还旨在涵盖所述绝对值或值范围的实施方式。

[0082] 如本文使用的术语“氨基酸”涵盖包含氨基和羧基官能团两者的任何分子,其中,氨基和羧基基团与相同的碳(α碳)附接。α碳任选地可以具有一个或两个另外的有机取代基。氨基酸可以通过其三字母代码、单字母代码来指定,或者在某些情况下通过其侧链的名

称来指定。例如,包括连接至α碳的环己烷基团的非常规氨基酸被称为“环己烷”或“环己基”。出于本公开的目的,在未指定其立体化学的情况下,氨基酸的命名旨在涵盖氨基酸的L或D形式,或外消旋混合物。然而,在氨基酸由其三个字母代码指定的情况下(即Lys),这种命名旨在指定氨基酸的天然L形式,而D形式将通过在三个字母代码或单个代码之前包含小写d来指定(即dLys或dK)。

[0083] 如本文使用的术语“羟基酸”是指经修饰以用羟基基团替换α碳氨基基团的氨基酸。

[0084] 如本文使用的术语“非编码氨基酸”涵盖不是以下20种氨基酸中任一种的L-异构体的任何氨基酸:Ala、Cys、Asp、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Pro、Gln、Arg、Ser、Thr、Val、Trp、Tyr。

[0085] “生物活性多肽”是指能够在体外和/或体内发挥生物效应的多肽。

[0086] 如本文使用的,对肽的一般提及旨在涵盖具有修饰的氨基和羧基末端的肽。例如,指定标准氨基酸的氨基酸序列旨在涵盖N末端和C末端的标准氨基酸以及N末端的相应羟基酸和/或被修饰以包括取代末端羧酸的酰胺基团的相应C末端氨基酸。

[0087] 如本文使用的“酰化”氨基酸是包括对于天然存在的氨基酸而言是非天然的酰基基团的氨基酸,无论其通过何种方式产生。产生酰化氨基酸和酰化肽的示例性方法是本领域已知的,并且包括在包含在肽中之前将氨基酸酰化,或进行肽合成随后对肽进行化学酰化。在一些实施方式中,酰基基团使肽具有以下一项或多项:(i)循环半衰期延长,(ii)作用起效延迟,(iii)作用持续时间延长,(iv)对蛋白酶的抗性改善,以及(v)在GLP-1受体处的效力增加。

[0088] 如本文使用的,“烷基化”氨基酸是包括对于天然存在的氨基酸而言是非天然的烷基基团的氨基酸,无论其产生的方式如何。产生烷基化氨基酸和烷基化肽的示例性方法是本领域已知的,并且包括在包含在肽中之前将氨基酸烷基化,或进行肽合成随后对肽进行化学烷基化。不受任何特定理论的束缚,据信肽的烷基化将实现与肽的酰化相似(如果不相同的话)的效果,例如循环半衰期延长、作用起效延迟、作用持续时间延长、对蛋白酶的抗性改善。

[0089] 如本文使用的,术语“药学上可接受的载体”包括以下的任何一种:任何标准药物载体,诸如磷酸盐缓冲盐溶液、水、乳剂(诸如油/水或水/油乳剂)以及各种类型的润湿剂。该术语还包括经美国联邦政府监管机构批准或在美国药典中列出的用于动物(包括人类)的任何试剂。

[0090] 如本文使用的术语“药学上可接受的盐”是指保留母体化合物的生物活性并且在生物学或其他方面不是非期望的化合物的盐。本文公开的许多化合物能够凭借氨基和/或羧基基团或与其类似的基团的存在而形成酸和/或碱盐。

[0091] 如本文使用的,术语“亲水部分”是指容易溶于水或容易吸收水并且在哺乳动物物种在体内耐受而无毒性作用(即生物相容性)的任何化合物。亲水部分的实例包括聚乙二醇(PEG)、聚乳酸、聚乙醇酸、聚乳酸-聚乙醇酸共聚物、聚乙烯醇、聚乙烯吡咯烷酮、聚甲噁唑啉、聚乙基噁唑啉、聚甲基丙烯酸羟乙酯、聚羟丙基甲基丙烯酰胺、聚甲基丙烯酰胺、聚二甲基丙烯酰胺和衍生纤维素诸如羟甲基纤维素或羟乙基纤维素及其共聚物,以及天然聚合物,包括例如白蛋白、肝素和右旋糖酐。

[0092] 如本文使用的,术语“治疗”包括减轻与特定疾患或病症相关的症状和/或预防或消除所述症状。例如,如本文使用的术语“治疗低血糖”通常指维持或增加血糖水平至接近正常水平。

[0093] 如本文使用的,GLP-1受体拮抗剂的“有效”量或“治疗有效量”是指无毒但足以提供期望效果的GLP-1拮抗剂的量。例如,一种期望效果是预防或治疗低血糖。“有效”的量将因受试者而异,取决于个体的年龄和一般状况、给药方式等。因此,并不总是可以指定确切的“有效量”。然而,任何个体情况下的适当“有效”量可以由本领域普通技术人员使用常规实验确定。

[0094] 术语“肠胃外”意指不通过消化道而是通过一些其他途径,诸如鼻内、吸入、皮下、肌内、椎管内或静脉内。

[0095] 如本文使用的术语“衍生物”旨在涵盖对化合物(例如,氨基酸)的化学修饰,包括体外化学修饰,例如通过在多肽的一个或多个位置的侧链中引入基团,例如酪氨酸残基中的硝基基团,或酪氨酸残基中的碘,或通过将游离羧基基团转化为酯基团或酰胺基团,或通过酰化将氨基基团转化为酰胺,或通过酰化羟基基团产生酯,或通过伯胺的烷基化产生仲胺或将亲水部分连接至氨基酸侧链。其他衍生物是通过多肽中氨基酸残基的侧链的氧化或还原而获得的。

[0096] 如本文使用的术语“同一性”涉及两个或更多个序列之间的相似性。同一性通过将相同残基数除以残基总数并将乘积乘以100来获得百分比来测量。因此,完全相同序列的两个拷贝具有100%同一性,而相对于彼此具有氨基酸缺失、添加或置换的两个序列具有较低程度的同一性。本领域技术人员将认识到,若干计算机程序,诸如采用算法诸如BLAST(Basic Local Alignment Search Tool,Altschul et al.(1993)J.Mol.Biol.215:403-410)的计算机程序可用于确定序列同一性。

[0097] 如本文使用的,术语分子对第一受体相对于第二受体的“选择性”是指以下比率:分子在第二受体处的EC_{50}除以分子在第一受体处的EC_{50}。例如,在第一受体处的EC_{50}为1nM并且在第二受体处的EC_{50}为100nM的分子对第一受体的选择性是相对于第二受体的100倍。

[0098] 如本文使用的氨基酸“修饰”是指氨基酸的置换,或通过向氨基酸添加化学基团和/或从氨基酸去除化学基团的氨基酸衍生,并且包括用人蛋白中常见的20种氨基酸以及非典型或非天然存在的氨基酸中的任何一种进行置换。非典型氨基酸的市售来源包括Sigma-Aldrich(Milwaukee,WI)、ChemPep Inc.(Miami,FL)和Genzyme Pharmaceuticals(Cambridge,MA)。非典型氨基酸可以从商业供应商购买、从头合成、或从天然存在的氨基酸化学修饰或衍生。

[0099] 如本文使用的氨基酸“置换”是指一个氨基酸残基被不同氨基酸残基取代。

[0100] 如本文使用的,术语“保守氨基酸置换”在本文中定义为以下五组中的一组内的交换:

[0101] I.小的脂肪族、非极性或弱极性残基:Ala、Ser、Thr、Pro、Gly;

[0102] II.极性、带负电荷的残基及其酰胺:

[0103] Asp、Asn、Glu、Gln、半胱氨酸和高半胱氨酸(homocysteic acid);

[0104] III.极性、带正电荷的残基:

[0105] His、Arg、Lys;鸟氨酸(Orn)

[0106] IV.大脂肪族非极性残基：

[0107] Met、Leu、Ile、Val、Cys、正亮氨酸(Nle)、高半胱氨酸

[0108] V.大芳香族残基：

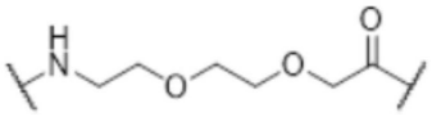
[0109] Phe、Tyr、Trp、乙酰基苯丙氨酸。

[0110] 在整个申请中，所有按编号提及特定氨基酸位置(例如，位置28)是指天然Exendin4(SEQ ID NO:1)中该位置处的氨基酸或其任何类似物中相应的氨基酸位置。例如，本文提及的“位置28”将意指Exendin4类似物的相应位置27，其中，SEQ ID NO:1的第一个氨基酸已缺失。因此，9-39Exendin4代表N末端截短的Exendin4肽，其中，前8个氨基酸已缺失。此外，提及大于39的位置(天然Exendin4仅具有39个氨基酸)意在指在SEQ ID NO:1的相应位置39之后具有C末端氨基酸延伸的类似物中的氨基酸位置。

[0111] 如本文使用的通用术语“聚乙二醇链”或“PEG链”是指支链或直链中的环氧乙烷和水的缩聚物的混合物，由通式$H(OCH_2CH_2)_nOH$表示，其中，n是至少2。“聚乙二醇链”(或“PEG链”)与数字后缀组合使用以指示其近似平均分子量。例如，PEG-5,000是指总平均分子量为约5,000道尔顿的聚乙二醇链。

[0112] 如本文使用的术语“聚乙二醇化”和类似术语是指通过将聚乙二醇链与化合物连接而从其天然状态修饰的化合物。“聚乙二醇化多肽”是具有与多肽共价结合的PEG链的多肽。

[0113] 如本文使用的术语“miniPEG”或“OEG”定义了包括以下结构的官能化聚乙烯化合物：

[0114] 

[0115] 如本文使用的“接头”或“间隔基”是将两个单独的实体彼此结合的键、分子或分子基团。接头可以提供两个实体的最佳间隔，或者可以进一步提供允许两个实体彼此分离的不稳定连接。不稳定连接包括可光裂解基团、酸不稳定部分、碱不稳定部分和可酶切基团。

[0116] 如本文使用的“二聚体”是包括经由接头彼此共价结合的两个亚基的复合物。术语二聚体，当在没有任何限定语言的情况下使用时，涵盖同二聚体和异二聚体两者。同二聚体包括两个相同的亚基，而异二聚体包括两个不同的亚基，尽管这两个亚基彼此基本相似。

[0117] 如本文使用的术语C16-C20脂肪酸表示结构：

[0118] $CO(CH_2)_{14-20}CH_3$以及术语C16-C20二酸表示结构：$-CO(CH_2)_{14-20}COOH$，其中，前缀“C16-C20”表示该名称所涵盖的化合物中可变的碳总数。例如，C18二酸代表结构：$-CO(CH_2)_{16}COOH$。如本文使用的，对酰化氨基酸的一般性提及涵盖其侧链被脂肪酸酰化的氨基酸和其侧链被二酸酰化的氨基酸两者。

[0119] 如本文公开的生理条件旨在包括约35℃至40℃的温度和约7.0至约7.4的pH，并且更典型地包括7.2至7.4的pH和36℃至38℃的温度。由于人体的生理pH和温度在高度限定的范围内受到严格调节，因此从二肽/药物复合物(前药)到药物的转化速度将表现出较高的患者内和患者间再现性。

[0120] 如本文使用的，术语“C_1-C_n烷基”(其中n可为1至6)表示具有一个至指定数目碳原子的支链或直链烷基基团。典型的C_1-C_6烷基基团包括但不限于甲基、乙基、正丙基、异丙基、

丁基、异丁基、仲丁基、叔丁基、戊基、己基等。

[0121] 如本文使用的,术语“C_2-C_n烯基”(其中n可为2至6)表示具有2至指定数目的碳原子和至少一个双键的烯属不饱和支链或直链基团。此类基团的实例包括但不限于1-丙烯基、2-丙烯基(-CH_2-CH=CH_2)、1,3-丁二烯基(-CH=CHCH=CH_2)、1-丁烯基(-CH=$CHCH_2CH_3$)、己烯基、戊烯基等。

[0122] 术语“C_2-C_n炔基”(其中n可为2至6)是指具有2至n个碳原子和至少一个三键的不饱和支链或直链基团。此类基团的实例包括但不限于1-丙炔基、2-丙炔基、1-丁炔基、2-丁炔基、1-戊炔基等。

[0123] 如本文使用的术语“芳基”是指具有一个或两个芳环的单环或双环碳环体系,包括但不限于苯基、萘基、四氢萘基、茚满基、茚基等。芳环的大小和取代基或连接基团的存在通过指定存在的碳数来指示。例如,术语“(C_1-C_3烷基)(C_6-C_{10}芳基)”是指经由一至三元烷基链连接至母体部分的5至10元芳基。

[0124] 如本文使用的术语“杂芳基”是指包含一个或两个芳环并且在芳环中包含至少一个氮、氧或硫原子的单环或双环的环体系。杂芳环的大小以及取代基或连接基团的存在通过指定存在的碳数来指示。例如,术语“(C_1-C_n烷基)(C_5-C_6杂芳基)”是指经由一至“n”元烷基链连接至母体部分的5或6元杂芳基。

[0125] 如本文使用的,术语“卤素”是指选自由氟、氯、溴和碘组成的组中的一种或多种成员。

[0126] 如本文使用的,术语“患者”在没有进一步指定的情况下旨在涵盖任何温血脊椎动物驯养动物(包括例如但不限于牲畜、马、猫、狗和其他宠物)和人,并且不限于在医师直接护理下的个体。

[0127] 如本文使用的,术语“分离的”意指已从其自然环境中移出。

[0128] 如本文使用的,术语“纯化的”涉及以基本不含通常在自然或天然环境中与分子或化合物相关的污染物的形式分离分子或化合物,并且意指由于与原始组合物的其他组分分离而导致纯度增加。术语“纯化的肽”在本文中用于描述已与其他化合物分离的肽,该其他化合物包括但不限于核酸分子、脂质和碳水化合物。

[0129] 如本文使用的,术语“肽”涵盖2个或更多个氨基酸且通常少于50个氨基酸的序列,其中,氨基酸是天然存在的或编码的或非天然存在的或非编码的氨基酸。非天然存在的氨基酸是指体内不天然存在但可掺入本文所述的肽结构中的氨基酸。如本文使用的,“非编码”是指不是以下20种氨基酸中任一种的L-异构体的氨基酸:Ala、Cys、Asp、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Pro、Gln、Arg、Ser、Thr、Val、Trp、Tyr。

[0130] 如本文使用的,“部分非肽”是指其中分子的一部分是具有生物活性的化学化合物或取代基并且不包括氨基酸序列的分子。

[0131] “肽模拟物”是指具有与现有肽的一般结构不同的结构,但以与现有肽类似的方式发挥作用的化合物,例如通过模拟该肽的生物活性。肽模拟物通常包括天然存在的氨基酸和/或非天然氨基酸,但也可包括对肽主链的修饰。例如,肽模拟物可以包括天然存在的氨基酸序列,其中插入或置换有非肽部分,例如反向反转片段,或掺入有非肽键,诸如氮杂肽键(CO被NH取代)或假肽键(例如,NH被CH_2取代),或酯键(例如,缩肽,其中一个或多个酰胺(-CONHR-)键被酯(COOR)键替代)。替代地,肽模拟物可以不含任何天然存在的氨基酸。

[0132] 如本文使用的,术语“带电荷的氨基酸”或“带电荷的残基”是指包括在生理pH下的水性溶液中带负电荷(即,去质子化)或带正电荷(即,质子化)的侧链的氨基酸。例如,带负电荷的氨基酸包括天冬氨酸、谷氨酸、半胱氨酸、高半胱氨酸和高谷氨酸,而带正电荷的氨基酸包括精氨酸、赖氨酸和组氨酸。带电荷的氨基酸包括人蛋白中常见的20种氨基酸中的带电荷的氨基酸,以及非典型或非天然存在的氨基酸。

[0133] 如本文使用的,术语“酸性氨基酸”是指包括第二酸性部分(除了氨基酸的α羧酸之外)(包括例如侧链羧酸或磺酸基团)的氨基酸。

[0134] 如本文使用的,术语“前药”定义为在表现出其全部药理学作用之前经历化学修饰的任何化合物。

[0135] 如本文使用的,“二肽”是α-氨基酸

[0136] 或α-羧基酸通过肽键连接至另一氨基酸的结果。

[0137] 如本文使用的,没有任何进一步指定的术语“化学裂解”涵盖导致共价化学键断裂的非酶促反应。

[0138] 如本文使用的,术语“非典型低血糖”定义为不依赖于外源胰岛素给药而在患者中发生的低血糖病症。

[0139] 缩写:

[0140] 小写k=赖氨酸的D异构体

[0141] 大写K=赖氨酸的L异构体

[0142] γE=γ谷氨酸的L异构体,

[0143] $(miniPEG)_2$=$COCH_2OCH_2CH_2OCH_2CH_2NH$

[0144] $COC_{16}H_{32}CO_2H$=(C18二酸)

[0145] (N-Me)G=肌氨酸

[0146] 实施方式

[0147] 根据本公开的一种实施方式,提供了用于治疗患有独立于外源性胰岛素给药而导致的低血糖病症(即非典型低血糖)的患者的组合物和方法。根据本公开,将包括GLP-1拮抗剂的组合物以足以增加血糖水平和/或减轻与低血糖相关的相关急性症状和慢性结果的量给药于患有非典型低血糖的患者。在一种实施方式中,经历非典型低血糖的患者还患有高胰岛素血症的病症。在一种实施方式中,高胰岛素血症病症发生在患者接受减重手术之后。

[0148] 根据一种实施方式,一种治疗患有非典型低血糖的患者的方法,包括给药酰化的GLP-1受体拮抗剂肽,其中,该GLP-1受体拮抗剂肽在N末端和/或C末端处被被足够大小的脂肪酸或脂肪二酸基团酰化以便以高亲和力结合血清白蛋白。在一种实施方式中,C14-C20酰基基团共价结合至GLP-1受体拮抗剂肽的N末端α胺。

[0149] 在一种实施方式中,GLP-1受体拮抗剂在GLP-1受体拮抗剂的N-末端处被酰化,任选地其中,乙酰基基团与胰高血糖素肽的N-末端α胺共价连接。酰化胰高血糖素肽的酰基基团可以是任何大小,例如任何长度的碳链,并且可以是直链或支链的。在本发明的一些特定实施方式中,酰基基团是C12至C30脂肪酸或脂肪二酸。例如,酰基基团可以是以下的任何一种:C12脂肪酸/二酸、C14脂肪酸/二酸、C16脂肪酸/二酸、C18脂肪酸/二酸、C20脂肪酸/二酸、C22脂肪酸/二酸、C24脂肪酸/二酸、C26脂肪酸/二酸、C28脂肪酸/二酸、或C30脂肪酸/二酸。在一些实施方式中,酰基基团是C14至C20脂肪酸,例如C14脂肪酸或脂肪二酸、C16脂肪

酸或脂肪二酸、或者C16脂肪酸或脂肪二酸。

[0150] 根据一种实施方式,酰化GLP-1受体拮抗剂肽包括氨基酸序列DVSSYLEEQAVREFIAWLVKGGPSSGAPPPSK(SEQ ID NO:3)或者与SEQ ID NO:3具有至少95%序列同一性同时保留GLP-1受体拮抗活性的其类似物。

[0151] 根据一种实施方式,本公开的酰化GLP-1受体拮抗剂肽包括肽DVSSYLEEQAVREFIAWLVKGGPSSGAPPPSK(SEQ ID NO:3)的类似物,其中,GLP-1受体拮抗剂与SEQ ID NO:3因1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个氨基酸修饰而不同,其中,该修饰选自氨基酸置换、添加或对氨基酸结构的修饰,包括但不限于C末端氨基酸的酰化和/或酰胺化。在一种实施方式中,氨基酸修饰是肽的位置12、16、18、19、24、26、27和28中的一处或多处的氨基酸置换和/或在位置15、16、17、19、20、21和23中的一处或多处被d-异构体置换(相对于天然Exendin4(SEQ ID NO:1)编号)。在一种实施方式中,SEQ ID NO:3的类似物通过用C16-C18脂肪酸或二酸任选地经由间隔基酰化C末端氨基酸侧链来进一步修饰。

