



(12)发明专利



(10)授权公告号 CN 104902919 B

(45)授权公告日 2018.11.20

(21)申请号 201380067038.4

(22)申请日 2013.12.19

(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 104902919 A

(43)申请公布日 2015.09.09

(30)优先权数据
12306647.4 2012.12.21 EP

(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2015.06.19

(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/EP2013/077313 2013.12.19

(87)PCT国际申请的公布数据
W02014/096150 EN 2014.06.26

(73)专利权人 赛诺菲
地址 法国巴黎

(72)发明人 T·哈克 M·瓦格纳 B·亨克尔
S·斯滕格林 A·埃弗斯
M·洛伦茨 K·洛伦茨

(74)专利代理机构 北京坤瑞律师事务所 11494
代理人 史悦

(51)Int.Cl.
A61K 38/26(2006.01)
C07K 14/605(2006.01)

(56)对比文件
WO 2011094337 A1, 2011.08.04, 摘要、权利要求31、说明书第139段.

CN 101663317 A, 2010.03.03, 全文.
CN 102821779 A, 2012.12.12, 全文.

WO 2008/023050 A1, 2008.02.28, 权利要求1、说明书第11页第3段.

李泰明,等.《Exendin-4 类似物的克隆、表达与体内生物活性检测》.《生物工程学报》.2012,第28卷(第7期),877-886.

刘延杰,等.《Exendin-4的固相化学合成及鉴定》.《中国生物工程杂志》.2011,第31卷(第2期),69-73.

审查员 袁实

权利要求书1页 说明书55页
序列表9页 附图8页

(54)发明名称

GLP1/GIP双重激动剂或GLP1/GIP/胰高血糖素三重激动剂

(57)摘要

本发明涉及毒蜥外泌肽-4衍生物及其医药用途,例如在代谢综合征的病症的治疗中的用途,所述病症包括糖尿病和肥胖症,以及减少食物摄入过量。

1. 选自SEQ ID NO:8-16的化合物、或其盐或其溶剂合物。
2. 权利要求1的化合物用于制备医药的用途,其中所述医药用于治疗或预防高血糖症、2型糖尿病、肥胖症、代谢综合征、或者用于降低体重。
3. 权利要求2的用途,其中所述医药是人用医药。
4. 根据权利要求2或3的用途,其中所述化合物作为活性剂与至少一种药学上可接受的载体一起存在于药物组合物中。

GLP1/GIP双重激动剂或GLP1/GIP/胰高血糖素三重激动剂

[0001] 说明书

发明领域

[0002] 本发明涉及毒蜥外泌肽-4 (exendin-4) 肽类似物, 其激活胰高血糖素样肽1 (GLP-1) 和葡萄糖依赖性的促胰岛素多肽 (GIP) 受体, 并任选地激活胰高血糖素受体 (GCG), 以及它们的医药用途, 例如在代谢综合征的病症包括糖尿病和肥胖症以及减少食物摄入过量的治疗中。

[0003] 发明背景

[0004] 毒蜥外泌肽-4是一种39个氨基酸的肽, 其是由吉拉毒蜥 (*Gila monster*) (钝尾毒蜥 (*Heloderma suspectum*)) 产生的 (Eng J. 等, *J. Biol. Chem.*, 267:7402-05, 1992)。毒蜥外泌肽-4是胰高血糖素样肽-1 (GLP-1) 受体的激活剂, 然而其对GLP受体仅显示出很低的激活作用, 并且不激活胰高血糖素受体 (见表1)。

[0005] 表1: 毒蜥外泌肽-4在增加的浓度下对人GLP-1、GIP和胰高血糖素受体 (以pM表示) 的效力, 以及如方法中所述测量形成的cAMP

[0006]	SEQ ID NO:	肽	EC50 hGLP-1 R [pM]	EC50 hGIP R [pM]	EC50 h胰高血糖素 R [pM]
	1	毒蜥外泌肽-4	0.4	12500.0	>10000000

[0007] 观察到毒蜥外泌肽-4具有许多用GLP-1观察到的葡萄糖调控作用 (glucoregulatory action)。临床和非临床研究已显示毒蜥外泌肽-4具有若干有益的抗糖尿病特性, 包括葡萄糖依赖性的胰岛素合成和分泌增强、葡萄糖依赖性的胰高血糖素分泌抑制、胃排空放慢、食物摄入和体重减少以及 β -细胞群和 β -细胞功能标记物的增加 (Gentilella R等, *Diabetes Obes Metab.*, 11:544-56, 2009; Norris SL等, *Diabet Med.*, 26:837-46, 2009; Bunck MC等, *Diabetes Care.*, 34:2041-7, 2011)。

[0008] 这些效果不仅对于糖尿病人是有益的, 并且对罹患肥胖症的患者也是有益的。患有肥胖者的患者具有更高的患上糖尿病、高血压、高血脂、心血管疾病和肌肉骨骼疾病的风险。

[0009] 相对于GLP-1和GIP, 毒蜥外泌肽-4对于由二肽基肽酶-4 (DPP4) 的切割更具有抗性, 导致更长的半衰期和体内作用持续期 (Eng J., *Diabetes*, 45 (增刊2):152A (摘要554), 1996; Deacon CF, *Horm Metab Res*, 36:761-5, 2004)。

[0010] 与GLP-1、胰高血糖素或胃酸调节素相比时, 毒蜥外泌肽-4还显示出对于中性内肽酶 (NEP) 的降解稳定得多 (Druce MR等, *Endocrinology*, 150 (4), 1712-1721, 2009)。

[0011] 但是毒蜥外泌肽-4在化学上是不稳定的, 这是由于位置14的甲硫氨酸氧化 (Hargrove DM等, *Regul. Pept.*, 141:113-9, 2007), 以及位置28的天冬酰胺脱氨基和异构化 (WO 2004/035623)。

[0012] 毒蜥外泌肽-4的氨基酸序列在SEQ ID NO:1中显示:

[0013] HEGTFTSDLSKQMEEEAVRLFIEWLKNGGPSSGAPPPS-NH₂

[0014] GLP-1 (7-36)-酰胺的氨基酸序列在SEQ ID NO:2中显示:

[0015] HAEGTFTSDVSSYLEGQAAKEFIAWLVKGR-NH₂

[0016] 利拉鲁肽 (Liraglutide) 是一种市场化的经化学修饰的GLP-1类似物,其中除了其他修饰,将脂肪酸连接到位置20的赖氨酸导致了作用持续期延长 (Drucker DJ等, Nature Drug Disc.Rev.9,267-268,2010;Buse,JB等, Lancet,374:39-47,2009)。

[0017] 利拉鲁肽的氨基酸序列在SEQ ID NO:3中显示:

[0018] HAEGTFTSDVSSYLEGQAAK ((S)-4-羧基-4-十六酰基氨基-丁酰基-) EFWLVRGRG-OH

[0019] GIP (葡萄糖依赖性的促胰岛素多肽) 是一种42个氨基酸的肽,在食物摄入后从肠K-细胞释放。GIP和GLP-1是两种来源于肠内分泌细胞的激素,其导致肠降血糖素作用,占了胰岛素对口服葡萄糖挑战的响应的超过70% (Baggio LL,Drucker DJ.Biology of incretins:GLP-1and GIP.Gastroenterology 2007;132:2131-2157)。

[0020] GIP的氨基酸序列在SEQ ID NO:4中显示:

[0021] YAEGTFISDYSIAMDKIHQQDFVNWLLAQKGKKNWKNITQ-OH

[0022] 胰高血糖素是一种29个氨基酸的肽,其在循环葡萄糖低的时候释放至血液中。胰高血糖素的氨基酸序列在SEQ ID NO:5中显示:

[0023] HSQGTFTSDYSKYLSRRAQDFVQWLMNT-OH

[0024] 在低血糖期间,当血糖水平降低至低于正常时,胰高血糖素向肝提供分解糖原并释放葡萄糖的信号,导致血糖水平升高达到正常水平。低血糖是用胰岛素治疗的由于糖尿病患者患有高血糖症 (升高的血糖水平) 的患者中的常见副作用。因此,胰高血糖素在葡萄糖调节中最主要的作用是抵销胰岛素作用以及保持血糖水平。

[0025] Holst (Holst,J.J.Physiol.Rev.2007,87,1409) 和Meier (Meier,J.J.Nat.Rev.Endocrinol.2012,8,728) 描述了GLP-1受体激动剂,如GLP-1、利拉鲁肽和毒蜥外泌肽-4,在患有T2DM的患者中通过降低空腹和餐后血糖 (FPG和PPG) 来改善血糖控制。结合并激活GLP-1受体的肽在专利申请WO 98/08871 A1、WO2008/081418 A1和WO2008/023050 A1中描述,其内容在此通过提述并入。

[0026] 与市场化的GLP-1激动剂利拉鲁肽相比,已描述了对GLP-1和GIP受体的双重激活作用 (例如通过将GLP-1和GIP的作用结合在一种制备物中) 在患T2DM和肥胖症的小鼠中导致具有显著更佳的血糖水平降低、胰岛素分泌增加和体重降低的治疗准则 (例如VA Gault等,Clin Sci (Lond),121,107-117,2011)。已证明在人中天然GLP-1和GIP按照联合输注以加和方式 (additive manner) 相互作用,与单用GLP-1相比具有显著增加的促胰岛素效果 (MA Nauck等,J.Clin.Endocrinol.Metab.,76,912-917,1993)。

[0027] 设计组合了对GLP-1受体、GIP受体和胰高血糖素受体的激动作用的杂交分子,提供了达到相比于市场化的GLP-1激动剂利拉鲁肽显著更佳的血糖水平降低、胰岛素分泌增加和对于体重降低更显著的显著效果的治疗潜力 (例如VA Gault等,Clin Sci (Lond),121,107-117,2011)。

[0028] 本发明的化合物是毒蜥外泌肽-4衍生物,其对GLP-1和GIP受体以及任选地对胰高血糖素受体显示出激动活性,并且除其他修饰之外,其优选地具有如下修饰:在位置1处的Tyr和在位置12处的Ile。

[0029] 出乎意料地发现,对于选择性GLP-1R激动剂毒蜥外泌肽-4在位置1处的Tyr和在位置12处的Ile的修饰导致了对GLP-1和GIP受体具有高双重活性的肽。这项观察结果是出人意料的,因为在其他GLP-1激动剂如GLP-1本身中同样的修饰并不导致对GIP的高活性,如表2中所示。

[0030] 表2:毒蜥外泌肽-4和GLP-1肽类似物在增加的浓度下对GLP-1和GIP受体的效力(以pM表示),以及如方法中所述测量形成的cAMP

SEQ ID NO:	肽	EC50 hGIP R [pM]	EC50 hGLP-1 R [pM]
6	Tyr(1)Ile(12)-毒蜥外泌肽-4	93.9	1.3
7	Tyr(1)Ile(12)-GLP1	3660.0	5.0

[0032] 结合并激活GIP和GLP-1两个受体以及任选地结合并激活胰高血糖素受体并改善血糖控制、抑制体重增加以及减少食物摄入的肽在专利申请WO 2011/119657 A1、WO 2012/138941 A1、WO 2010/011439 A2、WO 2010/148089 A1、WO 2011/094337 A1、WO 2012/088116 A2中描述,其内容在此通过提述并入。这些申请公开了GLP-1受体、GIP受体以及任选地胰高血糖素受体的混合激动剂能设计成天然GIP或胰高血糖素序列的类似物。

[0033] 本发明的化合物是毒蜥外泌肽-4肽类似物,其包含位置10处的亮氨酸和位置13处的谷氨酰胺。Krstenansky等(Biochemistry, 25, 3833-3839, 1986)显示了胰高血糖素的残基10-13对于其受体相互作用和腺苷酸环化酶激活的重要性。在本发明的毒蜥外泌肽-4肽类似物中,一些相关的残基(underlying residue)与所述胰高血糖素的不同。具体而言,残基Tyr10和Tyr13被位置10处的亮氨酸和位置13处的谷氨酰胺(一种非芳香族极性氨基酸)替代。这种替代,特别是与位置23处的异亮氨酸和位置24处的谷氨酸进行联合,导致毒蜥外泌肽-4衍生物的生物物理特性潜在地改善,如溶解度或在溶液中的聚集行为。在毒蜥外泌肽-4类似物的位置13处用极性氨基酸对芳香族氨基酸进行非保守替代,出人意料地导致肽对GIP受体以及任选地对胰高血糖素受体具有高活性。

[0034] 此外,本发明的化合物是毒蜥外泌肽-4衍生物,其在位置14处具有脂肪酸酰化的残基。这种位置14处的脂肪酸官能化导致了改善的药代动力学概貌。出人意料的是,位置14处的脂肪酸官能化还导致具有显著更高的GIPR活性的肽,例如实施例5、表8中所示的那些。

[0035] 本发明的化合物是唾液素-4肽类似物,其含有在位置20处有碱性侧链的 α, α -二烷基化的氨基酸。出人意料地是,当把非天然氨基酸整合到位置20处时,用这些氨基酸之一修饰毒蜥外泌肽-4序列得到了具有改进的生物物理学概貌的化合物,所述生物物理学概貌例如溶解性(尤其是在低pH,特别是在pH4.5)或溶液中的聚集行为(aggregation behaviour)。所得的毒蜥外泌肽-4类似物因此维持其GLP-1受体、GIP受体和任选地在胰高血糖素受体处的高活性。这些非天然氨基酸的整合还增加肽的酶稳定性,潜在产生改进的药代动力学特性。

[0036] 发明概述

[0037] 此处提供的是毒蜥外泌肽-4类似物,其强力地激活GLP-1和GIP受体和任选地胰高血糖素受体。在这些毒蜥外泌肽-4类似物中,除了其他取代之外,将位置14处的甲硫氨酸替代为侧链中携带-NH₂基团的氨基酸,所述侧链进一步用亲脂性侧链来取代(例如任选地与接头联合的脂肪酸)。

[0038] 本发明提供一种具有式(I)的肽化合物,或其盐或溶剂合物,

[0039] R^1-Z-R^2 (I)

[0040] 其中Z是具有式(II)的肽部分:

[0041] Tyr-Aib-X3-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Leu-Ser-X12-Gln-X14-X15-X16-X17-X18-X19-X20-X21-Phe-Ile-Glu-Trp-Leu-Lys-X28-X29-Gly-Pro-Ser-Ser-Gly-Ala-Pro-Pro-Pro-Ser-X40 (II)

[0042] X3代表选自Gln、Glu和His的氨基酸残基,

[0043] X12代表选自Ile和Lys的氨基酸残基,

[0044] X14代表具有含-NH₂基团的侧链的氨基酸残基,其中所述-NH₂侧链基团通过-C(O)-R⁵、-C(O)O-R⁵、-C(O)NH-R⁵、-S(O)₂-R⁵或R⁵而官能化,优选地通过-C(O)-R⁵而官能化,其中R⁵可以是包含多达50或多达100个碳原子并且任选地包含选自卤素、N、O、S和/或P的杂原子的部分,

[0045] X15代表选自Asp和Glu的氨基酸残基,

[0046] X16代表选自Ser、Lys、Glu和Gln的氨基酸残基,

[0047] X17代表选自Arg、Lys、Ile、Glu、Gln、Leu、Aib、Tyr和Ala的氨基酸残基,

[0048] X18代表选自Ala、Arg、Lys、Aib、Leu和Tyr的氨基酸残基,

[0049] X19代表选自Ala、Val、Gln和Aib的氨基酸残基,

[0050] X20代表选自Gln、Aib、Phe、Leu、Lys、His、Arg、Pip、(S) MeLys、(R) MeLys、(S) MeOrn和(R) MeOrn的氨基酸残基,

[0051] X21代表选自Asp、Glu、Leu和Tyr的氨基酸残基,

[0052] X28代表选自Asn、Ala、Arg、Lys、Aib和Ser的氨基酸残基,

[0053] X29代表选自Gly、Thr、Aib、D-Ala和Ala的氨基酸残基,

[0054] X40或是缺失的,或代表具有含-NH₂基团的侧链的氨基酸残基,其中所述-NH₂侧链基团任选地通过-C(O)-R⁵、-C(O)O-R⁵、-C(O)NH-R⁵、-S(O)₂-R⁵或R⁵而官能化,优选地通过-C(O)-R⁵而官能化,其中R⁵可以是包含多达50或多达100个碳原子并且任选地包含选自卤素、N、O、S和/或P的杂原子的部分,

[0055] R¹代表NH₂,

[0056] R²代表OH或NH₂。

[0057] 本发明的化合物是GLP-1和GIP受体激动剂和任选地胰高血糖素受体激动剂,其通过观察到它们能刺激细胞内cAMP形成而得以确定。在对激动剂的细胞测定中的体外效力确定是通过确定引起最大响应的50%激活(EC₅₀)的浓度而得以量化的,如方法中所述。

[0058] 因此,在一些实施方案中,本发明提供具有式(I)的肽化合物,或其盐或溶剂合物:

[0059] R^1-Z-R^2 (I)

[0060] 其中Z是具有式(II)的肽部分:

[0061] Tyr-Aib-X3-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Leu-Ser-X12-Gln-X14-X15-X16-X17-X18-X19-X20-X21-Phe-Ile-Glu-Trp-Leu-Lys-X28-X29-Gly-Pro-Ser-Ser-Gly-Ala-Pro-Pro-Pro-Ser-X40 (II)

[0062] X3代表选自Gln、Glu和His的氨基酸残基,

[0063] X12代表选自Ile和Lys的氨基酸残基,

[0064] X14代表具有含-NH₂基团的侧链的氨基酸残基,其中所述-NH₂侧链基团通过C(O)-R⁵、-C(O)O-R⁵、-C(O)NH-R⁵、-S(O)₂-R⁵或R⁵而官能化,优选通过C(O)-R⁵而官能化,其中R⁵是包含多达50或多达100个碳原子并且任选地包含选自卤素、N、O、S和/或P的杂原子的部分,

[0065] X15代表选自Asp和Glu的氨基酸残基,

[0066] X16代表选自Ser、Lys、Glu和Gln的氨基酸残基,

[0067] X17代表选自Arg、Lys、Ile、Glu、Gln、Leu、Aib、Tyr和Ala的氨基酸残基,

[0068] X18代表选自Ala、Arg、Lys、Aib、Leu和Tyr的氨基酸残基,

[0069] X19代表选自Ala、Val、Gln和Aib的氨基酸残基,

[0070] X20代表选自Gln、Aib、Phe、Leu、Lys、His、Arg、Pip、(S) MeLys、(R) MeLys、(S) MeOrn和(R) MeOrn的氨基酸残基,

[0071] X21代表选自Asp、Glu、Leu和Tyr的氨基酸残基,

[0072] X28代表选自Asn、Ala、Arg、Lys、Aib和Ser的氨基酸残基,

[0073] X29代表选自Gly、Thr、Aib、D-Ala和Ala的氨基酸残基,

[0074] X40或是缺失的,或代表具有含-NH₂基团的侧链的氨基酸残基,其中所述-NH₂侧链基团任选地通过-C(O)-R⁵、-C(O)O-R⁵、-C(O)NH-R⁵、-S(O)₂-R⁵或R⁵而官能化,优选地通过-C(O)-R⁵而官能化,其中R⁵可以是包含多达50或多达100个碳原子并且任选地包含选自卤素、N、O、S和/或P的杂原子的部分,

[0075] R¹代表NH₂,

[0076] R²代表OH或NH₂,

[0077] 其中所述肽化合物与天然GIP相比具有至少0.04%,优选为至少0.08%,更优选为至少0.2%的对GIP受体的相对活性。

[0078] 此外,所述肽化合物,特别是其位置14处赖氨酸被进一步取代为亲脂性残基的,其与GLP-1(7-36)相比表现出至少0.07%,优选为至少0.1%,更优选为至少0.14%,更优选为至少0.35%,以及甚至更优选为至少0.4%的对GLP-1受体的相对活性。

[0079] 此外,所述肽化合物,特别是其位置14处赖氨酸被进一步取代为亲脂性残基的,其与天然GIP(EC₅₀=0.4pM)相比表现出至少0.04%(即EC₅₀<1000pM),更优选为至少0.08%(即EC₅₀<500pM),甚至更优选为至少0.2%(即EC₅₀<200pM)的对GIP受体的相对活性。

[0080] 任选地,在一些实施方案中,所述肽化合物,特别是其位置14处赖氨酸被进一步取代为亲脂性残基的,其与天然胰高血糖素相比表现出至少0.1%,优选为至少0.2%,更优选为至少0.3%,更优选为至少0.4%,以及甚至更优选为至少0.5%的对胰高血糖素受体的相对活性。

[0081] 此处所用的术语“活性”,优选意指化合物激活人GLP-1受体、人GIP受体以及任选地激活人胰高血糖素受体的能力。更优选的是,此处所用的术语“活性”意指化合物刺激细胞内cAMP形成的能力。此处所用的术语“相对活性”理解为意指化合物相较于另一种受体激动剂,或相较于另一种受体,以某种比率激活一种受体的能力。激动剂对受体的激活是按照此处所述来确定的(例如通过测量cAMP水平),例如按照实施例所述。

[0082] 根据一个实施方案,本发明的化合物对于hGLP-1受体具有500pM或更低的EC₅₀,优选为200pM或更低,更优选为150pM或更低,更优选为100pM或更低,更优选为90pM或更低,更优选为80pM或更低,更优选为70pM或更低,更优选为60pM或更低,更优选为50pM或更低,更

优选为40pM或更低,更优选为30pM或更低,以及更优选为20pM或更低的EC₅₀。

[0083] 根据一个实施方案,本发明的化合物对于hGIP受体具有500pM或更低的EC₅₀,优选为200pM或更低,更优选为150pM或更低,更优选为100pM或更低,更优选为90pM或更低,更优选为80pM或更低,更优选为70pM或更低,更优选为60pM或更低,更优选为50pM或更低,更优选为40pM或更低,更优选为30pM或更低,以及更优选为20pM或更低的EC₅₀。

[0084] 根据另一个实施方案,本发明的化合物对于人胰高血糖素受体(hGlucagon receptor)具有500pM或更低的EC₅₀,优选为200pM或更低,更优选为150pM或更低,更优选为100pM或更低,更优选为90pM或更低,更优选为80pM或更低,更优选为70pM或更低,更优选为60pM或更低,更优选为50pM或更低,更优选为40pM或更低,更优选为30pM或更低,以及更优选为20pM或更低的EC₅₀。

[0085] 根据另一个实施方案,本发明的化合物对于hGLP-1受体具有500pM或更低的EC₅₀,优选为200pM或更低,更优选为150pM或更低,更优选为100pM或更低,更优选为90pM或更低,更优选为80pM或更低,更优选为70pM或更低,更优选为60pM或更低,更优选为50pM或更低,更优选为40pM或更低,更优选为30pM或更低,以及更优选为20pM或更低的EC₅₀,和/或对于hGIP受体具有500pM或更低的EC₅₀,优选为200pM或更低,更优选为150pM或更低,更优选为100pM或更低,更优选为90pM或更低,更优选为80pM或更低,更优选为70pM或更低,更优选为60pM或更低,更优选为50pM或更低,更优选为40pM或更低,更优选为30pM或更低,以及更优选为20pM或更低的EC₅₀,和/或对于人胰高血糖素受体具有500pM或更低的EC₅₀,优选为200pM或更低,更优选为150pM或更低,更优选为100pM或更低,更优选为90pM或更低,更优选为80pM或更低,更优选为70pM或更低,更优选为60pM或更低,更优选为50pM或更低,更优选为40pM或更低,更优选为30pM或更低,以及更优选为20pM或更低的EC₅₀。

[0086] 在又一个实施方案中,对两种受体的EC₅₀(即对hGLP-1受体的EC₅₀和对hGIP受体的EC₅₀)是500pM或更低,更优选为200pM或更低,更优选为150pM或更低,更优选为100pM或更低,更优选为90pM或更低,更优选为80pM或更低,更优选为70pM或更低,更优选为60pM或更低,更优选为50pM或更低,更优选为40pM或更低,更优选为30pM或更低,更优选为20pM或更低。

[0087] 在又一个实施方案中,对全部三种受体的EC₅₀(即对hGLP-1受体的EC₅₀、对hGIP受体的EC₅₀和对人胰高血糖素受体的EC₅₀)是500pM或更低,更优选为200pM或更低,更优选为150pM或更低,更优选为100pM或更低,更优选为90pM或更低,更优选为80pM或更低,更优选为70pM或更低,更优选为60pM或更低,更优选为50pM或更低,更优选为40pM或更低,更优选为30pM或更低,更优选为20pM或更低。

[0088] 可以按照此处方法中所述,或是按照生成实施例5中结果所用的方法来确定hGLP-1受体、hGIP受体和人胰高血糖素受体的EC₅₀。

[0089] 本发明的化合物具有减少肠通过率(intestinal passage)、增加胃内容物和/或减少患者的食物摄入的能力。本发明化合物的这些活性能在本领域技术人员已知的动物模型中进行评估,并同样在此处的方法中描述。这些实验的结果在实施例10中描述。如果按0.02mg/kg体重的单剂量(优选为皮下剂量)施用,优选的本发明化合物可以将小鼠(优选为雌性NMRI-小鼠)的胃内容物增加至少25%,更优选为至少30%,更优选为至少40%,更优选为至少50%,更优选为至少60%,更优选为至少70%,更优选为至少80%。

[0090] 优选的是,这项结果是在施用各自化合物1小时后和施用团注(bolus)30分钟后测得的,并且/或者如果按0.02mg/kg体重的单剂量(优选为皮下剂量)施用的话,可以将小鼠(优选为雌性NMRI-小鼠)的肠通过率减少至少45%,更优选为至少50%,更优选为至少55%,更优选为至少60%,和更优选为至少65%;并且/或者如果按0.01mg/kg体重的单剂量(优选为皮下剂量)施用22小时的时期的话,可以将小鼠(优选为雌性NMRI-小鼠)的食物摄入降低至少10%,更优选为15%,和更优选为20%。

[0091] 本发明的化合物具有降低患者血糖水平和/或降低患者HbA1c水平的能力。本发明化合物的这些活性能在本领域技术人员已知的动物模型中进行评估,并同样在此处方法中描述。这些实验的结果在实施例8和9中描述。

