



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 102918055 B

(45)授权公告日 2017.03.29

(21)申请号 201180025875.1

(22)申请日 2011.03.28

(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 102918055 A

(43)申请公布日 2013.02.06

(30)优先权数据
10157901.9 2010.03.26 EP
61/319,994 2010.04.01 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2012.11.26

(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/EP2011/054714 2011.03.28

(87)PCT国际申请的公布数据
W02011/117416 EN 2011.09.29

(73)专利权人 诺沃一诺迪斯克有限公司
地址 丹麦鲍斯韦

(72)发明人 J.F.劳 T.克鲁泽 L.林德罗思
H.托格森

(74)专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司
72001
代理人 孔青 梁谋

(51)Int.Cl.

C07K 14/605(2006.01)

A61K 38/26(2006.01)

(56)对比文件

WO 2005027978 A2,2005.03.31,

CN 1867360 A,2006.11.22,

张磊等.胰高血糖素样肽-1的聚乙二醇定点修饰.《过程工程学报》.2009,第9卷(第6期),第1169-1173.

Louise A.Scrocchi et al..Elimination of Glucagon-like peptide 1R signaling does not modify weight gain and islet adaptation in mice with combined disruption of leptin and glp-1 action.《Diabetes》.2000,第49卷(第9期),第1552-1560页.

审查员 王奇

权利要求书21页 说明书138页

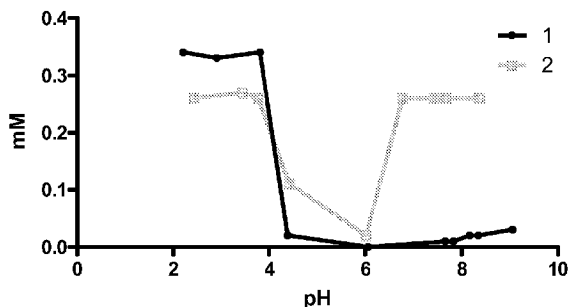
序列表1页 附图10页

(54)发明名称

新的胰高血糖素类似物

(57)摘要

本发明涉及在溶液中物理稳定性改进且在中性pH下溶解度提高的新的肽化合物,涉及所述化合物在治疗中的用途,涉及包括将所述化合物给予有需要的患者的治疗方法,并涉及所述化合物在制备药物中的用途。就高血糖症、糖尿病和肥胖症以及与高血糖症、糖尿病和肥胖症有关的各种疾病或病况的治疗而言,本发明的化合物尤其引人关注。



1. 一种胰高血糖素肽或其药学上可接受的盐、酰胺或酸,所述胰高血糖素肽包含氨基酸序列His-Ser-Gln-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Lys-Tyr-Leu-Asp-Ser-Arg-Arg-Ala-Gln-Asp-Phe-Val-Gln-Trp-Leu-Met-Asn-Thr (SEQ ID NO:1),其中在所述胰高血糖素肽中的下述一个或多个氨基酸位置上引入最多7个氨基酸取代: X₂、X₁₀、X₁₂、X₁₆、X₂₀、X₂₁、X₂₄、X₂₅、X₂₇、X₂₈、X₂₉和/或X₃₀,和在所述肽上引入包含3个或更多个带负电荷的部分的取代基,其中所述带负电荷的部分之一是亲脂部分的远端,且其中所述取代基在所述胰高血糖素肽的一个或多个下列氨基酸位置中在Lys残基的ε位上连接: X₁₂、X₁₆、X₂₀、X₂₄、X₂₅、X₂₇、X₂₈、X₂₉和/或X₃₀,

其中所述肽由式I表示:

His-X₂-Gln-Gly-Thr-X₆-X₇-Ser-Asp-X₁₀-Ser-X₁₂-Tyr-Leu-Asp-X₁₆-X₁₇-X₁₈-Ala-X₂₀-X₂₁-Phe-Val-X₂₄-X₂₅-Leu-X₂₇-X₂₈-X₂₉-X₃₀ [I]

其中

X₂表示Ser或D-Ser;

X₆表示Phe;

X₇表示Thr;

X₁₂表示Lys或Arg;

X₁₇表示Arg;

X₁₈表示Arg;

X₂₀表示Gln或Lys;

X₂₁表示Asp或Glu;

X₂₄表示Gln、Lys或His;

X₂₅表示Trp、Arg或Lys;

X₂₇表示Met、Leu或Lys;

X₂₈表示Asn、Lys或Ser;

X₂₉表示Thr、Lys或Pro;和

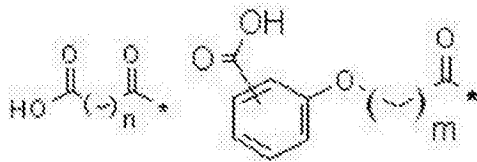
X₃₀不存在或表示Lys或Pro,以及

其中所述取代基由下式II表示:

Z₁-Z₂-Z₃-Z₄ [II]

其中,

Z₁表示下式IIa或IIc之一的结构;



IIa

IIc

其中式IIa中的n为6-20,

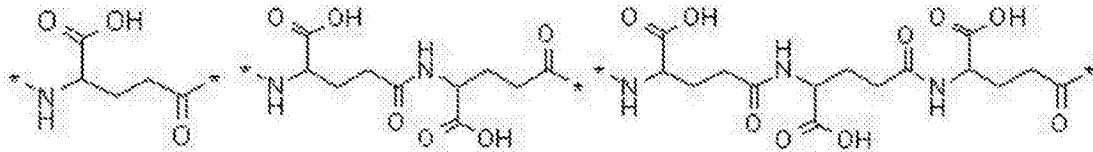
式IIc中的m为5-11,

式IIc的COOH基团可与苯环上的2、3或4位连接,

式IIa和IIc中的符号*表示与Z₂中的氮的连接点;

条件是如果 Z_2 不存在,则 Z_1 在符号*处与 Z_3 上的氮连接,如果 Z_2 和 Z_3 不存在,则 Z_1 在符号*处与 Z_4 上的氮连接,

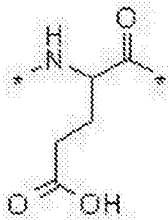
Z_2 不存在或表示下式IIId、IIe、IIIf或IIh之一的结构;



IIId

IIe

IIIf



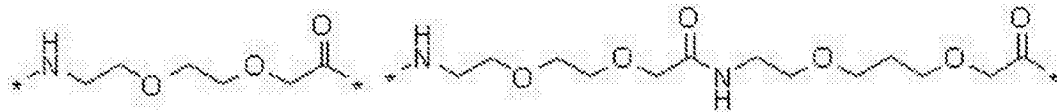
IIh

其中每个氨基酸部分独立地具有立体化学结构L或D;

其中 Z_2 通过标为*的碳原子与标为*的 Z_3 的氮连接;

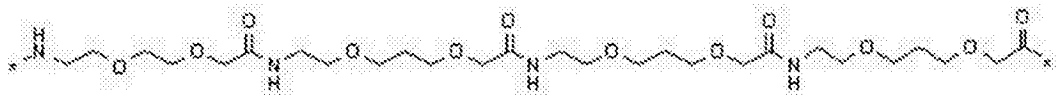
条件是如果 Z_3 不存在,则 Z_2 通过标为*的碳原子与标为*的 Z_4 的氮连接,并且如果 Z_3 和 Z_4 不存在,则 Z_2 通过标为*的碳与胰高血糖素肽的Lys残基的 ϵ 氮连接;

Z_3 不存在或表示下式IIIm、IIIn或IIp之一的结构;



IIIm

IIIn

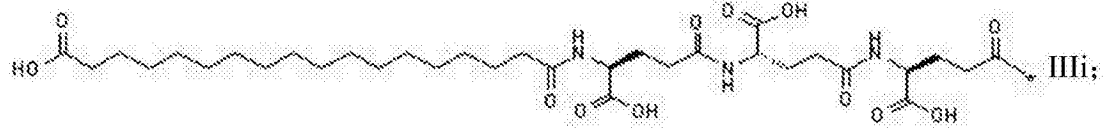
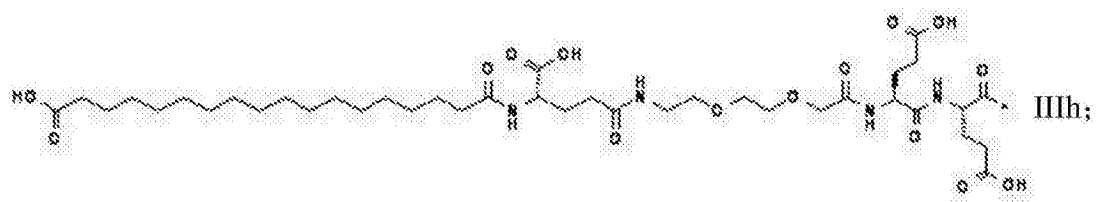
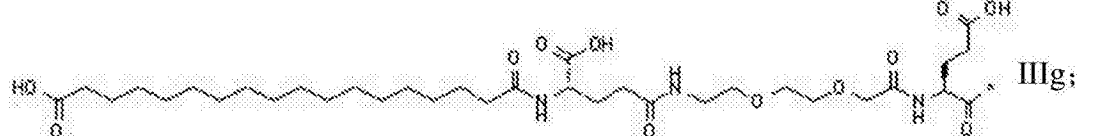
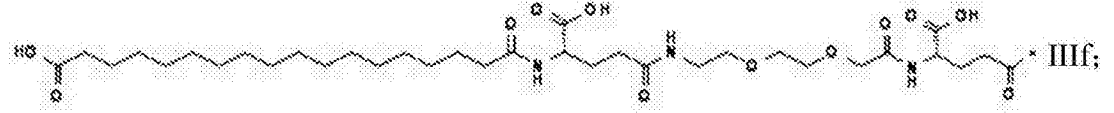
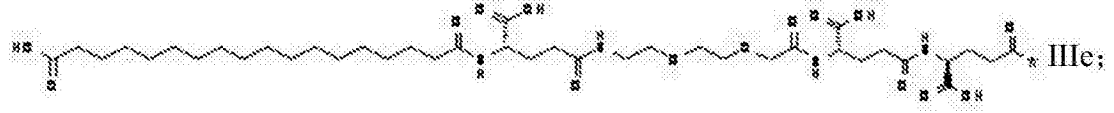
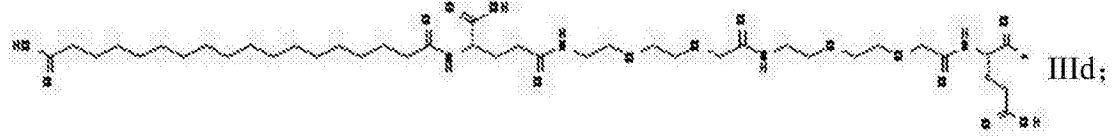
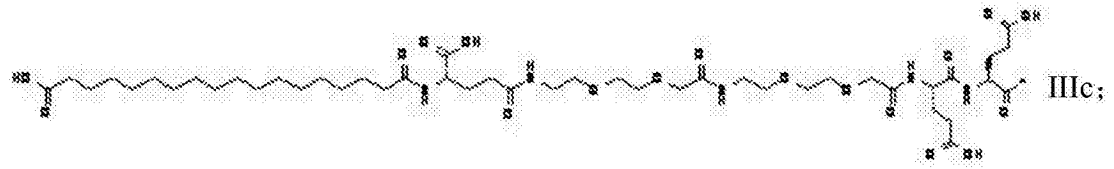
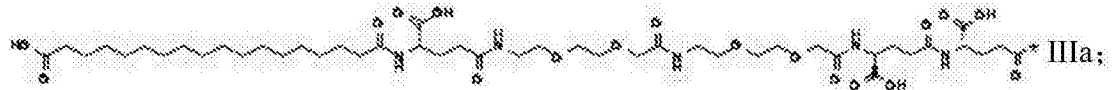


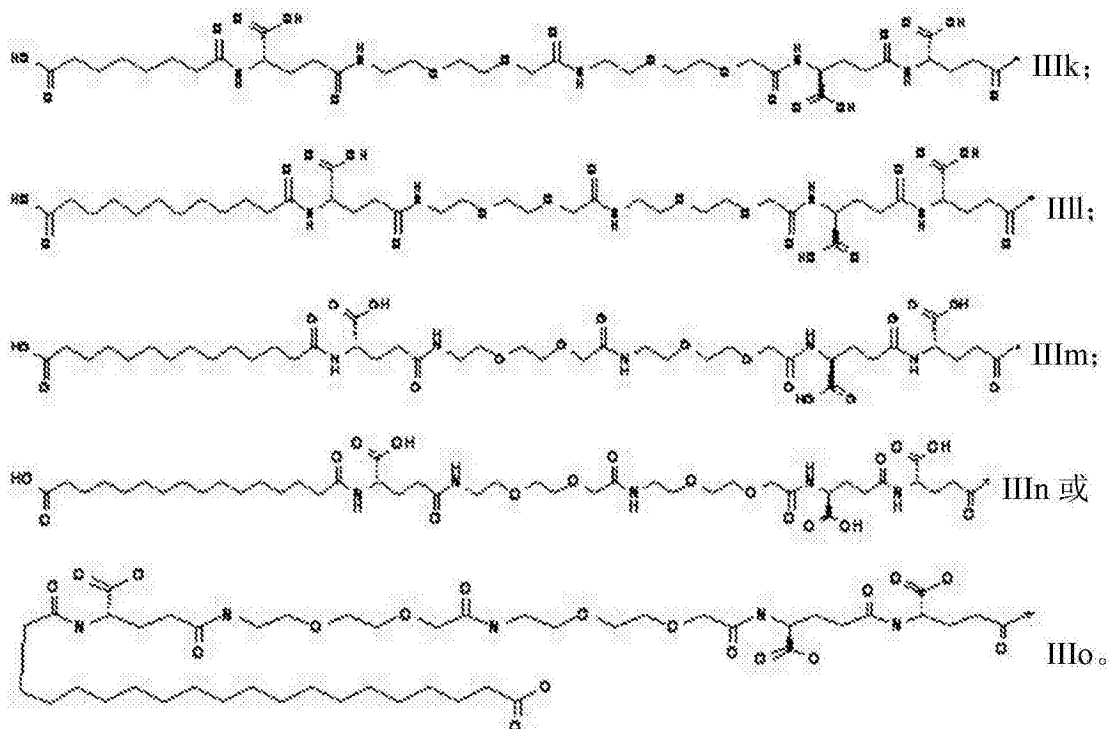
IIp

其中 Z_3 通过具有符号*的 Z_3 的碳与具有符号*的 Z_4 的氮连接,条件是如果 Z_4 不存在,则 Z_3 通过具有符号*的碳与胰高血糖素肽的Lys残基的 ϵ 氮连接;以及

Z_4 不存在或表示式IIId、IIe或IIi之一的结构;其中每个氨基酸部分独立地为L或D,其中 Z_4 通过具有符号*的碳与胰高血糖素肽的赖氨酸的 ϵ 氮连接。

2. 前述权利要求1的胰高血糖素肽,其中所述取代基表示式IIIa、IIIb、IIIc、IIId、IIIe、IIIf、IIIg、IIIh、IIIi、IIIj、IIIk、IIIl、IIIm、IIIIn或IIIo之一的结构:





3. 权利要求1-2中任一项的胰高血糖素肽,其中所述取代基位于所述胰高血糖素肽的一个或多个下列氨基酸位置上: X₁₆、X₂₄和/或X₂₈。

4. 权利要求1-2中任一项的胰高血糖素肽,其中所述取代基位于所述胰高血糖素肽的氨基酸位置X₂₄上。

5. 权利要求1-2中任一项的胰高血糖素肽,其中X₂₁表示Glu。

6. 权利要求1-2中任一项的胰高血糖素肽,其中X₂₄表示Lys。

7. 权利要求1-2中任一项的胰高血糖素肽,其中X₂₇表示Leu。

8. 权利要求1-2中任一项的胰高血糖素肽,其中X₂₈表示Lys或Ser。

9. 权利要求1-2中任一项的胰高血糖素肽,其中在所述式I中:

X₂表示Ser;

X₆表示Phe;

X₇表示Thr;

X₁₂表示Lys或Arg;

X₁₇表示Arg;

X₁₈表示Arg;

X₂₀表示Gln或Lys;

X₂₁表示Asp或Glu;

X₂₄表示Gln、Lys或His;

X₂₅表示Trp、Arg或Lys;

X₂₇表示Met、Leu或Lys;

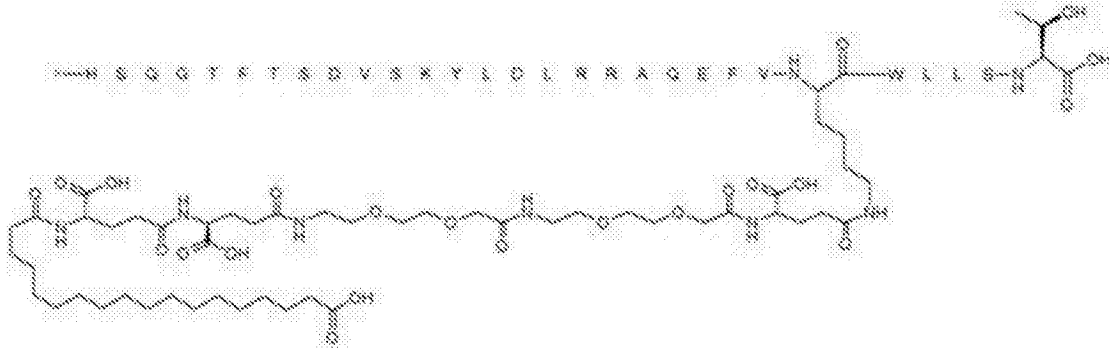
X₂₈表示Asn、Lys或Ser;

X₂₉表示Thr、Lys或Pro; 和

X₃₀不存在或表示Lys或Pro。

10. 权利要求1-2中任一项目的胰高血糖素肽,其选自:

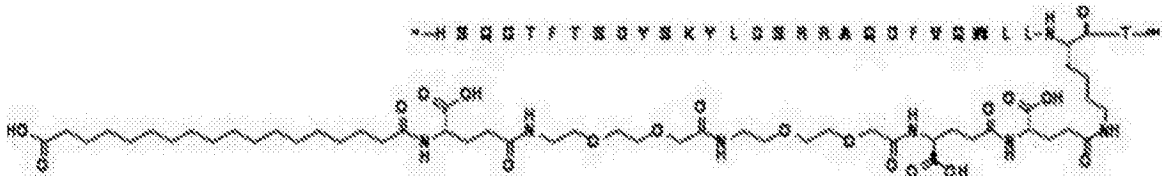
N^{ε24}-[(4S)-4-羧基-4-[[2-[2-[2-[2-[2-[2-[[4S)-4-羧基-4-[[4S)-4-羧基-4-(17-羧基十七烷酰基氨基)丁酰基]氨基]丁酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基]氨基]丁酰基)-[Val10,Leu16,Glu21,Lys24,Leu27,Ser28]-胰高血糖素



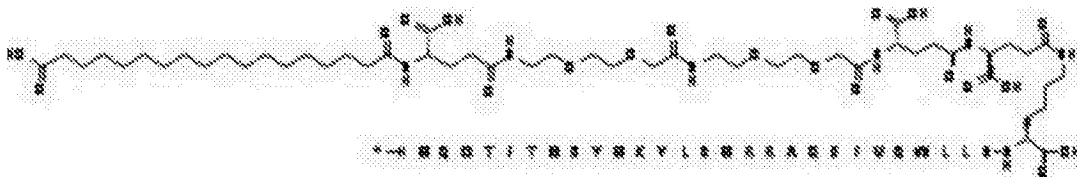
N^{ε24}-([(4S)-5-羟基-4-[[4S)-5-羟基-4-[[2-[2-[2-[2-[2-[2-[[4S)-5-羟基-4-[(18-羟基-18-氧代十八烷酰基)氨基]-5-氧代戊酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基]氨基]-5-氧代戊酰基]氨基]-5-氧代戊酰基)) [Lys²⁴,Leu²⁷]胰高血糖素



N^{ε28}-([(4S)-5-羟基-4-[[4S)-5-羟基-4-[[2-[2-[2-[2-[2-[2-[[4S)-5-羟基-4-[(18-羟基-18-氧代十八烷酰基)氨基]-5-氧代戊酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基]氨基]-5-氧代戊酰基]氨基]-5-氧代戊酰基)) [Leu²⁷,Lys²⁸]胰高血糖素

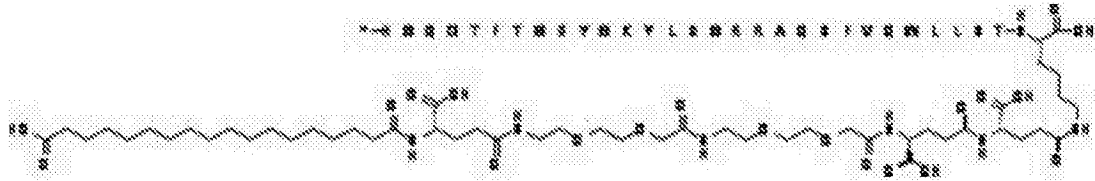


N^{ε29}-([(4S)-5-羟基-4-[[4S)-5-羟基-4-[[2-[2-[2-[2-[2-[2-[[4S)-5-羟基-4-[(18-羟基-18-氧代十八烷酰基)氨基]-5-氧代戊酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基]氨基]-5-氧代戊酰基]氨基]-5-氧代戊酰基)) [Leu²⁷,Lys²⁹]胰高血糖素

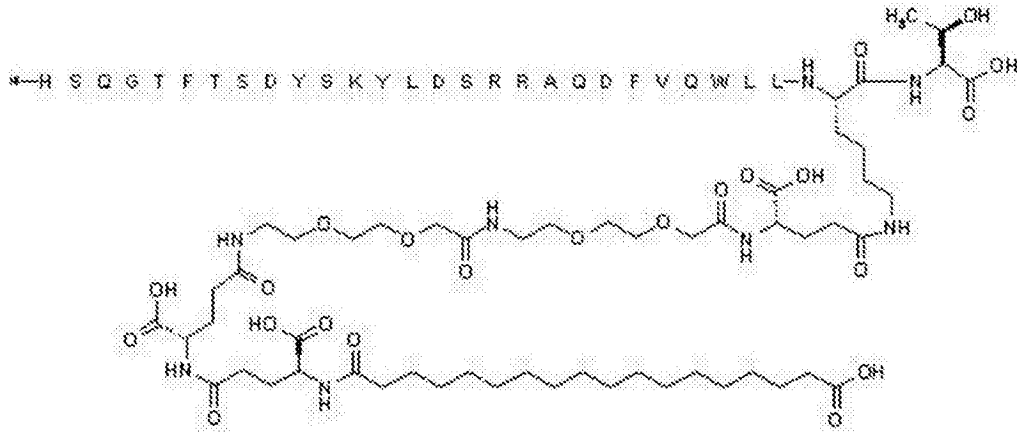


N^a-([Leu²⁷]胰高血糖素基)N^ε-([(4S)-5-羟基-4-[[4S)-5-羟基-4-[[2-[2-[2-[2-[2-[2-[[4S)-5-羟基-4-[(18-羟基-18-氧代十八烷酰基)氨基]-5-氧代戊酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基]氨基]-5-氧代戊酰基]氨基]-5-氧代

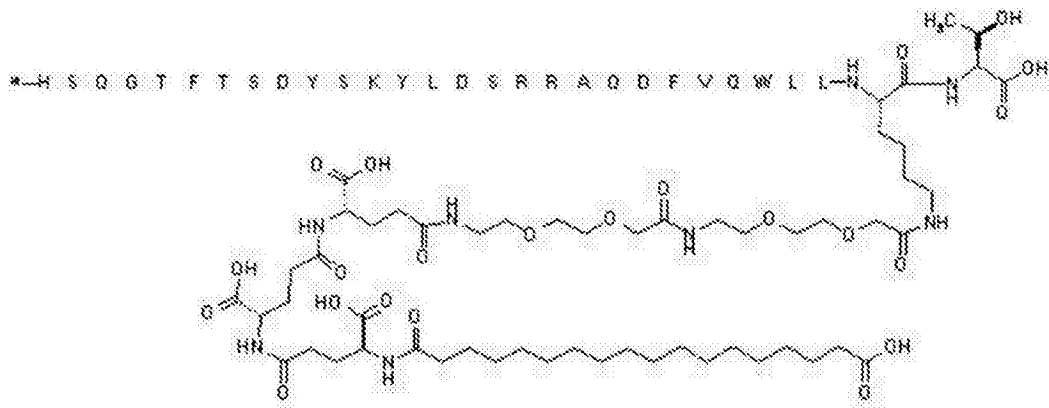
戊酰基)赖氨酸



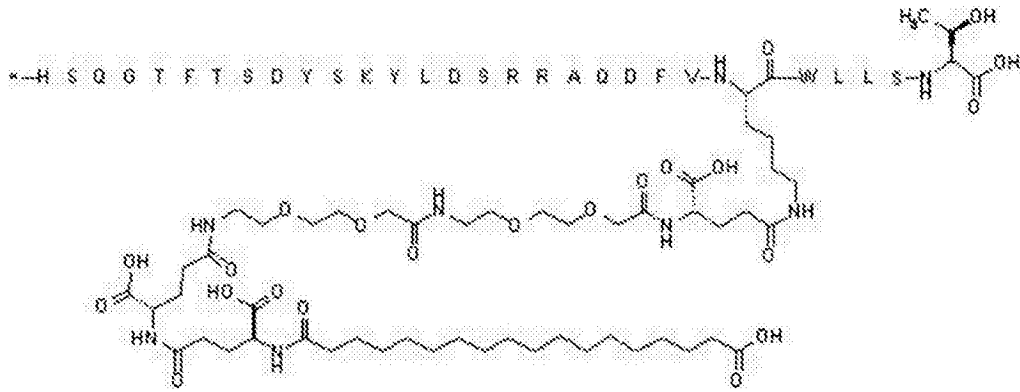
N^{ε28}-[(4S)-4-羧基-4-[[2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[[4S)-4-羧基-4-[[[4S)-4-羧基-4-(17-羧基十七烷酰基氨基)丁酰基]氨基]丁酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]氨基]丁酰基]-[Leu²⁷, Lys²⁸]-胰高血糖素



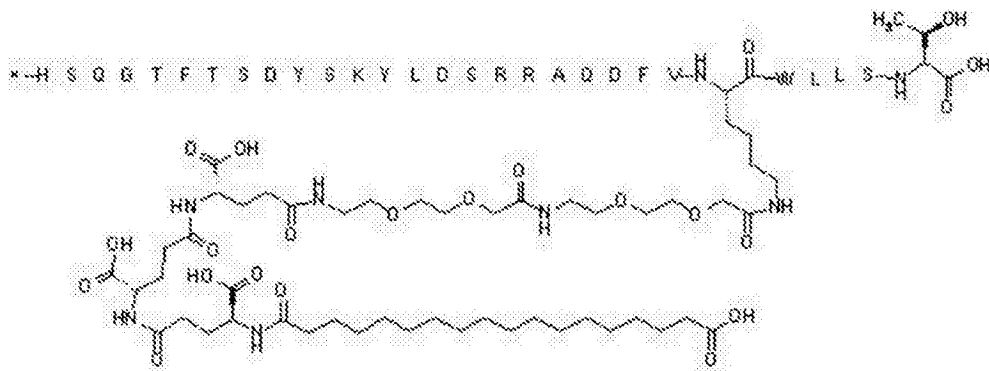
N^{ε28}-[2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[[4S)-4-羧基-4-[[[4S)-4-羧基-4-[[[4S)-4-羧基-4-(17-羧基十七烷酰基氨基)丁酰基]氨基]丁酰基]氨基]丁酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]-[Leu²⁷, Lys²⁸]-胰高血糖素



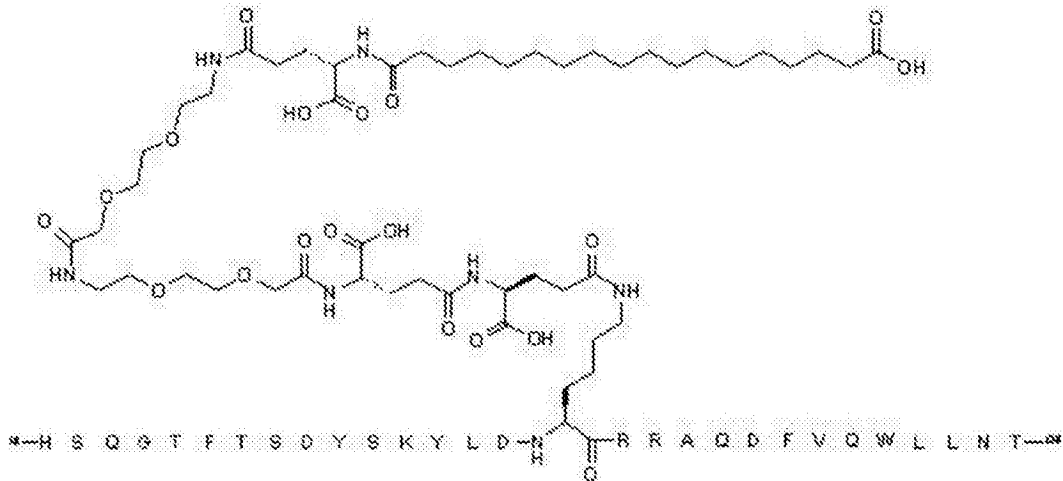
N^{ε24}-[(4S)-4-羧基-4-[[2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[[4S)-4-羧基-4-[[[4S)-4-羧基-4-(17-羧基十七烷酰基氨基)丁酰基]氨基]丁酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]-[Lys²⁴, Leu²⁷, Ser²⁸]-胰高血糖素



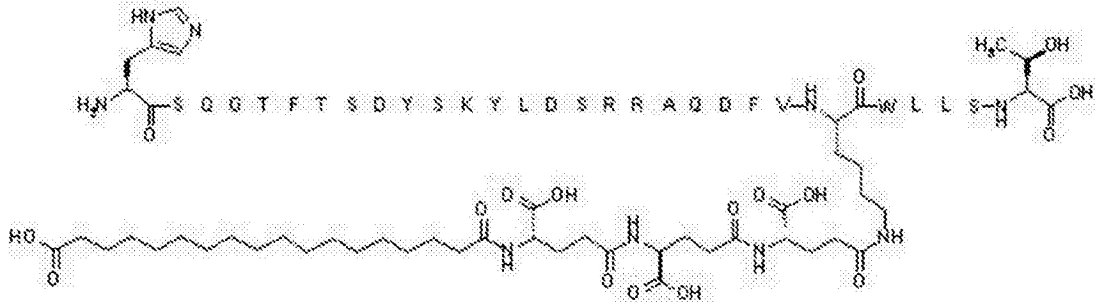
N^{ε24}-[2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[4S)-4-羧基-4-[[4S)-4-羧基-4-[[4S)-4-羧基-4-(17-羧基十七烷酰基氨基)丁酰基]氨基]丁酰基]氨基]丁酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基]-[Lys²⁴,Leu²⁷,Ser²⁸]-胰高血糖素



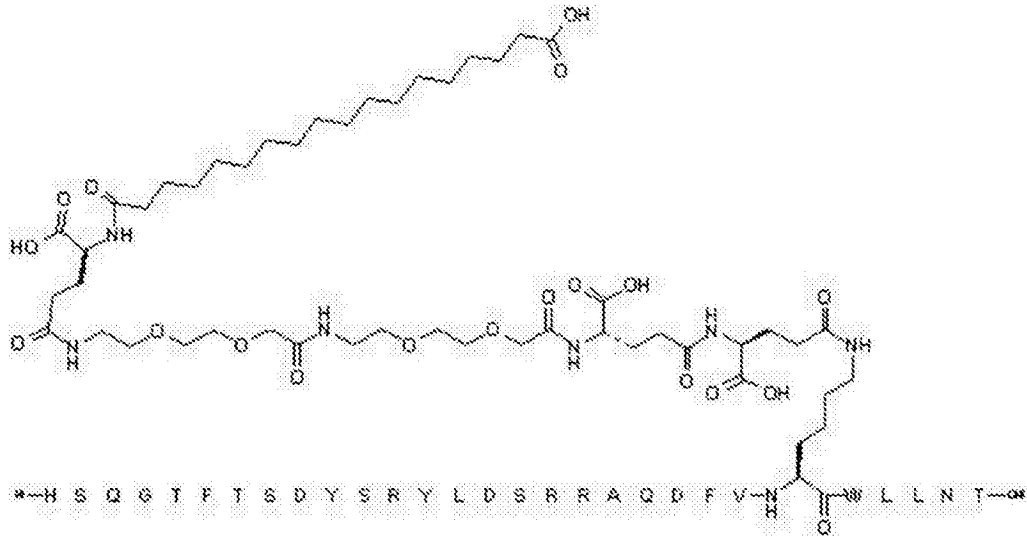
N^{ε16}-[(4S)-4-羧基-4-[[4S)-4-羧基-4-[[2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[4S)-4-羧基-4-(17-羧基十七烷酰基氨基)丁酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基]氨基]丁酰基]氨基]丁酰基]-[Lys¹⁶,Leu²⁷]-胰高血糖素



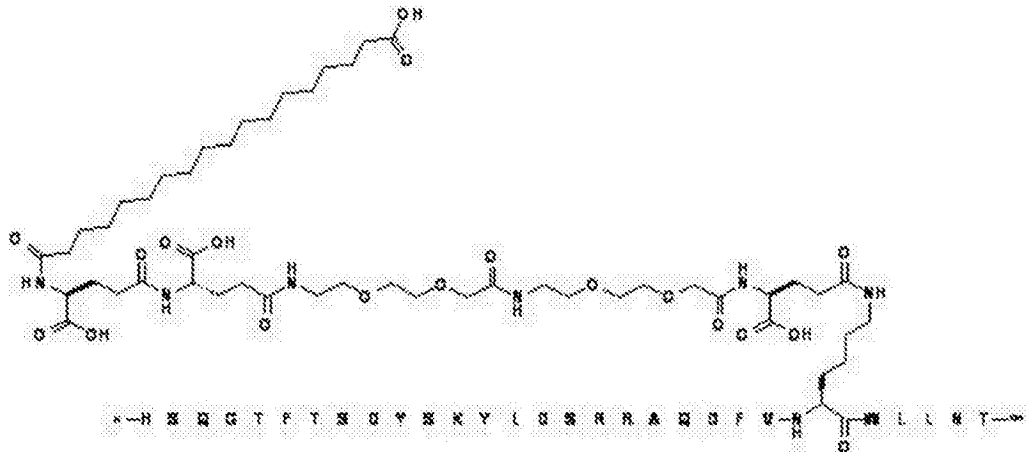
N^{ε24}-[(4S)-4-羧基-4-[[4S)-4-羧基-4-[[4S)-4-羧基-4-(17-羧基十七烷酰基氨基)丁酰基]氨基]丁酰基]氨基]丁酰基]-[Lys²⁴,Leu²⁷,Ser²⁸]-胰高血糖素



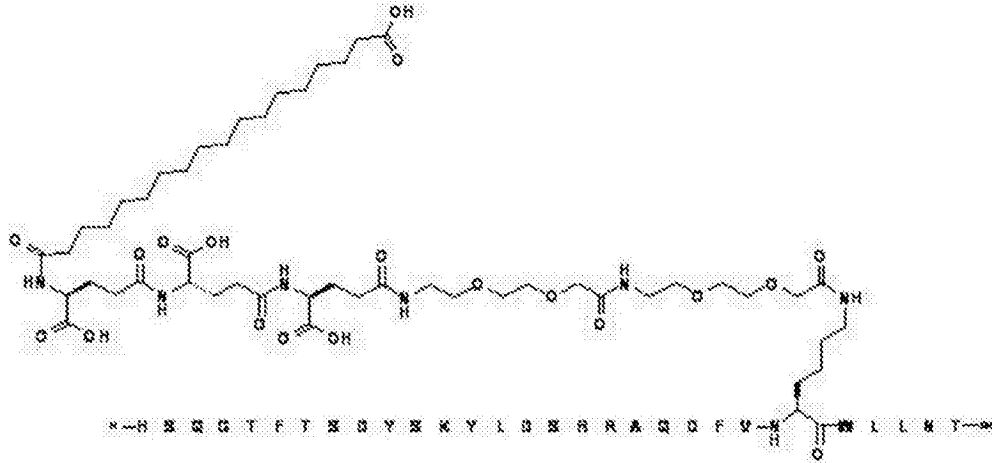
N^{ε24}-[(4S)-4-羧基-4-[[[(4S)-4-羧基-4-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[[[(4S)-4-羧基-4-(17-羧基十七烷酰基氨基)丁酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基]氨基]丁酰基]氨基]丁酰基]-[Arg¹²,Lys²⁴,Leu²⁷]-胰高血糖素



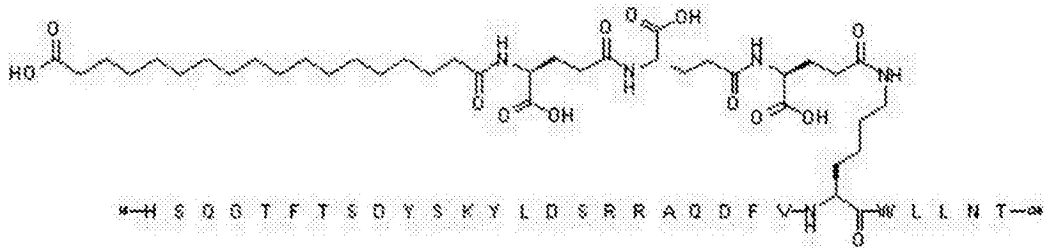
N^{ε24}-[(4S)-4-羧基-4-[[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[[[(4S)-4-羧基-4-[[[(4S)-4-羧基-4-(17-羧基十七烷酰基氨基)丁酰基]氨基]丁酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基]氨基]丁酰基]-[Lys²⁴,Leu²⁷]-胰高血糖素



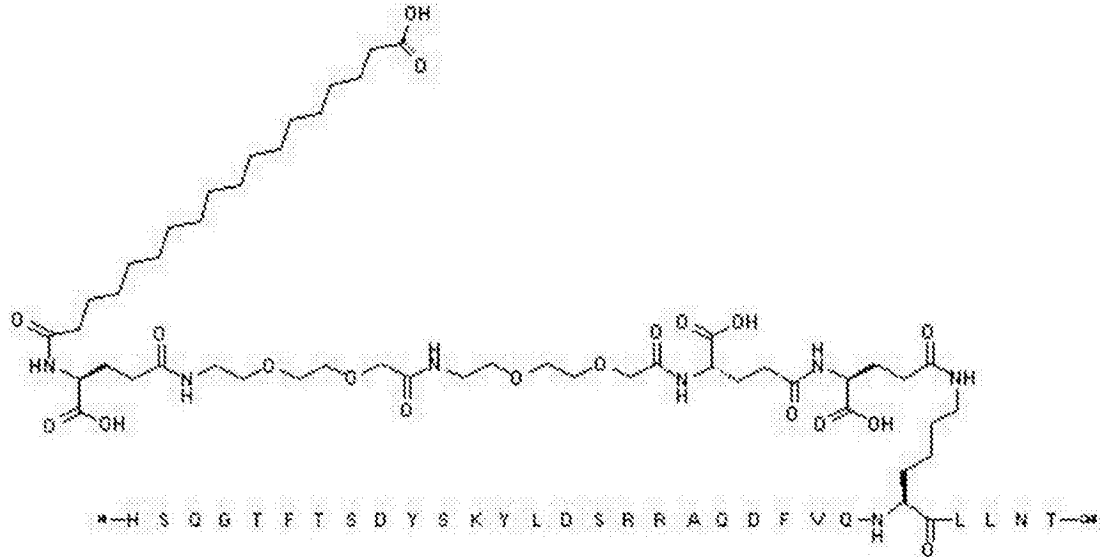
N^{ε24}-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[[[(4S)-4-羧基-4-[[[(4S)-4-羧基-4-[[[(4S)-4-羧基-4-(17-羧基十七烷酰基氨基)丁酰基]氨基]丁酰基]氨基]丁酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基]-[Lys²⁴,Leu²⁷]-胰高血糖素



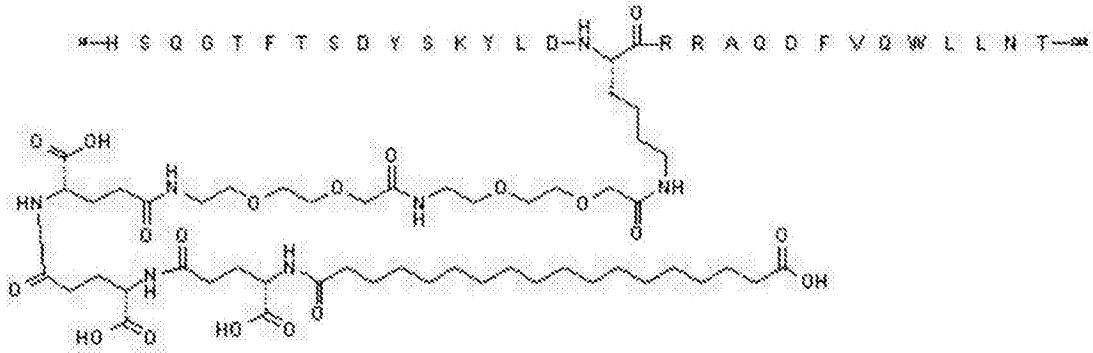
N^{ε24}-[(4S)-4-羧基-4-[[[(4S)-4-羧基-4-[[[(4S)-4-羧基-4-(17-羧基十七烷酰基氨基)丁酰基]氨基]丁酰基]氨基]丁酰基]-[Lys²⁴,Leu²⁷]-胰高血糖素



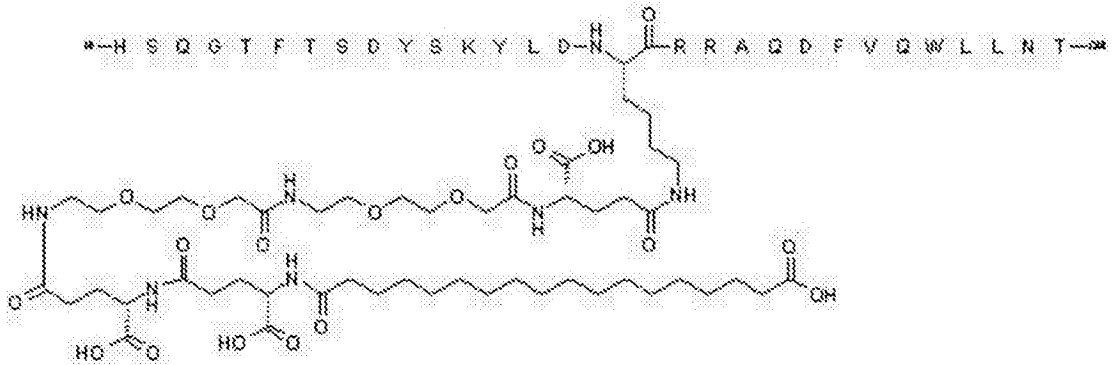
N^{ε25}-[(4S)-4-羧基-4-[[[(4S)-4-羧基-4-[[2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[[(4S)-4-羧基-4-(17-羧基十七烷酰基氨基)丁酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基]氨基]丁酰基]氨基]丁酰基]-[Lys²⁵,Leu²⁷]-胰高血糖素



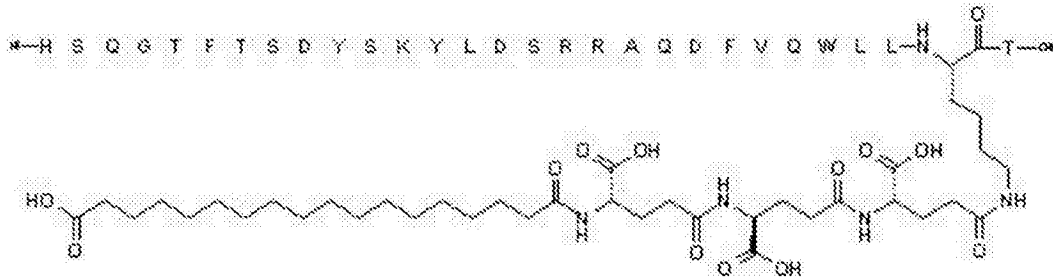
N^{ε16}-[2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[[(4S)-4-羧基-4-[[[(4S)-4-羧基-4-[[[(4S)-4-羧基-4-(17-羧基十七烷酰基氨基)丁酰基]氨基]丁酰基]氨基]丁酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基]-[Lys¹⁶,Leu²⁷]-胰高血糖素



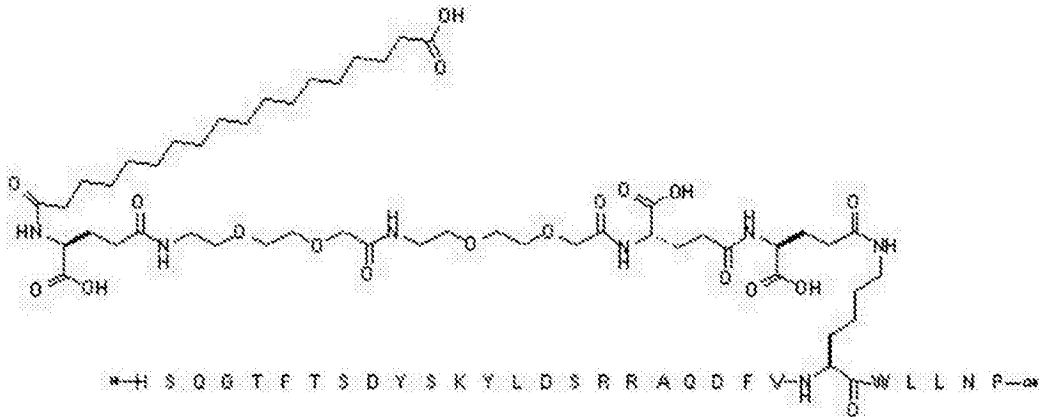
N^{ε16}-[(4S)-4-羧基-4-[[2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[[(4S)-4-羧基-4-[[[(4S)-4-羧基-4-(17-羧基十七烷酰基氨基)丁酰基]氨基]丁酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基]氨基]丁酰基]-[Lys¹⁶,Leu²⁷]-胰高血糖素



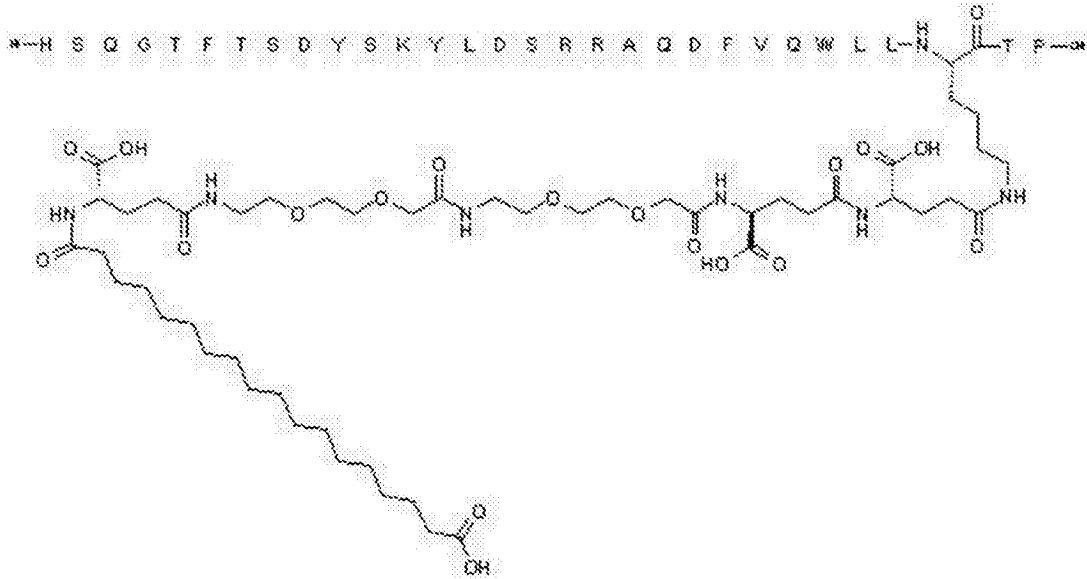
N^{ε28}-[(4S)-4-羧基-4-[[[(4S)-4-羧基-4-[[[(4S)-4-羧基-4-(17-羧基十七烷酰基氨基)丁酰基]氨基]丁酰基]氨基]丁酰基]-[Leu²⁷,Lys²⁸]-胰高血糖素



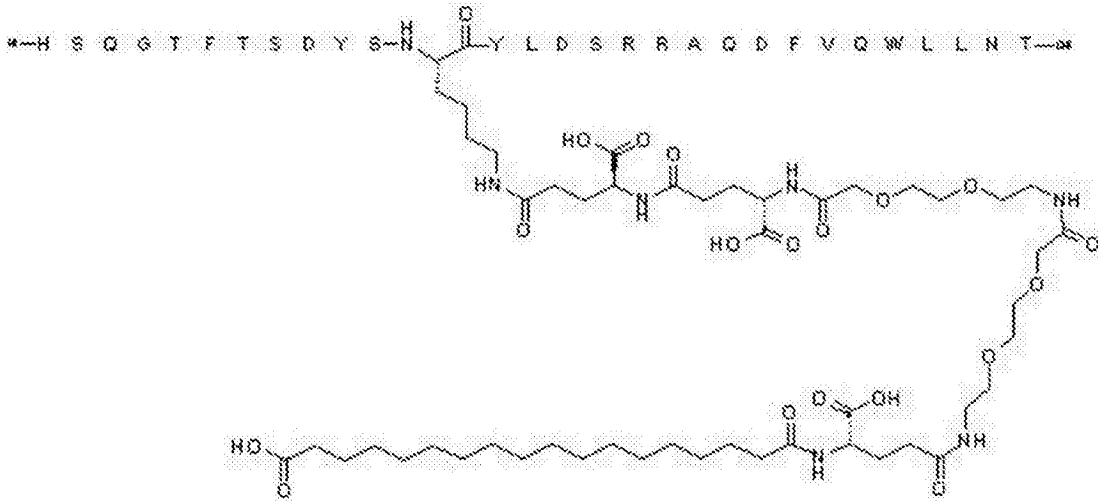
N^{ε24}-[(4S)-4-羧基-4-[[[(4S)-4-羧基-4-[[2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[[(4S)-4-羧基-4-(17-羧基十七烷酰基氨基)丁酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基]氨基]丁酰基]氨基]丁酰基]-[Lys²⁴,Leu²⁷,Pro²⁹]-胰高血糖素



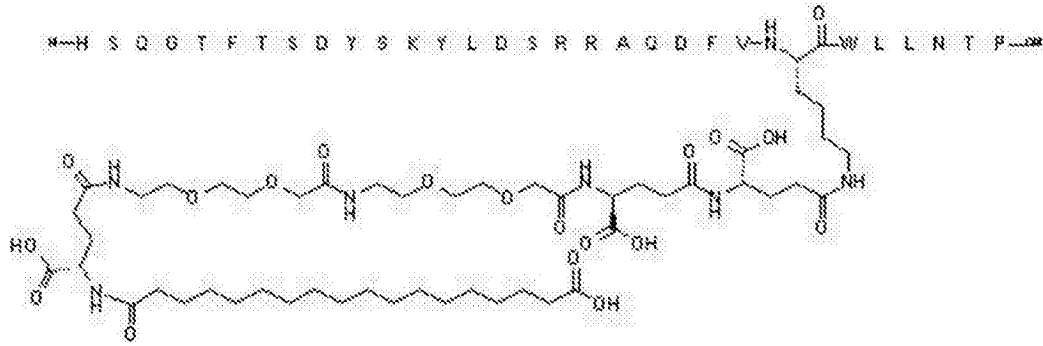
N^{ε28}-[(4S)-4-羧基-4-[[[(4S)-4-羧基-4-[[2-[2-[2-[2-[2-[2-[[[(4S)-4-羧基-4-(17-羧基十七烷酰基氨基)丁酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基]氨基]丁酰基]氨基]丁酰基]-[Leu²⁷,Lys²⁸]-胰高血糖素基-Pro



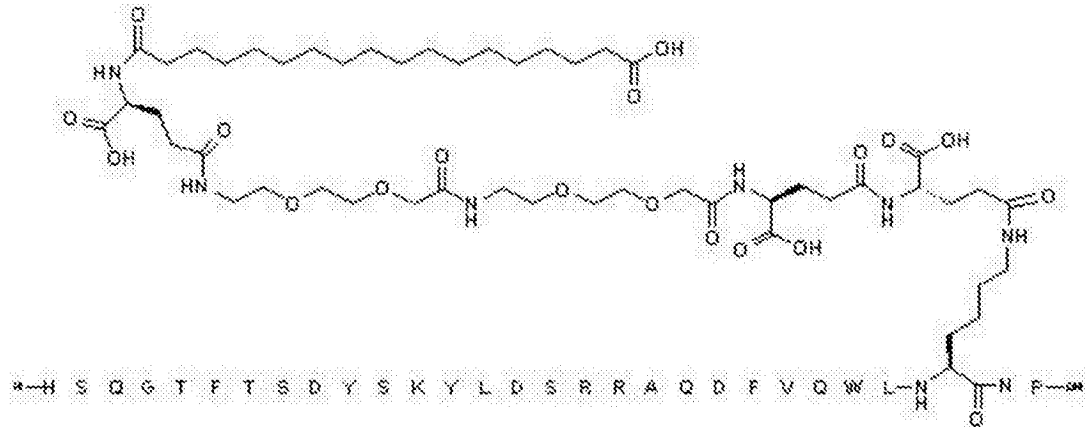
N^{ε12}-[(4S)-4-羧基-4-[[[(4S)-4-羧基-4-[[2-[2-[2-[2-[2-[2-[[[(4S)-4-羧基-4-(17-羧基十七烷酰基氨基)丁酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基]氨基]丁酰基]氨基]丁酰基]-[Leu²⁷]-胰高血糖素



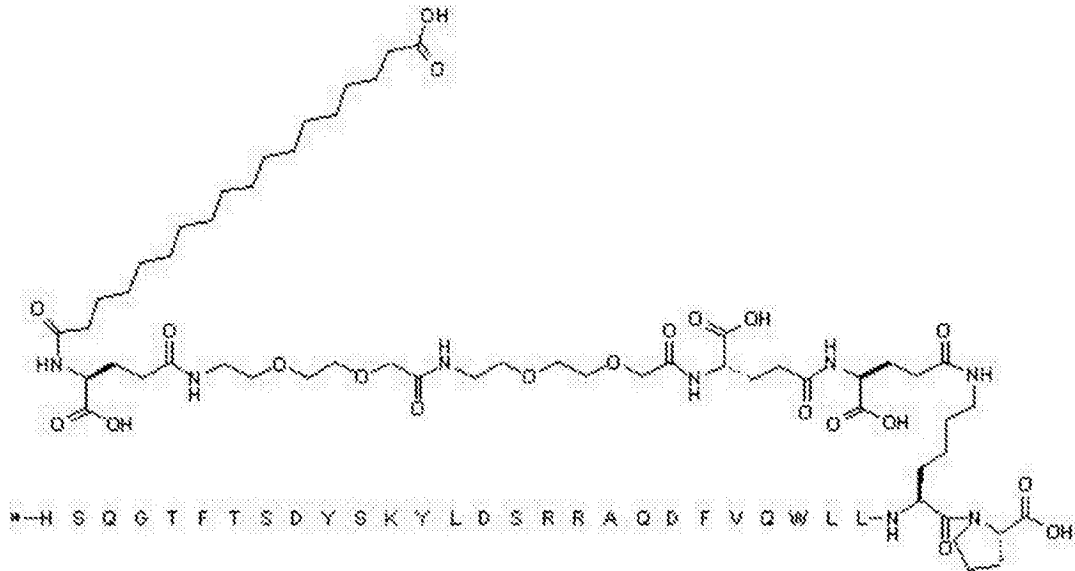
N^{ε24}-[(4S)-4-羧基-4-[[[(4S)-4-羧基-4-[[2-[2-[2-[2-[2-[2-[[[(4S)-4-羧基-4-(17-羧基十七烷酰基氨基)丁酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基]氨基]丁酰基]氨基]丁酰基]-[Lys²⁴,Leu²⁷]-胰高血糖素基-Pro



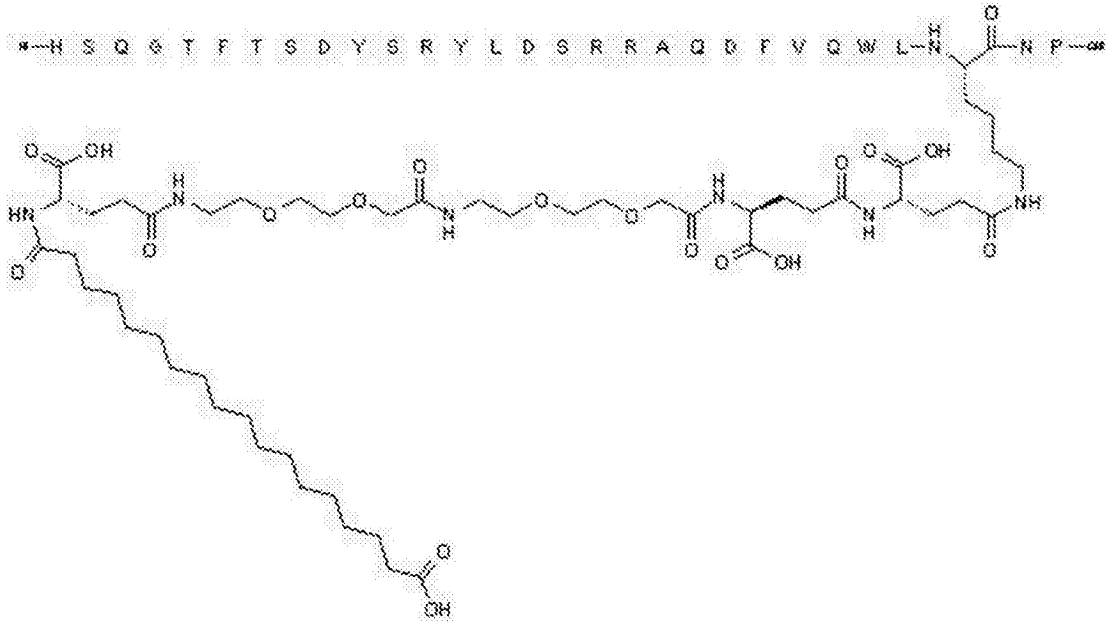
N^{ε27}-[(4S)-4-羧基-4-[[[(4S)-4-羧基-4-[[2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[[(4S)-4-羧基-4-(17-羧基十七烷酰基氨基)丁酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]氨基]丁酰基]氨基]丁酰基]-[Lys²⁷,Pro²⁹]-胰高血糖素



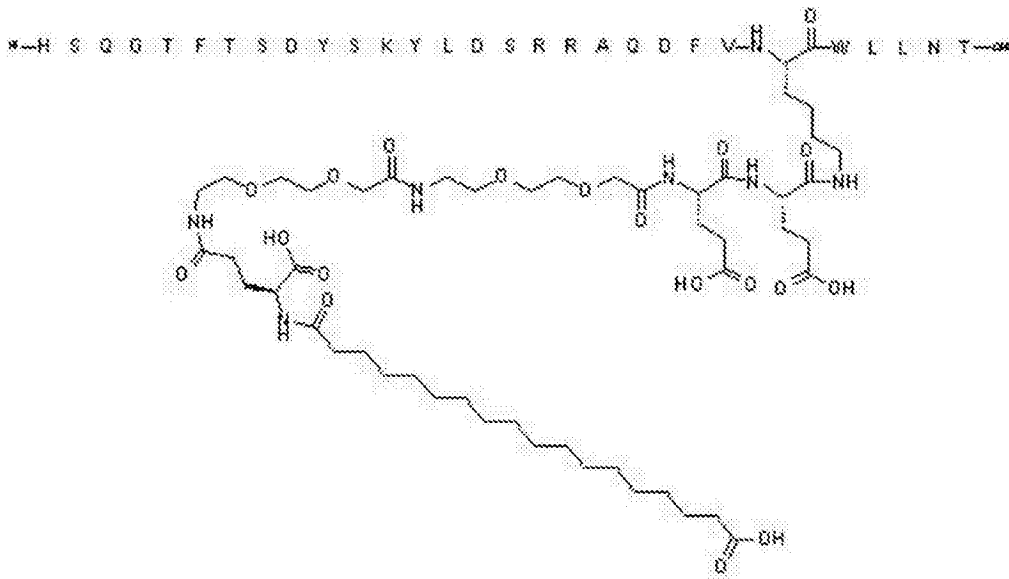
N^{ε28}-[(4S)-4-羧基-4-[[[(4S)-4-羧基-4-[[2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[[(4S)-4-羧基-4-(17-羧基十七烷酰基氨基)丁酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]氨基]丁酰基]氨基]丁酰基]-[Leu²⁷,Lys²⁸,Pro²⁹]-胰高血糖素



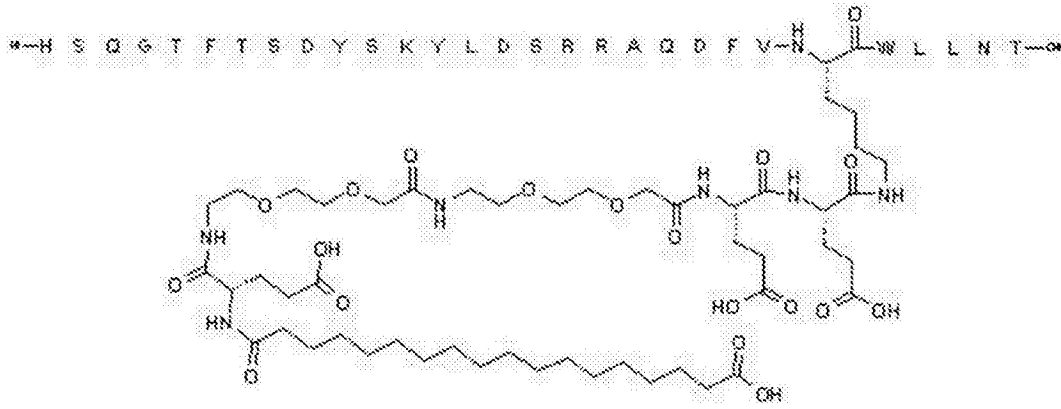
N^{ε27}-[(4S)-4-羧基-4-[[[(4S)-4-羧基-4-[[2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[[(4S)-4-羧基-4-(17-羧基十七烷酰基氨基)丁酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]氨基]丁酰基]氨基]丁酰基]-[Arg¹²,Lys²⁷,Pro²⁹]-胰高血糖素



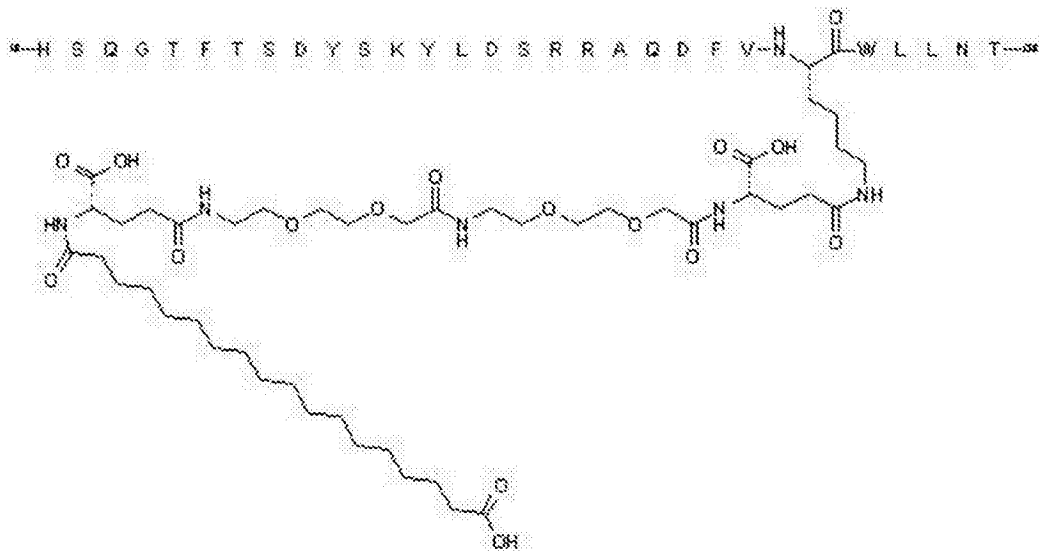
N^{ε24}-[(2S)-4-羧基-2-[[[(2S)-4-羧基-2-[[2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[[(4S)-4-羧基-4-(17-羧基十七烷酰基氨基)丁酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基]氨基]丁酰基]氨基]丁酰基]-[Lys²⁴,Leu²⁷]-胰高血糖素



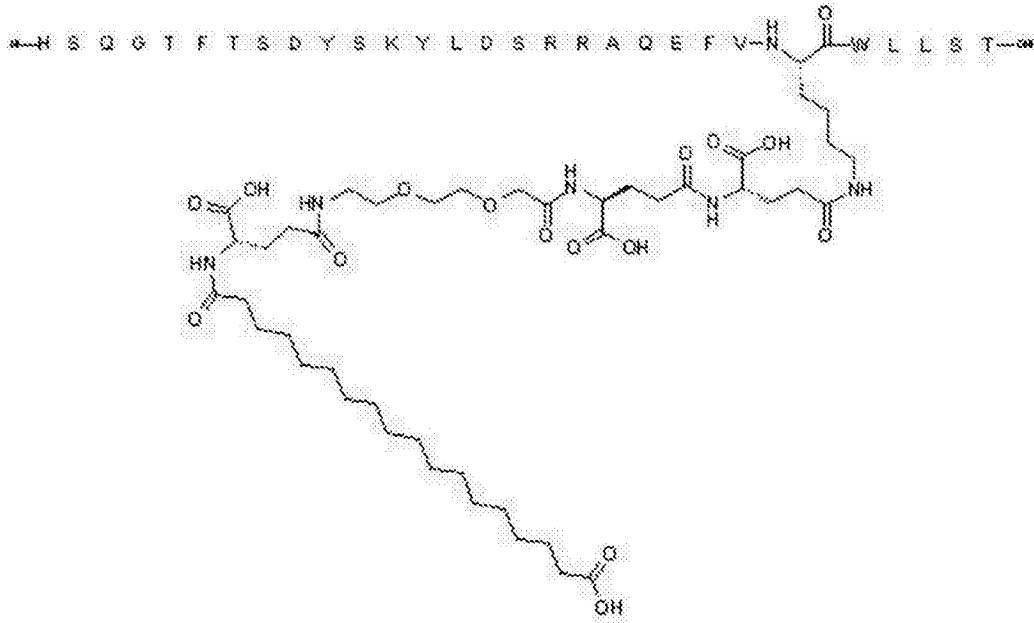
N^{ε24}-[(2S)-4-羧基-2-[[[(2S)-4-羧基-2-[[2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[[(2S)-4-羧基-2-(17-羧基十七烷酰基氨基)丁酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基]氨基]丁酰基]氨基]丁酰基]-[Lys²⁴,Leu²⁷]-胰高血糖素



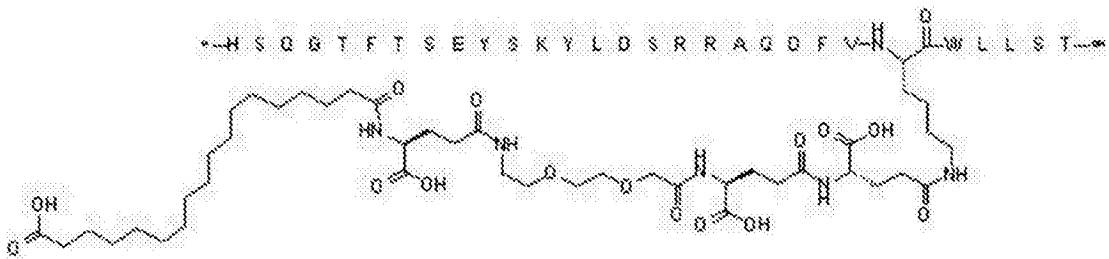
N^{ε24}-[(4S)-4-羧基-4-[[2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[[4S)-4-羧基-4-(17-羧基十七烷酰基氨基)丁酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]氨基]丁酰基]-[Lys²⁴,Leu²⁷]-胰高血糖素



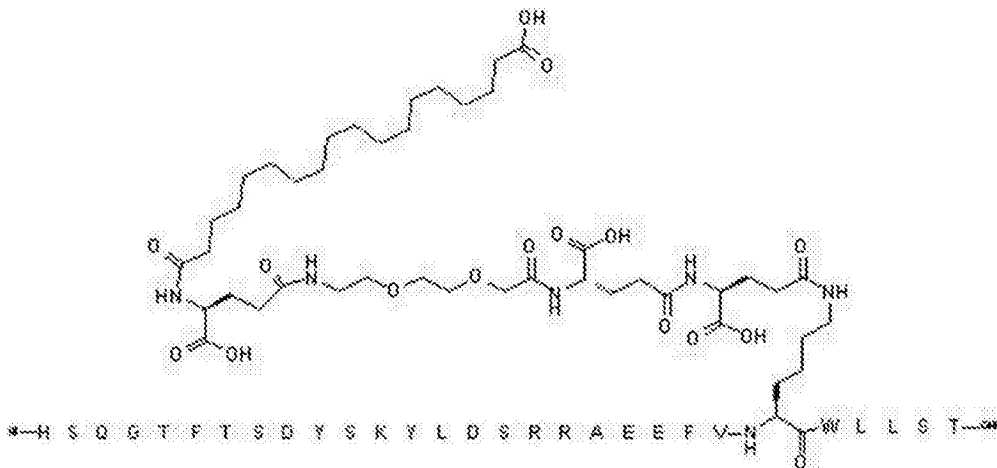
N^{ε24}-[(4S)-4-羧基-4-[[[4S)-4-羧基-4-[[2-[2-[2-[[[4S)-4-羧基-4-(17-羧基十七烷酰基氨基)丁酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]氨基]丁酰基]氨基]丁酰基]-[Glu²¹,Lys²⁴,Leu²⁷,Ser²⁸]-胰高血糖素



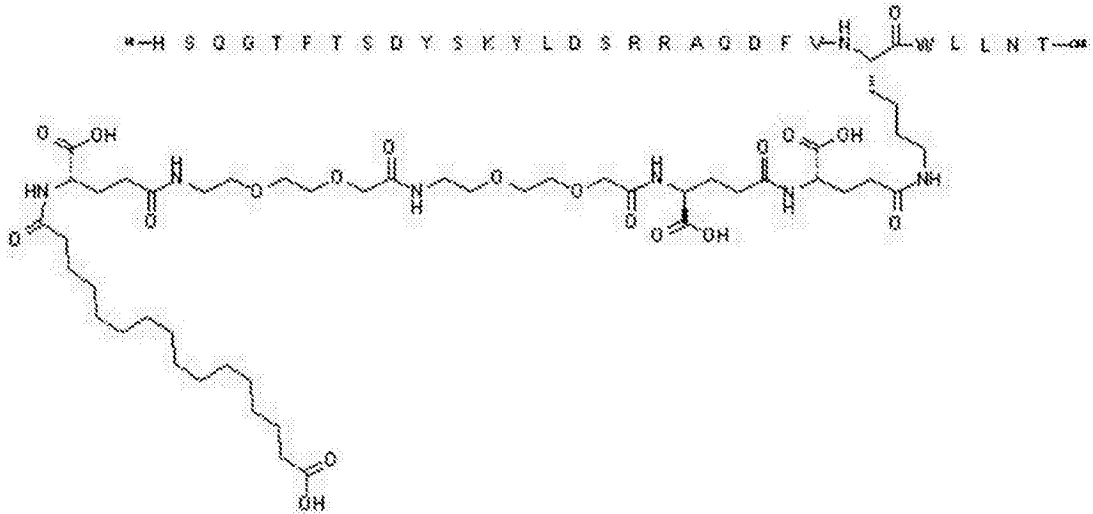
N^{ε24}-[(4S)-4-羧基-4-[[[(4S)-4-羧基-4-[[2-[2-[2-[[[(4S)-4-羧基-4-(17-羧基十七烷酰基氨基)丁酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基]氨基]丁酰基]氨基]丁酰基]-[Glu⁹, Lys²⁴,Leu²⁷,Ser²⁸]-胰高血糖素



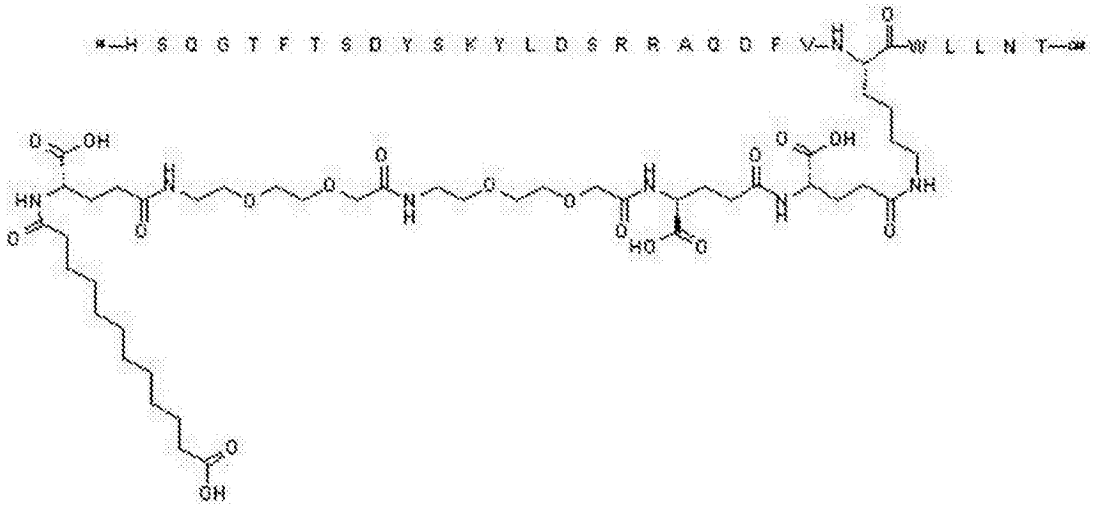
N^{ε24}-[(4S)-4-羧基-4-[[[(4S)-4-羧基-4-[[2-[2-[2-[[[(4S)-4-羧基-4-(17-羧基十七烷酰基氨基)丁酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基]氨基]丁酰基]氨基]丁酰基]-[Glu²⁰, Glu²¹,Lys²⁴,Leu²⁷,Ser²⁸]-胰高血糖素



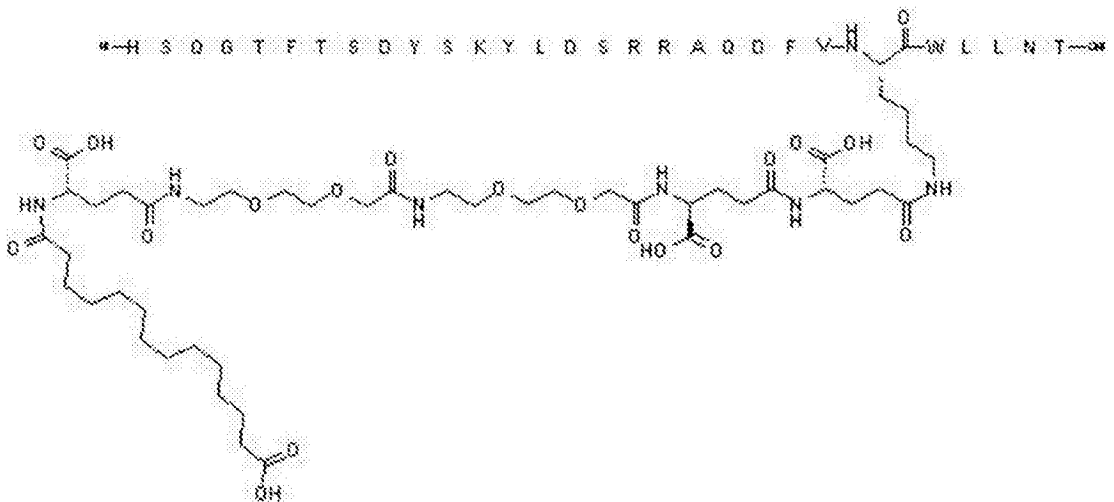
N^{ε24}-[(4S)-4-羧基-4-[[[(4S)-4-羧基-4-[[2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[[(4S)-4-羧基-4-(15-羧基十五烷酰基氨基)丁酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基]氨基]丁酰基]氨基]丁酰基]-[Lys²⁴,Leu²⁷]-胰高血糖素



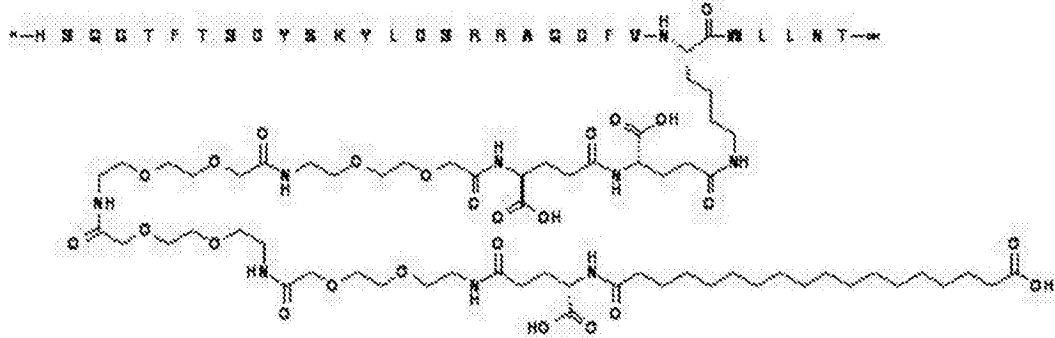
N^{ε24}-[(4S)-4-羧基-4-[[[(4S)-4-羧基-4-[[2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[[(4S)-4-羧基-4-(11-羧基十一烷酰基氨基)丁酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]氨基]丁酰基]氨基]丁酰基]-[Lys²⁴,Leu²⁷]-胰高血糖素



