

發明專利說明書

(本說明書格式、順序及粗體字，請勿任意更動，※記號部分請勿填寫)

※申請案號：97141806

※申請日期：2008/10/30

※IPC 分類：

一、發明名稱：(中文/英文)

胰高血糖素拮抗劑/ Glucagon Antagonists

A61K 47/48 (2006.01)
A61K 38/36 (2006.01)
C07K 14/605 (2006.01)
A61P 3/10 (2006.01)

二、申請人：(共 1 人)

姓名或名稱：(中文/英文)(簽章) ID：

印地安那大學研究及技術公司/Indiana University Research
and Technology Corporation

☐ 指定 為應受送達人

代表人：(中文/英文)(簽章)

丹尼爾哥希亞/Daniel Goytia

住居所或營業所地址：(中文/英文)

美國印地安那州印地安那波里斯區西 10 街 351 號
/351 West 10th Street, Indianapolis, IN 46202, U.S.A.

國籍：(中文/英文)

美國/USA

電話/傳真/手機：

E-MAIL：

三、發明人：(共 2 人)

姓名：(中文/英文)

1. 理察戴馬志/Richard DiMarchi

2.楊斌/Bin Yang

國 籍：(中文/英文)

美國/USA

四、聲明事項：

☐ 主張專利法第二十二條第二項 ☐ 第一款或 ☐ 第二款規定之事實，其事實發生日期為： 年 月 日。

☒ 申請前已向下列國家（地區）申請專利：

【格式請依：受理國家（地區）、申請日、申請案號 順序註記】

☒ 有主張專利法第二十七條第一項國際優先權：

1. 美國、2007/10/30、60/983,783

☐ 無主張專利法第二十七條第一項國際優先權：

☐ 主張專利法第二十九條第一項國內優先權：

【格式請依：申請日、申請案號 順序註記】

☐ 主張專利法第三十條生物材料：

☐ 須寄存生物材料者：

國內生物材料 【格式請依：寄存機構、日期、號碼 順序註記】

國外生物材料 【格式請依：寄存國家、機構、日期、號碼 順序註記】

☐ 不須寄存生物材料者：

所屬技術領域中具有通常知識者易於獲得時，不須寄存。

九、發明說明：

【發明所屬之技術領域】

本發明係關於一種胰高血糖素拮抗劑之設計，特別是關於一種胰高血糖素拮抗劑。

【先前技術】

天然胰高血糖素是一種由 29 個胺基酸所組成之胜肽，可經由在肝臟中促進葡萄糖合成及流動以調控血糖濃度。因此，抑制胰高血糖素內分泌作用可作為葡萄糖過度生成之相關藥物之發展標的之一，例如糖尿病。

胰高血糖素一般係作為拮抗性調節荷爾蒙，可對抗胰島素之作用，用以維持血液中葡萄糖濃度，特別是血糖過少之情況。然而，在某些糖尿病第一型及第二型之病人，顯示出絕對或相對血糖濃度之增高會造成高血糖之情況。在健康控制組動物及糖尿病第一型及第二型之動物組中，以特定抗體移除累積之胰高血糖素皆可降低其血糖值。(Brand et al., Diabetologia 37, 985 (1994); Diabetes 43, [suppl 1], 172A (1994); Am. J. Physiol. 269, E469-E477 (1995); Diabetes 44 [suppl 1], 134A (1995); Diabetes 45, 1076 (1996)) 此些學術研究顯示拮抗作用對於糖尿病患者血糖值之控制是有助益的。

胰高血糖素係經由結合及活化其受體以產生功用，其受

體為 7-穿膜 G-蛋白偶合受體家族之胰高血糖素小腸內泌素分支之一部分。受體係藉由一種腺苷酸環化酵素活性之作用使 cAMP 增加。在先前研究文獻已證明其胜肽基礎(參閱 Unson, C. G. et al. (1989) J. Biol. Chem. 264, 789-94, Ahn, J. et al. (2001) J. Peptide Research 58, 151-8 and Ahn J. et al. (2001) J. Med. Chem. 44, 1372-9)及核苷酸性(Sloop K. et al. (2004) J. Clinical Invest. 113, 1571-81)之胰高血糖素拮抗作用。胜肽基礎之抑制作用係利用與受體之結合產生功用，而核苷酸性之抑制作用係利用抑制細胞內胰高血糖素受體之 mRNA 而產生功用。

胰高血糖素受體之抑制子已被發現，其係以胰高血糖素之胺基酸序列為基礎。有些類似物係以刪除或取代之一或多個胺基酸以生成有效的胰高血糖素受體之拮抗劑，例如，[des His1] [Glu9]-glucagon amide (Unson et al., (1989) Peptides 10, 1171; Post et al., (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90, 1662), des His1, Phe6 [Glu9]-glucagon amide (Azizh et al., (1995) Bioorg. & Med. Chem. Lett. 16, 1849) 及 Nle9, Ala11,16-glucagon amide (Unson et al. (1994) J. Biol. Chem. 269(17), 12548)其他的相似物包括例如在胰高血糖素序列第 4 號位置 (Ahn J M et al. (2001) J. Pept. Res. 58(2):151-8), 1 (Dharanipragada, R. et al. (1993) Int. J. Pept. Res. 42(1): 68-77)

及第 4, 5, 12, 17, 18 號位置(Gysin B et al. 1986. Biochemistry. 25(25):8278-84)予以取代。

【發明內容】

本發明所欲解決之技術問題

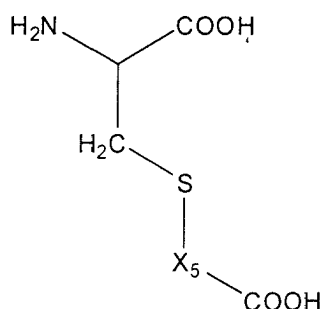
然而，胰高血糖素受體之抑制子已被發現，其係以胰高血糖素之胺基酸序列為基礎。有些類似物係以刪除或取代之或多個胺基酸以生成有效的胰高血糖素受體之拮抗劑，例如，[des His1] [Glu9]-glucagon amide (Unson et al., (1989) Peptides 10, 1171; Post et al., (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90, 1662), des His1, Phe6 [Glu9]-glucagon amide (Azizh et al., (1995) Bioorg. & Med. Chem. Lett. 16, 1849) 及 Nle9, Ala11,16-glucagon amide (Unson et al. (1994) J. Biol. Chem. 269(17), 12548).其他的相似物包括例如在胰高血糖素序列第 4 號位置 (Ahn J M et al. (2001) J. Pept. Res. 58(2):151-8), 1 (Dharanipragada, R. et al. (1993) Int. J. Pept. Res. 42(1): 68-77) 及第 4, 5, 12, 17, 18 號位置(Gysin B et al. 1986. Biochemistry. 25(25):8278-84)予以取代。

緣此，本發明之主要目的即是提供一種高效能胰高血糖素拮抗劑以代表天然胰高血糖素胜肽。

本發明解決問題之技術手段

本發明為解決習知技術之問題所採用之技術手段係在一實施例中，提供一具有胰高血糖素拮抗劑活性之類似物。胰高血糖素拮抗劑將可用於傾向於抑制胰高血糖素活化之環境下。最明顯接近於此情況即是使用於臨床前高血糖模式以產生低血糖之糖尿病治療。當要維持原拮抗活性時，這些胰高血糖素拮抗劑可被進一步地修飾以改善生物物理穩定性及該成分之水溶性。

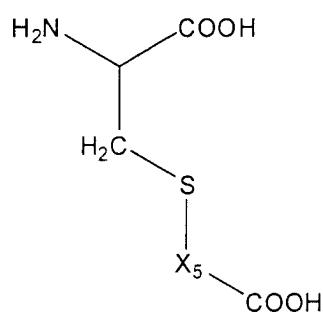
在一實施例中，提供一胰高血糖素拮抗劑，包括有一經刪除胺基端第 2-5 位置之胺基酸之天然胰高血糖素胜肽，以及將第 9 號位置之天冬胺酸取代為選自由下列胺基酸組成之群組中之胺基酸：麩胺酸、同麩胺酸、 β -同麩胺酸(一種半胱胺酸之磺酸衍生物)或一種半胱胺酸之烷羧化衍生物、或一種由半胱胺酸衍生出且包含下列化學結構之羧基烷衍生物：



其中 X_5 係為 $\text{C}_1\text{-C}_4$ 烷基、 $\text{C}_2\text{-C}_4$ 烯屬烴或 $\text{C}_2\text{-C}_4$ 炔基

在一實施例中，該半胱胺酸之磺酸衍生物係為半胱磺胺酸或同半胱磺胺酸。在一實施例中，羧基端之羧基被取代為不帶電之中性基，例如氨或酯。

在另一實施例中，提供一胰高血糖素拮抗劑(參閱在此所述之 PLA6 類似物)，其組成為一經由在胺基端前 5 個胺基酸刪除修飾，以及將剩餘之胺基端胺基酸(苯丙胺酸)之胺基端胺基取代為氫氧基(例如，一胺基端為苯基乳酸(PLA))之天然胰高血糖素胜肽。相對於刪除了前五個胺基酸但保留在胺基端苯丙胺酸之情況，該 PLA6 類似物增加了三倍的親和力，以及拮抗之效果。在另一實施例中，原生蛋白質第九號位置之天冬胺酸係可為由同麩胺酸、 β -同麩胺酸(一種半胱胺酸之磺酸衍生物)或一種半胱胺酸之烷羧化衍生物、或一種包含下列化學結構之烷羧化衍生物，上述所組成之群組中選出之一胺基酸：



其中 X_5 係為 C_1 - C_4 烷基， C_2 - C_4 烯屬烴或 C_2 - C_4 炔基

在一實施例中，胰高血糖素拮抗劑係包括選自由下列序

列所組成之群組：SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 37 及 SEQ ID NO: 38，以及在另一實施例中，胰高血糖素拮抗劑係包括選自 SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8。

在一實施例中，提供一胰高血糖素拮抗劑係包括 SEQ ID NO: 7 或 SEQ ID NO: 37 之序列，其中一聚乙二醇鏈係共價鍵結於第 11, 12, 16, 19 或 24 號位置之胺基酸，或鍵結於胜肽之 N 或羧基端。在一實施例中，提供一胰高血糖素拮抗劑係包括 SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11 或 SEQ ID NO: 12 之序列，其中一聚乙二醇鏈係共價鍵結於 SEQ ID NO: 9 之第 11 號位置胺基酸，SEQ ID NO: 10 之第 16 號位置胺基酸 of, SEQ ID NO: 11 之第 19 號位置胺基酸或同時鍵結在 SEQ ID NO: 12 之第 11 及 19 號位置胺基酸。在一實施例中，聚乙二醇鏈之分子量係為在 1000-5000 道耳吞之範圍中，且共價鍵結於胰高血糖素拮抗劑胜肽。在另一實施例中，聚乙二醇鏈之分子量係為在 20000-5000 道耳吞之範圍中，且共價鍵結於胰高血糖素拮抗劑胜肽。另外，胰高血糖素拮抗劑之序列包括 SEQ ID NO: 12，且具有單一聚乙二醇鏈，其共價鍵結於第 11 及 19 位置之胺基酸，其中二組合後之聚乙二醇鏈之分子量範圍係在 1000-5000 道耳吞之範圍或大於 20000 道耳吞。

在一實施例中，提供一胰高血糖素拮抗劑其中 SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 39 或 SEQ ID NO: 40 之羧基端胺基酸係共價鍵結於一具有 SEQ ID NO: 19 (GPSSGAPPPS)之第二胜肽。該些成分可進一步地經由 PEG 與胰高血糖素類似物之 SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 39 或 SEQ ID NO: 40 之第 11, 16, 19 號位置鍵結之修飾作用。在一實施例中，提供一胰高血糖素拮抗劑其中 SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 39 或 SEQ ID NO: 40 之羧基端胺基酸係共價鍵結於一具有 SEQ ID NO: 53 之第二胜肽。

在一實施例中，胰高血糖素拮抗劑係由在此所述之 A-B-C 結構組成，其中 A 係選自由下列成份所組成之群組：

- (i) 苯基乳酸 (PLA);
- (ii) 苯基乳酸之氧化衍生物;
- (iii) 一種 2-6 個胺基酸組成之胜肽，且該胜肽之其中兩連續胺基酸係由一酯鍵或一醚鍵鍵結連接；

B 代表 SEQ ID NO: 1 之胺基酸 i 到 26，其中 i 係為 3, 4, 5, 6, 或 7 之中隨意地由一或多個胺基酸修飾所組成，如在此進一步所述；而 C 係為選自由下列成份所組成之群組：

- (x) X;
- (xi) X-Y;

(xii) X-Y-Z; 以及

(xiii) X-Y-Z-R10,

其中 X 係為 Met, Leu, 或 Nle; Y 係為 Asn 或一帶電荷之胺基酸; Z 係為蘇胺酸、甘胺酸、半胱胺酸、離胺酸、鳥胺酸(Orn)、同半胱胺酸或乙醯苯丙胺酸(Ac-Phe), 或帶電荷之胺基酸, 其中 R10 係選自由 SEQ ID NOs: 19-21 及 53 所組成之群組; 以及; 以及

(xiv) 任何 (x) ~ (xiii) 之一, 其中羧基端羧基係由胺基所取代。

在另一實施例中, 任何缺少天然胰高血糖素之胺基端五個胺基酸及/或包括 PLA 之胰高血糖素拮抗劑, 其溶解度可經由在羧基端取代或加上帶電荷胺基酸之修飾作用而增加, 較佳地在胰高血糖素拮抗劑之羧基端至第 22 號位置(天然胰高血糖素之第 27 號位置)。在一實施例中, 天然胰高血糖素之第 23 及/或 24 號位置經由一帶電荷胺基酸所取代, 及/或在進一步實施例中羧基端加上三個帶電荷胺基酸。在應用例中, 一、二或全部之帶電荷胺基酸係為帶負電荷之胺基酸。在一實施例中, SEQ ID NO: 7 或 SEQ ID NO: 8 之胰高血糖素拮抗劑係進一步地包括在第 23 及/或 24 號位置由酸性胺基酸取代修飾。在一實施例中, 酸性胺基酸係為天冬胺酸或麩胺酸殘基, 且胰高血糖素拮抗劑包括 SEQ ID NO: 41 之序列。

在進一步實施例中，缺少天然胰高血糖素第 1-5 號位置胺基酸及/或包括 PLA 之胰高血糖素拮抗劑，在生理 pH 範圍內其穩定度可增加，主要經由在第 10 號位置之天冬胺酸(天然胰高血糖素之第 15 號位置)取代為選自下列胺基酸所組成之群組之胺基酸：麩胺酸、半胱磺胺酸、同麩胺酸、同半胱磺胺酸。在一實施例中，胰高血糖素拮抗劑包括 SEQ ID NO: 36 或 SEQ ID NO: 40 之序列。

任何在此提到之胰高血糖素拮抗劑可以進一步地修飾為包括一或多個保留有活性之 α, α -雙取代胺基酸。在某些實施例中，胰高血糖素拮抗劑之第 16, 17, 18, 20, 21, 24 或 29 號位置(依據野生型胰高血糖素之胺基酸序列號)之其中一、二、三、四或更多，係由 α, α -雙取代胺基酸所取代。例如，胰高血糖素拮抗劑包括第 16 號位置(依據野生型胰高血糖素之胺基酸序列號)取代為氨基異丁酸 (AIB)。在某些實施例中，胰高血糖素拮抗劑之第 16, 17, 18, 20, 21, 24 或 29 號位置(依據野生型胰高血糖素之胺基酸序列號)之其中一、二、三或更多，係由 AIB 所取代。在特定方面來說，胰高血糖素拮抗劑具有一或多個 α, α -雙取代胺基酸，更進一步地具有羧基端羧化物。

任何在此提到之胰高血糖素拮抗劑可以進一步地修飾為包括有一醯基及/或一烷基，該醯基或烷基係可透過一酯基、醚基、硫醯基、胺基或烷化胺基，以結合於一間隔子或胰高

血糖素拮抗劑。

任何在此提到之胰高血糖素拮抗劑可以進一步地以截斷、刪除一或二個羧基端之胺基酸進行修飾作用(例如，天然胰高血糖素肽之第 29 號位置，或第 28 及 29 號位置)。

添加修飾作用，例如保留性取代，可能使胰高血糖素拮抗劑仍可保留其拮抗活性。因此，本發明係在使任何在此揭露之胰高血糖素類似物可進一步地修飾為包括有 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 或 9 種胺基酸修飾作用，且仍可保留對胰高血糖素受體具有良好活性。

在此揭露之胰高血糖素拮抗劑之二聚體亦包含在本發明之範圍中。在一實施例中，提供一胰高血糖素拮抗劑之二聚體，其包括之二胜肽係分別地選自下列序列組成之群組：SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 39 以及 SEQ ID NO: 40，其中該二胰高血糖素拮抗劑彼此間係經由肽鍵鍵結於第 11 或 19 號位置之胺基酸。

在一實施例中，提供一藥物成分，該藥物成分包括在此所揭露之胰高血糖素拮抗劑。在一實施例中，一藥物成分包括一在不同包裝且滅菌過之溶液。藥物成分可進一步部分地包裝於一套件組中，該套件組包括有一可拋式裝置，可供一病人使用。

在一實施例中，提供一快速治療高血糖之方法，係使用

一經過前配製之水性溶液。該方法包括使用一有效劑量之水溶液，該水溶液中包括有本發明所揭露之經修飾之胰高血糖素拮抗劑。在一實施例中，提供一經聚乙二醇化修飾之胰高血糖素拮抗劑，且該聚乙二醇鏈之分子量範圍為 500-5000 道耳吞。在一實施例中，該經過修飾之胰高血糖素拮抗劑溶液經過前包裝於一裝置中，以提供給一具有高血糖症狀之病患。

在一實施例中，提供一對於胰島素依賴型病患調控血糖之改良方法。該方法包括施予一有效藥理劑量之胰島素以控制其糖尿病且施予一本發明所揭露之經修飾作用之胰高血糖素拮抗劑，其中該各實施步驟係分別在 12 小時內完成。在一實施例中，胰島素以及該胰高血糖素拮抗劑係同時以單一合成物實施，其中該胰高血糖素拮抗劑係經聚乙二醇化修飾，且該聚乙二醇鏈之分子量範圍為 5000-40000 道耳吞。

本發明對照先前技術之功效

經由本發明所採用之技術手段，此種新型的胰高血糖素拮抗劑表現出在天然胰高血糖素之胺基端序列進行新型的化學修飾作用，產生一種高專一性拮抗劑以展現出不明顯的促進活性。這些成分可被利用於任何抑制胰高血糖素活化之環境下。依據其中一實施例，該成分可被利用於治療糖尿病方面。

本發明所採用的具體實施例，將藉由以下之實施例及附呈圖式作進一步之說明。

【實施方式】

定義

在本發明之說明及請求項中，將使用依照下列定義之專門用語。

如在此所使用，所謂「藥學上可接受載體」包括任何標準的藥學載體，例如磷酸鹽緩衝液，諸如油/水、水/油乳化劑，及各種濕潤劑。這些專門用語包含了任何經由美國聯邦政府管理機構所准許或美國藥典中可使用於動物，包括人類之成分。

如在此所使用，所謂「藥學上可接受鹽類」係指包括各種保留有生物活性之鹽類成份，且非為生物上或其他方面所排斥。在此所揭露之係可藉由胺基、羧基或其他相似的官能基而形成酸性或鹼性鹽類。

藥學上可接受鹼性添加鹽類可經由無機或有機鹼製成。由無機鹼衍生之鹽類，包括鈉鹽、鉀鹽、鋰鹽、銨鹽、鈣鹽及鎂鹽。由有機鹼衍生之鹽類，包括但不限於例如一級、二級、三級胺。

藥學上可接受酸性添加鹽類可經由無機或有機酸製成。

由無機酸衍生之鹽類，包括氯化氫、溴化氫、硫酸、硝酸、磷酸等。由有機酸衍生之鹽類，包括醋酸、丙酸、乙醇酸、丙酮酸、草酸、蘋果酸、丙二酸、琥珀酸、馬來酸、富馬酸、酒石酸、檸檬酸、苯甲酸、肉桂酸、杏仁酸、甲基磺酸、乙基磺酸、p-甲苯磺酸、水楊酸等。

如在此所指之“治療”，係包括預防特定疾病或症狀，或減輕特定之疾病或症狀及/或防止或消除該病症。

如在此所指胰高血糖素類抗劑之「有效」之劑量或「藥理上有效」之劑量，係指一無毒性且具有足夠量以提供有效療效之胜肽。例如以一有效療效將可預防或治療高血糖症狀。所謂「有療效」的劑量係視情況而不同，視年齡及個人之一般情況，施用之方式等等。因此，無法做到所謂定義出一精確的「有效劑量」。然而，用在任何人之一適當「有效」劑量可經由在該領域具有通常知識者藉經驗之累積所決定。

所謂「腸胃外的」係指非經由消化道，而是藉由其他路徑例如皮下、肌肉內、脊椎內，或靜脈內。

在此所述之「胰高血糖素胜肽」，包括 SEQ ID NO: 1 之胺基酸序列，或任何由 SEQ ID NO: 1 之胺基酸序列所衍生之胜肽，包括胜肽之胺基酸取代或轉譯後修飾作用(例如甲基化、乙醯化、泛素化等等)，以刺激胰高血糖素或 GLP-1 受體活性，如實施例 13 中所述之測量 cAMP 之生成量。

在此所述之「胰高血糖素拮抗劑」，係指那些可拮抗胰高血糖素活性或抑制胰高血糖素功能之成分。例如，一種表現出具有至少 60% 抑制作用之胰高血糖素拮抗劑(例如 70% 之抑制作用)及較佳地，至少 80% 之抑制作用，其係由胰高血糖素作用在胰高血糖素受體之最大反應。在一實施例中，胰高血糖素拮抗劑在由胰高血糖素作用在胰高血糖素受體之最大反應上表現出至少 90% 之抑制作用。在一特定實施例中，胰高血糖素拮抗劑在由胰高血糖素作用在胰高血糖素受體之最大反應上表現出 100% 之抑制作用。同時，以 1 μ M 之胰高血糖素拮抗劑，於胰高血糖素作用在胰高血糖素受體之下，表現出少於 20% 之激動活性。在一實施例中，胰高血糖素拮抗劑於胰高血糖素作用在胰高血糖素受體之下，表現出少於 10% 之激動活性。在一特定實施例中，胰高血糖素拮抗劑於胰高血糖素作用在胰高血糖素受體之下，表現出少於 5% 之激動活性。在另一特定實施例中，胰高血糖素拮抗劑於胰高血糖素作用在胰高血糖素受體之下，表現出 0% 之激動活性。

一種「純胰高血糖素拮抗劑」，係指不會被測到有任何刺激胰高血糖素或 GLP-1 受體活性之胰高血糖素拮抗劑，其係利用有效的體外模型測試量測 cAMP 之生成，例如第 13 實施例中所述。舉例來說，純胰高血糖素拮抗劑可於胰高血糖素作用在胰高血糖素受體之下，表現出少於 5% 之激動活性(例如

少於 4%，少於 3%，少於 2%，少於 1%及大約為 0%)，以及於 GLP-1 作用在 GLP-1 受體之下，表現出少於 5%之激動活性(例如少於 4%，少於 3%，少於 2%，少於 1%及大約為 0%)。

如在此使用之「胰高血糖素拮抗劑」衍生物係為一種胜肽，其胺基酸序列係與 SEQ ID NO: 1 胺基酸序列相似度超過 60%，但係經由修飾以表現出胰高血糖素拮抗劑活性。該些修飾作用包括有胺基酸取代、刪除或後修飾作用(例如甲基化、胺化、醃化、泛素化、聚乙二醇化等等)。在一實施例中，胰高血糖素拮抗劑衍生物包括有經過修飾以具有刪除胺基端前 5 個胺基酸之 SEQ ID NO: 1 之胰高血糖素胜肽，以及使胺基端殘存之胺基酸(苯丙胺酸)之胺基取代為氫氧基。

如在此使用之胺基酸之“修飾作用”係指胺基酸之取代、添加或刪除，且包括取代或添加人類中常見的 20 種胺基酸，以及非自然產生之非典型胺基酸。非典型胺基酸之購買來源包括有 Sigma-Aldrich (Milwaukee, WI), ChemPep Inc. (Miami, FL)，以及 Genzyme Pharmaceuticals (Cambridge, MA) 等公司。非典型胺基酸可經由供應商所購得、再合成、化學修飾或經由自然產生之胺基酸所衍生得到。如在此使用之“取代作用”係指以另一不同之胺基酸取代原來之一胺基酸。

如在此使用之用語“保留性胺基酸取代”，其在此係定義為下列五種群組之一。

I. 較小、脂紡族、非極性或小部分極性之胺基酸：

Ala, Ser, Thr, Pro, Gly;

II. 極性、帶負電荷之胺基酸及其氨基化合物：

Asp, Asn, Glu, Gln;

III. 極性、帶負電荷殘基之胺基酸：

His, Arg, Lys; Ornithine (Orn)

IV. 較大、脂紡族、非極性之胺基酸：

Met, Leu, Ile, Val, Cys, Norleucine (Nle), homocysteine

V. 較大、芳香族之胺基酸：

Phe, Tyr, Trp, acetyl phenylalanine

在此使用的一般用語"polyethylene glycol"或"PEG"(聚乙二醇)，係指混合環氧乙烷及水之濃縮聚合物，以支鏈或直鏈之方式，以一般化學式表示為 $H(OCH_2CH_2)_nOH$ ，其中 n 至少為 9。在沒有更進一步特徵下，該用語係指包括以平均分子量在 500 到 40,000 道耳吞之間之聚乙二醇聚合物。聚乙二醇係在字尾標記數字以表示其大略之平均分子量。例如，PEG-5,000 係指平均分子量約在 5,000 之聚乙二醇。

在此使用之用語"pegylated"(聚乙二醇化)及其相似用語係指一種成分之天然狀態經由結合聚乙二醇之修飾作用。一"聚乙二醇化之胰高血糖素拮抗劑"係指將一聚乙二醇鏈共價鍵結於一胰高血糖素拮抗劑。

在此所提及之胜肽係指一具有修飾之胺基端及羧基端。例如，在羧基端取代為醯胺基之一胺基酸鏈，係由標準胺基酸所組成之胺基酸序列。

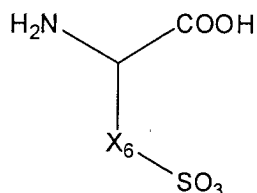
在此所指的「連結子」係為一種鍵結，經由分子間或基團間結合將二分開之實體彼此結合。連結子可提供兩實體間理想之間距，或可進一步地供應一不安定的連結，以使兩實體間彼此相隔。不穩定的連結包括可光分裂性基團、酸性不安定基團、鹼性不安定基團及可酵素分裂基團。

在此所指的「二聚體」係為由兩次單元經由一連結子以將兩者共價鍵結之複合物。在此所指的二聚體，在沒有進一步限制用語情況下，包含同二聚體及異二聚體。同二聚體係由二相同之次單元所組成，反之異二聚體係由二不相同之次單元所組成，儘管兩次單元實質上相似。

如本文所使用之用語「帶電胺基酸」係指包含在生理 pH 下之水溶液中帶負電(即去質子化)或帶正電(即質子化)之側鏈的胺基酸。舉例來說，帶負電的胺基酸包括天冬胺酸、麩胺酸、半胱磺胺酸、同半胱磺胺酸、及升麩胺酸，而帶正電的胺基酸包括精胺酸、離胺酸及組胺酸。帶電胺基酸包括在 20 種常見於人類蛋白質中之胺基酸、以及非典型或非自然產生之胺基酸中的帶電胺基酸。

如本文所使用之用語「半胱胺酸之硫酸衍生物」係指下列化

學結構式所表示之成分：



其中 X_6 係為 $\text{C}_1\text{-C}_4$ 烷基, $\text{C}_2\text{-C}_4$ 烯屬烴或 $\text{C}_2\text{-C}_4$ 炔基。

「 $\text{C}_1\text{-C}_n$ 烷基」之用語中的 n 可以由 1~6, 如在此使用的, 其代表一支鏈或直鏈的烷基具有由一到特定數目的碳原子。典型的 $\text{C}_1\text{-C}_6$ 烷基包括但不受限如下, 甲基、乙基、異丙烷基、丁基、異丁基、第二丁基、第三丁基、戊基、己基等此類。

「 $\text{C}_2\text{-C}_n$ 烯屬烴」之用語中的 n 可以由 2~6, 如在此使用的, 其代表一烯烴類的不飽和支鏈或直鏈基團, 具有由二到特定數目的碳原子且具有至少一雙鍵。這類的基團包括但不受限如下, 1-丙烯基、2-丙烯基 ($-\text{CH}_2\text{-CH=CH}_2$)、1,3-丁烯二基, ($-\text{CH=CHCH=CH}_2$)、1-丁烯基 ($-\text{CH=CHCH}_2\text{CH}_3$)、戊烯基、己烯基等此類。

「 $\text{C}_2\text{-C}_n$ 炔基」之用語中的 n 可以由 2~6, 係指一不飽和支鏈或直鏈基團, 具有由 2 到 n 個碳原子且具有至少一三鍵。這類的基團包括但不受限如下, 1-丙炔基、2-丙炔基、1-丁炔基、2-丁炔基、1-戊炔基等此類。

如本文所使用之用語「酸鹼值穩定胰高血糖素拮抗劑」係指一胰高血糖素相似物相對於天然胰高血糖素可表現出較佳穩定性及溶解度，且在水溶液中有較大的 pH 範圍，以應用於藥理用途。

如本文所使用之用語「酸性胺基酸」係指包含第二個酸性基團，包括例如羧酸基或磺酸基。

如本文所使用之用語「病患」在無進一步限定下，係指包含任何溫血脊椎之馴養動物(包括例如但不受限家畜如下，馬、貓、狗及其他寵物)及人類。

如本文所使用之用語「大約」係指大於或小於某數值或該數值的範圍在 10 個百分比內，但並非指定任何數值或該數值的範圍僅能在此限制內。每個數值或其範圍以「大約」之用語描述時，同時包含了實施例中所陳述的絕對數值或該數值之範圍。

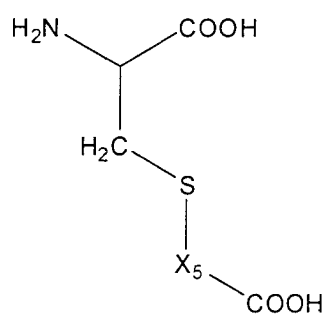
實施例

本文所揭露之胰高血糖素拮抗劑係對於胰高血糖素之抑制作用具有高度專一性，且不具有明顯的激動劑活性。此種胰高血糖素拮抗劑係可利用於任何希望抑制胰高血糖素活化之環境中。例如胰高血糖素拮抗劑可應用於治療糖尿病，其中胰高血糖素活化係由高血糖之前臨床模型所表現，以降低

血液中葡萄糖量。

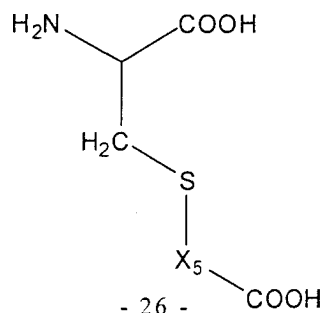
特定的胰高血糖素相似物在先前已發展，其第 9 號位置的天冬胺酸被麩胺酸或半胱磺胺酸之衍生物所取代。特別是，刪除第 1 號位置的胺基酸(des-His)，且將第 9 號位置的天冬胺酸取代為麩胺酸以生成胰高血糖素拮抗劑。將第 9 號位置之胺基酸取代為具有硫酸取代基之胰高血糖素衍生物，其可相似地表現出羧基胺基酸特性，但在物理特性方面仍具有部分關鍵性差異，例如溶解度之部分。傳統的 des-His, Glu9 胰高血糖素拮抗劑在第 9 號位置的亞硫酸同半胱胺酸(hCysSO₃) 取代為電子等排的麩胺酸後，仍保留有部份拮抗劑及少許的激動劑特性。

意外地，發明人發現到將胺基端殘基除去後，包括例如有，刪除前 5 個胺基酸(產生 des(1-5))，以及第 9 號位置以選自由下列胺基酸組成之群組之胺基酸取代(根據 SEQ ID NO: 1 之順序)：亞硫酸同半胱胺酸，同麩胺酸，β-同麩胺酸，或半胱胺酸之羧基烷類衍生物具有下列結構者：



其中 X_5 係為 C_1-C_4 烷基， C_2-C_4 烯屬烴或 C_2-C_4 炔基，以提供一化合物，其可表現出具高度專一性的、有效的、且無激動劑活性之荷爾蒙拮抗劑特性。因此，在此揭露一胰高血糖素衍生性胜肽，可表現出純粹的胰高血糖素拮抗劑活性。在一實施例中，胰高血糖素拮抗劑可降低胰高血糖素受體受胰高血糖素引發產生 cAMP 大約至少 50%，其係在胰高血糖素受體同時處理 0.8nM 之胰高血糖素及胰高血糖素拮抗劑之下，並以體外測定 cAMP 之產生。在一實施例中，胰高血糖素拮抗劑降低胰高血糖素受體受胰高血糖素引發產生 cAMP 之最大量相比約至少 80%。

在一實施例中，提供一胰高血糖素拮抗劑，相對於野生型之 SEQ ID NO: 1 序列而言，其包括一修飾過之胰高血糖素胜肽，藉由刪除胺基端前 2~5 個胺基酸，且將第 9 號位置天冬胺酸取代為麩胺酸、同麩胺酸、 β -同麩胺酸、半胱胺酸之磺酸衍生物或一種由半胱胺酸衍生出且包含下列化學結構之羧基烷衍生物：



其中 X_5 係為 C_1-C_4 烷基, C_2-C_4 烯屬烴或 C_2-C_4 炔基

在一實施例中，提供一胰高血糖素拮抗劑，其包括一修飾過之胰高血糖素胜肽，藉由刪除胺基端前 2~5 個胺基酸，將第 9 號位置天冬胺酸取代為麩胺酸，且更進一步將至多三個胺基酸進行修飾。例如，胰高血糖素拮抗劑可包括一、二或三個保留性之胺基酸修飾。可擇一或同時地，胰高血糖素拮抗劑可包括一或多個胺基酸修飾作用，其係選自下列群組之一：

- A. 取代下列位置胺基酸之其中之一或二，第 10、20 及 24 號位置(依據 SEQ ID NO: 1 之胺基酸序列)，或在胰高血糖素拮抗劑之胺基端或羧基端胺基酸透過一酯、醚、硫醚、氮或烷基胺鍵合以共價結合。
- B. 取代下列位置胺基酸之其中之一或二，第 16、17、20、21 及 24 號位置(依據 SEQ ID NO: 1 之胺基酸序列)，或在胰高血糖素拮抗劑之胺基端或羧基端胺基酸取代為下列胺基酸組成之群組之一，半胱胺酸、離胺酸、鳥胺酸、同半胱胺酸以及乙醯苯丙胺酸，其中群組中之胺基酸係結合於其親水性之基團；
- C. 添加一共價鍵結於親水性基團之胺基酸於胰高血糖素拮抗劑之胺基端或羧基端；
- D. 將第 15 號位置之天冬胺酸(依據 SEQ ID NO: 1 之胺基

酸序列)取代為半胱磺胺酸、麩胺酸、同麩胺酸以及同半磺胺酸；

E. 將第 16 號位置之絲胺酸(依據 SEQ ID NO: 1 之胺基酸序列)取代為半胱磺酸、麩胺酸、同麩胺酸以及同半磺胺酸；

F. 將第 16、20、21、24 號位置之一或多個位置取代為氨基異丁酸，依據 SEQ ID NO: 1 之胺基酸序列；

G. 刪除第 29 號位置或第 28 及 29 號位置胺基酸，依據 SEQ ID NO: 1 之胺基酸序列；

H. 將第 28 號位置之天冬醯胺酸及第 29 號位置之蘇胺酸(依據 SEQ ID NO: 1 之胺基酸序列)之一或兩者同時取代為帶電荷胺基酸及/或在 SEQ ID NO: 1 之羧基端添加一至二個帶電荷胺基酸；

I. 將第 27 號位置之甲硫胺酸(依據 SEQ ID NO: 1 之胺基酸序列)取代為白胺酸或正白胺酸；

J. 添加一胜肽，其胺基酸序列具有 SEQ ID NO: 1 中第 19-21 號位置及羧基端第 53 號位置，其中第 29 號位置係為蘇胺酸或甘胺酸；以及

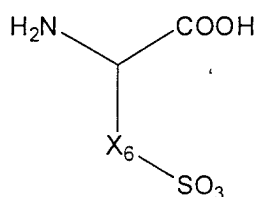
K. 將羧基端羧基取代為氨或酯。

在一特定實施例中，胰高血糖素拮抗劑包含一前述之 A,

B 或 C 之胺基酸修飾作用之一或其組合。在另一實施例中，胰高血糖素拮抗劑更包含一前述之 D 至 K 之胺基酸修飾作用之一或其組合，同時包括 A, B, 及/或 C 之胺基酸修飾作用。

在一實施例中，胰高血糖素拮抗劑包括一胰高血糖素胜肽，其中胺基端前 5 個胺基酸被刪除，且剩餘之胺基端之胺基取代為氫氧基”PLA6 相似物”，以產生 SEQ ID NO: 39 之胜肽。本發明人發現將前 5 個胺基酸被刪除且經取代第 9 號位置麩胺酸之胰高血糖素拮抗劑相似物(與天然胰高血糖素相比)之苯丙胺酸以苯乳酸取代後，可進一步地增強胰高血糖素拮抗劑相似物之效能。

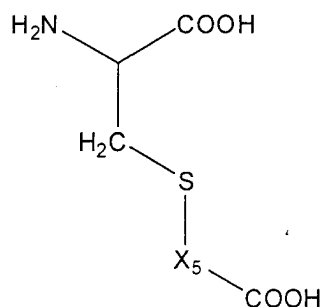
在一實施例中，SEQ ID NO: 39 之胰高血糖素拮抗劑胜肽可進一步藉由將第 4 號位置(天然胰高血糖素之第 9 號位置)之天冬胺酸取代為具有下列結構之胺基酸：



其中 X_6 係為 C_1 - C_4 烷基， C_2 - C_4 烯屬烴或 C_2 - C_4 炔基，以及 X 係為 C_1 - C_3 烷基，及在另一實施例中 X 係為 C_2 烷基。在一實施例中，胰高血糖素拮抗劑包括一胰高血糖素胜肽，其中

胺基端前 5 個胺基酸被刪除，且第 4 號位置(天然胰高血糖素之第 9 號位置)之天冬胺酸取代為半胱磺胺酸或同半胱磺胺酸。在一實施例中，胰高血糖素拮抗劑包括一胰高血糖素胜肽，該胰高血糖素胜肽之胺基酸序列包括選自下列群組：SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 7 及 SEQ ID NO: 8. 在一實施例中，胰高血糖素拮抗劑之胺基酸序列包括 SEQ ID NO: 39，其中第 4 號位置胺基酸係為同半胱磺胺酸。

在另一實施例中，SEQ ID NO: 39 之胰高血糖素拮抗劑更進一步將第 4 號位置天冬胺酸(天然胰高血糖素之第 9 號位置)取代為麩胺酸、同麩胺酸、 β -同麩胺酸，或一種由半胱胺酸衍生出且包含下列化學結構之羧基烷衍生物：



其中 X_5 係為 C_1 - C_4 烷基， C_2 - C_4 烯屬烴或 C_2 - C_4 炔基。在一特定實施例中， X 係為 C_1 或 C_2 烷基。

然而，本發明人發現將 des1-5 胰高血糖素相似物(例如前 5 個胺基酸被刪除之胰高血糖素相似物)之胺基端苯丙胺酸

取代為 PLA，而進一步將第 4 號位置（天然胰高血糖素之第 9 號位置）天冬胺酸取代，對於產生一具有純粹拮抗作用之胰高血糖素拮抗劑相似物是非必要的。此結果相當令人驚訝，因為習知技術中，將第 4 號位置（天然胰高血糖素之第 9 號位置）之胺基酸取代已使胰高血糖素相似物之胰高血糖素拮抗劑產生高度結合力及效能是必要的。利用 PLA 之取代改善了 Asp9 相似物之相對效能，和 Glu9 及 hCys(SO₃H)9 相似物相比（參表 6、7 之實施例）。

以苯丙胺酸相似物取代苯丙胺酸，包括 3,4-2F-phenylalanine (3,4-2F-Phe), 2-naphthylalanine (2-Nal), N-acyl-phenylalanine (Ac-Phe), alpha-methylhydrocinnamic acid (MCA) 以及 benzylmalonic acid (BMA)，並無法表現如 PLA 取代作用之效果。

若以 PLA 取代於第 6 號位置（依據天然胰高血糖素之順序）以外之其他位置，包括第 4 及 5 號位置，可使此 PLA6 相似物成為更有效能之拮抗劑，和胺基端些微延伸之胰高血糖素拮抗劑相比（參表 8 及第 8 圖之結果）。第 8 圖之結果顯示，PLA 氫氧基的醯化並不影響 PLA6 相似物之效能。因此，本發明包括一相似物，其胺基端胺基被醯化及烷化之「O 端」胜肽所取代。