[0092] 如果按0.01mg/kg体重的单剂量施用(优选为皮下剂量),优选的本发明化合物可以将小鼠(优选为雌性瘦蛋白受体缺陷型糖尿病db/db小鼠中)的血糖水平降低至少4mmol/L,更优选为至少6mmol/L,更优选为至少8mmol/L。如果按单剂量施用(优选为皮下剂量),如果将剂量增加至0.1mg/kg体重,在24小时的时期内在小鼠中能观察到更显著的血糖水平降低。优选地,本发明的化合物引起至少7mmol/L,更优选为至少9mmol/L,更优选为至少11mmol/L的降低。如果按0.01mg/kg至约引燃阈值(ignition value)的每日剂量施用,本发明的化合物优选地降低小鼠HbA1c水平在4周的时期内的增加。

[0093] 本发明的化合物还具有降低患者体重的能力。本发明化合物的这些活性可以在技术人员已知的动物模型中评估并且也在方法中和实施例7中描述。

[0094] 出人意料的是,发现式(I)的肽化合物,尤其是那些位置14处的赖氨酸(或接近的类似物)进一步被亲脂性残基所取代的,显示了非常强力的GLP-1和GIP受体激活作用;此外与氨基酸像位置3处的Gln联合也能提供非常强力的胰高血糖素受体激活作用。据文献(Murage EN等,Bioorg.Med.Chem.16(2008),10106-10112)描述,在位置14处具有乙酰化赖氨酸的GLP-1类似物与天然GLP-1相比显示出效力的显著降低。

[0095] 此外,毒蜥外泌肽-4核心结构中存在的甲硫氨酸的氧化(体内或体外),对于式(I)的肽化合物来说不再是可能的。

[0096] 进一步地,在酸性和/或生理学pH值,例如在pH 4.5和/或pH 7.4处,于25℃处,本发明的化合物优选地具有高溶解度,在另一个实施方案中为至少0.5mg/ml,而在一个具体实施方案中为至少1.0mg/ml。

[0097] 此外,根据一个实施方案,当储存于溶液中时,本发明的化合物优选地具有高稳定性。用于确定稳定性的优选测定条件是于25℃,在pH 4.5或pH 7.4下在溶液中储存7天。按照方法和实施例中所述,通过色谱分析来确定肽的剩余量。优选的是,于25℃,在pH 4.5或pH 7.4下在溶液中储存7天后,剩余的肽量为至少80%,更优选为至少85%,甚至更优选为至少90%,和甚至更优选为至少95%。

[0098] 优选地,本发明的化合物包含肽部分Z(式II),其是39-40个通过肽键即羧酰胺(carboxamide)键连接的氨基酸尤其是 α -氨基酸的线性序列。

[0099] 在一个实施方案中,X14表示具有官能化的-NH₂的侧链基团的氨基酸残基,例如官能化的Lys、Orn、Dab或Dap,更优选地是官能化的Lys,而X40是缺失的或是代表Lys。

[0100] 具有-NH₂侧链基团的氨基酸残基,例如Lys、Orn、Dab或Dap,可以被官能化,其中-NH₂侧链基团的至少一个H原子被-C(O)-R⁵、-C(O)O-R⁵、-C(O)NH-R⁵、-S(O)₂-R⁵或R⁵替代,优

选被-C(O)-R⁵替代,其中R⁵可以是包含多达50或多达100个碳原子并且任选地包含选自卤素、N、O、S和/或P的杂原子的部分。

[0101] 在一些实施方案中,R⁵可以包含亲脂性的部分,例如非环状的线性或分枝的饱和烃基团,其中R⁵具体包含非环状的线性或分枝的(C₄-C₃₀)饱和或不饱和烃基团,和/或环状的饱和、不饱和或芳香基团,特别是包含4-14个碳原子和0、1、或2个选自N、O和S的杂原子的单环、双环或三环基团,例如环己基、苯基、联苯基、色满基、菲基(phenanthrenyl)或萘基,其中所述非环状或环状基团可以是未经取代的或被例如卤素、-OH和/或CO₂H所取代。

[0102] 更优选的基团R⁵可以包含亲脂性的部分,例如非环状的线性或分枝的(C₁₂-C₂₂)饱和或不饱和烃基团。所述亲脂性的部分可以通过接头以其所有立体异构形式连接到-NH₂侧链基团,所述接头例如包含一个或多个(例如2、3或4个)氨基酸接头基团的接头,如γ-氨基丁酸(GABA)、ε-氨基己酸(ε-Ahx)、γ-Glu和/或β-Ala。在一个实施方案中,所述亲脂性的部分通过接头连接到-NH₂侧链基团。在另一个实施方案中,所述亲脂性的部分直接连接到-NH₂侧链基团。氨基酸接头基团的具体例子是(β-Ala)₁₋₄、(γ-Glu)₁₋₄、(ε-Ahx)₁₋₄、或(GABA)₁₋₄。优选的氨基酸接头基团是β-Ala、γ-Glu、β-Ala-β-Ala和γ-Glu-γ-Glu。

[0103] -C(O)-R⁵的具体的优选例子在如下表3中列出,其选自下组:(S)-4-羧基-4-十六酰基氨基-丁酰基-、(S)-4-羧基-4-十八酰基氨基-丁酰基-、4-十六酰基氨基-丁酰基-、4-{3-[(R)-2,5,7,8-四甲基-2-((4R,8R)-4,8,12-三甲基-十三烷基)-色满-6-基氧基羰基]-丙酰基氨基}-丁酰基-、4-十八酰基氨基-丁酰基-、4-((Z)-十八-9-烯酰基氨基)-丁酰基-、6-[(4,4-二苯基-环己氧基)-羟基-磷酰基氧基]-己酰基-、十六酰基-、(S)-4-羧基-4-(15-羧基-十五酰基氨基)-丁酰基-、(S)-4-羧基-4-{3-[3-((2S,3R,4S,5R)-5-羧基-2,3,4,5-四羟基-戊酰基氨基)-丙酰基氨基]-丙酰基氨基}-丁酰基-、(S)-4-羧基-4-{3-[(R)-2,5,7,8-四甲基-2-((4R,8R)-4,8,12-三甲基-十三烷基)-色满-6-基氧基羰基]-丙酰基氨基}-丁酰基-、(S)-4-羧基-4-((9Z,12Z)-十八碳-9,12-二烯酰基氨基)-丁酰基-、(S)-4-羧基-4-[6-((2S,3R,4S,5R)-5-羧基-2,3,4,5-四羟基-戊酰基氨基)-己酰基氨基]-丁酰基-、(S)-4-羧基-4-((2S,3R,4S,5R)-5-羧基-2,3,4,5-四羟基-戊酰基氨基)-丁酰基-、(S)-4-羧基-4-十四酰基氨基-丁酰基-、(S)-4-(11-苄基氧基羰基-十一酰基氨基)-4-羧基-丁酰基-、(S)-4-羧基-4-[11-((2S,3R,4R,5R)-2,3,4,5,6-五羟基-己基氨基甲酰基)-十一酰基氨基]-丁酰基-、(S)-4-羧基-4-((Z)-十八-9-烯酰基氨基)-丁酰基-、(S)-4-羧基-4-(4-十二烷基氧基-苯甲酰基氨基)-丁酰基-、(S)-4-羧基-4-二十一酰基氨基-丁酰基-、(S)-4-羧基-4-二十二酰基氨基-丁酰基-、(S)-4-羧基-4-((Z)-十九-10-烯酰基氨基)-丁酰基-、(S)-4-羧基-4-(4-癸氧基-苯甲酰基氨基)-丁酰基-、(S)-4-羧基-4-[(4'-辛氧基-联苯基-4-羰基)-氨基]-丁酰基-、(S)-4-羧基-4-(12-苯基-十二酰基氨基)-丁酰基-、(S)-4-羧基-4-二十酰基氨基-丁酰基-、(S)-4-羧基-4-((S)-4-羧基-4-十六酰基氨基-丁酰基氨基)-丁酰基-、(S)-4-羧基-4-((S)-4-羧基-4-十八酰基氨基-丁酰基氨基)-丁酰基-、3-(3-十八酰基氨基-丙酰基氨基)-丙酰基-、3-(3-十六酰基氨基-丙酰基氨基)-丙酰基-、3-十六酰基氨基-丙酰基-、(S)-4-羧基-4-[(R)-4-((3R,5S,7R,8R,9R,10S,12S,13R,14R,17R)-3,7,12-三羟基-8,10,13-三甲基-十六氢-环戊并[a]菲-17-基)-戊酰基氨基]-丁酰基-、(S)-4-羧基-4-[(R)-4-((3R,5R,8R,9S,10S,13R,14S,17R)-3-羟基-10,13-二甲基-十六氢-环戊并[a]菲-17-基)-戊酰基氨基]-丁酰基-、(S)-4-羧基-4-((9S,10R)-9,10,16-三羟基-十六酰

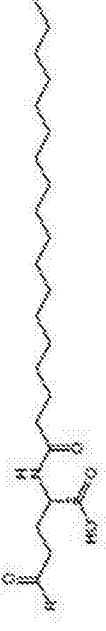
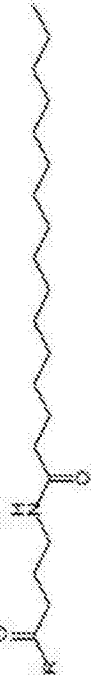
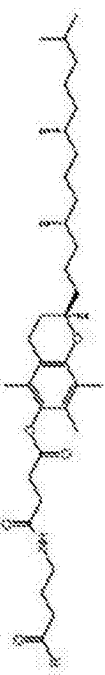
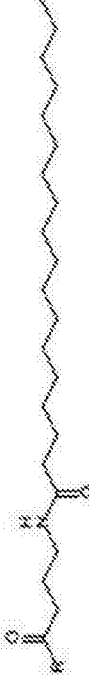
基氨基)-丁酰基-、十四酰基-、11-羧基-十一酰基-、11-苄基氧基羧基-十一酰基-、(S)-4-羧基-4-((S)-4-羧基-4-十四酰基氨基)-丁酰基氨基)-丁酰基-、6-[羟基-(萘-2-基氧基)-磷酰基氧基]-己酰基-、6-[羟基-(5-苯基-戊氧基)-磷酰基氧基]-己酰基-、4-(萘-2-磺酰基氨基)-4-氧代-丁酰基-、4-(联苯基-4-磺酰基氨基)-4-氧代-丁酰基-、(S)-4-羧基-4-{(S)-4-羧基-4-[2-(2-{2-[2-(2-{2-[(S)-4-羧基-4-(17-羧基-十七酰基氨基)-丁酰基氨基]-乙氧基)-乙氧基)-乙酰基氨基]-乙氧基)-乙氧基)-乙酰基氨基]-丁酰基氨基}-丁酰基-、(S)-4-羧基-4-[2-(2-{2-[2-(2-{2-[(S)-4-羧基-4-(17-羧基-十七酰基氨基)-丁酰基氨基]-乙氧基)-乙氧基)-乙酰基氨基]-乙氧基)-乙氧基)-乙酰基氨基]-丁酰基-、(S)-4-羧基-2-{(S)-4-羧基-2-[2-(2-{2-[2-(2-{2-[(S)-4-羧基-4-(17-羧基-十七酰基氨基)-丁酰基氨基]-乙氧基)-乙氧基)-乙酰基氨基]-乙氧基)-乙氧基)-乙酰基氨基]-丁酰基氨基}-丁酰基-、(S)-4-羧基-2-[2-(2-{2-[2-(2-{2-[(S)-4-羧基-4-(17-羧基-十七酰基氨基)-丁酰基氨基]-乙氧基)-乙氧基)-乙酰基氨基]-乙氧基)-乙氧基)-乙酰基氨基]-丁酰基-、(S)-4-羧基-4-{(S)-4-羧基-4-[2-(2-{2-[(S)-4-羧基-4-(17-羧基-十七酰基氨基)-丁酰基氨基]-乙氧基)-乙氧基)-乙酰基氨基]-丁酰基氨基}-丁酰基-、(S)-4-羧基-4-[2-(2-{2-[(S)-4-羧基-4-(17-羧基-十七酰基氨基)-丁酰基氨基]-乙氧基)-乙氧基)-乙酰基氨基]-丁酰基-、(S)-4-羧基-2-{(S)-4-羧基-2-[2-(2-{2-[(S)-4-羧基-4-(17-羧基-十七酰基氨基)-丁酰基氨基]-乙氧基)-乙氧基)-乙酰基氨基]-丁酰基氨基}-丁酰基-、(S)-4-羧基-2-[2-(2-{2-[(S)-4-羧基-4-(17-羧基-十七酰基氨基)-丁酰基氨基]-乙氧基)-乙氧基)-乙酰基氨基]-丁酰基-、2-(2-{2-[2-(2-{2-[(S)-4-羧基-4-(17-羧基-十七酰基氨基)-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-、2-(2-{2-[(S)-4-羧基-4-(17-羧基-十七酰基氨基)-丁酰基氨基]-乙氧基)-乙氧基)-乙酰基-、(S)-4-羧基-4-((S)-4-羧基-4-{(S)-4-羧基-4-[(S)-4-羧基-4-(19-羧基-十九酰基氨基)-丁酰基氨基]-丁酰基氨基)-丁酰基-、2-(2-{2-[2-(2-{2-[(S)-4-羧基-4-(16-羧基-十六酰基氨基)-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-、2-(2-{2-[2-(2-{2-[(S)-4-羧基-4-(16-羧基-十六酰基氨基)-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-、(S)-4-羧基-4-{(S)-4-羧基-4-[(S)-4-羧基-4-(17-羧基-十七酰基氨基)-丁酰基氨基]-丁酰基氨基}-丁酰基-、(S)-4-羧基-4-((S)-4-羧基-4-{2-[2-(2-{2-[2-(2-{(S)-4-羧基-4-[10-(4-羧基-苯氧基)-癸酰基氨基]-丁酰基氨基]-乙氧基)-乙氧基)-乙酰基氨基]-乙氧基)-乙氧基)-乙酰基氨基]-丁酰基-、(S)-4-羧基-4-{(S)-4-羧基-4-[2-(2-{2-[2-(2-{2-[(S)-4-羧基-4-(7-羧基-庚酰基氨基)-丁酰基氨基]-乙氧基)-乙氧基)-乙酰基氨基]-乙氧基)-乙氧基)-乙酰基氨基]-丁酰基氨基}-丁酰基-、(S)-4-羧基-4-{(S)-4-羧基-4-[2-(2-{2-[2-(2-{2-[(S)-4-羧基-4-(11-羧基-十一酰基氨基)-丁酰基氨基]-乙氧基)-乙氧基)-乙酰基氨基]-乙氧基)-乙氧基)-乙酰基氨基]-丁酰基氨基}-丁酰基-、(S)-4-羧基-4-{(S)-4-羧基-4-[2-(2-{2-[2-(2-{2-[(S)-4-羧基-4-(13-羧基-十三酰基氨基)-丁酰基氨基]-乙氧基)-乙氧基)-乙酰基氨基]-乙氧基)-乙氧基)-乙酰基氨基]-丁酰基氨基}-丁酰基-、(S)-4-羧基-4-{(S)-4-羧基-4-[2-(2-{2-[2-(2-{2-[(S)-4-羧基-4-(15-羧基-十五酰基氨基)-丁酰基氨基]-乙氧基)-乙氧基)-乙酰基氨基]-乙氧基)-乙氧基)-乙酰基氨基]-丁酰基氨基}-丁酰基-和(S)-4-羧基-4-{(S)-4-羧基-4-[2-(2-{2-[2-(2-{2-[(S)-4-

羧基-4-(19-羧基-十九酰基氨基)-丁酰基氨基]-乙氧基)-乙氧基)-乙酰基氨基]-乙氧基)-乙氧基)-乙酰基氨基]-丁酰基氨基)-丁酰基-。

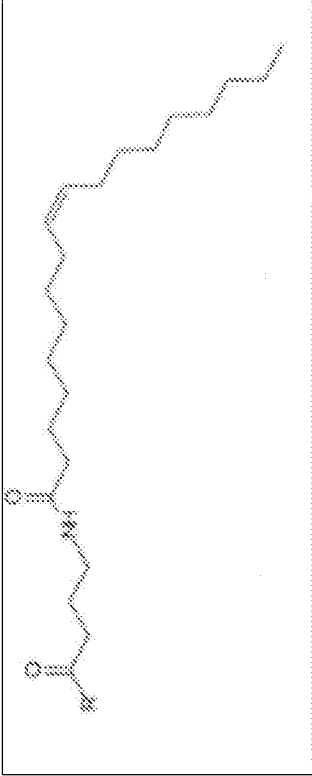
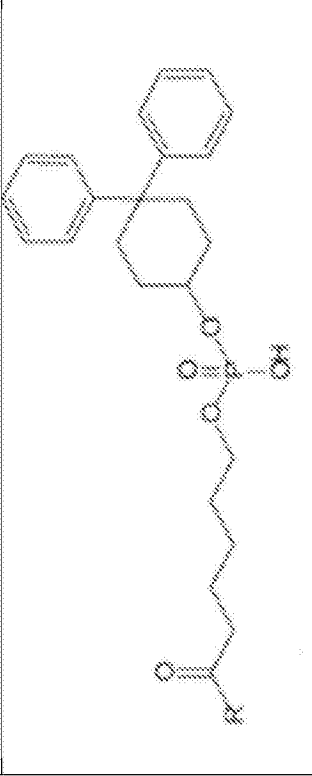
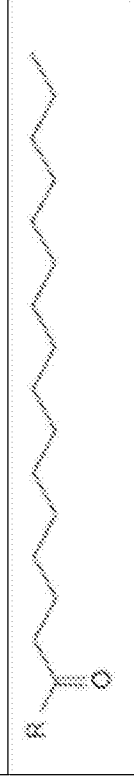
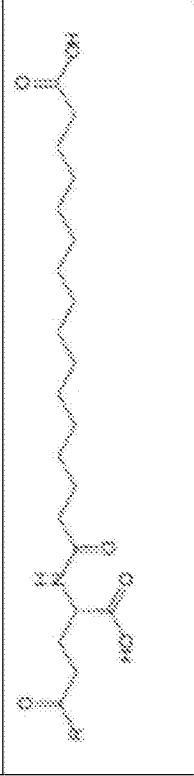
[0104] 进一步优选的是立体异构体,特别是这些基团的对映异构体,或是S-或是R-对映异构体。表3中的术语“R”意在表示肽主链处-C(0)-R⁵的连接位点,即Lys的ε-氨基基团。

[0105]

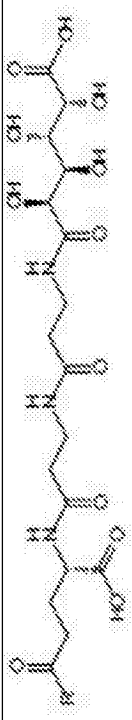
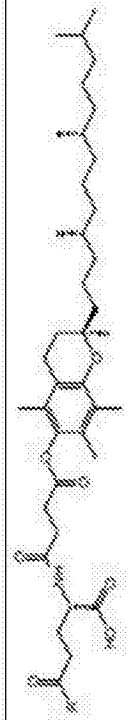
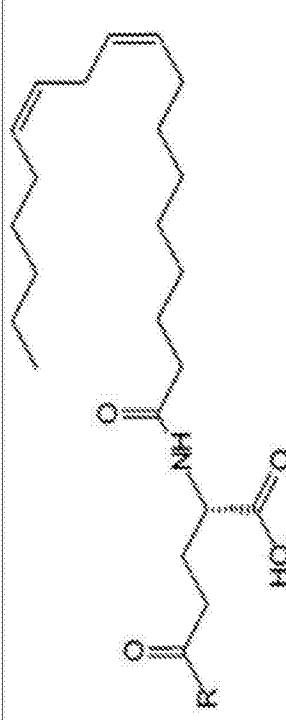
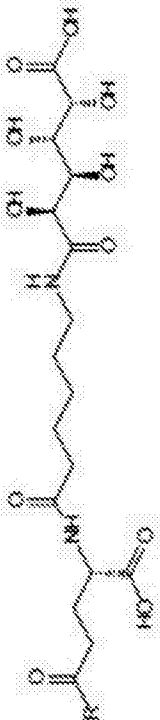
表3

结构	IUPAC	名称
	(S)-4-羧基-4-十六酰基氨基-丁酰基-	γE-x53
	(S)-4-羧基-4-十八酰基氨基-丁酰基-	γE-x70
	4-十六酰基氨基-丁酰基-	GABA-x53
	4-{3-[(R)-2,5,7,8-四甲基-2-((4R,8R)-4,8,12-三甲基-十三烷基)-色满-6-基氧基羰基]-丙酰基氨基}-丁酰基-	GABA-x60
	4-十八酰基氨基-丁酰基-	GABA-x70

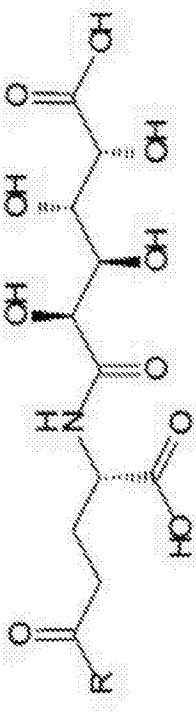
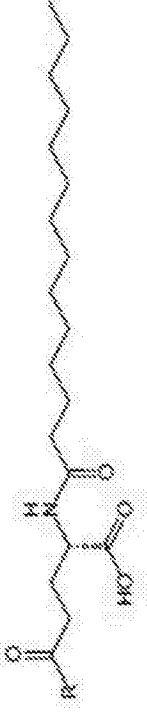
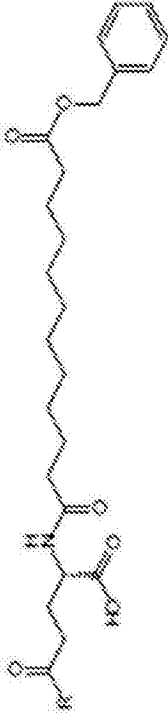
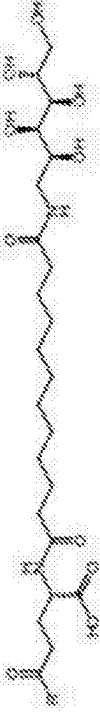
[0106]

	4-((Z)-十八-9-烯酰基氨基)-丁酰基-	GABA-x74
	6-[(4,4-二苯基-环己氧基)-羟基-磷酸基氧基]-己酰基-	Phosphol
	十六酰基-	x53
	(S)-4-羧基-4-(15-羧基-十五酰基氨基)-丁酰基-	x52

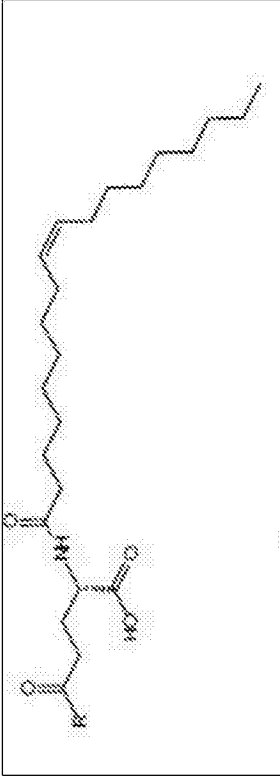
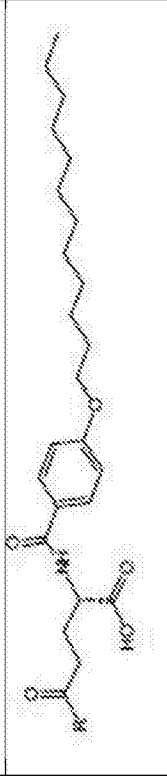
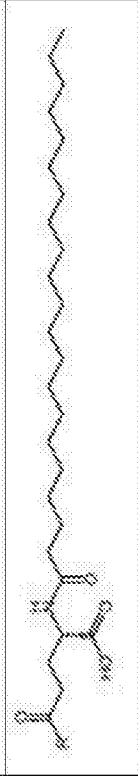
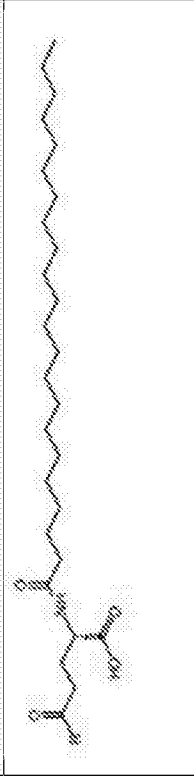
[0107]

	(S)-4-羧基-4-[3-[3-((2S,3R,4S,5R)-5-羧基-2,3,4,5-四羟基-戊酰基氨基)-丙酰基氨基]-丙酰基氨基]-丁酰基	γE-x59
	(S)-4-羧基-4-[3-[(R)-2,5,7,8-四甲基-2-((4R,8R)-4,8,12-三甲基-十三烷基)-色满-6-基氧基羧基]-丙酰基氨基]-丁酰基	γE-x60
	(S)-4-羧基-4-((9Z,12Z)-十八碳-9,12-二烯酰基氨基)-丁酰基	γE-x61
	(S)-4-羧基-4-[6-((2S,3R,4S,5R)-5-羧基-2,3,4,5-四羟基-戊酰基氨基)-己酰基氨基]-丁酰基	γE-x64

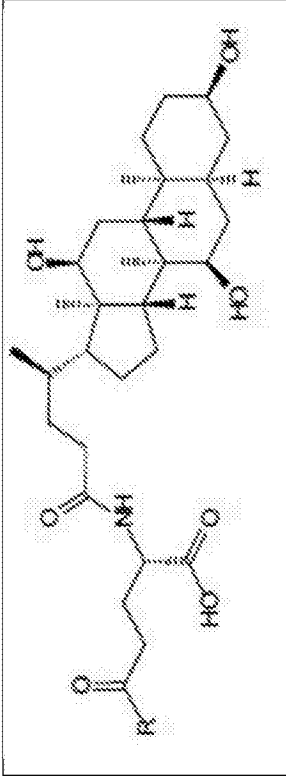
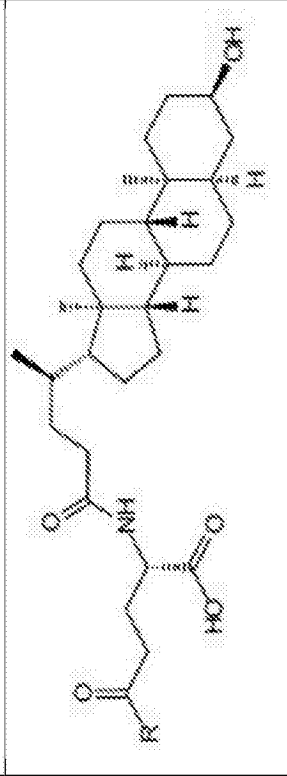
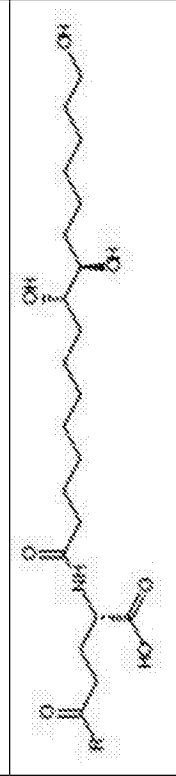
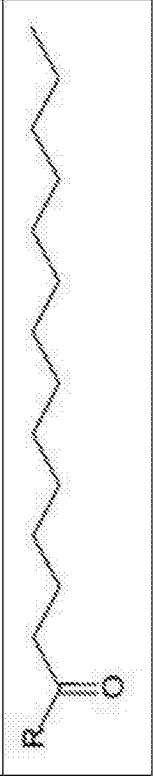
[0108]