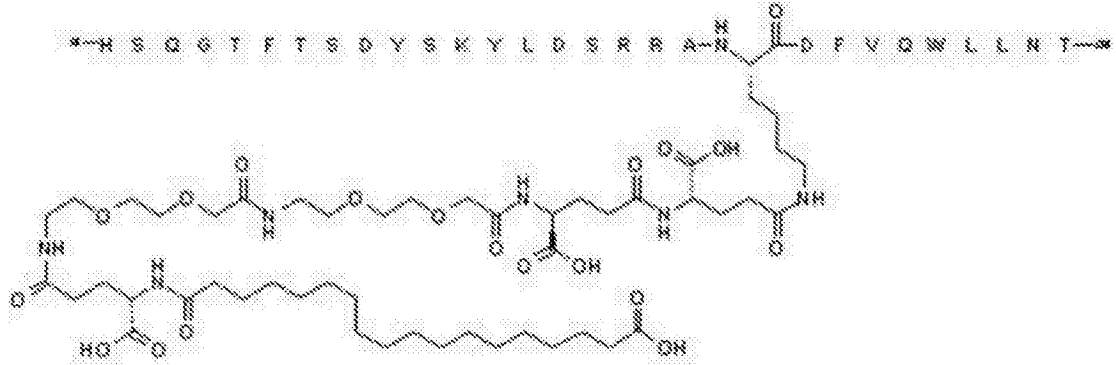
N^{ε24}-[(4S)-4-羧基-4-[[[(4S)-4-羧基-4-[[2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[[(4S)-4-羧基-4-(13-羧基十三烷酰基氨基)丁酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]氨基]丁酰基]氨基]丁酰基]-[Lys²⁴,Leu²⁷]-胰高血糖素



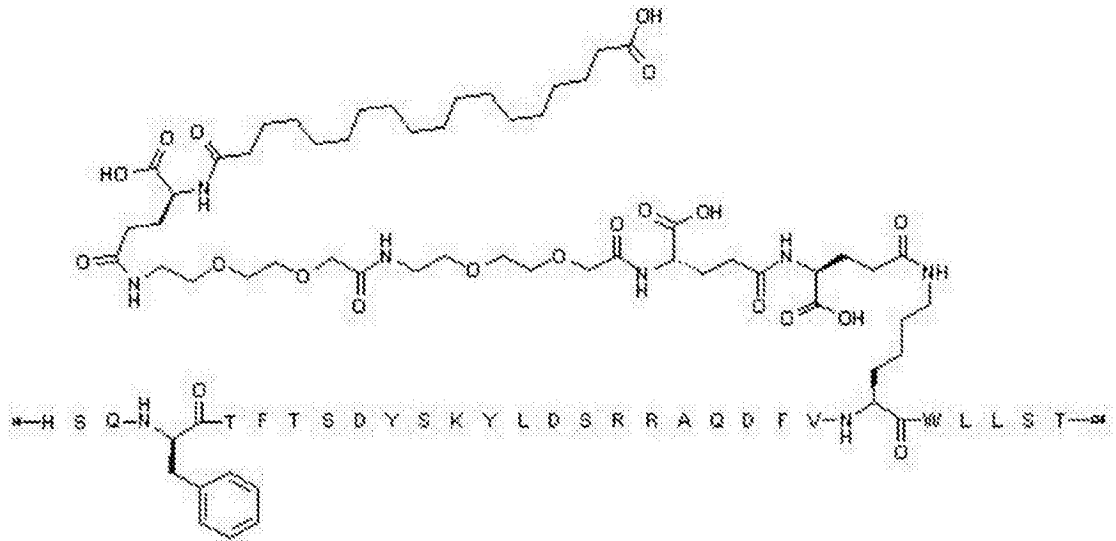
N^{ε24}-[(4S)-4-羧基-4-[[[(4S)-4-羧基-4-[[2-[2-[2-[2-[2-[2-[[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[[[(4S)-4-羧基-4-(17-羧基十七烷酰基氨基)丁酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基]氨基]丁酰基]氨基]丁酰基]-[Lys²⁴,Leu²⁷]-胰高血糖素



N^{ε20}-[(4S)-4-羧基-4-[[[(4S)-4-羧基-4-[[2-[2-[2-[2-[2-[2-[[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[[[(4S)-4-羧基-4-(17-羧基十七烷酰基氨基)丁酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基]氨基]丁酰基]氨基]丁酰基]-[Lys²⁰,Leu²⁷]-胰高血糖素

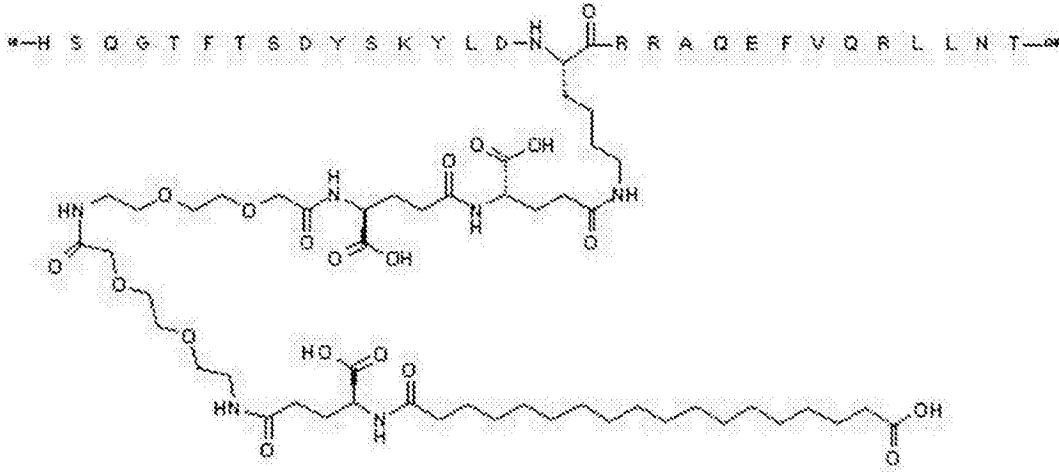


N^{ε24}-[(4S)-4-羧基-4-[[[(4S)-4-羧基-4-[[2-[2-[2-[2-[2-[2-[[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[[[(4S)-4-羧基-4-(17-羧基十七烷酰基氨基)丁酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基]氨基]丁酰基]氨基]丁酰基]-[D-Phe⁴,Lys²⁴,Leu²⁷,Ser²⁸]-胰高血糖素

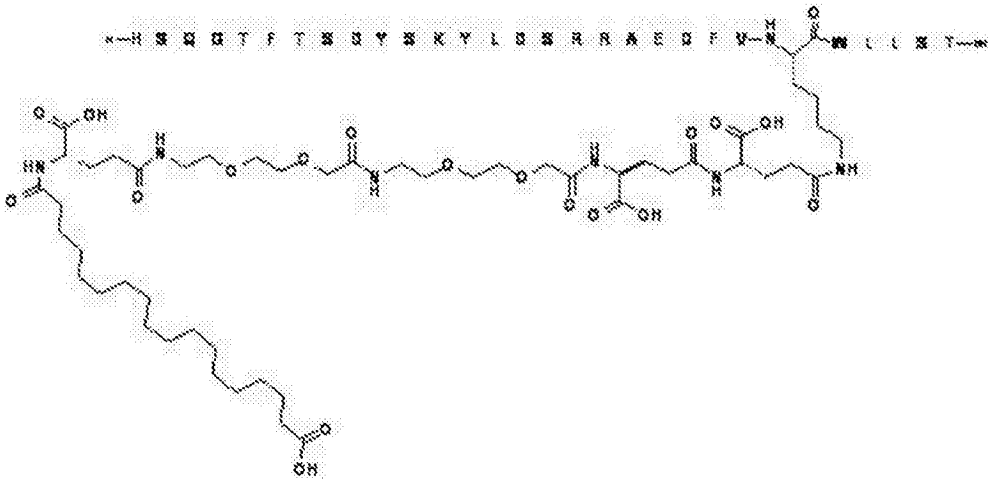


N^{ε16}-[(4S)-4-羧基-4-[[[(4S)-4-羧基-4-[[2-[2-[2-[2-[2-[2-[[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[[[(4S)-4-羧基-4-(17-羧基十七烷酰基氨基)丁酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙

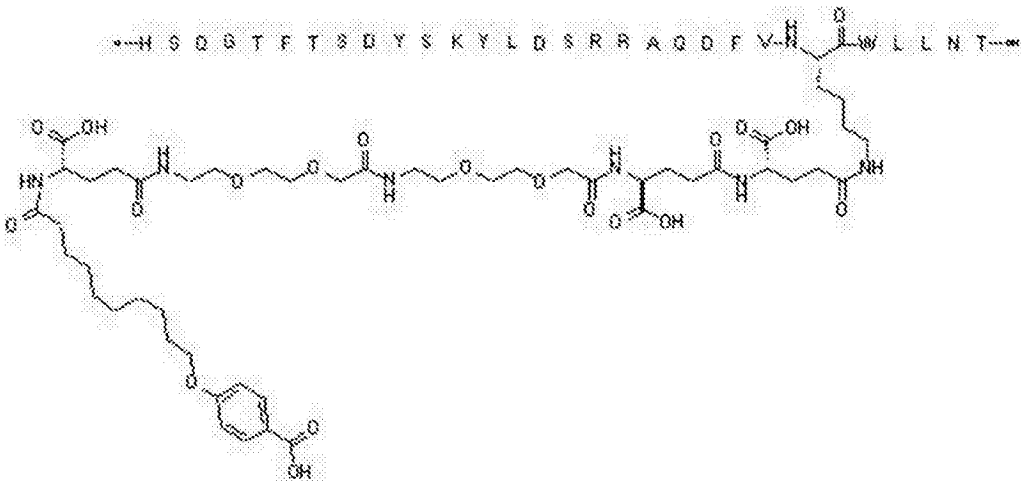
酰基]氨基]丁酰基]氨基]丁酰基]-[Lys¹⁶,Glu²¹,Arg²⁵,Leu²⁷]-胰高血糖素



$N^{\epsilon 24}$ -[(4S)-4-羧基-4-[[[(4S)-4-羧基-4-[[2-[2-[2-[2-[2-[2-[[[(4S)-4-羧基-4-(17-羧基十七烷酰基氨基)丁酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基]氨基]丁酰基]氨基]丁酰基]-[Glu²⁰,Lys²⁴,Leu²⁷,Ser²⁸]-胰高血糖素

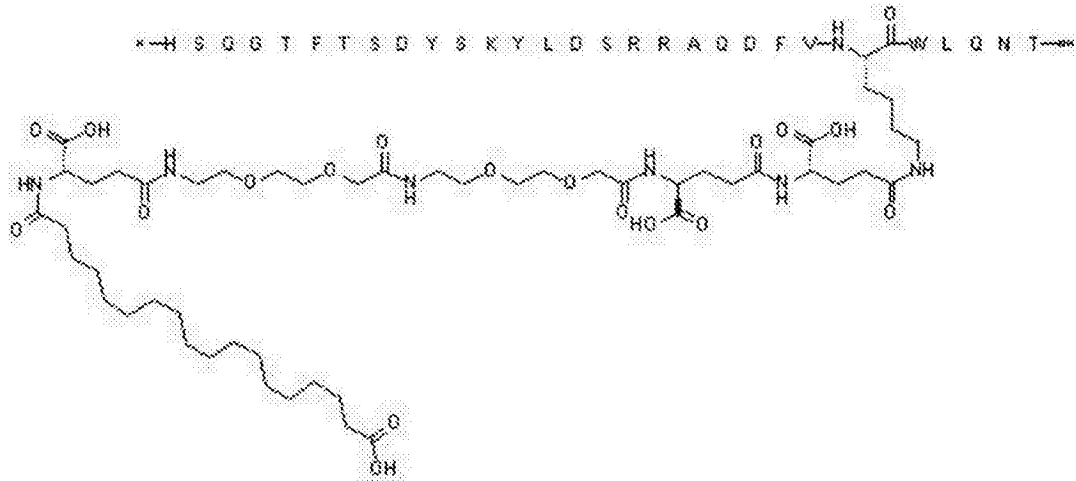


$N^{\epsilon 24}$ -[(4S)-4-羧基-4-[[[(4S)-4-羧基-4-[[2-[2-[2-[2-[2-[2-[[[(4S)-4-羧基-4-(10-(4-羧基苯氧基)癸酰基氨基]丁酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基]氨基]丁酰基]氨基]丁酰基]-[Lys²⁴,Leu²⁷]-胰高血糖素

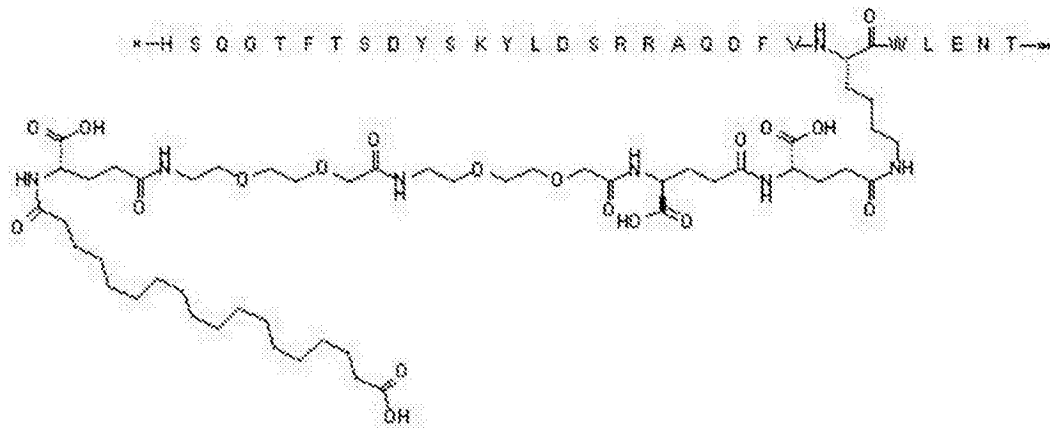


$N^{\epsilon 24}$ -[(4S)-4-羧基-4-[[[(4S)-4-羧基-4-[[2-[2-[2-[2-[2-[2-[[[(4S)-4-羧基-4-

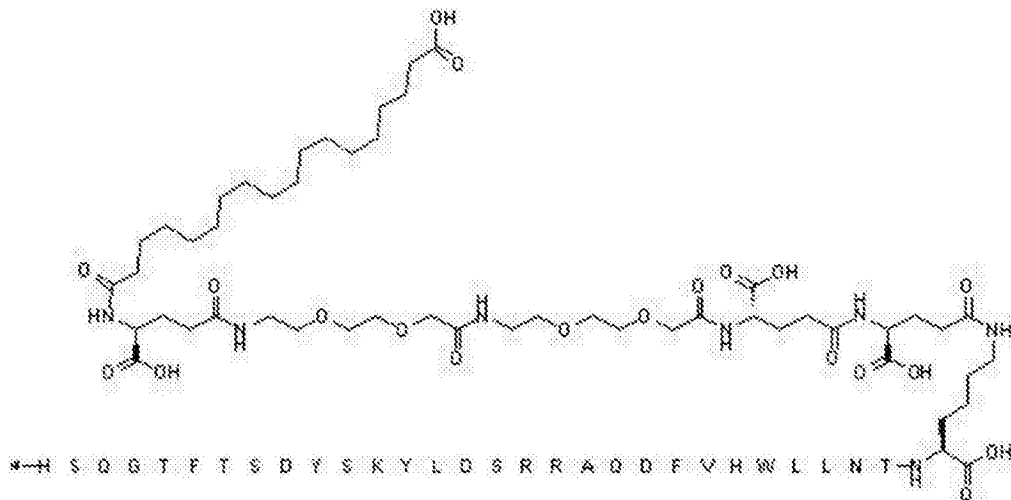
(17-羧基十七烷酰基氨基)丁酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基]氨基]丁酰基]氨基]丁酰基]-[Lys²⁴,Gln²⁷]-胰高血糖素



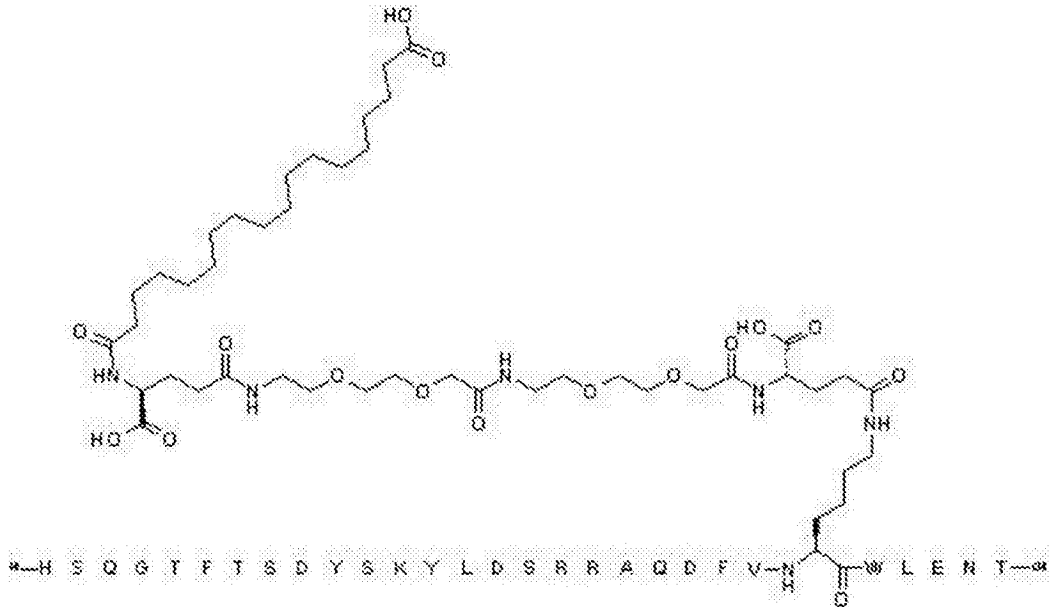
N^ε²⁴-[(4S)-4-羧基-4-[[[(4S)-4-羧基-4-[[[2-[2-[2-[2-[2-[2-[[[(4S)-4-羧基-4-(17-羧基十七烷酰基氨基)丁酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基]氨基]丁酰基]氨基]丁酰基]-[Lys²⁴,Glu²⁷]-胰高血糖素



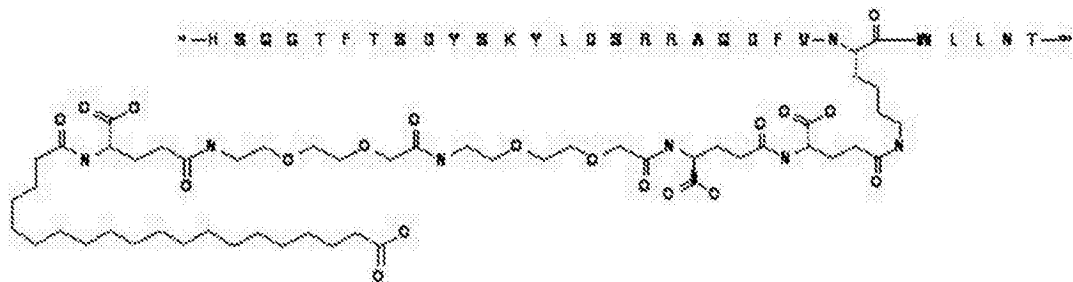
N^d ([His²⁴,Leu²⁷]-胰高血糖素基)-N^ε [(4S)-4-羧基-4-[[[(4S)-4-羧基-4-[[[2-[2-[2-[2-[2-[2-[[[(4S)-4-羧基-4-(17-羧基十七烷酰基氨基)丁酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基]氨基]丁酰基]氨基]丁酰基]Lys



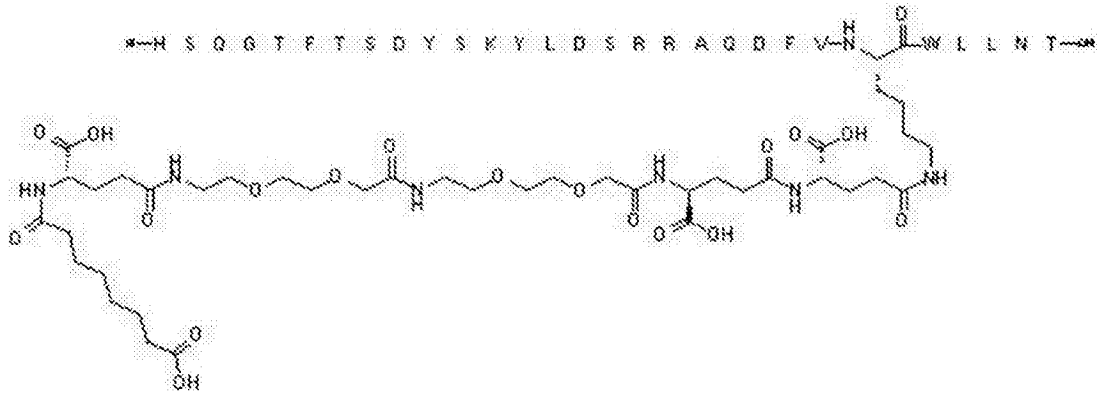
N^{e24}-[(4S)-4-羧基-4-[[2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[[(4S)-4-羧基-4-(17-羧基十七烷酰基氨基)丁酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基]氨基]丁酰基]-[Lys²⁴,Glu²⁷]-胰高血糖素



N^{e24}-[(4S)-4-羧基-4-[[[(4S)-4-羧基-4-[[2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[[(4S)-4-羧基-4-(19-羧基十九烷酰基氨基)丁酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基]氨基]丁酰基]氨基]丁酰基]-[Lys²⁴,Leu²⁷]-胰高血糖素



N^{e24}-[(4S)-4-羧基-4-[[[(4S)-4-羧基-4-[[2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[[(4S)-4-羧基-4-(7-羧基庚酰基氨基)丁酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基]氨基]丁酰基]氨基]丁酰基]-[Lys²⁴,Leu²⁷]-胰高血糖素



- 11. 一种药物组合物,其包含权利要求1-10中任一项的胰高血糖素肽。
- 12. 权利要求11的药物组合物,其还包含一种或多种其它的治疗活性化合物或物质。

13. 权利要求11-12中任一项的药物组合物,其还包含GLP-1化合物。

14. 权利要求11-12中任一项的药物组合物,其还包含胰岛素化合物。

15. 权利要求11-12中任一项的药物组合物,其适于胃肠外给药。

16. 一种用于治疗的权利要求1-10中任一项的胰高血糖素肽。

17. 权利要求1-10中任一项的胰高血糖素肽在制备用于治疗以下疾病的药物中的用途:高血糖症、2型糖尿病、葡萄糖耐量减低、1型糖尿病和肥胖症。

18. 权利要求1-10中任一项的胰高血糖素肽在制备用于以下方面的药物中的用途:延迟2型糖尿病的疾病进展、治疗肥胖症或预防体重超重、减少食物摄取、增加能量消耗、减轻体重、延迟从葡萄糖耐量减低(IGT)到2型糖尿病的进展;延迟从2型糖尿病到需要胰岛素的糖尿病的进展;调节食欲;引起饱满感;防止成功减轻体重后体重反弹;治疗贪食症;治疗暴食症;或治疗2型糖尿病、IGT。

19. 权利要求1-10中任一项的胰高血糖素肽在制备用于治疗以下疾病的药物中的用途:低血糖和胰岛素瘤。

20. 权利要求1-10中任一项的胰高血糖素肽在制备用于治疗以下疾病的药物中的用途:胰岛素诱导性低血糖、反应性低血糖、糖尿病性低血糖、非糖尿病性低血糖、空腹低血糖、药物诱发性低血糖、妊娠期低血糖和酒精诱发性低血糖。

新的胰高血糖素类似物

发明领域

[0001] 本发明涉及具有改进的物理稳定性和溶解度并且作用特征延长的新的胰高血糖素肽类似物,涉及所述肽在疗法中的用途,涉及包括将所述肽给予患者的治疗方法,并涉及所述肽在药物制备中的用途。

[0002] 发明背景

[0003] 对血糖水平的精确控制对人以及其它哺乳动物都极其重要。十分确定的是胰岛素和胰高血糖素两种激素对于维持适当的血糖水平很重要。胰岛素通过葡萄糖的外周摄取增加和自肝脏输出的葡萄糖减少来降低血糖水平而作用于肝脏和外周组织,与此同时,胰高血糖素通过糖异生和糖原分解上调来提高血糖水平而主要作用于胰腺和肝脏。另据报告,胰高血糖素增加脂解作用,诱导酮症并降低血浆中的血浆甘油三酯水平 [Schade和Eaton, *Acta Diabetologica*,1977,14,62]。

[0004] 胰高血糖素是抵抗低血糖的防御机制的重要部分,给予低剂量的胰高血糖素可防止胰岛素诱导性低血糖或改善从低血糖恢复的能力。研究还表明胰高血糖素在大鼠和人中的确减少食物摄取和体重 [Schulman等 *J. Appl. Physiol.* 1957,11,419]。因此,胰高血糖素是似乎可信的可促使停止食物摄取的信号。此外,给予较低剂量的胰高血糖素可在不影响血糖的情况下引起饱满感。许多患有糖尿病、特别是2型糖尿病的人体重超重或肥胖。肥胖症表示严重的并且甚至是致命的常见病的高风险因素,对于大多数糖尿病患者,非常需要的是,对他们的治疗不引起体重增加。

[0005] 然而,胰高血糖素由于具有约5分钟的半寿期而从循环中快速清除,因此在医药品中具有有限的潜在应用。在其中需要在长时间内保持治疗剂高血液水平的情况下,其高清除率是不方便的,因为为此必须重复给药。在一些情况下,有可能通过应用合适的药物组合物来影响肽的释放特征,但这种方法有各种缺点,一般不适用。

[0006] 目前可获得作为冻干制剂的重组形式的胰高血糖素,其作用持续时间短,限于几小时,尽管胰高血糖素水平达到的峰值水平远高于内源性胰高血糖素的水平。因此需要化学修饰的胰高血糖素化合物以便按连续水平递送,使得达到较长的生物半寿期,即具有作用特征延长的修饰胰高血糖素肽。

[0007] 此外,胰高血糖素当溶于水溶液时,无法非常长久地保持稳定,因为胰高血糖素的物理稳定性极差,且胰高血糖素的溶液在几小时或几天内形成凝胶和原纤维 (Beaven等, *European J. Biochem.* 1969,11,37-42),这取决于肽的纯度、盐浓度、pH和温度。此外,人胰高血糖素在pH 3.5-9.5下的溶解度极低下。

[0008] 公开了不同的基于胰高血糖素的类似物和GLP-1/胰高血糖素受体协同激动剂的若干专利申请是本领域已知的,例如专利W02008/086086、W02008/101017、W02007/056362、W02008/152403和W096/29342。公开于这些专利的一些GLP-1/胰高血糖素受体协同激动剂涉及相对于天然人胰高血糖素的特定突变。所公开的其它胰高血糖素类似物在天然人胰高血糖素的特定位置上是聚乙二醇化的(例如W02007/056362)或者是酰化的(例如W096/29342)。用于防止低血糖的胰高血糖素公开于例如专利申请US 7314859中。

[0009] 除了提供在生理pH下呈稳定的药物组合物的这类修饰胰高血糖素肽以外,本发明的肽还提供具有延长的作用特征的新的修饰胰高血糖素肽。

[0010] 发明概述

[0011] 本发明涉及在中性pH下物理稳定性和溶解度得到改进的新的胰高血糖素肽,涉及所述肽在疗法中的用途,涉及包括将所述肽给予患者的治疗方法,并涉及所述肽在制备用于治疗糖尿病、肥胖症和相关疾病和病况的药物中的用途。

[0012] 本发明人出人意料地发现人胰高血糖素中的多个位置在连接包含3个或更多个带负电荷的部分的取代基(其中所述带负电荷的部分之一是亲脂部分的远端)时,导致胰高血糖素激动剂物理稳定性和溶解度得到改进。

[0013] 在第一个实施方案(实施方案1)中,本发明涉及胰高血糖素肽或其药学上可接受的盐、酰胺、酸或前药,所述胰高血糖素肽包含SEQID 1、在所述胰高血糖素肽中的至多7个氨基酸取代和包含3个或更多个带负电荷的部分的取代基,其中所述带负电荷的部分之一是亲脂部分的远端,且其中所述取代基在所述胰高血糖素肽的一个或多个下列氨基酸位置中在Lys的 ϵ 位上、在Orn的 δ 位上或在Cys的硫上连接: X_{10} 、 X_{12} 、 X_{16} 、 X_{17} 、 X_{18} 、 X_{20} 、 X_{21} 、 X_{24} 、 X_{25} 、 X_{27} 、 X_{28} 、 X_{29} 和/或 X_{30} 。

[0014] 本发明还涉及本发明的化合物在治疗中的用途,涉及包含本发明化合物的药物组合物和本发明的化合物在制备药物中的用途。

附图说明

[0015] 图1表示胰高血糖素(1,黑线条)和实施例3(2,灰线条)的pH依赖性溶解度(测定VIII)。

[0016] 图2表示在sc给予100nmol/kg、300nmol/kg或1000nmol/kg实施例3的胰高血糖素类似物后大鼠的累积食物摄取。数据=平均值+/-SEM,n=5-6。

[0017] 图3表示在sc给予300nmol/kg实施例4的胰高血糖素类似物后大鼠的累积食物摄取。数据=平均值+/-SEM,n=5-6

[0018] 图4表示在sc给予300nmol/kg实施例5的胰高血糖素类似物后大鼠的累积食物摄取。数据=平均值+/-SEM,n=5-6。

[0019] 图5表示在iv和sc给予大鼠后实施例3的胰高血糖素类似物的PK。半寿期(iv.)约8.6小时 \pm 0.5,半寿期(sc.)约9.4小时 \pm 0.9,平均值 \pm SEM。

[0020] 图6表示给予仅实施例3的胰高血糖素类似物或与GLP-1类似物G3一起给予的饮食诱导性肥胖(DIO)大鼠中体重的减轻。点画线分别表示开始给药和剂量降低。

[0021] 图7表示给予仅实施例3的胰高血糖素类似物或与GLP-1类似物G3一起给予的饮食诱导性肥胖大鼠中第14天的 Δ 体重。误差棒表示显著差异(单因素方差分析,Bonferroni事后检验)

[0022] 图8表示给予仅实施例3的胰高血糖素类似物或与GLP-1类似物G3一起给予的饮食诱导性肥胖大鼠中给药第11天的血糖概况。点画线表示给药。

[0023] 图9表示给予仅实施例3的胰高血糖素类似物或与GLP-1类似物G3一起给予的饮食诱导性肥胖大鼠中饮食诱导性肥胖大鼠的食物摄取。

[0024] 图10表示给予仅实施例3的胰高血糖素类似物或与GLP-1类似物G3一起给予的饮

食诱导性肥胖大鼠中在研究结束时测量的胰岛素水平。采用对各组与溶媒高脂肪饲喂组进行比较的单因素方差分析和Dunnet事后检验来比较各组。

[0025] 图11表示研究给予仅实施例3的胰高血糖素类似物或与GLP-1类似物G3一起给予的饮食诱导性肥胖大鼠中在研究结束时测量的胆固醇水平。采用对各组与溶媒高脂肪饲喂组进行比较的单因素方差分析和Dunnet事后检验来比较各组。

[0026] 图12表示胰高血糖素类似物在10mM HEPES缓冲液(pH=7.5)中的溶解度。将缓冲液加至胰高血糖素类似物中至250 μ M的标称浓度,1小时后,离心后测量浓度。采用化学发光氮特异性HPLC检测器,评价浓度。

[0027] 图13表示胰高血糖素类似物的稳定性。将胰高血糖素类似物加至缓冲液中至250 μ M的标称浓度,1小时后记录UPLC层析图。将溶液在30 $^{\circ}$ C下保存6天,然后将样品过滤,记录新的UPLC。峰值(214nm)的曲线下面积用作溶液中肽的浓度的衡量。

[0028] 图14表示ThT(硫磺素T)原纤维形成测定法中得到的延迟时间(左Y轴)和回收率(右Y轴)。栏1:制剂1的延迟时间和回收率。栏2A:制剂2中实施例3的胰高血糖素类似物的延迟时间和回收率。栏2B:制剂2中胰岛素类似物G5的回收率。栏3A:制剂3中实施例3的胰高血糖素类似物的延迟时间和回收率。栏3B:制剂3中GLP-1类似物G1的回收率。栏4:制剂4中实施例3的胰高血糖素类似物的延迟时间和回收率(由于技术原因未测定GLP-1类似物G3回收率)。栏5:制剂5中胰岛素类似物G5的延迟时间和回收率。栏6:制剂6中GLP-1类似物G1的延迟时间和回收率。

[0029] 图15表示与DPP-IV(2 μ g/ml)一起在HEPES缓冲液中于37 $^{\circ}$ C温育的GLP-1、胰高血糖素和实施例3的胰高血糖素类似物。测定半寿期分别为11分钟、32分钟和260分钟。

[0030] 图16表示在单次sc给予实施例53和54的胰高血糖素类似物后大鼠的食物摄取(测定V)。

[0031] 图17表示大鼠中单次SC或IV给予后实施例51的胰高血糖素类似物的药代动力学特征。测定(VII)。

[0032] 图18表示单次sc给予实施例51的胰高血糖素类似物后大鼠的食物摄取(测定V)。

[0033] 图19表示天然胰高血糖素(黑色)和实施例51(灰色)的pH依赖性溶解度(测定VIII)。

[0034] 发明描述

[0035] 本发明的其它实施方案包括如下实施方案:

[0036] 2. 实施方案1的胰高血糖素肽,其中所述胰高血糖素肽在所述胰高血糖素肽中包含0、1、2、3、4、5、6或7个氨基酸残基取代。

[0037] 3. 前述实施方案中任一个的胰高血糖素肽,其中所述胰高血糖素肽在所述胰高血糖素肽中包含0个氨基酸残基取代。

[0038] 4. 实施方案1-2中任一个的胰高血糖素肽,其中所述胰高血糖素肽在所述胰高血糖素肽中包含1个氨基酸残基取代。

[0039] 5. 实施方案1-2中任一个的胰高血糖素肽,其中所述胰高血糖素肽在所述胰高血糖素肽中包含2个氨基酸残基取代。

[0040] 6. 实施方案1-2中任一个的胰高血糖素肽,其中所述胰高血糖素肽在所述胰高血糖素肽中包含3个氨基酸残基取代。

[0041] 7. 实施方案1-2中任一个的胰高血糖素肽,其中所述胰高血糖素肽在所述胰高血糖素肽中包含4个氨基酸残基取代。

[0042] 8. 实施方案1-2中任一个的胰高血糖素肽,其中所述胰高血糖素肽在所述胰高血糖素肽中包含5个氨基酸残基取代。

[0043] 9. 实施方案1-2中任一个的胰高血糖素肽,其中所述胰高血糖素肽在所述胰高血糖素肽中包含6个氨基酸残基取代。

[0044] 10. 实施方案1-2中任一个的胰高血糖素肽,其中所述胰高血糖素肽在所述胰高血糖素肽中包含7个氨基酸残基取代。

[0045] 11. 前述实施方案中任一个的胰高血糖素肽,其中所述氨基酸取代位于所述胰高血糖素肽的以下氨基酸位置上: X_2 、 X_4 、 X_9 、 X_{10} 、 X_{12} 、 X_{16} 、 X_{17} 、 X_{18} 、 X_{20} 、 X_{21} 、 X_{24} 、 X_{25} 、 X_{27} 、 X_{28} 、 X_{29} 和/或 X_{30} 。

[0046] 12. 前述实施方案中任一个的胰高血糖素肽,

[0047] 其中所述氨基酸取代可位于所述胰高血糖素肽的下列位置上

[0048] X_2 表示Aib或D-Ser;

[0049] X_4 表示D-Phe;

[0050] X_9 表示Glu;

[0051] X_{10} 表示Cys、Lys、Orn或(p) Tyr;

[0052] X_{12} 表示Cys、Lys、Orn、Ile、His、Gln、Tyr、Leu或Arg;

[0053] X_{16} 表示Cys、Glu、Lys或Orn;

[0054] X_{17} 表示Cys、Gln、Lys、His或Orn;

[0055] X_{18} 表示Cys、Gln、Ala、Lys、His或Orn;

[0056] X_{20} 表示Cys、Arg、Lys、Glu、His或Orn;

[0057] X_{21} 表示Cys、Orn、Glu、Arg、His或Lys;

[0058] X_{24} 表示Cys、Lys、Arg、His、Glu、Asp、Gly、Ser或Orn;

[0059] X_{25} 表示Cys、Arg、Lys、His、Glu、Asp、Gly、Phe、Ser、Tyr、(p) Tyr或Orn;

[0060] X_{27} 表示Met(O)、Val、Ile、Leu、Arg、His、Cys、Lys、Glu、Gln或Orn;

[0061] X_{28} 表示Cys、Lys、His、Arg、Ser、Thr、Glu、Asp、Ala、Gln或Orn;

[0062] X_{29} 表示Cys、Glu、Asp、Lys、His、Arg、Pro或Orn和

[0063] X_{30} 不存在或表示Cys、Lys、Arg、Glu、Gly、Pro或Orn。

[0064] 13. 前述实施方案中任一个的胰高血糖素肽,其中所述氨基酸取代可位于所述胰高血糖素肽的下列位置上: X_4 表示D-Phe, X_9 表示Glu, X_{12} 表示Arg, X_{16} 表示Lys, X_{20} 表示Lys或Glu, X_{21} 表示Glu, X_{24} 表示Lys或His, X_{25} 表示Arg或Lys, X_{27} 表示Leu、Lys、Glu或Gln, X_{28} 表示Lys或Ser, X_{29} 表示Lys或Pro, X_{30} 不存在或表示Lys或Pro。

[0065] 14. 前述实施方案中任一个的胰高血糖素肽,其中 X_{17} 表示Lys, X_{18} 表示Lys, X_{21} 表示Glu, X_{24} 表示Lys或Orn, X_{27} 表示Leu。

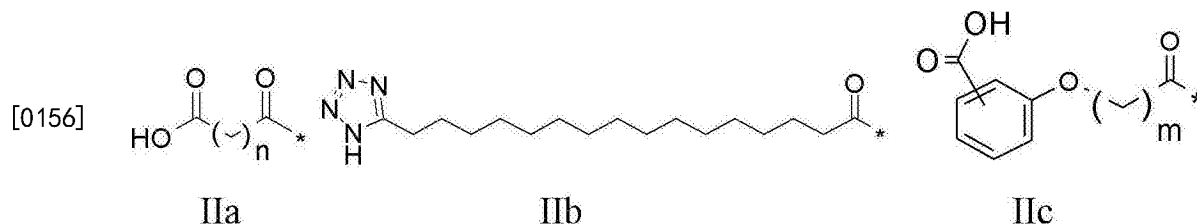
[0066] 15. 前述实施方案中任一个的胰高血糖素肽,其中 X_{17} 表示Lys, X_{18} 表示Lys, X_{21} 表示Glu, X_{27} 表示Leu。

[0067] 16. 前述实施方案中任一个的胰高血糖素肽,其中 X_{17} 表示Lys, X_{21} 表示Glu, X_{27} 表示Leu。

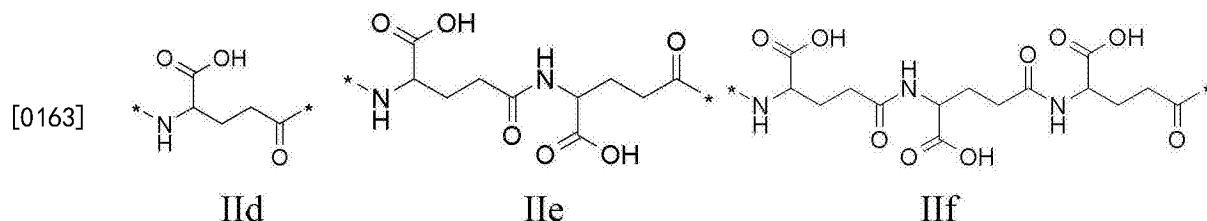
- [0068] 17. 前述实施方案中任一个的胰高血糖素肽, 其中X₁₇表示Lys, X₂₁表示Glu。
- [0069] 18. 前述实施方案中任一个的胰高血糖素肽, 其中X₂表示Aib或D-Ser。
- [0070] 19. 前述实施方案中任一个的胰高血糖素肽, 其中X₄表示D-Phe。
- [0071] 20. 前述实施方案中任一个的胰高血糖素肽, X₉表示Glu。
- [0072] 21. 前述实施方案中任一个的胰高血糖素肽, 其中X₁₀表示Cys、Lys、Orn或(p) Tyr。
- [0073] 22. 前述实施方案中任一个的胰高血糖素肽, 其中X₁₀表示Cys。
- [0074] 23. 前述实施方案中任一个的胰高血糖素肽, 其中X₁₀表示Lys。
- [0075] 24. 前述实施方案中任一个的胰高血糖素肽, 其中X₁₀表示Orn。
- [0076] 25. 前述实施方案中任一个的胰高血糖素肽, 其中X₁₂表示Cys、Lys、Orn、Ile、His、Gln、Tyr、Leu或Arg。
- [0077] 26. 前述实施方案中任一个的胰高血糖素肽, 其中X₁₂表示Arg。
- [0078] 27. 前述实施方案中任一个的胰高血糖素肽, 其中X₁₂表示Cys、Lys或Orn。
- [0079] 28. 前述实施方案中任一个的胰高血糖素肽, 其中X₁₂表示Lys或Orn。
- [0080] 29. 前述实施方案中任一个的胰高血糖素肽, 其中X₁₂表示Cys。
- [0081] 30. 前述实施方案中任一个的胰高血糖素肽, 其中X₁₂表示Lys。
- [0082] 31. 前述实施方案中任一个的胰高血糖素肽, 其中X₁₂表示Orn。
- [0083] 32. 前述实施方案中任一个的胰高血糖素肽, 其中X₁₆表示Cys、Glu、Lys或Orn。
- [0084] 33. 前述实施方案中任一个的胰高血糖素肽, 其中X₁₆表示Cys、Lys或Orn。
- [0085] 34. 前述实施方案中任一个的胰高血糖素肽, 其中X₁₆表示Lys或Orn。
- [0086] 35. 前述实施方案中任一个的胰高血糖素肽, 其中X₁₆表示Lys。
- [0087] 36. 前述实施方案中任一个的胰高血糖素肽, 其中X₁₆表示Cys。
- [0088] 37. 前述实施方案中任一个的胰高血糖素肽, 其中X₁₆表示Orn。
- [0089] 38. 前述实施方案中任一个的胰高血糖素肽, 其中X₁₇表示Cys、Gln、Lys、His或Orn。
- [0090] 39. 前述实施方案中任一个的胰高血糖素肽, 其中X₁₇表示Lys。
- [0091] 40. 前述实施方案中任一个的胰高血糖素肽, 其中X₁₇表示Cys。
- [0092] 41. 前述实施方案中任一个的胰高血糖素肽, 其中X₁₇表示Orn。
- [0093] 42. 前述实施方案中任一个的胰高血糖素肽, 其中X₁₈表示Gln、Ala、Lys、His或Orn。
- [0094] 43. 前述实施方案中任一个的胰高血糖素肽、其中X₂₀表示Cys、Arg、Lys、Glu、His或Orn。
- [0095] 44. 前述实施方案中任一个的胰高血糖素肽, 其中X₂₀表示Lys或Glu。
- [0096] 45. 前述实施方案中任一个的胰高血糖素肽, 其中X₂₀表示Lys。
- [0097] 46. 前述实施方案中任一个的胰高血糖素肽, 其中X₂₀表示Glu。
- [0098] 47. 前述实施方案中任一个的胰高血糖素肽, 其中X₂₀表示Cys。
- [0099] 48. 前述实施方案中任一个的胰高血糖素肽, 其中X₂₀表示Orn。
- [0100] 49. 前述实施方案中任一个的胰高血糖素肽, 其中X₂₁表示Cys、Orn、Glu、Arg、His或Lys。
- [0101] 50. 前述实施方案中任一个的胰高血糖素肽, 其中X₂₁表示Glu或Lys。
- [0102] 51. 前述实施方案中任一个的胰高血糖素肽, 其中X₂₁表示Glu。
- [0103] 52. 前述实施方案中任一个的胰高血糖素肽, 其中X₂₁表示Lys。

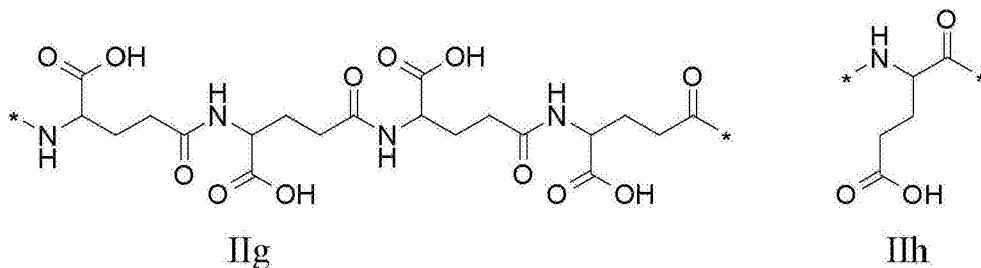
- [0104] 53. 前述实施方案中任一个的胰高血糖素肽, 其中X₂₁表示Cys。
- [0105] 54. 前述实施方案中任一个的胰高血糖素肽, 其中X₂₁表示Orn。
- [0106] 55. 前述实施方案中任一个的胰高血糖素肽, 其中X₂₄表示Cys、Lys、Arg、His、Glu、Asp、Gly、Ser或Orn。
- [0107] 56. 前述实施方案中任一个的胰高血糖素肽, 其中X₂₄表示Cys、Lys或Orn。
- [0108] 57. 前述实施方案中任一个的胰高血糖素肽, 其中X₂₄表示Lys或Orn。
- [0109] 58. 前述实施方案中任一个的胰高血糖素肽, 其中X₂₄表示Lys或His。
- [0110] 59. 前述实施方案中任一个的胰高血糖素肽, 其中X₂₄表示Lys。
- [0111] 60. 前述实施方案中任一个的胰高血糖素肽, 其中X₂₄表示His。
- [0112] 61. 前述实施方案中任一个的胰高血糖素肽, 其中X₂₄表示Cys。
- [0113] 62. 前述实施方案中任一个的胰高血糖素肽, 其中X₂₄表示Orn。
- [0114] 63. 前述实施方案中任一个的胰高血糖素肽, 其中X₂₅表示Arg、Lys、His、Glu、Asp、Gly、Phe、Ser、Tyr、(p) Tyr或Orn。
- [0115] 64. 前述实施方案中任一个的胰高血糖素肽, 其中X₂₅表示His、Lys、Ile、Leu、Ala、Met、Cys、Asn、Val、Ser、Gln、Asp、Glu、Thr或(p) Tyr。
- [0116] 65. 前述实施方案中任一个的胰高血糖素肽, 其中X₂₅表示His、Arg、Lys或(p) Tyr。
- [0117] 66. 前述实施方案中任一个的胰高血糖素肽, 其中X₂₅表示Arg或Lys。
- [0118] 67. 前述实施方案中任一个的胰高血糖素肽, 其中X₂₅表示Arg。
- [0119] 68. 前述实施方案中任一个的胰高血糖素肽, 其中X₂₅表示Lys。
- [0120] 69. 前述实施方案中任一个的胰高血糖素肽, 其中X₂₅表示Cys。
- [0121] 70. 前述实施方案中任一个的胰高血糖素肽, 其中X₂₅表示Orn。
- [0122] 71. 前述实施方案中任一个的胰高血糖素肽, 其中X₂₇表示Cys、Met(O)、Val、Ile、Leu、Arg、His、Lys、Glu、Gln或Orn。
- [0123] 72. 前述实施方案中任一个的胰高血糖素肽, 其中X₂₇表示Leu、Lys、Glu或Gln。
- [0124] 73. 前述实施方案中任一个的胰高血糖素肽, 其中X₂₇表示Leu。
- [0125] 74. 前述实施方案中任一个的胰高血糖素肽, 其中X₂₇表示Lys。
- [0126] 75. 前述实施方案中任一个的胰高血糖素肽, 其中X₂₇表示Glu。
- [0127] 76. 前述实施方案中任一个的胰高血糖素肽, 其中X₂₇表示Gln。
- [0128] 77. 前述实施方案中任一个的胰高血糖素肽, 其中X₂₇表示Cys、Lys或Orn。
- [0129] 78. 前述实施方案中任一个的胰高血糖素肽, 其中X₂₇表示Lys或Orn。
- [0130] 79. 前述实施方案中任一个的胰高血糖素肽, 其中X₂₇表示Cys。
- [0131] 80. 前述实施方案中任一个的胰高血糖素肽, 其中X₂₇表示Orn。
- [0132] 81. 前述实施方案中任一个的胰高血糖素肽, 其中X₂₈表示Cys、Lys、His、Arg、Ser、Thr、Glu、Asp、Ala、Gln或Orn。
- [0133] 82. 前述实施方案中任一个的胰高血糖素肽, 其中X₂₈表示Lys或Ser。
- [0134] 83. 前述实施方案中任一个的胰高血糖素肽, 其中X₂₈表示Cys、Lys或Orn。
- [0135] 84. 前述实施方案中任一个的胰高血糖素肽, 其中X₂₈表示Lys或Orn。
- [0136] 85. 前述实施方案中任一个的胰高血糖素肽, 其中X₂₈表示Cys。
- [0137] 86. 前述实施方案中任一个的胰高血糖素肽, 其中X₂₈表示Orn。

- [0138] 87. 前述实施方案中任一个的胰高血糖素肽,其中X₂₈表示Lys。
- [0139] 88. 前述实施方案中任一个的胰高血糖素肽,其中X₂₉表示Cys、Lys或Orn。
- [0140] 89. 前述实施方案中任一个的胰高血糖素肽,其中X₂₉表示Lys或Orn。
- [0141] 90. 前述实施方案中任一个的胰高血糖素肽,其中X₂₉表示Orn。
- [0142] 91. 前述实施方案中任一个的胰高血糖素肽,其中X₂₉表示Lys或Pro。
- [0143] 92. 前述实施方案中任一个的胰高血糖素肽,其中X₂₉表示Lys。
- [0144] 93. 前述实施方案中任一个的胰高血糖素肽,其中X₃₀不存在或表示Cys、Lys、Arg、Glu、Gly、Pro或Orn。
- [0145] 94. 前述实施方案中任一个的胰高血糖素肽,其中X₃₀不存在或表示Cys、Lys或Orn。
- [0146] 95. 前述实施方案中任一个的胰高血糖素肽,其中X₃₀不存在或表示Lys或Orn。
- [0147] 96. 前述实施方案中任一个的胰高血糖素肽,其中X₃₀不存在或表示Orn。
- [0148] 97. 前述实施方案中任一个的胰高血糖素肽,其中X₃₀不存在或表示Cys。
- [0149] 98. 前述实施方案中任一个的胰高血糖素肽,其中X₃₀不存在或表示Lys或Pro。
- [0150] 99. 前述实施方案中任一个的胰高血糖素肽,其中X₃₀不存在或表示Lys。
- [0151] 100. 前述实施方案中任一个的胰高血糖素肽,其中X₃₀不存在或表示Pro。
- [0152] 101. 前述实施方案中任一个的胰高血糖素肽,其中所述取代基具有下式II:
- [0153] Z₁-Z₂-Z₃-Z₄ [II]
- [0154] 其中,
- [0155] Z₁表示下式IIa、IIb或IIc之一的结构;

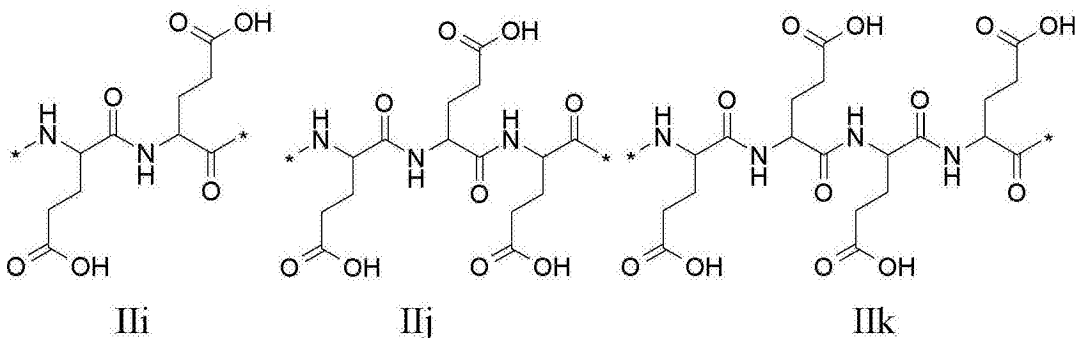


- [0157] 其中式IIa中的n为6-20,
- [0158] 式IIc中的m为5-11,
- [0159] 式IIc的COOH基团可与苯环上的2、3或4位连接,
- [0160] 式IIa、IIb和IIc中的符号*表示与Z₂中氮的连接点;
- [0161] 如果Z₂不存在,则Z₁在符号*处与Z₃上的氮连接,如果Z₂和Z₃不存在,则Z₁在符号*处与Z₄上的氮连接;
- [0162] Z₂不存在或表示下式IIId、IIe、IIIf、IIIf、IIIf、IIIf或IIIf之一的结构;

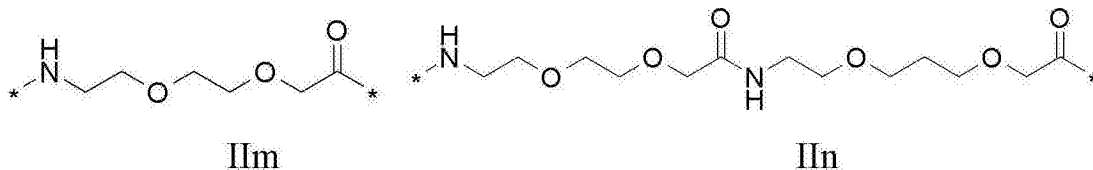




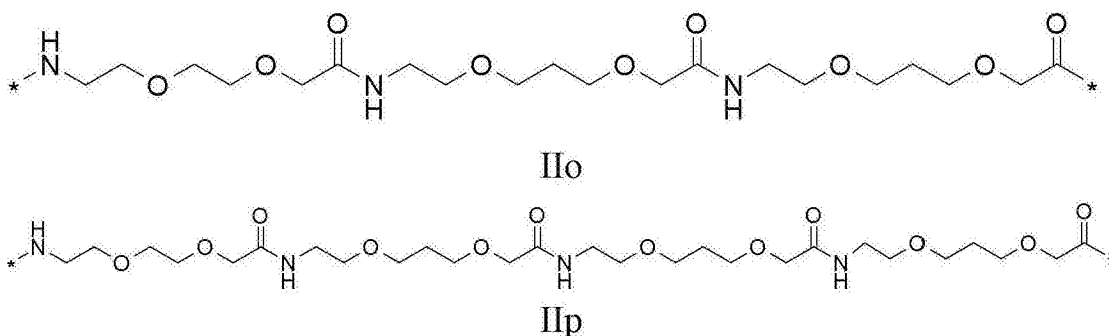
[0164]



[0165] 其中每个氨基酸部分独立地具有立体化学结构L或D;

[0166] 其中Z₂通过标为*的碳原子与标为*的Z₃的氮连接;[0167] 如果Z₃不存在,则Z₂通过标为*的碳原子与标为*的Z₄的氮连接,如果Z₃和Z₄不存在,则Z₂通过标为*的碳与胰高血糖素肽的赖氨酸的ε氮或鸟氨酸的δ氮连接。[0168] Z₃不存在或表示下式IIIm,IIIn,IIo或IIp之一的结构;

[0169]

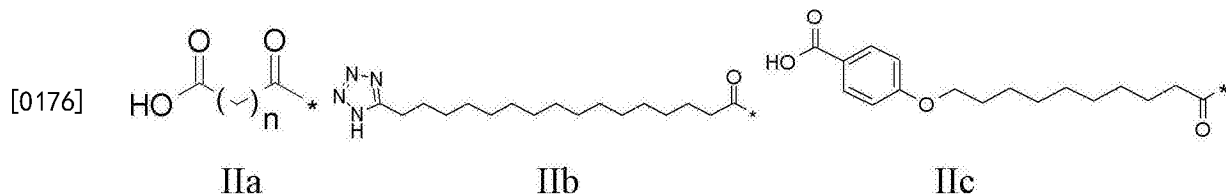
[0170] Z₃通过具有符号*的Z₃的碳与具有符号*的Z₄的氮连接,如果Z₄不存在,则Z₃通过具有符号*的碳与胰高血糖素肽的赖氨酸的ε氮或鸟氨酸的δ氮连接;[0171] Z₄不存在或表示式IIId,IIe,IIIf,IIg,IIh,IIi,IIj或IIk之一的结构;其中每个氨基酸部分独立地为L或D,其中Z₄通过具有符号*的碳与胰高血糖素肽的赖氨酸的ε氮或鸟氨酸的δ氮连接。

[0172] 102. 前述实施方案中任一个的胰高血糖素肽,其中所述取代基具有下式II:

[0173] Z₁-Z₂-Z₃-Z₄- [II]

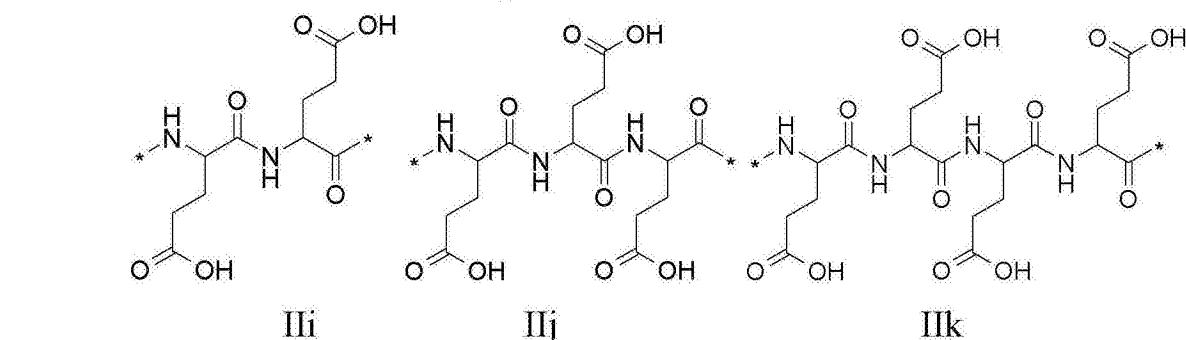
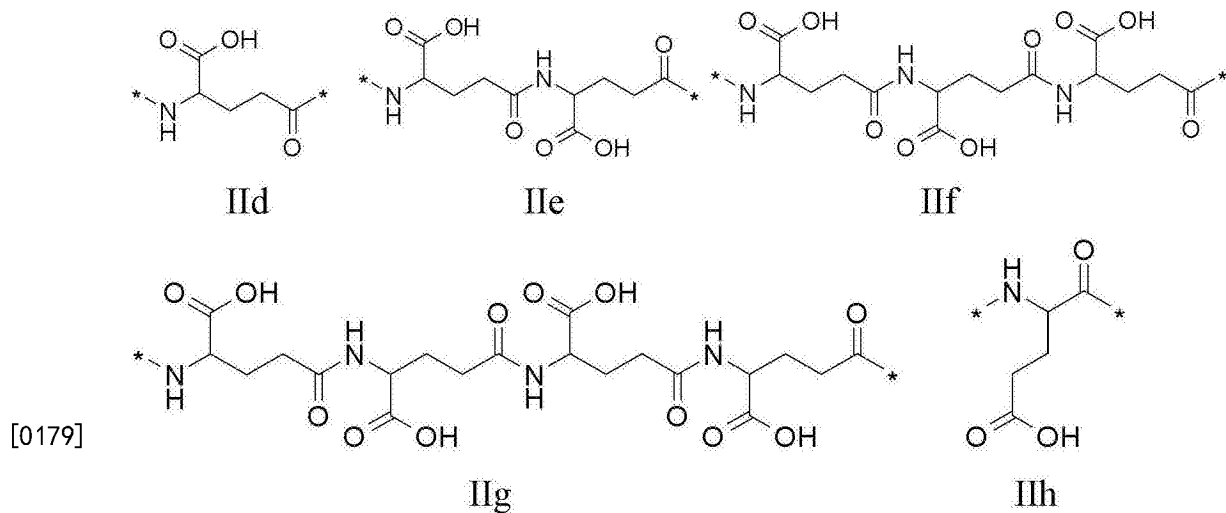
[0174] 其中,

[0175] Z₁表示下式IIa,IIb或IIc之一的结构;



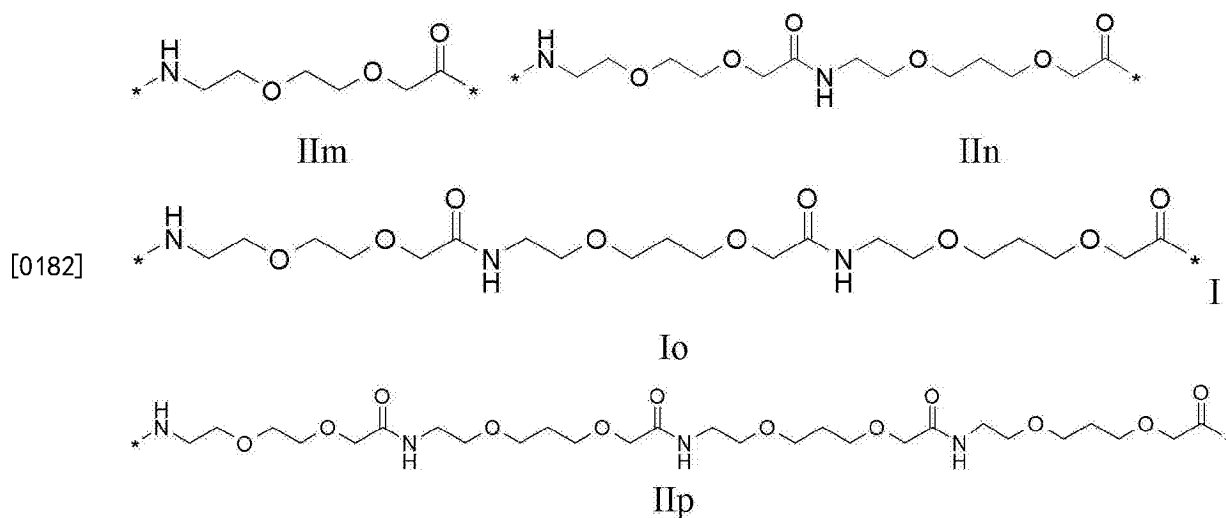
[0177] 其中式IIa中的n为6-20,

[0178] Z₂不存在或表示下式IIId、IIe、IIIf、IIg、IIh、IIi、IIj或IIk之一的结构;



[0180] 其中每个氨基酸部分独立地具有立体化学结构L或D。

[0181] Z₃不存在或表示下式IIIm、IIIn、IIIo或IIIp之一的结构;



[0183] Z₄不存在或表示式IIId、IIe、IIIf、IIg、IIh、IIi、IIj或IIk之一的结构;

[0184] 其中每个氨基酸部分独立地具有立体化学结构L或D。

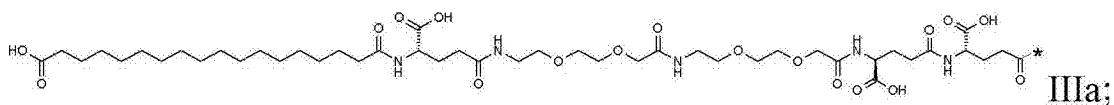
[0185] 103. 前述实施方案中任一个的胰高血糖素肽, 其中式IIa-IIp的结构具有立体化学结构L。

[0186] 104. 前述实施方案中任一个的胰高血糖素肽, 其中式IIa-IIp的结构具有立体化学结构D。

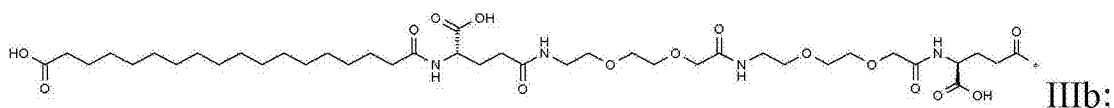
[0187] 105. 前述实施方案中任一个的胰高血糖素肽, 其中当Z₄存在时, 所述式II取代基的Z₂不存在。

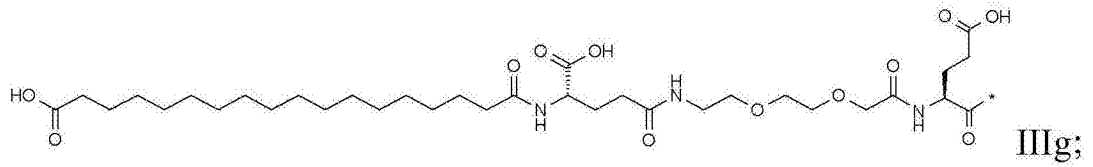
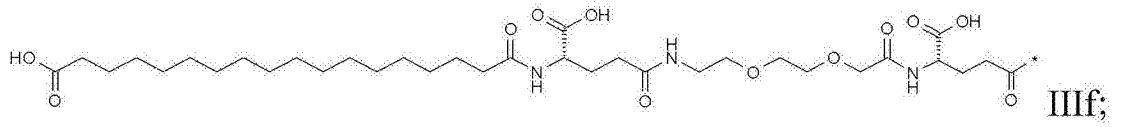
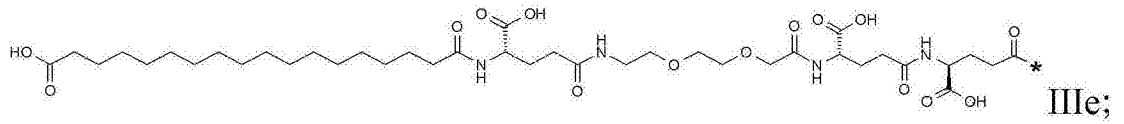
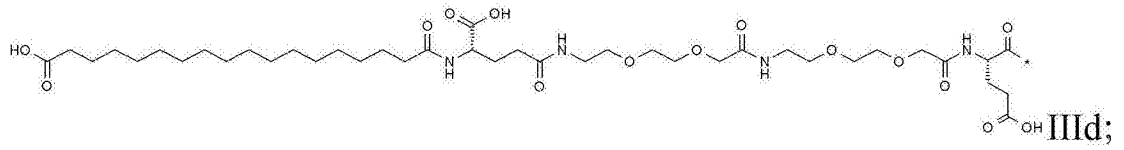
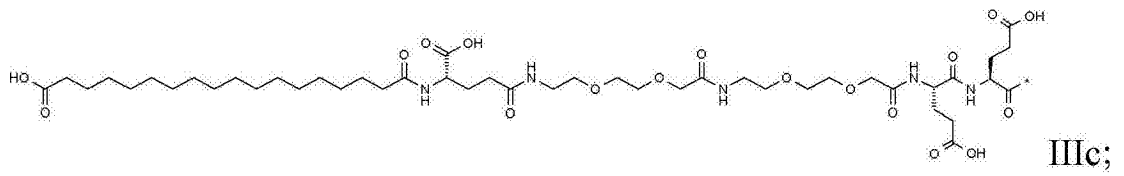
[0188] 106. 前述实施方案中任一个的胰高血糖素肽, 其中当Z₂存在时, 所述式II取代基的Z₄不存在。

[0189] 107. 前述实施方案中任一个的胰高血糖素肽, 其中所述取代基表示下式IIIa、IIIb、IIIc、IIId、IIIe、IIIf、IIIg、IIIh、IIIi、IIIj、IIIk、IIIl、IIIm、IIIIn或IIIo之一的结构:

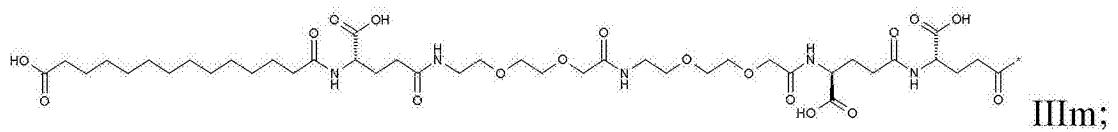
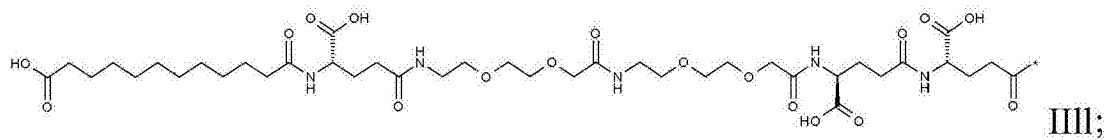
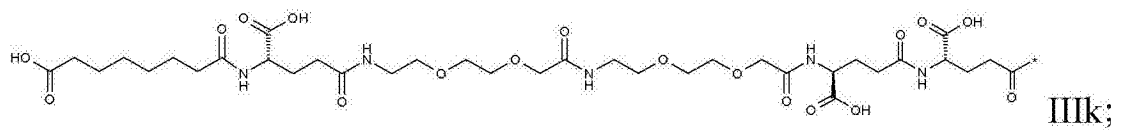
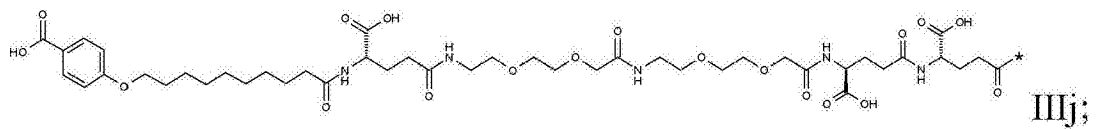
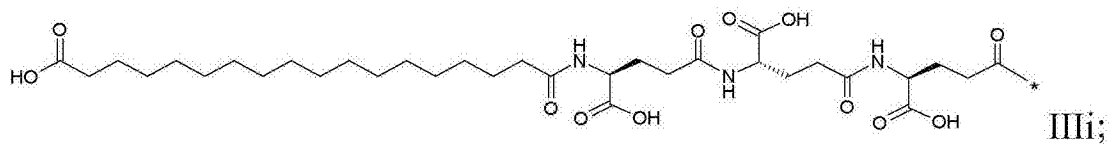
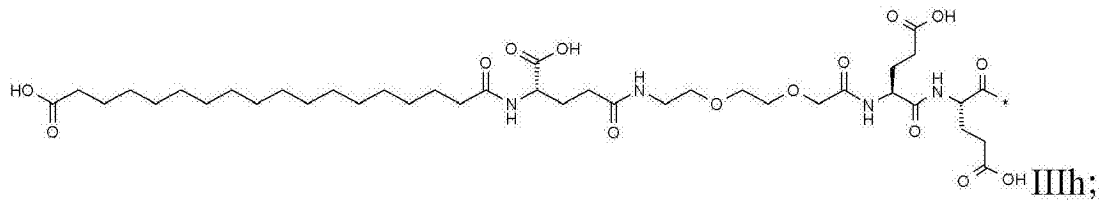


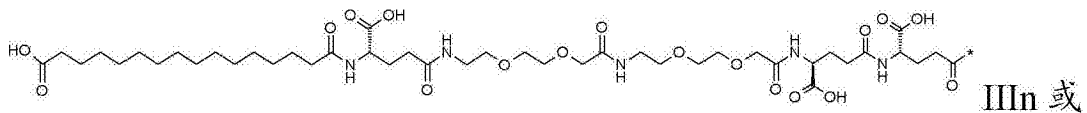
[0190]



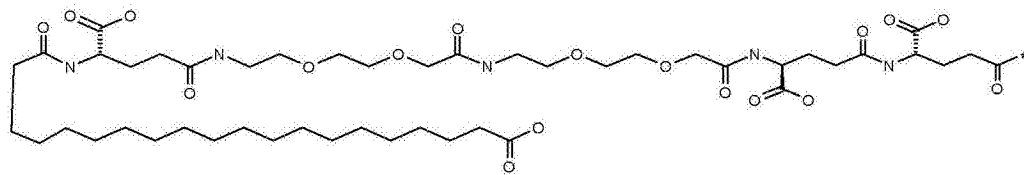


[0191]





[0192]



[0193] 108. 前述实施方案中任一个的胰高血糖素肽, 其中所述取代基的Z₄不存在。

[0194] 109. 前述实施方案中任一个的胰高血糖素肽, 其中所述取代基的Z₃和Z₄不存在。

[0195] 110. 前述实施方案中任一个的胰高血糖素肽, 其中所述取代基的Z₂和Z₄独立地由带负电荷的部分例如 γ Glu、Glu和/或Asp表示。

[0196] 111. 前述实施方案中任一个的胰高血糖素肽, 其中所述取代基的Z₂和Z₄独立地由多达10个所述部分表示。

[0197] 112. 前述实施方案中任一个的胰高血糖素肽, 其中所述取代基的Z₂和Z₄独立地由3个所述部分表示。

[0198] 113. 前述实施方案中任一个的胰高血糖素肽, 其中所述取代基的Z₂和Z₄独立地由4个所述部分表示。

[0199] 114. 前述实施方案中任一个的胰高血糖素肽, 其中所述取代基的Z₂和Z₄独立地由5个所述部分表示。

[0200] 115. 前述实施方案中任一个的胰高血糖素肽, 其中所述取代基的Z₂和Z₄独立地由Glu和/或 γ Glu部分表示。

[0201] 116. 前述实施方案中任一个的胰高血糖素肽, 其中所述取代基的Z₂和Z₄独立地由 γ Glu、 γ Glu-Glu、 γ Glu-Glu-Glu、 γ Glu-Glu-Glu-Glu、 γ Glu-Glu-Glu-Glu-Glu表示。

[0202] 117. 前述实施方案中任一个的胰高血糖素肽, 其中所述取代基的Z₂和Z₄独立地由Glu和/或Asp部分表示。

[0203] 118. 前述实施方案中任一个的胰高血糖素肽, 其中所述取代基的Z₂和Z₄独立地由 γ Glu和/或Asp部分表示。

[0204] 119. 前述实施方案中任一个的胰高血糖素肽, 其中所述取代基的Z₂和Z₄独立地由Asp部分表示。

[0205] 120. 前述实施方案中任一个的胰高血糖素肽, 其中所述取代基的Z₂和Z₄独立地由Asp、Asp-Asp、Asp-Asp-Asp或Asp-Asp-Asp-Asp表示。

[0206] 121. 前述实施方案中任一个的胰高血糖素肽, 其中所述取代基的Z₂和Z₄独立地由Glu部分表示。

[0207] 122. 前述实施方案中任一个的胰高血糖素肽, 其中所述取代基的Z₂和Z₄独立地由Glu、Glu-Glu、Glu-Glu-Glu、Glu-Glu-Glu-Glu、Glu-Glu-Glu-Glu-Glu表示。

[0208] 123. 前述实施方案中任一个的胰高血糖素肽, 其中所述取代基的Z₂和Z₄独立地由 γ Glu部分表示。

[0209] 124. 前述实施方案中任一个的胰高血糖素肽, 其中所述取代基的Z₂和Z₄独立地由 γ Glu、 γ Glu- γ Glu、 γ Glu- γ Glu- γ Glu、 γ Glu- γ Glu- γ Glu- γ Glu、 γ Glu- γ Glu- γ

Glu- γ Glu- γ Glu表示。

[0210] 125. 前述实施方案中任一个的胰高血糖素肽, 其中所述取代基包含亲脂残基。

[0211] 126. 前述实施方案中任一个的胰高血糖素肽, 其中所述取代基包含直链烷基或支链烷基。

[0212] 127. 前述实施方案中任一个的胰高血糖素肽, 其中所述取代基与白蛋白非共价结合。

[0213] 128. 前述实施方案中任一个的胰高血糖素肽, 其中所述取代基在生理pH下带有负电荷。

[0214] 本发明的其它实施方案涉及:

[0215] 129. 前述实施方案中任一个的胰高血糖素肽, 其中所述取代基在Lys的 ϵ 位上或在Orn的 δ 位上或在Cys的硫上连接。

[0216] 130. 前述实施方案中任一个的胰高血糖素肽, 其中所述取代基在Lys的 ϵ 位上或在Orn的 δ 位上连接。

[0217] 131. 前述实施方案中任一个的胰高血糖素肽, 其中所述取代基在Lys的 ϵ 位上连接。

[0218] 132. 前述实施方案中任一个的胰高血糖素肽, 其中所述取代基在Orn的 δ 位上连接。

[0219] 133. 前述实施方案中任一个的胰高血糖素肽, 其中所述取代基在Cys的硫位置上连接。

[0220] 134. 前述实施方案中任一个的胰高血糖素肽, 其中所述取代基在所述胰高血糖素肽的一个或多个下列氨基酸位置上连接: X₁₀、X₁₂、X₁₆、X₁₇、X₁₈、X₂₀、X₂₁、X₂₄、X₂₅、X₂₇、X₂₈、X₂₉和/或X₃₀。

[0221] 135. 前述实施方案中任一个的胰高血糖素肽, 其中所述取代基位于所述胰高血糖素肽的一个或多个下列氨基酸位置上: X₁₂、X₁₆、X₂₀、X₂₄、X₂₅、X₂₈、X₂₉和/或X₃₀。

[0222] 136. 前述实施方案中任一个的胰高血糖素肽, 其中所述取代基位于所述胰高血糖素肽的一个或多个下列氨基酸位置上: X₁₆、X₂₄和/或X₂₈。

[0223] 137. 前述实施方案中任一个的胰高血糖素肽, 其中所述取代基位于所述胰高血糖素肽的氨基酸位置X₁₂上。

[0224] 138. 前述实施方案中任一个的胰高血糖素肽, 其中所述取代基位于所述胰高血糖素肽的氨基酸位置X₁₆上。

[0225] 139. 前述实施方案中任一个的胰高血糖素肽, 其中所述取代基位于所述胰高血糖素肽的氨基酸位置X₂₀上。

[0226] 140. 前述实施方案中任一个的胰高血糖素肽, 其中所述取代基位于所述胰高血糖素肽的氨基酸位置X₂₄上。

[0227] 141. 前述实施方案中任一个的胰高血糖素肽, 其中所述取代基位于所述胰高血糖素肽的氨基酸位置X₂₈上。

[0228] 142. 前述实施方案中任一个的胰高血糖素肽, 其中所述取代基位于所述胰高血糖素肽的氨基酸位置X₂₉上。

[0229] 143. 前述实施方案中任一个的胰高血糖素肽, 其中所述取代基位于所述胰高血糖

素肽的氨基酸位置X₃₀上。

[0230] 144. 前述实施方案中任一个的胰高血糖素肽, 其中所述取代基位于所述胰高血糖素肽的至多5个氨基酸位置上。

[0231] 145. 前述实施方案中任一个的胰高血糖素肽, 其中所述取代基位于所述胰高血糖素肽的至多4个氨基酸位置上。

[0232] 146. 前述实施方案中任一个的胰高血糖素肽, 其中所述取代基位于所述胰高血糖素肽的至多3个氨基酸位置上。

[0233] 147. 前述实施方案中任一个的胰高血糖素肽, 其中所述取代基位于所述胰高血糖素肽的至多2个氨基酸位置上。

[0234] 148. 前述实施方案中任一个的胰高血糖素肽, 其中所述取代基位于所述胰高血糖素肽的1个氨基酸位置上。

[0235] 本发明的其它实施方案涉及:

[0236] 本发明涉及溶解度改进、针对凝胶和原纤维形成的物理稳定性改进且半寿期延长的新的胰高血糖素类似物。

[0237] 本发明人发现本发明的化合物具有延长的半寿期, 并且它们具有改进的药代动力学性质, 即它们具有延长的体内暴露。此外, 当皮下给予时, 本发明的化合物显示在食物摄取方面显著的降低, 其长期作用长达48小时。就我们所知, 首次表明长效胰高血糖素类似物减少食物摄取。