[0152] 根据一种实施方式,提供了一种GLP-1受体拮抗剂,其包括DVSRYLEEQAVREFIEWLVRGGPSSGAPPPSK(SEQ ID NO:4)的氨基酸序列,或者与SEQ ID NO:4因1、2、3、4或5个氨基酸置换而不同,同时保留GLP-1受体拮抗剂活性的氨基酸序列,前提条件是GLP-1拮抗剂肽不包括SEQ ID NO:3的序列。在一种实施方式中,提供了与SEQ ID NO:4的肽因以下一项或多项而不同的肽:

[0153] i.用Trp或dTrp置换位置7、10、11、13或16中的任何处的1、2或3个氨基酸;

[0154] i.用D构象的相应氨基酸置换位置15、16或23中的任何处的1、2或3个氨基酸;

[0155] ii.用Aib置换位置16、18、19、24、26或28中的任何处的1、2或3个氨基酸;

[0156] iii.在位置12处用酰化氨基酸、任选地酰化赖氨酸置换;

[0157] iv.在位置16处用dGlu、Asp、高谷氨酸(homoglutamic acid)或高半胱氨酸置换;

[0158] v.在位置19处用环丙烷、环戊烷、环己烷或苯基甘氨酸置换;

[0159] vi.在位置20处用dArg、高赖氨酸(homolysine)或瓜氨酸置换;

[0160] vii.用酰胺置换天然C末端羧基基团;

[0161] viii.添加1至3个氨基酸的N末端延伸,任选地其中,N末端延伸氨基酸之一被酰化;

[0162] ix.用酰化氨基酸置换C末端氨基酸;

[0163] x.i)至x)的任意组合。

[0164] 根据一种实施方式,提供了一种GLP-1受体拮抗剂,其包括以下氨基酸序列:

[0165] R_{10}-DV$X_{11}X_{12}$YL$X_{15}X_{16}$QA$X_{19}X_{20}$EFX_{23}EWLVRGGPSSGAPPPSX_{40}-R_{20}SEQ ID NO:23),其中

[0166] R_{10}是NH_2、-CO$(CH_2)_{14-20}CH_3$、-CO$(CH_2)_{14-20}$COOH或者1、2或3个氨基酸的N末端延伸,其中,N末端延伸的氨基酸之一被C16-C18脂肪酸或二酸任选地经由间隔基酰化,任选地其中,R_{10}是具有以下结构的二肽:X_7X_8,其中,X_7是酰化氨基酸,任选地酰化Lys或酰化dLys,并且X_8是Gly或C_1-C_4 N-烷基化Gly;

[0167] X_{11}是Trp、dTrp或Ser;

[0168] X_{12}是Arg或酰化氨基酸,任选地酰化Lys;

[0169] X_{15}是Glu或dGlu;

[0170] X_{16}是Glu、dGlu、Asp、高谷氨酸或高半胱氨酸;

[0171] X_{19}是Val、环丙烷、环戊烷、环己烷或苯基甘氨酸;

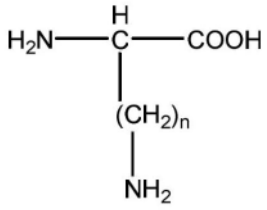
[0172] X_{20}是Arg、高赖氨酸或瓜氨酸;

[0173] X_{23}是Ile或dIle;

[0174] X_{40}是酰化氨基酸,任选地酰化Lys;以及

[0175] R_{20}是COOH或$CONH_2$,任选地其中,选自位置7、10、13或16的1、2或3个氨基酸被Trp或dTrp置换,任选的前提条件是位置10和11不能同时是Trp或dTrp;进一步任选的前提条件是R_{10}和X_{12}不能同时包括酰化氨基酸;任选地其中,位置16、18、19、24、26或28中的任何处的1、2或3个氨基酸被Aib置换。

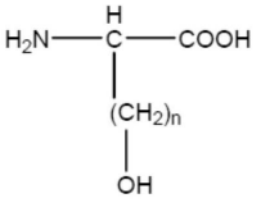
[0176] 在一种实施方式中,SEQ ID NO:23的肽的位置7、12和40中仅一个包括酰化氨基酸。在一种实施方式中,SEQ ID NO:23的肽的位置7、12和40中的两个包括酰化氨基酸。在一种实施方式中,位置7、12和40处的酰化氨基酸独立地是包括式I(任选地,Lys)或式II(任选地,Ser)的结构的氨基酸,其中,式I和式II中的每一个是:



其中，n=1 至 4

[式 I]和

[0177]



其中，n+1 至 4

[式 II]

[0178] 在一种实施方式中,提供了SEQ ID NO:23的肽,其中,R_{10}是X_7X_8,其中,X_7是酰化Lys或酰化dLys,X_{12}是Arg并且X_{40}是酰化Lys。在一种实施方式中,提供了SEQ ID NO:23的肽,其中,R_{10}是NH_2,X_{12}是酰化Lys并且X_{40}是酰化Lys。在一种实施方式中,提供了SEQ ID NO:23的肽,其中,R_{10}是NH_2,X_{12}是Arg并且X_{40}是酰化Lys。在一种实施方式中,SEQ ID NO:23的肽的酰化氨基酸是酰化Lys残基,任选地其中,酰化Lys残基独立地被C14-C24脂肪酸或脂肪二酸、或C16-C18脂肪酸或脂肪二酸酰化,任选地其中,脂肪酸或脂肪二酸经由本文公开的任何间隔基分子连接至Lys残基的侧链。

[0179] 根据一种实施方式,提供了一种GLP-1受体拮抗剂,其包括以下氨基酸序列:

[0180] R_{10}-DV$X_{11}X_{12}$YLEX_{16}QAVREFIEWLVRGGPSSGAPPPSX_{40}-R_{20} SEQ ID NO:24),

[0181] 其中,

[0182] R_{10}是NH_2-CO$(CH_2)_{14-20}CH_3$、-CO$(CH_2)_{14-20}$COOH或具有以下结构的二肽:X_7X_8,其中X_7

是酰化氨基酸,任选地酰化Lys或酰化dLys,并且X_8是Gly或C_1-C_4 N-烷基化Gly;

[0183] X_{11}是Trp、dTrp或Ser;

[0184] X_{12}是Arg或酰化氨基酸,任选地酰化Lys;

[0185] X_{16}是Glu或Asp;

[0186] X_{40}是酰化氨基酸,任选地酰化Lys;以及

[0187] R_{20}是COOH或$CONH_2$,任选地其中选自位置16、17、18、20或21的1、2或3个氨基酸被D构象的相应氨基酸置换,和/或位置16、18、19、24、26或28中的任何处的1、2或3个氨基酸被Aib置换。

[0188] 根据一种实施方式,提供了一种GLP-1受体拮抗剂,其包括以下氨基酸序列:

[0189] R_{10}-DV$X_{11}X_{12}$YLEX_{16}QAVREFIEWLVRGGPSSGAPPPSX_{40}-R_{20} SEQ ID NO:24),

[0190] 其中,

[0191] R_{10}是结构如下的二肽:X_7X_8,其中,X_7是酰化Lys或酰化dLys,并且X_8是Gly或肌氨酸;

[0192] X_{11}是Trp或dTrp;

[0193] X_{12}是Arg;

[0194] X_{16}是Glu;

[0195] X_{40}是酰化Lys;以及

[0196] R_{20}是COOH或$CONH_2$,其中,肽的所述酰化Lys残基任选地经由本文公开的间隔基用C16-C18脂肪酸或脂肪二酸独立地酰化,任选地其中,位置16、18、19、24、26或28中的任何处的1、2或3个氨基酸被Aib置换。

[0197] 在一种实施方式中,提供了一种GLP-1受体拮抗剂,其中,拮抗剂包括以下氨基酸序列:

[0198] D$X_{10}X_{11}X_{12}$YL$X_{15}X_{16}$QAVREF$X_{23}X_{24}$WLVRGGPSSGAPPPS(SEQ ID NO:98);

[0199] 其中,

[0200] X_{10}是Trp、dTrp或Val;

[0201] X_{11}是Trp、dTrp或Ser;

[0202] X_{12}是Arg、Lys或Ser;

[0203] X_{15}是Glu或dGlu;

[0204] X_{16}是Trp、dTrp、dGlu或Glu;

[0205] X_{23}是Ile或dIle;

[0206] X_{24}是Ala或Glu;

[0207] 以及

[0208] 所述GLP-1受体拮抗剂被足够大小的脂肪酸或二酸基团酰化以便以高亲和力结合血清白蛋白,任选地其中,将GLP-1受体拮抗剂的氨基酸用C16-C18脂肪酸或C16-C18脂肪二酸酰化。

[0209] 在一种实施方式中,提供了一种GLP-1受体拮抗剂,其中,拮抗剂包括以下氨基酸序列:

[0210] R_{10}-D$X_{10}X_{11}X_{12}$YL$X_{15}X_{16}$QAVREF$X_{23}X_{24}$WLVRGGPSSGAPPPS-R_{20}(SEQ ID NO:98),或与SEQ ID NO:98因1或2个氨基酸置换而不同的序列;

[0211] 其中,

[0212] X_{10}是Trp、dTrp或Val;

[0213] X_{11}是Trp、dTrp或Ser;X_{12}是Arg、Lys或Ser;X_{15}是Glu或dGlu

[0214] X_{16}是Trp、dTrp、dGlu或Glu;X_{23}是Ile或dIle;

[0215] X_{24}是Ala或Glu;

[0216] R_{10}是NH_2、-$CO(CH_2)_{14-20}CH_3$或者-$CO(CH_2)_{14-20}COOH$;以及R_{20}是

[0217] COOH或$CONH_2$。在一种实施方式中,提供SEQ ID NO:98的序列,其中

[0218] X_{10}是Val;

[0219] X_{11}是Trp、dTrp或Ser;X_{12}是Arg、Lys或Ser;X_{15}是Glu或dGlu

[0220] X_{16}是dGlu或Glu;X_{23}是Ile;

[0221] X_{24}是Ala或Glu;

[0222] R_{10}是-$CO(CH_2)_{14-20}CH_3$或-$CO(CH_2)_{14-20}COOH$以及

[0223] R_{20}是COOH,任选地其中,肽在相对于天然Exendin4序列(SEQ ID NO:1)的位置16、18、19、24、26或28中的任何处包括一个或多个Aib置换。

[0224] 在一种实施方式中,提供了一种GLP-1受体拮抗剂,其中,拮抗剂包括以下氨基酸序列:

[0225] R_{10}-$DX_{10}X_{11}X_{12}YLX_{15}X_{16}QAVREFX_{23}X_{24}WLVRGGPSSGAPPPS$-$R_{20}$(SEQ ID NO:98);

[0226] 其中,

[0227] X_{10}是Val;

[0228] X_{11}是Ser;

[0229] X_{12}是Arg;

[0230] X_{15}是Glu或dGlu;

[0231] X_{16}是dGlu或Glu;

[0232] X_{23}是Ile;

[0233] X_{24}是Glu;以及

[0234] R_{10}是-$CO(CH_2)_{14-20}CH_3$或-$CO(CH_2)_{14-20}COOH$以及

[0235] R_{20}是COOH或$CONH_2$。

[0236] 在一种实施方式中,GLP-1拮抗剂肽包括以下的氨基酸序列:R_{10}-DVSSYLEEQAVREFIAWLVKGGPSSGAPPPS(SEQ ID NO:3)或

[0237] 与SEQ ID NO:3因1、2或3个氨基酸置换而不同同时保留GLP-1激动剂活性的氨基酸序列,其中,R_{10}是与SEQ ID NO:3的氨基酸序列的N末端α胺连接的-$CO(CH_2)_{14-20}CH_3$或-$CO(CH_2)_{14-20}COOH$,以及R_{20}是COOH或$CONH_2$,任选地其中,R_{20}是COOH。

[0238] 在一种实施方式中,GLP-1拮抗剂肽包括以下氨基酸序列:$DVX_{11}RYLQX_{15}X_{16}AVREFX_{23}EWLVRGGPSSGAPPPSX_{40}$-$R_{20}$(SEQ ID NO:25),其中,

[0239] X_{11}是Trp、dTrp或Ser;

[0240] X_{15}是Glu或dGlu;

[0241] X_{16}是Glu或dGlu;

[0242] X_{23}是Ile或dIle;

[0243] X_{40}是酰化氨基酸,任选地是用C16-C18脂肪酸或二酸任选地经由间隔基酰化的

Lys;以及

[0244] R_{20}是COOH或$CONH_2$。任选地,SEQ ID NO:25的GLP-1拮抗剂通过以下来进一步修饰:在相对于SEQ ID NO:1的天然Exendin4序列的编号的位置16、18、19、24、26或28中的任何处的由一个或多个Aib置换或者任选地在位置12处由酰化Lys置换。在一种实施方式中,提供了SEQ ID NO:25的肽,其进一步包括在位置12处酰化Lys的置换和任选在位置27处Aib的置换。

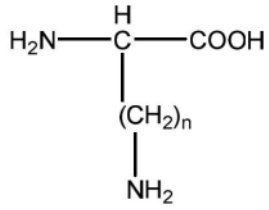
[0245] 在一种实施方式中,GLP-1拮抗剂肽包括以下氨基酸序列:

[0246] $DVX_{11}RYLEEQAVREFIEWLVRGGPSSGAPPPSX_{40}R_2$(SEQ ID NO:6)或

[0247] $X_7X_8DVX_{11}RYLEEQAVREFIEWLVRGGPSSGAPPPSX_{40}R_{20}$(SEQ ID

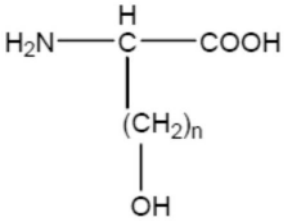
[0248] NO:26),其中,X_7是酰化Lys或酰化dLys,并且X_8是Gly或肌氨酸,X_{11}是Trp或dTrp,X_{40}是酰化氨基酸,任选地酰化Lys,其中,酰化Lys残基包括任选地经由间隔基共价连接至Lys侧链的C16-C18脂肪酸或二酸,以及R_{20}是COOH或$CONH_2$。任选地,SEQ ID NO:6和SEQ ID NO:26的肽可以基于天然Exendin4(SEQ ID NO:1)的编号在位置16、18、19、24、26或28中的任何处用Aib置换进一步修饰,或者SEQ ID NO:6的肽任选地在位置12处被酰化Lys置换。

[0249] 在一种实施方式中,GLP-1拮抗剂肽包括以下氨基酸序列:$DVX_{11}RYLEEQAVREFIEWLVRGGPSSGAPPPSX_{40}R_{20}$(SEQ ID NO:6或$DVWRYLEEQAVREFIEWLVRGGPSSGAPPPSX_{40}R_{20}$(SEQ ID NO:7)或者与SEQ ID NO:6或SEQ ID NO:7因1或2个氨基酸置换而不同的氨基酸,其中,X_{11}是Trp或dTrp,X_{40}是具有酰基基团的氨基酸,该酰基基团具有足够的大小以便以高亲和力结合连接至氨基酸的侧链的血清白蛋白,任选地其中,酰基基团经由间隔基连接,并且R_{20}是COOH或$CONH_2$,任选地在相对于天然Exendin4(SEQ ID NO:1)的编号的位置16、18、19、24、26或28中的任何一个位置处具有Aib置换,并且任选地其中,C末端氨基酸的羧基基团被酰胺置换(即,R_{20}是$CONH_2$)。在一种实施方式中,X_{40}是包括式I(任选地,Lys)、式II(任选地,Ser)或式III(任选地,Cys)的结构的氨基酸,其中,式I、II和III中的每一个是:



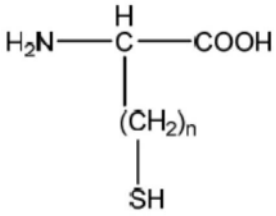
其中，n=1 至 4

[式 I]；

[0250] 

其中，n=1 至 4

[式 II]



其中，n=1 至 4

[式 III]。

[0251] 在一种实施方式中,GLP-1拮抗剂肽包括以下氨基酸序列：

[0252] $DVX_{11}RYLEEQAVREFIEWLVRGGPSSGAPPPSX_{40}$-COOH(SEQ ID NO:9)或

[0253] $DVX_{11}RYLEEQAVREFIEWLVRGGPSSGAPPPSX_{40}$-$NH_2$(SEQ ID NO:10),其中,$X_{11}$是Trp或dTrp,并且$X_{40}$是具有任选地经由间隔基连接至氨基酸侧链的酰基基团的氨基酸。在一种实施方式中,X_{40}是酰化Lys。

[0254] 根据一种实施方式,提供了一种GLP-1受体拮抗剂肽,其具有以下氨基酸序列：

[0255] $DVWX_{12}YLEEQAVREFIEWLVRGGPSSGAPPPSX_{40}$-$NH_2$(SEQ ID NO:8),

[0256] 其中,

[0257] X_{12}是酰化Lys;以及

[0258] X_{40}是具有取代C末端羧酸的酰胺的酰化Lys,其中,酰化Lys的酰基基团是C16-C18酸或二酸,任选地经由间隔基连接至Lys侧链。

[0259] 在又另一方面,本文公开的任何GLP-1受体拮抗剂的位置1处的氨基酸被修饰以抑制肽的蛋白酶降解。在一种实施方式中,蛋白酶的抑制通过以下实现：

[0260] i.酰化N末端氨基酸的侧链;

[0261] ii.用其D-立体异构体置换N末端氨基酸;

[0262] iii.修饰N末端α胺,包括例如将乙酰基基团与α胺共价连接,或去除α胺基团;或者

[0263] iv.i)-iii)的任意组合。

[0264] 在一种实施方式中,提供了包括DVX_{11}RYLEEQAVREFIEWLVRGGPSSGAPPPS$X_{40}R_2$(SEQ ID NO:6)的序列的肽,其相对于SEQ ID NO:6具有最多达3个氨基酸修饰,其中,X_{11}是Trp或dTrp,X_{40}是酰化氨基酸,并且R_{20}是COOH或$CONH_2$,其中,该肽表现出对人GLP-1的拮抗剂活性。

[0265] 在一种实施方式中,GLP-1受体拮抗剂包括选自由以下组成的肽:

[0266] DV(dW)RYLEEQAVREFIEWLVRGGPSSGAPPPSX40 R20,(SEQ ID NO:27)

[0267] DVWRYLEEQAVREFIEWLVRGGPSSGAPPPSX40 R20,(SEQ ID NO:28)

[0268] DV(dW)RYLE(Aib)QAVREFIEWLVRGGPSSGAPPPSX40 R20,(SEQ ID NO:29)

[0269] DVWRYLE(Aib)QAVREFIEWLVRGGPSSGAPPPSX40 R20,(SEQ ID NO:30

[0270] DV(dW)RYLEEQ(Aib)VREFIEWLVRGGPSSGAPPPSX40 R20,(SEQ ID NO:31)

[0271] DVWRYLEEQ(Aib)VREFIEWLVRGGPSSGAPPPSX40 R20,(SEQ ID NO:32)

[0272] DV(dW)RYLEEQA(Aib)REFIEWLVRGGPSSGAPPPSX40 R20,(SEQ ID NO:33)

[0273] DVWRYLEEQA(Aib)REFIEWLVRGGPSSGAPPPSX40 R20,(SEQ ID NO:34)

[0274] DV(dW)RYLEEQAVREFI(Aib)WLVRGGPSSGAPPPSX40 R20,(SEQ ID NO:35)

[0275] DVWRYLEEQAVREFI(Aib)WLVRGGPSSGAPPPSX40 R20,(SEQ ID NO:36)

[0276] DV(dW)RYLEEQAVREFIEW(Aib)VRGGPSSGAPPPSX40 R20,(SEQ ID NO:37)

[0277] DVWRYLEEQAVREFIEW(Aib)VRGGPSSGAPPPSX40 R20,(SEQ ID NO:38)

[0278] DV(dW)RYLEEQAVREFIEWLV(Aib)GGPSSGAPPPSX40 R20,(SEQ ID NO:39)

[0279] DVWRYLEEQAVREFIEWLV(Aib)GGPSSGAPPPSX40 R20,(SEQ ID NO:40)

[0280] DV(dW)RYLEEQAV(dR)EFIEWLVRGGPSSGAPPPSX40 R20,(SEQ ID NO:41)