	(S)-4-羧基-4-((2S,3R,4S,5R)-5-羧基-2,3,4,5-四羟基-戊酰基氨基)-丁酰基-	γE-x65
	(S)-4-羧基-4-十四酰基氨基-丁酰基-	γE-x69
	(S)-4-(11-苄基氧基羧基-十一酰基氨基)-4-羧基-丁酰基-	γE-x72
	(S)-4-羧基-4-[11-((2S,3R,4R,5R)-2,3,4,5,6-五羟基-基氨基甲酰基)-十一酰基氨基]-丁酰基-	γE-x73

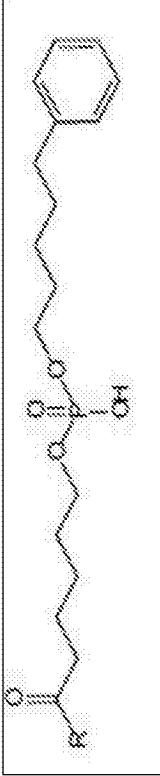
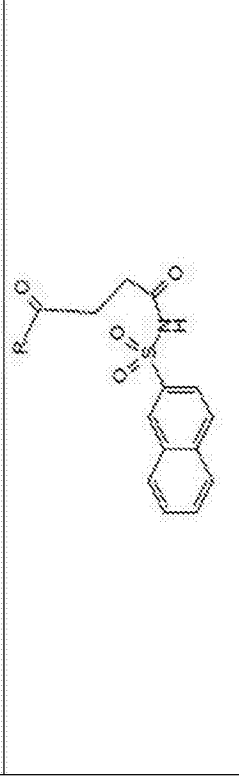
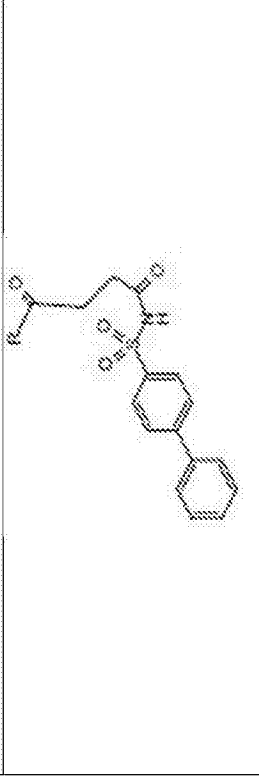
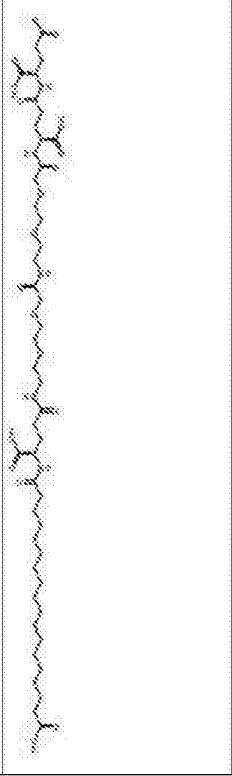
[0109]

	(S)-4-羧基-4-((Z)-十八-9-烯酰基氨基)-丁酰基-	γE-x74
	(S)-4-羧基-4-(4-(4-十二烷基氧基-苯甲酰基氨基)-丁酰基)-	γE-x75
	(S)-4-羧基-4-二十一酰基氨基-丁酰基-	γE-x76
	(S)-4-羧基-4-二十二酰基氨基-丁酰基-	γE-x77

[0112]

	(S)-4- -4-[(R)-4-((3R,5S,7R,8R,9R,10S,12S,13R,14R,17R)-3,7,12-三羟基-8,10,13-三甲基-十六氢-环戊并[a]菲-17-基)-戊酰基氨基]-丁酰基-	羧基	γE-x16
	(S)-4- -4-[(R)-4-((3R,5R,8R,9S,10S,13R,14S,17R)-3-10,13-二甲基-十六氢-环戊并[a]菲-17-基)-戊酰基氨基]-丁酰基-	羧基	γE-x19
	(S)-4-羧基-4-((9S,10R)-9,10,16-三羟基-十六酰基氨基)-丁酰基-	羧基	γE-x25
	十四酰基-		x69

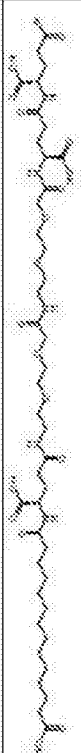
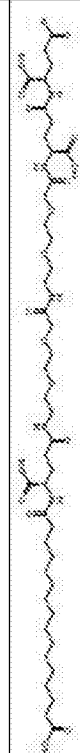
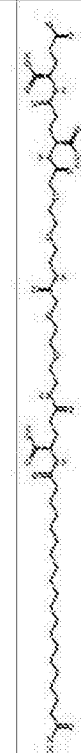
[0114]

	6-[羧基-(5-苄基-戊氧基)-磷酰基氧基]-己酰基- Phospho3
	4-(萘-2-磺酰基氨基)-4-氧代-丁酰基- Sulfonamid 1
	4-(联苯基-4-磺酰基氨基)-4-氧代-丁酰基- Sulfonamid 2
	(S)-4-羧基-4-[(S)-4-羧基-4-[2-(2-{2-[2-(S)-4-羧基-4-(17-羧基-十七酰基氨基)-丁酰基氧基]-乙氧基}-乙氧基)-乙酰基氨基]-乙氧基]-丁酰基氨基]-丁酰基- x100

[0117]

	x111	2-(2-{2-[2-(S)-4-羧基-4-(16-IH-四唑-5-基-十六酰氨基)-丁酰氨基]-乙氧基}-乙氧基)-乙酰基-
	x112	2-(2-{2-[2-(S)-4-羧基-4-(16-羧基-十六酰氨基)-丁酰氨基]-乙氧基}-乙氧基)-乙酰基-
	x113	(S)-4-羧基-4-{(S)-4-羧基-4-[S]-4-羧基-4-(17-羧基-十七酰氨基)-丁酰氨基]-丁酰氨基}-丁酰基-
	x114	(S)-4-羧基-4-(S)-4-羧基-4-{2-[2-(2-[2-(S)-4-羧基-4-[10-(4-羧基-苯氧基)-癸酰氨基]-丁酰氨基]-乙氧基]-乙氧基]-乙氧基}-丁酰基-
	x115	(S)-4-羧基-4-{(S)-4-羧基-4-[2-(2-[2-(S)-4-羧基-4-(7-羧基-庚酰氨基)-丁酰氨基]-乙氧基)-乙氧基]-乙氧基]-乙氧基}-丁酰基-

[0118]

	(S)-4-羧基-4-[(S)-4-羧基-4-[2-(2-[2-(2-{2-[(S)-4-羧基-4-(11-羧基-十一酰基氨基)-丁酰基氨基]-乙氧基})-乙氧基]-丁酰基氨基]-乙氧基)-乙氧基)-乙氧基]-丁酰基氨基}-基-	x116
	(S)-4-羧基-4-[(S)-4-羧基-4-[2-(2-[2-(2-{2-[(S)-4-羧基-4-(13-羧基-十三酰基氨基)-丁酰基氨基]-乙氧基})-乙氧基]-丁酰基氨基]-乙氧基)-乙氧基)-乙氧基]-丁酰基氨基}-基-	x117
	(S)-4-羧基-4-[(S)-4-羧基-4-[2-(2-[2-(2-{2-[(S)-4-羧基-4-(15-羧基-十五酰基氨基)-丁酰基氨基]-乙氧基})-乙氧基]-丁酰基氨基]-乙氧基)-乙氧基)-乙氧基]-丁酰基氨基}-基-	x118
	(S)-4-羧基-4-[(S)-4-羧基-4-[2-(2-[2-(2-{2-[(S)-4-羧基-4-(19-羧基-十九酰基氨基)-丁酰基氨基]-乙氧基})-乙氧基]-丁酰基氨基]-乙氧基)-乙氧基)-乙氧基]-丁酰基氨基}-基-	x119

[0119] 在一些实施方案中,本发明涉及如上述的式(I)肽化合物,其中X14代表选自Lys、Orn、Dab和Dap的氨基酸残基,其中-NH₂侧链基团通过-C(O)-R⁵而官能化;X40代表选自Lys、

Orn、Dab和Dap的氨基酸残基,其中-NH₂侧链基团通过-C(O)-R⁵而官能化,并且R⁵是选自非环状的线性或分枝(C₄-C₃₀)饱和或不饱和烃基团和/或环状饱和、不饱和或方向基团的亲脂性的部分;其中所述亲脂性的部分可以通过接头连接到-NH₂侧链基团,所述接头选自所有立体异构体形式的(β-Ala)₁₋₄、(γ-Glu)₁₋₄、(ε-Ahx)₁₋₄、或(GABA)₁₋₄。

[0120] 在一些实施方案中,X14代表具有官能化的-NH₂侧链基团的氨基酸残基,如官能化的Lys、Orn、Dab或Dap,其中-NH₂侧链基团的至少一个H原子被-C(O)-R⁵取代,其选自根据上述表3的取代基组成的组。

[0121] 在一些实施方案中,X14代表选自Lys、Orn、Dab和Dap的氨基酸残基,其中-NH₂侧链基团通过-C(O)-R⁵而官能化,X40代表选自Lys、Orn、Dab和Dap的氨基酸残基,其中-NH₂侧链基团能通过-C(O)-R⁵而官能化,并且-C(O)-R⁵选自根据上述表3的取代基组成的组。

[0122] 在本发明的一些实施方案中,式(II)中的位置X14和/或X40代表赖氨酸(Lys)。根据一些实施方案,将位置X14处的Lys和任选地位置40处的Lys官能化(例如用上述的-C(O)-R⁵基团)。在其他实施方案中,X40是缺失的并且X14是用-C(O)-R⁵、-C(O)O-R⁵、-C(O)NH-R⁵、-S(O)₂-R⁵或R⁵,优选的是通过-C(O)-R⁵来官能化的,其中R⁵如上所定义的。具体而言,X14是用C(O)-R⁵官能化的Lys,其中-C(O)-R⁵选自下组:(S)-4-羧基-4-十六酰基氨基-丁酰基(γE-x53)、(S)-4-羧基-4-十八酰基氨基-丁酰基(γE-x70)、4-十六酰基氨基-丁酰基(GABA-x53)、4-{3-[(R)-2,5,7,8-四甲基-2-((4R,8R)-4,8,12-三甲基-十三烷基)-色满-6-基氧基羰基]-丙酰基氨基}-丁酰基(GABA-x60)、4-十八酰基氨基-丁酰基(GABA-x70)、4-((Z)-十八-9-烯酰基氨基)-丁酰基(GABA-x74)、6-[(4,4-二苯基-环己氧基)-羟基-磷酰基氧基]-己酰基(Phosphol)、十六酰基(x53)、(S)-4-羧基-4-(15-羧基-十五酰基氨基)-丁酰基(x52)、(S)-4-羧基-4-{3-[3-((2S,3R,4S,5R)-5-羧基-2,3,4,5-四羟基-戊酰基氨基)-丙酰基氨基]-丙酰基氨基}-丁酰基(γE-x59)、(S)-4-羧基-4-{3-[(R)-2,5,7,8-四甲基-2-((4R,8R)-4,8,12-三甲基-十三烷基)-色满-6-基氧基羰基]-丙酰基氨基}-丁酰基(γE-x60)、(S)-4-羧基-4-((9Z,12Z)-十八碳-9,12-二烯酰基氨基)-丁酰基(γE-x61)、(S)-4-羧基-4-[6-((2S,3R,4S,5R)-5-羧基-2,3,4,5-四羟基-戊酰基氨基)-己酰基氨基]-丁酰基(γE-x64)、(S)-4-羧基-4-((2S,3R,4S,5R)-5-羧基-2,3,4,5-四羟基-戊酰基氨基)-丁酰基(γE-x65)、(S)-4-羧基-4-十四酰基氨基-丁酰基(γE-x69)、(S)-4-(11-苄基氧基羰基-十一酰基氨基)-4-羧基-丁酰基(γE-x72)、(S)-4-羧基-4-[11-((2S,3R,4R,5R)-2,3,4,5,6-五羟基-己基氨甲酰基)-十一酰基氨基]-丁酰基(γE-x73)、(S)-4-羧基-4-((Z)-十八-9-烯酰基氨基)-丁酰基(γE-x74)、(S)-4-羧基-4-(4-十二烷基氧基-苯甲酰基氨基)-丁酰基(γE-x75)、(S)-4-羧基-4-二十一酰基氨基-丁酰基(γE-x76)、(S)-4-羧基-4-二十二酰基氨基-丁酰基(γE-x77)、(S)-4-羧基-4-((Z)-十九-10-烯酰基氨基)-丁酰基(γE-x79)、(S)-4-羧基-4-(4-癸氧基-苯甲酰基氨基)-丁酰基(γE-x80)、(S)-4-羧基-4-[(4'-辛氧基-联苯基-4-羰基)-氨基]-丁酰基(γE-x81)、(S)-4-羧基-4-(12-苄基-十二酰基氨基)-丁酰基(γE-x82)、(S)-4-羧基-4-二十酰基氨基-丁酰基(γE-x95)、(S)-4-羧基-4-((S)-4-羧基-4-十六酰基氨基-丁酰基氨基)-丁酰基(γE-γE-x53)、(S)-4-羧基-4-((S)-4-羧基-4-十八酰基氨基-丁酰基氨基)-丁酰基(γE-γE-x70)和3-(3-十八酰基氨基-丙酰基氨基)-丙酰基(β-Ala-β-Ala-x70)。

[0123] 在一些实施方案中,X14是用C(O)-R⁵官能化的Lys,其中-C(O)-R⁵选自下组:(S)-4-

羧基-4-十六酰基氨基-丁酰基 (γ E-x53) 和 (S)-4-羧基-4-十八酰基氨基-丁酰基 (γ E-x70)。

[0124] 进一步的实施方案涉及一组化合物, 其中

[0125] R^1 是 NH_2 ,

[0126] R^2 是 NH_2 或,

[0127] R^1 和 R^2 是 NH_2 。

[0128] 进一步的实施方案涉及一组化合物, 其中

[0129] X3 代表选自 Gln、Glu 和 His 的氨基酸残基,

[0130] X12 代表选自 Ile 和 Lys 的氨基酸残基,

[0131] X14 代表具有含 $-NH_2$ 基团的侧链的氨基酸残基, 其中所述 $-NH_2$ 侧链基团通过 $-C(O)-R^5$ 而官能化, 其中 R^5 如上所述,

[0132] X15 代表选自 Asp 和 Glu 的氨基酸残基,

[0133] X16 代表选自 Ser、Lys、Glu 和 Gln 的氨基酸残基,

[0134] X17 代表选自 Arg、Lys、Glu、Ile、Gln、Leu、Aib、Tyr 和 Ala 的氨基酸残基,

[0135] X18 代表选自 Ala、Arg、Aib、Leu、Lys 和 Tyr 的氨基酸残基,

[0136] X19 代表选自 Ala、Gln、Val 和 Aib 的氨基酸残基,

[0137] X20 代表选自 Gln、Aib、Phe、Arg、Leu、Lys 和 His 的氨基酸残基,

[0138] X21 代表选自 Asp、Glu、Tyr 和 Leu 的氨基酸残基,

[0139] X28 代表选自 Asn、Ala、Aib、Arg 和 Lys 的氨基酸残基,

[0140] X29 代表选自 Gly、Thr、Aib、D-Ala 和 Ala 的氨基酸残基,

[0141] X40 或是缺失的, 或是代表 Lys。

[0142] 进一步的实施方案涉及一组化合物, 其中

[0143] X3 代表选自 Gln、Glu 和 His 的氨基酸残基,

[0144] X12 代表选自 Ile 和 Lys 的氨基酸残基,

[0145] X14 代表具有含 $-NH_2$ 基团的侧链的氨基酸残基, 其中所述 $-NH_2$ 侧链基团通过 $-C(O)-R^5$ 而官能化, 其中 R^5 如上所述,

[0146] X15 代表选自 Asp 和 Glu 的氨基酸残基,

[0147] X16 代表选自 Ser、Lys、Glu 和 Gln 的氨基酸残基,

[0148] X17 代表选自 Arg、Lys、Glu、Gln、Leu、Aib、Tyr 和 Ala 的氨基酸残基,

[0149] X18 代表选自 Ala、Arg、Aib、Leu 和 Tyr 的氨基酸残基,

[0150] X19 代表选自 Ala、Val 和 Aib 的氨基酸残基,

[0151] X20 代表选自 Gln、Aib、Phe、Leu、Lys、His、Pip、(S) MeLys、(R) MeLys 和 (S) MeOrn 的氨基酸残基,

[0152] X21 代表选自 Asp、Glu 和 Leu 的氨基酸残基,

[0153] X28 代表选自 Asn、Ala、Aib 和 Ser 的氨基酸残基,

[0154] X29 代表选自 Gly、Thr、Aib、D-Ala 和 Ala 的氨基酸残基,

[0155] X40 或是缺失的, 或是代表 Lys。

[0156] 进一步的实施方案涉及一组化合物, 其中

[0157] X3 代表选自 Gln、Glu 和 His 的氨基酸残基,

- [0158] X12代表Ile，
- [0159] X14代表具有含-NH₂基团的侧链的氨基酸残基，其中所述-NH₂侧链基团通过-C(O)-R⁵而官能化，其中R⁵如上所述，
- [0160] X15代表选自Asp和Glu的氨基酸残基，
- [0161] X16代表选自Ser、Lys、Glu和Gln的氨基酸残基，
- [0162] X17代表选自Arg、Lys、Glu、Gln、Leu、Aib、Tyr和Ala的氨基酸残基，
- [0163] X18代表选自Ala和Arg的氨基酸残基，
- [0164] X19代表选自Ala和Val的氨基酸残基，
- [0165] X20代表选自Gln、Aib、Lys、Pip、(S) MeLys、(R) MeLys和(S) MeOrn和His的氨基酸残基，
- [0166] X21代表选自Asp、Glu和Leu的氨基酸残基，
- [0167] X28代表选自Asn和Ala的氨基酸残基，
- [0168] X29代表选自Gly、Thr和D-Ala的氨基酸残基，
- [0169] X40或是缺失的，或是代表Lys。
- [0170] 进一步的实施方案涉及一组化合物，其中
- [0171] X3代表选自Gln、Glu和His的氨基酸残基，
- [0172] X12代表选自Ile和Lys的氨基酸残基，
- [0173] X14代表具有含-NH₂基团的侧链的氨基酸残基，其中所述-NH₂侧链基团通过-C(O)-R⁵而官能化，其中R⁵如上所述，
- [0174] X15代表选自Asp和Glu的氨基酸残基，
- [0175] X16代表选自Ser、Lys、Glu和Gln的氨基酸残基，
- [0176] X17代表选自Arg、Lys、Glu、Gln、Leu、Aib、Tyr和Ala的氨基酸残基，
- [0177] X18代表选自Ala和Arg的氨基酸残基，
- [0178] X19代表选自Ala和Val的氨基酸残基，
- [0179] X20代表选自Gln、Aib、Lys和His的氨基酸残基，
- [0180] X21代表选自Asp、Glu和Leu的氨基酸残基，
- [0181] X28代表选自Asn和Ala的氨基酸残基，
- [0182] X29代表选自Gly、Thr和D-Ala的氨基酸残基，
- [0183] X40或是缺失的，或是代表Lys。
- [0184] 进一步的实施方案涉及一组化合物，其中
- [0185] X3代表选自Gln和Glu的氨基酸残基，
- [0186] X12代表Ile，
- [0187] X14代表Lys，其中-NH₂侧链基团通过一种选自下组的基团而官能化：(S)-4-羧基-4-十六酰基氨基-丁酰基-、(S)-4-羧基-4-十八酰基氨基-丁酰基-、(S)-4-羧基-4-((S)-4-羧基-4-十八酰基氨基-丁酰基氨基)-丁酰基-、3-(3-十八酰基氨基-丙酰基氨基)-丙酰基和4-十八酰基氨基-丁酰基-、(S)-4-羧基-4-二十一酰基氨基-丁酰基-，
- [0188] X15代表选自Glu和Asp的氨基酸残基，
- [0189] X16代表选自Ser和Lys的氨基酸残基，
- [0190] X17代表Arg，

- [0191] X18代表Ala，
- [0192] X19代表Ala，
- [0193] X20代表选自Gln和Aib的氨基酸残基，
- [0194] X21代表选自Asp和Glu的氨基酸残基，
- [0195] X28代表选自Asn和Ala的氨基酸残基，
- [0196] X29代表选自Gly和Thr的氨基酸残基，
- [0197] X40是缺失的。
- [0198] 进一步的实施方案涉及一组化合物，其中
- [0199] X3代表Glu，
- [0200] X12代表Ile，
- [0201] X14代表Lys，其中-NH₂侧链基团通过一种选自下组的基团而官能化：(S)-4-羧基-4-十六酰基氨基-丁酰基-、(S)-4-羧基-4-十八酰基氨基-丁酰基-、(S)-4-羧基-4-((S)-4-羧基-4-十八酰基氨基-丁酰基氨基)-丁酰基-、3-(3-十八酰基氨基-丙酰基氨基)-丙酰基和4-十八酰基氨基-丁酰基-、(S)-4-羧基-4-二十一酰基氨基-丁酰基-，
- [0202] X15代表选自Glu和Asp的氨基酸残基，
- [0203] X16代表选自Ser和Lys的氨基酸残基，
- [0204] X17代表Arg，
- [0205] X18代表Ala，
- [0206] X19代表Ala，
- [0207] X20代表选自Gln和Aib的氨基酸残基，
- [0208] X21代表选自Asp和Glu的氨基酸残基，
- [0209] X28代表选自Asn和Ala的氨基酸残基，
- [0210] X29代表选自Gly和Thr的氨基酸残基，
- [0211] X40是缺失的。
- [0212] 进一步的实施方案涉及一组化合物，其中
- [0213] X3代表Glu，
- [0214] X12代表Ile，
- [0215] X14代表Lys，其中-NH₂侧链基团通过一种选自下组的基团而官能化：(S)-4-羧基-4-十六酰基氨基-丁酰基-、(S)-4-羧基-4-十八酰基氨基-丁酰基-、(S)-4-羧基-4-((S)-4-羧基-4-十八酰基氨基-丁酰基氨基)-丁酰基-、3-(3-十八酰基氨基-丙酰基氨基)-丙酰基和4-十八酰基氨基-丁酰基-、(S)-4-羧基-4-二十一酰基氨基-丁酰基-，
- [0216] X15代表选自Glu和Asp的氨基酸残基，
- [0217] X16代表选自Ser和Lys的氨基酸残基，
- [0218] X17代表Arg，
- [0219] X18代表Ala，
- [0220] X19代表Ala，
- [0221] X20代表选自Gln和Aib的氨基酸残基，
- [0222] X21代表选自Asp和Glu的氨基酸残基，
- [0223] X28代表选自Asn和Ala的氨基酸残基，

- [0224] X29代表选自Gly和Thr的氨基酸残基，
- [0225] X40是缺失的。
- [0226] 进一步的实施方案涉及一组化合物，其中
- [0227] X14代表Lys，其中-NH₂侧链基团通过一种选自下组的基团而官能化：(S)-4-羧基-4-十六酰基氨基-丁酰基-、(S)-4-羧基-4-十八酰基氨基-丁酰基-、4-十八酰基氨基-丁酰基-、十六酰基-、(S)-4-羧基-4-二十一酰基氨基-丁酰基-、(S)-4-羧基-4-((S)-4-羧基-4-十八酰基氨基-丁酰基氨基)-丁酰基-、3-(3-十八酰基氨基-丙酰基氨基)-丙酰基-。
- [0228] 进一步的实施方案涉及一组化合物，其中
- [0229] X14代表Lys，其中-NH₂侧链基团通过一种选自下组的基团而官能化：(S)-4-羧基-4-十八酰基氨基-丁酰基-、4-十八酰基氨基-丁酰基-、(S)-4-羧基-4-二十一酰基氨基-丁酰基-、(S)-4-羧基-4-((S)-4-羧基-4-十八酰基氨基-丁酰基氨基)-丁酰基-、3-(3-十八酰基氨基-丙酰基氨基)-丙酰基-。
- [0230] 进一步的实施方案涉及一组化合物，其中
- [0231] X14代表Lys，其中-NH₂侧链基团通过一种选自下组的基团而官能化：(S)-4-羧基-4-十六酰基氨基-丁酰基-、(S)-4-羧基-4-十八酰基氨基-丁酰基-。
- [0232] 进一步的实施方案涉及一组化合物，其中
- [0233] X3代表选自Gln和Glu的氨基酸残基，
- [0234] X12代表Ile，
- [0235] X14代表Lys，其中-NH₂侧链基团通过一种选自下组的基团而官能化：(S)-4-羧基-4-十六酰基氨基-丁酰基-和(S)-4-羧基-4-十八酰基氨基-丁酰基-，
- [0236] X15代表选自Glu和Asp的氨基酸残基，
- [0237] X16代表选自Ser和Lys的氨基酸残基，
- [0238] X17代表Arg，
- [0239] X18代表Ala，
- [0240] X19代表Ala，
- [0241] X20代表选自Gln和Aib的氨基酸残基，
- [0242] X21代表选自Asp和Glu的氨基酸残基，
- [0243] X28代表选自Asn和Ala的氨基酸残基，
- [0244] X29代表选自Gly和Thr的氨基酸残基，
- [0245] X40是缺失的。
- [0246] 进一步的实施方案涉及一组化合物，其中
- [0247] X3代表选自Gln、His和Glu的氨基酸残基，
- [0248] X12代表Ile，
- [0249] X14代表Lys，其中-NH₂侧链基团通过一种选自下组的基团而官能化：(S)-4-羧基-4-十六酰基氨基-丁酰基-和(S)-4-羧基-4-十八酰基氨基-丁酰基-，
- [0250] X15代表Glu，
- [0251] X16代表选自Glu和Lys的氨基酸残基，
- [0252] X17代表Glu，
- [0253] X18代表Ala，