[0238] 本发明的化合物的长期作用意味着它们发挥生物活性的时间期限延长。如果在“测定法IV”中与在相同时间内溶媒治疗的动物对照组的食物摄取相比, 化合物在24小时至48小时的时间内显著降低试验动物的食物摄取, 则作用定义为长期。可通过不同的结合测定法来评价长期作用, 例如可在间接白蛋白结合测定法中评价长期作用, 其中在卵清蛋白存在下针对结合而测定的K_i与在人血清白蛋白(HSA)存在下测定的EC₅₀值进行比较。

[0239] 本发明人意想不到地发现, 本发明的化合物显示在中性pH或略碱性pH下水溶性改进。此外, 本发明人还意想不到地发现, 本发明的胰高血糖素类似物针对水溶液中凝胶和原纤维的形成具有改进的稳定性。本发明化合物的稳定性可通过实施例63所述方法测量。

[0240] 可通过与已知的抗糖尿病药例如胰岛素、GLP-1激动剂和GIP一起共同给予胰高血糖素, 来实现对1型和2型糖尿病的血糖水平的更好控制。当给予单剂量时, 本发明的胰高血糖素类似物在大鼠中具有食欲减退作用, 观察到第2天的作用至少与给药当天的作用一样好, 清楚表明这些类似物的长期作用。此外, 当给予饮食诱导性肥胖大鼠时, 本发明的化合物引起体重高度减轻。通过与长效GLP-1类似物一起共同给予, 可达到甚至更显著的体重减轻, 这又导致了对血糖的更好控制。

[0241] 在一个实施方案中, 本发明的胰高血糖素类似物可与GLP-1类似物或胰岛素类似物联合配制, 形成稳定的药物组合物。

[0242] 与仅胰岛素的疗法相比, 胰岛素和胰高血糖素疗法的组合可能是有利的。通常, 在餐后情况下, 当血糖水平变低时, 第一激素反应是胰岛素产生降低。当血糖进一步下降时, 二线反应是产生胰高血糖素——导致葡萄糖从肝脏的输出增加。当糖尿病患者接受太高的外源剂量的胰岛素时, 胰高血糖素升高的天然反应便被外源胰岛素存在所抑制, 因为胰岛素对胰高血糖素产生具有抑制作用。因此, 略微过量给予胰岛素可引起低血糖。目前, 许多

糖尿病患者因担心可能是危及生命的低血糖事件,而往往较喜欢使用稍低于最适的胰岛素。

[0243] 本发明的化合物在中性pH下可溶解的事实,可允许与胰岛素一起联合配制,且使得血糖水平更稳定,使低血糖事件次数减少,以及使糖尿病相关并发症的风险降低。

[0244] 本发明的其它实施方案涉及分子内桥接:

[0245] 149.实施方案1-148中任一个的胰高血糖素肽,其还包含Xi位上的氨基酸和Xi+4位上的氨基酸的侧链之间的分子内桥接。

[0246] 150.实施方案149中任一个的胰高血糖素肽,其中Xi位上的氨基酸和Xi+4位上的氨基酸通过内酰胺桥或盐桥连接。

[0247] 151.实施方案149中任一个的胰高血糖素肽,其中Xi位上的氨基酸和Xi+4位上的氨基酸通过内酰胺桥连接。

[0248] 152.实施方案149的胰高血糖素肽,其中Xi位上的氨基酸和Xi+4位上的氨基酸通过盐桥连接。

[0249] 153.实施方案149-152的胰高血糖素肽,其中Xi选自位置X₁₂、X₁₆、X₁₇、X₂₀或X₂₄。

[0250] 154.实施方案149-153中任一个的胰高血糖素肽,其中所述分子内桥接位于17位上的氨基酸和21位上的氨基酸的侧链之间。

[0251] 155.实施方案149-154中任一个的胰高血糖素肽,其中所述胰高血糖素肽的X₁₆、X₁₇、X₂₀、X₂₁或X₂₄位的1、2、3或更多个被 α 氨基酸和/或 α -二取代氨基酸取代。

[0252] 156.前述实施方案中任一个的胰高血糖素肽,其中X₁₆表示Glu, X₂₀表示Lys。

[0253] 157.前述实施方案中任一个的胰高血糖素肽,其中所述胰高血糖素肽包含至多3个氨基酸残基的C端突出端。

[0254] 158.前述实施方案中任一个的胰高血糖素肽,其中所述胰高血糖素肽包含至多2个氨基酸残基的C端突出端。

[0255] 159.前述实施方案中任一个的胰高血糖素肽,其中所述胰高血糖素肽包含1个氨基酸残基的C端突出端。

[0256] 160.前述实施方案中任一个的胰高血糖素肽,其中所述胰高血糖素肽是C端酰胺或C端羧酸。

[0257] 161.前述实施方案中任一个的胰高血糖素肽,其中所述胰高血糖素肽是C端酰胺。

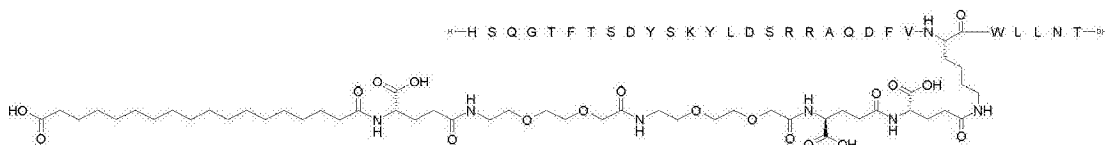
[0258] 162.前述实施方案中任一个的胰高血糖素肽,其中所述胰高血糖素肽是C端羧酸。

[0259] 163.前述实施方案中任一个的胰高血糖素肽,其中所述胰高血糖素肽选自胰高血糖素(1-29)、胰高血糖素(1-29)-酰胺或其类似物。

[0260] 164.前述实施方案中任一个的胰高血糖素肽,选自:

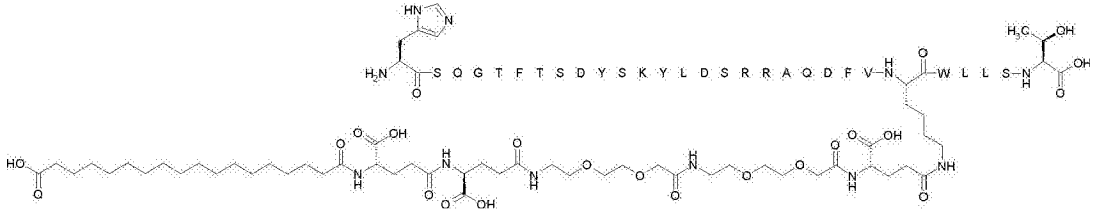
[0261] N^{c24}-([(4S)-5-羟基-4-[[(4S)-5-羟基-4-[[2-[2-[2-[2-[2-[2-[[(4S)-5-羟基-4-[(18-羟基-18-氧代十八烷酰基)氨基]-5-氧代戊酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基]氨基]-5-氧代戊酰基]氨基)-5-氧代戊酰基)) [Lys²⁴, Leu²⁷]胰高血糖素

[0262]



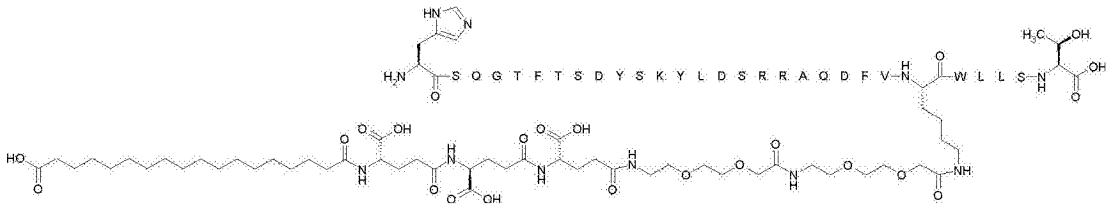
[0273] N^{e24}-[(4S)-4-羧基-4-[[2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[[(4S)-4-羧基-4-[[[(4S)-4-羧基-4-(17-羧基十七烷酰基氨基)丁酰基]氨基]丁酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基]氨基]丁酰基]-[Lys²⁴,Leu²⁷,Ser²⁸]-胰高血糖素

[0274]



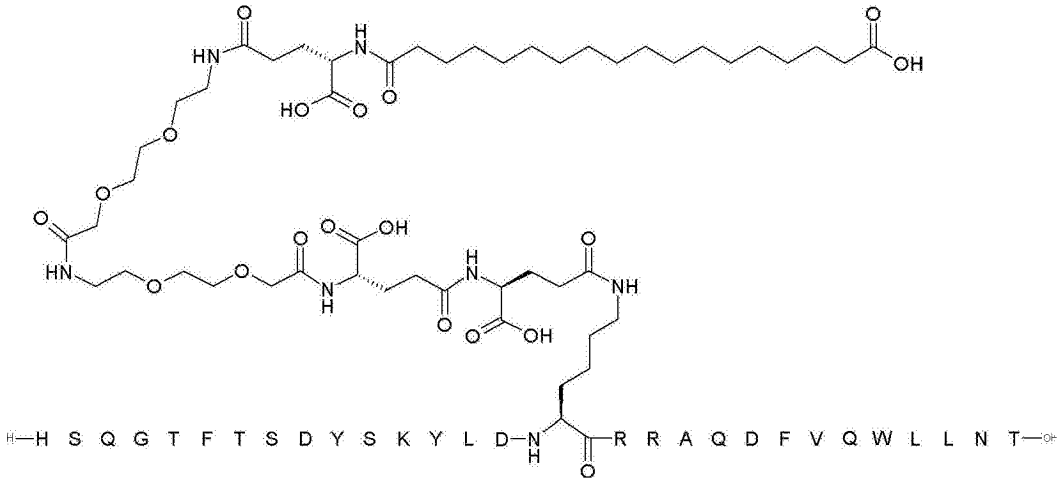
[0275] N^{e24}-[2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[[(4S)-4-羧基-4-[[[(4S)-4-羧基-4-[[[(4S)-4-羧基-4-(17-羧基十七烷酰基氨基)丁酰基]氨基]丁酰基]氨基]丁酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基]-[Lys²⁴,Leu²⁷,Ser²⁸]-胰高血糖素

[0276]



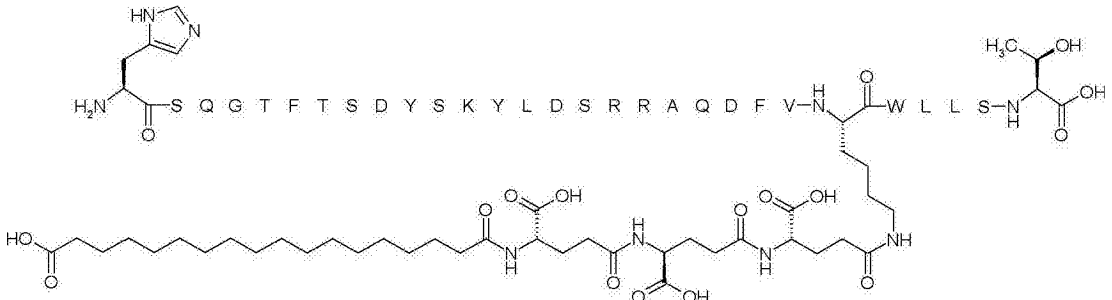
[0277] N^{e16}-[(4S)-4-羧基-4-[[[(4S)-4-羧基-4-[[2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[[(4S)-4-羧基-4-(17-羧基十七烷酰基氨基)丁酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基]氨基]丁酰基]氨基]丁酰基]-[Lys¹⁶,Leu²⁷]-胰高血糖素

[0278]



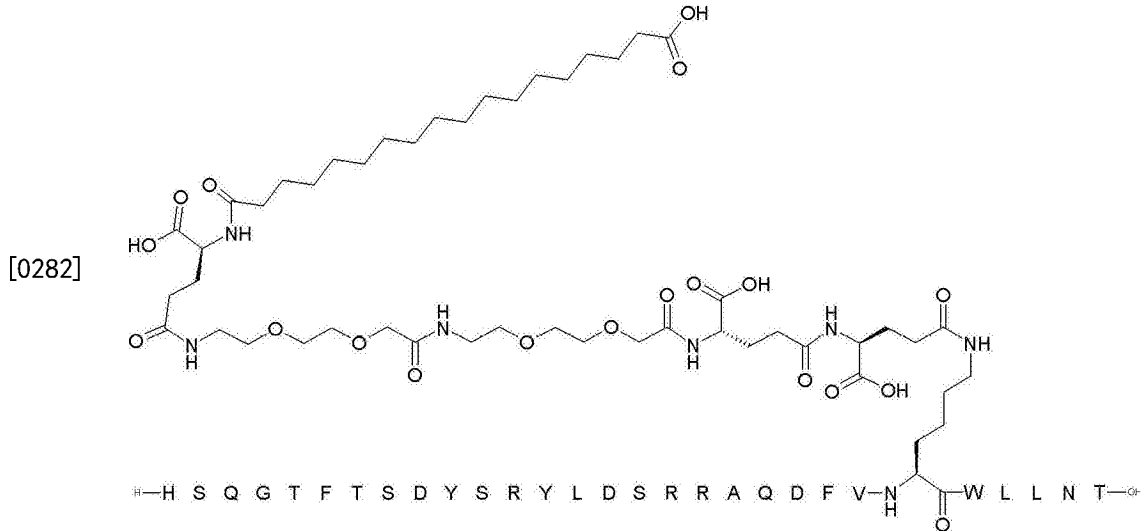
[0279] N^{e24}-[(4S)-4-羧基-4-[[[(4S)-4-羧基-4-[[[(4S)-4-羧基-4-(17-羧基十七烷酰基氨基)丁酰基]氨基]丁酰基]氨基]丁酰基]-[Lys²⁴,Leu²⁷,Ser²⁸]-胰高血糖素

[0280]

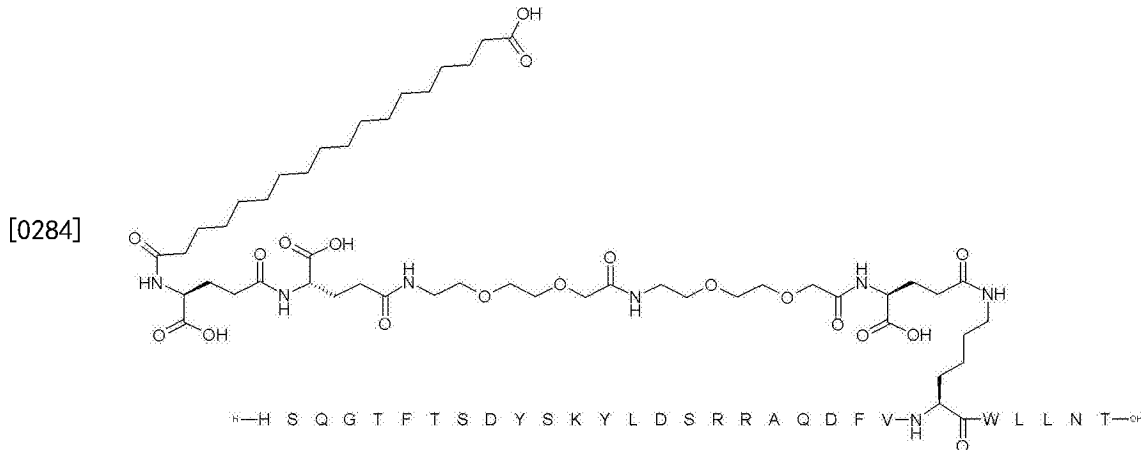


[0281] N^{e24}-[(4S)-4-羧基-4-[[[(4S)-4-羧基-4-[[2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[[(4S)-4-羧基-4-(17-羧基十七烷酰基氨基)丁酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]

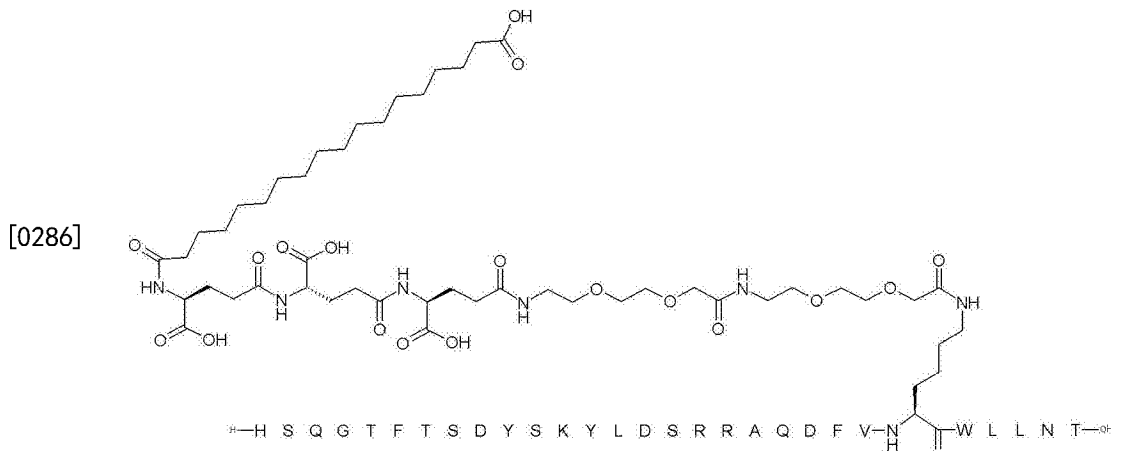
乙酰基]氨基]丁酰基]氨基]丁酰基]-[Arg¹²,Lys²⁴,Leu²⁷]-胰高血糖素



[0283] N^{ε24}-[(4S)-4-羧基-4-[[2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[[(4S)-4-羧基-4-[[[(4S)-4-羧基-4-(17-羧基十七烷酰基氨基)丁酰基]氨基]丁酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基]氨基]丁酰基]-[Lys²⁴,Leu²⁷]-胰高血糖素



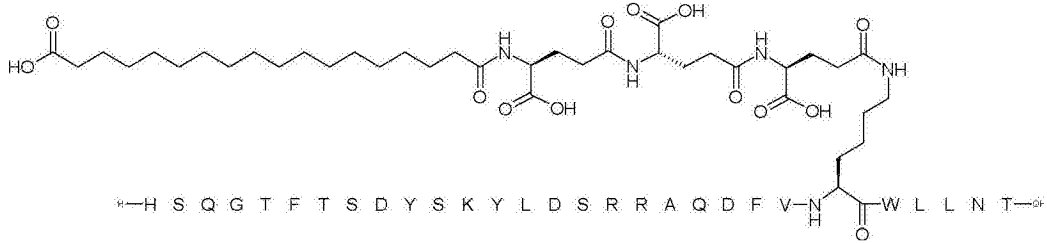
[0285] N^{ε24}-[2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[[(4S)-4-羧基-4-[[[(4S)-4-羧基-4-[[[(4S)-4-羧基-4-(17-羧基十七烷酰基氨基)丁酰基]氨基]丁酰基]氨基]丁酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基]-[Lys²⁴,Leu²⁷]-胰高血糖素



[0287] N^{ε24}-[(4S)-4-羧基-4-[[[(4S)-4-羧基-4-[[[(4S)-4-羧基-4-(17-羧基十七烷酰基

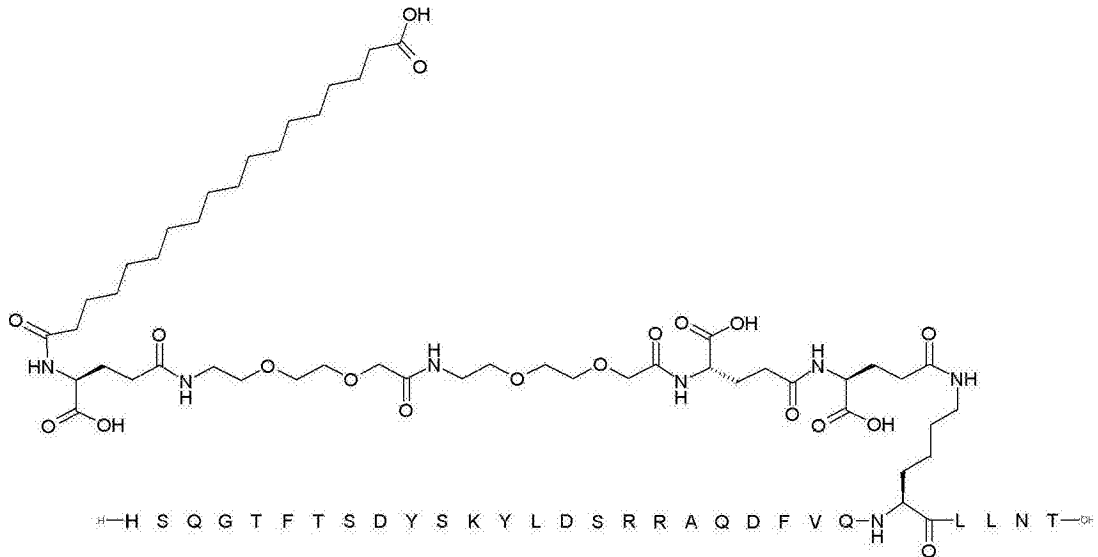
氨基)丁酰基]氨基)丁酰基]氨基)丁酰基]-[Lys²⁴,Leu²⁷]-胰高血糖素

[0288]



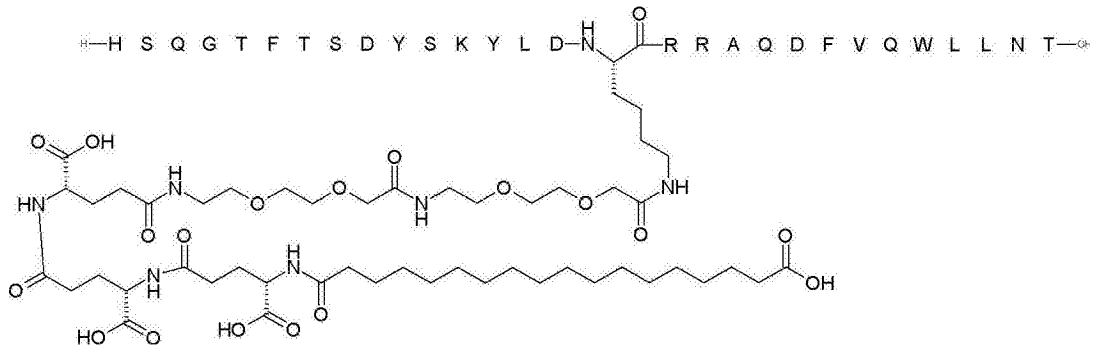
[0289] N^ε²⁵-[(4S)-4-羧基-4-[[[(4S)-4-羧基-4-[[2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[[(4S)-4-羧基-4-(17-羧基十七烷酰基氨基)丁酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基]氨基]丁酰基]氨基]丁酰基]-[Lys²⁵,Leu²⁷]-胰高血糖素

[0290]

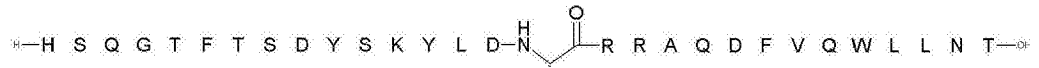


[0291] N^ε¹⁶-[2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[[(4S)-4-羧基-4-[[[(4S)-4-羧基-4-[[[(4S)-4-羧基-4-(17-羧基十七烷酰基氨基)丁酰基]氨基]丁酰基]氨基]丁酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基]-[Lys¹⁶,Leu²⁷]-胰高血糖素

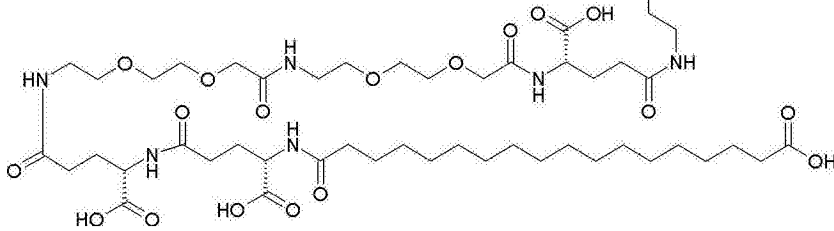
[0292]



[0293] N^ε¹⁶-[(4S)-4-羧基-4-[[2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[[(4S)-4-羧基-4-[[[(4S)-4-羧基-4-(17-羧基十七烷酰基氨基)丁酰基]氨基]丁酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基]氨基]丁酰基]-[Lys¹⁶,Leu²⁷]-胰高血糖素



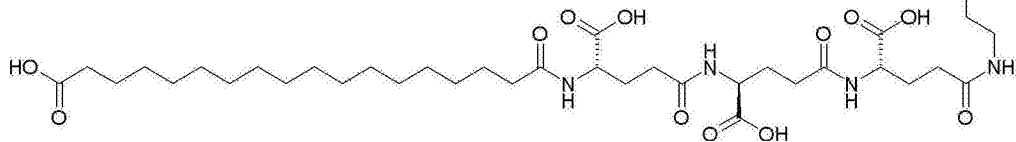
[0294]



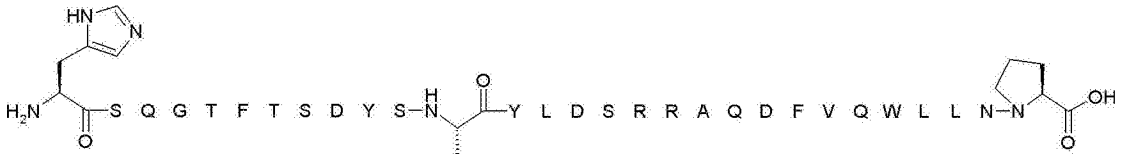
[0295] $\text{N}^{\epsilon 28}$ -[(4S)-4-羧基-4-[[[(4S)-4-羧基-4-[[[(4S)-4-羧基-4-(17-羧基十七烷酰基氨基)丁酰基]氨基]丁酰基]氨基]丁酰基]-[Leu²⁷,Lys²⁸]-胰高血糖素



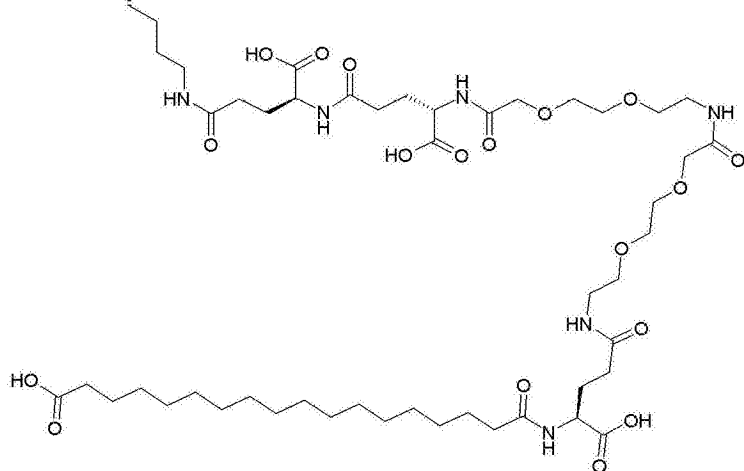
[0296]



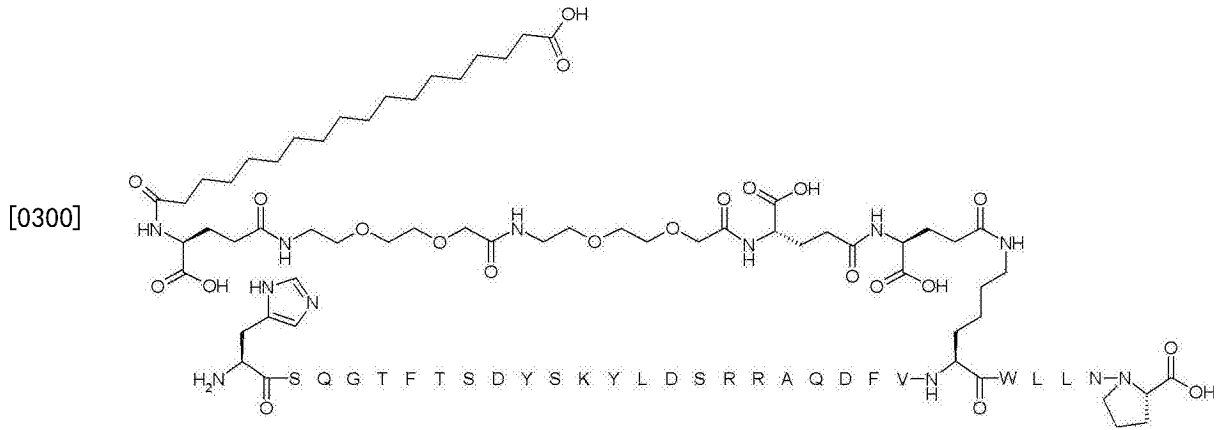
[0297] $\text{N}^{\epsilon 12}$ -[(4S)-4-羧基-4-[[[(4S)-4-羧基-4-[[2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[[(4S)-4-羧基-4-(17-羧基十七烷酰基氨基)丁酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基]氨基]丁酰基]氨基]丁酰基]-[Leu²⁷,Pro²⁹]-胰高血糖素



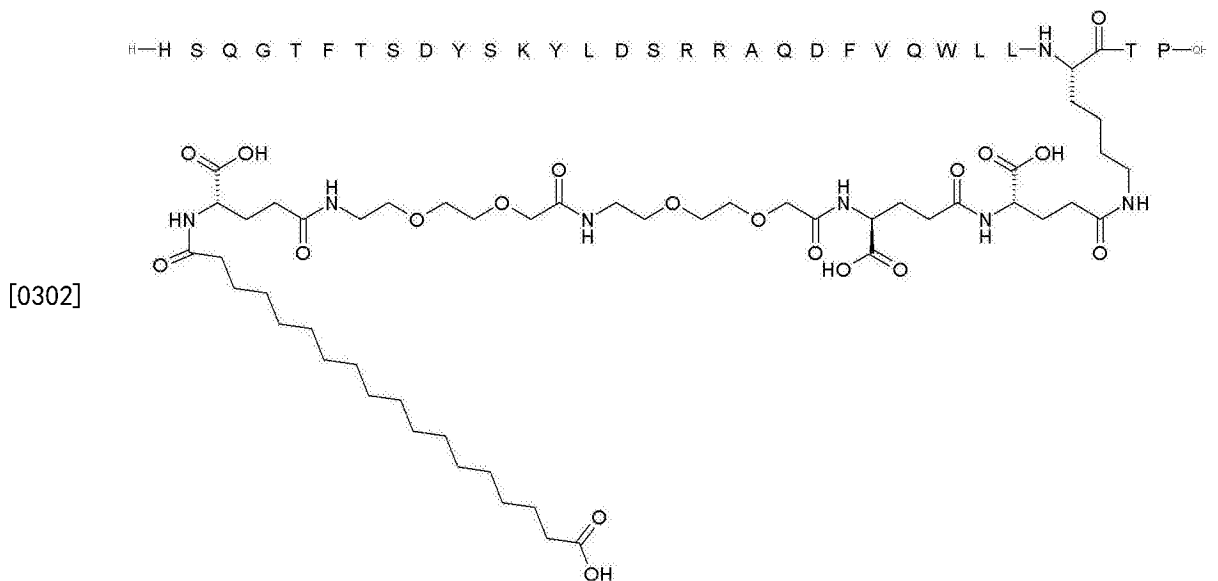
[0298]



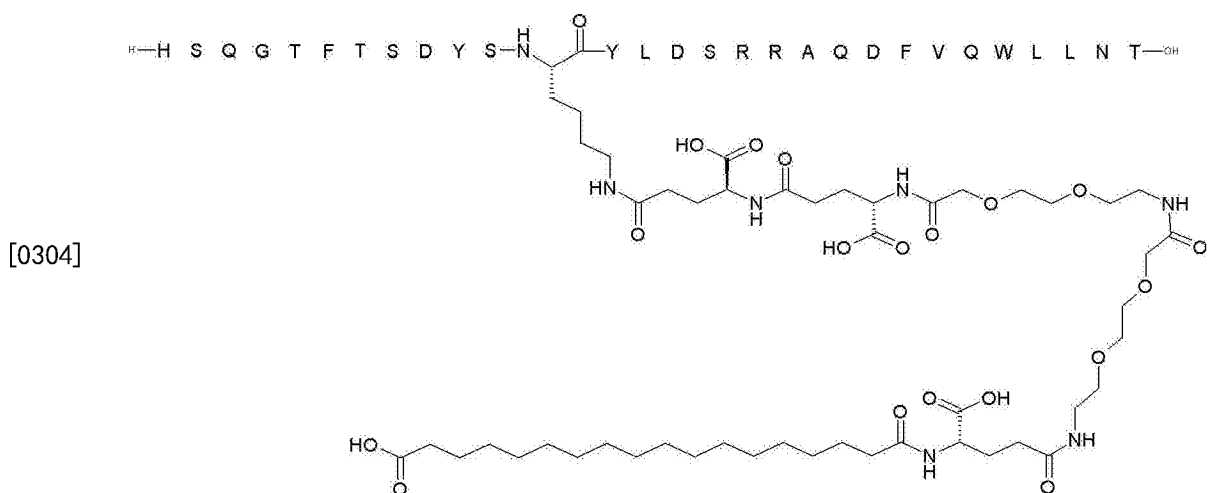
[0299] $\text{N}^{\epsilon 24}$ -[(4S)-4-羧基-4-[[[(4S)-4-羧基-4-[[2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[[(4S)-4-羧基-4-(17-羧基十七烷酰基氨基)丁酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基]氨基]丁酰基]氨基]丁酰基]-[Lys²⁴,Leu²⁷,Pro²⁹]-胰高血糖素



[0301] N^{e28}-[(4S)-4-羧基-4-[[[(4S)-4-羧基-4-[[2-[2-[2-[2-[2-[2-[[[(4S)-4-羧基-4-(17-羧基十七烷酰基氨基)丁酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基]氨基]丁酰基]氨基]丁酰基]-[Leu²⁷,Lys²⁸]-胰高血糖素基-Pro

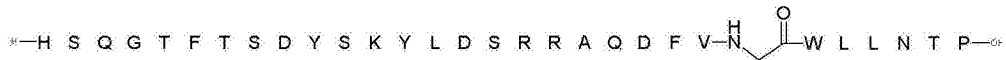


[0303] N^{e12}-[(4S)-4-羧基-4-[[[(4S)-4-羧基-4-[[2-[2-[2-[2-[2-[2-[[[(4S)-4-羧基-4-(17-羧基十七烷酰基氨基)丁酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基]氨基]丁酰基]氨基]丁酰基]-[Leu²⁷]-胰高血糖素

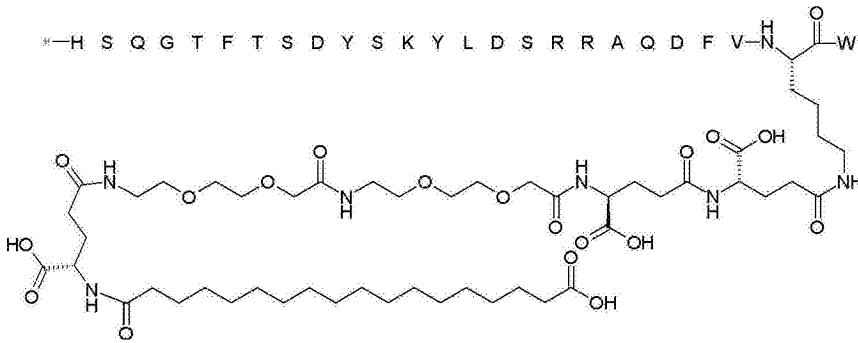


[0305] N^{e24}-[(4S)-4-羧基-4-[[[(4S)-4-羧基-4-[[2-[2-[2-[2-[2-[2-[[[(4S)-4-羧基-

4-(17-羧基十七烷酰基氨基)丁酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基]氨基]丁酰基]氨基]丁酰基]-[Lys²⁴,Leu²⁷]-胰高血糖素基-Pro

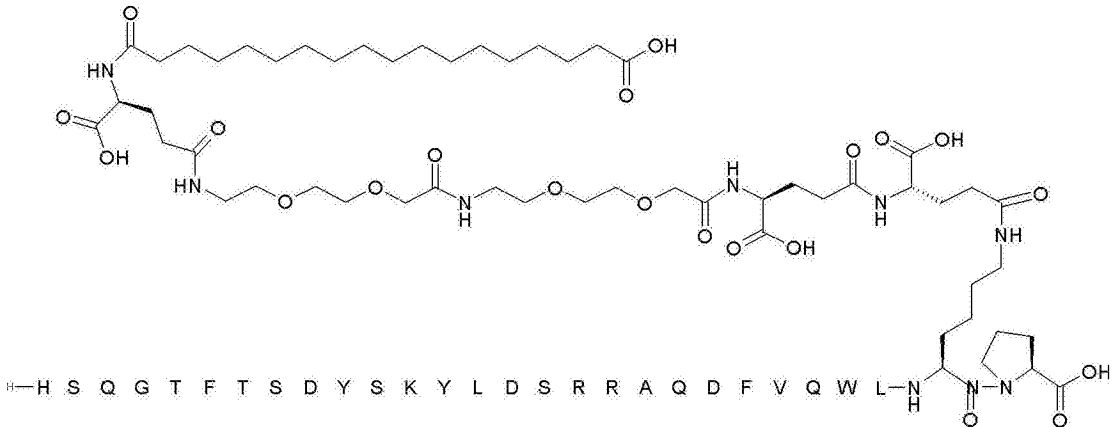


[0306]



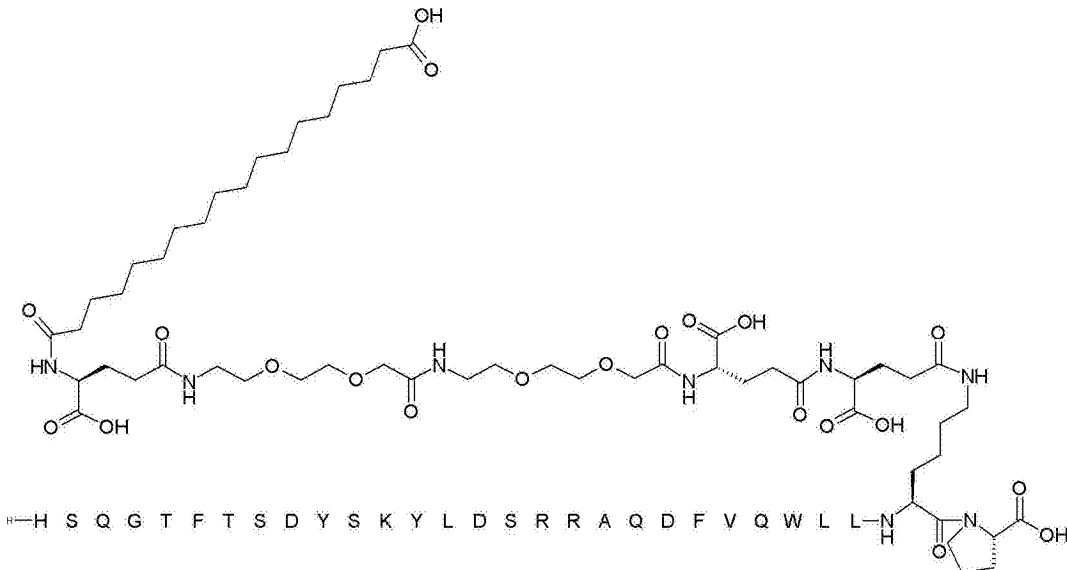
[0307] N^{ε27}-[(4S)-4-羧基-4-[[[(4S)-4-羧基-4-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[[(4S)-4-羧基-4-(17-羧基十七烷酰基氨基)丁酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基]氨基]丁酰基]氨基]丁酰基]-[Lys²⁷,Pro²⁹]-胰高血糖素

[0308]

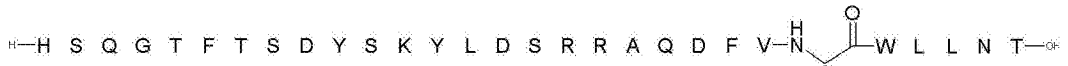


[0309] N^{ε28}-[(4S)-4-羧基-4-[[[(4S)-4-羧基-4-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[[(4S)-4-羧基-4-(17-羧基十七烷酰基氨基)丁酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基]氨基]丁酰基]氨基]丁酰基]-[Leu²⁷,Lys²⁸,Pro²⁹]-胰高血糖素

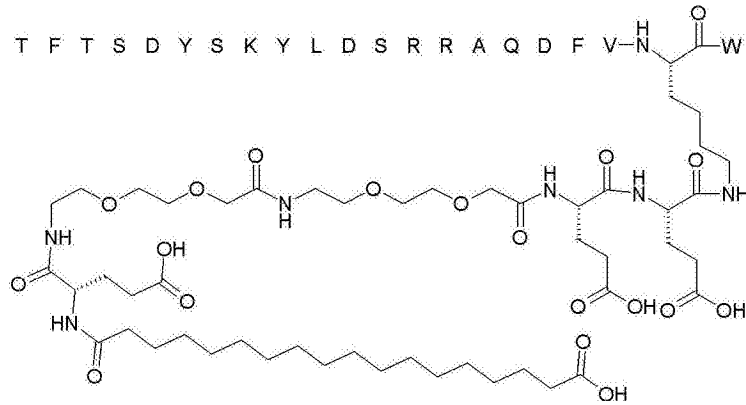
[0310]



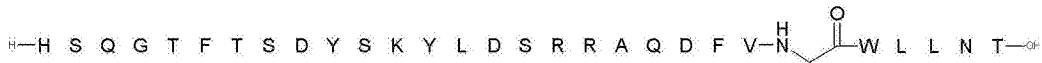
[0311] N^{ε27}-[(4S)-4-羧基-4-[[[(4S)-4-羧基-4-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[[(4S)-4-羧基-4-(17-羧基十七烷酰基氨基)丁酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基]氨基]丁酰基]氨基]丁酰基]-[Lys²⁷,Pro²⁹]-胰高血糖素



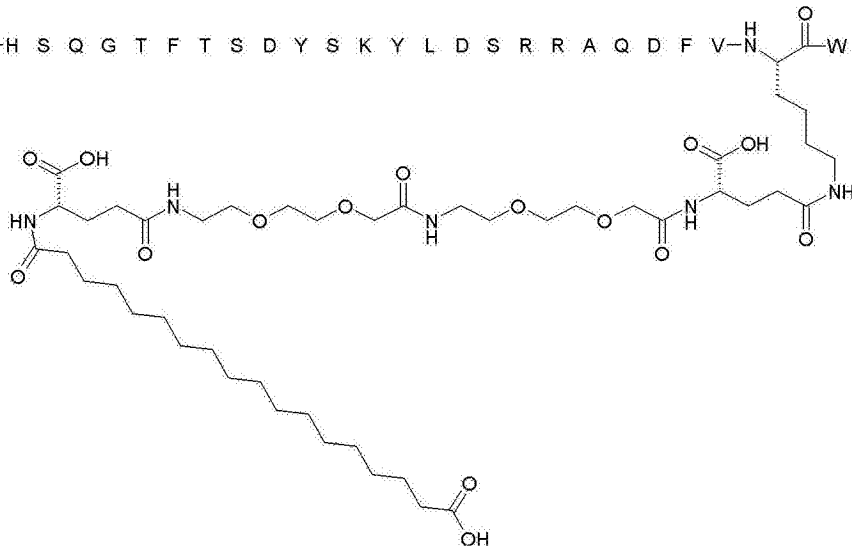
[0316]



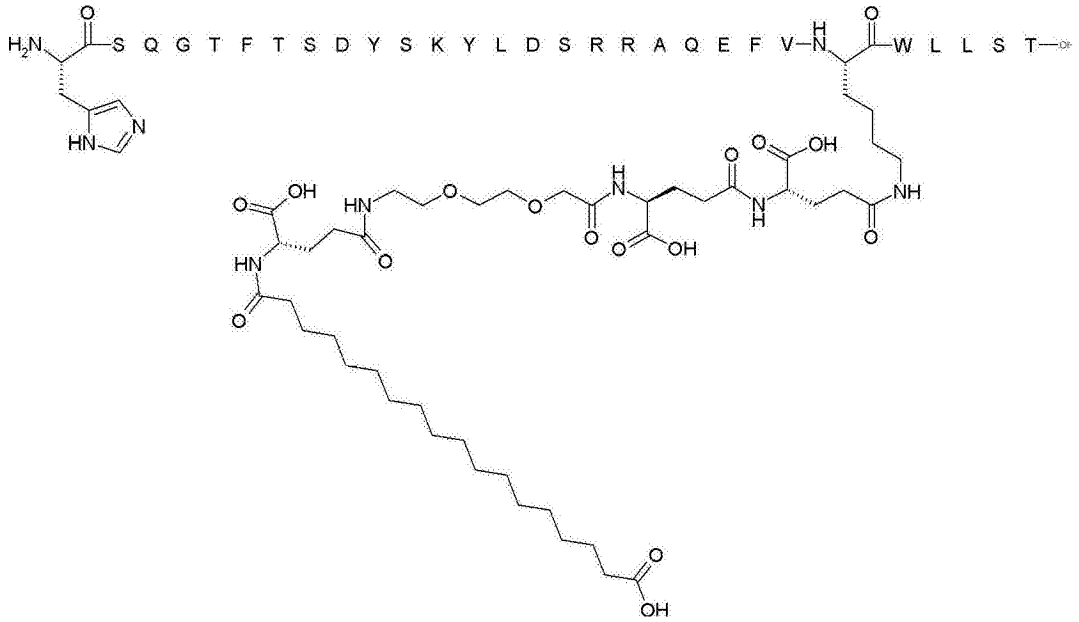
[0317] N^{e24}-[(4S)-4-羧基-4-[[2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[[(4S)-4-羧基-4-(17-羧基十七烷酰基氨基)丁酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基]氨基]丁酰基]-[Lys²⁴,Leu²⁷]-胰高血糖素



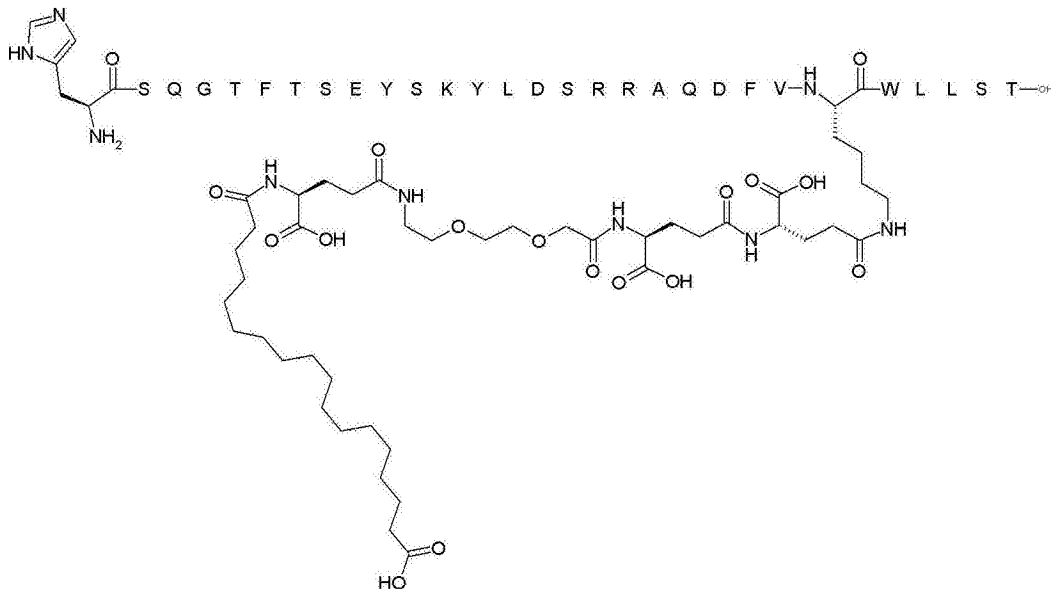
[0318]



[0319] N^{e24}-[(4S)-4-羧基-4-[[[(4S)-4-羧基-4-[[2-[2-[2-[[[(4S)-4-羧基-4-(17-羧基十七烷酰基氨基)丁酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基]氨基]丁酰基]氨基]丁酰基]-[Glu²¹,Lys²⁴,Leu²⁷,Ser²⁸]-胰高血糖素

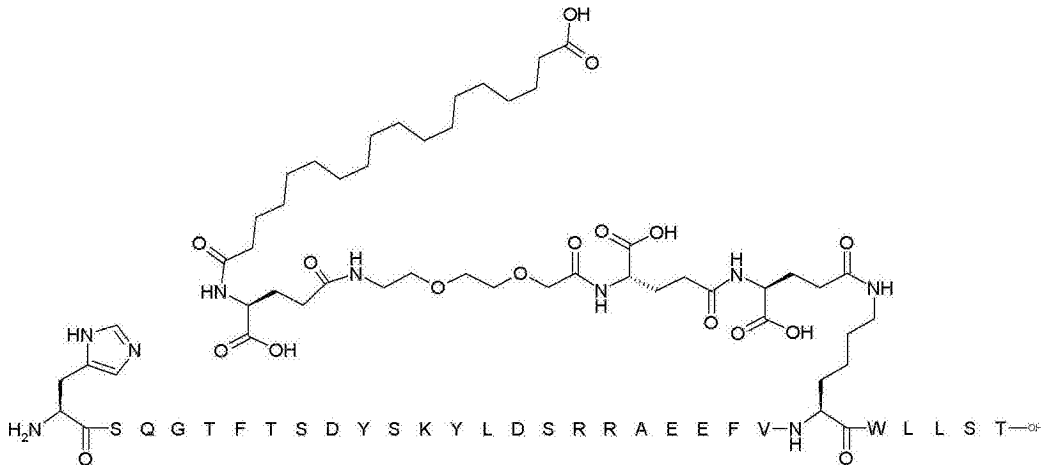


[0321] N^{e24}-[(4S)-4-羧基-4-[[[(4S)-4-羧基-4-[[2-[2-[2-[[[(4S)-4-羧基-4-(17-羧基十七烷酰基氨基)丁酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基]氨基]丁酰基]氨基]丁酰基]-[Glu⁹,Lys²⁴,Leu²⁷,Ser²⁸]-胰高血糖素



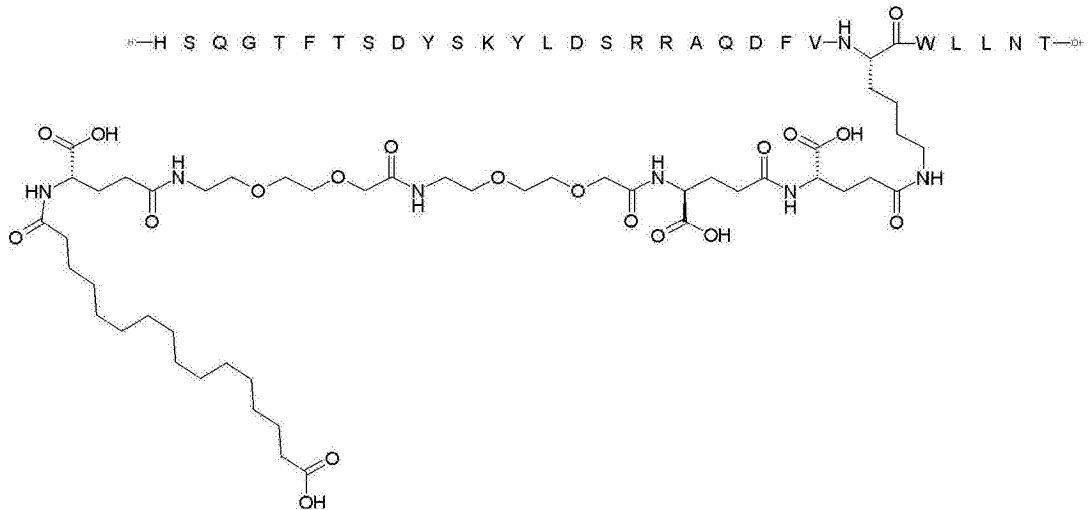
[0323] N^{e24}-[(4S)-4-羧基-4-[[[(4S)-4-羧基-4-[[2-[2-[2-[[[(4S)-4-羧基-4-(17-羧基十七烷酰基氨基)丁酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基]氨基]丁酰基]氨基]丁酰基]-[Glu²⁰,Glu²¹,Lys²⁴,Leu²⁷,Ser²⁸]-胰高血糖素

[0324]



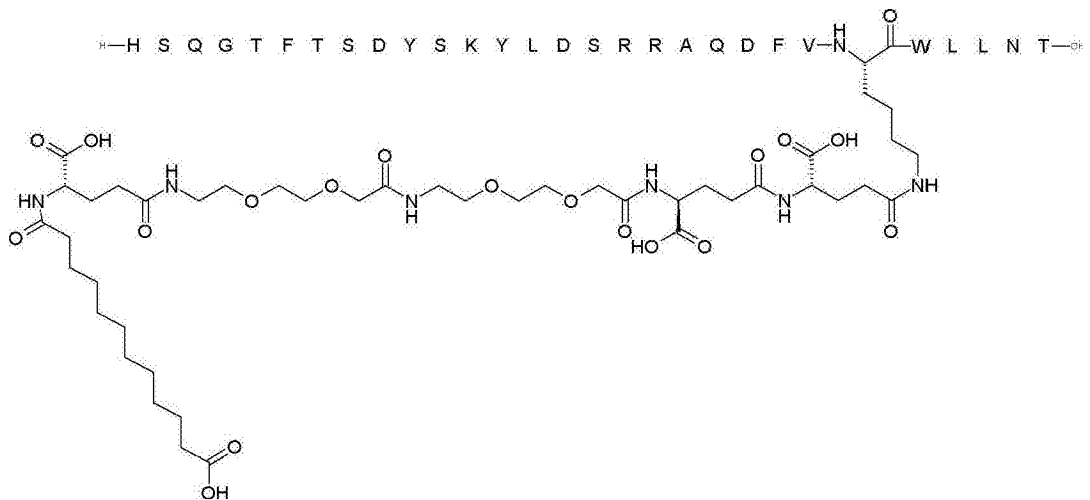
[0325] N^{c24}-[(4S)-4-羧基-4-[[[(4S)-4-羧基-4-[[2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[[(4S)-4-羧基-4-(15-羧基十五烷酰基氨基)丁酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基]氨基]丁酰基]氨基]丁酰基]-[Lys²⁴,Leu²⁷]-胰高血糖素

[0326]

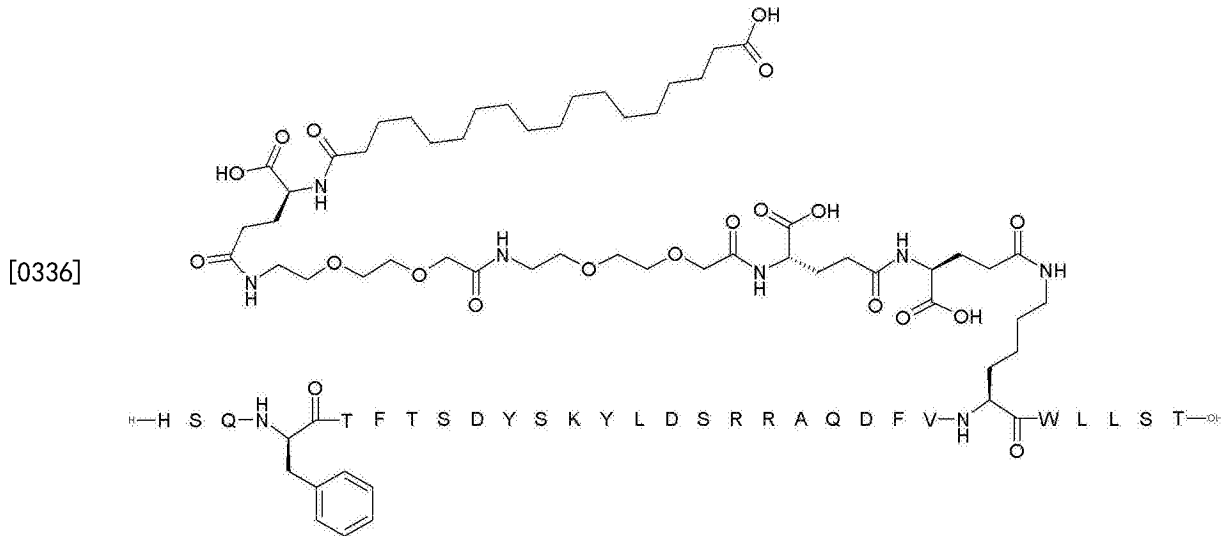


[0327] N^{c24}-[(4S)-4-羧基-4-[[[(4S)-4-羧基-4-[[2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[[(4S)-4-羧基-4-(11-羧基十一烷酰基氨基)丁酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基]氨基]丁酰基]氨基]丁酰基]-[Lys²⁴,Leu²⁷]-胰高血糖素

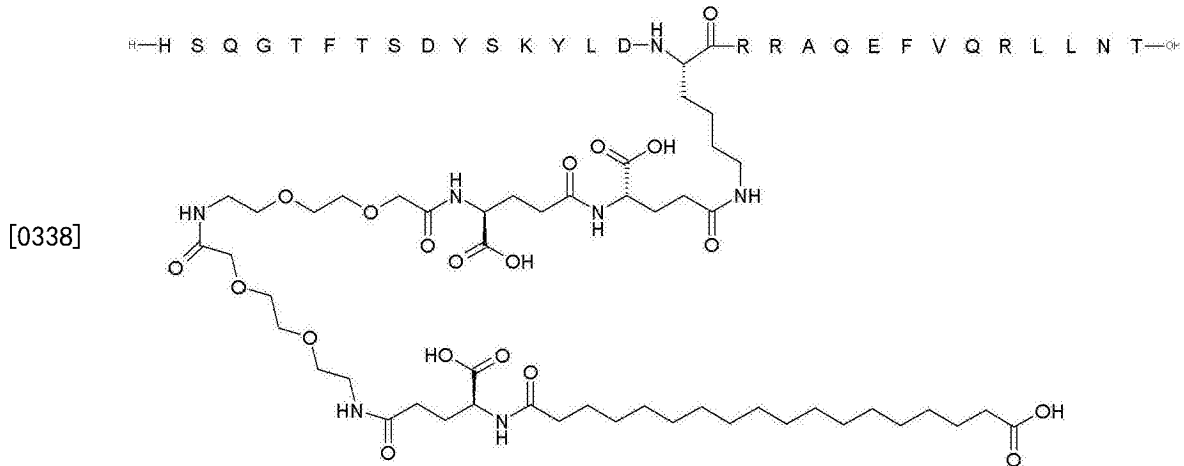
[0328]



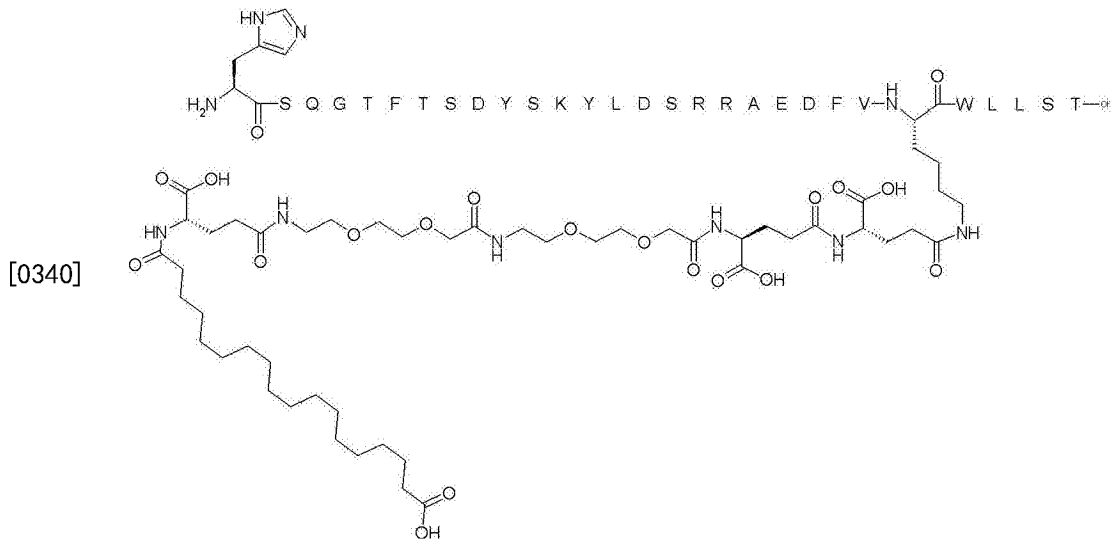
[0329] N^{c24}-[(4S)-4-羧基-4-[[[(4S)-4-羧基-4-[[2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[[(4S)-4-羧基-



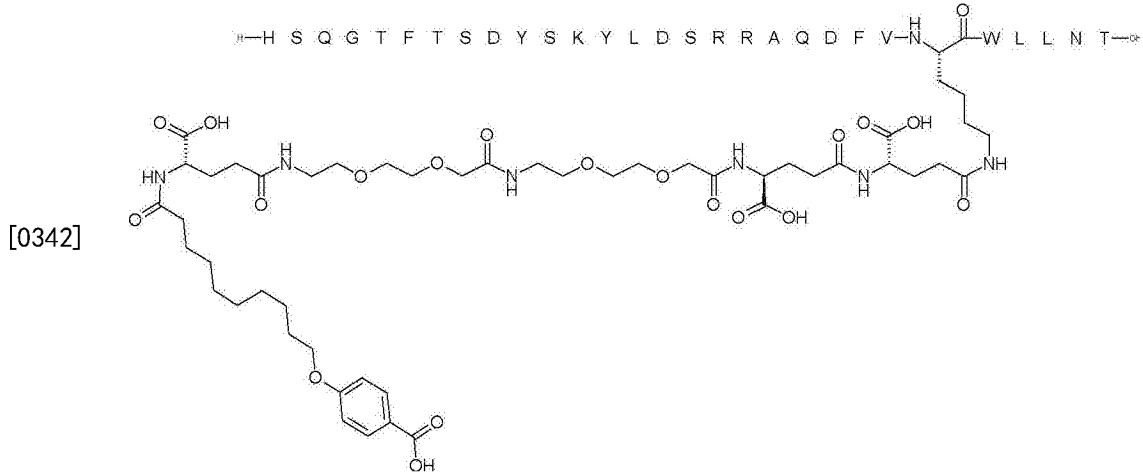
[0337] N^{e16}-[(4S)-4-羧基-4-[[[(4S)-4-羧基-4-[[2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[[(4S)-4-羧基-4-(17-羧基十七烷酰基氨基)丁酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基]氨基]丁酰基]氨基]丁酰基]-[Lys¹⁶,Glu²¹,Arg²⁵,Leu²⁷]-胰高血糖素



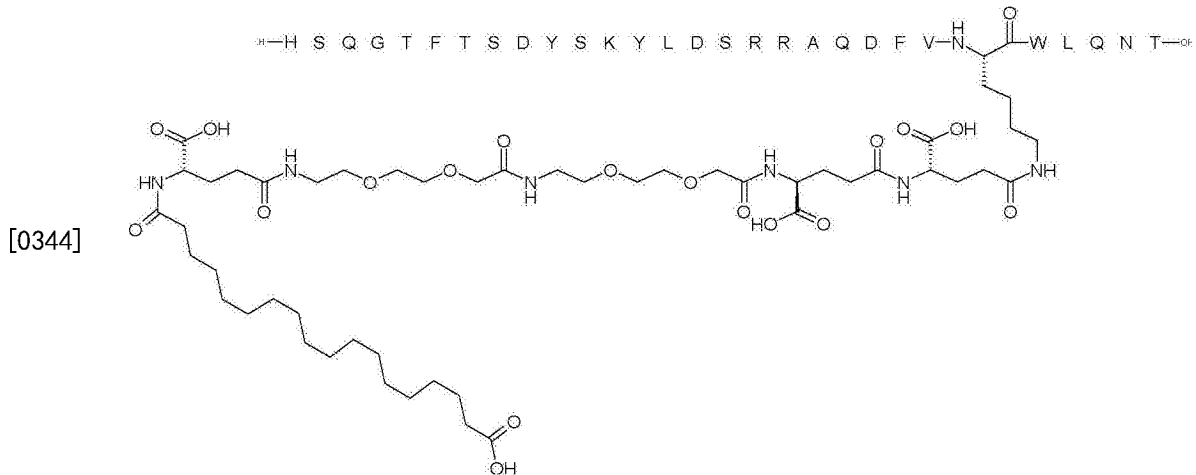
[0339] N^{e24}-[(4S)-4-羧基-4-[[[(4S)-4-羧基-4-[[2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[[(4S)-4-羧基-4-(17-羧基十七烷酰基氨基)丁酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基]氨基]丁酰基]氨基]丁酰基]-[Glu²⁰,Lys²⁴,Leu²⁷,Ser²⁸]-胰高血糖素



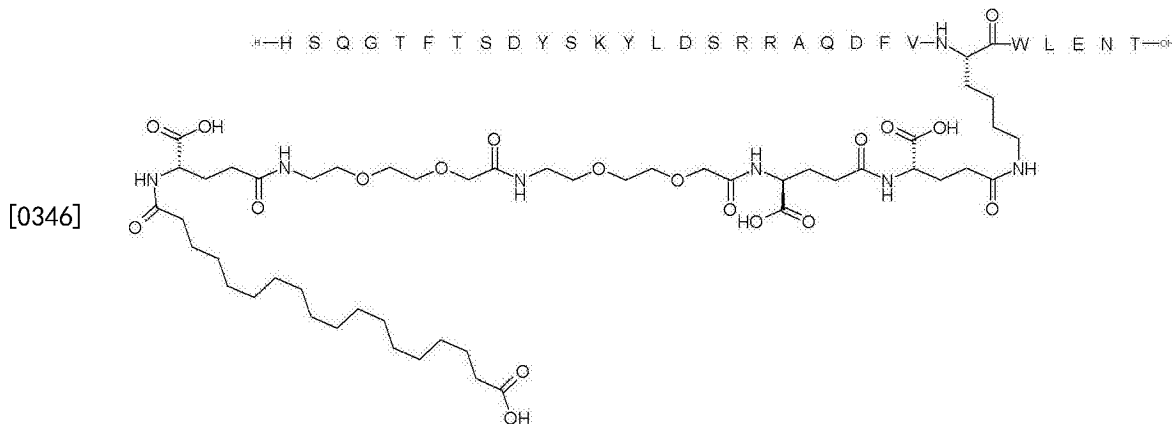
[0341] N^{e24}-[(4S)-4-羧基-4-[[[(4S)-4-羧基-4-[[2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[[(4S)-4-羧基-4-[10-(4-羧基苯氧基)癸酰基氨基]丁酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基]氨基]丁酰基]氨基]丁酰基]-[Lys²⁴,Leu²⁷]-胰高血糖素



[0343] N^{e24}-[(4S)-4-羧基-4-[[[(4S)-4-羧基-4-[[2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[[(4S)-4-羧基-4-(17-羧基十七烷酰基氨基]丁酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基]氨基]丁酰基]氨基]丁酰基]-[Lys²⁴,Gln²⁷]-胰高血糖素



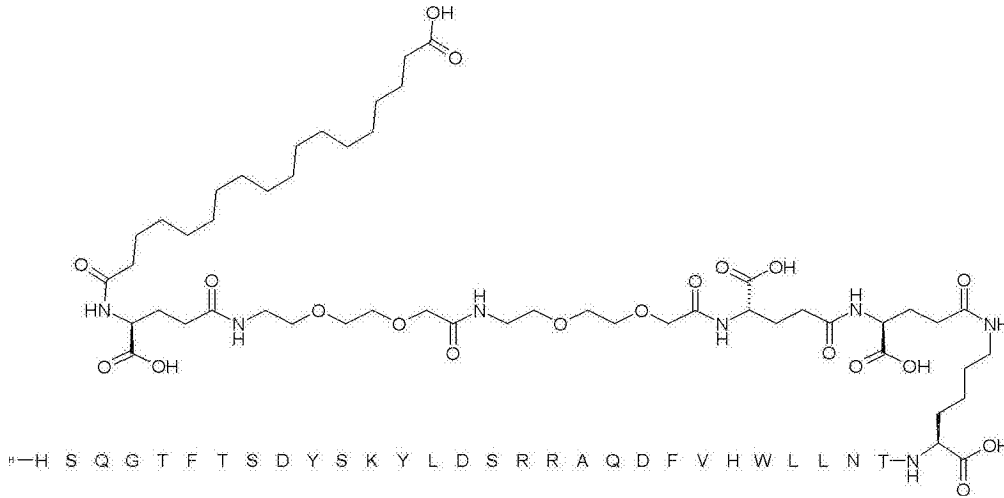
[0345] N^{e24}-[(4S)-4-羧基-4-[[[(4S)-4-羧基-4-[[2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[[(4S)-4-羧基-4-(17-羧基十七烷酰基氨基]丁酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基]氨基]丁酰基]氨基]丁酰基]-[Lys²⁴,Glu²⁷]-胰高血糖素



[0347] N^e ([His²⁴,Leu²⁷]-胰高血糖素基)-N^e [(4S)-4-羧基-4-[[[(4S)-4-羧基-4-[[2-[2-

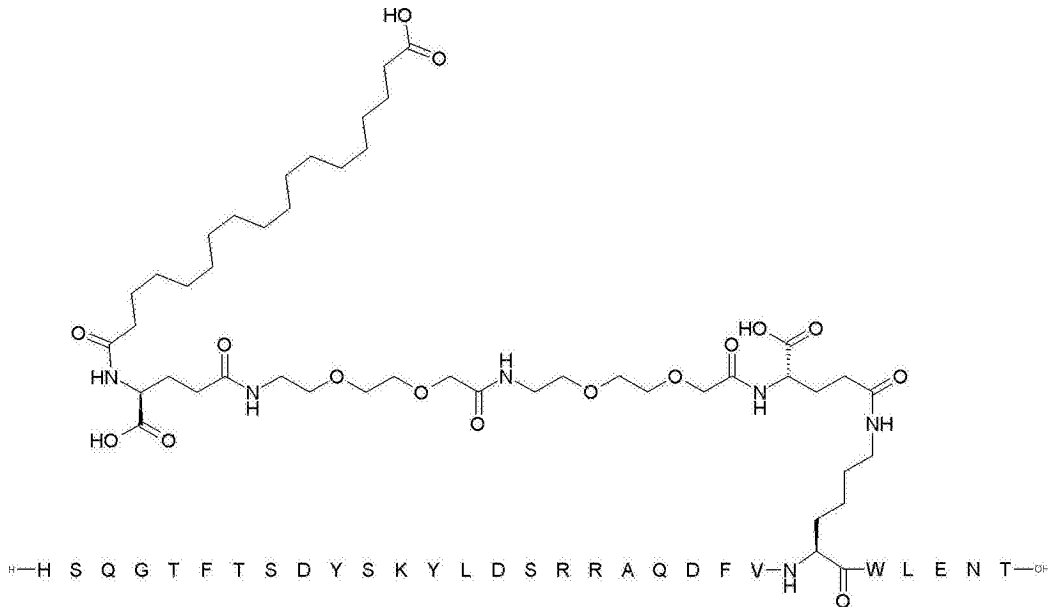
[2-[[2-[[2-[[2-[[[(4S)-4-羧基-4-(17-羧基十七烷酰基氨基)丁酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]氨基]丁酰基]氨基]丁酰基]Lys

[0348]



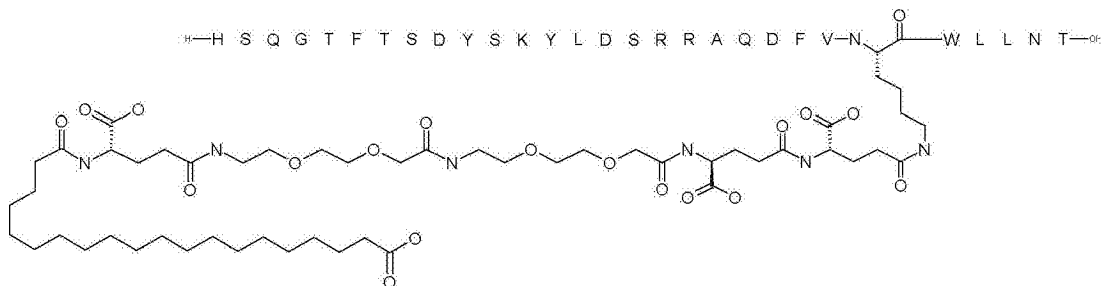
[0349] N^{c24}-[(4S)-4-羧基-4-[[2-[[2-[[2-[[2-[[2-[[[(4S)-4-羧基-4-(17-羧基十七烷酰基氨基)丁酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]氨基]丁酰基]-[Lys²⁴,Glu²⁷]-胰高血糖素

[0350]



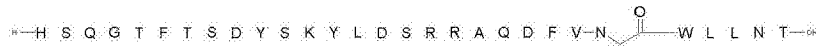
[0351] N^{c24}-[(4S)-4-羧基-4-[[[(4S)-4-羧基-4-[[2-[[2-[[2-[[2-[[2-[[[(4S)-4-羧基-4-(19-羧基十九烷酰基氨基)丁酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]氨基]丁酰基]氨基]丁酰基]-[Lys²⁴,Leu²⁷]-胰高血糖素

[0352]

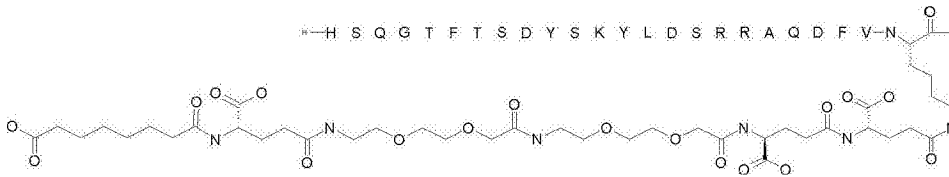


[0353] N^{c24}-[(4S)-4-羧基-4-[[[(4S)-4-羧基-4-[[2-[[2-[[2-[[2-[[2-[[[(4S)-4-羧基-

4-(7-羧基庚酰基氨基)丁酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]氨基]丁酰基]氨基]丁酰基]-[Lys24,Leu27]-胰高血糖素



[0354]



[0355] 本发明的其它实施方案涉及与抗糖尿病药或抗肥胖症药一起给予本发明的化合物:

[0356] 165. 与胰高血糖素样肽1 (GLP-1) 化合物组合的前述实施方案中任一个的胰高血糖素肽。

[0357] 166. 与胰岛素化合物组合的前述实施方案中任一个的胰高血糖素肽。

[0358] 167. 与毒蜥外泌肽-4组合的前述实施方案中任一个的胰高血糖素肽。

[0359] 168. 前述实施方案中任一个的胰高血糖素肽, 其呈双室制剂、贮库制剂 (depository formulation) 和/或微囊化制剂。

[0360] 169. 与胰高血糖素样肽1 (GLP-1) 化合物组合的前述实施方案中任一个的胰高血糖素肽, 用于制备治疗糖尿病和/或肥胖症的药物。

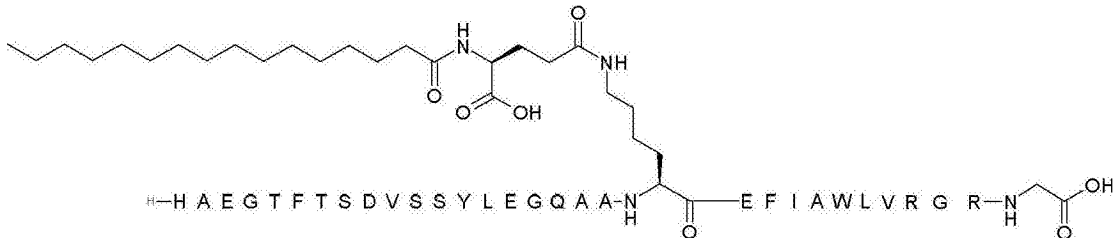
[0361] 170. 与胰岛素化合物组合的前述实施方案中任一个的胰高血糖素肽, 用于制备治疗糖尿病和/或肥胖症的药物。

[0362] 171. 与毒蜥外泌肽-4组合的前述实施方案中任一个的胰高血糖素肽, 用于制备治疗糖尿病和/或肥胖症的药物。

[0363] 172. 前述实施方案中任一个的胰高血糖素肽, 其中GLP-1化合物和胰岛素化合物用式G1-G5表示:

[0364] N-ε26-((S)-4-羧基-4-十六烷酰基氨基-丁酰基) [Arg34] GLP-1-(7-37):

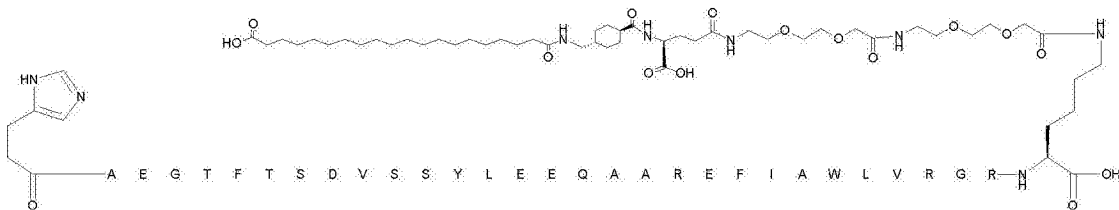
[0365]



[0366] (化合物G1);

[0367] N-ε37-[2-(2-[2-(2-[2-(2-[2-(S)-4-羧基-4-({反式-4-[(19-羧基十九烷酰基氨基)甲基]环己烷羰基)氨基]丁酰基氨基]乙氧基}乙氧基)乙氧基氨基]乙氧基}乙氧基)乙氧基] [脱氨基His7,Glu22,Arg26,Arg34,Lys37] GLP-1-(7-37):

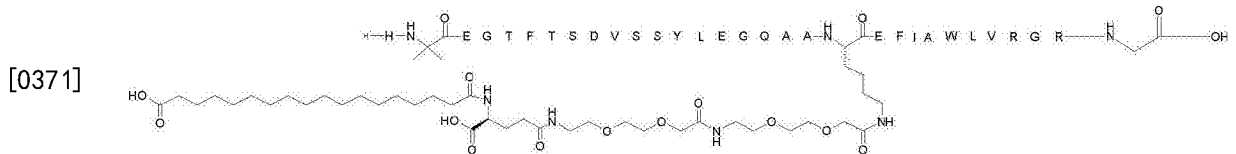
[0368]



[0369] (化合物G2);