進一步地，PLA6 取代作用不僅增加拮抗效能，也在聚乙

烯二醇化中扮演一重要角色。PLA6 相似物可在未回復胰高血糖素激動活性下被選擇性地聚乙二醇化。在無 PLA6 取代時，相似物之聚乙二醇化意外地可誘導胰高血糖素激動活性。某些聚乙二醇化之位置已被研究，例如第 3, 6 及 19 號位置(天然胰高血糖素之第 8, 11 及 19 號位置)以及胺基端胺基酸殘基(參表 12)。在一實施例中，在第 19 號位置(天然胰高血糖素之第 24 號位置)進行聚乙二醇化，可表現出最具效能及選擇性的胰高血糖素拮抗性。

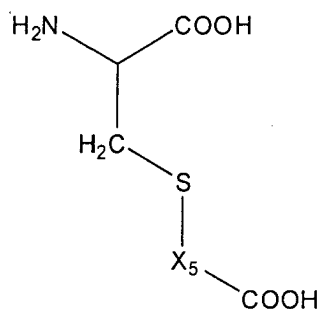
在一實施例中，胰高血糖素拮抗劑係由在此所述之 A-B-C 結構組成，其中 A 係選自下列群組：

- (i) 苯基乳酸 (PLA);
- (ii) 苯基乳酸之氧化衍生物;
- (iii) 一種 2-6 個胺基酸組成之胜肽，且該胜肽之其中兩連續胺基酸係由一酯鍵或一醚鍵鍵結連接；

B 代表 SEQ ID NO: 1 之胺基酸 i 到 26，其中 i 係為 3, 4, 5, 6, 或 7 之中選擇性地由一或多個胺基酸修飾群組所組成，包括：

- (iv) 第 9 號位置之天冬胺酸(依據 SEQ ID NO: 1 之胺基酸序列)取代為麩胺酸，半胱胺酸之硫酸化衍生物，同麩胺酸， β -同麩胺酸或一種半胱胺酸之烷羧化衍生物、或一種由半胱胺酸衍生出且包含下列化學結構之羧基烷衍

生物：



其中 X_5 係為 $\text{C}_1\text{-C}_4$ 烷基, $\text{C}_2\text{-C}_4$ 烯屬烴或 $\text{C}_2\text{-C}_4$ 炔基；

- (v) 取代下列位置胺基酸之其中之一或二，第 10、20 及 24 號位置(依據 SEQ ID NO: 1 之胺基酸序列)，以一共價結合結合於酯、醚、硫醚、醯胺或烷基胺鍵合之胺基酸取代；
- (vi) 取代下列位置胺基酸之其中之一或二，第 16、17、20、21 及 24 號位置(依據 SEQ ID NO: 1 之胺基酸序列)，以下列胺基酸組成之群組之一：半胱胺酸、離胺酸、鳥胺酸、同半胱胺酸以及乙醯苯丙胺酸(Ac-Phe)，其中群組中之胺基酸係共價結合於其親水性之基團；
- (vii) 將第 15 號位置之天冬胺酸(依據 SEQ ID NO: 1 之胺基酸序列)取代為半胱磺酸、麩胺酸、同麩胺酸以及同半磺胺酸；
- (viii) 將第 16 號位置之絲胺酸(依據 SEQ ID NO: 1 之胺基

酸序列)取代為半胱磺酸、麩胺酸、同麩胺酸以及同半磺胺酸；

(ix) 將第 16、20、21 及 24 號位置之一或多個位置取代為氨基異丁酸，依據 SEQ ID NO: 1 之胺基酸序列；

而 C 係為選自下列群組：

(x) X;

(xi) X-Y;

(xii) X-Y-Z; 以及

(xiii) X-Y-Z-R10,

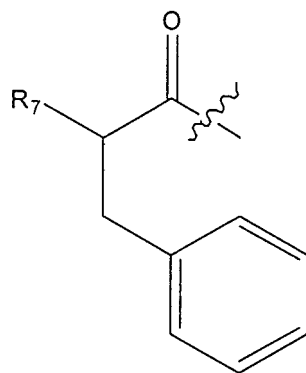
其中 X 係為 Met, Leu, 或 Nle; Y 係為 Asn 或一帶電荷之胺基酸; Z 係為蘇胺酸、甘胺酸、半胱胺酸、離胺酸、鳥胺酸(Orn)、同半胱胺酸或乙醯苯丙胺酸(Ac-Phe)，或帶電荷之胺基酸，其中 R10 係選自由 SEQ ID NOs: 19-21 及 53 所組成之群組，以及

(xiv) 任何 (x)到 (xiii) 其中羧基端羧基係由胺基所取代。

在一特定方面來看，胰高血糖素拮抗劑包括一苯基乳酸之氧化衍生物。本文所述之「苯基乳酸之氧化衍生物」係指包括有苯基乳酸之修飾結構之化合物，如氫氧基被取代為 O-R₁₁，其中 R₁₁ 係為一化學基團。就此來看，苯基乳酸之氧

化衍生物可以是，例如一苯基乳酸之酯或醚。

製造苯基乳酸之氧化衍生物係為該領域所熟習之技術。例如，苯基乳酸之氧化衍生物為一苯基乳酸之酯時，酯基可以藉由 PLA 之氫氧基與具有親核性之羰基反應形成。親核反應可以是經由任何適當的親核劑，包括但不限於例如胺或氫氧基。因此，苯基乳酸之酯可包括分子式 IV 之結構：



分子式 IV

其中 R7 係為一藉由 PLA 之氫氧基與具有親核性之羰基反應形成的酯。

具有親核性之羰基(與 PLA 之氫氧基反應以形成酯)可以是，例如一羧酸，一羧酸衍生物，或一羧酸的活化酯。羧酸衍生物可以是，但不受限於例如一醯氯化物、酸酐化物、氨基化合物、酯或亞硝酸鹽。羧酸之活化酯可以是例如 N-羥基琥珀硫亞氨(NHS)，甲苯磺酸鹽 (Tos)， 碳二醯胺或六氟磷酸

鹽。而在某些實施例中，酸酐化物係為 1,3-二環己基碳二亞胺 (DCC), 1,1'-合劑羰基二咪唑 (CDI), 1-乙基-3-(3-二甲氨基丙基) 碳二醯胺氫溴化鹽 (EDC) 或 1,3-雙異丙基碳二醯胺 (DICD)。在某些實施例中，六氟磷酸鹽係選自由下列組成之群組：hexafluorophosphate
benzotriazol-1-yl-oxy-tris(dimethylamino)phosphonium
hexafluorophosphate (BOP), benzotriazol-1-yl-oxytripyrrolidinophosphonium hexafluorophosphate (PyBOP), 2-(1H-7-azabenzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyl uronium hexafluorophosphate (HATU), 以及
o-benzotriazole-N,N,N',N'-tetramethyl-uronium-hexafluorophosphate (HBTU).

以氫氧基參與反應製造醚之方法係為該領域之習知技術 (例如苯乳酸之氫氧基)。舉例來說，可利用苯乳酸之氫氧基與鹵化烷或甲苯磺酸烷醇以形成一酯鍵。

一般而言， R_{11} 之化學基團不會降低胰高血糖素拮抗劑之活性。而在某些實施例中，此化學基團會促進胰高血糖素拮抗劑之活性、穩定性，以及\或溶解度。

在一特定實施例中，透過一含氧的鍵結以結合於苯乳酸 (例如透過一酯或醚鍵) 之化學基團係為一聚合物 (例如一聚烯烴基二醇)，一碳水化合物、一胺基酸、一胜肽、或一脂質，

例如脂肪酸或是類固醇。

在一特定實施例中，其化學基團係為一胺基酸，選擇性地，可為胜肽之一部份，例如在化學式 IV 中為一縮酯環肽。就此來看，苯乳酸可能在胰高血糖素拮抗劑之胺基端胺基酸殘基以外之位置，例如胰高血糖素拮抗劑包括一或多個(例如 1, 2, 3, 4, 5, 6, 或更多)胺基端胺基酸於苯乳酸殘基。舉例來說，胰高血糖素拮抗劑可包括苯乳酸在位置 n，其中 n 為胰高血糖素拮抗劑之第 2, 3, 4, 5, 或 6 號位置。

胺基酸之胺基端結合於苯乳酸殘基可以經由合成反應或自然發生。在一特定實施例中，在胺基酸之胺基端結合苯乳酸殘基係為自然發生。在一實施例中，胺基端結合苯乳酸殘基之胺基酸係為天然胰高血糖素之胺基端胺基酸。舉例來說，胰高血糖素拮抗劑之胺基端胺基酸序列可包括 SEQ ID NOs: 54-58 之一，其中苯乳酸係透過酯鍵結合於蘇胺酸：

SEQ ID NO: 54 His-Ser-Gln-Gly-Thr-PLA

SEQ ID NO: 55 Ser-Gln-Gly-Thr-PLA

SEQ ID NO: 56 Gln-Gly-Thr-PLA

SEQ ID NO: 57 Gly-Thr-PLA

SEQ ID NO: 58 Thr-PLA

在另一實施例中，胺基端其中之一或多個胺基酸可以被

取代為天然胰高血糖素所包含之其他胺基酸。例如，當胰高血糖素拮抗劑在第 5 或 6 號位置為苯乳酸時，可降低其第 1 及/或 2 號位置之胺基酸對於第四型二肽酶之敏感性。更進一步地，在某些實施例中，胰高血糖素拮抗劑之第 1 號位置係選自下列群組之胺基酸：D-組胺酸、 α, α -雙甲基咪唑乙酸 (DMIA)、N-甲基組胺酸、 α -甲基組胺酸、咪唑乙酸、去胺基組胺酸、煙基組胺酸、乙醯組胺酸及同組胺酸。更進一步地，在某些實施例中，胰高血糖素拮抗劑之第 2 號位置係選自下列群組之胺基酸：絲胺酸、D-絲胺酸、D-丙胺酸、纈氨酸、甘胺酸、N-甲基絲胺酸、N-甲基丙胺酸以及胺基異丁酸(AIB)。同時，例如當胰高血糖素拮抗劑在第 4、5 或 6 號位置為苯乳酸時，胰高血糖素拮抗劑之第 3 號位置係為麩胺酸，和天然胰高血糖素拮抗劑在該位置為麩醯胺酸之情形相反。在本發明之一應用例中，胰高血糖素拮抗劑之胺基端胺基酸序列係為 SEQ ID NOs: 59-61 之一。

當胰高血糖素拮抗劑包括化學式 IV 之結構時，此聚合物可以是任何可與苯乳酸之氫氧基反應之聚合物。該聚合物可以天然地具有一親核性之羰基。另外，該聚合物也可以由衍生地具有親核性之羰基。該聚合物可以是一由下列群組得到之衍生聚合物：聚醯胺、聚碳酸酯、聚烯及其衍生物，包括聚烯烴基氧化物、聚烯烴基噻唑，下列成分聚合物，包括：

丙烯酸樹脂、甲基丙烯酸酯，包括聚(甲基丙烯酸甲酯)、聚(甲基丙烯酸乙酯)、聚(甲基丙烯酸丁酯)、聚(甲基丙烯酸異丁酯)、聚(甲基丙烯酸己酯)、聚(甲基丙烯酸異葵酯)、聚(甲基丙烯酸十二酯)、聚(甲基苯丙烯酸酯)、聚(甲基丙烯酸酯)、聚(異丙基丙烯酸酯)、聚(異丁基丙烯酸酯)，及聚(丙烯酸十八酯)；聚乙烯化合物，包括聚乙醇、聚乙酯、聚乙醚、聚乙鹵化物、聚(醋酸乙烯)、聚乙吡咯烷酮、聚乙交醇、聚矽氧烷、聚氨酯及其共聚物，纖維素包括烷基纖維素、烴基烷纖維素、纖維素酯、纖維素醚、硝化纖維素、甲基纖維素、乙酸纖維素、丙酸纖維素、丁酸纖維素、丁酸乙酸纖維素、醋酸鄰苯二甲酸纖維素、磺酸鈉鹽纖維素，聚丙烯，聚乙烯包括聚(乙二醇)、聚(環氧乙烯)，聚(對苯二甲酸乙二酯)及聚苯乙烯。

該聚合物可以是一可生物分解之聚合物，包括一合成性可生物分解聚合物(例如乳酸及乙醇酸之聚合物、聚酐、聚(正)酯、聚氨基鉀酸酯、聚(丁酸)、聚(戊酸)，以及聚己內酯)，以及一種自然性可生物分解之聚合物(例如藻酸及其他多醣類包括葡萄聚糖、纖維素、膠原蛋白)，及其化學衍生物(化學基團之取代、添加，例如烷基、炔屬烴、氫氧化、氧化，及其他該領域具有通常知識者所熟習之修飾作用)，血清白蛋白及其他親水性蛋白質(例如玉蜀黍蛋白質及谷醇溶蛋白以及疏水性

蛋白質))，及其共聚合體或混合物。一般而言，此些材料可經由酵素水解或經由體內水分，藉由表面或整體侵蝕而分解。

該聚合物可以是一具生物黏性之聚合物，例如 H. S. Sawhney, C. P. Pathak and J. A. Hubbell 在 *Macromolecules*, 1993, 26, 581-587 所發表的 bioerodible hydrogel，如在此所述，聚透明質酸、酪蛋白、明膠、明膠蛋白、聚酞、聚丙烯酸、藻酸、幾丁質、聚(甲基丙烯酸甲酯)、聚(甲基丙烯酸乙酯)、聚(甲基丙烯酸丁酯)、聚(甲基丙烯酸異丁酯)、聚(甲基丙烯酸己酯)、聚(甲基丙烯酸異葵酯)、聚(甲基丙烯酸十二酯)、聚(甲基苯丙烯酸酯)、聚(甲基丙烯酸酯)、聚(異丙基丙烯酸酯)、聚(異丁基丙烯酸酯)，及聚(丙烯酸十八酯)。

在一實施例中，此聚合物係為一水溶性聚合物。適當的水溶性聚合物包括在該領域熟習此技藝者所知，例如聚乙烯吡咯烷酮、羥丙基纖維素(HPC; Klucel)、羥丙基甲基纖維素(HPMC; Methocel)、羥丙基乙基纖維素、羥丙基丁基纖維素、羥丙基戊基纖維素、羥丙基乙基纖維素、甲基纖維素、乙基纖維素(Ethocel)、羥乙基纖維素，各種烷化纖維素、烴烷化纖維素，各種酯纖維素、羧基纖維素、鈉羧甲基纖維素、鈣羧甲基纖維素、醋酸乙烯/巴豆酸共聚物，各種聚烴烷甲基丙烯酸、烴甲基甲基丙烯酸、甲基丙烯酸共聚物、聚甲基丙烯酸、聚丙烯酸甲酯、馬來酞/甲基丙烯酸酯共聚物、聚烯醇、鈉及鈣

聚丙烯酸、聚丙稀酸、酸性羧基聚合物、羧酸聚甲烷、羧酸烯聚合物、聚氧化乙烷、聚氧化丙烷共聚物、甲基乙烯基醚-馬來酐共聚物、羧甲基醯胺、鉀甲基丙烯酯-二烯苯共聚物、聚乙二醇、聚環氧乙烷，及其衍生物、鹽類及其組合。

在一實施例中，此聚合物係為一聚烯烴基二醇，包括例如聚乙二醇(PEG)。

此碳水化合物可以是任何由一羰基結合一 α 殘基團所組成之碳水化合物。此碳水化合物可以是由一羰基結合一 α 殘基團所衍生之碳水化合物。就此而言，此碳水化合物可以由單糖(例如葡萄糖、半乳糖、果糖)，雙糖(例如蔗糖、乳糖、麥芽糖)，寡糖(例如棉子糖、木蘇糖)，多糖(例如澱粉、澱粉酵素、支鏈澱粉、纖維素、幾丁質、愈傷葡聚糖，海帶聚糖，木聚糖，甘露聚糖，岩藻依多糖，半乳糖甘露聚糖)所衍生之碳水化合物。

就包括化學式 IV 之胰高血糖素拮抗劑而言，其脂質可以是任何由一羰基結合一 α 殘基團所組成之脂質。此脂質可以是由一羰基結合一 α 殘基團所衍生之脂質。就此而言，此脂質可以是脂肪酸之衍生物(例如 C4-C30 之脂肪酸、二十酸、前列腺素、白三烯素、凝血脂素、N-醯基膽胺)，甘油脂(例如單、雙、三取代甘油)，甘油磷脂(磷脂醯膽鹼、磷脂醯肌醇、磷脂醯乙醇胺、磷脂醯絲胺酸)，鞘脂質 (e.g., 鞘胺醇、腦醯

胺), 固醇類 (e.g., 類固醇、膽固醇), 戊烯醇, 糖脂質, 聚酮。油、臘質、膽固醇、固醇、脂溶性維他命、單酸甘油、二酸甘油、三酸甘油、磷脂質。

在一實施例中, R7 之分子量約在 100kDa 以下, 例如約 90kDa 以下, 約 80kDa 以下, 約 70kDa 以下, 約 60kDa 以下, 約 50kDa 以下, 約 40kDa 以下。同理, R7 之分子量可以在 35kDa 以下, 例如約 30kDa 以下, 約 25kDa 以下, 約 20kDa 以下, 約 15kDa 以下, 約 10kDa 以下, 約 5kDa 以下, 或約 1kDa。

在另一實施例中, 胰高血糖素拮抗劑包括如 A, 其 2-6 個胺基酸其中兩連續胺基酸係由酯鍵或醚鍵所連結。酯或醚鍵結可以是例如在第 2、3 胺基酸之間, 第 3、4 胺基酸之間, 第 4、5 胺基酸之間, 第 5、6 胺基酸之間。胰高血糖素拮抗劑亦可進一步地修飾, 包括藉由共價鍵結於另一化學官能基, 包括結合於一聚合物(例如親水性聚合物)、烷化或醯化。

該胜肽可包括任何合成或自然生成之胺基酸, 其中兩連續胺基酸係由酯鍵或醚鍵所連結。在一特定實施例中, 該胜肽包括天然胰高血糖素之胺基酸序列。例如, 該胜肽可包括天然胰高血糖素之 j 到 6 (SEQ ID NO: 1), 其中 j 為 1、2、3、4 或 5。另外, 此胜肽可包括 SEQ ID NO: 1 之胺基端序列加上一或多個胺基酸修飾。第 1 號位置或第 2 號位置之胺基酸可降低其對於第四型二肽酶之敏感性。舉例來說, 胰高血糖

素撚抗劑之第 1 號位置係為選自下列群組之胺基酸：D-組胺酸、 α, α -雙甲基咪唑乙酸 (DMIA)、N-甲基組胺酸、 α -甲基組胺酸、咪唑乙酸、去胺基組胺酸、煙基組胺酸、乙醯組胺酸及同組胺酸。更進一步地，在某些實施例中，胰高血糖素撚抗劑之第 2 號位置係選自下列群組之胺基酸：D-serine, D-alanine, valine, glycine, N-methyl serine, N-methyl alanine, and aminoisobutyric acid (AIB) 同時，胰高血糖素撚抗劑之第 3 號位置係為麩胺酸，和天然胰高血糖素撚抗劑在該位置為麩醯胺酸之情形相反。據此，胰高血糖素撚抗劑之胺基酸序列可包括如下：

Xaa₁-Xaa₂-Xaa₃-Thr-Gly-Phe (SEQ ID NO: 68);

Xaa₂-Xaa₃-Thr-Gly-Phe (SEQ ID NO: 69); 或

Xaa₃-Thr-Gly-Phe (SEQ ID NO: 70);

其中 Xaa₁ 係為選自下列群組：組胺酸、D-組胺酸、 α, α -雙甲基咪唑乙酸 (DMIA)、N-甲基組胺酸、 α -甲基組胺酸、咪唑乙酸、去胺基組胺酸、氫氧基組胺酸、乙醯化組胺酸及同組胺酸，Xaa₂ 係為選自下列群組：絲胺酸、D-絲胺酸、D-丙胺酸、纈氨酸、甘胺酸、N-甲基絲胺酸、N-甲基丙胺酸以及胺基異丁酸 (AIB)，以及 Xaa₃ 係為麩胺酸或麩

鹽胺酸。

本發明之實施例亦包含胰高血糖素拮抗劑之羧基端胺基酸之羧酸被取代為氨基基團之實施例。

胰高血糖素拮抗劑可進一步地修飾以增加在生理 pH 範圍水溶液中的溶解度，且可保留胰高血糖素拮抗劑活性。在天然胜肽的 1, 16, 17, 20, 21, 24 及 29 號位置引入親水性基團，或是在羧基端，可以增加在生理 pH 範圍水溶液中的溶解度，也可保留胰高血糖素拮抗劑活性。因此，在一實施例中胰高血糖素拮抗劑可進一步修飾為包括一或多個親水性基團，共價鍵結於胺基酸的側鏈，對應於天然胜肽的胺基端或羧基端之第 1, 16, 17, 20, 21, 24 及 29 號位置。在另一實施例中，對應於天然胜肽的第 16 及 24 號位置，共價鍵結於親水性基團，且在一實施例中，親水性基團係為聚乙二醇(PEG)。

在某些實施例中，胰高血糖素拮抗劑係為聚乙二醇化，胰高血糖素拮抗劑包括較短的胰高血糖素胜肽，在”胺基端”6-29 位置之胺基酸係為苯基乳酸(phenyl-lactic acid)。此些胰高血糖素拮抗劑係具有獨特的優點。和胺基端為苯丙胺酸之天然胰高血糖素相比，此些胰高血糖素拮抗劑係為具有較佳效能之胜肽，且由於聚乙二醇化，某些未見於天然苯丙胺酸之部份，故可抑制胰高血糖素激動活性。最後，除本文所述在第 9 號位置胺基酸之取代係為拮抗活性所需之外，發明人

亦發現一驚人結果，即是在 PLA⁶-(6-29)胰高血糖素相似物中不再需要此種取代作用。

在一實施例中，胰高血糖素拮抗劑之胺基酸至少取代為一半胱胺酸，其中半胱胺酸之側鏈殘基更修飾為一硫醇活性劑，包括例如馬來酰亞氨基、乙烯基砜、2-吡啶二硫化物、鹵化烷，以及 haloacy。此些硫醇活性劑可包括羧基、酮基、氫氧基及醚基等，且親水性基團係為例如聚乙二醇單元。在另一實施例中，胰高血糖素拮抗劑之一胺基酸取代為離胺酸，且其取代之離胺酸之側鏈更可以胺類活性劑例如羧酸之活性酯(例如丁二酰亞胺、酞等)進行修飾，或是親水性基團之醛例如聚乙二醇。在一實施例中，相對於天然胰高血糖素胜肽第 12 號位置之一離胺酸被取代為精胺酸，及一取代之離胺酸被插入至天然胰高血糖素胜肽第 1, 16, 17, 20, 21, 24 或 29 號位置，或是一離胺酸添加至胰高血糖素拮抗劑之胺基端或羧基端。

在另一實施例中，將天然胜肽第 27 號位置之甲硫胺酸取代為白胺酸或正白胺酸以防止胜肽之氧化分解。

在某些實施例中，任何在此提到之胰高血糖素拮抗劑可以進一步地以截斷、刪除一或二個羧基端之胺基酸進行修飾作用(例如，天然胰高血糖素胜肽之第 29 號位置或第 28 及 29 號位置)，且不影響對於胰高血糖素受體之活性及/或效能。就此

而言，本文所述之胰高血糖素拮抗劑係可主要地包括或包括天然胰高血糖素肽(SEQ ID NO: 1)之 1-27, 1-28, 2-27, 2-28, 3-27, 3-28, 4-27, 4-28, 5-27, 5-28, 6-27, 或 6-28 胺基酸，且具有一或多個修飾作用以達到本文所述之胰高血糖素拮抗劑活性。

本文中所揭露之胰高血糖素拮抗劑亦包含在某些位置之胺基酸取代作用，且該些位置在原本之胰高血糖素肽中被認為是不重要的。在一實施例中，該些取代作用係為在某一至三個位置之保留性胺基酸取代作用，該些位置係包括選自由下列位置組成之群組：SEQ ID NO: 39 之第 2, 5, 6, 7, 8, 9, 12, 13, 14, 15, 16, 19, 22, 23 或 24 號位置。在一實施例中，胰高血糖素拮抗劑包括一 SEQ ID NO: 42 之衍生性肽，其中胰高血糖素肽更包括一胺基酸取代作用，位於相對於 SEQ ID NO: 42 之一至三個位置，該些位置係包括選自由下列位置組成之群組：SEQ ID NO: 42 之第 2, 5, 6, 8, 9, 12, 13 或 14 號位置。在一實施例中，SEQ ID NO: 42 之第 2, 5, 6, 8, 9, 12, 13 或 14 號位置之取代作用係為保留性胺基酸取代作用。在一實施例中，相對於天然胰高血糖素肽之第 16, 17, 20, 21, 24 或 29 號位置，且更進一步地在第 21 及/或 24 號位置被取代為半胱胺酸或離胺酸，其中一聚乙二烯鏈係共價結合於該取代後之半胱胺酸或離胺酸。

在此些實施例中，胰高血糖素拮抗劑包括一聚乙二醇鏈，其可以為一直鏈或支鏈之形式。在一實施例中，聚乙二醇鏈之平均分子量係為選自 500-10,000 道耳吞之範圍。在一實施例中，聚乙二醇鏈之平均分子量係為選自 1,000-5,000 道耳吞之範圍。在一實施例中，聚乙二醇鏈之平均分子量係為選自 1,000-2,000 道耳吞之範圍。在一實施例中，聚乙二醇鏈之平均分子量大約係 1,000 道耳吞。

在一實施例中，修飾過之胰高血糖素拮抗劑包括共價結合有兩個或兩個以上之聚乙二醇鏈，其中總分子量係為約 1,000-5,000 道耳吞之範圍。在一實施例中，聚乙二醇化之胰高血糖素拮抗劑包括一胜肽，該胜肽係包括選自由下列序列組成之群組：SEQ ID NO: 12, 及 SEQ ID NO: 22，其中該胜肽包括在第 11 及 19 號位置結合一聚乙二醇鏈，且聚乙二醇鏈之分子量係為約 1,000-5,000 道耳吞之範圍。

在一實施例中，胰高血糖素拮抗劑包括一胜肽係選自由下列序列組成之群組：

R₁-Phe-Thr-Ser-Xaa-Tyr-Ser-Xaa-Tyr-Leu-Xaa-Xaa-Arg-Arg-Ala-Gln-Asp-Phe-Val-Gln-Trp-Leu- Xaa-Asn-Thr-R₂ (SEQ ID NO: 9),

R₁-Phe-Thr-Ser-Xaa-Tyr-Ser-Xaa-Tyr-Leu-Asp-Ser-Arg-Arg-Ala-Gln-Xaa-Phe-Val-Gln-Trp-Leu- Xaa-Asn-Thr-R₂ (SEQ ID

NO: 10),

R₁-Phe-Thr-Ser-Xaa-Tyr-Ser-Xaa-Tyr-Leu-Asp-Ser-Arg-Arg-Ala-Gln-Asp-Phe-Val-Xaa-Trp-Leu-Xaa-Asn-Thr-R₂ (SEQ ID NO: 11) 以及

R₁-Phe-Thr-Ser-Xaa-Tyr-Ser-Xaa-Tyr-Leu-Asp-Ser-Arg-Arg-Ala-Gln-Xaa-Phe-Val-Xaa-Trp-Leu-Xaa-Asn-Thr-R₂ (SEQ ID NO: 12),

其中在第 4 號位置之 Xaa = 天冬胺酸、麩胺酸、半胱磺胺酸、同半胱磺胺酸，在第 7 號位置之 Xaa = 離胺酸或精胺酸，在第 10 號位置之 Xaa = 天冬胺酸、半胱磺胺酸、麩胺酸、同半麩胺酸、同半胱磺胺酸，在第 11 號位置之 Xaa = 絲胺酸、離胺酸、半胱胺酸、鳥胺酸、同半胱胺酸或乙醯化苯丙胺酸，在第 16 號位置之 Xaa = 天冬胺酸、離胺酸、半胱胺酸、鳥胺酸、同半胱胺酸或乙醯化苯丙胺酸，在第 19 號位置之 Xaa = 麩醯胺酸、離胺酸、半胱胺酸、鳥胺酸、同半胱胺酸或乙醯化苯丙胺酸，在第 22 號位置之 Xaa = 甲硫胺酸、白胺酸或正白胺酸，R₁ 係為氫氧基或胺基，且 R₂ 係為羧基或酰胺基，其中該胜肽係在 SEQ ID NO: 9 之第 11 號位置、SEQ ID NO: 10 之第 16 號位置、SEQ ID NO: 11 之第 19 號位置、SEQ ID NO: 12 之第 16 及 19 號位置聚乙二醇化。

在一實施例中，該胜肽係包括選自由 SEQ ID NO: 9、SEQ ID NO: 10、SEQ ID NO: 13、SEQ ID NO: 14、SEQ ID NO: 16 所組成之群組，其中該胜肽係在 SEQ ID NO: 9、SEQ ID NO: 13 之第 11 號位置、SEQ ID NO: 10 之第 16 號位置、SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 14 之第 19 號位置聚乙二醇化。在一實施例中，在此揭露之胰高血糖素拮抗劑之羧基端胺基酸具有一取代羧酸基之鹽胺基。在一實施例中，胰高血糖素拮抗劑係包括 SEQ ID NO: 18 之序列。

在一實施例中，提供一胰高血糖素拮抗劑其中一血漿蛋白共價結合於其胺基酸之側鏈，以促進其溶解度、穩定性及/或胰高血糖素胜肽之藥物動力學。例如，血清蛋白可共價結合於本文所述之胰高血糖素拮抗劑。在一實施例中，血漿蛋白共價結合於一胺基酸，該胺基酸位置係為相對於天然胰高血糖素胜肽之第 16, 17, 20, 21, 24 或 29 號位置。更，在一實施例中，血漿蛋白共價結合於天然胰高血糖素胜肽之第 16 或 24 號位置胺基酸，其中胰高血糖素拮抗劑包括 SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 36 and SEQ ID NO: 39. 在一實施例中，胰高血糖素拮抗

劑包括一胜肽，係選自由下列序列所組成之群組：SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11 以及 SEQ ID NO: 12.

在一實施例中，提供一胰高血糖素摺抗劑其中一線性胺基酸序列代表免疫球蛋白分子的 Fc 部位，共價連結本文所述之胰高血糖素摺抗劑之一胺基酸之側鏈，以促進其溶解度、穩定性及/或胰高血糖素胜肽之藥物動力學。代表免疫球蛋白分子 Fc 部位之胺基酸序列可共價鍵結於 SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 39 之胰高血糖素胜肽之第 11, 12, 15, 16, 19, 21 或 24 號位置，或是胰高血糖素之相似物。在一實施例中，代表免疫球蛋白分子 Fc 部位之胺基酸序列係共價鍵結於 SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 36 之胰高血糖素摺抗劑胜肽之第 11, 19 號位置。通常 Fc 部位係由 IgG 分離出來，但由任何免疫球蛋白分離出來的 Fc 部位應具有功效。在一實施例中，胰高血糖素摺抗劑包括一胰高血糖素胜肽，該胜肽係為選自由下列序列所組成之群組：SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, 及 SEQ ID NO: 39，其中 Fc 部位係結合於相對於天然胰高血糖素胜肽之第 16, 17, 20, 21, 24 或 29 號位置。在一實施例中，胰高血糖素摺抗劑包括一胰高血糖素胜肽，該胜肽係為選自由下列序列所組成之群組：SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11 及 SEQ ID NO: 12，其中 Fc 部位係分別地結

合於 SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11 之第 11, 16 或 19 號位置，且同時結合於 SEQ ID NO: 12 之第 11 及 19 號位置。

本文所揭露同時包括在本文之胰高血糖素胜肽所結合的其他結合物，選擇性地透過共價鍵結及透過一連結子，以結合於該結合物。該連結可經由化學共價鍵，物理力例如靜電力、氫鍵、離子鍵、凡得瓦力、親水性或疏水性作用力。可利用各種不同的非共價鍵結方式，包括生物素-抗生物素蛋白，配體/受體，酵素/受質，核苷酸/核苷酸結合蛋白，脂質/脂質結合蛋白，細胞黏合分子；或任何結合該結合物或其彼此間具有親和力之片段。

該結合物可包括但不受限於，一異質胜肽或多肽(包括例如一血漿蛋白)，一標靶藥劑，一免疫球蛋白或其部位(例如變異部位、CDR 部位或 Fc 部位)，一診斷標記例如放射線同位素、螢光、或酵素標定，一聚合物包括水溶性聚合物，或其他醫療或診斷藥劑。在一實施例中，提供一結合物，其包括本發明之胰高血糖素胜肽及一血漿蛋白，其中血漿蛋白係選自由下列蛋白質所組成之群組：白蛋白、運鐵蛋白、纖維素原、球蛋白。在一實施例中，結合物之血漿蛋白基團係為白蛋白或運鐵蛋白。在某些實施例中，連結子包括由 1-60、1-30 個原子或更多之鏈長，2-5、2-10、5-10、10-20 個原子之鏈長。

在某些實施例中，組成連結子之骨幹之鏈原子係選自由下列元素組成之群組：碳、氧、氮及硫。鏈原子及結合子係選自依據其期望之溶解度(親水性)，以提供一更易溶解之結合物。在某些實施例中，連結子提供一官能基，該官能基易受到酵素分解或其他催化劑或在標的組織會器官或細胞中水解。在某些實施例中，連結子之長度足以減少立體結構障礙之效能。若連結子係為一共價鍵或一肽鍵且結合物係為一多肽，整體結合物係為一融合蛋白。此類肽連結子可以為任何長度。說明例之連結子係由約 1-50 胺基酸長度，5-50, 3-5, 5-10, 5-15 或 10-30 胺基酸長度。融合蛋白可以擇一地藉由該領域具有通常知識者所熟知的基因重組工程方法所生成。

在天然胰高血糖素之第 15-16 號位置之天冬胺酸-絲胺酸已證明可作為一獨特且不穩定之雙肽，可導致天然荷爾蒙在緩衝液中過早的化學分解。例如，當維持在 0.01N HCl, 37 °C 兩星期後，超過 50% 之天然胰高血糖素可能分解成片段。兩分解之胜肽第 1-15 及 16-29 係缺乏類胰高血糖素生化活性且限制了在水溶液中預先形成胰高血糖素及其相似物。在天然胰高血糖素第 15 號位置天冬胺酸取代為麩胺酸之選擇性取代實際上排除了在第 15-16 號位置胜肽鍵之切開。

因此，可預期本發明之胰高血糖素拮抗劑可被相似地修飾以降低在水性緩衝液中早期分解之敏感性。依據一實施

例，胰高血糖素拮抗劑可進一步地修飾，將第 15 號位置之天冬胺酸取代為選自由下列胺基酸組成之群組，以增加在水溶液中之穩定度，該群組包括：半胱磺酸、麩胺酸、同麩胺酸以及同半磺胺酸。依據一實施例，SEQ ID NO: 39 之胰高血糖素拮抗劑之第 10 號位置之天冬胺酸可取代為選自由下列胺基酸組成之群組：半胱磺酸、麩胺酸、同麩胺酸以及同半磺胺酸，且在一實施例中，SEQ ID NO: 39 之第 10 號位置之天冬胺酸取代為麩胺酸。在一實施例中，提供一胰高血糖素拮抗劑具有較佳的溶解度，其中胰高血糖素拮抗劑係包括選自由下列序列組成之群組：SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 40 及 SEQ ID NO: 42。在進一步實施例中胰高血糖素拮抗劑係為醯胺化。

在一實施例中，胰高血糖素拮抗劑藉由減少分解以增加穩定性，亦可藉由將第 16 號位置絲胺酸(依據天然胰高血糖素之順序)取代為麩胺酸、同麩胺酸、半胱磺胺酸以及同半磺胺酸。在另一實施例中，胰高血糖素拮抗劑第 16 號位置絲胺酸(依據天然胰高血糖素之順序)被取代為麩胺酸。更進一步來看，胰高血糖素拮抗劑之修飾作用包括一羧基端羧酸且未醯胺化。

在一實施例中提供一胰高血糖素拮抗劑，包括一胰高血糖素胜肽，係選自由下列序列組成之群組：SEQ ID NO: 7, SEQ

ID NO: 36, SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 42, SEQ ID NO: 43 以及 SEQ ID NO: 44, 更藉由在胰高血糖素胜肽之第 11, 12, 15, 16, 19 及/或 24 號位置之一或多個位置進行取代修飾, 其中取代修飾包括以一具有適於交叉結合於親水性基團之側鏈之胺基酸進行取代, 包括例如聚乙二醇。天然胰高血糖素胜肽可以一天然的或合成的(非天然生成的)胺基酸進行取代。合成的(非天然生成的)係指非在體內生成之胺基酸, 然而, 可與在此所述之胜肽進行作用。在一實施例中提供一胰高血糖素拮抗劑, 其中該胜肽包括 SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 42, SEQ ID NO: 43 以及 SEQ ID NO: 44, 且更包括一聚乙烯鏈, 結合於對應天然胰高血糖素胜肽 之第 21 及 24 號位置。在更進一步實施例中, 胰高血糖素胜肽之羧基端藉由醯胺基取代羧酸基進行修飾。

發明人同時發現到, 天然胰高血糖素可藉由在羧基端修飾帶電荷以增加胰高血糖素的溶解度。增加其溶解度可使胰高血糖素溶液製備或保存於中性 pH 值之環境。在相對中性 pH 值(例如 pH 值約在 6.0 至 8.0 之間)之溶液中製備胰高血糖素可增加胰高血糖素胜肽之穩定性。

同時本發明人發現, 本文中的天然胰高血糖素拮抗劑可藉由相似的修飾作用增加胰高血糖素拮抗劑在相對中性 pH 值

(例如 pH 值約在 6.0 至 8.0 之間)之溶液中的溶解度。據此，本發明之一實施例指出，SEQ ID NO: 39 之胰高血糖素拮抗劑更進一步地修飾，相對於在野生型胰高血糖素 (SEQ ID NO: 1) 之第 6-29 號位置藉由將不帶電荷之胺基酸取代為帶電荷之胺基酸增加以攜帶電荷，或在羧基端添加帶有電荷之胺基酸。在一實施例中，SEQ ID NO: 39 之胰高血糖素拮抗劑之 1-3 個不帶電荷之胺基酸被取代為一帶電荷之胺基酸。在一實施例中，該帶電荷之胺基酸係選自由下列胺基酸組成之群組：離胺酸、精胺酸、組胺酸、天冬胺酸及麩胺酸。特別是，本發明人發現到，在相對於天然胰高血糖素之第 28 及/或 29 號位置天然形成之胺基酸取代為帶電荷之胺基酸，及/或在羧基端添加 1-2 個帶有電荷之胺基酸，以增進在生理 pH 值範圍(例如 pH 值約在 6.5 至 7.5 之間)之溶液中的溶解度及穩定性。因此，在此所揭露之胰高血糖素拮抗劑之同類的修飾作用被預期在水性溶液中亦具有相似的功效，特別是在 pH 範圍在約 5.5-8.0 之間，用以保存原胜肽之生物活性時。

在一實施例中，SEQ ID NO: 39 之胰高血糖素拮抗劑在相對於天然胰高血糖素之第 28 及/或 29 號位置天然形成之胺基酸取代為帶負電荷之胺基酸(例如天冬胺酸及麩胺酸)，以及選擇性地添加帶負電荷之胺基酸於該胜肽之羧基端。在一實施例中，SEQ ID NO: 39 之胰高血糖素拮抗劑在相對於天然胰高

血糖素之第 29 號位置天然形成之胺基酸取代為帶正電荷之胺基酸(例如離胺酸、精胺酸、組胺酸)，以及選擇性地添加帶正電荷(例如離胺酸、精胺酸、組胺酸)之胺基酸於該胜肽之羧基端。在一實施例中，提供一具有較佳溶解度及穩定性之胰高血糖素相似物，其中該相似物包括 SEQ ID NO: 41，且其中 SEQ ID NO: 41 之第 23 或 24 號位置之至少一胺基酸被取代為酸性胺基酸，及/或在 SEQ ID NO: 41 之羧基端添加一酸性胺基酸。在一實施例中，酸性胺基酸係選自由下列胺基酸組成之群組：天冬胺酸、麩胺酸、半胱磺胺酸、同半胱磺胺酸。

在一實施例中，提供一具有較佳溶解度及穩定性之胰高血糖素拮抗劑，該胰高血糖素拮抗劑之胺基酸序列包括 SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 42, SEQ ID NO: 43 或 SEQ ID NO: 44，且其中第 23 或 24 號位置之至少一胺基酸被取代為非天然胺基酸(例如，第 23 或 24 號位置之至少一胺基酸取代為酸性胺基酸，且該酸性胺基酸係不同於對應 SEQ ID NO: 7 相同位置之胺基酸)。在一實施例中，提供一胰高血糖素激動劑包括 SEQ ID NO: 41 或 42，且第 23 號位置係為天冬醯胺酸，且第 24 號位置係為蘇胺酸，該胜肽更進一步包括 1-2 胺基酸添加於其羧基端，該胺基酸係選自由下列胺基酸組成之群組：離胺酸、精胺酸、組胺酸、天冬胺酸或麩胺酸。