- [0254] X19代表Val，
- [0255] X20代表Arg，
- [0256] X21代表Leu，
- [0257] X28代表选自Asn、Aib和Ala的氨基酸残基，
- [0258] X29代表选自Gly和Thr的氨基酸残基，
- [0259] X40是缺失的。
- [0260] 进一步的实施方案涉及一组化合物，其中
- [0261] X3代表Glu，
- [0262] X12代表Ile，
- [0263] X14代表Lys，其中-NH₂侧链基团通过一种选自下组的基团而官能化：(S)-4-羧基-4-十六酰基氨基-丁酰基-和(S)-4-羧基-4-十八酰基氨基-丁酰基-，
- [0264] X15代表Glu，
- [0265] X16代表选自Glu和Lys的氨基酸残基，
- [0266] X17代表Glu，
- [0267] X18代表Ala，
- [0268] X19代表Val，
- [0269] X20代表Arg，
- [0270] X21代表Leu，
- [0271] X28代表选自Asn、Aib和Ala的氨基酸残基，
- [0272] X29代表Gly，
- [0273] X40是缺失的。
- [0274] 进一步的实施方案涉及一组化合物，其中
- [0275] X3代表选自Gln、His和Glu的氨基酸残基，
- [0276] X12代表选自Ile和Lys的氨基酸残基，
- [0277] X14代表Lys，其中-NH₂侧链基团通过一种选自下组的基团而官能化：(S)-4-羧基-4-十六酰基氨基-丁酰基-和(S)-4-羧基-4-十八酰基氨基-丁酰基-，
- [0278] X15代表选自Glu和Asp的氨基酸残基，
- [0279] X16代表Glu，
- [0280] X17代表选自Arg和Gln的氨基酸残基，
- [0281] X18代表选自Ala和Arg的氨基酸残基，
- [0282] X19代表Ala，
- [0283] X20代表选自Pip、(S) MeLys、(R) MeLys和(S) MeOrn的氨基酸残基，
- [0284] X21代表Glu，
- [0285] X28代表选自Asn、Ser和Ala的氨基酸残基，
- [0286] X29代表选自Gly和Thr的氨基酸残基，
- [0287] X40是缺失的。
- [0288] 进一步的实施方案涉及一组化合物，其中
- [0289] X3代表选自Gln、His和Glu的氨基酸残基，
- [0290] X12代表选自Ile和Lys的氨基酸残基，

- [0291] X14代表Lys,其中-NH₂侧链基团通过一种选自下组的基团而官能化:(S)-4-羧基-4-十六酰基氨基-丁酰基-、十六酰基和(S)-4-羧基-4-十八酰基氨基-丁酰基-,
- [0292] X15代表选自Glu和Asp的氨基酸残基,
- [0293] X16代表选自Ser、Lys、Glu和Gln的氨基酸残基,
- [0294] X17代表选自Arg、Leu、Aib、Tyr、Glu、Ala和Lys的氨基酸残基,
- [0295] X18代表选自Ala、Aib、Leu和Tyr的氨基酸残基,
- [0296] X19代表选自Ala、Val和Aib的氨基酸残基,
- [0297] X20代表Aib,
- [0298] X21代表选自Glu、Leu和Tyr的氨基酸残基,
- [0299] X28代表选自Asn、Arg和Ala的氨基酸残基,
- [0300] X29代表选自Gly、Ala、D-Ala和Thr的氨基酸残基,
- [0301] X40或是缺失的,或是代表Lys。
- [0302] 进一步的实施方案涉及一组化合物,其中
- [0303] X3代表选自Gln、His和Glu的氨基酸残基,
- [0304] X12代表选自Ile和Lys的氨基酸残基,
- [0305] X14代表Lys,其中-NH₂侧链基团通过一种选自下组的基团而官能化:(S)-4-羧基-4-十六酰基氨基-丁酰基-和(S)-4-羧基-4-十八酰基氨基-丁酰基-,
- [0306] X15代表选自Glu和Asp的氨基酸残基,
- [0307] X16代表选自Ser、Lys和Glu的氨基酸残基,
- [0308] X17代表选自Arg、Lys、Ile、Glu和Gln的氨基酸残基,
- [0309] X18代表选自Ala、Arg和Lys的氨基酸残基,
- [0310] X19代表选自Ala、Val和Gln的氨基酸残基,
- [0311] X20代表选自Gln、Phe、Leu、Lys、His和Arg的氨基酸残基,
- [0312] X21代表选自Glu、Asp和Leu的氨基酸残基,
- [0313] X28代表选自Asn、Arg、Lys和Ala的氨基酸残基,
- [0314] X29代表选自Gly、Aib和Thr的氨基酸残基,
- [0315] X40或是缺失的,或是代表Lys。
- [0316] 进一步的实施方案涉及一组化合物,其中X12代表Ile。
- [0317] 进一步的实施方案涉及一组化合物,其中X19代表Ala。
- [0318] 进一步的实施方案涉及一组化合物,其中
- [0319] X16代表Glu,
- [0320] X20代表选自Pip、(S) MeLys、(R) MeLys和(S) MeOrn的氨基酸残基。
- [0321] 进一步的实施方案涉及一组化合物,其中
- [0322] X28代表Ala,
- [0323] X29代表Gly。
- [0324] 进一步的实施方案涉及一组化合物,其中
- [0325] X28代表Asn,
- [0326] X29代表Thr。
- [0327] 进一步的实施方案涉及一组化合物,其中

- [0328] X3代表选自Gln和Glu的氨基酸残基，
- [0329] X12代表选自Ile和Lys的氨基酸残基，
- [0330] X14代表Lys，其中-NH₂侧链基团通过-C(O)-R⁵官能化，其中-C(O)-R⁵选自：(S)-4-羧基-4-十六酰基氨基-丁酰基-(γE-x53)和(S)-4-羧基-4-十八酰基氨基-丁酰基-(γE-x70)，
- [0331] X15代表选自Asp和Glu的氨基酸残基，
- [0332] X16代表Glu，
- [0333] X17代表选自Arg和Gln的氨基酸残基，
- [0334] X18代表选自Ala和Arg的氨基酸残基，
- [0335] X19代表Ala，
- [0336] X20代表选自Pip、(S) MeLys、(R) MeLys和(S) MeOrn的氨基酸残基，
- [0337] X21代表Glu，
- [0338] X28代表选自Asn、Ala和Ser的氨基酸残基，
- [0339] X29代表选自Gly和Thr的氨基酸残基，
- [0340] X40是缺失的。
- [0341] 式(I)的肽化合物的具体例子是SEQ ID NO:8-16的化合物以及其盐和溶剂合物。
- [0342] 式(I)的肽化合物的具体例子是SEQ ID NO:8-13和15的化合物以及其盐和溶剂合物。
- [0343] 在一些实施方案中，即当式(I)的化合物包含遗传学编码的氨基酸残基时，本发明进一步提供编码所述化合物的核酸(其可以是DNA或RNA)、包含这种核酸的载体以及含有这种核酸或表达载体的宿主细胞。
- [0344] 在进一步的方面，本发明提供包含本发明化合物与载体混合的组合物。在优选的实施方案中，组合物是药学上可接受的组合物，而载体是药学上可接受的载体。本发明的化合物可以以盐的形式，例如药学上可接受的盐，或以溶剂合物的形式，例如水合物。在再进一步的方面，本发明提供用于在医药治疗方法中使用的组合物，特别是人的药物。
- [0345] 在一些实施方案中，核酸或表达载体可以用作治疗剂，例如在基因治疗中。
- [0346] 式(I)的化合物适于没有额外的治疗有效制剂的治疗应用。然而，在其他实施方案中，所述化合物与至少一种额外的治疗活性剂联合使用，如“联合治疗”中所述。
- [0347] 式(I)的化合物具体适合于治疗或预防由碳水化合物和/或脂质代谢失调引起的、与碳水化合物和/或脂质代谢失调相关的和/或伴随有碳水化合物和/或脂质代谢失调的疾病或病症，例如用于治疗或预防高血糖症、2型糖尿病、葡萄糖耐量受损、1型糖尿病、肥胖症和代谢综合征。而且，本发明的化合物具体适合于治疗或预防退行性疾病，特别是神经退行性疾病。
- [0348] 除其他之外，发现了所述化合物在预防增重或促进减重中的用途。“预防”指的是与不治疗相比的抑制或减少，并且并不一定意味着病症的完全中止。
- [0349] 本发明的化合物可以引起食物摄入减少和/或能量消耗增加，导致观察到对于体重的效果。
- [0350] 与其对体重的效果无关的是，本发明的化合物可以对循环的胆固醇水平具有有益效果，能够提高脂质水平，尤其是LDL，以及HDL水平(例如提高HDL/LDL比率)。

[0351] 因此,本发明的化合物能用于任何由体重过量引起的或表征的病况的直接或间接治疗,如对肥胖症、病态性肥胖症、肥胖相关的炎症、肥胖相关的胆囊疾病、肥胖诱导的睡眠呼吸暂停的治疗和/或预防。它们还可以用于治疗 and 预防代谢综合征、糖尿病、高血压、致动脉粥样硬化的血脂异常、动脉粥样硬化、动脉硬化、冠心病或中风。它们在这些病况中的效果可作为与它们对体重的效果的结果或与所述效果相关,或可以与其无关。

[0352] 优选的医药用途包括延缓或预防2型糖尿病中的疾病进展,治疗代谢综合征,治疗肥胖症或预防超重,用于减少食物摄入,增加能量消耗,降低体重,延缓从葡萄糖耐量受损(IGT)至2型糖尿病的进展,延缓从2型糖尿病至需要胰岛素的糖尿病的进展,调节食欲,诱导饱足,预防成功减肥后的再次增重,治疗超重或肥胖症相关的疾病或病状,治疗易饿症(bulimia),治疗暴食,治疗动脉粥样硬化、高血压、2型糖尿病、IGT、血脂异常、冠心病、脂肪肝,治疗 β 受体阻断剂中毒,用于抑制胃肠道运动的用途,与用如X射线、CT和NMR扫描等的技术的胃肠道研究联用。

[0353] 进一步优选的医药用途包括治疗或预防退行性疾病,特别是神经退行性疾病如阿兹海默病(Alzheimer's disease)、帕金森氏病(Parkinson's disease)、亨廷顿氏舞蹈病(Huntington's disease)、共济失调(例如脊髓小脑性共济失调)、肯尼迪病(Kennedy disease)、肌强直性营养不良、路易体痴呆症(Lewy body dementia)、多系统萎缩(multisystemic atrophy)、肌萎缩性脊髓侧索硬化、原发性脊髓侧索硬化、脊髓性肌萎缩、朊病毒相关疾病(例如克雅氏病(Creutzfeldt-Jacob disease))、多发性硬化、毛细血管扩增、贝敦氏症(Batten disease)、皮层基底节变性(corticobasal degeneration)、脊髓亚急性联合变性、脊髓痨、泰-萨二氏病(Tay-Sachs disease)、中毒性脑病、婴儿雷夫叙姆病(infantile Refsum disease)、雷夫叙姆病、神经棘红细胞增多症、尼曼匹克症(Niemann-Pick disease)、莱姆病(Lyme disease)、马查多·约瑟夫病(Machado-Joseph disease)、桑德霍夫病(Sandhoff disease)、雪-杜二氏综合征(Shy-Drager syndrome)、刺猬摇摆综合征(wobbly hedgehog syndrome)、原发病(proteopathy)、脑 β -淀粉样脑血管病、青光眼中的视网膜神经节细胞变性、核蛋白病(synucleinopathies)、滔蛋白病(tauopathies)、额颞叶变性(FTLD)、痴呆症、Cadasil综合征、具有淀粉样变性的遗传性脑溢血、亚历山大病(Alexander disease)、腓骨肌萎缩症(seipinopathies)、家族性淀粉样变性神经病变、老年系统性淀粉样变性(senile systemic amyloidosis)、腓骨肌萎缩症(serpinopathies)、AL(轻链)淀粉样变性(原发性全身淀粉样变性)、AH(重链)淀粉样变性、AA(继发性)淀粉样变性、主动脉内淀粉样变性(aortic medial amyloidosis)、ApoAI淀粉样变性、ApoAII淀粉样变性、ApoAIV淀粉样变性、芬兰型家族性淀粉样变性(FAF)、溶菌酶淀粉样变性、纤维蛋白原淀粉样变性、透析淀粉样变性、包涵体肌炎/肌病、白内障、具有视紫红质突变的视网膜色素变性、甲状腺髓样癌、心脏心房淀粉样变性、垂体催乳素瘤、遗传性网格状角膜营养不良(Hereditary lattice corneal dystrophy)、皮肤性苔藓状淀粉样变性、马洛里小体(Mallory bodies)、角膜乳铁蛋白淀粉样变性、肺泡蛋白沉着症(pulmonary alveolar proteinosis)、牙源性(Pindborg)肿瘤淀粉体、囊性纤维化病、镰状细胞疾病或危重病性肌病(CIM)。

[0354] 进一步的医药用途包括治疗骨骼相关的病症,如骨质疏松症或骨关节炎等,其中骨形成的增加和骨吸收(bone resorption)的减少可能是有益的。

[0355] 发明详述

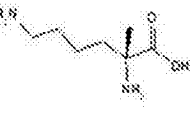
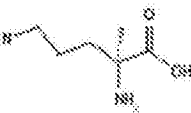
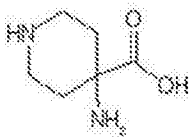
[0356] 定义

[0357] 本发明的氨基酸序列含有用于天然存在的氨基酸的常规单字母或三字母代码,以及用于其他氨基酸的普遍承认的三字母代码,如Aib(α -氨基异丁酸)、Orn(鸟氨酸)、Dab(2,4-二氨基丁酸)、Dap(2,3-二氨基丙酸)、Nle(正亮氨酸)、GABA(γ -氨基丁酸)或Ahx(ϵ -氨基己酸)

[0358] 此外,使用如下代码用于表4中所示氨基酸。

[0359] 表4:

[0360]

结构	名称	代码
 (S)MeLys	(S)- α -甲基-赖氨酸	(S)MeLys
 (R)MeLys	(R)- α -甲基-赖氨酸	(R)MeLys
 (S)MeOrn	(S)- α -甲基-鸟氨酸	(S)MeOrn
 Pip	4-氨基-哌啶-4-羧酸	Pip

[0361] 术语“天然毒蜥外泌肽-4”意指具有序列HGEGTFTSDLSKQMEEEAVRLFIEWLKNGGPSSGA PPPS-NH₂ (SEQ ID NO:1)的天然毒蜥外泌肽-4。

[0362] 本发明提供如上所定义的肽化合物。

[0363] 本发明的肽化合物包括通过肽键即羧酰胺键连接的氨基酸的线性主链。优选的是,所述氨基酸是 α -氨基酸,并且更优选地是L- α -氨基酸,除非另行指出。肽化合物优选地包含39-40个氨基酸的主链序列。

[0364] 本发明的肽化合物可以具有未修饰的侧链,但至少在其中一个侧链处携带一个修饰。

[0365] 为了免生疑义,在此处提供的定义中,通常认为肽部分(II)的序列与天然毒蜥外泌肽-4在那些规定允许变异的位置中的至少一个位置处不同。可以认为肽部分(II)内的氨基酸是从0至40以常规的N末端至C末端方向连续编号的。对肽部分(II)内的“位置”的提述应当照此理解,而对天然毒蜥外泌肽-4和其他分子内的位置的提述也应当如此,例如在毒蜥外泌肽-4中,His在位置1处,Gly在位置2处……Met在位置14处……和Ser在位置39处。

[0366] 位置14处和任选地位置40处的氨基酸残基具有含-NH₂基团的侧链,例如Lys、Orn、Dab或Dap,所述氨基酸残基缀合到官能基团,例如酰基基团。因此,本发明中肽的一个或多个选定的氨基酸可以在其侧链中携带共价连接物(attachment)。在一些情况下,这些连接可以是亲脂性的。这些亲脂性的侧链连接具有减少体内肽清除的潜能,从而增加它们的体

内半衰期。

[0367] 亲脂性的连接物可由亲脂性的部分组成,所述亲脂性的部分可以是分枝状或非分枝状的、脂肪族的(aliphatic)或不饱和非环状的部分和/或环状的部分(所述环状的部分选自一种或多种脂肪族的或不饱和的同素环或杂环、芳香族稠合或非稠合的同素环或杂环)、醚键、不饱和键和取代基,例如羟基和/或羧基基团。假如氨基酸在其侧链中携带氨基的话,所述亲脂性的部分可以连接到肽,所述连接或是通过烷基化、还原胺化或是通过酰胺键、氨基甲酸酯键或氨磺酰键进行的。

[0368] 能连接到氨基酸侧链的亲脂性部分的非限制性例子包括氨基酸(例如C₈₋₃₀氨基酸如棕榈酸、肉豆蔻酸、硬脂酸和油酸)和/或如上述的环状基团或其衍生物。

[0369] 亲脂性连接物与肽的氨基酸之间可以有一种或多种接头。这些接头的非限制性的例子是β-丙氨酸、γ-谷氨酸、α-谷氨酸、γ-氨基丁酸和/或ε-氨基己酸或二肽,如β-Ala-β-Ala(此处也简称为βA-βA)和/或γ-Glu-γ-Glu(此处也简称为γE-γE),以其所有的立体异构体形式(S和R对映异构体)。

[0370] 因此,侧链连接物的非限制性的例子是棕榈酸,其共价连接到谷氨酸的α-氨基基团,形成酰胺键。这种经取代的谷氨酸的γ-羧基基团能与肽内赖氨酸的侧链氨基基团形成酰胺键。

[0371] 在另一个方面,本发明提供一种组合物,其包含如此处所述的本发明化合物或其盐或溶剂合物,并与载体混合。

[0372] 本发明还提供本发明化合物用于作为药物使用的用途,尤其是用于治疗如下病况的药物的用途。

[0373] 本发明还提供一种组合物,其中所述组合物是药学上可接受的组合物,并且所述载体是药学上可接受的载体。

[0374] 肽合成

[0375] 技术人员知道用于制备本发明所述肽的多种不同方法。这些方法包括但不限于合成途径和重组基因表达。因此,制备这些肽的一种办法是在溶液中或在固体支持物上进行合成,以及随后的分离和纯化。制备所述肽的一种不同的方法是在宿主细胞中进行基因表达,所述宿主细胞中引入了编码所述肽的DNA序列。或者,可以不利用细胞系统而实现基因表达。上述方法还可以以任意方式组合。

[0376] 制备本发明的肽的优选方法是在合适的树脂上的固相合成。固相合成是一种发展完善的方法学(参见例如:Stewart和Young,Solid Phase Peptide Synthesis,Pierce Chemical Co.,Rockford,Ill.,1984;E.Atherton和R.C.Sheppard,Solid Phase Peptide Synthesis.A Practical Approach,Oxford-IRL Press,New York,1989)。固相合成是通过如下步骤起始的:将N末端受保护的氨基酸的羧基末端连接到携带可切割接头(cleavable linker)的惰性固体支持物。这种固体支持物可以是允许起始氨基酸进行偶联的任何聚合物,例如三苯甲基树脂、氯三苯甲基树脂、Wang树脂或Rink树脂,其中羧基基团(或Rink树脂的羧酰胺)对树脂的连接是对酸敏感的(当使用Fmoc策略时)。聚合物支持物在肽合成期间用于对α-氨基基团进行去保护的条件下必须是稳定的。

[0377] 在第一个氨基酸偶联到固体支持物上后,将这个氨基酸的α-氨基保护基团去除。然后用合适的酰胺偶联试剂将剩下的受保护的氨基酸按照肽序列代表的顺序一个接一个

地进行偶联,所述偶联试剂例如BOP、HBTU、HATU或DIC (N,N'-二异丙基碳二亚胺) /HOBt (1-羟基苯并三氮唑),其中BOP、HBTU和HATU与叔胺碱一起使用。或者,脱去束缚的N末端能用除氨基酸以外的基团进行官能化,例如羧酸等。

[0378] 通常,氨基酸的反应性(reactive)侧链基团是用合适的阻断基团来保护的。在所需要的肽被组装后,除去这些保护基团。在相同条件下伴随着从树脂上切割所需要的产品而将这些保护基团除去。保护基团和引入保护基团的步骤可在Protective Groups in Organic Synthesis, 3rd ed., Greene, T.W. and Wuts, P.G.M., Wiley & Sons (New York: 1999) 中找到。

[0379] 在一些情况下,可能需要具有侧链保护基团,所述基团能在其他侧链保护基团保持完好的条件下被选择性地除去。在这种情况下,可以选择性地将脱去束缚的官能体(functionality)进行官能化。例如,赖氨酸可以用ivDde ([1-(4,4-二甲基-2,6-二氧代环己-1-亚基)-3-甲基丁基 ([1-(4,4-dimethyl-2,6-dioxocyclohex-1-ylidene)-3-methylbutyl)]) 保护基团 (S.R.Chhabra等, Tetrahedron Lett. 39, (1998), 1603) 来保护,所述保护基团对于非常亲核的碱基是不稳定的,例如4%胍在DMF (二甲基甲酰胺) 中。因此,如果N末端氨基基团和所有侧链官能体是用酸不稳定的保护基团来保护的,则ivDde基团可以选择性地用4%胍在DMF中的溶液来除去,并且然后能对相应的游离氨基基团进行进一步修饰,例如通过酰化作用。或者赖氨酸能偶联到受保护的氨基酸,并且随后能够将这个氨基酸的氨基基团去保护,得到另一个游离的氨基基团,所述游离的氨基基团可以被酰化或连接到另一氨基酸。

[0380] 最后,将肽从树脂切下。这能够通过使用King's混合剂(cocktail) (D.S.King, C.G.Fields, G.B.Fields, Int. J. Peptide Protein Res. 36, 1990, 255-266) 来实现。然后能通过色谱法来纯化原材料,例如制备型RP-HPLC,如果必要的话。

[0381] 效力

[0382] 此处所用的“效力”或“体外效力”是对化合物在基于细胞的测定中激活GLP-1、GIP或胰高血糖素受体的能力的量度。从数字上来讲,其表示为“EC₅₀值”,这是在剂量响应实验中诱导响应(例如细胞内cAMP的形成)的最大增加的一半所需的化合物有效浓度。

[0383] 治疗用途

[0384] 本发明的化合物是GLP-1受体的激动剂和GIP受体的激动剂,以及选择性是胰高血糖素受体的激动剂(例如“双重激动剂或三重激动剂”)。这些肽是GIP/GLP-1共同激动剂或GIP/GLP-1/胰高血糖素三重激动剂,其可以提供治疗益处,以通过允许对糖尿病和肥胖症的同时治疗来满足对于靶向代谢综合征的临床需求。

[0385] 代谢综合征是一种医学病症的组合,当这些病症一起发生时,则增加患上2型糖尿病以及动脉粥样硬化血管疾病(例如心脏病和中风)的风险。对代谢综合征的医学参数的定义包括糖尿病、葡糖耐量受损、空腹葡萄糖升高、抗胰岛素性、尿白蛋白分泌、中心性肥胖症、高血压、甘油三酯升高、LDL胆固醇升高和HDL胆固醇降低。

[0386] 肥胖症是一种医学病况,其中过量的体脂肪积累到一定程度,可能对健康和预期寿命有不利影响;并且由于其在成人和儿童中愈发流行,肥胖症成为了当代世界里主要的可预防致死原因中的一种。它增加了多种疾病的可能性,包括心脏病、2型糖尿病、阻塞性睡眠呼吸暂停、一些类型的癌症、以及骨关节炎,并且它通常大多是由食物摄入过量、能量消

耗减少以及遗传易感性的组合而引起。

[0387] 糖尿病 (Diabetes mellitus), 通常简称为糖尿病 (diabetes), 是一组代谢性疾病; 在这种疾病中人具有高血糖水平, 这或是因为身体不产生足够的胰岛素, 或是因为细胞不对产生的胰岛素进行响应。最常见的糖尿病类型是: (1) 1型糖尿病, 其中身体无法产生胰岛素; (2) 2型糖尿病, 其中身体无法正确地使用胰岛素, 以及随时间增加的胰岛素缺乏; 和 (3) 妊娠糖尿病, 其中女性因其妊娠而患上糖尿病。所有形式的糖尿病都增加长期并发症的风险, 典型的是在许多年后患上所述并发症。这些长期并发症大多数基于血管的损害, 并且能分为两个类别, “大血管” 疾病 (由较大血管的动脉粥样硬化引起) 和 “微血管疾病” (由小血管的损害引起)。大血管疾病病况的例子是缺血性心脏病 (ischemic heart disease)、心肌梗死、中风和周围血管疾病。微血管疾病的例子是糖尿病性视网膜病、糖尿病性肾病以及糖尿病性神经病变。

[0388] GLP-1和GIP以及胰高血糖素的受体是7次跨膜的异三聚体G蛋白偶联受体家族的成员。它们结构上彼此相关, 并且不仅具有显著水平的序列同一性, 还具有相似的配体识别机制和细胞内信号传导途径。

[0389] 类似地, GLP-1、GIP和胰高血糖素的肽共享具有高序列同一性/相似性的区域。GLP-1和胰高血糖素产生自共同的前体——前胰高血糖素原 (preproglucagon), 其以组织特异性方式差异性地加工, 从而在肠内分泌细胞中产出例如GLP-1以及在胰岛的 α 细胞中产出胰高血糖素。GIP来源于较大的GIP原 (proGIP) 激素原前体, 并从定位于小肠中的K-细胞合成和释放。

[0390] 肽肠降血糖素 (incretin) 激素GLP-1和GIP是由肠内分泌细胞响应于食物而分泌的, 占了多达70%的进餐刺激性的胰岛素分泌。证据说明在患有葡糖耐量受损或2型糖尿病的受试者中GLP-1分泌减少, 然而这些患者中依然保留着对GLP-1的响应性。因此, 用合适的激动剂靶向GLP-1受体, 提供了有吸引力的治疗代谢病症 (包括糖尿病) 的手段。GLP-1的受体分布广泛, 主要在胰岛、脑、心脏、肾脏和胃肠道中发现。在胰腺中, GLP-1以严格的葡萄糖依赖性方式, 通过增加来自 β 细胞的胰岛素分泌来发挥作用。这种葡萄糖依赖性显示GLP-1受体的激活不太可能引起低血糖症。GIP受体也在周围组织中广泛表达, 所述组织包括胰岛、脂肪组织、胃、小肠、心脏、骨骼、肺、肾脏、睾丸、肾上腺皮质、垂体、内皮细胞、气管、脾、胸腺、甲状腺和脑。与其作为肠降血糖素激素的生物学功能相一致的是, 胰腺的 β 细胞在人中表达最高水平的GIP受体。有一些临床证据显示, 在T2DM患者中GIP受体介导的信号传导可能受到损伤, 但显示GIP作用是可逆的并且可以用糖尿病状态的改善来恢复。值得注意的是, 通过两种肠降血糖激素GIP和GLP-1的胰岛素分泌的刺激是严格葡萄糖依赖性的, 这确保了与低血糖症低风险相关的故障保险机制。