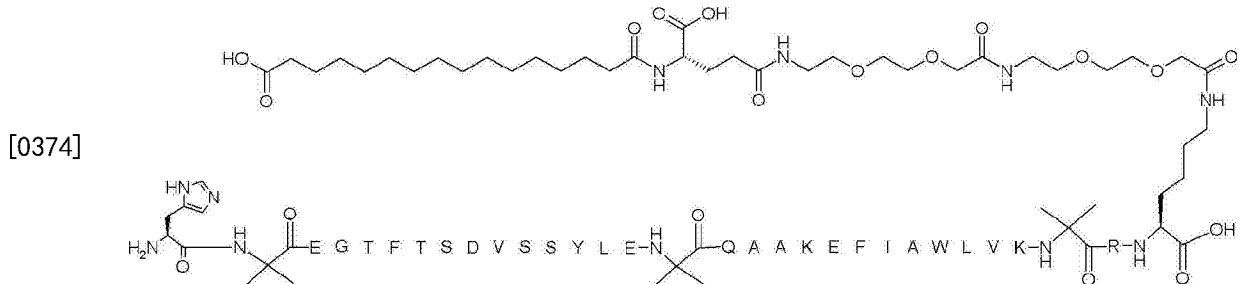
[0370] N-ε26-[2-(2-[2-(2-[2-(2-[2-(S)-4-羧基-4-(17-羧基十七烷酰基氨基)丁酰基氨基]

基]乙氧基)乙氧基)乙酰基氨基]乙氧基)乙氧基)乙酰基] [Aib8,Arg34]GLP-1-(7-37) :



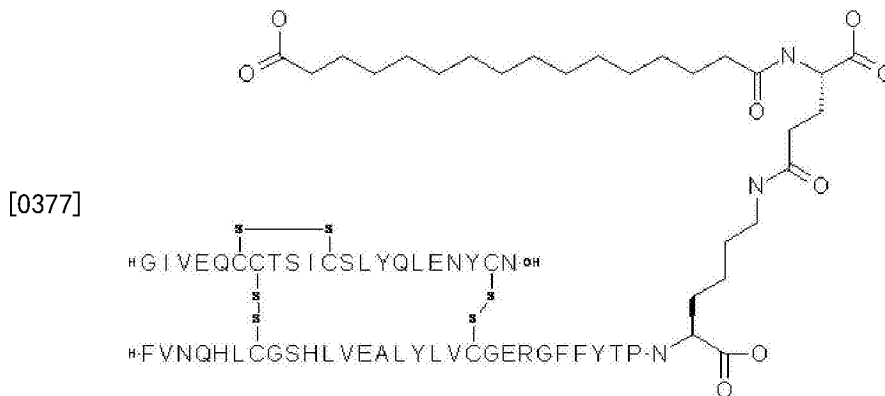
[0372] (化合物G3) ;

[0373] N-ε37-[2-(2-{2-[2-(2-{2-[(S)-4-羧基-4-(15-羧基-十五烷酰基氨基)-丁酰基氨基]-乙氧基)-乙氧基)-乙酰基氨基]-乙氧基)-乙氧基)-乙酰基] [Aib8,22,35,Lys37]GLP-1-(7-37) :



[0375] (化合物G4) 和

[0376] NεB29-十六烷二酰基-γ-Glu-(desB30)人胰岛素



[0378] (化合物G5)。

[0379] GLP-1是在食物摄取后由肠内分泌细胞产生的肠降血糖素激素。GLP-1是葡萄糖代谢和胰岛素从胰腺胰岛β细胞分泌的调节因子。GLP-1在糖尿病状态下还引起胰岛素分泌。然而GLP-1本身的体内半寿期非常短,因此,延长GLP-1的体内半寿期的方法吸引了极大关注。

[0380] WO 98/08871公开了半寿期延长的基于人GLP-1(7-37)(SEQ IDNO:3的氨基酸1-31)的长效GLP-1类似物和衍生物,包括利拉糖肽,一种每日一次给药的GLP-1衍生物,由Novo Nordisk A/S开发,已行销用于治疗2型糖尿病。

[0381] 艾塞那肽是用于治疗2型糖尿病的市售肠降血糖素模拟物,由Amylin Pharmaceuticals和Eli Lilly&Co制造并销售。艾塞那肽以存在于吉拉毒蜥(Gila monster)唾液中的激素毒蜥外泌肽-4为基础。它具有类似于人GLP-1的生物学性质。US 5424286尤其涉及通过给予毒蜥外泌肽-4(7-45)(该美国专利中的SEQ ID NO:1)而在哺乳动物中刺激胰岛素释放的方法。

[0382] 本文所用术语“GLP-1化合物”是指人GLP-1(7-37)(SEQ ID NO:3的氨基酸1-31)、

毒蜥外泌肽-4 (7-45) (SEQ ID NO:4的氨基酸1-39) 及其保持GLP-1活性的类似物、融合肽和衍生物。

[0383] 至于GLP-1化合物中的位置编号:对于本发明的目的,相对于SEQ ID NO:3和/或4的序列而言指出任何氨基酸取代、缺失和/或添加。然而,序列中氨基酸残基的编号总是始于编号1,而对于本发明的目的,按照本领域已确立的作法,我们需要始于氨基酸残基编号7,并将其指定为编号7。因此,本文中任何提及GLP-1 (7-37) 或毒蜥外泌肽-4序列的位置编号通常是指在两种情况下都始于第7位的His,且分别终于37位上的Gly或45位上的Ser的序列。

[0384] 可以实施例65为例来制备GLP-1化合物。

[0385] GLP-1活性可采用本领域已知的任何方法测定,例如本文的测定法(II) (在表达人GLP-1受体的细胞系中刺激cAMP形成)。

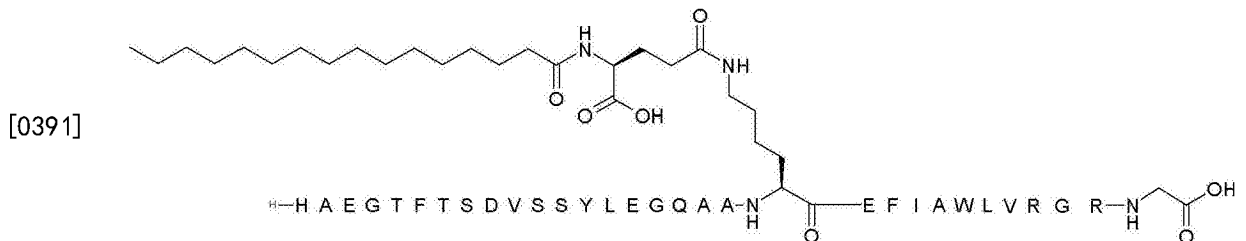
[0386] 此外,GLP-1化合物是这样的化合物,其:

[0387] i) 可包含下列的至少一个:脱氨基His7、Aib8、Aib22、Arg26、Aib35和/或Lys37;

[0388] ii) 可以是包含白蛋白结合部分的GLP-1衍生物或其药学上可接受的盐,所述白蛋白结合部分包含至少一个、优选至少两个、更优选两个游离羧基团;

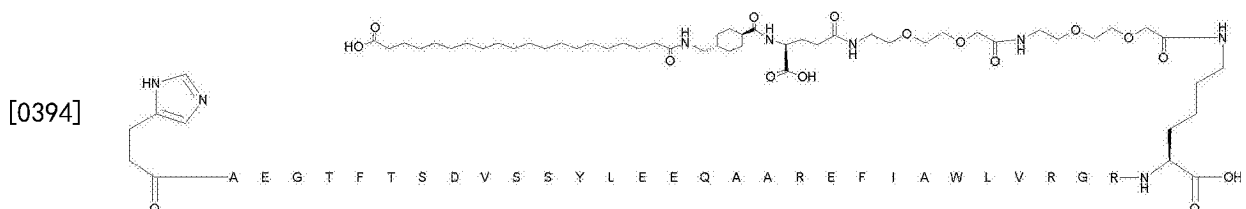
[0389] iii) 可以是包含白蛋白结合部分的GLP-1衍生物,所述白蛋白结合部分包含二羧酸的酰基,其优选包含共12-24个碳原子,例如C12、C14、C16、C18、C20、C22或C24,最优选C16、C18或C20;其中优选a) 酰基通过接头与GLP-1肽的赖氨酸残基的ε氨基连接;b) 接头包含至少一个OEG基团和/或至少一个Trx基团,任选另外至少一个Glu;和/或

[0390] iv) 可选自以下化合物及其药学上可接受的盐、酰胺、烷基化合物(alkyls)或酯: N-ε26-((S)-4-羧基-4-十六烷酰基氨基-丁酰基) [Arg34] GLP-1-(7-37):



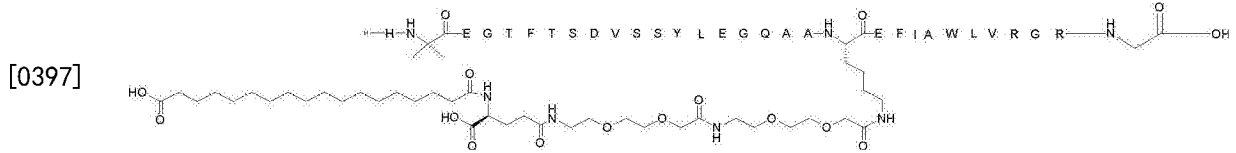
[0392] (化合物G1);

[0393] N-ε37-[2-(2-[2-[2-(2-[2-[(S)-4-羧基-4-({反式-4-[(19-羧基十九烷酰基氨基)甲基]环己烷羰基)氨基]丁酰基氨基]乙氧基]乙氧基)乙酰基氨基]乙氧基)乙酰基) [脱氨基His7,Glu22,Arg26,Arg34,Lys37] GLP-1-(7-37):



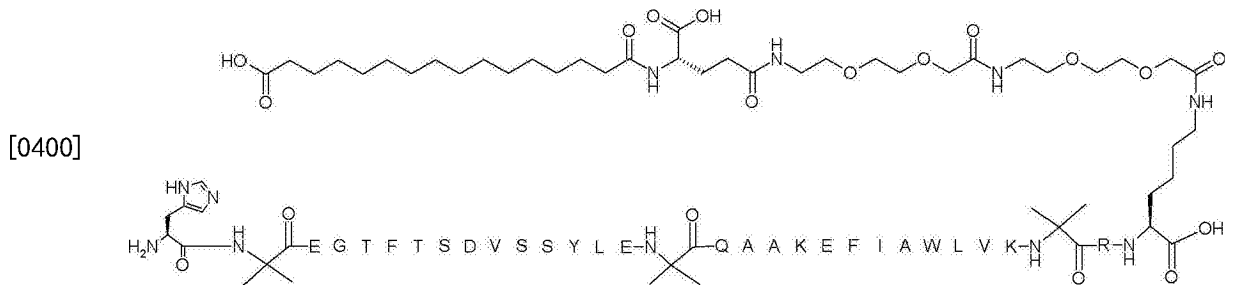
[0395] (化合物G2);

[0396] N-ε26-[2-(2-[2-[2-(2-[2-[(S)-4-羧基-4-(17-羧基十七烷酰基氨基)丁酰基氨基]乙氧基]乙氧基)乙酰基氨基]乙氧基)乙酰基) [Aib8,Arg34] GLP-1-(7-37):



[0398] (化合物G3)；

[0399] N-ε37-[2-(2-{2-[2-(2-[2-(S)-4-羧基-4-(15-羧基-十五烷酰基氨基)-丁酰基氨基]-乙氧基]-乙氧基]-乙酰基氨基]-乙氧基)-乙氧基)-乙酰基] [Aib8,22,35,Lys37] GLP-1-(7-37)；

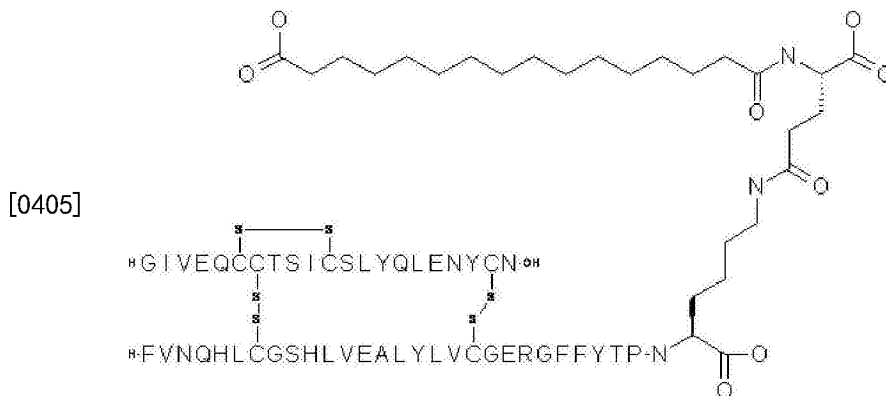


[0401] (化合物G4)。

[0402] 本发明的“胰岛素”在本文中要理解为人胰岛素、胰岛素类似物或胰岛素衍生物。

[0403] 所述胰岛素化合物是可用例如下式表示的化合物：

[0404] NεB29-十六烷二酰基-γ-Glu-(desB30)人胰岛素



[0406] (化合物G5)；

[0407] 可同时或序贯给予本申请说明书中定义的本发明的化合物和抗肥胖症药或抗糖尿病药。各因子可以单一剂型提供，其中所述单一剂型含有两种化合物，或者以套装药盒(kit-of-parts)的形式提供，所述套装药盒装有本发明化合物的制剂作为第一单位剂型和抗肥胖症药或抗糖尿病药的制剂作为第二单位剂型。每当本申请说明书全文中提及第一或第二或第三等单位剂量时，均不表示给予的优选顺序，而只是出于方便的目的。

[0408] 所谓“同时”给予本发明化合物的制剂和抗肥胖症药或抗糖尿病药的制剂意指给予呈单一剂型的化合物，或给予第一制剂，之后给予第二制剂，其时间间隔不超过15分钟、优选10分钟、更优选5分钟、更优选2分钟。任一因子均可先给予。

[0409] 所谓“序贯”给予意指给予第一制剂，之后给予第二制剂，其时间间隔超过15分钟。可先给予两种单位剂型的任一种。优选通过同一静脉口注射两种产品。

[0410] 正如已说明的一样，在所有上述公开的治疗方法或适应症中，都可单独给予本发明的化合物。然而，还可与一种或多种其它的治疗活性剂、物质或化合物组合或序贯地或同

时地给予。

[0411] 当用于本发明的方法时,本发明化合物的典型剂量的范围为约0.001-约100mg/kg体重/天,优选约0.01-约10mg/kg体重,更优选约0.01-约5mg/kg体重/天,例如约0.05-约10mg/kg体重/天或约0.03-约5mg/kg体重/天,其以一个剂量或多个剂量给予,例如1-3个剂量。确切的剂量可取决于给药的频率和方式、接受治疗的受试者的性别、年龄、体重和一般状况、受治疗病况的性质和严重程度、待治疗的任何伴发疾病和对本领域技术人员而言是显然的其它因素。

[0412] 可采用本领域技术人员众所周知的技术,将本发明的化合物合宜地配制成单位剂型。欲每天口服给予一次或多次(例如每天1-3次)的典型的单位剂型,可适宜地含有约0.05-约1000mg、优选约0.1-约500mg、例如约0.5-约200mg的本发明的化合物。

[0413] 本发明的化合物包含被认为是极适于以长于例如一日一次的间隔给予的化合物,因此,适当配制的本发明的化合物可适于例如通过合适的给药途径(例如本文公开的途径之一)一周两次或一周一次给予。

[0414] 如上所述,本发明的化合物可与一种或多种其它的治疗活性化合物或物质组合给予或组合施用,合适的其它化合物或物质可选自例如抗糖尿病药、抗高血脂药、抗肥胖症药、抗高血压药和用于治疗由糖尿病产生的并发症或与糖尿病有关的并发症的药物。

[0415] 合适的抗糖尿病药包括胰岛素、胰岛素衍生物或类似物、GLP-1(胰高血糖素样肽-1)衍生物或类似物[例如公开于W0 98/08871(NovoNordisk A/S)中的那些,其通过引用结合到本文中],或其它GLP-1类似物例如艾塞那肽(Byetta,Eli Lilly/Amylin;AVE0010, Sanofi-Aventis)、taspoglutide(Roche)、albiglutide(Syncria,GlaxoSmithKline)、胰岛淀粉样多肽、胰岛淀粉样多肽类似物(例如Symlin™/Pramlintide)以及口服活性降血糖药。

[0416] 合适的口服活性降血糖药包括:二甲双胍、咪唑啉类;磺脲类;双胍类;美格列奈类;噁二唑烷二酮类(oxadiazolidinediones);噻唑烷二酮类;胰岛素敏化剂; α -葡萄糖苷酶抑制剂;作用于胰 β -细胞的ATP依赖性钾通道的作用剂,例如钾通道开放剂,例如公开于W097/26265、W0 99/03861和W0 00/37474(Novo Nordisk A/S)(其通过引用结合到本文中)的那些;钾通道开放剂,例如ormitiglinide;钾通道阻断剂,例如那格列奈或BTS-67582;胰高血糖素受体拮抗剂,例如公开于W0 99/01423和W0 00/39088(Novo Nordisk A/S和AgouronPharmaceuticals,Inc.)的那些,其全部通过引用结合到本文中;GLP-1受体激动剂,例如公开于W0 00/42026(Novo Nordisk A/S和AgouronPharmaceuticals,Inc.)的那些,其通过引用结合到本文中;胰岛淀粉样多肽类似物(作用于胰岛淀粉样多肽受体的激动剂);DPP-IV(二肽基肽酶-IV)抑制剂;PTPase(蛋白质酪氨酸磷酸酶)抑制剂;葡萄糖激酶激活剂,例如描述于Hoffmann La Roche的W0 02/08209中的葡萄糖激酶激活剂;参与刺激糖异生和/或糖原分解的肝酶的抑制剂;葡萄糖摄取调节剂;GSK-3(糖原合酶激酶-3)抑制剂;改进脂质代谢的化合物,例如抗高血脂药和抗血脂药(antilipidemic agent);减少食物摄取的化合物;以及PPAR(过氧化物酶体增殖物激活受体)激动剂和RXR(类视黄醇X受体)激动剂例如ALRT-268、LG-1268或LG-1069。

[0417] 合适的其它治疗活性物质的其它实例包括胰岛素或胰岛素类似物;磺脲类,例如甲苯磺丁脲、氯磺丙脲、妥拉磺脲、格列本脲(glibenclamide)、格列吡嗪、格列美脲、格列齐特(glicazide)或格列本脲(glyburide);双胍类,例如二甲双胍;及美格列奈类,例如瑞格

列奈或色格列奈/那格列奈。

[0418] 合适的其它治疗活性物质的其它实例包括噻唑烷二酮类胰岛素敏化剂,例如曲格列酮、环格列酮、吡格列酮、罗格列酮、伊格列酮、达格列酮、恩格列酮、CS-011/CI-1037或T174或以下申请公开的化合物:WO 97/41097 (DRF-2344)、WO 97/41119、WO 97/41120、W000/41121和WO 98/45292 (Dr.Reddy's Research Foundation),其全部申请的内容均通过引用结合到本文中。

[0419] 合适的其它治疗活性物质的其它实例包括胰岛素敏化剂,例如GI 262570、YM-440、MCC-555、JTT-501、AR-H039242、KRP-297、GW-409544、CRE-16336、AR-H049020、LY510929、MBX-102、CLX-0940、GW-501516和公开于以下申请的化合物:WO 99/19313 (NN622/DRF-2725)、WO 00/50414、WO 00/63191、WO 00/63192和WO 00/63193 (Dr.Reddy's Research Foundation)和WO 00/23425、W000/23415、WO 00/23451、WO 00/23445、WO 00/23417、WO 00/23416、WO 00/63153、WO 00/63196、WO 00/63209、WO 00/63190和W000/63189 (Novo Nordisk A/S),其全部申请的内容均通过引用结合到本文中。

[0420] 合适的其它治疗活性物质的其它更多的实例包括: α -葡糖苷酶抑制剂,例如伏格列波糖、乙格列酯、米格列醇或阿卡波糖;糖原磷酸化酶抑制剂,例如描述于WO 97/09040 (Novo Nordisk A/S)中的化合物;葡糖激酶激活剂;作用于胰 β -细胞的ATP依赖性钾通道的作用剂,例如甲苯磺丁脲、格列本脲、格列吡嗪、格列齐特、BTS-67582或瑞格列奈;

[0421] 其它合适的其它治疗活性物质包括抗高血脂药和抗血脂药,例如消胆胺、考来替泊、氯贝丁酯、吉非贝齐、洛伐他汀、普伐他汀、辛伐他汀、普罗布考或右旋甲状腺素。

[0422] 适于作为其它治疗活性物质的其它药物包括抗肥胖症药和食欲调节药。这类物质可选自CART(可卡因-苯丙胺调节的转录物)激动剂、NPY(神经肽Y受体1和/或5)拮抗剂、MC3(黑皮质素受体3)激动剂、MC3拮抗剂、MC4(黑皮质素受体4)激动剂、食欲肽受体拮抗剂、TNF(肿瘤坏死因子)激动剂、CRF(促肾上腺皮质激素释放因子)激动剂、CRF BP(促肾上腺皮质激素释放因子结合蛋白)拮抗剂、尿皮质素(urocortin)激动剂、神经调节肽U类似物(作用于神经调节肽U受体亚型1和2的激动剂)、 β 3肾上腺素能激动剂例如CL-316243、AJ-9677、GW-0604、LY362884、LY377267或AZ-40140、MC1(黑皮质素受体1)激动剂、MCH(黑素细胞集群激素(melanocyte-concentratinghormone))拮抗剂、CCK(缩胆囊素)激动剂、5-羟色胺再摄取抑制剂(例如氟西汀、赛乐特或西酞普兰)、5-羟色胺和去甲肾上腺素再摄取抑制剂、5HT(5-羟色胺)激动剂、5HT6激动剂、5HT2c激动剂例如APD356 (US6953787)、铃蟾肽激动剂、甘丙肽拮抗剂、生长激素、生长因子例如催乳素或胎盘催乳素、生长激素释放化合物、TRH(促甲状腺激素释放激素)激动剂、UCP 2或3(解偶联蛋白质2或3)调节剂、化学解偶联剂、瘦蛋白激动剂、DA(多巴胺)激动剂(溴隐亭(bromocriptin)、doprexin)、脂肪酶/淀粉酶抑制剂、PPAR调节剂、RXR调节剂、TR β 激动剂、肾上腺素能CNS刺激剂、AGRP(野灰蛋白相关蛋白)抑制剂、组胺H3受体拮抗剂例如WO 00/42023、WO 00/63208和WO 00/64884中公开的组胺H3受体拮抗剂(其全部的内容通过引用结合到本文中)、毒蜥外泌肽-4类似物、GLP-1类似物、睫状神经营养因子、胰岛淀粉样多肽类似物、肽YY₃₋₃₆(PYY3-36)(Batterham等,Nature 418,650-654(2002))、PYY3-36类似物、NPY Y2受体激动剂、NPY Y4受体激动剂和以组合的NPY Y2和NPY Y4激动剂起作用的物质、FGF21及其类似物、 μ -阿片样物质受体拮抗剂、泌酸调节肽(oxyntomodulin)或其类似物。

[0423] 更多合适的抗肥胖症药为安非他酮(抗抑郁药)、托吡酯(抗惊厥药)、依考匹泮(多巴胺D1/D5拮抗剂)和纳曲酮(阿片样物质拮抗剂)及其组合。这些抗肥胖症药的组合可为例如:芬特明+托吡酯、安非他酮缓释制剂(sustained release, SR)+纳曲酮SR、唑尼沙胺SR和安非他酮SR。用于本发明方法的作为与本发明的化合物组合的其它治疗活性物质的合适抗肥胖症药的实施方案尤其为瘦蛋白和瘦蛋白的类似物或衍生物。

[0424] 合适的抗肥胖症药的其它实施方案为5-羟色胺和去甲肾上腺素再摄取抑制剂,例如西布曲明。

[0425] 合适抗肥胖症药的其它实施方案为脂肪酶抑制剂,例如奥利司他。

[0426] 合适的抗肥胖症药甚至更多的实施方案为肾上腺素能CNS刺激剂,例如右苯丙胺、苯丙胺、芬特明、马吲哚、苯甲曲秦、安非拉酮、芬氟拉明或右芬氟拉明。

[0427] 合适的其它治疗活性化合物的其它实例包括抗高血压药。抗高血压药的实例为 β -阻断剂例如阿普洛尔、阿替洛尔、噻吗洛尔、吲哚洛尔、普萘洛尔和美托洛尔、ACE(血管紧张素转化酶)抑制剂例如贝那普利、卡托普利、依那普利、福辛普利、赖诺普利、喹那普利和雷米普利、钙通道阻断剂例如硝苯地平、非洛地平、尼卡地平、伊拉地平、尼莫地平、地尔硫䓬和维拉帕米以及 α -阻断剂例如多沙唑嗪、乌拉地尔、哌唑嗪和特拉唑嗪。

[0428] 本发明的化合物相对于本领域之前公开的肽具有较高的胰高血糖素受体选择性。本发明的肽还有延长的体内半寿期。本发明的化合物可为可溶性胰高血糖素受体激动剂,例如其溶解度为至少0.2mmol/l、至少0.5mmol/l、至少2mmol/l、至少4mmol/l、至少8mmol/l、至少10mmol/l或至少15mmol/l。

[0429] 在本文中,如不另外说明,则术语“可溶解的”、“溶解度”、“可溶于水溶液”、“水溶性”、“水溶性的”、“可溶于水的”、“水溶解度”和“水溶性”是指化合物在水中或在含水盐溶液或水性缓冲溶液(例如10mM磷酸盐溶液)中或在含有其它化合物但无有机溶剂的水溶液中的溶解度。

[0430] 本文所用术语“多肽”和“肽”意指由通过肽键连接的至少5个组分氨基酸(constituent amino acid)组成的化合物。组分氨基酸可来自自由遗传密码编码的氨基酸的组别,且它们可以是非由遗传密码编码的天然氨基酸,以及合成氨基酸。非由遗传密码编码的天然氨基酸为例如羟脯氨酸、 γ -羧基谷氨酸、鸟氨酸、磷酸丝氨酸、D-丙氨酸和D-谷氨酰胺。合成氨基酸包括通过化学合成制备的氨基酸,即由遗传密码编码的氨基酸的D-异构体,例如D-丙氨酸和D-亮氨酸、Aib(α -氨基异丁酸)、Abu(α -氨基丁酸)、Tle(叔丁基甘氨酸)、 β -丙氨酸、3-氨基苯甲酸、邻氨基苯甲酸。

[0431] 本文提及多肽使用的术语“类似物”意指其中肽的一个或多个氨基酸残基被其它氨基酸残基取代和/或其中一个或多个氨基酸残基从肽中缺失和/或其中一个或多个氨基酸残基从肽中缺失和或其中一个或多个氨基酸残基添加至肽中的修饰肽。氨基酸残基的这类添加或缺失可发生在肽的N端和/或肽的C端。利用一个简单系统来描述类似物。使用按照IUPAC-IUB命名法所用的氨基酸的标准单字母或三字母缩写绘制肽类似物及其衍生物的化学式。

[0432] 本文所用的与肽有关的术语“衍生物”意指化学修饰的肽或其类似物,其中至少一个取代基不存在于未修饰肽或其类似物中,即已经共价修饰的肽。典型的修饰为酰胺、糖、烷基、酰基、酯等。

[0433] 未规定旋光异构体的所有氨基酸要理解为意指L-异构体。

[0434] 本文所用术语“胰高血糖素肽”意指胰高血糖素肽、胰高血糖素化合物、按照本发明的化合物、本发明的化合物、式I的化合物、胰高血糖素类似物、胰高血糖素衍生物或胰高血糖素类似物的衍生物、人胰高血糖素、人胰高血糖素(1-29)、胰高血糖素(1-30)、胰高血糖素(1-31)、胰高血糖素(1-32)及其保持胰高血糖素活性的类似物、融合肽和衍生物。

[0435] 至于胰高血糖素化合物的位置编号：对于本发明的目的，相对于天然人胰高血糖素(1-29)(SEQ ID 1)的序列来说明任何的氨基酸取代、缺失和/或添加。人胰高血糖素氨基酸位置1-29在本文中氨基酸位置 X_1 - X_{29} 相同。人胰高血糖素(1-29)序列为His-Ser-Gln-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Lys-Tyr-Leu-Asp-Ser-Arg-Arg-Ala-Gln-Asp-Phe-Val-Gln-Trp-Leu-Met-Asn-Thr (SEQ ID 1)。

[0436] 胰高血糖素(1-30)意指在C端带有1个氨基酸的突出端的人胰高血糖素，胰高血糖素(1-31)意指在C端带有2个氨基酸的突出端的人胰高血糖素，胰高血糖素(1-32)意指在C端带有3个氨基酸的突出端的人胰高血糖素。

[0437] 本文所用术语“远端”意指距连接点的最远处(末端)。

[0438] 本文所用术语“带负电荷的部分”意指可带有负电荷的化学部分，例如但不限于羧酸、磺酸或四唑部分。

[0439] 本文所用术语“亲脂部分”意指烷基链 $-(CH_2)_n-$ ，其中 $n=5-20$ 。

[0440] 本文所用术语“取代基”意指置换氢的化学部分或基团。

[0441] 本发明的实施方案中，相对于人胰高血糖素(1-29)，胰高血糖素类似物中最多17个氨基酸被修饰(取代、缺失、添加或其任何组合)。本发明的实施方案中，胰高血糖素类似物中的最多15个氨基酸被修饰。本发明的实施方案中，胰高血糖素类似物中最多10个氨基酸被修饰。本发明的实施方案中，胰高血糖素类似物中最多8个氨基酸被修饰。本发明的实施方案中，胰高血糖素类似物中最多7个氨基酸被修饰。本发明的实施方案中，胰高血糖素类似物中最多6个氨基酸被修饰。本发明的实施方案中，胰高血糖素类似物中最多5个氨基酸被修饰。本发明的实施方案中，胰高血糖素类似物中最多4个氨基酸被修饰。本发明的实施方案中，胰高血糖素类似物中最多3个氨基酸被修饰。本发明的实施方案中，胰高血糖素类似物中最多2个氨基酸被修饰。本发明的实施方案中，胰高血糖素类似物中1个氨基酸被修饰。

[0442] 本发明的其它实施方案涉及：

[0443] 173. 前述实施方案中任一个的胰高血糖素肽，其中所述胰高血糖素肽是DPPIV保护的化合物。

[0444] 174. 前述实施方案中任一个的胰高血糖素肽，其中所述胰高血糖素肽是DPPIV稳定的。

[0445] 175. 前述实施方案中任一个的胰高血糖素肽，其中所述胰高血糖素肽是胰高血糖素受体的激动剂。

[0446] 176. 前述实施方案中任一个的胰高血糖素肽，其中所述胰高血糖素肽是 $EC_{50} < 1nM$ 的胰高血糖素受体的激动剂。

[0447] 本文提及多肽使用的术语“DPP-IV保护的”意指这样的多肽，其经化学修饰从而使所述化合物对血浆肽酶二肽基氨基肽酶-4 (DPP-IV) 具有抗性。已知血浆中的DPP-IV酶参与

若干肽激素例如胰高血糖素、GLP-1、GLP-2、泌酸调节肽等的降解。因此,正在进行相当多的努力以开发对DPP-IV介导的水解敏感的多肽的类似物和衍生物以降低DPP-IV的降解速率。

[0448] 此外,在按测定法VI中所述的无白蛋白测定法中,本发明的化合物对DPP-IV切割是稳定的。

[0449] 本文所用术语“胰高血糖素激动剂”是指完全或部分激活人胰高血糖素受体的任何胰高血糖素肽。在一个优选的实施方案中,“胰高血糖素激动剂”是按本领域已知方法测量,优选以低于 $1\mu\text{M}$ 、例如低于 100nM 或低于 1nM 的亲亲和常数(KD)或效价(EC_{50})与胰高血糖素受体结合并具有促胰岛素活性的任何胰高血糖素肽,其中促胰岛素活性可通过本领域普通技术人员已知的体内或体外测定法测量。例如,可将胰高血糖素激动剂给予动物,并测量随时间而变化的胰岛素浓度。

[0450] 在本文中,术语“激动剂”欲表示激活所述受体类型的物质(配体)。

[0451] 在本文中,术语“拮抗剂”欲表示阻断、中和或抵消激动剂的作用的物质(配体)。

[0452] 更具体地讲,可如下对受体配体进行分类:

[0453] 受体激动剂,其刺激受体;部分激动剂也激活受体,但具有比完全激动剂低的功效。部分激动剂将作为受体部分拮抗剂起作用,部分抑制完全激动剂的作用。

[0454] 受体中性拮抗剂,其阻断激动剂的作用,但不影响受体组成型活性。

[0455] 受体逆激动剂,其阻断激动剂的作用,同时减弱受体组成型活性。完全逆激动剂可完全减弱受体组成型活性;部分逆激动剂可将受体组成型活性减至较低程度。

[0456] 本文所用术语“拮抗剂”包括中性拮抗剂和部分拮抗剂以及逆激动剂。术语“激动剂”包括完全激动剂以及部分激动剂。

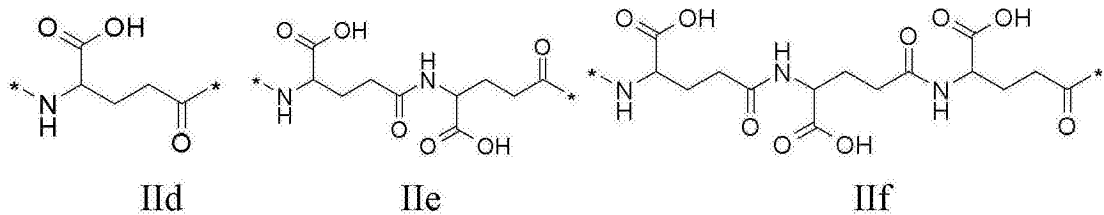
[0457] 在本文中,术语“药学上可接受的盐”欲表示对患者无害的盐。这类盐包括药学上可接受的酸加成盐、药学上可接受的金属盐、铵盐和烷基化铵盐。酸加成盐包括无机酸以及有机酸的盐。合适无机酸的代表性实例包括盐酸、氢溴酸、氢碘酸、磷酸、硫酸和硝酸等。合适有机酸的代表性实例包括甲酸、乙酸、三氯乙酸、三氟乙酸、丙酸、苯甲酸、肉桂酸、柠檬酸、富马酸、乙醇酸、乳酸、马来酸、苹果酸、丙二酸、扁桃酸、草酸、苦味酸、丙酮酸、水杨酸、琥珀酸、甲磺酸、乙磺酸、酒石酸、抗坏血酸、双羟萘酸、双亚甲基-水杨酸、乙二磺酸、葡萄糖酸、柠康酸、天冬氨酸、硬脂酸、棕榈酸、EDTA、乙醇酸、对氨基苯甲酸、谷氨酸、苯磺酸、对甲苯磺酸等。药学上可接受的无机酸或有机酸加成盐的其它实例包括J. Pharm. Sci. (1977) 66, 2中列出的药学上可接受的盐,其通过引用结合到本文中。相关金属盐的实例包括锂盐、钠盐、钾盐和镁盐等。烷基化铵盐的实例包括甲基铵、二甲基铵、三甲基铵、乙基铵、羟乙基铵、二乙基铵、丁基铵和四甲基铵盐等。

[0458] 本文所用术语化合物的“治疗有效量”是指足以治愈、减轻或部分抑制指定疾病和/或其并发症的临床表现的量。将适于实现这一目的的量定义为“治疗有效量”。对于每个目的而言,有效量将取决于疾病或损伤的严重程度以及受试者的体重和一般状况。应理解的是,可采用常规实验,通过构建值的矩阵并测定矩阵中的不同点来实现合适剂量的确定,所有这些都属于受过训练的医师或兽医的普通技能水平。

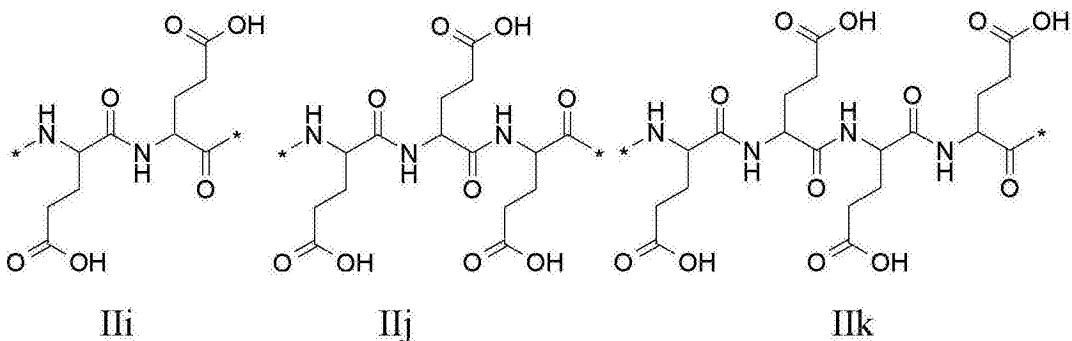
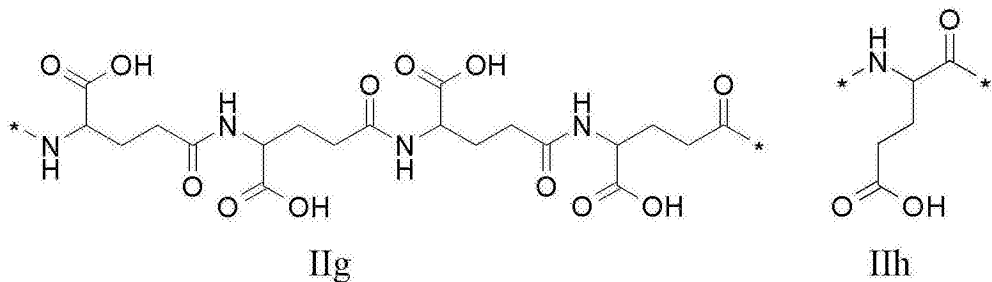
[0459] 本文所用术语“治疗”、“医疗”及其其它的变化形式是指为了对抗病况(例如疾病或病症)而对患者进行管理和护理。该术语欲包括对患者所患的指定病况的全面治疗,例如给予所述活性化合物以减轻其症状或并发症,延迟疾病、病症或病况的进展,治愈或消除疾

[0483] 如果 Z_2 不存在,则 Z_1 在符号*处与 Z_3 上的氮连接,如果 Z_2 和 Z_3 不存在,则 Z_1 在符号*处与 Z_4 上的氮连接,

[0484] Z_2 不存在或表示下式IIId、IIe、IIf、IIg、IIh、Iii、IIj或IIk之一的结构;



[0485]

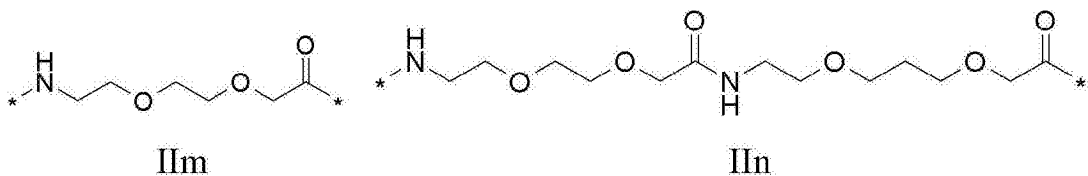


[0486] 其中各个氨基酸具有立体化学结构L或D;

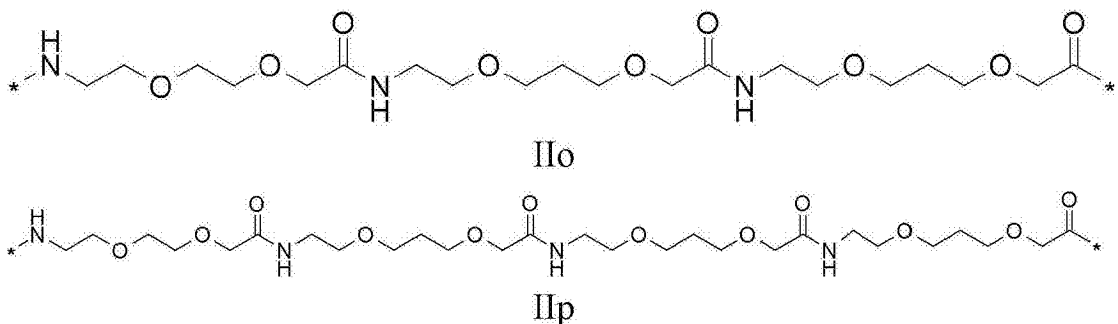
[0487] 其中 Z_2 通过标为*的碳原子与标为*的 Z_3 的氮连接;

[0488] 如果 Z_3 不存在,则 Z_2 通过标为*的碳原子与标为*的 Z_4 的氮连接,如果 Z_3 和 Z_4 不存在,则 Z_2 通过标为*的碳与胰高血糖素肽的赖氨酸的 ϵ 氮或鸟氨酸的 δ 氮连接;

[0489] Z_3 不存在或表示下式IIIm、IIIn、IIo或IIp之一的结构;



[0490]

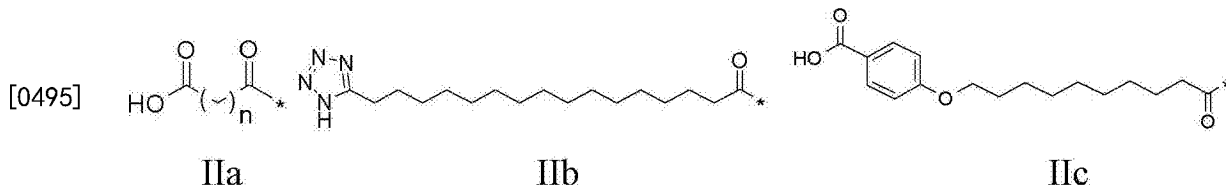


[0491] Z_3 通过具有符号*的 Z_3 的碳与具有符号*的 Z_4 的氮连接,如果 Z_4 不存在,则 Z_3 通过具有符号*的碳与胰高血糖素肽的赖氨酸的 ϵ 氮或鸟氨酸的 δ 氮连接;

[0492] Z_4 不存在或表示下式IIId、IIe、IIIf、IIg、IIh、Iii、IIj或IIk之一的结构；其中每个氨基酸部分独立地为L或D，其中 Z_4 通过具有符号*的碳与胰高血糖素肽的赖氨酸的 ϵ 氮或鸟氨酸的 δ 氮连接。

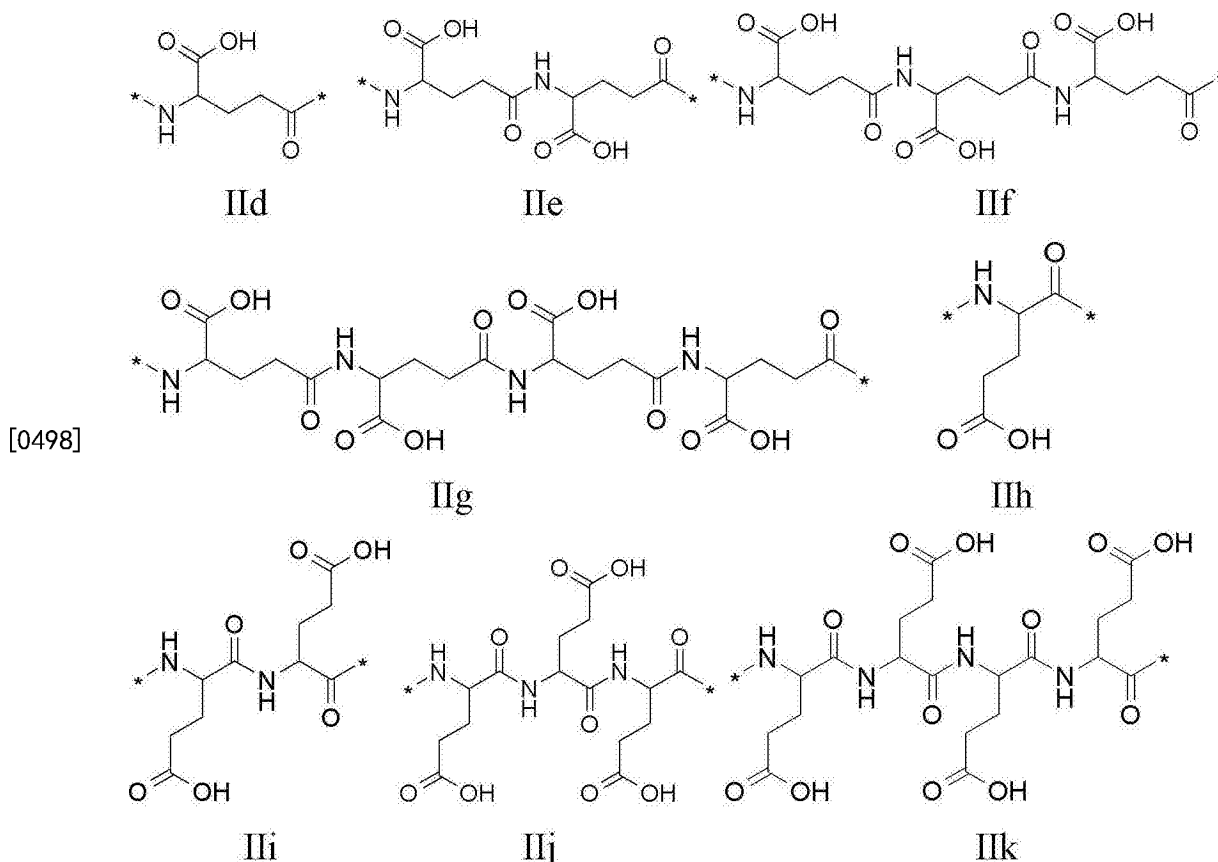
[0493] 178.实施方案177的取代基，其中

[0494] Z_1 表示下式IIa、IIb或IIc之一的结构；



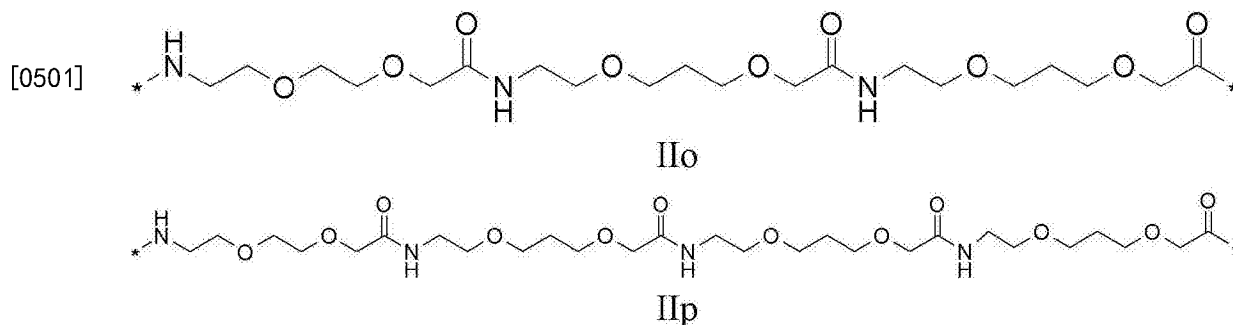
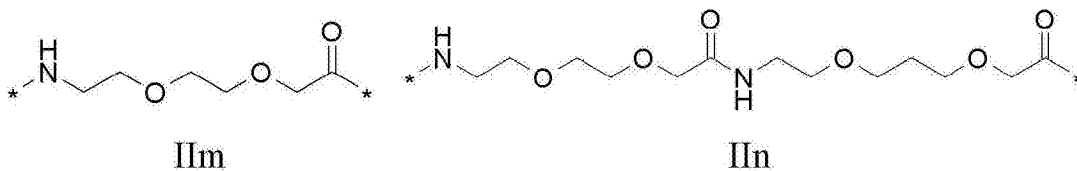
[0496] 其中式IIa中的n为6-20，

[0497] Z_2 不存在或表示下式IIId、IIe、IIIf、IIg、IIh、Iii、IIj或IIk之一的结构；



[0499] 其中每个氨基酸部分独立地为L或D。

[0500] Z_3 不存在或表示下式IIIm、IIIn、IIo或IIp之一的结构；



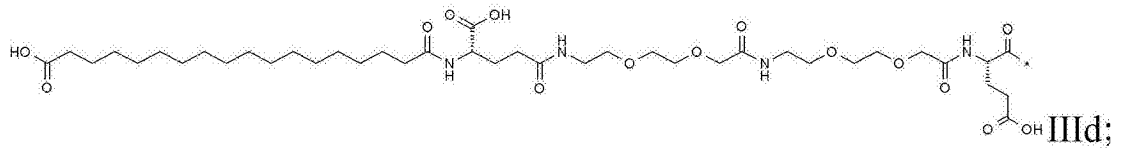
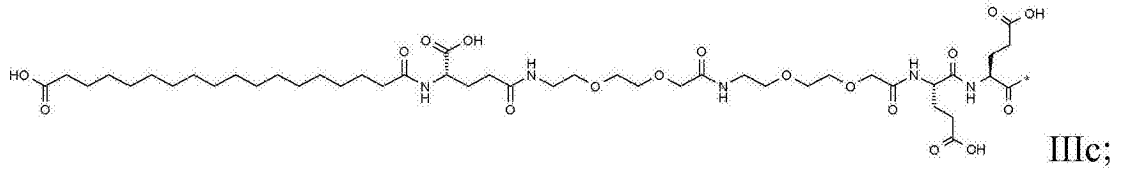
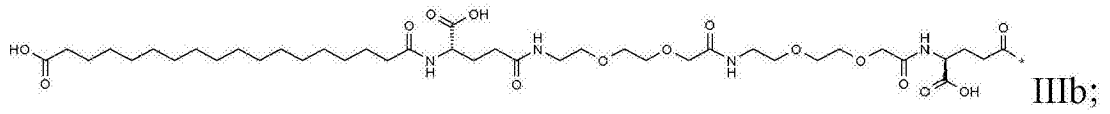
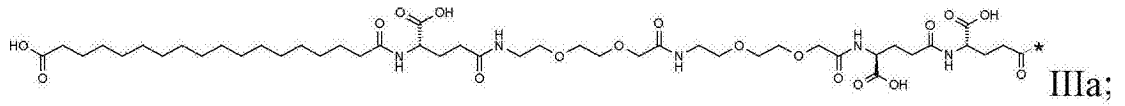
[0502] Z_4 不存在或表示式IIId、IIe、IIf、IIg、IIh、Iii、IIj或IIk之一的结构；

[0503] 其中每个氨基酸部分独立地为L或D。

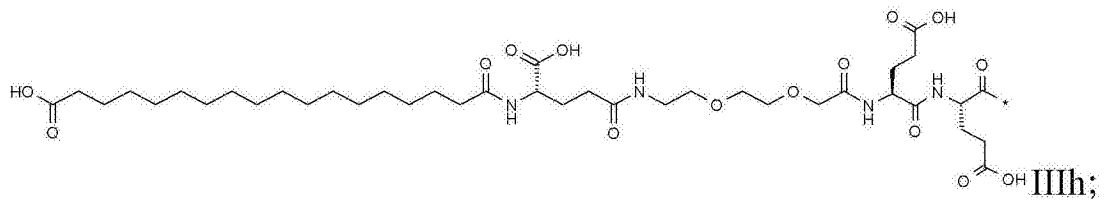
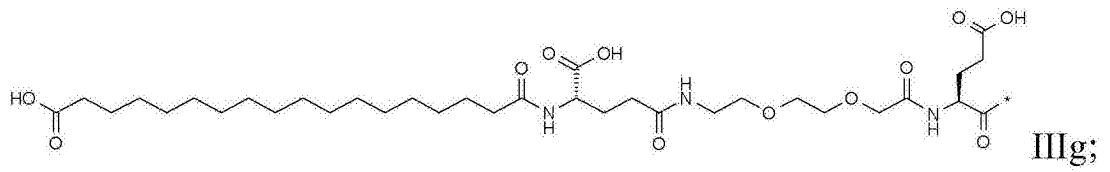
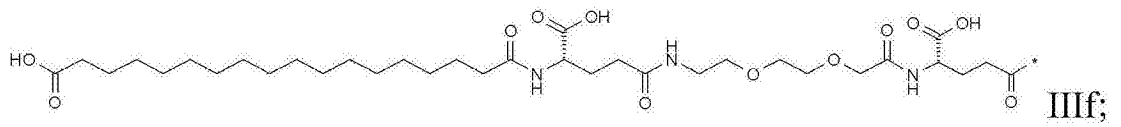
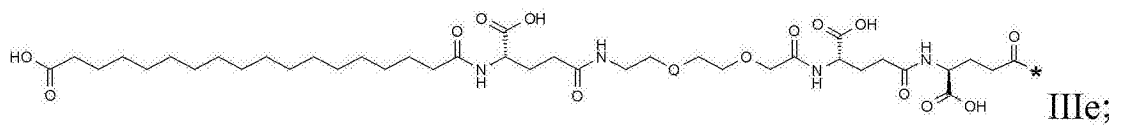
[0504] 179. 实施方案177-178中任一个的取代基，其中当 Z_4 存在时， Z_2 不存在。

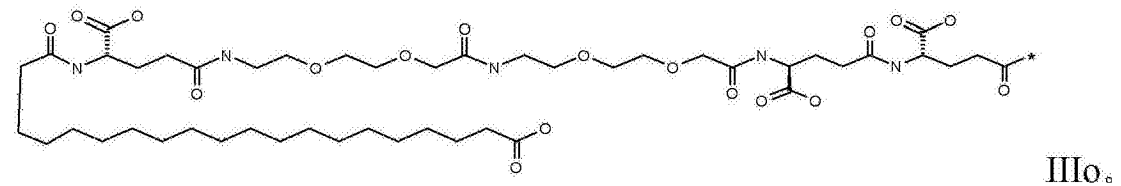
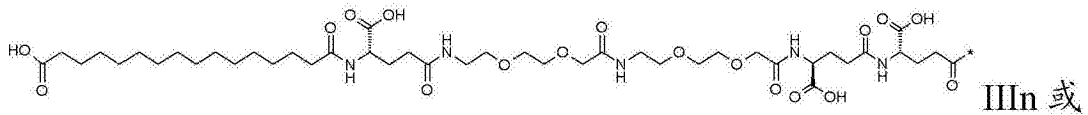
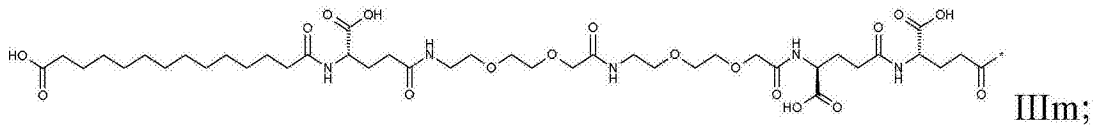
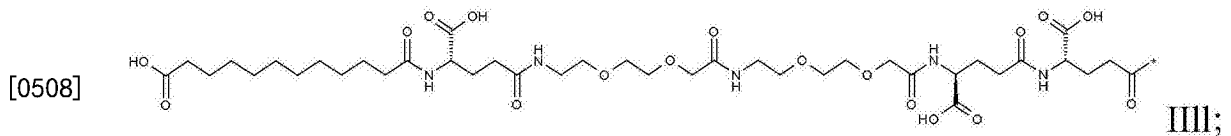
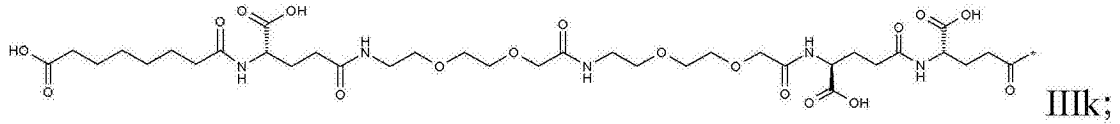
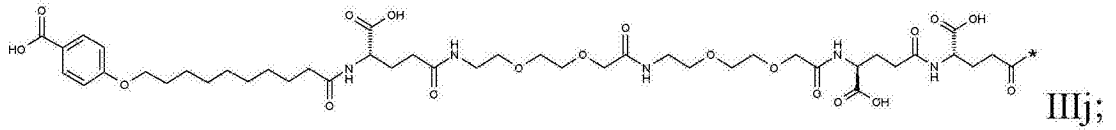
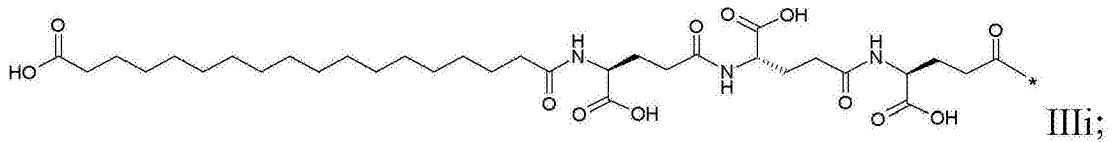
[0505] 180. 实施方案177-178中任一个的取代基，其中当 Z_2 存在时， Z_4 不存在。

[0506] 181. 实施方案177-180中任一个的取代基，其选自下式之一的结构：式IIIa、IIIb、a、IIIb、IIIc、IIId、IIIe、IIIf、IIIg、IIIh、IIIi、IIIj、IIIk、IIIl、IIIm、IIIIn或IIIo：

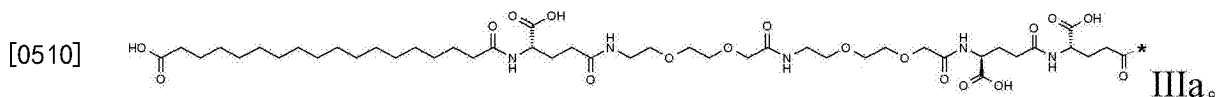


[0507]





[0509] 182. 实施方案177-180中任一个的取代基,其表示下式IIIa的结构:



[0511] 183. 实施方案177-182中任一个的取代基,其中Z₄不存在。

[0512] 184. 实施方案177-182中任一个的取代基,其中Z₃和Z₄不存在。

[0513] 本文所用术语“白蛋白结合残基”意指与人血清白蛋白非共价结合的残基。与治疗性多肽连接的白蛋白结合残基对人血清白蛋白的亲和力通常低于10 μ M,优选低于1 μ M。已知在含有4-40个碳原子的直链和支链亲脂部分中有大量白蛋白结合残基。

[0514] 本发明的其它实施方案涉及药物组合物:

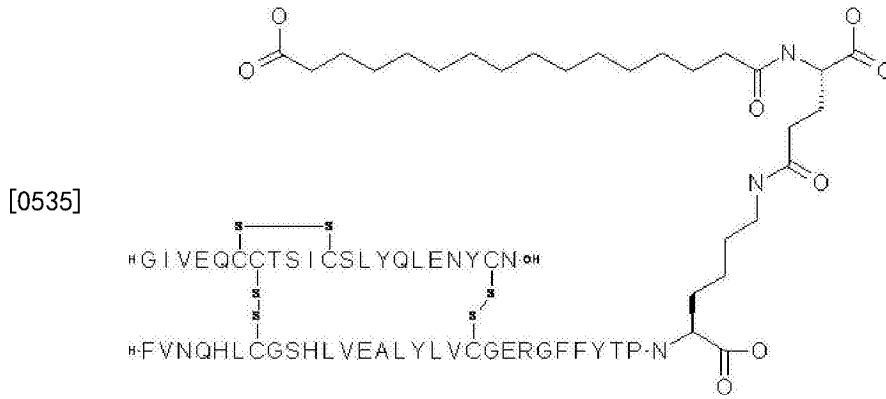
[0515] 185. 一种药物组合物,其包含实施方案1-176中任一个的胰高血糖素肽。

[0516] 186. 实施方案185的药物组合物,其还包含一种或多种其它的治疗活性化合物或物质。

[0517] 187. 实施方案185-186中任一个的药物组合物,其还包含GLP-1化合物。

[0518] 188. 实施方案185-186中任一个的药物组合物,其中GLP-1化合物选自:

[0519] N- ϵ 26-((S)-4-羧基-4-十六烷酰基氨基-丁酰基) [Arg34] GLP-1-(7-37):



[0536] (化合物G5)；

[0537] 191. 实施方案185-190中任一个的药物组合物,其呈单位剂型,包含约0.05mg-约1000mg、例如约0.1mg-约500mg、约2mg-约5mg、例如约0.5mg-约200mg的实施方案1-177中任一个的胰高血糖素肽。

[0538] 192. 实施方案185-190中任一个的药物组合物,其适于胃肠外给药。

[0539] 193. 用于治疗的实施方案1-177中任一个的胰高血糖素肽。

[0540] 本发明的其它实施方案涉及下列胰高血糖素肽:

[0541] 194. 任选与一种或多种其它治疗活性化合物组合的实施方案1-177中任一个的胰高血糖素肽,用于治疗或预防高血糖症、2型糖尿病、葡萄糖耐量减低、1型糖尿病和肥胖症。

[0542] 195. 任选与一种或多种其它治疗活性化合物组合的实施方案1-177中任一个的胰高血糖素肽,用于延迟或防止2型糖尿病的疾病进展。

[0543] 196. 任选与一种或多种其它治疗活性化合物组合的实施方案1-177中任一个的胰高血糖素肽,用于治疗肥胖症或预防体重超重。

[0544] 197. 任选与一种或多种其它治疗活性化合物组合的实施方案1-177中任一个的胰高血糖素肽,用于减少食物摄取。

[0545] 198. 任选与一种或多种其它治疗活性化合物组合的实施方案1-177中任一个的胰高血糖素肽,用于增加能量消耗。

[0546] 199. 任选与一种或多种其它治疗活性化合物组合的实施方案1-177中任一个的胰高血糖素肽,用于减轻体重。

[0547] 200. 任选与一种或多种其它治疗活性化合物组合的实施方案1-177中任一个的胰高血糖素肽,用于延迟从葡萄糖耐量减低(IGT)到2型糖尿病的进展。

[0548] 201. 任选与一种或多种其它治疗活性化合物组合的实施方案1-177中任一个的胰高血糖素肽,用于延迟从2型糖尿病到需要胰岛素的糖尿病的进展。

[0549] 202. 任选与一种或多种其它治疗活性化合物组合的实施方案1-177中任一个的胰高血糖素肽,用于调节食欲。

[0550] 203. 任选与一种或多种其它治疗活性化合物组合的实施方案1-177中任一个的胰高血糖素肽,用于引起饱满感。

[0551] 204. 任选与一种或多种其它治疗活性化合物组合的实施方案1-177中任一个的胰高血糖素肽,用于防止成功减轻体重后体重反弹。

[0552] 205. 任选与一种或多种其它治疗活性化合物组合的实施方案1-177中任一个的胰高血糖素肽,用于治疗与体重超重或肥胖症有关的疾病或状况。

- [0553] 206. 任选与一种或多种其它治疗活性化合物组合的实施方案1-177中任一个的胰高血糖素肽,用于治疗贪食症。
- [0554] 207. 任选与一种或多种其它治疗活性化合物组合的实施方案1-177中任一个的胰高血糖素肽,用于治疗暴食症(binge-eating)。
- [0555] 208. 任选与一种或多种其它治疗活性化合物组合的实施方案1-177中任一个的胰高血糖素肽,用于治疗动脉粥样硬化。
- [0556] 209. 任选与一种或多种其它治疗活性化合物组合的实施方案1-177中任一个的胰高血糖素肽,用于治疗高血压。
- [0557] 210. 任选与一种或多种其它治疗活性化合物组合的实施方案1-177中任一个的胰高血糖素肽,用于治疗2型糖尿病。
- [0558] 211. 任选与一种或多种其它治疗活性化合物组合的实施方案1-177中任一个的胰高血糖素肽,用于治疗葡萄糖耐量减低。
- [0559] 212. 任选与一种或多种其它治疗活性化合物组合的实施方案1-177中任一个的胰高血糖素肽,用于治疗血脂异常(dyslipidemia)。
- [0560] 213. 任选与一种或多种其它治疗活性化合物组合的实施方案1-177中任一个的胰高血糖素肽,用于治疗冠心病。
- [0561] 214. 任选与一种或多种其它治疗活性化合物组合的实施方案1-177中任一个的胰高血糖素肽,用于治疗肝脂肪变性。
- [0562] 215. 任选与一种或多种其它治疗活性化合物组合的实施方案1-177中任一个的胰高血糖素肽,用于治疗肝脂肪变性。
- [0563] 216. 任选与一种或多种其它治疗活性化合物组合的实施方案1-177中任一个的胰高血糖素肽,用于治疗 β -阻断剂中毒。
- [0564] 217. 任选与一种或多种其它治疗活性化合物组合的实施方案1-177中任一个的胰高血糖素肽,其用于抑制胃肠道蠕动,所述抑制可用于与采用X射线、CT扫描和NMR扫描等技术进行的胃肠道检查结合。
- [0565] 218. 任选与一种或多种其它治疗活性化合物组合的实施方案1-177中任一个的胰高血糖素肽,用于治疗或预防低血糖。
- [0566] 219. 任选与一种或多种其它治疗活性化合物组合的实施方案1-177中任一个的胰高血糖素肽,用于治疗或预防胰岛素诱导性低血糖。
- [0567] 220. 任选与一种或多种其它治疗活性化合物组合的实施方案1-177中任一个的胰高血糖素肽,用于治疗或预防反应性低血糖。
- [0568] 221. 任选与一种或多种其它治疗活性化合物组合的实施方案1-177中任一个的胰高血糖素肽,用于治疗或预防糖尿病性低血糖。
- [0569] 222. 任选与一种或多种其它治疗活性化合物组合的实施方案1-177中任一个的胰高血糖素肽,用于治疗或预防非糖尿病性低血糖。
- [0570] 223. 任选与一种或多种其它治疗活性化合物组合的实施方案1-177中任一个的胰高血糖素肽,用于治疗或预防空腹低血糖。
- [0571] 224. 任选与一种或多种其它治疗活性化合物组合的实施方案1-177中任一个的胰高血糖素肽,用于治疗或预防药物诱发性低血糖。

[0572] 225. 任选与一种或多种其它治疗活性化合物组合的实施方案1-177中任一个的胰高血糖素肽,用于治疗或预防胃旁路术诱发性低血糖。

[0573] 226. 任选与一种或多种其它治疗活性化合物组合的实施方案1-177中任一个的胰高血糖素肽,用于治疗或预防妊娠期低血糖。

[0574] 227. 任选与一种或多种其它治疗活性化合物组合的实施方案1-177中任一个的胰高血糖素肽,用于治疗或预防酒精诱发性低血糖。

[0575] 228. 任选与一种或多种其它治疗活性化合物组合的实施方案1-177中任一个的胰高血糖素肽,用于治疗或预防胰岛素瘤。

[0576] 229. 任选与一种或多种其它治疗活性化合物组合的实施方案1-177中任一个的胰高血糖素肽,用于治疗或预防Von Gierkes病。

[0577] 本发明的其它实施方案涉及下列方法:

[0578] 230. 一种用于治疗或预防高血糖症、2型糖尿病、葡萄糖耐量减低、1型糖尿病和肥胖症的方法,所述方法包括将任选与一种或多种其它治疗活性化合物组合的有效量的实施方案1-177中任一个的胰高血糖素肽给予有需要的患者。

[0579] 231. 一种用于延迟或防止2型糖尿病的疾病进展的方法,所述方法包括将任选与一种或多种其它治疗活性化合物组合的有效量的实施方案1-177中任一个的胰高血糖素肽给予有需要的患者。

[0580] 232. 一种用于治疗肥胖症或预防体重超重的方法,所述方法包括将任选与一种或多种其它治疗活性化合物组合的有效量的实施方案1-177中任一个的胰高血糖素肽给予有需要的患者。

[0581] 233. 一种用于减少食物摄取的方法,所述方法包括将任选与一种或多种其它治疗活性化合物组合的有效量的实施方案1-177中任一个的胰高血糖素肽给予有需要的患者。

[0582] 234. 一种用于增加能量消耗的方法,所述方法包括将任选与一种或多种其它治疗活性化合物组合的有效量的实施方案1-177中任一个的胰高血糖素肽给予有需要的患者。

[0583] 235. 一种用于减轻体重的方法,所述方法包括将任选与一种或多种其它治疗活性化合物组合的有效量的实施方案1-177中任一个的胰高血糖素肽给予有需要的患者。

[0584] 236. 一种用于延迟从葡萄糖耐量减低(IGT)到2型糖尿病的进展的方法,所述方法包括将任选与一种或多种其它治疗活性化合物组合的有效量的实施方案1-177中任一个的胰高血糖素肽给予有需要的患者。

[0585] 237. 一种用于延迟从2型糖尿病到需要胰岛素的糖尿病的进展的方法,所述方法包括将任选与一种或多种其它治疗活性化合物组合的有效量的实施方案1-177中任一个的胰高血糖素肽给予有需要的患者。

[0586] 238. 一种用于调节食欲的方法,所述方法包括将任选与一种或多种其它治疗活性化合物组合的有效量的实施方案1-177中任一个的胰高血糖素肽给予有需要的患者。

[0587] 239. 一种用于引起饱满感的方法,所述方法包括将任选与一种或多种其它治疗活性化合物组合的有效量的实施方案1-177中任一个的胰高血糖素肽给予有需要的患者。

[0588] 240. 一种用于防止成功减轻体重后体重反弹的方法,所述方法包括将任选与一种或多种其它治疗活性化合物组合的有效量的实施方案1-177中任一个的胰高血糖素肽给予有需要的患者。

[0589] 241.一种用于治疗与体重超重或肥胖症有关的疾病或状况的方法,所述方法包括将任选与一种或多种其它治疗活性化合物组合的有效量的实施方案1-177中任一个的胰高血糖素肽给予有需要的患者。

[0590] 242.一种用于治疗贪食症的方法,所述方法包括将任选与一种或多种其它治疗活性化合物组合的有效量的实施方案1-177中任一个的胰高血糖素肽给予有需要的患者。

[0591] 243.一种用于治疗暴食症的方法,所述方法包括将任选与一种或多种其它治疗活性化合物组合的有效量的实施方案1-177中任一个的胰高血糖素肽给予有需要的患者。

[0592] 244.一种用于治疗动脉粥样硬化的方法,所述方法包括将任选与一种或多种其它治疗活性化合物组合的有效量的实施方案1-177中任一个的胰高血糖素肽给予有需要的患者。

[0593] 245.一种用于治疗高血压的方法,所述方法包括将任选与一种或多种其它治疗活性化合物组合的有效量的实施方案1-177中任一个的胰高血糖素肽给予有需要的患者。

[0594] 246.一种用于治疗2型糖尿病的方法,所述方法包括将任选与一种或多种其它治疗活性化合物组合的有效量的实施方案1-177中任一个的胰高血糖素肽给予有需要的患者。

[0595] 247.一种用于治疗葡萄糖耐量减低的方法,所述方法包括将任选与一种或多种其它治疗活性化合物组合的有效量的实施方案1-177中任一个的胰高血糖素肽给予有需要的患者。

[0596] 248.一种用于治疗血脂异常的方法,所述方法包括将任选与一种或多种其它治疗活性化合物组合的有效量的实施方案1-177中任一个的胰高血糖素肽给予有需要的患者。

[0597] 249.一种用于治疗冠心病的方法,所述方法包括将任选与一种或多种其它治疗活性化合物组合的有效量的实施方案1-177中任一个的胰高血糖素肽给予有需要的患者。

[0598] 250.一种用于治疗肝脂肪变性的方法,所述方法包括将任选与一种或多种其它治疗活性化合物组合的有效量的实施方案1-177中任一个的胰高血糖素肽给予有需要的患者。

[0599] 251.一种用于治疗 β -阻断剂中毒的方法,所述方法包括将任选与一种或多种其它治疗活性化合物组合的有效量的实施方案1-177中任一个的胰高血糖素肽给予有需要的患者。

[0600] 252.一种用于抑制胃肠道蠕动的的方法,所述抑制可用于与采用X射线、CT扫描和NMR扫描等技术进行的胃肠道检查结合,所述方法包括将任选与一种或多种其它治疗活性化合物组合的有效量的实施方案1-177中任一个的胰高血糖素肽给予有需要的患者。

[0601] 253.一种用于治疗或预防低血糖的方法,所述方法包括将任选与一种或多种其它治疗活性化合物组合的有效量的实施方案1-177中任一个的胰高血糖素肽给予有需要的患者。

[0602] 254.一种用于治疗或预防胰岛素诱导性低血糖的方法,所述方法包括将任选与一种或多种其它治疗活性化合物组合的有效量的实施方案1-177中任一个的胰高血糖素肽给予有需要的患者。

[0603] 255.一种用于治疗或预防反应性低血糖的方法,所述方法包括将任选与一种或多种其它治疗活性化合物组合的有效量的实施方案1-177中任一个的胰高血糖素肽给予有需

要的患者。

[0604] 256.一种用于治疗或预防糖尿病性低血糖的方法,所述方法包括将任选与一种或多种其它治疗活性化合物组合的有效量的实施方案1-177中任一个的胰高血糖素肽给予有需要的患者。

[0605] 257.一种用于治疗或预防非糖尿病性低血糖的方法,所述方法包括将任选与一种或多种其它治疗活性化合物组合的有效量的实施方案1-177中任一个的胰高血糖素肽给予有需要的患者。

[0606] 258.一种用于治疗或预防空腹低血糖的方法,所述方法包括将任选与一种或多种其它治疗活性化合物组合的有效量的实施方案1-177中任一个的胰高血糖素肽给予有需要的患者。

[0607] 259.一种用于治疗或预防药物诱发性低血糖的方法,所述方法包括将任选与一种或多种其它治疗活性化合物组合的有效量的实施方案1-177中任一个的胰高血糖素肽给予有需要的患者。

[0608] 260.一种用于治疗或预防胃旁路术诱发性低血糖的方法,所述方法包括将任选与一种或多种其它治疗活性化合物组合的有效量的实施方案1-177中任一个的胰高血糖素肽给予有需要的患者。

[0609] 261.一种用于治疗或预防妊娠期低血糖的方法,所述方法包括将任选与一种或多种其它治疗活性化合物组合的有效量的实施方案1-177中任一个的胰高血糖素肽给予有需要的患者。

[0610] 262.一种用于治疗或预防酒精诱发性低血糖的方法,所述方法包括将任选与一种或多种其它治疗活性化合物组合的有效量的实施方案1-177中任一个的胰高血糖素肽给予有需要的患者。

[0611] 263.一种用于治疗或预防胰岛素瘤的方法,所述方法包括将任选与一种或多种其它治疗活性化合物组合的有效量的实施方案1-177中任一个的胰高血糖素肽给予有需要的患者。

[0612] 264.一种用于治疗或预防Von Girkes病的方法,所述方法包括将任选与一种或多种其它治疗活性化合物组合的有效量的实施方案1-177中任一个的胰高血糖素肽给予有需要的患者。

[0613] 本发明的其它实施方案涉及下列用途:

[0614] 265.实施方案1-177中任一个的胰高血糖素肽在制备药物中的用途。

[0615] 266.实施方案1-177中任一个的胰高血糖素肽在制备用于治疗或预防以下疾病中的药物中的用途:高血糖症、2型糖尿病、葡萄糖耐量减低、1型糖尿病和肥胖症。

[0616] 267.实施方案1-177中任一个的胰高血糖素肽在制备用于以下方面的药物中的用途:延迟或防止2型糖尿病的疾病进展、治疗肥胖症或预防体重超重、减少食物摄取、增加能量消耗、减轻体重、延迟从葡萄糖耐量减低(IGT)到2型糖尿病的进展;延迟从2型糖尿病到需要胰岛素的糖尿病的进展;调节食欲;引起饱满感;防止成功减轻体重后体重反弹;治疗与体重超重或肥胖症有关的疾病或状态;治疗贪食症;治疗暴食症;治疗动脉粥样硬化、高血压、2型糖尿病、IGT、血脂异常、冠心病、脂肪肝变性,治疗 β -阻断剂中毒,抑制胃肠道蠕动,所述抑制可用于与采用X射线、CT扫描和NMR扫描等技术进行的胃肠道检查结合。

[0617] 268. 实施方案1-177中任一个的胰高血糖素肽在制备用于治疗或预防以下疾病的药物中的用途:低血糖、胰岛素诱导性低血糖、反应性低血糖、糖尿病性低血糖、非糖尿病性低血糖、空腹低血糖、药物诱发性低血糖、胃旁路术诱发性低血糖、妊娠期低血糖、酒精诱发性低血糖、胰岛素瘤和Von Girkes病。

[0618] 本发明的其它实施方案涉及以下方面:

[0619] 269. 前述实施方案中任一个的胰高血糖素肽,其中所述胰高血糖素肽在ThT原纤维形成测定法中具有超过70%的回收率。

[0620] 270. 前述实施方案中任一个的胰高血糖素肽,其中所述胰高血糖素肽在ThT原纤维形成测定法中具有超过90%的回收率。

[0621] 271. 前述实施方案中任一个的胰高血糖素肽,其中所述胰高血糖素肽在ThT原纤维形成测定法中具有约100%的回收率。

[0622] 272. 前述实施方案中任一个的胰高血糖素肽,其中所述胰高血糖素肽在ThT原纤维形成测定法中具有超过7小时的延迟时间。

[0623] 273. 前述实施方案中任一个的胰高血糖素肽,其中所述胰高血糖素肽在ThT原纤维形成测定法中具有超过20小时的延迟时间。

[0624] 274. 前述实施方案中任一个的胰高血糖素肽,其中所述胰高血糖素肽在ThT原纤维形成测定法中具有45小时或更长的延迟时间。

[0625] 在本发明的用途和方法的某些实施方案中,本发明的胰高血糖素肽可与不止一种上述合适的其它治疗活性化合物或物质组合给予或施用,例如与以下活性化合物或物质组合:二甲双胍和磺脲例如格列本脲;磺脲和阿卡波糖;那格列奈和二甲双胍;阿卡波糖和二甲双胍;磺脲、二甲双胍和曲格列酮;胰岛素和磺脲;胰岛素和二甲双胍;胰岛素,二甲双胍和磺脲;胰岛素和曲格列酮;胰岛素和洛伐他汀,等等。

[0626] 特别在为了与治疗或预防肥胖症或体重超重有关(即与减轻或防止过度肥胖有关)的目的而任选与一种或多种上文公开的其它治疗活性化合物或物质组合给予本发明的胰高血糖素肽的情况下,为了实现减轻体重或防止体重增加,采用这类给药与手术介入的组合,可能是适当的,例如与肥胖病手术介入的组合。常用的肥胖病手术的实例包括但不限于下列手术:垂直遮断胃成形术(vertical bandedgastroplasty)(亦称“胃分隔”),其中将一部分胃缝合以形成较小的用作新胃的前胃囊;胃束带手术(gastric banding),例如可调节胃束带系统(例如Swedish Adjustable Gastric Band(SAGB)、LAP-BAND™或MIDband™),其中使用弹性体(例如硅酮)带产生小的用作新胃的前胃囊,其中患者可调节弹性体(例如硅酮)带的大小;以及胃旁路手术,例如“Roux-en-Y”旁路术,其中用缝合装置(stapler device)产生小的胃囊并将其与小肠远端连接,小肠上部以Y型形状再附着。

[0627] 本发明的胰高血糖素肽(任选与一种或多种上文公开的其它治疗活性化合物或物质组合)的给予可发生在进行所述肥胖病手术介入前的一段时间和/或其之后的一段时间。在许多情况下,在进行肥胖病手术介入后开始给予本发明的化合物可能是优选的。