本發明亦提供一胰高血糖素拮抗劑融合胜肽，其中在該

融合胜肽羧基端結合一第二胜肽。更進一步地，融合胜肽可包括一具有 SEQ ID NO: 44 之胰高血糖素摻抗劑胜肽，且更包括在其羧基端結合有 SEQ ID NO: 19 (GPSSGAPPPS), SEQ ID NO: 20 (Lys Arg Asn Arg Asn Asn Ile Ala) 或 SEQ ID NO: 21 (Lys Arg Asn Arg). 在一實施例中，SEQ ID NO: 19 之胺基酸序列(GPSSGAPPPS) 係透過一肽鍵結合於胰高血糖素摻抗劑之第 24 號位置之胺基酸。在另一實施例中，融合胜肽可包括一具有 SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 41 或 SEQ ID NO: 43 之胰高血糖素摻抗劑胜肽，且更包括在其第 24 號位置胺基酸結合有 SEQ ID NO: 19 (GPSSGAPPPS). 在另一實施例中，融合胜肽可包括一具有 SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 38, SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 41 或 SEQ ID NO: 43 之胰高血糖素摻抗劑胜肽，且更包括在其第 24 號位置胺基酸結合有 SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21 或 SEQ ID NO: 53. 在一實施例中，胰高血糖素摻抗劑融合胜肽包括一序列，係選自由下列序列組成之群組： SEQ ID NO: 46 及 SEQ ID NO 47. 在進一步實施例中，融合胜肽之羧基端羧酸取代為一鹽胺基。

在一實施例中，提供一胰高血糖素摻抗劑融合胜肽其中該融合胜肽之胰高血糖素摻抗劑部分係選自由下列序列組成

之群組：SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18 以及 SEQ ID NO: 39, 且 SEQ ID NO: 19 融合至胰高血糖素拮抗劑部分之羧基端，且其中 PEG 鏈之分子量係為 500 - 40,000 道耳吞。特別是在一實施例中，胰高血糖素拮抗劑係選自由下列序列組成之群組：SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 46 及 SEQ ID NO: 47 且其中 PEG 鏈之分子量係為 500 - 5,000 道耳吞，且在另一實施例中，PEG 鏈之分子量係約為 1,000 道耳吞。在進一步實施例中，融合胜肽之羧基端羧酸取代為一醯胺基。

胰高血糖素拮抗劑可進一步地包括添加 1-2 個帶電荷之胺基酸至羧基端。在一實施例中，其中添加 1-2 個帶電荷之胺基酸至 SEQ ID NO: 44 之羧基端，該胺基酸係為帶負電荷之胺基酸，包括例如麩胺酸及天冬胺酸。在一實施例中，胰高血糖素拮抗劑包括 SEQ ID NO: 42，其中對應於天然胰高血糖素胜肽 之第 27 及 28 號位置之至少其中之一係選自由下列胺基酸組成之群組：天冬胺酸、麩胺酸，且其中 SEQ ID NO: 42 係選擇性地進行修飾包括在羧基端添加 1-2 個帶負電荷之胺

基酸。在一實施例中，帶負電荷之胺基酸係為例如麩胺酸及天冬胺酸。

在另一實施例中，SEQ ID NO: 42 之胰高血糖素拮抗劑之溶解度可藉由共價鍵結一親水性基團於第 11, 12, 15, 16, 19 或 24 號位置胺基酸而增進，且在一實施例中，親水性基團係結合於第 11, 16 或 19 號位置，在進一步實施例中，親水性基團係結合於第 19 號位置。在一實施例中，親水性基團係為一血漿蛋白或是免疫球蛋白之 Fc 部位，且在另一實施例中，親水性基團係為一碳氫化合物鏈。在一實施例中，親水性基團係為聚乙二醇，其分子量範圍係約為 1,000 - 5,000 道耳吞。在另一實施例中，親水性基團係為聚乙二醇，其分子量至少為 20,000 道耳吞。在一實施例中，該經過聚乙烯化修飾的胰高血糖素拮抗劑包括 SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO: 44 或 SEQ ID NO: 45。

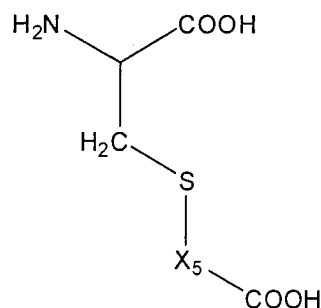
在一實施例中，胰高血糖素拮抗劑係由在此所述之 A-B-C 結構組成，其中 A 係選自下列群組：

- (i) 苯基乳酸 (PLA);
- (ii) 苯基乳酸之氧化衍生物;
- (iii) 一種 2-6 個胺基酸組成之胜肽，且該胜肽之其中兩連續

胺基酸係由一酯鍵或一醚鍵鍵結連接

B 代表 SEQ ID NO: 1 之胺基酸 i 到 26，其中 i 係為 3, 4, 5, 6, 或 7 之中隨意地由一或多個胺基酸修飾所組成，其中該胺基酸修飾係選自下列群組：

(iv) 第 9 號位置之天冬胺酸(依據 SEQ ID NO: 1 之胺基酸序列)取代為麩胺酸，半胱胺酸之硫酸化衍生物，同麩胺酸， β -同麩胺酸或一種半胱胺酸之烷羧化衍生物、或一種由半胱胺酸衍生出且包含下列化學結構之羧基烷衍生物：



其中 X_5 係為 C_1 - C_4 烷基， C_2 - C_4 烯屬烴或 C_2 - C_4 炔基

(v) 取代下列位置胺基酸之其中之一或二，第 10、20 及 24 號位置(依據 SEQ ID NO: 1 之胺基酸序列)，以一共價結合結合於酯、醚、硫醚、醯胺或烷基胺鍵合之胺基酸取代；

(vi) 取代下列位置胺基酸之其中之一或二，第 16、17、20、21 及 24 號位置(依據 SEQ ID NO: 1 之胺基酸序列)，以下列胺基酸組成之群組之一：半胱胺酸、離胺酸、鳥胺酸、同半胱胺酸以及乙醯苯丙胺酸 (Ac-Phe)，其中群組中之胺基酸係共價結合於其親水性之基團；

(vii) 將第 15 號位置之天冬胺酸(依據 SEQ ID NO: 1 之胺基酸序列)取代為半胱磺酸、麩胺酸、同麩胺酸以及同半磺胺酸；

(viii) 將第 16 號位置之絲胺酸(依據 SEQ ID NO: 1 之胺基酸序列)取代為半胱磺酸、麩胺酸、同麩胺酸以及同半磺胺酸；

(ix) 將第 16、20、21 及 24 號位置之一或多個位置取代為氨基異丁酸，依據 SEQ ID NO: 1 之胺基酸序列；

而 C 係為選自下列群組：

(x) X;

(xi) X-Y;

(xii) X-Y-Z; 以及

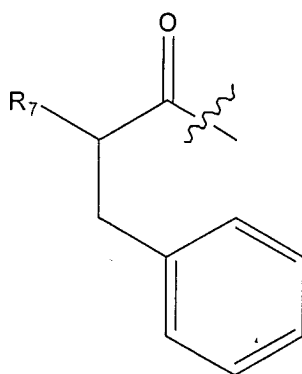
(xiii) X-Y-Z-R10,

其中 X 係為 Met, Leu, 或 Nle; Y 係為 Asn 或一帶電荷之胺

基酸；Z 係為蘇胺酸、甘胺酸、半胱胺酸、離胺酸、鳥胺酸(Orn)、同半胱胺酸或乙醯苯丙胺酸(Ac-Phe)，或帶電荷之胺基酸，其中 R10 係選自由 SEQ ID NOs: 19-21 及 53 所組成之群組；以及

(xiv)任何 (x)到 (xiii) 其中羧基端羧基係由胺基所取代。

在一特定方面來看，胰高血糖素拮抗劑包括一苯基乳酸之氧化衍生物。例如一苯基乳酸之酯或醚。在一實施例中，苯基乳酸之酯包括分子式 IV：



分子式 IV

其中 R7 係為一藉由 PLA 之氫氧基與具有親核性之羰基反應形成的酯。

在一特定實施例中，苯基乳酸之氧化衍生物包括一化學

基團，該化學基團係選自由聚合物(例如聚乙二醇)組成之群組，一碳水化合物、一胺基酸、一胜肽、或一脂質，例如脂肪酸或是類固醇，其中該化學基團係透過含氧鍵結(例如酯或醚鍵)連結於苯基乳酸。

在一特定實施例中，其化學基團係為一胺基酸，選擇性地，可為胜肽之一部份，例如在化學式 IV 中為一縮酯環肽。就此來看，苯乳酸可能在胰高血糖素拮抗劑之胺基端胺基酸殘基以外之位置，例如胰高血糖素拮抗劑包括一或多個(例如 1, 2, 3, 4, 5, 6, 或更多)胺基端胺基酸於苯乳酸殘基。舉例來說，胰高血糖素拮抗劑可包括苯乳酸在位置 n，其中 n 為胰高血糖素拮抗劑之第 2, 3, 4, 5, 或 6 號位置。

胺基酸之胺基端結合於苯乳酸殘基可以經由合成反應或自然發生。在一特定實施例中，在胺基酸之胺基端結合苯乳酸殘基係為自然發生。在一實施例中，胺基端結合苯乳酸殘基之胺基酸係為天然胰高血糖素之胺基端胺基酸。舉例來說，胰高血糖素拮抗劑之胺基端胺基酸序列可包括 SEQ ID NOs: 54-58 之一，其中苯乳酸係透過酯鍵結合於蘇胺酸：

SEQ ID NO: 54 His-Ser-Gln-Gly-Thr-PLA

SEQ ID NO: 55 Ser-Gln-Gly-Thr-PLA

SEQ ID NO: 56 Gln-Gly-Thr-PLA

SEQ ID NO: 57 Gly-Thr-PLA

SEQ ID NO: 58 Thr-PLA

在另一實施例中，胺基端其中之一或多個胺基酸可以被取代為天然胰高血糖素所包含之其他胺基酸。例如，當胰高血糖素拮抗劑在第 5 或 6 號位置為苯乳酸時，可降低其第 1 及/或 2 號位置之胺基酸對於第四型二肽酶之敏感性。更進一步地，在某些實施例中，胰高血糖素拮抗劑之第 1 號位置係選自下列群組之胺基酸：D-組胺酸、alpha, alpha-雙甲基咪唑乙酸 (DMIA)、N-甲基組胺酸、alpha-甲基組胺酸、咪唑乙酸、去胺基組胺酸、煙基組胺酸、乙醯組胺酸及同組胺酸。更進一步地，在某些實施例中，胰高血糖素拮抗劑之第 2 號位置係選自下列群組之胺基酸：絲胺酸、D-絲胺酸、D-丙胺酸、纈氨酸、甘胺酸、N-甲基絲胺酸、N-甲基丙胺酸以及胺基異丁酸(AIB)。同時，例如當胰高血糖素拮抗劑在第 4、5 或 6 號位置為苯乳酸時，胰高血糖素拮抗劑之第 3 號位置係為麩胺酸，和天然胰高血糖素拮抗劑在該位置為麩醯胺酸之情形相反。在本發明之一應用例中，胰高血糖素拮抗劑之胺基端胺基酸序列係為 SEQ ID NOs: 59-61 之一。

當胰高血糖素拮抗劑包括化學式 IV 之結構時，此聚合物可以是任何可與苯乳酸之氫氧基反應之聚合物。該聚合物可

以天然地具有一親核性之羰基。另外，該聚合物也可以由衍生地具有親核性之羰基。該聚合物可以是一由下列群組得到之衍生聚合物，聚醯胺、聚碳酸酯、聚烯及其衍生物，包括聚烯烴基氧化物、聚烯烴基噻唑，下列成分聚合物，包括：丙烯酸樹脂、甲基丙烯酸酯，包括聚(甲基丙烯酸甲酯)、聚(甲基丙烯酸乙酯)、聚(甲基丙烯酸丁酯)、聚(甲基丙烯酸異丁酯)、聚(甲基丙烯酸己酯)、聚(甲基丙烯酸異葵酯)、聚(甲基丙烯酸十二酯)、聚(甲基苯丙烯酸酯)、聚(甲基丙烯酸酯)、聚(異丙基丙烯酸酯)、聚(異丁基丙烯酸酯)，及聚(丙烯酸十八酯)；聚乙烯化合物，包括聚乙醇、聚乙酯、聚乙醚、聚乙鹵化物、聚(醋酸乙烯)、聚乙吡咯烷酮、聚乙交醇、聚矽氧烷、聚氨酯及其共聚物，纖維素包括烷基纖維素、烴基烷纖維素、纖維素酯、纖維素醚、硝化纖維素、甲基纖維素、乙酸纖維素、丙酸纖維素、丁酸纖維素、丁酸乙酸纖維素、醋酸鄰苯二甲酸纖維素、磺酸鈉鹽纖維素，聚丙烯，聚乙炔包括聚(乙二醇)、聚(環氧乙炔)，聚(對苯二甲酸乙二酯)及聚苯乙烯。

該聚合物可以是一可生物分解之聚合物，包括一合成性可生物分解聚合物(例如乳酸及乙醇酸之聚合物、聚酐、聚(正)酯、聚氨基鉀酸酯、聚(丁酸)、聚(戊酸)，以及聚己內酯)，以及一種自然性可生物分解之聚合物(例如藻酸及其他多醣類包

括葡萄聚糖、纖維素、膠原蛋白)，及其化學衍生物(化學基團之取代、添加，例如烷基、炔屬烴、氫氧化、氧化，及其他該領域具有通常知識者所熟習之修飾作用)，血清白蛋白及其他親水性蛋白質(例如玉蜀黍蛋白質及谷醇溶蛋白以及疏水性蛋白質))，及其共聚合體或混合物。一般而言，此些材料可經由酵素水解或經由體內水分，藉由表面或整體侵蝕而分解。

該聚合物可以是一具生物黏性之聚合物，例如 H. S. Sawhney, C. P. Pathak and J. A. Hubbell 在 *Macromolecules*, 1993, 26, 581-587 所發表的 bioerodible hydrogel，如在此所述，聚透明質酸、酪蛋白、明膠、明膠蛋白、聚酞、聚丙烯酸、藻酸、幾丁質、聚(甲基丙烯酸甲酯)、聚(甲基丙烯酸乙酯)、聚(甲基丙烯酸丁酯)、聚(甲基丙烯酸異丁酯)、聚(甲基丙烯酸己酯)、聚(甲基丙烯酸異葵酯)、聚(甲基丙烯酸十二酯)、聚(甲基苯丙烯酸酯)、聚(甲基丙烯酸酯)、聚(異丙基丙烯酸酯)、聚(異丁基丙烯酸酯)，及聚(丙烯酸十八酯)。

在一實施例中，此聚合物係為一水溶性聚合物。適當的水溶性聚合物包括在該領域熟習此技藝者所知，例如聚乙烯吡咯烷酮、羥丙基纖維素(HPC; Klucel)、羥丙基甲基纖維素(HPMC; Methocel)、羥丙基乙基纖維素、羥丙基丁基纖維素、羥丙基戊基纖維素、羥丙基乙基纖維素、甲基纖維素、乙基纖維素(Ethocel)、羥乙基纖維素，各種烷化纖維素、烴烷化纖

維素，各種酯纖維素、羧基纖維素、鈉羧甲基纖維素、鈣羧甲基纖維素、醋酸乙烯/巴豆酸共聚物，各種聚烴烷甲基丙烯酸、烴甲基甲基丙烯酸、甲基丙烯酸共聚物、聚甲基丙烯酸、聚丙烯酸甲酯、馬來酐/甲基乙烯酯共聚物、聚烯醇、鈉及鈣聚丙烯酸、聚丙烯酸、酸性羧基聚合物、羧酸聚甲烷、羧酸烯聚合物、聚氧化乙烷、聚氧化丙烷共聚物、甲基乙烯基醚-馬來酐共聚物、羧甲基醯胺、鉀甲基丙烯酸酯-二烯苯共聚物、聚乙二醇、聚環氧乙烷，及其衍生物、鹽類及其組合。

在一實施例中，此聚合物係為一聚烯烴基二醇，包括例如聚乙二醇(PEG)。

此碳水化合物可以是任何由一羰基結合一 α 殘基團所組成之碳水化合物。此碳水化合物可以是由一羰基結合一 α 殘基團所衍生之碳水化合物。就此而言，此碳水化合物可以是由單糖(例如葡萄糖、半乳糖、果糖)，雙糖(例如蔗糖、乳糖、麥芽糖)，寡糖(例如棉子糖、木蘇糖)，多糖(例如澱粉、澱粉酵素、支鏈澱粉、纖維素、幾丁質、愈傷葡聚糖、海帶聚糖、木聚糖、甘露聚糖、岩藻依多糖、半乳糖甘露聚糖)所衍生之碳水化合物。

就包括化學式 IV 之胰高血糖素拮抗劑而言，其脂質可以是任何由一羰基結合一 α 殘基團所組成之脂質。此脂質可以是由一羰基結合一 α 殘基團所衍生之脂質。就此而言，此脂

質可以是脂肪酸之衍生物(例如 C4-C30 之脂肪酸、二十酸, 前列腺素, 白三烯素, 凝血脂素, N-醯基膽胺), 甘油脂(例如單、雙、三取代甘油), 甘油磷脂(磷脂醯膽鹼、磷脂醯肌醇、磷脂醯乙醇胺、磷脂醯絲胺酸), 鞘脂質 (e.g., 鞘胺醇、腦醯胺), 固醇類 (e.g., 類固醇、膽固醇), 戊烯醇, 糖脂質, 聚酮。油、臘質、膽固醇、固醇、脂溶性維他命、單酸甘油、二酸甘油、三酸甘油、磷脂質。

在一實施例中, R7 之分子量約在 40kDa 或更少。因此, R7 之分子量約在 35 kDa 或更少, 約在 30 kDa 或更少, 約在 25 kDa 或更少, 約在 20 kDa 或更少, 約在 15 kDa 或更少, 約在 10 kDa 或更少, 約在 5 kDa 或更少, 約在 1 kDa 或更少。

在另一實施例中, 胰高血糖素拮抗劑包括如 A, 其 2-6 個胺基酸其中兩連續胺基酸係由酯鍵或醚鍵所連結。該胜肽可包括任何合成或自然生成之胺基酸, 其中兩連續胺基酸係由酯鍵或醚鍵所連結。在一特定實施例中, 該胜肽包括天然胰高血糖素之胺基酸序列。例如, 該胜肽可包括天然胰高血糖素之 j 到 6 (SEQ ID NO: 1), 其中 j 為 1、2、3、4 或 5。另外, 此胜肽可包括 SEQ ID NO: 1 之胺基端序列加上一或多個胺基酸修飾。第 1 號位置或第 2 號位置之胺基酸可降低其對於第四型二肽酶之敏感性。舉例來說, 胰高血糖素拮抗劑之第 1 號位置係為選自下列群組之胺基酸: D-組胺酸、alpha,

alpha-雙甲基咪唑乙酸 (DMIA)、 N-甲基組胺酸、 alpha-甲基組胺酸、咪唑乙酸、 去胺基組胺酸、煙基組胺酸、乙醯組胺酸及同組胺酸。更進一步地，在某些實施例中，胰高血糖素拮抗劑之第 2 號位置係選自下列群組之胺基酸：絲胺酸、 D-絲胺酸、 D-丙胺酸、纈氨酸、 甘胺酸、 N-甲基絲胺酸, N-甲基丙胺酸以及胺基異丁酸(AIB)。同時，胰高血糖素拮抗劑之第 3 號位置係為麩胺酸，和天然胰高血糖素拮抗劑在該位置為麩醯胺酸之情形相反。據此，胰高血糖素拮抗劑之胺基酸序列可包括如下：

Xaa₁-Xaa₂-Xaa₃-Thr-Gly-Phe (SEQ ID NO: 68);

Xaa₂-Xaa₃-Thr-Gly-Phe (SEQ ID NO: 69); 或

Xaa₃-Thr-Gly-Phe (SEQ ID NO: 70);

其中 Xaa₁ 係為選自下列群組：組胺酸、 D-組胺酸、 alpha, alpha-雙甲基咪唑乙酸(DMIA)、 N-甲基組胺酸、 alpha-甲基組胺酸、 咪唑乙酸、去胺基組胺酸、氫氧基組胺酸、乙醯化組胺酸及同組胺酸，Xaa₂ 係為選自下列群組：絲胺酸、 D-絲胺酸、 D-丙胺酸、纈氨酸、 甘胺酸、 N-甲基絲胺酸, N-甲基丙胺酸以及胺基異丁酸(AIB)，以及 Xaa₃ 係為麩胺酸或麩醯胺酸。

就胰高血糖素拮抗劑係由 A-B-C 結構組成而言，B 代表 SEQ ID NO: 1 之胺基酸 i 到 26，其中 i 係為 3, 4, 5, 6, 或 7 之中隨意地由一或多個胺基酸修飾所組成。在一特定實施例中，B 代表 SEQ ID NO: 1 之胺基酸第 7-26 號位置，且較佳地被進一步地修飾。

在一實施例中，B 具有至多三個胺基酸修飾。例如，B 代表在 SEQ ID NO: 1 具有至少一或更多的保留性胺基酸修飾。

在另一實施例中，B 包括一或多個胺基酸修飾，該胺基酸修飾係選自如本文所述之(iv) 至 (ix)所組成之群組。在一特定實施例中，B 包括如本文所述之(v) 及 (vi) 之一或二者之胺基酸修飾。在一進一步實施例中，B 包括選自由(iv)、(vii)、(viii)及 (ix)，同時包括 (v) 及 (vi)之胺基酸修飾組成之群組之一或其組合。

在另一特定實施例中，胰高血糖素拮抗劑包括在羧基端具有一或多個帶電荷之胺基酸。例如，Y 及/或 Z 可以是離胺酸、精胺酸、組胺酸、天冬胺酸及麩胺酸。在又一實施例中，胰高血糖素拮抗劑包括在具有 1-2 個帶電荷之胺基酸(例如離胺酸、精胺酸、組胺酸、天冬胺酸及麩胺酸)，由羧基端往 Z。更進一步來說，Z 伴隨在 1-2 個帶電荷之胺基酸且不包括 R10。

在一實施例中，胰高血糖素拮抗劑包括有一親水性基團，共價結合於胰高血糖素拮抗劑之胺基酸殘基，如本文所述。例如，胰高血糖素拮抗劑包括有一親水性基團，共價結合於胰高血糖素拮抗劑之第 1, 16, 20, 21, 或 24 號位置，依據 SEQ ID NO: 1 之順序。在另一實施例中，親水性基團係結合於胰高血糖素拮抗劑之羧基端胺基酸，在某些實施例中，係為由羧基端往 Z 第 1 或 11 號位置胺基酸。在又一實施例中，親水性基團係結合於苯乳酸，當 A 為苯乳酸、苯乳酸-苯丙胺酸或苯乳酸-蘇胺酸-苯丙胺酸，其中苯乳酸係經過修飾以包括親水性基團。在又一實施例中，在胰高血糖素拮抗劑之 N 或羧基端添加有一具有親水性基團之胺基酸。

在一實施例中，胰高血糖素拮抗劑包括如本文所述之一醯基或烷基。例如，醯化或烷化作用可發生在第 10, 20, 或 24 號位置胺基酸之側鏈，依據 SEQ ID NO: 1 之順序。在另一實施例中，醯化或烷化作用可發生在胰高血糖素拮抗劑之羧基端胺基酸，在某些情況下，係為羧基端往 Z 第 1 或 11 號位置胺基酸。在又一實施例中，當 A 為苯乳酸、苯乳酸-苯丙胺酸或苯乳酸-蘇胺酸-苯丙胺酸，其中苯乳酸係經過修飾包括有一醯基或烷基。

在本發明之實施例中，胰高血糖素拮抗劑之胺基酸序列

包括 SEQ ID NOs: 62, 64-67, 及 71 任何之一。

本文所揭露之胰高血糖素拮抗劑可適用於任何用途，如先前所述的其他胰高血糖素拮抗劑。因此，在此所述之胰高血糖素拮抗劑可用於治療高血糖症，或其他導因於血液中高胰高血糖素或血液中葡萄糖過高之代謝疾病。依據一實施例，在此所述之以胰高血糖素拮抗劑治療之病患係為一馴養動物，且在其他實施例中係為人類。研究指出，缺乏抑制胰高血糖素之糖尿病患者導致餐後高血糖，某種程度上係經由加速肝醣分解作用。由口服葡萄糖耐受試驗(OGTT)之血糖分析，且在有或沒有體抑素誘導胰高血糖素抑制之之下，顯示在較高胰高血糖素時血糖濃度也大量增加。因此，本發明之胰高血糖素拮抗劑可用於治療高血糖症，且寄望於對治療各種不同類型的糖尿病也有效，包括第一型、第二型或孕期型糖尿病，或是胰島素依賴型、非胰島素依賴型糖尿病，且降低糖尿病併發症例如腎疾病、視網膜病變及血管疾病。

Exendin-4，是一種由 39 個胺基酸組成之胜肽。其為一種對於受體之強力刺激物如 GLP-1。此胜肽被報導具有抑制食慾及可使體重下降之功效。本發明人發現，當在 Exendin-4 之末端序列添加至胰高血糖素的羧基端可增加其溶解度及穩定性，且不會減損胰高血糖素之生物活性。在一實施例中，在此揭露之胰高血糖素拮抗劑被施予患者作為降低食慾及體重

的方法。在一實施例中，患者係為一馴養動物，且在其他實施例中係為人類。在一實施例中，Exendin-4 之末端 10 個序列 (例如 SEQ ID NO: 19 (GPSSGAPPPS)) 結合到胰高血糖素拮抗劑之羧基端。此種融合蛋白質被寄望對於降低食慾、體重及體重維持具有藥理活性。在一實施例中，胰高血糖素拮抗劑可進一步地被修飾，包括將胺基酸序列 SEQ ID NO: 19 (GPSSGAPPPS) 結合至 SEQ ID NO: 42 之胰高血糖素拮抗劑第 24 號位置胺基酸，且施予患者以降低及維持體重。特別是，胰高血糖素拮抗劑胜肽包括選自由下列序列組成之群組：SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 42, SEQ ID NO: 43 以及 SEQ ID NO: 44，且進一步包括將 SEQ ID NO: 19 (GPSSGAPPPS) 結合至 SEQ ID NO: 42 之胰高血糖素拮抗劑第 24 號位置胺基酸，以降低食慾、體重及維持體重。在一實施例中，施予患者之胰高血糖素拮抗劑係包括 SEQ ID NO: 46 或 SEQ ID NO: 47。

此種用以減少食慾及促進體重流失之方法也被期望可用於減輕體重，避免體重回復，或是治療各種原因的肥胖，包括藥物引起的肥胖，及減少因肥胖引起的併發症例如血管疾病 (冠狀動脈疾病、心臟病、週邊血管疾病、缺血再灌注損傷

等)，高血壓，第二型糖尿病的發生，高血脂及肌骨骼疾病。

本發明之胰高血糖素胜肽可單獨使用，或與其它抗糖尿病或抗肥胖藥劑合併使用。該領域所熟知或正在研究中的抗糖尿病藥物包括胰島素，磺醯尿素類例如 tolbutamide (Orinase), acetohexamide (Dymelor), tolazamide (Tolinase), chlorpropamide (Diabinese), glipizide (Glucotrol), glyburide (Diabeta, Micronase, Glynase), glimepiride (Amaryl), 或是雙胍類例如 metformin (Glucophage) 或 phenformin, 或是胰島素增敏藥物例如 rosiglitazone (Avandia), pioglitazone (Actos), or troglitazone (Rezulin), 或其他 PPAR γ 抑制劑，可抑制碳水化合物分解的 α 糖解酵素抑制劑，例如 miglitol (Glyset), acarbose (Precose/Glucobay); exenatide (Byetta) 或 pramlintide；第四型二肽酶抑制劑，例如 vildagliptin or sitagliptin；第一型鈉依賴型葡萄糖運送子抑制劑；或果糖-1, 6-雙磷酸酶抑制劑。

該領域所熟知的抗肥胖藥劑包括食慾抑制劑，包括苯乙胺型興奮劑，phentermine (optionally with fenfluramine or dexfenfluramine), diethylpropion (Tenuate®), phendimetrazine (Prelu-2®, Bontril®), benzphetamine (Didrex®), sibutramine (Meridia®, Reductil®)；rimonabant (Acomplia®)；其他大麻受體拮抗劑；腸道荷爾蒙；鹽酸氟西汀 (Prozac)；Qnexa

(topiramate and phentermine), Excalia (bupropion and zonisamide) or Contrave (bupropion and naltrexone); 或脂肪分解酵素抑制劑，類似於 xenical (Orlistat) 或 Cetilistat (also known as ATL-962), 或 GT 389-255。

本發明之胰高血糖素拮抗劑亦可施予在那些具有分解代謝消瘦症狀之病患上。估計超過一半的癌症患者具有分解代謝消瘦之情形，也就是體重快速下降、虛弱，且體脂肪及肌肉的降低。這些症狀同樣出現在愛滋病患者身上，且亦表現於細菌及寄生蟲疾病患者，風濕性關節炎患者，及慢性的腸、肝臟、肺臟及心臟疾病患者。通常與厭食症有關，以及出現於老化或是生理創傷的結果。分解代謝消瘦係為一種會降低生活品質的症狀，使已知情況更加惡化，甚至會致死。本發明人預期在此所述之胰高血糖素拮抗劑可施加於有分解代謝消瘦症狀之患者身上。

藥學組成物包括在此所揭露之胰高血糖素拮抗劑，可配製且施用於患者，利用標準醫學可接受載體及該領域專門人士所熟知的施加路徑。據此，本發明同時包括藥學組成物，該藥學組成物包括一或多個在此所揭露之胰高血糖素拮抗劑與醫學可接受載體之組合。藥學組成物可單獨包括胰高血糖素拮抗劑作為完全的藥學活性成分，亦可將胰高血糖素拮抗劑與一或多種附加活性劑作為組合。在一實施例中，提供一

藥學組成物包括本發明之胰高血糖素拮抗劑以及一活化 GLP-1 受器之成份(例如 GLP-1, GLP-1 相似物, exendin-4 相似物, 或其衍生物)。在一實施例中, 提供一藥學組成物包括本發明之胰高血糖素拮抗劑以及胰島素或胰島素相似物。另外, 提供一可導致體重降低或防止體重回復之成分, 包括 SEQ ID NO: 42 之序列, 更包括將氨基酸序列 SEQ ID NO: 19 (GPSSGAPPPS)連結於 SEQ ID NO: 42 之第 24 號位置胺基酸, 以及一抗肥胖胜肽。適當的抗肥胖胜肽包括在美國專利 5,691,309 號、6,436,435 號或是美國公開 20050176643 號所揭露, 且包括但不受限於如 GLP-1, 胃抑素 (Gastric Inhibitory Polypeptide), MP1, PYY, MC-4, 瘦體蛋白。

在一實施例中, 提供一藥學組成物包括本發明所揭露之胰高血糖素胜肽, 較佳地為無菌的且純度在至少為 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 或 99%, 以及以一醫藥可接受稀釋度, 載體或輔藥。此成分包括胰高血糖素胜肽, 其濃度至少為 0.5 mg/ml, 1 mg/ml, 2 mg/ml, 3 mg/ml, 4 mg/ml, 5 mg/ml, 6 mg/ml, 7 mg/ml, 8 mg/ml, 9 mg/ml, 10 mg/ml, 11 mg/ml, 12 mg/ml, 13 mg/ml, 14 mg/ml, 15 mg/ml, 16 mg/ml, 17 mg/ml, 18 mg/ml, 19 mg/ml, 20 mg/ml, 21 mg/ml, 22 mg/ml, 23 mg/ml, 24 mg/ml, 25 mg/ml 或更高。在一實施例中, 此藥學組成物包括無菌的水溶液, 且存放於不同的容器中。該成分

可依據一實施例使用，先配製成一預配製溶液以供注射使用。在其他實施例中，此藥學組成物包括凍乾之粉末。該藥學組成物可進一步包裝成套件之一部份，該套件包括用於施加於患者之可拋式裝置。該容器或套件可標示儲存於常溫或低溫下。

在本文所提到的醫療方法、藥學組成物、套件及其他相似實施例，係考量到胰高血糖素拮抗劑包括其所有醫藥上可接受之鹽的使用。

聚乙二醇化之胰高血糖素拮抗劑可增進其水溶性。然而，增加聚乙二醇鏈長度，或結合複數個聚乙二醇鏈於胜肽，例如聚乙二醇鏈分子量在大於 5,000 道耳吞，可延長其作用時間。依據一實施例，提供一胰高血糖素拮抗劑其中包括一或多個聚乙二醇鏈，聚乙二醇鏈之總和分子量大於 5,000 道耳吞，且在另一實施例中，聚乙二醇鏈之總和分子量大於 10,000 道耳吞。此種經過修飾的胰高血糖素拮抗劑可延長其作用時間，且不會減少其生物活性。據此，此成分可預防性地施用以延長其胰高血糖素拮抗劑施用之效果。

在一實施例中，聚乙二醇化之胰高血糖素拮抗劑包括選自由下列序列組成之群組：SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO: 44 及 SEQ ID NO: 45，其中第 11, 16 或 19 號

位置胺基酸殘基之側鏈係共價結合一或多個聚乙二醇鏈，其中聚乙二醇鏈之總和分子量約大於 10,000 道耳吞。在一實施例中，聚乙二醇鏈之總和分子量約大於 10,000 道耳吞，且小於或等於 40,000 道耳吞。在一實施例中，聚乙二醇化之胰高血糖素拮抗劑包括 SEQ ID NO: 9 或 SEQ ID NO: 43，其中第 11 號位置胺基酸殘基之側鏈係共價結合一或多個聚乙二醇鏈，其中聚乙二醇鏈之總和分子量範圍約在 10,000 - 40,000 道耳吞。在一實施例中，聚乙二醇化之胰高血糖素拮抗劑包括 SEQ ID NO: 10 或 SEQ ID NO: 44，其中第 16 號位置胺基酸殘基之側鏈係共價結合一或多個聚乙二醇鏈，其中聚乙二醇鏈之總和分子量範圍約在 10,000 - 40,000 道耳吞。在一實施例中，聚乙二醇化之胰高血糖素拮抗劑包括 SEQ ID NO: 11 或 SEQ ID NO: 45，其中第 19 號位置胺基酸殘基之側鏈係共價結合一或多個聚乙二醇鏈，其中聚乙二醇鏈之總和分子量範圍約在 10,000 - 40,000 道耳吞。在一實施例中，聚乙二醇化之胰高血糖素拮抗劑包括 SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO. 14, SEQ ID NO: 15 或 SEQ ID NO: 16，其中第 19 號位置胺基酸殘基之側鏈係共價結合一或多個聚乙二醇鏈，其中聚乙二醇鏈之總和分子量約為 10,000 道耳吞，在另一實施例中聚乙二醇鏈之總和分子量範圍約在 20,000 - 40,000 道耳吞。在一實施例中，聚乙二醇化之胰高血糖素拮抗劑包括 SEQ ID NO: 12,

SEQ ID NO: 17 or SEQ ID NO: 22，其中第 11 及 19 號位置胺基酸殘基之側鏈係共價結合一或多個聚乙二醇鏈，其中聚乙二醇鏈之總和分子量約為 10,000 道耳吞。

在此所揭露之胰高血糖素拮抗劑可與其他活性劑組合使用，包括例如胰島素，以治療因過度胰高血糖素活性導致的疾病或症狀。在一實施例中，經聚乙二醇化修飾之胰高血糖素拮抗劑共價結合一分子量約大於 10,000 道耳吞之聚乙二醇鏈，可用以配合胰島素之使用，以幫助維持糖尿病患者之血糖濃度。在此所揭露之胰高血糖素拮抗劑可與胰島素作為單一成分共同施用，作為不同成分同時間施用，或另外地，可將胰高血糖素拮抗劑與胰島素在不同時間施用。在一實施例中，一成分包括胰島素及另一成分包括胰高血糖素拮抗劑，分別在 12 小時內施用。胰高血糖素拮抗劑與胰島素施用之正確比例應視糖尿病患者之血糖濃度而定，以及由經驗累積進行判斷。

本發明所揭露亦包含本文所述之已修飾的胰高血糖素拮抗劑之聚合體。兩個以上的胰高血糖素拮抗劑胜肽可利用該領域所熟知的連結劑予以連結。例如，可在兩個已修飾的胰高血糖素拮抗劑之間利用雙功能硫醇交叉連結劑或雙功能胺類交叉連結劑將其連結形成二聚體，特別是胰高血糖素拮抗劑（位於 11, 16 或 19 號位置）被以半胱胺酸、離胺酸、鳥胺

酸、同半胱胺酸或乙醯苯丙胺酸(例如 SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11 以及 SEQ ID NO: 12)所取代。該二聚體可以是同二聚體或是異二聚體。在一實施例中，該二聚體可經由兩胰高血糖素拮抗劑所形成，其中該胰高血糖素拮抗劑胜肽係分別選自由下列序列所組成之群組：SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 45, SEQ ID NO: 46, 或 SEQ ID NO: 47，其中兩胰高血糖素拮抗劑胜肽係透過一連結子將兩者的第 11 號位置、第 16 號位置、第 19 號位置之一或其組合予以連結。在一實施例中，其連結係為一雙硫鍵，分別形成於兩胜肽之 Cys11 到 Cys11，或 Cys19 到 Cys19，或 Cys11 到 Cys19 之間。

相似地，一二聚體可經由兩胰高血糖素拮抗劑所形成，其中該胰高血糖素拮抗劑胜肽係分別選自由下列序列所組成之群組：SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 38, SEQ ID NO: 39 以及 SEQ ID NO: 42，其中連結之胺基酸位置係分別選自由下列位置組成之群組：第 16, 21 及 24 號位置。

在一實施例中，提供一胰高血糖素拮抗劑之二聚體，各

個胰高血糖素拮抗劑包括 SEQ ID NO: 46，其中兩胰高血糖素拮抗劑胜肽係透過一雙硫鍵將兩胰高血糖素拮抗劑之第 25 號位置胺基酸予以連結。在另一實施例中，提供一胰高血糖素拮抗劑之二聚體，各個胰高血糖素拮抗劑包括 SEQ ID NO: 47，其中兩胰高血糖素拮抗劑胜肽係透過一雙硫鍵將兩胰高血糖素拮抗劑之第 35 號位置胺基酸予以連結。在一實施例中，提供一二聚體，係分別由 SEQ ID NO: 46 及 SEQ ID NO: 47 之胰高血糖素拮抗劑所形成，其中 SEQ ID NO: 47 之第 10 號位置胺基酸係為麩胺酸。

在一實施例中，該二聚體係為同二聚體，係包括二胰高血糖素拮抗劑融合蛋白，其中該胰高血糖素拮抗劑融合蛋白係選自由下列序列所組成之群組：SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 42，以及該胰高血糖素拮抗劑之藥學上可接受鹽類。在一實施例中，提供一二聚體，該二聚體係由一第一胰高血糖素拮抗劑與一第二胰高血糖素拮抗劑透過一連結子結合而成，其中該第一胰高血糖素拮抗劑及第二胰高血糖素拮抗劑係分別選自由下列序列所組成之群組：SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 41, 及 SEQ ID NO: 42，以及該胰高血糖素拮抗

劑之藥學上可接受鹽類。在另一實施例中，該第一胰高血糖素拮抗劑及第二胰高血糖素拮抗劑係分別選自由下列序列所組成之群組：SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 36 及 SEQ ID NO: 39。

在另一實施例中，該二聚體係為由胰高血糖素拮抗劑所組成之同二聚體，其中該胰高血糖素拮抗劑選自由下列序列所組成之群組：SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 31。在另一實施例中，提供一胰高血糖素拮抗劑二聚體，係由一第一胰高血糖素與一第二胰高血糖素透過一連結子結合而成，其中該第一胰高血糖素拮抗劑及第二胰高血糖素拮抗劑係分別選自由下列序列所組成之群組：SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27 及 SEQ ID NO: 28。在另一實施例中，提供一胰高血糖素拮抗劑同二聚體，係選自由下列序列所組成之群組：SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 11 and SEQ ID NO: 12，其中胰高血糖素拮抗劑更包括一聚乙二醇鏈，共價鍵結於胰高血糖素拮抗劑之第 11、19 號位置。

在一實施例中，本發明之胰高血糖素胜肽係為套件之一部分。在一實施例中，該套件係用以將該胰高血糖素拮抗劑施用於所需之患者，其中該套件包括一經過修飾之胰高血糖

素撾抗劑，其中該胰高血糖素撾抗劑選自由下列序列所組成之群組：

(1) 一胰高血糖素撾抗劑選自由下列序列所組成之群組：

SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 38, SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 42, SEQ ID NO: 43 及 SEQ ID NO: 44；

(2) 一聚乙二醇化胰高血糖素撾抗劑，其中該聚乙二醇鏈係共價鍵結於胰高血糖素撾抗劑之第 11,12, 15, 16, 19, 24 或 35 號位置，其中該胰高血糖素撾抗劑選自由下列序列所組成之群組：SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 46 及 SEQ ID NO: 47，其中該聚乙二醇之分子量範圍約在 500 - 40,000 道耳吞；

(3) 一融合胜肽包括一胰高血糖素撾抗劑，其中該胰高血糖素撾抗劑選自由下列序列所組成之群組：SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 42, SEQ ID NO: 43 及 SEQ ID NO: 44，且 SEQ ID NO: 19 之胜肽融合於該胰高血糖素撾抗劑之末端胺基酸；

(4) 一聚乙二醇化胰高血糖素拮抗劑，包括在該胰高血糖素拮抗劑之羧基端結合有 SEQ ID NO: 19 (GPSSGAPPPS)，其中該共價鍵結之聚乙二醇之分子量範圍約在 500 - 40,000 道耳吞；

在一實施例中，提供一套件，包括可將胰高血糖素拮抗劑成分施用於患者之裝置。該套件更包括各種不同之容器，例如小藥瓶、試管、瓶子，及相似物。較佳地，套件中包括有使用說明書。在一實施例中，該套件之裝置係為噴霧分配裝置，其中該成分係預先包裝於噴霧裝置內。在另一實施例中，套件包括有一注射器及一針頭，及在一實施例中，胰高血糖素拮抗劑係預先包裝於注射器中。

結合 α, α -雙取代胺基酸

在一實施例中，提供一胰高血糖素拮抗劑，包括在胰高血糖素拮抗劑(約在第 12-29 號位置胺基酸，依據野生型胰高血糖素之序列)之羧基端部分具有一或多個 α, α -雙取代胺基酸(胺基酸取代或插入)。在一特定實施例中， α, α -雙取代胺基酸係為一氨基異丁酸(AIB)，一種以相同或不同基團進行雙取代之胺基酸，其中該基團係選自由下列基團組成之群組：甲基、乙基、丙基、丁基，或以環辛烷、環庚烷(例如 1-胺基環辛烷-1-羧酸)。在某些實施例中，胰高血糖素拮抗劑之第 16, 17, 18,

20, 21, 24 或 29 號位置(依據野生型胰高血糖素之胺基酸序列號)之其中一、二、三、四或更多，係由 α, α -雙取代胺基酸所取代。在一特定實施例中，胰高血糖素拮抗劑之第 16, 20, 21, 或 24 號位置(依據野生型胰高血糖素之胺基酸序列號)之其中一、二、三、四或更多，係由氨基異丁酸所取代。在一特定實施例中，胰高血糖素拮抗劑具有一或多個 α, α -雙取代胺基酸，例如氨基異丁酸，且該胰高血糖素拮抗劑具有羧基端羧酸且在羧基端未被醯胺化。

與親水性基團之結合

在一實施例中，本文所揭露之胰高血糖素拮抗劑可共價結合親水性基團以增加其溶解度。親水性基團可在任何適當條件下結合於胰高血糖素拮抗劑，以使蛋白質與一活性聚分子反應。任何在該領域所熟知的技術皆可被使用，包括經由醯化、還原性烷化、邁克爾加成反應、硫醇烷化，或其他化學選擇性連結/結合方法，透過將聚乙二醇之反應基團(例如醛基、胺基、酯基、硫醇基、 α -含氯乙酰基、馬來醯亞胺基、胍基)。活化基團可被用於將水溶性聚合物連結於一或多個蛋白質，包括在無碘、順丁烯醯亞胺、硫氫基、硫醇基、三氯甲基磺酸鹽、tresylate, azidirine、環氧乙烷及 5-吡啶基之情況下。若利用還原性烷化法結合時，該聚合物應具有一

單一的活性醛基，可控制聚合反應的程度。可參閱例如 Kinstler et al., *Adv. Drug. Delivery Rev.* 54: 477-485 (2002); Roberts et al., *Adv. Drug Delivery Rev.* 54: 459-476 (2002); and Zalipsky et al., *Adv. Drug Delivery Rev.* 16: 157-182 (1995).