[0391] 在 β 细胞水平, GLP-1和GIP已显示促进葡萄糖敏感性 (sensitivity)、再生、增殖、胰岛素原的转录和过度生长 (hypertrophy), 以及抗凋亡。具有GLP-1和GIP受体双重激动剂活性的肽可以预期具有加和或协同的抗糖尿病益处。GLP-1的胰腺之外的其他相关效果包括延缓胃排空、增加饱足、减少食物摄入、降低体重, 以及神经保护和心脏保护效果。考虑到高比率的并存病 (comorbidities) 如肥胖症和心血管疾病, 在患有2型糖尿病的患者中, 这些胰腺外的效果可能是特别重要的。在胰腺之外的周围组织中进一步的GIP作用包括骨形成增加和骨吸收减少, 以及神经保护效果, 这可能对骨质疏松症和认知缺陷如阿兹海默病

的治疗是有益的。

[0392] 胰高血糖素是一种29个氨基酸的肽激素,由胰腺的 α 细胞产生,并在循环的葡萄糖低时释放到血液中。胰高血糖素的一个重要的生理学作用是在肝中刺激葡萄糖输出,这个过程在维持体内葡萄糖稳态中针对胰岛素提供了主要的反向调节机制。

[0393] 然而胰高血糖素受体也在肝外的组织中表达,如肾脏、心脏、脂肪细胞、淋巴母细胞、脑、视网膜、肾上腺和胃肠道,说明了葡萄糖稳态之外的更广泛的生理学作用。相应地,近期的研究已报道了胰高血糖素对于能量管理具有治疗上的积极效果,包括刺激能量消耗和生热作用,伴随着食物摄入减少和体重减少。总的来说,对胰高血糖素受体的刺激可能在治疗肥胖症和代谢综合征中是有用的。

[0394] 胃泌酸调节素是一种肽激素,由胰高血糖素组成,所述胰高血糖素具有包含8个氨基酸的C末端延伸。像GLP-1和胰高血糖素一样,它以前胰高血糖素原表现,并被被小肠的内分泌细胞以组织特异性的方式切割和分泌。已知胃泌酸调节素刺激GLP-1和胰高血糖素两种受体,并因此是双重激动剂的原型(prototype)。

[0395] 由于GLP-1和GIP因其抗糖尿病的效果而为人所知,GLP-1和胰高血糖素都因其食物摄入抑制效果而为人所知,而胰高血糖素还是额外的能量消耗的介导体,因此可以想到这两种或三种激素的活性结合在一个分子中能产生强效的药物,用于对代谢综合征的治疗,特别是对其组分糖尿病和肥胖症的治疗。

[0396] 相应地,本发明的化合物还可用于葡萄糖耐量、抗胰岛素性、前糖尿病、空腹葡萄糖增加、2型糖尿病、高血压、血脂异常、动脉硬化、冠心病、周围动脉疾病、中风或任何这些单个疾病组分的组合的治疗。

[0397] 此外,它们可以用于控制食欲、用餐和卡路里摄入,增加能力消耗,防止增重,促进减重,减少体重过量和总体治疗肥胖症,包括病态肥胖症。

[0398] 进一步的可用本发明化合物治疗的疾病状态和健康状况是肥胖症相关的炎症、肥胖症相关的胆囊疾病和肥胖症诱发的睡眠呼吸暂停。

[0399] 虽然这些病况可能直接或间接地与肥胖症联系起来,但本发明化合物的效果可以是整体或部分经由对体重的效果介导的,或是独立于该效果的。

[0400] 进一步地,所要治疗的疾病是神经退行性疾病如阿兹海默病或帕金森氏病,或如上所述的其他退行性疾病。

[0401] 与GLP-1、胰高血糖素和胃泌酸调节素相比,毒蜥外泌肽-4具有有益的物理化学特性,如溶液中和生理条件下的溶解度和稳定性(包括对于通过酶(如DPP-4或NEP)降解的酶稳定性),这导致了更长的体内作用持续时间。因此,毒蜥外泌肽-4可以起到良好的起始支架的作用,以获得具有双重药理作用或甚至三重药理作用(例如GLP-1/GIP和任选地添加胰高血糖素机制)的毒蜥外泌肽-4类似物。

[0402] 然而,毒蜥外泌肽-4也显示了在化学上不稳定,这是由于其位置14处的甲硫氨酸氧化以及位置28处天冬酰胺的脱氨基化和异构化。因此,可能通过位置14处的甲硫氨酸的取代和对已知易于降解的序列的避免,经过天冬酰胺键的形成(aspartimide formation)而进一步改善稳定性,特别是位置28和29处的Asp-Gly或Asn-Gly。

[0403] 药物组合物

[0404] 术语“药物组合物”表示含有在混合时相容的成分并且能够施用的混合物。药物组

合物可以包含一种或多种药用的药物。此外,药物组合物可以包含载体、缓冲剂、酸化剂、碱化剂、溶剂、佐剂、张度调节剂(tonicity adjusters)、软化剂、膨胀剂(expanders)、防腐剂、物理与化学稳定剂例如表面活性剂、抗氧化剂以及其他组分,无论这些被认为是活性还是非活性成分。可以找到供技术人员制备药物组合物的指导,例如在Remington:The Science and Practice of Pharmacy, (第20版) ed.A.R.Gennaro A.R.,2000,Lippencott Williams & Wilkins,和R.C.Rowe等(Ed),Handbook of Pharmaceutical Excipients, PhP,2013年5月更新。

[0405] 本发明的毒蜥外泌肽-4肽衍生物或其盐是连同可接受的药物载体、稀释剂或赋形剂(其作为药物组合物的一部分)一起施用的。“药学上可接受的载体”是生理学上可接受(例如生理学上可接受的pH)的载体,同时所述载体保持了与其一起施用的物质的治疗特性。标准的可接受的药物载体及其配制物是本领域技术人员已知的,并且在例如如下文献中描述:Remington:The Science and Practice of Pharmacy, (第20版) ed.A.R.Gennaro A.R.,2000,Lippencott Williams & Wilkins,和R.C.Rowe等(Ed),Handbook of Pharmaceutical Excipients,PhP,2013年5月更新。一种示例性的药学上可接受的载体是生理盐水溶液。

[0406] 在一个实施方案中,载体选自下组:缓冲剂(例如柠檬酸盐/柠檬酸)、酸化剂(例如盐酸)、碱化剂(例如氢氧化钠)、防腐剂(例如苯酚)、助溶剂(例如聚乙二醇400)、张度调节剂(例如甘露醇)、稳定剂(例如表面活性剂、抗氧化剂、氨基酸)。

[0407] 使用的浓度在生理学可接受的范围内。

[0408] 可接受的药物载体或稀释剂包括在适合口服、直肠、鼻或胃肠外(包括皮下、肌内、静脉内、皮内以及透皮)施用的配制物中使用的那些。典型的本发明的化合物是胃肠外施用的。

[0409] 术语“药学上可接受的盐”意指本发明化合物的盐,所述盐在哺乳动物中使用时是安全有效的。药学上可接受的盐可以包括但不限于酸加成盐(acid addition salt)和碱式盐。酸加成盐的例子包括氯化物、硫酸盐、硫酸氢盐、磷酸(氢)盐、乙酸盐、柠檬酸盐、甲苯磺酸盐或甲磺酸盐。碱式盐的例子包括具有无机阳离子的盐,例如碱金属或碱土金属的盐,如钠、钾、镁或钙盐;以及具有有机阳离子的盐,如胺盐。药学上可接受的盐的进一步例子在如下文献中描述:Remington:The Science and Practice of Pharmacy, (第20版) ed.A.R.Gennaro A.R.,2000,Lippencott Williams & Wilkins,或Handbook of Pharmaceutical Salts,Properties,Selection and Use,e.d.P.H.Stahl,C.G.Wermuth,2002,Verlag Helvetica Chimica Acta,Zurich,Switzerland与Wiley-VCH,Weinheim,Germany联合出版。

[0410] 术语“溶剂合物”意指本发明化合物或其盐与溶剂分子的复合物,所述溶剂分子例如有机溶剂分子和/或水。

[0411] 在药物组合物中,毒蜥外泌肽-4衍生物可以是单体或寡聚体形式的。

[0412] 术语“治疗上有效量”的化合物意指无毒但足以提供所需效果的量的化合物。需要多少量的式I的化合物来达到所需的生物学效果取决于一些因素,例如选择的具体化合物、预期用途、施用模式和患者的临床情况。在每个个案中合适的“有效”量是本领域普通技术人员可以用常规实验确定的。例如“治疗上有效量”的式(I)的化合物是约0.01-50mg/剂量,

优选为0.1-10mg/剂量。

[0413] 本发明的药物组合物是适于胃肠外(例如皮下、肌内、皮内和静脉内)、口服、直肠、局部和经口(例如舌下)施用的药物组合物,虽然在每个个案中最适合的施用模式依赖于要治疗的病况的性质和严重程度及每个案例中所用的式I化合物的性质。

[0414] 合适的药物组合物可以是分开的单元的形式,例如小瓶或安瓿中的胶囊、片剂和粉剂,其各自含有限定量的化合物;作为粉剂或颗粒;作为水或非水液体中的溶液或悬液(suspension);或作为水包油或油包水乳剂。它可以以单剂量或多剂量的可注射形式提供,例如以笔的形式。如已经提及的,组合物可以通过任何合适的药学方法来制备,所述方法包括使活性成分和载体(可由一种或多种额外成分组成)开始接触的步骤。

[0415] 在一些实施方案中,所述药物组合物可以与用于施用的装置一起提供,例如与注射器、注射笔或自动注射器一起提供。这些装置可以与药物组合物分别提供,或是预先装填所述药物组合物。

[0416] 联合治疗

[0417] 本发明的化合物,GLP-1和GIP受体双重激动剂或GLP-1、GIP和胰高血糖素受体的三重激动剂,能广泛与其他药理上活性的化合物联合,如Rote Liste 2012和/或Rote Liste 2013提到的所有药物,例如与Rote Liste 2012第12章和/或Rote Liste 2013第12章提到的所有抗糖尿病药、Rote Liste 2012第1章和/或Rote Liste 2013第1章提到的所有减肥剂或食欲抑制剂、Rote Liste 2012第58章和/或Rote Liste 2013第58章提到的所有降脂剂、Rote Liste 2012和/或Rote Liste 2013提到的所有降压药和神经保护药、或Rote Liste 2012第36章和/或Rote Liste 2013第36章提到的所有利尿剂联合。

[0418] 活性成分联合特别是可用于在作用上的协同性改善。它们或是能通过分开施用活性成分来应用于患者;或是能以联合产品的形式,其中多数活性成分存在于一个药物制剂中。当通过分开施用来施用所述活性成分时,可以同时或序贯地进行。

[0419] 下文提到的大多数活性成分在USP Dictionary of USAN and International Drug Names,US Pharmacopeia,Rockville 2011中公开。

[0420] 其他适合这种联合的活性物质特别包括例如这样的活性物质,所述活性物质针对一种提到的适应症加强一种或多种活性物质的治疗效果;和/或这样的活性物质,所述活性物质允许减少一种或多种活性物质的剂量。

[0421] 适于联合的治疗剂包括例如抗糖尿病药,如:

[0422] 胰岛素和胰岛素衍生物,例如:Glargine/**Lantus**[®]、270-330U/mL的甘精胰岛素(EP 2387989A)、300U/mL的甘精胰岛素(EP 2387989A)、Glulisin/**Apidra**[®]、Detemir/**Levemir**[®]、Lispro/**Humalog**[®] / **Liprolog**[®]、Degludec/DegludecPlus、天冬胰岛素(Aspart)、基础胰岛素和类似物(例如LY-2605541、LY2963016、NN1436)、聚乙二醇化的胰岛素Lispro、**Humulin**[®]、Linjeta、**SuliXen**[®]、NN1045、胰岛素加Symlin(Insulin plus Symlin)、PE0139、速效和短效胰岛素(例如Linjeta、PH20、NN1218、HinsBet)、(APC-002)水凝胶、口服、吸入、经皮和舌下胰岛素(例如**Exubera**[®]、**Nasulin**[®]、Afrezza、Tregopil、TPM

02、Capsulin、Oral-lyn[®]、Cobalamin[®]口服胰岛素、ORMD-0801、NN1953、NN1954、NN1956、VIAtab、Oshadi口服胰岛素)。其他还包括与白蛋白或另一蛋白质通过双功能接头键合的那些胰岛素衍生物。

[0423] GLP-1、GLP-1类似物和GLP-1受体激动剂,例如:利西拉来(Lixisenatide)/AVE0010/ZP10/Lyxumia、艾塞那肽(Exenatide)/毒蜥外泌肽-4/Byetta/Bydureon/ITCA 650/AC-2993、利拉鲁肽/Victoza、索马鲁肽(Semaglutide)、他司鲁肽(Taspoglutide)、Syncria/阿必鲁肽(Albiglutide)、度拉糖肽(Dulaglutide)、rExendin-4、CJC-1134-PC、PB-1023、TTP-054、Langlenatide/HM-11260C、CM-3、GLP-1Eligen、ORMD-0901、NN-9924、NN-9926、NN-9927、Nodexen、Viador-GLP-1、CVX-096、ZYG-1、ZYD-1、GSK-2374697、DA-3091、MAR-701、MAR709、ZP-2929、ZP-3022、TT-401、BHM-034、MOD-6030、CAM-2036、DA-15864、ARI-2651、ARI-2255、艾塞那肽-XTEN和胰高血糖素-Xten。

[0424] DPP-4抑制剂,例如:阿格列汀(Alogliptin)/Nesina、Trajenta/利拉利汀(Linagliptin)/BI-1356/Ondero/Trajenta/Tradjenta/Trayenta/Tradzenta、沙格列汀(Saxagliptin/Onglyza)、西格列汀(Sitagliptin)/Januvia/Xelevia/Tesave/Janumet/Velmetia、Galvus/维格列汀(Vildagliptin)、阿拉格列汀(Anagliptin)、吉格列汀(Gemigliptin)、替格列汀(Teneligliptin)、美格列汀(Melogliptin)、曲格列汀(Trelagliptin)、DA-1229、奥格列汀(Omarigliptin)/MK-3102、KM-223、埃格列汀(Evogliptin)、ARI-2243、PBL-1427、Pinoxacin。

[0425] SGLT2抑制剂,例如:Invokana/Canagliflozin、Forxiga/Dapagliflozin、Remogliflozin、Sergliflozin、Empagliflozin、Ipragliflozin、Tofogliflozin、Luseogliflozin、LX-4211、Ertugliflozin/PF-04971729、RO-4998452、EGT-0001442、KGA-3235/DSP-3235、LIK066、SBM-TFC-039,

[0426] 双胍类(例如二甲双胍、丁双胍、苯乙双胍)、噻唑烷二酮类(例如吡格列酮(Pioglitazone)、来格列酮(Rivoglitazone)、罗格列酮(Rosiglitazone)、曲格列酮(Troglitazone))、双重PPAR激动剂(例如阿格列扎(Aleglitazar)、莫格他唑(Muraglitazar)、替格列扎(Tesaglitazar))、磺酰脲类(例如甲苯磺丁脲(Tolbutamide)、格列本脲(Glibenclamide)、格列美脲(Glimepiride)/Amaryl、格列吡嗪(Glipizide))、氯茴苯酸类(例如那格列奈(Nateglinide)、瑞格列奈(Repaglinide)、米格列奈(Mitiglinide))、 α -葡萄糖苷酶抑制剂(例如阿卡波糖(Acarbose)、米格列醇(Miglitol)、伏格列波糖(Voglibose))、胰淀素和胰淀素类似物(例如普兰林肽,Symlin)。

[0427] GPR119激动剂(例如GSK-263A、PSN-821、MBX-2982、APD-597、ZYG-19、DS-8500), GPR40激动剂(例如Fasiglifam/TAK-875、TUG-424、P-1736、JTT-851、GW9508)。

[0428] 其他适合的组合搭档是Cycloset、11- β -HSD抑制剂(例如LY2523199、BMS770767、RG-4929、BMS816336、AZD-8329、HSD-016、BI-135585)、葡萄糖激酶激活剂(例如TTP-399、AMG-151、TAK-329、GKM-001)、DGAT抑制剂(例如LCQ-908)、蛋白酪氨酸磷酸酶1抑制剂(例如Trodusquemine)、葡萄糖-6-磷酸酶抑制剂、果糖-1,6-二磷酸酶抑制剂、糖原磷酸化酶抑制剂、磷酸烯醇式丙酮酸羧激酶抑制剂、糖原合成酶激酶抑制剂、丙酮酸脱氢激酶(pyruvate dehydrokinase)抑制剂、 α 2-拮抗剂、CCR-2拮抗剂、SGLT-1抑制剂(例如LX-2761)。

[0429] 一种或多种脂质降低剂也适于作为联合搭档,如例如:HMG-CoA-还原酶抑制剂(例

如辛伐他汀 (Simvastatin)、阿托伐他汀 (Atorvastatin))、贝特类 (例如苯扎贝特 (Bezafibrate)、非诺贝特 (Fenofibrate))、烟酸及其衍生物 (例如Niacin)、PPAR-(α 、 γ 或 α/γ) 激动剂或调节剂 (例如阿格列扎)、PPAR- δ 激动剂、ACAT抑制剂 (例如阿伐麦布 (Avasimibe))、胆固醇吸收抑制剂 (例如Ezetimibe)、胆汁酸结合物质 (例如消胆胺)、回肠胆汁酸转运抑制剂、MTP抑制剂或PCSK9调节剂。

[0430] 升HDL化合物如：CETP抑制剂 (例如Torcetrapib、Anacetrapid、Dalcetrapid、Evacetrapid、JTT-302、DRL-17822、TA-8995) 或ABCI调控剂。

[0431] 其他适合的联合搭档是一种或多种用于治疗肥胖症的活性物质，如例如：西布曲明 (Sibutramine)、特索芬辛 (Tesofensine)、奥利司他 (Orlistat)、大麻素-1受体拮抗剂、MCH-1受体拮抗剂、MC4受体激动剂、NPY5或NPY2拮抗剂 (例如韦利贝特 (Velnepert))、 β -3-激动剂、瘦蛋白或瘦蛋白模拟物、5HT_{2c}受体激动剂 (例如Lorcaserin) 或丁基丙酸苯 (bupropione)/纳曲酮、丁基丙酸苯/唑尼沙胺、丁基丙酸苯/苯丁胺或普兰林肽/美曲普汀的组合。

[0432] 其他合适的联合搭档是：

[0433] 进一步的胃肠肽如肽YY 3-36 (PYY3-36) 或其类似物、胰多肽 (PP) 或其类似物。

[0434] 胰高血糖素受体激动剂或拮抗剂，GIP受体激动剂或拮抗剂，葛瑞林 (ghrelin) 拮抗剂或反向激动剂、类爪蟾肽 (Xenin) 及其类似物。

[0435] 此外，具有影响高血压、慢性心力衰竭或动脉粥样硬化的药物的组合，所述药物如例如：血管紧张素II受体拮抗剂 (例如替米沙坦、坎地沙坦 (candesartan)、缬沙坦 (valsartan)、洛沙坦 (losartan)、依普沙坦 (eprosartan)、厄贝沙坦 (irbesartan)、奥美沙坦 (olmesartan)、他索沙坦 (tasosartan)、阿齐沙坦 (azilsartan))、ACE抑制剂、ECE抑制剂、利尿剂、 β -阻断剂、钙拮抗剂、中枢作用高血压药 (centrally-acting hypertensives)、 α -2-肾上腺素能受体拮抗剂、中性肽链内切酶抑制剂、凝血细胞聚集抑制剂等或其组合是合适的。

[0436] 在另一个方面，本发明涉及根据本发明的化合物或其生理学上可接受的盐与至少一种上述作为联合搭档的活性物质进行联合用于制备适用于治疗或预防疾病或病况的药物的用途，所述疾病或病况能受到对GLP-1和胰高血糖素受体的结合和对它们活性的调节的影响。优选地，这是代谢综合征背景下的疾病，特别是上述列出的疾病或病况中的一种，最尤其是糖尿病或肥胖症或其并发症。

[0437] 根据本发明的化合物或其生理学上可接受的盐与一种或多种活性物质的联合使用可以同时、分开或序贯地进行。

[0438] 根据本发明的化合物或其生理学上可接受的盐与另一种活性物质的联合使用可以同时或在错开的时间进行，但尤其要在短时间间隔内进行。如果将它们同时施用，则将两种活性物质一起给予患者；如果将它们在错开的时间施用，则将两种活性物质在少于或等于12小时的时期内给予患者，但尤其要少于或等于6小时。

[0439] 因而，在另一个方面，本发明涉及一种药物，其包含根据本发明的化合物或其生理学上可接受的盐和作为联合搭档的上述活性物质中的至少一种，任选地连同一种或多种惰性载体和/或稀释剂。

[0440] 根据本发明的化合物或其生理学上可接受的盐或溶剂合物以及要与之联合的额

外的活性物质,可以一起都存在于一种配制物中,所述配制物例如片剂或胶囊;或是分别在两种相同或不同的配制物中,所述配制物例如所谓的分部试剂盒(kit-of-parts)。

附图说明

[0441] 图1:在饮食诱导肥胖(DIO)的雌性C57BL/6NCr1小鼠中,每天一次以3 μ g/kg和10 μ g/kg s.c.施用化合物SEQ ID NO:11在3周的慢性治疗之后对于体重的作用。数据为平均值 $\pm$ SEM。

[0442] 图2:在饮食诱导肥胖(DIO)的雌性C57BL/6NCr1小鼠中,每天一次以3 μ g/kg和10 μ g/kg s.c.施用化合物SEQ ID NO:11在3周的慢性治疗之后对于体重的作用。体重变化以距基线的相对变化计算。数据为平均值 $\pm$ SEM。

[0443] 图3:在糖尿病dbdb小鼠中用SEQ ID NO:11以3和10 μ g/kg s.c.处理4周对于非空腹葡萄糖的作用,以距基线(0mmol/l,-7天)的变化表示。数据为平均值+SEM。

[0444] 图4:在糖尿病dbdb小鼠中用SEQ ID NO:11以3和10 μ g/kg s.c.处理4周对于HbA1c的作用,以距基线(0%,-7天)的变化表示。数据为平均值+SEM。

[0445] 图5:在糖尿病dbdb小鼠中用SEQ ID NO:11以3和10 μ g/kg s.c.处理4周对于口服葡萄糖耐量的作用,以距基线(t=0min,0mmol/l,即将施用葡萄糖之前)的变化表示。数据为平均值+SEM。

[0446] 图6:糖尿病dbdb小鼠中用SEQ ID NO:11以3和10 μ g/kg s.c.处理4周对于口服葡萄糖耐量的作用,以葡萄糖曲线下面积(葡萄糖-AUC)表示。数据为平均值+SEM。

[0447] 图7:在非空腹的雌性糖尿病dbdb小鼠中用SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:12和SEQ ID NO:15以3 μ g/kg s.c.处理对于降葡萄糖的作用,以距基线的变化表示。数据为平均值+SEM。

[0448] 图8:在雌性NMRI小鼠中以1、10和100 μ g/kg s.c.施用化合物SEQ ID NO:11对于胃排空和肠通过率的作用。数据为平均值+SEM。

[0449] a) $\rightarrow$ 胃排空

[0450] b) $\rightarrow$ 相对于小肠长度的小肠通过率。

[0451] 方法

[0452] 采用的略缩语如下:

[0453] AA 氨基酸

[0454] cAMP 环单磷酸腺苷

[0455] Boc 叔丁氧羰基

[0456] BOP (苯并三唑-1-基氧基)三(二甲氨基)磷鎓六氟磷酸酯

[0457] BSA 牛血清白蛋白

[0458] tBu 叔丁基

[0459] Dde 1-(4,4-二甲基-2,6-二氧代环亚己基)-乙基

[0460] ivDde 1-(4,4-二甲基-2,6-二氧代环亚己基)3-甲基-丁基

[0461] DIC N,N'-二异丙基碳二亚胺

[0462] DIPEA N,N-二异丙基乙胺

[0463] DMEM 达尔伯克氏改良伊格尔氏培养基(Dulbecco's modified Eagle's medium)

- [0464] DMF 二甲基甲酰胺
- [0465] EDT 乙二硫醇 (ethanedithiol)
- [0466] FA 甲酸
- [0467] FBS 胎牛血清
- [0468] Fmoc 芴甲氧羰基 (fluorenylmethyloxycarbonyl)
- [0469] HATU 0-(7-氮杂苯并三唑-1-基)-N,N,N',N'-四甲基脒鎓六氟磷酸酯
- [0470] HBSS Hanks' 平衡盐溶液
- [0471] HBTU 2-(1H-苯并三唑-1-基)-1,1,3,3-四甲基-脒鎓六氟磷酸酯
- [0472] HEPES 2-[4-(2-羟乙基)哌嗪-1-基]乙磺酸
- [0473] HOBt 1-羟基苯并三唑
- [0474] HOSu N-羟基琥珀酰亚胺
- [0475] HPLC 高效液相色谱
- [0476] HTRF 均相时间分辨荧光
- [0477] IBMX 3-异丁基-1-甲基黄嘌呤
- [0478] LC/MS 液相色谱/质谱法
- [0479] Palm 棕榈酰基
- [0480] PBS 磷酸盐缓冲盐水
- [0481] PEG 聚乙二醇
- [0482] PK 药代动力学
- [0483] RP-HPLC 反相高效液相色谱
- [0484] Stea 硬脂酰基
- [0485] TFA 三氟乙酸
- [0486] Trt 三苯甲基
- [0487] UV 紫外线
- [0488] 肽化合物的一般合成
- [0489] 材料:
- [0490] 不同的Rink-氨基树脂(4-(2',4'-二甲氧基苯基-Fmoc-氨基甲基)-苯氧基乙酰胺基-正亮氨酸基氨基甲基树脂,Merck Biosciences;4-[(2,4-二甲氧基苯基)(Fmoc-氨基)甲基]苯氧基乙酰胺基甲基树脂,Agilent Technologies)用于肽酰胺的合成,其负荷在0.3-0.4mmol/g范围内。
- [0491] 受Fmoc保护的天然氨基酸购自Protein Technologies Inc.、Senn Chemicals、Merck Biosciences、Novabiochem、Iris Biotech或Bachem。在合成过程中自始至终使用了下列标准氨基酸:Fmoc-L-Ala-OH、Fmoc-Arg (Pbf) -OH、Fmoc-L-Asn (Trt) -OH、Fmoc-L-Asp (OtBu) -OH、Fmoc-L-Cys (Trt) -OH、Fmoc-L-Gln (Trt) -OH、Fmoc-L-Glu (OtBu) -OH、Fmoc-Gly-OH、Fmoc-L-His (Trt) -OH、Fmoc-L-Ile-OH、Fmoc-L-Leu-OH、Fmoc-L-Lys (Boc) -OH、Fmoc-L-Met-OH、Fmoc-L-Phe-OH、Fmoc-L-Pro-OH、Fmoc-L-Ser (tBu) -OH、Fmoc-L-Thr (tBu) -OH、Fmoc-L-Trp (Boc) -OH、Fmoc-L-Tyr (tBu) -OH、Fmoc-L-Val-OH。
- [0492] 此外,如下特殊氨基酸购自上述相同的供应商:Fmoc-L-Lys (ivDde) -OH、Fmoc-L-Lys (Mmt) -OH、Fmoc-Aib-OH、Fmoc-D-Ser (tBu) -OH、Fmoc-D-Ala-OH、Boc-L-His (Boc) -OH(可