[0628] 术语“肥胖症”意指脂肪组织过量。当能量摄取超过能量消耗时,过量的卡路里便保存在脂肪组织中,如果这种净的正平衡持续,便导致肥胖症,即体重平衡有两个组分,任一端(摄取或消耗)异常都可导致肥胖症。在这种情况下,最好把肥胖症视为引起健康风险的任何程度的过量脂肪组织。正常和肥胖个体之间的区别可能仅仅是近似的,但肥胖症引

起的健康风险或许随脂肪组织增加而持续。然而,在本发明的情况下,体重指数(BMI=体重(千克)除以身高(米)的平方)超过25的个体被视为肥胖。

[0629] 本发明的其它实施方案涉及以下方面:

[0630] 275.一种下式I的化合物或其药学上可接受的盐、酰胺、酸或前药:

[0631] His-X₂-Gln-Gly-Thr-X₆-X₇-Ser-Asp-X₁₀-Ser-X₁₂-Tyr-Leu-Asp-X₁₆-X₁₇-X₁₈-Ala-X₂₀-X₂₁-Phe-Val-X₂₄-X₂₅-Leu-X₂₇-X₂₈-X₂₉-X₃₀ [I]

[0632] 其中

[0633] X₂表示Ser、Aib或D-Ser;

[0634] X₆表示Phe或Gln;

[0635] X₇表示Thr、Lys或Orn;

[0636] X₁₀表示Tyr、Lys、Orn或(p) Tyr;

[0637] X₁₂表示Lys、Orn或Arg;

[0638] X₁₆表示Ser、Glu、Thr、Lys或Orn;

[0639] X₁₇表示Arg、Gln、Lys或Orn;

[0640] X₁₈表示Arg、Gln、Ala、Lys或Orn;

[0641] X₂₀表示Arg、Gln、Lys或Orn;

[0642] X₂₁表示Asp、Glu或Lys;

[0643] X₂₄表示Gln、Lys、Arg、His、Glu、Asp、Gly、Pro、Ser或Orn;

[0644] X₂₅表示Trp、Arg、Lys、His、Glu、Asp、Gly、Pro、Phe、Ser、Tyr、(p) Tyr或Orn;

[0645] X₂₇表示Met、Met(O)、Val、Pro、Leu、Arg、Lys或Orn;

[0646] X₂₈表示Asn、Lys、Arg、Ser、Thr、Glu、Asp、Ala、Gln、Pro或Orn;

[0647] X₂₉表示Thr、Glu、Asp、Lys、Arg、Pro或Orn和

[0648] X₃₀不存在或表示Lys、Gly、Pro或Orn,

[0649] 在式I的化合物的一个或多个下列氨基酸位置上白蛋白结合残基包含两个或更多个带负电荷的基团:X₇、X₁₀、X₁₂、X₁₆、X₁₇、X₁₈、X₂₀、X₂₁、X₂₄、X₂₅、X₂₇、X₂₈、X₂₉和/或X₃₀,其中所述带负电荷的基团之一是所述白蛋白结合残基的末端,并且所述白蛋白结合残基在Lys的ε位上或在Orn的δ位上连接。

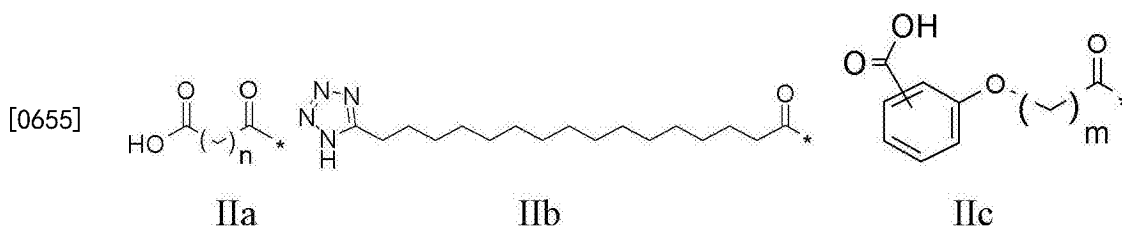
[0650] 276.实施方案181的化合物,其选自实施例的胰高血糖素肽。

[0651] 277.实施方案275-276中任一个的化合物,其中所述白蛋白结合残基具有下式II:

[0652] Z₁-Z₂-Z₃-Z₄ [II]

[0653] 其中,

[0654] Z₁表示下式IIa、IIb或IIc之一的结构;



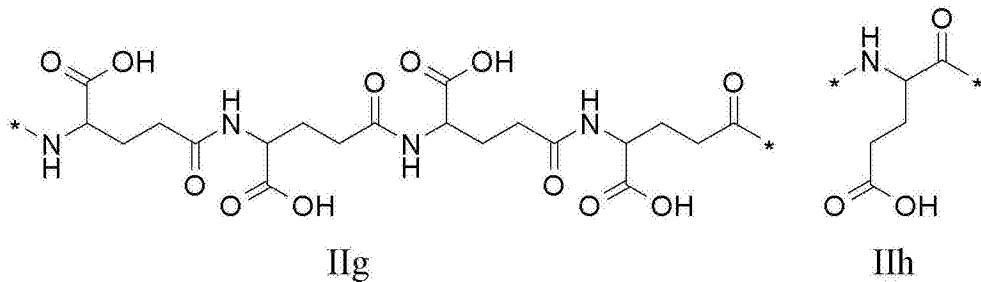
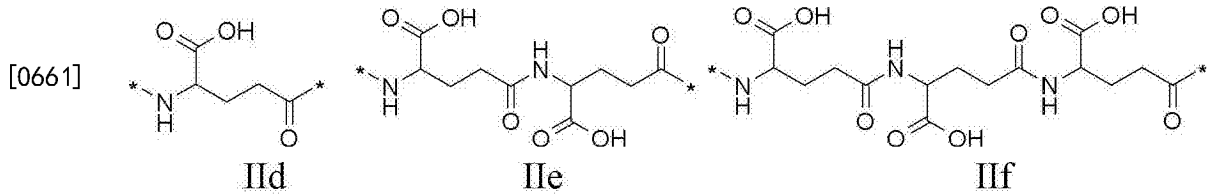
[0656] 其中式IIa中的n为6-20,

[0657] 式IIc中的m为5-9,

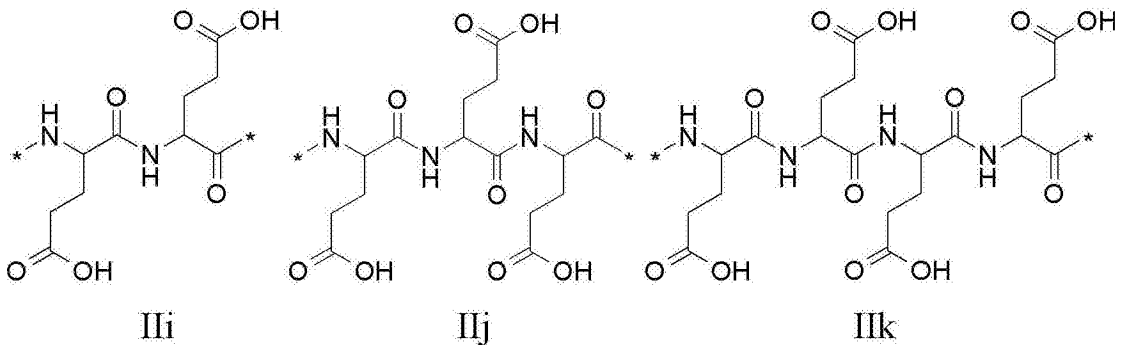
[0658] 式IIc的COOH基团可存在于苯环的2、3或4位上，

[0659] 式IIa、IIb和IIc中的符号*表示与Z₂、Z₃或Z₄中的氮的连接点；

[0660] Z₂不存在或表示下式IIId、IIe、IIf、IIg、IIh、Iii、IIj或IIk之一的结构；



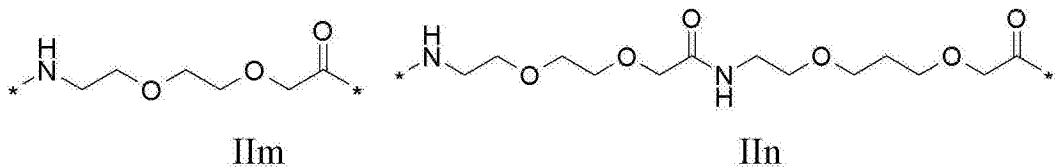
[0662]



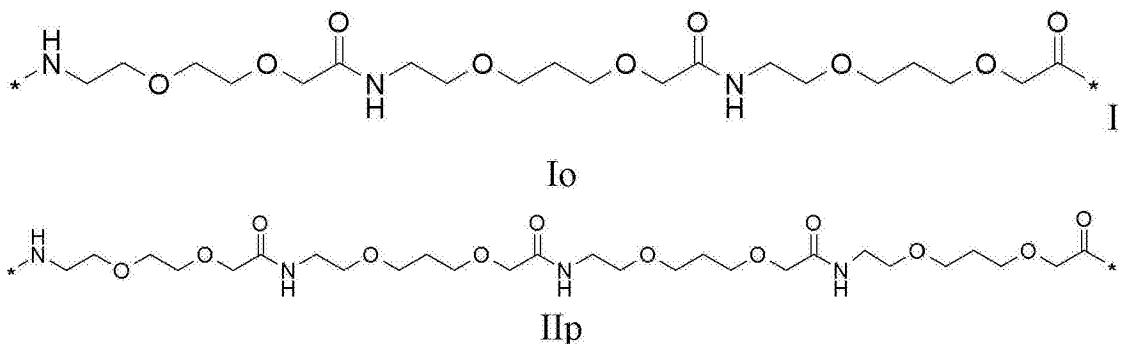
[0663] 其中每个氨基酸部分独立地为L或D；

[0664] 其中Z₂通过具有符号*的碳原子与Z₃、Z₄的氮或与胰高血糖素肽的赖氨酸的ε氮或鸟氨酸的δ氮连接；

[0665] Z₃不存在或表示下式IIIm、IIIn、IIo或IIp之一的结构；



[0666]

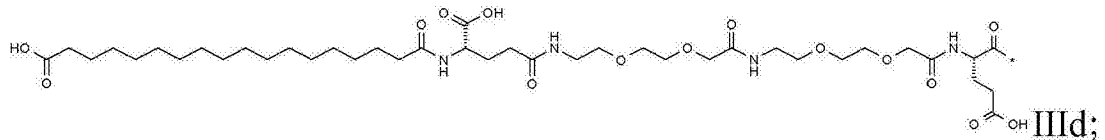
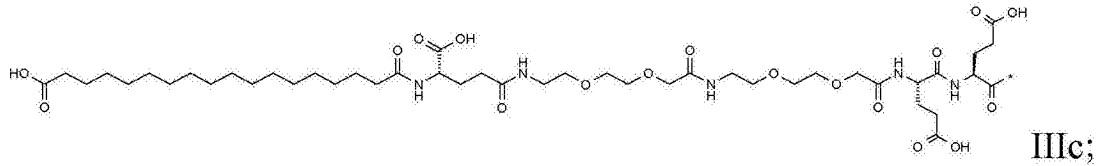
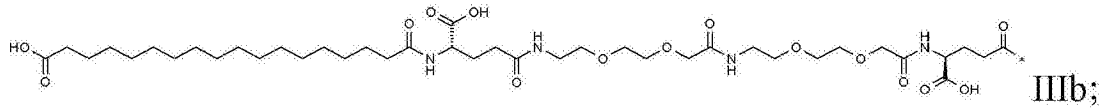
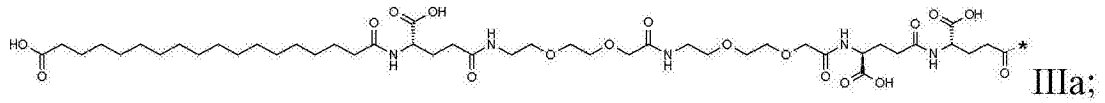


[0667] Z₃通过具有符号*的Z₃的碳与具有符号*的Z₄的氮或与胰高血糖素肽的赖氨酸的ε氮或鸟氨酸的δ氮连接；

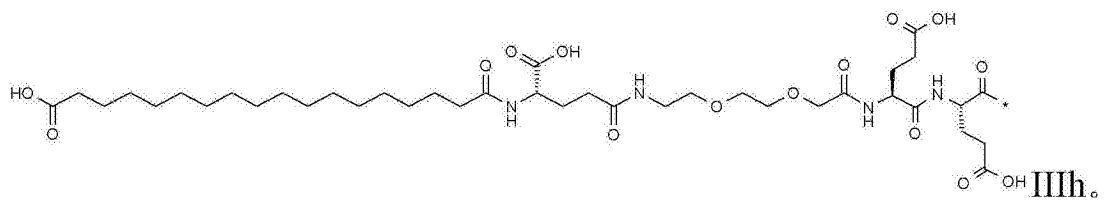
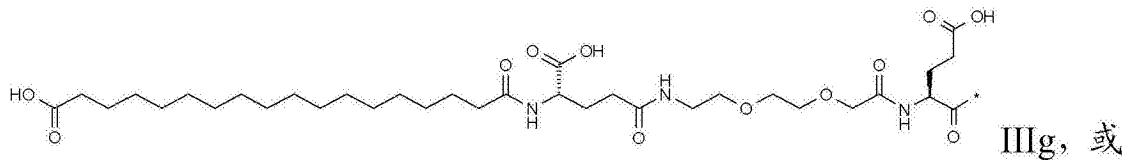
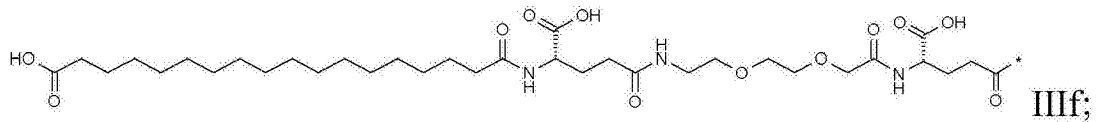
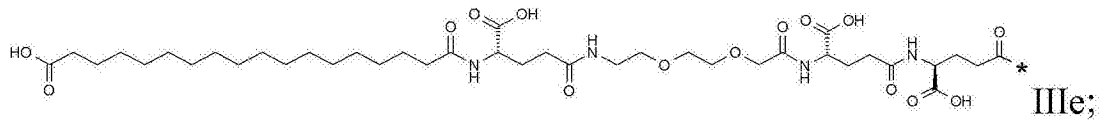
[0668] Z₄不存在或表示式IIId、IIe、IIf、IIg、IIh、Iii、IIj或IIk之一的结构；其中每个氨

基酸部分独立地为L或D,其中Z₄通过具有符号*的碳与胰高血糖素肽的赖氨酸的ε氮或鸟氨酸的δ氮连接。

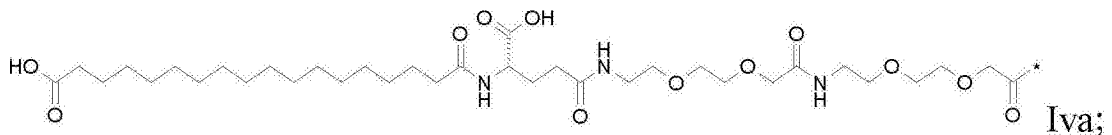
[0669] 278. 实施方案277的白蛋白结合残基,其选自下式IIIa、IIIb、IIIc、IIId、IIIe、III f或IIIg之一的结构:



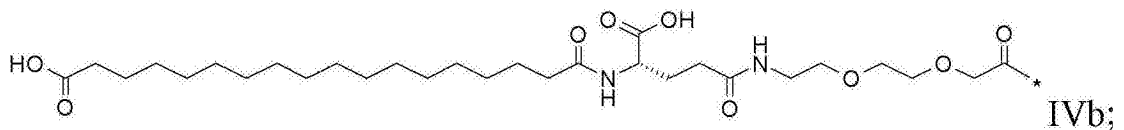
[0670]

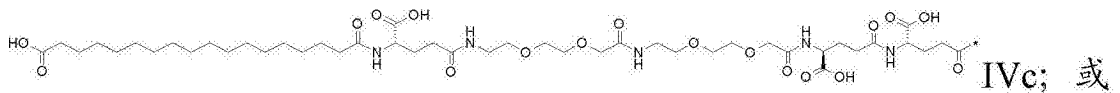


[0671] 279. 实施方案276-278的白蛋白结合残基,其选自下式Iva、IVb、IVc或IVd之一的结构:

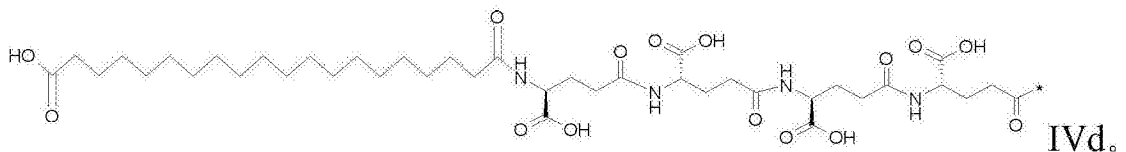


[0672]





[0673]



[0674] 280. 一种药物组合物,其包含实施方案275-277中任一个的化合物。

[0675] 281. 实施方案275-277中任一个的药物组合物,其还包含一种或多种其它的治疗活性化合物或物质。

[0676] 282. 实施方案中任一个的药物组合物,其还包含GLP-1化合物。

[0677] 283. 实施方案中任一个的药物组合物,其还包含胰岛素化合物。

[0678] 284. 适于胃肠外给药的实施方案中任一个的药物组合物。

[0679] 285. 用于治疗实施方案中任一个的化合物。

[0680] 286. 实施方案中任一个的化合物在制备药物中的用途。

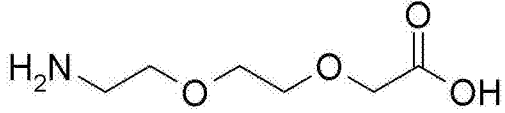
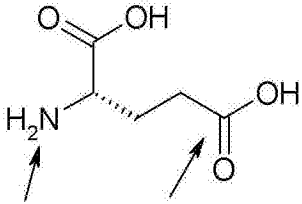
[0681] 287. 实施方案中任一个的化合物在制备用于治疗或预防以下疾病的药物中的用途:高血糖症、2型糖尿病、葡萄糖耐量减低、1型糖尿病和肥胖症。

[0682] 288. 实施方案中任一个的化合物在制备用于以下方面的药物中的用途:延迟或防止2型糖尿病的疾病进展、治疗肥胖症或预防体重超重、减少食物摄取、增加能量消耗、减轻体重、延迟从葡萄糖耐量减低(IGT)到2型糖尿病的进展;延迟从2型糖尿病到需要胰岛素的糖尿病的进展;调节食欲;引起饱满感;防止成功减轻体重后体重反弹;治疗与体重超重或肥胖症有关的疾病或状态;治疗贪食症;治疗暴食症;治疗动脉粥样硬化、高血压、2型糖尿病、IGT、血脂异常、冠心病、肝脂肪变性,治疗β-阻断剂中毒,抑制胃肠道蠕动,所述抑制可用于与采用X射线、CT扫描和NMR扫描等技术进行的胃肠道检查结合。

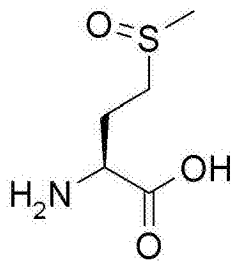
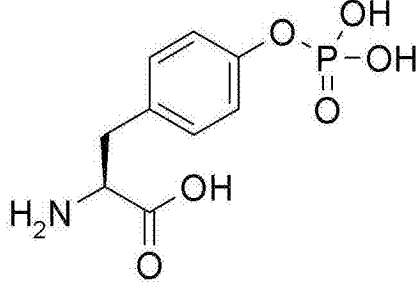
[0683] 289. 实施方案中任一个的化合物在制备用于治疗或预防以下疾病的药物中的用途:低血糖、胰岛素诱导性低血糖、反应性低血糖、糖尿病性低血糖、非糖尿病性低血糖、空腹低血糖、药物诱发性低血糖、胃旁路术诱发性低血糖、妊娠期低血糖、酒精诱发性低血糖、胰岛素瘤和Von Girkes病。

[0684] 本文所用氨基酸缩写词具有下列含义:

[0685]

Ado	
Aib	2-氨基异丁酸
Ala	丙氨酸
Asn	天冬酰胺
Asp	天冬氨酸
Arg	精氨酸
Cit	瓜氨酸
Cys	半胱氨酸
Gln	谷氨酰胺
Glu	谷氨酸
γ -Glu	 α -氨基和 γ -羧基形成两个相邻残基间的酰胺键
Gly	甘氨酸
His	组氨酸
Hyp	4-羟脯氨酸
Ile	异亮氨酸
Leu	亮氨酸
Lys	赖氨酸
Met	甲硫氨酸

[0686]

Met(O)	
Orn	鸟氨酸
Phe	苯丙氨酸
Pro	脯氨酸
Ser	丝氨酸
Thr	苏氨酸
Tyr	酪氨酸
p(Tyr)	
Trp	色氨酸
Val	缬氨酸

[0687] 以D-开始、接着三字母代码的氨基酸缩写词,例如D-Ser、D-His等,是指相应氨基酸的D-对映异构体,例如D-丝氨酸、D-组氨酸等。

[0688] 药物组合物

[0689] 含有本发明化合物的药物组合物可通过常规技术制备,例如以下文献所述方法: Remington's Pharmaceutical Sciences, 1985或Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 第19版, 1995。

[0690] 正如已提及的一样,本发明的一个方面是提供包含以下列浓度存在的本发明化合物的药物制剂: 约0.01mg/mL-约25mg/mL, 例如约0.1mg/mL-约5mg/mL和约2mg/mL-约5mg/mL, 且其中所述制剂的pH为2.0-10.0。药物制剂可包含以约0.1mg/mL-约50mg/mL的浓度存在的本发明的化合物, 且其中所述制剂的pH为2.0-10.0。所述制剂还可包含缓冲系统、防腐剂、等渗剂、螯合剂、稳定剂和表面活性剂。在本发明的一个实施方案中, 所述药物制剂是含水制剂, 即包含水的制剂。这类制剂通常是溶液剂或混悬剂。在本发明的又一个实施方案中, 药物制剂是含水溶液剂。术语“含水制剂”定义为包含至少50%w/w水的制剂。同样地, 术语“含水溶液剂”定义为包含至少50%w/w水的溶液剂, 术语“含水混悬剂”定义为包含至少50%w/w水的混悬剂。

[0691] 在另一个实施方案中, 药物制剂是冻干制剂, 医师或患者在用前向其中加入溶剂

和/或稀释剂。

[0692] 在另一个实施方案中,药物制剂是无需任何预先溶解便可随时使用的干燥制剂(例如冷冻干燥或喷雾干燥的)。

[0693] 在又一个方面,本发明涉及包含本发明化合物的含水溶液和缓冲剂的药物制剂,其中所述化合物以0.1mg/ml或更高的浓度存在,且其中所述制剂的pH为约2.0-约10.0。

[0694] 在又一个方面,本发明涉及包含本发明化合物的含水溶液和缓冲剂的药物制剂,其中所述化合物以0.1mg/ml或更高的浓度存在,且其中所述制剂的pH为约7.0-约8.5。

[0695] 在本发明的另一个实施方案中,制剂的pH选自2.0、2.1、2.2、2.3、2.4、2.5、2.6、2.7、2.8、2.9、3.0、3.1、3.2、3.3、3.4、3.5、3.6、3.7、3.8、3.9、4.0、4.1、4.2、4.3、4.4、4.5、4.6、4.7、4.8、4.9、5.0、5.1、5.2、5.3、5.4、5.5、5.6、5.7、5.8、5.9、6.0、6.1、6.2、6.3、6.4、6.5、6.6、6.7、6.8、6.9、7.0、7.1、7.2、7.3、7.4、7.5、7.6、7.7、7.8、7.9、8.0、8.1、8.2、8.3、8.4、8.5、8.6、8.7、8.8、8.9、9.0、9.1、9.2、9.3、9.4、9.5、9.6、9.7、9.8、9.9和10.0。优选制剂的pH离本发明化合物的等电点至少1pH单位,甚至更优选制剂的pH离本发明化合物的等电点至少2pH单位。

[0696] 在本发明的又一个实施方案中,缓冲剂选自乙酸钠、碳酸钠、柠檬酸盐、甘氨酸、组氨酸、赖氨酸、精氨酸、磷酸二氢钠、磷酸氢二钠、磷酸钠和三(羟基甲基)-氨基甲烷、hepes、N-二(羟乙基)甘氨酸、曲辛(tricine)、苹果酸、琥珀酸盐、马来酸、富马酸、酒石酸、天冬氨酸或其混合物。这些具体缓冲剂的每一种都构成本发明的备选实施方案。

[0697] 在本发明的又一个实施方案中,所述制剂还包含药学上可接受的防腐剂。在本发明的又一个实施方案中,防腐剂选自苯酚、邻甲酚、间甲酚、对甲酚、对羟基苯甲酸甲酯、对羟基苯甲酸丙酯、2-苯氧基乙醇、对羟基苯甲酸丁酯、2-苯基乙醇、苯甲醇、乙醇、三氯叔丁醇和硫柳汞(thiomerosal)、溴硝丙二醇、苯甲酸、咪唑、氯己定(chlorohexidine)、脱氢醋酸钠、氯甲酚、对羟基苯甲酸乙酯、苜蓿氯铵、氯苯甘醚(chlorphenesine)(3p-氯苯氧基丙烷-1,2-二醇)或其混合物。在本发明的又一个实施方案中,防腐剂以0.1mg/ml-30mg/ml的浓度存在。在本发明的又一个实施方案中,防腐剂以0.1mg/ml-20mg/ml的浓度存在。在本发明的又一个实施方案中,防腐剂以0.1mg/ml-5mg/ml的浓度存在。在本发明的又一个实施方案中,防腐剂以5mg/ml-10mg/ml的浓度存在。在本发明的又一个实施方案中,防腐剂以10mg/ml-20mg/ml的浓度存在。这些具体防腐剂的每一种都构成本发明的备选实施方案。药物组合物中防腐剂的使用为技术人员所熟知。为方便起见,作出对Remington:The Science and Practice ofPharmacy,第19版,1995的引用。

[0698] 在本发明的又一个实施方案中,所述制剂还包含等渗剂。在本发明的又一个实施方案中,等渗剂选自盐(例如氯化钠)、糖或糖醇、氨基酸(例如L-甘氨酸、L-组氨酸、精氨酸、赖氨酸、异亮氨酸、天冬氨酸、色氨酸、苏氨酸)、糖醇(例如甘油(丙三醇)、1,2-丙二醇(丙二醇)、1,3-丙二醇、1,3-丁二醇)、聚乙二醇(例如PEG400)或其混合物。可以使用任何糖例如单糖、二糖或多糖,或水溶性葡聚糖,包括例如果糖、葡萄糖、甘露糖、山梨糖、木糖、麦芽糖、乳糖、蔗糖、海藻糖、葡聚糖、普鲁兰(pullulan)、糊精、环糊精、可溶性淀粉、羟乙基淀粉和羧甲基纤维素-Na。在一个实施方案中,糖添加剂为蔗糖。糖醇定义为具有至少一个-OH基团的C4-C8烃,包括例如甘露醇、山梨糖醇、肌醇、半乳糖醇(galacititol)、卫矛醇、木糖醇和

阿拉伯糖醇。在一个实施方案中,糖醇添加剂为甘露醇。上述糖或糖醇可单独或组合使用。用量无固定限制,只要糖或糖醇可溶于液体制剂,并且不会不利地影响采用本发明的方法达到的稳定作用即可。在一个实施方案中,糖或糖醇浓度介于约1mg/ml和约150mg/ml之间。在本发明的又一个实施方案中,等渗剂以1mg/ml-50mg/ml的浓度存在。在本发明的又一个实施方案中,等渗剂以1mg/ml-7mg/ml的浓度存在。在本发明的又一个实施方案中,等渗剂以8mg/ml-24mg/ml的浓度存在。在本发明的又一个实施方案中,等渗剂以25mg/ml-50mg/ml的浓度存在。这些具体等渗剂的每一种构成本发明的备选实施方案。药物组合物中等渗剂的使用为技术人员所熟知。为方便起见,作出对Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 第19版, 1995的引用

[0699] 在本发明的又一个实施方案中,所述制剂还包含螯合剂。在本发明的又一个实施方案中,螯合剂选自乙二胺四乙酸(EDTA)、柠檬酸和天冬氨酸的盐及其混合物。在本发明的又一个实施方案中,螯合剂以0.1mg/ml-5mg/ml的浓度存在。在本发明的又一个实施方案中,螯合剂以0.1mg/ml-2mg/ml的浓度存在。在本发明的又一个实施方案中,螯合剂以2mg/ml-5mg/ml的浓度存在。这些具体螯合剂的每一种都构成本发明的备选实施方案。药物组合物中螯合剂的使用为技术人员所熟知。为方便起见,作出对Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 第19版, 1995的引用。

[0700] 在本发明的又一个实施方案中,所述制剂还包含稳定剂。药物组合物中稳定剂的使用为技术人员所熟知。为方便起见,作出对Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 第19版, 1995的引用。

[0701] 更具体地说,本发明的组合物是稳定的液体药物组合物,其治疗活性组分包括在液体药物制剂保存期间可能出现聚集体形成的多肽。所谓“聚集体形成”意指导致寡聚体形成的多肽分子间的物理相互作用,该寡聚物可保持可溶性,或者是从溶液中沉淀出的大的可见聚集体。所谓“保存期间”意指液体药物组合物或制剂一旦制备,不会立即给予受试者。更确切地讲,在制备后,将其包装以液体形式、冷冻状态,或以稍后复溶成液体形式的干燥形式或以适于给予受试者的其它形式保存。所谓“干燥形式”意指通过以下方法干燥的液体药物组合物或制剂:冷冻干燥(即冻干;参见例如Williams和Polli (1984) J. Parenteral Sci. Technol. 38:48-59)、喷雾干燥(参见Masters (1991), 载于Spray-Drying Handbook (第5版; Longman Scientific and Technical, Essex, U.K.), 第491-676页; Broadhead等 (1992) Drug Devel. Ind. Pharm. 18:1169-1206; 以及Mumenthaler等 (1994) Pharm. Res. 11: 12-20) 或风干(Carpenter和Crowe (1988) Cryobiology 25:459-470; 及Roser (1991) Biopharm. 4:47-53)。在液体药物组合物保存期间多肽的聚集体形成可不利地影响该多肽的生物活性,导致药物组合物的治疗效能损失。此外,聚集体形成可引起其它问题,例如当使用输注系统给予含有多肽的药物组合物时管道、滤膜或泵的阻塞。

[0702] 本发明的药物组合物还可包含足以减少组合物保存期间多肽的聚集体形成的量的氨基酸碱(amino acid base)。所谓“氨基酸碱”意指氨基酸或氨基酸的组合,其中任何给定的氨基酸以其游离碱的形式或以其盐的形式存在。如果使用氨基酸的组合,全部氨基酸可以其游离碱形式存在,全部可以其盐形式存在,或者一些可以其游离碱形式存在,而另一些以其盐形式存在。在一个实施方案中,用于制备本发明组合物的氨基酸是具有带电荷的侧链的氨基酸,例如精氨酸、赖氨酸、天冬氨酸和谷氨酸。在一个实施方案中,用于制备本发

明组合物的氨基酸是甘氨酸。具体氨基酸(例如甲硫氨酸、组氨酸、咪唑、精氨酸、赖氨酸、异亮氨酸、天冬氨酸、色氨酸、苏氨酸和其混合物)的任何立体异构体(即L或D)或这些立体异构体的组合都可存在于本发明的药物组合中,只要具体的氨基酸以其游离碱形式或其盐形式存在。在一个实施方案中,使用L-立体异构体。本发明的组合物还可用这些氨基酸的类似物配制。所谓“氨基酸类似物”意指天然存在的氨基酸的衍生物,其产生减少在本发明的液体药物组合物保存期间的多肽聚集体形成的所需效果。合适的精氨酸类似物包括例如氨基胍、鸟氨酸和N-单乙基L-精氨酸,合适的甲硫氨酸类似物包括乙硫氨酸和丁硫氨酸(buthionine),合适的半胱氨酸类似物包括S-甲基-L半胱氨酸。与其它氨基酸一样,将氨基酸类似物以其游离碱形式或其盐形式掺入组合物中。在本发明的又一个实施方案中,以足以防止或延迟蛋白质聚集的浓度,使用氨基酸或氨基酸类似物。

[0703] 在本发明的又一个实施方案中,当作为治疗剂起作用的多肽是包含至少一个易受氧化的甲硫氨酸残基时,可加入甲硫氨酸(或其它含硫氨基酸或氨基酸类似物)以抑制甲硫氨酸残基氧化成甲硫氨酸亚砷。所谓“抑制”意指甲硫氨酸氧化物质(oxidized species)随时间的推移发生的最小积聚。抑制甲硫氨酸氧化导致多肽以其适合的分子形式得到更大的保留。可以使用甲硫氨酸的任何立体异构体(L、D或其混合物)。要加入的量应是足以抑制甲硫氨酸残基氧化的量,使得甲硫氨酸亚砷的量可被管理机构接受。这通常意味着组合物含有不超过约10%-约30%的甲硫氨酸亚砷。这一般可通过加入甲硫氨酸,使得所加入的甲硫氨酸与甲硫氨酸残基之比的范围为约1:1-约1000:1、例如10:1-约100:1来实现。

[0704] 在本发明的又一个实施方案中,所述制剂还包含选自高分子量聚合物或低分子量化合物的稳定剂。在本发明的又一个实施方案中,稳定剂选自聚乙二醇(例如PEG 3350)、聚乙烯醇(PVA)、聚乙烯吡咯烷酮、羧基/羟基纤维素或其衍生物(例如HPC、HPC-SL、HPC-L和HPMC)、环糊精、含硫物质如单硫代甘油、巯基乙酸和2-甲基硫代乙醇和不同的盐(例如氯化钠)。这些具体稳定剂的每一种都构成本发明的备选实施方案。

[0705] 药物组合物还可包含其它稳定剂,其进一步提高其中的治疗活性多肽的稳定性。对本发明特别有益的稳定剂包括但不限于甲硫氨酸和EDTA,其保护多肽免受甲硫氨酸氧化;以及非离子型表面活性剂,其保护多肽免于与冻融或机械剪切有关的聚集。

[0706] 在本发明的又一个实施方案中,所述制剂还包含表面活性剂。在本发明的又一个实施方案中,表面活性剂选自洗涤剂、乙氧基化蓖麻油、聚乙二醇化(polyglycolyzed)甘油酯、乙酰化单甘油酯、山梨糖醇酐脂肪酸酯、聚氧丙烯-聚氧乙烯嵌段共聚物(例如泊洛沙姆例如Pluronic®F68、泊洛沙姆188和407、Triton X-100)、聚氧乙烯化山梨糖醇酐脂肪酸酯、星形PEO、聚氧乙烯和聚乙烯衍生物例如烷基化和烷氧基化衍生物(吐温例如Tween-20、Tween-40、Tween-80和Brij-35)、聚氧乙烯羟基硬脂酸酯、单甘油酯或其乙氧基化衍生物、二甘油酯或其聚氧乙烯衍生物、醇类、甘油、凝集素类和磷脂类(例如磷脂酰丝氨酸、磷脂酰胆碱、磷脂酰乙醇胺、磷脂酰肌醇、双磷脂酰甘油和鞘磷脂)、磷脂衍生物(例如二棕榈酰磷脂酸)和溶血磷脂衍生物(例如棕榈酰溶血磷脂酰-L-丝氨酸和乙醇胺、胆碱、丝氨酸或苏氨酸的1-酰基-sn-甘油-3-磷酸酯)及溶血磷脂酰胆碱和磷脂酰胆碱的烷基、烷氧基(烷基酯)、烷氧基(烷基醚)衍生物,例如溶血磷脂胆碱的月桂酰和肉豆蔻酰衍生物、二棕榈酰磷脂酰胆碱以及极性头基团(即胆碱类、乙醇胺类、磷脂酸、丝氨酸类、苏氨酸类、甘油、肌醇)的修饰物,和带正电的DODAC、DOTMA、DCP、BISHOP、溶血磷脂酰丝氨酸和溶血磷脂酰苏氨酸

以及甘油磷脂类(例如脑磷脂)、甘油糖脂类(例如吡喃型半乳糖苷(galactopyransoide))、鞘糖脂类(例如神经酰胺、神经节苷脂)、十二烷基磷酸胆碱、鸡蛋溶血卵磷脂、梭链孢酸衍生物(例如牛磺二氢梭链孢酸钠等)、长链脂肪酸及其C6-C12盐(例如油酸和辛酸)、酰基肉碱类及衍生物、赖氨酸、精氨酸或组氨酸的N^α-酰化衍生物、或者赖氨酸或精氨酸的侧链酰化衍生物、包括赖氨酸、精氨酸或组氨酸与中性或酸性氨基酸的任何组合的二肽的N^α-酰化衍生物、包括一个中性氨基酸与两个带电氨基酸的任何组合的三肽的N^α-酰化衍生物、DSS(多库酯钠,CAS登记号[577-11-7])、多库酯钙,CAS登记号[128-49-4]、多库酯钾,CAS登记号[7491-09-0]、SDS(十二烷基硫酸钠或月桂基硫酸钠)、辛酸钠、胆酸或其衍生物、胆汁酸及其盐、甘氨酸或牛磺酸缀合物、熊脱氧胆酸、胆酸钠、脱氧胆酸钠、牛磺胆酸钠、甘氨酸胆酸钠、N-十六烷基-N,N-二甲基-3-铵基-1-丙磺酸盐、阴离子(烷基-芳基-磺酸盐类)一价表面活性剂、两性离子表面活性剂(例如N-烷基-N,N-二甲基铵基-1-丙磺酸盐、3-氯酰氨基-1-丙基二甲基铵基-1-丙磺酸盐、阳离子表面活性剂(季铵碱)(例如溴化十六烷基三甲铵、氯化十六烷基吡啶鎓)、非离子型表面活性剂(例如十二烷基β-D-吡喃葡萄糖苷)、poloxamine(例如Tetronic's),其为衍生自依次将环氧丙烷和环氧乙烷加成至乙二胺的四官能嵌段共聚物,或者所述表面活性剂可选自咪唑啉衍生物或其混合物。这些具体表面活性剂的每一种都构成本发明的备选实施方案。

[0707] 药物组合物中表面活性剂的使用为技术人员所熟知。为方便起见,作出对Remington:The Science and Practice of Pharmacy,第19版,1995的引用。

[0708] 其它成分也可存在于本发明的药物制剂中。这类其它成分可包括润湿剂、乳化剂、抗氧化剂、填充剂、张度改性剂(tonicity modifier)、螯合剂、金属离子、油性溶媒、蛋白质(例如人血清白蛋白、明胶或蛋白质)和两性离子(例如氨基酸,例如甜菜碱、牛磺酸、精氨酸、甘氨酸、赖氨酸和组氨酸)。当然,这类其它成分不应不利地影响本发明药物制剂的整体稳定性。

[0709] 可将含有本发明化合物的药物组合物在若干部位给予需要这类治疗的患者,所述部位例如在局部部位例如皮肤和粘膜部位,在避开吸收的部位例如在动脉中、静脉中、心脏中给予,以及在涉及吸收的部位,例如在皮肤中、在皮肤下、在肌肉中或在腹部给予。

[0710] 可以通过若干给药途径将本发明的药物组合物给予需要这类治疗的患者,例如舌部、舌下、口腔、口内、口服、胃肠中、经鼻、经肺(例如通过细支气管和肺泡或其组合)、表皮、真皮、透皮、阴道、直肠、眼(例如通过结膜)、输尿管和胃肠外给药。

[0711] 可以若干剂型给予本发明的组合物,例如作为溶液剂、混悬剂、乳剂、微乳剂、复合型乳剂、泡沫剂、药膏剂、糊剂、硬膏剂(plaster)、软膏剂、片剂、包衣片剂、冲洗剂、胶囊剂(例如硬明胶胶囊剂和软明胶胶囊剂)、栓剂、直肠胶囊剂、滴剂、凝胶剂、喷雾剂、散剂、气雾剂、吸入剂、滴眼剂、眼用软膏剂、眼用冲洗剂、阴道栓剂、阴道冲洗剂、阴道软膏剂、注射用溶液剂、原位转化溶液剂(in situ transformingsolution)(例如原位胶凝剂、原位沉降剂、原位沉淀剂、原位结晶剂)、输液剂和植入剂。

[0712] 本发明的组合物还可例如通过共价、疏水和静电相互作用与药物载体、药物递送系统和高级药物递送系统复合或连接,以进一步提高化合物的稳定性,提高生物利用度,提高溶解度,降低不良作用,实现本领域技术人员熟知的按时疗法(chronotherapy)及提高患者依从性或其任何组合。载体、药物递送系统和高级药物递送系统的实例包括但不限于聚

合物(例如纤维素和衍生物)、多糖(例如葡聚糖和衍生物、淀粉和衍生物)、聚乙烯醇、丙烯酸酯和甲基丙烯酸酯聚合物、聚乳酸和聚乙醇酸及其嵌段共聚物、聚乙二醇、载体蛋白质例如白蛋白、凝胶剂(例如热胶凝系统、例如本领域技术人员熟知的嵌段共聚物系统)、胶束、脂质体、微球体、纳米颗粒、液晶及其分散体、脂质-水系统的相特性领域技术人员熟知的L2相及其分散体、聚合物胶束、复合型乳剂、自乳化剂、自微乳化剂、环糊精和其衍生物以及树枝状大分子(dendrimer)。

[0713] 使用全部为本领域众所周知的装置,例如定量吸入器、干粉吸入器和喷雾器,本发明的组合物可用于固体剂、半固体剂、粉剂和溶液剂的制剂中以用于经肺给予化合物。

[0714] 本发明的组合物特别可用于控释、缓释、延长释放、迟释和慢释药物递送系统的制剂。更具体地讲(但不限于)组合物可用于本领域技术人员众所周知的胃肠外控释系统和缓释系统(两个系统均导致给药次数减少许多倍)的制剂。甚至更优选为皮下给药的控释和缓释系统。在不限制本发明范围的情况下,有用的控释系统和组合物的实例为水凝胶、油性凝胶、液晶、聚合物胶束、微球体、纳米粒。

[0715] 可用于本发明组合物的产生控释系统的方法包括但不限于结晶、缩合、共结晶、沉淀、共沉淀、乳化、分散、高压匀浆、包囊化、喷雾干燥、微胶囊化、凝聚、相分离、溶剂蒸发以产生微球、挤出和超临界流体法。对以下文献作出整体参考:Handbook of Pharmaceutical Controlled Release(Wise,D.L.主编,Marcel Dekker,New York,2000)和 Drug and the Pharmaceutical Sciences第99卷:Protein Formulation and Delivery (MacNally,E.J.主编,Marcel Dekker,New York,2000)。

[0716] 胃肠外给药可以用注射器(任选笔型(pen-like)注射器),通过皮下、肌内、腹膜内或静脉内注射进行。或者,胃肠外给药可以用输注泵进行。另外的选择是用于以经鼻或经肺喷雾剂的形式给予本发明化合物的组合物,其可为溶液剂或混悬剂。作为又一个选择,含有本发明化合物的药物组合物还可适于透皮给药例如通过无针注射或由贴剂、任选离子电渗贴剂或者跨黏膜(例如口腔)给药。

[0717] 术语“稳定化制剂”是指物理稳定性提高、化学稳定性提高或物理和化学稳定性提高的制剂。

[0718] 本文所用关于蛋白制剂的术语“物理稳定性”是指由于蛋白暴露至热-机械应力和/或与破坏稳定的界面和表面(例如疏水表面和界面)的相互作用,所述蛋白形成蛋白的生物失活和/或不溶性聚集体的趋势。在将装于合适的容器(例如药筒或小瓶)中的制剂于不同温度下暴露于机械/物理应力(例如搅拌)中达各种时期后,通过目视检查和/或浊度测定评估水性蛋白制剂的物理稳定性。制剂的目视检查在黑暗背景下于聚焦强光中进行。制剂的浊度通过将浊度分级为例如0至3等级的目视评分来表征(未呈现混浊的制剂对应于目视评分0,而在日光中呈现可视混浊的制剂对应于目视评分3)。当其在日光中呈现可视混浊时,将制剂分类为关于蛋白聚集的物理不稳定。或者,可通过技术人员熟知的简易浊度测量来评估制剂的浊度。水性蛋白制剂的物理稳定性还可通过使用蛋白构象状态的光谱剂或光谱探测物来评估。所述探测物优选为优先结合至蛋白的非天然构象异构体的小分子。蛋白结构的小分子光谱探测物的一个实例为硫磺素T。硫磺素T为已广泛用于检测淀粉状原纤维的荧光染料。在存在原纤维以及也可能的其它蛋白构型下,硫磺素T当结合至原纤维蛋白形式时在约450nm下产生新的激发极值并在约482nm下发射增强。未结合的硫磺素T在所述波

长下基本无荧光。

[0719] 其它小分子可用作蛋白结构从天然状态向非天然状态变化的探测物。例如优先结合至蛋白的外露疏水补丁 (hydrophobic patch) 的“疏水补丁”探测物。所述疏水补丁通常埋藏于处于其天然状态的蛋白三级结构之内,但随着蛋白开始解折叠或变性而暴露。这些小分子光谱探测物的实例为芳族疏水染料,例如蒽 (anthracene)、吡啶、菲咯啉等。其它光谱探测物为金属-氨基酸络合物,例如疏水氨基酸 (例如苯丙氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、甲硫氨酸和缬氨酸) 的钴金属络合物等。

[0720] 本文所用关于蛋白制剂的术语“化学稳定性”是指蛋白结构的化学共价变化,所述变化导致形成与天然蛋白结构相比具有潜在较小生物效力和/或潜在增加的免疫原性的化学降解产物。根据天然蛋白的类型和性质以及所述蛋白所暴露的环境,可形成各种化学降解产物。如本领域技术人员所熟知,几乎不可能完全避免化学降解的消除,并且在储存和使用蛋白制剂期间常常见到化学降解产物的量不断增加。多数蛋白容易发生脱酰胺作用,其中谷氨酰胺或天冬酰胺残基的侧链酰胺基被水解而形成游离羧酸的过程。其它降解途径涉及高分子量转化产物的形成,其中两个或更多个蛋白分子通过转酰胺基作用和/或二硫化物相互作用相互共价结合,导致形成共价结合的二聚体、寡聚体和多聚体降解产物 (Stability of Protein Pharmaceuticals, Ahern, T. J. 和 Manning M. C., Plenum Press, New York 1992)。可提及作为化学降解另一种变体的氧化 (例如甲硫氨酸残基的氧化)。可通过在暴露至不同环境条件 (可通常通过例如增加温度来加速降解产物的形成) 下之后的各个时间点测量化学降解产物的量,来评估蛋白制剂的化学稳定性。通常通过利用各种层析技术 (例如 SEC-HPLC 和/或 RP-HPLC) 根据分子大小和/或电荷将降解产物分离来测量各种降解产物的量。

[0721] 因此,如上文所概述,“稳定化制剂”是指物理稳定性增加、化学稳定性增加或物理和化学稳定性增加的制剂。总之,制剂在使用和保存 (依照推荐的使用和保存条件) 期间必须稳定直至达到失效期。

[0722] 在本发明的一个实施方案中,包含本发明化合物的药物制剂的使用稳定期超过6周,且保存稳定期超过3年。

[0723] 在本发明的另一个实施方案中,包含本发明化合物的药物制剂的使用稳定期超过4周,且保存稳定期超过3年。

[0724] 在本发明的又一个实施方案中,包含本发明化合物的药物制剂的使用稳定期超过4周,且保存稳定期超过2年。

[0725] 在本发明的再一个实施方案中,包含所述化合物的药物制剂的使用稳定期超过2周,且保存稳定期超过2年。

[0726] 可将含有本发明的胰高血糖素肽的药物组合物胃肠外给予需要这类治疗的患者。胃肠外给药可以用注射器 (任选笔型注射器),通过皮下、肌内或静脉内注射进行。或者,胃肠外给药可以用输注泵进行。另一个选择是用于以经鼻或经肺喷雾剂的形式给予胰高血糖素肽的组合物,其可为粉剂或液体剂。作为又一个选择,本发明的胰高血糖素肽还可透皮给药例如由贴剂、任选离子电渗贴剂或者跨黏膜 (例如口腔) 给药。

[0727] 因此,本发明的胰高血糖素肽的注射用组合物可采用制药业的常规技术制备,所述常规技术包括适当溶解并混合各成分,以得到所需的最终产物。

[0728] 按照本发明的一个实施方案,提供适于通过注射给药的组合物形式的胰高血糖素肽。这类组合物可以是即用型注射用溶液剂,或者可以是一定量的固体组合物,例如冻干产物,在可注射前,必须将其溶于溶剂中。注射用溶液剂优选含有至少约2mg/ml、优选至少约5mg/ml、更优选至少约10mg/ml的胰高血糖素肽,且优选至多约100mg/ml的胰高血糖素肽。

[0729] 本发明的胰高血糖素肽可用于治疗各种疾病。待使用的具体胰高血糖素肽和用于任何患者的最佳剂量水平将取决于待治疗的疾病和各种因素,包括所用具体肽衍生物的功效、患者的年龄、体重、体力活动和饮食,取决于与其它药物的可能组合,并取决于病例的严重程度。建议由本领域技术人员来确定用于每个个体患者的本发明胰高血糖素肽的剂量。

[0730] 具体地讲,预期胰高血糖素肽可用于制备具有延长的作用特征的用于治疗非胰岛素依赖性糖尿病和/或用于治疗肥胖症的药物。

[0731] 在另一个方面,本发明涉及本发明的化合物在用于制备药物中的用途。

[0732] 在一个实施方案中,本发明涉及本发明的化合物在制备用于治疗以下疾病的药物中的用途:高血糖症、2型糖尿病、葡萄糖耐量减低、1型糖尿病、肥胖症、高血压、X综合征、血脂异常、 β -细胞凋亡、 β -细胞缺乏症、心肌梗死、炎性肠综合征、消化不良、认知障碍、例如认知提高、神经保护、动脉粥样硬化(atherosclerosis)、冠心病和其它心血管疾病。

[0733] 在另一个实施方案中,本发明涉及本发明的化合物在制备用于治疗以下疾病的药物中的用途:小肠综合征、炎性肠综合征或克罗恩病。

[0734] 在另一个实施方案中,本发明涉及本发明的化合物在制备用于治疗以下疾病的药物中的用途:高血糖症、1型糖尿病、2型糖尿病或 β -细胞缺乏症。

[0735] 用本发明化合物的治疗还可与例如选自以下的第二种或更多种药理活性物质结合:抗糖尿病药、抗肥胖症药、食欲调节药、抗高血压药、用于治疗和/或预防由糖尿病导致的或与糖尿病有关的并发症的药物和用于治疗和/或预防由肥胖症导致的或与肥胖症有关的并发症和病症的药物。在本文中,表述“抗糖尿病药”包括用于治疗 and/或预防胰岛素抵抗和其中胰岛素抵抗是病理生理机制的疾病的化合物。

[0736] 这些药理活性物质的实例为:胰岛素、GLP-1激动剂、磺脲(例如甲苯磺丁脲、格列本脲、格列吡嗪和格列齐特)、双胍类例如二甲双胍、美格列奈类、葡糖苷酶抑制剂(例如阿卡波糖(acarbose))、胰高血糖素拮抗剂、DPP-IV(二肽基肽酶-IV)抑制剂、参与刺激糖异生和/或糖原分解的肝酶的抑制剂、葡萄糖摄取调节剂、噻唑烷二酮类例如曲格列酮和环格列酮、改进脂质代谢的化合物例如抗高血脂药如HMG CoA抑制剂(他汀类)、减少食物摄取的化合物、RXR激动剂和作用于 β 细胞的依赖于ATP的钾通道的药物例如格列本脲、格列吡嗪、格列齐特和瑞格列奈;消胆胺、考来替泊、氯贝丁酯、吉非贝齐、洛伐他汀、普伐他汀、辛伐他汀、普罗布考、右旋甲状腺素、那格列奈(neteglinide)、瑞格列奈; β -阻断剂例如阿普洛尔、阿替洛尔、噻吗洛尔、吲哚洛尔、普萘洛尔和美托洛尔、ACE(血管紧张素转化酶)抑制剂例如贝那普利、卡托普利、依那普利、福辛普利、赖诺普利、alatriopril、喹那普利和雷米普利;钙通道阻断剂例如硝苯地平、非洛地平、尼卡地平、伊拉地平、尼莫地平、地尔硫䓬和维拉帕米及 α -阻断剂例如多沙唑嗪、乌拉地尔、哌唑嗪和特拉唑嗪;CART(可卡因-苯丙胺调节的转录物)激动剂、NPY(神经肽Y)拮抗剂、MC4(黑皮质素4)激动剂、食欲肽拮抗剂、TNF(肿瘤坏死因子)激动剂、CRF(促肾上腺皮质激素释放因子)激动剂、CRF BP(促肾上腺皮质激素释放因子结合蛋白)拮抗剂、尿皮质素激动剂、 β 3激动剂、MSH(促黑素细胞激素)激动剂、MCH(黑素细胞

集群激素)拮抗剂、CCK(缩胆囊素)激动剂、5-羟色胺再摄取抑制剂、5-羟色胺和去甲肾上腺素再摄取抑制剂、混合的5-羟色胺和去甲肾上腺素能化合物、5HT(5-羟色胺)激动剂、铃蟾肽激动剂、甘丙肽拮抗剂、生长激素、生长激素释放化合物、TRH(促甲状腺素(thyrotropin)释放激素)激动剂、UCP 2或3(解偶联蛋白质2或3)调节剂、瘦蛋白激动剂、DA激动剂(溴隐亭、doprexin)、脂肪酶/淀粉酶抑制剂、RXR(类视黄醇X受体)调节剂、TRB激动剂;组胺H3拮抗剂。

[0737] 应理解的是,本发明的化合物与一种或多种上述化合物和任选一种或多种其它药理活性物质的任何合适的组合均被视为属于本发明的范围。

[0738] 通过下列实施例对本发明作进一步说明,然而,所述实施例不得解释为限制保护的范。上述说明书和下列实施例中公开的特征单独地和以其任何组合可为以其不同形式实现本发明的材料。

实施例

- [0739] 所用的缩略词表
- [0740] DCM:二氯甲烷
- [0741] Dde:1-(4,4-二甲基-2,6-二氧代亚环己基)乙基
- [0742] DIC:二异丙基碳二亚胺
- [0743] DIPEA:二异丙基乙胺
- [0744] Fmoc:9-芴基甲基氧基羰基
- [0745] HATU:(六氟磷酸O-(7-氮杂苯并三唑-1-基)-1,1,3,3-四甲基脒鎓)
- [0746] HBTU:(六氟磷酸2-(1H-苯并三唑-1-基)-1,1,3,3-四甲基脒鎓)
- [0747] HFIP 1,1,1,3,3,3-六氟-2-丙醇或六氟异丙醇
- [0748] HOAt:1-羟基-7-氮杂苯并三唑
- [0749] HOBt:1-羟基苯并三唑
- [0750] HPLC:高效液相层析法
- [0751] ivDde:1-(4,4-二甲基-2,6-二氧代亚环己基)-3-甲基丁基
- [0752] LCMS:液相色谱质谱联用法
- [0753] MeOH:甲醇
- [0754] Mmt:4-甲氧基三苯甲基
- [0755] Mtt:4-甲基三苯甲基
- [0756] NMP:N-甲基吡咯烷酮
- [0757] OEG:8-氨基-3,6-二氧杂辛酸
- [0758] OtBu:叔丁基酯
- [0759] PBS:磷酸缓冲盐溶液
- [0760] RP:反相
- [0761] RP-HPLC:反相高效液相层析法
- [0762] RT:室温
- [0763] Rt:保留时间
- [0764] SPPS:固相肽合成

[0765] TFA:三氟乙酸

[0766] TIPS:三异丙基甲硅烷

[0767] Trt:三苯基甲基或三苯甲基

[0768] UPLC:超高效液相层析法

[0769] 通用方法

[0770] 该部分涉及用于合成树脂结合的肽的方法(SPPS方法,包括氨基酸脱保护的方法、从树脂上切割肽的方法及其纯化的方法)以及用于检测和表征所得肽的方法(LCMS和UPLC方法)。

[0771] 树脂结合的肽的合成

[0772] SPPS方法A

[0773] SPPS方法A是指在得自Protein Technologies(Tucson,AZ 85714U.S.A.)的Prelude固相肽合成仪上通过Fmoc化学法进行的肽合成。

[0774] 所用的Fmoc保护的氨基酸衍生物是推荐的标准品:Fmoc-Ala-OH、Fmoc-Arg(Pbf)-OH、Fmoc-Asn(Trt)-OH、Fmoc-Asp(OtBu)-OH、Fmoc-Cys(Trt)-OH、Fmoc-Gln(Trt)-OH、Fmoc-Glu(OtBu)-OH、Fmoc-Gly-OH、Fmoc-His(Trt)-OH、Fmoc-Ile-OH、Fmoc-Leu-OH、Fmoc-Lys(Boc)-OH、Fmoc-Met-OH、Fmoc-Phe-OH、Fmoc-Pro-OH、Fmoc-Ser(tBu)-OH、Fmoc-Thr(tBu)-OH、Fmoc-Trp(Boc)-OH、Fmoc-Tyr(tBu)-OH和Fmoc-Val-OH,由例如Anaspec、Bachem、Iris Biotech或Novabiochem供应。

[0775] 当赖氨酸侧链上存在白蛋白结合残基时,将被酰化的赖氨酸的 ϵ 氨基用Mtt保护(例如Fmoc-Lys(Mtt)-OH),而N端 α 氨基用Boc保护。同样地,当鸟氨酸侧链上存在白蛋白结合残基时,将被酰化的鸟氨酸的 δ 氨基用Mtt保护(例如Fmoc-Orn(Mtt)-OH)。

[0776] 用于合成具有C端羧酸的胰高血糖素类似物的合适树脂是预装柱的可获自Novabiochem的低负载Wang树脂(例如低载fmoc-Thr(tBu)-Wang树脂,LL,0.27mmol/g)。用于合成具有C端酰胺的胰高血糖素类似物的合适树脂是可获自Matrix-Innovation的PAL-ChemMatrix树脂。用含20%哌啶的NMP达2x3分钟来实现Fmoc-脱保护。偶联化学法是含DIC/HOAt/三甲基吡啶的NMP。向树脂中依次加入氨基酸/HOAt溶液(0.3M/0.3M在NMP中,以3-10倍摩尔过量)、相同摩尔当量的DIC(3M在NMP中)和三甲基吡啶(3M在NMP中)。例如,在下列标度反应中,每次偶联使用以下量的0.3M氨基酸/HOAt溶液:标度/ml,0.05mmol/1.5mL、0.10mmol/3.0mL、0.25mmol/7.5mL。偶联时间一般为30分钟。全部偶联都重复进行以确保完全偶联。

[0777] Mtt保护的赖氨酸的脱保护在Prelude固相肽合成仪上进行或通过手工合成进行。

[0778] 手工合成;通过将树脂用DCM洗涤,并将树脂悬浮于HFIP/DCM/TIPS(70:28:2)(2x20分钟)中,接着依次用DCM(3x)、5%DIPEA/DCM(1x)、DCM(4x)和NMP-DCM(4:1)洗涤,而脱去Mtt基团。

[0779] Prelude合成仪;通过将树脂用HFIP/DCM(75:25)(2x2分钟)洗涤,用DCM洗涤,然后将树脂悬浮于HFIP/DCM(75:25)(2x20分钟)中,随后依次用哌啶/NMP(20:80)、DCM(1x)、NMP(1x)、DCM(1x)、NMP(1x)洗涤,而脱去Mtt基团。

[0780] SPPS方法B-预制成的白蛋白结合部分的连接

[0781] 将预制成的白蛋白结合部分的羧酸例如2-[2-[2-[2-[2-[2-[[4S]-5-叔丁氧

基-4-[(18-叔丁氧基-18-氧代-十八烷酰基)氨基]-5-氧代-戊酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙酸(4当量)、HOAt(4当量)和DIC(4当量)在NMP-DCM(4:1)中的溶液搅拌30分钟后,加入树脂中。将混合物中的树脂搅拌30分钟后,加入三甲基吡啶(4当量)。将树脂搅动16小时后,用NMP(5x)和DCM(5x)洗涤。

[0782] SPPS方法C-白蛋白结合部分的连接——逐步法

[0783] 可如上所述(SPPC方法A)通过Prelude肽合成仪,使用适当保护的组件在逐步法中将白蛋白结合部分引入,其中的改动在于使包括Fmoc-Ado-OH、Fmoc-Glu-OtBu和十八烷二酸一叔丁酯(或类似物C8、C10、C12-、C14-、C16-、C20-二酸一叔丁酯)在内的氨基酸和脂肪酸衍生物在每步中偶联6小时。在每个偶联步骤后,使用过量的乙酸酐和三甲基吡啶(>10当量)对未反应的肽中间体封端(cap)。

[0784] 从树脂上切割

[0785] 在合成后,将树脂用DCM洗涤,通过用TFA/TIS/水(95/2.5/2.5)处理2-3小时,接着用乙醚沉淀,将肽从树脂上切割下来。沉淀物用乙醚洗涤。

[0786] 纯化和定量测定

[0787] 将粗制肽溶于水 and MeCN的合适混合物(例如水/MeCN(4:1))中,在含有C18-硅胶的柱上,通过反相制备型HPLC(Waters Deltaprep4000或Gilson)纯化。用含有0.1%TFA的水中的递增梯度的MeCN进行洗脱。相关流分用分析型HPLC或UPLC检查。将含有纯的靶标肽的流分混合,减压浓缩。分析所得溶液(UPLC、HPLC和LCMS),使用化学发光氮特异性HPLC检测器(Antek 8060HPLC-CLND)或者通过测量280nm下的UV吸收,定量测定产物。将产物分装入玻璃小瓶中。将小瓶用Millipore玻璃纤维预滤器盖住。冻干得到肽三氟乙酸酯,为白色固体。

[0788] 检测和表征的方法

[0789] LCMS方法

[0790] LCMS

[0791] 方法:LCMS_2

[0792] 在从Perkin Elmer Series 200 HPLC系统中洗脱后,利用PerkinElmer Sciex API 3000质谱仪鉴定样品质量。洗脱液:A:含0.05%三氟乙酸的水;B:含0.05%三氟乙酸的乙腈。柱:Waters Xterra MS C-18X3mm内径5 μ m。梯度:5%-90%B,以1.5ml/分钟在7.5分钟内。

[0793] 方法:LCMS_4

[0794] 在由Waters Acquity UPLC系统和得自Micromass的LCT PremierXE质谱仪组成的装置上进行LCMS_4。洗脱液:A:含0.1%甲酸的水

[0795] B:含0.1%甲酸的乙腈。在室温下,通过将适当体积的样品(优选2-10 μ l)注入柱上来进行分析,所述柱用A和B的梯度洗脱。UPLC条件、检测器设置和质谱仪设置为:柱:Waters Acquity UPLC BEH,C-18,1.7 μ m,2.1mm x 50mm。梯度:线性5%-95%乙腈,按0.4ml/分钟在4.0分钟(或8.0分钟)内。检测:214nm(TUV(可调UV检测器)的模拟输出)。MS电离方式:API-ES

[0796] 扫描:100-2000amu(或500-2000amu),步进0.1amu。

[0797] 方法:LCMS_AP

[0798] 在从由Waters 2525二元梯度模块、Waters 2767样品管理器、Waters 2996光电二极管阵列检测器和Waters 2420ELS检测器组成的HPLC系统洗脱后,利用Micromass Quatro micro API质谱仪确定样品质量。洗脱液:A:含0.1%三氟乙酸的水;B:含0.1%三氟乙酸的乙腈。柱:Phenomenex Synergi MAXRP,4 μ m,75x4.6mm。梯度:5%–95%B,以1.0ml/分钟在7分钟内。

[0799] UPLC方法

[0800] 方法04_A3_1

[0801] UPLC(方法04_A3_1):利用配备双频段检测器的Waters UPLC系统进行RP-分析。利用ACQUITY UPLC BEH130,C18,130 \AA ,1.7 μ m,2.1mmx150mm柱,40 $^{\circ}$ C,收集214nm和254nm下的UV检测。

[0802] 将UPLC系统与两个洗脱液贮器连接,所述洗脱液贮器装有:

[0803] A:90% H_2O 、10% CH_3CN 、0.25M碳酸氢铵

[0804] B:70% CH_3CN 、30% H_2O

[0805] 使用下列线性梯度:75%A,25%B至45%A,55%B,在16分钟内,流速为0.35ml/分钟。

[0806] 方法04_A4_1

[0807] UPLC(方法04_A4_1):利用配备双频段检测器的Waters UPLC系统进行RP-分析。使用ACQUITY UPLC BEH130,C18,130 \AA ,1.7 μ m,2.1mm x 150mm柱,40 $^{\circ}$ C,收集214nm和254nm下的UV检测。

[0808] 将UPLC系统与两个洗脱液贮器连接,所述洗脱液贮器装有:

[0809] A:90% H_2O 、10% CH_3CN 、0.25M碳酸氢铵

[0810] B:70% CH_3CN 、30% H_2O

[0811] 使用下列线性梯度:65%A,35%B至25%A,65%B,在16分钟内,流速为0.35ml/分钟。

[0812] 方法:04_A2_1

[0813] 利用配备双频段检测器的Waters UPLC系统进行RP-分析。利用ACQUITY UPLC BEH130,C18,130 \AA ,1.7 μ m,2.1mmx150mm柱,40 $^{\circ}$ C,收集214nm和254nm下的UV检测。将UPLC系统与两个洗脱液贮器连接,所述洗脱液贮器装有:A:90% H_2O 、10% CH_3CN 、0.25M碳酸氢铵;B:70% CH_3CN 、30% H_2O 。使用下列线性梯度:90%A,10%B至60%A,40%B,在16分钟内,流速为0.40ml/分钟。

[0814] 方法:04_A6_1

[0815] 利用配备双频段检测器的Waters UPLC系统进行RP-分析。使用ACQUITY UPLC BEH130,C18,130 \AA ,1.7 μ m,2.1mmx150mm柱,40 $^{\circ}$ C,收集214nm和254nm下的UV检测。将UPLC系统与两个洗脱液贮器连接,所述洗脱液贮器装有:A:10mM TRIS、15mM硫酸铵、80% H_2O 、20%,pH 7.3;B:80% CH_3CN 、20% H_2O 。使用下列线性梯度:95%A,5%B至10%A,90%B,在16分钟内,流速为0.35ml/分钟。

[0816] 方法:04_A7_1

[0817] 利用配备双频段检测器的Waters UPLC系统进行RP-分析。使用ACQUITY UPLC BEH130,C18,130 \AA ,1.7 μ m,2.1mmx150mm柱,40 $^{\circ}$ C,收集214nm和254nm下的UV检测。将UPLC系

统与两个洗脱液贮器连接,所述洗脱液贮器装有:A:10mM TRIS、15mM硫酸铵、80% H_2O 、20%,pH 7.3;B:80% CH_3CN 、20% H_2O 。使用下列线性梯度:95%A,5%B至40%A,60%B,在16分钟内,流速为0.40ml/分钟。

[0818] 方法:04_A9_1

[0819] 采用配备双频段检测器的Waters UPLC系统进行RP-分析。采用ACQUITY UPLC BEH Shield RP18,C18,1.7 μm ,2.1mmx150mm柱,60 $^{\circ}C$,收集214nm和254nm下的UV检测。将UPLC系统与两个洗脱液贮器连接,所述洗脱液贮器装有:A:含200mM Na_2SO_4 +20mM Na_2HPO_4 +20mM NaH_2PO_4 的90% H_2O /10% CH_3CN ,pH 7.2;B:70% CH_3CN 、30% H_2O 。使用下列步进梯度:在3分钟内90%A、10%B至80%A、20%B,在17分钟内80%A、20%B至50%A、50%B,,流速为0.40ml/分钟。

[0820] 方法05_B5_1

[0821] 利用配备双频段检测器的Waters UPLC系统进行RP-分析。利用ACQUITY UPLC BEH130,C18,130 \AA ,1.7 μm ,2.1mmx150mm柱,40 $^{\circ}C$,收集214nm和254nm下的UV检测。

[0822] 将UPLC系统与两个洗脱液贮器连接,所述洗脱液贮器装有:

[0823] A:0.2M Na_2SO_4 、0.04M H_3PO_4 、10% CH_3CN (pH 3.5)

[0824] B:70% CH_3CN 、30% H_2O

[0825] 使用下列线性梯度:60%A,40%B至30%A,70%B,在8分钟内,流速为0.35ml/分钟。

[0826] 方法:05_B7_1

[0827] 利用配备双频段检测器的Waters UPLC系统进行RP-分析。利用ACQUITY UPLC BEH130,C18,130 \AA ,1.7 μm ,2.1mmx150mm柱,40 $^{\circ}C$,收集214nm和254nm下的UV检测。将UPLC系统与两个洗脱液贮器连接,所述洗脱液贮器装有:A:0.2M Na_2SO_4 、0.04M H_3PO_4 、10% CH_3CN (pH 3.5);B:70% CH_3CN 、30% H_2O 。使用下列线性梯度:80%A,20%B至40%A,60%B,在8分钟内,流速为0.40ml/分钟。

[0828] 方法:05_B8_1

[0829] 利用配备双频段检测器的Waters UPLC系统进行RP-分析。利用ACQUITY UPLC BEH130,C18,130 \AA ,1.7 μm ,2.1mmx150mm柱,40 $^{\circ}C$,收集214nm和254nm下的UV检测。将UPLC系统与两个洗脱液贮器连接,所述洗脱液贮器装有:A:0.2M Na_2SO_4 、0.04M H_3PO_4 、10% CH_3CN (pH 3.5);B:70% CH_3CN 、30% H_2O 。使用下列线性梯度:50%A,50%B至20%A,80%B,在8分钟内,流速为0.40ml/分钟。

[0830] 方法:05_B9_1

[0831] 利用配备双频段检测器的Waters UPLC系统进行RP-分析。利用ACQUITY UPLC BEH130,C18,130 \AA ,1.7 μm ,2.1mmx150mm柱,40 $^{\circ}C$,收集214nm和254nm下的UV检测。将UPLC系统与两个洗脱液贮器连接,所述洗脱液贮器装有:A:0.2M Na_2SO_4 、0.04M H_3PO_4 、10% CH_3CN (pH 3.5);B:70% CH_3CN 、30% H_2O 。使用下列线性梯度:70%A,30%B至20%A,80%B,在8分钟内,流速为0.40ml/分钟。

[0832] 方法:05B_10_1

[0833] 利用配备双频段检测器的Waters UPLC系统进行RP-分析。利用ACQUITY UPLC BEH130,C18,130 \AA ,1.7 μm ,2.1mmx150mm柱,40 $^{\circ}C$,收集214nm和254nm下的UV检测。将UPLC系

统与两个洗脱液贮器连接,所述洗脱液贮器装有:A:0.2M Na₂SO₄、0.04M H₃PO₄、10%CH₃CN (pH 3.5);B:70%CH₃CN、30%H₂O。使用下列线性梯度:40%A,60%B至20%A,80%B,在8分钟内,流速为0.40ml/分钟。

[0834] 方法:07_B4_1

[0835] 利用配备双频段检测器的Waters UPLC系统进行RP-分析。利用ACQUITY UPLC BEH130,C18,130Å,1.7um,2.1mmx150mm柱,40℃,收集214nm和254nm下的UV检测。

[0836] 将UPLC系统与两个洗脱液贮器连接,所述洗脱液贮器装有:A:99.95%H₂O、0.05%TFA;B:99.95%CH₃CN、0.05%TFA。使用下列线性梯度:95%A,5%B至5%A,95%B,在16分钟内,流速为0.40ml/分钟。

[0837] 方法:09_B2_1

[0838] 利用配备双频段检测器的Waters UPLC系统进行RP-分析。利用ACQUITY UPLC BEH130,C18,130Å,1.7um,2.1mmx150mm柱,40℃,收集214nm和254nm下的UV检测。将UPLC系统与两个洗脱液贮器连接,所述洗脱液贮器装有:A:99.95%H₂O、0.05%TFA;B:99.95%CH₃CN、0.05%TFA。使用下列线性梯度:95%A,5%B至40%A,60%B,在16分钟内,流速为0.40ml/分钟。

[0839] 方法:09_B4_1

[0840] 利用配备双频段检测器的Waters UPLC系统进行RP-分析。利用ACQUITY UPLC BEH130,C18,130Å,1.7um,2.1mmx150mm柱,40℃,收集214nm和254nm下的UV检测。将UPLC系统与两个洗脱液贮器连接,所述洗脱液贮器装有:A:99.95%H₂O、0.05%TFA;B:99.95%CH₃CN、0.05%TFA。使用下列线性梯度:95%A,5%B至5%A,95%B,在16分钟内,流速为0.40ml/分钟。

[0841] 方法08_B2_1

[0842] 利用配备双频段检测器的Waters UPLC系统进行RP-分析。利用ACQUITY UPLC BEH130,C18,130Å,1.7um,2.1mmx150mm柱,40℃,收集214nm和254nm下的UV检测。

[0843] 将UPLC系统与两个洗脱液贮器连接,所述洗脱液贮器装有:

[0844] A:99.95%H₂O、0.05%TFA

[0845] B:99.95%CH₃CN、0.05%TFA

[0846] 使用下列线性梯度:95%A,5%B至40%A,60%B,在16分钟内,流速为0.40ml/分钟。

[0847] 方法08_B4_1

[0848] 利用配备双频段检测器的Waters UPLC系统进行RP-分析。利用ACQUITY UPLC BEH130,C18,130Å,1.7um,2.1mmx150mm柱,40℃,收集214nm和254nm下的UV检测。

[0849] 将UPLC系统与两个洗脱液贮器连接,所述洗脱液贮器装有:

[0850] A:99.95%H₂O、0.05%TFA

[0851] B:99.95%CH₃CN、0.05%TFA

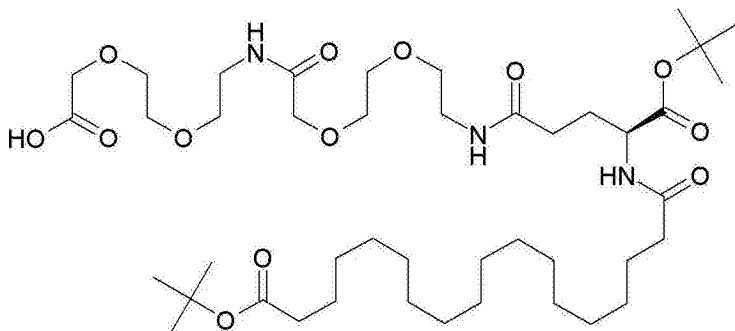
[0852] 使用下列线性梯度:95%A,5%B至5%A,95%B,在16分钟内,流速为0.40ml/分钟。

[0853] 方法10_B4_2

[0854] 利用配备双频段检测器的Waters UPLC系统进行RP-分析。使用ACQUITY UPLC BEH130,C18,130Å,1.7um,2.1mmx150mm柱,50℃,收集214nm和254nm的UV检测。

[0878] 组件2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[(4S)-5-叔丁氧基-4-[(18-叔丁氧基-18-氧代-十八烷酰基)氨基]-5-氧代-戊酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酸的制备:

[0879]



[0880] 使2-氯三苯甲基树脂100-200目(42.6g,42.6mmol)置于无水二氯甲烷(205mL)中溶胀20分钟。将{2-[2-(9H-芴-9-基甲氧基羰基氨基)-乙氧基]-乙氧基}-乙酸(13.7g,35.5mmol)和N,N-二异丙基乙胺(23.5mL,135mmol)在无水二氯甲烷(30mL)中的溶液加入树脂中,使混合物振荡3小时。将树脂过滤,并用N,N-二异丙基乙胺(12.4mL,70.9mmol)在甲醇/二氯甲烷混合物(4:1,250mL,2x5分钟)中的溶液处理。然后树脂用N,N-二甲基甲酰胺(2x150mL)、二氯甲烷(3x150mL)和N,N-二甲基甲酰胺(3x150mL)洗涤。通过用含20%哌啶的二甲基甲酰胺(1x5分钟,1x30分钟,2x150mL)处理除去Fmoc基团。树脂用N,N-二甲基甲酰胺(3x150mL)、2-丙醇(2x150mL)和二氯甲烷(200mL,2x150mL)洗涤。将{2-[2-(9H-芴-9-基甲氧基羰基氨基)-乙氧基]-乙氧基}-乙酸(20.5g,53.2mmol)、四氟硼酸O-(6-氯-苯并三唑-1-基)-N,N,N',N'-四甲基脲鎓(TCTU,18.9g,53.2mmol)和N,N-二异丙基乙胺(16.7mL,95.7mmol)在N,N-二甲基甲酰胺(100mL)和二氯甲烷(50mL)中的溶液加入树脂中,使混合物振荡1小时。将树脂过滤后,用N,N-二甲基甲酰胺(2x150mL)、二氯甲烷(3x150mL)和N,N-二甲基甲酰胺(155mL)洗涤。通过用含20%哌啶的二甲基甲酰胺(1x5分钟,1x30分钟,2x150mL)处理除去Fmoc基团。树脂用N,N-二甲基甲酰胺(3x150mL)、2-丙醇(2x150mL)和二氯甲烷(200mL,2x150mL)洗涤。将Fmoc-Glu-OtBu(22.6g,53.2mmol)、四氟硼酸O-(6-氯-苯并三唑-1-基)-N,N,N',N'-四甲基脲鎓(TCTU,18.9g,53.2mmol)和N,N-二异丙基乙胺(16.7mL,95.7mmol)在N,N-二甲基甲酰胺(155mL)中的溶液加入树脂中,使混合物振荡1小时。将树脂过滤后,用N,N-二甲基甲酰胺(2x150mL)、二氯甲烷(2x150mL)和N,N-二甲基甲酰胺(150mL)洗涤。通过用含20%哌啶的二甲基甲酰胺(1x5分钟,1x30分钟,2x150mL)处理除去Fmoc基团。树脂用N,N-二甲基甲酰胺(3x150mL)、2-丙醇(2x150mL)和二氯甲烷(200mL,2x150mL)洗涤。将十八烷二酸一叔丁酯(19.7g,53.2mmol)、四氟硼酸O-(6-氯-苯并三唑-1-基)-N,N,N',N'-四甲基脲鎓(TCTU,18.9g,53.2mmol)和N,N-二异丙基乙胺(16.7mL,95.7mmol)在N,N-二甲基甲酰胺/二氯甲烷混合物(1:4,200mL)中的溶液加入树脂中。使树脂振荡2小时,过滤后,用N,N-二甲基甲酰胺(3x150mL)、二氯甲烷(2x150mL)、甲醇(2x150mL)和二氯甲烷(300mL,6x150mL)洗涤。通过用2,2,2三氟乙醇(200mL)处理19小时,将产物从树脂下切割下来。将树脂滤出后,用二氯甲烷(2x150mL)、2-丙醇/二氯甲烷混合物(1:1,2x150mL)、2-丙醇(150mL)和二氯甲烷(2x150mL)洗涤。将溶液合并;蒸发溶剂后,粗产物用快速柱层析法纯化(Silicagel 60,0.040-0.060mm;洗脱液:二氯甲烷/甲醇1:0-9:1)。