[0281] DVWRYLEEQAV(dR)EFIEWLVRGGPSSGAPPPSX_{40} R_{20},(SEQ ID NO:42),

[0282] 其中,X_{40}是酰化氨基酸,任选地,是用C16-C18脂肪酸或二酸酰化的Lys,并且R_{20}是COOH或$CONH_2$,其中,该肽表现出对于人GLP-1的拮抗剂活性。

[0283] 在一种实施方式中,GLP-1受体拮抗剂包括选自由以下组成的肽:

[0284] R_{10}-DV(dW)RYLEEQAVREFIEWLVRGGPSSGAPPPS-R_{20},(SEQ ID NO:100)

[0285] R_{10}-DVWRYLEEQAVREFIEWLVRGGPSSGAPPPS-R_{20},(SEQ ID NO:101)

[0286] R_{10}-DV(dW)RYLE(Aib)QAVREFIEWLVRGGPSSGAPPPS-R_{20},(SEQ ID NO:102)

[0287] R_{10}-DVWRYLE(Aib)QAVREFIEWLVRGGPSSGAPPPS-R_{20},(SEQ ID NO:103)

[0288] R_{10}-DV(dW)RYLEEQ(Aib)VREFIEWLVRGGPSSGAPPPS-R_{20},(SEQ ID NO:104)

[0289] R_{10}-DVWRYLEEQ(Aib)VREFIEWLVRGGPSSGAPPPS-R_{20},(SEQ ID NO:105)

[0290] R_{10}-DV(dW)RYLEEQA(Aib)REFIEWLVRGGPSSGAPPPS-R_{20},(SEQ ID NO:106)

[0291] R_{10}-DVWRYLEEQA(Aib)REFIEWLVRGGPSSGAPPPS-R_{20},(SEQ ID NO:107)

[0292] R_{10}-DV(dW)RYLEEQAVREFI(Aib)WLVRGGPSSGAPPPS-R_{20},(SEQ ID NO:108)

[0293] R_{10}-DVWRYLEEQAVREFI(Aib)WLVRGGPSSGAPPPS-R_{20},(SEQ ID NO:109)

[0294] R_{10}-DV(dW)RYLEEQAVREFIEW(Aib)VRGGPSSGAPPPS-R_{20},(SEQ ID NO:110)

[0295] R_{10}-DVWRYLEEQAVREFIEW(Aib)VRGGPSSGAPPPS-R_{20},(SEQ ID NO:111)

[0296] R_{10}-DV(dW)RYLEEQAVREFIEWLV(Aib)GGPSSGAPPPS-R_{20},(SEQ ID NO:112)

[0297] R_{10} DVWRYLEEQAVREFIEWLV(Aib)GGPSSGAPPPS-R_{20},(SEQ ID NO:113)

[0298] R_{10}-DV(dW)RYLEEQAV(dR)EFIEWLVRGGPSSGAPPPS-R_{20},(SEQ ID NO:114)

[0299] R_{10}-DVWRYLEEQAV(dR)EFIEWLVRGGPSSGAPPPS-R_{20},(SEQ ID NO:115),

[0300] 其中,R_{10}是与多肽的N末端α胺连接的-CO$(CH_2)_{14-20}CH_3$或-CO$(CH_2)_{14-20}$COOH,并且R_{20}是COOH或$CONH_2$,其中,该肽表现出对于人GLP-1的拮抗剂活性。

[0301] 本公开的额外的示例性物种包括列于表1中的那些:

[0302] 表1

[0303]

SEQ ID NO.	说明/cmpd 注册	序列
1	Exendin-4	HGEGTFTSDVSKQMEEEAVRLFIEWLKNGGPSSGAPPPS
2	Ex-4 (9-39)a	DVSKQMEEEAVRLFIEWLKNGGPSSGAPPPS
3	Jant4 9-40am; K40[C16]	DVSSYLEEQAVREFIAWLVKGGPSSGAPPPS**K[C16]**-OH
4		DVSRYLEEQAVREFIEWLVRGGPSSGAPPPSK
5		DX$_{10}$X$_{11}$RYLX$_{15}$X$_{16}$QAVREFX$_{23}$EWLVRGGPSSGAPPPSX$_{40}$
6		DVX$_{11}$RYLEEQAVREFIEWLVRGGPSSGAPPPSX$_{40}$
7		DVWRYLEEQAVREFIEWLVRGGPSSGAPPPSX$_{40}$
8		DVWX$_{12}$YLEEQAVREFIEWLVRGGPSSGAPPPSX$_{40}$-NH_2)
9		DVX$_{11}$RYLEEQAVREFIEWLVRGGPSSGAPPPSX$_{40}$-COOH
10		DVX$_{11}$RYLEEQAVREFIEWLVRGGPSSGAPPPSX$_{40}$-NH_2

[0304]

11		DVX11RYLX15X16QAVREFX23EWLVRGGPSSGAPPPSK
12		DVSSYLEEQAVREFIAWLVKGGPSSGAPPPSX40
13		DVSRYLEEQAVREFIEWLVRGGPSSGAPPPSX40
14	X7X8 = dK(mPeg-γE- 二酸 C18)(N-Me-Gly)	X7X8DVSRYLEEQAVREFIEWLVRGGPSSGAPPPSX40
15	X7X8 = dK(mPeg-γE- 二酸 C18)(N- iPr-Gly	X7X8DVSRYLEEQAVREFIEWLVRGGPSSGAPPPSX40
16	9-40AC ; Jant4 (R12,E24,R28) K40[mPEG-gE-C16]	DVS**R**YLEEQAVREFI**E**WLV**R**GGPSSGAPPPS**K[miniPEG-γE-C16]**-OH
17	9-40AC, dK7(mPeg-γE(二酸 C18))G8 R12,E24,R28, K40(mPeg-γE(C16)) (前药)	**dK(mPeg-γE- 二酸 C18)G**DVS**R**YLEEQAVREFI**E**WLV**R**GGPSSGAPPPS**K[miniPEG-gE-C16]**-OH
18	9-40AC, dK7(mPeg-γE(二酸 C18)) (N-iPr-Gly8) R12,E24,R28, K40(mPeg-γE(C16)) (前药)	**dK(mPeg-γE-二酸 C18)(N-iPr-Gly)**DVS**R**YLEEQAVREFI**E**WLV**R**GGPSSGAPPPSK**[miniPEG-gE-C16]-OH**
19	9-40AC, dK7(mPeg-γE(二酸 C18)) (N-Me-Gly8) R12,E24,R28, K40(mPeg-γE(C16)) (前药)	dK(mPeg-γE-二酸 C18)(N-Me-Gly8)DVSRYLEEQAVREFIEWLVRGGPSSGAPPPSK[miniPEG-gE-C16]-OH
20	Jant9-40am, dK7(C18 二酸-gE-	dK7(C18二酸-gE-mPeg-K(mPeg-gE-C18二酸)GDVSRYLEEQAVREFIEWLVRGGPSSGAPPPSK

		mPeg-K(mPeg-gE-C18 二酸),G8, K40(mPeg-gE-C18 二酸)	[miniPEG-gE-C18 二酸)-NH2
	21	Jant9-40am, dK7(C18 二酸-gE-mPeg-K(mPeg-gE-C18 二酸),G8, K40(mPeg-gE-C16)	dK7(C18 二酸-gE-mPeg-K(mPeg-gE-C18 二酸)GDVSRYLEEQAVREFIEWLVRGGPSSGAPPPSK[miniPEG-gE-C16)-NH2
	22	Jant9-40am, dK7(C18 二酸-gE-mPeg-K(mPeg-gE-C18 二酸),N-meGly, K40(mPeg-gE-C16)	dK7(C18二酸-gE-mPeg-K(mPeg-gE-C18二酸)-N-MeGly-DVSRYLEEQAVREFIEWLVRGGPSSGAPPPSK[miniPEG- gE-C16)-NH2
[0305]	23		DVX11X12YLX15X16QAX19X20EFX23EWLVRGGPSSGAPPPSX40
	24		DVX11X12YLEX16QAVREFIEWLVRGGPSSGAPPPSX40
	25		DVX11RYLQX15X16AVREFX23EWLVRGGPSSGAPPPSX40
	26		X7X8DVX11RYLEEQAVREFIEWLVRGGPSSGAPPPSX40R20
	27		DV(dW)RYLEEQAVREFIEWLVRGGPSSGAPPPSX40 R20
	28		DVWRYLEEQAVREFIEWLVRGGPSSGAPPPSX40 R20
	29		DV(dW)RYLE(Aib)QAVREFIEWLVRGGPSSGAPPPSX40 R20
	30		DVWRYLE(Aib)QAVREFIEWLVRGGPSSGAPPPSX40 R20
	31		DV(dW)RYLEEQ(Aib)VREFIEWLVRGGPSSGAPPPSX40 R20
	32		DVWRYLEEQ(Aib)VREFIEWLVRGGPSSGAPPPSX40 R20
	33		DV(dW)RYLEEQA(Aib)REFIEWLVRGGPSSGAPPPSX40 R20
	34		DVWRYLEEQA(Aib)REFIEWLVRGGPSSGAPPPSX40 R20
	35		DV(dW)RYLEEQAVREFI(Aib)WLVRGGPSSGAPPPSX40 R20
	36		DVWRYLEEQAVREFI(Aib)WLVRGGPSSGAPPPSX40 R20
	37		DV(dW)RYLEEQAVREFIEW(Aib)VRGGPSSGAPPPSX40 R20

[0306]

38		DVWRYLEEQAVREFIEW(Aib)VRGGPSSGAPPPSX$_{40}$ R$_{20}$
39		DV(dW)RYLEEQAVREFIEWLV(Aib)GGPSSGAPPPS X$_{40}$ R$_{20}$
40		DVWRYLEEQAVREFIEWLV(Aib)GGPSSGAPPPSX$_{40}$ R$_{20}$
41		DV(dW)RYLEEQAV(dR)EFIEWLVRGGPSSGAPPPSX $_{40}$ R$_{20}$
42		DVWRYLEEQAV(dR)EFIEWLVRGGPSSGAPPPSX$_{40}$ R$_{20}$
43	9-40am; Jant4 (K27, Aib28) K40[C16]	DVSSYLEEQAVREFIAWLK(Aib)GGPSSGAPPPSK[C16]- NH2
44	9-40am; Jant4 (Aib26) K40[C16]	DVSSYLEEQAVREFIAW(Aib)VKGGPSSGAPPPSK[C16]-NH2
45	9-40am; Jant4 (Aib19) K40[C16]	DVSSYLEEQA(Aib)REFIAWLVKGGPSSGAPPPSK[C16]-NH2
46	9-40am; Jant4 (Aib18) K40[C16]	DVSSYLEEQ(Aib)VREFIAWLVKGGPSSGAPPPSK[C16]-NH2
47	9-40am ; Jant4 K40[C16]	DVSSYLEEQAVREFIAWLVKGGPSSGAPPPSK[C16]-NH2
48	9-40am; Jant4 K40[(mPEG)2-gE-C16]	DVSSYLEEQAVREFIAWLVKGGPSSGAPPPSK[(miniPEG)2-gE-C16]-NH2
49	9-40am ; Jant4 (dE15) K40[C16]	DVSSYL(dE)EQAVREFIAWLVKGGPSSGAPPPSK[C16]- NH2
50	9-40am ; Jant4 (dV19) K40[C16]	DVSSYLEEQA(dV)REFIAWLVKGGPSSGAPPPSK[C16]- NH2
51	9-40am ; Jant4 (dI23) K40[C16]	DVSSYLEEQAVREF(dI)AWLVKGGPSSGAPPPSK[C16]- NH2
52	9-40am; Jant4 K40[gE-C16]	DVSSYLEEQAVREFIAWLVKGGPSSGAPPPSK[gE-C16]-NH2
53	9-40am; Jant4 K40[gE2-C16]	DVSSYLEEQAVREFIAWLVKGGPSSGAPPPSK[gE2-C16]-NH2

[0307]

54	9-40am；Jant4 K40[gE4-C16]	DVSSYLEEQAVREFIAWLVKGGPSSGAPPPSK[gE4-C16]-NH2
55	9-40am；Jant4 K40[gE6-C16]	DVSSYLEEQAVREFIAWLVKGGPSSGAPPPSK[gE6-C16]-NH2
56	9-40am；Jant4 K40[mPEG-gE-C16]	DVSSYLEEQAVREFIAWLVKGGPSSGAPPPSK[miniPEG- gE-C16]-NH2
57	9-40am；Jant4 K40[EP2E-C16]	DVSSYLEEQAVREFIAWLVKGGPSSGAPPPSK[gE-(miniPEG)2-gE-C16]-NH2
58	9-40am；Jant4 K40(P2E2-C16)	DVSSYLEEQAVREFIAWLVKGGPSSGAPPPSK[(miniPEG)2-gE2-C16]-NH2
59	9-40am；Jant4 K40(PEPE-C16)	DVSSYLEEQAVREFIAWLVKGGPSSGAPPPSK[miniPEG-gE-miniPEG-gE-C16]-NH2
60	9-40am；Jant4 K40[PE2P-C16]	DVSSYLEEQAVREFIAWLVKGGPSSGAPPPSK[miniPEG-gE2-miniPEG-C16]-NH2
61	9-40am；Jant4 K40[E2P2-C16]	DVSSYLEEQAVREFIAWLVKGGPSSGAPPPSK[gE2-(miniPEG)2-C16]-NH2
62	9-40am；Jant4 K40[EPEP-C16]	DVSSYLEEQAVREFIAWLVKGGPSSGAPPPSK[gE-miniPEG-gE-miniPEG-C16]-NH2
63	9-40am;Jant4 K40[DiAcC18]	DVSSYLEEQAVREFIAWLVKGGPSSGAPPPSK[二酸C18]-NH2
64	9-40am；Jant4 K40[gE2-DiAcC18]	DVSSYLEEQAVREFIAWLVKGGPSSGAPPPSK[gE2-二酸C18]-NH2
65	9-40am；Jant4 K40[gE4-DiAcC18]	DVSSYLEEQAVREFIAWLVKGGPSSGAPPPSK[gE4-二酸C18]-NH2
66	9-40am；Jant4 K40[gE6-DiAcC18]	DVSSYLEEQAVREFIAWLVKGGPSSGAPPPSK[gE6-二酸C18]-NH2
67	9-40am；Jant4 K40[(mPEG)2-gE-DiAC18]	DVSSYLEEQAVREFIAWLVKGGPSSGAPPPSK[(miniPEG)2-gE-二酸C18]-NH2
68	9-40am；Jant4 K40[mPEG-gE-DiAcC18]	DVSSYLEEQAVREFIAWLVKGGPSSGAPPPSK[miniPEG- gE-DiAcC18]-NH2

[0308]

69	9-40am；Jant4 (R28) K40[C16]	DVSSYLEEQAVREFIAWLVRGGPSSGAPPPSK[C16]-NH2
70	9-40am ； Jant4 (E24,R28) K40[C16]	DVSSYLEEQAVREFIEWLVRGGPSSGAPPPSK[C16]-NH2
71	9-40am ； Jant4 (E17,R28) K40[C16]	DVSSYLEEEAVREFIAWLVRGGPSSGAPPPSK[C16]-NH2
72	9-40am；Jant4 (E17,E24,R28) K40[C16]	DVSSYLEEEAVREFIEWLVRGGPSSGAPPPSK[C16]-NH2
73	9-40am ； Jant4 (R12,R28) K40[C16]	DVSRYLEEQAVREFIAWLVRGGPSSGAPPPSK[C16]-NH2
74	9-40am ； Jant4 (R12,E24,R28) K40[C16]	DVSRYLEEQAVREFIEWLVRGGPSSGAPPPSK[C16]-NH2
75	9-40am ； Jant4 (R12,E17,E24,R28) K40[C16]	DVSRYLEEEAVREFIEWLVRGGPSSGAPPPSK[C16]-NH2
76	Ex9 K40[C16]	DLSKQMEEEAVRLFIEWLKNGGPSSGAPPPSK[C16]-NH2
77	9-40AC ； Jant4 (R28) K40[mPEG-gE-C16]	DVSSYLEEQAVREFIAWLVRGGPSSGAPPPSK[miniPEG- gE-C16]-OH
78	9-40AC ； Jant4 (E24,R28) K40[mPEG-gE-C16]	DVSSYLEEQAVREFIEWLVRGGPSSGAPPPSK[miniPEG- gE-C16]-OH
79	9-40AC ； Jant4 (E24,R27,V28) K40[mPEG-gE-C16]	DVSSYLEEQAVREFIEWLRVGGPSSGAPPPSK[miniPEG- gE-C16]-OH
80	9-40AC ； Jant4 (E24,R27,Aib28) K40[mPEG-gE-C16]	DVSSYLEEQAVREFIEWLR(Aib)GGPSSGAPPPSK[miniPEG-gE-C16]-OH

[0309]

81	9-40am；Jant4 (Aib27) K40[C16]	DVSSYLEEQAVREFIAWL(Aib)KGGPSSGAPPPSK[C16]-NH2
82	9-40am ； Jant4 (K26,Aib28) K40[C16]	DVSSYLEEQAVREFIAWKV(Aib)GGPSSGAPPPSK[C16]-NH2
83	9-40am；Jant4 (Aib24) K40[C16]	DVSSYLEEQAVREFI(Aib)WLVKGGPSSGAPPPSK[C16]-NH2
84	9-40am；Jant4 (Aib16) K40[C16]	DVSSYLE(Aib)QAVREFIAWLVKGGPSSGAPPPSK[C16]-NH2
85	9-40am；Jant4 (dE16) K40[C16]	DVSSYLE(dE)QAVREFIAWLVKGGPSSGAPPPSK[C16]-NH2
86	9-40am；Jant4 (dQ17) K40[C16]	DVSSYLEE(dQ)AVREFIAWLVKGGPSSGAPPPSK[C16]-NH2
87	9-40am；Jant4 (dR20) K40[C16]	DVSSYLEEQAV(dR)EFIAWLVKGGPSSGAPPPSK[C16]-NH2
88	9-40am；Jant4 (dE21) K40[C16]	DVSSYLEEQAVR(dE)FIAWLVKGGPSSGAPPPSK[C16]-NH2
89	Ex9, dK7(PEG2-γE(C16)), G8	dK(Peg2-gE(C16)) GDLSKQMEEEAVRLFIEWLKNGGPSSGAPPPS-NH2
90	Ex9-40am, K40(C18 二酸)	DLSKQMEEEAVRLFIEWLKNGGPSSGAPPPSK(C18二酸)-NH2
91	Ex9-40am, W11, K40(C18 二酸)	DLWKQMEEEAVRLFIEWLKNGGPSSGAPPPSK(C18二酸)-NH2
92	Ex9-40am, dW11, K40(C18 二酸)	DLdWKQMEEEAVRLFIEWLKNGGPSSGAPPPSK(C18二酸)-NH2
93	Ex9-40am, W11, K40(mPeg-gE-C18 二酸)	DLWKQMEEEAVRLFIEWLKNGGPSSGAPPPSK(mPeg-gE(C18二酸))-NH2
94	Ex9-40am, dW11,K40(mPeg-gE-C18 二酸)	DLdWKQMEEEAVRLFIEWLKNGGPSSGAPPPSK(mPeg-gE(C18二酸))-NH2
95	9-40am；Jant4 K40	DVSSYLEEQAVREFIAWLVKGGPSSGAPPPSK-NH2

[0310] 在一种实施方式中,制备包括本公开的两个或更多个GLP-1受体拮抗剂肽的二聚体和多聚体,包括同或异多聚体或者同或异二聚体。可以使用本领域技术人员已知的标准

连接剂和程序将两个或更多个GLP-1受体拮抗剂肽连接在一起。例如,通过使用双官能硫醇交联剂和双官能胺交联剂,可以在两个肽之间形成二聚体,特别是对于包括以下或者用以下置换的GLP-1受体拮抗剂肽:半胱氨酸、赖氨酸、鸟氨酸、高半胱氨酸或乙酰基苯丙氨酸残基。二聚体可以是同二聚体或者可以是异二聚体。在示例性实施方式中,连接两个(或更多个)类似物的接头是PEG,例如5kDa PEG、20kDa PEG。在一些实施方式中,接头是二硫键。例如,二聚体的每个单体可以包括Cys残基(例如,末端或内部定位的Cys)并且每个Cys残基的硫原子参与二硫键的形成。在示例性方面,二聚体的每个单体经由硫醚键连接。在示例性方面,一个单体的Lys残基的ε胺键合至Cys残基,Cys残基又经由化学部分连接至另一单体的Lys残基的ε胺。