以作为甲苯溶剂合物获得)和Boc-L-His(Trt)-OH。

[0493] 在例如Prelude Peptide Synthesizer(Protein Technologies Inc)或类似的自动化合成仪上用标准Fmoc化学法和HBTU/DIPEA激活进行固相肽合成。用DMF作为溶剂。去保护:20%哌啶/DMF,进行2x 2.5min。洗涤:7x DMF。偶联2:5:10200mM AA/500mM HBTU/2M DIPEA在DMF中进行2x 20min。洗涤:5x DMF。

[0494] 当Lys侧链经修饰时,将Fmoc-L-Lys(ivDde)-OH或Fmoc-L-Lys(Mmt)-OH用于相应的位置中。合成完成后,根据改良的文献步骤(S.R.Chhabra等,Tetrahedron Lett.39,(1998),1603),用4%水合肼在DMF中的溶液将ivDde基团除去。通过用1%TFA在二氯甲烷中的溶液重复处理,将Mmt基团除去。随后通过用所需酸的N-羟基琥珀酰亚胺酯处理树脂或是通过用偶联试剂如HBTU/DIPEA或HOBt/DIC,以进行酰化。

[0495] 用King's切割混合剂将所有已合成的肽从树脂切下,所述混合剂由82.5%TFA、5%苯酚、5%水、5%茴香硫醚、2.5%EDT组成。然后将粗制的肽在二乙醚或二异丙醚中沉淀,离心并冻干。通过分析型HPLC来分析所述肽,并通过ESI质谱法进行核查。通过常规制备型HPLC纯化步骤来纯化粗制的肽。

[0496] 分析型HPLC/UPLC

[0497] 方法A:在Waters UPLC系统上,用Waters UPLC HSS 1.7 μ m C18柱(2.1x 100mm),于40℃以流速为0.5mL/min的梯度洗脱来进行分析型HPLC/UPLC,并在215和280nm进行监测。梯度设为在15min内10%B至90%B,然后90%B 1min;或设为在12.5min内5%B至50%B,然后在3min内50%B至90%B。缓冲剂A(Buffer A)=0.1%甲酸在水中的溶液,而B=0.1%甲酸在乙腈中的溶液。

[0498] 用Waters LCT Premier Time-of-Flight仪器作为质量分析器,其配有阳离子模式的电喷雾。

[0499] 方法B:在210-225nm处监测,任选地偶联到Waters LCT Premier质量分析器上,电喷雾阳离子模式

[0500] 柱:Waters ACQUITY UPLC[®] CSH[™] C18 1.7 μ m (150x 2.1mm),于50℃

[0501] 溶剂:H₂O+0.5%TFA:ACN+0.35%TFA(流速0.5ml/min)

[0502] 梯度:80:20(0min)至80:20(3min)至25:75(23min)至2:98(23.5min)至2:98(30.5min)至80:20(31min)至80:20(37min)

[0503] 方法C:在215nm处检测

[0504] 柱:Aeris Peptide,3.6 μ m,XB-C18(250x 4.6mm),于60℃

[0505] 溶剂:H₂O+0.1%TFA:ACN+0.1%TFA(流速1.5ml/min)

[0506] 梯度:90:10(0min)至90:10(3min)至10:90(43min)至10:90(48min)至90:10(49min)至90:10(50min)

[0507] 方法D:在214nm处检测

[0508] 柱:Waters X-Bridge C18 3.5 μ m 2.1x 150mm

[0509] 溶剂:H₂O+0.5%TFA:ACN(流速0.55ml/min)

[0510] 梯度:90:10(0min)至40:60(5min)至1:99(15min)

[0511] 方法E:在210-225nm处检测,任选地偶联到Waters LCT Premier质量分析器上,电喷雾阳离子模式。

[0512] 柱:Waters ACQUITY UPLC® BEH™C18 1.7μm (250x 4.6mm), 于50℃

[0513] 溶剂:H₂O+1%FA:ACN+1%FA (流速0.9ml/min)

[0514] 梯度:95:5 (0min) 至95:5 (2min) 至35:65 (3min) 至65:35 (23.5min) 至5:95 (24min) 至95:5 (26min) 至95:5 (30min)。

[0515] 一般制备型HPLC纯化步骤:

[0516] 将粗制的肽或者在Äkta Purifier System上或者在Jasco semiprep HPLC System上进行纯化。根据要纯化的粗制肽的量,使用不同大小和不同流速的制备型RP-C18-HPLC柱。采用乙腈+0.05至0.1%TFA (B) 和水+0.05至0.1%TFA (A) 作为洗脱液。或者使用由乙腈和水以及少量乙酸组成的缓冲体系。收集含有产物的部分并冻干,以获得纯化的产物,通常是作为TFA或乙酸盐。

[0517] 毒蜥外泌肽-4衍生物的溶解度和稳定性测试

[0518] 测试一批肽的溶解度和稳定性之前,先确定其含量。因此,研究了两种参数,其纯度(HPLC-UV) 和该批次的盐负载量(离子色谱法)。

[0519] 对于溶解度测试,靶浓度为1.0mg/mL纯化合物。因此,在不同的缓冲体系中,基于之前确定的含量从固体样品制备溶液,其浓度为1.0mg/mL化合物。在温和搅拌2h后,从上清进行HPLC-UV,所述上清是通过以4000rpm离心20min获得的。

[0520] 然后通过与UV峰面积进行对比来确定溶解度,所述UV峰面积是用纯水中浓度为2mg/mL的肽储液或可变量的乙腈(所有化合物均溶解的光学对照(optical control))获得的。这种分析也起到稳定性测试起点(t0)的作用。

[0521] 对于稳定性测试,为溶解度获得的上清的等分试样在25℃储存7天。在这个时间过程后,将样品在4000rpm离心20min,并用HPLC-UV分析上清。

[0522] 为了进行剩余肽量的确定,按照如下等式将靶化合物在t0和t7的峰面积进行比较,得到“%剩余肽”:

[0523] $\% \text{剩余肽} = [(\text{峰面积肽} t_7) \times 100] / \text{峰面积肽} t_0$

[0524] 从所有观察到的杂质的峰面积之和的减少与t0处观察到的峰面积之和的比较来计算可溶性降解产物(degradation products)的量(即确定新形成的肽相关种类的量)。这个值按照与t0处初始肽量的百分率关系来给出,按照如下等式:

[0525] $\% \text{可溶性降解产物} = \{[(\text{杂质峰面积之和} t_7) - (\text{杂质峰面积之和} t_0)] \times 100\} / \text{峰面积肽} t_0$

[0526] “%剩余肽”和“%可溶性降解产物”之和与100%的潜在差距反映了在应激条件下没有保持可溶的肽的量,按照如下等式:

[0527] $\% \text{沉淀物} = 100 - (\% \text{剩余肽}) + (\% \text{可溶性降解产物})$

[0528] 该沉淀物包括不可溶降解产物、聚合物和/或原纤维,其已经通过离心从分析去除。

[0529] 化学稳定性以“%剩余肽”表示。

[0530] 阴离子色谱法

[0531] 仪器:Dionex ICS-2000,预/柱(pre/column):Ion Pac AG-18 2x 50mm (Dionex) / AS18 2x 250mm (Dionex),洗脱液:水性氢氧化钠,流速:0.38mL/min,梯度:0-6min:22mM

KOH, 6-12min: 22-28mM KOH, 12-15min: 28-50mM KOH, 15-20min: 22mM KOH, 抑制器 (suppressor): ASRS 300 2mm, 检测: 电导率 (conductivity)。

[0532] 用方法D或E作为HPLC/UPLC方法。

[0533] GIP受体、GLP-1受体和胰高血糖素受体效力的体外细胞测定

[0534] 通过功能测定法来确定化合物对受体的激动作用, 所述测定法测量稳定表达人GIP、GLP-1或胰高血糖素受体的HEK-293细胞系的cAMP响应。

[0535] 用来自Cisbio Corp. (产品编号: 62AM4PEC) 的试剂盒, 基于HTRF (均相时间分辨荧光) 来确定细胞的cAMP含量。为了制备, 将细胞分入T175培养瓶并在培养基 (DMEM/10%FBS) 中过夜生长至接近汇合状态 (confluency)。然后除去培养基, 并用无钙和镁的PBS洗涤细胞, 然后用accutase酶 (Sigma-Aldrich, 产品编号A6964) 进行蛋白酶处理。洗涤脱离的细胞并将其重悬于测定缓冲液 (1x HBSS; 20mM HEPES, 0.1% BSA, 2mM IBMX) 中, 并确定细胞密度。然后将其稀释至400000细胞/ml, 并将25 μ l的等分试样分装至96孔板的孔中。为了测量, 将25 μ l的测试化合物在测定缓冲液中的溶液添加到孔中, 然后室温温育30分钟。添加稀释于裂解缓冲液 (试剂盒组分) 中的HTRF试剂后, 将平板温育1小时, 然后测量665/620nm处的荧光比。通过检测引起最大响应的50%激活的浓度 (EC50) 来对激动剂的体外效力进行量化。

[0536] 用于在小鼠和猪中量化毒蜥外泌肽-4衍生物的生物分析筛选方法

[0537] 小鼠接受1mg/kg的皮下 (s.c.) 给药。将小鼠处死 (sacrificed) 并在施用后0.25、0.5、1、2、4、8、16和24小时后收集血样。蛋白质沉淀后经由液相色谱质谱法 (LC/MS) 分析血浆样品。用5.2.1版WinonLin (非房室模型) 计算PK参数和半衰期。

[0538] 雌性Göttinger小型猪接受0.1mg/kg的皮下 (s.c.) 给药。在施用后0.25、0.5、1、2、4、8、24、32、48、56和72小时后收集血样。蛋白质沉淀后经由液相色谱质谱法 (LC/MS) 分析血浆样品。用5.2.1版WinonLin (非房室模型) 计算PK参数和半衰期。

[0539] 小鼠中的胃排空和肠通过率

[0540] 使用体重在20-30g的雌性NMRI小鼠。使小鼠适应圈养条件至少1周。

[0541] 使小鼠禁食过夜, 而始终保持水的供应。在研究当日将小鼠称重, 单独笼养, 并允许其能接触500mg的饲料30min, 而水则被移除。在30min饲喂期结束时饲料保持已移除, 并进行称重。然后, 同时施用测试化合物/参比化合物或其在对照组中的载体 (vehicle)。60min后, 为了让化合物达到相关的血浆暴露, 通过强饲法 (gavage) 将着色的、非热量的推注 (bolus) 灌注 (instilled) 到胃中。再过30min后, 处死动物, 并准备好胃和小肠。将已填满的胃称重, 排空, 小心清洁, 并干燥和再次称重。以填满的重量减去排空胃的重量来计算胃内容物, 说明胃排空的程度。不用力地将小肠缕直, 并测量其长度。然后测量从肠的胃开端至肠内容物推注到达的最远端的距离。按照后者距离和小肠总长度的比来给出肠通过率。

[0542] 统计学分析是用Everstat 6.0通过单因素方差分析来进行的, 然后是Dunnnett's作为事后检验 (post-hoc test)。Dunnnett's检验应用于比较与载体对照的对比。在 $p < 0.05$ 的水平的差异被认为是统计学显著的。

[0543] 小鼠中对食物摄入的自动化评估

[0544] 使用体重在20-30g的雌性NMRI小鼠。使小鼠适应圈养条件至少1周, 并且在评估设备中单独笼养至少1天, 此时同时记录基本数据。在研究当天, 在接近熄灯阶段 (lights-off

phase) (熄灯12h)皮下施用测试产品,并且随后立即启动饲料消耗评估。评估包括在22小时内连续的监测,并将每30min期间的数据处理成平均值。在数天之内重复这个操作是可能的。将评估限制至22小时是出于实践上的理由,以允许在操作之间对动物再次称重,再次填喂饲料和施用水和药物。结果可以评估为22小时内的积累数据,或是差别化至30min的间隔。从雌性和雄性小鼠都能获得相当的数据。

[0545] 统计学分析是用Everstat 6.0通过对重复测量的双因素方差分析和Dunnett's事后分析来进行的。在 $p < 0.05$ 的水平的差异被认为是统计学显著的。

[0546] 在饮食诱导的肥胖(DIO) C57BL/6NCr1雌性小鼠中,毒蜥外泌肽-4衍生物在皮下治疗后对于血糖和体重的急性和亚慢性效果

[0547] 高脂肪饮食18周(方法1)

[0548] 使雌性C57BL/6NCr1小鼠以小组圈养在特殊的无病原体屏障设施中,进行12h光照/黑暗循环,能自由接触水和高脂肪饮食。高脂肪饮食18周后,将小鼠分层至治疗组($n = 8$),以使每组具有相似的平均体重。

[0549] 包括了年龄一致、能任意接触标准食物的组作为标准对照组。

[0550] 在实验之前,用载体溶液皮下(s.c.)注射小鼠并称重,进行3天,以使其适应该过程。

[0551] (1) 在饲养的DIO小鼠中对于血糖的急性效果:在即将首次施用(s.c.)载体(磷酸盐缓冲溶液)或毒蜥外泌肽-4衍生物之前取得初始血样,所述毒蜥外泌肽-4衍生物分别是以10、30和100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (溶于磷酸盐缓冲液中)的剂量施用的。施用体积为5mL/kg。动物在实验期间能接触到水和它们各自的饮食,在血液采样的所有时间点均对食物消耗进行确定。在 $t = 0.5\text{h}$ 、 $t = 1\text{h}$ 、 $t = 2\text{h}$ 、 $t = 4\text{h}$ 、 $t = 6\text{h}$ 、 $t = 8\text{h}$ 和 $t = 24\text{h}$ 处测量血糖水平(方法:d-葡萄糖己糖激酶、溶血产物、AU640Beckman Coulter)。血液采样通过无麻醉尾部切口进行。

[0552] (2) 对于体重的亚慢性效果:每日下午,在光照阶段(光照12h)结束时或用载体或用毒蜥外泌肽-4衍生物按上述剂量s.c.处理所有动物一次,进行4周。每日记录体重。在第6和第28天,用Bruker minispec (Ettlingen, Germany)通过核磁共振(NMR)来测量总脂肪量。

[0553] 用高脂肪饮食预饲喂14周(方法2)

[0554] 使雌性C57BL/6NCr1小鼠以小组圈养在特殊的无病原体屏障设施中,进行12h光照/黑暗循环,能自由接触水和高脂肪饮食。高脂肪饮食14周后,将小鼠分层至治疗组($n = 8$),以使每组具有相似的平均体重。

[0555] 包括了年龄一致、能任意接触标准食物和水的组作为标准对照组。

[0556] 在实验之前,用载体溶液皮下(s.c.)注射小鼠并称重,进行3天,以使其适应该过程。

[0557] 对于体重的亚慢性效果:每日下午早些时候,在光照阶段(LD 12:12)结束时或用载体或用毒蜥外泌肽-4衍生物按上述剂量s.c.处理所有动物一次,进行3周。每日记录体重。

[0558] 统计学分析是用Everstat 6.0通过重复测量双因素方差分析和Dunnett's事后检验(葡萄糖谱)和单因素方差分析,继之以Dunnett's事后检验(体重、体脂肪)来进行的。与载体处理的DIO对照小鼠对比的差异在 $p < 0.05$ 的水平被认为是统计学显著的。

[0559] 雌性瘦蛋白受体缺乏的糖尿病db/db小鼠中,毒蜥外泌肽-4衍生物在皮下处理后

对血糖和HbA1c的急性和亚慢性效果(方法3)

[0560] 雌性BKS.Cg-m+/+Leprdb/J (db/db) 和BKS.Cg-m+/+Leprdb/+ (瘦的对照) 小鼠从Charles River Laboratories, Germany获得, 所述小鼠年龄在9-10周。使动物以小组圈养在特殊的无病原体屏障设施中, 进行12h光照/黑暗循环, 能自由接触水和啮齿类标准食物。适应一周后, 从尾部无麻醉取血样, 并确定血糖(方法: d-葡萄糖己糖激酶, 溶血产物, AU640 Beckman Coulter) 和HbA1c(方法: 溶血产物, Cobas6000c501, Roche Diagnostics, Germany) 水平。

[0561] HbA1c是血红蛋白的糖基化形式, 其水平反映了红细胞在它的生存期间所暴露于的葡萄糖的平均水平。在小鼠中HbA1c是过往4周期间平均血糖水平的相关生物标记物(小鼠中红细胞寿命~47天)。

[0562] 将db/db小鼠分层至治疗组(n=8), 以使每个组具有相似的基线血糖和HbA1c水平。

[0563] (1) db/db小鼠中对于血糖的急性效果: 在即将首次施用(s.c.) 载体(磷酸盐缓冲溶液) 或毒蜥外泌肽-4衍生物之前取得初始血样, 所述毒蜥外泌肽-4衍生物分别是以3、10和100 μ g/kg (溶于磷酸盐缓冲液中) 的剂量施用的。施用体积为5mL/kg。动物在实验期间能接触到水和食物, 在血液采样的所有时间点均对食物消耗进行确定。在t=0.5h、t=1h、t=2h、t=4h、t=6h、t=8h和t=24h处测量血糖水平。血液采样通过无麻醉尾部切口进行。从雌性和雄性小鼠都能获得相当的数据。

[0564] (2) 对于血糖和HbA1c的亚慢性效果: 每日下午, 在光照阶段(光照12h) 结束时或用载体或用毒蜥外泌肽-4衍生物按上述剂量s.c. 处理所有动物一次, 进行4周。在研究结束时分析血样(尾部, 无麻醉) 的葡萄糖和HbA1c。从雌性和雄性小鼠都能获得相当的数据。

[0565] 统计学分析是用Everstat 6.0通过重复测量双因素方差分析和Dunnett's事后分析来进行的。与载体处理的db/db对照小鼠对比的差异在p<0.05的水平, 被认为是统计学显著的。

[0566] 在雌性糖尿病dbdb小鼠中, 4周的处理对于葡萄糖、HbA1c和口服葡萄糖耐量的效果(方法4)

[0567] 使用8周龄雌性糖尿病dbdb小鼠, 所述小鼠具有14.5mmol/l的平均非空腹葡萄糖值和37-40g的体重。将小鼠各自单独进行标记, 并使其适应于圈养条件至少1周。

[0568] 研究开始7周前确定非空腹葡萄糖和HbA1c的基线值; 研究开始5天前。根据其HbA1c值将小鼠分配到组和笼(每笼5只小鼠, 每组10只), 以确保组间较高值和较低值的均匀分布(层化)。

[0569] 通过每日一次在黑暗阶段(6pm至6am) 前3小时皮下施用, 将小鼠处理4周。在研究第21天从尾尖切口获得血样用于HbA1c, 并且在第4周内评估口服葡萄糖耐量。口服葡萄糖耐量测试在上午进行, 并且没有额外的在先化合物施用, 以主要评估慢性治疗和较少急性化合物施用的效果。在口服施用葡萄糖(2g/kg, t=0min) 前使小鼠禁食4小时。在施用葡萄糖之前和之后15、30、60、90、120和180min处采集血液。在最后一次采血之后恢复喂食。结果表示为距基线的变化、以mmol/l计的葡萄糖和以%计的HbA1c。

[0570] 统计学分析是用Everstat 6.0基于SAS通过单因素方差分析进行的, 然后是对比载体对照的Dunnett's事后检验。差异在p<0.05的水平, 被认为是统计学显著的。

[0571] 非空腹的雌性糖尿病dbdb小鼠的葡萄糖降低

[0572] 使用雌性糖尿病dbdb小鼠,所述小鼠具有20-22mmol/l的非空腹葡萄糖值和42g $\pm$ 0.6g (SEM) 的体重。将小鼠各自单独进行标记,并使其适应于圈养条件至少1周。

[0573] 在研究开始前3-5天根据其非空腹葡萄糖值将小鼠分配到组和笼(每笼4只小鼠,每组8只,对照组16),以确保组间较高值和较低值的均匀分布(层化)。在研究当天,将小鼠称重并给药($t=0$)。临化合物施用前将饲料移除,而保留水处于可获得状态,并在尾部切口处抽取第一次血样(基线)。进一步的血样分别在30、60、90、120、240、360和480min于尾部切口处抽取。

[0574] 统计学分析是用Everstat 6.0基于SAS通过重复测量的双因素方差分析进行的,然后是对比载体对照的Dunnett's事后检验。差异在 $p<0.05$ 的水平,被认为是统计学显著的。

实施例

[0575] 本发明进一步通过如下实施例来阐释。

[0576] 实施例1:

[0577] SEQ ID NO:8的合成

[0578] 在Novabiochem Rink-Amide树脂(4-(2',4'-二甲氧基苯基-Fmoc-氨基甲基)-苯氧基乙酰胺基-正亮氨酸基氨基甲基树脂)、100-200目(mesh)、0.34mmol/g的装载量(loading)上进行固相合成。用HBTU/DIPEA-激活来应用Fmoc-合成策略。将N-Boc-4-(Fmoc-氨基)哌啶-4-羧酸用作位置20处的氨基酸。将位置1处的Boc-Tyr(tBu)-OH和位置14处的Fmoc-Lys(ivDde)-OH用于固相合成方案中。根据改良的文献步骤(S.R.Chhabra等, Tetrahedron Lett.39, (1998), 1603),用4%水合肼在DMF中的溶液从树脂上的肽切割ivDde-基团。此后将Palm-Glu(γ O Su)-OtBu偶联到脱去束缚的氨基基团。用King's混合剂(D.S.King,C.G.Fields,G.B.Fields,Int.J.Peptide Protein Res.36,1990,255-266)从树脂将肽切下。通过制备型HPLC在Waters柱(Sunfire,Prep C18)上用乙腈/水梯度(二者都用0.05%TFA缓冲)来纯化粗制产品。通过LCMS(方法B)分析纯化的肽。对在保留时间为12.69min的峰下发现的质量信号(mass signals)进行的解卷积(deconvolution)揭示了肽质量为4618.71,其与预期值4619.21是一致的。

[0579] 实施例2:

[0580] SEQ ID NO:11的合成

[0581] 在Novabiochem Rink-Amide树脂(4-(2',4'-二甲氧基苯基-Fmoc-氨基甲基)-苯氧基乙酰胺基-正亮氨酸基氨基甲基树脂)、100-200目、0.34mmol/g的装载量上进行固相合成。用HBTU/DIPEA-激活来应用Fmoc-合成策略。将位置1处的Boc-Tyr(tBu)-OH、位置14处的Fmoc-Lys(ivDde)-OH和位置20处的Fmoc-(S)-MeLys(Boc)-OH用于固相合成方案中。根据改良的文献步骤(S.R.Chhabra等, Tetrahedron Lett.39, (1998), 1603),用4%水合肼在DMF中的溶液从树脂上的肽切割ivDde-基团。此后将Palm-Glu(γ O Su)-OtBu偶联到脱去束缚的氨基基团。用King's混合剂(D.S.King,C.G.Fields,G.B.Fields,Int.J.Peptide Protein Res.36,1990,255-266)从树脂将肽切下。通过制备型HPLC在Waters柱(Sunfire,Prep C18)上用乙腈/水梯度(二者都用0.05%TFA缓冲)来纯化粗制产品。通过LCMS(方法B)

分析纯化的肽。对在保留时间为12.88min的峰下发现的质量信号进行的解卷积揭示了肽质量为4634.66,其与预期值4635.25是一致的。

[0582] 实施例3:

[0583] SEQ ID NO:15的合成

[0584] 在Novabiochem Rink-Amide树脂(4-(2',4'-二甲氧基苯基-Fmoc-氨基甲基)-苯氧基乙酰胺基-正亮氨酸基氨基甲基树脂)、100-200目、0.34mmol/g的装载量上进行固相合成。用HBTU/DIPEA-激活来应用Fmoc-合成策略。将位置1处的Boc-Tyr(tBu)-OH和位置14处的Fmoc-Lys(ivDde)-OH和位置20处的Fmoc- α -甲基-鸟氨酸(Boc)-OH用于固相合成方案中。根据改良的文献步骤(S.R.Chhabra等,Tetrahedron Lett.39,(1998),1603),用4%水合肼在DMF中的溶液从树脂上的肽切割ivDde-基团。此后将Palm-Glu(γ O Su)-OtBu偶联到脱去束缚的氨基基团。用King's混合剂(D.S.King,C.G.Fields,G.B.Fields,Int.J.Peptide Protein Res.36,1990,255-266)从树脂将肽切下。通过制备型HPLC在Waters柱(Sunfire, Prep C18)上用乙腈/水梯度(二者都用0.1%TFA缓冲)来纯化粗制产品。通过LCMS(方法B)分析纯化的肽。通过LCMS(方法B)分析纯化的肽。对在保留时间为12.90min的峰下发现的质量信号进行的解卷积揭示了肽质量为4603.64,其与预期值4604.24是一致的。

[0585] 在类似的方法中,合成和表征(方法A-E)了如下肽SEQ ID NO:8-17,见表5。

[0586] 表5:合成的肽的列表和计算的分子量对发现的分子量的对比。

[0587]