纯产物经真空干燥,得到黄色油状物。

[0881] 收率:25.85g (86%)。

[0882] R_f (SiO₂, 氯仿/甲醇85:15):0.25。

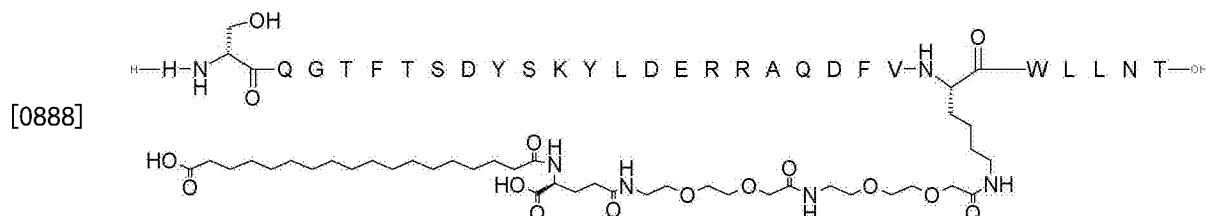
[0883] ¹H NMR谱 (300MHz, CDCl₃, δ_H):7.38 (bs, 1H); 7.08 (bs, 1H); 6.61 (d, J=7.5Hz, 1H); 4.43 (m, 1H); 4.15 (s, 2H); 4.01 (s, 2H); 3.78-3.39 (m, 16H); 2.31 (t, J=6.9Hz, 2H); 2.27-2.09 (m, 5H); 2.01-1.84 (m, 1H); 1.69-1.50 (m, 4H); 1.46 (s, 9H); 1.43 (s, 9H); 1.24 (bs, 24H)。

[0884] LC-MS纯度:100%。

[0885] LC-MS Rt (Sunfire 4.6mmx100mm, 乙腈/水60:40-0:100+0.1%FA):7.89分钟。LC-MS m/z:846.6 (M+H)⁺。

[0886] 实施例2

[0887] N^{c24}-([2-[2-[2-[[(4S)-5-羟基-4-[(18-羟基-18-氧代十八烷酰基)氨基]5-氧代戊酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基)]) [D-Ser², Glu¹⁶, Lys²⁴, Leu²⁷] 胰高血糖素



[0889] 基本按SPPS方法A和B中所述,使用2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[(4S)-5-叔丁氧基-4-[(18-叔丁氧基-18-氧代-十八烷酰基)氨基]-5-氧代-戊酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酸,制备了该肽。

[0890] UPLC 08_B4_1:8.4分钟

[0891] UPLC 08_B2_1:12.6分钟

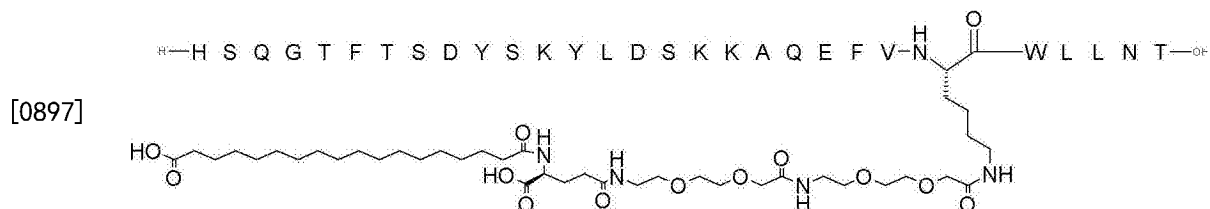
[0892] UPLC 05_B5_1:6.2分钟

[0893] UPLC 04_A3_1:9.3分钟

[0894] LCMS:m/z 1408.08 (M+3H) 3+, 1056.08 (M+4H) 4+, 845.10 (M+5) 5+

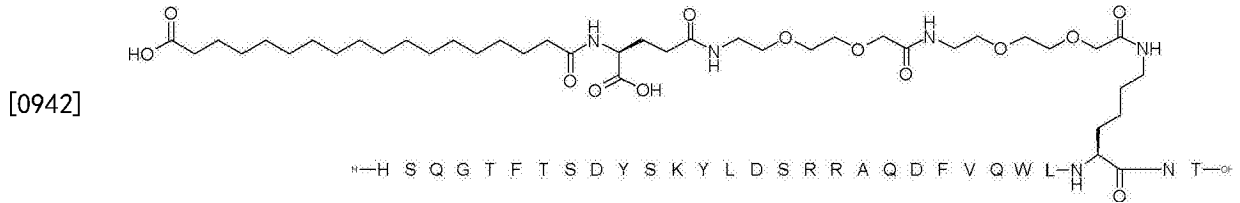
[0895] 实施例3

[0896] N^{c24}-([2-[2-[2-[[(4S)-5-羟基-4-[(18-羟基-18-氧代十八烷酰基)氨基]5-氧代戊酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基)]) [Lys¹⁷, Lys¹⁸, Glu²¹, Lys²⁴, Leu²⁷] 胰高血糖素



[0898] 基本按SPPS方法A和B中所述,使用2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[(4S)-5-叔丁氧基-4-[(18-叔丁氧基-18-氧代-十八烷酰基)氨基]-5-氧代-戊酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酸制备了该肽。

[0899] UPLC 08_B4_1:8.2分钟



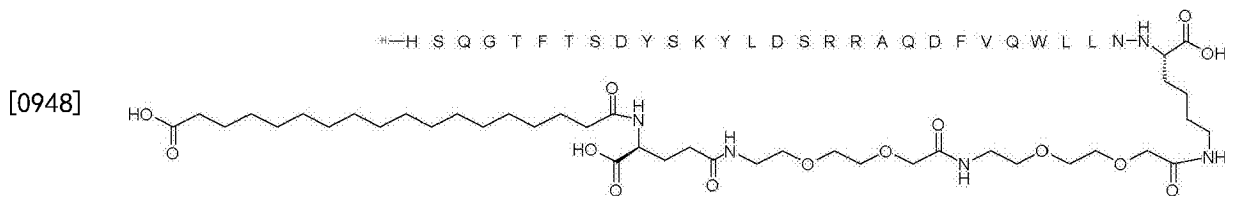
[0943] 基本按SPPS方法A和C中所述制备了该肽。

[0944] UPLC 10_B5_2:6.8分钟

[0945] LCMS方法:LCMS_4:m/z 1399.4 (M+3H) 3+

[0946] 实施例10

[0947] N^{ε29}-([2-[2-[2-[[(4S)-5-羟基-4-[(18-羟基-18-氧代十八烷酰基)氨基]5-氧代戊酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基)) [Leu²⁷,Lys²⁹]胰高血糖素



[0949] 基本按SPPS方法A和C中所述制备了该肽。

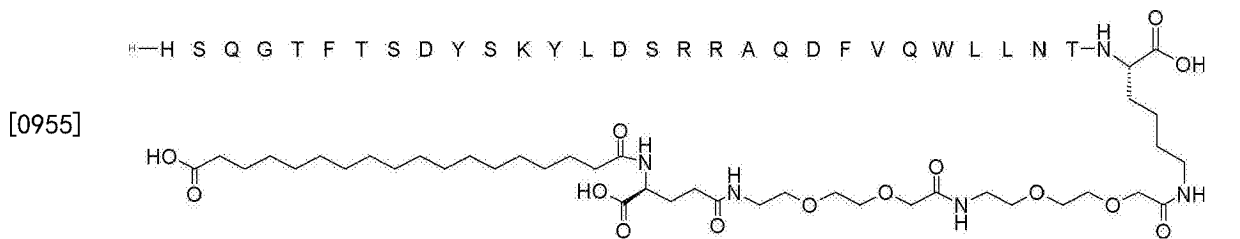
[0950] UPLC 10_B4_2:8.5分钟

[0951] UPLC 10_B5_2:8.1分钟

[0952] LCMS方法:LCMS_4:m/z 1403.32 (M+3H) 3+,1052.50 (M+4H) 4+,842.19 (M+5) 5+

[0953] 实施例11

[0954] N^ε ([Leu²⁷]胰高血糖素基)N^ε [(4S)-5-羟基-4-[[(4S)-5-羟基-4-[[(4S)-5-羟基-4-[[(4S)-5-羟基-4-[(20-羟基-20-氧代-二十碳酰基)氨基]-5-氧代-戊酰基]氨基]-5-氧代-戊酰基]氨基]-5-氧代-戊酰基]氨基]-5-氧代-戊酰基]赖氨酸



[0956] 基本按SPPS方法A和C中所述制备了该肽。

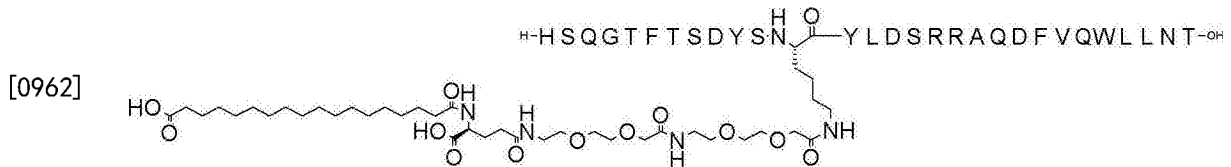
[0957] UPLC 10_B4_2:8.5分钟

[0958] UPLC 10_B5_2:7.9分钟

[0959] LCMS方法:LCMS_4:m/z 1437.02 (M+3H) 3+,1078.01 (M+4H) 4+,862.41 (M+5) 5+

[0960] 实施例12

[0961] N^{ε12}-([2-[2-[2-[[(4S)-5-羟基-4-[(18-羟基-18-氧代十八烷酰基)氨基]5-氧代戊酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基)) [Lys¹²,Leu²⁷]胰高血糖素



[0963] 基本按SPPS方法A和C中所述制备了该肽。

[0964] UPLC 10_B4_2:8.7分钟

[0965] UPLC 10_B5_2:8.4分钟

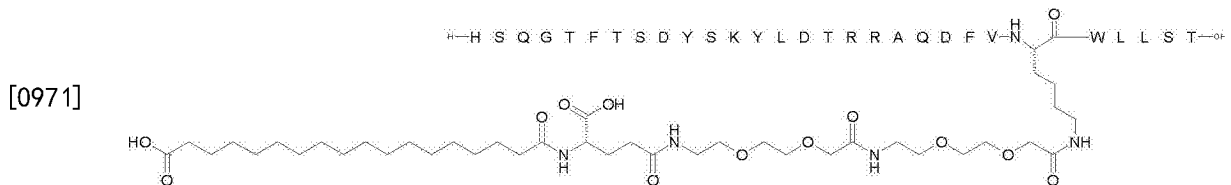
[0966] UPLC 05_B5_1:分钟

[0967] UPLC 04_A3_1:分钟

[0968] LCMS方法:LCMS_4:m/z 1394.35 (M+3H) 3+,1045.99 (M+4H) 4+

[0969] 实施例13

[0970] N^{e24}-([2-[2-[2-[[(4S)-5-羟基-4-[(18-羟基-18-氧代十八烷酰基)氨基]5-氧代戊酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基])) [Thr¹⁶,Lys²⁴,Leu²⁷,Ser²⁸]胰高血糖素



[0972] 基本按SPPS方法A和B中所述,使用2-[2-[2-[2-[2-[2-[[(4S)-5-叔丁氧基-4-[(18-叔丁氧基-18-氧代-十八烷酰基)氨基]-5-氧代-戊酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酸制备了该肽。

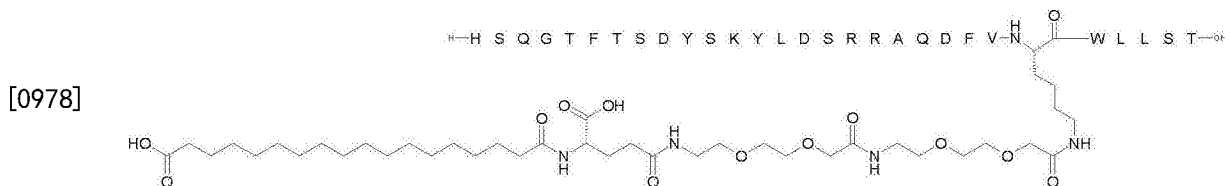
[0973] UPLC 05_B5_1:5.1分钟

[0974] UPLC 04_A3_1:12.6分钟

[0975] LCMS方法:LCMS_4:m/z 1389.79 (M+3H) 3+,1042.58 (M+4H) 4+,834.28 (M+5) 5+

[0976] 实施例14

[0977] N^{e24}-([2-[2-[2-[[(4S)-5-羟基-4-[(18-羟基-18-氧代十八烷酰基)氨基]5-氧代戊酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基])) [Lys²⁴,Leu²⁷,Ser²⁸]胰高血糖素



[0979] 基本按SPPS方法A和B中所述,使用2-[2-[2-[2-[2-[2-[[(4S)-5-叔丁氧基-4-[(18-叔丁氧基-18-氧代-十八烷酰基)氨基]-5-氧代-戊酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酸制备了该肽。

[0980] UPLC 04_A4_1:6.7分钟

[0981] UPLC 05_B5_1:4.9分钟

[0982] UPLC 04_A3_1:12.0分钟

[0983] LCMS方法:LCMS_4:m/z 1385.41 (M+3H) 3+,1039.06 (M+4H) 4+,831.45 (M+5) 5+

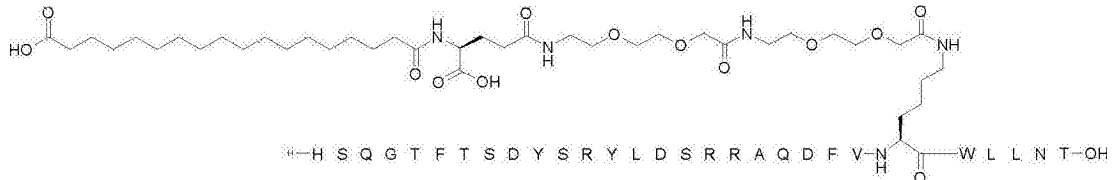
[1026] UPLC 05_B5_1:4.9分钟

[1027] LCMS方法:LCMS_4:m/z 1384.81 (M+3H) 3+,1038.62 (M+4H) 4+

[1028] 实施例20

[1029] N^{e24}-([2-[2-[2-[[[(4S)-5-羟基-4-[(18-羟基-18-氧代十八烷酰基)氨基]5-氧代戊酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基)]) [Arg¹²,Lys²⁴,Leu²⁷]胰高血糖素

[1030]



[1031] 基本按SPPS方法A和B中所述,使用2-[2-[2-[2-[2-[2-[[[(4S)-5-叔丁氧基-4-[(18-叔丁氧基-18-氧代-十八烷酰基)氨基]-5-氧代-戊酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酸制备了该肽。

[1032] UPLC 08_B4_1:8.74分钟

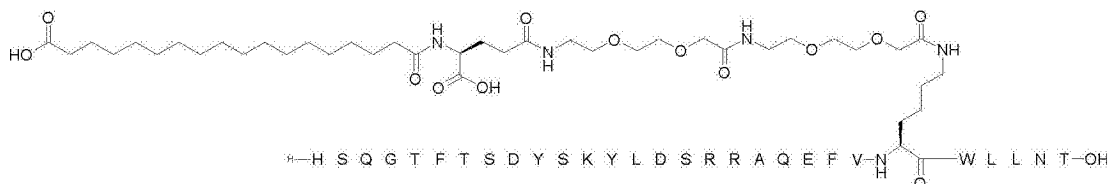
[1033] UPLC 05_B5_1:5.25分钟

[1034] LCMS方法:LCMS_4:4208.0

[1035] 实施例21

[1036] N^{e24}-([2-[2-[2-[[[(4S)-5-羟基-4-[(18-羟基-18-氧代十八烷酰基)氨基]5-氧代戊酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基)]) [Glu²¹,Lys²⁴,Leu²⁷]胰高血糖素

[1037]



[1038] 基本按SPPS方法A和B中所述,使用2-[2-[2-[2-[2-[2-[[[(4S)-5-叔丁氧基-4-[(18-叔丁氧基-18-氧代-十八烷酰基)氨基]-5-氧代-戊酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酸制备了该肽。

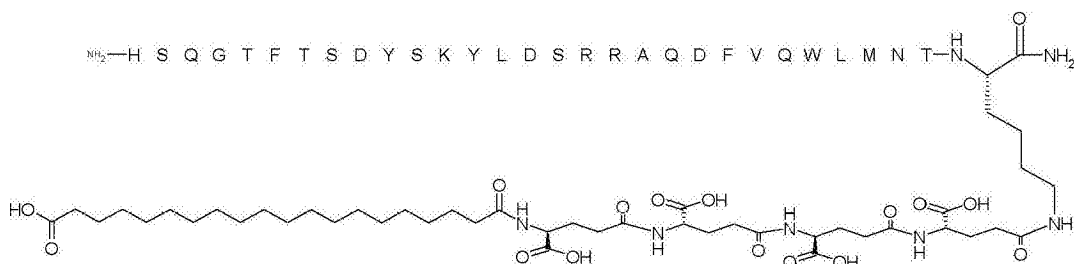
[1039] UPLC 08_B4_1:8.50分钟

[1040] LCMS方法:LCMS_4:4193

[1041] 实施例22

[1042] N^d-胰高血糖素基-N^e [(4S)-5-羟基-4-[[[(4S)-5-羟基-4-[[[(4S)-5-羟基-4-[[[(4S)-5-羟基-4-[(20-羟基-20-氧代-二十碳酰基)氨基]-5-氧代-戊酰基]氨基]-5-氧代-戊酰基]氨基]-5-氧代-戊酰基]氨基]-5-氧代-戊酰基]赖氨酸酰胺 (lysinyll amide)

[1043]



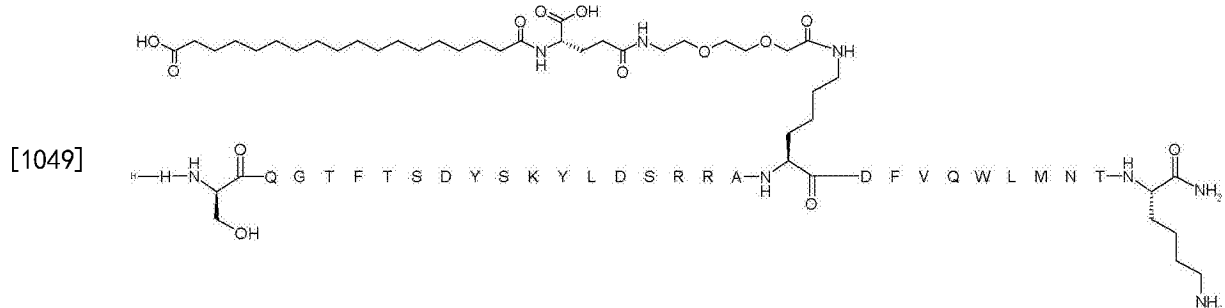
[1044] 基本按SPPS方法A和C中所述制备了该肽。

[1045] UPLC 08_B4_1:8.7分钟

[1046] LCMS方法:LCMS_4:m/z 4450

[1047] 实施例23

[1048] N^{ϵ} - $(N^{\epsilon 24}$ [2-[2-[2-[[(4S)-5-羟基-4-[(18-羟基-18-氧代-十八烷酰基)氨基]-5-氧代-戊酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基] [D-Ser²,Lys²⁰]胰高血糖素基)赖氨酸酰胺



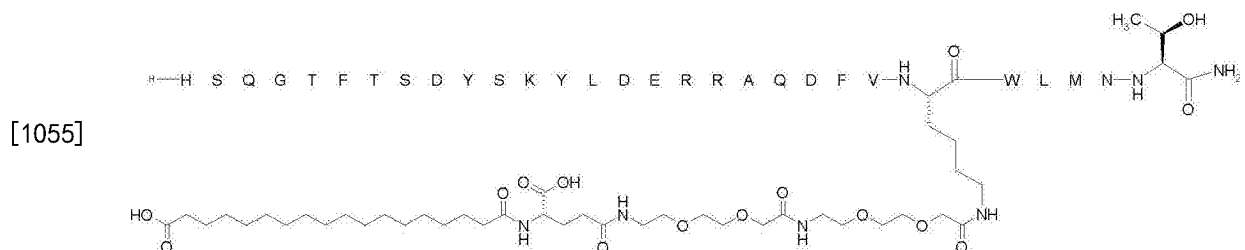
[1050] 基本按SPPS方法A和C中所述制备了该肽。

[1051] UPLC 08_B4_1:7.87分钟

[1052] LCMS方法:LCMS_4:m/z 4181

[1053] 实施例24

[1054] $N^{\epsilon 24}$ -[2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[(4S)-5-羟基-4-[(18-羟基-18-氧代十八烷酰基)氨基]-5-氧代戊酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基] [Glu¹⁶,Lys²⁴]胰高血糖素肽酰胺



[1056] 基本按SPPS方法A和B中所述,使用2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[(4S)-5-叔丁氧基-4-[(18-叔丁氧基-18-氧代-十八烷酰基)氨基]-5-氧代-戊酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酸制备了该肽。

[1057] UPLC 05_B5_1:Rt=6.2分钟

[1058] UPLC 04_A3_1:Rt=11.7分钟

[1059] LCMS方法:LCMS_4:m/z 1413.8 (M+3H) 3+,1060.7 (M+4H) 4+,848.8 (M+5) 5+

[1060] 实施例25

[1061] N^{ϵ} ([Glu¹⁶]胰高血糖素基) N^{ϵ} -([2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[(4S)-5-羟基-4-[(18-羟基-18-氧代十八烷酰基)氨基]-5-氧代戊酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基])赖氨酸酰胺

[(18-叔丁氧基-18-氧代-十八烷酰基)氨基]-5-氧代-戊酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酸制备了该肽。

[1082] UPLC 08_B2_1:Rt=12.9

[1083] UPLC 08_B4_1:Rt=8.6

[1084] UPLC 05_B5_1:Rt=5.7

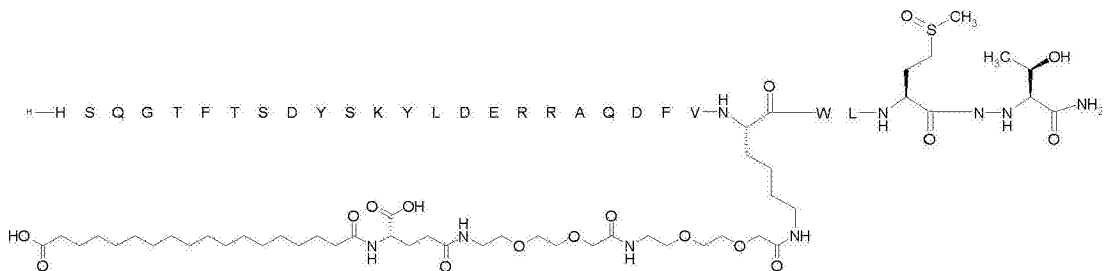
[1085] UPLC 04_A3_1:Rt=11.3

[1086] LCMS方法:LCMS_4:m/z 1428 (M+3H) 3+,1071 (M+4H) 4+,857 (M+5) 5+

[1087] 实施例28

[1088] N^{e24}-([2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[[(4S)-5-羟基-4-[(18-羟基-18-氧代十八烷酰基)氨基]-5-氧代戊酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基]) [Glu¹⁶,Lys²⁴,Met(O)²⁷]胰高血糖素肽酰胺

[1089]



[1090] 基本按SPPS方法A和B中所述,使用2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[[(4S)-5-叔丁氧基-4-[(18-叔丁氧基-18-氧代-十八烷酰基)氨基]-5-氧代-戊酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酸制备了该肽。

[1091] UPLC 05_B5_1:Rt=4.7

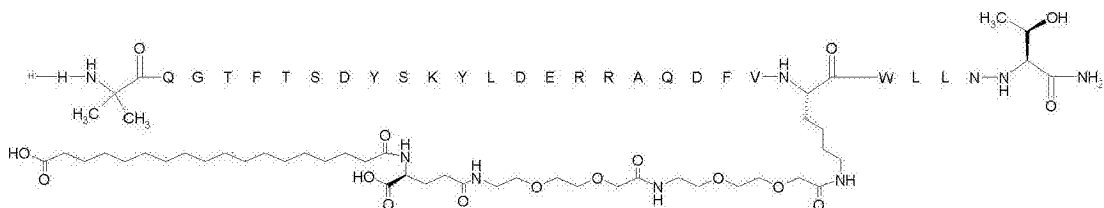
[1092] UPLC 04_A4_1:Rt=4.1

[1093] LCMS方法:LCMS_4:m/z 1419.2 (M+3H) 3+,1064.7 (M+4H) 4+,852.0 (M+5) 5+

[1094] 实施例29

[1095] N^{e24}-([2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[[(4S)-5-羟基-4-[(18-羟基-18-氧代十八烷酰基)氨基]-5-氧代戊酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基]) [Aib²,Glu¹⁶,Lys²⁴,Leu²⁷]胰高血糖素肽酰胺

[1096]



[1097] 基本按SPPS方法A和B中所述,使用2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[[(4S)-5-叔丁氧基-4-[(18-叔丁氧基-18-氧代-十八烷酰基)氨基]-5-氧代-戊酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酸制备了该肽。

[1098] UPLC 08_B4_1:Rt=8.4

[1099] UPLC 04_A4_1:Rt=7.2

[1100] LCMS方法:LCMS_4:m/z 1407.8 (M+3H) 3+,1056.4 (M+4H) 4+,845.6 (M+5) 5+

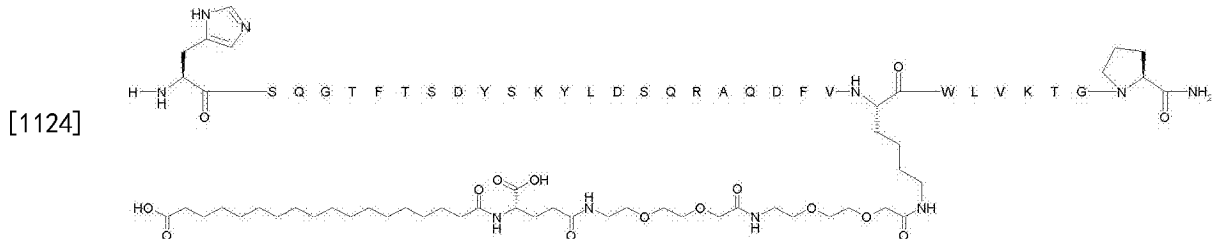
[1101] 实施例30

[1102] N^{e24}-([2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[[(4S)-5-羟基-4-[(18-羟基-18-氧代十八烷酰基)

[1121] LCMS方法:LCMS_4:m/z 1393.7 (M+3H) 3+

[1122] 实施例33

[1123] (N^{ε24}-([2-[2-[2-[2-[2-[2-[[(4S)-5-羟基-4-[(18-羟基-18-氧代十八烷酰基)氨基]-5-氧代戊酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基])[Gln¹⁷,Lys²⁴,Val²⁷,Lys²⁸]胰高血糖素基)-Gly-Pro酰胺



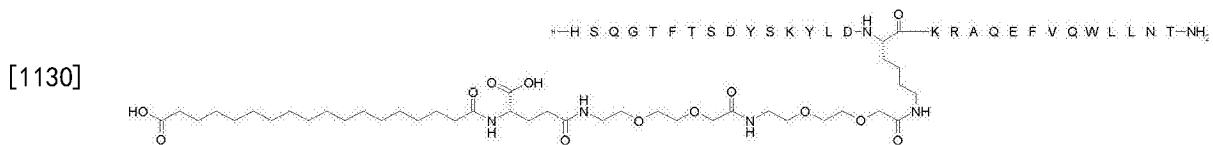
[1125] 基本按SPPS方法A和C中所述制备了该肽。

[1126] UPLC 08_B4_1:Rt=8.0

[1127] LCMS方法:LCMS_4:m/z 1436.3 (M+3H) 3+

[1128] 实施例34

[1129] N^{ε16}-([2-[2-[2-[2-[2-[2-[[(4S)-5-羟基-4-[(18-羟基-18-氧代十八烷酰基)氨基]-5-氧代戊酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基])[Lys¹⁶,Lys¹⁷,Glu²¹,Leu²⁷]胰高血糖素肽酰胺



[1131] 基本按SPPS方法A和B中所述,使用2-[2-[2-[2-[2-[2-[[(4S)-5-叔丁氧基-4-[(18-叔丁氧基-18-氧代-十八烷酰基)氨基]-5-氧代-戊酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酸制备了该肽。

[1132] UPLC 08_B2_1:Rt=12.9

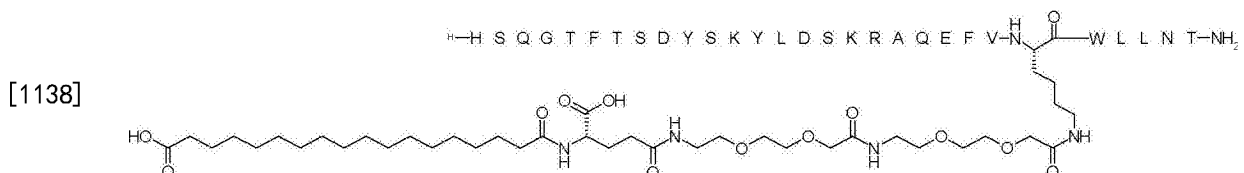
[1133] UPLC 08_B4_1:Rt=8.5

[1134] UPLC 05_B5_1:Rt=6.4

[1135] LCMS方法:LCMS_4:m/z 1402.7 (M+3H) 3+,1052.3 (M+4H) 4+,842.2 (M+5) 5+

[1136] 实施例35

[1137] N^{ε24}-([2-[2-[2-[2-[2-[2-[[(4S)-5-羟基-4-[(18-羟基-18-氧代十八烷酰基)氨基]-5-氧代戊酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基])[Lys¹⁷,Glu²¹,Lys²⁴,Leu²⁷]胰高血糖素肽酰胺



[1139] 基本按SPPS方法A和B中所述,使用2-[2-[2-[2-[2-[2-[[(4S)-5-叔丁氧基-4-[(18-叔丁氧基-18-氧代-十八烷酰基)氨基]-5-氧代-戊酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酸制备了该肽。

[1140] UPLC 08_B2_1:Rt=12.8

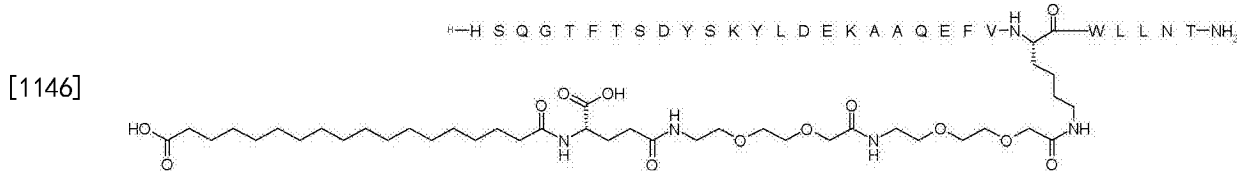
[1141] UPLC 08_B4_1:Rt=8.5

[1142] UPLC 05_B5_1:Rt=6.2

[1143] LCMS方法:LCMS_4:m/z 1389.3 (M+3H) 3+,1042.0 (M+4H) 4+,833.1 (M+5) 5+

[1144] 实施例36

[1145] N^{e24}-([2-[2-[2-[2-[2-[2-[[(4S)-5-羟基-4-[(18-羟基-18-氧代十八烷酰基)氨基]-5-氧代戊酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基]) [Glu¹⁶,Lys¹⁷,Ala¹⁸,Glu²¹,Lys²⁴,Leu²⁷]胰高血糖素肽酰胺



[1147] 基本按SPPS方法A和B中所述,使用2-[2-[2-[2-[2-[2-[[(4S)-5-叔丁氧基-4-[(18-叔丁氧基-18-氧代-十八烷酰基)氨基]-5-氧代-戊酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酸制备了该肽。

[1148] UPLC 08_B2_1:Rt=13.7

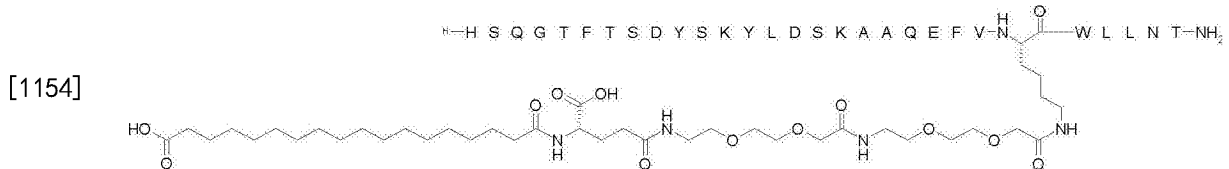
[1149] UPLC 08_B4_1:Rt=9.0

[1150] UPLC 05_B5_1:Rt=7.1

[1151] LCMS方法:LCMS_4:m/z 1374.7 (M+3H) 3+,1031.2 (M+4H) 4+

[1152] 实施例37

[1153] N^{e24}-([2-[2-[2-[2-[2-[2-[[(4S)-5-羟基-4-[(18-羟基-18-氧代十八烷酰基)氨基]-5-氧代戊酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基]) [Lys¹⁷,Ala¹⁸,Glu²¹,Lys²⁴,Leu²⁷]胰高血糖素肽酰胺



[1155] 基本按SPPS方法A和B中所述,使用2-[2-[2-[2-[2-[2-[[(4S)-5-叔丁氧基-4-[(18-叔丁氧基-18-氧代-十八烷酰基)氨基]-5-氧代-戊酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酸制备了该肽。

[1156] UPLC 08_B2_1:Rt=13.6

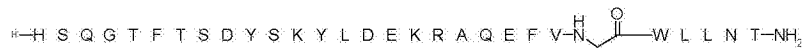
[1157] UPLC 08_B4_1:Rt=8.9

[1158] UPLC 05_B5_1:Rt=7.1

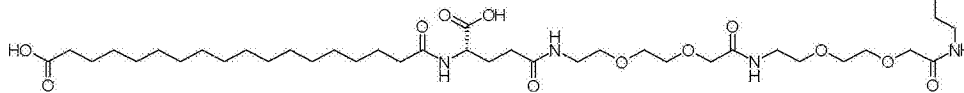
[1159] LCMS方法:LCMS_4:m/z 1361.0 (M+3H) 3+,1020.75 (M+4H) 4+

[1160] 实施例38

[1161] N^{e24}-([2-[2-[2-[2-[2-[2-[[(4S)-5-羟基-4-[(18-羟基-18-氧代十八烷酰基)氨基]-5-氧代戊酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基]) [Glu¹⁶,Lys¹⁷,Glu²¹,Lys²⁴,Leu²⁷]胰高血糖素肽酰胺



[1162]



[1163] 基本按SPPS方法A和B中所述,使用2-[2-[2-[2-[2-[2-[[[(4S)-5-叔丁氧基-4-[(18-叔丁氧基-18-氧代-十八烷酰基)氨基]-5-氧代-戊酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酸制备了该肽。

[1164] UPLC 08_B2_1:Rt=12.9

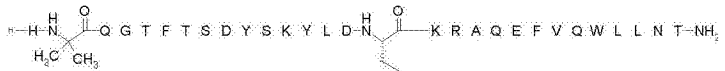
[1165] UPLC 08_B4_1:Rt=8.5

[1166] UPLC 05_B5_1:Rt=6.1

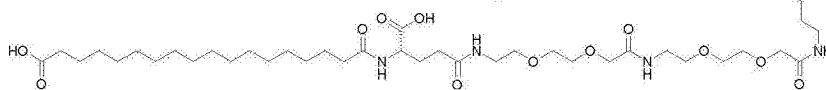
[1167] LCMS方法:LCMS_4:m/z 1403.3 (M+3H) 3+,1052.5 (M+4H) 4+,842.2 (M+5) 5+

[1168] 实施例39

[1169] N^{ε16}-([2-[2-[2-[2-[2-[2-[[[(4S)-5-羟基-4-[(18-羟基-18-氧代十八烷酰基)氨基]-5-氧代戊酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基]) [Aib²,Lys¹⁶,Lys¹⁷,Glu²¹,Leu²⁷]胰高血糖素肽酰胺



[1170]



[1171] 基本按SPPS方法A和B中所述,使用2-[2-[2-[2-[2-[2-[[[(4S)-5-叔丁氧基-4-[(18-叔丁氧基-18-氧代-十八烷酰基)氨基]-5-氧代-戊酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酸制备了该肽。

[1172] UPLC 05_B5_1:Rt=5.0

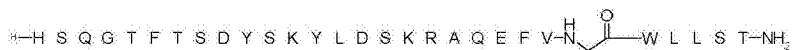
[1173] UPLC 04_A3_1:Rt=14.5

[1174] UPLC 04_A4_1:Rt=9.2

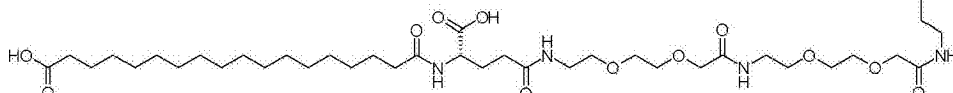
[1175] LCMS方法:LCMS_4:m/z 1402.5 (M+3H) 3+,1051.85 (M+4H) 4+,841.7 (M+5) 5+

[1176] 实施例40

[1177] N^{ε24}-([2-[2-[2-[2-[2-[2-[[[(4S)-5-羟基-4-[(18-羟基-18-氧代十八烷酰基)氨基]-5-氧代戊酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基]) [Lys¹⁷,Glu²¹,Lys²⁴,Leu²⁷,Ser²⁸]胰高血糖素肽酰胺



[1178]



[1179] 基本按SPPS方法A和B中所述,使用2-[2-[2-[2-[2-[2-[[[(4S)-5-叔丁氧基-4-[(18-叔丁氧基-18-氧代-十八烷酰基)氨基]-5-氧代-戊酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酸制备了该肽。

[1180] UPLC 09_B2_1:Rt=12.8

[1181] UPLC 09_B4_1:Rt=8.5

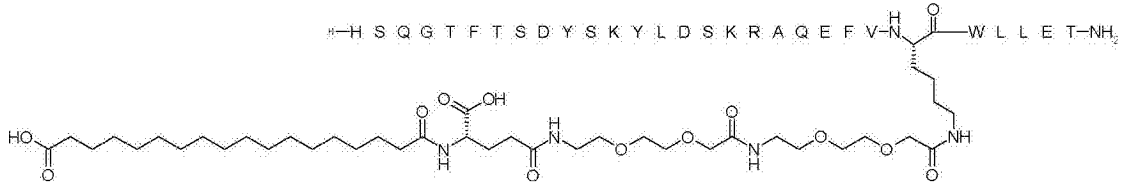
[1182] UPLC 05_B5_1:Rt=5.6

[1183] LCMS方法:LCMS_4:m/z 1380.2 (M+3H) 3+,1035.1 (M+4H) 4+,828.3 (M+5) 5+

[1184] 实施例41

[1185] N^{e24}-([2-[2-[2-[2-[2-[2-[[(4S)-5-羟基-4-[(18-羟基-18-氧代十八烷酰基)氨基]-5-氧代戊酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基)] [Lys¹⁷,Glu²¹,Lys²⁴,Leu²⁷,Glu²⁸]胰高血糖素肽酰胺

[1186]



[1187] 基本按SPPS方法A和B中所述,使用2-[2-[2-[2-[2-[2-[[(4S)-5-叔丁氧基-4-[(18-叔丁氧基-18-氧代-十八烷酰基)氨基]-5-氧代-戊酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酸制备了该肽。

[1188] UPLC 08_B2_1:Rt=12.8

[1189] UPLC 08_B4_1:Rt=8.5

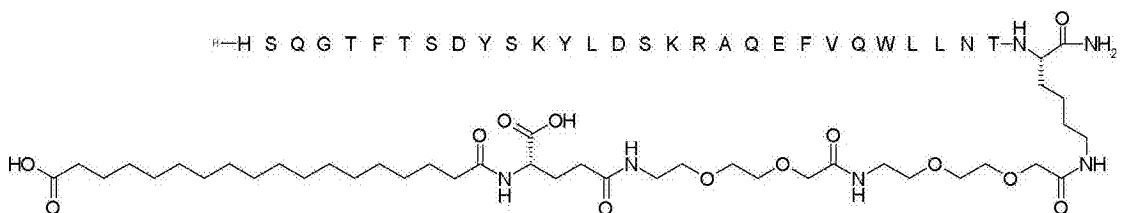
[1190] UPLC 05_B5_1:Rt=5.4

[1191] LCMS方法:LCMS_4:m/z 1394.1 (M+3H) 3+,1045.6 (M+4H) 4+,836.7 (M+5) 5+

[1192] 实施例42

[1193] N^e-([Lys¹⁷,Glu²¹,Leu²⁷]胰高血糖素基)N^e-([2-[2-[2-[2-[2-[2-[[(4S)-5-羟基-4-[(18-羟基-18-氧代十八烷酰基)氨基]-5-氧代戊酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基)赖氨酸酰胺

[1194]



[1195] 基本按SPPS方法A和B中所述,使用2-[2-[2-[2-[2-[2-[[(4S)-5-叔丁氧基-4-[(18-叔丁氧基-18-氧代-十八烷酰基)氨基]-5-氧代-戊酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酸制备了该肽。

[1196] UPLC 08_B2_1:Rt=12.4

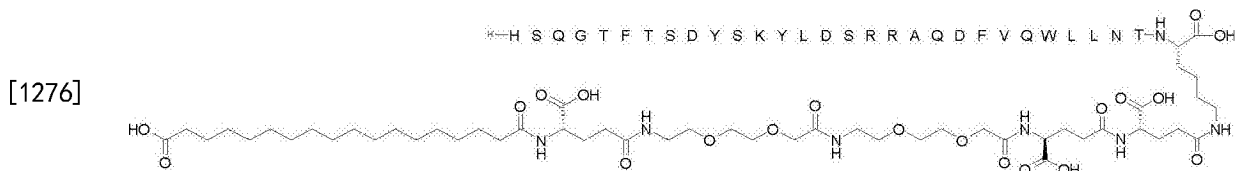
[1197] UPLC 08_B4_1:Rt=8.2

[1198] UPLC 05_B5_1:Rt=4.6

[1199] LCMS方法:LCMS_4:m/z 1431.9 (M+3H) 3+,1074.2 (M+4H) 4+,859.4 (M+5) 5+

[1200] 实施例43

[1201] N^{e28}([2-[2-[2-[2-[2-[2-[[(4S)-5-羟基-4-[(18-羟基-18-氧代十八烷酰基)氨基]-5-氧代戊酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基)] [Lys¹⁷,Glu²¹,Leu²⁷,Lys²⁸]胰高血糖素肽酰胺



[1277] 基本按SPPS方法A和C中所述制备了该肽。

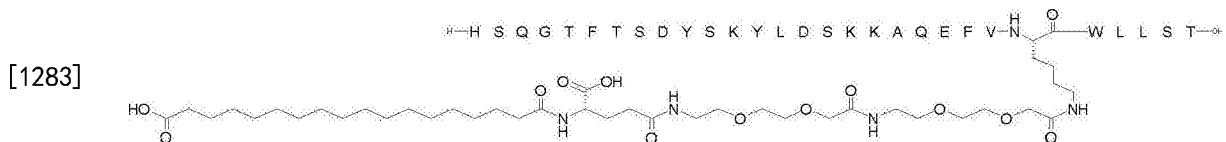
[1278] UPLC 08_B2_1:Rt=12.6

[1279] UPLC 08_B4_1:Rt=8.4

[1280] LCMS方法:LCMS_4m/z:4465.50 (M)+;1489.12 ((M/3)+3);1117.09 ((M/4)+4);893.67 (M/5)+5)。

[1281] 实施例55

[1282] N^{e24}-([2-[2-[2-[2-[2-[2-[[(4S)-5-羟基-4-[(18-羟基-18-氧代十八烷酰基)氨基]-5-氧代戊酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基])[Lys¹⁷,Lys¹⁸,Glu²¹,Lys²⁴,Leu²⁷,Ser²⁸]胰高血糖素



[1284] 基本按SPPS方法A和C中所述制备了该肽。

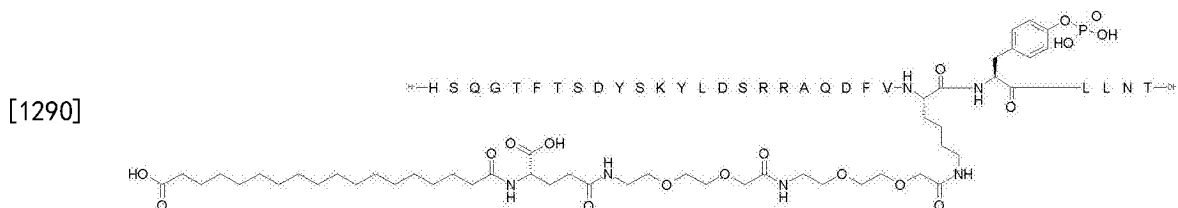
[1285] UPLC 08_B2_1:Rt=12.9

[1286] UPLC 08_B4_1:Rt=8.5

[1287] LCMS方法:LCMS_4m/z:4110.50 (M)+;1370.92 ((M/3)+3);1028.19 ((M/4)+4);822.75 (M/5)+5)。

[1288] 实施例56

[1289] N^{e24}-([2-[2-[2-[2-[2-[2-[[(4S)-5-羟基-4-[(18-羟基-18-氧代十八烷酰基)氨基]-5-氧代戊酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基])[Lys²⁴,(p)Tyr²⁵,Leu²⁷]胰高血糖素



[1291] 基本按SPPS方法A和B中所述,使用肽合成中的Fmoc-Tyr(PO(NMe₂)₂)-OH和2-[2-[2-[2-[2-[2-[[(4S)-5-叔丁氧基-4-[(18-叔丁氧基-18-氧代-十八烷酰基)氨基]-5-氧代-戊酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酸制备了该肽。在从树脂上切割下来后,通过将水加至共10%(V/V),使受保护的磷酸酪氨酸脱保护。将TFA-水混合物放置16小时以确保磷酸酪氨酸脱保护。

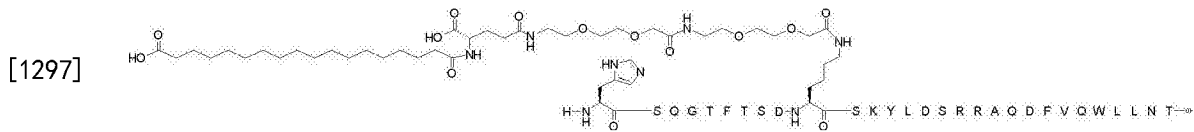
[1292] UPLC 09_B2_1:Rt=12.7

[1293] UPLC 09_B4_1:Rt=8.4

[1294] LCMS方法:LCMS_4m/z:4237.00 (M)+;1413.04 ((M/3)+3);1059.78 ((M/4)+4);848.26 (M/5)+5)。

[1295] 实施例57

[1296] N^ε¹⁰-([2-[2-[2-[2-[2-[2-[[(4S)-5-羟基-4-[(18-羟基-18-氧代十八烷酰基)氨基]-5-氧代戊酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]-乙酰基)] [Lys¹⁰,Leu²⁷]胰高血糖素



[1298] 基本按SPPS方法A和B中所述,使用2-[2-[2-[2-[2-[2-[[(4S)-5-叔丁氧基-4-[(18-叔丁氧基-18-氧代-十八烷酰基)氨基]-5-氧代-戊酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酸制备了该肽。

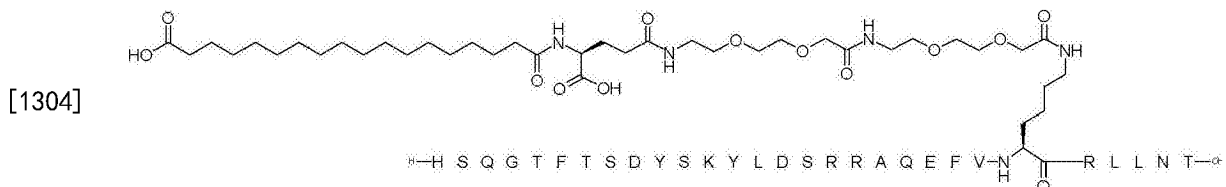
[1299] UPLC 08_B4_1:Rt=8.3

[1300] UPLC 05_B5_1:Rt=5.0

[1301] LCMS方法:LCMS_4m/z:1382.18 ((M/3)+3);1036.89 ((M/4)+4);829.72 ((M/5)+5)。

[1302] 实施例58

[1303] N^ε²⁴-([2-[2-[2-[2-[2-[2-[[(4S)-5-羟基-4-[(18-羟基-18-氧代十八烷酰基)氨基]-5-氧代戊酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基)] [Glu²¹,Lys²⁴,Arg²⁵,Leu²⁷]胰高血糖素



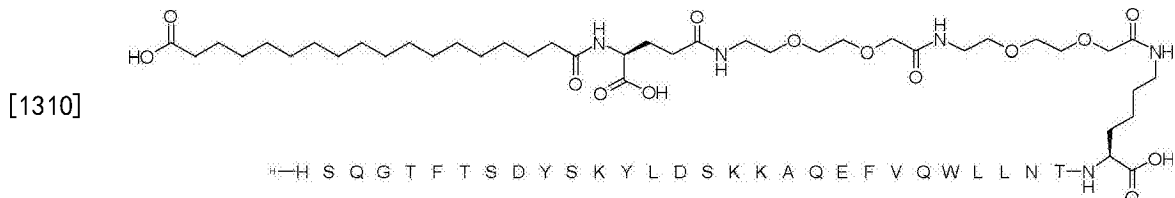
[1305] 基本按SPPS方法A和B中所述,使用2-[2-[2-[2-[2-[2-[[(4S)-5-叔丁氧基-4-[(18-叔丁氧基-18-氧代-十八烷酰基)氨基]-5-氧代-戊酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酸制备了该肽。

[1306] UPLC 08_B4_1:Rt=8.55

[1307] LCMS方法:LCMS_4:4164.8

[1308] 实施例59

[1309] N^α-([Lys¹⁷,Lys¹⁸,Glu²¹,Leu²⁷]胰高血糖素基)N^ε-([2-[2-[2-[2-[2-[2-[[(4S)-5-羟基-4-[(18-羟基-18-氧代十八烷酰基)氨基]-5-氧代戊酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]-乙酰基)]赖氨酸(Lysin)



[1311] 基本按SPPS方法A和B中所述,使用2-[2-[2-[2-[2-[2-[[(4S)-5-叔丁氧基-4-[(18-叔丁氧基-18-氧代-十八烷酰基)氨基]-5-氧代-戊酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酸制备了该肽。

[1312] UPLC 08_B4_1:Rt=8.45

[1313] LCMS方法:LCMS_4:4266.5

[1314] 实施例60

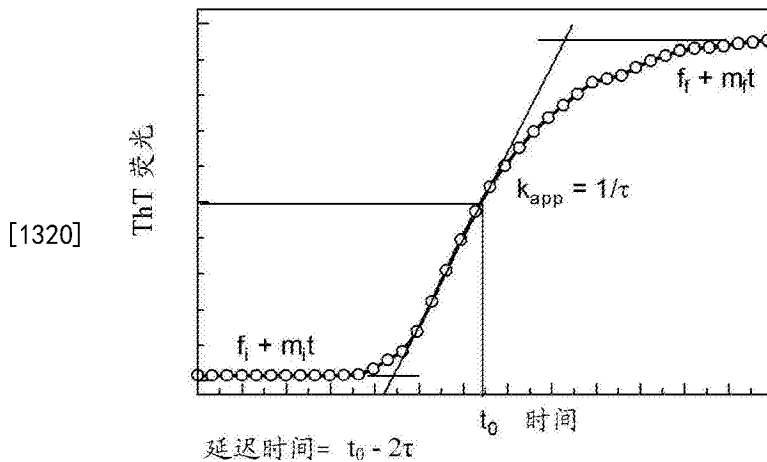
[1315] 用于评价蛋白质制剂的物理稳定性的ThT原纤维形成测定法

[1316] 肽的低物理稳定性可导致淀粉状原纤维形成,其是所观察到的样品中的井然有序的线状大分子结构,最终导致凝胶形成。传统上通过目视检查样品来测量。然而,这种测量是非常主观的,取决于观测者。因此,应用小分子指示物探测物要有利得多。硫磺素T (ThT)便是这类探测物,当与原纤维结合时,具有截然不同的荧光特性 [Naiki等(1989) Anal.Biochem.177,244-249;LeVine(1999) Methods.Enzymol.309,274-284]。

[1317] 可用下列表达式,通过S形曲线描述原纤维形成的时程 [Nielsen等(2001) Biochemistry 40,6036-6046]:

$$[1318] \quad F = f_i + m_i t + \frac{f_f + m_f t}{1 + e^{-[(t-t_0)/\tau]}} \quad \text{方程式(1)}$$

[1319] 式中,F是时间t时的ThT荧光。常数 t_0 是达到最大荧光50%所需要的时间。描述原纤维形成的两个重要参数是通过 $t_0 - 2\tau$ 计算的延迟时间和表观速率常数 $k_{app} = 1/\tau$ 。



[1321] 肽的部分折叠的中间体的形成被视作原纤维形成的一般引发机制。少量的这些中间体核形成模板,更多的中间体可在其上装配,并继续进行原纤维形成。延迟时间相当于其中建立核的临界质量的间隔,而表观速率常数是原纤维本身形成的速率。

[1322] 在每次测定前新鲜制备样品。图例中描述了各样品的组成。用适当量的浓NaOH和HCl调节样品的pH至所需值。将硫磺素T自储液在H₂O中加入样品中至终浓度1 μ M。

[1323] 将200 μ l等分量的样品置于96孔微量滴定板 (Packard OptiPlate™-96, 白色聚苯乙烯) 中。通常,将各样品一式4份或8份(相当于一种试验条件)置于一列孔中。将板用Scotch Pad (Qiagen) 密封。

[1324] 在规定温度下温育,振荡,在Fluoroskan Ascent FL荧光读板仪 (Thermo Labsystems) 中进行ThT荧光发射的测量。调节温度至所需值,通常为30 $^{\circ}$ C或37 $^{\circ}$ C。在无振荡(无外部物理应力)或用调节至960rpm、幅度为1mm的定轨振荡将板温育。采用通过444nm滤光片的激发和通过485nm滤光片发射的测量,进行荧光测量。

[1325] 每轮一开始都是将板在测定温度下温育10分钟。在所需时间内每20分钟对板进行测量。在每次测量之间,按照所述将板振荡和加热。

[1326] 在ThT测定法完成后,合并各样品的一式4份或8份,在18 $^{\circ}$ C下以20000rpm离心30分钟。上清液通过0.22 μ m过滤器过滤,将等分量转移至HPLC小瓶中。

[1327] 使用合适的标准品作为参比,通过反相HPLC测定初始样品中和经过滤的上清液中

的肽浓度。过滤样品的浓度占初始样品浓度的百分比报告为回收率。

[1328] 将测量点存于Microsoft Excel格式用于进一步处理,利用GraphPad Prism绘制曲线并拟合。在缺乏原纤维时得自ThT的背景发射可忽略。数据点通常为4或8个样品的平均值,用标准误差棒表示。在同一曲线中仅提供同一实验(即同一板中的样品)中得到的数据以确保实验之间原纤维形成的相对测量。

[1329] 可将数据集拟合至方程式(1)。然而,可通过目视检查曲线,识别ThT荧光显著高于背景水平的时间点,来评价原纤维形成前的延迟时间。

[1330] 实施例61

[1331] 肽溶解度

[1332] 肽和蛋白质的溶解度取决于溶液的pH。蛋白质或肽常常在其等电点(pI)或接近等电点时沉淀,在等电点时其净电荷为零。在低pH(即低于pI)时,蛋白质和肽通常带正电荷,在高于pI的pH下,它们带负电荷。

[1333] 如果在给定pH下足够浓度的治疗性肽是可溶性的,则对该治疗性肽是有利的,所述pH既适于配制稳定的药物产品,又适于将药物产品例如通过皮下注射给予患者。

[1334] 按如下所述测量溶解度相对于pH的曲线:在水中制备制剂或肽溶液,通过加入HCl和NaOH调节等分量至所需范围的pH值。将这些样品置于室温下平衡2-3天。然后将样品离心。取出各样品的少量等分量用于反相HPLC分析,以测定溶液中蛋白质的浓度。离心后测量各样品的pH,将各蛋白质的浓度对所测pH作图。

[1335] 实施例62

[1336] pH 7.5下的肽溶解度

[1337] 进行了天然胰高血糖素和胰高血糖素类似物在pH 7.5下的溶解度试验,以证实与天然胰高血糖素相比,接近生理pH的胰高血糖素类似物的溶解度是否得到改进。

[1338] 将天然胰高血糖素或胰高血糖素类似物的样品(通常为250nmol)加入HEPES缓冲液(通常为1mL)中至250 μ M的标称浓度。将混合物置于室温下1小时,并不时摇动,然后从溶液中取出200 μ L样品。将样品离心(6000rpm,5分钟)后,采用化学发光氮特异性HPLC检测器(Antek 8060 HPLC-CLND)定量测定了上清液。

[1339] 实施例63

[1340] 肽溶解度/稳定性

[1341] 进行了胰高血糖素类似物的稳定性试验,以证实该溶液的稳定性与天然胰高血糖素的溶液相比是否得到改进。

[1342] 将胰高血糖素类似物的样品(通常为250nmol)加入HEPES缓冲液(通常为1mL)中至250 μ M的标称浓度。将混合物置于室温下1小时,并不时摇动,然后从溶液中取出200 μ L样品。将样品离心(6000rpm,5分钟),在UPLC上对上清液进行分析,测量t=0时的峰下面积(214nm下的UV吸收)。由于胰高血糖素在pH 7.5下的溶解度差所致,将胰高血糖素的样品(GlucaGen[®] hypokit, Novo Nordisk, 在水中, 250 μ M, pH 2-3)包括在内用于比较。将溶液置于30 $^{\circ}$ C下6天后,将溶液过滤(Millex[®]-GV, 0.22 μ m过滤装置, Durapore[®] Membrane),并在UPLC上进行分析。测量t=6天时的峰下面积(214nm下的UV吸收)。

[1343] 实施例64

[1344] 胰高血糖素类似物(实施例3)与GLP-1类似物G1、GLP-1类似物G3和胰岛素类似物

G5的联合制剂

[1345] 对胰高血糖素类似物(实施例3)与具有治疗肥胖症和糖尿病潜力的许多肽的联合制剂进行了研究。制备下列制剂:

[1346] 1. 250 μ M胰高血糖素类似物(实施例3)、10mM HEPES pH 7.5

[1347] 2. 250 μ M胰高血糖素类似物(实施例3)、0.6mM胰岛素类似物G5、0.5mM Zn (Ac) 2、16mM间甲酚、16mM苯酚、213mM甘油, pH 7.6

[1348] 3. 250 μ M胰高血糖素类似物(实施例3)、1.6mM GLP-1类似物G1、58mM苯酚、10mM磷酸盐pH 8.15

[1349] 4. 250 μ M胰高血糖素类似物(实施例3)、1.2mM GLP-1类似物G3、58mM苯酚、10mM磷酸盐pH 7.4

[1350] 5. 0.6mM胰岛素类似物G5、0.5mM Zn (Ac) 2、16mM间甲酚、16mM苯酚、213mM甘油, pH 7.6

[1351] 6. 1.6mM GLP-1类似物G1、58mM苯酚、10mM磷酸盐pH 8.15

[1352] 通过在水中稀释合适的胰岛素类似物G5储液,加入间甲酚和苯酚,然后加入乙酸锌,制备了制剂2。胰高血糖素类似物作为最后的组分加入。以类似方式制备了制剂5。

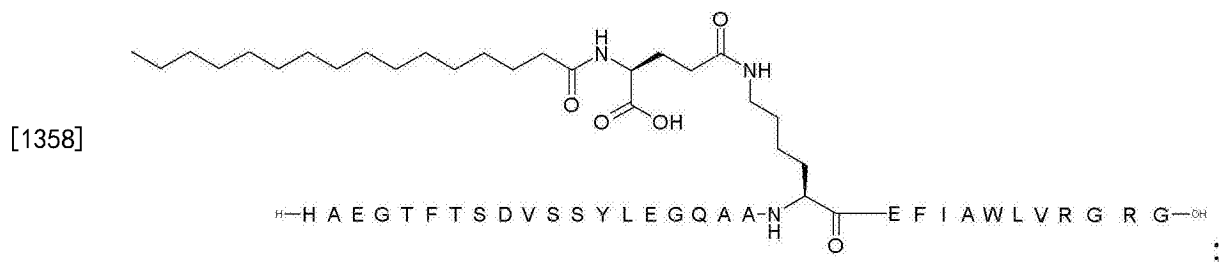
[1353] 对这6种制剂进行ThT原纤维形成测定法。将样品在37 $^{\circ}$ C温育45小时,并剧烈振荡(960rpm)。在这些条件下,无样品显示任何ThT荧光信号,且在制剂中存在完全回收的胰高血糖素类似物和混合肽两者(因技术原因未对GLP-1类似物G3进行分析)。与单独肽(制剂1、5和6)相比,胰高血糖素类似物(实施例3)与其它肽的联合制剂不会产生较不稳定的制剂。

[1354] 实施例65:GLP-1衍生物的制备

[1355] 制备了下列GLP-1化合物(全部均为GLP-1 (7-37)类似物的衍生物):

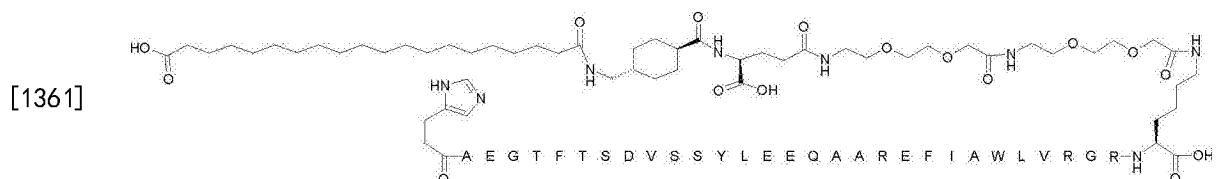
[1356] 化合物G1:

[1357] N- ϵ 26-((S)-4-羧基-4-十六烷酰基氨基-丁酰基) [Arg34] GLP-1-(7-37), 其亦可称为Arg³⁴Lys²⁶(N ϵ -(γ -谷氨酰基(N α -十六烷酰基))-GLP-1 (7-37)-OH:



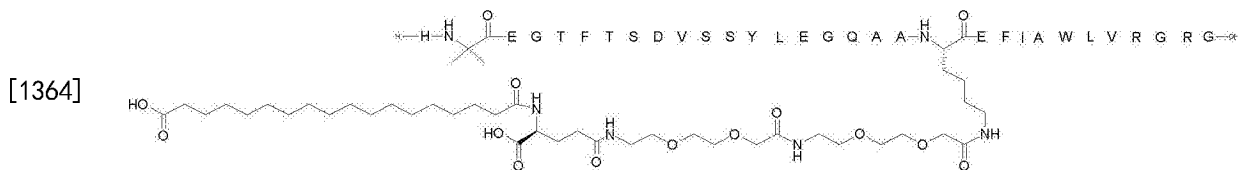
[1359] 化合物G2:

[1360] N- ϵ 37-[2-(2-[2-[2-(2-[2-[(S)-4-羧基-4-((反式-4-[(19-羧基十九烷酰基氨基)甲基]环己烷羰基)氨基)丁酰基氨基]乙氧基]乙氧基)乙酰基氨基]乙氧基)乙酰基] [脱氨基His7, Glu22, Arg26, Arg34, Lys37] GLP-1-(7-37):



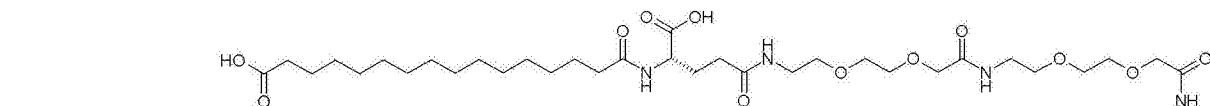
[1362] 化合物G3:

[1363] N-ε26-[2-(2-{2-[2-(2-{2-[(S)-4-羧基-4-(17-羧基十七烷酰基氨基) 丁酰基氨基] 乙氧基} 乙氧基) 乙酰基氨基] 乙氧基} 乙氧基) 乙酰基] [Aib8,Arg34]GLP-1-(7-37)

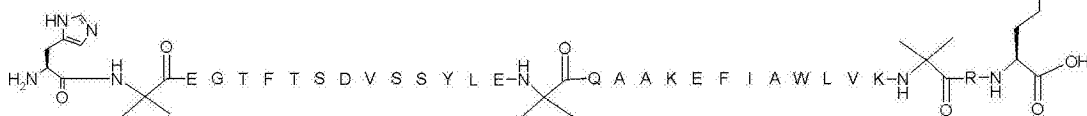


[1365] 化合物G4:

[1366] N-ε37-[2-(2-{2-[2-(2-{2-[(S)-4-羧基-4-(15-羧基-十五烷酰基氨基)-丁酰基氨基]-乙氧基}-乙氧基)-乙酰基氨基]-乙氧基}-乙氧基)-乙酰基] [Aib8,22,35,Lys37]GLP-1-(7-37)



[1367]



[1368] 按W0 98/08871的实施例37中所述制备化合物G1。按W009030771的实施例26中所述制备化合物G2。按W0 2006/097537的实施例4中所述制备化合物G3。

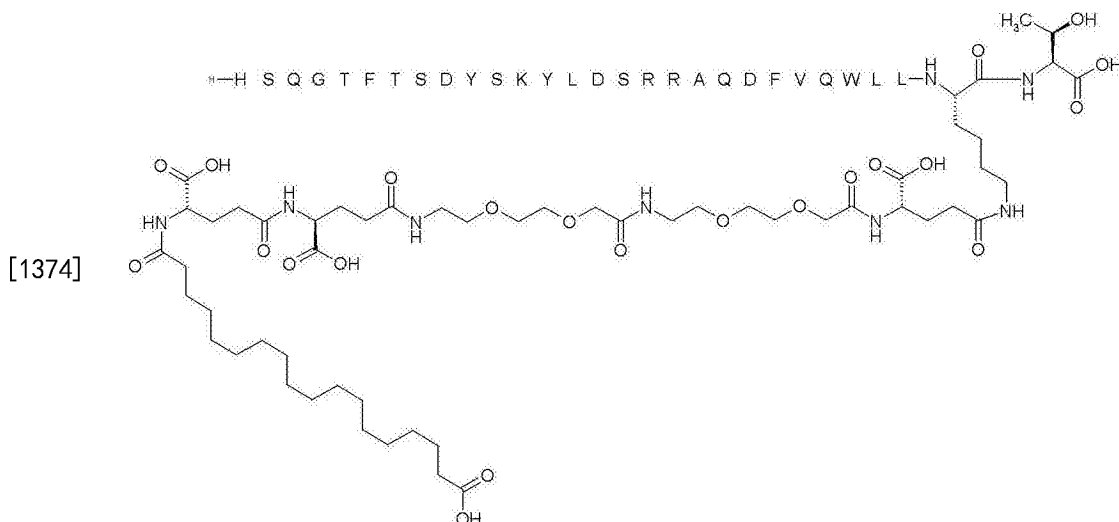
[1369] 按W0 09/030771所述方法的类似方式,使用CEM Liberty肽合成仪,制备新的化合物G4。

[1370] LCMS方法:LCMS 4:m/z=1046 (M/4)

[1371] 计算值(M)=4184.8。

[1372] 实施例66

[1373] N^{ε28}-[(4S)-4-羧基-4-[[2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[(4S)-4-羧基-4-[[(4S)-4-羧基-4-(17-羧基十七烷酰基氨基) 丁酰基] 氨基] 丁酰基] 氨基] 乙氧基] 乙氧基] 乙酰基] 氨基] 乙氧基] 乙氧基] 氨基] 丁酰基]-[Leu²⁷,Lys²⁸]-胰高血糖素



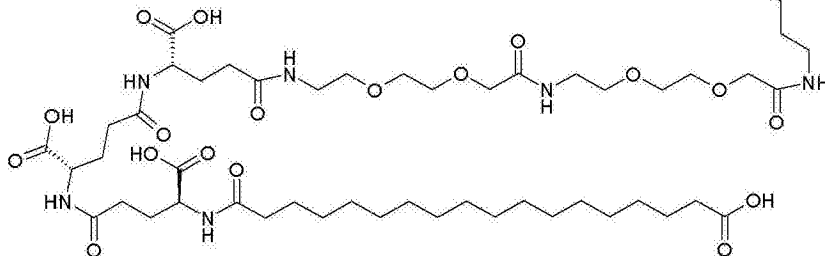
[1375] 基本按SPPS方法A和C中所述制备了该肽

[1376] UPLC方法:04_A6_1:Rt=5.2分钟

[1394] $N^{\epsilon 24}$ -[2-[2-[2-[2-[2-[2-[[[4S]-4-羧基-4-[[[4S]-4-羧基-4-[[[4S]-4-羧基-4-(17-羧基十七烷酰基氨基)丁酰基]氨基]丁酰基]氨基]丁酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基]-[Lys²⁴,Leu²⁷,Ser²⁸]-胰高血糖素



[1395]



[1396] 基本按SPPS方法A和C中所述制备了该肽

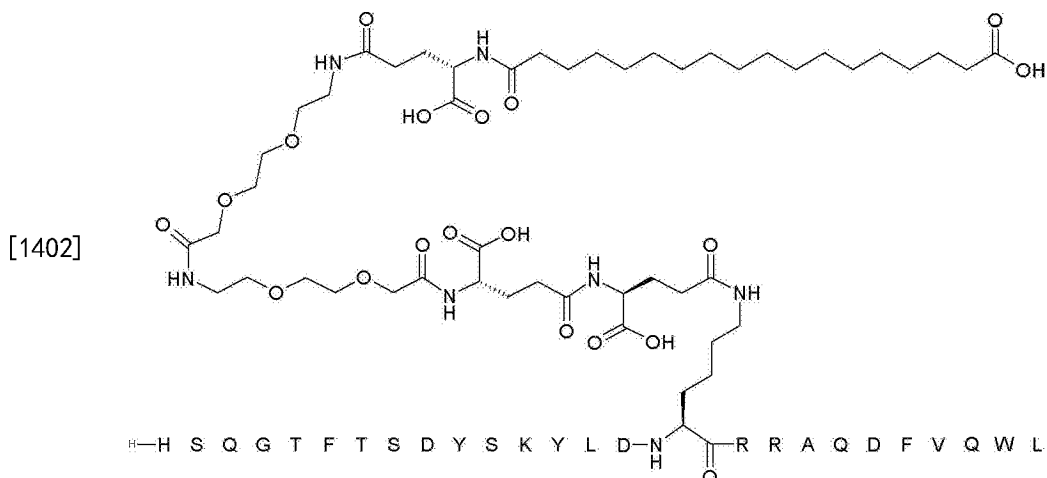
[1397] UPLC方法:04_A6_1:Rt=5.8分钟

[1398] UPLC方法:09_B2_1:Rt=12.6分钟

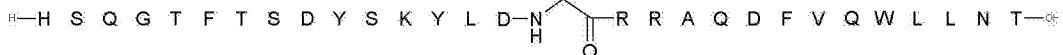
[1399] LCMS方法:LCMS_4:Rt=2.0分钟,m/3=1470;m/4=1103;m/5=883。

[1400] 实施例70

[1401] $N^{\epsilon 16}$ -[(4S)-4-羧基-4-[[[4S]-4-羧基-4-[[2-[2-[2-[2-[2-[2-[[[4S]-4-羧基-4-(17-羧基十七烷酰基氨基)丁酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基]氨基]丁酰基]氨基]丁酰基]-[Lys¹⁶,Leu²⁷]-胰高血糖素



[1402]



[1403] 基本按SPPS方法A和C中所述制备了该肽

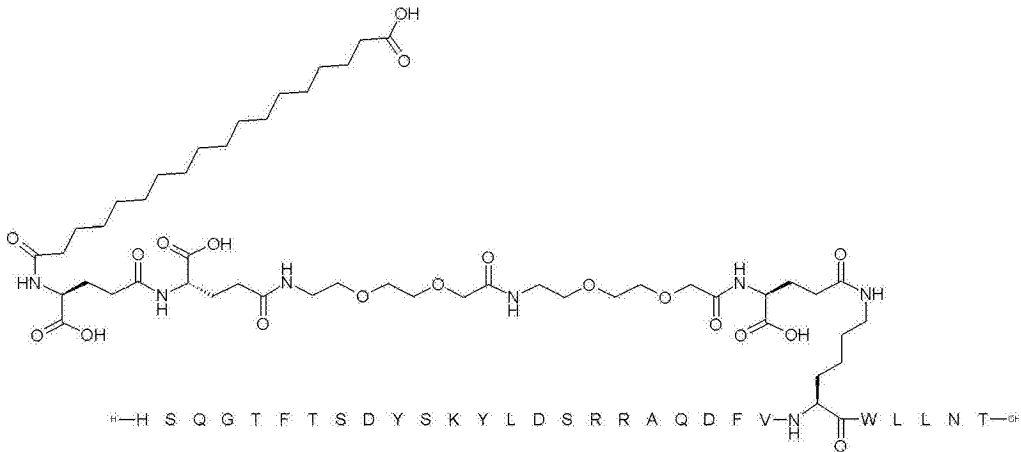
[1404] UPLC方法:04_A6_1:Rt=6.41分钟

[1405] LCMS方法:LCMS_4:Rt=1.9分钟,m/3=1494;m/4=1121;m/5=897。

[1406] 实施例71

[1407] $N^{\epsilon 24}$ -[(4S)-4-羧基-4-[[[4S]-4-羧基-4-[[[4S]-4-羧基-4-(17-羧基十七烷酰基氨基)丁酰基]氨基]丁酰基]氨基]丁酰基]-[Lys²⁴,Leu²⁷,Ser²⁸]-胰高血糖素

[1422]



[1423] 基本按SPPS方法A和C中所述制备了该肽

[1424] UPLC方法:04_A9_1:Rt=12.4分钟

[1425] UPLC方法:08_B2_1:Rt=12.7分钟

[1426] UPLC方法:04_B4_1:Rt=8.4分钟

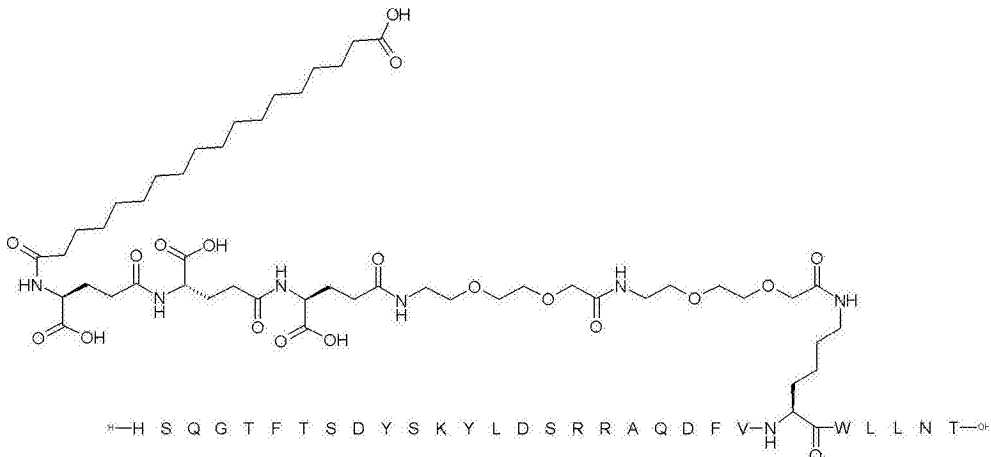
[1427] UPLC方法:05_B5_1:Rt=4.7分钟

[1428] LCMS方法:LCMS_4:Rt=2.1分钟,m/3=1480;m/4=1110;m/5=888。

[1429] 实施例74

[1430] N^e24-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[[[4S]-4-羧基-4-[[[4S]-4-羧基-4-[[[4S]-4-羧基-4-(17-羧基十七烷酰基氨基)丁酰基]氨基]丁酰基]氨基]丁酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基]-[Lys²⁴,Leu²⁷]-胰高血糖素

[1431]



[1432] 基本按SPPS方法A和C中所述制备了该肽

[1433] UPLC方法:04_A9_1:Rt=11.7分钟

[1434] UPLC方法:08_B2_1:Rt=12.6分钟

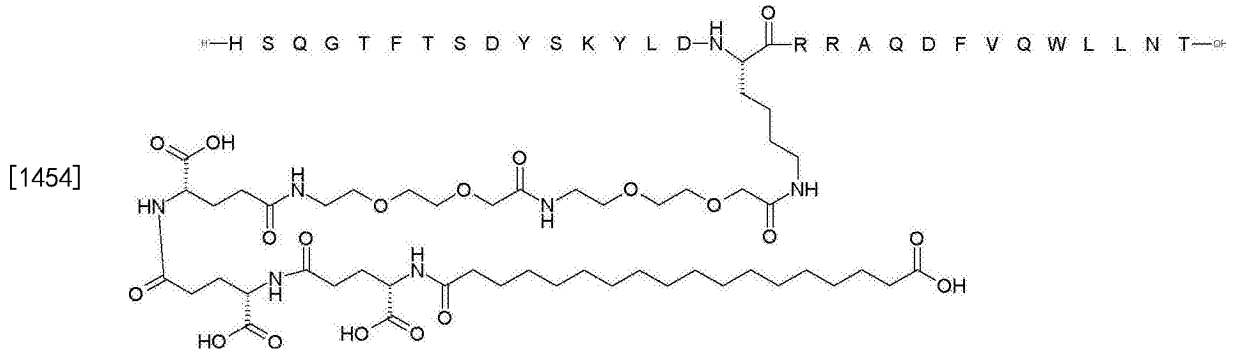
[1435] UPLC方法:08_B4_1:Rt=8.3分钟

[1436] UPLC方法:05_B5_1:Rt=4.6分钟

[1437] LCMS方法:LCMS_4:Rt=2.1分钟,m/3=1780;m/4=1110;m/5=888。

[1438] 实施例75

[1439] N^e24-[(4S)-4-羧基-4-[[[4S]-4-羧基-4-[[[4S]-4-羧基-4-(17-羧基十七烷酰基氨基)丁酰基]氨基]丁酰基]氨基]丁酰基]-[Lys²⁴,Leu²⁷]-胰高血糖素