[0311] 在一些实施方式中,单体经由末端氨基酸(例如,N末端或C末端,任选地其中,氨基酸被添加至待二聚化的肽的末端)、经由内部氨基酸、或经由至少一种单体的末端氨基酸和至少一种其他单体的内部氨基酸连接。在一些实施方式中,多聚体的单体以“尾对尾”方向连接在一起,其中,每个单体的C末端氨基酸连接在一起。替代地,在一种实施方式中,多聚体以“头对头”方向连接在一起,其中,每个单体的N末端氨基酸连接在一起。

[0312] 在一种实施方式中,本文公开的任何GLP-1拮抗剂肽的C末端氨基酸可以被修饰以用酰胺取代天然羧基基团。在一种实施方式中,本文公开的任何GLP-1拮抗剂肽的C末端氨基酸包括天然氨基酸羧基基团。

[0313] 药物组合物

[0314] 本公开另外提供了包括本公开的GLP-1受体拮抗剂肽、二聚体、多聚体或缀合物(或其组合)的任何一种和药学上可接受的载体、稀释剂或赋形剂的药物组合物。药物组合物优选是无菌的并且适用于肠胃外给药。

[0315] 根据一种实施方式,提供了一种药物组合物,其包括本文公开的任何新型GLP-1受体拮抗剂,优选纯度水平为至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%,以及药学上可接受的稀释剂、载体或赋形剂。这样的组合物可包含浓度为至少0.1 -10mg/ml或更高的本文公开的GLP-1受体拮抗剂。在一种实施方式中,药物组合物包括水性溶液,其被灭菌并且任选地储存在各种包装容器内。在其他实施方式中,药物组合物包括冻干粉末。药物组合物可以进一步包装为试剂盒的一部分,该试剂盒包括用于向患者给药组合物的一次性装置。容器或试剂盒可贴上标签以在环境室温或冷藏温度下储存。在一种实施方式中,药物组合物和/或试剂盒包括本文公开的任何GLP-1受体拮抗剂与可用于治疗低血糖的任何现有治疗剂的组合,该现有治疗剂包括但不限于葡萄糖补充剂(例如,右旋糖);升糖药剂诸如胰高血糖素和胰高血糖素类似物以及胰岛素分泌抑制剂(例如二氮嗪、奥曲肽)。

[0316] 根据一种实施方式,本文公开的药物组合物预期用于治疗或预防低血糖病症,以及更具体地,治疗或预防非典型低血糖或与低血糖相关的医学病症的方法中的用途。

[0317] 本公开的组合物可以使用任何标准给药途径给药。适合肠胃外给药的制剂包括水性和非水性等渗无菌注射溶液,其可包含抗氧化剂、缓冲剂、抑菌剂和使制剂与预期接受者的血液等渗的溶质,以及水性和非水性无菌混悬剂,其可包含助悬剂、增溶剂、增稠剂、稳定剂和防腐剂。术语“肠胃外”意指不通过消化管,而是通过一些其他途径诸如皮下、肌内、椎管内或静脉内。在一种实施方式中,包括本公开的GLP-1受体拮抗剂的药物组合物被配制用

于皮下给药或静脉内给药。在一种实施方式中,本公开的GLP-1受体拮抗剂可以单独或与其他合适的组分组合制备为经由吸入给药的气溶胶制剂。

[0318] 在一种实施方式中,通过将本公开的GLP-1受体拮抗剂与吸收增强剂共配制来将组合物配制成用于口服递送,该吸收增强剂可充分增强肽拮抗剂的吸收。N-[8-(2-羟基苯甲酰基)氨基]辛酸钠(SNAC)是一种递送剂,据报道其可以增强多种分子的通透性,包括肽,诸如胰岛素、GLP-1、降钙素和其他大分子诸如肝素。根据一种实施方式,提供了用于口服递送的药物组合物,其中,该组合物包括本公开的GLP-1受体拮抗剂和SNAC,任选地其中,该药物组合物被配制为片剂。

[0319] 酰化

[0320] 根据一种实施方式,表现出GLP-1拮抗剂活性的本文公开的肽、二聚体或多聚体中的任何一种可以被进一步修饰,以在向温血哺乳动物(包括例如智人(homo sapiens))给药时具有改善的治疗指数和延长的体内作用时间。更特别地,在一种实施方式中,本文公开的肽和二聚体通过将烷基或酰基基团共价连接至拮抗剂肽的氨基酸(任选地赖氨酸、丝氨酸或半胱氨酸)的侧链来修饰,其中,烷基或酰基基团具有足够大小以便以高亲和力结合血清白蛋白。在一种实施方式中,烷基化或酰化氨基酸位于GLP-1拮抗剂肽或二聚体的C末端。在一种实施方式中,GLP-1拮抗剂肽包括两个酰化氨基酸。在一种实施方式中,GLP-1受体拮抗剂肽的一个或多个氨基酸被脂肪酸或脂肪二酸、任选地C16-C18脂肪酸或C16-C18脂肪二酸酰化。根据一种实施方式,本文公开的GLP-1拮抗剂肽或二聚体的一个或多个赖氨酸残基通过C16-C18脂肪酸或C16-C18脂肪二酸任选地经由间隔基与赖氨酸侧链的共价连接来进行修饰。在一种实施方式中,酰化赖氨酸残基是GLP-1拮抗剂肽的C末端氨基酸。在一种实施方式中,酰化氨基酸存在于GLP-1拮抗剂肽的位置40处和选自位置7或12的第二位置处。在具有两个或更多个酰化氨基酸的实施方式中,酰化氨基酸可以相同或不同,并且连接的酰基基团可以相同或不同,只要酰基基团具有足够大小以结合血清白蛋白。在一种实施方式中,酰化氨基酸是赖氨酸,其中,侧链任选地经由间隔基连接至C16-C18脂肪酸或C16-C18脂肪二酸。

[0321] 在一种实施方式中,C16-C18脂肪酸或C16-C18脂肪二酸经由间隔基连接至氨基酸的侧链,其中,间隔基包括miniPEG、γGlu,或miniPEG和/或γGlu的任何多聚体或组合。在一种实施方式中,本文公开的任何GLP-1受体拮抗剂肽可被修饰以包括酰化氨基酸,任选地参考exendin4的天然序列在选自7、12和40的位置处。在一种实施方式中,酰化氨基酸是赖氨酸残基,其具有经由包括以下结构的间隔基来连接至赖氨酸侧链的C16至C18脂肪酸或C16至C18脂肪二酸:

[0322] $-[COCH_2(OCH_2CH_2)_kNH]_q-(\gamma谷氨酸)_p-$

[0323] 其中,k是选自2、4、6或8的整数,并且p和q独立地是选自1或2的整数。在一种实施方式中,间隔基选自由以下组成的组:

[0324] $-(\gamma谷氨酸)-[COCH_2(OCH_2CH_2)_kNH]_2-(\gamma谷氨酸)-$、或

[0325] $-[COCH_2(OCH_2CH_2)_kNH]_q-(\gamma谷氨酸)_p-[COCH_2(OCH_2CH_2)_kNH]_q-$

[0326] $(\gamma谷氨酸)_p-$、或

[0327] $-[COCH_2(OCH_2CH_2)_kNH]_2-(\gamma谷氨酸)_2-$、或

[0328] $-[COCH_2(OCH_2CH_2)_kNH]-(\gamma谷氨酸)_2-[COCH_2(OCH_2CH_2)_kNH]-$、或

[0329] -(γ谷氨酸)$_2$-[COCH$_2$(OCH$_2$CH$_2$)$_k$NH]$_2$、或

[0330] -(γ谷氨酸)-[COCH$_2$(OCH$_2$CH$_2$)$_k$NH]-(γ谷氨酸)$_p$-

[0331] [COCH$_2$(OCH$_2$CH$_2$)$_k$NH]-或γ谷氨酸,或γ谷氨酸-γ谷氨酸二肽,或γ谷氨酸-[COCH$_2$(OCH$_2$CH$_2$)$_k$NH]-γ谷氨酸,其中,

[0332] k为选自1-8范围内的整数;以及

[0333] q和p独立地是选自1-8范围的整数,任选地其中,k是2并且q和p独立地是1或2。在一种实施方式中,间隔基是

[0334] -[COCH$_2$(OCH$_2$CH$_2$)$_k$NH]$_q$-(γ谷氨酸)$_p$-,其中

[0335] k是选自1-4范围的整数;以及

[0336] q和p独立地是选自1-4范围内的整数,任选地

[0337] 其中,k是2并且q和p独立地是1或2,任选地其中,k是2并且q和p都是1。

[0338] 在一种实施方式中,GLP-1受体拮抗剂肽包括酰化Lys,任选地位于肽的C末端,其中,Lys的侧链经由包括以下结构的间隔基被C16-C18二酸酰化:-[COCH$_2$(OCH$_2$CH$_2$)$_k$NH]$_q$-(γ谷氨酸)$_p$-,其中,

[0339] k是选自1-4范围的整数;以及

[0340] q和p独立地是选自1-4范围的整数,任选地其中,k是2并且q和p独立地是1或2,任选地其中,k是2并且q和p都是1。在一种实施方式中,酰化Lys的侧链包括结构-[COCH$_2$(OCH$_2$CH$_2$)$_k$NH]$_q$-(γ谷氨酸)$_p$-COC$_{16}$H$_{32}$CO$_2$H,其中,k是2并且p和q独立地是1或2。在一种实施方式中,提供了一种GLP-1受体拮抗剂,其包括以下的序列:DV(dW)RYLEEQAVREFIEWLVRGGPSSGAPPPSX$_{40}$ R$_{20}$,(SEQ ID NO:27)或

[0341] DVWRYLEEQAVREFIEWLVRGGPSSGAPPPSX$_{40}$ R$_{20}$,(SEQ ID NO:28),其中,

[0342] R$_{20}$是COOH或CONH$_2$并且X$_{40}$是被-[COCH$_2$(OCH$_2$CH$_2$)$_k$NH]$_q$-(γ谷氨酸)$_p$-COC$_{14}$H$_{28}$CO$_2$H或-[COCH$_2$(OCH$_2$CH$_2$)$_k$NH]$_q$-(γ谷氨酸)$_p$-COC$_{16}$H$_{32}$CO$_2$H酰化的Lys,其中,k是2并且p和q独立地是1或2。

[0343] 缀合物

[0344] 在一些实施方式中,本文公开的任何一种GLP-1拮抗剂肽缀合至免疫球蛋白或其部分(例如可变区、CDR或Fc区)。已知的免疫球蛋白(Ig)类型包括IgG、IgA、IgE、IgD或IgM。Fc区是Ig重链的C末端区,负责与Fc受体结合,执行活动诸如再循环(导致半衰期延长)、抗体依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC)、和补体依赖的细胞毒性(CDC)。

[0345] 在一些实施方式中,本文公开的任何一种GLP-1拮抗剂肽与亲水部分缀合。亲水部分可以在用于使蛋白质与活化的聚合物分子反应的任何合适的条件下共价连接至GLP-1拮抗剂肽。可用于将水溶性聚合物连接至一种或多种蛋白的活化基团包括但不限于砜、马来酰亚胺、巯基、硫醇、三氟甲磺酸酯基、三氟乙基磺酸单甲氧基(tresylate)、氮杂环丙烷(azidirine)、环氧乙烷、5-吡啶基和α-卤代酰基基团(例如,α-碘乙酸、α-溴乙酸、α-氯乙酸)。如果通过还原烷基化连接到肽上,则所选聚合物应具有单一反应性醛,以便控制聚合度。参见例如Kinstler et al.,Adv.Drug.Delivery Rev.54:477-485(2002);Roberts et al.,Adv.Drug Delivery Rev.54:459-476(2002)以及Zalipsky et al.,Adv.Drug Delivery Rev.16:157-182(1995)。

[0346] 合适的亲水部分包括聚乙二醇(PEG)、聚丙二醇、聚氧乙烯多元醇(例如POG)、聚氧

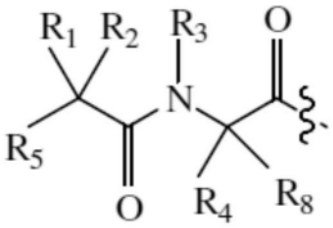
乙烯山梨糖醇、聚氧乙烯葡萄糖、聚氧乙烯甘油(POG)、聚氧化烯、聚乙二醇丙醛、乙二醇/丙二醇的共聚物、单甲氧基-聚乙二醇、单-(C1-C10)烷氧基-或芳氧基-聚乙二醇、羧甲基纤维素、聚缩醛、聚乙烯醇(PVA)、聚乙烯吡咯烷酮、聚1,3-二氧戊环、聚1,3,6-三噁烷、乙烯/马来酸酐共聚物、聚(β-氨基酸)(均聚物或无规共聚物)、聚(n-乙烯基吡咯烷酮)聚乙二醇、丙二醇均聚物(PPG)和其他聚环氧烷(polyakylene oxide)、聚环氧丙烷/环氧乙烷共聚物、结肠酸(colonic acid)或其他多糖聚合物、聚蔗糖或右旋糖酐及其混合物。右旋糖酐类是葡萄糖亚基的多糖聚合物,主要通过α1-6键连接。可获得多种分子量范围的右旋糖酐,例如约1kD至约100kD,或约5、10、15或20kD至约20、30、40、50、60、70、80或90kD。在一种实施方式中,亲水部分例如聚乙二醇链具有选自约500至约40,000道尔顿范围的分子量。在一些实施方式中,亲水部分是具有选自约500至约5,000道尔顿、或约1,000至约5,000道尔顿范围的分子量的聚乙二醇链。在另一种实施方式中,亲水部分例如聚乙二醇链具有约10,000至约20,000道尔顿的分子量。

[0347] 在一种实施方式中,提供了SEQ ID NO:5或SEQ ID NO:23的肽的缀合物衍生物,其中,二肽经由肽键共价连接至SEQ ID NO:5或SEQ ID NO:23的肽的N末端,任选地其中,二肽的氨基酸之一是酰化氨基酸。在一种实施方式中,二肽具有X_7X_8的结构,其中,X_7是酰化氨基酸并且X_8是任何氨基酸,任选地其中,X_7是酰化Lys或dLys并且X_8是Gly或C_1-C_4 N-烷基化Gly,任选地其中,X_7是用C14-C20脂肪酸或脂肪二酸酰化的Lys或dLys并且X_8是Gly或C_1-C_4 N-烷基化Gly(任选地Gly或肌氨酸),任选地其中,X_7是用C14-C20脂肪酸或脂肪二酸经由本文公开的任何间隔基酰化的Lys,并且X_8是C_1-C_4 N-烷基化Gly(任选地Gly或肌氨酸)。

[0348] 根据一种实施方式,提供了任何GLP-1受体拮抗剂肽的缀合物衍生物,其中,自切割二肽经由酰胺键共价结合至本文公开的GLP-1拮抗剂肽的氨基酸侧链胺或N末端α胺。在一种实施方式中,自切割二肽共价结合至GLP-1拮抗剂肽的N末端α胺。

[0349] 在示例性方面,自切割二肽包括以下结构:A-B,其中,A是氨基酸或羟基酸;以及B是通过A-B和GLP-1拮抗剂肽的胺之间的酰胺键与GLP-1拮抗剂肽连接的N-烷基化氨基酸,任选地其中,在生理条件下的PBS中A-B从GLP-1拮抗剂肽的化学裂解半衰期(t1/2)为至少约1小时至约1周。如本文所用,术语"羟基酸"是指已被修饰以用羟基基团取代α碳氨基基团的氨基酸。

[0350] 在一些实施方式中,自切割二肽具有以下一般结构:

[0351] 

[0352] 其中,

[0353] R_1、R_2、R_4和R_8独立地选自由以下组成的组:H、C_1-C_{18}烷基、C_2-C_{18}烯基、(C_1-C_{18}烷基)OH、(C_1-C_{18}烷基)SH、(C_2-C_3烷基)SCH_3、(C_1-C_4烷基)$CONH_2$、(C_1-C_4烷基)COOH、(C_1-C_4烷基)NH_2、(C_1-C_4烷基)NHC(NH_{2+})NH_2、(C_0-C_4烷基)(C_3-C_6环烷基)、(C_0-C_4烷基)(C_2-C_5杂环)、(C_0-C_4烷基)(C_6-C_{10}芳基)R_7、(C_1-C_4烷基)(C_3-C_9杂芳基)和C_1-C_{12}烷基(W1)C_1-C_{12}烷基,其中,W1是选自由N、S和O组成的组的杂原子;

[0354] R_3选自由以下组成的组:C_1-C_{18}烷基、(C_1-C_{18}烷基)OH、(C_1-C_{18}烷基)NH_2、(C_1-C_{18}烷基)SH、(C_0-C4烷基)(C_3-C_6)环烷基、(C_0-C_4烷基)(C_2-C_5杂环)、(C_0-C_4烷基)(C_6-C_{10}芳基)R_7和(C_1-C_4烷基)(C_3-C_9杂芳基),或R_4和R_3连同它们所连接的原子一起形成吡咯烷环;

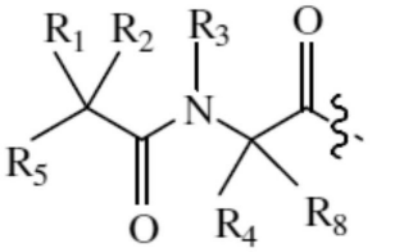
[0355] R_5是NHR_6或OH;

[0356] R_6是H、C_1-C_8烷基;以及

[0357] R_7选自由H和OH组成的组

[0358] 其中,在生理条件下的PBS中,A-B从所述GLP-1拮抗剂的化学裂解半衰期($t_{1/2}$)为至少约1小时至约1周。在一种实施方式中,二肽A-B共价连接至GLP-1拮抗剂氨基酸序列的N末端α胺。

[0359] 在一种实施方式中,自切割二肽具有以下一般结构:

[0360] 

[0361] 其中,

[0362] R_1和R_8独立地是H或C_1-C_8烷基;

[0363] R_2和R_4独立地选自由以下组成的组:H、C_1-C_8烷基、(C_1-C_4烷基)OH、(C_1-C_4烷基)SH、(C_2-C_3烷基)SCH_3、(C_1-C_4烷基)$CONH_2$、(C_1-C_4烷基)COOH、(C_1-C_4烷基)NH_2和(C_1-C_4烷基)(C_6芳基)R_7;

[0364] R_3是(C_1-C_6)烷基;

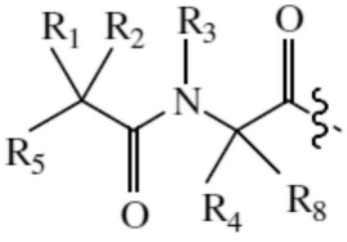
[0365] R_5是NH_2;以及

[0366] R_7选自由氢和OH组成的组。

[0367] 根据一种实施方式,本文公开的任何GLP-1拮抗剂肽和二聚体可以通过与自切割二肽连接而进一步修饰,其中,二肽的氨基酸被足够大小的脂肪酰基基团酰化以便以高亲和力结合血清白蛋白。

[0368] 在一种实施方式中,自切割二肽"A-B"的氨基酸"A"是用C16-C30脂肪酸或C16-C30二酸酰化的赖氨酸残基。在一种实施方式中,选择A和B以使得在生理条件下的标准PBS溶液中A-B从本文公开的GLP-1拮抗剂肽或二聚体的化学裂解半衰期(t1/2)为至少约24小时至约240小时,约48小时至约168小时,或约48至约120小时,或约70至约100小时。

[0369] 在一种实施方式中,自切割二肽具有以下一般结构:

[0370] 

[0371] 其中,

[0372] R_1包括选自由以下组成的组的侧链:C_1-C_8烷基、(C_1-C_4烷基)OH、(C_1-C_4烷基)SH、

(C_1-C_4烷基)COOH和(C_1-C_4烷基)NH_2,任选地其中,C16-C18脂肪酸或C16-C18二酸任选地经由本文公开的任何间隔基共价连接至所述侧链,该间隔基包括选自由以下组成的组的间隔基:γ谷氨酸、γ谷氨酸-γ谷氨酸二肽、-[$COCH_2(OCH_2CH_2)_kNH]_q$-(γ谷氨酸)$_p$和γ谷氨酸-[$COCH_2(OCH_2CH_2)_kNH]_q$-γ谷氨酸,其中,