合適的親水性基團包括聚乙二醇(PEG)，聚丙二醇，glycol, polyoxyethylated polyols (例如 POG), polyoxyethylated sorbitol, polyoxyethylated glucose, polyoxyethylated glycerol (POG), polyethylene glycol propionaldehyde, 乙二醇/丙二醇之共聚物，甲氧基聚乙二醇，mono-(C1-C10) alkoxy- or aryloxy-聚乙二醇，羧甲基纖維素，聚縮醛，聚乙烯醇(PVA)，聚乙烯吡咯烷酮，聚-1,3 二氧戊烷，乙烯/馬來酸酐共聚物，聚(beta-胺基酸)(同聚合物或隨意共聚物)，聚(n-乙烯基吡咯烷酮) 聚乙二醇，propylene glycol homopolymers (PPG)，及其他 polyalkylene oxides，polypropylene oxide/ethylene oxide copolymers, 或其他多糖高分子，聚糖體或葡聚糖及其混合物。

在某些實施例中，該親水性基團例如聚乙二醇鏈，其分子量範圍係為 500 - 40,000 道耳吞。在一實施例中，該親水性基團例如聚乙二醇鏈，其分子量範圍係為 500 - 5,000 道耳吞，或 1,000 - 5,000 道耳吞。在另一實施例中，該親水性基團例如聚乙二醇鏈，其分子量範圍係為 10,000 - 20,000 道耳吞。

吞。在又一實施例中，該親水性基團例如聚乙二醇鏈，其分子量範圍係為 20,000 – 40,000 道耳吞。

在一實施例中，葡聚糖可作為親水性基團。葡聚糖係為葡萄糖單元之多糖類聚合物，主要藉由 1-6 鍵結所連結。葡聚糖可具有多種分子量範圍，例如約 1 千道耳吞至 100 千道耳吞，或是從 5, 10, 15 或 20 至 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 或 90 千道耳吞。

直線型或分支型聚合物皆是可考慮的。導致結合之製備工作可能為單分散或多分散，且可使每胰高血糖素拮抗劑約具有 0.5, 0.7, 1, 1.2, 1.5 或 2 聚合物基團。

在一實施例中，該親水性基團係為一聚乙二醇(PEG)鏈，選擇性地連結余胰高血糖素拮抗劑之一或多個位置，包括 1, 16, 17, 21, 24, 29 號位置(依據野生型胰高血糖素之序列)，在羧基端序列範圍內的位置，例如第 30 號位置，或在 N 或羧基端胺基酸位置。在某些實施例中，原來位置的胺基酸被取代為具有適於交叉連結的側鏈的胺基酸，以幫助親水性基團連結於胰高血糖素拮抗劑。在說明例中，原來位置的胺基酸被取代為離胺酸、半胱胺酸、鳥胺酸、同半胱胺酸或乙醯化苯丙胺酸。在某些實施例中，胺基酸經過修飾具有親水性基團，並添加於胰高血糖素拮抗劑的 N 或羧基端。

連結物及融合物

本文所揭露同時包括在本文之胰高血糖素胜肽所結合的其他結合物，選擇性地透過共價鍵結及透過一連結子，以結合於該結合物。該連結可經由化學共價鍵，物理力例如靜電力、氫鍵、離子鍵、凡得瓦力、親水性或疏水性作用力。可利用各種不同的非共價鍵結方式，包括生物素-抗生物素蛋白，配體/受體，酵素/受質，核苷酸/核苷酸結合蛋白，脂質/脂質結合蛋白，細胞黏合分子；或任何結合該結合物或其彼此間具有親和力之片段。

胰高血糖素拮抗劑可結合於一結合基團，透過標的胺基酸直接共價鍵結於一有機衍生物，可與選擇性之側鏈或是該標的胺基酸之胺基端、羧基端胺基酸進行反應。胰高血糖素拮抗劑或連結物之反應基團包括例如醛基、胺基、酯基、硫醇基、 α -含氯乙酰基、馬來醯亞胺基、胍基。有機衍生物包括例如馬來醯亞胺琥珀醯亞胺酯(透過半胱胺酸殘基結合)，羥基丁二醯亞胺(透過離胺酸殘基結合)，戊二醛，琥珀酸酐，或其他在該領域所熟知成分。另外，結合基團可間接地透過一中介載體結合於胰高血糖素拮抗劑，例如多醣或多肽載體。多醣載體包括例如胺葡聚糖。多肽載體包括例如聚離胺酸，聚麩胺酸，聚天冬胺酸，其共聚合物，以及其胺基酸或其他胺

基酸之混合聚合物，例如絲胺酸，以提供其載體良好的可溶性結構。

半胱胺醯基通常會與 α -鹵代乙酸酯(及相關胺類)進行反應，例如氯乙酸或氯乙醯胺，以產生羧甲基或 carboxyamidomethyl 之衍生物。半胱胺酸殘基亦會衍生自與 bromotrifluoroacetone, α -bromo- β -(5-imidazolyl)propionic acid, chloroacetyl phosphate, N-alkylmaleimides, 3-nitro-2-pyridyl disulfide, methyl 2-pyridyl disulfide, p-chloromercuribenzoate, 2-chloromercuri-4-nitrophenol, 或 chloro-7-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazole 之反應中。

組胺醯基會衍生自與焦碳酸二乙酯在 pH 值為 5.5-7.0 之反應下，因為此化合物對於組胺酸側鏈之相對專一性較高。對溴苯醯甲基溴同樣具有作用；此反應之較佳條件係在 0.1M 之二甲砷酸鈉且 pH = 6.0。

離胺醯基及胺基端殘基會與琥珀酸及其他羧酸酐進行反應。和此些成分之衍生反應可反轉改變離胺醯基所帶電荷。其他適於衍生具有 α -胺殘基的包括有亞胺酯，例如 methyl picolinimide, pyridoxal phosphate, pyridoxal, chloroborohydride, trinitrobenzenesulfonic acid, O-methylisourea, 2,4-pentanedione, 以及與乙醛酸之轉胺酶催化反應。

精胺鹽基可藉由與某些傳統成份發生反應進行修飾，包括苯甲鹽基、2,3-丁二酮、1,2-環己二酮及茚三酮。精胺鹽基之衍生反應需要在鹼性環境下，因其胍功能基具有較高的 pKa。更進一步地，此些成分除可與精胺酸的基團發生反應外，亦可與精胺酸的 epsilon-胺基反應。

酪胺酸的特定修飾可經由在酪胺酸殘基之引介光譜標記完成，此標記係經由芳香族重氮成分或四硝基甲烷之反應形成。最常見地，將 N-乙鹽基及四硝基甲烷用以分別形成 O-乙鹽基酪胺酸類及 3-氮衍生物。

羧酸側基團(天冬胺鹽基或穀胺鹽基)係選擇性地藉由與碳化二亞胺($R-N=C=N-R'$)反應修飾，其中 R 及 R' 係為不同烷基團，例如 1-環己基-3-(2-嗎琳基-4-乙基)-碳化二亞胺或 1-乙基-3-(4-azonia-4,4-雙甲基戊基)-碳化二亞胺。更進一步地，天冬胺基或穀胺基藉由與銨離子反應而轉變為天冬鹽基或穀鹽基。

其他修飾作用包括脯胺酸及離胺酸的氫氧化，絲胺酸及蘇胺酸的磷酸化，離胺酸、精胺酸及組胺酸的側鏈之 alpha-氨基的甲基化 (T. E. Creighton, *Proteins: Structure and Molecular Properties*, W.H. Freeman & Co., San Francisco, pp. 79-86 (1983))，天冬鹽基或麩鹽基的去鹽基化，胺基端氨基的乙鹽基化，及/或羧基端羧基的鹽基化或酯化。

另一種共價修飾包括化學地或酵素地偶合糖苷結合於胰高血糖素拮抗劑。糖類可結合於精胺酸及組胺酸，自由羧酸基，自由硫氫基(例如半胱胺酸)，絲胺酸、蘇胺酸及氫氧化脯胺酸的自由氫氧基，在酪胺酸或色胺酸之芳香基，麩醯胺酸的醯胺基。這些方法在下列文獻中有描述，參閱公開於 1987 年 9 月 11 日的 WO87/05330 號前案，以及 in Aplin and Wriston, CRC Crit. Rev. Biochem., pp. 259-306 (1981)。

連結基團可結合於任何在此所描述的胰高血糖素拮抗劑，包括但不受限於一異源性胜肽或一多胜肽(包括例如血漿蛋白)，一標靶藥物，一免疫球蛋白或其蛋白質(例如可變區，CDR 或 Fc 部位)，一診斷標記例如同位素、螢光或酵素標記，一聚合物包括水溶性聚合物，或其他治療性或診斷性藥物。在一實施例中提供一結合物，其包括一本發明的胰高血糖素拮抗劑，以及一血漿蛋白，其中血漿蛋白係選自由下列蛋白組成之群組：白蛋白、運鐵蛋白、纖維素原、球蛋白。

在某些實施例中，連結子包括由 1-60、1-30 個原子或更多之鏈長，2-5、2-10、5-10、10-20 個原子之鏈長。在某些實施例中，組成連結子之骨幹之鏈原子係選自由下列元素組成之群組：碳、氧、氮及硫。鏈原子及結合子係選自依據其期望之溶解度(親水性)，以提供一更易溶解之結合物。在某些實施例中，連結子提供一官能基，該官能基易受到酵素分解或

其他催化劑或在標的組織會器官或細胞中水解。在某些實施例中，連結子之長度足以減少立體結構障礙之效能。若連結子係為一共價鍵或一肽鍵且結合物係為一多肽，整體結合物係為一融合蛋白。此類肽連結子可以為任何長度。說明例之連結子係由約 1-50 胺基酸長度，5-50，3-5，5-10，5-15，或 10-30 胺基酸長度。融合蛋白可以擇一地藉由該領域具有通常知識者所熟知的基因重組工程方法所生成。

如前所述，在某些實施例中，胰高血糖素攔抗劑結合有，例如融合於一免疫球蛋白或其部位(例如可變區，CDR 或 Fc 部位)。已知的免疫球蛋白(Ig)種類包括 IgG, IgA, IgE, IgD 或 IgM。Fc 部位係為免疫球蛋白重鏈的羧基端部位，用以結合於 Fc 受體以表現活性例如再利用(以延長其半生期)，抗體依賴毒殺細胞反應(ADCC)，及補體依賴毒殺細胞反應 (CDC)。

舉例來說，依據某些定義而言，人類免疫球蛋白 IgG 之重鏈 Fc 部位由 Cys226 延伸至重鏈 Fc 部位的羧基端。「樞紐部位」一般是由人類免疫球蛋白 IgG1 的 Glu216 延伸至 Pro230 (其他種類的免疫球蛋白 IgG 的樞紐部位可對齊於 IgG1 系列，藉由對齊於那些包含在半胱胺酸連結的半胱胺酸)。人類免疫球蛋白 IgG 的 Fc 部位包括兩不變區域 CH2 及 CH3。人類免疫球蛋白 IgG 的 Fc 部位之 CH2 區係由第 231 號位置延伸至 341 號位置。人類免疫球蛋白 IgG 的 Fc 部位之 CH2

區係由第 342 號位置延伸至 447 號位置。免疫球蛋白、其片段或區域的胺基酸順序係依據 Kabat et al. 1991, Sequences of Proteins of Immunological Interest, U.S. Department of Public Health, Bethesda, Md. 在一相關實施例中，Fc 部位可包括一或多個天然或修飾過的免疫球蛋白重鏈的不變區域，和 CH1 相較之下，例如，免疫球蛋白 IgG 及 IgA 的 CH2 與 CH3 區域，或免疫球蛋白 IgE 的 CH3 及 CH4 區域。

適合的連結基團包括免疫球蛋白序列之部分例如 FcRn 結合部。FcRn 是一種拯救受體，負責免疫球蛋白的再利用且將其送回血液中循環。FcRn 部位中結合 IgG 之區域已利用 X 光結晶法顯示(Burmeister et al. 1994, Nature 372:379)。FcRn 和 Fc 主要接觸之區域係接近於 CH2 和 CH3 連接的位置。主要接觸之位置包括 CH2 之胺基酸序列第 248, 250-257, 272, 285, 288, 290-291, 308-311, 及 314 號位置，以及 CH3 之胺基酸序列第 385-387, 428, 及 433-436 號位置。

某些連結基團可以包括或不包括 FcγR 部。FcγR 部係用以負責 ADCC 及 CDC 進行。Fc 區域與 FcγR 部直接接觸的位置在於第 234-239 號胺基酸(低樞紐部位)，第 265-269 號胺基酸(B/C loop)，第 297-299 號胺基酸(C'/E loop)，及第 327-332 號胺基酸(F/G loop)。IgE 的低樞紐部位也包括在 FcRI 結合中(Henry, et al., Biochemistry 36, 15568-15578, 1997)。IgA 受體

結合的殘基已發表於 Lewis et al., (J Immunol. 175:6694-701, 2005)。IgE 受體結合的殘基已發表於 (J Biol Chem. 279(34):35320-5, 2004)。

免疫球蛋白之 Fc 區域亦可形成胺基酸修飾。此可變的 Fc 區域至少包括一胺基酸修飾在 Fc 區域之 CH3 區(第 342-447 號位置)，及/或至少一胺基酸修飾在 Fc 區域之 CH2 區(第 231-341 號位置)。某些突變據信可增加對 FcRn 之親和力，包括 T256A、T307A、E380A 及 N434A(Shields et al. 2001, J. Biol. Chem. 276:6591)。其他突變可減少 Fc 區域對 FcγRI、FcγRIIA、FcγRIIB，及/或 FcγRIIIA 之親和力，在不明顯減少 FcRn 的親和力情形下。例如，將 Fc 區域第 297 號位置的天冬醯胺酸取代為丙胺酸或其他胺基酸，可除去高度保留的 N-部，以及伴隨著 Fc 區域半生期的延長而導致免疫力的降低，同時也減少結合於 FcγRs(Routledge et al. 1995, Transplantation 60:847; Friend et al. 1999, Transplantation 68:1632; Shields et al. 1995, J. Biol. Chem. 276:6591)。在 IgG1 之第 233-236 號位置的胺基酸修飾可減少結合於 FcγRs (Ward and Ghetie 1995, Therapeutic Immunology 2:77 及 Armour et al. 1999, Eur. J. Immunol. 29:2613)。有些胺基酸取代公開於在 US Patents 7,355,008 及 7,381,408。

本發明亦包括胰高血糖素融合胜肽或蛋白質，其中一第

二胜肽或多胜肽融合在其末端，例如在胰高血糖素拮抗劑之羧基端。在某些實施例中，融合在胰高血糖素拮抗劑之羧基端的第二胜肽係為 GPSSGAPPPS, KRNRNNIA 或 KRNR 連結於其第 29 號位置胺基酸(依據野生型胰高血糖素之胺基酸序列號)。在其他實施例中，第二胜肽係為 XGPSSGAPPPS，其中 X 係選自由 20 種常見胺基酸組成之群組，例如麩胺酸、天冬胺酸或甘胺酸。在一實施例中，X 代表一胺基酸例如半胱胺酸，進一步包括一共價結合於該胺基酸的親水性基團。諸如此種之羧基端衍生物可增進其溶解度，同時也增加了胰高血糖素或 GLP-1 活性。在某些實施例中，其中胰高血糖素拮抗劑進一步包括一羧基端之延伸，該延伸之末端係為一胺基或一酯基，而非一羧酸。

在某些實施例中，例如在胰高血糖素拮抗劑中包括有羧基端延伸，第 29 號位置之蘇胺酸(依據野生型胰高血糖素之胺基酸序列號)被取代為甘胺酸。舉例來說，胰高血糖素拮抗劑中包括有羧基端延伸以及第 29 號位置之蘇胺酸被取代為甘胺酸，和天然胰高血糖素第 29 號位置之蘇胺酸被取代為甘胺酸比較之下，前者對 GLP-1 受體可具有 4 倍活性。此 T29G 的取代可與其他在此所述的修飾同時具有作用，以增進胰高血糖素拮抗劑對 GLP-1 受體的親和力。

在某些實施例中，添加一胺基酸於其羧基端，且該胺基

酸係選自由下列胺基酸組成之群組：麩胺酸、天冬胺酸及甘胺酸。

本發明所揭露亦包含本文所述之已修飾的胰高血糖素拮抗劑之聚合體。兩個以上的胰高血糖素拮抗劑胜肽可利用該領域所熟知的連結劑予以連結。例如，可在兩個已修飾的胰高血糖素拮抗劑之間利用雙功能硫醇交叉連結劑或雙功能胺類交叉連結劑將其連結形成二聚體，特別是胰高血糖素拮抗劑（位於 11, 16 或 19 號位置）被以半胱胺酸、離胺酸、鳥胺酸、同半胱胺酸或乙醯苯丙胺酸(例如 SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11 以及 SEQ ID NO: 12)所取代。

醯化作用及烷化作用

在某些實施例中，本文所揭露的胰高血糖素拮抗劑係修飾為具有一醯基或一烷基。醯化作用及烷化作用可增加胰高血糖素拮抗劑在循環利用時的半生期。醯化作用及烷化作用可進一步延長啟動作用及/或延長作用於胰高血糖素及/或 GLP-1 受體之時間，及/或增進對於蛋白酶例如 DPP-IV 之抵抗性及/或其可溶性。在某些實施例中，經過醯化之胰高血糖素拮抗劑與沒有經過醯化之胰高血糖素拮抗劑比較其效能。胰高血糖素拮抗劑可在同一胺基酸上進行醯化及烷化作用，該胺基酸結合有一親水性基團，或在不同位置胺基酸上。

在某些實施例中，提供一胰高血糖素拮抗劑修飾以包括有一醯基或烷基，共價鍵結於胰高血糖素拮抗劑之第 10 號位置胺基酸(依據野生型胰高血糖素之胺基酸序列號)。胰高血糖素拮抗劑可進一步包括一間隔子，在胰高血糖素拮抗劑之第 10 號位置胺基酸與其醯基或烷基之間。在某些實施例中，該醯基可以是一脂肪酸、膽酸或其鹽類，例如 C4 - C30 脂肪酸，C8 - C24 脂肪酸、植物性膽酸，C4 - C30 烷基，C8 - C24 烷基，或是一包括有膽酸之固醇基團之烷基。該間隔子可以是任何適於結合於醯基或烷基之反應基團。在說明例中，間隔子包括一胺基酸、一雙胜肽或一三胜肽，或親水性雙功能間隔子。在某些實施例中，間隔子係選自由下列胺基酸所組成之群組：色胺酸、麩胺酸、天冬胺酸、半胱胺酸，及一間隔子包括 $\text{NH}_2(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n(\text{CH}_2)_m\text{COOH}$ ，其中 m 係為任何由 1-6 之整數之一，且 n 係為任何由 2-12 之整數之一。此醯化或烷化之胰高血糖素拮抗劑可進一步包括一親水性基團，選擇性地可為一聚乙二醇。任何如前所述之胰高血糖素拮抗劑可包括兩醯基或兩烷基，或其組合。

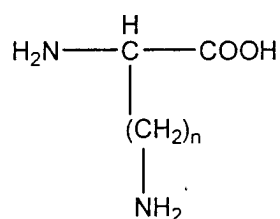
烷化作用可發生在胰高血糖素拮抗劑之任何位置，包括第 1-29 號位置胺基酸之一，在羧基端延伸之其中一位置，或在一羧基端胺基酸，以提供其胰高血糖素拮抗劑活性(且選擇性地包括 GLP-1 活性)。在非限定實施例中包括第 5, 10, 11, 12,

13, 14, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 24, 27, 28, 或 29 號位置(依據野生型胰高血糖素之胺基酸序列號)。該醯基可直接共價鍵結於胰高血糖素拮抗劑之一胺基酸，或透過一間隔子間接地共價鍵結於胰高血糖素拮抗劑之一胺基酸，其中該間隔子係位在胰高血糖素拮抗劑之胺基酸與醯基之間。胰高血糖素拮抗劑可在同一胺基酸上進行醯化作用，該胺基酸結合有親水性基團，或在不同位置胺基酸上。在非限定實施例中包括在第 10 號位置(依據野生型胰高血糖素之胺基酸序列號)進行醯化，且在羧基端部位之一或多個位置進行聚乙二醇化(依據野生型胰高血糖素之胺基酸序列號)，例如在第 24、28 或 29 號位置(依據野生型胰高血糖素之胺基酸序列號)，在一羧基端延伸段，或在羧基末端(例如透過在羧基端添加一半胱胺酸)。

就本發明之特點而言，提供一胰高血糖素拮抗劑修飾以包括有一醯基，係藉由在胰高血糖素拮抗劑胺基酸側鏈之胺基、氫氧基、或硫醇基進行直接醯化作用。在某些實施例中，胰高血糖素拮抗劑係藉由直接在胺基酸側鏈之胺基、氫氧基、或硫醇基進行醯化作用。在某些實施例中，胰高血糖素拮抗劑之醯化作用係發生在第 10, 20, 24 或 29 號位置。就此而言，醯化之胰高血糖素拮抗劑可包括有 SEQ ID NO: 2 之序列，或是一修飾的胺基酸，其包括有一或多個本所所述的胺基酸修飾作用，發生在第 10, 20, 24 及 29 號位置(依據野生

型胰高血糖素之胺基酸序列號)之胺基酸側鏈之胺基、氫氧基、或硫醇基。在某些實施例中，胰高血糖素拮抗劑之直接醯化作用係發生在第 10 號位置(依據野生型胰高血糖素之胺基酸序列號)胺基酸側鏈之胺基、氫氧基、或硫醇基。

在某些實施例中，該胺基酸包括一胺基側鏈，其結構如下列之分子式 I：

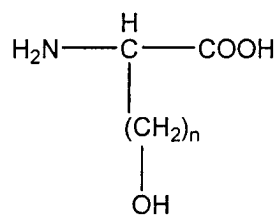


其中 $n = 1$ 到 4

[分子式 I]

在某些實施例中，包括分子式 I 之胺基酸其中 n 為 4 (Lys) 或 n 為 3 (Orn)。

在其他實施例中，該胺基酸包括一氫氧基側鏈，其結構如下列之分子式 II：

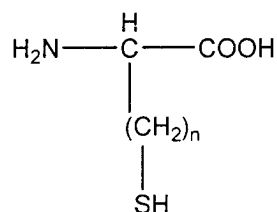


其中 $n = 1$ 到 4

[分子式 II]

在某些實施例中，包括分子式 II 之胺基酸其中 n 為 1 (Ser)。

在其他實施例中，該胺基酸包括一硫醇基側鏈，其結構如下列之分子式 III：



其中 $n = 1$ 到 4

[分子式 III]

在某些實施例中，包括分子式 III 之胺基酸其中 n 為 1 (Ser)。

在本發明之一實施例中，醯化之胰高血糖素拮抗劑包括一間隔子，在胰高血糖素拮抗劑與醯基之間。在某些實施例中，胰高血糖素拮抗劑係共價結合一間隔子，係共價結合在

醯基。在某些實施例中，胰高血糖素拮抗劑經過修飾以具有一醯基，係藉由在間隔子之胺基、氫氧基、或硫醇基進行醯化作用所形成。間隔子係結合於胺基酸側鏈之第 10, 20, 24, 或 29 號位置(依據野生型胰高血糖素之胺基酸序列號)，或在胰高血糖素拮抗劑之羧基端胺基酸。結合於間隔子之胺基酸包括一基團以幫助結合於間隔子。例如，一胺基酸包括一側鏈 NH₂, -OH, 或 -COOH (例如 Lys, Orn, Ser, Asp, 或 Glu)。就此而言，醯化之胰高血糖素拮抗劑可包括 SEQ ID NO: 1 之序列，或其經過修飾之胺基酸序列包括一或多個在此所述之胺基酸修飾，發生在第 10, 20, 24 或 29 號位置(依據野生型胰高血糖素之胺基酸序列號)之至少其中之一，其中的胺基、氫氧基或羧基側鏈。

在某些實施例中，間隔子係為一胺基酸，包括有一胺基、氫氧基或硫醇基側鏈，或是一雙胜肽、三胜肽，其包括有一具有胺基、氫氧基或硫醇基側鏈之胺基酸。

當醯化發生在間隔子的胺基時，此作用可發生在胺基酸的 alpha 胺基或其側鏈的胺基。當發生在胺基酸的 alpha 胺基時，間隔子的胺基酸可以是任何一種胺基酸。例如，間隔子的胺基酸可以是疏水性胺基酸，例如 Gly, Ala, Val, Leu, Ile, Trp, Met, Phe, Tyr. 另外，間隔子胺基酸可以是一酸性胺基

酸，例如 Asp 及 Glu 當發生在間隔子胺基酸的側鏈胺基時，間隔子的胺基酸係為具有一側鏈胺基的胺基酸，例如具有分子式 I 的胺基酸(例如 Lys 或 Orn)。就此情況而言，其有可能同時發生在間隔子胺基酸的 alpha 胺基或其側鏈的胺基，以致於胰高血糖素拮抗劑係為雙醃化的情況。實施例中包括此種雙醃化的分子。

當醃化發生在間隔子的氫氧基時，發生此作用的胺基酸或在雙胜肽、三胜肽的胺基酸可以是一具有分子式 II 的胺基酸。在一特定實施例中，此胺基酸係為絲胺酸。

當醃化發生在間隔子的硫醇基時，發生此作用的胺基酸或在雙胜肽、三胜肽的胺基酸可以是一具有分子式 III 的胺基酸。在一特定實施例中，此胺基酸係為半胱胺酸。

在一實施例中，此間隔子包括一親水性雙功能間隔子。在一特定實施例中，此間隔子包括一氨基多烷氧羧酸。就此而言，間隔子可包括例如 $\text{NH}_2(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n(\text{CH}_2)_m\text{COOH}$ ，其中 m 係為在 1-6 之間的任意整數，且 n 係為在 2-12 之間的任意整數，例如 8-氨基-3,6-二氧雜辛酸，可由 Peptides International, Inc. (Louisville, KY) 購得。

在胜肽之胺基、氫氧基及硫醇基上進行醃化作用之適當方法已是相當習知，例如第 19 說明例(用以在胺基進行醃化作用之方法)，Miller, Biochem Biophys Res Commun 218:

377-382 (1996); Shimohigashi and Stammer, *Int J Pept Protein Res* 19: 54-62 (1982); and Previero et al., *Biochim Biophys Acta* 263: 7-13 (1972) (用以在氫氧基進行醯化作用之方法); 以及 San and Silviu, *J Pept Res* 66: 169-180 (2005) (用以在硫醇基進行醯化作用之方法); *Bioconjugate Chem. "Chemical Modifications of Proteins: History and Applications"* pages 1, 2-12 (1990); Hashimoto et al., *Pharmacuetical Res. "Synthesis of Palmitoyl Derivatives of Insulin and their Biological Activity"* Vol. 6, No: 2 pp.171-176 (1989)

在醯化之胰高血糖素拮抗劑中的醯基可以具有各種大小，例如各種長度的碳鏈，且可以是直線型或支鏈型。在本發明之某些實施例中，醯基可以可以是 C4 - C30 之脂肪酸。例如，醯基可以可以是一 C4 脂肪酸，一 C4 脂肪酸，C6 脂肪酸，C8 脂肪酸，C10 脂肪酸，C12 脂肪酸，C14 脂肪酸，C16 脂肪酸，C18 脂肪酸，C20 脂肪酸，C22 脂肪酸，C24 脂肪酸，C26 脂肪酸，C28 脂肪酸，或 C30 脂肪酸。在某些實施例中，醯基可以可以是 C8 - C20 之脂肪酸，例如一 C14 脂肪酸或一 C16 脂肪酸。

在另外一實施例中，醯基可以是一膽汁酸。膽汁酸可以是任何適當的膽汁酸，包括但不受限於如下：膽酸、鵝脫氧膽酸、脫氧膽酸、石膽酸、甘膽酸、牛磺膽酸及膽固醇酸。

本文中所述之醯化之胰高血糖素拮抗劑可進一步包括有一親水性基團。在某些實施例中，親水性基團可包括一聚乙二醇(PEG)鏈。該親水性基團可經由任何適當的方法形成，例如在本文中所述之各種方法。就此而言，醯化之胰高血糖素拮抗劑可包括 SEQ ID NO: 1，其包括在本文所述之修飾作用，發生在第 10, 20, 24, 或 29 號位置胺基酸(依據野生型胰高血糖素之胺基酸序列號)，其包括在第 16, 17, 21, 24, 或 29 號位置胺基酸(依據野生型胰高血糖素之胺基酸序列號)，在羧基端延伸範圍內的位置，或在羧基端胺基酸修飾為半胱胺酸、離胺酸、鳥胺酸、同半胱胺酸或乙醯化苯丙胺酸，以及其胺基酸側鏈共價鍵結有一親水性基團(例如聚乙二醇)。在某些實施例中，醯基係結合於第 10 號位置胺基酸(依據野生型胰高血糖素之胺基酸序列號)，選擇性地透過一間隔子結合，間隔子包括可以是半胱胺酸、離胺酸、鳥胺酸、同半胱胺酸或乙醯化苯丙胺酸，以及親水性基團可以結合於第 24 號位置的半胱胺酸(依據野生型胰高血糖素之胺基酸序列號)。

另外，醯化之胰高血糖素拮抗劑可包括一間隔子，其中該間隔子同時醯化且經過修飾以包括親水性基團。在一非限制性實施例中，適當的間隔子包括一或多個選自由下列胺基酸組成之群組：半胱胺酸、離胺酸、鳥胺酸、同半胱胺酸或乙醯化苯丙胺酸。

依據一實施例，胰高血糖素拮抗劑可經過修飾以包括一結合於胰高血糖素拮抗劑之烷基，其係經由一酯基、醚基、硫醚基、胺基或烷化胺基結合，以增加胰高血糖素拮抗劑在循環利用時的半生期，及/或延長啟動作用及/或延長作用時間，及/或增進對於蛋白酶例如 DPP-IV 之抵抗性。

烷化作用可發生在胰高血糖素拮抗劑的任何位置，包括第 1-29 號位置之任一位置，烷化作用可發生在胰高血糖素拮抗劑之任何位置，包括第 1-29 號位置胺基酸之一，在羧基端延伸之其中一位置，或在一羧基端胺基酸，以提供並保留胰高血糖素拮抗劑活性(且選擇性地包括 GLP-1 活性)。在非限定實施例中包括第 5, 10, 11, 12, 13, 14, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 24, 27, 28, 或 29 號位置(依據野生型胰高血糖素之胺基酸序列號)。該鹽基可直接共價鍵結於胰高血糖素拮抗劑之一胺基酸，或透過一間隔子間接地共價鍵結於胰高血糖素拮抗劑之一胺基酸，其中該間隔子係位在胰高血糖素拮抗劑之胺基酸與鹽基之間。胰高血糖素拮抗劑可在同一胺基酸上進行鹽化作用，該胺基酸結合有親水性基團，或在不同位置胺基酸上。在非限定實施例中包括在第 10 號位置(依據野生型胰高血糖素之胺基酸序列號)進行鹽化，且在羧基端部位之一或多個位置進行聚乙二醇化(依據野生型胰高血糖素之胺基酸序列號)，例如在第 24、28 或 29 號位置(依據野生型胰高血糖素之

胺基酸序列號)，在一羧基端延伸段，或在羧基末端(例如透過在羧基端添加一半胱胺酸)。

在一特定實施例中，胰高血糖素拮抗劑可經由修飾以包括一烷基，係藉在下列位置直接烷化形成：胰高血糖素拮抗劑胺基酸側鏈的胺基、氫氧基或硫醇基。在某些實施例中，胰高血糖素拮抗劑可在胰高血糖素拮抗劑胺基酸側鏈的胺基、氫氧基或硫醇基直接烷化。在某些實施例中，胰高血糖素拮抗劑可在胰高血糖素拮抗劑胺基酸側鏈的胺基、氫氧基或硫醇基直接烷化。在某些實施例中，胰高血糖素拮抗劑之烷化作用係發生在第 10, 20, 24, 或 29 號位置(依據野生型胰高血糖素之胺基酸序列號)。就此而言，烷化之胰高血糖素拮抗劑可包括有 SEQ ID NO: 2 之序列，或是一修飾的胺基酸，其包括有一或多個本所所述的胺基酸修飾作用，發生在第 10, 20, 24, 及 29 號位置(依據野生型胰高血糖素之胺基酸序列號)之胺基酸側鏈之胺基、氫氧基、或硫醇基。在某些特定實施例中，胰高血糖素拮抗劑可在胰高血糖素拮抗劑第 10 號位置(依據野生型胰高血糖素之胺基酸序列號)之胺基酸側鏈的胺基、氫氧基或硫醇基直接烷化。

在某些實施例中，具有胺基側鏈之一胺基酸，其結構係為分子式 I。在某些說明例中，其中胺基酸之 n 為 4 (Lys) 或 n 為 3 (Orn)。

在其他實施例中，具有氫氧基側鏈之一胺基酸，其結構係為分子式 II。在某些說明例中，其中胺基酸之 n 為 1 (Ser)。

在其他實施例中，具有硫醇基側鏈之一胺基酸，其結構係為分子式 III。在某些說明例中，其中胺基酸之 n 為 1 (Cys)。

在本發明之一實施例中，烷化之胰高血糖素拮抗劑包括一間隔子，在胰高血糖素拮抗劑與烷基之間。在某些實施例中，胰高血糖素拮抗劑係共價結合一間隔子，係共價結合在烷基。在某些實施例中，胰高血糖素拮抗劑經過修飾以具有一烷基，係藉由在間隔子之胺基、氫氧基、或硫醇基進行烷化作用所形成。間隔子係結合於胺基酸側鏈之第 10, 20, 24, 或 29 號位置(依據野生型胰高血糖素之胺基酸序列號)。結合於間隔子之胺基酸包括一基團以幫助結合於間隔子。例如，一胺基酸包括一側鏈 NH_2 , $-\text{OH}$, 或 $-\text{COOH}$ (例如 Lys, Orn, Ser, Asp, 或 Glu)。就此而言，烷化之胰高血糖素拮抗劑可包括 SEQ ID NO: 1 之序列，或其經過修飾之胺基酸序列包括一或多個在此所述之胺基酸修飾，發生在第 10, 20, 24, 或 29 號位置(依據野生型胰高血糖素之胺基酸序列號)之至少其中之一，其中的胺基、氫氧基或羧基側鏈。

在某些實施例中，間隔子係為一胺基酸，包括有一胺基、氫氧基或硫醇基側鏈，或是一雙胜肽、三胜肽，其包括有一具有胺基、氫氧基或硫醇基側鏈之胺基酸。

當烷化發生在間隔子的胺基時，此作用可發生在胺基酸的 α 胺基或其側鏈的胺基。當發生在胺基酸的 α 胺基時，間隔子的胺基酸可以是任何一種胺基酸。例如，間隔子的胺基酸可以是疏水性胺基酸，例如 Gly, Ala, Val, Leu, Ile, Trp, Met, Phe, Tyr. 另外，間隔子胺基酸可以是一酸性胺基酸，例如 Asp 及 Glu. 當發生在間隔子胺基酸的側鏈胺基時，間隔子的胺基酸係為具有一側鏈胺基的胺基酸，例如具有分子式 I 的胺基酸(例如 Lys 或 Orn)。就此情況而言，其有可能同時發生在間隔子胺基酸的 α 胺基或其側鏈的胺基，以致於胰高血糖素拮抗劑係為雙烷化的情況。實施例中包括此種雙烷化的分子。

當烷化發生在間隔子的氫氧基時，發生此作用的胺基酸或在雙胜肽、三胜肽的胺基酸可以是一具有分子式 II 的胺基酸。在一特定實施例中，此胺基酸係為絲胺酸。

當烷化發生在間隔子的硫醇基時，發生此作用的胺基酸或在雙胜肽、三胜肽的胺基酸可以是一具有分子式 III 的胺基酸。在一特定實施例中，此胺基酸係為半胱胺酸。

在一實施例中，此間隔子包括一親水性雙功能間隔子。在一特定實施例中，此間隔子包括一氨基多烷氧羧酸。就此而言，間隔子可包括例如 $\text{NH}_2(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n(\text{CH}_2)_m\text{COOH}$ ，其中 m 係為在 1-6 之間的任意整數，且 n 係為在 2-12 之間的任意

整數，例如 8-氨基-3,6-二氧雜辛酸，可由 Peptides International, Inc. (Louisville, KY) 購得。

在胜肽之胺基、氫氧基及硫醇基上進行醯化作用之適當方法已是相當習知。例如，一種威廉森醚類合成法，可用於在胰高血糖素拮抗劑及烷基之間形成一醚鍵結。同時，以一烷基鹵化物在胜肽上進行親核性取代反應可形成酯基、醚基、硫醚基、胺基或烷化胺基之一。