SEQ ID NO:	计算的质量	发现的质量
8	4619.2	4618.7
9	4635.2	4634.8
10	4621.2	4621.1
11	4635.2	4635.1

[0588]

12	4649.3	4648.0
13	4634.3	4633.6
14	4649.3	4648.9
15	4604.2	4603.6
16	4548.2	4547.4
17*	4252.7	4251.7

[0589] *非酰化的比较化合物

[0590] 实施例4:化学稳定性和溶解度

[0591] 按照上述方法评估肽化合物的溶解度和化学稳定性。结果在表6中给出。

[0592] 表6:化学稳定性和溶解度

[0593]

SEQ ID NO:	稳 定 性 (pH4.5) [%]	稳 定 性 (pH7.4) [%]	溶 解 性 (pH4.5)[μg/ml]	溶解性 (pH7.4) [μg/ml]
1 (毒蜥外泌肽-4)	100.0	77.5	933.6	1000
8	93.0	93.0	>1000	>1000
11	100.0	99.0	964.2	899.8
12	98.0	91.0	>1000	983.0
15	98.0	98.0	>1000	>1000

[0594] 实施例5:对GLP-1、GIP和胰高血糖素受体的体外数据

[0595] 通过将表达人胰高血糖素受体 (hGLUC R)、人GIP受体 (hGIP R) 和人GLP-1受体 (hGLP-1R) 的细胞暴露于渐增浓度的所列出的化合物并按上述方法测量所形成的cAMP,来确定肽化合物在GLP-1、GIP和胰高血糖素受体处的效力。

[0596] 对人GIP受体 (hGIP R)、人GLP-1受体 (hGLP-1R) 和人胰高血糖素受体 (hGLUC R) 有活性的人毒蜥外泌肽-4衍生物的结果在表7中显示。

[0597] 表7. 毒蜥外泌肽-4肽类似物对GLP-1、GIP和胰高血糖素受体的EC50值 (以pM表示)

[0598]

SEQ ID NO:	EC50 hGIP R[pM]	EC50 hGLP-1 R	EC50 hGLUC R
------------	-----------------	---------------	--------------

[0599]

		[pM]	[pM]
8	16.3	4.7	34700.0
9	93.2	13.5	>1000000
10	7.1	4.9	10400.0
11	7.0	5.1	3160.0
12	27.0	11.6	1.3
13	33.1	13.6	202.0
14	4.5	7.2	4730.0
15	8.9	16.1	4.0
16	2.5	4.1	19800.0

[0600] 对比测试

[0601] 对于在位置14处包含官能化的氨基酸的创造性的毒蜥外泌肽-4衍生物的选择,已对比在这个位置14处具有“非官能化”的氨基酸的相应化合物进行了测试。参考的配对化合物和在GLP-1和GIP受体处相应的EC50值 (以pM表示) 在表8中给出。如其所示,创造性的毒蜥外泌肽-4衍生物显示出比在位置14处具有“非官能化”氨基酸的化合物优越的活性。

[0602] 表8. 在位置14处包含非官能化的氨基酸的毒蜥外泌肽-4衍生物相对于在位置14处包含官能化的氨基酸的毒蜥外泌肽-4衍生物的比较。对GLP-1和GIP受体的EC50以pM表示。(K=赖氨酸,L=亮氨酸,γ E-x53=(S)-4-羧基-4-十六酰基氨基-丁酰基)

[0603]	SEQ ID NO:	EC50 hGIPR [pM]	EC50 hGLP-1R [pM]	位置 14 处的 残基
	11	7.0	5.1	K(γ E-x53)
	17	163	5.9	L

[0604] 实施例6:药代动力学测试

[0605] 用上述方法确定药代动力学概貌。计算出的 $T_{1/2}$ 和 C_{max} 值在表9中显示。

[0606] 表9. 毒蜥外泌肽-4衍生物的药代动力学概貌

[0607]

	小鼠 (1mg/kg)	小型猪 (0.1mg/kg)
--	-------------	----------------

[0608]

SEQ ID NO:	$T_{1/2}$ [h]	C_{max} [ng/ml]	$T_{1/2}$ [h]	C_{max} [ng/ml]
11	4.3	5940	12.6	302
15	2.9	3740		

[0609] 实施例7:饮食诱导肥胖 (DIO) 的雌性C57BL/6Ncr1小鼠 (预先饲喂14周高脂饮食, 方法2) 中SEQ ID NO:11在皮下处理后对体重的亚慢性作用

[0610] 每天一次在下午早些时候光照期 (12h亮灯) 结束前, 用 $3\mu\text{g/kg}$ 和 $10\mu\text{g/kg}$ 的SEQ ID NO:11或载体皮下处理雌性肥胖C57BL/6Ncr1小鼠3周。每天记录体重。

[0611] 用SEQ ID NO:11处理降低了体重, 而高脂饮食对照组的体重甚至增加了 (图1和表10)。计算距基线值的体重相对变化揭示了剂量依赖性的体重降低, 分别对于 $3\mu\text{g/kg}$ 达到7.6%, 而对于 $10\mu\text{g/kg}$ 达到17.4% (图2)。

[0612] 表10.3周治疗期DIO小鼠的体重变化 (平均值 $\pm$ SEM)

[0613]

示例 (剂量)	总体重变化 (g)
对照标准饮食	$+0.3 \pm 0.2$
对照高脂饮食	$+2.7 \pm 0.3$
SEQ ID NO:11 ($3\mu\text{g/kg}$)	-3.2 ± 0.6
SEQ ID NO:11 ($10\mu\text{g/kg}$)	-6.8 ± 0.7

[0614] 实施例8:在糖尿病雌性dbdb小鼠中用SEQ ID NO:11处理4周对葡萄糖、HbA1c和口服葡萄糖耐量的作用 (方法4)。

[0615] 雌性dbdb小鼠历时4周每天一次皮下接受3和 $10\mu\text{g/kg}$ 的SEQ ID NO:11或磷酸盐缓冲盐水 (载体对照)。SEQ ID NO:11在3和 $10\mu\text{g/kg}$ 剂量处与载体对照相比统计学显著地降低了非空腹葡萄糖 (图3)。

[0616] 同样地, 与载体对照相比, SEQ ID NO:11在3和 $10\mu\text{g/kg}$ 剂量处都以统计学显著的方式预防了HbA1c增加 (图4; $p < 0.05$, 单因素方差分析, 然后是Dunnett's事后检验)。

[0617] 与载体对照相比, 用SEQ ID NO:11处理导致口服葡萄糖耐量改进 (以标准化至在0min处的0mmol/l来表示; 图5), 并且在3和 $10\mu\text{g/kg}$ 处葡萄糖曲线下的AUC减少达到了统计学显著 (图6; $p < 0.05$, 单因素方差分析, 然后是Dunnett's事后检验)。

[0618] 实施例9:在非空腹的糖尿病雌性dbdb小鼠中SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:12和SEQ

ID NO:15对葡萄糖降低的作用

[0619] 雌性dbdb小鼠在0min时间处皮下接受3 μ g/kg的SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:12和SEQ ID NO:15或磷酸盐缓冲盐水(载体对照)。所有三种化合物立即降低了葡萄糖值(基线在20-22mmol/l处),分别地,在240min处,SEQ ID NO:11和SEQ ID NO:12达到 $\sim$ 11mmol/l的葡萄糖降低的最大作用,而SEQ ID NO:15达到 $\sim$ 12mmol/l的葡萄糖降低最大作用,并持续到480min处的观察结束时(图7)。

[0620] 从t=60min直到观察结束,与载体对照相比,全部三个化合物达到了统计学显著的葡萄糖降低($p<0.05$,重复测量的二因素方差分析,然后是Dunnett's事后检验)。

[0621] 实施例10:SEQ ID NO:11在雌性NMRI小鼠中对于胃排空和肠通过率的作用

[0622] 重量为平均25-30g的雌性NMRI小鼠皮下接受1、10和100 μ g/kg的SEQ ID NO:11,或磷酸盐缓冲盐水(载体对照),30分钟之后施用着色的推注。30min后,进行胃内容物和肠通过率的评估(图8)。

[0623] 在雌性和雄性小鼠中都得到了相当的数据。

[0624] 在这些研究中,SEQ ID NO:11将肠通过率分别减少了44、68和69% ($p<0.0001$),并将剩余胃内容物分别增加了17、97和106% ($p<0.0001$ 对比载体对照,单因素方差分析,然后是Dunnett's事后检验)。

[0625] 表11:序列

[0626]

SEQ ID NO:	序列
1	H-G-E-G-T-F-T-S-D-L-S-K-Q-M-E-E-E-A-V-R-L-F-I-E-W-L-K-N-G-G-P-S-S-G-A-P-P-P-S-NH ₂
2	H-A-E-G-T-F-T-S-D-V-S-S-Y-L-E-G-Q-A-A-K-E-F-I-A-W-L-V-K-G-R-NH ₂

[0627]

3	H-A-E-G-T-F-T-S-D-V-S-S-Y-L-E-G-Q-A-A-K(γ E-x53)-E-F-I-A-W-L-V-R-G-R-G
4	Y-A-E-G-T-F-I-S-D-Y-S-I-A-M-D-K-I-H-Q-Q-D-F-V-N-W-L-L-A-Q-K-G-K-K-N-D-W-K-H-N-I-T-Q
5	H-S-Q-G-T-F-T-S-D-Y-S-K-Y-L-D-S-R-R-A-Q-D-F-V-Q-W-L-M-N-T
6	Y-G-E-G-T-F-T-S-D-L-S-I-Q-M-E-E-E-A-V-R-L-F-I-E-W-L-K-N-G-G-P-S-S-G-A-P-P-P-S-NH ₂
7	Y-A-E-G-T-F-T-S-D-V-S-I-Y-L-E-G-Q-A-A-K-E-F-I-A-W-L-V-K-G-R-NH ₂
8	Y-Aib-E-G-T-F-T-S-D-L-S-I-Q-K(γ E-x53)-E-E-R-A-A-Pip-E-F-I-E-W-L-K-N-T-G-P-S-S-G-A-P-P-P-S-NH ₂
9	Y-Aib-E-G-T-F-T-S-D-L-S-I-Q-K(γ E-x53)-E-E-R-A-A-(R)MeLys-E-F-I-E-W-L-K-N-T-G-P-S-S-G-A-P-P-P-S-NH ₂
10	Y-Aib-E-G-T-F-T-S-D-L-S-I-Q-K(γ E-x53)-E-E-R-A-A-(S)MeOrn-E-F-I-E-W-L-K-N-T-G-P-S-S-G-A-P-P-P-S-NH ₂
11	Y-Aib-E-G-T-F-T-S-D-L-S-I-Q-K(γ E-x53)-E-E-R-A-A-(S)MeLys-E-F-I-E-W-L-K-N-T-G-P-S-S-G-A-P-P-P-S-NH ₂
12	Y-Aib-Q-G-T-F-T-S-D-L-S-K-Q-K(γ E-x70)-D-E-Q-R-A-(S)MeLys-E-F-I-E-W-L-K-S-G-G-P-S-S-G-A-P-P-P-S-NH ₂
13	Y-Aib-Q-G-T-F-T-S-D-L-S-I-Q-K(γ E-x70)-D-E-Q-R-A-(R)MeLys-E-F-I-E-W-L-K-S-G-G-P-S-S-G-A-P-P-P-S-NH ₂
14	Y-Aib-E-G-T-F-T-S-D-L-S-I-Q-K(γ E-x70)-D-E-R-A-A-(S)MeLys-E-F-I-E-W-L-K-N-T-G-P-S-S-G-A-P-P-P-S-NH ₂
15	Y-Aib-Q-G-T-F-T-S-D-L-S-I-Q-K(γ E-x70)-D-E-Q-R-A-(S)MeOrn-E-F-I-E-W-L-K-A-G-G-P-S-S-G-A-P-P-P-S-NH ₂
16	Y-Aib-E-G-T-F-T-S-D-L-S-I-Q-K(γ E-x53)-E-E-R-A-A-(S)MeLys-E-F-I-E-W-L-K-A-G-G-P-S-S-G-A-P-P-P-S-NH ₂
17	Y-Aib-E-G-T-F-T-S-D-L-S-I-Q-L-E-E-R-A-A-(S)MeLys-E-F-I-E-W-L-K-N-T-G-P-S-S-G-A-P-P-P-S-NH ₂

序列表

<110> 赛诺菲
<120> GLP1/GIP 双重激动剂或 GLP1/GIP/胰高血糖素三重激动剂

<130> DE2012/179

<150> EP12306647.4

<151> 2012-12-21

<160> 17

<170> PatentIn 版本 3.5

<210> 1

<211> 39

<212> PRT

<213> 钝尾毒蜥

<220>

<221> MOD_RES

<222> (39)..(39)

<223> 酰胺化的 C 末端

<400> 1

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

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

[0001]

Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser
35

<210> 2

<211> 30

<212> PRT

<213> 人

<220>

<221> MOD_RES

<222> (30)..(30)

<223> 酰胺化的 C 末端

<400> 2

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

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

<210> 3

<211> 31

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工多肽

<220>

<221> MOD_RES

<222> (20)..(20)

<223> 在 N6 处用(S)-4-羧基-4-十六酰基氨基-丁酰基衍生化的 Lys

<400> 3

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

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

<210> 4

<211> 42

<212> PRT

<213> 人

<400> 4

Tyr Ala Glu Gly Thr Phe Ile Ser Asp Tyr Ser Ile Ala Met Asp Lys
1 5 10 15

Ile His Gln Gln Asp Phe Val Asn Trp Leu Leu Ala Gln Lys Gly Lys
20 25 30

Lys Asn Asp Trp Lys His Asn Ile Thr Gln
35 40

<210> 5

<211> 29

<212> PRT

<213> 人

[0002]

<400> 5

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

Arg Arg Ala Gln Asp Phe Val Gln Trp Leu Met Asn Thr
20 25

<210> 6

<211> 39

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工多肽

<220>

<221> MOD_RES

<222> (39)..(39)

<223> 酰胺化的 C 末端

<400> 6

Tyr Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Ile Gln Met Glu Glu
1 5 10 15

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

Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser
35

<210> 7
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 人工多肽

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (30)..(30)
 <223> 酰胺化的 C 末端

<400> 7

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

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

<210> 8
 <211> 39
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 人工多肽

[0003]

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (2)..(2)
 <223> 2-甲基丙氨酸

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (14)..(14)
 <223> 在 N6 处用(S)-4-羧基-4-十六酰基氨基-丁酰基衍生化的 Lys

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (20)..(20)
 <223> Xaa 是 4-氨基哌啶-4-羧酸

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (39)..(39)
 <223> 酰胺化的 C 末端

<400> 8

Tyr Ala Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Ile Gln Lys Glu Glu
 1 5 10 15

Arg Ala Ala Xaa Glu Phe Ile Glu Trp Leu Lys Asn Thr Gly Pro Ser
 20 25 30

Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser
 35

<210> 9
 <211> 39
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
<223> 人工多肽

<220>
<221> MOD_RES
<222> (2)..(2)
<223> 2-甲基丙氨酸

<220>
<221> MOD_RES
<222> (14)..(14)
<223> 在 N6 处用 (S)-4-羧基-4-十六酰基氨基-丁酰基衍生化的 Lys

<220>
<221> MOD_RES
<222> (20)..(20)
<223> (R)- α -甲基赖氨酸

<220>
<221> MOD_RES
<222> (39)..(39)
<223> 酰胺化的 C 末端

<400> 9

Tyr Ala Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Ile Gln Lys Glu Glu
1 5 10 15

Arg Ala Ala Lys Glu Phe Ile Glu Trp Leu Lys Asn Thr Gly Pro Ser
20 25 30

[0004]

Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser
35

<210> 10
<211> 39
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工多肽

<220>
<221> MOD_RES
<222> (2)..(2)
<223> 2-甲基丙氨酸

<220>
<221> MOD_RES
<222> (14)..(14)
<223> 在 N6 处用 (S)-4-羧基-4-十六酰基氨基-丁酰基衍生化的 Lys

<220>
<221> MOD_RES
<222> (20)..(20)
<223> Xaa 是 (S)- α -甲基鸟氨酸

<220>
<221> MOD_RES
<222> (39)..(39)
<223> 酰胺化的 C 末端

<400> 10

Tyr Ala Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Ile Gln Lys Glu Glu
1 5 10 15

Arg Ala Ala Xaa Glu Phe Ile Glu Trp Leu Lys Asn Thr Gly Pro Ser
20 25 30

Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser
35

<210> 11
<211> 39
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工多肽

<220>
<221> MOD_RES
<222> (2)..(2)
<223> 2-甲基丙氨酸

<220>
<221> MOD_RES
<222> (14)..(14)
<223> 在 N6 处用(S)-4-羧基-4-十六酰基氨基-丁酰基衍生化的 Lys

<220>
<221> MOD_RES
<222> (20)..(20)
<223> (S)- α -甲基赖氨酸

<220>
<221> MOD_RES
<222> (39)..(39)
<223> 酰胺化的 C 末端

[0005]

<400> 11

Tyr Ala Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Ile Gln Lys Glu Glu
1 5 10 15

Arg Ala Ala Lys Glu Phe Ile Glu Trp Leu Lys Asn Thr Gly Pro Ser
20 25 30

Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser
35

<210> 12
<211> 39
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工多肽

<220>
<221> MOD_RES
<222> (2)..(2)
<223> 2-甲基丙氨酸

<220>
<221> MOD_RES
<222> (14)..(14)
<223> 在 N6 处用(S)-4-羧基-4-十八酰基氨基-丁酰基衍生化的 Lys

<220>
<221> MOD_RES

<222> (20)..(20)
 <223> (S)- α -甲基赖氨酸

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (39)..(39)
 <223> 酰胺化的 C 末端

<400> 12

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

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

Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser
 35

<210> 13
 <211> 39
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 人工多肽

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (2)..(2)
 <223> 2-甲基丙氨酸

[0006]

<230>
 <221> MOD_RES
 <222> (14)..(14)
 <223> 在 N6 处用(S)-4-羧基-4-十八酰基氨基-丁酰基衍生化的 Lys

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (20)..(20)
 <223> (R)- α -甲基赖氨酸

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (39)..(39)
 <223> 酰胺化的 C 末端

<400> 13

Tyr Ala Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Ile Gln Lys Asp Glu
 1 5 10 15

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

Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser
 35

<210> 14
 <211> 39
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 人工多肽

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (2)..(2)
 <223> 2-甲基丙氨酸

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (14)..(14)
 <223> 在 N6 处用 (S)-4-羧基-4-十八酰基氨基-丁酰基衍生化的 Lys

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (20)..(20)
 <223> (S)- α -甲基赖氨酸

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (39)..(39)
 <223> 酰胺化的 C 末端

<400> 14

Tyr Ala Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Ile Gln Lys Asp Glu
 1 5 10 15

Arg Ala Ala Lys Glu Phe Ile Glu Trp Leu Lys Asn Thr Gly Pro Ser
 20 25 30

Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser
 35

[0007]

<210> 15
 <211> 39
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 人工多肽

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (2)..(2)
 <223> 2-甲基丙氨酸

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (14)..(14)
 <223> 在 N6 处用 (S)-4-羧基-4-十八酰基氨基-丁酰基衍生化的 Lys

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (20)..(20)
 <223> Xaa is (S)- α -甲基鸟氨酸

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (39)..(39)
 <223> 酰胺化的 C 末端

<400> 15

Tyr Ala Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Ile Gln Lys Asp Glu
 1 5 10 15

Gln Arg Ala Xaa Glu Phe Ile Glu Trp Leu Lys Ala Gly Gly Pro Ser
 20 25 30

Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser
35

<210> 16
<211> 39
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工多肽

<220>
<221> MOD_RES
<222> (2)..(2)
<223> 2-甲基丙氨酸

<220>
<221> MOD_RES
<222> (14)..(14)
<223> 在 N6 处用(S)-4-羧基-4-十六酰基氨基-丁酰基衍生化的 Lys

<220>
<221> MOD_RES
<222> (20)..(20)
<223> (S)- α -甲基赖氨酸

<220>
<221> MOD_RES
<222> (39)..(39)
<223> 酰胺化的 C 末端

<400> 16

[0008]

Tyr Ala Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Ile Gln Lys Glu Glu
1 5 10 15

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

Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser
35

<210> 17
<211> 39
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工多肽

<220>
<221> MOD_RES
<222> (2)..(2)
<223> 2-甲基丙氨酸

<220>
<221> MOD_RES
<222> (20)..(20)
<223> (S)- α -甲基赖氨酸

<220>
<221> MOD_RES
<222> (39)..(39)
<223> 酰胺化的 C 末端

<400> 17

	Tyr	Ala	Glu	Gly	Thr	Phe	Thr	Ser	Asp	Leu	Ser	Ile	Gln	Leu	Glu	Glu
	1				5				10					15		
[0009]	Arg	Ala	Ala	Lys	Glu	Phe	Ile	Glu	Trp	Leu	Lys	Asn	Thr	Gly	Pro	Ser
				20					25					30		
	Ser	Gly	Ala	Pro	Pro	Pro	Ser									
				35												