[0373] k为选自1-8范围内的整数;以及

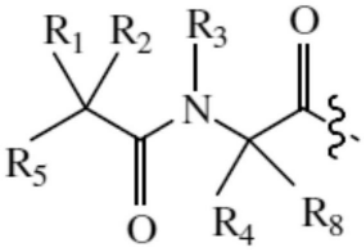
[0374] q和p独立地是选自1-8范围的整数,任选地其中,k是2并且q和p独立地是1或2;

[0375] R_2、R_4和R_8独立地是H或C_1-C_4烷基;

[0376] R_3是C_1-C_6烷基;以及

[0377] R_5是NH_2。

[0378] 在一种实施方式中,自切割二肽具有以下一般结构:

[0379] 

[0380] 其中,

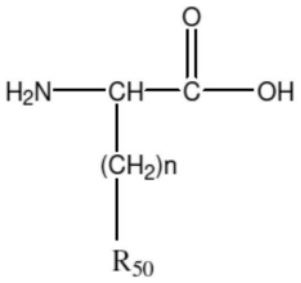
[0381] R_1是H、C_1-C_4烷基、(C_1-C_4烷基)OH或(C_1-C_4烷基)NH_2;R_2是H,

[0382] R_3是(C_1-C_4)烷基;

[0383] R_4是H或C_1-C_4烷基;R_5是NH_2;以及

[0384] R_8是氢。

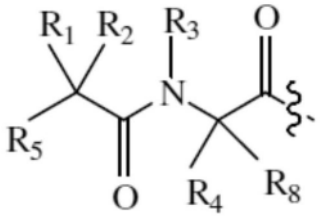
[0385] 根据一种实施方式,自切割二肽A-B包括作为“A”的酰化氨基酸残基和作为“B”的N-烷基化Gly残基,其中,“B”氨基酸经由酰胺键连接至GLP-1受体拮抗剂肽的N末端α胺,任选地其中,所述Lys残基呈D-构象。在一种实施方式中,A-B二肽的酰化氨基酸“A”是具有以下一般结构的氨基酸:

[0386] 

[0387] 其中,n是选自1-4范围内的整数并且R_{50}选自由以下组成的组:NH-CO(CH_2)$_{14-20}$COOH、NH-[间隔基]-CO(CH_2)$_{14-20}$COOH、S(CH_2)$_{14-20}$COOH和S-[间隔基]-CO(CH_2)$_{14-20}$COOH,其中,[间隔基]是本文公开的任何间隔基。在一种实施方式中,A的酰化氨基酸独立地选自赖氨酸、d-赖氨酸、鸟氨酸、半胱氨酸或高半胱氨酸,其中,所述酰化氨基酸的侧链任选地通过包括氨基酸或二肽的间隔基与C16-C22脂肪酸或C16-C22二酸共价连接。在一种实施方式中,间隔基包括γ谷氨酸。在一种实施方式中,间隔基包括任意组合的多个γ谷氨酸单元和miniPeg聚合物。在一种实施方式中,任选的间隔基包括两个γ谷氨酸,任选地其中,两个γ谷氨酸经由插入的官能化miniPEG聚合物[$COCH_2(OCH_2CH_2)_kHN]_q$彼此连接,其中,k和q各自是

独立地选自1、2、3、4、5、6、7或8的整数。

[0388] 在一种实施方式中,自切割二肽具有以下一般结构:

[0389] 

[0390] 其中

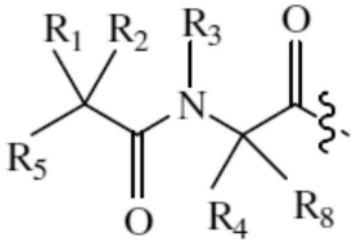
[0391] R_1是(C_4烷基)NH_2或(C_4烷基)NH(mPeg-γE-二酸)-C18;

[0392] R_2、R_4和R_8各自是H;

[0393] R_3是C_1-C_4烷基;以及

[0394] R_5是NH_2,任选地其中,自切割二肽的第一个氨基酸呈D-构象。

[0395] 在一种实施方式中,本文公开的GLP-1拮抗剂肽和二聚体共价连接至具有以下结构的自切割二肽:

[0396] 

[0397] 其中

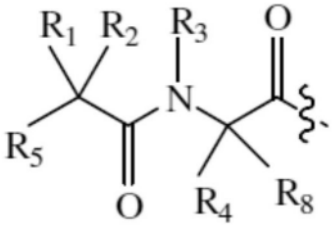
[0398] R_1是选自由C_1-C_{18}烷基、(C_1-C_4烷基)OH、(C_1-C_4烷基)SH、(C_1-C_4烷基)COOH和(C_1-C_4烷基)NH_2组成的组的侧链,任选地,其中,C16-C20脂肪酸或C16-C20二酸与所述侧链共价连接;

[0399] R_2、R_4和R_8独立地是H或C_1-C_4烷基;

[0400] R_3是C_1-C_4烷基,或者R_4和R_3与其所连接的原子一起形成吡咯烷环;并且

[0401] R_5是NH_2,前提条件是当R_4和R_3与它们所连接的原子一起形成吡咯烷环时,R_2不是H。

[0402] 在另外的实施方式中,自切割二肽具有以下结构:

[0403] 

[0404] 其中,R_1是(C_1-C_4烷基)NH-CO(CH_2)$_{14-20}$$CH_3$、($C_1$-$C_4$烷基)NH-[间隔基]-CO($CH_2$)$_{14-20}$$CH_3$、($C_1$-$C_4$烷基)NH-CO($CH_2$)$_{14-20}$COOH或($C_1$-$C_4$烷基)NH-[间隔基]-CO($CH_2$)$_{14-20}$COOH;$R_2$和$R_8$各自为H;$R_4$是H或$CH_3$;$R_3$是$C_1$-$C_4$烷基并且$R_5$是$NH_2$,任选地其中,自切割二肽的第一个氨基酸是呈D-立体化学构象的氨基酸并且间隔基选自本文公开的任何间隔基。在一种实施方式中,R_2、R_4和R_8各自是H。在一种实施方式中,R_1是(C_1-C_4烷基)NH-CO(CH_2)$_{16}$COOH或(C_1-C_4烷基)NH-[间隔基]-CO(CH_2)$_{16}$COOH,R_2、R_4和R_8各自为H且R_3为C_1-C_4烷基,任选地CH_3,任选地其中,

间隔基包括以下结构：

[0405] -[$COCH_2(OCH_2CH_2)_kNH]_q$-(γ谷氨酸)$_p$-

[0406] 其中,k是2,并且p和q独立地是选自1或2的整数。

[0407] 根据一种实施方式,自切割二肽包括酰化氨基酸作为第一氨基酸,其中,酰化氨基酸的侧链被C16-C20脂肪酸或C16-C20二酸酰化,任选地其中,酰化氨基酸选自C16-C20酰化赖氨酸、C16-C20酰化鸟氨酸、C16-C20酰化半胱氨酸和C16-C20酰化高半胱氨酸,任选地其中,二肽的酰化氨基酸是C16-C20酰化Lys,任选其中,自切割二肽的第一个氨基酸是呈D-立体化学构象的氨基酸。

[0408] 实施方式

[0409] 根据实施方式1,提供了GLP-1受体拮抗剂,其中,所述拮抗剂包括以下氨基酸序列：

[0410] R_{10}-$DVX_{11}X_{12}YLX_{15}X_{16}QAX_{19}X_{20}EFX_{23}EWLVRGGPSSGAPPPSX_{40}$-$R_{20}$SEQ ID NO:23),其中

[0411] R_{10}是NH_2或者1或2个氨基酸的N末端延伸,其中,所述N末端延伸的氨基酸之一被C14-C20脂肪酸或二酸任选地经由间隔基酰化,任选地其中,R_{10}是以下结构的二肽:X_7X_8,其中X_7是酰化氨基酸,任选地酰化Lys或酰化dLys,并且X_8是Gly或C_1-C_4 N-烷基化Gly;

[0412] X_{11}是Trp、dTrp或Ser;

[0413] X_{12}是Arg或酰化氨基酸,任选地酰化Lys;

[0414] X_{15}是Glu或dGlu;

[0415] X_{16}是Glu、dGlu、Asp、高谷氨酸或高半胱氨酸;

[0416] X_{19}是Val、环丙烷、环戊烷、环己烷或苯基甘氨酸;

[0417] X_{20}是Arg、高赖氨酸或瓜氨酸;

[0418] X_{23}是Ile或dIle;以及

[0419] X_{40}是酰化氨基酸,任选地酰化Lys;以及

[0420] R_{20}是COOH或$CONH_2$,任选地其中,选自位置7、10、13或16的1、2或3个氨基酸被Trp或dTrp置换,前提条件是当X_{10}或X_{11}之一是Trp或dTrp时,则另一个不是Trp或dTrp,并且R_{10}和X_{12}两者不能同时包括酰化氨基酸;任选地其中,位置16、18、19、24、26或28中的任何处的1、2或3个氨基酸被Aib置换。

[0421] 根据实施方式2,提供了实施方式1所述的GLP-1拮抗剂,其中,所述拮抗剂包括以下氨基酸序列

[0422] R_{10}-$DVX_{11}X_{12}YLX_{15}X_{16}QAX_{19}X_{20}EFX_{23}EWLVRGGPSSGAPPPSX_{40}$-$R_{20}$SEQ ID NO:23),其中,

[0423] R_{10}是NH_2或X_7X_8,其中,X_7是任选地经由间隔基被C14-C20脂肪酸或二酸酰化的氨基酸,并且X_8是Gly或C_1-C_4 N-烷基化Gly;

[0424] X_{11}是Trp、dTrp或Ser;

[0425] X_{12}是Arg或酰化氨基酸,任选地酰化Lys;

[0426] X_{15}是Glu或dGlu;

[0427] X_{16}是Glu、dGlu、Asp、高谷氨酸或高半胱氨酸;

[0428] X_{19}是Val、环丙烷、环戊烷、环己烷或苯基甘氨酸;

[0429] X_{20}是Arg、高赖氨酸或瓜氨酸;

[0430] X_{23}是Ile或dIle;以及

[0431] X_{40}是酰化氨基酸,任选地酰化Lys;以及

[0432] R_{20}是COOH或$CONH_2$,任选地其中,位置16、18、19、24、26或28中的任何处的1、2或3个氨基酸被Aib置换。

[0433] 根据实施方式3,提供了实施方式1或2所述的GLP-1拮抗剂,其中,GLP-1拮抗剂的每个酰化氨基酸是酰化Lys。

[0434] 根据实施方式4,提供了实施方式1-3中任一项所述的GLP-1拮抗剂,其中,X_7是酰化Lys并且X_{12}是Arg。

[0435] 根据实施方式5,提供了实施方式1-3中任一项所述的GLP-1拮抗剂,其中,R_{10}是NH_2并且X_{12}是酰化Lys。

[0436] 根据实施方式6,提供了实施方式1-3中任一项所述的GLP-1拮抗剂,其中,X_7是NH_2并且X_{12}是Arg。

[0437] 根据实施方式7,提供了实施方式1所述的GLP-1拮抗剂,其中,所述拮抗剂包括选自SEQ ID NO:5至SEQ ID NO:96中任何一个或其任何组合的氨基酸序列。

[0438] 根据实施方式8,提供了实施方式1-7中任一项所述的GLP-1拮抗剂,其中,所述GLP-1拮抗剂的酰化氨基酸独立地是用C16-C18脂肪酸或C16-C18脂肪二酸酰化的Lys残基,所述C16-C18脂肪酸或C16-C18脂肪二酸直接连接至Lys侧链或任选地经由间隔基连接,所述间隔基包括

[0439] (i) γ谷氨酸,

[0440] (ii)minipeg聚合物:-[$COCH_2(OCH_2CH_2)_kNH$]-,其中,k是2、4、6或8,

[0441] (iii)或者i)和/或ii)中的任意多个或组合。

[0442] 根据实施方式9,提供了实施方式1-8中任一项所述的GLP-1拮抗剂,其中,所述拮抗剂包括以下氨基酸序列

[0443] $DX_{10}X_{11}RYLX_{15}X_{16}QAVREFX_{23}EWLVRGGPSSGAPPPSX_{40}R_{20}$(SEQ ID NO:5),其中,

[0444] X_{10}是Trp、dTrp或Val;

[0445] X_{11}是Trp、dTrp或Ser;

[0446] X_{15}是Glu或dGlu;

[0447] X_{16}是Trp、dTrp、dGlu或Glu;

[0448] X_{23}是Ile或dIle;

[0449] X_{40}是酰化氨基酸;以及

[0450] R_{20}是COOH或$CONH_2$,任选地其中,所述肽包括在位置16、18、19、24、26或28中的任何处的一个或多个Aib的置换,或任选地在位置12处的酰化Lys的置换,其中,所述位置编号是相对于天然Exendin4氨基酸序列。

[0451] 根据实施方式10,提供了实施方式1-9中任一项所述的GLP-1拮抗剂,其中,X_{11}是Trp或dTrp。

[0452] 根据实施方式11,提供了实施方式1-10中任一项所述的GLP-1拮抗剂,其中,SEQ ID NO:5的位置16、18、19、24、26或28中的任何位置处的氨基酸被置换为Aib,任选地其中,Aib在位置18处置换。

[0453] 根据实施方式12,提供了实施方式1-11中任一项所述的GLP-1拮抗剂,其中,位置12处的氨基酸被酰化Lys置换。

[0454] 根据实施方式13,提供了实施方式1-11中任一项所述的GLP-1拮抗剂,其中,

[0455] X_{15}是dGlu;

[0456] X_{16}是Glu;以及

[0457] X_{23}是Ile。

[0458] 根据实施方式14,提供了实施方式1-11中任一项所述的GLP-1拮抗剂,其中,

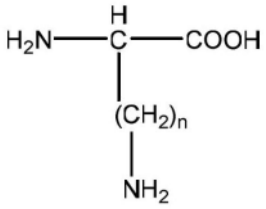
[0459] X_{15}是Glu;

[0460] X_{16}是Glu;以及

[0461] X_{23}是Ile。

[0462] 根据实施方式15,提供了实施方式1-14中任一项所述的GLP-1拮抗剂,其中,X40是具有任选地经由间隔基连接至所述氨基酸的侧链的酰基基团的氨基酸。

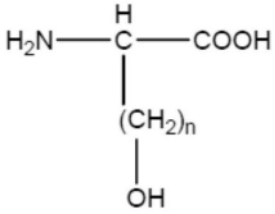
[0463] 根据实施方式16,提供了实施方式1-15中任一项所述的GLP-1拮抗剂,其中,X_{40}是包括式I(任选地,Lys)、式II(任选地,Cys)或式III(任选地,Ser)的结构的氨基酸,其中,式I、II和III中的每一个是:



其中，n＝1 至 4

[式 I];

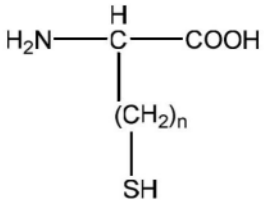
[0464]



其中，n=1 至 4

[式 II]；以及

[0465]



其中，n＝1 至 4

[式 III]。

[0466] 根据实施方式17,提供了实施方式1-16中任一项所述的GLP-1拮抗剂,其中,X_{40}是

酰化赖氨酸。

[0467] 根据实施方式18,提供了实施方式1-17中任一项所述的GLP-1拮抗剂,其中,所述酰化氨基酸的酰基基团选自(C1-C4烷基)NH-CO(CH2)14-20CH3、(C1-C4烷基)NH-[间隔基]-CO(CH2)14-20CH3、(C1-C4烷基)NH-CO(CH2)14-20COOH或(C1-C4烷基)NH-[间隔基]-CO(CH2)14-20COOH。

[0468] 根据实施方式19,提供了实施方式1-18中任一项所述的GLP-1拮抗剂,其中,所述酰化氨基酸的酰基基团经由间隔基共价连接至所述酰化氨基酸的氨基酸侧链。

[0469] 根据实施方式20,提供了实施方式1-19中任一项所述的GLP-1拮抗剂,其中,间隔基是氨基酸或二肽。

[0470] 根据实施方式21,提供了实施方式1-20中任一项所述的GLP-1拮抗剂,其中,间隔基包括

[0471] (i)γ谷氨酸,

[0472] (ii)minipeg聚合物:-[COCH2(OCH2CH2)kNH]-,其中,k是2、4、6或8,

[0473] (iii)或者i)和/或ii)中的任意多个或组合。

[0474] 根据实施方式22,提供了实施方式1-11中任一项所述的GLP-1拮抗剂,其中,所述酰化氨基酸与C16至C18脂肪酸或C16至C18脂肪二酸连接,任选地其中,所述酸或二酸经由包括以下结构的间隔基连接:

[0475] -(γ谷氨酸)p-[COCH2(OCH2CH2)kNH]q-(γ谷氨酸)n-

[0476] 或

[0477] -[COCH2(OCH2CH2)kNH]q-(γ谷氨酸)p-[COCH2(OCH2CH2)kNH]m-;

[0478] 其中k是选自2、4或8的整数,m和n独立地是选自0、1或2的整数,并且p和q独立地是选自1、2、4或8的整数。

[0479] 根据实施方式23,提供了实施方式1-22中任一项所述的GLP-1拮抗剂,其中酰化氨基酸是Lys,其具有通过包括以下结构的间隔基连接至赖氨酸侧链的C16至C18脂肪酸:

[0480] -[COCH2(OCH2CH2)kNH]q-(γ谷氨酸)p-

[0481] 其中,k是2,并且p和q独立地是选自1或2的整数。

[0482] 根据实施方式24,提供了实施方式1-23中任一项所述的GLP-1拮抗剂,其中

[0483] X11是Trp或dTrp;

[0484] X15是Glu或dGlu;

[0485] X16是Glu或dGlu;

[0486] X23是Ile或dIle;以及

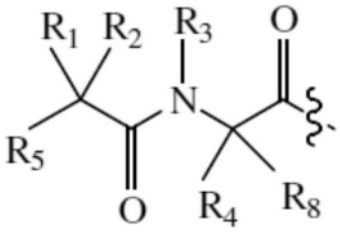
[0487] X40是被C16或C18二酸酰化的Lys,任选地其中,所述二酸经由包括以下结构的间隔基连接:

[0488] -[COCH2(OCH2CH2)kNH]q-(γ谷氨酸)p-

[0489] 其中,k是2,并且p和q独立地是选自1或2的整数。

[0490] 根据实施方式25,提供了实施方式1-24中任一项所述的GLP-1拮抗剂,其中R20是CONH2。

[0491] 根据实施方式26,提供了权利要求9-25中任一项所述的GLP-1拮抗剂的衍生物,其进一步包括二肽A-B:

[0492] 

[0493] 其通过酰胺键与所述GLP-1拮抗剂连接,其中,

[0494] R_1、R_2、R_4和R_8独立地选自由以下组成的组:H、C_1-C_{18}烷基、C_2-C_{18}烯基、(C_1-C_{18}烷基)OH、(C_1-C_{18}烷基)SH、(C_2-C_3烷基)SCH_3、(C_1-C_4烷基)$CONH_2$、(C_1-C_4烷基)COOH、(C_1-C_4烷基)NH_2、(C_1-C_4烷基)$NHC(NH_{2+})NH_2$、(C_0-C_4烷基)(C_3-C_6环烷基)、(C_0-C_4烷基)(C_2-C_5杂环)、(C_0-C_4烷基)(C_6-C_{10}芳基)R_7、(C_1-C_4烷基)(C_3-C_9杂芳基)和C_1-C_{12}烷基(W1)C_1-C_{12}烷基,其中,W1是选自由N、S和O组成的组的杂原子;

[0495] R_3选自由以下组成的组:C_1-C_{18}烷基、(C_1-C_{18}烷基)OH、(C_1-C_{18}烷基)NH_2、(C_1-C_{18}烷基)SH、(C_0-C4烷基)(C_3-C_6)环烷基、(C_0-C_4烷基)(C_2-C_5杂环)、(C_0-C_4烷基)(C_6-C_{10}芳基)R_7和(C_1-C_4烷基)(C_3-C_9杂芳基),或R_4和R_3连同它们所连接的原子一起形成吡咯烷环;

[0496] R_5是NHR_6或OH;