在烷化之胰高血糖素拮抗劑中的醯基可以具有各種大小，例如各種長度的碳鏈，且可以是直線型或支鏈型。在本發明之某些實施例中，此烷基係為 C1~C30 烷。例如，可以是 C4 烷、C6 烷、C8 烷、C10 烷、C12 烷、C14 烷、C16 烷、C18 烷、C20 烷、C22 烷、C24 烷、C26 烷、C28 烷或是 C30 烷。在某些實施例中，此烷基係為 C8~C20 烷，例如一 C14 烷或一 C16 烷。

在某些特定實施例中，烷基可以包括一膽汁酸的固醇基團，例如膽酸、鵝脫氧膽酸、脫氧膽酸、石膽酸、甘膽酸、牛磺膽酸及膽固醇酸。

本文中所述之烷化之胰高血糖素拮抗劑可進一步包括有一親水性基團。在某些實施例中，親水性基團可包括一聚乙二醇(PEG)鏈。該親水性基團可經由任何適當的方法形成，例如在本文中所述之各種方法。就此而言，烷化之胰高血糖素

損抗劑可包括 SEQ ID NO: 1，其包括在本文所述之修飾作用：發生在第 10, 20, 24, 或 29 號位置胺基酸(依據野生型胰高血糖素之胺基酸序列號)，其包括在第 16, 17, 21, 24, 或 29 號位置胺基酸(依據野生型胰高血糖素之胺基酸序列號)，在羧基端延伸範圍內的位置，或在羧基端胺基酸修飾為半胱胺酸、離胺酸、鳥胺酸、同半胱胺酸或乙醯化苯丙胺酸，以及其胺基酸側鏈共價鍵結有一親水性基團(例如聚乙二醇)。在某些實施例中，醯基係結合於第 10 號位置胺基酸(依據野生型胰高血糖素之胺基酸序列號)，選擇性地透過一間隔子結合，間隔子包括可以是半胱胺酸、離胺酸、鳥胺酸、同半胱胺酸或乙醯化苯丙胺酸，以及親水性基團可以結合於第 24 號位置的半胱胺酸(依據野生型胰高血糖素之胺基酸序列號)。

另外，烷化之胰高血糖素損抗劑可包括一間隔子，其中該間隔子同時烷化且經過修飾以包括親水性基團。在一非限制性實施例中，適當的間隔子包括一或多個選自由下列胺基酸組成之群組：半胱胺酸、離胺酸、鳥胺酸、同半胱胺酸或乙醯化苯丙胺酸。

實施例

本發明之成份可經由標準合成方法製備，DNA 重組技術，或任何其他製備胜肽或融合蛋白質的方法。雖然某些特

定非天然胺基酸無法以一般 DNA 重組技術表現，但其製備技術在該領域仍屬習知。本發明之成份包括非胜肽部分可經由標準有機化學反應合成，或以標準胜肽化學反應亦可適用。

一般合成方案：

於經修改的應用生物系統(Applied Biosystem) 430 A 肽合成器上使用 HBTU-活化之「Fast Boc」單一偶合劑自 0.2 毫莫耳之 Boc Thr(OBzl)Pam 樹脂開始合成得胰高血糖素類似物。Boc 胺基酸及 HBTU 係自 Midwest Biotech (Fishers, IN) 購得。所使用之側鏈保護基為：Arg(Tos)、Asn(Xan)、Asp(OcHex)、Cys(pMeBzl)、His(Bom)、Lys(2Cl-Z)、Ser(OBzl)、Thr(OBzl)、Tyr(2Br-Z)、及 Trp(CHO)。N-端 His 上之側鏈保護基為 Boc。

用哌啶於二甲基甲醯胺中之 20% 溶液處理各完成的肽基樹脂，以移除色胺酸之甲醯基。在對甲酚及二甲硫之存在下進行液態氟化氫分裂。分裂係使用 HF 裝置(Penninsula Labs)於冰浴中進行 1 小時。於蒸發掉 HF 後，將殘留物懸浮於乙醚中並過濾出固體物質。將各肽萃取至 30-70 毫升之乙酸水溶液中，並利用 HPLC[Beckman System Gold, 0.46x5cm Zorbax C8, 1ml/min, 45C, 214nm, A 緩衝液=0.1%TFA, 10%MeCN]

B=0.1%TFA/90%乙腈，於 10 分鐘內 10%至 80%B 之梯度]分析經稀釋的等分試樣。

於 FPLC 上在 2.2 x 25 公分 Kromasil C18 管柱上進行純化，同時並監測 214 奈米處之 UV 且收集 5 分鐘的收集份。將均勻的收集份組合並凍乾得>95%之產物純度。使用 MALDI 質譜分析確認準確的分子質量及純度。

一般聚乙二醇化步驟：(半胱胺酸-馬來酰亞氨基)

典型上，將胰高血糖素 Cys 類似物溶解於磷酸鹽緩衝鹽水(5-10 毫克／毫升)中，及加入 0.01M 乙二胺四乙酸(總體積之 10-15%)。加入過量(2 倍)的順丁烯二醯亞胺基甲氧基 PEG 試劑(Nektar)，且將反應於室溫下攪拌同時並利用 HPLC 監測反應之進行。於 8-24 小時後，將反應混合物酸化，且裝填於製備型逆相管柱上，以使用 0.1%TFA／乙腈梯度進行純化。將適當的收集份組合並凍乾得期望的聚乙二醇化類似物。

實施例 1

胰高血糖素 Cys¹⁷(1-29)及類似單 Cys 類似物之合成
使用 FastBoc HBTU-活化之單一偶合劑將存於 60 毫升反應容器中之 0.2 毫莫耳 Boc Thr(OBzl)Pam 樹脂(SynChem Inc)及以下序列輸入及於經修改的應用生物系統 430 A 肽合成器上執

行。

HSQGTFTSDYSKYLDSCRAQDFVQWLMNT (SEQ ID NO: 32)

使用以下之側鏈保護基：Arg(Tos)、Asp(OcHex)、Asn(Xan)、Cys(pMeBzl)、Glu(OcHex)、His(Boc)、Lys(2Cl-Z)、Ser(Bzl)、Thr(Bzl)、Trp(CHO)、及 Tyr(Br-Z)。利用 20% 哌啶／二甲基甲醯胺處理完成的肽基樹脂，以移除 Trp 甲醯基保護，然後轉移至 HF 反應容器中並於真空中乾燥。加入 1.0 毫升對甲酚及 0.5 毫升二甲硫連同一磁石攪拌棒。將容器連接至 HF 裝置(Penninsula Labs)，於乾冰／甲醇浴中冷卻，抽真空，及凝結入大約 10 毫升之液態氟化氫。將反應於冰浴中攪拌 1 小時，然後於真空中移除 HF。將殘留物懸浮於乙醚中；將固體過濾，以乙醚洗滌，且將肽萃取至 50 毫升乙酸水溶液中。利用分裂萃取物之小樣品進行分析 HPLC[0.46 x 5 cm Zorbax C8，1 ml/min，45C，214nm，A 緩衝液為 0.1%TFA，B 緩衝液為 0.1%TFA/90%ACN，梯度=於 10 分鐘內 10%B 至 80%B]。將剩餘的萃取物裝填於 2.2 x 25 公分 Kromasil C18 製備型逆相管柱上，且使用 Pharmacia FPLC 系統執行乙腈梯度。收集 5 分鐘的收集份，同時並監測 214 奈米處之 UV(2.0A)。A=0.1%TFA，B=0.1%TFA／50%乙腈。梯度=於 450 分鐘內 30%B 至 100%B。

將含有最純產物(48-52)的收集份組合冰凍，且凍乾得 30.1 毫克。產物的 HPLC 分析顯示純度>90%，且 MALDI 質譜分析顯示 3429.7 之期望質量。類似地製備得胰高血糖素 Cys²¹、胰高血糖素 Cys²⁴、及胰高血糖素 Cys²⁹。

實施例 2

胰高血糖素-Cex 及其他 C-端延伸類似物之合成

將 285 毫克(0.2 毫莫耳)甲氧二苯甲基胺樹脂(Midwest Biotech)置於 60 毫升反應容器中，且使用 FastBoc HBTU-活化之單一偶合劑於經修改的 Applied Biosystems 430A 肽合成器上輸入並執行以下序列。

HSQGTFTSDYSKYLDNRRAQDFVQWLMNTGPSSGAPPPS
(SEQ ID NO: 33)

使用以下之側鏈保護基：Arg(Tos)、Asp(OcHex)、Asn(Xan)、Cys(pMeBzl)、Glu(OcHex)、His(Boc)、Lys(2Cl-Z)、Ser(Bzl)、Thr(Bzl)、Trp(CHO)、及 Tyr(Br-Z)。利用 20%哌啶／二甲基甲醯胺處理完成的肽基樹脂，以移除 Trp 甲醯基保護，然後轉移至 HF 反應容器中並於真空中乾燥。加入 1.0 毫升對甲酚及 0.5 毫升二甲硫連同一磁石攪拌棒。將容器連接至 HF 裝置(Penninsula Labs)，於乾冰／甲醇浴中冷卻，抽真空，

及凝結入大約 10 毫升之液態氟化氫。將反應於冰浴中攪拌 1 小時，然後於真空中移除 HF。將殘留物懸浮於乙醚中；將固體過濾，以乙醚洗滌，且將肽萃取至 50 毫升乙酸水溶液中。對分裂萃取物之等分試樣進行分析 HPLC[0.46 x 5 cm Zorbax C8, 1 ml/min, 45°C, 214nm, A 緩衝液為 0.1%TFA, B 緩衝液為 0.1%TFA/90%ACN, 梯度=於 10 分鐘內 10%B 至 80%B]。將萃取物裝填於 2.2 x 25 公分 Kromasil C18 製備型逆相管柱上，且使用 Pharmacia FPLC 系執行乙腈梯度以進行溶離。收集 5 分鐘的收集份，同時並監測 214 奈米處之 UV(2.0A)。A=0.1%TFA, B=0.1%TFA/50%乙腈。梯度=於 450 分鐘內 30%B 至 100%B。將收集份 58-65 組合，冰凍且凍乾得 198.1 毫克。

產物的 HPLC 分析顯示純度大於 95%。MALDI 質譜分析顯示存在作為 C-端醯胺產物之 4316.7 之期望理論質量。以經適當裝填之 PAM 樹脂開始，類似地製備得作為 C-端羧酸的調酸素及調酸素-KRNR。

實施例 3

胰高血糖素 Cys¹⁷ Mal-PEG-5K

將 15.1 毫克之胰高血糖素 Cys17(1-29)及 27.3 毫克之甲氧基聚

(乙二醇)順丁烯二醯亞胺平均 M.W.5000 (mPEG-Mal-5000, Nektar Therapeutics)溶解於 3.5 毫升之磷酸鹽緩衝鹽水(PBS)中，並加入 0.5 毫升之 0.01M 乙二胺四乙酸(EDTA)。將反應於室溫下攪拌，並利用 HPLC 分析[0.46 x 5 cm Zorbax C8, 1ml/min, 45C, 214nm (0.5A), A=0.1%TFA, B=0.1%TFA/90%ACN, 梯度=於 10 分鐘內 10%B 至 80%B]監測反應之進行。

於 5 小時後，將反應混合物裝填於 2.2 x 25 公分 Kromasil C18 製備型逆相管柱上。於 Pharmacia FPLC 上執行乙腈梯度，同時並監測 214 奈米處之 UV 波長且收集 5 分鐘之收集份。A=0.1%TFA, B=0.1%TFA/50%乙腈，梯度=於 450 分鐘內自 30%B 至 100%B。將相當於產物的收集份組合，冰凍且凍乾得 25.9 毫克。

於 HPLC[0.46 x 5 cm Zorbax C8, 1 ml/min, 45C, 214nm (0.5A), A=0.1%TFA, B=0.1%TFA/90%ACN, 梯度=於 10 分鐘內自 10%B 至 80%B]上分析此產物，其顯示純度大約為 90%。MALDI(基質輔助雷射脫附游離)質譜分析顯示 8700 至 9500 之寬廣質量範圍(PEG 衍生物之典型值)。此顯示將大約 5,000 a.m.u 加成至起始胰高血糖素肽(3429)之質量。

實施例 4

胰高血糖素 Cys²¹ Mal-PEG-5K

將 21.6 毫克之胰高血糖素 Cys²¹(1-29)及 24 毫克之 mPEG-MAL-5000(Nektar Therapeutics)溶解於 3.5 毫升之磷酸鹽緩衝鹽水(PBS)中，並加入 0.5 毫升之 0.01M 乙二胺四乙酸(EDTA)。將反應於室溫下攪拌。於 2 小時後，加入另一 12.7 毫克之 mPEG-MAL-5000。於 8 小時後，將反應混合物裝填於 2.2 x 25 公分 Vydac C18 製備型逆相管柱上，且於 Pharmacia FPLC 上於 4 毫升／分鐘下執行乙腈梯度，同時收集 5 分鐘之收集份。A=0.1%TFA，B=0.1%TFA／50%ACN。梯度=於 450 分鐘內自 20%至 80%B。

將對應於出現產物的收集份組合，冰凍且凍乾得 34 毫克。利用分析 HPLC[0.46 x 5 cm Zorbax C8，1 ml/min，45C，214nm (0.5A)，A=0.1%TFA，B=0.1%TFA/90%ACN，梯度=於 10 分鐘內自 10%B 至 80%B]分析產物顯示不同於起始胰高血糖素肽的均勻產物。MALDI(基質輔助雷射脫附游離)質譜分析顯示 8700 至 9700 之寬廣質量範圍(PEG 類似物之典型值)。此顯示將大約 5,000 a.m.u 加成至起始胰高血糖素肽(3470)之質量。

實施例 5

胰高血糖素 Cys²⁴ Mal-PEG-5K

在攪拌下將 20.1 毫克之胰高血糖素 C24(1-29)及 39.5 毫克之 mPEG-Mal-5000(Nektar Therapeutics)溶解於 3.5 毫升之 PBS 中，並加入 0.5 毫升之 0.01M EDTA。將反應於室溫下攪拌 7 小時，然後加入另一 40 毫克之 mPEG-Mal-5000。於大約 15 小時後，將反應混合物裝填於 2.2 x 25 公分 Vydac C18 製備型逆相管柱上，且使用 Pharmacia FPLC 執行乙腈梯度。收集收集份同時並監測 214 奈米(2.0A)處之 UV。A 緩衝液=0.1%TFA，B 緩衝液=0.1%TFA/50%ACN，梯度=於 450 分鐘內自 30%B 至 100%B。將相當於產物的收集份組合，冰凍且凍乾得 45.8 毫克。MALDI 質譜分析顯示最大值位於 9175.2(其大約比胰高血糖素 C24(3457.8)多 5,000 a.m.u.)之典型的 PEG 寬信號。

實施例 6

胰高血糖素 Cys²⁴ Mal-PEG-20K

在室溫於攪拌下將 25.7 毫克之胰高血糖素 Cys²⁴ (1-29)及 40.7 毫克之 mPEG-Mal-20K(Nektar Therapeutics)溶解於 3.5 毫升之 PBS 中，並加入 0.5 毫升之 0.01M EDTA。於 6 小時後，如利用 HPLC 所測得，起始物料對產物之比大約為 60:40。加入另一 25.1 毫克之 mPEG-Mal-20K 且使反應再多攪拌 16 小時。產

物比率並未顯著地改良，因此將反應混合物裝填於 2.2 x 25 公分 Kromasil C18 製備型逆相管柱上，且於 Pharmacia FPLC 上使用於 450 分鐘內自 30%B 至 100%B 之梯度進行純化。A 緩衝液=0.1%TFA，B 緩衝液=0.1%TFA／50%ACN，流率=4 毫升／分鐘，且收集 5 分鐘之收集份同時並監測 214 奈米(2.0A)處之 UV。將含有均勻產物的收集份組合，冰凍且凍乾得 25.7 毫克。利用分析 HPLC 測得之純度為~90%。MALDI 質譜分析顯示自 23,000 至 27,000 之寬峰，其大約比起始胰高血糖素 C²⁴(3457.8)多 20,000 a.m.u.。

實施例 7

胰高血糖素 Cys²⁹ Mal-PEG-5K

在室溫於攪拌下將 20.0 毫克之胰高血糖素 Cys²⁹ (1-29) 及 24.7 毫克之 mPEG-Mal-5000(Nektar Therapeutics)溶解於 3.5 毫升之 PBS 中，並加入 0.5 毫升之 0.01M EDTA。於 4 小時後，加入另一 15.6 毫克之 mPEG-Mal-5000 以驅使反應完全。於 8 小時後，將反應混合物裝填於 2.2 x 25 公分 Vydac C18 製備型逆相管柱上，且於 Pharmacia FPLC 系統上執行乙腈梯度。收集 5 分鐘之收集份同時並監測 214 奈米(2.0A)處之 UV。A=0.1%TFA，B=0.1%TFA／50%ACN。將收集份 75-97 組合，冰凍且凍乾得 40.0 毫克之不同於在 HPLC 上之回收起始物料

(收集份 58-63)的產物。利用分析 HPLC[0.46 x 5 cm Zorbax C8 , 1 ml/min , 45C , 214nm (0.5A) , A=0.1%TFA , B=0.1%TFA/90%ACN , 梯度=於 10 分鐘內自 10%B 至 80%B] 分析產物顯示純度大於 95%。MALDI 質譜分析顯示存在具 8,000 至 10,000 之質量範圍(最大值在 9025.3)的 PEG 成分,其較起始物料(3484.8)大 5,540 a.m.u.。

實施例 8

胰高血糖素 Cys²⁴ (2-丁內酯)

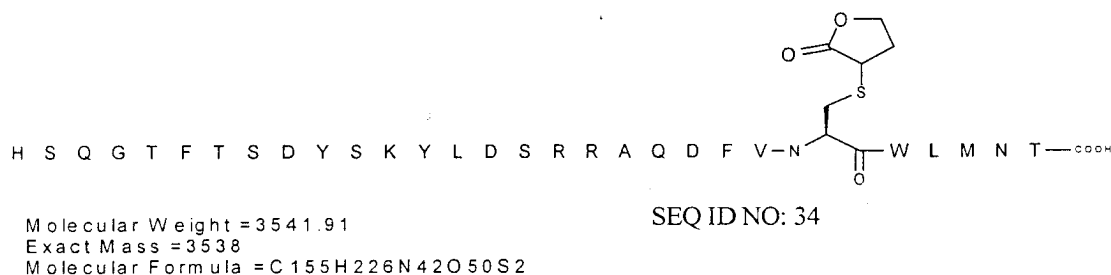
於 24.7 毫克之胰高血糖素 Cys²⁴ (1-29)中加入 4 毫升之 0.05M 碳酸氫銨 / 50%乙腈及 5.5 微升之 2-溴-4-羥基丁酸- γ -內酯之溶液(100 微升於 900 微升乙腈中)。於在室溫下攪拌 3 小時後,將另一 105 微升之內酯溶液加至反應混合物,將其再多攪拌 15 小時。以 10%乙酸水溶液將反應混合物稀釋至 10 毫升,並將其裝填於 2.2 x 25 公分 Kromasil C18 製備型逆相管柱上。於 Pharmacia FPLC 上執行乙腈梯度(於 450 分鐘內自 20%B 至 80%B),同時收集 5 分鐘之收集份並監測 214 奈米 (2.0A)處之 UV。流率=4 毫升 / 分鐘, A=0.1%TFA, B=0.1%TFA / 50%ACN。將收集份 74-77 組合,冰凍且凍乾得 7.5 毫克。HPLC 分析顯示純度為 95%,且 MALDI 質譜分析顯示 3540.7 之質量或較起始物料多 84 個質量單位。此結果與加入單一的

丁內酯部分一致。

實施例 9

胰高血糖素 Cys²⁴ (S-羧甲基)

將 18.1 毫克之胰高血糖素 Cys²⁴ (1-29) 溶解於 9.4 毫升之 0.1M 磷酸鈉緩衝液 (pH=9.2) 中，並加入 0.6 毫升之溴乙酸溶液 (1.3 毫克／毫升於乙腈中)。將反應於室溫下攪拌並利用分析 HPLC 追蹤反應的進行。於 1 小時後，加入另一 0.1 毫升之溴乙酸溶液。將反應再多攪拌 60 分鐘，然後用乙酸水溶液酸化

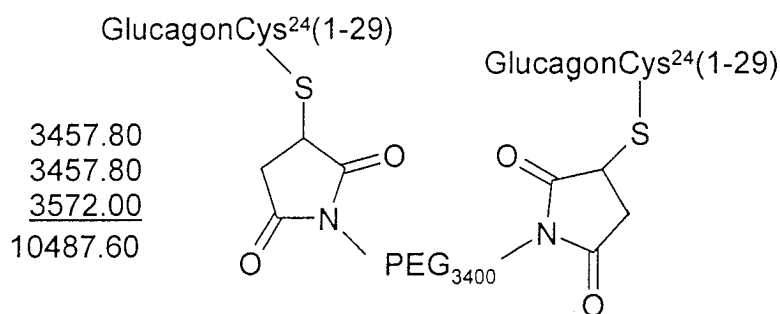


並裝填於 2.2 x 25 公分 Kromasil C18 製備型逆相管柱上進行純化。於 Pharmacia FPLC (流率=4 毫升／分鐘) 上執行乙腈梯度，同時收集 5 分鐘之收集份並監測 214 奈米 (2.0A) 處之 UV。A=0.1%TFA，B=0.1%TFA／50%ACN。將收集份 26-29 組合，冰凍且凍乾得數毫克之產物。分析 HPLC 顯示純度為 90%，且 MALDI 質譜分析確認之期望產物質量為 3515。

實施例 10

胰高血糖素 Cys²⁴ 順丁烯二醯亞胺基，PEG-3.4K-二聚體

將 16 毫克之胰高血糖素 Cys²⁴ 及 1.02 毫克之 Mal-PEG-Mal-3400，聚(乙二醇)-雙-順丁烯二醯亞胺平均 M.W. 3400(Nektar Therapeutics)溶解於 3.5 毫升磷酸鹽緩衝鹽水及 0.5 毫升之 0.01M EDTA 中，並將反應於室溫下攪拌。於 16 小時後，加入另一 16 毫克之胰高血糖素 Cys²⁴ 並持續攪拌。於大約 40 小時後，將反應混合物裝填於 Pharmacia PepRPC 16/10 管柱上，並於 Pharmacia FPLC 上執行乙腈梯度，同時收集 2 分鐘之收集份並監測 214 奈米(2.0A)處之 UV。流率=2 毫升／分鐘，A=0.1%TFA，B=0.1%TFA／50%ACN。將收集份 69-74 組合，冰凍且凍乾得 10.4 毫克。分析 HPLC 顯示純度為 90%，且 MALDI 質譜分析顯示在 9,500-11,000 範圍內之成分，其與期望的二聚體一致。



實施例 11

胰高血糖素溶解度檢定法：

製備存於 0.01N HCl 中之胰高血糖素(或類似物)的溶液(1 毫克／毫升或 3 毫克／毫升)。用 0.01N HCl 將 100 微升之儲備溶液稀釋至 1 毫升，並測定 UV 吸光度(276 奈米)。使用 200-250 微升之 0.1M Na₂HPO₄ (pH9.2)將剩餘儲備溶液之 pH 調整至 pH7。使溶液於 4℃ 下靜置隔夜然後離心。接著用 0.01N HCl 將 100 微升之上清液稀釋至 1 毫升，並測定 UV 吸光度(重複兩次)。

起始吸光度讀數補償體積之增加，且使用以下計算於確定溶解度百分比：

最終吸光度

————— X 100 = 溶解百分比

起始吸光度

結果示於表 1，其中胰高血糖素-Cex 代表野生型胰高血糖素(SEQ ID NO: 1)加上 SEQ ID NO: 26 之羧基端加成且胰高血糖素-Cex R12 代表 SEQ ID NO: 39。

表 1 胰高血糖素類似物之溶解度數據

類似物	溶解百分比
胰高血糖素	16

胰高血糖素-Cex, R12	104
胰高血糖素-Cex	87
調酸素	104
胰高血糖素, Cys17PEG5K	94
胰高血糖素, Cys21PEG5K	105
胰高血糖素, Cys24PEG5K	133

實施例 12

胰高血糖素受體結合檢定法

利用閃爍親近(scintillation proximity)檢定技術於競爭結合檢定法中量測肽對胰高血糖素受體的親和力。將於閃爍親近檢定緩衝液(0.05 M Tris-HCl, pH 7.5, 0.15 M NaCl, 0.1% w/v 牛血清白蛋白)中製得之肽的連續 3 倍稀釋液於 96 孔白色／透明底盤(Corning Inc., Acton, MA)中與 0.05 nM (3-[¹²⁵I]-碘酪胺醯基) Tyr10 胰高血糖素 (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ)(每孔 1-6 微克)、由過度表現人類胰高血糖素受體之細胞製備得之細胞質膜片段、及 1 毫克／孔之經聚乙二醇亞胺處理之小麥胚芽凝集素(agglutinin) A 型閃爍親近檢定珠粒(Amersham Biosciences, Piscataway, NJ)混合。當於旋轉搖盪器上在 800 rpm 下搖盪 5 分鐘後，將盤於室溫下培養 12 小時，然後於 MicroBeta1450 液體閃爍計數器(Perkin-Elmer,

Wellesley, MA)上進行讀取。於具有較測試樣品中之最高濃度大 4 倍濃度之「冷」天然配體的孔中量測非特異結合(NSB)放射性，且於沒有競爭物的孔中偵測總結合放射性。特異結合百分比係計算如下：特異結合 $\%$ =[(結合-NSB)/(總結合-NSB)] $\times 100$ 。IC₅₀ 值係經由使用 Origin 軟體(OriginLab, Northampton, MA)而測得。

實施例 13

功能檢定法-cAMP 合成

於基於螢火蟲螢光素酵素之報告檢定法中量測胰高血糖素類似物誘發 cAMP 的能力。經由於經補充 0.25%牛生長血清(HyClone, Logan, UT)之 DMEM(Invitrogen, Carlsbad, CA)中培養 16 小時，然後再用胰高血糖素、GLP-1 或新穎胰高血糖素類似物之連續稀釋液於 37°C，於 96 孔經塗布聚-D-離胺酸之「Biocoat」盤(BD Biosciences, San Jose, CA)中之 5%CO₂ 下培養 5 小時，而將經共轉染胰高血糖素受體或 GLP-1 受體之 HEK293 細胞及鍵結至 cAMP 反應元件之螢光素酵素基因除去血清。於培養結束時，將 100 微升之 LucLite 發光基質試劑(Perkin-Elmer, Wellesley, MA)添加至各孔。將盤短暫地振搖，於暗處培養 10 分鐘，並於 MicroBeta-1450 液體閃爍計數器(Perkin-Elmer, Wellesley, MA)上測量光輸出。經由使用 Origin

軟體(OriginLab, Northampton, MA)計算表 2

利用具有 C-端延伸之胰高血糖素類似物的 cAMP 誘導

肽	cAMP 誘導			
	胰高血糖素受體		GLP-1 受體	
	EC ₅₀ , nM	N*	EC ₅₀ , nM	N
胰高血糖素	0.22 ± 0.09	14	3.85 ± 1.64	10
GLP-1	2214.00 ± 182.43	2	0.04 ± 0.01	14
胰高血糖素 Cex	0.25 ± 0.15	6	2.75 ± 2.03	7
調酸素	3.25 ± 1.65	5	2.53 ± 1.74	5
調酸素 KRNR	2.77 ± 1.74	4	3.21 ± 0.49	2
胰高血糖素 R12	0.41 ± 0.17	6	0.48 ± 0.11	5
胰高血糖素 R12 Cex	0.35 ± 0.23	10	1.25 ± 0.63	10
胰高血糖素 R12 K20	0.84 ± 0.40	5	0.82 ± 0.49	5
胰高血糖素 R12 K24	1.00 ± 0.39	4	1.25 ± 0.97	5
胰高血糖素 R12 K29	0.81 ± 0.49	5	0.41 ± 0.24	6

胰高血糖素醯胺	0.26 ± 0.15	3	1.90 ± 0.35	2
調酸素 C24	2.54 ± 0.63	2	5.27 ± 0.26	2
調酸素 C24 PEG 20K	0.97 ± 0.04	1	1.29 ± 0.11	1

*-實驗數目

表 3

利用聚乙二醇化胰高血糖素類似物的 cAMP 誘導

肽	cAMP 誘導			
	胰高血糖素受體\		GLP-1 受體	
	EC ₅₀ , nM	N*	EC ₅₀ , nM	N
胰高血糖素	0.33 ± 0.23	18	12.71 ± 3.74	2
胰高血糖素 C17 PEG 5K	0.82 ± 0.15	4	55.86 ± 1.13	2
胰高血糖素 C21 PEG 5K	0.37 ± 0.16	6	11.52 ± 3.68	2
胰高血糖素 C24 PEG 5K	0.22 ± 0.10	12	13.65 ± 2.95	4
胰高血糖素 C29 PEG 5K	0.96 ± 0.07	2	12.71 ± 3.74	2
胰高血糖素 C24 PEG 20K	0.08 ± 0.05	3	未測定	
胰高血糖素 C24 二聚 體	0.10 ± 0.05	3	未測定	
GLP-1	> 1000		0.05 ± 0.02	4

*-實驗數目

實施例 14

胰高血糖素 Cys-順丁烯二醯亞胺基 PEG 類似物之穩定性檢定法

將各胰高血糖素類似物溶解於水或 PBS 中，並進行起始 HPLC 分析。於調整 pH(4、5、6、7)後，將樣品於 37°C 下在指定的期間內培養，並再次利用 HPLC 分析以測定肽的完整性。測定特定相關肽之濃度，並相對於起始分析計算保持完整的百分比。關於胰高血糖素 Cys²¹-順丁烯二醯亞胺基 PEG5K 的結果示於圖 1 及 2。

實施例 15

胰高血糖素拮抗劑

胰高血糖素拮抗劑係由下列步驟所合成：

Boc-chemistry strategy 之一般胜肽合成步驟：

於經修正過的應用生物系統(Applied Biosystem) 430 A 肽合成器上，使用 HBTU-活化之「Fast Boc」單一偶合劑，由 0.2 毫莫耳之 MBHA 樹脂或結合第一胺基酸之 Pam 樹脂開始，合成得到胰高血糖素相似物。Boc 胺基酸及 HBTU 係為 Midwest Biotech (Fishers, IN) 購得。所使用之側鏈保護基為：Arg(Tos)、Asn(Xan)、Asp(OcHex)、Cys(pMeBzl)、His(Bom)、Lys(2Cl-Z)、Ser(OBzl)、Thr(OBzl)、Tyr(2Br-Z)、及 Trp(CHO)。N-端 His 上

之側鏈保護基為Boc。在自動固相合成反應後，以N-terminal 3-phenyllactic acid (PLA) (Aldrich, Milwaukee, WI)，配合使用 BEPBT(3-(Diethoxy-phosphoryloxy)-3H-benzo[d][1,2,3]triazin-4-one, Synchem Inc., Aurora, OH)

在胜肽固相合成反應後，每個結束肽樹酯以20% piperidine/DMF進行處理，以移除色胺酸之甲醯基，在對甲酚及二甲硫之存在下進行液態氟化氫分裂。分裂係使用HF裝置(Penninsula Labs)於冰浴中進行1小時。於蒸發掉HF後，將殘留物懸浮於乙醚中並過濾出固體物質。將各肽萃取至30-70毫升之乙酸水溶液中並以水稀釋且將其凍乾。原胜肽以HPLC進行分析，並以ESI 或 MALDI-TOF質譜儀分析其分子量。該胜肽以一般HPLC純化步驟進行純化。

以Fmoc化學法進行一般性胜肽合成

以ABI 433A自動化胜肽合成器以Fmoc化學法進行，以Rink MBHA amide樹脂或以DIC/HOBT作為偶合劑之結合第一胺基酸之Wang樹脂(Novabiochem, San Diego, CA)，合成得到該胜肽。在自動化胜肽合成後，3-苯乳酸(PLA)手動地以BEPBT偶合。N -Fmoc [N-(9-fluorenyl)methoxycarbonyl]胺基酸所使用之側鏈保護基如下：Arg, Pmc; Asp, OtBu; Cys, Trt; Gln, Trt; His, Trt; Lys, Boc; Ser, tBu, Tyr, tBu；以及以Trp, Boc (Pmc =

2,2,5,7,8-pentamethylchroman-6-sulfonyl, OtBu = tert-butyl ester, Trt = trityl, Boc = tert-butyloxycarbonyl, and tBu = tert-butyl ester). Fmoc-Cys(SO₃Na)-OH 及 Fmoc-homoCys(SO₃Na)-OH 使用於合成包括有半胱磺胺酸及同半胱磺胺酸之胜肽。N-端 His 上之側鏈保護基為 Boc。將該胜肽與樹脂分離時係使用分離混合劑，包括 85%TFA, 5% phenol, 5% water and 5% thioanisole (當胜肽包括有半胱胺酸時添加 2.5% EDT)。原胜肽以醚沉澱法、離心法及凍乾法處理。再以 HPLC 分析且以 ESI 或 MALDI-TOF 質譜分析確認。再以一般 HPLC 純化步驟進行純化。

一般 HPLC 分析步驟：

HPLC 以 ZORBAX SB-C8 管柱 (0.46 x 5cm, 5 μm, Agilent) 之 Beckman System Gold HPLC system 進行，以流速在 1.0 mL/min 及監控在 214nm 之梯度洗出。梯度設定為 10%B 到 80%B 超過 10 分鐘，再以 10%B 進行 5 分鐘，緩衝液 A = 0.1%TFA and B = 0.1%TFA/90% 亞硝酸鹽。

一般製備性 HPLC 純化步驟：

純化胜肽時係以 Waters 600E，配合使用具有半製備性 HPLC 管柱 (ZORBAX SB-C8, 21.2x250mm, 7 μm, Agilent) 之 486 監

測系統，在214nm或230nm下進行監測。緩衝液A = 0.1%TFA / 10%亞硝酸鹽以及B = 0.1%TFA/90%亞硝酸鹽。該些用於純化之梯度為0-30%B進行40分鐘，再以30-50%B流速為12ml/min進行大於30分鐘。該些收集份以HPLC分析且以質譜分析確認。收集該些純度超過90%之收集份，凍乾且保存。混合該些純度為60-90%之收集份，凍乾後再次純化。

以半胱氨酸-馬來酰亞胺基步驟製備聚乙二醇化之胰高血糖素相似物。一般而言，胰高血糖素 Cys相似物係溶解於磷酸鹽緩衝液(5-10mg/ml)，且添加0.01M乙二胺四醋酸鈉(EDTA)(總體積之10-15%)。當以HPLC監測反應進行時，添加過量(1.5 - 21倍)的馬來酰亞胺基甲氧基PEG試劑(Nektar, Huntsville, AL)並在室溫下攪拌。2-24小時後，使反應混合物酸化並注入反相管柱以0.1%TFA/乙晴梯度進行純化。將適當的餾份混合且凍乾以得到聚乙二醇化之衍生物。對於在PBS中低溶解度之肽，將其溶解在25%乙晴水或4 - 6M尿素、0.1M Tris(pH調整為 8.0 - 8.5)緩衝液並與聚乙二醇藥劑進行反應。

該成份之特定實施例係經由以下所述之方法所合成：

製備Fmoc-homoCys(SO₃Na)-OH

將0.92克L-同半胱氨酸(5mmole) (Sigma, St. Louis, MO) 以及0.5克之氫氧化鈉 (12.5mmole)溶解於50毫升冰浴之水

中。將 9-Fluorenylmethyl succinimidyl carbonate (Fmoc-OSu) (1.86g, 5.5mmole) 溶液加入 50ml 二氧陸園。混合液在室溫下攪拌 4 小時。混合液在減壓下蒸發且加入 100 ml 水。該溶液以乙醚清洗且通過離子交換管柱 (Amberlite IR-120B, H⁺form; GFS Chemicals, Columbus, OH))。該洗出液凍乾以產生黏性非結晶之 Fmoc-homoCys(SO₃H)-OH (1.6g, 3.95mmole, 產量為 79.2%)。前述之自由酸加入 50ml 含有 0.16g (4mmole) NaOH 且冰浴之水中，凍乾後得到定量之 Fmoc-homoCys(SO₃Na)-OH，可直接使用於 SPPS，不需要進一步純化。Fmoc-homoCys(SO₃Na)-OH 可再結晶於乙醇/醋酸酯 (2:1) 以產生實體結晶產物，其熔點為 215-218°C 且 ESI-MS 404.2[(M-H)⁺, acid form]。

利用 0.1mmole Fmoc/HOBT/DCC 化學法，以 0.1mmole Rink MBHA 胺基樹脂，利用 DIC/HOBT 作為偶合劑，在 ABI 433A 自動胜肽合成器上，以第一固相合成具有胺基酸序列 TSEYSKYLDSTRRAQDFVQWLMNT 之胜肽。使用下列之 Fmoc 胺基酸：Ala, Arg(Pmc), Asp(OtBu), Asn(Trt), Glu(OtBu), Gln(Trt), Leu, Lys(Boc), Met, PLA, Ser(tBu), Thr(tBu), Trp(Boc), Tyr(tBu), 以及 Val. 在自動胜肽合成後，該胜肽樹脂以 3-苯乳酸 (83mg, 0.5mmole) 手動地耦合，以在 4ml 5%DIEA/DMF 之 DEPBT (150mg, 0.5mmole) 進行約 2 小時，以

得到具有下列序列之胜肽樹脂：
 HO-PLA-Thr-Ser-Glu-Tyr-Ser-Lys-Tyr-Leu-Asp-Ser-Arg-Arg-Ala-Gln-Asp-Phe-Val-Gln-Trp-Leu-Met-Asn-Thr-NH₂ (SEQ ID NO: 50)。

胜肽樹脂以8.5ml TFA加上 0.5g 酚，0.5ml 的水以及 0.5ml 甲基苯基硫醚，在室溫下處理約2小時。該胜肽溶解於TFA中過濾，且加入40ml的乙醚進行沉澱。沉澱得到粗胜肽，溶解於乙酸中並凍乾。粗胜肽產量約200 250mg，在純化後得到純度95%之胜肽25 40mg (10 15% 總產量)。該胜肽以HPLC分析後顯示保留時間約為7.66分鐘，且ESI-MS顯示質量為2986.0，對應於分子量為2986.3之胜肽。

以相同的步驟合成胜肽 [PLA6, D9]glucagon(6-29) amide，HPLC 7.25分鐘及ESI-MS 2973.5 對應於計算出的分子量為2973.3；[PLA6, D9, D28]glucagon(6-29) amide HPLC 7.46分鐘及ESI-MS 2973.0 對應於計算出的分子量為2973.3；[PLA6, D9, E9]glucagon(6-29) amide HPLC 7.20分鐘及ESI-MS 3002.0 對應於計算出的分子量為3002.3；[PLA6, E9, C16]glucagon(6-29) amide HPLC 7.38分鐘及ESI-MS 3002.0 對應於計算出的分子量為3002.3；[PLA6, E9, C24]glucagon(6-29) amide HPLC 7.33分鐘及ESI-MS 2961.0

對應於計算出的分子量為 2961.3 ； [PLA6, D9, C24]glucagon(6-29) amide HPLC 7.43 分鐘及 ESI-MS 2947.0
 對應於計算出的分子量為 2947.3 ； [PLA6, E9, C40]glucagon(6-40) amide HPLC 7.28 分鐘及 MALDI-MS 3925.5 對應於計算出的分子量為 3924.3 。

合成[hCys(SO₃H)₉]glucagon (6-29) amide

利用 0.1mmole Fmoc/HOBT/DCC 化學法，以 0.1mmole Rink MBHA 胺基樹脂，利用 DIC/HOBT 作為偶合劑，在 ABI 433A 自動胜肽合成器上，以第一固相合成具有胺基酸序列 YSKYLDSRRAQDFVQWLMNT (SEQ ID NO: 51; glucagon(10-29))之胜肽。在自動胜肽合成後，該胜肽樹脂以 Fmoc-homoCys(SO₃Na)-OH (130mg, 0.3mmole), HOBT (45.2mg, 0.33mole) 以及 DIC (52.0ul, 0.33mole) 在 4ml DMF 進行約 2 小時。在寧海準試驗之後，一半劑量的胜肽樹脂(0.05 mmole)自動地結合於 3 種胺基酸：絲胺酸、蘇胺酸及苯丙胺酸，以得到具有下列序列之胜肽樹脂：
 H₂N-Phe-Thr-Ser-homoCys(SO₃H)-Tyr-Ser-Lys-Tyr-Leu-Asp-Ser-Arg-Arg-Ala-Gln-Asp-Phe-Val-Gln-Trp-Leu-Met-Asn-Thr-NH₂ (SEQ ID NO: 52).