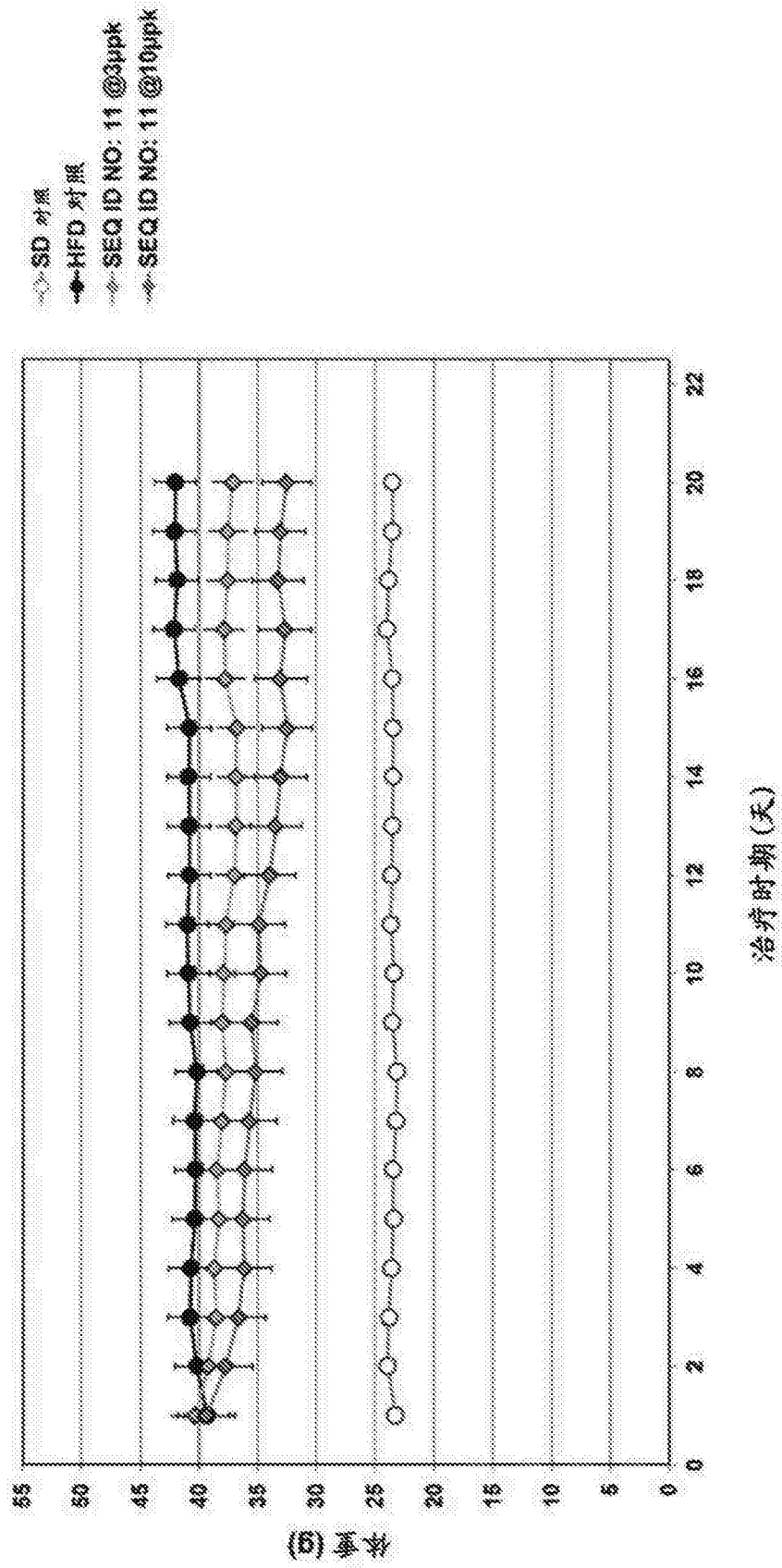


图1

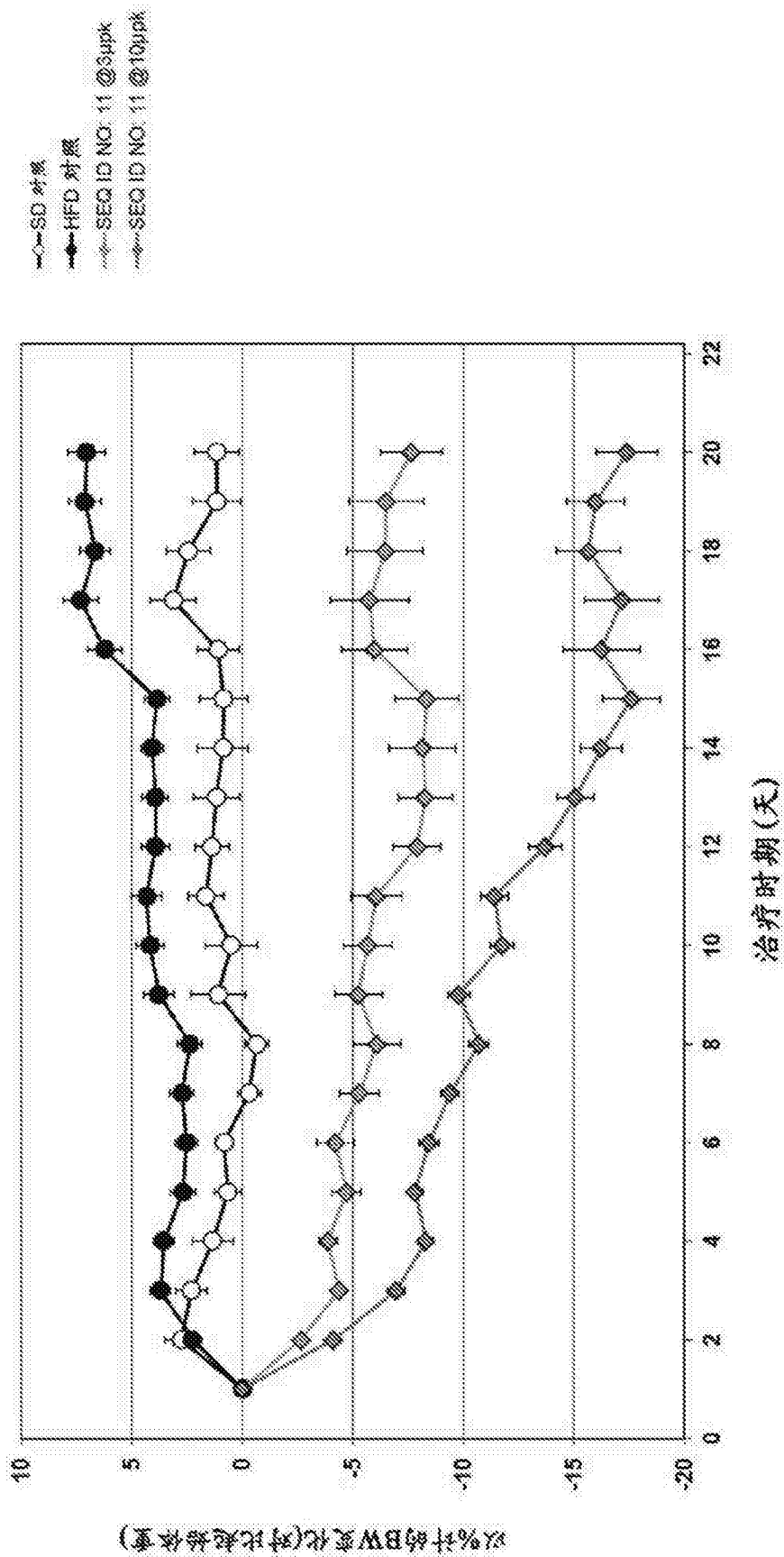


图2

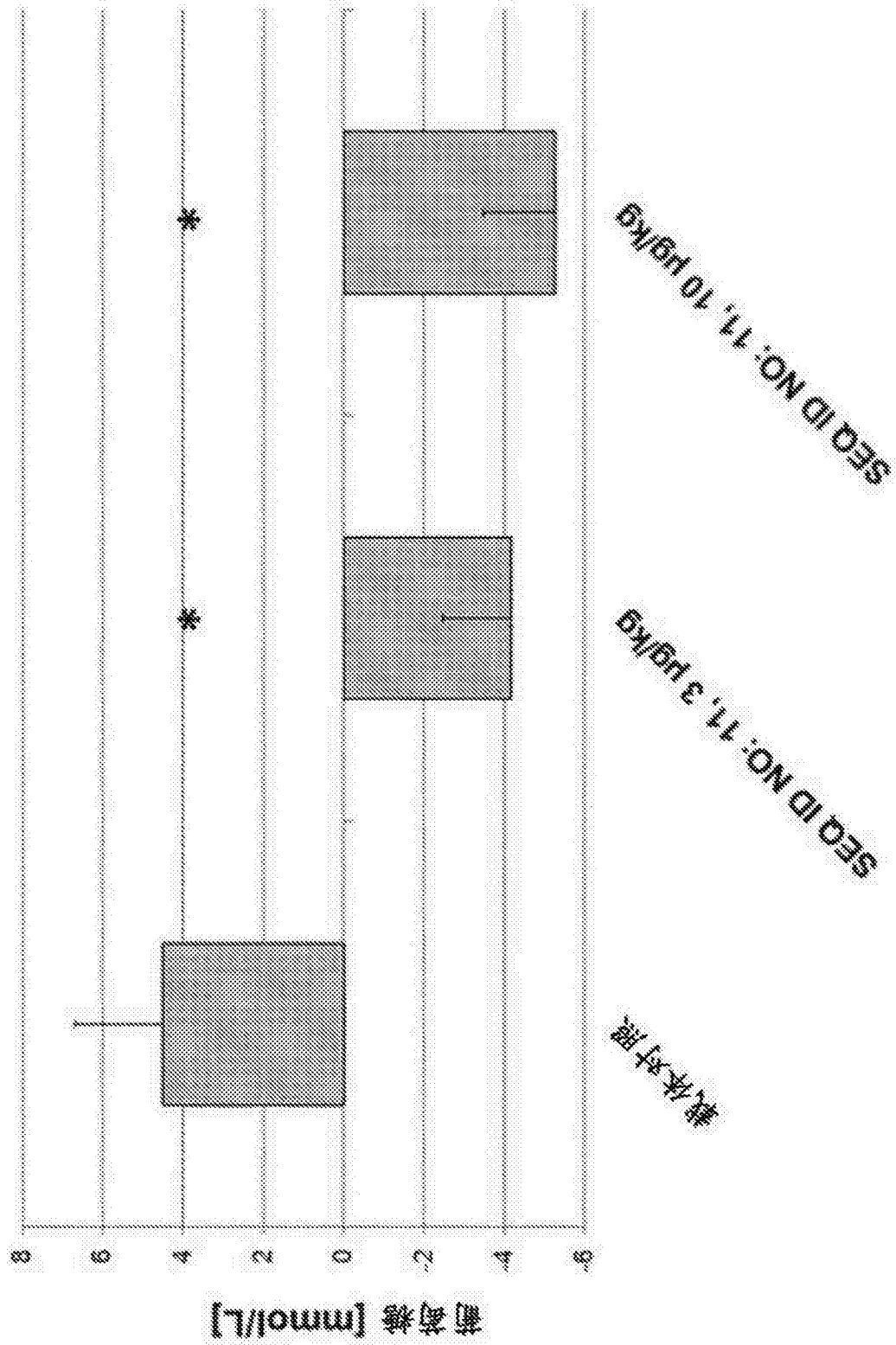


图3

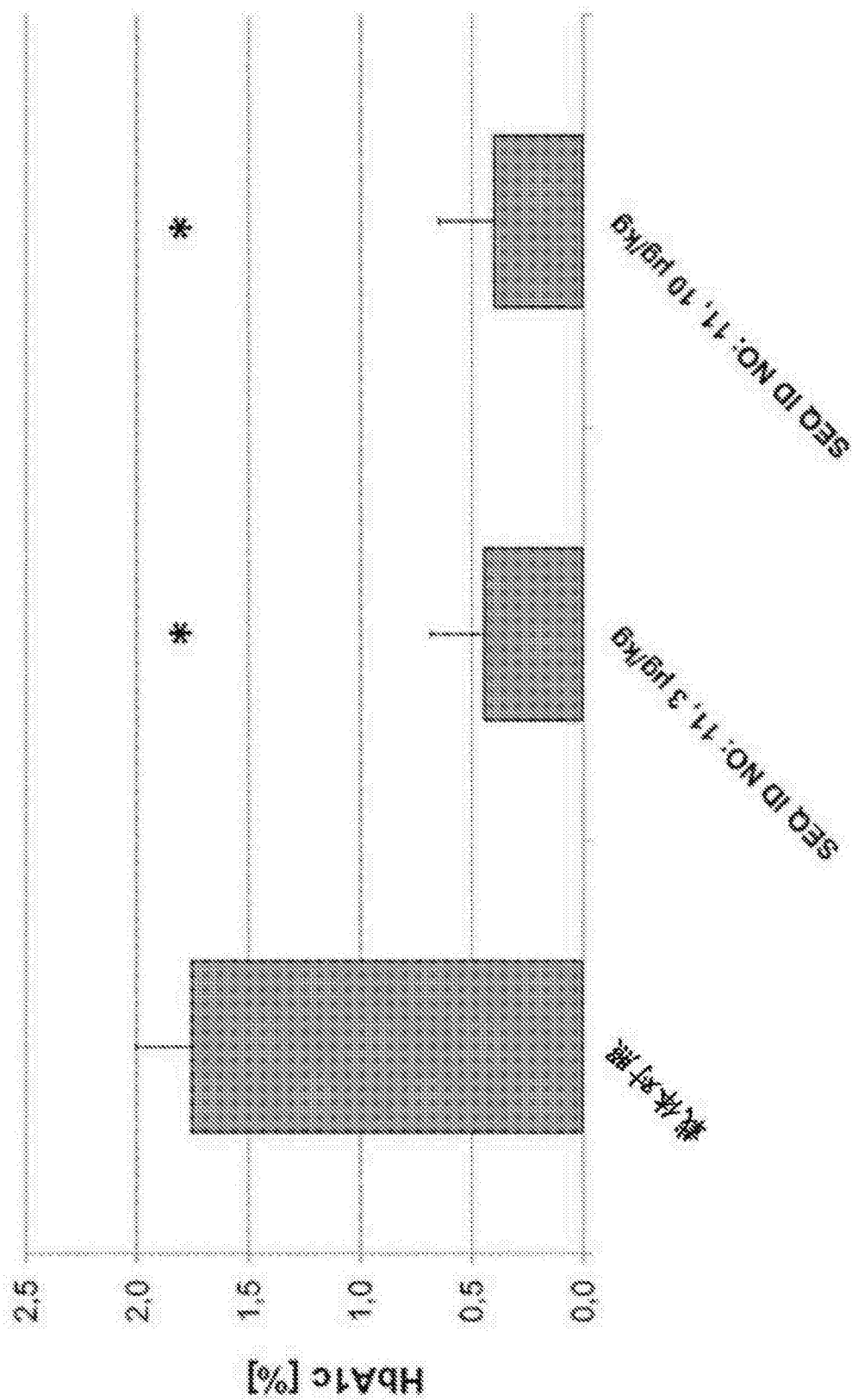


图4

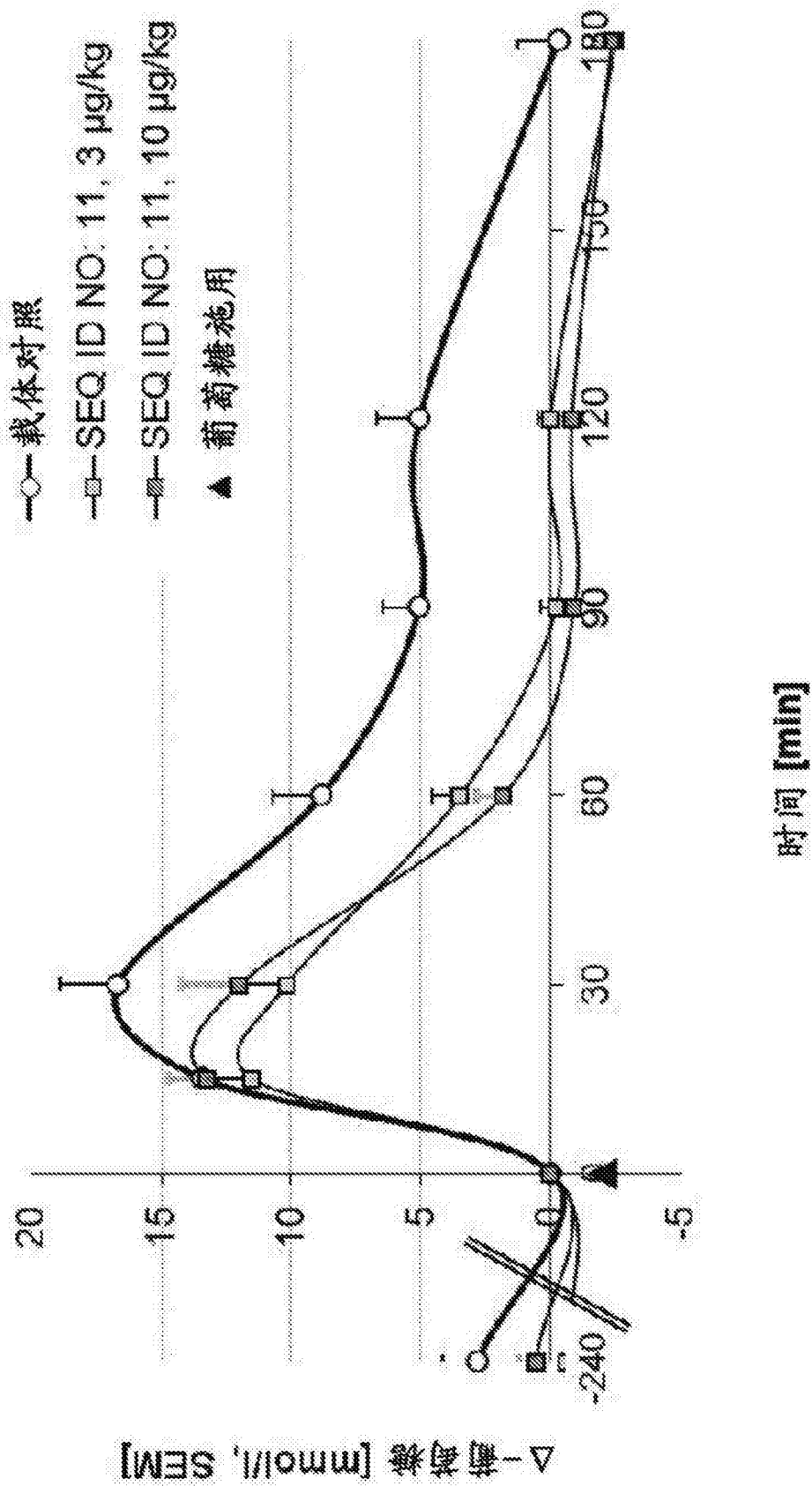


图5

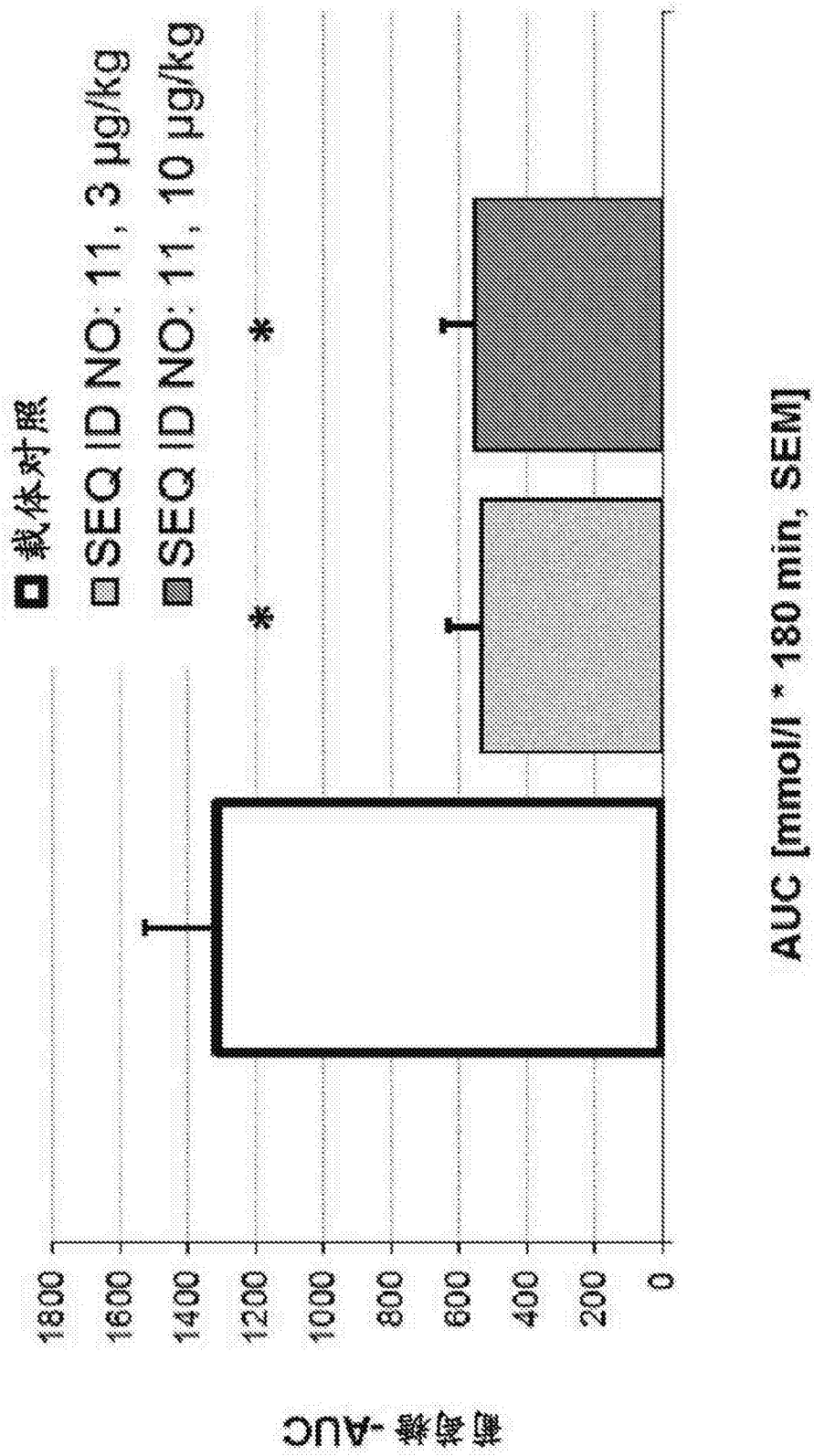


图6

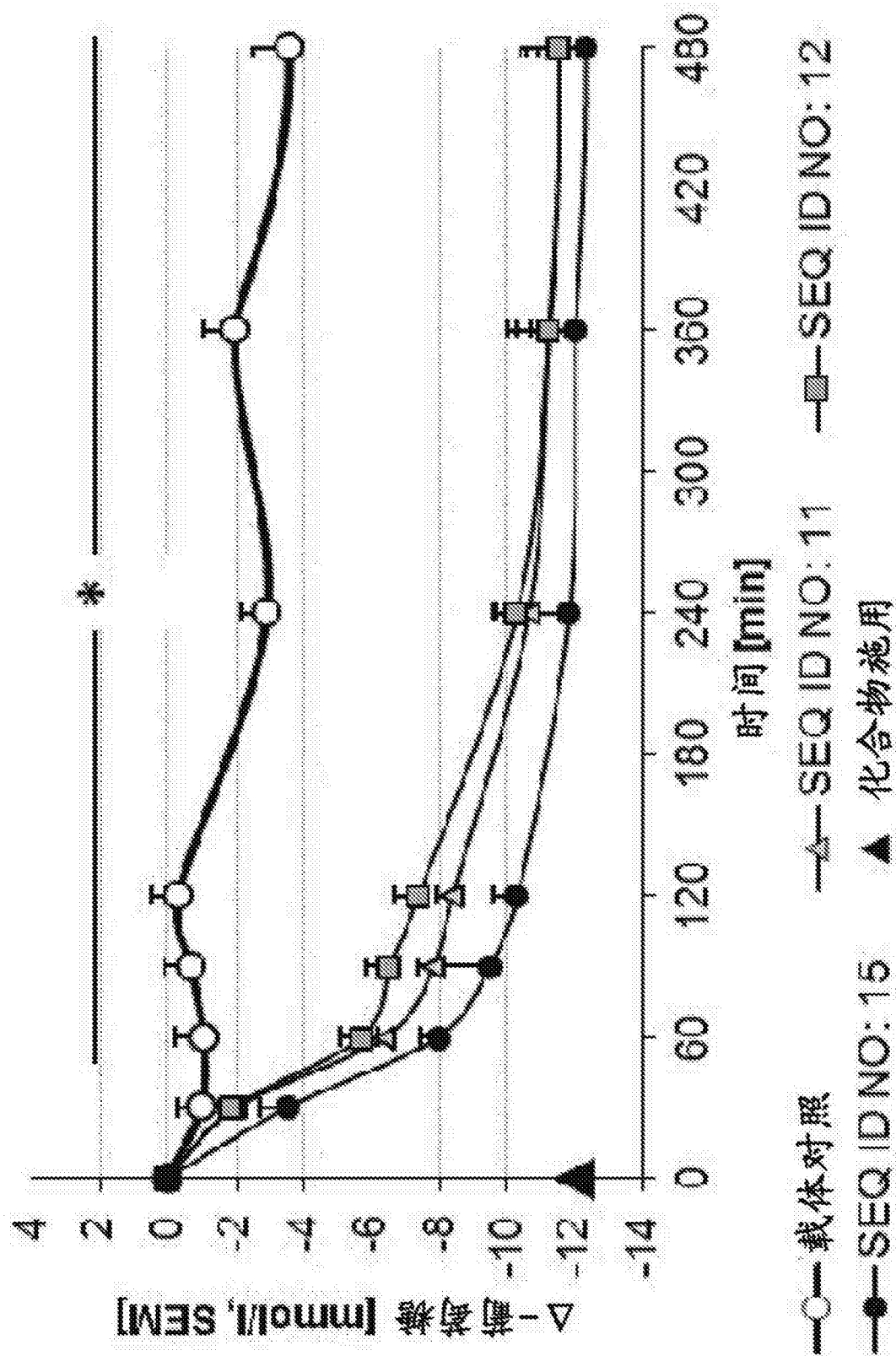
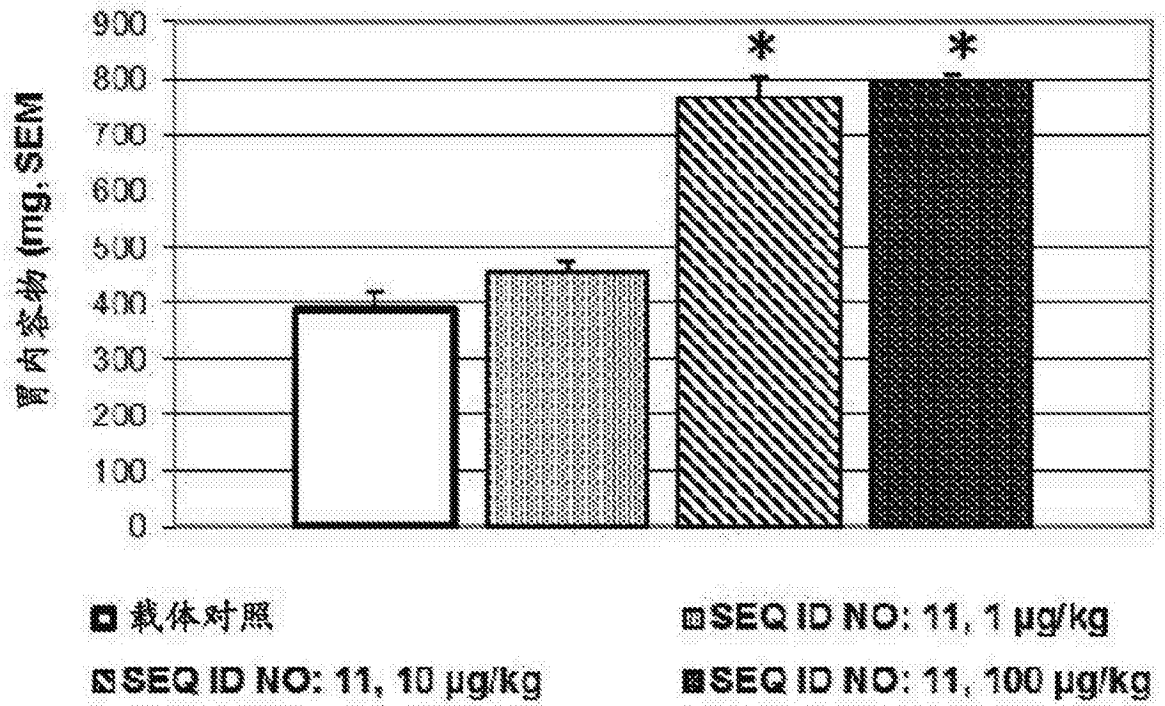


图7

a)



b)

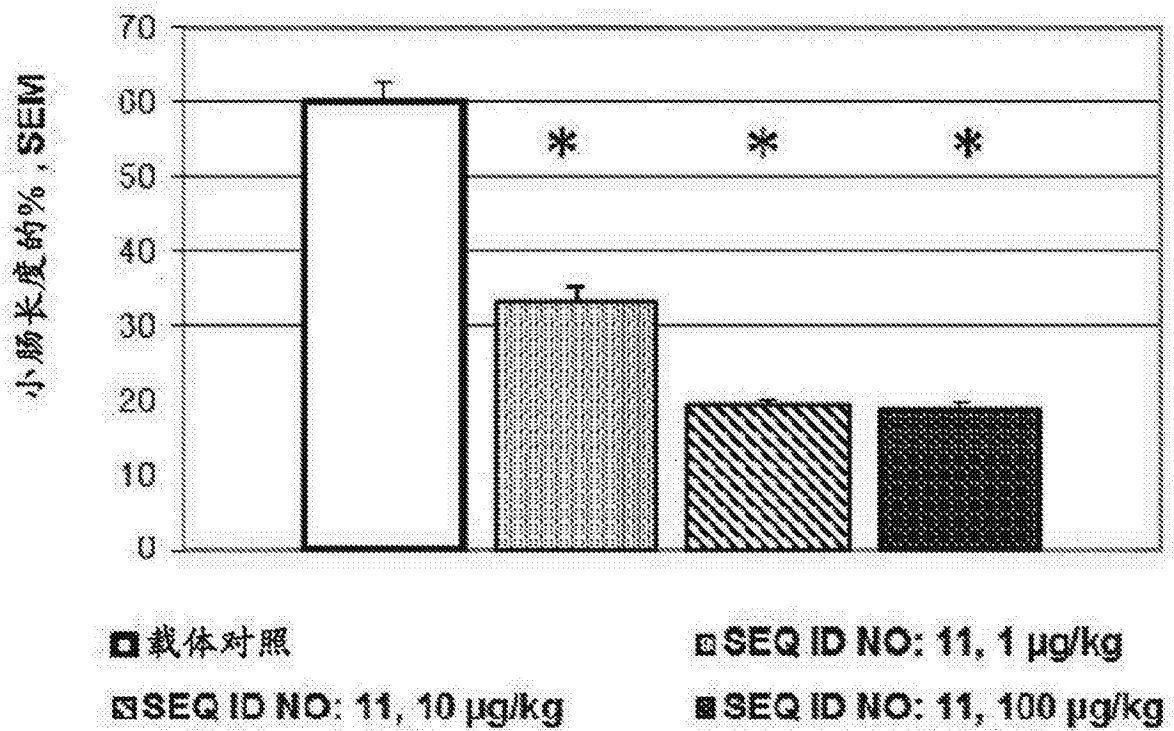


图8