[0497] R_6是H、C_1-C_8烷基;以及

[0498] R_7选自由H和OH组成的组

[0499] 其中,在生理条件下的PBS中,A-B从所述GLP-1拮抗剂的化学裂解半衰期($t_{1/2}$)为至少约1小时至约1周。

[0500] 根据实施方式27,提供了实施方式26所述的GLP-1拮抗剂,其中,所述二肽A-B共价连接至所述GLP-1拮抗剂氨基酸序列的N末端α胺。

[0501] 根据实施方式28,提供了实施方式26-27中任一项所述的GLP-1拮抗剂,其中

[0502] R_1和R_8独立地是H或C_1-C_8烷基;

[0503] R_2和R_4独立地选自由以下组成的组:H、C_1-C_8烷基、(C_1-C_4烷基)OH、(C_1-C_4烷基)SH、(C_2-C_3烷基)SCH_3、(C_1-C_4烷基)$CONH_2$、(C_1-C_4烷基)COOH、(C_1-C_4烷基)NH_2和(C_1-C_4烷基)(C_6芳基)R_7;

[0504] R_3是(C_1-C_6)烷基;

[0505] R_5是NH_2;以及

[0506] R_7选自由氢和OH组成的组。

[0507] 根据实施方式29,提供了实施方式26-27中任一项所述的GLP-1拮抗剂,其中,

[0508] R_1,包括选自由以下组成的组的侧链:C_1-C_8烷基、(C_1-C_4烷基)OH、(C_1-C_4烷基)SH、(C_1-C_4烷基)COOH和(C_1-C_4烷基)NH_2,任选地其中,C16-C30脂肪酸或C16-C30二酸任选地经由间隔基共价连接至所述侧链,所述间隔基选自由γ谷氨酸、γ谷氨酸-γ谷氨酸二肽和γ谷氨酸-$[COCH_2(OCH_2CH_2)_kNH]_q$-γ谷氨酸组成的组,其中,

[0509] k是选自1-8范围内的整数;以及

[0510] q是选自1-8范围的整数,任选地其中,k是2并且q选自1-8范围;

[0511] R_2、R_4和R_8独立地是H或C_1-C_4烷基;

[0512] R_3是C_1-C_6烷基;以及

[0513] R_5是NH_2。

[0514] 根据实施方式30,提供了实施方式26-29中任一项所述的GLP-1拮抗剂,其中,

[0515] R_1是H、C_1-C_4烷基、(C_1-C_4烷基)OH或(C_1-C_4烷基)NH_2;

[0516] R_2是H;

[0517] R_3是(C_1-C_4)烷基;

[0518] R_4是H或C_1-C_4烷基;

[0519] R_5是NH_2;以及

[0520] R_8是氢。

[0521] 根据实施方式31,提供了实施方式26-30中任一项所述的GLP-1拮抗剂,其中,所述二肽A-B包括酰化Lys残基和N-烷基化Gly残基,其中,所述Lys和N-烷基化Gly残基经由肽键连接,任选地其中,所述Lys残基呈D-构象。

[0522] 根据实施方式32,提供了实施方式26-30中任一项所述的GLP-1拮抗剂,其中

[0523] R_1是(C_4烷基)NH_2或(C_4烷基)NH(mPeg-γE-二酸)-C18;

[0524] R_2、R_4和R_8各自是H;

[0525] R_3是C_1-C_4烷基;和R_5是NH_2;

[0526] R_5是胺。

[0527] 根据实施方式33,提供了药物组合物,其包括权利要求1-32中任一项所述的GLP-1拮抗剂或衍生物以及药学上可接受的载体、稀释剂或赋形剂。

[0528] 根据实施方式34,提供了治疗患有非典型低血糖的患者的方法,其中,所述方法包括向有此需要的患者给药有效升高血糖水平的量的实施方式33所述的药物组合物的步骤。

[0529] 实施例1

[0530] Ex-4(9-39)a(SEQ ID NO:2)是一种已确定的GLP-1受体拮抗剂。然而,由于其非人类来源及其体内作用持续时间相对较短,其作为人类中的治疗剂的用途受到限制。人GLP-1的可比较的N末端截短减少了激动作用,但不提供高效拮抗剂。通过一系列GLP-1/Ex-4杂合肽,生成纯GLP-1基拮抗剂所需的最小结构变化被确定为Glu16、Val19和Arg20,由此产生的拮抗剂在体外的效力是与Ex-4(9-39)a相比的大约3倍高。基于人的拮抗剂的位点特异性酰化产生肽"9-40Jant4 K_{40}[C16](SEQ ID NO:3),其作为GLP-1受体拮抗剂的效力增加,并且是相对于GIP受体选择性高10倍(Patterson,et al,ACS Chem.Biol.2011,6,135-145)。

[0531] 如本文所公开的,已制备9-40Jant4-K_{40}的变体以提供进一步改进的GLP-1受体拮抗剂。肽9-40Jant4-K_{40}通过C16酰基基团与Lys侧链的直接连接在位置40处被酰化。已经制备了在Lys侧链和C16酰基基团之间插入间隔基的变体。表2列出了这些酰化变体的GLP-1拮抗剂活性和溶解度。

[0532] 对9-40Jant4-K_{40}(DVSSYLEEQAVREFIAWLVKGGPSSGAPPPSK;SEQ ID NO:3)的一级序列进行了各种氨基酸置换,并且表3中提供了这些变体的GLP-1拮抗剂活性和溶解度。

[0533] 表4提供了关于Aib置换对Jant4-K_{40}(SEQ ID NO:3)变体的活性和溶解度的影响的数据。表5提供了关于d-AA置换对Jant4-K_{40}(C16)(SEQ ID NO:3)变体的溶解度的影响的数据并且表6提供了关于Jant4-K_{40}(SEQ ID NO:3)位置3处的Trp置换的数据。

[0534] 材料和方法

[0535] Fmoc合成

[0536] 使用Symphony肽合成仪(Peptide Tech-nology,Tucson,AZ)以Wang树脂

(AAPPtec,Louisville,KY)和6-Cl-HOBt/DIC活化开始,通过自动化Fmoc/t-Bu固相方法制备肽。所有常规残基均购自Midwest Biotech(Fisher,IN),6-Cl-HOBt和DIC获自AAPPtec(Louisville,KY)。通过用包含2.5% TIS、2.5% H2O、1.5%甲醇、2.5%苯酚、0.5% DODT和0.5%二甲亚砜的TFA处理,将肽从树脂上切下并脱保护。根据标准程序,用冷乙醚从过滤的TFA溶液中沉淀肽。在树脂上用十倍过量的Fmoc-Glu-OtBu/DEPBT/DIEA进行肽的脂肪酰化,重复以进行双偶联,随后用十倍过量的棕榈酸或另一种脂肪酸/DEPBT/DIEA进行。

[0537] 拮抗剂酰化

[0538] 使用正交固相保护方案将棕榈酸引入到合成的拮抗剂肽中。Boc合成用于肽合成,允许在Lys40处选择性引入碱敏感侧链保护的Lys(Fmoc)-OH。将完全保护的肽在树脂上用DMF(v/v)中的20%哌啶处理30min,以去除Lys40侧链Fmoc基团。

[0539] 在DMF/DIEA(4:1v/v)中加入过量脂肪酸和5当量的苯并三唑-1-基-氧三吡咯烷基膦六氟磷酸盐(PyBOP)(Fluka),大约18h,来促进酰胺键形成。使用茚三酮测试监测反应进程,并且肽裂解后用ESI质谱法确认酰化。

[0540] 肽纯化

[0541] 使用反相HPLC(RP-HPLC)进行肽纯化。在制备型RP-HPLC纯化过程中,使用C18固定相(Vydac 218TP,250mm_22mm,10μm)和0.1%三氟乙酸中的线性乙腈梯度。使用具有C8柱(Zorbax 300SB,4.6mm X 50mm,3.5μm)的RP-HPLC对峰级分进行分析型分析。通过分析型RP-HPLC和ESI或MALDI质谱法评估肽的身份和纯度。发现所有肽均具有正确的分子量,并且纯度为大约95%纯。冻干肽储存于4℃。

[0542] GLP-1受体介导的cAMP诱导

[0543] 通过基于荧光素酶的报告基因测定来检查肽刺激或阻断GLP-1受体处的cAMP诱导的能力。用人GLP-1受体(Open Biosystems)和cAMP诱导型(cAMP响应元件)荧光素酶基因共转染HEK 293细胞构成了可以测量受体激活的细胞构建体。通过首先将细胞在补充了0.25%牛生长血清(HyClone)的Dulbecco改良Eagle培养基(Invitrogen)剥夺血清16h,并且然后在96孔聚D-赖氨酸包被的板(BD Biosciences)中添加适当浓度范围内的连续稀释的肽来进行生物测定。对于拮抗测定,在稀释肽后将恒定浓度的GLP-1(0.05nM)添加到测定板中。在37℃、5% CO_2下继续孵育5h,并且随后添加等体积(100μL)的LucLite发光底物试剂(Perkin-Elmer)。

[0544] 以600rpm的速度摇动板3min后,MicroBeta 1450液体闪烁计数(Perkin-Elmer)以每秒计数(cps)量化发光信号。使用Origin软件(OriginLab)绘制数据,并通过S形拟合确定有效浓度50(EC_{50})或抑制浓度50(IC_{50})。通过相对EC_{50}或IC_{50}值的比较分析来确定效力。每个实验重复至少三次,每个样品一式两份进行测定。

[0545] 动物

[0546] C57Bl/6小鼠获自杰克逊实验室(Jackson Laboratories)。小鼠在22℃下的12:12h光暗循环中单独饲养或分组饲养,可自由获取食物和水。所有研究均经辛辛那提大学机构动物护理和使用委员会(Institutional Animal Care and Use Committee of the University of Cincinnati)的指导方针批准并进行。

[0547] 葡萄糖耐量试验(GTT)

[0548] 为了测定糖耐量,对小鼠禁食6h并腹腔内注射葡萄糖。注射由每kg体重1.5g葡萄

糖(0.9%w/v盐水中的25%w/v D-葡萄糖(Sigma))构成。使用手持式血糖仪(FreeStyle Freedom Lite)在注射前0min以及注射后15、30、60和120min测量尾部血糖水平(mg dL-1)。

[0549] 急性体内研究

[0550] 小鼠接受皮下注射不同剂量的肽(PBS中)1、4、8、24、48、72或120,然后用IP注射二肽基肽酶-IV保护的Ex-4(0.65nmol kg-1)进行攻击。GLP-1注射后十五分钟进行GTT。如上所述获得尾部血糖值。

[0551] 表2:Jant 4-K_{40}序列(SEQ ID NO:3)的C16接头优化/分析#

[0552]

		生物活性			溶解度
	9-40 酰胺；Jant 4 K40[X]	**IC_{50}**	SDV	N	**[mg/mL] 80mM AmBicarb pH7.7**
95	游离胺	**281**	96	3	12.7
47	C16	**14**	7	15	6.1
52	γE-16	**12**	3	7	>20
53	γE_2-C16	**13**	5	10	>20
54	γE_4-C16	**21**	8	8	>20
55	γE_6-C16	**22**	15	5	>20
48	$(miniPEG)_2\gamma E$-C16	**9**	4	7	9.0
56	MiniPEG-γE-C16	**14**	2	3	>20
57	gE-Mini$(PEG)_2$-gE-C16	**9**	7	5	>25
58	(mini)PEG_2-gE_2-16				>25
59	miniPEG-gE-miniPEG-gE-C16	**11**	7	5	>25

	60	miniPEG-gE$_2$	**5**	2	5	>25
	61	miniPEG-C16 gE$_2$-(miniPEG)$_2$-C16	**6**	2	4	>25
	62	gE-miniPEG-gE-C16	**7**	3	4	>25
	63	miniPEG-二酸 C18	**114**	54	16	>25
[0553]	64	gE$_2$-二酸 C18	**841**	361	7	>25
	65	gE$_4$-二酸 C18	**1071**	624	8	>25
	66	gE$_6$-二酸 C18	**1464**	751	6	>25
	67	(miniPEG)$_2$-gE-二酸 C18	**579**	376	12	>25
	68	miniPEG-gE 二酸 C18	**718**	130	3	>25

[0554] 表3:Jant4-K$_{40}$(SEQ ID NO:3)的氨基酸置换变体

				生物活性			**溶解度**
	`#	9-40;Jant4	K40[C16]	**IC$_{50}$**	SDV	N	80mM AmeBicarb pH7.7
	47		-酰胺	**14**	7	15	**6.1**
	69	R28	-酰胺	**16**	1	3	**13.7‡**
	70	E24、R28	-酰胺	**14**	4	4	**>20**
	71	E17、R28	-酰胺	**18**	7	4	**>20**
	72	E17、E24、R28	-酰胺	**19**	6	4	**>20**
[0555]	73	R12、R28	-酰胺	**27**	17	4	**<0.1**
	74	R12、E24、R28	-酰胺	**15**	3	4	**>20**
	75	R12、E17、E24、R28	-酰胺	**19**	5	4	**18.6**
	76	Exendin K40	-酰胺	**6**	1	3	**18.6**
	77		R28¥-酸	**13**	2	5	**>20**
	78	E24,	R28¥-酸	**19**	13	13	**>20**
	16	R12、E24,	R28¥-酸	**18**	12	13	**>20**
	79	E24、R27	v28¥-酸	**115**	37	10	**>20**
	80	E24、R27	Aib28¥-酸	**106**	1414		**>20**

[0556] ¥K40[miniPEG-gE-C16]

[0557] ‡高粘度溶液

[0558] 表4:Aib对Jant4-K$_{40}$(SEQ ID NO:3)活性和溶解度的影响

[0559]

#	9-40am；Jant4 k40[C16]	生物活性 IC50	SDV	N	溶解度 [mg/mL] 80mM AmBicarb pH7.7	溶解度 [mg/mL] PBS pH7.7
81	Aib27	**23**	10	4	19.0 (6.1)	1.6
4328	K27、Aib28	**13**	13	10	18.9 (5.10	0.2
82	K26, Aib	**6**	2	4	14.2 (6.0)	0.1
44	Aib26	**8**	1	4	19.0 (5.7)	0.1
83	Aib24	**14**	6	4	12.6 (4.2)	0.3
45	Aib19	**8**	2	4	11.1 (1.6)	0.4
46	Aib18	**7**	2	3	17.5 (3.5)	0.7
84	Aib16	**30**	13	3	5.2 (0.2)	0.2

[0560] 表5:用d-AA改善Jant4-K_{40}(C16)(SEQ ID NO:3)的溶解度

[0561]

#	9-40am ; Jan54 K40[C16]	生物活性 KC50	SDV	N	溶解度 [mg/mL] 80mM/AmBicarb pH7.7
49	*d-Glu25*	**23**	12	**7**	**>20**
85	*d-Glu16*	**41**	20	**7**	**10.7**
86	*d-Gln17*	**41**	24	**6**	**2.2**
50	*d-Val19*	**124**	86	**6**	**>20**
87	*d-Arg20*	**16**	6	**4**	**0.8**
88	*d-Glu21*	**27**	13	**4**	**1.7**
51	*d-HE23*	**31**	12	**5**	**>20**

[0562] 表6:Jant4-K40(SEQ ID NO:3)的位置3处的Trp置换

[0563]

SEQ ID NO: #	结构	IC50(nM)
89	Ex9-39 酰胺、dK7(PEG2-γE(C16))、G8	6.2
90	Ex9-40 酰胺、K40(C18 二酸)	28
91	Ex9-40 酰胺、W11、K40(C18 二酸)	43
92	Ex9-40 酰胺、dW11、K40(C18 二酸)	32

[0564]

93	Ex9-40 酰胺、W11、K40(mPeg-γE-C18 二酸)	87
94	Ex9-40 酰胺，dW11，K40(mPeg-γE-C18 二酸)	115

[0565] 实施例2

[0566] MBX-1416的合成程序:

[0567] MBX-1416的合成是用Fmoc-Ser(tBu)-Wang的起始固相树脂以0.1mmol的规模进行的。一旦从Fmoc-Ser(tBu)-Wang树脂中去除第一个Fmoc-基团,构成残基9至38(Asp9-Pro38)的Fmoc-氨基酸就依次与游离N末端胺偶联。如下表所示,使用标准Fmoc/DIC/Oxyma合成方案,应用ABI肽合成器进行自动组装。

[0568] ABI433A合成器上使用的Fmoc_DIC_Oxyma_0.10mmol协议的详细信息

[0569]

偶联试剂		Fmoc保护氨基酸	溶剂	激活时间	偶联时间	脱保护
在NMP中的1M DIC(1.0 mL)	在NMP中的1M Oxyma(1.0mL)	1.0 mmol 筒	NMP和DCM	16 min	37 min	20%的在DMF中的哌啶，11 min

[0570] C18二酸偶联程序：

[0571] 一旦将完整的Asp9至Ser39肽组装,N末端C18二酸就与肽基树脂偶联。使用DMF中的DIC(1mmol)和Oxyma(1mmol)将其作为叔丁基保护的C18二酸(1mmol)引入。将叔丁基保护的C18二酸(1mmol)和Oxyma(1mmol)溶解在DMF(10mL)中。向该混合物中添加DIC(1mmol)并使其在室温下预活化10-15min。将该反应混合物添加至Asp9-Ser39肽基树脂中并在室温下搅拌4h进行偶联。

[0572] MBX-1416纯化：

[0573] 将MBX-1416通过Waters HPLC控制器600纯化,使用Gemini®10μm C8 100 Å,LC 250X21.2 mm反相柱(商品目录号00G-4763-P0-AX),具有以15ml/min的流速在90min内从80％ A与20％B至20％A与80％ B的线性梯度。两种缓冲液由在10％乙腈和90％ H2O中的0.1％ TFA(缓冲液A)和在100％乙腈中的0.1％ TFA(缓冲液B)组成。

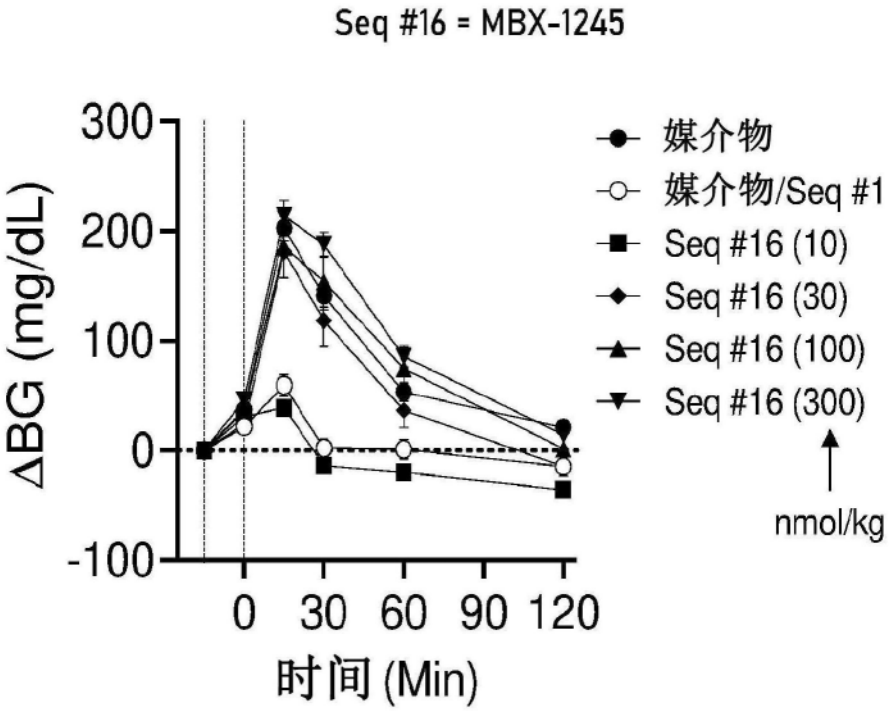

Seq #16 = MBX-1245
300
200
100
0
-100
ΔBG (mg/dL)
0 30 60 90 120
时间 (Min)
媒介物
媒介物/Seq #1
Seq #16 (10)
Seq #16 (30)
Seq #16 (100)
Seq #16 (300)
nmol/kg