使用下列的 Fmoc 胺基酸：Ala, Arg(Pmc), Asp(OtBu),

Asn(Trt), Gln(Trt), homoCys(SO₃Na), Leu, Lys(Boc), Met, Phe, Ser(tBu), Thr(tBu), Trp(Boc), Tyr(tBu), 以及 Val。

胜肽樹脂以 8.5ml TFA 加上 0.5g 酚，0.5ml 的水以及 0.5ml 甲基苯基硫醚，在室溫下處理約 2 小時。該胜肽溶解於 TFA 中過濾，且加入 40ml 的乙醚進行沉澱。沉澱得到粗胜肽，溶解於乙酸中並凍乾。粗胜肽產量約 100 130mg，在純化後得到純度 95% 之胜肽 15 20mg (10 15% 總產量)。該胜肽以 HPLC 分析後顯示保留時間約為 6.73 分鐘，且 ESI-MS 顯示質量為 3021.0，對應於分子量為 3021.3 之胜肽。

以相同方式合成 [hCys(SO₃H)₉]glucagon (5-29) amide，該胜肽以 HPLC 分析後顯示保留時間約為 6.82 分鐘，且 ESI-MS 顯示質量為 3122.5，對應於分子量為 3122.4 之胜肽；合成 [hCys(SO₃H)₉]glucagon (4-29) amide，該胜肽以 HPLC 分析後顯示保留時間約為 6.83 分鐘，且 ESI-MS 顯示質量為 3178.5，對應於分子量為 3179.3 之胜肽；合成 [hCys(SO₃H)₉]glucagon (2-29) amide，該胜肽以 HPLC 分析後顯示保留時間約為 6.79 分鐘，且 ESI-MS 顯示質量為 3394.5，對應於分子量為 3394.7 之胜肽；合成 [PLA6, hCys(SO₃H)₉]glucagon (6-29) amide，該胜肽以 HPLC 分析後顯示保留時間約為 7.17 分鐘，且 ESI-MS 顯示質量為 3022.0，對應於分子量為 3022.3 之胜肽。

合成 [PLA6, E9, C24(1.2K)]glucagon (6-29) amide

將20mg (0.00675mmole)之[PLA6, E9, C24]glucagon (6-29) amide及12.5mg (0.01mmole) m-dPEGTM24 -MAL(MW 1239, Quanta biodesign Ltd. Powell, OH), 溶解於9ml 25% 乙晴水以及1ml 1M Tris base緩衝液(pH調整為8.0 8.5)。將反應於室溫下攪拌並利用分析HPLC追蹤反應的進行。在HPLC偵測不到初始產物後(約2小時), 以製備性HPLC純化該混合物。

在凍乾後, 得到約 10 12 mg [PLA6, E9, C24(1.2K)]glucagon (6-29) amide, 以HPLC分析後顯示保留時間約為7.48分鐘, 且ESI-MS顯示質量為4218.5, 對應於分子量為4218.0 (含水分子)。

以相同方式合成[C5(1.2K), E9]glucagon (5-29) amide, 以HPLC分析後顯示保留時間約為7.25分鐘, 且ESI-MS顯示質量為4327.5, 對應於分子量為4327.8; 合成[C8(1.2K), E9]glucagon (6-29) amide, 以HPLC分析後顯示保留時間約為7.25分鐘, 且ESI-MS顯示質量為4260.0, 對應於分子量為4259.0。

合成[PLA6, E9, C24(20K)]glucagon (6-29) amide
15mg (0.005mmole) [PLA6, E9, C24]glucagon (6-29) amide以及140mg (0.006mmole) 20K mPEG-MAL(MW 22k, Nektar, Huntsville, AL) 溶解於9ml 25% 乙晴水以及1ml 1M Tris base緩衝液(pH調整為8.0 8.5)。將反應於室溫下攪拌並利用分析HPLC追蹤反應的進行。在HPLC偵測不到初始產物後(約6小

時)，以製備性HPLC純化該混合物。以分析HPLC在波長214nm確認該餾份，且以波長280nm之UV測量。該餾份具有90% HPLC純度以及對波長280nm之UV具有高吸光值 ($A_{280nm}=1.0-2.0$)，將其混合並凍乾。可得到約60-80 mg之[PLA6, E9, C24(20K)]glucagon (6-29) amide，以HPLC分析後顯示保留時間約為8.5-8.6分鐘，且MALDI-MS顯示質量為24K~26K之間。

以相同方式合成[PLA6, C8(20K), E9]glucagon (6-29) amide, [PLA6, E9, C16(20K)]glucagon (6-29) amide, [PLA6, E9, C40(20K)]glucagon (6-40) amide, [PLA6, D9, C16(20K)]glucagon (6-29) amide and [PLA6, D9, C24(20K)]glucagon (6-29) amide.

合成[PLA6, E9, C24(40K)]glucagon (6-29) amide

將15mg (0.005mmole) [PLA6, E9, C24]glucagon (6-29) amide以及(0.006mmole) 40K mPEG-MAL(MW 40k, Chirotech Technology Ltd., Cambs CB4 0WG, German)溶解於18ml 25% 乙晴水以及2ml 1M Tris base緩衝液(pH調整為8.0-8.5)。將反應於室溫下攪拌並利用分析HPLC追蹤反應的進行。在HPLC偵測不到初始產物後(約6小時)，以製備性HPLC純化該混合物。以分析HPLC在波長214nm確認該餾份，且以

波長280nm 之UV測量。該餾份具有90% HPLC純度以及對波長280nm 之UV具有高吸光值($A_{280nm}=1.0-2.0$)，將其混合並凍乾。可得到約100-120 mg之[PLA6, E9, C24(40K)]glucagon (6-29) amide，以HPLC分析後顯示保留時間約為8.60-8.8分鐘。

以相同方式合成[PLA6, C8(40K), E9]glucagon (6-29) amide, [PLA6, E9, C16(40K)]glucagon (6-29) amide and [PLA6, E9, C40(40K)]glucagon (6-40) amide, [PLA6, D9, C16(40K)]glucagon (6-29) amide 以及 [PLA6, D9, C24(40K)]glucagon (6-29) amide.

合成[PLA6, E9, C24(40K)]glucagon (6-29) amide二聚體
將20mg (0.00675mmole) [PLA6, E9, C24]glucagon (6-29) amide溶解於6ml PBS緩衝液，1ml 1M Tris base緩衝液(pH調整為8.0-8.5)，以及3ml DMSO。將反應於開放之容器中及室溫下攪拌，並利用分析HPLC每2小時追蹤反應的進行。在HPLC偵測不到初始產物後(HPLC滯留時間7.4分鐘)，二聚體產物(HPLC滯留時間7.9分鐘)係為主要產物(在12小時後)，以0.1%TFA10% 乙晴水稀釋該混合物，以製備性HPLC純化該混合物。在凍乾後得到約6-8mg之[PLA6, E9, C24]glucagon (6-29) amide二聚體，ESI-MS顯示質量為5920.0，對應於分子量為5920.6.

以相同方式合成 [C9]glucagon(6-29) amide 二聚體，ESI-MS顯示質量為5916.0，對應於分子量為5916.6；以及合成 [C5, E9]glucagon(5-29) amide 二聚體，ESI-MS顯示質量為6174.0，對應於分子量為6174.8

實施例 16

胰高血糖素之拮抗劑活性

胰高血糖素與各種不同衍生抑制物比較其受體結合、cAMP 誘導及 cAMP 抑制。此測試用以測定受體結合及 cAMP 誘導及 cAMP 抑制，係分別以實施例 12、13 所揭露之測定方法進行。

製備可表現胰高血糖素拮抗劑活性之特定胰高血糖素相似物。此成分不同於天然胰高血糖素，因其具有天然胰高血糖素胺基端殘基，且和天然胰高血糖素相較具有第 9 號位置取代為麩胺酸之修飾。表 4 提供特譯鄧胰高血糖素拮抗劑相似物之胰高血糖素受體親和力及拮抗活性。

表 4：具麩胺酸修飾之胺基端截斷胰高血糖素相似物及其胰高血糖素拮抗劑活性

胜肽	受體結合	cAMP 抑制
----	------	---------

	IC ₅₀ (nM)	IC ₅₀ (nM)
胰高血糖素	1-2.5	N/A
[Glu ⁹]胰高血糖素(aa2-29)-NH ₂	14	部份拮抗劑
[Glu ⁹]胰高血糖素(aa4-29)-NH ₂	136	128
[Glu ⁹]胰高血糖素(aa5-29)-NH ₂	37	74
[Glu ⁹]胰高血糖素(aa6-29)-NH ₂	36	97

Glu⁹ 係為第 9 號位置為麩胺酸，依據天然胰高血糖素之序列

如表 5 所指出，一系列 hCys9-based 拮抗劑並未表現如之前報告的 Glu9-based 拮抗劑一般有效地或選擇性地。成分 5B 及 6B 顯示出某些程度之拮抗活性，但僅在濃度高出其激動劑有效劑量三倍時。然而，當胺基端胺基酸(及天然胰高血糖素之第 1 號位置)移除時，hCys9-based 胰高血糖素拮抗劑的效能有所增加(參閱表 8)。

表 5

胰高血糖素拮抗劑相似物之受體結合及 cAMP 抑制結果

成份編號	胜肽	受體結合	cAMP 誘導	cAMP 抑制
		IC ₅₀ (nM)	EC ₅₀ (nM)	IC ₅₀ (nM)

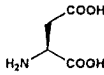
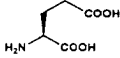
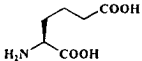
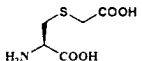
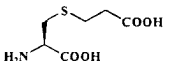
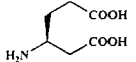
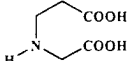
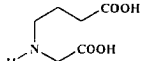
	胰高血糖素	1.75-0.31	0.21±0.11	N/A
	[desHis1, Glu9]胰高血糖素-NH ₂	36.90±0.32	65±37	1862±1234
	[desHis1, Glu9, Phe25, Leu27]胰高血糖素-NH ₂	12.59±0.41	81±23	N/A*
5	[desHis1, desPhe6] 胰高血糖素-NH ₂	129.55±44.9	1178±105	N/A*
6	[desHis1, Leu4, Glu9] 胰高血糖素-NH ₂	36.88±0.03	318±112	102±52
4B	[desHis1, hCys9(SO ₃ -), Phe25, Leu27] 胰高血糖素-NH ₂	13.90±0.37	430±45	N/A*
5B	[desHis1, desPhe6, hCys9(SO ₃ -), Phe25, Leu27] 胰高血糖素-NH ₂	53.32±9.97	3212±368	9217±3176
6B	[desHis1, Leu4, hCys9(SO ₃ -), Phe25, Leu27] 胰高血糖素-NH ₂		1614±1132	4456±1469

*表示非拮抗劑

上標之號碼表示相對於天然胰高血糖素之胺基酸位置

胰高血糖素及在第1號胺基酸截斷及第9號位置(依據天然胰高血糖素順序)取代修飾的胰高血糖素之受體結合親和力，以實施例12所述之分析方法，結果如表6所示。

表6

胜肽編號.	胜肽	第 9 號殘基	IC ₅₀ (nM) ^a
	胰高血糖素	 Asp	1.50 (1.0 ~ 2.5)*
1	[desHis ¹ , Glu ⁹]胰高血糖素 -NH ₂	 Glu	14.08 ± 0.34
2	[hGlu ⁹] 胰 高 血 糖 素 (aa2-29)-NH ₂	 hGlu	8.10 ± 0.40
3	[(CSA-1) ⁹] 胰 高 血 糖 素 (aa2-29)-NH ₂	 CSA-1	12.66 ± 0.13
4	[(CSA-2) ⁹] 胰 高 血 糖 素 (aa2-29)-NH ₂	 CSA-2	13.28 ± 0.78
5	[β-hGlu ⁹] 胰 高 血 糖 素 (aa2-29)-NH ₂	 β-hGlu	37.10 ± 0.34
6	[(NSG-1) ⁹] 胰 高 血 糖 素 (aa2-29)-NH ₂	 NSG-1	983 ± 82
7	[(NSG-2) ⁹] 胰 高 血 糖 素 (aa2-29)-NH ₂	 NSG-2	2348 ± 382

*EC₅₀ (nM)

hGlu = 同麩胺酸;

上標之號碼表示相對於天然胰高血糖素之胺基酸位置

以某些胰高血糖素修飾的胜肽進行測試，包括在第9號位置修飾為麩胺酸、同麩胺酸、CSA-1, CSA-2 及 β -同麩胺酸，表現出胰高血糖素拮抗劑活性。

胰高血糖素胜肽包括第9號位置胺基酸修飾，且具有不同的胺基端截斷，進行其胰高血糖素拮抗劑活性分析。此些胜肽之測試結果如表7所示。

表 7

胜 肽 編 號.	胜肽	第 9 號 殘基	IC50 (nM)a	cAMP	
				pA2b	(I/A)50c
8	[Glu9] 胰 高 血 糖 素 (aa4-29)-NH2	Glu	136.0 ± 17.84	7.05 ± 1.01	1375
9	[Leu4, Glu9] 胰 高 血 糖 素(aa4-29)-NH2	Glu	36.38 ± 8.69	NAd	NA
10	[Glu9] 胰 高 血 糖 素 (aa5-29)-NH2	Glu	37.38 ± 3.41	6.94 ± 0.34	390
11	[Glu9] 胰 高 血 糖 素 (aa6-29)-NH2	Glu	36.35 ± 5.23	7.16 ± 0.27	486
12	[hGlu9] 胰 高 血 糖 素 (aa6-29)-NH2	hGlu	162.9 ± 70.8	6.27 ± 0.11	2361
13	[(CSA-1)9] 胰 高 血 糖 素 (aa6-29)-NH2	CSA-1	107.3 ± 5.37	6.68 ± 1.05	506
14	[(CSA-2)9] 胰 高 血 糖 素 (aa6-29)-NH2	CSA-2	146.4 ± 36.9	6.64 ± 0.29	580
15	胰 高 血 糖 素 (aa6-29)-NH2	Asp	1894 ± 383	6.94 ± 0.63	1730

16	[Lys9] 胰高血糖素 (aa6-29)-NH ₂	Lys	5779 ± 1382	6.58 ± 0.60	1990
17	[Glu9] 胰高血糖素 (aa7-29)-NH ₂	Glu	>10000	NDe	ND

上標之號碼表示相對於天然胰高血糖素之胺基酸位置

^a 此資料之平均值±標準差係以至少三次獨立實驗所得。

^b pA₂: 拮抗劑濃度之負值對數，和 0.5 單位相較下減少 1 單位激動劑之反應。此資料之平均值±標準差，以至少兩次獨立實驗所得。

^c (I/A)₅₀: 抑制指標，抑制劑 IC₅₀ 與添加胰高血糖素(0.1-0.2nM)之比例。此資料之平均值±標準差，以至少三次獨立實驗所得，且由 EC₅₀ 標準化。

^d NA: 非完全的拮抗劑。

^e ND: 未檢測出。

第3圖表示測量胰高血糖素拮抗劑之結合親合力結果，胺基端進一步縮短為截斷1, 3或5個胺基酸。特別是，hCys9-based 胰高血糖素拮抗劑之結合親合力藉由量測與I¹²⁵標定之胰高血糖素之競爭結合於胰高血糖素受體。結果顯示刪除第1殘基減少親和力，但進一步的刪除僅些微改變其親和力，仍產生如奈米莫耳親和力之配體。第4圖顯示在cAMP生化測試中，選

擇拮抗劑以抑制胰高血糖素活性之能力。令人驚訝地，發現到相較於Glu9 2-29或Leu4, Glu9 4-29, 5-29 hCys9-based胰高血糖素拮抗劑更為有效。更進一步地，5-29 或 6-29 hCys9顯示出其完全有效的拮抗性，且並未量測出任何激動活性。

表8提供同半胱磺胺酸經截斷修飾之相似物片段之胰高血糖素受體親和力及拮抗活性。desHis1-based hCys(SO₃H)⁹-based顯示如先前報告之Glu⁹- based antagonist [desHis¹, Glu9]胰高血糖素胜肽的效能表現。更進一步截短的hCys(SO₃H)⁹-based胰高血糖素拮抗劑係截去3, 4或5個胺基酸。受體結合結果顯示，刪除第1號位置胺基酸降低其對於胰高血糖素受體之親和力，但進一步的刪除僅些微改變其親和力，仍產生如奈米莫耳親和力之配體。

表 8：同半胱磺胺酸經截斷修飾之胰高血糖素片段相似物及其
胰高血糖素拮抗活性

胜肽	IC50(nM)	cAMP	
		pA2	IC50(nM)
胰高血糖素	1.0~2.5 (EC50)		
[desHis1, Glu9]胰高血糖素 -NH2	14.08 ± 0.34	NA	1089 (部份拮抗劑)
[hCys9(SO3H)]胰高血糖素 (aa2-29)-NH2	13.16 ± 1.0	NA	146.6 (部份拮抗劑)
[hCys9(SO3H)]胰高血糖素 (aa4-29)-NH2	41.55 ± 4.79	7.22 ± 1.09	68.4
[hCys9(SO3H)]胰高血糖素 (aa5-29)-NH2	33.85 ± 9.38	6.77 ± 0.33	98.3
[hCys9(SO3H)]胰高血糖素 (aa6-29)-NH2	59.11 ± 18.10	7.16 ± 0.51	133.4

上標之號碼表示相對於天然胰高血糖素之胺基酸位置

如第 5A 及 5B 圖所示，4-29, 5-29 及 6-29 hCys(SO₃H)⁹-based
胜肽皆具有完全抑制胰高血糖素之活性，但 2-29 胜肽僅具有少

許胰高血糖素拮抗劑活性。第5A圖顯示2-29胜肽無法完全抑制胰高血糖素活性係因為該兩胜肽具有殘存的胰高血糖素激動活性之功能。

特定胰高血糖素相似物已在發展中，自然情況下的第6號位置之苯丙胺酸被取代為苯乳酸(PLA)，並在6-29截斷的胰高血糖素醯胺主幹上。苯乳酸係與苯丙胺酸等電性，但不具有可滴定的氫。表9及10說明了在PLA6取代的情況下，天然的Asp9具有完全的拮抗性，但在效能上較低於Glu9及hCys(SO₃H)⁹。先前文獻指出，將胰高血糖素(2-29)相似物之Asp9取代為Glu9或hCys(SO₃H)⁹，可具有較高親和力及完全的拮抗性。因此，令人驚訝的是，在6-29截斷的胰高血糖素醯胺主幹之苯丙胺酸被取代為苯乳酸可促進相較於Glu9及hCys(SO₃H)⁹之相對拮抗效能。更明確地，PLA6相似物增加了對於胰高血糖素受體三倍的親和力，且增加了相對於Phe6更好的拮抗效能。

表9：第9號殘基取代之胰高血糖素拮抗劑相似物及其胰高血糖素拮抗劑活性

IC50(nM)			cAMP	
胜肽	第 9 號殘基	受體結合	pA2	IC50(nM)
胰高血糖素	Asp	1.0~2.5		0.05~0.15 (EC50)
[E9] 胰 高 血 糖 素 (aa6-29)-NH2	Glu	36.35 ± 5.23	7.16 ± 0.27	97.2
[hCys(SO3)9] 胰 高 血 糖 素 (aa6-29)-NH2	hCys(SO3)	59.11 ± 18.10	7.16 ± 0.51	133.4
[hE9] 胰 高 血 糖 素 (aa6-29)-NH2	hGlu	162.9 ± 70.8	6.27 ± 0.11	472.2
[C9(SCH2COOH)] 胰 高 血 糖素(aa6-29)-NH2	CSA-1	107.3 ± 5.37	6.68 ± 1.05	101.2
[C9(SCH2CH2COOH)] 胰 高血糖素(aa6-29)-NH2	CSA-2	146.4 ± 36.9	6.64 ± 0.29	116
胰高血糖素(aa6-29)-NH2	Asp	1670 ± --	6.94 ± 0.63	346
[K9] 胰 高 血 糖 素	Lys	3236 ± --	6.58 ± 0.60	398

(aa6-29)-NH2				
--------------	--	--	--	--

上標之號碼表示相對於天然胰高血糖素之胺基酸位置

表 10：第 9 號殘基取代之[PLA6]胰高血糖素 (6-29)相似物及其胰高血糖素拮抗劑活性

胜肽	IC50(nM) (受體結合)	IC50(nM) (cAMP, 抑制胰高血 糖素拮抗劑) 0.1nM 或 0.2nM	溶解度 (%, pH 6-8)
胰高血糖素	1.96 ± 0.61	0.09 (EC50)	
[PLA6, D9]胰高血糖素 (aa6-29)-NH2	13.85 ± 3.22	6.90	11
[PLA6, D9]胰高血糖素 (aa6-29)-COOH	15.51 ± 3.86	13.20	96
[PLA6, E9]胰高血糖素 (aa6-29)-NH2	12.33 ± 2.24	2.39 42.40	11
[PLA6, hCys(SO3)9]胰高 血糖素(aa6-29)-NH2	14.20 ± 0.45	40.20	
[PLA6, D9, D28] 胰高血 糖素(aa6-29)-NH2	9.0±1.24	1.32	100
[PLA6, E9]胰高血糖素	40.28±11.29	24.75	16

(aa6-29+CEX)-NH ₂			
------------------------------	--	--	--

上標之號碼表示相對於天然胰高血糖素之胺基酸位置

在胰高血糖素相似物各個位置取代為PLA之效果，包括發生在第4及5號位置。該資料呈現於表11及第8圖中，其顯示PLA6相似物和較長的胜肽相比，其效能更佳。在第8圖結果顯示氫氧基的醯化作用並不影響PLA6相似物效能。

表 11：在第 4、5 及 6 號位置之 PLA 取代之相似物，及其拮抗活性

胜肽	IC50(nM) (受體結合)	IC50(nM) (cAMP, 抑制 0.8mM 胰高血糖素)
胰高血糖素	1.0-2.5	1.44 (EC50+)
[PLA6, E9] 胰高血糖素 (aa6-29)-NH2	12.34 ± 0.13	64.8 ± 3.4
[Ac-PLA6, E9] 胰高血糖素 (aa6-29)-NH2	ND	38.1 ± 9.2
[PLA5, E9] 胰高血糖素 (aa5-29)-NH2	ND	328 ± 25
[PLA4, E9] 胰高血糖素 (aa4-29)-NH2	ND	84.4 ± 19.5 (部份激動劑)

ND: 未檢測出

上標之號碼表示相對於天然胰高血糖素之胺基酸位置

表 12 之結果顯示之 PLA6 取代並非只增加胜肽效能，同時在聚乙二醇化反應中扮演重要角色。PLA6 相似物可選擇性地聚乙二醇化，在沒有恢復胰高血糖素激動活性之下。天然 Phe6 相似物令人驚訝地顯示出，當聚乙二醇化時可恢復激動活性。測試了某些特定聚乙二醇化位置，包括在第

8、11 及 24 號位置(相對於天然胰高血糖素胜肽)。在第 24 號位置聚乙二醇化之相似物顯示出最佳之效能及選擇性胰高血糖素拮抗劑活性。

表 12：聚乙二醇化胺基端截斷胰高血糖素相似物及其胰高
血糖素拮抗劑拮抗活性

胜肽	IC50(nM) (受體結合)	IC50(nM) (cAMP, 抑制 0.2mM 胰 高血糖素)
[C8(20kDaPEG), E9] 胰高血糖素 (aa6-29)-NH2	>1000	非拮抗劑
[PLA6, C8(20kDaPEG), E9] 胰高血 糖素(aa6-29)-NH2	303 ± 14	236
[E9, C11(20kDaPEG)] 胰高血糖素 (aa6-29)-NH2	>1000	非拮抗劑
[PLA6, E9, C11(20kDaPEG)] 胰高血 糖素(aa6-29)-NH2	776 ± 161	664
[E9, C24 (20kDaPEG)] 胰高血糖素 (aa6-29)-NH2	>1000	非拮抗劑
[PLA6, E9, C24(20kDaPEG)] 胰高血 糖素(aa6-29)-NH2	90 ± 7	126
[MCA6, E9, C24(20kDaPEG)] 胰高 血糖素(aa6-29)-NH2	208 ± 57	非拮抗劑
[C5(1.2kDaPEG), E9] 胰高血糖素	1081±268	2281

(aa5-29) -NH ₂		
[C5(5kDaPEG), E9] 胰高血糖素 (aa5-29) -NH ₂	634±174	1608
[C5(20kDaPEG), E9] 胰高血糖素 (aa5-29) -NH ₂	331±74	976
[d-Cys5(20kDaPEG), E9] 胰高血糖素 (aa5-29) -NH ₂	>10000	14764
[K5(CH ₂ CH ₂ S-20kDaPEG), E9] 胰高血糖素 (aa5-29) -NH ₂	>10000	非損抗劑
3.4kDaPEG-dimer[C5, E9] 胰高血糖素 (aa5-29) -NH ₂	435±256	1343
[PLA6, C8(1.2kDaPEG), E9] 胰高血糖素 (aa6-29) -NH ₂	220±36	非損抗劑
[PLA6, C8(5kDaPEG), E9] 胰高血糖素 (aa6-29) -NH ₂	948±297	216
[PLA6, C8(20kDaPEG), E9] 胰高血糖素 (aa6-29) -NH ₂	303±14	92
[PLA6, E9, C24(1.2kDaPEG)] 胰高血糖素 (aa6-29) -NH ₂	4.7±0.4	18
[PLA6, E9, C24(20kDaPEG)] 胰高血糖素 (aa6-29) -NH ₂	90±7	126

[MCA6, E9, C24(20kDaPEG)]胰高 血糖素(aa6-29) -NH2	208±57	非損抗劑
[Phe6, E9, C24(20kDaPEG)]胰高血 糖素(aa6-29) -NH2	>10000	非損抗劑

實施例 17

本文所述之胰高血糖素拮抗劑進行醯化作用如下：

製備醯化及/或聚乙二醇之胜肽如下。該胜肽係在一固相樹脂上合成，並以 CS Bio 4886 胜肽合成器或 Applied Biosystems 430A 胜肽合成器。利用所述之原位中和化學法 Schnolzer et al., Int. J. Peptide Protein Res. 40: 180-193 (1992). 對於醯化胜肽，欲進行醯化的標的胺基酸位置(例如第 10 號位置)取代為 N ϵ -FMOC 離胺酸殘基。以 N-terminally BOC 保護胜肽，及 20% 吡啶之 DMF，處理約 30 分鐘以移除 FMOC/甲酰基。藉由加入 10 倍莫耳量的 FMOC- 保護間隔子胺基酸 (例如 FMOC-(N-BOC)-Tryptophan-OH) 或醯鏈 (例如 C17-COOH) 及 PyBOP 或 DEPBT 偶合劑之 DMF/DIEA，以結合於自由的 ϵ -amino Lys 殘基。除去間隔子胺基酸的 FMOC 基，藉由重複的連結一醯鏈。最後處理以 100% TFA，以除去任何側鏈保護基以及胺基端 BOC 基。胜肽樹脂以 5% DIEA/DMF 中和，乾燥，再以 HF/p-cresol, 95:5, 0°C 處理 1 小時從樹脂分離。接著進行萃取，將粗胜肽溶解於 5% HOAc 溶液中。以 ESI-MS 確認溶液中樣本之分子量是否正確。正確的胜肽則以 10% CH₃CN/0.1% TFA 到 0.1% TFA 之 100% CH₃CN 線性梯度的 RP-HPLC 純化。以 Vydac C18 22 mm x 250 mm 蛋白質管柱進行純化。醯化胜肽相似物一般係在 20:80 之緩衝液比例沖出。各收集分集中在一起且以

RP-HPLC 確認其純度。純的收集分經過凍乾後產生白色固體的胜肽。

對於胜肽聚乙二醇化，以 40 kDa 之甲氧基聚(乙二醇)馬來醯亞胺基-丙醯胺 (Chirotech Technology Ltd.)，與相同莫耳量的胜肽在 7M 尿素，50mM Tris-HCl 下，利用少量的溶劑將胜肽及聚乙二醇溶解到乾淨溶液中(使用 2-3 毫克胜肽之反應時，係少於 2 毫升)。在室溫下激烈攪拌 4-6 小時，並以 RP-HPLC 進行分析。聚乙二醇化產物由初產物區別出來，以較少的滯留時間。純化係以 Vydac C4 管柱，以相似於初胜肽純化之步驟進行。約在緩衝液比例為 50:50 沖出。純的聚乙二醇胜肽之收集分被發現並進行凍乾。

實施例18

glucagon-based 之 縮 酯 環 肽 [Thr5-O-PLA6, E9]glucagon (2-29) amide 及 [Thr5-O-PLA6, E9]glucagon (1-29) amide之合成，係以下列步驟進行：

利用固相 Boc-chemistry，以 ABI 430A自動胜肽合成器，以 0.2mmole MBHA 醯胺樹脂及 DEPBT作為偶合劑，合成胜肽序列為HO-PLA-TSEYSKYLDSRRAQDFVQWLMNT [PLA6, E9]glucagon(6-29) (SEQ ID NO: 71)。使用下列Boc 胺基酸：Ala, Arg(Tos), Asp(OcHx), Asn(Xan), Glu(OcHx), Gln(Xan), Leu, Lys(2-Cl-Z), Met, PLA, Ser(OBzl), Thr(OBzl), Trp(HOC), Tyr(2,6-di-Cl-Bzl), 及 Val 此胜肽形成一縮酯環

肽(酯鍵)於樹脂，經由手動偶合於一預活化並具有 Boc-Thr(OBzl)-OH (2mmole) / DIC (1mmole) / DMAP (0.2mmole) 之 DCM的對稱性酞溶液約16小時。剩餘的胺基酸係以標準Boc-chemistry得到具有下列序列之縮酯環肽樹脂：

Ser-Gln-Gly-Thr-O-PLA-Thr-Ser-Glu-Tyr-Ser-Lys-Tyr-Leu-Asp-Ser-Arg-Arg-Ala-Gln-Asp-Phe-Val-Gln-Trp-Leu-Met-Asn-Thr-NH₂ (SEQ ID NO: 64).

肽樹脂以液態氟化氫將粗肽由固相分離下來且除去所有保護基。縮酯環肽係以製備性HPLC純化，且以MS及分析HPLC進行分析。純化的肽在分析光譜顯示單一波峰，及ESI-MS分析得到質量為3359.0，而對應計算為3359.6的分子量。

以相同的步驟，以組胺酸胺基端殘基單一附加偶合，合成縮酯環肽 [Thr5-O-PLA6, E9]glucagon (1-29) amide (SEQ ID NO: 65)。純化的肽在分析光譜顯示單一波峰，及ESI-MS分析得到質量為3359.0，而對應計算為3359.6的分子量。

實施例19

下列肽係以前述方法合成，並接著藉由量測由表現cAMP之細胞釋放出cAMP以測試刺激GLP-1受體的能力，以及藉由量測由表現cAMP之細胞釋放出cAMP以測試刺激胰高血糖素受體的能力，且以0.5 nM進行刺激，如實施例13

所述。結果顯示於表13中。

表 13

胜肽	胰高血糖素拮 抗劑	GLP-1 激動性
	IC50(nM, 抑制 0.5nM G)	EC50(nM)
胰高血糖素	0.005 ± 0.008	
GLP-1		0.005 ± 0.002
[PLA6, E9]胰高血糖素(6-29) PLA TSEYSKYLDSRRAQDFVQWLMNT-NH2 (SEQ ID NO: 71)	23.75 ± 4.16	無激動性
[PLA6, D9, D28]胰高血糖素(6-29) PLA TSDYSKYLDSRRAQDFVQWLMDT-NH2 (SEQ ID NO: 62)	9.03 ± 1.54	746.0 ± 225.7
[E9]胰高血糖素 (2-29) SQGTFTSEYSKYLDSRRAQDFVQWLMNT-NH2 (SEQ ID NO: 63)	340.0 ± 149.0	2719.8± 2136.4
[Thr5-O-PLA6, E9]胰高血糖素(2-29) SQGT(O*)FTSEYSKYLDSRRAQDFVQWLMNT-NH2 (SEQ ID NO: 64)	6.49 ± 2.17	1305.6 ± 241.5

[Thr5-O-PLA6, E9]胰高血糖素(1-29) HSQGT(O*)FTSEYSKYLDSRRAQDFVQWLMNT-NH2 (SEQ ID NO: 65)	14.19 ± 7.89	721.0 ± 35.5
--	--------------	--------------

(O*)表示縮酯環肽鍵

由以上之實施例可知，本發明所提供之++確具產業上之利用價值，故本發明業已符合於專利之要件。惟以上之敘述僅為本發明之較佳實施例說明，凡精於此項技藝者當可依據上述之說明而作其它種種之改良，惟這些改變仍屬於本發明之發明精神及以下所界定之專利範圍中。

【圖式簡單說明】

第 1 圖係為一柱狀圖，顯示胰高血糖素

Cys²¹-maleimidoPEG_{5K} 分別在 37°C 下 24, 48, 72, 96, 144 及 166 小時後之穩定性；

第 2 圖顯示胰高血糖素 Cys²¹-maleimidoPEG_{5K} 分別在 pH =5, 37°C 下 24, 72, 及 144 小時後之 HPLC 分析結果；

第 3 圖係顯示表列之經由胺基端截斷胺基磺酸之胰高血糖素拮抗劑相似物進行結合分析之結果；

第 4 圖係顯示測量胰高血糖素受體與表列之胰高血糖素之拮抗作用，其係經由 cAMP 之生成所測定；

第 5A 及 5B 圖係顯示測量胰高血糖素受體與表列之胰高血糖素之拮抗作用，其係經由 cAMP 之生成所測定。第

5A 圖係胰高血糖素受體經由胰高血糖素 類似物 [E9]G(2-29) ●, [hC9(SO₃H)]G(2-29) ▲, [hC9(SO₃H)]G(4-29) ▼, [hC9(SO₃H)]G(5-29) ◀ 及 [hC9(SO₃H)]G(6-29) ◀, 相對於天然胰高血糖素所誘導之比較情形。第 5B 圖係提供關於以相同之類似物對於在以 0.2 nM 胰高血糖素誘導胰高血糖素 受體下之抑制作用。縮寫：E9 = 在天然之胰高血糖素在第 9 號位置取代為麩胺酸； G(X-29) = 天然之胰高血糖素在胺基端截斷為 X - 1 胺基酸； hC9(SO₃H) = 相對於天然之胰高血糖素在第 9 號位置取代為同半胱磺胺酸。

第 6 圖係顯示合成 Fmoc-homoCys(SO₃Na)-OH 之合成流程。Fmoc-homoCys(SO₃Na)-OH 可溶於 DMF 或 NMP 中，且在自動合成胜肽之步驟中可直接利用 DIC/HOBT 或 HBTU/HOBT。所有 hC9(SO₃H)-based 之胰高血糖素拮抗劑相似物係經由鈉型態之 Fmoc-homoCys(SO₃Na)-OH 以固相合成法所合成。

第 7 圖係顯示胰高血糖素拮抗劑之結合親和力比較及經由胺基端胺基酸不同修飾後之胰高血糖素拮抗劑之胰高血糖素受體活性(天然胰高血糖素之第 6 號殘基)；

第 8 圖係顯示測量表列之 PLA 胰高血糖素拮抗劑相似物在 0.8 nM 之胰高血糖素下誘導胰高血糖素受體之拮抗作用，其係經由 cAMP 之生成所測定。受測 之 PLA

五、中文發明摘要：

提供一種將胰高血糖素序列進行胺基酸取代及/或修飾之胰高血糖素拮抗劑。在較佳實施例中，胰高血糖素拮抗劑係由天然胰高血糖素胜肽經過將其前兩個胺基酸殘基之胺基端及(i)在第 9 號位置之胺基酸(依照天然胰高血糖之胺基酸排列順序)取代或(ii)以苯乳酸(PLA)取代第 6 號位置之苯丙胺酸所組成。在另一實施例中，胰高血糖素可拮抗 A-B-C 結構，其中 A 為苯乳酸，一苯乳酸之氧化衍生物，或是由 2~6 個胺基酸組成之一胜肽，且該胜肽之其中兩連續胺基酸係由一酯鍵或一醚鍵鍵結連接。

六、英文發明摘要：

相似物包括 [PLA6, E9]G(6-29) ●, [Ac-PLA6, E9]G(6-29) ▲, [PLA4, E9]G(4-29) ▼, [PLA5, E9]G(5-29) ◀, 與天然胰高血糖素 之活性單獨作比較。縮寫：E9 = 在天然之胰高血糖素在第 9 號位置取代為麩胺酸，G(Ac-PLA) 係為乙醯化苯乳酸。

【主要元件符號說明】

無

十、申請專利範圍：

1. 一種胰高血糖素拮抗劑，包括 SEQ ID NO: 42 之序列，或其氧化衍生物。
2. 如申請專利範圍第 1 項所述之胰高血糖素拮抗劑，包括 SEQ ID NO: 42 之序列。
3. 如申請專利範圍第 1 或 2 項所述之胰高血糖素拮抗劑，其中該胰高血糖素拮抗劑之羧基端胺基酸具有一醯胺基，以取代其羧酸基。
4. 如申請專利範圍第 1 或 2 項所述之胰高血糖素拮抗劑，其中該第 4 號位置胺基酸係為天冬胺酸。
5. 如申請專利範圍第 1 或 2 項所述之胰高血糖素拮抗劑，更包括 SEQ ID NO: 19 之序列，融合於 SEQ ID NO: 42 之羧基端胺基酸。
6. 如申請專利範圍第 1 或 2 項所述之胰高血糖素拮抗劑，更包括一親水性基團共價鍵結於 SEQ ID NO: 42 之第 11、16 或 19 號位置，或在胰高血糖素拮抗劑之胺基端或羧基端胺基酸，以及該胰高血糖素胜肽之藥學上可接受鹽類。

7. 如申請專利範圍第 6 項所述之胰高血糖素拮抗劑，其中該親水性基團係為一血漿蛋白或是免疫球蛋白之 Fc 部位
8. 如申請專利範圍第 6 項所述之胰高血糖素拮抗劑，其中該親水性基團係為聚乙二醇。
9. 如申請專利範圍第 8 項所述之胰高血糖素拮抗劑，其中該聚乙二醇鏈之分子量係為至少 20,000 道耳吞。
10. 如申請專利範圍第 8 項所述之胰高血糖素拮抗劑，其中該聚乙二醇鏈之分子量範圍係為 1,000 ~ 5,000 道耳吞。
11. 如申請專利範圍第 8 項所述之胰高血糖素拮抗劑，其中該胰高血糖素拮抗劑包括 SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO: 44 或 SEQ ID NO: 45 之序列。
12. 如申請專利範圍第 1 或 2 項所述之胰高血糖素拮抗劑，其中該胰高血糖素拮抗劑包括 SEQ ID NO: 46 或 SEQ ID NO: 47 之序列。
13. 如申請專利範圍第 1 或 2 項所述之胰高血糖素拮抗劑，

其中該第 23 號位置為天冬醯胺酸時，該第 24 號位置之胺基酸係選自由天冬胺酸及麩胺酸組成之群組，以及當該第 24 號位置為蘇胺酸時，該第 23 號位置之胺基酸係選自由天冬胺酸及麩胺酸組成之群組。

14. 如申請專利範圍第 1 或 2 項所述之胰高血糖素拮抗劑，更包括 1~2 個胺基酸添加至具有 SEQ ID NO: 42 之胰高血糖素拮抗劑之羧基端，其中該添加至羧基端之胺基酸係選自由天冬胺酸及麩胺酸組成之群組。

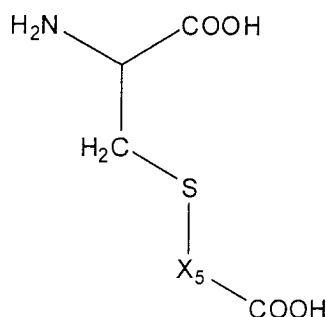
15. 如申請專利範圍第 1 或 2 項所述之胰高血糖素拮抗劑，其中 SEQ ID NO: 42 之第 10 號位置之胺基酸係選自由麩胺酸、半胱磺胺酸、同麩胺酸、同半胱磺胺酸組成之群組。

16. 如申請專利範圍第 1 或 2 項所述之胰高血糖素拮抗劑，其中該胰高血糖素拮抗劑包括 SEQ ID NO: 7、SEQ ID NO: 8、SEQ ID NO: 36、SEQ ID NO: 37、SEQ ID NO: 38、SEQ ID NO: 39、SEQ ID NO: 40 及 SEQ ID NO: 41 之序列。

17. 如申請專利範圍第 16 項所述之胰高血糖素拮抗劑，更包括 SEQ ID NO: 19 或 SEQ ID NO: 53 之序列，融合於該胰高血糖素拮抗劑之羧基端胺基酸。

18. 如申請專利範圍第 16 項所述之胰高血糖素拮抗劑，更包括一親水性基團共價鍵結於 SEQ ID NO: 42 之第 11、16 或 19 號位置，或在胰高血糖素拮抗劑之胺基端或羧基端胺基酸，以及該胰高血糖素胜肽之藥學上可接受鹽類。
19. 如申請專利範圍第 18 項所述之胰高血糖素拮抗劑，其中該親水性基團係為聚乙二醇。
20. 如申請專利範圍第 16 項所述之胰高血糖素拮抗劑，具有 SEQ ID NO: 41 之序列，其中該第 4 號位置係為天冬胺酸，且該第 10 號位置係為麩胺酸。
21. 如申請專利範圍第 16 項所述之胰高血糖素拮抗劑，其中該胰高血糖素拮抗劑包括 SEQ ID NO: 8、SEQ ID NO: 37 或 SEQ ID NO: 38。
22. 如申請專利範圍第 21 項所述之胰高血糖素拮抗劑，更包括 SEQ ID NO: 19 之序列，融合於該胰高血糖素拮抗劑之羧基端胺基酸。
23. 如申請專利範圍第 21 項所述之胰高血糖素拮抗劑，更包括一親水性基團共價鍵結於 SEQ ID NO: 42 之第 11、16 或 19 號位置，或在胰高血糖素拮抗劑之胺基端或羧基端胺基酸，以及該胰高血糖素胜肽之藥學上可接受鹽類。