[1455] 基本按SPPS方法A和C中所述制备了该肽

[1456] UPLC方法:04_A9_1:Rt=11.6分钟

[1457] UPLC方法:09_B2_1:Rt=12.5分钟

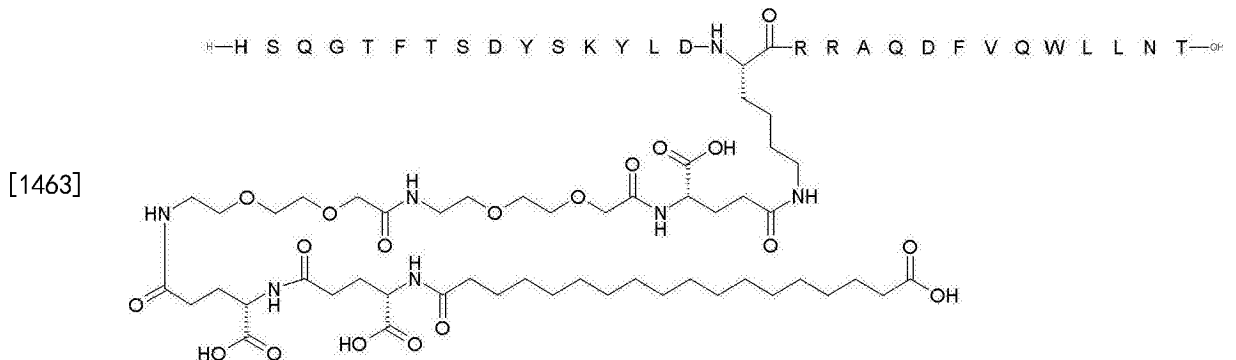
[1458] UPLC方法:09_B4_1:Rt=8.3分钟

[1459] UPLC方法:05_B5_1:Rt=4.3分钟

[1460] LCMS方法:LCMS_4:Rt=2.0分钟,m/3=1494;m/4=1120;m/5=896

[1461] 实施例78

[1462] N^{e16}-[(4S)-4-羧基-4-[[2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[[(4S)-4-羧基-4-[[[(4S)-4-羧基-4-(17-羧基十七烷酰基氨基)丁酰基]氨基]丁酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基]氨基]丁酰基]-[Lys¹⁶,Leu²⁷]-胰高血糖素



[1464] 基本按SPPS方法A和C中所述制备了该肽

[1465] UPLC方法:04_A9_1:Rt=10.9分钟

[1466] UPLC方法:09_B2_1:Rt=12.5分钟

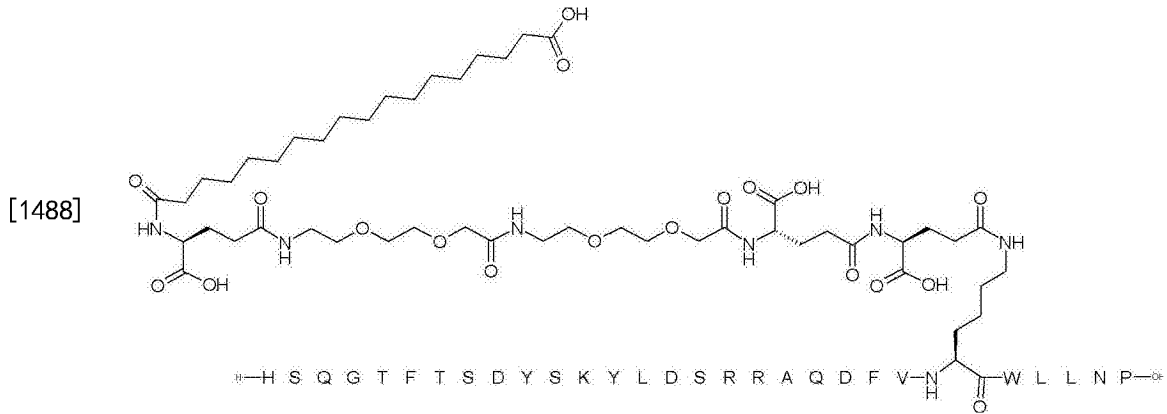
[1467] UPLC方法:09_B4_1:Rt=8.3分钟

[1468] UPLC方法:05_B5_1:Rt=4.3分钟

[1469] LCMS方法:LCMS_4:Rt=2.0分钟,m/3=1494;m/7=1120;m/5=896

[1470] 实施例79

[1471] N^{e28}-[(4S)-4-羧基-4-[[[(4S)-4-羧基-4-[[[(4S)-4-羧基-4-(17-羧基十七烷酰基氨基)丁酰基]氨基]丁酰基]氨基]丁酰基]-[Leu²⁷,Lys²⁸]-胰高血糖素



[1489] 基本按SPPS方法A和C中所述制备了该肽

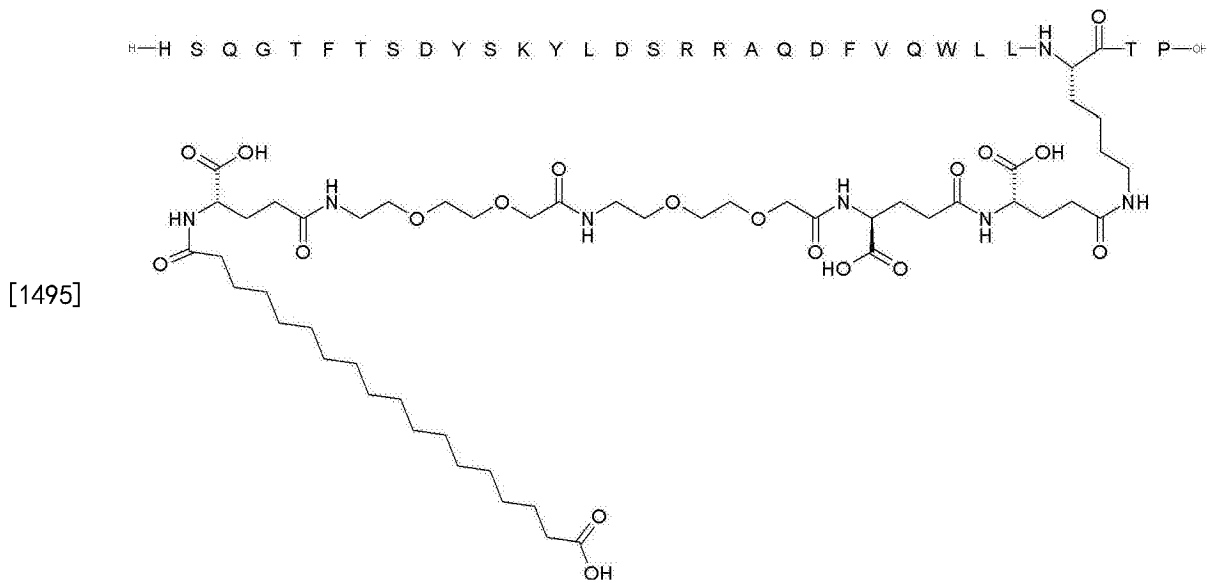
[1490] UPLC方法:04_A9_1:Rt=12.6分钟

[1491] UPLC方法:09_B4_1:Rt=8.4分钟

[1492] LCMS方法:LCMS_4:Rt=2.1分钟,m/3=1479;m/4=1109;m/5=888

[1493] 实施例82

[1494] N^{e28}-[(4S)-4-羧基-4-[[[(4S)-4-羧基-4-[[2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[[(4S)-4-羧基-4-(17-羧基十七烷酰基氨基)丁酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基]氨基]丁酰基]氨基]丁酰基]-[Leu²⁷,Lys²⁸]-胰高血糖素基-Pro



[1496] 基本按SPPS方法A和C中所述制备了该肽

[1497] UPLC方法:04_A9_1:Rt=12.4分钟

[1498] UPLC方法:09_B2_1:Rt=12.6分钟

[1499] UPLC方法:09_B4_1:Rt=8.4分钟

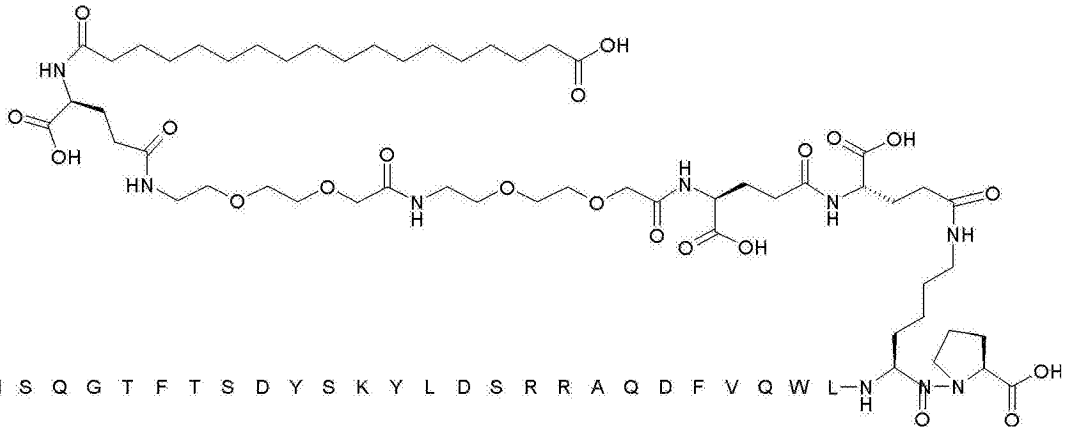
[1500] UPLC方法:05_B5_1:Rt=4.9分钟

[1501] LCMS方法:LCMS_4:Rt=2.0分钟,m/3=1517;m/4=1138;m/5=910

[1502] 实施例83

[1503] N^{e12}-[(4S)-4-羧基-4-[[[(4S)-4-羧基-4-[[2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[[(4S)-4-羧基-4-(17-羧基十七烷酰基氨基)丁酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基]氨基]丁酰基]氨基]丁酰基]-[Leu²⁷]-胰高血糖素

[1522]



[1523] 基本按SPPS方法A和C中所述制备了该肽

[1524] UPLC方法:04_A9_1:Rt=11.1分钟

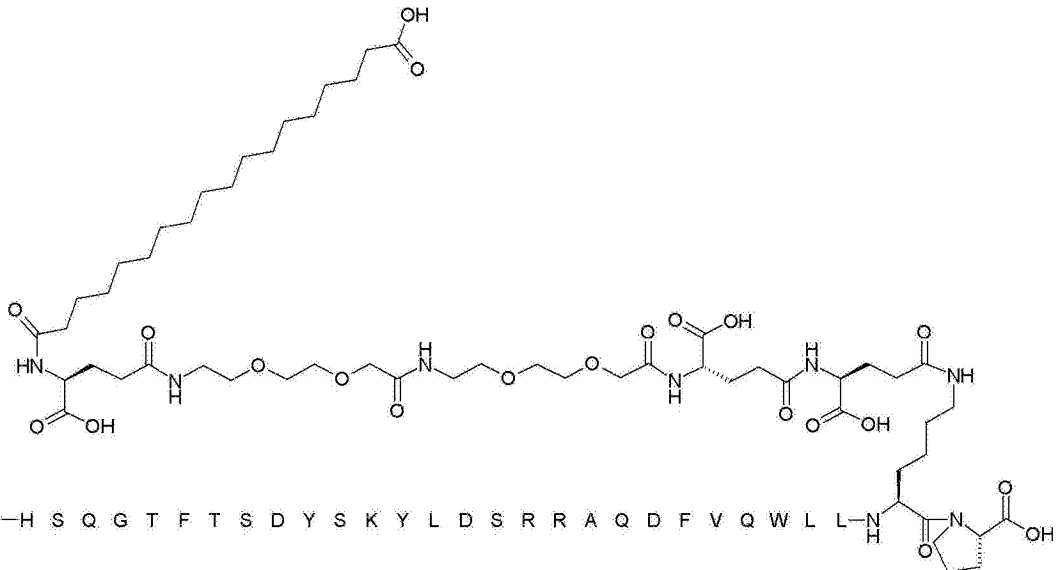
[1525] UPLC方法:09_B4_1:Rt=8.2分钟

[1526] LCMS方法:LCMS_2:Rt=4.4分钟,m/3=1485;m/4=1114;m/5=891

[1527] 实施例86

[1528] N^{e28}-[(4S)-4-羧基-4-[[[(4S)-4-羧基-4-[[2-[2-[2-[2-[2-[2-[[[(4S)-4-羧基-4-(17-羧基十七烷酰基氨基)丁酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基]氨基]丁酰基]氨基]丁酰基]-[Leu²⁷,Lys²⁸,Pro²⁹]-胰高血糖素

[1529]



[1530] 基本按SPPS方法A和C中所述制备了该肽

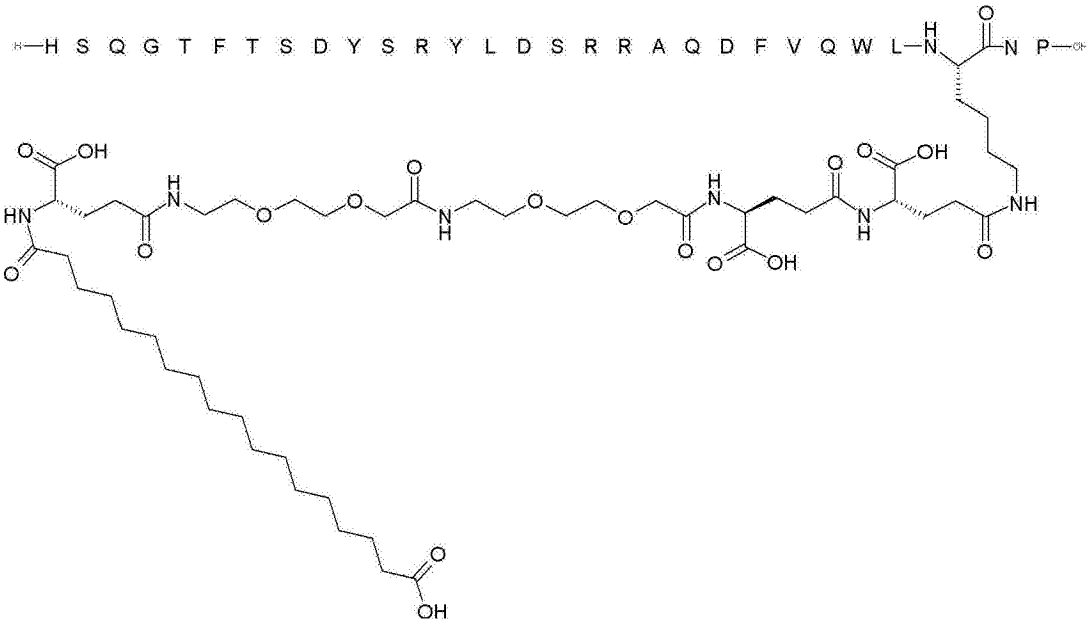
[1531] UPLC方法:04_A9_1:Rt=12.0分钟

[1532] UPLC方法:09_B4_1:Rt=8.6分钟

[1533] LCMS方法:LCMS_2:Rt=4.4分钟,m/3=1484.;m/4=1113;m/5=891

[1534] 实施例87

[1535] N^{e27}-[(4S)-4-羧基-4-[[[(4S)-4-羧基-4-[[2-[2-[2-[2-[2-[2-[[[(4S)-4-羧基-4-(17-羧基十七烷酰基氨基)丁酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基]氨基]丁酰基]氨基]丁酰基]-[Arg¹²,Lys²⁷,Pro²⁹]-胰高血糖素



[1536]

[1537] 基本按SPPS方法A和C中所述制备了该肽

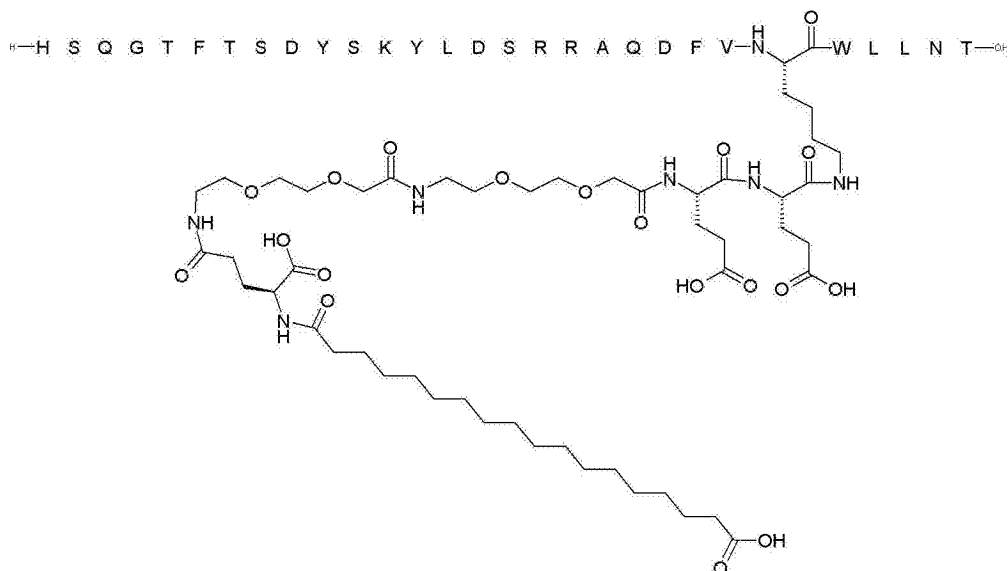
[1538] UPLC方法:04_A9_1:Rt=9.9分钟

[1539] UPLC方法:09_B4_1:Rt=8.2分钟

[1540] LCMS方法:LCMS_2:Rt=4.2分钟,m/3=1494;m/4=1121;m/5=897

[1541] 实施例88

[1542] $\text{N}^{\epsilon 24}$ -[(2S)-4-羧基-2-[[[(2S)-4-羧基-2-[[2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[[(4S)-4-羧基-4-(17-羧基十七烷酰基氨基)丁酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基]氨基]丁酰基]氨基]丁酰基]-[Lys²⁴,Leu²⁷]-胰高血糖素



[1543]

[1544] 基本按SPPS方法A和C中所述制备了该肽

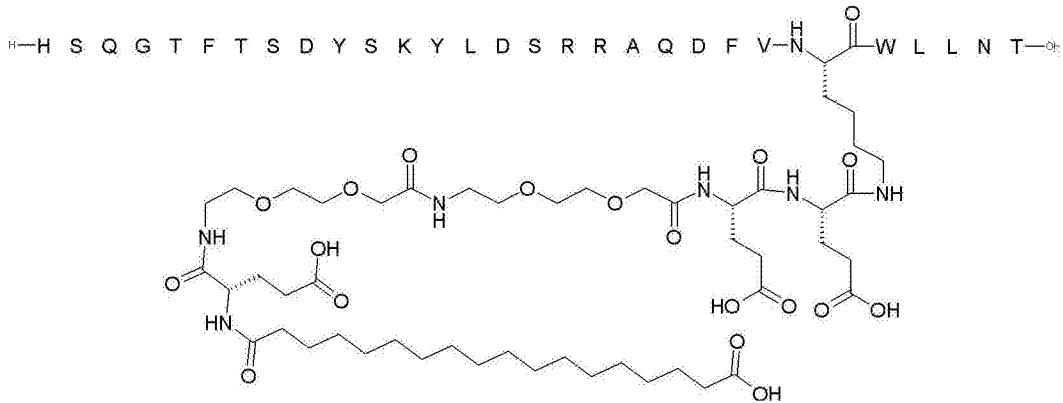
[1545] UPLC方法:AP_B4_1.:Rt=9.0分钟

[1546] LCMS方法:LCMS_AP:Rt=9.0分钟,m/3=1480;m/4=1110

[1547] 实施例89

[1548] $\text{N}^{\epsilon 24}$ -[(2S)-4-羧基-2-[[[(2S)-4-羧基-2-[[2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[[(2S)-4-羧基-2-(17-羧基十七烷酰基氨基)丁酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]

乙酰基]氨基]丁酰基]氨基]丁酰基]-[Lys²⁴,Leu²⁷]-胰高血糖素



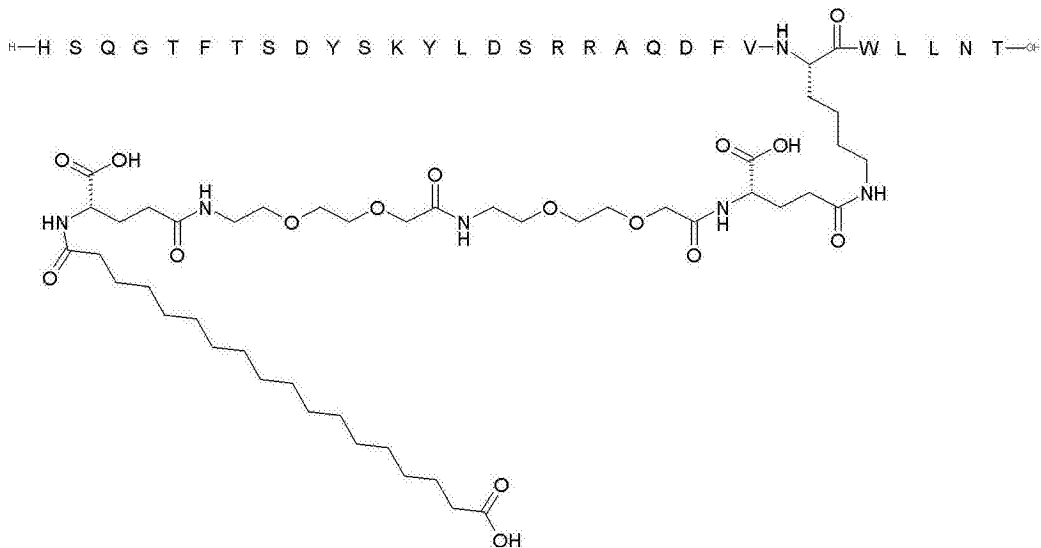
[1550] 基本按SPPS方法A和C中所述制备了该肽

[1551] UPLC方法:AP_B4_1:Rt=9.1分钟9204-0000-0163

[1552] LCMS方法:LCMS_AP:Rt=9.0分钟,m/3=1480;m/4=1111

[1553] 实施例90

[1554] N^{e24}-[(4S)-4-羧基-4-[[2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[[(4S)-4-羧基-4-(17-羧基十七烷酰基氨基)丁酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基]氨基]丁酰基]-[Lys²⁴,Leu²⁷]-胰高血糖素



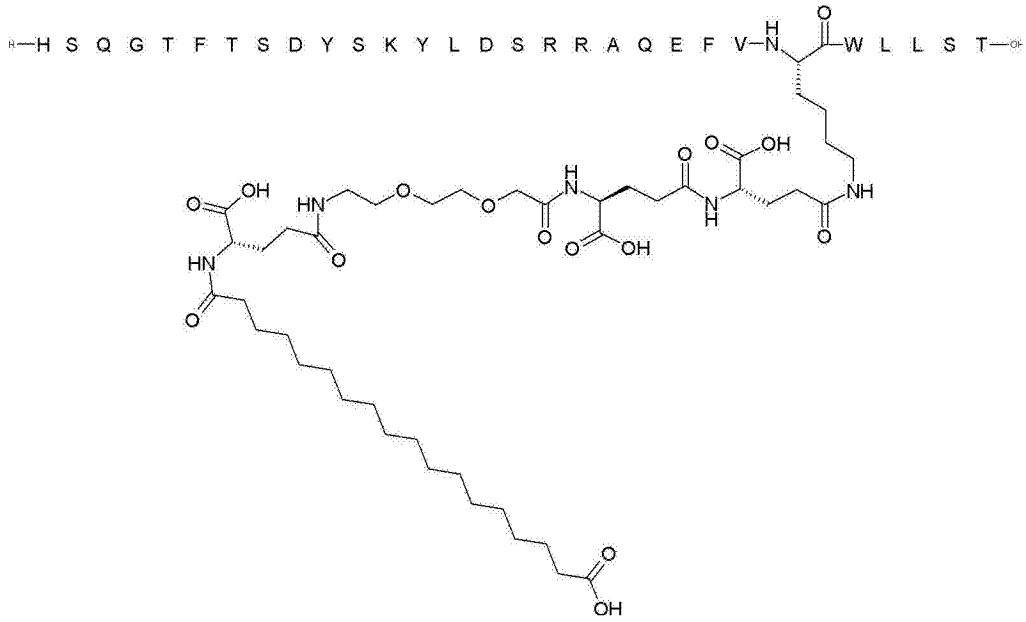
[1556] 基本按SPPS方法A和C中所述制备了该肽

[1557] UPLC方法:AP_B4_1:Rt=9.1分钟

[1558] LCMS方法:LCMS_AP:Rt=8.9分钟,m/3=1437;m/4=1078

[1559] 实施例91

[1560] N^{e24}-[(4S)-4-羧基-4-[[[(4S)-4-羧基-4-[[2-[2-[2-[[[(4S)-4-羧基-4-(17-羧基十七烷酰基氨基)丁酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基]氨基]丁酰基]氨基]丁酰基]-[Glu²¹,Lys²⁴,Leu²⁷,Ser²⁸]-胰高血糖素



[1561]

[1562] 基本按SPPS方法A和C中所述制备了该肽

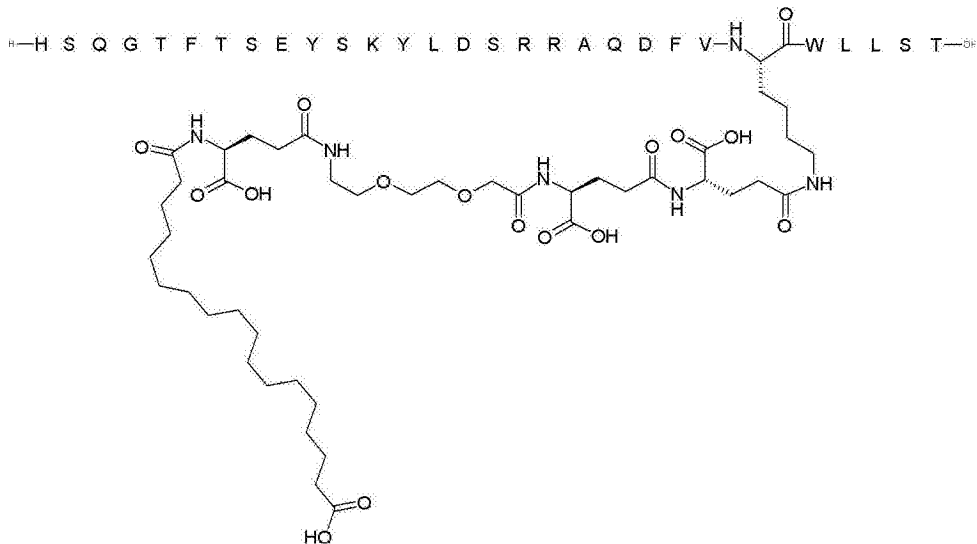
[1563] UPLC方法:04_A9_1:Rt=13.6分钟

[1564] UPLC方法:09_B4_1:Rt=8.6分钟

[1565] LCMS方法:LCMS_4:Rt=2.2分钟,m/3=1428;m/4=1071;m/5=857

[1566] 实施例92

[1567] $\text{N}^{\epsilon 24}$ -[(4S)-4-羧基-4-[[[(4S)-4-羧基-4-[[2-[2-[2-[[[(4S)-4-羧基-4-(17-羧基十七烷酰基氨基)丁酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基]氨基]丁酰基]氨基]丁酰基]-[Glu⁹,Lys²⁴,Leu²⁷,Ser²⁸]-胰高血糖素



[1568]

[1569] 基本按SPPS方法A和C中所述制备了该肽

[1570] UPLC方法:04_A9_1:Rt=13.2分钟

[1571] UPLC方法:09_B4_1:Rt=8.6分钟

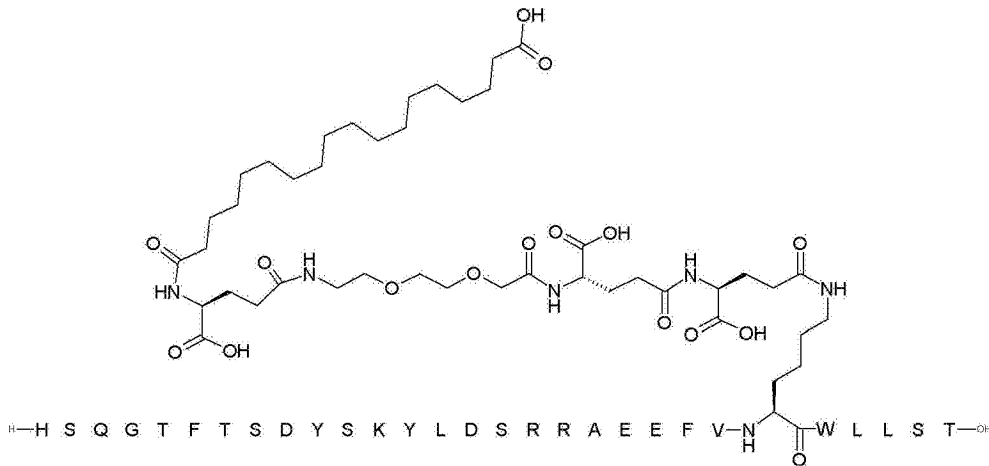
[1572] LCMS方法:LCMS_4:Rt=3.7分钟,m/3=1428;m/4=1071;m/5=857

[1573] 实施例93

[1574] $\text{N}^{\epsilon 24}$ -[(4S)-4-羧基-4-[[[(4S)-4-羧基-4-[[2-[2-[2-[[[(4S)-4-羧基-4-(17-羧基

十七烷酰基氨基]丁酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基]氨基]丁酰基]氨基]丁酰基]-
[Glu²⁰,Glu²¹,Lys²⁴,Leu²⁷,Ser²⁸]-胰高血糖素

[1575]



[1576] 基本按SPPS方法A和C中所述制备了该肽

[1577] UPLC方法:04_A9_1:Rt=12.5分钟

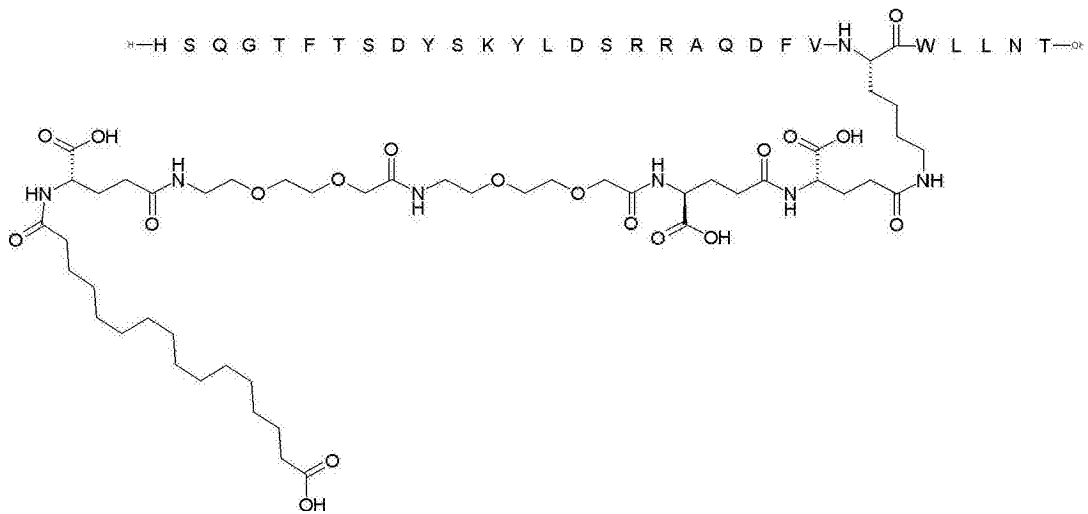
[1578] UPLC方法:09_B4_1:Rt=8.6分钟

[1579] LCMS方法:LCMS_4:Rt=3.7分钟,m/3=1428;m/4=1071;m/5=857

[1580] 实施例94

[1581] N^{e24}-[(4S)-4-羧基-4-[[[(4S)-4-羧基-4-[[2-[2-[2-[2-[2-[2-[[[(4S)-4-羧基-4-(15-羧基十五烷酰基氨基)丁酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基]氨基]丁酰基]氨基]丁酰基]-[Lys²⁴,Leu²⁷]-胰高血糖素

[1582]



[1583] 基本按SPPS方法A和C中所述制备了该肽

[1584] UPLC方法:04_A9_1:Rt=12.3分钟

[1585] UPLC方法:08_B2_1:Rt=11.8分钟

[1586] UPLC方法:08_B4_1:Rt=7.8分钟

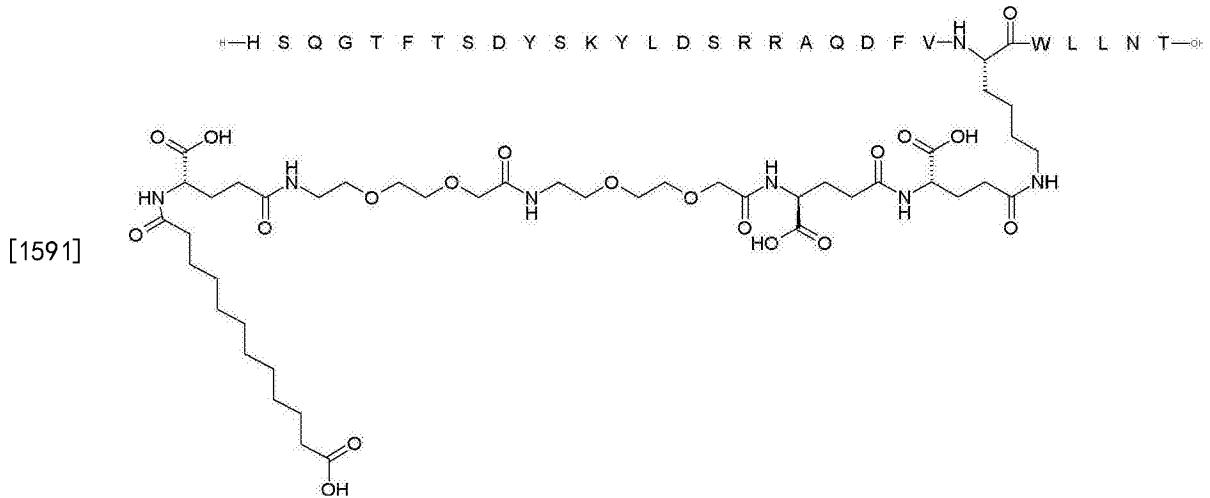
[1587] UPLC方法:05_B5_1:Rt=4.2分钟

[1588] LCMS方法:LCMS_4:Rt=2.0分钟,m/3=1471;m/4=1103;m/5=882

[1589] 实施例95

[1590] N^{e24}-[(4S)-4-羧基-4-[[[(4S)-4-羧基-4-[[2-[2-[2-[2-[2-[2-[[[(4S)-4-羧基-

4-(11-羧基十一烷酰基氨基)丁酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]氨基]丁酰基]氨基]丁酰基]-[Lys²⁴,Leu²⁷]-胰高血糖素



[1592] 基本按SPPS方法A和C中所述制备了该肽

[1593] UPLC方法:04_A9_1:Rt=10.6分钟

[1594] UPLC方法:08_B2_1:Rt=10.6分钟

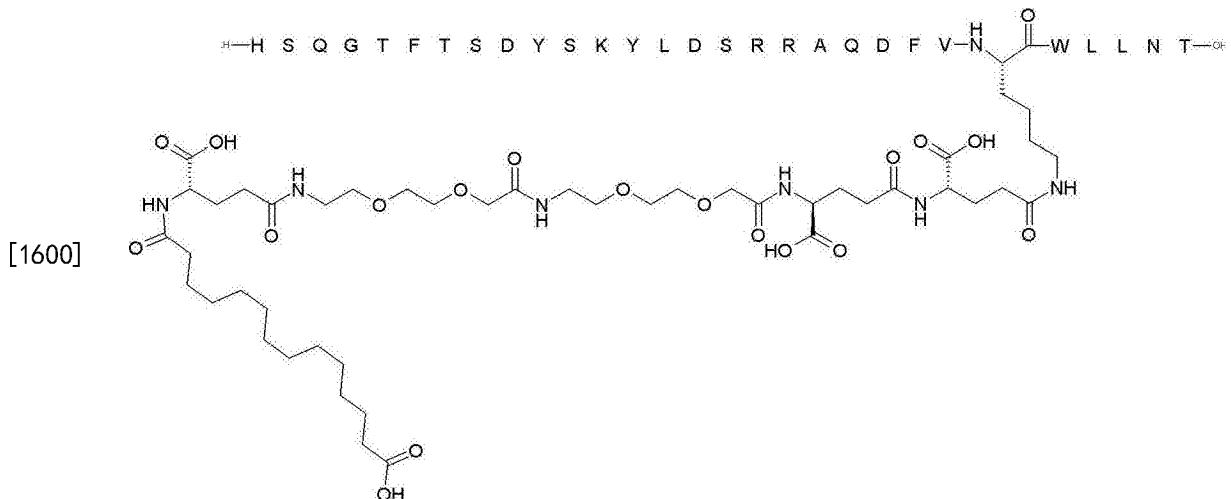
[1595] UPLC方法:08_B4_1:Rt=7.0分钟

[1596] UPLC方法:05_B7_1:Rt=6.7分钟

[1597] LCMS方法:LCMS_4:Rt=1.8分钟,m/3=1452;m/4=1089;m/5=871

[1598] 实施例96

[1599] N^{e24}-[(4S)-4-羧基-4-[[[(4S)-4-羧基-4-[[2-[2-[2-[2-[2-[2-[[[(4S)-4-羧基-4-(13-羧基十三烷酰基氨基)丁酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]氨基]丁酰基]氨基]丁酰基]-[Lys²⁴,Leu²⁷]-胰高血糖素



[1601] 基本按SPPS方法A和C中所述制备了该肽

[1602] UPLC方法:04_A9_1:Rt=11.2分钟

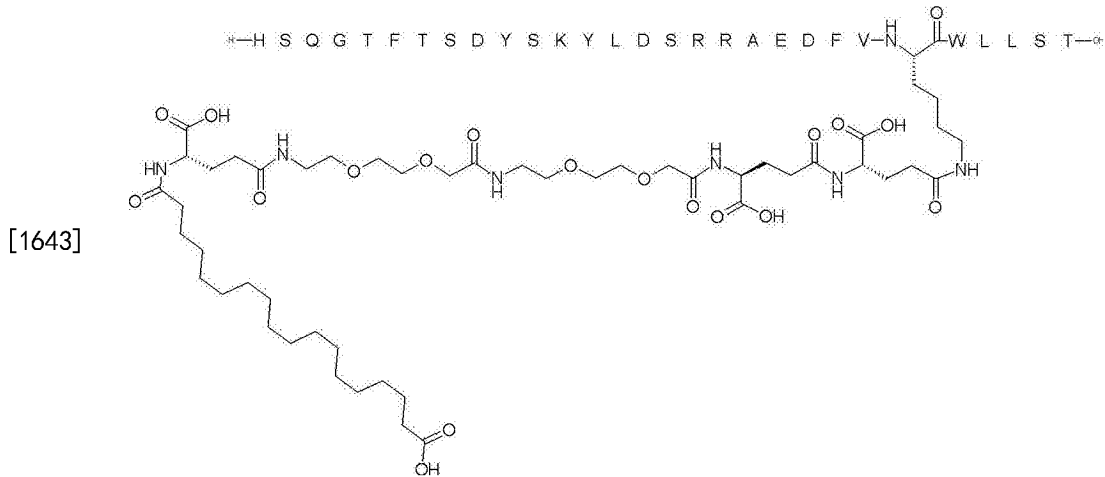
[1603] UPLC方法:09_B2_1:Rt=11.2分钟

[1604] UPLC方法:09_B4_1:Rt=7.4分钟

[1605] UPLC方法:05_B7_1:Rt=7.2分钟

[1606] LCMS方法:LCMS_4:Rt=1.9分钟,m/3=1461;m/4=1096;m/5=877

4-(17-羧基十七烷酰基氨基)丁酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基]氨基]丁酰基]氨基]丁酰基]-[Glu²⁰,Lys²⁴,Leu²⁷,Ser²⁸]-胰高血糖素



[1644] 基本按SPPS方法A和C中所述制备了该肽

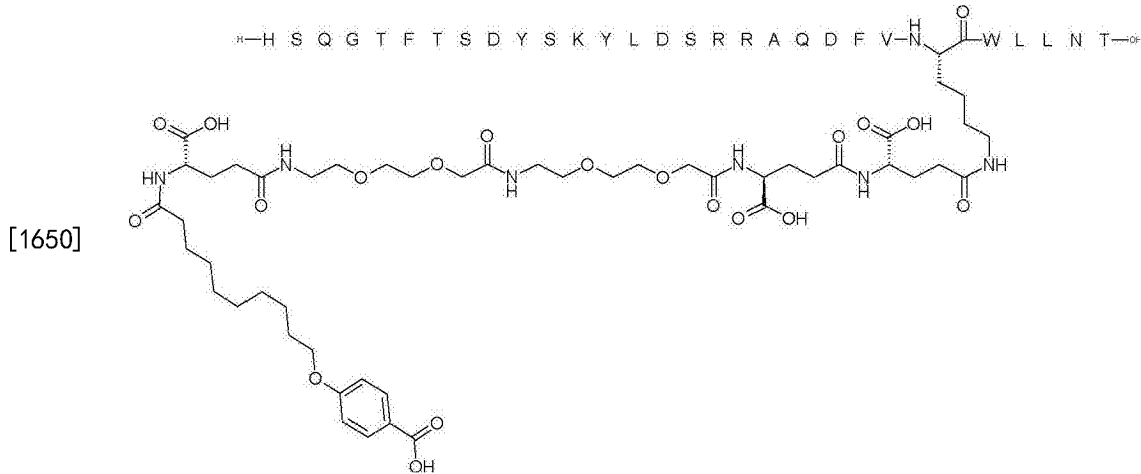
[1645] UPLC方法:04_A9_1:Rt=11.5分钟

[1646] UPLC方法:09_B4_1:Rt=8.6分钟

[1647] LCMS方法:LCMS_4:Rt=3.8分钟,m/3=1472;m/4=1104;m/5=884

[1648] 实施例102

[1649] N^ε24-[(4S)-4-羧基-4-[[[(4S)-4-羧基-4-[[2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[[(4S)-4-羧基-4-[10-(4-羧基苯氧基)癸酰基氨基]丁酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基]氨基]丁酰基]氨基]丁酰基]-[Lys²⁴,Leu²⁷]-胰高血糖素



[1651] 基本按SPPS方法A和C中所述制备了该肽

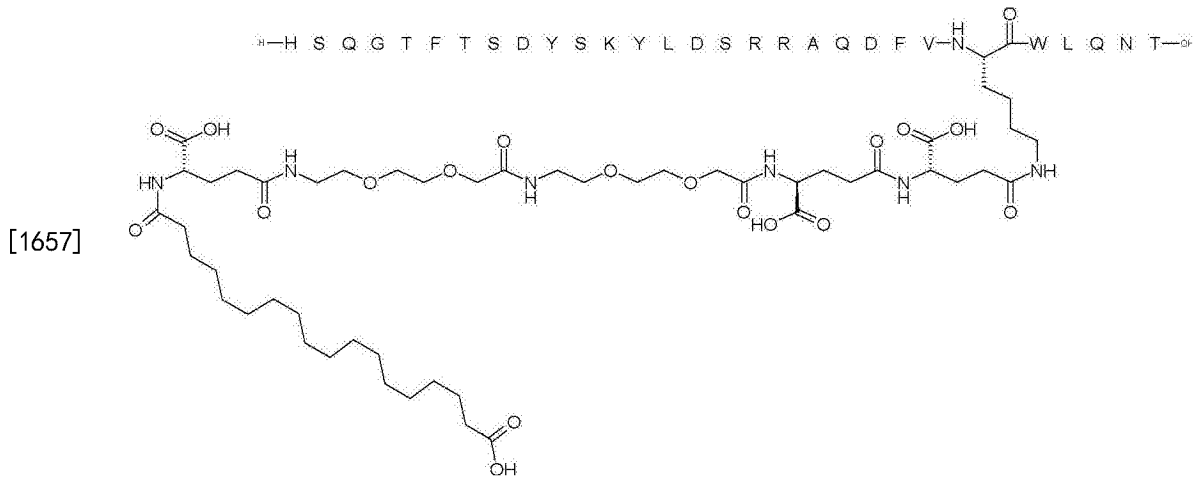
[1652] UPLC方法:04_A9_1:Rt=11.1分钟

[1653] UPLC方法:09_B2_1:Rt=11.1分钟

[1654] LCMS方法:LCMS_4:Rt=1.9分钟,m/3=1478;m/4=1109;m/5=888

[1655] 实施例103

[1656] N^ε24-[(4S)-4-羧基-4-[[[(4S)-4-羧基-4-[[2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[[(4S)-4-羧基-4-(17-羧基十七烷酰基氨基)丁酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基]氨基]丁酰基]氨基]丁酰基]-[Lys²⁴,Gln²⁷]-胰高血糖素



[1658] 基本按SPPS方法A和C中所述制备了该肽

[1659] UPLC方法:04_A9_1:Rt=11.4分钟

[1660] UPLC方法:09_B2_1:Rt=12.1分钟

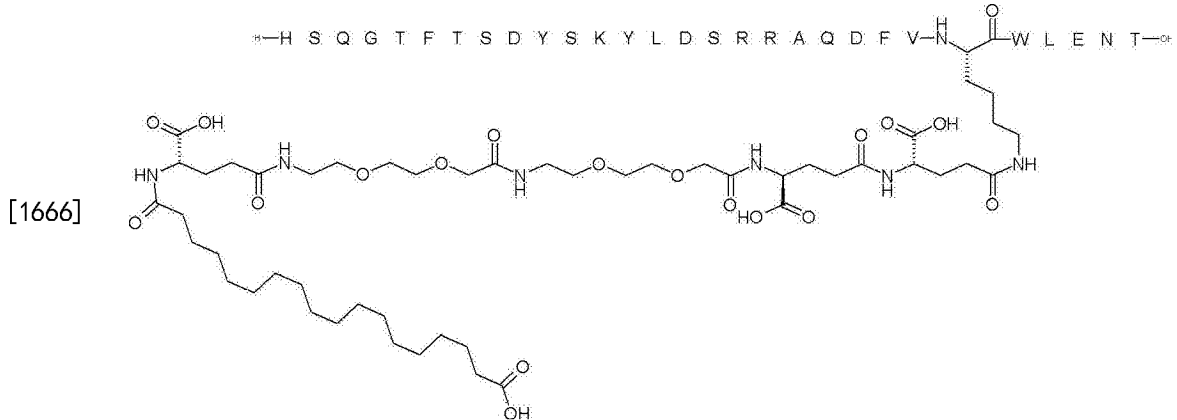
[1661] UPLC方法:09_B4_1:Rt=8.0分钟

[1662] UPLC方法:05_B5_1:Rt=3.5分钟

[1663] LCMS方法:LCMS_4:Rt=1.9分钟,m/3=1485;m/4=1114;m/5=891

[1664] 实施例104

[1665] N^ε24-[(4S)-4-羧基-4-[[[(4S)-4-羧基-4-[[2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[[(4S)-4-羧基-4-(17-羧基十七烷酰基氨基)丁酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基]氨基]丁酰基]氨基]丁酰基]-[Lys²⁴,Glu²⁷]-胰高血糖素



[1667] 基本按SPPS方法A和C中所述制备了该肽

[1668] UPLC方法:04_A9_1:Rt=8.9分钟

[1669] UPLC方法:09_B2_1:Rt=12.3分钟

[1670] UPLC方法:09_B4_1:Rt=8.2分钟

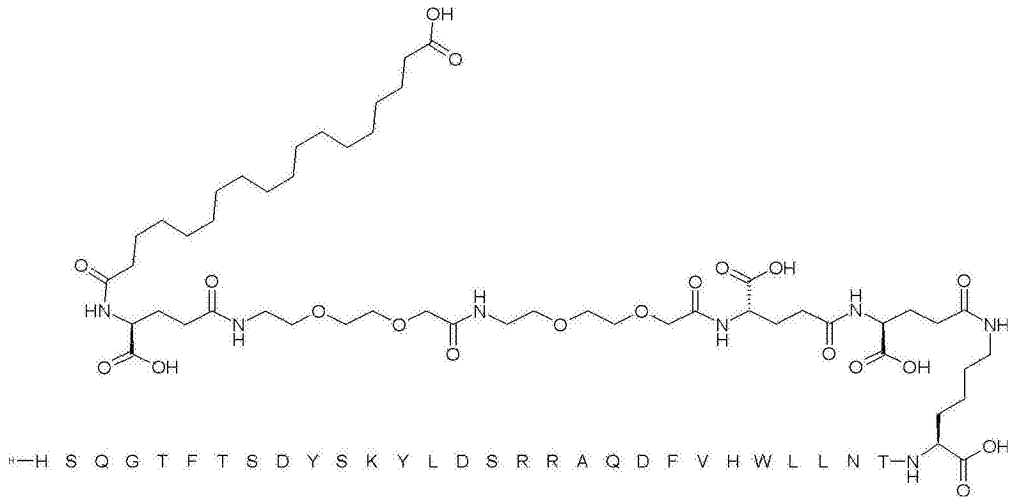
[1671] UPLC方法:05_B5_1:Rt=3.8分钟

[1672] LCMS方法:LCMS_4:Rt=2.0分钟,m/3=1486;m/4=1114;m/5=892

[1673] 实施例105

[1674] N^ε ([His²⁴,Leu²⁷]-胰高血糖素基)-N^ε [(4S)-4-羧基-4-[[[(4S)-4-羧基-4-[[2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[[(4S)-4-羧基-4-(17-羧基十七烷酰基氨基)丁酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基]氨基]丁酰基]氨基]丁酰基]Lys

[1675]



[1676] 基本按SPPS方法A和C中所述制备了该肽

[1677] UPLC:方法:04_A6_1:Rt=6.0分钟

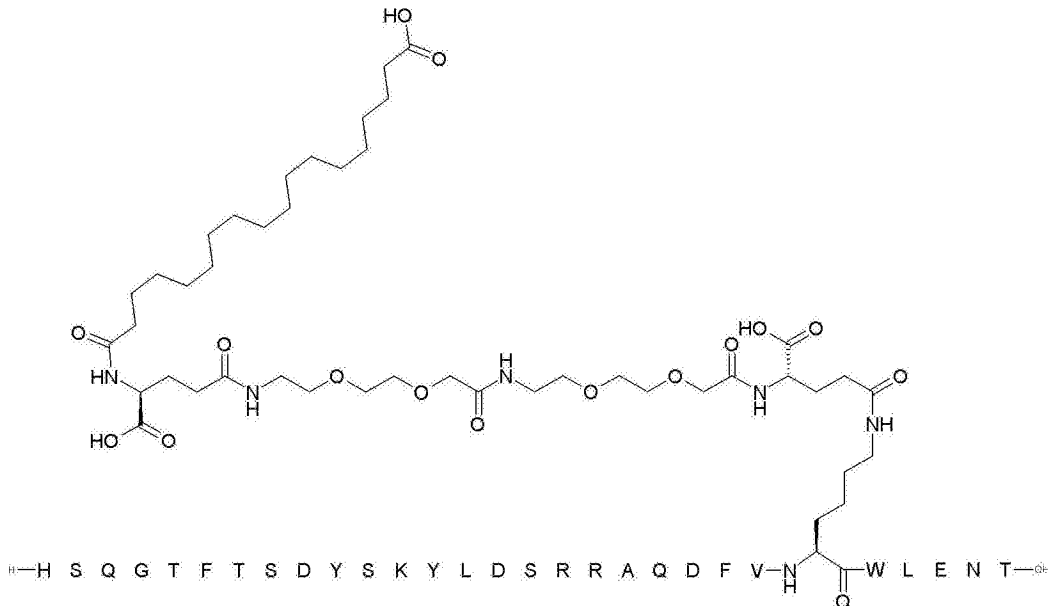
[1678] UPLC:方法:09_B4_1_214nm:Rt=8.1分钟

[1679] LC-MS方法:LCMS_4:Rt=2.7分钟,m/3=1526,m/4=1145,m/5=763

[1680] 实施例106

[1681] N^{e24}-[(4S)-4-羧基-4-[[2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[[(4S)-4-羧基-4-(17-羧基十七烷酰基氨基)丁酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]氨基]丁酰基]-[Lys²⁴,Glu²⁷]-胰高血糖素

[1682]



[1683] 基本按SPPS方法A和C中所述制备了该肽

[1684] UPLC方法:04_A9_1:Rt=7.7分钟

[1685] UPLC方法:09_B2_1:Rt=12.3分钟

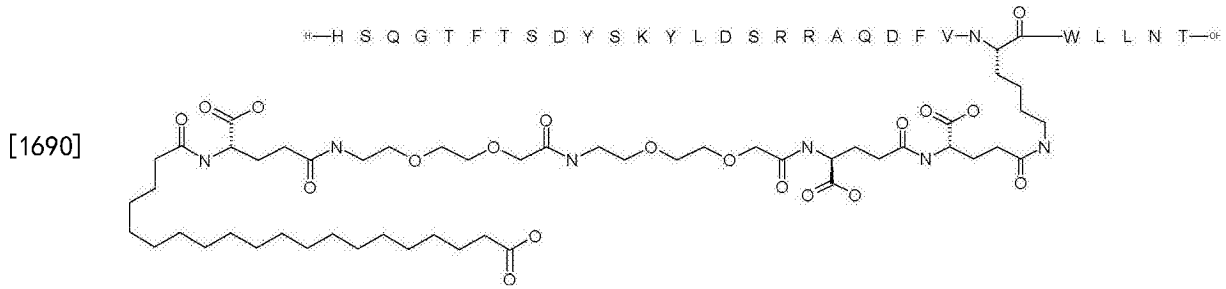
[1686] UPLC方法:09_B4_1:Rt=8.2分钟

[1687] LCMS方法:LCMS_4:Rt=3.9分钟,m/3=1443;m/4=1082;m/5

[1688] 实施例107

[1689] N^{e24}-[(4S)-4-羧基-4-[[[(4S)-4-羧基-4-[[2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[[(4S)-4-羧基-

4-(19-羧基十九烷酰基氨基)丁酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基]氨基]丁酰基]氨基]丁酰基]-[Lys24,Leu27]-胰高血糖素



[1691] 基本按SPPS方法A和C中所述制备了该肽

[1692] UPLC方法:09_B2_1:Rt=13.7分钟

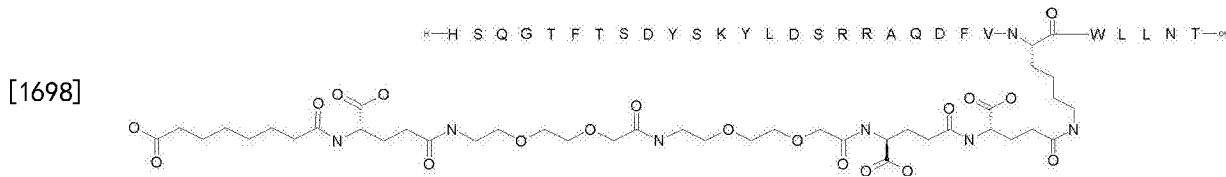
[1693] UPLC方法:09_B4_1:Rt=9.1分钟

[1694] UPLC方法:09_A9_1:Rt=13.1分钟

[1695] LCMS方法:LCMS_4:Rt=2.3分钟,m/3=1489.7;m/4=1117.3;m/5=894.2

[1696] 实施例108

[1697] N^e24-[(4S)-4-羧基-4-[[[(4S)-4-羧基-4-[[2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[[(4S)-4-羧基-4-(7-羧基庚酰基氨基)丁酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基]氨基]丁酰基]氨基]丁酰基]-[Lys24,Leu27]-胰高血糖素



[1699] 基本按SPPS方法A和C中所述制备了该肽

[1700] UPLC方法:09_B2_1:Rt=9.7

[1701] UPLC方法:09_B4_1:Rt=6.5

[1702] UPLC方法:04_A9_1:Rt=8.4

[1703] LCMS方法:LCMS_4:Rt=1.8分钟,m/3=1434;m/4=1075.5;m/5=860.8

[1704] 药理学方法

[1705] 测定法(I)

[1706] 胰高血糖素活性

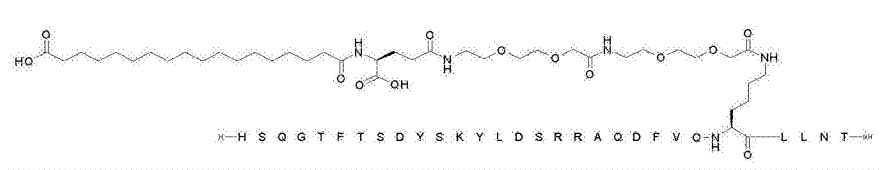
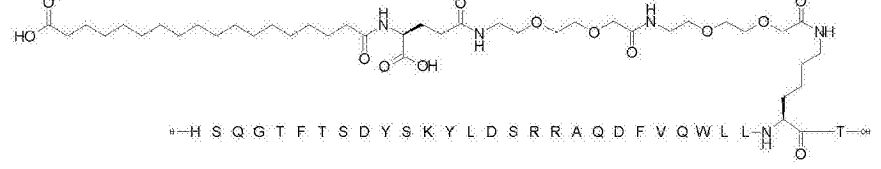
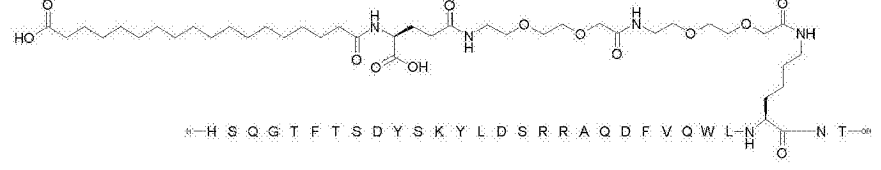
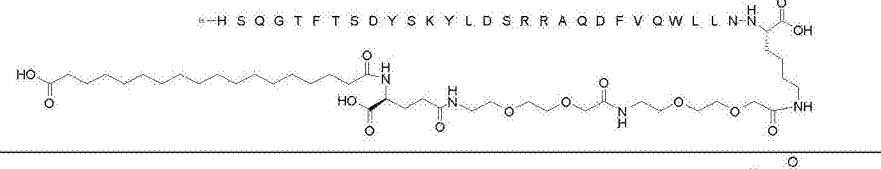
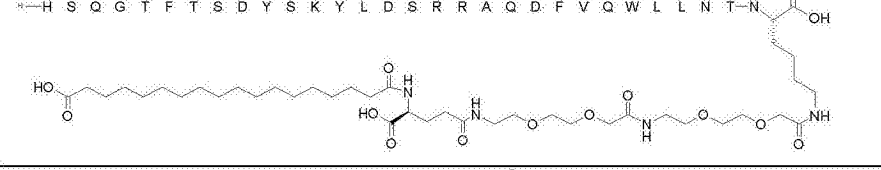
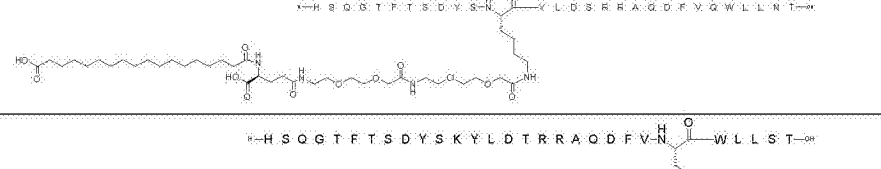
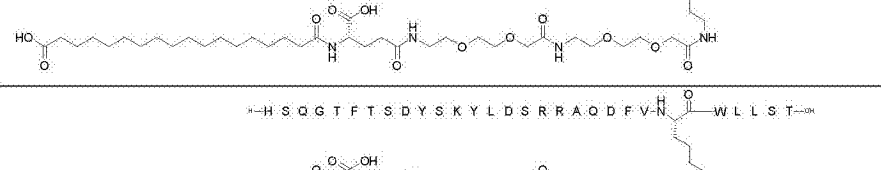
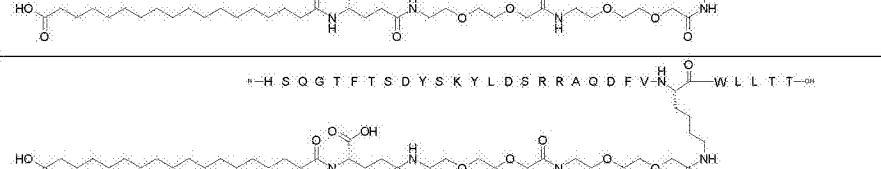
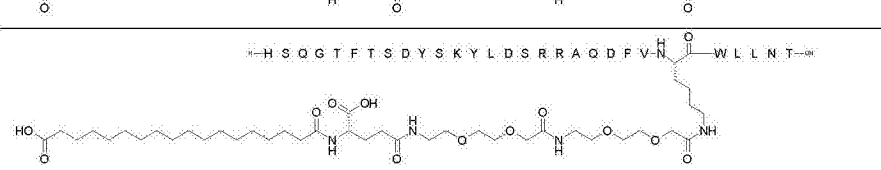
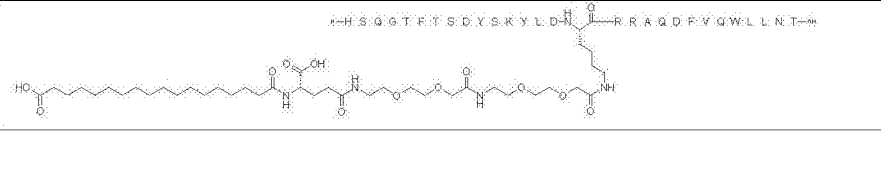

[1707] 将胰高血糖素受体克隆至具有膜结合的cAMP生物传感器(ACTOne™)的HEK-293细胞中。将细胞(14000个/孔)在384孔板中温育(37°C,5%CO₂)过夜。次日,使细胞负载只分布于胞质中的钙反应性染料。加入有机阴离子转运蛋白抑制剂丙磺舒以防止染料离开细胞。加入PDE抑制剂以防止形成的cAMP降解。将板置于FLIPRTETRA中,加入胰高血糖素类似物。6分钟后收集终点数据。胞内cAMP的增加与胞质中钙浓度的增加成比例。当钙结合染料时,便产生荧光信号。用Prism5计算EC₅₀值。

[1708] 表1.受体结合的体外数据

[1709]

实施例 编号	结构	测定法(I) 胰高血糖素 素 [EC50] (nM)
人胰高 血糖素	H-H S Q G T F T S D Y S K Y L D S R R A Q D F V Q W L M N T-OH	0.003
实施例1		0.093
实施例2		0.149
实施例3		0.019
实施例4		0.022
实施例5		0.020
实施例6		0.020

[1710]

实施例7	 <p>K-HSQGTFTSDYSKYLD SRRRAQDFVQ-NH</p>	0.155
实施例8	 <p>K-HSQGTFTSDYSKYLD SRRRAQDFVQWL L-NH</p>	0.022
实施例9	 <p>K-HSQGTFTSDYSKYLD SRRRAQDFVQWL-NH</p>	0.128
实施例10	 <p>K-HSQGTFTSDYSKYLD SRRRAQDFVQWLL L-NH</p>	0.046
实施例11	 <p>K-HSQGTFTSDYSKYLD SRRRAQDFVQWLL LNT-NH</p>	0.019
实施例12	 <p>K-HSQGTFTSDYSKYLD SRRRAQDFVQWLL LNT-NH</p>	0.034
实施例13	 <p>K-HSQGTFTSDYSKYLD TRRAQDFV-NH</p>	0.016
实施例14	 <p>K-HSQGTFTSDYSKYLD SRRRAQDFV-NH</p>	0.020
实施例15	 <p>K-HSQGTFTSDYSKYLD SRRRAQDFV-NH</p>	0.024
实施例16	 <p>K-HSQGTFTSDYSKYLD SRRRAQDFV-NH</p>	0.017
实施例17	 <p>K-HSQGTFTSDYSKYLD SRRRAQDFVQWLL LNT-NH</p>	0.003

[1711]

实施例 18	<p>H-S-Q-G-T-F-T-S-D-Y-S-K-Y-L-D-S-R-R-A-A-Q-D-F-V-Q-W-L-L-N-T-OH</p>	0.206
实施例 19	<p>H-S-Q-G-T-F-T-S-D-Y-S-K-Y-L-D-S-R-R-A-Q-D-F-V-Q-W-L-L-N-T-OH</p>	0.094
实施例 20	<p>H-S-Q-G-T-F-T-S-D-Y-S-R-Y-L-D-S-R-R-A-Q-D-F-V-Q-W-L-L-N-T-OH</p>	0.109
实施例 21	<p>H-S-Q-G-T-F-T-S-D-Y-S-K-Y-L-D-S-R-R-A-Q-E-F-V-Q-W-L-L-N-T-OH</p>	0.021
实施例 22	<p>H-S-Q-G-T-F-T-S-D-Y-S-K-Y-L-D-S-R-R-A-Q-D-F-V-Q-W-L-M-N-T-OH</p>	0.960
实施例 23	<p>H-S-Q-G-T-F-T-S-D-Y-S-K-Y-L-D-S-R-R-A-N-D-F-V-Q-W-L-M-N-T-OH</p>	0.540
实施例 24	<p>H-S-Q-G-T-F-T-S-D-Y-S-K-Y-L-D-E-R-R-A-Q-D-F-V-Q-W-L-M-N-T-OH</p>	0.027
实施例 25	<p>H-S-Q-G-T-F-T-S-D-Y-S-K-Y-L-D-E-R-R-A-Q-D-F-V-Q-W-L-M-N-T-OH</p>	0.397
实施例 26	<p>H-S-Q-G-T-F-T-S-D-Y-S-K-Y-L-D-E-R-R-A-R-D-F-V-Q-W-L-M-N-T-OH</p>	0.192
实施例 27	<p>H-S-Q-G-T-F-T-S-D-Y-S-K-Y-L-D-E-Q-A-A-R-D-F-V-Q-W-L-M-N-T-OH</p>	0.406

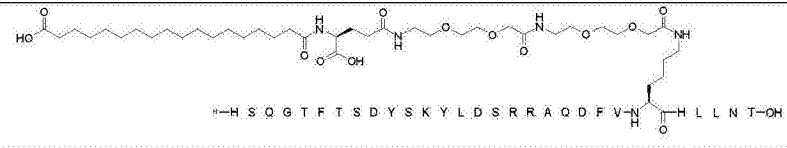
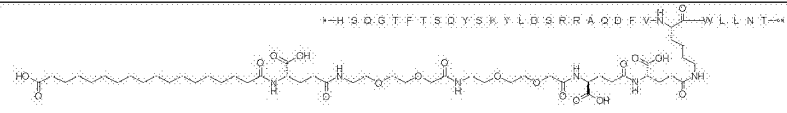
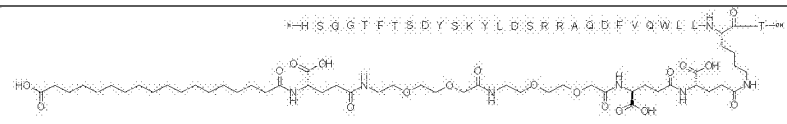
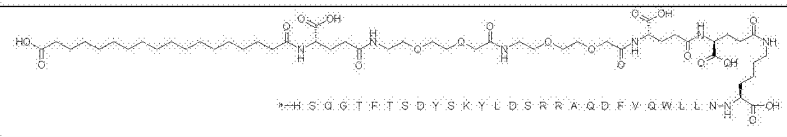
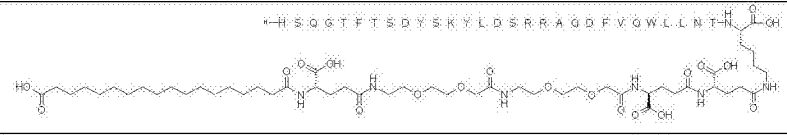
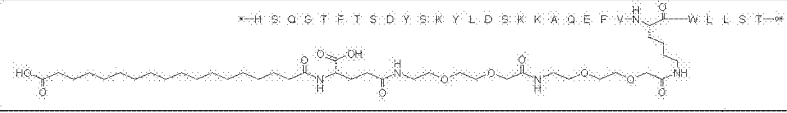
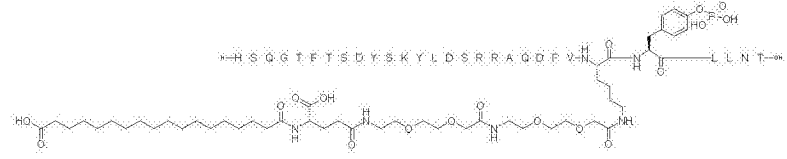
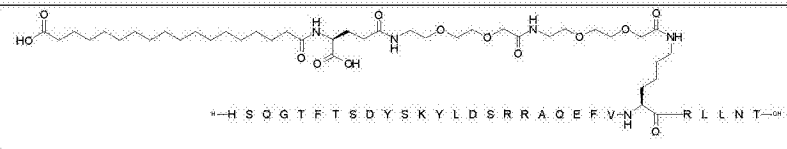
[1712]

<p>实施例 28</p>		<p>0.027</p>
<p>实施例 29</p>		<p>0.135</p>
<p>实施例 30</p>		<p>0.137</p>
<p>实施例 31</p>		<p>0.043</p>
<p>实施例 32</p>		<p>0.0235</p>
<p>实施例 33</p>		<p>0.942</p>
<p>实施例 34</p>		<p>0.018</p>
<p>实施例 35</p>		<p>0.016</p>
<p>实施例 36</p>		<p>0.048</p>
<p>实施例 37</p>		<p>0.033</p>
<p>实施例 38</p>		<p>0.015</p>

[1713]

实施例 39		0.007
实施例 40		0.007
实施例 41		0.003
实施例 42		0.017
实施例 43		0.003
实施例 44		0.012
实施例 45		0.007
实施例 46		0.003
实施例 47		0.109
实施例 48		0.021
实施例 49		0.150

[1714]

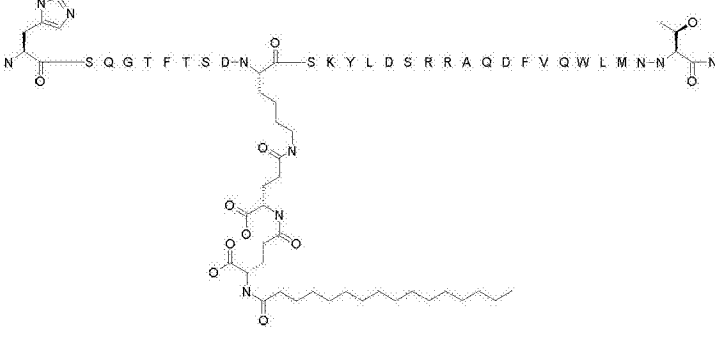
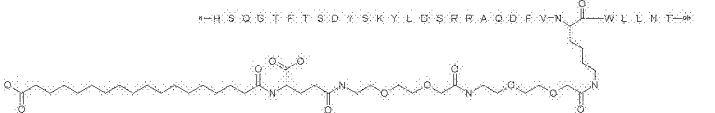
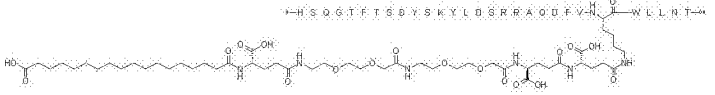
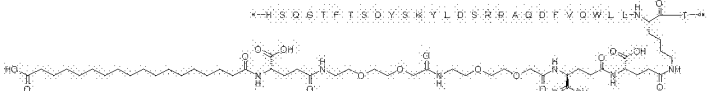
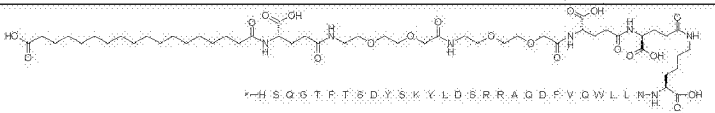
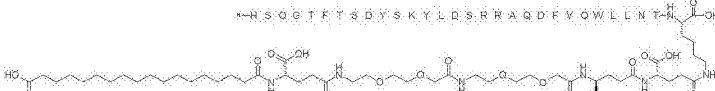
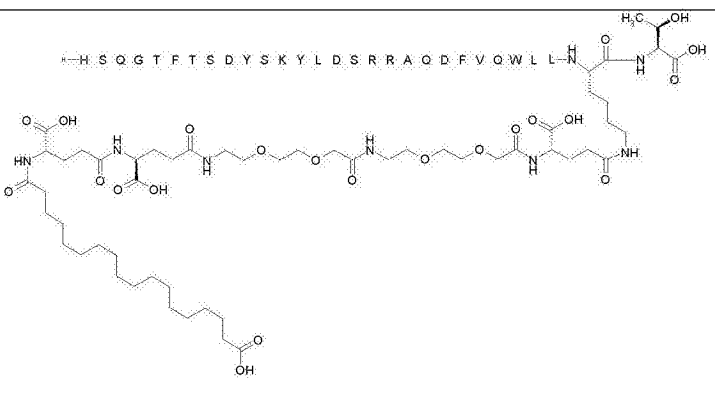
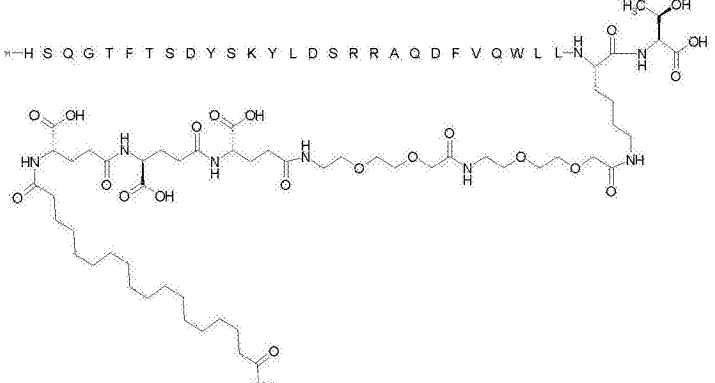
实施例 50		0.194
实施例 51		0.051
实施例 52		0.055
实施例 53		0.095
实施例 54		0.056
实施例 55		0.009
实施例 56		0.171
实施例 58		0.074

[1715] 表2.受体结合的体外数据、ThT测定法延迟时间和回收率

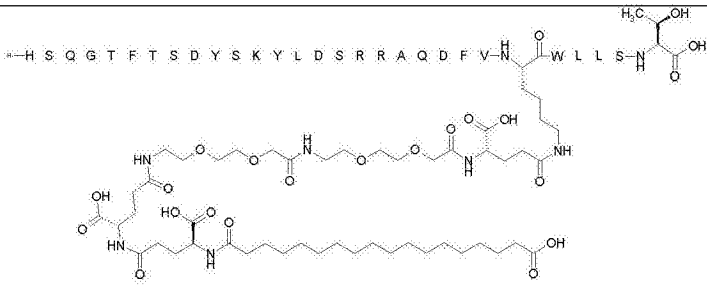
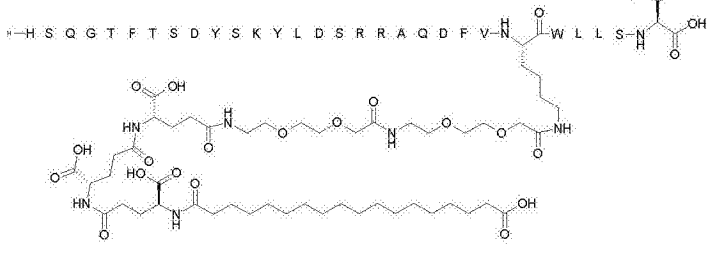
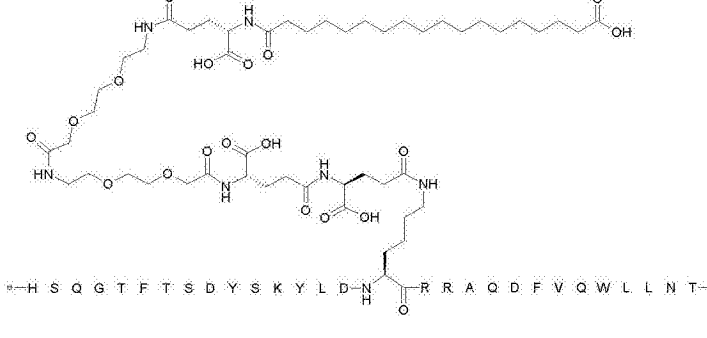
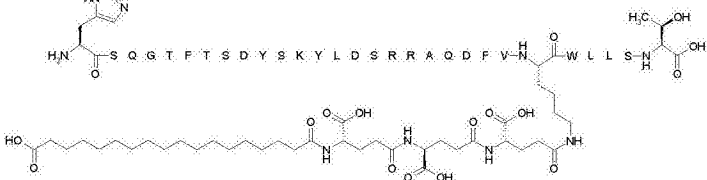
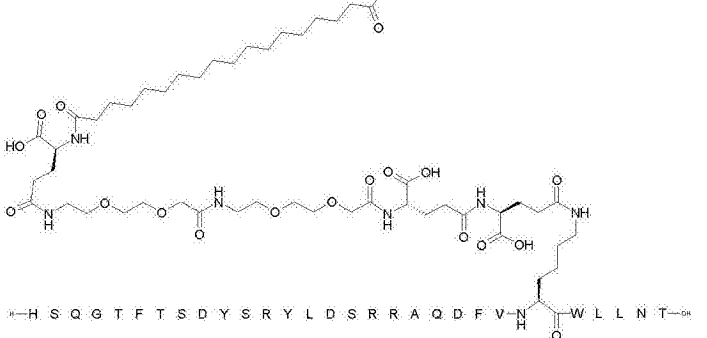
[1716]

实施例		测定法(I) 胰高血糖素 [EC50] [nM]	ThT 测定法[延 迟时 间](h)	ThT 测定法 [回 收 率] (%)
人胰高血 糖素	H-HSQGTFTSDYSKYLDARRAQDFVQWLMNT-OH	0.011	1.5	2.5