图1

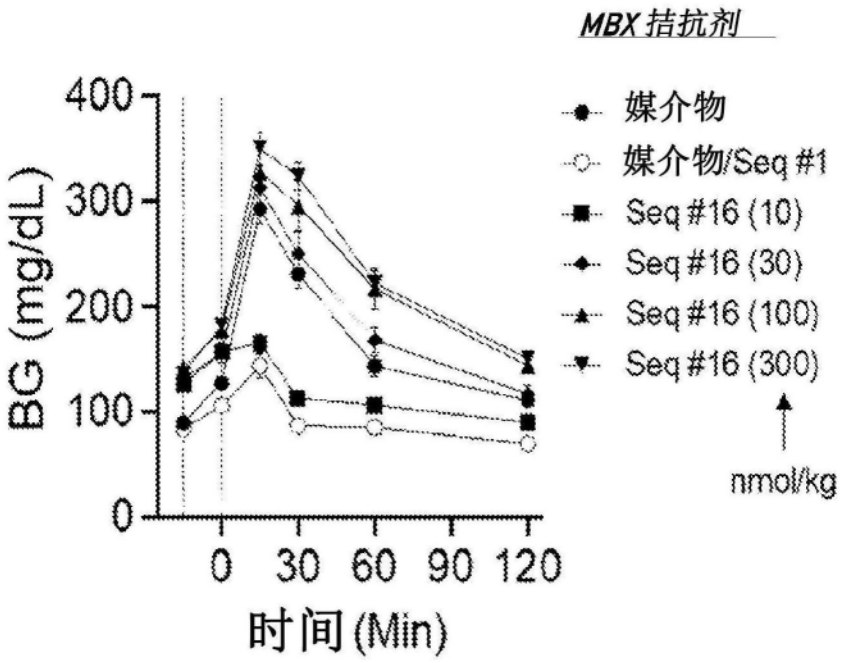

MBX 拮抗剂
400
300
200
100
0
BG (mg/dL)
0 30 60 90 120
时间 (Min)
媒介物
媒介物/Seq #1
Seq #16 (10)
Seq #16 (30)
Seq #16 (100)
Seq #16 (300)
nmol/kg

图2A

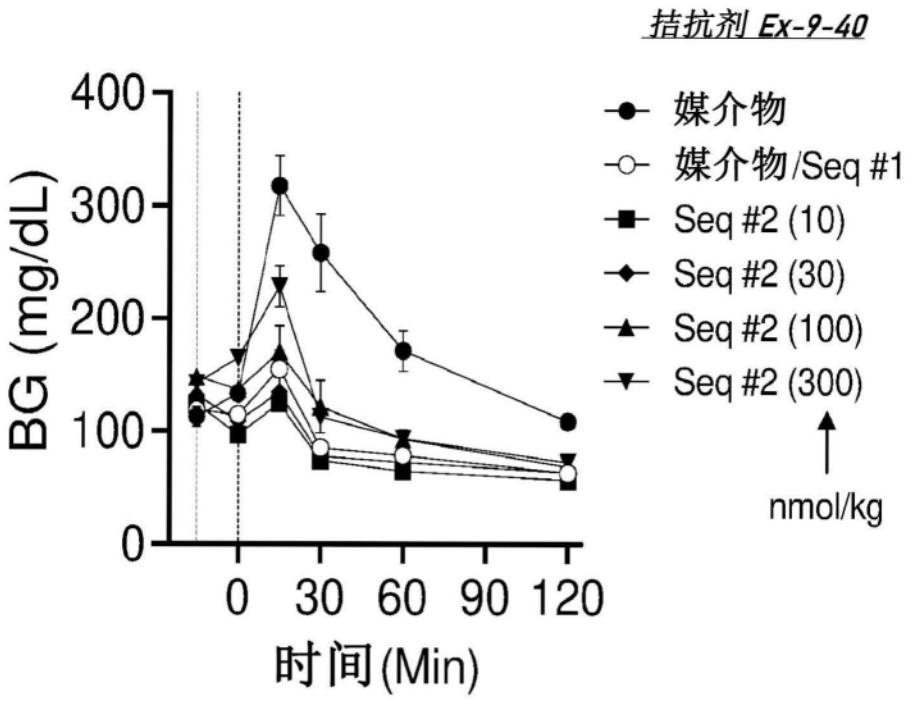

拮抗剂 Ex-9-40
媒介物
媒介物/Seq #1
Seq #2 (10)
Seq #2 (30)
Seq #2 (100)
Seq #2 (300)
nmol/kg
BG (mg/dL)
400
300
200
100
0
0 30 60 90 120
时间(Min)

图2B

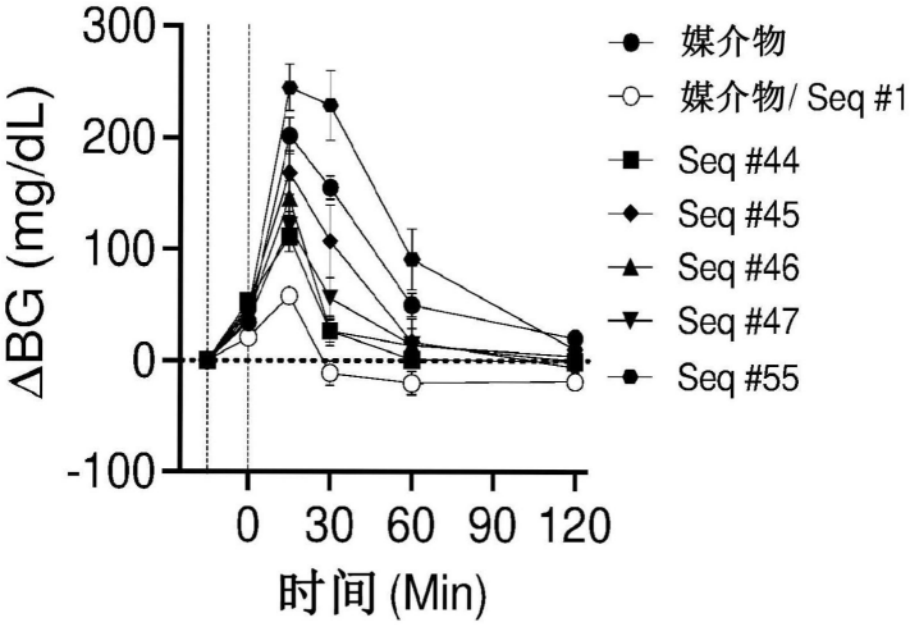

媒介物
媒介物/ Seq #1
Seq #44
Seq #45
Seq #46
Seq #47
Seq #55
ΔBG (mg/dL)
300
200
100
0
-100
0 30 60 90 120
时间 (Min)

图3

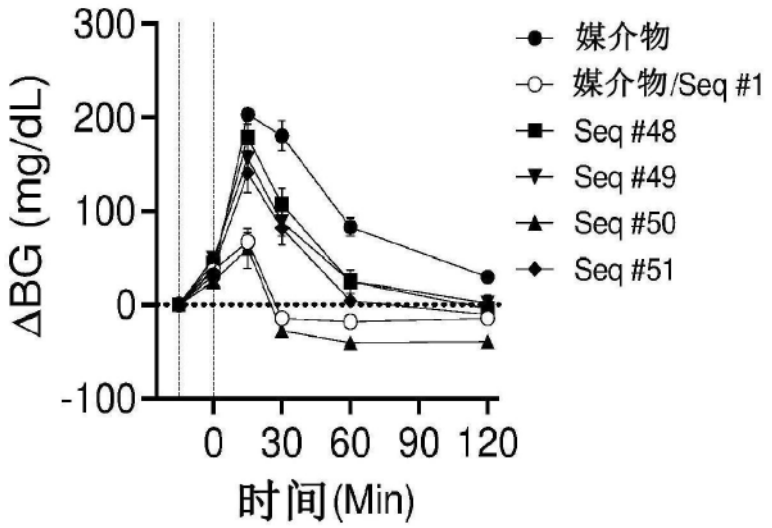

300
200
100
0
-100
ΔBG (mg/dL)
0 30 60 90 120
时间(Min)
媒介物
媒介物/Seq #1
Seq #48
Seq #49
Seq #50
Seq #51

图4

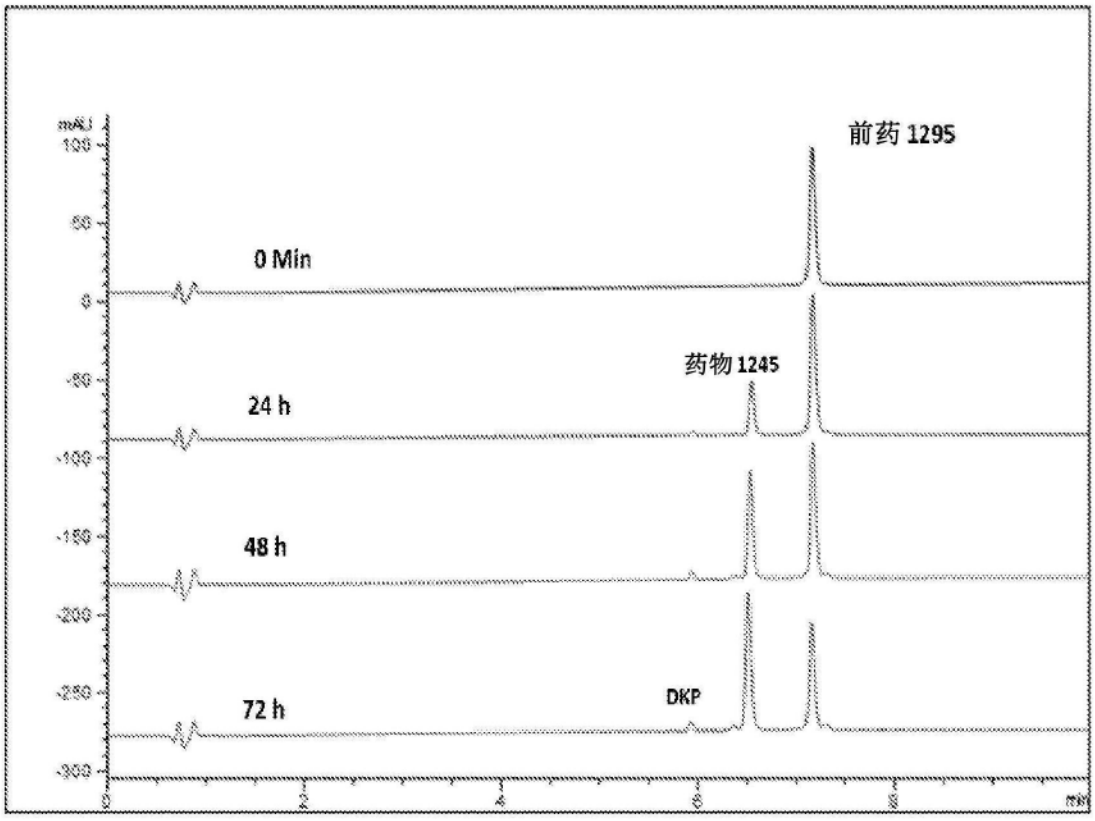

前药 1295
0 Min
药物 1245
24 h
48 h
72 h
DKP

图5A

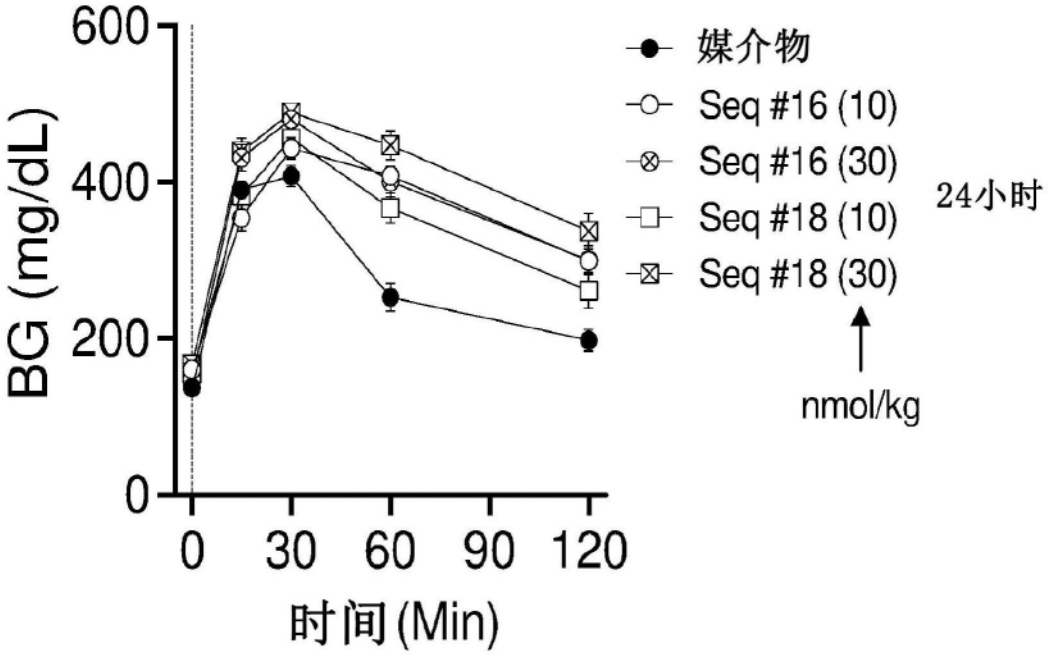

600
400
200
0
BG (mg/dL)
0
30
60
90
120
时间(Min)
媒介物
Seq #16 (10)
Seq #16 (30)
Seq #18 (10)
Seq #18 (30)
24小时
nmol/kg

图5B

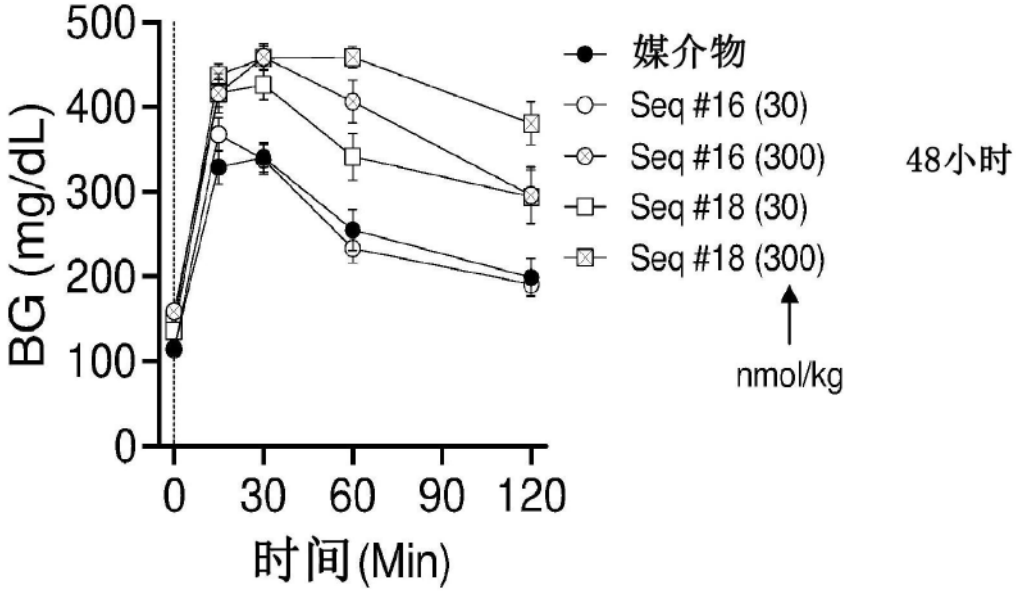

500
400
300
200
100
0
BG (mg/dL)
0
30
60
90
120
时间(Min)
媒介物
Seq #16 (30)
Seq #16 (300)
Seq #18 (30)
Seq #18 (300)
48小时
nmol/kg

图5C

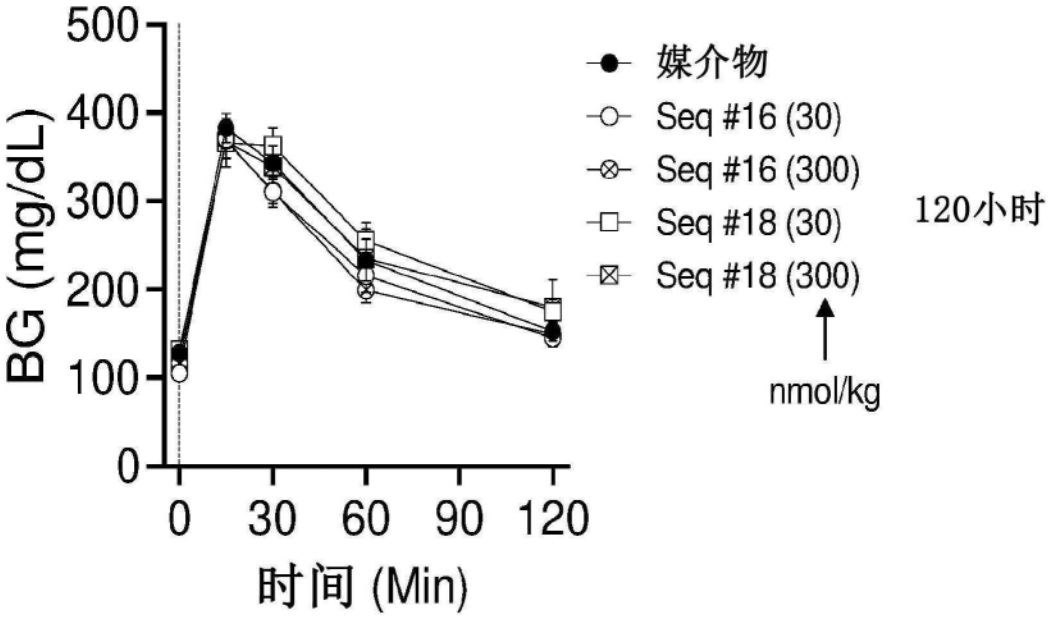

500
400
300
200
100
0
BG (mg/dL)
0
30
60
90
120
时间 (Min)
媒介物
Seq #16 (30)
Seq #16 (300)
Seq #18 (30)
Seq #18 (300)
120小时
nmol/kg

图5D

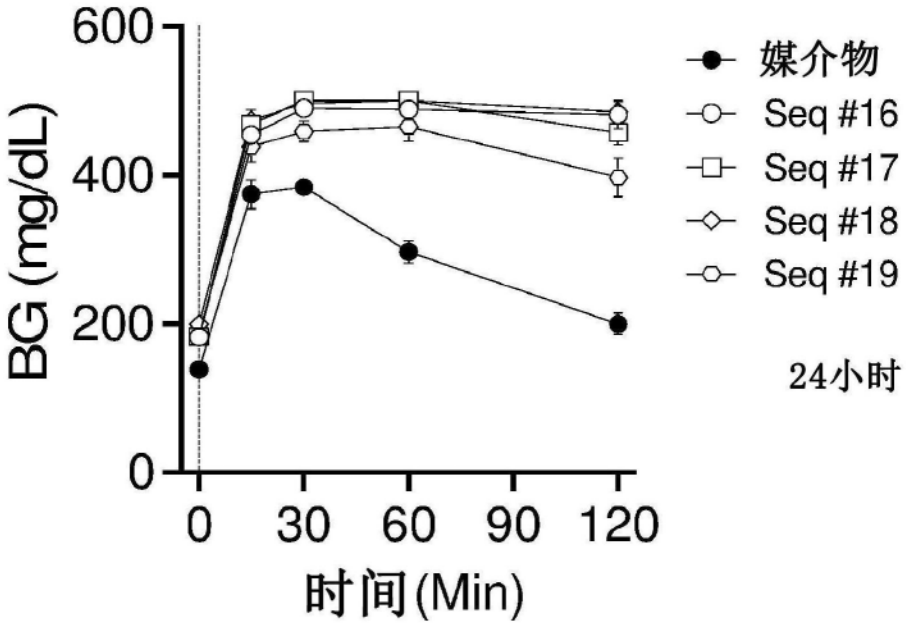

600
400
200
0
BG (mg/dL)
0
30
60
90
120
时间(Min)
媒介物
Seq #16
Seq #17
Seq #18
Seq #19
24小时