24. 如申請專利範圍第 1 或 2 項所述之胰高血糖素拮抗劑，其中該胰高血糖素拮抗劑包括 SEQ ID NO: 42 胜肽之衍生物，其中該胰高血糖素拮抗劑與 SEQ ID NO: 42 胜肽之區別在於具有 1~3 個胺基酸取代，該胺基酸係選自第 5、6、8、9、12、13 及 14 號位置之一。
25. 如前述申請專利範圍之任何一項所述之胰高血糖素拮抗劑，其中該氧化衍生物係為 SEQ ID NO: 42 之酯或醚。
26. 一種胰高血糖素拮抗劑，包括以天然胰高血糖素之胺基酸序列經由在 SEQ ID NO: 1 之胺基端刪除 2~5 個胺基酸，且在 SEQ ID NO: 1 第 9 號位置之天冬胺酸取代為麩胺酸、同麩胺酸、 β -同麩胺酸(一種半胱胺酸之磺酸衍生物)或一種半胱胺酸之烷羧化衍生物、或一種由半胱胺酸衍生出且包含下列化學結構之羧基烷衍生物：



其中 X_5 係為 C_1 - C_4 烷基， C_2 - C_4 烯屬烴或 C_2 - C_4 炔基。

27. 如申請專利範圍第 26 項所述之胰高血糖素拮抗劑，其中該半胱胺酸之磺酸衍生物係為同半胱磺胺酸。
28. 如申請專利範圍第 26 項所述之胰高血糖素拮抗劑，其中 X_5 係為 C_1 烷基或 C_2 烷基。
29. 如申請專利範圍第 26 至 28 項之任一項所述之胰高血糖素拮抗劑，其中該胰高血糖素拮抗劑之胺基酸序列更包括修飾為至多三個胺基酸修飾。
30. 如申請專利範圍第 29 項所述之胰高血糖素拮抗劑，其中該至多三個胺基酸修飾係選自由下列修飾作用組成之群組：
- A. 取代下列位置胺基酸之其中之一或二，第 10、20 及 24 號位置(依據 SEQ ID NO: 1 之胺基酸序列)，或在胰高血糖素拮抗劑之胺基端或羧基端胺基酸透過一酯、醚、硫醚、氮或烷基胺鍵合以共價結合；
 - B. 取代下列位置胺基酸之其中之一或二，第 16、17、20、21 及 24 號位置(依據 SEQ ID NO: 1 之胺基酸序列)，或在胰高血糖素拮抗劑之胺基端或羧基端胺基酸取代為下列胺基酸組成之群組之一，半胱胺酸、離胺酸、鳥胺酸、同半胱胺酸以及乙醯苯丙胺酸，其中群組中之胺基酸係結合於其親水性之基團；
 - C. 添加一共價鍵結於親水性基團之胺基酸於胰高血糖

素損抗劑之胺基端或羧基端；

- D. 將第 15 號位置之天冬胺酸(依據 SEQ ID NO: 1 之胺基酸序列)取代為半胱磺酸、麩胺酸、同麩胺酸以及同半磺胺酸；
- E. 將第 16 號位置之絲胺酸(依據 SEQ ID NO: 1 之胺基酸序列)取代為半胱磺酸、麩胺酸、同麩胺酸以及同半磺胺酸；
- F. 將第 16、20、21、24 號位置之一或多個位置取代為氨基異丁酸，依據 SEQ ID NO: 1 之胺基酸序列；
- G. 刪除第 29 號位置或第 28 及 29 號位置胺基酸，依據 SEQ ID NO: 1 之胺基酸序列；
- H. 將第 28 號位置之天冬醯胺酸及第 29 號位置之蘇胺酸(依據 SEQ ID NO: 1 之胺基酸序列)之一或兩者同時取代為帶電荷胺基酸及/或在 SEQ ID NO: 1 之羧基端添加一至二個帶電荷胺基酸；
- I. 將第 27 號位置之甲硫胺酸(依據 SEQ ID NO: 1 之胺基酸序列)取代為白胺酸或正白胺酸；
- J. 添加一胜肽，其胺基酸序列具有 SEQ ID NO: 1 中第 19-21 號位置及羧基端第 53 號位置，其中第 29 號位置係為蘇胺酸或甘胺酸；
- K. 將羧基端羧基取代為氨或酯。

31. 如申請專利範圍第 30 項所述之胰高血糖素損抗劑，包括如第 30 項所述之 A、B 及 C 之修飾作用之一或其組合。

32. 如申請專利範圍第 31 項所述之胰高血糖素摻抗劑，更包括如第 30 項所述之 D~K 之修飾作用之一或其組合。
33. 一種二聚體，係由如申請專利範圍第 1 或 2 項所述之胰高血糖素摻抗劑所組成，且該兩胰高血糖素摻抗劑之間係經由一連結子所連結。
34. 如申請專利範圍第 33 項所述之胰高血糖素摻抗劑，其中組成該二聚體之兩胰高血糖素摻抗劑係分別選自由下列序列組成之群組：SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10 及 SEQ ID NO: 11，且該胰高血糖素摻抗劑係彼此經由一連結子結合於各胰高血糖素摻抗劑之第 11 或 19 號位置。
35. 一種藥物成分，包括如第 1 或 2 項所述之胰高血糖素摻抗劑，以及一藥學上可接受載體。
36. 一種藥物成分，包括如第 17 項所述之胰高血糖素摻抗劑或其藥學上可接受鹽類，以及一藥學上可接受載體。
37. 一種利用經過前配製之水性成分以治療高血糖之方法，該方法包括施以如第 35 項所述成份之有效劑量之步驟。
38. 一種降低食慾、減少體重或引發體重流失之方法，該方法包括施以一包括胰高血糖素摻抗劑之成份之有效劑

量，該胰高血糖素拮抗劑包括 SEQ ID NO: 42 之序列。

39. 如申請專利範圍第 38 項所述之方法，其中該胰高血糖素拮抗劑進一步包括 SEQ ID NO: 19 之序列，融合於 SEQ ID NO: 42 之羧基端。

40. 一種治療病患之分解代謝消瘦之方法，包括施以一包括胰高血糖素拮抗劑之成份之有效劑量，該胰高血糖素拮抗劑包括 SEQ ID NO: 42 之序列。

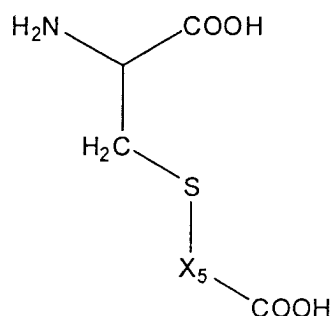
41. 如申請專利範圍第 40 項所述之方法，其中該胰高血糖素拮抗劑進一步包括 SEQ ID NO: 19 之序列，融合於 SEQ ID NO: 42 之羧基端。

42. 一種胰高血糖素拮抗劑，包括由 A-B-C 結構所組成，其中 A 係選自下列群組：

- (i) 苯基乳酸 (PLA);
- (ii) 苯基乳酸之氧化衍生物;
- (iii) 一種 2-6 個胺基酸組成之胜肽，且該胜肽之其中兩連續胺基酸係由一酯鍵或一醚鍵鍵結連接；

B 代表 SEQ ID NO: 1 之胺基酸 i 到 26，其中 i 係為 3、4、5、6 或 7 之中隨意地由一或多個胺基酸修飾所組成，如在此進一步所述；而 C 係為選自下列群組：

- (iv) 第 9 號位置之天冬胺酸(依據 SEQ ID NO: 1 之胺基酸序列)取代為麩胺酸，半胱胺酸之硫酸化衍生物，同麩胺酸， β -同麩胺酸或一種半胱胺酸之烷羧化衍生物、或一種由半胱胺酸衍生出且包含下列化學結構之羧基烷衍生物：



其中 X5 係為 C1-C4 烷基、C2-C4 烯屬烴或 C2-C4 炔基；

- (v) 取代下列位置胺基酸之其中之一或二，第 10、20 及 24 號位置(依據 SEQ ID NO: 1 之胺基酸序列)，以一共價結合結合於酯、醚、硫醚、醯胺或烷基胺鍵合之胺基酸取代；
- (vi) 取代下列位置胺基酸之其中之一或二，第 16、17、20、21 及 24 號位置(依據 SEQ ID NO: 1 之胺基酸序列)，以下列胺基酸組成之群組之一：半胱胺酸、離胺酸、鳥胺酸、同半胱胺酸以及乙醯苯丙胺酸 (Ac-Phe)，其中群組中之胺基酸係共價結合於其親水性之基團；

(vii) 將第 15 號位置之天冬胺酸(依據 SEQ ID NO: 1 之胺基酸序列)取代為半胱磺胺酸、麩胺酸、同麩胺酸以及同半胱磺胺酸；

(viii) 將第 16 號位置之絲胺酸(依據 SEQ ID NO: 1 之胺基酸序列)取代為半胱磺胺酸、麩胺酸、同麩胺酸以及同半胱磺胺酸；

(ix) 將第 16、20、21 及 24 號位置之一或多個位置取代為氨基異丁酸，依據 SEQ ID NO: 1 之胺基酸序列；而 C 係為選自下列群組：

(x) X;

(xi) X-Y;

(xii) X-Y-Z; 以及

(xiii) X-Y-Z-R10,

其中 X 係為 Met, Leu, 或 Nle; Y 係為 Asn 或一帶電荷之胺基酸; Z 係為蘇胺酸、甘胺酸、半胱胺酸、離胺酸、鳥胺酸(Orn)、同半胱胺酸或乙醯苯丙胺酸(Ac-Phe)，或帶電荷之胺基酸，其中 R10 係選自由 SEQ ID NOs: 19-21 及 53 所組成之群組；以及

(xiv) (x)至(xiii) 任何之一其羧基端羧基係由胺基所取代。

43. 如申請專利範圍第 42 項所述之方法，其中該苯乳酸之氧化衍生物係為苯乳酸之酯。

44. 如申請專利範圍第 43 項所述之胰高血糖素拮抗劑，其中該苯乳酸之氧化衍生物係為苯乳酸結合於一胺基酸、胜肽、親水性聚合物、鹽基或烷基，透過一酯鍵或醚鍵連結。
45. 如申請專利範圍第 44 項所述之胰高血糖素拮抗劑，其中該苯乳酸之氧化衍生物係為一縮酯環肽，包括將苯乳酸結合於一胺基酸、胜肽、親水性聚合物、鹽基或烷基，透過一酯鍵或醚鍵連結。
46. 如申請專利範圍第 45 項所述之胰高血糖素拮抗劑，其中該胺基酸係為 Xaa_3 ，或其中該胜肽包括 Xaa_2-Xaa_3 或 $Xaa_1-Xaa_2-Xaa_3$ ，其中該 Xaa_3 係為麩胺酸或麩鹽胺酸， Xaa_2 係選自由下列胺基酸組成之群組：絲胺酸、D-絲胺酸、D-丙胺酸、纈氨酸、甘胺酸、N-甲基絲胺酸、N-甲基丙胺酸以及胺基異丁酸(AIB)；且 Xaa_1 係選自由下列胺基酸組成之群組：組胺酸、D-組胺酸、alpha、alpha-雙甲基咪唑乙酸(DMIA)、N-甲基組胺酸、alpha-甲基組胺酸、咪唑乙酸、去胺基組胺酸、煙基組胺酸、乙醯化組胺酸及同組胺酸。
47. 如申請專利範圍第 42 項所述之胰高血糖素拮抗劑，其中 (iii) 之胜肽包括 SEQ ID NO: 1 之 j ~6 胺基酸，其中 j 係為 1、2、3、4 或 5。

48. 如申請專利範圍第 42 至 47 項之任一項所述之胰高血糖素拮抗劑，其中 B 代表 SEQ ID NO: 1 之第 7~26 號胺基酸。
49. 如申請專利範圍第 42 至 48 項之任一項所述之胰高血糖素拮抗劑，其中 B 代表(v)及(vi)之胺基酸修飾之一或其組合。
50. 如申請專利範圍第 49 項所述之胰高血糖素拮抗劑，其中 B 更包括選自由(iv)、 (vii)、 (viii)、 (ix)組成之群組，其中之一或其組合。
51. 如申請專利範圍第 42 至 50 項之任一項所述之胰高血糖素拮抗劑，其中 Y 或 Z 係為一帶電荷之胺基酸，該帶電荷之胺基酸係選自由下列胺基酸組成之群組：離胺酸、精胺酸、組胺酸、天冬胺酸及麩胺酸。
52. 如申請專利範圍第 42 至 53 項之任一項所述之胰高血糖素拮抗劑，更包括在羧基端往 Z 具有 1~2 個帶電荷胺基酸，當 C 包括 X-Y-Z 時。
53. 如申請專利範圍第 42 至 52 項之任一項所述之胰高血糖素拮抗劑，更包括有一親水性基團，共價結合於胰高血糖素拮抗劑之第 16、21 或 24 號位置，依據 SEQ ID NO:

1 之順序，或胰高血糖素拮抗劑之胺基端或羧基端殘基。

54. 如申請專利範圍第 42 至 53 項之任一項所述之胰高血糖素拮抗劑，包括一胺基酸透過一酯、醚、硫醚、氮或烷基胺共價鍵結於第 10、20 及 24 號位置(依據 SEQ ID NO: 1 之胺基酸序列)之鹽基或烷基，或在胰高血糖素拮抗劑之胺基端或羧基端胺基酸。

55. 如申請專利範圍第 42 至 54 項之任一項所述之胰高血糖素拮抗劑，包括 SEQ ID NOs: 62、64-67 及 71 之任一序列，或如表 4~12 所述之任一序列。

56. 一種二聚體或多聚體，係包括二或多個如專利範圍 1 ~ 32 以及第 42~55 項之任一項所述之胰高血糖素拮抗劑。

56. 一種結合物，包括如專利範圍 1~32 以及第 42~55 項之任一項所述之胰高血糖素拮抗劑以及一異質胜肽或一多胜肽。

58. 一種藥物成份，包括如專利範圍 1~32 以及第 42~55 項之任一項所述之胰高血糖素拮抗劑，第 56 項所述之二聚體，第 57 項所述之結合物之一或其組合。

59. 一種治療高血糖患者之方法，包括對患者施以如第 58 項

所述之藥物成份之有效劑量。

60. 一種降低食慾、減少體重或引發體重流失之方法，該方法包括對患者施以如第 58 項所述之藥物成份之有效劑量。

61. 一種治療病患之分解代謝消瘦之方法，包括對患者施以如第 58 項所述之藥物成份之有效劑量。

序列表

<110> 印地安那大學研究及技術公司.

<120> 胰高血糖素拮抗劑

<130> 29920-79399 (31135/43853)

<150> 60/983783

<151> 2000-01-01

<160> 71

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 29

<212> PRT

<213> 智人種 (Homo sapiens)

<400> 1

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> 2

<211> 28

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<220>

<221> MISC_FEATURE

<223> 胰高血糖素相似物

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (8)..(8)

<223> Xaa係為 aspartic acid, glutamic acid, cysteic acid 或
homocysteic
acid

<400> 2

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

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

<210> 3

<211> 27

<212> PRT

<213> 人工序列

-2-

<220>

<223> 合成多肽

<220>

<221> MISC_FEATURE

<223> 胰高血糖素相似物

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (7)..(7)

<223> Xaa係為 aspartic acid, glutamic acid, cysteic acid 或
homocysteic
acid

<400> 3

Gln Gly Thr Phe Thr Ser Xaa Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Ser Arg Arg

1 5 10 15

Ala Gln Asp Phe Val Gln Trp Leu Met Asn Thr

20

25

<210> 4

<211> 26

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<220>

<221> MISC_FEATURE

<223> 胰高血糖素相似物

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (6)..(6)

<223> Xaa係為 aspartic acid, glutamic acid, cysteic acid 或
homocysteic
acid

<400> 4

Gly Thr Phe Thr Ser Xaa Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Ser Arg Arg Ala

1 5 10 15

Gln Asp Phe Val Gln Trp Leu Met Asn Thr

20

25

<210> 5

<211> 25

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<220>

-3-

<221> MISC_FEATURE

<223> 胰高血糖素相似物

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (5)..(5)

<223> Xaa係為 aspartic acid, glutamic acid, cysteic acid或
homocysteic
acid

<400> 5

Thr Phe Thr Ser Xaa Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Ser Arg Arg Ala Gln

1

5

10

15

Asp Phe Val Gln Trp Leu Met Asn Thr

20

25

<210> 6

<211> 24

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<220>

<221> MISC_FEATURE

<223> 胰高血糖素相似物

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (4)..(4)

<223> Xaa係為 glutamic acid, cysteic acid或homocysteic acid

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (22)..(22)

<223> Xaa 在 22 號位置係為 Met, Leu或Nle

<400> 6

Phe Thr Ser Xaa Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Ser Arg Arg Ala Gln Asp

1

5

10

15

Phe Val Gln Trp Leu Xaa Asn Thr

20

<210> 7

<211> 24

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<220>

<221> MOD_RES

-4-

<222> (1)..(1)

<223> N端胺基被取代為煙基

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (4)..(4)

<223> Xaa係為 aspartic acid, glutamic acid, cysteic acid 或
homocysteic
acid

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (22)..(22)

<223> Xaa係為 Met, Leu 或 Nle

<400> 7

Phe Thr Ser Xaa Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Ser Arg Arg Ala Gln Asp

1

5

10

15

Phe Val Gln Trp Leu Xaa Asn Thr

20

<210> 8

<211> 24

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<220>

<221> MOD_RES

<222> (1) .. (1)

<223> N端胺基被取代為烴基

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (22) .. (22)

<223> Xaa係為 Met, Leu 或 Nle

<220>

<221> MOD_RES

<222> (24) .. (24)

<223> C端alpha羧基被取代為醯胺基

<400> 8

Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Arg Tyr Leu Asp Ser Arg Arg Ala Gln Asp

1

5

10

15

Phe Val Gln Trp Leu Xaa Asn Thr

20

<210> 9

<211> 24

<212> PRT

<213> 人工序列

-5-

<220>

<223> 合成多肽

<220>

<221> MISC_FEATURE

<223> 胰高血糖素相似物

<220>

<221> MOD_RES

<222> (1) .. (1)

<223> N端胺基被取代為烴基

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (4) .. (4)

<223> Xaa係為 aspartic acid, glutamic acid, cysteic acid 或
homocysteic
acid

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (7) .. (7)

<223> Xaa係為 Lys 或 Arg

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (11) .. (11)

<223> Xaa 係為Lys, Cys, Orn, homocysteine or acetyl phenyalanine

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (22) .. (22)

<223> Xaa係為 Met, Leu 或 Nle

<400> 9

Phe Thr Ser Xaa Tyr Ser Xaa Tyr Leu Asp Xaa Arg Arg Ala Gln Asp

1

5

10

15

Phe Val Gln Trp Leu Xaa Asn Thr

20

<210> 10

<211> 24

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<220>

<221> MISC_FEATURE

<223> 胰高血糖素相似物

<220>

<221> MOD_RES

<222> (1) .. (1)

<223> N端胺基被取代為煙基

<220>

-6-

<221> MISC_FEATURE

<222> (4) .. (4)

<223> Xaa係為 aspartic acid, glutamic acid, cysteic acid 或
homocysteic

acid

<220>

```

<221> MISC_FEATURE
<222> (7)..(7)
<223> Xaa係為 is Lys 或 Arg
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (16)..(16)
<223> Xaa係為 Lys, Cys, Orn, homocysteine 或 acetyl phenylalanine
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (22)..(22)
<223> Xaa係為 Met, Leu 或 Nle
<400> 10
Phe Thr Ser Xaa Tyr Ser Xaa Tyr Leu Asp Ser Arg Arg Ala Gln Xaa
1           5           10           15
Phe Val Gln Trp Leu Xaa Asn Thr
                20
<210> 11
<211> 24
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成多肽
<220>
<221> MISC_FEATURE
<223> 胰高血糖素相似物
<220>
<221> MOD_RES
<222> (1)..(1)
<223> N端胺基被取代為煙基
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (4)..(4)
<223> Xaa係為 aspartic acid, glutamic acid, cysteic acid 或
homocysteic
acid
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (7)..(7)

```

<223> Xaa係為 Lys 或 Arg

 $\langle 220 \rangle$

<221> MISC FEATURE

<222> (19) .. (19)

<223> Xaa係為 Lys, Cys, Orn, homocysteine或acetyl phenylalanine
-7-

 $\langle 220 \rangle$

<221> MISC FEATURE

 $\langle 222 \rangle \quad (22) \dots (22)$

<223> Xaa係為 Met, Leu或Nle

<400> 11

Phe Thr Ser Xaa Tyr Ser Xaa Tyr Leu Asp Ser Arg Arg Ala Gln Asp
1 5 10 15

Phe Val Xaa Trp Leu Xaa Asn Thr
20

<210> 12

<211> 24

<212> PRT

<213> 人工序列

 $\langle 220 \rangle$

<223> 合成多肽

 $\langle 220 \rangle$

<221> MISC FEATURE

<223> 胰高血糖素相似物

 $\langle 220 \rangle$

<221> MOD RES

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

<223> N端胺基被取代為烴基

 $\langle 220 \rangle$

<221> MISC FEATURE

$$\langle 222 \rangle \quad (4) \dots (4)$$

<223> Xaa係為 aspartic acid, glutamic acid, cysteic acid或
homocysteic
acid

 $\langle 220 \rangle$

<221> MISC FEATURE

$$\langle 222 \rangle \quad (7) \dots (7)$$

<223> Xaa係為 Lys 或 Arg

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (11)..(11)

<223> Xaa係為 Lys, Cys, Orn, homocysteine 或 acetyl phenylalanine

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (19)..(19)

<223> Xaa係為 Lys, Cys, Orn, homocysteine或acetyl phenylalanine

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (22)..(22)

<223> Xaa係為 Met, Leu 或 Nle

<400> 12

Phe Thr Ser Xaa Tyr Ser Xaa Tyr Leu Asp Xaa Arg Arg Ala Gln Asp

1

5

10

15

-8-

Phe Val Xaa Trp Leu Xaa Asn Thr

20

<210> 13

<211> 24

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<220>

<221> MISC_FEATURE

<223> 胰高血糖素相似物

<220>

<221> MOD_RES

<222> (1)..(1)

<223> N端胺基被取代為烴基

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (4)..(4)

<223> Xaa係為 aspartic acid, glutamic acid, cysteic acid或
homocysteic

acid

<220>

<221> MOD_RES

<222> (11)..(11)

<223> 聚乙二醇化

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (22)..(22)

<223> Xaa係為 Met, Leu 或 Nle

<400> 13

Phe Thr Ser Xaa Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Cys Arg Arg Ala Gln Asp

1

5

10

15

Phe Val Gln Trp Leu Xaa Asn Thr

20

<210> 14

<211> 24

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<220>

<221> MISC_FEATURE

<223> 胰高血糖素相似物

<220>

-9-

<221> MOD_RES

<222> (1)..(1)

<223> N端胺基被取代為烴基

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (4)..(4)

<223> Xaa係為 aspartic acid, glutamic acid, cysteic acid 或
homocysteic
acid

<220>

<221> MOD_RES

<222> (19)..(19)

<223> 聚乙二醇化

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (22)..(22)

<223> Xaa係為 Met, Leu 或 Nle

<400> 14

Phe Thr Ser Xaa Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Ser Arg Arg Ala Gln Asp

1

5

10

15

Phe Val Cys Trp Leu Xaa Asn Thr

20

<210> 15

<211> 24

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<220>

<221> MISC_FEATURE

<223> 胰高血糖素相似物

<220>

<221> MOD_RES

<222> (1)..(1)

<223> N端胺基被取代為煙基

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (4)..(4)

<223> Xaa係為 aspartic acid, glutamic acid, cysteic acid 或 homocysteic

acid

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (22)..(22)

<223> Xaa係為 Met, Leu 或 Nle

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (24)..(24)

<223> 20kDa 聚乙二醇基團結合於 Cysteine 第24號位置

-10-

<220>

<221> MOD_RES

<222> (24)..(24)

<223> 聚乙二醇化

-10-

<400> 15

Phe Thr Ser Xaa Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Ser Arg Arg Ala Gln Asp

1

5

10

15

Phe Val Gln Trp Leu Xaa Asn Cys

20

<210> 16

<211> 24

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<220>

<221> MISC_FEATURE

<223> 胰高血糖素相似物

<220>

<221> MOD_RES

<222> (1)..(1)

<223> N端胺基被取代為烴基

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (4)..(4)

<223> Xaa係為 aspartic acid, glutamic acid, cysteic acid 或 homocysteic

acid

<220>

<221> MOD_RES

<222> (19)..(19)

<223> 聚乙二醇化

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (22)..(22)

<223> Xaa係為 Met, Leu 或 Nle

<400> 16

Phe Thr Ser Xaa Tyr Ser Arg Tyr Leu Asp Ser Arg Arg Ala Gln Asp

1

5

10

15

Phe Val Lys Trp Leu Xaa Asn Thr

20

<210> 17

<211> 24

<212> PRT

<213> 人工序列

-11-

<220>

<221> MISC_FEATURE

<223> 胰高血糖素相似物

<220>

<221> MOD_RES

<222> (1)..(1)

<223> N端胺基被取代為煙基

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (4)..(4)

<223> Xaa係為 aspartic acid, glutamic acid, cysteic acid 或
homocysteic
acid

<220>

<221> MOD_RES

<222> (11)..(11)

<223> 聚乙二醇化

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (22)..(22)

<223> Xaa係為 Met, Leu 或 Nle

<400> 17

Phe Thr Ser Xaa Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Cys Arg Arg Ala Gln Asp

1

5

10

15

Phe Val Cys Trp Leu Xaa Asn Thr

20

<210> 18

<211> 24

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<220>

<221> MISC_FEATURE

<223> 胰高血糖素相似物

<220>

<221> MOD_RES

<222> (1)..(1)

<223> N端胺基被取代為煙基

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (4)..(4)

<223> Xaa係為 aspartic acid, glutamic acid, cysteic acid 或
homocysteic
acid

-12-

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (22)..(22)

<223> Xaa係為 Met, Leu 或 Nle

-12-

<220>

<221> MOD_RES

<222> (24)..(24)

<223> C端alpha羧基被取代為醯胺基

<400> 18

Phe Thr Ser Xaa Tyr Ser Lys Tyr Leu Glu Cys Arg Arg Ala Gln Asp

1

5

10

15

Phe Val Gln Trp Leu Xaa Asn Thr

20

<210> 19

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<220>

<221> MISC_FEATURE

<223> 胜肽片段係代表Exendin-4之C端10個胺基酸

<400> 19

Gly Pro Ser Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser
1 5 10

<210> 20

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<220>

<221> MISC_FEATURE

<223> 胜肽片段係代表調酸素之C端8個胺基酸

of

<400> 20

Lys Arg Asn Arg Asn Asn Ile Ala

1 5

<210> 21

<211> 4

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

-13-

<220>

<221> MISC_FEATURE

<223> 胜肽片段係代表調酸素C端4個胺基酸

<400> 21

Lys Arg Asn Arg

1

<210> 22

<211> 24

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<220>

<221> MISC_FEATURE

<223> 胰高血糖素相似物

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (7)..(7)

<223> Xaa係為 Lys 或 Arg

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (11)..(11)

<223> Xaa係為 Lys, Cys, Orn, homocystein 或 acetyl phenyalanine

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (19)..(19)

<223> Xaa係為 Lys, Cys, Orn, homocystein 或 acetyl phenyalanine

<400> 22

Phe Thr Ser Arg Tyr Ser Xaa Tyr Leu Asp Xaa Arg Arg Ala Gln Asp

1

5

10

15

Phe Val Xaa Trp Leu Met Asn Thr

20

<210> 23

<211> 34

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<220>

<221> MISC_FEATURE

<223> 胰高血糖素相似物

<220>

-14-

<221> MISC_FEATURE

<222> (4)..(4)

<223> Xaa係為 aspartic acid, glutamic acid, cysteic acid 或 homocysteic

acid

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (7)..(7)

<223> Xaa係為 Lys 或 Arg

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (16)..(16)

<223> Xaa係為 Lys, Cys, Orn, homocysteine 或 acetyl phenylalanine

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (22)..(22)

<223> Xaa係為 Met, Leu 或 Nle

<400> 23

Phe Thr Ser Xaa Tyr Ser Xaa Tyr Leu Asp Ser Arg Arg Ala Gln Xaa

1 5 10 15

Phe Val Gln Trp Leu Xaa Asn Thr Gly Pro Ser Ser Gly Ala Pro Pro

20 25 30

Pro Ser

<210> 24

<211> 32

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<220>

<221> MISC_FEATURE

<223> 胰高血糖素相似物

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (4)..(4)

<223> Xaa係為 aspartic acid, glutamic acid, cysteic acid 或 homocysteic

acid

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (7)..(7)

<223> Xaa係為 Lys 或 Arg

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (19)..(19)

<223> Xaa係為 Lys, Cys, Orn, homocysteine 或 acetyl phenylalanine

-15-

<220>

<221> MOD_RES

<222> (19)..(19)

<223> 聚乙二醇化

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (22)..(22)

<223> Xaa係為 Met, Leu 或 Nle

<400> 24

Phe Thr Ser Xaa Tyr Ser Xaa Tyr Leu Asp Ser Arg Arg Ala Gln Asp

1

5

10

15

Phe Val Xaa Trp Leu Xaa Asn Thr Lys Arg Asn Arg Asn Asn Ile Ala

20

25

30

<210> 25

<211> 34

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<220>

<221> MISC_FEATURE

<223> 胰高血糖素相似物

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (4)..(4)

<223> Xaa係為 aspartic acid, glutamic acid, cysteic acid 或
homocysteic
acid

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (7)..(7)

<223> Xaa係為 Lys 或 Arg

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (19)..(19)

<223> Xaa係為 Lys, Cys, Orn, homocysteine 或 acetyl phenylalanine

<220>

<221> MOD_RES

<222> (19)..(19)

<223> 聚乙二醇化

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (22)..(22)

<223> Xaa係為 Met, Leu 或 Nle

<400> 25

Phe Thr Ser Xaa Tyr Ser Xaa Tyr Leu Asp Ser Arg Arg Ala Gln Asp

1

5

10

15

-16-

Phe Val Xaa Trp Leu Xaa Asn Thr Gly Pro Ser Ser Gly Ala Pro Pro

20

25

30

Pro Ser

<210> 26

<211> 32

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<220>

<221> MISC_FEATURE

<223> 胰高血糖素相似物

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (4)..(4)

<223> Xaa係為 aspartic acid, glutamic acid, cysteic acid 或
homocysteic

acid

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (7)..(7)

<223> Xaa 係為Lys或Arg

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (16)..(16)

<223> Xaa係為 Lys, Cys, Orn, homocysteine 或 acetyl phenylalanine

<220>

<221> MOD_RES

<222> (16)..(16)

<223> 聚乙二醇化

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (22)..(22)

<223> Xaa係為 Met, Leu 或 Nle

<400> 26

Phe	Thr	Ser	Xaa	Tyr	Ser	Xaa	Tyr	Leu	Asp	Ser	Arg	Arg	Ala	Gln	Xaa
1				5				10						15	
Phe	Val	Gln	Trp	Leu	Xaa	Asn	Thr	Lys	Arg	Asn	Arg	Asn	Asn	Ile	Ala
			20					25						30	

<210> 27

<211> 28

<212> PRT

<213> 人工序列

-17-

<220>

<223> 合成多肽

<220>

<221> MISC_FEATURE

<223> 胰高血糖素相似物

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (4)..(4)

<223> Xaa係為 aspartic acid, glutamic acid, cysteic acid 或 homocysteic acid

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (7)..(7)

<223> Xaa係為 Lys 或 Arg

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (16)..(16)

<223> Xaa係為 Lys, Cys, Orn, homocysteine 或 acetyl phenylalanine

<220>

<221> MOD_RES

<222> (16)..(16)

<223> 聚乙二醇化

$\langle 220 \rangle$

<221> MISC FEATURE

$$\langle 222 \rangle \quad (22) \dots (22)$$

<223> Xaa係為 Met, Leu 或 Nle

<400> 27

Phe Thr Ser Xaa Tyr Ser Xaa Tyr Leu Asp Ser Arg Arg Ala Gln Xaa

1 5 10 15

Phe Val Gln Trp Leu Xaa Asn Thr Lys Arg Asn Arg

20

25

<210> 28

<211> 28

<212> PRT

<213> 人工序列

 $\langle 220 \rangle$

<223> 合成多肽

 $\langle 220 \rangle$

<221> MISC FEATURE

<223> 胰高血糖素相似物

 $\langle 220 \rangle$

<221> MISC FEATURE

$$\langle 222 \rangle \quad (4) \dots (4)$$

<223> Xaa係為 aspartic acid, glutamic acid, cysteic acid 或 homocysteic

acid

- 18 -

 $\langle 220 \rangle$

<221> MISC FEATURE

 $\langle 222 \rangle \quad (7) \dots (7)$

<223> Xaa係為 Lys 或 Arg

 $\langle 220 \rangle$

<221> MISC FEATURE

<222> (19) .. (19)

<223> Xaa係為 Lys, Cys, Orn, homocysteine 或 acetyl phenylalanine

 $\langle 220 \rangle$

<221> MOD RES

<222> (19) .. (19)

<223> 聚乙二醇化

 $\langle 220 \rangle$

<221> MISC_FEATURE

<222> (22)..(22)

<223> Xaa係為 Met, Leu 或 Nle

<400> 28

Phe Thr Ser Xaa Tyr Ser Xaa Tyr Leu Asp Ser Arg Arg Ala Gln Asp

1 5 10 15

Phe Val Xaa Trp Leu Xaa Asn Thr Lys Arg Asn Arg

20 25

<210> 29

<211> 34

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<220>

<221> MISC_FEATURE

<223> 胰高血糖素相似物

<220>

<221> MOD_RES

<222> (1)..(1)

<223> N端胺基被取代為煙基

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (4)..(4)

<223> Xaa係為 aspartic acid, glutamic acid, cysteic acid 或
homocysteic
acid

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (22)..(22)

<223> Xaa係為 Met, Leu 或 Nle

<400> 29

Phe Thr Ser Xaa Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Ser Arg Arg Ala Gln Asp

1 5 10 15

-19-

Phe Val Gln Trp Leu Xaa Asn Thr Gly Pro Ser Ser Gly Ala Pro Pro

20 25 30

Pro Ser

<210> 30
 <211> 32
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成多肽
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <223> 胰高血糖素相似物
 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (1)..(1)
 <223> N端胺基被取代為烴基
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (4)..(4)
 <223> Xaa係為 aspartic acid, glutamic acid, cysteic acid 或
 homocysteic
 acid
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (22)..(22)
 <223> Xaa係為 Met, Leu 或 Nle
 <400> 30
 Phe Thr Ser Xaa Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Ser Arg Arg Ala Gln Asp
 1 5 10 15
 Phe Val Gln Trp Leu Xaa Asn Thr Lys Arg Asn Arg Asn Asn Ile Ala
 20 25 30
 <210> 31
 <211> 28
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成多肽
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <223> 胰高血糖素相似物
 <220>

<221> MOD_RES

-20-

<222> (1)..(1)

<223> N端胺基被取代為煙基

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (4)..(4)

<223> Xaa係為 aspartic acid, glutamic acid, cysteic acid 或
homocysteic

acid

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (22)..(22)

<223> Xaa係為 Met, Leu 或 Nle

<400> 31

Phe Thr Ser Xaa Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Ser Arg Arg Ala Gln Cys

1

5

10

15

Phe Val Gln Trp Leu Xaa Asn Thr Lys Arg Asn Arg

20

25

<210> 32

<211> 29

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<220>

<221> MISC_FEATURE

<223> 胰高血糖素相似物

<400> 32

His Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Ser

1

5

10

15

Cys Arg Ala Gln Asp Phe Val Gln Trp Leu Met Asn Thr

20

25

<210> 33

<211> 39

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<220>

<221> MISC_FEATURE

<223> 胰高血糖素相似物

<400> 33

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

-21-

Arg Arg Ala Gln Asp Phe Val Gln Trp Leu Met Asn Thr Gly Pro Ser
20 25 30

Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser
35

<210> 34

<211> 29

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<220>

<221> MISC_FEATURE

<223> 胰高血糖素相似物

<220>

<221> MOD_RES

<222> (24)..(24)

<223> 2-丁内酯結合於Cysteine之硫醇基

<400> 34

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

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

<210> 35

<211> 29

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<220>

<221> MISC_FEATURE

<223> 胰高血糖素相似物

<220>

<221> MOD_RES

<222> (24)..(24)

<223> 羧甲基結合於Cysteine之硫醇基

<400> 35

His Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Ser

1

5

10

15

-22-

Arg Arg Ala Gln Cys Phe Val Gln Trp Leu Met Asn Thr

20

25

<210> 36

<211> 24

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<220>

<221> MISC_FEATURE

<223> 胰高血糖素相似物

<220>

<221> MOD_RES

<222> (1)..(1)

<223> N端胺基被取代為烴基

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (4)..(4)

<223> Xaa係為 aspartic acid, glutamic acid, cysteic acid 或
homocysteic
acid

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (22)..(22)

<223> Xaa係為 Met, Leu 或 Nle

<400> 36

Phe Thr Ser Xaa Tyr Ser Lys Tyr Leu Glu Ser Arg Arg Ala Gln Asp

1

5

10

15

Phe Val Gln Trp Leu Xaa Asn Thr

20

<210> 37

<211> 24

<212> PRT

<213> 人工序列

 $\langle 220 \rangle$

<223> 合成多肽

 $\langle 220 \rangle$

<221> MISC FEATURE

<223> 胰高血糖素相似物

<220>

<221> MOD RES

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

<223> N端胺基被取代為烴基

 $\langle 220 \rangle$

<221> MISC FEATURE

- 23 -

 $\langle 222 \rangle \quad (22) \dots (22)$

<223> Xaa係為 Met, Leu 或 Nle

<400> 37

Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Ser Arg Arg Ala Gln Asp

1

5

10

15

Phe Val Gln Trp Leu Xaa Asn Thr

20

<210> 38

<211> 24

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

 $\langle 220 \rangle$

<221> MISC FEATURE

<223> 胰高血糖素相似物

 $\langle 220 \rangle$

<221> MOD RES

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

<223> N端胺基被取代為烴基

 $\langle 220 \rangle$

<221> MISC_FEATURE
 <222> (22)..(22)
 <223> Xaa係為 Met, Leu 或 Nle
 <400> 38
 Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Glu Ser Arg Arg Ala Gln Asp
 1 . 5 10 15
 Phe Val Gln Trp Leu Xaa Asn Thr
 20
 <210> 39
 <211> 24
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成多肽
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <223> 胰高血糖素相似物
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (1)..(1)
 <223> N端胺基被取代為煙基
 -24-
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (4)..(4)
 <223> Xaa係為 aspartic acid, glutamic acid, cysteic acid 或
 homocysteic
 acid
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (22)..(22)
 <223> Xaa係為 Met, Leu 或 Nle
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (23)..(23)
 <223> Xaa係為 Asn, Asp, Glu, cysteic acid 或 homocysteic acid
 <220>
 <221> MISC_FEATURE

<222> (24)..(24)

<223> Xaa id Thr, Asp, Glu, cysteic acid 或 homocysteic acid

<400> 39

Phe Thr Ser Xaa Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Ser Arg Arg Ala Gln Asp

1

5

10

15

Phe Val Gln Trp Leu Xaa Xaa Xaa

20

<210> 40

<211> 24

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<220>

<221> MISC_FEATURE

<223> 胰高血糖素相似物

<220>

<221> MOD_RES

<222> (1)..(1)

<223> N端胺基被取代為煙基

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (4)..(4)

<223> Xaa係為 aspartic acid, glutamic acid, cysteic acid 或 homocysteic

acid

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (10)..(10)

<223> Xaa係為 Glu, cysteic acid, homoglutamic acid 或 homocysteic acid

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (22)..(22)

-25-

<223> Xaa係為 Met, Leu 或 Nle

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (23)..(23)

<223> Xaa係為 Asn 或一酸性胺基酸

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (24)..(24)

<223> Xaa係為 Thr 或一酸性胺基酸

<400> 40

Phe Thr Ser Xaa Tyr Ser Lys Tyr Leu Xaa Ser Arg Arg Ala Gln Asp

1

5

10

15

Phe Val Gln Trp Leu Xaa Xaa Xaa

20

<210> 41

<211> 24

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<220>

<221> MISC_FEATURE

<223> 胰高血糖素相似物

<220>

<221> MOD_RES

<222> (1)..(1)