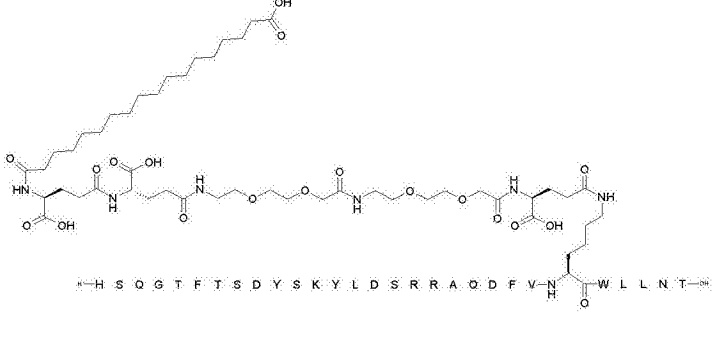
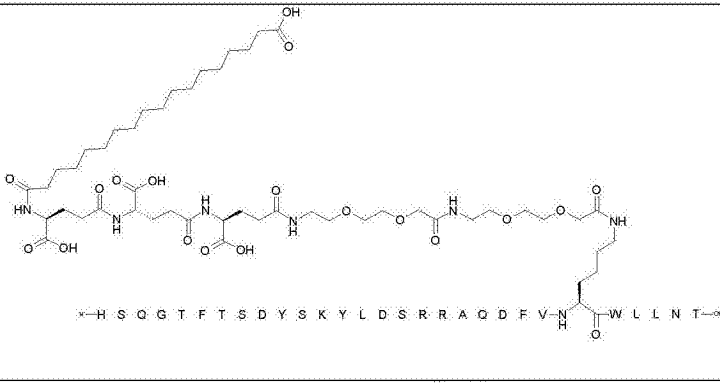
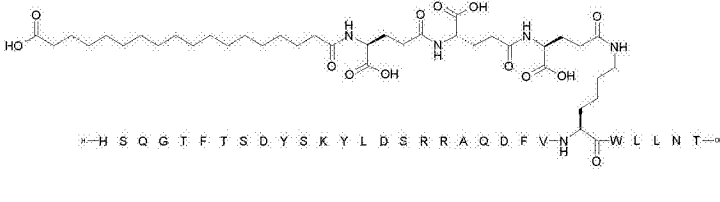
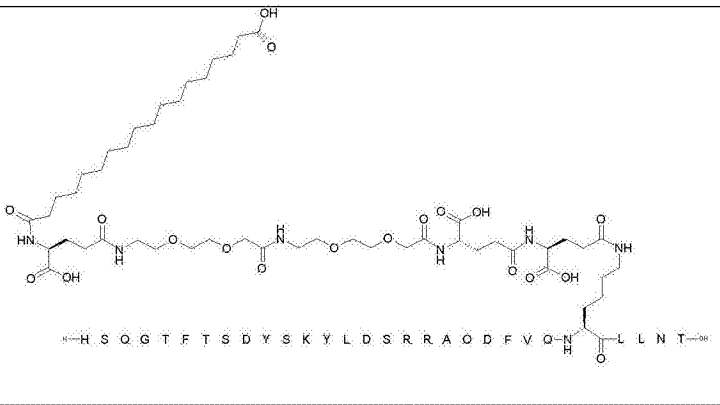
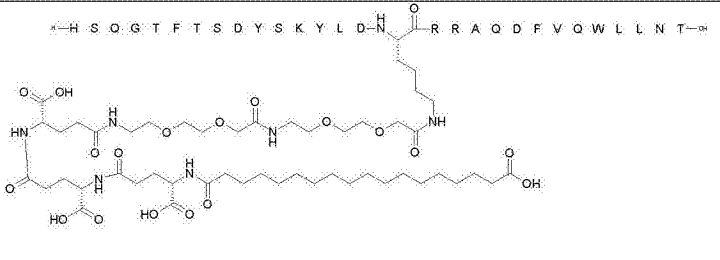
[1717]

<p>K10(γGlu-γGlu-C16) 胰高血糖素-NH2</p>		<p>0.006</p>	<p>14</p>	<p>0</p>
<p>16</p>	<p>←-H S Q G T F T S D Y S K Y L D S R R A Q D F V N-W L L L N T-*</p> 	<p>0.017</p>	<p>1.3</p>	<p>0</p>
<p>51</p>	<p>←-H S Q G T F T S D Y S K Y L D S R R A Q D F V N-W L L L N T-*</p> 	<p>0.051</p>	<p>45</p>	<p>100</p>
<p>52</p>	<p>←-H S Q G T F T S D Y S K Y L D S R R A Q D F V Q W L L N T-*</p> 	<p>0.055</p>	<p>30</p>	<p>95</p>
<p>53</p>	<p>←-H S Q G T F T S D Y S K Y L D S R R A Q D F V Q W L L N T-*</p> 	<p>0.095</p>	<p>12</p>	<p>91</p>
<p>54</p>	<p>←-H S Q G T F T S D Y S K Y L D S R R A Q D F V Q W L L N T-*</p> 	<p>0.056</p>	<p>5</p>	<p>87</p>
<p>66</p>	<p>←-H S Q G T F T S D Y S K Y L D S R R A Q D F V Q W L L N T-*</p> 	<p>0.093</p>	<p>45</p>	<p>100</p>
<p>67</p>	<p>←-H S Q G T F T S D Y S K Y L D S R R A Q D F V Q W L L N T-*</p> 	<p>0.116</p>	<p>15</p>	<p>94</p>

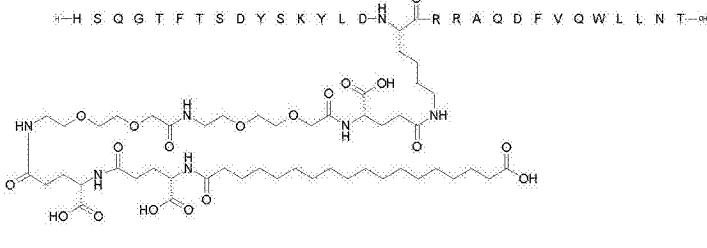
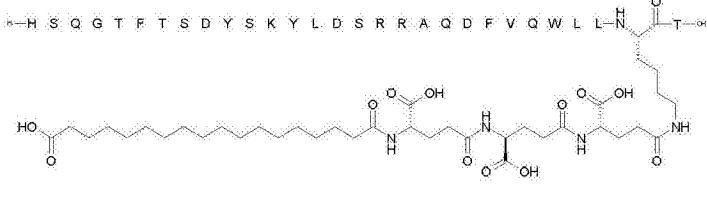
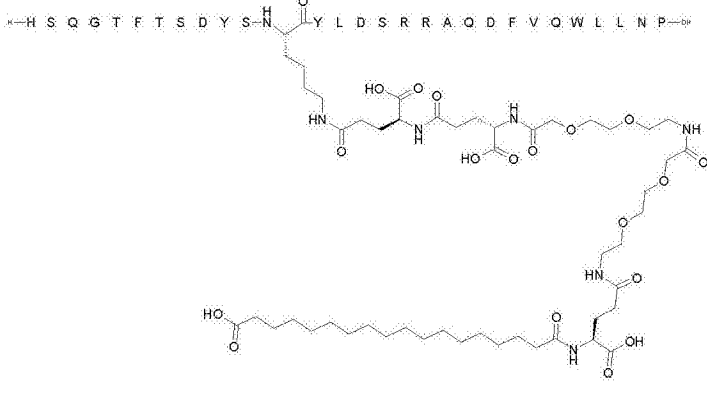
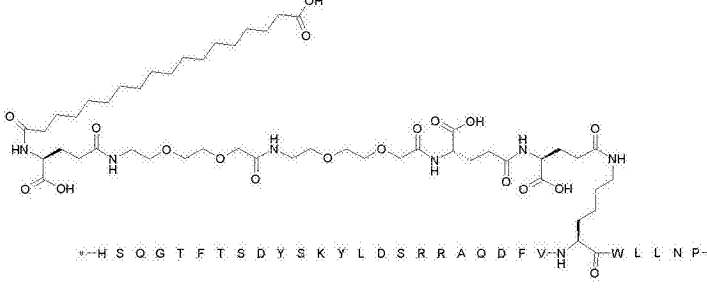
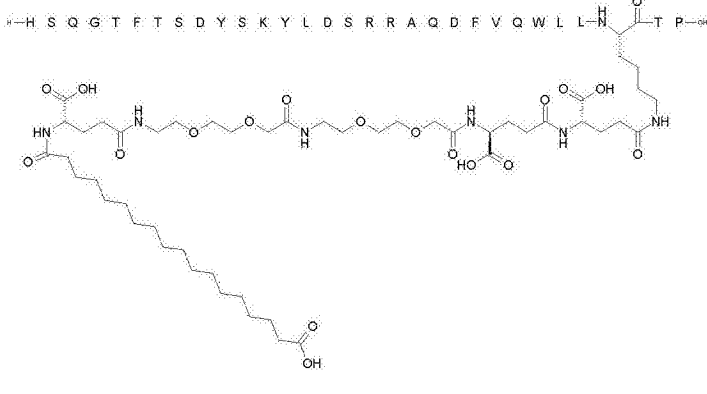
[1718]

<p>68</p>		<p>0.106</p>	<p>45</p>	<p>100</p>
<p>69</p>		<p>0.115</p>	<p>45</p>	<p>100</p>
<p>70</p>		<p>0.105</p>	<p>15</p>	<p>44</p>
<p>71</p>		<p>0.094</p>	<p>45</p>	<p>100</p>
<p>72</p>		<p>0.127</p>	<p>39</p>	<p>100</p>

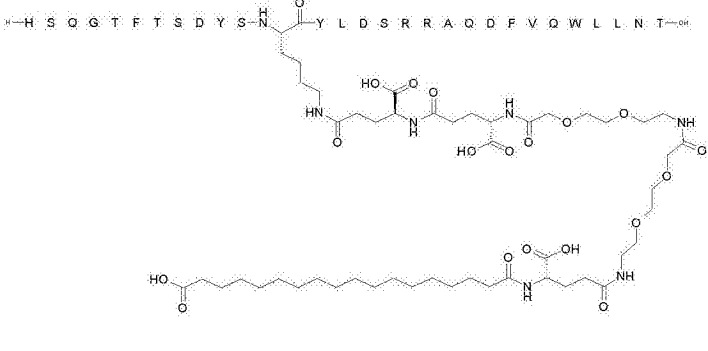
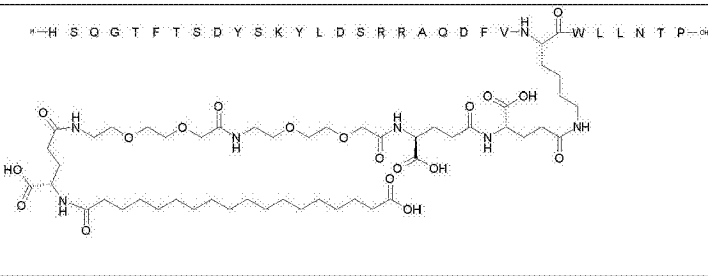
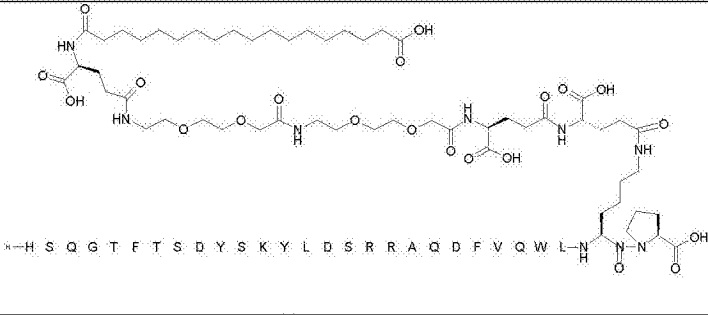
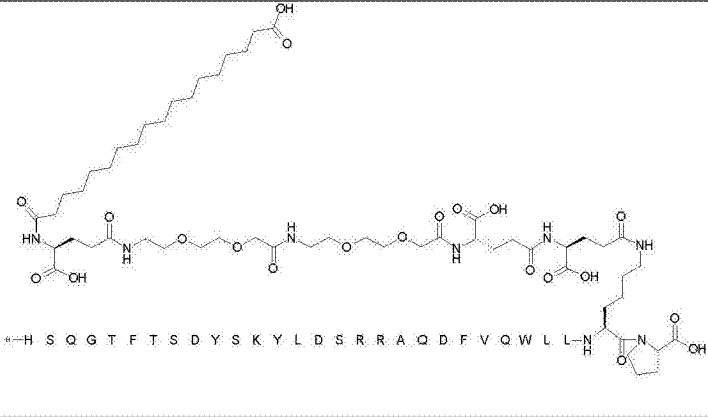
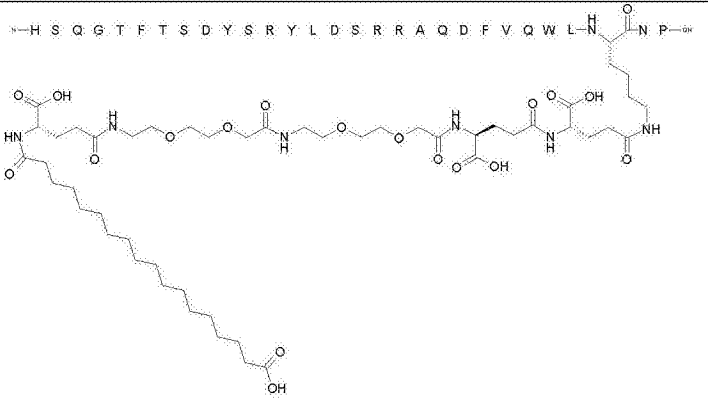
[1719]

<p>73</p> 	<p>0.079</p>	<p>45</p>	<p>100</p>
<p>74</p> 	<p>0.093</p>	<p>45</p>	<p>100</p>
<p>75</p> 	<p>0.170</p>	<p>45</p>	<p>100</p>
<p>76</p> 	<p>0.988</p>	<p>30</p>	<p>97</p>
<p>77</p> 	<p>0.081</p>	<p>2</p>	<p>59</p>

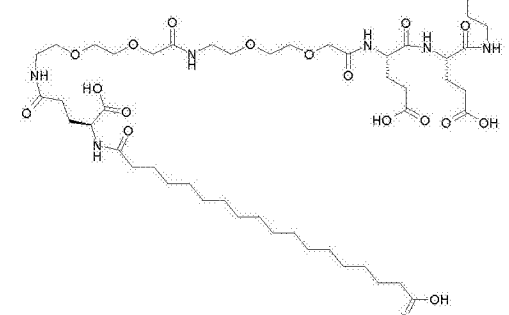
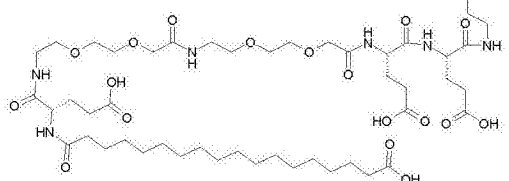
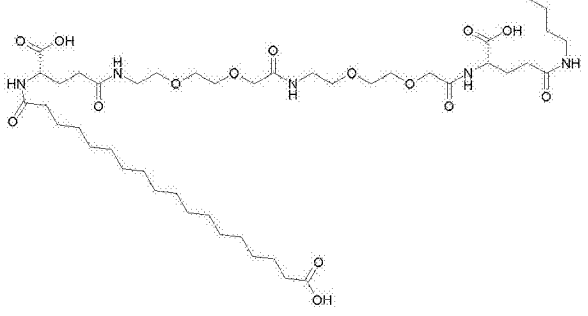
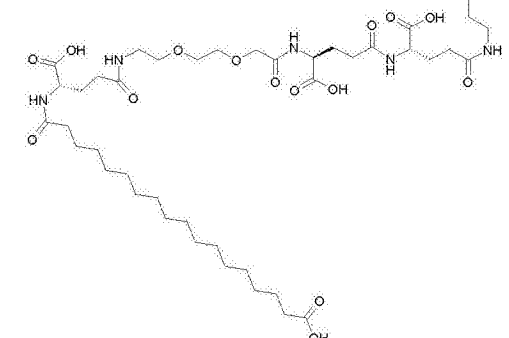
[1720]

<p>78</p>	<p>~H S Q G T F T S D Y S K Y L D-NH-CO-R R A Q D F V Q W L L N T~</p> 	<p>0.122</p>	<p>4</p>	<p>59</p>
<p>79</p>	<p>~H S Q G T F T S D Y S K Y L D S R R A Q D F V Q W L L-NH-CO-T-OH</p> 	<p>0.141</p>	<p>8</p>	<p>68</p>
<p>80</p>	<p>~H S Q G T F T S D Y S-NH-CO-Y L D S R R A Q D F V Q W L L N P~</p> 	<p>1.577</p>	<p>n. d</p>	<p>n. d</p>
<p>81</p>	 <p>~H S Q G T F T S D Y S K Y L D S R R A Q D F V-NH-CO-W L L N P~</p>	<p>0.156</p>	<p>40</p>	<p>100</p>
<p>82</p>	<p>~H S Q G T F T S D Y S K Y L D S R R A Q D F V Q W L L-NH-CO-T P~</p> 	<p>0.128</p>	<p>45</p>	<p>100</p>

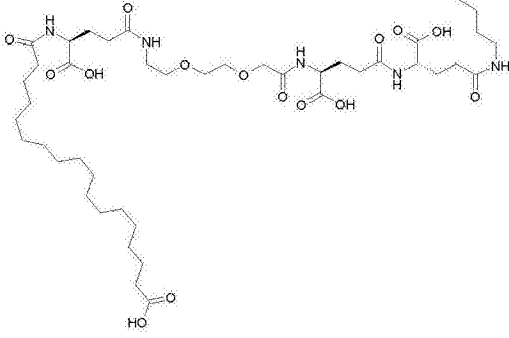
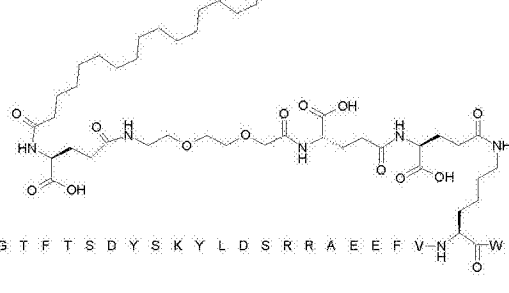
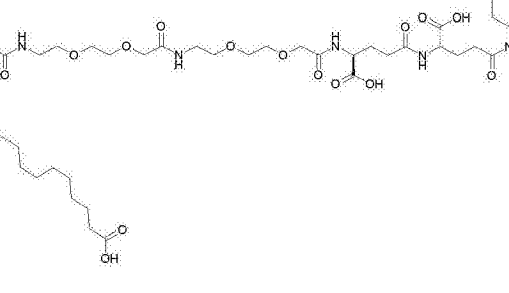
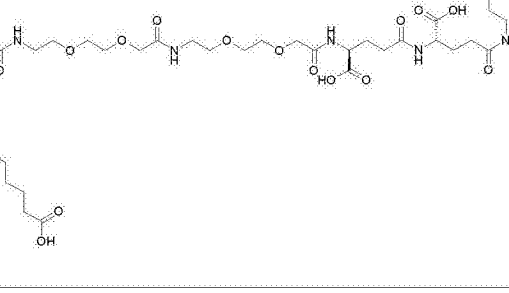
[1721]

<p>83</p>	<p>Y-H S Q G T F T S D Y S-N⁺ Y L D S R R A Q D F V Q W L L N T-OH</p> 	<p>1.878</p>	<p>45</p>	<p>100</p>
<p>84</p>	<p>K-H S Q G T F T S D Y S K Y L D S R R A Q D F V-N⁺ W L L N T P-OH</p> 	<p>0.142</p>	<p>45</p>	<p>100</p>
<p>85</p>	 <p>K-H S Q G T F T S D Y S K Y L D S R R A Q D F V Q W L-N⁺</p>	<p>1.173</p>	<p>7</p>	<p>100</p>
<p>86</p>	 <p>K-H S Q G T F T S D Y S K Y L D S R R A Q D F V Q W L L-N⁺</p>	<p>0.189</p>	<p>10</p>	<p>82</p>
<p>87</p>	<p>K-H S Q G T F T S D Y S R Y L D S R R A Q D F V Q W L-N⁺ N P-OH</p> 	<p>2.114</p>	<p>0</p>	<p>95</p>

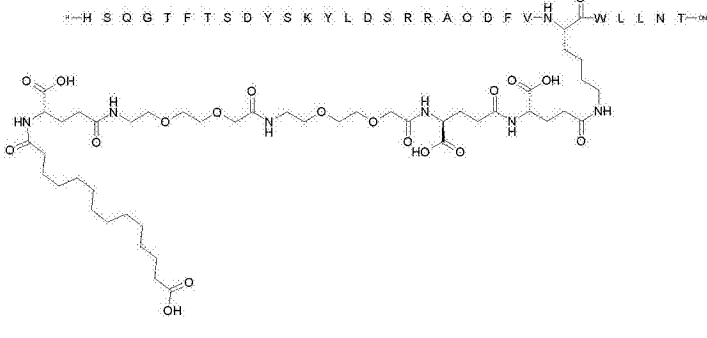
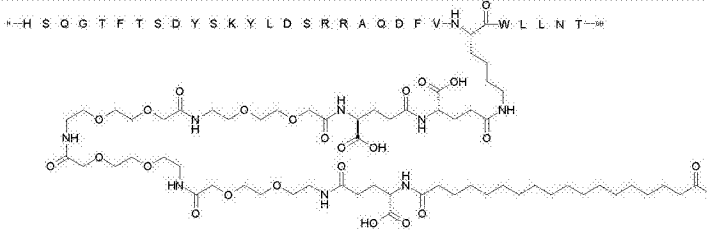
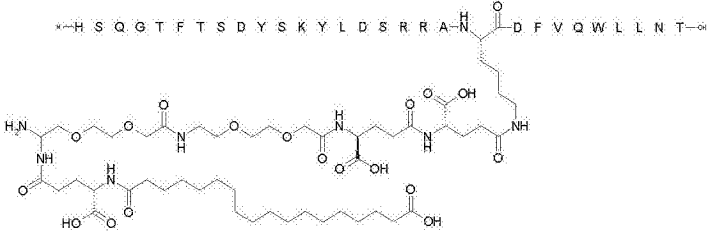
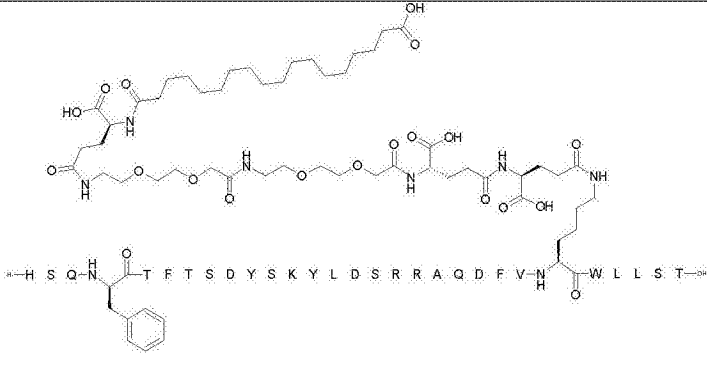
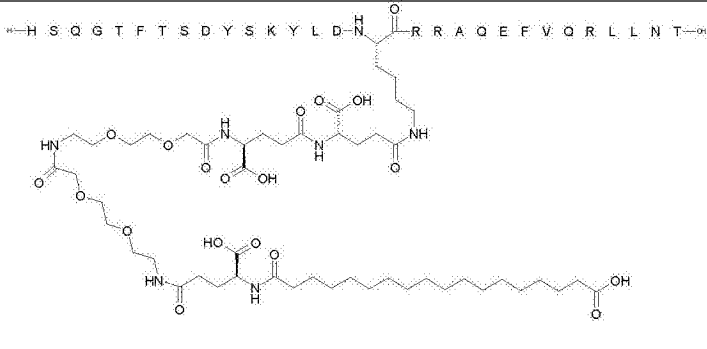
[1722]

<p>88</p>	<p>←-H S Q G T F T S D Y S K Y L D S R R A Q D F V-N⁺-W L L N T-→</p> 	<p>0.037</p>	<p>45</p>	<p>100</p>
<p>89</p>	<p>←-H S Q G T F T S D Y S K Y L D S R R A Q D F V-N⁺-W L L N T-→</p> 	<p>0.087</p>	<p>45</p>	<p>100</p>
<p>90</p>	<p>←-H S Q G T F T S D Y S K Y L D S R R A Q D F V-N⁺-W L L N T-→</p> 	<p>0.018</p>	<p>29</p>	<p>84</p>
<p>91</p>	<p>←-H S Q G T F T S D Y S K Y L D S R R A Q E F V-N⁺-W L L S T-→</p> 	<p>0.053</p>	<p>45</p>	<p>100</p>

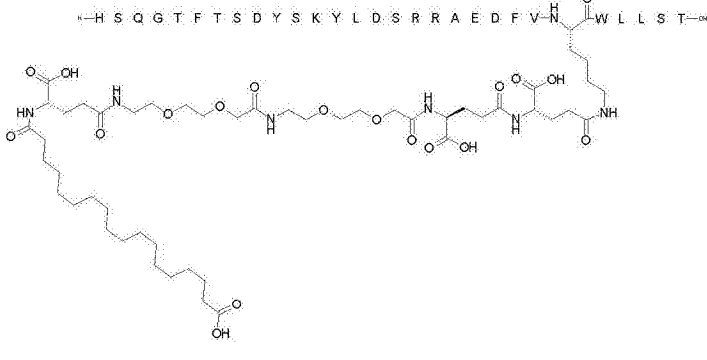
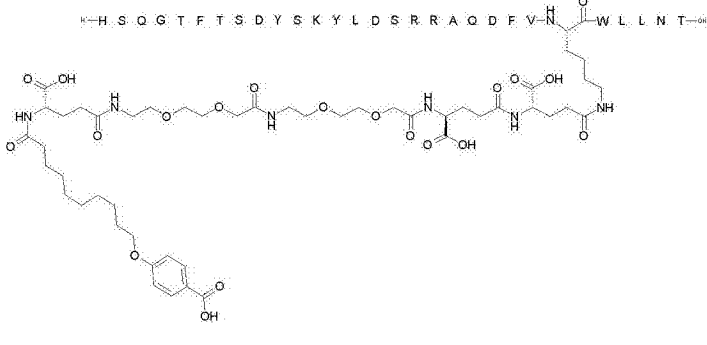
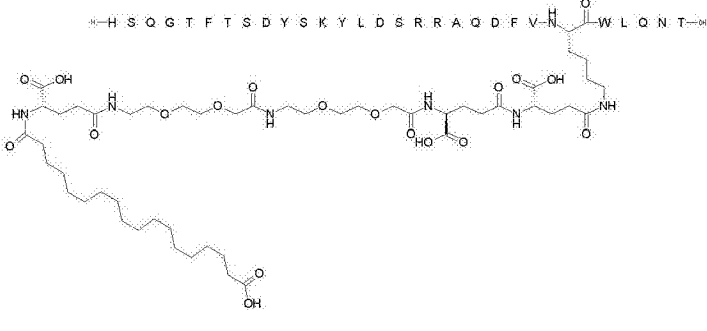
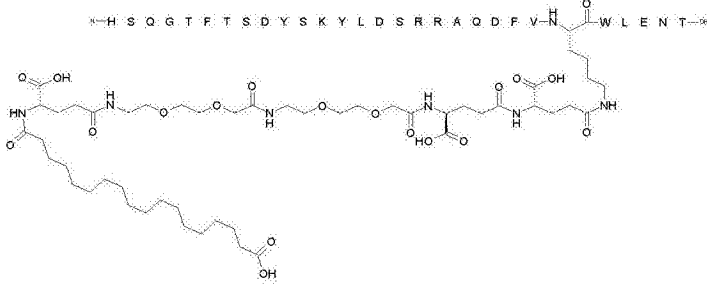
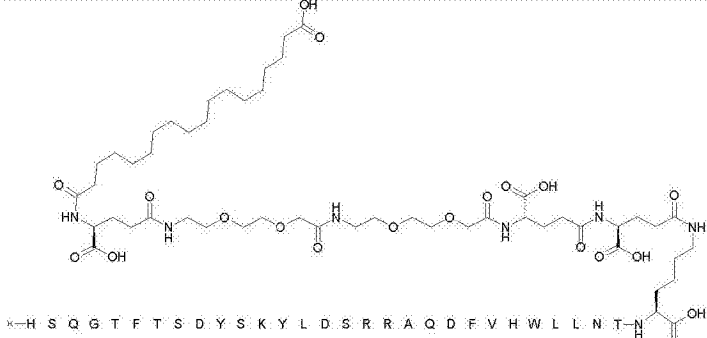
[1723]

<p>92</p>	<p>*-H S Q G T F T S E Y S K Y L D S R R A Q D F V-NH-W L L S T-*</p> 	<p>2.2</p>	<p>45</p>	<p>100</p>
<p>93</p>	<p>*-H S Q G T F T S D Y S K Y L D S R R A E E F V-NH-W L L S T-*</p> 	<p>0.12</p>	<p>45</p>	<p>100</p>
<p>94</p>	<p>*-H S Q G T F T S D Y S K Y L D S R R A Q D F V-NH-W L L N T-*</p> 	<p>0.009</p>	<p>45</p>	<p>100</p>
<p>95</p>	<p>*-H S Q G T F T S D Y S K Y L D S R R A Q D F V-NH-W L L N T-*</p> 	<p>0.009</p>	<p>45</p>	<p>100</p>

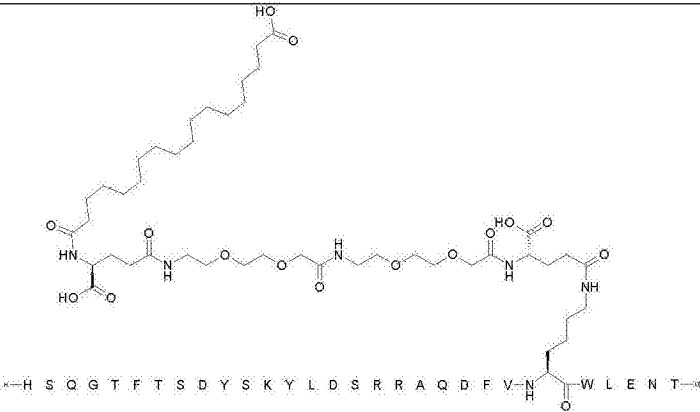
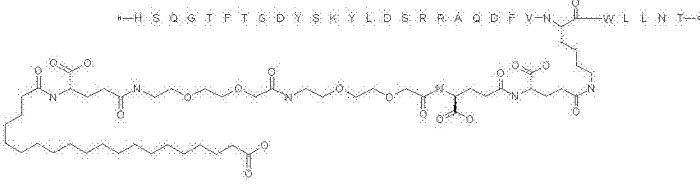
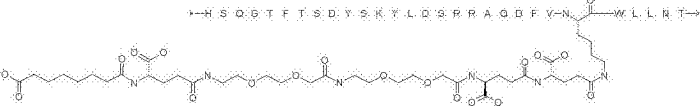
[1724]

<p>96</p>	<p>←-H S Q G T F T S D Y S K Y L D S R R A Q D F V -N H C(=O) W L L N T →-OH</p> 	<p>0.010</p>	<p>45</p>	<p>100</p>
<p>97</p>	<p>←-H S Q G T F T S D Y S K Y L D S R R A Q D F V -N H C(=O) W L L N T →-OH</p> 	<p>0.033</p>	<p>45</p>	<p>100</p>
<p>98</p>	<p>←-H S Q G T F T S D Y S K Y L D S R R A N -H C(=O) D F V Q W L L N T →-OH</p> 	<p>0.058</p>	<p>1</p>	<p>26</p>
<p>99</p>	 <p>←-H S Q G T F T S D Y S K Y L D S R R A Q D F V -N H C(=O) W L L S T →-OH</p>	<p>0.044</p>	<p>45</p>	<p>100</p>
<p>100</p>	<p>←-H S Q G T F T S D Y S K Y L D -N H C(=O) R R A Q E F V Q R L L N T →-OH</p> 	<p>0.450</p>	<p>45</p>	<p>100</p>

[1725]

<p>101</p>	<p>K-H S Q G T F T S D Y S K Y L D S R R A E D F V-N⁺W L L S T-O⁻</p> 	<p>0.307</p>	<p>45</p>	<p>100</p>
<p>102</p>	<p>K-H S Q G T F T S D Y S K Y L D S R R A Q D F V-N⁺W L L N T-O⁻</p> 	<p>0.007</p>	<p>45</p>	<p>100</p>
<p>103</p>	<p>K-H S Q G T F T S D Y S K Y L D S R R A Q D F V-N⁺W L Q N T-O⁻</p> 	<p>0.118</p>	<p>45</p>	<p>100</p>
<p>104</p>	<p>K-H S Q G T F T S D Y S K Y L D S R R A Q D F V-N⁺W L E N T-O⁻</p> 	<p>0.101</p>	<p>32</p>	<p>100</p>
<p>105</p>	 <p>K-H S Q G T F T S D Y S K Y L D S R R A Q D F V H W L L N T-N⁺H⁺</p>	<p>0.100</p>	<p>1.3</p>	<p>16</p>

[1726]

106		0.067	2.3	63
107		0.116	9	100
108		1.011	45	100

[1727] 测定法 (II)

[1728] GLP-1活性

[1729] 将GLP-1受体克隆至具有膜结合的cAMP生物传感器(ACTOne™)的HEK-293细胞中。将细胞(14000个/孔)在384孔板中温育(37℃,5%CO₂)过夜。次日,使细胞负载只分布于胞质中的钙反应性染料。加入有机阴离子转运蛋白抑制剂丙磺舒以防止染料离开细胞。加入PDE抑制剂以防止已形成的cAMP降解。将板置于FLIPRTETRA中,加入胰高血糖素类似物。6分钟后收集终点数据。胞内cAMP的增加与胞质中钙浓度的增加成比例。当钙结合染料时,便产生了荧光信号。用Prism5计算了EC₅₀值。

[1730] 测定法 (III)

[1731] LOCI测定法

[1732] 采用冷光氧通道形成免疫测定法(Luminescence OxygenChanneling Immunoassay, LOCI),对样品中的肽进行了分析。供体珠用链霉抗生物素包被,而受体珠与对胰高血糖素有特异性的单克隆抗体(1F120)缀合。使其它结合胰高血糖素的单克隆抗体(2F7)生物素化。将3种反应物与分析物混合,形成二部位(two-sided)免疫复合物。照射复合物从供体珠中释放出单线态氧原子。它们在受体珠中开出通道,并激发化学发光,其在EnVision读板仪中进行测量。所发出光的量与肽浓度成比例。

[1733] 将1μL样品/校准物/对照应用于384孔LOCI板的各孔中,接着加入15μL抗体包被的受体珠(0.5μg/孔)和生物素化抗体的混合物。将板在21-22℃下温育1小时。然后,将30μL链霉抗生物素包被的供体珠(2μg/孔)加入各孔中,在21-22℃下温育30分钟。在用680nm激光激发后,在21-22℃下在具有520-645nm带宽的滤光片的Envision读板仪中对板进行了读

出。每孔的总测量时间为210ms,包括70ms激发时间。

[1734] 测定法(IV)

[1735] 饮食诱导性肥胖大鼠的体重减轻

[1736] 该研究使用了得自Taconic Europe的六十四只高脂肪(ResearchDiet D12492)饲养的和八只低脂肪(Research Diet D12450B)饲养的Sprague Dawley大鼠。给药前,给大鼠称重,分别为约970g和730g。大鼠任意进食水,单独关养以供每日监测食物摄取。从10AM到10PM关灯。

[1737] 将大鼠分成8组,一日一次皮下(sc)给予两种试验物质15天,剂量体积为0.5ml/kg。在开始给药前,每日对大鼠进行处理和训练以皮下给药5天。将胰高血糖素类似物N-ε 24-([2-[2-[2-[[[4S]-5-羟基-4-[(18-羟基-18-氧代十八烷酰基)氨基]5-氧代戊酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基]氨基)-乙氧基]乙氧基]乙酰基)]) [Lys17,Lys18,Glu21,Lys24,Leu27]-胰高血糖素(实施例3)或G3给予大鼠。

[1738] 高脂肪饲养试验组如下:第1组:溶媒(接受2次溶媒注射),第2组:胰高血糖素类似物(实施例3)30nmol/kg和1次溶媒注射;第3组:胰高血糖素类似物(实施例3)300nmol/kg和1次溶媒注射;第4组:G3 1nmol/kg和1次溶媒注射;第5组:胰高血糖素类似物(实施例3)30nmol/kg和G3 1nmol/kg;第6组:胰高血糖素类似物(实施例3)300nmol/kg和G3 1nmol/kg;第7组:2次溶媒注射和与第6组配对饲养。第8组饲养低脂肪饮食并接受2次溶媒注射。在第5个给药日,由于大鼠经历的急剧体重减轻曲线所致,调整胰高血糖素类似物(实施例3)的剂量自30nmol/kg到3nmol/kg和自300nmol/kg到30nmol/kg。

[1739] 在第11天,对大鼠进行血糖特征分析。在第15天或第16天处死大鼠,采集血液用于测量胰岛素和胆固醇。

[1740] 测定法(V)

[1741] 使用任意喂食的大鼠模型用胰高血糖素衍生物对食欲的功效测试的实验方案

[1742] 本实验使用得自Taconic Europe,Denmark的Sprague Dawley (SD) 大鼠。大鼠在开始实验时体重为200-250g。大鼠在实验开始前14天到达以使之适应实验环境。在该时间内,处理动物两次。在到达后,将大鼠单独关养一周,在逆转的光/暗期(意味着在日间关灯,在夜间开灯)中两周。因为大鼠通常在暗期活动,并进食其大部分的每日食物摄取,因此正好在关灯前的早晨给大鼠给药。这种安排产生最低的数据变异和最高的试验灵敏度。实验在大鼠关养笼中进行,大鼠在整个适应期和实验期内自由进食食物和水。在5只大鼠的组别中测定衍生物的各种剂量。在每套测试中包括6-7只大鼠的溶媒组。根据体重,用皮下(sc.)给予的0.01-3mg/kg溶液给予大鼠一次。给药后,把大鼠送回其关养笼,在其中它们取得食物和水。每小时通过联机登记或手工单独连续地记录食物消耗持续7小时,然后在24小时后和48小时后再次记录。在实验期结束时,使动物安乐死。

[1743] 在Microsoft excel表格中记录各数据。在应用于异常值的Grubbs统计评价试验后,排除异常值。将数据报告为作为时间的函数的累积食物摄取。应用斯氏t检验或单因素方差分析对溶媒组和试验组进行了比较。

[1744] 测定法(VI)

[1745] DPP-IV稳定性测定法

[1746] 将10μM肽一式两份与DPP-IV(2μg/ml)一起在37℃下在HEPES缓冲液中温育,向

HEPES缓冲液中加入了0.005%吐温20。在该实验中,人GLP-1用作阳性对照。在3、15、30、60、120和240分钟时取出等分量的样品,加入3体积的乙醇终止反应。通过LC-MS针对母体肽对样品的进行分析。根据第一动力学对数据绘图,并将稳定性报告为半寿期。

[1747] 测定法(VII)

[1748] PK特征

[1749] 将15只雄性大鼠(Sprague Dawley, 400g, Taconic Europe)分成3组,每组5只大鼠。在 $t=0$ 时,将15nmol/kg IV、30nmol/kg SC或100nmol/kg分别给予大鼠。在使大鼠短暂处于异氟烷麻醉下时,通过尾静脉进行IV给药。在 $t=-15$ 分钟、5分钟(仅IV给药的大鼠)、15分钟、30分钟、1小时、1 $\frac{1}{2}$ 小时、2小时、4小时、6小时、12小时、24小时、48小时和72小时时,通过舌下静脉获取血样。将血浆样品保存在冷冻下直到通过LCMS进行分析。

[1750] 测定法(VIII)

[1751] pH依赖性溶解度

[1752] 肽和蛋白质的溶解度取决于溶液的pH。蛋白质或肽常常在其等电点(pI)处或接近等电点时沉淀,在等电点时其净电荷为零。在低pH(即低于pI)时,蛋白质和肽通常带正电荷,在高于pI的pH下,它们带负电荷。

[1753] 如果在给定pH下足够浓度的治疗性肽是可溶性的,则对该治疗性肽是有利的,所述pH既适于配制稳定的药物产品,又适于将药物产品例如通过皮下注射给予患者。

[1754] 如下所述测量溶解度相对于pH的曲线:在水中制备制剂或肽溶液,通过加入HCl和NaOH调节等分量至所需范围的pH值。将这些样品置于室温下平衡2-4天。然后将样品离心。取出各样品的少量等分量用于反相HPLC分析,以测定溶液中蛋白质的浓度。离心后测量各样品的pH,将各蛋白质的浓度对所测pH作图。

<110> 诺沃—诺迪斯克有限公司

<120> 新的胰高血糖素类似物

<130> 8342

<160> 1

<170> PatentIn 版本 3.5

<210> 1

[0001]

<211> 29

<212> PRT

<213> 人(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				

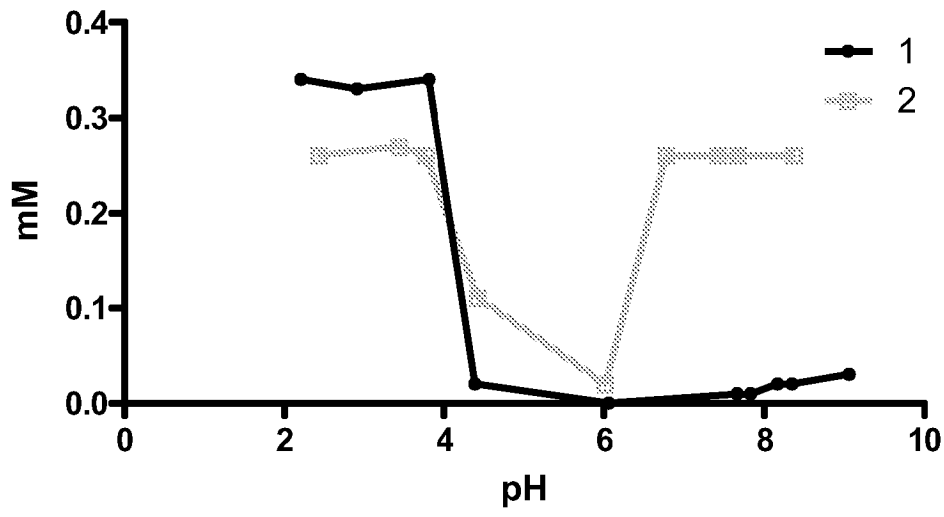


图 1

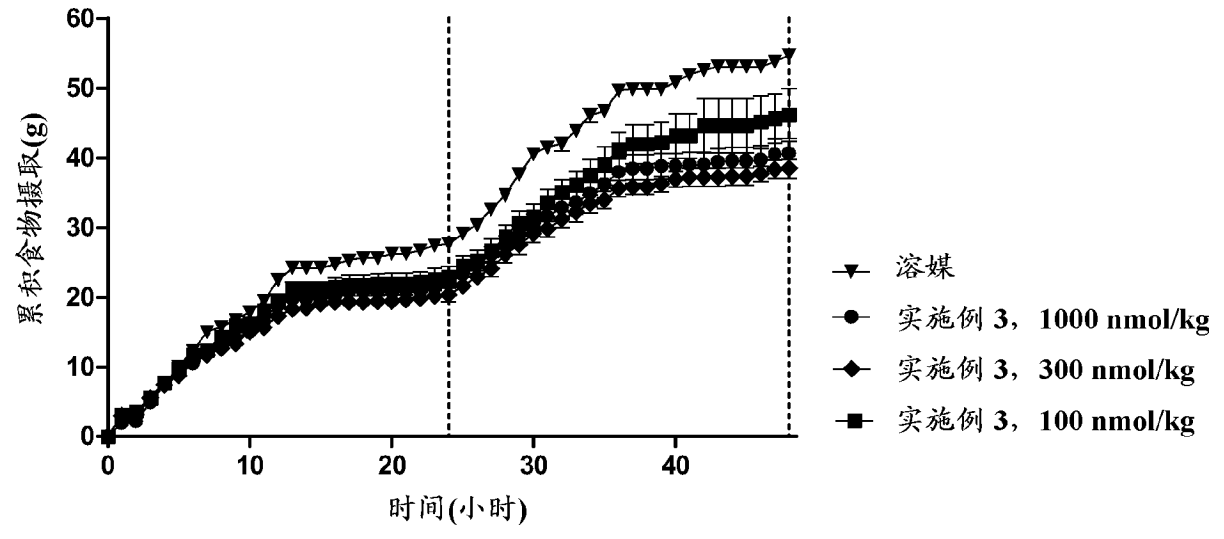


图 2

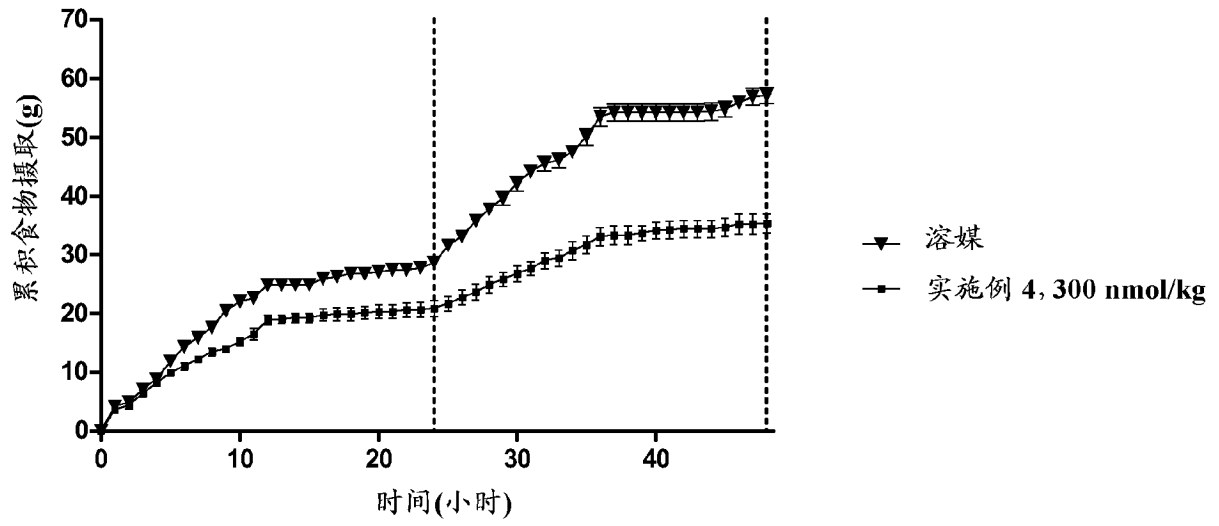


图 3

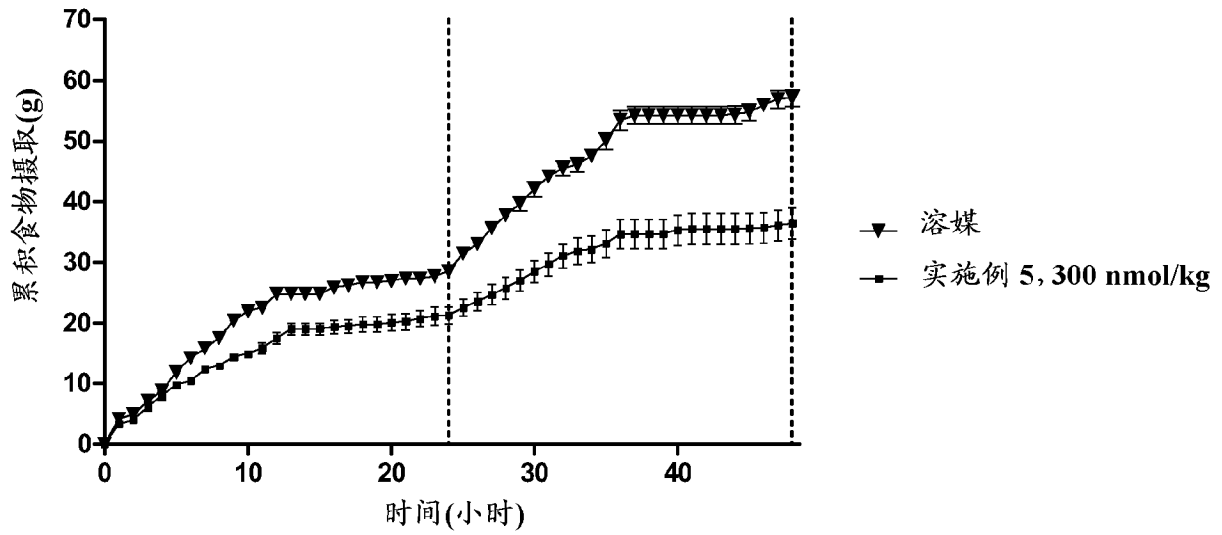


图 4

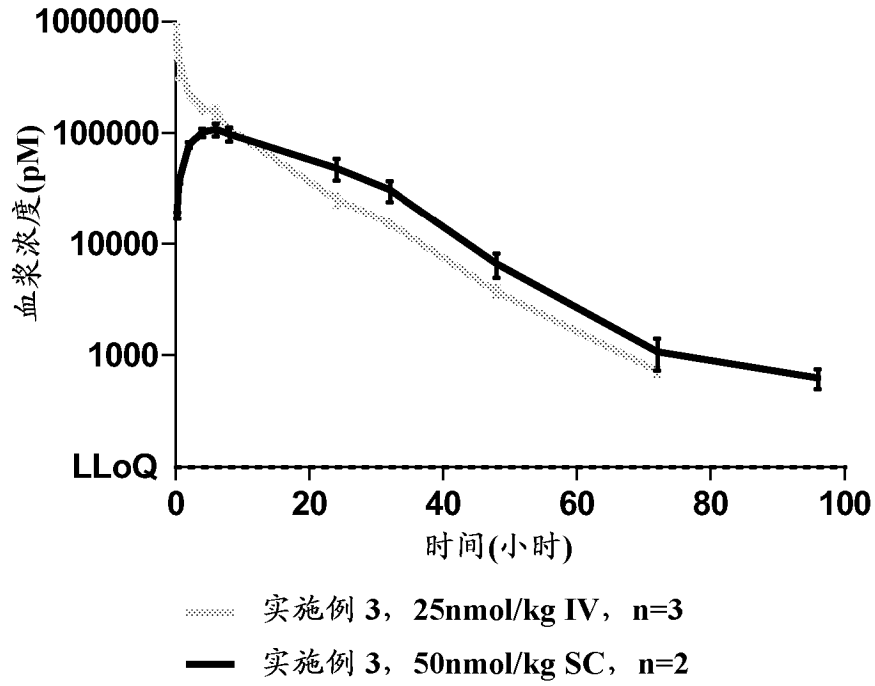


图 5

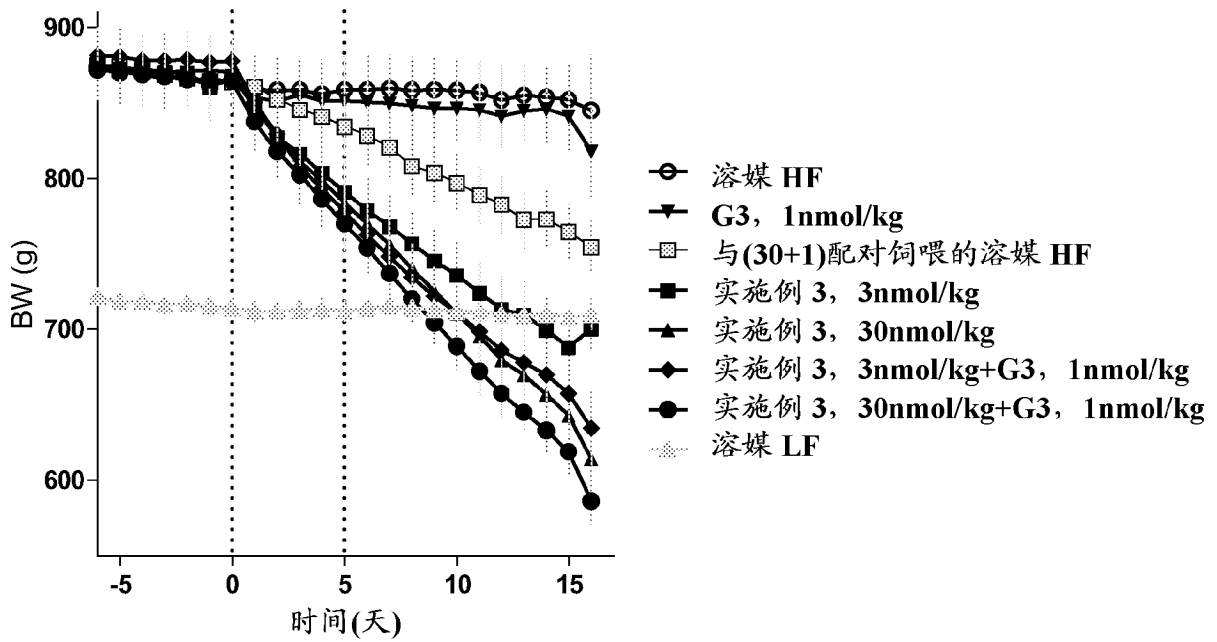


图 6

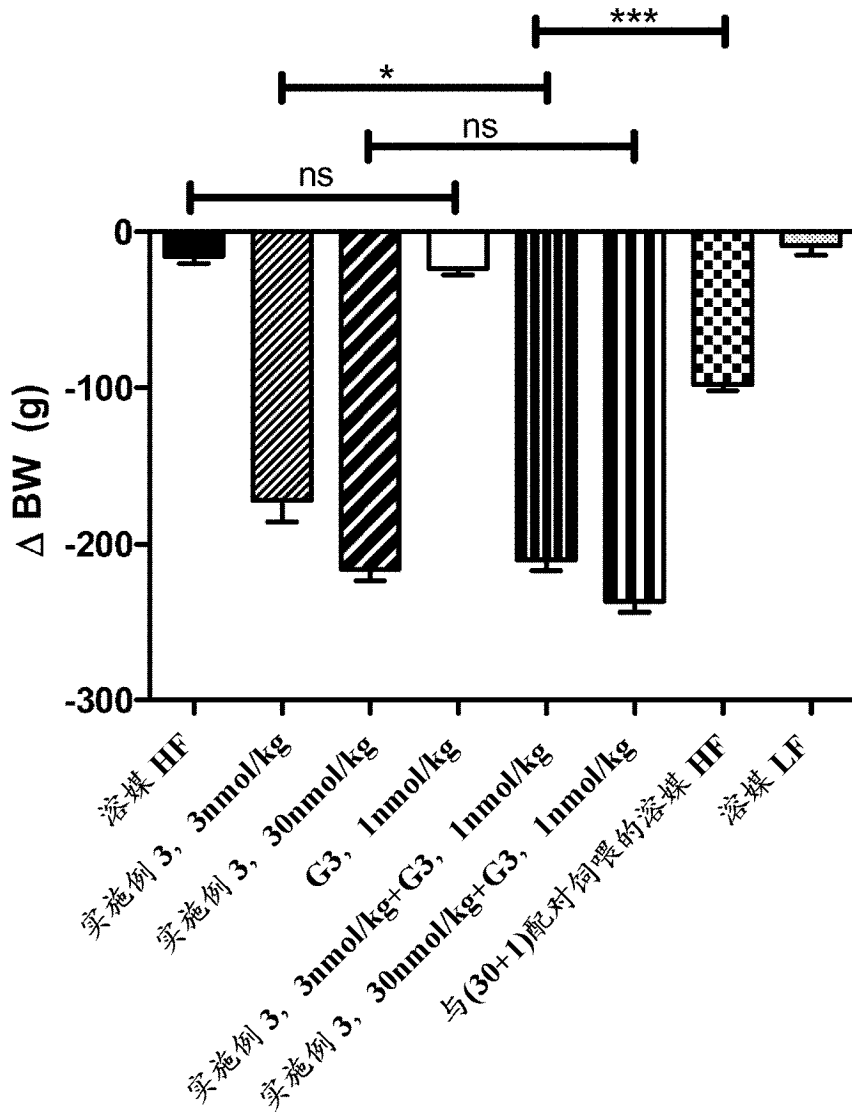


图 7

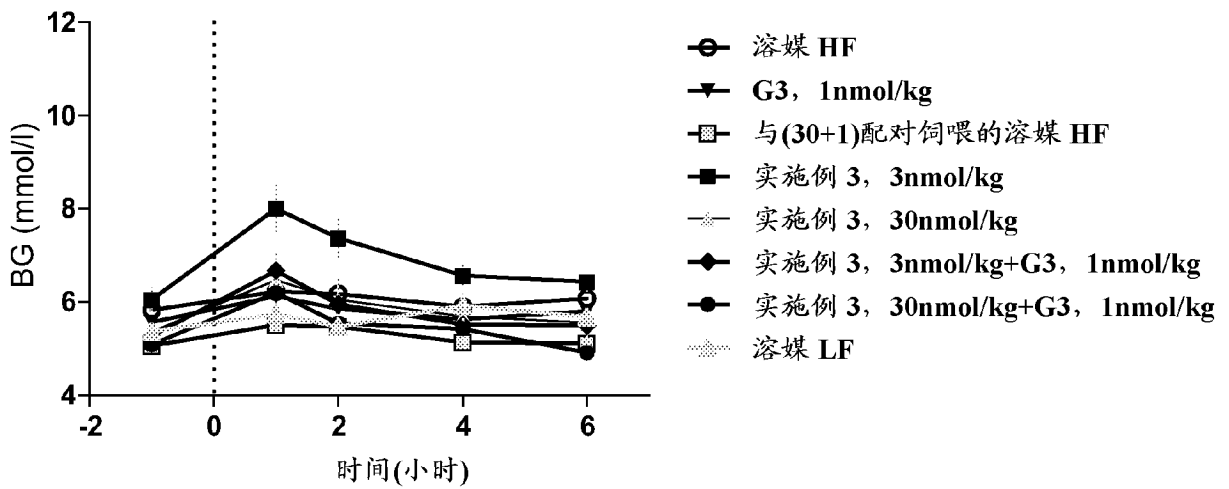


图 8

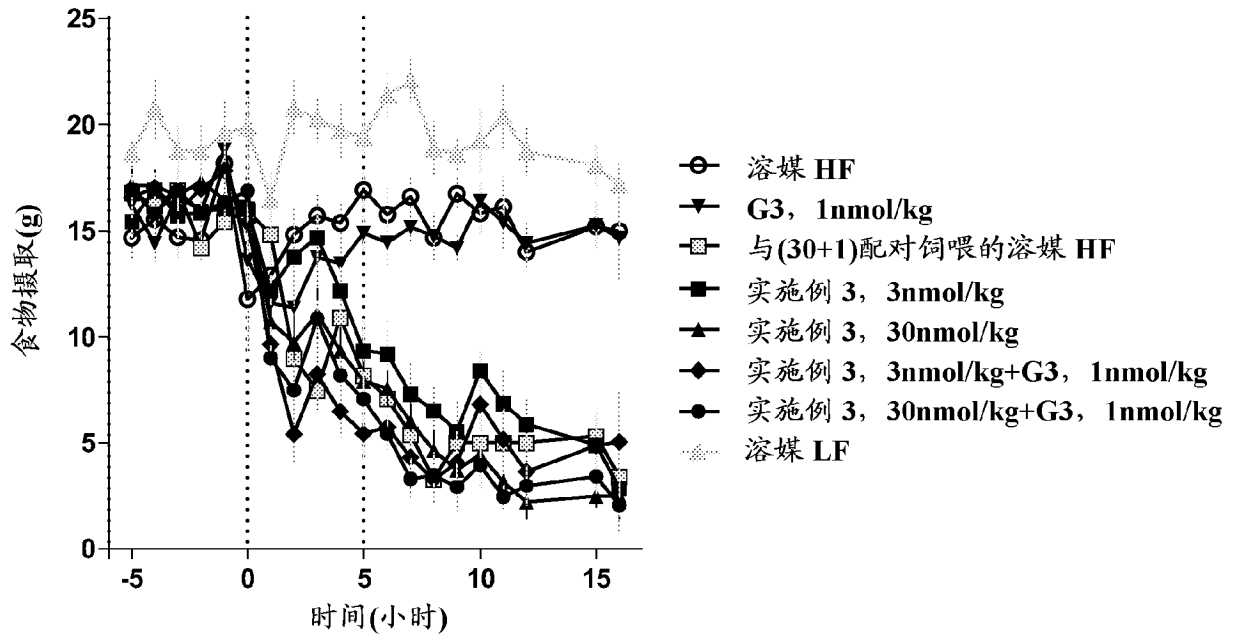


图 9

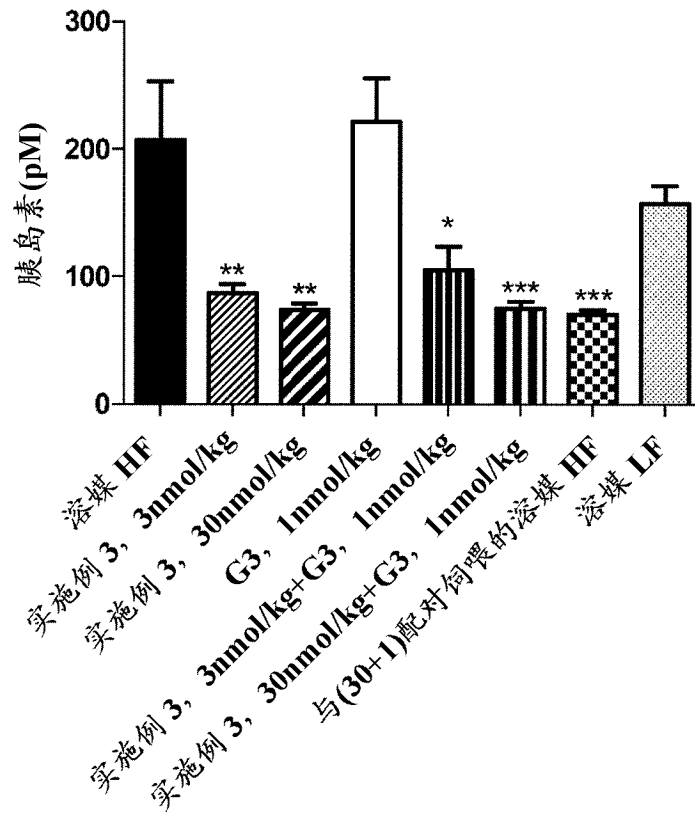


图 10

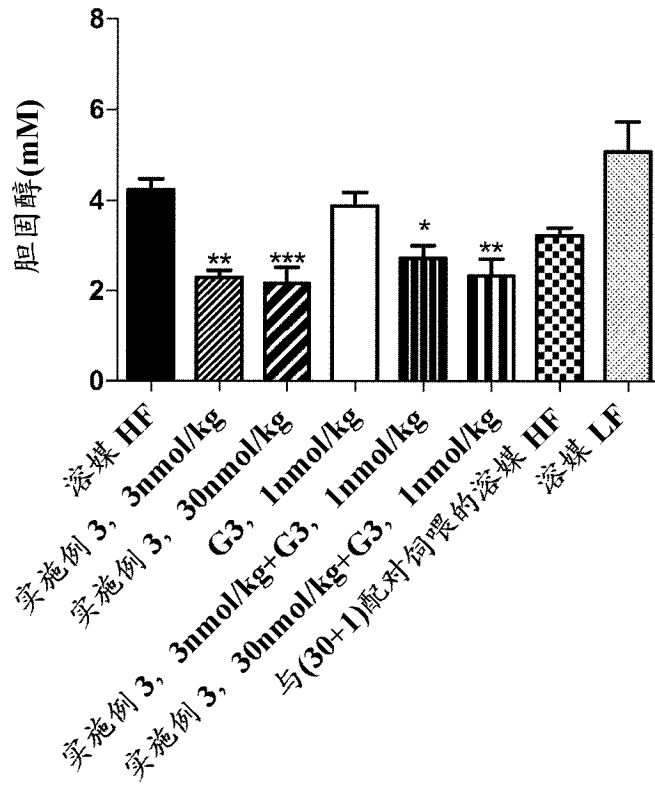


图 11

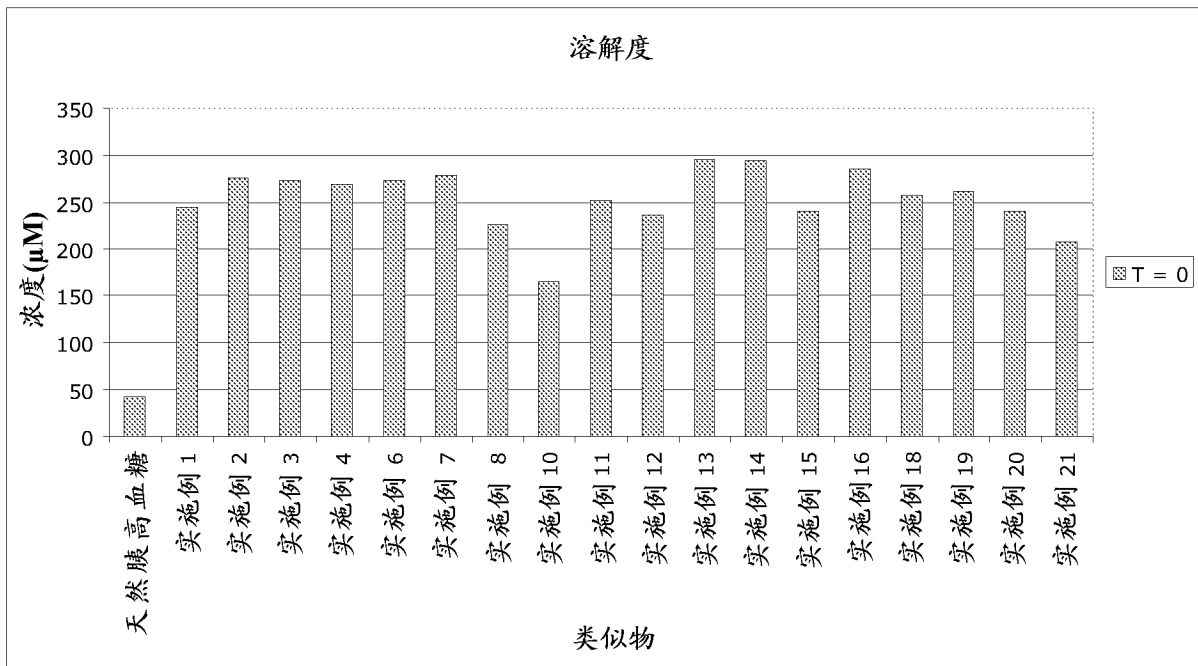


图 12

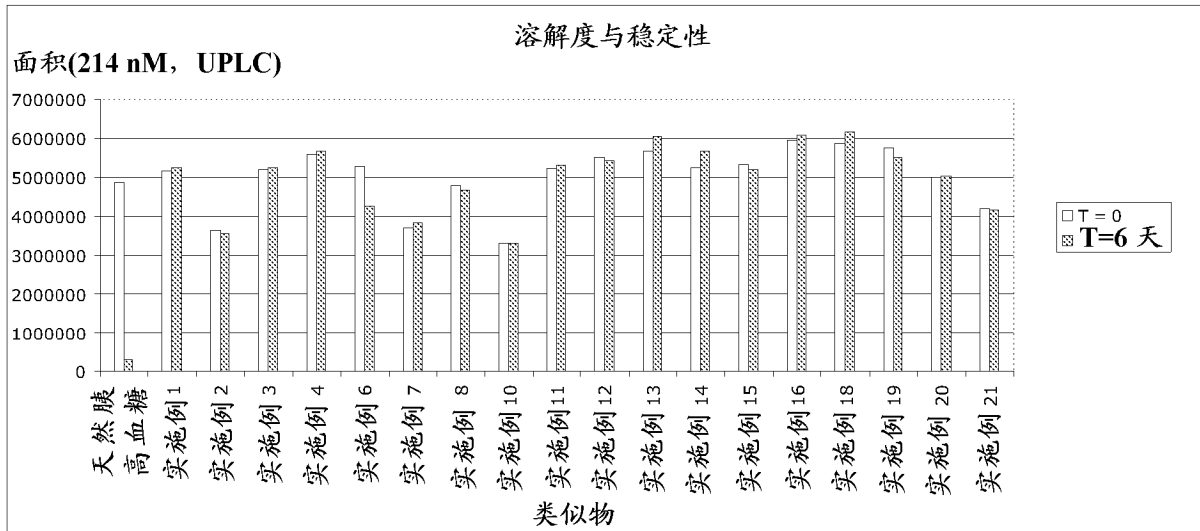


图 13

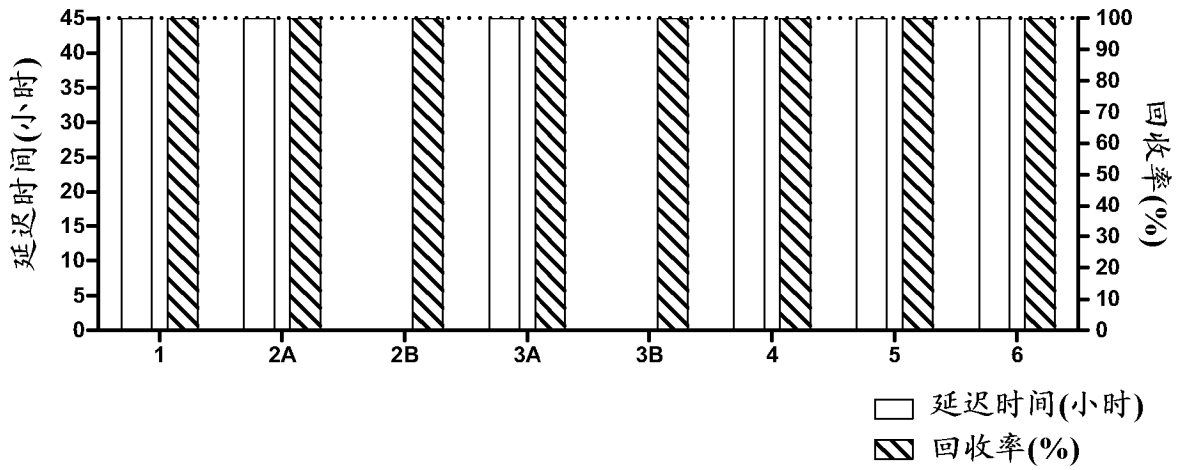


图 14

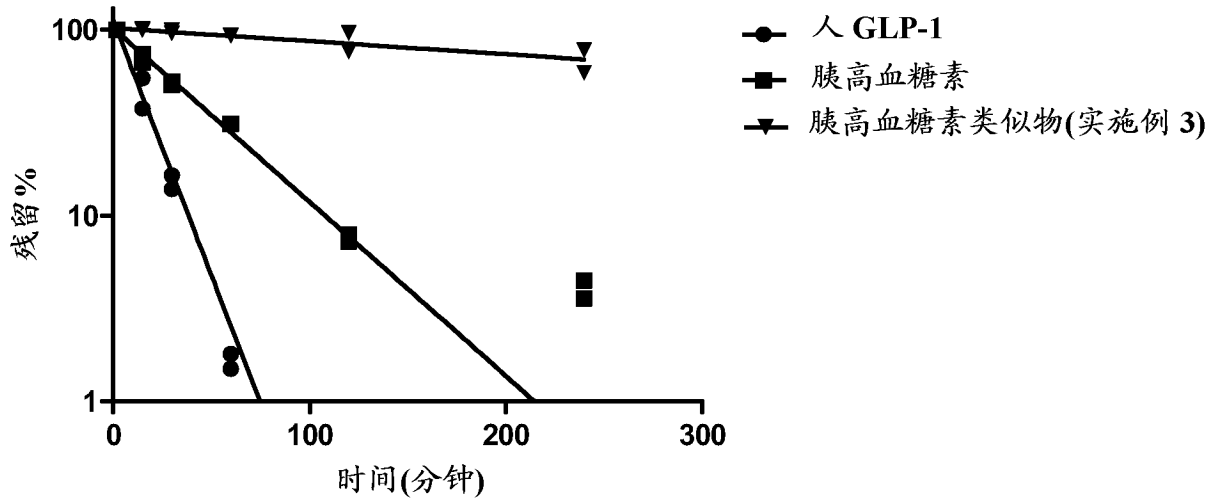


图 15

数据=平均值±SEM, n=3-7

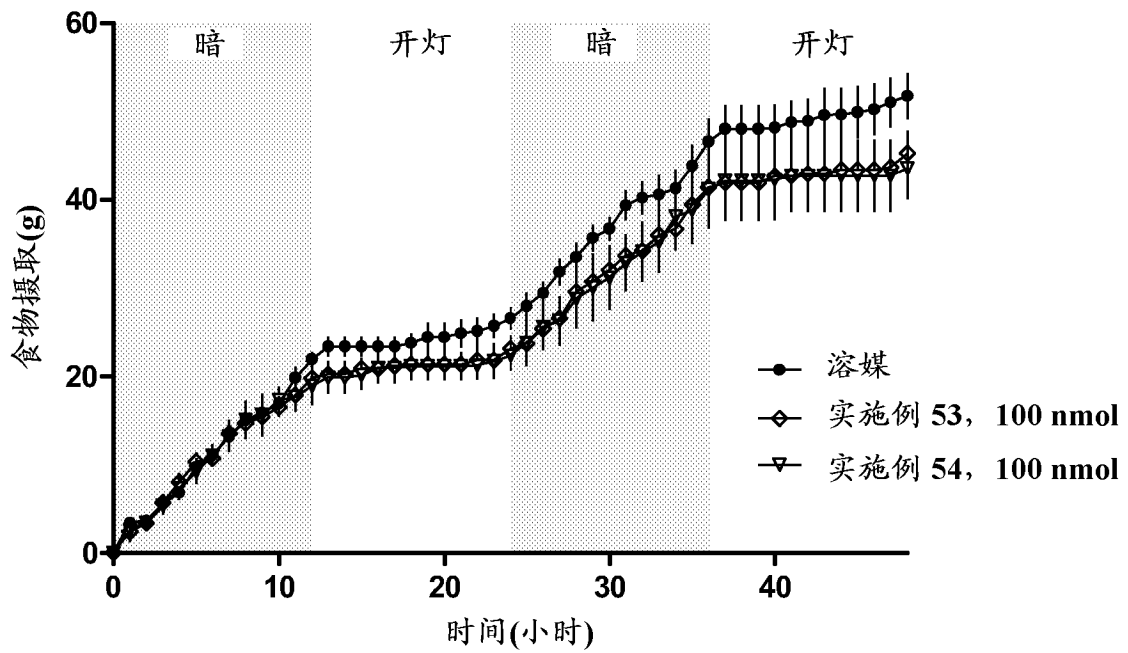


图 16

数据=平均值±SEM, n=5

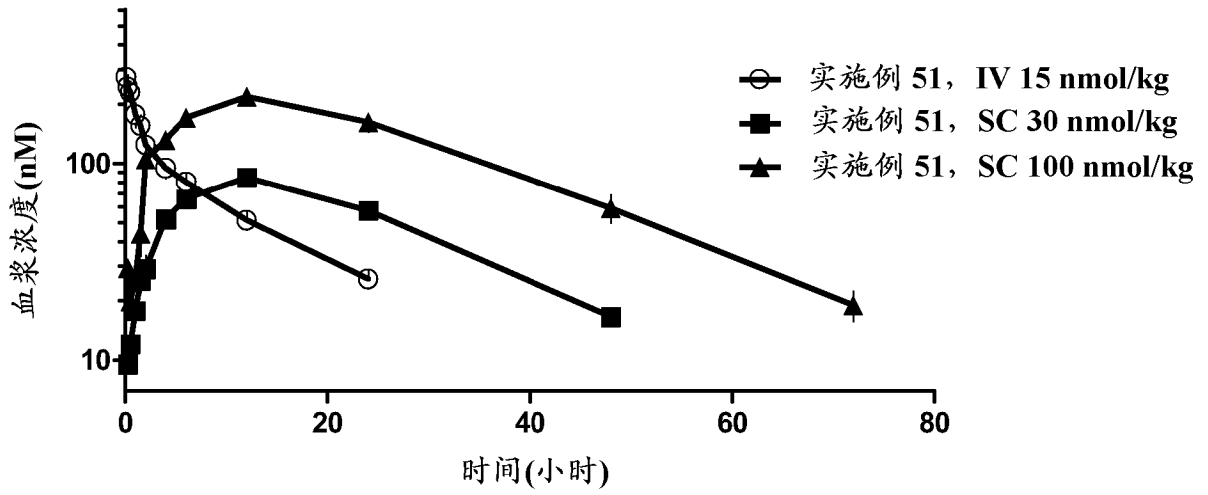


图 17

数据=平均值±SEM, n=5-7

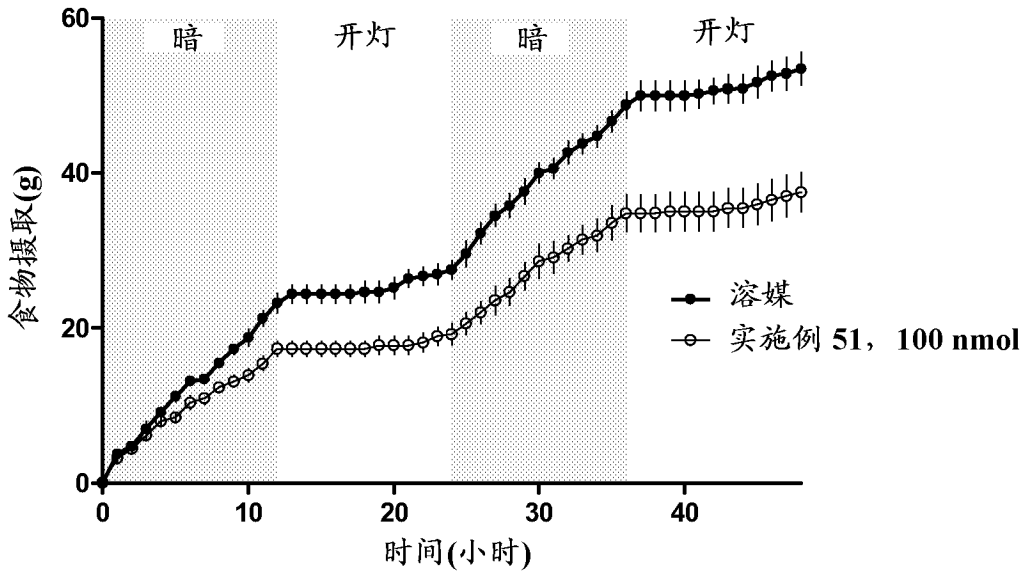


图 18

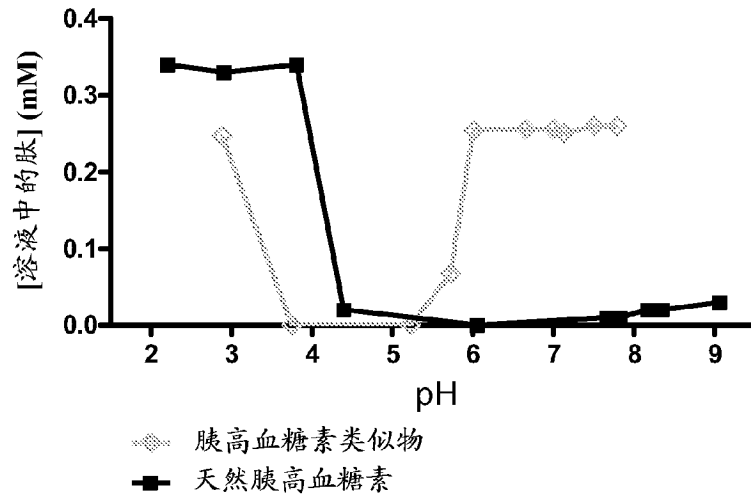


图 19