图6A

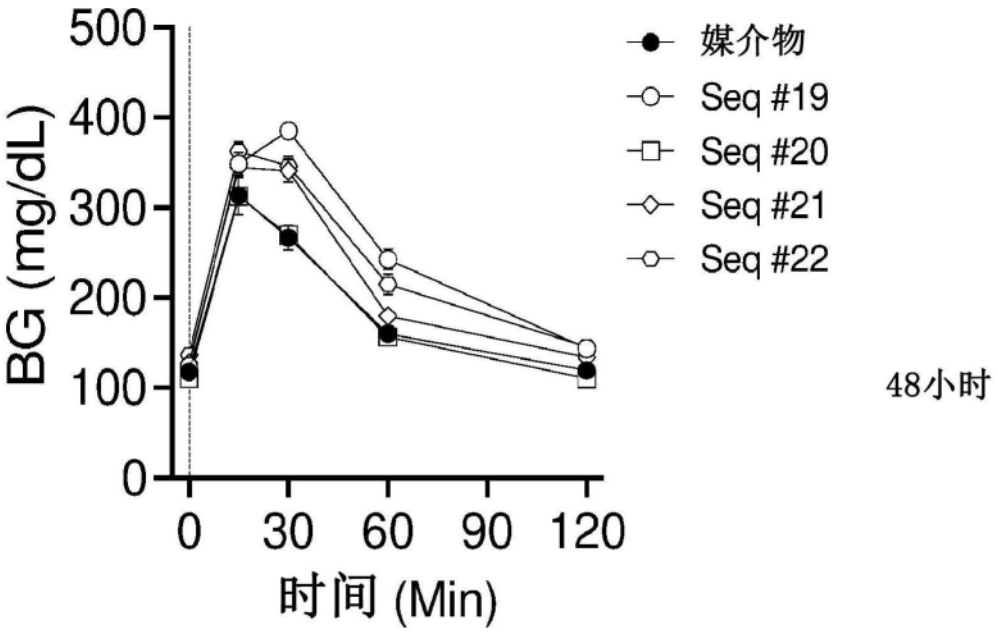


图6B

N -末端脂肪酰化GLP - 1拮抗剂

MBX 1391:	XZGDVSSYLEEQAVREFIEWLVKGGPSSGAPPPSB-酰胺
MBX 1401:	X—DVS**R**YLEEQAVREFIEWLV**R**GGPSSGAPPPSO-酸
MBX 1402:	X—**E**VS**R**YLEEQAVREFIEWLV**R**GGPSSGAPPPSO-酸
MBX 1403:	X—D**L**S**KQM**EE**E**AVR**L**FIEWL**KN**GGPSSGAPPPSO-酸
MBX 1404:	X—DVSSYLEEQAVREFI**A**WLVKGGPSSGAPPPSO-酰胺
MBX 1406:	X—DVSSYLEEQAVREFI**A**WLVKGGPSSGAPPPSO-酸
MBX 1407:	X—DVSSYLEEQAVREFI**A**WLV**R**GGPSSGAPPPSO-酸
MBX 1408:	X—D**L**S**KQM**EE**E**AVR**L**FIEWL**KN**GGPSSGAPPPSO-酰胺
MBX 1416:	X—DVSSYLEEQAVREFI**A**WLV**R**GGPSSGAPPPS-酸

X=C18-二酸 Z=rE-miniPEG O=K(C18-二酸) B=K(miniPEG-rE-C16-一元酸)

图7

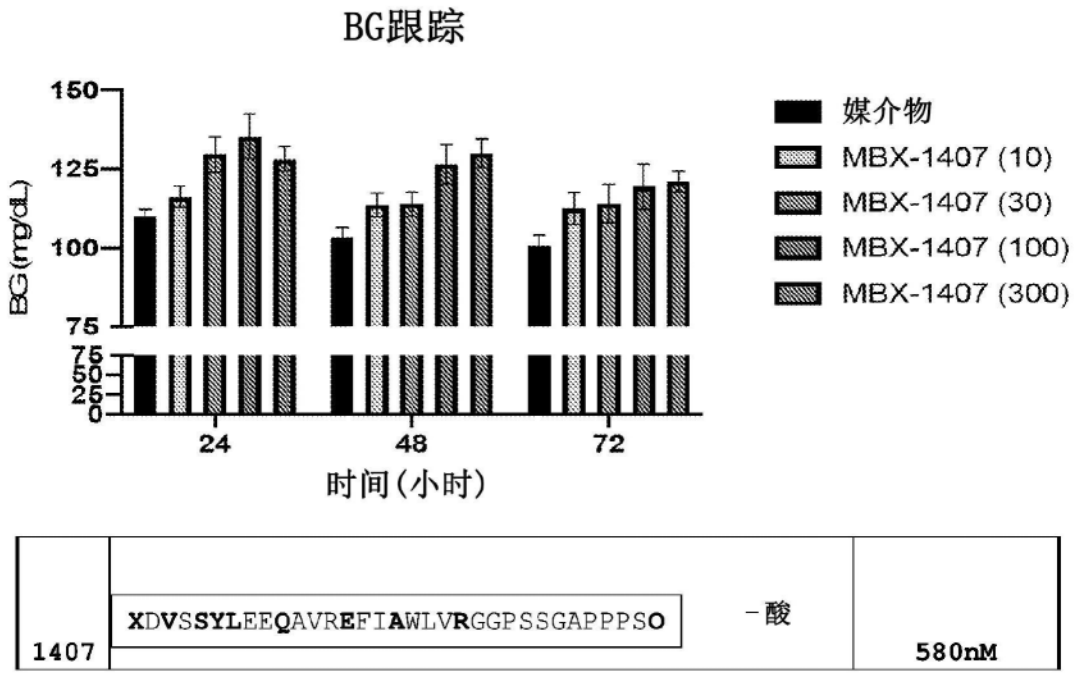

BG跟踪
BG(mg/dL)
150
125
100
75
75
50
25
0
24
48
72
时间(小时)
媒介物
MBX-1407 (10)
MBX-1407 (30)
MBX-1407 (100)
MBX-1407 (300)
1407
XDVSSYLEEQAVREFIAWLVRGGPSSGAPPPSO
-酸
580nM

图8

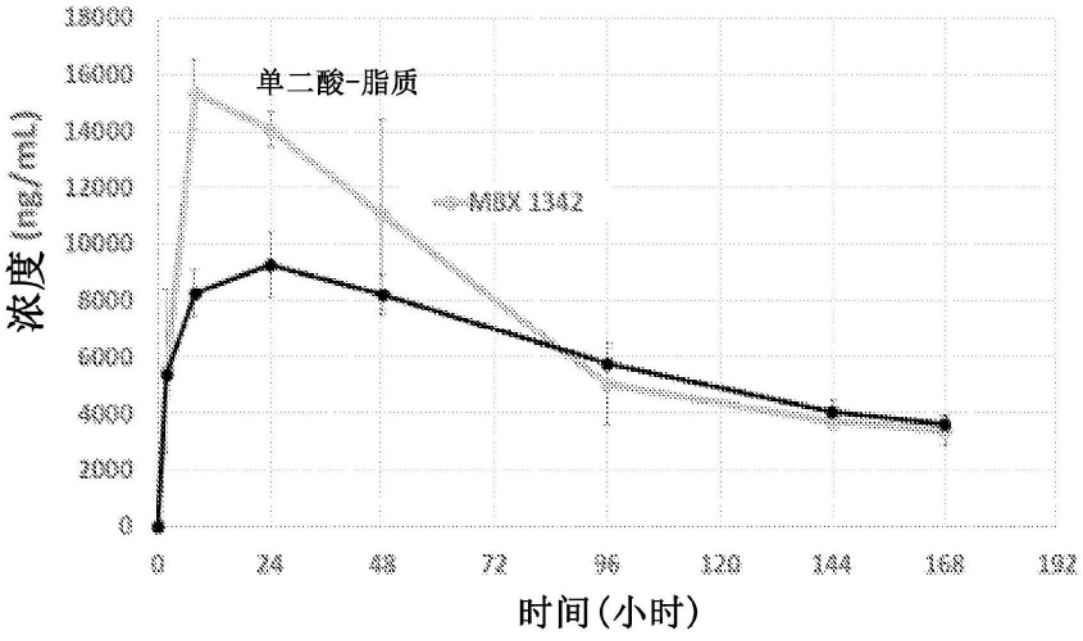

浓度(ng/mL)
18000
16000
14000
12000
10000
8000
6000
4000
2000
0
单二酸-脂质
MBX 1342
0
24
48
72
96
120
144
168
192
时间(小时)

图9

		IC_{50} nM
1342	DLSKQMEEEAVRLFIEWLKNGGPSSGAPPPSO~酰胺	41
1373	k(X)G DLSKQMEEEAVRLFIEWLKNGGPSSGAPPPS~酰胺	14
1416	X DVSSYLEEQAVREFIAWLVRGGPSSGAPPPS~酸	36
1417	ZK(X)GDVSSYLEEQAVREFIAWLVRGGPSSGAPPPS-酸	80
1418	Z DVSSYLEEQAVREFIAWLVRGGPSSGAPPPSO~酸	67

Z=焦谷氨酰胺 X=C18-二酸 O=K(C18~二酸)

图10

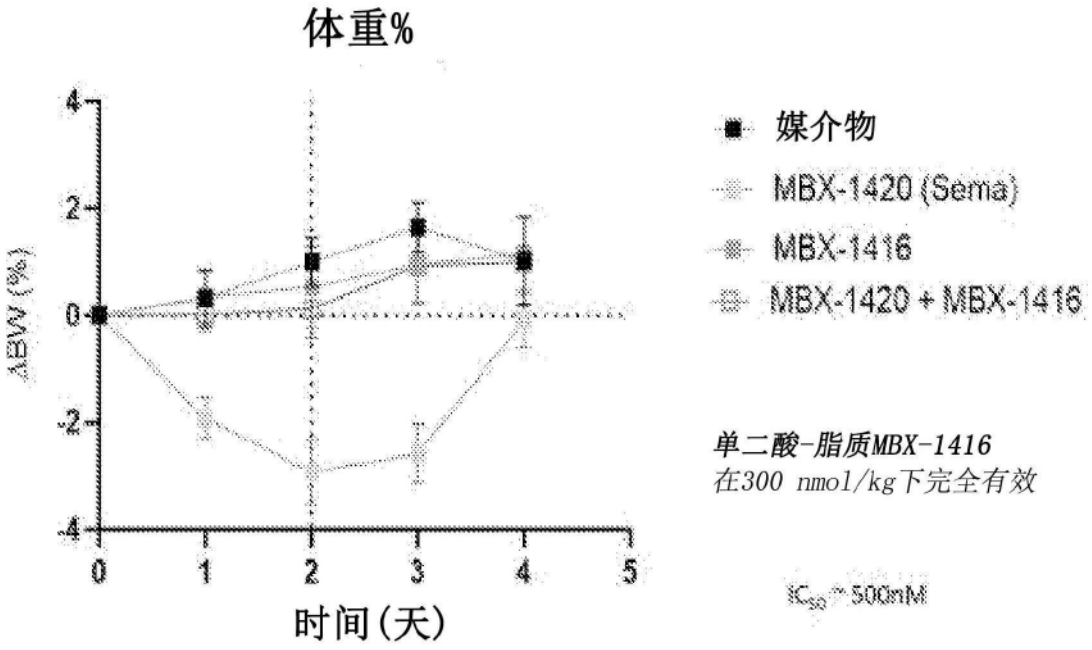


图11A

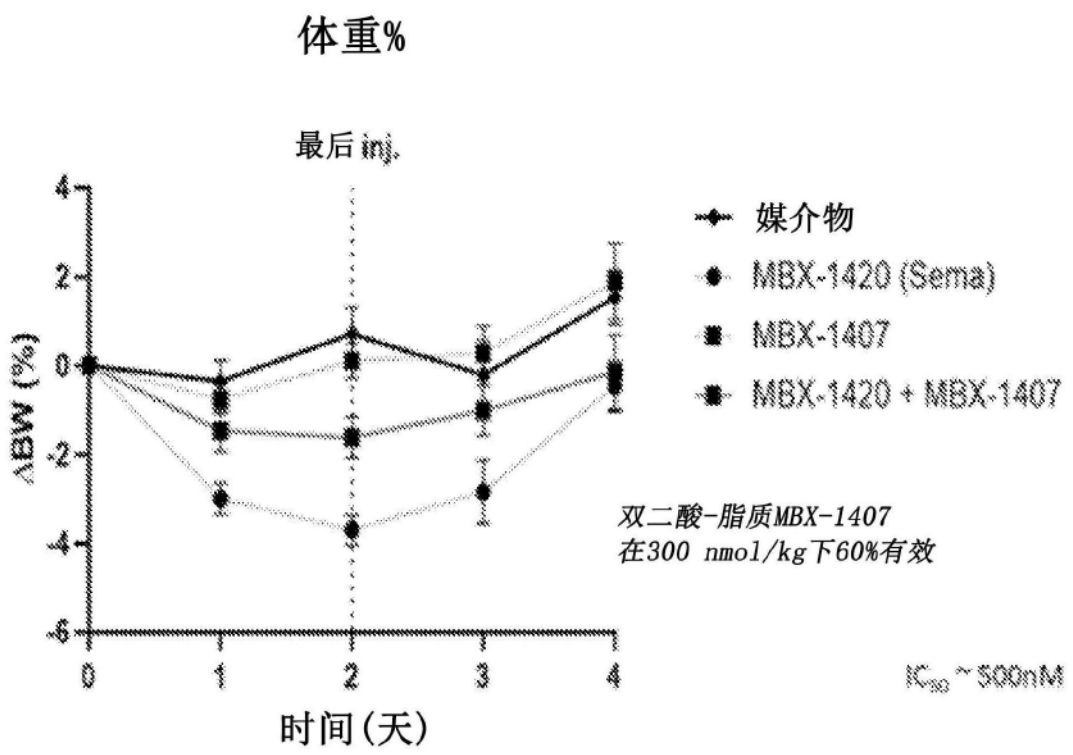

体重%
最后 inj.
媒介物
MBX-1420 (Sema)
MBX-1407
MBX-1420 + MBX-1407
双二酸-脂质MBX-1407
在300 nmol/kg下60%有效
IC50 ~ 500nM
ΔBW (%)
时间(天)
4
2
0
-2
-4
-6
0
1
2
3
4

图11B

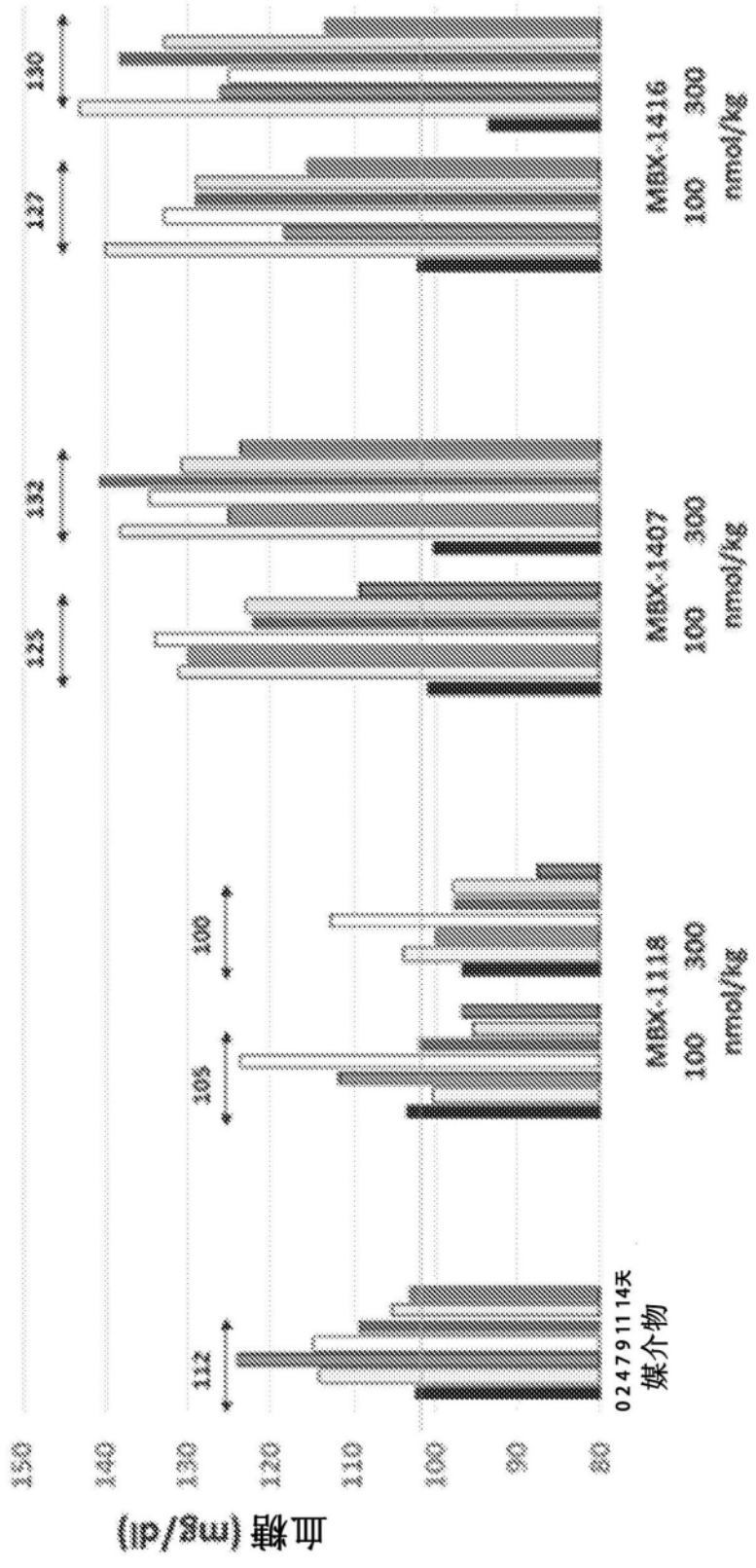

血糖 (mg/dl)
150
140
130
120
110
100
90
80
0 2 4 7 9 11 14天
媒介物
112
105
100
125
132
127
130
MBX-1118
100 300
nmol/kg
MBX-1407
100 300
nmol/kg
MBX-1416
100 300
nmol/kg

图12

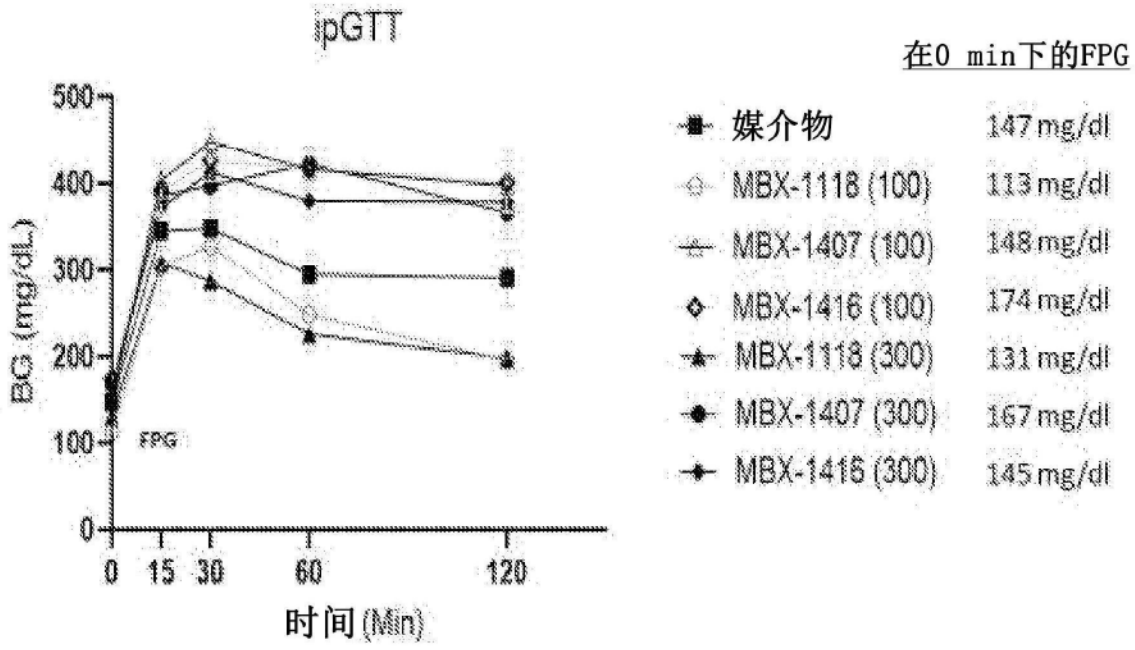

ipGTT
BG (mg/dL)
500
400
300
200
100
0
FPG
0
15
30
60
120
时间 (Min)
在0 min下的FPG
媒介物 147 mg/dl
MBX-1118 (100) 113 mg/dl
MBX-1407 (100) 148 mg/dl
MBX-1416 (100) 174 mg/dl
MBX-1118 (300) 131 mg/dl
MBX-1407 (300) 167 mg/dl
MBX-1416 (300) 145 mg/dl

图13