<223> N端胺基被取代為煙基

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (4)..(4)

<223> Xaa係為 aspartic acid, glutamic acid, cysteic acid 或
homocysteic

acid

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (10)..(10)

<223> Xaa係為 Glu, cysteic acid, homoglutamic acid 或 homocysteic
acid

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (22)..(22)

<223> Xaa係為 Met, Leu 或 Nle

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (23)..(23)

<223> Xaa係為 Asn, Asp 或 Glu

<220>

<221> MISC_FEATURE

-26-

<222> (24)..(24)

<223> Xaa係為 Thr, glu 或 Asp

<400> 41

Phe Thr Ser Xaa Tyr Ser Lys Tyr Leu Xaa Ser Arg Arg Ala Gln Asp

1

5

10

15

Phe Val Gln Trp Leu Xaa Xaa Xaa

20

<210> 42

<211> 24

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<220>

<221> MISC_FEATURE

<223> 胰高血糖素相似物

<220>

<221> MOD_RES

<222> (1)..(1)

<223> N端胺基被取代為煙基

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (4)..(4)

<223> Xaa係為 aspartic acid, glutamic acid, cysteic acid 或 homocysteic

acid

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (10)..(10)

<223> Xaa係為 Glu, cysteic acid, homoglutamic acid 或 homocysteic

acid

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (22)..(22)

<223> Xaa係為 Met, Leu 或 Nle

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (23)..(23)

<223> Xaa係為 Asn 或一酸性胺基酸

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (24)..(24)

<223> Xaa係為 Thr 或一酸性胺基酸

<400> 42

Phe Thr Ser Xaa Tyr Ser Lys Tyr Leu Xaa Ser Arg Arg Ala Gln Asp

1

5

10

15

-27-

Phe Val Gln Trp Leu Xaa Xaa Xaa

20

<210> 43

<211> 24

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<220>

<221> MISC_FEATURE

<223> 胰高血糖素相似物

<220>

<221> MOD_RES

<222> (1)..(1)

<223> N端胺基被取代為烴基

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (4)..(4)

<223> Xaa係為 aspartic acid, glutamic acid, cysteic acid 或 homocysteic

acid

```

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (10)..(10)
<223> Xaa係為 Asp, Glu, cysteic acid, homoglutamic acid 或
homocysteic
acid
<220>
<221> MOD_RES
<222> (11)..(11)
<223> 20kDa 聚乙二醇基團結合於第11號位置之Xaa
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (22)..(22)
<223> Xaa係為 Met, Leu 或 Nle
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (23)..(23)
<223> Xaa 係為Asn 或一酸性胺基酸
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (24)..(24)
<223> Xaa 係為Thr 或一酸性胺基酸
<400> 43
Phe Thr Ser Xaa Tyr Ser Lys Tyr Leu Xaa Cys Arg Arg Ala Gln Asp
1          5          10          15
Phe Val Gln Trp Leu Xaa Xaa Xaa
20

-28-
<210> 44
<211> 24
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成多肽
<220>
<221> MISC_FEATURE
<223> 胰高血糖素相似物
<220>

```



```

<221> MOD_RES
<222> (1)..(1)
<223> N端胺基被取代為烴基
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (4)..(4)
<223> Xaa係為 aspartic acid, glutamic acid, cysteic acid 或
homocysteic
acid
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (10)..(10)
<223> Xaa係為 Asp, Glu, cysteic acid, homoglutamic acid 或
homocysteic
acid
<220>
<221> MOD_RES
<222> (16)..(16)
<223> 20kDa 聚乙二醇基團結合於第16號位置之Xaa
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (22)..(22)
<223> Xaa係為 Met, Leu 或 Nle
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (23)..(23)
<223> Xaa係為 Asn 或一酸性胺基酸
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (24)..(24)
<223> Xaa係為 Thr 或一酸性胺基酸
<400> 44
Phe Thr Ser Xaa Tyr Ser Lys Tyr Leu Xaa Ser Arg Arg Ala Gln Cys
1          5          10          15
Phe Val Gln Trp Leu Xaa Xaa Xaa
          20

<210> 45
<211> 24

```

<212> PRT
<29-
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成多肽
<220>
<221> MISC_FEATURE
<223> 胰高血糖素相似物
<220>
<221> MOD_RES
<222> (1)..(1)
<223> N端胺基被取代為烴基
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (4)..(4)
<223> Xaa係為 aspartic acid, glutamic acid, cysteic acid 或
homocysteic
acid
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (10)..(10)
<223> Xaa係為 Asp, Glu, cysteic acid, homoglutamic acid 或
homocysteic
acid
<220>
<221> MOD_RES
<222> (19)..(19)
<223> 聚乙二醇化
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (22)..(22)
<223> Xaa係為 Met, Leu 或 Nle
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (23)..(23)
<223> Xaa 可以是任何天然胺基酸
<220>
<221> MISC_FEATURE

<222> (24)..(24)

<223> Xaa係為 Thr 或一酸性胺基酸

<400> 45

Phe Thr Ser Xaa Tyr Ser Lys Tyr Leu Xaa Ser Arg Arg Ala Gln Asp

1

5

10

15

Phe Val Cys Trp Leu Xaa Xaa Xaa

20

<210> 46

<211> 35

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

-30-

<223> 合成多肽

<220>

<221> MISC_FEATURE

<223> 胰高血糖素相似物

<220>

<221> MOD_RES

<222> (1)..(1)

<223> N端胺基被取代為烴基

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (4)..(4)

<223> Xaa係為 aspartic acid, glutamic acid, cysteic acid 或
homocysteic
acid

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (10)..(10)

<223> Xaa係為 Asp, Glu, cysteic acid, homoglutamic acid 或
homocysteic
acid

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (22)..(22)

<223> Xaa係為 Met, Leu 或 Nle

<220>

```

<221> MISC_FEATURE
<222> (23)..(23)
<223> Xaa係為 Asn 或一酸性胺基酸
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (24)..(24)
<223> Xaa係為 Thr 或一酸性胺基酸
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (25)..(25)
<223> Xaa係為 Lys, Cys, Orn, homocystein 或 acetyl phenyalanine
<220>
<221> MOD_RES
<222> (25)..(25)
<223> 聚乙二醇化
<400> 46
Phe Thr Ser Xaa Tyr Ser Lys Tyr Leu Xaa Ser Arg Arg Ala Gln Asp
1           5           10           15
Phe Val Gln Trp Leu Xaa Xaa Xaa Xaa Gly Pro Ser Ser Gly Ala Pro
          20           25           30
Pro Pro Ser
          35
-31-
<210> 47
<211> 35
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成多肽
<220>
<221> MISC_FEATURE
<223> 胰高血糖素相似物
<220>
<221> MOD_RES
<222> (1)..(1)
<223> N端胺基被取代為烴基
<220>
<221> MISC_FEATURE

```

<222> (4)..(4)

<223> Xaa係為 aspartic acid, glutamic acid, cysteic acid 或
homocysteic
acid

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (10)..(10)

<223> Xaa係為 Asp, Glu, cysteic acid, homoglutamic acid 或
homocysteic
acid

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (22)..(22)

<223> Xaa係為 Met, Leu 或 Nle

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (23)..(23)

<223> Xaa係為 Asn 或一酸性胺基酸

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (24)..(24)

<223> Xaa係為 Thr 或一酸性胺基酸

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (35)..(35)

<223> Xaa係為 Lys, Cys, Orn, homocysteine 或 acetyl phenyalanine

<220>

<221> MOD_RES

<222> (35)..(35)

<223> 聚乙二醇基團化

<400> 47

Phe Thr Ser Xaa Tyr Ser Lys Tyr Leu Xaa Ser Arg Arg Ala Gln Asp

1 5 10 15

Phe Val Gln Trp Leu Xaa Xaa Xaa Gly Pro Ser Ser Gly Ala Pro Pro

20 25 30

-32-

Pro Ser Xaa

35

<210> 48

<211> 39

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<220>

<221> MISC_FEATURE

<223> 胰高血糖素相似物

<400> 48

His Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Arg Tyr Leu Asp Ser

1 5 10 15

Arg Arg Ala Gln Asp Phe Val Gln Trp Leu Met Asn Thr Gly Pro Ser

20 25 30

Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser

35

<210> 49

<211> 35

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<220>

<221> MISC_FEATURE

<223> 胰高血糖素相似物

<220>

<221> MOD_RES

<222> (1)..(1)

<223> N端胺基被取代為烴基

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (4)..(4)

<223> Xaa係為 aspartic acid, glutamic acid, cysteic acid 或
homocysteic

acid

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (7)..(7)

<223> Xaa係為 Lys 或 Arg

<220>

<221> MISC_FEATURE

-33-

<222> (22)..(22)

<223> Xaa係為 Met , Leu 或 Nle

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (35)..(35)

<223> Xaa係為 Lys, Cys, Orn, homocysteine 或 acetyl phenyalanine

<220>

<221> MOD_RES

<222> (35)..(35)

<223> 聚乙二醇化

<400> 49

Phe Thr Ser Xaa Tyr Ser Xaa Tyr Leu Asp Ser Arg Arg Ala Gln Asp

1 5 10 15

Phe Val Gln Trp Leu Xaa Asn Thr Gly Pro Ser Ser Gly Ala Pro Pro

20 25 30

Pro Ser Xaa

35

<210> 50

<211> 24

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<220>

<221> MISC_FEATURE

<223> 胰高血糖素相似物

<220>

<221> MOD_RES

<222> (1)..(1)

<223> N端胺基被取代為煙基

<400> 50

Phe Thr Ser Glu Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Ser Arg Arg Ala Gln Asp

1 5 10 15

Phe Val Gln Trp Leu Met Asn Thr

20

<210> 51

<211> 20

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

-34-

<220>

<221> MISC_FEATURE

<223> 胰高血糖素相似物

<400> 51

Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Ser Arg Arg Ala Gln Asp Phe Val Gln Trp

1

5

10

15

Leu Met Asn Thr

20

<210> 52

<211> 24

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<220>

<221> MISC_FEATURE

<223> 胰高血糖素相似物

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (4)..(4)

<223> Xaa係為 Homocysteic acid

<400> 52

Phe Thr Ser Xaa Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Ser Arg Arg Ala Gln Asp

1

5

10

15

Phe Val Gln Trp Leu Met Asn Thr

20

<210> 53

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<220>

<221> MISC_FEATURE

<223> 胜肽片段係代表C端 10 amino acids

of Exendin-4

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (11)..(11)

<223> Xaa係為 Lys, Cys, Orn, homocysteine 或 acetyl phenyalanine

<400> 53

-35-

Gly Pro Ser Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser Xaa

1

5

10

<210> 54

<211> 6

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (6)..(6)

<223> Xaa係為苯乳酸

<400> 54

His Ser Gln Gly Thr Xaa

1

5

<210> 55

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (5)..(5)

<223> Xaa係為 苯乳酸

<400> 55

Ser Gln Gly Thr Xaa

1 5

<210> 56

<211> 4

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (4)..(4)

<223> Xaa係為 苯乳酸

<400> 56

Gln Gly Thr Xaa

1

-36-

<210> 57

<211> 3

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (3)..(3)

<223> Xaa係為 苯乳酸

<400> 57

Gly Thr Xaa

1

<210> 58

<211> 2

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (2)..(2)

<223> Xaa係為 苯乳酸

<400> 58

Thr Xaa

1

<210> 59

<211> 6

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(1)

<223> Xaa係為選自由下列組成之群組：His, D-histidine, alpha, alpha-dimethyl imidiazole acetic acid (DMIA), N-methyl histidine, alpha-methyl histidine, imidazole acetic acid, desaminohistidine, hydroxyl-histidine, acetyl-histidine 及

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (2)..(2)

<223> Xaa係為 選自由下列組成之群組：Ser, D-serine, D-alanine, Val, Gly, N-methyl serine, N-methyl alanine, 及 胺基異丁酸 (AIB)

-37-

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (3)..(3)

<223> Xaa係為 選自由下列組成之群組：Glu 或 Gln

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (6)..(6)

<223> Xaa係為 苯乳酸

<400> 59

Xaa Xaa Xaa Gly Thr Xaa

1

5

<210> 60

<211> 5

<212> PRT

```

<213> 人工序列
<220>
<223> 合成多肽
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(1)
<223> Xaa係為 選自由下列組成之群組： Ser, D-serine,
D-alanine, Val, Gly, N-methyl serine, N-methyl alanine, 及
胺基異丁酸 (AIB)
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (2)..(2)
<223> Xaa係為 選自由下列組成之群組： Glu 或 Gln
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (5)..(5)
<223> Xaa係為 苯乳酸
<400> 60
Xaa Xaa Gly Thr Xaa
1           5
<210> 61
<211> 4
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成多肽
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(1)
<223> Xaa係為 選自由下列組成之群組： Glu 及 Gln
-38-
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (4)..(4)
<223> Xaa係為 苯乳酸
<400> 61
Xaa Gly Thr Xaa
1

```

<210> 62

<211> 24

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<220>

<221> MISC_FEATURE

<223> Peptide AL

<220>

<221> MOD_RES

<222> (1)..(1)

<223> N端胺基被取代為煙基

<220>

<221> MOD_RES

<222> (24)..(24)

<223> C端alpha羧基選擇性地取代為醯胺基

<400> 62

Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Ser Arg Arg Ala Gln Asp

1

5

10

15

Phe Val Gln Trp Leu Met Asp Thr

20

<210> 63

<211> 28

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<220>

<221> MISC_FEATURE

<223> Peptide AM

<220>

<221> MOD_RES

<222> (28)..(28)

<223> C端alpha羧基選擇性地取代為醯胺基

<400> 63

-39-

Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Glu Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Ser Arg

```

1             5             10             15
Arg Ala Gln Asp Phe Val Gln Trp Leu Met Asn Thr
      20             25

<210> 64
<211> 28
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成多肽
<220>
<221> MISC_FEATURE
<223> Peptide AN
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (4)..(5)
<223> 第4號位置Threonine 及第5號位置苯乳酸藉由酯鍵連結
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (5)..(5)
<223> Xaa係為 苯乳酸
<220>
<221> MOD_RES
<222> (28)..(28)
<223> C端alpha羧基選擇性地取代為醯胺基
<220>
<221> MOD_RES
<222> (28)..(28)
<223> C端alpha羧基選擇性地取代為醯胺基
<400> 64
Ser Gln Gly Thr Xaa Thr Ser Glu Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Ser Arg
1             5             10             15
Arg Ala Gln Asp Phe Val Gln Trp Leu Met Asn Thr
      20             25

<210> 65
<211> 29
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>

```

```

<223> 合成多肽
<220>
<221> MISC_FEATURE
-40-
<223> Peptide AO
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (5)..(6)
<223> 第5號位置Threonine及第6號位置苯乳酸藉由酯鍵連結
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (6)..(6)
<223> Xaa係為 苯乳酸
<220>
<221> MOD_RES
<222> (29)..(29)
<223> C端alpha羧基選擇性地取代為醯胺基
<400> 65
His Ser Gln Gly Thr Xaa Thr Ser Glu 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> 66
<211> 24
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成多肽
<220>
<221> MISC_FEATURE
<223> Peptide AQ
<220>
<221> MOD_RES
<222> (1)..(1)
<223> N端胺基被取代為烴基
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (11)..(11)

```

<223> Xaa係為胺基異丁酸

<400> 66

Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Xaa Arg Arg Ala Gln Asp

1 5 10 15

Phe Val Gln Trp Leu Met Asn Thr

20

<210> 67

<211> 24

- 41 -

<212> PRT

<213> 人工序列

 $\langle 220 \rangle$

<223> 合成多肽

 $\langle 220 \rangle$

<221> MISC FEATURE

<223> Peptide AT

 $\langle 220 \rangle$

<221> MOD RES

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

<223> N端胺基被取代為烴基

<400> 67

Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Glu Arg Arg Ala Gln Asp

1 5 10 15

Phe Val Gln Trp Leu Met Asn Thr

20

<210> 68

<211> 6

<212> PRT

<213> 人工序列

 $\langle 220 \rangle$

<223> 合成多肽

 $\langle 220 \rangle$

<221> MISC FEATURE

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

<223> Xaa係為 選自由下列組成之群組： His, D-histidine, alpha, alpha-dimethyl imidazole acetic acid (DMIA), N-methyl histidine, alpha-methyl histidine, imidazole acetic acid, desaminohistidine, hydroxyl-histidine, acetyl-histidine 及

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (2)..(2)

<223> Xaa係為 選自由下列組成之群組： Ser, D-serine, D-alanine, Val, Gly, N-methyl serine, N-methyl alanine, 及 胺基異丁酸 (AIB)

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (3)..(3)

<223> Xaa係為 選自由下列組成之群組： Glu 或 Gln

<400> 68

Xaa Xaa Xaa Thr Gly Phe

1

5

<210> 69

-42-

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(1)

<223> Xaa係為 選自由下列組成之群組： Ser, D-serine, D-alanine, Val, Gly, N-methyl serine, N-methyl alanine, 及 胺基異丁酸 (AIB)

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (2)..(2)

<223> Xaa係為 選自由下列組成之群組： Glu 或 Gln

<400> 69

Xaa Xaa Thr Gly Phe

1

5

<210> 70

<211> 4

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(1)

<223> Xaa係為 選自由下列組成之群組： Glu 或 Gln

<400> 70

Xaa Thr Gly Phe

1

<210> 71

<211> 24

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<220>

<221> MOD_RES

<222> (1)..(1)

<223> N端胺基被取代為烴基

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (24)..(24)

-43-

<223> C端alpha羧基選擇性地取代為醯胺基

<400> 71

Phe Thr Ser Glu Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Ser Arg Arg Ala Gln Asp

1

5

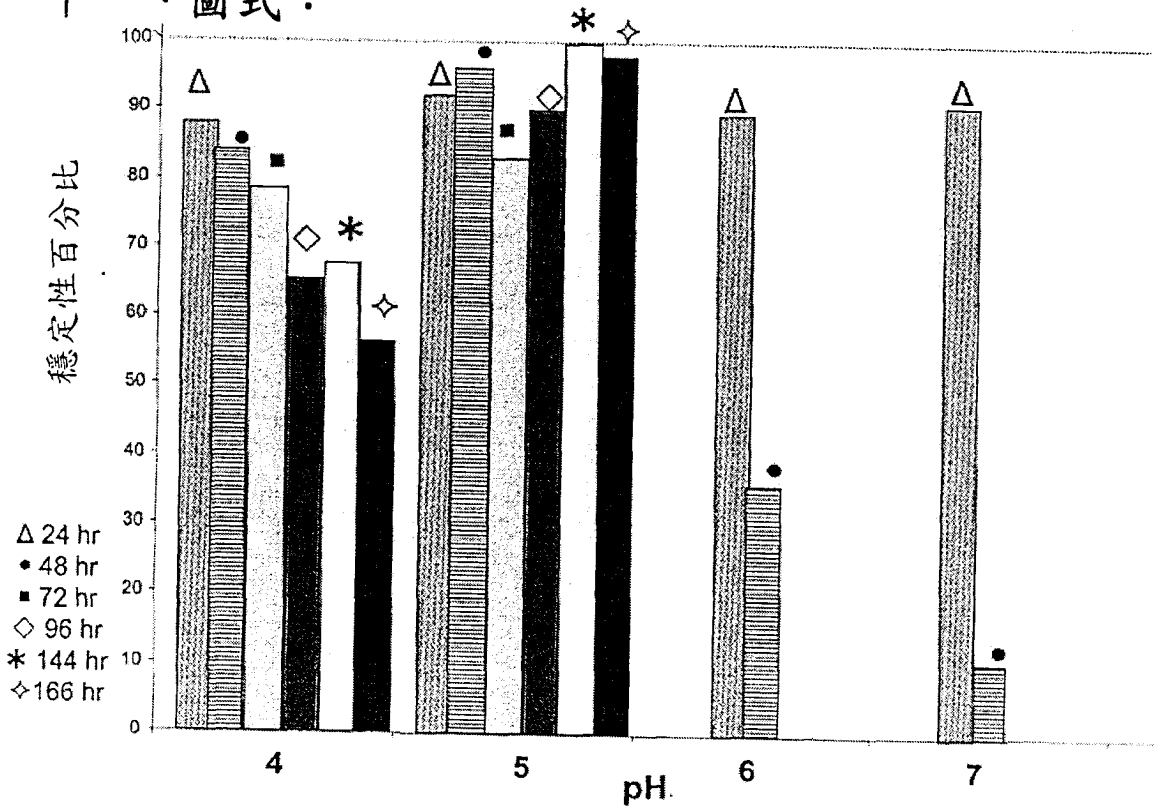
10

15

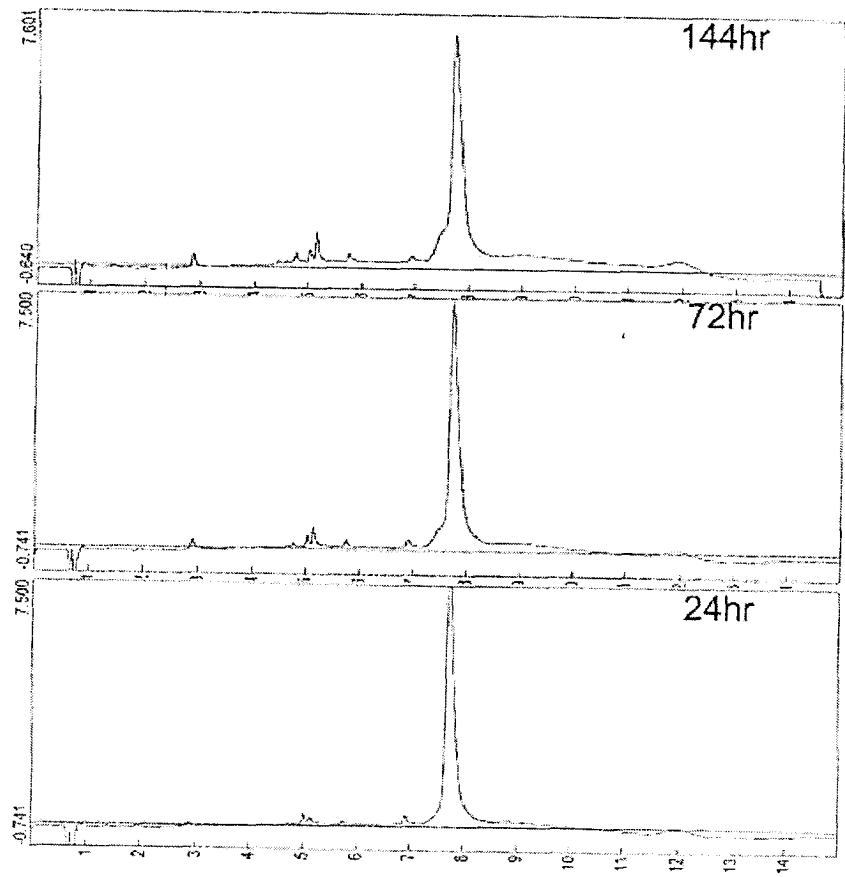
Phe Val Gln Trp Leu Met Asn Thr

20

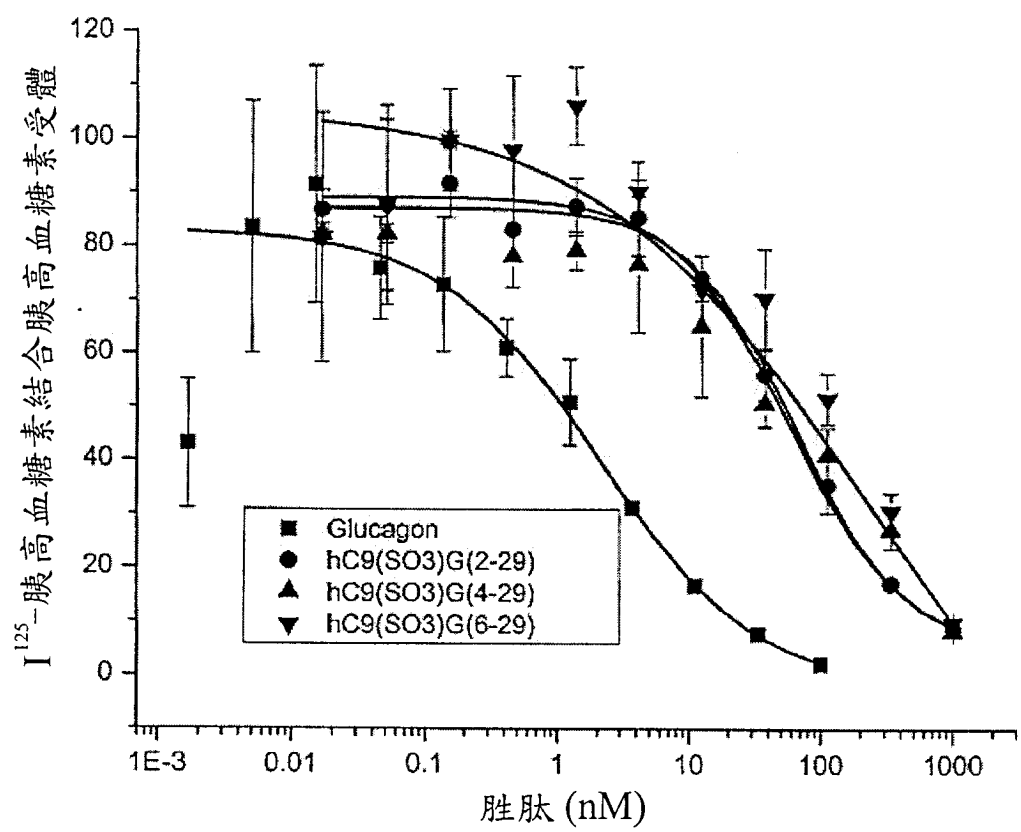
十一、圖式：



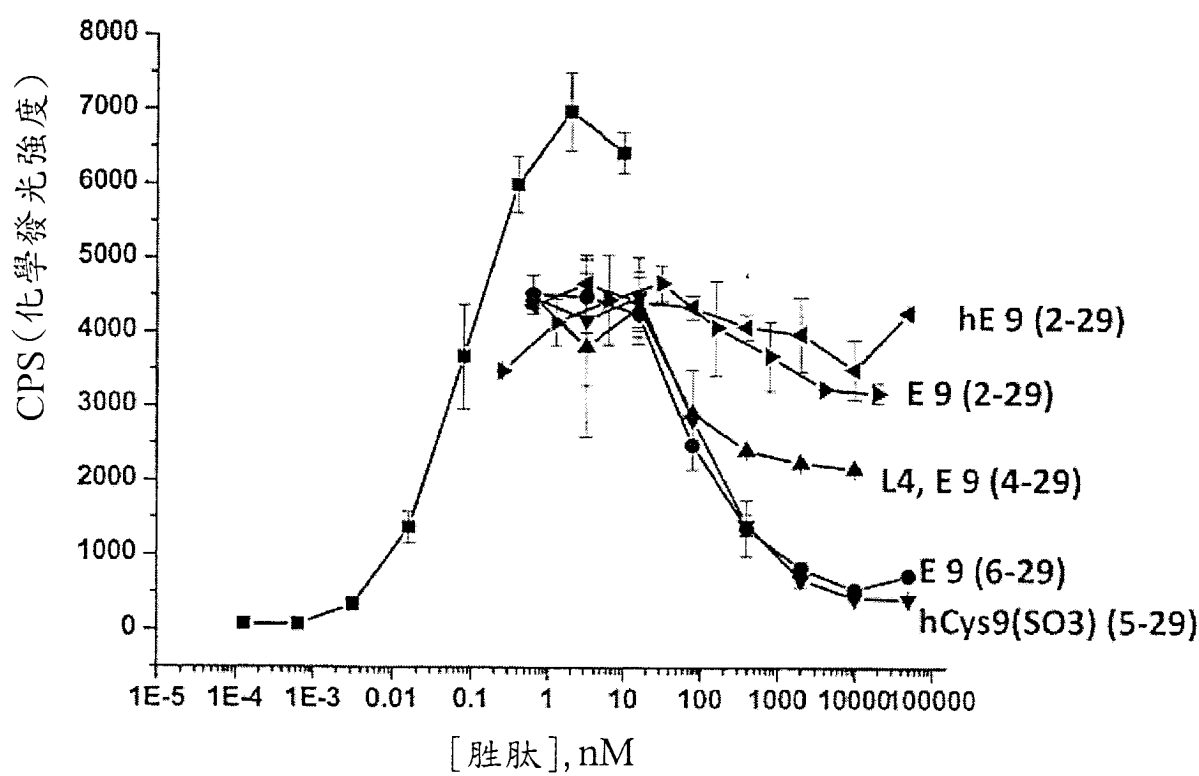
第1圖



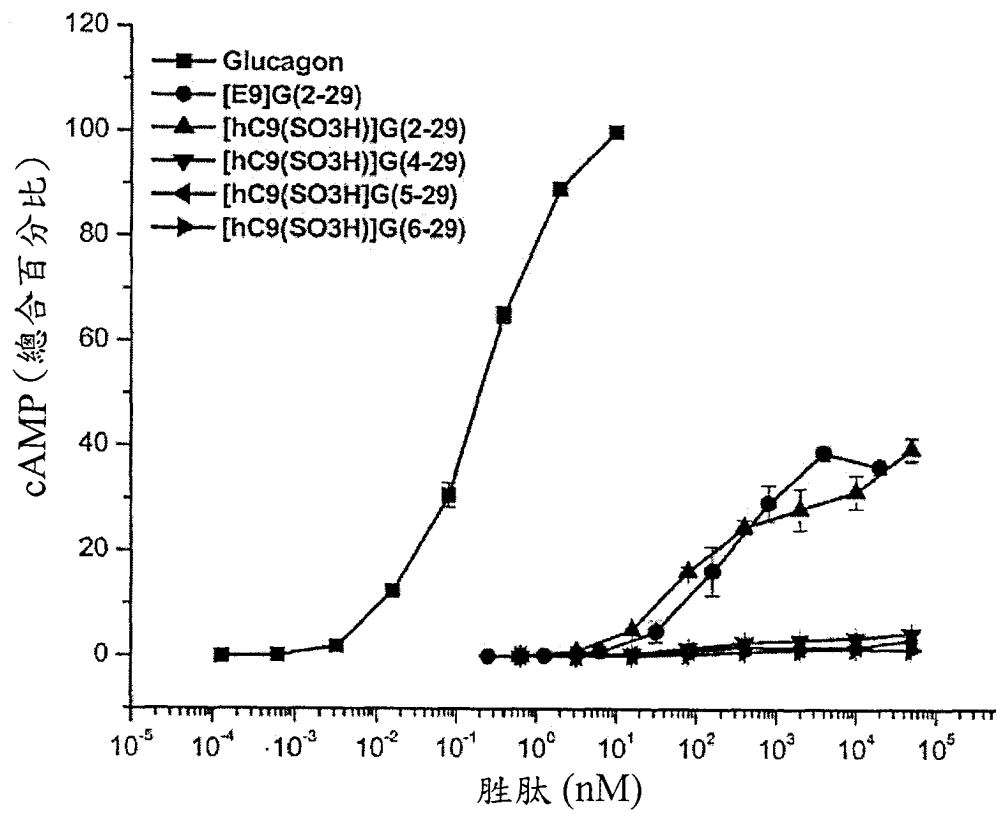
第2圖



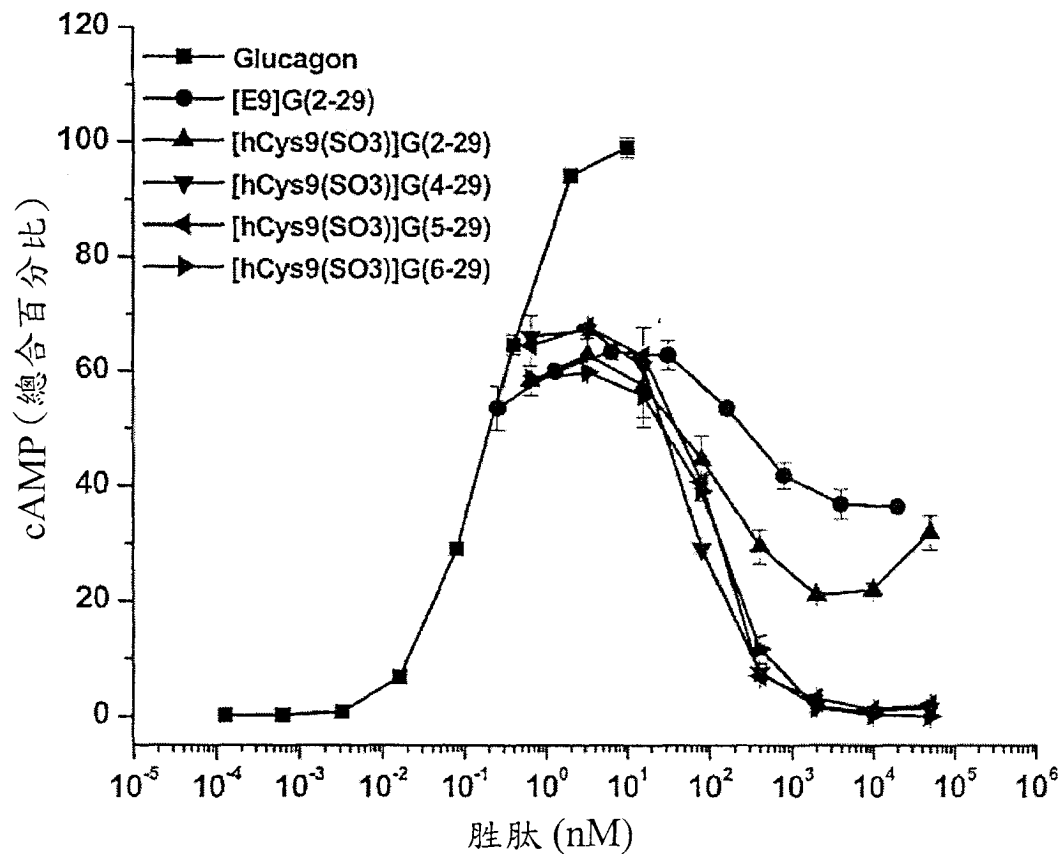
第3圖



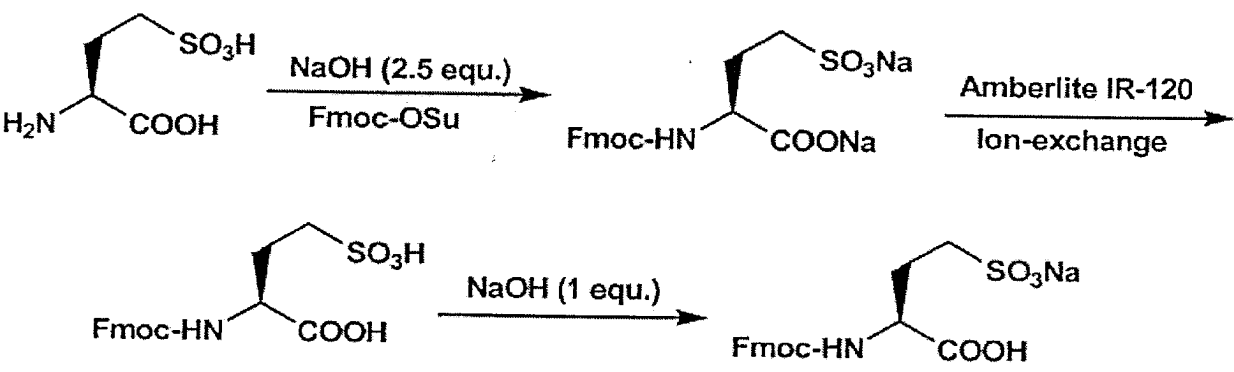
第4圖



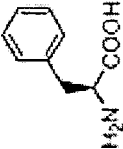
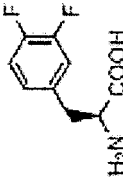
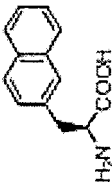

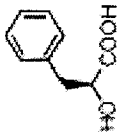
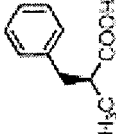
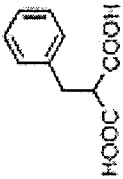
第5A圖



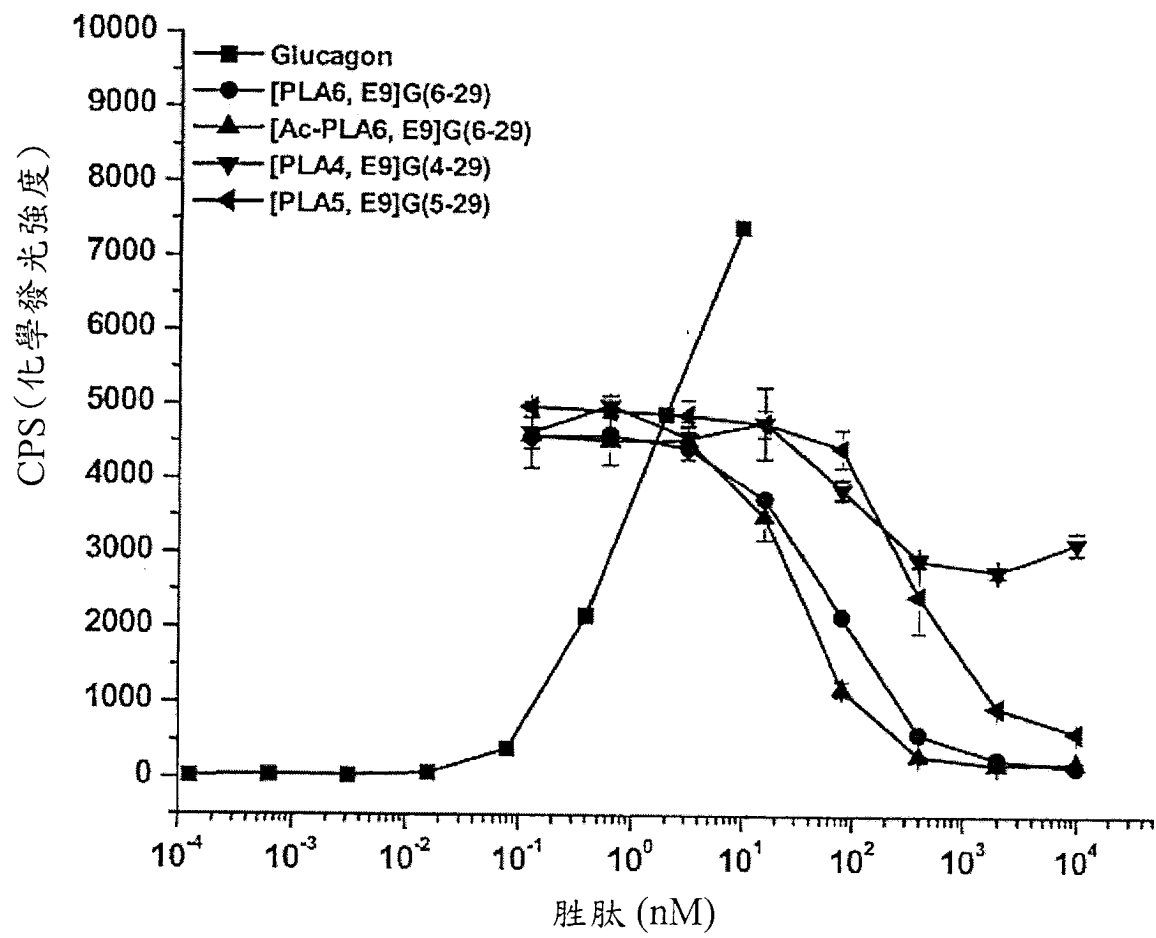
第5B圖



第6圖

胜肽	6 號殘基	IC ₅₀ (nM)	pA ₂	cAMP	(I/A) ₅₀
[E ⁹]G(6-29)-NH ₂		36.35 ± 5.23 (n=3)	7.16 ± 0.27		486
[3,4-2(F)-F ⁶ , E ⁹]G(6-29)-NH ₂		36.70 ± 0.54 (n=1)	7.35±0.08		665
[2-Nal ⁶ , E ⁹]G(6-29)-NH ₂		95.16±1.32 (n=2)	7.17±0.64		206 (n=2)
[Ac-F ⁶ , E ⁹]G(6-29)-NH ₂		37.09±0.26 (n=2)	6.67±0.63		749 (n=2)
[PLA ⁶ , E ⁹]G(6-29)-NH ₂ (PLA: 3-phenyllactic acid)		12.34± 0.13 (n=2)	7.67±0.30		212 (n=3)
[MCA ⁶ , E ⁹]G(6-29)-NH ₂ (MCA: α-methyl/hydrocinnamic acid)		114.4±5.76 (n=2)	6.90±0.83		233 (n=2)
[BMA ⁶ , E ⁹]G(6-29)-NH ₂ (BMA: benzylmalonic acid)		80.56± 17.91(n=2)	6.43±1.44		1174

第7圖



第8圖

七、指定代表圖：

(一)本案指定代表圖為：第 6 圖

(二)本代表圖之元件代表符號簡單說明：無

八、本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式：